



สารเสาวภา

Queen Saovabha Memorial Institute Bulletin (QSMI Bulletin)

ISSN 1685 – 6341

ปีที่ 24 ฉบับที่ 2 / 2568

VOLUME 24, NO. 2 / 2025



สถานเสาวภา สภากาชาดไทย
Queen Saovabha Memorial Institute



สารเสาวภา

Queen Saovabha Memorial Institute Bulletin

(QSMI Bulletin)

คณะดำเนินการ	สถานเสาวภา สภากาชาดไทย	
ที่ปรึกษา	วิศิษฎ์ ลิตปรีชา	ณรงค์ศักดิ์ ชัยบุตร
บรรณาธิการ	สุนุชชา สุนทรารชุน	
รองบรรณาธิการ	อรวรรณ แซ่ไคว้	
กองบรรณาธิการ	ภูมิ จันทตรี สุดา พันธุ์รินทร์ ธรรมนุญ ดั่งโสน ณัฐดี มนต์อ่อน ชานนท์ ฝาเงิน	สุรศักดิ์ เอกโสวรรณ ทักษะ เวสารัชชพงศ์ สุจิตตรา ขุนทรัพย์ ปณิธิ ละอองบัว ศรัณยา หวังเจริญตระกูล
จัดพิมพ์และเผยแพร่โดย	สถานเสาวภา สภากาชาดไทย 1871 ถนนพระราม 4 เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทรศัพท์ 0 2252 0161-4 www.saovabha.org	
ออกแบบปกโดย	ศรัณยา หวังเจริญตระกูล	

ISSN 1685 – 6341

* เนื้อหาบทความทางวิชาการในวารสารนี้เป็นความคิดเห็นและความรับผิดชอบของผู้เขียน

บทบรรณาธิการ

สารเสาวภา ฉบับนี้เป็นฉบับที่ 2 ประจำปีที่ 24 พ.ศ. 2568 โดยเนื้อหาของสารเสาวภา ยังคงมุ่งเน้นในการเผยแพร่ผลงานทางวิชาการตามพันธกิจของสถานเสาวภา มีการเรียบเรียงบทความเป็นภาษาไทยทำให้ง่ายต่อการอ่าน เพื่อการแลกเปลี่ยนความรู้ ความชำนาญ ซึ่งจะนำไปสู่ความคิดสร้างสรรค์ที่จะเป็นประโยชน์ต่อนักวิชาการและประชาชนทั่วไป

สารเสาวภาฉบับนี้ มีเนื้อหาทั้งบทความวิชาการและการศึกษาวิจัยที่มีความหลากหลาย น่าสนใจประกอบด้วยบทความวิชาการอีก 1 เรื่องเกี่ยวข้องกับเทคโนโลยี RNA Interference (RNAi) และการศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องกับโรคพิษสุนัขบ้า ภูมิคุ้มกันและพิษงูจำนวน 4 เรื่องคือการเปรียบเทียบชนิดของเซลล์เม็ดเลือดขาวและระดับไซโตไคน์ในน้ำผลิตเซรุ่มป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าหลังฉีดกระตุ้นด้วยวัคซีนโรคพิษสุนัขบ้า การศึกษาบทบาทของยีน cGAS ต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในหนูที่ติดเชื้อพิษสุนัขบ้า การพัฒนาการตรวจหาเชื้อไวรัสระบบทางเดินหายใจในงูโดยใช้เทคนิค RPA/CRISPR-Cas12a และการศึกษาขนาดของเอ็กโซโซมในพิษงูเห่าไทยและการเปรียบเทียบบัพเพอร์ที่ใช้ในการสกัดโปรตีน

กองบรรณาธิการสารเสาวภา ขอขอบคุณผู้สนับสนุนทุกท่านที่ได้สละเวลาในการเผยแพร่ความรู้อันมีคุณค่าทางวิชาการ และหวังเป็นอย่างยิ่งว่าสารเสาวภาฉบับนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับผู้อ่านทุกท่าน พบกันใหม่ในฉบับหน้า

สุนุชชา สุนทรารชุน

บรรณาธิการ



สารเสาวภา

Queen Saovabha Memorial Institute Bulletin

ปีที่ 24 ฉบับที่ 2 / 2568

VOLUME 24 NO. 2 / 2025 ISSN 1685 – 6341

- การเปรียบเทียบชนิดของเซลล์เม็ดเลือดขาวและระดับไซโตไคน์ในม้าผลิตเซรุ่ม
ป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าหลังฉีดกระตุ้นด้วยวัคซีนโรคพิษสุนัขบ้า 1 - 10
*Comparison of white blood cell types and cytokine levels in rabies
immunoglobulin-producing horses after rabies vaccine booster injections*
สุรสิทธิ์ อุษสุวรรณ วชิราภรณ์ แสงสีลม ภัทรวัจน์ ตันติวรสิทธิ์
- การศึกษาบทบาทของยีน cGAS ต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในหนูที่ติดเชื้อพิษสุนัขบ้า 11- 17
*Functional role of cGAS in immune modulation during rabies virus
infection in mice*
ปัทมทัต อารีกุล
- เทคโนโลยี RNA Interference (RNAi) และการประยุกต์ใช้ 19- 24
RNA interference (RNAi) technology and applications
รพี ลินเนืองนง นันทพงศ์ หลงศรีภูมิ
- การพัฒนาการตรวจหาเชื้อไวรัสระบบทางเดินหายใจในงูโดยใช้เทคนิค 25 - 30
RPA/CRISPR-Cas12a
*Development of diagnostic assays for snake respiratory virus based on
the RPA/CRISPR-Cas12a technique*
อภิญญา ลงยา
- การศึกษาขนาดของเอ็กโซโซมในพิษงูเห่าไทยและการเปรียบเทียบบัฟเฟอร์ 31 - 35
ที่ใช้ในการสกัดโปรตีน
*Effective exosome isolation from Siamese cobra venom: insights into
exosome size and lysis buffer selection for protein extraction*
กมลวรรณ เขียนไชยพันธ์



การเปรียบเทียบชนิดของเซลล์เม็ดเลือดขาวและระดับไซโตไคน์ในม้าผลิตเซรุ่มป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าหลังฉีดกระตุ้นด้วยวัคซีนโรคพิษสุนัขบ้า

Comparison of white blood cell types and cytokine levels in rabies immunoglobulin-producing horses after rabies vaccine booster injections

สุรสีห์ อุษุสุวรรณ¹ วชิราภรณ์ แสงสีสม² ภัทรวัจน์ ต้นติวรสิทธิ์³

Suraseha Ouisuwan¹, Wachiraporn Saengseesom², Pattarawat Thantivorasit³

- 1 สถานีเพาะเลี้ยงม้าและสัตว์ทดลองฯ สถานเสาวภา สภากาชาดไทย
- 2 ฝ่ายวิจัยและพัฒนา สถานเสาวภา สภากาชาดไทย
- 3 คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- 1 Horse Farm & Laboratory Animal Breeding Center, Queen Saovabha Memorial Institute, Thai Red Cross Society
- 2 Department of Research and Development, Queen Saovabha Memorial Institute, Thai Red Cross Society
- 3 Faculty of Medicine, Chulalongkorn University

บทคัดย่อ: การเปรียบเทียบปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาวในระบบภูมิคุ้มกันชนิด Granulocyte, Monocyte และ Lymphoid cell รวมทั้งการหาระดับไซโตไคน์ (Cytokine) ได้แก่ IFN- α , IL-4, IFN- γ , IL-10 และ IL-17 เพื่อใช้บ่งชี้การสร้างภูมิคุ้มกันผ่านทาง Cell-mediated immunity (โดยเซลล์ Th1) หรือ Humoral immune response (โดยเซลล์ Th2) ในม้า 3 กลุ่มที่มีระดับภูมิคุ้มกันสูง กลาง และต่ำ หลังฉีดกระตุ้นด้วยวัคซีนโรคพิษสุนัขบ้า เพื่อใช้ผลิตเซรุ่มป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าชนิดอิมมูโนโกลบูลินจี ผลการศึกษาพบว่าชนิดและปริมาณของเซลล์เม็ดเลือดขาว และระดับไซโตไคน์ชนิดต่างๆ ในม้าทั้ง 3 กลุ่ม ไม้มีความแตกต่างกันที่สำคัญ จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด Monocyte ไม่สามารถใช้ในการประเมินการตอบสนองของเซลล์เดนไดรต์ (Dendritic cell) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการสร้างเรกูเลเตอร์ทีเซลล์ (Regulatory T cells) ในกระบวนการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันไม่ได้ เนื่องจากข้อมูลที่ได้มีความแปรปรวนทางสถิติในระดับสูง ซึ่งส่งผลต่อความน่าเชื่อถือของผลการวิเคราะห์

คำสำคัญ: ม้า อิมมูโนโกลบูลินจี เซลล์เดนไดรต์

ABSTRACT: Three groups of horses with high, intermediate, and low immune response levels were stimulated with the rabies vaccine to produce immunoglobulin G and prevent rabies. The comparison of white blood cells in the immune system, specifically granulocyte, monocyte, and lymphoid cells, as well as the measurement of cytokine levels (including IFN- α , IL-4, IFN- γ , IL-10, and IL-17), was done to indicate the immune response through Th1 cells or cell-mediated immunity, or Th2 cells or humoral immune response. According to the study's findings, there were no significant differences in the types and numbers of white blood cell populations or the levels of various cytokines among the three horse groups. Furthermore, due to the wide range of statistical values, the number of monocyte-type white blood cells could not be used to predict the trend of dendritic cell responses, which influence the production of regulatory T cells during the immune response process in horses.

Keywords: Horse, ERIG, Dendritic cell

บทนำ

อิมมูโนโกลบูลิน (Immunoglobulin) คือโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นแอนติบอดี (Antibody) ในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยมีอิมมูโนโกลบูลิน จี (Immunoglobulin G หรือ IgG) เป็นแอนติบอดีที่พบมากที่สุด มีความสำคัญในการป้องกันและต่อสู้กับเชื้อโรคต่างๆ และอิมมูโนโกลบูลินต่อโรครabiesสุนัขบ้า (Rabies immunoglobulin: RIG) เป็นแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสเรบีส (Rabies virus) ที่ป้องกันโรครabiesสุนัขบ้าหลังจากการสัมผัสเชื้อ (Post-exposure)

ในกระบวนการผลิตอิมมูโนโกลบูลินจี้ต่อโรครabiesสุนัขบ้าจากม้า (Equine rabies immunoglobulin G: ERIG) ของสถานเสาวภา ใช้วิธีการฉีดกระตุ้นมาด้วยวัคซีนป้องกันโรครabiesสุนัขบ้าชนิดเชื้อตาย เพื่อใหม่ให้มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่จำเพาะต่อไวรัสเรบีสในระดับสูงเพียงพอต่อการป้องกันโรค และสามารถนำไปผลิตเป็นเซรัมเพื่อป้องกันโรครabiesสุนัขบ้า (ERIG) หลังการสัมผัสเชื้อได้ แอนติบอดีหรืออิมมูโนโกลบูลินที่สร้างขึ้นในม้าเป็นการตอบสนองของภูมิคุ้มกันประเภท Humoral หรือ Adaptive immune response โดยระดับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันมาจากหลายปัจจัย ได้แก่ ปริมาณของเชื้อไวรัสเรบีส วิธีการฉีดเชื้อไวรัสเรบีสเข้าร่างกายม้า (Injection route) เช่น ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง ฉีดเข้ากล้ามเนื้อหรือฉีดเข้าหลอดเลือดดำ การทำหน้าที่ของเซลล์เก็บกินสิ่งแปลกปลอม (Antigen presenting cell: APC) โดยเฉพาะเซลล์เดนไดรต์ (Dendritic cell: DC) รวมถึงตัวรับบนพื้นผิวเซลล์ที่สำคัญคือ Major Histocompatibility Complex (MHC molecule) การสร้างสารสื่อการอักเสบหรือไซโตไคน์ (Cytokine) มีส่วนกำหนดทิศทางการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันให้เกิดขึ้นอย่างมาก นอกจากนี้สุขภาพของม้าที่ถูกฉีดกระตุ้นยังเป็นอีกปัจจัยที่มีส่วนสำคัญต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันด้วยเช่นกัน (Moore and Hanlon, 2010) การฉีดวัคซีนป้องกันโรครabiesสุนัขบ้าซึ่งเป็นไวรัสเรบีสชนิดเชื้อตาย จะไปกระตุ้นการตอบสนองภูมิคุ้มกันของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด $CD4^+$ T lymphocyte โดยเฉพาะ T helper type 2 (Th2) ร่วมกับการสร้างไซโตไคน์ ที่สำคัญได้แก่ IL-4, IL-5 และ IL-10 ส่งผลต่อการสร้างแอนติบอดีและอิมมูโนโกลบูลินขึ้นมาต่อต้านสิ่งแปลกปลอม

ชนิด Extracellular antigen แต่ในกรณีที่ว่ากระตุ้นเป็นชนิด Intracellular antigen จะไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้เกิดการตอบสนองชนิด Cellular immune response โดยการตอบสนองของ T helper type 1 (Th1) และมีการสร้าง IFN- γ ใหม่ทำงานร่วมกัน (Venkataswamy et al., 2015)

ในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน DC ทำหน้าที่เป็น APC ที่สำคัญในการเข้าทำปฏิกิริยาต่อสิ่งแปลกปลอม ซึ่ง DC กำเนิดมาจาก Hematopoietic stem cell ซึ่งเปลี่ยนแปลงได้จากทั้ง Lymphoid และ Myeloid cell แต่ส่วนใหญ่แล้วกำเนิดมาจาก Myeloid cell มีการจำแนกลักษณะของ DC ออกเป็น 4 กลุ่ม ตามหน้าที่และตัวรับบนพื้นผิวเซลล์ได้แก่ Classical DCs, Plasmacytoid DC, Langerhans cell และ Monocyte-derived DC ซึ่งชนิดหลังอยู่ในรูป Monocyte ไหลเวียนอยู่ในกระแสเลือด เมื่อมีการอักเสบหรือมีสิ่งแปลกปลอมเข้ามาจะเปลี่ยนเป็น Macrophage แล้วเข้าสู่เนื้อเยื่อต่างๆ การทำหน้าที่ของ DC ขึ้นอยู่กับความเจริญสมบูรณ์ (Maturity) ของเซลล์เองด้วย โดยมีการนำเสนอถึงบทบาทของ DC ในการก่อให้เกิดภาวะไม่ตอบสนอง (Tolerance) ที่ขึ้นอยู่กับการเจริญสมบูรณ์ของเซลล์ พบว่าในภาวะที่ยังเติบโตไม่เต็มที่ (Immature) แม้จะมีคุณสมบัติสามารถเก็บกินและย่อยสิ่งแปลกปลอมได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่การนำเสนอสิ่งแปลกปลอมยังทำได้ไม่สมบูรณ์ เนื่องจากการแสดงตัวรับ (Receptor expression) บนผิวเซลล์มีน้อย รวมทั้งการสร้างไซโตไคน์ที่มีคุณสมบัติกดภูมิคุ้มกัน (Immunosuppressive) หรือ Anti-inflammatory agent ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นในสิ่งแวดล้อมขณะทำหน้าที่นั้นสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะไม่ตอบสนองตามมา

การทำปฏิกิริยาระหว่าง DC กับ Lymphocyte ชนิด T cell มีส่วนสำคัญที่ก่อให้เกิดภาวะไม่ตอบสนองของภูมิคุ้มกัน โดยมี Lymphocyte ชนิด T cell ชนิดหนึ่งเรียกว่า Lymphocyte กลุ่มควบคุม หรือ Regulatory T cell: Treg ซึ่งมีหน้าที่ในการรักษาสมดุลของระบบภูมิคุ้มกันภายในร่างกาย สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ $CD4^+$ Treg cell และ $CD8^+$ Treg cell ซึ่งจำนวนของ Treg cell ทั้ง 2 กลุ่มสามารถบอกภาวะความเสี่ยงต่อการเป็นโรคที่เกี่ยวข้อง

กับระบบภูมิคุ้มกันและโรคมะเร็งได้ โดยเมื่อมี Treg cell มากเกินไป หรือทำหน้าที่มากเกินไป จะไปยับยั้ง Effector T cell ในการทำลายสิ่งแปลกปลอม ทำให้มีความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งได้ แต่ถ้า Treg cell ทำหน้าที่น้อยเกินไปจะทำให้เกิดภาวะภูมิไวเกิน โดยชนิดหรือสถานะของ DC มีผลเหนี่ยวนำหรือกระตุ้นหรือยับยั้งการสร้างแอนติบอดีได้เช่นกัน เป็นผลจากการเกาะจับหรือเข้าทำปฏิกิริยาระหว่างชนิดของ DC กับชนิดของ T cell ที่ถูกกระตุ้นหรือสร้างขึ้นมาด้วย (Hasegawa and Matsumoto, 2018) การจำแนกชนิดของ DC ต้องใช้เทคนิคการพิสูจน์โมเลกุลบนพื้นผิวเซลล์ซึ่งมีค่าใช้จ่ายสูง และยังไม่มีความชัดเจนสำหรับใช้ในม้า ดังนั้น การตรวจวัดปริมาณเซลล์ Monocyte ที่มีการเปลี่ยนแปลง (Differentiation) ไปเป็นเซลล์ DC จึงอาจ เป็นอีกหนึ่งวิธีการที่สามารถใช้เป็นตัวชี้วัดทางอ้อมในการประเมินประสิทธิภาพ การทำหน้าที่ของ DC และบทบาทสำคัญของเซลล์เหล่านี้ในการกระตุ้นและควบคุมการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย

การตรวจส่วนประกอบของเลือด เป็นส่วนหนึ่งของการตรวจสุขภาพเพื่อบ่งบอกถึงภาวะต่างๆ ทั้งที่ปกติและผิดปกติของม้า โดยการตรวจนับเม็ดเลือด (Hemogram) เช่น เม็ดเลือดแดง ฮีโมโกลบิน โปรตีน อย่างไรก็ตาม ต้องนำข้อจำกัดมาใช้ในการแปลผลค่าที่ได้ด้วย เนื่องจากม้ามีเม็ดเลือดสำรองเก็บไว้ในม้ามเยอะมากและได้รับผลกระทบจากปัจจัยต่างๆ ด้วย เช่น ความตื่นเต้นจากการเจาะเลือด (Satie et al., 2012) ส่วนการประเมินผลค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ได้จากการตรวจนับเม็ดเลือดขาว (Leukogram) เช่น การนับเม็ดเลือดขาวรวมและแยกแต่ละชนิด สามารถบ่งบอกถึงสถานะทางภูมิคุ้มกันของม้าแต่ละตัวได้ (Satie et al., 2014) เช่น กรณีมี Neutrophils สูง อาจบ่งบอกภาวะการติดเชื้อในช่วงแรก กรณีมี Lymphocyte สูง เกี่ยวข้องกับการสร้างภูมิคุ้มกันเพื่อทำลายเชื้อโรคหรือได้รับการฉีดวัคซีน การที่ Monocyte สูงเกี่ยวข้องกับการสร้าง APC เช่น DC หรือ Macrophage และการมี Basophil สูง อาจเกี่ยวข้องกับการบวมการอักเสบหรือแพ้ต่างๆ เป็นต้น

วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้ เพื่อตรวจหาชนิดและปริมาณของเซลล์เม็ดเลือดขาวและระดับไซโตไคน์

ในระบบภูมิคุ้มกันทั้งทางตรงและทางอ้อม เพื่อประเมินการตอบสนองของระดับภูมิคุ้มกันของม้าในการสร้างแอนติบอดีหลังได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าชนิดเชื้อตาย

ขั้นตอนและวิธีการ

1. การเจาะเก็บเลือดม้า

ม้าที่ใช้ในการศึกษาเป็นม้าสุขภาพดีที่ใช้ในการผลิตเซรุ่มป้องกันโรคพิษสุนัขบ้า (ERIG) จำนวน 15 ตัว จากสถานเพาะเลี้ยงม้าและสัตว์ทดลองฯ สถานเสาวภา สภากาชาดไทย อายุระหว่าง 5-6 ปี คณะแพศ กินอาหารแบบขุ่นและหยากจำนวน 2 มื้อต่อวัน โดยม้าสามารถเข้าถึงแหล่งน้ำและหญ้าได้ตลอดเวลา วิธีดำเนินการทดลองได้รับการรับรองการใช้สัตว์ทดลองเพื่องานทางวิทยาศาสตร์จากคณะกรรมการเพื่อการใช้สัตว์ทดลองทางวิทยาศาสตร์ สถานเสาวภา เลขที่ QSMI-ACUC-005-2015 ฉีดกระตุ้นม้าด้วยวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าชนิดเชื้อตาย (Rabisin®; 40 IU/ml) ขนาด 160 IU ผสมกับ Imject® Alum ในอัตราส่วน 2:1 โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง บริเวณแก้มคอ จำนวน 4 จุด จุดละ 1.5 มิลลิลิตร

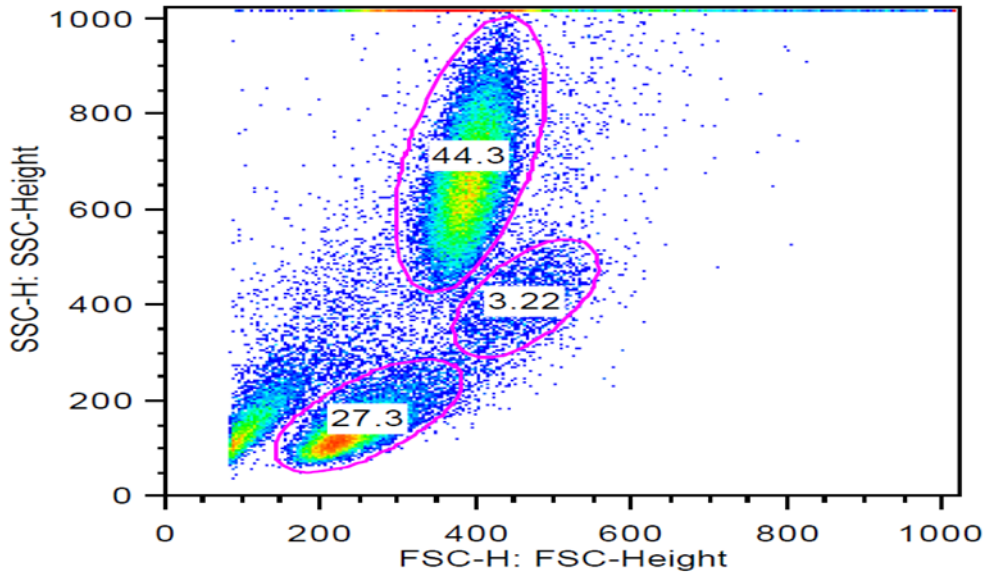
การเจาะเก็บเลือดม้า เก็บก่อนการเริ่มฉีดวัคซีน (Day 0) และหลังฉีดวัคซีนที่ Day 3, 7, 11 และ 14 วัน ตำแหน่งหลอดเลือดดำบริเวณคอ ปริมาตร 150 มิลลิลิตรต่อตัว โดยแบ่งเลือดออกเป็น 2 หลอด หลอดที่ 1 (50 มิลลิลิตร) เติมน้ำยาป้องกันการแข็งตัวของเลือด EDTA-coated tubes ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อส่งตรวจ Whole blood leukocyte และ Hemogram หลอดที่ 2 (100 มิลลิลิตร) เติม Heparinized (Sodium heparin) 10 IU/ml เพื่อใช้แยกเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียร์ (Peripheral Blood Mononuclear cells: PBMCs)

2. การตรวจเลือดทางห้องปฏิบัติการ

2.1 การตรวจความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด (Complete Blood Count, CBC) ที่ห้องปฏิบัติการทางสัตวแพทย์ของเอกชน

2.2 การเตรียมตัวอย่างเลือดเพื่อการตรวจวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของ Blood leukocyte population นำเลือด

น้ำปริมาณ 0.3 มิลลิลิตร เติมน้ำยา Lysing solution ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากนั้นทำการฟิกส์เซลล์โดยเติม 2% Paraformaldehyde 0.3 มิลลิลิตร นำไปตรวจวิเคราะห์หาชนิดและจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาว ได้แก่ Lymphoid cells, Monocytes และ Granulocytes ด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ (รูปที่ 1) (ส่งตรวจวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)



รูปที่ 1 แผนภาพจุด (Dot plot) แสดงลักษณะการกระจายแสง (Light scatter) ของกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาว 3 ชนิด Granulocytes (44.3%), Monocytes (3.22%) และ Lymphoid cells (27.3%) ด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์

2.3 การแยกเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียร์ (Peripheral Blood Mononuclear cells: PBMC) โดยใช้น้ำยา Ficoll-Hypaque และตรวจวัดปริมาณของไซโตไคน์ 5 ชนิด ได้แก่ IL-4, IL-10, IL-17, INF- γ และ INF- α เลือดม้าที่เติม Heparin เพื่อป้องกันเลือดแข็งตัว เมื่อตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเม็ดเลือดแดงตกตะกอน ดูดส่วนใสของพลาสมา 20 มิลลิลิตร เติมน้ำบน Ficoll-Hypaque 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นที่อุณหภูมิ ห้อง ความเร็ว รอบ 3500 rpm เป็นเวลา 20 นาที ดูดเก็บส่วน Buffy coat ซึ่งเป็นชั้นของเซลล์ PBMCs ปั่นล้าง 2 ครั้ง ด้วย Phosphate buffered saline (PBS) ปรับปริมาณเซลล์ให้ได้ความเข้มข้น 2×10^6 เซลล์/มิลลิลิตร ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ Complete media (RPMI 1640/ 10% Fetal bovine serum) นำไปเลี้ยงในเพลท (Plate) แบบ 6 หลุม โดย PBMCs ของ ม้าแต่ละตัวอย่าง แบ่งเลี้ยงเป็น 2 หลุม หลุมแรกใส่เซลล์ PBMCs เพียงอย่างเดียว หลุมที่สองใส่ เซลล์ PBMCs ที่เติมสาร Cell stimulation cocktail

ปริมาณ 2 ไมโครลิตร นำเพลทไปบ่มในตู้บ่มที่มี CO₂ 5% อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์หลุมละ 1 มิลลิลิตร ไวที่ -80 °C ส่งตรวจวิเคราะห์หาปริมาณของไซโตไคน์ด้วยวิธี Bead-based multiplex equine specific monoclonal antibodies on a Luminex Instrument ที่ห้องปฏิบัติการ Animal Health Diagnostic Center มหาวิทยาลัยคอร์เนล ประเทศสหรัฐอเมริกา

3. การตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันต่อโรคพิษสุนัขบ้าด้วยวิธี Rapid Immunofluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT)

ทำการเจือจางพลาสมาม้า และนำมาผสมกับไวรัสโรคพิษสุนัขบ้า (CVS-11) บ่มที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมเซลล์ชนิด BHK-21 และบ่มต่อในตู้บ่มที่มี CO₂ 5% อุณหภูมิ 37°C นาน 21 ชั่วโมง เพื่อให้มีการติดเชื่อในเซลล์ ทำการฟิกส์เซลล์ด้วย

90% Acetone และย้อมด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสเรบีสและติดด้วยสารฟลูออเรสซิน (FITC) ตรวจสอบปริมาณไวรัสที่เติบโตในเซลล์ ภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนซ์ คำนวณค่าที่อ่านได้ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ ระดับภูมิคุ้มกันต่อโรคพิษสุนัขบ้ามีหน่วยเป็น IU/มิลลิลิตร

4. การตรวจหาค่าโปรตีนรวมในพลาสมา

ตรวจหาค่าโปรตีนรวมในพลาสมาด้วยน้ำยา Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ยี่ห้อ Thermo Scientific, USA) โดยเทียบกับสารละลายมาตรฐาน (Bovine serum albumin; BSA) วัดความเข้มของสีด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ค่าการดูดกลืนแสง (OD) 562 nm นำค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานมาสร้างเป็นกราฟ คำนวณค่าโปรตีนของพลาสมาโดยใช้โปรแกรม Excel

5. การวิเคราะห์ทางด้านสถิติ

ใช้โปรแกรม Student pair t test two sample for means ภายในกลุ่มทดลอง และใช้ ANOVA test ระหว่างกลุ่มทดลอง ($p < 0.05$)

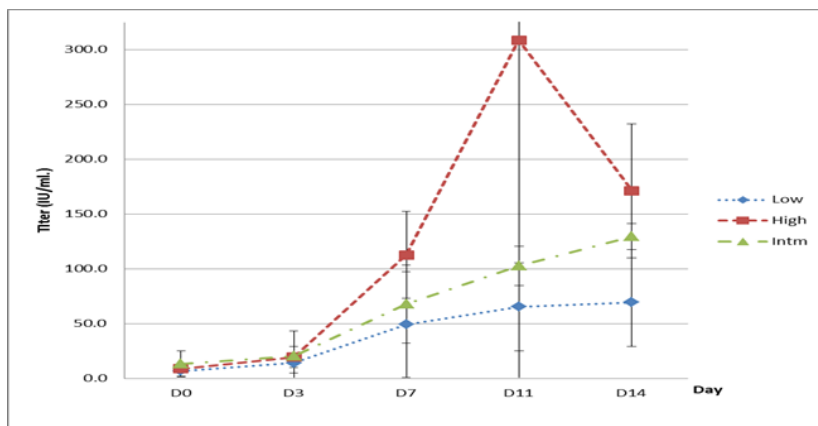
ผลการทดลอง

ระดับภูมิคุ้มกันต่อโรคพิษสุนัขบ้า

หลังฉีดกระตุ้นมาด้วยวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้า พบว่ามี การตอบสนองในการสร้างภูมิคุ้มกันที่แตกต่างกัน สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม (ตารางที่ 1) คือ กลุ่มที่มีระดับภูมิคุ้มกันสูง (High) กลุ่มที่มีระดับภูมิคุ้มกันปานกลาง (Intermediate; Intm) และกลุ่มที่มีระดับภูมิคุ้มกันต่ำ (Low) กลุ่มที่มีระดับภูมิคุ้มกันสูงแสดงค่าสูงสุด (308.9 ± 319.8) ในวันที่ 11 หลังการฉีดวัคซีน แต่ระดับภูมิคุ้มกันจะลดลงในวันที่ 14 (รูปที่ 2) อย่างไรก็ตาม เนื่องจากมาแต่ละตัวมีการตอบสนองที่แตกต่างกัน ทำให้ข้อมูลมีความแปรปรวนสูง ส่งผลให้ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่ม

ตารางที่ 1 แสดงค่าระดับภูมิคุ้มกันก่อนและหลังฉีดวัคซีนในวันที่ 3, 7, 11 และ 14 ตรวจสอบด้วยวิธี RFFIT ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่า mean±SD หน่วย IU/มิลลิลิตร

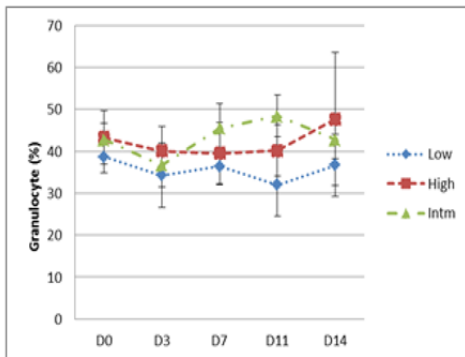
กลุ่ม	Day				
	0	3	7	11	14
Low (IU)	6.7±4.8	14.0±8.9	49.1±48.2	65.3±44.2	69.6±40.4
High (IU)	8.8±3.2	19.5±9.5	112.7±39.6	308.9±319.8	171.3±61.1
Intermediate (IU)	13.2±11.9	20.3±22.9	67.8±35.5	102.8±17.8	129.5±12.0



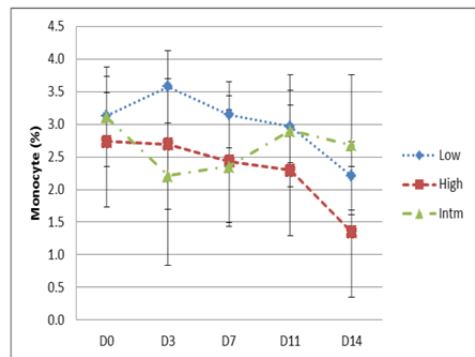
รูปที่ 2 กราฟแสดงค่าระดับภูมิคุ้มกันต่อโรคพิษสุนัขบ้า ในมา 3 กลุ่ม

ผลการวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของเซลล์เม็ดเลือดขาว Granulocyte, Monocyte และ Lymphoid cell ในเลือดม้า 3 กลุ่ม ก่อนและหลังฉีดกระตุ้นด้วยวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้า (รูปที่ 3) พบว่า ค่าเฉลี่ยของเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งสามชนิดในม้าทั้งสามกลุ่มไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ กลุ่มม้าที่มีระดับภูมิคุ้มกันสูง พบค่า Monocyte มีแนวโน้มลดลง หลังการฉีดกระตุ้น (รูป3B) และที่ Day3 หลังฉีดกระตุ้นจำนวน Lymphoid cell มีค่าลดลงอย่างชัดเจน และกลับสู่ระดับใกล้เคียงกับกลุ่มอื่นได้ในช่วงต่อมา (รูป3C) ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงชั่วคราวของเซลล์เม็ดเลือดขาวบางชนิดหลังการฉีดกระตุ้น แม้ว่าในภาพรวมจะไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่ม

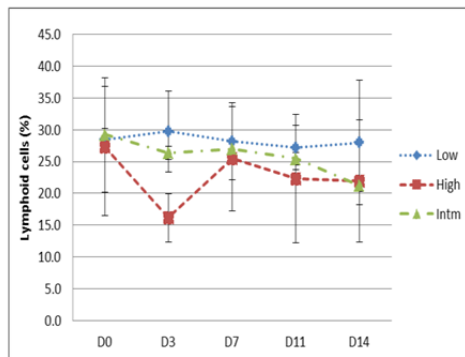
A.



B.



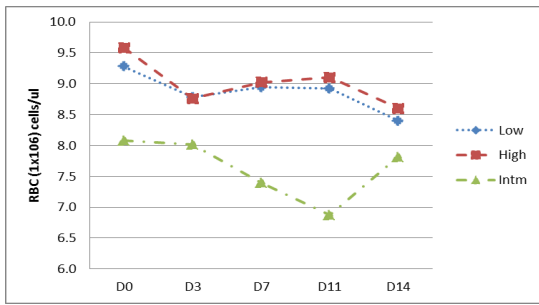
C.



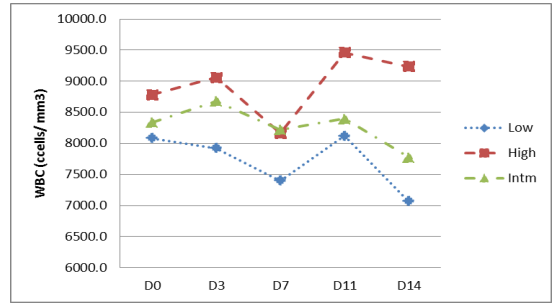
รูปที่ 3 ร้อยละของ Granulocyte (A) , Monocyte (B) และ Lymphoid cell (C) ในม้า 3 กลุ่ม ด้วยวิธี Flow cytometry

ผลการตรวจความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด (Complete Blood Count, CBC)

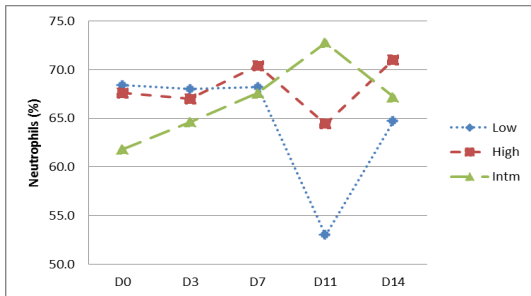
การตรวจความสมบูรณ์ของเม็ดเลือดเป็นการวิเคราะห์ปริมาณและลักษณะของเม็ดเลือด ได้แก่ เม็ดเลือดแดง (Red blood cell, RBC) เม็ดเลือดขาว (White blood cell, WBC) และ เกล็ดเลือด (Platelet) การตรวจ CBC นี้มีประโยชน์ในการวินิจฉัยโรคหรือสภาวะผิดปกติต่างๆ ในม้าได้ ผลการศึกษาแสดงในรูปที่ 4 ซึ่งประกอบด้วยกราฟแสดงค่า Hemogram 6 ชุด ได้แก่กราฟ A, B, C, D, E และ F ซึ่งกราฟเหล่านี้แสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของเลือดม้าแต่ละกลุ่มหลังจากได้รับการกระตุ้นด้วยวัคซีน ซึ่งเป็นข้อมูลสำคัญในการประเมินการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของม้าต่อวัคซีนโรคพิษสุนัขบ้า



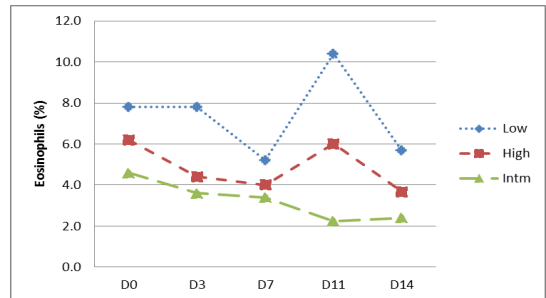
A ปริมาณ RBC



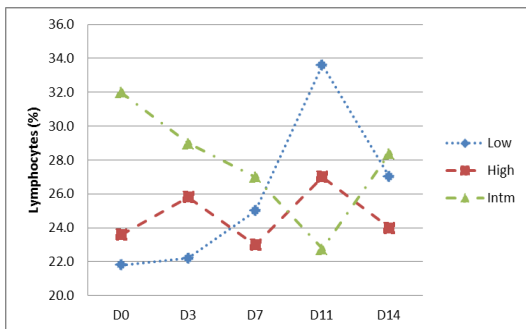
B ปริมาณ WBC



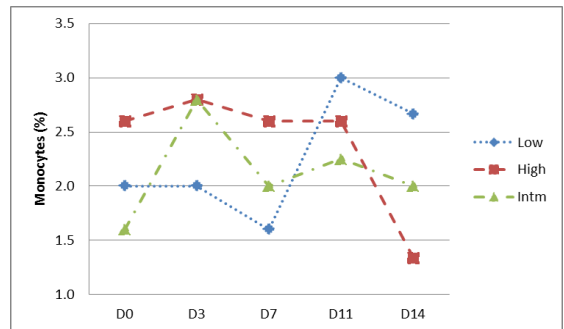
C ปริมาณ Neutrophil



D ปริมาณ Eosinophil



E ปริมาณ Lymphocyte



F ปริมาณ Monocyte

รูปที่ 4 กราฟแสดงค่า Hemogram ของปริมาณ RBC, WBC, Neutrophil, Eosinophil, Lymphocyte และ Monocyte ก่อนและหลังฉีดวัคซีนในม้า 3 กลุ่ม

ค่า Hemogram ในม้าทั้งสามกลุ่ม มีปริมาณ WBC, Neutrophil, Eosinophil, Lymphocyte และ Monocyte (รูปที่ 4) อยู่ในช่วงปกติ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่ปริมาณ WBC ในม้ากลุ่มที่มีระดับภูมิคุ้มกันสูงมีค่าสูงที่สุด สอดคล้องกับม้ากลุ่มที่มีระดับภูมิคุ้มกันต่ำมีปริมาณ WBC ต่ำที่สุด และม้ากลุ่มที่มีระดับภูมิคุ้มกันปานกลางมีค่าระหว่างกลาง แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนปริมาณ

RBC พบว่ามีแนวโน้มลดลงทั้งสามกลุ่ม สอดคล้องกับค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นที่มีทิศทางไปในแนวเดียวกัน แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างและภายในกลุ่มเช่นเดียวกัน

ตารางที่ 2 แสดงค่าความเข้มข้นของไซโตไคน์ชนิดต่างๆ จากน้ำเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว (PBMCs) ที่ Day 0, 3, 7 และ 14 หลังฉีดวัคซีน

Cytokine	Group	Day			
		0	3	7	14
IFN- α (pg/ml) mean \pm SD	Low	26.2 \pm 12.9	13.2 \pm 12.8	17.2 \pm 19.4	14.0 \pm 17.0
	High	11.0 \pm 16.2	0.6 \pm 1.3	22.6 \pm 15.1	15.6 \pm 20.1
	Intm	6.6 \pm 10.5	5.6 \pm 7.5	24.2 \pm 29.0	12.8 \pm 24.9
IL-4 (ng/ml)	Low	132.8 \pm 137.5	68.4 \pm 23.9	101.4 \pm 42.6	105.1 \pm 90.1
	High	80.3 \pm 79.2	53.4 \pm 18.0	120.6 \pm 62.2	71.8 \pm 79.5
	Intm	55.8 \pm 31.8	100.0 \pm 29.7	143.3 \pm 27.2	67.7 \pm 56.7
IFN- γ (ng/ml) mean \pm SD	Low	2.0 \pm 0.5	1.3 \pm 0.8	2.0 \pm 0.5	1.3 \pm 1.2
	High	1.1 \pm 1.1	0.8 \pm 0.5	2.2 \pm 0.3	1.1 \pm 1.1
	Intm	1.1 \pm 0.7	1.1 \pm 0.5	2.0 \pm 0.7	1.1 \pm 1.0
IL-10 (ng/ml)	Low	65.1 \pm 37.3	37.1 \pm 17.2	62.5 \pm 23.8	72.2 \pm 68.1
	High	44.4 \pm 53.7	22.9 \pm 9.2	80.8 \pm 59.1	38.3 \pm 40.3
	Intm	25.8 \pm 19.2	38.3 \pm 23.0	57.2 \pm 36.6	22.4 \pm 27.5
IL-17 (U \times 10 ² /ml)	Low	116.3 \pm 49.3	64.6 \pm 52.6	90.3 \pm 66.6	68.1 \pm 77.0
	High	50.8 \pm 64.9	12.4 \pm 11.2	110.4 \pm 66.7	66.5 \pm 73.8
	Intm	41.3 \pm 53.0	39.3 \pm 27.7	74.4 \pm 73.2	47.7 \pm 70.8

ค่าเฉลี่ยไซโตไคน์ (ตารางที่ 2) พบว่าหลังกระตุ้นมีค่าเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่หลังตามธรรมชาติในน้ำเลี้ยงเซลล์ (ไม่ได้แสดงค่า) โดยพบว่าค่า IL-4, IFN- γ , IL-10 และ IL-17 มีความแปรผันสูงอย่างมาก และเมื่อเปรียบเทียบค่าในน้ำทั้งสามกลุ่มไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งก่อนและหลังฉีดกระตุ้นน้ำภายในกลุ่มเดียวกันและระหว่างกลุ่ม

วิจารณ์ผลการทดลอง

ม้าทุกตัวที่นำมาใช้ในการศึกษามีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรง จากการตรวจสอบทั้งค่า Hemogram พบองค์ประกอบของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันอยู่ในช่วงปกติ แต่เมื่อตรวจหาค่า RBC และ Hematocrit พบว่าม้าในกลุ่มที่ระดับภูมิคุ้มกันสูงและกลุ่มที่มีระดับภูมิคุ้มกันต่ำมีค่า RBC และ Hematocrit สูงกว่ากลุ่มภูมิคุ้มกันระดับปานกลางอย่างชัดเจน มีรายงานเกี่ยวกับภาวะการตื่นตัวของม้าส่งผลกระทบต่อการทำงานของระบบ Sympathetic โดย

ทำให้ม้ามมีการบีบตัวและปล่อยเม็ดเลือดแดงที่เก็บสำรองไว้จำนวนมากออกสู่ระบบไหลเวียนเลือด ทำให้ค่าเม็ดเลือดแดงสูงขึ้นกว่าปกติ (Satue et al., 2012) อย่างไรก็ตาม ภาวะดังกล่าวไม่ส่งผลต่อเม็ดเลือดขาว (Satue et al., 2014) การเจาะเก็บเลือดมาที่นำมาใช้ศึกษาได้ทำการเจาะในช่วงเช้ามีเม็ดภายหลังที่มีการตอนมาให้เข้าของบังคับ ด้วยความจำกัดของเวลาทำให้ม้ามมีเวลาพักไม่นานพอ (อย่างน้อย 45 นาที) ที่จะทำให้ม้ามคลายความเครียดและคืนต้นจากการถูกไล่ตอน สังเกตได้จากพฤติกรรมของม้ามที่มีอาการตระหนกและระแวง ซึ่งอาจส่งผลต่อค่าเม็ดเลือดแดงที่ศึกษา ดังนั้นในการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับปริมาณเม็ดเลือดแดงควรจะต้องคำนึงถึงประเด็นดังกล่าวไว้รอบคอบขึ้น

การศึกษาคุณสมบัติของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียร์ 3 กลุ่ม ได้แก่ Lymphocyte, Monocyte และ Granulocyte เพื่อการตอบสนองทางระดับภูมิคุ้มกันในม้าม มีรายงานเกี่ยวกับปัจจัยที่ส่งผลต่อปริมาณ และการสร้างไซโตไคน์ของเซลล์เม็ดเลือดขาว ได้แก่ ช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่างในแต่ละวันที่แตกต่างกัน มีผลต่อการตรวจพบจำนวนเซลล์แตกต่างกัน เช่น จำนวน Lymphocyte พบสูงสุดในช่วงเวลา 15.00 น. Monocyte พบต่ำสุดในช่วงเวลา 09.00 น. อย่างไรก็ตามช่วงเวลาไม่มีผลต่อจำนวนของ Granulocyte (Satue et al., 2014) อายุของม้ามเป็นอีกปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาว โดยม้ามอายุมากจะมีค่า Lymphocyte และ Granulocyte สูง ซึ่งส่งผลให้มีการสร้างไซโตไคน์ เช่น IL-4, IL-10 ที่สูงขึ้นด้วย (Schnabel et al., 2015) ในการศึกษาที่ใช้ม้ามอายุ 5-6 ปี (อายุใกล้เคียงกันและอายุน้อย) จึงไม่มีผลกระทบจากการศึกษาไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของจำนวน Lymphocyte, Monocyte และ Granulocyte หลังฉีดกระตุ้นในม้ามทั้งสามกลุ่ม แม้ว่าม้ามทุกกลุ่มจะมีการสร้างแอนติบอดีในระดับที่แตกต่างกัน

ในการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถใช้ปริมาณ Monocyte เพื่อประเมินการตอบสนองของเซลล์จำพวก Monocyte-derived dendritic cell ว่ามีการเคลื่อนย้ายออกจากกระแสเลือด หรือมีความสอดคล้องกับระดับการตอบสนองของม้ามหรือไม่ เนื่องจากการตรวจหา DC ชนิดจำเพาะ จำเป็นต้องใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อตัวรับบนผิวเซลล์ของ DC เพื่อขึ้นับจำนวนและชนิดของ DC ที่มีการตอบสนองหลังได้รับการกระตุ้น (Yamazaki and Steinman, 2009) และด้วยปัจจัยด้านงบประมาณที่ไม่มากพอและความก้าวหน้าในการตรวจวินิจฉัยในม้ามยังไม่พัฒนาเทียบเท่าในคน ทำให้การศึกษาในครั้งนี้ไม่สามารถบรรลุวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ในประเมินความสัมพันธ์ระหว่างระดับ Monocyte ในกระแสเลือดกับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในม้าม

ไซโตไคน์เป็นตัวกำหนดทั้งรูปแบบและความแรงของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ที่ถูกสร้างโดยเซลล์ที่เกี่ยวข้องเริ่มตั้งแต่ Antigen presenting cell เช่น DC และ Helper T cell โดยในสิ่งแวดล้อมที่เกิดปฏิกิริยาระหว่างสิ่งแปลกปลอมกับเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันจะต้องเกิดขึ้นอย่างสมดุล เพื่อกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีขึ้นมาได้ ในการกำจัดสิ่งแปลกปลอม ชนิดของไซโตไคน์ที่ถูกสร้างขึ้นสอดคล้องกับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน และชนิดของสิ่งแปลกปลอม ได้แก่ T helper type 2 (Th2) สร้างไซโตไคน์ ที่สำคัญได้แก่ IL-4, IL-5 และ IL-10 ส่งผลต่อการสร้างแอนติบอดีและอิมโมโนโกลบูลิน ขึ้นมาต่อต้านสิ่งแปลกปลอมชนิด Extracellular antigen ในกรณีที่เป็น Intracellular antigen จะไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้เกิดการตอบสนองชนิด Cellular immune response โดยการตอบสนองของ T helper type 1 (Th1) และมีการสร้าง IFN- γ (Wagner et al., 2010) การฉีดม้ามด้วยวัคซีนป้องกันพิษสุนัขบ้าชนิดเชื้อตายถือเป็นการให้สิ่งแปลกปลอมชนิด Extracellular antigen ซึ่งไวรัสเชื้อตายจะไปกระตุ้นการตอบสนองผ่านทาง

Th2 เพื่อเกิด Humoral immune response การตรวจระดับไซโตไคน์ในการศึกษานี้ แม้จะมีความแปรผันของข้อมูล แต่สอดคล้องกับการศึกษาอื่นๆ ที่พบความแปรผันสูงเช่นเดียวกัน แสดงให้เห็นว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้รับการกระตุ้นจากสิ่งแปลกปลอม มีการสร้างไซโตไคน์ออกมาอย่างมาก ซึ่งบ่งชี้ถึงภาวะการทำงานที่เป็นปกติของเซลล์ดังกล่าว อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ไม่ได้นำเซลล์หลังฉีดกระตุ้นในช่วงแรกๆ มาทำการศึกษา แต่เป็นการเจาะเลือดหลังฉีดกระตุ้นที่ 3, 7, 14 วัน ดังนั้นเซลล์ในวันที่ 7 หรือ 14 อาจไม่ได้บ่งชี้ผลกระทบที่เกิดขึ้นเนื่องจากการฉีดกระตุ้น การศึกษานี้พบว่าม้าในกลุ่มที่มีระดับภูมิคุ้มกันต่ำมีการตอบสนองต่อการฉีดวัคซีนแต่การตอบสนองอยู่ในระดับต่ำกว่ากลุ่มอื่น อย่างไรก็ตาม การตอบสนองนี้ยังสูงกว่าก่อนการฉีดวัคซีน (Day 0) ทำให้ไม่สามารบ่งชี้ว่าม้าในกลุ่มนี้มีภาวะ Tolerant ต่อวัคซีน เมื่อพิจารณาระดับภูมิคุ้มกัน พบว่า ระดับภูมิคุ้มกันในม้าทุกกลุ่มเพิ่มสูงขึ้นใน Day 7 ถึง 11 แต่เมื่อถึง Day 14 ม้าในกลุ่มภูมิคุ้มกันสูงกลับมีระดับภูมิคุ้มกันลดลง ในขณะที่ไม่พบการลดลงในม้ากลุ่มภูมิคุ้มกันต่ำและปานกลาง ในการศึกษาต่อไปอาจทำการฉีดวัคซีนกระตุ้นซ้ำในช่วง Day 7 ถึง 10 เพื่อดูการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันว่าเป็นไปในทิศทางใด โดยอาจมีส่วนช่วยเหนี่ยวนำให้เกิด Immunological tolerance หรืออาจทำให้ระดับภูมิคุ้มกันเพิ่มสูงขึ้นไปอีก นอกจากนี้ยังควรพิจารณาองค์ประกอบอื่นๆ ในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันด้วย การศึกษาเพื่อแก้ปัญหา Low responder ควรทำการศึกษาดำเนินการที่ฉีดกระตุ้น เพื่อดูจำนวน ปริมาณ และชนิดของเซลล์ หรือไซโตไคน์ ในสิ่งแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันด้วย

เอกสารอ้างอิง

Hasegawa, H., Matsumoto, T. 2018. Mechanisms of tolerance induction by dendritic cells *in vivo*. *Front Immunol.* 9, 350.

Moore, S. M., Hanlon, C. A. 2010. Rabies-specific antibodies: Measuring surrogates of protection against a fatal disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 4(3), e595-e600.

Satue, K., Hernandez, A., Munoz, A. 2012. Physiological factors in the interpretation of equine hematological profile. In: C. H. Lawrie (Ed.), *Hematology-Science and Practice*, InTech. Open Access Publisher, 573-596.

Satue, K., Munoz, A., Gardon, J. C. 2014. Interpretation of the equine leukogram. *J. Hematol. Res.* 1, 27-35.

Schnabel, C. L., Steinig, P., Schuberth, H. J., Koy, M., Wagner, B., Wittig, B., Juhls, C., Willenbrock, S., Murua Escobar, H., Jaehnig, P., Feige, K., Cavalleri, J. M. V. 2015. Influences of age and sex on leukocytes of healthy horses and their *ex vivo* cytokine release. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 165 (1-2), 64-74.

Venkataswamy, M. M., Madhusudana, S. N., Sanyal, S. S., Taj, S., Belludi, A. Y., Mani, R. S., Hazra, N. 2015. Cellular immune response following pre-exposure and post-exposure rabies vaccination by intradermal and intramuscular routes. *Clin Exp Vaccine Res* 4(1), 68-74.

Wagner, B., Burton, A., Ainsworth, D. 2010. Interferon-gamma, interleukin-4, and interleukin-10 production by T helper cells reveals intact Th1 and regulatory T_R1 cell activation and a delay of the Th2 cell response in equine neonates and foals. *Vet. Res.* (41), 47-60.

Yamazaki, S., Steinman, R. 2009. Dendritic cells as controllers of antigen-specific Foxp3⁺ regulatory T cells. *J. Dermatol Sci.* 54(2), 69-75.



การศึกษาบทบาทของยีน cGAS ต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในหนูที่ติดเชื้อพิษสุนัขบ้า

Functional role of cGAS in immune modulation during rabies virus infection in mice

ปณนัท อารีกุล

Pannat Areekul

ฝ่ายวิจัยและพัฒนา สถานเสาวภา สภากาชาดไทย

Department of Research and Development, Queen Saovabha Memorial Institute, Thai Red Cross Society

บทคัดย่อ: การติดเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า (Rabies virus) ในสมองส่วนกลาง จะมีความแตกต่างของอาการและความรุนแรงของโรค ซึ่งสัมพันธ์อย่างมากกับระดับและระยะเวลาของการหลั่งไซโตไคน์และคีโมไคน์ ในกลไกการตอบสนองของภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (Innate immune response) และอาจเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน cGAS (Cyclic GMP-AMP synthase) ซึ่งมีบทบาทในการตรวจจับสารพันธุกรรมของทั้งไวรัสและสิ่งแปลกปลอมในไซโทพลาสซึมของเซลล์ที่ติดเชื้อ การศึกษาบทบาทของ cGAS ต่อการติดเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าซึ่งมีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวจะช่วยให้เข้าใจกลไกการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อที่เกี่ยวข้องกับยีน cGAS หรือไม่ จากการทดลองฉีดเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าในหนูปกติ (Wild type; WT) และหนูพร่องยีน cGAS (cGAS^{-/-}) พบว่าหนู cGAS^{-/-} แสดงอาการป่วยช้ากว่าหนูปกติ แต่การติดเชื้อกลับมีความรุนแรงมากกว่า ซึ่งเห็นว่า cGAS ทำให้ร่างกายตอบสนองต่อเชื้อไวรัสได้เร็ว และช่วยควบคุมความรุนแรงของการติดเชื้อด้วย เมื่อศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องต่อกระบวนการอักเสบด้วยวิธี RT-qPCR โดยใช้การแสดงออกของยีน β -actin เป็นมาตรฐาน พบว่าหนู cGAS^{-/-} มีการแสดงออกของยีน iNOS ลดลง ซึ่งแตกต่างจากหนูปกติ แสดงว่า cGAS มีความสำคัญต่อการแสดงออกของ iNOS นอกจากนี้ หนูปกติมีการแสดงออกของยีน IL-6 สูงกว่า cGAS^{-/-} ในขณะที่หนูกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ติดเชื้อ ไม่มีการแสดงออกหรือมีการแสดงออกของยีน IL-6 ในระดับต่ำ ซึ่งเห็นว่ายีน IL-6 อาจไม่ได้รับการตอบสนองผ่าน cGAS ส่วนกรณีของยีน IL-1 β และ TNF- α มีการแสดงออกในหนู cGAS^{-/-} สูงกว่าหนูปกติ จึงกล่าวได้ว่า cGAS อาจมีบทบาทในการกดการแสดงออกของยีนทั้งสอง สำหรับยีน IL-10 พบการแสดงออกในหนูปกติและหนู cGAS^{-/-} ที่ติดเชื้อ สูงกว่าหนูกลุ่มควบคุมในปริมาณใกล้เคียงกัน จึงอธิบายได้ว่าแม้หนูจะขาดยีน cGAS แต่ยังสามารถพบการแสดงออกของ IL-10 ได้เช่นเดียวกับหนูปกติ การหลั่งของยีน IL-10 ในกระบวนการติดเชื้อจึงอาจเกิดจากยีน cGAS หรืออาจเกิดร่วมกับกลไกอื่นๆ

คำสำคัญ: ไวรัสพิษสุนัขบ้า ภูมิคุ้มกัน ยีน cGAS

ABSTRACT: Central nervous system infection by the rabies virus exhibits variability in clinical manifestations and disease severity, which is strongly associated with the level and duration of cytokine and chemokine secretion as part of the innate immune response. This process may also involve the expression of the cyclic GMP-AMP synthase (cGAS) gene, which plays a critical role in detecting viral and foreign DNA within the cytoplasm of infected cells. Investigating the role of cGAS in rabies virus infection, despite the virus possessing a negative-sense single-stranded RNA genome, may provide insights into whether cGAS contributes to the immune response against rabies virus. In an experimental model using wild-type (WT) mice and cGAS-deficient (cGAS^{-/-}) mice, it was observed that cGAS^{-/-} mice exhibited a delayed onset of clinical symptoms compared to WT mice; however, the infection was more severe in the cGAS^{-/-} group. These findings suggest that cGAS facilitates a more rapid immune response to the virus while also modulating the severity of infection. Gene expression analysis related to inflammatory processes was performed using RT-qPCR, with β -actin serving as the internal control. The results demonstrated reduced expression of the inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene in cGAS^{-/-} mice. In contrast, WT mice showed increased iNOS expression, indicating that cGAS is essential for iNOS induction. Furthermore, WT mice exhibited higher expression levels of interleukin-6 (IL-6) compared to cGAS^{-/-} mice, while uninfected control mice showed either no expression or minimal expression of IL-6. This suggests that IL-6 induction may occur independently of cGAS. In contrast, expression levels of interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) were elevated in cGAS^{-/-} mice relative to WT mice, implying that cGAS may play a suppressive role in regulating these pro-inflammatory cytokines. Regarding interleukin-10 (IL-10), both infected WT and cGAS^{-/-} mice exhibited similarly elevated expression levels compared to uninfected controls. This indicates that IL-10 expression can occur in the absence of cGAS, suggesting that its induction may be mediated by cGAS or through alternative pathways.

Keywords: Rabies virus, Immune response, cGAS

บทนำ

ในปัจจุบันโรคพิษสุนัขบ้ายังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของโลก ซึ่งคร่าชีวิตผู้คนที่ยึดเชื้อโดยเฉพาะประเทศในแถบเอเชีย แอฟริกา รวมถึงประเทศไทย โรคพิษสุนัขบ้ามีการติดต่อผ่านการกัดโดยสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยเฉพาะอย่างยิ่งสุนัข สุนัขจรจัดถือเป็นพาหะที่สำคัญเนื่องจากมีความใกล้ชิดกับมนุษย์ อย่างไรก็ตามพบสัตว์พาหะชนิดอื่นได้บ้าง เช่น ค่างควา สุนัขจิ้งจอก สุนัขป่า และ Non-human primate เป็นต้น โรคพิษสุนัขบ้ามีสาเหตุจากเชื้อไวรัสเรบีส (Rabies virus; RABV) ปัจจุบันการให้วัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าในนั้นยังคงไม่ทั่วถึง เมื่อมีผู้ถูกสุนัขที่ไม่ทราบประวัติกัด จำเป็นต้องมีการจับสุนัขมากักเพื่อสังเกตอาการเป็นเวลาอย่างน้อย 10 วัน หากสุนัขตายภายในช่วงเวลานี้ จำเป็นต้องมีการตรวจยืนยันการติดเชื้อด้วยวิธีการผ่าเนื้อเยื่อสมองมาตรวจหาเชื้อไวรัส ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจสุนัขที่ติดเชื้อพิษสุนัขบ้า โดยสามารถทราบผลภายใน 3 วัน นับตั้งแต่สุนัขตาย ในระหว่างการกักสุนัขเพื่อดูอาการ หากเป็นสุนัขป่วยจะมีการแสดงออกของอาการผ่านพฤติกรรมซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มอาการหลัก คือ กลุ่มอาการดุร้าย (Furious form) และกลุ่มอาการเซื่องซึม (Dumb หรือ Paralytic form) จากข้อมูลงานวิจัยพบว่าสุนัขกลุ่มอาการเซื่องซึมจะมีการอักเสบบริเวณก้านสมอง (Brainstem) อย่างเด่นชัด ในขณะที่สมองส่วนซีรีบรัม (Cerebrum) มีปริมาณไวรัสต่ำกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มอาการดุร้าย กระบวนการอักเสบบริเวณก้านสมองจึงอาจเป็นกลไกในการจำกัดการแพร่กระจายของไวรัสไปยังสมองส่วนอื่นๆ (Shuangshoti et al., 2013) จึงสะท้อนถึงความแตกต่างในการตอบสนองของภูมิคุ้มกันในระบบประสาทส่วนกลาง โดยเฉพาะการแสดงออกของไซโตไคน์ (Cytokine) ที่มีบทบาทต่อกระบวนการอักเสบ เช่น IFN- γ , TNF- α และ IL-6 เป็นต้น เมื่อมีการติดเชื้อ ไวรัสจะพยายามหลบหลีกการตอบสนองโดยภูมิคุ้มกันของผู้ป่วย ซึ่งสัมพันธ์กับความสามารถในการก่อโรคและกระบวนการอักเสบหลายระดับ โดยพบการสูญเสียของเซลล์ประสาทเพียงเล็กน้อย เมื่อเชื้อเดินทางเข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลาง (Central Nervous System; CNS) จะมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันผ่านตัวรับหลายชนิด

เช่น Toll-like receptor 3 (TLR-3) ตัวรับในเอนโดโซม ซึ่งจำเพาะต่ออาร์เอ็นเอสายคู่ (Double strand RNA; dsRNA) หรือไวรัสพิษสุนัขบ้าในระหว่างการจำลองตัว (Replication) TLR-7 ตัวรับสำหรับอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (Single strand RNA; ssRNA) และ Retinoic acid-inducible gene 1-like receptor (RIG-I) เป็นตัวรับสำหรับ dsRNA ส่วนใหญ่และ ssRNA บางชนิด (Conzelmann, 2015) จากนั้นเกิดการหลั่ง IFN- β ในปริมาณสูงเพื่อตอบสนองต่อไวรัส ซึ่งเป็นหนึ่งในกระบวนการตอบสนองแบบ Innate immune responses นอกจากนี้ IFN- β ยังส่งผลให้เซลล์ประสาทมีการสร้าง IFN- γ , IL-6, CCL21 และ CX3CL1 ไปกระตุ้นเซลล์ Macrophage และ Glial cells ให้มีการผลิตไซโตไคน์ และคีโมไคน์อื่น ๆ เช่น IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α , CCL4, CCL5, CC7 และ CXCL10 (Taniguchi and Takaoka, 2002; Faber et al., 2004; Li et al., 2008; Masatani et al., 2010; Choppy et al., 2011) ความแตกต่างในการก่อโรคของ RABV แต่ละสายพันธุ์ไม่เพียงแต่สัมพันธ์กับการเพิ่มจำนวนของไวรัสและอัตราการติดเชื้อในเซลล์เท่านั้น แต่ยังสัมพันธ์กับระดับและระยะเวลาของการหลั่งไซโตไคน์ด้วย จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า RABV ที่อ่อนกำลังสามารถชักนำให้เกิดการหลั่งไซโตไคน์ใน Blood-brain barrier ได้ ซึ่งสัมพันธ์กับการตรวจพบ IFN- γ และการแทรกผ่านของ Inflammatory cells เข้าสู่ CNS นำไปสู่กระบวนการ Viral clearance (Roy et al., 2007; Kuang et al., 2009; Spindler and Hsu, 2012)

การหลั่งเอนไซม์ cGAS (cyclic GMP-AMP synthase) เป็นกระบวนการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันอีกอย่างหนึ่งต่อเชื้อไวรัส โดยทั่วไปเอนไซม์ cGAS มีบทบาทสำคัญในการตรวจจับสารพันธุกรรมของไวรัสที่หลุดเข้ามาในไซโตพลาสซึมของเซลล์ที่ติดเชื้อ โดยในสภาวะปกติสารพันธุกรรมของไวรัสจะถูกจำกัดอยู่เฉพาะในนิวเคลียสและไมโทคอนเดรียเท่านั้น หากมีการตรวจพบสารพันธุกรรมของไวรัสในไซโตพลาสซึม นั่นหมายถึงมีการติดเชื้อไวรัส เมื่อ cGAS จับกับดีเอ็นเอของไวรัสจะเกิดการกระตุ้นการผลิต Second messenger เรียกว่า cyclic GMP-AMP (cGAMP) จากนั้น cGAMP จะทำหน้าที่จับกับโปรตีน STING (Stimulator of Interferon Genes) ซึ่งอยู่บนผิวของเอนโดพลาสมิกเรติคูล-

ลัม การจับกันของสองโมเลกุลเป็นการกระตุ้น STING ให้เข้าสู่ STING pathways โดยจะกระตุ้นการผลิต Type I interferons คือ IFN- α และ IFN- β และ Pro-inflammatory cytokine อื่นๆ ซึ่งโมเลกุลเหล่านี้เป็นกุญแจสำคัญในการกระตุ้น Neighboring cells และ Immune cells เช่น Macrophages และ Dendritic cells ทำหน้าที่จำกัดการเพิ่มจำนวนของไวรัสทั้งในเซลล์ที่ติดเชื้อและเซลล์ไม่ติดเชื้อข้างเคียง โดยเพิ่มความสามารถในการทำลายอาร์เอ็นเอไวรัสและโปรตีนต่างๆ นอกจากนี้แล้ว cGAS ยังมีบทบาทสำคัญในการเกิด Autophagy และ Apoptosis (Programmed cell death) ซึ่งช่วยส่งเสริมการจำกัดและยับยั้งการแพร่กระจายของไวรัส (Ablasser and Chen, 2019; Hopfner and Hornung, 2020) ดังนั้น cGAS จึงมีความสำคัญในการป้องกันโรคติดเชื้อจากไวรัสบางชนิด โดยเฉพาะชนิดที่มีการสร้างดีเอ็นเอ เช่น HIV ในกรณีของไวรัสพิษสุนัขบ้า แม้ว่าจะเป็นไวรัสชนิด ssRNA แต่ cGAS ก็อาจมีความเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรค โดยบางส่วนเกิดจากการปลดปล่อยดีเอ็นเอของตนเอง เช่น ดีเอ็นเอจากไมโทคอนเดรีย (Mitochondrial DNA; mtDNA) และดีเอ็นเอของเจ้าบ้าน (Host DNA) (Hiengrach et al., 2022; Zhang et al., 2022) รวมถึงเกิดจากไซโตไคน์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบบางชนิด (Wu et al., 2023) เนื่องจากไวรัสพิษสุนัขบ้าไม่เพียงติดเชื้อในเซลล์ประสาทเท่านั้น แต่ยังบุกรุกเซลล์ไมโครเกลีย (Microglia) (Ray et al., 1997) จึงอาจก่อความเสียหายต่อไมโทคอนเดรียทำให้มีการปลดปล่อย Mitochondrial DNA (mtDNA) เข้าสู่ไซโตซอล (Cytosol) และกระตุ้น cGAS ในเซลล์มาโครฟาจ (Macrophage) แม้ว่าการอักเสบจากการกระตุ้นไมโครเกลียทำให้เกิดการลดปริมาณของเชื้อไวรัส แต่การกระตุ้นภูมิคุ้มกันนี้เอง อาจส่งผลให้เกิดการทำลายเซลล์ประสาทด้วย (Wattl and Kalinke, 2022) นอกจากนี้ภายในเซลล์ประสาท โปรตีน RNA-de-

pendent RNA polymerase (P) ของ RABV จะมีปฏิสัมพันธ์กับ Mitochondrial complex I ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของห่วงโซ่การขนส่งอิเล็กตรอน ส่งผลให้เกิดความไม่สมดุลของการไหลของอิเล็กตรอนและเพิ่มการเกิด Oxidative stress (Kiflu, 2024) ขณะที่โปรตีน Matrix (M) มีความเกี่ยวข้องในการกระตุ้นการตายของเซลล์แบบ Apoptosis (Yuan et al., 2024) การศึกษาบทบาทของ cGAS ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันสำหรับโรคติดเชื้อพิษสุนัขบ้า จะช่วยให้เข้าใจกลไกการทำงานของ Innate immune response ที่เกิดขึ้นหลังจากสัตว์ได้รับเชื้อเข้าสู่ร่างกายผ่านกลไกการตอบสนองของ cGAS

งานวิจัยนี้จะกล่าวถึงรูปแบบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในหนูที่ติดเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าที่มีการตอบสนองผ่านการจดจำต่อ Single strand DNA (cGAS pathway) หรือไม่ โดยศึกษาการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องในหนูพร่องยีน cGAS เปรียบเทียบกับหนูปกติ

วิธีดำเนินการวิจัย

หนูที่ใช้ทดลองเป็นหนูสายพันธุ์ C57BL/6 แบ่งหนูทดลองเป็น 4 กลุ่ม คือ หนูปกติ (Wild type; WT) ที่ทำให้ติดเชื้อ (n=4) หนูพร่องยีน cGAS (cGAS^{-/-}) ที่ทำให้ติดเชื้อ (n=6) หนูปกติ (WT) ที่ไม่ติดเชื้อ (n=2) และ หนูพร่องยีน cGAS (cGAS^{-/-}) ที่ไม่ติดเชื้อ (n=2) ทำการฉีดเชื้อไวรัสเรบีสในหนูกลุ่มที่ทำให้ติดเชื้อ โดยฉีดเข้ากล้ามเนื้อขาหลังด้วยไวรัสประมาณ 8.22×10^9 copies ต่อหนูหนึ่งตัว สังเกตอาการทุกวันหลังจากฉีดเชื้อ บันทึกจำนวนวันที่หนูเริ่มมีอาการอย่างสังเกตเห็นชัด คือ ความกระตือรือร้นลดลง มีการสั่นหรือกระตุกของขาหลัง เดินเซ จนกระทั่งพบว่าหนูมีอาการอัมพาตชัดเจน นอนนิ่ง เดินไม่ได้ จึงทำการเก็บตัวอย่างเลือดและสมองหนูตัวนั้น เก็บตัวอย่างจนครบทุกตัว ส่วนหนูทั้ง 2 กลุ่มที่ไม่ติดเชื้อ ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม (Mock-infected) จะถูกฉีดด้วยสารละลายสำหรับ

เก็บรักษาไวรัส (Virus diluent) ที่ไม่มีเชื้อไวรัส สังเกตอาการทุกวัน โดยเก็บตัวอย่างพร้อมกับหนูตัวสุดท้ายที่ติดเชื้อทั้ง 2 กลุ่ม ทำการสกัด RNA จากเนื้อเยื่อสมอง ตรวจยืนยันการติดเชื้อด้วยวิธี PCR โดยใช้ยีน L ซึ่งเป็นส่วน Large structural protein ของไวรัสเรบีสเป็นยีนเป้าหมาย จากนั้นตรวจดูการแสดงออกของยีน IL-6, TNF- α , IL-1 β และ iNOS ด้วยวิธี RT-q PCR วิเคราะห์ผลของยีนแต่ละชนิดโดยใช้ค่า Ct (Cycle threshold) ที่เป็นค่าเฉลี่ยของหนูในกลุ่มเปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ย Ct ของ β -actin (reference gene) ในหนูกลุ่มเดียวกัน เพื่อดูปริมาณการแสดงออกของแต่ละยีน

ผลการทดลอง

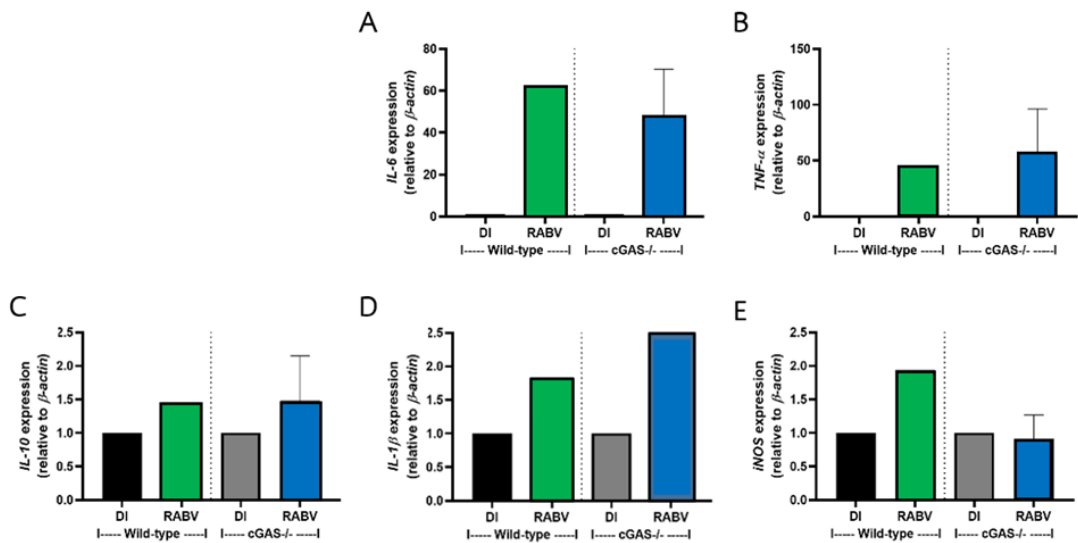
จากการสังเกตอาการและบันทึกระยะเวลาที่หนูทุกกลุ่มเริ่มแสดงอาการจนถึงระยะอัมพาต พบว่าหนู WT ที่ติดเชื้อทุกตัวเริ่มแสดงอาการ (เกร็งขา การเดินผิดปกติ การเคลื่อนไหวช้าลง) หลังจากรับเชื้อเป็นเวลา 7 วัน ในขณะที่หนูกลุ่ม cGAS-/- ที่ติดเชื้อเริ่มแสดงอาการตั้งแต่วันที่ 6-9 หลังรับเชื้อ อย่างไรก็ตาม หนูกลุ่มนี้มีพัฒนาการของโรคสู่ภาวะอัมพาตทั้งตัว นอนนิ่ง หายใจแผ่ว อย่างรวดเร็ว ภายในเวลา 1 วันหลังแสดงอาการ ในขณะที่หนู WT ที่ติดเชื้อใช้เวลา 1-4 วัน (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงระยะเวลาที่หนูทดลองกลุ่มติดเชื้อเริ่มแสดงอาการจนถึงระยะอัมพาต

หนูกลุ่มติดเชื้อ	No.	จำนวนวันหลังรับเชื้อ (Day)		PCR
		เริ่มแสดงอาการ	ระยะอัมพาต	
หนู WT	1	7	8	+
	2	7	9	+
	3	7	11	+
	4	7	11	+
หนู cGAS-/-	1	6	7	+
	2	8	9	+
	3	7	8	+
	4	8	9	+
	5	8	9	+
	6	9	10	+

อาการของหนูติดเชื้อที่ใช้เป็นเกณฑ์ในการจำแนก อธิบายไว้ในเนื้อหาข้างต้น หนูกลุ่มควบคุมทุกตัวไม่แสดงอาการป่วยจึงไม่แสดงผลในตาราง

การศึกษากการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองของภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด ในหนูทดลองที่ติดเชื้อไวรัสเรบีสกลุ่ม WT และ cGAS-/- (รูปที่ 1) ด้วยวิธี RT-qPCR เพื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีนเกี่ยวกับการอักเสบในเซลล์สมองหนู โดยใช้การแสดงออกของยีน β -actin เป็นมาตรฐาน พบว่าหนูทั้งกลุ่ม WT และ cGAS-/- ที่ได้รับเชื้อมีค่าเฉลี่ยการแสดงออกของยีน IL-6 เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่กลุ่ม cGAS-/- เพิ่มในปริมาณที่น้อยกว่ากลุ่ม WT ส่วนยีน TNF- α และ IL-1 β มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในหนูทั้งสองกลุ่ม แต่การแสดงออกในหนูกลุ่ม cGAS-/- มากกว่าหนู WT เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ยีน IL-10 มีการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นในหนูติดเชื้อทั้งสองกลุ่มในปริมาณเท่าๆ กัน ส่วนยีน iNOS ในหนู cGAS-/- พบการแสดงออกลดลงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่หนูกลุ่ม WT มีการแสดงออกของยีนสูงขึ้นมา



รูปที่ 1 กราฟแสดงระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบจากสมองของหนูทดลองโดยใช้เทคนิค RT-qPCR แกน Y แสดงจำนวนเท่าของยีนที่มีแนวโน้มการแสดงออกเพิ่มมากขึ้น (Upregulation) หรือลดลง (Downregulation) เทียบกับการแสดงออกของยีน β -actin กราฟแต่ละแห่งคำนวณจากค่า Ct เฉลี่ยของหนูทดลองทุกตัวในกลุ่มการทดลอง, DI หมายถึงหนูกลุ่มที่ฉีดด้วยสารละลายสำหรับเก็บรักษาไวรัส (Virus diluent), RABV หมายถึงหนูกลุ่มที่ฉีดไวรัสพิษสุนัขบ้า

สรุปและอภิปรายผล

การแสดงออกที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงของยีนที่ศึกษา มีความสำคัญในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อพิษสุนัขบ้า ซึ่งส่งผลต่อการแสดงอาการทางคลินิกและความรุนแรงของโรค จากผลการทดลองพบว่าหนูกลุ่ม WT ที่ติดเชื้อจะแสดงอาการไม่รุนแรงเท่าหนูกลุ่ม cGAS-/- ที่ติดเชื้อ เนื่องจากเมื่อหนูกลุ่ม WT ที่ติดเชื้อเริ่มแสดงอาการจะใช้เวลาตั้งแต่ 1-4 วันจึงพัฒนาอาการถึงระยะอัมพาตจนถึงโกลตาย ในขณะที่หนูกลุ่ม cGAS-/- ที่ติดเชื้อใช้เวลาไม่เกิน 1 วันจึงมีความเป็นไปได้ว่าการมีอยู่ของยีน cGAS มีส่วนช่วยควบคุมความรุนแรงของการติดเชื้อ ยีน cGAS ยังอาจมีหน้าที่ในการควบคุมการอักเสบ โดยกระตุ้น IL-1 β และ TNF- α ซึ่งเป็นไซโตไคน์กระตุ้นการอักเสบ (Proinflammatory cytokine) ที่สำคัญให้มีการแสดงออกน้อยลงเมื่อเทียบกับหนูที่ติดเชื้อกลุ่ม cGAS-/- สอดคล้องกับอาการของหนูที่ติดเชื้อกลุ่ม WT ที่มีอาการรุนแรงของโรคน้อยกว่าอาจเนื่องมาจากการอักเสบของสมองลดลง แต่การพร่องยีน cGAS กลับให้ผลตรงข้ามในกรณีของ IL-6 เนื่องจากมีการแสดงออกลดลงในหนู cGAS-/- เมื่อเทียบกับหนู WT อย่างไรก็ตาม IL-

6 จัดเป็นไซโตไคน์ ที่ช่วยกระตุ้นการสร้าง Acute phase proteins ซึ่งส่งผลในการจำกัดความเสียหายของเซลล์และฟื้นฟูเนื้อเยื่อ รวมถึงกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีโดย B cell จากผลการทดลอง หนูติดเชื้อกลุ่ม WT ซึ่งมีการแสดงออกของ IL-6 สูงกว่า จึงมีอาการรุนแรงน้อยกว่า สำหรับ IL-10 มีหน้าที่ยับยั้งการสร้าง Proinflammatory cytokine ยับยั้งการอักเสบ และ ควบคุมภูมิคุ้มกันไม่ให้มากเกินไปจากความจำเป็น จากผลการทดลองพบว่าการแสดงออกของยีนที่เท่ากันในหนูทั้งสองกลุ่ม การทำงานของยีนจึงอาจไม่ได้เกี่ยวข้องหรือเป็นผลโดยตรงจากยีน cGAS สำหรับการแสดงออกของยีน iNOS พบว่าหนูติดเชื้อกลุ่ม cGAS-/- มีแนวโน้มการแสดงออกลดลงเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม ในขณะที่หนูติดเชื้อกลุ่ม WT มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น เนื่องจาก iNOS จัดเป็นโปรตีนบ่งชี้ในการมีอยู่ของ M1 macrophage จึงเป็นไปได้ว่าเมื่อขาดยีน cGAS อาจส่งผลให้มี M1 macrophage ลดลง ทำให้ความสามารถในการทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส และจำกัดการเพิ่มจำนวนของไวรัสของร่างกายลดลงด้วย จึงเป็นปัจจัยเสริมให้หนูพร่องยีน cGAS มีอาการป่วยรุนแรงกว่าหนู WT

จากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่ายีน cGAS ในหนูทดลอง มีผลต่อกระบวนการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันโดยกระตุ้นการอักเสบ ผ่านการเพิ่ม หรือลดการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องและสัมพันธ์กับความรุนแรงของอาการของโรค แม้ว่าโรคพิษสุนัขบ้าจะเกิดจากไวรัสชนิดอาร์เอ็นเอ แต่การทำงานของ cGAS ซึ่งเป็นกระบวนการที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอแปลกปลอมในเซลล์ สามารถอธิบายกลไกการทำงานของ cGAS ได้จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ ซึ่งศึกษาความผิดปกติของไมโทคอนเดรียจากการติดเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า (Venugopal et al., 2013) พบว่า การติดเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้ามีผลให้ไมโทคอนเดรียเกิดความเสียหาย เกิดการรั่วไหลของ Mitochondrial DNA จนอาจเป็นสาเหตุหลักที่กระตุ้นการทำงานของยีน cGAS อย่างไรก็ตาม การทดลองยังคงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อความถูกต้อง เชื่อถือได้ เช่น การเพิ่มจำนวนตัวอย่างในกลุ่มการทดลอง การวัดปริมาณไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องด้วยการกระตุ้นเซลล์ภูมิคุ้มกันด้วยเชื้อไวรัสภายในหลอดทดลอง เป็นต้น กลไกการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อพิษสุนัขบ้ายังคงมีความซับซ้อนและยากที่จะเข้าใจได้อย่างชัดเจน การศึกษาต่อเนื่องเกี่ยวกับไซโตไคน์ในระบบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้ายังคงเป็นประเด็นที่น่าสนใจและท้าทาย

เอกสารอ้างอิง

Ablasser, A., Chen, Z. J. 2019. cGAS in action: Expanding roles in immunity and inflammation. *Science* 363(6431): eaat8657. Doi:10.1126/science.aat8657.

Chopy, D., Detje, C. N., Lafage, M., Kalinke, U., Lafon, M. 2011. The type I interferon response bridles rabies virus infection and reduces pathogenicity. *J. Neurovirol.* 17, 353–367.

Conzelmann, K. K. 2015. Activation and eva-

sion of innate immune response by rhabdoviruses. In: A. K. Pattnaik and M. A. Whitt (Eds.), *Biology and Pathogenesis of Rhabdo- and Filoviruses.* World Scientific, 353-385.

Faber, M., Pulmanusahakul, R., Nagao, K., Prośniak, M., Rice, A. B., Koprowski, H., Schnell, M. J., Dietzschold, B. 2004. Identification of viral genomic elements responsible for rabies virus neuroinvasiveness. *PLoS Pathog.* 101, 16328–16332.

Hiengrach, P., Visitchanakun, P., Tongchirawewat, P., Tangsiriatian, P., Jungteerapanich, T., Ritprajak, P., Wanigama, D.L., Tangtanatakul, P., Lee lahavanichkul, A. 2022. Sepsis encephalopathy is partly mediated by miR370-3p-induced mitochondrial injury but attenuated by BAM15 in cecal ligation and puncture sepsis male mice. *Int. J. Mol. Sci.* 23(10): 5445. Doi: 10.3390/ijms23105445.

Hopfner, K. P., Hornung, V. 2020. Molecular mechanisms and cellular functions of cGAS-STING signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21(9), 501-521.

Kiflu, A. B. 2024. The immune escape strategy of rabies virus and its pathogenicity mechanisms. *Viruses* 16(11): 1774. Doi: 10.3390/v16111774.

Kuang, Y., Lackay, S. N., Zhao, L., Fu, Z. F. 2009. Role of chemokines in the enhancement of BBB permeability and inflammatory infiltration after rabies virus infection. *Virus Res.* 144, 18–26.

- Li, J., McGettigan, J. P., Faber, M., Schnell, M. J., Dietzschold, B. 2008. Infection of monocytes or immature dendritic cells (DCs) with an attenuated rabies virus results in DC maturation and a strong activation of the NF κ B signaling pathway. *Vaccine*. 26, 419–426.
- Masatani, T., Ito, N., Shimizu, K., Ito, Y., Nakagawa, K., Sawaki, Y., Koyama, H., Sugiyama, M. 2010. Rabies virus nucleoprotein functions to evade activation of the RIG-I-mediated antiviral response. *J. Virol*. 84, 4002–4012.
- Roy, A., Phares, T. W., Koprowski, H., Hooper, D. C. 2007. Failure to open the blood-brain barrier and deliver immune effectors to the CNS tissues leads to the lethal outcome of silver-haired bat rabies virus infection. *J. Virol*. 81, 1110–1118.
- Spindler, K. R., Hsu, T. H. 2012. Viral disruption of blood-brain barrier. *Trends Microbiol*. 20, 282–290.
- Shuangshoti, S., Thepa, N., Phukpattaranont, P., Jittmittraphap, A., Intarat, N., Tepsumethanon, V., Wacharapluesadee, S., Thoner, P. S., Hemachudha, T. 2013. Reduced viral burden in paralytic compared to furious canine rabies is associated with prominent inflammation at the brainstem level. *BMC Vet Res*. 9:31. Doi: 10.1186/1746-6148-9-31.
- Ray, N. B., Power, C., Lynch, W. P., Ewalt, L. C., Lodemell, D. L. 1997. Rabies viruses infect primary cultures of murine, feline, and human microglia and astrocytes. *Arch Virol*. 142(5), 1011–1019. Doi: 10.1007/s007050050136.
- Taniguchi, T., Takaoka, A. 2002. The interferon- α/β system in antiviral responses: a Multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors. *Curr Opin Immunol*. 14, 111–116.
- Venugopal, A. K., Ghantasala, S. S. K., Selvan, L. D. N., Mahadevan, A., Renuse, S., Kumar, P., Pawar, H., Sahasrabhuddhe, N. A., Suja, M. S., Ramachandra, Y. L., Prasad, T. S. K., Madhusudhana, S. N., Harsha, H. C., Chaerkady, R., Satishchandra, P., Pandey, A., Shankar, S. K. 2013. Quantitative proteomics for identifying biomarkers for rabies. *Clin Proteomics*. 10, 1-13.
- Waltl, I., Kalinke, U. 2022. Beneficial and detrimental functions of microglia during viral encephalitis. *Trends Neurosci*. 45, 158-170, Doi: 10.1016/j.tins.2021.11.004.
- Wu, D., Wang, J., Huang, C., Zhao, J., Fu, Z. F., Zhao, L., Zhou, M. 2023. Interleukin-1 β suppresses rabies virus infection by activating cGAS-STING pathway and compromising the blood-brain barrier integrity in mice. *Vet Microbiol*. 280, 109708. Doi: 10.1016/j.vetmic.2023.109708.
- Yuan, Y., Fang, A., Wang, H., Wang, C., Sui, B., Zhao, J., Fu, Z. F., Zhou, M., Zhao, L. 2024. Lyssavirus M protein degrades neuronal microtubules by reprogramming mitochondrial metabolism. *mBio*. 15, e0288023. Doi:10.1128/mbio.02880-23.
- Zhang, H., Huang, J., Song, Y., Liu, X., Qian, M., Huang, P., Li, Y., Zhao, L., Wang, H. 2022. Regulation of innate immune responses by rabies virus. *Animal Model Exp Med*. 5, 418-429. Doi: 10.1002/ame2.12273.





เทคโนโลยี RNA Interference (RNAi) และการประยุกต์ใช้

RNA interference (RNAi) technology and applications

รพี สีนเรืองนอง¹ นันทพงศ์ หลงศรีภูมิ²

Rapee Sinnuengnong¹, Nantapong Longsripoom²

¹ ฝ่ายวิจัยและพัฒนา สถาบันเสาวภา สภากาชาดไทย

² ฝ่ายผลิตภัณฑ์ สถาบันเสาวภา สภากาชาดไทย

¹ Department of Research and Development, Queen Saovabha Memorial Institute, Thai Red Cross Society

² Department of Vaccine Production, Queen Saovabha Memorial Institute, Thai Red Cross Society

บทคัดย่อ: กระบวนการ RNA interference (RNAi) เป็นการควบคุมการแสดงออกของยีนหลังการถอดรหัส (Post-transcription) สามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิตประเภทยูคาริโอต (Eukaryote) กระบวนการ RNAi เริ่มจากเซลล์ได้รับ Long double-stranded RNA (Long dsRNA) ด้วยกระบวนการ Endocytosis จากนั้นจะเกิดการตัดสาย Long dsRNA ให้กลายเป็นสายสั้น (Short interference RNA, siRNA) และรวมกลุ่มกับเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการตัดหรือทำลายสาย mRNA ที่เป็นคู่สมกับสาย siRNA ดังกล่าว ส่งผลให้การแสดงออกของยีนลดลงหรือยับยั้งการแสดงออกของยีน บทความนี้ได้อธิบายหลักการของกระบวนการ RNAi และการนำกระบวนการ RNAi ไปใช้ในด้านการเกษตรและการแพทย์ เพื่อเป็นพื้นฐานสำหรับการพัฒนาต่อยอดในอนาคต

คำสำคัญ: กระบวนการ RNA interference ยูคาริโอต การแสดงออกของยีน การประยุกต์ใช้ RNAi

ABSTRACT: RNA interference (RNAi), which can be found in eukaryotes, is a post-transcriptional process to control gene expression. Firstly, the cells receive long double-stranded RNA (long dsRNA) by endocytosis. Then, long dsRNA is cleaved to form a short interference RNA (siRNA) and incorporated with the enzyme complex to damage the complementary mRNA, resulting in decreased or inhibited gene expression. This review article describes RNAi processes and the applications of RNAi, including agricultural and medicinal applications.

Keywords: RNA interference processes, Eukaryote, Gene expression, RNAi applications

บทนำ

RNA interference (RNAi) เป็นกระบวนการทางชีวภาพเพื่อควบคุมการแสดงออกของยีน สามารถพบได้ทั้งในพืช สัตว์และมนุษย์ โดยอาศัยการทำงานของอาร์เอ็นเอสายคู่ สายสั้น (siRNA) ซึ่งสามารถเข้าจับแบบจำเพาะกับยีนเป้าหมาย (Kim and Rossi, 2008) กระบวนการ RNAi พบครั้งแรกในหนอนโปร่งใสขนาดเล็ก *Caenorhabditis elegans* โดยเริ่มจากการฉีด Antisense RNA และพบว่าสาย RNA ดังกล่าวเป็นสาเหตุทำให้การแสดงออกของยีนใน *C. elegans* ที่ควบคุมการแสดงออกของเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สืบพันธุ์ (Germline) ลดลง (Guo and Kemphues, 1995) จากนั้นได้มีการศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการ RNAi เรื่อยมาจนกระทั่งในปี ค.ศ. 1998 Fire และคณะ ได้ทำการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับ Antisense RNA และกลไกที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนใน *C. elegans* โดยพบว่าเมื่อฉีดสาย Sense mRNA ควบคู่กับสาย Antisense RNA ที่จำเพาะกับการสร้างโปรตีนกล้ามเนื้อให้กับ *C. elegans* พบว่า *C. elegans* มีการเคลื่อนที่แบบกระตุก (Twitching movements) ในขณะที่ *C. elegans* ปกติจะไม่มีการเคลื่อนที่รูปแบบดังกล่าวและได้ตั้งสมมติฐานว่าสาย mRNA และ Antisense RNA ที่ฉีดเข้าไปอาจเกิดการจับเข้าคู่กันเกิดเป็น dsRNA และสายดังกล่าวที่เกิดขึ้นสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนกล้ามเนื้อ (Fire et al., 1998) และทำให้ผู้วิจัยได้รับรางวัลโนเบล สาขาสรีรวิทยาในปี ค.ศ. 2006

เนื่องด้วยกระบวนการ RNAi สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนอย่างจำเพาะเจาะจง ด้วยเหตุนี้จึงมีการประยุกต์ใช้กระบวนการดังกล่าวในการป้องกันโรคหรือการควบคุมการแสดงออกของยีนที่ผิดปกติ เช่น การป้องกันโรคไวรัสในกุ้ง การป้องกันโรคไวรัสในพืช หรือการควบคุมการเจริญของเซลล์มะเร็ง เป็นต้น ดังนั้นบทความนี้ได้อธิบายกระบวนการ RNAi และรวบรวมการนำกระบวนการดังกล่าว

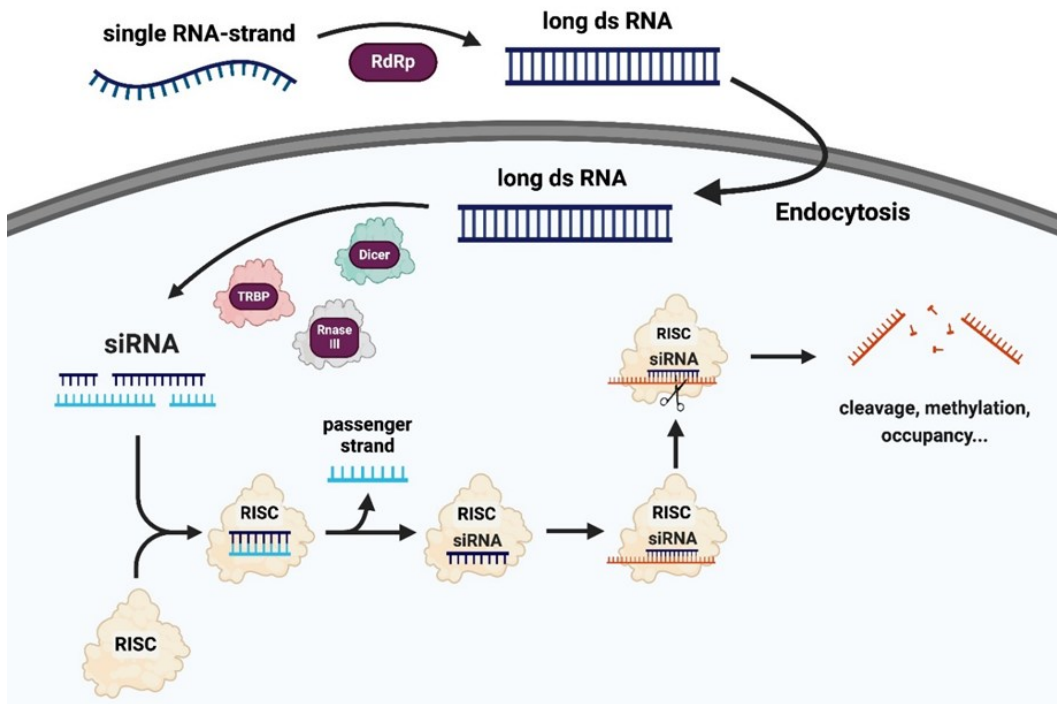
มาประยุกต์ใช้

กระบวนการ RNA interference (ดัดแปลงจาก Ikenmann et al., 2023)

กระบวนการ RNA interference เป็นกระบวนการที่ควบคุมการแสดงออกของยีน โดยลดการแสดงออกของยีนเป้าหมายด้วยอาร์เอ็นเอสายคู่ สายสั้น (siRNA) และเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นหลังกระบวนการถอดรหัส (Transcription) ด้วยการทำลายสาย mRNA (mRNA cleavage) หรือการยับยั้งการแปลรหัส (Translation repression) ของยีนเป้าหมาย

กระบวนการดังกล่าวเริ่มจากเอนไซม์ RNA-dependent-RNA polymerase (RdRp) ทำการสังเคราะห์สาย dsRNA สายยาว (Long dsRNAs) โดยใช้สายอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (Single-stranded RNA, ssRNA) เป็นสายต้นแบบ จากนั้นสาย Long dsRNA จะเคลื่อนที่เข้าสู่ของเหลวภายในเซลล์ (Cytosol) และเกิดการตัดสาย Long dsRNA ให้มีขนาดสั้นลงด้วยเอนไซม์ Endoribonuclease Dicer หรือ Tar-RNA-binding protein (TRBP) กลายเป็น siRNA ซึ่งมีขนาดประมาณ 20-27 นิวคลีโอไทด์ ต่อมาสาย siRNA จะเข้าจับกับ RNA-induced silencing complex (RISC) โดยมีส่วนที่สำคัญคือ โปรตีน Argonaute ซึ่งมีหน้าที่ในการเข้าจับกับสาย siRNA และมีบริเวณที่เข้าจับแบบจำเพาะ โดยบริเวณ N-domain ของโปรตีน Argonaute จะทำหน้าที่ในการคลี่สายของ dsRNA ให้กลายเป็น ssRNA ส่วนบริเวณ PAZ-domain จะเข้าจับด้านปลาย 3' ในขณะที่ MID-domain เข้าจับกับทางด้านปลาย 5' ของสาย ssRNA และบริเวณ PIWI-domain จะทำหน้าที่ในตัดสาย mRNA ที่เป็นสายคู่สมกับ siRNA ดังกล่าว จากนั้น RISC complex ที่จับกับ siRNA จะเข้าจับกับสาย RNA หรือ DNA ที่เป็นคู่สมกับ siRNA เมื่อทำการเข้าจับเรียบร้อยแล้ว ในกรณีที่เป้าหมาย DNA จะเกิดกระบวนการ DNA methylation

หรือ Chromatin modification ส่งผลให้เกิดการยับยั้งกระบวนการ Transcription ของสาย DNA ดังกล่าว สำหรับสาย RNA จะเกิดกระบวนการทำลายสาย mRNA หรือการยับยั้งกระบวนการแปลรหัส (Translation inhibition) ด้วยเหตุนี้สาย mRNA ดังกล่าวจึงไม่เกิดการแปลรหัสเป็นโปรตีน ส่งผลให้การแสดงออกของโปรตีนลดลงหรืออาจไม่เกิดการแสดงออกของโปรตีน ซึ่งกระบวนการ RNAi แสดงดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 กระบวนการ RNAi (ดัดแปลงจาก Isenmann et al., 2023)

การประยุกต์ใช้กระบวนการ RNAi

1. ทางด้านการแพทย์

เนื่องจากกระบวนการ RNAi เป็นกระบวนการที่จำเพาะกับยีนเป้าหมาย จึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการป้องกันการติดเชื้อไวรัส โดยสามารถใช้ siRNA ได้ 2 รูปแบบ รูปแบบที่ 1 siRNAs จะมีความจำเพาะกับยีนโปรตีนของไวรัสที่มีความจำเป็นต่อการเพิ่มจำนวนของไวรัส สำหรับรูปแบบที่ 2 siRNAs จะมีความจำเพาะกับยีนของเซลล์เจ้าบ้านที่มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการนำเข้าของไวรัส (Kang et al., 2023) ตัวอย่างเช่น การศึกษา RNAi สำหรับรักษาโรคไวรัสตับอักเสบบี ชนิดเรื้อรัง (Chronic HBV) โดยทำการศึกษาในมนุษย์ Phase I จากผลการทดลองพบว่า RNAi สำหรับโรคไวรัสตับอักเสบบี ชนิดเรื้อรังมีความปลอดภัยและสามารถนำมาใช้ในมนุษย์ (Gish et al., 2011) นอกจากนี้มี

การศึกษา ARC-520 ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม RNA interference สำหรับโรค Chronic HBV เช่นเดียวกัน ซึ่งพบว่าสามารถป้องกันโรค Chronic HBV ได้ (Kadelka et al., 2021) ในปี ค.ศ. 2018 ได้มีการศึกษา Phase III ในมนุษย์ โดยใช้ยา Patisiran สำหรับโรค Hereditary Transthyretin Amyloidosis ซึ่งพบว่ายาดังกล่าวสามารถลดอาการและความรุนแรงของโรคได้ (Adams et al., 2018) การศึกษา ยา Teprasiran ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม siRNA ที่สามารถป้องกันภาวะไตวายเฉียบพลันในมนุษย์ พบว่า siRNA ดังกล่าวสามารถป้องกันโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Thielmann et al., 2021)

2. ทางด้านการเกษตร

สำหรับทางด้านการเกษตรมีการนำกระบวนการ RNAi มาประยุกต์ใช้ในการป้องกันโรค

ที่เกิดจากไวรัสในกุ้ง เช่น ในปี ค.ศ. 2011 ได้มีการศึกษาการฉีด dsRNA ที่มีความจำเพาะต่อยีน ns1 และ vp ของไวรัส *Penaeus monodon* densovirus (PmDENV) ในกุ้งกุลาดำ พบว่าสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสในกุ้งได้ (Attasart et al., 2011) ต่อมาได้ศึกษาการให้อาหารกุ้งที่ผสม dsRNA ที่จำเพาะกับยีน ns1 และ vp ของไวรัส PmDENV ในกุ้งกุลาดำ พบว่าสามารถป้องกันการติดเชื้อไวรัสในกุ้งกุลาดำได้ (Chimwai et al., 2016) ดังนั้นการให้อาหารที่ผสม dsRNA จึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการป้องกันการติดเชื้อไวรัสในกุ้งในระดับฟาร์มเพาะเลี้ยงได้ นอกจากนี้ไวรัส PmDENV แล้ว ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการยับยั้งไวรัสชนิดอื่นในกุ้งด้วยกระบวนการ RNAi เช่นกัน ยกตัวอย่างเช่น Yellow head virus (Sanitt et al., 2016; Chaimongkon et al., 2020; Worawittayatada et al., 2022) Laem-Singh virus (Saksmerprome et al., 2013) White spot syndrome virus (Chaimongkon et al., 2020; Jonjaroen et al., 2024) นอกจากนี้ได้มีการนำกระบวนการ RNAi มาประยุกต์ใช้ในการป้องกันโรคในพืช เช่น โรคราสนิม (Rust) (Degnan et al., 2022; Degnan et al., 2023) โรคราสีเทาที่มีสาเหตุจากรา *Botrytis cinerea* (Niño-Sánchez., 2022) แมลงศัตรูพืช (Jain et al., 2022) ไวรัสในพืช (Nilon et al., 2021) และได้มีการศึกษาการนำไปใช้ในระดับแปลง ซึ่งพบว่าสามารถป้องกันโรคในพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เอกสารอ้างอิง

- Attasart, P., Kaewkhaw, R., Chimwai, C., Kongphom, U., Panyim, S. 2011. Clearance of *Penaeus monodon* densovirus in naturally pre-infected shrimp by combined ns1 and vp dsRNAs. *Virus Res.* 159(1), 79-82. Doi: 10.1016/j.virusres.2011.05.001.
- Adams, D., Gonzalez-Duarte, A., O'Riordan, W. D., Yang, C. C., Ueda, M., Kristen, A. V., Tournev, I., Schmidt, H. H., Coelho, T., Berk, J. L., Lin, K. P., Vita, G., Attarian, S., Planté-Bordeneuve, V., Mezei, M. M., Campistol, J. M., Buades, J., Brannagan, T. H. 3rd, Kim, B. J., Oh, J., Parman, Y., Sekijima, Y., Hawkins, P. N., Solomon, S. D., Polydefkis, M., Dyck, P. J., Gandhi, P. J., Goyal, S., Chen, J., Strahs, A. L., Nochur, S. V., Sweetser, M. T., Garg, P. P., Vaishnav, A. K., Gollob, J. A., Suhr, O. B. 2018. Patisiran, an RNAi therapeutic, for hereditary transthyretin amyloidosis. *N Engl J Med.* 379(1), 11-21. Doi: 10.1056/NEJMoa1716153.
- Chaimongkon, D., Assavalapsakul, W., Panyim, S., Attasart, P. 2020. A multi-target dsRNA for simultaneous inhibition of yellow head virus and white spot syndrome virus in shrimp. *J. Biotechnol.* 321, 48-56. Doi: 10.1016/j.jbiotec.2020.06.022.
- Chimwai, C., Tongboonsong, P., Namramoon, O., Panyim, S., Attasart, P. 2016. A formulated double-stranded RNA diet for reducing *Penaeus monodon* densovirus infection in black tiger shrimp. *J. Invertebr Pathol.* 134, 23-26. Doi: 10.1016/j.jip.2016.01.003.
- Degnan, R. M., McTaggart, A. R., Shuey, L. S., Pame, L. J. S., Smith, G. R., Gardiner, D. M., Nock, V., Soffe, R., Sale, S., Garrill, A., Carroll, B. J., Mitter, N., Sawyer, A. 2022. Exogenous double-stran-

- ded RNA inhibits the infection physiology of rust fungi to reduce symptoms in planta. *Mol Plant Pathol.* 24(3), 191-207. Doi: 10.1111/mpp.13286.
- Degnan, R. M., Shuey, L. S., Radford-Smith, J., Gardiner, D. M., Carroll, B. J., Mitter, N., McTaggart, A. R., Sawyer, A. 2023. Double-stranded RNA prevents and cures infection by rust fungi. *Commun Biol.* 6(1), 1234. Doi: 10.1038/s42003-023-05618-z.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., Mello, C. C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 391 (6669), 806-11. Doi: 10.1038/35888.
- Gish, R. G., Satishchandran, C., Young, M., Pachuk, C. 2011. RNA interference and its potential applications to chronic HBV treatment: results of a phase I safety and tolerability study. *Antivir Ther.* 16(4), 547-54. Doi: 10.3851/IMP1798.
- Guo, S., Kemphues, K. J. 1995. par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell.* 81(4), 611-20. Doi: 10.1016/0092-8674(95)90082-9.
- Ismann, M., Stoddart, M. J., Schmelzeisen, R., Gross, C., Della Bella, E., Rothweiler, R. M. 2023. Basic principles of RNA interference: nucleic acid types and *in vitro* intracellular delivery methods. *Micromachines (Basel).* 14 (7), 1321. Doi: 10.3390/mi14071321.
- Jain, R. G., Fletcher, S. J., Manzie, N., Robinson, K. E., Li, P., Lu, E., Brosnan, C. A., Xu, Z. P., Mitter, N. 2022. Foliar application of clay-delivered RNA interference for whitefly control. *Nat Plants.* 8(5), 535-548. Doi: 10.1038/s41477-022-01152-8.
- Jonjaroen, V., Jitrakorn, S., Charoonnart, P., Kaewsaengon, P., Thinkohkaew, K., Payongsri, P., Surarit, R., Saksmerprom, V., Niamsiri, N. 2025. Optimizing chitosan nanoparticles for oral delivery of double-stranded RNA in treating white spot disease in shrimp: Key Insights and practical implications. *Int J Biol Macromol.* 290, 138970. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.138970.
- Kadelka, S., Dahari, H., Ciupe, S. M. 2021. Understanding the antiviral effects of RNAi-based therapy in HBeAg-positive chronic hepatitis B infection. *Sci Rep.* 11(1), 200. Doi: 10.1038/s41598-020-80594-6.
- Kang, H., Ga, Y. J., Kim, S. H., Cho, Y. H., Kim, J. W., Kim, C., Yeh, J. Y. 2023. Small interfering RNA (siRNA)-based therapeutic applications against viruses: principles, potential, and challenges. *J Biomed Sci.* 30(1), 88. Doi: 10.1186/s12929-023-00981-9.
- Kim, D., Rossi, J. 2008. RNAi mechanisms and applications. *Biotechniques.* 44(5), 613-6. Doi: 10.2144/000112792.
- Nilon, A., Robinson, K., Pappu, H. R., Mitter, N. 2021. Current status and potential of RNA interference for the management of tomato spotted wilt virus and thrips vectors. *Pathogens.* 10(3), 320. Doi: 10.3390/pathogens10030320.
- Niño-Sánchez, J., Sambasivam, P. T., Sawyer, A., Hamby, R., Chen, A., Czulowski, E., Li, P., Manzie, N., Gardiner, D. M., Ford, R., Xu, Z. P., Mitter, N., Jin, H. 2022. BioClay™ prolongs RNA interference-mediated crop protection against

- Botrytis cinerea. J Integr Plant Biol. 64(11), 2187-2198. Doi: 10.1111/jipb.13353.
- Saksmerprome, V., Thammasorn, T., Jitrikorn, S., Wongtripop, S., Borwornpinyo, S., Withyachumnarnkul, B. 2013. Using double-stranded RNA for the control of Laem-Singh Virus (LSNV) in Thai *P. monodon*. J Biotechnol. 164 (4), 449-53. Doi: 10.1016/j.jbiotec.2013.01.028.
- Sanitt, P., Apiratikul, N., Niyomtham, N., Yingyongnarongkul, B. E., Assavalapsakul, W., Panyim, S. Udomkit, A. 2016. Cholesterol-based cationic liposome increases dsRNA protection of yellow head virus infection in *Penaeus vannamei*. J Biotechnol. 228, 95-102. Doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.04.049.
- Thielmann, M., Corteville, D., Szabo, G., Swaminathan, M., Lamy, A., Lehner, L. J., Brown, C. D., Noiseux, N., Atta, M. G., Squiers, E. C., Erlich, S., Rothenstein, D., Molitoris, B., Mazer, C. D. 2021. Tepasiran, a small interfering RNA, for the prevention of acute kidney injury in high-risk patients undergoing cardiac surgery: A randomized clinical study. Circulation. 144(14), 1133-1144. Doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.053029.
- Worawittayatada, J., Angsujinda, K., Sinnuengnong, R., Attasart, P., Smith, D. R. Assavalapsakul, W. 2022. Simultaneous production of a virus-like particle linked to dsRNA to enhance dsRNA delivery for yellow head virus inhibition. Viruses. 14(12), 2594. Doi: 10.3390/v14122594.
-



สารเสาวภา

Queen Saovabha Memorial Institute Bulletin



การพัฒนาการตรวจหาเชื้อไวรัสระบบทางเดินหายใจในงูโดยใช้เทคนิค RPA/CRISPR-Cas12a

Development of diagnostic assays for snake respiratory virus based on the RPA/CRISPR-Cas12a technique

อภิญา ลงยา

Apinya Longya

ฝ่ายวิจัยและพัฒนา สถานเสาวภา สภากาชาดไทย

Department of Research and Development, Queen Saovabha Memorial Institute, Thai Red Cross Society

บทคัดย่อ: ปัจจุบันสัตว์เลี้ยงแปลก (Exotic pet) ได้รับความนิยมในประเทศไทย งูสวยงามเป็นสัตว์เลี้ยงแปลกที่ได้รับความนิยมสูงสุด โดยเฉพาะกลุ่มงูหลามบอลเนื่องจากนิสัยที่ไม่ก้าวร้าว มีสีสันและลวดลายสวยงามจึงมีผู้นิยมเลี้ยงจำนวนมาก มีการนำเข้าและมีฟาร์มเพาะพันธุ์งูหลามบอลเพื่อให้ได้สีสันและลวดลายใหม่ๆ มากขึ้น งูสวยงามจึงเป็นสัตว์เลี้ยงแปลกอีกกลุ่มหนึ่งที่มีความสำคัญและสามารถสร้างมูลค่าทางเศรษฐกิจในวงการสัตว์เลี้ยง โรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจของงูมักพบในงู ส่งผลให้เกิดอัตราการเจ็บป่วยและอัตราการตายสูง โดยสาเหตุหลักคือการติดเชื้อไวรัส ผู้วิจัยจึงได้พัฒนาเทคนิค Recombinase Polymerase Amplification (RPA) ร่วมกับ CRISPR/Cas12 เพื่อเพิ่มความไว ความจำเพาะ และลดเวลาในการตรวจวินิจฉัย อ่านผลได้ง่ายและไม่ต้องใช้เครื่องมือที่ยุ่งยาก โดยอาศัยการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วยอุณหภูมิเดียว และการตัดตัวอ่านผลสัญญาณด้วยเทคนิค CRISPR/Cas12 แพลตฟอร์มการตรวจจับที่รวดเร็ว ผลการตรวจหาเชื้อไวรัสระบบทางเดินหายใจในงูโดยใช้เทคนิค RPA/CRISPR-Cas12a พบว่าการทำปฏิกิริยา RPA 15 นาที และปฏิกิริยา CRISPR/Cas12 15 นาที สามารถวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสได้ด้วยตาเปล่าภายใต้หลอดไฟ LED ที่ความเข้มข้นของเขื่อน้อยสุดที่สามารถตรวจได้คือ 2.6×10^8 ng/ μ L

คำสำคัญ: คริสเปอร์-แคส สัตว์เลี้ยงแปลก โรคระบบทางเดินหายใจ อาร์พีเอ

ABSTRACT: The pet snake business has gained popularity in Thailand, with ball pythons (*Python regius*) being the most popular exotic pet due to their diverse morphology, including unique body colors, and their friendly behavior. Respiratory diseases are commonly observed in both captive and wild snakes, often caused by snake viruses. This study focuses on viruses that are frequently found in Python's respiratory tracts. The development of an RT-RPA/Cas12 rapid diagnostic test for respiratory viruses in snakes could benefit clinical diagnosis, research, and snake breeding farms. This technique combines Recombinase Polymerase Amplification (RPA) and CRISPR-Cas, offering a fast, easy-to-use, cost-effective method that enables the screening of infected snakes from healthy snakes. It was found that the RPA reaction can be completed in just 15 minutes, and the CRISPR/Cas12 reaction can also be completed in 15 minutes, allowing for pathogen diagnosis with the naked eye under LED light. The lowest detectable pathogen concentration is 2.6×10^8 ng/ μ L

Keywords: CRISPR-Cas12, Respiratory disease, RPA, Pet snake

บทนำ

ปัจจุบันงูสวยงามได้กลายมาเป็นสิ่งมีชีวิตที่ได้รับความนิยมในวงการสัตว์เลี้ยงแปลก (Exotic pets) ซึ่งสามารถเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจให้กับประเทศได้เป็นอย่างมาก เนื่องจากงูไม่มีพิษบางชนิดมีลวดลายสีสันทที่สวยงาม มีความหลากหลายของลักษณะที่ปรากฏ สายพันธุ์ที่นิยมเลี้ยงในประเทศไทย ได้แก่ Corn snake (งูข้าวโพด) Ball python (งูบอลไพธอน/งูหลามบอล) Mexican black king snake (งูแบล็คคิง/งูดำ) Milk snake (งูมิลค์) Hog-nose snake (งูฮ็อกโนส/งูจมูกหมู) Rainbow water snake (งูสายรุ้ง) ปัญหาที่มักพบในงูทั้งระบบเลี้ยงและระบบธรรมชาติ คือการติดเชื้อแบคทีเรียและไวรัส ซึ่งส่งผลต่อระบบต่างๆ ภายในร่างกายของงู ทำให้เกิดความผิดปกติและแสดงอาการเจ็บป่วยออกมา โดยเฉพาะการติดเชื้อไวรัสเนื่องจากทำให้เกิดการแพร่ระบาดของโรคได้อย่างรวดเร็ว ติดต่อกันได้ง่ายผ่านการสัมผัส และการเลี้ยงรวมกับงูที่ติดเชื้อ จากข้อมูลการจัดการด้านสุขภาพ การตรวจวินิจฉัย และการรักษาที่คลินิกสัตว์เลี้ยงคลาน สถานเสาวภา พบว่าปัญหาส่วนใหญ่เกิดความผิดปกติของระบบทางเดินหายใจ และมีอาการปากอักเสบ

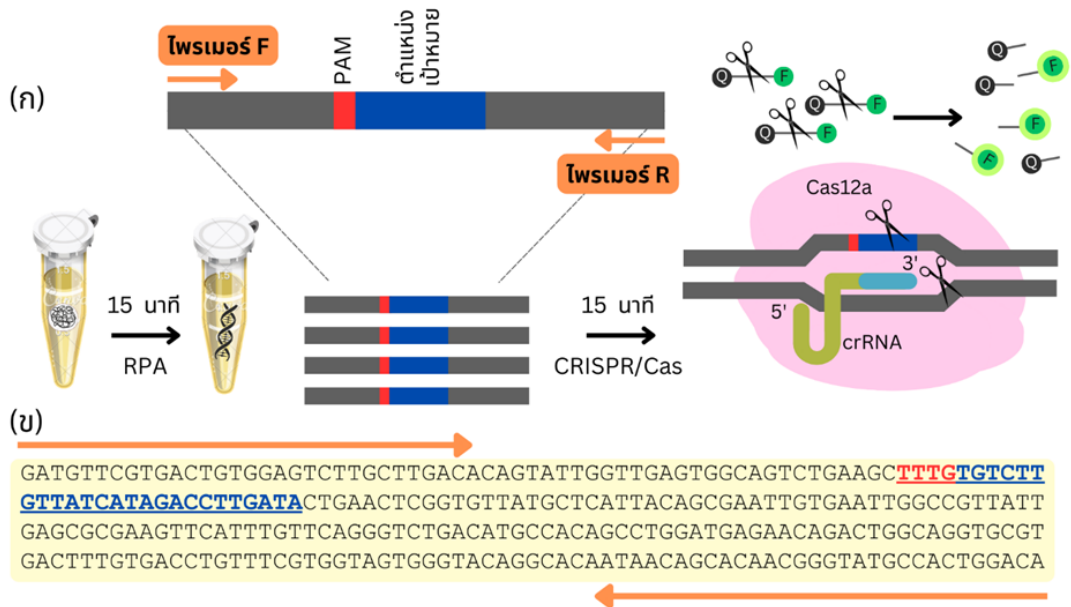
จากงานวิจัยพบว่าโรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจของงูมักพบในงูเลี้ยง ส่งผลให้เกิดอัตราการเจ็บป่วยและอัตราการตายที่สูง โดยพบว่าไวรัสเป็นสาเหตุของการเกิดโรค ไวรัสที่พบบ่อยในงูได้แก่ ไวรัสวงศ์พารามิกโซ (Paramyxoviridae) ไวรัสวงศ์นี้เป็นวงศ์ของเชื้อไวรัสก่อโรคสำคัญที่มักพบได้ในกลุ่มสัตว์เลี้ยงคลาน ไวรัสกลุ่มนี้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 200 - 300 นาโนเมตร (nm) ประกอบไปด้วยโปรตีนเปลือกนอก (Capsid) ทำหน้าที่ห่อหุ้มสารพันธุกรรมอาร์เอ็นเอ (Ribonucleic acid; RNA) แบบสายเดี่ยว (Single stranded RNA) ที่อยู่ในไวรัสวงศ์นี้ประกอบด้วยสกุลซันไชน์ (Sunshinevirus) เฟอร์ลา (Ferlavirus) และสกุลอื่นๆ นอกจากนี้ ไวรัสชนิด (Nidovirus) เป็นเชื้อไวรัสก่อ

โรคที่สำคัญในสัตว์เลี้ยงคลาน ซึ่งไวรัสชนิดนี้จัดอยู่ในวงศ์โคโรนา (Coronaviridae) ซึ่งเคยอยู่ในวงศ์ย่อยของโคโรนา (Coronavirinae) มีจีโนมเป็น Positive stranded RNA มีการแพร่เชื้อในสัตว์มีกระดูกสันหลังและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ซึ่งหลายชนิดทำให้เกิดโรคร้ายแรงทั้งในคนและสัตว์ การติดเชื้อในคนอาจส่งผลได้หลากหลายตั้งแต่การติดเชื้อที่ไม่แสดงอาการไปจนถึงการเจ็บป่วยและตาย เช่น กลุ่มอาการทางเดินหายใจเฉียบพลันรุนแรง (SARS-CoV) และกลุ่มอาการทางเดินหายใจตะวันออกกลาง (MERS-CoV) กลุ่มนี้ยังรวมถึงไวรัสที่ก่อให้เกิดการแพร่ระบาดทั่วโลกของโควิด-19 เป็นต้น ตั้งแต่ปี 2014 มีการค้นพบไวรัสซอร์เฟนโตในงูทั่วโลก ส่วนใหญ่เป็นงูเลี้ยงสายพันธุ์ Pythonidae เช่นเดียวกับงูหลามบอล โรคปอดบวมและปากอักเสบเป็นโรคที่รุนแรงและมักทำให้ถึงแก่ชีวิตในงูเลี้ยงที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสชนิด มีตัวอย่างการวินิจฉัยไวรัสในงู เช่น การศึกษาของ Rampacci และคณะในปี 2019 ได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อไวรัสก่อโรคในงูหลามบอล ที่เกิดจากเชื้อไวรัสในวงศ์นี้ด้วยวิธีการ Toehold Reverse Transcription Polymerase Reaction (RT-PCR) โดยการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน ORF1a และยีน L การตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อในสัตว์เลี้ยงคลานเป็นสิ่งสำคัญและจำเป็นต้องมีการพัฒนาองค์ความรู้และวิธีการอย่างต่อเนื่อง ปัจจุบันมีการค้นพบเชื้อก่อโรคในสัตว์เลี้ยงคลานและพบการแพร่กระจายอย่างกว้างขวางมากยิ่งขึ้น ซึ่งโรคติดเชื้อไวรัสในงูสามารถพบได้ทั้งในงูที่อยู่ในระบบเลี้ยงและงูที่อยู่ตามธรรมชาติ ปัญหาที่พบของลักษณะอาการของงูในบางครั้งจะไม่มีอาการแสดงลักษณะของอาการที่มีความจำเพาะ ซึ่งอาจประสบปัญหาในการวินิจฉัยอาการของงูจากลักษณะภายนอก ทำให้เป็นอุปสรรคต่อการดำเนินการรักษา หนึ่งในโรคติดเชื้อที่กำลังระบาดคือการติดเชื้อไวรัสเซอร์เฟนโต ซึ่งพบได้ในกลุ่มงูหลาม และงูหลามบอล งูจะมีอาการของระบบหายใจ มีการแพร่และการกระจายเชื้ออย่าง

รวดเร็วกว่าการสัมผัส และวัสดุปูลอง ยังไม่มีรายงานแน่ชัดว่าเชื้อไวรัสโคโรนาสามารถแพร่ผ่านทางอากาศได้หรือไม่ การตรวจหาเชื้อไวรัสโคโรนาในปัจจุบันสามารถทำได้ด้วยวิธีการทางห้องปฏิบัติการโดยการตรวจหาเชื้อไวรัสด้วยวิธี RT-PCR ซึ่งต้องใช้เวลา 1-2 วัน และต้องดำเนินการโดยผู้เชี่ยวชาญ มีการใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่จำเพาะและมีราคาสูง จึงทำให้การตรวจไวรัสยังไม่เป็นที่นิยมในคลินิกสัตว์เลี้ยงแปลกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมโดยทั่วไป ผู้วิจัยจึงพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสโคโรนาอย่างง่ายและรวดเร็ว สามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่า โดยอาศัยหลักการการทำงานของเทคนิค Recombinase Polymerase Amplification (RPA) ร่วมกับ CRISPR-Cas ซึ่งสามารถอ่านผลได้ภายใน 1 ชั่วโมง และไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่ซับซ้อนราคาแพง ทำให้สามารถใช้ตรวจคัดกรองและจัดการแยกกำจัดเชื้อออกจากตัวอื่นได้ เพื่อลดการแพร่ระบาดและการสูญเสียได้

เทคนิค RPA ถูกพัฒนาขึ้นในปี พ.ศ. 2549 โดย Piepenburg และคณะ ภายใต้บริษัท ASM Scientific (ปัจจุบันคือบริษัท TwistDxTM Limited เมืองเคมบริดจ์ ประเทศอังกฤษ) หลักการของเทคนิค RPA อาศัยคุณสมบัติของเอนไซม์ Recombinase ที่สามารถจับเป็นโมเลกุลเชิงซ้อนกับไพรเมอร์ (Recombinase-primer complex) ในการแยกดีเอ็นเอสายคู่ให้กลายเป็นสายเดี่ยว เพื่อให้บริเวณคู่สมของไพรเมอร์บนสายแม่แบบเปิดออก แทนที่จะใช้การเพิ่มอุณหภูมิอย่างในเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase chain reaction, PCR) จากนั้นโปรตีน Single strand DNA binding protein (SSB) จะเข้าไปจับที่ดีเอ็นเอสายเดี่ยวเพื่อป้องกันไม่ให้ดีเอ็นเอทั้งสองสายเข้าจับคู่กันใหม่ หลังจากนั้นโมเลกุลเชิงซ้อน (Recombinase-primer complex) ดังกล่าวจะหลุดออกจากกันและถูกแทนที่ด้วยเอนไซม์ DNA polymerase บนดีเอ็นเอสายเดี่ยวทำให้เกิดปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนของสารพันธุกรรม และเนื่องจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนั้นคล้ายคลึงกับในเซลล์มนุษย์อุณหภูมิที่ใช้ในเทคนิค RPA จึงเป็นอุณหภูมิเดียวที่อยู่ในช่วง 37 - 42 องศาเซลเซียส โดยทั่วไปผลลัพธ์จะเสร็จภายใน 3 - 10 นาที ทำให้ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือควบคุมอุณหภูมิ (Thermocycler หรือ PCR machine) นอกจากนี้ มีรายงานว่าเทคนิคนี้มี

ความจำเพาะและความไวสูงถึงแม้จะมีดีเอ็นเอเป้าหมายน้อยกว่า 10 ลำเนาก็สามารถตรวจพบได้ (Piepenburg et al, 2006) เทคนิค RPA จึงเป็นอีกหนึ่งเทคนิคที่น่าสนใจในการประยุกต์ และพัฒนาสำหรับชุดตรวจวินิจฉัยเชื้อก่อโรคต่างๆ เช่น ไวรัสโคโรนา-19 เนื่องจากราคาไม่แพง รวดเร็ว ไม่ต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญ สามารถประยุกต์ใช้ได้กับทั้ง DNA และ RNA มีรายงานการพัฒนาชุดทดสอบ Ultra-high sensitivity, One-pot RNA detection assays โดยการใช้ Reverse transcriptase ร่วมกับปฏิกิริยา RPA มีการทำปฏิกิริยาพร้อมกันหลายๆ ไพรเมอร์ (Multiplexing) โดยการผสม Multiple primers ในหลอดทดลองเดียว สามารถเพิ่มจำนวนและวัดผลเป้าหมายแตกต่างกันได้พร้อมกัน ระบบ CRISPR-Cas เป็นกลไกระบบภูมิคุ้มกันแบบหนึ่งของแบคทีเรีย การทำงานคล้ายการทำงานของ RNA interference (RNAi) โดยยีน CRISPR และยีน Cas จะทำงานร่วมกัน ทำให้โปรตีน Cas เข้าไปจับและทำลายยีนเป้าหมาย นักวิทยาศาสตร์จึงนำระบบ CRISPR-Cas มาประยุกต์แก้ไขพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต มีการนำมาตรวจหาเป้าหมายโดยเฉพาะเอนไซม์ Cas12 และ Cas13 ซึ่งมีคุณสมบัติตัดสาย DNA หรือ RNA เป้าหมายทำให้สามารถนำไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยหาเชื้อก่อโรคต่างๆ ได้ โดยสามารถอ่านผลฟลูออเรสเซนซ์ได้ด้วยตาเปล่า จึงได้มีการพัฒนาเทคนิค CRISPR/Cas12 ร่วมกับ RPA (รูปที่ 1) เพื่อเพิ่มความไว ความจำเพาะ และลดเวลาในการตรวจวินิจฉัย ทำให้ไม่ต้องใช้เครื่องมือที่ยุ่งยากและอ่านผลได้ง่าย



รูปที่ 1 ภาพจำลองการออกแบบไพรเมอร์ ตำแหน่ง PAM และตำแหน่งเป้าหมาย เพื่อพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยที่อาศัยการทำงานร่วมกันของ CRISPR/Cas12 ร่วมกับ RPA (ก) แสดงการทำงานภาพรวมของเทคนิค RPA ร่วมกับ CRISPR/Cas12 (ข) แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเป้าหมาย ไพรเมอร์ ตำแหน่ง PAM และตำแหน่งตัดของ CRISPR/Cas12

ขั้นตอนและวิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่าง

สืบค้นข้อมูลจีโนมของไวรัสชนิดจากฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) เพื่อนำมาสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ส่วนที่จำเพาะกับไวรัสที่สนใจ (บริษัท Macrogen) จากนั้นนำมาเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะโดยวิธี PCR โดยใช้ชุดเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 1X GoTaq® Colorless MasterMix (Promega, USA) ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้ว ตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส บน 1.5% เจลอะกาโรส และนำมาทำบริสุทธิ์ด้วย GEL/PCR Purification Mini Kit (Favor- Prep™) และนำไปวัดความเข้มข้นด้วยเครื่องนาโนดรอป

2. การออกแบบไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยา RPA และไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยา CRISPR/Cas

สืบค้นข้อมูลจีโนมของไวรัสชนิดจากฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) มาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยา

RPA โดยมีความยาวไพรเมอร์ 30-35 เบส เพื่อนำมาใช้ทดสอบในปฏิกิริยาอาร์พีเอ (รูปที่ 1) และไพรเมอร์ที่จำเพาะสำหรับการอ่านผลโดยอาศัยตัวรายงานที่เป็นฟลูออเรสเซนต์ คือ 5'-6-FAM-TTAT TATT-BHQ1-3'

3. การออกแบบ Guide RNA (crRNA)

ใช้โปรแกรม TrueGuide Synthetic CRISPR gRNA ซึ่งเป็นเป็น Ready-to-transfect CRISPR guide RNAs ซึ่งถูกออกแบบด้วย Algorithm ที่เป็นลิขสิทธิ์เฉพาะสำหรับ High-efficiency editing และทำ Chemical modifications โดยในการออกแบบ gRNA นั้นจะต้องคำนึงถึง Spacer หรือลำดับเบสที่ตรงกับ DNA จะไปตัดบน Cas protein และ PAM คือ ลำดับเบส 4 ตัว (TTTV) ที่จำเพาะของ Cas (รูปที่ 1)

4. ปฏิกิริยา Recombinase polymerase amplification (RPA) และ CRISPR/Cas12a

ละลายตะกอน RPA ด้วย Rehydration buffer 29.5 ไมโครลิตร (TwistAmp basic RPA

kit) เติมไพรเมอร์ (10 µM) ข้างละ 2.4 ไมโครลิตร น้ำ Nuclease-free 10.45 ไมโครลิตร ตัวอย่างทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ 4 ไมโครลิตร และ MgAc (280 mM), 1.25 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 5-60 นาที

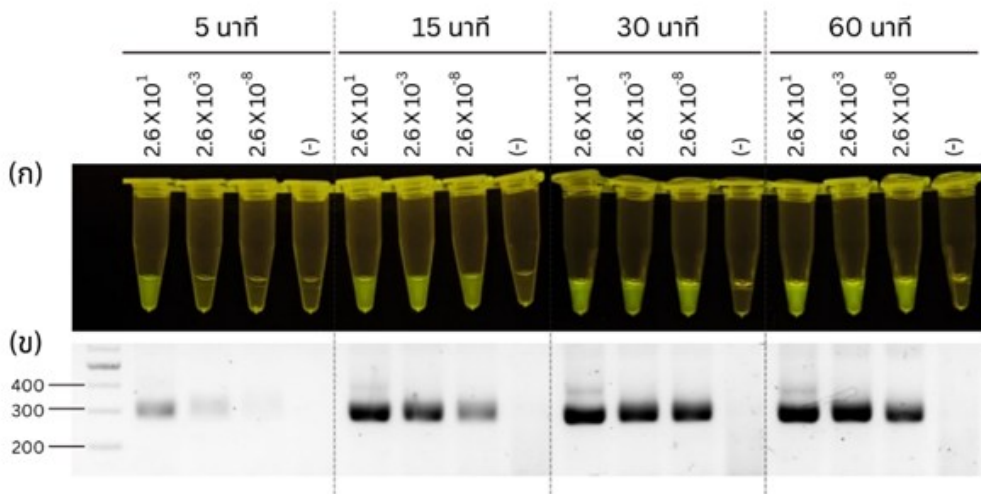
5. การอ่านผลโดยอาศัยตัวรายงานที่เป็นฟลูออเรสเซนต์

ผสมสารในปฏิกิริยา CRISPR/Cas12a ประกอบด้วย NEBuffer 3.1 (10x) 2 ไมโครลิตร LbCas12a (100 ng/µL) 2 ไมโครลิตร crRNA (100 nM) 1 ไมโครลิตร และโพรบ 1 ไมโครลิตร ผลผลิตจากปฏิกิริยา RPA 1 ไมโครลิตร และ Nuclease-free water 13 ไมโครลิตร รวม 20 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 10 นาที เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา นำมาถ่ายภาพภายใต้หลอดไฟ LED

ผลและการอภิปราย

1. การทดสอบเวลาที่เหมาะสมในการบ่มปฏิกิริยา Recombinase Polymerase Amplification (RPA) RPA มีหลักการ

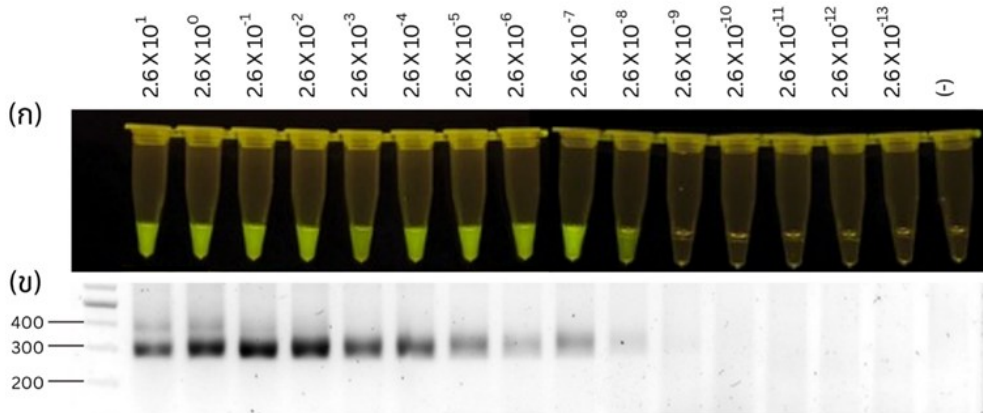
ทำงานเพื่อเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมายของไวรัสโดยมีจุดเด่นคือสามารถทำงานได้ที่สภาวะอุณหภูมิคงที่ (Isothermal amplification) จึงไม่ต้องใช้เครื่องมือที่ยุ่งยากราคาแพง และใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาไม่นาน จากผลการทดลองบ่ม RPA ที่เวลา 5 15 30 และ 60 นาที ด้วยความเข้มข้นของสารพันธุกรรม (DNA) จากเชื้อไวรัสความเข้มข้นสูง (2.6×10^1) กลาง (2.6×10^{-3}) และความเข้มข้นต่ำ (2.6×10^{-8}) ng/µL พบว่าการบ่ม RPA 5 นาที สามารถตรวจเชื้อที่มีความเข้มข้นสูงได้ แต่ไม่สามารถตรวจปริมาณไวรัสกลางและต่ำได้ ในขณะที่เวลา 15 30 และ 60 นาที สามารถวินิจฉัยผลบวกได้ทุกความเข้มข้นของเชื้อ (รูปที่ 2) จึงสรุปได้ว่าเวลาในการบ่มปฏิกิริยา RPA ในการตรวจหาเชื้อไวรัสในงูที่พัฒนาขึ้นครั้งนี้ที่เหมาะสมที่สุด คือ 15 นาที เนื่องจากเพียงพอในการทำปฏิกิริยาที่เชื้อมีความเข้มข้นน้อยได้



รูปที่ 2 แสดงผลของเวลาในการทำปฏิกิริยา Recombinase Polymerase Amplification (RPA) ที่เวลา 5 15 30 และ 60 นาที (ก) แสดงการอ่านผลโดยอาศัยตัวรายงานที่เป็นฟลูออเรสเซนต์ จากปฏิกิริยา CRISPR/Cas12 (ข) แสดงผลผลิตจากปฏิกิริยา RPA ที่ตรวจสอบด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิส บน 1.5% เจลอะกาโรส

2. ปริมาณของเชื้อน้อยที่สุดที่สามารถทดสอบได้

เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเชื้อไวรัสด้วยวิธี PCR และทำให้บริสุทธิ์ จากนั้นนำไปวัดความเข้มข้นด้วยเครื่องนาโนทรอปได้ความเข้มข้น 260 ng/µL เมื่อนำมาเจือจาง 10 เท่า เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 2.6×10^1 - 2.6×10^{-13} ng/µL และนำไปทดสอบด้วย RPA ร่วมกับ CRISPR/Cas12 พบว่าสามารถตรวจให้ผลบวกตั้งแต่ความเข้มข้น 2.6×10^1 - 2.6×10^{-8} ng/µL (รูปที่ 3) จึงสรุปได้ว่าวิธีการที่พัฒนานี้สามารถตรวจไวรัสในทางเดินหายใจที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 2.6×10^{-8} ng/µL ขึ้นไป



รูปที่ 3 แสดงผลปริมาณเชื้อไวรัสที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจสอบได้ด้วยการทำปฏิกิริยา RPA 15 นาทีพร้อมกับ CRISPR/Cas 15 นาที
 (ก) แสดงผลโดยอาศัยตัวรายงานที่เป็นฟลูออเรสเซนต์ จากปฏิกิริยา CRISPR/Cas12
 (ข) แสดงผลผลิตจากปฏิกิริยา RPA ด้วยการนำไปตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส บน 1.5% เจลอะกาโรส

ผลการทดลองเบื้องต้นประสบความสำเร็จในการพัฒนาเทคนิคการตรวจหาเชื้อไวรัสระบบทางเดินหายใจในงูโดยใช้เทคโนโลยี RPA/CRISPR-Cas 12a และก่อนนำไปใช้ตรวจจริงจำเป็นต้องมีการทดสอบความจำเพาะกับไวรัสชนิดอื่น เพื่อไม่ให้เกิดผลบวกปลอม และยังคงต้องศึกษาเพิ่มเติมโดยเปรียบเทียบกับวิธีดั้งเดิมที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสในงู เช่น วิธี PCR หรือ Real-time PCR

เอกสารอ้างอิง

Chen, J. S., Ma, E., Harrington, L. B., Costa, M. D., Tian, X., Palefsky, J. M., Doudna, J. A. 2018. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science*. 360, 436-439.

Parrish, K., Kirkland, P. D., Skerratt, L. F., Ariel, E. 2021. Nidoviruses in reptiles: A review. *Front. Vet. Sci.* Doi: 10.3389/fvets.2021.733404

Rampacci, E., Masi, M., Origgi, F. C., Stefanetti, V., Bottinelli, M., Selleri, P., Coletti, M., Passamonti, F. 2019. First molecular detection of ball python nidovirus in

Italy. *Acta Vet. Hung.* 67(1): 127-134. Doi: 10.1556/004.2019.014.

Stenglein, M. D., Jacobson, E. R., Wozniak, E. J., Wellehan, J. F., Kincaid, A., Gordon, M., Porter, B. F., Baumgartner, W., Stahl, S., Kelley, K., Towner, J. S., De Risi, J. L. 2014. Ball python nidovirus: a candidate etiologic agent for severe respiratory disease in *Python regius*. *mBio*. 5(5), e01484-14. DOI: 10.1128/mBio.01484-14

Tan, M., Liao, C., Liang, L., Yi, X., Zhou, Z., Wei, G. 2022. Recent advances in recombinase polymerase amplification: Principle, advantages, disadvantages, and applications. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* Doi: 10.3389/fcimb.2022.1019071

Uccellini, L., Ossiboff, R. J., de Matos, R. E., Morrissey, J. K., Petrosov, A., Navarrete-Macias, I., Jain, K., Hicks, A. L., Buckles, E. L., Tokarz, R., McAloose, D., Lipkin, W. I. 2014. Identification of a novel nidovirus in an outbreak of fatal respiratory disease in ball pythons (*Python regius*). *Virology*. Doi: 10.1186/1743-422X-11-144



สารเสาวภา

Queen Saovabha Memorial Institute Bulletin



การศึกษาขนาดของเอ็กโซโซมในพิษงูเห่าไทยและการเปรียบเทียบบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัดโปรตีน

Effective exosome isolation from Siamese cobra venom: insights into exosome size and lysis buffer selection for protein extraction

กมลวรรณ เขียนไชยจันทร์

Kamolwan Khianchaikhan

ฝ่ายวิจัยและพัฒนา สถานเสาวภา สภากาชาดไทย

Department of Research and Development, Queen Saovabha Memorial Institute, Thai Red Cross Society

บทคัดย่อ: เอ็กโซโซม (Exosomes) ในพิษงูส่งผลกระทบอย่างรุนแรงต่อเซลล์ที่ได้รับพิษและทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับเซลล์และการสื่อสารระหว่างเซลล์ อย่างไรก็ตามยังไม่มีกรรายงานเกี่ยวกับเอ็กโซโซมในพิษงูเห่าไทย (*Naja kaouthia*) ดังนั้นการศึกษานี้ได้ทำการแยกเอ็กโซโซมจากพิษงูเห่าไทยด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยงตกตะกอนแบบยิ่งยวด และตรวจสอบขนาดของเอ็กโซโซมด้วยเครื่องวิเคราะห์ขนาดอนุภาคในระดับนาโนเมตร พบว่าตัวอย่าง P20K มีขนาดเอ็กโซโซมอยู่ระหว่าง 70 ถึง 200 nm ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าในตัวอย่าง P120K ที่มีขนาดอยู่ระหว่าง 50 ถึง 150 nm นอกจากนี้เมื่อวัดปริมาณโปรตีนที่สกัดจากเอ็กโซโซมทั้งในตัวอย่าง P20K และ P120K พบว่า RIPA Lysis buffer สามารถสกัดโปรตีนได้ปริมาณที่มากกว่า CHAPS Lysis buffer ดังนั้นการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าวิธีปั่นเหวี่ยงตกตะกอนแบบยิ่งยวดรวมกับการใช้ RIPA Lysis buffer เป็นวิธีที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างเอ็กโซโซม เพื่อการศึกษาโปรตีนและโมเลกุลสำคัญอื่นๆ ของเอ็กโซโซมในพิษงูเห่าไทย

คำสำคัญ: เอ็กโซโซม พิษงูเห่าไทย การปั่นเหวี่ยงตกตะกอนแบบยิ่งยวด

ABSTRACT: Exosomes derived from snake venom demonstrate significant effects on venom-exposed cells, leading to alterations at both the cellular and intercellular communication levels. However, research on exosomes in Siamese cobra venom (*Naja kaouthia*) remains limited. This study aimed to isolate exosomes from Siamese cobra venom using ultracentrifugation and to analyze their sizes using a nanoparticle size analyzer. The results indicated that the P20K sample exhibited exosome sizes ranging from 70 to 200 nm, which were larger than those observed in the P120K sample, which ranged from 50 to 150 nm. Furthermore, when assessing the protein yield from exosomes in both the P20K and P120K samples, it was determined that RIPA Lysis buffer enabled a more efficient extraction of proteins than CHAPS Lysis buffer. These findings indicate that the use of ultracentrifugation for exosome isolation, combined with RIPA Lysis buffer for protein extraction, represents an appropriate approach for subsequent investigations into the proteins and other key biomolecules present in exosomes derived from Siamese cobra venom.

Keywords: Exosome, Snake venom, Siamese cobra, Ultracentrifugation

บทนำ

เอ็กโซโซม (Exosomes) เป็นถุงที่สร้างขึ้นภายในเซลล์และจะถูกปล่อยออกมาจากเซลล์ โดยรวมกับส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ มีขนาดระหว่าง 30 ถึง 200 นาโนเมตร ภายในบรรจุสารชีวโมเลกุลต่างๆ เช่น กรดนิวคลีอิก (DNA, RNA หรือ miRNA) โปรตีน ลิพิด และเมตาบอไลต์ มีบทบาทสำคัญในการเป็นตัวกลางสำหรับการสื่อสารระหว่างเซลล์ผ่านการถ่ายโอนสารชีวโมเลกุลต่างๆ และปกป้องโมเลกุลดังกล่าวให้ไปถึงเซลล์ผู้รับ เพื่อควบคุมกระบวนการทางสรีรวิทยาและพยาธิวิทยา เอ็กโซโซมจัดเป็น Extracellular vesicles ที่ได้รับการศึกษามากที่สุด เนื่องจากเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่สำคัญและเป็นเป้าหมายในการรักษาโรคต่างๆ ได้ (Raposo and Stoorvogel, 2013; Mathiesen et al., 2021; van Niel et al., 2022; Kumar et al., 2024)

การศึกษาก่อนหน้าเกี่ยวกับเอ็กโซโซมในพิษงูที่เป็นพิษต่อระบบเลือด ได้แก่ งูในสกุล *Crotalus*, *Agkistrodon contortrix* และ *Bothrops jararaca* พบว่าโปรตีนจากเอ็กโซโซมของพิษงูสามารถกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ผู้รับ เช่น ชัดขวางกลไกการห้ามเลือด (Hemostatic system) ทำลายการทำงานของไฟบริโนเจน (Fibrinogen) กระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์ (Apoptosis) ทำให้เกิดการอักเสบ (Inflammation) และปัญหาทางระบบภูมิคุ้มกัน และเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนที่บรรจุในเอ็กโซโซมที่หลั่งออกมาจากเซลล์ที่ได้รับพิษกับเซลล์ที่ไม่ได้รับพิษ พบว่าองค์ประกอบของโปรตีนภายในเอ็กโซโซมมีความแตกต่างไปจากเดิม แสดงให้เห็นถึงผลของพิษงูต่อการเปลี่ยนแปลงในระดับเซลล์และการสื่อสารระหว่างเซลล์ ดังนั้นบทบาทของเอ็กโซโซมในพิษงูจึงถูกคาดการณ์ว่าอาจส่งผลกระทบต่ออย่างรุนแรงในระยะยาวต่อผู้ที่ได้รับพิษ (Long-term effect) (Souza-Imber et al., 2017; Carregari et al., 2018; Willard et al., 2021; Gonçalves-Machado et al., 2022; Nagendra

et al., 2024) นอกจากนี้มีการศึกษา miRNA ในเอ็กโซโซมของพิษงู *Naja atra* ที่เป็นพิษต่อระบบประสาท พบ miRNA หลายชนิดในเอ็กโซโซม ซึ่งมีบทบาทเกี่ยวกับการอยู่รอดของเซลล์ และมีบทบาทสร้างความเสียหายต่อกล้ามเนื้อ ตับ ไต ในหนูทดลอง ดังนั้นเอ็กโซโซมในพิษงูจึงมีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยนแปลงระดับเซลล์และส่งผลกระทบต่ออย่างรุนแรงทั้งในระยะสั้นและระยะยาวต่อเซลล์ที่ได้รับพิษ ข้อมูลที่ได้ในระดับเซลล์นี้จะสามารถนำไปประยุกต์ต่อแนวทางการรักษาใหม่ๆ ต่อไป (Liao et al., 2023; Kumar et al., 2024)

อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการรายงานเกี่ยวกับเอ็กโซโซมในพิษงูเห่าไทย (*Naja kaouthia*) ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาเอ็กโซโซมในพิษงูเห่าไทย (*Naja kaouthia*) เพื่อศึกษาขนาดของเอ็กโซโซมจากพิษงูเห่าไทย รวมทั้งเปรียบเทียบกับ Lysis buffer ที่ใช้ในการสกัดโปรตีนจากเอ็กโซโซม การศึกษานี้จะทำให้ได้วิธีการที่เหมาะสมในการศึกษาโปรตีนหรือโมเลกุลอื่นๆ ที่สำคัญในเอ็กโซโซมในพิษงูเห่าไทยต่อไป

วิธีการศึกษา

การสกัดเอ็กโซโซมจากพิษงูสด

เจือจางพิษงูเห่าไทยสดปริมาตร 6 มิลลิลิตร ด้วย 1X PBS pH 7.4 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 8,000 xg เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เก็บเฉพาะของเหลวเหนือตะกอนไปผ่านการกรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.22 µm จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนแบบยิ่งยวดที่ความเร็ว 20,000 xg เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 °C เก็บตะกอนด้านล่างเป็นตัวตัวอย่างครั้งแรก (P20K) และเก็บของเหลวเหนือตะกอนไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนแบบยิ่งยวดที่ความเร็ว 120,000 xg เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 °C เก็บตะกอนเป็นตัวตัวอย่างครั้งที่สอง (P120K) ตะกอนที่ได้จากการปั่นแยกทั้งสองครั้ง (P20K และ P120K)

จะถูกนำมาล้างด้วย PBS แล้วปั่นตามความเร็วของแต่ละตัวอย่าง จากนั้นทำให้เป็นสารแขวนลอยอีกครั้งโดยการเติม 1X PBS pH 7.4 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร

การวัดขนาดอนุภาคเอ็กโซโซมที่แยกได้จากพิษงู

นำ 80 ไมโครลิตร ของเอ็กโซโซมที่อยู่ใน PBS จากตัวอย่างที่ปั่นแยกทั้งสองครั้ง (P20K และ P120K) มาทำให้เจือจาง 10 เท่า (เติม PBS ปริมาตร 720 ไมโครลิตร) จากนั้นนำไปวัดขนาดอนุภาคด้วยเครื่องวิเคราะห์หาขนาดอนุภาคในระดับนาโนเมตร (Nano-particle size analyzer)

การสกัดโปรตีนจากเอ็กโซโซมโดยใช้บัฟเฟอร์ CHAPS และบัฟเฟอร์ RIPA

สกัดโปรตีนในตัวอย่างเอ็กโซโซมจากการปั่นแยกครั้งที่ 1 (P20K) และครั้งที่ 2 (P120K) ด้วย Lysis buffer 2 ชนิดที่แตกต่างกัน เพื่อเปรียบเทียบ Lysis buffer ที่เหมาะสมสำหรับนำมาสกัดโปรตีนที่อยู่ในเอ็กโซโซม เริ่มจากนำ 200 ไมโครลิตร ของเอ็กโซโซมที่อยู่ใน PBS จาก ตัวอย่าง P20K และ P120K ตัวอย่างละ 2 หลอดทดลอง มาปั่นตามความเร็วของแต่ละตัวอย่างแล้วเก็บตะกอนด้านล่าง หลอดที่ 1 เติม CHAPS Lysis buffer (2 M thiourea, 7 M urea, 4% CHAPS, 30 mM Tris-HCl pH8.5 และ 1% Protease inhibitor cocktail) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หลอดที่ 2 เติม RIPA Lysis buffer (25mM Tris HCl pH 7.6, 150mM NaCl, 1% NP-40, 1% Sodium deoxycholate, 0.1% SDS และ 1% Protease inhibitor cocktail) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำทั้ง 2 หลอดทดลองบ่มในน้ำแข็ง นาน 30 นาที แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 xg เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 °C เก็บของเหลวเหนือตะกอนไปวัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford

ผลและอภิปรายผลการศึกษา

เอ็กโซโซมทั้ง 2 ตัวอย่างที่แยกได้จากการปั่นเหวี่ยงตกตะกอนแบบยิ่งยวดที่ความเร็ว 20,000 xg (P20K) และ 120,000 xg (P120K) ถูกนำมาวัดขนาดอนุภาค เพื่อยืนยันว่ามีขนาดที่เป็นอนุภาคเอ็กโซโซม และทดสอบการสกัดโปร-

ตีนจากเอ็กโซโซมที่ได้ด้วย Lysis buffer 2 ชนิด เพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมในการศึกษาโปรตีนหรือโมเลกุลอื่นๆ ที่สำคัญในเอ็กโซโซมในพิษงูเห่าไทย

การศึกษาขนาดของอนุภาคเอ็กโซโซมที่อยู่ใน PBS เมื่อทดสอบด้วยเครื่องวิเคราะห์หาขนาดอนุภาคในระดับนาโนเมตร พบว่าตัวอย่าง P20K มีขนาดอนุภาคอยู่ระหว่าง 70 ถึง 200 nm และตัวอย่าง P120K มีขนาดอนุภาคอยู่ระหว่าง 50 ถึง 150 nm (ตารางที่ 1) ซึ่งเอ็กโซโซมที่พบในตัวอย่าง P20K มีขนาดใหญ่กว่าขนาดของเอ็กโซโซมที่พบในตัวอย่าง P120K อย่างไรก็ตามเอ็กโซโซมที่พบในตัวอย่าง P20K และ P120K มีขนาดของอนุภาคที่อยู่ในช่วงเดียวกับอนุภาคเอ็กโซโซมที่เคยมีการรายงานอยู่ที่ขนาดระหว่าง 30 ถึง 200 nm (Raposo and Stoorvogel, 2013) นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบกับผลของขนาดเอ็กโซโซมในพิษงู *Bothrops jararaca* ซึ่งเป็นงูพิษต่อระบบเลือด พบว่าขนาดอนุภาคในตัวอย่าง P20K จากพิษงู *B. jararaca* อยู่ที่ขนาดระหว่าง 30 ถึง 1,000 nm มีขนาดของอนุภาคที่อยู่ในช่วงเดียวกับอนุภาคเอ็กโซโซม และ Microvesicles ที่มีขนาดใหญ่ได้ถึง 1,000 nm แต่ในการศึกษาเอ็กโซโซมในพิษงูเห่าไทยนี้ ได้นำของเหลวเหนือตะกอนไปผ่านการกรองด้วยเมมเบรน ขนาด 0.22 μm ก่อนที่จะนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนแบบ ยิ่งยวดที่ความเร็ว 20,000 xg ทำให้ขนาดอนุภาคที่ได้มีขนาดสูงสุดอยู่ที่ประมาณ 200 nm ในขณะที่ตัวอย่าง P20K จากพิษงู *B. jararaca* ไม่ได้ผ่านการกรอง จึงทำให้สามารถพบอนุภาคที่ใหญ่กว่าในการศึกษานี้ได้ ในขณะที่ตัวอย่าง P120K ที่มีขนาดอนุภาคอยู่ระหว่าง 50 ถึง 150 nm ให้ผลสอดคล้องกับขนาดอนุภาคในตัวอย่าง P100K จากพิษงู *B. jararaca* ที่มีขนาดอยู่ระหว่าง 30 ถึง 130 nm (Gonçalves-Machado et al., 2022) นอกจากนี้มีการศึกษาก่อนหน้าทำการแยก Extracellular vesicle (EVs) จากพิษงู 4 ชนิด คือ *Agkistrodon contortrix contortrix*, *Crotalus Cerberus oreganus*, *Crotalus atrox* และ *Crotalus viridis* ด้วย Size exclusion column ร่วมกับ ÄKTA chromatography system จากนั้นปั่นเหวี่ยงตกตะกอนแบบยิ่งยวดที่ความเร็ว 100,000 xg เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 °C และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิ-

ยาของ EVs โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) พบว่า EVs มีขนาดอยู่ระหว่าง 50 - 500 นาโนเมตร (Carregari et al., 2018) ดังนั้น Extracellular vesicle (EVs) รวมทั้งเอ็กโซโซมที่แยกได้จากพิษงู มีขนาดที่หลากหลาย ขึ้นอยู่กับชนิดของพิษงูและวิธีการแยกหรือการสกัดเอ็กโซโซม

ตารางที่ 1 แสดงขนาดของอนุภาคจากตัวอย่างเอ็กโซโซมของพิษงูเห่าไทยที่แยกได้จากการปั่นเหวี่ยงตกตะกอนแบบยิ่งยวด ครั้งที่ 1 (P20K) และการปั่นครั้งที่ 2 (P120K)

ตัวอย่าง	ขนาดอนุภาค (nm)
P20K	70 – 200
P120K	50 – 150

การศึกษาเปรียบเทียบ Lysis buffer 2 ชนิดคือ CHAPS Lysis buffer และ RIPA Lysis buffer ในการสกัดโปรตีนจากเอ็กโซโซมของพิษงูเห่าไทย แล้วนำไปวัดปริมาณด้วยวิธี Bradford พบว่า โปรตีนจากเอ็กโซโซม ในตัวอย่าง P20K และ P120K ที่สกัดโดยใช้ RIPA Lysis buffer มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 1,498.22 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และ 1,613.68 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ตามลำดับ ซึ่งมีค่ามากกว่าโปรตีนจากเอ็กโซโซมที่สกัดโดยใช้ CHAPS Lysis buffer โดยตัวอย่าง P20K และ P120K มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 434 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และ 674 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ตามลำดับ (ตารางที่ 2) มีการศึกษาก่อนหน้านี้ทำการเปรียบเทียบ Lysis buffer เพื่อใช้ในการสกัดโปรตีนจากเอ็กโซโซมที่หลั่งออกมาจากเซลล์มะเร็ง แล้วทำการวิเคราะห์โปรตีนที่ได้จากตัวอย่างเอ็กโซโซม ด้วยวิธี Mass spectrometry พบว่า RIPA Lysis buffer สามารถใช้สกัดโปรตีนได้ดีที่สุด โดยระบุโปรตีนได้มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ Tris-SDS, Tris-Triton, GuHCl, Urea-Thiourea และ Commercial cell-lysis buffer (Subedi et al., 2019) นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนที่สกัดได้ในตัวอย่าง P120K มีปริมาณมากกว่าโปรตีนในตัวอย่าง P20K เนื่องจากเอ็กโซโซมมีขนาดเล็ก ทำให้ตัวอย่าง P20K ที่มีการปั่นเหวี่ยงตกตะกอนแบบยิ่งยวดด้วยความเร็วที่ต่ำกว่า จะแยกเอ็กโซโซมออกมาได้น้อยกว่าในตัวอย่าง P120K มีการปั่นเหวี่ยงตกตะกอนแบบยิ่งยวดด้วยความเร็วที่สูงกว่า ดังนั้นจึงควรศึกษาองค์ประกอบของโปรตีนในตัวอย่าง P20K และ P120K เพิ่มเติม เพื่อค้นหาโปรตีนที่สำคัญที่อาจส่งผลกระทบต่อเซลล์ที่ได้รับพิษงูต่อไป

ตารางที่ 2 แสดงปริมาณโปรตีนที่สกัดจากตัวอย่างเอ็กโซโซมของพิษงูเห่าไทยที่แยกได้จากการปั่นเหวี่ยงตกตะกอนแบบยิ่งยวด ครั้งที่ 1 (P20K) และการปั่นแยกครั้งที่ 2 (P120K) โดยใช้ CHAPS Lysis buffer และ RIPA Lysis buffer

ตัวอย่าง	ปริมาณโปรตีน ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
	CHAPS Lysis buffer	RIPA Lysis buffer
P20K	434	1,498.22
P120K	674	1613.68

สรุปผลการศึกษา

ในการศึกษาเอ็กโซโซมในพิษงูเห่าไทย (*Naja kaouthia*) นี้ ได้ทำการแยกเอ็กโซโซมจากพิษงูเห่าไทยด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยงตกตะกอนแบบยิ่งยวดที่ความเร็ว 20,000 xg (ตัวอย่าง P20K) และ 120,000 xg (ตัวอย่าง P120K) แล้วตรวจสอบขนาดของเอ็กโซโซมด้วยเครื่องวิเคราะห์หาขนาดอนุภาคในระดับนาโนเมตร พบว่าตัวอย่าง P20K และ P120K มีขนาดเอ็กโซโซมอยู่ที่ช่วงประมาณ 70 ถึง 200 nm และ 50 ถึง 150 nm ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อวัดปริมาณโปรตีนที่สกัดจากเอ็กโซโซมทั้ง 2 ตัวอย่าง (P20K และ P120K) พบว่า RIPA Lysis buffer สามารถสกัดโปรตีนได้ปริมาณที่มากกว่า CHAPS Lysis buffer ผลการศึกษานี้ยืนยันว่า การปั่นเหวี่ยงตกตะกอนแบบยิ่งยวดรวมกับการใช้ RIPA Lysis buffer เป็นวิธีที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพสำหรับการเตรียมตัวอย่างเอ็กโซโซม เพื่อการศึกษาโปรตีนและโมเลกุลสำคัญอื่นๆ ในเอ็กโซโซมจากพิษงูเห่าไทย

เอกสารอ้างอิง

Carregari, V. C., Rosa-Fernandes, L., Baldasso, P., Bydlowski, S. P., Marangoni, S., Larsen, M. R., Palmisano, G. 2018. Snake venom extracellular vesicles (SVEVs) reveal wide molecular and functional proteome diversity. *Sci Rep.* 8 (1), 12067. Doi: 10.1038/s41598-018-30578-4

Gonçalves-Machado, L., Verçozza, B. R. F., Nogueira, F. C. S., Melani, R. D., Domont, G. B., Rodrigues, S. P., Rodrigues, J. C. F., Zingali, R. B. 2022. Extracellular vesicles from *Bothrops jararaca* venom are diverse in structure and protein composition and interact with mammalian cells. *Toxins* 14(11), 806. Doi: 10.3390/toxins14110806

Kumar, M. A., Baba, S. K., Sadida, H. Q., Marzooqi, S. A., Jerobin, J., Altemani, F. H., Algehainy, N., Alanazi, M. A., Abou-Samra, A., Kumar, R., Al-Shabeeb Akil, A. S., Macha, M. A., Mir, R., Bhat, A. A. 2024. Extracellular vesicles as tools and targets in therapy for diseases. *Sig Transduct Target Ther.* 9, 27. Doi: 10.1038/s41392-024-01735-1

Liao, T., Gan, M., Qiu, Y., Lei, Y., Chen, Q., Wang, X., Yang, Y.,

Chen, Y., Zhao, Y., Niu, L., Wang, Y., Zhang, S., Zhu, L., Shen, L. 2023. miRNAs derived from cobra venom exosomes contribute to the cobra envenomation. *J. Nanobiotechnology* 21, 356. Doi: 10.1186/s12951-023-02131-7

Mathiesen, A., Hamilton, T., Carter, N., Brown, M., McPheat, W., Dobrian, A. 2021. Endothelial extracellular vesicles: From keepers of health to messengers of disease. *Int J Mol Sci.* 22(9), 4640. Doi: 10.3390/ijms22094640

Nagendra, K., Bakkannavar, S. M., Bhat, V. R., Sirur, F. M. 2024. A review on snake venom extracellular vesicles: Past to present. *Toxicon* 244, 107772. Doi: 10.1016/j.toxicon.2024.107772

Raposo, G., Stoorvogel, W. 2013. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* 200, 373–383. Doi: 10.1083/jcb.201211138

Souza-Imberg, A., Carneiro, S. M., Giannotti, K. C., Sant'Anna, S. S., Yamanouye, N. 2017. Origin and characterization of small membranous vesicles present in the venom of *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon* 136, 27–33. Doi:10.1016/j.toxicon.2017.06.013

Subedi, P., Schneider, M., Philipp, J., Azimzadeh, O., Metzger, F., Moertl, S., Atkinson, M. J., Tapio, S. 2019. Comparison of methods to isolate proteins from extracellular vesicles for mass spectrometry-based proteomic analyses. *Anal Biochem.* 584, 113390. Doi: 10.1016/j.jab.2019.113390.

van Niel, G., Carter, D. R. F., Clayton, A., Lambert, D. W., Raposo, G., Vader, P. 2022. Challenges and directions in studying cell-cell communication by extracellular vesicles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 23, 369–382. Doi: 10.1038/s41580-022-00460-3

Willard, N. K., Salazar, E., Oyevides, F. A., Wiebe, C. S., Ocheltree, J. S., Cortez, M., Perez, R. P., Markowitz, H., Iliuk, A., Sanchez, E. E., Suntravat, M., Galan, J. A. 2021. Proteomic identification and quantification of snake venom biomarkers in venom and plasma extracellular vesicles. *Toxins* 13(9), 654. Doi: 10.3390/toxins13090654

สารเสาวภา
(QUEEN SAOVABHA MEMORIAL INSTITUTE BULLETIN; QSMI Bulletin)
คำชี้แจงการส่งบทความ

1. ประเภทของบทความ	มีรายละเอียดดังนี้
บทความวิชาการ (Academic Article)	เป็นบทความทางวิชาการเชิงวิทยาศาสตร์ ที่มีเนื้อหาที่เป็นประโยชน์และสร้างสรรค์ ความยาวไม่น้อยกว่า 5 หน้าและไม่เกิน 10 หน้า
2. การเตรียมต้นฉบับ	มีรายละเอียดดังนี้
ภาษา	เป็นภาษาไทย พิมพ์ด้วย Word for windows XP โดยเว้นระยะห่างระหว่างบรรทัด 1.5 เท่า รูปแบบตัวอักษร TH SarabunPSK ขนาด 16 มีเลขหน้ากำกับทางมุมขวาบนและใส่หมายเลขบรรทัดกำกับไว้ด้วย คำย่อให้ใช้เฉพาะที่เป็นสากลเท่านั้นและต้องบอกคำเต็มไว้ครั้งแรกก่อน ในส่วนของบทความจะต้องมีทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ
ตาราง แผนภูมิ ภาพประกอบ	ต้นฉบับที่มีตาราง แผนภูมิ และภาพประกอบ ให้ใส่หลังจากมีการกล่าวถึงในเนื้อหา โดยวางไว้กึ่งกลางหน้ากระดาษ มีความละเอียด 300 dpi และบันทึกภาพโดยใช้นามสกุล .jpg หรือ .tif เพื่อความชัดเจนในการจัดพิมพ์ สำหรับคำอธิบายตาราง แผนภูมิ และภาพประกอบ ให้พิมพ์ได้ภาพหรือเหนือตาราง
3. ส่วนประกอบของบทความ	ประกอบด้วย
ชื่อเรื่อง	ควรตั้งให้สั้น กระชับ แต่ได้ใจความ ครอบคลุมหรือเกี่ยวข้องกับบทความ ทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ
ชื่อผู้เขียน	เขียนตัวเต็มทั้งชื่อตัวและนามสกุลทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ไม่ต้องระบุปริญญาหรือตำแหน่งทางวิชาการ ในกรณีที่ผู้แต่งหลายคน ให้ระบุชื่อผู้รับผิดชอบบทความและที่อยู่ติดต่อได้
ชื่อหน่วยงาน	ระบุชื่อหน่วยงานและสถาบันของผู้ร่วมงานทุกคนที่สามารถติดต่อได้ ทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ
บทคัดย่อ	ย่อเฉพาะเนื้อหาสำคัญเท่านั้น ความยาวไม่ควรเกิน 120 คำหรือ 12 บรรทัด ให้มีบทคัดย่อเป็นภาษาไทยและภาษาอังกฤษ
คำสำคัญ	ไม่ควรเกิน 5 คำ ทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ
เนื้อหา	อาจแบ่งเป็นหัวข้อเพื่อให้ง่ายต่อการอ่าน เช่น บทนำ เนื้อเรื่อง อาจมีขั้นตอนการทำหรือวิธีการตรวจฯ บทสรุป วิเคราะห์และวิจารณ์ เอกสารอ้างอิง
4. การอ้างอิง	<p>การอ้างอิงในเนื้อหา</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. ใช้การอ้างอิงแบบ นาม-ปี ไว้ในวงเล็บท้ายประโยคที่ต้องการอ้างอิง โดยภาษาไทยระบุ ชื่อ-นามสกุลผู้แต่งตามด้วยปีที่พิมพ์ ภาษาอังกฤษระบุเฉพาะชื่อสกุลของผู้แต่ง ตามด้วยปีที่พิมพ์ แต่ถ้าชื่อผู้แต่งที่อ้างถึงเป็นส่วนหนึ่งของเนื้อหาที่จะเขียนต่อไป ให้วงเล็บเฉพาะปีที่พิมพ์ 2. การอ้างอิงบทความที่มีผู้แต่งมากกว่า 1 คน ภาษาไทยให้อ้างชื่อ-นามสกุล ภาษาอังกฤษให้อ้างเฉพาะชื่อสกุล <ol style="list-style-type: none"> 2.1 ผู้แต่ง 2 คน ให้ใช้ชื่อ-นามสกุล/ชื่อสกุลของผู้แต่งทั้ง 2 คน ภาษาไทยใช้ชื่อ-นามสกุลจริงเชื่อมด้วย “และ” ภาษาอังกฤษใช้ชื่อสกุลเชื่อมด้วย “and” 2.2 ผู้แต่ง 2 คนขึ้นไป ให้ใช้ชื่อ-นามสกุล ภาษาอังกฤษระบุเฉพาะชื่อสกุลของผู้แต่งคนแรก ตามด้วย “และคณะ” (ภาษาอังกฤษตามด้วยคำว่า “et al.”) แล้วตามด้วยปีที่พิมพ์ ในทุกครั้งที่มีการอ้างอิง 2.3 กรณีอ้างอิงผลงานมากกว่า 1 ชิ้น ให้ใช้เครื่องหมาย “;” คั่นระหว่างบทความแต่ละเรื่อง และเรียงลำดับอ้างอิงตามปี โดยเรียงจากปีเก่ามาปีที่ใหม่สุด ตามลำดับ <p>การอ้างอิงท้ายบทความ</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. การเรียงลำดับเอกสารอ้างอิง ให้เรียงเอกสารภาษาไทยขึ้นก่อน ตามด้วยเอกสารภาษาอังกฤษ โดยเรียงลำดับตามอักษรพยัญชนะ 2. ถ้ามาจากเอกสารภาษาไทย ให้ใช้ชื่อ-นามสกุลเป็นภาษาไทย ถ้ามาจากเอกสารภาษาอังกฤษ ให้ใช้ชื่อผู้เขียนเป็นภาษาอังกฤษ ให้เขียนชื่อสกุลตัวเต็มนำหน้า ตามด้วยอักษรย่อชื่อต้นและชื่อกลาง

<p>5. เอกสารอ้างอิง</p>	<p>วารสาร ชื่อผู้เขียน. ปีที่พิมพ์. ชื่อบทความ. ชื่อวารสาร ฉบับที่ (เลขที่), หน้าแรก-หน้าสุดท้าย.</p> <p>หนังสือ/ตำรา ชื่อผู้เขียน. ปีที่พิมพ์. ชื่อหนังสือ. พิมพ์ครั้งที่ (ถ้ามี). สำนักพิมพ์, ชื่อเมือง. หน้าแรก-หน้าสุดท้าย.</p> <p>บทหนึ่งในหนังสือ/ตำรา ชื่อผู้เขียน. ปีที่พิมพ์. ชื่อเรื่อง. ใน: ชื่อบรรณาธิการ. ชื่อหนังสือ. พิมพ์ครั้งที่ (ถ้ามี). สำนักพิมพ์, ชื่อเมือง. หน้าแรก-หน้าสุดท้าย.</p> <p>สื่ออิเล็กทรอนิกส์ ชื่อผู้เขียน. ปีที่เผยแพร่สารนิเทศบนอินเทอร์เน็ต (ถ้ามี). ชื่อเรื่อง/ชื่อบทความ. สืบค้น วัน เดือน ปี, จาก http://www</p> <p>เอกสารประกอบการสัมมนา/ประชุมวิชาการ ชื่อผู้เขียน. ปีที่พิมพ์. ชื่อเรื่อง/ชื่อบทความ. ใน: ชื่อการสัมมนา/ประชุมวิชาการ ครั้งที่(ถ้ามี) ประจำปี. หน่วยงานที่รับผิดชอบ. วันที่จัดการสัมมนา/ประชุม. หน้าแรก-หน้าสุดท้าย.</p> <p>เอกสารแบบไม่มีชื่อผู้เขียน ชื่อเรื่อง/ชื่อบทความ/ชื่อหนังสือ. ปีที่พิมพ์. ฉบับที่ (เลขที่), หน้าแรก-หน้าสุดท้าย.</p>
<p>6. การรับเรื่องพิมพ์</p>	<p>ส่งต้นฉบับในรูปแบบไฟล์ มาที่ E-mail: sunutcha.s@redcross.or.th หรือ sunutcha@yahoo.com</p>
<p>7. สถานที่ติดต่อ</p>	<p>สุนุชชา สุนทรารชุน บรรณาธิการ สารเสาวภา ฝ่ายวิจัยและพัฒนา สถานเสาวภา สภากาชาดไทย 1871 ถ. พระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทร. (02) 252-0161-4 ต่อ 82534 E-mail: sunutcha.s@redcross.or.th หรือ sunutcha@yahoo.com</p>

