

การทำโปรตีนที่หลังออกมาจากไมโครเกลียเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยเบต้าอะไมลอยด์เปปไทด์



นางสาวนนทพร อังศุวิทยา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A SECRETOME ANALYSIS OF MICROGLIAL ACTIVATION INDUCED BY β -AMYLOID
PEPTIDES

Miss Nontaporn Angsuwittaya



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Medical Science Program in Medical Science
Faculty of Medicine
Chulalongkorn University
Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การหาโปรตีนที่หลังออกมาจากไมโครเกลียเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยเบต้าอะไมลอยด์เปปไทด์

โดย

นางสาวนนทพร อังศุวิทยา

สาขาวิชา

วิทยาศาสตร์การแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

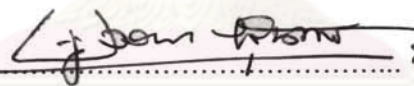
รองศาสตราจารย์ ดร. พูลลาภ ชีพสุนทร


คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นักวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

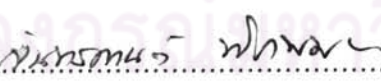

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ อติศร ภัทราดุลย์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. วิไล อโนมะศิริ)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร. พูลลาภ ชีพสุนทร)


..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิสิฏฐ์ ประพันธ์วัฒนะ)


..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร. จันทรกานต์ พิภพมงคล)

นันทพร อังศุวิทยา : การหาโปรตีนที่หลั่งออกมาจากไมโครเกลียเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย
เบต้าอะไมลอยด์เปปไทด์ (A SECRETOME ANALYSIS OF MICROGLIAL
ACTIVATION INDUCED BY β -AMYLOID PEPTIDES). อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก :
รศ. ดร. พูลลาภ ชีพสุนทร, 87 หน้า.

เบต้าอะไมลอยด์เปปไทด์ ($A\beta$ 1-42) เป็นองค์ประกอบหลักที่พบใน amyloid plaques ในสมองของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ เชื่อว่าการสะสมของ $A\beta$ 1-42 จะไปกระตุ้นให้เซลล์ไมโครเกลียหลังสารที่เป็นพิษและทำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทในที่สุด การถูกกระตุ้นของเซลล์ไมโครเกลียสามารถตรวจพบได้ในระยะแรกๆ ของโรคอัลไซเมอร์ จึงอาจใช้เป็น biomarker ได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ $A\beta$ 1-42 และ phosphorylated tau ที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษารูปแบบและชนิดของโปรตีนที่หลั่งออกมาจากเซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นด้วย $A\beta$ 1-42 เปรียบเทียบกับโปรตีนที่หลั่งจากเซลล์ไมโครเกลียที่ไม่ถูกกระตุ้นโดยใช้วิธี 1D LC-MS/MS โปรตีนที่หลั่งออกมาหลังจากที่เซลล์ถูกกระตุ้นเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ถูกนำมาแยกด้วย SDS-PAGE band ที่ได้แต่ละ band ถูกย่อยด้วย trypsin ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS ลำดับกรดอะมิโนที่ได้ถูกนำมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI nr เพื่อหาชนิดของโปรตีน ผลการศึกษาพบว่ามีการกระตุ้นด้วย $A\beta$ 1-42 เปลี่ยนแปลงรูปแบบของโปรตีนที่หลั่งออกมาจากเซลล์ไมโครเกลีย และพบโปรตีนแตกต่างกัน 46 ชนิด ที่พบเฉพาะในเซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นด้วย $A\beta$ 1-42 สามารถจำแนกหน้าที่ได้ ดังนี้ คือ regulation of gene expression, cell communication/signal transduction, cellular transport, cytoskeletal structural integrity, metabolism, immune response/inflammation, heme association และ protease inhibitor ในจำนวนนี้พบโปรตีน 14 ชนิดที่มีความสัมพันธ์กับระยะแรกของโรคอัลไซเมอร์ หรือ mild cognitive impairment (MCI) จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า $A\beta$ 1-42 ไปกระตุ้นเซลล์ไมโครเกลียให้เกิดการตอบสนองได้ในหลายด้านและสัมพันธ์กับพยาธิสภาพกำเนิดของโรคอัลไซเมอร์ในระยะแรก โปรตีนเหล่านี้ก็นำไปประยุกต์ใช้เป็น biomarkers ของโรคอัลไซเมอร์ในระยะแรกๆ ต่อไป

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์
ปีการศึกษา 2553

ลายมือชื่อนิสิต นันทพร อังศุวิทยา
ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก จุฬาลักษณ์

5174782830 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS : AMYLOID β PEPTIDES/ ALZHEIMER'S DISEASE/ ACTIVATED MICROGLIA

NONTAPORN ANGSUWITTAYA : A SECRETOME ANALYSIS OF MICROGLIAL ACTIVATION INDUCED BY β -AMYLOID PEPTIDES.
ADVISOR : ASSOC. PROF. POONLARP CHEEPSUNTHORN, Ph.D.
87 pp.

β -amyloid beta peptides ($A\beta_{1-42}$) are predominant components of amyloid plaques in brains of patients with Alzheimer's disease (AD). It is believed that $A\beta_{1-42}$ accumulation induces microglia to secrete neurotoxins leading to neuronal death. Microglial activation has been shown to occur at early stage of AD. Therefore, it may be a suitable biomarker for early AD compared with $A\beta_{1-42}$ and phosphorylated tau. The objective of this study was to determine differential expression of microglial secretory proteins induced by $A\beta_{1-42}$ compared with that of control using 1D LC-MS/MS. Proteins that were secreted from $A\beta_{1-42}$ -induced microglia at 12 h were separated on SDS-PAGE. Each band was tryptic digested followed by LC-MS/MS analysis. Obtained amino acid sequences were searched in NCBI nr database for protein identification. The result showed that induction with $A\beta_{1-42}$ altered microglial secretory proteins. Moreover, differential expressions of 46 candidate proteins induced by $A\beta_{1-42}$ were identified. These proteins were classified according to their functions as followed: regulation of gene expression, cell communication/signal transduction, cellular transport, cytoskeletal structural integrity, metabolism, immune response/inflammation, heme association and protease inhibitor. Among these proteins, 14 candidate proteins involved mild cognitive impairment. These results indicated that $A\beta_{1-42}$ induced a broad spectrum response in microglia related to pathogenesis of early AD. These proteins may apply to be early AD biomarkers.

Field of Study : Medical Science

Student's Signature *Nontaporn Angsumittaya*

Academic Year : 2010

Advisor's Signature *Poonlarp Cheepsunthorn*

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยความช่วยเหลือที่ดียิ่งจากอาจารย์หลายท่าน ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. พูลลาภ ชีพสุนทร ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาจารย์ที่ปรึกษา ที่กรุณาชี้แนะแนวทางการทำงาน ตลอดจนตรวจทาน แก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วิไล อโนมะศิริ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิสิฐฐิติ ประพันธ์วัฒนะ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่เสนอข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ และแก้ไข เพิ่มเติมส่วนที่บกพร่องของงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. จันทรกานต์ พิภพมงคล กรรมการสอบวิทยานิพนธ์และพี่ๆ นักวิจัยทุกท่านจากห้องปฏิบัติการชีวเคมี สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ทำวิจัย การวิเคราะห์โปรตีน และคำปรึกษาที่เกี่ยวข้องกับเทคนิค 1D LC-MS/MS รวมไปถึงการต้อนรับที่อบอุ่นยิ่งตลอดการศึกษาวิจัย

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่หน่วย chula MRC คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่าน ที่คอยอำนวยความสะดวกในเรื่องอุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ เสมอมา

ขอขอบพระคุณ พี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ทั้งในและนอกห้องปฏิบัติการวิจัยโรคอัลไซเมอร์ ที่คอยเป็นกำลังใจ ให้คำแนะนำ และให้ความช่วยเหลือจนงานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

และขอกราบขอบพระคุณ มารดาที่ให้โอกาสและสนับสนุนการศึกษามาโดยตลอด ซึ่งประโยชน์และคุณค่าของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน ตลอดจนผู้ที่สามารถนำงานวิจัยนี้ไปใช้เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อไป

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 คำถามของการวิจัย.....	2
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.4 สมมติฐาน.....	2
1.5 ข้อยกเว้นเบื้องต้น.....	2
1.6 คำสำคัญ.....	2
1.7 รูปแบบการวิจัย.....	3
1.8 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	3
1.9 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
1.10 กรอบความคิดในการวิจัย.....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	21
3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	21
3.2 สารเคมี.....	22
3.3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	23
3.3.1 การเลี้ยงเซลล์ไมโครเกลีย.....	23

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.3.2 การตรวจวัดไนตริกออกไซด์ (nitric oxide assay).....	23
3.3.3 การทำ secretome.....	24
3.3.3.1 การกระตุ้นเซลล์ไมโครเกลีย.....	24
3.3.3.2 การตกตะกอนโปรตีน.....	24
3.3.3.3 การวัดปริมาณของโปรตีน.....	24
3.3.3.4 การแยกโปรตีนบนเจล one dimensional sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE).....	24
3.3.3.5 การย่อยโปรตีน.....	25
3.3.3.6 LC-MS/MS.....	26
3.3.3.7 ชีวสารสนเทศ (bioinformatics).....	26
3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล.....	26
3.4.1 การวิเคราะห์ค่าไนตริกออกไซด์.....	26
3.4.2 การวิเคราะห์ secretome.....	26
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	28
4.1 รูปแบบของโปรตีนที่หลั่งออกมาจากเซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นด้วย A β 1-42.....	29
4.2 การหาชนิดของโปรตีนที่หลั่งออกมาจากเซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นด้วย A β 1-42 ด้วยวิธี LC-MS/MS โดยอ้างอิงกับฐานข้อมูล NCBI nr.....	30
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผล.....	39
รายการอ้างอิง.....	42
ภาคผนวก.....	51
ภาคผนวก ก.....	52
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	87

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 ตารางเปรียบเทียบความชุกของอาการสมองเสื่อมของประชากรสูงอายุไทยกับชาวอเมริกัน.....	7
ตารางที่ 4.1 รายชื่อ candidate proteins ที่พบในกลุ่มของเซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นด้วย A β 1-42 แต่ไม่พบในกลุ่มของเซลล์ไมโครเกลียที่ไม่ถูกกระตุ้น.....	31
ตารางที่ 4.2 Candidate proteins ที่หลังจากเซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นด้วย A β 1-42 จำแนกตามหน้าที่.....	34



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 2.1 อายุที่เพิ่มขึ้นเป็นปัจจัยเสี่ยงของการตายของเซลล์ประสาทในโรคอัลไซเมอร์.....	5
รูปที่ 2.2 กราฟการคาดประมาณผู้สูงอายุที่มีปัญหาจากกลุ่มอาการสมองเสื่อมใน พ.ศ. 2543 - พ.ศ. 2573.....	6
รูปที่ 2.3 รูปแสดงจำนวนประชากรไทยในวัยต่างๆ ในปี พ.ศ. 2548 - พ.ศ. 2578.....	7
รูปที่ 2.4 ลักษณะของ tangles ที่พบในเซลล์ประสาทและ amyloid plaques ที่พบบนเซลล์ประสาทในเนื้อสมองของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์.....	8
รูปที่ 2.5 ความไม่เสถียรของ microtubule จากการสะสมของ PHFs ภายในเซลล์ประสาท.....	11
รูปที่ 2.6 ลักษณะ amyloid plaque ในสมองที่มีพยาธิสภาพมากขึ้น.....	11
รูปที่ 2.7 เมตาบอลิซึมของ APP.....	14
รูปที่ 2.8 ตัวรับบนผิวเซลล์ของเซลล์ไมโครเกลียที่ตอบสนองต่อ A β	16
รูปที่ 2.9 ตำแหน่งที่แตกต่างกันของกลุ่มของเซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นและกลุ่มของเซลล์แอสโตรไซต์ที่ถูกกระตุ้นที่สัมพันธ์กับแกนกลางของ plaque.....	17
รูปที่ 3.1 สรุปลักษณะการทดลองเพื่อตรวจสอบรูปแบบและชนิดของโปรตีนที่หลั่งออกมาจากเซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นด้วย A β เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับรูปแบบของโปรตีนที่หลั่งออกมาจากเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น.....	27
รูปที่ 4.1 การผลิต NO จากเซลล์ไมโครเกลียหลังการกระตุ้นด้วย LPS (1 μ g/ml) ที่เวลา 2, 4, 6, 8, 10, 12 และ 24 ชั่วโมง.....	29
รูปที่ 4.2 รูปแบบของโปรตีนที่หลั่งจากเซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นด้วย A β 1-42 แยกตาม MW โดยใช้ 12.5% 1D SDS-PAGE.....	30
รูปที่ 4.3 แผนภาพวงกลมแสดงการจำแนกโปรตีนที่ถูกเหนี่ยวนำให้หลั่งจากเซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นด้วย A β 1-42 ตามหน้าที่ของโปรตีน.....	36
รูปที่ 4.4 ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนที่หลั่งออกมาจากเซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นด้วย A β 1-42 กับพยาธิสภาพในระยะแรกๆ ของโรคอัลไซเมอร์ (mild cognitive impairment).....	38

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

NFTs	= neurofibrillary tangles
A β	= β -amyloid peptide
ROS	= reactive oxygen species
LC-MS/MS	= liquid chromatography-tandem mass spectrometry
FAD	= familial Alzheimer's disease
SAD	= sporadic Alzheimer's disease
APP	= amyloid protein precursor
PSEN1	= presenilin-1
PSEN2	= presenilin-2
APOE	= apolipoprotein E
PHFs	= paired helical filaments
LDL	= low-density lipoprotein
CuBD	= copper-binding domain
ISF	= interstitial fluid
CSF	= cerebrospinal fluid
N-APP	= heparin-binding domain
APPI	= amyloid protein precursor inhibitor domain
AICD	= amyloid protein precursor intracellular domain
sAPP α	= soluble APP α
sAPP β	= soluble APP β
RAGE	= receptor for advanced glycation endproducts
MAPK	= mitogen-activated protein kinase
CNS	= central nervous system
MHC-II	= major histocompatibility complex class II
CD	= cluster of differentiation
ICAM-1	= intracellular adhesion molecules-1
Iba-1	= ionized calcium binding adapter molecule 1
IL	= interleukin
TNF	= tumor necrosis factor

p-tau	= phosphorylated tau
t-tau	= total tau
ALZAS	= Alzheimer Associated Protein
DMEM	= Dulbecco's modified eagle's medium
FBS	= fetal bovine serum
LPS	= lipopolysaccharide
NO	= nitric oxide
TCA	= trichloroacetic acid
1D SDS-PAGE	= one dimensional sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis
ACN	= acetonitrile
DTT	= dithiothreitol
IAA	= iodoacetamide
TFA	= trifluoroacetic acid
SD	= standard deviation
kDa	= kilodalton
1D LC-MS/MS	= one dimensional PAGE liquid chromatography-tandem mass spectrometry
2D SDS-PAGE	= two dimensional sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis
pI	= isoelectric point
MCI	= mild cognitive impairment
BLVRA	= biliverdin reductase A
HPX	= hemopexin
BBB	= blood-brain barrier
TFPI	= tissue factor pathway inhibitor
NRG1	= neuregulin 1

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) เป็นกลุ่มอาการสมองเสื่อม (dementia) ที่พบบ่อยที่สุดในผู้สูงอายุตั้งแต่ 65 ปีขึ้นไป ทำให้เกิดความบกพร่องด้านความจำ เนื่องจากมีการตายของเซลล์ประสาทอย่างมากในบริเวณ cerebral cortex และ hippocampus พยาธิสภาพที่ตรวจพบในสมองของผู้ป่วยที่เสียชีวิตด้วยโรคอัลไซเมอร์ที่สำคัญคือ 1) การสะสมของ neurofibrillary tangles (NFTs) ภายในเซลล์ประสาท NFTs เกิดจากการรวมกลุ่มของโปรตีน tau ที่ถูก phosphorylated อย่างผิดปกติ และ 2) การสะสมของ amyloid plaque ภายนอกเซลล์ประสาทจากการตกตะกอนและรวมตัวกันของเบต้าอะไมลอยด์เปปไทด์ ($A\beta$) นอกจากนี้ ยังพบเซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นเป็นจำนวนมากในเนื้อสมองโดยเฉพาะรอบๆ บริเวณที่มีการสะสมของ plaques การเปลี่ยนแปลงระดับของ $A\beta$ และ hyperphosphorylated tau (p-tau) ในพลาสมาและน้ำไขสันหลังได้ถูกนำมาใช้เป็น biomarkers สำหรับการวินิจฉัยโรคอัลไซเมอร์ อย่างไรก็ตามพบว่าทั้ง $A\beta$ และ p-tau มีความสัมพันธ์กับการดำเนินไปของโรคในระยะท้ายๆ ดังนั้นการหา biomarkers ที่สอดคล้องกับการดำเนินไปของโรคอัลไซเมอร์ในระยะต้นๆ จึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง เพื่อค้นหาที่มีใช้ในปัจจุบัน (symptomatic drugs) และที่กำลังพัฒนา (disease-modifying drugs) มีประสิทธิภาพสูงสุดที่จะชะลอหรือยับยั้งการตายของเซลล์ประสาทในสมองของผู้สูงอายุที่เสี่ยงต่อการเป็นโรคอัลไซเมอร์

ในปัจจุบันสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคอัลไซเมอร์ยังไม่ทราบ แต่เชื่อว่าโรคอัลไซเมอร์เป็น multifactorial disease ที่มีอายุเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญ กลไกที่นำไปสู่การตายของเซลล์ประสาทในโรคอัลไซเมอร์ถูกเชื่อมโยงกับ amyloid cascade hypothesis ที่ว่า การตายของเซลล์ประสาทในโรคอัลไซเมอร์มีจุดเริ่มต้นมาจากการสะสมของ $A\beta$ ที่มีความเป็นพิษโดยตรงต่อเซลล์ประสาทและการไปกระตุ้นเซลล์ไมโครเกลีย (microglia) ให้หลั่ง cytokines chemokines reactive oxygen species (ROS) proteases และ neurotoxic compounds ทำให้เซลล์ประสาทตายอย่างต่อเนื่องตรงเท่าที่วงจรมันยังคงดำเนินต่อไป จากการศึกษาในระบบเซลล์เพาะเลี้ยงพบว่าเซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นด้วย $A\beta$ สามารถผลิตโมเลกุลที่เป็นผลดีต่อการฟื้นตัวของเซลล์ในระบบประสาทได้ นอกเหนือไปจาก neurotoxic substances ที่กล่าวมาแล้วข้างต้น แต่ในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาในลักษณะที่เป็น high throughput เพื่อศึกษารูปแบบและชนิดของโปรตีนที่ผลิตออกมาจากเซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นด้วย $A\beta$ ดังนั้น การศึกษาในครั้งนี้จึงใช้เทคนิคทาง

proteomics เพื่อหาโปรตีนที่หลังจากเซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นด้วย $A\beta$ ซึ่งสอดคล้องกับพยาธิกำเนิดของโรคอัลไซเมอร์ โดยมุ่งหวังว่าโปรตีนที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้จะสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็น biomarkers ของโรคอัลไซเมอร์ในระยะแรกๆ ได้

คำถามของงานวิจัย

การกระตุ้นเซลล์ไมโครเกลียด้วย $A\beta$ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จะเปลี่ยนแปลงรูปแบบและชนิดของโปรตีนที่เซลล์หลั่งออกมาหรือไม่

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อตรวจสอบรูปแบบของโปรตีนที่หลั่งออกมาจากเซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นด้วย $A\beta$ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับรูปแบบของโปรตีนที่หลั่งออกมาจากเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น
2. เพื่อหาชนิดของโปรตีนที่หลั่งออกมาจากเซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นด้วย $A\beta$ ที่เวลา 12 ชั่วโมง

สมมติฐาน

1. การกระตุ้นเซลล์ไมโครเกลียด้วย $A\beta$ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จะเปลี่ยนแปลงรูปแบบและชนิดของโปรตีนที่เซลล์หลั่งออกมา
2. ชนิดของโปรตีนที่หลั่งออกมาจากเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย $A\beta$ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จะถูกตรวจพบจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง mass spectrometry

ข้อตกลงเบื้องต้น

เครื่องมือต่างๆ ที่ใช้ในการทดลองเป็นเครื่องมือที่ผ่านการทดสอบความเที่ยงตรงและความแม่นยำตามมาตรฐานของเครื่องมือชนิดนั้นๆ

คำสำคัญ

- เบต้าอะไมลอยด์เปปไทด์ (β -amyloid peptides)
- โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease)
- เซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้น (activated microglia)

รูปแบบการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง (Experimental research)

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

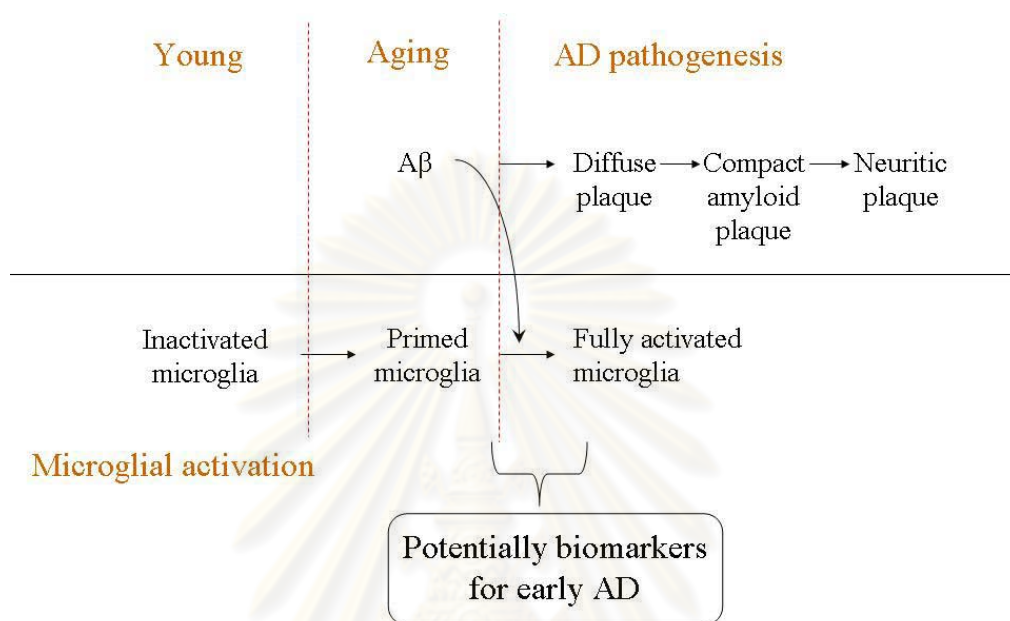
A β 1-42 เกิดจากโปรตีนตั้งต้นของ A β คือ amyloid protein precursor (APP) ที่ถูกตัดด้วย β - และ γ -secretases มีกรดอะมิโน 42 ตัว เรียงต่อกันตามลำดับ ดังนี้ DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVIA และในการศึกษานี้จะใช้เป็นตัวกระตุ้นเซลล์ไมโครเกลีย

Liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) เป็นเทคนิคขั้นสูงที่ควบคู่กันระหว่างการแยกสารด้วย LC กับการแตกสารด้วย MS/MS เป็นเทคนิคที่มีความไวสูง โดย LC ใช้หลักการแยกตามคุณสมบัติทางเคมีของสารแต่ละชนิด เช่น ความมีขั้ว (polar) ไม่มีขั้ว (non polar) ความเป็นกรดเบส (pH) ส่วน MS/MS จะแตกสารที่ทดสอบให้เป็นไอออนและวัดค่ามวลต่อประจุ (m/z) เพื่อหาค่ามวลโมเลกุลและลำดับกรดอะมิโน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลจากการศึกษาเพื่อหารูปแบบและชนิดของโปรตีนที่หลั่งออกมาจากเซลล์ไมโครเกลียที่ถูกระตุ้นด้วย A β อาจทำให้ได้มาซึ่ง biomarkers ที่สอดคล้องกับการดำเนินไปของโรคอัลไซเมอร์ในระยะต้นๆ ซึ่งนอกจากจะช่วยให้เข้าใจถึงพยาธิกำเนิดของโรคแล้วยังอาจจะเป็นประโยชน์ในการติดตามผลการใช้ยาที่มีอยู่ในปัจจุบันและที่กำลังพัฒนาเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดในการชะลอหรือยับยั้งการตายของเซลล์ประสาทของผู้สูงอายุที่เสี่ยงต่อการเป็นโรคอัลไซเมอร์

กรอบความคิดในการวิจัย

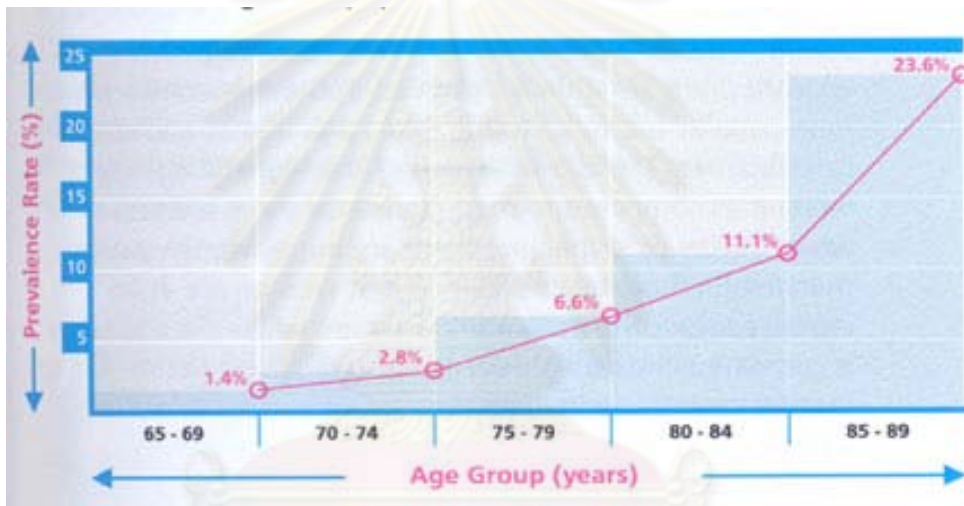


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

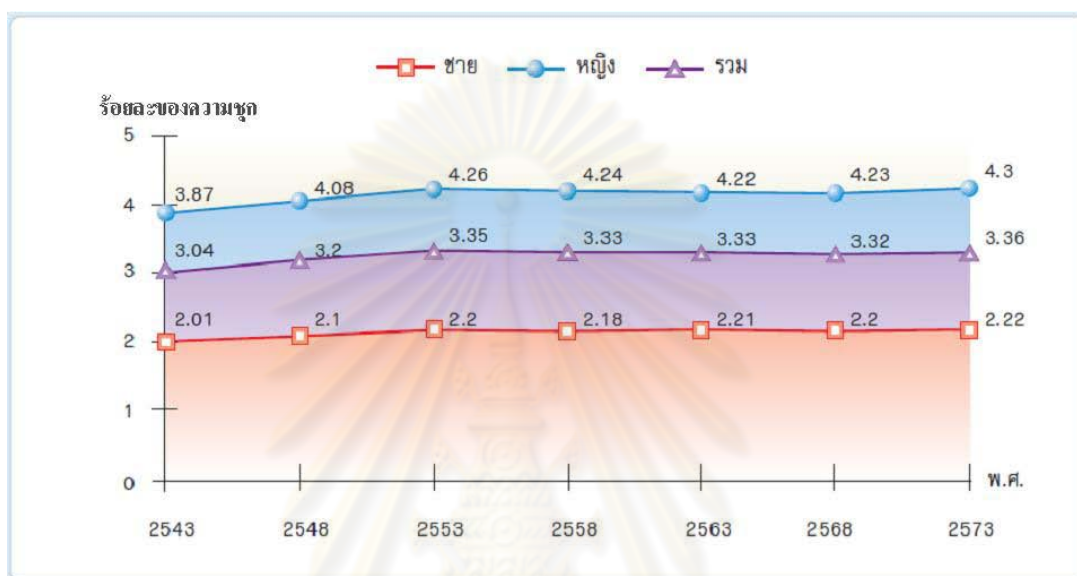
โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) เป็นกลุ่มอาการสมองเสื่อม (dementia) ที่พบได้บ่อยที่สุดในผู้สูงอายุ เป็นความผิดปกติทางระบบประสาทเกิดจากการตายของเซลล์ประสาทในสมอง เช่น บริเวณ cerebral cortex และ hippocampus มีรายงานว่าจำนวนผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ทุกๆ 5 ปี ในช่วงอายุตั้งแต่ 65-85 ปี และจะเพิ่มขึ้นอย่างมากเมื่ออายุเลย 85 ปีไปแล้ว โดยผู้สูงอายุในกลุ่มหลังนี้จะพบว่าเป็นโรคอัลไซเมอร์ถึงร้อยละ 20-40 แสดงให้เห็นว่าอายุเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญของโรคนี้ (1) ดังแสดงในรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 อายุที่เพิ่มขึ้นเป็นปัจจัยเสี่ยงของการตายของเซลล์ประสาทในโรคอัลไซเมอร์ แกน x เป็นช่วงอายุที่เพิ่มขึ้นทุกๆ 5 ปี แบ่งเป็น 5 กลุ่มคือ 65-69 ปี 70-74 ปี 75-79 ปี 80-84 ปี และ 85-89 ปี และแกน y เป็นอัตราความชุกของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ (%) (2)

โรคอัลไซเมอร์สามารถพบได้ทั่วโลก ประมาณการณ์ว่าปัจจุบันมีผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์อยู่ถึง 18 ล้านคน และอาจสูงขึ้นเป็น 2 เท่าภายในปี ค.ศ. 2025 (3) จากข้อมูลขององค์การอนามัยโลก (World Health Organization) พบว่า โรคอัลไซเมอร์เป็นสาเหตุการตายลำดับที่ 5 ในผู้สูงอายุเพศหญิง และลำดับที่ 8 ในผู้สูงอายุเพศชาย ที่มีอายุมากกว่า 65 ปี ทำให้รัฐบาลสหรัฐอเมริกาต้องใช้งบประมาณเพื่อการดูแลรักษาและส่งเสริมการเข้าถึงของผู้ป่วยทุกปี (4) โดยเงินจำนวนนี้ยังไม่รวมถึงการลงทุนไปกับการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาการรักษาโรคอัลไซเมอร์ให้เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ ปลอดภัย และสามารถเข้าถึงได้ทุกคน

สำหรับประเทศไทย มีรายงานการสาธารณสุขไทย (5) ปี พ.ศ. 2548 – พ.ศ. 2550 กล่าวไว้ว่า ความชุก (prevalence) ของกลุ่มอาการสมองเสื่อมของคนไทยพบอยู่ประมาณร้อยละ 3.04 ในปี พ.ศ. 2543 ซึ่งคาดว่าในปี พ.ศ. 2573 จะมีผู้สูงอายุที่มีปัญหาจากอาการสมองเสื่อมเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 3.36 โดยในจำนวนนี้เป็นเพศหญิงมากกว่าเพศชายถึง 2 เท่า (รูปที่ 2.2)



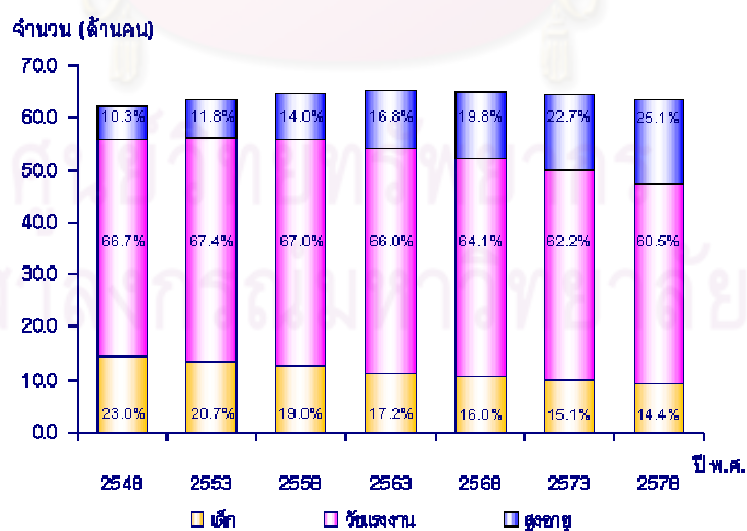
รูปที่ 2.2 กราฟแสดงการคาดประมาณผู้สูงอายุที่มีปัญหาจากกลุ่มอาการสมองเสื่อมใน พ.ศ. 2543 - พ.ศ. 2573 (6)

เมื่อเปรียบเทียบความชุกของอาการสมองเสื่อมในประเทศไทยกับประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่า ผู้สูงอายุไทยมีอัตราความชุกของอาการสมองเสื่อมต่ำกว่าผู้สูงอายุอเมริกัน แต่เมื่อพิจารณาความชุกในแต่ละช่วงอายุแล้ว พบอัตราการเพิ่มขึ้นใกล้เคียงกับชาวอเมริกัน (ตารางที่ 2.1)

ตารางที่ 2.1 ตารางเปรียบเทียบความชุกของอาการสมองเสื่อมของประชากรสูงอายุไทยกับชาวอเมริกัน (7)

อายุ (ปี)	ไทย	สหรัฐอเมริกา
60 - 64	1%	-
65 - 69	2%	2.5%
70 - 74	3%	5%
75 - 79	5%	10%
80 - 84	7.5%	15%
85 - 89	12.5%	30%
90+	30%	-

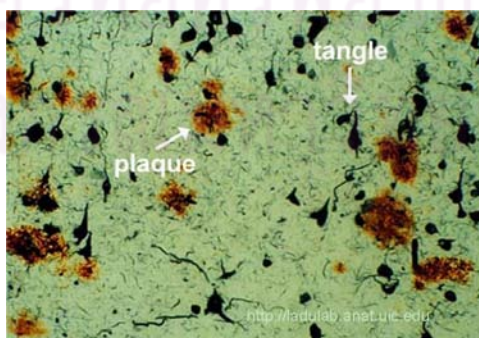
นอกจากนี้ ในการสำรวจวิจัยของผู้ช่วยศาสตราจารย์ปัทมา ว่าพัฒนวนศ์และศาสตราจารย์ปราโมทย์ ประสาทกุล สถาบันวิจัยประชากรและสังคม มหาวิทยาลัยมหิดล (8) พบว่า อัตราการเจริญเติบโตของจำนวนประชากรไทยมีอัตราลดลง แต่อัตราการเจริญเติบโตของจำนวนประชากรผู้สูงอายุกลับมีอัตราเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยในปี พ.ศ. 2548 ประชากรผู้สูงอายุมีจำนวนกว่า 6 ล้านคน คิดเป็นร้อยละ 10 ของประชากรไทย คาดการณ์ว่ามีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเป็น 16 ล้านคน หรือร้อยละ 25 ของประชากรไทย ในปี พ.ศ. 2578 ซึ่งหมายความว่าภายในเวลาเพียง 30 ปี อัตราการเจริญเติบโตของประชากรผู้สูงอายุเพิ่มขึ้นเกือบ 3 เท่า (รูปที่ 2.3) แสดงว่าสังคมไทยกำลังจะกลายเป็นสังคมผู้สูงอายุ



รูปที่ 2.3 แสดงจำนวนประชากรไทยในวัยต่างๆ ในปี พ.ศ. 2548 - พ.ศ. 2578 (8)

การสำรวจวิจัยนี้แม้ไม่ได้แสดงถึงความชุกของโรคอัลไซเมอร์ในประเทศไทยอย่างชัดเจน แต่การเพิ่มขึ้นของอัตราการเจริญเติบโตของจำนวนประชากรผู้สูงอายุไทย และการเพิ่มขึ้นของอัตราความชุกของอาการสมองเสื่อมอาจแสดงถึงแนวโน้มที่สูงขึ้นของโรคอัลไซเมอร์ในประเทศไทยด้วย

โรคอัลไซเมอร์ได้ชื่อมาจากดอกเตอร์อัลลลอยส์ อัลไซเมอร์ นักจิตวิทยาและนักพยาธิวิทยาทางประสาทศาสตร์ชาวเยอรมนี ซึ่งเป็นผู้ที่ได้อธิบายถึงลักษณะของพยาธิสภาพของเซลล์ประสาทในโรคอัลไซเมอร์ ดอกเตอร์อัลไซเมอร์ได้ตีพิมพ์รายงานในปี ค.ศ. 1907 โดยบรรยายถึงสิ่งที่พบทางกายวิภาคศาสตร์และผลการศึกษาวิจัยด้วยกล้องจุลทรรศน์จากการตรวจหาพยาธิสภาพในสมองหลังการเสียชีวิตของออกัส ดีเทอร์ ผู้ป่วยเพศหญิงอายุ 56 ปี ที่ป่วยด้วยอาการสูญเสียความทรงจำเป็นเวลานาน หลงทิศทาง (disorientation) ประสาทหูหลอน (auditory hallucinations) และมีความบกพร่องทางจิตอย่างรุนแรง ดอกเตอร์อัลไซเมอร์ได้พบการฝ่อ (atrophy) ของสมองหลายส่วน ได้แก่ hippocampus ที่เกี่ยวข้องกับความทรงจำ การเรียนรู้ และ cerebral cortex ในส่วนของ temporal lobe ที่เกี่ยวข้องกับการได้ยิน การพูด ในส่วน frontal lobe ที่เกี่ยวข้องกับการอารมณ์ การเคลื่อนไหว และในส่วน parietal lobe ที่เกี่ยวข้องกับการมองเห็น ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีการตายของเซลล์ประสาทในบริเวณเหล่านี้อย่างมาก นอกจากนี้ ผลจากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบเส้นใยที่ย้อมติดสีมากและหนาเป็นพิเศษในเซลล์ประสาท และพบจุดเล็กๆ เป็นจำนวนมากที่ประกอบกันเป็นแผ่น (plaque) ในเนื้อสมอง (9) บริเวณที่พบ plaques จะมีเซลล์ประสาทที่มี dystrophic neurites โดยลักษณะพยาธิสภาพทางประสาทศาสตร์เหล่านี้ ปัจจุบันรู้จักกันว่า “neurofibrillary tangles (NFTs)” และ “amyloid plaques” หรือ “senile plaques” ตามลำดับ (รูปที่ 2.4)



รูปที่ 2.4 แสดงลักษณะของ tangles ที่พบในเซลล์ประสาทและ amyloid plaques ที่พบนอกเซลล์ประสาทในเนื้อสมองของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ (10)

ในปัจจุบันยังไม่ทราบว่าพยาธิกำเนิดของโรคอัลไซเมอร์เกิดจากสาเหตุใด แต่สามารถแบ่งโรคอัลไซเมอร์ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มียีนถ่ายทอดทางพันธุกรรม (familial Alzheimer's disease: FAD) และกลุ่มที่ไม่ทราบสาเหตุแน่ชัด (sporadic Alzheimer's disease: SAD) โดยผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ในกลุ่ม FAD พบได้น้อยกว่ากลุ่ม SAD มาก คือ ประมาณ 5% และ 95% ตามลำดับ (11) จากการศึกษาในกลุ่ม FAD พบว่า ผู้ป่วยมักเริ่มแสดงอาการของโรคในช่วงอายุที่น้อยกว่า 65 ปี โดยมีสาเหตุจากการกลายพันธุ์ในยีนตั้งต้นของเบต้าอะไมลอยด์เปปไทด์ (β -amyloid peptide: A β) คือ amyloid protein precursor (*APP* gene) บนโครโมโซมคู่ที่ 21 (12) หรือยีนพรีซีนิลิน-1 (presenilin-1: *PSEN1* gene) บนโครโมโซมคู่ที่ 14 หรือยีนพรีซีนิลิน-2 (presenilin-2: *PSEN2* gene) บนโครโมโซมคู่ที่ 1 (11) นอกจากนี้ ยังมียีนที่เป็นปัจจัยเสี่ยง ได้แก่ ยีนที่ผลิตอะโปไลโปโปรตีน E (apolipoprotein E: *APOE* gene) อีกด้วย (13) สำหรับกลุ่ม SAD มีหลักฐานบ่งชี้ว่าโรคอัลไซเมอร์มีหลายปัจจัยเข้ามาเกี่ยวข้อง (14-15) ได้แก่ ความอ้วน การออกกำลังกายน้อย การศึกษาน้อย การสูบบุหรี่ โรคประจำตัว เช่น โรคตับ โรคไต โรคไทรอยด์ (thyroid) ความดันโลหิตสูง (hypertension) เบาหวาน (diabetes mellitus) ความบกพร่องทางจิต (mental disabilities) การติดเชื้อ (infection) เช่น เชื้อซิฟิลิส (Syphilis) เชื้อเอชไอวี (HIV) ไวรัสตับอักเสบบี (HCV) การพบเส้นเลือดตีบหรือแตกในสมอง เนื้องอกในสมอง รวมไปถึงการได้รับบาดเจ็บและการกระทบกระเทือนของสมอง

การวินิจฉัยโรคอัลไซเมอร์ทางการแพทย์อาศัยการซักประวัติผู้ป่วยและญาติ ตรวจร่างกายของผู้ป่วย ทำแบบทดสอบทางด้านสมองและจิตใจ การเอกซเรย์สมอง รวมถึงการเจาะเลือดเพื่อหาสาเหตุอื่นที่อาจส่งผลให้เกิดอาการสมองเสื่อมได้ นอกจากนี้ อาจเจาะเลือดหรือน้ำไขสันหลังเพื่อตรวจหา A β และโปรตีนเทา (tau) เพื่อใช้ในการคัดแยกและวินิจฉัยโรคอัลไซเมอร์เพิ่มเติมได้ โดยอาการของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ที่แสดงออกมาสามารถแบ่งได้เป็น 3 ระยะ ได้แก่ ระยะแรก (mild) ระยะกลาง (moderate) และระยะรุนแรง (severe) (16)

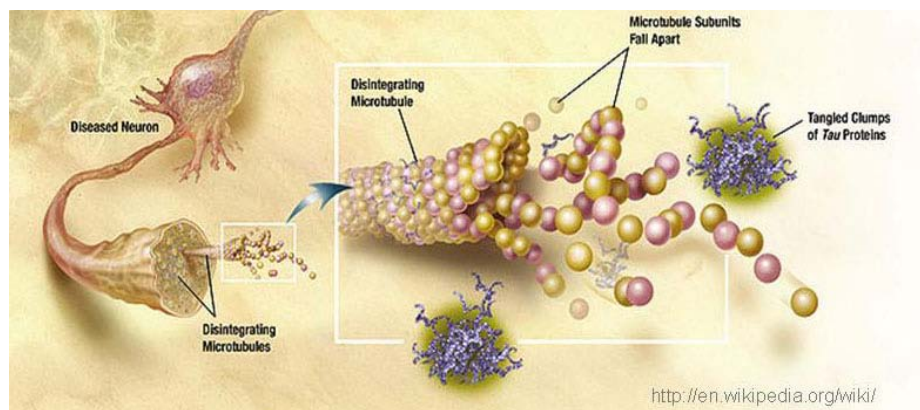
ระยะแรก (1-3 ปี) ผู้ป่วยจะมีความจำบกพร่อง (impairment of learning and memory) ลืมการสนทนาที่เพิ่งพูดไป ทำให้ผู้ป่วยถามซ้ำแล้วซ้ำอีกกับคำถามเดิมที่เคยถามไปแล้ว ผู้ป่วยจะจำเหตุการณ์เก่าๆ ได้ดีกว่าเหตุการณ์ที่เพิ่งเกิดขึ้น อาจจะมีปัญหาเกี่ยวกับการใช้ภาษาตั้งแต่ช่วงแรกของโรค มักเลือกใช้คำมาพูดไม่ถูก เรียกชื่อสิ่งของที่ไม่ได้ใช้บ่อยๆ ไม่ถูกต้อง (paraphasia) ไม่สามารถวางแผนการทำงานได้ (impairment of executive function) อาจสับสนทิศทาง (disorientation) โดยเฉพาะเส้นทางที่ไม่คุ้นเคย

ระยะกลาง (2-10 ปี) อาการหลงลืมจะเป็นมากขึ้น เริ่มจำสิ่งที่ทำไปแล้วไม่ได้ รวมทั้งความจำเก่าๆ จะเริ่มเสียไป จำชื่อเพื่อนหรือชื่อญาติไม่ได้ ไม่รู้ว่าสิ่งที่เห็น ที่ได้ยิน หรือสัมผัสเป็นอะไร (agnosia) ไม่รู้ว่าตัวเองป่วย (anosognosia) มีปัญหาในการทำกิจวัตรประจำวันที่ซับซ้อน การดูแลตนเองจะเริ่มบกพร่อง ผู้ป่วยบางรายอาจมีอาการหวาดระแวง เห็นภาพหลอนและหูแว่ว

ระยะรุนแรง (3-12 ปี) ความจำจะแย่มาก จำคนใกล้ตัวไม่ได้ หรืออาจจำชื่อตนเองไม่ได้ มีภาวะซึมเศร้า (depression) นอนไม่หลับ พุดน้อยลงมากจนกระทั่งไม่พูดเลย ในที่สุดผู้ป่วยจะพูดไม่ได้ เดินไม่ได้ กลืนอาหารไม่เป็น (apraxia) นอนติดเตียง ต้องดูแลตลอด 24 ชั่วโมง อาจเสียชีวิตจากอาการปอดบวม (pneumonia) หรือแผลกดทับ

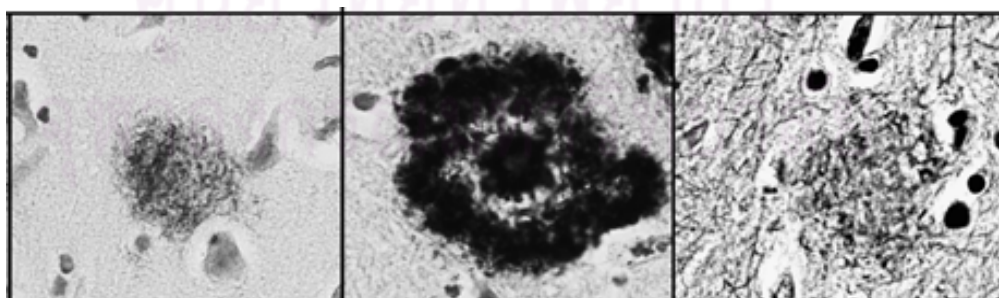
การวินิจฉัยเพื่อระบุระยะของโรคอัลไซเมอร์ไม่สามารถวินิจฉัยชี้ขาดได้ จนกระทั่งผู้ป่วยได้แสดงอาการที่บ่งชี้ของระยะนั้นๆ แล้ว อาการของโรคอัลไซเมอร์จะค่อยเป็นค่อยไปและไม่อาจทราบการดำเนินไปของโรคอย่างแน่ชัดได้ล่วงหน้า เนื่องจากยังไม่อาจหาตัวชี้วัดทางชีวภาพ (biomarkers) ที่มีประสิทธิภาพและน่าเชื่อถือเพียงพอที่จะนำมาใช้เป็นเครื่องพิสูจน์กลไกหรือสภาวะที่เป็นไปของพยาธิสภาพในสมองได้ นอกจากการตรวจพบ NFTs และ amyloid plaques ในสมองของผู้ป่วยหลังเสียชีวิตจะถือเป็นการวินิจฉัยสิ้นสุดของโรคอัลไซเมอร์ (17)

NFTs คือ เส้นใยคู่ที่พันกันเป็นเกลียว (paired helical filaments: PHFs) มาเกาะกลุ่มกันในเซลล์ประสาท (รูปที่ 2.5) ประกอบไปด้วยโปรตีน tau ที่อยู่ในรูปที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตหลายตำแหน่ง (hyperphosphorylated tau: p-tau) ซึ่งเอนไซม์ที่ควบคุมการเติมหมู่ฟอสเฟตนี้ ได้แก่ glycogen synthase kinase 3 (GSK3), cyclin-dependent kinase 5 (CDK5), protein phosphatase-1 (PP-1), protein phosphatase-2A (PP-2A) เป็นต้น (19) tau เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ microtubules ที่เป็นโครงสร้างของเซลล์ และใช้ในการขนส่งโปรตีนและเอนไซม์ (axonal transport) ออกนอกเซลล์ tau พบได้มากในเซลล์ประสาท ทำหน้าที่จับกับ microtubules ด้วย microtubule-binding domains และส่งเสริมการรวมตัว (assembly) และความเสถียรของ microtubules (20) จากการศึกษาในหลอดทดลอง (*in vitro*) แสดงให้เห็นว่า tau ที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตจะก่อตัวเป็น polymer มีโครงสร้างคล้ายกับ PHFs (21) เหมือนกับที่พบในโรคอัลไซเมอร์ ทำให้ความเสถียรของ microtubules ลดลงและรบกวนการขนส่งโปรตีนหรือสารสื่อประสาทของเซลล์ได้



รูปที่ 2.5 แสดงความไม่เสถียรของไมโครทิวบูลจากการสะสมของ PHFs ภายในเซลล์ประสาท (18)

ส่วน amyloid plaques มีลักษณะโครงสร้างเล็กกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10-160 ไมโครเมตร อยู่นอกเซลล์ประสาท ก็มีรายงานอย่างต่อเนื่องว่าพบการสะสมในเนื้อสมองของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ (22) amyloid plaques สามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิด ได้แก่ diffuse plaques และ compact amyloid plaques (22-23) ดังแสดงในรูป 2.6 ที่ถูกล้อมรอบไปด้วยเซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้น (activated microglia) ซึ่งเป็นเสมือนเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดของสมอง สำหรับ compact amyloid plaques ที่พบในสมองบางตำแหน่งอาจถูกล้อมรอบด้วยลักษณะที่เรียกว่า dystrophic neurites ซึ่งเป็นการสะสมของแอกซอน (axon) ที่บวม และมีเดนไดรต์ (dendrites) ที่พบ lysosomal-related attenuated bodies และสามารถย่อยมติด chromogranin A และ ubiquitin ได้ด้วยวิธีทางอิมมูโน (immunology) จึงอาจเรียก compact amyloid plaques ที่มีลักษณะดังกล่าวว่า neuritic plaques แต่ไม่ใช่ compact amyloid plaques ทั้งหมดจะเป็น neuritic plaques เสมอไป (22, 24)



รูปที่ 2.6 แสดงลักษณะ amyloid plaque ในสมองที่มีพยาธิสภาพมากขึ้นตามลำดับจากซ้ายไปขวา รูปซ้าย คือ diffuse plaque รูปกลาง คือ compact amyloid plaque และรูปขวา คือ neuritic plaque (24)

ตามสมมติฐาน amyloid cascade ที่ตั้งโดย Hardy และ Allsop ในปี 1991 (25) ได้กล่าวไว้ว่า plaques เป็นจุดเริ่มต้นของพยาธิสภาพของโรคอัลไซเมอร์ โดย plaque เหล่านี้เป็นผลจากเมตาบอลิซึมที่ผิดปกติของ APP ทำให้เกิดการเสียสมดุลระหว่างกระบวนการผลิตและการกำจัด A β นำไปสู่การสะสม A β นอกเซลล์ประสาท ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการส่งกระแสประสาทที่ผิดปกติในบริเวณที่ส่งกระแสประสาท (synapse) และการตายของเซลล์ประสาทในโรคอัลไซเมอร์ นอกจากนี้ การเกาะกลุ่ม (aggregation) ของ A β ยังถูกพิจารณาว่าเป็นกระบวนการเริ่มต้นของการเกิด NFTs โดยไปเหนี่ยวนำ glycogen synthase kinase 3 β ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญที่เติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ tau มีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์และเกิดความผิดปกติของเซลล์ประสาทในที่สุด แสดงให้เห็นว่าการสะสม A β น่าจะเป็นความผิดปกติแรกๆ ที่เป็นจุดเริ่มต้นของพยาธิสภาพของโรคอัลไซเมอร์ อีกทั้ง A β ยังสามารถกระตุ้นเซลล์ไมโครเกลียให้หลั่งสารที่มีบทบาทในกระบวนการอักเสบ (proinflammatory cytokines) อันเป็นสาเหตุของการเกิดการอักเสบในระบบประสาท (neuroinflammation) (26) โดยภายในสมองของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์จะพบ A β เป็นจำนวนมากและสะสมกันเป็น amyloid plaques ที่ไม่สามารถถูกกำจัดออกไปได้หมด ทำให้เซลล์ไมโครเกลียถูกกระตุ้นอย่างต่อเนื่องและหลั่งสารที่เป็นพิษมากขึ้น จนเกิดความเสียหายต่อเซลล์ประสาทและเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการอักเสบของเซลล์ประสาทได้อย่างเรื้อรัง (chronic neuroinflammation)

ภายใน amyloid plaque พบ A β เป็นองค์ประกอบหลัก และสามารถพบองค์ประกอบอื่นๆ ใน plaque ได้ด้วย เรียกว่า A β -associated proteins (24) ได้แก่ cytokines, chemokines, proteases, ApoE, α -1-antichymotrypsin, proteoglycans และ serum amyloid (22-23) ปฏิสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบของ plaque อาจส่งเสริมให้ amyloid plaque มีความเสถียรมากขึ้น และช่วยเพิ่มการตอบสนองต่อการอักเสบของเซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นบริเวณที่อยู่รอบๆ หรืออยู่ใน amyloid plaque

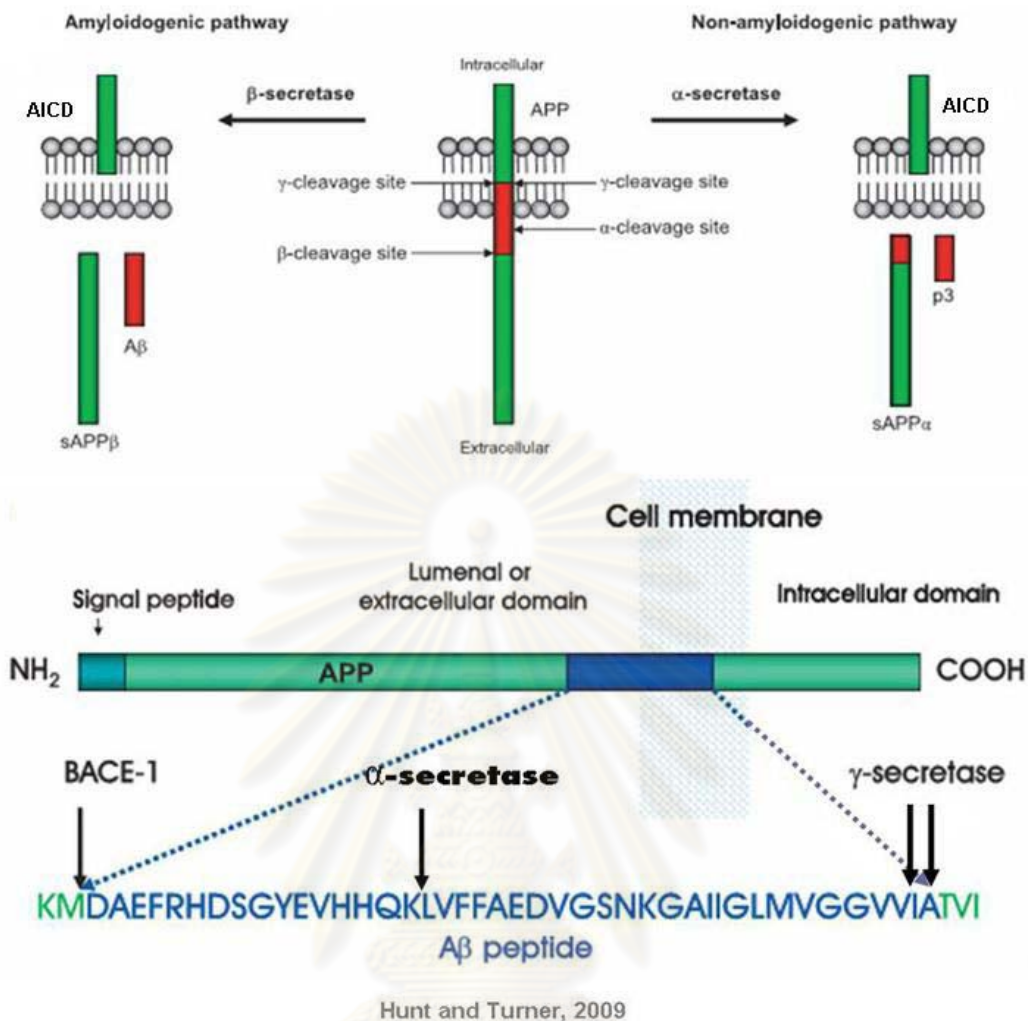
บทบาทของ A β ในสมองที่ทำงานปกติยังไม่ทราบ แต่คาดคิดกันว่า A β อาจจะควบคุมการขนส่ง cholesterol โดยการยับยั้ง cholesterol ในรูปของ low-density lipoprotein (LDL) ปฏิสัมพันธ์นี้อาจสำคัญต่อการควบคุมการนำเข้าของ cholesterol เข้าสู่สมองและการควบคุมระดับ cholesterol ภายในเซลล์ (27) A β ยังถูกพิจารณาว่าเป็นโปรตีนที่จับกับโลหะหนักที่เรียกว่า metalloprotein เนื่องจากได้ส่วนของ copper-binding domain (CuBD) มาจาก APP เช่น การจับของธาตุเหล็ก (iron) ทองแดง (copper) และสังกะสี (zinc) กับชิ้นส่วนของ A β บริเวณที่ประกอบด้วย histidine 3 ตัว และ tyrosine 1 ตัว ซึ่งอยู่ปลายด้านเอมีนที่ชอบน้ำ (hydrophilic N-

terminus) (28-29) ดังนั้น จึงกล่าวได้ว่า $A\beta$ อาจทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ในสมอง (30)

$A\beta$ เป็นเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุล (MW) ประมาณ 4.5 กิโลดาลตัน (kDa) สามารถผลิตได้จากเซลล์ประสาท พบกระจายอยู่ทั่วสมองของผู้สูงอายุประมาณ 2 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักกรัมของสมอง และพบ $A\beta$ สูงขึ้นในสมองของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ได้ถึง 31 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักกรัมของสมอง (31) นอกจากนี้ ยังพบ $A\beta$ ได้ในของเหลวระหว่างเซลล์ (interstitial fluid: ISF) หรือน้ำไขสันหลัง (cerebrospinal fluid: CSF) ด้วย (32) $A\beta$ เกิดจากกระบวนการตัด APP ด้วยเอนไซม์หลายชนิด (33) ดังแสดงในรูปที่ 2.7 โดย APP เป็น glycoprotein ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane) ซึ่งมีปลายคาร์บอกซิล (C-terminus) มีหางสั้นๆ อยู่ในไซโตพลาสซึม อีกครึ่งหนึ่งทางด้านปลายเอมีน (N-terminus) จะมี heparin-binding domain (N-APP), CuBD และ APP inhibitor domain (APPI) APP พบได้ในเซลล์หลายชนิดรวมถึงเซลล์ประสาท เนื่องจาก APP อยู่ในบริเวณที่ส่งกระแสประสาท ดังนั้น APP อาจมีบทบาทใน neurite extension และอาจเป็นโปรตีนที่ขนส่งโลหะหนัก เรียกว่า metal transporter รวมถึงอาจเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณภายในเซลล์ผ่าน domain ใน cytoplasm ที่เรียกว่า APP intracellular domain (AICD) (34)

เมตาบอลิซึมของ APP สามารถแบ่งได้เป็นสองเส้นทาง (pathway) ที่เป็นอิสระต่อกัน (35) เส้นทางแรก คือ non-amyloidogenic pathway เป็นเส้นทางที่อาศัยเอนไซม์ α -secretase และ γ -secretase ในการตัดโปรตีน APP อีกเส้นทางหนึ่ง คือ amyloidogenic pathway เป็นเส้นทางที่อาศัยเอนไซม์ β -secretase และ γ -secretase ในกระบวนการตัดโปรตีน APP (รูปที่ 2.7 บน)

ในเส้นทางแรก α -secretase ทำหน้าที่ตัด APP ภายนอกเซลล์ ตรงกับตำแหน่งกรดอะมิโนของ $A\beta$ ระหว่างตำแหน่งที่ 16 และ 17 ให้ส่วนของ soluble APP_{α} ($sAPP_{\alpha}$) หลุดออกนอกเซลล์ และส่วนของ AICD ที่มีกรดอะมิโน 83 ตัว ตามด้วย γ -secretase ไปตัด AICD บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งสามารถตัดได้หลายตำแหน่ง เช่น ตำแหน่งของกรดอะมิโนของ $A\beta$ ที่ 40 และ 42 เป็นต้น ทำให้แบ่ง APP ออกเป็น 3 ส่วน คือ $sAPP_{\alpha}$ (APP N-terminus - $A\beta$ 16), P3 ($A\beta$ 17 - $A\beta$ 40/42) และ AICD ($A\beta$ 41/43 - APP C-terminus) ดังแสดงในรูปที่ 2.7 (ล่าง) ชิ้นส่วนของ P3 จะถูกย่อยอย่างรวดเร็วและไม่มีความหมายทางพยาธิสภาพ ขณะที่ชิ้นส่วน $sAPP_{\alpha}$ อาจให้ผลปกป้องเซลล์ประสาทได้บางส่วน (23, 36)



รูปที่ 2.7 เมตาบอลิซึมของ APP รูปบนแสดงเส้นทาง non-amyloidogenic pathway และ amyloidogenic pathway รวมถึงชิ้นส่วนที่ได้จากเส้นทางดังกล่าว ส่วนรูปล่างแสดงตำแหน่งและกรดอะมิโนของ A β อยู่ภายใน APP โดยมีลูกศรชี้ตำแหน่งของ APP ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ β -, α - และ γ -secretase ตามลำดับ โดยเอนไซม์ γ -secretase สามารถตัด APP ได้หลายตำแหน่ง ขณะที่ α -secretase และ β -secretase จะตัดในตำแหน่งที่จำเพาะ ดังนั้น non-amyloidogenic pathway หรือ α -secretase pathway จะไม่สร้าง A β แต่ amyloidogenic pathway หรือ β -secretase pathway จะสามารถสร้าง A β ได้ (35)

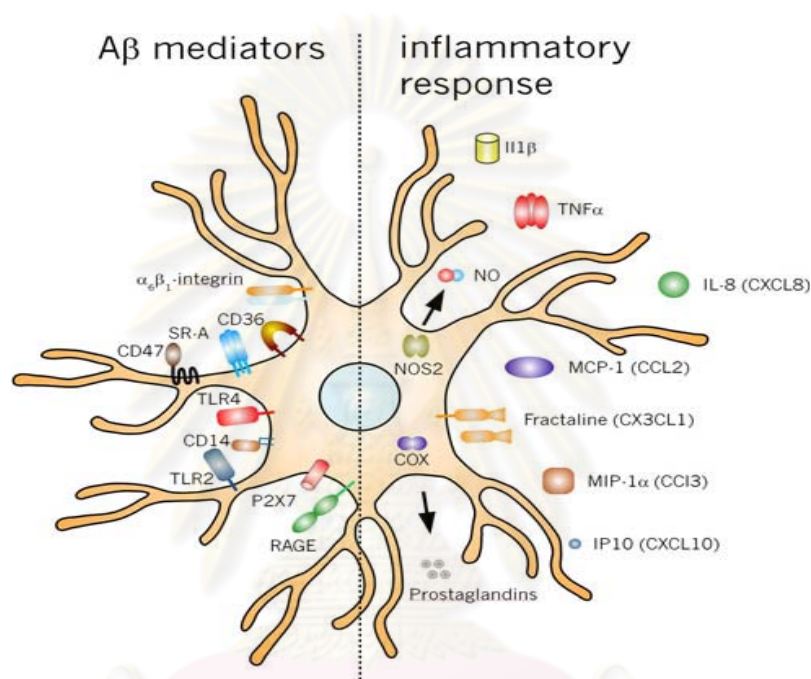
ส่วนอีกเส้นทางหนึ่ง β -secretase จะตัด APP ภายนอกเซลล์ ให้ส่วนของ soluble APP β (sAPP β) ออกมาภายนอกเซลล์ และ AICD ที่มีกรดอะมิโน 99 ตัว ตามด้วย γ -secretase ซึ่งตัด AICD บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ให้ชิ้นส่วนที่ 3 คือ A β 1-40 หรือ A β ความยาวเต็ม (A β 1-42) (34)

รูปแบบของ $A\beta$ ที่พบมากที่สุดที่สุดใน plaque คือ $A\beta$ 1-40 และ $A\beta$ 1-42 (33) ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกัน ต่างกันเพียง 2 ตัว คือ isoleucine และ alanine ที่เพิ่มขึ้นทางด้านปลายคาร์บอกซิลของ $A\beta$ 1-42 ดังแสดงในรูปที่ 2.7 (ล่าง) ในสมองของผู้สูงอายุทั่วไปสามารถพบ $A\beta$ 1-40 มากกว่า $A\beta$ 1-42 ในอัตราส่วน 10 : 1 หรือประมาณ 9 เท่า (37) แต่ในผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์จะพบการสะสมของ $A\beta$ 1-42 ได้มากกว่า $A\beta$ 1-40 ถึง 10 เท่า (17) จากการศึกษาในหลอดทดลองพบว่า $A\beta$ 1-42 ละลายน้ำได้ยากกว่า $A\beta$ 1-40 ประมาณ 4-5 เท่า (38) เนื่องจากปลายด้านคาร์บอกซิลของ $A\beta$ 1-42 จะมีกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำอยู่ถึง 14 ตัว จึงมีโครงสร้างที่แข็งแกร่งกว่า $A\beta$ 1-40 ในอุณหภูมิร่างกาย (37, 39) อาจกล่าวได้ว่าการละลายน้ำได้ไม่ดีของ $A\beta$ 1-42 ส่งเสริมการสร้างโครงสร้างทุติยภูมิของมันเอง โดยสาย fibril ของ $A\beta$ จะเข้ามาคู่ขนานและเชื่อมกันด้วยพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) เพื่อจัดรูปของโครงสร้างทุติยภูมิที่เรียกว่า β -pleated sheet (22) โครงสร้างนี้ยังพบได้จากการทดลองในหลอดทดลองที่แสดงให้เห็นว่า $A\beta$ ในความเข้มข้นสูงสามารถเกาะกลุ่มกันและสร้างโครงสร้าง β -sheet ได้ (40) การเกาะกลุ่มกันของ $A\beta$ 1-42 ยังมีรายงานว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทได้มากกว่าการเกาะกลุ่มกันของ $A\beta$ 1-40 (41)

นอกจากความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทจะเกิดจาก $A\beta$ ในรูปของ $A\beta$ ที่เกาะกลุ่มกันแล้ว $A\beta$ ในรูปก่อนการเกาะกลุ่ม เช่น โมโนเมอร์ของ $A\beta$ 1-42 ก็พบว่าเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทได้เช่นกัน ซึ่งพบได้ในการวิจัยหลายการวิจัยที่ใช้แบบจำลองต่างกัน (42) ได้แก่ แบบจำลองในหลอดทดลอง (*in vitro*) ของ Zhang และคณะ ในเซลล์ประสาทของมนุษย์ที่นำมาเพาะเลี้ยงให้เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงปฐมภูมิ (primary culture) พบว่าโมโนเมอร์ของ $A\beta$ 1-42 สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ประสาทตายผ่านทาง p53-Bax pathway ได้ (43) และการใช้ anti- $A\beta$ 1-42 antibody ในเซลล์ neuroblastoma SH-SY5Y ของมนุษย์ที่ได้รับ $A\beta$ 1-42 สามารถช่วยปกป้องเซลล์ประสาทจากความเสียหายของ $A\beta$ 1-42 (44) นอกจากนี้ การศึกษาในแบบจำลองในสิ่งมีชีวิต (*in vivo*) โดย Chiba และคณะ ได้แสดงให้เห็นว่าการได้รับ $A\beta$ 1-42 ในหนู Tg2576 จะไปรบกวน JAK2/STAT3 ในเซลล์ประสาทบริเวณ hippocampus เป็นผลให้เกิดความบกพร่องด้านความจำได้อีกด้วย (45)

ผลจากความเสียหายของ $A\beta$ สามารถพบได้ทั้งทางตรงและทางอ้อม โดยทางตรง $A\beta$ เองสามารถเป็นสารที่เป็นพิษต่อเซลล์ประสาทได้ โดยจับกับตัวรับ (receptor) เช่น receptor for advanced glycation end products (RAGE) บนผิวเซลล์ประสาท ทำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis ผ่านทาง mitogen-activated protein kinase (MAPK) (46) สุดท้ายจะเกิดการแตกของเซลล์ซึ่งเศษเซลล์เหล่านี้จะถูกเก็บกินโดยเซลล์ไมโครเกลีย (26) นอกจากนี้ $A\beta$ ยังสามารถสร้างรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้แคลเซียมไอออนสามารถเข้าไปภายในเซลล์ประสาทแล้วกระตุ้น

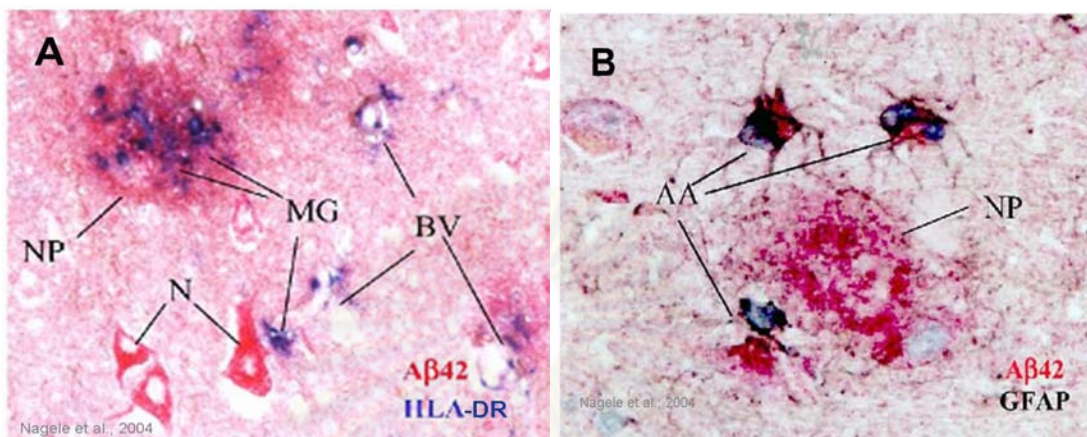
MAPK ทำให้เซลล์ประสาทตายแบบ apoptosis ได้เช่นเดียวกัน (31) ส่วนพิษโดยอ้อมของ A β คือ การที่ A β ไปกระตุ้นเซลล์ไมโครเกลียผ่านทางตัวรับดังแสดงในรูปที่ 2.8 แล้วปล่อย proinflammatory cytokines, proteolytic enzyme, complement protein, และ neurotoxin ออกมาทำลายเซลล์ประสาท (47) หลักฐานเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าเซลล์ไมโครเกลียเป็นเซลล์ที่มีความสัมพันธ์กับ A β และมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเกิดพยาธิสภาพของโรคอัลไซเมอร์



รูปที่ 2.8 ตัวรับบนผิวเซลล์ของเซลล์ไมโครเกลียที่ตอบสนองต่อ A β (48)

เซลล์ไมโครเกลียเป็นเซลล์ค้ำจุนในระบบประสาท (neuroglia) ที่มีขนาดเล็กที่สุด มีอยู่ประมาณ 10% ของเซลล์ในระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system: CNS) กระจายตัวอยู่ทั่วสมอง แต่จะพบใน gray matter มากกว่า white matter (49) เซลล์ไมโครเกลียทำหน้าที่ในการรักษาสมดุลสภาวะแวดล้อมภายในสมองคล้ายกับ macrophage ในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ลักษณะของเซลล์ไมโครเกลียในสภาวะปกติจะอยู่ในรูป inactive แต่ในสภาวะที่เนื้อเยื่อประสาทถูกทำลาย สภาวะอักเสบ (inflammation) การติดเชื้อ (infection) หรือสภาวะที่มีการตายของเซลล์ประสาท (degeneration) เช่น พยาธิสภาพที่มีการสะสม amyloid plaques เซลล์ไมโครเกลียจะเป็นเซลล์แรกที่ตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ เรียกระยะนี้ว่าระยะถูกกระตุ้น (activating state) (50-51) การสะสมของ amyloid plaques สามารถดึงดูดเซลล์ไมโครเกลียให้เคลื่อนตัวไปยัง amyloid plaques ที่เกิดใหม่ได้ภายใน 1-2 วัน (51) และสามารถพบกลุ่มของ

เซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นอยู่ภายในแกนกลาง (core) ของ compact amyloid plaques (รูปที่ 2.9A) (52) โดยพบเซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นอยู่ใน amyloid plaque ได้ถึง 20% (53)



รูปที่ 2.9 ตำแหน่งที่แตกต่างกันของกลุ่มของเซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นและกลุ่มของเซลล์แอสโตรไซต์ที่ถูกกระตุ้น (activated astrocytes) ที่สัมพันธ์กับ core ของ neuron-derived plaque (NP) โดยการย้อมผสมของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ด้วยวิธี double labeling immunostainings โดยรูปซ้ายใช้ anti-A β 1-42 (สีแดง) และ HLA-DR (สีน้ำเงิน) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นเซลล์ไมโครเกลีย และรูปขวาใช้ anti-A β 1-42 (สีแดง) และ GFAP (สีดำ) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ถึงเซลล์แอสโตรไซต์ แสดงให้เห็นว่าเซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นพบอยู่ใน core ของ amyloid plaques ขณะที่เซลล์แอสโตรไซต์ที่ถูกกระตุ้นจะพบอยู่รอบนอกของ amyloid plaque (52)

ความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดของเซลล์ไมโครเกลียและ plaques นี้มาจากความพยายามของเซลล์ไมโครเกลียที่ต้องการจะกำจัด A β ที่เป็นองค์ประกอบหลักของ plaques เซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นในสมองของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ จะพบการเพิ่มจำนวน การเปลี่ยนแปลงรูปร่างและมีการเพิ่มขึ้นของ markers บนผิวเซลล์ เช่น MHC-II, CD86, CD11b, CD40, intracellular adhesion molecules-1 (ICAM-1), ionized calcium binding adapter molecule 1 (Iba-1) เป็นต้น รวมถึงมีการหลั่งสารจำพวก cytokines, chemokines และ neurotoxic mediators ร่วมกับการมีภาวะที่เซลล์ถูกทำลายด้วยสารอนุมูลอิสระ (oxidative stress) (26) โดยสามารถพบเซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นได้ในระยะแรกๆ และเกิดคู่ขนานไปกับการเจริญของ plaque จาก diffuse plaque ไปเป็น compact amyloid plaque (23) ดังนั้น จึงเชื่อว่าเซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นอยู่รอบๆ diffuse plaque นี้จะนำไปสู่การสร้าง core ของ plaque ได้ เนื่องจากสารที่หลั่งออกมา

จากเซลล์ไมโครเกลียสามารถรวมตัวกันแบบเชิงซ้อน (complex) กับ A β ได้ เช่น C1q รวมตัวกับ fibrillar A β จะกระตุ้น classical complement pathway และ serum amyloid ซึ่งจะไปเพิ่มการสร้าง proinflammatory cytokines เช่น IL-1 β , TNF- α และ IL-6 จากเซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้น (54-56) การพบการสะสม amyloid plaques เป็นจำนวนมาก อาจเกิดจากเซลล์ไมโครเกลียไม่สามารถกำจัด A β ได้ รวมทั้งมีความบกพร่องในกระบวนการ phagocytosis ด้วย เซลล์ไมโครเกลียจึงอาจเป็นเสมือนแหล่งผลิต cytokines ที่เหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการอักเสบอย่างเรื้อรัง และนำไปสู่ความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาท (neurotoxicity) การสะสมของ amyloid plaque เป็นเวลานานยังสามารถเหนี่ยวนำให้เกิด oxidative stress ซึ่งทำลายเซลล์ประสาทและกระตุ้นเซลล์ไมโครเกลียได้อย่างต่อเนื่อง เซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นจะกลายเป็นแหล่งของ ROS และอนุมูลอิสระของไนตริกออกไซด์ (20) เป็นไปได้ว่า oxidative stress น่าจะเป็นอีกกระบวนการหนึ่งที่ส่งเสริมให้เกิดการอักเสบในระบบประสาทผ่านการกระตุ้นเซลล์ไมโครเกลียด้วย A β หลักฐานเหล่านี้แสดงให้เห็นได้ว่าเซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นในระยะแรกๆ อาจมีกลไกหรือกระบวนการกำจัด A β ที่ดีกว่าเซลล์ไมโครเกลียในระยะหลังๆ เป็นไปได้ว่าอาจจะมีโมเลกุลบางโมเลกุลที่สามารถหลั่งออกมาเพื่อควบคุมการทำงานของเซลล์ไมโครเกลียได้ตั้งแต่ระยะต้นๆ การศึกษาถึงสิ่งที่หลั่งออกมาจากเซลล์ไมโครเกลียจึงอาจช่วยให้เข้าใจถึงการทำงานของเซลล์ไมโครเกลียและกลไกที่เป็นไปได้ของการเกิดพยาธิสภาพของโรคอัลไซเมอร์

การศึกษากการเปลี่ยนแปลงในสมองเป็นไปได้ยาก เนื่องจากไม่สามารถนำชิ้นเนื้อจากสมองของผู้ป่วยที่ยังมีชีวิตอยู่มาศึกษาได้ นอกจากการตรวจวิเคราะห์พยาธิสภาพหลังการเสียชีวิต ซึ่งให้ความแม่นยำสูงในการวินิจฉัยโรคอัลไซเมอร์ จึงมีความจำเป็นต้องหา biomarkers อื่นๆ ที่สามารถบ่งบอกถึงการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นภายในสมอง มีความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ต่อโรคอัลไซเมอร์สูง รวมถึงสามารถตรวจพบได้ง่ายและสร้างความเจ็บปวดให้ผู้พวายน้อยที่สุด โดยความไว คือ โอกาสที่ผู้เป็นโรคจะได้รับผลตรวจว่าเป็นโรค และความจำเพาะ คือ โอกาสที่ผู้ที่ไม่ได้เป็นโรคจะได้รับผลการตรวจว่าไม่เป็นโรค หลายงานวิจัยจึงมีความพยายามที่จะหา biomarkers ในระดับโมเลกุลที่มีการเปลี่ยนแปลงในสมอง CSF หรือพลาสมา ก่อนที่ผู้ป่วยจะเสียชีวิต (57) โดยโมเลกุลส่วนมากที่นำมาใช้เป็น biomarkers ในปัจจุบัน มักจะพบว่าเป็นโปรตีน ดังนั้น การศึกษาด้านชีวเคมีที่เรียกว่า “secretome” ซึ่งเป็นการศึกษาโปรตีนทั้งหมดที่หลั่งออกมาจากเซลล์และเป็นวิธีที่กำลังได้รับความนิยมในปัจจุบัน จึงนำมาใช้ในการศึกษาเพื่อให้ได้ biomarkers ออกมาเป็นจำนวนมากในการศึกษาเพียงครั้งเดียว คำว่า secretome นี้ได้ถูกเรียกและทดลองใช้ครั้งแรกโดย Tjalsma และคณะ ในปี 2000 เพื่อหาโปรตีนที่หลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกเพื่อใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุดในด้าน

อุตสาหกรรมหมักดอง (58) การได้มาของโปรตีนเป็นจำนวนมากนี้จะช่วยเพิ่มโอกาสในการค้นหา biomarkers ใหม่ ๆ ที่อาจนำมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องมือในการวินิจฉัยโรคและติดตามความก้าวหน้าของโรคอัลไซเมอร์ต่อไป

Biomarkers ของโรคอัลไซเมอร์ในงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการศึกษาจากตัวอย่าง (specimen) หลายแหล่งจากผู้ป่วยที่ยังมีชีวิตอยู่ เช่น CSF และพลาสมา การศึกษา biomarkers ที่พบใน CSF นี้เป็นเสมือนหน้าต่างของเมตาบอลิซึมที่เกิดขึ้นในสมอง โดยคาดว่าโปรตีนประมาณ 20% ของ CSF เป็นโปรตีนที่ได้มาจากสมอง (59) ขณะที่พลาสมาจะเป็นเสมือนแหล่งที่รวมสารต่างๆ ที่ได้จากผู้ป่วยง่ายที่สุด โดย biomarkers ที่ได้รับการยอมรับให้ใช้ได้ (validation) ในปัจจุบัน ได้แก่ $A\beta$ 1-42 และ p-tau

$A\beta$ 1-42 มีรายงานว่าลดลงในผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์เทียบกับกลุ่มที่ไม่มีอาการสมองเสื่อม มีความไว 86% และความจำเพาะ 90% ในการวินิจฉัยโรค อัลไซเมอร์ที่เชื่อมโยงกับพยาธิสภาพของ tau และ $A\beta$ ในสมอง (60) โดยเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน (gold standard) คือ การตรวจสอบพยาธิสภาพสมองของผู้ป่วยหลังการเสียชีวิต อย่างไรก็ตาม พบว่า $A\beta$ 1-42 ใน CSF สัมพันธ์กับการวินิจฉัยโรคอัลไซเมอร์ในระยะท้ายๆ แล้ว อีกทั้งการเลือกใช้ตัวอย่างจาก CSF ไม่สามารถนำมาใช้ตรวจวิเคราะห์เป็นงานประจำทางคลินิกได้ เนื่องจากสร้างความเจ็บปวดให้กับผู้ป่วยมาก และแม้ว่าจะมีการตรวจพบ $A\beta$ 1-42 ในพลาสมา แต่ก็ยังไม่มีความไวและความจำเพาะที่จะใช้ในการช่วยวินิจฉัยโรคอัลไซเมอร์

ส่วน p-tau และ total tau (t-tau) ก็เป็น biomarkers ที่พบได้ใน CSF ซึ่งสะท้อนถึงการถูกทำลายและการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทที่เกิดขึ้นในสมองด้วย (57) สามารถตรวจพบ p-tau และ t-tau สูงขึ้นใน CSF ของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ โดย p-tau มีความไวและความจำเพาะอยู่ที่ 80% และ 90% ตามลำดับ ในขณะที่ t-tau มีความไวและความจำเพาะอยู่ที่ 85% และ 58% ตามลำดับ แต่ทั้ง p-tau และ t-tau ยังอาจพบสูงขึ้นได้ใน CSF ของผู้ป่วยโรคทางระบบประสาทอื่นๆ ได้ เช่น frontotemporal lobe dementia, normal pressure hydrocephalus, Creutzfeldt-Jakob disease (61) และสัมพันธ์กับโรคอัลไซเมอร์ในระยะท้ายเช่นเดียวกับ $A\beta$ 1-42 นอกจากนี้ทั้ง p-tau และ t-tau ก็ไม่สามารถบ่งชี้ถึงสภาวะก่อนที่จะมีการถูกทำลายของเซลล์ประสาทซึ่งนำไปสู่พยาธิสภาพของโรคอัลไซเมอร์ได้

ส่วน biomarkers ในพลาสมาได้มีการถูกเสนอขึ้นมาเป็นจำนวนมาก เนื่องจากการเลือกใช้พลาสมาของผู้ป่วยสร้างความเจ็บปวดให้แก่ผู้ป่วยได้น้อยกว่าการเลือกใช้ CSF biomarkers เหล่านี้ ได้แก่ F2-isoprostane, 3-nitrotyrosin, 24S-hydrocholesterol (24S-OHC),

27-hydroxycholesterol (27-OH), homocysteine, APOE, Alzheimer Associated Protein (ALZAS) และโมเลกุลที่ตอบสนองต่อการอักเสบ เช่น α -1-antichymotrypsin, IL-1 β , IL-6, TNF- α , C-reactive protein, C1q complementary systems เป็นต้น แต่ยังมีไม่มี biomarkers ตัวใดที่มีความไวและความจำเพาะต่อการวินิจฉัยโรคอัลไซเมอร์ (60) แม้ว่า biomarkers ในพลาสมาจะยังไม่สามารถใช้วินิจฉัยโรคอัลไซเมอร์ได้ แต่การตรวจวัดดัชนีเหล่านี้อาจมีประโยชน์ต่อการศึกษาทางคลินิกในการช่วยประเมินผลของยาที่ใช้ในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ได้ ดังนั้น การค้นหา biomarkers ในพลาสมา ก็ยังคงได้รับความสนใจศึกษาอยู่จนกระทั่งปัจจุบัน

ด้วยความต้องการหา biomarkers ที่สามารถบอกถึงการเปลี่ยนแปลงในระยะแรกของโรคอัลไซเมอร์ ในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกใช้เซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นด้วย A β ซึ่งเป็นแบบจำลองที่พบว่าเซลล์ไมโครเกลียมีความสอดคล้องกับพยาธิสภาพของโรคอัลไซเมอร์ในระยะต้นๆ มาทำการศึกษา secretome โดยมุ่งหวังว่าโปรตีนที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้จะช่วยให้เข้าใจถึงพยาธิสภาพในระดับโมเลกุลของโรคอัลไซเมอร์ได้ โดยอาจนำมาประยุกต์ใช้เป็น biomarkers ของโรคอัลไซเมอร์ในระยะแรกๆ และอาจนำ biomarkers ที่ได้เหล่านี้มาพัฒนายาที่มีข้ออยู่ในปัจจุบัน (symptomatic drugs) และยาที่กำลังพัฒนา (disease-modifying drugs) ให้มีประสิทธิภาพสูงสุดที่จะชะลอหรือยับยั้งการตายของเซลล์ประสาทในสมองของผู้สูงอายุที่เสี่ยงต่อการเป็นโรคอัลไซเมอร์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1. เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อ NUAIRE DH AUTOFLOW CO₂ Air-Jacketed Incubator (B.K.TECH ASSOCIATES)
2. ตู้ปลอดเชื้อ NUAIRE Biological Safety Cabinets Class II (B.K.TECH ASSOCIATES)
3. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ MEMMERT (K.K.SCIENTIFIC)
4. กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับพร้อมกล้องดิจิทัล NIKON ECLIPSE TS100 (NIKON)
5. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน BOECO U-32R (NOVELMED)
6. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนควบคุมอุณหภูมิ Centrifuge 5415R (Eppendorf)
7. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ HIRAYAMA HICLAVE™ HVE-50 (BECTHAI)
8. เครื่องให้ความร้อนแบบแห้ง MEMMERT (K.K.SCIENTIFIC)
9. ตู้เย็น SCD/MDC (SYSTEMform)
10. ตู้เย็นแช่แข็ง SANYO BIOLOGICAL FREEZER MDF-U537 (THANES Development)
11. ตู้เย็นแช่แข็งอุณหภูมิต่ำ SANYO ULTRA LOW MDF-U5086W (THANES Development)
12. เครื่องวัดความเข้มข้นสารละลายด้วยคลื่นแสง SmatSpec™3000 (BIO-RAD)
13. เครื่องแยกโปรตีน miniVE Holfer (Amersham Biosciences)
14. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า Electrophoresis Power Supply-EPS 1001 (Amersham Biosciences)
15. เครื่องเขย่าผสมสาร ORBITAL SHAKER SO1 (Stnart)
16. เครื่องกวาดภาพ ImageScanner (Amersham Biosciences)
17. เครื่องให้ความร้อนควบคุมอุณหภูมิ ThermoMixer Comfort (Eppendorf)
18. Q-TOF mass spectrometer (MicroMass)
19. เตาให้ความร้อนพร้อมชุดกวนสารละลาย HOT PLATE STIRRER HS-115 (HARIKUL GROUP)
20. เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง pH Meter Lab860 (Schott)
21. เครื่องซั่งน้ำหนักแบบละเอียดอ่านได้ทศนิยม 2 ตำแหน่ง XT2200C (BECTHAI)

22. เครื่องชั่งน้ำหนักแบบละเอียดอ่านได้ทศนิยม 4 ตำแหน่ง XT220A (BECTHAI)
23. เครื่องเขย่าผสมสาร Labnet VX100 (National Labnet)

3.2. สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้ในการเลี้ยงและกระตุ้นเซลล์
 - 1.1. Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) (Gibco)
 - 1.2. Fetal bovine serum (FBS) (Gibco)
 - 1.3. Lipopolysaccharide (LPS) (Sigma)
 - 1.4. Amyloid beta peptide 1-42 ($A\beta$ 1-42) (Genscript)
 - 1.5. Phosphate buffer saline (PBS) (Sigma)
 - 1.6. Trypan blue (Sigma)
2. สารเคมีที่ใช้ในการวัดปริมาณ NO
 - 2.1. Griess reagent (Invitrogen)
3. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดและวัดปริมาณโปรตีน
 - 3.1. Trichloroacetic acid (TCA) (Sigma)
 - 3.2. Cold acetone (Merck)
 - 3.3. Urea (GE Healthcare)
 - 3.4. Thiourea (GE Healthcare)
 - 3.5. CHAPS (GE Healthcare)
 - 3.6. 1,4-dithiothreitol (DTT) (GE Healthcare)
 - 3.7. Bovine serum albumin (BSA) (Gibco)
 - 3.8. Bradford dye (Bio-rad)
4. สารเคมีที่ใช้ในการวิ่งโปรตีนบนเจล 1D SDS-PAGE
 - 4.1. 30% Acrylamide/Bis (Bio-rad)
 - 4.2. Tris [hydroxymethyl] aminomethane (Univar)
 - 4.3. Ammonium persulphate (Univar)
 - 4.4. Sodium dodecyl sulfate (SDS) (GE Healthcare)
 - 4.5. N'-tetramethylethylenediamine (TEMED)
 - 4.6. Glycine (GE Healthcare)
 - 4.7. Protein marker PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermantas)

5. สารเคมีสำหรับใช้ย้อมสีเจล

- 5.1. Methanol (Merck)
- 5.2. Glacial acetic acid (Merck)
- 5.3. Coomassie blue R-250 (GE Healthcare)

6. สารเคมีสำหรับใช้ย่อยโปรตีน

- 6.1. Ammonium hydrogen carbonate (Unilab)
- 6.2. Acetonitrile (ACN) (Sigma)
- 6.3. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Unilab)
- 6.4. Iodoacetamide (Amersham Biosciences)
- 6.5. Calcium chloride (Unilab)
- 6.6. Trypsin (Promega)
- 6.7. Trifluoroacetic acid (TFA) (Sigma)
- 6.8. Formic acid (Sigma)

7. สารเคมีอื่นๆ

- 7.1. HCl (Merck)
- 7.2. NaOH (Unilab)

3.3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.3.1. การเลี้ยงเซลล์ไมโครเกลีย

เซลล์ไมโครเกลีย (mouse BV₂ cell line) ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก Professor James R. Conner (Department of Neurosurgery, The Pennsylvania State University, USA) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM (Hyclone) ที่มี 5% FBS, 2mM L-glutamine, 1mM sodium pyruvate, 10 mM HEPES และ 100 U/L penicillin-streptomycin solution ถูกเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส และ 5% CO₂

3.3.2. การตรวจวัดไนตริกออกไซด์ (nitric oxide assay)

ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide) ที่เซลล์ผลิตออกมาใน medium ปริมาณ 150 ไมโครลิตร อยู่ในสภาวะที่ไม่เสถียรจะถูกเปลี่ยนให้เป็นไนไตรท์ ซึ่งสามารถตรวจวัดได้โดยใช้ Griess reagent 20 ไมโครลิตร ที่ประกอบไปด้วย 1% sulfanilamide/ 0.1% N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride/ 2.5% phosphoric acid เมื่อเติม

sulphanilic acid ไนไตรท์จะเปลี่ยนรูปไปเป็น diazonium salt และไปจับกับ N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride ได้เป็น azo dye ที่มีสีชมพู เจือจางด้วย DMEM 130 ไมโครลิตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 548 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงของไนไตรท์ในตัวอย่างถูกนำไปคำนวณหาความเข้มข้นโดยเทียบจาก standard curve ที่ได้จากโซเดียมไนไตรท์ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน ไนไตรท์ที่ได้จะใช้เป็นตัวแทนปริมาณของไนตริกออกไซด์ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้น

3.3.3. การทำ secretome

3.3.3.1. การกระตุ้นเซลล์ไมโครเกลีย

เซลล์ไมโครเกลียที่ใช้ในการทดลองนี้ถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ เซลล์ไมโครเกลียที่ไม่ถูกกระตุ้นและเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย A β 1-42 (Genscript) ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ โดยใช้ 5% DMSO เป็นตัวทำละลาย ระยะเวลาที่ใช้ในการกระตุ้น คือ 12 ชั่วโมง

3.3.3.2. การตกตะกอนโปรตีน

medium จากทั้ง 2 กลุ่ม ถูกตกตะกอนโดยใช้ TCA (62) เป็นเวลา 15 นาที ตกตะกอนโปรตีนถูกปั่นแยกที่ 15,000 x g เป็นเวลา 10 นาที และล้างด้วย cold acetone 2 รอบ โดยการปั่นตกตะกอนที่ 15,000 x g เป็นเวลา 5 นาที ตกตะกอนโปรตีนให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง และละลายใน lysis buffer ที่มี 7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS และ 2% DTT ทั้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนนำไปวัดปริมาณของโปรตีน

3.3.3.3. การวัดปริมาณของโปรตีน

โปรตีนตัวอย่าง 1 ไมโครลิตร ถูกเจือจางใน lysis bufer 799 ไมโครลิตร และนำมาผสมกับ Bradford dye (5x) (Biorad) 200 ไมโครลิตร จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้ทำปฏิกิริยากับโปรตีน เป็นเวลา 10 นาที ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร ซึ่งมีสีน้ำเงิน นำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนจาก standard curve ที่ได้จาก BSA ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน

3.3.3.4. การแยกโปรตีนบนเจล one dimensional sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE)

โปรตีนตัวอย่างปริมาณ 30 ไมโครกรัมที่ได้จากการตกตะกอน medium ของทั้ง 2 กลุ่มถูกนำมาแยกบนเจล 1D SDS-PAGE ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในการแยกโปรตีนตาม MW ด้วย

กระแสไฟฟ้า เนื้อเจลที่ใช้แยกโปรตีนแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ 4% stacking gel (13% acrylamide/Bis, 0.1% SDS, 0.05% APS, 125 mM Tris-HCl pH 6.8, TEMED) และ 12.5% separating gel (30% acrylamide/Bis, 0.1% SDS, 0.05% APS, 375 mM Tris-HCl pH 8.8, TEMED) และใช้โปรตีนมาตรฐาน (protein markers) ที่มี MW ตั้งแต่ 16-97 kDa ปริมาณ 5 ไมโครลิตร ในการเปรียบเทียบ MW ของโปรตีนที่แยกได้ จากนั้นนำไปย้อมใน 0.5% Coomassie blue ทิ้งไว้ 16-18 ชั่วโมง แล้วล้างสีด้วย destain buffer 1 (40% methanol, 10% acetic acid) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตามด้วย destain buffer 2 (10% methanol, 5% acetic acid) จนกระทั่งเห็นโปรตีนชัดเจน แล้วนำเจลทั้ง 2 กลุ่มไปบันทึกภาพด้วยเครื่อง ImageScanner

3.3.3.5. การย่อยโปรตีน

โปรตีนบนเจล 1D SDS-PAGE ที่เห็นตั้งแต่ band แรก จนถึง band สุดท้ายได้ถูกตัดโดยมีระยะห่างเท่าๆ กันประมาณ 1.5 มิลลิเมตร แล้วนำไปย่อยโปรตีนด้วยวิธี tryptic in-gel digestion โดย band แต่ละ band ได้ถูกล้างด้วย 0.1 M NH_4HCO_3 / 50% ACN 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จนกระทั่งสี Coomassie blue หลุดออกหมด จากนั้นใส่ 0.1 M NH_4HCO_3 / 10 mM DTT/ 1 mM EDTA 50 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นดูดสารละลายออก แล้วใส่ 100 mM IAA 50 มิลลิลิตร เก็บไว้ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างชิ้นเจลด้วย 0.05 M Tris-HCl, pH 8.5 ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ใน 50% ACN อีกครั้งและทำให้แห้งโดยใช้ระบบสุญญากาศ (vacuum) จากนั้นย่อยโปรตีนในเจลด้วย trypsin (Promega, WI, USA) เพื่อตัดโปรตีนตรงตำแหน่งของกรดอะมิโน lysine arginine และ proline ให้เป็นเปปไทด์สายสั้นๆ โดยใช้ trypsin ปริมาณ 1 ไมโครกรัม/ 10% acetic acid 30 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วย TFA ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ตามด้วยการใส่ 0.05 M Tris-HCl, pH 8.5/ 1 mM CaCl_2 ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และ sonicate เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นใส่ 5% formic acid/ 50% ACN ปริมาณ 40 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที sonicate อีกครั้ง เป็นเวลา 5 นาที และทำให้แห้งเป็นผงโดยใช้ระบบสุญญากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไปเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส เตรียมนำส่งไปวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนด้วยเครื่อง LC-MS/MS ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยจุฬาภรณ์

3.3.3.6. LC-MS/MS

Nanoflow liquid chromatography ได้นำมาใช้ร่วมกับ electrospray ionization (nano ESI MS/MS) และใช้ส่วนวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์แบบ Quadropole-Time of Flight (Micromass, Manchester, UK) ที่ผ่าน calibration โดยใช้ Glu-fibrinopeptide เปปไทด์ที่ได้ถูกนำมาทำให้เข้มข้นขึ้นและกำจัดเกลือออกโดยใช้คอลัมน์ 75 μm ID x 150 mm C18 PepMap column (LC Packings, Amsterdam, The Netherlands) ะด้วยสารละลายชะ A คือ 0.1% formic acid ใน 97% water ที่ผสม 3% ACN และสารละลายชะ B คือ 0.1% formic acid ใน 97% ACN ตามลำดับ เปปไทด์ที่ผ่านการย่อยได้ถูกฉีดเข้าสู่ nano-LC system และถูกแยกในส่วนวิเคราะห์ต่อไป

3.3.3.7. ชีวสารสนเทศ (bioinformatics)

ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จาก LC-MS/MS ของเปปไทด์ที่ย่อยมาจากโปรตีนที่หาล้างออกมาจากเซลล์ไมโครเกลียทั้ง 2 กลุ่ม ถูกนำไปหาชนิดของโปรตีนผ่านโปรแกรมช่วยสืบค้นข้อมูล MASCOT (www.matrixscience.com) โดยอ้างอิงจากฐานข้อมูล NCBI nr ซึ่งเป็นฐานข้อมูลปฐมภูมิที่เก็บข้อมูลไว้เป็นจำนวนมากเกี่ยวกับลำดับของสารชีวโมเลกุล เช่น นิวคลีโอไทด์ โปรตีน และข้อมูลต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับลำดับนั้น (63) โดยจะช่วยในการหาโปรตีนบางชนิดที่หายากได้ การตั้งค่าพารามิเตอร์ใช้ peptide mass tolerance = 1.2 Da; MS/MS ion mass tolerance = 0.2 Da; การยอมรับการตัดของเอนไซม์ trypsin ให้ผิดพลาดได้เพียง 1 ตำแหน่ง ประจุของเปปไทด์จำกัดที่ +1, +2 และ +3

3.4. การวิเคราะห์ข้อมูล

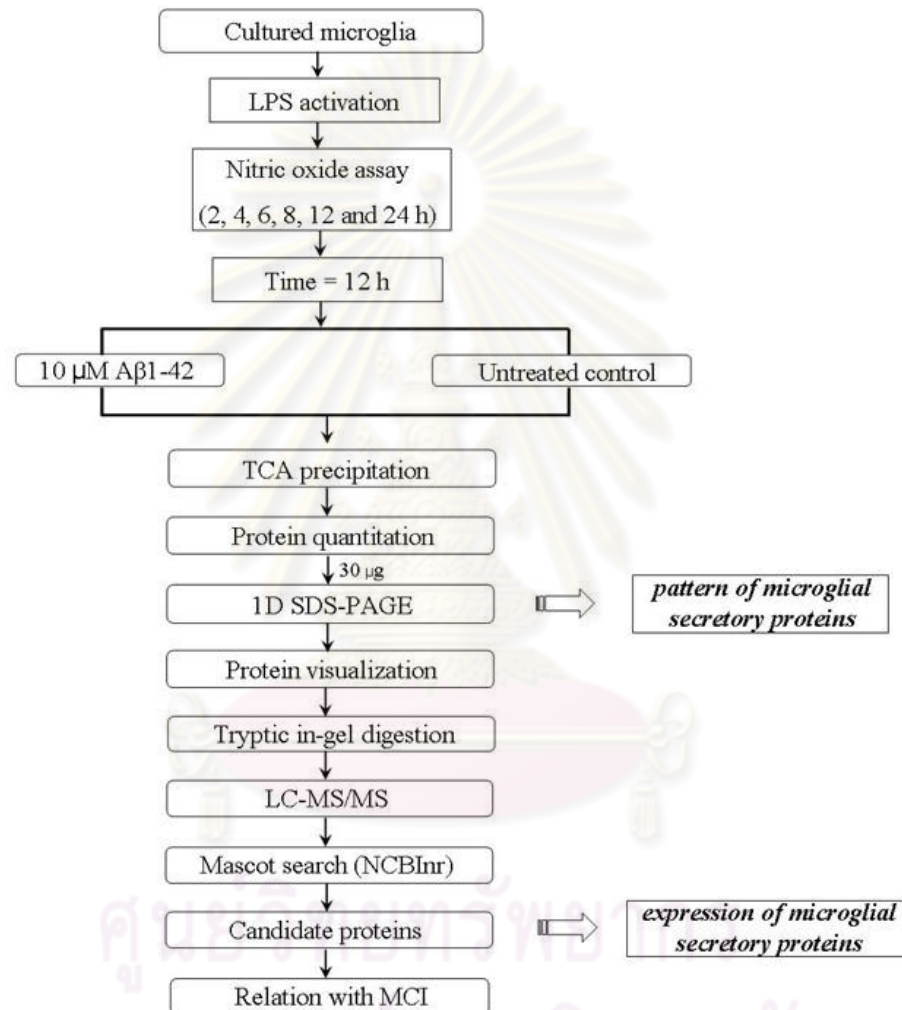
3.4.1. การวิเคราะห์ค่าในตริกออกไซด์

การวิเคราะห์ข้อมูลใช้ค่าเฉลี่ย (mean) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation: SD) และ Student's independent t-test เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของระหว่าง 2 กลุ่ม โดยความแตกต่างจะพิจารณาที่ค่าระดับนัยสำคัญที่น้อยที่สุดที่ยอมรับได้น้อยกว่า 0.05 ($p < 0.05$)

3.4.2. การวิเคราะห์ secretome

เปปไทด์ที่ได้จากการย่อยของโปรตีนแต่ละ band ถูกนำเข้าโปรแกรมสืบค้นข้อมูล MASCOT ที่อ้างอิงฐานข้อมูล NCBI nr เพื่อหาชนิดของโปรตีน เฉพาะโปรตีนที่มี MW

ใกล้เคียงกับตำแหน่งของ bands ที่ปรากฏบนเจล 1D SDS-PAGE ได้ถูกคัดเลือกและนำไปหาความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับภาวะบกพร่องความจำเล็กน้อย (mild cognitive impairment: MCI) โดยใช้โปรแกรม The Ingenuity Pathways Analysis (IPA) version 9.0 ดังแสดงในรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 สรุปขั้นตอนการทดลองเพื่อตรวจสอบรูปแบบและชนิดของโปรตีนที่หลั่งออกมาจากเซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นด้วย Aβ1-42 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับรูปแบบของโปรตีนที่หลั่งออกมาจากเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น

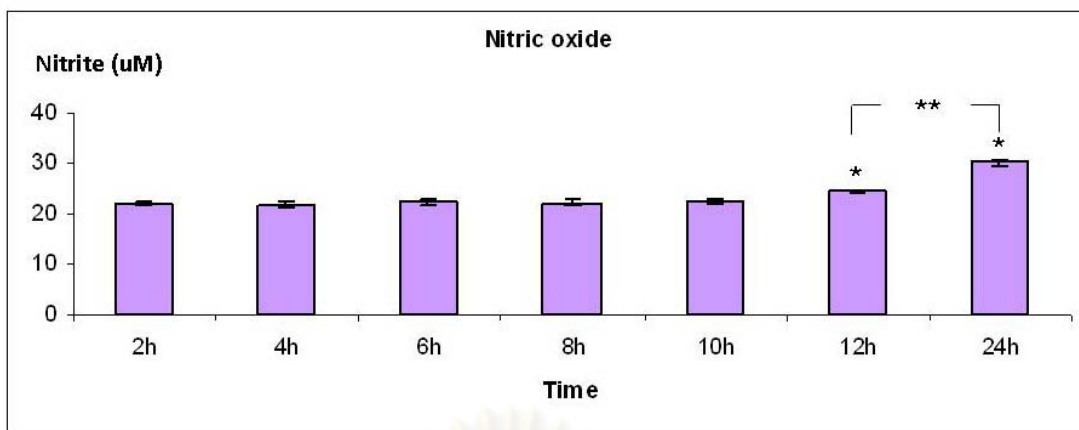
บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบสภาวะการถูกกระตุ้นของเซลล์ไมโครเกลียสอดคล้องกับพยาธิกำเนิดในระยะแรกๆ ของโรคอัลไซเมอร์ (64) ดังนั้น การศึกษาในครั้งนี้ผู้วิจัยจึงต้องการตรวจสอบสิ่งที่เซลล์ไมโครเกลียผลิตออกมาในระยะแรกๆ หลังจากถูกกระตุ้นด้วย A β ซึ่งอาจทำให้เข้าใจถึงบทบาทของเซลล์ไมโครเกลียต่อพยาธิกำเนิดและการดำเนินไปของโรคอัลไซเมอร์ โดยคาดว่าโมเลกุลที่เซลล์ผลิตออกมาหลังจากถูกกระตุ้นในระยะแรกๆ น่าจะแตกต่างไปจากโมเลกุลที่เคยมีรายงานไว้ก่อนหน้านี้ เช่น โมเลกุลในกลุ่มของ cytokines และ chemokines เป็นต้น ซึ่งถือว่าเป็นโมเลกุลในกลุ่ม late response ที่หลังจากเซลล์ที่ถูกกระตุ้น นอกจากนี้โมเลกุลที่ได้จะนำไปใช้เป็น markers ของโรคอัลไซเมอร์ในระยะแรกๆ ได้

เพื่อหาเวลาที่เหมาะสมที่เซลล์ไมโครเกลียเริ่มตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้น ซึ่งเวลาที่ได้จะใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป ผู้วิจัยได้เลือกใช้ NO ซึ่งเป็นโมเลกุลที่สามารถผลิตออกมาในระยะต้นๆ หลังจากเซลล์ไมโครเกลียถูกกระตุ้น (65-66) เป็นตัวบ่งชี้การตอบสนองของเซลล์ต่อสิ่งกระตุ้นในการทดลองนี้ได้ใช้ LPS ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นตัวกระตุ้นเซลล์ไมโครเกลีย จากนั้นปริมาณ NO ที่ถูกผลิตออกมาจากเซลล์ไมโครเกลียใน medium ที่เวลาต่างๆ คือ 2, 4, 6, 8, 10, 12 และ 24 ชั่วโมง ถูกตรวจสอบด้วย Griess reagent ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.1 พบว่า ในช่วง 2-10 ชั่วโมงหลังจากที่เซลล์ถูกกระตุ้นไม่มีการเปลี่ยนแปลงระดับของ NO ใน medium ขณะที่เวลา 12-24 ชั่วโมงสามารถตรวจวัดระดับ NO ได้ในปริมาณที่สูงขึ้นและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณ NO ที่วัดได้ที่เวลา 2-10 ชั่วโมง ดังนั้นระยะเวลาที่ 12 ชั่วโมงจึงเป็นเวลาที่สั้นที่สุดที่ใช้ในการกระตุ้นเซลล์ไมโครเกลียในระยะแรกๆ

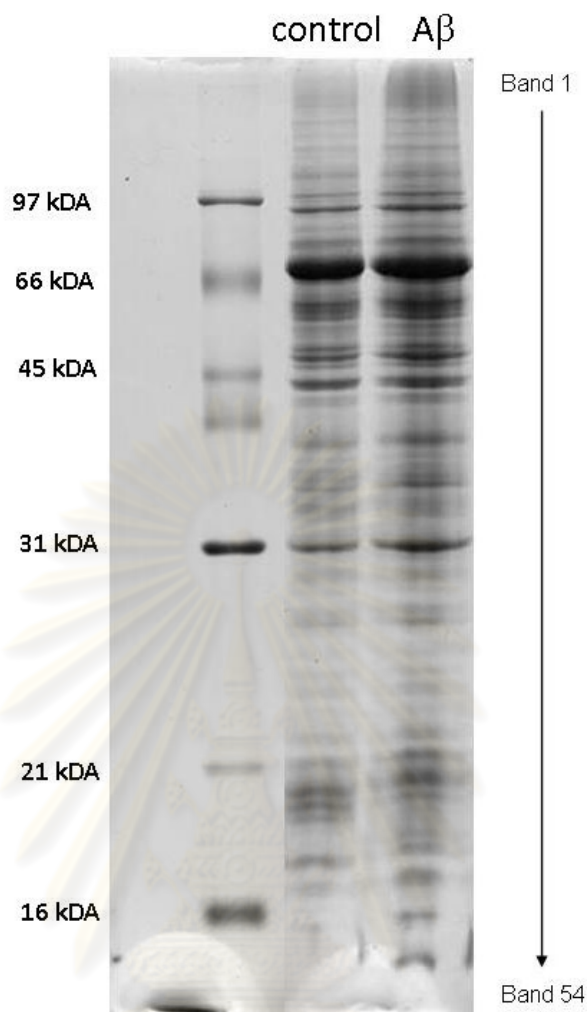
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.1 การผลิต NO จากเซลล์ไมโครเกลียหลังการกระตุ้นด้วย LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) ที่เวลา 2, 4, 6, 8, 10, 12 และ 24 ชั่วโมง โดย * แสดงความแตกต่างของการผลิต NO ในแต่ละช่วงเวลา เปรียบเทียบกับการผลิต NO ในเวลาที่สั้นกว่าอย่างมีนัยสำคัญระดับ 0.05 ($p < 0.05$) และ ** แสดงความแตกต่างของการผลิต NO ในแต่ละช่วงเวลา เปรียบเทียบกับการผลิต NO ในเวลาที่สั้นกว่าอย่างมีนัยสำคัญระดับ 0.01 ($p < 0.01$)

4.1 รูปแบบโปรตีนที่หลั่งออกมาจากเซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นด้วย $\text{A}\beta$ 1-42

เพื่อศึกษารูปแบบของโปรตีนที่หลั่งออกมาจากเซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นด้วย $\text{A}\beta$ 1-42 ได้ใช้ $\text{A}\beta$ 1-42 ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ในการกระตุ้นเซลล์ไมโครเกลียเป็นเวลา 12 ชั่วโมง โปรตีนที่หลั่งออกมาจากเซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นและไม่ถูกกระตุ้นด้วย $\text{A}\beta$ 1-42 ใน medium ได้ถูกนำไปตกตะกอนและแยกโปรตีนด้วยวิธี 1D SDS-PAGE ดังแสดงในรูปที่ 4.2 พบว่า $\text{A}\beta$ 1-42 สามารถเปลี่ยนแปลงรูปแบบของโปรตีนที่หลั่งออกมาจากเซลล์ไมโครเกลียได้ โดยรูปแบบที่เปลี่ยนแปลงนี้เห็นได้ชัดในช่วงที่มี MW ต่ำกว่า 21 kDa ลักษณะของการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น อาจเกิดจากการเพิ่มจำนวนของโปรตีนที่มีอยู่หรือการเกิดใหม่ของโปรตีนในแต่ละ band อย่างไรก็ตาม รูปแบบของ band ที่ไม่แตกต่างกันก็ได้บ่งชี้ถึงการเปลี่ยนแปลงชนิดของโปรตีนในแต่ละ band ดังนั้น เพื่อศึกษาโปรตีนที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย $\text{A}\beta$ 1-42 จึงจำเป็นต้องศึกษาองค์ประกอบของโปรตีนที่มีอยู่ในแต่ละ band ด้วย LC-MS/MS



รูปที่ 4.2 รูปแบบของโปรตีนที่หลังจากเซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นด้วย $A\beta$ 1-42 แยกตาม MW โดยใช้ 12.5% 1D SDS-PAGE โดย Lane 1: แสดงน้ำหนักโมเลกุลพื้นฐาน (kDa) Lane 2: แสดงรูปแบบโปรตีนที่หลังจากเซลล์ไมโครเกลียในสถานะที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย $A\beta$ 1-42 และ Lane 3: แสดงรูปแบบโปรตีนที่หลังจากเซลล์ไมโครเกลียในสถานะที่ถูกกระตุ้นด้วย $A\beta$ 1-42

4.2 การหาชนิดของโปรตีนที่หลังออกมาจากเซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นด้วย $A\beta$ 1-42 ด้วยวิธี LC-MS/MS โดยอ้างอิงกับฐานข้อมูล NCBIInr

หลังจากที่โปรตีนในแต่ละ band ถูกย่อยด้วย trypsin และนำไปวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS ลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ที่ได้ถูกนำไปสืบค้นชนิดของโปรตีนโดยอ้างอิงกับฐานข้อมูล NCBIInr พบโปรตีน 46 ชนิด ที่หลังออกมาจากเซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นด้วย $A\beta$ 1-42 แต่ไม่พบในเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น ดังแสดงในตารางที่ 4.1 อาจกล่าวได้ว่า โปรตีนทั้ง 46 ชนิดนี้เป็น candidate proteins ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย $A\beta$ 1-42 ให้หลังออกมาจากเซลล์ไมโครเกลีย และอาจมีความสัมพันธ์กับพยาธิกำเนิดของโรคอัลไซเมอร์ในระยะต้นๆ ได้

ตารางที่ 4.1 รายชื่อ candidate proteins ที่พบในกลุ่มของเซลล์ไมโครเกลียถูกกระตุ้นด้วย A β 1-42 แต่ไม่พบในกลุ่มของเซลล์ไมโครเกลียที่ไม่ถูกกระตุ้น

Band No.	Accession No.	Protein name	MW (kDa)
1	gi 124956	RecName: Full=Integrin alpha-M; AltName: Full=Cell surface glycoprotein MAC-1 subunit alpha; AltName: Full=CR-3 alpha chain; AltName: Full=Leukocyte adhesion receptor MO1; AltName: Full=CD11 antigen-like family member B; AltName: CD_antigen=CD11b; Flags: Precursor	127400
	gi 56119098	Retinal guanylyl cyclase 2 precursor	124346
	gi 148692501	Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 3	122671
	gi 73621177	RecName: Full=Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains protein 3; Short=LIG-3; Flags: Precursor	122611
3	gi 34328148	Topoisomerase (DNA) II beta	181795
4	gi 148682115	ATPase, Cu ⁺⁺ transporting, alpha polypeptide, isoform CRA_b	164892
	gi 148682114	ATPase, Cu ⁺⁺ transporting, alpha polypeptide, isoform CRA_a	163471
	gi 1698802	Menkes disease gene product	161903
	gi 458224	Putative copper efflux ATPase	158991
	gi 148665014	Topoisomerase (DNA) III beta, isoform CRA_a	97395
5	gi 1205976	p162 protein	161852
6	gi 454417	Huntington's Disease gene homologue	344512
	gi 1708161	RecName: Full=Huntingtin; AltName: Full=Huntington disease protein homolog; Short=HD protein homolog	344471
	gi 438805	HD protein	344452
	gi 438807	HD protein	290542
	gi 70995287	Calcineurin binding protein 1	243018

Band No.	Accession No.	Protein name	MW (kDa)
6	gi 148677040	ALS2 C-terminal like	123595
	gi 225690620	ALS2 C-terminal-like protein	108206
	gi 81862921	RecName: Full=ALS2 C-terminal-like protein	108077
8	gi 51593084	Probable global transcription activator SNF2L2 isoform 1	180609
	gi 11230802	Actinin alpha 4	104911
	gi 61097906	Actinin, alpha 1	103004
11	gi 148710091	STE20-like kinase (yeast), isoform CRA_b	94774
	gi 40556368	Protein Jade-3	93395
	gi 12832989	Ezrin	69392
	gi 50881	Ezrin	69303
	gi 32363498	RecName: Full=Radixin; AltName: Full=ESP10	68558
	gi 68226735	Protein FAM73A	67492
	gi 26351407	Protein FAM73A	67458
14	gi 34849776	Phosphorylase kinase alpha 2 (Phka2 protein)	60241
15	gi 11321424	Ral-A exchange factor RalGPS2	65507
	gi 123232348	Ral GEF with PH domain and SH3 binding motif 1	65347
	gi 148676647	Ral GEF with PH domain and SH3 binding motif 1, isoform CRA_b	63599
	gi 123232349	Ral GEF with PH domain and SH3 binding motif 1	55943
16	gi 160707990	Cathepsin C preproprotein	52343
17	gi 26325288	Anoctamin-1	53101
	gi 160358829	Hemopexin precursor	51285
	gi 1881768	Hemopexin	50514
	gi 71534081	Kcnj10 protein	48874
21	gi 29747831	Galactokinase 1	42282
	gi 93102413	Galactokinase 1	42268

Band No.	Accession No.	Protein name	MW (kDa)
21	gi 11132435	RecName: Full=Galactokinase; AltName: Full=Galactose kinase	42149
	gi 160333390	Histocompatibility 2, Q region locus 1	41296
	gi 133922588	Histocompatibility 2, K1, K region isoform 1	41276
	gi 133778955	Histocompatibility 2, D region locus 1 precursor	40810
	gi 74213886	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	40798
	gi 53841	Class I (Qa) Q1-k antigen	40723
23	gi 6753086	APEX nuclease 1	35468
27	gi 12832065	Biliverdin reductase A	34470
	gi 124487331	Biliverdin reductase A precursor	33504
	gi 30353884	Biliverdin reductase A	33477
30	gi 148664879	Phosphomannomutase 2, isoform CRA_b	27933
	gi 8393988	Phosphomannomutase 2	27639
31	gi 33468885	Calcyclin binding protein	26494
	gi 147904547	Chromatin modifying protein 6	23401
	gi 41350312	Nascent polypeptide-associated complex alpha subunit isoform b	23370
	gi 74207780	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha	23370
32	gi 126098563	Type III neuregulin 1	23216
33	gi 2897818	Huntingtin interacting protein-2	22389
	gi 141797000	Pms2 protein	21778
35	gi 148672895	R-spondin 3 homolog	28482
	gi 27370216	R-spondin 2 homolog precursor	28256
	gi 148676808	R-spondin 2 homolog, isoform CRA_a	27318
	gi 26345290	R-spondin-3	25381
	gi 12850680	R-spondin-3	24288
38	gi 2914482	Chain A, Complex Of The Second Kunitz Domain Of Tissue Factor Pathway Inhibitor With Porcine Trypsin	23460

Band No.	Accession No.	Protein name	MW (kDa)
49	gi 148707431	Torsin family 3, member A	20331

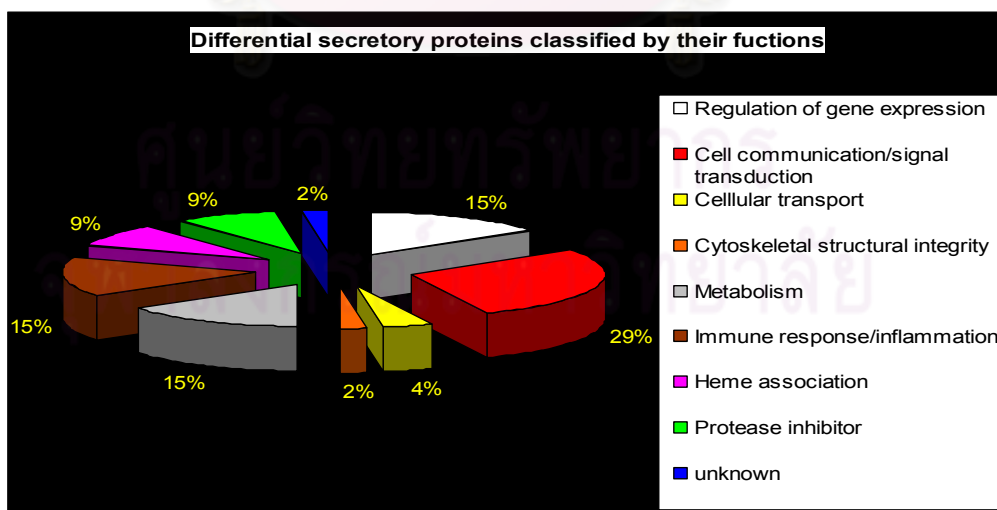
Candidate proteins ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำของ $A\beta$ 1-42 ให้หลังออกมาจากเซลล์ไมโครเกลียทั้ง 46 ชนิดนี้ สามารถจำแนกตามหน้าที่ได้เป็น 9 กลุ่ม ได้แก่ regulation of gene expression, cell communication/signal transduction, cellular transport, cytoskeletal structural integrity, metabolism, heme association, immune response/inflammation, protease inhibitor และไม่ทราบหน้าที่ชัดเจน ดังแสดงในตารางที่ 4.2 โดยมีสัดส่วนของ candidate proteins ที่จำแนกตามหน้าที่ ดังในรูปที่ 4.3 แสดงให้เห็นถึงการตอบสนองหลายด้านของเซลล์ไมโครเกลียเมื่อถูกกระตุ้นด้วย $A\beta$ 1-42

ตารางที่ 4.2 Candidate proteins ที่หลังจากเซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นด้วย $A\beta$ 1-42 จำแนกตามหน้าที่

Function	Protein Name
โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีน (7)	<ul style="list-style-type: none"> - Topoisomerase (DNA) II beta - Probable global transcription activator SNF2L2 isoform 1 - p162 protein - Protein Jade-3 - APEX nuclease 1 - Chromatin modifying protein 6 - Postmeiotic segregation increased 2 (PMS2)
โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสื่อสารภายในเซลล์ (12)	<ul style="list-style-type: none"> - Calcineurin binding protein 1 - Retinal guanylyl cyclase 2 precursor - ALS2 C-terminal-like protein - STE20-like kinase, isoform CRA_b - Ral-A exchange factor RalGPS2 - Ral GEF with PH domain and SH3 binding motif 1 - Anoctamin-1

Function	Protein Name
โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสื่อสารภายในเซลล์ (12)	<ul style="list-style-type: none"> - R-spondin 3 homolog - R-spondin 2 homolog precursor - Calcyclin binding protein - Nascent polypeptide-associated complex alpha subunit isoform b - Type III neuregulin 1
โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งของเซลล์ (2)	<ul style="list-style-type: none"> - ATPase, Cu⁺⁺ transporting, alpha polypeptide, isoform CRA_b - Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 10 (Kcnj10)
โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างของเซลล์ (1)	<ul style="list-style-type: none"> - Actinin alpha 4
โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึม (7)	<ul style="list-style-type: none"> - HD protein - Phosphorylase kinase alpha 2 (Phka2) - Galactokinase 1 - Aspartate aminotransferase, mitochondrial - Phosphomannomutase 2 - Huntingtin interacting protein-2 - Torsin family 3, member A
โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับฮีม (4)	<ul style="list-style-type: none"> - Hemopexin precursor - Hemopexin - Biliverdin reductase A precursor - Biliverdin reductase A
โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันและการอักเสบ (7)	<ul style="list-style-type: none"> - Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 3 - Cathepsin C preproprotein - Ezrin

Function	Protein Name
โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันและการอักเสบ (7)	<p>- RecName: Full=Integrin alpha-M; AltName: Full=Cell surface glycoprotein MAC-1 subunit alpha; AltName: Full=CR-3 alpha chain; AltName: Full=Leukocyte adhesion receptor MO1; AltName: Full=CD11 antigen-like family member B; AltName: CD_antigen=CD11b; Flags: Precursor</p> <p>- RecName: Full=Radixin; AltName: Full=ESP10</p> <p>- Histocompatibility 2, Q region locus 1</p> <p>- Histocompatibility 2, D region locus 1 precursor</p>
โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งเอนไซม์โปรติเอส (1)	- Chain A, Complex Of The Second Kunitz Domain Of Tissue Factor Pathway Inhibitor With Porcine Trypsin
โปรตีนที่ไม่ทราบหน้าที่ชัดเจน (1)	- Protein FAM73A

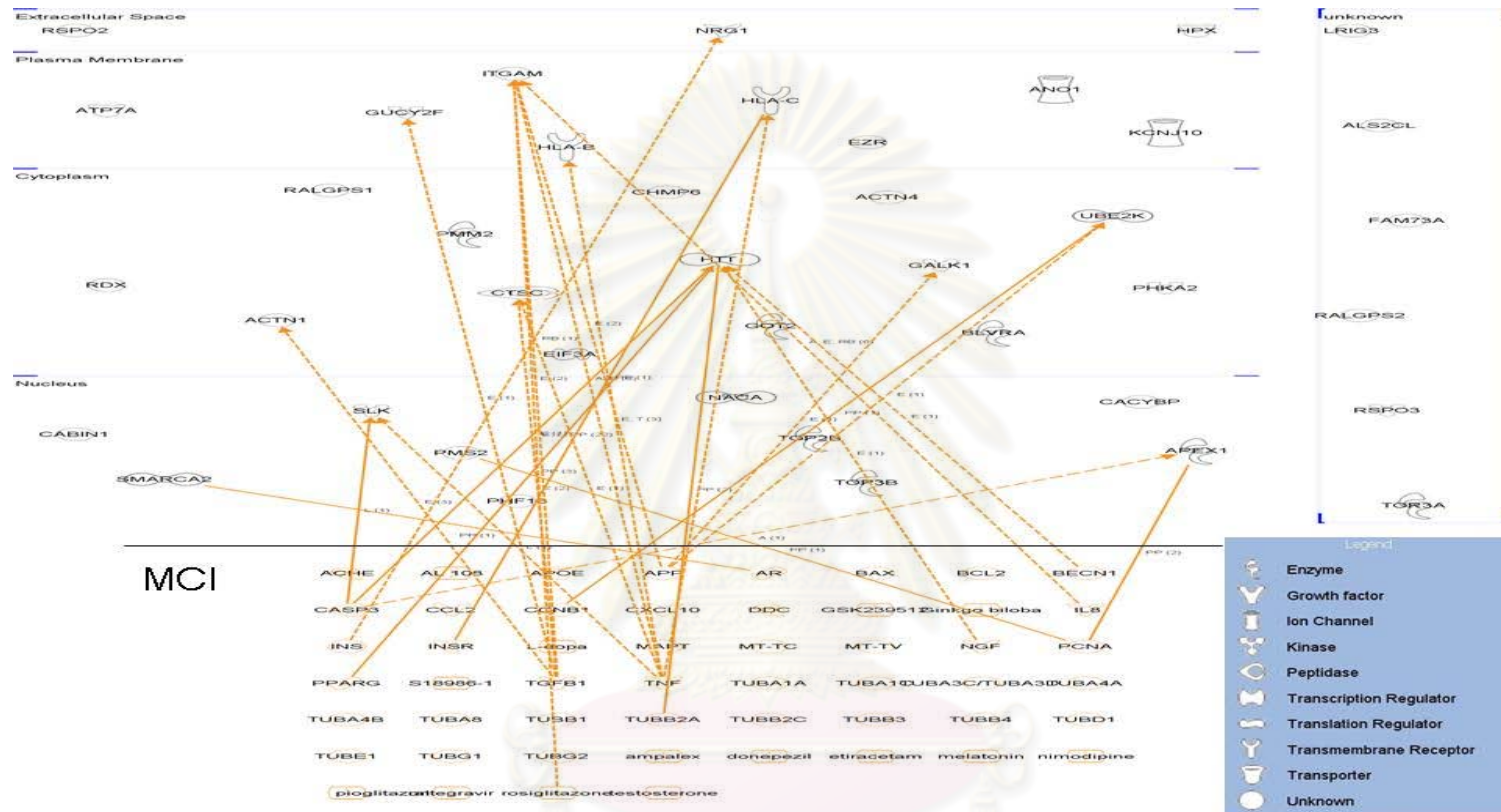


รูปที่ 4.3 แผนภาพวงกลมแสดงการจำแนก candidate proteins ที่ถูกเหนี่ยวนำให้หลั่งจากเซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นด้วย A β 1-42 ตามหน้าที่ของโปรตีน

Candidate proteins ที่ห้ล้งออกมาจากเซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นด้วย A β 1-42 ได้นำมาหาความสัมพันธ์กับโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับ mild cognitive impairment (MCI) ที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของโปรแกรม IPA พบว่ามี candidate proteins 14 ชนิด ที่มีความสัมพันธ์กับ MCI (รูปที่ 4.4) ได้แก่ probable global transcription activator SNF2L2 isoform 1, STE20-like kinase, isoform CRA_b, APEX nuclease 1, postmeiotic segregation increased 2, HD protein, actinin, alpha 1, cathepsin C preproprotein, galactokinase 1, huntingtin interacting protein-2, integrin alpha-M, retinal guanylyl cyclase 2 precursor, histocompatibility 2, Q region locus 1, histocompatibility 2, D region locus 1 precursor และ type III neuregulin 1 แสดงให้เห็นว่า candidate proteins มีความสัมพันธ์กับการเกิดพยาธิสภาพของโรคอัลไซเมอร์ในระยะต้นๆ



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.4 ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนที่หลั่งออกมาจากเซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นด้วย $A\beta_{1-42}$ กับพยาธิสภาพในระยะแรกๆ ของโรคอัลไซเมอร์ (mild cognitive impairment) โดยเส้นที่บ่งชี้หัวลูกศรแสดงถึงความสัมพันธ์โดยตรง และเส้นประที่บ่งชี้หัวลูกศรแสดงถึงความสัมพันธ์โดยอ้อม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

A β 1-42 เป็นองค์ประกอบหลักใน amyloid plaque ที่พบได้ในสมองของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ได้ถูกนำมาใช้กระตุ้นเซลล์ไมโครเกลียในการศึกษาครั้งนี้ โดยการสะสมของ A β เชื่อว่าเป็นจุดเริ่มต้นของการเกิดพยาธิสภาพของโรคอัลไซเมอร์ ตามสมมติฐาน amyloid cascade และจากหลักฐานที่แสดงให้เห็นว่าเซลล์ไมโครเกลียซึ่งเป็นเซลล์รักษาสมดุลสภาวะแวดล้อมภายในสมองถูกพบเป็นเซลล์แรกๆ เมื่อถูกกระตุ้นด้วย A β เพื่อทำหน้าที่กำจัด A β โดยมีการหลั่งโมเลกุลต่างๆ ที่อาจมีบทบาทต่อการเกิดพยาธิสภาพของโรคอัลไซเมอร์ (64) การศึกษา secretome ด้วยวิธี 1D LC-MS/MS เพื่อศึกษาโปรตีนที่หลั่งออกมาจากเซลล์เพาะเลี้ยงเคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้ (67-68) สำหรับการศึกษานี้อาจกล่าวได้ว่าเป็นการศึกษาแรกที่ศึกษาโปรตีนที่หลั่งออกมาจากเซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นด้วย A β 1-42 ด้วยวิธี 1D LC-MS/MS

การหาเวลาที่เหมาะสมที่เซลล์ไมโครเกลียเริ่มตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้น ได้ทดสอบโดยใช้ NO (65-66) ซึ่งถือว่าเป็น early marker ที่รู้ว่าหลั่งออกมาภายหลังจากเซลล์ถูกกระตุ้นด้วย LPS หรือ A β 1-42 ผ่านทาง Toll-like receptor 4 (69-70) ผลการกระตุ้นเซลล์ไมโครเกลียด้วย LPS พบว่าที่เวลา 12 ชั่วโมง เป็นระยะเวลาที่เซลล์ไมโครเกลียเริ่มผลิต NO ในระดับที่สูงกว่า baseline อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 4.1) ผู้วิจัยจึงเลือกใช้เวลาที่ 12 ชั่วโมง เพื่อดูผลการกระตุ้นเซลล์ไมโครเกลียด้วย A β 1-42 ซึ่งถือว่าเป็นระยะเวลาการกระตุ้นที่สั้นกว่าที่มีรายงานไว้ในวรรณกรรม ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้ที่เวลา 24 ชั่วโมงในการตรวจวัด cytokines ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการกระตุ้นเซลล์ไมโครเกลียด้วย A β 1-42 จะเปลี่ยนแปลงรูปแบบของโปรตีนที่หลั่งออกมา (รูปที่ 4.2) แต่การเปลี่ยนแปลงที่พบเป็นแค่เพียงบางส่วน โดยเฉพาะช่วงที่มี MW ต่ำ ซึ่งอาจจะเป็นข้อจำกัดของเทคนิค 1D SDS-PAGE ที่ไม่สามารถแยกโปรตีนที่มี MW เดียวกัน หรือใกล้เคียงกันออกจากกันได้ โดยอาจจะปรับปรุงประสิทธิภาพการแยกโปรตีนโดยใช้เทคนิค 2D SDS-PAGE เพื่อให้สามารถเห็นรูปแบบของโปรตีนที่ชัดเจนมากขึ้น

ผลจากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จาก LC-MS/MS เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI nr ผ่านโปรแกรมช่วยสืบค้นข้อมูล MASCOT ไม่พบ cytokines ที่เคยมีรายงานว่าสามารถหลั่งออกมาจากเซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นด้วย A β 1-42 (71) ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่าเวลาที่ใช้ในการกระตุ้น 12 ชั่วโมง เป็นระยะเวลาที่สั้นเมื่อเทียบกับการศึกษาทั่วไป การสะสมของ cytokines ใน medium ในระดับที่ตรวจวัดได้อาจต้องใช้เวลา นอกจากนี้ ปริมาณ cytokines อาจมีน้อยมาก จนไม่สามารถตรวจสอบโปรตีนได้ด้วยวิธี LC-MS/MS หรือโปรตีน cytokines ที่ได้

สูญเสียไปในระหว่างขั้นตอนก่อนนำเข้าวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS อีกทั้งปริมาณโปรตีนเริ่มต้นก่อนการแยกโปรตีนที่น้อยอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ไม่พบ cytokines ในการศึกษานี้

จากผลการทดลองที่พบการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน 46 ชนิด (ตารางที่ 4.1) จำแนกตามหน้าที่ได้หลายกลุ่ม คือ regulation of gene expression, cell communication/signal transduction, cellular transport, cytoskeletal structural integrity, metabolism, immune response/inflammation, heme association และ protease inhibitor ดังแสดงในตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.3 แสดงให้เห็นว่า เซลล์ไมโครเกลียไวต่อการกระตุ้นด้วย $A\beta$ 1-42 และ $A\beta$ 1-42 สามารถกระตุ้นเซลล์ไมโครเกลียให้มีการตอบสนองได้ในหลายๆ ด้าน โดย candidate proteins เช่น type III neuregulin1, biliverdin reductase A, tissue factor pathway inhibitor เป็นต้น พบว่าเคยมีรายงานมาก่อนว่ามีความเกี่ยวข้องกับพยาธิกำเนิดของโรคอัลไซเมอร์อีกด้วย

การหาความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนที่หลั่งออกมาจากเซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นด้วย $A\beta$ 1-42 กับการเกิดพยาธิสภาพในระยะแรกๆ ของโรคอัลไซเมอร์ ด้วยโปรแกรม IPA ในการสืบค้นโมเดลที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของโปรแกรมที่มีความเกี่ยวข้องกับภาวะบกพร่องความจำเล็กน้อย (mild cognitive impairment: MCI) พบว่ามี candidate proteins 14 ชนิด ที่มีความสัมพันธ์กับ MCI ดังแสดงในรูปที่ 4.4 ได้แก่ probable global transcription activator SNF2L2 isoform 1, STE20-like kinase, isoform CRA_b, APEX nuclease 1, postmeiotic segregation increased 2, HD protein, actinin, alpha 1, cathepsin C preproprotein, galactokinase 1, huntingtin interacting protein-2, integrin alpha-M, retinal guanylyl cyclase 2 precursor, histocompatibility 2, Q region locus 1, histocompatibility 2, D region locus 1 precursor และ type III neuregulin 1 โดยความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนเหล่านี้กับการเกิดพยาธิสภาพในระยะแรกๆ ของโรคอัลไซเมอร์อาจศึกษาต่อยอดเพื่อพัฒนาเป็น biomarkers ที่บ่งชี้ถึงการเปลี่ยนแปลงในระยะแรกๆ ก่อนที่จะพัฒนาไปเป็นโรคอัลไซเมอร์ได้

ตัวอย่าง candidate proteins ที่เคยมีรายงานว่าถูกพบอยู่ในรูปอิสระภายนอกเซลล์ได้ ได้แก่ biliverdin reductase A (BLVRA), tissue factor pathway inhibitor (TFPI), type III neuregulin 1 (NRG1) และ hemopexin (HPX) โดย BLVRA, TFPI และ NRG1 สามารถพบได้ในสมองของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ (72-74) และการเพิ่มขึ้นของ TFPI และ NRG1 ยังพบว่าสัมพันธ์กับ amyloid plaque (73, 75) จากการศึกษาในหลอดทดลองการเพิ่มขึ้นของ NRG1 มีผลไปกระตุ้นเซลล์ไมโครเกลียให้เกิดการแบ่งตัวผ่านทาง erbB receptor และกระตุ้นให้เซลล์ไมโครเกลียเคลื่อนตัวไปยังบริเวณที่มี amyloid plaque การหลั่งของ NRG1 จากเซลล์ไมโครเกลียที่มากขึ้น

จึงอาจส่งเสริมให้เกิดการแบ่งตัวของเซลล์ไมโครเกลียรอบๆ amyloid plaque และสามารถย้อนกลับไปกระตุ้นตัวเองให้หลั่ง IL-1 β ออกมา (75) ผ่านทาง erbB receptor ซึ่ง IL-1 β นี้เป็น cytokine ที่ทำให้เกิด neuroinflammation ซึ่งนำไปสู่การตายของเซลล์ประสาทได้ ส่วนการเพิ่มขึ้นของ TFPI ที่พบในพยาธิสภาพดังกล่าวยังไม่ทราบความสัมพันธ์ที่ชัดเจน แต่การพบ TFPI ซึ่งเป็น anticoagulant ในผู้สูงอายุ จึงสันนิษฐานได้ว่า TFPI อาจยับยั้งการแทรกซึมของเลือดเข้าสู่สมองผ่าน blood-brain barrier ที่พบความบกพร่องได้ในสมองของผู้สูงอายุ (76) ในสมองของผู้ที่มีภาวะ MCI ยังสามารถพบ BLVRA สูงขึ้นได้ ซึ่ง BLVRA เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับเส้นทางการกำจัดฮีโม (heme degradation pathway) โดยกระบวนการนี้ให้ bilirubin ซึ่งเป็น anti-oxidant ออกมาและสามารถกำจัด ROS ในสมองได้ (72,77) จึงชี้ให้เห็นว่าการหลั่ง BLVRA จากเซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นด้วย A β 1-42 อาจช่วยลดการทำลายเซลล์ประสาทจาก oxidative stress ที่พบในพยาธิกำเนิดของโรคอัลไซเมอร์ในระยะแรกๆ และการสูญเสียหน้าที่หรือการลดลงของการหลั่ง BLVRA จากเซลล์ไมโครเกลียอาจส่งเสริมการดำเนินไปของโรคอัลไซเมอร์ได้ และเนื่องจาก HPX เป็นโปรตีนขนส่งที่สามารถจับกับฮีโมได้ (78) จึงสันนิษฐานว่าการหลั่ง HPX จากเซลล์ไมโครเกลียอาจมีบทบาทในการลด oxidative stress ในสมองเช่นเดียวกับ BLVRA นอกจากนี้ HPX ยังจัดอยู่ในกลุ่ม acute phase protein ที่สามารถพบได้ในพลาสมา (79) และใน CSF (80) ซึ่งอาจบ่งชี้ถึงการเกิดการเกิดพยาธิสภาพของระบบประสาทส่วนกลางได้ จากหลักฐานเหล่านี้ช่วยสนับสนุน candidate proteins ที่ได้ว่ามีความเกี่ยวข้องกับพยาธิกำเนิดของโรคอัลไซเมอร์ในระยะแรกๆ

ผลของการศึกษาสามารถสรุปได้ดังนี้ คือ

1. การกระตุ้นเซลล์ไมโครเกลียด้วย A β 1-42 สามารถตรวจสอบการหลั่งโปรตีนออกมาได้ที่เวลา 12 ชั่วโมง
2. A β 1-42 สามารถเปลี่ยนแปลงรูปแบบของโปรตีนที่หลั่งออกมาจากเซลล์ไมโครเกลียได้
3. candidate proteins ทั้ง 46 ชนิด ที่พบเฉพาะในเซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นด้วย A β 1-42 สามารถจำแนกหน้าที่ได้หลายกลุ่ม คือ regulation of gene expression, cell communication/signal transduction, cellular transport, cytoskeletal structural integrity, metabolism, immune response/inflammation, heme association และ protease inhibitor ในจำนวนนี้พบโปรตีน 14 ชนิดที่มีความสอดคล้องกับ mild cognitive impairment (MCI) ซึ่งถือได้ว่าเป็นความผิดปกติของโรคอัลไซเมอร์ในระยะแรกๆ

รายการอ้างอิง

- (1) Vas, C.J., Rajkumar, S., Tanyakitpibal, P., and Chandra, V. Alzheimer's Disease: Of Emerging Importance. Regional Health Forum. 2002;6(1):39-48.
- (2) Alzheimer's disease: The Brain Killer. [Online]. Available from:http://www.searowhoint/en/Section1174/Section1199/Section1567/Section1823_8066.htm. [2009, March].
- (3) Sheta, E.A., Appel, S.H., and Goldknopf, I.L. 2D gel blood serum biomarkers reveal differential clinical proteomics of the neurodegenerative diseases. Expert Rev Proteomics. 2006 Feb;3(1):45-62.
- (4) Barten, D.M., and Albright, C.F. Therapeutic strategies for Alzheimer's disease. Mol Neurobiol. 2008 Apr-Jun;37(2-3):171-86.
- (5) รายงานการสาธารณสุขไทย. [Online]. Available from:<http://www.moph.go.th/ops/thp>. [2011, January].
- (6) รายงานการสาธารณสุขไทยปี 2548-2550. [Online]. Available from:http://www.moph.go.th/ops/thp/index.php?option=com_content&task=view&id=6&Itemid=2. [2010, January].
- (7) Jitapunkul, S., Chayovan, N., and Kespichaywattana, J. National Policies on Ageing and Long-term Care Provision for Older Persons in Thailand in David R. Phillips and Alfred C.M. Chan (eds). Ageing and Long-term Care: National Policies in the Asia-Pacific Bestprint Printing Co, Singapore [serial on the Internet]. 2002.
- (8) ประชากรไทยในอนาคต. [Online]. Available from:<http://www.wipsr.mahidol.ac.th/IPSR/AnnualConference/ConferenceII/Article/Article02.htm>. [2011, February].
- (9) Maurer, K., Volk, S., and Gerbaldo, H. Auguste D and Alzheimer's disease. Lancet. 1997 May 24;349(9064):1546-9.

- (10) LaDu Lab, Department of Anatomy and Cell Biology, University of Illinois at Chicago. [Online]. Available from: <http://ladulabanatuicedu>. [2009, January].
- (11) Harman, D. Alzheimer's disease pathogenesis: role of aging. Ann N Y Acad Sci. 2006 May;1067:454-60.
- (12) Giaccone, G., Morbin, M., Moda, F., Botta, M., Mazzoleni, G., Uggetti, A., et al. Neuropathology of the recessive A673V APP mutation: Alzheimer disease with distinctive features. Acta Neuropathol. 2010 Dec;120(6):803-12.
- (13) Bu, G. Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. Nat Rev Neurosci. 2009 May;10(5):333-44.
- (14) Chen, J.H., Lin, K.P., and Chen, Y.C. Risk factors for dementia. J Formos Med Assoc. 2009 Oct;108(10):754-64.
- (15) Rowland, L.P., and Pedley, T.A. Merritt's Neurology. 11th Edition. Philadelphia : Lea & Febiger 2009.
- (16) Fauci, A.S., Kasper, D.L., Longo, D.L., Braunwald, E., Hauser, S.L., and Jameson, J.L. Harrison's Principles of Internal Medicine. 17th Edition 2008.
- (17) Wang, J., Dickson, D.W., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. The levels of soluble versus insoluble brain Abeta distinguish Alzheimer's disease from normal and pathologic aging. Exp Neurol. 1999 Aug;158(2):328-37.
- (18) Wikipedia. [Online]. Available from:http://en.wikipedia.org/wiki/File:TANGLES_HIGH.jpg. [2010, September].
- (19) Blennow, K., de Leon, M.J., and Zetterberg, H. Alzheimer's disease. Lancet. 2006 Jul 29;368(9533):387-403.
- (20) Querfurth, H.W., and LaFerla, F.M. Alzheimer's disease. N Engl J Med. 2010 Jan 28;362(4):329-44.

- (21) Bamburg, J.R., and Bloom, G.S. Cytoskeletal pathologies of Alzheimer disease. Cell Motil Cytoskeleton. 2009 Aug;66(8):635-49.
- (22) Wippold, F.J., 2nd, Cairns, N., Vo, K., Holtzman, D.M., and Morris, J.C.. Neuropathology for the neuroradiologist: plaques and tangles. AJNR Am J Neuroradiol. 2008 Jan;29(1):18-22.
- (23) Jakob-Roetne, R., and Jacobsen, H. Alzheimer's disease: from pathology to therapeutic approaches. Angew Chem Int Ed Engl. 2009;48(17):3030-59.
- (24) Eikelenboom, P., van Gool, W.A., Rozemuller, A.J., Scheper, W., Veerhuis, R., and Hoozemans, J.J. Abeta Peptide and Alzheimer's Disease: Springer; 2007.
- (25) Hardy, J., and Allsop, D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. Trends Pharmacol Sci. 1991 Oct;12(10):383-8.
- (26) Lynch, M.A. The multifaceted profile of activated microglia. Mol Neurobiol. 2009 Oct;40(2):139-56.
- (27) Yao, Z.X., and Papadopoulos, V. Function of beta-amyloid in cholesterol transport: a lead to neurotoxicity. FASEB J. 2002 Oct;16(12):1677-9.
- (28) Avramovich-Tirosh, Y., Amit, T., Bar-Am, O., Weinreb, O., and Youdim, M.B. Physiological and pathological aspects of Abeta in iron homeostasis via 5'UTR in the APP mRNA and the therapeutic use of iron-chelators. BMC Neurosci. 2008;9 Suppl 2:S2.
- (29) Faller, P. Copper and zinc binding to amyloid-beta: coordination, dynamics, aggregation, reactivity and metal-ion transfer. Chembiochem. 2009 Dec 14;10(18):2837-45.
- (30) Zou, K., Gong, J.S., Yanagisawa, K., and Michikawa, M. A novel function of monomeric amyloid beta-protein serving as an antioxidant molecule against metal-induced oxidative damage. J Neurosci. 2002 Jun 15;22(12):4833-41.

- (31) Rauk, A. Why is the amyloid beta peptide of Alzheimer's disease neurotoxic? Dalton Trans. 2008 Mar 14(10):1273-82.
- (32) Deane, R., Bell, R.D., Sagare, A., and Zlokovic, B.V. Clearance of amyloid-beta peptide across the blood-brain barrier: implication for therapies in Alzheimer's disease. CNS Neurol Disord Drug Targets. 2009 Mar;8(1):16-30.
- (33) Bossy-Wetzel, E., Schwarzenbacher, R., and Lipton, S.A. Molecular pathways to neurodegeneration. Nat Med. 2004 Jul;10 Suppl:S2-9.
- (34) Carter, J., and Lippa, C.F. Beta-amyloid, neuronal death and Alzheimer's disease. Curr Mol Med. 2001 Dec;1(6):733-7.
- (35) Hunt, C.E., and Turner, A.J. Cell biology, regulation and inhibition of beta-secretase (BACE-1). FEBS J. 2009 Apr;276(7):1845-59.
- (36) Ibarreta, D., Duchen, M., Ma, D., Qiao, L., Kozikowski, A.P., and Etcheberrigaray, R. Benzolactam (BL) enhances sAPP secretion in fibroblasts and in PC12 cells. Neuroreport. 1999 Apr 6;10(5):1035-40.
- (37) Yan, Y., and Wang, C. Abeta42 is more rigid than Abeta40 at the C terminus: implications for Abeta aggregation and toxicity. J Mol Biol. 2006 Dec 15;364(5):853-62.
- (38) Harper, J.D., and Lansbury, P.T., Jr. Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. Annu Rev Biochem. 1997;66:385-407.
- (39) Morimoto, A., Irie, K., Murakami, K., Masuda, Y., Ohigashi, H., Nagao, M., et al. Analysis of the secondary structure of beta-amyloid (Abeta42) fibrils by systematic proline replacement. J Biol Chem. 2004 Dec 10;279(50):52781-8.
- (40) Trzesniewska, K., Brzyska, M., and Elbaum, D. Neurodegenerative aspects of protein aggregation. Acta Neurobiol Exp (Wars). 2004;64(1):41-52.

- (41) Jan, A., Gokce, O., Luthi-Carter, R., and Lashuel, H.A. The ratio of monomeric to aggregated forms of Abeta40 and Abeta42 is an important determinant of amyloid-beta aggregation, fibrillogenesis, and toxicity. J Biol Chem. 2008 Oct 17;283(42):28176-89.
- (42) Duyckaerts, C., Potier, M.C., and Delatour, B. Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. Acta Neuropathol. 2008 Jan;115(1):5-38.
- (43) Zhang, Y., McLaughlin, R., Goodyer, C., and LeBlanc, A. Selective cytotoxicity of intracellular amyloid beta peptide1-42 through p53 and Bax in cultured primary human neurons. J Cell Biol. 2002 Feb 4;156(3):519-29.
- (44) Solorzano-Vargas, R.S., Vasilevko, V., Acero, G., Ugen, K.E., Martinez, R., Govezensky, T., et al. Epitope mapping and neuroprotective properties of a human single chain FV antibody that binds an internal epitope of amyloid-beta 1-42. Mol Immunol. 2008 Feb;45(4):881-6.
- (45) Chiba, T., Yamada, M., Sasabe, J., Terashita, K., Shimoda, M., Matsuoka, M., et al. Amyloid-beta causes memory impairment by disturbing the JAK2/STAT3 axis in hippocampal neurons. Mol Psychiatry. 2009 Feb;14(2):206-22.
- (46) Wyss-Coray, T., McConlogue, L., Kindy, M., Schmidt, A.M., Du Yan, S., and Stern, D.M. Key signaling pathways regulate the biological activities and accumulation of amyloid-beta. Neurobiol Aging. 2001 Nov-Dec;22(6):967-73.
- (47) Giulian, D., Haverkamp, L.J., Yu, J.H., Karshin, W., Tom, D., Li, J., et al. Specific domains of beta-amyloid from Alzheimer plaque elicit neuron killing in human microglia. J Neurosci. 1996 Oct 1;16(19):6021-37.
- (48) Heneka, M.T., O'Banion, M.K., Terwel, D., and Kummer, M.P. Neuroinflammatory processes in Alzheimer's disease. J Neural Transm. 2010 Aug;117(8):919-47.

- (49) von Bernhardi, R., Tichauer, J.E., and Eugenin, J. Aging-dependent changes of microglial cells and their relevance for neurodegenerative disorders. J Neurochem. 2010 Mar;112(5):1099-114.
- (50) วินิตดา บัณฑิต, วิไล ชินธเนศ และ มณกานต์ ตันสถิตย์. Histology1: The cell and basic tissues. 2545.
- (51) Lue, L.F., Kuo, Y.M., Beach, T., and Walker, D.G. Microglia activation and anti-inflammatory regulation in Alzheimer's disease. Mol Neurobiol. 2010 Jun;41(2-3):115-28.
- (52) Nagele, R.G., Wegiel, J., Venkataraman, V., Imaki, H., and Wang, K.C. Contribution of glial cells to the development of amyloid plaques in Alzheimer's disease. Neurobiol Aging. 2004 May-Jun;25(5):663-74.
- (53) Lee, C.Y., and Landreth, G.E. The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain. J Neural Transm. 2010 Aug;117(8):949-60.
- (54) Eikelenboom, P., Veerhuis, R., Scheper, W., Rozemuller, A.J., van Gool, W.A., and Hoozemans, J.J. The significance of neuroinflammation in understanding Alzheimer's disease. J Neural Transm. 2006 Nov;113(11):1685-95.
- (55) Rogers, J., and Lue, L.F. Microglial chemotaxis, activation, and phagocytosis of amyloid beta-peptide as linked phenomena in Alzheimer's disease. Neurochem Int. 2001 Nov-Dec;39(5-6):333-40.
- (56) Rosenberg, P.B. Clinical aspects of inflammation in Alzheimer's disease. Int Rev Psychiatry. 2005 Dec;17(6):503-14.
- (57) Craig-Schapiro, R., Fagan, A.M., and Holtzman, D.M. Biomarkers of Alzheimer's disease. Neurobiol Dis. 2009 Aug;35(2):128-40.
- (58) Tjalsma, H., Bolhuis, A., Jongbloed, J.D., Bron, S., and van Dijk, J.M. Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. Microbiol Mol Biol Rev. 2000 Sep;64(3):515-47.

- (59) Korolainen, M.A., Nyman, T.A., Aittokallio, T., and Pirttila, T. An update on clinical proteomics in Alzheimer's research. J Neurochem. 2010 Mar;112(6):1386-414.
- (60) Jellinger, K.A., Janetzky, B., Attems, J., and Kienzl, E. Biomarkers for early diagnosis of Alzheimer disease: 'ALZheimer ASSociated gene'--a new blood biomarker? J Cell Mol Med. 2008 Aug;12(4):1094-117.
- (61) Mattsson, N., Blennow, K., and Zetterberg, H. CSF biomarkers: pinpointing Alzheimer pathogenesis. Ann N Y Acad Sci. 2009 Oct;1180:28-35.
- (62) Rajalingam, D., Loftis, C., Xu, J.J., and Kumar, T.K. Trichloroacetic acid-induced protein precipitation involves the reversible association of a stable partially structured intermediate. Protein Sci. 2009 May;18(5):980-93.
- (63) Bioinformatics Digest. [Online]. Available from:<http://portalinh/ssaeng-nu/pages/1803>. [2011, April].
- (64) Eikelenboom, P., and van Gool, W.A. Neuroinflammatory perspectives on the two faces of Alzheimer's disease. J Neural Transm. 2004 Mar;111(3):281-94.
- (65) Monsonego, A., Imitola, J., Zota, V., Oida, T., and Weiner, H.L. Microglia-mediated nitric oxide cytotoxicity of T cells following amyloid beta-peptide presentation to Th1 cells. J Immunol. 2003 Sep 1;171(5):2216-24.
- (66) Ooi, Y.Y., Ramasamy, R., Rahmat, Z., Subramaiam, H., Tan, S.W., Abdullah, M., et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells modulate BV2 microglia responses to lipopolysaccharide. Int Immunopharmacol. 2010 Dec;10(12):1532-40.
- (67) Wu, H.Y., Chang, Y.H., Chang, Y.C., and Liao, P.C. Proteomics analysis of nasopharyngeal carcinoma cell secretome using a hollow fiber culture system and mass spectrometry. J Proteome Res. 2009 Jan;8(1):380-9.
- (68) Srisomsap, C., Sawangareetrakul, P., Subhasitanont, P., Chokchaichamnankit, D., Chiablaem, K., Bhudhisawasdi, V., et al. Proteomic studies of

- cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma cell secretomes. J Biomed Biotechnol. 2010;2010:437143.
- (69) Jung, D.Y., Lee, H., Jung, B.Y., Ock, J., Lee, M.S., Lee, W.H., et al. TLR4, but not TLR2, signals autoregulatory apoptosis of cultured microglia: a critical role of IFN-beta as a decision maker. J Immunol. 2005 May 15;174(10):6467-76.
- (70) Tahara, K., Kim, H.D., Jin, J.J., Maxwell, J.A., Li, L., and Fukuchi, K. Role of toll-like receptor signalling in A β uptake and clearance. Brain. 2006 Nov;129(Pt 11):3006-19.
- (71) Rampe, D., Wang, L., and Ringheim, G.E. P2X7 receptor modulation of beta-amyloid- and LPS-induced cytokine secretion from human macrophages and microglia. J Neuroimmunol. 2004 Feb;147(1-2):56-61.
- (72) Mueller, C., Zhou, W., Vanmeter, A., Heiby, M., Magaki, S., Ross, M.M., et al. The heme degradation pathway is a promising serum biomarker source for the early detection of Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis. 2010;19(3):1081-91.
- (73) Hollister, R.D., Kisiel, W., Hyman, B.T. Immunohistochemical localization of tissue factor pathway inhibitor-1 (TFPI-1), a Kunitz proteinase inhibitor, in Alzheimer's disease. Brain Res. 1996 Jul 22;728(1):13-9.
- (74) Calvo, M., Zhu, N., Tsantoulas, C., Ma, Z., Grist, J., Loeb, J.A., et al. Neuregulin-ErbB signaling promotes microglial proliferation and chemotaxis contributing to microgliosis and pain after peripheral nerve injury. J Neurosci. 2010 Apr 14;30(15):5437-50.
- (75) Chaudhury, A.R., Gerecke, K.M., Wyss, J.M., Morgan, D.G., Gordon, M.N., and Carroll, S.L. Neuregulin-1 and erbB4 immunoreactivity is associated with neuritic plaques in Alzheimer disease brain and in a transgenic model of Alzheimer disease. J Neuropathol Exp Neurol. 2003 Jan;62(1):42-54.

- (76) Popescu, B.O., Toescu, E.C., Popescu, L.M., Bajenaru, O., Muresanu, D.F., Schultzberg, M., et al. Blood-brain barrier alterations in ageing and dementia. J Neurol Sci. 2009 Aug 15;283(1-2):99-106.
- (77) Kimpara, T., Takeda, A., Yamaguchi, T., Arai, H., Okita, N., Takase, S., et al. Increased bilirubins and their derivatives in cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease. Neurobiol Aging. 2000 Jul-Aug;21(4):551-4.
- (78) Wagner, K.R., Sharp, F.R., Ardizzone, T.D., Lu, A., and Clark, J.F. Heme and iron metabolism: role in cerebral hemorrhage. J Cereb Blood Flow Metab. 2003 Jun;23(6):629-52.
- (79) Vinchi, F., Gastaldi, S., Silengo, L., Altruda, F., and Tolosano, E. Hemopexin prevents endothelial damage and liver congestion in a mouse model of heme overload. Am J Pathol. 2008 Jul;173(1):289-99.
- (80) Hvidberg, V., Maniecki, M.B., Jacobsen, C., Hojrup, P., Moller, H.J., and Moestrup, S.K. Identification of the receptor scavenging hemopexin-heme complexes. Blood. 2005 Oct 1;106(7):2572-9.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก ก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางแสดงโปรตีนที่หลังออกมาจากเซลล์ไมโครเกลียที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย A β 1-42 ในบริเวณที่เห็นการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของโปรตีนที่หลังออกมาจากเซลล์ไมโครเกลีย วิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS โดยอ้างอิงจากฐานข้อมูล NCBI nr

Band	Accession No.	Description	MW	pI	Peptide match	%sequence coverage	Score	Ion score	Sequence
C42	gi 6679439	peptidylprolyl isomerase A	17960	7.74	2	10%	63	89	R.VSFELFADK.V K.FEDENFILK.H
	gi 12846244	unnamed protein product	17973	8.44	2	10%	63	89	R.VSFELFADK.V K.FEDENFILK.H
	gi 74146841	unnamed protein product	17933	7.74	2	10%	63	89	R.VSFELFADK.V K.FEDENFILK.H
	gi 74191492	unnamed protein product	17932	7.72	2	10%	63	89	R.VSFELFADK.V K.FEDENFILK.H
	gi 149257773	hypothetical protein	18003	6.2	2	10%	63	89	R.VSFELFADK.V K.FEDENFILK.H
	gi 9966867	eIF-5A2 protein	16782	5.38	3	15%	46	64	K.EIEGK.Y K.NGFVWLK.G K.VHLVGIDIFTGK.K
	gi 6755368	ribosomal protein S18	17708	10.99	1	7%	38	38	K.YSQVLANGLDNK.L
	gi 74197062	unnamed protein product	17736	11.1	1	7%	38	38	K.YSQVLANGLDNK.L
	gi 149252587	similar to ribosomal protein	17680	10.4	1	7%	38	38	K.YSQVLANGLDNK.L

Band	Accession No.	Description	MW	pI	Peptide match	%sequence coverage	Score	Ion score	Sequence
C42	gi 149259085	similar to ribosomal protein isoform 1	16723	10.96	1	8%	38	38	K.YSQVLANGLDNK.L
	gi 149263957	hypothetical protein	17738	10.85	1	7%	38	38	K.YSQVLANGLDNK.L
	gi 149264584	similar to ribosomal protein	17680	10.86	1	7%	38	38	K.YSQVLANGLDNK.L
	gi 149264635	similar to ribosomal protein	17661	10.74	1	7%	38	38	K.YSQVLANGLDNK.L
	gi 4506685	ribosomal protein S13	17212	10.53	2	14%	28	41	K.GLSQSALPYR.R K.GLTPSQIGVILR.D
	gi 15029927	Rps13 protein	16132	10.72	2	15%	28	41	K.GLSQSALPYR.R K.GLTPSQIGVILR.D
	gi 82918395	hypothetical protein	17238	10.55	2	14%	28	41	K.GLSQSALPYR.R K.GLTPSQIGVILR.D
	gi 149257815	hypothetical protein	17213	10.47	2	14%	28	41	K.GLSQSALPYR.R K.GLTPSQIGVILR.D
	gi 12847552	unnamed protein product	19536	10.33	2	8%	0	33	K.STELLIR.K R.EIAQDFK.T
	gi 30061401	histone cluster 2, H3c1	20234	11.39	2	7%	0	33	K.STELLIR.K R.EIAQDFK.T
	gi 74204635	unnamed protein product	16164	11.38	2	9%	0	33	K.STELLIR.K R.EIAQDFK.T

Band	Accession No.	Description	MW	pI	Peptide match	%sequence coverage	Score	Ion score	Sequence
C42	gi 149255706	hypothetical protein	18634	10.61	2	8%	0	33	K.STELLIR.K R.EIAQDFK.T
C43	gi 6679439	peptidylprolyl isomerase A	17960	7.74	1	5%	58	58	R.VSFELFADK.V
	gi 12846244	unnamed protein product	17973	8.44	1	5%	58	58	R.VSFELFADK.V
	gi 74146841	unnamed protein product	17933	7.74	1	5%	58	58	R.VSFELFADK.V
	gi 74191492	unnamed protein product	17932	7.72	1	5%	58	58	R.VSFELFADK.V
	gi 149257773	hypothetical protein	18003	6.2	1	5%	58	58	R.VSFELFADK.V
	gi 30061401	histone cluster 2, H3c1	20234	11.39	5	15%	0	65	R.VTIMPK.D K.DIQLAR.R K.STELLIR.K K.STELLIR.K K.STELLIR.K R.YRPGTVALR.E
	gi 74204635	unnamed protein product	16164	11.38	5	19%	0	65	R.VTIMPK.D K.DIQLAR.R K.STELLIR.K K.STELLIR.K R.YRPGTVALR.E

Band	Accession No.	Description	MW	pl	Peptide match	%sequence coverage	Score	Ion score	Sequence
C43	gi 160420308	histone cluster 1, H2bp	15555	10.25	2	13%	0	23	R.LLLPGELAK.H K.ESYSVYVYK.V
	gi 387496	tumor metastatic process-associated protein NM23	18672	8.44	2	10%	0	22	R.LLLPGELAK.H R.TFIAIKPDGVQR.G
	gi 37700232	nucleoside-diphosphate kinase 1	17197	6.84	2	11%	0	22	R.LLLPGELAK.H R.TFIAIKPDGVQR.G
	gi 148683963	mCG145251	17298	6.78	2	11%	0	22	R.LLLPGELAK.H R.TFIAIKPDGVQR.G
	gi 26337919	unnamed protein product	17456	5.24	1	3%	0	21	K.DLLKVK.G
	gi 3319311	Brachyury the second	17813	6.6	1	5%	0	21	K.CQSPESPQR.R
	gi 20378840	brachyury2	17823	6.6	1	5%	0	21	K.CQSPESPQR.R
C44	gi 82886943	PREDICTED: hypothetical protein isoform 2	16238	10.31	2	12%	32	41	R.KLTLQGQR.D R.RVLQALEGLK.M
	gi 109157563	Chain K, 2.9 Angstrom X-Ray Structure Of Hybrid Macroh2a Nucleosomes	16152	11.21	2	12%	0	33	R.HLQLAIR.N R.AGLQFPVGR.V
	gi 46049029	histone cluster 3, H2bb	17134	10.06	1	5%	0	24	R.LLLPGELAK.H

Band	Accession No.	Description	MW	pl	Peptide match	%sequence coverage	Score	Ion score	Sequence
C45	gi 159163110	Chain A, Solution Structure Of Coactosin-Like Protein (Cofilin Family) From Mus Musculus	16507	5.13	2	5%	23	11	K.EVQNFAK.E
	gi 148685167	ribosomal protein S15a, isoform CRA_a	17764	9.96	4	24%	0	30	K.EVQNFAK.E K.ILGFFF R.MNVLADALK.S K.WQNNLLPSR.Q K.HGYIGEFEIIDDHR.A
	gi 148685168	ribosomal protein S15a, isoform CRA_b	17101	10.01	4	25%	0	30	K.ILGFFF R.MNVLADALK.S K.WQNNLLPSR.Q K.HGYIGEFEIIDDHR.A
	gi 149250029	similar to ribosomal protein L35a	19827	10.36	1	3%	0	21	K.AIFAGYK.R
	gi 149267376	similar to ribosomal protein L35a	17952	10.49	1	4%	0	21	K.AIFAGYK.R
	gi 148703492	mCG22278	17480	5.23	1	5%	0	20	K.ELGVGLALR.K

Band	Accession No.	Description	MW	pI	Peptide match	%sequence coverage	Score	Ion score	Sequence
C46	gi 94378251	similar to histone H4	17228	10.59	6	32%	54	110	K.VFLENVIR.D R.DAVTYTEHAK.R R.ISGLIYEETR.G K.TVTAMDVVYALK.R R.DNIQGITKPAIR.R R.DNIQGITKPAIR.R
	gi 8393739	lysozyme 2 precursor	16678	9.11	1	10%	45	45	R.GDQSTDYGFQINSR.Y
	gi 74140002	unnamed protein product	17889	9.11	1	9%	45	45	R.GDQSTDYGFQINSR.Y
	gi 74192892	unnamed protein product	18301	9.11	1	9%	45	45	R.GDQSTDYGFQINSR.Y
	gi 149261998	PREDICTED: hypothetical protein	17095	11.97	2	7%	0	19	R.QPGRR.R R.GGASGLR.A
C47	gi 94378251	similar to histone H4	17228	10.59	8	37%	115	222	R.TLYGFGG K.VFLENVIR.D R.DAVTYTEHAK.R R.ISGLIYEETR.G K.TVTAMDVVYALK.R R.DNIQGITKPAIR.R R.DNIQGITKPAIR.R K.RISGLIYEETR.G

Band	Accession No.	Description	MW	pI	Peptide match	%sequence coverage	Score	Ion score	Sequence
C47	gi 148680649	profilin 1, isoform CRA_b	17883	6.21	1	8%	54	54	R.SSFFVNGLTGGQK.C
	gi 149258165	similar to beta-globin isoform 1	16126	7.9	2	15%	22	30	R.LLVYPWTQR.F K.VNVEEVGGEALGR.L
C48	gi 94378251	similar to histone H4	17228	10.59	2	10%	16	24	R.TLYGFGG R.ISGLIYEETR.G
	gi 1183933	haemoglobin beta-2 chain	16324	8.56	2	12%	0	43	K.LHVDPENFR.L R.LLVYPWTQR.Y
	gi 156257619	beta-globin	16223	7.94	2	12%	0	43	K.LHVDPENFR.L R.LLVYPWTQR.Y
	gi 148707431	torsin family 3, member A	20331	4.97	1	6%	0	19	K.SISQRINLFLP
	gi 22122339	pituitary tumor-transforming gene 1 protein-interacting protein precursor	19952	9	1	2%	0	17	R.LSSAR.S
	gi 26354717	unnamed protein product	20025	9	1	2%	0	17	R.LSSAR.S
	gi 74196032	unnamed protein product	19953	8.8	1	2%	0	17	R.LSSAR.S
	gi 26339134	unnamed protein product	18424	7.98	1	3%	0	17	K.ISSVK.L
C51	gi 1167510	TI-225	14167	9.33	3	22%	40	93	R.LIFAGK.Q MQIFVK.T K.TITLEVEPSDTIENVK.A

Band	Accession No.	Description	MW	pl	Peptide match	%sequence coverage	Score	Ion score	Sequence
C51	gi 4507761	ubiquitin and ribosomal protein L40 precursor	14719	9.87	3	21%	40	93	R.LIFAGK.Q MQIFVK.T K.TITLEVEPSDTIENVK.A
	gi 51701919	RecName: Full=Ubiquitin	8560	6.56	3	36%	40	93	R.LIFAGK.Q MQIFVK.T K.TITLEVEPSDTIENVK.A
	gi 82894992	PREDICTED: similar to fusion protein: ubiquitin (bases 43_513); ribosomal protein S27a (bases 217_532)	13530	10.1	3	23%	40	93	R.LIFAGK.Q MQIFVK.T K.TITLEVEPSDTIENVK.A
	gi 94369204	PREDICTED: hypothetical protein	8723	6.56	3	36%	40	93	R.LIFAGK.Q MQIFVK.T K.TITLEVEPSDTIENVK.A
	gi 94385661	PREDICTED: similar to ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1	14657	9.71	3	21%	40	93	R.LIFAGK.Q MQIFVK.T K.TITLEVEPSDTIENVK.A

Band	Accession No.	Description	MW	pl	Peptide match	%sequence coverage	Score	Ion score	Sequence
C51	gi 148688761	mCG1048340	10235	9.05	3	30%	40	93	R.LIFAGK.Q MQIFVK.T K.TITLEVEPSDTIENVK.A
	gi 148708840	mCG7881	14662	9.72	3	21%	40	93	R.LIFAGK.Q MQIFVK.T K.TITLEVEPSDTIENVK.A
	gi 149262307	PREDICTED: similar to ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1 isoform 1	14702	9.82	3	21%	40	93	R.LIFAGK.Q MQIFVK.T K.TITLEVEPSDTIENVK.A
	gi 197725012	Chain B, Crystal Structure Of Human Amsh-Lp Dub Domain In Complex With Lys63-Linked Ubiquitin Dimer	8588	6.56	3	36%	40	93	R.LIFAGK.Q MQIFVK.T K.TITLEVEPSDTIENVK.A
	gi 197725013	Chain C, Crystal Structure Of Human Amsh-Lp Dub Domain In Complex With Lys63-Linked Ubiquitin Dimer	8675	5.77	3	36%	40	93	R.LIFAGK.Q MQIFVK.T K.TITLEVEPSDTIENVK.A

Band	Accession No.	Description	MW	pl	Peptide match	%sequence coverage	Score	Ion score	Sequence
C52	gij1167510	TI-225	14167	9.33	4	31%	61	109	R.LIFAGK.Q K.EGIPPDQQR.L K.ESTLHLVLR.L K.TITLEVEPSDTIENVK.A
	gij4507761	ubiquitin and ribosomal protein L40 precursor	14719	9.87	4	31%	61	109	R.LIFAGK.Q K.EGIPPDQQR.L K.ESTLHLVLR.L K.TITLEVEPSDTIENVK.A
	gij13195690	Ubiquitin	17939	9.68	4	25%	61	109	R.LIFAGK.Q K.EGIPPDQQR.L K.ESTLHLVLR.L K.TITLEVEPSDTIENVK.A
	gij51701919	RecName: Full=Ubiquitin	8560	6.56	4	52%	61	109	R.LIFAGK.Q K.EGIPPDQQR.L K.ESTLHLVLR.L K.TITLEVEPSDTIENVK.A

Band	Accession No.	Description	MW	pl	Peptide match	%sequence coverage	Score	Ion score	Sequence
C52	gij94369204	PREDICTED: hypothetical protein	8723	6.56	4	51%	61	109	R.LIFAGK.Q K.EGIPPDQQR.L K.ESTLHLVLR.L K.TITLEVEPSDTIENVK.A
	gij94385661	PREDICTED: similar to ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1	14657	9.71	4	31%	61	109	R.LIFAGK.Q K.EGIPPDQQR.L K.ESTLHLVLR.L K.TITLEVEPSDTIENVK.A
	gij148688761	mCG1048340	10235	9.05	4	43%	61	109	R.LIFAGK.Q K.EGIPPDQQR.L K.ESTLHLVLR.L K.TITLEVEPSDTIENVK.A
	gij148708840	mCG7881	14662	9.72	4	31%	61	109	R.LIFAGK.Q K.EGIPPDQQR.L K.ESTLHLVLR.L K.TITLEVEPSDTIENVK.A

Band	Accession No.	Description	MW	pl	Peptide match	%sequence coverage	Score	Ion score	Sequence
C52	gij197725012	Chain B, Crystal Structure Of Human Amsh-Lp Dub Domain In Complex With Lys63-Linked Ubiquitin Dimer	8588	6.56	4	52%	61	109	R.LIFAGK.Q K.EGIPPDQQR.L K.ESTLHLVLR.L K.TITLEVEPSDTIENVK.A
	gij197725013	Chain C, Crystal Structure Of Human Amsh-Lp Dub Domain In Complex With Lys63-Linked Ubiquitin Dimer	8675	5.77	4	51%	61	109	R.LIFAGK.Q K.EGIPPDQQR.L K.ESTLHLVLR.L K.TITLEVEPSDTIENVK.A
	gij148684097	mCG13235	15406	9.82	4	29%	61	109	R.LIFAGK.Q K.EGLPPDQQR.L K.ESTLHLVLR.L K.TITLEVEPSDTIENVK.A

Band	Accession No.	Description	MW	pl	Peptide match	%sequence coverage	Score	Ion score	Sequence
C52	gi 149262307	PREDICTED: similar to ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1 isoform 1	14702	9.82	4	31%	61	19	R.LIFAGK.Q K.EGLPPDQQR.L K.ESTLHLVLR.L K.TITLEVEPSDTIENVK.A
	gi 51827457	PREDICTED: hypothetical protein	14345	7.82	1	7%	0	18	K.FGLYSLVIR.S
	gi 148705765	mCG65590	14473	8.66	1	6%	0	18	K.FGLYSLVIR.S
	gi 148707949	mCG145610	12936	9.26	1	6%	0	17	R.AVTVHCGR.R
	gi 148702781	mCG15041	9330	9.62	1	12%	0	15	K.CVQASTAPGGR.L
	gi 159106929	hypothetical protein LOC208501	7780	9.69	1	14%	0	15	K.CVQASTAPGGR.L
	gi 887893	KRAB-zinc finger protein 64	11592	9.48	1	5%	0	13	R.IHLGPK.A
C53	gi 148674163	mCG1027988	10481	8.92	1	5%	0	21	R.VCGEK.V
	gi 148673631	mCG1040556, isoform CRA_c	3473	8.37	1	15%	0	19	K.VTGEK.M
	gi 149261510	PREDICTED: hypothetical protein	12205	9.98	1	5%	0	13	R.ISGEK.E
	gi 149271738	PREDICTED: hypothetical protein	5762	9.04	1	10%	0	14	R.CPGEK.D
C54	gi 148702781	mCG15041	9330	9.62	1	12%	0	15	K.CVQASTAPGGR.L
	gi 159106929	hypothetical protein LOC208501	7780	9.69	1	14%	0	15	K.CVQASTAPGGR.L
	gi 196914	Ig kappa chain precursor VJ5-region	12425	8.66	1	5%	0	10	K.SGTSFK.R

ตารางแสดงโปรตีนที่หลั่งออกมาจากเซลล์ไมโครเกลียที่ถูกกระตุ้นด้วย A β 1-42 ในบริเวณที่เห็นการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของโปรตีนที่หลั่งออกมาจากเซลล์ไมโครเกลีย วิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS โดยอ้างอิงจากฐานข้อมูล NCBI nr

Band	Accession No.	Description	MW	pI	Peptide match	%sequence coverage	Score	Ion score	Sequence
AB42	gi 6680924	cofilin 1, non-muscle	18548	8.22	3	19%	109	168	K.NIILEEGK.E R.YALYDATYETK.E K.LGGSAVISLEGKPL.-
	gi 149255823	PREDICTED: similar to Cofilin-1 (Cofilin, non-muscle isoform)	18503	7.59	3	19%	109	168	K.NIILEEGK.E R.YALYDATYETK.E K.LGGSAVISLEGKPL.-
	gi 6679078	nucleoside diphosphate kinase B	17352	6.97	4	28%	56	133	R.TFIAIKPDGVQR.G R.GLVGEIHK.R K.DRPFFPGLVK.Y R.NIIHGSDSVESAEK.E
	gi 154550673	expressed in non-metastatic cells 2 protein	17352	6.97	4	28%	56	133	R.TFIAIKPDGVQR.G R.GLVGEIHK.R K.DRPFFPGLVK.Y R.NIIHGSDSVESAEK.E

Band	Accession No.	Description	MW	pI	Peptide match	%sequence coverage	Score	Ion score	Sequence
AB42	gi 6679439	peptidylprolyl isomerase A	17960	7.74	4	14%	41	77	R.VSFELFADK.V R.VSFELFADK.V K.GFGYK.G K.FEDENFILK.H
	gi 12846244	unnamed protein product	17973	8.44	4	14%	41	77	R.VSFELFADK.V R.VSFELFADK.V K.GFGYK.G K.FEDENFILK.H
	gi 74146841	unnamed protein product	17933	7.74	4	14%	41	77	R.VSFELFADK.V R.VSFELFADK.V K.GFGYK.G K.FEDENFILK.H
	gi 74191492	unnamed protein product	17932	7.72	4	14%	41	77	R.VSFELFADK.V R.VSFELFADK.V K.GFGYK.G K.FEDENFILK.H

Band	Accession No.	Description	MW	pI	Peptide match	%sequence coverage	Score	Ion score	Sequence
AB42	gi 149257773	PREDICTED: hypothetical protein	18003	6.2	4	14%	41	77	R.VSFELFADK.V R.VSFELFADK.V K.GFGYK.G K.FEDENFILK.H
	gi 4506685	ribosomal protein S13	17212	10.53	2	14%	34	38	K.GLSQSALPYR.R K.GLTPSQIGVILR.D
	gi 15029927	Rps13 protein	16132	10.72	2	0%	34	38	K.GLSQSALPYR.R K.GLTPSQIGVILR.D
	gi 82918395	PREDICTED: hypothetical protein	17238	10.55	2	0%	34	38	K.GLSQSALPYR.R K.GLTPSQIGVILR.D
	gi 149257815	PREDICTED: hypothetical protein	17213	10.47	2	0%	34	38	K.GLSQSALPYR.R K.GLTPSQIGVILR.D
	gi 94390143	PREDICTED: similar to Rps13 protein	14209	10.19	2	0%	34	38	K.GLSQSALPYR.R K.GLTPSQIGVILR.D
	gi 6755368	ribosomal protein S18	17708	10.99	3	20%	34	67	R.AGELTEDEVER.V K.IPDWFLNR.Q K.YSQVLANGLDNK.L

Band	Accession No.	Description	MW	pI	Peptide match	%sequence coverage	Score	Ion score	Sequence
AB42	gi 74197062	unnamed protein product	17736	11.10	3	20%	34	67	R.AGELTEDEVER.V K.IPDWFLNR.Q K.YSQVLANGLDNK.L
	gi 149263957	PREDICTED: hypothetical protein	17738	10.85	3	20%	34	67	R.AGELTEDEVER.V K.IPDWFLNR.Q K.YSQVLANGLDNK.L
	gi 149264584	PREDICTED: similar to ribosomal protein	17680	10.86	3	20%	34	67	R.AGELTEDEVER.V K.IPDWFLNR.Q K.YSQVLANGLDNK.L
	gi 149264635	PREDICTED: similar to ribosomal protein	17661	10.74	3	20%	34	67	R.AGELTEDEVER.V K.IPDWFLNR.Q K.YSQVLANGLDNK.L
	gi 149252587	PREDICTED: similar to ribosomal protein	17680	10.40	3	20%	34	67	R.AGELTEDEVER.V K.IPDWFLNR.Q K.YSQVLANGLDNK.L

Band	Accession No.	Description	MW	pI	Peptide match	%sequence coverage	Score	Ion score	Sequence
AB42	gi 387496	tumor metastatic process-associated protein NM23	18672	8.44	3	20%	33	71	R.TFIAIKPDGVQR.G R.GLVGEIHK.R R.NIIHGSDSVKSAEK.E
	gi 37700232	nucleoside-diphosphate kinase 1	17197	6.84	3	22%	33	71	R.TFIAIKPDGVQR.G R.GLVGEIHK.R R.NIIHGSDSVKSAEK.E
	gi 148683963	mCG145251	17298	6.78	3	22%	33	71	R.TFIAIKPDGVQR.G R.GLVGEIHK.R R.NIIHGSDSVKSAEK.E
	gi 12859724	unnamed protein product	16355	8.71	1	6%	26	26	K.YPEAPPSVR.F
	gi 20987292	Ube2v2 protein	16696	6.56	1	6%	26	26	K.YPEAPPSVR.F
	gi 26324680	unnamed protein product	16429	7.79	1	6%	26	26	K.YPEAPPSVR.F
	gi 31543918	ubiquitin-conjugating enzyme E2v2 isoform 1	16356	7.79	1	6%	26	26	K.YPEAPPSVR.F
	gi 42741690	ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1	16344	7.74	1	6%	26	26	K.YPEAPPSVR.F
	gi 220938249	ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1	19327	6.60	1	6%	26	26	K.YPEAPPSVR.F

Band	Accession No.	Description	MW	pI	Peptide match	%sequence coverage	Score	Ion score	Sequence
AB42	gi 4503545	eukaryotic translation initiation factor 5A isoform B	16821	5.08	1	7%	21	21	K.VHLVGIDIFTGK.K
	gi 9966867	eIF-5A2 protein	16782	5.38	1	5%	21	21	K.VHLVGIDIFTGK.K
	gi 12847616	unnamed protein product	16926	5.80	1	5%	21	21	K.VHLVGIDIFTGK.K
	gi 56800106	eukaryotic translation initiation factor 5A	16292	4.85	1	5%	21	21	K.VHLVGIDIFTGK.K
	gi 148680531	eukaryotic translation initiation factor 5A, isoform CRA_c	18356	5.08	1	5%	21	21	K.VHLVGIDIFTGK.K
	gi 148680533	eukaryotic translation initiation factor 5A, isoform CRA_d	19160	5.87	1	5%	21	21	K.VHLVGIDIFTGK.K
	gi 148680535	eukaryotic translation initiation factor 5A, isoform CRA_f	16592	4.95	1	5%	21	21	K.VHLVGIDIFTGK.K
	gi 148680542	eukaryotic translation initiation factor 5A, isoform CRA_j	18171	5.00	1	5%	21	21	K.VHLVGIDIFTGK.K
AB43	gi 6679439	peptidylprolyl isomerase A	17960	7.74	5	25%	66	195	M.VNPTVFFDITADDEPLGR.V R.VSFELFADK.V R.VSFELFADK.V R.SIYGEEK.F K.FEDENFILK.H

Band	Accession No.	Description	MW	pI	Peptide match	%sequence coverage	Score	Ion score	Sequence
AB43	gi 74146841	unnamed protein product	17933	7.74	5	25%	66	195	M.VNPTVFFDITADDEPLGR.V R.VSFELFADK.V R.VSFELFADK.V R.SIYGEEK.F K.FEDENFILK.H
	gi 74191492	unnamed protein product	17932	7.72	5	25%	66	195	M.VNPTVFFDITADDEPLGR.V R.VSFELFADK.V R.VSFELFADK.V R.SIYGEEK.F K.FEDENFILK.H
	gi 149257773	PREDICTED: hypothetical protein	18003	6.20	5	25%	66	195	M.VNPTVFFDITADDEPLGR.V R.VSFELFADK.V R.VSFELFADK.V R.SIYGEEK.F K.FEDENFILK.H
	gi 3097244	ribosomal protein S14	16291	10.14	2	15%	62	86	K.TPGPGAQSALR.A R.IEDVTPIPSDSTR.R
	gi 5032051	ribosomal protein S14	16263	10.07	2	15%	62	86	K.TPGPGAQSALR.A R.IEDVTPIPSDSTR.R

Band	Accession name	Description	MW	pI	Peptide match	%sequence coverage	Score	Ion score	Sequence	
AB43	gi 63680339	PREDICTED: similar to 40S ribosomal protein S14 isoform 1	16310	10.13	2	15%	62	86	K.TPGPGAQSALR.A R.IEDVTPIPSDSTR.R	
	gi 74226871	unnamed protein product	16279	9.97	2	15%	62	86	K.TPGPGAQSALR.A R.IEDVTPIPSDSTR.R	
	gi 82958328	PREDICTED: similar to 40S ribosomal protein S14 isoform 1	16324	10.13	2	15%	62	86	K.TPGPGAQSALR.A R.IEDVTPIPSDSTR.R	
	gi 30061401	histone cluster 2, H3c1	20234	11.39	4	21%	35	79	R.YRPGTVALR.E K.STELLIR.K R.EIAQDFK.T K.DIQLAR.R	
	gi 74204635	unnamed protein product	16164	11.38	4	20%	35	79	R.YRPGTVALR.E K.STELLIR.K R.EIAQDFK.T K.DIQLAR.R	
	gi 148672373	mCG49427		17836	10.7	2	14%	35	41	R.SAINEVTR.E K.LYTLVTVYVPVTTFK.N

Band	Accession name	Description	MW	pI	Peptide match	%sequence coverage	Score	Ion score	Sequence
AB43	gi 4503545	eukaryotic translation initiation factor 5A isoform B	16821	5.08	3	20%	25	57	K.NGFVWLK.G
		K.VHLVGIDIFTGK.K							
	gi 12847616	unnamed protein product	16926	5.80	3	20%	25	57	R.EDLRLPEGDLGK.E
		K.NGFVWLK.G							
	gi 56800106	eukaryotic translation initiation factor 5A	16292	4.85	3	20%	25	57	K.VHLVGIDIFTGK.K
		R.EDLRLPEGDLGK.E							
	gi 148680531	eukaryotic translation initiation factor 5A, isoform CRA_c	18356	5.08	3	18%	25	57	K.NGFVWLK.G
		K.VHLVGIDIFTGK.K							
	gi 148680533	eukaryotic translation initiation factor 5A, isoform CRA_d	19160	5.87	3	17%	25	57	R.EDLRLPEGDLGK.E
		K.NGFVWLK.G							
									K.VHLVGIDIFTGK.K
									R.EDLRLPEGDLGK.E

Band	Accession No.	Description	MW	pI	Peptide match	%sequence coverage	Score	Ion score	Sequence
AB43	gi 148680535	eukaryotic translation initiation factor 5A, isoform CRA_f	16592	4.95	3	20%	25	57	K.NGFVWLK.G K.VHLVGIDIFTGK.K R.EDLRLPEGDLGK.E
	gi 148680542	eukaryotic translation initiation factor 5A, isoform CRA_j	18171	5.00	3	18%	25	57	K.NGFVWLK.G K.VHLVGIDIFTGK.K R.EDLRLPEGDLGK.E
AB44	gi 12963511	ribosomal protein S19	16076	10.41	4	27%	62	82	R.KLTPQGQR.D K.VPEWDTVK.L K.ELAPYDENWFYTR.A R.RVLQALEGLK.M
	gi 56541224	Rps19 protein	16651	10.52	4	26%	62	82	R.KLTPQGQR.D K.VPEWDTVK.L K.ELAPYDENWFYTR.A R.RVLQALEGLK.M

Band	Accession No.	Description	MW	pI	Peptide match	%sequence coverage	Score	Ion score	Sequence
AB44	gi 94397093	PREDICTED: hypothetical protein	16215	10.52	4	27%	62	82	R.KLTPQGQR.D K.VPEWVDTVK.L K.ELAPYDENWFYTR.A R.RVLQALEGLK.M
	gi 148686705	mCG14926	16136	10.41	4	27%	62	82	R.KLTPQGQR.D K.VPEWVDTVK.L K.ELAPYDENWFYTR.A R.RVLQALEGLK.M
	gi 148692364	mCG126277, isoform CRA_b	17756	10.37	4	24%	62	82	R.KLTPQGQR.D K.VPEWVDTVK.L K.ELAPYDENWFYTR.A R.RVLQALEGLK.M
	gi 387496	tumor metastatic process-associated protein NM23	18672	8.44	2	12%	0	23	K.FLQASEDLLK.E K.DRPFFTGLVK.Y
	gi 37700232	nucleoside-diphosphate kinase 1	17197	6.84	2	0%	0	23	K.FLQASEDLLK.E K.DRPFFTGLVK.Y
	gi 148683963	mCG145251	17298	6.78	2	0%	0	23	K.FLQASEDLLK.E K.DRPFFTGLVK.Y

Band	Accession No.	Description	MW	pI	Peptide match	%sequence coverage	Score	Ion score	Sequence
AB44	gi 200796	16S ribosomal protein	16346	10.21	2	0%	0	21	R.FAGVDIR.V K.GPLQSVQVFGR.K
	gi 4506691	ribosomal protein S16	16435	10.21	2	0%	0	21	R.FAGVDIR.V K.GPLQSVQVFGR.K
	gi 52078405	Rps16 protein	17542	10.21	2	0%	0	21	R.FAGVDIR.V K.GPLQSVQVFGR.K
	gi 60334810	Rps16 protein	19262	10.21	2	0%	0	21	R.FAGVDIR.V K.GPLQSVQVFGR.K
	gi 148683908	mCG3370	16490	10.14	2	0%	0	21	R.FAGVDIR.V K.GPLQSVQVFGR.K
	gi 149262347	PREDICTED: similar to Rps16 protein	18423	10.14	2	0%	0	21	R.FAGVDIR.V K.GPLQSVQVFGR.K
AB45	gi 148685167	ribosomal protein S15a, isoform CRA_a	17764	9.96	2	20%	20	28	K.HGYIGEFEIIDDHR.A K.ILGFFF.-
	gi 148685168	ribosomal protein S15a, isoform CRA_b	17101	10.01	2	20%	20	28	K.HGYIGEFEIIDDHR.A K.ILGFFF.-

Band	Accession No.	Description	MW	pI	Peptide match	%sequence coverage	Score	Ion score	Sequence
AB45	gi 109157563	Chain K, 2.9 Angstrom X-Ray Structure Of Hybrid Macroh2a Nucleosomes	16152	11.03	2	12%	0	58	R.HLQLAIR.N R.AGLQFPVGR.V
AB46	gi 148685167	ribosomal protein S15a, isoform CRA_a	17764	9.96	3	18%	34	70	K.HGYIGEFEIIDDHR.A K.WQNNLLPSR.Q K.ILGFFF.-
	gi 148685168	ribosomal protein S15a, isoform CRA_b	17101	10.01	3	19%	34	70	K.HGYIGEFEIIDDHR.A K.WQNNLLPSR.Q K.ILGFFF.-
AB47	gi 94378251	PREDICTED: similar to histone H4	17228	10.59	3	21%	94	146	R.DNIQGITKPAIR.R R.ISGLIYEETR.G K.TVTAMDVYALK.R
	gi 148708987	mCG148440	16824	12.00	1	0%	0	21	R.GLSAPAGR.R

Band	Accession No.	Description	MW	pI	Peptide match	%sequence coverage	Score	Ion score	Sequence
AB48	gi 94378251	PREDICTED: similar to histone H4	17228	10.59	4	22%	0	72	R.TLYGFGG.- K.VFLENVIR.D R.DAVTYTEHAK.R R.ISGLIYEETR.G
AB49	gi 148707431	torsin family 3, member A	20331	4.97	1	0%	0	22	K.SISQRINLFLP.-
AB51	gi 1778802 gi 1167510	amyloid precursor protein TI-225	8893 14167	6.04 9.33	1 6	14% 30%	55 0	55 93	K.LVFFAEDVGSNK.G M.QIFVK.T R.LIFAGK.Q none.MQIFVK.T K.EGIPPDQQR.L K.ESTLHLVLR.L R.TLSDYNIQK.E
	gi 4507761	ubiquitin and ribosomal protein L40 precursor	14719	9.87	6	30%	0	93	M.QIFVK.T R.LIFAGK.Q none.MQIFVK.T K.EGIPPDQQR.L K.ESTLHLVLR.L R.TLSDYNIQK.E

Band	Accession No.	Description	MW	pI	Peptide match	%sequence coverage	Score	Ion score	Sequence
AB51	gi 51701919	RecName: Full=Ubiquitin	8560	6.56	6	51%	0	93	M.QIFVK.T R.LIFAGK.Q none.MQIFVK.T K.EGIPPDQQR.L K.ESTLHLVLR.L R.TLSDYNIQK.E
	gi 94369204	PREDICTED: hypothetical protein	8723	6.56	6	50%	0	93	M.QIFVK.T R.LIFAGK.Q none.MQIFVK.T K.EGIPPDQQR.L K.ESTLHLVLR.L R.TLSDYNIQK.E
	gi 148688761	mCG1048340	10235	9.05	6	42%	0	93	M.QIFVK.T R.LIFAGK.Q none.MQIFVK.T K.EGIPPDQQR.L K.ESTLHLVLR.L R.TLSDYNIQK.E

Band	Accession No.	Description	MW	pl	Peptide match	%sequence coverage	Score	Ion score	Sequence
AB51	gi 148708840	mCG7881	14662	9.72	6	30%	0	93	M.QIFVK.T R.LIFAGK.Q none.MQIFVK.T K.EGIPPDQQR.L K.ESTLHLVLR.L R.TLSDYNIQK.E
	gi 197725013	Chain C, Crystal Structure Of Human Amsh-Lp Dub Domain In Complex With Lys63-Linked Ubiquitin Dimer	8675	5.77	6	50%	0	93	M.QIFVK.T R.LIFAGK.Q none.MQIFVK.T K.EGIPPDQQR.L K.ESTLHLVLR.L R.TLSDYNIQK.E
AB52	gi 1167510	TI-225	14167	9.33	1	4%	0	23	R.LIFAGK.Q
	gi 4507761	ubiquitin and ribosomal protein L40 precursor	14719	9.87	1	0%	0	23	R.LIFAGK.Q
	gi 51701919	RecName: Full=Ubiquitin	8560	6.56	1	0%	0	23	R.LIFAGK.Q

Band	Accession No.	Description	MW	pI	Peptide match	%sequence coverage	Score	Ion score	Sequence
AB52	gi 82894992	PREDICTED: similar to fusion protein: ubiquitin (bases 43_513); ribosomal protein S27a (bases 217_532)	13530	10.10	1	0%	0	23	R.LIFAGK.Q
	gi 94369204	PREDICTED: hypothetical protein	8723	6.56	1	0%	0	23	R.LIFAGK.Q
	gi 94385661	PREDICTED: similar to ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1	14657	9.71	1	0%	0	23	R.LIFAGK.Q
	gi 148684097	mCG13235	15406	9.82	1	0%	0	23	R.LIFAGK.Q
	gi 148688761	mCG1048340	10235	9.05	1	0%	0	23	R.LIFAGK.Q
	gi 148708840	mCG7881	14662	9.72	1	0%	0	23	R.LIFAGK.Q
	gi 154550710	ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1	8033	6.89	1	0%	0	23	R.LIFAGK.Q
	gi 197725012	Chain B, Crystal Structure Of Human Amsh-Lp Dub Domain In Complex With Lys63-Linked Ubiquitin Dimer	8588	6.56	1	0%	0	23	R.LIFAGK.Q
	gi 197725013	Chain C, Crystal Structure Of Human Amsh-Lp Dub Domain In	8675	5.77	1	0%	0	23	R.LIFAGK.Q

Band	Accession No.	Description	MW	pI	Peptide match	%sequence coverage	Score	Ion score	Sequence
AB52	gi 148702781	mCG15041	9330	9.62	1	0%	0	17	K.CVQASTAPGGR.L
	gi 159106929	hypothetical protein LOC208501	7780	9.69	1	0%	0	17	K.CVQASTAPGGR.L
	gi 74178417	unnamed protein product	15072	9.46	1	0%	0	17	K.RNLSPR.E
	gi 1778802	amyloid precursor protein	8893	6.04	1	0%	55	55	K.LVFFAEDVGSNK.G
AB53	gi 148706564	mCG17902, isoform CRA_j	10051	12.39	1	0%	0	17	R.SRSGSIIGSR.Y
	gi 1167510	TI-225	14167	9.33	1	0%	0	17	K.TITLEVEPSDTIENVK.A
	gi 4507761	ubiquitin and ribosomal protein L40 precursor	14719	9.87	1	0%	0	17	K.TITLEVEPSDTIENVK.A
	gi 51701919	RecName: Full=Ubiquitin	8560	6.56	1	0%	0	17	K.TITLEVEPSDTIENVK.A
	gi 82894992	PREDICTED: similar to fusion protein: ubiquitin (bases 43_513); ribosomal protein S27a (bases 217_532)	13530	10.10	1	0%	0	17	K.TITLEVEPSDTIENVK.A
	gi 94369204	PREDICTED: hypothetical protein	8723	6.56	1	0%	0	17	K.TITLEVEPSDTIENVK.A
	gi 94385661	PREDICTED: similar to ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1	14657	9.71	1	0%	0	17	K.TITLEVEPSDTIENVK.A
	gi 148684097	mCG13235	15406	9.82	1	0%	0	17	K.TITLEVEPSDTIENVK.A

Band	Accession name	Description	MW	pl	Peptide match	%sequence coverage	Score	Ion score	Sequence
AB53	gi 148688761	mCG1048340	10235	9.05	1	0%	0	17	K.TITLEVEPSDTIENVK.A
	gi 148708840	mCG7881	14662	9.72	1	0%	0	17	K.TITLEVEPSDTIENVK.A
	gi 197725012	Chain B, Crystal Structure Of Human Amsh-Lp Dub Domain In Complex With Lys63-Linked Ubiquitin Dimer	8588	6.56	1	0%	0	17	K.TITLEVEPSDTIENVK.A
	gi 197725013	Chain C, Crystal Structure Of Human Amsh-Lp Dub Domain In Complex With Lys63-Linked Ubiquitin Dimer	8675	5.77	1	0%	0	17	K.TITLEVEPSDTIENVK.A
AB54	gi 1778802	amyloid precursor protein	8893	6.04	1	0%	24	28	K.LVFFAEDVGSNK.G
	gi 1167510	TI-225	14167	9.33	2	11%	0	23	R.LIFAGK.Q K.ESTLHLVLR.L
	gi 4507761	ubiquitin and ribosomal protein L40 precursor	14719	9.87	2	11%	0	23	R.LIFAGK.Q K.ESTLHLVLR.L
	gi 51701919	RecName: Full=Ubiquitin	8560	6.56	2	11%	0	23	R.LIFAGK.Q K.ESTLHLVLR.L

Band	Accession No.	Description	MW	pI	Peptide match	%sequence coverage	Score	Ion score	Sequence
AB54	gi 94369204	PREDICTED: hypothetical protein	8723	6.56	2	11%	0	23	R.LIFAGK.Q K.ESTLHLVLR.L
	gi 94385661	PREDICTED: similar to ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1	14657	9.71	2	11%	0	23	R.LIFAGK.Q K.ESTLHLVLR.L
	gi 148684097	mCG13235	15406	8.82	2	11%	0	23	R.LIFAGK.Q K.ESTLHLVLR.L
	gi 148688761	mCG1048340	10235	9.05	2	11%	0	23	R.LIFAGK.Q K.ESTLHLVLR.L
	gi 148708840	mCG7881	14662	9.72	2	11%	0	23	R.LIFAGK.Q
	gi 154550710	ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1	8033	6.89	2	11%	0	23	R.LIFAGK.Q K.ESTLHLVLR.L
	gi 197725012	Chain B, Crystal Structure Of Human Amsh-Lp Dub Domain In Complex With Lys63-Linked Ubiquitin Dimer	8588	6.56	2	11%	0	23	R.LIFAGK.Q K.ESTLHLVLR.L

Band	Accession name	Description	MW	pI	Peptide match	%sequence coverage	Score	Ion score	Sequence
AB54	gi 197725013	Chain C, Crystal Structure Of Human Amsh-Lp Dub Domain In Complex With Lys63-Linked Ubiquitin Dimer	8675	5.77	2	11%	0	23	R.LIFAGK.Q
	gi 148673787	mCG146067	12555	10.14	1	0%	0	15	R.LLFKK.I
	gi 154424497	novel KRAB box containing protein	11471	5.81	1	0%	0	15	K.IIFKK.K
	gi 196876	immunoglobulin kappa chain V-region (V-J)	7584	5.00	2	0%	0	18	none.KDGTVK.L
									none.DDGTVKLLIYNTSTLYSGVPSR.F

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวนนทพร อังศุวิทยา
วัน เดือน ปี ที่อยู่	24 มิถุนายน พ.ศ. 2528 215/44 ถนนพหลโยธิน แขวงจันทระเกษม เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2550 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี คณะสหเวชศาสตร์ สาขาเทคนิคการแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย