

การวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของโปรตีนโอม
และอินเทอแรกโตมเพื่อค้นหาสารบ่งชี้สำหรับ
โรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกร



นางสาวฉัตรระวี พิชาติพันธ์พงศ์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2560

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PROTEOME EXPRESSION PROFILING AND INTERACTOMIC ANALYSIS
FOR IDENTIFICATION OF CANDIDATE BIOMARKERS
FOR AUTISM SPECTRUM DISORDER (ASD)

Miss Chatravee Pichitpunpong



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Clinical Biochemistry and Molecular
Medicine

Department of Clinical Chemistry

Faculty of Allied Health Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2017

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของโปรตีนโอมและอินเทอแรกโตมเพื่อ
ค้นหาสารบ่งชี้สำหรับโรคคออทิซิมสเปกตรัม

โดย

นางสาวฉัตรระวี พิษิตพันธ์พงศ์

สาขาวิชา

ชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

อาจารย์ ดร.เทวฤทธิ์ สະระชนะ

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณะบดีคณะสหเวชศาสตร์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาลณี อัมรานนท์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.รัชนา ศานติยานนท์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์ ดร.เทวฤทธิ์ สະระชนะ)

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร.ศิริพร แสงสุธรรม)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(อาจารย์ ดร.มลฤดี สุขประสารทรัพย์)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ฉัตรระวี พิษิตพันธ์พงศ์ : การวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของโปรตีโอมและอินเทอแรกโตมเพื่อค้นหาสารบ่งชี้สำหรับโรคออทิซึมสเปกตรัม (PROTEOME EXPRESSION PROFILING AND INTERACTOMIC ANALYSIS FOR IDENTIFICATION OF CANDIDATE BIOMARKERS FOR AUTISM SPECTRUM DISORDER (ASD)) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อ. ดร.เทวฤทธิ์ สະระชนะ, 147 หน้า.

ในปัจจุบัน ออทิซึมสเปกตรัม (Autism spectrum disorder, ASD) ยังคงเป็นโรคที่ยังคงไม่ทราบกลไกระดับโมเลกุลแน่ชัด ยีนและโปรตีนที่เคยมีการรายงานการแสดงออกผิดปกติไปในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมมีความสามารถในการทำซ้ำ (Reproducibility) ต่ำหรืออาจไม่มีเลย ซึ่งน่าจะมาจากความหลากหลายของอาการแสดงของผู้ป่วย จากการศึกษาล่าสุด แสดงให้เห็นว่าการจัดกลุ่มออทิซึมสเปกตรัมออกเป็นกลุ่มย่อยตามความรุนแรงของลักษณะทางคลินิกสามารถช่วยในการระบุยีนและกลไกที่ผิดปกติไปในกลุ่มย่อยของผู้ป่วย อย่างไรก็ตาม การแบ่งกลุ่มผู้ป่วยเป็นกลุ่มย่อยตามความรุนแรงของลักษณะทางคลินิกในออทิซึมสเปกตรัมยังไม่มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในการค้นหาโปรตีน Biomarker ที่เกี่ยวข้องกับออทิซึมสเปกตรัม ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยทำการวิเคราะห์โดยการแบ่งกลุ่มผู้ป่วยจำนวน 85 รายออกเป็นกลุ่มย่อยทางคลินิกตามคะแนน ADI-R และทำการวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของยีนในออทิซึมสเปกตรัมในแต่ละกลุ่มย่อยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมคนปกติที่อยู่ใกล้เคียงกันและเพศเดียวกันกับผู้ป่วย (Sex/age-matched control) ซึ่งสามารถระบุยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติ (Differentially expressed genes, DEGs) ในออทิซึมสเปกตรัม นอกจากนี้ ผู้วิจัยได้ทำการวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของโปรตีโอมจากเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาว (Lymphoblastoid cell lines, LCLs) ด้วยเทคนิค Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) ร่วมกับ Nano-liquid chromatography-tandem mass spectrometry (Nano-LC-MS/MS) รายชื่อของโปรตีนที่มีการแสดงออกผิดปกติไปอย่างมีนัยสำคัญที่ได้จากการวิเคราะห์ถูกนำมาเปรียบเทียบกับ DEGs และผลการวิเคราะห์ Meta-analysis ของโปรตีนและโปรตีโอมในการศึกษาก่อนหน้านี้ หน้าที่ทางพยาธิสภาพที่มีความเกี่ยวข้องกันกับโปรตีนถูกวิเคราะห์โดยโปรแกรม Ingenuity Pathway Analysis (IPA) และได้ทำการคัดเลือกโปรตีนที่น่าสนใจมาทำการตรวจสอบโดยใช้ Western blot analysis จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าผลการวิเคราะห์การแบ่งกลุ่มผู้ป่วยออกเป็นกลุ่มย่อยทางคลินิกตามคะแนน ADI-R สามารถแบ่งผู้ป่วยออกเป็น 4 กลุ่มย่อย ซึ่งพบว่าหนึ่งในกลุ่มนั้นเป็นกลุ่มออทิซึมสเปกตรัมที่มีความบกพร่องทางภาษารุนแรง จากผลวิเคราะห์รูปแบบ ทรานสคริปโตมของเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวพบว่าโปรตีนจำนวน 82 จุดที่มีการแสดงออกผิดปกติไปอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มออทิซึมสเปกตรัมที่มีความบกพร่องทางภาษารุนแรง และได้ทำการคัดเลือก 18 จุดโปรตีนจากทั้งหมดมาวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนโดยเทคนิค Nano-LC-MS/MS ซึ่งพบว่ามีความเกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบประสาทและกระบวนการอักเสบ จากการศึกษาพบว่าจากโปรตีนทั้งหมด การแสดงออกของ Isocitrate dehydrogenase (IDH2) และ Diazepam binding inhibitor (DBI) ลดลงในออทิซึมสเปกตรัม ซึ่งโปรตีนเหล่านี้ยังพบการแสดงออกผิดปกติในการวิเคราะห์ Meta-analysis ของทรานสคริปโตมและโปรตีโอมร่วมด้วย การแบ่งกลุ่มออทิซึมสเปกตรัมออกเป็นกลุ่มย่อยทางคลินิกตามด้วยการวิเคราะห์ทรานสคริปโตมและโปรตีโอมแบบบูรณาการร่วมกัน ทำให้การศึกษานี้สามารถระบุโปรตีนที่มีการแสดงออกผิดปกติไปอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มย่อยของออทิซึมสเปกตรัมที่มีความบกพร่องทางภาษาอย่างรุนแรง ซึ่งโปรตีนเหล่านี้ อาจทำหน้าที่เป็นตัวแทนในการช่วยระบุกลไกทางโมเลกุลของออทิซึมสเปกตรัมในอนาคต ตลอดจน อาจพัฒนาไปเป็น Biomarker ที่ในการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับออทิซึมสเปกตรัมต่อไป

ภาควิชา เคมีคลินิก

สาขาวิชา ชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์

ปีการศึกษา 2560

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

5776653437 : MAJOR CLINICAL BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR MEDICINE

KEYWORDS: AUTISM SPECTRUM DISORDER / LANGUAGE IMPAIRMENT / SUBGROUPING / PROTEOMICS / TRANSCRIPTOMICS / BIOINFORMATICS / DIAZEPAM BINDING INHIBITOR / ISOCITRATE DEHYDROGENASE

CHATRAVEE PICHITPUNPONG: PROTEOME EXPRESSION PROFILING AND INTERACTOMIC ANALYSIS FOR IDENTIFICATION OF CANDIDATE BIOMARKERS FOR AUTISM SPECTRUM DISORDER (ASD). ADVISOR: TEWARIT SARACHANA, Ph.D., 147 pp.

The molecular mechanisms underlying autism spectrum disorder (ASD) remain unclear. Most genes/proteins reported to be dysregulated in ASD cases have shown little or no reproducibility, likely due to the heterogeneity of the disorder. Recent studies have demonstrated that subgrouping ASD cases based on their clinical phenotypes is useful for identification of genes and pathways dysregulated in ASD subgroups. However, this strategy has not been used extensively for identification of proteins related to ASD. In this study, we conducted clustering analysis of ADI-R scores from 85 ASD cases and identified subgroups. Meta-analysis of transcriptome profiles of ASD individuals in each subgroup and sex/age-matched unaffected individuals was conducted to identify differentially expressed genes (DEGs) in ASD. Moreover, proteome analysis of lymphoblastoid cell lines (LCLs) from these ASD cases and control was conducted using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) followed by Nano-liquid chromatography-tandem mass spectrometry (Nano-LC-MS/MS). Significantly differentially expressed proteins were identified and compared to the list of DEGs from the meta-analysis, as well as to a list of proteins from previous proteome studies in ASD. Biological functions associated with the proteins were predicted using Ingenuity Pathway Analysis program. Selected proteins were further validated by Western blot analysis. Clustering analysis of ADI-R scores revealed four ASD subgroups, one of which was found to be ASD individuals with severe language impairment. Meta-analysis of transcriptome data of LCLs revealed DEGs in each ASD subgroup. The 2D-PAGE analysis showed that as many as 82 protein spots were differentially expressed in the subgroup of ASD with severe language impairment. Among these, a total of 18 proteins were selected for protein identification by Nano-LC-MS/MS and found to be related to neurological functions and inflammation. Among those were isocitrate dehydrogenase (IDH2) and diazepam binding inhibitor (DBI) proteins which were decreased in ASD. These proteins were also identified by the meta-analysis of transcriptome or proteome. In conclusions, using subgrouping ASD individuals based on clinical phenotypes followed by integrated transcriptome-proteome analysis, we identified significant proteins in a subgroup of ASD with severe language impairment. These proteins may serve as candidates for future molecular mechanism identification and biomarker discovery research in ASD.

Department: Clinical Chemistry

Student's Signature

Field of Study: Clinical Biochemistry and Molecular
Medicine

Advisor's Signature

Academic Year: 2017

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีเนื่องด้วยความกรุณาของ อาจารย์ ดร.เทวฤทธิ์ สระชนะ ซึ่งรับหน้าที่เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักในงานวิจัยครั้งนี้ อาจารย์คอยให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางในการดำเนินการวิจัย แนะนำแนวทางการแก้ไขปัญหา รวมไปถึง แนะนำแนวทางการแก้ไขข้อบกพร่องระหว่างการวิจัย ตลอดจนแนะนำโอกาสดี ๆ ทางการศึกษาที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อนิสิต นอกจากนี้ อาจารย์ยังคอยติดตามความก้าวหน้าพร้อมกับให้ความช่วยเหลือและสนับสนุนงานการทำงานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีด้วยความเอาใจใส่เป็นอย่างยิ่ง ศิษย์ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์เป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. รัชชา ศานติยานนท์ ประธานกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร.ศิริพร แสงสุธรรม กรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และอาจารย์ ดร. มลฤดี สุขประเสริฐพิทย์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ภายนอกมหาวิทยาลัย ที่กรุณาสละเวลามาเป็นคณะกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ขอกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร.Valarie W. Hu จากมหาวิทยาลัยจอร์จ วอชิงตัน กรุงวอชิงตัน ดี.ซี. สหรัฐอเมริกา ที่ให้คำแนะนำ และสนับสนุนเซลล์ไลน์ชนิด LCLs เพื่อใช้เป็นโมเดลในการศึกษานี้ รวมถึงให้ความอนุเคราะห์โปรแกรมวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศ IPA

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนาวิ ที่สนับสนุนงานทางด้านสารเคมีที่ใช้ในการทำงานด้านโปรตีโอมิกส์ และ ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. วาลูกา พลายงาม ที่กรุณาให้คำแนะนำและให้ความรู้เกี่ยวกับเทคนิคการทำงานด้านโปรตีโอมิกส์

ขอกราบขอบพระคุณ The Autism Genetic Resource Exchange (AGRE) Repository ที่ให้ความอนุเคราะห์ข้อมูล demographic characteristics ของเซลล์ไลน์ชนิด LCLs ในการศึกษาครั้งนี้ ตลอดจนขอกราบขอบพระคุณผู้ป่วยและผู้ปกครองของผู้ป่วยทุกท่านในการศึกษาครั้งนี้

ขอกราบขอบคุณทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาจากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดชทรงเจริญพระชนมายุครบ ๗๒ พรรษา ทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (CU59-004-HR) และ ทุน ๙๐ ปีจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาเคมีคลินิกและในคณะสหเวชศาสตร์ที่คอยสั่งสอนให้ความรู้รวมถึงคำแนะนำในการทำวิจัย ตลอดจนขอขอบพระคุณบุคลากรทุกท่านในคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความสะดวกในด้านสถานที่ และอุปกรณ์ในการศึกษาวิจัย ขอขอบคุณที่ ๆ เพื่อน ๆ ตลอดจนน้อง ๆ ทั้งในหลักสูตรบัณฑิตศึกษาและหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิตที่มอบมิตรภาพและให้ความช่วยเหลือกับกรวิจัย

และสุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่คอยสนับสนุนในทุก ๆ ด้านและเป็นยิ่งกว่ากำลังใจในการทำงานวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วง

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ	ฎ
สารบัญตารางภาคผนวก.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย.....	5
1.3 ขอบเขตและข้อจำกัดของงานวิจัย.....	6
1.4 ประโยชน์ของงานวิจัย.....	7
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	8
2.1 โรคออทิซึมสเปกตรัม (Autism spectrum disorder).....	8
2.2 เซลล์ไลน์ชนิดลิมโฟบลาสต์ (Lymphoblastoid Cell Lines; LCLs).....	14
2.3 ชีวสารสนเทศศาสตร์ (Bioinformatics) และชีววิทยาเชิงระบบ (Systems biology).....	16
บทที่ 3 ขั้นตอนและวิธีการทำงานวิจัย	20
ตอนที่ 1 การวิเคราะห์ข้อมูลรูปแบบทรานสคริปโตมของ LCLs.....	21
ตอนที่ 1.1 การคัดเลือกข้อมูลการศึกษานทรานสคริปโตมของ LCLs	21
ตอนที่ 1.2 การวิเคราะห์ข้อมูลทางชีวสารสนเทศจากฐานข้อมูล.....	22
ตอนที่ 2 การวิเคราะห์ Meta-analysis ของโปรตีนและรูปแบบโปรตีโอมของผู้ป่วย ออทิซึมสเปกตรัม.....	23
ตอนที่ 2.1 การคัดเลือกข้อมูลการศึกษามาจากฐานข้อมูลทางชีวสารสนเทศ	23

ตอนที่ 2.2 การวิเคราะห์ข้อมูลทางชีวสารสนเทศจากฐานข้อมูล.....	24
ตอนที่ 3 การวิเคราะห์รูปแบบโปรตีนของ LCLs.....	25
ตอนที่ 3.1 การคัดเลือกสิ่งตัวอย่าง.....	25
ตอนที่ 3.2 การเพาะเลี้ยงและการเก็บเซลล์ LCLs.....	26
การเพาะเซลล์.....	26
การเก็บเซลล์.....	27
ตอนที่ 3.3 การสกัดโปรตีนจากเซลล์ การวัดปริมาณโปรตีน และการตรวจสอบคุณภาพโปรตีน.....	28
การสกัดโปรตีนจากเซลล์โดยเทคนิค Phenol-chloroform extraction	28
การตกตะกอนโปรตีนด้วยเทคนิค TCA/acetone protein precipitation.....	29
การวัดปริมาณโปรตีนด้วยเทคนิค Bradford's assay.....	29
การตรวจสอบคุณภาพโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และ Coomassie staining	30
ตอนที่ 3.4 แยกโปรตีนด้วยเทคนิค Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) และวิเคราะห์ความแตกต่างของจุดโปรตีน	31
ตอนที่ 3.5 การย่อยแผ่นเจล สกัดเปปไทด์และวิเคราะห์เปปไทด์ด้วย LC-MS/MS และฐานข้อมูลโปรตีน MASCOT.....	32
ตอนที่ 3.6 การวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศศาสตร์รูปแบบโปรตีนของ LCLs.....	33
การวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศศาสตร์เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของทรานสคริปโตม โปรตีนโอมในการศึกษาก่อนหน้า และรูปแบบโปรตีนโอมของ LCLs.....	33
การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนด้วยเทคนิค Western blot.....	34
บทที่ 4 ผลการวิจัย	35
4.1 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลรูปแบบทรานสคริปโตมของ LCLs.....	38
4.2 ผลการวิเคราะห์ Meta-analysis ของโปรตีนและรูปแบบโปรตีนโอมของผู้ป่วยอติซิมสเปกตรัม.....	42

4.3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลพื้นที่คาบเกี่ยว (Overlap) ระหว่างรูปแบบทรานสคริปโตมของ LCLs ร่วมกับผลการวิเคราะห์ Meta-analysis ของโปรตีนและรูปแบบโปรตีโอมของผู้ป่วยอหิวาต์ซิมสเปกตรัม	47
4.4 ผลการวิเคราะห์รูปแบบโปรตีโอมของ LCLs	50
4.5 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลพื้นที่คาบเกี่ยว (Overlap) ระหว่างรูปแบบทรานสคริปโตมร่วมกับผลการวิเคราะห์รูปแบบโปรตีโอมของ LCLs ด้วยเทคนิค two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) และ LC-MS/MS.....	61
4.6 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลพื้นที่คาบเกี่ยว (Overlap) ระหว่างผลการวิเคราะห์ Meta-analysis ของโปรตีนและรูปแบบโปรตีโอมของผู้ป่วยอหิวาต์ซิมสเปกตรัมร่วมกับผลการวิเคราะห์รูปแบบโปรตีโอมของ LCLs ด้วยเทคนิค 2D-PAGE และ LC-MS/MS.....	62
4.7 ผลการวิเคราะห์การยืนยันการแสดงออกของรูปแบบโปรตีโอมของ LCLs โดยเทคนิค Western blot.....	63
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	65
รายการอ้างอิง	73
ภาคผนวก.....	86
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	147

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 แสดงรายชื่อของฐานข้อมูลทางชีวสารสนเทศศาสตร์ที่สำคัญจำนวน 10 แหล่ง พร้อม ตัวที่อยู่เว็บไซต์ และรายละเอียดเบื้องต้นเกี่ยวกับข้อมูลที่สามารถค้นหาได้ในแต่ละฐานข้อมูล	17
ตารางที่ 2 แสดงรายชื่อของเครื่องมือทางชีวสารสนเทศศาสตร์ที่สำคัญจำนวน 12 แหล่ง โดยแยก ตามประเภทของเครื่องมือ และที่อยู่เว็บไซต์ และรายละเอียดเบื้องต้นเกี่ยวกับข้อมูล.....	18
ตารางที่ 3 แสดงจำนวนยีนที่แสดงออกอย่างมีนัยสำคัญของผู้ป่วยโรคออทิซึมสเปกตรัมโดยรวม และกลุ่มย่อยเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มคนปกติ	38
ตารางที่ 4 แสดงชนิดของสิ่งตัวอย่างจำแนกตามจำนวนการศึกษาที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ และจำนวนโปรตีนที่แสดงออกอย่างมีนัยสำคัญจากการศึกษาทั้งหมด	43
ตารางที่ 5 โปรตีนที่อยู่ในพื้นที่คาบเกี่ยวกัน (Overlap) ระหว่างยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติไป (ทั้งกลุ่มผู้ป่วยโดยรวมและกลุ่มผู้ป่วยย่อยที่แบ่งตามลักษณะประชากร) และข้อมูลของโปรตีนที่ พบว่าเคยมีการรายงานความผิดปกติในงานวิจัยอื่น ๆ	49
ตารางที่ 6 จุดโปรตีนที่มีการแสดงออกผิดปกติไปอย่างมีนัยสำคัญจำนวน 18 จุด.....	54
ตารางที่ 7 หน้าที่และพยาธิสภาพที่มีความเกี่ยวข้องกับจุดโปรตีนที่มีการแสดงออกผิดปกติไป อย่างมีนัยสำคัญจำนวน 18 จุด	56
ตารางที่ 8 จุดโปรตีนที่มีการแสดงออกผิดปกติไปอย่างมีนัยสำคัญจำนวน 18 จุด เมื่อทำการ ค้นหาค้นกลับไปในฐานะข้อมูลเกี่ยวกับโรคออทิซึมสเปกตรัม ได้แก่ AutismDB, AutismKB, SFARI เพื่อหาหน้าที่และพยาธิสภาพเบื้องต้นที่เคยมีการรายงานความผิดปกติในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม	58

สารบัญภาพ

รูปภาพที่ 1 การวิเคราะห์เครือข่ายความสัมพันธ์ทางชีวภาพ (Biological interactome).....	11
รูปภาพที่ 2 แสดงขั้นตอนการ Transformation เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด B-lymphocytes ด้วย Epstein-Barr virus	15
รูปภาพที่ 3 แสดงแผนผังขั้นตอนและวิธีการทำงานวิจัยในการศึกษาครั้งนี้.....	20
รูปภาพที่ 4 แสดง Heat map จากข้อมูลคะแนนแบบทดสอบคัดกรอง ADI-R.....	36
รูปภาพที่ 5 แสดงผลการวิเคราะห์ Principal component analysis (PCA).....	37
รูปภาพที่ 6 ภาพ Venn diagram แสดงการแสดงออกของยีนที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของกลุ่มย่อยของพยาธิสภาพของโรคอหิวาต์ซึมสเปกตรัมเปรียบเทียบกับกลุ่มคนปกติจำนวน 29 ราย	39
รูปภาพที่ 7 ภาพเครือข่ายทางชีวภาพแสดงการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างยีน (Interactomic analysis) ในกลุ่ม G3 (Red).....	41
รูปภาพที่ 8 ภาพเครือข่ายทางชีวภาพแสดงการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน (Interactomic analysis) ของโปรตีนที่ได้จากการศึกษาอื่น ๆ ในฐานข้อมูลทั้งหมด 16 การวิจัย...	46
รูปภาพที่ 9 ภาพ Venn diagram แสดงจำนวนSymbolที่อยู่ในพื้นที่คาบเกี่ยวกัน (Overlap) ระหว่างยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติไป (ทั้งกลุ่มผู้ป่วยโดยรวมและกลุ่มผู้ป่วยย่อยที่แบ่งตามลักษณะประชากร) และข้อมูลของโปรตีนที่พบว่าเคยมีการรายงานความผิดปกติในงานวิจัยอื่น ๆ...	48
รูปภาพที่ 10 ภาพแผ่นเจลการแสดงผลการแสดงผลของโปรตีนจาก LCLs (1)	51
รูปภาพที่ 11 ภาพแผ่นเจลการแสดงผลการแสดงผลของโปรตีนจาก LCLs (2).....	52
รูปภาพที่ 12 ภาพแผ่นเจลการแสดงผลการแสดงผลของโปรตีนจาก LCLs (3).....	53
รูปภาพที่ 13 จุดโปรตีนที่มีการแสดงออกผิดปกติไปอย่างมีนัยสำคัญจำนวน 18 จุด เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยสถิติแบบ ANOVA ($P < 0.05$) และคัดเลือกจุดโปรตีนดังกล่าวอีกครั้งโดยให้มีส่วนความเข้มแตกต่างกันลดลง/เพิ่มขึ้นอย่างน้อย 2 เท่า	55
รูปภาพที่ 14 ภาพเครือข่ายทางชีวภาพแสดงการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน (Interactomic analysis) จากรายชื่อโปรตีนที่ได้จากเทคนิค 2D-PAGE และ LC-MS/MS.....	60

รูปภาพที่ 15 ภาพแสดงจำนวน Symbol ที่อยู่ในพื้นที่คาบเกี่ยวกัน (Overlap) ระหว่างยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติไปในกลุ่มผู้ป่วยย่อย G3 และโปรตีนที่ได้มาจากการศึกษาโปรตีโอมด้วยเทคนิค 2D-PAGE และ LC-MS/MS 61

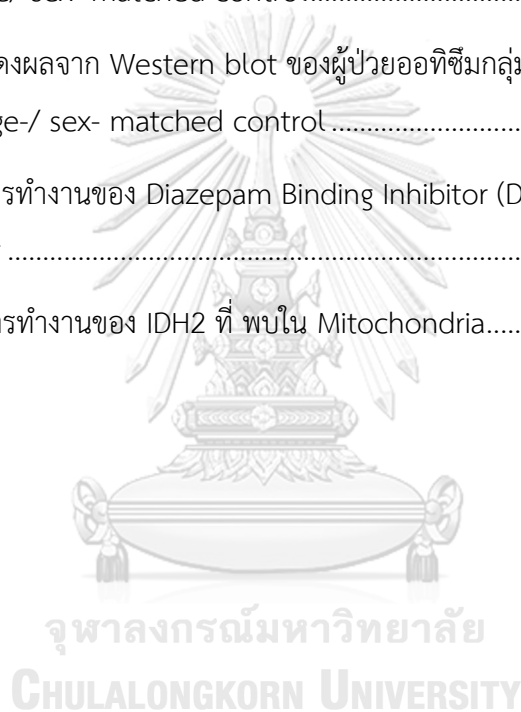
รูปภาพที่ 16 ภาพแสดงจำนวน Symbol ที่อยู่ในพื้นที่คาบเกี่ยวกัน (Overlap) ระหว่างโปรตีนที่พบว่าเคยมีการรายงานความผิดปกติในงานวิจัยอื่น ๆ ในอดีต และข้อมูลของโปรตีนที่ได้มาจากการศึกษา โปรตีโอมด้วยเทคนิค 2D-PAGE และ LC-MS/MS..... 62

รูปภาพที่ 17 ภาพแสดงผลจาก Western blot ของผู้ป่วยออทิซึมกลุ่มที่มีความผิดปกติทางด้านภาษารุนแรง และ Age/ sex- matched control..... 63

รูปภาพที่ 18 ภาพแสดงผลจาก Western blot ของผู้ป่วยออทิซึมกลุ่มที่มีความผิดปกติทางด้านภาษารุนแรง และ Age-/ sex- matched control 64

รูปภาพที่ 19 แสดงการทำงานของ Diazepam Binding Inhibitor (DBI) เพื่อควบคุมการทำงานของ GABA receptor 67

รูปภาพที่ 20 แสดงการทำงานของ IDH2 ที่ พบใน Mitochondria..... 69



สารบัญตารางภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 แสดงรายละเอียดงานวิจัยจากงานวิจัยเรื่อง A proteomic study of serum from children with autism showing differential expression of apolipoproteins and complement proteins โดย BA Corbett และคณะ [87]	87
ตารางภาคผนวกที่ 2 แสดงรายละเอียดงานวิจัยจากงานวิจัยเรื่อง Hypo-Phosphorylation of Salivary Peptidome as a Clue to the Molecular Pathogenesis of Autism Spectrum Disorders โดย Massimo Castagnola และคณะ [88]	88
ตารางภาคผนวกที่ 3 แสดงรายละเอียดงานวิจัยจากงานวิจัยเรื่อง A Proteomic Investigation of B Lymphocytes in an Autistic Family: A Pilot Study of Exposure to Natural Rubber Latex (NRL) May Lead to Autism โดย Chen Shen และคณะ [66]	89
ตารางภาคผนวกที่ 4 แสดงรายละเอียดงานวิจัยจากงานวิจัยเรื่อง A lack of association between elevated serum levels of S100B protein and autoimmunity in autistic children โดย Laila Yousef Al-Ayadhi และ Gehan Ahmed Mostafa [89].....	91
ตารางภาคผนวกที่ 5 แสดงรายละเอียดงานวิจัยจากงานวิจัยเรื่อง Identification of an age-dependent biomarker signature in children and adolescents with autism spectrum disorders โดย Jordan M Ramsey และคณะ [90]	92
ตารางภาคผนวกที่ 6 แสดงรายละเอียดงานวิจัยจากงานวิจัยเรื่อง Neonatal cytokines and chemokines and risk of Autism Spectrum Disorder: the Early Markers for Autism (EMA) study: a case-control study โดย Oussenv Zerbo และคณะ [91]	93
ตารางภาคผนวกที่ 7 แสดงรายละเอียดงานวิจัยจากงานวิจัยเรื่อง Proteomic analysis of post mortem brain tissue from autism patients: evidence for opposite changes in prefrontal cortex and cerebellum in synaptic connectivity-related proteins โดย Jantine AC Broek และคณะ [92].....	94
ตารางภาคผนวกที่ 8 แสดงรายละเอียดงานวิจัยจากงานวิจัยเรื่อง A pilot proteomic study of protein markers in autism spectrum disorder โดย Armand G. Ngounou Wetie และคณะ [68].....	96

ตารางภาคผนวกที่ 9 แสดงรายละเอียดงานวิจัยจากงานวิจัยเรื่อง Serum Level of Desert Hedgehog Protein in Autism Spectrum Disorder: Preliminary Results โดย Shahid Bashir และคณะ [93].....	97
ตารางภาคผนวกที่ 10 แสดงรายละเอียดงานวิจัยจากงานวิจัยเรื่อง Comparative two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of the salivary proteome of children with autism spectrum disorder โดย Armand G. Ngounou Wetie และคณะ [94].....	98
ตารางภาคผนวกที่ 11 แสดงรายละเอียดงานวิจัยจากงานวิจัยเรื่อง A Pilot Proteomic Analysis of Salivary Biomarkers in Autism Spectrum Disorder โดย Armand G. Ngounou Wetie และคณะ [69].....	101
ตารางภาคผนวกที่ 12 แสดงรายละเอียดงานวิจัยจากงานวิจัยเรื่อง Neonatal Cytokine Profiles Associated with Autism Spectrum Disorder โดย Paula Krakowiak และคณะ [95].....	103
ตารางภาคผนวกที่ 13 แสดงรายละเอียดงานวิจัยจากงานวิจัยเรื่อง Urine Protein Biomarker Candidates for Autism โดย Libang Yang และคณะ [96].....	105
ตารางภาคผนวกที่ 14 แสดงรายละเอียดงานวิจัยจากงานวิจัยเรื่อง Expression and oxidative modifications of plasma proteins in autism spectrum disorders: Interplay between inflammatory response and lipid peroxidation โดย Alessio Cortelazzo และคณะ [97].....	135
ตารางภาคผนวกที่ 15 แสดงรายละเอียดงานวิจัยจากงานวิจัยเรื่อง Redox proteomic identification of carbonylated proteins in autism plasma: insight into oxidative stress โดย Chengyun Feng และคณะ [98].....	137
ตารางภาคผนวกที่ 16 แสดงรายละเอียดงานวิจัยจากงานวิจัยเรื่อง iTRAQ based proteomic analysis reveals protein profile in plasma from children with autism โดย Liming Shen และคณะ [99].....	138
ตารางภาคผนวกที่ 17 แสดงจุดโปรตีนทั้งหมด 82 จุดโปรตีนที่มีค่าสัดส่วนความเข้มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มคนปกติและกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม.....	140
ตารางภาคผนวกที่ 18 แสดงสารเคมีและเครื่องมือที่ใช้.....	144

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหาที่ทำการวิจัย

โรคออทิสซึมสเปกตรัม (Autism spectrum disorders, ASD) เป็นโรคที่จัดอยู่ในกลุ่มโรคที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติทางพัฒนาการของระบบประสาท (Neurodevelopmental disorder) หลักเกณฑ์การวินิจฉัยโรคออทิสซึมสเปกตรัมประกอบไปด้วยความผิดปกติด้านพฤติกรรม 2 ประการหลัก ๆ ได้แก่ 1) มีความบกพร่องด้านปฏิสัมพันธ์ทางสังคมและการสื่อสาร (Impairments in social interaction and communication) และ 2) มีพฤติกรรมบางอย่างซ้ำ ๆ ย้ำคิดย้ำทำ และมีความสนใจจำกัดเฉพาะบางเรื่อง (Repetitive behaviors and restricted interests) [1] ลักษณะความรุนแรงของผู้ป่วยโรคออทิสซึมสเปกตรัมค่อนข้างหลากหลาย ตั้งแต่การพบภาวะปัญญาอ่อน (Mental retardation) ร่วมด้วย การไม่สามารถพูดได้ จนไปถึงผู้ป่วยมีภาวะอัจฉริยภาพ และมีความใกล้เคียงกับคนปกติ [2] การวินิจฉัยโรคออทิสซึมสเปกตรัมในปัจจุบันสามารถตรวจพบได้ตั้งแต่ผู้ป่วยอายุ 3 ปีเป็นต้นไป [3, 4] แม้ว่าโรคออทิสซึมสเปกตรัมจะไม่ทำให้เกิดพยาธิสภาพร้ายแรงจนถึงแก่ความตาย แต่ทำให้เกิดการสูญเสียทรัพยากรมนุษย์และงบประมาณจำนวนมากในการดูแลสุขภาพผู้ป่วย [5] นอกจากนี้ โรคออทิสซึมสเปกตรัมยังมีความชุกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและกำลังเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญทั่วโลก [6-8] จากการศึกษาล่าสุด โดยศูนย์ควบคุมและป้องกันโรคของสหรัฐอเมริกา (Centers for Disease Control and Prevention) ประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่าอัตราความชุกของผู้ป่วยต่อจำนวนประชากรเด็กปกติในปี พ.ศ.2555 เพิ่มขึ้นเป็น 1 ต่อ 68 ราย หรือประมาณ 14.7 รายต่อประชากรเด็กทั้งหมด 1,000 ราย โดยเฉพาะผู้ป่วยชายอัตราความชุกเพิ่มขึ้นเป็น 1 ต่อ 28 ราย หรือประมาณ 23.6 รายต่อประชากรเด็กทั้งหมด 1,000 ราย [9] เช่นเดียวกับประเทศไทย ในการวินิจฉัยโรคความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับระบบประสาทในเด็กโรคออทิสซึมสเปกตรัมถูกพบได้บ่อยครั้ง [10, 11] อย่างไรก็ตาม จากอุบัติการณ์ความชุกของผู้ป่วยในประเทศไทยที่ได้กล่าวมาคาดการณ์ว่ามีค่าต่ำกว่าความเป็นจริงเนื่องจากประชาชนทั่วไปในประเทศไทยและทั่วโลกยังคงขาดความรู้และความเข้าใจเกี่ยวกับโรคออทิสซึมสเปกตรัม จึงทำให้เด็กจำนวนมากที่ป่วยเป็นโรคดังกล่าวขาดโอกาสในการได้รับการวินิจฉัยที่ถูกต้อง

ปัจจุบัน โรคออทิซึมสเปกตรัมยังคงไม่มีการรักษาที่มีประสิทธิภาพและจำเพาะต่อโรคโดยตรง [12] วิธีการรักษาผู้ป่วยที่ดีที่สุด คือการส่งเสริมพัฒนาการของผู้ป่วยตั้งแต่ระยะต้น ๆ เพื่อให้ผู้ป่วยจะมีโอกาสในการพัฒนาทักษะที่จำเป็นต่อชีวิต จากในหลาย ๆ การศึกษายืนยันได้ว่าการตรวจพบผู้ป่วยที่รวดเร็วยิ่งขึ้นจะทำให้ได้มีโอกาสได้รับการประเมินความรุนแรงของโรคโดยผู้เชี่ยวชาญ และได้เข้ารับการรักษาอย่างเหมาะสม [13, 14] เนื่องจากความรู้ในการวินิจฉัยและคัดกรองเด็กที่เป็นโรคออทิซึมสเปกตรัมทั่วโลกยังคงเป็นไปอย่างจำกัด ถึงแม้การวินิจฉัยจะดำเนินการโดยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญ แต่การวินิจฉัยยังอาศัยเพียงพื้นฐานมาจากการซักประวัติผู้ป่วยและการสังเกตพฤติกรรมของผู้ป่วยที่มีพัฒนาการที่ผิดปกติไปเท่านั้น และยังไม่มีการบำบัดที่สามารถใช้ช่วยในการวินิจฉัยโรคออทิซึมสเปกตรัมได้โดยทางคลินิก

สาเหตุและกลไกพยาธิสภาพของโรคออทิซึมสเปกตรัมยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่พบว่าโรคออทิซึมสเปกตรัมมีอัตราการถ่ายทอดทางพันธุกรรมสูงถึงหรือมากกว่าร้อยละ 90 [15-18] ซึ่งนับว่าเป็นโรคความผิดปกติทางระบบประสาทที่มีอัตราการถ่ายทอดทางพันธุกรรมสูงที่สุดโรคหนึ่ง อย่างไรก็ตาม ยังไม่ทราบว่ารูปแบบการแสดงออกในระดับโปรตีนของยีนกลุ่มนี้ มีความผิดปกติในผู้ป่วยโรคออทิซึมสเปกตรัมหรือไม่

จากการค้นพบอัตราการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของโรคออทิซึมสเปกตรัมดังกล่าวในช่วงต้น ส่งผลให้นักวิทยาศาสตร์จำนวนมากทุ่มเทความพยายามในการค้นหาความผิดปกติในดีเอ็นเอของผู้ป่วยโรคออทิซึมสเปกตรัม โดยมีการศึกษาหลากหลายระดับขึ้น นับตั้งแต่การค้นหาการกลายพันธุ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่กี่ตำแหน่งที่จำกัดอยู่ในยีนที่คณะผู้วิจัยสนใจ ไปจนถึงการศึกษาทางจีโนมิกส์ขนาดใหญ่ เช่น การศึกษาความสัมพันธ์ของการกลายพันธุ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมต่อการเกิดโรคออทิซึมสเปกตรัม แบบ Genome-wide association study [19-21], การถ่ายทอดทางพันธุกรรมร่วมกันของการกลายพันธุ์ตำแหน่งต่าง ๆ ในจีโนม แบบ Genome-wide linkage analysis [19, 22, 23], การวิเคราะห์จำนวนชุดของสารพันธุกรรมในจีโนม แบบ Genome-wide copy number variants [24-26] เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันพบความผิดปกติของยีนเป็นสาเหตุของโรคในร้อยละ 10 - 15 ของผู้ป่วยเท่านั้น [27] นั่นหมายความว่าสาเหตุของการเกิดโรคออทิซึมสเปกตรัมในผู้ป่วยส่วนใหญ่ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ความผิดปกติในระดับจีโนมยังไม่สามารถอธิบายการเกิดโรคออทิซึมสเปกตรัมในผู้ป่วยส่วนใหญ่ และมีความเป็นไปได้สูงที่จะมีปัจจัยอื่นนอกเหนือจากความผิดปกติในระดับจีโนมมาเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคด้วย

ในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมา คณะผู้วิจัยหลายกลุ่มจึงได้หันมาศึกษาความเป็นไปได้และความสำคัญของปัจจัยเหนือพันธุกรรม (Epigenetic factors) และปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมต่อการเกิดโรคหรือความเสี่ยงของโรคอหิวาต์ซิมสเปกตรัม จากหลาย ๆ การศึกษาพบว่ากลไกเหนือพันธุกรรมอาจมีความสัมพันธ์ต่อโรคอหิวาต์ซิมสเปกตรัม ได้แก่ การเกิด DNA methylation [28-30], Chromatin / histone modifications [31, 32] และในกระบวนการ RNA-associated gene regulation mechanisms [33] ส่วนปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่พบว่ามีความสัมพันธ์กับโรคอหิวาต์ซิมสเปกตรัม เช่น การได้รับสารเคมีต่าง ๆ ในขณะที่อยู่ในครรภ์ ไม่ว่าจะเป็น Bisphenol-A [34-36] หรือมลพิษทางอากาศ [37, 38] นอกจากนี้ยังมีปัจจัยทางภูมิคุ้มกันของผู้ป่วย [39] เป็นต้น เนื่องจากปัจจัยเหนือพันธุกรรม (Epigenetic factors) และปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมสามารถทำให้เกิดความผิดปกติในการแสดงออกของยีนและโปรตีนได้ โดยที่ไม่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในระดับจีโนม และความผิดปกตินั้นอาจถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ มีรายงานว่ากลไกเหนือพันธุกรรมอาจมีความสัมพันธ์ต่อโรคอหิวาต์ซิมสเปกตรัม [40] อย่างไรก็ตาม ยังคงไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่าปัจจัยเหล่านี้ทำให้เกิดความผิดปกติในระดับการแสดงออกของยีนหรือโปรตีนและมีผลต่อการเกิดพยาธิสภาพของผู้ป่วยหรือไม่ เนื่องจากมีข้อจำกัดที่สำคัญคือไม่สามารถบ่งชี้ได้อย่างแน่ชัดว่าทำให้เกิดความผิดปกติในการแสดงออกของยีนและระดับของโปรตีนในผู้ป่วยโรคอหิวาต์ซิมสเปกตรัมหรือไม่ ดังนั้น ความเข้าใจเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงในระดับโปรตีนในเซลล์ของผู้ป่วยโรคอหิวาต์ซิมสเปกตรัมจึงน่าจะส่งผลให้เกิดความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นในเซลล์ของผู้ป่วยโรคอหิวาต์ซิมสเปกตรัมได้อย่างตรงไปตรงมามากกว่าการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ในจีโนม สภาวะเหนือพันธุกรรมหรือปัจจัยสิ่งแวดล้อม กับโรคอหิวาต์ซิมสเปกตรัม

ในการศึกษานี้ คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจอย่างยิ่งที่จะศึกษาระดับการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์ไลน์จากผู้ป่วยโรคอหิวาต์ซิมสเปกตรัม โดยแทนที่จะมุ่งเน้นศึกษาโปรตีนเพียงไม่กี่ชนิดที่คณะผู้วิจัยตั้งสมมติฐานและคัดเลือกมาศึกษาเหมือนการศึกษาที่เคยมีการทำมาก่อน [41-44] การศึกษาในรูปแบบโปรตีโอมนี้มีจุดแข็งคือสามารถช่วยระบุโปรตีนชนิดใหม่ ๆ ที่ไม่เคยมีรายงานว่าผิดปกติในผู้ป่วยโรคอหิวาต์ซิมสเปกตรัมมาก่อนได้ ไม่มีอคติมาตีกรอบความสนใจให้จำกัดอยู่แค่เพียงเฉพาะโปรตีนชนิดที่มีการรายงานแล้วในฐานข้อมูลเท่านั้น ซึ่งการศึกษานี้จะนำไปสู่การสร้างองค์ความรู้ใหม่ ๆ เกี่ยวกับโปรตีนที่แสดงออกผิดปกติในเซลล์ของผู้ป่วยโรคอหิวาต์ซิมสเปกตรัม และเนื่องจากโปรตีนเกือบทุกชนิดต้องอาศัยการทำงานประสานกับโปรตีนหรือสารเมตาบอไลต์ชนิดอื่น

ต่อเนื่องกันเป็นเครือข่ายของความสัมพันธ์ระดับชีวโมเลกุล (Biological interactome) ที่ซับซ้อน การศึกษาเกี่ยวกับระดับการแสดงออกของโปรตีนเพียงอย่างเดียวจึงไม่เพียงพอในการสร้างความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกพยาธิสภาพของโรคอหิวาต์เทียมสเปกตรัม ดังนั้น คณะผู้วิจัยนี้จึงมีความสนใจศึกษา ลึกลงไปถึงเครือข่ายความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนที่พบว่าแสดงออกผิดปกติ (Protein interactome) โดยนอกจากจะศึกษาเครือข่ายความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนที่มีระดับการแสดงออกผิดปกติ ในการศึกษานี้ คณะผู้วิจัยยังสนใจจะทำการบูรณาการองค์ความรู้เกี่ยวกับโปรตีนที่ค้นพบในการศึกษานี้กับโปรตีนที่เคยมีผู้รายงานไว้แล้ว โดยใช้การวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศศาสตร์และเหมืองข้อมูลในการทำนายและสร้างเครือข่ายความสัมพันธ์ทางชีวภาพของโปรตีนขึ้น ซึ่งรายชื่อของโปรตีนที่ผิดปกติ รวมไปถึงเครือข่ายความสัมพันธ์ทางชีวภาพนั้น ตลอดจนทำการบูรณาการ องค์ความรู้จากในส่วนของรูปแบบการแสดงออกของ miRNA ในสิ่งตัวอย่างชุดเดียวกับในการศึกษา ที่ผ่านมาของ Sarachana T. และคณะ [45] ที่ทำการศึกษารูปแบบการแสดงออกของ miRNA ในผู้ป่วยโรคอหิวาต์เทียมเปรียบเทียบกับฝาแฝดไข่ใบเดียวกัน การศึกษานี้จะนำไปสู่การค้นพบโปรตีนที่อาจพัฒนาให้เป็นสารบ่งชี้ทางชีวภาพที่สามารถช่วยในการวินิจฉัยโรคอหิวาต์เทียมในอนาคต และยังสามารถก่อให้เกิดความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับพยาธิสภาพของโรคอหิวาต์เทียมสเปกตรัมในระดับชีวโมเลกุลอีกด้วย โดยในการศึกษานี้คณะผู้วิจัยมีสมมติฐานว่า เซลล์ไลน์ที่พัฒนาจากเลือดของผู้ป่วยโรคอหิวาต์เทียมสเปกตรัมมีระดับการแสดงออกของโปรตีนหลายชนิดที่ผิดปกติซึ่งส่งผลต่อรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนอื่น ซึ่งโปรตีนเหล่านั้นมีเครือข่ายความสัมพันธ์ที่เกี่ยวข้องกับกลไกทางชีวโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับโรคอหิวาต์เทียมสเปกตรัม

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษารูปแบบการแสดงออกของโปรตีนโอมในเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวจากผู้ป่วยโรคอหิวาต์ซิมสเปกตรัมเปรียบเทียบกับเซลล์ไลน์ที่มาจากคนทั่วไป และระบุโปรตีนที่มีระดับการแสดงออกผิดปกติในโรคอหิวาต์ซิมสเปกตรัม

2. เพื่อศึกษาความสอดคล้องและความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มของโปรตีน กับกลุ่มของยีนที่ผิดปกติในเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวจากผู้ป่วยโรคอหิวาต์ซิมสเปกตรัมทั้งในแง่ชนิดและหน้าที่ทางชีวภาพของโปรตีน

3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน (อินเทอแรกโตม) ของกลุ่มโปรตีนที่มีระดับการแสดงออกผิดปกติในเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวจากผู้ป่วยโรคอหิวาต์ซิมสเปกตรัม หน้าที่ทางชีวภาพ และความเกี่ยวข้องกับชีวพยาธิสภาพที่พบในผู้ป่วยโรคอหิวาต์ซิมสเปกตรัม



1.3 ขอบเขตและข้อจำกัดของงานวิจัย

การศึกษานี้เป็นการวิจัยที่มีการออกแบบเป็น Case - control analytical study โดยคณะผู้วิจัยดำเนินการศึกษารูปแบบการแสดงของโปรตีนโอมและอินเทอแรกโตมในเซลล์ไลน์ชนิด ลิมโฟบลาสโตยด์ (Lymphoblastoid cell lines; LCLs) ที่พัฒนามาจากเซลล์จากเลือดของผู้ป่วย โรคออทิซึมสเปกตรัมและคนปกติซึ่งมีอายุใกล้เคียงและมีเพศเดียวกับผู้ป่วย (Sex-/ age- matched control) การผลิตเซลล์เหล่านี้ดำเนินการโดย Autism Genetic Resource Exchange (AGRE) Repository ซึ่งเป็นธนาคารชีวภาพที่รวบรวมสิ่งตัวอย่างและเซลล์สำหรับการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับโรคออทิซึมสเปกตรัม ประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งเซลล์ไลน์เหล่านี้ คณะผู้วิจัยได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr.Valerie Hu มหาวิทยาลัยจอร์จวอชิงตัน กรุงวอชิงตัน ดีซี โดยเซลล์ไลน์จากผู้ป่วยจะถูกจำแนกออกเป็นกลุ่มย่อย (Subgroups) จำนวน 4 กลุ่ม และคัดเลือกเหลือเพียงกลุ่มที่มีความผิดปกติทางด้านภาษารุนแรง (Severe language impaired) จำนวน 6 ราย โดยใช้เกณฑ์ ADI-R scoring และลักษณะอาการทางคลินิก ทั้งนี้คณะผู้วิจัยจะทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในช่วง pH 3 - 10 ระหว่างกลุ่มทดสอบและกลุ่มควบคุม โดยกำหนดจุดโปรตีนที่สนใจจะต้องมีค่า ANOVA ($P < 0.05$) จากนั้นทำการวิเคราะห์มวลของตัวอย่างโปรตีนที่สนใจด้วยเทคนิค LC-MS/MS นำผลที่ได้มาทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลและหาความสัมพันธ์ของโปรตีนที่สนใจ

1.4 ประโยชน์ของงานวิจัย

เนื่องจากโรคคอหอยพอกเป็นโรคที่ยังไม่ทราบถึงสาเหตุการเกิดที่แท้จริง ยังไม่มีสารบ่งชี้ ยังไม่มีการรักษาที่จำเพาะ ทางสาธารณสุขจึงมุ่งเน้นไปที่การวินิจฉัยความรุนแรงของโรคเพื่อดูแลผู้ป่วยโดยการปรับพฤติกรรม การศึกษาครั้งนี้จะทำให้ทราบโปรตีนที่ผิดปกติไปในเซลล์ที่พัฒนา มาจากเม็ดเลือดขาวผู้ป่วยโรคคอหอยพอกและตลอดจนทราบถึงเครือข่ายความสัมพันธ์ ทางชีวภาพ (อินเทอแรกโตม) ของโปรตีนเหล่านั้น ซึ่งโปรตีนที่ค้นพบว่าผิดปกตินี้ อาจใช้เป็น โปรตีนเป้าหมายสำหรับการศึกษาระดับโมเลกุลในประชากรผู้ป่วยเพื่อค้นหาสาเหตุหรือพยาธิสภาพระดับ ชีวโมเลกุลของโรคคอหอยพอกต่อไปในอนาคต นอกจากนี้ อาจจะนำไปพัฒนาให้เป็นสารบ่งชี้ ทางชีวภาพ (Biomarkers) ในการตรวจวินิจฉัยที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อโรคคอหอยพอกต่อไป ส่งผลให้คุณภาพชีวิตของผู้ป่วยโรคคอหอยพอกดีขึ้นและนำไปสู่การลดการสูญเสียทรัพยากร มนุษย์และงบประมาณในที่สุด

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โรคออทิซึมสเปกตรัม (Autism spectrum disorder)

โรคออทิซึมสเปกตรัม (Autism spectrum disorder, ASD) เป็นโรคที่จัดอยู่ในกลุ่มโรคที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติทางพัฒนาการของระบบประสาท (Neurodevelopmental disorder) เป็นโรคที่อยู่ในกลุ่มภาวะบกพร่องจากความผิดปกติทางพัฒนาการของระบบประสาทในวัยเด็ก ตามคู่มือการวินิจฉัยและสถิติสำหรับความผิดปกติทางจิตฉบับล่าสุดในปี พ.ศ.2556 (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition, DSM-5) โดยสมาคมจิตแพทย์อเมริกัน (American Psychiatric Association, APA) ได้แยกหลักการสำหรับวินิจฉัยโรคกลุ่มอาการออทิซึมสเปกตรัมออกมาโดยเฉพาะจากหลักเกณฑ์การวินิจฉัยกลุ่มโรค Pervasive developmental disorders (PDD) ซึ่งประกอบไปด้วยแอสเปอร์เจอร์ (Asperger's syndrome), เร็ทท์ (Rett's disorder), Childhood disintegrative disorder (CDD), Pervasive developmental disorder (Not Otherwise Specified หรือ PDD-NOS) และออทิซึมสเปกตรัม ตลอดจนเปลี่ยนแปลงหลักเกณฑ์การจำแนกพฤติกรรมลักษณะพฤติกรรมเหลือเพียงพฤติกรรมหลัก 2 ประการ [1, 46] ได้แก่

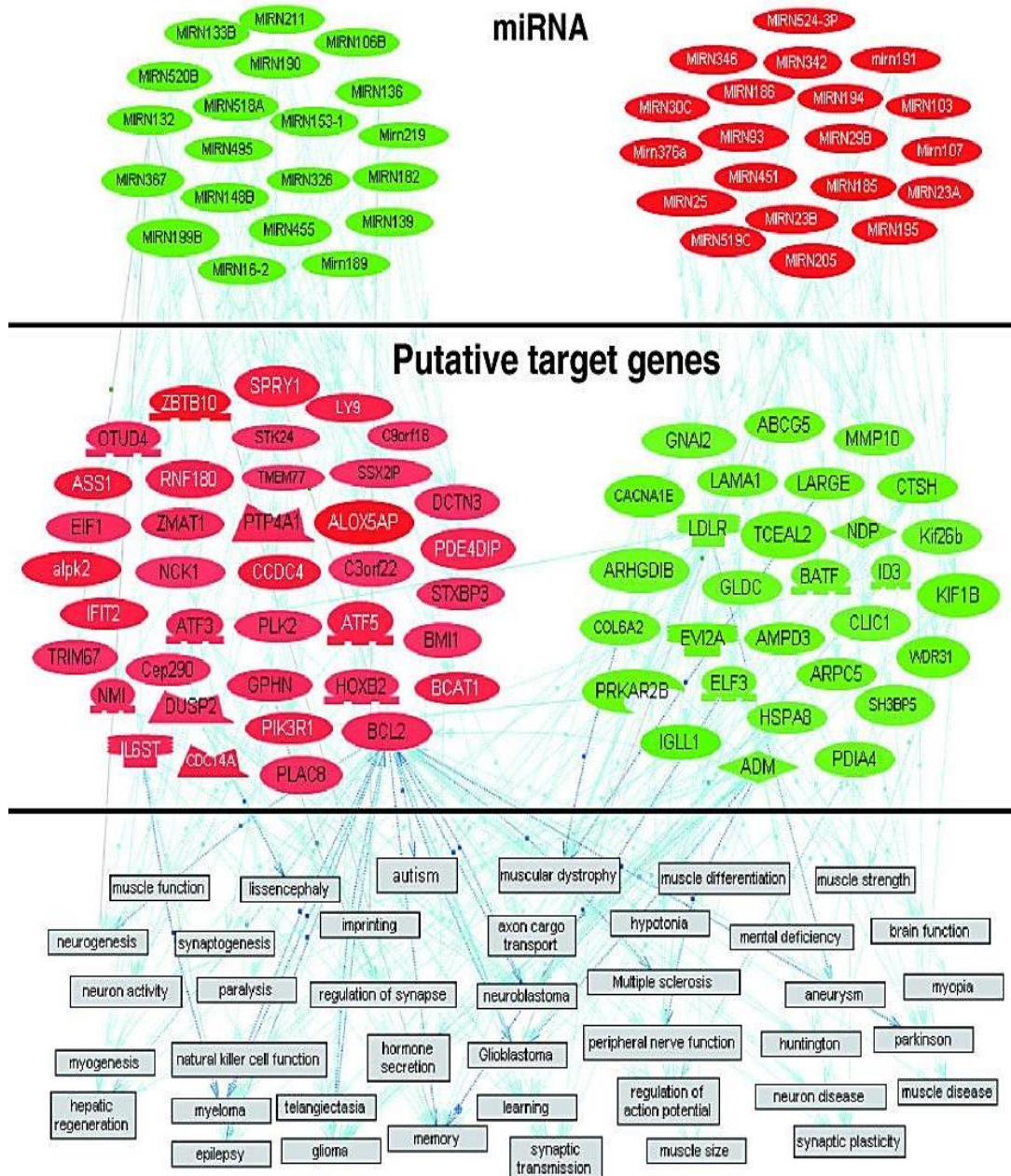
- 1) มีความบกพร่องด้านปฏิสัมพันธ์ทางสังคมและการสื่อสาร (Impairments in social interaction and communication) เช่น ไม่สามารถโต้ตอบบทสนทนาได้ ไม่สามารถสื่อสารกับผู้อื่นโดยใช้ท่าทางได้ มีปัญหาในการผูกมิตรต่อผู้อื่น เป็นต้น
- 2) มีพฤติกรรมบางอย่างซ้ำ ๆ ย้ำคิดย้ำทำ และมีความสนใจจำกัดเฉพาะบางเรื่อง (Repetitive behaviors and restricted interests) เช่น รับประทานอาหารแบบเดิม และพูดแต่ในสิ่งที่ตนเองมีความสนใจ เป็นต้น

โดยเฉลี่ยพบว่าผู้ปกครองของผู้ป่วยจะเริ่มสังเกตเห็นความผิดปกติทางพฤติกรรมดังกล่าว ในช่วงที่ผู้ป่วยอายุ 1 ปี 4 เดือนไปจนถึง 2 ปีครึ่ง (16 - 30 เดือน) [3, 4] โรคออทิซึมสเปกตรัม ก่อให้เกิดการสูญเสียทรัพยากรมนุษย์และงบประมาณจำนวนมากมหาศาลในการดูแลผู้ป่วย และมีอุบัติการณ์ของโรคที่สูงขึ้นเรื่อย ๆ และกำลังเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญทั่วโลก [47-50]

จากการศึกษาทางระบาดวิทยาโดยศูนย์ควบคุมและป้องกันโรคของสหรัฐอเมริกา (Centers for Disease Control and Prevention) ตั้งแต่ปี พ.ศ.2550 พ.ศ.2552 และล่าสุดในปี พ.ศ.2559 [6-9] ได้ทำการศึกษาย้อนหลังในเด็กอายุ 8 - 11 ปี ในพื้นที่เฝ้าระวังในประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่าอัตราความชุกของโรคออทิซึมสเปกตรัมสูงถึง 1 ใน 110 รายในปี พ.ศ.2549 [6] เพิ่มสูงขึ้นในปี พ.ศ.2551 เป็น 1 ใน 88 ราย [7] ในปี พ.ศ.2555 อัตราความชุกยังคงเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องเป็น 1 ใน 68 ราย [9] เช่นเดียวกับประเทศไทย ในการวินิจฉัยโรคความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับระบบประสาทในเด็กโรคออทิซึมสเปกตรัมถูกพบได้บ่อยครั้ง [10, 11] จากการศึกษาความชุกของโรคออทิซึมสเปกตรัมในเด็กอายุต่ำกว่า 12 ปีเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ จาก 1.43 รายต่อจำนวนประชากร 10,000 คนในปี พ.ศ.2541 เป็น 6.94 รายต่อจำนวนประชากร 10,000 คนในปี พ.ศ.2545 [10] จากการสำรวจความชุกของโรคออทิซึมสเปกตรัมโดยวารสารสุขภาพจิตแห่งประเทศไทยล่าสุด ในปี พ.ศ.2548 พบว่ามีผู้ป่วยมากถึง 9.9 คนต่อประชากรจำนวน 10,000 คน [51] และจากการสำรวจความชุกในเด็กก่อนวัยเรียนที่จังหวัดเชียงใหม่ในปี พ.ศ.2554 พบว่ามีเด็กที่มีความบกพร่องทางพัฒนาการแบบรอบด้าน (Pervasive developmental disorders) ซึ่งรวมถึงโรคออทิซึมสเปกตรัมด้วยสูงถึง 32 คนต่อประชากรจำนวน 10,000 คน [52] การค้นพบสารบ่งชี้ในผู้ป่วยจึงเปรียบเสมือนแสงนำทางที่จะทำให้ผู้ป่วยมีโอกาสในการรักษาและปรับเปลี่ยนพฤติกรรมได้รวดเร็วขึ้น ซึ่งจะเป็ผลดีต่อผู้ป่วยในการช่วยพัฒนาศักยภาพในการใช้ชีวิตให้ใกล้เคียงกับบุคคลปกติได้ดียิ่งขึ้น

จากประวัติการศึกษาโรคออทิซึมสเปกตรัมระยะแรกเริ่ม นักวิทยาศาสตร์ใช้การสังเกตลักษณะโครงสร้างทางกายภาพของสมอง ร่วมกับสังเกตการพัฒนาการของระบบประสาทและการทำหน้าที่ทางชีวภาพของสมองผู้ป่วย [2] ผลการศึกษาลักษณะทางกายภาพของเนื้อสมองผู้ป่วยโรคออทิซึมสเปกตรัมมักจะเป็นไปในแนวทางเดียวกัน โดยพบว่าในวัยเด็กจะมีสมองของผู้ป่วยจะมีขนาดโตกว่าเด็กปกติช่วงวัยเดียวกันเมื่อใช้เทคนิค Magnetic resonance imaging (MRI) ในการวัดปริมาณ แต่ขนาดสมองของผู้ป่วยเมื่อแรกเกิดไม่แตกต่างกันกับคนปกติ และขนาดสมองของผู้ป่วยจะลดขนาดลงเมื่อผู้ป่วยมีอายุที่มากขึ้น [53-55] ซึ่งสาเหตุดังกล่าวคาดว่าเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเซลล์ประสาท gray matter (GM) เพิ่มสูงขึ้นในส่วนของ frontal temporal parietal และบริเวณระบบประสาท limbic และปริมาณเซลล์ประสาท white matter (WM) ลดลงในส่วนของ frontal temporal และบริเวณระบบประสาท limbic [55-57] ทั้งนี้ยังพบว่าปริมาณของสารเคมีต่าง ๆ ในสมองมีการเปลี่ยนแปลงไปอีกด้วย [58] อย่างไรก็ตาม

การศึกษาดังกล่าวยังคงมีข้อจำกัดในด้านจำนวนของผู้ป่วยที่จะใช้ในการศึกษา [59] เนื่องจากส่วนใหญ่เป็นการศึกษาพยาธิสภาพแบบย้อนหลังในเนื้อเยื่อสมองของผู้ป่วยที่เสียชีวิตไปแล้ว การนำความรู้ดังกล่าวมาใช้ในการวินิจฉัยผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมที่ยังมีชีวิตอยู่จึงเป็นไปได้ยาก และไม่จำเพาะต่อโรคออทิซึมสเปกตรัมโดยตรง จากการประวัติการศึกษาที่ผ่านมาเกี่ยวกับการค้นหาพยาธิสภาพของโรคออทิซึมสเปกตรัม [60] กลุ่มผู้ทำการวิจัยส่วนใหญ่มุ่งเน้นไปที่การหาค้นหาความผิดปกติที่ในสายรหัสพันธุกรรมควบคู่ไปกับการเกิดพยาธิสภาพบนสมองของผู้ป่วย ตลอดจนการศึกษามากมายได้ดำเนินการเปรียบเทียบความชุกของโรคออทิซึมสเปกตรัมระหว่างฝาแฝดร่วมไข่ (Monozygotic twins) และฝาแฝดต่างไข่ (Dizygotic twins) ได้ข้อสรุปที่สอดคล้องกันว่าหากฝาแฝดคนหนึ่งเป็นโรคออทิซึมสเปกตรัม อีกคนหนึ่งที่เป็นฝาแฝดร่วมไข่จะมีโอกาสเป็นโรคออทิซึมสเปกตรัมสูงกว่าฝาแฝดต่างไข่ [17, 61, 62] ซึ่งมีความสอดคล้องกับจากการศึกษาที่ผ่านมาของ Valerie Hu และคณะ ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของยีนทั้งจีโนม หรือเรียกว่า การวิเคราะห์ทรานสคริปโตมโดยศึกษาอาร์เอ็นเอปริมาณกว่า 42,000 ทรานสคริปต์ เพื่อดูการแสดงออกของยีนในเซลล์ไลน์ลิมโฟบลาสต์ของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมและฝาแฝดไข่ใบเดียวกันของผู้ป่วยโดยเทคนิค DNA microarray พบว่าหน้าที่ของยีนที่มีการแสดงออกที่ผิดปกติออกไปเกี่ยวข้องกับพัฒนาและการทำหน้าที่ในระบบประสาท เช่นเดียวกับการศึกษาที่ผ่านมาของ Sarachana T. และคณะ [45] ได้ทำการศึกษารูปแบบการแสดงออกของ miRNA ในผู้ป่วยโรคออทิซึมสเปกตรัมเปรียบเทียบกับฝาแฝดไข่ใบเดียวกันที่ปกติ โดยพบว่าเซลล์จากผู้ป่วยโรคออทิซึมสเปกตรัมมีรูปแบบของระดับการแสดงออก miRNA ผิดปกติ ยิ่งไปกว่านั้น เมื่อดำเนินการวิเคราะห์อินเทอแรกโตมโดยบูรณาการระหว่างรูปแบบการแสดงออกของ miRNA และรูปแบบการแสดงออกของยีนในเซลล์จากผู้ป่วยและกลุ่มควบคุมเดียวกัน ยังพบว่ารูปแบบการแสดงออกของ miRNA มีความสอดคล้องแบบแปรผกผันกับรูปแบบการแสดงออกของยีนจำนวนมากที่ผิดปกติในเซลล์จากผู้ป่วยโรคออทิซึมสเปกตรัม ซึ่งยีนเหล่านั้นเป็นที่ทราบกันดีว่าทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับหน้าที่และการทำงานของระบบประสาท รวมไปถึงมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการชีวภาพต่าง ๆ ที่เคยมีรายงานว่าผิดปกติในผู้ป่วยโรคออทิซึมสเปกตรัม ได้แก่ synaptic plasticity ความผิดปกติของกล้ามเนื้อ ตลอดจนโรกระบบทางเดินอาหาร และระบบ steroid hormone signaling ดังแสดงในภาพที่ 1



Disrupted biological functions and disorders

รูปภาพที่ 1 การวิเคราะห์เครือข่ายความสัมพันธ์ทางชีวภาพ (Biological interactome) แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่าง miRNA ยีน หน้าที่ทางชีวภาพและโรคที่เกี่ยวข้องกับยีนที่ถูก miRNA ควบคุม สีเข้มแสดงถึง miRNA หรือยีนที่มีระดับการแสดงออกสูงผิดปกติในผู้ป่วยโรคออทิซึม สเปกตรัม ในขณะที่สีอ่อนแสดงถึง miRNA หรือยีนที่มีระดับการแสดงออกต่ำผิดปกติในผู้ป่วย (แหล่งที่มาของภาพ: Sarachana T., et al., 2010 [45])

จากการทำการวิเคราะห์อินเทอแรกโตมนี้ ทำให้เห็นภาพความสัมพันธ์ระหว่างระบบเครือข่าย miRNA ที่ควบคุมระบบเครือข่ายการแสดงออกของยีน และกระบวนการทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องได้ชัดเจนมากขึ้น ในการศึกษาดังกล่าวโดย Sarachana T. และคณะ [45] ได้เลือกทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง miRNA ชนิด hsa-miR-29b ซึ่งควบคุมยีน ID3 และ hsa-miR-219 ซึ่งควบคุมยีน PLK2 และยืนยันสิ่งที่ค้นพบจากการทำการวิเคราะห์อินเทอแรกโตมว่า miRNA ทั้งสองชนิดนี้มีระดับการแสดงออกผิดปกติในเซลล์จากผู้ป่วยและเป็นตัวควบคุมการแสดงออกของยีนทั้งสองนี้ ซึ่งพบว่าจากสาเหตุดังกล่าว รหัสพันธุกรรมของผู้ป่วยมีความเกี่ยวข้องกับสาเหตุของโรคออทิซึมสเปกตรัมเพียงร้อยละ 10 - 15 จากผู้ป่วยทั้งหมด [63] นอกจากสาเหตุปัจจัยทางพันธุกรรม ยังมีกลุ่มผู้วิจัยได้ทำการศึกษาเหนือพันธุกรรมของผู้ป่วยในหลาย ๆ การศึกษาพบว่ากลไกเหนือพันธุกรรมอาจมีความสัมพันธ์ต่อโรคออทิซึมสเปกตรัม ได้แก่ DNA methylation [28-30], Chromatin/histone modifications [31, 32] และ RNA-associated gene regulatory mechanisms [33] และพบว่าปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมมีความสัมพันธ์กับโรคออทิซึมสเปกตรัม เช่น การได้รับสารเคมีต่าง ๆ ในขณะที่อยู่ในครรภ์ ไม่ว่าจะเป็น Bisphenol-A [34-36] หรือมลพิษทางอากาศ [37, 38] นอกจากนี้ยังมีปัจจัยทางภูมิคุ้มกันของผู้ป่วย [39] เป็นต้น อย่างไรก็ตาม แม้จะมีการค้นคว้าเกี่ยวกับพยาธิสภาพของโรคออทิซึมสเปกตรัมเพิ่มขึ้นในปัจจุบัน แต่ยังคงไม่ค้นพบสาเหตุการเกิดโรคที่แท้จริงของออทิซึมสเปกตรัม

คณะผู้วิจัยหลายคณะเริ่มให้ความสนใจกับการศึกษาลักษณะการแสดงออกของโปรตีนในผู้ป่วยโรคออทิซึมสเปกตรัม เนื่องจากโรคที่มีความซับซ้อนสูง (Complex disease) เช่น โรคทางจิตเวชบางโรค สามารถอธิบายกลไกความรุนแรงการเกิดพยาธิสภาพและสามารถหาโปรตีนบ่งชี้เพื่อช่วยในการตรวจหาและยืนยันการเกิดโรคได้ด้วยเทคนิคทางโปรตีโอมิกส์ [64-66] อย่างไรก็ตามจากการศึกษาที่ผ่านมา ๆ มา ยังคงไม่สามารถตอบโจทย์ความต้องการที่ตั้งไว้ได้ ยกตัวอย่างเช่นจากการศึกษาของ Shen C และคณะในปี พ.ศ. 2553 [66] ได้ทำการศึกษาในเซลล์ B lymphocyte ของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมจำนวน 3 ราย ควบคุมกับพี่น้องที่มีพ่อแม่เดียวกันจำนวน 3 ราย ในครอบครัวชาวจีนครอบครัวหนึ่ง โดยใช้เทคนิค Antibody chip พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไปใน 4 โปรตีนซึ่งเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ IKK α ที่มีการแสดงออกสูงขึ้น และ Tyk2, EIF4G1 และ PRKCI ที่มีการแสดงออกลดลง และยังพบว่าประวัติของครอบครัวผู้ป่วยมีความเกี่ยวข้องกับการสัมผัสกาวยางธรรมชาติมีผลต่อการกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออก

ของ B lymphocyte ในผู้ป่วยออทิสซึมสเปกตรัมอีกด้วย อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาครั้งนี้ยังไม่จัดว่าเป็นการดูรูปแบบทั้งหมดของการแสดงออกของโปรตีนผู้ป่วยออทิสซึมสเปกตรัมอย่างแท้จริงและอาจมีการสูญเสียข้อมูลของโปรตีนในส่วนที่ไม่มี Antibody ที่จำเพาะไป

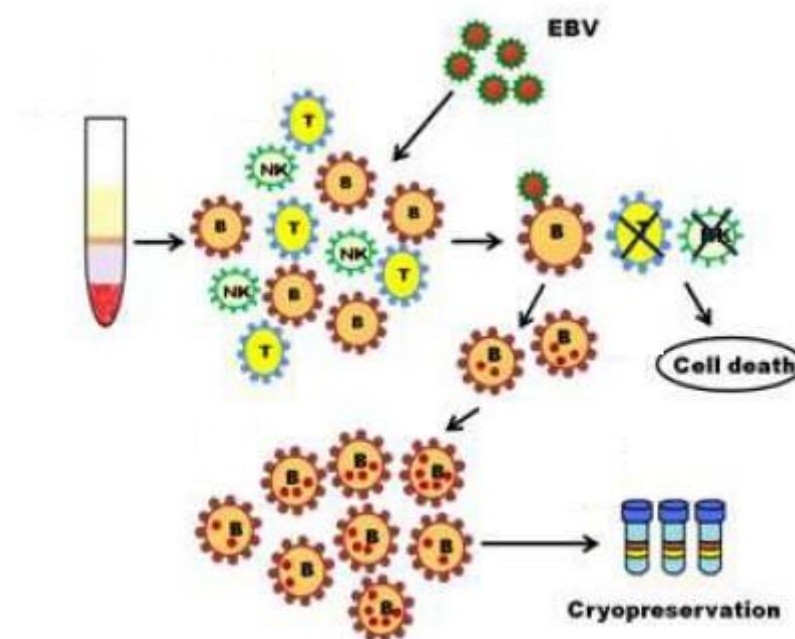
ดังนั้น คณะผู้วิจัยนี้สนใจศึกษาระดับการแสดงออกของโปรตีนทุกชนิดในเซลล์หรือที่เรียกว่า โปรตีโอม (Proteome) หรือโปรตีโอมิกส์ ซึ่งน่าจะมีความสำคัญในการเพิ่มเติมความเข้าใจในโรคออทิสซึมสเปกตรัม จากการแสดงออกเป็นรูปแบบของโปรตีนให้ผลที่ตรงไปตรงมาโดยไม่มีการมุ่งเน้นไปที่เป้าหมายเพียงตัวใดตัวหนึ่ง [67] โดยใช้เทคโนโลยีการวิเคราะห์ที่ล้ำสมัย อย่างไม่มีอคติเอนเอียงไปที่โปรตีนเพียงไม่กี่ชนิดที่มีผู้สนใจอย่างกว้างขวาง หรือที่เคยมีรายงานจากการศึกษาก่อนหน้า เช่น จากการศึกษาของ Ngounou Wetie AG และคณะในปี พ.ศ.2557 [68] ทำการศึกษาในซีรัมของผู้ป่วยออทิสซึมสเปกตรัมอายุตั้งแต่ 3 - 18 ปีเปรียบเทียบกับคนปกติจำนวนกลุ่มละ 7 ราย โดยใช้เทคนิค SDS-PAGE เพื่อบอกขนาดของโมเลกุลโปรตีนร่วมกับเทคนิค LC-MS/MS พบว่าระดับของ Apolipoprotein A1 (ApoA1) และ Apolipoprotein A4 (ApoA4) ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการ Cholesterol metabolism และ PON1 ซึ่งเกี่ยวข้องกับการ Detoxification มีการเปลี่ยนแปลงไปอย่างไรก็ตาม ในการศึกษาในรูปแบบโปรตีนด้วย SDS-PAGE เพียงมิติเดียวอาจไม่เพียงพอต่อความจำเพาะและความไวสำหรับระดับการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนโดยรวมในผู้ป่วยโรคออทิสซึมสเปกตรัม และจากการศึกษาของ Ngounou Wetie AG และคณะใน พ.ศ.2558 [69] ทำการศึกษารูปแบบการแสดงออกในน้ำลายของผู้ป่วยออทิสซึมสเปกตรัมเปรียบเทียบกับคนปกติจำนวนกลุ่มละ 6 ราย โดยใช้เทคนิค Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) ร่วมกับ LC-MS/MS ทั้งนี้ จากการศึกษาพบว่ามี ความเปลี่ยนแปลงในส่วนของการแสดงออกของโปรตีน Alpha-amylase, CREB-binding protein, P532, Transferrin, Zn alpha2, Glycoprotein, Zymogen granule protein 16, Cystatin D และ Plasminogen ที่มีการแสดงออกลดลงในผู้ป่วยออทิสซึมสเปกตรัม และพบว่า Proto-oncogene Frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas 1 (FRAT1), Kinesin family member 14, Integrin alpha6 subunit, growth hormone regulated TBC protein 1, Parotid secretory protein, Prolactin-inducible protein precursor, Mucin-16, Ca binding protein migration inhibitory factor-related protein 14 (MRP14) มีการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้น อย่างไรก็ตาม การศึกษาโปรตีโอมิกส์ในสารคัดหลั่ง เช่น น้ำลายของผู้ป่วย อาจยังไม่ใช่คำตอบที่ดีที่สุด

การค้นหาล้างบ่งชี้ เนื่องจากการเก็บสิ่งส่งตรวจทำให้ปราศจากการปนเปื้อนเป็นเรื่องที่ทำได้ยาก และรูปแบบการแสดงออกบางส่วนอาจไม่ครบถ้วนเหมือนการวิเคราะห์รูปแบบโปรตีนโดยใช้สิ่งส่งตรวจเป็นโลหิต ดังนั้น การวิเคราะห์รูปแบบของโปรตีนหรือเทคนิคโปรตีโอมิกส์ด้วยเทคนิค 2D-PAGE ร่วมกับ LC-MS/MS [46] ในโลหิตของผู้ป่วยจึงเป็นเหมือนตัวแทนที่ทำให้สามารถเข้าใจได้ถึงผลพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นในโรคที่มีความซับซ้อนสูงเช่นในโรคอหิวาต์ซีมสเปกตรัม

2.2 เซลล์ไลน์ชนิดลิมโฟบลาสต์ (Lymphoblastoid Cell Lines; LCLs)

เซลล์ไลน์ชนิดลิมโฟบลาสต์เกิดจากการพัฒนาโดยการนำเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด B-lymphocyte จากโลหิตมาทำให้เกิดการติดเชื้อโดย Epstein-Barr virus (EBV) ซึ่งจะช่วยให้มีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติไปเป็นเซลล์มะเร็ง และจะสามารถแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้อย่างไม่มีขีดจำกัดเหมือนการศึกษาในเซลล์ที่ได้จากผู้ป่วยโดยตรง ซึ่งเซลล์ที่ได้จากผู้ป่วยโดยตรงจะมีช่วงชีวิต (Life span) ที่จำกัด จึงทำให้ต้องขอเจาะเลือดผู้ป่วยอีกครั้งเพื่อที่จะทำการศึกษา ซึ่งอาจจะทำได้ยากหรืออาจจะทำไม่ได้เลย หากผู้ป่วยไม่พร้อมให้ทำการเจาะเก็บเลือดได้อีกด้วยสาเหตุต่าง ๆ [70] นอกจากนี้ เซลล์ไลน์ชนิดลิมโฟบลาสต์ ยังสามารถลดข้อจำกัดในการเก็บตัวอย่างที่เก็บได้ยาก เช่น ในการศึกษาผู้ป่วยที่มีความผิดปกติระบบประสาทต่าง ๆ นั้น ไม่จำเป็นต้องเก็บตัวอย่างที่เป็นชิ้นเนื้อจากสมองโดยตรง [71] อีกทั้งยังสามารถเก็บรักษาเซลล์ไลน์ชนิดลิมโฟบลาสต์ ไว้ใน Biobank เพื่อที่จะใช้ในการศึกษาในอนาคตได้อีกด้วย

โดยหลักการของการเตรียมเซลล์ไลน์ชนิดลิมโฟบลาสต์ จะเริ่มต้นโดยทำการตัดแยกให้เพียงเม็ดเลือดขาว (Lymphoblast) ด้วยวิธี Density centrifugation หลังจากนั้นจะทำการเปลี่ยนแปลง B-lymphocyte โดยทำให้ติดเชื้อ EBV และทำการแยกเซลล์ T-lymphocyte, NK-cell และ B-lymphocyte ออกจากกัน ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี ตั้งแต่วิธีการทำให้เกิด resetting cytotoxic T-cell โดยใช้ Sheep red blood cell (SRBCs) การเติม T-cell mitogen เช่น Phytohemagglutinin (PHA) ไปจนถึงการใช้ Magnetic beads ที่ Conjugate ด้วย Anti-CD19 antibody ซึ่งเป็นแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ B-cells เป็นต้น [72] หลังจากนั้น สามารถให้นำเซลล์ไลน์ชนิดลิมโฟบลาสต์ไปเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ให้ได้ตามต้องการและหากต้องการเก็บเซลล์ให้ใส่ Growth medium ก่อนที่จะนำไปแช่แข็ง (Cryopreservation) ดังภาพประกอบที่ 2



รูปภาพที่ 2 แสดงขั้นตอนการ Transformation เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด B-lymphocytes ด้วย Epstein-Barr virus (แหล่งที่มาของภาพ: Hussain T., Mulherkar R., 2012 [73])

อย่างไรก็ตามการใช้เซลล์ไลน์ชนิดลิมโฟบลาสตอยต์ในการศึกษาวิจัยนั้นก็ยังมีข้อจำกัด คือ ผลการศึกษาอาจไม่เหมือนการศึกษาจากเซลล์ในร่างกายโดยตรง โดยพบว่าเซลล์ไลน์ชนิดลิมโฟบลาสตอยต์ มีอัตราการกลายพันธุ์ของเซลล์ร่างกาย (Somatic mutation) อยู่ที่ร้อยละ 0.3 [74] ถึงแม้ว่าเซลล์ไลน์ชนิดลิมโฟบลาสตอยต์จะมีข้อจำกัดอยู่บ้าง แต่เมื่อเทียบกับประโยชน์แล้วทำให้ในปัจจุบันมีการใช้เซลล์ไลน์ชนิดลิมโฟบลาสตอยต์ในการศึกษาวิจัยเพิ่มมากขึ้น และถือเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ใช้ในการศึกษาความผิดปกติทางระบบประสาท และโรคทางการแพทย์อื่น ๆ เพื่อประโยชน์ในการวินิจฉัยโรคและการรักษาในอนาคต

2.3 ชีวสารสนเทศศาสตร์ (Bioinformatics) และชีววิทยาเชิงระบบ (Systems biology)

เนื่องจากความสำเร็จในเรื่องโครงการจีโนมมนุษย์ (Human genome project) ส่งผลให้ตั้งแต่อดีตที่ผ่านมาจนถึงปัจจุบัน มีจำนวนข้อมูลจากการศึกษาวิจัยทางชีววิทยาเพิ่มขึ้นสูงขึ้น และมีแนวโน้มว่าข้อมูลเหล่านี้จะเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ อย่างมหาศาล จากสถิติของฐานข้อมูล GenBank ซึ่งเก็บรวบรวมข้อมูลทางด้านพันธุกรรมทั้ง DNA และ mRNA และจากฐานข้อมูล Swiss-Prot ซึ่งเป็นฐานข้อมูลสำหรับโปรตีน พบว่าโดยเฉลี่ยปริมาณของข้อมูลการศึกษาทั้งหมดจะเพิ่มขึ้นเป็นจำนวนสองเท่าทุก ๆ 15 เดือน [75, 76] ด้วยสาเหตุดังกล่าว ทำให้มีคณะผู้วิจัยทั่วโลกมีความต้องการที่จะพัฒนาความรู้ด้านการจัดเก็บข้อมูล การค้นหาข้อมูล การเข้าถึงข้อมูลร่วมกัน ตลอดจนการพัฒนาเครื่องมือที่สามารถช่วยในการวิเคราะห์และประมวลผลจากข้อมูลที่มีปริมาณมากได้อย่างสะดวกสบาย ซึ่งนำไปสู่ผลลัพธ์คือการเกิดขึ้นขององค์ความรู้ด้านชีวสารสนเทศศาสตร์ (Bioinformatics)

ชีวสารสนเทศศาสตร์ คือ การศึกษาเกี่ยวกับการจัดการข้อมูลทางชีววิทยาโดยใช้ศาสตร์ทางด้านคอมพิวเตอร์ วิศวกรรมศาสตร์ และ สถิติ เข้ามาช่วยในการจัดการข้อมูลดังกล่าว [77] นอกจากนี้ การศึกษาทางด้านชีวสารสนเทศศาสตร์ยังมีความหมายครอบคลุมไปถึงการวิจัย การพัฒนา และการประยุกต์ใช้โปรแกรมซอฟต์แวร์เพื่อขยายประโยชน์ในการใช้ข้อมูลทางชีวภาพ และการจัดเก็บข้อมูลต่าง ๆ ทางชีวภาพด้วย ชีวสารสนเทศศาสตร์สามารถแบ่งได้เป็น 2 แบบหลัก ๆ ตามจุดประสงค์ในการใช้งาน ได้แก่ ฐานข้อมูลทางชีวสารสนเทศศาสตร์ (Bioinformatics databases) และเครื่องมือทางชีวสารสนเทศศาสตร์ (Bioinformatics tools)

ในปัจจุบัน ฐานข้อมูลทางชีวสารสนเทศศาสตร์มีบทบาทสำคัญเป็นอย่างมากในการเก็บรวบรวมข้อมูลจากการศึกษาในปัจจุบัน ด้วยการตระหนักถึงความสำคัญดังกล่าวทำให้มีฐานข้อมูลที่มีความจำเพาะสูงขึ้นเกี่ยวข้องกับชนิดของสารพันธุกรรม ตลอดจนพยาธิสภาพต่อโรคเกิดขึ้นมากมาย ส่งผลให้การค้นคว้าหาข้อมูลเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น เนื่องจากผู้วิจัยสามารถกำหนดปัจจัยต่าง ๆ ได้ตามความต้องการ เช่นเดียวกับการใช้เครื่องมือทางชีวสารสนเทศศาสตร์ (Bioinformatics tools) มักถูกนำมาใช้เพื่อการทำนายผลการวิเคราะห์เบื้องต้นก่อนการทดลอง ใช้ในการช่วยรวบรวมผล ตลอดจนวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของแต่ละปัจจัยจากผลการทดลอง ซึ่งฐานข้อมูลทั้งหมดมีข้อดีคือ ไม่เสียค่าใช้จ่าย มีความถูกต้องสูง ทำงานได้รวดเร็ว เข้าใจการทำงานได้ง่าย

มีข้อมูลที่ทันสมัย สามารถเข้าถึงได้โดยผ่านระบบอินเทอร์เน็ต และเป็นที่ยอมรับแพร่หลายโดยทั่วไป
 ทั้งนี้ ผู้วิจัยได้ทำการสรุปฐานข้อมูลทางชีวสารสนเทศศาสตร์ที่มักนำมาใช้โดยเบื้องต้นไว้ในตารางที่ 1
 และเครื่องมือทางชีวสารสนเทศศาสตร์ที่มักนำมาใช้โดยเบื้องต้นไว้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 แสดงรายชื่อของฐานข้อมูลทางชีวสารสนเทศศาสตร์ที่สำคัญจำนวน 10 แห่ง พร้อมด้วย
 ที่อยู่เว็บไซต์ และรายละเอียดเบื้องต้นเกี่ยวกับข้อมูลที่สามารถค้นหาได้ในแต่ละฐานข้อมูล

ชื่อฐานข้อมูล	URL	รายละเอียด
GenBank/DDBJ/ EMBL	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ query.fcgi?db=Nucleotide	Nucleotide sequences
Ensembl	www.ensembl.org	Human/mou se genome
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ query.fcgi?DB=pubmed	Literature references
NR	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ query.fcgi?db=Protein	Non redundant Protein sequences
SWISS-PROT	www.expasy.ch	Protein sequences
InterPro	www.ebi.ac.uk	Protein domains
OMIM	www.ncbi.nlm.nih.gov	Genetic diseases
Enzymes	www.chem.qmul.ac.uk	Enzymes
PDB	www.rcsb.org/pdb/	Protein structures
KEGG	www.genome.ad.jp	Metabolic pathways

ตารางที่ 2 แสดงรายชื่อของเครื่องมือทางชีวสารสนเทศศาสตร์ที่สำคัญจำนวน 12 แห่ง โดยแยกตามประเภทของเครื่องมือ และที่อยู่เว็บไซต์ และรายละเอียดเบื้องต้นเกี่ยวกับข้อมูล

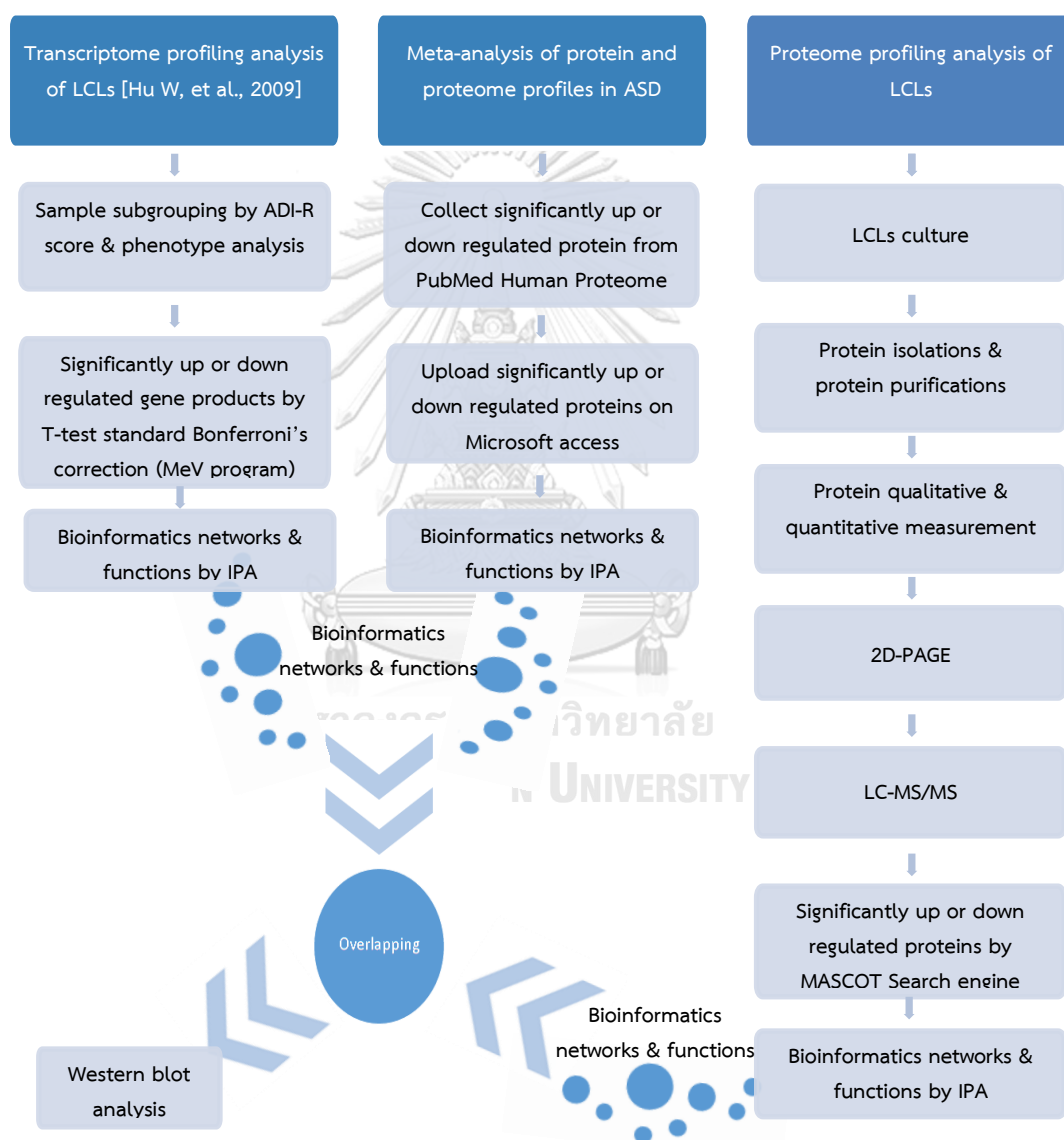
ประเภทของเครื่องมือ	ชื่อเครื่องมือ	URL	รายละเอียด
Database Search	SRS	srs.ebi.ac.uk	Database search
	Entrez	www.ncbi.nih.gov/Entrez	Database search
	BLAST	www.ncbi.nlm.nih.gov/blast	Homology search
	DALI	www.ebi.ac.uk/dali	Structure database search
Multiple alignment	ClustalW	www.ebi.ac.uk	Multiple sequence alignment
	MUSCLE	phylogenomics.berkeley.edu/muscle/	Multiple sequence alignment
	Tcoffee	www.tcoffee.org	Multiple Sequence Alignment
Prediction	GenScan	genes.mit.edu	Gene prediction
	PsiPred	bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/	Protein structure prediction
	Mfold	www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/	RNA structure prediction
Phylogenetics	Phylip	bioweb.pasteur.fr/seqanal/phylogeny/phylip-uk.html	Tree reconstruction
	PhyML	atgc.lirmm.fr/phyml/	Tree reconstruction
Edition/ Visualization	Jalview	www.jalview.org	Alignment editor
	Logos	weblogo.berkeley.edu	A MSA Visualization Tool
	Trees	iubio.bio.indiana.edu/treeapp/treeprint-form.html	Tree Visualization
	Rasmol	www.umass.edu/microbio/rasmol	Structure visualization

ส่วนชีววิทยาเชิงระบบ (Systems biology) นั้นมีระเบียบวิธีการที่คล้ายคลึงกับชีวสารสนเทศศาสตร์ และใช้เครื่องมือทางด้านชีวสารสนเทศศาสตร์ในการตอบคำถาม แต่ชีววิทยาเชิงระบบมีจุดมุ่งหมายที่แตกต่างกันออกไป กล่าวคือ ชีววิทยาเชิงระบบนั้นเป็นการศึกษาที่ทำการสร้างแบบจำลองทางชีววิทยาที่ซับซ้อนขึ้นโดยผ่านกระบวนการทางคณิตศาสตร์และคอมพิวเตอร์ เพื่อศึกษามุ่งเน้นการปฏิสัมพันธ์ภายในระบบชีวภาพที่ซับซ้อนโดยใช้แนวทางแบบองค์รวม (Holistic) และมีจุดมุ่งหมายคือ การค้นพบคุณสมบัติของเซลล์หรือเนื้อเยื่อ ตลอดจนการทำงานอย่างเป็นระบบในสิ่งมีชีวิต [78] ในขณะที่ชีวสารสนเทศศาสตร์นั้นมุ่งเน้นที่การเก็บข้อมูลและวิเคราะห์ข้อมูลขนาดใหญ่ให้เหลือแต่สิ่งที่สำคัญและเหมาะสมกับการนำไปใช้ศึกษาต่อ เช่น การวิเคราะห์ข้อมูลยีนทั้งหมดจาก Microarrays และทำการคัดเลือกเฉพาะยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติไปอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตาม ชีววิทยาเชิงระบบมักมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึม (Metabolism) หรือเครือข่ายการสื่อสารสัญญาณระหว่างเซลล์ (Cell signaling networks) [79]

ชีววิทยาเชิงระบบยังถือว่าเป็นจุดเริ่มต้นการเปลี่ยนแปลงจากแนวทางการวิเคราะห์แบบลดทอนนิยม (Reductionist) ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ที่พยายามลดทอนระบบทางชีววิทยาให้กลายเป็นส่วนย่อยที่เล็กที่สุดและอธิบายได้ด้วยพื้นฐานไปสู่มุมมองการวิเคราะห์แบบองค์รวม (Holistic) [80] โดยชีววิทยาเชิงระบบยังสามารถปิดข้อจำกัดของการวิเคราะห์แบบลดทอนนิยมในแง่ของการรวบรวมข้อมูลในแต่ละลำดับขั้นตั้งแต่การแสดงออกที่มีความผิดปกติไปในยีน โปรตีน จนไปถึงระดับเมแทบอลิซึม ทั้งในการศึกษาในเซลล์, ในสัตว์ทดลอง ตลอดจนการศึกษาในมนุษย์ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่เพียงพอและเที่ยงตรง รวมทั้งสามารถอธิบายข้อมูลขนาดใหญ่ที่ซับซ้อนให้สามารถเข้าใจได้ง่ายขึ้น [81] ทำให้สามารถเข้าใจการทำงานของระบบในภาวะปกติและสามารถคาดการณ์สิ่งที่เกิดขึ้นเมื่อเกิดภาวะผิดปกติไปในระบบ [82] การวิเคราะห์ทางชีววิทยาเชิงระบบจึงน่าจะเพิ่มโอกาสในการวินิจฉัยการพยากรณ์โรค และการตรวจหาโรคสำหรับการใช้งานทางคลินิกได้ดียิ่งขึ้น [83]

บทที่ 3 ขั้นตอนและวิธีการทำงานวิจัย

ในส่วนของขั้นตอนและวิธีการทำงานวิจัย ผู้วิจัยได้แบ่งออกเป็น 3 ส่วนหลัก ๆ ดังรูปภาพที่ 3 คือ ตอนที่ 1 การวิเคราะห์ข้อมูลรูปแบบทรานสคริปโตมของเซลล์ไลน์ชนิดลิมโฟบลาสตอยด์ (LCLs) ตอนที่ 2 การวิเคราะห์ Meta-analysis ของโปรตีนและรูปแบบโปรตีโอมของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม ตอนที่ 3 การวิเคราะห์รูปแบบโปรตีโอมของเซลล์ไลน์ชนิดลิมโฟบลาสตอยด์ (LCLs)



รูปภาพที่ 3 แสดงแผนผังขั้นตอนและวิธีการทำงานวิจัยในการศึกษาครั้งนี้

ตอนที่ 1 การวิเคราะห์ข้อมูลรูปแบบทรานสคริปโตมของ LCLs

วัตถุประสงค์

เพื่อทำการวิเคราะห์รูปแบบทรานสคริปโตมของเซลล์ไลน์ชนิดลิมโฟบลาสต์ (LCLs) จากการศึกษาด้วยเทคนิคไมโครอาร์เรย์ที่เคยมีการศึกษาแล้วก่อนหน้านี้ โดยนำกลุ่มของยีนที่ผิดปกติในเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวจากผู้ป่วยโรคออทิซึมสเปกตรัมไปเปรียบเทียบกับความสอดคล้องและความสัมพันธ์กับกลุ่มของโปรตีนที่มีระดับการแสดงออกผิดปกติในเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคออทิซึมสเปกตรัมทั้งในการศึกษาก่อนหน้าและในการศึกษานี้ทั้งในแง่ชนิดและหน้าที่ทางชีวภาพของโปรตีน

ตอนที่ 1.1 การคัดเลือกข้อมูลการศึกษาทรานสคริปโตมของ LCLs

วัตถุประสงค์

เพื่อทำการคัดเลือกเซลล์ไลน์จากการศึกษาที่วิเคราะห์จากเทคนิคไมโครอาร์เรย์ เพื่อเลือกกลุ่มเซลล์ไลน์ที่เหมาะสมกับการนำมาใช้วิเคราะห์โปรตีโอมิกส์ในการศึกษานี้ และเพื่อคัดเลือกกลุ่มย่อยของออทิซึมสเปกตรัมในการวิเคราะห์หาข้อมูลยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติไปจากกลุ่มควบคุมทั้งจากในออทิซึมสเปกตรัมโดยรวมและในกลุ่มย่อยต่อไป

วิธีการวิจัย

ทำการคัดเลือกข้อมูลการวิเคราะห์ทรานสคริปโตมของ LCLs จำนวน 114 เซลล์ไลน์ ประกอบด้วยกลุ่มออทิซึมสเปกตรัม 85 เซลล์ไลน์ และกลุ่มควบคุมจำนวน 29 เซลล์ไลน์ ซึ่งเป็น Age- /sex- matched control จากการศึกษาของ Hu et al., 2009 (GSE 15402) โดยรูปแบบการแสดงออกของยีนใช้เทคนิค cDNA microarrays โดยใช้ชุด TIGR 40K human arrays [84] กล่าวโดยย่อคือ ทำการดึงข้อมูลจากฐานข้อมูล Geo DataSets ของ GSE 15402 โดยทำการเลือกเฉพาะเซลล์ไลน์ที่มีข้อมูลของผู้ป่วยที่มีข้อมูลลักษณะประชากรในการศึกษา ADI-R scoring ดังที่ได้มีการศึกษาของ Hu et al., 2009 [84] เมื่อได้ข้อมูลของกลุ่มออทิซึมสเปกตรัมทั้งหมดที่ผ่านการคัดเลือกมาแล้ว ผู้วิจัยได้ทำการจัดข้อมูลอีกครั้งโดยการใช้โปรแกรม Multi Experiment Viewer (MEV) โดยวิเคราะห์ด้วยวิธี Principal component analysis (PCA) และวิธี Hierarchical Clustering (HCL) เพื่อทำการแบ่งเป็นกลุ่มย่อย ๆ ของออทิซึมสเปกตรัม

ตอนที่ 1.2 การวิเคราะห์ข้อมูลทางชีวสารสนเทศจากฐานข้อมูล

วัตถุประสงค์

เพื่อวิเคราะห์หาข้อมูลยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติไปจากกลุ่มควบคุมทั้งจากในออตซิมสเปกตรัมโดยรวมและออตซิมสเปกตรัมในกลุ่มย่อยตามลักษณะประชากร และนำข้อมูลมาใช้ในการวิเคราะห์ผลทางชีวสารสนเทศเพื่อค้นหาความเกี่ยวข้องกับโรคทางระบบประสาทและหน้าที่ทางชีวภาพ ตลอดจนสร้างเครือข่ายทางชีวภาพที่แสดงความเกี่ยวข้องของยีนดังกล่าว

วิธีการวิจัย

1. ข้อมูลทรานสคริปโตมของเซลล์ไลน์โดยรวมและกลุ่มย่อยได้ถูกนำวิเคราะห์อีกครั้ง โดยใช้โปรแกรม Multi Experiment Viewer (MEV) มาทำการ Normalized ข้อมูลอีกครั้ง และใช้ 70% data filters เพื่อทำการตัดข้อมูลของยีนที่มีการสูญเสียข้อมูลไปมากกว่าร้อยละ 30 จากจำนวนเซลล์ไลน์ทั้งหมดออกไป จากนั้นจึงนำข้อมูลยีนที่เหลือ มาทำการวิเคราะห์หารายชื่อยีนที่แสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญด้วยเทคนิค T-test (Standard Bonferroni correction) ที่ค่านัยสำคัญ $P < 0.05$ โดยกำหนดค่าที่ 100 permutation โดยเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมกับแต่ละกลุ่มย่อยตามลักษณะของผู้ป่วยออตซิมสเปกตรัมและระหว่างกลุ่มควบคุมกับผู้ป่วยออตซิมสเปกตรัมโดยรวม

2. นำรายชื่อยีนทั้งหมดที่ผิดปกติอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มควบคุมกับแต่ละกลุ่มย่อยตามลักษณะของผู้ป่วยออตซิมสเปกตรัม และระหว่างกลุ่มควบคุมกับผู้ป่วยออตซิมสเปกตรัมโดยรวม มาอัปโหลดเพื่อทำการวิเคราะห์เครือข่ายทางชีวภาพของยีนด้วยโปรแกรม Ingenuity Pathway Analysis (IPA) ซึ่งโปรแกรมนี้ได้รับความร่วมมือกับมหาวิทยาลัยจอร์จ วอชิงตัน กรุงวอชิงตัน ดีซี ทั้งนี้ ในการสร้างและวิเคราะห์เครือข่ายทางชีวภาพ รายชื่อยีนทั้งหมดจะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของ symbol และถูกนำโดยใช้วิธีการทางสถิติ Fisher's Exact Test ในระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ใช้คือ P-value (two-sided) < 0.05 ผลที่ได้จากโปรแกรมจะทำนายถึงความเกี่ยวข้องกับโรคต่าง ๆ และหน้าที่ทางชีวภาพ ตลอดจนเครือข่ายทางชีวภาพที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติไปทั้งหมด

ตอนที่ 2 การวิเคราะห์ Meta-analysis ของโปรตีนและรูปแบบโปรตีนของผู้ป่วย ออทิซึมสเปกตรัม

วัตถุประสงค์

เพื่อทำการค้นหาการศึกษาในกลุ่มโปรตีนในมนุษย์ที่เคยมีรายงานความผิดปกติในโรคออทิซึมสเปกตรัมในฐานะข้อมูลชีวสารสนเทศศาสตร์ และทำการวิเคราะห์ความสอดคล้องและความสัมพันธ์กับกลุ่มของโปรตีนที่มีระดับการแสดงออกผิดปกติในเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคออทิซึมสเปกตรัมในการศึกษานี้

ตอนที่ 2.1 การคัดเลือกข้อมูลการศึกษาจากฐานข้อมูลทางชีวสารสนเทศ

วัตถุประสงค์

เพื่อทำการกำหนดเกณฑ์การคัดเลือกการศึกษาที่นำมาวิเคราะห์ Meta-analysis ตลอดจนเกณฑ์ในการคัดเลือกรายชื่อของโปรตีนที่มีการแสดงออกผิดปกติไป

วิธีการวิจัย

ทำการค้นหาและรวบรวมงานวิจัยต่าง ๆ ที่ถูกตีพิมพ์ไปแล้วจากฐานข้อมูล NCBI ในส่วนของ Pubmed โดยกำหนดขอบเขตปีทำการตีพิมพ์ตั้งแต่ปี พ.ศ.2550 จนถึงในปัจจุบัน และกำหนดข้อมูลให้มีเนื้อหาที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาโปรตีนหรือโปรตีนที่มีการแสดงออกผิดปกติในผู้ป่วยโรคออทิซึมสเปกตรัมในมนุษย์เท่านั้น ซึ่งในแต่ละงานวิจัยที่ค้นหานั้นใช้สิ่งตัวอย่างในการทดลองจากเนื้อเยื่อส่วนปลาย (Peripheral tissues) เช่น ชีรุม น้ำลาย และเลือดจากเด็กทารกแรกเกิด ตลอดจนสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วย เช่น ปัสสาวะ และในเนื้อเยื่อสมอง (Post-mortem brain) ซึ่งทั้งหมดเป็นมนุษย์ที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคออทิซึมสเปกตรัมแล้ว

ตอนที่ 2.2 การวิเคราะห์ข้อมูลทางชีวสารสนเทศจากฐานข้อมูล

วัตถุประสงค์

ทำการเก็บข้อมูลโปรตีนที่มีการแสดงออกผิดปกติไปจากงานวิจัยในฐานข้อมูลลงในฐานข้อมูลของผู้ทำวิจัย และทำการดึงข้อมูลดังกล่าวมาใช้ในการวิเคราะห์ผลทางชีวสารสนเทศเพื่อค้นหากลุ่มโรคทางระบบประสาทและหน้าที่ทางชีวภาพ ตลอดจนสร้างเครือข่ายทางชีวภาพที่แสดงความเกี่ยวข้องของโปรตีนดังกล่าว

วิธีการวิจัย

หลังจากทำการเก็บข้อมูลโปรตีนที่มีการแสดงออกผิดปกติไปอย่างมีนัยสำคัญเรียบร้อยแล้วรายชื่อโปรตีนทั้งหมดถูกนำมาอัปโหลดเพื่อทำการวิเคราะห์เครือข่ายทางชีวภาพของโปรตีนด้วยโปรแกรม Ingenuity Pathway Analysis (IPA) ในการสร้างและวิเคราะห์โครงข่ายทางชีวภาพโดยใช้วิธีการทางสถิติ Fisher's Exact Test ในระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ใช้คือ P-value (two-sided) < 0.05 ผลที่ได้จากโปรแกรมจะทำนายถึงโรคต่าง ๆ และหน้าที่ทางชีวภาพ ตลอดจนเครือข่ายทางชีวภาพที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนที่มีการแสดงออกผิดปกติไปทั้งหมด

ตอนที่ 3 การวิเคราะห์รูปแบบโปรตีนของ LCLs

ตอนที่ 3.1 การคัดเลือกสิ่งตัวอย่าง

วัตถุประสงค์

เพื่อทำการกำหนดเกณฑ์การคัดเลือกผู้ป่วยที่เหมาะสมในแต่ละกลุ่มตัวอย่างในงานวิจัยโปรตีนโอมิกส์ครั้งนี้

วิธีการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้ ทำการศึกษาในเซลล์ไลน์ชนิดลิมโฟบลาสต์ (LCLs) ซึ่งพัฒนามาจาก mononuclear cells ในเลือดของผู้ป่วยโรคออทิซึมสเปกตรัมและคนปกติโดย Autism Genetic Resource Exchange (AGRE) repository ซึ่งคณะผู้วิจัยได้รับความอนุเคราะห์เซลล์เหล่านี้จาก Dr.Valerie Hu มหาวิทยาลัยจอร์จทาวน์ กรุงวอชิงตัน ดีซี ประเทศสหรัฐอเมริกา เซลล์เหล่านี้ได้ผ่านการคัดกรองโดยหลักการของ Dr.Valerie Hu และคณะ [85] ตลอดจนใช้ในการวิเคราะห์การแสดงออกของทรานสคริปโตมิกส์โดยใช้ดีเอ็นเอไมโครอาร์เรย์ (DNA microarray analysis) ที่ได้ตีพิมพ์ไว้แล้ว กล่าวโดยย่อคือ ทำการคัดเลือกผู้ป่วยชายที่เป็นโรคออทิซึมสเปกตรัมที่ไม่เคยพบประวัติครอบครัวมาก่อน จากจำนวน 1,954 ราย โดยใช้ข้อมูลจากพฤติกรรมของผู้ป่วย 123 ประการ ในชุดแบบสอบถามเพื่อการวินิจฉัยโรคออทิซึมสเปกตรัมที่เรียกว่า Autism Diagnostic Interview-Revised (ADI-R) คัดแยกผู้ป่วยที่มี Cognitive impairment (Raven's scores <70) ผู้ป่วยที่มีความผิดปกติทางพันธุกรรมชัดเจน (Fragile X, Rett, Tuberous sclerosis, Chromosome 15q11-q13 duplication) ผู้ป่วยที่คลอดก่อนกำหนด (<35 สัปดาห์) และผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยด้วยโรคจิตประสาทที่เป็น Comorbid disorders ของออทิซึมสเปกตรัม ได้แก่ Bipolar disorder, Obsessive compulsive disorder, Severe anxiety ออกไป เหลือเพียงผู้ป่วยที่เป็นโรคออทิซึมสเปกตรัมแบบ idiopathic จากนั้นทำการจัดกลุ่มเป็น 3 กลุ่มย่อย (Subgroups) ตามการแสดงทางคลินิก (Clinical phenotypes) โดยหลักการของ Valerie Hu และคณะ [85]

โดยสำหรับการศึกษานี้ ทำการศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกที่ผิดปกติไปของโปรตีนในกลุ่มออทิซึมสเปกตรัมที่มีความผิดปกติทางด้านภาษารุนแรง (Severe language impaired) จำนวน 6 ราย และกลุ่มคนปกติที่เป็นอายุเท่ากันและเพศเดียวกันกับผู้ป่วย (Age- /sex- matched control) จำนวน 6 ราย

ตอนที่ 3.2 การเพาะเลี้ยงและการเก็บเซลล์ LCLs

วัตถุประสงค์

เพื่อนำมาเป็นโมเดลในการสกัดโปรตีนในการศึกษาโปรตีโอมจากกลุ่มออทิซึมสเปกตรัมที่มีความผิดปกติทางด้านภาษารุนแรง (Severe language impaired) และคนปกติที่เป็นอายุเท่ากันและเพศเดียวกัน (Age- /sex- matched control)

วิธีการวิจัย

การเพาะเซลล์

เซลล์ LCL จะถูกเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวจนกว่าจะนำมาเพาะเลี้ยงตามระเบียบวิธีการของ Rutgers University Cell and DNA Repository ผู้ผลิตและดูแลรักษาเซลล์ใน Autism Genetic Research Exchange (AGRE) collection กล่าวโดยย่อคือ

1. เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย RPMI1640, Fetal bovine serum (FBS) และ Penicillin/streptomycin ลงใน Culture flask ขนาด 25 cm² นำไปอุ่นในตู้เลี้ยงเซลล์
2. นำเซลล์ LCL ที่ถูกเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวมาละลายอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 37 °C ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ปิเปตต์เซลล์ใส่ลงใน Culture flask ที่เตรียมไว้ในข้อแรกอย่างช้า ๆ เขย่าเบา ๆ ให้เซลล์กับอาหารเลี้ยงเซลล์ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C ที่มีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เมื่อครบ 24 ชั่วโมงต้องทำการเปลี่ยน Culture flask เป็นขนาด 75 cm²
3. เมื่ออาหารเลี้ยงเซลล์เปลี่ยนเป็นสีเหลืองต้องทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยตั้ง Culture flask ดังกล่าวไว้เพื่อให้เซลล์ตกตะกอน จากนั้นปิเปตต์อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ออกมาให้มากที่สุดและใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ลงไปมากกว่าปริมาตรที่ปิเปตต์ออกมา 1 ml ทั้งนี้ ขั้นตอนทั้งหมดต้องใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลาประมาณ 1 เดือน เพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์มากกว่า 4×10^8 cell/cm³ ซึ่งเป็นจำนวนเซลล์ที่ได้เพียงพอต่อการวิจัย

การเก็บเซลล์

เมื่อได้จำนวนเซลล์ที่เพียงพอทำการเก็บเซลล์ใน RNAlater (Life Technologies) ที่อุณหภูมิ $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ จนกว่าจะนำมาสกัดโปรตีนต่อไป ทั้งนี้ ทุกขั้นตอนข้างต้นยกเว้นการนับเซลล์จะต้องทำใน Biological safety cabinet class 2 และขั้นตอนการเก็บเซลล์ทุกขั้นตอนจะต้องรักษาอุณหภูมิของเซลล์ไว้ที่ $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ กล่าวโดยย่อคือ

1. ปิเปตต์เซลล์ใน Culture flask ใส่ลงใน Microcentrifuge tube ปริมาณ 1 ml นำเซลล์ในข้อ 2 มาย้อมด้วย Tryphan blue ด้วยอัตราส่วน เซลล์ : Tryphan blue เท่ากับ 9 : 1 จากนั้นนับจำนวนเซลล์ด้วย Hemocytometer ถ้าหากเซลล์มีปริมาณตั้งแต่ $4 \times 10^8\text{ cell/cm}^3$ ขึ้นไปจึงทำการเก็บเซลล์

2. นำเซลล์ในข้อ 1 ไปปั่นแยก ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมดให้คงเหลือไว้แต่เซลล์ที่ตกตะกอน ใส่ RNAlater จากนั้นปิเปตต์ขึ้นลงให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเก็บที่ $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ จนกว่าจะนำมาโปรตีนต่อไป



ตอนที่ 3.3 การสกัดโปรตีนจากเซลล์ การวัดปริมาณโปรตีน และการตรวจสอบคุณภาพโปรตีน

วัตถุประสงค์

เพื่อทำการสกัดโปรตีน ทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ขึ้น ลดปริมาณเกลือส่วนเกินของโปรตีน ทำการวัดปริมาณโปรตีนที่คงเหลือ และตรวจสอบคุณภาพโปรตีนที่นำมาทำการศึกษาเพื่อให้ได้ปริมาณโปรตีนที่เหมาะสมในการศึกษา

วิธีการวิจัย

การสกัดโปรตีนจากเซลล์โดยเทคนิค Phenol-chloroform extraction

โปรตีนจากเซลล์ที่เก็บไว้ใน RNAlater จะถูกสกัดโดยใช้ Genezol reagent (Invitrogen) ตามวิธีที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิตน้ำยา กล่าวโดยย่อคือ

1. นำ LCL เก็บไว้ใน -80°C มาละลายที่อุณหภูมิห้อง ทำการปั่นเหวี่ยงและปิเปตต์ RNA later ออก เติม Genezol® Reagent ลงไปโดยให้มีปริมาตรเป็น 2 เท่าของปริมาณ LCL ทำการปิเปตต์ขึ้น-ลง เพื่อให้เซลล์แตก แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที
2. เติม Chloroform ปิดฝาหลอดให้แน่น จากนั้น เขย่าหลอดแรง ๆ ด้วยมือ เป็นเวลา 15 วินาที และตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 - 3 นาที นำไปปั่นแยกที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อให้สิ่งตัวอย่างแยกชั้น โดยจะแยกออกเป็น 3 ชั้น คือ ชั้นล่างสุดหรือ Organic phase จะเป็นชั้นที่มีสีแดงของ Phenol-chloroform ซึ่งเป็นชั้นที่มีโปรตีน ส่วนชั้นกลางหรือ Interphase จะเป็นส่วนที่ประกอบด้วยดีเอ็นเอ และชั้นบนสุดจะเป็นชั้นสารละลายไม่มีสีหรือ Aqueous phase จะเป็นชั้นของอาร์เอ็นเอ ทำการปิเปตต์ชั้นสารละลายใสและชั้นกลางออกไปใส่หลอดใหม่ให้มากที่สุด เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนการสกัดอาร์เอ็นเอ และดีเอ็นเอตามลำดับ
3. นำสารละลายในชั้น Phenol-chloroform จากข้อ 2 มาทำการทดสอบต่อ โดยเติม Isopropanol ลงไป ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูส่วนน้ำใสออก เพื่อให้เหลือแต่ตะกอนโปรตีน (Protein pellet)
4. เติม Wash solution (0.3 M Guanidine hydrochloride ใน 95% Ethanol) ลงไป แล้วปิเปตต์ขึ้นลง ตั้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นเท Wash solution ทิ้ง ทำซ้ำอีก 2 รอบ และทำการเติม 100% Ethanol ปริมาตร 2 ml ลงไป ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที
5. ปั่น ที่อุณหภูมิ 4°C แล้วเท 100% Ethanol ออกและตากตะกอนแบบไม่ต้องแห้งสนิท นำไป Incubate ที่ 50°C ประมาณ 20 นาที นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วน

น้ำเก็บไว้ใน Microtube อันใหม่ และเก็บที่ -20°C จนกว่าจะทำการวัดปริมาณโปรตีนและตรวจสอบคุณภาพโปรตีนต่อไป และส่วนของตะกอนให้เติม 10M Urea ลงไปแล้วปิเปตต์ขึ้นลง นำไปเก็บที่ อุณหภูมิต่ำ -20°C

การตกตะกอนโปรตีนด้วยเทคนิค TCA/acetone protein precipitation

เพื่อทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ขึ้นและลดปริมาณเกลือส่วนเกิน กล่าวโดยย่อคือ

1. นำโปรตีนที่อยู่ใน 10 M Urea มาเติม 20% (w/v) TCA solution ปริมาณอัตราส่วน Sample : TCA solution เป็น 1 : 1 แล้วทำการผสมให้เข้ากันด้วย Vortex จากนั้นทำการเก็บไว้ที่ -20°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปั่นแยกที่อุณหภูมิต่ำ 4°C ทั้งส่วนน้ำใส (Supernatant) ด้วยการเทออก เก็บส่วนตะกอนไว้

2. 20 mM Dithiothreitol in ice-cold acetone แล้วนำไปปั่นแยก ทั้งส่วนน้ำใส (Supernatant) ด้วยการค่อย ๆ ดูดเอา Supernatant ออกด้วย Micropipette เก็บส่วนตะกอนไว้ แล้วทำการ Dry ตะกอนจนกว่าจะแห้ง (ใช้เวลาไม่นานมาก) แล้วละลายตะกอนกลับด้วย Lysis buffer ที่ประกอบด้วย Tris-base, Urea, Thiourea, CHAPS, Dithiothreitol และ Protease inhibitor ทำการผสมให้เข้ากัน แล้วใช้ที่บดเซลล์ช่วยบดให้โปรตีนผสมเป็นเนื้อเดียวกับ Lysis buffer เก็บโปรตีนไว้ที่ -20°C ได้จนกว่าจะนำมาใช้ปฏิบัติงาน

การวัดปริมาณโปรตีนด้วยเทคนิค Bradford's assay

ทำการหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford's assay ซึ่งเป็นหลักการ Dye-Binding กล่าวโดยย่อคือ

1. ทำการเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน โดยใช้น้ำ MilliQ และ 10% BSA ทำการเตรียมให้ได้ 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.03125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ตามลำดับ

2. ปิเปตต์สารละลายโปรตีนมาตรฐานทั้ง 5 ความเข้มข้น, lysis buffer และโปรตีนที่สกัดได้จากขั้นตอนการสกัดโปรตีน ปริมาณ 10 μl ลงใน 96 wells plate โดยในแต่ละตัวอย่างมีสามหลุม (Triplicate)

3. เติม Bradford's solution ลงไปใน 96 wells plate ที่มีการเติม สารละลายโปรตีนมาตรฐานทั้ง 5 ความเข้มข้น Blank และโปรตีนที่ต้องการวัดปริมาณโปรตีน ไว้แล้วเคาะขอบ 96 wells plate มือเบา ๆ โดยเคาะขอบทั้ง 4 ด้าน เพื่อให้สารละลายทั้งหมดเข้ากันเป็นเนื้อเดียว และไม่เกิดฟองอากาศ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิต่ำ เป็นเวลา 5 นาที

4. นำไปวัดค่าความการดูดกลืนแสงที่ 595 nm และนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น เพื่อเปรียบเทียบหาความเข้มข้นของตัวอย่างโปรตีน โดยใช้โปรแกรม Excel ในการคำนวณ

การตรวจสอบคุณภาพโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และ Coomassie staining

ทำการตรวจสอบคุณภาพโปรตีนโดยใช้ระบบ Hoefer miniVE Vertical Electrophoresis System ของ GE Healthcare กล่าวโดยย่อคือ

1. เตรียมเจลโดยใช้ 12% Separating gel (30% Acrylamide, 1.5 M Tris pH 8.8, 10% SDS, 10% APS, 0.1% TEMED) และ 6% stacking gel (30% Acrylamide, 0.5 M Tris pH 6.8, 10% SDS, 10% APS, 0.1% TEMED)

2. ทำการรันระบบ Gel electrophoresis ด้วย running buffer ที่มีส่วนประกอบของ Tris, SDS และ Glycine จำนวน 1 L ลงในระบบ ทำการหยอดตัวอย่างโปรตีนความเข้มข้น 5 µg ผสมกับ Laemli buffer (Tris pH 6.8, SDS, Glycerol, Bromphenol blue, Dithiothreitol) ปริมาณ 10 µl และ Broad range protein ปริมาณ 5 µl ทำการต่อระบบเข้ากับกระแสไฟฟ้า แบ่งเป็น 2 ช่วงการทำงาน ได้แก่

ช่วงแรกกำหนด $V_{max} = 200$ V, กำหนด A_{max} คงที่ = 15 mA/gel

ช่วงที่สอง กำหนด $V_{max} = 200$ V, กำหนด A_{max} คงที่ = 30 mA/gel

3. นำแผ่นเจลที่ได้ตัดส่วน stacking gel ออก แผลงลงใน fixative solution (Acetic acid, Methanol, Water) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างเจลด้วย MilliQ water 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที แล้วจึงนำแผ่นเจลไปย้อมสีด้วย Colloidal Coomassie Brilliant Blue G-250 solution (Ammonium sulphate, 85% Phosphoric acid, Coomassie Brilliant Blue G-250, Methanol) เป็นเวลา 16 - 18 ชม. แล้วล้างด้วยน้ำ MilliQ ที่อุณหภูมิ 45 - 60 °C อีก 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที บันทึกภาพเจลที่ด้วยเครื่อง gel doc สามารถเก็บ gel ที่ย้อมสำเร็จไว้ที่อุณหภูมิ 2 - 8 °C

ตอนที่ 3.4 แยกโปรตีนด้วยเทคนิค Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) และวิเคราะห์ความแตกต่างของจุดโปรตีน

วัตถุประสงค์

เพื่อทำการศึกษาโปรตีนของ LCLs โดยใช้เทคนิคการแยกโปรตีนตามคุณสมบัติของโปรตีน ได้แก่ ค่า Isoelectric point (pI) และมวลโมเลกุลของโปรตีน (MW)

วิธีการวิจัย

1. ในส่วนของขั้นตอนแรก หรือ มิติที่ 1 (First dimension) เป็นการแยกโปรตีนโดยอาศัยเทคนิคที่เรียกว่า Isoelectric focusing (IEF) โดยระบบของ Ettan IPGphor III ทำการเจือจางโปรตีนให้มีปริมาณ 200 ug โดยผสมกับ Rehydration buffer (7 M Urea, 2 M Thiourea, 4% CHAPS, 100 mM DTT, 2% Bio-lyte and 0.5% Bromophenol blue) และ Immobiline Drystrips ตัวอย่างโปรตีนจะถูกนำมาศึกษาใน IPG strips ขนาด 13 เซนติเมตร ในช่วง pH 3 - 10 Linear (EttanIPGphorIII) ตัวอย่างโปรตีนจะถูก Rehydration ที่อุณหภูมิ 20°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมงและผ่านกระแสไฟฟ้าในขั้นตอน Isoelectric focusing (500V for 300 Vh (Step and Hold), 1000 V for 800 Vh (Gradient), 8000 V for 11300 Vh (Gradient), 8000 V for 4400 Vh (Step and Hold)) โดยกำหนดปริมาณ Amax อยู่ที่ 75 μ A ต่อ strip หลังจากนั้น strip จะถูกนำไปแช่ใน 100 mM Dithiothreitol ใน equilibration buffer (50mM Tris-HCl pH 8.8, 6M Urea, 30% Glycerol, 2% SDS และ 0.002% Bromphenol blue) เป็น 30 นาที และ 150 mM Iodoacetamide ใน Equilibration buffer 15 ml เป็นเวลา 45 นาทีตามลำดับ

2. จากนั้นได้นำสิ่งที่ได้จากการวิเคราะห์ในขั้นตอนแรกไปทำการวิเคราะห์ต่อในขั้นตอนที่สอง หรือมิติที่สอง (second dimension) ที่เรียกว่า Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) โดยใช้ 12.5% separating gel ทำการต่อระบบเข้ากับกระแสไฟฟ้า แบ่งเป็น 2 ช่วงการทำงาน

ช่วงแรกกำหนด $V_{max} = 300$ V, กำหนด mA ให้คงที่ = 32mA/gel

ช่วงที่สอง กำหนด $V_{max} = 300$ V, กำหนดปริมาณ mA ให้คงที่ = 48 mA/gel

3. แช่แผ่นเจลลงใน fixative solution (Acetic acid, Methanol, Water) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างเจลด้วย MilliQ water 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที แล้วจึงนำแผ่นเจลไปย้อมสีด้วย Colloidal Coomassie Brilliant Blue G-250 solution (Ammonium sulphate, 85% Phosphoric acid, Coomassie Brilliant Blue G-250, Methanol) เป็นเวลา 16 - 18 ชั่วโมง

แล้วล้างด้วยน้ำ MilliQ ที่อุณหภูมิ 45 - 60 °C อีก 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที นำไปบันทึกภาพด้วยระบบ Image scanner III (GE Health Care, USA) และวิเคราะห์ความแตกต่างของการแสดงออกของโปรตีนด้วยโปรแกรม Image Master 2D Platinum version 7.0 (GE Health Care, USA) ทำการเก็บจุดโปรตีนที่มีความเข้มแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อด้วยเทคนิค Mass spectrometry เพื่อระบุชนิดของโปรตีนต่อไป

ตอนที่ 3.5 การย่อยแผ่นเจล สกัดเปปไทด์และวิเคราะห์เปปไทด์ด้วย LC-MS/MS และ ฐานข้อมูลโปรตีน MASCOT

วัตถุประสงค์

เพื่อทำการคัดเลือกจุดโปรตีนที่มีความการแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญออกมาสกัดเปปไทด์ที่ต้องการ ทำให้เปปไทด์บริสุทธิ์ก่อนทำการวิเคราะห์หาชนิดของโปรตีน และหาชนิดของจุดโปรตีน ซึ่ง

วิธีการวิจัย

ในขั้นตอนนี้ทางผู้วิจัยได้ทำการส่งแผ่นเจลที่ไปวิเคราะห์ต่อที่ Proteomic service center คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งมีวิธีการโดยย่อ ดังนี้

1. จุดโปรตีนที่มีความเข้มแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) จะถูกตัดออกจากเจลและนำมาล้างสีออกด้วย De-stain solution (50% Acetonitrile (ACN) ใน 100 μ L ของ 25 mM Ammonium bicarbonate) และตัดด้วยเอนไซม์ทริปซินข้ามคืนที่ 37 °C ใน 25 mM ammonium bicarbonate เปปไทด์จะถูกนำมาสกัดใน 50 μ L of 5% Formic acid/ 50% ACN และนำไปใส่ใน ultrasonic bath เป็นเวลา 15 นาทีและทำให้แห้งด้วย Speed-vacuum

2. นำตัวอย่างโปรตีนไปละลายด้วย 98% H₂O, 2% ACN และ 0.1% formic acid และปั่นแยกที่อุณหภูมิ 4 °C 15,000 \times g เป็นเวลา 5 นาทีก่อนจะนำเข้าสู่ระบบ LC-MS/MS ซึ่งใช้หลักการ ESI- QUAD-TOF ควบคู่ไปกับ HPLC ใน Positive ion mode ข้อมูลจะถูกเก็บโดยใช้ Full-scan MS ที่มีมวลต่อประจุในช่วง 300–2000 และ Full-scan MS/MS ของ Ion ที่สนใจในช่วงมวลต่อประจุ 50–2000 การวิเคราะห์โปรตีนจะใช้เครื่องมือ MASCOT search engine โดยข้อมูล MASCOT score จะถูกรายงานหลังจากมีการตรวจสอบความถูกต้องของรูปแบบโปรตีน

ตอนที่ 3.6 การวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศศาสตร์รูปแบบโปรตีโอมของ LCLs

วัตถุประสงค์

เพื่อทำการวิเคราะห์ชนิดและหน้าที่ของจุดโปรตีนที่ถูกคัดเลือกออกมา ตลอดจนวิเคราะห์เครือข่ายความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนและยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับออบิซึมสเปกตรัมทั้งในการศึกษาก่อนหน้าและการศึกษาในครั้งนี้

วิธีการวิจัย

หลังจากทำวิเคราะห์โดย MASCOT โปรตีนที่มีการแสดงออกผิดปกติไปอย่างมีนัยสำคัญ เรียบร้อยแล้ว รายชื่อโปรตีนทั้งหมดถูกนำมาอัปโหลดเพื่อทำการวิเคราะห์เครือข่ายทางชีวภาพของโปรตีนด้วยโปรแกรม Ingenuity Pathway Analysis (IPA) ในการสร้างและวิเคราะห์โครงข่ายทางชีวภาพ โดยใช้วิธีการทางสถิติ Fisher's Exact Test ในระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ใช้คือ P-value (two-sided) < 0.05 ผลที่ได้จากโปรแกรมจะทำนายถึงโรคต่าง ๆ และหน้าที่ทางชีวภาพ ตลอดจนเครือข่ายทางชีวภาพที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนที่มีการแสดงออกผิดปกติไป

การวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศศาสตร์เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของทรานสคริปโตม โปรตีโอมในการศึกษาก่อนหน้า และรูปแบบโปรตีโอมของ LCLs

วัตถุประสงค์

เพื่อตรวจสอบความเกี่ยวข้องกันระหว่างการแสดงออกของทรานสคริปโตม โปรตีโอมในการศึกษาก่อนหน้า และรูปแบบโปรตีโอมของเซลล์ Lymphoblastoid cell lines (LCLs)

วิธีการวิจัย

ทำการวิเคราะห์ความเกี่ยวข้องกันระหว่างการแสดงออกของทรานสคริปโตม โปรตีโอมในการศึกษาก่อนหน้า และรูปแบบโปรตีโอมของเซลล์ Lymphoblastoid cell lines (LCLs) โดยทำการ Overlap symbol ที่ได้จากโปรแกรม Ingenuity Pathway Analysis (IPA)

การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนด้วยเทคนิค Western blot

วัตถุประสงค์

เพื่อเป็นการยืนยันผลจากการวิเคราะห์และชีวสารสนเทศศาสตร์ กลุ่มโปรตีนที่แสดงออกผิดปกติ และมีความเกี่ยวข้องอย่างมีนัยสำคัญต่อเครือข่ายและหน้าที่ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับโรค ออทิซึมสเปกตรัมจะถูกคัดเลือกมาทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot ต่อไป

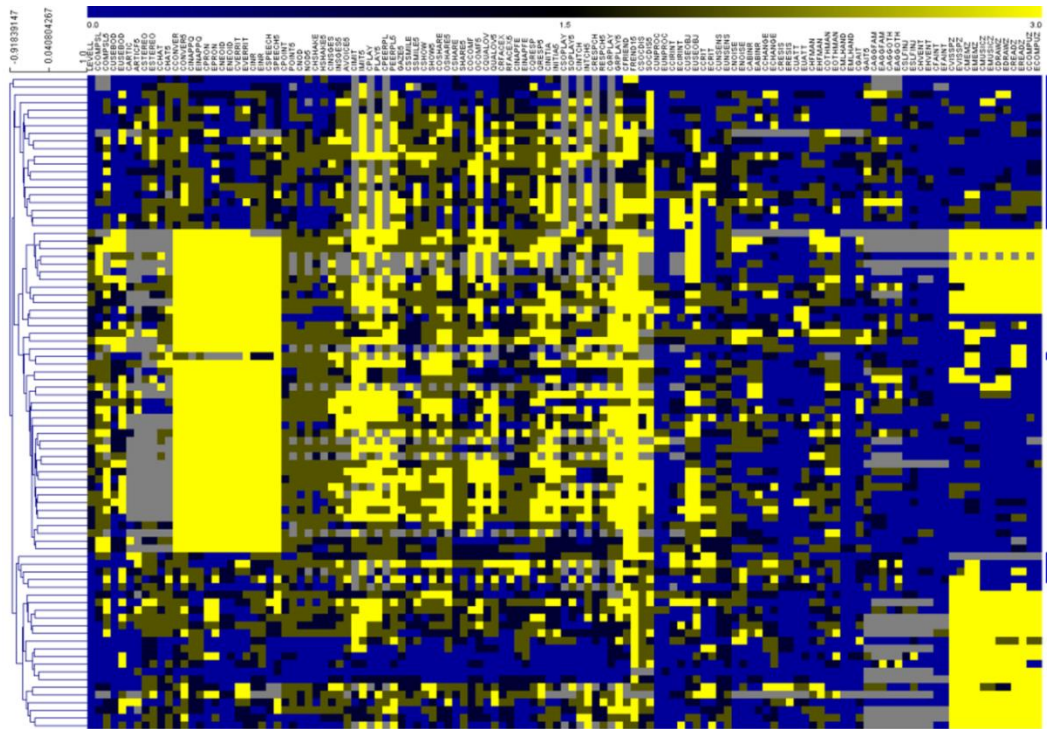
วิธีการวิจัย

ทำการวิเคราะห์โดยนำโปรตีนจำนวน 15 μ g จากผู้ป่วยในกลุ่มความผิดปกติทางด้านภาษารุนแรง (Severe language impaired) จำนวน 5 ราย และเปรียบเทียบกับกลุ่มคนปกติจำนวน 5 ราย ทำการรันเจลด้วยระบบ SDS-PAGE โดยใช้ 12% SDS-PAGE ดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น จากนั้นทำการเปลี่ยนถ่ายโปรตีนจากแผ่นเจลไปสู่แผ่นเมมเบรน 0.2 μ M Immun-Blot@ PVDF membrane (Bio-rad) โดยใช้ Mini-PROTEAN® Tetra system จากนั้นทำการ Blocking membrane เพื่อทำป้องกันการเกิดสัญญาณที่ไม่จำเพาะ โดยใช้ 5% Non-fat dry milk ใน TBST เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการ Incubate ข้ามคืนด้วย 1: 4,000 ของ Rabbit monoclonal anti-human IDH2 antibody [EPR7576] (ab129180, Abcam) ที่มีความจำเพาะต่อ IDH2 หรือ 1 : 6,000 ของ Rabbit polyclonal anti-human DBI antibody (ab196485, Abcam) ที่มีความจำเพาะต่อ DBI ซึ่งโปรตีนที่นัยสำคัญต่อการทดสอบ ล้างแผ่นเมมเบรนด้วย TBST buffer 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที เพื่อล้างเอาแอนติบอดีลำดับที่ 1 ที่ไม่ได้จับจำเพาะออก ตามด้วยการใส่แอนติบอดีลำดับที่ 2 ได้แก่ 1 : 8,000 (สำหรับ Anti-IDH2) and 1 : 12,000 (สำหรับ Anti-DBI) ของ Donkey anti-rabbit IgG H&L (HRP) preadsorbed (ab7083, Abcam) ซึ่งจะมีความจำเพาะต่อแอนติบอดีลำดับที่ 1 และมีส่วนที่สามารถเพิ่มสัญญาณได้นำแผ่นเมมเบรนดังกล่าวไปประกบฟิล์มโดยใช้ระบบ Amersham ECL Select Western Blotting Detection Reagent ร่วมกับ ECL hyperfilm หลังจากนั้นทำการ Strip membrane โดยล้าง membrane ด้วย 0.2M NaOH เป็นเวลา 5 นาที และ Re-probe ข้ามคืนด้วย 1 : 10,000 ของ Rabbit polyclonal anti- GAPDH antibody (sc25778, Santacruz) ซึ่งเป็น Endogenous control protein ที่อุณหภูมิห้อง ตามด้วย incubate ใน 1 : 12,000 ของ Donkey anti-rabbit IgG H&L (HRP) preadsorbed (ab7083, Abcam) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำไปประกบฟิล์มโดยใช้ระบบ Amersham ECL Select Western Blotting Detection Reagent ร่วมกับ ECL hyperfilm

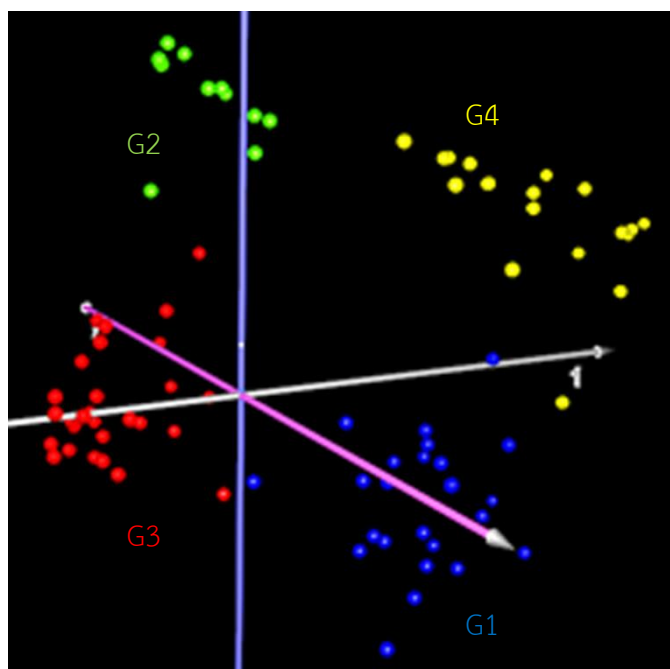
บทที่ 4 ผลการวิจัย

ทำการวิเคราะห์ลักษณะประชากร (Demographic characteristics) ในผู้ป่วยจำนวน 85 รายที่มีลักษณะอาการชัดเจน (ทำการคัดเลือกผู้ป่วยที่ไม่ได้อยู่ในกลุ่มอาการ Intermediate) จากการศึกษาการแสดงออกของยีนของ Valerie W. Hu ในปี ค.ศ.2009 [84] โดยทำการการจัดกลุ่มผู้ป่วยใหม่จากข้อมูลจากแบบทดสอบคัดกรอง ADI-R ซึ่งเป็นแบบสอบถามทางคลินิกจำนวน 123 ข้อ ที่ใช้วินิจฉัยผู้ป่วยโดยทำการสอบถามจากผู้ปกครองที่ดูแลผู้ป่วยประกอบการดูลักษณะพฤติกรรมของผู้ป่วย แบบสอบถามนี้แบ่งออกเป็น 3 ด้านหลัก ได้แก่ ความบกพร่องในการมีปฏิสัมพันธ์ทางสังคม (Impairment in social interaction), ความบกพร่องในการสื่อสาร (Impairment in communication) และพฤติกรรมและความสนใจแบบจำเพาะซ้ำเดิมเพียงไม่กี่ชนิด (Restricted, repetitive and stereotypic behaviors and interests) ข้อมูล ADI-R ของผู้ป่วยได้รับความอนุเคราะห์จาก The Autism Genetic Research Exchange (AGRE) repository ข้อมูลดังกล่าวได้ถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี Principal component analysis (PCA) ซึ่งใช้ในการจำแนกผู้ป่วยออกเป็นกลุ่มย่อยเพื่อลดความหลากหลายของความรุนแรงโรคในผู้ป่วยลง ร่วมกับการวิเคราะห์ด้วยวิธี Hierarchical Clustering (HCL) ซึ่งใช้เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างสมาชิกในกลุ่มและระหว่างกลุ่ม โดยใช้โปรแกรม Multi Experiment Viewer (MEV) [86] ตามระเบียบวิธีการของ Hu & Steinberg, 2009 [85]

จากการศึกษา พบว่าผู้ป่วยออทิสซึมสเปกตรัมจำนวน 85 รายถูกแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยจำนวน 4 กลุ่มตามลักษณะความรุนแรงของโรค ได้แก่ กลุ่มสีน้ำเงิน (G1) คือกลุ่มความผิดปกติทางด้านภาษาน้อย (Mildly autistic), กลุ่มสีเขียว (G2) คือกลุ่มผู้ป่วยที่มีทักษะความสามารถพิเศษร่วมกับความผิดปกติด้านภาษารุนแรง กลุ่มสีแดง (G3) คือกลุ่มผู้ป่วยที่มีความผิดปกติทางด้านภาษารุนแรง (Severe language impaired) และกลุ่มสีเหลือง (G4) คือกลุ่มที่มีทักษะความสามารถพิเศษ (“Savant” skill) ดังรูปภาพที่ 4 และ 5 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้โดย Hu & Steinberg, 2009 [85] โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มผู้ป่วยที่มีความผิดปกติด้านภาษารุนแรง (Severe language impaired)



รูปภาพที่ 4 แสดง Heat map จากข้อมูลคะแนนแบบทดสอบคัดกรอง ADI-R ของผู้ป่วยออทิสซึมสเปกตรัมจำนวน 85 ราย โดยแนวตั้ง (Column) แทนด้วยคำถามที่จำเพาะต่ออาการของผู้ป่วย ส่วนแนวนอน (Row) แทนด้วยค่าคะแนนจากผู้ป่วย จากภาพสามารถบอกอาการ ความรุนแรงที่จำเพาะในผู้ป่วยโดยแบ่งเป็นความรุนแรงของอาการน้อย(สีน้ำเงิน)ไปยังความรุนแรงของอาการมาก (สีเหลือง) ซึ่งเมื่อการวิเคราะห์แล้วคณะผู้วิจัยพบว่าสามารถแบ่งผู้ป่วยทางพยาธิสภาพความรุนแรงออกได้เป็น 4 กลุ่มหลัก ดังแถบสีทางด้านขวามือ โดยกลุ่มสีน้ำเงิน (G1) คือกลุ่มความผิดปกติทางด้านภาษาน้อย (Mildly autistic), กลุ่มแถบสีเขียว (G2) คือกลุ่มผู้ป่วยที่มีทักษะความสามารถพิเศษร่วมกับความผิดปกติด้านภาษารุนแรง, กลุ่มแถบสีแดง (G3) คือกลุ่มผู้ป่วยที่มีความผิดปกติทางด้านภาษารุนแรง (Severely language-impaired) และกลุ่มแถบสีเหลือง (G4) คือกลุ่มที่มีทักษะความสามารถพิเศษ (“Savant” skill)



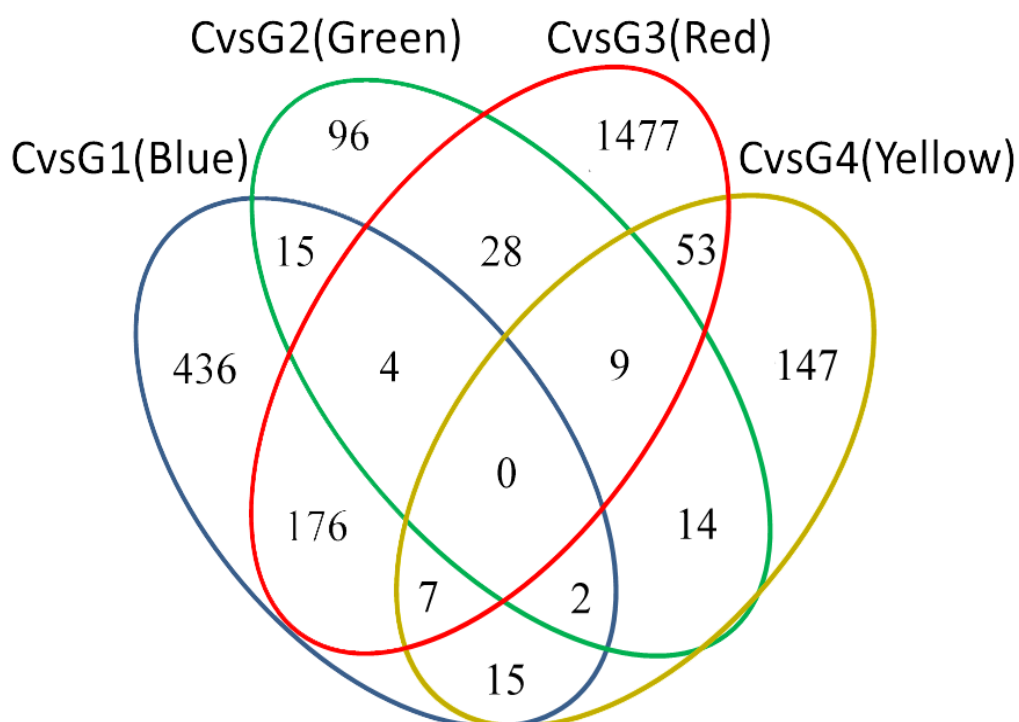
รูปภาพที่ 5 แสดงผลการวิเคราะห์ Principal component analysis (PCA) ซึ่งแต่ละจุดจะแทนผู้ป่วย 1 คน และแต่ละแกนจะแสดงลักษณะพฤติกรรมของผู้ป่วย 3 ด้านหลักซึ่งพบว่าสามารถแบ่งผู้ป่วยทางพยาธิสภาพความรุนแรงออกได้เป็น 4 กลุ่ม ซึ่งสอดคล้องกับการแบ่งกลุ่มด้วยแบบทดสอบคัดกรอง ADI-R

4.1 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลรูปแบบทรานสคริปโตมของ LCLs

หลังจากการแบ่งกลุ่มผู้ป่วยด้วย ADI-R score ออกเป็น 4 กลุ่มย่อย ผู้วิจัยได้ทำการวิเคราะห์ทรานสคริปโตมของเซลล์ไลน์ชนิดลิมโฟบลาสต์อยด์ (LCLs) เพื่อหาฮีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมทั้งหมด 85 ราย (ทั้งโดยรวมและกลุ่มย่อย) เปรียบเทียบกับกลุ่มคนปกติที่มีเพศเดียวกับกลุ่มผู้ป่วยและมีอายุใกล้เคียงกับกลุ่มผู้ป่วย (Age- / sex- matched control) โดยวิธีการทางสถิติ T-Test แบบ Standard Bonferroni's correction ในระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ใช้คือ P-value (two-sided) < 0.05 จำนวนฮีนที่แสดงออกอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละกลุ่มของพยาธิสภาพเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มคนปกติ ได้แสดงไว้ดังตารางที่ 3 และได้นำรายชื่อฮีนที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละกลุ่มย่อยของผู้ป่วยมาสร้างเป็นแผนภาพ Venn Diagram ซึ่งสามารถแสดงความสัมพันธ์ของฮีนแต่ละกลุ่ม ได้ดังรูปภาพที่ 6

ตารางที่ 3 แสดงจำนวนฮีนที่แสดงออกอย่างมีนัยสำคัญของผู้ป่วยโรคออทิซึมสเปกตรัมโดยรวมและกลุ่มย่อยเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มคนปกติ โดยใช้สถิติ T-Test (Standard Bonferroni's correction) ที่ค่านัยสำคัญ P-value < 0.05 (two-sided)

กลุ่มของผู้ป่วยโรคออทิซึมสเปกตรัมเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มคนปกติ	จำนวน Probe
All ASDs	815
G1 (Blue) group	1192
G2 (Green) group	367
G3 (Red) group	3024
G4 (Yellow) group	497



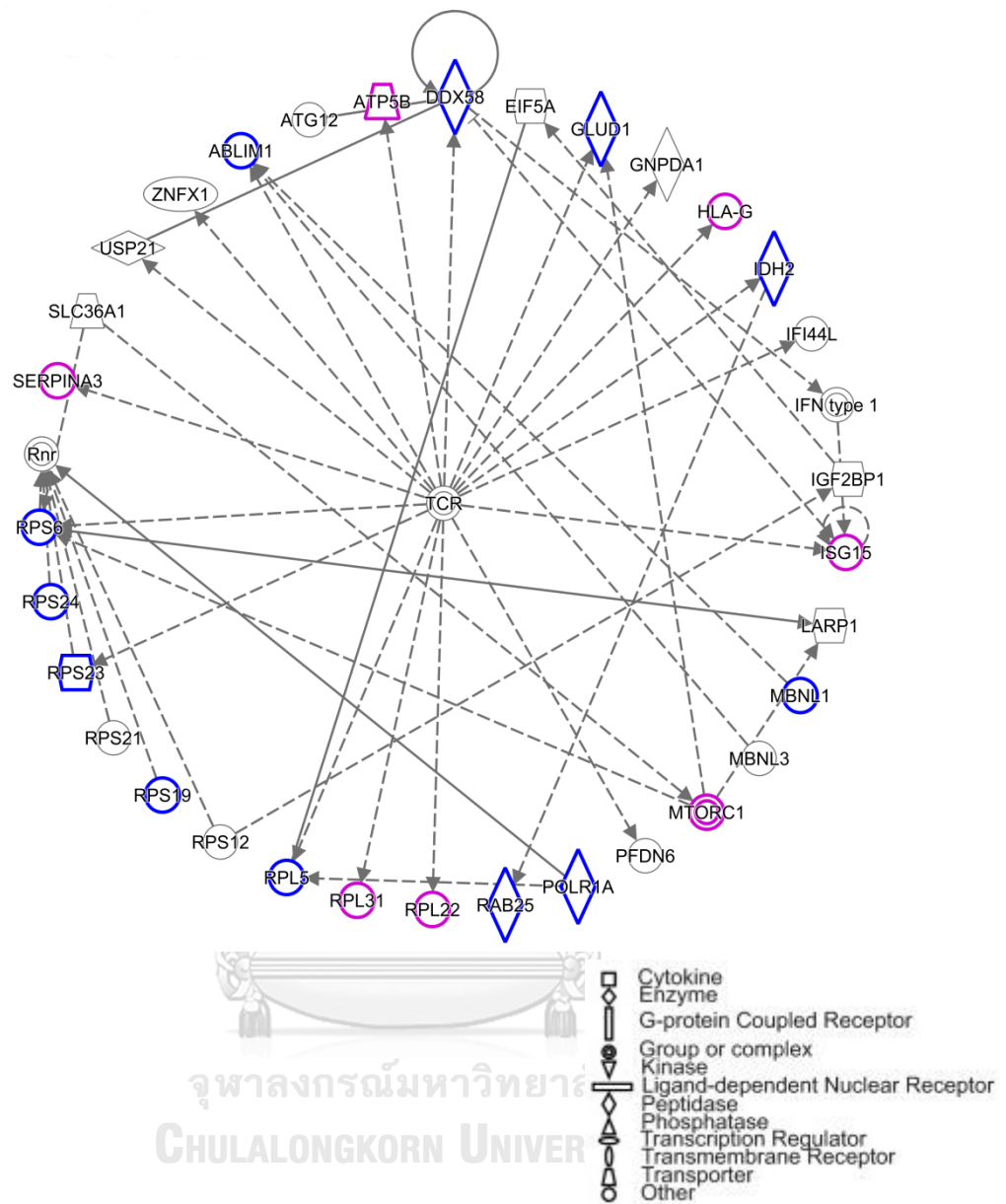
รูปภาพที่ 6 ภาพ Venn diagram แสดงการแสดงออกของยีนที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของกลุ่มย่อยของพยาธิสภาพของโรคออทิซึมสเปกตรัมเปรียบเทียบกับกลุ่มคนปกติจำนวน 29 ราย โดยใช้สถิติ T-Test (Standard Bonferroni's correction) ที่ค่านัยสำคัญ P-value < 0.05 (two-sided) โดยกลุ่มสีน้ำเงิน (G1) คือกลุ่มความผิดปกติทางด้านภาษาน้อย (Mildly autistic) กลุ่มสีเขียว (G2) คือ กลุ่มผู้ป่วยที่มีทักษะความสามารถพิเศษร่วมกับความผิดปกติด้านภาษารุนแรง กลุ่มสีแดง (G3) คือ กลุ่มผู้ป่วยที่มีความผิดปกติทางด้านภาษารุนแรง (Severe language impaired) และกลุ่มสีเหลือง (G4) คือกลุ่มที่มีทักษะความสามารถพิเศษ ("Savant" skill) นอกจากนี้ จากการวิเคราะห์พบว่ามียีนจำนวน 815 ยีนที่มีการแสดงออกแตกต่างจากกลุ่มคนปกติโดยไม่ได้ผ่านการแบ่งเป็นกลุ่มย่อยตามลักษณะพยาธิสภาพของผู้ป่วย

จากการศึกษานี้ พบว่ามียีนที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญโดยรวมและในแต่ละกลุ่มย่อยของผู้ป่วยเมื่อเปรียบเทียบกับคนปกติจำนวนมาก ซึ่งยีนในแต่ละกลุ่มค่อนข้างจำเพาะ จึงมีความเป็นไปได้ที่ความผิดปกติในแต่ละกลุ่มของผู้ป่วยอาจมีสาเหตุมาจากความผิดปกติจากยีนที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่ม G3 (Red) พบจำนวนยีนที่มีความแตกต่างกับกลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญมากที่สุด หลังจากนั้น ได้ทำการค้นหาพยาธิสภาพและโรคที่เกี่ยวข้องโดยใช้โปรแกรม Ingenuity Pathway Analysis (IPA) ซึ่งเป็นโปรแกรมที่ใช้ในการทำนายหน้าที่และการทำงานของยีนและโปรตีนใน pathway ที่เกี่ยวข้องกับโรคหรือกลุ่มอาการที่มีความผิดปกติใน

ร่างกาย โดยพบว่ายีนที่มีการแสดงออกอย่างมีนัยสำคัญในทุกกลุ่มย่อยพบว่ามีความเกี่ยวข้องกับกลุ่มโรคที่มีความบกพร่องของพัฒนาการ (Developmental disorder) และกลุ่มโรคที่มีความผิดปกติทางระบบประสาท (Neurological disease) นอกจากนี้ ในกลุ่ม G3 (Red) ยังพบว่ายีนที่มีการแสดงออกผิดปกติอย่างมีนัยสำคัญที่เกี่ยวข้องกับภาวะปัญญาอ่อน (Mental retardation; $n = 56$ ยีน, $P\text{-value} = 0.00567$), ออทิสซึมหรือความบกพร่องทางสติปัญญา (Autism or intellectual disability; $n = 59$ ยีน, $P\text{-value} = 0.00797$), ความบกพร่องทางสติปัญญาและอาการลมชัก (Intellectual disability and seizures; $n = 3$ ยีน, $P\text{-value} = 0.0155$)

จากการศึกษานี้ได้ทำการสร้างเครือข่ายทางชีวภาพแสดงการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างยีน (Interactomic analysis) โดยใช้รายชื่อยีนที่แสดงออกอย่างมีนัยสำคัญของกลุ่ม G3 (Red) ซึ่งได้ถูกแสดงไว้ดังรูปภาพที่ 7





รูปภาพที่ 7 ภาพเครือข่ายทางชีวภาพแสดงการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างยีน (Interactomic analysis) ในกลุ่ม G3 (Red) โดยบริเวณที่เน้นด้วยสีน้ำเงินแทนยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับกลุ่มโรคที่มีความบกพร่องของพัฒนาการ (Developmental disorder) และบริเวณที่เน้นด้วยสีม่วงแทนยีนที่มีความผิดปกติทางระบบประสาท (Neurological disease)

4.2 ผลการวิเคราะห์ Meta-analysis ของโปรตีนและรูปแบบโปรตีโอมของผู้ป่วย ออทิสซึมสเปกตรัม

เพื่อค้นหาว่าการแสดงออกที่ผิดปกติไปของโปรตีนน่าจะเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้เกิดหรือเป็นผลมาจากความผิดปกติในผู้ป่วยออทิสซึมสเปกตรัม เราจึงทำการรวบรวมการศึกษาโปรตีนและโปรตีโอมที่ค้นพบว่ามี การแสดงออกที่ความผิดปกติไปอย่างมีนัยสำคัญในผู้ป่วยออทิสซึมสเปกตรัม จากฐานข้อมูล PubMed ตั้งแต่ปี ค.ศ.2007- 2017 โดยทำการคัดเลือกเฉพาะการศึกษาที่มีสิ่งตัวอย่างจากมนุษย์เท่านั้น ซึ่งมีสิ่งส่งตรวจประกอบไปด้วย Serum, Plasma, Neonatal blood spot, Saliva, Urine และ Post-mortem brain ของผู้ป่วย รวมทั้งหมด 16 งานวิจัย โดยมีจำนวนโปรตีนรวมทั้งหมดที่ 860 โปรตีน ดังตารางที่ 4 (รายชื่อโปรตีนทั้งหมดแต่ละงานวิจัยได้ถูกรวบรวมไว้ในภาคผนวก)



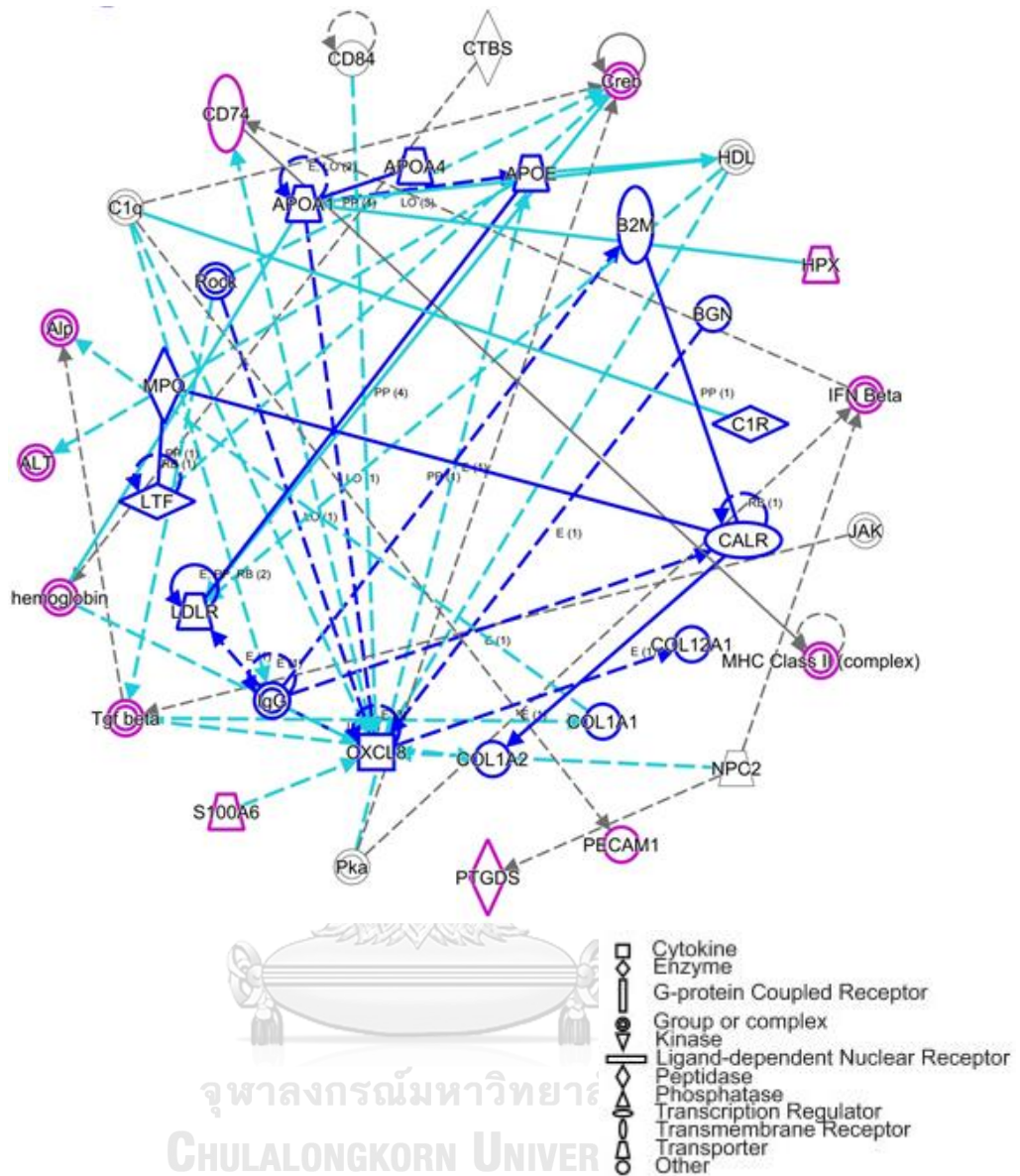
ตารางที่ 4 แสดงชนิดของสิ่งตัวอย่างจำแนกตามจำนวนการศึกษาที่นำมาใช้ในการศึกษาคั้งนี้และจำนวนโปรตีนที่แสดงออกอย่างมีนัยสำคัญจากการศึกษาทั้งหมด

ปีค.ศ.ที่ตีพิมพ์	ชื่อเรื่อง (Reference)	ชนิดของสิ่งส่งตรวจ	จำนวนโปรตีน
2007	A proteomic study of serum from children with autism showing differential expression of apolipoproteins and complement proteins [87]	Serum	5
2008	Hypo-Phosphorylation of Salivary Peptidome as a Clue to the Molecular Pathogenesis of Autism Spectrum Disorders [88]	Saliva	8
2011	A Proteomic Investigation of B Lymphocytes in an Autistic Family: A Pilot Study of Exposure to Natural Rubber Latex (NRL) May Lead to Autism [66]	Serum	14
2012	A lack of association between elevated serum levels of S100B protein and autoimmunity in autistic children [89]	Serum	1
2013	Identification of an age-dependent biomarker signature in children and adolescents with autism spectrum disorders [90]	Serum	12
2014	Neonatal cytokines and chemokines and risk of Autism Spectrum Disorder: the Early Markers for Autism (EMA) study: a case-control study [91]	neonatal blood spots	2
2014	Proteomic analysis of post mortem brain tissue from autism patients: evidence for opposite changes in prefrontal cortex and cerebellum in synaptic connectivity-related proteins [92]	Post-mortem brain	13

ปีค.ศ.ที่ตีพิมพ์	ชื่อเรื่อง (Reference)	ชนิดของสิ่งส่งตรวจ	จำนวนโปรตีน
2014	A pilot proteomic study of protein markers in autism spectrum disorder [68]	Serum	3
2014	Serum Level of Desert Hedgehog Protein in Autism Spectrum Disorder: Preliminary Results [93]	Serum	1
2015	Comparative two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of the salivary proteome of children with autism spectrum disorder [94]	Saliva	40
2015	A Pilot Proteomic Analysis of Salivary Biomarkers in Autism Spectrum Disorder [69]	Saliva	18
2015	Neonatal Cytokine Profiles Associated with Autism Spectrum Disorder [95]	neonatal blood spots	16
2016	Urine Protein Biomarker Candidates for Autism [96]	Urine	694
2016	Expression and oxidative modifications of plasma proteins in autism spectrum disorders: Interplay between inflammatory response and lipid peroxidation [97]	Plasma	13
2017	Redox proteomic identification of carbonylated proteins in autism plasma: insight into oxidative stress [98]	Plasma	2
2017	iTRAQ based proteomic analysis reveals protein profile in plasma from children with autism [99]	plasma	24

จากนั้น เมื่อนำเอารายชื่อโปรตีนดังกล่าวมาทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Ingenuity Pathway Analysis (IPA) เพื่อทำการค้นหาหน้าที่เบื้องต้นและความเกี่ยวข้องกับโปรตีนอื่น ๆ พบว่าเป็นโปรตีนที่มีความเกี่ยวข้องกับความผิดปกติทางระบบประสาท (Neurological disease; n = 187 โปรตีน, P-value = 3.52E-35 – 8.14E-11), กลุ่มโรคทางจิตเวช (Psychological disorder; n = 126 โปรตีน, P-value = 3.52E-35 – 8.14E-11), การพัฒนาการของเอ็มบริโอ (Embryonic development; n = 17 โปรตีน, P-value = 9.70E-11) และการพัฒนาการของระบบประสาท (Nervous system development; n = 15 โปรตีน, P-value = 1.43E-12) ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับพยาธิสภาพของออทิซึมสเปกตรัม

นอกจากนี้ ยังพบอีกว่ากลุ่มโปรตีนดังกล่าวมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Free radical scavenging; n = 41 โปรตีน, P-value = 5.25E-23 – 2.46E-10) โรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (Inflammatory disease; n = 159 โปรตีน, P-value = 2.24E-36 – 1.06E-09), กระบวนการเมแทบอลิซึมของไขมัน (Lipid metabolism; n = 58 โปรตีน, P-value = 2.13E-24 – 7.12E-12) และกระบวนการพัฒนาของระบบการย่อย (Digestive system development; n = 28 โปรตีน, P-value = 1.27E-17 – 6.00E-10) ซึ่งเคยมีรายงานความผิดปกติดังกล่าวที่มีความเกี่ยวข้องกับผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมเช่นกัน [100, 101] และเมื่อนำรายชื่อของโปรตีนมาทำการสร้างเครือข่ายทางชีวภาพแสดงการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน (Interaction network) ดังรูปภาพที่ 8 ซึ่งพบว่ากลุ่มโปรตีนส่วนใหญ่มีความเชื่อมโยงกับกลุ่มโรคที่มีความบกพร่องของพัฒนาการ (Developmental disorder) และโปรตีนที่มีความผิดปกติทางระบบประสาท (Neurological Disease)

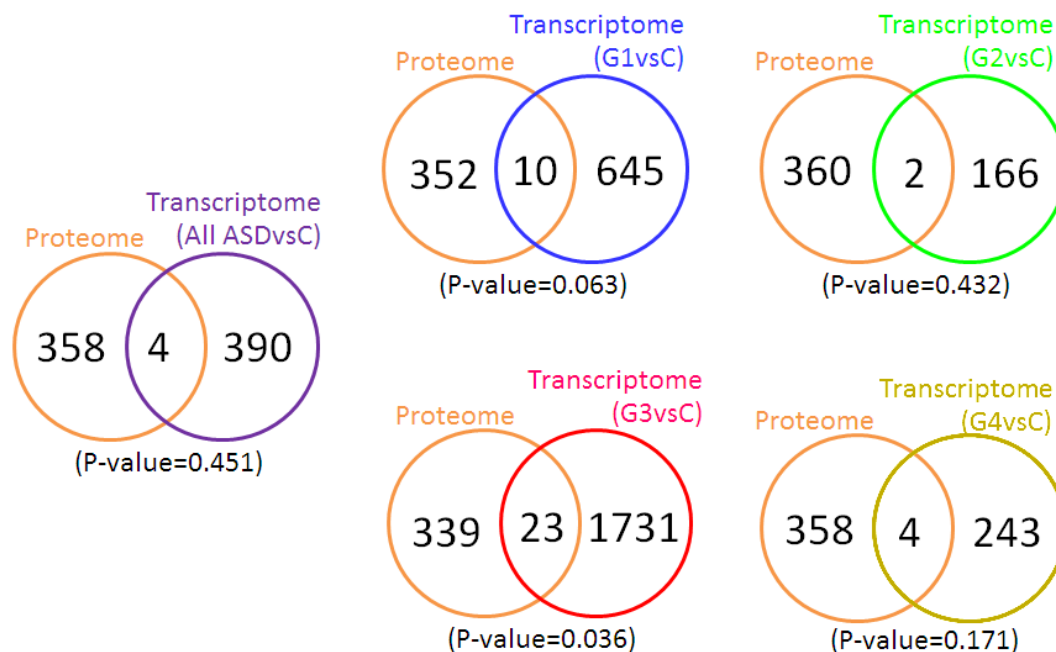


รูปภาพที่ 8 ภาพเครือข่ายทางชีวภาพแสดงการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน (Interactomic analysis) ของโปรตีนที่ได้จากการศึกษาอื่น ๆ ในฐานข้อมูลทั้งหมด 16 การวิจัย โดยบริเวณที่เน้นด้วยสีน้ำเงินแทนโปรตีนที่มีความเกี่ยวข้องกับกลุ่มโรคที่มีความบกพร่องของพัฒนาการ (Developmental disorder) และบริเวณที่เน้นด้วยสีม่วงแทนโปรตีนที่มีความผิดปกติทางระบบประสาท (Neurological disease)

4.3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลพื้นที่คาบเกี่ยว (Overlap) ระหว่างรูปแบบทรานสคริปโตมของ LCLs ร่วมกับผลการวิเคราะห์ Meta-analysis ของโปรตีนและรูปแบบโปรตีโอมของผู้ป่วยอหิวาต์ซิมสเปกตรัม

ในการศึกษาครั้งนี้ ทำการ Upload ข้อมูลของยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติไป (ทั้งกลุ่มผู้ป่วยโดยรวมและกลุ่มผู้ป่วยย่อยที่แบ่งตามลักษณะประชากร) และ Upload ข้อมูลของโปรตีนที่พบว่าเคยมีการรายงานความผิดปกติในงานวิจัยอื่น ๆ เข้าไปใน Ingenuity Pathway Analysis (IPA) จากนั้นทำการแปรข้อมูล (Convert) ดังกล่าวให้อยู่ในรูป Symbol ซึ่งในขั้นตอนนี้ทำให้มีจำนวนยีนและโปรตีนที่ไม่มีในฐานข้อมูลเกิดการสูญหายไปบางส่วน จากนั้น ได้ทำการเปรียบเทียบข้อมูลทั้งสองกลุ่มเพื่อหาข้อมูลพื้นที่คาบเกี่ยว (Overlap) ซึ่งแสดงไว้ดังรูปภาพที่ 9 และตารางที่ 5

นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ข้อมูลพื้นที่คาบเกี่ยว (Overlap) ในแต่ละกลุ่มย่อยยังพบว่าเมื่อมีการตั้งกลุ่มย่อยแยกลงไปจากกลุ่มผู้ป่วยทั้งหมด ปริมาณของ Symbol ในกลุ่มย่อยบางกลุ่มมีจำนวนที่สูงขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่ม G3 (Red) ซึ่งเราพบว่าปริมาณ Symbol สูงที่สุด และเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วย Hypergeometric distribution analysis ซึ่งเป็นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่ม เราพบว่าทรานสคริปโตมของกลุ่ม G3 (Red) มีความสอดคล้องกับการผิดปกติของการแสดงออกของโปรตีนและโปรตีโอมในการศึกษา ก่อน ๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($P\text{-value} = 0.036$)



รูปภาพที่ 9 ภาพ Venn diagram แสดงจำนวน Symbol ที่อยู่ในพื้นที่คาบเกี่ยวกัน (Overlap) ระหว่างยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติไป (ทั้งกลุ่มผู้ป่วยโดยรวมและกลุ่มผู้ป่วยย่อยที่แบ่งตามลักษณะประชากร) และข้อมูลของโปรตีนที่พบว่าเคยมีการรายงานความผิดปกติในงานวิจัยอื่น ๆ

โดยใช้สถิติ T-Test (Standard Bonferroni's correction) ที่ค่านัยสำคัญ p-value < 0.05 (two-sided) โดยวงกลมสีส้ม คือ โปรตีนที่พบว่าเคยมีการรายงานความผิดปกติในงานวิจัยอื่น ๆ ; วงกลมสีม่วง คือ ยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติไปในกลุ่มผู้ป่วยโดยรวม; วงกลมสีน้ำเงิน (G1) คือยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติในกลุ่มผู้ป่วยความผิดปกติทางด้านภาษาน้อย (Mildly autistic); วงกลมสีเขียว (G2) คือยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติไปในกลุ่มผู้ป่วยที่มีทักษะความสามารถพิเศษร่วมกับความผิดปกติด้านภาษารุนแรง; วงกลมสีแดง (G3) คือยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติไปในกลุ่มผู้ป่วยที่มีความผิดปกติทางด้านภาษารุนแรง (Severely language-impaired); และวงกลมสีเหลือง (G4) คือยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติไปในกลุ่มที่มีทักษะความสามารถพิเศษ ("Savant" skill)

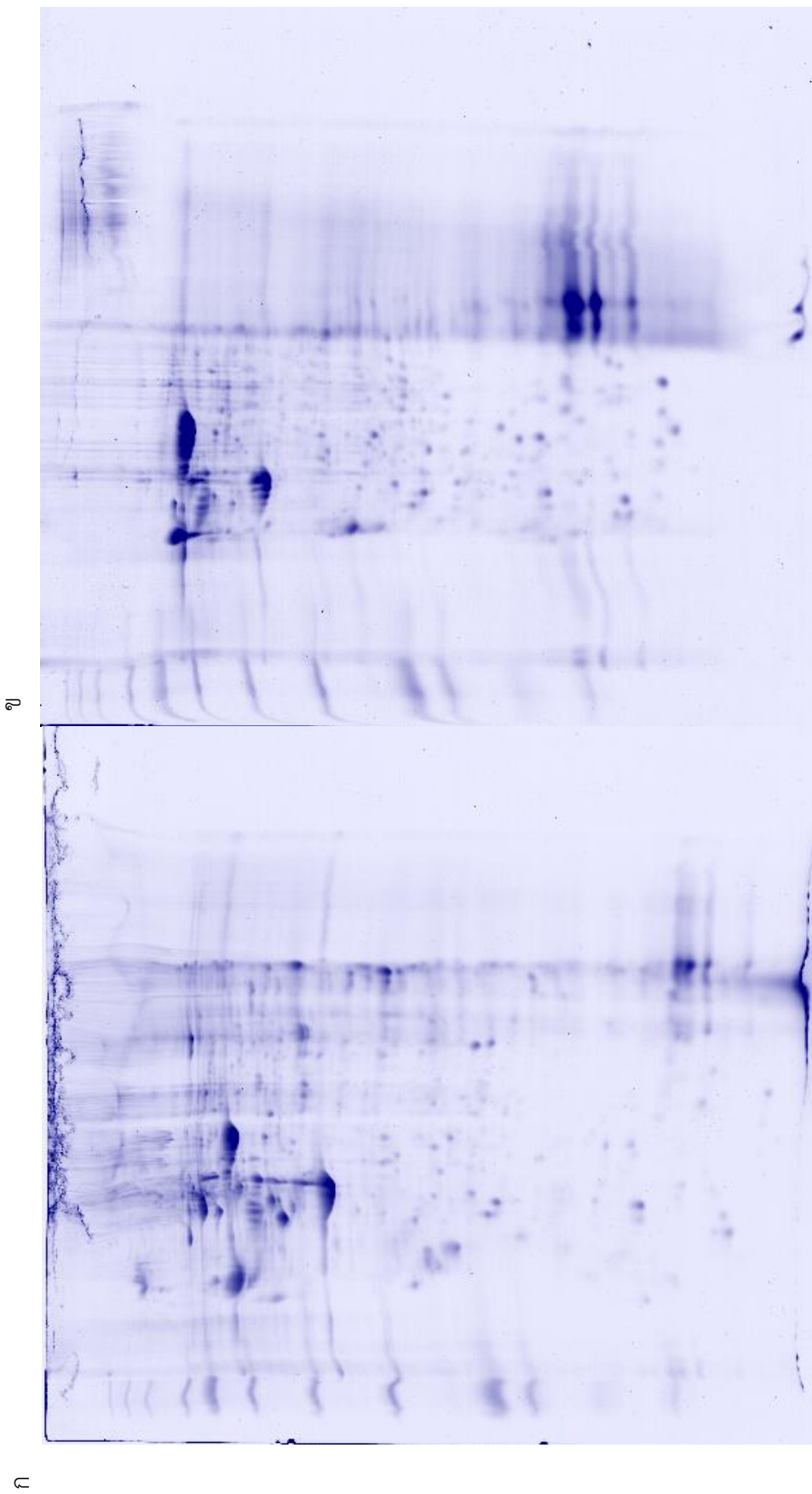
ตารางที่ 5 โพรตีนที่อยู่ในพื้นที่คาบเกี่ยวกัน (Overlap) ระหว่างยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติไป (ทั้งกลุ่มผู้ป่วยโดยรวมและกลุ่มผู้ป่วยย่อยที่แบ่งตามลักษณะประชากร) และข้อมูลของโปรตีนที่พบว่าเคยมีการรายงานความผิดปกติในงานวิจัยอื่น ๆ โดยใช้สถิติ T-Test (Standard Bonferroni's correction) ที่ค่านัยสำคัญ P-value < 0.05 (two-sided)

Overlapping	total	elements
Previous Proteome _C vs All ASD transcriptome	4	PPP1R2, FGB, PRH1, C5
Previous Proteome _C vs G1 (Blue) transcriptome	10	HERC1, C1RL, CD59, BMPR2, FGB, RNASE1, CTSA, ZG16B, MGMT, ATRN
Previous Proteome _C vs G2 (Green) transcriptome	2	PRH1, PSCA
Previous Proteome _C vs G3 (Red) transcriptome	23	HSPA8, FN1, C5, FCMR, IGFBP5, LGALS3, LRP2, MBP, SERPINA3, NID1, BCAN, GM2A, MRC2, VTN, MST1, PPP1R2, PTGDS, FGA, CTBS, ACTG2, SERPINC1, APOA1, MMP9
Previous Proteome _C vs G4 (Yellow) transcriptome	4	FLNC, IGSF8, PRH1, IGFBP5

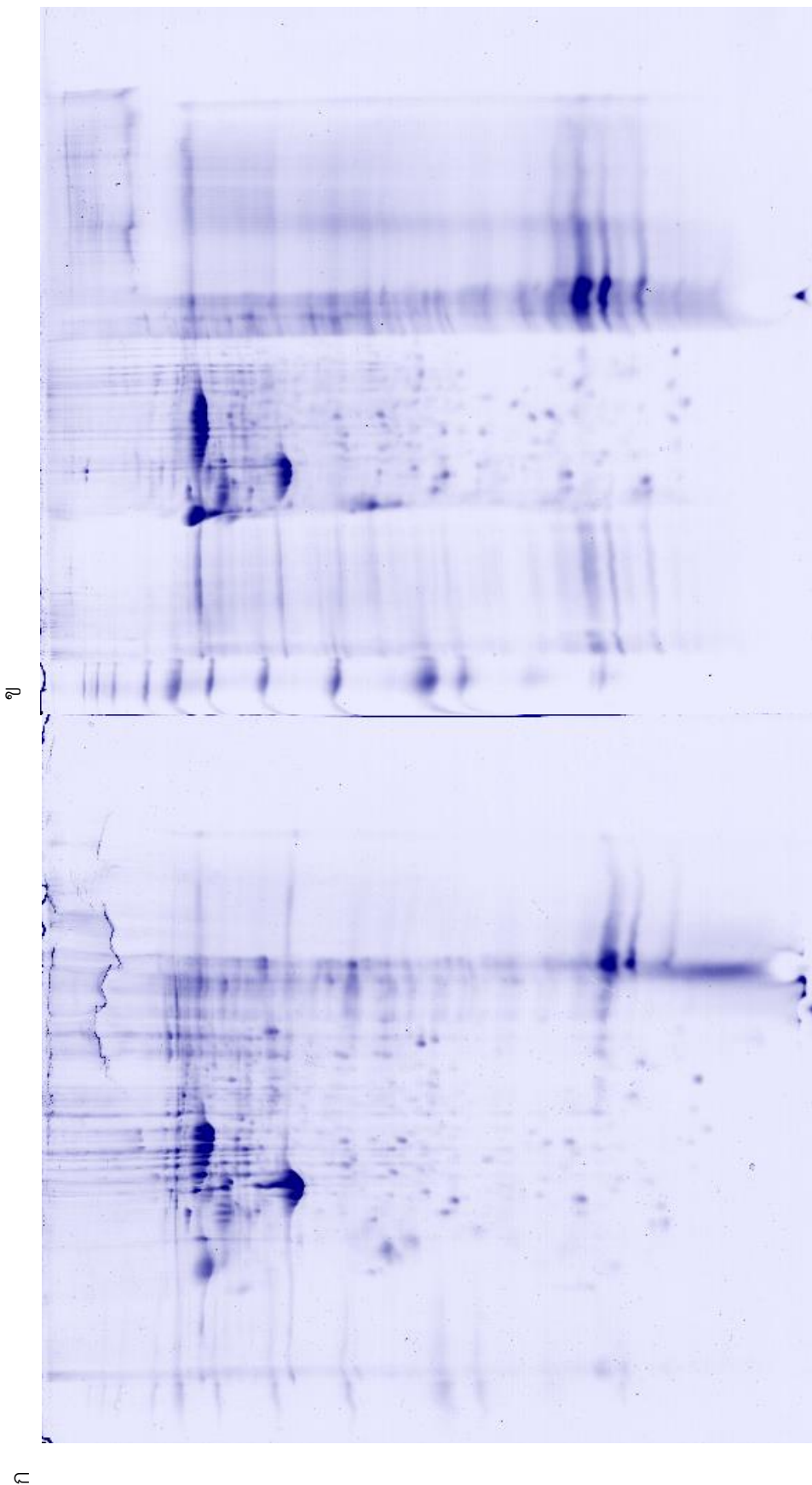
4.4 ผลการวิเคราะห์รูปแบบโปรตีนของ LCLs

ศึกษาการแสดงออกจากโปรตีนใน LCLs ของผู้ป่วยออทิสซึมสเปกตรัมจำนวน 6 ราย เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นคนปกติที่มีอายุใกล้เคียงกับผู้ป่วย (Age-matched control) จำนวน 6 ราย โดยใช้เทคนิค Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) ทำการวิเคราะห์โปรตีนในช่วง pH เท่ากับ 3-10 ซึ่งการทดสอบแต่ละครั้งจะทำสามซ้ำ (Triplicate) ทั้งนี้ LCLs ที่ได้นำมาวิเคราะห์ได้ทำการเพาะเลี้ยงและการเก็บเซลล์ตามระเบียบวิธีการของ Rutgers University Cell and DNA Repository ซึ่งเป็นผู้ผลิตและดูแลรักษาเซลล์ใน Autism Genetic Research Exchange (AGRE) collection ตลอดจนได้ทำการสกัดโปรตีนจากเซลล์, วัดปริมาณโปรตีนและตรวจสอบคุณภาพโปรตีน เมื่อดำเนินการแล้ว แผ่นเจลที่ได้จากการวิเคราะห์จะถูกนำไปวิเคราะห์ต่อด้วยโปรแกรม Image Master 2D Platinum version 7.0 (GE Health Care, USA) เพื่อทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างของการแสดงออกของจุดโปรตีนในแต่ละแผ่น

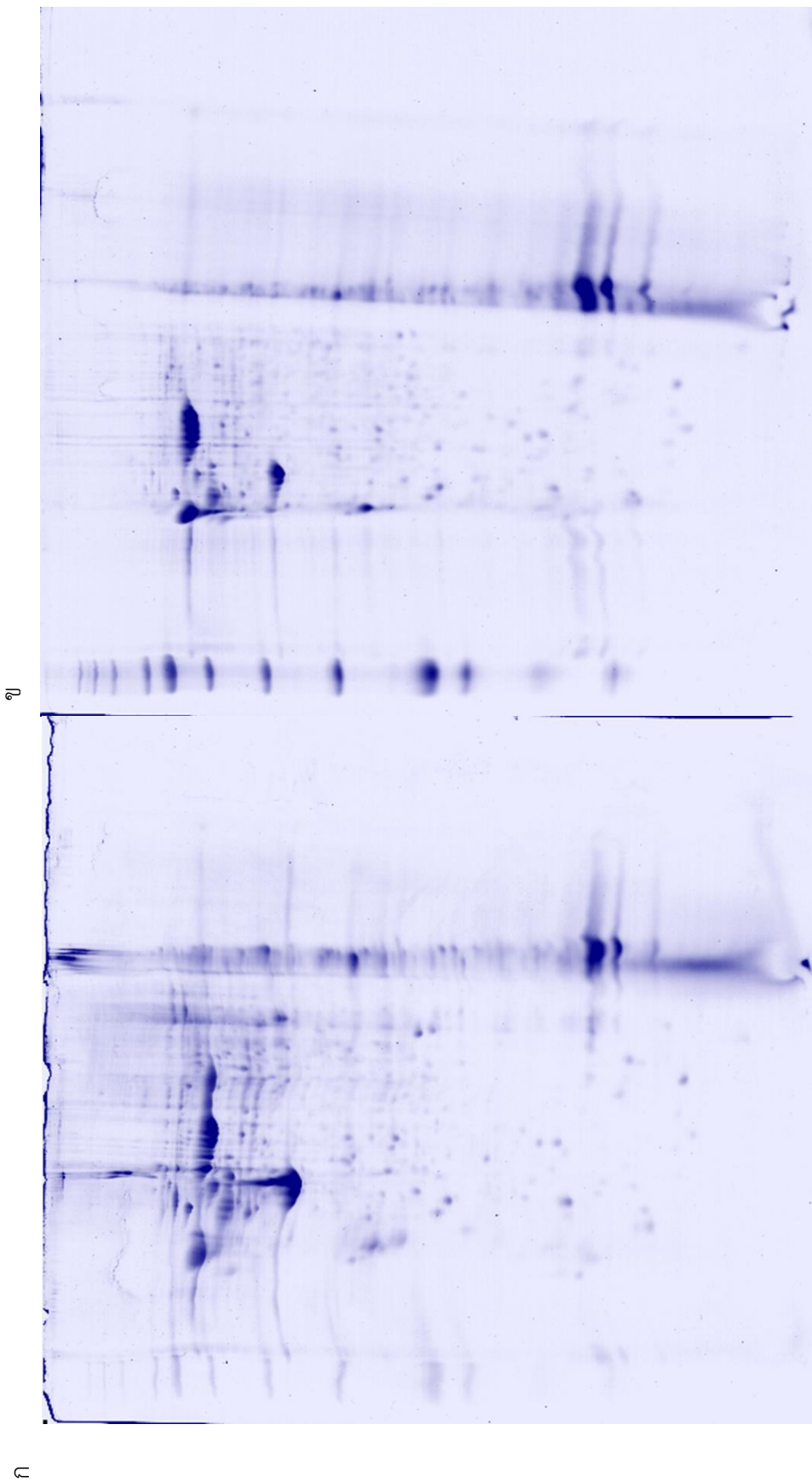
จากการศึกษา พบว่ามีปริมาณจุดโปรตีน 530 จุดโปรตีนต่อแผ่นเจล ดังภาพ 4.7 และภาพ 4.8 ซึ่งเมื่อนำมาทำการวิเคราะห์ด้วยสถิติแบบ ANOVA ที่ P-value < 0.05 พบว่ามีจุดโปรตีนที่มีค่าสัดส่วนความเข้มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มคนปกติและกลุ่มผู้ป่วยออทิสซึมสเปกตรัมอยู่ที่ 82 จุดโปรตีนต่อแผ่นเจล ดังตารางซึ่งได้แสดงไว้ในภาคผนวก 2 จากนั้น ได้ทำการคัดเลือกจุดโปรตีนดังกล่าวอีกครั้งโดยให้มีสัดส่วนความเข้มแตกต่างกันลดลงหรือเพิ่มขึ้นอย่างน้อย 2 เท่า พบว่าจุดโปรตีนที่มีการแสดงออกผิดปกติไปอย่างมีนัยสำคัญจำนวน 18 จุด ซึ่งถูกแสดงไว้ในรูปภาพที่ 10 - 12 ตารางที่ 6 และรูปภาพที่ 13



รูปภาพที่ 10 ภาพแผ่นเจลการแสดงออกของโปรตีนจาก LCLs ของ Age-matched control (ก) และผู้ป่วยออทิสซึมที่มีความผิดปกติทางด้านภาษารุนแรง (ข) ทั้งหมดกลุ่มละ 6 ราย ด้วยเทคนิค 2D-PAGE (1)



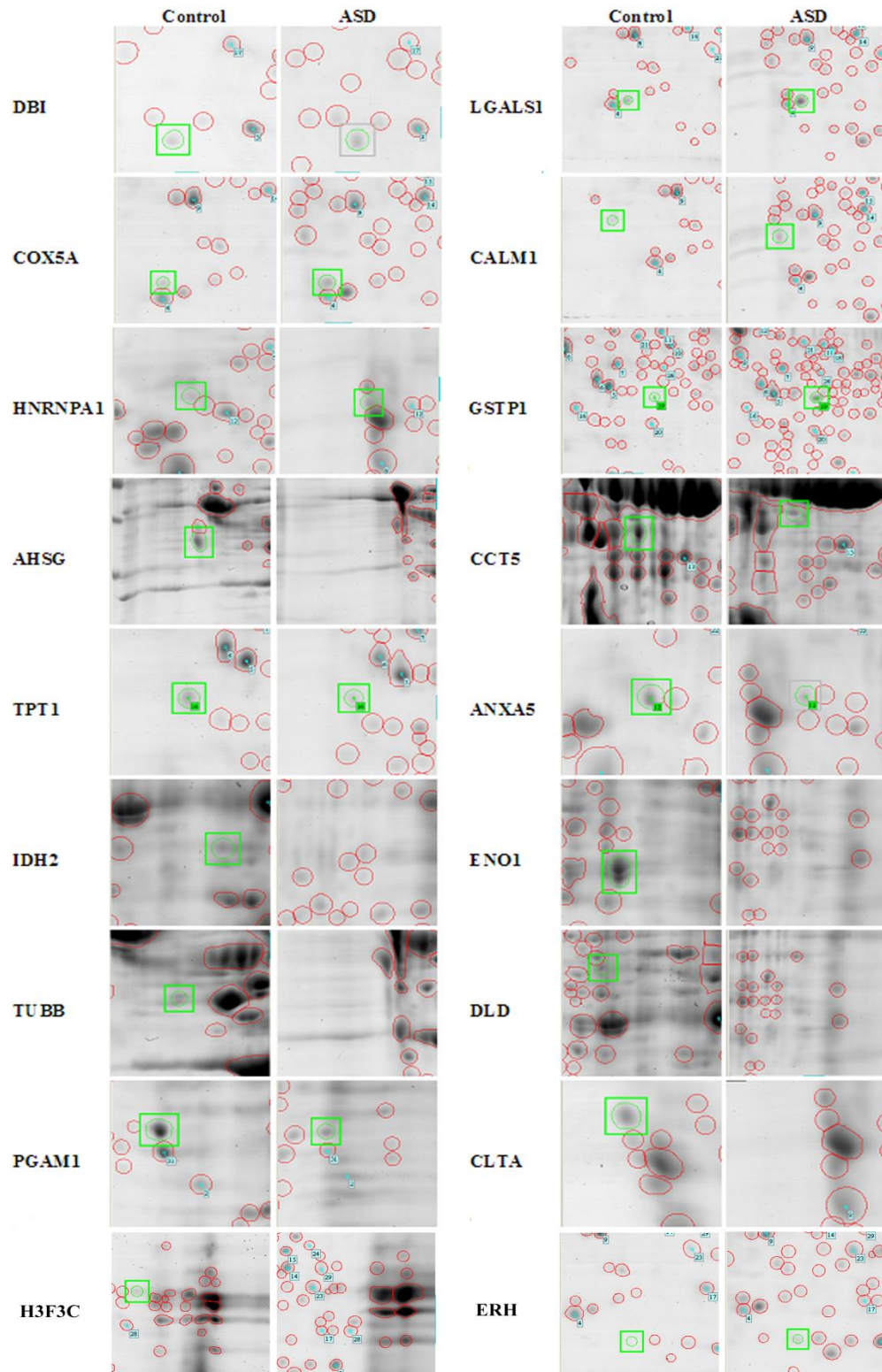
รูปภาพที่ 11 ภาพแผ่นเจลการแสดงออกของโปรตีนจาก LCLs ของ Age-matched control (ก) และผู้ป่วยออทิสซึมเพศชายที่มีความผิดปกติทางด้านภาษารุนแรง (ข) ทั้งหมดกลุ่มละ 6 ราย ด้วยเทคนิค 2D-PAGE (2)



รูปภาพที่ 12 ภาพแผ่นเจลการแสดงออกของโปรตีนจาก LCLs ของ Age-matched control (ก) และผู้ป่วยออทิสซึมสเปกตรัมที่มีความผิดปกติทางด้านภาษารุนแรง (ข) ทั้งหมดกลุ่มละ 6 ราย ด้วยเทคนิค 2D-PAGE (3)

ตารางที่ 6 จุดโปรตีนที่มีการแสดงออกผิดปกติไปอย่างมีนัยสำคัญจำนวน 18 จุด เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยสถิติแบบ ANOVA ที่ P-value < 0.05 และคัดเลือกจุดโปรตีนดังกล่าวอีกครั้งโดยให้มีสัดส่วนความเข้มข้นแตกต่างกันลดลงหรือเพิ่มขึ้นอย่างน้อย 2 เท่า

No.	Predicted Proteins	Description	P-value	MASCOT scores
1	DLD	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	5.95E-06	666
2	IDH2	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	1.59E-04	629
3	TPT1	Translationally-controlled tumor protein	2.03E-04	92
4	ANXA5	Annexin A5	6.26E-04	308
5	CCT5	T-complex protein 1 subunit epsilon	8.47E-04	545
6	COX5A	Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial	1.73E-03	233
7	LGALS1	Galectin-1	3.63E-03	612
8	GSTP1	Glutathione S-transferase P	3.77E-03	57
9	HNRNPA1	40S ribosomal protein SA	4.31E-03	53
10	PGAM1	Phosphoglycerate mutase 1 (brain isoform)	5.39E-03	951
11	TUBB	Tubulin beta chain	6.30E-03	557
12	ENO1	Alpha-enolase	6.81E-03	339
13	H3F3C	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	8.80E-03	50
14	DBI	Diazepam binding inhibitor	2.21E-02	116
15	AHSG	Alpha-2-HS-glycoprotein	3.13E-02	552
16	ERH	Enhancer of rudimentary homolog	3.51E-02	32
17	CLTA	Clathrin light chain A	3.65E-02	215
18	CALM1	Calmodulin-1	4.33E-02	69



รูปภาพที่ 13 จุดโปรตีนที่มีการแสดงออกผิดปกติไปอย่างมีนัยสำคัญจำนวน 18 จุด เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยสถิติแบบ ANOVA ($P < 0.05$) และคัดเลือกจุดโปรตีนดังกล่าวอีกครั้งโดยให้มีสัดส่วนความเข้มแตกต่างกันลดลง/เพิ่มขึ้นอย่างน้อย 2 เท่า

หลังจากนั้น เราได้นำรายชื่อโปรตีนทั้งหมดไปเข้า Ingenuity Pathways Analysis (IPA) เพื่อทำนาย pathway ที่น่าจะมีความเกี่ยวข้อง ซึ่งพบว่าส่วนใหญ่ของรายชื่อโปรตีนนั้นมีความเกี่ยวข้องกับโรคในระบบต่อมไร้ท่อ (Endocrine system disorders), ความผิดปกติทางระบบประสาท (Neurological disease), กระบวนการเมแทบอลิซึมของไขมัน (Lipid metabolism), โรคที่มีกระบวนการอักเสบเกิดขึ้น (Inflammatory Disease), กลุ่มโรคที่มีความบกพร่องของพัฒนาการ (Developmental disorder) และกลุ่มโรคทางจิตเวช (Psychological disorders) ดังผลที่ได้ถูกแสดงไว้ในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 หน้าที่และพยาธิสภาพที่มีความเกี่ยวข้องกับจุดโปรตีนที่มีการแสดงออกผิดปกติไปอย่างมีนัยสำคัญจำนวน 18 จุด เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยสถิติแบบ ANOVA ที่ P-value < 0.05 และคัดเลือกจุดโปรตีนดังกล่าวอีกครั้งโดยให้มีสัดส่วนความเข้มข้นแตกต่างกันลดลงหรือเพิ่มขึ้นอย่างน้อย 2 เท่า

Category	P-value	Molecules
Endocrine system disorders	5.93E-06-4.16E-02	TUBB, COX5A, ANXA5, GSTP1, AHSG, ENO1, CCT5
Neurological disease	3.19E-05-3.72E-02	HNRNPA1, DLD, CALM1 (includes others), TUBB, LGALS1, TPT1, ANXA5, DBI, GSTP1, H3F3C, CCT5, IDH2
Lipid metabolism	6.25E-05-1.47E-02	LGALS1, ANXA5, DBI, GSTP1
Inflammatory disease	4.95E-04-4.17E-02	HNRNPA1, LGALS1, ERH, ANXA5, GSTP1, AHSG, ENO1
Developmental disorder	9.24E-04-1.06E-02	HNRNPA1, DLD, CALM1 (includes others), TUBB, IDH2
Psychological disorders	4.61E-03-3.72E-02	HNRNPA1, TUBB, LGALS1, TPT1, DBI, GSTP1

จากการวิเคราะห์จุดโปรตีนทั้ง 18 จุด เราพบว่าโปรตีนจำนวน 11 จุดจากทั้งหมด 18 จุด ได้แก่ PGAM1, DLD, IDH2, TUBB, AHSB, CCT5, ENO1, ANXA5, CLTA, TPT1 และ H3F3C มีการแสดงออกลดลงในผู้ป่วย และโปรตีนจำนวน 7 จุดจากทั้งหมด 18 จุด ได้แก่ LGALS1, COX5A, DBI, CALM1, GSTP1, HNRNPA1 และ ERH มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในผู้ป่วย นอกจากนี้เรายังพบว่าโปรตีนจำนวน 5 จุดจาก 18 จุด ได้แก่ PGAM1, DLD, IDH2, ENO1 และ COX5A มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างพลังงาน และ โปรตีนจำนวน 4 จุดจาก 18 จุด ได้แก่ TUBB, AHSB, DBI, TPT1 มีความเกี่ยวข้องกับระบบประสาท

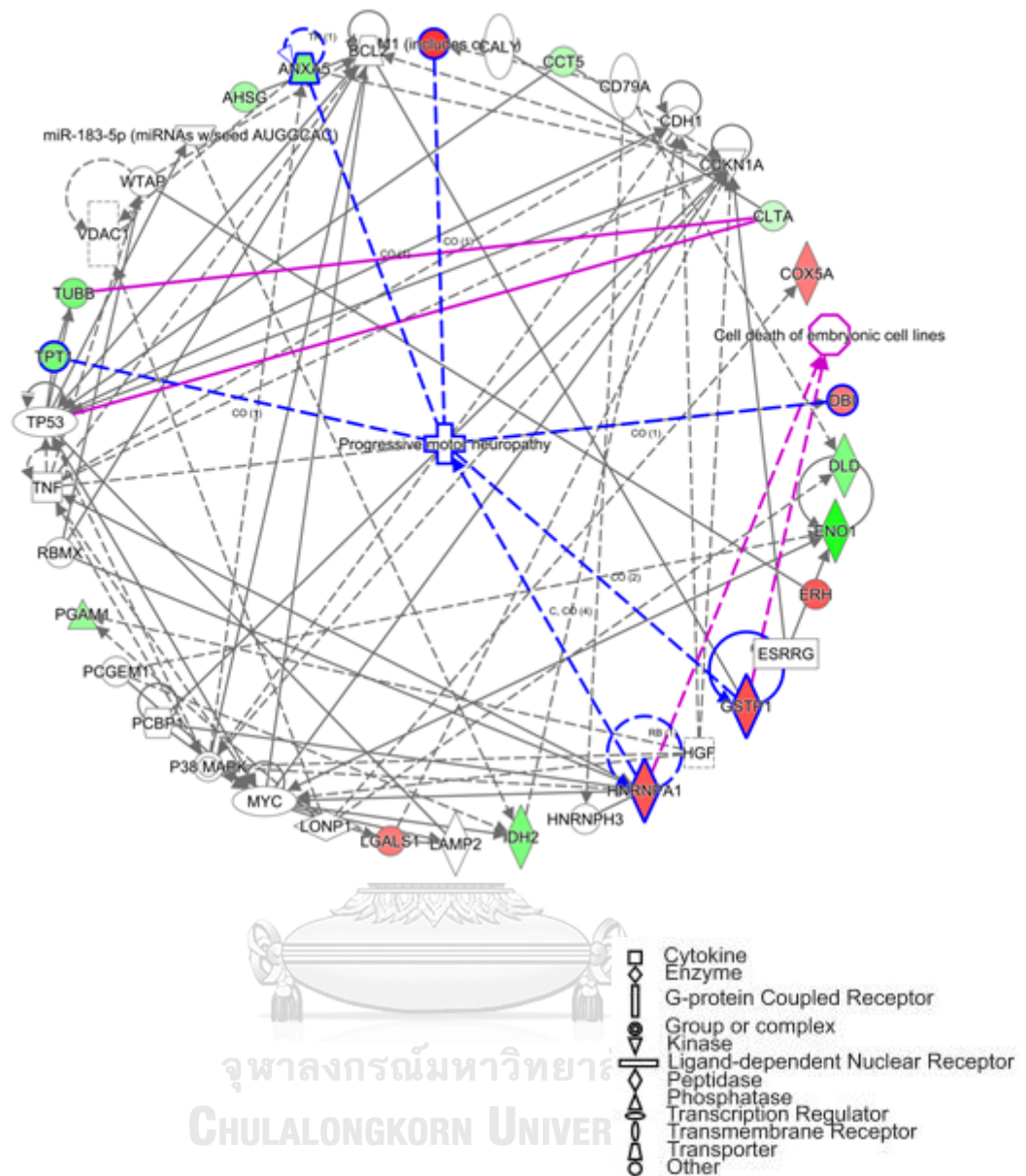
นอกจากนี้ ในการศึกษาี้ เรายังได้ทำการค้นหาค้นหาข้อมูลเกี่ยวกับโรคออทิซึมสเปกตรัม ได้แก่ AutismDB, AutismKB, SFARI เพื่อหาความผิดปกติที่เคยพบมาก่อนที่เกี่ยวข้องกับโปรตีนดังกล่าว ซึ่งเป็นไปตามตารางที่ 8

ในการศึกษาี้ได้ทำการสร้างโครงข่ายความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนต่อโปรตีน (Interactome) ของโปรตีนส่วนใหญ่ดังรูปภาพที่ 14 ซึ่งพบว่ามีความเกี่ยวข้องกับความผิดปกติของระบบประสาทส่วนปลายชนิดรุนแรง (Progressive motor neuropathy) และการตายของเซลล์ต้นกำเนิดจากเอ็มบริโอ (Cell death of embryonic cell lines)

ตารางที่ 8 จุดโปรตีนที่มีการแสดงออกผิดปกติไปอย่างมีนัยสำคัญจำนวน 18 จุด เมื่อทำการค้นหากลับไปในฐานะข้อมูลเกี่ยวกับโรคออทิซึมสเปกตรัม ได้แก่ AutismDB, AutismKB, SFARI เพื่อหาหน้าที่และพยาธิสภาพเบื้องต้นที่เคยมีการรายงานความผิดปกติในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม โดยเครื่องหมาย / แทนการเคยค้นพบการศึกษาว่ามีความผิดปกติไปในยีนหรือโปรตีนดังกล่าวกับโรคออทิซึมสเปกตรัม และเครื่องหมาย x แทนการยังไม่เคยมีการค้นพบความเกี่ยวข้องกับออทิซึมสเปกตรัมในปัจจุบัน

No.	Predicted Proteins	Description	Functions/Associated Human Phenotypes	Overlapping with ASD Databases		
				AutDB	AutKB	SFARI
15	AHSG	Alpha-2-HS-glycoprotein	Present in the cortical plate of the immature cerebral cortex, brain development	x	/	x
4	ANXA5	Annexin A5	Calcium channel activity, inflammation, placental anticoagulation	x	/	x
18	CALM1	Calmodulin-1	Calcium modulated protein	x	x	x
5	CCT5	T-complex protein 1 subunit epsilon	Hereditary sensory and autonomic neuropathy with spastic paraplegia (HSNSP), Increased circadian period length	x	/	x
17	CLTA	Clathrin light chain A	Component of coated vesicles and synaptic vesicles	x	/	x
6	COX5A	Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial	Mitochondrial respiratory chain	x	/	x
14	DBI	Diazepam binding inhibitor	Diazepam binding inhibitor by GABAA receptor binding, behavior/neurological phenotype, mortality/aging	x	x	x
1	DLD	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	Global/Neurodevelopmental delay, cerebellar ataxia, seizure etc.	x	/	x
12	ENO1	Alpha-enolase	Activator of plasminogen on the cell surface of several cell-types such as leukocytes and neurons	x	/	x

No.	Predicted Proteins	Description	Functions/Associated Human Phenotypes	Overlapping with ASD Databases		
				AutDB	AutKB	SFARI
16	ERH	Enhancer of rudimentary homolog	A component of methylosome, targeting proteins to the survival of motor neurons (SMN) complex for assembly into small nuclear ribonucleoprotein (snRNP) core particles	x	x	x
8	GSTP1	Glutathione S-transferase P	Detoxification, Decreased NANOG and OCT4 protein expression	x	/	x
13	H3F3C	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	Chromatin/nucleosome remodeling	x	/	x
9	HNRNPA1	40S ribosomal protein SA	Pre-mRNA processing, early-onset Paget disease, frontotemporal dementia	x	/	x
2	IDH2	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	Global/Neurodevelopmental delay, seizure etc.	x	/	x
7	LGALS1	Galectin-1	Expressed in brain endothelial cells, immune tolerance in pregnancy, enhanced apoptosis, autophagy	x	/	x
10	PGAM1	Phosphoglycerate mutase 1 (brain isoform)	Corticobasal degeneration	x	x	x
3	TPT1	Translationally-controlled tumor protein	Allergic Hypersensitivity Disease, Paraneoplastic Cerebellar Degeneration.	x	/	x
11	TUBB	Tubulin beta chain	Mutations in this gene cause cortical dysplasia, complex, with other brain malformations	x	/	x

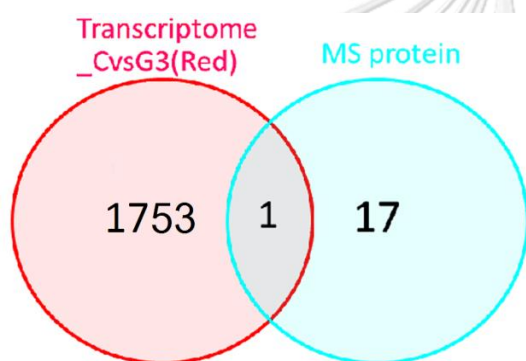


รูปภาพที่ 14 ภาพเครือข่ายทางชีวภาพแสดงการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน (Interactomic analysis) จากรายชื่อโปรตีนที่ได้จากเทคนิค 2D-PAGE และ LC-MS/MS โดยบริเวณที่ระบายด้วยสีแดงแทนโปรตีนที่พบว่ามี การแสดงออกเพิ่มขึ้น และบริเวณที่ระบายด้วยสีเขียวแทนโปรตีนที่พบว่ามี การแสดงออกลดลง ทั้งนี้ บริเวณที่เน้นด้วยสีน้ำเงินแทนโปรตีนที่มีความเกี่ยวข้องกับ ความผิดปกติของระบบประสาทส่วนปลายชนิดรุนแรง (Progressive Motor Neuropathy) และ บริเวณที่เน้นด้วยสีม่วงแทนโปรตีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ต้นกำเนิดจากเอ็มบริโอ (Cell death of embryonic cell lines)

4.5 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลพื้นที่คาบเกี่ยว (Overlap) ระหว่างรูปแบบทรานสคริปโตมร่วมกับผลการวิเคราะห์รูปแบบโปรตีนของ LCLs ด้วยเทคนิค two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) และ LC-MS/MS

จากการแยกการแสดงออกของยีนที่ผิดปกติไปออกเป็นกลุ่มย่อยๆตามลักษณะอาการทางคลินิกของผู้ป่วยที่จำเพาะยิ่งขึ้น และเมื่อเรานำผลจากกลุ่ม G3 (Red) มาทำการวิเคราะห์ข้อมูลพื้นที่คาบเกี่ยว (Overlap) กับโปรตีนที่ได้มาจากการศึกษาโปรตีนด้วยเทคนิค 2D-PAGE และ LC-MS/MS จากการศึกษานี้ พบว่ามีเพียง symbol เดียวที่มีการคาบเกี่ยว (Overlap) ได้แก่ Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial (IDH2) ดังแสดงในรูปภาพที่ 15

ก



Names	total	elements
Transcriptome vs MS protein	1	IDH2

รูปภาพที่ 15 ภาพแสดงจำนวน Symbol ที่อยู่ในพื้นที่คาบเกี่ยวกัน (Overlap) ระหว่างยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติไปในกลุ่มผู้ป่วยย่อย G3 และโปรตีนที่ได้มาจากการศึกษาโปรตีนด้วยเทคนิค 2D-PAGE และ LC-MS/MS โดยใช้สถิติ T-Test (Standard Bonferroni's correction) ที่ค่านัยสำคัญ P-value < 0.05 (two-sided)

ก) Venn diagram โดยวงกลมสีแดง (G3) คือ ยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติไปในกลุ่มผู้ป่วยที่มีความผิดปกติทางด้านภาษารุนแรง (Severely language-impaired); และวงกลมสีฟ้า (G4) คือ โปรตีนที่ได้มาจากการศึกษาโปรตีนด้วยเทคนิค 2D-PAGE และ LC-MS/MS จากการศึกษานี้

ข) แสดง Symbol ที่อยู่ในพื้นที่คาบเกี่ยวกัน (Overlap)

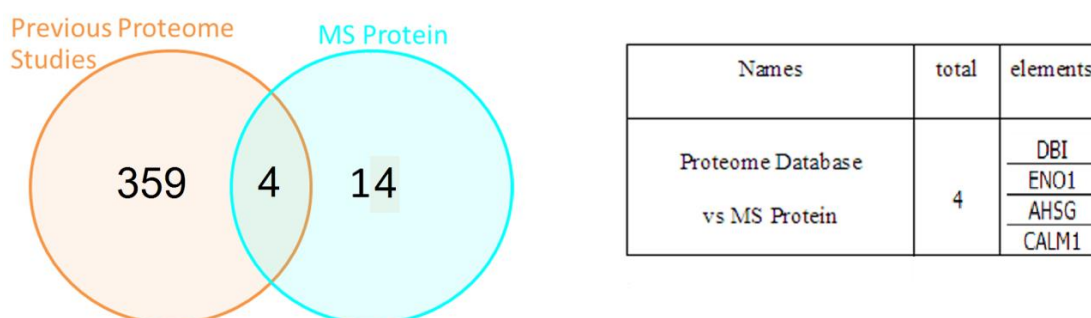
4.6 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลพื้นที่คาบเกี่ยว (Overlap) ระหว่างผลการวิเคราะห์ Meta-analysis ของโปรตีนและรูปแบบโปรตีโอมของผู้ป่วยอหิวาต์ซิมสเปกตรัมร่วมกับผลการวิเคราะห์รูปแบบโปรตีโอมของ LCLs ด้วยเทคนิค 2D-PAGE และ LC-MS/MS

เมื่อนำรายชื่อของโปรตีนที่พบว่าเคยมีการรายงานความผิดปกติในงานวิจัยอื่น ๆ ในอดีตมาทำการวิเคราะห์ข้อมูลพื้นที่คาบเกี่ยว (Overlap) กับโปรตีนที่ได้มาจากการศึกษาโปรตีโอมด้วยเทคนิค 2D-PAGE และ LC-MS/MS พบว่ามี 4 symbol เดียวที่มีการคาบเกี่ยว (Overlap) ได้แก่ Alpha-enolase (ENO1), Alpha-2-HS-glycoprotein (AHSG), Diazepam binding inhibitor (DBI), Calmodulin-1 (CALM1) ดังที่แสดงในรูปภาพที่ 16

ก



ข



รูปภาพที่ 16 ภาพแสดงจำนวนSymbolที่อยู่ในพื้นที่คาบเกี่ยวกัน (Overlap) ระหว่างโปรตีนที่พบว่าเคยมีการรายงานความผิดปกติในงานวิจัยอื่น ๆ ในอดีต และข้อมูลของโปรตีนที่ได้มาจากการศึกษาโปรตีโอมด้วยเทคนิค 2D-PAGE และ LC-MS/MS โดยใช้สถิติ T-Test (Standard Bonferroni's correction) ที่ค่านัยสำคัญ P-value < 0.05 (two-sided)

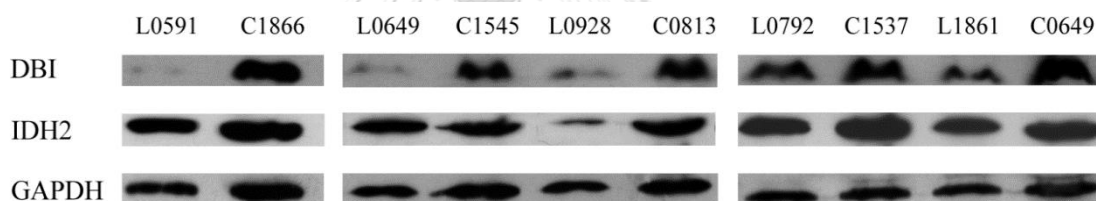
ก) Venn diagram โดยวงกลมสีส้ม คือ โปรตีนที่พบว่าเคยมีการรายงานความผิดปกติในงานวิจัยอื่น ๆ และวงกลมสีฟ้า (G4) โปรตีนที่ได้มาจากการศึกษาโปรตีโอมด้วยเทคนิค 2D-PAGE และ LC-MS/MS จากการศึกษาในครั้งนี้

ข) แสดง Symbolที่อยู่ในพื้นที่คาบเกี่ยวกัน (Overlap)

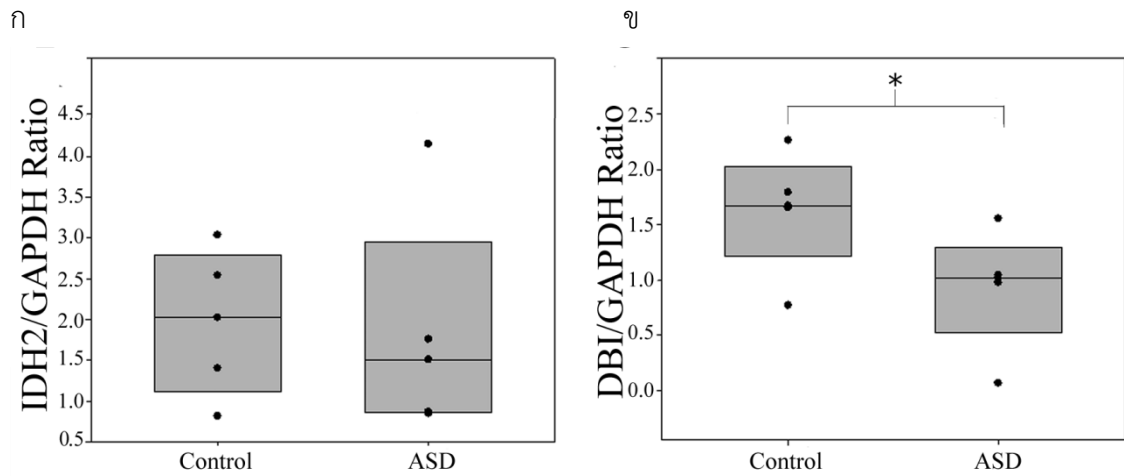
4.7 ผลการวิเคราะห์การยืนยันการแสดงออกรูปแบบโปรตีนของ LCLs โดยเทคนิค Western blot

เพื่อเป็นการยืนยันผลจากวิธี 2D-PAGE และพิจารณาการแสดงออกที่ผิดปกติไปในรายบุคคลที่จำเพาะมากยิ่งขึ้น เราเลือก DBI และ IDH2 มาทำการศึกษาต่อ โดยใช้ GAPDH เป็น loading control

ผลจากการทำ Western blot พบว่าการแสดงออกของโปรตีน Acyl-CoA-binding protein (DBI) ของผู้ป่วยออทิซึมกลุ่มมีความผิดปกติทางด้านภาษารุนแรงมีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับ Age-/sex-matched control เมื่อใช้สถิติ T-test โดยมีค่า P-value < 0.05 ในขณะที่เดียวกันยังพบว่าการแสดงออกของ Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial (IDH2) ในผู้ป่วยออทิซึมกลุ่มมีความผิดปกติทางด้านภาษารุนแรงมีแนวโน้มลดลงเช่นกันเมื่อเปรียบเทียบกับ Age-matched control ซึ่งผล Western blot ได้ถูกแสดงเอาไว้ในรูปภาพที่ 17 และรูปภาพที่ 18



รูปภาพที่ 17 ภาพแสดงผลจาก Western blot ของผู้ป่วยออทิซึมกลุ่มมีความผิดปกติทางด้านภาษารุนแรง และ Age/sex-matched control (ผู้ป่วยออทิซึมกลุ่มมีความผิดปกติทางด้านภาษารุนแรง แทนด้วย L และ Age/sex-matched control แทนด้วย C) โดยใช้สถิติ T-Test ที่ค่านัยสำคัญ P-value < 0.05



รูปภาพที่ 18 ภาพแสดงผลจาก Western blot ของผู้ป่วยออทิซึมกลุ่มมีความผิดปกติทางด้านภาษารุนแรง และ Age-matched control (ผู้ป่วยออทิซึมกลุ่มมีความผิดปกติทางด้านภาษารุนแรงแทนด้วย ASD และ Age-matched control แทนด้วย Control) โดยใช้สถิติ T-Test ที่ค่านัยสำคัญ P-value < 0.05



บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยมุ่งเน้นที่จะหาโปรตีนที่การแสดงออกผิดปกติไปอย่างมีนัยสำคัญของผู้ป่วยโรคออทิซึมสเปกตรัมในกลุ่มที่ความผิดปกติอย่างรุนแรงทางด้านภาษา (Severe language impaired) และคาดหวังว่าโปรตีนที่ได้จากการวิเคราะห์ในครั้ง นี้ จะสามารถนำไปใช้เป็นโปรตีนบ่งชี้ (biomarkers) ได้ในอนาคต จากการวิเคราะห์ข้อมูลลักษณะทางอาการทางคลินิกโดยใช้แบบทดสอบ ADI-R โด้นใช้การวิเคราะห์ Principal component analysis (PCA) ร่วมกับ Hierarchical Clustering (HCL) ทำให้ผู้ป่วยถูกจัดออกเป็นกลุ่มย่อยจำนวน 4 กลุ่ม และยังพบอีกด้วยว่าในแต่ละกลุ่มเองก็ยังมีรูปแบบการแสดงออกที่ผิดปกติไปของทรานสคริปโตมที่มีความจำเพาะและคล้ายคลึงกัน นอกจากนี้ยังพบอีกว่าการวิเคราะห์ Meta-analysis ระหว่างทรานสคริปโตมและโปรตีโอมในอดีต บ่งบอกถึงการแสดงออกที่ผิดปกติในยีนอาจนำไปสู่การแสดงออกที่ผิดปกติไปโปรตีนด้วยเช่นกัน จากสมมติฐานดังกล่าวนำไปสู่การศึกษาในรูปแบบโปรตีโอมของเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาว (LCLs) ของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมแบบมีความผิดปกติรุนแรงทางด้านภาษาเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม Age-/ sex- matched control จากการวิเคราะห์ดังกล่าว เราพบโปรตีนจำนวน 18 โปรตีนที่มีการแสดงออกผิดปกติไปอย่างมีนัยสำคัญด้วยการวิเคราะห์เทคนิค 2D-PAGE ร่วมกับ MS/MS โปรตีนโดยส่วนใหญ่ที่ได้จากการวิเคราะห์มีความเกี่ยวข้องกับหน้าที่การทำงานต่าง ๆ ในระบบประสาท โรคทางระบบประสาท ตลอดจนการเกิดการอักเสบ และเมื่อทำการยืนยันการแสดงออกด้วยเทคนิค Western blot ผู้วิจัยยังพบอีกว่า IDH2 และ DBI ของกลุ่มออทิซึมสเปกตรัมมีปริมาณลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

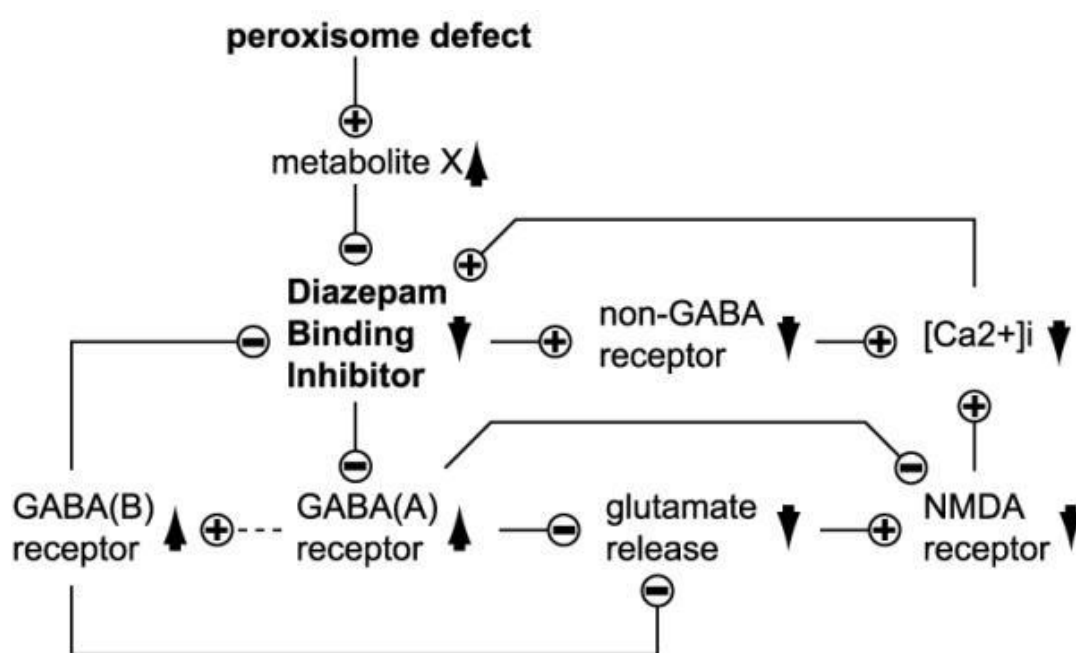
จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการแบ่งกลุ่มย่อย ๆ ของออทิซึมสเปกตรัมโดยใช้คะแนนผลการทดสอบ ADI-R สามารถลดความหลากหลายของจำนวนประชากรออทิซึมสเปกตรัมลง และนำไปสู่การวิเคราะห์ยีนที่ผิดปกติไปอย่างมีนัยสำคัญและความผิดปกติทางชีวภาพที่จำเพาะต่อกลุ่มย่อย ๆ ของออทิซึมสเปกตรัมยิ่งขึ้น ซึ่งอาจนำไปสู่การสร้าง Biomarker และพัฒนาการรักษาที่มีความจำเพาะในกลุ่มออทิซึมสเปกตรัมในการวิจัยในอนาคต [85] ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยใช้ระเบียบวิธีในการวิเคราะห์การจัดกลุ่มโดยคะแนน ADI-R จากผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมจำนวน 85 คนที่มี LCLs ซึ่งเป็นระเบียบวิธีเดียวกันกับที่ใช้ในการวิเคราะห์ cDNA microarray [84] สอดคล้องไปกับการศึกษาก่อนหน้านี้โดย Hu et al., 2009 กล่าวโดยย่อคือ การวิเคราะห์การจัดกลุ่มโดยใช้คะแนน

ADI - R แสดงให้เห็นว่ากลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมได้รับการจัดกลุ่มเป็นกลุ่มย่อย ๆ ที่มีลักษณะทางคลินิกแตกต่างกัน ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่ากลุ่มย่อยจำนวนอย่างน้อย 4 กลุ่ม ได้แก่ G1 – G4 มีการแสดงรูปแบบคะแนน ADI-R ที่แตกต่างกันในแต่ละกลุ่มย่อย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่ม G3 (Red) ซึ่งประกอบด้วยออทิซึมสเปกตรัมที่มีความบกพร่องทางภาษาอย่างรุนแรงจำนวน 30 ราย เราพบว่าเป็นกลุ่มที่มีความสอดคล้องและได้ผลการจัดกลุ่มทุกรายเหมือนกับในการศึกษาของ Hu et al., 2009 ยกเว้นมีเพียง 1 ราย ซึ่งมาจากกลุ่ม G2 ในการศึกษาก่อนหน้านี้เข้ามารวมด้วยในกลุ่มการศึกษานี้ [84] จากผลการวิเคราะห์ดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าในกลุ่มออทิซึมสเปกตรัมที่มีความบกพร่องทางภาษาอย่างรุนแรงเป็นกลุ่มที่มีความเที่ยงตรงที่สูงกว่ากลุ่มย่อยอื่น ๆ ดังนั้น ในการศึกษานี้ผู้วิจัยจึงมุ่งเน้นไปที่กลุ่มย่อยนี้ จากการวิเคราะห์ Meta-analysis ของ LCLs ระหว่างทรานสคริปโตมจากออทิซึมสเปกตรัมในกลุ่มG3 เปรียบเทียบกับ Age-/ sex- matched control โดยใช้สถิติ T-test (Standard Bonferroni's correction) พบว่ามีทรานสคริปสูงถึง 1,754 ทรานสคริปที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับออทิซึมสเปกตรัมถึง 59 ยีน นอกจากนี้ เมื่อทำการวิเคราะห์ symbol ร่วมกันระหว่างทรานสคริปโตมของออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม G3 และโปรตีนในการศึกษาก่อนหน้า ยังพบว่าสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อทำการวิเคราะห์การกระจายตัวด้วย Hypergeometric distribution analysis เพิ่มเติม การเปลี่ยนแปลงของทรานสคริปโตมจึงอาจสะท้อนให้เห็นถึงการควบคุมในระดับของโปรตีน และอาจมีหน้าที่เกี่ยวกับการทำหน้าที่ในระบบของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับออทิซึมสเปกตรัม

ในการศึกษารูปแบบโปรตีนของ LCLs ของกลุ่มย่อย G3 ของออทิซึมสเปกตรัมซึ่งมีความบกพร่องทางภาษาอย่างรุนแรงเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมในครั้งนี้นำใช้เทคนิค 2D-PAGE ควบคู่ไปกับ LC-MS/MS ผู้วิจัยพบว่าจุดโปรตีนจำนวน 82 จุดมีความเข้มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และได้คัดเลือกจุดโปรตีนจำนวน 18 จุดโปรตีนไปทำการวิเคราะห์ต่อด้วย LC-MS/MS ซึ่งพบว่า 14 จาก 18 โปรตีนนั้นมีความเกี่ยวข้องกับการหน้าที่หรือโรคทางระบบประสาท (Neurological functions/ diseases) และมี 4 โปรตีน (DBI, ENO1, AHS3, และ CALM1) ที่เคยมีการรายงานความผิดปกติมาแล้วในการศึกษาโปรตีนก่อนหน้านี้

Diazepam Binding Inhibitor (DBI) พบว่ามีการแสดงออกลดลงในออทิซึมสเปกตรัมที่มีความบกพร่องทางภาษาอย่างรุนแรง จากการศึกษาล่าสุดได้พบว่าโปรตีน DBI เป็นหนึ่งในโปรตีนที่มีการแสดงออกผิดปกติอย่างมีนัยสำคัญในปัสสาวะของกลุ่มออทิซึมสเปกตรัมจากโปรตีนทั้งหมด 231

โปรตีน [96] อย่างไรก็ตาม ยังไม่เคยมีการเลือก DBI เป็นโปรตีน Biomarker ของออทิซึมสเปกตรัม มาก่อน DBI เป็นที่รู้จักในชื่อ Acyl-CoA-binding protein (ACBP) หรือ Endozepine (EP) DBI ซึ่งสามารถเข้าแทนที่ Diazepam จาก Benzodiazepine (BZD) recognition site located บน GABA type A receptor และเป็น Neuropeptide และก่อให้เกิดการควบคุมการทำงานของ GABA receptor [102] ดังที่ได้แสดงในรูปภาพที่ 19



รูปภาพที่ 19 แสดงการทำงานของ Diazepam Binding Inhibitor (DBI) เพื่อควบคุมการทำงานของ GABA receptor (แหล่งที่มาของภาพ: Rainer B, et al., 2004)

ในการศึกษาก่อนหน้านี้ เคยมีการรายงานว่ DBI มีการแสดงออกสูงขึ้นหลายบริเวณในสมอง ประกอบไปด้วย Cerebellar cortex, Area postrema และ Ependyma of the third ventricle [103] และจากการศึกษาล่าสุด ในหนูได้รายงานว่ การขาดหายไปของยีน DBI ส่งผลให้ความสนใจทางสังคม (Social interest) ในทั้งหนูเพศผู้และเมียลดลง และในหนูเพศผู้จะมีความผิดปกติที่รุนแรงมากกว่าในเพศเมีย [104] และยังพบอีกว่ทั้งหนูเพศผู้และเมียยังแสดงอาการ Repetitive grooming เพิ่มขึ้น ซึ่งพฤติกรรมที่เปลี่ยนไปดังกล่าวมีความสอดคล้องกันกับออทิซึมสเปกตรัม และในการศึกษาหนู DBI over-expressed ที่มีความบกพร่องในการเรียนรู้ที่เพิ่มขึ้นโดยปราศจากความวิตกกังวล (Anxiety) หรือพฤติกรรมอื่น ๆ ที่ขัดแย้ง [105]

AHSG (Alpha-2-HS-glycoprotein) หรือ fetuin-A เป็นโปรตีนที่สามารถพบได้ใน serum โดยเริ่มต้นการสร้างจากตับและถูกปล่อยออกมาในกระแสเลือด [106] AHSG มีความเกี่ยวข้องกับหลาย ๆ กระบวนการในร่างกาย ยกตัวอย่างเช่น การพัฒนาของสมอง (Brain development) [107] ในการศึกษาทางด้านโปรตีโอม โดยใช้เทคนิค Liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry (LC-ESI-MS) ใน serum ของกลุ่มออทิซึมสเปกตรัม พบว่าการแสดงออกของโปรตีน AHSG เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกลุ่มคนปกติที่มีอัตราส่วนของอายุและเพศเท่ากัน และเมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมที่เป็น low functioning autism พบว่าโปรตีน AHSG เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกลุ่มคนปกติที่มีอัตราส่วนของอายุและเพศเท่ากัน [87] ในการศึกษาด้าน CNV ในผู้ป่วยโรคออทิซึมสเปกตรัมด้วยเทคนิค Array comparative genomic hybridization (aCGH) พบ Denovo CNVs ที่เกิดการ loss ไปที่บริเวณ 3q27.2-29 [108, 109] นอกจากนี้ ในด้านการศึกษาเกี่ยวกับ genomic linkage ในผู้ป่วยโรคออทิซึมสเปกตรัม โดยใช้เทคนิค SNP-based genomic screen ได้รายงานพบว่า AHSG เป็นหนึ่งในยีนที่เหมาะสมสำหรับใช้สำหรับตรวจหาผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม [110]

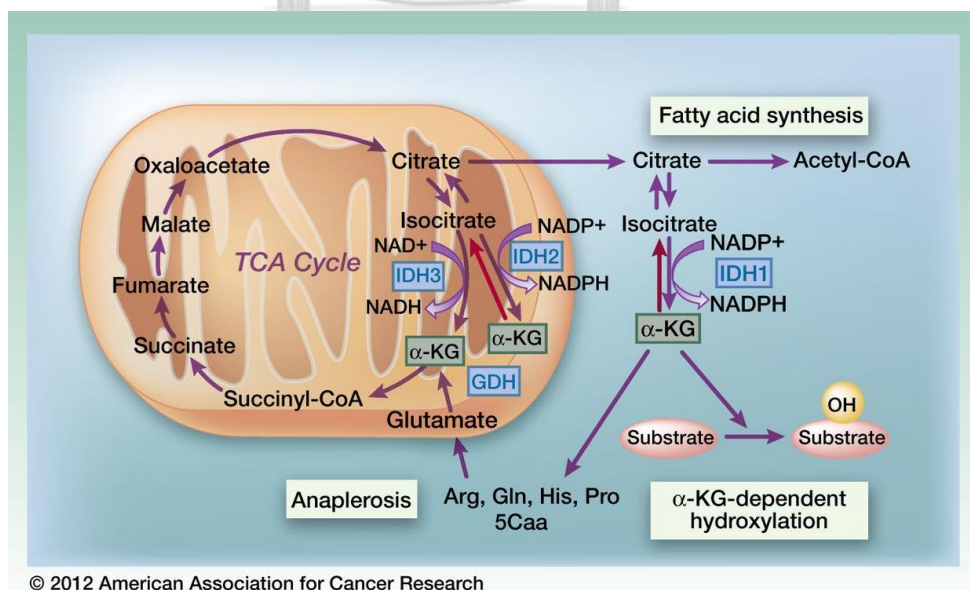
ENO1 และ CALM1 มีการรายงานว่าลดลงในการศึกษาโปรตีโอมก่อนหน้านี้ จากการใช้เทคนิค Isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ) – based mass spectrometry โดยใช้สิ่งส่งตรวจเป็น plasma จากออทิซึมสเปกตรัมเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่อายุเท่า ๆ กัน [99] ENO1 (Alpha enolase) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ได้หลากหลายที่ทำหน้าที่เปลี่ยน 2-phosphoglycerate ให้เป็น Phosphoenolpyruvate ในกระบวนการ Glycolysis และทำหน้าที่เป็น Activator ของ Plasminogen บน Cell surface ของ Leukocytes และเซลล์ประสาท ในการศึกษา CNV ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมโดยใช้เทคนิค high density genotyping ได้รายงานการลดลงบริเวณ 1p36 ซึ่งเป็นตำแหน่งเดียวกับยีน ENO1 [111] ในขณะที่ CALM1 (Calmodulin 1) เป็นหนึ่งในสามยีนที่เป็น Calcium binding protein ที่มีลักษณะเหมือนกัน (Identical calcium binding protein) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการควบคุมของ Ion channels และการทำงานของ enzyme ที่เกี่ยวข้องกับแคลเซียม

นอกเหนือไปจากนี้ โปรตีนที่มีการแสดงออกผิดปกติไปอย่างมีนัยสำคัญเหล่านี้ที่เคยมีการรายงานความผิดปกติในการศึกษาอื่น ๆ ก่อนหน้านี้ โปรตีนหรือยีนที่มีการแสดงออกยังมีความเชื่อมโยงอย่างมากกับออทิซึมสเปกตรัมเช่นกัน

TUBB เป็นส่วนประกอบสำคัญของ Microtubules ที่แสดงออกอย่างมากในสมองที่กำลังพัฒนา การ mutations ของยีน TUBB นำไปสู่การเกิดความบกพร่องทางสติปัญญา (Cognitive impairment) ร่วมกับการทำงานที่บกพร่องไปในเซลล์ประสาทสั่งการ การพัฒนาทางด้านภาษาล่าช้า , การพัฒนาจิตประสาทล่าช้ารุนแรง (Severely delayed psychomotor development) ซึ่งมีความเกี่ยวข้องเป็นอย่างมากกับออทิซึมสเปกตรัม [112, 113] จากการศึกษาด้าน CNVs พบว่ายีน TUBB เคยมีการรายงานในออทิซึมสเปกตรัม [114] ซึ่งเป็นที่เป็นที่น่าสังเกตว่าการลดลงของโปรตีน TUBB พบได้ในกลุ่มย่อย G3 ที่มีความบกพร่องทางภาษาอย่างรุนแรง

นอกจากความเกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบประสาท โปรตีนที่แสดงออกผิดปกติไปอย่างมีนัยสำคัญหลายชนิดก็มีส่วนเกี่ยวข้องกับการทำงานของ Mitochondria และการผลิตพลังงาน (energy production) ซึ่งเคยมีการรายงานว่าความผิดปกติในออทิซึมสเปกตรัม (สามารถอ่านได้จาก Review ที่ [115, 116])

IDH2 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการออกซิเดชันของ Isocitrate เป็น 2-oxoglutarate IDH2 พบใน Mitochondria และมีบทบาทในการ Metabolism และกระบวนการสร้างพลังงาน (Energy production) ดังที่แสดงในภาพที่ 20 อย่างไรก็ตาม ในการศึกษานี้พบว่าทั้งระดับการแสดงออกของทรานสคริปโตมและโปรตีนของ IDH2 จะลดลงในออทิซึมสเปกตรัมที่มีความบกพร่องทางภาษาอย่างรุนแรง



รูปภาพที่ 20 แสดงการทำงานของ IDH2 ที่ พบใน mitochondria (แหล่งที่มาของภาพ: Hui Yang, et al., 2012)

โปรตีนอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของ Mitochondria ได้แก่ PGAM1, DLD, ENO1 และ COX5A

PGAM1 (Phosphoglycerate mutase 1) เป็นเอนไซม์ที่อยู่ใน Glycolytic pathway ซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยน 3-phosphoglycerate เป็น 2-phosphoglycerate นอกจากนี้เอนไซม์ PGAM1 ยังช่วยส่งเสริมการเกิดกระบวนการ Glycolysis และการผลิต ATP ผ่านวัฏจักร Tricarboxylic acid cycle (TCA cycle) และระบบลูกโซ่ของการขนส่งอิเล็กตรอน (Electron transport chain)

DLD ทำหน้าที่เป็น E3 เป็น subunit ของ mitochondrial multienzyme complexes 3 ชนิด ได้แก่ Pyruvate dehydrogenase (PDH), Alpha-ketoglutarate dehydrogenase (α -KGDH) และ Dehydrogenase 2-oxoacid branched chain (BCKDH)

COX5A เป็น Subunit ของ Cytochrome c oxidase complex หรือที่เรียกว่า Complex IV ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัวสุดท้ายในกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน (electron transport chain) การขาดเอนไซม์ COX ก่อให้เกิดโรค Cytochrome C oxidase deficiency ซึ่งเป็นภาวะที่สามารถก่อให้เกิดความเสียหายต่ออวัยวะได้หลายชนิดโดยเฉพาะอย่างยิ่งในสมอง

โปรตีนที่แสดงออกผิดปกติไปหลายชนิดมีบทบาทเกี่ยวข้องกับอ็อกซิซิสมสเปกตรัม ทั้งในส่วนของความเครียด, Oxidative stress, การอักเสบ และโครงสร้างของเซลล์

GSTP1 (Glutathione S-transferase) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มที่มีบทบาทสำคัญในการเป็นสารกำจัดพิษ (Detoxification) จากการศึกษาที่หลากหลายพบว่าความผิดปกติในการแสดงออกของ GSTP1 เป็นปัจจัยเสี่ยงสูงที่เกี่ยวข้องกับอ็อกซิซิสมสเปกตรัม จากการศึกษาความหลากหลายของยีนของครอบครัว (Family-based association studies of polymorphisms) ที่มีผู้ป่วยอ็อกซิซิสมสเปกตรัม GSTP1 เป็นหนึ่งในยีนที่แสดงออกแตกต่างจากกลุ่มควบคุม [117] ความหลากหลายของ GSTP1 จากการทดสอบ transmission disequilibrium testing (TDT) พบว่ามีผลกระทบต่อทารกในครรภ์ [118] จากการศึกษาทางด้าน CNV ในผู้ป่วยอ็อกซิซิสมสเปกตรัม พบ Whole gene duplication บริเวณ Chromosome 11 ในส่วนของ 11q13. [111] และจากการศึกษา SNPs ของผู้ป่วยอ็อกซิซิสมสเปกตรัมพบการเพิ่มขึ้นของบริเวณ 11q13.2 ในแม่ของผู้ป่วยและผู้ป่วย [119, 120]

ANXA5 (Annexin A5) และ Protein kinase C inhibitory protein เป็นโปรตีนที่จัดอยู่ในกลุ่มที่ควบคุมโดย Ca^{2+} channel และทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการการส่งต่อสัญญาณในเซลล์

(Cellular signal transduction), กระบวนการอักเสบ (Inflammation), การเจริญเติบโตและการพัฒนาของเซลล์ (Growth and differentiation)

CCT5 (T-complex protein 1 subunit epsilon) มีความเกี่ยวข้องกับการพับของโปรตีน (Protein folding) และการเมแทบอลิซึม การ Mutation ของ CCT5 ก่อให้เกิดโรค Autosomal recessive mutilating sensory neuropathy with spastic paraplegia ในมนุษย์ [121] ในการศึกษาผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมในด้าน CNV พบ De novo CNVs แบบ Loss บริเวณ 5p15.1-15.2 [122], บริเวณ 5p15.33-15.2 และ 5p15.31-15.2 [123], บริเวณ 5p15.2 [124] และบริเวณ 5p15.2-p15.33. [125]

CLTA (Clathrin light chain A) Clathrin เป็นโปรตีนที่มีบทบาทในการสร้าง Polyhedral coat สำหรับ Coated pits และ Vesicles ที่ใช้ในกระบวนการเอนโดไซโทซิส (Endocytosis) ในการศึกษาในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมด้าน CNV โดยใช้เทคนิค SNP microarray มีการรายงานพบบริเวณ 9p13.3 เพิ่มขึ้นเฉพาะในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม [126]

HNRNPA1 (40S ribosomal protein SA) เป็นโปรตีนในกลุ่ม Ribosomal ซึ่งเป็นการแสดงออกจายีน RPSA นอกจากนี้ยังทำหน้าที่เป็น Cell receptor บนผิวของเซลล์ เช่น Laminin HNRNPA1 มีส่วนเกี่ยวข้องในกระบวนการก่อให้เกิดโรคหลายอย่าง จากการตรวจพบ microarray ของ SNP ของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม พบว่ามีความผิดปกติที่บริเวณ 12q12-24.33 ซึ่งเคยมีการค้นพบว่ามีความผิดปกติในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม จากบริเวณดังกล่าวยังพบว่ามี ความเกี่ยวข้อง กับ CEP290 (Autosomal Recessive ของออทิซึมสเปกตรัม) และ PTPN11 (Autosomal dominant ของออทิซึมสเปกตรัม) ทั้งจาก CEP290 และ PTPN11 ได้รับการรายงานจากผลการศึกษาหลายเรื่องที่เกี่ยวข้องกับออทิซึมสเปกตรัม [122] จากการเชื่อมโยงทางพันธุกรรมของผู้ป่วย (Genetic linkage) ของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม ASDs โดยพิจารณาในผู้ป่วยที่ยังไม่ทราบสาเหตุแน่ชัดในปัจจุบัน (proband) กับทักษะการพูดที่ผิดปกติ (word speech delay) โดยเทคนิค Microsatellite-based genomic screen พบความผิดปกติบริเวณ 12q13.13 [127]

จากการวิเคราะห์แบบทรานสคริปโตม พบว่าการจำแนกผู้ป่วยเป็นกลุ่มย่อยตามลักษณะทางคลินิกของโรคช่วยให้สามารถเปรียบเทียบกลุ่มที่เฉพาะเจาะจง เช่นเดียวกับในการศึกษาก่อนหน้านี้เกี่ยวกับโรคที่ซับซ้อนซึ่งเคยได้จัดกลุ่มผู้ป่วยไว้ในกลุ่มย่อย อย่างไรก็ตามจำนวนผู้ป่วยที่มีอาการออทิซึมสเปกตรัมในการศึกษานี้ยังคงจำกัดในด้านจำนวนผู้ป่วย ซึ่งในอนาคตควรทำการเพิ่มจำนวน

ผู้ป่วยและดำเนินการทดลองทางคลินิกเพิ่มเติมเพื่อให้เข้าถึงผู้ป่วยได้ดียิ่งขึ้นในการวิจัย และเมื่อวิเคราะห์ข้อมูล Proteomic จากการวิเคราะห์ข้อมูลโปรตีโอมของการศึกษาก่อน ๆ พบว่าเมื่อมีการสืบค้นกลับไปยังมีปริมาณของการศึกษาทางด้านโปรตีโอมและโปรตีนของผู้ป่วยออทิสซึมสเปกตรัมที่ใช้ส่งตรวจที่มาจากมนุษย์เท่านั้นจำนวนจำกัด โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อจำกัดการศึกษาเพียงในกลุ่มเนื้อเยื่อของผู้ป่วย (peripheral tissue) เช่น Serum, Plasma, Neonatal blood spot เป็นต้น ซึ่งส่งตรวจในกลุ่มนี้เป็นส่วนที่ง่ายต่อการเก็บส่งตรวจ, ไม่มีการปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อมภายนอก เนื่องจากเป็น Sterile site และน่าจะมีความสัมพันธ์ต่อการเป็นเป้าหมายสำหรับการสร้างเป็น Biomarker ในเลือดได้เหมาะสมมากที่สุด อย่างไรก็ตาม เนื้อเยื่ออื่น ๆ จากผู้ป่วย เช่น น้ำลาย, น้ำปัสสาวะ และตัวอย่างเลือดหลังการชันสูตรควรได้รับการตรวจสอบเพิ่มเติมในอนาคต



รายการอ้างอิง

1. American Psychiatric Association: **Diagnostic and statistical manual of mental disorders**, vol. V. Washington, DC; 2013.
2. DiCicco-Bloom E, Lord C, Zwaigenbaum L, Courchesne E, Dager SR, Schmitz C, Schultz RT, Crawley J, Young LJ: **The developmental neurobiology of autism spectrum disorder**. *J Neurosci* 2006, 26(26):6897-6906.
3. Dumont-Mathieu T, Fein D: **Screening for autism in young children: The Modified Checklist for Autism in Toddlers (M-CHAT) and other measures**. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2005, 11(3):253-262.
4. Kleinman JM, Robins DL, Ventola PE, Pandey J, Boorstein HC, Esser EL, Wilson LB, Rosenthal MA, Sutera S, Verbalis AD *et al*: **The Modified Checklist for Autism in Toddlers: A Follow-up Study Investigating the Early Detection of Autism Spectrum Disorders**. *Journal of autism and developmental disorders* 2008, 38(5):827-839.
5. Wang L, Mandell DS, Lawer L, Cidav Z, Leslie DL: **Healthcare Service Use and Costs for Autism Spectrum Disorder: A Comparison Between Medicaid and Private Insurance**. *Journal of autism and developmental disorders* 2013, 43(5):1057-1064.
6. Rice C: **Prevalence of Autism Spectrum Disorders: Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, United States, 2006. Morbidity and Mortality Weekly Report. Surveillance Summaries. Volume 58, Number SS-10. Centers for Disease Control and Prevention 2009.**
7. Baio J: **Prevalence of Autism Spectrum Disorders: Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 14 Sites, United States, 2008. Morbidity and Mortality Weekly Report. Surveillance Summaries. Volume 61, Number 3. Centers for Disease Control and Prevention 2012.**
8. Developmental Disabilities Monitoring Network Surveillance Year, Investigators P: **Prevalence of autism spectrum disorder among children aged 8 years- autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, United States, 2010. Morbidity and mortality weekly report Surveillance summaries (Washington, DC: 2002) 2014, 63(2):1.**
9. Christensen DL, Baio J, Braun KV, Bilder D, Charles J, Constantino JN, Daniels J, Durkin MS, Fitzgerald RT, Kurzius-Spencer M *et al*: **Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8**

- Years - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2012. *MMWR Surveill Summ* 2016, 65(3):1-23.
10. Plubrukarn R, Piyasil V, Moungnoi P, Tanprasert S, Chutchawalitsakul V: **Trend study of autistic spectrum disorders at Queen Sirikit National Institute of Child Health.** *J Med Assoc Thai* 2005, 88(7):891-897.
 11. Hansakunachai T, Roongpraiwan R, Sombuntham T, Limprasert P, Ruangdaraganon N: **A new structured interview for children with autism spectrum disorder based on the DSM-IV.** *J Med Assoc Thai* 2014, 97 Suppl 8:S7-14.
 12. Al-Ayadhi L, Halepoto DM: **Role of proteomics in the discovery of autism biomarkers.** *J Coll Physicians Surg Pak* 2013, 23(2):137-143.
 13. Rogers SJ: **Empirically supported comprehensive treatments for young children with autism.** *J Clin Child Psychol* 1998, 27(2):168-179.
 14. McEachin JJ, Smith T, Lovaas OI: **Long-term outcome for children with autism who received early intensive behavioral treatment.** *Am J Ment Retard* 1993, 97(4):359-372; discussion 373-391.
 15. Folstein S, Rutter M: **INFANTILE AUTISM: A GENETIC STUDY OF 21 TWIN PAIRS.** *Journal of Child Psychology and Psychiatry* 1977, 18(4):297-321.
 16. Steffenburg S, Gillberg C, Hellgren L, Andersson L, Gillberg IC, Jakobsson G, Bohman M: **A twin study of autism in Denmark, Finland, Iceland, Norway and Sweden.** *J Child Psychol Psychiatry* 1989, 30(3):405-416.
 17. Bailey A, Le Couteur A, Gottesman I, Bolton P, Simonoff E, Yuzda E, Rutter M: **Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study.** *Psychol Med* 1995, 25(1):63-77.
 18. Bailey A, Palferman S, Heavey L, Le Couteur A: **Autism: the phenotype in relatives.** *J Autism Dev Disord* 1998, 28(5):369-392.
 19. Weiss LA, Arking DE, The Gene Discovery Project of Johns Hopkins the Autism C: **A GENOME-WIDE LINKAGE AND ASSOCIATION SCAN REVEALS NOVEL LOCI FOR AUTISM.** *Nature* 2009, 461(7265):802-808.
 20. Ma DQ, Salyakina D, Jaworski JM, Konidari I, Whitehead PL, Andersen AN, Hoffman JD, Slifer SH, Hedges DJ, Cukier HN *et al*: **A genome-wide association study of autism reveals a common novel risk locus at 5p14.1.** *Annals of human genetics* 2009, 73(Pt 3):263-273.
 21. Ronald A, Butcher LM, Docherty S, Davis OSP, Schalkwyk LC, Craig IW, Plomin R: **A Genome-Wide Association Study of Social and Non-Social Autistic-Like Traits in the General Population Using Pooled DNA, 500 K SNP**

- Microarrays and Both Community and Diagnosed Autism Replication Samples.** *Behavior Genetics* 2010, 40(1):31-45.
22. Cannon DS, Miller JS, Robison RJ, Villalobos ME, Wahmhoff NK, Allen-Brady K, McMahon WM, Coon H: **Genome-wide linkage analyses of two repetitive behavior phenotypes in Utah pedigrees with autism spectrum disorders.** *Molecular Autism* 2010, 1:3-3.
 23. Werling DM, Lowe JK, Luo R, Cantor RM, Geschwind DH: **Replication of linkage at chromosome 20p13 and identification of suggestive sex-differential risk loci for autism spectrum disorder.** *Molecular Autism* 2014, 5:13-13.
 24. Chow ML, Pramparo T, Winn ME, Barnes CC, Li H-R, Weiss L, Fan J-B, Murray S, April C, Belinson H *et al*: **Age-Dependent Brain Gene Expression and Copy Number Anomalies in Autism Suggest Distinct Pathological Processes at Young Versus Mature Ages.** *PLoS Genetics* 2012, 8(3):e1002592.
 25. Gu F, Chauhan V, Kaur K, Brown WT, LaFauci G, Wegiel J, Chauhan A: **Alterations in mitochondrial DNA copy number and the activities of electron transport chain complexes and pyruvate dehydrogenase in the frontal cortex from subjects with autism.** *Translational Psychiatry* 2013, 3(9):e299.
 26. Girirajan S, Johnson RL, Tassone F, Balciuniene J, Katiyar N, Fox K, Baker C, Srikanth A, Yeoh KH, Khoo SJ *et al*: **Global increases in both common and rare copy number load associated with autism.** *Human Molecular Genetics* 2013, 22(14):2870-2880.
 27. Dhillon S, Hellings JA, Butler MG: **Genetics and mitochondrial abnormalities in autism spectrum disorders: a review.** *Curr Genomics* 2011, 12(5):322-332.
 28. Nardone S, Sams DS, Zito A, Reuveni E, Elliott E: **Dysregulation of Cortical Neuron DNA Methylation Profile in Autism Spectrum Disorder.** *Cereb Cortex* 2017, 27(12):5739-5754.
 29. Andrews SV, Ellis SE, Bakulski KM, Sheppard B, Croen LA, Hertz-Picciotto I, Newschaffer CJ, Feinberg AP, Arking DE, Ladd-Acosta C *et al*: **Cross-tissue integration of genetic and epigenetic data offers insight into autism spectrum disorder.** *Nat Commun* 2017, 8(1):1011.
 30. Sharp GC, Salas LA, Monnereau C, Allard C, Yousefi P, Everson TM, Bohlin J, Xu Z, Huang RC, Reese SE *et al*: **Maternal BMI at the start of pregnancy and offspring epigenome-wide DNA methylation: findings from the pregnancy**

- and childhood epigenetics (PACE) consortium. *Hum Mol Genet* 2017, 26(20):4067-4085.
31. Sun W, Poschmann J, Cruz-Herrera Del Rosario R, Parikshak NN, Hajan HS, Kumar V, Ramasamy R, Belgard TG, Elanggovan B, Wong CCY *et al*: **Histone Acetylome-wide Association Study of Autism Spectrum Disorder**. *Cell* 2016, 167(5):1385-1397.e1311.
 32. De Rubeis S, He X, Goldberg AP, Poultney CS, Samocha K, Cicek AE, Kou Y, Liu L, Fromer M, Walker S *et al*: **Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism**. *Nature* 2014, 515(7526):209-215.
 33. Zhao X, Pak C, Smrt RD, Jin P: **Epigenetics and Neural developmental disorders: Washington DC, September 18 and 19, 2006**. *Epigenetics* 2007, 2(2):126-134.
 34. Rahbar MH, Swingle HM, Christian MA, Hessabi M, Lee M, Pitcher MR, Campbell S, Mitchell A, Krone R, Loveland KA *et al*: **Environmental Exposure to Dioxins, Dibenzofurans, Bisphenol A, and Phthalates in Children with and without Autism Spectrum Disorder Living near the Gulf of Mexico**. *Int J Environ Res Public Health* 2017, 14(11).
 35. Ye BS, Leung AOW, Wong MH: **The association of environmental toxicants and autism spectrum disorders in children**. *Environ Pollut* 2017, 227:234-242.
 36. Kondolot M, Ozmert EN, Asci A, Erkekoglu P, Oztop DB, Gumus H, Kocer-Gumusel B, Yurdakok K: **Plasma phthalate and bisphenol a levels and oxidant-antioxidant status in autistic children**. *Environ Toxicol Pharmacol* 2016, 43:149-158.
 37. Kerin T, Volk H, Li W, Lurmann F, Eckel S, McConnell R, Hertz-Picciotto I: **Association Between Air Pollution Exposure, Cognitive and Adaptive Function, and ASD Severity Among Children with Autism Spectrum Disorder**. *J Autism Dev Disord* 2018, 48(1):137-150.
 38. Goodrich AJ, Volk HE, Tancredi DJ, McConnell R, Lurmann FW, Hansen RL, Schmidt RJ: **Joint effects of prenatal air pollutant exposure and maternal folic acid supplementation on risk of autism spectrum disorder**. *Autism Res* 2017.
 39. Han Y, Cheung M-c, Sze S, Chan A: **Altered Immune Function Associated with Neurophysiological Abnormalities and Executive Function Deficits in Children with Autism**. In: *Comprehensive Guide to Autism*. Edited by Patel VB, Preedy VR, Martin CR: Springer New York; 2014: 1611-1625.

40. Grafodatskaya D, Chung B, Szatmari P, Weksberg R: **Autism spectrum disorders and epigenetics.** *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2010, 49(8):794-809.
41. Harley KG, Gunier RB, Kogut K, Johnson C, Bradman A, Calafat AM, Eskenazi B: **Prenatal and Early Childhood Bisphenol A Concentrations and Behavior in School-Aged Children.** *Environmental research* 2013, 126:43-50.
42. Elsworth JD, Jentsch JD, VandeVoort CA, Roth RH, Redmond DE, Leranath C: **Prenatal exposure to bisphenol A impacts midbrain dopamine neurons and hippocampal spine synapses in non-human primates.** *Neurotoxicology* 2013, 35:113-120.
43. Landrigan PJ, Lambertini L, Birnbaum LS: **A Research Strategy to Discover the Environmental Causes of Autism and Neurodevelopmental Disabilities.** *Environmental Health Perspectives* 2012, 120(7):a258-a260.
44. Becerra TA, Wilhelm M, Olsen J, Cockburn M, Ritz B: **Ambient Air Pollution and Autism in Los Angeles County, California.** *Environmental Health Perspectives* 2013, 121(3):380-386.
45. Sarachana T, Zhou R, Chen G, Manji HK, Hu VW: **Investigation of post-transcriptional gene regulatory networks associated with autism spectrum disorders by microRNA expression profiling of lymphoblastoid cell lines.** *Genome Medicine* 2010, 2(4):23-23.
46. Tsai LY, Ghaziuddin M: **DSM-5 ASD moves forward into the past.** *J Autism Dev Disord* 2014, 44(2):321-330.
47. Becerra TA, von Ehrenstein OS, Heck JE, Olsen J, Arah OA, Jeste SS, Rodriguez M, Ritz B: **Autism spectrum disorders and race, ethnicity, and nativity: a population-based study.** *Pediatrics* 2014, 134(1):e63-71.
48. Brugha T, Cooper SA, McManus S, Purdon S, Smith J, Scott FJ, Spiers N, Tyrer F: **Estimating the Prevalence of Autism Spectrum Conditions in Adults: Extending the 2007 Adult Psychiatric.** 2012.
49. Gomes PT, Lima LH, Bueno MK, Araujo LA, Souza NM: **Autism in Brazil: a systematic review of family challenges and coping strategies.** *J Pediatr (Rio J)* 2015, 91(2):111-121.
50. Sun X, Allison C, Matthews FE, Sharp SJ, Auyeung B, Baron-Cohen S, Brayne C: **Prevalence of autism in mainland China, Hong Kong and Taiwan: a systematic review and meta-analysis.** *Mol Autism* 2013, 4(1):7.
51. Sriwanna P, Wipakorn S, Somkuan H, Uraiwan Y: **Holistic care for Thai autism.** *Journal Mental Health Thailand* 2005.

52. Duangdara S, Orawan L, Chawanun C, Chatree W: **Prevalence of pervasive developmental disorders in preschool children in Chiang Mai.** *Chiang Mai Med Bull* 2005, 44(1):29-34.
53. Courchesne E, Campbell K, Solso S: **Brain growth across the life span in autism: age-specific changes in anatomical pathology.** *Brain Res* 2011, 1380:138-145.
54. Hazlett HC, Poe MD, Gerig G, Styner M, Chappell C, Smith RG, Vachet C, Piven J: **Early brain overgrowth in autism associated with an increase in cortical surface area before age 2 years.** *Arch Gen Psychiatry* 2011, 68(5):467-476.
55. Stanfield AC, McIntosh AM, Spencer MD, Philip R, Gaur S, Lawrie SM: **Towards a neuroanatomy of autism: a systematic review and meta-analysis of structural magnetic resonance imaging studies.** *Eur Psychiatry* 2008, 23(4):289-299.
56. Chen R, Jiao Y, Herskovits EH: **Structural MRI in autism spectrum disorder.** *Pediatr Res* 2011, 69(5 Pt 2):63r-68r.
57. Brambilla P, Hardan A, di Nemi SU, Perez J, Soares JC, Barale F: **Brain anatomy and development in autism: review of structural MRI studies.** *Brain Res Bull* 2003, 61(6):557-569.
58. Corrigan NM, Shaw DW, Estes AM, Richards TL, Munson J, Friedman SD, Dawson G, Artru AA, Dager SR: **Atypical developmental patterns of brain chemistry in children with autism spectrum disorder.** *JAMA Psychiatry* 2013, 70(9):964-974.
59. Sahin M, Sur M: **Genes, circuits, and precision therapies for autism and related neurodevelopmental disorders.** *Science (New York, NY)* 2015, 350(6263).
60. Fatemi SH, Aldinger KA, Ashwood P, Bauman ML, Blaha CD, Blatt GJ, Chauhan A, Chauhan V, Dager SR, Dickson PE *et al*: **Consensus Paper: Pathological Role of the Cerebellum in Autism.** *Cerebellum (London, England)* 2012, 11(3):777-807.
61. Rosenberg RE, Law JK, Yenokyan G, McGready J, Kaufmann WE, Law PA: **Characteristics and concordance of autism spectrum disorders among 277 twin pairs.** *Arch Pediatr Adolesc Med* 2009, 163(10):907-914.
62. Hallmayer J, Cleveland S, Torres A, Phillips J, Cohen B, Torigoe T, Miller J, Fedele A, Collins J, Smith K *et al*: **Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism.** *Arch Gen Psychiatry* 2011, 68(11):1095-1102.

63. Schaaf Christian P, Zoghbi Huda Y: **Solving the Autism Puzzle a Few Pieces at a Time.** *Neuron* 2011, 70(5):806-808.
64. Han MH, Hwang SI, Roy DB, Lundgren DH, Price JV, Ousman SS, Fernald GH, Gerlitz B, Robinson WH, Baranzini SE *et al*: **Proteomic analysis of active multiple sclerosis lesions reveals therapeutic targets.** *Nature* 2008, 451(7182):1076-1081.
65. McGregor E, Dunn MJ: **Proteomics of the heart: unraveling disease.** *Circ Res* 2006, 98(3):309-321.
66. Shen C, Zhao XL, Ju W, Zou XB, Huo LR, Yan W, Zou JH, Yan GD, Jenkins EC, Brown WT *et al*: **A proteomic investigation of B lymphocytes in an autistic family: a pilot study of exposure to natural rubber latex (NRL) may lead to autism.** *J Mol Neurosci* 2011, 43(3):443-452.
67. Altelaar AF, Munoz J, Heck AJ: **Next-generation proteomics: towards an integrative view of proteome dynamics.** *Nat Rev Genet* 2013, 14(1):35-48.
68. Ngounou Wetie AG, Wormwood K, Thome J, Dudley E, Taurines R, Gerlach M, Woods AG, Darie CC: **A pilot proteomic study of protein markers in autism spectrum disorder.** *Electrophoresis* 2014, 35(14):2046-2054.
69. Ngounou Wetie AG, Wormwood KL, Russell S, Ryan JP, Darie CC, Woods AG: **A Pilot Proteomic Analysis of Salivary Biomarkers in Autism Spectrum Disorder.** *Autism Res* 2015, 8(3):338-350.
70. Neitzel H: **A routine method for the establishment of permanent growing lymphoblastoid cell lines.** *Hum Genet* 1986, 73(4):320-326.
71. Toneff T, Mende-Mueller L, Wu Y, Hwang SR, Bunday R, Thompson LM, Chesselet MF, Hook V: **Comparison of huntingtin proteolytic fragments in human lymphoblast cell lines and human brain.** *J Neurochem* 2002, 82(1):84-92.
72. Amoli MM, Carthy D, Platt H, Ollier WE: **EBV Immortalization of human B lymphocytes separated from small volumes of cryo-preserved whole blood.** *Int J Epidemiol* 2008, 37 Suppl 1:i41-45.
73. Hussain T, Mulherkar R: **Lymphoblastoid Cell lines: a Continuous in Vitro Source of Cells to Study Carcinogen Sensitivity and DNA Repair.** *International Journal of Molecular and Cellular Medicine* 2012, 1(2):75-87.
74. Mohyuddin A, Ayub Q, Siddiqi S, Carvalho-Silva DR, Mazhar K, Rehman S, Firasat S, Dar A, Tyler-Smith C, Mehdi SQ: **Genetic instability in EBV-transformed lymphoblastoid cell lines.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 2004, 1670(1):81-83.

75. Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Rapp BA, Wheeler DL: **GenBank**. *Nucleic Acids Res* 2000, 28(1):15-18.
76. Bairoch A, Apweiler R: **The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000**. *Nucleic Acids Res* 2000, 28(1):45-48.
77. Luscombe NM, Greenbaum D, Gerstein M: **What is bioinformatics? A proposed definition and overview of the field**. *Methods Inf Med* 2001, 40(4):346-358.
78. Longo G, Montévil M: **Perspectives on Organisms**: Springer; 2014.
79. Bu Z, Callaway DJE: **Chapter 5 - Proteins MOVE! Protein dynamics and long-range allostery in cell signaling**. In: *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. Edited by Donev R, vol. 83: Academic Press; 2011: 163-221.
80. Westerhoff HV, Palsson BO: **The evolution of molecular biology into systems biology**. *Nature biotechnology* 2004, 22(10):1249-1252.
81. Kitano H: **Systems biology: a brief overview**. *Science (New York, NY)* 2002, 295(5560):1662-1664.
82. Kobeissy FH, Sadasivan S, Liu J, Gold MS, Wang KK: **Psychiatric research: psychoproteomics, degradomics and systems biology**. *Expert review of proteomics* 2008, 5(2):293-314.
83. Robeva R: **Systems biology - old concepts, new science, new challenges**. *Frontiers in psychiatry* 2010, 1:1.
84. Hu VW, Sarachana T, Kim KS, Nguyen A, Kulkarni S, Steinberg ME, Luu T, Lai Y, Lee NH: **Gene Expression Profiling Differentiates Autism Case–Controls and Phenotypic Variants of Autism Spectrum Disorders: Evidence for Circadian Rhythm Dysfunction in Severe Autism**. *Autism research : official journal of the International Society for Autism Research* 2009, 2(2):78-97.
85. Hu VW, Steinberg ME: **Novel clustering of items from the Autism Diagnostic Interview-Revised to define phenotypes within autism spectrum disorders**. *Autism research : official journal of the International Society for Autism Research* 2009, 2(2):67-77.
86. Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, Braisted J, Klapa M, Currier T, Thiagarajan M *et al*: **TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis**. *Biotechniques* 2003, 34(2):374-378.
87. Corbett BA, Kantor AB, Schulman H, Walker WL, Lit L, Ashwood P, Rocke DM, Sharp FR: **A proteomic study of serum from children with autism showing**

- differential expression of apolipoproteins and complement proteins. *Mol Psychiatry* 2007, 12(3):292-306.
88. Castagnola M, Messana I, Inzitari R, Fanali C, Cabras T, Morelli A, Pecoraro AM, Neri G, Torrioli MG, Gurrieri F: **Hypo-phosphorylation of salivary peptidome as a clue to the molecular pathogenesis of autism spectrum disorders.** *J Proteome Res* 2008, 7(12):5327-5332.
89. Al-Ayadhi LY, Mostafa GA: **A lack of association between elevated serum levels of S100B protein and autoimmunity in autistic children.** *J Neuroinflammation* 2012, 9:54.
90. Ramsey JM, Guest PC, Broek JA, Glennon JC, Rommelse N, Franke B, Rahmoune H, Buitelaar JK, Bahn S: **Identification of an age-dependent biomarker signature in children and adolescents with autism spectrum disorders.** *Mol Autism* 2013, 4(1):27.
91. Zerbo O, Yoshida C, Grether JK, Van de Water J, Ashwood P, Delorenze GN, Hansen RL, Kharrazi M, Croen LA: **Neonatal cytokines and chemokines and risk of Autism Spectrum Disorder: the Early Markers for Autism (EMA) study: a case-control study.** *J Neuroinflammation* 2014, 11:113.
92. Broek JA, Guest PC, Rahmoune H, Bahn S: **Proteomic analysis of post mortem brain tissue from autism patients: evidence for opposite changes in prefrontal cortex and cerebellum in synaptic connectivity-related proteins.** *Mol Autism* 2014, 5:41.
93. Bashir S, Halepoto DM, Al-Ayadhi L: **Serum level of desert hedgehog protein in autism spectrum disorder: preliminary results.** *Med Princ Pract* 2014, 23(1):14-17.
94. Ngounou Wetie AG, Wormwood KL, Charette L, Ryan JP, Woods AG, Darie CC: **Comparative two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of the salivary proteome of children with autism spectrum disorder.** *J Cell Mol Med* 2015, 19(11):2664-2678.
95. Krakowiak P, Goines PE, Tancredi DJ, Ashwood P, Hansen RL, Hertz-Picciotto I, Van de Water J: **Neonatal Cytokine Profiles Associated with Autism Spectrum Disorder.** *Biol Psychiatry* 2015.
96. Yang L, Rudser K: **Urine Protein Biomarker Candidates for Autism**, vol. s14; 2016.
97. Cortelazzo A, De Felice C, Guerranti R, Signorini C, Leoncini S, Zollo G, Leoncini R, Timperio AM, Zolla L, Ciccoli L *et al*: **Expression and oxidative modifications of plasma proteins in autism spectrum disorders: Interplay**

- between inflammatory response and lipid peroxidation. *Proteomics Clin Appl* 2016, 10(11):1103-1112.
98. Feng C, Chen Y, Pan J, Yang A, Niu L, Min J, Meng X, Liao L, Zhang K, Shen L: **Redox proteomic identification of carbonylated proteins in autism plasma: insight into oxidative stress and its related biomarkers in autism.** *Clin Proteomics* 2017, 14:2.
99. Shen L, Zhang K, Feng C, Chen Y, Li S, Iqbal J, Liao L, Zhao Y, Zhai J: **iTRAQ-Based Proteomic Analysis Reveals Protein Profile in Plasma from Children with Autism.** *Proteomics Clin Appl* 2017.
100. Chauhan A, Chauhan V: **Oxidative stress in autism.** *Pathophysiology* 2006, 13(3):171-181.
101. Vuong HE, Hsiao EY: **Emerging Roles for the Gut Microbiome in Autism Spectrum Disorder.** *Biol Psychiatry* 2017, 81(5):411-423.
102. Guidotti A, Forchetti CM, Corda MG, Konkel D, Bennett CD, Costa E: **Isolation, characterization, and purification to homogeneity of an endogenous polypeptide with agonistic action on benzodiazepine receptors.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1983, 80(11):3531-3535.
103. Alho H, Fremeau RT, Tiedge H, Wilcox J, Bovolin P, Brosius J, Roberts JL, Costa E: **Diazepam binding inhibitor gene expression: location in brain and peripheral tissues of rat.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1988, 85(18):7018-7022.
104. Ujjainwala AL, Courtney CD, Rhoads SG, Rhodes JS, Christian CA: **Genetic loss of diazepam binding inhibitor in mice impairs social interest.** *Genes Brain Behav* 2017.
105. Siiskonen H, Oikari S, Korhonen VP, Pitkanen A, Voikar V, Kettunen M, Hakumaki J, Wahlfors T, Pussinen R, Penttonen M *et al*: **Diazepam binding inhibitor overexpression in mice causes hydrocephalus, decreases plasticity in excitatory synapses and impairs hippocampus-dependent learning.** *Mol Cell Neurosci* 2007, 34(2):199-208.
106. Mori K, Emoto M, Inaba M: **Fetuin-A: a multifunctional protein.** *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov* 2011, 5(2):124-146.
107. Elsas J, Sellhaus B, Herrmann M, Kinkeldey A, Weis J, Jahnen-Dechent W, Hausler M: **Fetuin-a in the developing brain.** *Dev Neurobiol* 2013, 73(5):354-369.

108. Bremer A, Giacobini M, Eriksson M, Gustavsson P, Nordin V, Fernell E, Gillberg C, Nordgren A, Uppstromer A, Anderlid BM *et al*: **Copy number variation characteristics in subpopulations of patients with autism spectrum disorders.** *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2011, 156(2):115-124.
109. Jacquemont ML, Sanlaville D, Redon R, Raoul O, Cormier-Daire V, Lyonnet S, Amiel J, Le Merrer M, Heron D, de Blois MC *et al*: **Array-based comparative genomic hybridisation identifies high frequency of cryptic chromosomal rearrangements in patients with syndromic autism spectrum disorders.** *J Med Genet* 2006, 43(11):843-849.
110. Allen-Brady K, Miller J, Matsunami N, Stevens J, Block H, Farley M, Krasny L, Pingree C, Lainhart J, Leppert M *et al*: **A high-density SNP genome-wide linkage scan in a large autism extended pedigree.** *Mol Psychiatry* 2009, 14(6):590-600.
111. Bucan M, Abrahams BS, Wang K, Glessner JT, Herman EI, Sonnenblick LI, Alvarez Retuerto AI, Imielinski M, Hadley D, Bradfield JP *et al*: **Genome-wide analyses of exonic copy number variants in a family-based study point to novel autism susceptibility genes.** *PLoS Genet* 2009, 5(6):e1000536.
112. Breuss M, Heng JI, Poirier K, Tian G, Jaglin XH, Qu Z, Braun A, Gstrein T, Ngo L, Haas M *et al*: **Mutations in the beta-tubulin gene TUBB5 cause microcephaly with structural brain abnormalities.** *Cell Rep* 2012, 2(6):1554-1562.
113. Barbara M, Anna Livia L, Grazia G, Paolo C: **Autism and Metabolic Diseases.** *Journal of Child Neurology* 2008, 23(3):307-314.
114. Berkel S, Marshall CR, Weiss B, Howe J, Roeth R, Moog U, Endris V, Roberts W, Szatmari P, Pinto D *et al*: **Mutations in the SHANK2 synaptic scaffolding gene in autism spectrum disorder and mental retardation.** *Nat Genet* 2010, 42(6):489-491.
115. Rossignol DA, Frye RE: **Mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorders: a systematic review and meta-analysis.** *Mol Psychiatry* 2012, 17(3):290-314.
116. Hollis F, Kanellopoulos AK, Bagni C: **Mitochondrial dysfunction in Autism Spectrum Disorder: clinical features and perspectives.** *Curr Opin Neurobiol* 2017, 45:178-187.
117. Serajee FJ, Nabi R, Zhong H, Huq M: **Polymorphisms in xenobiotic metabolism genes and autism.** *J Child Neurol* 2004, 19(6):413-417.
118. Williams TA, Mars AE, Buyske SG, Stenroos ES, Wang R, Fatura-Santiago MF, Lambert GH, Johnson WG: **Risk of autistic disorder in affected offspring of**

- mothers with a glutathione S-transferase P1 haplotype. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2007, 161(4):356-361.
119. Pinto D, Pagnamenta AT, Klei L, Anney R, Merico D, Regan R, Conroy J, Magalhaes TR, Correia C, Abrahams BS *et al*: **Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders.** *Nature* 2010, 466(7304):368-372.
 120. Gai X, Xie HM, Perin JC, Takahashi N, Murphy K, Wenocur AS, D'Arcy M, O'Hara RJ, Goldmuntz E, Grice DE *et al*: **Rare structural variation of synapse and neurotransmission genes in autism.** *Mol Psychiatry* 2012, 17(4):402-411.
 121. Bouhouche A, Benomar A, Bouslam N, Chkili T, Yahyaoui M: **Mutation in the epsilon subunit of the cytosolic chaperonin-containing t-complex peptide-1 (Cct5) gene causes autosomal recessive mutilating sensory neuropathy with spastic paraplegia.** *J Med Genet* 2006, 43(5):441-443.
 122. Szatmari P, Paterson AD, Zwaigenbaum L, Roberts W, Brian J, Liu XQ, Vincent JB, Skaug JL, Thompson AP, Senman L *et al*: **Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements.** *Nat Genet* 2007, 39(3):319-328.
 123. Marshall CR, Noor A, Vincent JB, Lionel AC, Feuk L, Skaug J, Shago M, Moessner R, Pinto D, Ren Y *et al*: **Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder.** *Am J Hum Genet* 2008, 82(2):477-488.
 124. Harvard C, Malenfant P, Koochek M, Creighton S, Mickelson EC, Holden JJ, Lewis ME, Rajcan-Separovic E: **A variant Cri du Chat phenotype and autism spectrum disorder in a subject with de novo cryptic microdeletions involving 5p15.2 and 3p24.3-25 detected using whole genomic array CGH.** *Clin Genet* 2005, 67(4):341-351.
 125. Sanders SJ, Ercan-Sencicek AG, Hus V, Luo R, Murtha MT, Moreno-De-Luca D, Chu SH, Moreau MP, Gupta AR, Thomson SA *et al*: **Multiple recurrent de novo CNVs, including duplications of the 7q11.23 Williams syndrome region, are strongly associated with autism.** *Neuron* 2011, 70(5):863-885.
 126. van der Zwaag B, Franke L, Poot M, Hochstenbach R, Spierenburg HA, Vorstman JA, van Daalen E, de Jonge MV, Verbeek NE, Brilstra EH *et al*: **Gene-network analysis identifies susceptibility genes related to glycobiology in autism.** *PLoS One* 2009, 4(5):e5324.
 127. Spence SJ, Cantor RM, Chung L, Kim S, Geschwind DH, Alarcon M: **Stratification based on language-related endophenotypes in autism:**

attempt to replicate reported linkage. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2006, 141b(6):591-598.





ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก 1

ข้อมูลรายละเอียดงานวิจัยย้อนหลังแสดงรายชื่อโปรตีนที่มีที่มีการแสดงออกผิดปกติอย่างมีนัยสำคัญที่ค้นพบและเทคนิคการวิเคราะห์ที่ใช้ในแต่ละงานวิจัยทั้ง 16 งานวิจัย

ตารางภาคผนวกที่ 1 แสดงรายละเอียดงานวิจัยจากงานวิจัยเรื่อง A proteomic study of serum from children with autism showing differential expression of apolipoproteins and complement proteins โดย BA Corbett และคณะ [87]

A proteomic study of serum from children with autism showing differential expression of apolipoproteins and complement proteins

BA Corbett^{1,2}, AB Kantor³, H Schulman³, WL Walker^{2,4}, L Lit^{2,4}, P Ashwood^{2,5}, DM Rocke⁶ and FR Sharp^{2,4}

Publish	2007
Method	LC-ESI-MS on time-of-flight (TOF)
Specimen	Serum from ASD children and typically developing children
ชื่อโปรตีน	Symbol
Apolipoprotein B-100 precursor	LPHUB
Complement factor H-related protein 1 precursor (FHR-1)	Q03591
Complement C1q subcomponent, C chain precursor	P02747
Fibronectin 1 isoform 1 preproprotein; cold-insoluble globulin	NP_002017.1
Apolipoprotein A-IV precursor	NP_000473.1

ตารางภาคผนวกที่ 2 แสดงรายละเอียดงานวิจัยจากงานวิจัยเรื่อง Hypo-Phosphorylation of Salivary Peptidome as a Clue to the Molecular Pathogenesis of Autism Spectrum Disorders โดย Massimo Castagnola และคณะ [88]

Hypo-Phosphorylation of Salivary Peptidome as a Clue to the Molecular Pathogenesis of Autism Spectrum Disorders

Massimo Castagnola,^{*,†,‡} Irene Messina,[‡] Rosanna Inzitari,^{†,‡} Chiara Fanali,^{†,‡} Tiziana Cabras,[‡] Alessandra Morelli,[§] Anna Maria Pecoraro,[§] Giovanni Neri,[¶] Maria Giulia Torrioli,[§] and Fiorella Gurrieri^{*}

Publish	2008
Method	HPLC-ESI-IT-MS
Specimen	Human saliva
ชื่อโปรตีน	Symbol
Statherin	STATH
Histatin 1	HTN1
PRP-1	PRH1
PRP-2	PRH2
PIF-s	PRH1
PRP-3	PRPF3
PRP-4	PRPF4
PIF-f	PRH1

ตารางภาคผนวกที่ 3 แสดงรายละเอียดงานวิจัยจากงานวิจัยเรื่อง A Proteomic Investigation of B Lymphocytes in an Autistic Family: A Pilot Study of Exposure to Natural Rubber Latex (NRL) May Lead to Autism โดย Chen Shen และคณะ [66]

A Proteomic Investigation of B Lymphocytes in an Autistic Family: A Pilot Study of Exposure to Natural Rubber Latex (NRL) May Lead to Autism

Chen Shen • Xin-liang Zhao • Weina Ju •
Xiao-bing Zou • Li-rong Huo • Wu Yan • Jun-hua Zou •
Guo-di Yan • Edmund C. Jenkins • W. Ted Brown •
Nanbert Zhong

Publish	2011
Method	Antibody Microarray Express 500 Kits Western Blot Analysis
Specimen	Peripheral blood obtained from three autistic children and three non-autistic siblings in the same family
ชื่อโปรตีน	Symbol
IKK α	IKK α
CDC27	CDC27
CDC37	CDC37
FKBP10	FKBP10
FKBP1A	FKBP1A
MAP2K5	MAP2K5
MAP4	MAP4
EIF4G1	EIF4G1
PRKC1	PRKC1
TYK2	TYK2
PPP1R2	PPP1R2
PPP5C	PPP5C
PRKCQ	PRKCQ

ชื่อโปรตีน	Symbol
PRKCD	PRKCD



ตารางภาคผนวกที่ 4 แสดงรายละเอียดงานวิจัยจากงานวิจัยเรื่อง A lack of association between elevated serum levels of S100B protein and autoimmunity in autistic children โดย Laila Yousef Al-Ayadhi และ Gehan Ahmed Mostafa [89]

A lack of association between elevated serum levels of S100B protein and autoimmunity in autistic children

Laila Yousef Al-Ayadhi¹ and Gehan Ahmed Mostafa^{1,2*}

Publish	2012	
Method	ELIZA	
Specimen	Serum	
ชื่อโปรตีน		Symbol
astrocytic calcium-binding protein(S100B)		S100B

ตารางภาคผนวกที่ 5 แสดงรายละเอียดงานวิจัยจากงานวิจัยเรื่อง Identification of an age-dependent biomarker signature in children and adolescents with autism spectrum disorders โดย Jordan M Ramsey และคณะ [90]

Identification of an age-dependent biomarker signature in children and adolescents with autism spectrum disorders

Jordan M Ramsey¹, Paul C Guest¹, Jantine AC Broek¹, Jeffrey C Glennon², Nanda Rommelse^{3,4}, Barbara Franke^{3,5}, Hassan Rahmoune¹, Jan K Buitelaar^{3,4} and Sabine Bahn^{1,6*}

Publish	2013
Method	multiplex immunoassay profiling analysis
Specimen	Serum samples from ASD children and non-affected siblings
ชื่อโปรตีน	Symbol
Haptoglobin	HP
Cancer antigen 19-9	CA-19-9
Thyroglobulin	TG
C-Reactive Protein	CRP
TRAIL-R3	TR3
Adiponectin	ADIP
Matrix metalloproteinase 7	MMP-7
Interferon inducible T cell α chemoattractant	ITAC
Insulin-like growth factor binding protein 5	IGFBP5
Transferrin	TF
Neuropilin-1	NP1
Creatine kinase-MB	CK-MB

ตารางภาคผนวกที่ 6 แสดงรายละเอียดงานวิจัยจากงานวิจัยเรื่อง Neonatal cytokines and chemokines and risk of Autism Spectrum Disorder: the Early Markers for Autism (EMA) study: a case-control study โดย Ousseny Zerbo และคณะ [91]

Neonatal cytokines and chemokines and risk of Autism Spectrum Disorder: the Early Markers for Autism (EMA) study: a case-control study

Ousseny Zerbo^{1*}, Cathleen Yoshida¹, Judith K Grether^{1,2}, Judy Van de Water^{3,4}, Paul Ashwood^{4,5}, Gerald N Delorenze¹, Robin L Hansen^{4,6}, Matv Kharrazi² and Lisa A Croen¹

Publish	2014	
Method	Prenatal screening program	
Specimen	Newborn blood	
ชื่อโปรตีน		Symbol
MCP-1		CCL2
RANTES		CCL5

ตารางภาคผนวกที่ 7 แสดงรายละเอียดงานวิจัยจากงานวิจัยเรื่อง Proteomic analysis of post mortem brain tissue from autism patients: evidence for opposite changes in prefrontal cortex and cerebellum in synaptic connectivity-related proteins โดย Jantine AC Broek และคณะ [92]

Proteomic analysis of *post mortem* brain tissue from autism patients: evidence for opposite changes in prefrontal cortex and cerebellum in synaptic connectivity-related proteins

Jantine AC Broek¹, Paul C Guest¹, Hassan Rahmoune¹ and Sabine Bahn^{1,2*}

Publish	2014
Method	selected reaction monitoring mass spectrometry (SRM-MS)
Specimen	Post mortem prefrontal cortex and cerebellum samples from ASD and matched controls

ชื่อโปรตีน	Symbol
Glial fibrillary acidic protein	GFAP
Vimentin	VIME
Creatine kinase B-type	CKB
Myelin-associated glycoprotein	MAG
Myelin basic protein	MBP
Myelin-oligodendrocyte glycoprotein	MOG
Myelin proteolipid protein	PLP1
Dynamin-2	DNM2
Syntaxin-1A	STX1A
Syntaxin-binding protein 1	STXBP1
Synapsin-2	SYN2

ชื่อโปรตีน	Symbol
Synaptotagmin-1	SYT1
Protein kinase C casein kinase substrate 1	PACSIN1



ตารางภาคผนวกที่ 8 แสดงรายละเอียดงานวิจัยจากงานวิจัยเรื่อง A pilot proteomic study of protein markers in autism spectrum disorder โดย Armand G. Ngounou Wetie และคณะ [68]

Armand G. Ngounou Wetie¹
 Kelly Wormwood¹
 Johannes Thome^{2,3}
 Edward Dudley³
 Regina Taurines⁴
 Manfred Gerlach⁴
 Alisa G. Woods^{1*}
 Costel C. Darie¹

Research Article

A pilot proteomic study of protein markers in autism spectrum disorder

Autism spectrum disorder (ASD) diagnosis is increasing, with 1/88 children believed to be affected by the disorder, with a most recent survey suggesting numbers as high as 1/50

Publish	2014
Method	Tricine gel electrophoresis (Tricine-PAGE) LC-MS/MS
Specimen	Serum from males ASD and male normal control
ชื่อโปรตีน	Symbol
Paraoxanase	PON1
ApoA1	APOA1
ApoA4	APOA4

ตารางภาคผนวกที่ 9 แสดงรายละเอียดงานวิจัยจากงานวิจัยเรื่อง Serum Level of Desert Hedgehog Protein in Autism Spectrum Disorder: Preliminary Results โดย Shahid Bashir และคณะ [93]

Serum Level of Desert Hedgehog Protein in Autism Spectrum Disorder: Preliminary Results

Shahid Bashir^{a, b} Dost Muhammad Halepoto^b Laila Al-Ayadhi^b

Publish	2014	
Method	ELISA	
Specimen	Human serum	
ชื่อโปรตีน		Symbol
Dhh		DHH

ตารางภาคผนวกที่ 10 แสดงรายละเอียดงานวิจัยจากงานวิจัยเรื่อง Comparative two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of the salivary proteome of children with autism spectrum disorder โดย Armand G. Ngounou Wetie และคณะ [94]

**Comparative two-dimensional polyacrylamide gel
electrophoresis of the salivary proteome of
children with autism spectrum disorder**

Armand G. Ngounou Wetie ^{a, #}, Kelly L. Wormwood ^{a, #}, Laci Charette ^{b, c}, Jeanne P. Ryan ^c,
Alisa G. Woods ^{a, b, *}, Costel C. Darie ^{a, *}

Publish	2015
Method	two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) nanoliquid chromatography-tandem mass spectrometry (nanoLC-MS/MS)
Specimen	Saliva from children with ASD and controls.

ชื่อโปรตีน	Symbol
Proto-oncogene FRAT1	31317236
Ig alpha-1 chain C region	113584
Immunoglobulin heavy chain constant region alpha-2 subunit	3819788
V-type proton ATPase subunit C 1	4502315
Carbonic anhydrase VI nirs variant 3	58737051
Kinesin family member 14	109730619
Integrin alpha 6 subunit	33942
Carbonic anhydrase isozyme VI	179732
G RTP1 protein	34783442
Parotid secretory protein	16755850
Prolactin-inducible protein precursor	4505821
Mucin-16	74716283

ชื่อโปรตีน	Symbol
Ca binding protein MRP14	225793
Alpha-amylase	178585
Spectrin, beta, non-erythrocytic 5	119612929
CBP	33150676
p532	1477565
Transferrin variant	62897069
Chain A, Human Pancreatic Alpha-Amylase In Complex With Myricetin	409974028
Protein Tro alpha1 H,myeloma	223069
Ig Aalpha1 Bur	223099
Ig A1 Bur	229585
Amylase, alpha 2A; pancreatic precursor variant	62898658
AMY1A protein	47124258
Protein-L-isoaspartate O-methyltransferase domain-containing protein 1 isoform 3	557948029
Chain X, Structural Studies Of Phe256trp Of Human Salivary Alpha- Amylase	47168614
Chain A, Structure Of Human Pancreatic Alpha-Amylase In Complex With The Carbohydrate Inhibitor Acarbose	7245760
Squamous cell carcinoma antigen 1	25005272
Zn alpha2 glycoprotein	228099
Glutamate-rich protein 6B	210147567
Immunoglobulin heavy chain variable region	112702600
ALB protein	23241675
Ig J-chain	532598
Sperm activating protein subunit I- apolipoprotein A1-SPAP-subunit I	235865
Zymogen granule protein 16 homologue B precursor	94536866
Putative lipocalin 1-like protein 1	74746821

ชื่อโปรตีน	Symbol
Cystatin SA-III=potential precursor of acquired enamel pellicle	235948
Cystatin D	398711
Plasminogen	38051823



ตารางภาคผนวกที่ 11 แสดงรายละเอียดงานวิจัยจากงานวิจัยเรื่อง A Pilot Proteomic Analysis of Salivary Biomarkers in Autism Spectrum Disorder โดย Armand G. Ngounou Wetie และคณะ [69]

A Pilot Proteomic Analysis of Salivary Biomarkers in Autism Spectrum Disorder

Armand G. Ngounou Wetie, Kelly L. Wormwood, Stefanie Russell, Jeanne P. Ryan, Costel C. Darie, and Alisa G. Woods

Publish	2015
Method	MS-based proteomics
Specimen	Saliva from ASD compared to neurotypical control subjects
ชื่อโปรตีน	Symbol
PIP	PIP
LTF	LTF
annexin A1	ANXA1
neutrophil-defensin 1	DEFA1
lactoperoxidase	LPO
lipocalin-1	LCN1
proline-rich phospho-protein 1/2	PRH1
submaxillary gland androgen-regulated protein 3B	SMR3B
antileukoproteinase	SLPI
pleckstrin-homology domain-containing family H member	PLEKHH1
statherin	STATH
polymeric immunoglobulin receptor	PIGR
deleted in malignant brain tumors 1 protein	DMBT1
IgG gamma-1 chain C region	IGHM
IgG kappa chain C region	IGKC
myeloperoxidase	MPO
histatin1	HTN1
lactoperoxidase	LPO



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางภาคผนวกที่ 12 แสดงรายละเอียดงานวิจัยจากงานวิจัยเรื่อง Neonatal Cytokine Profiles Associated with Autism Spectrum Disorder โดย Paula Krakowiak และคณะ [95]

Neonatal Cytokine Profiles Associated with Autism Spectrum Disorder

Paula Krakowiak, Paula E. Goines, Daniel J. Tancredi, Paul Ashwood, Robin L. Hansen, Irva Hertz-Picciotto, and Judy Van de Water

Publish	2015
Method	cytokine and chemokine levels = Luminex Multiplex type of cytokine = Bio-Plex Precision Pro Human Cytokine Assays and MILLIPLEX human chemokine kits
Specimen	Neonatal blood spots from children with ASD and typical development
ชื่อโปรตีน	Symbol
IL-1 β	IL1B
IL-4	IL4
IL-2	IL2
IL-5	IL5
IL-6	IL6
IL-10	IL10
IL-12	IL12
IL-13	IL13
IFN- γ	IFNG
TNF- α	TNF
IL-8	IL8
MCP-1	CCL2
MIP-1 α	CCL3
MIP-1 β	CCL4
IP-10	CXCL10

ชื่อโปรตีน	Symbol
RANTES	CCL5



ตารางภาคผนวกที่ 13 แสดงรายละเอียดงานวิจัยจากงานวิจัยเรื่อง Urine Protein Biomarker Candidates for Autism โดย Libang Yang และคณะ [96]

Urine Protein Biomarker Candidates for Autism

Libang Yang¹, Kyle Rudser², Allison Goinik¹, Andrew Wey², Lee Ann Higgins³ and Glenn R Gourley^{1*}

Publish	2016
Method	isobaric Tags with Relative and Absolute Quantitation (iTRAQ™)
Specimen	Urine sample from ASD with well characterized severe ASD and age and gender matched normal controls

ชื่อโปรตีน	Symbol
Serum albumin precursor UPS	113576
kininogen 1 isoform 2 [Homo sapiens]	4504893
heparan sulfate proteoglycan 2 precursor [Homo sapiens]	126012571
fibronectin 1 isoform 3 preproprotein [Homo sapiens]	16933542
fibronectin 1 isoform 6 preproprotein [Homo sapiens]	47132549
fibronectin 1 isoform 4 preproprotein [Homo sapiens]	47132555
Serotransferrin precursor (Transferrin) (Siderophilin) (Beta-1-metal-binding globulin) UPS	136191
collagen, type XII, alpha 1 long isoform precursor [Homo sapiens]	93141047
fibronectin 1 isoform 5 preproprotein [Homo sapiens]	47132553
uromodulin precursor [Homo sapiens]	59850812
secreted phosphoprotein 1 isoform a [Homo sapiens]	91206462
alpha-2-glycoprotein 1, zinc, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119597027
Cationic trypsin precursor (Beta-trypsin) [Contains: Alpha-trypsin chain 1,2 cRAP	2507249
transferrin, isoform CRA_d [Homo sapiens]	119599573

ชื่อโปรตีน	Symbol
Alpha-amylase 1 precursor (1,4-alpha-D-glucan glucanohydrolase 1) cRAP	1351933
salivary amylase alpha 1A precursor [Homo sapiens]	56549660
salivary amylase alpha 1C precursor [Homo sapiens]	56549664
secreted phosphoprotein 1 isoform b [Homo sapiens]	4759166
hCG2028285, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119593309
Ig gamma 2 H chain, BUR [human, Peptide Mutant, 348 aa]	243169
epidermal growth factor precursor [Homo sapiens]	166362728
prostaglandin D2 synthase, brain [Homo sapiens]	32171249
lectin, mannose-binding 2 precursor [Homo sapiens]	5803023
Serum albumin precursor (Allergen Bos d 6) (BSA) cRAP	1351907
granulin, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119571985
alpha 1-acid glycoprotein, orosomucoid, alpha 1-AGP [human, Peptide, 201 aa]	998943
orosomucoid 1 precursor [Homo sapiens]	167857790
Pro-epidermal growth factor precursor (EGF) (Urogastrone)] UPS	119226
light chain kappa Sci, k Sci=Bence Jones protein [human, Peptide, 214 aa]	238284
pancreatic ribonuclease precursor [Homo sapiens]	38201682
ribonuclease, RNase A family, 1 (pancreatic), isoform CRA_a [Homo sapiens]	119586841
Chain L, Crystal Structure Of Hgfa In Complex With Allosteric Inhibitory Antibody Fab40	281307133
Chain L, Crystal Structure Of Hgfa In Complex With The Allosteric Non-Inhibitory Antibody Fab40.Deltatrp	281306943
Chain Q, Crystal Structure Of Hgfa In Complex With The Allosteric Non-Inhibitory Antibody Fab40.Deltatrp	281306947

ชื่อโปรตีน	Symbol
Chain L, Crystal Structure Of Hgfa In Complex With The Allosteric Non-Inhibitory Antibody Fab40.Deltatrp And Ac-Kqlr-Chloromethylketone	281306952
collagen, type III, alpha 1 (Ehlers-Danlos syndrome type IV, autosomal dominant), isoform CRA_b [Homo sapiens]	119631316
CD59 antigen, complement regulatory protein, isoform CRA_b [Homo sapiens]	119588599
semenogelin I, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119596277
alpha 2 type I collagen precursor [Homo sapiens]	48762934
collagen, type I, alpha 2, isoform CRA_c [Homo sapiens]	119597202
apolipoprotein H precursor [Homo sapiens]	153266841
kallikrein 1 preproprotein [Homo sapiens]	4504875
anitubulin IgG1 kappa VL chain [N-terminal] [human, serum, immunocytic sarcom patient PER isolate, Peptide Partial, 219 aa]	1911815
fibronectin 1 isoform 2 preproprotein [Homo sapiens]	47132551
fibronectin 1 isoform 1 preproprotein [Homo sapiens]	47132557
polymeric immunoglobulin receptor, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119613922
semenogelin II [Homo sapiens]	119596276
collagen, type XII, alpha 1, isoform CRA_c [Homo sapiens]	119569135
apolipoprotein D, apoD [human, plasma, Peptide, 246 aa]	619383
apolipoprotein D, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119598430
alpha 1 type I collagen preproprotein [Homo sapiens]	110349772
coagulation factor II preproprotein [Homo sapiens]	4503635
coagulation factor II (thrombin), isoform CRA_b [Homo sapiens]	119588384
immunoglobulin fragment Fab New lambda light chain [human, Peptide Partial, 208 aa]	260395
CD44 antigen isoform 1 precursor [Homo sapiens]	48255935
CD44 antigen isoform 2 precursor [Homo sapiens]	48255937

ชื่อโปรตีน	Symbol
CD44 antigen isoform 3 precursor [Homo sapiens]	48255939
CD44 antigen (Indian blood group), isoform CRA_a [Homo sapiens]	119588550
CD44 antigen (Indian blood group), isoform CRA_c [Homo sapiens]	119588552
CD44 antigen (Indian blood group), isoform CRA_d [Homo sapiens]	119588554
CD44 antigen (Indian blood group), isoform CRA_f [Homo sapiens]	119588556
CD44 antigen (Indian blood group), isoform CRA_h [Homo sapiens]	119588559
CD44 antigen (Indian blood group), isoform CRA_j [Homo sapiens]	119588561
S100 calcium-binding protein A9 [Homo sapiens]	4506773
hCG1811191 [Homo sapiens]	119572370
inter-alpha (globulin) inhibitor H4 isoform 1 precursor [Homo sapiens]	31542984
inter-alpha (globulin) inhibitor H4 isoform 2 precursor [Homo sapiens]	262050538
secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin), isoform CRA_b [Homo sapiens]	119582072
matrix-remodelling associated 8 precursor [Homo sapiens]	14150145
fibrillin [human, Marfan syndrome patient, Peptide Mutant, 2871 aa]	455958
fibrillin 1 precursor [Homo sapiens]	281485550
tenascin C precursor [Homo sapiens]	153946395
ICK=intron-containing kallikrein [alternatively spliced, intron 2] [human, colon, Peptide, 216 aa]	998972

ชื่อโปรตีน	Symbol
CD55 antigen, decay accelerating factor for complement (Cromer blood group), isoform CRA_b [Homo sapiens]	119613892
CD55 antigen, decay accelerating factor for complement (Cromer blood group), isoform CRA_c [Homo sapiens]	119613894
CD55 antigen, decay accelerating factor for complement (Cromer blood group), isoform CRA_k [Homo sapiens]	119613904
plasminogen activator, urokinase isoform 1 preproprotein [Homo sapiens]	4505863
plasminogen activator, urokinase isoform 2 [Homo sapiens]	222537759
alpha 2-HS-glycoprotein, alpha 2HSG=insulin receptor inhibitor [human, liver, Peptide, 367 aa]	499139
alpha-2-HS-glycoprotein, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119598593
alpha-2-HS-glycoprotein, isoform CRA_c [Homo sapiens]	119598595
protein C receptor, endothelial (EPCR), isoform CRA_a [Homo sapiens]	119596629
amylase, pancreatic, alpha-2B precursor [Homo sapiens]	10280622
salivary amylase alpha 1B precursor [Homo sapiens]	56549662
cadherin 1, type 1 preproprotein [Homo sapiens]	4757960
pI 5.3 beta 2-microglobulin, BM [human, urine, chronic renal failure patient, Peptide, 98 aa]	1195503
collagen, type I, alpha 1, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119615036
polyubiquitin UbC [Homo sapiens]	2647408
Chain B, X-Ray Structure Of Human Ubiquitin Cd(li) Adduct	224983545
deoxyribonuclease I precursor [Homo sapiens]	21361254
CD59 antigen, complement regulatory protein, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119588598
decay accelerating factor for complement isoform 2 precursor [Homo sapiens]	168693643
hemopexin, isoform CRA_b [Homo sapiens]	119589125

ชื่อโปรตีน	Symbol
retinol-binding protein 4, plasma precursor [Homo sapiens]	55743122
hCG2029799, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119567976
CD44 antigen (Indian blood group), isoform CRA_i [Homo sapiens]	119588560
aggrecan isoform 2 precursor [Homo sapiens]	256017257
Plasma retinol-binding protein precursor (PRBP) (RBP) [Contains: Plasma retinol-binding protein(1-182); Plasma retinol-binding protein(1-181); Plasma retinol-binding protein(1-179); Plasma retinol-binding protein(1-176)] UPS	62298174
serpin peptidase inhibitor, clade G, member 1 precursor [Homo sapiens]	73858568
retinol binding protein 4, plasma, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119570450
retinol binding protein 4, plasma, isoform CRA_b [Homo sapiens]	119570453
low density lipoprotein-related protein 2 [Homo sapiens]	119631685
low density lipoprotein-related protein 2 precursor [Homo sapiens]	126012573
fibrinogen, alpha polypeptide isoform alpha-E preproprotein [Homo sapiens]	4503689
tenascin XB isoform 1 precursor [Homo sapiens]	188528648
prion protein preproprotein [Homo sapiens]	4506113
prion protein (p27-30) (Creutzfeld-Jakob disease, Gerstmann-Strausler-Scheinker syndrome, fatal familial insomnia), isoform CRA_a [Homo sapiens]	119630855
attractin, isoform CRA_c [Homo sapiens]	119630937
signal-regulatory protein alpha precursor [Homo sapiens]	91105767
protein tyrosine phosphatase, non-receptor type substrate 1, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119631011
S100 calcium binding protein A7 (psoriasin 1) [Homo sapiens]	119573712
regenerating islet-derived 1 alpha precursor [Homo sapiens]	29725633

ชื่อโปรตีน	Symbol
trefoil factor 3 (intestinal), isoform CRA_a [Homo sapiens]	119629976
gelsolin isoform b [Homo sapiens]	38044288
gelsolin isoform c [Homo sapiens]	189083782
ribosomal protein S27a, isoform CRA_d [Homo sapiens]	119620514
beta-2-microglobulin precursor [Homo sapiens]	4757826
Beta-2-microglobulin precursor [Contains: Beta-2-microglobulin form pl 5.3] UPS	48428791
matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase) [Homo sapiens]	119596182
protein tyrosine phosphatase, non-receptor type substrate 1, isoform CRA_b [Homo sapiens]	119631013
albumin Herborn [internal fragment] [human, serum, Peptide Partial Mutant, 27 aa]	385767
insulin-like growth factor binding protein 7 [Homo sapiens]	4504619
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 14 precursor [Homo sapiens]	23200041
Chain I, Crystal Structure Of Antithrombin Variant S137aV317CT401C With Plasma Latent Antithrombin	82408097
collagen, type VI, alpha 1 precursor [Homo sapiens]	87196339
collagen, type VI, alpha 1, isoform CRA_b [Homo sapiens]	119629727
kininogen 1, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119598587
S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B), isoform CRA_a [Homo sapiens]	119573719
cubilin (intrinsic factor-cobalamin receptor) [Homo sapiens]	119606627
kininogen 1, isoform CRA_b [Homo sapiens]	119598586
hemopexin, isoform CRA_d [Homo sapiens]	119589127
CD44 antigen isoform 4 precursor [Homo sapiens]	48255941
CD44 antigen (Indian blood group), isoform CRA_b [Homo sapiens]	119588551

ชื่อโปรตีน	Symbol
CD44 antigen (Indian blood group), isoform CRA_e [Homo sapiens]	119588555
haptoglobin, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119579598
haptoglobin, isoform CRA_b [Homo sapiens]	119579599
haptoglobin, isoform CRA_c [Homo sapiens]	119579600
kininogen 1 isoform 1 [Homo sapiens]	156231037
intercellular adhesion molecule 2, isoform CRA_b [Homo sapiens]	119614623
intercellular adhesion molecule 2, isoform CRA_d [Homo sapiens]	119614626
S100 calcium-binding protein A8 [Homo sapiens]	21614544
hCG2029799, isoform CRA_c [Homo sapiens]	119567978
kininogen 1 isoform 3 [Homo sapiens]	262050546
intercellular adhesion molecule 2, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119614622
roundabout homolog 4, magic roundabout precursor [Homo sapiens]	17511435
ribonuclease, RNase A family, 2 (liver, eosinophil-derived neurotoxin) [Homo sapiens]	119586839
Gelsolin precursor (Actin-depolymerizing factor) (ADF) (Brevin) (AGEL) UPS	121116
apolipoprotein-J, Apo-J, SP-40,40=plasma glycoprotein/complement system hemolysis modulator [human, seminal plasma, Peptide, 449 aa]	298237
clusterin isoform 1 [Homo sapiens]	42716297
GM2 ganglioside activator, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119582085
regenerating islet-derived 1 alpha (pancreatic stone protein, pancreatic thread protein), isoform CRA_b [Homo sapiens]	119619983

ชื่อโปรตีน	Symbol
trefoil factor [human, intestine, Peptide Partial, 61 aa]	385570
Ubiquitin UPS	51703339
keratin 5 [Homo sapiens]	119395754
clusterin isoform 2 preproprotein [Homo sapiens]	42740907
coagulation factor II (thrombin), isoform CRA_a [Homo sapiens]	119588383
coagulation factor II (thrombin), isoform CRA_c [Homo sapiens]	119588385
clusterin isoform 3 [Homo sapiens]	283806712
fibrinogen alpha chain, isoform CRA_b [Homo sapiens]	119625330
secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin), isoform CRA_a [Homo sapiens]	119582071
hemopexin, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119589124
hemopexin, isoform CRA_c [Homo sapiens]	119589126
EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 precursor [Homo sapiens]	9665262
hCG16977, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119620486
nucleobindin 1 precursor [Homo sapiens]	20070228
vitelline membrane outer layer 1 homolog (chicken), isoform CRA_b [Homo sapiens]	119610817
glutaminy-peptide cyclotransferase (glutaminy cyclase), isoform CRA_a [Homo sapiens]	119620797
cadherin 13 preproprotein [Homo sapiens]	4502719
Fc fragment of IgG, low affinity IIIa, receptor (CD16a) isoform a precursor [Homo sapiens]	50726979
Fc fragment of IgG, low affinity IIIa, receptor (CD16a) isoform c precursor [Homo sapiens]	189083838
Fc fragment of IgG, low affinity IIIa, receptor (CD16a) isoform d precursor [Homo sapiens]	189083842
secretogranin II precursor [Homo sapiens]	68160947
chitobiase, di-N-acetyl-, isoform CRA_c [Homo sapiens]	119593639

ชื่อโปรตีน	Symbol
hCG39313 [Homo sapiens]	119602712
collagen, type VI, alpha 1, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119629725
Chain H, Crystal Structure Of Hgfa In Complex With The Allosteric Inhibitory Antibody Fab40	281307132
aggrecan isoform 1 precursor [Homo sapiens]	256017259
trefoil factor 2 (spasmolytic protein 1) [Homo sapiens]	119629975
epididymal secretory protein E1 precursor [Homo sapiens]	5453678
signal-regulatory protein beta 1 isoform 3 precursor [Homo sapiens]	209529703
cystatin C precursor [Homo sapiens]	4503107
nidogen 1 precursor [Homo sapiens]	115298674
anti-HIV-1 gp120 immunoglobulin kappa chain variable region [clone b3] [human, bone marrow, Peptide Recombinant Partial, 108 aa]	299744
collectin sub-family member 12, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119622133
AXL receptor tyrosine kinase isoform 2 [Homo sapiens]	21536468
cystatin A (stefin A) [Homo sapiens]	119599895
protein C receptor, endothelial (EPCR), isoform CRA_b [Homo sapiens]	119596630
histidine-rich glycoprotein, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119598589
peptidoglycan recognition protein 1 precursor [Homo sapiens]	4827036
interleukin 18 binding protein isoform a precursor [Homo sapiens]	89111127
immunoglobulin VL region=humanized bispecific antibody [human, Peptide Recombinant, 107 aa]	259596
C-type lectin domain family 3, member B precursor [Homo sapiens]	156627579
signal-regulatory protein beta 1 isoform 1 precursor [Homo sapiens]	144953876

ชื่อโปรตีน	Symbol
sapiens]	
anti-HIV-1 gp120 immunoglobulin kappa chain variable region [clone b11] [human, bone marrow, Peptide Recombinant Partial, 108 aa]	299740
regenerating islet-derived 1 beta precursor [Homo sapiens]	10835248
regenerating islet-derived 1 beta (pancreatic stone protein, pancreatic thread protein) [Homo sapiens]	119619985
cathepsin L1 preproprotein [Homo sapiens]	4503155
Fc fragment of IgG, low affinity IIIa, receptor (CD16a) isoform b precursor [Homo sapiens]	189083836
Keratin, type II cytoskeletal 1 (Cytokeratin-1) (CK-1) (Keratin-1) (K1) (67 kDa cyto keratin) (Hair alpha protein) cRAP	1346343
keratin 1 [Homo sapiens]	119395750
hCG16977, isoform CRA_b [Homo sapiens]	119620488
chromogranin A precursor [Homo sapiens]	4502805
amyloid beta A4 protein isoform a precursor [Homo sapiens]	4502167
serpin peptidase inhibitor, clade A, member 3 precursor [Homo sapiens]	50659080
amyloid beta (A4) precursor protein (peptidase nexin-II, Alzheimer disease), isoform CRA_b [Homo sapiens]	119630363
matrix metalloproteinase 9 preproprotein [Homo sapiens]	74272287
granulin, isoform CRA_b [Homo sapiens]	119571986
cystatin SA-III=potential precursor of acquired enamel pellicle [human, Peptide, 121 aa]	235948
EDC1, HI30=urinary proteinase inhibitor [N-terminal] [human, urine, Peptide Partial, 28 aa, segment 2 of 2]	262428
calmodulin [Homo sapiens]	665588
neuropolypeptide h3 [human, brain, Peptide, 186 aa]	913159

ชื่อโปรตีน	Symbol
triosephosphate isomerase 1 isoform 1 [Homo sapiens]	4507645
vascular cell adhesion molecule 1 isoform a precursor [Homo sapiens]	4507875
butyrophilin, subfamily 2, member A2 isoform a [Homo sapiens]	6453813
diazepam binding inhibitor isoform 1 [Homo sapiens]	10140853
cystatin SN precursor [Homo sapiens]	19882251
lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1 [Homo sapiens]	40549451
T cell immunoglobulin mucin 3 precursor [Homo sapiens]	49574534
opioid binding protein/cell adhesion molecule-like isoform b preproprotein [Homo sapiens]	59939900
CD276 antigen isoform a [Homo sapiens]	67188443
complement component 4A preproprotein [Homo sapiens]	67190748
apolipoprotein A-IV precursor [Homo sapiens]	71773110
voltage-gated sodium channel beta-3 subunit precursor [Homo sapiens]	93587332
neural cell adhesion molecule 1 isoform 1 [Homo sapiens]	94420689
alpha 1 type XVIII collagen isoform 2 precursor [Homo sapiens]	110611233
alpha 1 type XVIII collagen isoform 1 precursor [Homo sapiens]	110611235
cathepsin A isoform a precursor [Homo sapiens]	119395729
CD300 antigen like family member G, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119572042
CD300 antigen like family member G, isoform CRA_d [Homo sapiens]	119572045
hCG1996357, isoform CRA_e [Homo sapiens]	119573500
hCG1996357, isoform CRA_f [Homo sapiens]	119573501
hCG1996357, isoform CRA_i [Homo sapiens]	119573504
hepatitis A virus cellular receptor 2, isoform CRA_b [Homo sapiens]	119582018

ชื่อโปรตีน	Symbol
phosphatidylethanolamine-binding protein 4 [Homo sapiens]	119584051
acid phosphatase 2, lysosomal, isoform CRA_b [Homo sapiens]	119588357
extracellular link domain containing 1 [Homo sapiens]	119588971
vascular cell adhesion molecule 1, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119593355
protective protein for beta-galactosidase (galactosialidosis), isoform CRA_a [Homo sapiens]	119596194
protective protein for beta-galactosidase (galactosialidosis), isoform CRA_b [Homo sapiens]	119596195
prostate stem cell antigen, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119602718
slit-like 2 (Drosophila) [Homo sapiens]	119605717
triosephosphate isomerase 1, isoform CRA_b [Homo sapiens]	119609128
ephrin-B1, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119625776
collagen, type XVIII, alpha 1, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119629743
collagen, type XVIII, alpha 1, isoform CRA_c [Homo sapiens]	119629745
collagen, type XVIII, alpha 1, isoform CRA_e [Homo sapiens]	119629747
collagen, type XVIII, alpha 1, isoform CRA_b [Homo sapiens]	119629749
trefoil factor 1 (breast cancer, estrogen-inducible sequence expressed in) [Homo sapiens]	119629974
amyloid beta (A4) precursor protein (peptidase nexin-II, Alzheimer disease), isoform CRA_g [Homo sapiens]	119630371
cystatin SN [Homo sapiens]	119630539
cystatin S [Homo sapiens]	119630540
cystatin C (amyloid angiopathy and cerebral hemorrhage), isoform CRA_a [Homo sapiens]	119630542
chromogranin B (secretogranin 1) [Homo sapiens]	119630815
diazepam binding inhibitor isoform 3 [Homo sapiens]	120433590
diazepam binding inhibitor isoform 2 [Homo sapiens]	120433593

ชื่อโปรตีน	Symbol
coagulation factor XII precursor [Homo sapiens]	145275213
complement component 4B preproprotein [Homo sapiens]	178557739
cathepsin A isoform b precursor [Homo sapiens]	189163485
alpha 1 type XVIII collagen isoform 3 precursor [Homo sapiens]	206597445
chromogranin B precursor [Homo sapiens]	221316599
dystroglycan 1 preproprotein [Homo sapiens]	260099735
collagen, type II, alpha 1 isoform 1 precursor [Homo sapiens]	111118976
collagen, type II, alpha 1 isoform 2 precursor [Homo sapiens]	111118974
leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1 [Homo sapiens]	119589617
fibrinogen, alpha polypeptide isoform alpha preproprotein [Homo sapiens]	11761629
fibrinogen alpha chain, isoform CRA_c [Homo sapiens]	119625332
haptoglobin isoform 1 preproprotein [Homo sapiens]	4826762
proinsulin precursor [Homo sapiens]	4557671
macrophage colony-stimulating factor, M-CSF [N-terminal] [human, Peptide Recombinant Partial, 153 aa]	456957
carboxyl ester lipase precursor [Homo sapiens]	148536848
signal-regulatory protein beta 1, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119631025
keratin 14 [Homo sapiens]	15431310
cadherin 2, type 1 preproprotein [Homo sapiens]	14589889
Keratin, type I cytoskeletal 10 (Cytokeratin-10) (CK-10) (Keratin-10) (K10) cRAP	147744568
keratin 10 [Homo sapiens]	195972866
lysosomal-associated membrane protein 2 isoform B precursor [Homo sapiens]	7669503
lysosomal-associated membrane protein 2, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119632286
lysosomal-associated membrane protein 2, isoform CRA_c [Homo sapiens]	119632288

ชื่อโปรตีน	Symbol
Keratin, type I cytoskeletal 9 (Cytokeratin-9) (CK-9) (Keratin-9) (K9) cRAP	81175178
regenerating islet-derived 1 alpha (pancreatic stone protein, pancreatic thread protein), isoform CRA_a [Homo sapiens]	119619982
immunoglobulin binding factor, IgBF=prostatic secretory protein homolog [human, Peptide Partial, 30 aa]	237563
beta-microseminoprotein [N-terminal] [human, seminal plasma, Peptide Partial, 21 aa]	1086994
prostate specific antigen isoform 3 preproprotein [Homo sapiens]	71834853
p8=calcium-binding myeloid related protein MRP-8 homolog [N-terminal] [human, zymosan-activated neutrophils, Peptide Partial, 25 aa]	256213
calprotectin L1L subunit [N-terminal] [human, neutrophil cytosol, Peptide Partial, 27 aa]	264281
calprotectin=urinary stone protein band A [N-terminal] [human, calcium oxalate urinary stone, Peptide Partial, 20 aa]	806925
hCG16977, isoform CRA_c [Homo sapiens]	119620489
Antithrombin-III precursor (ATIII) UPS	113936
Chain L, Crystal Structure Of Antithrombin Variant S137aV317CT401C With Plasma Latent Antithrombin	82408098
Chain I, 2.1 Angstrom Structure Of A Nonproductive Complex Between Antithrombin, Synthetic Heparin Mimetic Sr123781 And Two S195a Thrombin Molecules	116666783
CD84 antigen (leukocyte antigen), isoform CRA_f [Homo sapiens]	119573097
neural cell adhesion molecule 1 isoform 3 [Homo sapiens]	115529478
neural cell adhesion molecule 1 isoform 2 [Homo sapiens]	115529482
attractin, isoform CRA_b [Homo sapiens]	119630936
Cu,Zn superoxide dismutase, SOD=SOD1 gene product [A to V	408239

ชื่อโปรตีน	Symbol
single-site mutation] [human, Peptide Mutant, 153 aa]	
superoxide dismutase 1, soluble [Homo sapiens]	4507149
superoxide dismutase 1, soluble (amyotrophic lateral sclerosis 1 (adult)), isoform CRA_a [Homo sapiens]	119630295
procollagen C-endopeptidase enhancer [Homo sapiens]	119596921
protein tyrosine phosphatase, non-receptor type substrate 1, isoform CRA_c [Homo sapiens]	119631014
protein tyrosine phosphatase, non-receptor type substrate 1, isoform CRA_d [Homo sapiens]	119631016
amyloid fibril protein=transthyretin-related [human, Peptide Mutant, 127 aa]	255208
transthyretin precursor [Homo sapiens]	4507725
Chain A, Human Transthyretin (Ttr) Complexed With Bivalent Amyloid Inhibitor (4 Carbon Linker)	85544663
Chain B, Human Transthyretin (Ttr) Complexed With Bivalent Amyloid Inhibitor (4 Carbon Linker)	85544664
sulfatase 2 isoform a precursor [Homo sapiens]	29789100
complement component 1, r subcomponent-like, isoform CRA_b [Homo sapiens]	119609092
TIMP-2, CSC-21K=tissue inhibitor of metalloproteinase [human, A2058 melanoma cells, Peptide, 192 aa]	262883
Glutathione S-transferase A1 (GTH1) (HA subunit 1) (GST-epsilon) (GSTA1-1) (GST class-alpha member 1) UPS	121730
alpha-class glutathione S-transferase omega 1 subunit [human, liver, Peptide Partial, 169 aa, segment 1 of 3]	265539
alpha-class glutathione S-transferase omega 2 subunit [human, liver, Peptide Partial, 169 aa, segment 1 of 3]	265545
glutathione S-transferase alpha 1 [Homo sapiens]	22091454
glutathione S-transferase alpha 3 [Homo sapiens]	24430144

ชื่อโปรตีน	Symbol
intercellular adhesion molecule 2, isoform CRA_c [Homo sapiens]	119614624
ubiquitin B precursor [Homo sapiens]	11024714
ribosomal protein S27a, isoform CRA_c [Homo sapiens]	119620513
Chain A, X-Ray Structure Of Human Ubiquitin Cd(li) Adduct	224983544
amyloid beta A4 protein isoform b precursor [Homo sapiens]	41406055
amyloid beta (A4) precursor protein (peptidase nexin-II, Alzheimer disease), isoform CRA_a [Homo sapiens]	119630362
amyloid beta (A4) precursor protein (peptidase nexin-II, Alzheimer disease), isoform CRA_d [Homo sapiens]	119630365
amyloid beta A4 protein isoform f precursor [Homo sapiens]	209915573
glutaminy-peptide cyclotransferase (glutaminy cyclase), isoform CRA_c [Homo sapiens]	119620800
cancer-associated SCM-recognition immunodefense-suppressing and serine protease-protecting peptide, CRISPP peptide [human, uterine cancer patient, blood plasma, Peptide, 29 aa]	262839
cancer-associated SCM-recognition immunodefense-suppressing and serine protease-protecting peptide, CRISPP peptide [human, colon cancer patient, blood plasma, Peptide, 29 aa]	262840
complement component 1, r subcomponent-like, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119609091
hemicentin 1 precursor [Homo sapiens]	118572606
serine protease inhibitor, Kunitz type, 2 isoform a precursor [Homo sapiens]	10863909
kappa 1 immunoglobulin light-chain variable domain, Wat=Bence Jones protein [human, multiple myeloma patient, urine, Peptide Partial Mutant, 108 aa]	786379
E3-MPO VL=anti-myeloperoxidase IgM monoclonal autoantibody light chain variable region [CDR3 region] [human, peripheral	1699298

ชื่อโปรตีน	Symbol
blood leukocyte-CB-F7 heteromyeloma fusion cell line, microscopic polyarteritis patient 1, Peptide Partial, 108 aa]	
S100 calcium binding protein A7 [Homo sapiens]	115298657
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, isoform CRA_b [Homo sapiens]	119609193
collagen, type I, alpha 2, isoform CRA_b [Homo sapiens]	119597201
neuronal growth regulator 1, isoform CRA_b [Homo sapiens]	119626834
glutaminy-peptide cyclotransferase (glutaminy cyclase), isoform CRA_b [Homo sapiens]	119620798
cathepsin B preproprotein [Homo sapiens]	4503139
WAP four-disulfide core domain 2 precursor [Homo sapiens]	56699495
proteoglycan 4 isoform A [Homo sapiens]	67190163
bone morphogenetic protein receptor type II precursor [Homo sapiens]	15451916
vitelline membrane outer layer 1 homolog (chicken), isoform CRA_a [Homo sapiens]	119610816
platelet/endothelial cell adhesion molecule (CD31 antigen), isoform CRA_a [Homo sapiens]	119614613
ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal accessory protein 1 precursor [Homo sapiens]	17136148
basigin isoform 1 precursor [Homo sapiens]	38372919
basigin isoform 2 precursor [Homo sapiens]	38372925
ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal accessory protein 1, isoform CRA_b [Homo sapiens]	119593119
ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal accessory protein 1, isoform CRA_d [Homo sapiens]	119593121
G protein-coupled receptor, family C, group 5, member B precursor [Homo sapiens]	7706451

ชื่อโปรตีน	Symbol
ARS component B precursor [Homo sapiens]	9966907
metallothionein 1G [Homo sapiens]	10835230
integrin beta 1 isoform 1C-1 precursor [Homo sapiens]	19743817
integrin beta 1 isoform 1C-2 precursor [Homo sapiens]	19743821
fibulin 1 isoform C precursor [Homo sapiens]	34734062
frizzled-related protein precursor [Homo sapiens]	38455388
Pepsin A precursor cRAP	73620983
filamin A, alpha isoform 1 [Homo sapiens]	116063573
gamma filamin isoform a [Homo sapiens]	116805322
galactosidase, beta 1 isoform a preproprotein [Homo sapiens]	119372308
galactosidase, beta 1 isoform b [Homo sapiens]	119372312
ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal accessory protein 1, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119593118
filamin A, alpha (actin binding protein 280), isoform CRA_b [Homo sapiens]	119593151
filamin A, alpha (actin binding protein 280), isoform CRA_c [Homo sapiens]	119593152
WAP four-disulfide core domain 2, isoform CRA_b [Homo sapiens]	119596243
WAP four-disulfide core domain 2, isoform CRA_e [Homo sapiens]	119596246
ABI gene family, member 3 (NESH) binding protein, isoform CRA_c [Homo sapiens]	119600212
ABI gene family, member 3 (NESH) binding protein, isoform CRA_e [Homo sapiens]	119600214
secreted LY6/PLAUR domain containing 1 [Homo sapiens]	119602714
integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12), isoform CRA_b [Homo sapiens]	119606355
integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen	119606358

ชื่อโปรตีน	Symbol
CD29 includes MDF2, MSK12), isoform CRA_d [Homo sapiens]	
frizzled-related protein [Homo sapiens]	119631363
filamin A, alpha isoform 2 [Homo sapiens]	160420317
gamma filamin isoform b [Homo sapiens]	188595687
galactosidase, beta 1 isoform c preproprotein [Homo sapiens]	208022658
Insulin-like growth factor II precursor (IGF-II) (Somatomedin-A) [Contains: Insulin-like growth factor II Ala-25 Del] UPS	124255
IgM monoclonal antibody heavy chain variable region, IgM VH region=group B meningococcus capsular polysaccharide monoclonal IgM Escherichia coli K1 capsular polysaccharide monoclonal IgM [human, serum, NOV, Peptide, 134 aa]	233244
sperm activating protein subunit I, apolipoprotein A1, SPAP subunit I [human, Peptide Partial, 26 aa]	235865
heparan sulfate proteoglycan fibroblast growth factor receptor, HSPG-FGF receptor [human, liver, Peptide, 310 aa]	245443
alpha B crystallin fragment 5 [human, muscle, Peptide Partial, 12 aa]	248438
apolipoprotein AI, apo AI [human, spleen, Peptide Mutant, 88 aa]	253362
urine protein 1, UP1=Clara cell 10 kda protein homolog [N- terminal] [human, urine, Peptide Partial, 53 aa]	256397
syndecan=heparan sulfate proteoglycan core protein [human, lung fibroblasts, Peptide, 310 aa]	258824
cancer-associated SCM-recognition immunodefense-suppressing and serine protease-protecting peptide, CRISPP peptide [human, breast cancer patient, blood plasma, Peptide, 29 aa]	262841
EMS1 gene product [human, Peptide, 550 aa]	299626
receptor-type protein tyrosine phosphatase beta, RPTP beta, PTP zeta [human, brainstem, Peptide, 2307 aa]	300182

ชื่อโปรตีน	Symbol
Bence Jones protein HAG=monoclonal IgM lambda VIII light chain [V region] [human, multiple myeloma, Peptide Partial, 117 aa]	632814
transthyretin, ATTR=amyloid fibril protein [human, advanced senile systemic amyloidosis patient V280, heart, Peptide, 127 aa]	1181952
transthyretin, ATTR=amyloid fibril protein [human, advanced senile systemic amyloidosis patient HL, heart, Peptide, 127 aa]	1181953
crystallin, alpha B [Homo sapiens]	4503057
enolase 1 [Homo sapiens]	4503571
heat shock protein beta-1 [Homo sapiens]	4504517
keratin 8 [Homo sapiens]	4504919
lipocalin 1 precursor [Homo sapiens]	4504963
low density lipoprotein receptor precursor [Homo sapiens]	4504975
platelet-derived growth factor receptor beta precursor [Homo sapiens]	4505683
CD14 antigen precursor [Homo sapiens]	4557417
cardiac muscle alpha actin 1 proprotein [Homo sapiens]	4885049
metallothionein 2A [Homo sapiens]	5174764
heat shock 70kDa protein 8 isoform 1 [Homo sapiens]	5729877
tyrosine 3/tryptophan 5 -monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide [Homo sapiens]	5803225
tyrosine 3/tryptophan 5 -monooxygenase activation protein, theta polypeptide [Homo sapiens]	5803227
BMP and activin membrane-bound inhibitor precursor [Homo sapiens]	6912534
S100 calcium-binding protein A6 [Homo sapiens]	7657532
resistin [Homo sapiens]	9966777
prosaposin isoform a preproprotein [Homo sapiens]	11386147
CD276 antigen isoform b [Homo sapiens]	13376852

ชื่อโปรตีน	Symbol
desmocollin 2 isoform Dsc2b preproprotein [Homo sapiens]	13435366
PTK7 protein tyrosine kinase 7 isoform a precursor [Homo sapiens]	15826840
integrin beta 1 isoform 1A precursor [Homo sapiens]	19743813
integrin beta 1 isoform 1B precursor [Homo sapiens]	19743815
integrin beta 1 isoform 1D precursor [Homo sapiens]	19743819
neurexin 1 isoform beta precursor [Homo sapiens]	21070967
versican isoform 1 precursor [Homo sapiens]	21361116
ciliary neurotrophic factor receptor preproprotein [Homo sapiens]	22212918
PTK7 protein tyrosine kinase 7 isoform b precursor [Homo sapiens]	22902126
PTK7 protein tyrosine kinase 7 isoform c precursor [Homo sapiens]	22902128
PTK7 protein tyrosine kinase 7 isoform d precursor [Homo sapiens]	22902130
notch 2 preproprotein [Homo sapiens]	24041035
heat shock 70kDa protein 8 isoform 2 [Homo sapiens]	24234686
interleukin 10 receptor, beta precursor [Homo sapiens]	24430215
inducible T-cell co-stimulator ligand precursor [Homo sapiens]	27477039
protocadherin 1 isoform 1 precursor [Homo sapiens]	27754771
protocadherin 1 isoform 2 precursor [Homo sapiens]	27754773
contactin 1 isoform 1 precursor [Homo sapiens]	28373117
contactin 1 isoform 2 precursor [Homo sapiens]	28373119
interleukin 6 signal transducer isoform 1 precursor [Homo sapiens]	28610147
interleukin 6 signal transducer isoform 2 precursor [Homo sapiens]	28610149
syndecan 1 precursor [Homo sapiens]	29568086

ชื่อโปรตีน	Symbol
serine peptidase inhibitor, Kunitz type 1 isoform 1 precursor [Homo sapiens]	32313599
fibulin 1 isoform B precursor [Homo sapiens]	34734064
fibulin 1 isoform A precursor [Homo sapiens]	34734068
guanylate cyclase activator 2A precursor [Homo sapiens]	38176149
syndecan 4 precursor [Homo sapiens]	38201675
basigin isoform 4 [Homo sapiens]	38372923
thrombospondin 1 precursor [Homo sapiens]	40317626
syndecan 2 precursor [Homo sapiens]	40548378
latrophilin 1 isoform 2 precursor [Homo sapiens]	41281557
LY6/PLAUR domain containing 2 precursor [Homo sapiens]	45387925
serine protease inhibitor, Kazal type 1 precursor [Homo sapiens]	45505132
latrophilin 1 isoform 1 precursor [Homo sapiens]	57165355
mucin 1 isoform 1 precursor [Homo sapiens]	65301117
complement component 1, r subcomponent precursor [Homo sapiens]	66347875
mucin 1 isoform 2 precursor [Homo sapiens]	67189007
mucin 1 isoform 3 precursor [Homo sapiens]	67189069
prostate specific antigen isoform 4 preproprotein [Homo sapiens]	71834855
corticosteroid binding globulin precursor [Homo sapiens]	73858564
serine peptidase inhibitor, Kunitz type 1 isoform 2 precursor [Homo sapiens]	74027265
alpha 1 type V collagen preproprotein [Homo sapiens]	89276751
alpha 2 type V collagen preproprotein [Homo sapiens]	89363017
protein tyrosine phosphatase, receptor-type, zeta1 precursor [Homo sapiens]	91208428
prosaposin isoform b preproprotein [Homo sapiens]	110224476
prosaposin isoform c preproprotein [Homo sapiens]	110224479

ชื่อโปรตีน	Symbol
galectin 3 [Homo sapiens]	115430223
alpha 1 type XV collagen precursor [Homo sapiens]	116008152
membrane metallo-endopeptidase [Homo sapiens]	116256327
superoxide dismutase 3, extracellular precursor [Homo sapiens]	118582275
O-6-methylguanine-DNA methyltransferase, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119569551
O-6-methylguanine-DNA methyltransferase, isoform CRA_b [Homo sapiens]	119569552
GDNF family receptor alpha 1, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119569841
GDNF family receptor alpha 1, isoform CRA_b [Homo sapiens]	119569842
GDNF family receptor alpha 1, isoform CRA_c [Homo sapiens]	119569843
actin, alpha 2, smooth muscle, aorta, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119570538
CD300 antigen like family member G, isoform CRA_b [Homo sapiens]	119572043
CD300 antigen like family member G, isoform CRA_c [Homo sapiens]	119572044
poliovirus receptor-related 4, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119573050
poliovirus receptor-related 4, isoform CRA_b [Homo sapiens]	119573051
immunoglobulin superfamily, member 8, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119573128
brevican, isoform CRA_b [Homo sapiens]	119573313
hCG1996357, isoform CRA_b [Homo sapiens]	119573497
hCG1996357, isoform CRA_c [Homo sapiens]	119573498
hCG1996357, isoform CRA_g [Homo sapiens]	119573502
hCG1996506, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119573713
hCG2011101 [Homo sapiens]	119578813
ciliary neurotrophic factor receptor, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119578849

ชื่อโปรตีน	Symbol
sapiens]	
KIAA0174, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119579609
KIAA0174, isoform CRA_c [Homo sapiens]	119579611
KIAA0174, isoform CRA_d [Homo sapiens]	119579612
KIAA0174, isoform CRA_e [Homo sapiens]	119579613
CD74 antigen (invariant polypeptide of major histocompatibility complex, class II antigen-associated), isoform CRA_c [Homo sapiens]	119582135
platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119582150
platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide, isoform CRA_c [Homo sapiens]	119582152
hCG1979926, isoform CRA_b [Homo sapiens]	119582221
protocadherin 1 (cadherin-like 1), isoform CRA_a [Homo sapiens]	119582304
protocadherin 1 (cadherin-like 1), isoform CRA_b [Homo sapiens]	119582305
protocadherin 1 (cadherin-like 1), isoform CRA_c [Homo sapiens]	119582306
protocadherin 1 (cadherin-like 1), isoform CRA_d [Homo sapiens]	119582307
CD14 antigen [Homo sapiens]	119582441
dipeptidase 1 (renal), isoform CRA_a [Homo sapiens]	119587123
acid phosphatase 2, lysosomal, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119588356
immunoglobulin superfamily, member 4D, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119589280
immunoglobulin superfamily, member 4D, isoform CRA_b [Homo sapiens]	119589281
hCG2003941, isoform CRA_b [Homo sapiens]	119589342
resistin, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119589421
complement component 3, isoform CRA_b [Homo sapiens]	119589477
filamin A, alpha (actin binding protein 280), isoform CRA_a	119593150

ชื่อโปรตีน	Symbol
[Homo sapiens]	
filamin A, alpha (actin binding protein 280), isoform CRA_e [Homo sapiens]	119593154
biglycan, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119593267
biglycan, isoform CRA_b [Homo sapiens]	119593268
biglycan, isoform CRA_c [Homo sapiens]	119593269
biglycan, isoform CRA_d [Homo sapiens]	119593271
sulfatase 2, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119596096
sulfatase 2, isoform CRA_b [Homo sapiens]	119596097
sulfatase 2, isoform CRA_c [Homo sapiens]	119596098
WAP four-disulfide core domain 2, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119596242
syndecan 4 (amphiglycan, ryudocan), isoform CRA_a [Homo sapiens]	119596266
syndecan 4 (amphiglycan, ryudocan), isoform CRA_b [Homo sapiens]	119596267
tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, beta polypeptide, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119596299
membrane metallo-endopeptidase (neutral endopeptidase, enkephalinase, CALLA, CD10), isoform CRA_a [Homo sapiens]	119599159
ceruloplasmin (ferroxidase), isoform CRA_b [Homo sapiens]	119599289
ceruloplasmin (ferroxidase), isoform CRA_c [Homo sapiens]	119599290
hCG2041209 [Homo sapiens]	119599808
limbic system-associated membrane protein, isoform CRA_c [Homo sapiens]	119599996
limbic system-associated membrane protein, isoform CRA_d [Homo sapiens]	119599997
hCG2043033, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119602705

ชื่อโปรตีน	Symbol
integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12), isoform CRA_a [Homo sapiens]	119606354
integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12), isoform CRA_c [Homo sapiens]	119606356
integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12), isoform CRA_e [Homo sapiens]	119606362
integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12), isoform CRA_f [Homo sapiens]	119606366
BMP and activin membrane-bound inhibitor homolog (Xenopus laevis), isoform CRA_a [Homo sapiens]	119606436
BMP and activin membrane-bound inhibitor homolog (Xenopus laevis), isoform CRA_b [Homo sapiens]	119606437
CD163 antigen, isoform CRA_b [Homo sapiens]	119609069
CD163 antigen, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119609071
triosephosphate isomerase 1, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119609127
tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide, isoform CRA_b [Homo sapiens]	119611034
Fas apoptotic inhibitory molecule 3 [Homo sapiens]	119613923
mannose receptor, C type 2, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119614747
cadherin 13, H-cadherin (heart) [Homo sapiens]	119615921
phosphoglycerate kinase 1, isoform CRA_c [Homo sapiens]	119619010
actin, gamma 2, smooth muscle, enteric, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119620118
ribosomal protein S27a, isoform CRA_b [Homo sapiens]	119620512
neurexin 1, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119620587
neurexin 1, isoform CRA_c [Homo sapiens]	119620589
calmodulin 2 (phosphorylase kinase, delta), isoform CRA_a [Homo sapiens]	119620625

ชื่อโปรตีน	Symbol
syndecan 1, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119621233
tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta polypeptide, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119621382
twisted gastrulation homolog 1 (Drosophila), isoform CRA_a [Homo sapiens]	119622011
serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 7, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119623150
serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 7, isoform CRA_c [Homo sapiens]	119623152
chromosome 4 open reading frame 18, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119625268
chromosome 4 open reading frame 18, isoform CRA_b [Homo sapiens]	119625269
V-set and immunoglobulin domain containing 4, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119625798
V-set and immunoglobulin domain containing 4, isoform CRA_b [Homo sapiens]	119625799
V-set and immunoglobulin domain containing 4, isoform CRA_c [Homo sapiens]	119625800
guanylate cyclase activator 2A (guanylin) [Homo sapiens]	119627573
KIAA0319-like, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119627818
KIAA0319-like, isoform CRA_b [Homo sapiens]	119627819
KIAA0319-like, isoform CRA_c [Homo sapiens]	119627820
stratifin, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119628191
stratifin, isoform CRA_b [Homo sapiens]	119628192
SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like 3, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119628236
brain abundant, membrane attached signal protein 1, isoform	119628417

ชื่อโปรตีน	Symbol
CRA_a [Homo sapiens]	
inducible T-cell co-stimulator ligand, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119629851
inducible T-cell co-stimulator ligand, isoform CRA_b [Homo sapiens]	119629852
inducible T-cell co-stimulator ligand, isoform CRA_c [Homo sapiens]	119629853
interleukin 10 receptor, beta, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119630245
interleukin 10 receptor, beta, isoform CRA_b [Homo sapiens]	119630246
cystatin SA [Homo sapiens]	119630538
signal-regulatory protein beta 1, isoform CRA_c [Homo sapiens]	119631027
collagen, type V, alpha 2, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119631311
collagen, type V, alpha 2, isoform CRA_b [Homo sapiens]	119631312
NCK-associated protein 1, isoform CRA_a [Homo sapiens]	119631357
NCK-associated protein 1, isoform CRA_f [Homo sapiens]	119631362
glypican 3, isoform CRA_b [Homo sapiens]	119632175
glypican 3, isoform CRA_c [Homo sapiens]	119632176
protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 2 [Homo sapiens]	148747351
glypican 1 precursor [Homo sapiens]	167001141
integrin-binding sialoprotein precursor [Homo sapiens]	167466187
immunoglobulin heavy chain variable region [Homo sapiens]	187950127
insulin-like growth factor 2 isoform 2 [Homo sapiens]	189083846
macrophage stimulating 1 precursor [Homo sapiens]	205277383
neurexin 1 isoform alpha2 precursor [Homo sapiens]	208609951
Fas apoptotic inhibitory molecule 3 isoform a [Homo sapiens]	216547575
sulfatase 2 isoform b precursor [Homo sapiens]	240255478
calmodulin 1 isoform 2 [Homo sapiens]	260656025



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางภาคผนวกที่ 14 แสดงรายละเอียดงานวิจัยจากงานวิจัยเรื่อง Expression and oxidative modifications of plasma proteins in autism spectrum disorders: Interplay between inflammatory response and lipid peroxidation โดย Alessio Cortelazzo และคณะ [97]

RESEARCH ARTICLE

Expression and oxidative modifications of plasma proteins in autism spectrum disorders: Interplay between inflammatory response and lipid peroxidation

Alessio Cortelazzo^{1,2*}, Claudio De Felice^{3*}, Roberto Guerranti², Cinzia Signorini⁴, Silvia Leoncini^{1,4}, Gloria Zollo^{1,4}, Roberto Leoncini², Anna Maria Timperio⁵, Lello Zolla⁵, Lucia Ciccoli⁴ and Joussef Hayek¹

Publish	2016
Method	two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) with MS/MS and Oxidative PTMs analysis
Specimen	Platelet poor plasma from heparinized blood of ASD and age-/sex- match control

ชื่อโปรตีน	Symbol
alpha-2-macroglobulin	P01023
alpha-1-antitrypsin	P01009
haptoglobin	P00738
Fibrinogen beta chain	P02675
Fibrinogen gamma chain	P02679
serum transferrin	P02787
prealbumin	P02766
apolipoprotein A-I	P02647
apolipoprotein A-IV	P06727
apolipoprotein J	P10909
serum albumin	P02768

ชื่อโปรตีน	Symbol
Ig alpha-1 chain C region	P01876
Ig gamma heavy chain	P99006



ตารางภาคผนวกที่ 15 แสดงรายละเอียดงานวิจัยจากงานวิจัยเรื่อง Redox proteomic identification of carbonylated proteins in autism plasma: insight into oxidative stress โดย Chengyun Feng และคณะ [98]



Redox proteomic identification of carbonylated proteins in autism plasma: insight into oxidative stress and its related biomarkers in autism

Chengyun Feng², Youjiao Chen¹, Jintao Pan², Aochu Yang¹, Li Niu², Jie Min², Xianling Meng², Liping Liao¹, Kaoyuan Zhang¹ and Liming Shen^{1*}

Publish	2017
Method	two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) and Immunoprecipitation follow with Western blot analysis
Specimen	Plasma from heparinized blood of ASD and age-/sex- match control

ชื่อโปรตีน	Symbol
complement component C8 alpha chain	P07357
Ig kappa chain C	P01834

ตารางภาคผนวกที่ 16 แสดงรายละเอียดงานวิจัยจากงานวิจัยเรื่อง iTRAQ based proteomic analysis reveals protein profile in plasma from children with autism โดย Liming Shen และคณะ [99]

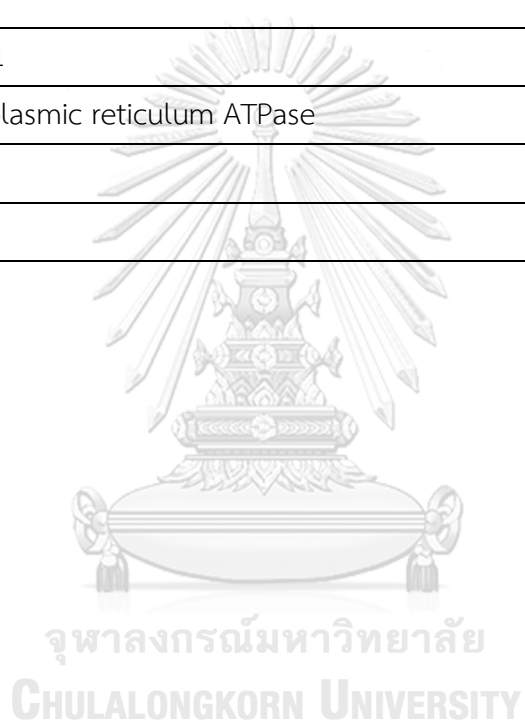
iTRAQ-Based Proteomic Analysis Reveals Protein Profile in Plasma from Children with Autism

Liming Shen, Kaoyuan Zhang, Chengyun Feng, Youjiao Chen, Shuiming Li, Javed Iqbal, Liping Liao, Yuxi Zhao, and Jian Zhai*

Publish	2017
Method	isobaric Tags with Relative and Absolute Quantitation (iTRAQ™)
Specimen	Plasma from EDTA blood of ASD and age-/sex- match control

ชื่อโปรตีน	Symbol
Actin, cytoplasmic	ACTG1
Alpha-1-antitrypsin	SERPINA1
Alpha-actinin-1	ACTN1
Alpha-enolase	ENO1
Angiotensinogen	AGT
Apolipoprotein E	APOE
Beta-parvin	PARVB
Calmodulin	CALM1
Calreticulin	CALR
Complement C3	C3
Complement C5	C5
EH domain-containing protein 3	FERMT3
Fibronectin	FN1

ชื่อโปรตีน	Symbol
Insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile subunit	IGFALS
Fibulin-1	FBLN1
Integrin alpha-lib	ITGA2B
Kallistatin	SERPINA4
Microtubule-associated protein RP/EB family member 2	MAPRE2
Talin-1	TLN1
Thrombospondin-1	THBS1
Transitional endoplasmic reticulum ATPase	VCP
Vinculin	VCL
Vitronectin	VTN



ภาคผนวก 2

จุดโปรตีนทั้งหมด 82 จุดโปรตีนที่มีค่าสัดส่วนความเข้มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มคนปกติและกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม

ตารางภาคผนวกที่ 17 แสดงจุดโปรตีนทั้งหมด 82 จุดโปรตีนที่มีค่าสัดส่วนความเข้มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มคนปกติและกลุ่มผู้ป่วย ออทิซึมสเปกตรัม

ID	control	6Lgroup	ANOVA	L/C	log2C	log2L	log2(A/C)
329	0.851	0.000	0.000	0.000	-0.232	0.000	0.000
302	0.034	0.000	0.000	0.000	-4.869	0.000	0.000
353	0.103	0.000	0.000	0.000	-3.276	0.000	0.000
306	0.024	0.000	0.000	0.000	-5.382	0.000	0.000
348	0.168	0.000	0.000	0.000	-2.573	0.000	0.000
313	0.051	0.000	0.000	0.000	-4.291	0.000	0.000
510	0.066	0.000	0.000	0.000	-3.924	0.000	0.000
312	0.113	0.000	0.000	0.000	-3.151	0.000	0.000
300	0.030	0.000	0.000	0.000	-5.061	0.000	0.000
320	0.056	0.000	0.000	0.000	-4.149	0.000	0.000
283	0.125	0.000	0.000	0.000	-2.994	0.000	0.000
299	0.047	0.000	0.000	0.000	-4.422	0.000	0.000
298	0.041	0.000	0.000	0.000	-4.621	0.000	0.000
281	0.257	0.000	0.001	0.000	-1.958	0.000	0.000
291	0.109	0.000	0.001	0.000	-3.196	0.000	0.000
277	0.136	0.000	0.001	0.000	-2.879	0.000	0.000
297	0.067	0.000	0.001	0.000	-3.909	0.000	0.000
304	0.038	0.000	0.001	0.000	-4.712	0.000	0.000
361	0.195	0.000	0.002	0.000	-2.357	0.000	0.000
350	0.342	0.000	0.003	0.000	-1.548	0.000	0.000

ID	control	6Lgroup	ANOVA	L/C	log2C	log2L	log2(A/C)
362	0.093	0.000	0.003	0.000	-3.432	0.000	0.000
360	0.119	0.000	0.003	0.000	-3.075	0.000	0.000
303	0.089	0.000	0.004	0.000	-3.486	0.000	0.000
295	0.054	0.000	0.006	0.000	-4.214	0.000	0.000
274	0.068	0.000	0.006	0.000	-3.873	0.000	0.000
324	0.146	0.000	0.006	0.000	-2.780	0.000	0.000
293	0.063	0.000	0.006	0.000	-3.978	0.000	0.000
338	0.121	0.000	0.006	0.000	-3.042	0.000	0.000
322	0.601	0.000	0.007	0.000	-0.735	0.000	0.000
514	0.219	0.000	0.009	0.000	-2.194	0.000	0.000
349	0.049	0.000	0.009	0.000	-4.343	0.000	0.000
358	0.052	0.000	0.011	0.000	-4.270	0.000	0.000
289	0.032	0.000	0.011	0.000	-4.968	0.000	0.000
326	0.191	0.000	0.012	0.000	-2.391	0.000	0.000
321	0.095	0.000	0.015	0.000	-3.403	0.000	0.000
335	0.059	0.000	0.015	0.000	-4.092	0.000	0.000
325	0.052	0.000	0.016	0.000	-4.262	0.000	0.000
319	0.813	0.000	0.016	0.000	-0.298	0.000	0.000
352	0.089	0.000	0.016	0.000	-3.482	0.000	0.000
356	0.043	0.000	0.018	0.000	-4.537	0.000	0.000
305	0.031	0.000	0.034	0.000	-5.014	0.000	0.000
286	0.091	0.000	0.034	0.000	-3.451	0.000	0.000
172	0.303	0.023	0.014	0.076	-1.720	-5.438	-3.717
143	0.051	0.007	0.024	0.141	-4.288	-7.115	-2.826

ID	control	6Lgroup	ANOVA	L/C	log2C	log2L	log2(A/C)
384	0.235	0.035	0.005	0.150	-2.092	-4.831	-2.739
161	0.215	0.040	0.031	0.186	-2.216	-4.644	-2.428
232	0.043	0.009	0.033	0.206	-4.529	-6.807	-2.279
221	0.038	0.009	0.035	0.227	-4.703	-6.841	-2.138
526	0.183	0.043	0.000	0.235	-2.451	-4.543	-2.092
252	0.147	0.038	0.001	0.259	-2.767	-4.717	-1.950
525	0.198	0.071	0.021	0.357	-2.336	-3.821	-1.485
504	0.107	0.039	0.036	0.365	-3.223	-4.675	-1.452
78	0.214	0.099	0.008	0.460	-2.222	-3.342	-1.120
82	0.149	0.078	0.028	0.519	-2.743	-3.689	-0.946
184	0.045	0.025	0.013	0.551	-4.490	-5.350	-0.861
518	0.286	0.168	0.007	0.587	-1.806	-2.574	-0.768
63	4.824	2.984	0.020	0.619	2.270	1.577	-0.693
11	0.102	0.068	0.042	0.666	-3.296	-3.883	-0.587
41	0.174	0.231	0.005	1.328	-2.523	-2.113	0.409
2	0.057	0.087	0.030	1.528	-4.136	-3.524	0.612
183	0.052	0.081	0.033	1.560	-4.265	-3.623	0.641
153	0.107	0.170	0.033	1.590	-3.223	-2.554	0.669
290	0.489	0.798	0.006	1.632	-1.032	-0.325	0.707
119	0.100	0.165	0.046	1.651	-3.320	-2.597	0.723
15	0.089	0.155	0.038	1.747	-3.493	-2.687	0.805
213	0.054	0.096	0.031	1.767	-4.209	-3.388	0.821
29	0.033	0.060	0.011	1.789	-4.907	-4.068	0.839
32	0.043	0.091	0.045	2.145	-4.555	-3.454	1.101

ID	control	6Lgroup	ANOVA	L/C	log2C	log2L	log2(A/C)
21	0.043	0.095	0.026	2.210	-4.538	-3.394	1.144
8	0.068	0.158	0.002	2.324	-3.881	-2.664	1.216
3	0.039	0.090	0.006	2.332	-4.691	-3.470	1.221
6	0.079	0.186	0.004	2.352	-3.657	-2.424	1.234
193	0.028	0.066	0.008	2.389	-5.168	-3.912	1.256
1	0.059	0.142	0.022	2.415	-4.083	-2.811	1.272
194	0.039	0.096	0.002	2.455	-4.670	-3.374	1.296
522	0.031	0.080	0.036	2.607	-5.033	-3.651	1.382
521	0.040	0.118	0.035	2.917	-4.630	-3.086	1.544
51	0.048	0.144	0.004	3.006	-4.385	-2.797	1.588
125	0.038	0.119	0.004	3.090	-4.700	-3.072	1.627
17	0.075	0.282	0.043	3.753	-3.735	-1.827	1.908
524	0.000	0.073	0.001	0.000	0.000	-3.771	0.000
523	0.000	0.079	0.008	0.000	0.000	-3.655	0.000

ภาคผนวก 3
สารเคมีและเครื่องมือที่ใช้

ตารางภาคผนวกที่ 18 แสดงสารเคมีและเครื่องมือที่ใช้

ขั้นตอน	รายการเครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีที่ต้องใช้	
การเพาะเลี้ยงและการเก็บ เซลล์ไลน์ชนิด ลิมโฟบลาสต์	1. RPMI1640 medium 2. Fatal bovine serum 3. Penicillin/Streptomycin 4. Dimethyl sulfoxide 5. Liquid nitrogen tank 6. RNeasy lysis solution 7. Trypan blue	8. Ice 9. Clorox 10. Detergent 11. class II microbiological safety cabinet 12. 37° C and 5% CO2 Incubator
การสกัดดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และโปรตีน	1. Genezol® Reagent 2. Chloroform 3. Isopropyl alcohol 4. ethanol 5. urea	6. RNase-free water 7. Sodium citrate 8. NaOH 9. guanidine hydrochloride 10. isopropanol
การวัดคุณภาพของโปรตีน และการตรวจสอบคุณภาพ ของโปรตีน	1. Bovine serum albumin 2. MilliQ water 3. Laemli's buffer 4. Bradford solution 5. 96 wells plate 6. SDS-PAGE equipment 7. 30% acrylamide 8. 1.5M Tris-HCl pH 8.8 9. 0.5M Tris-HCl pH 6.8 10. pH meter PL-600 11. Shaker Polymax 1040	12. Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) 13. Ammonium Persulfate (APS) 14. TEMED 15. Glycine 18. Methanol 19. Ammonium sulphate 20. 85% Phosphoric Acid 21. Coomassie Brilliant Blue G-250

ขั้นตอน	รายการเครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีที่ต้องใช้	
แยกโปรตีนด้วยเทคนิค 2D-GE และวิเคราะห์ความแตกต่างของจุดโปรตีน	1. Urea 2. CHAPS 3. Bromphenol blue 4. Dithiothreitol 5. IPG buffer 6. IPG strips, 13 cm, pH 3-10 7. Image scanner III 8. Tris-HCl pH 8.8 9. MilliQ water	10. glycerol 11. Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) 12. Iodoacetamide 13. 30% acrylamide 14. Methanol 15. APS 16. TEMED 17. Acetic acid
การย่อยแผ่นเจลสกัดเปปไทด์และวิเคราะห์เปปไทด์ด้วย LC-MS/MS	1. Acetonitrile (CAN) 2. Ammonium bicarbonate 3. Trypsin enzyme 4. Formic acid	5. HPLC Water 6. Speed-vacuum 7. Ultrasonic bath 8. Mascot search engine
การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนด้วยเทคนิค western blot	1. Non-fat dry milk 2. MilliQ water 3. Laemli's buffer 4. Bradford solution 5. 96 wells plate 6. SDS-PAGE equipment 7. 30% acrylamide 8. 1.5M Tris-HCl pH 8.8 9. 0.5M Tris-HCl pH 6.8 10. pH meter PL-600 11. Shaker Polymax 1040 12. 0.2 uM Immun-Blot® PVDF membrane 13. TBST 14. rabbit polyclonal anti-human DBI antibody (ab196485) 15. ECL hyperfilm 16. TEMED	17. Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) 18. Ammonium Persulfate (APS) 19. rabbit polyclonal anti-GAPDH antibody (sc25778) 20. Glycine 21. Mini-PROTEAN® Tetra system 22. rabbit monoclonal anti-human IDH2 antibody [EPR7576] (ab129180) 23. donkey anti-rabbit IgG H&L (HRP) preadsorbed (ab7083) 24. NaOH 25. Amersham ECL Select Western Blotting Detection Reagent



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวฉัตรระวี พิชิตพันธ์พงศ์ เกิดเมื่อวันที่ 2 กันยายน พ.ศ.2534 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร จบการศึกษาระดับปริญญาตรี (เทคนิคการแพทย์) จากคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2556 และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท (หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์) ในปีการศึกษา 2557 โดยได้รับทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาจากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดชทรงเจริญพระชนมายุครบ ๗๒ พรรษา (เฉพาะค่าเล่าเรียน), ทุนรัชดาภิเษกสมโภชจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (CU59-004-HR) และ ทุน ๘๐ ปีจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

