



รายงานการวิจัย

การแสดงออกและบทบาทหน้าที่ของโปรตีนเหมือนไคติเนสในมะเร็งท่อน้ำดี

Expression and Roles of Chitinase-Like Proteins in

Cholangiocarcinoma

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT1-102-55-12-39



รายงานการวิจัย

การแสดงออกและบทบาทหน้าที่ของโปรตีนเหมือนไคตินเนสในมะเร็งท่อน้ำดี

Expression and Roles of Chitinase-Like Proteins in
Cholangiocarcinoma

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. วิภา สุจินต์

ผู้ร่วมโครงการ

อ. ดร. ชุติมา ตลับนิล

หน่วยวิจัยชีวเคมี-เคมีไฟฟ้า

สาขาวิชาชีวเคมี

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2555

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

สิงหาคม 2557

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณ
ศูนย์เครื่องมือ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ใช้อุปกรณ์และเครื่องมือในห้องปฏิบัติการชีวเคมีเพื่อการ
วิจัย ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

รองศาสตราจารย์ ดร. วิภา สุจินต์

อาจารย์ประจำสาขาวิชาชีวเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

18 สิงหาคม พ.ศ. 2557

บทคัดย่อ

มะเร็งท่อน้ำดี (Cholangiocarcinoma หรือ CCA) เป็นมะเร็งที่บริเวณเยื่อบุท่อน้ำดีที่มีความรุนแรงสูง และมีอุบัติการณ์สูงในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ส่วนโปรตีน YKL-40 หรือ chitinase-3-like-1 (CH3L1) เป็นไกลโคโปรตีนที่ถูกหลั่งออกมาโดย stromal cells และพบว่ามีระดับสูงขึ้นในผู้ป่วยมะเร็งหลายชนิด ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยทำการตรวจหาระดับการแสดงออกของโปรตีน YKL-40 ในซีรัมโดยวิธี ELISA และในเนื้อเยื่อของผู้ป่วย CCA โดยวิธี immunohistochemistry เมื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่าง YKL-40 กับลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี ได้แก่ อายุ เพศ ระยะของการดำเนินโรค (Tumor Stage) และมหจุลชีววิทยา (Histology Type) พบว่าในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีมีระดับของ YKL-40 สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเมื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่าง YKL-40 กับลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี ได้แก่ อายุ เพศ และเมื่อวิเคราะห์เพื่อหาความสัมพันธ์ของระยะรอดชีพของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีกับ YKL-40 พบว่าการรอดชีพของผู้ป่วยที่มี YKL-40 สูงมีระยะรอดชีพที่สั้นกว่าผู้ป่วยที่มี YKL-40 ต่ำ การศึกษาแสดงออกของโปรตีน YKL-40 ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีด้วยเทคนิค การวิเคราะห์การแสดงออกของ YKL-40 mRNA พบมีการแสดงออกต่ำกับ CAA cell lines ที่ทดสอบ ส่วนการศึกษาด้าน immunohistochemistry พบว่าโปรตีน YKL-40 มีการแสดงออกน้อยในเซลล์มะเร็ง แต่พบเซลล์ที่ย้อมให้ผลบวกที่บริเวณใกล้เคียงได้แก่ เซลล์ตับและเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ได้แก่ fibroblast และ infiltrating macrophages

ABSTRACT

Cholangiocarcinoma (CCA) is a malignancy of the bile duct epithelium. CCA is a devastating cancer with a high incidence in Northeast Thailand. YKL-40 or chitinase-3-like-1 (CH3L1) is a secreted glycoprotein, which is commonly expressed in stromal cells and highly elevated in patients with several types of cancers. In this study, we determined YKL-40 expression in plasma and tumor tissues of CCA patients by ELISA and immunohistochemistry. Correlations between YKL-40 expression in plasma and tumor tissues, clinicopathological features and patient survival were investigated. YKL-40 plasma concentrations were significantly increased in CCA patients as compared to those in the control group. Overall survival was worst in patients with elevated YKL-40 plasma concentration. YKL-40 mRNA was found at low level in CCA cell lines. Immunohistochemical study of YKL-40 in CCA tissues indicated that YKL-40 was rarely expressed in CCA tumor cells, but was highly expressed in liver cells and cells around connective tissue, including fibroblast and infiltrating macrophages.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญภาพ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	4
ขอบเขตของการวิจัย	4
ประโยชน์ที่รับจากการวิจัย	5
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	6
บทที่ 3 ผลการวิจัยและข้อวิจารณ์	8
บทที่ 4 บทสรุป	
สรุปผลการวิจัย	17
ข้อเสนอแนะ	17
บรรณานุกรม	18
ภาคผนวก	
ก ผลงานเผยแพร่	21
ข ประวัติผู้วิจัย	22

สารบัญภาพ

		หน้า
รูปที่ 1.1	แสดงโดเมนโครงสร้างของ CLPS ชนิดต่าง ๆ เทียบกับเอนไซม์ไคตินเนส	1
รูปที่ 1.2	การวิเคราะห์ทาง immunohistochemistry ของเนื้อเยื่อที่ทำ paraffin section	3
รูปที่ 1.3	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับโปรตีน YKL-40 และระดับโปรตีน บ่งชี้ CA-125 ในผู้ป่วยมะเร็งเยื่อบุโพรงมดลูก	3
รูปที่ 3.1.	ตัวอย่างกราฟมาตรฐานที่ได้จากการวัดด้วยวิธี Indirect ELISA assay	8
รูปที่ 3.2.	ระดับความเข้มข้นของ serum YKL-40 ในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี	10
รูปที่ 3.3.	การวิเคราะห์ Kaplan-Meier survival curve	12
รูปที่ 3.4.	การวิเคราะห์การแสดงออกของ YKL-40 mRNA โดยวิธี RT PCR	13
รูปที่ 3.5.	การย้อมเนื้อเยื่อ CCA ด้วยวิธี Immunoperoxidase staining	14

สารบัญตาราง

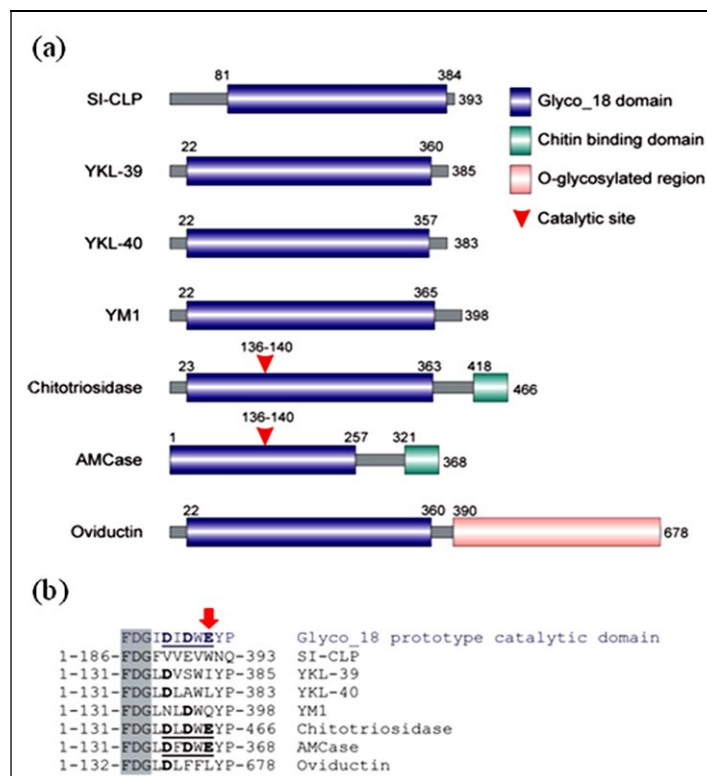
	หน้า
ตารางที่ 3.1. ค่าการจับของโปรตีนมาตรฐาน YKL-40 ที่วัดด้วยวิธี Enzyme-linked Indirect ELISA assay	8
ตารางที่ 3.2. ระดับความเข้มข้นของโปรตีน YKL-40 ในซีรัมคนปกติเทียบกับซีรัมของ ผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี	9
ตารางที่ 3.3. ความสัมพันธ์เชิงสถิติระหว่างระดับ serum YKL-40 กับลักษณะทางคลินิก ของผู้ป่วย CCA	11
ตารางที่ 3.4. Univariate และ Multivariate analysis of prognosis โดยวิธี Cox Proportional Hazard Regression model ในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี	11

บทที่ 1

บทนำ

1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

โปรตีนเหมือนไคตินเนส หรือ chitinase-like proteins (CLPs) ถูกค้นพบครั้งแรกในสารคัดหลั่งจากเนื้อเยื่อภูมิคุ้มกันและในซีรัมของผู้ป่วยติดเชื้ออหิวสเรื้อรัง โดย CLPs เป็นกลุ่มของโปรตีนในแฟมิลี 18 ไกลโคซิล ไฮโดรเลส ที่มีโครงสร้าง $(\beta/\alpha)_8$ TIM barrel domain เหมือนเอนไซม์ไคตินเนส (Houston et al., 2003) ที่มีร่องจับกับไคตินได้แต่ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาการสลายสับสเตรทได้ เนื่องจากมีกรดอะมิโน Glu ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนไปเป็นกรดอะมิโนชนิดอื่น (Kavada et al., 2007) โปรตีน CLPs ที่มีการศึกษาเชิงโครงสร้างหรือหน้าที่ได้แก่ chitinase 3-like 1 protein (CHI3L1 หรือ YKL-40 หรือ HC gp-39) (Johansen et al., 1992) chitinase 3-like 2 protein (YKL-39) (Hu et al., 1996) YM-1 (chitinase 3-like-3 หรือ CHI3L3) (Chang et al., 2001) oviduct-specific glycoprotein (oviductin หรือ Mucin 9) (Arias et al., 1994) และ stabilin-1 interacting chitinase-like protein (SI-CLP) (Kzyhokowaka et al., 2007) รูปที่ 1.1 แสดงโดเมนโครงสร้างของ CLPs ชนิดต่าง ๆ เทียบกับเอนไซม์ไคตินเนส

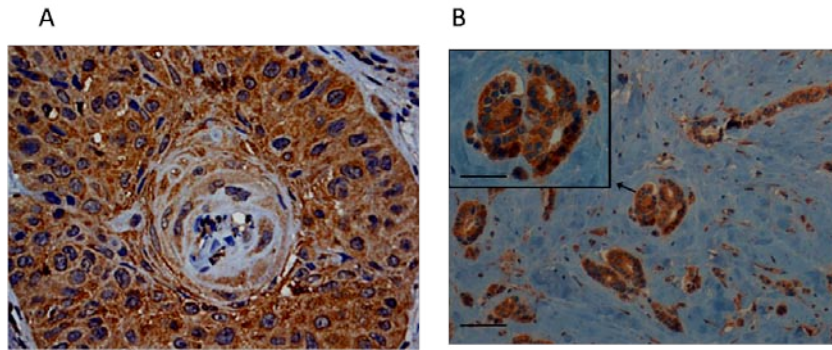


รูปที่ 1.1 (a) แสดงองค์ประกอบของโดเมนในโปรตีนในแฟมิลี 18: human chitinases ได้แก่ chitotriosidase และ AMCase) ส่วน chitinase-like proteins ได้แก่ SI-CLP YKL-39 YKL-40 YM1 และ Oviduction ส่วน (b) แสดง

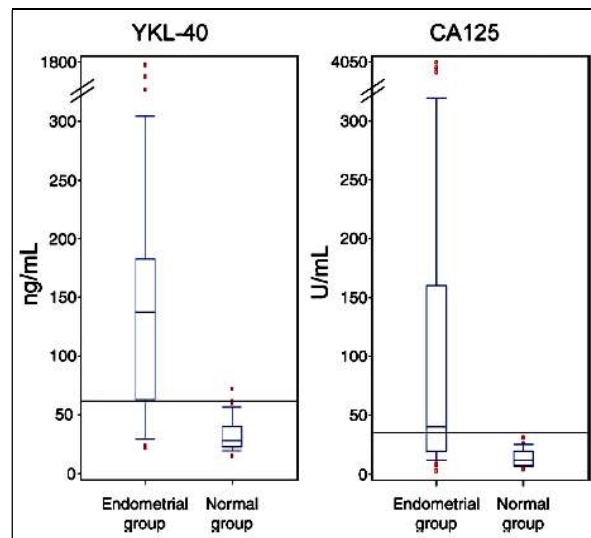
ตำแหน่งของกรดอะมิโนเร่งปฏิกิริยา Glu ที่ถูกแทนที่ด้วยกรดอะมิโน Leu Ile หรือ Trp ใน CLPs (Kzhyshkowska et al., 2006)

โปรตีนที่สำคัญที่มีรายงานเกี่ยวกับการภาวะการอักเสบและมะเร็งได้แก่ YKL-40 (หรือรู้จักในชื่อ chitinase-3-like-1 และ human cartilage glycoprotein-39) โปรตีนนี้เป็นไกลโคโปรตีนที่จับกับ heparin sulfate แบบจำเพาะ มีการตรวจพบว่าโปรตีน YKL-40 ถูกหลั่งออกมาในซีรัมมากผิดปกติในผู้ป่วยที่มีสภาวะพยาธิสภาพของการอักเสบเรื้อรัง การติดเชื้อโรคต่างๆ โรคหัวใจ โรคเบาหวาน และโรคมะเร็ง เป็นต้น โปรตีนนี้มีน้ำหนักโมเลกุล 40 kDa มีลำดับของกรดอะมิโนด้านปลาย N (N-terminus) สามตัวเรียงกันคือ Y-K-L และโปรตีนนี้ค้นพบครั้งแรกจากการศึกษา *In vitro* โดยพบว่ามีการหลั่งออกมามากโดย osteosarcoma cell line MG63 (Johansen et al., 1992) จากการศึกษาหลายชิ้นพบว่าบริเวณร่องจับของโปรตีน YKL-40 ไม่พบกรดอะมิโนดังกล่าวที่มีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาการย่อยไคตินและยังพบว่าตำแหน่งของกรดอะมิโนกลูตามิกเอซิดถูกแทนที่ด้วยกรดอะมิโนลิซีน (Renkema et al., 1998; Fusetti et al., 2003; and Houston et al., 2003) ปัจจุบันมีงานวิจัยหลายชิ้นศึกษาเกี่ยวกับบทบาทของ YKL-40 โดยพบว่า YKL-40 ส่วนใหญ่ถูกสร้างจากเซลล์แมโครฟาจ (macrophage) นิวโทรฟิล (neutrophil) และเซลล์มะเร็ง (cancer cell) ระดับของ YKL-40 สามารถตรวจพบได้จากเลือดหรือซีรัม โดยจากการศึกษาพบว่าระดับของ YKL-40 ที่เพิ่มสูงขึ้นจากระดับปกติจะสามารถตรวจพบได้ในผู้ป่วยที่เป็นโรคที่มีภาวะเกี่ยวข้องกับการอักเสบเรื้อรัง (inflammation) และการก่อรูปเนื้อเยื่อ (tissue remodeling) เช่น โรคมะเร็ง โรคภาวะหัวใจขาดเลือด โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ โรคลำไส้อักเสบเรื้อรัง โรคเบาหวาน โรคหอบหืด โรคปอดเรื้อรัง โรคปอดอักเสบ และโรคพังผืดที่ตับ (liver fibrosis) เป็นต้น (Johansen et al., 2006; Rathcke et al., 2006; Letuve et al., 2008; and Fontana et al., 2010) อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการศึกษาแน่ชัดถึงหน้าที่ของ YKL-40 ต่อพยาธิสภาพของโรคต่างๆ แต่มีการให้ข้อเสนอว่า YKL-40 อาจทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นในระบบภูมิคุ้มกันแบบ adaptive immune response ผ่านวิถี allergen-induced Th2 inflammation โดยบริเวณที่เกิดการอักเสบแบบ Th2 จะมีการสร้าง cytokines หรือ interleukin (IL)-13 ซึ่งจะกระตุ้นการสร้างโปรตีน YKL-40 ในเซลล์แมโครฟาจ และเซลล์เยื่อ โปรตีน YKL-40 ที่เพิ่มขึ้นจะมีผลกระตุ้นกระบวนการอักเสบโดยลดการตาย (apoptosis) ของเซลล์แมโครฟาจและเหนี่ยวนำการทำหน้าที่เฉพาะของเซลล์แมโครฟาจแบบ alternative (M2) โดยเพิ่มจำนวนของ dendritic cells (DC) ที่ถูกกระตุ้นแล้ว และยับยั้งการ apoptosis ของ Th2 cell นอกจากนี้ Th2 cytokines ที่ถูกผลิตออกมาจะมีผลเหนี่ยวนำให้มีการสร้างสาร chemokines และ transforming growth factor (TGF)- β_1 ซึ่งจะส่งผลทำให้เกิดการอักเสบ และการก่อรูปของเนื้อเยื่อ (tissue remodeling) ที่ผิดปกติต่อไป (Lee et al., 2009; and Lee et al., 2011)

ตัวอย่างการศึกษาระดับการแสดงออกของ YKL-40 ที่มีความสัมพันธ์กับโรคมะเร็ง ได้แก่ การศึกษาทาง immunohistochemistry ในผู้ป่วย high-grade neck cancer (Roslind et al., 2008) และมะเร็งรังไข่ (Yang et al., 2009) พบผลการย้อมติดสีโปรตีน YKL-40 ในเซลล์มะเร็งดังแสดงในรูปที่ 1.2



รูปที่ 1.2 การวิเคราะห์ทาง immunohistochemistry ของเนื้อเยื่อที่ทำ paraffin section เซลล์ที่ย้อมติดสีน้ำตาล แสดงผลบวกของแอนติบอดีกับโปรตีน YKL-40 รูป (A) มะเร็งคอ (B) มะเร็งรังไข่ ผลการศึกษาอื่น ๆ เช่นในมะเร็งมดลูกชนิด endometrial cancer ให้ผลเหมือนกับการศึกษาอื่น ๆ โดยพบระดับของ โปรตีน YKL-40 สูงกว่า 61 ng/mL เทียบกับคนปกติ และระดับของโปรตีนมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับระดับของ โปรตีนบ่งชี้จำเพาะของมะเร็งนี้คือ CA-125 ดังแสดงในรูปที่ 1.3



รูปที่ 1.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับโปรตีน YKL-40 และระดับโปรตีนบ่งชี้ CA-125 ในผู้ป่วยมะเร็งเยื่อบุโพรงมดลูก (Diefenbach et al., 2007)

ต่อมา Johansen et al. (2006) ได้เสนอให้ใช้ YKL-40 เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) ของโรคมะเร็งชนิด solid tumor โดย ณ ปัจจุบันระดับการแสดงออกของ YKL-40 ในซีรัมถูกนำมาใช้เพื่อเป็นตัวบ่งชี้ในการพยากรณ์โรค (prognostic biomarker) ในมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งเต้านม มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งกระเพาะอาหาร มะเร็งสมอง มะเร็งรังไข่ และมะเร็งผิวหนัง เป็นต้น โดยพบว่าถ้าผู้ป่วยมะเร็งมีระดับของ YKL-40 เพิ่มขึ้นสูงจากระดับปกติจะส่งผลให้มีพยากรณ์โรคแย่ ระยะการรอดชีพ (survival time) สั้น แต่ขณะที่ผู้ป่วยมะเร็งที่มีระดับของ YKL-40 ในระดับปกติจะมีพยากรณ์โรคที่ดี มีระยะการรอดชีพที่ยาวนานกว่า (Johansen et al., 2006; Johansen et al., 2008; Yamac et al., 2008; and Høgdall et al., 2009) ในคนปกติค่าเฉลี่ยของ YKL-40 ในเลือดเท่ากับ 40-60 ng/mL โดยระดับของ YKL-40 ไม่ขึ้นอยู่กับความแตกต่างระหว่างเพศ แต่จะเพิ่มขึ้นตามอายุ (Bojesen et al., 2011) อย่างไรก็ตามหน้าที่ทางชีวภาพ (biological function) ของ YKL-40 ต่อการเกิดมะเร็งนั้นยังไม่แน่ชัด แต่จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า YKL-40 มีส่วนเกี่ยวข้องในการควบคุมการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง (cell proliferation) การเปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่เฉพาะของเซลล์ (differentiation) และการสร้างเส้นเลือดใหม่ (angiogenesis) เป็นต้น (Eurich et al. 2009; Shao et al., 2009; Lee et al., 2011) นอกจากนี้ยังพบหลักฐานที่แสดงถึงหน้าที่ของ YKL-40 ในการส่งเสริมการพัฒนาของมะเร็ง โดยพบว่าระดับของโปรตีน YKL-40 ในเซลล์มะเร็งเต้านมและมะเร็งลำไส้จะเพิ่มขึ้นตามการพัฒนาการของเซลล์มะเร็งผ่านกระบวนการ tumor angiogenesis โดยการเหนี่ยวนำร่วมกันระหว่างตัวรับบนผิวเซลล์ syndecan-1 และ integrin $\alpha\beta_3$ และกระตุ้น intracellular signaling cascade ประกอบด้วย focal adhesion kinase (FAK) และ MAP kinase/Erk 1/2 ภายในเซลล์ endothelial (Shao et al., 2009)

ส่วนโปรตีน YKL-39 หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า chitinase3-like 2 (CHI3L2) ได้มีการศึกษาครั้งแรกพบใน primary culture ของ human articular chondrocytes (Hu et al., 1996) โปรตีนนี้มีลำดับกรดอะมิโนที่ปลายด้านเอ็นเหมือน YKL-40 คือ tyrosine (Y) lysine (K) และ leucine (L) แต่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่าคือ 39 kDa โปรตีนนี้ผลิตออกมามากในเซลล์กระดูกอ่อน (chondrocyte) และเซลล์เยื่อข้อ (synoviocytes) มีการศึกษาพบว่าโปรตีนนี้น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการอักเสบของข้อต่อและการเกิดภาวะโรคข้อเสื่อม (Osteoarthritis) โดยมีรายงานว่าระดับการแสดงออกของ YKL-39 mRNA expression มีความสัมพันธ์โดยตรงกับระดับของ collagen type 2 (Steck et al., 2002) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่า YKL-39 อาจทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับ tissue modeling และเป็นตัวเหนี่ยวนำระบบ autoimmune ของร่างกาย (Sakata et al., 2002) ในส่วนของความเกี่ยวข้องกับโรคมะเร็งยังไม่มียางานที่แน่ชัด แต่อย่างไรก็ตามจากการวิเคราะห์ข้อมูลเบื้องต้น DNA expression profiling ที่ได้จากฐานข้อมูล DNA microarray ของผู้ป่วยโรคมะเร็งท่อน้ำดี พบว่ามีการ down-regulate ของโปรตีน YKL-39 ประมาณ 1.8 เท่าของระดับการแสดงออกของตัวอย่างคนปกติ

1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาการแสดงออกของโปรตีนเหมือนโคตินเนสในซีรัมและเนื้อเยื่อของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี
2. เพื่อศึกษาการแสดงออกของระดับอาร์เอ็นเอของโปรตีนเหมือนโคตินเนสในผู้ป่วยโรคมะเร็งท่อน้ำดีเปรียบเทียบกับคนปกติ
3. เพื่อศึกษาศักยภาพในการทำหน้าที่เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพโปรตีนเหมือนโคตินเนสในโรคมะเร็งท่อน้ำดี

1.3. ขอบเขตของการวิจัย

ขอบเขตในงานวิจัยนี้ทำการศึกษาทางชีวเคมีและทางอิมมูโนวิทยาในระดับโมเลกุลดังนี้

1. การโคลนยีน human YKL-39 หรือ YKL-40 และการศึกษาการแสดงออกในระบบแบคทีเรีย *E. coli*
2. การผลิตและการทำบริสุทธิ์แอนติเจน YKL-39 หรือ YKL-40
3. การทดสอบหาระดับโปรตีน YKL-39 หรือ YKL-40 จากซีรัมตัวอย่างของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีเทียบกับคนปกติด้วยเทคนิค Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)
4. การทดสอบระดับการแสดงออกของ YKL-39 mRNA หรือ YKL-40 mRNA ในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีเทียบกับคนปกติโดยเทคนิค Reverse transcriptase PCR (RT-PCR) หรือเทคนิค Real time PCR
5. การทดสอบระดับการแสดงออกของโปรตีนในซีรัมผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีด้วยวิธี Western blotting
6. การทดสอบระดับการแสดงออกของโปรตีนในเนื้อเยื่อผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีด้วยวิธี Immunohistochemistry

1.4. ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

งานวิจัยนี้ต้องการตรวจวัดการแสดงออกของยีนและปริมาณโปรตีนเหมือนโคตินในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่เป็นมะเร็งที่พบมากที่สุดในกลุ่มประชากรภาคอีสานของประเทศไทย โดยผลการตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีนหรือระดับของโปรตีนอาจนำไปสู่การพัฒนาตัวบ่งชี้มะเร็งท่อน้ำดีระยะลุกลามและช่วยทำนายอาการของโรค หรือ prognosis และการกลับมาใหม่ หรือ recurrent ของมะเร็งหลังการรักษาได้ งานวิจัยนี้ยังไม่มีผู้ใดดำเนินการมาก่อน ดังนั้นผลงานวิจัยที่ได้ถือเป็นองค์ความรู้ใหม่ เทคนิคที่ต้องการพัฒนามีเป้าหมายชัดเจนและให้ผลกระทบต่อการแพทย์และคุณภาพของประชากรไทยสูง โดยผลสำเร็จที่คาดว่าจะได้รับหลังจากเสร็จสิ้นโครงการคือ

1. การตีพิมพ์ในวารสารที่มีค่า impact factor สูง 1 เรื่อง
2. การนำเสนอผลงานวิจัยในที่ประชุมระดับชาติหรือระดับนานาชาติ 1 ครั้ง
3. การผลิตนักวิจัยรุ่นเยาว์ที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะทาง 1 คน

หน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์คือ

1. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
2. สถาบันวิจัยทางการแพทย์ทั้งในและต่างประเทศ
3. สถาบันมะเร็งแห่งชาติทั้งในและต่างประเทศ

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

2.1. การเก็บตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

ผู้วิจัยได้รับตัวอย่างเลือดหรือตัวอย่างเนื้อเยื่อบนแผ่นพาราฟิล์มของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีจากธนาคารตัวอย่างพยาธิใบไม้ในตับ และศูนย์วิจัยมะเร็งท่อน้ำดี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ตัวอย่างเลือดและเนื้อเยื่อที่ได้รับการเซ็นยินยอมจากผู้ป่วยและงานวิจัยได้รับการอนุมัติโดย the Ethics Committee for Human Research ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ตัวอย่างเลือดที่ได้รับมีจำนวน 57 ตัวอย่าง ส่วนตัวอย่างคนที่มียุทธศาสตร์ที่มีทั้งหมด 41 ตัวอย่าง โดยกลุ่มควบคุมได้รับการตรวจสุขภาพจากโรงพยาบาลว่ามีอายุอยู่ในวัยเดียวกับผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี แต่ไม่มีการตรวจของโรคมะเร็งหรืออาการติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับ ตัวอย่างเลือดทั้งหมดก่อนนำมาวิเคราะห์ถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -40°C

2.2. การตรวจหาระดับโปรตีน YKL-40 ในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีด้วยวิธี ELISA

ทำการวัดระดับโปรตีน YKL-40 โดยใช้ YKL-40 ELISA kit (BlueGene Biotech, Shanghai, China) ในคนปกติจำนวน 41 คน และผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีจำนวน 57 คน ซึ่งวิธีการวัดทำตามคำแนะนำที่แนบมากับชุด kit โดยมีหลักการคือ competitive ELISA โดยเป็นการทำงานร่วมกันของ monoclonal anti-YKL-40 antibody และ YKL-40-HRP conjugate โดยที่ตัวอย่างพลาสมาที่ต้องการวัดหาปริมาณ YKL-40 จะถูกผสมกับ YKL-40-HRP conjugate ลงไปใน pre-coated plate ของชุด kit เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°C จากนั้นจึงล้างออกแล้วเติม substrates ทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 37°C จากนั้นจึงหยุดปฏิกิริยาโดยเติม stop solution และทำการวัดค่า Optical Density (OD) ที่ความยาวคลื่น 450 nm ปริมาณโปรตีน YKL-40 ในตัวอย่างคำนวณได้จากกราฟมาตรฐาน (standard curve) ของ YKL-40 ที่ปริมาณความเข้มข้นของโปรตีน YKL-40 เท่ากับ 0 – 250 ng/ml จากนั้นนำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่าง YKL-40 กับลักษณะทางคลินิกและระยะการรอดชีพ โดยใช้โปรแกรม SPSS v.16.0

2.3. การหาค่าทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติที่ได้รับจากการวัดหาระดับความเข้มข้นของโปรตีน YKL-40 ในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยเทียบกับกลุ่มควบคุมด้วยโปรแกรม SPSS Statistics 16.0 (IBM, NY, USA) และความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของโปรตีน YKL-40 กับลักษณะทางพยาธิสภาพของกลุ่มตัวอย่างด้วยใช้การทดสอบแบบ chi-square test หาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของโปรตีน YKL-40 กับอัตราการอยู่รอดของผู้ป่วยหลังการผ่าตัดรักษาถึงเวลาที่ผู้ป่วยเสียชีวิตด้วยวิธี Kaplan-Meier method และทดสอบความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี log-rank statistics. และใช้วิธี Cox Proportional-Hazards Regression model เพื่อจำแนกค่า independent prognostic factor โดยการวิเคราะห์ทุกวิธีกำหนดให้ความสัมพันธ์มีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$

2.4. การตรวจหาระดับการแสดงออกของ YKL-40 mRNA ด้วยวิธี RT-PCR

ทำการตรวจหาระดับของการแสดงออกของระดับ YKL-40 mRNA ด้วยวิธี real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) โดยใช้วิธีตาม protocol ของ Applied Biosystems 7900HT Sequence Detection System โดยทำปฏิกิริยาใน 96-well plate ทำการสกัด total RNA จากเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวด้วย TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) หลังจากนั้นทำการสร้าง cDNA โดยปฏิกิริยาของ reverse transcriptase โดยใช้ protocol ที่มากับ ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI) โดยส่วนประกอบใน PCR reaction ได้แก่ 1) 100 nM each primer 2) diluted cDNA template และ 3) FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) โดยตั้งค่าการทำปฏิกิริยาดังนี้

จำนวน PCR cycles: 40 cycles

Denaturation: 95°C for 30 seconds

Annealing: 58°C 30 seconds

Extension: 72°C for 30 seconds

ในแต่ละปฏิกิริยาเพิ่มจำนวน mRNA จาก cDNA ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งโดยใช้ปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวน ของ β -actin mRNA เป็นปฏิกิริยาควบคุมและใช้ระดับของ β -actin mRNA เป็นตัวเทียบหาระดับของการสร้าง mRNA จากตัวอย่างโดยใช้ความสัมพันธ์ $2^{-\Delta CT}$ โดยที่ $\Delta CT = [Ct(\beta\text{-actin}) - Ct(YKL-40)]$ โปรแกรมที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา RT PCR ออกแบบมาจากส่วนของ human YKL-40 gene [GenBank: NM_001276.2] ได้แก่ 5' CACCCTAATCAAGGAAATGAA 3' (sense) และ 5' CCAGGTGTTGGGATATCTTG 3' (antisense) สำหรับยีน β -actin ใช้ primers ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ 5' CTGGAACGGTGAAGGTGACA 3' (sense) และ 5' AAGGGACTTCCTGTAACAATGCA 3' (antisense)

2.5. การตรวจหาระดับการแสดงออกของ YKL-40 ในเนื้อเยื่อผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

ทำการย้อมชิ้นเนื้อมะเร็งท่อน้ำดี เพื่อศึกษาการแสดงออกของโปรตีน YKL-40 ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี โดยใช้เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี (Immunohistochemistry) โดยใช้ EnVision + system (Dako, Carpinteria, CA) เป็น detection system ซึ่งมีวิธีการทดลองดังนี้คือ ตัวอย่างเนื้อเยื่อพาราฟินของมะเร็งท่อน้ำดี (paraffin section) จะถูกล้างพาราฟินออกด้วย xylene ต่อด้วยการ rehydrated โดยผ่านแอลกอฮอล์จากเปอร์เซ็นต์สูงไปต่ำ หลังจากย้อมยั้ง Endogenous Enzyme โดยใช้ 0.5% Hydrogen peroxide ใน methanol แล้ว เนื้อเยื่อจะถูกคืนสภาพแอนติเจน (Antigen retrieval) ใน 10 mM Citrate Buffer, pH 6.0 แล้วให้ความร้อนโดยใช้ไมโครเวฟ จากนั้นจึงยับยั้งการจับกันอย่างไม่จำเพาะโดยใช้ normal horse serum ที่ความเข้มข้น 1:20 หลังจากนั้นเติม primary antibody หรือ rabbit anti-human YKL-40 (Quidel Corporation, Santa Clara, CA) ที่ความเข้มข้น 1:100 ตั้งทิ้งไว้ค้างคืน (overnight) หลังจากนั้นจึงล้าง primary antibody ออกแล้วหยด EnVision และ System-HRP labeled polymer anti-rabbit IgG ตั้งทิ้งไว้วัน 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างสไลด์ด้วย PBS แล้วจึงหยด 3, 3 Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) ทิ้งไว้วัน 5 นาทีแล้วล้างออกด้วยน้ำประปา และทำการย้อมเนื้อเยื่อที่ไม่ติดสี (counterstain) โดยใช้ hematoxylin จากนั้นจึงทำการ dehydrated โดยผ่านแอลกอฮอล์จากเปอร์เซ็นต์สูงไปต่ำแล้วต่อด้วย xylene และปิดสไลด์โดยหยด permount แล้วปิดทับด้วยแผ่น coverslip จากนั้นนำสไลด์ไปตรวจหาปฏิกิริยาการติดสีของแอนติเจนภายใต้กล้องจุลทรรศน์

บทที่ 3

ผลการทดลองและข้อวิจารณ์

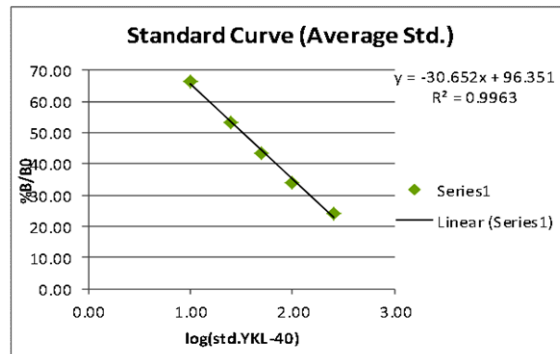
3.1. การวัดระดับของ YKL-40 ในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีโดยวิธี Indirect ELISA assay

ทำการตรวจหาระดับของ YKL-40 ในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีโดยใช้ชุดตรวจวัดที่เป็น commercial YKL-40 ELISA kit (BlueGene Biotech, Shanghai, China) และทำการทดลองซ้ำสองครั้งตามวิธีที่แนะนำใน protocol ของชุดสกัดโดยมีหลักการการจับแบบแข่งขันระหว่าง monoclonal anti-YKL-40 antibody และ YKL-40 – HRP conjugate ขั้นตอนแรกทำการสร้างกราฟมาตรฐานของโปรตีน YKL-40 ที่มากับชุดสกัด ด้วยการบ่มสารละลาย YKL-40 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กับ YKL-40 – HRP conjugate ใน pre-coated plate เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างตัวอย่างออกให้สะอาดแล้วเติมสับสเตรทสำหรับ เอนไซม์ horse radish peroxidase จะได้สีของปฏิกิริยาระหว่าง enzyme-substrate เป็นสีน้ำเงิน ซึ่งเมื่อหยุดปฏิกิริยาด้วยแล้วจะเปลี่ยนสีเป็นสีเหลืองซึ่งวัดด้วยค่าดูดกลืนแสงที่ 450 nm ด้วยเครื่อง microplate reader ข้อมูลที่ได้จากการวัดค่าดูดกลืนแสง A450 ที่ความเข้มข้นของ YKL-40 มาตรฐานที่ได้แล้วนำมาคำนวณหาค่าสัดส่วนการจับกับโปรตีน YKL-40 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในปฏิกิริยาเมื่อเทียบกับค่าการจับของปฏิกิริยาที่ไม่มี YKL-40 (% B/B₀) ตัวอย่างข้อมูลที่ได้จากการวัดแสดงในตารางที่ 3.1.

ตารางที่ 3.1. ค่าการจับของโปรตีนมาตรฐาน YKL-40 ที่วัดด้วยวิธี Enzyme-linked Indirect ELISA assay

Standard (Average std.)		
YKL-40 (ng/ml)	%B/B ₀	log(YKL-40)
250	24.08	2.40
100	33.92	2.00
50	43.56	1.70
25	53.28	1.40
10	66.54	1.00
0	100.00	-

ซึ่งข้อมูลในตารางที่ 3.1. นำมาสร้างเป็นกราฟมาตรฐานการจับของโปรตีน YKL-40 ได้ดังแสดงในรูปที่ 3.1.



รูปที่ 3.1. ตัวอย่างกราฟมาตรฐานที่ได้จากการวัดด้วยวิธี Indirect ELISA assay ที่นำมาคำนวณหาค่าระดับการจับของ YKL-40 ในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

3.2. การวัดระดับของโปรตีน YKL-40 ในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

เมื่อสร้างกราฟมาตรฐานที่เชื่อถือได้แล้ว การทดลองต่อมาคือการวัดหาระดับโปรตีน YKL-40 ในตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี 57 ตัวอย่างเทียบกับตัวอย่างซีรัมของคนปกติ 41 ตัวอย่าง โดยวิธี Indirect ELISA assay จากชุดสกัดชุดเดียวกัน โดยระดับความเข้มข้นของโปรตีน YKL-40 ในตัวอย่างเลือดที่ได้จากกราฟมาตรฐานแสดงในตารางที่ 3.2.

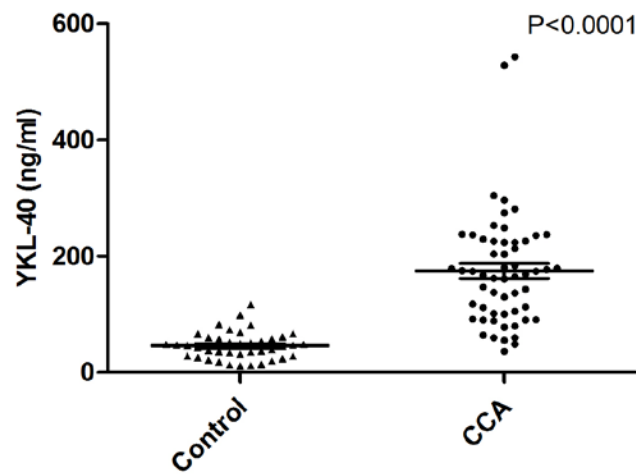
ตารางที่ 3.2.ระดับความเข้มข้นของโปรตีน YKL-40 ในซีรัมคนปกติเทียบกับซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

Healthy		CCA			
No.	YKL-40 (ng/ml)	No.	YKL-40 (ng/ml)	No.	YKL-40 (ng/ml)
H2	98.89	W14		M13	
		7	237.51	3	203.34
H3	61.47	W17		M13	
		8	105.19	7	36.45
H4	37.80	W12		M15	
		0	102.78	8	79.99
H5	17.61	W10		M17	
		5	177.24	4	104.56
H6	51.52	W14		M20	
		0	163.18	7	235.56
H7	66.30	W10		M21	
		8	236.99	2	48.81
H8	34.30	W11		M21	
		1	161.04	5	129.66
H9	47.09	W12		M22	
		2	543.38	8	180.61
H46	31.46	W12		M23	
		3	117.85	6	174.00
H57	48.29	W12		M24	
		9	90.38	0	248.85
H58	45.91	W13		M25	
		0	55.26	0	101.17
H67	68.73	W13		M26	
		2	77.97	5	90.85
H68	46.92	W13		M27	
		3	147.18	2	169.47
H69	60.16	W14		M17	
		9	175.05	6	281.40
H70	73.60	W15		M30	
		1	304.38	3	252.71
71	81.12	W16		M31	
		3	53.61	1	274.69
H72	48.46	W16		M31	
		9	111.98	9	178.64
H73	42.72	W17		M22	
		1	112.70	3	237.03

H74	35.81	W18 3	59.56	M25 2	164.77
H75	12.24	W19 0	528.10	M30 0	162.49
H015	49.98	X29	105.90	M00 1	179.09
H031	66.61	X30	64.30	M07 1	296.96
H073	13.91	X33	203.68	M09 7	143.47
H082	35.15	M019	59.51	M13 3	203.34
H091	57.43	M174	96.08	M13 7	36.45
H014	25.65	M128	91.75	M15 8	79.99
H153	39.10	M259	229.06	M17 4	104.56
H180	53.08	M032	167.07	M20 7	235.56
H017	82.43	M067	223.70	M21 2	48.81
H032	20.34	M109	213.07	M21 5	129.66
H056	36.14	M113	88.56	M22 8	180.61
H078	116.67	M140	223.70	M23 6	174.00
H007	28.27	M141	226.30	M24 0	248.85
H154	52.11	M152	90.43	M25 0	101.17
H159	28.27	M156	183.72	M26 5	90.85
H030	23.60	M171	136.58	M27 2	169.47
H043	21.81	M182	137.53	M17 6	281.40
H108	13.04	M210	174.18	M30 3	252.71
H143	11.19	M213	225.78	M31 1	274.69
H183	47.06	M223	237.03	M31 9	178.64
H161	58.78	M252	164.77	N	57
N	41	M300	162.49	SD	95.92
SD	23.56	M001	179.09	mean	169.50
mea	46.92	M071	296.96	%CV	56.76
%CV	51.08	M097	143.47		

3.2.ความมีนัยสำคัญของระดับโปรตีน YKL-40 ระหว่างผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

จากการวิเคราะห์ทางสถิติค่า median ของโปรตีน YKL-40 ในซีรัมผู้ป่วยทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 169.5 ng.mL^{-1} และมีช่วงระหว่าง $36.45 - 543.4 \text{ ng.mL}^{-1}$ เมื่อเทียบกับค่า median ของซีรัมกลุ่มปกติที่มีค่าเท่ากับ 46.92 ng.mL^{-1} และอยู่ในช่วง $11.2-116.7 \text{ ng.mL}^{-1}$ (รูปที่ 3.2.) ซึ่งค่าความแตกต่างที่ได้ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า $P < 0.0001$



รูปที่ 3.2. ระดับความเข้มข้นของ serum YKL-40 ในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

3.3.ความสัมพันธ์เชิงสถิติระหว่างระดับ serum YKL-40 กับลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับความเข้มข้นของ serum YKL-40 ที่ค่า 25th percentile (100.7 ng.mL^{-1}) กับลักษณะทางพยาธิสภาพต่าง ๆ ของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี เช่น อายุ เพศ ระยะการดำเนินไปของโรคพบว่าความสัมพันธ์ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า $P < 0.05$ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากกลุ่มตัวอย่างที่วิเคราะห์มีขนาดค่อนข้างเล็ก (ตารางที่ 3.3) แต่อย่างไรก็ตามข้อมูลที่วิเคราะห์มีความน่าสนใจอยู่มากโดยพบว่าโดยรวมระดับของโปรตีน YKL-40 มีค่าสูงขึ้นเมื่ออายุของผู้ป่วยเพิ่มขึ้น ระดับโปรตีนสูงในเพศชายมีค่าสูงกว่าเพศหญิง นอกจากนี้ระยะของมะเร็งที่ลุกลามจากระยะที่ 1 ถึง 4 ยังพบระดับของโปรตีน YKL-40 สูงขึ้นตามลำดับด้วย เมื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่าง YKL-40 กับมัลจุลินวิทยา (Histology Type) พบว่าในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีมีระดับของ YKL-40 สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับในคนปกติเป็น 169.5 ng.mL^{-1} และ 46.9 ng.mL^{-1} ตามลำดับอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 3.3. ความสัมพันธ์เชิงสถิติระหว่างระดับ serum YKL-40 กับลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วย CCA

	Number	YKL-40 staining (%)		P value
		Negative	Positive	
Age (years)				
< 56	19	4 (21.1)	15 (78.9)	0.051
≥ 56	15	8 (53.3)	7 (46.7)	
Sex				
Male	19	7 (36.8)	10 (63.2)	0.832
Female	15	5 (33.3)	12 (66.7)	
Tumor Stage				
II	17	4 (41.2)	13 (58.8)	0.473
III & IV	17	6 (29.4)	10 (70.6)	
T stage				
T2	6	1 (16.7)	5 (83.3)	0.160
T3	21	10 (47.6)	11 (52.4)	
T4	7	1 (14.3)	6 (85.7)	
N stage				
N0	20	6 (30.0)	14 (70.0)	0.440
N1	14	6 (42.9)	8 (57.1)	
AJCC stage				
II	2	0 (0.0)	2 (100.0)	0.241
III	2	1 (50.0)	1 (50.0)	
IVA	16	4 (25.0)	12 (75.0)	
IVB	1	1 (100.0)	0 (0.0)	
Histology Type				
Papillary	12	8 (66.7)	4 (33.3)	0.005*
Non-Papillary	22	4 (18.2)	18 (81.8)	

อย่างไรก็ตามเมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติแบบ Univariate analysis โดยวิธี Cox Proportional Hazard Regression เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างระยะการรอดชีพกับลักษณะทางคลินิกพบว่ามีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ 1) ระยะการดำเนินไปของโรค 2) มหจุลชีวิวิทยาแบบ non-papillary และ 3) ระดับของโปรตีน YKL-40 ดังแสดงในตารางที่ 3.4.

ตารางที่ 3.4 Univariate และ Multivariate analysis of prognosis โดยวิธี Cox Proportional Hazard Regression model ในผู้ป่วยมะเร็งเรื้อรังที่น้ำดี

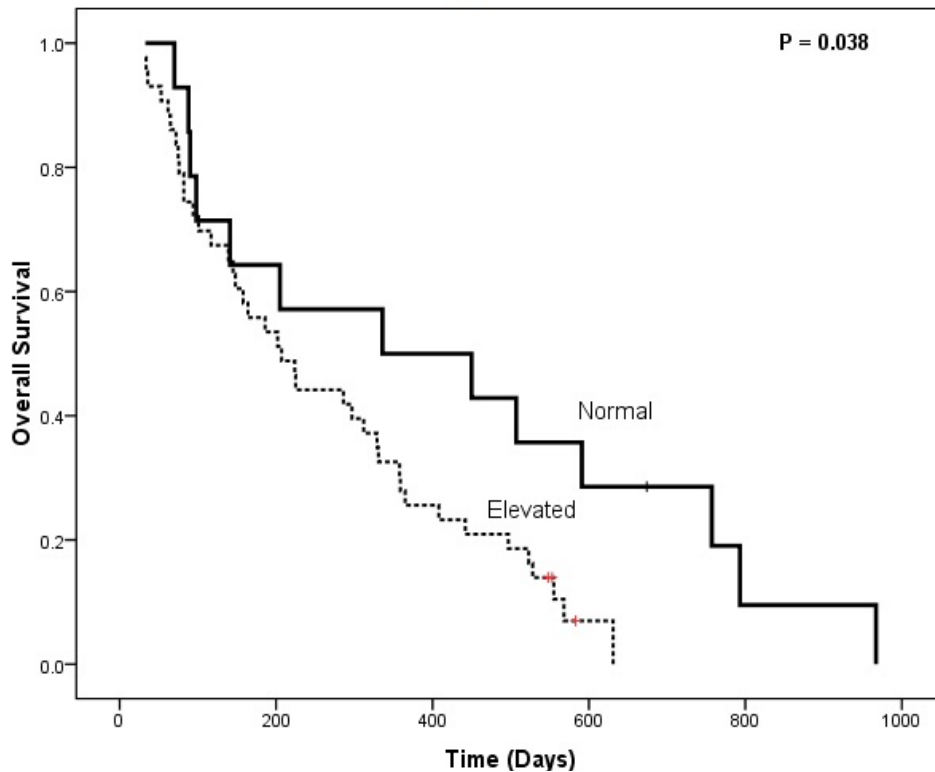
Variable	Univariate analysis		Multivariate analysis		
	HR	P value	HR	95% CI	P value
Age:	1				
< 56					
≥ 56	0.696 (0.394 – 1.227)	0.208	1.046	0.569 – 1.926	0.884
Sex:	1				
Male					
Female	1.020 (0.570 – 1.823)	0.948	1.022	0.558 – 1.875	0.943
Tumor Stage:	1				
I-II					
III	1.856 (0.836 – 4.122)	0.124			
IV	3.298 (1.771 – 6.141)	<0.0001*	2.817	1.428 – 5.559	0.003*
Histology Type:	1				
Papillary					
Non-papillary	2.647 (1.309 – 5.356)	0.005*	1.870	0.868 – 4.026	0.110
Serum YKL-40:	1				
Normal					
Elevated	2.117 (1.027 – 4.363)	0.038*	1.642	0.780 – 3.455	0.192

ส่วนการวิเคราะห์ข้อมูลแบบ Multivariate Cox Analysis พบว่าให้ความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทาง

สถิติระหว่างอัตราการรอดชีพกับระยะการดำเนินไปของโรคเพียงอย่างเดียวที่ค่า $p < 0.05$ (ตารางที่ 3.4.) โดยไม่มีความสัมพันธ์กับระดับการแสดงออกของโปรตีน YKL-40 ซึ่งผลการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้แสดงให้เห็นว่าความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการรอดชีพกับระยะการดำเนินไปของโรคเป็นปัจจัยอิสระจากความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการรอดชีพกับระดับการแสดงออกของโปรตีน YKL-40

3.4.ความสัมพันธ์เชิงสถิติระหว่างระยะการรอดชีพกับระดับโปรตีน YKL-40

เมื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของระยะการรอดชีพของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีกับ YKL-40 ดังแสดงในรูปที่ 3.3. พบว่าผู้ป่วยที่มีระดับ YKL-40 สูงมีระยะการรอดชีพที่สั้นกว่าผู้ป่วยที่มี YKL-40 ต่ำ ($p = 0.038$) อย่างไรก็ตาม YKL-40 ไม่ได้เป็นปัจจัยหลักต่อระยะการรอดชีพของผู้ป่วยแต่ขึ้นอยู่กับระยะของการดำเนินโรคมามากกว่าเมื่อพิจารณาจากค่าทางสถิติแบบ Univariate และ Multivariate Analysis ดังแสดงในตารางที่ 3.4.

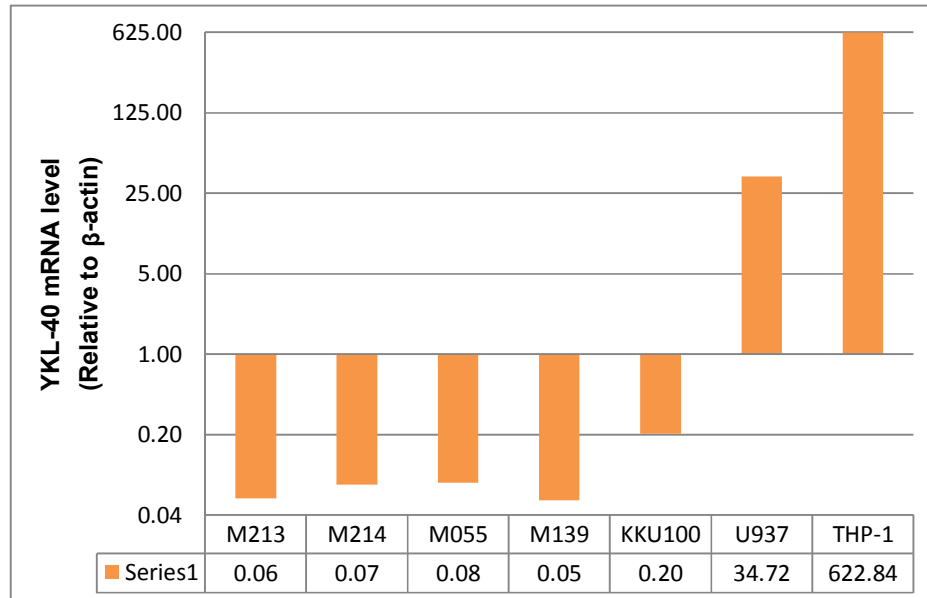


รูปที่ 3.3. การวิเคราะห์ Kaplan-Meier survival curve แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับโปรตีน YKL-40 กับระยะการรอดชีพของผู้ป่วยหลังการผ่าตัดรักษา

3.5. การศึกษาการแสดงออกของระดับ mRNA ของ YKL-40 ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (CCA cell lines)

ทำการทดสอบหาระดับการแสดงออกของ YKL-40 mRNA ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีโดยวิธี RT-PCR แล้วทำการเปรียบเทียบผลระดับ mRNA จาก CCA จำนวน 5 cell lines ได้แก่ M213 M214 M055 M139 และ KKK100 กับผลของ myeloid cell lines คือ U937 cells และ THP-1 cells ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมบวก (positive control) ผลการวิเคราะห์ข้อมูลพบว่า CCA cell lines ทั้ง 5 ชนิดมีการแสดงออก YKL-40 mRNA ต่ำกว่าระดับของ YKL-40 mRNA ของกลุ่มควบคุม (รูปที่ 3.4.) การทดลองได้รับบ่งชี้ว่า YKL-40 อาจไม่ถูกสร้างโดยตรงโดยเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี แต่ถูกกระตุ้นให้มีสร้างจากเนื้อเยื่ออื่นแล้วอาจถูกส่งมายังกระแสเลือดไปมีผลต่อการทำงานของเซลล์มะเร็งผ่านกระบวนการอื่นเช่นกระตุ้น angiogenesis หรือ CCA cell proliferation ที่ไม่ได้เกิดจากการส่งสัญญาณของเซลล์แบบ autocrine ได้มีการศึกษาก่อนหน้าพบว่าระดับ YKL-40 ใน

เซลล์มะเร็งเต้านมและมะเร็งลำไส้จะเพิ่มขึ้นตามการพัฒนาการของเซลล์มะเร็งผ่านกระบวนการ tumor angiogenesis ผ่านการจับกับตัวรับบนผิวเซลล์ syndecan-1 และ integrin $\alpha\beta_3$ และกระตุ้น intracellular signaling cascade ประกอบด้วย focal adhesion kinase (FAK) และ MAP kinase/ Erk 1/2 (Shao et al., 2009)



รูปที่ 3.4. การวิเคราะห์การแสดงออกของ YKL-40 mRNA โดยวิธี RT PCR

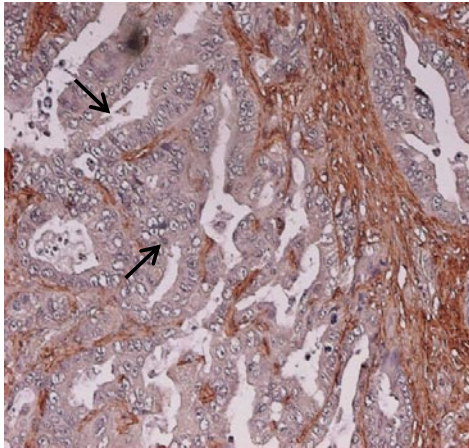
ทำการเปรียบเทียบระดับของ YKL-40 mRNA ที่วัดได้จากเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี 5 สายพันธุ์ได้แก่ KKU100 M213 M214 M055 และ M139 levels กับการแสดงออกของ β -actin mRNA ซึ่งจัดเป็น house keeping mRNA และใช้ myeloid cell lines (U937 and THP-1) เป็น positive control

3.6. การศึกษาการแสดงออกของ YKL-40 ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี

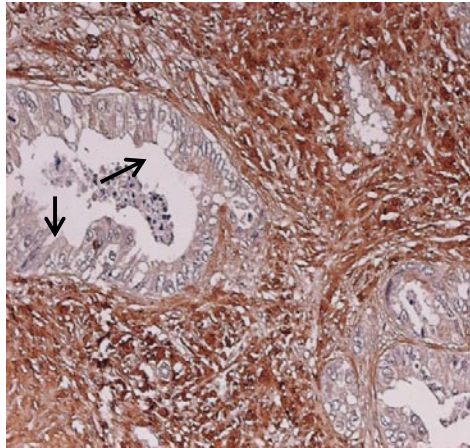
จากการศึกษาแสดงออกของโปรตีน YKL-40 ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีด้วยเทคนิค immunohistochemistry พบผลบวกโดยการติดสีน้ำตาลในบริเวณ stromal cells ได้แก่ fibroblast infiltrating macrophages บริเวณภายในท่อน้ำดี และเซลล์ตับปกติ โดยเฉพาะใน infiltrating macrophage จะมีผลบวกสูง (รูปที่ 3.5. ตำแหน่งลูกศรชี้) อย่างไรก็ตามในบริเวณที่เป็นมะเร็งมีผลบวกต่ำเมื่อเทียบกับเซลล์ตับปกติ ซึ่งเป็นไปได้ว่าเซลล์มะเร็งไม่ได้เป็นตัวหลักในการสร้างโปรตีน YKL-40 แต่อาจมาจากเซลล์ macrophages ที่อยู่ภายในบริเวณรอบ ๆ เซลล์มะเร็งแต่เซลล์ที่เป็นมะเร็งไม่ได้สร้างโปรตีน YKL-40 โดยตรงซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองหาระดับ YKL-40 mRNA โดยวิธี RT PCR

ตัวอย่าง CCA parafilm section ที่ R104/20

(A)

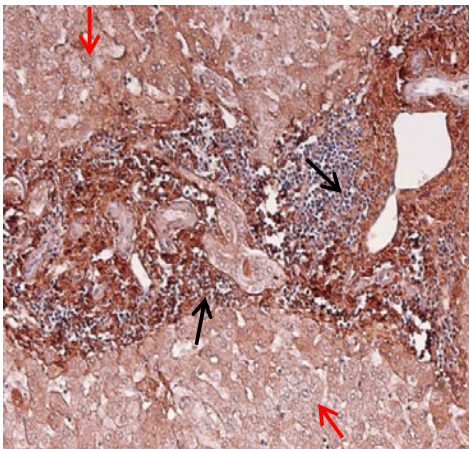


(B)

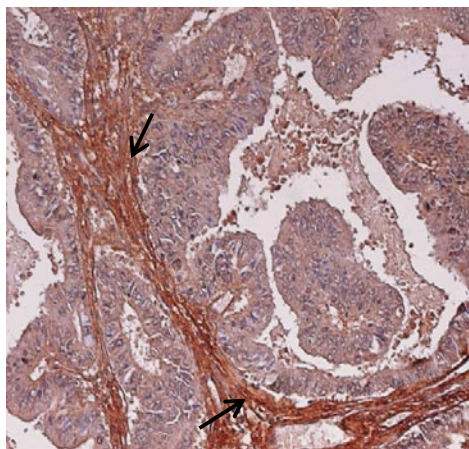


ตัวอย่าง CCA parafilm section ที่ Y140/6

(C)



(D)



รูปที่ 3.5. การย้อมเนื้อเยื่อ CCA ด้วยวิธี Immunoperoxidase staining

ทำการย้อมเนื้อเยื่อด้วย anti YKL-40 polyclonal antibodies (10X HP) ลูกศรชี้แสดง (A) แสดงตำแหน่งเนื้อเยื่อที่ย้อมติด YKL-40 ในเซลล์มะเร็ง (B) ตำแหน่งการย้อมติด YKL-40 ที่ hyperplasia lesion ของ bile duct (C) การย้อมติด YKL-40 ที่บริเวณ stromal cells และ infiltrating macrophages (D) การย้อมติด YKL-40 ที่ fibroblast

บทที่ 4

บทสรุป

4.1. สรุปผลการทดลอง

โปรตีนYKL-40 (chitinase-3-like-1 และ human cartilage glycoprotein-39) เป็นไกลโคโปรตีนที่สำคัญที่มีรายงานเกี่ยวกับการภาวะการอักเสบเรื้อรัง ในช่วงเวลาที่ผ่านมามีรายงานหลายชิ้นแสดงให้เห็นว่าระดับของโปรตีน YKL-40 ที่สูงขึ้นมีความสัมพันธ์กับสภาวะพยาธิสภาพของมะเร็งชนิดต่าง ๆ แต่ยังไม่มียาหรือการรักษาที่เกี่ยวข้องระหว่างโปรตีน YKL-40 กับมะเร็งท่อน้ำดี งานวิจัยนี้ผู้วิจัยทำการศึกษาดูว่าระดับของโปรตีน YKL-40 ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีจำนวน 57 คนและเปรียบเทียบกับซีรัมของผู้มีสุขภาพดี 41 คน ผลการวิเคราะห์พบว่าซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีมีระดับของโปรตีน YKL-40 สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 169.5 ng.mL^{-1} ที่ เมื่อเทียบกับค่าเฉลี่ยของซีรัมกลุ่มปกติที่มีค่า 46.9 ng.mL^{-1} การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับของโปรตีน YKL-40 กับลักษณะทางคลินิกต่าง ๆ เช่น อายุ เพศ ระยะการดำเนินไปของโรคพบว่าความสัมพันธ์ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ แต่โดยรวมระดับของโปรตีน YKL-40 มีค่าสูงขึ้นเมื่ออายุของผู้ป่วยเพิ่มขึ้น ระดับโปรตีนในเพศชายมีค่าสูงกว่าเพศหญิง และระยะของมะเร็งที่ลุกลามไปที่ระยะที่ 4 ก็มีระดับของโปรตีน YKL-40 สูงขึ้นด้วย ขณะที่ผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่มีมุลชีววิทยา (Histology Type) แบบ non-papillary มีระดับของ YKL-40 สูงกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ การวิเคราะห์ทางสถิติแบบ Univariate analysis แสดงความสัมพันธ์ที่มีนัยสำคัญทางสถิติกับระยะการรอดชีพกับลักษณะทางคลินิก 1) ระยะการดำเนินไปของโรค 2) มุลชีววิทยาแบบ non-papillary และ 3) ระดับของโปรตีน YKL-40 ส่วนการวิเคราะห์ข้อมูลแบบ Multivariate Analysis กราฟความสัมพันธ์ของระยะการรอดชีพโดยรวมหลังการผ่าตัด (overall survival) กับระดับ YKL-40 พบว่าผู้ป่วยมะเร็งที่มีระดับ YKL-40 สูงมีระยะการรอดชีพที่สั้นกว่าผู้ป่วยที่มีระดับ YKL-40 ต่ำ

การวิเคราะห์การแสดงออกที่ระดับอาร์เอ็นเอใน CCA cell lines 5 ชนิดพบว่ามีการแสดงออก YKL-40 mRNA ในระดับต่ำ ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน YKL-40 ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีที่พบผลบวกโดยการติดสีน้ำตาลในบริเวณ stromal cells ได้แก่ fibroblast infiltrating macrophages บริเวณภายในท่อน้ำดีที่อยู่รอบเซลล์มะเร็ง แต่ในเซลล์มะเร็งมีระดับโปรตีน YKL-40 ต่ำ ผลการทดลองที่ได้รับบ่งชี้ว่า YKL-40 อาจไม่ถูกสร้างโดยตรงโดยเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี แต่ถูกกระตุ้นให้มีสร้างจากเนื้อเยื่ออื่นแล้วอาจถูกส่งมายังกระแสเลือดไปช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งผ่านกระบวนการอื่นเช่น angiogenesis หรือ cell proliferation

4.1. ข้อเสนอแนะ

ไม่มี

บรรณานุกรม

1. Bojesen, S. E., Johansen, J. S., and Nordestgaard, B. G. (2011). Plasma YKL-40 levels in healthy subjects from the general population. *Clinica Chimica Acta* 412:709-712.
2. Diefenbach, C.S., Shah, Z., Iasonos, A., Barakat, R.R., Levine, D.A., Aghajanian, C., Sabbatini, P., Hensley, M.L., Konner, J., Tew, W., Spriggs, D., Fleisher, M., Thaler, H., and Dupont J. (2007). Preoperative serum YKL-40 is a marker for detection and prognosis of endometrial cancer. *Gynecol Oncol.* 104, 435-442.
3. Eurich, K., Segawa, M., Toei-Shimizu, S., and Mizoguchi, E. (2009). Potential role of chitinase 3-like-1 in inflammation associated carcinogenic changes of epithelial cells. *World. J. Gastroenterol.* 15: 5249-5259.
4. Fontana, R. J.,1 Dienstag, J. L., Bonkovsky, H. L., Sterling, R. K., Naishadham, D., Goodman, Z. D., Lok, A. S. F., Wright, E. C., and Su, G. L. (2010). Serum fibrosis markers are associated with liver disease progression in non-responder patients with chronic hepatitis C. *Gut.* 59:1401-1409.
5. Fusetti, F., Pijning, T., Kalk, K. H., Bos, E., and Dijkstra, B. W. (2003). Crystal structure and carbohydrate-binding properties of the human cartilage glycoprotein-39. *J. Biol. Chem.* 278: 37753-37760.
6. Gatto, M. and Alvaro, D. (2010). New insights on cholangiocarcinoma. *World J Gastrointest Oncol* 2: 136-145.
7. Henrisset, B. and Bairoch, A. (1993). New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 293: 781-788.
8. Høgdall, E. V. S., Ringsholt, M., Høgdall, C. K., Christensen, I. J., Johansen, J. S., Kjaer, S. K., Blaakaer, J., Ostenfeld-Møller, L., Price, P. A., and Christensen, L. H. (2009). YKL-40 tissue expression and plasma levels in patients with ovarian cancer. *BMC. Cancer.* 9: 8.
9. Houston, D. R., Recklies, A. D., Krupa, J. C., and van Aalten, D. M. F. (2003). Structure and ligand-induced conformational change of the 39-kDa glycoprotein from human articular chondrocytes. *J. Biol. Chem.* 278: 30206–30212.
10. Hu, B., Trinh, K., Figueira, W.F., and Price, P. A. (1996). Isolation and sequence of a novel human chondrocyte protein related to mammalian members of the chitinase protein family. *J. Biol. Chem.* 271: 19415-19420.
11. Johansen, J. S., Williamson, M. K., Rice, J. S., and Price, P. A. (1992). Identification of proteins secreted by human osteoblastic cells in culture. *J. Bone. Miner. Res.* 7: 501-512.

12. Johansen, J. S., Jensen, B. V., Roslind, A., Nielsen, D., and Price, P. A. (2006). Serum YKL-40, a new prognostic biomarker in cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 15(2): 194-202.
13. Johansen, J. S., Bojesen, S. E., Mylin, A. K., Frikke-Schmidt, R., Price, P. A., and Nordestgaard, B. G. (2008). Elevated plasma YKL-40 predicts increased risk of gastrointestinal cancer and decreased survival after any cancer diagnosis in the general population. *J. Clin. Oncol.* 27: 1-8.
14. Landis, S., Murray, T., Bolden, S., and Wingo, P. (1998). "Cancer statistics, 1998". *CA Cancer J Clin* 48, 1: 6-29.
15. Letuve, S., Kozhich, A., Arouche, N., Grandsaigne, M., Reed, J., Dombret, M. C., Kiener, P. A., Aubier, M., Coyle, A. J., and Pretolani, M. (2008). YKL-40 is elevated in patients with chronic obstructive pulmonary disease and activates alveolar macrophages. *J. Immun.* 181: 5167-5173.
16. Lee, C. G., Hart, D., Lee, G. R., Koller, B., Matsuura, H., Da Silva, C. A., Sohn, M. H., Cohn, L., Homer, R. J., Kozhich, A. A., Humbles, A., Kearley, J., Coyle, A., Chupp, G., Reed, J., Flavell, R. A., and Elias, J. A. (2006). Role of breast regression protein 39 (BRP-39)/chitinase 3-like-1 in Th2 and IL-13-induced tissue responses and apoptosis. *J. Exp. Med.* 206(5): 1149-1166.
17. Lee, C. G., Da Silva, C. A., Dela Cruz, C. S., Ahangari, F., Ma, B., Kang, M. J., He, C. H., Takyar, S., and Elias, J. A. (2011). Role of chitinase/chitinase-like proteins in inflammation, tissue remodeling, and injury. *Annu. Rev. Physiol.* 73: 479-501.
18. Rathcke, C. N., Johansen, J. S., and Vestergaard, H. (2006). YKL-40, a biomarker of inflammation, is elevated in patients with type 2 diabetes and is related to insulin resistance. *Inflamm. Res.* 55: 53-59.
19. Renkema, G. H., Boot, G. R., Au, F. L., Donker-Koopman, W. E., Strijland, A., Muilners, A. O., Hrebicek, M., and Aerts, J. M. F. G. (1998). Chitotriosidase, a chitinase, and the 39-kDa human cartilage glycoprotein, a chitin-binding lectin, are homologues of family 18 glycosyl hydrolases secreted by human macrophages. *Eur. J. Biochem.* 251: 504-509.
20. Roslind, A., Johansen, J.S., Christensen, I.J., Kiss, K., Balslev, E., Nielsen, D.L., Bentzen, J., Price, P.A., and Andersen E. (2008). High serum levels of YKL-40 in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck are associated with short survival. *Int. J. Cancer.* 122, 857-863.
21. Sakata, M., Masuko-Hongo, K., Tsuruha, J., Sekine, T., Nakamura, H., Takigawa, M., Nishioka, K., and Kato, T. (2002). YKL-39, a human cartilage-related protein, induces arthritis in mice. *Clin. Exp. Rheumatol.* 20: 343-350.
22. Shao, R., Hame, K., Petersen, L., Cao, J. Q., Arenas, R. B., Bigelow, C., Bentley, B., and Yan, W. (2009). YKL-40, a secreted glycoprotein, promotes tumor angiogenesis. *Oncogene.* 28(50): 4456-4468.

23. Steck, E., Breit, S., Breusch, S. J., Axt M., and Richter, W. (2002). Enhanced expression of the human chitinase 3-like 2 gene (YKL-39) but not chitinase 3-like 1 gene (YKL-40) in osteoarthritic cartilage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 299: 109-115.
24. Sun, Y.J., Chang, N.C., Hung, S.I., Chang, A.C., Chou, C.C., and Hsiao CD. (2001) The crystal structure of a novel mammalian lectin, Ym1, suggests a saccharide binding site. *J. Biol. Chem.* 276:17507-17514.
25. Uttaravichien, T., Bhudhisawasdi, V., Pairojkul, C., and Pugkhem, A. (1999). "Intrahepatic cholangiocarcinoma in Thailand". *J Hepato-Biliary-Pancreatic Surg* 6, 2: 128–35.
26. Vatanasapt, V., Sriamporn, S., and Vatanasapt, P. (2002). "Cancer control in Thailand". *Jap. J. Clin. Oncol.* 32 Suppl S82–91.
27. Yamac, D., Ozturk, B., Coskun, U., Tekin, E., Sancak, B., Yildiz, R., and Atalay, C. (2008). Serum YKL-40 levels as a prognostic factor in patients with locally advanced breast cancer. *Adv. Ther.* 25(8): 801-809.
28. Yang, G.F., Cai, P.Y., Li, X.M., Deng, H.X., He, W.P., and Xie, D. (2009). Expression and clinical significance of YKL-40 protein in epithelial ovarian cancer tissues. *Chin. J. Cancer.* 28, 142-145.

ภาคผนวก ก

ผลงานตีพิมพ์และการเผยแพร่

1. ผลงานอยู่ในระหว่างเตรียมตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ 1 ผลงาน

- Sunisa Thongsom, Wipa Suginta*, Atit Silsrilivanit, Wethaka Chaocharoen, Sopit Wongkham, Choe Han, Chutima Talabnin*. HUMAN YKL-40 PROMOTES MALIGNANT PHENOTYPE AND IS ASSOCIATED WITH PROGNOSIS OF PATIENTS WITH CHOLANGIOCARCINOMA. Manuscript in preparation for Cancer Res.

2. ผลงานนำเสนอในรูปแบบบรรยายหรือโปสเตอร์ในที่ประชุมระดับนานาชาติหรือระดับชาติ 3 ผลงาน

- Thongsom S, Chaocharoen W, Silsriwianit A, Wongkham S, **Suginta W***, and Talabnin C*. PLASMA LEVELS OF YKL-40 IS A POTENTIAL SCREENING MARKER IN PATIENTS WITH CHOLANGIOCARCINOMA. 13Th FAOBMB Congress, BITECH, Bangkok, 25-29 November, 2012, p156
- Sunisa Thongsom, Atit Silsrilivanit, Sopit Wongkham, **Wipa Suginta***, Chutima Talabnin*. PLASMA YKL-40, A POTENTIAL SCREENING MARKER IN PATIENTS WITH CHOLANGIOCARCINOMA. 8th International Symposium of The Protein Society of Thailand, Chulabhorn Research Institute, Bangkok, 5-7 August, 2013, p75.
- Sunisa Thongsom, Wethaka Chaocharoen, Atit Silsrilivanit, Sopit Wongkham, **Wipa Suginta***, Chutima Talabnin*. Human YKL-40 promotes malignant phenotype and is associated with prognosis of patients with cholangiocarcinoma. The Joint 7th AOHUPO Congress and 9th International Symposium of the Protein Society of Thailand. The Miracle Grand Convention Hotel, Bangkok, 6-8 August, 2014. P122.

ภาคผนวก ข

ประวัติผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นาง วิภา นามสกุล สุจินต์
(ภาษาอังกฤษ) Mrs. Wipa Suginta
2. หมายเลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 2201 00491 912
3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์ ดร. ด้าน ชีวเคมี
4. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail
หน่วยวิจัยชีวเคมี-เคมีไฟฟ้า สาขาวิชาเคมีและชีวเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ ม.เทคโนโลยีสุรนารี
อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000 โทรศัพท์ 44 223968 โทรสาร 44 223195 e-mail wipa@sut.ac.th
5. ประวัติการศึกษา
2541-2543 ปฏิบัติงานวิจัยหลังปริญญาเอก โดยรับทุนวิจัย Wellcome Trust ณ ภาควิชา Biomedical Sciences มหาวิทยาลัย Edinburgh ประเทศอังกฤษ เป็นเวลา 18 เดือน
2538-2541 ปริญญาดุษฎีบัณฑิต (ชีวเคมี) มหาวิทยาลัย Edinburgh ประเทศอังกฤษ
2533-2536 ปริญญามหาบัณฑิต (ชีวเคมี) มหาวิทยาลัยมหิดล
2530-2533 ปริญญามหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ
ชีวเคมีของเอนไซม์และโปรตีนที่เยื่อเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ
- 7.3 รางวัลผลงานวิจัยระดับชาติ/นานาชาติ
2014 “2014 Prof. MR. Jisnusun Svasti BMB Award” from The Science Society of Thailand under the Patronage of His Majesty the King
2013 “2013 TRF-CHE-Scopus Researcher Award” from The Thailand Research Fund and Elsveir
2009-2012 “Alexander von Humboldt Fellowship for Experienced Researchers” from The Alexander von Humboldt Foundation, Bonn, Germany.
2010 “2010 SUT Outstanding Research Award” from Suranaree University of Technology.
2006 Suranaree University of Technology Award for “Outstanding Academic Performance in Science”
2005 “2005 For Women in Science Fellowship” from L’OREAL/UNESCO Thailand.
2003 “Visiting Scientist Fellowship” from the German Academic Exchange Service (DAAD), Germany.
1999-2000 “Wellcome Trust fellowship” for Postdoctoral Research Study at The Membrane Biology Group, The University of Edinburgh, United Kingdom.

1995-1999 “Royal Thai Government Ph.D. Scholarship” from the Royal Thai Government to carry out a Ph.D. study in United Kingdom.

7.4 ผลงานตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

1. Suginta W*, Schulte A, Mahendran KR, Aunkham A, Chumjan W, Winterhalter M (2014) Chitoporin from *Vibrio harveyi*: Effects of transmembrane voltage and N-acetyl functionality on translocation of chitin oligosaccharides. Under revisions for Biophys J.
2. Chaocharoen W, Suginta W, Ranok A, Limbut W, Numnuam A, Khunkaewla P, Kanatharana P, Thavarungkul P, Schulte A* (2014) Electrochemical immunosensing of human YKL-40, a mammalian chitinase-like protein and disease marker. Bioelectrochem. In Press.
3. Sirimontree P, Suginta W*, Sritho N, Kanda Y, Shinya S, Ohnuma T, and Fukamzo T*. (2014) Mutation strategies for obtaining chitooligosaccharides with longer chains by transglycosylation reaction of a family GH18 chitinase. Biosci Biotech Biochem. In press.
4. Aunkham A, Schulte A, Winterhalter M, Suginta W* (2014) BpsOmp38 porin involvement in cephalosporin and carbapenem resistance of the ultraresistant melioidosis bacterium *Burkholderia pseudomallei*. PLoS One. 9:e95918.
5. Ranok A, Khunkaewla P, Suginta W* (2013) Human cartilage chitinase 3-like protein 2: Cloning, expression, production of polyclonal and monoclonal antibodies for osteoarthritis detection and identification of potential binding partners. Monoclon Antib Immunodiagn Immunother (formerly Hybridoma). 32, 317-325.
6. Suginta W, Smith MF* (2013) Single-molecule trapping dynamics of sugar-uptake channels in marine bacteria. Phys Rev Lett. 110, 238102.
7. Suginta W, Khunkaewla P, Schulte A* (2013) Electrochemical biosensor applications of polysaccharides chitin and chitosan. Chem Rev. 113, 5458-5479.
8. Suginta W*, Chumjan W, Mahendran KR, Schulte A, Winterhalter M. (2013) Chitoporin from *Vibrio harveyi*: A Channel with Exceptional Sugar Specificity. J Biol Chem. 288, 11038-11046.
9. Suginta W*, Chumjan W, Mahendran KR, Janning P, Schulte A, Winterhalter M. (2013) Molecular uptake of chitooligosaccharides through chitoporin from the marine bacterium *Vibrio harveyi*. PLoS One. 8:e55126.
10. Suginta W*, Sritho N. (2012) Multiple roles of Asp313 in the refined catalytic cycle of chitin degradation by *Vibrio harveyi* chitinase A. Biosci Biotech Biochem. 76, 2275-2281.
11. Sritho N & Suginta W* (2012) Role of Tyr-435 of *Vibrio harveyi* chitinase A in chitin utilization. App Biochem Biotech. 166, 1192-1202.
12. Pantoom S, Vetter I*, Prinz, H*, Suginta W* (2011) Potent family-18 chitinase inhibitors: X-ray structures, affinities and binding mechanisms. J Biol Chem. 286, 24312-24323.

13. Suginta W*, Mahendran KR, Chumjan W, Hajjar E, Schulte A, Winterhalter M, Weingart H*. (2011) Molecular analysis of antimicrobial agent translocation through the membrane porin BpsOmp38 from an ultraresistant *Burkholderia pseudomallei* strain. BBA-Biomembr. 1808, 1552-1559.
14. Suginta W*, Chuenark D, Masuhara M, Fukamizo T (2010) Novel β -N-acetylglucosaminidases from *Vibrio harveyi* 650: Cloning, expression, enzymatic properties, and subsite identification. BMC Biochem. 11:40. (Highly accessed)
15. Schulte A, Ruamchan S, Khunkaewla P, Suginta W* (2009) The outer membrane protein VhOmp from *Vibrio harveyi*: The pore-forming properties in black lipid membranes. J Membr Biol. 230, 101-111.
16. Suginta W*, Pantoom S, Prinz H (2009) Substrate binding modes and anomer selectivity of chitinase A from *Vibrio harveyi*. J Chem Biol. 2, 191-202.
17. Songsiriritthigul C, Pantoom S, Aguda AH, Robinson RC, Suginta W* (2008) Crystal structures of *Vibrio harveyi* chitinase A complexed with chitooligosaccharides: Implications for the catalytic mechanism. J Struct Biol. 162, 491-499.
18. Pantoom S, Songsiriritthigul C, Suginta W* (2008) The effects of the surface-exposed residues on the binding and hydrolytic activities of *Vibrio carchariae* chitinase A. BMC-Biochem. 9:2.
19. Suginta W*, Songsiriritthigul C, Kobdaj A, Opassiri R, Svasti J (2007) Mutations of Trp275 and Trp397 altered the binding selectivity of *Vibrio carchariae* chitinase A. BBA-General Subjects. 1770, 1151-1160.
20. Suginta W* (2007) Identification of chitin binding proteins and characterization of two chitinase isoforms from *Vibrio alginolyticus* 283. Enzyme Microb Tech. 41, 212-220.
21. Songsiriritthigul C, Yuvaniyama J, Robinson RC, Vongsuwan A, Prinz H, Suginta W* (2005) Expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of chitinase A from *Vibrio carchariae*. Acta Cryst. Section F. 61, 895-898.
22. Suginta W*, Vongsuwan A, Songsiriritthigul C, Svasti J, Prinz H (2005) Enzymatic properties of wild-type and active site mutants of chitinase A from *Vibrio carchariae*, as revealed by HPLC-MS. FEBS J. 272, 3376-3386.
23. Siritapetawee J, Prinz H, Krittana C, Suginta W* (2004) Expression, refolding of Omp38 from *Burkholderia pseudomallei* and *B. thailandensis*, and its function as a diffusion porin. Biochem J. 384, 609-617.
24. Suginta W*, Vongsuwan A, Songsiriritthigul C, Prinz H, Estibeiro P, Duncan RR, Svasti J, Fothergill-Gilmore LA (2004) An endochitinase A from *Vibrio carchariae*: gene isolation, modelled structure topology, cloning and functional expression. Arch Biochem Biophys. 424, 171-180.

25. Siritapetawee J, Prinz H, Samosornsuk W, Ashley RH, Suginta W* (2004) Functional reconstitution, gene isolation and topology modelling of porins from *Burkholderia pseudomallei* and *B. thailandensis*. *Biochem J.* 377, 579-587.
26. Suginta W, Karoulias N, Aitkin A, Ashley RH* (2001) Brain dynamin-1 interacts directly with the chloride intracellular channel protein CLIC4 in a complex containing actin and 14-3-3 proteins. *Biochem J.* 359, 55-64.
27. Suginta W, Robertson PAW, Austin B, Fry SC, Fothergill-Gilmore LA* (2000) Chitinases from *Vibrio*: activity screening and purification of chi A from *Vibrio carchariae*. *J Appl Microbiol.* 89, 76-84.
28. Svasti J*, Srisomsap C, Surarit R, Benjavongkulchai E, Suginta W, Khunyoshyeng S, Champattanachai V, Nilwarangkoon S, Rungvirayudx S (1996) Potential Applications of Plant Glycohydrolases for Oligosaccharide Synthesis. In *Protein Structure-Function Relationship* (Zaidi, Z.H. and Smith, D.L., eds.), Plenum Press. pp.249-257.
29. Surarit R, Svasti MR J, Srisomsap C, Suginta W, Khunyoshyeng S, Nilwarangkoon S, Harnsakul P, Benjavongkulchai E* (1995) Possible Use of Glycosidase Enzymes from Thai Plant Seeds for Oligosaccharide Synthesis. In *Biopolymers and Bioproducts: structure, function and applications* (Svasti, J. et al., eds.), Samakkhisan Public Co. Ltd., Bangkok, 251-255.
30. Suginta W, Svasti MRJ* (1995) Purification and Properties of β -Galactosidase from *Hibiscus sabdariffa* L. var. *altissima*. *ScienceAsia* (Formerly *J Sci Soc Thai*) 21, 183-186.
31. Suginta W, Svasti J* (1995) Beta-Galactosidase from Thai Jute: Purification and Characterization. In *Biopolymers and Bioproducts: Structure, Function and Applications* (Svasti, J. et al., eds.), Samakkhisan Public Co. Ltd., Bangkok, 256-260.
32. Surarit R, Svasti MRJ, Srisomsap C, Suginta W, Khunyoshyeng S, Nilwarangkoon S, Harnsakul P, Benjavongkulchai E (1995) Screening of Glycohydrolase Enzymes in Thai Plant Seeds for Potential Use in Oligosaccharide Synthesis. *ScienceAsia* (Formerly *J Sci Soc Thai*) 21, 293-303.

หมายเหตุ *Corresponding author
