

รายงานการวิจัย

ชื่อโครงการวิจัย

(ภาษาไทย)

บทบาทของ MAIT cells ในการควบคุมการติดเชื้อแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis*

(ภาษาอังกฤษ)

Role of MAIT cells in the control of *Mycobacterium tuberculosis* infection

หน่วยงาน: หน่วยภูมิคุ้มกันวิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

[illegible]

หน่วยภูมิคุ้มกันวิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. ผศ.นพ.กมล แก้วกิตติณรงค์ สัดส่วน 30% (ผู้ร่วมวิจัย)

หน่วยโรคปอด ภาควิชาอายุรศาสตร์ รพ. จุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย

3. อ.นิพนธ์ อุดมสันติสุข สัดส่วน 15% (ผู้ร่วมวิจัย)

หน่วยแบคทีเรีย ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Acknowledgement (กิตติกรรมประกาศ)

โครงการวิจัยในรายงานการวิจัยฉบับนี้ ได้รับการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณแผ่นดิน ปี 2559

บทคัดย่อ (Abstract)

วัณโรค (Tuberculosis) เป็นสาเหตุหลักของการเสียชีวิตจากโรคติดเชื้อของประชากรทั่วโลก (1) วัณโรคเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis* ภูมิคุ้มกันของร่างกายที่มีต่อเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ประกอบด้วยเซลล์จากส่วนของ innate immunity และ adaptive immunity ในส่วนของ adaptive immunity กลุ่มของ T cells ที่มีส่วนสำคัญ ได้แก่ ทั้ง conventional T cells (ทั้ง CD8+ และ CD4+) และ non-conventional T cells (MAIT, NKT, CD1-restricted T cells) (2)

MAIT (Mucosal-associated invariant T) cells จัดอยู่ในกลุ่มของ non-conventional T cells ที่พบได้ปริมาณมากตามเยื่อของร่างกาย รวมถึงปอด (3) นอกจากนี้ MAIT cells ยังพบได้ในกระแสเลือดมากถึง 10% ของ T cells ทั้งหมด ซึ่งนับว่าเป็นปริมาณที่สูงสำหรับ T cells ที่มี specificity ต่อ antigen ชนิดเดียวกัน (โดยเฉพาะเมื่อเปรียบเทียบกับ classical HLA-restricted T cells) MAIT cells เป็นกลุ่มเซลล์ที่มีคุณสมบัติ antibacterial activity โดยการหลั่งทั้ง cytokines และ cytotoxicity molecules ออกมาจากกลุ่มเซลล์นี้ การศึกษาเท่าที่มีได้แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่าง MAIT cells และเชื้อจุลินทรีย์ *Mycobacterium tuberculosis* โดยที่กลุ่มเซลล์นี้สามารถที่จะได้รับการกระตุ้นด้วย *Mycobacterium* species ได้ และพบปริมาณ MAIT cells ในกระแสเลือดของผู้ป่วยที่เป็นวัณโรคนั้นลดลงและมีการหลั่ง cytokines ที่ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับอาสาสมัครที่ปกติ

การศึกษาโครงวิจัยในรายงานวิจัยฉบับนี้มุ่งเน้นที่จะศึกษาความสัมพันธ์และบทบาทของ MAIT cells ในการควบคุมและ/หรือ การป้องกัน/การต่อสู้ทำลายเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ในมนุษย์ โดยเป็นการติดตามการเปลี่ยนแปลงของ MAIT cells เป็นระยะเวลา 6 เดือน กับผู้ป่วยวัณโรคที่ได้รับการรักษาที่ รพ. จุฬาลงกรณ์ ตลอดระยะเวลาของการรักษา

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

บทนำ (Introduction).....	7
วิธีการดำเนินการวิจัย (Materials and Methods)	11
ผลการวิจัย (Results).....	15
อภิปราย /วิจารณ์ (Discussion)	28
ข้อสรุปและข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป (Conclusion and Further Directions)	28
ประโยชน์ในการประยุกต์ของผลงานวิจัย (Research Application)	30
บรรณานุกรม (Bibliography)	30
ประวัตินักวิจัยและคณะ (Research investigators and CVs).....	32

สารบัญตาราง (List of Tables)

ไม่มี

สารบัญภาพ (List of Illustrations)

รูปที่ 1 MAIT cell ในกระแสเลือดของผู้ป่วยวัณโรค	16
รูปที่ 2 Cytokine receptor บนผิวของ MAIT cell ในกระแสเลือดของผู้ป่วยวัณโรค.....	17
รูปที่ 3 CXC chemokine receptor บนผิวของ MAIT cell ในกระแสเลือดของผู้ป่วยวัณโรค.....	19
รูปที่ 4 CC chemokine receptor บนผิวของ MAIT cell ในกระแสเลือดของผู้ป่วยวัณโรค	21
รูปที่ 5 Cutaneous Lymphocyte-associated antigen (CLA) บนผิวของ MAT cell.....	21
รูปที่ 6 การหลั่ง cytokine ใน $CD3^+$ MAIT cell เมื่อถูกกระตุ้น	23
รูปที่ 7 การหลั่ง cytokine ใน $CD3^+CD4^-$ MAIT cell เมื่อถูกกระตุ้น	24
รูปที่ 8 การหลั่งสารทำลายสิ่งแปลกปลอมใน $CD3^+$ MAIT cell เมื่อถูกกระตุ้น.....	26
รูปที่ 9 การหลั่งสารทำลายสิ่งแปลกปลอมใน $CD3^+CD4^-$ MAIT cell เมื่อถูกกระตุ้น	27

คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)

2M	2 months
2W	2 weeks
4M	4 months
AFB	Acid fast Bacilli
BFA	Brefeldin A
CLA	Cutaneous lymphocyte-associated antigen
D0	Day 0
IL	Interleukin
MAIT cell	Mucosal associated invariant T cell
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polymerase chain reaction
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate

บทนำ (Introduction)

วัณโรค (Tuberculosis) เป็นสาเหตุหลักของการเสียชีวิตจากโรคติดเชื้อของประชากรทั่วโลก (1) วัณโรคเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis* ซึ่งเป็นแบคทีเรีย acid-fast bacilli ตัวเชื้อมักจะอาศัยอยู่ในปอดของผู้ที่ติดเชื้อ และมีผู้ป่วยส่วนหนึ่งที่พัฒนาไปเกิดเป็น active tuberculosis (active TB) ภายในระยะเวลาประมาณ 1-3 ปี (4) ส่วนผู้ที่ติดเชื้ออีกส่วนหนึ่งจะมีการเกิด immune response ของร่างกายเพื่อป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อและกักเชื้อโรคไว้ในปอด เกิดเป็น granuloma ภาวะนี้เรียกว่าเกิดเป็นลักษณะของ latent tuberculosis infection (latent TB infection) ต่อมาเวลาผ่านไปเมื่อผู้ที่ติดเชื้อเกิดสภาวะที่ภูมิคุ้มกันต่ำลง และเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* เกิดการ reactivate ขึ้นผู้ป่วยก็จะมีลักษณะของ reactivated tuberculosis (reactivated TB) ขึ้นมา ในภาวะนี้ granuloma ที่เกิดขึ้นก็จะมีการ necrosis และมีการทำลายของเนื้อเยื่อปอดอย่างถาวรได้ รวมถึงเป็นช่องทางการแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรียไปสู่ผู้อื่น (2)

ภูมิคุ้มกันของร่างกายที่มีส่วนสำคัญในการทำลายเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* มีทั้งส่วนของภูมิคุ้มกัน ที่มีมาแต่กำเนิด (innate immunity) ซึ่งตอบสนองต่อการติดเชื้อได้เร็ว และส่วนของภูมิคุ้มกันที่ได้มาภายหลัง (adaptive immunity) ซึ่งต้องใช้เวลาในการตอบสนองต่อการติดเชื้อมากกว่าแต่มีความจำเพาะต่อเชื้อโรคมากกว่าและมีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อมากกว่า ภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด

ภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ในส่วนของ adaptive immune response นั้น มีทั้ง กลุ่มเม็ดเลือดขาว conventional T cells (CD4+ T cells และ CD8+ T cells) (2) และ non-conventional T cells (NKT cells, $\gamma\delta$ T cells, CD1restricted T cells และ MAIT cells) (3, 5, 6) ซึ่งเซลล์แต่ละกลุ่มมีบทบาทในการรับรู้เชื้อด้วยกระบวนการที่แตกต่างกันไป ในงานวิจัยที่จะนำเสนอนี้จะ focus ลงไปที่กลุ่มของ non-conventional T cells ชนิดหนึ่งที่มีชื่อเรียกว่า Mucosal-associated invariant T (MAIT) cells

MAIT cells (ย่อมาจาก Mucosal-associated invariant T cell) เป็นกลุ่ม T cells ที่พบมากบริเวณเยื่อของร่างกาย (mucosal surfaces) เช่น เยื่อบุทางเดินอาหาร และ ปอด เป็นต้น (7) ทั้งนี้ MAIT cells ยังพบได้ประมาณ 2-10 % ของ T cells ในเลือด (8) ซึ่งนับว่าเป็นสัดส่วนที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับ T cells อื่นๆ ในร่างกาย MAIT cells ตอบสนองต่อวิตามินที่ถูกนำเสนอโดยโมเลกุลบนผิวของ antigen-presenting cells ที่มีชื่อว่า MR1 (ย่อมาจาก MHC-related class I molecule)

ลักษณะโครงสร้างของ T cell receptor ที่อยู่บนผิวของ MAIT cells นั้น มีลักษณะพิเศษกว่า conventional T cells ตรงที่ alpha chain นั้นมีความจำเพาะในระดับที่สูง (TRAV1-2-TRAJ33-predominant**, TRAV1-2-TRAJ12-TRAV1-2-TRAJ20) และมักจะเลือกจับคู่กับ beta chain เฉพาะบาง family (predominantly TRBV6-1,6-4,20) (9) การที่ MAIT T cell receptor มีโครงสร้างเช่นนี้ทำให้เหมาะต่อการตอบสนองต่อ antigen ที่ถูกนำเสนอโดย MR1 เพราะ MR1 เป็น MHC molecule ที่มีโครงสร้าง amino acid ในมนุษย์เหมือนกันหมดทุกคน ซึ่งจะต่างจาก HLA- class I หรือ HLA-class II ที่ ทุกคนจะมีโครงสร้างแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับว่ารับ HLA molecule ใดมาจากพ่อแม่ โดยปกติแล้ว HLA-class I และ HLA-class II จะนำเสนอ antigen ให้กับ CD8+ T cells และ CD4+ T cells ตามลำดับ จะมีบางกรณีที่สามารถนำเสนอ antigen โดยข้ามกลุ่มกัน เรียกว่าเป็น cross-presentation แต่สำหรับ MAIT cells ประกอบด้วยกลุ่มเซลล์ที่ express ทั้ง CD8+, CD4+ และ CD4-CD8- (DN)

MAIT cells ตอบสนองต่อเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราบางกลุ่มเท่านั้น (10) ภายหลังได้มีการเชื่อมโยงถึงความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มจุลชีพที่กระตุ้น MAIT cells ได้ว่าจำเป็นต้องมี riboflavin pathway สำหรับการสังเคราะห์วิตามิน บี 2 (vitamin B2) (11) ตัวอย่างของเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราที่สามารถกระตุ้น MAIT cells ได้แก่ Mycobacteria species (*M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.smegmatis*), *Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, etc. การตอบสนองของ MAIT cells ต่อเชื้อจุลชีพได้แก่ การหลั่ง cytokine (IFN γ , TNF, IL-17, IL-2) (8) และ cytotoxicity effect (12) นอกจากนี้ MAIT cells ยังมีบทบาทในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพได้อีกด้วย

จากการที่ MAIT cells นั้นมี T cell receptor ที่เป็น TRAV1-2+ alpha chain และมีการ express ของ CD161 อยู่ในระดับที่สูง (CD161++) จึงทำให้การติดตาม MAIT cells นี้ทำได้โดยการเชื่อมเซลล์ด้วย anti-TRAV1-2 monoclonal antibody และ anti-CD161 antibody ปัจจุบันมีการคิดค้น MR1 tetramer ซึ่งสามารถทำให้การติดตาม MAIT cells เป็นไปได้ด้วยความจำเพาะยิ่งขึ้น (9, 13)

มีการศึกษาโดย Gold MC et al. (2010) เปรียบเทียบระดับของ %CD8+V α 7.2+ T cells ในผู้ป่วยที่เป็น active TB, LTBI (latent TB infection) และ uninfected (healthy) donors มีการพบว่าผู้ป่วยที่เป็น active TB มีระดับของ %CD8+V α 7.2+ T cells ต่ำกว่า ผู้ป่วยที่เป็น latent TB infection อย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) แต่ทั้งนี้ การติดตามกลุ่มเซลล์ในลักษณะนี้อาจจะไม่ได้เป็นตัวแทนของ MAIT cells ที่ดีได้ เนื่องจาก anti-TRAV1-2 antibody หากไม่ได้ใช้ร่วมกับ anti-CD161+ antibody แล้วจะมีการรวมกลุ่มของ TRAV1-2+ conventional T

cells เข้ามาในการเปรียบเทียบ นอกจากนี้แล้วการศึกษานี้ได้มุ่งเปรียบเทียบเฉพาะ CD8+ T cells แต่ MAIT cells นั้นมีกลุ่มเซลล์ของทั้ง CD8+, CD4+ และ CD4-CD8- (DN)

การศึกษาโดย Jiang J et al. (2014) ที่มีการเปรียบเทียบสัดส่วนของ MAIT cells ในผู้ป่วยคนจีนที่เป็น active TB (sputum Mtb+ or sputum Mtb-), latent TB infection และ healthy controls พบว่าในผู้ป่วยที่เป็น active TB นั้นมีสัดส่วนของ MAIT cells ที่น้อยกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มของ healthy controls อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.0001$) และน้อยกว่าเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่เป็น latent TB infection ($p < 0.05$)

จากการศึกษาทั้งสองนี้ จะเห็นได้ว่าสัดส่วนของ MAIT cells มีความสัมพันธ์กับ disease activity ของ tuberculosis แต่สิ่งที่ยังมีข้อสงสัยก็คือว่า สัดส่วนของ MAIT cells ที่เห็นว่ามันน้อยกว่านั้นเป็นผลของตัวโรคเอง หรือว่าเป็นจากธรรมชาติของคนๆนั้นที่เป็นเหตุให้ไม่สามารถควบคุมการติดเชื้อ Mycobacterium tuberculosis จนเกิดการพัฒนามาเป็น active TB ได้

ภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อสู้เชื้อ Mycobacterium tuberculosis นั้น ในส่วนของ conventional T cells พบว่าทั้ง CD4+ และ CD8+ T cells มีบทบาทในการควบคุมโรค โดยเฉพาะในกลุ่มของ T cells ที่มีลักษณะ polyfunctional ซึ่งหมายความว่า สามารถเพิ่มจำนวน (proliferation) และ หลั่ง cytokine ได้หลายตัว (TNF, IFN γ , IL2) เมื่อได้รับการกระตุ้นโดย antigen (14) กลุ่มของ M.tb-specific CD4+ T cells และ M.tb-specific CD8+ T cells ที่มีการทดสอบถึง polyfunctionality ซึ่งพบว่าทั้งใน healthy donors (nonTb), ผู้ป่วย latent TB infection (LTb) และ ผู้ป่วย active TB (ATb) การตอบสนองต่อ M.tb antigen มันจะเป็น single cytokine producing T cells อยู่ รองลงมาก็จะเป็น dual-cytokine producing T cells การทดสอบของ T cells ในลักษณะ TB model มักจะเป็นการศึกษาการตอบสนองต่อโปรตีนกลุ่ม ESAT-6 และ CFP-10 (15, 16) เชื้อ Mycobacterium tuberculosis เป็น intracellular pathogen ที่อาศัยอยู่ใน macrophage เวลาที่อยู่ร่างกายของ host กลุ่มของ CD8+ T cells ที่มีหน้าที่รับรู้ antigen จากเซลล์ที่ติดเชื้อ และมีความสามารถในการทำลายเซลล์ที่มีการติดเชื้อได้นั้น ปัจจุบันจึงมีการศึกษาถึงบทบาทของ CD8+ T cells มากขึ้น (3) การศึกษาที่กล่าวมานี้ ใช้โปรตีนเป็น antigen ในการกระตุ้น จึงมิได้นำ MAIT cells ซึ่งเป็นเซลล์ที่ตอบสนองต่อวิตามินบี2 (vitamin B2) เข้ามาคำนึงถึง

เนื่องด้วย MAIT T cell receptor ที่อยู่บนผิว MAIT cells มีลักษณะเป็น semi-invariant T cell receptor จึงทำให้ สามารถที่จะชี้ได้ว่าเป็น MAIT cells จากการตรวจสอบ T cell receptor sequence ของ alpha chain ซึ่ง

จะต้องเป็น TRAV1-2-TRAJ33, TRAV1-2-TRAJ12 และ TRAV1-2-TRAJ20 และมีตำแหน่ง amino acid ที่สำคัญ ได้แก่ Tyr95 (17, 18) และ beta chain ซึ่งอาจเป็น TRBV6-1, 6-4, 20, etc. (9) การติดตาม MAIT cells นั้นจึงสามารถทำได้โดยการ sequence MAIT T cell receptor และ ตรวจสอบดู alpha chain และ beta chain ของ MAIT cells ได้ การติดตาม MAIT TCR repertoire จาก MAIT cells ในกระแสเลือดในผู้ป่วยที่เป็น active TB และติดตามดูการเปลี่ยนแปลงของ MAIT TCR repertoire ไปภายหลังการได้รับการรักษาแล้ว จะเป็นการศึกษาที่ช่วยให้เข้าใจถึง dynamics ของ MAIT cells ในการควบคุมวัณโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ Mycobacterium tuberculosis ได้

โดยสรุป MAIT cells เป็นกลุ่มของเซลล์ที่มีความสามารถในการหลั่ง cytokine ได้หลากหลายชนิด และเป็นกลุ่มของ T cells ที่มีสัดส่วนที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับ classical HLA-restricted T cells รวมถึงเป็นเซลล์ที่มีการอนุรักษ์ในเชิงวิวัฒนาการมาเป็นล้านๆปี เนื่องจาก MR1 molecule ซึ่งเป็น selecting/restricting element มีการพบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จะเห็นได้ว่ากลุ่ม MAIT cells เป็นกลุ่มของ T cells ที่มีศักยภาพในการที่จะพัฒนาศึกษาถึงบทบาทในการควบคุมโรคติดเชื้อวัณโรคที่เกิดจาก Mycobacterium tuberculosis

ในรายงานการวิจัยสิ้นปีที่ 1 ของโครงการวิจัยนี้ ได้มีการสรุปวิธีการดำเนินการวิจัยและผลการวิจัยที่ทำมาซึ่งเป็นเพียงส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยทั้งหมด

วิธีการดำเนินการวิจัย (Materials and Methods)

1. การเก็บตัวอย่างของผู้ป่วยที่เข้าร่วมโครงการวิจัย

ในงานวิจัยนี้ต้องการศึกษา MAIT cell ในเลือดของผู้ป่วยวัณโรค โดยจะทำการเก็บตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยในหลอดเลือดชนิด EDTA ปริมาตรครั้งละ 10 ml ซึ่งจะเริ่มเก็บตั้งแต่ผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นวัณโรค (Day 0) ตลอดช่วงที่ได้รับการรักษาเป็นเวลา 6 เดือน (2 weeks, 4 weeks, 6-8 weeks, 4 months) และภายหลังได้รับการรักษาด้วยยาครบตามระยะเวลา (6 months) โดยตลอดการทดลองจะทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยทั้งหมด 20 คน

1.1. เกณฑ์ในการคัดเลือกผู้ป่วยเข้าร่วมโครงการวิจัย (Inclusion criteria)

- 1.1.1. ผู้ป่วยเข้าร่วมโครงการและรับการรักษาที่ทางโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์จนครบกำหนด 6 เดือน
- 1.1.2. ผู้ป่วยที่อายุระหว่าง 18 – 60 ปี
- 1.1.3. ผู้ป่วย AFB stain positive (+)
- 1.1.4. ผู้ป่วยที่มีผล PCR positive (+)
- 1.1.5. สามารถเก็บตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยที่มีภาวะดื้อยา (MDR), Treatment Failure และ Relapse ได้

1.2. เกณฑ์ในการคัดเลือผู้ป่วยออกจากโครงการวิจัย (Exclusion criteria)

- 1.2.1. ผู้ป่วยปฏิเสธเข้าร่วมโครงการวิจัย
- 1.2.2. ผู้ป่วยมีภาวะติดเชื้อ HIV
- 1.2.3. ผู้ป่วยเป็นโรคมะเร็ง (Active cancer) หรือ เคยได้รับการฉายแสง หรือ เคมีบำบัด (Chemotherapy)
- 1.2.4. ผู้ป่วยมีภาวะของโรคตับ (Active Hepatitis B, Hepatitis C)
- 1.2.5. ผู้ป่วยมีประวัติเคยทำการปลูกถ่ายอวัยวะ (Transplantation)
- 1.2.6. ผู้ป่วยเคยได้รับยากดภูมิมาก่อน

2. การแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียส (PBMC) จากเลือดของผู้ป่วย

นำเลือดที่เก็บได้จากผู้ป่วยมาแยก plasma/serum โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 rpm ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที จากนั้นดูดแยกส่วน plasma/serum ที่อยู่ด้านบน ออกมาใส่ในหลอด 1.5 ml เก็บที่ -80 °C เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป ส่วนของเลือดที่เหลืออยู่จะถูกนำมาผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ RF10 ในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นค่อยๆปล่อยเลือดที่ผสมแล้วนี้ลงบน Ficall Hypaque ปริมาตร 10 ml ในหลอดที่เตรียมไว้ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ที่ความเร็วรอบ 1,500 rpm นาน 30 นาที แล้วจึงดูดส่วนของ PBMC มาใส่ในหลอดใหม่ แล้วล้าง 2 ครั้ง ด้วยอาหาร RF10 ปริมาตร 10 ml และปั่นด้วยความเร็วรอบ 1,500 rpm ที่ 4 °C นาน 5 นาที แล้วเทส่วนอาหารทิ้ง จากนั้นจึงนับเซลล์ที่มีชีวิตและเก็บเซลล์ใน freezing media (90% FBS และ 10% DMSO) โดยแบ่งเก็บในหลอดตามปริมาณเซลล์ที่ต้องการและเก็บเซลล์ใน liquid nitrogen เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3. การศึกษาลักษณะสมบัติของ T cell ชนิด MAIT cell ในเลือดของผู้ป่วย

นำ PBMC ที่เก็บไว้ใน liquid nitrogen ออกมาแช่ที่ 37 °C นานประมาณ 1 นาที จากนั้นทำการล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วยอาหาร RF10 ปริมาตร 10 ml และปั่นด้วยความเร็วรอบ 1,500 rpm ที่ 4 °C นาน 5 นาที จากนั้นใส่อาหาร RF10 ลงในหลอดที่มีเซลล์อยู่อีกครั้ง โดยปรับปริมาตรให้มีความเข้มข้นของเซลล์ 1×10^6 cell/ml แล้วจึงใส่เซลล์ลงใน 96 well plate และทำการย้อมผิวเซลล์ของ PBMC โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ MAIT cell ดังนี้ CD3-PE/Cy7, CD4-PE/Cy5, CD8-PerCp/Cy5.5, CD161-APC/Cy7 หรือ CD161-APC และ V α 7.2-FITC นอกจากนี้ยังศึกษา chemokine และ cytokine receptor ที่อยู่บนผิวของ MAIT cell โดยใช้แอนติบอดีดังต่อไปนี้ CXCR 3-AF700, CXCR 4-APC, CXCR 5-PE, CXCR 6-PerCp/Cy5.5, CCR 4-APC, CCR 5-PE, CCR 6-AF700, CCR 7-AF700, CCR 9-PerCp/Cy5.5, CLA-PerCp/Cy5.5, IL12R-APC, IL18R-PE และ IL23R-AF700 นำเซลล์ที่ย้อมด้วยแอนติบอดีแล้วมาแช่ในน้ำแข็งนาน 30 นาที ในที่มืด จากนั้นล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วย FACS wash buffer หลุมละ 200 μ l และปั่นเหวี่ยงที่ 4 °C ความเร็วรอบ 1,500 rpm นาน 5 นาที จากนั้นใส่ 1% formaldehyde หลุมละ 200 μ l เพื่อรักษาสภาพของเซลล์ แล้วจึงนำไปศึกษาด้วยเครื่อง Flow cytometer และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม FlowJo V10 ร่วมกับโปรแกรม GraphPad Prism 5

4. ศึกษาการหลั่ง cytokine ใน MAIT cell จากเลือดของผู้ป่วย

นำ PBMC ของผู้ป่วยที่เก็บไว้ใน liquid nitrogen ออกมาแช่ที่ 37 °C นานประมาณ 1 นาที จากนั้นทำการล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วยอาหาร RF10 ปริมาตร 10 ml และปั่นด้วยความเร็วรอบ 1500 rpm ที่ 4 °C นาน 5 นาที จากนั้นทำการนับเซลล์และปรับปริมาตรให้เซลล์มีความเข้มข้นอยู่ที่ 1×10^6 cell/ml จากนั้นใส่เซลล์ลงใน 96 U-bottom plate หลุมละ 100 μ l (1×10^5 cell/well) แล้วจึงกระตุ้นด้วย PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) ที่ความเข้มข้น 5 ng/ml และ Ionomycin ที่ความเข้มข้น 1 μ g/ml หรือ กระตุ้นด้วย anti CD3/CD28 coated bead หลุมละ 6 μ l แล้วบ่มที่ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นใส่ brefeldin a ความเข้มข้น 20 μ g/ml แล้วบ่มต่ออีก 4 ชั่วโมงที่ 37 °C หลังจากนั้นทำการย้อมผิวเซลล์ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ MAIT cell ดังนี้ CD3-PE/Cy7 หรือ CD3-APC, CD4-PE/Cy5, V α 7.2-FITC หรือ V α 7.2-AF700, CD161-APC หรือ CD161-APC/Cy7 และ CD8-PerCP/Cy5.5 แล้วนำเซลล์ที่ย้อมด้วยแอนติบอดีแล้วมาแช่ในน้ำแข็งนาน 30 นาที ในที่มืด จากนั้นล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วย FACS wash buffer หลุมละ 200 μ l และปั่นเหวี่ยงที่ 4 °C ความเร็วรอบ 1,500 rpm นาน 5 นาที จากนั้นใส่ 1% formaldehyde หลุมละ 200 μ l เพื่อรักษาสภาพของเซลล์ บ่มที่ 4°C นาน 30 นาที จากนั้นปั่นล้างเซลล์ที่ความเร็วรอบ 1,500 rpm นาน 5 นาที แล้วทำการเจาะรูเซลล์ด้วย 0.3% saponin พร้อมกับทำการย้อม cytokine ภายในเซลล์ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ cytokine ดังนี้ IFN γ -AF700, IL2-PerCp/Cy5.5, TNF α -AF700 และ IL17-PE โดยบ่มในน้ำแข็งนาน 45 นาที แล้วจึงล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วย FACS wash และตรวจสอบการหลั่ง cytokine ของ MAIT cell ด้วย flow cytometer และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม FlowJo V10 ร่วมกับโปรแกรม GraphPad Prism 5

5. ศึกษาคุณสมบัติ cytotoxicity ใน MAIT cell จากเลือดของผู้ป่วย

นำ PBMC ของผู้ป่วยที่เก็บไว้ใน liquid nitrogen ออกมาแช่ที่ 37 °C นานประมาณ 1 นาที จากนั้นทำการล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วยอาหาร RF10 ปริมาตร 10 ml และปั่นด้วยความเร็วรอบ 1500 rpm ที่ 4 °C นาน 5 นาที จากนั้นทำการนับเซลล์และปรับปริมาตรให้เซลล์มีความเข้มข้นอยู่ที่ 1×10^6 cell/ml จากนั้นใส่เซลล์ลงใน 96 U-bottom plate หลุมละ 100 μ l (1×10^5 cell/well) แล้วจึงกระตุ้นด้วย PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) ที่ความเข้มข้น 5 ng/ml และ Ionomycin ที่ความเข้มข้น 1 μ g/ml หรือ กระตุ้นด้วย anti CD3/CD28 coated bead หลุมละ 6 μ l แล้วบ่มที่ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นใส่ monensin ความเข้มข้น 20 μ g/ml แล้วบ่มต่ออีก 4

ชั่วโมงที่ 37 °C หลังจากนั้นทำการย้อมผิวเซลล์ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ MAIT cell ดังนี้ CD3-APC, CD4-PE/Cy5, V α 7.2-AF700, CD161-APC/Cy7 และ CD107a-PE/Cy7 แล้วนำเซลล์ที่ย้อมด้วยแอนติบอดีแล้วมาแช่ในน้ำแข็งนาน 30 นาที ในที่มืด จากนั้นล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วย FACS wash buffer หลุมละ 200 μ l และปั่นเหวี่ยงที่ 4 °C ความเร็วรอบ 1,500 rpm นาน 5 นาที จากนั้นใส่ 1% formaldehyde หลุมละ 200 μ l เพื่อรักษาสภาพของเซลล์ บ่มที่ 4°C นาน 30 นาที จากนั้นปั่นล้างเซลล์ที่ความเร็วรอบ 1,500 rpm นาน 5 นาที แล้วทำการเจาะรูเซลล์ด้วย 0.3% saponin พร้อมกับทำการย้อมสารที่หลงภายในเซลล์ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะดังนี้ granulysin-PE, granzyme B-FITC และ perforin-PerCp/Cy5.5 โดยบ่มในน้ำแข็งนาน 45 นาที แล้วจึงล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วย FACS wash และตรวจสอบ cytotoxicity ของ MAIT cell ด้วย flow cytometer และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม FlowJo V10 ร่วมกับโปรแกรม GraphPad Prism 5

ผลการวิจัย (Results)

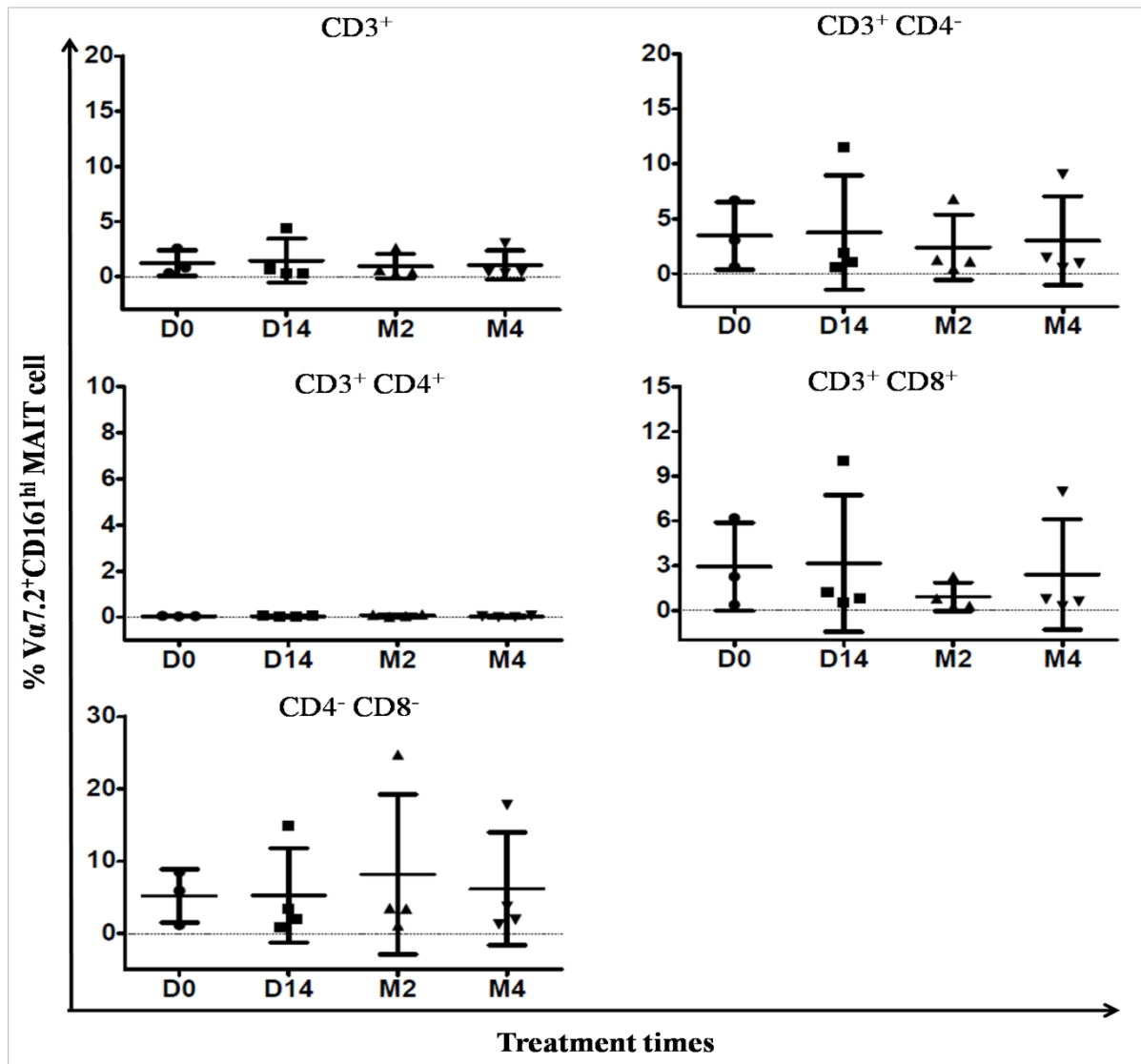
การศึกษาลักษณะสมบัติของ T cell ชนิด MAIT cell ในเลือดของผู้ป่วย

เพื่อศึกษาคุณสมบัติของ mucosal associated invariant T cell หรือ MAIT cell ใน peripheral blood ของผู้ป่วยวัณโรค ในงานวิจัยนี้จึงทำการเก็บเลือดของผู้ป่วยมาแยกส่วน PBMC และช้อมเซลล์เหล่านั้นด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ MAIT cell ดังนี้ CD3-PE/Cy7, CD4-PE/Cy5, CD8-PerCp/Cy5.5, CD161-APC/Cy7 หรือ CD161-APC และ V α 7.2-FITC แล้วทำการตรวจวัด MAIT cell ในกลุ่มต่างๆ โดยใช้เทคนิค Flow cytometry โดยในการวิเคราะห์ข้อมูลครั้งนี้จะระบุเซลล์ที่เชื่อมติดแอนติบอดี CD161-APC/Cy7 หรือ CD161-APC และ V α 7.2-FITC ว่าเป็น MAIT cell เนื่องจากปกติแล้ว MAIT cell จะมีคุณลักษณะที่ชัดเจน ก็จะมี T cell receptor ที่จำเพาะเป็น V α 7.2-J α 33 อยู่ที่ผิวเซลล์ และมีการแสดงออกของ CD161 ที่สูงมาก อยู่ที่ผิวของ MAIT cell เช่นกัน

เนื่องจาก MAIT cell สามารถพบได้ในหลากหลาย population ของ T cell ดังนั้น ในการทดลองนี้จึงทำการศึกษา MAIT cell ใน T cell population ที่แตกต่างกันทั้งหมด 5 population ได้แก่ CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD4⁻ และ CD3⁺CD4⁻CD8⁻ T cell โดยจะมีการเปรียบเทียบปริมาณของ MAIT cell ในแต่ละ population ตามระยะเวลาการตรวจรักษาของผู้ป่วยด้วย จากผลการทดลองพบว่า CD3⁺ MAIT cell ซึ่งถือเป็นปริมาณ MAIT cell ทั้งหมด ใน PBMC ของผู้ป่วยวัณโรคนั้นมีอยู่ประมาณ 1-1.5% ของ T cell และเมื่อศึกษาแยกลงไปในแต่ละ population ก็พบว่า MAIT cell ใน PBMC ของผู้ป่วยนั้นจะจัดอยู่ในกลุ่มของ CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD4⁻ และ CD4⁻CD8⁻ T cell ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน แต่ไม่พบ MAIT cell ใน population ของ CD3⁺CD4⁺ T cell เลย ดังแสดงในรูปที่ 1

นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบปริมาณของ MAIT ในแต่ละ population ตามระยะเวลาเริ่มตั้งแต่ที่ผู้ป่วยมาพบแพทย์ครั้งแรก และได้รับยาเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์, 2 เดือน และ 4 เดือน ก็พบว่าในภาวะที่ผู้ป่วยได้รับเชื้อแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis* และเกิดภาวะการเป็นโรคนั้น (Day 0) จะมีปริมาณของ MAIT cell อยู่ในกระแสเลือดน้อย ซึ่งอาจสืบเนื่องมาจาก T cell ต่างๆ รวมทั้ง MAIT cell จะถูกทำลายไปสะสมที่บริเวณที่เกิดการติดเชื้อ ซึ่งส่วนใหญ่แล้วจะเป็นที่ปอดนั่นเอง แต่แม้ว่าผู้ป่วยจะได้รับยาอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 2 สัปดาห์ 2 เดือน และ 4 เดือนแล้ว แต่ก็ยังไม่มีความแตกต่างกันของปริมาณ MAIT cell ในแต่ละช่วงเวลา อย่างไรก็ตามการทดลองนี้ยังต้องรอผู้ป่วยรับยาจนครบ 6 เดือน หรืออาจขยายระยะเวลาในการเก็บเลือดของผู้ป่วยออกไปจนถึง 1

ปี เพื่อให้ร่างกายของผู้ป่วยกลับมาเป็นปกติมากที่สุด ซึ่งจะส่งผลให้สามารถพบ MAIT cell ในกระแสเลือดได้มากขึ้นเทียบเท่ากับในคนปกติได้

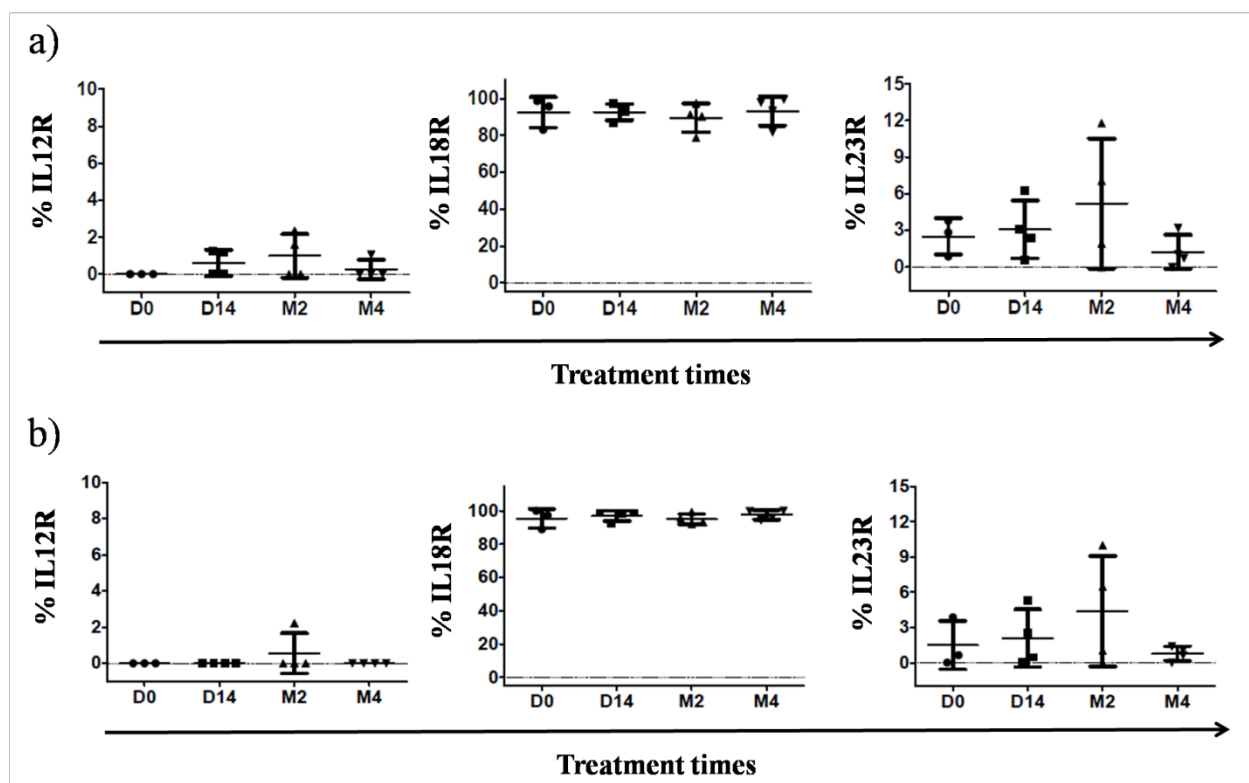


รูปที่ 1 MAIT cell ในกระแสเลือดของผู้ป่วยวัณโรค

โดยแกน X แสดงระยะเวลาของผู้ป่วยที่เริ่มทำการรักษาและรับยา ส่วนแกน Y แสดงเปอร์เซ็นต์ของ Vα7.2⁺CD161^{hi} MAIT cell สัญลักษณ์แต่ละจุดแสดงแทนจำนวนผู้ป่วยหนึ่งคน

หลังจากที่ศึกษา population ของ MAIT cell ในเลือดของผู้ป่วยวัณโรคแล้ว ต่อมาจึงทำการศึกษาลักษณะสมบัติของ MAIT cell โดยจะเลือกศึกษาใน CD3⁺ MAIT cell ซึ่งเป็น MAIT cell ทั้งหมดใน PBMC

และ $CD3^+CD4^-$ MAIT cell ซึ่งเป็น population ส่วนใหญ่ของ MAIT cell โดยในการทดลองนี้จะทำการย้อมผิวของ MAIT cell ทั้ง 2 population ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ receptor สำหรับ IL12, IL18 และ IL23 (IL12R, IL18R และ IL23R) จากการทดลองนี้พบว่าทั้ง $CD3^+$ MAIT cell (รูปที่ 2a) และ $CD3^+CD4^-$ MAIT cell (รูปที่ 2b) จะมีการแสดงออกของ IL28R ที่ผิวเซลล์สูงมากถึง 90% ขณะที่ IL23R นั้นพบได้น้อยกว่า 6% และ IL12R พบน้อยกว่า 2% และยังไม่พบความแตกต่างกันของปริมาณ cytokine receptor แต่ละตัวในแต่ละช่วงเวลาของการรักษา จากการทดลองนี้จึงสรุปได้ว่า IL18R อาจจะเป็นคุณลักษณะที่สำคัญของ MAIT cell และ MAIT cell ส่วนใหญ่จะมี phenotype เป็น $CD3^+CD4^-IL18R^+V\alpha7.2^+CD161^{hi}$ นั่นเอง



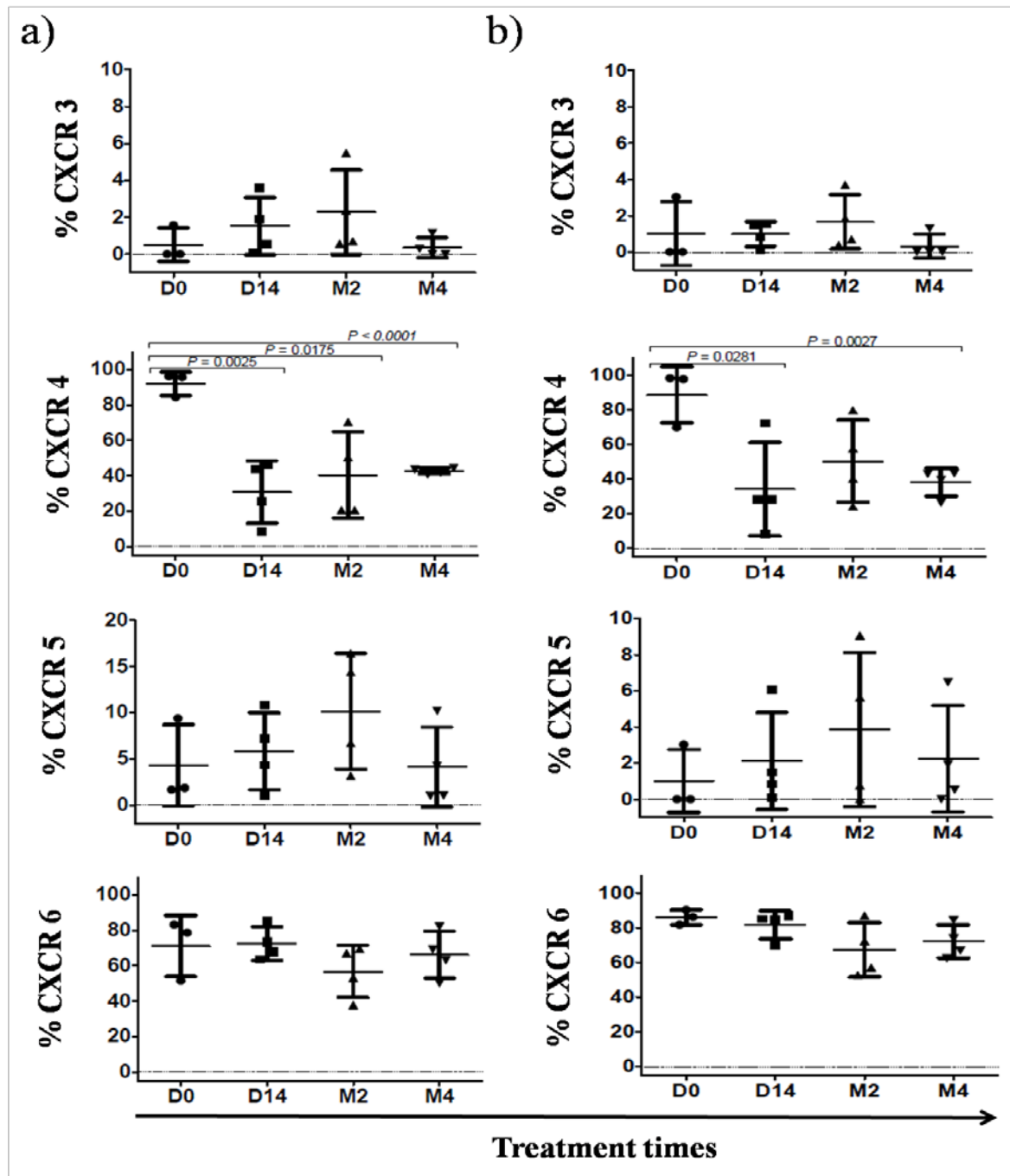
รูปที่ 2 Cytokine receptor บนผิวของ MAIT cell ในกระแสเลือดของผู้ป่วยวัณโรค

โดย a) แสดงปริมาณ cytokine receptor บนผิวของ $CD3^+$ MAIT cell และ b) แสดงปริมาณ cytokine receptor บนผิวของ $CD3^+CD4^-$ MAIT cell แกน X แสดงระยะเวลาของผู้ป่วยที่เริ่มทำการรักษาและรับยา ส่วนแกน Y แสดงเปอร์เซ็นต์ของ cytokine receptor สัญลักษณ์แต่ละจุดแสดงแทนจำนวนผู้ป่วยหนึ่งคน

เมื่อศึกษา cytokine receptor แล้ว ต่อมาก็จะศึกษา chemokine receptor บนผิวของ MAIT cell โดยแบ่ง chemokine receptor ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ CXC chemokines และ CC chemokine receptor สำหรับ CXC chemokine receptor จะศึกษาโดยทำการข้อมผิวของ MAIT cell ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ CXC chemokine receptor ได้แก่ CXCR3, CXCR4, CXCR5 และ CXCR6 จากผลการทดลองพบว่า $CD3^+$ MAIT cell มีการแสดงออกของ CXCR6 ในระดับที่สูงถึง 70% แต่ไม่มีความแตกต่างกันเมื่อเทียบในแต่ละช่วงเวลาของการรักษา ในขณะที่ CXCR4 จะมีการแสดงออกที่สูงมากถึง 90% ในระยะของการเป็นโรคแต่เมื่อได้รับยา ก็พบว่า CXCR4 จะมีการแสดงออกที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) อยู่ในระดับปานกลางคือประมาณ 40% (รูปที่ 3a) สำหรับ $CD3^+CD4^-$ MAIT cell ก็เช่นกัน สามารถพบ CXCR6 สูงถึง 85% และมีแนวโน้มที่จะลดลงเมื่อผู้ป่วยได้รับยาเป็นเวลาต่อเนื่อง ส่วน CXCR4 บน $CD3^+CD4^-$ MAIT cell ก็มีปริมาณสูงมากถึง 90% ในระยะของการเป็นโรคเช่นกัน และเมื่อได้รับยาอย่างต่อเนื่องก็ส่งผลให้ CXCR4 ที่เวลา 2 สัปดาห์, 2 เดือน และ 4 เดือน มีปริมาณที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (รูปที่ 3b) นอกจากนี้ยังพบว่าทั้ง $CD3^+$ MAIT cell และ $CD3^+CD4^-$ MAIT cell ยังมีการแสดงออกของ CXCR3 และ CXCR5 ในปริมาณที่น้อยเมื่อเทียบกับ CXCR4 และ CXCR6

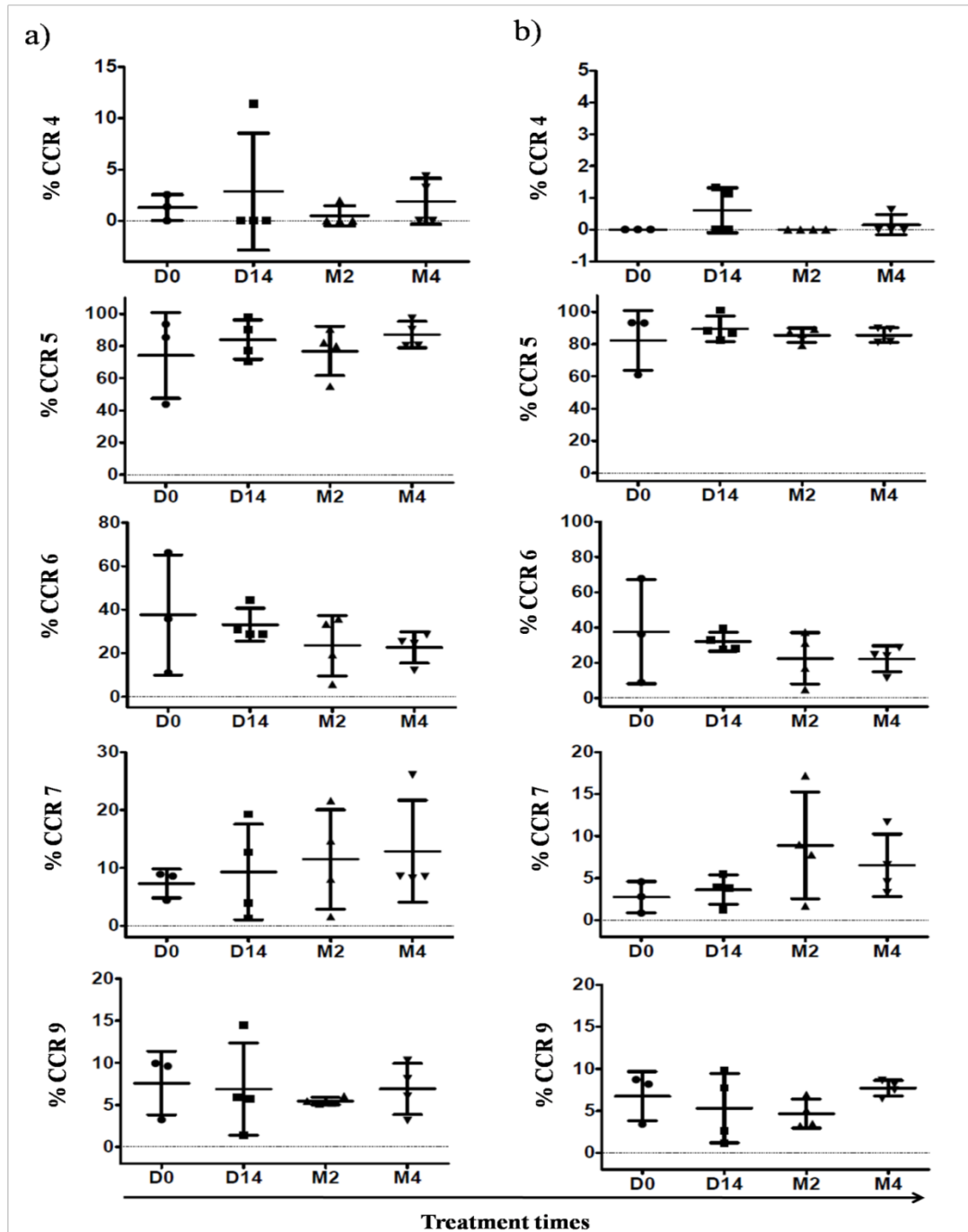
สำหรับ CC chemokine receptor พบว่าบนผิวของ $CD3^+$ MAIT cell และ $CD3^+CD4^-$ MAIT cell มีการแสดงออกของ CC chemokine receptor ที่สอดคล้องกัน โดย CCR5 มีการแสดงออกอยู่ในระดับที่สูงมากถึง 85% รองลงมาคือ CCR6 ประมาณ 40% โดยเมื่อเปรียบเทียบกันในแต่ละช่วงเวลาของการรักษา พบว่า CCR6 จะมีการแสดงออกที่ลดลงเมื่อได้รับยาเป็นระยะเวลาที่นานพอที่จะทำให้ผู้ป่วยเป็นปกติ อย่างไรก็ตามการลดลงของ CCR6 นี้ไม่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังพบว่า MAIT cell ทั้ง 2 population จะมีการแสดงออกของ CCR7 และ CCR9 ในปริมาณน้อยประมาณ 5-10% เท่านั้น ส่วน CCR4 นั้นมีการแสดงออกในระดับที่น้อยกว่า 5% ดังแสดงในรูปที่ 4

นอกจาก cytokine และ chemokine receptor แล้ว ในการทดลองนี้ยังศึกษาการแสดงออกของ cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA) บนผิวของ MAIT cell โดยจากการทดลองพบว่า $CD3^+$ MAIT cell มีการแสดงออกของ CLA เพียง 10% แต่เมื่อผู้ป่วยได้รับยาแล้วเป็นเวลา 2 สัปดาห์, 2 เดือน และ 4 เดือน ปริมาณของ CLA นี้จะเพิ่มขึ้น โดยในช่วง 2 เดือนจะพบ CLA มากกว่าในระยะของการเป็นโรครอย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.0291$) แต่อย่างไรก็ตาม บนผิวของ $CD3^+CD4^-$ MAIT cell ยังไม่พบความแตกต่างของปริมาณ CLA ที่แสดงออกในแต่ละช่วงเวลาของการรักษา ดังแสดงในรูปที่ 5



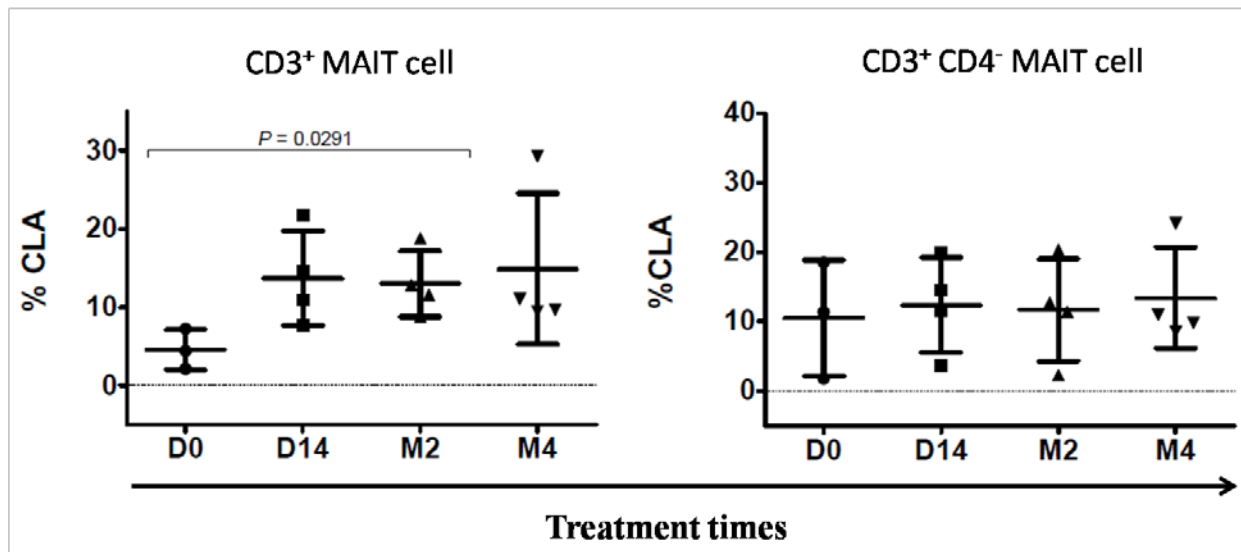
รูปที่ 3 CXC chemokine receptor บนผิวของ MAIT cell ในกระแสเลือดของผู้ป่วยวัณโรค

โดย a) แสดงปริมาณ chemokine receptor ชนิด CXC บนผิวของ $CD3^+$ MAIT cell และ b) แสดงปริมาณ chemokine receptor ชนิด CXC บนผิวของ $CD3^+CD4^-$ MAIT cell แกน X แสดงระยะเวลาของผู้ป่วยที่เริ่มทำการรักษาและรับยา ส่วนแกน Y แสดงเปอร์เซ็นต์ของ chemokine receptor สัญลักษณณ์แต่ละจุดแสดงแทนจำนวนผู้ป่วยหนึ่งคน



รูปที่ 4 CC chemokine receptor บนผิวของ MAIT cell ในกระแสเลือดของผู้ป่วยวัณโรค

โดย a) แสดงปริมาณ chemokine receptor ชนิด CC บนผิวของ $CD3^+$ MAIT cell และ b) แสดงปริมาณ chemokine receptor ชนิด CC บนผิวของ $CD3^+CD4^-$ MAIT cell แกน X แสดงระยะเวลาของผู้ป่วยที่เริ่มทำการรักษาและรับยา ส่วนแกน Y แสดงเปอร์เซ็นต์ของ chemokine receptor สัญลักษณณ์แต่ละจุดแสดงแทนจำนวนผู้ป่วยหนึ่งคน



รูปที่ 5 Cutaneous Lymphocyte-associated antigen (CLA) บนผิวของ MAT cell

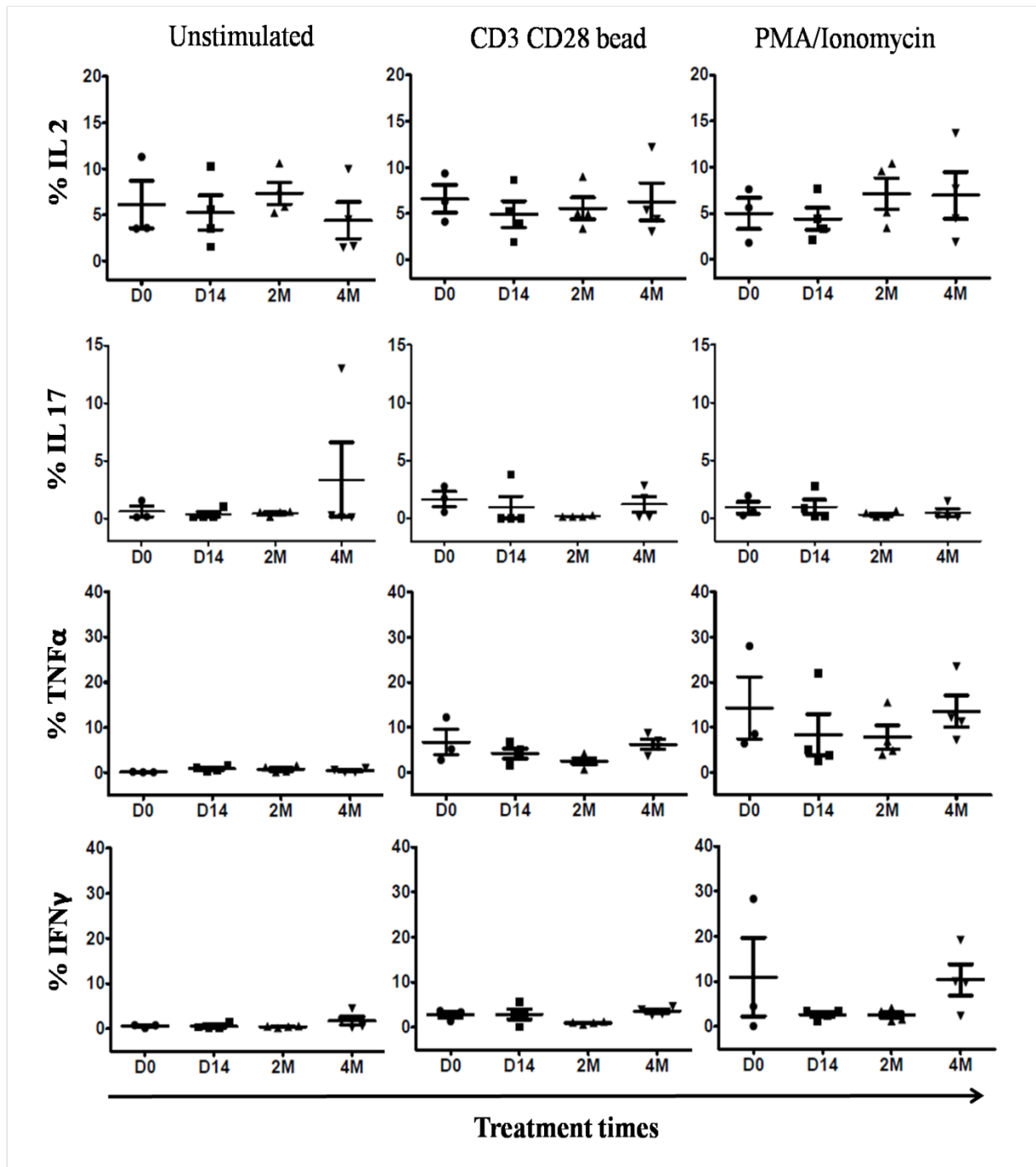
โดยแกน X แสดงระยะเวลาของผู้ป่วยที่เริ่มทำการรักษาและรับยา ส่วนแกน Y แสดงเปอร์เซ็นต์ของ CLA บน MAIT cell สัญลักษณณ์แต่ละจุดแสดงแทนจำนวนผู้ป่วยหนึ่งคน

ศึกษาการหลั่ง cytokine ใน MAIT cell จากเลือดของผู้ป่วยวัณโรค

จากการทดลอง เมื่อนำ PBMC ของผู้ป่วยวัณโรคในแต่ละช่วงเวลาของการรักษาและรับยามากระตุ้นด้วย $CD3/CD28$ bead หรือ PMA/Ionomycin เป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วย้อม MAIT cell ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ cytokine ดังนี้ คือ IL2, IL17, $IFN-\gamma$ และ $TNF-\alpha$ แล้วทำการตรวจวัดปริมาณการหลั่งของ cytokine จาก $CD3^+$ MAIT cell (รูปที่ 6) และ $CD3^+CD4^-$ MAIT cell (รูปที่ 7) พบว่า MAIT cell ทั้ง 2 population จะมีลักษณะการหลั่งของ cytokine ที่คล้ายกัน คือในสภาวะที่ยังไม่ได้มีการกระตุ้นด้วย $CD3/CD28$ bead หรือ PMA/Ionomycin นั้น MAIT cell จะไม่มีการหลั่ง cytokine ใดๆเลยหรือมีในปริมาณน้อยมากๆ แต่เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วย PMA/Ionomycin พบว่า MAIT cell ทั้ง 2 population จะมีการหลั่ง $IFN-\gamma$ และ $TNF-\alpha$ ในปริมาณที่

สูง โดยเฉพาะในช่วง 4 เดือนที่ได้รับยา ในขณะที่ IL2 และ IL17 จะมีการหลั่งออกมาในปริมาณน้อยมากแม้ว่าจะกระตุ้นด้วย CD3CD28 bead หรือ PMA/Ionomycin ก็ตาม

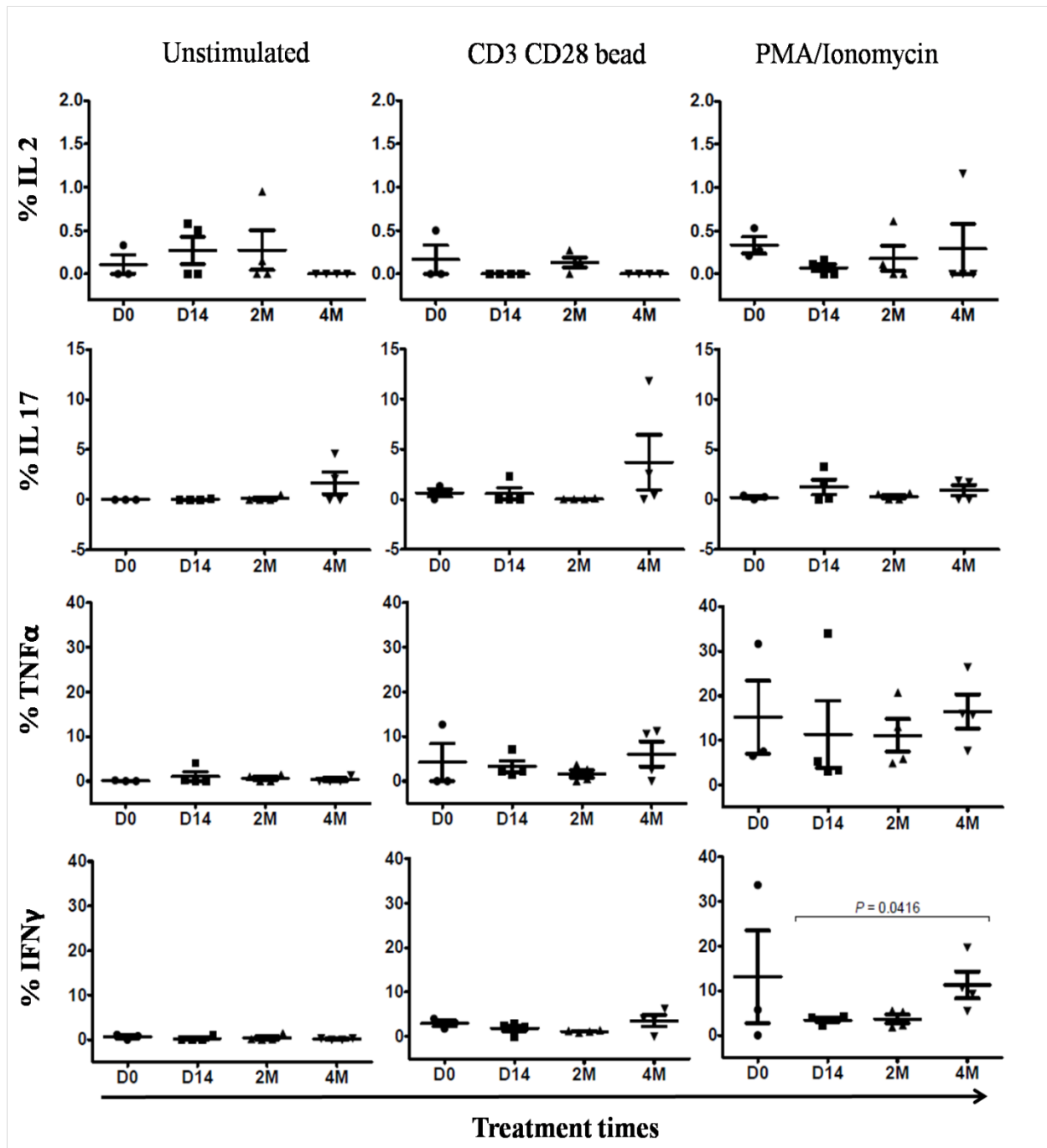
จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า MAIT cell ใน PBMC ของผู้ป่วยวัณโรคจะสูญเสียการตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นหรือสิ่งแปลกปลอมไป แต่เมื่อผู้ป่วยได้รับยาและการรักษาอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานานถึง 4 เดือน MAIT cell ก็จะเริ่มกลับมาตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นได้ดีโดยการหลั่ง inflammatory cytokine ได้แก่ IFN- γ และ TNF- α ในปริมาณที่มากกว่าซึ่งอาจเป็นสิ่งที่บ่งบอกว่าระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยอาจกลับมาทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพอีกครั้งนั่นเอง



รูปที่ 6 การหลั่ง cytokine ใน CD3⁺ MAIT cell เมื่อถูกกระตุ้น

โดยแกน X แสดงระยะเวลาของผู้ป่วยที่เริ่มทำการรักษาและรับยา ส่วนแกน Y แสดงเปอร์เซ็นต์ของ cytokine ต่างๆ ที่หลั่งมาจาก CD3⁺ MAIT cell หลังจากถูกกระตุ้นด้วย CD3CD28 bead (แถวกลาง) หรือ

PMA/Ionomycin (แถวขาวสุด) เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น (แถวซ้ายสุด) และสัญลักษณ์แต่ละจุดแสดงแทนจำนวนผู้ป่วยหนึ่งคน

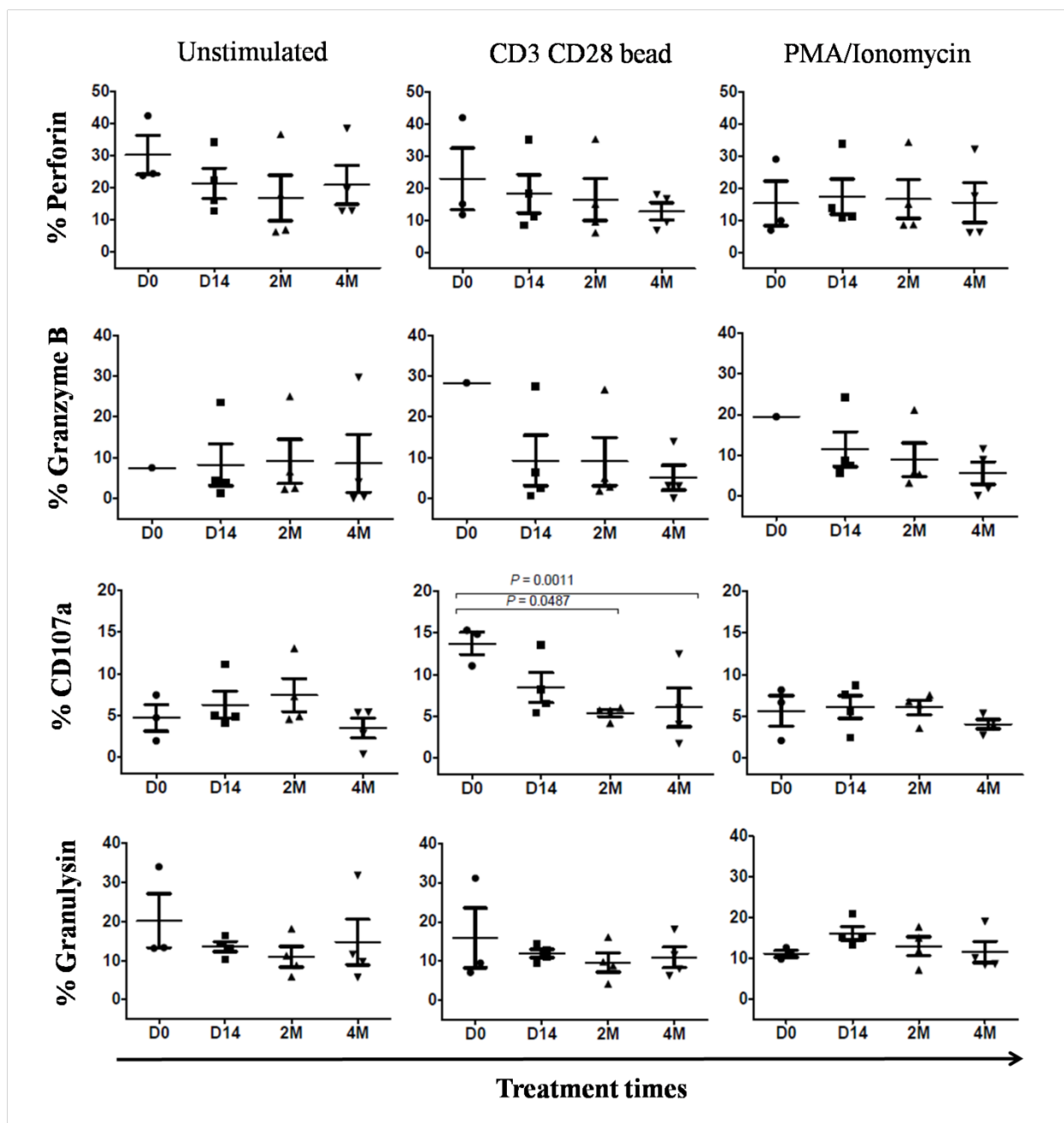


รูปที่ 7 การหลั่ง cytokine ใน CD3⁺CD4⁺ MAIT cell เมื่อถูกกระตุ้น

โดยแกน X แสดงระยะเวลาของผู้ป่วยที่เริ่มทำการรักษาและรับยา แกน Y แสดงเปอร์เซ็นต์ของ cytokine ต่างๆ ที่หลั่งมาจาก $CD3^+CD4^-$ MAIT cell หลังจากถูกกระตุ้นด้วย CD3CD28 bead (แถวกลาง) หรือ PMA/Ionomycin (แถวขวาสุด) เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น (แถวซ้ายสุด) และสัญลักษณ์แต่ละจุดแสดงแทนจำนวนผู้ป่วยหนึ่งคน

ศึกษาคุณสมบัติ cytotoxicity ใน MAIT cell จากเลือดของผู้ป่วย

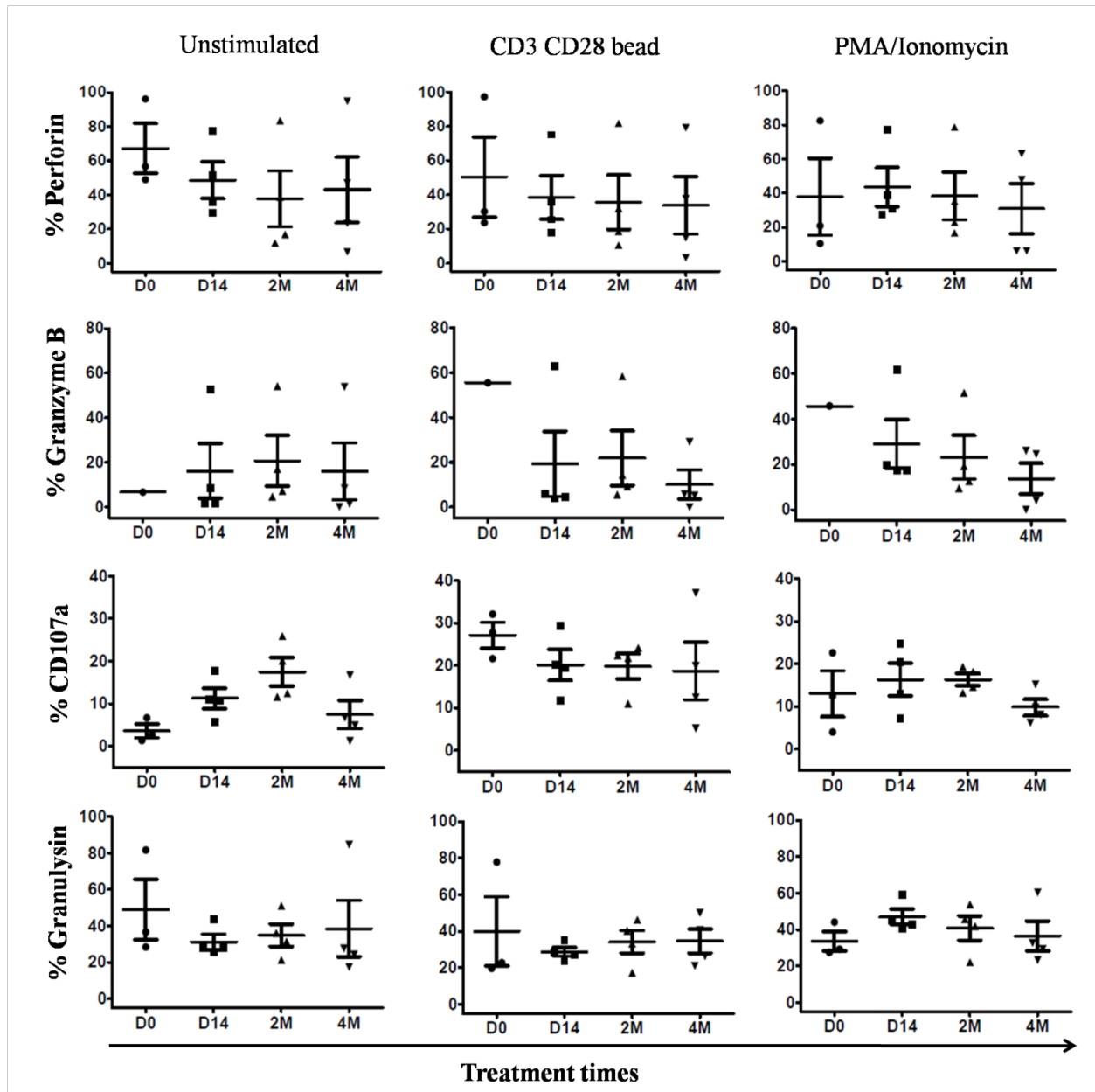
นอกจากความสามารถในการหลั่ง cytokine แล้ว MAIT cell ยังมีคุณสมบัติ cytotoxicity โดยการหลั่งสารออกมาทำลายเซลล์ของจุลชีพหรือสิ่งแปลกปลอมต่างๆ ได้ด้วย และเพื่อศึกษาคุณสมบัติส่วนนี้ใน MAIT cell ของผู้ป่วยที่เป็นวัณโรค จึงนำ PBMC ของผู้ป่วยในแต่ละช่วงเวลาของการรักษาและรับยามากระตุ้นด้วย CD3/CD28 bead หรือ PMA/Ionomycin เป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วขี้น MAIT cell ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ perforin, CD107a, granzyme B และ granzulin จากนั้นทำการตรวจวัดปริมาณการหลั่งของสารเหล่านี้จาก $CD3^+$ MAIT cell (รูปที่ 8) และ $CD3^+CD4^-$ MAIT cell (รูปที่ 9) จากการทดลองพบว่า ในสภาวะที่ MAIT cell ไม่ได้รับการกระตุ้นใดๆ จะมีการหลั่ง perforin, CD107a, granzyme B และ granzulin ออกมาในปริมาณหนึ่ง แต่เมื่อ เซลล์ถูกกระตุ้นด้วย CD3CD28 bead หรือ PMA/Ionomycin จะส่งผลให้คุณสมบัติในการหลั่งสารเหล่านั้นเปลี่ยนแปลงไป โดยการหลั่งของ CD107a จะเพิ่มขึ้นเมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วย CD3CD28 bead แต่การหลั่งนี้มีแนวโน้มที่จะลดลงเมื่อผู้ป่วยได้รับยาเป็นเวลา 4 เดือน ส่วน granzyme B ก็จะถูกหลั่งมากขึ้นเมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วย PMA/Ionomycin และมีแนวโน้มที่จะลดลงเมื่อผู้ป่วยได้รับยาเป็นเวลา 4 เดือนเช่นกัน ส่วน perforin และ granzulin เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย CD3CD28 bead หรือ PMA/Ionomycin พบว่าถูกหลั่งออกมาในปริมาณที่น้อยกว่าเซลล์ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้น



รูปที่ 8 การหลังสารทำลายสิ่งแปลกปลอมใน CD3⁺ MAIT cell เมื่อถูกกระตุ้น

โดยแกน X แสดงระยะเวลาของผู้ป่วยที่เริ่มทำการรักษาและรับยา แกน Y แสดงเปอร์เซ็นต์ของสารต่างๆ ที่มีคุณสมบัติ cytotoxicity ได้แก่ perforin, CD107a, granzyme B และ granulysin ที่หลั่งมาจาก CD3⁺ MAIT cell หลังจากถูกกระตุ้นด้วย CD3CD28 bead (แถวกลาง) หรือ PMA/Ionomycin (แถวขวาสุด)

เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น (แถวซ้ายสุด) และสัญลักษณ์แต่ละจุดแสดงแทนจำนวนผู้ป่วยหนึ่งคน



รูปที่ 9 การหลังสารทำลายสิ่งแปลกปลอมใน $CD3^+CD4^-$ MAIT cell เมื่อถูกกระตุ้น

โดยแกน X แสดงระยะเวลาของผู้ป่วยที่เริ่มทำการรักษาและรับยา แกน Y แสดงเปอร์เซ็นต์ของสารต่างๆ ที่มีคุณสมบัติ cytotoxicity ได้แก่ perforin, CD107a, granzyme B และ granulysin ที่หลั่งมาจาก

CD3⁺CD4⁺ MAIT cell หลังจากถูกกระตุ้นด้วย CD3CD28 bead (แถวกลาง) หรือ PMA/Ionomycin (แถว ขวาสุด) เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น (แถวซ้ายสุด) และสัญลักษณ์แต่ละจุดแสดงแทนจำนวน ผู้ป่วยหนึ่งคน

อภิปราย /วิจารณ์ (Discussion)

1. ผลการทดลองนี้เป็นผลการทดลองเบื้องต้นของผู้ป่วยที่เป็นวัณโรคปอด (pulmonary tuberculosis) จำนวน 4 คน จึงทำให้เห็นการเปลี่ยนแปลงใน phenotyping ต่างๆ ของ MAIT cells ยังไม่ชัดเจน ทาง ผู้วิจัยจะต้องทำการทดลองเพิ่มเติมในผู้ป่วยวัณโรคปอดอีกประมาณ 16 คน (ซึ่งตอนนี้เก็บจำนวนผู้ป่วย กลุ่มประชากรนี้ครบแล้ว) และจะต้องมีการเปรียบเทียบกับ กลุ่มประชากรที่เป็น latent tuberculosis และ healthy individuals ด้วย เพื่อเป็น control ดู
2. จากผลการทดลองเท่าที่มีข้อมูลที่ได้แสดงให้เห็นนั้น จะเห็นได้ว่าที่ระยะเวลาที่ 2 เดือนนั้นจะมีการเปลี่ยนแปลงของ phenotypes ต่างๆ อาจเป็นได้จากช่วงระยะเวลา 2 เดือนเป็นช่วงเวลาที่เชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* นั้นส่วนใหญ่จะถูกฆ่าโดยยาที่ผู้ป่วยได้รับในการรักษา การเปลี่ยนแปลงที่ สังเกต ได้แก่ การแสดงออกของ IL-12R, IL-23R, CXCR3, CXCR5 และ CCR7 ที่สูงขึ้น หรือ ในบาง กรณีมีการแสดงออกสูงสุด ณ ระยะเวลา 2 เดือน และมีการลดลงภายหลังระยะเวลานี้
3. การหลั่งของ cytokines และ cytotoxic granules นั้นยัง ไม่มีแนวโน้ม (trend) ที่ชัดเจน

ข้อสรุปและข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป (Conclusion and Further Directions)

1. การเก็บ clinical data และวิเคราะห์ confounding factors และ/หรือ factors ที่สามารถนำมาใช้ในการ stratify กลุ่มประชากรผู้ป่วยให้เห็นกลุ่มย่อยลงไปอีก ได้แก่ อายุ, เพศ, HIV status, วิธีการที่ใช้ ในการวินิจฉัยว่าเป็น active tuberculosis (Chest x-ray, sputum, PCR, culture lab results), สูตรยาที่ใช้ในการรักษา, drug sensitivity ของเชื้อ isolate ของผู้ป่วยแต่ละราย เป็นต้น
2. จำนวนกลุ่มประชากรที่นำมาใช้ในการทดสอบ parameter ที่กำลังศึกษาอยู่ในส่วนของ immunophenotyping นั้น ได้แก่ (i) วิเคราะห์ ผู้ป่วย active tuberculosis อีก 16 คน รวมกับผลการ ทดลองที่ได้มาจาก 4 คนแล้ว เป็น 20 คน, (ii) screening อาสาสมัครด้วย QuantiFERON test และแยก

- กลุ่มประชากรออกเป็น กลุ่ม latent tuberculosis และ healthy individuals เพื่อทำการศึกษา immunophenotyping ในลักษณะเดียวกับกลุ่ม active tuberculosis ต่อไป
3. นอกจากการศึกษาลักษณะสมบัติของ MAIT cell แล้วเพื่อให้มีความเข้าใจใน MAIT cell มากขึ้นจึง อาจทำการศึกษาต่อในระดับของ MAIT cell receptor โดยนำ PBMC ของผู้ป่วยมาเชื่อมด้วย แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ MAIT cell และย้อมแอนติบอดี propidium iodide-PE Texas red เพื่อแยก เซลล์เป็นและเซลล์ตายด้วย แล้วนำ PBMC ที่ย้อมแอนติบอดีแล้วไปมาผ่าน flow cytometer ที่ต่อ กับ cell sorter เพื่อแยก MAIT cell ลงใน 96 well PCR plate หลุมละ 1 เซลล์ และเพื่อศึกษา T cell receptor บน CD3⁺ T cell จึงนำเซลล์ที่ได้มาสกัด RNA และเปลี่ยนเป็น cDNA โดยใช้ชุด Superscript vilo cDNA synthesis Kit and master mix (Invitrogen) แล้วนำ plate ไปบ่มที่อุณหภูมิ 25°C 5 นาที ที่ 42°C 30 นาที และที่ 80°C 5 นาที จากนั้นทำ Nested PCR โดยนำ cDNA ที่ได้มาเป็น template ในการทำ external PCR โดยใช้สารซึ่งประกอบด้วย Tag DNA polymerase 0.15 µl, 0.2 mM dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 1X PCR buffer และ primer สำหรับ external amplification ซึ่ง ประกอบด้วย TRAV Ext primer mix, TRAC Ext primer, TRBV Ext primer mix และ TRBC Ext primer ความเข้มข้นอย่างละ 2.5 pmol/µl ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ โดยขึ้น แรกบ่มที่ 95 °C นาน 2 นาที แล้วต่อด้วยขั้นที่สอง บ่มที่ 95 °C 20 วินาที, 52 °C 20 วินาที และ 72 °C 45 วินาที ไปจนครบจำนวน 35 รอบ ขั้นสุดท้ายบ่มที่ 72 °C นาน 7 นาที จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาเป็น template ในการทำ internal PCR ต่อไป โดยในขั้นนี้จะเตรียมสารเหมือนกับในขั้น external PCR แต่ใช้ชุด primer สำหรับ internal amplification แทน ซึ่งประกอบด้วย TRAV Int primer mix, TRAC Int primer, TRBV Int primer mix และ TRBC Int primer ความเข้มข้นอย่างละ 2.5 pmol/µl จากนั้นวิเคราะห์ PCR product โดยใช้ 2% agarose gel electrophoresis และส่ง sequencing เพื่อจะได้นำ sequence ที่ได้มา clone หรือผลิตเป็นโปรตีนต่อไป ทั้งนี้เพื่อเป็นการติดตามดูการเปลี่ยนแปลงของ T cell clones ของกลุ่ม MAIT cells นั้นต่อไป

ประโยชน์ในการประยุกต์ของผลงานวิจัย (Research Application)

1. ได้องค์ความรู้ใหม่สำหรับกลุ่มเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันวิทยาที่มีความสำคัญต่อการดำรงอยู่ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม คือ MAIT cells ในการป้องกันและ/หรือ การต่อสู้กับเชื้อวัณโรค
2. เพื่อเป็นพื้นฐานองค์ความรู้สำหรับการพัฒนาสารโมเลกุลเล็กที่จะควบคุมการทำงานของ MAIT cells ได้
3. เพื่อเป็นพื้นฐานองค์ความรู้สำหรับการใช้ MAIT cells เป็นตัวพยากรณ์โรค (prognosis marker) ของผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยาวัณโรค

บรรณานุกรม (Bibliography)

1. Flynn JL, Chan J. Tuberculosis: latency and reactivation. Infection and immunity. 2001;69(7):4195-201.
2. Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. Annual review of immunology. 2001;19:93-129.
3. Gold MC, Cerri S, Smyk-Pearson S, Cansler ME, Vogt TM, Delepine J, et al. Human mucosal associated invariant T cells detect bacterially infected cells. PLoS biology. 2010;8(6):e1000407.
4. Styblo K. Recent advances in epidemiological research in tuberculosis. Advances in tuberculosis research Fortschritte der Tuberkuloseforschung Progres de l'exploration de la tuberculose. 1980;20:1-63.
5. Moody DB, Guy MR, Grant E, Cheng TY, Brenner MB, Besra GS, et al. CD1b-mediated T cell recognition of a glycolipid antigen generated from mycobacterial lipid and host carbohydrate during infection. The Journal of experimental medicine. 2000;192(7):965-76.
6. Moody DB, Ulrichs T, Muhlecker W, Young DC, Gurucha SS, Grant E, et al. CD1c-mediated T-cell recognition of isoprenoid glycolipids in Mycobacterium tuberculosis infection. Nature. 2000;404(6780):884-8.
7. Treiner E, Duban L, Bahram S, Radosavljevic M, Wanner V, Tilloy F, et al. Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1. Nature. 2003;422(6928):164-9.

8. Dusseaux M, Martin E, Serriari N, Peguillet I, Premel V, Louis D, et al. Human MAIT cells are xenobiotic-resistant, tissue-targeted, CD161hi IL-17-secreting T cells. *Blood*. 2011;117(4):1250-9.
9. Reantragoon R, Corbett AJ, Sakala IG, Gherardin NA, Furness JB, Chen Z, et al. Antigen-loaded MR1 tetramers define T cell receptor heterogeneity in mucosal-associated invariant T cells. *The Journal of experimental medicine*. 2013;210(11):2305-20.
10. Le Bourhis L, Mburu YK, Lantz O. MAIT cells, surveyors of a new class of antigen: development and functions. *Current opinion in immunology*. 2013;25(2):174-80.
11. Kjer-Nielsen L, Patel O, Corbett AJ, Le Nours J, Meehan B, Liu L, et al. MR1 presents microbial vitamin B metabolites to MAIT cells. *Nature*. 2012;491(7426):717-23.
12. Le Bourhis L, Dusseaux M, Bohineust A, Bessoles S, Martin E, Premel V, et al. MAIT cells detect and efficiently lyse bacterially-infected epithelial cells. *PLoS pathogens*. 2013;9(10):e1003681.
13. Corbett AJ, Eckle SB, Birkinshaw RW, Liu L, Patel O, Mahony J, et al. T-cell activation by transitory neo-antigens derived from distinct microbial pathways. *Nature*. 2014;509(7500):361-5.
14. Prezzemolo T, Guggino G, La Manna MP, Di Liberto D, Dieli F, Caccamo N. Functional Signatures of Human CD4 and CD8 T Cell Responses to *Mycobacterium tuberculosis*. *Frontiers in immunology*. 2014;5:180.
15. Rozot V, Vigano S, Mazza-Stalder J, Idrizi E, Day CL, Perreau M, et al. *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD8⁺ T cells are functionally and phenotypically different between latent infection and active disease. *European journal of immunology*. 2013;43(6):1568-77.
16. Marin ND, Paris SC, Rojas M, Garcia LF. Functional profile of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in latently infected individuals and patients with active TB. *Tuberculosis*. 2013;93(2):155-66.

17. Reantragoon R, Kjer-Nielsen L, Patel O, Chen Z, Illing PT, Bhati M, et al. Structural insight into MR1-mediated recognition of the mucosal associated invariant T cell receptor. The Journal of experimental medicine. 2012;209(4):761-74.
18. Patel O, Kjer-Nielsen L, Le Nours J, Eckle SB, Birkinshaw R, Beddoe T, et al. Recognition of vitamin B metabolites by mucosal-associated invariant T cells. Nature communications. 2013;4:2142.

ประวัตินักวิจัยและคณะ (Research investigators and CVs)

ผู้วิจัยหลัก

1. ชื่อ - นามสกุล อ.พญ.ดร. รังสิมา เจริญตระกูล
ชื่อ - นามสกุล Dr. Rangsima Reantragoon, M.D., Ph.D.
2. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ A-5 คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
3. หน่วยงานและสถานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)
ภาควิชาจุลชีววิทยา ตึก อ.ป.ร. ชั้น 17
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
หมายเลขโทรศัพท์ 02-256-4132 ต่อ 623
หมายเลขโทรสาร 02-252-5952
Email: rangsima.reantragoon@gmail.com, Rangsima.R@chula.ac.th
4. ประวัติการศึกษา
พ.ศ. 2557 (6 เดือน) Postdoctoral training at Peter Doherty Institute of Infection and Immunity, Melbourne, Australia
พ.ศ. 2553-2557 PhD in Microbiology and Immunology, University of Melbourne, Australia
พ.ศ. 2549-2555 Doctor of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

T cell immunology, MR1-MAIT TCR interaction, generation of tetramers

6. Publications:

Immune Mediators in Osteoarthritis: Infrapatellar Fat Pad-Infiltrating CD8+ T Cells Are Increased in Osteoarthritic Patients with Higher Clinical Radiographic Grading

Apinun J, Sengprasert P, Yuktanandana P, Ngarmukos S, Tanavalee A, **Reantragoon R**
International Journal of Rheumatology; Volume 2016 (2016), Article ID 9525724, 8 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2016/9525724>

Mucosal-associated invariant T cells in clinical diseases.

Reantragoon R, Boonpattanaporn N, Corbett AJ, McCluskey J.
Asian Pac J Allergy Immunol. 2016 Mar;34(1):3-10. Review.

The frequency of mucosal-associated invariant T cells is selectively increased in dermatitis herpetiformis.

Li J, **Reantragoon R**, Kostenko L, Corbett AJ, Varigos G, Carbone FR.
Australas J Dermatol. 2016 Mar 4. doi: 10.1111/ajd.12456.

A molecular basis underpinning the T cell receptor heterogeneity of mucosal-associated invariant T cells.

Eckle SB, Birkinshaw RW, Kostenko L, Corbett AJ, McWilliam HE, **Reantragoon R**, Chen Z, Gherardin NA, Beddoe T, Liu L, Patel O, Meehan B, Fairlie DP, Villadangos JA, Godfrey DI, Kjer-Nielsen L, McCluskey J, Rossjohn J. *J Exp Med.* 2014 Jul 28;211(8):1585-600.

T-cell activation by transitory neo-antigens derived from distinct microbial pathways.

Corbett AJ, Eckle SB, Birkinshaw RW, Liu L, Patel O, Mahony J, Chen Z, **Reantragoon R**, Meehan B, Cao H, Williamson NA, Strugnell RA, Van Sinderen D, Mak JY, Fairlie DP, Kjer-Nielsen L, Rossjohn J, McCluskey J. *Nature.* 2014 May 15;509(7500):361-5.

[Antigen-loaded MR1 tetramers define T cell receptor heterogeneity in mucosal-associated invariant T cells.](#)

Reantragoon R, Corbett AJ, Sakala IG, Gherardin NA, Furness JB, Chen Z, Eckle SB, Uldrich AP, Birkinshaw RW, Patel O, Kostenko L, Meehan B, Kedzierska K, Liu L, Fairlie DP, Hansen TH, Godfrey DI, Rossjohn J, McCluskey J, Kjer-Nielsen L. *J Exp Med.* **2013** Oct 21;210(11):2305-20.

[Recognition of vitamin B metabolites by mucosal-associated invariant T cells.](#)

Patel O, Kjer-Nielsen L, Le Nours J, Eckle SB, Birkinshaw R, Beddoe T, Corbett AJ, Liu L, Miles JJ, Meehan B, **Reantragoon R**, Sandoval-Romero ML, Sullivan LC, Brooks AG, Chen Z, Fairlie DP, McCluskey J, Rossjohn J. *Nat Commun.* **2013**;4:2142.

[MR1 presents microbial vitamin B metabolites to MAIT cells.](#)

Kjer-Nielsen L, Patel O, Corbett AJ, Le Nours J, Meehan B, Liu L, Bhati M, Chen Z, Kostenko L, **Reantragoon R**, Williamson NA, Purcell AW, Dudek NL, McConville MJ, O'Hair RA, Khairallah GN, Godfrey DI, Fairlie DP, Rossjohn J, McCluskey J. *Nature.* **2012** Nov 29;491(7426):717-23.

[Structural insight into MR1-mediated recognition of the mucosal associated invariant T cell receptor.](#)

Reantragoon R, Kjer-Nielsen L, Patel O, Chen Z, Illing PT, Bhati M, Kostenko L, Bharadwaj M, Meehan B, Hansen TH, Godfrey DI, Rossjohn J, McCluskey J. *J Exp Med.* **2012** Apr 9;209(4):761-74.

[Asthma research performance in Asia-Pacific: a bibliometric analysis by searching PubMed database.](#)

Klaewsongkram J, **Reantragoon R**. *J Asthma.* **2009** Dec;46(10):1013-20.

ผู้ร่วมวิจัย คนที่ 1

1. ชื่อ - นามสกุล ผศ.นพ. กมล แก้วกิติณรงค์

ชื่อ - นามสกุล **Assistant Professor Kamon Kawkitinarong, M.D.**

2. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
3. หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)
ภาควิชา หน่วยโรคปอด ภาควิชาอายุรศาสตร์ รพ.จุฬาลงกรณ์
หมายเลขโทรศัพท์
หมายเลขโทรสาร
Email: **kamonkaw@hotmail.com**
4. ประวัติการศึกษา
พ.ศ.
5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
6. Publications:

Clinical characteristics and treatment outcomes among patients with tuberculosis in Bangkok and Nonthaburi, Thailand.

Manosuthi W, Kawkitinarong K, Suwanpimolkul G, Chokbumrungsuk C, Jirawattanapisal T, Ruxrungtham K, Akksilp S.
Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2012 Nov;43(6):1426-36.

A highly sensitive novel PCR assay for detection of *Pneumocystis jirovecii* DNA in bronchoalveolar lavage specimens from immunocompromised patients.

Tia T, Putaporntip C, Kosuwin R, Kongpolprom N, Kawkitinarong K, Jongwutiwes S.
Clin Microbiol Infect. 2012 Jun;18(6):598-603. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03656.x. Epub 2011 Sep 26.

Prevalence of gastroesophageal reflux in Thai asthmatic patients.

Jaimchariyatam N, Wongtim S, Udompanich V, Sittipunt C, Kawkitinarong K, Chaiyakul S, Gonlachanvit S.
J Med Assoc Thai. 2011 Jun;94(6):671-8.

[Antiviral immune responses in H5N1-infected human lung tissue and possible mechanisms underlying the hyperproduction of interferon-inducible protein IP-10.](#)

Thitithanyanont A, Engering A, Uprasertkul M, Ekchariyawat P, Wiboon-Ut S, Kraivong R, Limsalakpetch A, Kum-Arb U, Yongvanitchit K, Sa-Ard-Iam N, Rukyen P, Mahanonda R, Kawkitinarong K, Auewarakul P, Utaisincharoen P, Sirisinha S, Mason CJ, Fukuda MM, Pichyangkul S.

Biochem Biophys Res Commun. 2010 Aug 6;398(4):752-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.07.017.
Epub 2010 Jul 11.

[Differential regulation of pulmonary endothelial monolayer integrity by varying degrees of cyclic stretch.](#)

Birukova AA, Chatchavalvanich S, Rios A, Kawkitinarong K, Garcia JG, Birukov KG.
Am J Pathol. 2006 May;168(5):1749-61.

[Pulmonary alveolar proteinosis: a report of seven patients from King Chulalongkorn Memorial Hospital.](#)

Kawkitinarong K, Sittipunt C, Wongtim S, Udompanich V.
J Med Assoc Thai. 2005 Sep;88 Suppl 4:S312-6.

[Oxidized phospholipids reduce vascular leak and inflammation in rat model of acute lung injury.](#)

Nonas S, Miller I, Kawkitinarong K, Chatchavalvanich S, Gorshkova I, Bochkov VN, Leitinger N, Natarajan V, Garcia JG, Birukov KG.
Am J Respir Crit Care Med. 2006 May 15;173(10):1130-8. Epub 2006 Mar 2.

[Differential effects of shear stress and cyclic stretch on focal adhesion remodeling, site-specific FAK phosphorylation, and small GTPases in human lung endothelial cells.](#)

Shikata Y, Rios A, Kawkitinarong K, DePaola N, Garcia JG, Birukov KG.
Exp Cell Res. 2005 Mar 10;304(1):40-9. Epub 2004 Nov 26.

[Epoxy cyclopentenone-containing oxidized phospholipids restore endothelial barrier function via Cdc42 and Rac.](#)

Birukov KG, Bochkov VN, Birukova AA, Kawkitinarong K, Rios A, Leitner A, Verin AD, Bokoch GM, Leitinger N, Garcia JG.

Circ Res. 2004 Oct 29;95(9):892-901. Epub 2004 Oct 7.

[Differential regulation of human lung epithelial and endothelial barrier function by thrombin.](#)

Kawkitinarong K, Linz-McGillem L, Birukov KG, Garcia JG.

Am J Respir Cell Mol Biol. 2004 Nov;31(5):517-27. Epub 2004 Jul 29.

ผู้ร่วมวิจัย คนที่ 2

- ชื่อ - นามสกุล อ.นิพนธ์ อุดมสันติสุข
ชื่อ - นามสกุล Nipon Udomsantisuk
- ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- หน่วยงานและสถานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)
ภาควิชาจุลชีววิทยา ตึก อ.ป.ร. ชั้น 15
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
หมายเลขโทรศัพท์ 02-256-4132 ต่อ 613
หมายเลขโทรสาร 02-252-5952
Email: fmednus@gmail.com
- ประวัติการศึกษา
พ.ศ.

5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

Mycobacteria species, bacteriology

6. Publications:

[The utility of stool cultures for diagnosing tuberculosis in people living with the human immunodeficiency virus.](#)

Oramasionwu GE, Heilig CM, **Udomsantisuk N**, Kimerling ME, Eng B, Nguyen HD, Thai S, Keo C, McCarthy KD, Varma JK, Cain KP.

Int J Tuberc Lung Dis. 2013 Aug;17(8):1023-8.

[Nontuberculous mycobacterial disease in patients with HIV in Southeast Asia.](#)

McCarthy KD, Cain KP, Winthrop KL, **Udomsantisuk N**, Lan NT, Sar B, Kimerling ME, Kanara N, Lynen L, Monkongdee P, Tasaneeyapan T, Varma JK.

Am J Respir Crit Care Med. 2012 May 1;185(9):981-8.

[Molecular characterization of extended spectrum beta-lactamase among clinical isolates Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae.](#)

Udomsantisuk N, Nunthapisud P, Tirawatanapong T, Dansuputra M.

J Med Assoc Thai. 2011 Dec;94(12):1504-12.

[Bloodstream infections among HIV-infected outpatients, Southeast Asia.](#)

Varma JK, McCarthy KD, Tasaneeyapan T, Monkongdee P, Kimerling ME, Buntheoun E, Sculier D, Keo C, Phanuphak P, Teeratakulpisarn N, **Udomsantisuk N**, Dung NH, Lan NT, Yen NT, Cain KP.

Emerg Infect Dis. 2010 Oct;16(10):1569-75.

[Yield of acid-fast smear and mycobacterial culture for tuberculosis diagnosis in people with human immunodeficiency virus.](#)

Monkongdee P, McCarthy KD, Cain KP, Tasaneeyapan T, Nguyen HD, Nguyen TN, Nguyen TB, Teeratakulpisarn N, **Udomsantisuk N**, Heilig C, Varma JK.

Am J Respir Crit Care Med. 2009 Nov 1;180(9):903-8.

Inadequate ventilation for nosocomial tuberculosis prevention in public hospitals in Central Thailand.

Jiamjarasrangsri W, Bualert S, Chongthaleong A, Chaindamporn A, **Udomsantisuk N**, Euasamarnjit W.
Int J Tuberc Lung Dis. 2009 Apr;13(4):454-9. Erratum in: Int J Tuberc Lung Dis. 2009 Dec;13(12):1579.

Diagnostic value and cost utility analysis for urine Gram stain and urine microscopic examination as screening tests for urinary tract infection.

Wiwanitkit V, **Udomsantisuk N**, Boonchalermvichian C.
Urol Res. 2005 Jun;33(3):220-2. Epub 2005 Feb 25.

Amplification of P1 gene by polymerase chain reaction for detection of Mycoplasma pneumoniae.

Tumwasorn S, Nilgate S, **Udomsantisuk N**.
J Med Assoc Thai. 2002 Jun;85 Suppl 1:S389-98.

A more reliable PCR for detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical samples.

Kox LF, Rhienthong D, Miranda AM, **Udomsantisuk N**, Ellis K, van Leeuwen J, van Heusden S, Kuijper S, Kolk AH.
J Clin Microbiol. 1994 Mar;32(3):672-8.

Norfloxacin versus co-trimoxazole for the treatment of upper urinary tract infections: a double blind trial.

Tungsanga K, Chongthaleong A, Udomsantisuk N, Petcharabutr OA, Sitprija V, Wong EC.
Scand J Infect Dis Suppl. 1988;56:28-34.