

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5980002

ชื่อโครงการ: การศึกษาตัวบ่งชี้สถานะปราศจากการติดเชื้อวัณโรคหลังการรักษาด้วยยาต้านวัณโรคในหลอดทดลอง และในมนุษย์

ชื่อนักวิจัย: นายเกียรติไชย พักศรี และคณะ

E-mail address: kiatichai@kku.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

มีการประมาณการว่าหนึ่งในสามของประชากรโลกติดเชื้อวัณโรคแบบแอบแฝง หรือเรียกว่า Latent Tuberculosis infection (LTBI) ปัจจุบันยังไม่มีวิธีการมาตรฐานในการตรวจวินิจฉัยและยังไม่มีตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่สามารถบอกลักษณะปราศจากเชื้อของผู้ป่วยภายหลังการรักษาได้ คณะผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาและวิเคราะห์หาตัวชี้วัดสถานะปราศจากเชื้อ (clearance stage) จากเซลล์ภายหลังการให้ยาต้านเชื้อวัณโรคและการตรวจวินิจฉัย โดยใช้ แมคโครฟาจที่ติดเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) เป็นต้นแบบและตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วย แล้วเปรียบเทียบกับโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นในระยะติดเชื่อกับสถานะปราศจากเชื้อ ด้วยวิธีตัดโปรตีนด้วยเอนไซม์ trypsin ในเจล (in-gel tryptic digestion) ต่อด้วยการทำ liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC MS/MS) โดยนำโปรตีนรวมนอกเซลล์ (จากน้ำเลี้ยงเซลล์) และ โปรตีนรวมในเซลล์ (องค์ประกอบในเซลล์จากการทำให้แตกแล้ว) โดยใช้เซลล์ PBMC ที่ติดเชื้อวัณโรคสายพันธุ์ H37Rv Bj IO และ EUA ด้วยอัตราส่วนระหว่างเชื้อและเซลล์ 1:1 ซึ่งเชื้อในเซลล์ถูกฆ่าด้วยยาต้านส่วน isoniazid 3 ไมโครกรัม และ ยา rifampicin 9 ไมโครกรัม จากนั้นโปรตีนรวมจึงถูกเก็บมาวิเคราะห์ในวันที่ 1 (สถานะติดเชื้อ) และวันที่ 5 หลังจากเติมยาแล้ว (สถานะปราศจากเชื้อ) โดยสถานะปราศจากเชื้อวัดจากการไม่พบ *Mtb* ในเซลล์ PBMC จากนั้นจึงเตรียมโปรตีนที่สกัดได้เพื่อวิเคราะห์ด้วย LC MS/MS ผลการศึกษาพบว่ามีชนิดของโปรตีนภายนอกเซลล์จำนวน 1073 ชนิด โดยมีโปรตีนที่พบเฉพาะสถานะปราศจากเชื้อ (ไม่พบในสถานะติดเชื้อ) จากภายนอกเซลล์จำนวน 2 ชนิด โดย PSTK และ FKBP8 เป็นโปรตีนที่มีแนวโน้มที่ดีในการใช้เป็นตัวบ่งชี้สถานะปราศจากเชื้อวัณโรค จากการวิเคราะห์โปรตีนด้วย Western blot analysis จากตัวอย่างของผู้ป่วยวัณโรคแอบแฝง เปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยวัณโรคปอดแสดงอาการ และกลุ่มควบคุมสุขภาพดี พบว่า PSTK เป็นโปรตีนที่สามารถใช้เป็นตัวชี้วัดสถานะปราศจากเชื้อและน้ำเลือดของผู้ติดเชื้อวัณโรคภายหลังการรักษา การศึกษา protein จากตัวอย่างโดยใช้เทคนิคการตรวจปริมาณมาก (SERS, RAMANS) พบแบบแผนโปรตีนและโมเลกุลที่ช่วยจำแนกกลุ่มผู้ป่วยวัณโรค และการตรวจวิเคราะห์ไซโตไคน์ช่วยบ่งชี้ว่า CXCL10 ช่วยในการจำแนกกลุ่มผู้ป่วยวัณโรคได้ดี ตัวบ่งชี้โปรตีนเหล่านี้ อาจจะสามารถนำมาเป็นตัวชี้วัดสถานะปราศจากเชื้อวัณโรคภายหลังจากการรักษาได้

คำสำคัญ *Mycobacterium tuberculosis*, ติดเชื้อวัณโรคแอบแฝง, comparative proteomic, LC MS/MS, clearance marker,

Abstract

Project Code: MRG5980002

Project Title: *In vitro* and *in vivo* investigations of biomarkers indicating clearance stage of *Mycobacterium tuberculosis* infection after treatment with anti-tuberculous drugs

Investigator: kiatichai Faksri et. al

E-mail Address: kiatichai@kku.ac.th

Project Period: 2 years

One-third of the world population was infected with *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) and was defined as latent tuberculosis infection (LTBI). So far, there is no gold standard method for LTBI diagnosis and no biomarker for determining the clearance stage of *M. tuberculosis* infection after treatment. We aim to analyze the potential biomarkers for diagnosis and indicating the clearance stage of *M. tuberculosis* infection by using macrophage infection model. Comparative proteomic analysis between *M. tuberculosis* infection stage and clearance stage were performed by using in-gel tryptic digestion followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (GeLC MS/MS). Extracellular (culture supernatant) proteomes from activated PBMC infected with *M. tuberculosis* (H37Rv, Bj, IO, EUA) strain (MOI = 1) and treated with 3 µg of isoniazid and 9 µg of rifampicin for 1 day (infection stage) and 5 days (clearance stage) post infection were extracted, processed for GeLC MS/MS. Clearance stage was defined as the condition with no viable *M. tuberculosis* from infected PBMC. There were overall 1073 proteins elements were found extracellular proteome. There were 4 extracellular that uniquely found in the clearance stage of all *M. tuberculosis* (H37Rv, Bj, IO, EUA) strain. PSTK and FKBP8 were promising to use as *M. tuberculosis* clearance biomarker based on LC-MS/MS data. The evaluation based on western blot of active pulmonary TB and LTBI patients compare to healthy control confirmed that PSTK is a promising clearance marker. The high throughput analysis (SERS and RAMAN) of TB patient serum revealed the protein and biomolecule pattern that can be used to differentiate the TB patients groups and chemokine analysis revealed that CXCL10 was the marker that can be used to differentiate among the TB patient groups. These proteins were the potential biomarkers for TB diagnosis and to indicate the clearance stage of MTB infection after anti-tuberculous treatment.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, latent *Mycobacterium tuberculosis* infection, LTBI, comparative proteomic, LC MS/MS, clearance marker