

รายงานการวิจัย

การศึกษาโปรตีนส่วนประกอบของเฮชดีแอลในผู้ที่มีการติดเชื้อในกระแสโลหิต
ด้วยวิธีการทางโปรตีโอมิกส์

Identification of proteins in HDL in patients with septicemia
using proteomic approach

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ วีรพันธุ์ โขวิฑูรกิจ และคณะ

สาขาวิชาต่อมไร้ท่อและเมตะบอลิซึม

ภาควิชาอายุรศาสตร์

คณะแพทยศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานการวิจัย

การศึกษาโปรตีนส่วนประกอบของเอชดีแอลในผู้ที่มีการติดเชื้อในกระแสโลหิต
ด้วยวิธีการทางโปรตีโอมิกส์

Identification of proteins in HDL in patients with septicemia
using proteomic approach

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ วีรพันธุ์ โขวิฑูรกิจ และคณะ

สาขาวิชาต่อมไร้ท่อและเมตะบอลิซึม

ภาควิชาอายุรศาสตร์

คณะแพทยศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2551
คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ดร. สิทธิรักษ์ รอยตระกูล และ รศ. นพ. วิศิษฐ์ ทองบุญเกิด ที่ให้คำแนะนำใน
การทำวิจัย ขอขอบคุณ คุณวาทินี เปล่งพาณิชย์ คุณวรกมล แน่นอุดร คุณกรรณิการ์ เกตุภู และคุณ
สุชัญญา พูลสุข ผู้ร่วมทำการวิจัย และขอขอบคุณคุณอุภาภรณ์ การินทร์ ที่ช่วยเหลือในการทำบัญชี
โครงการวิจัย

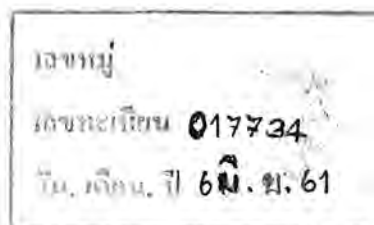
บทคัดย่อภาษาไทย

HDL (high density lipoprotein) เป็น lipoprotein ที่ทำหน้าที่ลำเลียงไขมันจากเซลล์ต่างๆ ของร่างกายกลับไปทิ้งที่ตับ จึงมีส่วนสำคัญในการป้องกันการเกิดโรคหลอดเลือดแดงแข็ง นอกจากนี้ HDL ยังมีบทบาทสำคัญที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายโดยพบว่าสามารถจับกับ endotoxin ของเชื้อแบคทีเรียที่เรียกว่าลิโปไลพอลิแซ็กคาไรด์และทำให้ฤทธิ์ของ endotoxin ลดลง ซึ่งเป็นผลจากโปรตีนหลายๆชนิดที่อยู่บน HDL การศึกษาโปรตีนส่วนประกอบของ HDL ในระหว่างที่ร่างกายมีการติดเชื้อในกระแสเลือด ยังไม่มีการศึกษาอย่างเป็นระบบในคน ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนของ HDL ในระหว่างที่ร่างกายมีการติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือด โดยใช้วิธีทางโปรตีนโอมิก คือใช้วิธี two dimensional gel electrophoresis และ mass spectrometry

ตัวอย่างเลือดจากคนไข้ที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือด และตัวอย่างเลือดคนไข้คนเดิมที่หายจากการติดเชื้อแล้วหรือคนปกติ ถูกนำมาแยก HDL โดยวิธี immunoaffinity column chromatography จากนั้นนำ HDL ไปศึกษาส่วนประกอบโปรตีนด้วยวิธี two dimensional gel electrophoresis โปรตีนที่พบ มีการเปรียบเทียบและพิสูจน์ชนิดของโปรตีนด้วยวิธี MALDI TOF mass spectrometry และ peptide mass fingerprint

ผลการศึกษาพบว่าสามารถพิสูจน์ทราบชนิดของโปรตีนบน HDL กว่า 20 ชนิด และพบว่าในระหว่างที่ร่างกายมีการติดเชื้อแบคทีเรียที่เรียกว่าลิโปไลพอลิแซ็กคาไรด์ในกระแสเลือด มีการเพิ่มขึ้นของโปรตีน apo A-IV และ serum amyloid A และมีการลดลงของโปรตีน alpha1 antitrypsin และ transthyretin สำหรับในคนที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียที่เรียกว่าลิโปไลพอลิแซ็กคาไรด์ในกระแสเลือด พบมีการเพิ่มขึ้นของโปรตีน apo A-IV, orosomucoid และ serum amyloid A และมีการลดลงของโปรตีน alpha1 antitrypsin, paraoxonase1 และ transthyretin

ผลการศึกษาครั้งนี้ บ่งถึง protein target ที่ควรนำมาศึกษาเพิ่มเติมและอาจมีประโยชน์ในการนำมาปรับเปลี่ยนระดับที่อาจส่งผลต่อกระบวนการติดเชื้อในร่างกายได้



บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

HDL (high density lipoprotein) is a group of lipoproteins that play a role in reverse cholesterol transport and protect against atherosclerosis. HDL also plays a role in innate immunity because it can bind and inactivate endotoxin from gram negative bacteria. Biological effects of HDL are mediated by various proteins carried on HDL. In this study, we aimed to examine the changes in protein composition of HDL during bacterial septicemia in a comprehensive manner using a proteomic approach of two dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry

Blood samples of subjects with septicemia and the same subjects after recovery or control subjects were used for isolation of HDL using immunoaffinity column chromatography. Purified HDL were subjected to two dimensional gel electrophoresis and the protein spots were identified using MALDI TOF mass spectrometry and peptide mass fingerprint.

We found more than 20 proteins associated with HDL. In addition, we found an increase in apo A-IV and serum amyloid A and a decrease in alpha1 antitrypsin and transthyretin during gram negative septicemia. For gram positive septicemia, we found an increase in apo A-IV, orosomucoid, and serum amyloid A, while alpha1 antitrypsin, paraoxonase1, and transthyretin were decreased.

Results from this study point to various protein targets for further examination, and modulation of these protein targets may prove to be useful for combating bacterial septicemia.

สารบัญเรื่อง

หัวข้อ	หน้า
บทนำ	9
ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	9
วัตถุประสงค์และขอบเขตของโครงการวิจัย	12
ทฤษฎี แนวทางความคิดของโครงการวิจัย	13
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	13
วิธีการดำเนินการวิจัย	14
ขั้นตอนและวิธีการวิจัย	14
การเก็บข้อมูล และจำนวนตัวอย่าง	14
วิธีการวิจัย	14
วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล	15
ผลการวิจัย	16
โปรตีนของ HDL	16
การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนของ HDL ในคนไข้ติดเชื้อมาลาเรีย	28
การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนของ HDL ในคนไข้ติดเชื้อมาลาเรีย	30
อภิปรายผล	34
สรุป	36
ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป	37
ประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลงานวิจัย	38
บรรณานุกรม	39
ประวัตินักวิจัยและคณะ	43

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
ตารางที่ 1 ชนิดของ โปรตีนบน HDL ที่สามารถค้นพบจากการศึกษา	16
ตารางที่ 2 โปรตีนของ HDL ที่พบจาก peptide mass fingerprint	17
ตารางที่ 3 ข้อมูลตัวอย่างเลือดคนไข้ที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ	28
ตารางที่ 4 ข้อมูลตัวอย่างเลือดคนไข้ที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก	30

สารบัญรูป

รูป	หน้า
รูปที่ 1 proteomic map ของ HDL	27
รูปที่ 2A ตัวอย่าง two dimensional gel ของ HDL ของคนไข้ขณะที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียกรัมลบ	29
รูปที่ 2B ตัวอย่าง two dimensional gel ของ HDL ของคนไข้เมื่อหายจากการติดเชื้อแบคทีเรียกรัมลบ	29
รูปที่ 3 การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนระหว่างการติดเชื้อแบคทีเรียกรัมลบ	30
รูปที่ 4A ตัวอย่าง two dimensional gel ของ HDL ของคนไข้ขณะที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียกรัมบวก	31
รูปที่ 4B ตัวอย่าง two dimensional gel ของ HDL ของคนไข้เมื่อหายจากการติดเชื้อแบคทีเรียกรัมบวก	32
รูปที่ 5 การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนระหว่างการติดเชื้อแบคทีเรียกรัมบวก	32

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

Apo	Apolipoprotein
APR	Acute-phase response
Da	Dalton
HDL	High-density lipoprotein
LBP	Lipopolysaccharide-binding protein
LDL	Low-density lipoprotein
pI	Isoelectric point

บทนำ

ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โรคติดเชื้อจากแบคทีเรียเป็น โรคที่พบบ่อย และเป็นสาเหตุสำคัญอันดับต้นๆของการตายของผู้ป่วยในโรงพยาบาล (1,2) ในกรณีที่การติดเชื้อลุกลามเข้าสู่กระแสโลหิต อัตราการตายจะสูงขึ้นมาก ก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจและคุณภาพ และส่งผลทางอ้อมให้เกิดความยากจนในสังคม การรักษาภาวะติดเชื้อในกระแสโลหิตในปัจจุบัน อาศัยยาปฏิชีวนะร่วมกับการรักษาแบบประคับประคอง อย่างไรก็ตาม อัตราการตายของผู้ที่มีการติดเชื้อในกระแสโลหิตยังสูงมาก จึงมีความพยายามค้นหาวิธีการรักษาแบบใหม่ๆ เพื่อช่วยลดอัตราการตายในผู้ป่วยเหล่านี้ (3)

การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงของร่างกายในขณะที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสโลหิต พบว่า ร่างกายมีการตอบสนองที่เรียกรวมว่า acute-phase response ซึ่งช่วยป้องกันร่างกายไม่ให้มีการบาดเจ็บเพิ่มขึ้น และช่วยในกระบวนการซ่อมแซมของร่างกาย (4) ปฏิกริยาตอบสนองนี้เห็นได้จากการที่มีการเพิ่มขึ้นของระดับ โปรตีนที่เป็น acute-phase reactant ในเลือด เช่น C-reactive protein, fibrinogen และ serum amyloid A ในขณะที่เดียวกัน ระดับ โปรตีนบางอย่างพบว่าลดลง เช่น albumin และ protein C เป็นต้น

จากผลการศึกษาวิจัยในขณะที่ร่างกายมีการติดเชื้อในกระแสโลหิต ที่พบว่าระดับของ protein C ในเลือดลดลง และมีความสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี (5) ทำให้มีความพยายามที่จะทดแทน protein C และศึกษาผลที่เกิดขึ้น การศึกษาทางคลินิกพบว่าการใช้ recombinant activated protein C สามารถลดอัตราการตายในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อในกระแสโลหิตได้ (6) ดังนั้นในปัจจุบัน การใช้ recombinant activated protein C จัดเป็นวิธีการรักษาหนึ่งที่เป็นมาตรฐานในการรักษาภาวะติดเชื้อในกระแสโลหิต

ในระหว่างที่ร่างกายมีการติดเชื้อแบคทีเรีย นอกจากจะมีการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในเลือดแล้ว ระดับไขมันในเลือดมีการเปลี่ยนแปลงในหลายๆด้าน เช่น มีการเพิ่มขึ้นของระดับไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) และการลดลงของคอเลสเตอรอล (cholesterol) (7) ไขมันที่ไหลเวียนอยู่ในเลือดอยู่ในรูปของอนุภาคขนาดเล็กที่ประกอบไปด้วยไขมันและโปรตีนชนิดต่างๆ รวมเรียกว่า lipoproteins ซึ่งแบ่งได้หลายชนิดตามความหนาแน่น (density) และโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบหลัก การศึกษาทางระบาดวิทยาและการวิจัยทางคลินิก แสดงให้เห็นว่า ระดับของ lipoproteins ชนิดต่างๆ มีความสัมพันธ์ และเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญอันหนึ่งของการเกิดโรคหลอดเลือดแดงแข็ง (atherosclerosis) (8)

High-density lipoprotein หรือ HDL เป็น lipoprotein ที่ขนาดเล็กที่สุด และมีสัดส่วนของโปรตีนมากกว่า lipoproteins ชนิดอื่นๆ โปรตีนที่อยู่บน HDL มีอยู่มากกว่า 50 ชนิด (9,10) แต่ละชนิดทำหน้าที่แตกต่างกันไป หลักฐานการศึกษาระบาดวิทยา พบว่าระดับของ HDL cholesterol

มีความผกผันกับการเกิดโรคหลอดเลือดแดงแข็ง ซึ่งการศึกษาในเซลล์และในสัตว์ทดลองพบว่า HDL สามารถป้องกันการเกิดโรคหลอดเลือดแดงแข็งได้โดยเป็นตัวนำคอเลสเตอรอลส่วนเกินออกจากเซลล์เพื่อขับออกจากร่างกาย นอกจากนี้ HDL ยังมีฤทธิ์ป้องกันการเกิด oxidation ของ low-density lipoprotein (LDL) ลดการอักเสบ และป้องกันการเกิดลิ่มเลือด (11,12) ซึ่งหน้าที่ต่างๆ เหล่านี้ของ HDL อาศัยการทำงานของโปรตีนหลายๆชนิดบน HDL นั้นเอง

ในระหว่างที่ร่างกายมีการติดเชื้อ นอกจากระดับของ HDL cholesterol จะเปลี่ยนไปแล้ว ยังพบว่าส่วนประกอบของ HDL ก็มีการเปลี่ยนแปลงไปทั้งในส่วนของไขมันและโปรตีน HDL ซึ่งเกิดขึ้นในระหว่างที่ร่างกายมีการติดเชื้อ (เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า acute-phase HDL) มีระดับของ free cholesterol และ ไตรกลีเซอไรด์เพิ่มมากขึ้น แต่มี cholesterol ester (13) สำหรับโปรตีนของ HDL พบว่าระดับของ apolipoprotein J (apo J) และ apo serum amyloid A เพิ่มขึ้น แต่ระดับของ apo A-I และ paraoxonase ลดลง การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ยังผลให้หน้าที่การทำงานของ lipoproteins เปลี่ยนแปลงไปด้วย ดังจะเห็นได้จากการที่ acute-phase HDL มีความบกพร่องในการลำเลียงคอเลสเตอรอลออกมาภายนอกเซลล์ อันเนื่องจากการลดลงของโปรตีน lecithin:cholesterol acyltransferase ใน acute-phase HDL (14)

นอกจากผลซึ่งเป็นที่รู้จักกันดีของ lipoproteins ในด้านการลำเลียงไขมันแล้ว ยังพบว่าในระหว่างที่ร่างกายมีการติดเชื้อ lipoproteins หลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง HDL ยังมีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันด้วย (15) lipoprotein ทุกชนิด พบว่าสามารถจับกับ endotoxin (หรือ lipopolysaccharide) ของแบคทีเรียกรัมลบ และมีฤทธิ์ในการลดพิษของ endotoxin ได้ (15-18) endotoxin นี้สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกายให้มีการหลั่งสาร cytokines เพื่อช่วยร่างกายในการกำจัดการติดเชื้อและการซ่อมแซมเซลล์ที่ได้รับการบาดเจ็บ อย่างไรก็ตาม endotoxin ที่กระตุ้น cytokines จนมีมากเกินไป ทำให้ร่างกายเกิดภาวะ septic shock และเกิดการเสียชีวิตได้ เมื่อนำ endotoxin มาใส่ในเลือด พบว่าส่วนใหญ่ของ endotoxin พบอยู่กับ HDL (19) ในสัตว์ทดลองที่มีการฉีด endotoxin หรือฉีดแบคทีเรียกรัมลบเข้าร่างกาย พบว่าหนูทดลองที่มีระดับของ HDL สูง เสียชีวิตน้อยกว่าหนูทดลองที่มีระดับ HDL ต่ำ (18) นอกจากนี้ การทดลองในคน พบว่าเมื่อมีการฉีด endotoxin เข้าร่างกาย การให้ HDL สังเคราะห์ สามารถลดการหลั่ง cytokines และลดอาการของผู้ป่วยที่เกิดจาก endotoxin ได้ (20)

HDL ประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิด แต่ละชนิดมีหน้าที่แตกต่างกันไป การศึกษาโปรตีนโดยวิธี proteomics ทำให้ทราบถึงโปรตีนหลายชนิดบน HDL (9,10) โปรตีนบางตัวเป็นโปรตีนที่ทราบมาก่อนแล้วว่าเป็นส่วนประกอบของ HDL เช่น apo A-I, apo A-II, apo Cs, apo E ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวกับเมตะบอลิซึมของ lipoproteins โปรตีนบางตัวเป็นโปรตีนใหม่ที่ไม่เคยทราบมาก่อนว่าเป็นโปรตีนของ HDL และยังไม่ทราบหน้าที่ที่ชัดเจน เช่น alpha salivary amylase, insulinoma associated protein I A-6 (9,10) เป็นที่น่าสังเกตว่าโปรตีนหลายตัวบน HDL มีบทบาทเกี่ยวกับการ

อีกเสปติคเชื้อของร่างกาย เช่น c-reactive protein, complement component 3, macrophage stimulating factor 1 (9)

โปรตีนหลายชนิดใน HDL สามารถจับกับ endotoxin และลดพิษของ endotoxin ได้ Apo A-I เป็นโปรตีนหลักของ HDL ซึ่งนอกจากทำหน้าที่ลำเลียงคอเลสเตอรอลออกจากเซลล์แล้ว ยังมีหลักฐานในสัตว์ทดลองว่าสามารถจับกับ endotoxin ของแบคทีเรียกรัมลบและลดการหลั่ง cytokines จาก macrophage ได้ (21, 22) เมื่อนำ apo A-I มาผสมกับ endotoxin พบว่า สามารถลดปฏิกิริยาอักเสบที่หลอดเลือด ลดการเกิดไข่ และลดอัตราการตายในสัตว์ทดลองได้ (21-23) นอกจากนี้ apo A-I แล้ว โปรตีนอื่นของ HDL เช่น apo E, apo A-IV และ lipopolysaccharide-binding protein (LBP) ที่มีฤทธิ์ใกล้เคียงกับ apo A-I สามารถลดผลของ endotoxin ต่อเซลล์และสัตว์ทดลองได้ (13) สัตว์ทดลองที่ขาด apo E หรือ LBP พบว่าเสียชีวิตมากขึ้นเมื่อมีการติดเชื้อในกระแสโลหิต (24, 25)

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนของ HDL ระหว่างที่มีการติดเชื้อ มักเป็นการศึกษาโปรตีนแยกแต่ละชนิดของ HDL โดยพบว่าระดับของ apo A-I ลดลง แต่ระดับ apo E และ LBP เพิ่มขึ้น (13) จากการทดลองของ apo A-I ระหว่างที่มีการติดเชื้อ ร่วมกับผลของ apo A-I ที่สามารถลดพิษของ endotoxin ทำให้มีการทดลองให้ apo A-I ในสัตว์ทดลองที่มีการติดเชื้อและพบว่าสามารถลดอัตราการตายได้ (21) นอกจากนี้ การที่พบว่าระดับของ LBP สูงขึ้นมากในขณะที่ร่างกายมีการติดเชื้อ ทำให้มีการทดลองใช้ LBP ในสัตว์ทดลองขณะที่มีการติดเชื้อ และผลพบว่า LBP สามารถลดอัตราการตายได้เช่นเดียวกัน (25) ดังนั้น จะเห็นได้ว่าการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนหลายชนิดบน HDL มีผลโดยตรงต่อร่างกาย ในการต่อสู้กับการติดเชื้อของร่างกาย

ในปัจจุบัน การศึกษาโปรตีนโดยใช้วิธีทาง proteomics กำลังได้รับความนิยมมากขึ้น เนื่องจากมีการพัฒนาเทคนิคทั้งในด้าน isoelectric focusing และ mass spectrometer รวมทั้งมีฐานข้อมูลที่แพร่หลายของทั้งทาง genomic และ โปรตีน ดังนั้นการใช้วิธี two-dimensional gel electrophoresis ร่วมกับ mass spectrometry จึงเป็นวิธีที่ใช้ในการศึกษาโปรตีนหลายๆชนิดพร้อมกัน แม้ปริมาณโปรตีนที่ศึกษาจะมีไม่มาก แต่มีความไว ความแม่นยำและความเที่ยงตรงสูง (26) การศึกษาโปรตีนส่วนประกอบของ HDL นั้นมีการศึกษามานานแล้ว แต่มักเป็นการศึกษาโปรตีนแต่ละชนิดของ HDL การใช้วิธีทาง proteomics เพื่อศึกษาชนิดของโปรตีนบน HDL นั้น เพิ่งเริ่มมีการศึกษา โดยเป็นการศึกษาโปรตีนของ HDL ของคนในภาวะปกติเป็นหลัก (9, 10)

การศึกษารวมของการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนของ HDL ระหว่างที่มีการติดเชื้อนั้น ยังมีการศึกษาน้อยและจำกัดอยู่ในเฉพาะสัตว์ทดลองเท่านั้น (27, 28) การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ HDL ด้วยวิธี proteomics ในสัตว์ทดลองของข้าพเจ้า ทำให้พบการเพิ่มขึ้นของ apo A-IV, apo A-V (27) และ โปรตีนของ HDL ตัวใหม่ที่มีชื่อว่า parotid secretory protein ซึ่งผลการวิจัยเพิ่มเติมพบว่ามียูทรีในการต้านการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Candida albicans* ด้วย (28) อย่างไรก็ตาม

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนของ HDL ในคนที่มีการติดเชื้อ โดยใช้วิธีทาง proteomics นั้น ยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน และไม่ทราบว่า ในคนว่าการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว เกิดขึ้นในทำนองเดียวกันหรือไม่

ถึงแม้ว่าการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนของ HDL ด้วยวิธี proteomics จะให้ภาพรวมได้ดีกว่าการศึกษาแยกโปรตีนแต่ละชนิดแล้วนั้น การศึกษาดังกล่าว ก็ยังถูกจำกัดโดยวิธีที่นิยมใช้ในการแยก HDL จากเลือด คือ ultracentrifugation ซึ่งอาศัยการปั่นแยก HDL จากเลือดด้วยความเร็วสูง ทำให้โปรตีนหลายชนิดของ HDL มีการหลุดออกมาจาก HDL ที่แยกได้ (29) การศึกษาโปรตีนดังกล่าวจึงไม่ใช่ภาพรวมที่แท้จริง (9,10) วิธีหนึ่งที่ใช้แยก HDL จากเลือดโดยไม่ทำให้โปรตีนหลุดจาก HDL คือการใช้ immunoaffinity column chromatography โดยใช้ antibody ต่อ human apo A-I ในการแยก HDL จากเลือด (30, 31) อย่างไรก็ตาม antibody ดังกล่าว ยังมีใช้เฉพาะในบางห้องปฏิบัติการเท่านั้น จากทุนพัฒนาอาจารย์ใหม่ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ. 2547-2548 ข้าพเจ้าได้ผลิต antibody ต่อ human apo A-I และสามารถใช้อntibody ดังกล่าวมาสร้างเป็น apo A-I immunoaffinity column ได้ ผลการศึกษา พบว่าสามารถใช้ column ดังกล่าวในการแยก HDL จากเลือดได้

โครงการวิจัยนี้ ทำการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของ HDL ในมนุษย์เมื่อมีการติดเชื้อในกระแสเลือด โดยแยก HDL ด้วยวิธี immunoaffinity column chromatography เปรียบเทียบระหว่าง HDL ที่ได้จากผู้ป่วยในระยะเวลาที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสโลหิต (septicemia) กับ HDL ในคนปกติ และศึกษาต่อด้วยวิธีทาง proteomics ซึ่งยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน

การศึกษาวิจัยที่เสนอมานี้ จะทำให้ทราบถึงภาพรวมของการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนชนิดต่างๆ ในคนที่มีการติดเชื้อในกระแสโลหิต ก่อให้เกิดความรู้และความเข้าใจในบทบาทของ HDL ในระบบภูมิคุ้มกัน และจะเป็นพื้นฐานในการศึกษาวิจัยต่อเพื่อค้นคว้าหาส่วนประกอบของ HDL ที่มีฤทธิ์ด้านการติดเชื้อได้ อันจะก่อให้เกิดประโยชน์ในการนำความรู้มาประยุกต์ใช้ในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งยังคงเป็นสาเหตุสำคัญอันดับต้นๆของการตายในผู้ป่วยในโรงพยาบาลด้วย

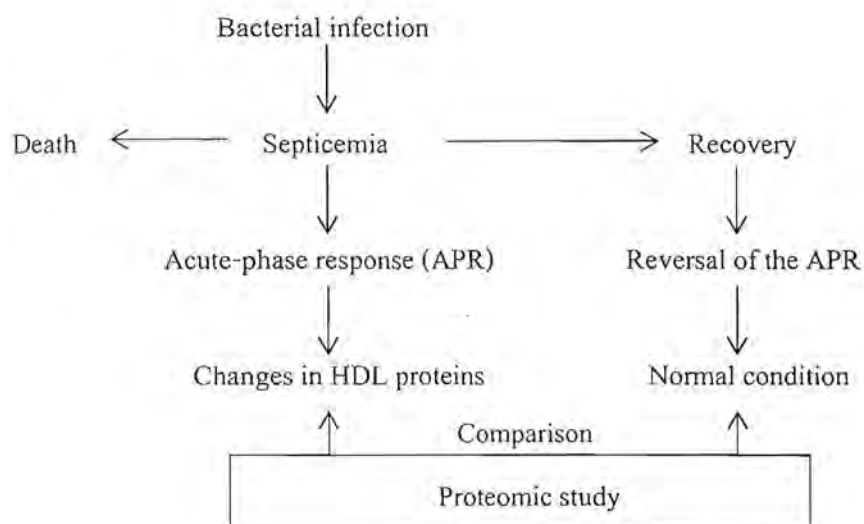
วัตถุประสงค์และขอบเขตของโครงการวิจัย

เพื่อศึกษาถึงชนิดของโปรตีนของ HDL ของคนที่มีการเปลี่ยนแปลงในระหว่างที่ร่างกายมีการติดเชื้อในกระแสโลหิต ตัวอย่างเลือดผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อในกระแสโลหิต จะไม่รวมผู้ป่วยที่ผลการเพาะเชื้อแบคทีเรียในเลือดบ่งว่าเป็น contamination (เช่น ผลการเพาะเชื้อ ได้เชื้อที่เป็น normal flora ของผิวหนังเพียง 1 ใน 2 หรือ 3 ชนิด)

ทฤษฎี แนวทางความคิดของโครงการวิจัย

การติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสโลหิต ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนหลายๆชนิด เพื่อป้องกันอันตรายที่อาจเกิดขึ้น ร่างกายมีกระบวนการที่จะพยายามจำกัดการอักเสบติดเชื้อ และ กำจัดเชื้อโรคที่เป็นสาเหตุ โดยมีการสร้างโปรตีนบางชนิดขึ้นมาเพื่อต้านการติดเชื้อหรือช่วยในการ ซ่อมแซมเซลล์ที่ได้รับผลกระทบ นอกจากนี้ร่างกายมีการลดลงของการสร้างโปรตีนบางชนิด ซึ่ง อาจเกิดจากปฏิกิริยาของร่างกายเอง หรือเกิดจากการติดเชื้อทำให้โปรตีนดังกล่าวลดลง ทำให้ เกิดผลเสียโดยรวมต่อร่างกาย (4)

เนื่องจาก HDL เป็นอนุภาคไขมันที่มีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับภูมิคุ้มกันของร่างกายและ ประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิดที่มีหลักฐานช่วยต่อต้านการอักเสบติดเชื้อในร่างกาย การศึกษาการ เปลี่ยนแปลงของโปรตีนบน HDL โดยรวมด้วยวิธี proteomics จึงมีความสำคัญในการสร้างองค์ ความรู้ใหม่และเป็นการปูพื้นฐานสำหรับการวิจัยต่อยอดในอนาคต ที่จะนำมาซึ่งความรู้ความเข้าใจ ของการทำงานของโปรตีนในร่างกาย และเพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการรักษาการติดเชื้อในกระแส โลหิต



ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลของการวิจัยนี้จะเป็นองค์ความรู้ใหม่ในการทราบถึงการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นของ โปรตีนบน HDL ในระหว่างที่ร่างกายมีการติดเชื้อในกระแสโลหิต ซึ่งจะเป็นพื้นฐานในการวิจัยต่อ ยอดในอนาคต ในด้านการศึกษาวิจัยในรายละเอียดของโปรตีนที่พบ ในส่วนที่เกี่ยวข้องกับการติด เชื้อในร่างกาย ที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการรักษาการติดเชื้อในกระแสโลหิตได้

วิธีการดำเนินการวิจัย

ขั้นตอนและวิธีการวิจัย

1. เก็บรวบรวมตัวอย่างเลือด เพื่อนำมาแยก HDL ด้วยวิธี immunoaffinity column chromatography
2. นำ HDL ที่ได้ ทั้งในภาวะปกติและภาวะติดเชื้อในกระแสโลหิตมาศึกษาโปรตีนส่วนประกอบโดยวิธี two-dimensional gel electrophoresis
3. เปรียบเทียบ โปรตีนที่มีความแตกต่างของ HDL และนำไปพิสูจน์ชนิดของโปรตีนด้วยวิธี mass spectrometry

การเก็บข้อมูล และจำนวนตัวอย่าง

ตั้งแต่ปีพ.ศ. 2546 – 2547 ผู้วิจัยได้ทำการเก็บตัวอย่างเลือดคนไข้ 2 กลุ่ม กลุ่มแรกในคนไข้ที่เข้ารับการรักษาในหอผู้ป่วยใน ฝ่ายอายุรศาสตร์โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ซึ่งมีอาการทางคลินิกที่เข้าได้กับการติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสโลหิต (septicemia) ไม่ได้รับยาปฏิชีวนะภายใน 1 สัปดาห์ก่อนหน้านั้น และผลการเพาะเชื้อในกระแสโลหิตพบว่าตรวจพบเชื้อแบคทีเรียในเลือด (positive blood culture or bacteremia) กลุ่มที่ 2 ในคนปกติ หรือในคนไข้หลังหายจากการรักษาการติดเชื้อและออกจากโรงพยาบาลแล้ว อย่างน้อย 2 เดือนหลังจากการเก็บตัวอย่างเลือดครั้งแรก

การเก็บตัวอย่างเลือดดังกล่าว มีการลงนามในใบยินยอมโดยผู้ป่วยและ/หรือญาติ และโครงการวิจัยดังกล่าวได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรม คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเรียบร้อยแล้ว (No 147/2003)

วิธีการวิจัย

ตัวอย่างเลือดดังกล่าวได้เก็บไว้ในตู้แช่แข็งที่ -80°C ในรูปของซีรัมหรือพลาสมา ซึ่งจะได้นำมาแยก HDL โดยวิธี immunoaffinity column chromatography ซึ่งคณะผู้วิจัยได้ทำการผลิตจากเงินทุนวิจัยพัฒนาอาจารย์ใหม่ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีพ.ศ. 2547-2548 และพบว่านำมาใช้แยก HDL คนได้ หลังจากที่ได้แยก HDL ได้แล้ว จะมีการนำมาแยกชนิดของโปรตีนด้วยวิธีทาง proteomics กล่าวคือใช้วิธี two-dimensional gel electrophoresis ร่วมกับ mass spectrometry

ในกระบวนการ two-dimensional gel electrophoresis จะมีการนำ HDL มาผ่านกระแสไฟฟ้าในเจลเพื่อแยกชนิดของโปรตีนต่างๆ ใน HDL ออกจากกันตาม isoelectric point และตาม molecular weight แล้วมีการย้อมสีโปรตีนด้วย silver nitrate หรือ colloidal Coomassie blue

วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล

ในการทำ two-dimensional gel electrophoresis จะใช้ HDL 2 ตัวอย่างพร้อมๆกัน ทั้งนี้เพื่อเป็นการเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนใน HDL ในคนเดียวกันขณะที่ร่างกายมีการติดเชื้อในกระแสโลหิตกับในภาวะปกติ หรือเปรียบเทียบคนไข้ 2 คนที่ต่างกัน คนหนึ่งปกติ อีกคนหนึ่งมีการติดเชื้อ

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนขณะที่ร่างกายมีการติดเชื้อ จะต้องใช้ตัวอย่างจากคนไข้หลายคน เพื่อให้แน่ใจว่าการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น พบได้ในทุกคน ไม่ได้เป็นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเฉพาะในคนไข้คนใดคนหนึ่ง

หลังจากการข้อมสี โปรตีนแล้ว โปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นหรือลดลง ถูกนำไปวิเคราะห์หาชนิดของโปรตีนดังกล่าวด้วยวิธี mass spectrometry ที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

ผลการวิจัย

โปรตีนของ HDL

เริ่มแรกได้นำเลือดมาแยก HDL ทำ two dimensional gel electrophoresis ของ HDL และย้อมสี เพื่อให้ได้ proteomic map ของ HDL พบว่าแบบแผนโปรตีนที่พบในแต่ละคนมีความแตกต่างกันไป จากการนำ spot ต่างๆของโปรตีนของ HDL เพื่อทำการตรวจชนิดของโปรตีนโดยวิธี mass spectrometry และสืบค้น peptide mass fingerprint จาก database ทำให้สามารถทราบชนิดของโปรตีนบน HDL ได้มากกว่า 20 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 1 และ 2 และสามารถสร้าง proteomic map ของ HDL ได้ดังรูปที่ 1

ตารางที่ 1 ชนิดของโปรตีนบน HDL ที่สามารถค้นพบจากการศึกษา

Apo A-I	Ig G
Apo A-IV	Ig A
Apo C-I	Ig M
Apo E	Transthyretin
Apo J	Vitamin D-binding protein
Apo L-I	Alpha-1 antitrypsin
Serum amyloid A	Fibrinogen
Paraoxanase-1	Orosomuroid
Albumin	Complement C1
Transferrin	Complement C3
Haptoglobin	

ตารางที่ 2 โปรตีนของ HDL ที่พบจาก peptide mass fingerprint

Spot no.	protein	Accession no.	pI	Mass (Da)	Masses matched	Amino acid position	Sequence coverage
1	Alpha-1 antitrypsin	gi 942953	5.43	44322	1015.6526	301-310	52%
					1076.7047	235-243	
					1078.5613	275-282	
					1090.6290	194-201	
					1092.6454	235-243	
					1110.6403	291-300	
					1204.6919	234-243	
					1220.7290	234-243	
					1247.6116	224-233	
					1263.6173	224-233	
					1275.7200	192-201	
					1419.7185	223-233	
					1641.9710	26-39	
					1779.9061	11-25	
					1804.1014	260-274	
					1834.0704	311-328	
					1892.0121	202-217	
2058.0919	137-154						
2090.3001	175-191						
2186.2365	137-155						
2574.5558	102-125						
2820.4542	1-25						
2	Albumin	gi4502027	5.92	71317	1149.6993	66-75	21%
					1226.7270	35-44	
					1468.0419	361-372	
					1640.1419	438-452	
					1899.3211	170-184	
					1911.2381	509-524	

Spot no.	protein	Accession no.	pI	Mass (Da)	Masses matched	Amino acid position	Sequence coverage
					1932.3378 2045.3998 2490.6611	89-105 397-413 45-65	
3	ApoA-I	gi90108664	5.27	28061	1031.4363 1047.4270 1152.5335 1226.4309 1235.5911 1252.5105 1283.4792 1299.4770 1302.5169 1318.5306 1380.6266 1400.5976 1411.6301 1427.6364 1462.7793 1467.7352 1612.7374 1650.8427 1815.8544 2202.1407	141-149 141-149 132-140 1-10 13-23 97-106 108-116 108-116 141-151 141-151 97-107 28-40 107-116 107-116 11-23 119-131 46-59 13-27 24-40 60-77	51%
4	ApoA-IV	P06727	5.2	43400	1400.6554 975.5234 976.5411 983.5715 1083.5442 1102.5842 1104.5932	52-64 256-264 156-163 267-275 201-209 212-220 135-143	58%

Spot no.	protein	Accession no.	pI	Mass (Da)	Masses matched	Amino acid position	Sequence coverage
					1196.5747	307-316	
					1215.6821	317-326	
					1231.6747	317-326	
					1235.6807	113-123	
					1258.6802	276-287	
					1258.6802	212-221	
					1287.6708	144-154	
					1311.7359	80-90	
					1350.6649	222-233	
					1352.6847	306-316	
					1558.8170	234-246	
					1574.8153	234-246	
					1634.8509	52-65	
					1805.9295	329-345	
					1927.9756	288-304	
					1994.0076	170-187	
					2084.0141	288-305	
5	ApoC-I	gi4502157	8.01	9326	1003.6603	55-63	39%
					1052.6285	39-47	
					1201.6877	66-74	
					1279.7986	39-49	
					1293.7873	37-47	
					1488.8727	64-74	
					1504.8605	64-74	
6	ApoE	gi178849	5.65	36302	899.1665	51-56	28%
					948.2043	177-185	
					968.2298	199-207	
					1033.1882	270-278	
					1247.1569	34-43	
					1313.2700	259-269	

Spot no.	protein	Accession no.	pI	Mass (Da)	Masses matched	Amino acid position	Sequence coverage
					1497.3065 1753.3330 2092.3783	210-224 208-224 91-108	
7	ApoJ	gi338305	5.74	36997	907.5662 954.5343 970.5127 1075.6737 1288.7730 1393.8237 1444.8981 1763.0448 1874.2210 1888.2465 1905.0707 2000.2450 2079.2339 2314.4723	201-207 291-298 291-298 76-83 187-197 44-55 186-197 168-183 270-286 29-43 29-43 60-75 166-183 247-269	43%
8	Apo L-I	gi12232634	5.99	42357	1165.6417 1290.6066 1574.7083 1590.8286 1595.7701 1630.7776 2487.2028 2955.4117	145-155 306-316 306-319 276-290 219-231 291-305 241-262 64-90	30%
9	CD5 antigen-like protein (CD5L or sp alpha)	gi5174411	5.28	39603	915.4135 993.3838 1147.3851 1545.5021 1565.5080	308-314 299-307 246-256 212-225 199-211	24%

Spot no.	protein	Accession no.	pI	Mass (Da)	Masses matched	Amino acid position	Sequence coverage
					1747.5545 1761.6470 2063.7339	315-328 300-314 155-170	
10	Complement component 1	gi87298828	8.83	26933	968.6166 1092.5923 1591.8537 1660.8990 1879.9545 2493.3134 2530.3238	129-136 178-186 216-229 164-177 142-156 137-156 194-215	34%
11	Complement component 3	gi78101267	6.82	71317	1042.6852 1139.5736 1370.7953 1389.7539 1470.8690 1511.9360 1520.9089 1600.0817 1639.9960 1653.9712 1656.0589 1788.1244 1866.1200 1872.2133 1879.1547 1891.2623 1896.1889 1910.2579 1986.2222 1994.2422	260-268 220-227 115-126 406-417 269-282 509-522 1-13 571-585 140-154 83-97 140-154 322-337 243-259 441-456 204-219 387-403 81-97 98-114 545-562 242-259	60%

Spot no.	protein	Accession no.	pI	Mass (Da)	Masses matched	Amino acid position	Sequence coverage
					2002.1672 2166.2257 2198.3616 2444.6011 2494.4591 2578.6182 2594.6054 2765.6528 2781.6397 3537.9653	545-562 186-203 365-386 487-508 612-635 418-440 418-440 341-364 341-364 601-635	
12	Fibrinogen beta	gi119625343	8.38	59024	902.4384 1030.5544 1239.5781 1535.7807 1544.7650 1560.7960 1684.8344 1785.9590 1941.0419 1951.1581 2127.2987 2390.2522 2401.3979	472-478 472-479 427-436 354-367 459-471 459-471 446-458 314-328 14-29 54-72 179-196 329-348 247-267	32%
13	Fibrinogen gamma	gi223170	5.54	46823	979.6543 1117.6635 1134.6542 1150.6305 1194.6183 1293.8437 1491.9214	206-212 248-256 257-266 257-266 6-14 163-173 96-108	40%

Spot no.	protein	Accession no.	pI	Mass (Da)	Masses matched	Amino acid position	Sequence coverage
					1513.8813 1546.0000 1683.1833 2012.1555 2536.5540 2768.6299	109-120 391-405 233-247 339-356 63-85 128-151	
14	Haptoglobin	gi3337391	6.67	39300	920.6747 1225.9599 1544.0297 1845.4919 2763.8202 3845.2305	111-118 332-341 218-231 176-191 238-60 286-319	30%
15	IgA1	gi40890038	7.87	51957	931.6030 940.5406 1153.6163 1213.6355 1375.5955 1540.6767 1835.8627	335-343 291-299 396-404 386-395 323-334 276-290 405-421	17%
16	IgM	gi4467842	6.35	50105	1029.6724 1249.7066 1616.9482 1618.0340 1637.9988 1717.0043 1774.1683	143-150 132-142 377-391 154-169 224-238 301-315 323-338	21%
17	IgG2	gi14030849	7.94	50229	1161.6080 1286.7726 1287.7279 1423.8056	361-370 345-355 126-137 138-151	34%

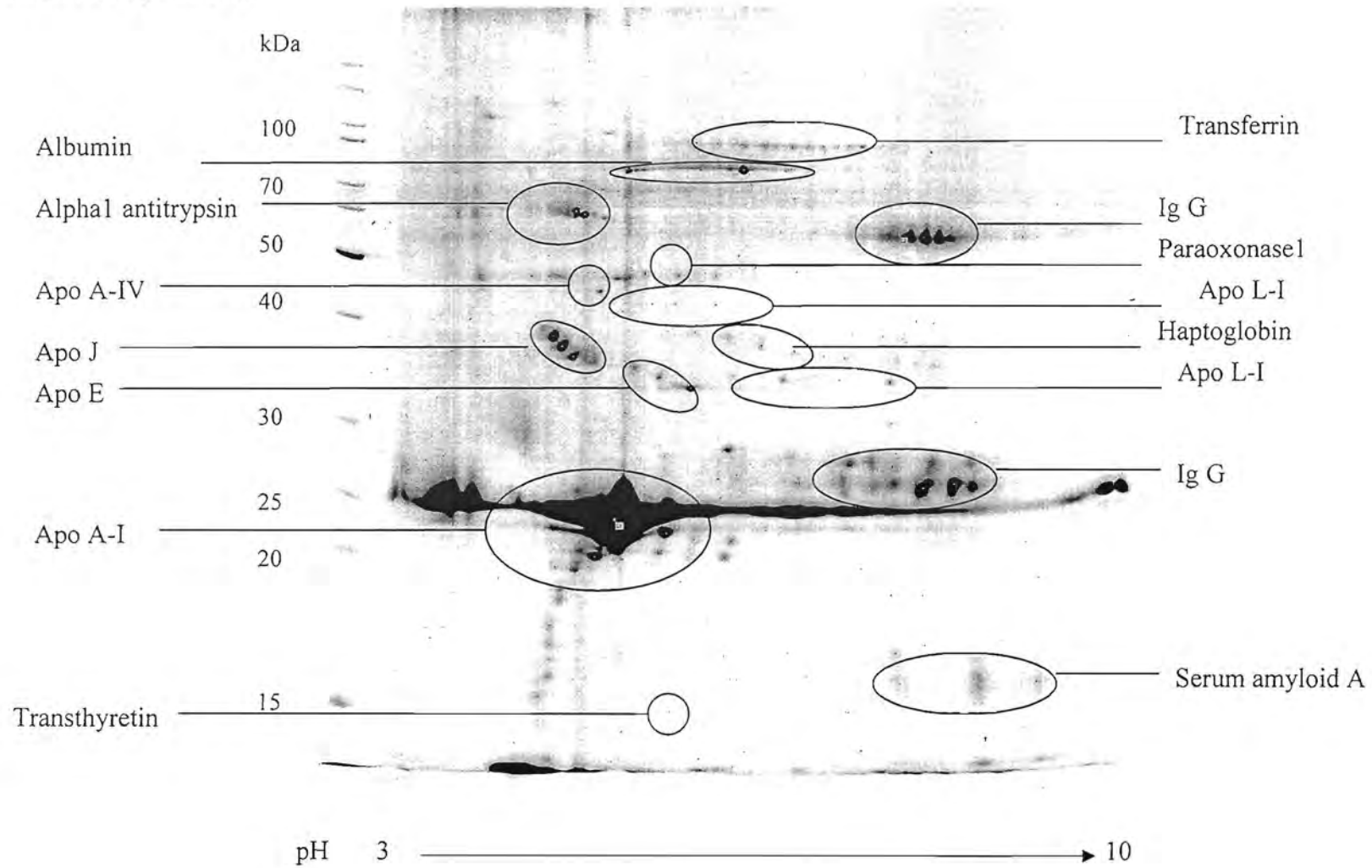
Spot no.	protein	Accession no.	pI	Mass (Da)	Masses matched	Amino acid position	Sequence coverage
					1794.1403 1905.0945 1922.0792 2544.3486 2801.5059 2817.5051 2908.6586	302-317 345-360 393-409 371-392 417-439 417-439 223-248	
18	Orosomu- coid2	gi4505529	5.03	23873	994.7498 1144.6518 1160.8299 1234.9775 1757.2292 2113.5065 2663.9412	74-81 171-179 43-51 114-123 139-153 154-170 87-108	44%
19	Serum amyloid A1 (SAA1)	gi40316910	6.28	13581	1456.7585 1550.7710 1612.8770 1640.8798 1670.9002 1749.9860 2178.1259	66-80 20-33 65-80 109-122 44-57 106-121 86-105	66%
20	Transferrin	gi110590599	6.85	76988	1195.6057 1211.5874 1249.6656 1273.6509 1276.6683 1283.6655 1317.6424 1323.7406 1364.7221	101-110 101-110 432-442 204-214 278-288 509-519 5-15 294-305 520-531	48%

Spot no.	protein	Accession no.	pI	Mass (Da)	Masses matched	Amino acid position	Sequence coverage
					1478.8535	310-321	
					1491.8313	276-288	
					1494.8159	310-321	
					1521.7882	350-362	
					1531.8011	662-674	
					1565.9034	625-637	
					1577.8009	454-467	
					1586.8823	566-578	
					1593.8764	454-467	
					1615.9272	204-217	
					1629.8697	86-99	
					1690.0234	237-251	
					1705.8842	473-487	
					1882.0130	215-229	
					1953.1222	550-565	
					2072.0401	412-430	
					2171.3173	122-140	
					2175.2263	378-398	
					2549.5264	230-251	
					2987.5408	494-519	
21	Transthyretin, chain A	gi443295	5.35	13810	1366.9577	22-34	79%
					1394.7720	36-48	
					1495.0531	22-35	
					1522.8918	35-48	
					2360.5455	105-126	
					2451.5500	81-103	
					2455.4701	49-70	
					2516.7046	104-126	
					3140.8927	49-76	
22	Vitamin D-	gi139641	5.4	54526	952.6696	277-284	33%

Spot no.	protein	Accession no.	pI	Mass (Da)	Masses matched	Amino acid position	Sequence coverage
	binding protein				1170.9097	354-363	
					1254.9505	208-218	
					1275.8266	219-229	
					1327.0236	353-363	
					1388.9541	342-352	
					1404.9488	342-352	
					1444.8250	293-303	
					1695.2351	51-65	
					2093.2139	371-388	
					2265.3834	95-114	
					2328.6801	31-50	
					2518.4869	66-87	

pI: Isoelectric point; Da: Dalton

รูปที่ 1 Proteomic map ของ HDL



จากตัวอย่างเลือดที่เก็บได้ในคนไข้ที่มีการติดเชื้อ ได้แบ่งคนไข้เป็น 2 ประเภท คือคนไข้ที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียกรัมลบ และคนไข้ที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียกรัมบวก

การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนของ HDL ในคนไข้ติดเชื้อกรัมลบ

ตัวอย่างเลือดชุดแรก เป็นตัวอย่างเลือดของคนไข้คนเดียวกัน 3 คนที่เก็บใน 2 ช่วงเวลา ช่วงแรกเก็บในระหว่างที่มารับการรักษาตัวในโรงพยาบาลจากการติดเชื้อแบคทีเรียกรัมลบ ช่วงที่ 2 เก็บเมื่อคนไข้หายจากการติดเชื้อและออกจากโรงพยาบาลอย่างน้อย 2 เดือน ตัวอย่างเลือดชุดที่ 2 เป็นตัวอย่างเลือดของคนไข้ที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียกรัมลบ 3 คนเปรียบเทียบกับคนปกติ 3 คน 1 ข้อมูลของตัวอย่างเลือด แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ข้อมูลตัวอย่างเลือดคนไข้ที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียกรัมลบ

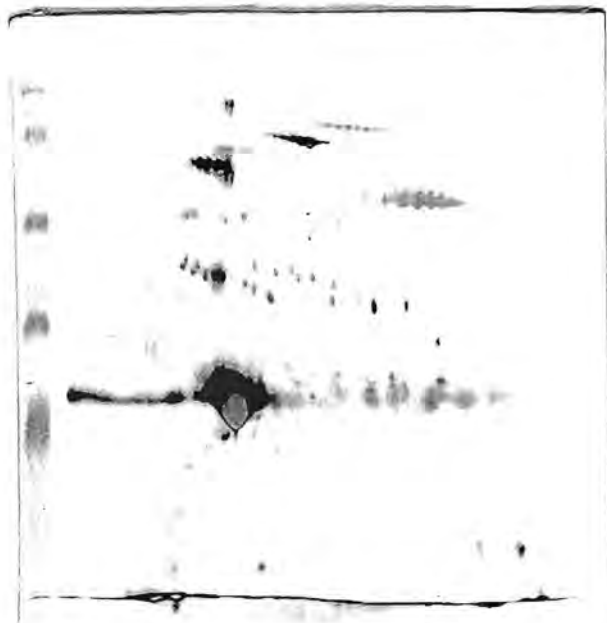
ชื่อย่อ	เพศ	เชื้อแบคทีเรียในเลือด
ชุดที่ 1 (ขณะติดเชื้อและเมื่อหายติดเชื้อ)		
ขส	หญิง	Escherichia coli
ปก	หญิง	Escherichia coli
ทย	หญิง	Escherichia coli
ชุดที่ 2 (คนไข้ติดเชื้อและคนปกติ)		
รส	หญิง	Salmonella gr. D
สว	หญิง	Escherichia coli
ฟช	หญิง	Enterococcus
ส	หญิง	-(control)
ว	ชาย	-(control)
ช	หญิง	-(control)

จากตัวอย่างดังกล่าวทั้ง 2 ชุด ได้นำมาแยก HDL และทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนของ HDL ด้วยวิธี two dimensional gel electrophoresis ดังตัวอย่างรูปที่ 2 พบว่าแบบแผนโปรตีนที่พบในแต่ละคนมีความแตกต่างกันไป แต่เมื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทั้งหมดแล้ว พบว่า มีการเพิ่มขึ้นของโปรตีน apo A-IV และ serum amyloid A และมีการลดลงของโปรตีน alpha1 antitrypsin และ transthyretin ดังรูปที่ 3

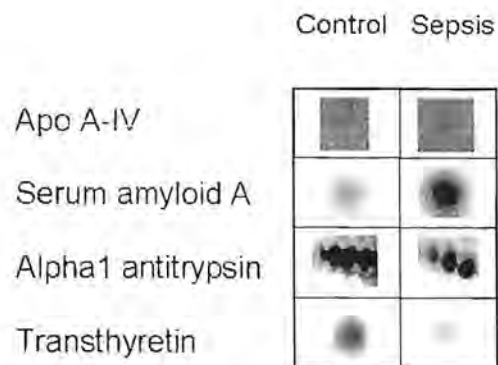
รูปที่ 2A ตัวอย่าง two dimensional gel ของ HDL ของคนไข้ขณะที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียที่เรียกรวม



รูปที่ 2B ตัวอย่าง two dimensional gel ของ HDL ของคนไข้เมื่อหายจากการติดเชื้อแบคทีเรียที่เรียกรวม



รูปที่ 3 การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนระหว่างการติดเชื้อแบคทีเรียที่เรียกรวมลบ



การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนของ HDL ในคนไข้ติดเชื้อกรั่มบวก

ตัวอย่างเลือดชุดแรก เป็นตัวอย่างเลือดของคนไข้คนเดียวกัน 3 คนที่เก็บใน 2 ช่วงเวลา ช่วงแรกเก็บในระหว่างที่มารับการรักษาตัวในโรงพยาบาลจากการติดเชื้อแบคทีเรียที่เรียกรวมลบ ช่วงที่ 2 เก็บเมื่อคนไข้หายจากการติดเชื้อและออกจากโรงพยาบาลอย่างน้อย 2 เดือน ตัวอย่างเลือดชุดที่ 2 เป็นตัวอย่างเลือดของคนไข้ที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียที่เรียกรวมลบ 3 คนเปรียบเทียบกับคนปกติ 3 คน 1 ข้อมูลของตัวอย่างเลือด แสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ข้อมูลตัวอย่างเลือดคนไข้ที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียที่เรียกรวมลบ

ชื่อย่อ	เพศ	เชื้อแบคทีเรียในเลือด
ชุดที่ 1 (ขณะติดเชื้อและเมื่อหายติดเชื้อ)		
นค	ชาย	Staphylococcus aureus
ชร	ชาย	Streptococcus gr. D
บย	หญิง	Bacillus sp.

ชุดที่ 2 (คนไข้ติดเชื้อและคนปกติ)

อส	ชาย	Streptococcus bovis
อช	ชาย	Staphylococcus aureus
ลช	หญิง	Staphylococcus aureus
ว	ชาย	-(control)
ก	หญิง	-(control)
วข	ชาย	-(control)

จากตัวอย่างดังกล่าวทั้ง 2 ชุด ได้นำมาแยก HDL และทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนของ HDL ด้วยวิธี two dimensional gel electrophoresis ดังตัวอย่างรูปที่ 4

ในการทำงานเดียวกัน พบว่าแบบแผนโปรตีนที่พบในแต่ละคนมีความแตกต่างกันไป และเมื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทั้งหมดแล้ว พบว่า มีการเพิ่มขึ้นของโปรตีน apo A-IV, orosomucoid และ serum amyloid A และมีการลดลงของโปรตีน alpha1 antitrypsin, paraoxonase1 และ transthyretin ดังรูปที่ 5

รูปที่ 4A ตัวอย่าง two dimensional gel ของ HDL ของคนไข้ขณะที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก



รูปที่ 4B ตัวอย่าง two dimensional gel ของ HDI ของคนไข้เมื่อหายจากการติดเชื้อแบคทีเรียกรัမ်
บวก



รูปที่ 5 การเปลี่ยนแปลงของ โปรตีนระหว่างการติดเชื้อแบคทีเรียกรั่มบวก

Control Sepsis

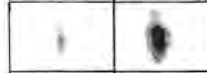
Apo A-IV



Orosomucoid



Serum amyloid A



Alpha1 antitrypsin



Paraoxonase1



Transthyretin



อภิปรายผล

จากความก้าวหน้าในกระบวนการ isoelectric focusing และ mass spectrometry รวมทั้งการที่มีฐานข้อมูลสำหรับการศึกษาทาง proteomics ทำให้การศึกษาด้านนี้ ได้รับความนิยมและก้าวหน้าขึ้นมาก ในการศึกษานี้ได้ใช้วิธีการดังกล่าวในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนของ HDL ในระหว่างที่ร่างกายมีการติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือด ผลการศึกษาพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนต่างกันไป ในการติดเชื้อแบคทีเรียกรัมนบวกและการติดเชื้อกรัลบ

ผลการศึกษาพบว่าสามารถพิสูจน์ทราบชนิดของโปรตีนบน HDL กว่า 20 ชนิด และพบว่าในระหว่างที่ร่างกายมีการติดเชื้อแบคทีเรียกรัลบในกระแสเลือด มีการเพิ่มขึ้นของโปรตีน apo A-IV และ serum amyloid A สำหรับในคนที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียกรัมนบวกในกระแสเลือด พบมีการเพิ่มขึ้นของโปรตีน apo A-IV, orosomuroid และ serum amyloid A โปรตีนทั้ง 3 ชนิดนี้ เคยมีรายงานแล้วว่าเพิ่มขึ้นในระหว่างที่ร่างกายมีการอักเสบติดเชื้อ

Apo A-IV เป็นโปรตีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่แน่ชัด โดยมีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับการดูดซึมวิตามินที่ละลายในไขมันได้ การควบคุมความหิวความอิ่ม การกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ lecithin cholesterol acyltransferase การลำเลียงไขมันออกจากเซลล์ รวมทั้งการป้องกันปฏิกิริยา oxidation การศึกษาในสัตว์ทดลองของข้าพเจ้าที่ผ่านมา เคยพบว่า apo A-IV เป็นโปรตีนของ HDL ที่มีการเพิ่มขึ้นระหว่างการอักเสบติดเชื้อ (27) สำหรับบทบาทของ apo A-IV ในแง่ของการติดเชื้อนั้น มีรายงานว่า apo A-IV สามารถลดการหลั่ง cytokine จาก macrophage ที่ถูกกระตุ้นด้วย endotoxin ได้ (32) การเพิ่มขึ้นของ apo A-IV จึงอาจเป็นกลไกของร่างกายเพื่อลดการกระตุ้น macrophage ที่เกิดขึ้นมาขณะร่างกายมีการติดเชื้อแบคทีเรียและมีระดับ endotoxin สูงขึ้นในกระแสเลือด นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่าทำให้ apo A-IV ในหนูทดลองที่มีการอักเสบของลำไส้ใหญ่ สามารถลดกระบวนการอักเสบได้ (33)

Serum amyloid A เป็น acute phase protein ที่มีการศึกษากันมานาน โดยพบมีการเพิ่มขึ้นทั้งในเลือดและใน HDL ในระหว่างที่ร่างกายมีการอักเสบติดเชื้อ (13) อย่างไรก็ตาม หน้าที่ที่แท้จริงของ serum amyloid A ก็ยังไม่ทราบแน่ชัด โดยมีหลักฐานว่า serum amyloid A อาจมีส่วนในการปรับเปลี่ยนกระบวนการอักเสบของร่างกาย โดยมีผลต่อ neutrophil และเกล็ดเลือด (34)

Orosomuroid หรืออีกชื่อหนึ่งคือ alpha1 acid glycoprotein 2 เป็น acute phase protein อีกตัวหนึ่ง ซึ่งมีฤทธิ์เป็น immunomodulator และมีฤทธิ์ด้านการอักเสบ (35) ระหว่างการติดเชื้อ ระดับของ orosomuroid เพิ่มสูงขึ้นหลายเท่าตัวและแบบแผนของ glycosylation ของโปรตีนนี้ก็แตกต่างกันไปด้วย

โปรตีน alpha1 antitrypsin และ transthyretin พบมีการลดลงขณะที่มีการติดเชื้อแบคทีเรีย
กรั่มลบ แต่ในการติดเชื้อแบคทีเรียกรั่มบวก พบมีการลดลงของโปรตีน alpha1 antitrypsin,
paraoxonase I และ transthyretin

โปรตีนหลายอย่างในเลือดมีการลดลงขณะที่ร่างกายมีการอักเสบติดเชื้อ ซึ่งรวมเรียกว่า
negative acute phase protein ทั้ง transthyretin และ paraoxonase I ต่างก็เป็น negative acute phase
protein เนื่องจากมีรายงานว่าระดับในเลือดลดลงในขณะที่ร่างกายมีการอักเสบติดเชื้อ (36) รวมทั้งมี
รายงานว่า transthyretin เป็นตัวพยากรณ์โรคที่ไม่ดี หากว่ามีระดับต่ำลงมากในขณะที่ติดเชื้อ (37)

Transthyretin เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นตัวพาออร์โมนซีร็อกซิน และ retinol-binding
protein ซึ่งนำมาใช้ในการประเมินภาวะทางโภชนาการของคนไข้ เนื่องจากโปรตีนตัวนี้มีค่าครึ่ง
ชีวิตสั้น (1.9 วัน) และมีระดับลดลงเมื่อร่างกายเกิด acute phase response (38) Transthyretin ที่อยู่ใน
กระแสเลือดมีเพียง 1-2% ที่อยู่บน HDL โดยอาศัยจับกับ apo A-I (39) มีรายงานว่า transthyretin
สามารถตัด apo A-I ได้ ทำให้หน้าที่ของ apo A-I ในการนำคอเลสเตอรอลออกจากเซลล์ลดลง (40)
การลดลงของ transthyretin ใน HDL ยังไม่ทราบว่ามีผลอย่างไร

Paraoxonase I เป็นเอนไซม์ที่พบบน HDL และมีหน้าที่ยับยั้งปฏิกิริยา oxidation ของ LDL
การลดลงของ paraoxonase I ระหว่างการอักเสบติดเชื้อมีรายงานทั้งในคนและสัตว์ทดลอง (13)
ความสำคัญของการลดลงนี้ ยังไม่ทราบว่ามีผลเช่นไร แต่มีสมมติฐานว่าอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับ
ความเสี่ยงที่สูงขึ้นในการเกิดโรคหลอดเลือดแดงแข็ง (7)

Alpha1 antitrypsin เป็น acute phase reactant protein อีกตัวหนึ่ง อย่างไรก็ตาม ใน
การศึกษานี้ พบว่าระดับของโปรตีนนี้ลดลงใน HDL ซึ่งตรงกับการศึกษาในภาวะที่มีการผ่าตัดช่อง
ท้องในคน ที่พบว่าระดับ endotoxin สูงขึ้นในเลือดและในช่วงแรก ระดับ alpha1 antitrypsin
ลดลง ก่อนที่จะสูงขึ้นในภายหลัง (41) การเพิ่มขึ้นของ alpha1 antitrypsin ทำให้มีการยับยั้ง protein
C และส่งเสริมให้เกิดภาวะ procoagulant state ที่พบในภาวะที่มีการติดเชื้อในกระแสเลือด (42)

สรุป

การศึกษานี้ เป็นการศึกษาเบื้องต้นในเชิงพรรณนาเพื่อค้นหาการเปลี่ยนแปลงโดยรวมของ โปรตีนบน HDL ในระหว่างที่ร่างกายมีการติดเชื้อในกระแสเลือด ผลการศึกษาพบว่าสามารถ พิสูจน์ทราบชนิดของ โปรตีนบน HDL กว่า 20 ชนิด และพบว่าในระหว่างที่ร่างกายมีการติดเชื้อ แบคทีเรียกรัมลบในกระแสเลือด มีการเพิ่มขึ้นของ โปรตีน apo A-IV และ serum amyloid A และมีการลดลงของ โปรตีน alpha1 antitrypsin และ transthyretin สำหรับในคนที่มีการติดเชื้อแบคทีเรีย กรัมนวกในกระแสเลือด พบมีการเพิ่มขึ้นของ โปรตีน apo A-IV, orosomuroid และ serum amyloid A และมีการลดลงของ โปรตีน alpha1 antitrypsin, paraoxonase1 และ transthyretin

ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป

การวิจัยในขั้นต่อไป ควรมีการศึกษาถึงสาเหตุและผลในทางชีววิทยาของการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนดังกล่าวบน HDL ว่าก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในหน้าที่ของ HDL ในระหว่างการติดเชื้ออย่างไร ผลจากการศึกษานี้บ่งถึง target protein ที่อาจนำมาศึกษาเพิ่มเติมและอาจมีประโยชน์ในการนำมาปรับเปลี่ยนระดับที่อาจส่งผลดีต่อกระบวนการติดเชื้อในร่างกายได้

ประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลงานวิจัย

ผลงานวิจัยนี้ สามารถนำไปศึกษาต่อยอดในการศึกษาเชิงลึกในการปรับเปลี่ยนระดับของโปรตีนบน HDL เพื่อศึกษาถึงผลที่เกิดขึ้นต่อกระบวนการติดเชื้ในกระแสเลือด

บรรณานุกรม

1. Angus DC, Pereira CA, Silva E. Epidemiology of severe sepsis around the world. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2006;6:207-12.
2. Beaman GM, Wenzel RP. Bacteremias: a leading cause of death. *Arch Med Res*. 2005;36:646-59.
3. Sharma VK, Dellinger RP. Treatment options for severe sepsis and septic shock. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2006;4:395-403.
4. Gabay C, and I. Kushner. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med*. 1999;340:448-454.
5. Protein C levels as a prognostic indicator of outcome in sepsis and related diseases. *Crit Care Med*. 2000;28(9 Suppl):S49-56.
6. Fourrier F. Recombinant human activated protein C in the treatment of severe sepsis: an evidence-based review. *Crit Care Med*. 2004;32(suppl):S534-41.
7. Khovidhunkit, W., R. A. Memon, K. R. Feingold, and C. Grunfeld. Infection and inflammation-induced proatherogenic changes of lipoproteins. *J Infect Dis*. 2000;181:S462-S472.
8. Lusis, A.J. Atherosclerosis. *Nature* 2000;407:233-241.
9. Rezaee F, Casetta B, Levels JH, Speijer D, Meijers JC. Proteomic analysis of high-density lipoprotein. *Proteomics*. 2006;6:721-30.
10. Karlsson H, Leanderson P, Tagesson C, Lindahl M. Lipoproteomics II: mapping of proteins in high-density lipoprotein using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*. 2005;5:1431-45.
11. Escola-Gil JC, Calpe-Berdiel L, Palomer X, Ribas V, Ordonez-Llanos J, Blanco-Vaca F. Antiatherogenic role of high-density lipoproteins: insights from genetically engineered-mice. *Front Biosci*. 2006;11:1328-48.
12. Mineo C, Deguchi H, Griffin JH, Shaul PW. Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circ Res*. 2006;98:1352-64.
13. Khovidhunkit W, Kim MS, Memon RA, Shigenaga JK, Moser AH, Feingold KR, Grunfeld C. Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. *J Lipid Res*. 2004;45:1169-96.

14. Khovidhunkit, W., J. K. Shigenaga, A. H. Moser, K. R. Feingold, and C. Grunfeld. Cholesterol efflux by acute-phase high-density lipoprotein: role of lecithin:cholesterol acyltransferase. *J. Lipid Res.* 2001;42:967-975.
15. Ulevitch, R.J., A.R. Johnston, and D.B. Weinstein. New function for high density lipoproteins: their participation in intravascular reactions of bacterial lipopolysaccharides. *J. Clin. Invest.* 1979;64: 1516-1524.
16. Ulevitch, R.J., A.R. Johnston, and D.B. Weinstein. New function for high density lipoproteins: isolation and characterization of a bacterial lipopolysaccharide-high density lipoprotein complex formed in rabbit plasma. *J. Clin. Invest.* 1981;67:827-837.
17. Flegel, W.A., A. Wolpl, D.A. Mannel, and H. Northhoff. Inhibition of endotoxin-induced activation of human monocytes by human lipoproteins. *Infect. Immun.* 1989;57:2237-2245.
18. Levine, D.M., T. S. Parker, T.M. Donnelly, A. Walsh, and A.L. Rubin. In vivo protection against endotoxin by plasma high-density lipoprotein. *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993;90:12040-12044.
19. Levels JH, Abraham PR, van den Ende A, van Deventer SJ. Distribution and kinetics of lipoprotein-bound endotoxin. *Infect Immun.* 2001;69:2821-8.
20. Pajkrt, D., J. E. Doran, F. Koster, P. G. Lerch, B. Arnet, T. van der Poll, J. W. ten Cate, and S. J. van Deventer. Antiinflammatory effects of reconstituted high-density lipoprotein during human endotoxemia. *J. Exp. Med.* 1996;184:1601-1608.
21. Ma J, Liao XL, Lou B, Wu MP. Role of apolipoprotein A-I in protecting against endotoxin toxicity. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2004;36:419-24.
22. Flegel WA, Baumstark MW, Weinstock C, Berg A, Northhoff H. Prevention of endotoxin-induced monokine release by human low- and high-density lipoproteins and by apolipoprotein A-I. *Infect Immun.* 1993;61:5140-6.
23. Emancipator K, Csako G, Elin RJ. In vitro inactivation of bacterial endotoxin by human lipoproteins and apolipoproteins. *Infect Immun.* 1992;60:596-601.
24. de Bont, N., M. G. Netea, P. N. Demacker, I. Verschueren, B. J. Kullberg, K. W. van Dijk, J. W. van der Meer, and A. F. Stalenhoef. 1999. Apolipoprotein E knock-out mice are highly susceptible to endotoxemia and *Klebsiella pneumoniae* infection. *J. Lipid Res.* 40: 680-685.

25. Jack, R. S., X. Fan, M. Bernheiden, G. Rune, M. Ehlers, A. Weber, G. Kirsch, R. Mentel, B. Furll, M. Freudenberg, G. Schmitz, F. Stelter, and C. Schutt. 1997. Lipopolysaccharide-binding protein is required to combat a murine gram-negative bacterial infection. *Nature*. 389: 742-745.
26. Domon B, Aebersold R. Mass spectrometry and protein analysis. *Science*. 2006;312:212-7.
27. Khovidhunkit W, Duchateau PN, Medzihradzky KF, Moser AH, Naya-Vigne J, Shigenaga JK, Kane JP, Grunfeld C, Feingold KR. Apolipoproteins A-IV and A-V are acute-phase proteins in mouse HDL. *Atherosclerosis*. 2004;176:37-44.
28. Khovidhunkit W, Hachem JP, Medzihradzky KF, Duchateau PN, Shigenaga JK, Moser AH, Movsesyan I, Naya-Vigne J, Kane JP, Feingold KR, Grunfeld C. Parotid secretory protein is an HDL-associated protein with anticandidal activity. *Am. J. Physiol. - Reg Integrat Comp Physiol*. 2005;288:R1306-15.
29. Kunitake ST, Kane JP. Factors affecting the integrity of high density lipoproteins in the ultracentrifuge. *J Lipid Res*. 1982;23:936-40.
30. Kunitake ST, Jarvis MR, Hamilton RL, Kane JP. Binding of transition metals by apolipoprotein A-I-containing plasma lipoproteins: inhibition of oxidation of low density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:6993-7.
31. Cheung MC, Albers JJ. Characterization of lipoprotein particles isolated by immunoaffinity chromatography. Particles containing A-I and A-II and particles containing A-I but no A-II. *J Biol Chem*. 1984;259:12201-9.
32. Recalde D, Ostos MA, Badell E, Garcia-Otin AL, Pidoux J, Castro G, Zakin MM, Scott-Algara D. Human apolipoprotein A-IV reduces secretion of proinflammatory cytokines and atherosclerotic effects of a chronic infection mimicked by lipopolysaccharide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:756-61.
33. Vowinkel T, Mori M, Krieglstein CF, Russell J, Saijo F, Bharwani S, Turnage RH, Davidson WS, Tso P, Granger DN, Kalogeris TJ. Apolipoprotein A-IV inhibits experimental colitis. *J Clin Invest*. 2004;114:260-9.
34. Marhaug G, Dowton SB. Serum amyloid A: an acute phase apolipoprotein and precursor of AA amyloid. *Baillieres Clin Rheumatol*. 1994;8:553-73.

35. Hocheppied T, Berger FG, Baumann H, Libert C. Alpha(1)-acid glycoprotein: an acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003;14:25-34.
36. Afandi B, Vera R, Schussler GC, Yap MG. Concordant decreases of thyroxine and thyroxine binding protein concentrations during sepsis. *Metabolism.* 2000;49:753-4.
37. Devakonda A, George L, Raoof S, Esan A, Saleh A, Bernstein LH. Transthyretin as a marker to predict outcome in critically ill patients. *Clin Biochem.* 2008;41:1126-30.
38. Ando Y. Transthyretin-its function and pathogenesis. *Rinsho Byori.* 2006;54:497-502.
39. Sousa MM, Berglund L, Saraiva MJ. Transthyretin in high density lipoproteins: association with apolipoprotein A-I. *J Lipid Res.* 2000;41:58-65.
40. Liz MA, Gomes CM, Saraiva MJ, Sousa MM. ApoA-I cleaved by transthyretin has reduced ability to promote cholesterol efflux and increased amyloidogenicity. *J Lipid Res.* 2007;48:2385-95.
41. Buttenschoen K, Buttenschoen DC, Berger D, Vasilescu C, Schafheutle S, Goeltenboth B, Seidelmann M, Beger HG. Endotoxemia and acute-phase proteins in major abdominal surgery. *Am J Surg.* 2001;181:36-43.
42. Dhainaut JF, Marin N, Mignon A, Vinsonneau C. Hepatic response to sepsis: interaction between coagulation and inflammatory processes. *Crit Care Med.* 2001;29:S42-7.

ประวัตินักวิจัยและคณะ

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นพ. วีรพันธุ์ โขวิฑูรกิจ
(ภาษาอังกฤษ) Dr. Weerapan Khovidhunkit

2. เลขหมายประจำตัวประชาชน 3-1005-02724-16-5

3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

4. หน่วยงานที่สังกัดและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

สาขาวิชาต่อมไร้ท่อและเมตะบอลิซึม ภาควิชาอายุรศาสตร์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตึกสามัคคีพยาบาลชั้น 2 โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-256-4101, 02-256-4296

โทรสาร 02-652-5347

E-mail : fmedwkv@md.chula.ac.th, Weerapan.K@chula.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

5.1 แพทยศาสตรบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี พ.ศ. 2535

5.2 American Board of Internal Medicine, Albert Einstein Medical Center สหรัฐอเมริกา ปี พ.ศ. 2539

5.3 American Board of Endocrinology, Diabetes & Metabolism, University of California at San Francisco สหรัฐอเมริกา ปี พ.ศ. 2542

5.4 Ph. D. (Biomedical Sciences), University of California at San Francisco สหรัฐอเมริกา ปี พ.ศ. 2545

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

Lipid and lipoprotein metabolism, proteomics

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย ไม่มี

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย

7.2.1 โครงการวิจัยเรื่อง "Proatherogenic effects of high-density lipoprotein during the acute-phase response" ทุน American Heart Association ปีพ.ศ. 2543 -2545

7.2.2 โครงการวิจัยเรื่อง "Identification and characterization of high-density lipoprotein-associated proteins during the acute-phase response" ทุน American Heart Association ปีพ.ศ. 2545

7.2.3 โครงการวิจัยเรื่อง “ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของไลโปโปรตีนของผู้ป่วยระหว่างและหลังจากการติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสโลหิต” ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสม โภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีพ.ศ. 2546 - 2547

7.2.4 โครงการวิจัยเรื่อง “ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของ high-density lipoproteins ในภาวะตอบสนอง acute-phase” ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ปีพ.ศ. 2546 - 2548

7.2.5 โครงการวิจัยเรื่อง “การทำงานของเอนไซม์โคเลสเตอรอล เอสเทอร์ ทรานสเฟอรั โปรตีนในคนไทยที่มีไขมันในเลือดชนิดเอชดีแอลสูงมาก” ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสม โภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีพ.ศ. 2547 – 2548

7.2.6 หัวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง “การผลิต polyclonal antibodies ต่อ apolipoprotein A-I ของมนุษย์ในกระต่าย” ทุนพัฒนาอาจารย์ใหม่/นักวิจัยใหม่ กองทุนรัชดาภิเษกสม โภช ปีพ.ศ. 2547 – 2548

7.2.7 หัวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง “การศึกษาความไวของอินซูลินในคนไทยที่มีไขมันในเลือดชนิดเอชดีแอลสูงมาก” ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสม โภช คณะแพทยศาสตร์ ปี พ.ศ. 2548

7.2.8 หัวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง “การประเมินภาวะดื้ออินซูลิน การทำงานของเบต้าเซลล์ของตับอ่อน และระดับไขมันในเลือดในหญิงมีครรภ์ปกติและหญิงที่เป็นเบาหวานขณะตั้งครรภ์เพื่อทำนายผลของการตั้งครรภ์ต่อมารดาและทารก” ทุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีพ.ศ. 2549

7.2.9 หัวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง “การทำงานของเอนไซม์เฮพาทิก ไลเปส และไลโปโปรตีนไลเปสในคนไทยที่มีไขมันในเลือดชนิดเอชดีแอลสูงมาก” ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสม โภช คณะแพทยศาสตร์ ปีพ.ศ. 2549

7.2.10 หัวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง “การศึกษาหัตถพันธุกรรมของเอนไซม์คอเลสเตอรอล เอสเทอร์ ทรานสเฟอรั โปรตีน ในคนไทยที่มีไขมันในเลือดชนิดเอชดีแอลสูงมาก” ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสม โภช คณะแพทยศาสตร์ ปีพ.ศ. 2549

7.2.11 หัวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง “สุขภาพในช่องปากกับโรคหลอดเลือดและหัวใจในผู้ป่วยเบาหวานวัยกลางคนและผู้สูงอายุ” ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสม โภช คณะแพทยศาสตร์ ประจำปีพ.ศ. 2550

7.2.12 หัวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง “การเปรียบเทียบโปรตีนส่วนประกอบของเอชดีแอลในผู้ที่มีระดับเอชดีแอลในเลือดสูงมากกับคนปกติด้วยวิธีการทางโปรติโอมิกส์” ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสม โภช คณะแพทยศาสตร์ ประจำปีพ.ศ. 2550

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

7.3.1 Chantaphakul H, Limsuwan A, **Khovidhunkit W**, Singhapakdi S.

Childhood Malignancies in Chulalongkorn Hospital From 1986 to 1989. *Chulalongkorn Medical Journal*. 1991;35(12):823-9. เป็นผู้ร่วมวิจัย

7.3.2 Jitapunkul S, **Khovidhunkit W**. Urinary Incontinence in Thai Elderly

Living in Klong Toey Slum. *Journal of Medical Association of Thailand*. 1998;81:160-8. เป็นผู้ร่วมวิจัย

7.3.3 **Khovidhunkit W**, Memon RA, Shigenaga JK, Pang M, Schambelan M,

Mulligan K, Feingold KR, Grunfeld C. Plasma Platelet-activating Factor Acetylhydrolase Activity in Human Immunodeficiency Virus Infection and the Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Metabolism*. 1999;48:1524-31. เป็นผู้วิจัยหลัก

7.3.4 **Khovidhunkit W**, Shigenaga JK, Moser AH, Feingold KR, Grunfeld C.

Cholesterol Efflux by Acute Phase High Density Lipoprotein: Role of Lecithin:cholesterol Acyltransferase. *Journal of Lipid Research*. 2001;42:967-75. เป็นผู้วิจัยหลัก ทุน American Heart Association

7.3.5 **Khovidhunkit W**, Moser AH, Shigenaga JK, Grunfeld, Feingold KR.

Regulation of Scavenger Receptor Class B Type I in Hamster Liver and Hep3B Cells by Endotoxin and Cytokines. *Journal of Lipid Research*. 2001;42:1636-44. เป็นผู้วิจัยหลัก ทุน American Heart Association

7.3.6 Tsuruoka H, **Khovidhunkit W**, Brown BE, Fluhr JW, Elias PM, Feingold

KR. Scavenger Receptor Class B Type I (SR-BI) is Expressed in Cultured Keratinocytes and Epidermis: Regulation in Response to Changes in Cholesterol Homeostasis and Barrier Requirements. *Journal of Biological Chemistry*. 2002; 277:2916-22. เป็นผู้ร่วมวิจัย

7.3.7 **Khovidhunkit W**, Moser AH, Shigenaga JK, Grunfeld C, Feingold KR.

Endotoxin Downregulates ABCG5 and ABCG8 in Mouse Liver and ABCA1 and ABCG1 in J774 Murine Macrophages: Differential Role of LXR. *Journal of Lipid Research*. 2003;44:1728-36. เป็นผู้วิจัยหลัก ทุน American Heart Association

7.3.8 **Khovidhunkit W**, Duchateau PN, Medzihradzky KF, Moser AH, Naya-

Vigne J, Shigenaga JK, Kane JP, Grunfeld C, Feingold KR. Apolipoproteins A-IV and A-V Are Acute-phase Proteins in Mouse HDL. *Atherosclerosis*. 2004;176:37-44. เป็นผู้วิจัยหลัก ทุน American Heart Association

7.3.9 **Khovidhunkit W**, Hachem JP, Medzihradzsky KF, Duchateau PN, Shigenaga JK, Moser AH, Movsesyan I, Naya-Vigne J, Kane JP, Feingold KR, Grunfeld C. Parotid secretory protein is an HDL-associated protein with anticandidal activity. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative, and Comparative Physiology*. 2005;288:R1306-15. เป็นผู้วิจัยหลัก ทุน American Heart Association

7.3.10 Thaveeratitham P, **Khovidhunkit W**, Patumraj S. High-density lipoproteins (HDL) inhibit endotoxin-induced leukocyte adhesion on endothelial cells in rats: Effect of the acute-phase HDL. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2007;36:1-12 เป็นผู้วิจัยหลัก ทุนวิจัย รัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ และทุนพัฒนาศักยภาพในการทำวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

7.3.11 Thaveeratitham P, Plengpanich P, Naen-Udom W, Patumraj S, **Khovidhunkit W**. Effects of human apolipoprotein A-I on endotoxin-induced leukocyte adhesion on endothelial cells in vivo and on the growth of Escherichia coli in vitro. *Journal of Endotoxin Research*. 2007,13:58-64. เป็นผู้วิจัยหลัก ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ และทุนพัฒนาศักยภาพในการทำวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

7.3.12 Plengpanich W, Siriwong S, Snabboon T, **Khovidhunkit W**. Functional and genetic analyses in Thai subjects with hyperalphalipoproteinemia. Manuscript in preparation. เป็นผู้วิจัยหลัก ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์

7.3.13 โครงการวิจัยเรื่อง “การประเมินภาวะคีโตนชิวลิน การทำงานของเบต้าเซลล์ของตับอ่อน และระดับไขมันในเลือดในหญิงมีครรภ์ปกติและหญิงที่เป็นเบาหวานขณะตั้งครรภ์ เพื่อทำนายผลของการตั้งครรภ์ต่อมารดาและทารก” ทุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีพ.ศ. 2549 เป็นหัวหน้าโครงการวิจัย เพิ่งแล้วเสร็จ

7.3.14 โครงการวิจัยเรื่อง “สุขภาพในช่องปากกับโรคหลอดเลือดและหัวใจในผู้ป่วยเบาหวานวัยกลางคนและผู้สูงอายุ” ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ ประจำปีพ.ศ. 2550 เป็นหัวหน้าโครงการวิจัย เพิ่งแล้วเสร็จ

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

7.4.1 โครงการวิจัยเรื่อง “การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับ Retinol binding protein 4 กับผลของการตั้งครรภ์ต่อมารดาและทารก ในหญิงมีครรภ์ที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดเบาหวานขณะตั้งครรภ์” ประจำปีพ.ศ. 2552 เป็นหัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวกรรณิการ์ เกตุภู
(ภาษาอังกฤษ) Miss Kannika Khetpu

2. เลขหมายประจำตัวประชาชน 3 1017 01316 20 3

3. ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์ ผู้ช่วยวิจัย

4. หน่วยงานที่สังกัดและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

สาขาวิชาคอมพิวเตอร์และเมตะบอลิซึม ภาควิชาอายุรศาสตร์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตึกสามัคคีพยาบาลชั้น 2 โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-256-4101, 02-256-4296

โทรสาร 02-652-5347

E-mail: j21kannika@yahoo.com

5. ประวัติการศึกษา

5.1 วิทยาศาสตร์บัณฑิต มหาวิทยาลัยรามคำแหง ปี พ.ศ. 2543

5.2 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี พ.ศ. 2549

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

Genetics and genotyping

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย ไม่มี

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย ไม่มี

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

7.3.1 Klinbunga S, **Khetpu K**, Khamnamtong B, Menasveta P. Genetic heterogeneity of the blue swimming crab (*Portunus pelagicus*) in Thailand determined by AFLP analysis.

Biochem Genet. 2007;45(9-10):725-36. เป็นผู้ร่วมวิจัย

7.3.2 Klinbunga S, **Khetpu K**, Khamnamtong B, Menasveta P. Development of a species-diagnostic SCAR marker of the blue swimming crab (*Portunus pelagicus*). Biochem

Genet. 2007;45(11-12):755-60. เป็นผู้ร่วมวิจัย

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ ไม่มี

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) ดร. พลกฤษณ์ แสงวนิช
(ภาษาอังกฤษ) Dr. Polkit Sangvanich

2. เลขหมายประจำตัวประชาชน 3 1009 03696 59 6

3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์

4. หน่วยงานที่สังกัดและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ 02-218-7637

โทรสาร 02-218-7598

E-mail: spolkit@chula.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

5.1 วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เคมี) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี พ.ศ. 2534

5.2 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ปีโทเคมี) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี พ.ศ. 2536

5.3 Ph.D., Organic chemistry (Mass spectrometry), UMIST, UK ปี พ.ศ. 2543

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

Mass spectrometry

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย ไม่มี

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย ไม่มี

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

7.3.1 Soogarun S, Sangvanich P, Chowbumroongkait M, Jiemsup S, Wiwanikit V, Pradniwat P, Palasuwan A, Pawinwongchai J, Chanprasert S, Mounkote T. Analysis of green pit viper (*Trimeresurus alborabris*) venom protein by LC/MS-MS. *J Biochem Mol Toxicol.* 2008;22:225-9. เป็นผู้ร่วมวิจัย

7.3.2 Pornmanee P, Sánchez EE, López G, Petsom A, Khaw O, Pakmanee N, Chanhom L, Sangvanich P, Pérez JC. Neutralization of lethality and proteolytic activities of Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*) venom with North American Virginia opossum (*Didelphis virginiana*) serum. *Toxicon.* 2008;52:186-9. เป็นผู้ร่วมวิจัย

7.3.3 Boonmee A, Reynolds CD, Sangvanich P. Alpha-glucosidase inhibitor proteins from *Sesbania grandiflora* flowers. *Planta Med.* 2007;73:1197-201. เป็นผู้ร่วมวิจัย

- 7.3.4 Arpijuntarangkoon J, Rojnuckarin P, Muanpasitporn C, Kaeothip S, **Sangvanich P**, Intragumtomchai T. Molecular cloning and sequence analysis of alboaggregin B. *Platelets*. 2007;18:266-72. เป็นผู้ร่วมวิจัย
- 7.3.5 Kamchanatat A, Petsom A, **Sangvanich P**, Piaphukiew J, Whalley AJ, Reynolds CD, Sihanonth P. Purification and biochemical characterization of an extracellular beta-glucosidase from the wood-decaying fungus *Daldinia eschscholzii* (Ehrenb.:Fr.) Rehm. *FEMS Microbiol Lett*. 2007;270:162-70. เป็นผู้ร่วมวิจัย
- 7.3.6 **Sangvanich P**, Kaeothip S, Srisomsap C, Thiptara P, Petsom A, Boonmee A, Svasti J. Hemagglutinating activity of Curcuma plants. *Fitoterapia*. 2007;78:29-31. เป็นผู้วิจัยหลัก
- 7.3.7 Chulalaksananukul S, Gadd GM, **Sangvanich P**, Sihanonth P, Piapukiew J, Vangnai AS. Biodegradation of benzo(a)pyrene by a newly isolated *Fusarium* sp. *FEMS Microbiol Lett*. 2006;262:99-106. เป็นผู้ร่วมวิจัย
- 7.3.8 Yibchok-Anun S, Adisakwattana S, Yao CY, **Sangvanich P**, Roengsumran S, Hsu WH. Slow Acting Protein Extract from Fruit Pulp of *Momordica charantia* with Insulin Secretagogue and Insulinomimetic Activities. *Biol Pharm Bull*. 2006;29:1126-31. เป็นผู้ร่วมวิจัย
- 7.3.9 Wattanaphon HT, Kerdsin A, Thammacharoen C, **Sangvanich P**, Vangnai AS. A biosurfactant from *Burkholderia cenocepacia* BSP3 and its enhancement of pesticide solubilization. *J Appl Microbiol*. 2008;105:416-23. เป็นผู้ร่วมวิจัย
- 7.3.10 Thaniyavarn J, Chianguthai T, **Sangvanich P**, Roongsawang N, Washio K, Morikawa M, Thaniyavarn S. Production of sophorolipid biosurfactant by *Pichia anomala*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2008;72:2061-8. เป็นผู้ร่วมวิจัย
- 7.3.11 Kongpatanakul S, Chatsiricharoenkul S, Panich U, Sathirakul K, Pongnarin P, **Sangvanich P**. A randomized, open-label, 2-period, crossover bioequivalence study of two oral formulations of 75 mg oseltamivir in healthy Thai volunteers. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2008;46:654-662. เป็นผู้ร่วมวิจัย
- 7.3.12 Roengsumran S, Pompakakul S, Muangsin N, **Sangvanich P**, Nhujak T, Singtothong P, Chaichit N, Puthong S, Petsom A. New halimane diterpenoids from *Croton oblongifolius*. *Planta Med* 2004;70:87-89 เป็นผู้ร่วมวิจัย

7.3.13 Petsom A, Roengsumran S, Hanphichanchai S, **Sangvanich P.**

Brominated phenol-formaldehyde resin as an adhesive for plywood. *Journal of Applied Polymer Science* 2003;89:1918-1924. เป็นผู้วิจัยหลัก

7.3.14 Petsom A, Roengsumran S, Ariyaphattanakul A, **Sangvanich P.** An

oxygen index evaluation of flammability for zinc hydroxystannate and zinc stannate as synergistic flame retardants for acrylonitrile-butadiene-styrene copolymer. *Polymer Degradation and Stability* 2003;80:17-22. เป็นผู้วิจัยหลัก

7.3.15 **Sangvanich P,** Mackness B, Gaskell SJ, Durrington P, Mackness M. The

effect of high-density lipoproteins on the formation of lipid/protein conjugates during in vitro oxidation of low-density lipoprotein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003;300:501-506. เป็นผู้วิจัยหลัก

7.3.16 Roengsumran S, Musikul K, Petsom A, Vilaivan T, **Sangvanich P,**

Pornpakakul S, Puthong S, Chaichantipyuth C, Jaiboon N, Chaichit N. Croblongifolin, a new anticancer clerodane from *Croton oblongifolius*. *Planta Med* 2002;68:274-277. เป็นผู้ร่วมวิจัย

7.3.17 Sidhu KS, **Sangvanich P,** Brancia FL, Sullivan AG, Gaskell SJ,

Wolkenhauer O, Oliver SG, Hubbard SJ. Bioinformatic assessment of mass spectrometric chemical derivatisation techniques for proteome database searching. *Proteomics* 2001;1:1368-1377. เป็นผู้ร่วมวิจัย

7.3.18 Pattanaargsorn S, **Sangvanich P,** Petsom A, Roengsumran S.

Determination of Oligomer Distribution of Alkylphenol Polyethoxylates and Fatty Alcohol Polyethoxylates by Positive-Ion Atmospheric-Pressure Chemical-Ionization Mass-Spectrometry. *Analyst* 1995;120:1573-1576. เป็นผู้ร่วมวิจัย

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

7.4.1 โครงการการวิเคราะห์สาเหตุการเกิดโรค Arteriosclerosis (ภาวะหลอดเลือด

แข็งตัว) ศูนย์วิจัยพยาธิวิทยาและไขมัน คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีพ.ศ. 2546 ถึง ปัจจุบัน

7.4.2 โครงการการวิเคราะห์องค์ประกอบของพิษงู สภากาชาดไทย ปีพ.ศ. 2545

ถึงปัจจุบัน