รหัสโครงการ SUT6-606-53-24-03

รายงานการวิจัย

การพัฒนาเทคโนโลยียีนบำบัดและเซลล์บำบัด เพื่อรักษาภาวะโลหิตจางในโรคไตวายเรื้อรัง

(Development of Gene Therapy Technology and Cell Therapy for Treatment of Anemia in Chronic Renal failure)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT6-606-53-24-03

รายงานการวิจัย

การพัฒนาเทคโนโลยียีนบำบัดและเซลล์บำบัด เพื่อรักษาภาวะโลหิตจางในโรคไตวายเรื้อรัง

(Development of Gene Therapy Technology and Cell Therapy for Treatment of Anemia in Chronic Renal failure)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร. ชวบูลย์ เดชสุขุม

สาขาพยาธิวิทยา

สำนักวิชาแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

ผศ.ทพญ.ดร.วิไลรัตน์ ลื้อนันต์ศักดิ์ศิริ

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2553-2554

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

พฤศจิกายน 2558

กิตติกรรมประกาศ

ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปี 2553-2554

บทคัดย่อ

ภาวะซีดถือเป็นภาวะที่สำคัญที่พบในผู้ป่วยไตวายเรื้อรัง ซึ่งส่งผลกระทบให้คุณภาพชีวิตของผู้ป่วยลดลงเป็นอย่างมากและเป็นสาเหตุของการเกิดอาการข้างเคียงอื่นตามมาเพิ่มขึ้น เช่น โรคหัวใจ เป็นต้น การรักษาภาวะโลหิตจางในผู้ป่วยไตวายจึงนับเป็นส่วนสำคัญในการดูแลผู้ป่วย ให้มีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น และลดอัตราการตายลง อย่างไรก็ตามการรักษาโดยการฉีดอีรีโทรพอยอีติน พบว่ามีข้อด้อยบางประการ ได้แก่ ราคาที่สูง ระดับที่ไม่สม่ำเสมอในเลือด และการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อโปรตีนดังกล่าวทำให้ผลการรักษาไม่ดีพอ การวิจัยนี้จึงได้มุ่งพัฒนาการรักษาโดยวิธียีนบำบัดในการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง โปรตีน erythropoietin ในเซลล์ผู้ป่วยเอง โดยการใช้ adeno-associated virual vector ในการนำพาส่วนของยีน *Erythropoietin* สู่เซลล์ไฟโบรบลาสท์ของมนุษย์ (human fibroblasts) ผลการทดลองพบว่าสามารถสร้าง adeno-associated viral vector ที่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ ยีน *Erythropoietin* ได้สำเร็จ และได้ทดสอบประสิทธิภาพในการนำเข้าสู่เซลล์ พบว่า adeno-associated viral vector ที่สร้างขึ้นสามารถเข้าสู่เซลล์เป้าหมายได้ดี การศึกษาให้เห็นประสิทธิภาพการกระตุ้นการสร้าง Erythropoietin จากเซลล์ดังกล่าว พบว่าเซลล์ดังกล่าวมีการแสดงออกของยีน *Erythropoietin* ซึ่งยืนยันโดยการที่สามารถตรวจระดับ mRNA ของยีน *Erythropoietin* ในเซลล์เป้าหมาย นอกจากนี้พบว่าเซลล์ดังกล่าวสามารถสร้างและหลั่งโปรตีนออกนอกเซลล์ได้ในระดับที่สูง ซึ่งยืนยันโดยการตรวจระดับโปรตีน Erythropoietin ในสารน้ำที่เลี้ยงเซลล์ได้ โดยสรุปการวิจัยนี้ประสบความสำเร็จในการสร้างเซลล์มนุษย์ที่สามารถสร้างโปรตีน Erythropoietin ได้ระดับสูงและสามารถหลั่งโปรตีนดังกล่าวออกนอกเซลล์ โดยใช้ Adeno-associated viral vector ในการนำพาส่วนของยีน *Erythropoietin* เข้าสู่เซลล์ ผลงานที่ได้เป็นขั้นตอนสำคัญในการนำไปพัฒนาต่อยอดเพื่อนำไปสู่การวิจัยในสัตว์ทดลอง และในมนุษย์ในระยะต่อไปเพื่อช่วยรักษาภาวะโลหิตจางจากโรคไตวายเรื้อรัง นอกจากนี้เทคนิคดังกล่าวยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคทางพันธุกรรมอื่นๆ ได้อีกในอนาคต

Abstract

Anemia in chronic renal failure has a great impact on the quality of life of patients and is the major factor in determining the other complications including heart disease. The prevention of anemia becomes the crucial part of the management of these patients. The standard treatment is erythropoietin injection which has some drawbacks including high cost, fluctuated blood level and development of autoantibody. This study aims to develop the gene therapy method to induce erythropoietin gene expression in the human cells which can be used for cell therapy for the chronic renal failure patients. In this study, the adeno-associated viral vector expressing human erythropoietin gene can be successfully produced. Furthermore, this vector can be transduced into the target cells with about 30% efficiency. These viral-infected cells can produce *Erythropoietin* mRNA. Moreover, these cells can secrete erythropoietin as shown by the high level of protein detected by ELISA method in culture media. In conclusion, we successfully produce the human cells which can produce and secrete erythropoietin by using adeno-associated viral vector as a gene-transfer method. This work will be the key step in development of gene therapy for the treatment of anemia in chronic renal failure patients. Moreover, this technique can also be applied for treatment of other genetic diseases in the future.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	7
ขอบเขตของการวิจัย	7
วิธีการดำเนินวิจัยโดยย่อ	8
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	8
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	
ระเบียบวิธีการดำเนินการวิจัย	9
ผลการวิจัย	14
บทที่ 3 ข้อวิจารณ์	
การรายงานผลการวิจัยและการวิเคราะห์ข้อมูล	27
อภิปรายผลการวิจัย.....	27
บทที่ 4 บทสรุป	
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	29
บรรณานุกรม	30
ประวัติผู้วิจัย	34

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดง primer sequences และขนาดของ PCR products
ที่ใช้ในการคัดกรองหา lentiviral vector (pLenti 7.3/V5-DEST Gateway vector)
ที่มีส่วนของ cDNA ของยีน human *erythropoietin*……..…11

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 แผนภูมิแสดงตำแหน่งของ primers……10
ภาพที่ 2 การตรวจหา plasmid pCR®8/GW/TOPO® vector
ที่มีส่วนของ cDNA ของยีน erythropoietin โดยวิธี PCR……..16
ภาพที่ 3 การตรวจหา plasmid pLenti 7.3/V5-DEST Gateway vector
ที่มีส่วนของ cDNA ของยีน erythropoietin โดยวิธี PCR……..17
ภาพที่ 4 ผลการตรวจการแสดงออกของยีน GFP โดย flow cytometry……...18
ภาพที่ 5 การตรวจหา plasmid hrGFP-AAV ที่มีส่วนของ cDNA
ของยีน erythropoietin โดยวิธี PCR…….…….20
ภาพที่ 6 เป็นผลการตรวจการแสดงออกของยีน GFP (green fluorescent protein)
ในเซลล์ที่ใช้สร้าง AAV viral vector โดยการใช้ fluorescent microscope……..…21
ภาพที่ 7 ผลการศึกษาเพื่อยืนยันว่ามีการแสดงออกของยีน human erythropoietin
ในเซลล์ที่ใช้ในการสร้าง viral vector (packaging cells) โดยใช้เทคนิค RT-PCR...…22
ภาพที่ 8 ผลการกระตุ้นการแสดงออกของ EPO (erythropoietin gene)
ในเซลล์เป้าหมาย (human fibroblast)…… ……..…23
ภาพที่ 9 ภาพแสดงปริมาณเซลล์ HT1080 ที่ได้รับการติดเชื้อ AAV
ที่มีส่วนของยีน *erythropoietin*……..……..24
ภาพที่ 10 ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน erythropoietin
ในเซลล์ human fibroblasts โดยเทคนิค RT-PCR……..……..26

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โรคไตวายเรื้อรัง (chronic renal failure) นับเป็นโรคที่ต้องใช้งบประมาณในการรักษาสูงมากและเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญทั้งในระดับประเทศและระดับโลก โดยมีอุบัติการณ์ของโรคดังกล่าวในประเทศไทยโดยเฉลี่ย 123 คน ต่อประชากร 1,000,000 คนและสูงสุดที่ประเทศไต้หวัน โดยเฉลี่ย 376 คน ต่อประชากร 1,000,000 คน ตามผลสำรวจของสมาคมโรคไตแห่งประเทศไทยและ RDS ประเทศสหรัฐอเมริกา ในปี 2004 ซึ่งโรคนี้นับเป็นโรคที่ยากต่อการรักษาให้หายขาดและมีค่ารักษาที่สูงมาก (Liyanage et al., 2015) ข้อมูลทางสถิติของโรคไตวายในประเทศไทยนั้นพบว่ามีสาเหตุส่วนใหญ่ เกิดจาก glomerulonephritis ร้อยละ 51.61 จากเบาหวาน ร้อยละ 20.72 ความดันโลหิตสูงร้อยละ 15.22 โรคนิ่วร้อยละ 1.44 และจากสาเหตุอื่น ๆ ร้อยละ 11.01 โดยมีผู้ป่วยส่วนใหญ่ ต้องได้รับการรักษาโดย การฟอกเลือด ในแบบ hemodialysis หรือ peritoneal dialysis รวมถึงการทำ kidney transplantation ผู้ป่วยเหล่านี้ จำเป็นต้องได้รับการดูแลที่ดี เพื่อป้องกันภาวะข้างเคียงอื่น ๆ ดังกล่าวแล้ว เพื่อให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตที่ดี และมีอัตราการตายที่น้อยลง

ภาวะไตวายเรื้อรังเป็นความเสื่อมในการทำงานของไตเป็นเวลาติดต่อกันเกินกว่า 6 เดือน และไม่สามารถรักษาให้กลับคืนมาเป็นปกติได้ ซึ่งการบอกว่าผู้ป่วยมีภาวะไตวายเรื้อรัง หรือไม่นั้นจำเป็นต้องพิจารณาจากประสิทธิภาพในการทำงานของไต คือ ค่าที่เรียกว่า Creatinine clearance ซึ่ง ค่าปกติคือ 120 มล./วินาที ความรุนแรงของโรคสามารถแบ่งได้ตามค่า serum creatinine โดยในภาวะ severe end stage renal disease จะมีค่า serum creatinine สูงกว่า 10 มก./ดล. และมีค่า creatinine clearance < 10 มล./นาที ผลดังกล่าวนำไปสู่การคั่งของสารที่มีอันตรายต่อร่างกายหลายชนิด ที่เรียกว่า uremic toxin ซึ่งสารเหล่านี้ จะนำไปสู่อาการข้างเคียงของโรคหลายชนิด ที่เกิดขึ้นกับระบบต่าง ๆ ของร่างกายที่สำคัญ เช่น ระบบประสาทส่วนกลางจะเกิดภาวะ uremic encephalopathy ระบบหัวใจและหลอดเลือด จะพบภาวะ Ishemic cardiomyopathy , dilated cardiomyopathy รวมถึงภาวะ uremic pericarditis ระบบต่อมไร้ท่อจะพบภาวะความผิดปกติของ hypothalamic – pituitary – target gland axis ทำให้เกิด hypogonadism, delayed puberty, anovulation , infertility และ impotence ระบบที่สำคัญที่ได้รับผลกระทบอย่างมาก คือ ระบบเซลล์เม็ดเลือด ซึ่งจะมีผลต่อการทำงานของเซลล์ทั้งหมด คือ เม็ดเลือดแดงจะพบภาวะซีดจากการขาดสาร erythropoietin (ลุวีระ และ คณะ, 1993; Eschbach et al., 1990; Zehnder et al., 1992) ซึ่งสร้างจาก proximal tubular cells และ interstitial cells ซึ่งจะพบเมื่อไตถูกทำลาย มากกว่า 3 ใน 4 นอกจากภาวะซีด แล้วยังพบมีการทำงานของเกล็ดเลือด ที่ต่ำลง ร่วมกับความผิดปรกติของ

เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน เช่น neutrophils และ lymphocytes ปัจจัยเหล่านี้จะนำไปสู่ภาวะเลือดแข็งตัวผิดปกติและการติดเชื้อสูงขึ้น

ภาวะซีด (Anemia) ถือเป็นภาวะที่สำคัญที่พบในผู้ป่วยไตวายเรื้อรัง (chronic renal failure) ซึ่งส่งผลกระทบให้คุณภาพชีวิตของผู้ป่วยลดลงเป็นอย่างมากและเป็นสาเหตุของการเกิดอาการข้างเคียงอื่นตามมาเพิ่มขึ้น เช่น โรคหัวใจ เป็นต้น นอกจากนี้ยังเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตในผู้ป่วยโรคไตวายได้ การศึกษาอัตราการตายในผู้ป่วยไตวายเรื้อรังที่ได้รับการรักษาโดยการล้างไต ทั้งแบบ hemodialysis และ peritoneum dialysis จำนวนรวม 855 คน เป็นเวลานาน 15 ปี (Cannella et al., 1990) พบว่าระดับ hemoglobin ในเลือดเป็นตัวบ่งชี้ถึงอัตราการตายของผู้ป่วยเป็นอย่างดี โดยพบว่าผู้ป่วยที่มีระดับ hemoglobin ต่ำกว่า 12 g/dl มีอัตราการตายสูงกว่าผู้ป่วยที่มีระดับ hemoglobin ในเลือดน้อยกว่า 12 g/dl ประมาณ 2.13 เท่า และ 1.85 เท่า ในกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับ hemodialysis และ peritoneal dialysis ตามลำดับ นอกจากการศึกษาแบบเทียบอัตราการตายและเวลาที่ต้องรักษาตัวในโรงพยาบาล เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่มีระดับ hemoglobin ในเลือดต่างกัน พบว่า ระดับ hemoglobin ที่น้อยกว่า 9 g/dl มีโอกาสเสียชีวิตจากโรคมากกว่าผู้ป่วยที่มีค่า hemoglobin ระหว่าง 11-12 g/dl ถึง 2.11 เท่า และถ้าผู้ป่วยมีระดับ hemoglobin ระหว่าง 12-13 g/dl พบว่ามีโอกาสเสียชีวิตจากโรคเป็น 0.84 เท่า ของกลุ่มที่มี hemoglobin ระหว่าง 11-12 g/dl (Ofsthun et al., 1992) นอกจากนี้การศึกษาในผู้ป่วยไตวายเรื้อรังที่ได้รับการรักษาโดย hemodialysis จำนวน 5517 ราย เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่าง อัตราการตาย ในผู้ป่วยและระดับ hemoglobin ในเลือด ในเวลา 1, 3 และ 6 เดือน ก่อนเสียชีวิต (Avram et al., 2003) พบว่าระดับ hemoglobin ในเลือด 3 เดือนก่อนเสียชีวิต มีความสัมพันธ์กับอัตราการตายของผู้ป่วยอย่างชัดเจน โดยในผู้ป่วยที่มีระดับ hemoglobin <9 g/dl , 9-10 g/dl , 10-11 g/dl มีความเสี่ยงต่อการเสียชีวิตจากโรค เป็น 1.74 , 1.25 , 1.22 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีระดับ hemoglobin ระหว่าง 11-12 g/dl ตามลำดับ นอกจากนี้การศึกษาผลต่อภาวะซีดต่ออาการในระบบหัวใจและหลอดเลือด พบว่าระดับ hemoglobin ที่ลดลง ทุก ๆ 1 g/dl เพิ่มความเสี่ยงต่อการพบความผิดปกติในระบบหัวใจ คือ ภาวะ left ventricular dilation ถึง 1.46 เท่า และเพิ่มภาวะการเกิดภาวะหัวใจวาย ถึง 1.46 และ 1.28 เท่า ในแบบ de novo และ recurrent heart failure ตามลำดับ (Foley et al., 1996) จากข้อมูลดังกล่าวจะเห็นได้ว่า ภาวะซีดในผู้ป่วยไตวายมีความสำคัญต่อคุณภาพชีวิตของผู้ป่วย รวมถึงอัตราการตายของโรคอย่างมาก

โดยเหตุดังกล่าวการรักษาภาวะซีดในผู้ป่วยไตวายเรื้อรัง เป็นสิ่งที่มีความจำเป็นเพื่อลดผลข้างเคียงต่าง ๆ ในผู้ป่วย ในปัจจุบันวิธีการรักษาภาวะซีดในผู้ป่วยไตวายเรื้อรังใช้วิธีการให้โปรตีน erythropoietin ฉีดให้ผู้ป่วย โดยโปรตีนที่ใช้เป็นโปรตีนที่สังเคราะห์ขึ้นในห้องทดลอง (recombinant human erythropoietin) ซึ่งมีปัญหาและข้อควรระวังหลายประการ ซึ่งการรักษาในปัจจุบันจะใช้วิธีการฉีด erythropoietin (EPO) ให้ผู้ป่วย 30-70 units/kg 2 ครั้งต่อสัปดาห์ ร่วมกับการให้เหล็ก โฟลิก วิตามิน บี / ซี อย่างไรก็ตามการรักษาโดย การฉีด EPO มีค่าใช้จ่ายที่สูงมาก

เนื่องจากต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศ ทำให้มีข้อจำกัดในการใช้โดยทั่วไปการฉีด erythropoietin ให้ผู้ป่วยจำเป็นต้องเพิ่มระดับ erythropoietin ในเลือด สูงกว่าระดับ base - line 40 – 200 mU/ml ดังนั้นจำเป็นต้องฉีดให้ผู้ป่วยไปอย่างต่อเนื่องไปตลอดชีวิต เนื่องจากระดับโปรตีนในเลือดมีระยะครึ่งอายุที่ต่ำ (3 – 48 ชม.) การฉีดยาทำให้มีระดับโปรตีนที่ไม่สม่ำเสมอ ทำให้ได้ผลการรักษาที่ไม่ดี นอกจากนี้โปรตีนที่ใช้รักษาส่วนใหญ่เป็น recombinant protein ที่สร้างในห้องทดลอง โดยใช้เซลล์ที่ไม่ใช่มาจากมนุษย์ (nonhuman manmalial cells) ทำให้โปรตีนที่ได้มีโครงสร้างต่างไปจากโปรตีนปกติในมนุษย์ เช่น มีความต่างกันใน amino acid , glycosylation and formulation (Besarab et al, 2000) โดยการศึกษาพบว่าสามารถตรวจพบ antibodies ต่อโปรตีนดังกล่าว ในผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาโดย recombinant erythropoietin ซึ่งทำให้เกิดอันตรายในผู้ป่วยอย่างรุนแรงและอาจเสียชีวิตได้ (Bennett et al., 2004; Lippin et al., 2005) ข้อจำกัดอื่นๆได้แก่การที่ค่าใช้จ่ายในการซื้อโปรตีน erythropoietin มีสูงมาก และทำให้มีผลต่อการตัดสินใจในการเลือกใช้ยาดังกล่าวในผู้ป่วย และอาจทำให้การเริ่มใช้ยาช้ากว่าที่ควรเป็น ดังนั้นจึงมีแนวคิดที่จะนำวิธีการรักษาแนวใหม่มาใช้เพื่อรักษาภาวะซีดในผู้ป่วยไตวายเรื้อรัง

การใช้วิธีรักษาในแบบ gene therapy นับเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาภาวะซีดในผู้ป่วยไตวายเรื้อรัง โดยมีหลักการคือ ใช้ vector ที่อาจเป็น viral หรือ non – viral vector เพื่อนำพาส่วนของยีนที่สร้างโปรตีนที่เราต้องการ เข้าสู่เซลล์ของผู้ป่วย เพื่อให้เซลล์สามารถสร้างโปรตีนในร่างกายผู้ป่วยในระดับที่มากพอ เพื่อให้ผลในการรักษา วิธีนี้จะมีผลดีกว่าการฉีด recombinant protein หลายประการ เช่น ทำให้ได้โปรตีนที่มีโครงสร้างเหมือนกับโปรตีนปกติที่พบในร่างกายมนุษย์ มีระดับโปรตีนที่คงที่กว่า ทำให้มีผลการรักษาที่ดี มีค่าใช้จ่ายที่ต่ำกว่ามาก และไม่ต้องฉีดโปรตีนเข้าร่างกายบ่อย ๆ ทำให้มีความสะดวกในการดูแลผู้ป่วย นอกจากนี้จะไม่ทำให้เกิด antibodies ต่อโปรตีน ดังนั้น วิธีการรักษาโดยเทคนิค gene therapy ถือเป็นการรักษาที่ควรได้รับการพัฒนาให้มีประสิทธิภาพสูงและใช้ในผู้ป่วยได้อย่างปลอดภัย การสร้างแหล่งการผลิตเซลล์เม็ดเลือดแดงได้เองอย่างถาวรด้วยเทคโนโลยีเซลล์ต้นกำเนิดบำบัด โดยไม่ต้องฉีด erythropoietin ให้แก่ผู้ป่วยก็เป็นอีกหนึ่งวิธีที่น่าสนใจและสามารถทำให้ผู้ป่วยหายขาดจากภาวะโลหิตจางได้ เพิ่มโอกาสการรอดชีวิตและคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยก็จะดีขึ้นตามลำดับ

องค์ความรู้ใหม่ของเทคโนโลยียีนบำบัดและเซลล์ต้นกำเนิดบำบัดที่ได้จากโครงการวิจัยนี้จะเป็นองค์ความรู้ที่สำคัญในการนำมาใช้รักษาโรคภาวะโลหิตจางซึ่งยังไม่มีผู้ใดทำมาก่อนและเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง ในการรักษาภาวะโลหิตจางสูงให้หมดไปได้ โดยมีค่าใช้จ่ายในการรักษาต่ำกว่าวิธีให้ recombinant erythropoietin มาก และมีความปลอดภัยสูง เหมาะสำหรับการพัฒนาเพื่อนำไปสู่การรักษาโรคในทางคลินิกต่อไปในอนาคต ซึ่งจะเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการแก้ไขภาวะ anemia ในผู้ป่วยโรคไตวายและโรคอื่นที่มีภาวะดังกล่าว ซึ่งจะช่วยเพิ่มคุณภาพชีวิตและลดค่าใช้จ่ายในการรักษาแก่ผู้ป่วย ซึ่งท้ายที่สุดจะส่งผลที่ดีต่อประเทศไทยโดยส่วนรวม

จากข้อจำกัดในการใช้ recombinant erythropoietin ในการแก้ไขภาวะซีดในผู้ป่วยไตวาย ดังที่ได้กล่าวแล้ว จึงมีความพยายามในการพัฒนาวิธีการแบบใหม่เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว การใช้วิธีรักษาในแบบ gene therapy นับเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ ในการรักษาภาวะซีดในผู้ป่วยไตวายเรื้อรัง เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการรักษาสูงกว่า และมีค่าใช้จ่ายต่ำกว่าวิธีแบบเดิม โดยมีหลักการคือ ใช้ vector ที่อาจเป็น viral หรือ non – viral vector เพื่อนำพาส่วนของยีนที่สร้างโปรตีนที่ต้องการ เข้าสู่เซลล์ในตัวผู้ป่วยเอง เพื่อให้เซลล์สามารถสร้างโปรตีนในร่างกายผู้ป่วยในระดับที่มากพอ เพื่อให้ผลในการรักษา วิธีนี้จะมีผลดีกว่าการฉีด recombinant protein หลายประการ เช่น ทำให้ได้โปรตีนที่มีโครงสร้างเหมือนกับโปรตีนปรกติที่พบในร่างกาย มีระดับโปรตีนที่คงที่กว่า ทำให้มีผลการรักษาที่ดี มีค่าใช้จ่ายที่ต่ำกว่ามาก และไม่ต้องฉีดโปรตีนเข้าร่างกายบ่อย ๆ ทำให้มีความสะดวกในการดูแลผู้ป่วย นอกจากนี้จะไม่ทำให้เกิด antibodies ต่อโปรตีน ดังนั้น วิธีการรักษาโดยเทคนิค gene therapy ถือเป็นการรักษาที่ควรได้รับการพัฒนาให้มีประสิทธิภาพสูงและใช้ในผู้ป่วยได้อย่างปลอดภัย

โครงการวิจัยนี้จะทำการศึกษาและพัฒนาเทคโนโลยียีนบำบัดโดยการพัฒนา Adeno-associated viral vector ให้สร้าง Erythropoietin ได้อย่างถาวรในร่างกาย รวมทั้งมีระดับที่สูงพอในเลือดเพื่อแก้ไขภาวะโลหิตจาง การนำ adeno-associated viral vector มาใช้เป็นพาหะในการนำยีนเข้าสู่เซลล์นับว่าเป็นวิธีที่น่าสนใจเนื่องจากมีประสิทธิภาพในการนำยีนเข้าสู่เซลล์สูง และสามารถนำยีนเข้าสู่เซลล์ได้โดยไม่ขึ้นกับระยะการแบ่งตัวของเซลล์ (resting cells and deviding cells) นอกจากนี้ viral vector ดังกล่าวจะไม่แทรกเข้าไปในโครโมโซมของเซลล์ ทำให้มีความปลอดภัยมากยิ่งขึ้น และใช้ได้ดีกับเนื้อเยื่อเกี่ยวพันใต้ผิวหนัง (subcutaneous tissue) และ กล้ามเนื้อ ทำให้สะดวกและง่ายต่อการฉีดให้ผู้ป่วย นอกจากนี้ยังสามารถกระตุ้นการสร้างโปรตีนได้เป็นเวลานาน (permanent expression of transgene) หลังจากสร้าง adeno-associated viral vector ขั้นต่อไปจะทำการนำพา vector ดังกล่าวเข้าสู่เซลล์ human fibroblast cell line (HFF-1) ตามด้วยการคัดเลือกโคลนที่ได้รับยีนบำบัดเพื่อนำไปเพิ่มจำนวนต่อไป แล้วจึงทดสอบปริมาณการแสดงออกของ Erythropoietin gene ทั้งระดับ mRNA และโปรตีน ที่สร้างจากเซลล์ดังกล่าว ท้ายสุดจะทดสอบประสิทธิภาพของ EPO ที่สร้างได้ต่อความสามารถในการกระตุ้นการสร้างเม็ดเลือดแดงในหลอดทดลอง (In vitro) โดยใช้ human hematopoietic stem cell ที่กระตุ้นมาจาก cord blood stem cells เป็นต้นแบบในการศึกษา

องค์ความรู้ใหม่ของเทคโนโลยียีนบำบัดและเซลล์ต้นกำเนิดบำบัดที่ได้จากโครงการวิจัยนี้จะนำไปสู่การสร้างเทคโนโลยีที่สำคัญในการนำมาใช้รักษาโรคภาวะโลหิตจางจากโรคไตวาย ซึ่งเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง โดยมีค่าใช้จ่ายในการรักษาที่ต่ำ และมีความปลอดภัย เหมาะสำหรับการพัฒนาเพื่อนำไปสู่การรักษาในทางคลินิกต่อไปในอนาคต ซึ่งทั้งหมดนี้หากผู้ป่วยสามารถสร้างเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ปกติได้เองจะสามารถยุติการฉีด erythropoietin ให้แก่ผู้ป่วย ซึ่งจะช่วย

เพิ่มคุณภาพชีวิตและลดค่าใช้จ่ายในการรักษาแก่ผู้ป่วย ซึ่งท้ายที่สุดจะส่งผลที่ดีต่อประเทศไทยโดยส่วนรวม

Erythropoietin เป็น glycoprotein ที่สร้างจาก proximal renal tubules โดยจะถูกควบคุมการสร้างโดย ภาวะ hypoxia ซึ่งเกิดขึ้นในโรคหลายอย่าง เช่น chronic renal failure โดย erythropoietin ที่สร้างขึ้นจะไปจับและกระตุ้น receptor ที่อยู่บน erythroid progenitor cells (Sawyer et al., 1989) โดยพบว่าในภาวะที่เกิด erythropoietin – receptor complex จะทำให้ erythroid progenitor cell เจริญจนเป็น mature erythrocytes แต่ในภาวะที่ไม่มี erythropoietin เซลล์ erythroid progenitor จะตายไป (Koury et al., 1990) ภาวะปกติ ปริมาณ EPO ในเลือดเป็น 10 – 20 U/Lite ซึ่งเพียงพอในการกระตุ้นการสร้าง red blood cell ให้เป็นปรกติและไม่มีภาวะ hypoxia ทำให้ปริมาณ erythropoietin อยู่ใน base – line level อย่างไรก็ตามในภาวะ anemia ระดับ erythropoietin ในเลือดจะมีระดับที่สูงขึ้น แบบ exponential โดยพบว่าเมื่อมี hematocrit เป็น 20% จะมีการเพิ่มของ ระดับ erythropoietin ในเลือดถึง 100 เท่า

ยีน Erythropoietin ในมนุษย์อยู่บน chromosome ที่ 7 (7pter – q22) มีขนาดของยีน 5.4 kb (Watkins et al., 1986; Powell et al 1986; Law et al., 1986; Jacob et al., 1985; Lin et al., 1985, Smalling et al., 1985) ซึ่งจะสร้างโปรตีนที่ประกอบด้วย 193 amino acid โดยโปรตีนจะถูกตัดเอา amino acid จำนวน 27 ตัว ออกจากบริเวณ N – terminus ในระหว่างการหลั่งออกนอกเซลล์ และจะทำให้ได้โปรตีนขนาด 18 Kd (Lai et al, 1986) นอกจากนี้โปรตีนยังมีการเปลี่ยนแปลงอื่น ๆ เช่น glycosylation เพื่อให้มีการทำงานได้เต็มที่ (Lai et al, 1986) Erythropoietin ในมนุษย์ถูกสร้างจากเซลล์ไตเป็นส่วนใหญ่ โดยพบว่าเซลล์ที่สร้าง เป็นเซลล์ที่อยู่ใน interstitium ของ renal cortex โดยพบว่า ในภาวะ hypoxia กระตุ้นให้เซลล์ดังกล่าวมีจำนวนมากขึ้น (Koury et al., 1989) ในภาวะคนไข้ที่เป็น end – stage renal disease และ anemia พบว่าปริมาณ erythropoietin ลดต่ำลงอย่างมาก แต่จะกลับสู่ระดับปกติเมื่อได้รับการปลูกถ่ายไต (Denny et al, 1986) Erythropoietin จะทำงานผ่านการกระตุ้น erythropoietin receptor ที่อยู่บนผิวเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดแดง ซึ่งได้แก่ CFU–E และ BFU–E โดย BFU–E ต้องการ GM–CSF หรือ IL3 นอกเหนือจาก erythropoietin ในการเจริญเติบโต เป็น mature erythroid cells (Emerson et al., 1988; Emerson et al., 1985) การศึกษาพบว่า BFU – E มีจำนวน erythropoietin receptor ที่ต่ำกว่า CFU–E และมีการตอบสนองต่อ erythropoietin ต่ำกว่า ทำให้เชื่อว่าระดับ erythropoietin receptor มีความสำคัญในการตอบสนองของ progenitor cells ต่อ erythropoietin โดยพบว่า เซลล์เม็ดเลือดแดงในระยะ basophilic erythroblast และเซลล์ในระยะต่อมา มีระดับ erythropoietin receptor ต่ำลง พร้อมกับการที่ไม่พึ่งพา erythropoietin ในการเจริญเติบโต (Koury et al., 1990; Sawyer et al., 1987) การศึกษากลไกการทำงานของ erythropoietin พบว่าผ่านทาง JAK–2 kinase ซึ่งถูกกระตุ้นเมื่อมีการจับของ erythropoietin บน receptor จากนั้นจะมีการเกิด tyrosine phosphorylation ของโปรตีนหลายตัว โดยเฉพาะ STAT–5 ซึ่งนำไปสู่การเจริญเติบโตของเซลล์ (Lacombe et al., 1999)

มีการศึกษาไม่มากนัก เพื่อใช้เทคนิค gene therapy เพื่อสร้าง erythropoietin ในเซลล์ เพื่อหวังผลในการประยุกต์ใช้ในผู้ป่วย ตัวอย่างเช่น การศึกษาโดยใช้ adenoviral vector เพื่อสร้าง erythropoietin (EPO) ในเซลล์ใต้ผิวหนังของผู้ป่วยไตวายเรื้อรัง จำนวน 10 คน (Verhelst et al., 2004) พบว่าสามารถกระตุ้นการสร้างโปรตีนในเซลล์ และเมื่อฉีดเซลล์เข้าผู้ป่วย (Intradermal implantation) สามารถตรวจระดับ โปรตีน EPO ได้ตั้งแต่วันที่ 1 หลัง tissue implantation และสามารถตรวจพบได้นาน 14 วัน หลังการฉีดเนื้อเยื่อดังกล่าว การศึกษาดังกล่าวไม่พบผลข้างเคียงในผู้ป่วยที่ร้ายแรง อย่างไรก็ตาม การตรวจเนื้อเยื่อที่ได้รับ viral vector ในผู้ป่วย พบว่ามีการกระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันอย่างมาก

ผลการศึกษาดังกล่าวนี้ใช้ adenoviral vector ซึ่งเชื่อว่าอาจกระตุ้น immune system ได้ และการแสดงออกของยีนเป็นแบบชั่วคราว เหตุผลดังกล่าวการใช้วิธีอื่น ๆ เช่น ใช้ retroviral vector หรือ lentivirus vector จึงได้รับความสนใจในการนำมาใช้ในการสร้าง EPO เพื่อนำไปรักษาในผู้ป่วยภาวะซีดจากไตวาย การศึกษาส่วนใหญ่ เป็นการศึกษาในสัตว์ทดลอง เช่น มีการใช้ retrovirus vector เพื่อสร้าง EPO ในเนื้อเยื่อของหนูในลักษณะ ex vivo หลังจากฉีดเนื้อเยื่อที่ได้รับยีนบำบัดดังกล่าว เข้าไปยังตัวหนู (intraperitoneal transplantation) พบว่าสามารถตรวจวัด EPO ได้ในเลือด (Einbinder et al., 2003, 27) นอกจากการศึกษาโดยใช้ DBA/2FG-pcy mouse model of polycystic kidney disease พบว่า สามารถกระตุ้นการสร้าง EPO ในหนู หลังจากฉีด adenoviral vector ที่สร้าง EPO เข้าสู่ช่องท้องของหนู (Osada et al., 1999) โดยทำให้หนูมีระดับ hematocrit และ reticulocyte count ที่สูงขึ้นได้ แต่อย่างไรก็ตามผลที่เกิดขึ้นมีลักษณะแบบ transient ซึ่งอย่างน้อยอธิบายได้จาก ชนิดของ virus vector ที่ใช้ การศึกษาอื่นใช้ transgenic mouse strain 134.3 Lc, Epo – Tag ^{H} ซึ่งไม่สามารถสร้าง EPO ได้ พบว่าเมื่อใช้เซลล์กล้ามเนื้อที่ได้รับยีนบำบัด(transgene) ที่สร้าง EPO สามารถตรวจพบระดับ EPO ในเลือด แบบชั่วคราวได้ (Bohn et al 2000)

การศึกษาในสัตว์ที่ใกล้เคียงกับมนุษย์ คือ non – human primate โดยใช้ adenoassociated virus (AAV) ที่สร้าง EPO พบว่าเมื่อฉีด vector สู่เซลล์กล้ามเนื้อ และเซลล์ปอด ของสัตว์ดังกล่าว (Chenuaud et al., 2004; Gao et al., 2004) สามารถตรวจพบระดับ EPO สูงขึ้นในเลือด อย่างไรก็ตามในสัตว์ทดลอง บางส่วน เกิดภาวะ autoimmune anemia ที่พบร่วมกับ anti – EPO antibody ในเลือด นอกจากการรักษาภาวะ anemia ใน โรคไตวายแล้ว ยังมีการศึกษาอื่น เพื่อวิเคราะห์ผลของ EPO – expression vector ต่อภาวะซีดที่เกิดในโรค thalassemia โดยกลุ่มจาก Pasteur Institute ได้ศึกษาผลใน mouse model of β- thalassemia (Bohn et al, 2000) พบว่าเมื่อนำ adenovirus – associated virus (AAV) เข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อของหนู ส่งผลให้มีการสร้าง EPO ในเลือด ร่วมกับการกระตุ้น β- minor globin (the mouse equivalent to human γ- globin) ตามด้วยภาวะการสร้างเม็ดเลือดแดงที่ดีขึ้น (Bohn et al.o, 2000) ผลงานวิจัยจากกลุ่มอื่น (Dalle et al., 1999) ก็ให้ผลที่คล้ายกัน ดังนั้นจะเห็นว่า วิธีการ gene therapy เพื่อกระตุ้นการสร้าง EPO ในผู้ป่วยเอง เป็นวิธีที่มีผลดีกว่าการรักษาแบบเดิม และสามารถพัฒนานำไปสู่การใช้ในทางคลินิกได้ ในอนาคต อย่างไร

ก็ตามจำเป็นต้องมีการพัฒนาวิธีการให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น โดยเฉพาะให้มีการสร้างได้อย่างถาวร และมีระดับที่สูงพอในเลือดเพื่อแก้ไขภาวะโลหิตจางในผู้ป่วย รวมทั้งมีความปลอดภัยมากขึ้น การนำ lentivirus vector เป็นวิธีการที่น่าสนใจ เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการเข้าสู่เซลล์ที่ดีกว่า และสามารถกระตุ้นการสร้างโปรตีนได้เป็นเวลานานกว่า ดังนั้น ในงานวิจัยที่เสนอนี้จะมุ่งเพื่อพัฒนา lentivirus vector มาใช้ในงานดังกล่าว เพื่อสร้าง Erythropoietin ที่สามารถพัฒนาไปใช้ในผู้ป่วยได้ในอนาคต โดยการทดลองนี้จะใช้ Lentivirus vector ในการนำพา erythropoietin gene เข้าสู่เซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (human fibroblast cell line, HFF-1) ที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ จากนั้นจึงวิเคราะห์การสร้างโปรตีน Erythropoietin จากเซลล์ดังกล่าว รวมทั้งผลต่อการกระตุ้นการสร้างเซลล์เม็ดเลือดแดงจาก human hemetopoietic stem cell ในหลอดทดลอง นอกจากนี้ lentivirus vector ที่จะใช้ในการทดลองนี้จะถูกปรับปรุงให้มีความปลอดภัยขึ้น โดยตัดต่อเอาส่วนของ suicidal gene (Thymidine kinase) เข้าสู่ vector ดังกล่าว ซึ่งควมคุมการแสดงออกโดย inducible promoter เพื่อป้องกันอันตรายจาก insertional mutagenesis ที่อาจเกิดขึ้นได้แม้มีโอกาสน้อยก็ตาม

องค์ความรู้ใหม่ของเทคโนโลยียีนบำบัดและเซลล์ต้นกำเนิดบำบัดที่ได้จากโครงการวิจัยนี้จะเป็นองค์ความรู้ที่สำคัญในการนำมาใช้รักษาโรคภาวะโลหิตจางซึ่งยังไม่มีผู้ใดทำมาก่อนและเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง ในการรักษาภาวะโลหิตจางเรื้อรังได้โดยมีค่าใช้จ่ายในการรักษาต่ำ และมีความปลอดภัยสูงมากกว่าวิธีการอื่น เหมาะสำหรับการพัฒนาเพื่อนำไปสู่การรักษาโรคในทางคลินิกต่อไปในอนาคต ซึ่งจะเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการรักษาภาวะโลหิตจางจากโรคไตวายและโรคอื่นที่มีภาวะดังกล่าว ช่วยเพิ่มคุณภาพชีวิตและลดค่าใช้จ่ายในการรักษาแก่ผู้ป่วย นอกจากนี้เทคนิคดังกล่าวยังสามารถนำไปประยุกต์ ใช้ในการรักษาโรคอื่นๆ โดยเฉพาะโรคทางพันธุกรรมเช่น Thalassemia ซึ่งท้ายที่สุดจะส่งผลที่ดีต่อกระบวนการดูแลรักษาผู้ป่วยของประเทศโดยส่วนรวม

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ผลิต **Adeno-associated viral vector** ที่สามารถสร้าง **Erytropoietin** เพื่อนำไปพัฒนาต่อยอดใช้ในการรักษาภาวะโลหิตจางในผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรัง
2. สร้าง **human fibroblast cells** ที่สามารถสร้าง **Erythropoietin (EPO)** ที่มีปริมาณเพียงพอที่จะกระตุ้นการสร้างเม็ดเลือดแดง และสามารถนำไปใช้ในการทำวิจัยต่อยอดในระยะต่อไป

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

งานวิจัยนี้จะศึกษาการรักษาภาวะโลหิตจางในโรคไตวาย ด้วยการผลิต erythropoietin โดยใช้รูปแบบการศึกษาแบบ In vitro (experimental study) โดยเลือกใช้ Adeno-associated viral

vector ในการนำพาส่วนของยีน Erythropoietin เข้าสู่ human fibroblast cell ซึ่งจะมีผลให้เซลล์ดังกล่าวสามารถสร้าง Erythropoietin (EPO) อย่างถาวร จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพการสร้าง EPO ทั้งระดับ mRNA และโปรตีน เพื่อยืนยันประสิทธิภาพในการผลิตโปรตีน Erythropoietin ว่าสามารถพัฒนาต่อยอดเพื่อการรักษาในผู้ป่วยได้หรือไม่ การนำ Adeno-associated viral vector มาใช้เป็นพาหะในการนำยีนเข้าสู่เซลล์นับว่าเป็นวิธีที่ดีเนื่องจากมีประสิทธิภาพในการนำยีนเข้าสู่เซลล์สูง และสามารถนำยีนเข้าสู่เซลล์ได้โดยไม่ขึ้นกับระยะการแบ่งตัวของเซลล์ (resting cells and deviding cells) นอกจากนี้ viral vector ดังกล่าวจะไม่แทรกเข้าไปในโครโมโซมของเซลล์ ทำให้มีความปลอดภัยมากยิ่งขึ้น และใช้ได้ดีกับเนื้อเยื่อเกี่ยวพันใต้ผิวหนัง (subcutaneous tissue) และกล้ามเนื้อ ทำให้สะดวกและง่ายต่อการฉีดให้ผู้ป่วย

1.4 วิธีการดำเนินการวิจัยโดยย่อ

โครงการวิจัยนี้จะทำการศึกษาและพัฒนาเทคโนโลยียีนบำบัดโดยการพัฒนา Adeno-associated viral vector ให้สร้าง Erythropoietin ได้อย่างถาวรในร่างกาย รวมทั้งมีระดับที่สูงพอในเลือดเพื่อแก้ไขภาวะโลหิตจาง นอกจากนี้ยังสามารถกระตุ้นการสร้างโปรตีนได้เป็นเวลานาน (permanent expression of transgene) โดยการทำวิจัยประกอบด้วยขั้นตอนหลักๆ ได้แก่ ขั้นตอนการสร้าง Adeno-associated viral vector ที่มีส่วนประกอบของยีน erythropoietin ขั้นตอนการนำพา vector ดังกล่าวเข้าสู่เซลล์ human fibroblast cell line ขั้นตอน การคัดเลือกโคลนที่ได้รับยีนบำบัดเพื่อนำไปเพิ่มจำนวนต่อไป และขั้นตอนการทดสอบปริมาณการแสดงออกของ Erythropoietin gene ทั้งระดับ mRNA และโปรตีน ที่สร้างจากเซลล์

1.5 ประโยชน์ที่ได้รับ

1. ได้กระบวนการยีนบำบัดที่มีประสิทธิภาพในการรักษาภาวะโลหิตจางและมีผลข้างเคียงน้อยที่สุด
2. ได้เซลล์บำบัดที่สามารถใช้ในการศึกษาต่อยอดในสัตว์ทดลอง ในการรักษาภาวะโลหิตจาง

หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

ผู้ป่วยและ ครอบครัว มหาวิทยาลัย โรงพยาบาล วงการแพทย์ บริษัทเอกชน นักวิชาการ ผู้ที่เกี่ยวข้องและผู้สนใจทั่วไป

บทที่ 2
เนื้อเรื่อง

2.1 ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

1 การเตรียม Erythropoietin-expressing Lentiviral vector

ได้ดำเนินการวิจัยตามขั้นตอนเพื่อให้ได้ Lentiviral vector ที่สามารถกระตุ้นการสร้างโปรตีน Erythropoietin ใน human fibroblast cells ดังนี้

- **เพิ่มปริมาณ Lentivirual vector และ packaging vector เพื่อใช้ในการ transfect เข้าสู่ packaging cells**

การวิจัยนี้ใช้ lentivirus vector ชนิด pLenti 7.3/V5-DEST Gateway vector และ packaging vectors ที่ประกอบด้วย pLP1, pLP2, pLP/VSV vectors โดยการ transform vector ดังกล่าว เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย (supercompetent cells, One Shot Stbl™ Competent *E.coli*) ปล่อยให้แบคทีเรียเจริญใน LB agar ที่มี ampicillin ผสมอยู่ เลือก clone แล้วจึงเลี้ยง clone ให้มีปริมาณมากใน LB broth เพื่อนำไปสกัด plasmid โดยวิธี Column purification method (PureLink™ HiPure Plasmid Mediprep Kit, Invitrogen, CA, USA)

- **สร้างส่วนของ cDNA ซึ่งประกอบด้วย complete coding sequence ของ Human erythropoietin gene และ clone เข้าสู่ pCR®8/GW/TOPO® vector (Invitrogen).**

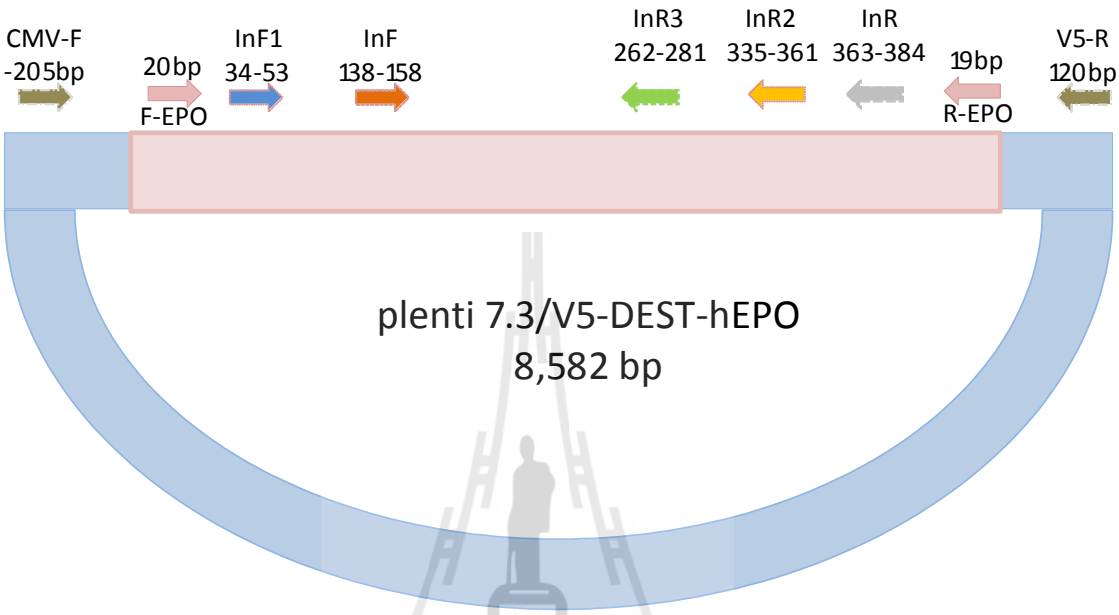
ใช้วิธี RT-PCR ในการสร้างส่วนของ complete coding DNA ของ Human erythropoietin gene เพื่อนำไปสอดแทรกเข้าสู่ pCR®8/GW/TOPO® vector (Invitrogen, CA, USA)

- **ทำการย้ายส่วน cDNA of EPO gene เข้าสู่ pLenti 7.3/V5-DEST Gateway vector** โดยใช้เทคนิค LR recombination

ได้ทำการย้าย cDNA of EPO gene เข้าสู่ pLenti 7.3/V5-DEST Gateway vector โดยใช้เทคนิค recombination

ทั้งนี้ได้แสดงตำแหน่ง และ sequence ของ primers ดัง**ภาพที่ 1** และ ขนาดของ PCR product ที่ amplify ได้ดัง Table 1

Figure 1 แผนภูมิแสดง ตำแหน่งของ primers ที่ใช้ในการ screen Lentiviral vector ที่มี cDNA of EPO gene



มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Primer	Sequence
F-EPO	5’-ACCATGGGGGTGCACGAATG-3’
InF1	5’-CTTCTCCTGTCCCTGCTGTC-3’
InF	5’-CAAGGAGGCCGAGAATATCAC-3’

Primer	Sequence
R-EPO	5’-TCTGTCCCCTGTCCTGCAG-3’
InR	5’-CACTGACGGCTTTATCCACATG-3’
InR2	5’-GAAGAGTTGACCAACAGGGC-3’
InR3	5’-AGGCCCTGCCAGACTTCTAC-3’

Primers		Product size (bp)
CMV-F + InR	205 + 384 + 3 (acc)	592
CMV-F + InR2	205 + 361+ 3	569
CMV-F + InR3	205 + 281+ 3	489
InF + V5-R	442 + 120	563
InF 1+ V5-R	546 + 120	666

Table 1 แสดง primer sequences และขนาดของ PCR product ที่ amplifyได้ ซึ่งใช้ในการคัดกรองหา Lentiviral vector ที่มี EPO cDNA

2. การสร้าง Lentivirual vector และ การนำ Lentivirual vector ที่มียีน erythropoietin อยู่เข้าสู่เซลล์

ได้ทำการสร้าง Lentiviral vector โดยใช้ packaging cells (293T packaging cell lines) โดยการ Transfect plasmids ทั้ง 4 ชนิดเข้าสู่เซลล์ ดังกล่าว ได้แก่ packaging plasmids 3 ชนิด คือ pLP1 (gag/pol), pLP2 (rev), pLPv (env) และ Lentiviral plasmid เข้าสู่เซลล์ จากนั้นปล่อยให้เซลล์สร้างไวรัส และปล่อยออกมาสู่ อาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการ transduction เข้าสู่เซลล์เป้าหมายต่อไป

จากนั้นได้ทำการทดลองในการ นำ Lentiviral vector ที่เป็น empty vector ซึ่งไม่มีส่วนของ ยีน erythropoietin แต่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ GFP (green fluorescent protein) ในเซลล์เป้าหมายได้ โดยวิธี transduction ทั้งนี้เพื่อใช้ในการบอกประสิทธิภาพของการนำพา Lentiviral vector เข้าเซลล์เป้าหมาย

3. การเตรียม Erythropoietin-expressing adeno-associated viral vector

ได้ดำเนินการวิจัยเพื่อให้ได้ adeno-associated viral vector (hrGFP-AAV) ที่สามารถสร้างโปรตีน Erythropoietin ใน human fibroblast cells ดังนี้

- เพิ่มปริมาณ adenoassociated viral vector (hrGFP-AAV) และ pHelper and pAAV-RC vectors เพื่อใช้ในการ transfect เข้าสู่ packaging cells โดยการ transform vector ดังกล่าว เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย (supercompetent cells) ปล่อยให้แบคทีเรียเจริญใน LB agar ที่มี ampicillin ผสมอยู่ เลือก clone แล้วจึงเลี้ยง clone ให้มีปริมาณมากใน LB broth เพื่อนำไปสกัด plasmid โดยวิธี Column purification method (PureLink™ HiPure Plasmid Mediprep Kit)

- สร้าง cDNA ของ erythropoietin gene ซึ่งประกอบด้วย complete coding sequence ของ human erythropoietin gene และ clone เข้าสู่ hrGFP-AAV

- การสร้าง EPO-pAAV viral vector โดยการนำพา vectors 3 ชนิด คือ adenoassociated viral vector (hrGFP-AAV) และ pHelper and pAAV-RC vectors เข้าสู่ packaging cell (AAV-293) จากนั้นทำการแยก AAV virus ที่ได้เพื่อนำไปใช้ในการกระตุ้นการแสดงออกของยีน erythropoietin ในเซลล์เป้าหมาย

- การนำ AAV ไปกระตุ้นการแสดงออกของยีน ในเซลล์เป้าหมาย (human fibroblast)

4. การเลี้ยงเซลล์ลายในห้องปฏิบัติการ

เลี้ยง fibroblast cell line HFF-1 ที่ซื้อจาก ATCC (American Type Cell Culture, VA, USA)ในน้ำเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM medium ที่ถูกเสริมด้วย 10% Fetal bovine serum เซลล์ถูกปล่อยให้เจริญเติบโตในตู้อบ 37°C ที่มี 5% CO_2 เซลล์จะถูกปล่อยให้เจริญจนได้ความหนาแน่นประมาณ 80% แล้วจึงถูก trypsinized และ subculture ในอัตราที่เหมาะสม

5. การวัดการแสดงออกของ erythropoietin ในระดับ RNA และ โปรตีน

นำ fibroblast cell line ที่ได้รับยีนบำบัด มาตรวจสอบว่ามีการแสดงออกของ erythropoietin ในระดับ RNA และ โปรตีนหรือไม่โดย วิธี PCR และ ELISA ตามลำดับ

5.1 วิธี RT-PCR ในการวัดการแสดงออกของ erythropoietin ในระดับ RNA ที่ถือเป็นวิธีที่มีความไว และความจำเพาะสูงในการตรวจปริมาณ mRNA ของยีนที่สนใจ โดยมีวิธีการโดยสังเขปดังนี้

- สกัด Total RNA หรือ mRNA จากเซลล์โดยใช้ Trizol reagent โดยจะเก็บ RNA ที่ได้ใน

DEPC water ที่มี RNAse inhibitor ผสมอยู่

- วัดปริมาณ RNA ที่ได้โดย spectrophotometer

- นำ RNA ที่ได้ไปใช้ในปฏิกริยา Reverse transcription ที่ประกอบด้วย 75 mM KCl, 50

mM Tris (pH 8.3), 3 mM $MgCl_2$, 500 mM dNTPs และ 2 μM Primers โดยปล่อยให้เกิด

ปฏิกริยา ที่ 42°C เป็นเวลา 1 ชม. จากนั้นจึงทำลาย MMLV โดยอบที่อุณหภูมิ 95°C 5

นาที

- นำ cDNA ที่ได้ไปใช้ในปฏำริยา PCR ซึ่งประกอบด้วย 56 mM KCl, 19.6 mM Tris (pH

8.3), 1.6 mM $MgCl_2$, 200 μM dNTPs, 1 μM Primers และ 10-100 nM Taqman Probe

- ทำปฏิกริยา PCR โดยใช้เครื่อง Thermocycler โดยใช้ภาวะดังนี้, Denaturation 95°C 1

นาที, Annealing ที่ 60 °C 30 วินาที และ Extension ที่ 72°C เป็นเวลา 1 นาที และทำปฏิกิริยารวม 40 รอบ

5.2 ตรวจวัดระดับ โปรตีน Erythropoietin โดยเทคนิค EIISA

ทำการตรวจวิเคราะห์ผลการแสดงออกของโปรตีน erythropoietin ที่หลั่งออกจากเซลล์ ด้วยวิธี ELISA โดยใช้ ELISA Kit (R&D system, MN, USA) จากนั้นตรวจสอบหาปริมาณ erythropoietin โดยเครื่อง ELISA Reader วิธีการทดลองมีขั้นตอนดังนี้

1 ขั้นตอนการสกัดโปรตีนจากเซลล์ ทำดังนี้

1.1 นำเซลล์ที่เตรียมได้ออกจาก -20 องศาเซลเซียส

1.2 ละลายตะกอนเซลล์ด้วย CelLytic M reagent (Cat no C2978: Sigma, MO, USA) ปริมาตร 250

ไมโครลิตร/ตัวอย่าง

1.3 ใช้ปิเปตเพื่อ re-suspend เซลล์ให้ทั่วถึง

1.4 incubate เป็นเวลา 15 นาที โดยเขย่าบน shaker

1.5 ปั่น lysed cells ด้วยความเร็วรอบ 15000 x g เป็นเวลา 15 นาที เพื่อตกตะกอนเศษเซลล์

1.6 ใช้ปิเปตดูดเอา Protein supernatant และใส่ลงใน 1.5 microcentrifuge tube sterile

1.7 เก็บโปรตีนที่ได้ในถังน้ำแข็ง เพื่อใช้งานต่อไป

2. ขั้นตอนการทำ EPO ELISA ทำดังนี้

2.1 ใช้ปิเปตดูดสาร Erythropoietin Assay Diluent ลงในแต่ละ well ของ 96 well plate โดยใช้ well ละ 100 ไมโครลิตร

2.2 ดูด EPO standard (0, 2.5, 5, 20, 50, 100, 200 mIU/ml) และ ตัวอย่างโปรตีนที่สกัดได้ อย่างละ 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละ well

2.3 incubate เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

2.4 ใช้ปิเปตดูดสารในแต่ละ well ออก โดยไม่ต้องล้าง well อีก

2.5 เติม Erythropoietin Conjugate ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ลงในแต่ละ well ปิด well plate ด้วยพลาสติกใส (adhesive strip)

2.6 incubate เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

2.7 ดูดสารในแต่ละ well ออก และล้างด้วย 400 ไมโครลิตร Wash buffer

2.8 เตรียม substrate solution (color reagent A:color reagent B ในอัตราส่วน 1:1) ให้เพียง
พอที่จะใช้

2.9 เติม substrate solution ปริมาณ 200 ไมโครลิตรลงในแต่ละ well และ incubate เป็น
เวลา 25 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

2.10 เติม 100 ไมโครลิตร stop solution ลงในแต่ละ well

2.11 นำไปวัดค่า O.D. ที่ 450 nm ภายใน 15 นาทีหลังหยุดปฏิกริยา (อาจอ่านค่าที่ 450/600 nm ก็ได้)

2.12 นำค่าที่วัดได้ไปคำนวณหาความเข้มข้นของ EPO ด้วยโปรแกรม four parameter logistic (4PL) curve-fit

2.2 ผลการวิจัย

ผลการดำเนินงานที่ได้ดำเนินการไปแล้วทั้งหมด

1 การเตรียม Erythropoietin-expressing Lentiviral vector

ได้ดำเนินการวิจัยตามขั้นตอนเพื่อให้ได้ Lentiviral vector ที่สามารถสร้างโปรตีน Erythropoietin ใน human fibroblast cells ดังนี้

1.1 เพิ่มปริมาณ Lentivirual vector และ packaging vector เพื่อใช้ในการ transfect เข้าสู่ packaging cells โดยงานส่วนนี้ได้เสร็จสิ้นแล้ว

การวิจัยนี้ใช้ lentivirus vector ชนิด pLenti 7.3/V5-DEST Gateway vector และ packaging vectors ที่ประกอบด้วย pLP1, pLP2, pLP/VSV vectors โดยการ transform vector ดังกล่าว เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย (supercompetent cells) ปล่อยให้

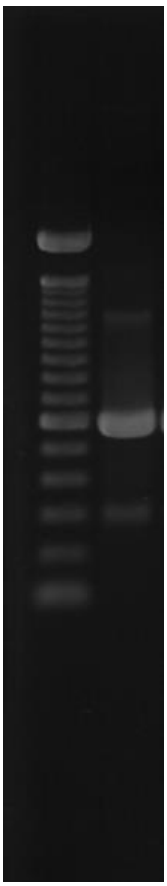
แบคทีเรียเจริญใน LB agar ที่มี ampicillin ผสมอยู่ เลือก clone แล้วจึงเลี้ยง clone ให้มีปริมาณมากใน LB broth เพื่อนำไปสกัด plasmid โดยวิธี Column purification method (PureLink™ HiPure Plasmid Mediprep Kit)

1.2 สร้างส่วนของ cDNA ซึ่งประกอบด้วย complete coding sequence ของ Human erythropoietin gene และ clone เข้าสู่ pCR®8/GW/TOPO® vector (Invitrogen).

การทดลองที่ผ่านมาสามารถสร้างส่วนของ complete coding DNA ของ Human erythropoietin gene เข้าสู่ pCR®8/GW/TOPO® vector (Invitrogen) ได้แล้ว และสามารถแสดงผลการทดลองให้เห็นดังภาพ ที่ 2 ซึ่งเป็นการทำการทดลองโดยวิธี PCR โดยใช้ pCR®8/GW/TOPO® vector ที่มีส่วนของ complete cDNA ของ erythropoietin gene อยู่ เป็นแม่แบบ (template) เพื่อ ยืนยันว่ามีส่วน complete cDNA ของ erythropoietin gene อยู่ โดยจากรูปแสดงให้เห็นว่า ได้ PCR product ในขนาดที่ถูกต้องคือ 582 bp เมื่อตรวจวิเคราะห์โดย agarose gel electrophoresis with UV detection โดยผลการทดลองสามารถแสดงได้ ดังภาพที่ 2

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Lane 1 2



Lane 1: 100 bp ladder

Lane 2: PCR product of pENTR221-EPO clone2

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

- PCR product showed expected sized 582 bp of EPO gene

Figure 2 เป็นการทำ PCR โดยใช้ pCR®8/GW/TOPO® vector ที่มีส่วนของ complete cDNA ของ erythropoietin gene อยู่ เป็นแม่แบบ (template) เพื่อ ยืนยันว่ามีส่วน complete cDNA ของ erythropoietin gene อยู่ โดยจากรูปแสดงให้เห็นว่า ได้ PCR product ในขนาดที่ถูกต้องคือ 582 bp

1.3 ทำการย้ายส่วน cDNA of EPO gene เข้าสู่ pLenti 7.3/V5-DEST Gateway vector โดยใช้เทคนิค LR recombination

ได้ทำการย้าย cDNA of EPO gene เข้าสู่ pLenti 7.3/V5-DEST Gateway vector ได้สำเร็จ และมี orientation ที่ถูกต้อง ซึ่งยืนยันโดยใช้ primers รวม 3 คู่ ที่ประกอบด้วย ส่วนของ plasmid และ ส่วนของ EPO gene ในการทำ PCR ได้แก่ F-EPO + R-EPO C3, CMV-F + InR-EPO C3 และ InF-EPO + V5-R C3 โดยให้ผลดังภาพที่ 3

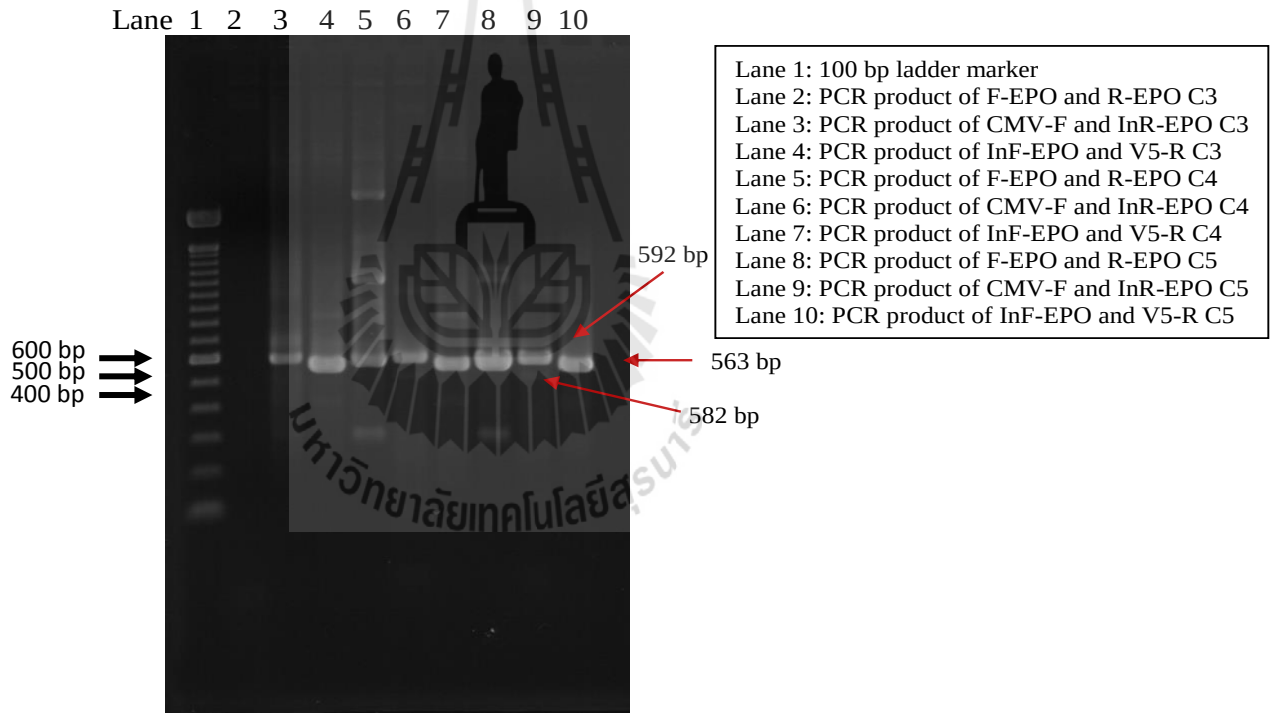


Figure 3 เป็นการทำ PCR โดยใช้ pLenti 7.3/V5-DEST Gateway vector ที่มีส่วนของ complete cDNA ของ erythropoietin gene อยู่ เป็นแม่แบบ (template) เพื่อ ยืนยันว่ามีส่วน complete cDNA ของ erythropoietin gene อยู่ และที่ orientation ที่ถูกต้อง โดยจากรูปแสดงให้เห็นว่า ได้ PCR product ในขนาดที่ถูกต้องคือ 582 bp, 592 bp , 563 bp เมื่อใช้ primers 3 คู่ คือ F-EPO + R-EPO C3, CMV-F + InR-EPO C3 และ InF-EPO + V5-R C3

2. การสร้าง Lentiviral vector และ การนำ Lentiviral vector ที่มียีน erythropoietin อยู่เข้าสู่เซลล์

ได้ทำการสร้าง Lentiviral vector โดยใช้ packaging cells (293T packaging cell lines) โดยการ Transfect plasmids ทั้ง 4 ชนิดเข้าสู่เซลล์ ดังกล่าว ได้แก่ packaging plasmids 3 ชนิด คือ pLP1 (gag/pol), pLP2 (rev), pLPv (env) และ Lentiviral plasmid เข้าสู่เซลล์ จากนั้นปล่อยให้เซลล์สร้างไวรัส และปล่อยออกมาสู่ อาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการ transduction เข้าสู่เซลล์เป้าหมายต่อไป

จากนั้นได้ทำการทดลองในการ นำ Lentiviral vector ที่เป็น empty vector ซึ่งไม่มีส่วนของ ยีน erythropoietin แต่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ GFP (green fluorescent protein) ในเซลล์เป้าหมายได้ โดยวิธี transduction ทั้งนี้เพื่อใช้ในการบอกประสิทธิภาพของการนำพา Lentiviral vector เข้าเซลล์เป้าหมาย

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ด้วยการใช้เทคนิคดังกล่าว สามารถนำพาส่วนของ Lentiviral vector เข้าสู่เซลล์เป้าหมายได้ สำเร็จ โดยการตรวจปริมาณเซลล์ ที่มีไวรัสได้โดยการสังเกตุโดยใช้ Fluorescent microscope ร่วมกับการใช้ Flow cytomerty ทั้งนี้เซลล์ที่มีไวรัส จะติดสี Green fluorescence ให้เห็นได้ โดยผลการทดลองโดยการทำ flow cytometry แสดงดังภาพที่ 4

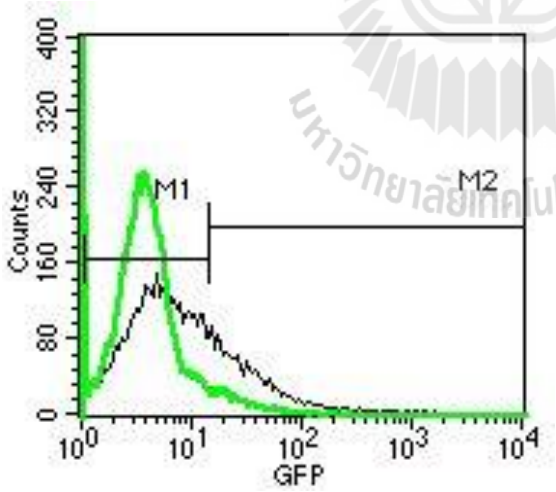


Figure 4 Histogram of GFP^+ expression of infected cells analyzed by flow cytometry. The target cells were transduced with Lentiviral vector and then were analyzed by flow cytometry to measure the efficiency of transduction. The data showed that about 30% of target cells can uptake the viral vector.

3. ผลการทดลองในการใช้ adeno-associtaed viral vector ในการกระตุ้นการสร้าง Erythropoietin ในเซลล์ human fibroblasts

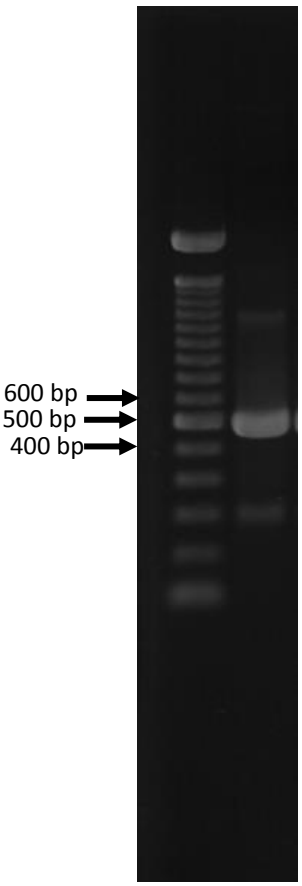
ด้วยเหตุผลในด้านความปลอดภัยต่อผู้ป่วย ทางคณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของการกระตุ้นการแสดงออกของยีน Erythropoietin ในเซลล์เป้าหมาย (human fibroblasts) โดยการใช้ adeno-associated viral (AAV vector) แทนการใช้ Lentivirus ทั้งนี้การใช้ AAV virus เป็นพาหะในการกระตุ้นการแสดงออกของยีน มีข้อดีในแง่ที่ viral vector ชนิดนี้ไม่มีการสอดแทรกของ viral DNA เข้าสู่เซลล์เป้าหมายทำให้ลดปัญหาความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งลงได้ ทำให้การนำไปไปให้การทดลองระยะต่อไปในสัตว์ และ มนุษย์ มีความปลอดภัยมากขึ้น

ทั้งนี้ผลการทำวิจัยสามารถสรุปได้ดังนี้

3.1 การเตรียม Erythropoietin-expressing adeno-associated viral vector ได้ดำเนินการวิจัยเพื่อให้ได้ adeno-associated viral vector (hrGFP-AAV) ที่สามารถสร้างโปรตีน Erythropoietin ใน human fibroblast cells ดังนี้

- ผลการสร้าง cDNA ของ erythropoietin gene ซึ่งประกอบด้วย complete coding sequence ของ Human erythropoietin gene และ clone เข้าสู่ hrGFP-AAV

การทดลองที่ผ่านมาสามารถสร้างส่วนของ complete coding DNA ของ Human erythropoietin gene และนำ เข้าสู่ hrGFP-AAV ได้แล้ว และสามารถแสดงผลการทดลองให้เห็นดังภาพ ที่ 4 ซึ่งเป็นการทำการทดลองโดยวิธี PCR โดยใช้ vector ที่คาดว่ามีส่วนของ complete cDNA ของ erythropoietin gene อยู่เป็นแม่แบบ (template) เพื่อ ยืนยันว่ามีส่วน complete cDNA ของ erythropoietin gene อยู่ โดยจากภาพแสดงให้เห็นว่า ได้ PCR product ในขนาดที่ถูกต้องคือ 582 bp เมื่อตรวจวิเคราะห์โดย agarose gel electrophoresis with UV detection โดยผลการทดลองสามารถแสดงได้ ดังภาพที่ 5



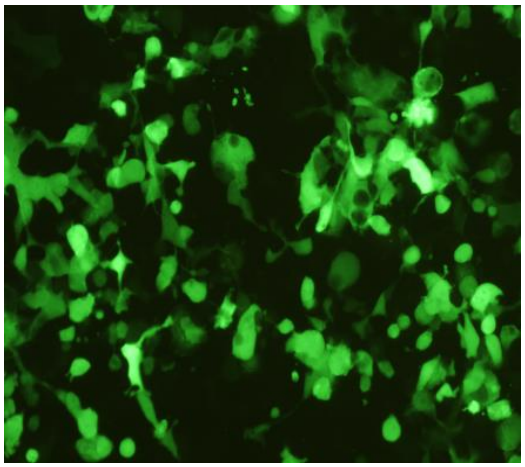
Lane 1: 100 bp ladder

Lane 2: PCR product for detection of erythropoietin gene

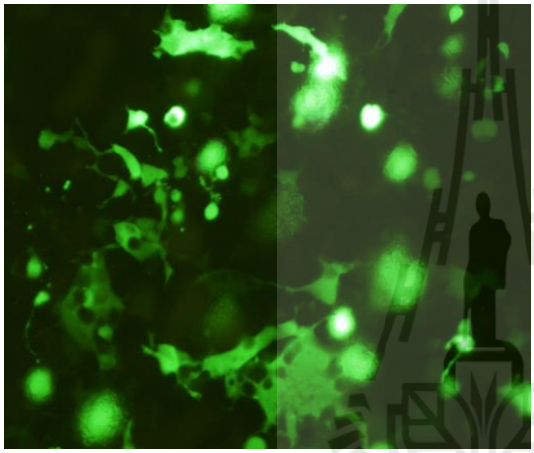
- PCR product showed expected sized 582 bp of EPO gene

Figure 5 เป็นการทำ PCR เพื่อยืนยันว่ามีส่วนของ complete cDNA ของ erythropoietin gene อยู่ใน vector โดยจากรูปแสดงให้เห็นว่า ได้ PCR product ในขนาดที่ถูกต้องคือ 582 bp

- การสร้าง EPO-pAAV viral vector โดยการนำพา vectors 3 ชนิด คือ adenoassociated viral vector (hrGFP-AAV) และ pHelper and pAAV-RC vectors เข้าสู่ packaging cell (AAV-293) จากนั้นทำการแยก AAV virus ที่ได้เพื่อนำไปใช้ในการกระตุ้นการแสดงออกของยีน erythropoietin ในเซลล์เป้าหมาย โดยผลการทดลองพบว่าสามารถทำให้เกิดการแสดงออกของ ยีน GFP ใน packaging cell ได้แล้วโดยแสดงให้เห็นดังภาพ ที่ 6 ซึ่งเป็นการยืนยันว่ามีการสร้าง adenoassociated viral vector ที่มีส่วนของ erythropoietin gene เป็นองค์ประกอบได้สำเร็จ ในเซลล์ดังกล่าว



A



B

Figure 6 เป็นผลการตรวจการแสดงออกของยีน GFP (green fluorescent protein) ในเซลล์ที่ใช้สร้าง AAV viral vector โดยการใช้ fluorescent microscope ผลการทดลองพบว่ามีการแสดงออกของยีนใน packaging cells ดังกล่าว (A= pAAV ที่มีส่วนของ EPO gene, B= pAAV ที่ไม่มีส่วนของ EPO gene)

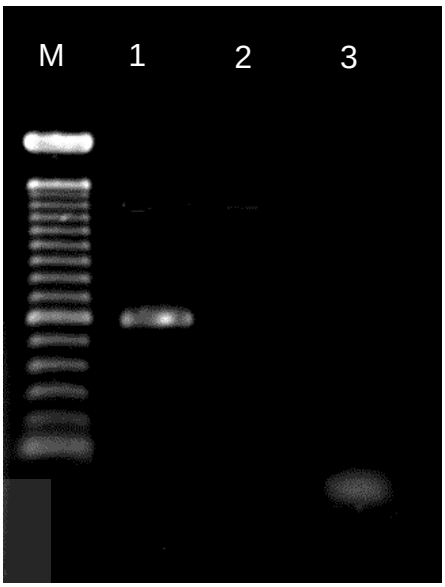
นอกจากนี้ยังได้ศึกษาให้เห็นว่ามีการสร้าง erythropoietin protein ขึ้น ในเซลล์ดังกล่าว โดยการสกัด RNA จาก packaging cells แล้วนำ RNA ที่ได้ไปผ่านกระบวนการ RT-PCR ซึ่งผลการทดลองพบว่ามีการแสดงออกของยีน erythropoietin จริงในเซลล์ดังกล่าว ทั้งนี้ผลการทดลองได้แสดงให้เห็นในภาพ ที่ 7

AAV-293 cells post transfection for 48 hours

RNA Extraction

RT-PCR

1% agarose gel



M = 100 bp DNA ladder

1 = AAV-EPO

2 = AAV-GFP

3 = Blank

Figure 7 ผลการศึกษาเพื่อยืนยันว่ามีการแสดงออกของยีน human erythropoietin ในเซลล์ที่ใช้ในการสร้าง viral vector (packaging cells) โดยใช้เทคนิค RT-PCR ที่มี RNA ที่สกัดจากเซลล์ดังกล่าวเป็นแม่แบบ ผลการศึกษาพบว่ามี RT-PCR product ที่มีขนาดตรงกับขนาดของ gene erythropoietin คือ ประมาณ 582 bp

<u>หมายเหตุ</u>

- lens ที่ 1 เป็นภาพการตรวจหา RT-PCR product ของ erythropoietin gene จากเซลล์ที่ใช้ผลิต adenoasociated viral vector ที่มีส่วนของ erythropoietin gene เป็นส่วนประกอบ
- lens ที่ 2 เป็นภาพการตรวจหา RT-PCR product ของ erythropoietin gene จากเซลล์ที่ใช้ผลิต adenoasociated viral vector ที่มีส่วนของ Green fluorescent protein เป็นส่วนประกอบ
- lens 3 เป็น negative control ซึ่งไม่มี RNA ในปฏิกิริยา RT-PCR

3.2 ผลการทดลองกระตุ้นการแสดงออกของ erythropoietin gene ในเซลล์เป้าหมาย

ผลการนำ AAV ไปกระตุ้นการแสดงออกของยีน ในเซลล์เป้าหมาย (human fibroblast) โดยผลการทดลองพบว่าหลังจากการติดเชื้อในเซลล์เป้าหมายคือ human foreskin fibroblsats (HFF-1) แล้ว เซลล์ดังกล่าวสามารถสร้าง GFP protein ขึ้นได้ ซึ่งเป็นการสนับสนุนว่าย่อมจะมีการสร้างโปรตีน erythropoietin ในเซลล์ดังกล่าวเช่นกัน โดยผลการทดลองแสดงดังภาพ ที่ 8

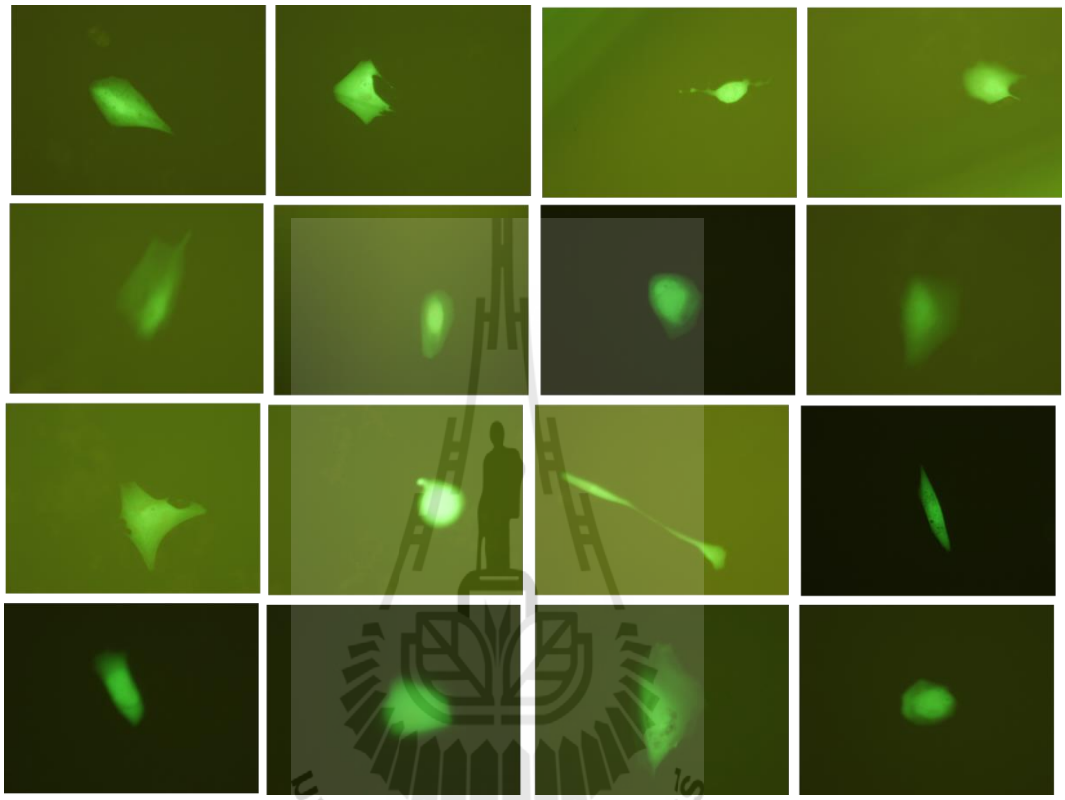
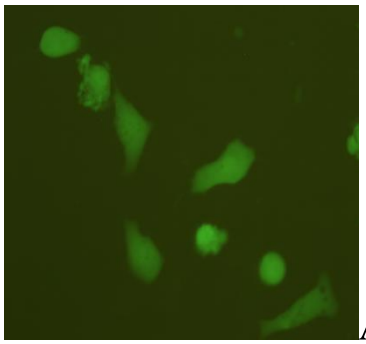
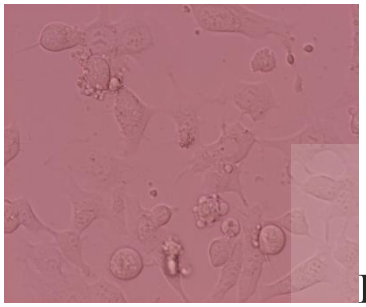
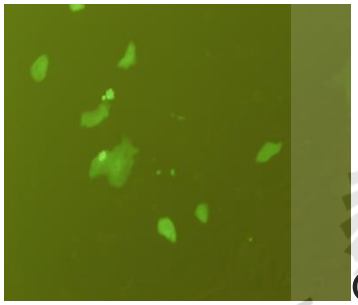


Figure 8 ผลการกระตุ้นการแสดงออกของ EPO (erythropoietin gene) ในเซลล์เป้าหมาย (human fibroblast) ในภาพแสดงให้เห็นการแสดงออกของโปรตีน GFP (green fluorescent protein) ในเซลล์ fibroblasts หลังมีการติดเชื้อโดย AAV viral vector (วันที่ 19 หลังการติดเชื้อ) โดยเป็นการสังเกตเซลล์ภายใต้ Fluorescent microscope (กำลังขยาย 400 เท่า)

นอกจากนี้ได้ทำการทดลองโดยใช้เซลล์อื่น ได้แก่ HT1080 ซึ่งเป็น human fibrosarcoma cell line ในการกระตุ้นให้มีการสร้าง erythropoietin ด้วยนอกเหนือจากเซลล์ HFF-1 ทั้งนี้เพื่อหาเซลล์ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการสร้าง erythropoietin ผลการทดลองพบว่าประสิทธิภาพในการรับการติดเชื้อ AAV ในเซลล์ HT1080 มีสูงกว่าเซลล์ HFF-1 ซึ่งแสดงโดยการที่มีปริมาณเซลล์ที่ติดสี GFP (green fluorescence protein) สูงกว่า โดยแสดงผลให้เห็นดังภาพที่ 9


A


B


C

D

Figure 9 ภาพแสดงปริมาณเซลล์ HT1080 ที่ได้รับการติดเชื้อ AAV ที่มีส่วนของยีน *erythropoietin* โดยเซลล์ที่มีการติดเชื้อจะติดสีเขียวของ green fluorescence protein (GFP) จากภาพเป็นการสังเกตุเซลล์ในวันที่ 11 หลังการติดเชื้อ ทั้งนี้สัดส่วนของเซลล์ที่ติดสีมีประมาณมากกว่า 20% (กำลังขยาย 200 เท่า)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

หมายเหตุ A= เซลล์ที่ใช้ AVV ที่มีส่วนของ *erythropoietin* และ GFP ซึ่งสังเกตภายใต้ Fruorescence microscope

B= เซลล์ที่ใช้ AVV ที่มีส่วนของ *erythropoietin* และ GFP ซึ่งสังเกตภายใต้ inverted microscope

C= เซลล์ที่ใช้ AVV ที่มีส่วนของ GFP ซึ่งสังเกตภายใต้ Fruorescence microscope

D= เซลล์ที่ใช้ AVV ที่มีส่วนของ GFP ซึ่งสังเกตภายใต้ inverted microscope

3.2 ผลการตรวจการแสดงออกของยีน erythropoietin ในเซลล์เป้าหมาย ในระดับ RNA และ โปรตีน

ผลการตรวจการแสดงออกของยีน *erythropoietin* ในเซลล์ human fibroblast หลังการติดเชื้อ AAV โดยวิธี RT-PCR แสดงให้เห็นดังภาพที่ 10

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

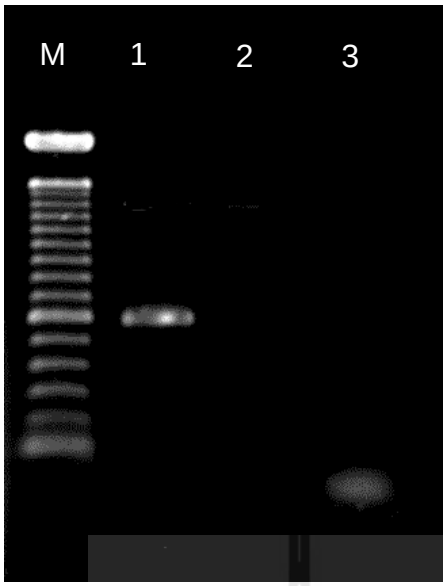


Figure 10 ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน erythropoietin ในเซลล์ human fibroblasts โดยเทคนิค RT-PCR พบว่าเซลล์ที่ติดเชื้อ AAV ที่มีส่วนของ EPO gene มีการแสดงออกในระดับ RNA ในขณะที่ control smaple ไม่พบมีการแสดงออกของยีน (M= 100 bp ladder, Lens 1= RNA from cells infected with AAV-EPO, Lens 2= RNA from cells transfected with AAV-GFP, Lens 3= negative (no RNA) control)

- ผลการตรวจวัดการแสดงออกของยีน EPO ในระดับโปรตีน

ผลการตรวจปริมาณ EPO โดยวิธี ELISA assay พบว่าหลังการติดเชื้อด้วย AAV เซลล์ human fibroblasts มีการสร้าง erythropoietin และสามารถหลั่งสู่น้ำเลี้ยงเซลล์ได้ ซึ่งระดับโปรตีนที่วัดได้มีระดับสูงถึง 904.8 mU/ml ซึ่งเป็นระดับที่สูงกว่าที่พบในเลือดของคนปกติ นอกจากนี้การวัดระดับโปรตีนที่อยู่ภายในเซลล์ (intracellular protein) ในเซลล์ดังกล่าวพบว่ามีระดับ 900.9 mU/ml ทั้งนี้ ระดับปกติของ EPO ในเลือด = 5-36 mU/ml

บทที่ 3
ข้อวิจารณ์

3.1 การรายงานผลการวิจัย และการวิเคราะห์ผล

การวิจัยนี้สามารถได้ผลการทดลองดังนี้

1. การสร้างส่วนของ cDNA ของยีน human erythropoietin โดยวิธี RT-PCT พบว่าสามารถสร้างส่วนของ cDNA ได้ถูกต้องและสมบูรณ์
2. การตัดต่อส่วนของ cDNA ของ human erythropoietin gene เข้าสู่ adeno-associated viral vector ได้ใช้วิธี directional cloning โดยใช้ restriction enzyme and ligase และได้ adeno-associated viral vector DNA ที่มีส่วนของยีนดังกล่าวตามต้องการ
3. การนำ adeno-associated viral vector DNA ร่วมกับ pHelper and pAAV-RC vectors เข้าสู่ packaging cells ได้ทำสำเร็จซึ่งแสดงให้เห็นจากการที่มีการตรวจพบโปรตีน GFP ในเซลล์ดังกล่าว ในปริมาณที่สูง
4. การนำ adeno-associated viral vector ที่มีส่วนของยีน human erythropoietin เข้าสู่เซลล์เป้าหมาย ได้แก่ human fibroblast cells พบว่าสามารถกระตุ้นให้เซลล์เป้าหมายมีการแสดงออกของยีน human erythropoietin ได้สำเร็จ โดยมีสัดส่วนของเซลล์ที่สามารถสร้างโปรตีนได้ประมาณ 20 %
5. การตรวจวัดปริมาณ human erythropoietin RNA และ โปรตีน ที่สร้างจากเซลล์ human fibroblasts ที่ได้รับการติดเชื้อโดย adeno-associated viral vector ที่มีส่วนของยีน human erythropoietin พบว่าเซลล์มีการแสดงออกของยีนดังกล่าวในปริมาณสูง โดยมีปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนในน้ำเลี้ยงเซลล์ และ ใน cytoplasm ของเซลล์ เป็น 904.8 mU/ml และ 900.9 mU/ml ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าปริมาณ erythropoietin ที่สามารถตรวจพบในเลือดมนุษย์ประมาณ 25 เท่า

3.2 อภิปรายผลการวิจัย

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เทคนิค การกระตุ้นการทำงานของยีน ในเซลล์มนุษย์ โดยการใช้ adeno-associated viral vector เป็นพาหะนี้ เป็นเทคนิค ที่มีประสิทธิภาพสูง ในคุณลักษณะต่างๆ โดยเฉพาะในด้านประสิทธิภาพการนำพาเข้าสู่เซลล์ เป้าหมาย โดยเฉพาะเซลล์มนุษย์ ซึ่งสูงกว่า Non-viral vector นอกจากนี้ยังสามารถ กระตุ้นการแสดงออกของยีนในเวลานาน เนื่องจาก AAV virus ไม่สามารถแทรกตัวเข้าสู่ genome ของ เซลล์เป้าหมาย ดังนั้นจึงมีความปลอดภัยมากกว่าการใช้ lentiviral vector

ดังนั้นการใช้ Adeno-associated viral vector นี้ จึงมีความเหมาะสมอย่างยิ่งในการนำนาประยุกต์ ใช้ในการรักษาโรค ที่ต้องการให้มีการแสดงออกของยีนเป็นเวลา นาน เช่น genetic disease และ การรักษาภาวะเสื่อมหรือ ถูกทำลายของเซลล์ อย่างถาวร เช่น ภาวะไตวาย ที่สนใจในการศึกษานี้เป็นต้น และมีข้อดีที่สำคัญได้แก่ การมีความปลอดภัยสูงเนื่องจากส่วนของ viral genome จะไม่มีการแทรกเข้าสู่ chromosome ของเซลล์เป้าหมาย จึงนับเป็นวิธีการรักษาที่อาจนำไปประยุกต์ใช้ในทางคลินิกได้มากขึ้นในอนาคต ทั้งนี้จากการค้นคว้าเพิ่มเติมพบว่ามีการทำวิจัยทางคลินิกมากขึ้นในช่วงเวลาที่ผ่านมาในการใช้ adeno-associated viral vector ในการรักษาโรคต่างๆในมนุษย์ และมีการนำไปใช้ในผู้ป่วยได้แล้วด้วย (Kotterman et al, 2014)

ผลการทดลองที่พบว่าวิธีการทดลองที่ใช้ในการกระตุ้นการสร้าง erythropoietin จากเซลล์ สามารถได้ปริมาณสูงกว่าในเลือดหลายเท่านั้น ทำให้เห็นว่าวิธีการดังกล่าวนี้มีศักยภาพในการนำไปใช้เพื่อการรักษาภาวะโลหิตจางในมนุษย์ได้ ซึ่งต้องพิสูจน์โดยทำการทดลองในสัตว์ในระยะต่อไป ทั้งนี้ในสภาพที่ใช้จริงในสัตว์ นั้น จะต้องทำการฉีดเซลล์ที่ถูกกระตุ้นให้สามารถสร้าง erythropoietin เข้าสู่ร่างกายสัตว์ จากนั้นต้องทำการวัดปริมาณโปรตีน erythropoietin ที่ถูกหลั่งเข้าสู่กระแสเลือด ซึ่งผลการทดลองอาจพบว่าระดับที่วัดได้ในร่างกายสัตว์ อาจจะต่ำลงกว่าที่วัดได้ในการทดลองที่ใช้การวัดในน้ำเลี้ยงเซลล์ เนื่องจากโปรตีนต้องกระจายตัวไปในสารน้ำของร่างกายสัตว์ที่มีประมาณมากขึ้น ดังนั้น การสามารถกระตุ้นให้สามารถสร้างโปรตีนในปริมาณสูงมากเท่าไหร่ น่าจะทำให้มีโอกาสทำสำเร็จในสัตว์ทดลองมากขึ้น ส่วนข้อกังวลที่ว่าจะทำให้มีปริมาณโปรตีนในร่างกายมากเกินไปนั้น สามารถแก้ไขโดยการปรับปริมาณเซลล์ที่ฉีดเข้าในร่างกายได้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4
สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทำวิจัยและข้อเสนอแนะ

สามารถสรุปผลการทำวิจัยได้ดังนี้

1. สามารถสร้างส่วน coding sequence ของ ยีน human erythropoietin ได้สำเร็จ
2. สามารถตัดต่อส่วนของยีนดังกล่าวเข้าสู่ Adeno-associated viral vector (AAV)
3. สามารถสร้าง adeno-associated viral vector (AAV) ที่มีส่วนของยีน *erythropoietin*จาก packing cells ได้สำเร็จ
4. สามารถนำ AAV vector เข้าสู่เซลล์เป้าหมายได้แก่ human fibroblast cells ได้สำเร็จ
5. สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน EPO ในเซลล์เป้าหมายได้สำเร็จ โดยพบว่าเซลล์เป้าหมายมีการสร้างโปรตีนดังกล่าว และสามารถหลั่งออกนอกเซลล์ได้ในปริมาณสูง โดยระดับโปรตีนที่วัดได้นี้มีระดับที่สูงกว่าที่สามารถตรวจพบได้ในคนปกติ

การวิจัยนี้เป็นการพัฒนาวิธีการรักษาภาวะโลหิตจางเรื้อรัง ในผู้ป่วยไตวาย โดยใช้เทคนิค gene therapy ในการกระตุ้นการทำงานของ ยีน Erythropoietin ในเซลล์ผู้ป่วย adenoassociated viral vector เนื่องจากคุณสมบัติที่ดีหลายประการดังกล่าวแล้ว ผลการทดลองจากการทำวิจัยพบว่าได้มีการดำเนินการเป็นไปตามแผนที่ตั้งไว้ และมีผลการทดลองที่เป็นไปตามที่คาดไว้ สอดคล้องกับวัตถุประสงค์ ซึ่งได้แก่การสามารถสร้าง adeno-associated viral vector ที่มีส่วนของยีน human erythropoietin ได้สำเร็จ และหลังการนำ adeno-associated viral vector ดังกล่าวเข้าสู่เซลล์ พบว่ามีประสิทธิภาพสูงในการเข้าสู่เซลล์ นอกจากนี้พบว่าระดับของ Erythropoietin ที่สร้างขึ้นในเซลล์สามารถหลั่งออกนอกเซลล์ได้ และระดับที่วัดได้มีปริมาณที่สูงกว่าที่พบในเลือดของคนปกติ ซึ่งเป็นหลักฐานที่สนับสนุนว่า สามารถนำเซลล์ดังกล่าวไปใช้ในการทำวิจัยต่อยอดในสัตว์ทดลอง และ ในมนุษย์ได้ในที่สุด โดยในปัจจุบันมีการใช้วิธียีนบำบัดโดยใช้ adeno-associated viral vector มากขึ้นในการทำวิจัย และในบางโครงการได้นำมาใช้ใน clinical trial แล้ว ในต่างประเทศ เช่น การใช้ AAV ในการทำลาย T lymphocyte ในผู้ป่วยที่ได้รับ bone marrow transplant และมีภาวะ graft versus host เป็นต้น (Lupo-Stanghellini et al, 2010) ส่วนการใช้ในการรักษาภาวะ anemia จาก chronic renal failure นั้น ยังอยู่ในการศึกษาในสัตว์เป็นส่วนใหญ่ และเป็นการใช้ lentivirus and adenoviral vector เป็นส่วนมาก (Oh et al, 2006) ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยได้หวังอย่างยิ่งว่าผลงานวิจัยที่ได้จากโครงการนี้จะเป็นก้าวสำคัญ ในการนำไปพัฒนาต่อยอดเพื่อนำไปใช้ในการรักษาภาวะซีดจากโรคไตวายเรื้อรัง รวมถึงโรคทางพันธุกรรมอื่นๆ เช่น hemophilia, thalassemia โดยเทคนิคยีนบำบัด โดยการประยุกต์จากแนวทางที่ใช้ในโครงการนี้

บรรณานุกรม

1. อุษณา ลุวีระ และ พรรณบุปผา ชูวิเชียร (1993) Renal replacement therapy in Thailiand. Hemodialysis and CAPD. พิมพ์ครั้งที่ 1, กรุงเทพเวชสาร
2. Avram MM, Blaustein D, Fein PA, Goel N, Chattopadhyay J, Mittman N. (2003) Hemoglobin predicts long-term survival in dialysis patients: a 15-year single-center longitudinal study and a correlation trend between prealbumin and hemoglobin. Kidney Int Suppl 87:S6-11.
3. Bennett CL, Luminari S, Nissenson AR, et al. (2004) Pure red-cell aplasia and epoetin therapy. N Engl J Med 351:1403-1408
4. Besarab A. (2000) Physiological and pharmacodynamic considerations for route of EPO administration. Semin Nephrol 20: 364-374.
5. Bohl D, Bosch A, Cardona A, Salvetti A, Heard JM. (2000) Improvement of erythropoiesis in beta-thalassemic mice by continuous erythropoietin delivery from muscle. Blood 95:2793-2798.
6. Bohl D, Heard JM. (2000) Delivering erythropoietin through genetically engineered cells. J Am Soc Nephrol 11(suppl 16):S159-162.
7. Cannella G, LaCanna G. Sandrini M, Gaggiotti M, Nordio G, Movilli E, Maiorca R. (1990) Renormalization of high cardiac output and of left ventricular size following long – term recombinant human erythropoietin treatment of anemic dialyzed uremic patients. Clin Nephrol 34(6):272-278.
8. Chenuaud P, Larcher T, Rabinowitz JE, et al. (2004) Autoimmune anemia in macaques following erythropoietin gene therapy. Blood 103: 3303-3304.
9. Dalle B, Payen E, Regulier E, et al. (1999) Improvement of mouse beta-thalassemia upon erythropoietin delivery by encapsulated myoblasts. Gene Ther 6:157-161.
10. Denny WF, Flanigan WJ, Zukoski CF 3rd. (1996) Serial erythropoietin studies in patients undergoing renal homotransplantation. J Lab Clin Med Mar;67(3):386-397.
11. Einbinder T, Sufaro Y, Yusim I, et al. (2003) Correction of anemia in uremic mice by genetically modified peritoneal mesothelial cells. Kidney Int 63:2103-2112.
12. Emerson SG, Sieff CA, Wang EA, Wong GG, Clark SC, Nathan DG. (1985) Purification of fetal hematopoietic progenitors and demonstration of recombinant multipotential colony-stimulating activity. J Clin Invest Sep;76(3):1286-1290.

13. Emerson SG, Yang YC, Clark SC, Long MW. (1988) Human recombinant granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin 3 have overlapping but distinct hematopoietic activities. J Clin Invest Oct;82(4):1282-1287.

14. Eschbach JW, Haley NR, Adamson JW. (1990) The anaemia of chronic renal failure:pathophysiology and effects of recombinant erythropoietin. Contributions Nephrol 78:24-36.

15. Foley RN, Parfrey PS, Harnett JD, Kent GM, Murray DC, Barre PE. (1996) The impact of anemia on cardiomyopathy, morbidity, and and mortality in end-stage renal disease. Am J Kidney Dis Jul;28(1):53-61.

16. Gao G, Lebherz C, Weiner DJ, et al. (2004) Erythropoietin gene therapy leads to autoimmune anemia in macaques. Blood 103:3300-3302.

17. Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, Neill SD, Kaufman RJ, Mufson A, Seehra J, Jones SS, Hewick R, Fritsch EF, et al. (1985) Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. Nature Feb 28-Mar 6;313(6005):806-810.

18. Kotterman MA, Schaffer DV. (2014) Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy. Nat Rev Genet Jul;15(7):445-51. doi: 10.1038/nrg3742. Epub 2014 May 20.

19. Koury MJ, Bondurant MC. (1990) Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells. Science Apr 20;248(4953):378-381

20. Koury ST, Koury MJ, Bondurant MC, Caro J, Graber SE. (1989) Quantitation of erythropoietin-producing cells in kidneys of mice by in situ hybridization: correlation with hematocrit, renal erythropoietin mRNA, and serum erythropoietin concentration. Blood Aug 1;74(2):645-651.

21. Lacombe C, Mayeux P. (1999) The molecular biology of erythropoietin. Nephrol Dial Transplant 14 Suppl 2:22-28. Review

22. Lai PH, Everett R, Wang FF, Arakawa T, Goldwasser E. (1986) Structural characterization of human erythropoietin. J Biol Chem 5;261(7):3116-3121.

23. Law ML, Cai GY, Lin FK, Wei Q, Huang SZ, Hartz JH, Morse H, Lin CH, Jones C, Kao FT. (1886) Chromosomal assignment of the human erythropoietin gene and its DNA polymorphism. Proc Natl Acad Sci U S A 83(18):6920-6924.

24. Lin FK, Suggs S, Lin CH, Browne JK, Smalling R, Egrie JC, Chen KK, Fox GM, Martin F, Stabinsky Z, et al. (1985) Cloning and expression of the human erythropoietin gene. Proc Natl Acad Sci U S A 82(22):7580-7584.

25. Lin FK, Suggs S, Lin CH, Browne JK, Smalling R, Egrie JC, Chen KK, Fox GM, Martin F, Stabinsky Z, et al. (1985) Cloning and expression of the human erythropoietin gene. Proc Natl Acad Sci U S A 82(22):7580-7584.

26. Lippin Y, Dranitzki-Elhalel M, Brill-Almon E, Mei-Zahav C, Mizrachi S,Liberman Y, Iaina A, Kaplan E, Podjarny E, Zeira E, Harati M, Casadevall N, Shani N, Galun E. (2005) Human erythropoietin gene therapy for patients with chronic renal failure Blood 106:2280-2286.

27. Lupo-Stanghellini MT, Provasi E, Bondanza A, Ciceri F, Bordignon C, Bonini C. (2010) Clinical impact of suicide gene therapy in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Hum Gene Ther 21(3):241-250.

28. Ofsthun N, Labrecque J, Lacson E, Keen M, Lazarus JM. (2003) The effect of higher hemoglobin level on mortality and hospitalization in hemodialysis patients. Kidney Int 63:1980-1984

29. Oh TK, Quan GH, Kim HY, Park F, Kim ST. (2006) Correction of anemia in uremic rats by intramuscular injection of lentivirus carrying an erythropoietin gene. Am J Nephrol 26(4):326-34. Epub 2006 Jul 5

30. Osada S, Ebihara I, Setoguchi Y, Takahashi H, Tomino Y, Koide H. (1999) Gene therapy for renal anemia in mice with polycystic kidney using an adenovirus vector encoding the human erythropoietin gene. Kidney Int 55:1234-1240.

31. Powell JS, Berkner KL, Lebo RV, Adamson JW. (1986) Human erythropoietin gene: high level expression in stably transfected mammalian cells and chromosome localization. Proc Natl Acad Sci U S A 83(17):6465-6469.

32. Sawyer ST, Koury MJ. (1987) Erythoropoietin requirement during terminal erythroid differentiation: The role of surface receptor for erythropoietin. J Cell Biol 105:191a, (abstr, suppl)

33. Sawyer ST, Krantz SB, Sawada K. (1989) Receptors for erythropoietin in mouse and human erythroid cells and placenta. Blood 74(1):103-109.

34. Verhelst D, Rossert J, Casadevall N, Kruger A, Eckardt KU, Macdougall IC. (2004) Treatment of erythropoietin-induced pure red cell aplasia: a retrospective study. Lancet 363:1768-1771.

35. Watkins PC, Eddy R, Hoffman N, Stanislovitis P, Beck AK, Galli J, Vellucci V, Gusella JF, Shows TB. (1986) Regional assignment of the erythropoietin gene to human chromosome region 7pter----q22. Cytogenet Cell Genet 42(4):214-218.
36. Zehnder C, Zuber M, Sulzer M, Meyer B, Straumann E, Jenzer HR, Blumberg A. (1992) Influence of long – term amelioration of anemia and blood pressuer control on left ventricular hypertrohy in hemodialyzed patients. Nephrology 61(1):21-25.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติผู้วิจัย

ผศ. นพ. ดร. ชวบูลย์ เดชสุขุม เกิดเมื่อวันที่ 17 กุมภาพันธ์ 2509 สำเร็จการศึกษา ระดับปริญญาตรี แพทยศาสตร์(พ.ศ. 2533) จากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และ Diploma Thai Board สาขา Anatomical Pathology จาก ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล จากนั้นได้ศึกษา ต่อในระดับปริญญาเอก สาขา Pathology ณ Medical College of Virginia, Virginia Commonwealth University ประเทศสหรัฐอเมริกา จนจบการศึกษาในปี พ.ศ. 2543 ก่อนที่จะศึกษาต่อทางด้าน Molecular Pathology ในระดับ Post-Doctoral Fellow ณ Medical College of Virginia, Virginia Commonwealth University ประเทศสหรัฐอเมริกา (พ.ศ. 2543) ปัจจุบัน ผศ. นพ. ดร. ชวบูลย์ เดชสุขุม ทำงานในตำแหน่งหัวหน้าสาขาวิชาพยาธิวิทยา และเป็นอาจารย์ประจำสาขาวิชาพยาธิวิทยา สำนักวิชาแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ. นครราชสีมา ประเทศไทย ผศ. นพ. ดร. ชวบูลย์ เดชสุขุมได้รับรางวัลทางด้านวิชาการหลายรางวัล อาทิเช่น รางวัล King Scholarship award, Stem Cell Travelling award, International Society for Stem Cell Research (พ.ศ. 2551) และ รางวัลส่งเสริมบัณฑิตบัณฑิต มูลนิธิอานันทมหิดล ปัจจุบันอาจารย์ ผศ. นพ. ดร. ชวบูลย์ เดชสุขุม มีผลงานตีพิมพ์ในระดับนานาชาติ 15 ผลงาน และผลงานจดสิทธิบัตร เรื่อง“A nucleic acid marker of cancer” Serial No.09/434,620, filed Nov.5, 1999 Joy L Ware, Chavaboon Dechsukhum, Carleton T Garrett (Detection of novel WT1 transcript in human malignancy, including prostate, breast cancer and acute leukemia) สถานที่ติดต่อ สาขาวิชาพยาธิวิทยา สำนักวิชาแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี 111 ถนน มหาวิทยาลัย ต.สุรนารี อ.เมือง จ. นครราชสีมา 30000 E-mail : chavaboon@sut.ac.th

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติผู้ร่วมวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เทคนิคการแพทย์หญิง ดร. วิไลรัตน์ ลื้อนันต์ศักดิ์ศิริ เกิดเมื่อวันที่ 31 มีนาคม 2513 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วท.บ. เทคนิคการแพทย์(พ.ศ. 2535) และ ปริญญาโท วท.ม. ชีวเคมีทางการแพทย์ (พ.ศ. 2539) จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น จากนั้นได้ศึกษาต่อในระดับปริญญาเอก สาขา Microbiology and Immunology โดยเน้นทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยาทางการแพทย์และ เซลล์ต้นกำเนิด ณ Medical College of Virginia, Virginia Commonwealth University ประเทศ สหรัฐอเมริกา จนจบการศึกษาในปี พ.ศ. 2544 ก่อนที่จะศึกษาต่อทางด้าน stem cell transplantation and stem cell regulation ในระดับ Post-Doctoral Fellow ณ National Institute of Health ประเทศ สหรัฐอเมริกา (พ.ศ. 2545-2546) ปัจจุบัน ผศ. ทนพญ. ดร. วิไลรัตน์ ทำงานในตำแหน่งอาจารย์ประจำ สาขาวิชาปรีคลินิก สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ. นครราชสีมา ประเทศไทย อาจารย์วิไลรัตน์ ลื้อนันต์ศักดิ์ศิริ ได้รับรางวัลทางด้านวิชาการหลายรางวัล อาทิเช่น รางวัล Excellent Research Award (Stem cell), USA, Key Stone Symposium (พ.ศ. 2550), American Society of Hematology Traveling Award, USA (พ.ศ. 2546), Traveling Award, International Society for Stem Cell Research, Australia (พ.ศ.2547) / USA (พ.ศ. 2551), รางวัลส่งเสริมบัณฑิตบัณฑิต มูลนิธิอานันท มหิดล พ.ศ. 2551-2554 และ รางวัลศิษย์เก่าดีเด่นด้านวิชาการ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัย ขอนแก่นในปี พ.ศ. 2554 ปัจจุบัน ผศ. ทนพญ. ดร. วิไลรัตน์ ลื้อนันต์ศักดิ์ศิริ มีผลงานตีพิมพ์ในระดับนานาชาติ 18 ผลงาน สถานที่ติดต่อ สาขาวิชาจุลชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี 111 ถนน มหาวิทยาลัย ต.สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000 E-mail : wilairat@g.sut.ac.th

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี