รายงานการวิจัย

การเหนี่ยวนำเซลล์ไฟโบรบลาสต์ไปเป็นเซลล์เซลล์ประสาทโดปามิเนอจิก

Directed programming fibroblasts toward dopaminergic neuronal fate

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-304-60-24-21

รายงานการวิจัย

การเหนี่ยวนำเซลล์ไฟโบรบลาสต์ไปเป็นเซลล์เซลล์ประสาทโดปามิเนอจิก

Directed programming fibroblasts toward dopaminergic neuronal fate

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รศ.ดร. ปริญญา น้อยสา

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีปีงบประมาณ 2560-2561

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

พฤศจิกายน 2564

บทคัดย่อ

โดปามีนเป็นสารสื่อประสาทที่ผลิตในเซลล์ประสาทโดปามีน การทำงานผิดปกติของสารสื่อประสาทโดปามีนสามารถเกิดความผิดปกติที่หลายอย่าง เช่น โรคพาร์กินสัน (PD) จุดมุ่งหมายของการศึกษานี้คือการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไฟโบรบลาสต์มนุษย์ (hNF) โดยการเหนี่ยวนำด้วยสารโมเลกุล HPI1 และ NZ ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบทั้งระหว่างการเหนี่ยวนำ HPI1 หรือ NZ เพียงตัวเดียวและแบบเหนี่ยวนำ HPI1 และ NZ ร่วมกัน ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเซลล์ hNF สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ประสาทโดปามีนด้วยโมเลกุลขนาดเล็ก การเหนี่ยวนำร่วมกันระหว่าง (HPI1) และ neurodazine (NZ) ในเซลล์ hNF หลังการรักษาเป็นเวลา 10 วันทำให้ยีนไฟโบรบลาสต์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (Col1A1, Col1A2, Col3A1, KRT18 และ Elastin) และโปรตีนจำเพาะของไฟโบรบลาสต์ (ColA1) และเพิ่มขึ้นยีนมาร์กเกอร์ของเซลล์ประสาท (Tuj, PAX6 และ SOX1) และโปรตีนจำเพาะต่อเซลล์ประสาท (Tuj) ในเวลาเดียวกัน เซลล์ hNF หลังการรักษาได้เพิ่มปัจจัยการถอดรหัสของเซลล์ประสาทโดปามีนอย่างมีนัยสำคัญ (TH, FOXA2, Nuur1, EN1, Pixt3 และ LAMX1B) และโปรตีนของเซลล์ประสาทโดปามีน (TH, Tuj และโดปามีน) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ การตรวจสอบเส้นทางการส่งสัญญาณของ autophagy แสดงให้เห็นว่าการเหนี่ยวนำร่วมกันของ HPI1 และ NZ ในเซลล์ hNF เป็นเวลา 10 วัน พบว่าทำให้ยีน autophagy เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (LC3, ATG5 และ ATG12) ในขณะที่ยีน apoptotic ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการเหนี่ยวนำเซลล์ไฟโบรบลาสต์ไปเป็นเซลล์ปามิเนอร์จิก ต้องใช้ทั้งสาร HPI1 และ Nz เนื่องจาก HPI1 หรือ Nz เพียงอย่างเดียวไม่สามารถกระตุ้นยีนและโปรตีนโดปามีนได้หลังการเหนี่ยวนำเป็นเวลา 10 วัน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Abstract

Dopamine is a neurotransmitter that is produced in the dopaminergic neurons. Dopamine neurotransmission impairment underlies a wide range of disorders from motor control deficiencies, such as Parkinson's disease (PD). The aim of this study is investigated transdifferentiation of human neonatal fibroblast (hNF) cells by alone and combination treatment of hedgehog pathway inhibitor (HPI1) and neurodazine (NZ). The results demonstrate that hNF cells can differentiated to a dopaminergic neuron by small molecules. The combination of hedgehog pathway inhibitor (HPI1) and neurodazine (NZ) on hNF cells post treatment for 10 days were significantly decrease the fibroblast marker gene (*Col1A1*, *Col1A2*, *Col3A1*, *KRT18* and *Elastin*) and fibroblast-specific protein (ColA1) and increase neuron marker gene (*Tuj*, *PAX6* and *SOX1*) and neuron-specific protein (Tuj). In the same time, hNF cells post treatment were significantly increase the transcription factors of dopaminergic neuron (*TH, FOXA2, Nuur1, EN1, Pixt3* and *LAMX1B*) and dopaminergic neuron proteins (TH, Tuj and dopamine). Investigation the signaling pathway of autophagy demonstrated that combination of HPI1 and NZ on hNF cells post treatment were significantly increase autophagy gene (*LC3*, *ATG5* and *ATG12*) while significantly decrease in apoptotic gene. Moreover, dopaminergic neuron requires a combination treatment to differentiate, because HPI1 and NZ alone can't stimulate the dopaminergic genes and proteins.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปี พ.ศ. 2560-2561 เป็นงานวิจัยเพื่อศึกษาคุณสมบัติทางด้านเซลล์และอณูชีววิทยาของเซลล์ประสาทโดปามิเนอจิกที่ได้จากการเหนี่ยวนำเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ศึกษา transcription factors ที่มีการแสดงออกสูงในเซลล์ประสาทโดปามิเนอจิกว่ามี กลไก หน้าที่ และความสำคัญ อย่างไรต่อการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ไปเป็นเซลล์ประสาทโดปามิเนอจิก เพื่อทราบถึงกลไกควบคุมการพัฒนาเซลล์ประสาทโดปามิเนอจิกที่จะสามารถนำไปเพิ่มประสิทธิภาพการสร้างเซลล์ประสาทโดปามิเนอจิกเพื่อใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคพาร์คินสันได้ในอนาคต

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)ที่ได้ให้การสนับสนุนทุนในการทำวิจัยนี้ ขอขอบคุณผู้เกี่ยวข้องทุกฝ่ายที่ได้ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ทั้งความสะดวกในการใช้อุปกรณ์และเครื่องมือวิเคราะห์ ตลอดจนสถานที่ในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่ให้การช่วยเหลืออำนวยความสะดวกด้วยดีตลอดมา ขอขอบคุณผู้ร่วมวิจัยที่อุทิศกำลังกายและกำลังใจช่วยในการวิจัยครั้งนี้ลุล่วงได้ด้วยดี ประโยชน์อันใดที่เกิดจากงานวิจัยนี้ย่อมเป็นผลมาจากความกรุณาของท่านและหน่วยงาน ผู้วิจัยจึงใคร่ขอขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

รศ.ดร.ปริญญา น้อยสา
25 พฤศจิกายน 2564

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ข
กิตติกรรมประกาศ..... ค
สารบัญ..... ง
สารบัญภาพ..... จ

บทที่ 1 บทนำ..... 1
ความเป็นมาและความสำคัญ..... 1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2
เป้าหมาย/ผลผลิต.....2
ตัวชี้วัดความสำเร็จของโครงการ..... 2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 3

บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....5

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....12

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ 17

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย 23

บรรณานุกรม.....25

ประวัติผู้วิจัย 29

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

รูปที่ 1 การเหนี่ยวนำเซลล์ประสาทของเซลล์ hNF ด้วยโมเลกุลขนาดเล็ก (HPI1 และ NZ) เป็นเวลา 10 วัน โดยการตรวจสอบการแสดงออกต่อยีนจำเพาะเซลล์ประสาท (TUJ1, SOX1 และ PAX6) และยีนจำเพาะต่อไฟโบรบลาสต์ (CO1A1, KRT18,CO1A2, CO3A1 และ Elastin) 16

รูปที่ 2 ความสามารถในการเหนี่ยวนำเซลล์ hNF ให้กลายเป็นเซลล์ประสาทโดพามิเนอร์จิกได้ โดยตรวจสอบการแสดงออกของยีน dopaminergic neuron (TH, FOXA2, Nuur1, EN1, Pixt3 และ LAMX1B) และโปรตีน dopaminergic neuron และ TH หลังได้รับ HPI1 และ NZ เป็นเวลา 10 วัน 18

รูปที่ 3 การแสดงออกของของยีน autophagy เช่น LC3I/II, ATG5 และ ATG12 และ ยีน apoptotic (Bcl1, BAX) โดยวิธี RT-PCR การแสดงออกของ โปรตีน LC3I/II ด้วยวิธี immunofluorescence หลังได้รับ HPI1 และ NZ เป็นเวลา 10 วัน.....21

รูปที่ 4 ผลการทดสอบว่าโมเลกุลขนาดเล็กของ Nz และ HPI1 โดยการใช้แยกกัน มีกิจกรรมกระตุ้นการสร้าง เซลล์ประสาทในเซลล์ hNF โดยการตรวจสอบมาร์กเกอร์ ไฟโบรบลาสต์ (Elastin, KRT18, Col1A1) และ ยีนมาร์กเกอร์ของเซลล์ประสาท (Pax6, SOX1, Tuj) หลังได้รับ Nz หรือ HPI1 เป็นเวลา 10 วัน.....23

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญ

โรคการเสื่อมของระบบประสาทนั้นเกิดมาจากการเสื่อมสภาพและการทำงานบกพร่องของเซลล์ประสาทภายในสมอง ซึ่งสาเหตุการเกิดโรคนั้น ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ตัวอย่างของโรคการเสื่อมของระบบประสาทที่พบบ่อยนั้น ได้แก่ โรคอัลไซเมอร์ และ โรคพาร์คินสัน นอกจากโรคทั้งสองโรคนี้แล้วยังพบอีกด้วยว่าการที่เส้นเลือดในสมองแตกหรือการบาดเจ็บที่สมองขึ้นรุนแรงนั้นก็อาจมีสาเหตุมาจากการการทำงานที่บกพร่องของเซลล์ประสาทอีกด้วย การระบาดของโรคเหล่านี้ซึ่งพบเห็นได้อย่างแพร่หลายทั้วโลกตามการรายงานการพบเห็นในแต่ละปีนั้น ทำให้วงการแพทย์มีการตื่นตัวที่จะคิดหาวิธีการฟื้นฟูการเสื่อมสภาพของเซลล์ และการซ่อมแซมการทำงานของเซลล์ให้กลับมาใช้ได้เหมือนเดิมได้ [1,2]

โรคพาร์คินสัน (Parkinson's disease) เป็นโรคสมองเสื่อมฝ่อที่ความชุกเป็นลำดับที่ สองรองจากโรคอัลไซเมอร์ ชื่อของโรคนี้ตั้งเป็นเกียรติแก่นายแพทย์ James Parkinson ซึ่งเป็น คนแรกที่อธิบายโรคนี้เมื่อกว่าศตวรรษมาแล้ว อาการที่เด่นชัดของโรคคืออาการที่เกี่ยวข้องกับการ เคลื่อนไหว เช่น กล้ามเนื้อแข็งเกร็ง (rigidity) เคลื่อนไหวช้า (bradykinesia) โดยเฉพาะเมื่อ เริ่มต้นเคลื่อนไหว (initiation of movement) มือสั่นขณะพัก (resting tremor) การทรงตัวหรือ ท่าทางที่ผิดปกติ (gait disturbance) และการเสื่อมลงของรีเฟลกซ์การทรงตัว (postural reflex impairment) นอกจากนั้น ยังมีความผิดปกติของการเดินที่ก้าวสั้น ๆ เดินที่อ ๆ ไม่แกว่งแขน ความผิดปกติในการกลืน เป็นต้น และยังมีอาการผิดปกตินอกเหนือจากความผิดปกติของการ เคลื่อนไหว (non-motor symptoms) ได้แก่ ซึมเศร้า ความจ าเสื่อม การดมกลิ่นเสื่อมลง อ่อนเพลียง่าย การท างานของระบบทางเดินอาหารผิดปกติ น้ำหนักตัวลดลง ความผิดปกติของการ นอน ฯลฯ อาการต่าง ๆ เหล่านี้ท าให้ผู้ป่วยช่วยเหลือตัวเองไม่ค่อยได้ การดำรงชีวิตประจำวัน ค่อนข้างลำบาก และคุณภาพชีวิตเสื่อมลง เช่นเดียวกับโรคสมองเสื่อมฝ่อทั้งหลาย ผู้ป่วยต้องได้รับ การดูแลอย่างใกล้ชิด รักษาอย่างต่อเนื่องตลอดชีวิต ค่าใช้จ่ายในการรักษาที่สูง ท าให้เป็นภาระแก่ ญาติหรือผู้ใกล้ชิดและแก่สังคมโดยรวม ความชุกของโรคนี้ประมาณ 0.5-1% ของประชากรทั้งโลก และเพิ่มขึ้นเป็น 4% ของผู้ที่อายุมากกว่า 65 ปีขึ้นไป1 โรคนี้มักเกิดกับผู้ที่มีอายุเกิน 55 ปี เกิดกับ ผู้ชายมากกว่าผู้หญิง และความชราเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญที่สุดของโรคนี้ ดังนั้นจึงคาดว่าใน อนาคตจะมีผู้เป็นโรคนี้สูงขึ้น เนื่องจากขณะนี้ประเทศต่าง ๆในโลกอยู่ในสังคมของผู้สูงอายุและมีจำนวนของผู้สูงอายุเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ขณะนี้ยังไม่ทราบสาเหตุที่แท้จริงของโรคนี้ แต่ทราบว่า ปัจจัยเสี่ยงต่อโรคนี้นอกเหนือจากความชราแล้ว ยังมีปัจจัยเสี่ยงอื่น ๆ ได้แก่ การสัมผัสกับยากำจัด ศัตรูพืช การอาศัยอยู่ในชนบท การดื่มน้ำบาดาล การได้รับโลหะหนัก (เช่น แมงกานีส) เป็นต้น พยาธิสภาพในสมองผู้ป่วยที่เด่นชัดคือมีการตายของเซลล์ประสาทโดพามีน (dopamine) อย่าง ต่อเนื่องใน substantia nigra par compacta ทำให้สารสื่อประสาทโดพามีนใน striatum ลดลง อย่างมาก การรักษาโรคนี้มักจะให้ยาที่เพิ่มการสังเคราะห์โดพามีน (เช่น L-dopa + carbidopa, L-dopa + benserazide, entacapone) ยาที่ลดการกำจัดโดพามีน

(selegiline) ยาที่กระตุ้น ตัวรับโดพามีน (pramiplexole, ropinirole) ซึ่งบางครั้งอาจเรียกว่าเป็นการรักษาโดยให้ยา ทดแทนโดพามีนที่พร่องไป (dopamine replacement therapy) แม้ว่าการรักษาด้วยยาดังกล่าวจะให้ประสิทธิผลที่ดีในระยะแรกของโรคและเมื่อเริ่มใช้ยา แต่ประสิทธิผลของการรักษาจะค่อย ๆ ลดลงจนในที่สุดการรักษาจะล้มเหลวและอาการของผู้ป่วยจะทรุดลงอย่างรวดเร็ว เช่นเดียวกับโรค สมองเสื่อมฝ่ออื่น ๆ การรักษาด้วยยาที่มีใช้ในปัจจุบันเป็นการรักษาตามอาการโดยที่ไม่ได้ก าจัด ต้นเหตุของการเกิดโรคหรือการเกิดสมองเสื่อมฝ่อแต่อย่างใด นอกเหนือจากข้อจำกัดที่การรักษา ที่ได้ผลระยะสั้นมักไม่เกิน 5 ปีแล้ว การรักษาโดยการเพิ่มการทำงานของระบบประสาทโดพามีนใน ระยะยาวไม่สามารถลดอาการนอกเหนือจากความผิดปกติของการเคลื่อนไหว 6 และยังท าให้เกิด ผลไม่พึงประสงค์ที่เป็นอุปสรรคในการรักษาผู้ป่วยอีกหลายประการ เช่น การเคลื่อนไหวผิดปกติ โดยไม่ได้ตั้งใจ (abnormal involuntary movements หรือบางครั้งเรียกว่า dyskinesia) ปรากฏการณ์ on-off (เมื่อการรักษานานขึ้น ช่วงเวลาที่ตอบสนองต่อยาจะสั้นลงเรื่อย ๆ) [3]

2. วัตถุประสงค์

ศึกษาวิธีการเหนี่ยวนำเซลล์ไฟโบรบลาสต์ไปเป็นเซลล์ประสาทโดปามิเนอจิก ศึกษาคุณสมบัติทางด้านเซลล์และอณูชีววิทยาของเซลล์ประสาทโดปามิเนอจิกที่ได้จากการเหนี่ยวนำเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ศึกษาคุณสมบัติทางด้านสรีรวิทยาของเซลล์ประสาทโดปามิเนอจิกที่ได้จากการเหนี่ยวนำเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ศึกษา transcription factors ที่มีการแสดงออกสูงในเซลล์ประสาทโดปามิเนอจิกว่ามี กลไก หน้าที่ และความสำคัญอย่างไรต่อการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ไปเป็นเซลล์ประสาทโดปามิเนอจิก

3. เป้าหมาย/ผลผลิต

เซลล์ประสาทโดปามิเนอจิกที่ได้จากการเหนี่ยวนำไฟโบรบลาสต์แสดงลักษณะทางชีววิทยาของเซลล์ประสาทได้เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารเคมี เข้าใจถึงกลไกระดับโมเลกุลของกระบวนการเหนี่ยวนำไฟโบรบลาสต์ ไปเป็นเซลล์ประสาทโดปามิเนอจิก

4. ตัวชี้วัดความสำเร็จของโครงการ

1. ผลงานวิจัย ได้รับการตีพิมพ์ระดับชาติ หรือนานาชาติ
2. บุคลากรด้านการวิจัยและนวัตกรรมเพิ่มขึ้น

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถสร้างเซลล์ประสาทโดปามิเนอจิกจากเซลล์ไฟโบรบลาสต์ได้ สามารถได้เซลล์ที่มีคุณสมบัติคล้ายเซลล์ประสาทโดปามิเนอจิกที่สามารถนำเซลล์นี้ไปศึกษาชีววิทยาของเซลล์ประสาทโดปามิเนอจิกได้ต่อไป สามารถเซลล์ประสาทโดปามิเนอจิกที่ได้สามารถเพาะเลี้ยงในห้องทดลองได้และนำไปทดสอบวัดระดับความเป็นพิษของสารเคมีที่มีต่อเซลล์ในระบบประสาทได้ ทราบถึงกลไกควบคุมการพัฒนาเซลล์ประสาทโดปามิเนอจิกที่จะสามารถนำไปเพิ่มประสิทธิภาพการสร้างเซลล์ประสาทโดปามิเนอจิกเพื่อใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคพาร์คินสันได้ สามารถตีพิมพ์ผลงานในวารสารวิชาการนานาชาติได้อย่างน้อย 1 เรื่อง และนำเสนอผลงานวิจัยในระดับนานาชาติได้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาที่จุดประกายถึงบทบาทของแคฟเฟอีนในโรคพาร์คินสันเกิดประมาณเกือบ 20 ปีที่แล้วเมื่อ ดร. W. Hellenbrand และคณะ (1996) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอาหารที่บริโภค กับโรคพาร์คินสันและพบว่ามีอาหารหลายชนิดที่ลดความเสี่ยงของโรคนี้ได้ซึ่งหนึ่งในรายการ อาหารนี้คือกาแฟ9 รายงานวิจัยของ ดร. P.A. Fall และคณะสนับสนุนว่าการดื่มกาแฟสามารถ ลดการเกิดโรคพาร์คินสันได้10 การศึกษาที่ได้รับการยอมรับมากคือการศึกษาในชาวอเมริกันเชื้อ สายญี่ปุ่นในฮาวาย 8,004 คนของโครงการ Honolulu Heart Program ที่ติดตามผลนาน 30 ปี พบว่าการบริโภคแคฟเฟอีนจากกาแฟหรือจากแหล่งอื่นต่างลดความเสี่ยงการเป็นโรคพาร์คินสันได้ อย่างมีนัยสำคัญ แต่กาแฟที่สกัดแคฟเฟอีนออกไม่ลดความเสี่ยงนี้11 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัย ขนาดใหญ่ที่ติดตามผลไปข้างหน้าในโครงการ the Health Professionals' Follow-up Study และ the Nurses' Health Study ที่ประกอบด้วยอาสาสมัครชาย 47,351 คนและหญิง 88,565 คนที่พบว่าผู้ชายที่บริโภคแคฟเฟอีน ดื่มกาแฟ หรือดื่มชาสามารถลดการเกิดโรคพาร์คินสันได้อย่าง มีนัยสำคัญ แต่การดื่มกาแฟที่สกัดแคฟเฟอีนออกไม่ลดความเสี่ยงต่อโรคนี้ส่วนความสัมพันธ์ ระหว่างการบริโภคแคฟเฟอีนหรือการดื่มกาแฟกับโรคพาร์คินสันในผู้หญิงเป็นแบบรูปตัว U โดย การดื่มกาแฟ 1-3 ถ้วยจะป้องกันได้ดีที่สุด12 ส่วนการศึกษาแบบ case-control ของ ดร. M.D. Benedetti และคณะพบว่าการดื่มกาแฟป้องกันโรคพาร์คินสันได้ถึง 65% และการป้องกันนี้ สัมพันธ์กับปริมาณกาแฟที่ดื่มด้วย13 การศึกษาแบบ case-control ของ ดร. Paganini-Hill ใน อาสาสมัครวัยเกษียณอายุที่อยู่ในหมู่บ้านทางตอนใต้ของมลรัฐแคลิฟอร์เนียก็ชี้ว่าการดื่มกาแฟวัน ละ 2 ถ้วยหรือมากกว่านี้สามารถป้องกันโรคพาร์คินสันได้อย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน14 ในปี2002 Hernan และคณะวิเคราะห์ผลจาก 13 งานวิจัย (8 case-control และ 5 cohort) และสรุปผลการวิเคราะห์ว่าการดื่มกาแฟสามารถลดความเสี่ยงของโรคพาร์คินสันได้ ประมาณ 31% (ความเสี่ยงสัมพัทธ์หรือ relative risk 0.69, ความเชื่อมั่น 95% หรือ 95% confidence interval = 0.59-0.80)15 หลังจากนั้น มีงานวิจัยจำนวนมากที่สนับสนุนว่า การบริโภคแคฟเฟอีนหรือการดื่มกาแฟสามารถป้องกันการเกิดโรคพาร์คินสันได้[4-5] นอกจากแคฟเฟอีนและการดื่มกาแฟแล้ว ผลการวิจัยยังพบว่าการดื่มชาก็สามารถลดความเสี่ยงการเกิดโรค พาร์คินสันได้เช่นกัน [6-8] และการลดความเสี่ยงนี้จะแปรผันไปตามปริมาณกาแฟหรือชาที่ดื่ม มากขึ้น [9-13] ผลลดความเสี่ยงต่อโรคพาร์คินสันของกาแฟและชานี้ ถ้าปรับผล ที่เกิดจากแคฟเฟอีนออกแล้ว จะพบว่าการดื่มกาแฟและชาจะไม่มีผลลดความเสี่ยงการเกิดโรค พาร์คินสันอีกต่อไป ซึ่งแสดงว่าผลของการดื่มกาแฟหรือชาเกิดจากแคฟเฟอีนในกาแฟหรือ ชา [14-18] นอกจากนั้น การดื่มกาแฟที่สกัดแคฟเฟอีนออกจะไม่ลดความเสี่ยงในการเกิดโรคพาร์คินสัน[19-20] ซึ่งช่วยสนับสนุนให้แน่นหนาขึ้นว่าแคฟเฟอีนเป็นสารออกฤทธิ์สำคัญของ กาแฟและชาในการป้องกันโรคพาร์คินสัน อย่างไรก็ตาม มีบางการศึกษาที่ไม่พบว่าการดื่มกาแฟ หรือการบริโภคแคฟเฟอีนสามารถป้องกันโรคพาร์คินสันได้[21-23]

แคฟเฟอีนป้องกันสมองฝ่อในรูปแบบจ าลองโรคพาร์คินสันในสัตว์ทดลอง MPTP เป็นสารพิษต่อเซลล์ประสาทโดพามีน เมื่อให้สารนี้แก่สัตว์ทดลองโดยการฉีดเข้า ช่องท้อง (intraperitoneal injection) จะทำให้มีการท าลายและลดจำนวนเซลล์ประสาทโดพา มีนในสมองโดยเฉพาะที่ striatum และท าให้สัตว์ทดลองมีพยาธิสภาพและมีอาการบางอย่างคล้าย โรคพาร์คินสันในคน ดังนั้นจึงนิยมใช้ MPTP เหนี่ยวน าให้เกิดพาร์คินสันในสัตว์ทดลองเพื่อใช้ ศึกษาพยาธิสภาพ รวมทั้งศึกษายาป้องกันหรือรักษาโรคนี้การศึกษาที่ให้แคฟเฟอีนในขนาด 5-30 มก./กก. (ซึ่งเป็นปริมาณเทียบเท่ากับที่บริโภคปกติในคน) ก่อนการให้MPTP แก่หนูถีบจักรจะ สามารถต้านพิษที่ท าลายเซลล์ประสาทโดพามีนในสมองส่วน striatum ได้ตามขนาดของแคฟเฟ อีนที่หนูถีบจักรได้รับ51 ซึ่งสอดคล้องกับอีกรายงานวิจัยที่แสดงว่าแคฟเฟอีนต้านพิษของ MPTP ในการทำลายเซลล์ประสาทโดพามีนในสมองส่วน substantia nigra ได้[24-25] ที่น่าสนใจอย่างยิ่งคือไม่มีการทน (tolerance) ต่อฤทธิ์ป้องกันการท าลายสมองนี้เมื่อได้รับแคฟเฟอีนติดต่อกันนาน ๆ ซึ่งต่างจากฤทธิ์การกระตุ้นสมองของแคฟเฟอีนที่มีการทนต่อฤทธิ์กระตุ้นสมองค่อนข้างเร็ว [26] นอกจากนี้ แคฟเฟอีนยังสามารถป้องกันการท าลายเซลล์ประสาทโดพามีนของสมองจากพิษของ 6-hydroxy-dopamine ที่ฉีดเข้าทางโพรงสมอง (intracerebroventricular injection) ของหนู ขาว[27-28] หรือจากพิษของสารก าจัดศัตรูพืช เช่น สารก าจัดวัชพืช (paraquat, พาราควอท) หรือ สารก าจัดแมลงกลุ่ม carbamates ที่ฉีดเข้าช่องท้องของหนูถีบจักร [29-30]

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

1. การเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์

เซลล์ไฟโบรบลาสต์จะถูกเลี้ยงในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO2 ด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ High-glucose DMEM/F12 ที่เติม Fetal bovine serum 10%, L-glutamine 2 mM, Penicillin 100 U/ml และ Streptomycin 100 g/ml โดยน้ำยาเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนวันเว้นวัน และเมื่อเซลล์หนาแน่น 90-100% แล้ว เซลล์จะถูก subculture ด้วย 0.02% EDTA ใน DPBS โดยหลังจาก subculture เซลล์ถูกย้ายไปจานเลี้ยงเซลล์ใหม่ที่ความหนาแน่น 104 เซลล์ ต่อ ตารางเซนติเมตร

2. การศึกษาคุณสมบัติของเซลล์เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผิวหนัง

คุณสมบัติของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผิวหนังจะถูกยืนยันด้วยการแสดงออกของยีนและโปรตีนจำเพาะ เช่น Cytokeratin18, Collagen IA1, Collagen IIIA1, Collagen IIA1 และ Elastin โดยผู้วิจัยจะยืนยันการแสดงออกของยีนเหล่านี้ทั้งในระดับ RNA และ โปรตีน ด้วยเทคนิค RT-PCR และ immunofluorescence

3. การพัฒนาวิธีการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผิวหนังไปเป็นเซลล์ประสาทโดปามิเนอจิก เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผิวหนังจะถูกเหนี่ยวนำไปเป็นเซลล์ประสาทโดปามิเนอจิกด้วยสารโมเลกุลของ HPI1 และ NZ โดยผู้วิจัยจะทดสอบการแสดงของยีนต่อไปนี้ TH, LMX1a, SOX2, NURR1, EN1 และ PITX3 โดยวิธี RT-PCR และตรวจสอบการแสดงออกโปรตีน โดปามิเนอจิก โดยวิธี immunofluorescence ซึ่งมีรายงานว่ามีความจำเป็นต่อการเจริญของเซลล์ประสาทโดปามิเนอจิก โดยหลังจากได้สูตรน้ำยาเหนี่ยวนำและกลุ่มยีนที่เหมาะสมต่อการสร้างเซลล์ประสาทโดปามิเนอจิกแล้ว ไปตรวจสอบระดับโดปามีนด้วย DA Elisa kit

4. การตรวจสอบประสิทธิภาพของวิธีการเหนี่ยวนำเซลล์ประสาทโดปามิเนอจิก การแสดงออกของยีนและโปรตีนที่สำคัญต่อการพัฒนาของเซลล์ประสาทโดปามิเนอจิกจะถูกติดตามอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาของกระบวนการเหนี่ยวนำ โดยคุณลักษณะความเป็นเซลล์ประสาทโดปามิเนอจิกต่างๆจะถูกทดสอบ เช่น การแสดงออกของยีนและโปรตีนจำเพาะ ความสามารถในการหลั่งสารประสาทโดปามิน และความสามารถในบรรเทาอาการของโรคพาร์คินสันในสัตว์ทดลอง เป็นต้น โดยการทดลองในขั้นนี้จะทำที่ห้องปฏิบัติการวิจัยสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

6. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนจำเพาะต่อเซลล์ประสาทโดปามิเนอจิก เซลล์ประสาทโดปามิเนอจิกที่ได้จากการเหนี่ยวนำสามารถตรวจสอบได้จากการแสดงออกของโปรตีนจำเพาะชนิดต่างๆ ดังนั้นเพื่อเป็นการพิสูจน์ว่าเซลล์ที่ได้จากการทดลองนี้มีคุณสมบัติคล้ายเซลล์ประสาทโดปามิเนอจิกจริง ผู้วิจัยจะตรวจสอบการแสดงออกของยีนและโปรตีนจำเพาะชนิดต่างๆทั้งก่อนและหลังการถูกเหนี่ยวนำ โดยเซลล์ที่ได้หลังการเหนี่ยวนำจะถูกนำมาตรวจสอบการแสดงออกของยีนและโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับเซลล์ประสาทโดปามิเนอจิกเพื่อ

ยืนยันประสิทธิภาพของวิธีการเหนี่ยวนำ โดยวิธีการตรวจสอบการแสดงออกของยีนจะใช้การทำพีซีอาร์ปกติ (conventional RT-PCR) เพื่อดูระดับการแสดงออกของยีนจำเพาะต่อเซลล์ประสาทโดปามิเนอจิก เช่น Tyrosine Hydroxylase (TH), Vesicular Monoamine Transporter 2 (VMAT2) และ Engrailed 1 (EN1) เป็นต้น โดย RNA ของเซลล์ที่ระยะต่างๆของการเหนี่ยวนำจะถูกแยกและเปลี่ยนเป็น complementary DNA (cDNA) ด้วยวิธี reverse transcription จากนั้น cDNA ที่ได้จะถูกนำไปตรวจสอบระดับการแสดงออกของกลุ่มยีนจำเพาะดังกล่าวด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนนั้นๆ การแสดงออกของยีนเหล่านี้ในระดับโปรตีนจะถูกยืนยันด้วยการย้อมโปรตีนด้วยแอนติบอดีจำเพาะต่างๆ (Immunocytochemistry) และทำการส่องกล้องจุลทรรศน์สำหรับส่องสารเรืองแสง

7. การศึกษาความสำคัญของ transcription factors หนึ่งๆต่อการพัฒนาเซลล์ประสาทโดปามิเนอจิก หลังจากได้เซลล์ประสาทโดปามิเนอจิกจากการเหนี่ยวนำเซลล์ไฟโบรบลาสต์แล้ว ผู้วิจัยจะค้นหาว่ามียีนใดบ้างที่มีความจำเป็นต่อการพัฒนาเซลล์ประสาทโดปามิเนอจิกและมีการแสดงออกในระดับสูง โดยผู้วิจัยจะทดสอบหน้าที่และความสำคัญของยีนดังกล่าวต่อการพัฒนาของเซลล์ประสาทโดปามิเนอจิกโดยใช้การทดลองดังต่อไปนี้ 13.10. การยับยั้งการแสดงออก (knockdown of expression) ของยีนดังกล่าวในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผิวหนัง เซลล์ต้นไฟโบรบลาสต์จากผิวหนังจะถูกยับยั้งการแสดงออกของยีนหนึ่งๆด้วยเทคนิค RNA interference โดยลำดับเบสเป้าหมายจะถูกโคลนใส่ small hairpin RNA expression vector (pSuperior, Clonetech) ที่มี selectable antibiotics สำหรับคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับเวคเตอร์ดังกล่าวเข้าสู่เซลล์

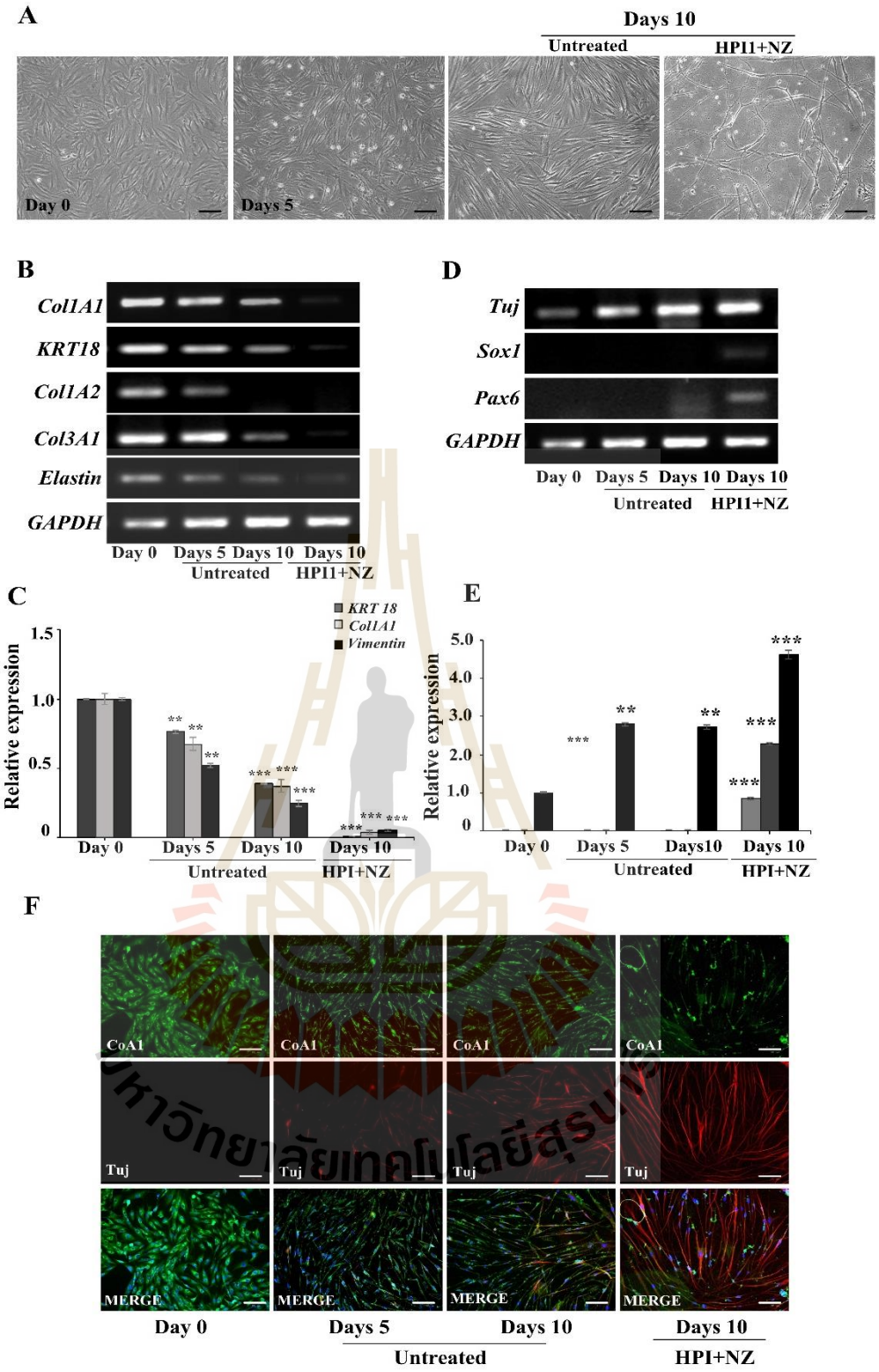
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ผลการทดลองที่ 1 การเหนี่ยวนำเซลล์ประสาทของเซลล์ hNF ด้วยโมเลกุลขนาดเล็ก

สำหรับการเหนี่ยวนำเซลล์ hNF เป็นเซลล์ประสาทโดยโมเลกุลขนาดเล็ก ซึ่งเซลล์ hNF ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กของ HPI1 และ NZ เป็นเวลา 5 และ 10 วัน โดยแบ่งเป็น 4 กลุ่ม การทดลองคือ 1. กลุ่มควบคุม day 0 2. กลุ่มควบคุม days 5 3. กลุ่มที่ได้รับ HPI1+NZ days 5 4. กลุ่มที่ได้รับ HPI1+NZ days ลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์เปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาเล็กน้อยในวันที่ 5 และในวันที่ 10 กลุ่มที่ใช้ร่วมกันระหว่าง HPI1 และ NZ เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างคล้ายเซลล์ประสาทมากขึ้น (รูปที่ A) จากนั้นตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่จำเพาะกับเซลล์ประสาท ผลลัพธ์แสดงให้เห็นว่ายีนจำเพาะของเซลล์ประสาทของ TUJ1, SOX1 และ PAX6 มีการแสดงเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ($p\text{-value} < 0.05$) ในวันที่ 10 ในกลุ่มที่ได้รับ HPI1 และ NZ ร่วมกัน เมื่อเทียบกับกลุ่มวันที่ 0 วันที่ 5 และวันที่ 10 (รูปที่ D และรูปที่ E) ในทางตรงกันข้าม การแสดงออก ยีนไฟโบรบลาสต์ในกลุ่มที่ได้รับ HPI1 และ NZ เป็นเวลา 10 วันแสดงให้เห็นว่ายีนไฟโบรบลาสต์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p\text{-value} < 0.05$) (CO1A1, KRT18,CO1A2, CO3A1 และ Elastin) เมื่อเทียบกับกลุ่มวันที่ 0 วันที่ 5 และวันที่ 10 (ที่ไม่ได้รับ HPI1 และ NZ) (รูปที่ B และ C) การแสดงออกยีนไฟโบรบลาสต์ซึ่งสอดคล้องกับผลของโปรตีนโดยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนส์พบว่าในวันที่ 10 ของกลุ่ม HPI1 และ NZ ร่วมกัน มีการแสดงออกของ TUJ1 เพิ่มขึ้นและ Col1A1 ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมใน วันที่ 0 วันที่ 5 และวันที่ 10 ตามลำดับ (รูปที่ F). ผลการวิจัยพบว่าโมเลกุลขนาดเล็ก (HPI1 และ NZ) สามารถกระตุ้นเซลล์ hNF ไปยังเซลล์ประสาทได้ภายใน 10 วัน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

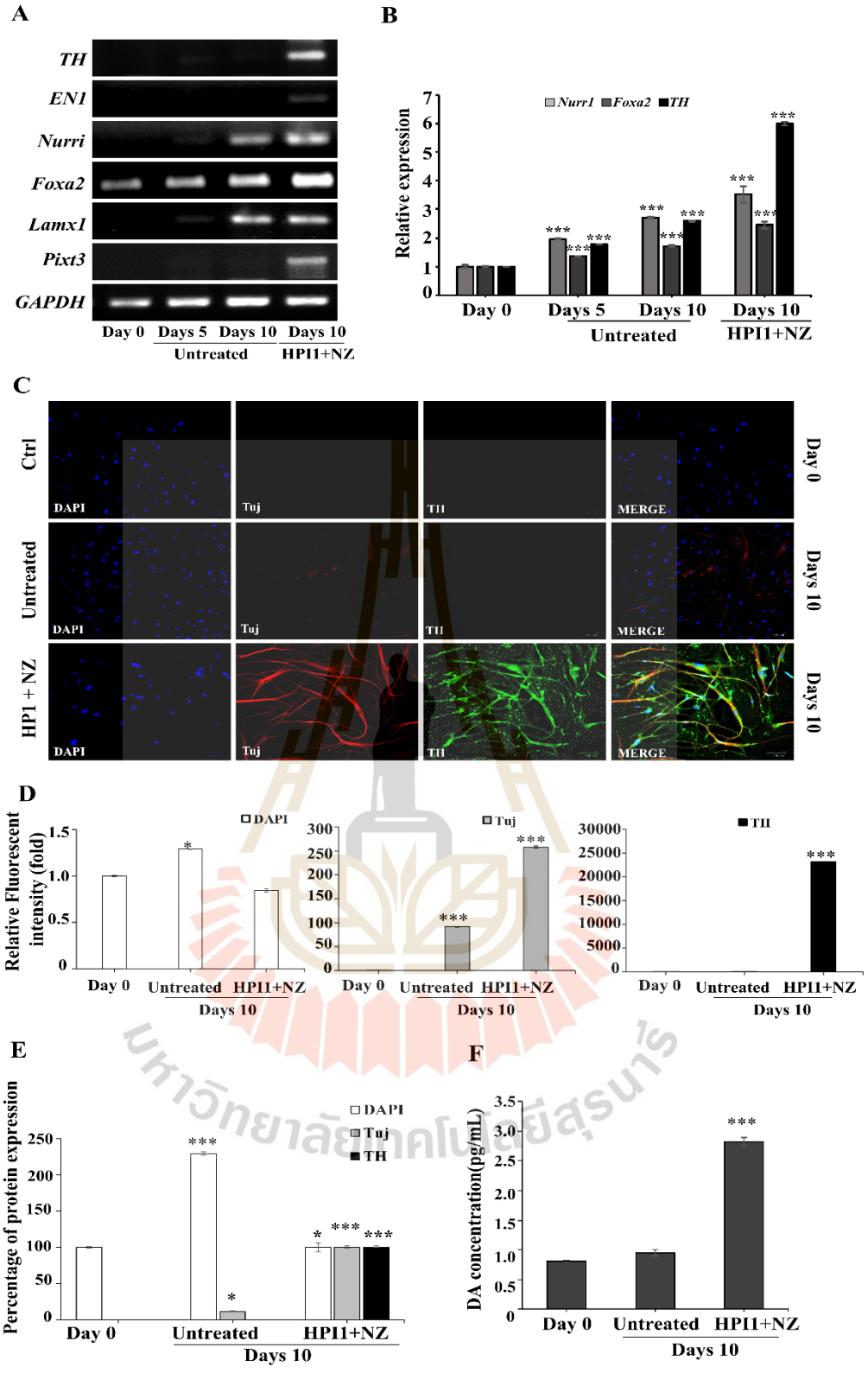


รูปที่ 1 การเหนี่ยวนำเซลล์ประสาทของเซลล์ hNF ด้วยโมเลกุลขนาดเล็ก (HPI1 และ NZ) เป็นเวลา 10 วัน โดยการตรวจสอบการแสดงออกต่อยีนจำเพาะเซลล์ประสาท (TUJ1, SOX1 และ PAX6) และยีนจำเพาะต่อไฟโบรบลาสต์ (CO1A1, KRT18,CO1A2, CO3A1 และ Elastin)

4.2 . ผลการทดสอบว่า Nz และ HPI1 สามารถกระตุ้นเซลล์ hNF ไปเป็นเซลล์คล้ายโดปามีนได้หรือไม่

ผลลัพธ์ก่อนหน้าของเราแสดงให้เห็นว่า HPI1 และ NZ สามารถกระตุ้นเซลล์ hNF ให้เป็นเซลล์ประสาทได้ ดังนั้นเราจึงตรวจสอบยีนของเซลล์ประสาทโดปามีน ผลจากการทดลองแสดงให้เห็นว่าเซลล์ hNF สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ประสาทโดปามีนได้โดยใช้โมเลกุลขนาดเล็ก การใช้ร่วมกันของ HPI1 และ NZ ในเซลล์ hNF หลังการรักษา 10 วัน ช่วยเพิ่มปัจจัยการถอดรหัสของยีน dopaminergic neuron (TH, FOXA2, Nuur1, EN1, Pixt3 และ LAMX1B) อย่างมีนัยสำคัญ (p-value < 0.05) (รูปที่ 2 A,2B) จากนั้นทำการยืนยันการแสดงออกของยีนด้วยการตรวจสอบระดับโปรตีนโดปามีน ด้วยชุด Elisa kit (รูปที่ 2 F) และ โปรตีน TH ด้วยวธีวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนส์ พบว่ากลุ่มที่ได้รับ HPI1 และ NZ ร่วมกัน พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีน dopaminergic neuron และ TH เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (p-value < 0.05) เมื่อเทียบกับกลุ่มวันที่ 0 วันที่ 5 และวันที่ 10 (ที่ไม่ได้รับ HPI1 และ NZ) (รูปที่ 2 C-E) ในการศึกษาของเราแสดงให้เห็นว่าการใช้ร่วมของโมเลกุลขนาดเล็กของ HPI1 และ NZ สามารถเปลี่ยนแปลงเซลล์ hNF ให้กลายเป็นเซลล์ประสาทโดพามิเนอร์จิกได้ โดยการตรวจสอบความสามารถในการแสดงออกของยีนและโปรตีนของเซลล์ประสาทโดปามีนหลังจากทดสอบด้วยโมเลกุลขนาดเล็กของ HPI1 และ NZ เป็นเวลา 10 วัน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

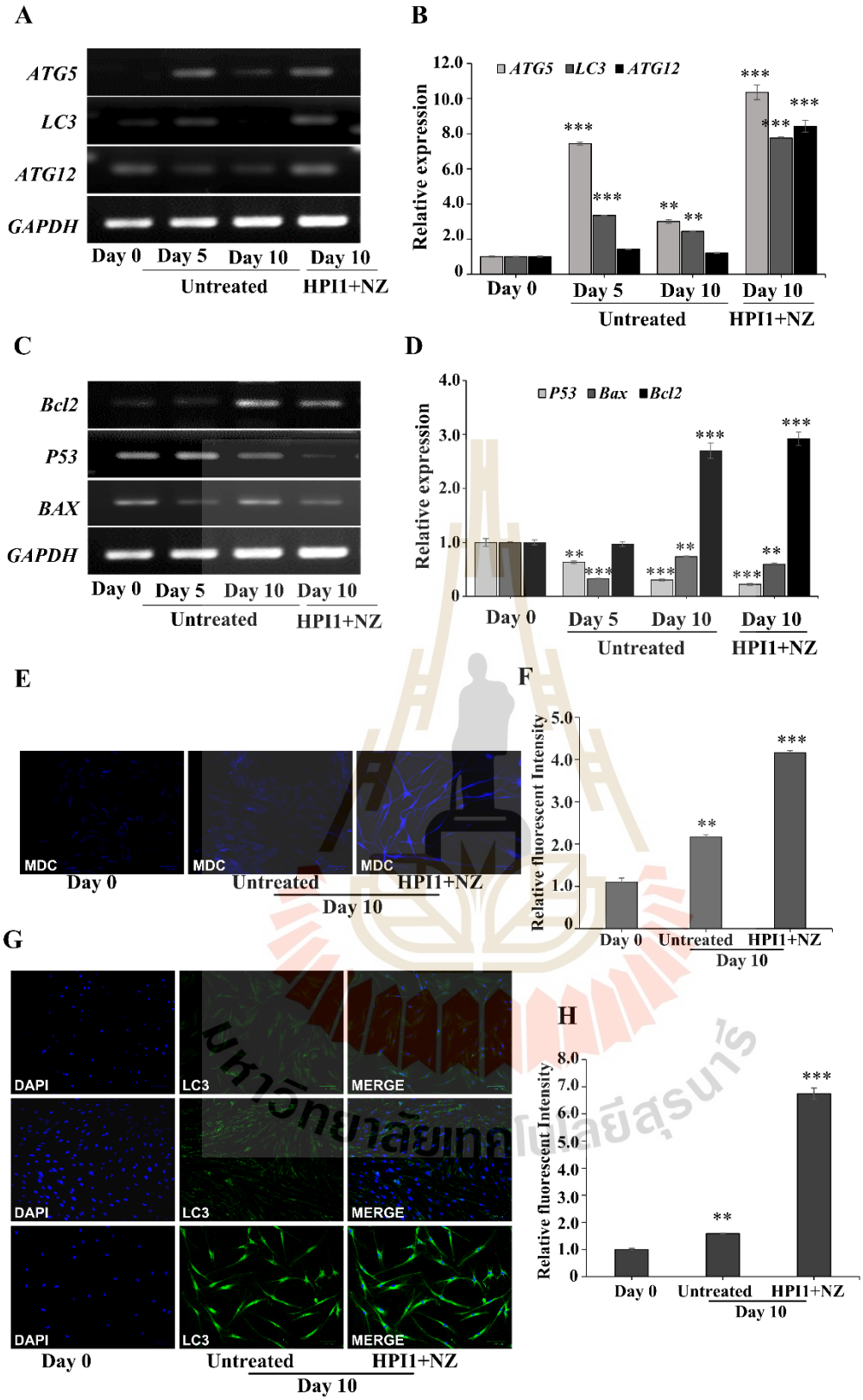


รูปที่ 2 ความสามารถในการเหนี่ยวนำเซลล์ hNF ให้กลายเป็นเซลล์ประสาทโดพามิเนอร์จิกได้ โดยตรวจสอบการแสดงออกของยีน dopaminergic neuron (TH, FOXA2, Nuur1, EN1, Pixt3 และ LAMX1B) และโปรตีน dopaminergic neuron และ TH หลังได้รับ HPI1 และ NZ เป็นเวลา 10 วัน

4.3 ตรวจสอบการใช้โมเลกุลขนาดเล็ก HPI1 และ NZ ร่วมกัน มีการแปลงแปลงต่อกิจกรรมของ autophagy และ apoptotic หรือไม่

เพื่อตรวจสอบว่าการใช้ร่วมกันระหว่าง HPI1 และ NZ สามารถเปลี่ยนแปลง autophagy ในเซลล์ hNF ได้หรือไม่ โดยการตรวจสอบแสดงออกของของยีน autophagy เช่น LC3I/II, ATG5 และ ATG12 ผลการทดสอบพบว่า กลุ่มที่ได้รับ HPI1 และ NZ ร่วมกันเป็นเวลา 10 วัน มีการแสดงออกของยีน autophagy เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (p-value < 0.05) (รูป A-B) ซึ่งสอดคล้องกับผลการแสดงออกของโปรตีน LC3I/II ที่มีการเพิ่มขึ้นในกลุ่มที่ได้รับ HPI1 และ NZ ร่วมกันเป็นเวลา 10 วัน เมื่อเทียบกับกลุ่มวันที่ 0 วันที่ 5 และวันที่ 10 (ที่ไม่ได้รับ HPI1 และ NZ) (รูป E-H) จากนั้นตรวจสอบดูการตายของเซลล์โดยการตรวจสอบยีน apoptotic (Bcl1, BAX) พบว่า ในวันที่ 10 ของกลุ่มที่ได้รับ HPI1 และ NZ และไม่ได้รับ HPI1 และ NZ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p-value < 0.05) (รูป C-D)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

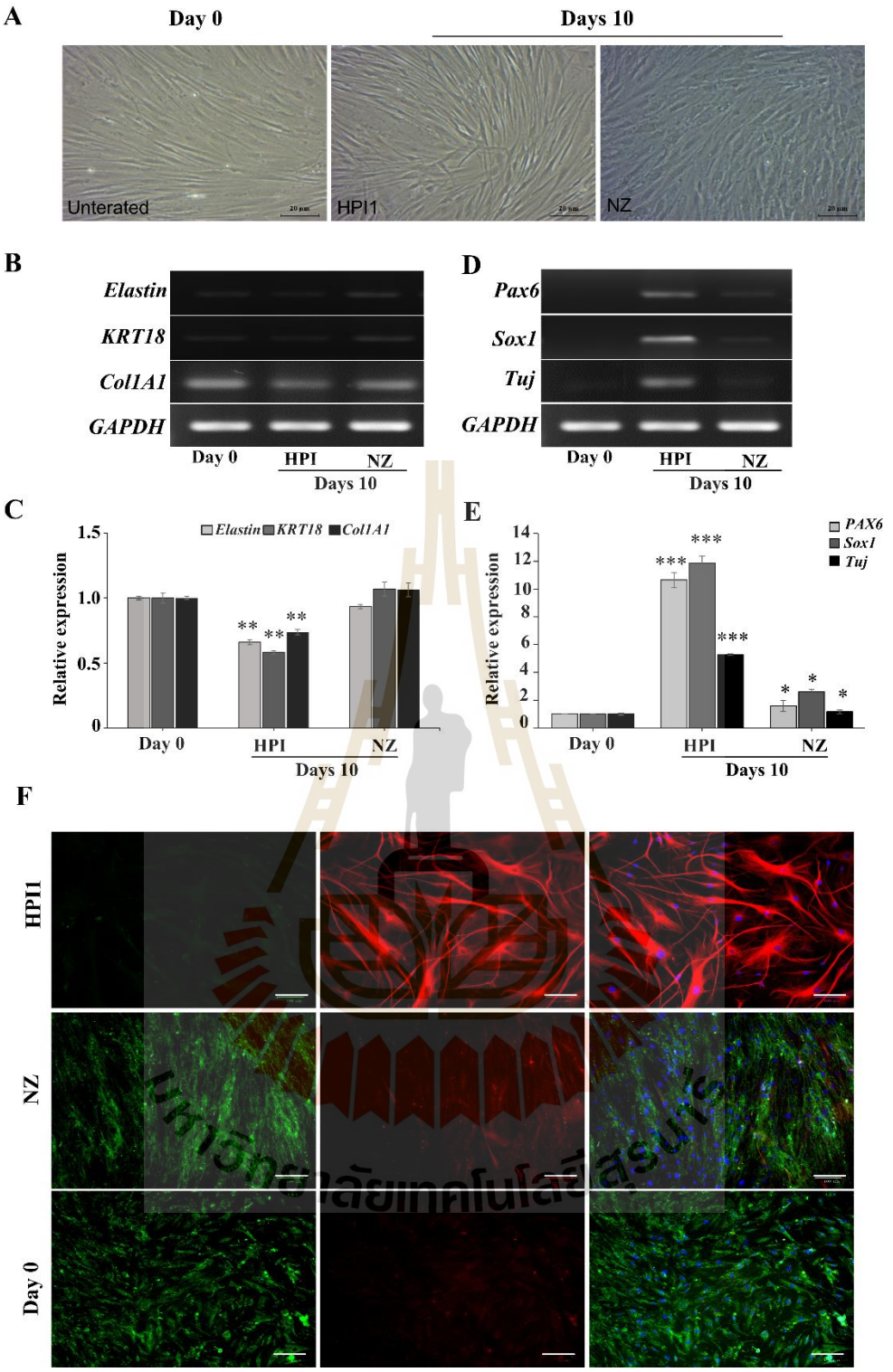


รูปที่3 การแสดงออกของของยีน autophagy เช่น LC3I/II, ATG5 และ ATG12 และ ยีน apoptotic (Bcl1, BAX) โดยวิธี RT-PCR การแสดงออกของโปรตีน LC3I/II ด้วยวิธี immunofluorescence หลังได้รับ HPI1 และ NZ เป็นเวลา 10 วัน

4.4 ผลการทดสอบว่าโมเลกุลขนาดเล็กของ Nz และ HPI1 โดยการใช้แยกกันมีกิจกรรมกระตุ้นการสร้างเซลล์ประสาทในเซลล์ hNF หรือไม่

ก่อนหน้านี้พบว่าการใช้ร่วมกันระหว่าง Nz และ HPI1 เป็นเวลา 10 วัน มีการแสดงออกของยีนจำเพาะต่อเซลล์ประสาท และโดปามีเนอร์จิก ดังนั้นเราจึงสนใจทดสอบโมเลกุลขนาดเล็กของ Nz และ HPI1 เพื่อทดสอบว่า Nz และ HPI1 เพียงอย่างเดียว มีกิจกรรมที่กระตุ้นการสร้างเซลล์ประสาทในเซลล์ hNF หรือไม่ โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ hNF ด้วย 10 μM Nz หรือ 10 μM HPI1 เพียงอย่างเดียว เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นจึงทำการทดสอบยีนมาร์กเกอร์ไฟโบรบลาสต์ (Elastin, KRT18, Col1A1) (รูป B-C) ยีนมาร์กเกอร์ของเซลล์ประสาท (Pax6, SOX1, Tuj) (รูป D-E) ผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่ากลุ่มที่ได้รับ HPI1 เพียงอย่างเดียว เป็นเวลา 10 วัน พบว่ามีการแสดงออกของยีนมาร์กเกอร์ไฟโบรบลาสต์น้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับ Nz เพียงอย่างเดียว เป็นเวลา 10 วัน และกลุ่มที่ได้รับ HPI1 มีการแสดงออกของยีนมาร์กเกอร์ของเซลล์ประสาทมากกว่ากลุ่มที่ได้รับ Nz เพียงอย่างเดียว เป็นเวลา 10 วัน ทั้งกลุ่มที่ได้รับ HPI1 และ NZ เพียงอย่างเดียว เป็นเวลา 10 วัน พบว่าไม่มีการแสดงออกของยีน dopaminergic ผลการทดสอบได้รับการยืนยันโดยการตรวจสอบโปรตีนไฟโบรบลาสต์ Co1A1 และ โปรตีน Tuj ด้วยวิธี immunofluorescence ผลที่ได้คือกลุ่มที่ได้รับ HPI1 มีการแสดงออกมาร์กเกอร์ของเซลล์ประสาทมากกว่า กลุ่มที่ได้รับ Nz อย่างมีนัยสำคัญ (p-value < 0.05) และกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วย HPI1 มีการแสดงออกของมาร์กเกอร์ไฟโบรบลาสต์น้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับ Nz อย่างมีนัยสำคัญ (p-value < 0.05) และทั้งกลุ่มที่ได้รับ HPI1 และ NZ ไม่มีการแสดงออกมาร์กเกอร์ของโดปามีนแต่อย่างใด

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 4 ผลการทดสอบว่าโมเลกุลขนาดเล็กของ Nz และ HPI1 โดยการใช้แยกกันมีกิจกรรมกระตุ้นการสร้างเซลล์ประสาทในเซลล์ hNF โดยการตรวจสอบมาร์กเกอร์ไฟโบรบลาสต์ (Elastin, KRT18, Col1A1) และ ยีนมาร์กเกอร์ของเซลล์ประสาท (Pax6, SOX1, Tuj) หลังได้รับ Nz หรือ HPI1 เป็นเวลา 10 วัน

บทที่ 5
บทสรุปการวิจัย

ผลจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเซลล์ hNF ที่เหนี่ยวนำไปเป็นเซลล์โดปามิเนอร์จิก ด้วยโมเลกุลขนาดเล็ก Nz และ HPI1 ร่วมกันเป็นเวลา 10 วัน พบว่ามีการแสดงออกของยีนและโปรตีนจำเพาะต่อเซลล์ประสาทและยีนและโปรตีนจำเพาะต่อโดปามีน ซึ่ง HPI-1 เป็นตัวยับยั้งทางเดิน Hedgehog (HH) ที่ระงับการส่งสัญญาณผ่าน Sonic HH (IC_{50} = 1.5 μM) โดยไม่ส่งผลกระทบอย่างมีนัยสำคัญต่อการส่งสัญญาณ WNT (IC_{50} ≥ 30 μM) HPI-1 จะยับยั้งการกระตุ้น HH ที่เกิดจากการสูญเสีย Suppressor of Fused หรือโดยการแสดงออกที่มากเกินไปของ Gli [33] HPI-1 เป็นโมเลกุลขนาดเล็กที่ยับยั้งการทำงานของส่วนประกอบของเส้นทางการส่งสัญญาณของ HH เนื่องจากบทบาทของสัญญาณที่ผิดปกติจะเกิดการลุกลามของเนื้องอกและการรักษาเซลล์ต้นกำเนิดจากมะเร็ง[40-42] ข้ามประเภทมะเร็ง การยับยั้งของ เส้นทางการส่งสัญญาณของ HH สามารถเป็นกลยุทธ์ที่มีประโยชน์สำหรับการจำกัดการเติบโตของเนื้องอกและสำหรับการป้องกันการกลับเป็นซ้ำของโรคหลังการผ่าตัด หลังการรักษาด้วยรังสีหรือหลังเคมีบำบัด ดังนั้น สารยับยั้งทางเดินของ HH จึงเป็นยาต้านมะเร็งกลุ่มสำคัญสารยับยั้งทางเดิน HH อย่างน้อย 3 ชนิดได้รับการอนุมัติจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) สำหรับการรักษามะเร็ง ซึ่งรวมถึง Vismodegib และ Erismodegib สารยับยั้งทั้งสองชนิดของ Smoothened (SMO) ซึ่งถูกใช้เพื่อรักษามะเร็งเซลล์ต้นกำเนิด สารหนูไตรออกไซด์ซึ่งเป็นตัวยับยั้งปัจจัยการถอดรหัส GLI กำลังถูกใช้เพื่อรักษามะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันกลุ่มโพรไมอีโลไซติก นอกจากนี้ สารยับยั้งทางเดินอาหารของเม่นหลายตัวอยู่ในระยะต่างๆ ของการทดลองทางคลินิก [43] ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าในกระบวนการเหนี่ยวนำเซลล์ hDF ไปเป็นเซลล์โดปามีน HPI1 จะช่วยในการเปลี่ยนแปลงเซลล์ไม่ให้เกิดการพัฒนาในทางผิดปกติเช่นเนื้องอก นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า Nz แสดงเครื่องหมายแสดงความจำเพาะของเซลล์ประสาท ความสามารถของ Nz ในการกระตุ้นการสร้างเซลล์ประสาทของนิวโรบลาสโตมาและเซลล์ไฟโบรบลาสต์พบว่าสามารถเทียบเคียงได้กับปัจจัย neurogenic ที่รู้จัก ได้แก่ กรดเรติโนอิกและไตรโคสแตตินเอ นอกจากนี้ เซลล์ที่แยกความแตกต่างโดย Nz ยังแสดงไอโซฟอร์มที่แตกต่างกันของตัวรับกลูตาเมต ผลการศึกษาเส้นทางการส่งสัญญาณพบว่าสารทั้งสองเสริมประสิทธิภาพ neurogenesis ในเซลล์ neuroblastoma โดยการเปิดใช้งานเส้นทางการส่งสัญญาณ Wnt และ Shh และการสร้างเซลล์ประสาทในเซลล์ไฟโบรบลาสต์โดยส่วนใหญ่เปิดใช้งานเส้นทางการส่งสัญญาณ Wnt [44]

ออโตฟาจี หมายถึง การกินตัวเองของเซลล์ เป็นกระบวน การปกติภายในเซลล์ต่าง ๆ ของร่างกาย เพื่อกำจัดโปรตีนหรือ องค์ประกอบของเซลล์ที่เสื่อมสภาพ โดยองค์ประกอบดังกล่าว จะถูกบรรจุในถุงออโตฟาโกโซม (Autophagosome) หลังจาก นั้น ออโตฟาโกโซมจะรวมตัวกับไลโซโซม (Lysosome) ทำให้ เกิดการย่อยสลายองค์ประกอบในออโตฟาโกโซมได้เป็นหน่วย ย่อยของสารชีวโมเลกุลที่สามารถนำไปใช้ได้ ในสภาวะปกติ ภายในเซลล์อาศัยวิถี mammalian target of rapamycin (mTOR pathway) ยับยั้งกระบวนการออโตฟา จี แต่เมื่อร่างกายอยู่ในสภาวะขาดอาหาร (Starvation) หรือ ภาวะเครียดออกซิเดชั่น (Oxidative

stress) เซลล์จะกระตุ้นวิถี AMP-activated protein kinase (AMPK pathway) ซึ่งส่งผล ยับยั้งการทำงานของวิถี mTOR จึงส่งเสริมให้เกิดกระบวนการ ออโตฟาจีขึ้น[45] ในกรณีของโรคความเสื่อมของระบบประสาท (Neurodegenerative diseases) ความสัมพันธ์กับความบกพร่องของ กระบวนการออโตฟาจีนั้น พบว่าในโรคความเสื่อมของระบบ ประสาทจะมีการสะสมของโปรตีนที่มีการม้วนพับผิดปกติ (Misfolded proteins) ภายในเซลล์ประสาท ซึ่งเกิดจากถุงออ โตฟาโกโซมไม่สามารถรวมตัวกับไลโซโซมได้ จึงไม่สามารถทำลายโปรตีนที่ผิดปกติภายในเซลล์ประสาท การสะสมของ โปรตีนที่มีการม้วนพับผิดปกติส่งผลให้เซลล์ประสาทเกิดสภาวะ เครียดออกซิเดชั่นนำไปสู่การตายของเซลล์ประสาท ซึ่งอาจจะ นำไปสู่การเกิดโรคอัลไซเมอร์และโรคพาร์กินสัน ส่งจะผลให้ผู้ ป่วยมีความบกพร่องและสูญเสียความทรงจำหรือพบการเสื่อมสมรรถนะของร่างกายและมีการเคลื่อนไหวที่ผิดปกติ[46] อย่างไรก็ตามปัจจัยที่ก่อให้เกิดโรคเหล่านี้ ส่วนหนึ่งมาจาก การใช้ชีวิตประจำวัน ซึ่งจะถูกควบคุมผ่านนาฬิกาชีวิต โดย อวัยวะต่าง ๆ ภายในร่างกายรวมถึงกระบวนการออโตฟาจีจะ มีช่วงเวลาในการทำงานอย่างเป็นระบบ หากทำงานผิดเวลาหรือ มีการใช้ชีวิตประจำวันที่ขาดสมดุล อาจส่งผลให้การทำงานของ นาฬิกาชีวิตแปรปรวนได้

จากการเหนี่ยวนำเซลล์ hNF ไปเป็นเซลล์โดปามิเนอร์จิก ด้วยโมเลกุลขนาดเล็ก Nz และ HPI1 ร่วมกันเป็นเวลา 10 วัน พบว่ามีความสามารถในการเพิ่มการแสดงออกของยีนและโปรตีนจำเพาะต่อเซลล์ประสาทที่จำเพาะต่อโดปามีนผ่านกระบวนการ autophagy ได้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บรรณานุกรม

1. Hachinski V, Iadecola C, Petersen RC, Breteler MM, Nyenhuis DL, Black SE, Powers WJ, DeCarli C, Merino JG, Kalaria RN (2006) National Institute of Neurological Disorders and Stroke–Canadian stroke network vascular cognitive impairment harmonization standards. *Stroke* 37, 2220-2241.

2. Cardozo AJ, Gómez DE, Argibay PF (2011) Transcriptional characterization of Wnt and Notch signaling pathways in neuronal differentiation of human adipose tissue-derived stem cells. *Journal of Molecular Neuroscience* 44, 186-194.

3. Dluzen D. Estrogen decreases corpus striatal neurotoxicity in response to 6-hydroxydopamine. Brain Res. 1997;767:340-4.

4. Kanda T, Jackson MJ, Smith LA, Pearce RK, Nakamura J, Kase H, Kuwana Y, Jenner P. Adenosine A2A antagonist: a novel antiparkinsonian agent that does not provoke dyskinesia in parkinsonian monkeys. Ann Neurol. 1998; 43: 507-13.

5. Savica R, Grossardt BR, Bower JH, Ahlskog JE, Rocca WA. Risk factors for Parkinson's disease may differ in men and women: an exploratory study. Hormones Behav. 2013;63:308-14.

6. Jimenez-Jimenez FJ, Mateo D, Gimenez-Roldan S. Premorbid smoking, alcohol consumption, and coffee drinking habits in Parkinson's disease: a case-control study. Mov Disord. 1992;7:339-44.

7. Fink J, Bains L, Beiser A, Seshadri S, Wol P. Caffeine intake and the risk of incident Parkinson's disease: The Framingham study. Fifteenth annual symposia abstracts. Mov Disord. 2001;16:984.

8. Checkoway H, Powers K, Smith-Weller T, Franklin GM, Longstreth Jr WT, Swanson PD. Parkinson's disease risks associated with cigarette smoking, alcohol consumption, and caffeine intake. Am J Epidemiol 2002; 155: 732-8.

9. Kalda A, Yu L, Oztas E, Chen JF. Novel neuroprotection by caffeine and adenosine A2A receptor antagonists in animal model of Parkinson's disease. J Neurol Sci. 2006;248:9-15.

10. Xu K, Xu YH, Chen JF, Schwarzschild MA. Caffeine neuroprotection against 1-methyl-4phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity shows no tolerance to chronic caffeine administration in mice. Neurosci Lett. 2002;322:13-6.

11. Xu K, Xu YH, Chen JF, Schwarzschild MA. Neuroprotection by caffeine: Time course and role of its metabolites in the MPTP model of Parkinson disease. Neuroscience 2010;167:475-81.

12. Singh S, Singh K, Gupta SP, Patel DK, Singh VK, Singh MP. Effect of caffeine on the expression of cytochrome P450 1A2, adenosine A2A receptor and dopamine transporter in control and 1-methyl-4-phenyl 1,2,3,6- tetrahydropyridine treated mouse striatum. Brain Res. 2009;1283:115-26.

13. Joghataie MT, Rogahani M, Negahdar F, Gashemi L. Protective effect of caffeine against neurodegeneration in a model of Parkinson's disease in rat: behavioral and histochemical evidence. Parkinsonism Relat Disord. 2004;10:465-8.

14. Aguiar LM, Nobre HV Jr, Macedo DS, Oliveira AA, Freitas RM, Vasconcelos SM, Cunha GM, Sousa FC, Viana GS. Neuroprotective effects of caffeine in the model of 6-hydroxydopamine lesion in rats. Pharmacol Biochem Behav. 2006;84:415-9.

15. Kachroo A, Irizarry MC, Schwarzschild MA. Caffeine protects against combined paraquat and maneb-induced dopaminergic neuron degeneration. Exp Neurol. 2010;223:657-61.

16. Ascherio A, Weisskopf MG, O'Reilly EJ, McCullough ML, Calle EE, Rodriguez, Thun MJ. Coffee consumption, gender, and Parkinson's disease mortality in the cancer prevention study II cohort: the modifying effects of estrogen. Am J Epidemiol. 2004;160:977-84.

17. Hancock DB, Martin ER, Stajin JM, Jewett R, Stacy MA, Scott BL, Vance JM, Scott WK. Smoking, caffeine, and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in families with Parkinson's disease. Arch Neurol. 2007;64:576-80.

18. Hu G, Bidel S, Jousilahti P, Tuomilehto J. Coffee and tea consumption and the risk of Parkinson's disease. Mov Disord. 2007;22:2242-8.

19. Tan EK, Chua E, Fook-Ching SM, Teo YY, Yuen Y, Tan L, Zhao Y. Association between caffeine intake and risk of Parkinson's disease among fast and slow metabolizers. Pharmacogenet Genomics 2007;17:1001-5.

20. Powers KM, Kay DM, Factor SA, Zabetian CP, Higgins DS, Samii A, Nutt JG, Griffith A, Leis B, Roberts JW, Martinez ED, Montimurro JS, Checkoway H, Payami H. Combined effects of smoking, coffee, and NSAIDs on Parkinson's diasease risk. Mov Disord. 2008;23:88-95.

21. Saaksjarvi K, Knekt P, Rissanen H, Laaksonen MA, Mannisto S. Prospective study of coffee consumption and risk of Parkinson's disease. Eur J Clin Nutr. 2008;62:908-15.

22. Prediger RDS. Effects of caffeine in Parkinson's disease: From neuroprotection to the management of motor and non-motor symptoms. J Alzheimer's Dis. 2010;20:S205-20.

23. Costa J, Lunet N, Santos C, Santos J, Vaz-Carneiro A. Caffeine exposure and the risk of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis of observational studies. J Alzheimer's Dis. 2010;20:S221-8. 28. Skeie GO, Muller B, Haugarvoll K, Larsen JP, Tysnes OB. Differential effect of environmental risk factors on postural instability gait difficulties and tremor dominant Parkinson's disease. Mov Disord. 2010;25:1847-52.

24. Altman RD, Lang AE, Postuma RB. Caffeine in Parkinson's disease: a pilot open-label, dose escalation study. Mov Disord. 2011;26:2427-31.

25. Tanaka K, Miyake Y, Fukushima W, Sasaki S, Kiyohara C, Tsuboi Y, Yamada T, Oeda T, Miki T, Kawamura N, Sakae N, Fukuyama H, Hirota Y, Nagai M, the Fukuoka Kinki Parkinson's Diasease study group. Intake of Japanese and Chinese teas reduces risk of Parkinson's disease. Parkinsonism Related Disord. 2011;17:446-50.

26. Savica R, Grossardt BR, Bower JH, Ahlskog JE, Rocca WA. Risk factors for Parkinson's disease may differ in men and women: an exploratory study. Hormones Behav. 2013;63:308-14.

27. Jimenez-Jimenez FJ, Mateo D, Gimenez-Roldan S. Premorbid smoking, alcohol consumption, and coffee drinking habits in Parkinson's disease: a case-control study. Mov Disord. 1992;7:339-44.

28. Fink J, Bains L, Beiser A, Seshadri S, Wol P. Caffeine intake and the risk of incident Parkinson's disease: The Framingham study. Fifteenth annual symposia abstracts. Mov Disord. 2001;16:984.

29. Joghataie MT, Rogahani M, Negahdar F, Gashemi L. Protective effect of caffeine against neurodegeneration in a model of Parkinson's disease in rat: behavioral and histochemical evidence. Parkinsonism Relat Disord. 2004;10:465-8.

30. Aguiar LM, Nobre HV Jr, Macedo DS, Oliveira AA, Freitas RM, Vasconcelos SM, Cunha GM, Sousa FC, Viana GS. Neuroprotective effects of caffeine in the model of 6-hydroxydopamine lesion in rats. Pharmacol Biochem Behav. 2006;84:415-9.

31. Yu L, Chen Y, Tooze SA. Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms. Autophagy 2018; 14: 207-15

32. Fujikake N, Shin M, Shimizu S. Association Between Autophagy and Neurodegenerative Diseases. Front Neurosci 2018; 12: 255.

33. Hyman et al (2009) Small-molecule inhibitors reveal multiple strategies for Hedgehog pathway blockade. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 106 14132 PMID: 19666565.

34. Lang A., Lozano A. Medical progress: Parkinson's disease (first of two parts) *N. Engl. J. Med.* 1998;339:1044–1053.

35. Lange A., Lozano A. Parkinson's disease: second of two parts. *N. Engl. J. Med.* 1998;339:1130–1143.

36. Hardy J. Genetic analysis of pathways to Parkinson disease. *Neuron.* 2010;68(2):201–206.

37. Kefalopoulou Z. Long-term clinical outcome of fetal cell transplantation for Parkinson disease: two case reports. *JAMA Neurol.* 2014;71(1):83–87. 5. Barker R.A. Fetal dopaminergic transplantation trials and the future of neural grafting in Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2013;12(1):84–91.

38. Barker R.A., Drouin-Ouellet J., Parmar M. Cell-based therapies for Parkinson disease [mdash] past insights and future potential. *Nat. Rev. Neurol.* 2015;11(9):492–503.

39. Barker R.A., Drouin-Ouellet J., Parmar M. Cell-based therapies for Parkinson disease [mdash] past insights and future potential. *Nat. Rev. Neurol.* 2015;11(9):492–503.

40. Grealish S. Human ESC-derived dopamine neurons show similar preclinical efficacy and potency to fetal neurons when grafted in a rat model of Parkinson's disease. *Cell Stem Cell.* 2014;15(5):653–665.

41. Caiazzo M. Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts. *Nature.* 2011;476(7359):224–227.

42. Jiang H. Cell cycle and p53 gate the direct conversion of human fibroblasts to dopaminergic neurons. *Nat. Commun.* 2015;6:10100.

43. Vierbuchen T. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature.* 2010;463(7284):1035–1041.

44. Debasish Halder, Gun-Hee Kim and Injae Shin. Synthetic small molecules that induce neuronal differentiation in neuroblastoma and fibroblast cells. The Royal Society of Chemistry 2015. Cite this:DOI: 10.1039/c5mb00161g.

45. Tomas-Hernández S, Blanco J, Rojas C, Roca-Martínez J, Ojeda-Montes MJ, Beltrán-Debón R, et al. Resveratrol Potently Counteracts Quercetin Starvation-Induced Autophagy and Sensitizes HepG2 Cancer Cells to Apoptosis. Mol Nutr Food Res 2018; 62: 1700610. 21.

46. Liu Y, Gong W, Yang ZY, Zhou XS, Gong C, Zhang TR, et al. Quercetin induces protective autophagy and apoptosis through ER stress via the p-STAT3/Bcl-2 axis in ovarian cancer. Apoptosis 2017; 22: 544-77.

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) รศ.ดร.ปริญญา น้อยสา

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Assoc. Prof. Parinya Noisa, Ph.D.

เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3489900186665

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร สาขาเทคโนโลยชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ที่อยู่ ห้องปฏิบัติการ Cell-based assyas and Innovations อาคารศูนย์เครื่องมือ 14 มหาวิทยาลัยเทคโลยีสุรนารี 111 ถนนมหาวิทยาลัย ต.สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000

โทรศัพท์มือถือ 061-6266390 E-mail p.noisa@sut.ac.th

ประวัติการศึกษา วิทยาลัยอิมพีเรียล ลอนดอน สาขาวิชา Stem cell technology

ปีที่จบ พศ.2553

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

Stem cells, Neurobiology, Cell biology, Toxicology, Natural products

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องและทำเสร็จแล้ว

1. Noisa, P., Ramasamy, S. T., Lamont, R.F., Yu, L. S. J., Sheldon, M., Russell, A., Jin, X., Cui, W., Identification and Characterisation of the Early Differentiating Cells in Neural Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. PLOS One, 2012; doi:10.1371/journal.pone.0037129

2. Tommiska, J., Toppari, J., Vaaralahti, K., Känsäkoski, J., Laitinen, E.M., Noisa, P., Kinnala, A., Niinikoski, H., Raivio, T., PROKR2 mutations in autosomal recessive Kallmann syndrome. Fertil Steril, 2012; doi:10.1016/j.fertnstert.2012.11.003

3. Jongkamonwiwat, N., Noisa, P., Biomedical and clinical promises of human pluripotent stem cells for neurological disorders. Biomed Res Int, 2013; doi: 10.1155/2013/656531 (Review).

4. Noisa, P., Lund, C., Kanduri, K., Lund, R., Lähdesmäki, H., Lahesmaa, R., Lundin, K., Chokechuwattanalert, H., Otonkoski, T., Tuuri, T., Raivio, T., Notch signaling regulates the differentiation of neural crest from human pluripotent stem cells. J Cell Sci. 2014;doi: 10.1242/jcs.145755.

5. Noisa, P., Raivio, T., Neural crest cells: From developmental biology to clinical interventions. Birth Defects Res C Embryo Today. 2014 Sep 16. doi: 10.1002/bdrc.21074. (Review)

6. Suksuphew, S., Noisa, P., Neural stem cells could serve as a therapeutic material for age-related neurodegenerative diseases. W J of Stem Cells. 2014, in press (review).

7. Noisa P., Raivio T., Cui W., Neural Progenitor Cells Derived from Human Embryonic Stem Cells as an Origin of Dopaminergic Neurons. Stem Cells Int. 2015;2015:647437. doi: 10.1155/2015/647437. Epub 2015 Apr 30.

8. Trokovic R., Weltner J., Noisa P., Raivio T., Otonkoski T., Combined negative effect of donor age and time in culture on the reprogramming efficiency into induced pluripotent stem cells. Stem Cell Res. 2015 Jun 11. pii: S1873-5061(15)00074-4. doi: 10.1016/j.scr.2015.06.001.

9. Prajumwongs P., Weeranantanapan O., Jaroonwitchawan T., Noisa P., Human Embryonic Stem Cells: A Model for the Study of Neural Development and Neurological Diseases. Stem Cells Int. 2016 Volume 2016 (2016), Article ID 2958210, 9 pages http://dx.doi.org/10.1155/2016/2958210.

10. Lund C., Pulli K., Yellapragada V., Giacobini P., Lundin K., Vuoristo S., Tuuri T., Noisa P., Raivio T., Development of Gonadotropin-Releasing Hormone-Secreting Neurons from Human Pluripotent Stem Cells. Stem Cell Reports. 2016 Jul 13. pii: S2213-6711(16)30099-6. doi: 10.1016/j.stemcr.2016.06.007.

11. Jaroonwitchawan T., Chaicharoenaudomrung N., Namkaew J., Noisa P., Curcumin attenuates paraquat-induced cell death in human neuroblastoma cells through modulating oxidative stress and autophagy. Neurosci Lett. 2016 Oct 25. pii: S0304-3940(16)30805-9. doi: 10.1016/j.neulet.2016.10.050.

12. Jaroonwitchawan T., Muangchan P., Noisa P., Inhibition of FGF signaling accelerates neural crest cell differentiation of human pluripotent stem cells. Biochem Biophys Res Commun. 2016 Nov 2. pii: S0006-291X(16)31842-3. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.10.147.

13. Suebsoonthron J., Jaroonwitchawan T., Yamabhai M., Noisa P., Inhibition of WNT signaling reduces differentiation and induces sensitivity to doxorubicin in human malignant neuroblastoma SH- SY5 Y cells. Anticancer Drugs. 2017 Feb 24. doi:10.1097/CAD.0000000000000478.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี