



การเจริญเปลี่ยนแปลงของเซลล์เดนไดรติกที่พัฒนาจากโมโนไซต์หลังได้รับการกระตุ้น



มนัสวี คนหลัก

วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยา
ปีการศึกษา 2565
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

การเจริญเปลี่ยนแปลงของเซลล์เดนไดรติกที่พัฒนาจากโมโนไซต์หลังได้รับการกระตุ้น



วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยา
ปีการศึกษา 2565
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

วิทยานิพนธ์ เรื่อง "การเจริญเปลี่ยนแปลงของเซลล์เดนไดรติกที่พัฒนาจากโมโนไซต์หลังได้รับการกระตุ้น"

ของ มนัสวี คนหลัก

ได้รับการพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิงจรรยา สูงสถิตานนท์)

..... ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์อภิรัตน์ หวังธีระ
ประเสริฐ)

..... กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(รองศาสตราจารย์ ดร.ตลฤดี สงวนเสริมศรี)

..... กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(รองศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิงสุรชาติ พงษ์เจริญ)

..... กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน
(ดร.อัญชลี ฐานวิสัย)

อนุมัติ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.กรรองกาญจน์ ชูทิพย์)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง	การเจริญเปลี่ยนแปลงของเซลล์เดนไดรติกที่พัฒนาจากโมโนไซต์หลังได้รับการกระตุ้น
ผู้วิจัย	มนัสวี คนหลัก
ประธานที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์อภิรัตน์ หวังธีระประเสริฐ
กรรมการที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.ตฤที สวงนเสริมศรี รองศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิงสุธาทิพย์ พงษ์เจริญ
ประเภทสารนิพนธ์	วิทยานิพนธ์ วท.ม. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2565
คำสำคัญ	เซลล์เดนไดรติก, การกระตุ้นเซลล์, จุลทรรศน์โทโมคิวบ์ HT-2 แบบ 3 มิติ

บทคัดย่อ

เซลล์เดนไดรติกเป็นเซลล์ที่มีบทบาทหน้าที่สำคัญเป็นอย่างยิ่งในนำเสนอแอนติเจนต่อ T cells ซึ่งเป็นการกระตุ้นการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ ในการศึกษาวิจัยแยกโมโนไซต์จากแยกเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียร์ (Peripheral blood mononuclear cells; PBMC) และพัฒนาเป็นเซลล์เดนไดรติกที่ยังไม่เจริญเต็มที่ และกระตุ้นให้พัฒนาเป็นเซลล์เดนไดรติกที่เจริญเต็มที่ด้วย Lipopolysaccharide (LPS) ก่อนนำมาศึกษาความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ และศึกษาลักษณะภายในเซลล์ทั้งสองกลุ่มโดยใช้โฟลไซโตเมทรีและกล้องจุลทรรศน์โทโมคิวบ์ HT-2 แบบ 3 มิติ จากการศึกษาครั้งนี้พบการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของมวลและไขมันภายในเซลล์เดนไดรติกที่เจริญเต็มที่แล้ว และได้รับการยืนยันจากการย้อมสี Oil red O ที่มีความจำเพาะต่อไขมัน การใช้กล้องจุลทรรศน์โทโมคิวบ์ HT-2 แบบ 3 มิติ เพื่อศึกษาความลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะภายในเซลล์เดนไดรติกครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงข้อมูลใหม่ ๆ ซึ่งเป็นการย้ำถึงความสำคัญของการศึกษาการทำงานและการตอบสนองของเซลล์เดนไดรติกในขณะที่ยังเจริญเติบโตไม่เต็มที่และหลังจากเซลล์เดนไดรติกที่เจริญเต็มที่ และเป็นการเปิดช่องทางใหม่ ๆ สำหรับการวิจัยเพิ่มเติมเกี่ยวกับการทำงานและกระบวนการ metabolism ของเซลล์ภูมิคุ้มกันที่มีผลกระทบต่อการพัฒนาและรักษาด้วยภูมิคุ้มกันบำบัด

Title	DIFFERENTIATION OF MONOCYTE-DERIVED DENDRITIC CELLS AFTER STIMULATION
Author	Manutsavee Khonlak
Advisor	Assistant Professor Apirath Wangteeraprasert, MD, Ph.D.
Co-Advisor	Associate Professor Donruedee Sanguansermsri, Ph.D. Associate Professor Sutatip Pongcharoen, MD, Ph.D.
Academic Paper	M.Sc. Thesis in Microbiology, Naresuan University, 2022
Keywords	Dendritic cells, Cell stimulation, Tomocube HT-2 microscope

ABSTRACT

Dendritic cells (DCs) play a critical role in initiating the adaptive immune response by presenting antigens to T cells. In this study, a method for the successful isolation and culture of both immature and mature dendritic cells from monocytes obtained from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) using Lipopolysaccharide (LPS) was established. The morphological and intracellular differences between the two groups of mature dendritic cells were then examined using a flow cytometry and 3-dimensional Tomocube HT-2 microscope. A significant increase in cell mass and lipid mass was observed in mature dendritic cells compared to immature dendritic cells, as confirmed by Oil Red O staining. The utility of the Tomocube HT-2 microscope in comparing the morphological and intracellular differences between immature and mature dendritic cells was demonstrated. New insights into the functional differences between immature and mature dendritic cells were provided and the importance of dendritic cells in the immune response was highlighted. These findings open a new avenue for further research into the function of immune cells and the relationship of metabolism at the various stages of these cells. This may have implications for the development of immunotherapies.

ประกาศขอบคุณการ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างสมบูรณ์ด้วยความกรุณาจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์อภิรัตน์ หวังธีระประเสริฐ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิงสุรชาติพิทย์ พงษ์เจริญ และรองศาสตราจารย์ ดร. ดลฤดี สงวนเสริมศรี ผู้เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา ร่วมที่ได้สละเวลาอันมีค่าเพื่อให้คำปรึกษา และคำแนะนำอันเป็นประโยชน์แก่ข้าพเจ้า และขอขอบคุณ อาจารย์การตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ในงานวิจัยของข้าพเจ้าด้วยความเอาใจใส่ตลอดจนสำเร็จ ในงานวิจัยฉบับนี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณพี่ ๆ นักวิทยาศาสตร์หน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์พื้นฐาน คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ผู้ให้คำปรึกษาการใช้เครื่องมือและสนับสนุนการทำวิจัยในทุก ๆ ด้านเสมอมา สุดท้ายนี้ขอขอบคุณกำลังใจจากทุก ๆ ท่านที่เชื่อมั่นและคอยสนับสนุนผู้วิจัยเสมอมา

มนัสวี คนหลัก



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
ประกาศคุุณุปการ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญภาพ.....	ณ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาของปัญหา	1
จุดมุ่งหมายของการศึกษา.....	2
ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
นิยามศัพท์เฉพาะ	3
สมมติฐานงานวิจัย	3
บทที่ 2 เอกสารอ้างอิงและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
ภูมิคุ้มกัน	4
ภูมิคุ้มกันที่มาจากกำเนิด	6
ภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ	10
Dendritic cells.....	13
ความเป็นมาของ Dendritic cells.....	14
ลักษณะและประเภทของ Dendritic cells	15
การรับรู้ถึงสิ่งแปลกปลอมของ Dendritic cells.....	19

การตอบสนองของ Dendritic cells.....	19
Holotomographic microscope model HT-2H Tomocube	20
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน	22
ระเบียบวิธีวิจัย.....	22
วัสดุอุปกรณ์ในหลอดทดลอง.....	22
เครื่องมือในการทดลอง.....	22
เซลล์ที่ใช้ในการทดสอบ.....	23
สารเคมีสำหรับการเพาะเลี้ยงและทดสอบ.....	23
วิธีการวิจัย.....	23
การแยกเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียร์จากตัวอย่างเลือด (buffy coat).....	23
การแยกโมโนไซต์จากเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียร์เพื่อพัฒนาเป็นเซลล์เดนไดรติก...25	
การกระตุ้นเซลล์เดนไดรติก.....	25
การวิเคราะห์ความแตกต่างของเซลล์เดนไดรติกในระยะก่อนถูกกระตุ้น (Immature dendritic cells) และหลังถูกกระตุ้น (Mature dendritic cells) ด้วย Monoclonal antibodies และ Flow Cytometry.....	26
การวิเคราะห์ความแตกต่างของเซลล์เดนไดรติกในระยะก่อนถูกกระตุ้น (Immature dendritic cells) และหลังถูกกระตุ้น (Mature dendritic cells) ภายใต้กล้อง Holotomographic microscope model HT-2H Tomocube (Tomocube).....	26
การวิเคราะห์ปริมาณไขมันภายในเซลล์เดนไดรติกในระยะก่อนถูกกระตุ้น (Immature dendritic cells) และหลังถูกกระตุ้น (Mature dendritic cells) ด้วยการย้อมสี Oil Red O.....	27
การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนภายในเซลล์ด้วย Bicinchoninic acid assay (BCA kit).....	27
การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	27

บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	28
การแยกโมโนไซต์จากเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียร์.....	28
การเพาะเลี้ยงและพัฒนาเซลล์เดนไดรติกจากโมโนไซต์.....	30
การวิเคราะห์ความแตกต่างในระยะก่อนและหลังถูกกระตุ้นของเซลล์เดนไดรติกด้วย Monoclonal antibodies และ Flow Cytometry	32
การวิเคราะห์ความแตกต่างในระยะก่อนและหลังได้รับการกระตุ้นของเซลล์เดนไดรติก ภายใต้กล้อง Holotomographic microscope model HT-2H Tomocube (Tomocube)	34
การวิเคราะห์ปริมาณไขมันภายในเซลล์เดนไดรติกในระยะก่อนถูกกระตุ้น (Immature dendritic cells) และ ภายหลังจากได้รับการกระตุ้น (Mature dendritic cells) ด้วยการ ย้อมสี Oil Red O	38
การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนภายในเซลล์ด้วย Bicinchoninic acid assay (BCA kit).....	40
บทที่ 5 บทสรุป.....	41
บรรณานุกรม.....	44
ภาคผนวก.....	54
ประวัติผู้วิจัย	62

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพ 1 แสดงองค์ประกอบของระบบภูมิคุ้มกันร่างกาย	6
ภาพ 2 แสดงการทำงานของ NK cells.....	9
ภาพ 3 แสดงการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะผ่านทาง MHC II และ MHC I ของเซลล์เดนไดรติก	12
ภาพ 4 แสดงการพัฒนาของเซลล์เดนไดรติกในร่างกายมนุษย์	16
ภาพ 5 แสดงภาพกล้อง Holotomographic microscope model HT-2H (Tomocube).....	21
ภาพ 6 แสดงตำแหน่งเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียร์หลังจากทำการปั่นแยกด้วยเทคนิค Density gradient centrifugation	24
ภาพ 7 แสดงตำแหน่งของโมโนไซต์จากการวิเคราะห์ด้วย Flow Cytometry.....	29
ภาพ 8 แสดงภาพการพัฒนาโมโนไซต์เป็นเซลล์เดนไดรติกจาก Flow Cytometry	31
ภาพ 9 แสดงภาพการติดสีของ CD11c, CD80, CD83, CD86 และ HLA-DR ในเซลล์เดนไดรติก ในระยะก่อนถูกกระตุ้น (Immature dendritic cells) และหลังได้รับการกระตุ้น (Mature dendritic cells) ภายใต้การวิเคราะห์ด้วย Flow Cytometry.....	32
ภาพ 10 แสดงภาพกราฟที่ได้จากการวิเคราะห์การติดสี CD11c, CD80 และ CD86 ในเซลล์เดนไดรติกในระยะก่อนถูกกระตุ้น (Immature dendritic cells) และหลังได้รับการกระตุ้น (Mature dendritic cells) ภายใต้การวิเคราะห์ด้วย Flow Cytometry.....	33
ภาพ 11 แสดงภาพของเซลล์เดนไดรติกในระยะที่ไม่เจริญเต็มที่ (iDCs) และเซลล์เดนไดรติกในระยะเจริญเต็มที่ (mDCs) ภายใต้กล้อง Tomocube.....	35
ภาพ 12 แสดงกราฟการเปรียบเทียบเซลล์เดนไดรติกในระยะ Immature dendritic cells และ Mature dendritic cells ภายใต้กล้อง Tomocube	37
ภาพ 13 แสดงภาพของเซลล์เดนไดรติกที่ถูกย้อมด้วยสี Oil red O	38

ภาพ 14 แสดงกราฟเปรียบเทียบขนาดเซลล์และขนาดไขมันในเซลล์เดนไดรติกในระยะ
Immature dendritic cells และ Mature dendritic cells.....39

ภาพ 15 แสดงกราฟเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนภายในเซลล์เดนไดรติกในระยะ Immature
dendritic cells และ Mature dendritic cells ที่วิเคราะห์ด้วย BCA Kit40



บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาของปัญหา

จากสถานการณ์การพัฒนาอย่างต่อเนื่องของเทคโนโลยีและนวัตกรรมต่าง ๆ ทั่วโลกเพื่ออำนวยความสะดวกในการดำรงชีวิตของมนุษย์ และจากสถานการณ์ภาวะโลกร้อนส่งผลให้สิ่งมีชีวิตจำเป็นต้องปรับตัวและพัฒนาสายพันธุ์ขึ้นเพื่อความอยู่รอด ส่งผลให้สถานการณ์ความรุนแรงของโรคที่ก่อให้เกิดปัญหาทางด้านการสาธารณสุขมีการพัฒนาขึ้นอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากการพัฒนาขึ้นของเชื้อจุลชีพส่งผลให้สถานการณ์ความผลกระทบเป็นวงกว้างแก่การดำรงชีวิตของมนุษย์ เช่น การพัฒนาขึ้นของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่มีการแพร่ระบาดอย่างต่อเนื่องในทุก ๆ ปี (Moghadami, 2017) การอุบัติใหม่ของเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (COVID-19) ที่มีความรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิตและมีความสามารถในการระบาดไปกว่า 219 ประเทศทั่วโลก (Saavedra, Prates, Gonçalves, Piovan, Matafome, & Mathias, 2021) การเปลี่ยนแปลงและพัฒนาขึ้นของโรคมะเร็งที่มีผู้ป่วยเพิ่มสูงขึ้นทุกปี (International Agency for Research on Cancer (IARC), 2021, World Health Organization, 2021) สิ่งต่าง ๆ เหล่านี้เป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขของทุก ๆ ประเทศทั่วโลก และจากสถานการณ์การพัฒนาของเชื้อจุลชีพและความรุนแรงของโรคเหล่านี้เป็นการท้าทายขีดความสามารถของระบบภูมิคุ้มกันที่มีหน้าที่สำคัญในการป้องกันร่างกายจากสิ่งแปลกปลอม (Antigen) เป็นอย่างมาก ระบบภูมิคุ้มกันที่มีหน้าที่สำคัญในการปกป้องร่างกายจากสิ่งแปลกปลอมจึงได้รับความสนใจและถูกนำมาเป็นหัวข้อในการศึกษาเป็นจำนวนมากถึงความสามารถในการรับรู้และตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมของระบบภูมิคุ้มกันเพื่อนำความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการป้องกันและรักษาโรคต่าง ๆ ได้ อย่างมีประสิทธิภาพเช่น การนำความรู้ในการเรียนรู้และจดจำของ T cells ที่มีความสามารถในการตอบสนองต่อการติดเชื้อเข้ามาใช้ในการผลิตวัคซีนเช่น การผลิตวัคซีนเพื่อป้องกันเชื้อ COVID-19 (Saavedra et al., 2021) และวัคซีนไข้หวัดใหญ่ (Moghadami, 2017) หรือการนำความรู้ทางภูมิคุ้มกันมาประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง หรือที่เรียกว่าการรักษาแบบภูมิคุ้มกันบำบัด (Immunotherapy) ซึ่งเป็นการควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันเพื่อกำจัดมะเร็งหรือสิ่งแปลกปลอมนี้เลียนแบบธรรมชาติเช่น การประยุกต์ใช้ความสามารถในการนำเสนอสิ่งแปลกปลอมของเซลล์เดนไดรติก (Dendritic cells, DCs) ที่มีความจำเพาะต่อชนิดของมะเร็งที่ต้องการรักษาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดมะเร็ง (Shah, 2014; Page et al., 2015) โดยการทำงานของ DCs จะนำเสนอสื่อแปลกปลอมได้อย่างรวดเร็วด้วยวิธีการจับกินแบบฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) และนำเสนอแอนติเจนของสิ่งแปลกปลอมให้กับเซลล์ที่อยู่ในระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเพื่อเพิ่ม

ประสิทธิภาพในการกำจัดสิ่งแปลกปลอม นอกจากนี้เซลล์เดนไดรติกยังสามารถสร้างไซโตไคน์ที่มีความสามารถในการทำลายสิ่งแปลกปลอม และเรียกเซลล์ภูมิคุ้มกันชนิดอื่นๆ มาช่วยกันทำลายสิ่งแปลกปลอมได้อีกด้วย (Blum, Wearsch, & Cresswell, 2013; Wculek, Cueto, Mujal, Melero, Krummel, & Sancho, 2020) ซึ่งการรักษาด้วยภูมิคุ้มกันบำบัดนี้จะมีผลข้างเคียงน้อยกว่าวิธีการรักษาในปัจจุบันเช่น การให้ยาเคมีบำบัด การฉายแสง และการผ่าตัด โดยวิธีการรักษาโรคมะเร็งต่าง ๆ เหล่านี้ขึ้นอยู่กับแพทย์ผู้ทำการรักษาเห็นสมควร (Sabado, Balan, & Bhardwaj, 2017, Hosseinzadeh, Banaee, & Nedaie, 2017; Abbas, & Rehman, 2018; National Cancer Institute, 2021) และด้วยความสามารถในการจัดการกับสิ่งแปลกปลอมอย่างรวดเร็วและความสามารถในการนำเสนอแอนติเจนที่โดดเด่นนี้เซลล์เดนไดรติกจึงเป็นเซลล์ที่มีความสำคัญเป็นอย่างมากในระบบภูมิคุ้มกัน และเป็นหัวข้อวิจัยที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งโดยเฉพาะการศึกษากระบวนการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมของระบบภูมิคุ้มกันต่อสิ่งแปลกปลอมและจำเป็นต้องศึกษาบทบาทและหน้าที่การทำงานของเซลล์เดนไดรติกเพิ่มเติม เพื่อให้เข้าใจถึงลักษณะและการทำงานของเซลล์เดนไดรติกต่อไป

การศึกษาลักษณะและการทำงานของเซลล์เดนไดรติกที่ยังไม่เจริญเต็มที่ (Immature dendritic cells, iDCs) และเซลล์เดนไดรติกที่เจริญเต็มที่ (Mature dendritic cells, mDCs) จึงจำเป็นต้องได้รับการศึกษาเพิ่มเติมถึงความแตกต่างของ Immature dendritic cells และ Mature dendritic cells โดยในการศึกษานี้จะทำศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ Immature dendritic cells และ Mature dendritic cells โดยใช้ Flow Cytometry และกล้อง Holotomographic microscope model HT-2H Tomocube (Tomocube) ซึ่งเป็นเทคนิคที่สามารถศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ขณะที่มีชีวิตได้

จุดมุ่งหมายของการศึกษา

1. เพื่อศึกษาวิธีการคัดเลือกและแยกเก็บโมโนไซม์จากเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียร์ (Peripheral blood mononuclear cells; PBMC) เพื่อนำไปใช้พัฒนาเป็นเซลล์เดนไดรติก
2. เพื่อศึกษาลักษณะฟิโนไทป์ของเซลล์เดนไดรติกที่ถูกพัฒนาจากโมโนไซม์
3. เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างเซลล์เดนไดรติกที่ยังไม่เจริญเต็มที่ (immature dendritic cells, iDCs) และเซลล์เดนไดรติกที่เจริญเต็มที่ (mature dendritic cells, mDCs)

ขอบเขตของงานวิจัย

แยกเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียร์ (Peripheral blood mononuclear cells; PBMC) จากตัวอย่างเลือด (Buffy coat) และนำ PBMC ที่ได้มาแยกด้วยวิธี Adherence cells เพื่อเพิ่มจำนวนโมโนไซต์ ก่อนนำมาแยกด้วย MACS CD14+ isolation kit ซ้ำเพื่อเพิ่มความบริสุทธิ์ของโมโนไซต์ก่อนนำโมโนไซต์ที่ได้ มาพัฒนาเป็นเซลล์เดนไดรติก โดยนำโมโนไซต์ที่แยกได้มาเลี้ยงในอาหาร R-10 (RPMI 1640, 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin-streptomycin and 1% Glutamax) ร่วมกับ Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) ที่มีความเข้มข้น 800 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ Interleukin-4 (IL-4) ความเข้มข้น 500 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 7 วัน ก่อนนำเซลล์เดนไดรติกที่ได้มาทำการกระตุ้นด้วย Lipopolysaccharide (LPS) เป็นเวลา 2 วันเพื่อกระตุ้นเซลล์เดนไดรติกจากระยะ Immature dendritic cells เป็นระยะ Mature dendritic cells ก่อนนำไปศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ด้วย Flow Cytometry และกล้อง Holotomographic microscope model HT-2H Tomocube (Tomocube)

นิยามศัพท์เฉพาะ

เซลล์เดนไดรติก (Dendritic cell, DCs) เซลล์เดนไดรติกที่ยังไม่เจริญเต็มที่ (immature dendritic cells, iDCs) และ เซลล์เดนไดรติกที่เจริญเต็มที่ (mature dendritic cells, mDCs)

สมมติฐานงานวิจัย

เซลล์เดนไดรติกที่ถูกพัฒนาจากโมโนไซม์มีคุณสมบัติเหมือนเซลล์เดนไดรติกตามธรรมชาติ สามารถนำมาทดสอบการตอบสนองของเซลล์เดนไดรติกได้ โดยเซลล์เดนไดรติกที่ถูกพัฒนาขึ้นจะอยู่ในระยะที่ยังไม่เจริญเต็มที่ (Immature dendritic cells) และเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย LPS เซลล์เดนไดรติกที่ถูกพัฒนาขึ้นสามารถเข้าสู่ระยะเจริญเต็มที่ (Mature dendritic cells) ได้ โดยผลที่ได้จากเซลล์เดนไดรติกทั้ง 2 ระยะจะมีลักษณะสัญญาณวิทยาและการตอบสนองชีววิทยาที่แตกต่างกัน และสามารถสังเกตลักษณะที่แตกต่างกันได้ด้วยกล้อง Holotomographic microscope model HT-2H Tomocube (Tomocube) และสามารถสังเกตลักษณะที่แตกต่างกันได้หลังจากการย้อม Monoclonal antibodies ที่มีความจำเพาะต่อเซลล์ในแต่ละระยะก่อนนำมาวิเคราะห์ด้วย Flow Cytometry โดยจะใช้ Monoclonal antibodies CD11c ติดสี PE ที่มีความจำเพาะต่อเซลล์เดนไดรติกและใช้ Monoclonal antibodies CD80 ติดสี APC, Monoclonal antibodies CD83 ติดสี Per CP, Monoclonal antibodies CD86 ติดสี APC และ Monoclonal antibodies HLA-DR ติดสี Fit C ที่มีความจำเพาะต่อเซลล์เดนไดรติกในระยะเจริญเต็มที่

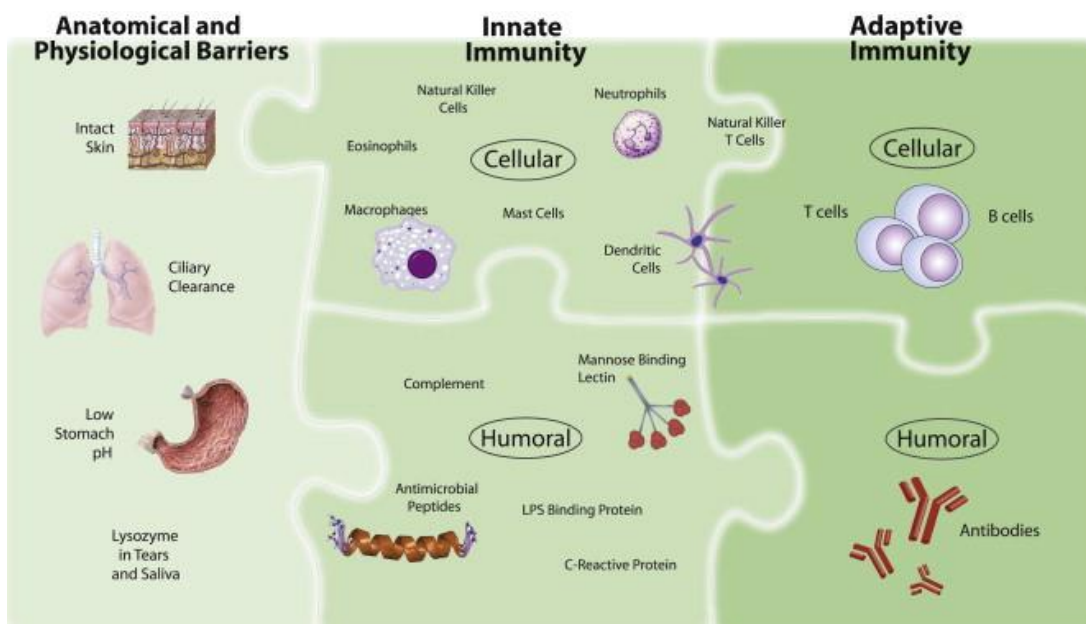
บทที่ 2

เอกสารอ้างอิงและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ภูมิคุ้มกัน

ภูมิคุ้มกัน (Immunity) เป็นกระบวนการป้องกันร่างกายที่เกิดจากทำงานร่วมกันของเซลล์และอวัยวะต่าง ๆ ภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิตเพื่อทำหน้าที่ปกป้องร่างกายจากสิ่งแปลกปลอม (Antigen) โดยกระบวนการป้องกันร่างกายของระบบภูมิคุ้มกันแบ่งเป็นการป้องกันร่างกายจากสิ่งแวดล้อมภายนอกที่เกิดจากอุปสรรคทางร่างกาย และการป้องกันร่างกายจากสิ่งแปลกปลอมที่ตรวจพบภายในร่างกายซึ่งประกอบไปด้วย การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (Innate Immunity) ที่ทำหน้าที่รับรู้ถึงสิ่งแปลกปลอมภายในร่างกายและสามารถตอบสนองได้อย่างรวดเร็ว และการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (Adaptive Immunity) ที่ทำหน้าที่ตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมภายในร่างกายที่มีความจำเพาะเจาะจง (ภาพ 1) (Janeway, & Medzhitov, 2002; Turvey, & Broide, 2010) โดยการป้องกันร่างกายที่เกิดจากอุปสรรคทางร่างกายซึ่งจัดเป็นการปกป้องร่างกายในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดจะทำหน้าที่เป็นด่านป้องกันแรกในการป้องกันร่างกายจากสิ่งแวดล้อมเพื่อป้องกันสิ่งแปลกปลอมจากภายนอกเข้าสู่ร่างกาย แต่หากร่างกายได้รับบาดเจ็บเกิดการฉีกขาดบริเวณผิวหนัง ซึ่งเป็นการป้องกันที่เกิดจากอุปสรรคทางกายจะหายไปส่งผลให้สิ่งแปลกปลอมจากสิ่งแวดล้อมภายนอกสามารถเข้าสู่ร่างกาย (Riera Romo, Pérez-Martínez, & Castillo Ferrer, 2016) เมื่อสิ่งแปลกปลอมจากภายนอกเข้าสู่ร่างกายเซลล์ภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดที่อยู่ในบริเวณบาดแผลจะรับรู้ถึงเชื้อจุลชีพที่บุกรุกหรือสิ่งแปลกปลอมที่บุกรุกเข้ามาได้อย่างรวดเร็ว โดยเซลล์ภูมิคุ้มกันในที่อยู่ในบริเวณดังกล่าวจะทำลายสิ่งแปลกปลอมเหล่านั้นผ่านกระบวนการต่าง ๆ ก่อนนำเสนอสิ่งแปลกปลอมที่ตรวจพบแก่เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเพื่อเพิ่มความสามารถในการกำจัดเชื้อหรือสิ่งแปลกปลอมที่เป็นอันตรายต่อร่างกายใหม่ต่อไป (Janeway, Travers, Walport, & Shlomchik, 2001) นอกจากการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมที่เกิดจากสิ่งแวดล้อมภายนอกแล้วเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดยังสามารถรับรู้ได้ถึงสิ่งแปลกปลอมภายในร่างกายที่เกิดจากความผิดปกติของเซลล์ภายในร่างกายได้อีกด้วย หลังจากเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดรับรู้และทำลายสิ่งแปลกปลอม เซลล์ภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดที่มีคุณสมบัติในการนำเสนอแอนติเจนหรือที่เรียกว่า Antigen presenting cells (APCs) จะทำหน้าที่นำเสนอสิ่งแปลกปลอมให้กับเซลล์ที่อยู่ในระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ และทำหน้าที่เป็นสะพานเชื่อมการทำงานระหว่างเซลล์ภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดและเซลล์ภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (Marshall, Warrington, Watson, & Kim, 2018) เมื่อเซลล์ที่อยู่ในระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะได้รับ

การนำเสนอสิ่งแปลกปลอม เซลล์จะถูกกระตุ้นให้เรียนรู้และจดจำลักษณะจำเพาะของสิ่งแปลกปลอม นั้น ๆ ก่อนจะกระตุ้นให้เกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัด สิ่งแปลกปลอม โดยการตอบสนองของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะนี้จะมีการตอบสนองต่อ สิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายได้อย่างจำเพาะ และสามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมแปลกปลอมภายใน ร่างกายนั้น ๆ ได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ แต่อย่างไรก็ตามการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน แบบจำเพาะนี้ก็จำเป็นต้องได้รับการนำเสนอสิ่งแปลกปลอมจากเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่ กำเนิดที่มีคุณสมบัติเป็น APCs ก่อนจึงจะตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมได้ ส่งผลให้เมื่อมีการติดเชื้อ ระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะจึงจำเป็นต้องใช้เวลาประมาณ 5 - 7 วัน เพื่อตอบสนองต่อสิ่ง แปลกปลอม (Marshall et al., 2018; Netea, Schlitzer, Placek, Joosten, & Schultze, 2019) ซึ่งล่าช้ากว่าการตอบสนองของเซลล์ภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดที่สามารถรับรู้ถึงสิ่งแปลกปลอมได้อย่าง รวดเร็วแต่ไม่มีความจำเพาะ และเมื่อมีการติดเชื้อซ้ำเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะที่มี ความสามารถในการจดจำลักษณะเฉพาะของสิ่งแปลกปลอมจะสามารถตอบสนองการติดเชื้อซ้ำได้ อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้นต่างจากเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดที่ไม่มี ความสามารถในการจดจำที่จำเพาะต่อสิ่งแปลกปลอมจึงมีการตอบสนองต่อการติดเชื้อซ้ำแบบเดิม อย่างไรก็ตามการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันจำต้องอาศัยทำงานร่วมกันของเซลล์ทั้ง 2 ระบบจึงจะ สามารถตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมได้อย่างครอบคลุมและมีประสิทธิภาพสูงสุด (Anaya, Shoenfeld, Rojas-Villarraga, Levy, & Cervera, 2013; Nicholson, 2016)



ภาพ 1 แสดงองค์ประกอบของระบบภูมิคุ้มกันร่างกาย (1) องค์ประกอบของระบบภูมิคุ้มกันที่เกิดจากอุปสรรคทางร่างกาย (Anatomical and Physiological Barriers) เช่น ผิวหนัง กรดในกระเพาะ และไลโซไซม์ในน้ำตา (2) องค์ประกอบของระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (Innate Immunity) เช่นการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด เช่น Macrophages และDendritic cells และการการตอบสนองแบบ humoral ของระบบ Complement เป็นต้น (3) องค์ประกอบของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (Adaptive Immunity) เช่นการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมของ T cells B cells และการตอบสนองของแอนติบอดีที่เป็นการตอบสนองแบบ humoral ของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ

ที่มา: Turvey, & Broide, 2010

ภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด

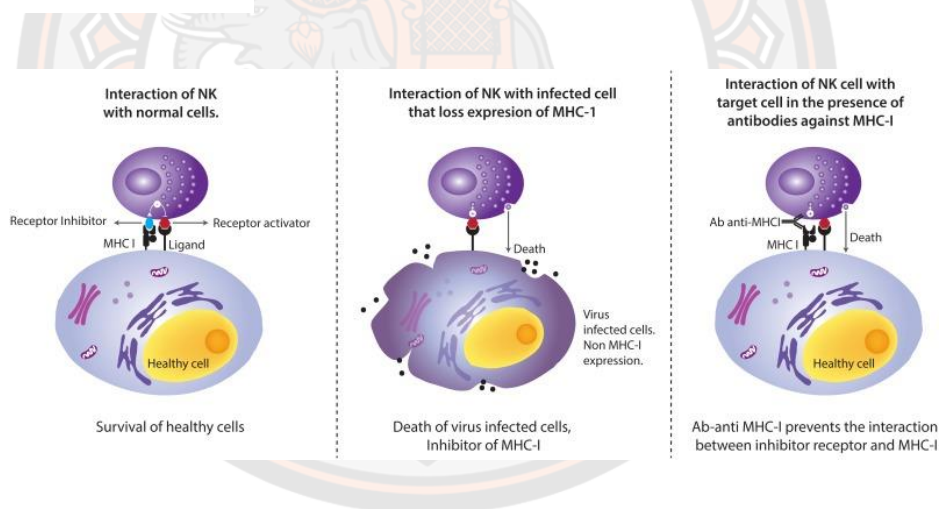
ภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (Innate Immunity) เป็นกระบวนการป้องกันร่างกายจากสิ่งแปลกปลอมที่มีมาตั้งแต่เกิด ทำหน้าที่เป็นด่านแรกในการป้องกันร่างกายจากสิ่งแปลกปลอมที่เกิดจากสิ่งแวดล้อมภายนอกที่ต้องการเข้าสู่ร่างกาย โดยการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดจะเป็นการทำงานร่วมกันของการป้องกันที่เกิดจากอุปสรรคทางร่างกายเพื่อป้องกันสิ่งแปลกปลอมจากภายนอกเข้าสู่ร่างกาย และการป้องกันที่เกิดจากการตอบสนองของเซลล์ภูมิคุ้มกันทำหน้าที่ตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมที่ตรวจพบภายในร่างกาย (Janeway et al., 2002; Turvey, 2010) การป้องกันที่เกิดจากอุปสรรคทางร่างกายเป็นการป้องกันที่เกิดจากคุณลักษณะทางกายภาพ (Anatomic) และ

ทางสรีรวิทยา (physiologic) ของร่างกายของสิ่งมีชีวิตที่มีมาแต่กำเนิดเช่น การป้องกันร่างกายจากสิ่งแวดล้อมภายนอกของผิวหนังที่มีความสามารถในการพลัดเปลี่ยนเซลล์ผิวหนังชั้นนอก (Epithelial cell) ให้หลุดออกจากร่างกายเพื่อขจัดเชื้อจุลชีพและสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาเกาะติดและเจริญเติบโตที่บริเวณผิวหนัง และนอกจากการพลัดเปลี่ยนเซลล์ผิวเพื่อขจัดสิ่งแปลกปลอมแล้ว ในบริเวณผิวหนังจะประกอบไปด้วยต่อมเหงื่อที่มีความสามารถในการสร้างกรดเกลือที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลชีพร่วมอยู่ด้วย โดยร่างกายจะหลั่งเหงื่อที่มีคุณสมบัติเป็นกรดออกมาเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (Matsui, & Amagai, 2015; Riera Romo et al., 2016) และในบริเวณผิวหนังนี้ยังเป็นที่อยู่ของเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่น (Normal flora) ที่มีความสามารถในการเจริญเติบโตที่ผิวหนัง โดยเชื้อจุลชีพประจำถิ่นเหล่านี้จะทำหน้าที่สำคัญในการยับยั้งการเข้าจับและเจริญเติบโตของเชื้อต่างถิ่น เพื่อไม่ให้เชื้อจุลชีพต่างถิ่นบุกรุกเข้าสู่ร่างกายได้ ในบริเวณช่องทางเปิดเข้าสู่ร่างกาย เช่น บริเวณทางเดินหายใจ และบริเวณทางเดินอาหาร ผิวหนังจะมีลักษณะบอบบางเพื่อแลกเปลี่ยนก๊าซในการบวกร่างกายและเพื่อดูดซึมสารอาหารเข้าสู่ร่างกาย ผิวหนังในบริเวณดังกล่าวจะมีเซลล์เยื่อเมือกซึ่งทำหน้าที่สร้างชั้นเยื่อเมือก (Mucous membrane) ขึ้นปกคลุมเซลล์และทำหน้าที่ดักจับสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในช่องทางเปิด และมีเซลล์ที่มีลักษณะเป็นขนเล็ก ๆ ที่เรียกว่า ซิเลีย (cilia) ที่ทำหน้าที่พัดโบกให้สิ่งแปลกปลอมต่าง ๆ ที่หลุดเข้ามาให้หลุดออกไปจากร่างกาย (Turvey et al., 2010; Chaplin, 2010) และจากความสามารถในการป้องกันร่างกายของผิวหนังนี้ ผิวหนังจึงจัดเป็นการป้องกันร่างกายที่เกิดจากอุปสรรคทางร่างกายที่มีขนาดใหญ่ที่สุด ในบริเวณช่องทางเปิดอื่น ๆ ที่ไม่มีการป้องกันจากผิวหนังเช่นบริเวณตา ดวงตาจะมีสารคัดหลั่งที่มีฤทธิ์ในการต้านจุลชีพ เช่น ในน้ำตาประกอบไปด้วยไลโซไซม์ (lysozyme) ที่มีฤทธิ์ในการทำละลายเชื้อจุลชีพ (Akinbi, Epaud, Bhatt, & Weaver, 2000) จากกระบวนการป้องกันที่เกิดจากอุปสรรคทางร่างกายเหล่านี้ ส่งผลให้สิ่งแปลกปลอมภายนอกเข้าสู่ร่างกายได้ยาก แต่หากร่างกายได้รับบาดเจ็บและเกิดการฉีกขาดบริเวณผิวหนังซึ่งเป็นการป้องกันที่เกิดจากอุปสรรคทางร่างกายสูญเสียไป สิ่งแปลกปลอมจากภายนอกจะสามารถบุกรุกเข้าสู่ร่างกายและก่อให้เกิดโรคและเป็นอันตรายต่อร่างกายได้ (Janeway et al., 2001) ร่างกายจะกระตุ้นให้เกิดการอักเสบเพื่อเรียกเซลล์ภูมิคุ้มกันมากำจัดเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย การอักเสบในบริเวณดังกล่าวนี้จะส่งผลให้เกิดการการคลั่งของเลือดส่งผลให้บริเวณที่มีการติดเชื้อหรือได้รับบาดเจ็บจะมีอุณหภูมิ (Temperature) สูงขึ้นส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลชีพและเพิ่มจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีความสามารถในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมอีกด้วย (Janeway et al., 2001; Anaya et al., 2013; Riera Romo et al., 2016)

เมื่อสิ่งแปลกปลอมจากภายนอกเข้าสู่ร่างกาย เซลล์ภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดจะสามารถรับรู้ถึงสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายหรือที่เรียกว่า Pathogen-associated molecular pattern (PAMPs) ได้อย่างรวดเร็ว โดยเซลล์ภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดจะสามารถรับรู้ถึง PAMPs ซึ่งเป็น

โมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของเชื้อจุลชีพรวดเร็วผ่านทางโมเลกุลของ Pattern recognition receptors (PRRs) เช่น Toll-like receptors (TLRs), C-type lectin receptors (CLRs), Retinoic acid-inducible gene (RIG)-I-like receptors (RLRs) และ NOD-like receptors (NLRs) ซึ่งเป็นโมเลกุลที่จะมีการแสดงออกอยู่บนผิวของเซลล์ภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด โดย PRRs นี้จะทำหน้าที่ในการตรวจจับสิ่งแปลกปลอมภายในร่างกายทั้งจากสิ่งแปลกปลอมที่เกิดจากเชื้อจุลชีพ (PAMPs) เช่น Lipopolysaccharides (LPS), Peptidoglycan, lipoteichoic acid, lipoarabinomannan, bacterial flagellar proteins, viral double-stranded ribonucleic acid (RNA) และ Damage-associated molecular patterns (DAMPs) ที่เกิดจากเซลล์ภายในร่างกายที่ได้รับบาดเจ็บหรือถูกทำลายเช่น high-mobility group box 1 (HMGB1), S100 proteins, heat shock proteins (HSPs) และ Uric acid (Takeuchi, & Akira, 2010; Chaplin, 2010) เมื่อ PRRs รับรู้ถึงสิ่งแปลกปลอมเช่น LPS ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของเชื้อจุลชีพ (PAMPs) เข้าสู่ร่างกาย TLRs ที่ทำหน้าที่เป็น PRRs และมีความจำเพาะกับ LPS จะรับรู้ถึงสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายนี้ ก่อนจะส่งสัญญาณเข้าสู่นิวเคลียส (Nucleus) เพื่อกระตุ้นการทำงานของทรานสคริปชันแฟคเตอร์ (transcription factors) เช่น Nuclear factor kB (NF-kb), Activating protein 1 (AP-1), Interferon respond factor 3 (IRF3) และ IRF7 ให้มีการผลิตไซโตไคน์ (cytokines) และคีโมไคน์ (chemokine) จำพวก Tumor necrosis factor (TNF), Interleukin (IL)- 1, IL-6, Interferon (INF)- α และ INF- γ ที่มีความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการอักเสบและกระตุ้นการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (Janeway et al., 2002; Chaplin, 2010; Turvey et al., 2010; Marshall et al., 2018) เมื่อเซลล์ภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดรับรู้ถึงสิ่งแปลกปลอมในร่างกาย เซลล์ภูมิคุ้มกันที่มีคุณสมบัติในการนำเสนอแอนติเจน (APCs) เช่น โมโนไซต์ (Monocyte) แมคโครฟาจ (Macrophage) และเซลล์เดนดริตริก (Dendritic cell) จะจับสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่เซลล์ด้วยการฟาโกไซโตซิส (Phagocytosis) ก่อนนำสิ่งแปลกปลอมเหล่านั้น เข้าสู่กระบวนการทำลายและตัดแยกให้สิ่งแปลกปลอมดังกล่าว กลายเป็นชิ้นส่วนโปรตีนสายสั้น ๆ ที่เรียกว่าเปปไทด์ (peptide) ก่อนนำเสนอสิ่งแปลกปลอมหรือแอนติเจนเหล่านี้ให้แก่เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ เพื่อกระตุ้นการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะและเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย (Blum et al., 2013) นอกจากการจับกินแบบ Phagocytosis ของเซลล์ภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดแล้ว ระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดยังมีเซลล์ที่มีความสามารถตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมผ่านทาง การหลั่งเอนไซม์และสารเคมี เช่น การทำงานของกลุ่มแกรนูโลไซต์ (Granulocytes) เช่น นิวโทรฟิล (neutrophils) อีโอซิโนฟิล (eosinophils) เบโซฟิล (basophils) และแมสต์เซลล์ (mast cells) ที่มีความสามารถในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมด้วยสารเคมีที่มีฤทธิ์ในการทำลายสิ่งแปลกปลอม (Nicholson, 2016) โดยเฉพาะการทำงานของ Natural killer (NK) cells (ภาพ 2) ที่มี

ความสามารถในการทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส หรือเซลล์ที่ผิดปกติผ่านทาง activating receptor ที่มีความสามารถกระตุ้นให้เซลล์เกิดการ apoptosis ได้หากไม่ได้รับการยับยั้งผ่านทาง inhibitory receptor ที่มีความจำเพาะกับ Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I ที่มีการแสดงออกในเซลล์ปกติ โดย activating receptor ของ NK cells ที่มีความสามารถในการจับกับ โมเลกุลต่าง ๆ ที่ผิวเซลล์ไม่ได้รับการยับยั้งจาก MHC Class I บนผิวเซลล์ activating receptor จะกระตุ้นให้เซลล์เกิดการตายแบบ Apoptosis พร้อมหลั่งสาร perforin และ granzyme ที่มีความสามารถในการทำลายผนังเซลล์ออกมา เพื่อทำลายเซลล์ที่ติดเชืื่อนั้น ๆ นอกจากนี้เมื่อระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะได้รับการกระตุ้น NK cells จะสามารถทำงานร่วมกับแอนติบอดี (Antibody) ผ่านทาง Fc γ RIIIA (CD16) ซึ่งเป็น receptor ที่มีความจำเพาะต่อ Fc ของ IgG ได้อีกด้วย โดยการทำงานของ Fc γ RIIIA (CD16) จะกระตุ้นให้เซลล์ที่ผิดปกติถูกทำลายผ่านกระบวนการ antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) ซึ่งเป็นการจับอย่างจำเพาะของ NK cells ผ่านทางแอนติบอดีกับเซลล์ที่ผิดปกติก่อนจะหลั่งสารพิษออกมาเพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอม นั้น ๆ อย่างจำเพาะ (Anaya et al., 2013)



ภาพ 2 แสดงการทำงานของ NK cells (1) การทำงานของ NK cells ต่อเซลล์ปกติเมื่อ NK cells ตรวจพบ MHC I บนผิวเซลล์ปกติที่มีความสามารถในการจับกับ inhibitor receptor เพื่อยับยั้งการทำงานของทำงานของ NK cells (2) การทำงานของ NK cells ต่อเซลล์ที่ผิดปกติ ซึ่งจะมีการแสดงออกของ MHC I ต่ำส่งผลให้ไม่สามารถยับยั้งการทำลายเซลล์ผ่านทาง inhibitor receptor ได้ (3) การทำงานของ NK cells ต่อเซลล์ที่ผิดปกติร่วมกับแอนติบอดี แอนติบอดีจะไปจับกับแอนติเจนที่มีความผิดปกติก่อนจะกระตุ้นการทำงานของ NK cells ให้ทำลายเซลล์ที่ผิดปกติผ่านทาง ADCC

ที่มา: Anaya et al., 2013

นอกจากการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดแล้ว ระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดยังมีการตอบสนองผ่าน Humoral immunity ซึ่งเป็นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่อาศัยโปรตีนขนาดเล็กในสารน้ำตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอม โดยหนึ่งในการตอบสนองแบบ Humoral immunity ที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดคือ การตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมของระบบคอมพลีเมนต์ (Complement System) เป็นการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมที่เกิดจากการทำงานร่วมกันของกลุ่มโปรตีนขนาดเล็กประมาณ 50 ชนิด เพื่อให้เกิดการอักเสบและกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย โดยการทำงานของทำงานของระบบคอมพลีเมนต์จะแบ่งออกเป็นการรับรู้และทำงาน 3 ระบบ คือ 1) Classical pathway ซึ่งเกิดจากการรับรู้ถึงแอนติเจนที่เกิดจากการเข้าจับของแอนติบอดีก่อนกระตุ้นการทำงานของระบบระบบคอมพลีเมนต์ 2) Alternative pathway เป็นการทำงานของระบบคอมพลีเมนต์ที่เกิดจากการรับรู้ถึงแอนติเจนของเชื้อโรคโดยตรง และ 3) Mannose-binding lectin pathway ซึ่งเป็นการรับรู้ถึงแอนติเจนผ่านทาง mannose-binding lectin (MBL), L-ficolin และ H-ficolin ที่มีความจำเพาะกับ D-mannose และ N-acetyl-D-glucose บนผิวของเซลล์เชื้อโรคที่มีความสามารถในการกระตุ้นการทำงานของระบบคอมพลีเมนต์ โดยหลังจากระบบคอมพลีเมนต์รับรู้และเข้าจับกับแอนติเจนแล้ว โปรตีนขนาดเล็กในระบบคอมพลีเมนต์ที่จะร่วมตัวกันเป็นวงกลมเพื่อเจาะรูเชื้อโรคหรือเซลล์ที่ผิดปกติส่งผลให้สารละลายจากภายนอกไหลเข้าสู่เซลล์และส่งผลให้เซลล์ถูกทำลาย (Dunkelberger, & Song, 2010; Riera Romo et al., 2016)

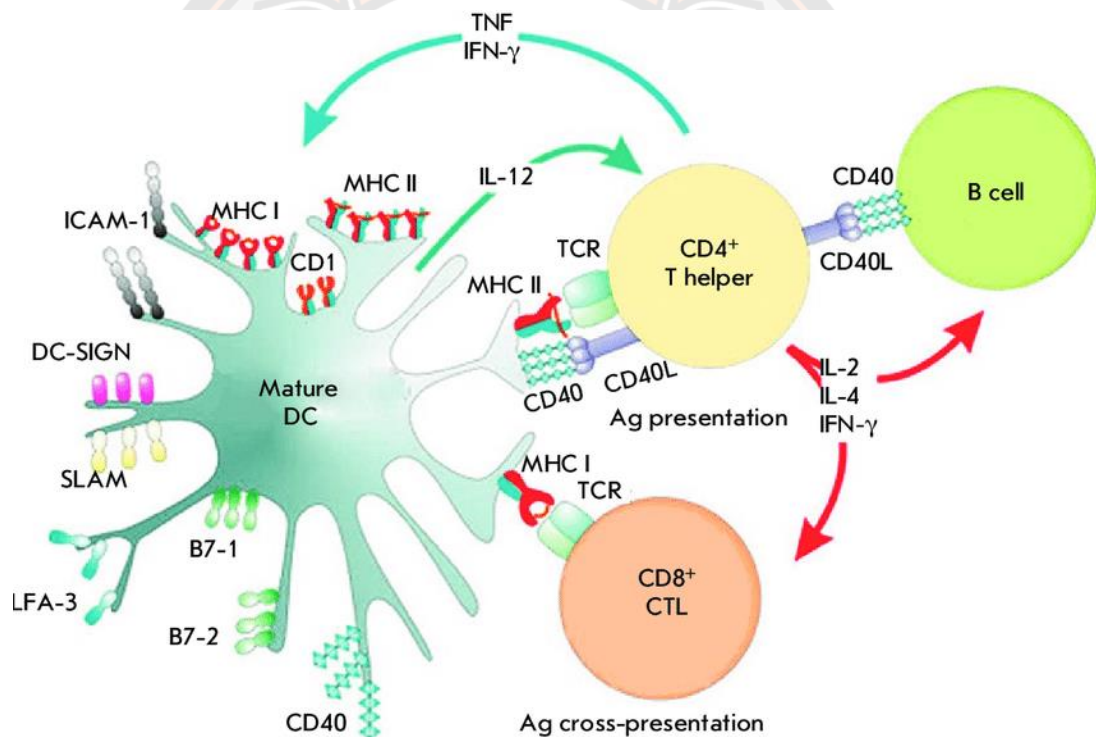
ภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ

ภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (Adaptive Immunity) เป็นกระบวนการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมที่มีความจำเพาะและมีความสามารถในการจดจำสิ่งแปลกปลอมและจำเป็นต้องได้รับการนำเสนอและกระตุ้นจากเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด ต่างจากการตอบสนองของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดที่มีความสามารถในการรับรู้และตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมได้อย่างรวดเร็ว ภูมิคุ้มกันจำเพาะจำเป็นต้องได้รับการนำเสนอสิ่งแปลกปลอมเพื่อเรียนรู้ถึงสิ่งแปลกปลอม เมื่อได้รับการนำเสนอสิ่งแปลกปลอมครั้งแรกระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะจะเรียนรู้และจดจำสิ่งแปลกปลอมนั้น ๆ อย่างจำเพาะเจาะจง ก่อนจะกระตุ้นให้เซลล์มีการตอบสนองที่จำเพาะต่อสิ่งแปลกปลอมนั้น ๆ และสร้างเซลล์ที่มีความสามารถในการจำจำสิ่งแปลกปลอมขึ้นมาเพื่อจดจำสิ่งแปลกปลอมที่ได้รับการกระตุ้น เมื่อได้รับการกระตุ้นจากสิ่งแปลกปลอมเดิมอีกครั้ง เซลล์ที่มีความสามารถในการจดจำสิ่งแปลกปลอมจะถูกกระตุ้นและมีการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมที่มีการนำเสนอซ้ำนั้นอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้สามารถตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมซ้ำนั้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งความสามารถในการจดจำต่อสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามานั้นต่างจากระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดที่มีความจำเพาะต่อโมเลกุลของสิ่งแปลกปลอมอย่างจำกัด ดังนั้นเมื่อมีการติดเชื้อซ้ำการ

ทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดจึงมีการตอบสนองเหมือนเดิม (Bonilla, & Oettgen, 2010) แต่อย่างไรก็ตามการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะก็จำเป็นต้องได้รับการนำเสนอของเซลล์ที่มีความสามารถในการเป็น APC เพื่อกระตุ้นการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ ดังนั้นการร่วมมือกันของทั้ง 2 ระบบภูมิคุ้มกันจึงจะมีประสิทธิภาพมากที่สุดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเกี่ยวข้องกับการทำงานร่วมกันของเซลล์เม็ดเลือดขาว 2 กลุ่ม คือ การทำงานของ T Lymphocyte หรือ T cells ที่สร้างมาจากต่อมไทมัส (Thymus) และการทำงานของ B Lymphocyte (B cells) ที่สร้างมาจากไขกระดูก (Bone marrow) ที่มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดี (Antibody) ที่มีความจำเพาะกับสิ่งแปลกปลอม (Marshall et al., 2018; Netea et al., 2019)

การทำงานและตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมของ T Lymphocyte ในระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเกิดจากการกระตุ้นและการนำเสนอสิ่งแปลกปลอมผ่านทางเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดที่มีคุณสมบัติเป็น APCs เช่น Dendritic cell เมื่อสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย APCs จะจับสิ่งแปลกปลอมกินและย่อยสลายสิ่งแปลกปลอมนั้นให้เป็นชิ้นส่วนโปรตีนสายสั้น ๆ (Peptide) ก่อนนำเสนอผ่านทางโมเลกุลของ MHC เพื่อกระตุ้นการทำงานของ naïve T cell ผ่านทาง T cell receptors (TCR) การตอบสนองของ T cells เมื่อได้รับการกระตุ้นผ่านทาง MHC แบ่งเป็นการกระตุ้นผ่านทาง MHC class I ที่มีความจำเพาะกับ CD8+ T cells เมื่อ CD8+ T cells ได้รับการกระตุ้น CD8+ T cells จะพัฒนาเป็น Cytotoxic T cells (TC) Killer T cell หรือ cytotoxic T-lymphocyte (CTL) ที่มีความสามารถในการเรียนรู้และจดจำสิ่งแปลกปลอมที่ถูกนำเสนออย่างจำเพาะ เมื่อพบสิ่งแปลกปลอม CD8+ T cells พบเซลล์ที่ผิดปกติ CD8+ T cells จะเข้าไปทำลายเซลล์ที่มีการติดเชื้อหรือสิ่งแปลกปลอมนั้น ๆ ทันทีโดยอาศัยการทำงานของไซโตไคน์และคีโมไคน์ที่มีความสามารถในการทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อและเซลล์ที่ผิดปกติ (Berg, & Forman, 2006; Chaplin, 2010) การนำเสนอสิ่งแปลกปลอมผ่านทาง MHC class II ที่มีความจำเพาะกับ CD4+ T cell หรือ Helper T-cell เมื่อได้รับการกระตุ้น CD4+ T cell ซึ่งเป็น helper cells ที่ไม่มีความสามารถในการทำลายหรือฆ่าเซลล์ที่ผิดปกติจะทำหน้าที่กระตุ้นและส่งสัญญาณกระตุ้นการทำงานของเซลล์ภูมิคุ้มกันอื่น ๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดสิ่งแปลกปลอมเช่น การทำงานของ T helper cells 1 (Th1) ที่มีความสามารถในการผลิต Interferon-gamma ที่มีความสามารถในการกระตุ้นการทำงานของ macrophages และ NK cells ในการกำจัดสิ่งแปลกปลอม การทำงานของ Th2 ที่มีความสามารถในการสร้างและหลั่ง Interleukin 4 ที่มีความสามารถในการกระตุ้นการทำงานของ B cells ให้ผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเพื่อตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอม (ภาพ 3) (Palmer et al., 2005; Bonilla et al., 2010; Markov, Mironova, Vlasov, & Zenkova, 2016; Marshall et al., 2018) นอกจากการตอบสนองของ CD4+ และ CD8+ T cells แล้ว T Lymphocyte ยังมีการตอบสนอง

ของ $\gamma\delta$ T cells (gamma delta T cells) ที่มีลักษณะ TCR เป็นแบบ Gamma-Delta cells Receptor ($\gamma\delta$ T cells receptor) ต่างจาก CD4+ และ CD8+ T cells ที่มีการแสดงออกของ TCR แบบ Alpha-Beta Cell Receptor ($\alpha\beta$ T cell receptors) โดย $\gamma\delta$ T cells สามารถตอบสนองต่อแอนติเจนได้โดยตรงไม่จำเป็นต้องมีการนำเสนอแอนติเจนผ่านทาง MHC ของ APCs ดังนั้นเมื่อมีการติดเชื้อ $\gamma\delta$ T cells จะสามารถตอบสนองกำจัดเซลล์ที่ติดเชื้อและสิ่งแปลกปลอมต่าง ๆ ได้อย่างรวดเร็ว (Chaplin, 2010; Wang, & Welte, 2013) โดยการทำงานของ T cells เหล่านี้จะถูกควบคุมโดยการทำงานของ Regulatory T cells (TREG) ที่มีความสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ T cells และยับยั้งการผลิตไซโตไคน์ที่มากเกินไปจนก่อให้เกิดโรคแพ้ภูมิตัวเองได้ (Kondělková, Vokurková, Krejsek, Borská, Fiala, & Ctirad, 2010)



ภาพ 3 แสดงการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะผ่านทาง MHC II และ MHC I ของเซลล์เดนไดรติก เพื่อกระตุ้นการทำงานของ CD4 T cells และ CD8 T cells ตามลำดับ

ที่มา: Markov, Mironova, Vlasov, & Zenkova, 2016

การทำงานและการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมของ B lymphocytes ซึ่งเป็นเซลล์ภูมิคุ้มกันในระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะที่ถูกสร้างมาจาก stem cell ของไขกระดูก โดยการทำงานและการตอบสนองของ B cells จะได้รับการกระตุ้นการทำงานจาก CD4+ T cells ผ่านทาง B cell receptor (BCR) บนผิวเซลล์ B cells ก่อนจะพัฒนาตัวเองเป็น plasma cell ที่มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อสิ่งแปลกปลอมเพื่อตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมที่ได้รับการกระตุ้น โดย แอนติบอดีนี้จะเป็นสาร glycoprotein ที่ถูกสร้างขึ้นเพื่อตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมแบ่งเป็นสาร immunoglobulin (Ig) 5 ชนิด ที่สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตเลี้ยงลูกด้วยนม คือ IgG, IgA, IgM, IgD และ IgE (Schroeder, & Cavacini, 2010) แอนติบอดีที่ถูกสร้างขึ้นจะมีการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมแบบ humoral immunity หรือการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่อาศัยสารน้ำในการตอบสนอง โดยจะแบ่งการทำงานเป็น 1) Neutralization ซึ่งเป็นการจับกันของแอนติเจนและสิ่งแปลกปลอมนั้น ๆ เพื่อไม่ให้สิ่งแปลกปลอมสามารถทำงานได้ 2) Opsonization ซึ่งเป็นการเข้าจับสิ่งแปลกปลอมของแอนติบอดีจะเพื่อเพิ่มกระตุ้นและเพิ่มประสิทธิภาพการ phagocytosis ของเซลล์ในกลุ่มของ phagocyte 3) Antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) โดยแอนติบอดีจะไปจับกับเซลล์หรือสิ่งแปลกปลอมก่อนกระตุ้นให้เกิดให้เซลล์ที่อยู่ในระบบภูมิคุ้มกันเช่น NK cells เข้ามาทำลายเซลล์ที่ติดปกติเหล่านั้นอย่างจำเพาะด้วยสารเคมีเช่น Perforin และ Granzyme 4.) Complement activation โดยแอนติบอดีจะเข้าจับกับสิ่งแปลกปลอมและกระตุ้นให้เกิดการทำงานของระบบคอมพลีเมนต์ผ่านทาง Classical pathway เพื่อเจาะรูรั่วและทำลายเซลล์ที่ติดปกตินั้น ๆ (Bonilla et al., 2010; Chaplin, 2010; Marshall et al., 2018)

Dendritic cells

Dendritic cells (DCs) เป็นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดมีหน้าที่สำคัญในการป้องกันร่างกายจากสิ่งแปลกปลอมและนำเสนอสิ่งแปลกที่ตรวจพบให้แก่เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะดังนั้นเซลล์เดนไดรติกจึงทำหน้าที่เป็นเหมือนสะพานเชื่อมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันทั้ง 2 ระบบ โดยการนำเสนอสิ่งแปลกปลอมให้แก่เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะนี้จะเป็นการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่อาจก่อให้เกิดอันตรายต่อร่างกายได้ เซลล์เดนไดรติกสามารถพบได้ทั่วไปในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ทั่วร่างกาย เช่นในบริเวณผิวหนัง ชั้นเยื่อเมือก และเลือด โดยเซลล์เดนไดรติกจะมีหน้าที่สำคัญในการตรวจจับสิ่งแปลกปลอมในร่างกาย เมื่อเซลล์เดนไดรติกพบสิ่งแปลกปลอม เซลล์เดนไดรติกที่มีความสามารถในการรับรู้ถึงสิ่งแปลกปลอมผ่านทาง PRRs จะจับสิ่งแปลกปลอมนั้น ๆ กินแบบฟาโกไซโทซิสก่อนจะเคลื่อนที่ไปยังต่อมน้ำเหลืองเพื่อนำเสนอสิ่งแปลกปลอมที่จับได้ให้แก่ T Lymphocyte เพื่อกระตุ้นการทำงานของเซลล์ภูมิคุ้มกันต่าง ๆ ในระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ

(Solano-Gálvez et al., 2018) ดังนั้นในทางภูมิคุ้มกันวิทยาเซลล์เดนไดรติกที่มีความสามารถในการรับรู้และนำเสนอแอนติเจนต่าง ๆ นี้จึงเป็น APCs ที่สำคัญในการทำหน้าที่เป็นสะพานเชื่อมการทำงานระหว่างระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดและระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (Marshall et al., 2018)

ความเป็นมาของ Dendritic cells

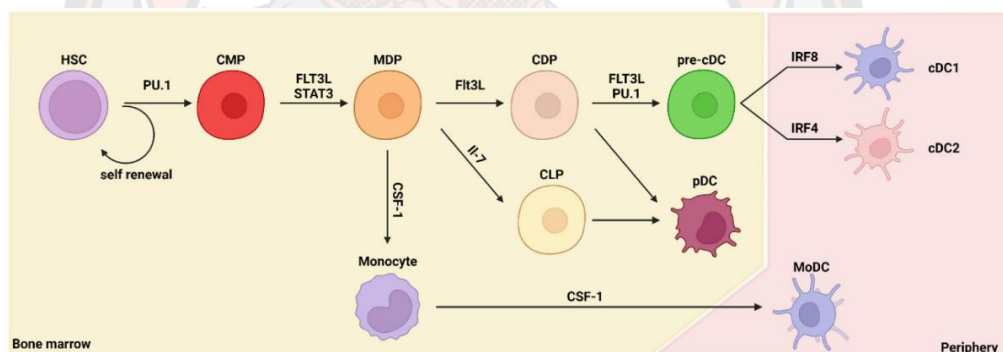
Dendritic cells ถูกค้นพบในปีคริสต์ศักราช 1868 จากการศึกษากระจายตัวของ Langerhans cells บริเวณผิวหนังของมนุษย์ของ Langerhans จากการศึกษาครั้งนี้ Langerhans พบเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายกับเดนไดรต์ (Dendrite) ของเซลล์ประสาท (neuron) (Breathnach, 1963) แต่ยังไม่ได้รับการอธิบายถึงเซลล์ที่มีความพิเศษนี้ ตลอดจนในปีคริสต์ศักราช 1967 ที่มีการศึกษาการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันเพื่อทดลองสร้างแอนติบอดีของ Mishell และ Dutton พบว่าการกระตุ้นการทำงานของ T Lymphocyte เพียงอย่างเดียวไม่เพียงพอแก่การสร้างแอนติบอดี (Mishell, & Dutton, 1967) การสร้างแอนติบอดีจำเป็นต้องมีเซลล์ทำหน้าที่เป็น APCs นำเสนอสิ่งแปลกปลอมและกระตุ้นเซลล์ ซึ่งอาจเป็น macrophages ที่มีความสำคัญในระบบภูมิคุ้มกัน (Unanue, & Cerottini, 1970) แต่จากการศึกษาต่อมาพบว่า macrophages มีความสามารถในการทำลายสิ่งแปลกปลอมอย่างรุนแรง ส่งผลให้ไม่สามารถนำเสนอแอนติเจนแก่ T Lymphocyte ได้ (Ehrenreich, & Cohn, 1967, Ehrenreich, & Cohn, 1969, Steinman, & Cohn, 1972) ต่อมาในปีคริสต์ศักราช 1973 Steinman และ Cohn ได้ทำการศึกษาเซลล์ในต่อมน้ำเหลืองของหนูและพบเซลล์ที่มีลักษณะพิเศษลักษณะแตกต่างจากเซลล์ Macrophages แต่มีลักษณะคล้ายกับเซลล์ที่มีการค้นพบโดย Langerhans ในปี 1868 จึงมีการนำเสนอชื่อเซลล์ที่ค้นพบใหม่นี้ว่าเซลล์เดนไดรติก (Dendritic cells) ตามคำภาษากรีกที่แปลว่าต้นไม้ (dendron) (Steinman, & Cohn, 1973) และจากการศึกษาต่อมายังพบว่าเดนไดรติกอาจเป็นเซลล์ที่มีความสามารถในการนำเสนอแอนติเจนและมีตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่มีประสิทธิภาพมากกว่าเซลล์ภูมิคุ้มกันชนิดอื่น ๆ (Steinman, & Witmer, 1978) และจากการศึกษาลักษณะแอนติเจนที่ผิวเซลล์เดนไดรติกที่ค้นพบใหม่นี้ยังพบว่าเดนไดรติกเซลล์มีการแสดงออกของ MHC I ที่มีความสามารถในการกระตุ้นการทำงานของ Cytotoxic T cells (CD8+ T cells) ต่างจากการทำงานของ macrophages (Nussenzweig, Steinman, Gutschinov, & Cohn, 1980) และพบว่าเซลล์เดนไดรติกเซลล์จึงเป็นเซลล์ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการนำเสนอแอนติเจนและกระตุ้นการทำงานของ T cells (Liu, 2016)

ลักษณะและประเภทของ Dendritic cells

เซลล์เดนไดรติกเป็นเซลล์เดนไดรติกที่พัฒนามาจาก Haematopoietic stem cells (HSCs) หรือเซลล์ต้นกำเนิดของเม็ดเลือดมักมีรูปร่างลักษณะของเซลล์คล้ายกับเซลล์ประสาท (Breathnach, 1963) ที่มีรูปร่างดาว (Stellate shape) (Steinman et al., 1973) โดยเซลล์เดนไดรติกจะมีหน้าที่สำคัญในการสำรวจและค้นหาสิ่งแปลกปลอมภายในร่างกายก่อนจะนำเสนอสิ่งแปลกปลอม (antigen-presenting cell) ให้แก่เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ ดังนั้นเซลล์เดนไดรติกจึงเป็นตัวเชื่อมต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (innate immune system) กับระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (adaptive immune system) (Marshall et al., 2018) โดยแอนติเจนบนผิวเซลล์เดนไดรติกจะไม่มีการแสดงออกของ CD3 ซึ่งเป็นลักษณะจำเพาะของเซลล์ในกลุ่ม T Lymphocyte และไม่มีการแสดงออกของ CD19 และ CD56 ซึ่งเป็นแอนติเจนที่เป็นลักษณะจำเพาะของ B cells และ NK cells ตามลำดับ แต่จะมีการแสดงออกของ MHC class II (HLA-DR) ที่เป็นลักษณะจำเพาะของ APC (Haniffa, Collin, & Ginhoux, 2013; Solano-Gálvez et al., 2018) และการแสดงออกของ CD11c, CD26 และ CD33 ที่มีความจำเพาะกับเซลล์เดนไดรติกแทน (Guilliams et al., 2016) โดยการทำงานของเซลล์เดนไดรติกซึ่งสามารถพบได้ทั่วไปในร่างกาย ทั้งจากต่อมน้ำเหลืองส่วนกลาง และเนื้อเยื่อต่าง ๆ นั้นจะมีหน้าที่และการทำงานที่แตกต่างกัน เช่น การทำงานของเซลล์เดนไดรติกในบริเวณไขกระดูกจะทำหน้าที่เป็นเซลล์ที่เลี้ยงให้แก่ B cells และเซลล์เดนไดรติกที่อยู่ในบริเวณต่อมไทมัสจะทำหน้าที่ในการคัดเลือกและทำลาย T cells ตัวอ่อนที่มีผิดปกติ หรือเซลล์เดนไดรติกในบริเวณเนื้อเยื่อที่สัมผัสกับสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น เซลล์เดนไดรติกในบริเวณใต้ผิวหนัง ในบริเวณเยื่อบุต่าง และเดนไดรติกที่สามารถพบได้ในเลือดจะมีหน้าที่สำคัญในการตรวจสอบและค้นหาสิ่งแปลกปลอมภายในร่างกาย (Liu, 2016)

เซลล์เดนไดรติกเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เกิดจาก Haematopoietic stem cells (HSCs) หรือเซลล์ต้นกำเนิดของเม็ดเลือด (CD34+) ภายในไขกระดูก (Devi, & Anandasabapathy, 2017) ภายใต้การพัฒนาและกระตุ้นจากไซโตไคน์หลายชนิด โดยเฉพาะการกระตุ้นจาก FMS-like tyrosine kinase 3 ligand (FLT3L) ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่มีผลต่อการพัฒนาเซลล์เดนไดรติกที่ส่งผลให้เซลล์เดนไดรติกแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน (Kang, & Lee, 2022) การพัฒนาเซลล์เดนไดรติกเริ่มจาก HSCs ที่มีการแสดงออกของ PU.1 transcription factor (ภาพ 4) จะพัฒนาเป็น common myeloid progenitors (CMPs) จากนั้น CMPs จะถูกกระตุ้นจาก FLT3L และพัฒนาเป็น macrophage-DC progenitors (MDPs) ที่สามารถพัฒนาเป็นโมโนไซต์หรือ เซลล์เดนไดรติกได้ โดยเมื่อได้รับการกระตุ้นจาก colony-stimulating factor 1 (CSF-1) จะพัฒนาเป็นโมโนไซต์ และหาก ได้รับการกระตุ้นจาก FLT3L ที่มากเพียงพอ MDP จะพัฒนา common DC progenitors (CDPs) ก่อนจะพัฒนาเป็น classical/conventional DC progenitors (pre-cDCs) หากได้รับการกระตุ้นจาก

FLT3L และมีการแสดงออกของ PU.1 transcription factor หลังจากนั้น pre-cDC จะได้รับการกระตุ้นจาก interferon-regulatory factor (IRF) ก่อนจะพัฒนาเป็นเซลล์เดนไดรติกที่สมบูรณ์ (cDC1s หรือ cDC2s) และจากไขกระดูกไปทำหน้าที่ในเนื้อเยื่อส่วนปลายต่อไป และหาก MDP ได้รับการกระตุ้นจาก IL-7 ที่เพียงพอ MDP จะพัฒนาเป็น common lymphoid progenitor (CLPs) ที่สามารถพัฒนาเป็น plasmacytoid DCs (pDCs) ได้ นอกจากนี้ pDCs อาจพัฒนามาจาก CDPs ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นจาก FLT3L และไม่มีการแสดงออกของ PU.1 transcription factor ได้อีกด้วย นอกจากนี้เซลล์เดนไดรติกยังสามารถพัฒนาขึ้นจากโมโนไซต์ได้หากเรื่องกายเกิดการอักเสบและได้รับการกระตุ้นจาก CSF-1 โดยเซลล์เดนไดรติกที่ถูกสร้างจากโมโนไซต์นี้จะเรียกว่า monocyte-derived DC (MoDC) (Kang et al., 2022) และจากการพัฒนานี้เองสามารถแยกเซลล์เดนไดรติกได้ออกเป็น 3 กลุ่มคือ Conventional หรือ Myeloid Dendritic Cells (cDCs) และ Plasmacytoid Dendritic Cells (pDCs) และอีก 1 กลุ่มเซลล์พิเศษที่เกิดจากการกระตุ้นภายใต้สภาวะที่ร่างกายเกิดการอักเสบ monocytes (mo-DCs) (Al-Ashmawy, 2018; Solano-Gálvez et al., 2018)



ภาพ 4 แสดงการพัฒนาของเซลล์เดนไดรติกในร่างกายมนุษย์ ในไขกระดูกก่อนออกสู่เนื้อเยื่อส่วนปลายที่เกิดจากความแตกต่างของไซโตไคน์ (FMS-like tyrosine kinase 3 ligand; FLT3L colony-stimulating factor 1; CSF-1 และ interferon-regulatory factor; IRF และ interleukin-7; IL-7) ที่ได้รับการกระตุ้น

ที่มา: Kang, & Lee, 2022

Conventional หรือ Myeloid Dendritic Cells (cDCs) เป็นเซลล์เดนไดรติกทั่วไปที่พัฒนาเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดในไขกระดูกก่อนจะย้ายเข้าสู่กระแสเลือด และมีความสามารถรับรู้ถึงสิ่งแปลกปลอมผ่านทาง TLR และมีการแสดงออกของแอนติเจน CD1a, CD11c, CD13, CD26

และ CD33 ที่มีความจำเพาะ (Guilliams et al., 2016) และไม่มีการแสดงออกของ CD14 และ CD16 ที่มีความจำเพาะต่อโมโนไซต์และแมคโครฟาจ แบ่งออกเป็นสองกลุ่มย่อยคือ กลุ่มที่มีการแสดงออกของ CD1c+ ซึ่งเป็นเซลล์เดนไดรติกที่สามารถพบได้ในบริเวณหลอดเลือดและเนื้อเยื่อทั่วไป และกลุ่มเซลล์เดนไดรติกที่มีการแสดงออกของ CD141+ ซึ่งสามารถพบได้มากในบริเวณต่อมน้ำเหลือง (Collin, McGovern, & Haniffa, 2013) เซลล์เดนไดรติกในกลุ่มที่มีการแสดงออกของ CD1c + จะเป็นเซลล์ที่มีหน้าที่สำคัญในการตรวจหาสิ่งแปลกปลอมต่าง ๆ ในร่างกายและจะมีการแสดงออกของ CD1a, CD11b และ CD11c ที่เกี่ยวข้องกับการนำเสนอ LPS ให้กับ naive T cells (Van Rhijn, Ly, & Moody, 2013) และการแสดงออกของ CD13 ที่มีที่เกี่ยวกับการฟาโกไซโตซิส (Villaseñor-Cardoso, Frausto-Del-Río, & Ortega, 2013) โดยการฟาโกไซโตซิสของเซลล์เดนไดรติกนั้นสามารถยับยั้งได้ผ่านทาง CD172 ที่มีความสามารถในการจับกับ CD47 บนผิวเซลล์อื่น ๆ เพื่อยับยั้งการจับกินแบบฟาโกไซโตซิสของเซลล์ (Gardai et al., 2005) นอกจากนี้บนผิวของเซลล์เดนไดรติกยังมีการแสดงออกของ CLR และ TLRs ที่มีความสามารถรับรู้ถึงสิ่งแปลกปลอมเช่น Lipopolysaccharide, Flagellin และส่วนประกอบของเชื้อจุลินทรีย์อื่น ๆ ได้ดี และเมื่อถูกกระตุ้น เซลล์เดนไดรติกจะมีการแสดงออกของ CD80+, CD83+, CD86+ และ CD40+ ที่บริเวณผิวเซลล์ และจะผลิต Tumor necrosis factor (TNF), Interleukin (IL)-6, IL-10, และ IL-12 ที่มีความสามารถกระตุ้นการทำงานของ naive T cells เช่นการกระตุ้นการทำงานของ Th1 และ Th17 ที่เป็น naive CD4+ T cells (Shortman, & Liu, 2002, Kassianos et al., 2012) กลุ่มเซลล์เดนไดรติกที่มีการแสดงออกของ CD141+ ซึ่งเป็นกลุ่มเซลล์ที่สามารถพบได้มากในต่อมน้ำเหลืองเช่น บริเวณต่อมทอนซิล ม้าม และไขกระดูก เซลล์เดนไดรติกที่มีการแสดงออกของ CD141+ มีลักษณะเหมือน CD1c+ DCs แต่จะมีการแสดงออกของ CD11b และ CD11c ต่ำ แต่จะมีการแสดงออกของ CLEC9A ซึ่งเป็น C-Type Lectin Receptor (CLR) ที่มีความจำเพาะโปรตีนของเซลล์ที่ถูกทำลายสูง และมีจะแสดงออกของ TLR3 และ TLR8 ที่มีความจำเพาะกับกรดนิวคลีอิกของไวรัส ส่งผลให้เซลล์เดนไดรติกที่มีการแสดงออกของ CD141+ เป็นเซลล์ที่มีความสามารถในการรับรู้ถึงเซลล์ที่ถูกทำลาย และเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสได้ดี ส่งผลให้เซลล์เดนไดรติกที่มีการแสดงออกของ CD141+ มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในการนำเสนอแอนติเจนและสามารถกระตุ้นการทำงานของ Cytotoxic T cells (Al-Ashmawy, 2018; Solano-Gálvez et al., 2018)

Plasmacytoid Dendritic Cells (pDCs) เป็นเดนไดรติกที่มีลักษณะเซลล์คล้ายเซลล์พลาสมา (plasma cell) พบได้น้อยมากในต่อมน้ำเหลืองแต่สามารถพบได้มากในเลือดและบริเวณอวัยวะที่บาดเจ็บและเกิดการอักเสบ Plasmacytoid Dendritic Cells มีการพัฒนาคล้ายกับ Conventional Dendritic Cells ที่เกิดจากเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดที่ต้องได้รับ Flt3L ในการเจริญเติบโต (Mildner, & Jung, 2014) แต่จะมีการแสดงออกของ MHC และ costimulatory

ที่ต่ำกว่าเซลล์เดนไดรติกทั่วไป แต่จะมีการแสดงออกที่จำเพาะของ TLR7 และ TLR9 ที่มีความจำเพาะต่อไวรัส ส่งผลให้ pDCs เป็นเซลล์ที่มีความสำคัญในการต่อต้านการติดเชื้อไวรัส (Liu, 2016; Solano-Gálvez et al., 2018) นอกจากนี้ pDCs ยังเป็นเซลล์เดนไดรติกที่มีความสามารถพิเศษในการผลิต Interferons (IFNs) 1 เพื่อกระตุ้นการทำงานของ CD4+ และ CD8+ T cells ต่างจากเซลล์เดนไดรติกปกติที่มักกระตุ้นการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะผ่านทาง IL-12 (Al-Ashmawy, 2018) และมีความสามารถในกระตุ้นการทำงานของ Th1 และ Th2 ของ CD4+ T cell ผ่านทาง IL-4 ได้อีกด้วย (Collin et al., 2013, Castell-Rodríguez, Piñón-Zárate, Herrera- Enríquez, Jarquín-Yáñez, & Medina-Solares, 2017; Al-Ashmawy, 2018)

Dendritic Cells Derived from Monocytes (moDC) เป็นเซลล์โมโนไซต์ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการพัฒนาเป็นเซลล์เดนไดรติกภายใต้สภาวะการอักเสบ โดยเมื่อร่างกายได้รับบาดเจ็บและเกิดการอักเสบ โมโนไซต์ที่อยู่ในบริเวณนั้น ๆ จะได้รับการกระตุ้นจากไซโตไคน์ที่มีชื่อว่า Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) ที่มีความสามารถในกระตุ้นการพัฒนาของโมโนไซต์ให้พัฒนาเป็นเซลล์เดนไดรติก GM-CSF เป็นไซโตไคน์ที่ถูกผลิตขึ้นจาก fibroblast, endothelial, epithelial populations และเซลล์เม็ดเลือดในกลุ่มของ T และ B Lymphocyte เมื่อร่างกายเกิดการอักเสบ โดย GM-CSF จะเข้าไปจับกับ GM-CSF receptor (GM-CSFR) ซึ่งประกอบไปด้วยสาย α (CD116; GM-CSF R α) และ สาย β (CD131; GM-CSF R β) ก่อนจะส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์ผ่านทาง janus kinase/signal transducer and activator of transcription (JAK/STAT) pathway, mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway และ phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway เพื่อกระตุ้นการพัฒนาเป็นเซลล์เดนไดรติกของเซลล์โมโนไซต์ (van de Laar, L., Coffey, & Woltman, 2012; Hamilton, 2019) moDC ที่ได้รับการพัฒนาโมโนไซต์จะมีความสามารถในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเหมือนกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของ cDCs ที่เกิดจากการพัฒนาเป็นเซลล์เดนไดรติกโดยตรงผ่านการกระตุ้นจาก Flt3 ligand (Flt3L) ของเซลล์เม็ดเลือดต้นกำเนิด โดย moDC จะสามารถนำเสนอแอนติเจนและกระตุ้นการทำงานของ CD4+ T และ CD8+ T ผ่านทาง MHC ได้ และสามารถผลิตไซโตไคน์เช่น IL-1, IL-6, TNF- α , IL-12 และ IL-23 เพื่อกระตุ้นและสนับสนุนการทำงานของเซลล์ภูมิคุ้มกันได้เหมือนเซลล์เดนไดรติกทั่วไป (Ganguly, Paul, Bagchi, Rakshit, Mandal, Bandyopadhyay, & Bandyopadhyay, 2007; Collin et al., 2013; Solano-Gálvez et al., 2018; Al-Ashmawy, 2018) แต่การแสดงออกบนผิวเซลล์ของ moDC จะมีการแสดงออกของ CD11c และ HLA สูง ซึ่งเป็นลักษณะจำเพาะของเซลล์เดนไดรติกที่พัฒนามาจากโมโนไซต์และมีการแสดงออกของ CD14

ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของโมโนไซต์ต่ำ (Mildner et al., 2014; Qu, Brinck-Jensen, Zang, & Chen, 2014)

การรับรู้ถึงสิ่งแปลกปลอมของ Dendritic cells

ในสภาวะปกติเซลล์เดนไดรติกส่วนใหญ่ในร่างกายจะเป็นเซลล์อ่อนที่ยังไม่เจริญเต็มที่แต่หากร่างกายได้รับบาดเจ็บมีสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย เซลล์เดนไดรติกจะสามารถรับรู้ถึงสิ่งแปลกปลอมได้อย่างรวดเร็วก่อนจะเคลื่อนที่ไปในบริเวณดังกล่าวเพื่อกำจัดเชื้อ โดยเซลล์เดนไดรติกที่ยังไม่เจริญเต็มที่เหล่านี้จะมีการแสดงออกของ CCR1, CCR2, CCR5, CCR6 และ CXCR1 ที่มีความสามารถในการรับรู้จับและสามารถกับคีโมไคน์ (chemokines) ที่เกิดจากการอักเสบ (Yanagihara, Komura, Nagafune, Watarai, & Yamaguchi, 1998; Sallusto, 1999) เช่น รับรู้ถึง macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha) ผ่านทาง CCL3 และรับรู้ถึง MIP-3alpha และ RANTES ผ่านทาง CCL20 และ CCL5 ตามลำดับ (Dieu et al., 1998; Solano-Gálvez et al., 2018) นอกจากการรับรู้ถึงคีโมไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบแล้ว เซลล์เดนไดรติกยังสามารถรับรู้ถึงสิ่งแปลกปลอมผ่านทาง PRRs ที่ประกอบไปด้วย Toll-like receptors (TLRs), RIG-like helicases (RLHs), NOD-like receptors (NLRs), C-type lectin-like receptors และ cytosolic DNA sensors และการรับรู้ถึงน้ำตาล Mannose ที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์เชื้อจุลินทรีย์ผ่านทาง mannose receptor (Collin et al., 2013; Solano-Gálvez et al., 2018) และสามารถรับรู้ผ่านทาง FcγRs, FcεRs และ CRs ของแอนติบอดีและระบบคอมพลีเมนต์ได้อีกด้วย (Auffray, Sieweke, & Geissmann, 2009) เมื่อเซลล์เดนไดรติกรับรู้ถึงสิ่งแปลกปลอมผ่านทางรีเซพเตอร์ต่าง ๆ เหล่านี้ เซลล์เดนไดรติกจะจับสิ่งแปลกปลอมกินผ่านกระบวนการฟาโกไซโทซิสก่อนจะพัฒนาตัวเองเป็นเซลล์เดนไดรติกที่เจริญเต็มที่ ที่มีการแสดงออกของ CCR6 และ CCR7 ที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการเคลื่อนที่ไปยังต่อมน้ำเหลือง และมีการแสดงออกของโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการนำเสนอแอนติเจนเพิ่มสูงขึ้นเพื่อทำหน้าที่ในการนำเสนอแอนติเจนและกระตุ้นการทำงานของ naive T cells ในขณะเดียวกันเซลล์เดนไดรติกที่ได้รับการกระตุ้นจะมีการเจริญเต็มที่เหล่านี้จะมีการแสดงออกของรีเซพเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับรับรู้ถึงสิ่งแปลกปลอมลดลง ส่งผลให้เซลล์เดนไดรติกที่ได้รับการกระตุ้นจะมีการเจริญเต็มที่ที่ไม่สามารถจับกับสิ่งแปลกปลอมอื่น ๆ ได้ต่ำ (Castell-Rodríguez et al., 2017; Solano-Gálvez et al., 2018)

การตอบสนองของ Dendritic cells

ในสภาวะปกติเซลล์เดนไดรติกนี้จะอยู่ในสภาวะที่ยังไม่เจริญเติบโตเต็มที่ (Immature dendritic cells, iDCs) หลังจากเซลล์เดนไดรติกรับรู้ถึงสิ่งแปลกปลอมผ่านทางรีเซพเตอร์ต่าง ๆ เซลล์เดนไดรติกจะจับกินสิ่งแปลกปลอมกินแบบฟาโกไซโทซิสผ่านทาง Fc receptors ของ IgG หรือ lectins เช่น CD205 ที่อยู่บริเวณผิวเซลล์ ก่อนนำสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ภายในเซลล์และพัฒนาเป็น

Mature dendritic cells (mDCs) และเคลื่อนตัวไปยังบริเวณต่อมน้ำเหลืองเพื่อกระตุ้นการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (Solano-Gálvez et al., 2018) สิ่งแปลกปลอมที่ถูกจับกินและนำเข้าสู่เซลล์จะถูกทำลายด้วย lysosomal protease ให้กลายเป็นโปรตีนสายสั้น ๆ ขนาด 8 – 17 กรดอะมิโน ที่เหมาะต่อการนำเสนอแอนติเจนผ่านทาง MHC ให้กับ T cells (Liu, 2016; Castell-Rodríguez et al., 2017) ในขณะเดียวกันเซลล์เดนไดรติกที่รับรู้ถึง PAMP และ DAMP ที่เกิดจากการติดเชื้อและการอักเสบผ่านทาง PRRs ช่องทางต่าง ๆ จะกระตุ้นการถ่ายทอดสัญญาณภายในเซลล์ (signaling pathways) ระหว่าง Toll-Interleukin receptor (TIR) domain กับ adaptor protein ต่าง ๆ เช่น Myeloid differentiation primary response 88 (MyD88), TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β (TRIF), TRIF-related adaptor molecule (TRAM) หรือ TIR domain-containing adaptor protein (TIRAP) เพื่อส่งสัญญาณไปให้ Transcription factor ได้แก่ nuclear factor kappa B (NF- κ B) และ activator protein-1 (AP-1) ซึ่งสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง pro-inflammatory cytokines ต่าง ๆ เช่น Tumor necrosis factor (TNF), Interleukin (IL)-6, IL-10, IL-18 และ IL-12 ที่มีผลช่วยสนับสนุนการทำงานของเซลล์ภูมิคุ้มกันออกมาเพื่อช่วยกระตุ้นการทำงานและสนับสนุนการทำงานของเซลล์ภูมิคุ้มกันอื่น ๆ (Hamilton, 2019) และกระตุ้นให้ตัวเองมีแสดงออกของ MHC, CD40, CD80, CD86 ที่เพิ่มสูงขึ้นซึ่งการแสดงออกของแอนติเจนเหล่านี้เป็นสัญญาณแสดงถึงการพัฒนาของเซลล์เดนไดรติกที่เจริญเต็มที่แล้ว และพร้อมทำหน้าที่เป็น APCs การนำเสนอแอนติเจนของ APCs จะเป็นการนำเสนอแอนติเจนที่จับได้ผ่านทาง MHC ต่าง ๆ ที่มีความจำเพาะกับ TCR ของ T cells โดยสิ่งแปลกปลอมที่ถูกย่อยภายในเซลล์จะถูกนำผ่านทาง MHC I จะเป็นการนำเสนอแอนติเจนเพื่อกระตุ้นการทำงานของ naive CD8+ T cells หรือ Cytotoxic T cells และการนำเสนอแอนติเจนผ่านทาง MHC II จะเป็นการนำเสนอแอนติเจนเพื่อกระตุ้นการทำงานของ naive CD4 + T cells (Liu, 2016; Solano-Gálvez et al., 2018)

Holotomographic microscope model HT-2H Tomocube

Holotomographic microscope model HT-2H Tomocube เป็นกล้องจุลทรรศน์ที่ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อศึกษาโครงสร้างวัตถุภายใต้กล้องในรูป 3 มิติ ที่เกิดจากการนำค่าการเบี่ยงเบนของแสง (Optical diffraction tomography; ODT) ของคลื่น X-Ray มาทำการวิเคราะห์หาค่าดัชนีหักเหแสง (refractive index; RI) และสร้างออกมาเป็นรูป 3 มิติ (Lee, Hugonnet, Park, & Park, 2020) โดย การใช้กล้อง Tomocube microscope ได้รับความนิยมเป็นอย่างมากในการนำมาใช้ในการศึกษาโครงสร้างและลักษณะของเซลล์ เนื่องจากกล้องสามารถศึกษาเซลล์ในขณะที่ยังมีชีวิตอยู่ได้

แบบเรียลไทม์โดยไม่ต้องทำการย้อมเซลล์ ภาพตัวอย่างที่ได้จากกล้อง Tomocube microscope จะเป็นภาพ 2 มิติและ 3 มิติ ซึ่งจะแสดงรูปร่างและลักษณะของตัวอย่างได้อย่างชัดเจนและครอบคลุม นอกจากนี้ค่าดัชนีหักเหของแสงที่ได้สามารถนำมาวิเคราะห์ถึงปริมาตรเซลล์ น้ำหนักเซลล์ ความหนาแน่นของไซโตพลาสซึมภายในเซลล์ และพื้นที่ผิวของเซลล์ ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาเซลล์ในเชิงปริมาณ พยาธิสรีรวิทยาและประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ของยาได้อีกด้วย (Kim, Lee, Yoon, Heo, Choi, & Park, 2016)



ภาพ 5 แสดงภาพกล้อง Holotomographic microscope model HT-2H (Tomocube)

ที่มา: Kate Anderton, 2018

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงาน

ระเบียบวิธีวิจัย

วัสดุอุปกรณ์ในหลอดทดลอง

1. 6-well plate, 24-well plate, 96-well plate บริษัท FALCON ประเทศสหรัฐอเมริกา

2. Plate ขนาด 10 มิลลิลิตร บริษัท NEST ประเทศสหรัฐอเมริกา

3. Flask ขนาด 25 มิลลิลิตร และ 75 มิลลิลิตร บริษัท NEST ประเทศสหรัฐอเมริกา

4. Tip ขนาด 1,000 µl, 200 µl และ 10 µl บริษัท RAININ ประเทศสหรัฐอเมริกา

5. Pipette ขนาด 10 มิลลิลิตร บริษัท NEST ประเทศสหรัฐอเมริกา

6. Tube ขนาด 15 มิลลิลิตร และ 50 มิลลิลิตร บริษัท NEST ประเทศสหรัฐอเมริกา

7. Tube Flow Cytometry 5 มิลลิลิตร บริษัท FALCON ประเทศสหรัฐอเมริกา

8. Microcentrifuge tube 1.5 มิลลิลิตร บริษัท COSTER ประเทศเยอรมัน

9. Hemocytometer บริษัท BOECO ประเทศเยอรมัน

10. Tomocube TomoDish ขนาด 50 มิลลิเมตร บริษัท Tomocube, Inc. ประเทศ

เกาหลี

เครื่องมือในการทดลอง

1. Micropipette บริษัท PZ HTL SA ประเทศโปแลนด์

2. Flow Cytometry บริษัท LUMINEX รุ่น GUAVA easyCyte™ ประเทศสหรัฐอเมริกา

3. Centrifuge ยี่ห้อ TOMY Seiko ประเทศญี่ปุ่น

4. laminar flow class II บริษัท FASTER รุ่น Safefast Elite 212s ประเทศอิตาลี

5. ตู้ป้อนเลี้ยงเซลล์ (CO2 incubator) บริษัท Thermo Fisher Scientific, Inc. ประเทศ

สหรัฐอเมริกา

6. CD14 MicroBeads, human บริษัท Miltenyi Biotec ประเทศเยอรมัน

7. Holotomographic microscope model HT-2H Tomocube บริษัท Tomocube,

Inc. ประเทศเกาหลี

8. Microplate reader บริษัท Bio-Rad Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา

เซลล์ที่ใช้ในการทดสอบ

1. Monocyte ที่แยกได้จาก PBMC
2. Dendritic cells พัฒนาจาก Monocyte

สารเคมีสำหรับการเพาะเลี้ยงและทดสอบ

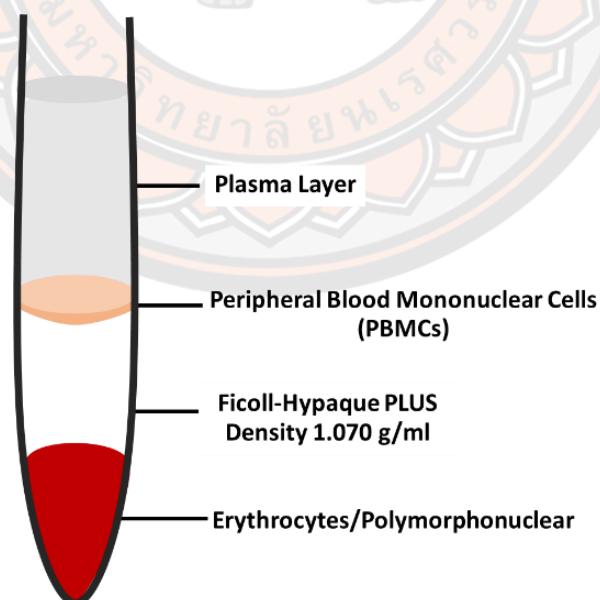
1. Ampicillin/streptomycin บริษัท Gibco ประเทศสหรัฐอเมริกา
2. Fetal bovine serum (FBS) บริษัท Gibco ประเทศสหรัฐอเมริกา
3. HEPES Buffer Solution บริษัท Gibco ประเทศสหรัฐอเมริกา
4. 0.25% Trypsin-EDTA (1x) บริษัท Gibco ประเทศสหรัฐอเมริกา
5. RPMI 1640 บริษัท Gibco ประเทศสหรัฐอเมริกา
6. Ficoll Hypaque PLUS บริษัท Axis-Shield PoC AS ประเทศนอร์เวย์
7. L-glutamine บริษัท Gibco ประเทศสหรัฐอเมริกา
8. Interleukin-4 (IL-4) บริษัท PeproTech Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา
9. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) บริษัท Pepro Tech Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา
10. Lipopolysaccharide (LPS) บริษัท Invitrogen ประเทศสหรัฐอเมริกา
11. Anti CD11c PE บริษัท eBioscience, Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา
12. Anti CD14 PerCP บริษัท Biolegend ประเทศสหรัฐอเมริกา
13. Anti CD80 APC บริษัท Biolegend ประเทศสหรัฐอเมริกา
14. Anti CD83 PerCP บริษัท eBioscience, Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา
15. Anti CD86 APC บริษัท eBioscience, Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา
16. Anti HLA-DR Fit c บริษัท Bioscience, Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา
17. Oil red O บริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา
18. Pierce BCA Protein Assay Kit บริษัท Thermo Fisher Scientific, Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

วิธีการวิจัย

การแยกเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียร์จากตัวอย่างเลือด (buffy coat)

นำตัวอย่างเลือด (Buffy coat) ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากธนาคารเลือดมหาวิทยาลัยนเรศวร และได้รับอนุญาตการใช้เลือดเพื่อการวิจัยจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนเรศวรเลขที่โครงการ 0045/62 มาแยกเก็บเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียร์ (Peripheral blood mononuclear cells; PBMC) ทำได้โดยนำ buffy coat จำนวน 50 มิลลิลิตร

มาเจือจางด้วย Phosphate buffer saline (PBS) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในอัตราส่วน buffy coat: PBS (1: 1) จากนั้นจะนำตัวอย่างที่ถูกเจือจางมาเติมลงในหลอดทดลองที่มีสาร Ficoll-Hypaque PLUS (density = 1.070 กรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 15 มิลลิลิตร เบบ ๆ ก่อนนำตัวอย่างที่ได้มาทำการแยกเก็บ PBMC ด้วยเทคนิค Density gradient centrifugation โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 25 นาที 20 องศาเซลเซียส หลังจากครบเวลาไม่ใช้ระบบเบรกช่วยหยุดและปล่อยให้หยุดเองเพื่อตกตะกอนเม็ดเลือดจากนั้นจะเก็บ PBMC ที่อยู่บริเวณด้านบนของ Ficoll-Hypaque PLUS ใส่ในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตรก่อน PBS ให้ครบ 50 มิลลิลิตร ก่อนนำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 1500 rpm 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ที่ซึ่งสารละลายส่วนใส (Supernatant) จากนั้นนำ PBMC ที่ได้มาเติมด้วย 1X Red blood cells lysis buffer ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแตกเม็ดเลือดแดงส่วนเกินที่มีการบ่งเปื้อนใน PBMC เมื่อครบเวลาจะเติม PBS ให้ครบ 50 มิลลิลิตร ก่อนนำไปปั่นตกตะกอนโดยใช้ความเร็วที่ 1500 rpm 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้งและเติม PBS ให้ครบ 50 มิลลิลิตร ก่อนนำไปปั่นที่ความเร็ว 1500 rpm 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที 2 รอบเพื่อล้าง 1X Red blood cells lysis buffer จากนั้นเติม R-10 (RPMI 1640, 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin-streptomycin and 1% Glutamax ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อแตกตะกอนเซลล์ให้เป็นเซลล์เดี่ยว ก่อนนำไปนับจำนวนเซลล์ โดยใช้ hemacytometer (ภาพ 6)



ภาพ 6 แสดงตำแหน่งเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียร์หลังจากทำการปั่นแยกด้วยเทคนิค Density gradient centrifugation

การแยกโมโนไซต์จากเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียร์เพื่อพัฒนาเป็นเซลล์เดนไดรติก

นำ PBMC ที่แยกได้มาเพาะเลี้ยงด้วย RPMI-10 ในตู้ปลอดเชื้อ 37 องศาเซลเซียส 5 % คาร์บอนไดออกไซด์เป็นเวลา 90 นาที ซึ่งเป็นวิธีการแยกแบบโมโนไซต์ออกจากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดอื่น ๆ ใน PBMC ด้วยวิธีที่เรียกว่า Adherence cells โดยโมโนไซต์ที่อยู่ใน PBMC จะค่อย ๆ ลงมาเกาะที่พื้นผิวของ Flask ขนาด 75 มิลลิลิตร หลังครบเวลา 90 นาที Flask ที่มีโมโนไซต์เกาะอยู่ที่พื้นผิวจะถูกนำมาล้างด้วย RPMI 1640 เป็นจำนวน 3 รอบ เพื่อขจัดเซลล์ลอย และเซลล์ส่วนเกินที่ไม่เกาะผิว Flask ออก ก่อนนำโมโนไซต์ที่แยกเก็บด้วย Adherence cells มาทำการแยกเก็บอีกครั้งด้วย MACs CD14+ isolation kit เพื่อเพิ่มความบริสุทธิ์ให้แก่จำนวนโมโนไซต์ หลังจากนั้นโมโนไซต์ที่แยกได้จะถูกนำมาแยกด้วย Monoclonal antibodies CD14 ติดสี PerCP ที่มีความจำเพาะต่อ Monocytes เพื่อวิเคราะห์หาจำนวนความบริสุทธิ์ของโมโนไซต์โดยใช้ Flow Cytometry ในการวิเคราะห์ หลังการวิเคราะห์โมโนไซต์ที่มีความบริสุทธิ์สูงกว่าร้อยละ 90 จะถูกนำมาเพาะเลี้ยงใน RPMI-10 ที่มีส่วนผสมของ Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) 800 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ Interleukin-4 (IL-4) 500 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 7 วัน เพื่อกระตุ้นให้โมโนไซต์พัฒนาเป็นเซลล์เดนไดรติก โดยในระหว่าง 7 วันของการพัฒนาจะมีการเติม GM-CSF ปริมาตร 800 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ IL-4 ปริมาตร 500 หน่วยต่อมิลลิลิตร ทุก ๆ 2 วัน เมื่อครบ 7 วัน โมโนไซต์ที่ถูกกระตุ้นให้พัฒนาเป็นเซลล์เดนไดรติกเหล่านี้ จะถูกนำมาวิเคราะห์หาจำนวนของ จำนวนเซลล์เดนไดรติกที่พัฒนาได้โดยใช้การย้อมสี Monoclonal antibodies CD14 ติดสี PerCP ที่มีความจำเพาะต่อโมโนไซต์ และ Monoclonal antibodies CD11c ติดสี PE ที่มีความจำเพาะกับเซลล์เดนไดรติกก่อนนำมาวิเคราะห์ด้วย Flow Cytometry

การกระตุ้นเซลล์เดนไดรติก

เซลล์เดนไดรติกที่พัฒนามาจากโมโนไซต์จะเป็นเซลล์ในระยะ Immature dendritic cells จะถูกนำมากระตุ้นด้วย Lipopolysaccharide (LPS) เพื่อพัฒนาเซลล์เดนไดรติกให้เข้าสู่ระยะ Mature dendritic cells โดยเซลล์เดนไดรติก จำนวน 2.5×10^6 เซลล์ จะถูกนำมาเพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงแบบ 6 หลุม ที่มี RPMI-2 (RPMI 1640, 2 % fetal bovine serum (FBS), 1 % penicillin-streptomycin and 1% Glutamax (all from Gibco, MA, USA) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร อยู่ และในหลุมที่ต้องการพัฒนาเซลล์เดนไดรติกเป็น Mature dendritic cells จะมีการเติม LPS ให้มีความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ก่อนนำไปเพาะเลี้ยงในตู้ปลอดเชื้อ 37 องศาเซลเซียส 5 % คาร์บอนไดออกไซด์เป็นเวลา 2 วัน เพื่อกระตุ้นเซลล์เดนไดรติกจากเซลล์ในระยะ Immature dendritic cells เป็น Mature dendritic cells หลังจากนั้นจะนำเซลล์ที่ได้มาย้อมด้วย Monoclonal antibodies ที่มีความจำเพาะต่อ Dendritic cells และทำการวิเคราะห์ด้วย Flow

Cytometry และศึกษาลักษณะฟิโนไทป์ด้วย Holotomographic microscope model HT-2H Tomocube (Tomocube)

การวิเคราะห์ความแตกต่างของเซลล์เดนไดรติกในระยะก่อนถูกกระตุ้น (Immature dendritic cells) และหลังถูกกระตุ้น (Mature dendritic cells) ด้วย Monoclonal antibodies และ Flow Cytometry

การวิเคราะห์ความแตกต่างของ Dendritic cells ในระยะ Immature dendritic cells และ Mature dendritic cells จะถูกวิเคราะห์โดยการย้อม Monoclonal antibodies ที่มีความจำเพาะต่อเซลล์ในแต่ละระยะก่อนนำมาวิเคราะห์ด้วย Flow Cytometry โดยจะใช้ Monoclonal antibodies CD11c ติดสี PE ที่มีความจำเพาะต่อ Dendritic cells และใช้ Monoclonal antibodies CD80 ติดสี APC, Monoclonal antibodies CD83 ติดสี PerCP, Monoclonal antibodies CD86 ติดสี APC และ Monoclonal antibodies HLA-DR ติดสี FitC ที่มีความจำเพาะต่อ Dendritic cells ในระยะ Mature dendritic cells โดย Dendritic cells ทั้ง 2 ระยะจะถูกย้อมด้วย Monoclonal antibodies เป็นระยะเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืด เมื่อครบเวลาเซลล์ที่ถูกย้อมจะถูกนำมาปั่นล้างที่ความเร็ว 300 g 5 นาที 4 องศาเซลเซียส เพื่อล้าง Monoclonal antibodies และสีส่วนเกิน ก่อนเติม 0.5 % ของ FBC ใน PBS ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ก่อนนำมาวิเคราะห์หาความแตกต่างของ Immature dendritic cells และ Mature dendritic cells ด้วย Flow Cytometry

การวิเคราะห์ความแตกต่างของเซลล์เดนไดรติกในระยะก่อนถูกกระตุ้น (Immature dendritic cells) และหลังถูกกระตุ้น (Mature dendritic cells) ภายใต้กล้อง Holotomographic microscope model HT-2H Tomocube (Tomocube)

การวิเคราะห์ความแตกต่างของ Dendritic cells ในระยะ Immature dendritic cells และ Dendritic cells ในระยะ Mature dendritic cells ภายใต้กล้อง Tomocube ทำโดยการนำเซลล์ Dendritic จำนวน 5×10^4 เซลล์ จะถูกนำมาเลี้ยงด้วย RPMI-2 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ในจานเพาะเลี้ยงจำเพาะ (Tomocube TomoDish) ขนาด 50 มิลลิเมตร ก่อนเติม LPS ลงในจานเพาะเลี้ยงของ Mature dendritic cells โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ก่อนนำเซลล์ทั้ง 2 ระยะไปเพาะเลี้ยงในตู้ปลอดเชื้อ 37 องศาเซลเซียส 5 % คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 2 วัน ก่อนนำ Tomocube TomoDish ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงออกมาล้างด้วย PBS เบา ๆ 1 รอบ เพื่อล้างอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ก่อนนำเติม PBS 1 มิลลิลิตรก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยกล้อง Tomocube

การวิเคราะห์ปริมาณไขมันภายในเซลล์เดนไดรติกระยะก่อนถูกกระตุ้น (Immature dendritic cells) และหลังถูกกระตุ้น (Mature dendritic cells) ด้วยการย้อมสี Oil Red O

นำ Immature dendritic cells และ Mature dendritic cells ที่ทำการกระตุ้นด้วย LPS จำนวน 1×10^5 cells มาทำการยัดเกาะบนสไลด์ด้วย 10 % Formalin เป็นเวลา 45 นาที ก่อนล้าง Formalin ออกด้วยน้ำ และเติม 60 % isopropanol ลงในแต่ละหลุม 30 ไมโครลิตรเป็นเวลา 5 นาที และเมื่อครบเวลา 60 % isopropanol จะถูกขับออก และย้อมเซลล์ด้วยสี Oil Red O เป็นเวลา 20 นาที ก่อนนำเซลล์ที่ถูกย้อมสี Oil Red O มาทำการล้างออกด้วยน้ำ 3 ครั้ง และย้อมเซลล์ด้วยสี Hematoxylin เป็นเวลา 1 นาที และเมื่อครบเวลาสีจะถูกล้างออกด้วยน้ำ 3 ครั้ง ก่อนเติมน้ำปริมาตร 50 ไมโครลิตร ก่อนนำสไลด์ที่ได้ไปอ่านภายใต้กล้อง Fluorescence microscope โดยสี Oil Red O และ สี Hematoxylin จะถูกเตรียมก่อนย้อมตามวิธีการย้อมของ Lipid (Oil Red O) staining kit

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนภายในเซลล์ด้วย Bicinchoninic acid assay (BCA kit)

นำ Immature dendritic cells และ Mature dendritic cells จำนวน 1×10^6 เซลล์ มาทำการปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 rpm 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ที่สารละลายส่วนใส ก่อนเติม RIPA buffer เพื่อแตกผนังเซลล์เป็นเวลา 5 นาที ในกล่องน้ำแข็ง เมื่อครบเวลาหลอดที่ทดลองที่ถูกใช้แตกเซลล์หลัง Immature dendritic cells และ Mature dendritic cells จะถูกนำมาปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 rpm 4 องศาเซลเซียส 15 นาที เพื่อเก็บสารละลายส่วนใสและนำมาวิเคราะห์ด้วย Pierce BCA Protein Assay Kit เพื่อหาปริมาณโปรตีนภายในเซลล์

การวิเคราะห์ทางสถิติ

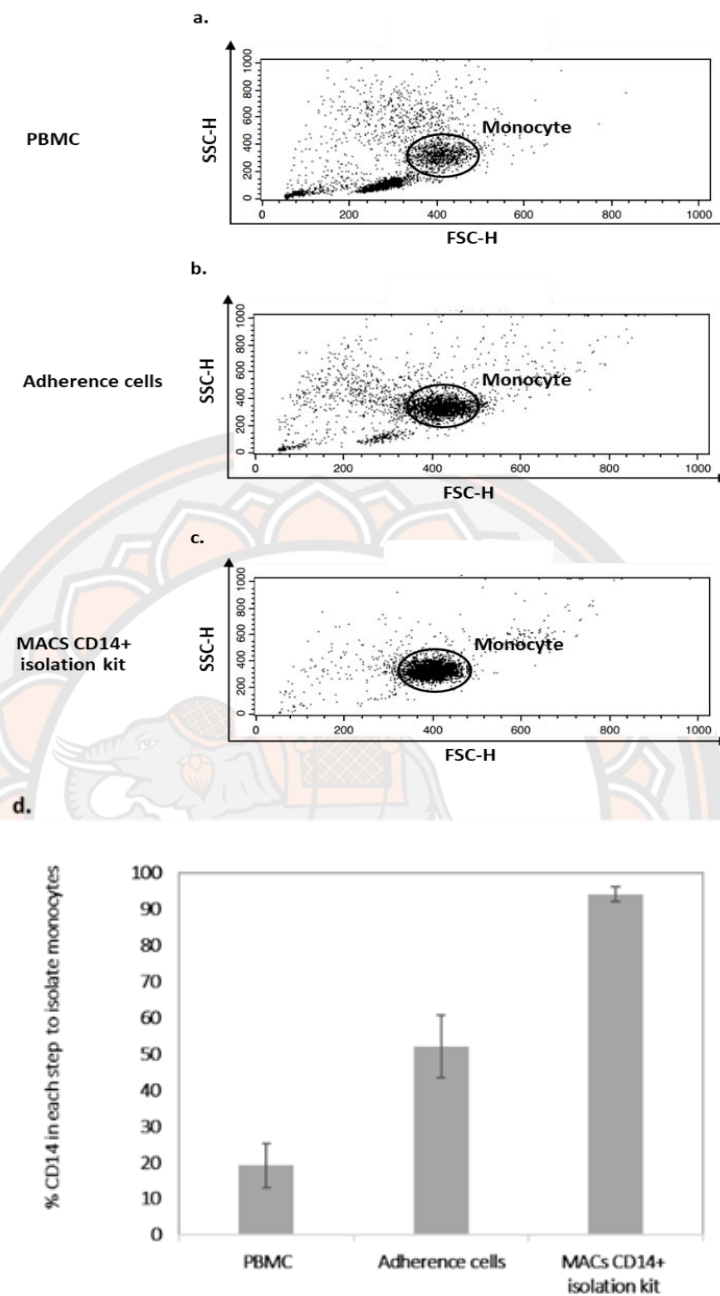
เก็บข้อมูลและทำการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ย นำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (ANOVA, t.Test) ที่ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยใช้โปรแกรมคำนวณสำเร็จรูป

บทที่ 4

ผลการทดลอง

การแยกโมโนไซต์จากเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียร์

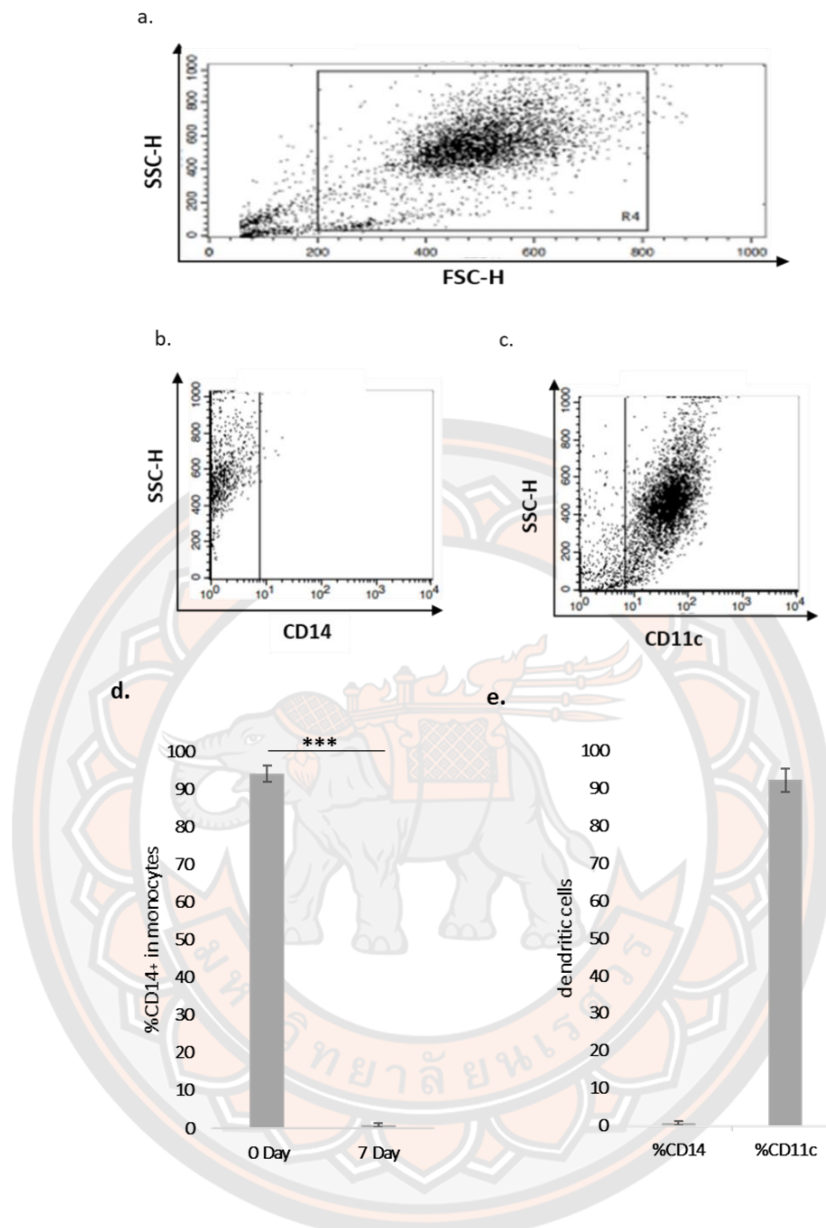
เมื่อนำ PBMC และโมโนไซต์ที่ได้จากวิธี Adherence cells และวิธี Adherence cells ร่วมกับ MACS CD14+ isolation kit มาแยกด้วย Monoclonal antibodies CD14 ติดสี PerCP ที่มีความจำเพาะต่อโมโนไซต์มาวิเคราะห์ด้วย Flow Cytometry เพื่อหาความบริสุทธิ์ของโมโนไซต์ที่สามารถแยกได้ในแต่ละขั้นตอนพบว่า PBMCs ที่แยกได้จาก buffy coat ประกอบไปด้วยกลุ่มเซลล์ภูมิคุ้มกันหลายชนิดแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มอย่างเห็นได้ชัดเจน (ภาพ 7a) และเมื่อนำมาวิเคราะห์จากการติดสี CD14 PerCP พบว่าใน PBMC จะมีโมโนไซต์ปนอยู่กับเซลล์ภูมิคุ้มกันชนิดอื่น ๆ โดยเฉลี่ยเพียงร้อยละ 19 ± 6.16 ของเซลล์ทั้งหมด และเมื่อนำ PBMCs มาแยกเก็บโมโนไซต์ด้วยวิธี Adhesion cells พบว่าการเก็บโมโนไซต์ด้วยวิธี Adhesion cells สามารถเพิ่มความบริสุทธิ์ของจำนวนโมโนไซต์ได้สูงขึ้นถึงร้อยละ 52 ± 8.07 แต่ความบริสุทธิ์ที่ได้ยังมีการปนเปื้อนของเซลล์อื่น ๆ เป็นจำนวนมาก (ภาพ 7b) ดังนั้นจึงนำโมโนไซต์ที่แยกเก็บโมโนไซต์ด้วยวิธี Adhesion cells มาแยกเก็บโมโนไซต์อีกครั้งด้วย MACS CD14+ isolation kit และจากการแยกด้วย MACS CD14+ isolation kit นี้พบว่าจำนวนของโมโนไซต์จะมีความบริสุทธิ์เพิ่มสูงถึงร้อยละ 94 ± 2.13 (ภาพ 7c) เมื่อนำผลการแยกโมโนไซต์ในแต่ละขั้นตอนมาเปรียบเทียบกันจะพบว่าแต่ละขั้นตอนจะส่งผลให้ความบริสุทธิ์ของโมโนไซต์เพิ่มสูงขึ้น (ภาพ 7d)



ภาพ 7 แสดงตำแหน่งของโมโนไซต์จากการวิเคราะห์ด้วย Flow Cytometry (a) แสดงตำแหน่งของโมโนไซต์จาก PBMCs (b) แสดงตำแหน่งของโมโนไซต์หลังจากแยกในขั้นตอน Adherence cells (c) แสดงตำแหน่งของโมโนไซต์หลังจากแยกในขั้นตอน MACs CD14+ isolation kit (d) แสดงกราฟเปรียบเทียบจำนวนของโมโนไซต์ในแต่ละขั้นตอนเป็นค่า mean \pm SD จากการทดสอบอย่างน้อย 5 ครั้ง ที่เป็นอิสระต่อกัน

การเพาะเลี้ยงและพัฒนาเซลล์เดนไดรติกจากโมโนไซต์

โมโนไซต์ที่ถูกแยกได้จาก MACs CD14+ isolation kit จะถูกนำมากระตุ้นด้วย GM-CSF ปริมาตร 800 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ IL-4 ปริมาตร 500 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 7 วัน เพื่อพัฒนาโมโนไซต์เป็น เซลล์เดนไดรติก โดยเซลล์เดนไดรติกที่ได้จะเป็นเซลล์เดนไดรติกที่ไม่เจริญเต็มที่หรือที่เรียกว่า Immature dendritic cells โดยหลังครบ 7 วัน (ภาพ 8a) เซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงและกระตุ้นให้พัฒนาเป็นเซลล์เดนไดรติกจะถูกนำมาย้อมด้วย Monoclonal antibodies CD14 ติดสี PerCP และ Monoclonal antibodies CD11c ติดสี PE ก่อนนำมาวิเคราะห์ด้วย Flow Cytometry เพื่อนำมาวิเคราะห์และยืนยันการพัฒนาเป็นเซลล์เดนไดรติก และจากการวิเคราะห์ด้วย Flow Cytometry พบว่าจำนวนของ CD14 ซึ่งเป็น Marker cells ที่มีความจำเพาะต่อโมโนไซต์ในวันแรกที่มีความบริสุทธิ์สูงถึง $94 \pm 2.13\%$ ลดลงเหลือเพียง $1 \pm 0.52\%$ ในวันที่ 7 หลังการกระตุ้น (ภาพ 8b, 8d) และเมื่อวิเคราะห์จำนวนการแสดงออกของ CD14 และ CD11c ในวันที่ 7 จะพบว่าการแสดงออกของ CD11c ซึ่งเป็น Marker cells ที่มีความจำเพาะต่อเซลล์เดนไดรติกมีการแสดงออกสูงถึง $92 \pm 3.01\%$ แต่การแสดงออกของ CD14 ลดลงเหลือเพียง $1 \pm 0.52\%$ (ภาพ 8c, 8e)

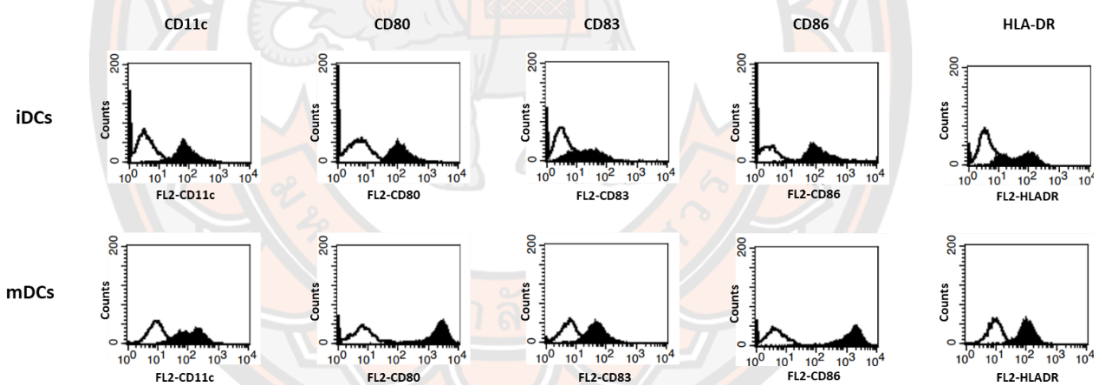


ภาพ 8 แสดงภาพการพัฒนาโมโนไซต์เป็นเซลล์เดนไดรติกจาก Flow Cytometry

(a) แสดงภาพเซลล์ที่พัฒนาหลังครบ 7 วันทั้งหมด (b) แสดงภาพเซลล์ที่พัฒนาหลังครบ 7 วันที่ติดสี CD14+ (c) แสดงภาพเซลล์ที่พัฒนาหลังครบ 7 วันที่ติดสี CD11c+ (d) แสดงกราฟเปรียบเทียบการแสดงออกของ CD14 ในวันที่ 0 และวันที่ 7 ของเซลล์ที่ได้มาจากการพัฒนาโมโนไซต์เป็นเซลล์เดนไดรติก (e) แสดงกราฟเปรียบเทียบการแสดงออกของจำนวนของ CD14 และ CD11c ในวันที่ 7 ของเซลล์ที่ได้มาจากการพัฒนาโมโนไซต์เป็นเซลล์เดนไดรติก โดยค่าที่แสดงในกราฟเป็นค่า mean \pm SD จากการทดสอบทั้งหมด 5 ครั้ง ที่เป็นอิสระต่อกัน, *** $p < 0.001$ แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของ CD14+ ในวันที่ 0 และวันที่ 7

การวิเคราะห์ความแตกต่างในระยะก่อนและหลังถูกกระตุ้นของเซลล์เดนไดรติกด้วย Monoclonal antibodies และ Flow Cytometry

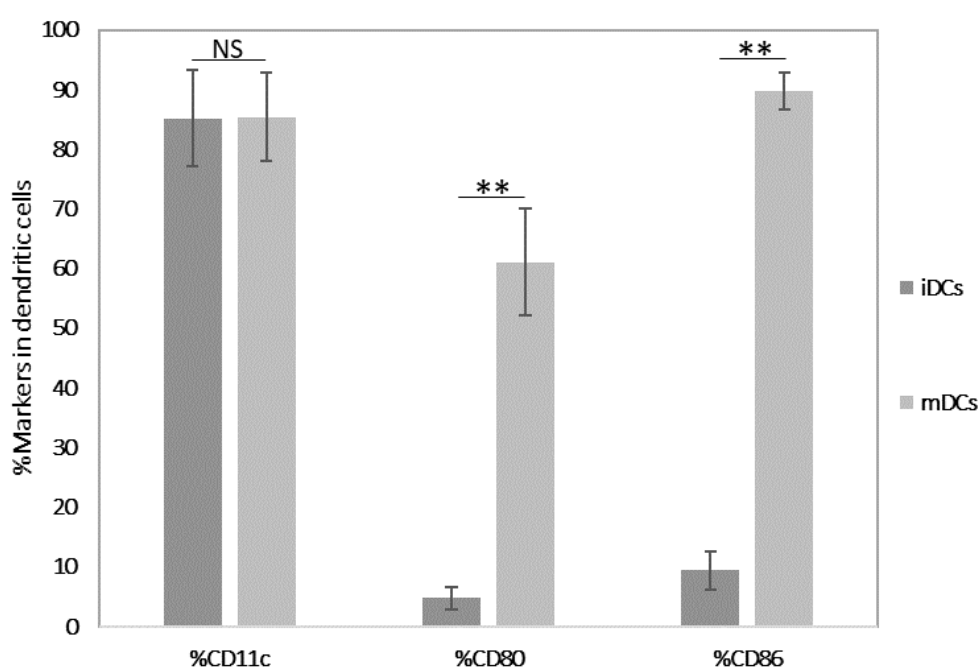
Dendritic cells ที่พัฒนาจากโมโนไซต์จะถูกนำมากระตุ้นด้วย LPS เป็นเวลา 2 วัน เพื่อกระตุ้น Dendritic cells ในระยะ Immature dendritic cells เป็น Dendritic cells ในระยะ Mature dendritic cells หลังจากนั้นเซลล์ทั้ง 2 ระยะจะถูกนำมาย้อมด้วย Monoclonal antibodies CD11c ติดสี PE ที่มีความจำเพาะต่อ Dendritic cells และ Monoclonal antibodies CD80 ติดสี APC, Monoclonal antibodies CD83 ติดสี PerCP, Monoclonal antibodies CD86 ติดสี APC และ Monoclonal antibodies HLA-DR ติดสี FitC ที่มีความจำเพาะต่อ Dendritic cells ในระยะ Mature dendritic cells เป็นระยะเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืดก่อนนำเซลล์ที่ได้มาวิเคราะห์ด้วย Flow Cytometry เพื่อวิเคราะห์หาความแตกต่างของ Immature dendritic cells และ Mature dendritic cells พบเซลล์ทั้ง 2 ระยะมีการแสดงออกของ CD11c ไม่แตกต่างกัน แต่การแสดงออกของ CD80+, CD83+, CD86+ และ HLA-DR ใน Mature dendritic cells มีการแสดงออกต่างจาก Immature dendritic cells (ภาพ 9)



ภาพ 9 แสดงภาพการติดสีของ CD11c, CD80, CD83, CD86 และ HLA-DR ในเซลล์เดนไดรติกในระยะก่อนถูกกระตุ้น (Immature dendritic cells) และหลังได้รับการกระตุ้น (Mature dendritic cells) ภายใต้การวิเคราะห์ด้วย Flow Cytometry

เมื่อนำการติดสีของ CD11c, CD80 และ CD86 ในเซลล์เดนไดรติกในระยะก่อนถูกกระตุ้น (Immature dendritic cells) และหลังได้รับการกระตุ้น (Mature dendritic cells) มาวิเคราะห์ด้วย Flow Cytometry มาวิเคราะห์ (CD83 และ HLA-DR ไม่แสดง) พบว่าเซลล์ทั้ง 2 ระยะมีการแสดงออกของ CD11c ที่ $85 \pm 8\%$ ไม่แตกต่างกัน และเมื่อวิเคราะห์ถึงการแสดงออกของ CD80 และ CD86 ที่มีที่ความจำเพาะต่อ Dendritic cells ในระยะ Mature dendritic cells พบว่า

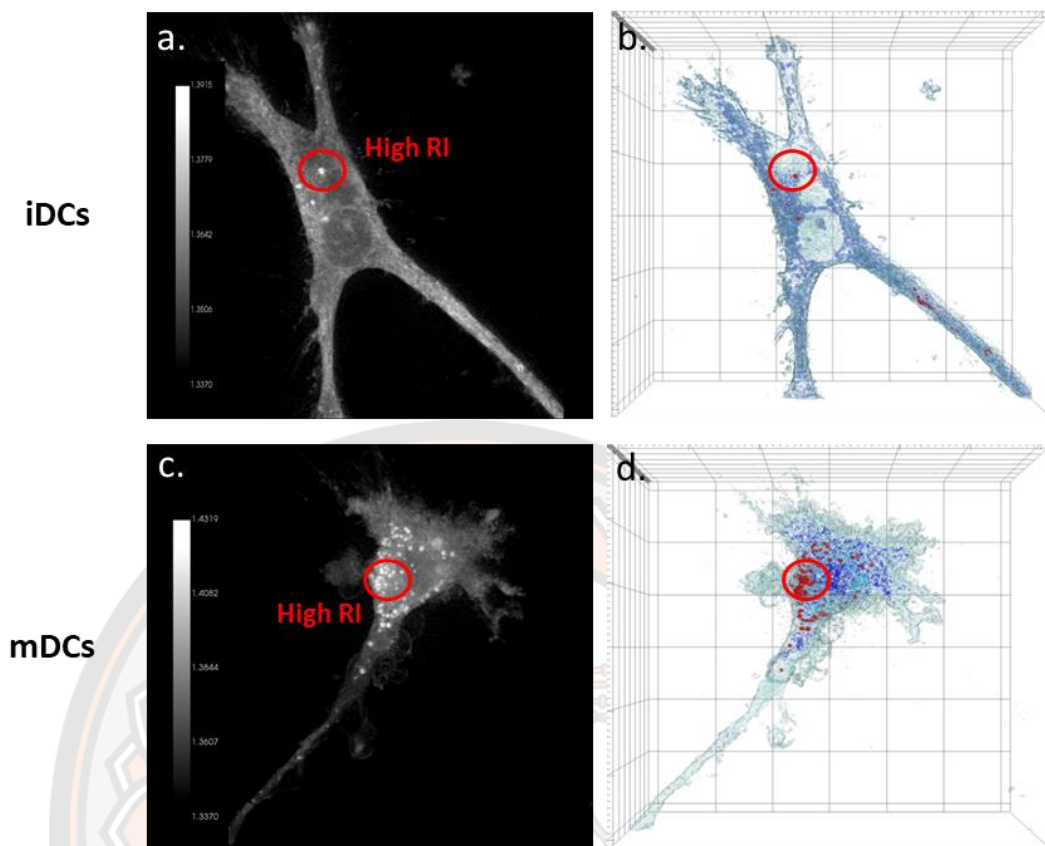
เซลล์ในระยะ Immature dendritic cells มีการแสดงออกของ CD80 ที่ $5 \pm 1.86\%$ และมีการแสดงออกของ CD86 ที่ $9 \pm 3.08\%$ ในขณะที่เซลล์ในระยะ Mature dendritic cells มีการแสดงออกของ CD80 สูงถึง $61 \pm 8.93\%$ และมีการแสดงออกของ CD86 ที่ $90 \pm 3.17\%$ และเมื่อนำการแสดงออกของ CD80 และ CD86 ของเซลล์ในระยะ Immature dendritic cells และ Mature dendritic cells มาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าการแสดงออกของเซลล์ในระยะ Mature dendritic cells มีการแสดงออกของ CD80 และ CD86 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (NS = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$) (ภาพ 10)



ภาพ 10 แสดงภาพกราฟที่ได้จากการวิเคราะห์การติดสี CD11c, CD80 และ CD86 ในเซลล์เดนไดรติกในระยะก่อนถูกกระตุ้น (Immature dendritic cells) และหลังได้รับการกระตุ้น (Mature dendritic cells) ภายใต้การวิเคราะห์ด้วย Flow Cytometry โดยค่าที่แสดงในกราฟเป็นค่า mean \pm SD จากการทดสอบทั้งหมด 4 ครั้ง ที่เป็นอิสระต่อกัน (NS = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ $***p < 0.001$ แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของ CD80 และ CD86 ในเซลล์เดนไดรติกในระยะก่อนถูกกระตุ้น (iDCs) และหลังได้รับการกระตุ้น (mDCs))

การวิเคราะห์ความแตกต่างในระยะก่อนและหลังได้รับการกระตุ้นของเซลล์เดนไดรติกภายใต้กล้อง Holotomographic microscope model HT-2H Tomocube (Tomocube)

หลังจาก Dendritic cells ถูกนำมากระตุ้นด้วย LPS ใน Tomocube TomoDish เป็นเวลา 2 วัน ก่อนนำมาวิเคราะห์ด้วยกล้อง Tomocube โดยหลักการทำงานของกล้องจะวิเคราะห์ผลจากแสงที่ทะลุผ่านเซลล์ซึ่งถูกเลี้ยงอยู่ใน Tomocube TomoDish และนำแสงที่ส่องผ่านเซลล์มาทำการวิเคราะห์ผลเป็นรูปภาพ 2 มิติ (ภาพ 11a และ 11c) ภาพ 3 มิติ (ภาพ 11b และ 11d) จากการศึกษาความลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ในระยะก่อนและหลังได้รับการกระตุ้นของเซลล์เดนไดรติกภายใต้กล้อง Tomocube พบว่าเซลล์ Dendritic cells ในระยะ Immature dendritic cells จะมีขอบเขตเซลล์เรียบและชัดเจน (ภาพ 11a และ 11b) ในขณะที่เซลล์ในระยะ Mature dendritic cells จะมีลักษณะขอบเขตเซลล์ที่ขรุขระไม่เป็นระเบียบ (ภาพ 11c และ 11d) และพบว่าเซลล์ที่อยู่ในระยะ Mature dendritic cells จะมีการแสดงออกของจุดสีขาวในภาพแบบ 2 มิติ (ภาพ 11c) และการแสดงออกของจุดสีแดงใน 3 มิติ (ภาพ 11d) เป็นจำนวนมากต่างจากการแสดงออกของจุดสีขาวในภาพ 2 มิติ (ภาพ 11a) และ 3 มิติ (ภาพ 11b) ของเซลล์ในระยะ Immature dendritic cells อย่างชัดเจน โดยจุดสีขาวในภาพ 2 มิติและจุดสีแดงในภาพ 3 มิติเหล่านี้จะแสดงออกถึงจุดที่มีค่าดัชนีหักเหแสงสูง หรือเรียกว่า High RI (Refractive index, RI) ภายในเซลล์ และเมื่อนำมาวิเคราะห์ตามฐานข้อมูลของกล้อง Tomocube แล้วการแสดงออกของสีเหล่านี้จะแสดงถึง Lipid droplets หรือไขมันที่มีอยู่ในเซลล์นั้น ๆ

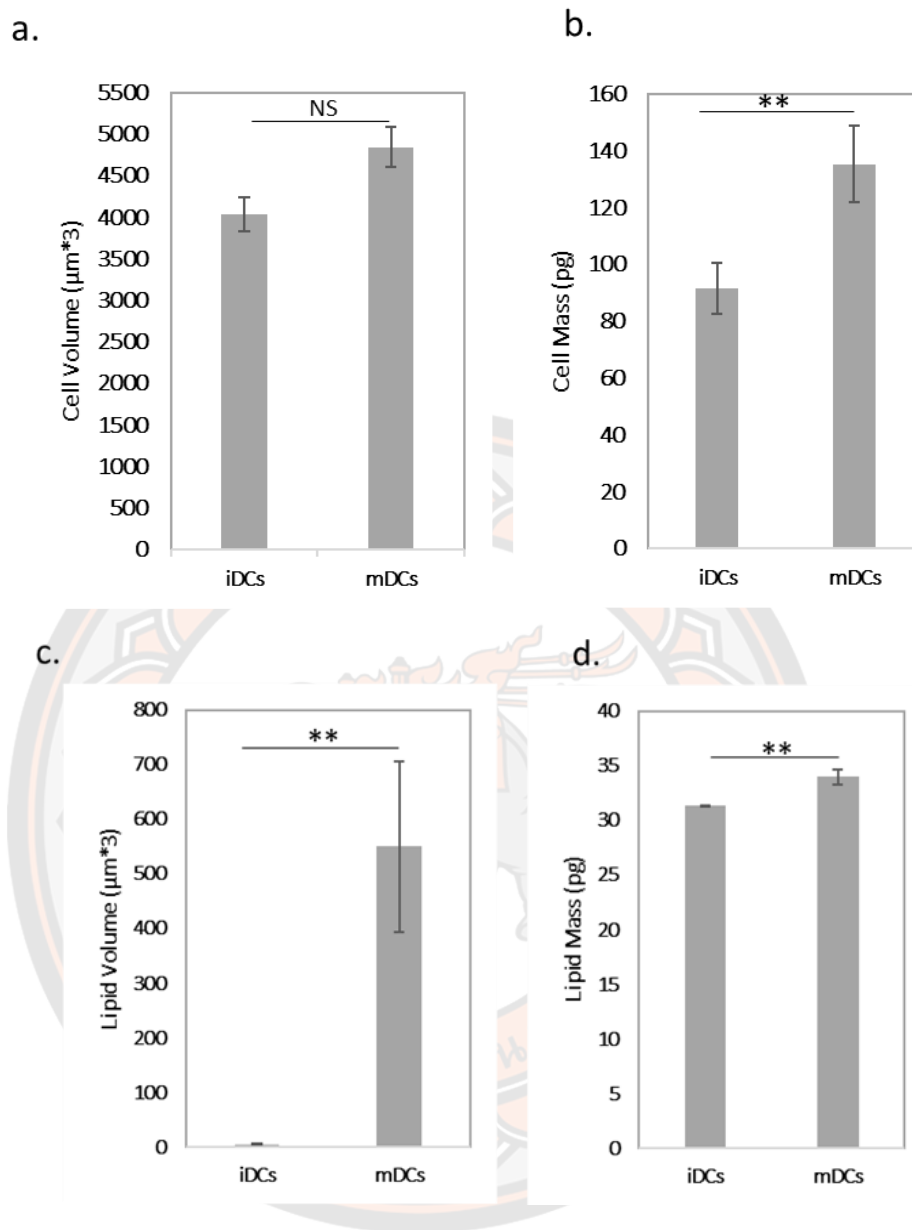


ภาพ 11 แสดงภาพของเซลล์เดนไดรติกในระยะที่ไม่เจริญเต็มที่ (iDCs) และเซลล์เดนไดรติกในระยะเจริญเต็มที่ (mDCs) ภายใต้กล้อง Tomocube (a และ b) แสดงภาพ 2 มิติและ 3 มิติของ Immature dendritic cells ภายใต้กล้อง Tomocube ตามลำดับ (c และ d) แสดงภาพ 2 มิติและ 3 มิติของ Mature dendritic cells ภายใต้กล้อง Tomocube ตามลำดับ

เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษาด้วยกล้อง Tomocube มาวิเคราะห์พบว่าเซลล์ในระยะ Mature dendritic cells จะมีขนาดเซลล์โดยเฉลี่ยที่ $4,840 \pm 643.41$ ไมโครเมตร ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ในระยะ Immature dendritic cells ที่ขนาดเซลล์โดยเฉลี่ยเพียง $4,039 \pm 37.28$ ไมโครเมตร แต่ขนาดที่ใหญ่ขึ้นของ Mature dendritic cells ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับเซลล์ Immature dendritic cells (ภาพ 12a) แต่เมื่อวิเคราะห์ถึงมวลของ Mature dendritic cells จะพบว่ามวลของ Mature dendritic cells มีน้ำหนักเฉลี่ยที่ 135 ± 13.62 พิโกกรัม มากกว่าน้ำหนักของ Immature dendritic cells โดยเฉลี่ยที่ 92 ± 9.01 พิโกกรัมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพ 12b) และเมื่อวิเคราะห์ถึงขนาดและมวลของไขมันในเซลล์ทั้ง 2 ระยะจะพบว่า Mature dendritic cells จะมีขนาดของไขมันภายในเซลล์เพิ่มสูงขึ้นถึง 551 ± 156.13 ไมโครเมตร และมี

มวลโดยเฉลี่ยเท่ากับ 34 ± 0.66 พิโกกรัม ซึ่งการเพิ่มขึ้นของขนาดและมวลของไขมันภายใน Mature dendritic cells นี้ต่างจากค่าเฉลี่ยของขนาดไขมันภายใน Immature dendritic cells อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยขนาดไขมันภายใน Immature dendritic cells จะมีเพียง 6 ± 1.66 ไมโครเมตร และมีมวลโดยเฉลี่ยเท่ากับ 31 ± 0.06 พิโกกรัม (ภาพ 12c และ 12d) (NS = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

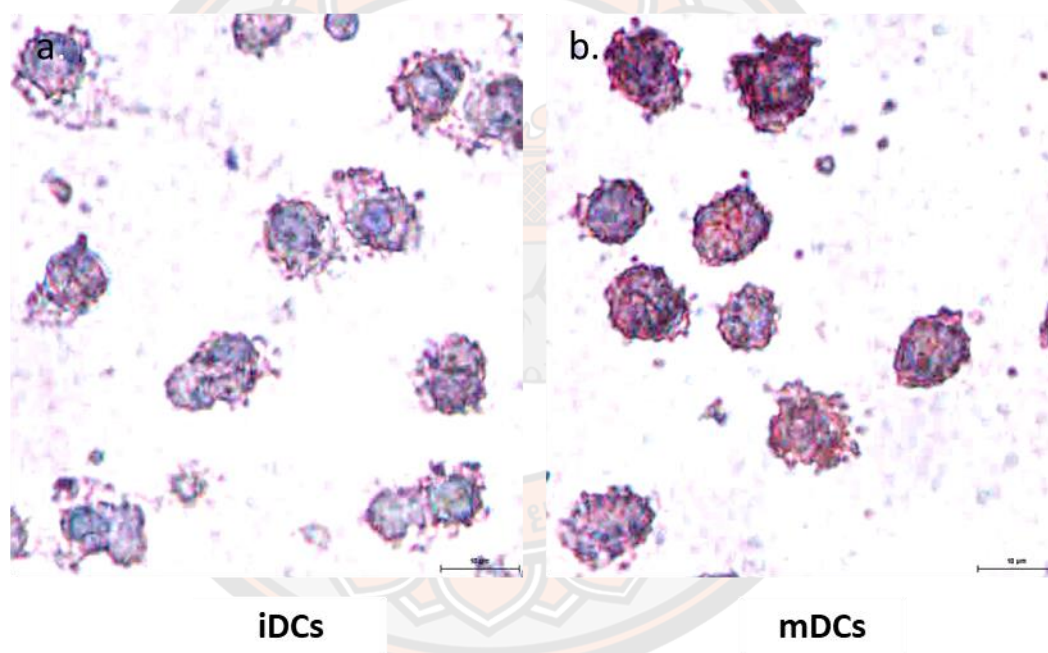




ภาพ 12 แสดงกราฟการเปรียบเทียบเซลล์เดนไดรติกในระยะ Immature dendritic cells และ Mature dendritic cells ภายใต้กล้อง Tomocube (a) แสดงกราฟเปรียบเทียบขนาดของเซลล์ (b) แสดงกราฟเปรียบเทียบน้ำหนักของเซลล์ (c) แสดงกราฟเปรียบเทียบขนาดของไขมันภายในเซลล์ (d) แสดงกราฟเปรียบเทียบมวลของไขมันภายในเซลล์ โดยค่าที่แสดงในกราฟเป็นค่า mean \pm SD จากการวิเคราะห์ 3 เซลล์ตัวอย่างการทดลอง (**p < 0.01 แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของ Cell mass, Lipid volume และ Lipid mass ในเซลล์เดนไดรติกในระยะก่อนถูกกระตุ้น (iDCs) และหลังได้รับการกระตุ้น (mDCs))

การวิเคราะห์ปริมาณไขมันภายในเซลล์เดนไดรติกในระยะก่อนถูกกระตุ้น (Immature dendritic cells) และ ภายหลังได้รับการกระตุ้น (Mature dendritic cells) ด้วยการย้อมสี Oil Red O

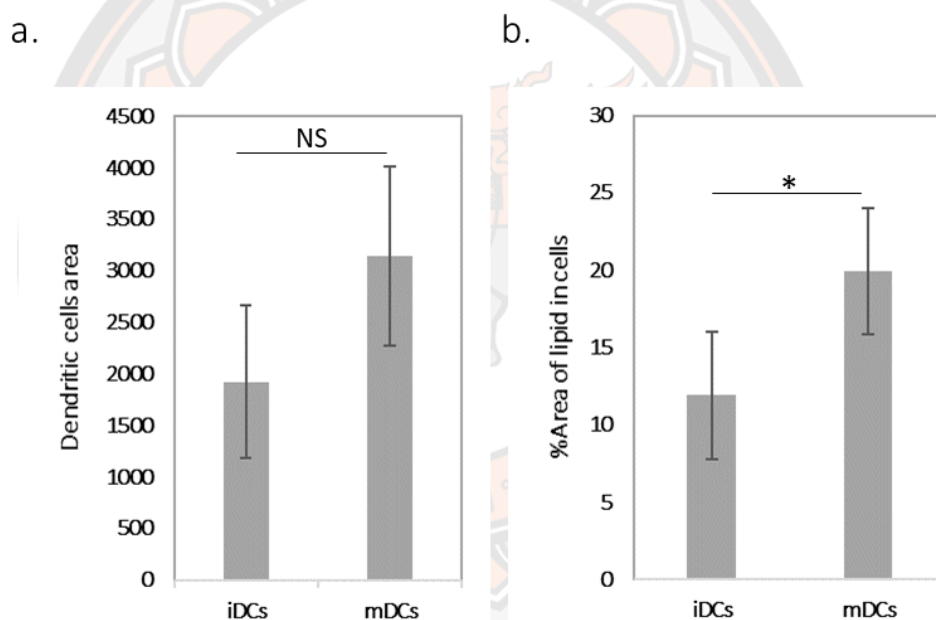
เพื่อวิเคราะห์และยืนยันการพบไขมันภายในเซลล์ Dendritic cells ด้วยกล้อง Tomocube เซลล์ทั้ง 2 ระยะจะถูกนำมาย้อมสี Oil red O เพื่อยืนยันการพบไขมันภายในเซลล์ โดยบริเวณภายในเซลล์ที่เป็นนิวเคลียสซึ่งเป็นบริเวณที่มี DNA และโปรตีนรวมอยู่เป็นจำนวนมากจะติดสีน้ำเงินของสี Hematoxylin และหากบริเวณใดของเซลล์มีไขมันสะสมอยู่จะติดสีแดงของ Oil red O ภายหลังการทดสอบพบว่าเซลล์ในระยะ Immature dendritic cells จะติดสีน้ำเงินอย่างชัดเจนโดยเฉพาะบริเวณนิวเคลียสของเซลล์และติดสีแดงเพียงเล็กน้อย (ภาพ 13a) ในขณะที่เซลล์ในระยะ Mature จะติดสีแดงอย่างเห็นได้ชัดบดบังการติดสีน้ำเงิน (ภาพ 13b)



ภาพ 13 แสดงภาพของเซลล์เดนไดรติกที่ถูกย้อมด้วยสี Oil red O (a) แสดงภาพของเซลล์เดนไดรติกในระยะ Immature dendritic cells ที่ถูกย้อมด้วยสี Oil red O (b) แสดงภาพเซลล์เดนไดรติกในระยะ Mature dendritic cells ที่ถูกย้อมด้วยสี Oil red O

เมื่อนำภาพที่ได้จากการย้อมสี Oil red O ของเซลล์ทั้ง 2 ระยะมาทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ImageJ พบว่าเซลล์ในระยะ Mature dendritic cells มีขนาดโดยเฉลี่ยที่ $3,145 \pm 867.59$ ไมโครเมตร และมีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ในระยะ Immature dendritic cells ที่มีขนาดเพียง $1,921 \pm 741.88$ ไมโครเมตรสอดคล้องกับผลจากการวิเคราะห์ด้วยกล้อง Tomocube ที่พบว่าเซลล์

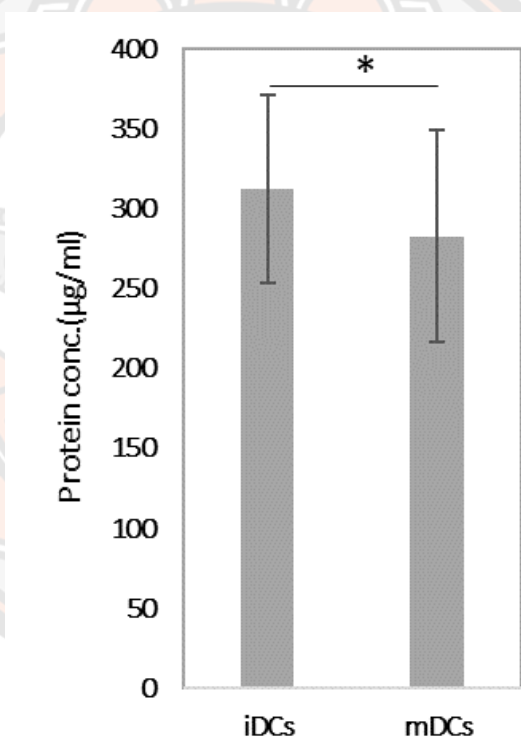
ในระยะ Mature dendritic cells จะมีขนาดใหญ่ขึ้นจากเซลล์ในระยะ Immature dendritic cells แต่ขนาดที่ใหญ่ขึ้นนี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ภาพ 14a) และเมื่อวิเคราะห์ขนาดไขมันภายในเซลล์โดยวัดจากการติดสีแดงของ Oil red O จะพบว่าเซลล์ระยะ Mature dendritic cells จะติดสีแดงคิดเป็น $20 \pm 4.09\%$ จากทั้งเซลล์ซึ่งมากกว่าเซลล์ในระยะ Immature dendritic cells ที่จะติดสีแดงเพียง $12 \pm 4.13\%$ จากทั้งเซลล์ มากและบ่งบอกถึงปริมาณไขมันภายในเซลล์ที่มากกว่าเซลล์ในระยะ Immature dendritic cells (ภาพ 14b) ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์จากกล้อง Tomocube และเมื่อนำบริเวณที่ติดสีแดงมาเปรียบเทียบกันจะพบว่าขนาดของไขมันภายในเซลล์เดนไดรติกในระยะ Mature dendritic cells จะมากกว่าเซลล์เดนไดรติกในระยะ Immature dendritic cells อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($*p < 0.05$)



ภาพ 14 แสดงกราฟเปรียบเทียบขนาดเซลล์และขนาดไขมันในเซลล์เดนไดรติกในระยะ Immature dendritic cells และ Mature dendritic cells (a) แสดงกราฟเปรียบเทียบขนาดของเซลล์เดนไดรติก (b) แสดงกราฟเปรียบเทียบขนาดของไขมันภายในเซลล์เดนไดรติก โดยค่าที่แสดงในกราฟเป็นค่า mean \pm SD จากการวิเคราะห์เซลล์ 3 ตัวอย่างการทดลอง (NS = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ, $*p < 0.05$ แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบขนาดของการติดสีแดงภายในเซลล์เดนไดรติกในระยะก่อนถูกกระตุ้น (iDCs) และหลังได้รับการกระตุ้น (mDCs))

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนภายในเซลล์ด้วย Bicinchoninic acid assay (BCA kit)

Dendritic cells ทั้ง 2 ระยะจะถูกทำลายผนังเซลล์ด้วย RIPA buffer ที่มีความสามารถในการแตกผนังเซลล์ เพื่อเก็บตะกอนโปรตีนภายในเซลล์ก่อนนำโปรตีนที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณด้วย BCA kit พบว่าเซลล์ในระยะหลังถูกกระตุ้นหรือเซลล์เดนไดรติกในระยะ Mature dendritic cells จะมีปริมาณโปรตีนภายในเซลล์โดยเฉลี่ยที่ 312 ± 66.59 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในขณะที่เซลล์ในระยะ immature dendritic cells จะมีโปรตีนภายในเซลล์โดยเฉลี่ยเพียง 283 ± 59.24 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ภาพ 13) และเมื่อนำปริมาณโปรตีนของเซลล์เดนไดรติกทั้ง 2 ระยะมาทำการเปรียบเทียบพบว่าปริมาณโปรตีนของ Mature dendritic cells จะมีปริมาณโปรตีนมากกว่า immature dendritic cells อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($*p < 0.05$)



ภาพ 15 แสดงกราฟเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนภายในเซลล์เดนไดรติกในระยะ Immature dendritic cells และ Mature dendritic cells ที่วิเคราะห์ด้วย BCA Kit โดยค่าที่แสดงในกราฟเป็นค่า mean \pm SD จากการวิเคราะห์ 3 ตัวอย่างการทดลอง ($*p < 0.05$ แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนภายในเซลล์เดนไดรติกในระยะก่อนถูกกระตุ้น (iDCs) และหลังได้รับการกระตุ้น (mDCs))

บทที่ 5

บทสรุป

การพัฒนาเซลล์เดนไดรติกที่ใช้ในการวิจัยได้มาจากการแยกโมโนไซต์จาก PBMC ที่ได้จาก Buffy coat ด้วยวิธี adhering ร่วมกับชุดแม่เหล็กแยกเซลล์ (MACs CD14+ isolation kit) ก่อนกระตุ้นด้วย GM-CSF สามารถทำได้และได้รับความนิยมเป็นอย่างยิ่งในการศึกษาเซลล์เดนไดรติก เนื่องจากเซลล์เดนไดรติกที่สามารถแยกได้จากเลือดมีอยู่น้อยมาก โดยในเลือดจะสามารถพบเซลล์เดนไดรติกได้เพียงร้อยละ 2 (Sallusto, & Lanzavecchia, 1994; Zhou et al., 2012; Liu, 2016) ไม่เพียงพอต่อการศึกษามาก ดังนั้นการพัฒนาเซลล์เดนไดรติกภายใต้อาหารเพาะเลี้ยง R-10 (RPMI 1640, 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin-streptomycin and 1% Glutamax) ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์นั้นเป็นอาหารที่เหมาะสมและเป็นที่ยอมรับสำหรับการพัฒนาโมโนไซต์เป็นเซลล์เดนไดรติก (Svajger, & Jeras, 2011) โดยอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง จะได้รับการสนับสนุนด้วย Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) ที่มีความเข้มข้น 800 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ Interleukin-4 (IL-4) ความเข้มข้น 500 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่เพียงพอต่อการพัฒนาของเซลล์เดนไดรติก (Chometon et al., 2020) จากผลการศึกษาเซลล์เดนไดรติกที่พัฒนาที่พัฒนาจากโมโนไซต์ด้วย Flow Cytometry โดยใช้การวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (FSC เทียบกับ SSC) ร่วมกับการย้อมด้วยสี immunofluorescence anti-CD11c ที่มีความจำเพาะต่อเซลล์เดนไดรติก พบว่าโมโนไซต์ที่ถูกกระตุ้นด้วย GM-CSF และ IL-4 มีการพัฒนาเป็นเซลล์เดนไดรติก และเมื่อนำเซลล์ที่ได้มาศึกษาการพัฒนาและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของเซลล์เดนไดรติกหลังได้รับการกระตุ้นด้วย LPS พบว่าเซลล์มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนไป โดยภายใต้การวิเคราะห์ด้วย Flow Cytometry พบว่าเซลล์เดนไดรติกที่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS มีการพัฒนาจากเซลล์ที่ไม่เจริญเต็มที่ (iDCs) เป็นเซลล์ที่เจริญเต็มที่ (mDCs) จะมีการแสดงออกของ CD80 CD83 และ CD86 ซึ่งสัญลักษณ์แสดงถึงการพัฒนาของเซลล์เดนไดรติกที่บรรลุนิติภาวะแล้ว และพร้อมทำหน้าที่เป็น APCs (Liu, 2016; Solano-Gálvez et al., 2018) และเมื่อนำเซลล์เดนไดรติกที่รับการกระตุ้นด้วย LPS มาวิเคราะห์ภายใต้กล้อง Tomocube เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เดนไดรติก พบว่าเซลล์เดนไดรติกที่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS จะลักษณะทางลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปลี่ยนไปผิวเซลล์มีรอยยับและรอยคล้ายมันเพิ่มขึ้นสอดคล้องกับงาน Pauline และคณะในปี 2004 ที่ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาระหว่างการเจริญเติบโตของเซลล์เดนไดรติกภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพบว่าเซลล์เดนไดรติกที่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS จะพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยมีขนาดใหญ่ขึ้นและมีผิวยับไม่เรียบ (Verdijk

et al., 2004; Xing, Wang, Hu, Yu, Chen, & Liu, 2011) และสอดคล้องกับการศึกษาการพัฒนาของ Myeloid Dendritic Cells ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านของ Neumüller และคณะในปี 2016 ที่พบว่าหลังได้รับการกระตุ้นเซลล์เดนไดรติกจะพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยและมีผิวยับยั้ง (Neumüller, Neumüller-Guber, Huber, Ellinger, & Wagner, 2016) และจากการวิเคราะห์ค่าดัชนีการหักเหแสงจากกล้อง Tomocube ที่มีความสามารถในการศึกษาลักษณะภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต (Feng, Lee, & Kornmann, 2019) และมีความสามารถในการวิเคราะห์หาปริมาณมวลโดยรวมและปริมาณไขมันภายในเซลล์เซลล์ (Park et al., 2020) พบว่าเซลล์เดนไดรติกที่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS มีขนาดใหญ่ขึ้น มีมวลเพิ่มสูงขึ้น และมีการสะสมของไขมันภายในเซลล์ โดยการเพิ่มของมวลในเซลล์เดนไดรติกสอดคล้องกับผลจากการวัดปริมาณโปรตีนด้วย BCA kit และการเพิ่มขึ้นของไขมันภายในเซลล์จากการศึกษาในครั้งนี้ได้รับการยืนยันด้วยการย้อมสี oil red O ซึ่งเป็นวิธีพื้นฐานในการย้อมสีเพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาไขมันภายในเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ต้องการศึกษา (Peng et al., 2015; Du, Zhao, Kang, He, & Bi, 2023) โดยการเพิ่มขึ้นของมวลเซลล์นี้สอดคล้องกับผลที่ได้จากการวัดปริมาณโปรตีนด้วย BCA kit ซึ่งเป็นการวัดปริมาณโปรตีนโดยรวมภายในเซลล์โดยการเพิ่มขึ้นของโปรตีนนี้อาจเป็นผลมาจากการกระบวนการสร้างไซโตไคน์ซึ่งเป็นโปรตีนขนาดเล็กเพื่อตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอม

การเพิ่มขึ้นของไขมันในเซลล์เดนไดรติกหลังได้รับการกระตุ้นนี้สอดคล้องกับ การศึกษาของ Lühr และคณะในปี 2020 ซึ่งทำการศึกษาการกระตุ้นเซลล์เดนไดรติกที่พัฒนามาจากโมโนไซต์และลักษณะของเมมเบรนและไขมันที่เปลี่ยนไป โดยจากการศึกษานี้พบว่าเซลล์เดนไดรติกที่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS จะมีปริมาณไขมันเพิ่มสูงขึ้นส่งผลต่อการพัฒนาและเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเยื่อหุ้มเซลล์ (Cell membrane) ซึ่งมีหน้าที่สำคัญในการแลกเปลี่ยนและส่งสัญญาณ โดยการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ในเซลล์ที่เจริญเต็มที่ (mDCs) จะมีความสามารถมากกว่าเซลล์ที่ไม่เจริญเต็มที่ (iDCs) (Lühr et al., 2020) และการเพิ่มขึ้นของไขมันภายในเซลล์นี้อาจเกี่ยวข้องกับลำเลียงและส่งออกของไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ โดยมีรายงานพบว่าในขณะที่เซลล์เดนไดรติกถูกกระตุ้น กลูโคสจะถูกนำมาใช้เป็นแหล่งพลังงานในการสังเคราะห์ Fatty acid synthesis (FAS) เพื่อนำไปใช้ในการสร้างและขยายตัวของผนังเซลล์ของ Endoplasmic reticulum (ER) และ Golgi ที่มีส่วนช่วยในการสังเคราะห์และลำเลียง Proinflammatory ออกสู่ภายนอกเซลล์ นอกจากนี้ยังมีการทำงานของ acetyl-CoA ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิต FAS ยังเป็นส่วนประกอบของ Protein acetylation และเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล (cholesterol) ที่เป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์อีกด้วย (Møller, Wang, Ho,

2022) จากรายงานและการศึกษาดังกล่าวจะเห็นได้ว่าไขมันที่เพิ่มขึ้นในเซลล์เดนไดรติกหลังได้รับการกระตุ้นนี้มีความสำคัญเป็นอย่างมาก

อย่างไรก็ตามการศึกษาในครั้งนี้เป็นการยืนยันการเพิ่มขึ้นของไขมันในเซลล์เดนไดรติกที่หลังได้รับการกระตุ้นที่ได้มาจากกล้อง Tomocube ที่มีความสามารถในการถ่ายภาพลักษณะของเซลล์และวิเคราะห์ค่าดัชนีการหักเหแสงเพื่อวิเคราะห์ถึงชีวโมเลกุลต่าง ๆ ภายในเซลล์และสร้างออกมาเป็นภาพ 3 มิติ โดยการศึกษานี้อาจถูกใช้เป็นแนวทางในการศึกษาบทบาทของไขมันที่เพิ่มขึ้นในมุมมองอื่น ๆ ต่อไปซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการทำเมแทโบโลมิกส์ (metabolite) ที่เป็นการศึกษาการทำงานของสารชีวโมเลกุลเพื่อดูวิถีเมแทบอลิซึม (metabolic pathway) ของไขมัน เพื่อให้เข้าใจถึงการเปลี่ยนแปลงของวิถีเมแทบอลิซึม เพื่อเข้าใจถึงภาพรวมของการทำงานของไขมันภายในเซลล์เดนไดรติกที่ถูกกระตุ้น ก่อนนำมาวิเคราะห์และศึกษาความสำคัญของชนิดของไขมันกลุ่มย่อยที่แตกกันต่อไป





บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- Abbas, Z., & Rehman, S. (2018). *An Overview of Cancer Treatment Modalities, Neoplasm, Hafiz Naveed Shahzad, IntechOpen*, DOI: 10.5772/intechopen.76558.
- Akinbi, H. T., Epaud, R., Bhatt, H., & Weaver, T. E. (2000). Bacterial killing is enhanced by expression of lysozyme in the lungs of transgenic mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 165(10), 5760–5766. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.10.5760>
- Al-Ashmawy, G. M. Z. (2018). Dendritic Cell Subsets, Maturation and Function. In (Ed.), *Dendritic Cells. IntechOpen*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.79926>
- Anaya, J. M., Shoenfeld, Y., Rojas-Villarraga, A., Levy, R. A., & Cervera, R. (Eds.). (2013). *Autoimmunity: From Bench to Bedside*. N.P.: El Rosario University Press.
- Auffray, C., Sieweke, M. H., & Geissmann, F. (2009). Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annual review of immunology*, 27, 669–692. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132557>
- Berg, R. E., & Forman, J. (2006). The role of CD8 T cells in innate immunity and in antigen non-specific protection. *Current opinion in immunology*, 18(3), 338–343. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2006.03.010>
- Blum, J. S., Wearsch, P. A., & Cresswell, P. (2013). Pathways of antigen processing. *Annual review of immunology*, 31, 443–473. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095910>
- Bonilla, F. A., & Oettgen, H. C. (2010). Adaptive immunity. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 125(2 Suppl 2), S33–S40. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.017>
- Breathnach A. S. (1963). The distribution of Langerhans cells within the human hair follicle, and some observations on its staining properties with gold chloride. *Journal of anatomy*, 97(Pt 1), 73–80.

- Castell-Rodríguez, A., Piñón-Zárate, G., Herrera- Enríquez, M., Jarquín-Yáñez, K., & Medina-Solares, I. (2017). Dendritic Cells: Location, Function, and Clinical Implications. In (Ed.), *Biology of Myelomonocytic Cells. IntechOpen*.
<https://doi.org/10.5772/intechopen.68352>
- Chaplin D. D. (2010). Overview of the immune response. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 125(2 Suppl 2), S3–S23.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.12.980>
- Chometon, T. Q., Siqueira, M., Sant Anna, J. C., Almeida, M. R., Gandini, M., Martins de Almeida Nogueira, A. C., & Antas, P. (2020). A protocol for rapid monocyte isolation and generation of singular human monocyte-derived dendritic cells. *PloS one*, 15(4), e0231132. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231132>
- Collin, M., McGovern, N., & Haniffa, M. (2013). Human dendritic cell subsets. *Immunology*, 140(1), 22–30. <https://doi.org/10.1111/imm.12117>
- Devi, K. S., & Anandasabapathy, N. (2017). The origin of DCs and capacity for immunologic tolerance in central and peripheral tissues. *Seminars in immunopathology*, 39(2), 137–152. <https://doi.org/10.1007/s00281-016-0602-0>
- Dieu, M. C., Vanbervliet, B., Vicari, A., Bridon, J. M., Oldham, E., Ait-Yahia, S., Brière, F., Zlotnik, A., Lebecque, S., & Caux, C. (1998). Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *The Journal of experimental medicine*, 188(2), 373–386.
<https://doi.org/10.1084/jem.188.2.373>
- Du, J., Zhao, L., Kang, Q., He, Y., & Bi, Y. (2023). An optimized method for Oil Red O staining with the salicylic acid ethanol solution. *Adipocyte*, 12(1), 2179334.
<https://doi.org/10.1080/21623945.2023.2179334>
- Dunkelberger, J. R., & Song, W. C. (2010). Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell research*, 20(1), 34–50.
<https://doi.org/10.1038/cr.2009.139>
- Ehrenreich, B. A., & Cohn, Z. A. (1967). The uptake and digestion of iodinated human serum albumin by macrophages in vitro. *The Journal of experimental medicine*, 126(5), 941–958. <https://doi.org/10.1084/jem.126.5.941>

- Ehrenreich, B. A., & Cohn, Z. A. (1969). The fate of peptides pinocytosed by macrophages in vitro. *The Journal of experimental medicine*, *129*(1), 227–245. <https://doi.org/10.1084/jem.129.1.227>
- Feng, Q., Lee, S. S., & Kornmann, B. (2019). A Toolbox for Organelle Mechanobiology Research-Current Needs and Challenges. *Micromachines*, *10*(8), 538. <https://doi.org/10.3390/mi10080538>
- Ganguly, D., Paul, K., Bagchi, J., Rakshit, S., Mandal, L., Bandyopadhyay, G., & Bandyopadhyay, S. (2007). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor drives monocytes to CD14^{low} CD83⁺ DCSIGN⁻ interleukin-10-producing myeloid cells with differential effects on T-cell subsets. *Immunology*, *121*(4), 499–507. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02596.x>
- Gardai, S. J., McPhillips, K. A., Frasch, S. C., Janssen, W. J., Starefeldt, A., Murphy-Ullrich, J. E., Bratton, D. L., Oldenborg, P. A., Michalak, M., & Henson, P. M. (2005). Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell*, *123*(2), 321–334. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.032>
- Guilliams, M., Dutertre, C. A., Scott, C. L., McGovern, N., Sichien, D., Chakarov, S., Van Gassen, S., Chen, J., Poidinger, M., De Pijck, S., Tavernier, S. J., Low, I., Irac, S. E., Mattar, C. N., Sumatoh, H. R., Low, G. H. L., Chung, T. J. K., Chan, D. K. H., Tan, K. K., Hon, T. L. K., ... Ginhoux, F. (2016). Unsupervised High-Dimensional Analysis Aligns Dendritic Cells across Tissues and Species. *Immunity*, *45*(3), 669–684. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.08.015>
- Hamilton J. A. (2019). GM-CSF-Dependent Inflammatory Pathways. *Frontiers in immunology*, *10*, 2055. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02055>
- Haniffa, M., Collin, M., & Ginhoux, F. (2013). Ontogeny and functional specialization of dendritic cells in human and mouse. *Advances in immunology*, *120*, 1–49. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417028-5.00001-6>
- Hosseinzadeh, E., Banaee, N., & Nedaie, H. (2017). Cancer and Treatment Modalities. *Current Cancer Therapy Reviews*, *13*. doi: 10.2174/15733947136661705310818

- International Agency for Research on Cancer. (2022, December 21). *Re: Cancer Over time [Web blog message]*. Retrieved December 22, 2021, from <https://gco.iarc.fr/>
- Janeway, C. A., Jr, & Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annual review of immunology*, 20, 197–216. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359>
- Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M., (2001). *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease* (5th ed.). New York: n.p.
- Kang, B. H., & Lee, H. K. (2022). Dendritic Cell-Based Immunotherapy in Hot and Cold Tumors. *International journal of molecular sciences*, 23(13), 7325. <https://doi.org/10.3390/ijms23137325>
- Kassianos, A. J., Hardy, M. Y., Ju, X., Vijayan, D., Ding, Y., Vulink, A. J..., Radford, K. J. (2012). Human CD1c (BDCA-1)+ myeloid dendritic cells secrete IL-10 and display an immuno-regulatory phenotype and function in response to *Escherichia coli*. *European journal of immunology*, 42(6), 1512–1522. <https://doi.org/10.1002/eji.201142098>
- Kate Anderton (2018, November 28). *Tomocube releases first of it's kind, 3D fluorescent holotomography microscope*. Retrived December 2, 2021, from <https://www.news-medical.net/news/20181128/Tomocube-releases-first-of-its-kind-3D-fluorescent-holotomography-microscope.aspx>
- Kim, K., Lee, S., Yoon, J., Heo, J., Choi, C., & Park, Y. (2016). Three-dimensional label-free imaging and quantification of lipid droplets in live hepatocytes. *Scientific reports*, 6, 36815. <https://doi.org/10.1038/srep36815>
- Kondělková, K., Vokurková, D., Krejsek, J., Borská, L., Fiala, Z., & Ctírad, A. (2010). Regulatory T cells (TREG) and their roles in immune system with respect to immunopathological disorders. *Acta medica (Hradec Kralove)*, 53(2), 73–77. <https://doi.org/10.14712/18059694.2016.63>
- Lee, A. J., Hugonnet, H., Park, W., & Park, Y. (2020). Three-dimensional label-free imaging and quantification of migrating cells during wound healing. *Biomedical optics express*, 11(12), 6812–6824. <https://doi.org/10.1364/BOE.405087>

- Liu K. (2016). Dendritic Cells. *Encyclopedia of Cell Biology*, 741–749.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394447-4.30111-0>
- Lühr, J. J., Alex, N., Amon, L., Kräter, M., Kubánková, M., Sezgin, E., Lehmann, C. H. K., Heger, L., Heidkamp, G. F., Smith, A. S., Zaburdaev, V., Böckmann, R. A., Levental, I., Dustin, M. L., Eggeling, C., Guck, J., & Dudziak, D. (2020). Maturation of Monocyte-Derived DCs Leads to Increased Cellular Stiffness, Higher Membrane Fluidity, and Changed Lipid Composition. *Frontiers in immunology*, 11, 590121. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.590121>
- Markov, O. V., Mironova, N. L., Vlasov, V. V., & Zenkova, M. A. (2016). Molecular and Cellular Mechanisms of Antitumor Immune Response Activation by Dendritic Cells. *Acta naturae*, 8(3), 17–30.
- Marshall, J.S., Warrington, R., Watson, W. & Kim, H.L. (2018). An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy Asthma Clin Immunol*, 14, 49.
<https://doi.org/10.1186/s13223-018-0278-1>
- Matsui, T., & Amagai, M. (2015). Dissecting the formation, structure and barrier function of the stratum corneum. *International immunology*, 27(6), 269–280.
<https://doi.org/10.1093/intimm/dxv013>
- Mildner, A., & Jung, S. (2014). Development and function of dendritic cell subsets. *Immunity*, 40(5), 642–656. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.04.016>
- Mishell, R. I., & Dutton, R. W. (1967). Immunization of dissociated spleen cell cultures from normal mice. *The Journal of experimental medicine*, 126(3), 423–442.
<https://doi.org/10.1084/jem.126.3.423>
- Moghadami M. (2017). A Narrative Review of Influenza: A Seasonal and Pandemic Disease. *Iranian journal of medical sciences*, 42(1), 2–13.
- Møller, S. H., Wang, L., & Ho, P. C. (2022). Metabolic programming in dendritic cells tailors immune responses and homeostasis. *Cellular & molecular immunology*, 19(3), 370–383. <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00753-1>
- National Cancer Institute. (2021, December 15). *Re: Immunotherapy to Treat Cancer [Web blog message]*. Retrieved December 25, 2021, from <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/immunotherapy>

- Netea, M. G., Schlitzer, A., Placek, K., Joosten, L. A. B., & Schultze, J. L. (2019). Innate and Adaptive Immune Memory: an Evolutionary Continuum in the Host's Response to Pathogens. *Cell host & microbe*, *25*(1), 13–26.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.12.006>
- Neumüller, J., Neumüller-Guber, S. E., Huber, J., Ellinger, A., & Wagner, T. (2016). *Development of Myeloid Dendritic Cells under the Influence of Sexual Hormones Visualized using Scanning and Transmission Electron Microscopy. Modern Electron Microscopy in Physical and Life Sciences.* doi: 10.5772/62310
- Nicholson L. B. (2016). The immune system. *Essays in biochemistry*, *60*(3), 275–301.
<https://doi.org/10.1042/EBC20160017>
- Nussenzweig, M. C., Steinman, R. M., Gutchinov, B., & Cohn, Z. A. (1980). Dendritic cells are accessory cells for the development of anti-trinitrophenyl cytotoxic T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine*, *152*(4), 1070–1084.
<https://doi.org/10.1084/jem.152.4.1070>
- Page, D. B., Bourla, A. B., Daniyan, A., Naidoo, J., Smith, E., Smith, M., . . . Callahan, M. K. (2015). Tumor immunology and cancer immunotherapy: summary of the 2014 SITC primer. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, *3*(1), 25.
 doi:10.1186/s40425-015-0072-2
- Palmer, D. R., Sun, P., Celluzzi, C., Bisbing, J., Pang, S., Sun, W., . . . Burgess, T. (2005). Differential effects of dengue virus on infected and bystander dendritic cells. *Journal of Virology*, *79*(4), 2432–2439. doi: 10.1128/JVI.79.4.2432-2439.2005
- Park, S., Ahn, J. W., Jo, Y., Kang, H. Y., Kim, H. J., Cheon, Y., Kim, J. W., Park, Y., Lee, S., & Park, K. (2020). Label-Free Tomographic Imaging of Lipid Droplets in Foam Cells for Machine-Learning-Assisted Therapeutic Evaluation of Targeted Nanodrugs. *ACS nano*, *14*(2), 1856–1865. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b07993>
- Peng, K., Liu, L., Wei, D., Lv, Y., Wang, G., Xiong, W., Wang, X., Altaf, A., Wang, L., He, D., Wang, H., & Qu, P. (2015). P2X7R is involved in the progression of atherosclerosis by promoting NLRP3 inflammasome activation. *International journal of molecular medicine*, *35*(5), 1179–1188.
<https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2129>

- Qu, C., Brinck-Jensen, N. S., Zang, M., & Chen, K. (2014). Monocyte-derived dendritic cells: targets as potent antigen-presenting cells for the design of vaccines against infectious diseases. *International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases*, *19*, 1–5.
- Riera Romo, M., Pérez-Martínez, D., & Castillo Ferrer, C. (2016). Innate immunity in vertebrates: an overview. *Immunology*, *148*(2), 125–139. <https://doi.org/10.1111/imm.12597>
- Saavedra, L. P. J., Prates, K. V., Gonçalves, G. D., Piován, S., Matafome, P., & Mathias, P. C. F. (2021). COVID-19 During Development: A Matter of Concern. *Frontiers in cell and developmental biology*, *9*, 659032. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.659032>
- Sabado, R. L., Balan, S., & Bhardwaj, N. (2017). Dendritic cell-based immunotherapy. *Cell Research*, *27*(1), 74–95. doi: 10.1038/cr.2016.157
- Sallusto, F., & Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *The Journal of experimental medicine*, *179*(4), 1109–1118. <https://doi.org/10.1084/jem.179.4.1109>
- Sallusto, F., Palermo, B., Lenig, D., Miettinen, M., Matikainen, S., Julkunen, I., Forster, R., Burgstahler, R., Lipp, M., & Lanzavecchia, A. (1999). Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. *European journal of immunology*, *29*(5), 1617–1625. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199905\)29:05<1617::AID-IMMU1617>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199905)29:05<1617::AID-IMMU1617>3.0.CO;2-3)
- Schroeder, H. W., Jr, & Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *125*(2 Suppl 2), S41–S52. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.046>
- Shah, C. U. (2014). *Cancer research and therapy: Where are we today?* N.P.: n.p.
- Shortman, K., & Liu, Y. J. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nature reviews. Immunology*, *2*(3), 151–161. <https://doi.org/10.1038/nri746>

- Solano-Gálvez, S. G., Tovar-Torres, S. M., Tron-Gómez, M. S., Weiser-Smeke, A. E., Álvarez-Hernández, D. A., Franyuti-Kelly, ..., Vázquez-López, R. (2018). Human Dendritic Cells: Ontogeny and Their Subsets in Health and Disease. *Medical sciences (Basel, Switzerland)*, *6*(4), 88. <https://doi.org/10.3390/medsci6040088>
- Steinman, R. M., & Cohn, Z. A. (1972). The interaction of soluble horseradish peroxidase with mouse peritoneal macrophages in vitro. *The Journal of cell biology*, *55*(1), 186–204. <https://doi.org/10.1083/jcb.55.1.186>
- Steinman, R. M., & Cohn, Z. A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *The Journal of experimental medicine*, *137*(5), 1142–1162. <https://doi.org/10.1084/jem.137.5.1142>
- Steinman, R. M., & Witmer, M. D. (1978). Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *75*(10), 5132–5136. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.10.5132>
- Svajger U, Jeras M. (2011). Optimal dendritic cell differentiation in rpmi media requires the absence of HEPES buffer. *Immunol Invest*, *40*(4), 413–26. [10.3109/08820139.2011.556172](https://doi.org/10.3109/08820139.2011.556172)
- Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, *140*(6), 805–820. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>
- Turvey S.E. & Broide D.H. (2010), Innate immunity. *J Allergy Clin Immunol*, *125*(Suppl 2), S24–32.
- Unanue, E. R., & Cerottini, J. C. (1970). The immunogenicity of antigen bound to the plasma membrane of macrophages. *The Journal of experimental medicine*, *131*(4), 711–725. <https://doi.org/10.1084/jem.131.4.711>
- van de Laar, L., Coffey, P. J., & Woltman, A. M. (2012). Regulation of dendritic cell development by GM-CSF: molecular control and implications for immune homeostasis and therapy. *Blood*, *119*(15), 3383–3393. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-11-370130>

- Van Rhijn, I., Ly, D., & Moody, D. B. (2013). CD1a, CD1b, and CD1c in immunity against mycobacteria. *Advances in experimental medicine and biology*, 783, 181–197. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6111-1_10
- Verdijk, P., van Veelen, P. A., de Ru, A. H., Hensbergen, P. J., Mizuno, K., Koerten, H. K., Koning, F., Tensen, C. P., & Mommaas, A. M. (2004). Morphological changes during dendritic cell maturation correlate with cofilin activation and translocation to the cell membrane. *European journal of immunology*, 34(1), 156–164. <https://doi.org/10.1002/eji.200324241>
- Villaseñor-Cardoso, M. I., Frausto-Del-Río, D. A., & Ortega, E. (2013). Aminopeptidase N (CD13) is involved in phagocytic processes in human dendritic cells and macrophages. *BioMed research international*, 2013, 562984. <https://doi.org/10.1155/2013/562984>
- Wang T, Welte T. Role of Natural Killer and Gamma-Delta T cells in West Nile Virus Infection. *Viruses*. 2013, 5(9):2298-2310. <https://doi.org/10.3390/v5092298>
- Wculek, S. K., Cueto, F. J., Mujal, A. M., Melero, I., Krummel, M. F., & Sancho, D. (2020). Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, 20(1), 7-24. doi: 10.1038/s41577-019-0210-z
- World Health Organization. (2021, December 21). *Re: Cancer [Web blog message]*. Retrieved December 30, 2021, from https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1
- Xing, F., Wang, J., Hu, M., Yu, Y., Chen, G., & Liu, J. (2011). Comparison of immature and mature bone marrow-derived dendritic cells by atomic force microscopy. *Nanoscale research letters*, 6(1), 455. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-6-455>
- Yanagihara, S., Komura, E., Nagafune, J., Watarai, H., & Yamaguchi, Y. (1998). EBI1/CCR7 is a new member of dendritic cell chemokine receptor that is up-regulated upon maturation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 161(6), 3096–3102.
- Zhou, L., Somasundaram, R., Nederhof, R. F., Dijkstra, G., Faber, K. N., Peppelenbosch, M. P., & Fuhler, G. M. (2012). Impact of human granulocyte and monocyte isolation procedures on functional studies. *Clinical and vaccine immunology: CVI*, 19(7), 1065–1074. <https://doi.org/10.1128/CI.05715-11>



ภาคผนวก

ภาคผนวก ก สารเคมีและอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์

1. Phosphate-Buffered Saline (PBS Buffer)

ความเข้มข้น 1X ปริมาตร 1 ลิตร (PH 7.4)

Sodium chloride (NaCl)	8	กรัม
Potassium chloride (KCl)	0.2	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	0.24	กรัม
Sodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)	1.44	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

การเตรียม PBS Buffer

ชั่งสารเคมีสำหรับเตรียม PBS Buffer ปริมาตร 1 ลิตรก่อนละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 800 มิลลิลิตรเป็นเวลา 1-2 ชั่วโมงหลังจากนั้นสารละลายจะถูกปรับ pH เป็น 7.4 ด้วย HCl และถูกปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น หลังจากนั้นสารละลายจะถูกแบ่งใส่ขวดและนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำเป็นเวลา 15 นาทีที่ 15 psi อุณหภูมิที่ 121 องศาเซลเซียส ก่อนนำเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส)

2. Red blood cells lysis buffer

ความเข้มข้น 10X ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (PH 7.4)

Ammonium chloride (NH_4Cl)	8.02	กรัม
Sodium hydrogen carbonate (NaHCO_3)	0.84	กรัม
EDTA	0.037	กรัม

การเตรียม Red blood cells lysis buffer

ชั่งสารเคมีสำหรับเตรียม PBS Buffer ปริมาตร 100 ลิตรก่อนละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 80 มิลลิลิตรเป็นเวลา 1-2 ชั่วโมงหลังจากนั้นสารละลายจะถูกปรับ pH เป็น 7.4 ด้วย HCl และถูกปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ก่อนนำมากรองด้วย filter sterilization และเก็บในขวดปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. RPMI 1640 Media (Mammalian Cell Culture Media)

ความเข้มข้น 1X ปริมาตร 1 ลิตร (PH 7.2)

RPMI 1640 Media	1	ซอง
Sodium bicarbonate (NaHCO_3)	2	กรัม

L-glutamine	10	มิลลิลิตร
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร
การเตรียม RPMI 1640 Media		

เตรียม RPMI 1640 Media 1 ลิตรซึ่งสาร NaHCO_3 2 กรัมผสมกับ RPMI 1640 Media 1 ซอง ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตรเป็นเวลา 1-2 ชั่วโมงหลังจากนั้น สารละลายจะถูกปรับ pH เป็น 7.2 ด้วย HCl และถูกปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น ก่อนนำมากรองด้วย filter sterilization และเก็บในขวดปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ R-10

ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

RPMI 1640 Media	445	มิลลิลิตร
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL)	5	มิลลิลิตร
Fetal Bovine Serum (FBS)	50	มิลลิลิตร
การเตรียม R-10		

ปิเปต Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และปิเปต Fetal Bovine Serum (FBS) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในขวดปลอดเชื้อที่ผ่านการนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำเป็นเวลา 15 นาทีที่ 15 psi อุณหภูมิที่ 121 องศาเซลเซียสแล้ว จากนั้นเติม RPMI 1640 Media ให้ครบ 500 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันก่อนนำไปใช้และเก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่า 4 องศาเซลเซียส

5. MACS Buffer

ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

PBS (PH 7.4)	100	มิลลิลิตร
Bovine Serum Albumin (BSA)	0.5	กรัม
EDTA	7.4445	มิลลิกรัม
การเตรียม MACS Buffer		

เตรียม MACS Buffer 100 มิลลิตรซึ่งสาร BSA 0.5 กรัมและ EDTA 7.4445 มิลลิกรัม ละลายใน PBS เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมงหลังจากนั้นสารละลายจะถูกนำมากรองด้วย filter sterilization และเก็บในขวดปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

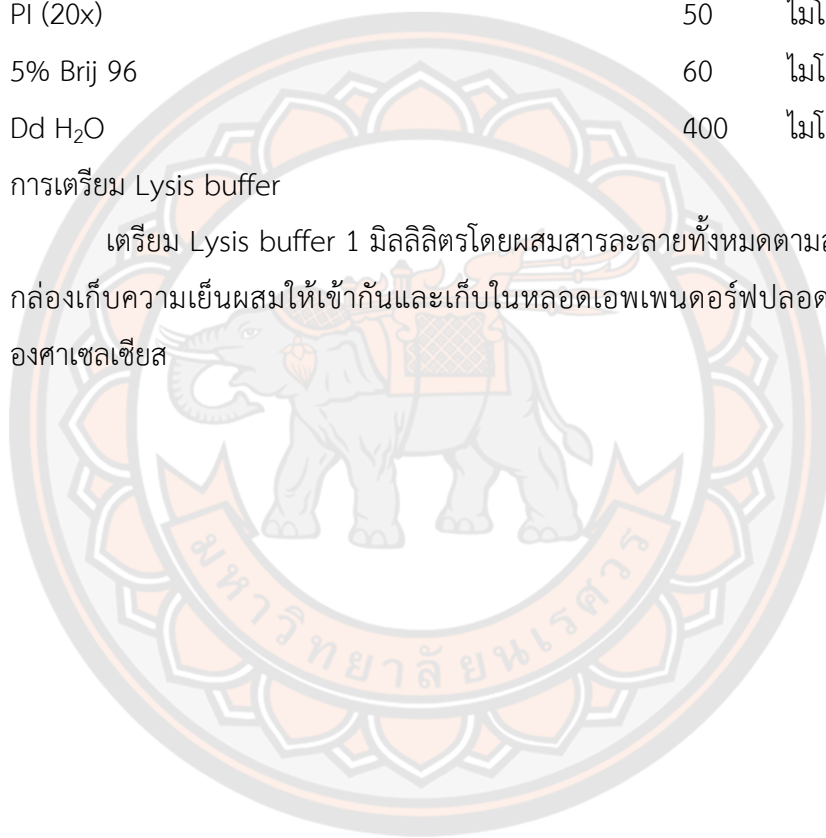
6. Lysis buffer

ปริมาตร 1 มิลลิตร

2X EMBO	500	ไมโครลิตร
50 mM Sodium metavanadate (NaVO_3)	10	ไมโครลิตร
1 mM Sodium fluoride (NaF)	10	ไมโครลิตร
500 mM Indole-3-Acetic Acid (IAA)	10	ไมโครลิตร
100 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)	10	ไมโครลิตร
PI (20x)	50	ไมโครลิตร
5% Brij 96	60	ไมโครลิตร
Dd H_2O	400	ไมโครลิตร

การเตรียม Lysis buffer

เตรียม Lysis buffer 1 มิลลิตรโดยผสมสารละลายทั้งหมดตามสัดส่วนด้านบนใน
 กล้องเก็บความเย็นผสมให้เข้ากันและเก็บในหลอดเอพเพนดอร์ฟปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 4
 องศาเซลเซียส



ภาคผนวก ข ข้อมูลดิบ

1. จำนวนโมโนไซต์ที่แยกได้ในแต่ละขั้นตอน

	PBMC	Adherence cells	MACs
buffy coat 01	24.4	45.86	96.75
buffy coat 02	15.76	40.59	93.22
buffy coat 03	26.43	59.93	92.2
buffy coat 04	17.63	57.18	95.87
buffy coat 05	11.57	54.00	92.22
Mean ± SD	19 ± 6.16	52 ± 8.07	94.1 ± 2.13

2. จำนวนเซลล์เดนไดรติกที่พัฒนาจากโมโนไซต์

	Dendritic	
	%CD14	%CD11c
buffy coat 01	0	96
buffy coat 02	0.77	92.72
buffy coat 03	1.46	89.59
buffy coat 04	0.6	88.79
buffy coat 05	0.8	94
Mean ± SD	1 ± 0.52	92 ± 3.01

3. การแสดงออกของ CD11c CD80 และ CD86 ของเซลล์เดนไดรติกตัวอ่อน

	Unstimulation dendritic cells		
	%CD11c	%CD80	%CD86
buffy coat 01	89	5	6
buffy coat 02	73	7	8
buffy coat 03	89	5	13
buffy coat 04	90	2	11
Mean ± SD	85 ± 8.05	5 ± 1.86	9 ± 3.17

4. การแสดงออกของ CD11c CD80 และ CD86 ของเซลล์เดนไดรติกตัวอ่อน

Stimulation dendritic cells

	%CD11c	%CD80	%CD86
buffy coat 01	89	58	91
buffy coat 02	74	53	90
buffy coat 03	89	59	85
buffy coat 04	90	74	93
Mean \pm SD	85 \pm 7.44	61 \pm 8.93	90 \pm 3.17

5. ผลจากการวิเคราะห์ภายใต้กล้อง Tomocube

Unstimulation dendritic cells

	Cell Volume (μm^3)	Cell Mass (pg)	Lipid Volume (μm^3)	Lipid Mass (pg)
1	4002	83	5.23	31
2	4076	101	6.00	31
3	4039	92	8.42	31
Mean \pm SD	4039 \pm 37.28	92 \pm 9.01	5.62 \pm 1.66	31 \pm 0.06

Stimulation dendritic cells

	Cell Volume (μm^3)	Cell Mass (pg)	Lipid Volume (μm^3)	Lipid Mass (pg)
1	4977	121	370.41	34
2	5404	137	646.25	33
3	4139	148	635.08	34
Mean \pm SD	4840 \pm 643.41	135 \pm 13.62	550.58 \pm 156.13	34 \pm 0.66

6. ผลจากการวิเคราะห์ด้วย Oil red O

%Area of lipid in cells

	B01	B02	B03	B04	Mean \pm SD
Unstimulation dendritic cells	15	7	15	10	12 \pm 4.13
Stimulation dendritic cells	25	17	22	16	20 \pm 4.09

Dendritic cells area

	B01	B02	B03	B04	Mean \pm SD
Unstimulation dendritic cells	1490	1272	2941	1983	1921 \pm 741.88
Stimulation dendritic cells	2472	2876	4419	2814	3145 \pm 867.59

7. ผลจากการวิเคราะห์ด้วย BCA kit

Protein conc.(μ g/ml)				
	B01	B02	B03	Mean \pm SD
Unstimulation dendritic cells	323.3	233.5	352.96	312.29 \pm 59.24
Stimulation dendritic cells	358.3	258.3	390.37	282.89 \pm 66.59