สารบัญ

หน้า

หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเวชศาสตร์

การคัดแยกจำแนกและศึกษาคุณลักษณะของแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะ เชื้อแบคทีเรียดื้อยา 1

ผู้วิจัย วัชรินทร์ จันทุมา

ตัวบ่งชี้ชีวภาพทางคลินิกในการติดเชื้อมาลาเรีย: ทบทวนวรรณกรรมเชิงระบบของไมโครอาร์เอ็นเอ 3

ผู้วิจัย GREGORIO RANGEL

บทคัดย่อ

เรื่อง	:	การคัดแยกจำแนกและศึกษาคุณลักษณะของแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะเชื้อแบคทีเรียดื้อยา
ผู้วิจัย	:	วัชรินทร์ จันทุมา
ชื่อปริญญา	:	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	:	ชีวเวชศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	:	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มารุตพงศ์ ปัญญา
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	:	ศาสตราจารย์ ดร.พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ
	:	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธารินี ไชยวงศ์
คำสำคัญ	:	*Pseudomonas aeruginosa*, bacteriophage, multidrug resistant bacteria, Bacteriophage therapy

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและศึกษาคุณสมบัติของแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะ ต่อเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ดื้อยาหลายชนิด ผลการศึกษาพบว่าสามารถคัดแยกแบคเทอริโอเฟจ WJ9 (phageWJ9) ได้จากโรงบำบัดน้ำเสียโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานีโดย phageWJ9 มีความจำเพาะต่อเชื้อ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ดื้อยาหลายชนิดที่คัดแยกจากผู้ป่วยในโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ การศึกษาคุณสมบัติของ phageWJ9 ได้แก่ การศึกษาเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน การทนต่อสารละลายเกลือและแอลกอฮอล์ คุณสมบัติของสารพันธุกรรม และการศึกษาสัณฐานวิทยา การศึกษาพบว่า phageWJ9 มีความจำเพาะต่อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* สูง โดยมีค่าร้อยละเท่ากับร้อยละ 70 (7/10) ของจำนวนเชื้อ *P. aeruginosa* ทดสอบทั้งหมด นอกจากนี้ phageWJ9ไม่สามารถ ทำลายแบคทีเรีย *Escherichia coli* ATCC 25922 *Enterobacter* sp. *Klebsiella pneumonia* *Salmonella typhimurium* DMSc 5784 *Shigella dysenteriae* DMSc 2137 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Staphylococcus epidermidis* และ *Bacillus subtilis* การทดสอบการทนต่อสารละลายเกลือและแอลกอฮอล์ พบว่า phageWJ9 สามารถอยู่รอดได้ในสารละลายน้ำเกลือเป็นเวลา 30 นาที การศึกษาคุณสมบัติ สารพันธุกรรมพบว่า phageWJ9 มีสารพันธุกรรมเป็น double-stranded DNA ทั้งนี้สารพันธุกรรม ถูกย่อยได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII และ *Nc*oI และเอนไซม์ DNase แต่ไม่ถูกย่อยด้วย RNase A การศึกษารูปร่างของแบคเทอริโอเฟจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่า phageWJ9 มีลักษณะส่วนหัวเป็น icosahedral ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 83 นาโนเมตร ส่วนหางยาวประมาณ 200 นาโนเมตร เมื่อพิจารณารูปร่างและชนิดสารพันธุกรรมของ phageWJ9 พบว่าจัดอยู่ในวงศ์ *Myoviridae* ออร์เดอร์ *Caudovirales* ดังนั้นแบคเทอริโอเฟจที่คัดแยกได้จากการศึกษาครั้ง

นี้มีคุณสมบัติที่ดีและน่าสนใจนำไปศึกษาในขั้นสูงต่อไป เช่น การทดสอบการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ในเซลล์เพาะเลี้ยง สัตว์ทดลอง และรักษาแผลติดเชื้อ *P. aeruginosa* ในผู้ป่วยต่อไป

ABSTRACT

TITLE : ISOTATION IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF BACTERIOPHAGE SPECIFIC TO ANTIBIOTICS RESISTANT BACTERIA
AUTHOR : WATCHARIN JUNTUMA
DEGREE : MASTER OF SCIENCE
MAJOR : BIOMEDICAL SCIENCES
ADVISOR : ASST. PROF. MARUTPONG PANYA , Ph.D.
CO-ADVISORS : PROF. PONGSAK RATTANACHAIKUNSOPON, Ph.D.
: ASST. PROF. TARINEE CHAIWONG, Ph.D.
KEYWORDS : *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, BACTERIOPHAGE, MULTIDRUG RESISTANCE BACTERIA, BACTERIOPHAGE THERAPY

This study aimed to isolate and characterize bacteriophage specific to the multidrug-resistant (MDR) *Pseudomonas aeruginosa* strains. The result found that the bacteriophage named WJ9 (phageWJ9) could be isolated from the wastewater treatment plant of Sanprasitthiprasong Hospital, Ubon Ratchathani Province. The phageWJ9 was highly specific to bacteria MDR *Pseudomonas aeruginosa*. The strains were isolated from patients who were hospitalized at Sanpasitiprasong Hospital. Bacteriophage properties that were thoroughly investigated in this study include determination of bacteriophage's host range, stability in ethanol and normal saline solution, bacteriophage genome analysis and bacteriophage morphology. The results showed that phageWJ9 was highly specific to *P. aeruginosa* at percentage of 70 (7/10) of all strains tested. However, other tested bacteria which include *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterobacter* sp, *Klebsiella pneumonia*, *Salmonella typhimurium* DMSc5784, *Shigella dysenteriae* DMSc2137, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Staphylococcus epidermidis* and *Bacillus subtilis* were not killed by phageWJ9. Stability in ethanol and normal saline solution demonstrated that phageWJ9 was able to survive after incubating in 0.85 % normal saline for 30 minutes but was not tolerated in the solution. Genome analysis revealed that phageWJ9's genome consisted of a double-stranded alcohol DNA because it was digested by restriction enzyme *Hind*III and *Nco*I and DNase enzyme, but it was not digested by RNase A. Study of phage morphology by transmission electron microscopy revealed that the phage had an

icosahedral head (83nm in diameter) and a long contractile tail (200nm in length). Thus, based on phage genome and morphology, phageWJ9 can be categorized in the family *Myoviridae* of the order *Caudovirales*. In conclusion, the highly specific bacteriophage to MDR *Pseudomonas aeruginosa* had good properties and should be considered for further advanced study such as determination of the *P. aeruginosa* growth inhibition in cell line culture, animal models, and application for wound healing of *P. aeruginosa* in patients with infectious diseases.

บทคัดย่อ

เรื่อง	:	ตัวบ่งชี้ชีวภาพทางคลินิกในการติดเชื้อมาลาเรีย: ทบทวนวรรณกรรมเชิงระบบของไมโครอาร์เอ็นเอ
ผู้วิจัย	:	GREGORIO RANGEL
ชื่อปริญญา	:	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	:	ชีวเวชศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	:	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรศักดิ์ แว่นรัมย์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	:	ดร.อนุวัตร ภิญญะชาติ
	:	ดร.ณัฐวัฒน์ ตีระวัฒนพงศ์
คำสำคัญ	:	โรคติดเชื้อมาลาเรีย, การตอบสนองภูมิคุ้มกันในมนุษย์, ทบทวนวรรณกรรมเชิงระบบ, ไมโครอาร์เอ็นเอ, ตัวบ่งชี้ชีวภาพทางคลินิก

มาลาเรียเป็นหนึ่งของโรคติดเชื้อในภูมิภาคเขตร้อนที่มีนัยสำคัญในมนุษย์ การเกิดโรคมาลาเรียเกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของมนุษย์ที่สัมพันธ์ต่อการหลั่งไซโตไคน์ ซึ่งกลไกการควบคุมของไมโครอาร์เอ็นเอซึ่งตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่มีศักยภาพต่อพยาธิกำเนิดของโรคมาลาเรียดังกล่าวยังไม่ถูกค้นพบมากนัก และน่าจะได้รับการศึกษาวิจัยและนำมาประยุกต์ใช้เพื่อเป็นตัวบ่งชี้ทั้งในระยะแรก การตรวจวินิจฉัย พยากรณ์โรค รักษา และประเมินโรคมาลาเรียในอนาคต วัตถุประสงค์ คือ เพื่อทบทวนวรรณกรรมเชิงระบบของไมโครอาร์เอ็นเอที่ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรีย และการทำนายจีนที่สัมพันธ์กับไมโครอาร์เอ็นเอที่เกี่ยวข้องต่อภูมิคุ้มกันของร่างกาย วัสดุและวิธีการศึกษาใช้จากแหล่งข้อมูล ได้แก่ Medline, EMBASE, CINAHL และ Cochrane data bases โดยงานวิจัยตีพิมพ์ที่สัมพันธ์กับโรคมาลาเรียและไมโครอาร์เอ็นเอโดยจำแนกตาม PRISMA guidelines ใช้คำสำคัญ ได้แก่ มาลาเรีย พลาสโมเดีย พลาสโมเดียม ไมโครอาร์เอ็นเอ และนอน-โคดดิ้งอาร์เอ็นเอ ผลการศึกษาการทบทวนวรรณกรรมเชิงระบบนี้จากการคัดกรอง 262 ผลงานที่น่าสนใจเบื้องต้น โดยพบความซ้ำซ้อน 74 ผลงาน คัดเหลือ 188 ผลงาน เมื่อพิจารณาจากความสอดคล้องของชื่อเรื่องและบทคัดย่อถูกคัดออก 141 ผลงาน เหลือ 47 ผลงาน พิจารณาจากเหตุผลของการศึกษา 34 ผลงาน และเหลือผลงานวิจัยที่ใช้ขั้นสุดท้ายจำนวน 19 ผลงาน โดยเกี่ยวกับพลาสโมเดียมฟาลซิพารัม 13 ผลงาน พลาสโมเดียม ไวแวกซ์ 1 ผลงาน ทั้งพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม และพลาสโมเดียมไวแวกซ์ 5 ผลงาน ซึ่งพบว่ามีการศึกษาในแอนติเจนที่มีความสัมพันธ์กับการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันของมนุษย์ โดยพบว่าระดับการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอที่ลดลงและเพิ่มขึ้น สำหรับผลการทำนายด้วยซอฟต์แวร์ด้านไบโออินฟอร์เมติกที่ให้ความสำคัญกับความสัมพันธ์ของการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันของมนุษย์ที่สัมพันธ์การหลั่งไซโตไคน์ในระหว่างการเกิดโรคมาลาเรียพบว่ามีจำนวนเป้าหมายไมโครอาร์เอ็นเอที่น่าสนใจประกอบด้วยการใช้ Target Scan และ Miranda พบว่าจาก Target Scan: CD36 เท่ากับ 20

miRNAs, IFN-γ เท่ากับ 10 miRNAs, AGO-1 เท่ากับ 5 miRNAs และ AGO-2 เท่ากับ 7 miRNAs จาก Miranda: CD36 เท่ากับ 15 miRNAs, IFN-γ เท่ากับ 18 miRNAs, AGO-1 เท่ากับ 6 miRNAs และ AGO-2 เท่ากับ 16 miRNAs การทบทวนวรรณกรรมเชิงระบบด้วยสมมุติฐานอ้างอิงองค์ความรู้ปัจจุบันพบตัวแทนไมโครอาร์เอ็นเอบนสัมพันธ์การตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์ในการติดเชื้อ การวิจัยแสดงให้เห็นว่าการใช้ไมโครอาร์เอ็นเอที่เสมือนเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพทางคลินิกน่าจะมีความเป็นไปได้มี 5 ตัวเลือก ได้แก่ miR-155, miR-16, miR-150, miR-223 และ miR-451 การตระหนักถึงตัวแทนของไมโครอาร์เอ็นเอเปรียบเสมือนตัวบ่งชี้ที่น่าจะมีศักยภาพเพื่อการประยุกต์ใช้ในทางคลินิก และน่าจะถูกศึกษาวิจัยต่อไปในอนาคต

ABSTRACT

TITLE : CLINICAL BIOMARKERS IN MALARIA INFECTION: A SYSTEMATIC REVIEW ON MICRORNA
AUTHOR : GREGORIO RANGEL
DEGREE : MASTER OF SCIENCE
MAJOR : BIOMEDICAL SCIENCES
ADVISOR : ASST .PROF. SURASAK WANRAM, Ph.D.
CO-ADVISOR : ANUWAT PINYACHAT, Ph.D.
: NATTAWAT TEERAWATTANAPONG, Ph.D.
KEYWORDS : MALARIA INFECTION, HOST IMMUNE RESPONSE, SYSTEMATIC REVIEW, MIRNA, CLINICAL BIOMARKERS

Malaria remains one of the most significant human infectious tropical diseases. The pathogenesis of malaria associated with two most common types such as *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. To date, knowledge of malaria pathogenesis induces host immune response which is associated with massive cytokines production (IFN-γ, TLRs, PRRs, CD36, Ago-1, Ago-2, and IL-1β) and microRNAs regulation leading to severe malaria and cerebral malaria, is undiscovered. Limitation of potential biomarkers relevant to malaria pathogenesis and host interaction should be used for further early detection, diagnoses, prognosis, therapy and monitoring of malaria diseases, especially for microRNA which is a short single-stranded non-coding RNA sequences that post-transcriptionally regulate of protein encoding genes. The research aimed to perform a systematic review on miRNA serves as clinical biomarkers in malaria infection through complicated malaria pathogenesis and predict host immune response genes which associate with miRNA by using bioinformatics software. Materials and methods were used to perform including Medline, EMBASE, CINAHL and Cochrane data bases. The publications all over the world related malaria and miRNA were searched and PRISMA guidelines were followed. Selection was based on the design which consisting of malaria, plasmodia, plasmodium, miRNA and non-coding region. Results from systematic review analyzed 19 papers all over the world (Asia, Africa, Europe and USA). 262 articles was accessed, 74 duplicates was removed and remained 188. 141 papers were excluded and remained 47, 34 full texts

articles were excluded with reason and 19 were included in the studies, finally. From 19 papers, 13 articles focused on *P. falciparum*, 1 concentrated on *P. vivax* and 5 studied on both *P. falciparum* and *P. vivax*. The research found the candidates genes (IFN-γ, CD36, Ago-1, and Ago-2) and miRNAs [(miRs) (miR-155, miR-150, miR-223, miR-16, and miR-451)] to be used in the bioinformatics analysis (Target Scan and miRanda). Target Scan: CD36 was associated with miR-155 and miR-223, IFN-γ and AGO-1 were connected with miR-150, AGO-2 was linked with miR-16. For miRanda: IFN-γ was associated with miR-223 and miR-155, AGO-2 was linked with miR-16 and miR-223. This comprehensive systematic review synthesizes current knowledge of candidate miRNAs on host immune response to malaria infection is essential on both innate and adaptive immunity. The research suggested these five miRNAs (miR-155, miR-16, miR-150, miR-223 and miR-451) as candidate miRNAs biomarker should be explored. Emphasis on the candidate miRNAs biomarker as the potential clinical applications should be explored in the future perspective.