

การทำนายกลไกการอักเสบด้วยการวิเคราะห์เครือข่ายโดยเทคนิคทางชีวสารสนเทศ

ฐิติรัตน์ นุชศิลา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ


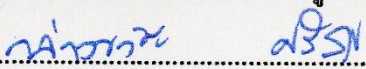
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

มีนาคม 2563

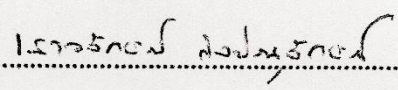

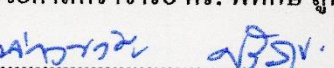
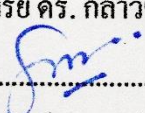
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณา
วิทยานิพนธ์ของ ฐิติรัตน์ นุชศิลา ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้


คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์


.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิทักษ์ สุตรอนันต์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.กล่าวขวัญ ศรีสุข)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


.....ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เสาวลักษณ์ กัตปณิกขณ์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิทักษ์ สุตรอนันต์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.กล่าวขวัญ ศรีสุข)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนันต์ อธิพรชัย)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพของมหาวิทยาลัยบูรพา


.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกรัฐ ศรีสุข)

วันที่ 19 เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2563

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิทักษ์
สุตรอนันต์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก และรองศาสตราจารย์ ดร.กล่าวขวัญ ศรีสุข อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ที่กรุณาให้คำปรึกษาและแนะนำแนวทางที่ถูกต้อง ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความ
ละเอียดถี่ถ้วนและเอาใจใส่ด้วยดีเสมอมา ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณ
เป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

เนื่องจากการวิจัยครั้งนี้ส่วนหนึ่งได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยมหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปี
งบประมาณ พ.ศ. 2560 จึงขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา ครอบครัว และทุกคนที่คอยให้กำลังใจ คำแนะนำ และ
ช่วยเหลือผู้วิจัยเสมอมา

คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบเป็นกตัญญูแด่แม่เพ็ญใจ
บูรพาจารย์ และผู้ที่มีพระคุณทุกท่านทั้งในอดีตและปัจจุบัน ที่ทำให้ข้าพเจ้าเป็นผู้มีการศึกษาและ
ประสบความสำเร็จมาจนตราบเท่าทุกวันนี้

จิตติรัตน์ นุชศิลา

58910076: สาขาวิชา: วิทยาศาสตร์ชีวภาพ; วท.ม. (วิทยาศาสตร์ชีวภาพ)

คำสำคัญ: การอักเสบ/ข้อมูลไมโครอาร์เรย์/ชีวสารสนเทศ/ การวิเคราะห์เครือข่ายการแสดงออกของยีน

ผู้คิดค้น นุชศิลา: การทำนายกลไกการอักเสบด้วยการวิเคราะห์เครือข่ายโดยเทคนิค

ทางชีวสารสนเทศ (PREDICTION OF INFLAMMATORY MECHANISM WITH NETWORK ANALYSIS BY BIOINFORMATICS TECHNIQUE) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: พัทธ์ศุภรอนันต์, Ph. D., กล่าวขวัญ ศรีสุข, Ph. D. 155 หน้า. ปี พ.ศ. 2563.

การอักเสบมีบทบาทสำคัญในการซ่อมแซมเนื้อเยื่อและเป็นส่วนสำคัญในการกระตุ้นการแสดงออกของยีน การศึกษาข้อมูลการแสดงออกของยีนหลายหมื่นยีนพร้อมกันภายใต้สภาวะที่สนใจสามารถใช้เทคโนโลยีไมโครอาร์เรย์ในการตรวจสอบ ปัจจุบันโปรแกรมและฐานข้อมูลทางชีวสารสนเทศถูกพัฒนาเป็นจำนวนมากเพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น ในการศึกษานี้จะทำการค้นหากระบวนการชีวสารสนเทศเพื่อการตรวจสอบกลไกการตอบสนองการอักเสบ โดยอาศัยการวิเคราะห์เครือข่ายการแสดงออกของยีนของข้อมูลไมโครอาร์เรย์จากเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ที่ได้จากฐานข้อมูลสาธารณะ ขั้นตอนของการวิเคราะห์ประกอบไปด้วยการคัดเลือกพีเจอร์ การค้นหารายชื่อยีนการอักเสบ วิเคราะห์ร่วมกับเครือข่ายการควบคุมการแสดงออกของยีน เครือข่ายการแสดงออกร่วมของยีน เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน และการแปลผลทางชีวภาพ พบว่าในช่วงเวลาที่ 3 และ 6 ชั่วโมงกลุ่มยีนการอักเสบที่พบในช่วงเวลานี้เป็นยีนที่มีการตอบสนองช่วงแรกของกลไกการอักเสบ ได้แก่ ยีนของโปรตีน CD14 และ TLR4 ซึ่งเป็นโปรตีนตัวรับสัญญาณที่อยู่บริเวณผิวเซลล์ และที่เวลา 8 และ 18 ชั่วโมงพบยีนการอักเสบที่มีการเชื่อมโยงหลายกระบวนการ เช่น NF-kB pathway, MAPK signaling pathway, JACK-STAT signaling pathway รวมถึงวิถีกลไกการเกิดโรคมะเร็ง และเป็นช่วงที่มีการรักษาบาดแผล โดยการกระตุ้นการสร้างและเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด ซึ่งนำไปสู่การประยุกต์กับการศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารออกฤทธิ์ ดังนั้นการวิเคราะห์เครือข่ายการแสดงออกของยีนจากข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่เหมาะสมจะช่วยให้เข้าใจกลไกการตอบสนองต่อการอักเสบมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

58910076: MAJOR: BIOLOGICAL SCIENCES; M.Sc. (BIOLOGICAL SCIENCES)

KEYWORDS: INFLAMMATION/ MICROARRAY DATA/ BIOINFORMATICS/ GENE
EXPRESSION NETWORK ANALYSIS

THITIRAT NUCHSILA: PREDICTION OF INFLAMMATORY MECHANISM
WITH NETWORK ANALYSIS BY BIOINFORMATICS TECHNIQUE. ADVISORY
COMMITTEE: PITAK SOOTANAN, Ph.D., KLAOKWAN SRISOOK, Ph.D. 155 P. 2020.

Inflammation is important in tissue repair and is an important part in stimulating gene expression. Study of gene expression data for tens of thousands of genes simultaneously under favorable conditions used microarray technology. A vast amount of tools and databases in currently, bioinformatics and programs have been developed for analyzing an increase number of microarray data. The objective of this study is to search for bioinformatics process for detection of inflammatory response mechanisms by gene expression network analysis of the LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells from public databases. This process consists of feature selection, searching for inflammation genes analyzed together with the gene regulatory network; gene co-expression network; protein-protein interaction network; and interpretation of biological. At 3 and 6 hours, the inflammatory genes found during this period were genes that responded to the initial stages of inflammatory mechanisms such as gene encoded for protein CD14 and TLR4, which are receptor proteins located on the cell surface. For 8 and 18 hours, an inflammatory genes with multiple processes were found such as the NF- κ B pathway, MAPK signaling pathway, JAK-STAT signaling pathway, including cancer pathway mechanisms, which are periods for wound healing by stimulating platelet formation and platelet clotting. This led to the application of the anti-inflammatory effect of the active ingredient. Therefore, the analysis of gene expression networks from appropriate microarray data can help to understand the mechanism of inflammatory response that is more effective.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ฉ
อภิธานศัพท์.....	๗
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ณ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
1. ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา.....	1
2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
3. สมมติฐานของวิจัย.....	3
4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย.....	3
5. ขอบเขตของการวิจัย.....	3
2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 ทฤษฎี.....	5
2.1.1 การอึกเสป.....	5
2.1.2 เทคโนโลยีไมโครอาร์เรย์.....	9
2.1.3 ฐานข้อมูลสาธารณะ.....	11
2.1.3.1 ฐานข้อมูลการตอบสนองการแสดงผลของยีน.....	11
2.1.3.2 ฐานข้อมูลสำหรับสืบค้นกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนอง การอึกเสป.....	14
2.1.4 การวิเคราะห์ข้อมูลไมโครอาร์เรย์.....	17
2.1.5 การคัดเลือกยีน.....	18

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
2.1.6 การสร้างและแสดงผลเครือข่ายปฏิสัมพันธ์.....	20
2.1.6.1 เครือข่ายการแสดงผลออกกร่วมของยีน.....	22
2.1.6.2 เครือข่ายการควบคุมการแสดงผลออกของยีน.....	23
2.1.6.3 เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่าง โปรตีน.....	26
2.1.7 การแปลผลทางชีวภาพ.....	27
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	29
3 วัสดุ อุปกรณ์ วิธีการทดลอง.....	33
3.1 วัสดุ และอุปกรณ์.....	33
3.2 ข้อมูลและฐานข้อมูล.....	33
3.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	34
3.2.1 การรวบรวมข้อมูล.....	35
3.2.2 การเตรียมข้อมูลการแสดงผลออกของยีนสำหรับการวิเคราะห์.....	37
3.2.3 การคัดเลือกยีน Feature selection.....	38
3.2.4 การสร้างเครือข่ายปฏิสัมพันธ์การแสดงผลออกของยีน.....	39
3.2.4.1 การสร้างเครือข่ายควบคุมการแสดงผลออกของยีน.....	39
3.2.4.2 การสร้างเครือข่ายการแสดงผลออกกร่วมของยีน.....	40
3.2.4.3 การสร้างเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่าง โปรตีน.....	41
3.2.5 การแปลผลทางชีวภาพและการประยุกต์ใช้กับสารออกฤทธิ์.....	43
4 ผลการทดลอง.....	44
4.1 การรวบรวมและการเตรียมข้อมูลการแสดงผลออกของยีน.....	44
4.2 การปรับรูปแบบมาตรฐานก่อนการนำมาวิเคราะห์ (Normalization).....	48
4.3 การคัดเลือกยีนและการตรวจสอบหน้าที่ของกลุ่มยีน.....	49
4.4 เครือข่ายปฏิสัมพันธ์การควบคุมการแสดงผลออกของ.....	56
4.5 เครือข่ายปฏิสัมพันธ์การแสดงผลออกกร่วมของยีน.....	64
4.6 เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่าง โปรตีน.....	71
4.7 การทดสอบฤทธิ์การต้านการแสดงผลออกของสารออกฤทธิ์	
ร่วมกับเครือข่ายต้นแบบ.....	79

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
5 อภิปราย สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ.....	86
5.1 อภิปรายผลการทดลอง.....	86
5.2 สรุปผลการทดลอง.....	97
5.3 ข้อเสนอแนะ.....	98
บรรณานุกรม.....	99
ภาคผนวก	112
ภาคผนวก ก.....	113
ภาคผนวก ข.....	117
ภาคผนวก ค.....	123
ภาคผนวก ง.....	131
ภาคผนวก จ.....	152
ประวัติย่อของผู้วิจัย.....	155

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4-1 ข้อมูลจำนวนโพรบและจำนวนยีนจากชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์.....	45
4-2 ฐานข้อมูลกลุ่มยีนการอักเสบ.....	45
4-3 รายละเอียดชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่ใช้ในการทดลอง.....	46
4-4 การแปลผลทางชีวภาพตามลักษณะของยีนออนโทโลยี Biological process.....	54
4-5 การแปลผลทางชีวภาพตามลักษณะของยีนออนโทโลยี Cell component.....	53
4-6 การแปลผลทางชีวภาพตามลักษณะของยีนออนโทโลยี Molecular function.....	54
ก-1 ผลการวิเคราะห์ค่าการแสดงออกของ <i>GAPDH</i>	114
ก-2 รายชื่อยีนที่ถูกคัดเลือกอย่างน้อยสองวิธีการจากทั้งหมดสามวิธี.....	115
ข-1 โมดูลย่อยและรายชื่อทรานส์คริปชันแฟกเตอร์กับยีนเป้าหมายของแต่ละสภาวะ.....	118
ข-2 โมดูลที่ถูกคัดเลือกของ GRN ในแต่ละช่วงเวลา.....	125
ค-1 โมดูลย่อยและรายชื่อยีนภายในโมดูลของเครือข่ายแสดงออกร่วมยีน.....	132
ค-2 โมดูลที่ถูกคัดเลือกของ GCN ในแต่ละช่วงเวลา.....	135
ง-1 โมดูลย่อยและรายชื่อยีนภายในโมดูลของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน.....	139
ง-2 โมดูลที่ถูกคัดเลือกของ PPIN ในแต่ละช่วงเวลา.....	146
จ-1 รายชื่อยีนการอักเสบจากวิถีกลไกหลัก.....	153

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2-1 กระบวนการตอบสนองต่อสิ่งแปลกของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน.....	6
2-2 ภาพรวมของวิธีการส่งสัญญาณของ TLR.....	8
2-3 วิธีการส่งสัญญาณการตอบสนองการอักเสบของเซลล์แมคโครฟาจ.....	9
2-4 ฐานข้อมูลสาธารณะ Gene Expression Omnibus; GEO.....	12
2-5 หน้าต่างการแสดงผลละเอียดของชุดข้อมูล.....	13
2-6 ตัวอย่างชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์จากฐานข้อมูลสาธารณะ GEO.....	13
2-7 ฐานข้อมูล GeneCards.....	14
2-8 ฐานข้อมูล OMIM.....	15
2-9 ตัวอย่างหน้าต่างจากการค้นหาข้อมูลยีนการอักเสบ.....	16
2-10 ฐานข้อมูล UniProt.....	17
2-11 กระบวนการวิเคราะห์ข้อมูลไมโครอาร์เรย์.....	18
2-12 หน้าต่างการคัดเลือก Feature selection.....	20
2-13 เครื่องมือที่ใช้ในการอธิบายตำแหน่งของอินเตอร์โมดูลาร์ฮับ และอินทราโมดูลาร์ฮับ.....	22
2-14 ปลั๊กอิน ExpressionCorrelation.....	23
2-15 โปรแกรม DREM.....	25
2-16 การวิเคราะห์ข้อมูลการแสดงออกของโปรแกรม DREM 2.0 จากเซลล์ปอด ของมนุษย์ A549	25
2-17 ฐานข้อมูล STRING.....	27
2-18 หน้าต่างของฐานข้อมูล DAVID.....	29
3-1 ภาพรวมงานวิจัย.....	35
3-2 วิธีการดาวน์โหลดชุดข้อมูลการแสดงออกของยีนการอักเสบ.....	36
3-3 ฐานข้อมูลที่ใช้ในการค้นหารายชื่อยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบ.....	36

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
3-4 การปรับมาตรฐานข้อมูล.....	37
3-5 วิธีการคัดเลือกยีนที่มีการแสดงออกที่เด่นชัด.....	38
3-6 การสร้างเครือข่ายการควบคุมการแสดงออกของยีน.....	40
3-7 การสร้างเครือข่ายการแสดงออกร่วมยีน.....	41
3-8 การสร้างเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน.....	42
3-9 ฐานข้อมูลที่จะช่วยในการแปลผลทางชีวภาพ.....	43
4-1 ผลการปรับรูปแบบมาตรฐานข้อมูลการแสดงออกของยีน.....	48
4-2 จำนวนยีนที่ผ่านการคัดเลือกด้วยวิธีการ SAM (Tusher, 2001), eBayes (Smyth, 2004), และ PLS-CV (Hall, 2000).....	50
4-3 เครือข่าย GRN ที่ถูกกระตุ้นการตอบสนองการแสดงออกด้วย LPS ในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน.....	58
4-4 โมดูลย่อยที่ถูกคัดเลือกโดย jActiveModules จากเครือข่าย GRN.....	59
4-5 โมดูลที่ 3-3 และ 6-3 เป็นตัวแทนของเครือข่าย GRN ในช่วงเวลาที่ 3 และ 6 ชั่วโมง โมดูลที่ 8-4 และ 18-2 เป็นตัวแทนของเครือข่าย GRN ในช่วงเวลาที่ 8 และ 18 ชั่วโมง	63
4-6 เครือข่าย GCN ที่ถูกกระตุ้นการตอบสนองการแสดงออกด้วย LPS ในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน.....	66
4-7 โมดูลย่อยที่ถูกคัดเลือกโดย jActiveModules จากเครือข่าย GCN.....	67
4-8 โมดูลที่ 3-1 และ 6-5 เป็นตัวแทนของเครือข่าย GCN ในช่วงเวลาที่ 3 และ 6 ชั่วโมง โมดูลที่ 8-3 และ 18-2 เป็นตัวแทนของเครือข่าย GCN ในช่วงเวลาที่ 8 และ 18 ชั่วโมง	70
4-9 เครือข่าย PPIN ที่ถูกกระตุ้นการตอบสนองการแสดงออกด้วย LPS ในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน.....	73
4-10 โมดูลย่อยที่ถูกคัดเลือกโดย jActiveModules จากเครือข่าย PPIN.....	74
4-11 โมดูลที่ 3-1 และ 6-5 เป็นตัวแทนของเครือข่าย PPIN ในช่วงเวลาที่ 3 และ 6 ชั่วโมง โมดูลที่ 8-2 และ 18-3 เป็นตัวแทนของเครือข่าย PPIN ในช่วงเวลาที่ 8 และ 18 ชั่วโมง	78

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4-12 ผลของการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ 4CS.....	82
4-13 ผลของการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ Albiflorin.....	83
4-14 ผลของการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ Paeoniflorin.....	84
4-15 ผลของการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ Paeonol.....	85
5-1 การแปลผลทางชีวภาพกับการวิเคราะห์เครื่อง่ายต้นแบบช่วงเวลา 3 ชั่วโมง.....	93
5-2 การแปลผลทางชีวภาพกับการวิเคราะห์เครื่อง่ายต้นแบบช่วงเวลา 6 ชั่วโมง.....	94
5-3 การแปลผลทางชีวภาพกับการวิเคราะห์เครื่อง่ายต้นแบบช่วงเวลา 8 ชั่วโมง.....	95
5-4 การแปลผลทางชีวภาพกับการวิเคราะห์เครื่อง่ายต้นแบบช่วงเวลา 18 ชั่วโมง.....	96
ค-1 เครื่อง่าย GCN ที่ถูกกระตุ้นการตอบสนองการแสดงออกด้วย LPS และการทดสอบด้วยสารออกฤทธิ์ EGCG.....	137

อภิธานศัพท์

คำศัพท์	ภาษาอังกฤษ	ความหมาย
กระบวนการนอร์มอลไลซ์เซชัน	Normalization	ข้อมูลการแสดงผลที่ได้จะเป็นข้อมูลดิบ (raw data) ที่เป็นข้อมูลการทดลองโดยตรง ซึ่งหน่วยของข้อมูลที่ใช้ในแต่ละชุดอาจแตกต่างกัน จะทำให้ข้อมูลในแต่ละตัวแปรมีค่าตัวเลขที่ห่างกันมาก มีการกระจายตัวของข้อมูลที่ไม่เป็นระเบียบ ทำให้ข้อมูลไม่มีความน่าเชื่อถือ ข้อมูลเหล่านี้จึงต้องมีการปรับรูปแบบมาตรฐานข้อมูล หรือกระบวนการนอร์มอลไลซ์เซชัน เพื่อลดปัญหาการผิดพลาดของข้อมูลและมีความเป็นระเบียบมากขึ้น
การคัดเลือกยีนที่มีการแสดงออกอย่างเด่นชัด	Feature selection	การคัดเลือกยีน โดยใช้วิธีการคัดเลือกทางสถิติที่แตกต่างกันที่พบอย่างน้อย 2 วิธีจากทั้งหมด 3 วิธี
เครือข่ายการควบคุมการแสดงออกยีน	Gene regulatory network	เป็นเครือข่ายที่ควบคุมระดับโมเลกุลที่มีปฏิสัมพันธ์กับสารอื่น ๆ ในเซลล์ เพื่อควบคุมระดับการแสดงออกของยีน mRNA และโปรตีน

อภิธานศัพท์ (ต่อ)

คำศัพท์	ภาษาอังกฤษ	ความหมาย
เครือข่ายการแสดงออกร่วมยีน	Gene co-expression network	เครือข่ายที่ถูกสร้างด้วยข้อมูลการแสดงออกของยีนที่มีรูปแบบการแสดงออกที่คล้ายกัน โดยการวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน (Pearson Correlation Coefficient) ระหว่างยีนแต่ละยีน
เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน	Protein-protein interaction network	เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนเป็นตัวแทนของการวิเคราะห์ทางคณิตศาสตร์ของการจับกันทางกายภาพระหว่างโปรตีนที่มีความจำเพาะ
ยีนออนโทโลยี	Gene ontology (GO)	ฐานข้อมูลที่บันทึกข้อมูลเกี่ยวกับหน้าที่ ตำแหน่ง องค์ประกอบที่เกี่ยวข้องในทางชีวภาพของโปรตีนหรือยีนที่ต้องการค้นหา ซึ่งจะประกอบไปด้วย Biological process, Cellular component และ Molecular function

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

AP-1	=	Activator protein-1
C/EBP- β	=	CAAAT/enhancer binding protein-beta
Cd14	=	Monocyte differentiation antigen CD14
Chuk	=	O15111 Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha
DAMPs	=	Danger associated molecular patterns
<i>Ifng</i>	=	Interferon gamma
<i>Ikkkb</i>	=	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta
<i>Il11</i>	=	Interleukin-11
<i>Il1a</i>	=	Interleukin-1 alpha
<i>Il1b</i>	=	Interleukin-1 beta
<i>Il6</i>	=	Interleukin-6
IRFs	=	Interferon regulatory factors
JAK-STAT	=	Janus kinases (JAKs), signal transducer and activator of transcription proteins (STATs)
LPS	=	lipopolysaccharides
<i>Mapk1</i>	=	Mitogen-activated protein kinase 1
<i>Mapk10</i>	=	Mitogen-activated protein kinase 10
<i>Mapk11</i>	=	Mitogen-activated protein kinase 11
<i>Mapk12</i>	=	Mitogen-activated protein kinase 12
<i>Mapk13</i>	=	Mitogen-activated protein kinase 13
<i>Mapk14</i>	=	Mitogen-activated protein kinase 14
<i>Mapk3</i>	=	Mitogen-activated protein kinase 3
<i>Mapk8</i>	=	Mitogen-activated protein kinase 8
<i>Mapk8ip3</i>	=	C-Jun-amino-terminal kinase-interacting protein 3
<i>Mapk9</i>	=	Mitogen-activated protein kinase 9
MAPKs	=	Mitogen-activated protein kinases
MEF2	=	Myocyte Enhancer Factor 2A
MyD88	=	Myeloid differentiation 88

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

<i>Myd88</i>	= Myeloid differentiation primary response protein MyD88
NF-κB	= nuclear factor κB
<i>Nfkb1</i>	= Nuclear factor NF-κB p105 subunit
<i>Nfkb3</i>	= Transcription factor p65
<i>Nfkbia, Nfkbia</i>	= NF-κB inhibitor alpha
<i>Nos2</i>	= Nitric oxide synthase, inducible
<i>Nos3</i>	= Nitric oxide synthase, endothelial
<i>P58</i>	= Serine/threonine-protein kinase PAK 2
PAMPs	= Pathogen-associated molecular patterns
PGE ₂	= Prostaglandin E ₂
<i>Pik3cg</i>	= PI3-kinase subunit gamma
<i>Pik3r6</i>	= Phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 6
<i>PRRs</i>	= Pattern recognition receptors
<i>Ptger1</i>	= Prostaglandin E ₂ receptor EP1 subtype
<i>Ptger2</i>	= Prostaglandin E ₂ receptor EP2 subtype
<i>Ptger3</i>	= Prostaglandin E ₂ receptor EP3 subtype
<i>Ptger4</i>	= Prostaglandin E ₂ receptor EP4 subtype
<i>Ptgs2</i>	= Prostaglandin G/H synthase 2
<i>Rela</i>	= Transcription factor p65
<i>Stat3</i>	= Signal transducer and activator of transcription 3
<i>Ticam1</i>	= TIR domain-containing adapter molecule 1
<i>Ticam2</i>	= TIR domain-containing adapter molecule 2
TIR	= Toll/interleukin (IL)-1 receptor
TLR4	= Toll-like receptor 4
TLRs	= Toll-like receptors
TNF	= Tumor necrosis factor
TRAM	= TRIF-related adaptor molecule
TRIF	= TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

TRIF = TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon- β

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

กลไกการอักเสบ (Inflammation) เป็นกระบวนการที่ร่างกายตอบสนองต่อสิ่งที่เข้ามากระตุ้นเมื่อเนื้อเยื่อของร่างกายได้รับบาดเจ็บ จากเชื้อโรค หรือสารเคมี การอักเสบมีส่วนช่วยกำจัดสิ่งแปลกปลอม และทำให้เกิดการซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่เสียหาย (พิริยทุท สิทธิไชยากุล, 2552) กระบวนการอักเสบเกิดขึ้นเมื่อเซลล์แมคโครฟาจ (Macrophages) นิวโทรฟิล (Neutrophils) และเซลล์เดนไดรติก (Dendritic cell) กินแบคทีเรียจะมีการปล่อยโปรตีนส่วนประกอบของผนังเซลล์บางส่วนออกมา เช่น ไลโปโพลีแซคคาไรด์ (Lipopolysaccharide, LPS) ซึ่งจะมีผลไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้เกิดการตอบสนองด้วยการหลั่งสารสื่อกลางทางเคมี (Chemical mediators) เช่น ไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide, NO), พรอสตาแกรนดินส์ (Prostaglandins E₂, PGE₂) และลิวโคไตรเอน (Leukotrienes) ออกมาเพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมออกไป (เพ็ญพรรณ เวชวิทยาขลัง, 2555) แต่ถ้าหากเกิดการตอบสนองต่ออักเสบที่มากเกินไปอาจจะทำลายเนื้อเยื่อจนเกิดการทำงานที่ผิดปกติและก่อให้เกิดโรคอาจนำไปสู่การเสียชีวิตได้ (พิริยทุท สิทธิไชยากุล, 2552) การลดระดับการตอบสนองการอักเสบที่มากเกินไปจึงมีความจำเป็น โดยการควบคุมการตอบสนองการอักเสบระดับโมเลกุลภายในเซลล์จะอาศัยการควบคุมในระดับการแสดงออกของยีนที่แปลรหัสเป็นโปรตีน ซึ่งเกี่ยวข้องกับกลไกการตอบสนองการอักเสบ การบรรเทาการอักเสบสามารถทำได้โดยใช้สารที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบที่จะเข้าไปยับยั้งกระบวนการผลิตและการส่งสัญญาณผ่านสารสื่อกลางการอักเสบชนิดต่าง ๆ เพื่อช่วยลดระดับการตอบสนองการอักเสบที่เกิดขึ้น (พิริยทุท สิทธิไชยากุล, 2552) โดยการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบสามารถใช้เทคโนโลยีไมโครอาร์เรย์ หรือเทคโนโลยีขั้นสูงในปัจจุบันเพื่อติดตามและตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีนทั้งหมดในจีโนมของเซลล์ต้นแบบ ซึ่งการตรวจวัดดังกล่าวจะทำให้ได้ข้อมูลการแสดงออกของยีนจำนวนมากในเวลาเดียวกัน (Kitano, 2002) การทดสอบการตอบสนองการอักเสบนิยมใช้เซลล์ไลน์ของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เป็นต้นแบบสำหรับการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารออกฤทธิ์จากธรรมชาติ (de Mejia & Dia, 2009; Uto, 2012)

ในปัจจุบันสามารถดาวน์โหลดข้อมูลการตรวจวัดการแสดงออกของยีนที่ได้จากการศึกษาการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ในเวลาช่วงที่

แตกต่างกัน (Comer, 2006; Shell, 2009; Hammer, 2010; Schott, 2014) ได้จากฐานข้อมูลสาธารณะ GEO (Gene Expression Omnibus, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/> Edgar, Domrachev & Lash, 2002) ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลสำหรับการตรวจสอบการตอบสนองทางชีววิทยาเชิงระบบได้ เครื่องข่ายทางชีวภาพนั้นถูกใช้เพื่ออธิบายถึงการมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างหน่วยที่สนใจในหลาย ๆ ด้าน ได้อย่างเป็นระบบ โดยเฉพาะตัวแทนเครือข่ายจะเป็นประโยชน์ต่อการวิเคราะห์และมองเห็นภาพ กิจกรรมทางชีววิทยาที่ซับซ้อน (Yu et al., 2013) จากข้อมูลและโปรแกรมทางชีวสารสนเทศที่มี มากขึ้นในปัจจุบันทำให้การหากระบวนการวิเคราะห์ข้อมูลและการเลือกใช้โปรแกรมจึงมี ความสำคัญต่อการแปลผลที่ดี การทำความเข้าใจกลไกที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบที่ เกิดขึ้นในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และผลจากการตอบสนองต่อ สารออกฤทธิ์ โดยอาศัยการติดตามและตรวจวัดการแสดงออกของยีนภายใต้สภาวะที่ศึกษาเพื่อ พิจารณาปฏิสัมพันธ์ระหว่างโมเลกุลภายในระบบ สามารถทำได้โดยการหาพื้นที่มีบทบาท ความสำคัญต่อการตอบสนองผ่านเครื่องมือการทำเหมืองข้อมูลออนไลน์ (Glaab, Garibaldi, & Krasnogor, 2009) และการวิเคราะห์เครือข่ายชนิดเดียวอาจไม่เพียงพอต่อการอธิบายกลไกในเชิง ชีวภาพที่ครอบคลุม ในงานวิจัยนี้จึงนำการวิเคราะห์เครือข่ายที่มากกว่า 1 ชนิดมาวิเคราะห์ร่วมกัน เช่น การสร้างเครือข่ายควบคุมการแสดงออกจากข้อมูลทรานสคริปชันแฟกเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการ ตอบสนองการอักเสบ (Nilsson, 2006; Ravasi, 2007; Weintz, 2010) การสร้างเครือข่ายการ แสดงออกร่วมกัน (Dam et al., 2017; Zhang & Horvath, 2005) การสร้างเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ ระหว่างโปรตีน (Xia, Bennern, & Hancock, 2014) การใช้ข้อมูลยีนที่มีการตอบสนองต่อการ อักเสบ (Rutledge, 2012; Mages, 2008) การตรวจสอบหน้าที่การทำงานของยีนภายใต้ฐานข้อมูล ยีนออนโทโลยี (Huang, Sherman, & Lempicki, 2009) ที่จะทำให้ได้วิธีการทางชีวสารสนเทศที่ เหมาะสมสำหรับการอธิบายกลไกของการตอบสนองการอักเสบและการศึกษาสารออกฤทธิ์กับการ ด้านการอักเสบ

งานวิจัยนี้ต้องการค้นหากระบวนการทางชีวสารสนเทศที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ ข้อมูลการแสดงออกของยีนเพื่อนำมาอธิบายกลไกการอักเสบ จึงได้ทำการตรวจสอบข้อมูลการ แสดงออกของยีนในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ตามช่วงเวลา (Shell, 2005; Comer, 2006; Hammer, 2010; Schott, 2014) ซึ่งได้จากฐานข้อมูลสาธารณะ GEO (Edgar et al., 2006) แล้วนำมาปรับมาตรฐานข้อมูลเพื่อลดความผิดปกติของข้อมูลก่อนนำมา คัดเลือกยีนที่มีบทบาทสำคัญโดยอาศัยโปรแกรมการทำเหมืองข้อมูล (Glaab et al., 2009) และการ วิเคราะห์เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีน (Schulz et al., 2012; Shannon et al., 2003;

Fronczuk et al., 2015) ที่ประกอบไปด้วยเครือข่ายการควบคุมการแสดงออกของยีน (Schulz et al., 2012) เครือข่ายการแสดงออกร่วมของยีน และเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน (Szkłarczyk et al., 2012) แล้วทำการคัดเลือกเครือข่ายย่อยเพื่อให้ง่ายต่อการแปลผลและการอธิบายกลไกที่เกิดขึ้นเป็นไปตามช่วงเวลาได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Ideker et al., 2002; Ashburner et al., 2000) เพื่อเป็นต้นแบบสำหรับการวิเคราะห์การดำเนินการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบด้วยสารออกฤทธิ์ (Huang et al., 2006; Hammer et al., 2010; Byun et al., 2010)

1.2 วัตถุประสงค์การทดลอง

เพื่อค้นหากระบวนการทางชีวสารสนเทศที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลการแสดงออกของยีนผ่านการสร้างเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีน เพื่อนำมาอธิบายกลไกการอักเสบได้อย่างมีประสิทธิภาพ

1.3 สมมติฐานการวิจัย

เนื่องจากในปัจจุบันมีเครื่องมือและฐานข้อมูลสาธารณะทางชีวสารสนเทศเป็นจำนวนมาก ซึ่งผู้วิจัยเชื่อว่าสามารถค้นหาเครื่องมือเพื่อสร้างกระบวนการทางชีวสารสนเทศที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลการแสดงออกของยีน โดยอาศัยการสืบค้นเครือข่ายการแสดงออกของการตอบสนองของยีนอักเสบที่ได้จากแหล่งที่มาของเครือข่ายที่มากกว่า 1 ชนิด และการวิเคราะห์ยีนที่ผ่านการคัดเลือกจากการแสดงออกที่เด่นชัด ซึ่งการค้นหาวិธีการวิเคราะห์ที่เหมาะสมจะทำให้สามารถวิเคราะห์และอธิบายการเกิดกลไกการตอบสนองการอักเสบได้อย่างมีประสิทธิภาพ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

ได้กระบวนการวิเคราะห์ข้อมูลทางชีวสารสนเทศที่เหมาะสมสำหรับการค้นหาเครือข่ายเพื่อที่จะนำไปอธิบายกลไกการตอบสนองการอักเสบได้อย่างมีประสิทธิภาพและสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับสารออกฤทธิ์ได้

1.5 ขอบเขตของโครงการวิจัย

สืบค้นและรวบรวมข้อมูลการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และการทดสอบฤทธิ์การดำเนินการอักเสบในช่วงเวลาต่าง ๆ จากฐานข้อมูลสาธารณะ แล้วนำมาปรับมาตรฐานเพื่อเตรียมข้อมูลสำหรับการ

วิเคราะห์ นำไปค้นหากลุ่มสินค้าที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบในแต่ละช่วงเวลา แล้วนำกลุ่มสินค้าที่ถูกคัดเลือกการแสดงผลออกที่เด่นชัดไปตรวจสอบหน้าที่กลไกการตอบสนองในระดับโมเลกุลผ่านเครือข่ายที่มีการบูรณาการข้อมูลของเครือข่ายการควบคุมการแสดงผลของยีน เครือข่ายการแสดงผลออกร่วมของยีน และเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนเพื่อคัดเลือกเครือข่ายต้นแบบที่มีการตอบสนองการแสดงผลออกยีนอักเสบในแต่ละช่วงเวลาอย่างมีประสิทธิภาพเพื่อเป็นแนวทางสำหรับการนำไปวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านการอักเสบของสารออกฤทธิ์

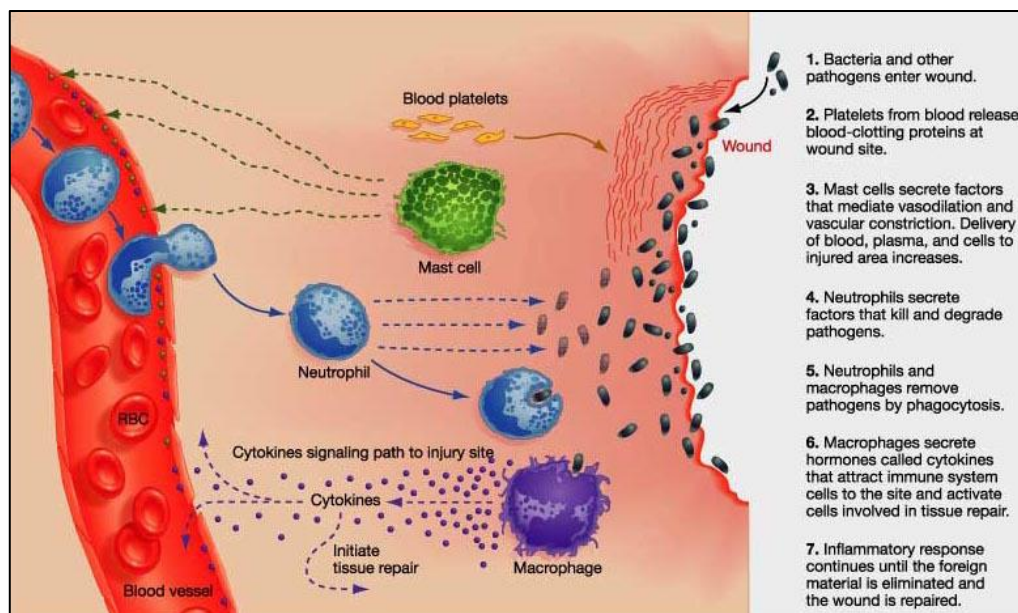
บทที่ 2

ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทฤษฎี

2.1.1 การอักเสบ

การอักเสบ (Inflammation) เป็นการตอบสนองของเนื้อเยื่อของร่างกายเมื่อได้รับบาดเจ็บ เช่น เชื้อโรค การขาดออกซิเจน ในกระบวนการตอบสนองการอักเสบ มีกระบวนการดังนี้ การเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือด การเข้ามาของเซลล์เม็ดเลือดขาว และผลกระทบที่เกิดจากร่างกายทั้งระบบ ผลของการอักเสบจะทำให้เกิดการกำจัดสิ่งแปลกปลอมเหล่านั้นออกไป หากไม่มีกระบวนการอักเสบเกิดขึ้นร่างกายจะไม่มีกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกาย ทำให้เนื้อเยื่อนั้นถูกทำลาย เนื้อเยื่อไม่ได้รับการซ่อมแซมจนเกิดอาการบาดเจ็บ นำไปสู่การทำงานของเนื้อเยื่อที่ผิดปกติ และอาจเป็นอันตรายถึงแก่ชีวิตได้ กระบวนการอักเสบสามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ การอักเสบเฉียบพลัน (Acute inflammation) และการอักเสบเรื้อรัง (Chronic inflammation) การอักเสบแบบเฉียบพลันจะเกิดขึ้นรวดเร็วภายในระยะเวลาเป็นวินาทีหรือเป็นนาทีหลังจากได้รับสิ่งกระตุ้นและคงอยู่ประมาณ 2 ถึง 3 วัน แต่มักไม่เกิน 1 สัปดาห์ ลักษณะสำคัญของการอักเสบเฉียบพลัน คือ การบวมของเนื้อเยื่อ (Edema) มีสารน้ำซึ่งมีโปรตีน (Exudate) ภายในเนื้อเยื่อ ส่วนการอักเสบแบบเรื้อรังนั้นจะเกิดนานกว่า อาจเกิดตามหลังการอักเสบแบบเฉียบพลัน หรือเกิดจากร่างกายตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมบางชนิดก็ได้ ขึ้นกับปัจจัยหลาย ๆ ด้าน ลักษณะสำคัญของการอักเสบเรื้อรัง คือ มีการสร้างเนื้อเยื่อพังผืดขึ้น (Fibrosis) มีการสร้างหลอดเลือดขึ้นจำนวนมาก และพบเซลล์อักเสบชนิดแมคโครฟาจ (Macrophages) และลิมโฟไซต์ (Lymphocytes) กระบวนการอักเสบเฉียบพลัน ประกอบด้วยลักษณะสำคัญ คือ การเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือด ทำให้เกิดการไหลเวียนของเลือดมายังบริเวณที่ได้รับบาดเจ็บมากขึ้น การเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของหลอดเลือดขนาดเล็ก ทำให้มีสารน้ำ โปรตีนและเซลล์เม็ดเลือดขาวรั่วออกมาภายนอกหลอดเลือด การเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวมายังบริเวณที่ได้รับบาดเจ็บ และได้รับการกระตุ้นเพื่อให้สามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมต่าง ๆ ได้ (พิริยทศ สิทธิไชยากุล, 2552)

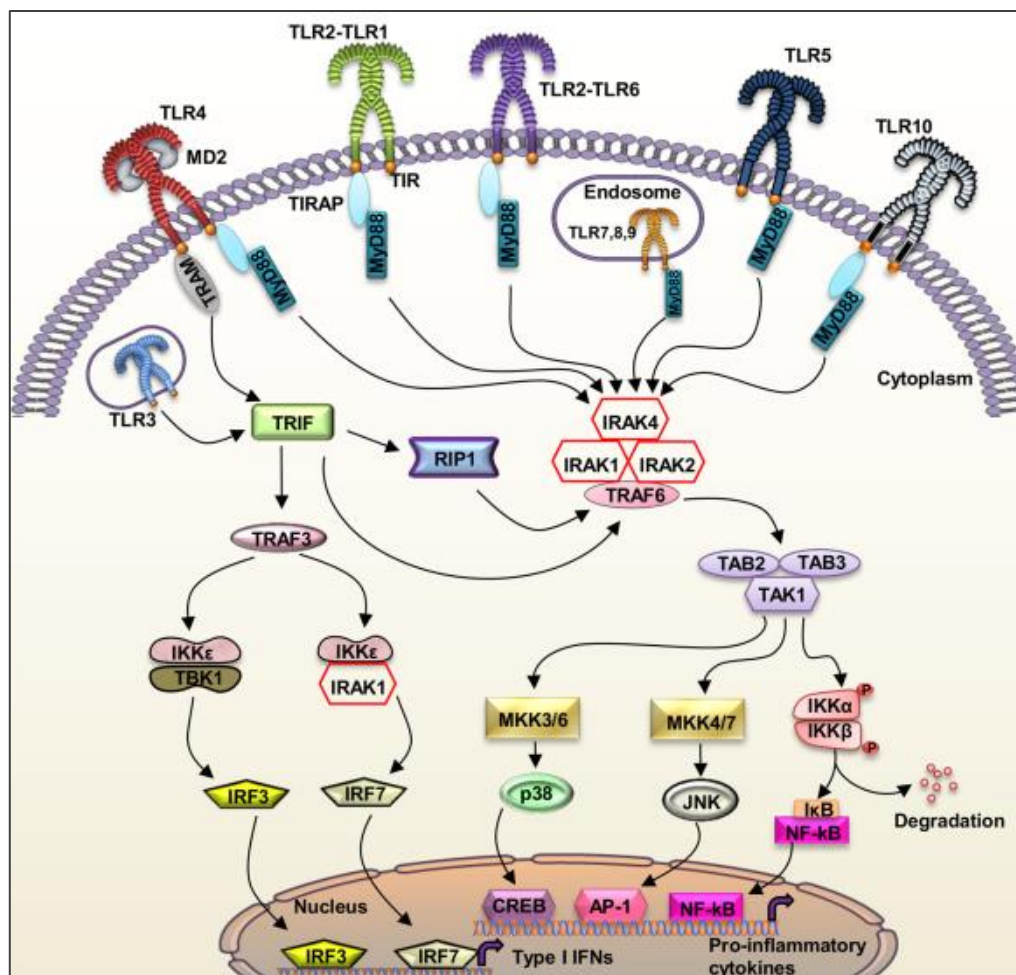


ภาพที่ 2-1 กระบวนการตอบสนองต่อสิ่งแปลกของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน

(ที่มา : <https://randolphworld.com/2015/06/>)

ในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาตั้งแต่กำเนิดถือเป็นสิ่งแรกของการป้องกันเจ้าบ้านจากเชื้อโรคที่บุกรุก การตอบสนองนี้ถูกกระตุ้นด้วยการกระตุ้นของรีเซปเตอร์ที่มีรูปแบบของการจดจำ (Pattern recognition receptors: PRRs) ซึ่งเป็นตัวแทนของการเชื่อมโยงที่สำคัญระหว่างการตรวจสอบเชื้อโรคและการเหนี่ยวนำสารสื่อกลางการอักเสบ (Pro-inflammatory) ที่มีวัตถุประสงค์เพื่อยับยั้งการติดเชื้อ ในบรรดากลุ่ม PRRs โทลล์ไลค์รีเซปเตอร์ (Toll-like receptors : TLRs) เป็นตัวแรกที่ได้รับการระบุและมีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย TLRs มีบทบาทสำคัญในการตอบสนองเบื้องต้นต่อผู้บุกรุกที่เกี่ยวข้องทั้งการตอบสนองภูมิคุ้มกันที่มีมาตั้งแต่กำเนิด (Innate immune) และระบบภูมิคุ้มกันที่ถูกสร้างขึ้นมาภายหลัง (Adaptive immune) ปัจจุบันในเซลล์ของมนุษย์นั้นการแสดงออกของ TLRs ทั้งหมด 10 ตัว (TLR1-10) ยกเว้นของหนูมีทั้งหมด 12 ตัว (TLR1-9 และ TLR 11-13) TLRs จัดเป็นสมาชิกของกลุ่ม Toll/interleukin (IL)-1 receptor (TIR) (Acheek, Yesudhas, & Choi, 2016) และขึ้นอยู่กับระหว่างคุณสมบัติโครงสร้างของโทลล์ ซึ่งจะประกอบไปด้วยมอทีฟที่มีลิวซีน (Leucine-rich repeat motifs) ซ้ำกันที่อยู่ด้านนอกเซลล์ช่วยในเรื่องการจับกันของลิแกนด์ซึ่งจะสามารถระบุเชื้อโรคและทางด้านของโดเมน (TIR domain) จะอยู่ในไซโตพลาสซึม ซึ่งมีการอนุรักษ์ค่อนข้างสูงมากในตำแหน่งของโดเมน TIR และจะทำหน้าที่ในการสรรหาโมเลกุลอะแดปเตอร์ (Adaptor) (อย่างเช่น Myeloid differentiation 88 : MyD88, MyD88-

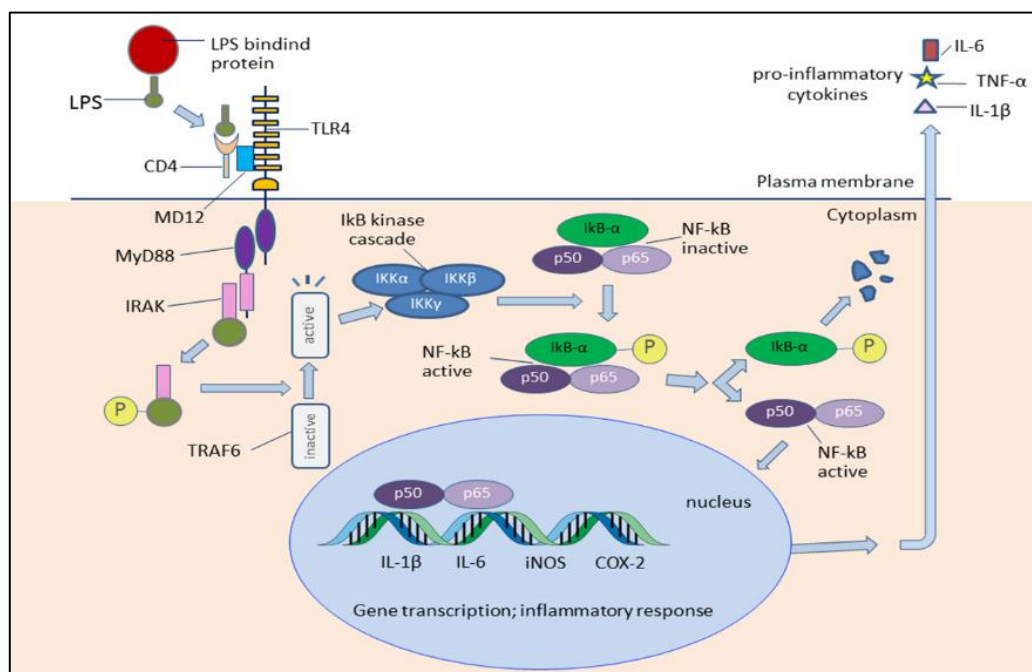
adaptor-like : MAL, TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon- β : TRIF และ TRIF-related adaptor molecule : TRAM) เป็นการกระตุ้นของการส่งสัญญาณตามลำดับชั้นลงไป ถึงแม้ว่าโครงสร้างและหน้าของ TLRs จะคล้ายคลึงกัน แต่ก็ยังมีความแตกต่างหลัก ๆ คือลิแกนด์ TLRs ก็ยังคงมีความจำเพาะ การใช้อะแดปเตอร์โปรตีน ตำแหน่งที่อยู่บนเซลล์ การจัดเรียง TLRs ต่างกันไปตามแกนก็ได้ถูกจดจำ ดังนั้น TLRs ที่เกี่ยวข้องในการจดจำของโมเลกุลผิวเซลล์ (Cell-surface molecules) ได้แก่ TLRs 1, 2, 4, 5, 6, และ 10 จะแสดงออกบนผิวเซลล์ ในขณะที่ TLRs 3, 7, 8 และ 9 จะจดจำกรดนิวคลีอิก (Nucleic acid recognition) ซึ่งจะอยู่ภายในเซลล์ที่เอนโดโซม TLRs ช่วยให้โฮสต์สามารถระบุได้ว่าเป็นชิ้นส่วนจากเชื้อโรคที่หลากหลาย ซึ่งมีการอนุรักษ์และถูกเรียกว่า Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) อย่างเช่น Bacterial lipopolysaccharides (LPS), Viral RNA, CpG-containing DNA และ Flagellin แต่ยังมีโมเลกุลที่ออกจากเซลล์เมื่อได้รับความเสียหายจะถูกเรียกว่า Danger associated molecular patterns (DAMPs) การตรวจสอบที่มีความจำเพาะของ PAMPs และ DAMPs โดยรีเซปเตอร์ของโฮสต์ทำให้เกิดการส่งสัญญาณมารวมกันที่ Nuclear factor- κ B (NF- κ B) และ Interferon regulatory factors (IRFs) ทำให้เกิดการเหนี่ยวนำการหลั่ง Pro-inflammatory cytokines, Type I interferon (IFN) และเคโมไคน์ (Chemokines) ซึ่งสิ่งเหล่านี้มีหน้าที่ในการกำจัดเชื้อโรคโดยตรง ในบางครั้งความหลากหลายของลิแกนด์ทำให้รับรู้ค่อนข้างเร็ว โดยตัวรับเหล่านี้และความซับซ้อนของการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่ถูกเรียกโดยการกระตุ้นตัวเองก็ก่อให้เกิดโรคเช่นกัน ตัวอย่างเช่น โรคแพ้ภูมิตัวเอง (Autoimmune) โรคการอักเสบ (Inflammatory diseases) การจับกันของ TLRs กับลิแกนด์มีผลในการกระตุ้นและเกิดการตอบสนองของ Antigen-presenting cells (APCs) เช่น เซลล์แมคโครฟาจ (Macrophages) หรือ เซลล์เดนไดรติก (Dendritic cell) เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันที่ได้รับมาเกิดการตอบสนองโดยผ่านการกระตุ้นการส่งสัญญาณสารสื่อกลางจาก T cell และ B cell การส่งสัญญาณของ TLRs แบ่งคร่าว ๆ จะแบ่งได้สองวิถี ในวิถีแรก MyD88 เป็นโปรตีนอะแดปเตอร์หลักทำให้เกิดการกระตุ้นด้วย NF- κ B และ Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) และอีกวิถีคือ MyD88 ที่เป็นอิสระ (MyD88-independent) จะไปกระตุ้น TRIF ส่งสัญญาณไปยังโมเลกุลอะแดปเตอร์และนำไปสู่การกระตุ้น IRFs and NF- κ B ให้สามารถทำงานได้ การตอบสนองต่อการอักเสบที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย TLR คือการตอบสนองในการป้องกัน ซึ่งจะช่วยให้แน่ใจได้ว่าไม่ใช่การขจัดสิ่งกระตุ้นที่เป็นอันตรายเท่านั้น แต่ยังช่วยในการซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่เสียหาย การตอบสนองนี้จะสิ้นสุดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเนื้อเยื่อถูกซ่อมแซมและกำจัดเชื้อโรคออกไปแล้วดังภาพที่ 2-2 (Achet et al., 2016)



ภาพที่ 2-2 ภาพรวมของวิธีการส่งสัญญาณของ TLR (Acheek et al., 2016)

การอักเสบมีบทบาทสำคัญในการซ่อมแซมเนื้อเยื่อ และเป็นส่วนสำคัญในการกระตุ้นการแสดงออกของยีน เช่น กลไกการส่งสัญญาณของ Toll-like receptor ในเซลล์แมคโครฟาจ ประกอบไปด้วยชุดควบคุมการแสดงออกที่หลากหลายของยีนในการทำงาน (Medzhitov & Horng, 2009) ซึ่งเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 เป็นเซลล์ต้นแบบที่นิยมใช้ในการศึกษาการตอบสนองการอักเสบที่มีต่อไลโปโพลีแซคคาไรด์ (Lipopolysaccharide, LPS) (Wu et al., 2015) ที่เป็นส่วนประกอบของเซลล์แบคทีเรียแกรมลบ โดยจะถูกจดจำด้วยโปรตีนกลุ่มทอลล์ (Toll-like receptor 4, TLR4) ทำให้เกิดการส่งผ่านสัญญาณและปลดปล่อยไซโตไคน์ (Cytokine) เคโมไคน์ (Chemokine) ส่งผลให้เซลล์อื่นที่เกี่ยวข้องมีการแสดงออกพร้อมเพื่อที่จะกำจัดสิ่งแปลกปลอมออกไป (Foster & Medzhitov, 2009) เซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 เป็นเซลล์ไลน์ที่นิยมใช้ในการศึกษาฤทธิ์การต้านการอักเสบจากสารสกัดจากธรรมชาติ (de Mejia & Dia, 2009) ดังนั้นการเรียนรู้กลไก

การตอบสนองการอักเสบในระดับโมเลกุลอย่างเป็นระบบจึงมีความสำคัญต่อการอธิบายกลไกในระดับโมเลกุลและกลไกที่เกี่ยวข้องเมื่อมีการใช้กับสารทดสอบเพื่อดูความต้านทานของสารทดสอบซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาตัวยาในอนาคตได้



ภาพที่ 2-3 วิธีการส่งสัญญาณการตอบสนองการอักเสบของเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS (Achek et al., 2016)

2.1.2 เทคโนโลยีไมโครอาร์เรย์

ในต้นปีทศวรรษ 1990 เทคโนโลยีไมโครอาร์เรย์ (Microarray technology) ได้ปฏิวัติการวิจัยทางพันธุกรรม ซึ่งถูกใช้ประโยชน์เพื่อสร้างโปรไฟล์การแสดงออกของยีนผ่านการคัดกรองการแสดงออกยีนเป็นพันยีนพร้อมกัน ซึ่งเทคนิคไมโครอาร์เรย์ถูกพัฒนามาจากเทคนิค Northern blotting และเทคนิค RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) ซึ่งเป็นเทคนิคดั้งเดิมสำหรับการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับ mRNA แต่อาเรย์นั้นจะให้ข้อมูลที่มีความครอบคลุมมากกว่าต่อการทดลองหนึ่งครั้ง เพื่อให้ประหยัดเวลาในการทดลองและทำให้สามารถมองภาพรวมของการทำงานร่วมกันของยีนได้ ปัจจุบันนั้นเทคโนโลยีไมโครอาร์เรย์นั้นถูกใช้ในการหา ยีน การวิเคราะห์ภาวะพหุสัณฐาน (Polymorphism) ของนิวคลีโอไทด์ขนาดใหญ่ การระบุยีนใหม่ การหาการแสดงออกของยีนที่สามารถนำไปใช้ในการสร้างเครือข่ายทางพันธุกรรม และยังคงถูก

นำมาประยุกต์ใช้สำหรับการวิเคราะห์โปรตีนและสารเมตาโบไลต์ (Metabolites) ซึ่งเป็นตัวควบคุมหลักของการแสดงออกของยีนเพื่อยืนยันผลลัพธ์ในระดับโมเลกุล เทคโนโลยีไมโครอาร์เรย์จะช่วยในการทำความเข้าใจรูปแบบของการแสดงออกของยีนและวิธีการส่งสัญญาณของโมเลกุล (Kitano, 2002) และการนำไปประยุกต์ใช้กับการบำบัดด้วยยีน ซึ่งมีบทบาทมากในงานวิจัยทางด้านการแพทย์ วิทยาศาสตร์ การเกษตรทั้งพืชและสัตว์ ที่สามารถใช้ในการอธิบายกลไกเชิงชีวภาพในสิ่งมีชีวิตได้ (จิรรัตน์ มงคลศิริวัฒนา, 2552)

หลักการสำคัญของเทคนิคดีเอ็นเอไมโครอาร์เรย์คือการจับกันอย่างจำเพาะเจาะจงของสายดีเอ็นเอสองสายคู่กัน (Hybridization) โดยการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างคู่เบสพื้นฐานของ Nucleotide (Complementary strands of DNA ; A-T, C-G) หลังจากนั้นจะทำการล้างออกจะยังคงเหลือดีเอ็นเอที่เป็น Complementary กัน จากนั้นนำลำดับเป้าหมายที่ทำการติดฉลากด้วยสารเรืองแสง ซึ่งจะไปจับกับโพรบให้เกิดการจับกันบนกระจกและทำการล้างออก บนแผ่นกระจกจะมีดีเอ็นเอหรือยีนที่ทราบอยู่แล้ว กล่าวคือดีเอ็นเอชนิดเดียวกันกับดีเอ็นเอที่อยู่บนแผ่นไมโครอาร์เรย์จะถูกจับติดอยู่บนแผ่นไมโครอาร์เรย์นั้น แต่ดีเอ็นเอที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างออกไปจะไม่สามารถยึดจับกับดีเอ็นเอบนแผ่นไมโครอาร์เรย์ได้ จากนั้นนำแผ่นไมโครอาร์เรย์เข้าเครื่องอ่าน เนื่องจากได้มีการติดฉลาก เครื่องจึงสามารถวัดสีเรืองแสงได้ ทำให้เกิดการแสดงสัญญาณขึ้น ซึ่งความเข้มของสัญญาณนั้นขึ้นอยู่กับ การจับกันของโพรบกับจุดบนแผ่นอาร์เรย์ ความเข้มของสีก็สามารถบอกปริมาณดีเอ็นเอที่ถูกจับไว้ได้ แผ่นกระจกนี้สามารถบรรจุยีนดีเอ็นเอได้เป็นจำนวนมากและอาจได้ถึง 30,000 ขึ้น เรียกแผ่นกระจกนี้ว่า “แผ่นไมโครอาร์เรย์ (Microarray slide)” (Barar, Saei, & Omid, 2011)

การระบุชนิดของไมโครอาร์เรย์นำไปสู่การผลิตอาร์เรย์นั้นมีหลายแบบขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย อย่างเช่น จำนวนของโพรบที่จะทำการทดลอง ราคา ความต้องการของลูกค้า ประเภทของคำถามทางวิทยาศาสตร์ อาร์เรย์จากผู้จำหน่ายในเชิงพาณิชย์อาจจะจัดจำหน่ายตั้งแต่น้อยสุด คือ 10 โพรบหรือมากกว่า 5 ล้านโพรบ ชนิดหลักของไมโครอาร์เรย์ก็จะมี Spotted กับ In-situ synthesised arrays คือไมโครอาร์เรย์สามารถประดิษฐ์ได้โดยใช้เทคโนโลยีที่หลากหลาย รวมถึงวิธีการพิมพ์ด้วยหมึกละเอียดบนแผ่นกระจก วิธี Photolithography เป็นการให้แสงช่วยทำให้ดีเอ็นเอติดบนแผ่นกระจกด้วยพันธะโควาเลนต์ (Covalent bond) วิธี Mechanical microspotting ซึ่งใช้แรง Capillary จากเข็มที่ใช้จุด (spot) ทำให้ดีเอ็นเอติดบนแผ่นกระจก หรือใช้ระบบพิมพ์แบบ Ink jetting ซึ่งใช้กระแสไฟฟ้าช่วยในการยึดติดระหว่างดีเอ็นเอและแผ่นกระจกเสียสภาพ (Denature) โดยการคลายเกลียวออกจากกันและติดบนแผ่นกระจกแน่นขึ้น อาร์เรย์ในการตรวจวัดค่าการแสดงออก

ก็จะมียู่ 2 แบบคือ Two-channel กับ One-channel detection จะเป็นการระบุด้วยสีที่เป็นแบบสองสี และสีเดียว ตามลำดับ (Barar, 2011)

ในการประยุกต์ใช้ดีเอ็นเอไมโครอาร์เรย์นั้นมีหลายอย่าง เช่น การวิเคราะห์ การแสดงออกของยีนในระดับ mRNA หรือการทดสอบการแสดงออกของยีนในหลายพันยีนพร้อมกัน เพื่อศึกษาผลการรักษาบางอย่างในเรื่องของโรค ตัวอย่างเช่น การศึกษาการแสดงออกของยีนเกี่ยวกับการติดเชื้อว่ามีการตอบสนองอย่างไร โดยการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนปกติกับยีนที่ติดเชื้อ และการยับยั้งการแสดงออกของยีนโดยใช้ยาในการทดสอบ การวิเคราะห์จีโนมในเซลล์ที่แตกต่างกันหรือความใกล้เคียงของสิ่งมีชีวิต (Bumgarner, 2013)

2.1.3 ฐานข้อมูลสาธารณะ

2.1.3.1 ฐานข้อมูลการตอบสนองการแสดงออกของยีน

การใช้ข้อมูลที่ได้จากไมโครอาร์เรย์ทำให้สามารถกำหนดหน้าที่ของยีนภายในเซลล์ และสามารถระบุเป้าหมายของการสร้างยาตัวใหม่ รวมถึงการสร้างเครือข่ายโมเลกุลและวิถีการส่งสัญญาณ (Barar, 2011) ซึ่งการเข้าถึงข้อมูลไมโครอาร์เรย์หรือการเข้าถึงระบบที่กำหนดทั้งในแง่ของการเข้าถึงทางกายภาพ และการใช้งานของระบบวิเคราะห์ข้อมูลไมโครอาร์เรย์เป็นสิ่งสำคัญสำหรับกระบวนการวิเคราะห์ข้อมูลไมโครอาร์เรย์ การเข้าถึงข้อมูลสะดวก เมื่อนักวิจัยจะเผยแพร่ผลงานเกี่ยวกับการทำงานของไมโครอาร์เรย์พวกเขาอาจต้องวิเคราะห์ข้อมูลเกี่ยวกับข้อมูลขั้นต่ำในเรื่องมาตรฐานทดสอบไมโครอาร์เรย์ (MIAME) (Brazma, 2001) และส่งข้อมูลไปเผยแพร่ในฐานข้อมูลสาธารณะ หลักเกณฑ์มาตรฐานของ MIAME จะระบุข้อมูลที่ควรจะมีอย่างน้อยที่สุดที่ควรจะมีรวมไว้ในการอธิบายการทดลองด้วยไมโครอาร์เรย์ เพื่อแสดงถึงความน่าเชื่อถือของข้อมูล ซึ่งข้อมูลที่จำเป็นต้องมีข้อมูลเช่นอาร์เรย์แพลตฟอร์ม การออกแบบการทดลอง และการเตรียมตัวอย่าง ข้อมูลเหล่านี้จะถูกรวบรวมไว้ในฐานข้อมูลสาธารณะ ในปัจจุบันการศึกษาการแสดงออกของยีนภายใต้สภาวะต่าง ๆ ของเทคโนโลยีไมโครอาร์เรย์นั้นมีอยู่จำนวนมากและถูกเก็บบันทึกในฐานข้อมูลสาธารณะที่สามารถเข้าถึงได้จากทั่วโลก อย่างเช่น ฐานข้อมูล GEO (Gene Expression Omnibus, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/> Edgar, Domrachev, & Lash, 2002) (ภาพที่ 2-4) เป็นฐานข้อมูลที่ถูกสนับสนุนข้อมูล โดย MIAME จากการส่งข้อมูลจากนักวิจัยที่ทำการทดลองและฐานข้อมูลนี้ได้รับการดูแลโดย NCBI (Edgar, 2002) เป็นฐานข้อมูลสาธารณะที่เก็บรวบรวมข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่มีอยู่หลายฐานข้อมูลที่ได้ทำการศึกษาแล้ว ซึ่งเป็นฐานข้อมูลที่สนับสนุนข้อมูลทางด้านอาร์เรย์ และข้อมูล Sequence-based เกี่ยวกับข้อมูลการแสดงออกของยีน ซึ่งเป็นหนึ่งในเครื่องมือที่ใหญ่ที่สุดที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย เครื่องมือนี้จะเป็นเครื่องมือที่มีไว้เพื่อช่วยดาวน์โหลด การทดลอง และอธิบายข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการทดลองได้ ปัจจุบันมีผู้เข้าร่วมการวิจัยมากกว่า 1,600 คน

งานวิจัยกว่า 60,000 ฉบับ คิดเป็นจำนวนมากกว่าครึ่งพันล้านของการแสดงออกของยีนสำหรับสิ่งมีชีวิตกว่า 100 ชนิด ซึ่งส่วนใหญ่มาจากการทดลองด้วยไมโครอาร์เรย์ข้อมูล ไมโครอาร์เรย์ที่มีมากมายนั้นทำให้นักวิจัยมีโอกาสใหม่ ๆ เพื่อให้ได้มาซึ่งข้อมูลในการวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพ (Olson, 2006) เมื่อทำการตรวจสอบชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่จะทำการวิเคราะห์นั้น จะเลือกเฉพาะกลุ่มที่มีการแบ่งการทดลองเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และกลุ่มที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เพื่อให้ง่ายต่อการนำผลมาเปรียบเทียบการทดลอง โดยมีเวลาในการทดสอบที่แตกต่างกัน ตัวอย่างชุดข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์เช่น ชุด GSE2002 (Shell et al., 2005), ชุด GSE4712 (Comer et al., 2006) และชุด GSE21841 (Hammer et al., 2010) และในบางชุดข้อมูลจะมีข้อมูลการตอบสนองการแสดงออกของยีนกับสารทดสอบ ในแต่ละชุดข้อมูลที่ทำการศึกษาแล้วจะประกอบไปด้วย ส่วนของรายละเอียดทั่วไปของงานวิจัย รายละเอียดเกี่ยวกับตัวอย่างการทดลอง กระบวนการทดลอง และค่าระดับการแสดงออกของโพรบ ดังภาพที่ 2-5 และภาพที่ 2-6 เป็นชุดข้อมูลตัวอย่างการแสดงออกของโพรบยีนที่ทำการศึกษา ซึ่งสามารถนำชุดข้อมูลเหล่านี้ไปเป็นตัวอย่างในการศึกษาการอธิบายกลไกการตอบสนองการอักเสบได้

ภาพที่ 2-4 ฐานข้อมูลสาธารณะ Gene Expression Omnibus; GEO สำหรับการสืบค้น
(ที่มา : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>; (Edgar, 2002)

Series GSE21841		Query DataSets for GSE21841
Status	Public on May 15, 2010	
Title	Expression data from LPS-stimulated RAW 264.7 mouse macrophages treated with Hypericum perforatum fraction and bioactive constituents	
Organism	Mus musculus	
Experiment type	Expression profiling by array	
Summary	<p>Hypericum perforatum extracts have been used as dietary supplements to treat conditions including mild-moderate depression and inflammation. A group of four bioactive constituents were identified from an active fraction of the extract.</p> <p>In order to identify the mechanism for the potential anti-inflammatory activity of the identified compounds, we used Affymatrix microarray to study the gene expression profile impacted by these compounds, as well as the active fraction in LPS-stimulated mouse macrophages.</p>	
Overall design	<p>We treated RAW264.7 mouse macrophages with DMSO control, active fraction from Hypericum perforatum extract, and a combination of the 4 putative bioactive compounds, called the 4-component system, all with and without LPS induction. A total of six treatment combinations were included in the final gene expression analysis using microarray.</p>	
Contributor(s)	Hammer KD , Yum MY , Dixon PM , Birt DF	
Citation(s)	<p>Hammer KD, Yum MY, Dixon PM, Birt DF. Identification of JAK-STAT pathways as important for the anti-inflammatory activity of a Hypericum perforatum fraction and bioactive constituents in RAW 264.7 mouse macrophages. <i>Phytochemistry</i> 2010 May;71(7):716-25. PMID: 20303133</p>	

ภาพที่ 2-5 หน้าต่างการแสดงผลรายละเอียดของชุดข้อมูล

(ที่มา : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>; (Edgar, 2002))

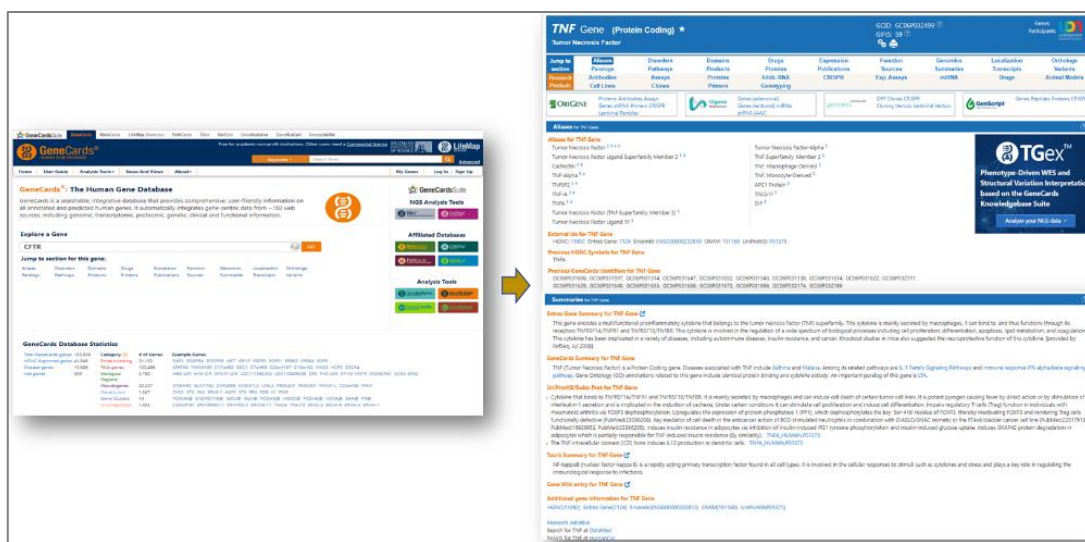
ID_REF	GSM10638	GSM10638	GSM10638	GSM10638	GSM10639	GSM10639	GSM10639	GSM10639
1415670_๕	2930.2	2274.7	2642.4	3744.7	2988.4	3312.4	2316.6	2116.5
1415671_๕	2903.1	2628	2935.4	4695.3	3973.6	4011.1	2453.4	2071
1415672_๕	4160.8	4518.1	5409.4	4515.9	5000.8	5594.2	4648.6	4244.5
1415673_๕	1050.5	822.5	1138.1	901.1	810	748.8	961.3	919.7
1415674_๕	1508	1188	2387.2	1801	1703.1	2761.6	1448.9	1406.7
1415675_๕	899	1022.1	1263.2	1079.3	1372.1	1701.5	942.1	1031.6
1415676_๕	7936	7082	10279.1	9617.4	8180.3	11878.8	7649.9	6572.9
1415677_๕	695.5	492.2	533.7	1016.8	312.3	549.8	450.5	684
1415678_๕	1254.6	2119.9	2393.4	1554.2	2548.8	2318.5	1502	2187.6
1415679_๕	4113.1	3809.4	5115.8	4568.9	4773.3	6280.3	3010.9	3883.1
1415680_๕	2057.5	1556.5	2122.1	1805	1986	2444.4	2351	2076.8
1415681_๕	1779.5	2118	2630.2	1958	2229.1	3235.1	2228.2	1940.3
1415682_๕	952.6	876.5	1155.7	860.2	855.1	998.5	921.7	910.3

ภาพที่ 2-6 ตัวอย่างชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์จากฐานข้อมูลสาธารณะ GEO

(ที่มา : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>; (Edgar, 2002))

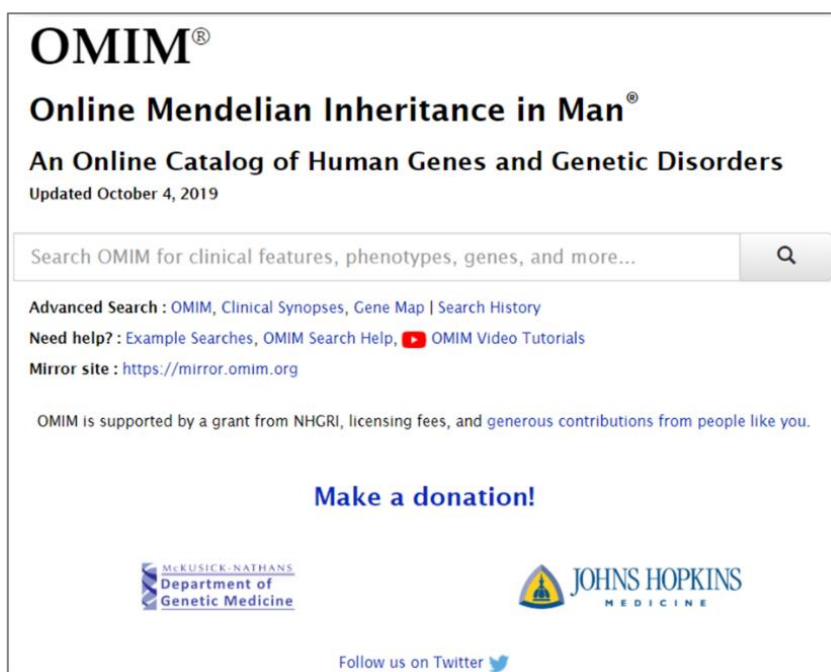
2.1.3.2 ฐานข้อมูลสำหรับการสืบค้นกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบ

ฐานข้อมูล GeneCards (<https://www.genecards.org/>; Stelzer et al., 2016) เป็นฐานข้อมูลเชิงบูรณาการที่สามารถค้นหาและใช้งานง่าย ซึ่งให้ข้อมูลที่ครอบคลุมสำหรับยีนมนุษย์ที่มีคำอธิบายประกอบและการทำนาย เป็นฐานข้อมูลยีนที่มีการรวมกันของข้อมูลมาจากฐานข้อมูลประมาณ 150 แหล่งข้อมูลไม่ว่าจะเป็นข้อมูลทางจีโนมิก (Genomic) ทรานสคริปโตมิกส์ (Transcriptomic) โปรตีโอมิกส์ (Proteomic) จีเนติก (Genetic) ข้อมูลเกี่ยวกับโรค ข้อมูลเกี่ยวกับหน้าที่การทำงานเกี่ยวกับยีนหรือโปรตีนเหล่านั้น ในการเข้าถึง GeneCards จะอธิบายข้อมูลเกี่ยวกับยีนแต่ละตัวแบ่งออกเป็น 17 ส่วนหลักได้แก่ 1. Aliases 2. Summaries 3. Genomics 4. Proteins 5. Domains 6. Function 7. Localization 8. Pathways (and interactions) 9. Drugs (and compounds) 10. Transcripts 11. Expression 12. Orthologs 13. Paralogs 14. Variants 15. Disorders 16. Publications 17. Products (ภาพที่ 2-7) ด้วยฐานข้อมูลนี้รวมมาจากแหล่งข้อมูลหลายแหล่ง ฐานข้อมูลนี้จึงเหมาะสมสำหรับการค้นหารายชื่อยีนหรือโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบเพื่อที่จะใช้วิเคราะห์เครือข่ายปฏิสัมพันธ์การตอบสนองการอักเสบ

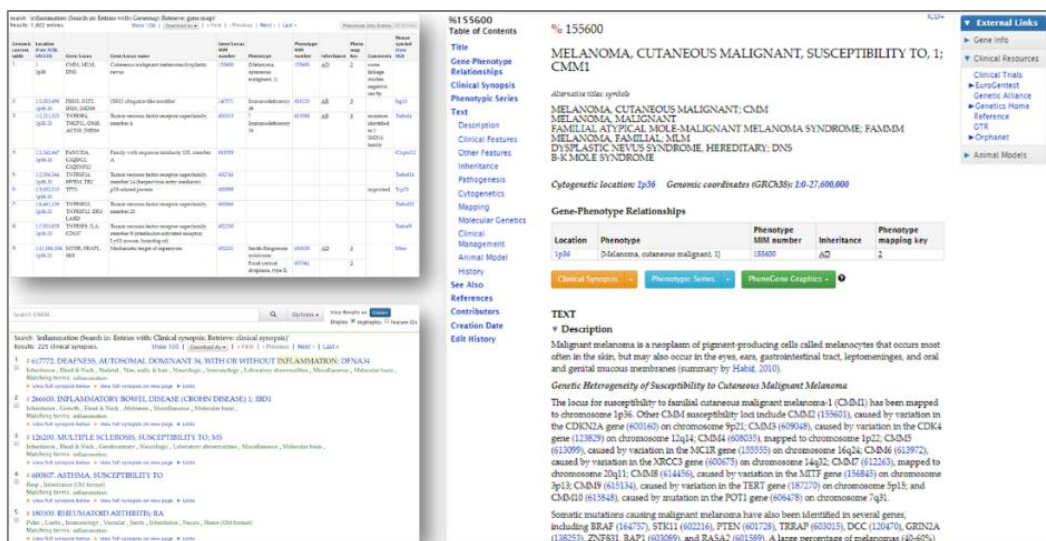


ภาพที่ 2-7 ฐานข้อมูล GeneCards (<https://www.genecards.org/>; Stelzer et al., 2016) และตัวอย่างเมื่อทำการค้นหาข้อมูลเกี่ยวกับกลุ่มยีนหรือโปรตีนที่เราสนใจจากฐานข้อมูล GeneCards ซึ่งหน้าต่างนี้จะแสดงข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับยีนหรือโปรตีนเหล่านั้น

ฐานข้อมูล OMIM (<https://www.omim.org/about>; Hamosh et al., 2002) เป็นฐานข้อมูลที่รวบรวมข้อมูลยีนและฟีโนไทป์ของพันธุกรรมของมนุษย์และหนู สามารถเข้าถึงข้อมูลได้ง่าย ในภาพรวมของฐานข้อมูล OMIM ประกอบด้วยข้อมูลเกี่ยวกับความผิดปกติของเมนเดลที่รู้จักทั้งหมดและยีนมากกว่า 15,000 ยีน OMIM มุ่งเน้นไปที่ความสัมพันธ์ระหว่างฟีโนไทป์และจีโนไทป์ ข้อมูลเหล่านี้จะถูกอัปเดตทุกวัน และฐานข้อมูลนี้จะมีการเชื่อมต่อไปยังฐานข้อมูลพันธุศาสตร์อื่น ๆ ด้วย OMIM นั้นได้รับการพัฒนาโดย NCBI ซึ่งเป็นศูนย์ข้อมูลเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ในฐานข้อมูล OMIM ที่เก็บข้อมูลที่มีการปรับปรุงอย่างต่อเนื่องเรื่องของการตัดข้อมูลเกี่ยวกับยีนและความผิดปกติของยีน OMIM ให้ความช่วยเหลือแก่แพทย์นักศึกษาและนักวิจัยในการไขความสัมพันธ์ที่ซับซ้อนระหว่างยีนและโรค ลำดับความสำคัญของ OMIM ยังคงให้ข้อมูลที่เหมาะสมเกี่ยวกับความผิดปกติของยีนเดี่ยวและโรคที่ซับซ้อนรวมถึงฐานโมเลกุลและเพื่อให้คำอธิบายหน้าที่ของยีน เมื่อทำการค้นหาด้วยคำจำกัดความจะพบว่าหลักการอธิบายเกี่ยวกับโรคที่เราค้นหาคือ ตารางแผนที่ยีน และสรุปผลเกี่ยวกับโรคทางคลินิก (ภาพที่ 2-8 และ 2-9)



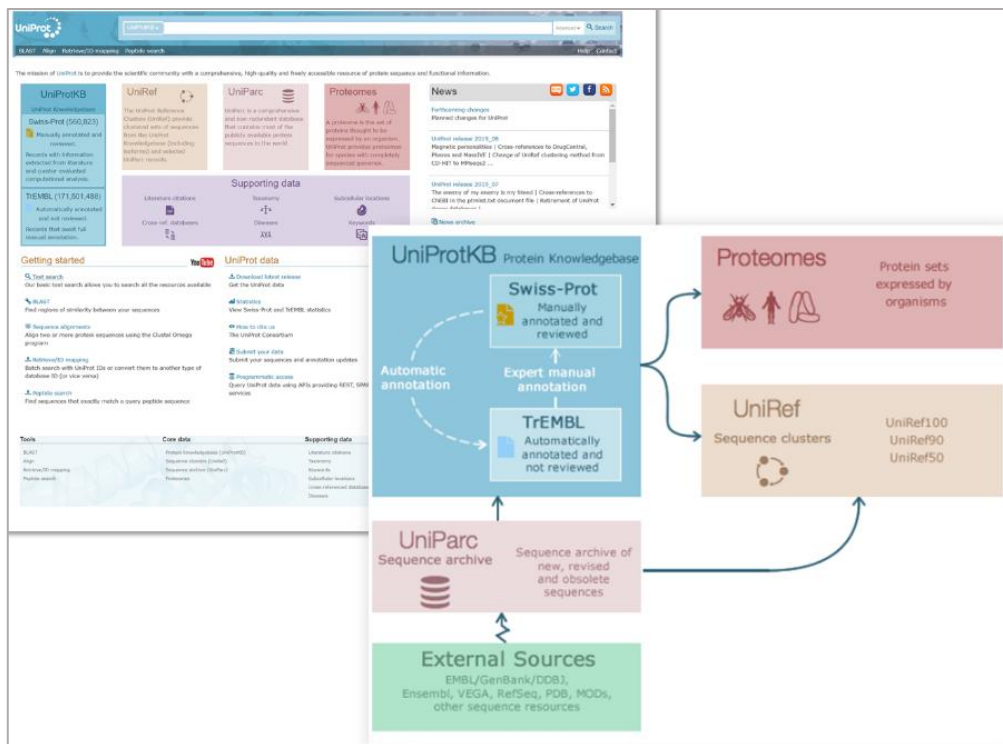
ภาพที่ 2-8 ฐานข้อมูล OMIM (<https://www.omim.org/about>; Hamosh et al., 2002)



ภาพที่ 2-9 ตัวอย่างหน้าต่างจากการค้นหาข้อมูลโดยการอัปเดต จะขึ้นรายชื่อการอัปเดตและมีการบอกรายละเอียดเกี่ยวกับยีนเหล่านั้น (Hamosh et al., 2002)

ฐานข้อมูล UniProt (The Universal Protein Resource; Apweiler et al., 2004)

(ภาพที่ 2-10) คือฐานข้อมูลที่มีความครอบคลุมลำดับโปรตีน (Protein sequence) ในเรื่องของหน้าที่ของโปรตีนได้โดยการศึกษาคุณสมบัติ เช่น กระบวนการทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับ Post-translational modifications ปฏิสัมพันธ์ระหว่างโมเลกุล ตำแหน่งของโปรตีนในเซลล์และสิ่งมีชีวิต และการทำนายข้อมูล ฐานข้อมูล UniProt ประกอบไปด้วย 1. UniProt Knowledgebase (UniProtKB) คือศูนย์กลางสำหรับการรวบรวมข้อมูลการทำงานของโปรตีนที่มีความถูกต้องมีความเสถียร ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นลำดับของกรดอะมิโน ชื่อโปรตีน หรือคำอธิบายข้อมูลทางอนุกรมวิธาน ข้อมูลการอ้างอิง รวมถึงตัวบ่งชี้ที่ชัดเจนของคุณภาพของคำอธิบายประกอบในรูปแบบของการแสดงหลักฐานของข้อมูลการทดลองและการคำนวณ UniProt Reference Clusters (UniRef) เป็นฐานข้อมูลที่ให้ชุดของลำดับโปรตีนที่ถูกจัดกลุ่มจาก UniProtKB และข้อมูลจาก UniParc ที่ถูกคัดเลือก และฐานข้อมูล UniProt Archive (UniParc) เป็นฐานข้อมูลลำดับโปรตีนที่ครอบคลุมและไม่ซ้ำซ้อนเข้าถึงง่าย

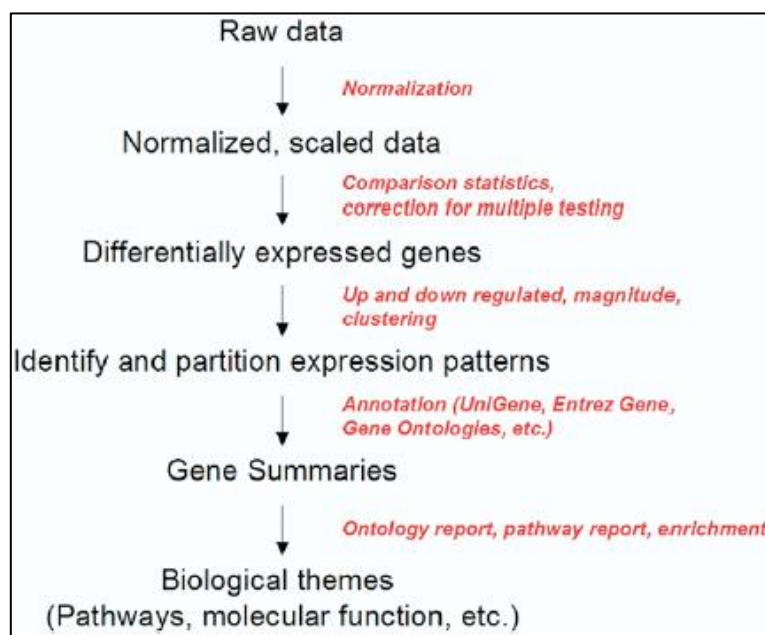


ภาพที่ 2-10 ฐานข้อมูล UniProt (The Universal Protein Resource; Apweiler et al., 2004)

2.1.4 การวิเคราะห์ข้อมูลไมโครอาร์เรย์

กระบวนการวิเคราะห์ข้อมูลไมโครอาร์เรย์จะอาศัยหลักการทางคณิตศาสตร์ สถิติ คอมพิวเตอร์ และชีววิทยามาใช้ในการวิเคราะห์ เพื่อหาความหมายของข้อมูลที่ได้จากการทดลอง นำไปสู่การหาข้อสรุปทางชีววิทยา ประเภทของการศึกษาไมโครอาร์เรย์สามารถแบ่งออกเป็นสามกลุ่มทั่วไปขึ้นอยู่กับเป้าหมาย คือการเปรียบเทียบ การค้นพบ และการทำนาย ซึ่งเป้าหมายของการเปรียบเทียบคือการระบุยีนที่มีการแสดงออกที่แตกต่างกันระหว่างสองกลุ่มขึ้นไป ซึ่งกลุ่มเหล่านี้สามารถแสดงสถานะทางชีวภาพที่แตกต่างกันได้ เช่นชนิดของโรค จุลกายวิภาคศาสตร์ สภาวะของกลุ่ม เป้าหมายของการค้นคว้าวิจัยคือการระบุกลุ่มที่มีตัวอย่างที่ตรวจสอบหรือภายในยีนที่ตรวจสอบ การศึกษาการทำนายเกี่ยวข้องกับการพยายามคาดการณ์การเป็นสมาชิกกลุ่มสำหรับกลุ่มตัวอย่างตามโปรไฟล์การแสดงออกของยีน ในการวิเคราะห์ข้อมูลนั้นข้อมูลที่ได้จะเป็นข้อมูลดิบ (Raw data) ที่เป็นข้อมูลการทดลองโดยตรง ซึ่งหน่วยของข้อมูลที่ใช้ในแต่ละชุดอาจแตกต่างกัน จะทำให้ข้อมูลในแต่ละตัวแปรมีค่าตัวเลขที่ห่างกันมาก มีการกระจายตัวของข้อมูลที่ไม่เป็นระเบียบ มีความกระจัดกระจาย ทำให้ข้อมูลไม่มีความน่าเชื่อถือ ข้อมูลเหล่านี้จึงต้องมีการปรับรูปแบบมาตรฐานข้อมูล หรือกระบวนการนอร์มอลไลซ์เซชัน (Normalization) เพื่อลดปัญหาการผิดพลาด

ของข้อมูล ข้อมูลที่ผ่านกระบวนการนอร์มอลไลซ์เซชันจะมีความเป็นระเบียบมากขึ้น หากไม่มีข้อมูลที่มีคุณภาพจะไม่สามารถระบุยีนที่แสดงความแตกต่างได้อย่างน่าเชื่อถือ และสามารถนำข้อมูลที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ต่อไป ยกตัวอย่างเช่น การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับโรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) ซึ่งมีการใช้ข้อมูลไมโครอาร์เรย์ (Raw data) ของโรคพาร์กินสัน ข้อมูลที่ได้นั้นมีจำนวนมากจากฐานข้อมูลสาธารณะ ในการวิเคราะห์ข้อมูลโดยทำการปรับค่าของข้อมูลจะใช้วิธีการทางคณิตศาสตร์และสถิติเข้ามาเกี่ยวข้อง จากนั้นแยกและคัดเลือกการแสดงออกของยีนที่มีการแสดงออกมากหรือน้อย และแยกรูปแบบการแสดงออกนำไปหาความหมายทางชีวภาพและแปลผล เพื่อเป็นประโยชน์ในการรักษาทางการแพทย์ต่อไป (Olson, 2006) ซึ่งตัวอย่างกระบวนการวิเคราะห์ข้อมูลไมโครอาร์เรย์จะแสดงให้เห็นดังภาพที่ 2-11



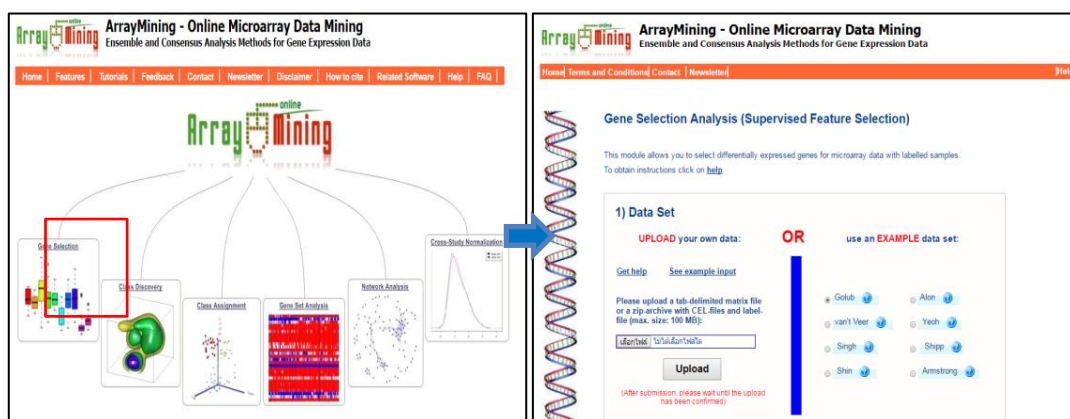
ภาพที่ 2-11 กระบวนการวิเคราะห์ข้อมูลไมโครอาร์เรย์ (ที่มา : Olson, 2006)

2.1.5 การคัดเลือกยีน

การคัดเลือกยีน (Feature selection) ที่รูปแบบการแสดงออกที่มีนัยสำคัญและเกี่ยวข้องกับการจัดจำแนกตัวอย่างภายใต้สภาวะที่ทำการศึกษาเป็นงานที่พบบ่อยในการศึกษาการแสดงออกของยีน เพราะเป็นจุดประสงค์หลักของการวิเคราะห์ไมโครอาร์เรย์ในการวิเคราะห์ความแตกต่าง การควบคุมการแสดงออกของยีนที่เพิ่มขึ้นหรือลดลง (Barar, 2011) ซึ่งนักวิจัยพยายามที่จะระบุชุด

ของยีนที่เล็กที่สุดเท่าที่เป็นไปได้และยังคงให้ผลการทำนายที่ดี ตัวอย่างเช่น สำหรับการใช้งานในอนาคตที่มีวัตถุประสงค์ในการวินิจฉัยโรคในทางคลินิก (Uriarte, 2006) โดยหลักการของการคัดเลือดยีนคือการกรองเพื่อระบุยีนที่แสดงออกแตกต่างกัน โดยใช้เกณฑ์รวมทั้งรวมถึงค่าระดับการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออก (Fold change) และความสำคัญทางสถิติที่กำหนดด้วยสถิติการเปรียบเทียบ (Olson, 2006) โปรแกรม ArrayMining (Glaab et al., 2009) จะมีแอปพลิเคชันที่ช่วยในการวิเคราะห์การคัดเลือดยีน (Gene selection) (ภาพที่ 2-12) มาใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลการแสดงออกของยีนที่ได้จากชุดข้อมูลในแต่ละช่วงเวลา ซึ่งวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์นั้นมีหลากหลายวิธี เช่น SAM, eBayes และ PLS-CV โดยในแต่ละวิธีนั้นจะมีการคำนวณค่าทางสถิติที่แตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น วิธี Significance Analysis for Microarray (SAM) เป็นวิธีที่ใช้การจำแนกกลุ่มของข้อมูล ซึ่ง SAM นั้นถูกพัฒนาจากพื้นฐานของ t -test โดยที่วิธี SAM นั้นจะทำการคัดเลือกข้อมูลจากการเปรียบเทียบค่าการแสดงออกทีละคู่ระหว่าง 2 กลุ่มข้อมูล คือ กลุ่มข้อมูลควบคุม และกลุ่มข้อมูลที่เป็นตัวอย่างการทดสอบ เพื่อที่จะคิดเป็นคะแนนความต่างของ 2 กลุ่มข้อมูล และเลือกโปรบ/ยีนที่แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่าง 2 กลุ่มข้อมูลนี้ออกมา โดยวิธีการ SAM นี้ถูกพัฒนาให้มีความเหมาะสมกับรูปแบบข้อมูลไมโครอาร์เรย์ซึ่งเป็นข้อมูลที่มีจำนวนตัวอย่างน้อย แต่มียีนหรือฟีเจอร์อยู่เป็นจำนวนมาก (Tusher, Tibshirani, & Chu, 2001) ในส่วนของวิธี Empirical Bayes moderated t -statistic (eBayes) ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้ t -test เป็นค่าสถิติในการทดสอบ โดยที่วิธีนี้จะเป็นการเรียงลำดับความสำคัญของยีนจากการเปรียบเทียบตัวอย่างเป็นคู่ที่มีความแตกต่างของกลุ่ม (Class) และทำการเปรียบเทียบระหว่างข้อมูลของตัวอย่างจากทั้ง 2 กลุ่มตัวอย่างที่ใส่เข้าไปเพื่อให้เป็นคะแนนจากการเปรียบเทียบ โดยวิธี eBayes จะอาศัยการคำนวณโดยใช้ความความน่าจะเป็นหรือโอกาสที่โปรบ/ยีนนั้นจะสามารถทำให้เกิดความแตกต่างของ 2 กลุ่มตัวอย่างได้ แล้วทำการให้คะแนนแก่โปรบ/ยีนแต่ละชนิดตามโอกาสของการจำแนกกลุ่ม ก่อนที่จะจัดเรียงลำดับของโปรบ/ยีนตามลำดับความสำคัญของการจำแนกกลุ่มจากมากไปหาน้อย (Smyth, 2004) และวิธี Partial Least Squares Cross-Validation (PLS-CV) เป็นวิธีการคัดเลือกโปรบ/ยีน โดยอาศัยการทำ Cross-validation จากข้อมูลตัวอย่างทั้งหมดที่แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม (class) โดยจะทำการสุ่มเลือกตัวอย่างจำนวน 2 ใน 3 จากตัวอย่างทั้งหมดที่มีใน 2 กลุ่ม ในสัดส่วนที่เท่ากัน ก่อนที่จะนำมาตรวจสอบความแตกต่างของระดับการแสดงออกโดยอาศัย t -test statistic ก่อนที่จะให้คะแนนแก่โปรบ/ยีนตามลำดับความสำคัญของการจำแนกกลุ่มตัวอย่าง แล้วทำการสุ่มตัวอย่างและทำซ้ำขั้นตอนเดิมเป็นจำนวนรวมทั้งสิ้น 20 ครั้ง แล้วทำการรวบรวมคะแนนของโปรบ/ยีนและเรียงลำดับความสำคัญตามความสามารถในการจำแนกกลุ่มตัวอย่างทั้ง 2 กลุ่มออกจากกัน ซึ่งความน่าเชื่อถือที่ได้จะขึ้นอยู่กับปริมาณของกลุ่มตัวอย่างถ้ายิ่งมากก็จะทำให้การคัดเลือกโดยวิธีนี้ก็ยิ่งมีความน่าเชื่อถือมาก (Hall,

2000) ตัวอย่างของการคัดเลือกยีนโดยใช้การคัดเลือกพีเจอร์ทั้งสามชนิด ได้แสดงให้เห็นในงานวิจัยของ วันเฉลิม จินอู๋ และพิทักษ์ สุตรอนันต์ ในปี 2557 ที่ได้มีการใช้เครื่องมือการทำเหมืองข้อมูลออนไลน์ ArrayMining (<http://www.arraymining.net>) (Glaab et al., 2009) มาคัดเลือกยีนที่มีการแสดงออกที่เด่นชัดในการตอบสนองต่อ LPS ของเซลล์แมคโครฟาจ พบว่าการนำข้อมูลไมโครอาร์เรย์และโปรแกรมออนไลน์บนเครือข่ายสาธารณะมาช่วยในงานวิจัยทางชีววิทยาเชิงระบบเพื่อทำความเข้าใจกลไกการตอบสนองการอักเสบและประยุกต์ใช้กับกลไกอื่นได้



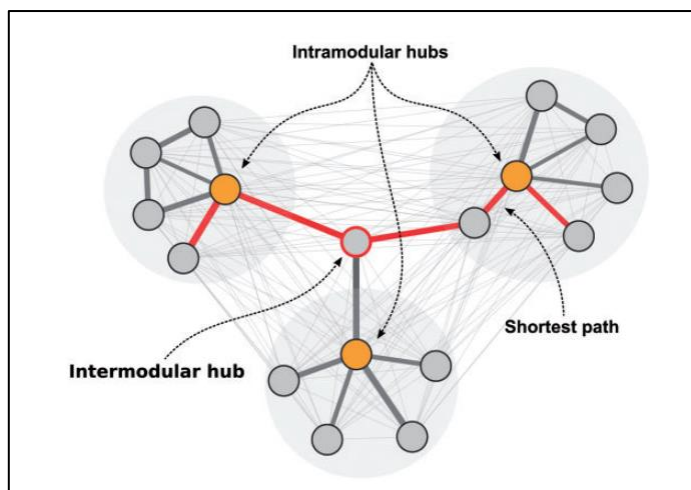
ภาพที่ 2-12 หน้าต่างการคัดเลือก Feature selection

(ที่มา : <http://www.arraymining.net/ASAP/index.php>)

2.1.6 การสร้างและแสดงผลเครือข่ายปฏิสัมพันธ์

เป้าหมายของชีววิทยาระบบเครือข่ายคือเหมือนความรู้จากการสร้างเครือข่ายที่ได้จากเทคโนโลยีขั้นสูง โดยการใช้ประโยชน์จากคุณสมบัติพิเศษของระบบทางชีววิทยา การทำความเข้าใจทางชีววิทยาโดยการแปลความหมายเหล่านี้ว่าเป็นระบบ ตัวอย่างเช่น การทำความเข้าใจกระบวนการควบคุมยีนที่เฉพาะเจาะจง การทำความเข้าใจในระดับกลไกการส่งสัญญาณของระบบภายในเซลล์ จากมุมมองการคำนวณการสร้างแบบจำลองกระบวนการควบคุมยีนและการรับส่งสัญญาณ โดยใช้โมเดลเชิงเมตริกที่เหมาะสมจะช่วยให้เพิ่มความรู้ดังกล่าว การสร้างเครือข่ายความสัมพันธ์การแสดงออกนั้นจะช่วยหาความสัมพันธ์การแสดงออกของยีนที่มีความหลากหลายและมีข้อมูลจำนวนมาก เครือข่ายการแสดงออกจะระบุว่ายีนใดมีแนวโน้มที่จะแสดงรูปแบบการแสดงออกในแนวเดียวกัน และยังมีอีกหลายวิธีนอกเหนือจากการวิเคราะห์เครือข่ายการแสดงออกแบบเดิมคือ การวิเคราะห์การแสดงออกแบบที่แตกต่างกัน (Differential co-expression analysis) เช่น การวิเคราะห์ข้อมูลเกี่ยวกับ การจับกันของโปรตีน (Protein-protein

interactions) ข้อมูลเมทิล (Methylome data) การจับกันระหว่างของทรานสคริปชันแฟกเตอร์ (Transcription factors: TF) และอินทิเนเตอร์ ซึ่งการรวมข้อมูลเหล่านี้จะช่วยในการตรวจสอบบทบาทการควบคุมของอินทิเนเตอร์ได้ ซึ่งในงานวิจัยนี้จะเน้นการวิเคราะห์การแสดงออกของอินทิเนเตอร์ การวิเคราะห์การควบคุมการแสดงออกของอินทิเนเตอร์จากข้อมูลทรานสคริปชันแฟกเตอร์และอินทิเนเตอร์ และการวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน เครือข่ายที่แสดงความสัมพันธ์ของอินทิเนเตอร์ที่มีการแสดงออกสัมพันธ์กัน โดยมีการกำหนดโหนด (Node) ซึ่งโหนดเป็นตัวแทนของการแสดงออกของอินทิเนเตอร์ โดยกำหนดขนาดของโหนดตามค่าการแสดงออก หากโหนดมีค่าการแสดงออกสูงขนาดของโหนดก็จะมีความใหญ่ สีของโหนดถูกกำหนดตามกลุ่มการแสดงออกที่มีความสัมพันธ์กัน เอจหรือปฏิสัมพันธ์ (Edge/Interaction) เป็นตัวแทนความสัมพันธ์ระหว่างอินทิเนเตอร์ โดยขนาดของเอจแสดงถึงค่าความสัมพันธ์ระหว่างอินทิเนเตอร์ หากมีค่าความสัมพันธ์ระหว่างอินทิเนเตอร์สูง เอจที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอินทิเนเตอร์ก็จะมีความหนาแน่นมากขึ้น และ โมดูล (Module) เป็นกลุ่มเครือข่ายย่อยที่ถูกจัดกลุ่ม (Clustering in co-expression analyses) ขึ้นมาในรูปแบบการแสดงออกที่คล้ายคลึงกันในหลายตัวอย่างเพื่อสร้างกลุ่มของอินทิเนเตอร์ที่แสดงออกพร้อมกันที่จะเป็นอินทิเนเตอร์เท่านั้น (van Dam et al., 2017) โมดูลการแสดงออกที่ถูกระบุโดยการจัดกลุ่มมักมีขนาดใหญ่ ดังนั้นการระบุว่ายีนใดในแต่ละโมดูลจะอธิบายถึงพฤติกรรมของโมดูลได้ดีที่สุด และการระบุอินทิเนเตอร์หนึ่งคือการกำหนดยีนฮับ (Hub genes) หรือการระบุอินทิเนเตอร์ที่เป็นจุดศูนย์กลาง เนื่องจากอินทิเนเตอร์ฮับนั้นจะมีการเชื่อมต่อกับอินทิเนเตอร์อื่นค่อนข้างมากในเครือข่ายการแสดงออกพร้อม ซึ่งฮับสามารถบอกหน้าที่ได้ดีกว่าโหนดอื่น อินทิเนเตอร์โมดูลาร์ฮับ (Intramodular hubs) คือศูนย์กลางในโมดูลที่มีความจำเพาะของเครือข่ายย่อย ในทางตรงกันข้ามอินทิเนเตอร์โมดูลาร์ (Intermodular hubs) จะเป็นศูนย์กลางของเครือข่ายทั้งหมด (van Dam et al., 2017) ดังภาพที่ 2-13

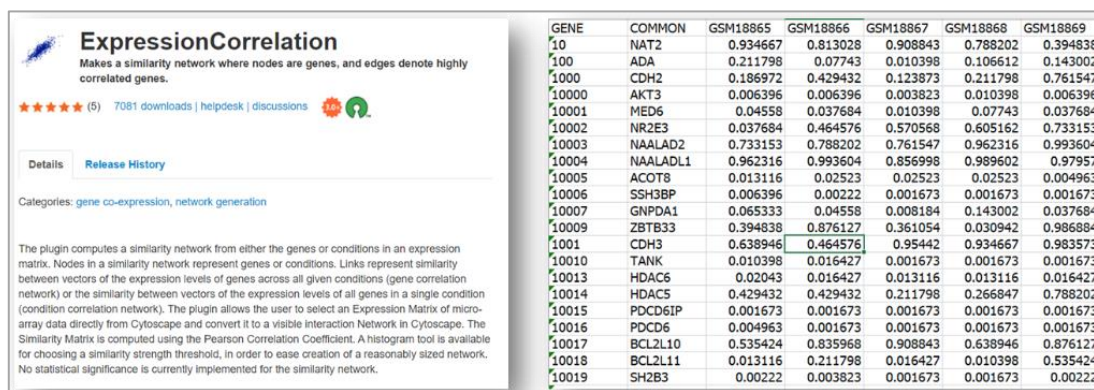


ภาพที่ 2-13 ภาพเครือข่ายที่ใช้ในการอธิบายตำแหน่งของอินเตอร์โมดูลาร์ฮับ และอินทราโมดูลาร์ฮับ (van Dam et al., 2017)

2.1.6.1 เครือข่ายการแสดงออกร่วมของยีน (Gene co-expression network: GCN) เป็นเครือข่ายการตอบสนองระหว่างยีนหรือโหนดที่มีการเชื่อมต่อกันด้วยเอดส์ที่มีการแสดงออกอย่างมีนัยสำคัญ การสร้างเครือข่ายการแสดงออกร่วมของยีนสามารถใช้เพื่อเชื่อมโยงยีนกับหน้าที่ที่ยังไม่ถูกระบุหรือทราบหน้าที่การทำงานในกระบวนการทางชีววิทยาได้ ซึ่งมันมีความซับซ้อน ด้วยการพัฒนาของเทคโนโลยีขั้นสูง (High-throughput technologies) รวมถึงเทคโนโลยีไมโครอาร์เรย์กับการวิเคราะห์ข้อมูลจะนำไปสู่การระบุสถานะหน้าที่ของยีน โดยมองภาพรวมอย่างเป็นระบบ ซึ่งจะช่วยสรุปหน้าที่โรคที่เกี่ยวข้องกับยีนจากการแสดงออกของยีนทั้งจีโนม เครือข่ายการแสดงออกร่วมของยีนสามารถใช้เพื่อวัตถุประสงค์ต่าง ๆ รวมทั้งการจัดลำดับความสำคัญของยีนกับโรค การทำนายหน้าที่ของยีน (van Dam et al., 2017) อย่างไรก็ตามเครือข่ายการแสดงออกร่วมของยีนจะสามารถระบุความสัมพันธ์ได้เท่านั้น เช่นยีนที่มีการใช้งานพร้อมกันมักบ่งบอกถึงการมีบทบาทในกระบวนการทางชีววิทยาเดียวกัน แต่ไม่สามารถบอกเกี่ยวกับสาเหตุหรือทิศทางระหว่างยีนที่ถูกควบคุมและการควบคุมได้

ในการวิเคราะห์เครือข่ายการแสดงออกร่วมนั้นจะใช้ปลั๊กอิน ExpressionCorrelation อยู่ในโปรแกรม Cytoscape (Shannon et al., 2003) ซึ่งสามารถดาวน์โหลดได้จากปลั๊กอิน ExpressionCorrelation (ภาพที่ 2-14) เป็นปลั๊กอินที่จะคำนวณความคล้ายคลึงกันของเครือข่ายจากยีนหรือสภาวะที่อยู่ในรูปแบบของเมทริกซ์การแสดงออก โดยที่ yin คือแถว สภาวะของการทดสอบคือคอลัมน์ ซึ่งโหนดที่อยู่ในเครือข่ายที่คล้ายคลึงกัน (Similarity network) จะหมายถึงยีนหรือสภาวะนั้น ๆ เจ็สจะเป็นตัวแทนของความคล้ายคลึงกันหรือสหสัมพันธ์ระหว่างเวกเตอร์ของระดับ

การแสดงผลออกในทุกสภาวะที่กำหนด (Gene correlation network) หรือความคล้ายคลึงกันระหว่างเวกเตอร์ของระดับการแสดงออกของยีนทั้งหมดในสภาวะเดียว (Condition correlation network) ปลั๊กอินนี้จะใช้การคำนวณความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร โดยการวิเคราะห์แบบสหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน (Pearson correlation coefficient) ซึ่งเป็นเทคนิคสถิติที่ใช้หาขนาดและทิศทางของความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างตัวแปรที่มีมาตรวัดแบบช่วง (Interval scale) หรืออัตราส่วน (Ratio scale) สองตัวหรือตัวแปรเชิงปริมาณ (Metrics variables) (Benesty et al., 2009) ปลั๊กอิน ExpressionCorrelation ถูกพัฒนามาโดย Potylitsine Weston และ Bader ในกลุ่มของ Sander จาก Computational Biology Center, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center ในเมืองนิวยอร์ก และมีการอัปเดตข้อมูลโดย Shirley Hui และ Laetitia Morrison ใน Bader lab



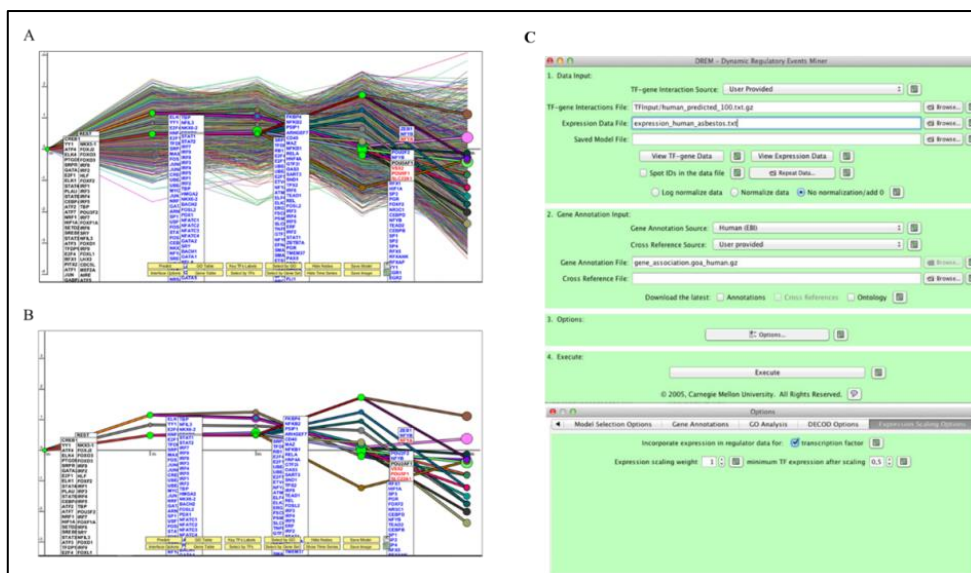
GENE	COMMON	GSM18865	GSM18866	GSM18867	GSM18868	GSM18869
10	NAT2	0.934667	0.813028	0.908843	0.788202	0.394838
100	ADA	0.211798	0.07743	0.010398	0.106612	0.143002
1000	CDH2	0.186972	0.429432	0.123873	0.211798	0.761547
10000	AKT3	0.006396	0.006396	0.003823	0.010398	0.006396
10001	MED6	0.04558	0.037684	0.010398	0.07743	0.037684
10002	NR2E3	0.037684	0.464576	0.570568	0.605162	0.733153
10003	NAALAD2	0.733153	0.788202	0.761547	0.962316	0.993604
10004	NAALAD1	0.962316	0.993604	0.856998	0.989602	0.97957
10005	ACOT8	0.013116	0.02523	0.02523	0.02523	0.004963
10006	SSH3BP	0.006396	0.00222	0.001673	0.001673	0.001673
10007	GNPDA1	0.065333	0.04558	0.008184	0.143002	0.037684
10009	ZBTB33	0.394838	0.876127	0.361054	0.030942	0.986884
1001	CDH3	0.638946	0.464576	0.95442	0.934667	0.983573
10010	TANK	0.010398	0.016427	0.001673	0.001673	0.001673
10013	HDAC6	0.02043	0.016427	0.013116	0.013116	0.016427
10014	HDAC5	0.429432	0.429432	0.211798	0.266847	0.788202
10015	PDCD6IP	0.001673	0.001673	0.001673	0.001673	0.001673
10016	PDCD6	0.004963	0.001673	0.001673	0.001673	0.001673
10017	BCL2L10	0.535424	0.835968	0.908843	0.638946	0.876127
10018	BCL2L11	0.013116	0.211798	0.016427	0.010398	0.535424
10019	SH2B3	0.00222	0.003823	0.001673	0.001673	0.00222

ภาพที่ 2-14 ปลั๊กอิน ExpressionCorrelation ซึ่งเป็นเครื่องมือของ Cytoscape (Shannon et al., 2003) ที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์การแสดงออกร่วมกันและการจัดรูปแบบชุดข้อมูลสำหรับการรันแอปพลิเคชัน ExpressionCorrelation

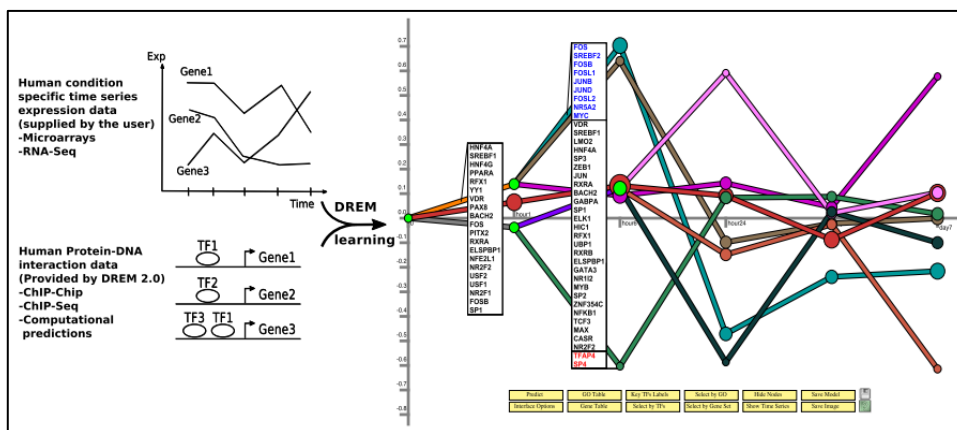
2.1.6.1 เครือข่ายการควบคุมการแสดงออกของยีน (Gene regulatory network: GRN) เป็นเครือข่ายที่ควบคุมระดับโมเลกุลที่มีปฏิสัมพันธ์กับสารอื่น ๆ ในเซลล์เพื่อควบคุมระดับการแสดงออกของยีน mRNA และโปรตีน ซึ่งมีบทบาทสำคัญใน Morphogenesis การสร้างโครงสร้างร่างกายซึ่งเป็นศูนย์กลางของการพัฒนาทางชีววิทยาวิวัฒนาการ ตัวควบคุมสามารถเป็นทั้งดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ โปรตีน หรือส่วนประกอบของสิ่งเหล่านี้ ปฏิสัมพันธ์ในเครือข่ายสามารถเป็นได้ทั้งทางตรงหรือทางอ้อม (ผ่าน Transcribed RNA หรือ Translated protein) โดยทั่วไปโมเลกุล mRNA แต่ละตัวจะสร้างโปรตีนเฉพาะหรือชุดของโปรตีน บางตัวโปรตีนจะทำหน้าที่เป็นโครงสร้างและจะสะสมที่เยื่อหุ้มเซลล์ ในขณะที่โปรตีนจะเป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาบางอย่าง โปรตีนบางตัวจะทำ

หน้าที่เพียงเพื่อกระตุ้นการทำงานของยีนอื่น ซึ่งโปรตีนนั้นคือทรานสคริปชันแฟกเตอร์ (Transcription factor) มีความสำคัญในการควบคุมการตอบสนองภายในเครือข่าย โดยการจับกับโปรโมเตอร์ที่บริเวณจุดเริ่มต้นเพื่อการสังเคราะห์โปรตีนอื่น ทรานสคริปชันบางตัวทำหน้าที่ในการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนหรือการตอบสนองภายในเครือข่าย โหนดภายในเครือข่ายการควบคุมการแสดงออกนั้นสามารถเป็นได้ทั้งยีน โปรตีน เอ็มอาร์เอ็นเอ โปรตีนคอมเพล็กซ์ (Protein/protein complexes) โหนดที่ถูกความเชื่อมโยงกันนั้นจะบ่งบอกถึงการอยู่ภายใต้สภาวะเดียวกัน เอดส์จะหมายถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่างโหนดที่แสดงถึงความสอดคล้องกับปฏิกิริยาระดับโมเลกุลไม่ว่าจะเป็นดีเอ็นเอ เอ็มอาร์เอ็นเอ เอ็มไออาร์เอ็นเอ (miRNA) หรือกระบวนการในระดับโมเลกุล ซึ่งบ่งบอกถึงผลิตภัณฑ์ของยีนหนึ่งส่งผลกระทบต่อยีนอื่น ในเครื่องหมายลูกศรนั้นบ่งบอกถึงการมีผลต่อการแสดงออกไม่ว่าจะเป็นการยับยั้งการแสดงออกหรือเพิ่มการแสดงออก ซึ่งหมายถึงการเป็นตัวควบคุมที่มีผลต่อการแสดงออกของยีนเป้าหมาย โหนดสามารถควบคุมตนเองได้โดยตรงหรือโดยอ้อมจากการสร้างลูปวนกลับก่อให้เกิดวงจรฟิงฟา หรือวนกลับในเครือข่ายโทโพโลยี (Topological network) (Hecker, Lambeck, & Toepfer, 2009; Cheng, Su, & Zhang, 2011)

ในงานวิจัยนี้จะใช้โปรแกรม Dynamic Regulatory Events Miner หรือ DREM (Schulz, 2012) ในการสร้างเครือข่ายการควบคุมการแสดงออกของยีน เป็นโปรแกรมที่จะช่วยสร้างแบบจำลองการวิเคราะห์ และการแสดงการเปลี่ยนแปลงการควบคุมยีนของทรานสคริปชันแฟกเตอร์ DREM จะใช้ข้อมูลการแสดงออกในรูปแบบอนุกรมเวลา (Time series) และสถิติหรือข้อมูลปฏิสัมพันธ์ของยีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ในรูปแบบไดนามิก (Dynamic) และสร้างแผนที่ควบคุมแบบไดนามิก (Dynamic regulatory map) แผนที่ควบคุมแบบไดนามิกจะเน้นข้อมูลแบบอนุกรมเวลาและการตอบสนองของทรานสคริปชันแฟกเตอร์ DREM จะทำการวิเคราะห์แบบจำลองความน่าจะเป็นของการกระจายข้อมูล โดยการคำนวณของ Gaussian distribution หรือ Normal distribution เป็นพารามิเตอร์ในการหาโครงสร้างของต้นไม้ในแผนภาพการควบคุมแบบไดนามิกจากการคัดเลือกชุดย่อย (Sub set) ของยีนที่ถูกสุ่มเลือก และยีนที่เหลือจะถูกใช้เพื่อหาคะแนนกับการวิเคราะห์ความหลากหลายของต้นไม้โดยใช้อัลกอริทึม Baum-Welch มาวิเคราะห์ดังภาพที่ 2-15 ตัวอย่างของเครือข่ายและหน้าต่างของการเซตค่าพารามิเตอร์ เพื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีนเป้าหมายและทรานสคริปชันแฟกเตอร์ ภาพที่ 2-16 จะเป็นตัวอย่างการวิเคราะห์ข้อมูลการแสดงออกของโปรแกรม DREM 2.0 จากเซลล์ปอดของมนุษย์ A549 ที่ผ่านการรักษาด้วยแร่ใยหิน โดยใช้การทำนายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับดีเอ็นเอ (Protein-DNA interactions) (Schulz et al., 2012)



ภาพที่ 2-15 โปรแกรม DREM ใช้ในการวิเคราะห์เครือข่ายการควบคุมการแสดงออกของยีน 2-15A และ 2-15B คือผลจากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนจากโปรแกรม DREM 2-15C คือหน้าต่างของโปรแกรม DREM สำหรับเซตค่าพารามิเตอร์เพื่อการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนกับทรานสคริปชันแฟกเตอร์



ภาพที่ 2-16 การวิเคราะห์ข้อมูลการแสดงออกของโปรแกรม DREM 2.0 จากเซลล์ปอดของมนุษย์ A549 ที่ผ่านการรักษาด้วยแร่ใยหิน โดยใช้การทำนายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับ ดีเอ็นเอ (Protein-DNA interactions) (Schulz et al., 2012)

2.1.6.1 เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่าง โปรตีน (Protein-protein interaction networks: PPIN)

ปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน (Protein-protein interactions :PPIs) มีความสำคัญในเกือบทุกกระบวนการภายในเซลล์ ดังนั้นการทำความเข้าใจปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนจึงเป็นสิ่งสำคัญสำหรับการทำความเข้าใจสรีรวิทยาของเซลล์ในสภาวะปกติและสภาวะของโรค เพื่อการพัฒนาในอนาคต เนื่องจากยาสามารถส่งผลกระทบต่อปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน (Protein-protein interaction networks: PPIN) เป็นตัวแทนของการวิเคราะห์ทางคณิตศาสตร์ของการจับกันทางกายภาพระหว่างโปรตีนภายในเซลล์ ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจง มีหน้าที่การทำงานที่เฉพาะ เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนมักจะถูกนำเสนอเครือข่ายหรือกราฟที่ไม่ได้ออกทิศทาง โหนดเป็นโปรตีนและเอดส์บ่งบอกถึงการมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนที่เชื่อมต่อสองชนิด (Xia et al., 2014) โดยปกติจะมีการวิเคราะห์ทั่วไปคือ 3 ขั้นตอน ซึ่งในขั้นตอนแรกจะเป็นขั้นตอนของการค้นหาหรือโปรตีนที่เราสนใจ ในงานวิจัยนี้คือต้องการค้นหาโปรตีนการอักเสบ ขั้นตอนที่สองคือทำการค้นหาข้อมูลโปรตีนเหล่านั้นในฐานะข้อมูล PPIN ซึ่งงานวิจัยนี้จะใช้ฐานข้อมูล STRING (<https://string-db.org/>; Szklarczyk et al., 2018) เป็นฐานข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน เครือข่ายจะสามารถประกอบขึ้นได้นั้นขึ้นอยู่กับปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนเหล่านั้น และขั้นตอนสุดท้ายคือการวิเคราะห์เครือข่าย

ในฐานะข้อมูล STRING (Szklarczyk et al., 2018) นั้นมีจุดประสงค์เพื่อรวบรวมและการประสานแหล่งข้อมูลปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนจากฐานข้อมูลสาธารณะที่มีอยู่ทั้งหมด เพื่อเสริมการทำนายด้วยการคำนวณ ในฐานะข้อมูล STRING ที่ทำการรวบรวมข้อมูลก็จะมีการจัดแบ่งเป็นหมวดหมู่ของข้อมูลประกอบด้วย 7 กลุ่ม กลุ่มของการทำนาย 3 กลุ่มจะขึ้นอยู่กับข้อมูลของจีโนมนั่นคือ กลุ่ม neighborhood กลุ่ม gene fusion และกลุ่ม gene co-occurrence กลุ่มที่ 4 คือ coexpression กลุ่มที่ 5 คือ text-mining กลุ่มที่ 6 คือ biochemical/genetic data ('experiments') กลุ่มที่ 7 คือ previously curated pathway and protein-complex knowledge ('databases') เมื่อทำการค้นหาโปรตีนหรือยีนที่สนใจจะปรากฏข้อมูลเหล่านี้ขึ้นมา ในภาพที่ 2-17 เป็นหน้าต่างของฐานข้อมูล STRING ตัวอย่างของการค้นหาโปรตีนที่ผู้ใช้สนใจรวมถึงการแสดงรายละเอียดของข้อมูลโปรตีนที่ทำการค้นหา

ภาพที่ 2-17 ฐานข้อมูล STRING เป็นฐานข้อมูลที่รวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับโปรตีน เมื่อทำการค้นหาโปรตีนที่เราสนใจ จะได้เครือข่ายความสัมพันธ์ทั่วไปของโปรตีนที่เราสนใจ แต่เครือข่ายจะได้รับการขยายเพิ่มอีก 10 โปรตีน และมีในส่วนของขยายความเพิ่มเติมเกี่ยวกับโปรตีนที่เราทำการค้นหาเช่นการทดลอง ฐานข้อมูล (Szklarczyk et al., 2018)

2.1.7 การแปลผลทางชีวภาพ

ขั้นตอนถัดมาหลังจากการวิเคราะห์ข้อมูลไมโครอาร์เรย์ด้วยการสร้างเครือข่ายการแสดงผลออกกร่วมของยีน เครือข่ายควบคุมการแสดงออกของยีน และเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนแล้วนั้นกระบวนการค้นหาหน้าที่การทำงานของยีนหรือโปรตีนจะเป็นขั้นตอนถัดไปที่จะกำหนดความสำคัญทางชีวภาพของกลุ่มเครือข่าย มีฐานข้อมูลสาธารณะที่หลากหลายซึ่งสามารถเข้าถึงได้ง่ายสำหรับยีนและผลิตภัณฑ์ของยีน โดยการรวมตัวของข้อมูลบทบาทของยีนทางชีวภาพในวงกว้าง ซึ่งจะอธิบายถึงลักษณะทางชีววิทยาที่เกี่ยวข้องกับการทดลอง โดยเฉพาะและเพื่อระบุยีนที่น่าสนใจ

DAVID (The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery: Huang, 2009) ประกอบไปด้วยฐานความรู้ทางชีวภาพแบบบูรณาการและเครื่องมือที่จะช่วยค้นหาความหมายทางชีวภาพจากรายชื่อยีนหรือโปรตีนที่มีจำนวนมาก เครื่องมือนี้จะช่วยในการแปลผลหรืออธิบายความหมายทางชีวภาพ เช่น การระบุความสำคัญทางชีวภาพ GO (Gene ontology) การค้นพบหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับกลุ่มยีน การจัดกลุ่มในการทำนายเพื่อลดความซ้ำซ้อนของข้อมูล

สามารถเห็นขึ้นบนแผนภาพวิถีกลไกบนฐานข้อมูล BioCarta (Nishimura, 2001) และ KEGG (Kanehisa & Sato, 2019) การเชื่อมโยงความสัมพันธ์ของยีนกับโรค การเชื่อมกันของข้อมูลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และอื่น ๆ อีกมากมาย (Ashburner et al., 2000) เครื่องมือที่จะช่วยในการวิเคราะห์ที่อยู่ในฐานข้อมูล DAVID นั้น ได้แก่ 1. Functional Annotation จะช่วยในการหาความหมายหรือการทำนายทางด้าน GO terms ปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน (Protein-protein interactions) โดเมนหน้าที่ของโปรตีน (Protein functional domains) ความสัมพันธ์ของโรค (Disease associations) วิถีกลไกทางชีวภาพ (bio-pathways) คุณสมบัติทั่วไปของลำดับ (Sequence general features) ความคล้ายคลึงกัน (Homologies) การสรุปหน้าที่การทำงาน การแสดงออกของยีน วรรณกรรมหรืองานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 2. Gene functional classification คือการจัดกลุ่มยีนบนพื้นฐานของการทำงานที่คล้ายคลึงกันซึ่งสามารถทำนายความหมายทางชีวภาพของยีนที่มีจำนวนมากได้ (High throughput) 3. Gene ID Conversion 4. Gene Name Batch Viewer ในฐานข้อมูล DAVID นั้นจะเชื่อมโยงไปยังฐานข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการอธิบายความหมายทางชีวภาพ เช่น ฐานข้อมูลของ Gene Ontology (<http://geneontology.org/>) ซึ่งฐานข้อมูลนี้มีคำศัพท์สำหรับคำอธิบายเกี่ยวกับหน้าที่โมเลกุลในกระบวนการทางชีวภาพและองค์ประกอบของเซลล์ ฐานข้อมูล KEGG Pathways (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>; Kanehisa & Sato, 2019) เป็นสารานุกรมของยีนและจีโนมของญี่ปุ่นที่มีข้อมูลเกี่ยวกับการควบคุม และวิถีกลไกเมตาบอลิซึม (Metabolic pathways) ของยีน OMIM (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?-db=OMIM>; McKusick et al., 2007) จะเป็นฐานข้อมูลเกี่ยวกับยีนของมนุษย์และความผิดปกติทางพันธุกรรม

ภาพที่ 2-18 หน้าต่างของฐานข้อมูล DAVID ใช้ในการแปลผลทางชีวภาพหรือการค้นหายีนโปรตีนที่เราสนใจ ซึ่งสามารถแปลผลยีนจำนวนมากได้พร้อมๆ กัน ซึ่งจะนำไปสู่การแปลผลแบบกลุ่มหรือการจัดกลุ่มยีนที่มีหน้าที่การทำงานคล้ายกันหรืออยู่ในกลุ่มเดียวกัน และยังสามารถเชื่อมโยงไปยังวิถีกลไกการส่งสัญญาณได้

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มีขี้นจำนวนมากมหาศาลที่ได้จากข้อมูล ไมโครอาร์เรย์ (Microarray data) มีบทบาทด้านการแปลความหมายทางชีวภาพ ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของยีนอย่างแพร่หลาย ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาด้านการรักษาเชิงการแพทย์และด้านอื่น ๆ ในปี 2006 Comer และคณะ ได้ทำการศึกษาการถอดรหัสและการตอบสนองของหน้าที่การทำงานของเซลล์แมคโครฟาจต่อ Edema toxin (EdTx) เป็นสารพิษที่เกิดจากแบคทีเรีย *Bacillus anthracis* ซึ่งใช้ GeneChip ในการวิเคราะห์เพื่อตรวจสอบรูปแบบการถอดรหัสของเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย EdTx ในเซลล์แมคโครฟาจของหนู และสามารถระบุยีนจำนวน 71 และ 259 ยีนที่มีค่านัยสำคัญในการแสดงออกที่เป็นพิษในเวลา 3 และ 6 ชั่วโมงตามลำดับ โดยยีนที่มีการควบคุมการแสดงออกในเซลล์ RAW 264.7 ที่ตอบสนองต่อ EdTx ซึ่งชี้ให้เห็นว่ามีส่วนในการตอบสนองต่อการอักเสบของเซลล์ การตายของเซลล์ เซลล์ที่ทำหน้าที่กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันและการควบคุมการถอดรหัส ในการวิเคราะห์ GeneChip ยังชี้ให้เห็นว่า EdTx มีการเหนี่ยวนำทำให้ Activator protein-1 (AP-1) และ CCAAT/enhancer binding protein-beta (C/EBP-β) เกิดการทำงาน ซึ่งในการวิเคราะห์ GeneChip

ได้ดำเนินการเพิ่มกิจกรรมของทรานสคริปชันแฟกเตอร์ที่ถูกพบเป็นเวลา 30 นาที และ EdTx ยับยั้งการผลิต TNF- α นอกจากนี้ยังลดความสามารถในการจับกินของเซลล์แมคโครฟาจ ในปี 2010 Hammer และคณะ ได้ทำการศึกษาการจำแนกวิถี JAK-STAT ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการอักเสบ โดยสารสกัดจาก *Hypericum perforatum* มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ และการออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ของหนู สารสกัดจาก *H. perforatum* ถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคสถานะการอักเสบ มีผู้ที่สนใจนำสารสกัด *H. perforatum* มาใช้ในการรักษาการอักเสบ ซึ่งในการทดลองใช้ 4 องค์ประกอบของสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความสัมพันธ์ร่วมกัน เพื่อที่จะอธิบายกิจกรรมของการต้านการอักเสบของส่วนสกัด *H. perforatum* ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ของหนู โดยใช้ LPS ในการกระตุ้นการตอบสนองการอักเสบ และ 4 องค์ประกอบของส่วนสกัด *H. perforatum* ถูกนำมาใช้ในการยับยั้งการตอบสนองต่อ LPS ที่เหนี่ยวนำให้เกิด Prostaglandin E₂ (PGE₂) ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ของหนู ในการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน

การค้นหาข้อมูลทรานสคริปชันแฟกเตอร์และยีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับยีนอักเสบสามารถค้นหาได้จากงานวิจัยที่เกี่ยวข้องเช่น การศึกษาการควบคุมการแสดงออกของยีนแบบเชิงระบบในเซลล์แมคโครฟาจ (Ravasi, 2007) การศึกษาเครือข่ายควบคุมการถอดรหัส (Regulatory network) เพื่อดูกลไกการควบคุมของยีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออก ซึ่งในงานวิจัยของ Nilsson et al. (2006) ศึกษาการวิเคราะห์เครือข่ายจีโนมของการควบคุมการถอดรหัสภายใต้การตอบสนองของเซลล์แมคโครฟาจในหนูที่มีต่อ LPS โดยการวิเคราะห์การแสดงออกที่เป็นแบบหลายเวลา (Time series) นำมารวมข้อมูลเพื่อดูโครงสร้างเครือข่ายที่มีความครอบคลุม โดยการประมวลผลผ่านคอมพิวเตอร์ เพื่อทำนายบริเวณการจับกันของทรานสคริปชันแฟกเตอร์ โดยการรวมข้อมูลการแสดงออกของข้อมูล Microarray และ qPCR-series ด้วยการวิเคราะห์โปรโมเตอร์ ซึ่งพบว่าเครือข่ายมีการเปลี่ยนวิถีการส่งสัญญาณในกระบวนการของเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ซึ่งกำหนดการควบคุมโมดูลของลักษณะการตอบสนองพบว่า มีทรานสคริปชันแฟกเตอร์ ATF-3 และ NRF-2 มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบ โดยในการค้นพบนี้สามารถเข้าใจความแตกต่างของเซลล์ในยูคาริโอตเพิ่มขึ้น ข้อมูลของยีนที่ตอบสนองต่อการอักเสบก็สามารถตรวจสอบได้จากงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง อย่างเช่น ข้อมูลของ Rutledge et al. (2012) กล่าวถึงผลการตอบสนองของเซลล์แมคโครฟาจที่มีผลต่อ LPS ภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน โดยใช้เทคโนโลยีไมโครอาร์เรย์ในการตรวจวัดการแสดงออก และใช้เทคนิค quantitative real-time RT-PCR เพื่อยืนยันผลของยีนบางกลุ่ม (Rutledge, 2012) Kadana et al. (2017) ได้ทำการศึกษา Melatonin ซึ่งถูกผลิตโดย Pineal gland มีหน้าที่ในการยับยั้งการตอบสนองการอักเสบที่มีมาตั้งแต่กำเนิด โดยการวิเคราะห์ข้อมูล

ไมโครอาร์เรย์ร่วมกับ Transcription factor binding site (TFBS) ในการจัดกลุ่มยีนและสร้างเครือข่าย ซึ่งใช้เซลล์ Macrophages ของหนูเมาส์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เพื่อตรวจสอบผลของการรักษาเมลาโทนิน ผลที่ได้คือไปลด Interferon regulatory factors (IRFs) Signal transducers and activators of transcription (STATs) และเชื้อไวรัส ในข้อมูลแบบแผนการแสดงออกตามเวลาจะถูกนำมาใช้ในการค้นหาทรานสคริปชันแฟกเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีน โดยอาศัยโปรแกรม Dynamic Regulatory Events Miner หรือ DREM (Schulz et al., 2012) การสร้างเครือข่ายการตอบสนองการอักเสบผ่านการควบคุมการแสดงออกโดยอาศัยข้อมูลทรานสคริปชันแฟกเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบและยีนเป้าหมายที่สามารถดาวน์โหลดได้จากฐานข้อมูลสาธารณะ Integrated Transcription Factor Platform, ITFP (Zheng, 2008) จะทำให้ได้เครือข่ายของทรานสคริปชันแฟกเตอร์กับยีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบ ในปี 2555 เหมือนฝัน โวหารกล้า กอบเกตุ วงษา และพิทักษ์ สุตรอนันต์ ได้ทำการสำรวจกลไกการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจชนิดเซลล์ไลน์ที่ช่วงเวลา 1, 2 และ 4 ชั่วโมง และเซลล์แมคโครฟาจที่ได้จากไขกระดูกที่เวลา 2 และ 6 ชั่วโมง โดยการใช้ข้อมูลไมโครอาร์เรย์และพาชเวย์มาช่วยจัดกลุ่มยีนที่ได้จากการเปรียบเทียบอัตราส่วนค่าระดับการแสดงออกของยีนที่แสดงในรูปแบบจำนวนเท่า (Fold change) คือ 1.6 เท่า พบว่ายีนส่วนใหญ่จากเซลล์ทั้งสองชนิดที่ถูกคัดเลือกจากพาชเวย์มีแนวโน้มที่มีการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้นตามช่วงเวลา ผลจากการคัดเลือกกลุ่มยีนโดยอิงจากพาชเวย์อาจจะทำให้สูญเสียยีนตัวสำคัญไปเนื่องจากกลุ่มยีนที่ได้นั้นมาจากพาชเวย์ของการอักเสบเท่านั้น ในปี 2557 พศิกา ไบยา วิไลพร ศรีตะบุตร และ พิทักษ์ สุตรอนันต์ ได้ทำการตรวจสอบกลุ่มยีนและทรานสคริปชันแฟกเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบเพื่อนำมาสร้างเครือข่ายควบคุมการแสดงออกร่วมกับการคัดเลือกยีนที่มีค่าโพลด์เซนจ์มากกว่า 1.4 เท่า โดยการวิเคราะห์ข้อมูลไมโครอาร์เรย์ของข้อมูลเซลล์แมคโครฟาจจากฐานข้อมูลสาธารณะ พบว่าทรานสคริปชันแฟกเตอร์ MEF2 เป็นศูนย์กลางการควบคุมการแสดงออกที่สำคัญของยีนตอบสนองการอักเสบ 4 ชนิด ในช่วงเวลา 3 และ 8 ชั่วโมง ยังแสดงให้เห็นว่าการนำข้อมูลไมโครอาร์เรย์มาวิเคราะห์นั้นสามารถเรียนรู้และทำความเข้าใจกลไกการอักเสบในระดับโมเลกุลได้

การสร้างเครือข่าย (Network visualization) ทางชีวภาพร่วมกับข้อมูลการแสดงออกเพื่อดูภาพรวมของการแสดงออกของยีนภายใต้สภาวะต่าง ๆ ซึ่งในการสร้างเครือข่ายการแสดงออกการอักเสบนั้นสามารถสร้างได้จากการจัดกลุ่มความสัมพันธ์กับความสอดคล้องของระดับการแสดงออกของยีน ซึ่งแสดงถึงการแสดงออกร่วมกันในเชิงเครือข่าย (Co-expression network) ในปัจจุบันนี้มีโปรแกรมสำเร็จรูปมากมายที่สามารถดาวน์โหลดมาใช้ในการสร้างเครือข่าย เช่น โปรแกรม Cytoscape โดย Shannon et al. (2003) ได้ทำการศึกษาการใช้งานโปรแกรม Cytoscape

ในการวิเคราะห์ผลการแสดงออกของ mRNA หน้าที่ของจีโนม และการทดลองโปรตีน และในโปรแกรมนี้ยังมีอีกหลายแอปพลิเคชันสำหรับการวิเคราะห์เครือข่าย อย่างเช่น ปลั๊กอิน jActiveModules (Ideker et al., 2002) ซึ่งเป็นตัวช่วยในการค้นหาเครือข่ายความสัมพันธ์ในระดับโมเลกุลเพื่อค้นหาเครือข่ายย่อยที่ถูกกระตุ้นการแสดงออก เครือข่ายย่อยดังกล่าวเป็นส่วนที่เชื่อมต่อกันของเครือข่ายที่แสดงการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญในการแสดงออกในส่วนย่อย ๆ และอีกหนึ่งโปรแกรมคือ โปรแกรม ArrayMining (Glaab et al., 2009) ผ่านการสร้างบนแอปพลิเคชัน Gene co-expression network analysis ซึ่งโปรแกรมนี้จะใช้การให้ค่าน้ำหนักการวิเคราะห์เครือข่ายการแสดงออกร่วมของยีน (Weighted Gene Co-Expression Network Analysis; WGCNA, Zhang, & Horvath, 2005) ในปี 2008 Chen et al. ได้สร้างและศึกษาเครือข่ายควบคุมการแสดงออกของยีน (Gene regulatory network) ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบ (Inflammatory response system) โดยผ่านการวิเคราะห์แบบไดนามิกและกระบวนการทางเหมือนข้อมูล ซึ่งทำให้ได้เครือข่ายที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบภายใต้สภาวะการทดสอบด้วย LPS และการศึกษาของ Maurya et al. (2006) ได้ทำการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนระหว่างเซลล์ RAW264.7 และ TGEM RAW ภายใต้สภาวะ KLA เพื่อตรวจสอบการตอบสนองของวิถีการส่งสัญญาณ TLR4 ในงานวิจัยของ Rutledge et al. (2012) ศึกษาการตอบสนองการแสดงออกของเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ภายใต้สภาวะที่แตกต่างกันด้วยเทคโนโลยีไมโครอาร์เรย์ เป็นวิธีตรวจวัดการแสดงออกของยีนและยีนอันผลด้วยเทคนิค quantitative real-time RT-PCR (Rutledge, 2012) ของยีนในบางกลุ่ม ซึ่งพบว่ายีนนั้นมีการแสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบระหว่างถูกกระตุ้นและไม่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ซึ่งส่วนหนึ่งอยู่ในวิถีการส่งสัญญาณ IL-6 signaling, Interferon signaling, NF- κ B signaling, p38MAPK signaling และ Apoptosis signaling ซึ่งตรงตามรายงานวิจัยที่มีอย่างต่อเนื่องที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองของเซลล์แมคโครฟาจต่อ LPS (Mages, 2008) ในปี 2557 กิตติพันธ์ ธาระเขตร์ และ พิทักษ์ สุตรอนันต์ ได้ทำการค้นหายีนจากข้อมูลไมโครอาร์เรย์ของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ที่ได้จากวิธีการคัดเลือกยีนที่มีการเปลี่ยนแปลงร่วมกับการวิเคราะห์เครือข่ายการแสดงร่วมของยีน พบว่าในการสร้างเครือข่ายถูกจำกัดการสร้างอยู่แค่ 2000 โหนดหรือยีนจากโปรแกรม ArrayMinig อาจทำให้เครือข่ายที่ได้มานั้นไม่ครอบคลุมต่อการอธิบายกลไกการตอบสนองการอักเสบได้

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุ และอุปกรณ์

3.1.1 เครื่องคอมพิวเตอร์ส่วนบุคคล (Personal Computer)

Processor: Intel(R) core(TM) i7-8550U CPU @ 1.80GHz 1.99GHz

Installed memory (RAM): 8.00 GB (7.9 GB usable)

System type: 64-bit Operating System, x64-based processor

3.2 ข้อมูล และฐานข้อมูล

3.1.1 โปรแกรมระบบปฏิบัติการ ไมโครซอฟวินโดวส์ (Windows 10)

3.1.2 โปรแกรมไมโครซอฟเอกซ์เซล (Microsoft Excel 2010)

3.1.3 โปรแกรม Cytoscape (Network Data Integration, Analysis, and Visualization in a Box; Shannon et al., 2003)

3.1.4 โปรแกรม DREM 2.0 (Schulz et al., 2012)

3.1.5 โปรแกรม ArrayMining (<http://arraymining.net/>; Glaab et al., 2009)

3.1.6 โปรแกรม GeneCard (<https://www.genecards.org/>; Stelzer et al., 2016)

3.1.7 โปรแกรม OMIM (<https://www.omim.org/>; McKusick et al., 2007)

3.1.8 โปรแกรม GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>; Edgar et al., 2002)

3.1.9 โปรแกรม UniProt (<http://www.uniprot.org/>; Apweiler et al., 2004)

3.1.10 โปรแกรม STRING (<https://string-db.org/>; Szklarczyk et al., 2018)

3.1.11 โปรแกรม DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>; Huang, Sherman & Lempicki, 2009)

3.1.12 โปรแกรม KEGG PATHWAY (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>; Kanehisa & Sato, 2019)

3.1.13 โปรแกรม ExpressionCorrelation (<http://apps.cytoscape.org/apps/expressioncorrelation>)

3.1.14 โปรแกรม jActiveModules (<http://apps.cytoscape.org/apps/jactivemodules>;
Ideker et al., 2002)

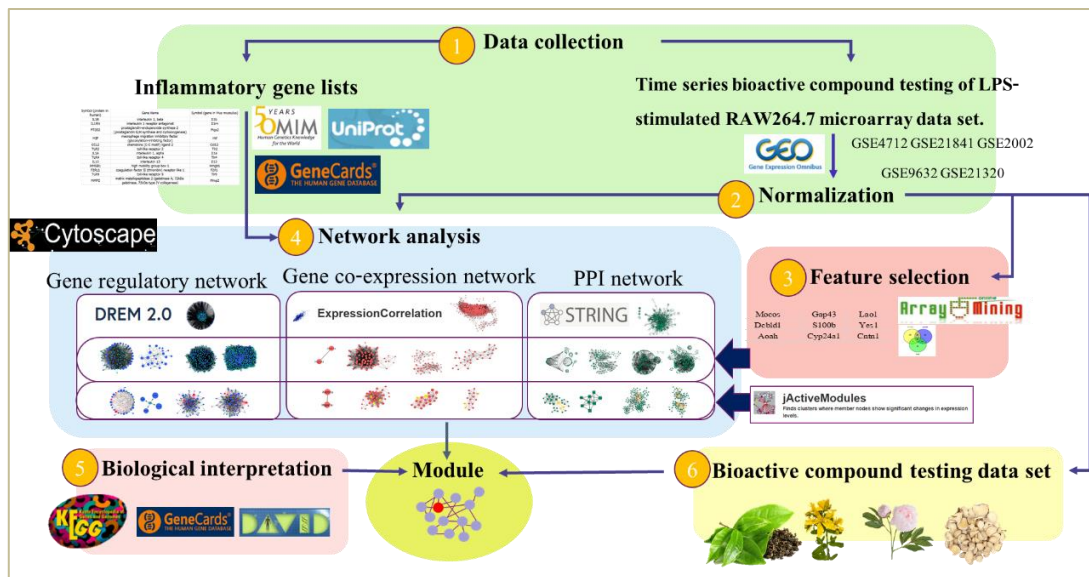
3.1.15 โปรแกรม Venn^{2,1} (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>; Oliveros, 2007)

3.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย

ในการศึกษานี้ต้องการค้นหากระบวนการวิเคราะห์ข้อมูลการแสดงออกของยีนที่มีการตอบสนองการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ที่เหมาะสม เพื่อนำไปอธิบายกลไกการตอบสนองการอักเสบในระดับโมเลกุลอย่างมีประสิทธิภาพ และกระบวนการวิเคราะห์ที่เหมาะสมจะทำให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ที่มีผลต่อการแสดงออกของยีนการอักเสบได้

ภาพรวมของงานวิจัยนี้ประกอบด้วยขั้นตอนการวิเคราะห์ทั้งหมด 2 ขั้นตอนดังนี้
ขั้นตอนที่ 1 คือการค้นหากระบวนการวิเคราะห์ข้อมูลทางชีวสารสนเทศที่เหมาะสม

1. การรวบรวมชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่มีการตอบสนองการแสดงออกของยีนการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และสารออกฤทธิ์ที่มีผลต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีนการอักเสบ การค้นหาชุดรายชื่อยีนและทรานสคริปชันแฟกเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ
 2. การนำชุดข้อมูลการแสดงออกยีนที่ได้มาทำการปรับรูปแบบมาตรฐาน
 3. การคัดเลือกยีนที่มีการแสดงออกอย่างเด่นชัดในแต่ละช่วงเวลา โดยวิธีที่ใช้ในการคัดเลือกมีทั้งหมด 3 วิธี คือ วิธี PLS-CV (Hall, 2000) วิธี eBayes (Smyth, 2004) และวิธี SAM (Tusher et al., 2001) ทำการค้นหายีนที่พบอย่างน้อย 2 ใน 3 วิธีมาทำการวิเคราะห์ต่อ
 4. การวิเคราะห์และการสร้างเครือข่ายจากชุดข้อมูลการแสดงออกการตอบสนองของยีนการอักเสบ โดยการสร้างเครือข่ายจะมีทั้งหมด 3 ชนิดที่จะนำมาสร้างและวิเคราะห์ร่วมกัน คือ เครือข่าย GRN เครือข่าย GCN และเครือข่าย PPIN
 5. ยีนที่ได้จากการคัดเลือกการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างเด่นชัดภายใต้สภาวะที่ต่างกันจะถูกนำมาวิเคราะห์ร่วมกับเครือข่าย และทำการแปลผลทางชีวภาพผ่านการวิเคราะห์ข้อมูลทางยีนออนโทโลยี
- ขั้นตอนที่ 2 คือการนำเครือข่ายต้นแบบไปประยุกต์ใช้กับสารออกฤทธิ์
6. การนำเครือข่ายที่เหมาะสมไปประยุกต์ใช้กับสารออกฤทธิ์ที่มีผลต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีนการอักเสบ



ภาพที่ 3-1 ภาพรวมงานวิจัย

3.3.1 การรวบรวมข้อมูล

งานวิจัยนี้ต้องการที่จะเน้นการศึกษากลไกการแสดงออกของยีนการตอบสนองการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน ซึ่งจะเป็นข้อมูลการแสดงออกของยีนในระดับจีโนมที่ได้จากเทคโนโลยีไมโครอาร์เรย์ ข้อมูลเหล่านี้สามารถดาวน์โหลดได้จากฐานข้อมูลสาธารณะ GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>, Edgar et al., 2002) ชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์แต่ละชุดที่คัดเลือกนั้นจำเป็นต้องมีการทดสอบการแสดงออกของยีนที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และไม่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ในบางชุดข้อมูลจะมีการทดสอบกับสารออกฤทธิ์ร่วมด้วย ซึ่งจะจัดอยู่ในรูปแบบไฟล์ Series matrix เป็นไฟล์ที่บรรจุข้อมูลการแสดงออกของโพรบที่ผ่านการทำ Pre-preprocess มาแล้ว ซึ่งมีรายละเอียดที่ประกอบด้วยชื่อ ID ของยีน ที่มาของชุดข้อมูลของยีน จำนวนของโพรบ หรือยีนทั้งหมดของแต่ละชุดการทดลองที่ใช้ Platform ของข้อมูล และรายละเอียดเกี่ยวกับตัวอย่างยีนที่ใช้ในการวิจัยในครั้งนี้ดังภาพที่ 3-2 โดยงานวิจัยนี้ได้ทำการคัดเลือกชุดข้อมูล GSE4712 ชุดข้อมูล GSE21841 ชุดข้อมูล GSE2002 ชุดข้อมูล GSE9632 และชุดข้อมูล GSE21320 ซึ่งในแต่ละชุดข้อมูลจะทำการทดสอบการแสดงออกของยีนในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน โดยหลักเกณฑ์ของการคัดเลือกช่วงเวลาทำการทดสอบจะอาศัยผลของสารออกฤทธิ์ที่มีต่อการแสดงออกของยีนการอักเสบที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS มาทำการคัดเลือกช่วงเวลาที่เหมาะสมการรวบรวมชุดรายชื่อยีนการอักเสบจากฐานข้อมูลทั้ง 3 ฐาน ได้แก่ OMIM (McKusick et al., 2007)

Uniprot (Apweiler et al., 2004) และ Genecard (Stelzer et al., 2016) เพื่อหารายชื่อยีนการอักเสบที่มีร่วมกัน การค้นหารายชื่อทรานสคริปชันแฟคเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบจากฐานข้อมูล Genecard (Stelzer et al., 2016) มาทำการวิเคราะห์ต่อไปดังภาพที่ 3-3

การรวบรวมชุดข้อมูลการแสดงออกของยีน

The screenshot shows a search for 'inflammation of RAW264.7' on the GEO DataSets website. It displays search results for Series GSE21841, including details about the study, organism (Mus musculus), and download options for supplementary files like GSE21841_RAW.tar.

1. การรวบรวมชุดข้อมูลการแสดงออกของยีนถูกสืบค้นจากฐานข้อมูลสาธารณะ GEO
2. หน้าค่าแสดงรายละเอียดเกี่ยวกับงานวิจัย เช่น ชื่องานวิจัย สัตว์ทดลอง การออกแบบการทดลอง

ภาพที่ 3-2 วิธีการดาวน์โหลดชุดข้อมูลการแสดงออกของยีนการอักเสบ

ฐานข้อมูลสาธารณะสำหรับการค้นหาชื่อยีนการอักเสบ

The block contains screenshots of the OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) and GeneCards websites. Below them is a Venn diagram with three overlapping circles labeled 1 (OMIM), 2 (Uniprot), and 3 (GeneCards), with an 'X' in the center intersection.

รายชื่อยีนการอักเสบจะถูกทำการค้นหาผ่านฐานข้อมูลสาธารณะ ได้แก่ ฐานข้อมูล OMIM ฐานข้อมูล Uniprot และ ฐานข้อมูล GeneCards

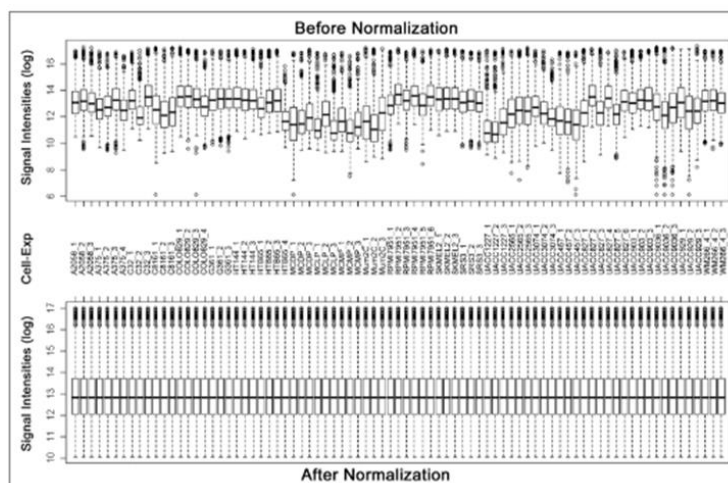
ภาพที่ 3-3 ฐานข้อมูลที่ใช้ในการค้นหาชื่อยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบ

3.3.2 การเตรียมข้อมูลการแสดงผลของยีนสำหรับการวิเคราะห์

การเตรียมข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์หรือการปรับรูปแบบมาตรฐาน (Normalization) นั้นเป็นขั้นตอนของการรวมข้อมูลไมโครอาร์เรย์จากงานวิจัยที่ต่างกันและรูปแบบ (Platform) ที่ต่างกันภายใต้สภาวะทางชีววิทยาที่เทียบเท่ากันเพื่อให้เป็นข้อมูลชุดเดียว (Glaab et al., 2009) ซึ่งเป็นข้อมูลที่มีความหลากหลายของระดับการแสดงผลที่ตรวจพบ และข้อมูลที่ได้นั้นเป็นค่าการแสดงผลที่มีปริมาณของการแสดงผลของยีนที่มาก จึงจำเป็นต้องมีการปรับมาตรฐานรูปแบบให้เป็นรูปแบบเดียวกันเพื่อการวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพ โดยการนำค่าทางสถิติมาวิเคราะห์เพื่อลดความคลาดเคลื่อนของข้อมูล ในงานวิจัยนี้การปรับมาตรฐานของข้อมูลนั้นชุดข้อมูลการแสดงผลทั้งหมดจะถูกนำมาปรับมาตรฐานข้อมูลโดยใช้ลอการิทึมฐานสอง (\log_2) และการใช้ z-score ในการปรับมาตรฐานของข้อมูลซึ่งคำนวณได้จากสมการ (1)

$$z\text{-score} = (X - \text{mean}) / \text{SD} \quad (1)$$

โดยที่ X คือค่าการแสดงผลของยีนในแต่ละตัวอย่างภายในชุดข้อมูล mean คือค่าเฉลี่ยของค่าการแสดงผลของแต่ละยีน และ SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าการแสดงผลของแต่ละชุดยีน



ภาพที่ 3-4 การปรับมาตรฐานข้อมูล

3.3.3 การคัดเลือกยีนที่มีการแสดงออกอย่างเด่นชัด (Feature selection)

ชุดข้อมูลการแสดงออกของยีนนั้นที่ผ่านการปรับรูปแบบมาตรฐานมาแล้วจะถูกนำมาทำการคัดเลือกยีนที่มีการแสดงออกที่เด่นชัด โดยผ่านวิธีการคัดเลือกทั้งหมด 3 วิธี ซึ่งแต่ละวิธีจะมีการคำนวณทางสถิติที่แตกต่างกันโดยโปรแกรมการวิเคราะห์ ArrayMining (Glaab et al., 2009) คือ วิธี SAM (Tusher et al., 2001) วิธี eBayes (Smyth, 2004) และวิธี PLS-CV (Hall, 2000) ดังภาพที่ 3-5 หลังจากนั้นจะคัดเลือกยีนที่ถูกรวบรวมอย่างน้อยจาก 2 ใน 3 วิธี เพื่อยืนยันผลการวิเคราะห์ว่ายีนที่ถูกคัดเลือกนั้นมีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกอย่างมีนัยสำคัญ

ขั้นตอนการคัดเลือกกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไป

1) Data Set

UPLOAD your own data: OR use an EXAMPLE data set:

Get help See example input

Please upload a tab-delimited matrix file or a zip-archive with CEL-files and label-file (max. size: 100 MB):

เลือกไฟล์ โยนไฟล์เลือกไฟล์

Upload

(After submission, please wait until the upload has been confirmed)

2) Feature Selection Method

eBayes SAM
PLS-CV CFS
RF-MDA ENSEMBLE

3) Parameters

Maximum feature subset size: 100

4) E-Mail Notification (optional)

Your e-mail address: _____

Submit

4

eBayes PLS-CV
X X X
X X X
SAM

- ฐานข้อมูล ArrayMining จะถูกใช้ในการคัดเลือกยีนที่มีการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลง
- ข้อมูลที่ต้องการวิเคราะห์จะต้องถูกจัดอยู่ในรูปแบบ ZIP-archive containing Affymetrix CEL-files หรือ a text-file containing tab-delimited numerical sample labels
- เลือกวิธีการวิเคราะห์
- ยีนที่ถูกรวบรวมอย่างน้อย 2 ใน 3 วิธีจะถูกนำมาวิเคราะห์ต่อ

ภาพที่ 3-5 วิธีการคัดเลือกยีนที่มีระดับการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกที่เด่นชัดภายใต้สภาวะที่ทำการทดสอบ

3.3.4 การสร้างเครือข่ายปฏิสัมพันธ์การแสดงออกของยีน

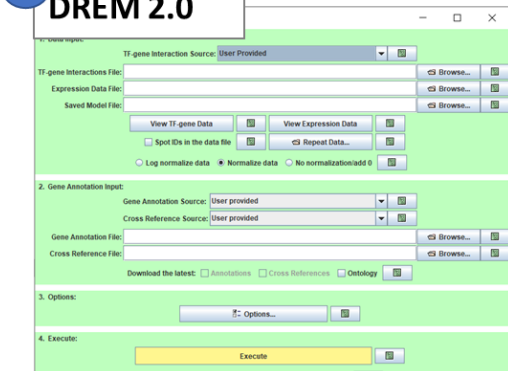
จากชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่ถูกปรับมาตรฐานข้อมูลแล้วนั้นก็จะถูกนำมาคัดกรองด้วยยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบก่อนที่จะทำการสร้างและวิเคราะห์ด้วยเครือข่ายทั้ง 3 ชนิด

3.3.4.1 การสร้างเครือข่ายควบคุมการแสดงออกของยีน (Gene regulatory network: GRN)

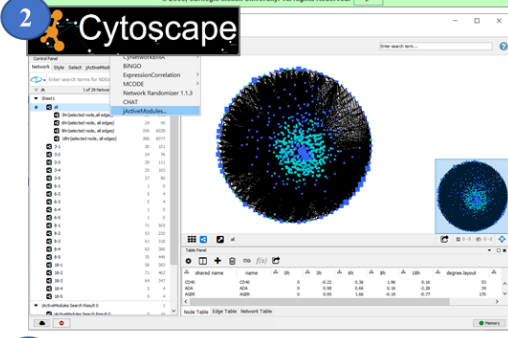
การสร้างเครือข่าย GRN นั้นคือ การหาปฏิสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลทรานสคริปชันแฟกเตอร์และยีนเป้าหมาย (TF-TG interaction) ในงานวิจัยนี้จะใช้โปรแกรม DREM (Schulz et al., 2012) วิเคราะห์หาปฏิสัมพันธ์ระหว่างทรานสคริปชันแฟกเตอร์และยีนเป้าหมาย โดยจะใช้ข้อมูลหนูเมาส์ Mouse (*Mus musculus*, Ernst et al., 2010) เนื่องจากเป็นแหล่งต้นกำเนิดของเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 โดยข้อมูลนี้จะประกอบไปด้วยข้อมูลทรานสคริปชันแฟกเตอร์จำนวน 335 ชนิด ข้อมูลยีนเป้าหมาย 16,640 ยีน และมีปฏิสัมพันธ์ของการควบคุมระหว่างทรานสคริปชันแฟกเตอร์และยีนเป้าหมายทั้งหมด 468,319 ปฏิสัมพันธ์ ซึ่งข้อมูลเหล่านี้จะถูกบรรจุอยู่ในฐานข้อมูล DREM (Schulz et al., 2012) (ภาพที่ 3-6) ทำให้ได้ผลปฏิสัมพันธ์ระหว่างทรานสคริปชันแฟกเตอร์และยีนเป้าหมายในรูปแบบชุดเวลา (Time series) แล้วนำมาแปลผลและวิเคราะห์ผ่านโปรแกรม Cytoscape (Shannon et al., 2003) เครือข่ายที่ได้จะถูกนำมาคัดกรองด้วยรายชื่อทรานสคริปชันแฟกเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบ หลังจากนั้นเพื่อให้มีการแสดงออกของเครือข่ายที่เป็นไปตามช่วงเวลาจึงนำกลุ่มยีนที่ได้จาก Feature selection มาช่วยค้นหาเครือข่ายที่มีการตอบสนองที่เป็นไปตามช่วงเวลา ปลั๊กอิน jActiveModules (Ideker et al., 2002) จะถูกใช้ในการค้นหาเครือข่ายย่อยหรือเครือข่ายต้นแบบสำหรับการอธิบายกลไกการตอบสนองการอักเสบสามารถดาวน์โหลดได้จากแอปพลิเคชันของโปรแกรม Cytoscape (Shannon et al., 2003)

การสร้างเครือข่ายการควบคุมการแสดงออกของยีน

1 DREM 2.0



2 Cytoscape



3



1. การป้อนข้อมูลเพื่อการวิเคราะห์เครือข่ายควบคุมการแสดงออกของยีน

Data Input :

- TF-gene Interaction Source: Mouse_predicted.txt
- TF-gene Interaction : Mouse (Mus musculus)
- Expression Data File: ชุดข้อมูลการแสดงออกของยีน

Gene Annotation Input:

- Gene Annotation Source: Mus musculus (MGI)

Excute: Excute

2. ผลที่ได้จาก DREM 2.0 จะถูกนำมาวิเคราะห์และสร้างเครือข่ายโดยโปรแกรม Cytoscape

3. เครือข่ายที่ได้จะถูกค้นหาเครือข่ายย่อยจากรายชื่อกลุ่มยีนที่ได้จากขั้นตอนฟีเจอร์ และทำการคัดเลือกเครือข่ายที่มีการแสดงออกที่มันยสำคัญโดยปลั๊กอิน jActiveModules

ภาพที่ 3-6 การสร้างเครือข่ายการควบคุมการแสดงออกของยีนที่ผ่านการวิเคราะห์โดยโปรแกรม DREM 2.0 (Schulz et al., 2012)

3.3.4.2 การสร้างเครือข่ายการแสดงออกร่วมของยีน (Gene co-expression network: GCN)

ในงานวิจัยนี้จะใช้ปลั๊กอิน ExpressionCorrelation วิเคราะห์หาเครือข่าย GCN ซึ่งสามารถดาวน์โหลดและติดตั้งได้ใน โปรแกรม Cytoscape (Shannon et al., 2003) ในภาพที่ 3-7 ชุดข้อมูลการแสดงออกการตอบสนองของยีนการอักเสบจะถูกวิเคราะห์ด้วยปลั๊กอิน ExpressionCorrelation ทำให้ได้เครือข่ายใหญ่ เครือข่าย GCN นั้นจะถูกค้นหาเครือข่ายที่มีการแสดงออกที่เด่นชัดในแต่ละช่วงเวลาโดยการนำกลุ่มยีนจากขั้นตอน Feature selection มาทำการ

ค้นหาเครือข่าย GCN หลังจากนั้นจะใช้ปลั๊กอิน jActiveModules (Ideker et al., 2002) มาทำการค้นหาเครือข่ายต้นแบบสำหรับการอธิบายกลไกการตอบสนองการอักเสบ

การสร้างเครือข่ายการแสดงออกพร้อมของยีน

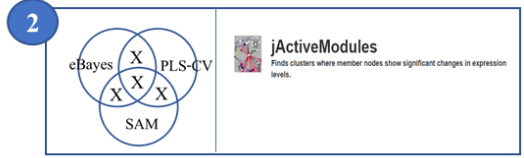
1



1. ปลั๊กอิน ExpressionCorrelation จะถูกใช้สำหรับการวิเคราะห์เครือข่ายการแสดงออกพร้อมของยีนที่มีอยู่ในโปรแกรม Cytoscape โดยการอัปโหลดข้อมูลการแสดงออกของยีน

2. เครือข่ายที่ได้จะถูกค้นหาเครือข่ายย่อยจากรายชื่อกลุ่มยีนที่ได้จากขั้นตอนที่เจ็ด และทำการคัดเลือกเครือข่ายที่มีการแสดงออกที่มีนัยสำคัญ โดยปลั๊กอิน jActiveModules

2



ภาพที่ 3-7 การสร้างเครือข่ายการแสดงออกพร้อมยีนการอักเสบโดยใช้ปลั๊กอิน

ExpressionCorrelation ซึ่งเป็นฟีเจอร์หนึ่งของโปรแกรม Cytoscape (Shannon et al., 2003) และการค้นหาเครือข่ายย่อย

3.3.4.3 การสร้างเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน (Protein-protein interaction network: PPIN)

การค้นหาข้อมูลปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนการอักเสบจะถูกค้นหาจากฐานข้อมูล STRING (Szklarczyk et al., 2018) ซึ่งเป็นฐานข้อมูลสาธารณะโดยการนำรายชื่อยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบมาทำการค้นหาในฐานข้อมูลนี้ และจะถูกนำมาสร้างและวิเคราะห์เครือข่ายปฏิสัมพันธ์โดยโปรแกรม Cytoscape (Shannon et al., 2003) ทำการเพิ่มข้อมูลการแสดงออกของยีนเข้าไปในเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน เครือข่ายที่ได้จะถูกทำการค้นหาเครือข่ายช่วงเวลาโดยการนำกลุ่มยีนที่ได้จากขั้นตอน Feature selection มาทำการค้นหา หลังจากนั้นเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนที่มีการตอบสนองการอักเสบในแต่ละเวลานั้นจะถูกค้นหาเครือข่ายย่อยที่มีการแสดงออกอย่างมีนัยสำคัญ โดยปลั๊กอิน jActiveModules (Ideker et al., 2002) ดังภาพที่ 3-8

เครือข่ายย่อยที่ถูกคัดเลือกจากปลั๊กอิน jActiveModules (Ideker et al., 2002) ที่ได้จากเครือข่าย GRN เครือข่าย GCN และเครือข่าย PPIN ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบในแต่ละช่วงเวลาจะได้ตัวแทนเครือข่ายสำหรับการวิเคราะห์อย่างละ 5 เครือข่าย และเครือข่ายเหล่านั้นจะถูกคัดเลือกมา 1 เครือข่ายเพื่อมาเป็นตัวแทนในการอธิบายกลไกและแปลผลทางชีวภาพ โดยหลักเกณฑ์ในการคัดเลือกจะใช้กลุ่มรายชื่อยีนและ โปรตีนที่ได้จากวิถีกลไกหลักของการตอบสนองการอักเสบและมีการรายงานอย่างต่อเนื่องมาทำการคัดเลือกทำให้ได้เครือข่ายที่เป็นเครือข่ายต้นแบบซึ่งจะถูกนำมาอธิบายกลไกการตอบสนองการอักเสบในแต่ละช่วงเวลา

การสร้างเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน



1. ทำการค้นหาข้อมูลปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนการอักเสบจากฐานข้อมูล STRING
2. นำข้อมูลที่ได้จากฐานข้อมูล STRING และสร้างเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนโดยใช้โปรแกรม Cytoscape
3. เครือข่ายที่ได้จะถูกค้นหาเครือข่ายย่อยจากรายชื่อกลุ่มยีนที่ได้จากขั้นตอนพีเจอร์ และทำการคัดเลือกเครือข่ายที่มีการแสดงออกที่มีนัยสำคัญโดยปลั๊กอิน jActiveModules

ภาพที่ 3-8 การสร้างเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนนั้นสร้างจากฐานข้อมูล STRING

(Szklarczyk et al., 2018)

3.3.5 การแปลผลทางชีวภาพและการประยุกต์ใช้กับสารออกฤทธิ์

ยีนที่ได้จากขั้นตอน Feature selection จะถูกนำมาทำการวิเคราะห์ Gene ontology ด้วยโปรแกรม DAVID (Huang et al., 2009) ซึ่งเป็นฐานข้อมูลสาธารณะเพื่อค้นหาหน้าที่การทำงานของยีนเหล่านั้น เครื่องมือต้นแบบที่ได้จากเครือข่ายทั้ง 3 ประเภทได้แก่เครือข่าย GRN เครือข่าย GCN และเครือข่าย PPIN จะถูกนำมาแปลผลทางชีวภาพเพื่อค้นหาหน้าที่การทำงาน โดยการวิเคราะห์จากฐานข้อมูล DAVID (Huang et al., 2009) การค้นหาวิถีกลไกการตอบสนอง การอักเสบด้วยฐานข้อมูล KEGG PATHWAY Database (Kanehisa & Sato, 2019) และฐานข้อมูล Genecard (Stelzer et al., 2016) เครื่องมือต้นแบบที่ได้จะนำไปประยุกต์ใช้กับการตอบสนองต่อสารออกฤทธิ์ (ภาพที่ 3-9)

การแปลผลทางชีวภาพ

1

2

3

ฐานข้อมูลที่ใช้สำหรับการแปลผลทางชีวภาพ

- ฐานข้อมูล DAVID
- ฐานข้อมูล Genecards
- ฐานข้อมูล KEGG

ภาพที่ 3-9 ฐานข้อมูลที่จะช่วยในการแปลผลทางชีวภาพได้แก่ฐานข้อมูล DAVID

(Huang et al., 2009) ฐานข้อมูล GeneCards (Stelzer et al., 2016) และฐานข้อมูล KEGG Pathway (Kanehisa & Sato, 2019)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การรวบรวมและการเตรียมข้อมูลการแสดงออกของยีน

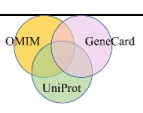
ชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่ถูกคัดเลือกจะอยู่ในรูปแบบไฟล์ Series expression matrix และแบ่งชุดข้อมูลออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ชุดข้อมูลที่ใช้ในการค้นหาเครือข่ายต้นแบบสำหรับการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนการอักเสบที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 และกลุ่มที่ 2 ชุดข้อมูลที่ประกอบไปด้วยข้อมูลการแสดงออกของยีนการอักเสบที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และการยับยั้งการอักเสบด้วยสารออกฤทธิ์ ชุดข้อมูลกลุ่มที่ 1 มีจำนวนทั้งหมด 3 ชุดข้อมูล ซึ่งอยู่ภายใต้แพลตฟอร์ม Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 array (GPL1261) ได้แก่ ชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ GSE4712 (Comer et al., 2006) และ GSE21841 (Hammer et al., 2010) มีจำนวนโพรบทั้งหมด 45,101 โพรบ จำนวนยีน 21,495 ยีน ซึ่งถูกทดสอบที่สภาวะ 3, 6 และ 8 ชั่วโมง ตามลำดับหลังจากที่เซลล์ RAW264.7 ถูกกระตุ้นด้วย LPS และชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ GSE2002 (Shell et al., 2005) จะอยู่ภายใต้แพลตฟอร์ม Affymetrix Mouse Expression 430A Array (GPL339) มีจำนวนโพรบทั้งหมด 22,690 โพรบ จำนวนยีน 13,480 ยีน ที่ถูกทดสอบในช่วงเวลา 18 ชั่วโมงหลังจากมีการกระตุ้นด้วย LPS ซึ่งทั้ง 3 ชุดข้อมูล 2 แพลตฟอร์มจะถูกนำมาทำการเปรียบเทียบข้อมูลเพื่อให้ได้รายชื่อยีนชุดเดียวกัน จึงทำให้ได้จำนวนยีนที่ถูกพบทั้ง 3 ชุดข้อมูลมีจำนวนทั้งหมด 13,480 ยีน และจะถูกคัดกรองด้วยกลุ่มยีนการอักเสบของหนูที่ได้จากฐานข้อมูล OMIM (McKusick, 2007) ฐานข้อมูล UniProt (Apweiler et al., 2004) และ GeneCard (Stelzer et al., 2016) พบจำนวนยีนการอักเสบทั้งหมด 376 ยีน ทรานส์สคริปชันแฟกเตอร์ทั้งหมด 310 ชนิด และจำนวนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบนั้นมีทั้งหมด 337 ชนิด จากฐานข้อมูล STRING (Szklarczyk et al., 2018) แสดงในตารางที่ 4-2 เพื่อที่จะทำการค้นหาเครือข่ายต้นแบบของการตอบสนองการอักเสบต่อไป กลุ่มที่ 2 ชุดข้อมูลที่ประกอบไปด้วยข้อมูลการแสดงออกของยีนการอักเสบที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และการยับยั้งการอักเสบด้วยสารออกฤทธิ์ ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ได้แก่ชุดข้อมูล GSE21841 ถูกทดสอบภายใต้สภาวะที่ 8 ชั่วโมงหลังจากที่มีการกระตุ้นด้วย LPS และถูกทดสอบกับสารออกฤทธิ์ 4-Component-system จากพืช *Hypericum perforatum* ชุดข้อมูล GSE9632 มีจำนวนโพรบทั้งหมด 33,013 โพรบ มีจำนวนยีนทั้งหมด 15,149 ยีน แพลตฟอร์มที่ใช้ GPL2995 ABI Mouse Genome Survey Microarray ถูกทดสอบกับสารออกฤทธิ์จากรากของต้น โปด้น (Paeony) ได้แก่ Albiflorin, Paeoniflorin และ

Paeonol ที่เวลา 6 ชั่วโมง ชุดข้อมูล GSE21320 มีจำนวนโพรบทั้งหมด 211 โพรบ มีจำนวนยีนทั้งหมด 211 ยีน แพลตฟอร์มที่ใช้ GPL10321 ARIM-GX ถูกทดสอบด้วยสารออกฤทธิ์ Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) ที่ได้จากชาเขียว (ตารางที่ 4-3) ชุดข้อมูลทั้งหมดจะถูกนำมาปรับรูปแบบมาตรฐาน (Normalization) เพื่อให้มีค่าการกระจายของตัวเลขน้อยลง ดังนั้นในการค้นหาเครือข่ายต้นแบบสำหรับการอธิบายการแสดงออกการตอบสนองของยีนการอักเสบจะใช้ชุดข้อมูล GSE4712, GSE21841 และ GSE2002 และชุดข้อมูล GSE21841, GSE9632 และ GSE21320 จะเป็นการนำสารออกฤทธิ์นั้นมาวิเคราะห์ร่วม เพื่อพิจารณาการยับยั้งการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ

ตารางที่ 4-1 ข้อมูลจำนวนโพรบและจำนวนยีนจากชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่ใช้ในการทดลอง

ชุดข้อมูล	ช่วงเวลา (ชั่วโมง)	แพลตฟอร์ม	จำนวนโพรบ (โพรบ)	จำนวนยีน (ยีน)	จำนวนยีนที่ถูกนำมาใช้ในการทดลอง (ยีน)
GSE4712	3	GPL1261	45,101	21,495	13,480
	6				
GSE21841	8				
GSE2002	18	GPL339	22,690	13,480	
GSE9632	6	GPL2995	3,3013	3,3013	3,3013
GSE21320	6	GPL10321	211	211	211

ตารางที่ 4-2 ตารางการค้นหาข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบจากฐานข้อมูลสาธารณะ

ฐานข้อมูลที่ใช้สำหรับค้นหาข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ		
 376 genes	OMIM (McKusick, 2007)	310 TFs จาก GeneCard (Stelzer et al., 2016)
	UniProt (Apweiler et al., 2004) GeneCard (Stelzer et al., 2016)	337 proteins จาก STRING (Szkarczyk et al., 2018)

ตารางที่ 4-3 แสดงรายละเอียดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ที่ใช้ในการทดลอง

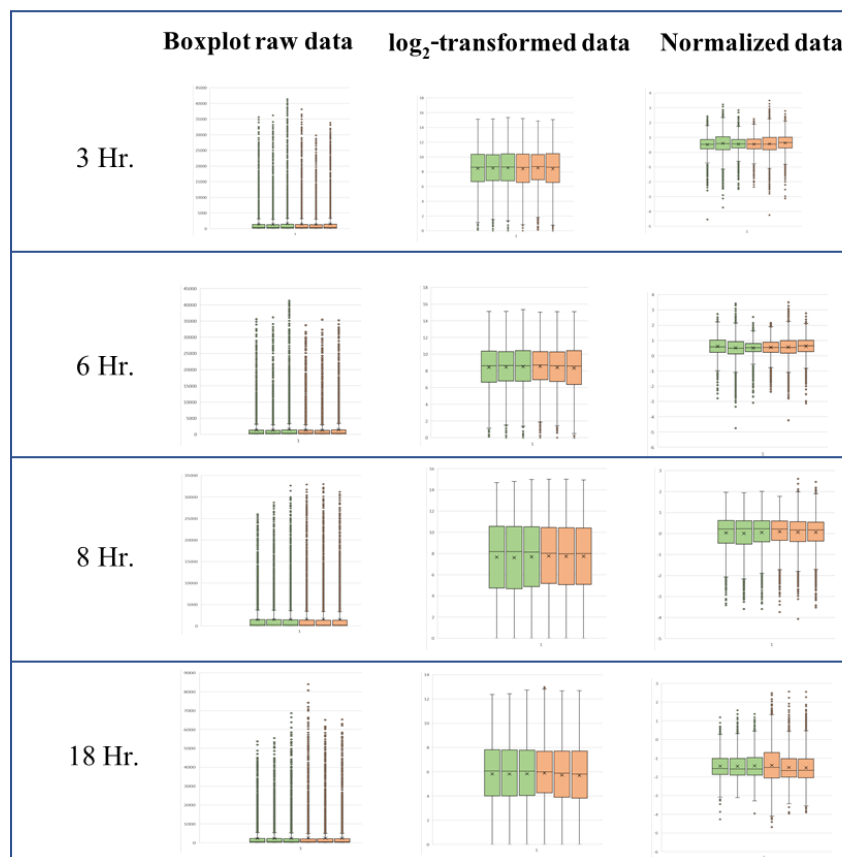
GSE ID	หัวข้อ	เอกสารอ้างอิง	แพลตฟอร์ม	ตัวอย่าง	แหล่งของ LPS
GSE4712	Edema Toxin-treated Macrophage Study.	Comer et al., 2006	Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 Array (GPL1261)	9 ตัวอย่าง -Untreated=3 -3 Hrs. LPS=3 -6 Hrs. LPS=3	LPS (0.01ng/ml; Sigma Aldrich)
GSE21841	Expression data from LPS-stimulated RAW 264.7 mouse macrophages treated with Hypericum perforatum fraction and bioactive constituents.	Hammer et al., 2010	Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 Array (GPL1261)	6 ตัวอย่าง -Untreated=3 -8 Hrs. LPS=3 -8 Hrs. 4CS & LPS = 3	LPS (1µg/ml; Sigma Aldrich)
GSE2002	CstF-64 Influenced Gene Expression	Shell et al., 2005	Affymetrix Mouse Expression 430A Array (GPL339)	6 ตัวอย่าง -Untreated =3 -18 Hrs. LPS =3	LPS (100 ng/ml; Sigma Aldrich)

ตารางที่ 4-3 (ต่อ)

GSE ID	หัวข้อ	เอกสารอ้างอิง	แพลตฟอร์ม	ตัวอย่าง	แหล่งของ LPS
GSE9632	Gene expression profiles of RAW264.7 macrophage cells treated with Paeony root-derived compounds	Huang et al., 2006	ABI Mouse Genome Survey Microarray (GPL2995)	33 ตัวอย่าง -Untreated = 3 -6 Hrs. LPS = 3 -6 Hrs. LPS & albiflorin (1, 10 and 100 ug/ml) = 9 -6 Hrs. LPS & paeoniflorin (1, 10 and 100 ug/ml) = 9 - 6 Hrs. LPS & paeonol (1, 10 and 100 ug/ml) = 9	LPS (1µg/ml; Sigma Aldrich)
GSE21320	TLR 4 Signaling Inhibitory Pathway Induced by Green Tea Polyphenol Epigallocatechin-3-Gallate through 67-kDa Laminin Receptor	Byun et al., 2010	ARIM-GX (GPL10321)	12 ตัวอย่าง -Untreated = 3 -6 Hrs. EGCE = 3 -6 Hrs. LPS = 3 -6 Hrs. EGCG & LPS = 3	LPS (50 ng/ml; Sigma Aldrich)

4.2 การปรับรูปแบบมาตรฐานก่อนการนำมาวิเคราะห์ (Normalization)

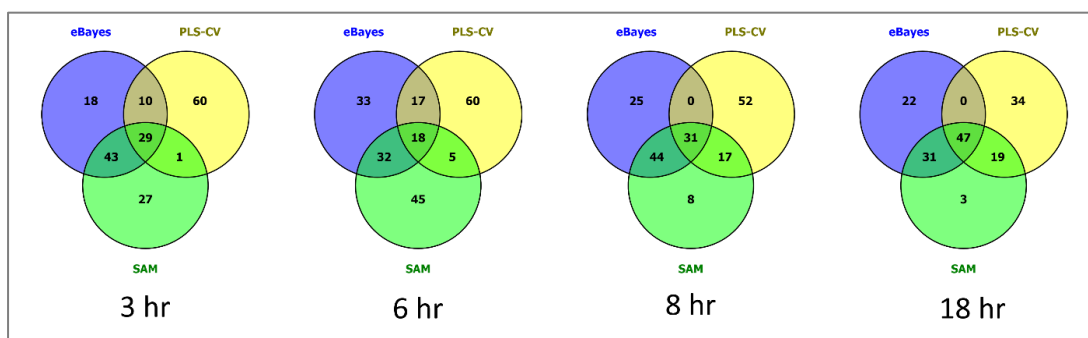
ชุดข้อมูลทั้งหมดจะผ่านกระบวนการการปรับรูปแบบมาตรฐาน เพื่อลดปัญหาการผิดพลาดของข้อมูล ข้อมูลที่ผ่านกระบวนการนอร์มอลไลซ์เซชันจะมีความเป็นระเบียบมากขึ้นและอยู่ในมาตรฐานเดียวกัน เนื่องจากข้อมูลที่ได้นั้นมาจากหลายแหล่ง ในการปรับมาตรฐานข้อมูลจะใช้ค่า Z-score ในการวิเคราะห์ข้อมูล โดย ค่า mean มีค่าเท่ากับ 0 และค่า SD มีค่าเท่ากับ 1 จะพบว่าข้อมูลที่ไม่ถูกปรับรูปแบบมาตรฐานค่าการแสดงผลออกของยีนมีการกระจาย เมื่อชุดข้อมูลการแสดงผลออกผ่านกระบวนการจัดรูปแบบมาตรฐานจะมีความเป็นระเบียบมากขึ้นค่าตัวเลขอยู่ในมาตรฐานเดียวกัน (ตารางภาคผนวก ก-1)



ภาพที่ 4-1 ผลการปรับรูปแบบมาตรฐานข้อมูลการแสดงผลออกของยีนการตอบสนองการอักเสบ

4.3 การคัดเลือกยีนและการตรวจสอบหน้าที่ของกลุ่มยีน

ชุดข้อมูลกลุ่มที่ 1 คือ ชุดข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนการอักเสบที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ผ่านการปรับมาตรฐานข้อมูลมาแล้วและยังไม่ถูกกรองด้วยยีนการอักเสบนั้นจะถูกนำมาทำการคัดเลือกยีนที่มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกอย่างเด่นชัดของแต่ละสภาวะ (Feature Selection) จากวิธี Significance Analysis for Microarray (SAM) (Tusher et al., 2001) วิธี Empirical Bayes moderated t-statistic (eBayes) (Smyth, 2004) และวิธี Partial Least Squares Cross-Validation (PLS-CV) (Hall, 2000) ในเครื่องมือการทำเหมืองข้อมูลออนไลน์ ArrayMining (<http://www.arraymining.net>) (Glaab et al., 2009) และทำการคัดเลือกยีนที่ถูพบอย่างน้อยจำนวน 2 ใน 3 วิธีมาทำการแปลผลทางชีวภาพ จากภาพที่ 4-2 แสดงเวนนไดอะแกรมของการคัดเลือกกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไปจากทั้งสามวิธีในแต่ละช่วงเวลาของชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ ซึ่งจะทำให้ได้กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบในช่วงเวลา 3 ชั่วโมง เป็นจำนวน 83 ยีน ช่วงเวลา 6 ชั่วโมง เป็นจำนวน 72 ยีน ช่วงเวลา 8 ชั่วโมง เป็นจำนวน 92 ยีน และที่ช่วงเวลา 18 ชั่วโมง เป็นจำนวน 97 ยีน รายชื่อยีนที่ถูกคัดเลือกอย่างน้อยสองในสามวิธีตามตารางภาคผนวก ก-2 จากรายชื่อยีนที่ถูกคัดเลือกจากชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ในแต่ละช่วงเวลาก่อนหน้านี้จะถูกนำมาผ่านการตรวจสอบหน้าที่การทำงานของยีน โดยอาศัยฐานข้อมูลยีนออนโทโลยีภายใต้โปรแกรมออนไลน์ DAVID (Huang, 2009) การแปลผลยีนออนโทโลยีประกอบด้วย 3 ลักษณะ คือ Biological process (BP), Cell component (CC), และ Molecular function (MF) แสดงในตารางที่ 4-4 ถึงตารางที่ 4-6 ในการแปลผลยีนจากขั้นตอนของ Feature selection นั้นพบว่าในช่วงเวลา 3 ชั่วโมงหลังจากเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ระดับการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของกลุ่มยีนการอักเสบยังไม่ชัดเจน ในขณะที่ยีนที่ยังคงมียีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอื่นมีระดับการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกมากกว่ากลุ่มยีนการอักเสบ แต่ก็เริ่มมีกระบวนการจับกันของตัวจับจำเพาะ ที่เวลา 6 ชั่วโมงระดับการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของกลุ่มยีนการอักเสบเพิ่มมากขึ้น พบการตอบสนองของกระบวนการควบคุมแรงดันของเลือด มีการจับกันของ LPS กับตัวจับจำเพาะที่บริเวณผิวเซลล์ และเมื่อเข้าสู่เวลาที่ 8 ชั่วโมงหลังจากเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ในช่วงเวลานี้ระดับการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มยีนการอักเสบนั้นเพิ่มมากขึ้น ในช่วงเวลานี้จะเป็นช่วงเวลาที่มีการส่งสัญญาณภายในเซลล์เกี่ยวกับกลไกระบบภูมิคุ้มกันเพื่อตอบสนองต่อสิ่งที่เข้ามากระตุ้น มีกระบวนการตายของเซลล์เกิดขึ้น และยังคงมีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนการอักเสบต่อเนื่องไปถึงเวลาที่ 18 ชั่วโมง ในเวลานี้จะมีอุณหภูมิความร้อนเข้ามาเกี่ยวข้องและเกิดการส่งสัญญาณไปยังกระบวนการอื่น เช่น เกิดวิถีการส่งสัญญาณมะเร็งเกิดขึ้น



ภาพที่ 4-2 จำนวนยีนที่ผ่านการคัดเลือกด้วยวิธีการ SAM (Tusher, 2001), eBayes (Smyth, 2004), และ PLS-CV (Hall, 2000) ของชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์ในช่วงเวลา 3, 6, 8 และ 18 ชั่วโมง

ตารางที่ 4-4 ตารางแสดงการแปลผลทางชีวภาพของกลุ่มยีนที่ถูกคัดเลือกในแต่ละช่วงเวลาจากฐานข้อมูล DAVID (Huang, 2009) ตามลักษณะของ ยีนออนโทโลยี Biological process

3 Hr.	6 Hr.	8 Hr.	18 Hr.
- neuron projection development	- positive regulation of blood pressure	- immune response	- immune system process
- N-terminal protein amino acid acetylation	- cell surface receptor signaling pathway	- inflammatory response	- mitotic nuclear division
- astrocyte differentiation	- iron ion homeostasis	- cellular response to lipopolysaccharide	- cellular response to interleukin-1
- steroid metabolic process	- axon guidance	- positive regulation of gene expression	- innate immune response
- ossification	- palate development	- positive regulation of ERK1 and ERK2 cascade	- cytokinesis
- hypothalamus development	- central nervous system projection neuron axonogenesis	- positive regulation of T cell proliferation	- inflammatory response

ตารางที่ 4-4 (ต่อ)

3 Hr.	6 Hr.	8 Hr.	18 Hr.
- establishment of epithelial cell polarity	- positive regulation of organ growth	- cytokine-mediated signaling pathway	- negative regulation of apoptotic process
- multicellular organism development	- extracellular matrix organization	- positive regulation of prostaglandin secretion	- negative regulation of interferon-gamma production
- nervous system development	- morphogenesis of an epithelium	- cellular response to tumor necrosis factor	- fever generation
- digestive tract morphogenesis	- odontogenesis	- positive regulation of stress-activated MAPK cascade	- hepatocyte proliferation
- anterior/posterior pattern specification	- regulation of long-term neuronal synaptic plasticity	- positive regulation of JNK cascade	- cytokine-mediated signaling pathway
- positive regulation of cell-cell adhesion	- negative regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway in absence of ligand	- positive regulation of NF- κ B transcription factor activity	- positive regulation of I- κ B kinase/NF- κ B signaling

ตารางที่ 4-5 ตารางแสดงการแปลผลทางชีวภาพของกลุ่มยีนที่ถูกคัดเลือกในแต่ละช่วงเวลาจากฐานข้อมูล DAVID (Huang, 2009) ตามลักษณะของ ยีนออนโทโลยี Cell component

3 Hr.	6 Hr.	8 Hr.	18 Hr.
- extracellular region	- plasma membrane	- extracellular space	- chromosome, centromeric region
- cell periphery	- integral component of plasma membrane	- cytoplasm	- kinetochore
- basolateral plasma membrane	- extracellular region	- CD95 death-inducing signaling complex	- cytoplasm
- cell-cell junction	- membrane	- symbiont-containing vacuole membrane	- spindle
	- anchored component of membrane	- external side of plasma membrane	- cytoskeleton
	- proteinaceous extracellular matrix	- basal part of cell	- spindle microtubule
	- integral component of membrane	- spindle	- centriole
	- extracellular space	- membrane raft	- neuronal cell body

ตารางที่ 4-6 ตารางแสดงการแปลผลทางชีวภาพของกลุ่มยีนที่ถูกคัดเลือกในแต่ละช่วงเวลาจากฐานข้อมูล DAVID (Huang, 2009) ตามลักษณะของ
ยีนออนโทโลยี Molecular function

3 Hr.	6 Hr.	8 Hr.	18 Hr.
- protein dimerization activity	- serine-type endopeptidase inhibitor activity	- cytokine activity	- microtubule binding
- arylamine N-acetyltransferase activity	- carbohydrate binding	- interleukin-1 receptor binding	- ATP binding
- dynactin binding	- RNA polymerase II transcription factor activity, sequence-specific DNA binding	- protease binding	- RNA polymerase II core promoter sequence-specific DNA binding
- receptor activity	-	- chemokine activity	- ubiquitin protein ligase binding

ตารางที่ 4-6 (ต่อ)

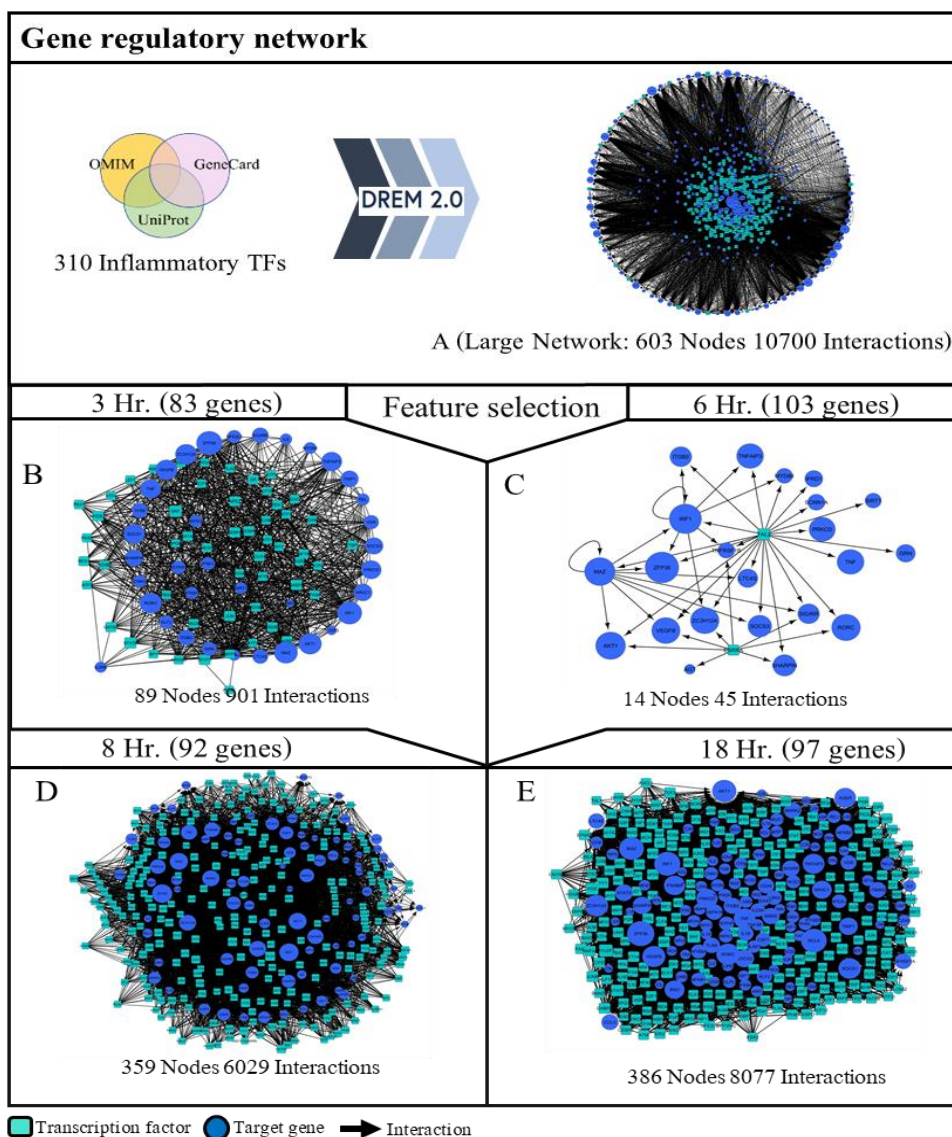
3 Hr.	6 Hr.	8 Hr.	18 Hr.
- glycoprotein binding	-	- core promoter proximal region DNA binding	- microtubule motor activity
- dynein binding	-	- receptor binding	- interleukin-1 receptor binding
- receptor binding	-	- tumor necrosis factor-activated receptor activity	- cytokine activity
- chemoattractant activity	-	- protein binding	

4.3 เครือข่ายปฏิสัมพันธ์การควบคุมการแสดงออกของยีน (Gene regulatory network: GRN)

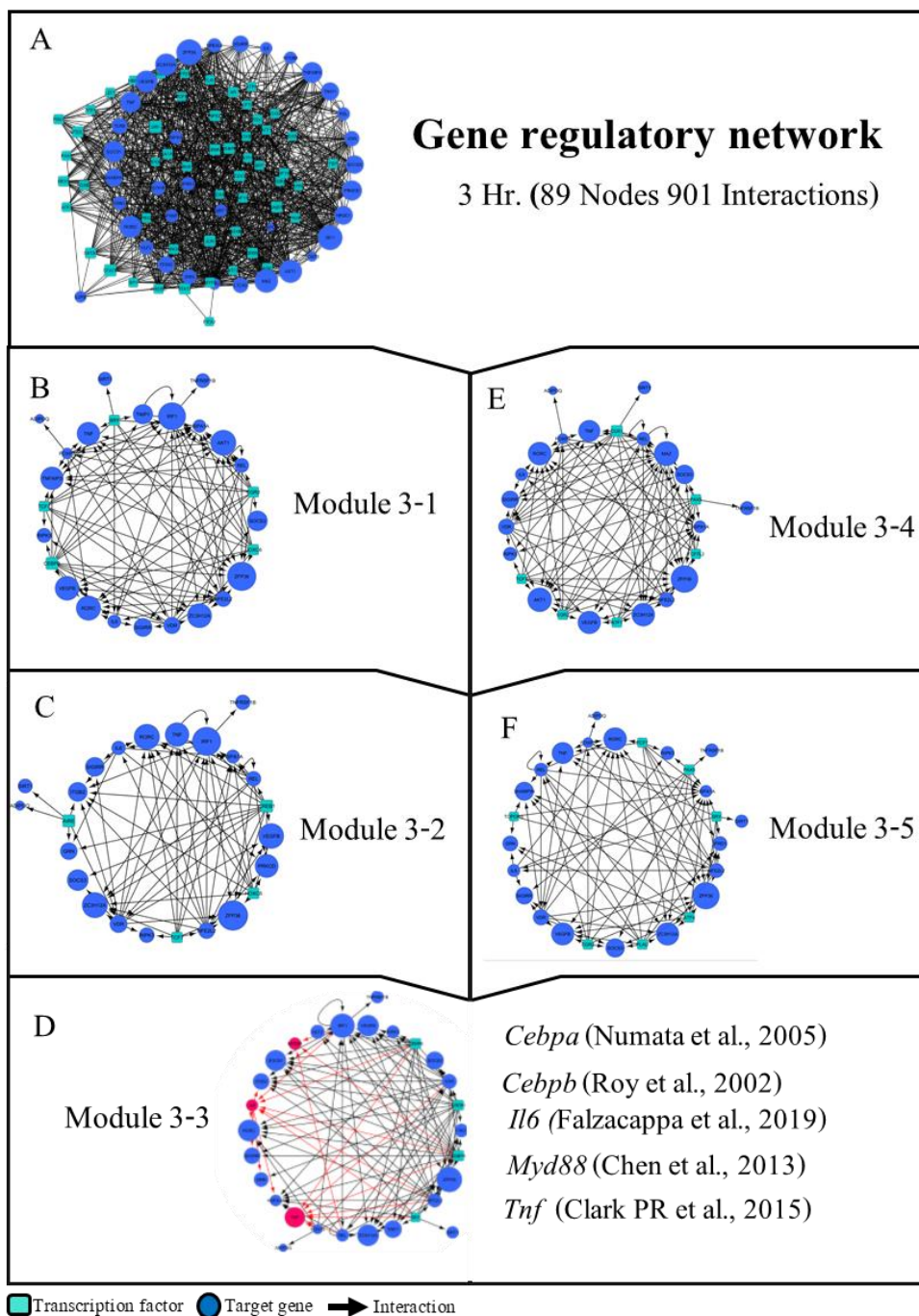
ผลจากการวิเคราะห์เครือข่าย GRN จากการนำชุดข้อมูลการแสดงออกของยีนที่มี การตอบสนองต่อ LPS ของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 กลุ่มที่ 1 หลังจากปรับมาตรฐาน ข้อมูลจะถูกคัดกรองด้วยกลุ่มทรานส์คริปชันแฟกเตอร์การอักเสบทั้งหมด 310 ชนิด ดังตารางที่ 4-2 ทำให้ทราบว่าเครือข่ายที่ได้นั้นมีขนาด 603 โหนด 10,700 ปฏิสัมพันธ์ ดังภาพที่ 4-3A เครือข่ายที่ได้ จะถูกนำมาวิเคราะห์ต่อโดยการค้นหาเครือข่ายย่อยการแสดงออกการตอบสนองการอักเสบของ แต่ละชั่วโมงหลังจากที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS โดยการนำยีนจากขั้นตอน Feature selection มาทำการ ค้นหาเครือข่ายย่อยจะทำให้ได้ตัวแทนเครือข่ายของแต่ละชั่วโมงที่มีการตอบสนองต่อ LPS ในช่วง เวลาที่ 3 ชั่วโมงจำนวนยีนที่ทำการค้นหานั้นมีทั้งหมด 83 ยีนจากขั้นตอน Feature selection ทำให้ ได้เครือข่าย GRN ที่มีการตอบสนองการแสดงออกที่ช่วงเวลา 3 ชั่วโมงหลังจากที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS มีจำนวนโหนดทั้งหมด 89 โหนด และปฏิสัมพันธ์ภายในเครือข่ายมีทั้งหมด 901 ปฏิสัมพันธ์ ดังภาพที่ 4-3B เมื่อทำการค้นหาเครือข่ายย่อยด้วยยีนที่ได้จากขั้นตอน Feature selection ทั้งหมด 103 ยีน ของช่วงเวลา 6 ชั่วโมงหลังจากที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ทำให้ได้เครือข่าย GRN ที่มีจำนวน โหนดทั้งหมด 24 โหนด 45 ปฏิสัมพันธ์ดังภาพที่ 4-3C เมื่อเวลา 8 ชั่วโมงจำนวนยีนที่ทำการ ค้นหาทั้งหมด 92 ยีนจากขั้นตอน Feature selection ทำให้ได้เครือข่าย GRN ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ในช่วงเวลาที่ 8 ชั่วโมงมีจำนวนโหนดทั้งหมด 356 โหนด 6029 ปฏิสัมพันธ์ดังภาพที่ 4-3D และที่เวลา 18 ชั่วโมงจำนวนยีนที่ทำการค้นหามีจำนวน 97 ยีนจากขั้นตอนของ Feature selection ทำให้ได้เครือข่าย GRN ที่มีขนาด 386 โหนด 8077 ปฏิสัมพันธ์ที่มีการแสดงออกตอบสนองต่อ LPS ในช่วงเวลา 18 ชั่วโมงดังภาพที่ 4-3E

การวิเคราะห์เครือข่าย GRN ภายใต้สภาวะของการทดลองในแต่ละช่วงเวลาเครือข่ายนั้น ยังคงมีขนาดใหญ่ยากต่อการวิเคราะห์ จึงได้นำโปรแกรม jActiveModules (Ideker et al., 2002) เพื่อ ช่วยค้นหาโมดูลย่อยที่มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนอย่างมีนัยสำคัญภายใต้ช่วงเวลาที่ แตกต่างกัน ในแต่ละช่วงเวลาจะมีโมดูลย่อยทั้งหมด 5 โมดูล (ภาคผนวก ข-1 และภาพที่ 4-4) ภายในตารางจะแสดงรายชื่อยีนที่อยู่ภายในโมดูล ทำการคัดเลือกโมดูลย่อย 1 โมดูลเพื่อเป็น ต้นแบบของการแปลผลทางชีวภาพจาก 5 โมดูล โดยการนำยีนจากวิถีกลไกการตอบสนองการ อักเสบหลักและมีการรายงานการวิจัยมาอย่างต่อเนื่อง (ภาคผนวก จ) มาทำการคัดเลือกโมดูลย่อย ของแต่ละช่วงเวลาที่แตกต่างกันได้แก่ โมดูลที่ 3-3 เป็นโมดูลต้นแบบของเครือข่าย RGN ที่ช่วงเวลา 3 ชั่วโมงหลังจากที่มีการกระตุ้นด้วย LPS ในโมดูลที่ 3-3 พบว่ามี *Cebpa*, *Cebpb*, *Il6*, *Myd88* และ *Tnf* มีปฏิสัมพันธ์กัน *Cebpa* และ *Cebpb* เป็นทรานส์คริปชันแฟกเตอร์มีผลต่อการแสดงออกของ

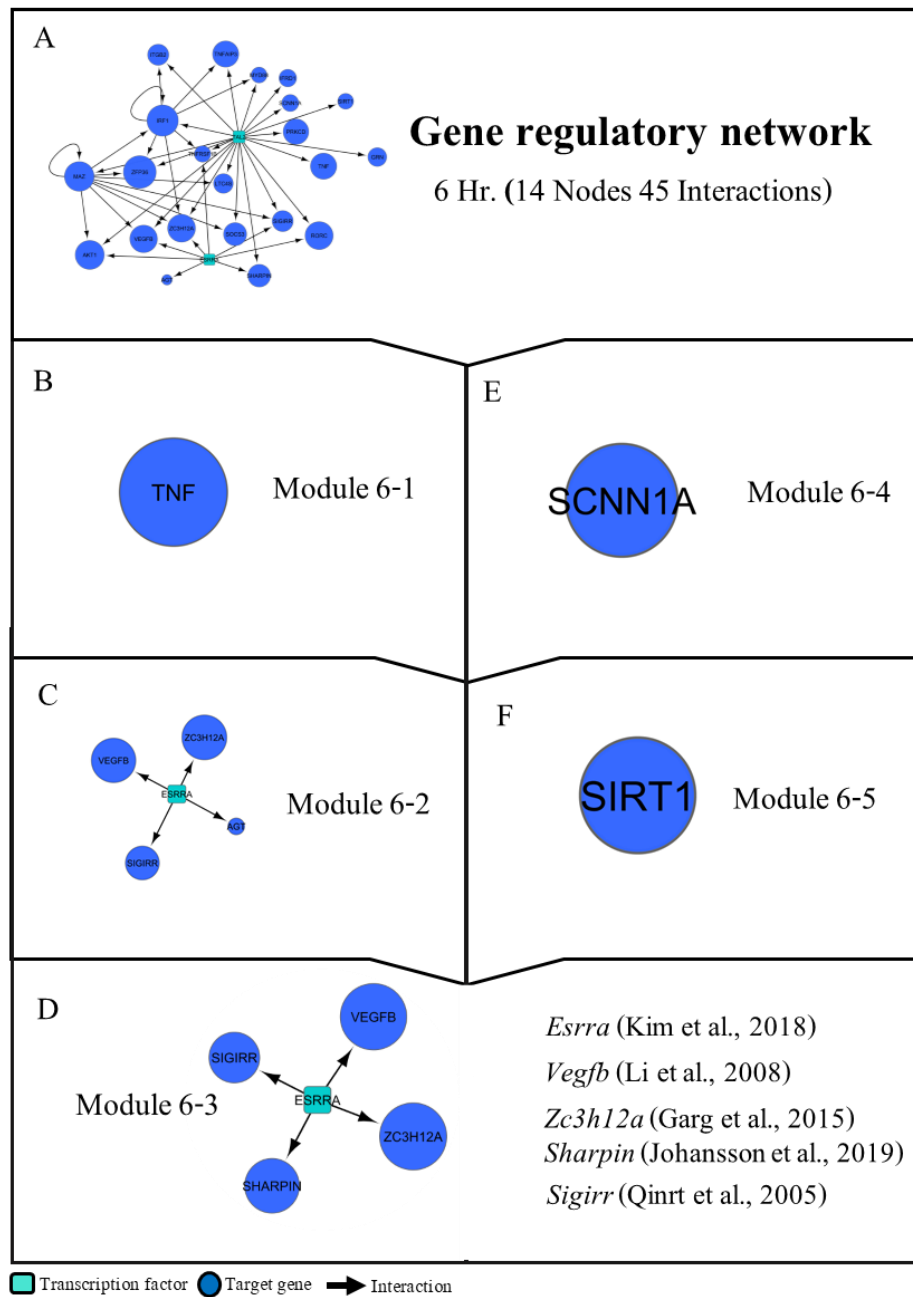
ยีนเป้าหมาย *Il6*, *Myd88* และ *Tnf* ในโมดูล 6-3 *Esrra* เป็นทรานส์สคริปชันแฟกเตอร์มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน *Vegfb*, *Zc3h12a*, *Sharpin* และ *Sigirr* (ภาพที่ 4-5B) โมดูล 8-4 ถูกเลือกมาวิเคราะห์ต่อและเป็นต้นแบบของเครือข่าย GRN ที่ช่วงเวลา 8 ชั่วโมงหลังจากที่มีการกระตุ้นการแสดงออกด้วย LPS จากภาพที่ 4-5C นั้นพบว่า *Cebpa*, *Cebpd*, *Ets1*, *Jun* และ *Runx1* เป็นทรานส์สคริปชันแฟกเตอร์ที่มีผลต่อการแสดงออกของ *Il6*, *Nos3* และ *Tnf* โมดูล 18-2 ถูกเลือกมาเป็นเครือข่ายต้นแบบของการวิเคราะห์ที่ช่วงเวลา 18 ชั่วโมงหลังจากถูกกระตุ้นด้วย LPS จากภาพที่ 4-5D ในโมดูลนี้ *Cebpa*, *Elk1*, *Irf9* นั้นมีผลต่อการแสดงออกของยีน *Myd88*, *Pik3cg*, *Rela*, *Stat3* และ *Tlr4* คำอธิบายเพิ่มเติมเกี่ยวกับรายชื่อที่พบในโมดูลจะแสดงในภาคผนวก ข-2



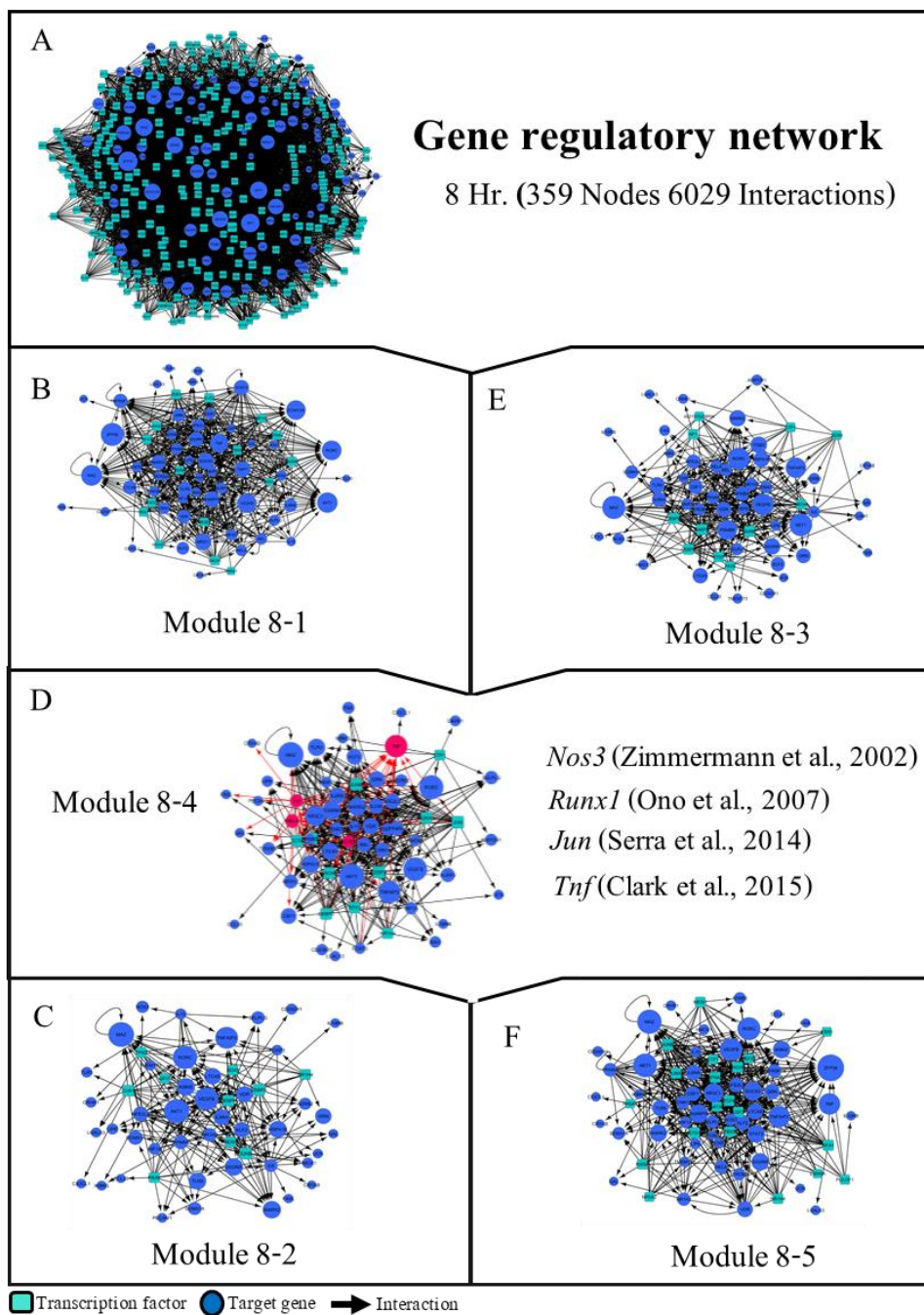
ภาพที่ 4-3 เครือข่าย GRN ที่ถูกกระตุ้นการตอบสนองการแสดงออกด้วย LPS ในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน ภาพที่ 4-3B เครือข่าย GRN ที่มีการตอบสนองในช่วงเวลา 3 ชั่วโมงหลังจากถูกกระตุ้นด้วย LPS เครือข่าย GRN ที่มีการตอบสนองในช่วงเวลา 6 ชั่วโมงหลังจากถูกกระตุ้นด้วย LPS (4-3C) เครือข่าย GRN ที่มีการตอบสนองในช่วงเวลา 8 ชั่วโมงหลังจากถูกกระตุ้นด้วย LPS (4-3D) และเครือข่าย GRN ที่มีการตอบสนองในช่วงเวลา 18 ชั่วโมงหลังจากถูกกระตุ้นด้วย LPS (4-3E)



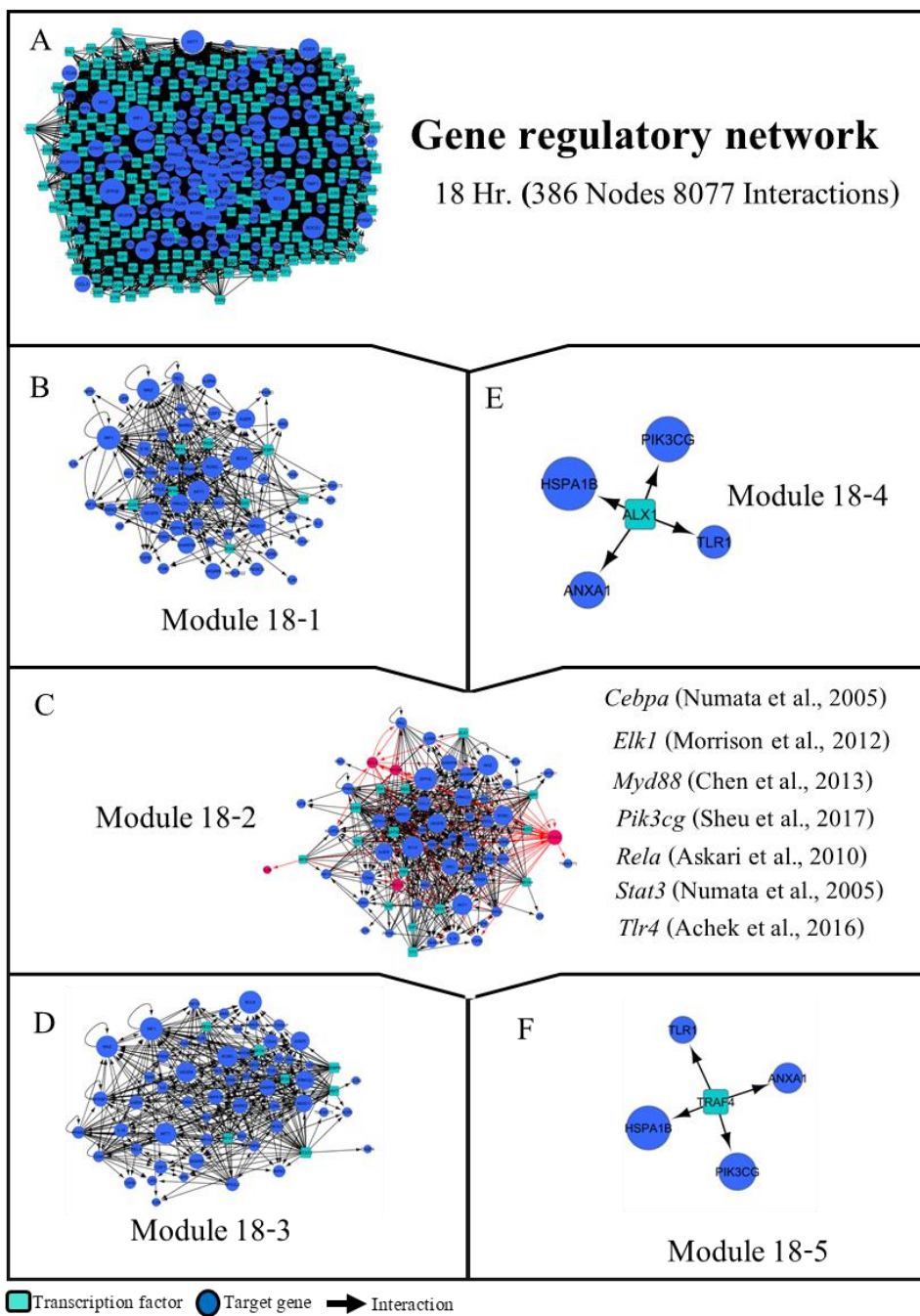
ภาพที่ 4-4 โมดูลย่อยที่ถูกคัดเลือกโดย jActiveModules (Ideker et al., 2002) จากเครือข่าย GRN ที่มี การตอบสนองต่อ LPS



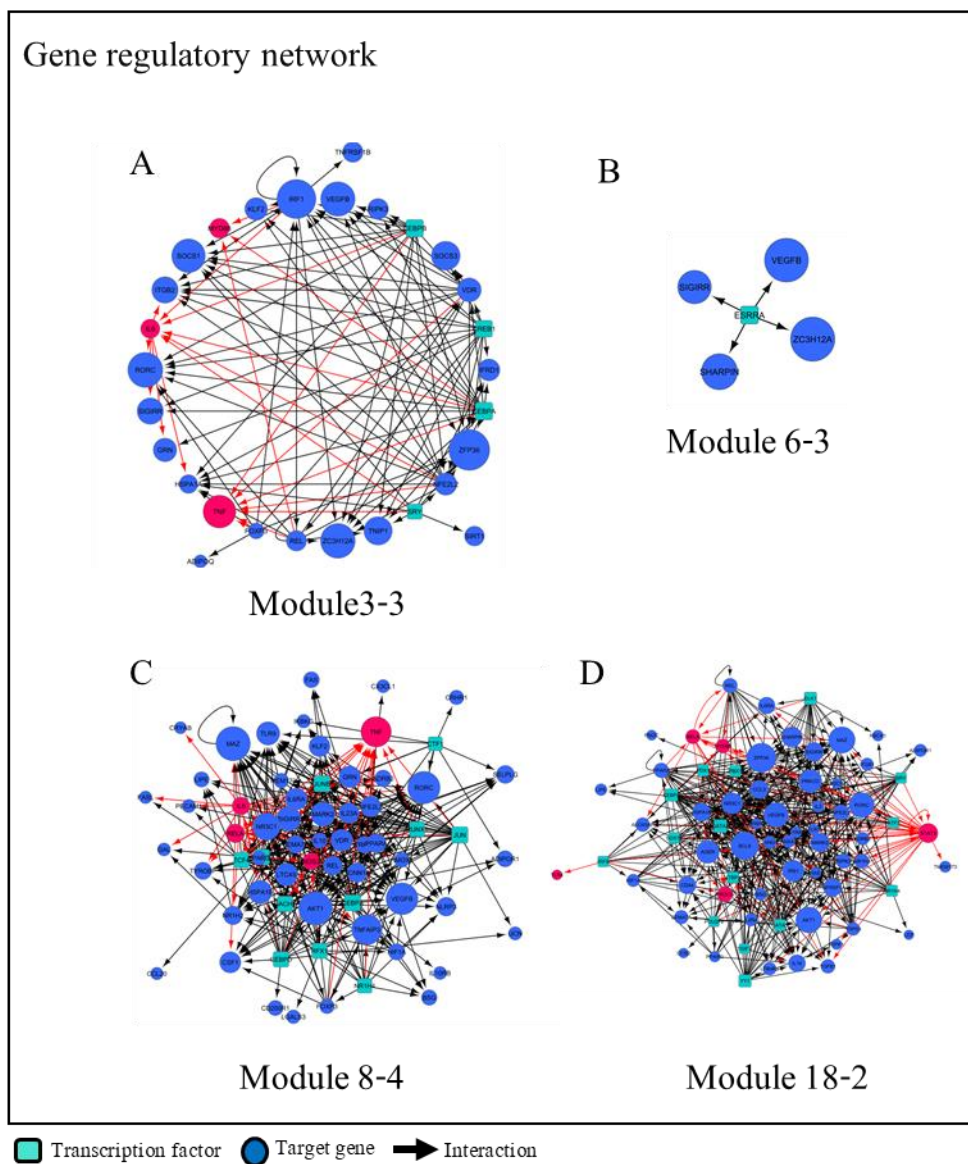
ภาพที่ 4-4 (ต่อ)



ภาพที่ 4-4 (ต่อ)



ภาพที่ 4-4 (ต่อ)



ภาพที่ 4-5 โมดูลที่ 3-3 และ 6-3 เป็นตัวแทนของเครือข่าย GRN ในช่วงเวลาที่ 3 และ 6 ชั่วโมง
 โมดูลที่ 8-4 และ 18-2 เป็นตัวแทนของเครือข่าย GRN ในช่วงเวลาที่ 8 และ 18 ชั่วโมง

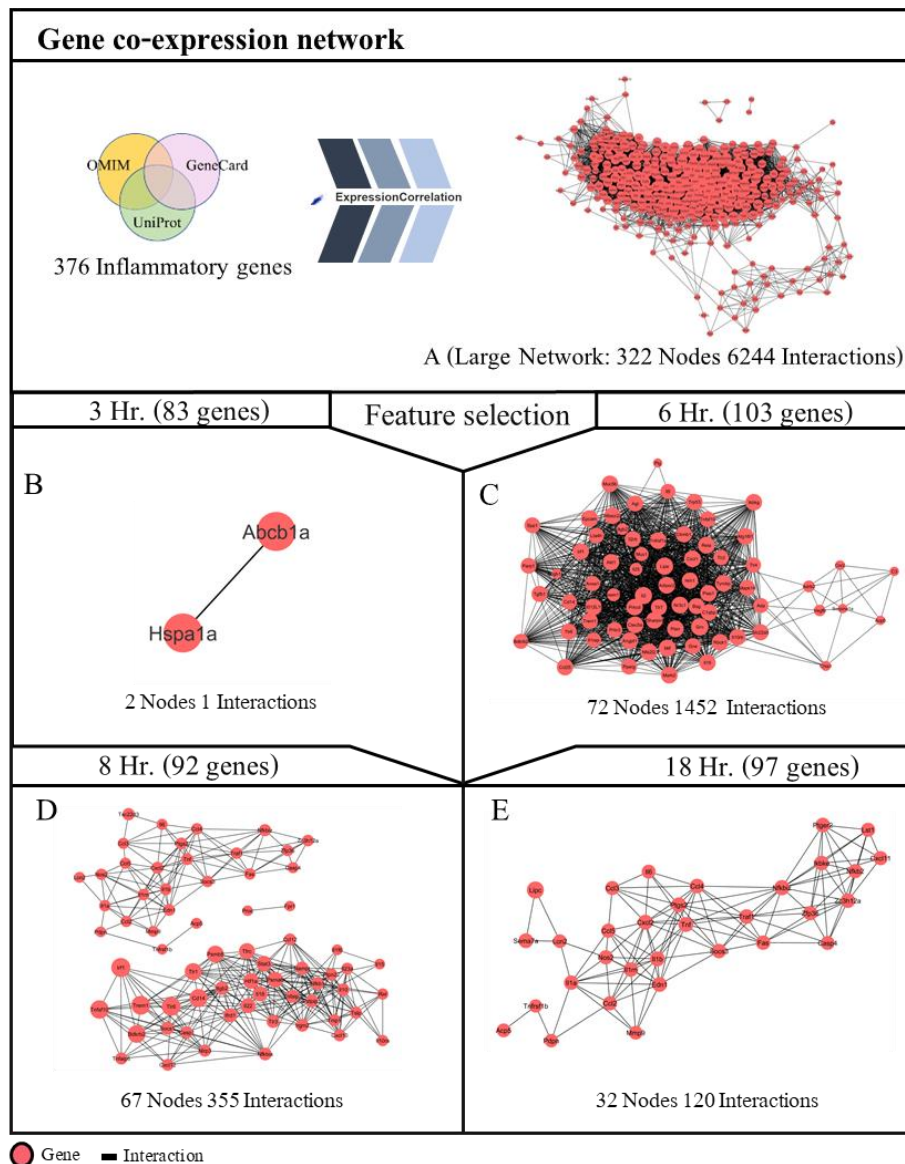
4.5 เครือข่ายปฏิสัมพันธ์การแสดงออกร่วมของยีน (Gene Co-expression network: GCN)

การค้นหาเครือข่าย GCN นั้นจะถูกค้นหาโดยการนำชุดข้อมูลกลุ่มที่ 1 ที่ใช้สำหรับค้นหาเครือข่ายต้นแบบและผ่านการคัดกรองด้วยกลุ่มยีนการอักเสบ พบว่าเครือข่ายแรกที่ได้นั้นมีจำนวนโหนดทั้งหมด 322 โหนด 6244 ปฏิสัมพันธ์ (ภาพที่ 4-6A) เมื่อทำการค้นหาเครือข่ายที่มีการแสดงออกที่เด่นชัดของแต่ละช่วงเวลา โดยการนำยีนจากขั้นตอน Feature selection มาคัดเลือกเครือข่ายย่อยจากเครือข่ายใหญ่พบว่า ที่ช่วงเวลา 3 ชั่วโมงนั้นจำนวนยีนที่ได้จากขั้นตอนของ Feature selection มีทั้งหมด 83 ยีน มาคัดเลือกเครือข่าย GCN พบว่ามีเพียง 2 โหนด และมีปฏิสัมพันธ์เพียง 1 ปฏิสัมพันธ์เท่านั้น ในสถานะต่อมาที่เวลา 6 ชั่วโมงนั้นจำนวนยีนที่ได้จากขั้นตอน Feature selection ทั้งหมด 103 ยีนนำไปคัดเลือกเครือข่าย GCN ทำให้ได้เครือข่าย GCN ที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย LPS มีจำนวนโหนดทั้งหมด 72 โหนด 1452 ปฏิสัมพันธ์ ดังภาพที่ 4-6C ในช่วงเวลาที่ 8 ชั่วโมงจำนวนยีนที่นำมาทำการค้นหาเครือข่ายย่อยนั้นมีทั้งหมด 92 ยีน ซึ่งได้จากขั้นตอน Feature selection มาทำการค้นหาเครือข่ายย่อย ทำให้ได้เครือข่าย GCN ที่ถูกกระตุ้นการแสดงออกด้วย LPS ในสถานะ 8 ชั่วโมงที่มีจำนวนโหนดทั้งหมด 67 โหนด 355 ปฏิสัมพันธ์ ดังภาพที่ 4-6D และที่เวลา 18 ชั่วโมง จำนวนยีนที่ทำการค้นหาจากเครือข่ายใหญ่นั้นมีทั้งหมด 97 ยีนที่ได้จากขั้นตอน Feature selection ทำให้ได้เครือข่าย GCN ที่ถูกกระตุ้นการตอบสนองการแสดงออกของยีนด้วย LPS ที่ช่วงเวลา 18 ชั่วโมงที่มีจำนวนโหนดทั้งหมด 32 โหนด 120 ปฏิสัมพันธ์ ดังภาพที่ 4-6E

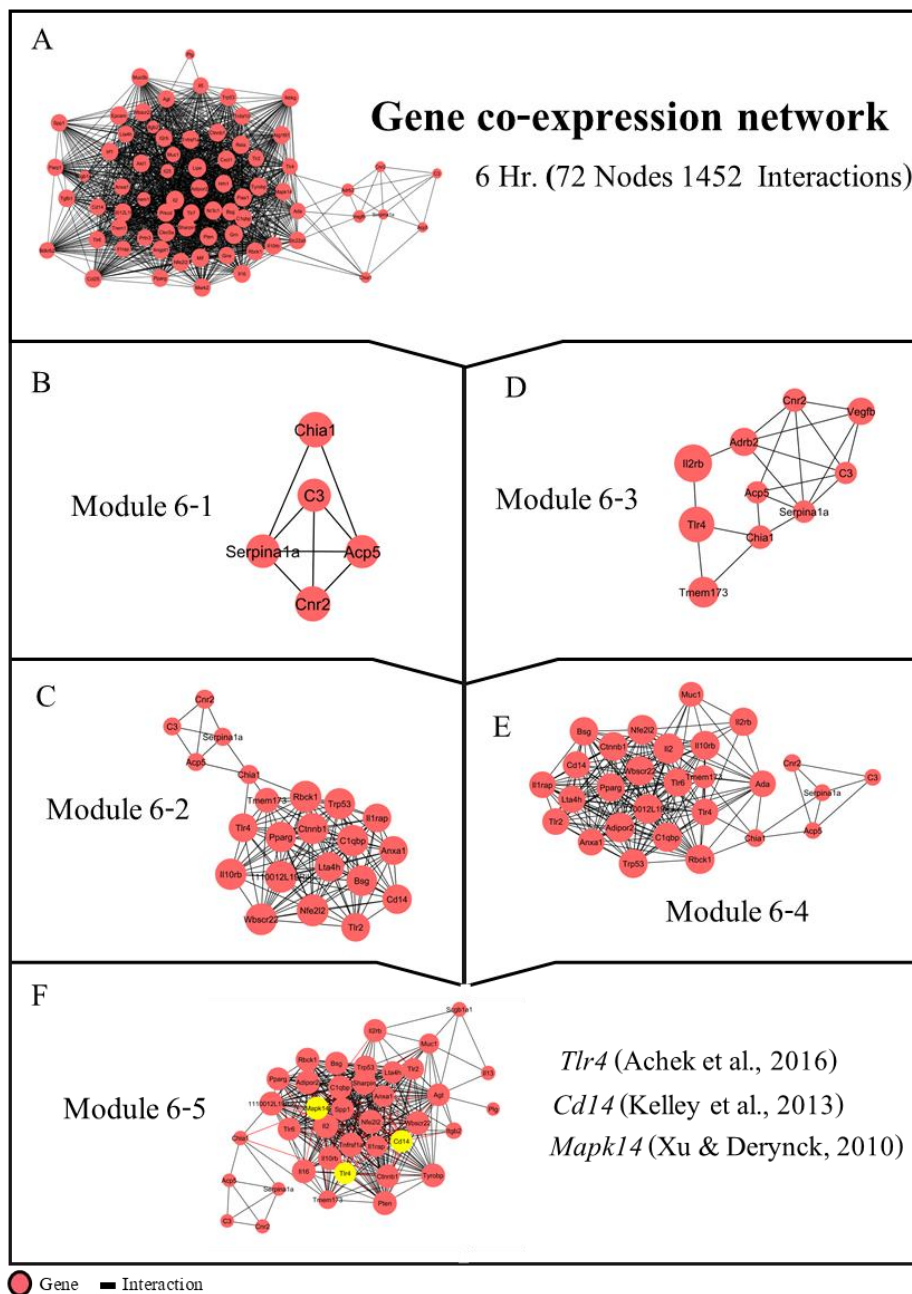
เนื่องจากเครือข่ายที่ได้ในแต่ละช่วงเวลานั้นยังคงมีขนาดใหญ่ยากที่จะวิเคราะห์ ดังนั้นจึงมีการคัดเลือกเครือข่ายย่อยเพื่อเป็นเครือข่ายต้นแบบของแต่ละช่วงเวลาที่มียกระดับการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยสำคัญ โดยการนำโปรแกรม jActiveModules (Ideker et al., 2002) มาช่วยคัดเลือกโมดูลย่อยทำให้ได้โมดูลของแต่ละช่วงเวลามาทั้งหมด 5 โมดูล ยกเว้นในช่วงเวลาที่ 3 ชั่วโมง เนื่องจากมีจำนวนโหนดและปฏิสัมพันธ์น้อย ดังนั้นจะไม่นำมาวิเคราะห์ต่อดังภาพที่ 4-7 และจากตารางภาคผนวก ค-1 นั้นจะเป็นตารางแสดงรายชื่อยีนที่อยู่ภายในโมดูลที่ถูกคัดเลือก ซึ่งโมดูลเหล่านี้จะถูกคัดเลือกมาอย่างละหนึ่งโมดูลเพื่อเป็นเครือข่าย GCN ต้นแบบให้กับแต่ละช่วงเวลาที่ทำการทดสอบการแสดงออกการตอบสนองของยีนการอักเสบ โดยการค้นหาภายในโมดูลจากรายชื่อยีนการอักเสบที่ได้จากวิถีกลไกหลักและมีการรายงานการศึกษามาอย่างต่อเนื่องจะแสดงในภาคผนวก จ

จากภาพที่ 4-8 คือ โมดูลที่ถูกคัดเลือกเพื่อมาเป็นต้นแบบของเครือข่าย GCN ของแต่ละช่วงเวลา และคำอธิบายเพิ่มเติมเกี่ยวกับยีนที่พบภายในโมดูลจะแสดงในภาคผนวก ค-2 ในช่วงเวลา

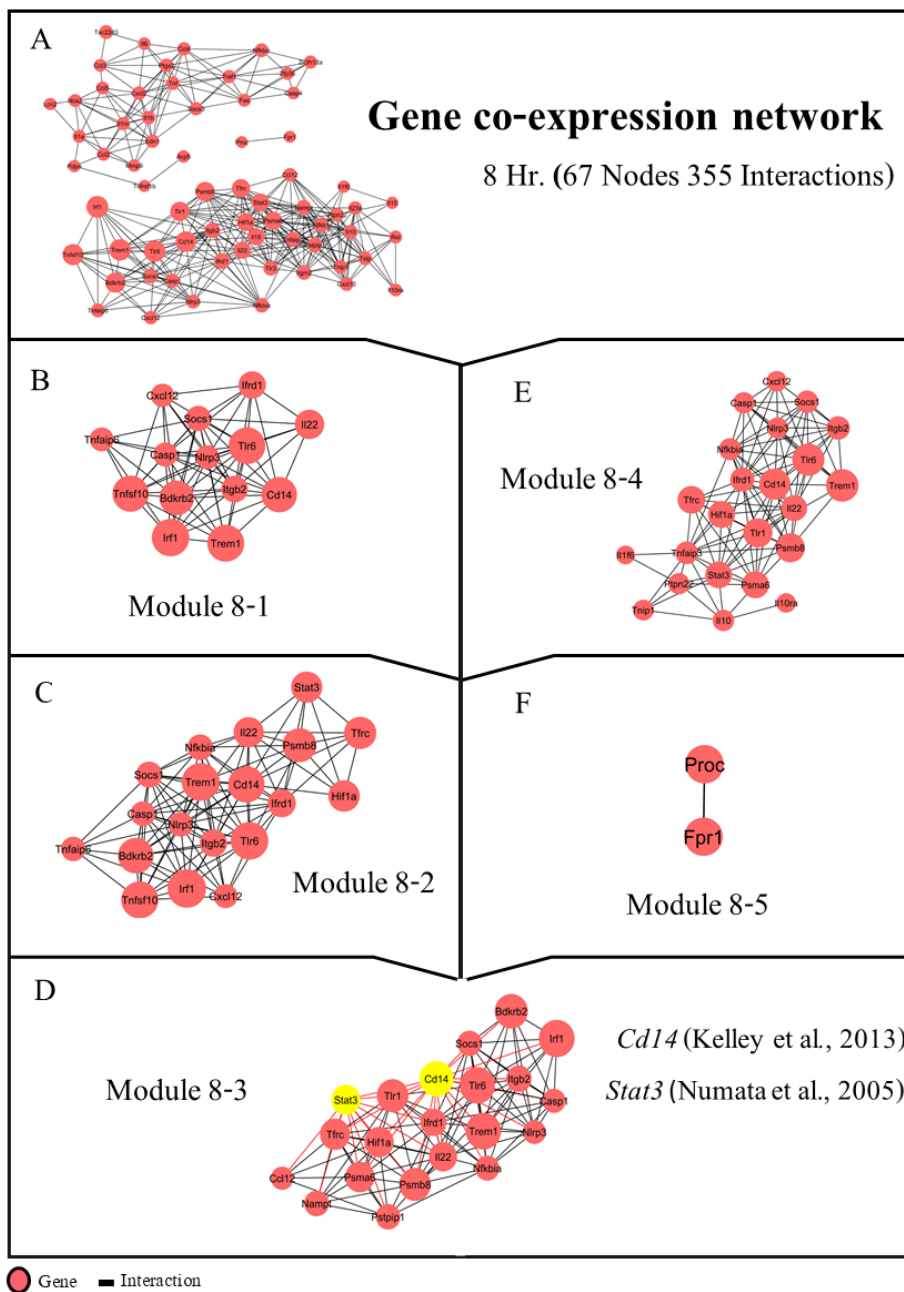
ที่ 3 ชั่วโมง จำนวนโหนดมีเพียง 2 โหนดหลังจากที่ทำการค้นหาเครือข่ายย่อยจากขั้นตอน Feature selection ทำให้พบเพียง 2 โหนด 1 ปฏิสัมพันธ์เท่านั้นจึงไม่นำวิเคราะห์ต่อดังภาพที่ 4-8A โมดูลที่ 6-5 ดังภาพที่ 4-8B เป็นเครือข่าย GCN ต้นแบบในช่วงเวลาที่ 6 ชั่วโมงหลังจากที่มีการกระตุ้นด้วย LPS จะมีตัวยีนหลักที่มีระดับการแสดงออกของยีนที่เปลี่ยนแปลงอย่างเด่นชัด คือ *Tlr4*, *Cd14* และ *Mapk14* และมีผลต่อการแสดงออกต่อโหนดอื่น โมดูล 8-3 เป็นเครือข่าย GCN ต้นแบบที่เวลา 8 ชั่วโมงหลังจากที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS (ภาพที่ 4-8C) พบว่าที่เวลา 8 ชั่วโมงหลังจากที่มีการกระตุ้นด้วย LPS นั้น มี *Cd14* และ *Stat3* ที่มีระดับการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างเด่นชัดและยังมีผลต่อการแสดงออกของยีนอื่นด้วย ที่สภาวะ 18 ชั่วโมงหลังจากที่มีการกระตุ้นการแสดงออกด้วย LPS โมดูลที่ 18-2 เป็นเครือข่าย GCN ต้นแบบที่ช่วงเวลา 18 ชั่วโมงและพบว่าในโมดูลนี้ *Tnf*, *Ptger2* และ *Ptgs2* มีการแสดงออกที่เด่นชัด



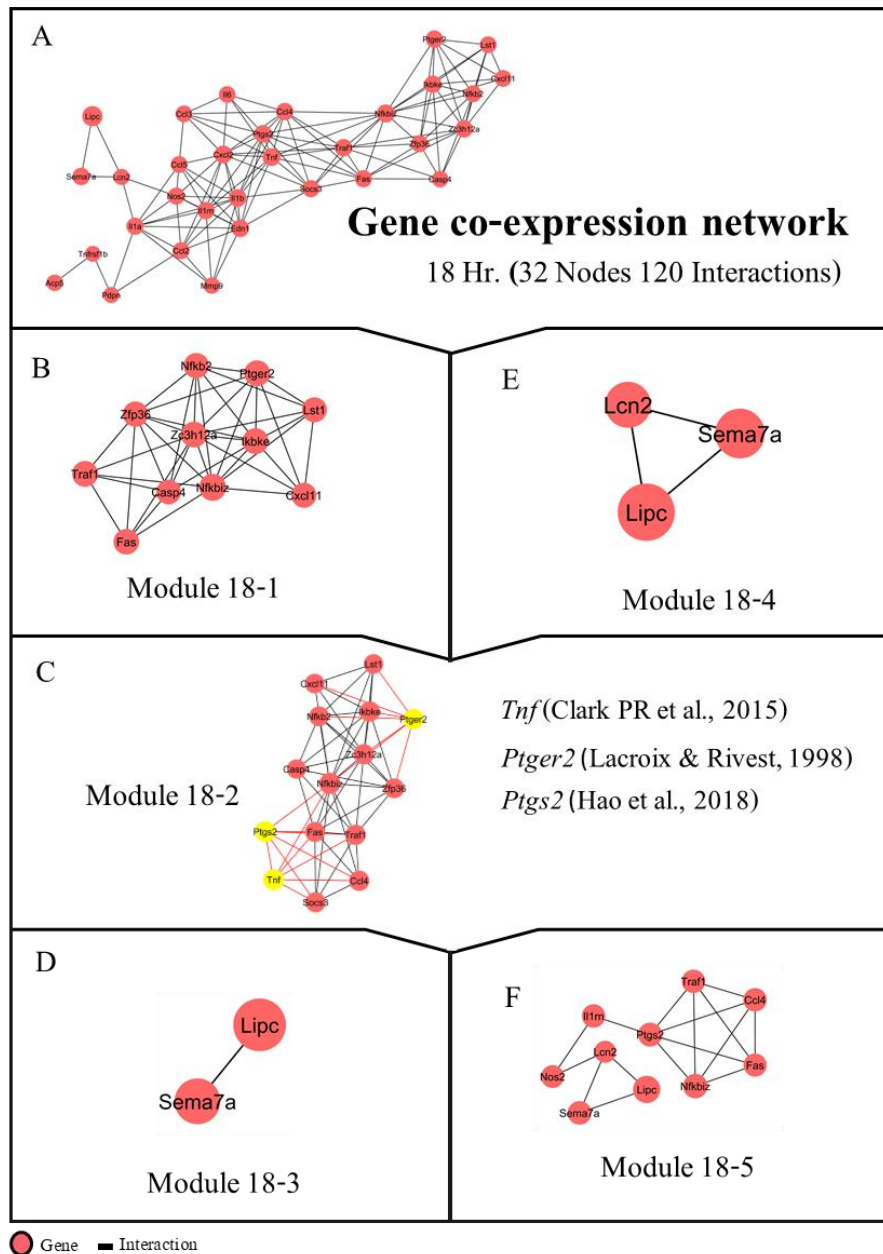
ภาพที่ 4-6 เครือข่าย GCN ที่ถูกกระตุ้นการตอบสนองการแสดงออกด้วย LPS ในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน ภาพที่ 4-6B เครือข่าย GCN ที่มีการตอบสนองในช่วงเวลา 3 ชั่วโมงหลังจากถูกกระตุ้นด้วย LPS เครือข่าย GCN ที่มีการตอบสนองในช่วงเวลา 6 ชั่วโมงหลังจากถูกกระตุ้นด้วย LPS (4-6C) เครือข่าย GCN ที่มีการตอบสนองในช่วงเวลา 8 ชั่วโมงหลังจากถูกกระตุ้นด้วย LPS (4-6D) และเครือข่าย GCN ที่มีการตอบสนองในช่วงเวลา 18 ชั่วโมงหลังจากถูกกระตุ้นด้วย LPS (4-6E)



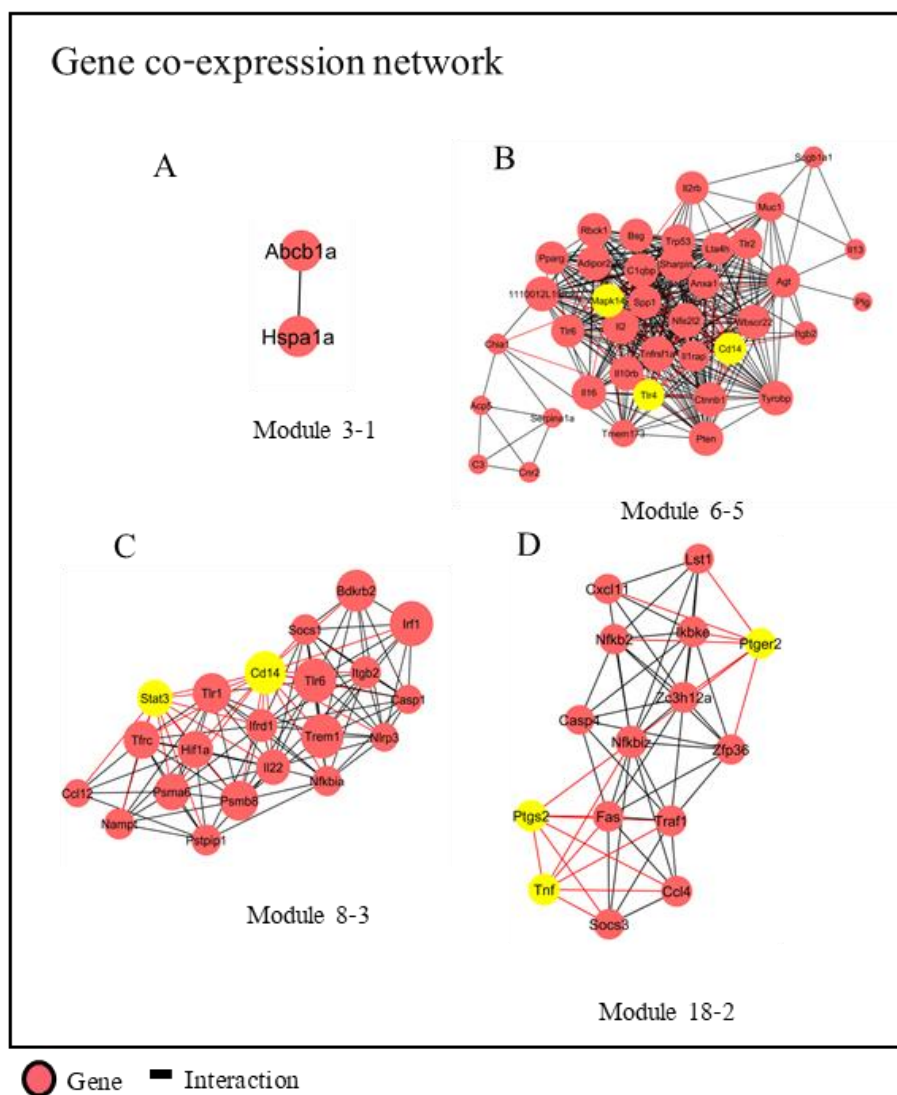
ภาพที่ 4-7 โมดูลย่อยที่ถูกคัดเลือกโดย jActiveModules (Ideker et al., 2002) จากเครือข่าย GCN ที่มี การตอบสนองต่อ LPS



ภาพที่ 4-7 (ต่อ)



ภาพที่ 4-7 (ต่อ)



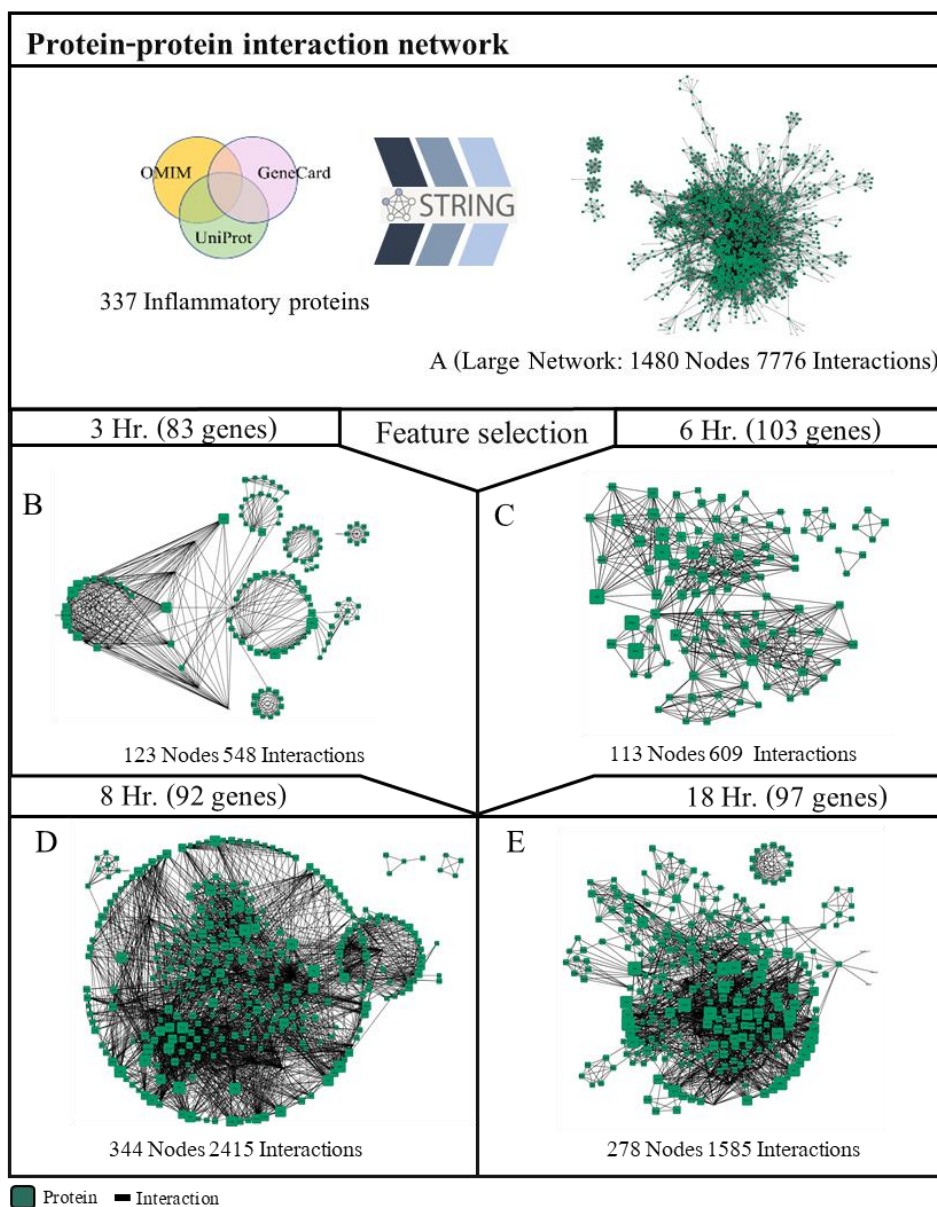
ภาพที่ 4-8 โมดูลที่ 3-1 และ 6-5 เป็นตัวแทนของเครือข่าย GCN ในช่วงเวลาที่ 3 และ 6 ชั่วโมง
 โมดูลที่ 8-3 และ 18-2 เป็นตัวแทนของเครือข่าย GCN ในช่วงเวลาที่ 8 และ 18 ชั่วโมง

4.6 เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน (Protein-protein interaction networks: PPIN)

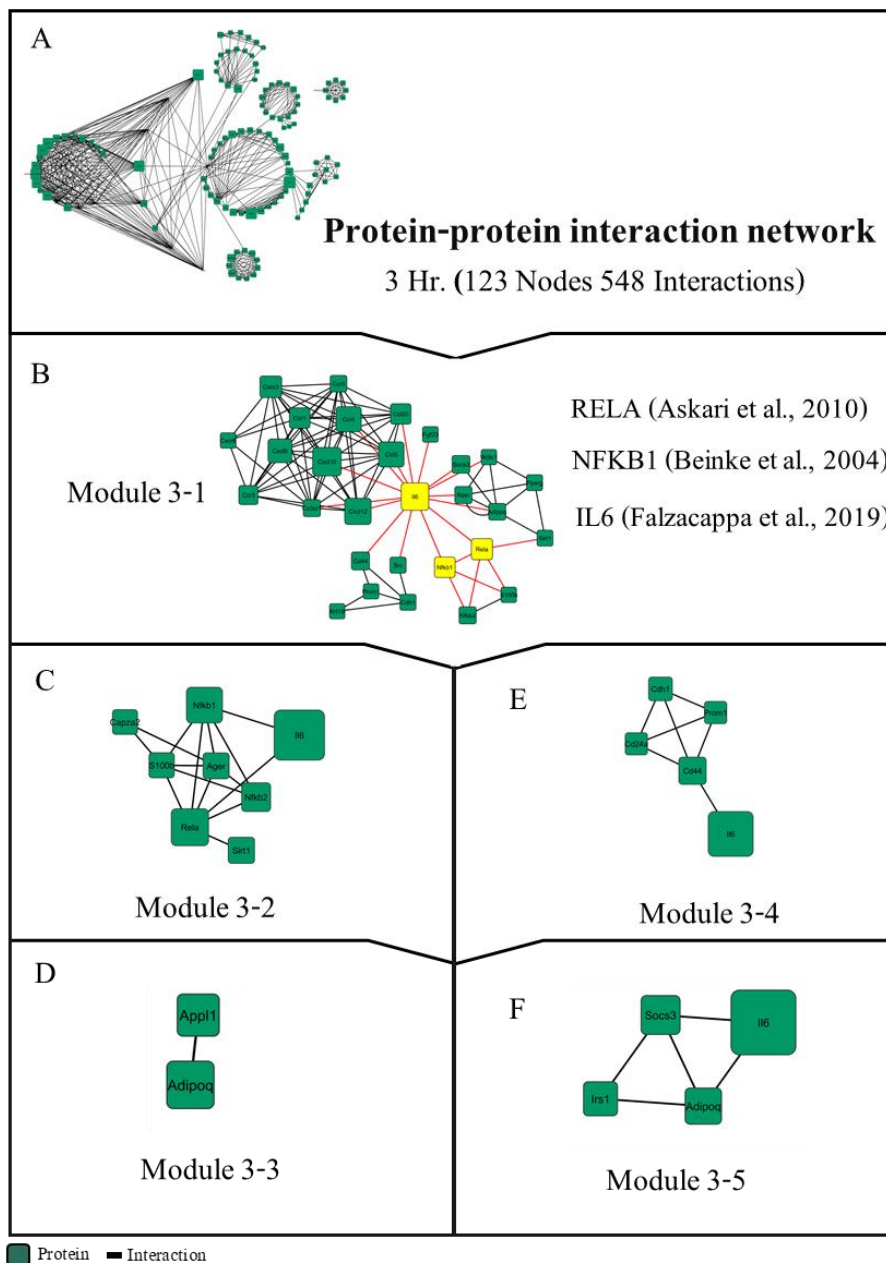
เครือข่าย PPIN ถูกสร้างขึ้นโดยการสืบค้นข้อมูลโปรตีนการอักเสบจากฐานข้อมูล STRING (Szklarczyk et al., 2018) ตารางที่ 4-2 พบว่ามีจำนวนโปรตีน 337 ชนิด ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบร่วมกับการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Cytoscape (Shannon et al., 2003) เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนเครือข่ายแรก พบว่ามีจำนวนของโหนดภายในเครือข่ายทั้งหมดมี 1480 โหนด 7776 ปฏิสัมพันธ์ (ภาพที่ 4-9A) และต้องการที่จะทราบถึงโปรตีนที่มีการแสดงออกในช่วงเวลาต่าง ๆ เมื่ออยู่ในสถานะที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS จึงมีการนำกลุ่มยีนที่ได้จากขั้นตอน Feature selection มาทำการค้นหาเครือข่ายย่อยเพื่อให้ได้เครือข่ายที่มีการแสดงออกการตอบสนองการอักเสบตามช่วงเวลา ซึ่งช่วงเวลาที่ทำการค้นหาทั้งหมด 4 ช่วงเวลา คือ 3, 6, 8 และ 18 ชั่วโมง ที่สถานะ 3 ชั่วโมง จำนวนโปรตีนที่ทำการค้นหาคือ 83 ชนิด จากขั้นตอนการคัดเลือก Feature selection ทำให้ได้เครือข่าย PPIN ที่มีจำนวนโหนดทั้งหมด 123 โหนด 548 ปฏิสัมพันธ์ที่ช่วงเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากการกระตุ้นการแสดงออกด้วย LPS (ภาพที่ 4-9B) ในช่วงเวลาที่ 6 ชั่วโมง จำนวนโปรตีนที่ทำการค้นหาทั้งหมด 103 ชนิด ที่ได้จากขั้นตอน Feature selection ทำให้ได้เครือข่าย PPIN ที่มีขนาด 113 โหนด 609 ปฏิสัมพันธ์ (ภาพที่ 4-9C) ในช่วงเวลาที่ 8 ชั่วโมงหลังจากที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ทำให้มีการแสดงออกของโปรตีนทั้ง 92 ชนิด ที่ได้จากขั้นตอน Feature selection ทำการค้นหาเครือข่ายย่อย ทำให้ได้เครือข่าย PPIN ที่มีขนาด 344 โหนด 2415 ปฏิสัมพันธ์ (ภาพที่ 4-9D) และที่เวลา 18 ชั่วโมง หลังจากทำการกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีนด้วย LPS แล้วนั้นจำนวนโปรตีนที่ทำการค้นหาทั้งหมด 97 ชนิด จากขั้นตอน Feature selection ที่ 18 ชั่วโมง ทำให้ได้เครือข่าย PPIN ที่มีการตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย LPS ที่สถานะ 18 ชั่วโมงมีจำนวนโหนดทั้งหมด 278 โหนด 1585 ปฏิสัมพันธ์ ดังภาพที่ 4-9E

เมื่อได้เครือข่ายของแต่ละช่วงเวลาแล้วจึงทำการคัดเลือกโมดูลย่อยที่มีการแสดงออกอย่างมีนัยสำคัญโดยแอปพลิเคชัน jActiveModules (Ideker et al., 2002) ทำให้ได้โมดูลทั้งหมด 5 โมดูลของแต่ละช่วงเวลาดังภาพที่ 4-10 และรายชื่อโปรตีนภายในโมดูลจะแสดงในตารางภาคผนวก ง-1 โมดูลของแต่ละสถานะจะถูกคัดเลือกมาเพียงหนึ่งโมดูลของแต่ละช่วงเวลาเพื่อมาเป็นเครือข่าย PPIN ต้นแบบสำหรับการวิเคราะห์ต่อไป โดยหลักการการคัดเลือกจะอิงรายชื่อโปรตีนจากวิถีกลไกการตอบสนองการอักเสบหลักและมีการรายงานกันอย่างต่อเนื่อง (ตารางภาคผนวก จ) เพื่อเป็นตัวแทนในการอธิบายกลไกการตอบสนองการอักเสบ โดยอธิบายจากความความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน โมดูลที่ 3-1 เป็นเครือข่าย PPIN ต้นแบบที่ช่วงเวลาที่ 3 ชั่วโมง พบว่า RELA NFKB1 IL6 ในเครือข่าย PPIN มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นมากกว่าโหนดอื่นและมี

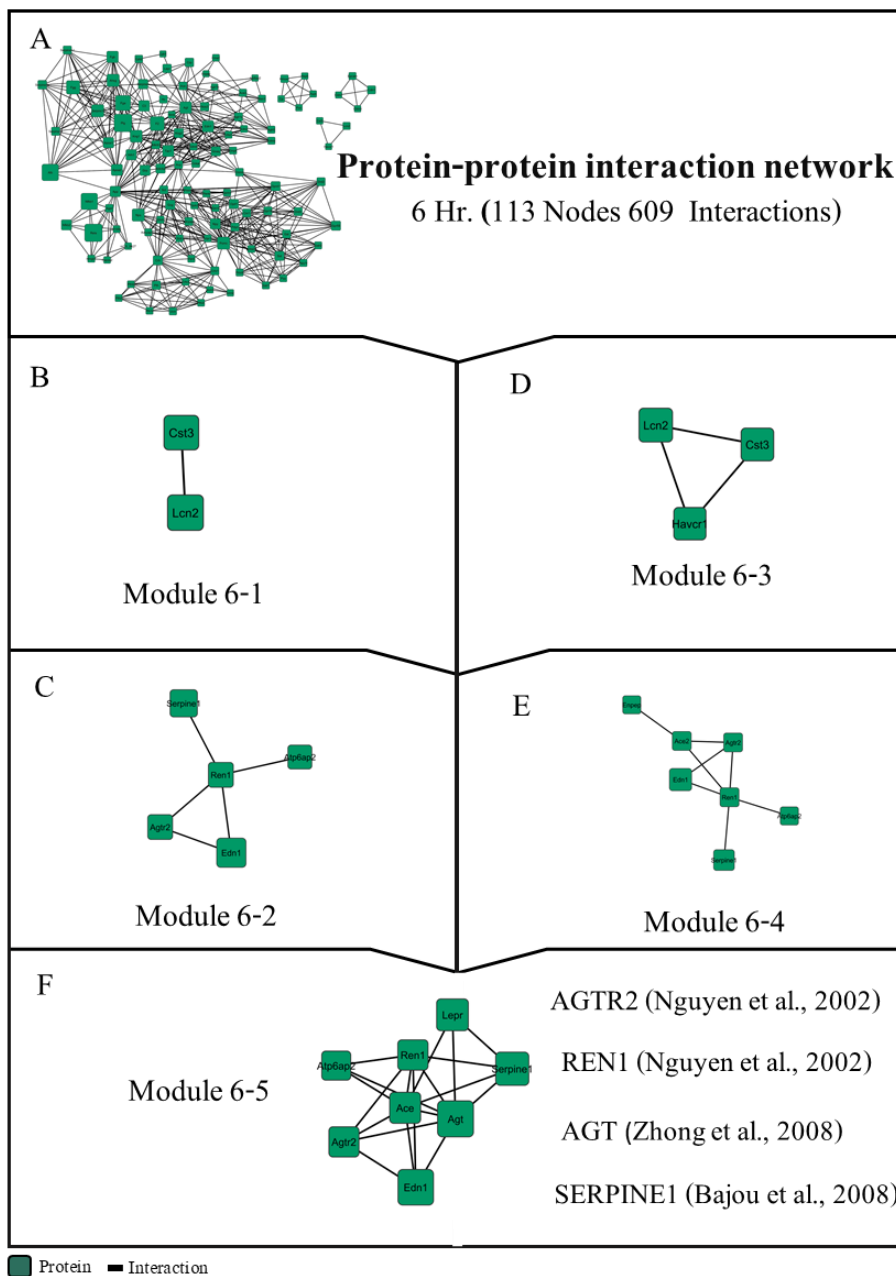
ปฏิสัมพันธ์กัน IL6 ยังเป็นตัวกลางที่เชื่อมต่อไปยังโปรตีนฮับกลุ่มอื่นภายในโมดูลนั้น โมดูล 6-5 (4-11B) เป็นเครือข่าย PPIN ต้นแบบในเวลา 6 ชั่วโมงหลังจากที่มีการกระตุ้นด้วย LPS ขนาดของ โหนดภายในเครือข่ายใกล้เคียงกัน พบว่ามี AGTR2, ACE และ REN1 เป็นสมาชิกของโมดูล 6-5 เมื่อทำการค้นหาข้อมูลพบว่า โปรตีนเหล่านี้ทำหน้าที่เกี่ยวกับการแข็งตัวของเลือด โมดูลที่ 8-2 (ภาพที่ 4-11C) เป็นเครือข่าย PPIN ต้นแบบที่ช่วงเวลา 8 ชั่วโมงหลังจากที่มีการกระตุ้นการ แสดงออกด้วย LPS พบว่าขนาดของโหนด IL6 มีขนาดใหญ่ เช่นเดียวกับที่เวลา 3 ชั่วโมง และยัง พบอีกว่า IL6 มีปฏิสัมพันธ์โดยตรงกับ TLR4 MAPK3 IFNG และเชื่อมต่อไปยังโหนดฮับตัวอื่นใน โมดูลย่อยของเครือข่าย PPIN โมดูล 18-3 เป็นเครือข่าย PPIN ต้นแบบของช่วงเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากถูกกระตุ้นการแสดงผลออกด้วย LPS ใน โมดูลพบว่ามีโปรตีน IKBKB, RELA, MAPK14, TLR4, STAT3, MAPK3, IL1A และ MYD88 มีปฏิสัมพันธ์กัน ข้อมูลการอธิบายเพิ่มเติมเกี่ยวกับ รายชื่อสมาชิกโปรตีนที่พบภายใน โมดูลจะแสดงในภาคผนวก ง-2



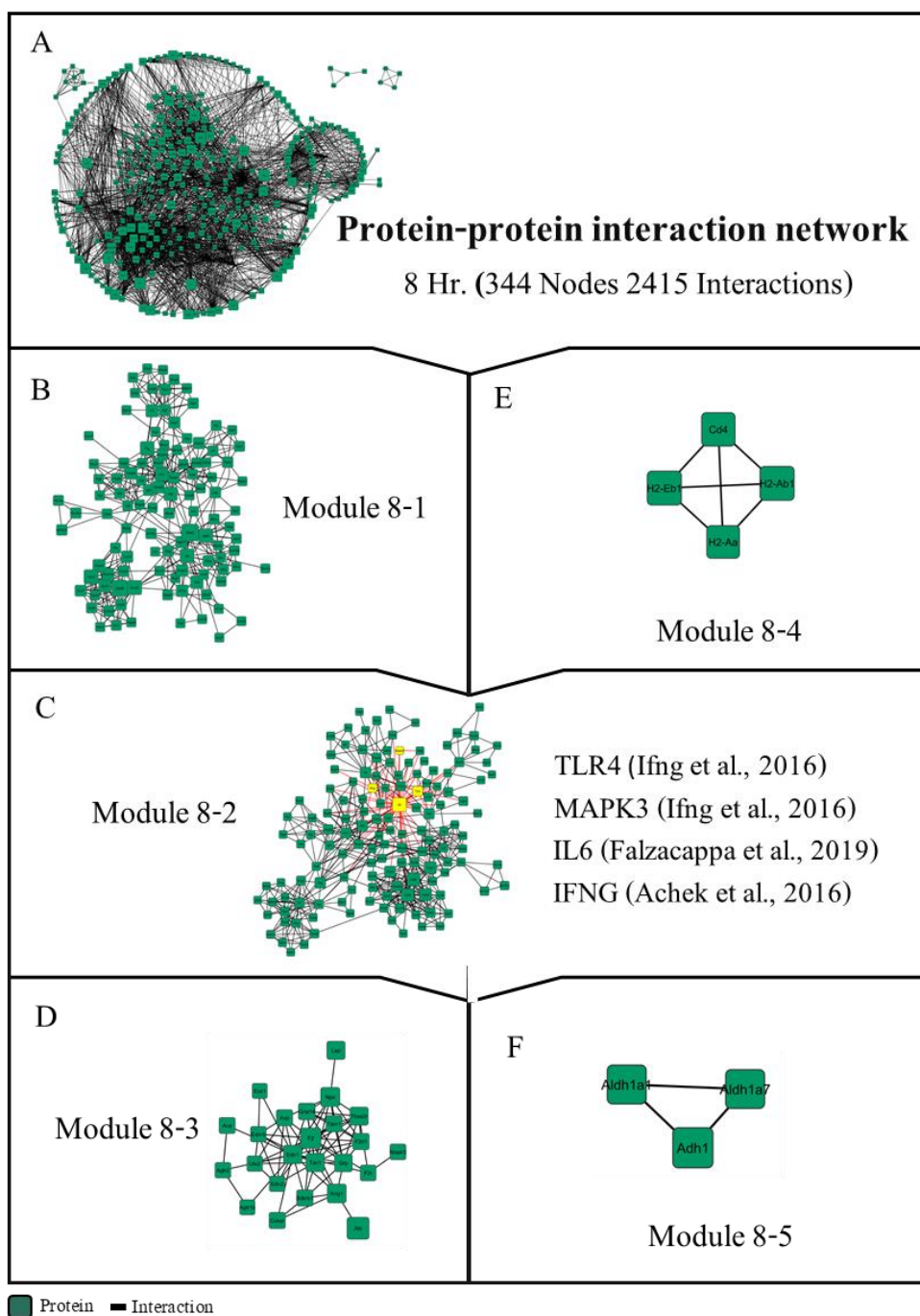
ภาพที่ 4-9 เครือข่าย PPIN ที่ถูกกระตุ้นการตอบสนองการแสดงออกด้วย LPS ในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน ภาพที่ 4-9B เครือข่าย PPIN ที่มีการตอบสนองในช่วงเวลา 3 ชั่วโมงหลังจากถูกกระตุ้นด้วย LPS เครือข่าย PPIN ที่มีการตอบสนองในช่วงเวลา 6 ชั่วโมงหลังจากถูกกระตุ้นด้วย LPS (4-9C) เครือข่าย PPIN ที่มีการตอบสนองในช่วงเวลา 8 ชั่วโมงหลังจากถูกกระตุ้นด้วย LPS (4-9D) และเครือข่าย GCN ที่มีการตอบสนองในช่วงเวลา 18 ชั่วโมงหลังจากถูกกระตุ้นด้วย LPS (4-9E)



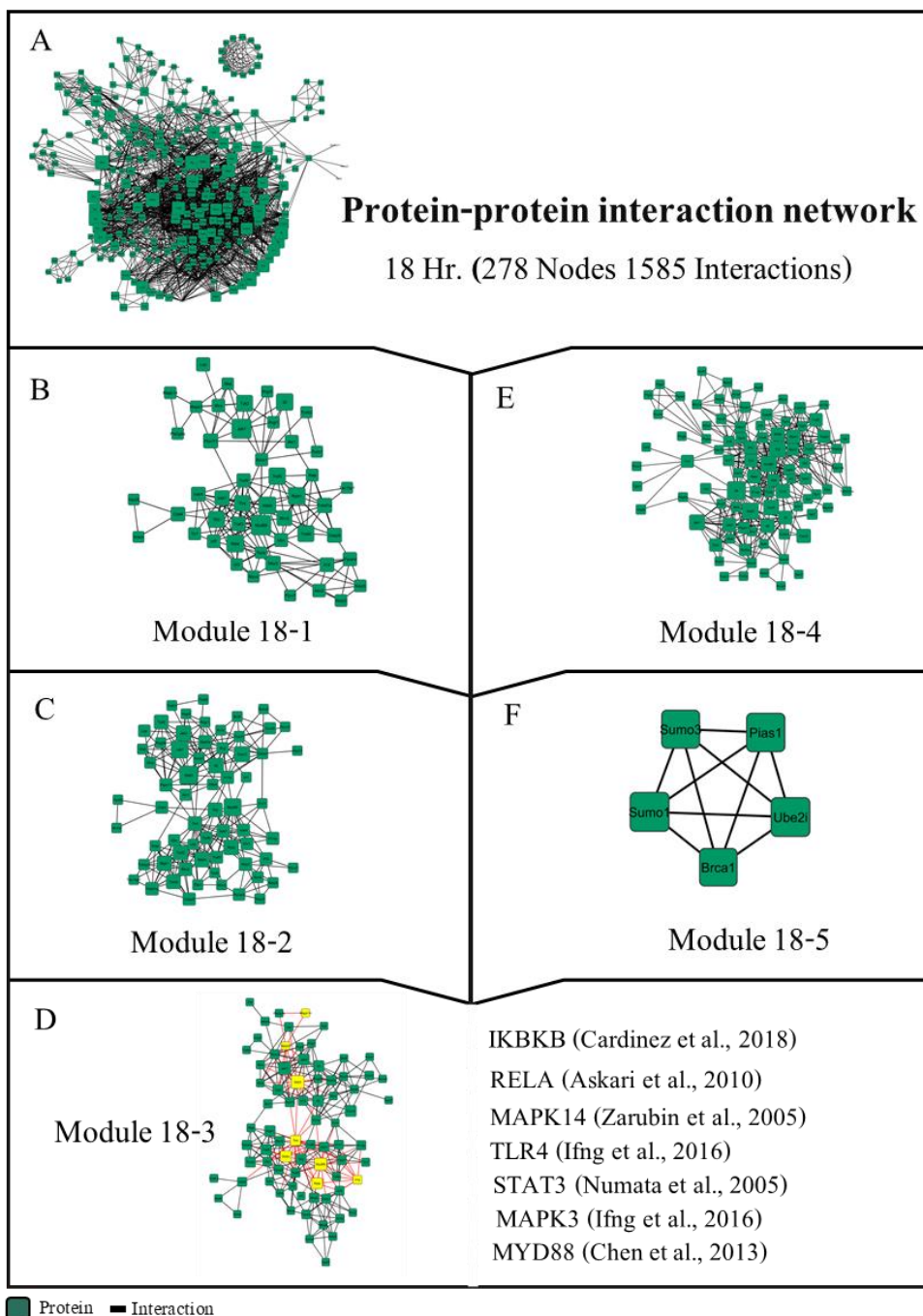
ภาพที่ 4-10 โมดูลย่อยที่ถูกคัดเลือกโดย jActiveModules (Ideker et al., 2002) จากเครือข่าย PPIN ที่มีการตอบสนองต่อ LPS



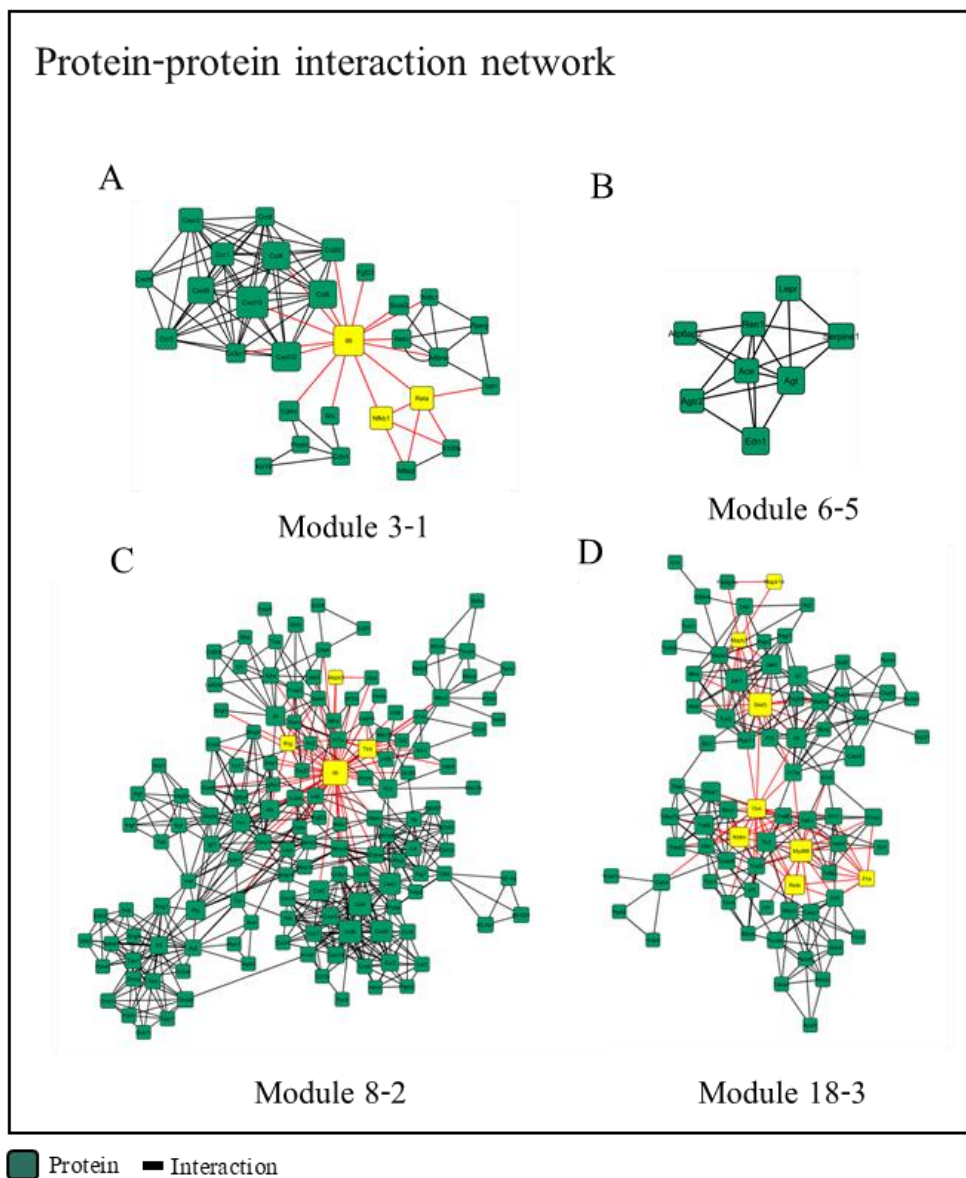
ภาพที่ 4-10 (ต่อ)



ภาพที่ 4-10 (ต่อ)



ภาพที่ 4-10 (ต่อ)



ภาพที่ 4-11 โมดูลที่ 3-1 และ 6-5 เป็นตัวแทนของเครือข่าย PPIN ในช่วงเวลาที่ 3 และ 6 ชั่วโมง
 โมดูลที่ 8-2 และ 18-3 เป็นตัวแทนของเครือข่าย PPIN ในช่วงเวลาที่ 8 และ 18 ชั่วโมง

4.7 การทดสอบฤทธิ์การต้านการแสดงออกของสารออกฤทธิ์ร่วมกับเครือข่ายต้นแบบ

4.7.1 สารออกฤทธิ์ 4CS จากสมุนไพร *Hypericum perforatum* ของชุดข้อมูล GSE21841 เมื่อนำชุดข้อมูล GSE21841 (4-Component-system ที่มีการทำงานร่วมกันในการต้านการอักเสบ) ที่ถูกทำการทดสอบฤทธิ์การต้านการอักเสบจากสารออกฤทธิ์ 4CS จากสมุนไพร *Hypericum perforatum* มาทำการวิเคราะห์ร่วมกับเครือข่ายต้นแบบที่ได้จากเครือข่ายทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ เครือข่าย GRN เครือข่าย GCN และเครือข่าย PPIN และคัดเลือกยีนที่อยู่ในเครือข่ายเพื่อเป็นตัวแทนในการอธิบายการแสดงออกของยีนที่เปลี่ยนแปลงไป โดยการนำรายชื่อยีนที่มีการศึกษามาอย่างต่อเนื่องและพบในวิถีกลไกหลักของการตอบสนองการอักเสบ (ภาคผนวก จ) พบว่า เครือข่าย GRN พบว่า *Tnf*, *Junb*, *Rel* และ *Cryab* มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS ที่ช่วงเวลา 8 ชั่วโมง และเมื่อทดสอบฤทธิ์การต้านการแสดงออกของยีนการอักเสบด้วยสารออกฤทธิ์ 4CS พบว่าระดับการแสดงออกของ *Tnf* ยังคงมีการแสดงออกเพิ่มขึ้น ระดับการแสดงออกของ *Cryab* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และไม่พบการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ *Junb* และ *Rel* ในเครือข่าย GCN ต้นแบบที่ช่วงเวลา 8 ชั่วโมงที่ถูกกระตุ้นการแสดงออกด้วย LPS พบว่าระดับการแสดงออกของ *Socs1*, *Bdkrb2*, *Nfkbia*, *Trem1* และ *Nampt* เพิ่มขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS และเมื่อทดสอบกับสารออกฤทธิ์ 4CS พบว่าระดับการแสดงออกของ *Bdkrb2*, *Trem1* และ *Nampt* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ แต่ระดับการแสดงออกของ *Nfkbia* ยังคงเพิ่มขึ้น และ *Socs1* ไม่พบการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกเมื่อถูกทดสอบด้วยสารออกฤทธิ์ 4CS เมื่อทดสอบสารออกฤทธิ์ 4CS กับเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ที่ไม่ถูกกระตุ้นการแสดงออกด้วย LPS พบว่าไม่พบการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ *Socs1*, *Bdkrb2*, *Nfkbia*, *Trem1* และ *Nampt* และเครือข่าย PPIN พบว่า CTSS, ANXA1, TSLP, MMP9, TLR2, NLRP3, EDNRB, CCL5, CCL4, CD44 และ TIMP1 มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS และเมื่อทดสอบฤทธิ์การต้านการแสดงออกของ 4CS ไม่พบการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีน แต่ระดับการแสดงออกของ IL6RA, TLR2 และ IL5RA เพิ่มขึ้นเมื่อถูกทดสอบด้วยสารออกฤทธิ์ 4CS

4.7.2 สารออกฤทธิ์ที่ได้จากรากของต้น โปต้นจากชุดข้อมูล GSE9632

จากชุดข้อมูล GSE9632 ที่ทำการศึกษาฤทธิ์การต้านการแสดงออกของยีนการอักเสบจากสารออกฤทธิ์ทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ Albiflorin, Paeoniflorin และ Paeonol จากรากของต้น โปต้น (Paeony) ในปริมาณ 1, 10 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ที่ถูกทดสอบที่ช่วงเวลา 6 ชั่วโมง วิเคราะห์ร่วมกับเครือข่าย GRN พบว่าชุดข้อมูลนี้ไม่ตรงกับกลุ่มยีนเป้าหมายและทรานส์สคริปชันแฟกเตอร์

ภายในเครือข่าย GRN ต้นแบบที่ช่วงเวลา 6 ชั่วโมง จึงทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ข้อมูลการยับยั้งการแสดงออกของสารออกฤทธิ์ได้

4.7.2.1 สารออกฤทธิ์ Albiflorin กับการวิเคราะห์ร่วมกับเครือข่ายต้นแบบ

ในเครือข่าย GCN พบว่า *Tlr2*, *Anxa1*, *Itgb2*, *Cd14* และ *Tnfrsf1a* มีระดับการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อถูกกระตุ้นการแสดงออกด้วย LPS และเมื่อทำการทดสอบกับสารออกฤทธิ์ Albiflorin ในปริมาณ 1, 10 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าระดับการแสดงออกของ *Tlr2*, *Anxa1*, *Itgb2*, *Cd14* และ *Tnfrsf1a* ไม่มีการเปลี่ยนแปลง แต่ *Il2* มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อถูกทดสอบด้วยสารออกฤทธิ์ Albiflorin ในปริมาณ 1 $\mu\text{g/ml}$ ในขณะที่ *Il2* เมื่อถูกกระตุ้นการแสดงออกด้วย LPS ไม่พบการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนที่ระดับนัยสำคัญ เครือข่าย PPIN พบว่า SERPINE1, EDN1 และ AGTR2 มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้น แต่ ATP6AP2 มีการแสดงออกลดลงหลังจากที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และเมื่อทำการทดสอบสารออกฤทธิ์ Albiflorin หลังจากที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS พบว่า EDN1 มีระดับการแสดงออกลดลงอย่างมีนัยสำคัญด้วยสารออกฤทธิ์ Albiflorin ที่ปริมาณ 100 $\mu\text{g/ml}$ ในขณะที่ SERPINE1, ATP6AP2 และ AGTR2 ไม่พบการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกที่ถูกทดสอบด้วยสารออกฤทธิ์ Albiflorin ในปริมาณ 1, 10 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ ดังภาพที่ 4-13

4.7.2.2 สารออกฤทธิ์ Paeoniflorin กับการวิเคราะห์ร่วมกับเครือข่ายต้นแบบ

จากการวิเคราะห์เครือข่าย GCN ร่วมกับสารออกฤทธิ์ Paeoniflorin พบว่า *Tlr2*, *Anxa1*, *Itgb2*, *Cd14* และ *Tnfrsf1a* มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นหลังจากที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เมื่อทดสอบฤทธิ์การต้านการแสดงออกของ Paeoniflorin ในปริมาณ 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ *Tlr2*, *Anxa1*, *Itgb2*, *Cd14* และ *Tnfrsf1a* ที่ระดับนัยสำคัญ และผลจากการวิเคราะห์เครือข่าย PPIN กับทดสอบฤทธิ์การต้านการแสดงออกของ Paeoniflorin พบว่าที่ปริมาณ 10 $\mu\text{g/ml}$ ระดับการแสดงออกของ SERPINE1 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ในปริมาณของสารทดสอบที่ 1 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ SERPINE1 ดังภาพที่ 4-14

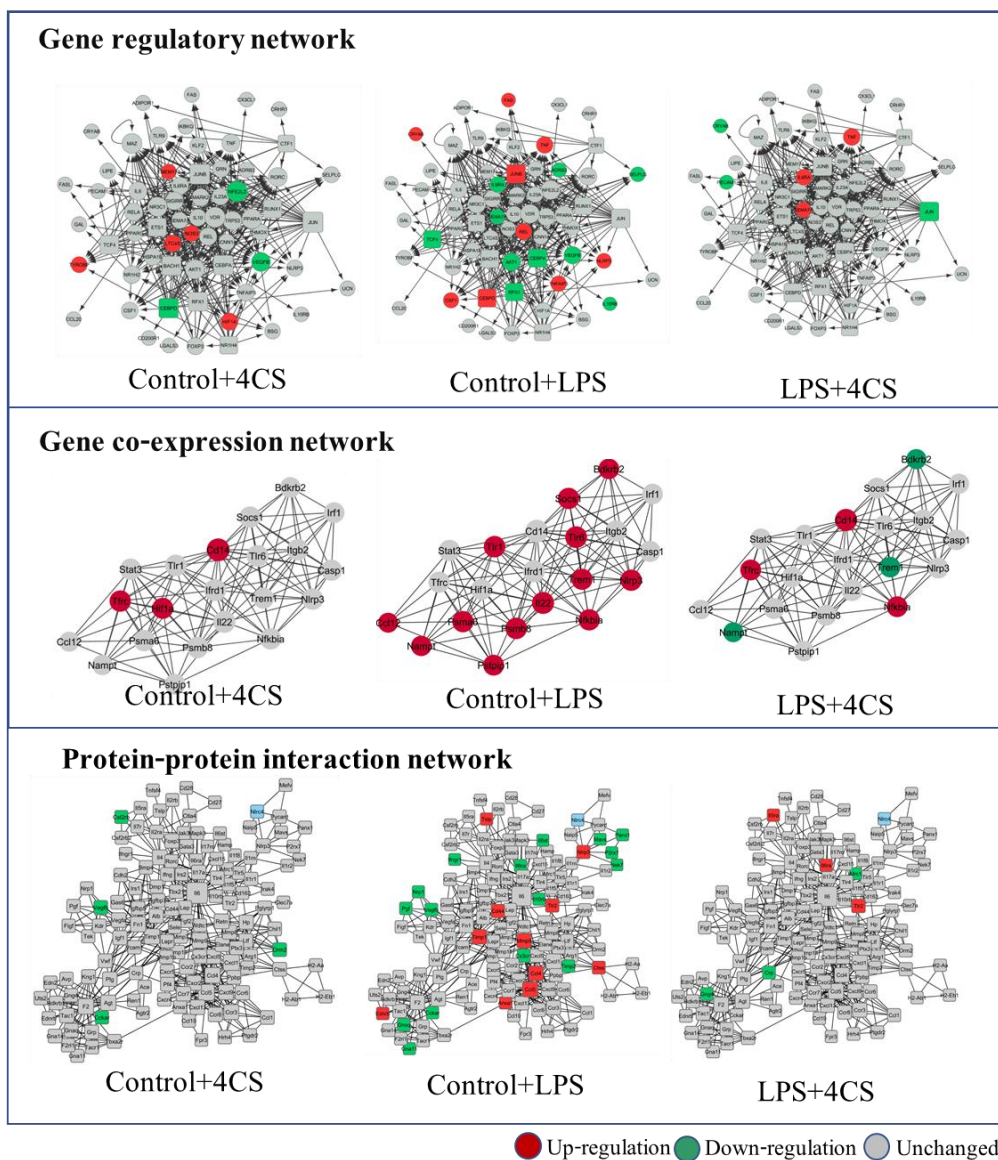
4.7.2.3 สารออกฤทธิ์ Paeonol กับการวิเคราะห์ร่วมกับเครือข่ายต้นแบบ

จากการทดสอบฤทธิ์การต้านการแสดงออกของยีนการอักเสบกับสารออกฤทธิ์ Paeonol พบว่าในเครือข่าย GCN กลุ่ม *Tlr2*, *Anxa1*, *Itgb2*, *Cd14* และ *Tnfrsf1a* มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นหลังจากที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และเมื่อทดสอบฤทธิ์การต้านการแสดงออกของ Paeonol พบว่าระดับการแสดงออกของ *Itgb2* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในปริมาณ 1 $\mu\text{g/ml}$ และ 100 $\mu\text{g/ml}$ และเครือข่าย PPIN กับทดสอบสารออกฤทธิ์ Paeonol พบว่าระดับการแสดงออกของ SERPINE1

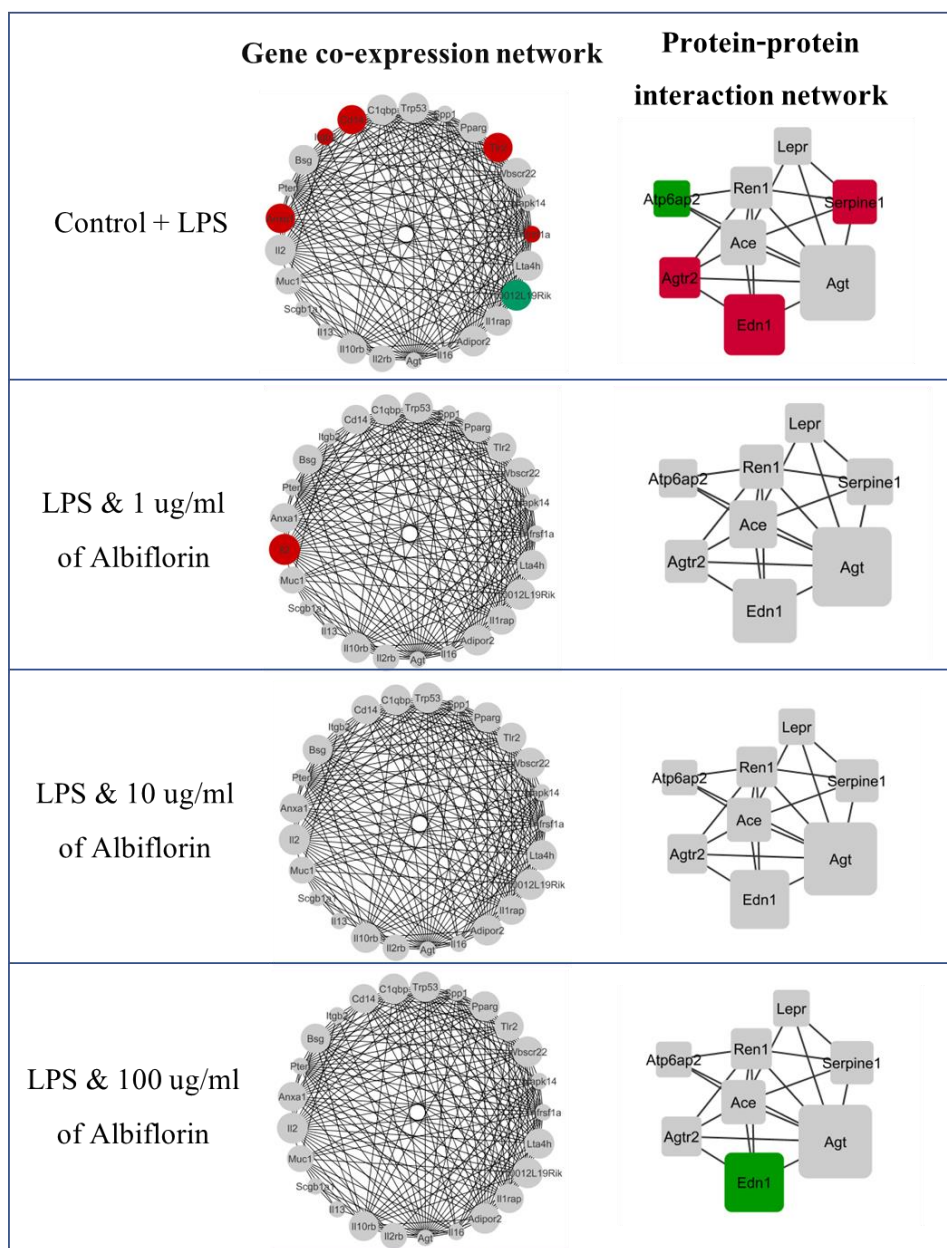
ลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่ปริมาณ 1 $\mu\text{g/ml}$ และเมื่อเพิ่มปริมาณสารออกฤทธิ์ Paeonol เป็น 10 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าไม่พบการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ SERPINE1 ดังภาพที่ 4-15

4.7.3 สารออกฤทธิ์ EGCG (Epigallocatechin-3-gallate) ที่ได้จากชาเขียวจากชุดข้อมูล GSE21320

ในชุดข้อมูล GSE21320 ได้ทำการทดสอบสารออกฤทธิ์ EGCG (Epigallocatechin-3-gallate) ที่ได้จากชาเขียวกับฤทธิ์การต้านการอักเสบที่เวลา 6 ชั่วโมง พบว่าชุดข้อมูลนี้ไม่ตรงกับกลุ่มยีนเป้าหมายและทรานสคริปชันแฟกเตอร์ภายในเครือข่าย GRN ต้นแบบที่ช่วงเวลา 6 ชั่วโมง จึงทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ข้อมูลการยับยั้งการแสดงออกของสารออกฤทธิ์ได้ สารออกฤทธิ์ EGCG ถูกนำมาวิเคราะห์ร่วมกับเครือข่าย GCN พบว่ามียีนการอักเสบจำนวน 4 ชนิดที่ตรงกันกับชุดข้อมูลคือ *C3*, *Mapk14*, *Spp1* และ *Tnfrsf1a* เมื่อทดสอบการกระตุ้นการแสดงออกของยีนการอักเสบด้วย LPS พบว่า *Spp1* มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้น แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ *Spp1* เมื่อถูกทดสอบด้วยสารออกฤทธิ์ EGCG

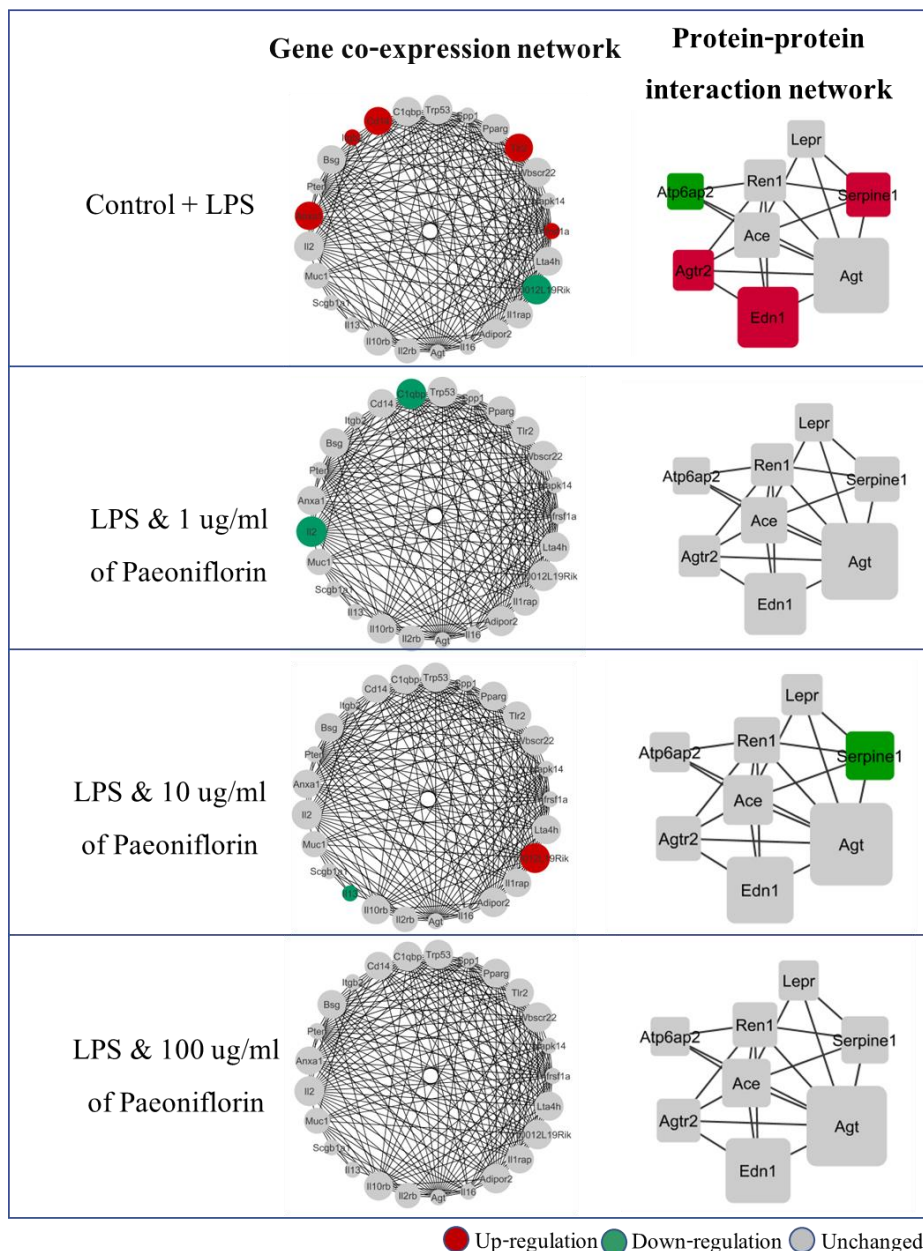


ภาพที่ 4-12 ผลของการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ 4CS จากสมุนไพร Hypericum perforatum ของชุดข้อมูล GSE21841 ร่วมกับเครือข่ายต้นแบบที่ถูกทดสอบในช่วงเวลาที่ 8 ชั่วโมง

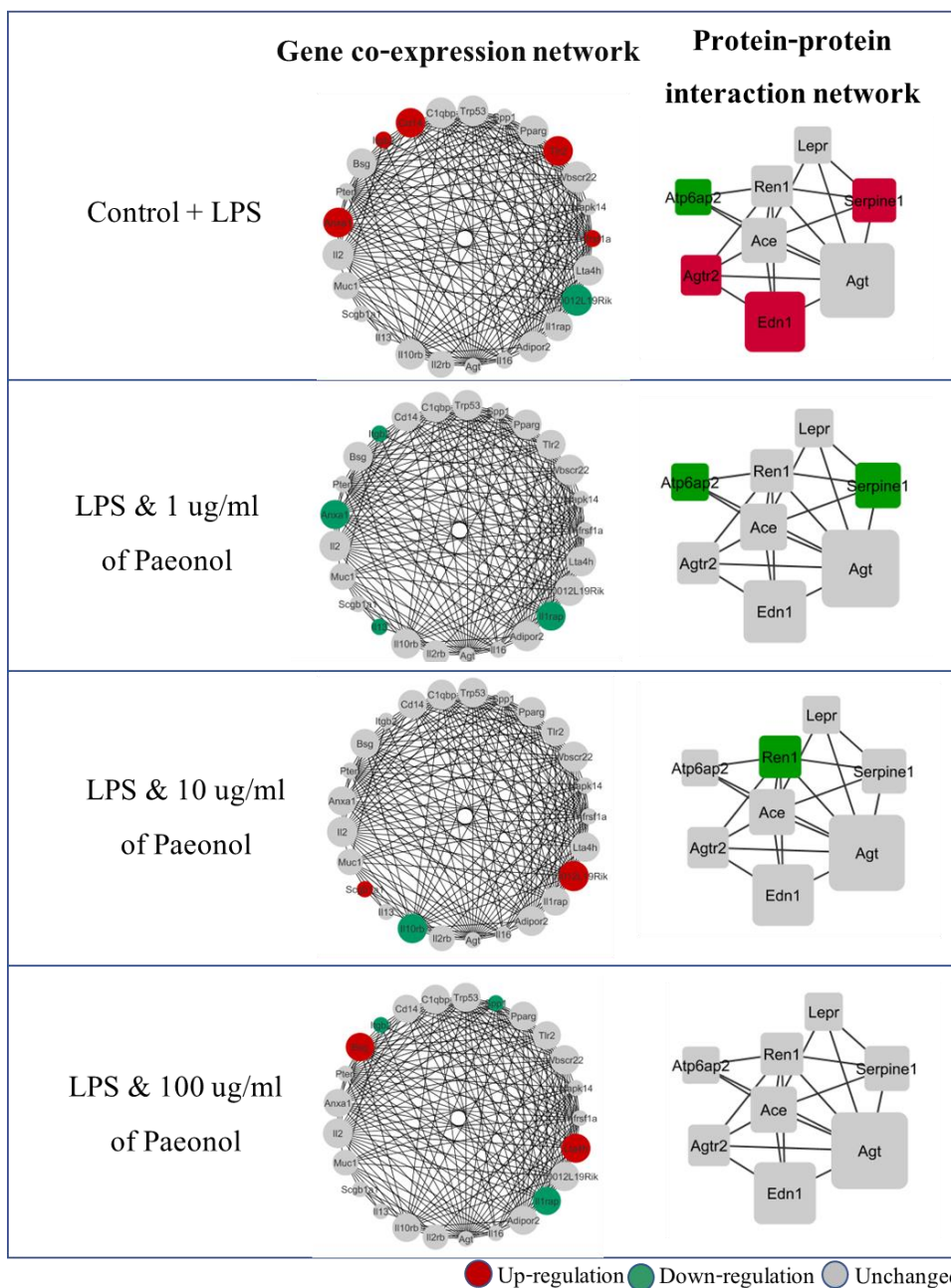


● Up-regulation ● Down-regulation ● Unchanged

ภาพที่ 4-13 ผลของการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ Albiflorin ของชุดข้อมูล GSE9632 ร่วมกับเครือข่าย
ค้นแบบที่ถูกทดสอบในช่วงเวลาที่ 6 ชั่วโมง



ภาพที่ 4-14 ผลของการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ Paconiflorin ของชุดข้อมูล GSE9632 ร่วมกับเครือข่ายต้นแบบที่ถูกทดสอบในช่วงเวลาที่ 6 ชั่วโมง



ภาพที่ 4-15 ผลของการวิเคราะห์สารถออกฤทธิ์ Paeonol ของชุดข้อมูล GSE9632 ร่วมกับเครือข่าย
 ต้นแบบที่ถูกทดสอบในช่วงเวลาที่ 6 ชั่วโมง

บทที่ 5

อภิปราย สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผลการทดลอง

ผลจากการคัดเลือกยีนด้วยวิธี Feature selection (แสดงในตารางที่ 4-4 ถึง 4-6) ที่มีการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างเด่นชัด พบว่าเมื่อนำกลุ่มยีนที่ถูกคัดเลือกอย่างน้อยสองในสามวิธี ถูกนำมาแปลผลทางชีวภาพตามลักษณะของยีนออนโทโลยี ที่เวลา 3 ชั่วโมง หลังจาก เซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ถูกกระตุ้นด้วย LPS ช่วงเวลานี้จะเป็นระยะแรกของการเริ่มต้นการส่งสัญญาณเนื่องจากกลุ่มยีนที่ถูกคัดเลือกการแสดงออกอย่างเด่นชัดในช่วงเวลาที่ 3 ชั่วโมง มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการตอบสนองการอักเสบเป็นจำนวนน้อย เนื่องจากเป็นช่วงแรกของการส่งสัญญาณรวมถึงบริเวณที่เกิดกระบวนการตอบสนองเป็นบริเวณที่ผิวเซลล์หรือ Cell-cell adhesion (González-Amaro, Diaz-González, & Sánchez-Madrid, 1998; Harjupää et al., 2019) ที่เวลา 6 ชั่วโมง หลังจากยีนถูกกระตุ้นการแสดงออกด้วย LPS พบว่ากลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบนั้น เริ่มมีการตอบสนองต่อสิ่งที่เข้ามากระตุ้นหรือส่งสัญญาณภายในเซลล์มากขึ้น เริ่มมีวิถีกลไกของกระบวนการตายของเซลล์เกิดขึ้น แต่ช่วงนี้ก็ยังคงเป็นช่วงแรกของการตอบสนองต่อสิ่งเร้า เนื่องจากบริเวณของการเกิดกระบวนการยังอยู่ที่บริเวณผิวเซลล์ การแสดงออกของการตอบสนองยีนการอักเสบเพิ่มขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS (McKee & Lukens, 2016; Moore et al., 2018) ที่ช่วงเวลา 8 ชั่วโมง มีการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อ LPS พบยีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณของวิถีกลไก NF- κ B วิถี JNK และวิถี MAPK ซึ่งเป็นพาร์ธเวย์หลักของการตอบสนองการอักเสบเพื่อให้กำจัดสิ่งแปลกปลอมเหล่านั้นออกไป รวมถึงกระบวนการสร้างเนื้ออกหรือมะเร็ง และยังเกิดกระบวนการตายของเซลล์เกิดขึ้น (Chen, Deng, & Cui, 2018; Dhanasekaran & Reddy, 2008) ที่เวลา 18 ชั่วโมง หลังจากเซลล์ถูกกระตุ้นการตอบสนองด้วย LPS พบว่า วิถีกลไกการตอบสนองการอักเสบยังคงเกิดขึ้นแต่กระบวนการตายของเซลล์เริ่มลดลง และมีอาการปวดบวม แดงร้อนเกิดขึ้น ซึ่งสิ่งเหล่านี้คือกระบวนการการตอบสนองของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบเมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS เพื่อไม่ให้เซลล์นั้นมีความเสียหาย (Chen et al., 2018)

ผลจากการนำเครือข่ายการตอบสนองการอักเสบทั้งสามเครือข่ายมาทำการวิเคราะห์ พบว่าการแสดงออกยีนในช่วงเวลาที่ 3 ชั่วโมงนั้นมีการแสดงออกเกิดขึ้นทั้งสามเครือข่าย แต่ระดับ

การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบยังพบน้อยและขนาดของเครือข่ายทั้งสามเครือข่าย นั้นมีขนาดเล็ก อาจเป็นเพราะเป็นช่วงแรกของการตอบสนองของกลไกการอักเสบ และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอื่นมีระดับการแสดงที่เด่นชัด จึงทำให้ยีนที่พบใน โมดูลต้นแบบนั้นอาจจะไม่สอดคล้องกันของทั้งสามเครือข่าย จากเครือข่าย GRN นั้น

ทรานสคริปชันแฟกเตอร์ *Cebpa* และ *Cebpb* มีการแสดงออกพร้อมกันในช่วงเวลาที่ 3 ชั่วโมง ทรานสคริปชันแฟกเตอร์ *Cebpb* มีผลต่อการแสดงออกของ *Il6* เนื่องจาก LPS ไปจับกับ TLR4 ทำให้เกิดการกระตุ้นสัญญาณของ MYD88 ผ่านวิถีของ NF- κ B signaling pathway ทำให้เกิดการสังเคราะห์ TNF ซึ่งเป็น Positive feedback กลับไปกระตุ้นการสังเคราะห์วิถี TNF signaling pathway ไปกระตุ้นให้ CEBPB สร้าง IL6 ซึ่งเป็น Inflammatory cytokine (van der Bruggen et al., 1999; Yao et al., 1997; Streetz et al., 2000; Benihoud et al., 2007) และเชื่อมโยงอีกหลายวิถีที่เกี่ยวกับโรคการอักเสบ ทรานสคริปชันแฟกเตอร์ *Cebpa* มีผลต่อการแสดงออกของ *Il6* เนื่องจากมีหน้าที่ไปควบคุมการสังเคราะห์ IL6 ที่เกี่ยวข้องกับวิถีกลไกของมะเร็ง (Mackey & Darlington, 2004; Numata et al., 2005; Masjedi et al., 2018) เครือข่าย PPIN ที่ช่วงเวลา 3 ชั่วโมงนั้น พบว่าระดับการแสดงออกของ IL6 มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับเครือข่าย GRN ที่พบว่า *Il6* มีระดับการแสดงออกที่เด่นชัดเช่นกัน ใน โมดูลนี้ก็จะมีการตอบสนองของวิถี NF- κ B signaling pathway เนื่องจากมีการพบ RELA และ NFKB1 มีการแสดงออกที่เด่นชัดอาจเป็นเพราะการทำงานร่วมกันในวิถี NF- κ B signaling pathway ซึ่ง NF- κ B จะประกอบด้วย NFKB1 หรือ NFKB2 รวมกับ REL, RELA หรือ RELB ทำให้เกิดมีการแสดงออกพร้อมกัน (Sharif-Askari et al., 2010) และเครือข่าย GCN มีจำนวนยีนการอักเสบน้อยอาจเป็นเพราะขั้นตอนของการนำรายชื่อยีนที่มีการแสดงออกอย่างเด่นชัดในช่วงเวลาที่ 3 ชั่วโมงทำการค้นหาเครือข่ายย่อย ซึ่งการแสดงออก การตอบสนองการอักเสบในช่วงนี้ยังพบระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบน้อย และยีนที่พบส่วนใหญ่จะเกี่ยวข้องกับกระบวนการอื่น เมื่อทำการค้นหาเครือข่ายต้นแบบโดยใช้ รายชื่อยีนจากพาร์สหลักของการตอบสนองการอักเสบจึงไม่สอดคล้องกับรายชื่อยีนในเครือข่าย และทำให้มีผลต่อขนาดเครือข่าย

ที่เวลา 6 ชั่วโมงให้ผลเช่นเดียวกับที่ช่วงเวลา 3 ชั่วโมง คือพบการแสดงออกของยีนการอักเสบเปลี่ยนแปลงเมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS แต่ไม่ใช้ยีนที่พบในวิถีกลไกการตอบสนองการอักเสบที่มีการรายงานกันอย่างต่อเนื่อง (Achek, Yesudhas, & Choi, 2016) (ตารางภาคผนวก ง) เป็นไปได้ว่าเครือข่ายต้นแบบที่ถูกคัดเลือกจากระดับการแสดงออกของยีนที่เด่นชัดนั้นเกี่ยวข้องกับกระบวนการส่งสัญญาณอื่นมากกว่ากระบวนการของยีนการอักเสบ รวมถึงการคัดเลือกโมดูลย่อยจากการวิเคราะห์ถึงระดับการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนที่มีนัยสำคัญและมีความสัมพันธ์ที่

สอดคล้องกันของสมาชิกภายในโมดูลที่มีขนาดเครือข่ายเล็กโดยโปรแกรม jActiveModules (Ideker et al., 2002) จึงทำให้ภายในเครือข่ายพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบน้อย แต่ในเครือข่าย GCN พบว่าระดับการแสดงออกของ *Mapk14*, *Tlr4* และ *Cd14* มีระดับการแสดงออกที่เด่นชัดที่เวลา 6 ชั่วโมง ซึ่งยีนเหล่านี้มีความสำคัญต่อการตอบสนองการอักเสบ เมื่อพิจารณาช่วงเวลาทั้ง 3 ชั่วโมง และ 6 ชั่วโมงหลังจากการกระตุ้นด้วย LPS จะเห็นว่าที่เวลา 6 ชั่วโมงหลังจากการกระตุ้นการแสดงออกของยีนการอักเสบด้วย LPS นั้น การแสดงออกของ *Cd14* และ *Tlr4* เป็นช่วงแรกของการตอบสนองต่อการอักเสบเนื่องจาก CD14 ทำงานร่วมกับ TLR4 ทำหน้าที่เป็นตัวรับที่จำเพาะต่อ LPS ในกลไกการตอบสนองการอักเสบ (Zanoni et al., 2011) และสอดคล้องกับระดับการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างเด่นชัด ของ *Mapk14* หรือ *p38* เนื่องจากที่ช่วงเวลา 3 ชั่วโมงเริ่มมีการตอบสนองของ TNF signaling pathway และ MAPK signaling pathway ซึ่งส่งผลต่อการกระตุ้นการแสดงออกของ *p38* (Xu & Derynck, 2010) ดังนั้นจากการแสดงออกของยีนการอักเสบชี้ให้เห็นว่าในช่วงเวลาที่ 3 และ 6 ชั่วโมงเป็นช่วงแรกของการตอบสนองการอักเสบ

เมื่อเวลาที่ 8 ชั่วโมงจากภาพจะเห็นได้ว่าเครือข่ายการตอบสนองการอักเสบทั้ง 3 ชนิดนั้นมีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อเทียบกับช่วงเวลาทั้ง 3 และ 6 ชั่วโมง เนื่องจากช่วงเวลาตั้งแต่ 8 ชั่วโมงหลังจากที่มีการกระตุ้นการตอบสนองด้วย LPS กลไกการตอบสนองต่อการอักเสบนั้นเพิ่มมากขึ้นเพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมออกไป จากผลการวิเคราะห์เครือข่ายโดยการเทียบกันระหว่างเครือข่าย จะพบว่าเครือข่าย GRN เครือข่าย GCN และเครือข่าย PPIN มีการแสดงออกของยีนภายในเครือข่ายที่สอดคล้องกัน พบว่ามี *Il6* ในเครือข่าย GRN และเครือข่าย PPIN บ่งบอกถึงการแสดงออกของ *Il6* มีระดับการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างเด่นชัดเมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS ซึ่งหมายถึง IL6 มีการทำงานเกิดขึ้นในช่วงเวลาที่ 8 ชั่วโมง (Nan et al., 2018) นอกจากนี้ยังพบ *Cd14* ในเครือข่าย GCN ซึ่งมีความสอดคล้องกับการพบการแสดงออกของ TLR4 ในเครือข่าย PPIN ทั้งสองตัวนี้มีความสัมพันธ์กันของการส่งสัญญาณการตอบสนองต่อ LPS จะอยู่ที่บริเวณผิวเซลล์ ซึ่งเป็นตัวจับจำเพาะที่มีต่อ LPS (Acheh et al., 2016) ในเครือข่าย GCN โหนดของ *Tnf* นั้นมีขนาดใหญ่และมีการแสดงออกร่วมกับ *Il6*, *Rela* และ *Nos3* ซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในวิถีกลไกของ TNF และ MAPK signaling pathway และเมื่อพิจารณาร่วมกับช่วงเวลาทั้ง 3 และ 6 ชั่วโมงพบว่าการสังเคราะห์โปรตีน TNF ในวิถีกลไกของ NF-κB pathway เกิดขึ้นทำให้เกิดปฏิกิริยาย้อนกลับไปกระตุ้นการส่งสัญญาณต่อใน TNF และ MAPK signaling pathway ที่ช่วงเวลา 8 ชั่วโมงหลังจากมีการกระตุ้นด้วย LPS การส่งสัญญาณของ NF-κB signaling pathway ก็ยังคงเกิดต่อเนื่อง เมื่อวิเคราะห์เครือข่าย PPIN โปรตีน TLR4, MAPK3, IL6 และ IFNG มีการแสดงออกเกิดขึ้นพร้อมกันบ่งบอกถึงการมีปฏิสัมพันธ์กัน ซึ่งสอดคล้องกับกลไกการส่งสัญญาณการตอบสนองของ Toll-like receptor

signaling pathway หลังจาก LPS มากระตุ้นการตอบสนองการอักเสบของเซลล์แมคโครฟาจที่เวลา 8 ชั่วโมง โดยที่ TLR4 เป็นตัวจับจำเพาะ (Receptor) ที่มีการตอบสนองจำเพาะต่อ LPS ซึ่ง TLR4 receptor นั้นต้องการ Co-receptors มาทำงานร่วมกันคือ CD14 และ MD2 เพื่อที่จะจับกับ LPS (Acheh et al., 2016) แล้วส่งสัญญาณการตอบสนองภายในเซลล์ทั้งกลไกของ NF- κ B pathway และ MAPK signaling pathway เกิดการส่งผ่านสัญญาณของ ERK1 หรือ MAPK3 (Zarubin & Han, 2005) ไปกระตุ้นการสังเคราะห์ Inflammatory cytokine เช่น TNF, IL6 และ IFNG (Acheh et al., 2016) แล้ว Cytokine ก็จะไปจับกับ Cytokine-cytokine receptor ทำให้เกิดการส่งสัญญาณของ STAT3 (Numata et al., 2005) ในวิถีกลไก Jack-Stat signaling pathway (Harrison, 2012) ก่อให้เกิดกระบวนการหลายอย่าง เช่น ก่อให้เกิดกระบวนการตายของเซลล์ กระบวนการแบ่งเซลล์ และการแสดงออกของโปรตีนภายในเครือข่ายเกี่ยวข้องกับวิถีกลไกการตอบสนองของมะเร็งอีกด้วย ซึ่งชี้ให้เห็นว่าทั้งสามเครือข่ายนี้มีการแสดงออกที่เด่นชัดของโปรตีนภายในเครือข่ายและระหว่างเครือข่ายมีความสอดคล้องและเชื่อมโยงกัน (Masjedi et al., 2018; Haanen & Vermes, 1995; Verfaillie, Garg, & Agostinis, 2013) และเนื่องจากชุดข้อมูล GSE21841 ถูกทำการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในช่วงเวลา 8 ชั่วโมงโดยอาศัยการสังเกตผลจากสารออกฤทธิ์ที่มีผลต่อการแสดงออกของยีนการอักเสบจึงทำให้ช่วงเวลาที่ 8 ชั่วโมงถูกเลือกขึ้นมาวิเคราะห์เมื่อเทียบกับช่วงเวลาอื่น ดังนั้นยีนที่ถูกคัดเลือกมาในเครือข่ายต้นแบบในช่วงเวลาดังกล่าวอาจจะพบกลุ่มยีนที่มีระดับการแสดงออกเปลี่ยนแปลงตั้งแต่ช่วงเวลาที่ 1 ชั่วโมงและส่งผลกระทบต่อแสดงออกของยีนตัวอื่น ๆ ด้วย (Hammer et al., 2009)

ช่วงเวลาที่ 18 ชั่วโมงหลังจากการกระตุ้นการตอบสนองการแสดงออกของเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ด้วย LPS เช่นเดียวกับเวลาที่ 8 ชั่วโมงมีการแสดงออกของกลุ่มยีนการอักเสบที่สอดคล้องกันของเครือข่าย GRN เครือข่าย GCN และเครือข่าย PPIN พบยีนและโปรตีนในกลุ่มเดียวกัน ซึ่งเป็นกลุ่มที่อยู่ในวิถีกลไกหลักของการตอบสนองการอักเสบทั้งการส่งสัญญาณในกลไก NF- κ B, JAK-STAT และ MAPK signaling ในเครือข่าย GRN นั้นพบว่าทรานสคริปชันแฟกเตอร์ *Irf9* มีผลต่อการแสดงออกยีนเป้าหมายหลายตัว เช่น *Il6* โดยการแสดงออกของ *Il6* นั้นถูกกระตุ้นโดย ISGF3 (Tyrosine-phosphorylated STAT1/2 heterodimers bind to IRF9, forming IFN-stimulated gene factor 3) ซึ่งจะไปจับกับ ISREs (IFN-stimulated response elements) ในโปรโมเตอร์ของ IFN-induced genes เพื่อให้เกิดการถอดรหัสและส่งผลกระทบต่อแสดงออกของ *Stat3* เช่นกัน (Nan et al., 2018) นอกเหนือจากนี้ *Irf9* ยังมีผลต่อการแสดงออกของ *Pik3cg* ซึ่งเชื่อมโยงไปที่กระบวนการกระตุ้นการสร้างเกล็ดเลือดและการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด นำไปสู่การฟื้นฟูบาดแผล (Huang et al., 2016) ดังนั้นจากผลการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนและโปรตีนที่มี

ลักษณะเด่นชัดนั้นในช่วงที่ 8 ชั่วโมง และ 18 ชั่วโมงจะเป็นช่วงของการส่งสัญญาณกลไกการตอบสนองการอักเสบมากกว่าที่ช่วงเวลา 3 และ 6 ชั่วโมง เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมรวมถึงการกระตุ้นการสร้างเกร็ดเลือดกระตุ้นการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดเพื่อให้บาดแผลนั้นปิดและลดการอักเสบ

ในการทดสอบเครือข่าย GRN และสารออกฤทธิ์ 4CS (4-component-system จากสมุนไพร *Hypericum perforatum*) จากชุดข้อมูล GSE21841 (Hammer et al., 2010) พบว่าสารออกฤทธิ์ 4CS ไม่มีฤทธิ์ในการต้านการแสดงออกของ *Tnf*, *Junb* และ *Rel* เนื่องจากไม่มีการเปลี่ยนแปลงที่ระดับนัยสำคัญ แต่ 4CS สามารถลดการแสดงออกของ *Cryab* ได้อย่างมีนัยสำคัญ CRYAB เป็นโปรตีนตัวหลักในการควบคุมการแสดงออกเชิงลบเกี่ยวกับการต่อต้านกระบวนการตายของเซลล์ ซึ่งอาจจะเป็นเพราะว่าเมื่อมีการตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย LPS ส่งสัญญาณไปยังกระบวนการตายของเซลล์ ทำให้เกิดการกำจัดตัวเองของเซลล์เกิดขึ้นเพื่อกำจัดเชื้อโรค และถ้ามีมากเกินไปจะส่งผลเสียต่อเนื้อเยื่อหรือก่อเกิดมะเร็ง จึงทำให้ต้องมีตัวควบคุมการส่งสัญญาณในกระบวนการตายของเซลล์เพื่อไม่ให้มีมากเกินไป (Zhang et al., 2019) ในการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านการอักเสบของสารออกฤทธิ์ 4CS ร่วมกับเครือข่าย GCN พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านการแสดงออกของ *Bdkrb2*, *Trem1* และ *Nampt* เนื่องจากระดับการแสดงออกของยีนทั้ง 3 ชนิดนี้ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อทดสอบผลของสารออกฤทธิ์กับเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ไม่มีผลต่อระดับการแสดงออกยีนทั้ง 3 ชนิดนี้ แต่สารออกฤทธิ์ 4CS ไม่สามารถต้านการแสดงออกของ *Socs1* และ *Nfkbia* เนื่องจากการแสดงออกนั้นไม่ลดลงหลังจากที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และทดสอบด้วยสารออกฤทธิ์ 4CS ยีน *Bdkrb2*, *Trem1* และ *Nampt* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีกลไกการส่งสัญญาณการตอบสนองระบบภูมิคุ้มกัน การตอบสนองการอักเสบ และการเชื่อมโยงถึงระบบอื่น ซึ่งแม้จะไม่ใช่นิวเคลียสหลักในการศึกษาการตอบสนองการอักเสบ แต่ก็มีความสำคัญต่อกลไกการตอบสนองภายในเซลล์เช่นกัน (Chen et al., 2017; Feng et al., 2019; Garten et al., 2011) ในการวิเคราะห์เครือข่าย PPIN กับสารออกฤทธิ์ 4CS พบว่าในโปรตีนที่มีระดับการแสดงออกที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และสารออกฤทธิ์ 4CS เมื่อเทียบกับโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญหลังที่ถูกกระตุ้นการแสดงออกด้วย LPS อาจจะเป็นเพราะระดับการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไปของโปรตีนที่ถูกทดสอบด้วยสาร 4CS และถูกกระตุ้นการแสดงออกด้วย LPS นั้นค่าการแสดงออกลดลงเป็นจำนวนครึ่งหนึ่งของการแสดงออกของโปรตีน ในขณะที่ระดับการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไปของโปรตีนเพิ่มขึ้นจากเดิมไม่มากเมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS จึงทำให้ไม่พบยีนที่สอดคล้องกันที่ระดับนัยสำคัญเมื่อเทียบทั้ง 3 เครือข่าย และจากการทดสอบสารออกฤทธิ์ 4CS กับการแสดงออกของยีนการอักเสบจากงานวิจัยของ Hammer ในปี 2008

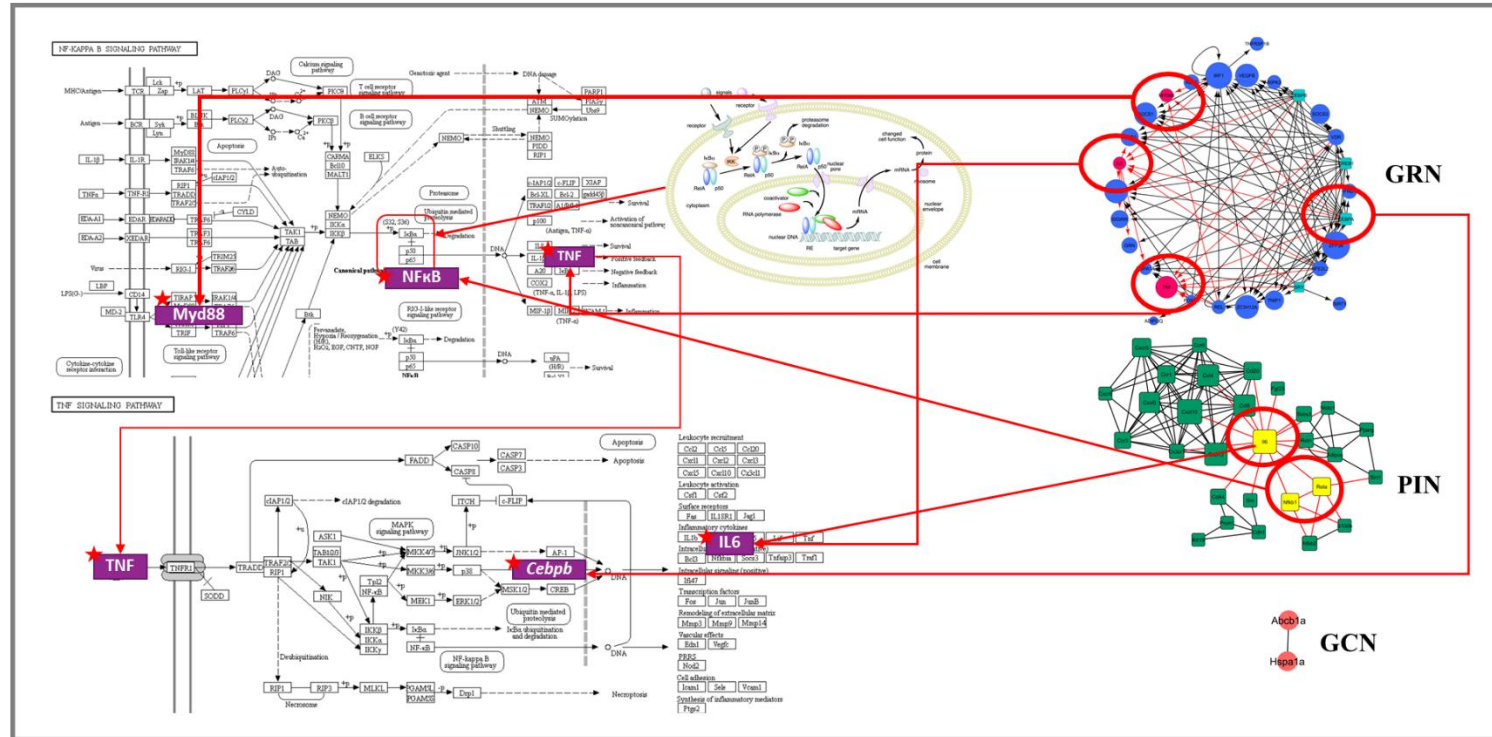
สารออกฤทธิ์ 4CS มีฤทธิ์ในการยับยั้งการแสดงออกของ PGE2 และอื่น ๆ ซึ่งอาจจะไม่พบในเครือข่ายต้นแบบที่ถูกทำการคัดเลือก และในการทดสอบระดับปฏิบัติการที่นอกเหนือจากเทคโนโลยีไมโครอาร์เรย์และช่วงเวลาที่ทำการทดสอบค่อนข้างหลากหลาย และชี้ให้เห็นว่าการวิเคราะห์เครือข่ายจากชุดข้อมูลการแสดงออกของยีนที่ได้จากเทคโนโลยีนั้นมีความครอบคลุมและอาจจะมองมากกว่ารายชื่อที่ทำการวิเคราะห์

จากชุดข้อมูล GSE9632 ได้ทำการทดสอบการแสดงออกของยีนการอักเสบและการต้านการอักเสบของสารออกฤทธิ์ 3 ชนิด ได้แก่ Albiflorin, Paeoniflorin และ Paeonol จากรากของต้นโบตั๋น (*Paeony*) ในปริมาณ 1, 10 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ ภายใต้สภาวะ 6 ชั่วโมงตามลำดับ พบว่าเมื่อทดสอบกับเครือข่าย GRN ที่ช่วงเวลา 6 ชั่วโมง ไม่พบรายชื่อยีนที่ตรงกัน อาจจะเป็นเพราะว่าในช่วงเวลาที่ 6 ชั่วโมงการตอบสนองของยีนการอักเสบภายในเครือข่ายยังไม่ชัดเจนเครือข่ายการอักเสบที่ได้จึงมีขนาดเล็ก ทำให้รายชื่อยีนจากชุดข้อมูล GSE9632 และรายชื่อยีนภายในโมดูลไม่สอดคล้องกัน เมื่อทำการวิเคราะห์เครือข่าย GCN ร่วมกับชุดข้อมูล GSE9632 พบว่า Albiflorin ที่ปริมาณ 1, 10 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ ภายใต้สภาวะ 6 ชั่วโมง ไม่สามารถลดการแสดงออกของยีนการอักเสบได้ และยังไปกระตุ้นการแสดงออกของ *IL2* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากในเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นการแสดงออกด้วย LPS มีการแสดงออกของ *Tlr2*, *Anxa1*, *Itgb2*, *Cd14* และ *Tnfrsf1a* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อถูกทดสอบด้วยสารออกฤทธิ์ Albiflorin และ Paeoniflorin ที่ปริมาณ 1, 10 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ *Tlr2*, *Anxa1*, *Itgb2*, *Cd14* และ *Tnfrsf1a* แต่ Paeonol มีผลต่อระดับการแสดงออกที่ลดลงของ *Anxa1* ที่ปริมาณ 1 $\mu\text{g/ml}$ และ *Itgb2* ที่ปริมาณ 1 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ซึ่ง ANXA1 เป็นโปรตีนในกลุ่มโปรตีนที่ต้านการอักเสบ (Sheikh & Solito, 2018) และ ITGB2 เป็นโปรตีนที่ยับยั้งการตอบสนองของ TLR โดยการควบคุมการกระตุ้นการส่งสัญญาณใน NF- κ B pathway and p38 MAPK (Yee & Hamerman, 2013) ชี้ให้เห็นว่าถ้าพิจารณาเพียงเครือข่าย GCN เท่านั้นจะพบว่าสารออกฤทธิ์ Paeonol ไม่ใช่ตัวเลือกที่ดีสำหรับการเลือกไปพัฒนาต่อเป็นยาที่มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ เพราะ Paeonol มีผลต่อโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการควบคุมกลไกการตอบสนองการอักเสบที่ไม่ให้มากเกินไป ซึ่งจะก่อให้เกิดโรคตามมา เมื่อทำการวิเคราะห์เครือข่าย PPIN กับชุดข้อมูล GSE9632 พบว่า Albiflorin มีฤทธิ์ในการต้านการแสดงออกของ EDN1 ที่ปริมาณ 100 $\mu\text{g/ml}$ หลังจากที่ถูกกระตุ้นการแสดงออกด้วย LPS และ Paeoniflorin มีฤทธิ์ในการต้านการแสดงออกของ SERPINE1 ที่ปริมาณ 10 $\mu\text{g/ml}$ และสารออกฤทธิ์ Paeonol มีฤทธิ์ในการต้านการแสดงออกของ SERPINE1 ที่ปริมาณ 1 $\mu\text{g/ml}$ อย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากระดับการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ SERPINE1, EDN1 และ AGTR2 มีระดับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นเมื่อเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ถูกกระตุ้น

ด้วย LPS เมื่อทดสอบด้วยสารออกฤทธิ์ Albiflorin, Paeoniflorin และ Paeonol ทำให้ระดับการแสดงออกของ SERPINE1, EDN1 และ AGTR2 ลดลงในปริมาณสารที่แตกต่างกัน ซึ่ง SERPINE1 หรือ PAI-1 มีบทบาทสำคัญในการซ่อมแซมบาดแผล การแข็งตัวของเลือด ซึ่งสารออกฤทธิ์ที่มีฤทธิ์ในด้านนี้การแสดงออกของ SERPINE1 (Simone et al., 2014) อาจจะเป็นอีก 1 ตัวเลือกสำหรับการผลิตยาลดรอยแผลเป็นก็ได้

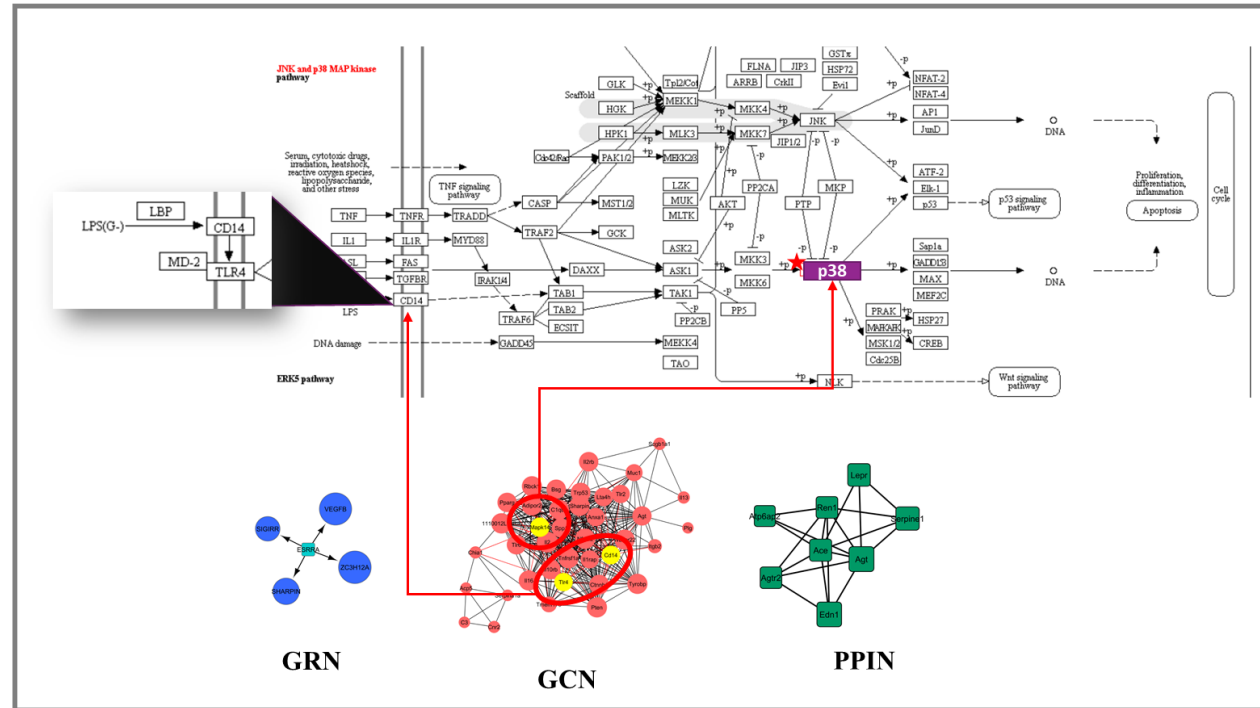
ในชุดข้อมูล GSE21320 นั้นสามารถวิเคราะห์ได้แค่เพียงเครือข่าย GCN เท่านั้น เนื่องจากชุดข้อมูลมียีนทั้งหมด 211 ยีน ซึ่งมีขนาดเล็กทำให้การค้นหาในเครือข่าย GRN และเครือข่าย PPIN นั้นเป็นไปได้ที่จะไม่พบ และโมดูลที่ถูกคัดเลือกมาเป็นตัวแทนถูกคัดเลือกจากยีนที่มีการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยสำคัญและมีความสัมพันธ์กันระหว่างยีน ซึ่งมีตัวเลือกที่มากกว่าจึงทำให้รายชื่อยีนกับชุดข้อมูลนี้พบแค่เครือข่ายเดียวในเครือข่าย GCN พบเพียง 4 ชนิดที่ตรงกันกับชุดข้อมูล จากการวิเคราะห์ผลพบว่ามีเพียง *Spp1* เท่านั้นที่พบว่ามีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญภายใต้สภาวะที่ถูกทดสอบด้วย LPS และเมื่อทดสอบด้วยสารออกฤทธิ์ EGCG (Epigallocatechin-3-gallate) ที่ได้จากชาเขียวเป็นเวลา 6 ชั่วโมงหลังจากถูกกระตุ้นด้วย LPS นั้นการแสดงออกยังคงเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ซึ่งชี้ให้เห็นว่าสารออกฤทธิ์ EGCG ไม่มีฤทธิ์ในการด้านการแสดงออกของ *Spp1* ในการแสดงออกของ *Opn* หรือ *Spp1* เกิดขึ้นจาก *Opn* ถูกควบคุมการแสดงออกโดยการกระตุ้นของ PI3K (Phosphoinositide 3-kinase), ERK (extracellular signal-regulated kinase) และ JNK (c-Jun NH2-terminal kinase) ซึ่งอาจจะไม่ใช่ยีนหลักที่มีการตอบสนองการอักเสบโดยตรง แต่การกระตุ้นการแสดงออกด้วย LPS มีกลไกการตอบสนองอื่นเข้ามาเกี่ยวข้องด้วยชี้ให้เห็นถึงความสัมพันธ์กันของกระบวนการตอบสนองภายในเซลล์และนอกเซลล์ (Kahles, Findeisen, & Bruemmer, 2014)

Networks of inflammatory gene expression at 3 hours



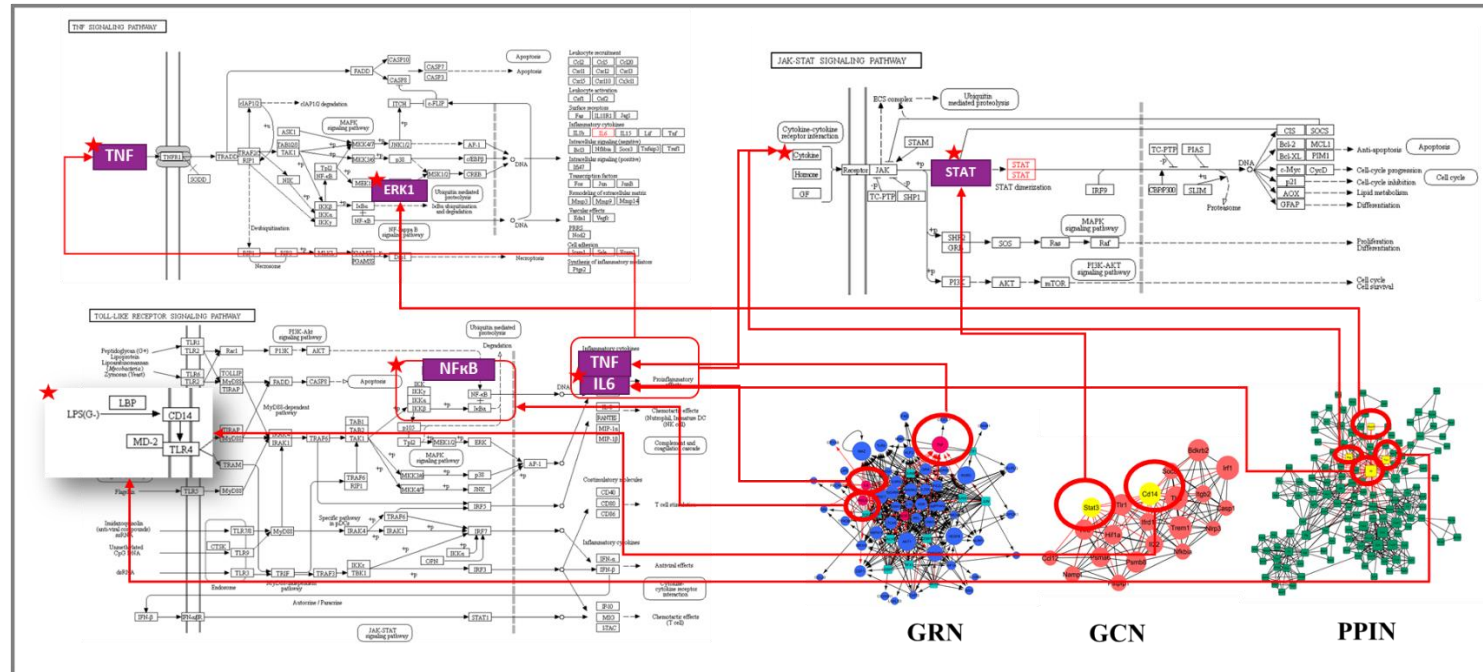
ภาพที่ 5-1 การแปลผลทางชีวภาพกับการวิเคราะห์เครือข่ายต้นแบบจากเครือข่ายทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ เครือข่าย GRN เครือข่าย GCN และเครือข่าย PPIN ที่มีการแสดงออกที่เด่นชัดในช่วงเวลาที่ 3 ชั่วโมงหลังจากที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS

Networks of inflammatory gene expression at 6 hours



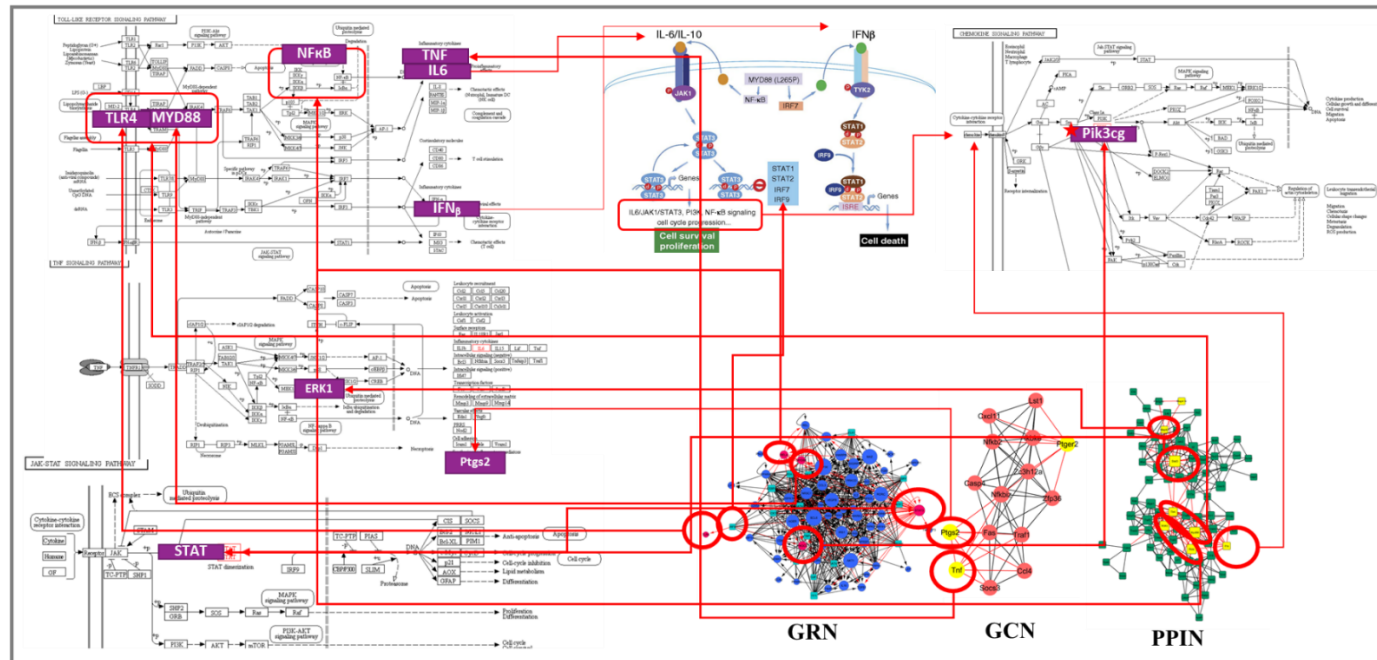
ภาพที่ 5-2 การแปลผลทางชีวภาพกับการวิเคราะห์เครือข่ายต้นแบบจากเครือข่ายทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ เครือข่าย GRN เครือข่าย GCN และเครือข่าย PPIN ที่มีการแสดงออกที่เด่นชัดในช่วงเวลาที่ 6 ชั่วโมงหลังจากที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS

Networks of inflammatory gene expression at 8 hours



ภาพที่ 5-3 การแปลผลทางชีวภาพกับการวิเคราะห์เครือข่ายต้นแบบจากเครือข่ายทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ เครือข่าย GRN เครือข่าย GCN และเครือข่าย PPIN ที่มีกรแสดงออกที่เด่นชัดในช่วงเวลาที่ 8 ชั่วโมงหลังจากที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS

Networks of inflammatory gene expression at 18 hours



ภาพที่ 5-4 การแปลผลทางชีวภาพกับการวิเคราะห์เครือข่ายต้นแบบจากเครือข่ายทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ เครือข่าย GRN เครือข่าย GCN และเครือข่าย PPIN ที่มีการแสดงออกที่เด่นชัดในช่วงเวลาที่ 18 ชั่วโมงหลังจากที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS

5.2 สรุปผลการทดลอง

1. จากการวิเคราะห์เครือข่ายการควบคุมการแสดงออกยีน เครือข่ายการแสดงออกกร่วมยีน และเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบนั้นจะเห็นว่าที่เวลา 3 และ 6 ชั่วโมง หลังจากที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS การแสดงออกการตอบสนองของโปรตีนหรือยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบนั้นยังไม่เด่นชัด แต่เมื่อเข้าสู่ช่วงเวลาที่ 8 และ 18 ชั่วโมง การตอบสนองการอักเสบมีมากขึ้น ซึ่งให้เห็นว่าช่วงเวลาที่ 3 และ 6 ชั่วโมงนั้นเป็นช่วงแรกของการส่งสัญญาณการตอบสนองการอักเสบที่ยังมีไม่มากนัก แต่เมื่อเวลาผ่านไปกระบวนการส่งสัญญาณและการขยายสัญญาณเพิ่มมากขึ้นเพื่อที่จะกำจัดสิ่งแปลกปลอมออกไป

2. การนำกระบวนการทางชีวสารสนเทศโดยใช้เครือข่ายทั้ง 3 ชนิดมาช่วยค้นหากระบวนการวิเคราะห์กลไกการตอบสนองการอักเสบพบว่าทั้ง 3 เครือข่ายสามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์หรืออธิบายกลไกการเกิดการตอบสนองการอักเสบร่วมกันได้ ยังไม่สามารถบอกได้ว่าชนิดใดดีกว่าอาจจะเป็นข้อจำกัดของการได้มาซึ่งข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์ในเครือข่ายนั้นแตกต่างกัน

3. ในการค้นหากระบวนการทางชีวสารสนเทศเพื่อมาช่วยในการวิเคราะห์ข้อมูลไมโครอาร์เรย์การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อ LPS ในเซลล์แมคโครฟาจของหนู เพื่อให้ได้การศึกษาชีววิทยาเชิงระบบสำหรับสืบค้นกลไกการตอบสนองต่อการอักเสบ ทำให้ได้กระบวนการทางชีวสารสนเทศที่ประกอบไปด้วย การจัดเตรียมข้อมูลการแสดงออกของยีน (GEO: Edgar, 2002) การคัดเลือกกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกอย่างเด่นชัด (ArrayMining: Glaab et al., 2009) การสร้างเครือข่ายการแสดงออกกร่วมยีน (ExpressionCorrelation) และเครือข่ายการควบคุมการแสดงออกของยีน (DREM: Schulz et al., 2012) และการบูรณาการเครือข่ายกับข้อมูลทางชีวภาพ (Gene Ontology: Ashburner et al., 2000; GeneCards: Stelzer et al., 2016 และ KEGG: Kanehisa, 2010) ที่ทำให้ได้เครือข่ายต้นแบบที่มีกลุ่มยีนที่มีบทบาทและความสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการอักเสบ ซึ่งสามารถนำไปอธิบายกลไกการตอบสนองการอักเสบและสามารถนำไปวิเคราะห์ร่วมกับสารออกฤทธิ์ได้

5.3 ข้อเสนอแนะ

1. ควรเพิ่มปริมาณชุดข้อมูลกับช่วงเวลาที่ทำการทดสอบให้มีความหลากหลายมากขึ้น เนื่องจากเครือข่ายบางช่วงเวลายังไม่สามารถบอกระยะไรได้มาก
2. ในขั้นตอนการคัดเลือกยีนด้วยวิธี Feature selection ควรเพิ่มการคัดกรองด้วยกลุ่มยีนการอักเสบ เนื่องจากยีนที่ได้จากขั้นตอนนี้พบว่าเกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบน้อยในช่วงเวลาแรกของการวิเคราะห์
3. ควรเพิ่มวิธีการคัดเลือกเครือข่ายย่อยเพิ่มให้มากขึ้น เพื่อให้ได้เครือข่ายสำหรับการอธิบายกลไกการตอบสนองการอักเสบได้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น
4. จากการวิเคราะห์การค้นหาระบบการวิเคราะห์ข้อมูลไมโครอาร์เรย์พบว่าชุดข้อมูลการแสดงออกของยีนที่ถูกทดสอบด้วย LPS โดยส่วนใหญ่จะถูกออกแบบการทดลองการตอบสนองการอักเสบในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน การคัดเลือกช่วงเวลาที่ทำการทดสอบใช้เกณฑ์การตัดสินใจคือผลของสารออกฤทธิ์ที่มีผลต่อการแสดงออกของยีนอักเสบ ซึ่งอาจจะให้ผลตรงกันข้ามกับยีนบางยีนที่อาจจะมีการแสดงออกภายใน 1 ชั่วโมงหลังจากการทดสอบ แต่ตรวจพบว่าเป็นสมาชิกในกลุ่มช่วงเวลาที่มีการตอบสนองหลังจาก 8 ชั่วโมง อาจจะต้องวิเคราะห์พฤติกรรมของการตอบสนองในแบบของช่วงเวลาของยีนแต่ละตัวและนำมาอภิปรายร่วมกัน ซึ่งจะทำให้การวิเคราะห์จะมีความน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น

บรรณานุกรม

- กิตติพันธ์ ชาระเขตร์, จูติรัตน์ นุชศิลา, เหมือนฝัน โวหารกล้า และพิทักษ์ สุตรอนันต์. (2559). การค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบจากข้อมูลไมโครอาร์เรย์โดยการคัดเลือกและการวิเคราะห์เครือข่ายการแสดงออกร่วม. ใน *รายงานสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการระดับชาติ “วิทยาศาสตร์วิจัย” ครั้งที่ 8* (หน้า 235-240). พะเยา: มหาวิทยาลัยพะเยา.
- จิรัตน์ มงคลศิริวัฒนา. (2552). เทคโนโลยียีนชิป. *Thai Journal of Genetics*, 2(2), 84–102.
- พศิกา ไบยา, วิไลพร ศรีตะบุตร และพิทักษ์ สุตรอนันต์. (2557). เครือข่ายควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบจากข้อมูลไมโครอาร์เรย์. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, 19 (ฉบับพิเศษ), 173-184.
- พิรยुทธ สิทธิไชยากุล. (2552). *Acute and Chronic Inflammation*. เอกสารประกอบรายวิชาหลักพยาธิวิทยาและนิติเวชศาสตร์. พิษณุโลก: ภาควิชาพยาธิวิทยาและนิติวิทยาศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร.
- เพ็ญพรรณ เวชวิทยาคลัง. (2555). *ฤทธิ์ต้านการอักเสบของโสม Anti-inflammatory of Ginseng*. นครปฐม: คณะเภสัชศาสตร์ ม.ศิลปากร/โรงพิมพ์ ม.ศิลปากร.
- เหมือนฝัน โวหารกล้า, กอบเกตุ วงษา และพิทักษ์ สุตรอนันต์. (2556). ในการใช้ข้อมูลไมโครอาร์เรย์และพารามิเตอร์เพื่อสำรวจกลไกการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจ. ใน *The Science Research Conference* (หน้า 248-255). พะเยา: มหาวิทยาลัยพะเยา.
- Achek, A., Yesudhas, D., & Choi, S. (2016). Toll-like receptors: promising therapeutic targets for inflammatory diseases. *Archives of pharmacal research*, 39(8), 1032-1049.
- Apweiler, R., Bairoch, A., Wu, C.H., Barker, W.C., Boeckmann, B., Ferro, S., Gasteiger, E., Huang, H., Lopez, R., Magrane, M., & Martin, M.J. (2004). UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic acids research*, 32, D115-D119.
- Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J.M., Davis, A.P., Dolinski, K., Dwight, S.S., Eppig, J.T., & Harris, M.A. (2000). Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature genetics*, 25, 25-29.

- Bajou, K., Peng, H., Laug, W.E., Maillard, C., Noel, A., Foidart, J. M., Martial, J. A., & DeClerck, Y.A. (2008). Plasminogen activator inhibitor-1 protects endothelial cells from FasL-mediated apoptosis. *Cancer cell*, *14*(4), 324-334.
- Barar, J., Saei, A. A., & Omid, Y. (2011). Impacts of DNA Microarray Technology in Gene Therapy. *In Gene Therapy-Developments and Future Perspectives*. doi: 10.5772/18979
- Beinke, S., & Ley, S. C. (2004). Functions of NF- κ B1 and NF- κ B2 in immune cell biology. *Biochemical Journal*, *382*(2), 393-409.
- Benesty, J., Chen, J., Huang, Y., & Cohen, I. (2009). Pearson correlation coefficient. In *Noise reduction in speech processing* (pp. 1-4). doi: https://doi.org/10.1007/978-3-642-00296-0_5.
- Benihoud, K., Esselin, S., Descamps, D., Jullienne, B., Salone, B., Bobe, P., Bonardelle, D., Connault, E., Opolon, P., Saggio, I., & Perricaudet, M. (2007). Respective roles of TNF- α and IL-6 in the immune response-elicited by adenovirus-mediated gene transfer in mice. *Gene therapy*, *14*(6), 533.
- Brazma, A., Hingamp, P., Quackenbush, J., Sherlock, G., Spellman, P., Stoeckert, C., Aach, J., Ansorge, W., Ball, C. A., Causton, H. C., & Gaasterland, T. (2001). Minimum information about a microarray experiment (MIAME)—toward standards for microarray data. *Nature genetics*, *29*(4), 365.
- Bumgarner R. (2013). Overview of DNA microarrays: types, applications, and their future. *Current protocols in molecular biology*, *101*(1), 22.
- Byun, E. H., Fujimura, Y., Yamada, K., & Tachibana, H. (2010). TLR4 signaling inhibitory pathway induced by green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate through 67-kDa laminin receptor. *The Journal of immunology*, *185*(1), 33-45.
- Cardinez, C., Miraghazadeh, B., Tanita, K., da Silva, E., Hoshino, A., Okada, S., Chand, R., Asano, T., Tsumura, M., Yoshida, K., & Ohnishi, H. (2018). Gain-of-function IKBKB mutation causes human combined immune deficiency. *Journal of Experimental Medicine*, *215*(11), 2715-2724.

- Chen, B. S., Yang, S. K., Lan, C. Y., & Chuang, Y. J. (2008). A systems biology approach to construct the gene regulatory network of systemic inflammation via microarray and databases mining. *BMC Medical Genomics*, *1*(1), 46.
- Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., & Zhao, L. (2018). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*, *9*(6), 7204.
- Chen, S., Zhang, L., Xu, R., Ti, Y., Zhao, Y., Zhou, L., & Zhao, J. (2017). *BDKRB2*+ 9/- 9 bp polymorphisms influence *BDKRB2* expression levels and NO production in knee osteoarthritis. *Experimental biology and medicine*, *242*(4), 422-428.
- Chen, Y., Chen, J., Wang, H., Shi, J., Wu, K., Liu, S., Liu, Y., & Wu, J. (2013). HCV-induced miR-21 contributes to evasion of host immune system by targeting MyD88 and IRAK1. *PLoS pathogens*, *9*(4), e1003248.
- Cheng, X., Su, S., Zhang, Z., Wang, H., Yang, F., Luo, Y., & Wang, J. (2011). Virtual network embedding through topology-aware node ranking. *ACM SIGCOMM Computer Communication Review*, *41*(2), 38-47.
- Clark, P. R., Kim, R. K., Pober, J. S., & Kluger, M. S. (2015). Tumor necrosis factor disrupts claudin-5 endothelial tight junction barriers in two distinct NF- κ B-dependent phases. *PloS one*, *10*(3), e0120075.
- Comer, J. E., Galindo, C. L., Zhang, F., Wenglikowski, A. M., Bush, K. L., Garner, H. R., Peterson, J. W., & Chopra, A. K. (2006). Murine macrophage transcriptional and functional responses to *Bacillus anthracis* edema toxin. *Microbial pathogenesis*, *41*(2-3), 96-110.
- de Mejia, E. G., & Dia, V. P. (2009). Lunasin and lunasin-like peptides inhibit inflammation through suppression of NF- κ B pathway in the macrophage. *Peptides*, *30*(12), 2388-2398.
- Dhanasekaran, D. N., & Reddy, E. P. (2008). JNK signaling in apoptosis. *Oncogene*, *27*(48), 6245.
- Di Paolo, N. C., & Shayakhmetov, D. M. (2016). Interleukin 1 α and the inflammatory process. *Nature immunology*, *17*(8), 906.

- Díaz-Urriarte, R., & De Andres, S. A. (2006). Gene selection and classification of microarray data using random forest. *BMC bioinformatics*, 7(1), 3.
- Edgar, R., Domrachev, M., & Lash, A. E. (2002). Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic acids research*, 30(1), 207-210.
- Feng, C. W., Chen, N. F., Sung, C. S., Kuo, H. M., Yang, S. N., Chen, C. L., Hung, H. C., Chen, B. H., Chen, W. F., & Wen, Z. H. (2019). Therapeutic effect of modulating TREM-1 via anti-inflammation and autophagy in Parkinson's disease. *Frontiers in neuroscience*, 13, 769.
- Foster, S. L., & Medzhitov, R. (2009). Gene-specific control of the TLR-induced inflammatory response. *Clinical immunology*, 130(1), 7-15.
- Fronczuk, M., Raftery, A. E., & Yeung, K. Y. (2015). CyNetworkBMA: a Cytoscape app for inferring gene regulatory networks. *Source code for biology and medicine*, 10(1), 11.
- Garg, A. V., Amatya, N., Chen, K., Cruz, J. A., Grover, P., Whibley, N., Conti, H. R., Mir, G. H., Sirakova, T., Childs, E. C., & Smithgall, T. E. (2015). MCP1 endoribonuclease activity negatively regulates interleukin-17-mediated signaling and inflammation. *Immunity*, 43(3), 475-487.
- Garten, A., Petzold, S., Schuster, S., Körner, A., Kratzsch, J., & Kiess, W. (2011). Nampt and its potential role in inflammation and type 2 diabetes. In *Diabetes-Perspectives in Drug Therapy* (pp. 147-164). Berlin, Heidelberg: Springer.
- Glaab, E., Garibaldi, J. M., & Krasnogor, N. (2009). ArrayMining: a modular web-application for microarray analysis combining ensemble and consensus methods with cross-study normalization. *BMC bioinformatics*, 10(1), 358.
- González-Amaro, R., Díaz-González, F., & Sánchez-Madrid, F. (1998). Adhesion molecules in inflammatory diseases. *Drugs*, 56(6), 977-988.
- Haanen, C., & Vermes, I. (1995). Apoptosis and inflammation. *Mediators of inflammation*, 4(1), 5-15.
- Hall, M. A. (2000). *Correlation-based feature selection of discrete and numeric class machine learning*. (Working paper 00/08). Hamilton, New Zealand: University of Waikato, Department of Computer Science.

- Hammer, K. D., Yum, M.Y., Dixon, P. M., & Birt, D. F. (2010). Identification of JAK–STAT pathways as important for the anti-inflammatory activity of a *Hypericum perforatum* fraction and bioactive constituents in RAW 264.7 mouse macrophages. *Phytochemistry*, *71*(7), 716-725.
- Hamosh, A., Scott, A. F., Amberger, J., Bocchini, C., Valle, D., & McKusick, V. A. (2002). Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), a knowledgebase of human genes and genetic disorders. *Nucleic acids research*, *30*(1), 52-55.
- Hao, J., Xu, H., Luo, M., Yu, W., Chen, M., Liao, Y., Zhang, C., Zhao, X., Jiang, W., Hou, S., & Feng, X. (2018). The Tumor-Promoting Role of TRIP4 in Melanoma Progression and its Involvement in Response to BRAF-Targeted Therapy. *Journal of Investigative Dermatology*, *138*(1), 159-170.
- Harjunpää, H., Lloret Asens, M., Guenther, C., & Fagerholm, S. C. (2019). Cell adhesion molecules and their roles and regulation in the immune and tumor microenvironment. *Frontiers in immunology*, *10*, 1078.
- Harrison, D. A. (2012). The jak/stat pathway. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *4*(3), a011205.
- Hecker, M., Lambeck, S., Toepfer, S., Van Someren, E., & Guthke, R. (2009). Gene regulatory network inference: data integration in dynamic models—a review. *Biosystems*, *96*(1), 86-103.
- Huang, C. C., Papas, T. S., & Bhat, N. K. (1997). A variant form of ETS1 induces apoptosis in human colon cancer cells. *Oncogene*, *15*(7), 851.
- Huang, D. W., Sherman, B. T., & Lempicki, R. A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols*, *4*(1), 44.
- Huang, H., Park, C. K., Ryu, J. Y., Chang, E. J., Lee, Y., Kang, S. S., & Kim, H. H. (2006). Expression profiling of lipopolysaccharide target genes in RAW264. 7 cells by oligonucleotide microarray analyses. *Archives of pharmacal research*, *29*(10), 890-897.

- Huang, X., Dai, Z., Cai, L., Sun, K., Cho, J., Albertine, K.H., Malik, A.B., Schraufnagel, D.E., & Zhao, Y.Y. (2016). Endothelial p110 γ PI3K mediates endothelial regeneration and vascular repair after inflammatory vascular injury. *Circulation*, 133(11), 1093-1103.
- Ideker, T., Ozier, O., Schwikowski, B., & Siegel, A. F. (2002). Discovering regulatory and signalling circuits in molecular interaction networks. *Bioinformatics*, 18, S233-S240.
- Johansson, H., Isabella Tsai, Y. C., Fantom, K., Chung, C. W., Kümper, S., Martino, L., Thomas, D. A., Eberl, H. C., Muelbaier, M., House, D., & Rittinger, K. (2019). Fragment-based covalent ligand screening enables rapid discovery of inhibitors for the RBR E3 ubiquitin ligase HOIP. *Journal of the American Chemical Society*, 141(6), 2703-2712.
- Kadena, M., Kumagai, Y., Vandenbon, A., Matsushima, H., Fukamachi, H., Maruta, N., Kataoka, H., Arimoto, T., Morisaki, H., Funatsu, T., & Kuwata, H. (2017). Microarray and gene co-expression analysis reveals that melatonin attenuates immune responses and modulates actin rearrangement in macrophages. *Biochemical and biophysical research communications*, 485(2), 414-420.
- Kahles, F., Findeisen, H. M., & Bruemmer, D. (2014). Osteopontin: A novel regulator at the cross roads of inflammation, obesity and diabetes. *Molecular metabolism*, 3(4), 384-393.
- Kanehisa, M., & Sato, Y. (2019). KEGG Mapper for inferring cellular functions from protein sequences. *Protein Science*, 29(1), 28-35.
- Kelley, S. L., Lukk, T., Nair, S. K., & Tapping, R. I. (2013). The crystal structure of human soluble CD14 reveals a bent solenoid with a hydrophobic amino-terminal pocket. *The Journal of Immunology*, 190(3), 1304-1311.
- Kim, S. Y., Yang, C. S., Lee, H. M., Kim, J. K., Kim, Y. S., Kim, Y. R., Kim, J. S., Kim, T. S., Yuk, J. M., Dufour, C. R., & Lee, S. H. (2018). ESRRA (estrogen-related receptor α) is a key coordinator of transcriptional and post-translational activation of autophagy to promote innate host defense. *Autophagy*, 14(1), 152-168.
- Kinoshita, S., Akira, S., & Kishimoto, T. (1992). A member of the C/EBP family, NF-IL6 beta, forms a heterodimer and transcriptionally synergizes with NF-IL6. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(4), 1473-1476.
- Kitano, H. (2002). Systems biology: a brief overview. *science*, 295(5560), 1662-1664.

- Lacroix, S., & Rivest, S. (1998). Effect of acute systemic inflammatory response and cytokines on the transcription of the genes encoding cyclooxygenase enzymes (COX-1 and COX-2) in the rat brain. *Journal of neurochemistry*, 70(2), 452-466.
- Li, Y., Zhang, F., Nagai, N., Tang, Z., Zhang, S., Scotney, P., Lennartsson, J., Zhu, C., Qu, Y., Fang, C., & Hua, J. (2008). VEGF-B inhibits apoptosis via VEGFR-1-mediated suppression of the expression of BH3-only protein genes in mice and rats. *The Journal of clinical investigation*, 118(3), 913-923.
- Mackey, S. L., & Darlington, G. J. (2004). CCAAT enhancer-binding protein α is required for interleukin-6 receptor α signaling in newborn hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 279(16), 16206-16213.
- Madge, L. A., & Pober, J. S. (2000). A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway, activated by tumor necrosis factor or interleukin-1, inhibits apoptosis but does not activate NF κ B in human endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 275(20), 15458-15465.
- Mages, J., Dietrich, H., & Lang, R. (2008). A genome-wide analysis of LPS tolerance in macrophages. *Immunobiology*, 212(9-10), 723-737.
- Masjedi, A., Hashemi, V., Hojjat-Farsangi, M., Ghalamfarsa, G., Azizi, G., Yousefi, M., & Jadidi-Niaragh, F. (2018). The significant role of interleukin-6 and its signaling pathway in the immunopathogenesis and treatment of breast cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 108, 1415-1424.
- Maurya, M. R., Gupta, S., Li, X., Fahy, E., Dinasarapu, A. R., Sud, M., Brown, H. A., Glass, C. K., Murphy, R. C., Russell, D. W., & Dennis, E. A. (2013). Analysis of inflammatory and lipid metabolic networks across RAW264. 7 and thioglycolate-elicited macrophages. *Journal of lipid research*, 54(9), 2525-2542.
- McKee, C. A., & Lukens, J. R. (2016). Emerging roles for the immune system in traumatic brain injury. *Frontiers in immunology*, 7, 556.
- McKusick, V. A. (2007). Mendelian Inheritance in Man and its online version, OMIM. *The American Journal of Human Genetics*, 80(4), 588-604.
- Medzhitov, R., & Horng, T. (2009). Transcriptional control of the inflammatory response. *Nature Reviews Immunology*, 9(10), 692.

- Moore, K. J., Koplev, S., Fisher, E. A., Tabas, I., Björkegren, J. L., Doran, A. C., & Kovacic, J. C. (2018). Macrophage trafficking, inflammatory resolution, and genomics in atherosclerosis: JACC macrophage in CVD series (part 2). *Journal of the American College of Cardiology*, *72*(18), 2181-2197.
- Morrison, D. K. (2012). MAP kinase pathways. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *4*(11), a011254.
- Nan, J., Wang, Y., Yang, J., & Stark, G. R. (2018). IRF9 and unphosphorylated STAT2 cooperate with NF- κ B to drive IL6 expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(15), 3906-3911.
- Nguyen, G., Delarue, F., Burcklé, C., Bouzahir, L., Giller, T., & Sraer, J. D. (2002). Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *The Journal of clinical investigation*, *109*(11), 1417-1427.
- Nilsson, R., Bajic, V.B., Suzuki, H., di Bernardo, D., Björkegren, J., Katayama, S., Reid, J.F., Sweet, M.J., Gariboldi, M., Carninci, P., & Hayashizaki, Y. (2006). Transcriptional network dynamics in macrophage activation. *Genomics*, *88*(2), 133-142.
- Nishimura, D. (2001). BioCarta. Biotech Software & Internet Report. *The Computer Software Journal for Scient*, *2*(3), 117-120.
- Numata, A., Shimoda, K., Kamezaki, K., Haro, T., Kakumitsu, H., Shide, K., Kato, K., Miyamoto, T., Yamashita, Y., Oshima, Y., & Nakajima, H. (2005). Signal transducers and activators of transcription 3 augments the transcriptional activity of CCAAT/enhancer-binding protein α in granulocyte colony-stimulating factor signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(13), 12621-12629.
- Oliveros, J. C. (2007). VENNY. *An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams*. Retrieved from <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>.
- Olson, N. E. (2006). The microarray data analysis process: from raw data to biological significance. *NeuroRx*, *3*(3), 373-383.
- Ono, M., Yaguchi, H., Ohkura, N., Kitabayashi, I., Nagamura, Y., Nomura, T., Miyachi, Y., Tsukada, T., & Sakaguchi, S. (2007). Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1. *Nature*, *446*(7136), 685.

- Qin, J., Qian, Y., Yao, J., Grace, C., & Li, X. (2005). SIGIRR inhibits interleukin-1 receptor-and toll-like receptor 4-mediated signaling through different mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, 280(26), 25233-25241.
- Rajsbaum, R., Versteeg, G.A., Schmid, S., Maestre, A.M., Belicha-Villanueva, A., Martínez-Romero, C., Patel, J.R., Morrison, J., Pisanelli, G., Miorin, L., & Laurent-Rolle, M. (2014). Unanchored K48-linked polyubiquitin synthesized by the E3-ubiquitin ligase TRIM6 stimulates the interferon- $\text{IKK}\epsilon$ kinase-mediated antiviral response. *Immunity*, 40(6), 880-895.
- Ravasi, T., Wells, C. A., & Hume, D. A. (2007). Systems biology of transcription control in macrophages. *Bioessays*, 29(12), 1215-1226.
- Roy, S.K., Hu, J., Meng, Q., Xia, Y., Shapiro, P.S., Reddy, S.P., Platanius, L.C., Lindner, D.J., Johnson, P.F., Pritchard, C., & Pagés, G. (2002). MEKK1 plays a critical role in activating the transcription factor C/EBP- β -dependent gene expression in response to IFN- γ . *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(12), 7945-7950.
- Rutledge, H. R., Jiang, W., Yang, J., Warg, L. A., Schwartz, D. A., Pisetsky, D. S., & Yang, I. V. (2012). Gene expression profiles of RAW264. 7 macrophages stimulated with preparations of LPS differing in isolation and purity. *Innate immunity*, 18(1), 80-88.
- Schott, J., Reitter, S., Philipp, J., Haneke, K., Schäfer, H., & Stoecklin, G. (2014). Translational regulation of specific mRNAs controls feedback inhibition and survival during macrophage activation. *PLoS genetics*, 10(6), e1004368.
- Schulz, M. H., Devanny, W. E., Gitter, A., Zhong, S., Ernst, J., & Bar-Joseph, Z. (2012). DREM 2.0: Improved reconstruction of dynamic regulatory networks from time-series expression data. *BMC systems biology*, 6(1), 104.
- Serra, R. W., Fang, M., Park, S. M., Hutchinson, L., & Green, M. R. (2014). A KRAS-directed transcriptional silencing pathway that mediates the CpG island methylator phenotype. *Elife*, 3, e02313.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., & Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for

- integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research*, 13(11), 2498-2504.
- Sharif-Askari, E., Vassen, L., Kosan, C., Khandanpour, C., Gaudreau, M.C., Heyd, F., Okayama, T., Jin, J., Rojas, M.E., Grimes, H.L., & Zeng, H. (2010). Zinc finger protein Gfi1 controls the endotoxin-mediated Toll-like receptor inflammatory response by antagonizing NF- κ B p65. *Molecular and cellular biology*, 30(16), 3929-3942.
- Sheikh, M. H., & Solito, E. (2018). Annexin A1: Uncovering the many talents of an old protein. *International journal of molecular sciences*, 19(4), 1045.
- Shell, S. A., Hesse, C., Morris, S. M., & Milcarek, C. (2005). Elevated levels of the 64-kDa cleavage stimulatory factor (CstF-64) in lipopolysaccharide-stimulated macrophages influence gene expression and induce alternative poly (A) site selection. *Journal of Biological Chemistry*, 280(48), 39950-39961.
- Sheu, M. L., Shen, C. C., Jheng, J. R., & Chiang, C. K. (2017). Activation of PI3K in response to high glucose leads to regulation of SOCS-3 and STAT1/3 signals and induction of glomerular mesangial extracellular matrix formation. *Oncotarget*, 8(10), 16925.
- Siegmund, B., Sennello, J. A., Jones-Carson, J., Gamboni-Robertson, F., Lehr, H. A., Batra, A., Fedke, I., Zeitz, M., & Fantuzzi, G. (2004). Leptin receptor expression on T lymphocytes modulates chronic intestinal inflammation in mice. *Gut*, 53(7), 965-972.
- Simone, T. M., Higgins, C. E., Czekay, R. P., Law, B. K., Higgins, S. P., Archambeault, J., & Higgins, P. J. (2014). SERPINE1: a molecular switch in the proliferation-migration dichotomy in wound "activated" keratinocytes. *Advances in wound care*, 3(3), 281-290.
- Smyth, G. K. (2004). Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical applications in genetics and molecular biology*, 3, 1-25.
- Stelzer, G., Rosen, N., Plaschkes, I., Zimmerman, S., Twik, M., Fishilevich, S., Stein, T. I., Nudel, R., Lieder, I., Mazor, Y., & Kaplan, S. (2016). The GeneCards suite: from gene data mining to disease genome sequence analyses. *Current protocols in bioinformatics*, 54(1), 1-30.

- Streetz, K. L., Luedde, T., Manns, M. P., & Trautwein, C. (2000). Interleukin 6 and liver regeneration. *Gut*, *47*(2), 309-312.
- Szklarczyk, D., Gable, A.L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N. T., Morris, J. H., Bork, P., & Jensen, L. J. (2018). STRING v11: protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic acids research*, *47*(D1), D607-D613.
- Tusher, V. G., Tibshirani, R., & Chu, G. (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(9), 5116-5121.
- Uto, T., Qin, G. W., Morinaga, O., & Shoyama, Y. (2012). 17-Hydroxy-jolkinolide B, a diterpenoid from *Euphorbia fischeriana*, inhibits inflammatory mediators but activates heme oxygenase-1 expression in lipopolysaccharide-stimulated murine macrophages. *International immunopharmacology*, *12*(1), 101-109.
- van Dam, S., Vosa, U., van der Graaf, A., Franke, L., & de Magalhaes, J. P. (2017). Gene co-expression analysis for functional classification and gene–disease predictions. *Briefings in bioinformatics*, *19*(4), 575-592.
- van der Bruggen, T., Nijenhuis, S., van Raaij, E., Verhoef, J., & van Asbeck, B. S. (1999). Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production by human monocytes involves the raf-1/MEK1-MEK2/ERK1-ERK2 pathway. *Infection and Immunity*, *67*(8), 3824-3829.
- Verfaillie, T., Garg, A. D., & Agostinis, P. (2013). Targeting ER stress induced apoptosis and inflammation in cancer. *Cancer letters*, *332*(2), 249-264.
- Verga Falzacappa, M. V., Vujic Spasic, M., Kessler, R., Stolte, J., Hentze, M. W., & Muckenthaler, M. U. (2006). STAT3 mediates hepatic hepcidin expression and its inflammatory stimulation. *Blood*, *109*(1), 353-358.
- Verga Falzacappa, M. V., Vujic Spasic, M., Kessler, R., Stolte, J., Hentze, M. W., & Muckenthaler, M. U. (2006). STAT3 mediates hepatic hepcidin expression and its inflammatory stimulation. *Blood*, *109*(1), 353-358.

- Weintz, G., Olsen, J. V., Frühauf, K., Niedzielska, M., Amit, I., Jantsch, J., Mages, J., Frech, C., Dölken, L., & Mann, M. (2010). The phosphoproteome of toll-like receptor-activated macrophages. *Molecular systems biology*, 6(1), 1744-4292.
- Wu, C., Zhao, W., Zhang, X., & Chen, X. (2015). Neocryptotanshinone inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW264.7 macrophages by suppression of NF- κ B and iNOS signaling pathways. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5(4), 323-329.
- Xia, J., Benner, M. J., & Hancock, R. E. (2014). NetworkAnalyst-integrative approaches for protein-protein interaction network analysis and visual exploration. *Nucleic acids research*, 42(W1), W167-W174.
- Xu, P., & Derynck, R. (2010). Direct activation of TACE-mediated ectodomain shedding by p38 MAP kinase regulates EGF receptor-dependent cell proliferation. *Molecular cell*, 37(4), 551-566.
- Yao, J., Mackman, N., Edgington, T. S., & Fan, S. T. (1997). Lipopolysaccharide induction of the tumor necrosis factor- α promoter in human monocytic cells regulation by Egr-1, c-Jun, AND NF- κ B transcription factors. *Journal of Biological Chemistry*, 272(28), 17795-17801.
- Yee, N. K., & Hamerman, J. A. (2013). β 2 integrins inhibit TLR responses by regulating NF- κ B pathway and p38 MAPK activation. *European journal of immunology*, 43(3), 779-792.
- Yu, D., Kim, M., Xiao, G., & Hwang, T. H. (2013). Review of biological network data and its applications. *Genomics & informatics*, 11(4), 200.
- Zanoni, I., Ostuni, R., Marek, L. R., Barresi, S., Barbalat, R., Barton, G. M., Granucci, F., & Kagan, J. C. (2011). CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like receptor 4. *Cell*, 147(4), 868-880.
- Zarubin, T., & Jiahuai, H. A. N. (2005). Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell research*, 15(1), 11.
- Zhang, B., & Horvath, S. (2005). A general framework for weighted gene co-expression network analysis. *Statistical applications in genetics and molecular biology*, 4(1). doi: <https://doi.org/10.2202/1544-6115.1128>

- Zhang, J., Liu, J., Wu, J., Li, W., Chen, Z., & Yang, L. (2019). Progression of the role of CRYAB in signaling pathways and cancers. *OncoTargets and therapy*, *12*, 4129.
- Zheng, G., Tu, K., Yang, Q., Xiong, Y., Wei, C., Xie, L., Zhu, Y., & Li, Y. (2008). ITFP: an integrated platform of mammalian transcription factors. *Bioinformatics*, *24*(20), 2416-2417.
- Zhong, J. C., Yu, X. Y., Lin, Q. X., Li, X. H., Huang, X. Z., Xiao, D. Z., & Lin, S. G. (2008). Enhanced angiotensin converting enzyme 2 regulates the insulin/Akt signalling pathway by blockade of macrophage migration inhibitory factor expression. *British journal of pharmacology*, *153*(1), 66-74.
- Zimmermann, K., Opitz, N., Dedio, J., Renné, C., Müller-Esterl, W., & Oess, S. (2002). NOSTRIN: a protein modulating nitric oxide release and subcellular distribution of endothelial nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(26), 17167-17172.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ผลการวิเคราะห์ Housekeeping gene ที่ผ่านการปรับรูปแบบมาตรฐานข้อมูล (Normalization) และ
การคัดเลือกยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบ โดย Feature selection

ตารางภาคผนวก ก-1 ผลการวิเคราะห์ค่าการแสดงออกของ *GAPDH* ซึ่งเป็น housekeeping gene ที่ผ่านการปรับรูปแบบมาตรฐานข้อมูล

Data	Time	<i>GAPDH</i> (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)						
		No Condition 1	No Condition 2	No Condition 3	LPS 1	LPS 2	LPS 3	p-value
RAW data	3 Hr.	31953.7	32237	31546.4	33598.3	27747.9	30172.5	0.510391117
	6 Hr.	31953.7	32237	31546.4	31001.9	29919.2	31461.4	0.227469647
	8 Hr.	21292.36037	23811.46293	25008.64245	27030.22373	26551.89679	24419.46768	0.28674718
	18 Hr.	4535	4860.1	6099.3	7027	5532.1	5338.4	0.484387504
log ₂ -transformed data	3 Hr.	14.96369537	14.97642987	14.94518776	15.03610062	14.76009097	14.88094662	0.492883525
	6 Hr.	14.96369537	14.97642987	14.94518776	14.92006902	14.86878398	14.94129525	0.229152796
	8 Hr.	14.37804827	14.53936864	14.61013913	14.72228583	14.69652731	14.57574413	0.290419234
	18 Hr.	12.14688684	12.24677028	12.57442796	12.77869318	12.43361152	12.38219169	0.47305126
Normalization data	3 Hr.	0.679911014	0.39555427	0.520064841	0.605316088	0.618435703	0.586248763	0.492883525
	6 Hr.	1.064066459	0.798513244	0.956996667	1.126583533	0.913319994	1.367955281	0.212416054
	8 Hr.	0.001957816	0.168156845	0.241067575	0.356605828	0.330068311	0.205632406	0.290419234
	18 Hr.	-2.296678503	-2.193774376	-1.856207658	-1.645765039	-2.001282678	-2.054257545	0.47305126

ตารางภาคผนวก ก-2 ตารางแสดงรายชื่อยีนที่ถูกคัดเลือกลักษณะอย่างน้อยสองวิธีการจากทั้งหมดสามวิธีการ คือ SAM (Tusher, 2001), eBayes (Smyth, 2004), และ PLS-CV (Hall, 2000) ของชุดข้อมูลไมโครอาร์เรย์

ชุดข้อมูล	จำนวนยีนที่พบ	รายชื่อที่พบ
GSE4712 (สภาวะที่ 3 ชั่วโมง หลังจากที่ถูกกระตุ้น ด้วย LPS)	83	<i>Mocos Dcbld1 Aoah 1700011H14Rik Car14 Scg2 Rnf208 Kif9 Enthd2 Slc22a7 Gabrq Cald1 Mcpt2 Auts2 Ppp1r42 Trpc4 Cubn Dsc3 Rhod Itpka Scml4 Sult1b1 Moxd1 Eppk1 Fstl3 Ano1 Cend1 Avpr2 Gap43 S100b Cyp24a1 Rtkn2 Zfp759 Fcamr Vmn1r46 Zfp825 Rdh16 Dqx1 Naa11 Dpf3 Tmed6 Hoxb2 Atp1b4 Vmn1r11 Sntg2 Cdh1 Ap1m2 Rnf17 Ccr8 Adipoq Kcnj14 Prl8a9 Hspa1a Ace2 Dnase2b Srd5a2 Lao1 Yes1 Cntn1 Hes2 Saa4 Tulp2 Hoxc4 Hes5 AY074887 Pla2r1 Crygn Iyd Fgf20 Nat3 Aanat Myf5 Bicd1 Gbp8 Gm20362 Rgs8 Vangl2 Ccdc64 Efh1 Agr2 Gsx1 Sost Myh11</i>
GSE4712 (สภาวะที่ 6 ชั่วโมง หลังจากที่ถูกกระตุ้น ด้วย LPS)	102	<i>Rnf208 Larp6 1700011H14Rik Asp1 2310057J18Rik Klra1 Dcbld1 Defb1 Lama1 Klra16 Tspan1 AA517023 Ropn11 Exd2 Pdyn Tal2 Adra2b Tbx4 Crhr2 Havcr1 Ttc39c Gpr31b Gm11559 Pdzd9 Ppp1r42 Gipc3 Uchl4 Ephb3 Gm6277 Spint2 Spink4 Gpc6 B930003M22Rik S100b Steap3 Nebl Agt Vmn1r44 Moxd1 Steap3 Armcx4 Cntn1 2310030G06Rik Efnb3 Bhlhe22 Mansc1 Rapsn Gm6277 Serpina1a Magea6 Ly75 Cyp2c39 Slco1c1 Krtap16-3 Atp1b4 Vipr2 Il7 Spint2 Spink4 Gpc6 B930003M22Rik S100b Slc38a4 Grtp1 Gas1 C530030P08Rik Nebl Agt Vmn1r44 Sfxn4 Tmem150b Tagln Rell2 Serpinb5 Dqx1 Heph Twist1 Itpka Bnpl Fam65b Tsga8 Cldn7 Serpina1a Magea6 Ly75 Cyp2c39 Slco1c1 Krtap16-3 Atp1b4 Vipr2 Il7 Gas1 C530030P08Rik Armcx4 Cntn1 2310030G06Rik Efnb3 Bhlhe22 Mansc1 Rapsn Slc38a4 Grtp1Moxd1</i>

ตารางภาคผนวก ก-2 (ต่อ)

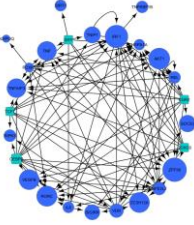
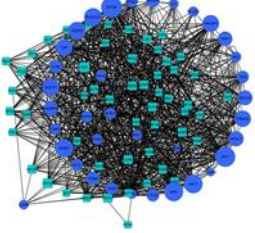
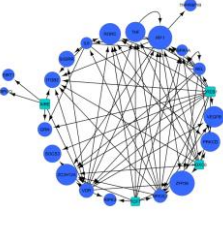

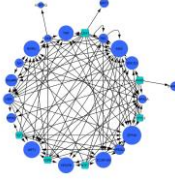
ชุดข้อมูล	จำนวนยีนที่พบ	รายชื่อที่พบ
<p>GSE21841</p> <p>(สภาวะที่ 8 ชั่วโมง หลังจากที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS)</p>	<p>92</p>	<p><i>C78513 Il1b St3gal1 Cd83 Ifnb1 Socs3 Gadd45b Asic5 Ccl5 Lif BC057675 Tnc Sdc4 Cerl2 Lrrc8c Csf3 Tnfaip3 Mtmr7 Il15ra Col5a3 Csf2 Il4i1 Gm8615 Il15 Tnfaip2 Cd274 Rps6ka2 Il1a Olfr1508 Ccl22 Marcks Hs6st1 3930401B19Rik Arhgef3 Nfic Zfp36l2 Lyl1 Mtss1 Aldh1a2 Sip1 Haus4 Tsc22d1 Cflar H1f0 1200003I10Rik Pde4b Mum1 C80360 Cxcl2 Pim1 Impa2 Gbp7 Tnfrsf22 Bmyc F8a Dher7 Ung Phlda1 Tmem206 Frmd4b Timp1 Wdhd1 Cldn11 Fas Hoxb13 Appl2 Vegfc Rcan3 Ripk2 LOC624295Gp49a Il1rn Zbtb8a Saa3 St8sia4 Tnfrsf1b Il6 Hnf1b Tslp Edn1 Gbp2b Lix1 D7Ert187e Ngef Ceacam14 Fpr1 Dusp2 Nlrp3 Chaf1b Fbxo21 Rasa3 Maf</i></p>
<p>GSE2002</p> <p>(สภาวะที่ 18 ชั่วโมง หลังจากที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS)</p>	<p>97</p>	<p><i>Nrm Cenpa Bst2 Traf1 Haus4 Ptpn23 Tspo C78513 Kif11 Dlgap5 Rgl1 Ncapd2 C920025E04Rik Cebpb Birc5 Plk3 Glrx Mad2l1 Ccna2 Pbk Rad51ap1 Zc3h12a Plk1 3930401B19Rik Slc7a2 Melk Rps6ka2 Gstt2 Plagl2 Kif20a Brca1 Ercc6l Socs3 Slfn1 D17H6S56E-5 Gbp2 Pdpn Blvrb Serpinb2 Cdc25c Ptgs2 Procr Hdc Casp4 Ccnb1 Il1b 1200015M12Rik Mki67 Cdca3 Dgkg Hist2h2aa2 Iqgap3 Cenpn Anln Zbp1 Pole Kif2c Ect2 Sod2 Il13ra2 Ccl2 Hmnr Oasl2 Nuf2 Slc15a3 Cp Ccnb2 Irf7 Ube2c Ube2t Cenpf Lgals9 Ptges Gbp2b Magee1 Pdcd4 Gata3 Cd300lf Ccl6 Saa3 Nusap1 Lcn2 Cd274 Ms4a4c Maff Cep55 Tnfrsf1b Car13 Clec4n Vegfc 1200003I10Rik Depdc1a Wdr62 Il1rn Cfb Nos2 Ms4a6d</i></p>

ภาคผนวก ข

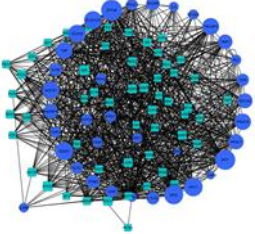
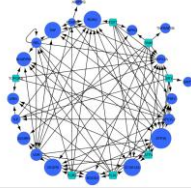
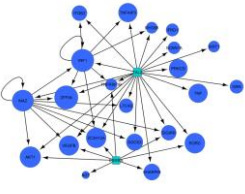

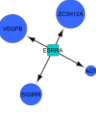



โมดูลย่อยของเครือข่ายการควบคุมการแสดงออกของยีน

(Gene regulatory network)

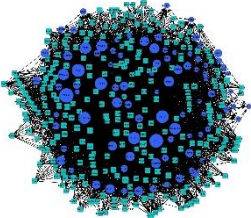
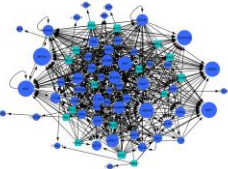
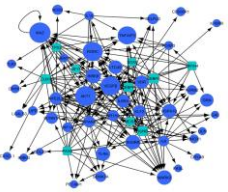
ตารางภาคผนวก ข-1 ตารางแสดงโมดูลย่อยและรายชื่อทรานส์สคริปชันแฟกเตอร์กับยีนเป้าหมาย
ของแต่ละสถานะ โดยการค้นหาด้วยปลั๊กอิน Jactivemodule

สถานะที่ทำการศึกษา (ชั่วโมง)	โมดูลที่	รายชื่อยีนที่อยู่ในโมดูล
	 3-1	<i>Hoxc6, Rel, Nfe2l2, Ripk3, Rorc, Sirt1, Socs3, Tnf, Tnfaip3, Tnfrsf1b, Tnip1, Egr2, Vdr, Vegfb, Zc3h12a, Akt1, Zfp36, Sigirr, Cebpb, Sry, Tcf7, Foxp3, Hspa1a, Il6, Irf1, Adipoq</i>
 3 ชั่วโมง	 3-2	<i>Cebpa, Rel, Nfe2l2, Ripk3, Rorc, Creb1, Ifrd1, Sirt1, Socs3, Myd88, Tnf, Klf2, Tnfrsf1b, Tnip1, Vdr, Vegfb, Zc3h12a, Zfp36, Sigirr, Cebpb, Sry, Foxp3, Grn, Hspa1a, Il6, Itgb2, Irf1, Socs1, Adipoq</i>
	 3-3	<i>Prkcd, Hoxc6, Tcf7, Rel, Nfe2l2, Grn, Ripk3, Hspa1a, Rorc, Creb1, Sirt1, Il6, Itgb2, Socs3, Tnf, Irf1, Tnfrsf1b, Vdr, Vegfb, Zc3h12a, Zfp36, Aire, Adipoq, Sigirr</i>
	 3-4	<i>Tcf7l2, Rel, Nfe2l2, Ripk3, Rorc, Sirt1, Socs3, Atf1, Tnf, Pax5, Tnfrsf1b, Egr2, Vdr, Vegfb, Zc3h12a, Akt1, Zfp36, Sigirr, Tcf7, Foxp3, Hspa1a, Il6, Maz, Cux1, Adipoq</i>

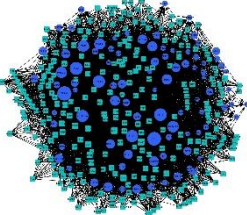
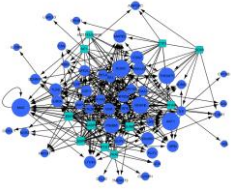
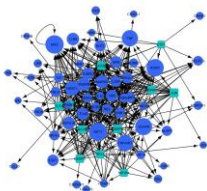
ตารางภาคผนวก ข-1 (ต่อ)

สถานะที่ทำการศึกษา (ชั่วโมง)	โมดูลที่	รายชื่อยีนที่อยู่ในโมดูล
 3 ชั่วโมง	 3-5	<i>Rel, Nfe2l2, Ripk3, Rorc, Sharpin, Ifrd1, Sirt1, Socs3, Tnf, Pax5, Tnfrsf1b, Egr2, Vdr, Vegfb, Zc3h12a, Zfp36, Topors, Sigirr, Sry, Tcf7, Foxp3, Grn, Atf4, Hspa1a, Il6, Plau, Adipoq</i>
 6 ชั่วโมง	 6-1	<i>Tnf</i>
	 6-2	<i>Esrra, Agt, Vegfb, Zc3h12a, Sigirr</i>
	 6-3	<i>Esrra, Vegfb, Zc3h12a, Sharpin, Sigirr</i>
	 6-4	<i>Scnn1a</i>
	 6-5	<i>Sirt1</i>

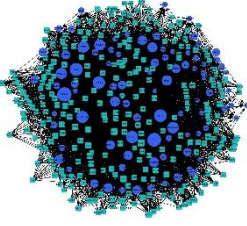
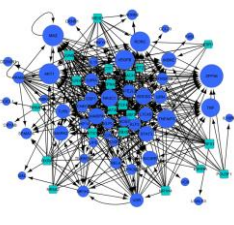
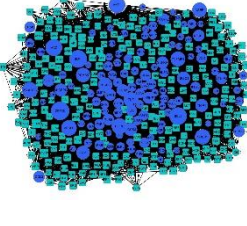
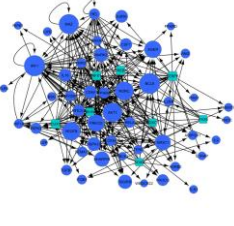
ตารางภาคผนวก ข-1 (ต่อ)

สภาวะที่ทำการศึกษา (ชั่วโมง)	โมดูลที่	รายชื่อยีนที่อยู่ในโมดูล
 <p>8 ชั่วโมง</p>	 <p>8-1</p>	<p><i>Hoxc6, Bach1, Rel, Nfe2l2, Rela, Nr6a1, Rorc, Sharpin, Socs3, Stat3, Gal, Cryab, Rfx1, Tnf, Ucn, Tnip1, Bsg, Ccl20, Vdr, Tmem173, Vegfb, Zc3h12a, Zfp36, Sigirr, Adrb2, Runx1, Nr1h4, Nfatc2, Cd200r1, Foxp3, Tbx5, Pparg, Mark2, Nos3, Pecam1, Rxra, Scnn1a, Selplg, Sema7a, Tlr9, Efna2, Il10rb, Max, Hmox1, Ltc4s, Nr1h2, Tnfrsf1a, Il6ra, Klf2, Mmp9, Nlrp3, Il10, Pax1, Akt1, Pbx1, Fasl, Crhr1, Cx3cl1, Tyrobp, Grn, Hif1a, Ikbkg, Zeb1, Elf2, Lgals3, Trp53, Lipe, Maz, Ppara, Meis1, Nr3c1</i></p>
	 <p>8-2</p>	<p><i>Junb, Cebpa, Nfe2l2, Rorc, Tpx2, Gal, Cryab, Ucn, Tnfaip3, Gfi1, Ccl20, Vdr, Tmem173, Vegfb, Sigirr, Adrb2, Nr1h4, Cd200r1, Foxp3, Mark2, Nos3, Pecam1, Scnn1a, Selplg, Sema7a, Tlr9, Cebp, Il10rb, Hmox1, Hspa1b, Ltc4s, Nr1h2, Il6ra, Klf2, Il10, Akt1, Fasl, Crhr1, Cx3cl1, Sox9, Grn, Hif1a, Ikbkg, Pax6, Ikbke, Il6, Tlr3, Lgals3, Lipe, Maz, Ppara, Cux1, Meis1</i></p>

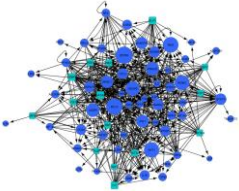
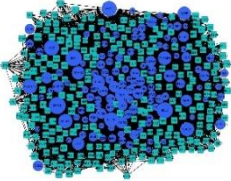

ตารางภาคผนวก ข-1 (ต่อ)

สภาวะที่ทำการศึกษา (ชั่วโมง)	โมดูลที่	รายชื่อยีนที่อยู่ในโมดูล
 8 ชั่วโมง	 8-3	<p><i>Psmb8, Ets1, Junb, Cebpa, Nfe2l2, Rel, Rela, Gabpa, Rorc, Gal, Cryab, Ucn, Tnfaip3, Ccl20, Vdr, Tmem173, Vegfb, Sigirr, Adrb2, Nr1h4, Cd200r1, Foxp3, Ctf1, Itgb2, Mark2, Nos3, Pecam1, Scnn1a, Selplg, Sema7a, Tlr9, Cebpd, Fas, Il10rb, Hmox1, Hspa1b, Ltc4s, Nr1h2, Il6ra, Klf2, Mmp9, Adipor1, Akt1, Fasl, Crhr1, Csf1, Cx3cl1, Tyrobp, Sox9, Grn, Ikbkg, Pax6, Il6, Lgals3, Trp53, Lipe, Maz, Ppara, 4921515j06rik, Nfkbia, Nf1</i></p>
8 ชั่วโมง	 8-4	<p><i>Ets1, Bach1, Junb, Cebpa, Rel, Nfe2l2, Rela, Rorc, Gal, Cryab, Rfx1, Tnf, Ucn, Tnfaip3, Bsg, Ccl20, Vdr, Tmem173, Vegfb, Sigirr, Adrb2, Runx1, Nr1h4, Cd200r1, Foxp3, Ctf1, Pparg, Mark2, Nos3, Pecam1, Scnn1a, Selplg, Sema7a, Tlr9, Cebpd, Fas, Il10rb, Hmox1, Tcf4, Hspa1b, Ltc4s, Nr1h2, Il6ra, Klf2, Il10, Nlrp3, Adipor1, Akt1, Fasl, Crhr1, Csf1, Cx3cl1, Tyrobp, Grn, Ikbkg, Hif1a, Jun, Il6, Il23a, Lgals3, Trp53, Lipe, Maz, Ppara, Nr3c1</i></p>

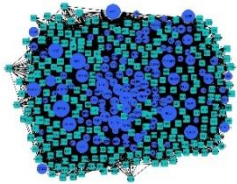
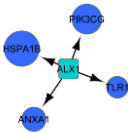

ตารางภาคผนวก ข-1 (ต่อ)

สภาวะที่ทำการศึกษา (ชั่วโมง)	โมดูลที่	รายชื่อยีนที่อยู่ในโมดูล
 <p>8 ชั่วโมง</p>	 <p>8-5</p>	<p><i>Ets1, Bach1, Junb, Nfe2l2, Nr5a2, Rela, Nr6a1, Rorc, Sharpin, Socs3, Stat3, Gal, Cryab, Rfx1, Tnf, Ucn, Tnfaip3, Esrra, Tnfrsf1b, Ccl20, Vdr, Tmem173, Vegfb, Zfp36, Sigirr, Adrb2, Runx1, Nr1h4, Cd200r1, Foxp3, Ctf1, Pou3f1, Tbx5, Mark2, Nos3, Pecam1, Rxra, Scnn1a, Selplg, Sema7a, Tlr9, Efna2, Il10rb, Usf2, Hmox1, Tef4, Ltc4s, Nr1h2, Esr1, Il6ra, Klf2, Il10, Gata4, Akt1, Fasl, Crhr1, Csf1, Cx3cl1, Tyrobp, Mef2a, Grn, Hif1a, Ikbkg, Ikbke, Lgals3, Lipe, Maz, Ppara, Meis1, Nr3c1</i></p>
 <p>18 ชั่วโมง</p>	 <p>18-1</p>	<p><i>Prkcd, Rbck1, Rel, Nfe2l2, Rela, Ripk1, Foxc1, Ripk3, Rorc, Sharpin, Creb1, Wbscr22, Rfx1, Ppard, Tgfb1, Bsg, Tmem173, Vegfb, Sigirr, Adrb2, Alox5ap, Nr1h4, Lep, Il16, Mark2, Sema7a, Il2, Anxa1, Cd44, Hspa1b, Myd88, Il6ra, Tlr4, Adipor1, Ager, Itgb1, Akt1, Bcl6, Pias1, Pik3cg, Cebpb, Csf1, Pnoc, Tlr1, Ang, Sox9, Hif1a, Pax6, Il2ra, Irf1, Trp53, Lipe, Maz, Ppara, Tfrc, Cux1, Nr3c1, Il1rap</i></p>

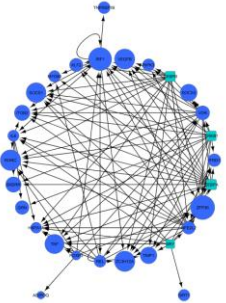
ตารางภาคผนวก ข-1 (ต่อ)

สถานะที่ทำการศึกษา (ชั่วโมง)	โมดูลที่	รายชื่อยีนที่อยู่ในโมดูล
	 18-2	<p><i>Pdx1, Prkcd, Pou2f2, Rbck1, Cebpa, Rel, Nfe2l2, Rela, Ripk1, Elk1, Ripk3, Rorc, Sharpin, Stat3, Wbscr22, Ppard, Tgfb1, Bsg, Tmem173, Vegfb, Zfp36, Irf9, Sigirr, Sry, Adrb2, Alox5ap, Nr1h4, Ccl3, Lep, Il16, Irs1, Pparg, Mark2, Sema7a, Il2, Anxa1, Cd44, Sox10, Hspa1b, Myd88, Nr1h2, Ccr2, Tnfrsf1a, Il6ra, Tlr4, Gata3, Adipor1, Ager, Itgb1, Akt1, Ltb4r1, Bcl6, Tbp, Pbx1, Pias1, Pik3cg, Pnoc, Atf3, Tlr1, Gata2, Ang, Hif1a, Tgjf1, Il2ra, Trp53, Lipe, Yy1, Maz, Ppara, Nr3c1, Il1rap</i></p>
 18 ชั่วโมง	 18-3	<p><i>Prkcd, Rbck1, Nfe2l2, Rela, Ripk1, Ripk3, Rorc, Sharpin, Wbscr22, Rfx1, Ppard, Tgfb1, Tnfrsf1b, Bsg, Tmem173, Vegfb, Sigirr, Adrb2, Alox5ap, Nr1h4, Lep, Il16, Mark2, Casp4, Sema7a, Il2, Anxa1, Cd44, Gata1, Hspa1b, Myd88, Nr1h2, Ccr2, Irf7, Tnfrsf1a, Il6ra, Stat2, Tlr4, Cd40, Adipor1, Ager, Itgb1, Akt1, Ltb4r1, Bcl6, Pias1, Pik3cg, Cebpb, Csf1, Pnoc, Tlr1, Ang, Hif1a, Il6, Il2ra, Irf1, Trp53, Lipe, Acp5, Maz, Ppara, Meis1, Nr3c1, Il1rap</i></p>

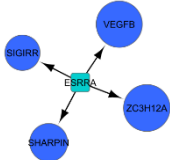
ตารางภาคผนวก ข-1 (ต่อ)

สถานะที่ทำการศึกษา (ชั่วโมง)	โมดูลที่	รายชื่อยีนที่อยู่ในโมดูล
 18 ชั่วโมง	 18-4	<i>Alx1, Tlr1, Hspa1b, Pik3cg, Anxa1</i>
	 18-5	<i>Tlr1, Hspa1b, Traf4, Pik3cg, Anxa1</i>

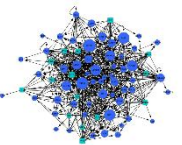
ตารางภาคผนวก ข-2 โมดูลที่ถูกคัดเลือกของ GRN ในแต่ละช่วงเวลาพร้อมรายชื่อยีนภายในโมดูลและคำอธิบาย

โมดูล	ยีนที่พบ	ประเภท		คำอธิบาย	แหล่งอ้างอิง
		TF	TG		
 <p>3-3</p>	<i>Cebpa</i>	✓		The encoded protein functions in homodimers and also heterodimers with CCAAT/enhancer-binding proteins beta and gamma	(Numata et al., 2005)
	<i>Cebpb</i>	✓		Important transcription factor regulating the expression of genes involved in immune and inflammatory responses	(Roy et al., 2002)
	<i>Il6</i>		✓	This gene encodes a cytokine that functions in inflammation and the maturation of B cells.	(Falzacappa et al., 2006)
	<i>Myd88</i>		✓	This gene encodes a cytosolic adapter protein that plays a central role in the innate and adaptive immune response. This protein functions as an essential signal transducer in the interleukin-1 and Toll-like receptor signaling pathways.	(Chen et al., 2013)
	<i>Tnf</i>		✓	This gene encodes a multifunctional proinflammatory cytokine that belongs to the tumor necrosis factor (TNF) superfamily. This cytokine is mainly secreted by macrophages.	(Madge et al., 2000; Clark et al., 2015)

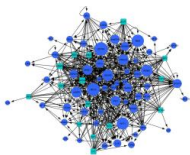
ตารางภาคผนวก ข-2 (ต่อ)

โมดูล	ยีนที่พบ	ประเภท		คำอธิบาย	แหล่งอ้างอิง
		TF	TG		
 <p>6-3</p>	<i>Esrra</i>	✓		Estrogen-related receptor alpha is involved in Alzheimer's disease. ESRRA is required for the activation of autophagy to promote innate antimicrobial defense against mycobacterial infection.	(Kim et al., 2018)
	<i>Vegfb</i>		✓	Diseases associated with VEGFB include Macular Degeneration, Age-Related, 1 and Kuhnt-Junius Degeneration. Among its related pathways are Tyrosine Kinases / Adaptors and Apoptotic Pathways in Synovial Fibroblasts.	(Li et al., 2008)
	<i>Zc3h12a</i>		✓	Endoribonuclease involved in various biological functions such as cellular inflammatory response and immune homeostasis, glial differentiation of neuroprogenitor cells, cell death of cardiomyocytes, adipogenesis and angiogenesis.	(Garg et al., 2015)
	<i>Sharpin</i>		✓	Diseases associated with SHARPIN include Incontinentia Pigmenti and Branchioototic Syndrome. Among its related pathways are TNF signaling (REACTOME) and Protein-protein interactions at synapses.	(Johansson et al., 2019)

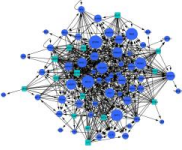
ตารางภาคผนวก ข-2 (ต่อ)

โมดูล	ยีนที่พบ	ประเภท		คำอธิบาย	แหล่งอ้างอิง
		TF	TG		
6-3	<i>Sigirr</i>		✓	Acts as a negative regulator of the Toll-like and IL-1R receptor signaling pathways.	(Qin et al., 2005)
 8-4	<i>Cebpa</i>	✓		The encoded protein functions in homodimers and also heterodimers with CCAAT/enhancer-binding proteins beta and gamma	(Numata et al., 2005)
	<i>Cebpd</i>	✓		Important transcription factor regulating the expression of genes involved in immune and inflammatory responses	(Kinoshita et al., 1992)
	<i>Ets1</i>	✓		Transcription factor. Directly controls the expression of cytokine and chemokine genes in a wide variety of different cellular contexts.	(Huang et al., 1997)
	<i>Il6</i>		✓	This gene encodes a cytokine that functions in inflammation and the maturation of B cells.	(Falzacappa et al., 2019)

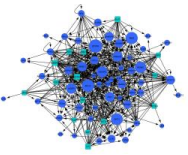
ตารางภาคผนวก ข-2 (ต่อ)

โมดูล	ยีนที่พบ	ประเภท		คำอธิบาย	แหล่งอ้างอิง
		TF	TG		
 <p>8-4</p>	<i>Jun</i>	✓		This gene is the putative transforming gene of avian sarcoma virus 17.	(Serra et al., 2014)
	<i>Nos3</i>		✓	Nitric oxide is a reactive free radical which acts as a biologic mediator in several processes, including neurotransmission and antimicrobial and antitumoral activities. Nitric oxide is synthesized from L-arginine by nitric oxide synthases.	(Zimmermann et al., 2002)
	<i>Runx1</i>	✓		This complex provides stability to the RUNX1 protein which is involved in the generation of hematopoietic stem cells and for their differentiation into myeloid and lymphoid lines.	(Ono M et al., 2007)
	<i>Tnf</i>		✓	This gene encodes a multifunctional proinflammatory cytokine that belongs to the tumor necrosis factor (TNF) superfamily. This cytokine is mainly secreted by macrophages.	(Madge & Pober, 2000; Clark et al., 2015)

ตารางภาคผนวก ข-2 (ต่อ)

โมดูล	ยีนที่พบ	ประเภท		คำอธิบาย	แหล่งอ้างอิง
		TF	TG		
 18-2	<i>Cebpa</i>	✓		The encoded protein functions in homodimers and also heterodimers with CCAAT/enhancer-binding proteins beta and gamma	(Numata et al., 2005)
	<i>Elk1</i>	✓		This gene is a member of the Ets family of transcription factors and of the ternary complex factor (TCF) subfamily. The protein encoded by this gene is a nuclear target for the ras-raf-MAPK signaling cascade.	(Morrison et al., 2012)
	<i>Irf9</i>	✓		Transcription factor that mediates signaling by type I IFNs (IFN-alpha and IFN-beta). Following type I IFN binding to cell surface receptors, Jak kinases (TYK2 and JAK1) are activated, leading to tyrosine phosphorylation of STAT1 and STAT2.	(Rajsbaum et al., 2014)
	<i>Myd88</i>		✓	This gene encodes a cytosolic adapter protein that plays a central role in the innate and adaptive immune response. This protein functions as an essential signal transducer in the interleukin-1 and Toll-like receptor signaling pathways.	(Chen et al., 2013)

ตารางภาคผนวก ข-2 (ต่อ)



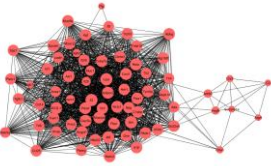
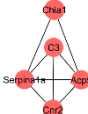
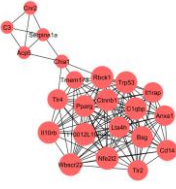


โมดูล	ยีนที่พบ	ประเภท		คำอธิบาย	แหล่งอ้างอิง
		TF	TG		
 18-2	<i>Pik3cg</i>		✓	Phosphoinositide 3-kinases (PI3Ks) phosphorylate inositol lipids and are involved in the immune response.	(Sheu et al., 2017)
	<i>Rela</i>		✓	NF-kappa-B is composed of NFKB1 or NFKB2 bound to either REL, RELA, or RELB. The most abundant form of NF-kappa-B is NFKB1 complexed with the product of this gene, RELA	(Askari et al., 2010)
	<i>Stat3</i>		✓	In response to cytokines and growth factors, STAT family members are phosphorylated by the receptor associated kinases, and then form homo- or heterodimers that translocate to the cell nucleus where they act as transcription activators.	(Numata et al., 2005)
	<i>Tlr4</i>		✓	TLR4 has been implicated in signal transduction events induced by lipopolysaccharide (LPS) found in most gram-negative bacteria.	(Acheek et al., 2016)

ภาคผนวก ค

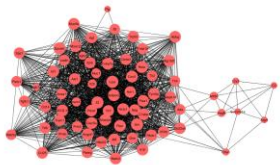
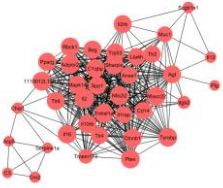




โมดูลย่อยของเครือข่ายการแสดงออกร่วมกัน

(Gene co-expression network)

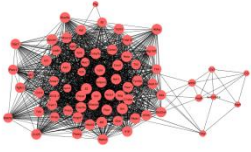
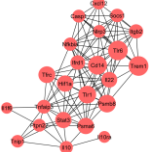


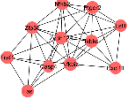
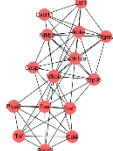



ตารางภาคผนวก ก-1 ตารางแสดงโมดูลย่อยและรายชื่อยีนภายในโมดูลของเครือข่ายแสดงออกพร้อม
ยีนที่มีการตอบสนองการอักเสบของแต่ละสถานะ โดยการค้นหาด้วย
โปรแกรม Jactivemodule

สถานะที่ทำการศึกษา (ชั่วโมง)	โมดูลที่	รายชื่อยีนที่อยู่ในโมดูล
 3 ชั่วโมง	 3-1	<i>Hspa1a, Abcb1a</i>
 6 ชั่วโมง	 6-1	<i>Serpina1a, Chia1, C3, Acp5, Cnr2</i>
	 6-2	<i>Tmem173, Serpina1a, Anxa1, Chia1, Tlr2, Tlr4, C1qbp, Il1rap, Cd14, Nfe2l2, 1110012L19Rik, Trp53, Rbck1, C3, Acp5, Cnr2, Lta4h, Wbscr22, Cttnb1, Il10rb, Bsg, Pparg</i>
	 6-3	<i>Serpina1a, Tmem173, Chia1, Il2rb, Adrb2, C3, Acp5, Tlr4, Cnr2, Vegfb</i>
	 6-4	<i>Tmem173, Serpina1a, Chia1, Tlr6, C1qbp, Il1rap, Cd14, 1110012L19Rik, Il2rb, Trp53, Rbck1, C3, Acp5, Ada, Wbscr22, Cttnb1, Il10rb, Anxa1, Adipor2, Tlr2, Tlr4, Il2, Nfe2l2, Muc1, Cnr2, Lta4h, Bsg, Pparg</i>



ตารางภาคผนวก ค-1 (ต่อ)

สภาวะที่ทำการศึกษา (ชั่วโมง)	โมดูลที่	รายชื่อยีนที่อยู่ในโมดูล
 <p>6 ชั่วโมง</p>	 <p>6-5</p>	<p><i>Tmem173, Serpina1a, Chia1, Tlr6, C1qbp, Il1rap, Tnfrsf1a, Cd14, I110012L19Rik, Il13, Scgb1a1, Il2rb, Mapk14, Trp53, Rbck1, Il16, C3, Acp5, Plg, Wbscr22, Ctmb1, Il10rb, Sharpin, Anxa1, Adipor2, Tlr2, Pten, Itgb2, Tlr4, Il2, Agt, Nfe2l2, Spp1, Tyrobp, Muc1, Cnr2, Lta4h, Bsg, Pparg</i></p>
 <p>8 ชั่วโมง</p>	 <p>8-1</p>	<p><i>Irf1, Cxcl12, Itgb2, Tnfsf10, Tlr6, Tnfaip6, Casp1, Il22, Cd14, Ifrd1, Trem1, Bdkrb2, Socs1, Nlrp3</i></p>
	 <p>8-2</p>	<p><i>Irf1, Cxcl12, Itgb2, Tnfsf10, Tlr6, Nfkb1a, Tnfaip6, Casp1, Il22, Cd14, Ifrd1, Trem1, Psmb8, Bdkrb2, Hif1a, Socs1, Nlrp3, Stat3, Tfric</i></p>
	 <p>8-3</p>	<p><i>Irf1, Itgb2, Tlr6, Nfkb1a, Casp1, Il22, Cd14, Ifrd1, Trem1, Ccl12, Psmb8, Pstpip1, Bdkrb2, Hif1a, Tlr1, Psma6, Socs1, Nlrp3, Stat3, Nampt, Tfric</i></p>


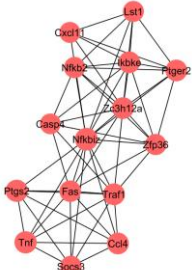
ตารางภาคผนวก ค-1 (ต่อ)

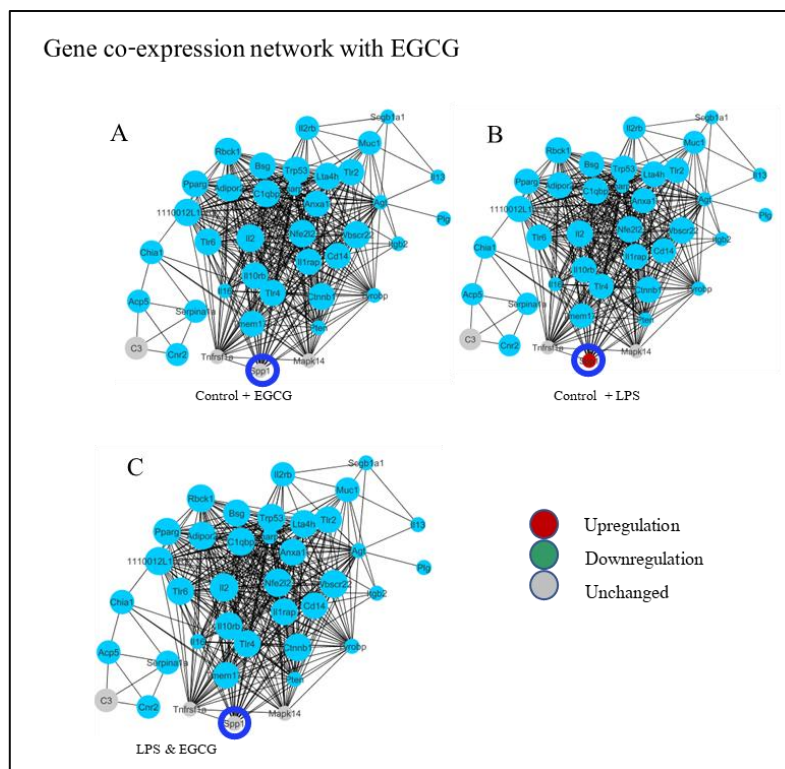
สถานะที่ทำการศึกษา (ชั่วโมง)	โมดูลที่	รายชื่อยีนที่อยู่ในโมดูล
 <p data-bbox="422 763 528 801">8 ชั่วโมง</p>	 <p data-bbox="799 772 842 801">8-4</p>	<p data-bbox="991 504 1385 846"><i>Cxcl12, Itgb2, Tlr6, Nfkbia, Casp1, Il22, Cd14, Il1f6, Ifrd1, Trem1, Psmb8, Il10, Tnfaip3, Hif1a, Tlr1, Psma6, Ptpn22, Socs1, Il10ra, Nlrp3, Tnfp1, Stat3, Tfr</i></p>
	 <p data-bbox="799 981 842 1010">8-5</p>	<p data-bbox="991 898 1118 927"><i>Fpr1, Proc</i></p>
 <p data-bbox="422 1563 528 1601">18 ชั่วโมง</p>	 <p data-bbox="794 1176 842 1205">18-1</p>	<p data-bbox="991 1064 1362 1220"><i>Ptger2, Ikbke, Cxcl11, Zc3h12a, Fas, Casp4, Nfkbiz, Nfkb2, Lst1, Traf1, Zfp36</i></p>
	 <p data-bbox="794 1444 842 1473">18-2</p>	<p data-bbox="991 1274 1382 1487"><i>Cxcl11, Fas, Zc3h12a, Casp4, Nfkb2, Socs3, Traf1, Tnf, Zfp36, Ptgs2, Ptger2, Ikbke, Nfkbiz, Lst1, Ccl4</i></p>
	 <p data-bbox="794 1585 842 1615">18-3</p>	<p data-bbox="991 1565 1145 1594"><i>Sema7a, Lipc</i></p>
	 <p data-bbox="794 1742 842 1771">18-4</p>	<p data-bbox="991 1709 1219 1738"><i>Lcn2, Sema7a, Lipc</i></p>
	 <p data-bbox="794 1937 842 1966">18-5</p>	<p data-bbox="991 1856 1382 1951"><i>Il1rn, Lcn2, Ccl4, Lipc, Traf1, Nfkbiz, Nos2, Fas, Ptgs2, Sema7a</i></p>

ตารางภาคผนวก ค-2 โมดูลที่ถูกคัดเลือกของเครือข่าย GCN ในแต่ละช่วงเวลาพร้อมรายชื่อยีนภายในโมดูลและคำอธิบาย

โมดูล	ยีนที่พบ	คำอธิบาย	แหล่งอ้างอิง
 6-5	<i>Tlr4</i>	The protein encoded by this gene is a member of the Toll-like receptor (TLR) family which plays a fundamental role in pathogen recognition and activation of innate immunity. TLR4 has been implicated in signal transduction events induced by lipopolysaccharide (LPS) found in most gram-negative bacteria.	(Aчек et al., 2016)
	<i>Cd14</i>	CD14 (CD14 Molecule) is a Protein Coding gene. Among its related pathways are Diseases associated with the TLR signaling cascade and TRAF Pathway.	(Kelley et al., 2013)
	<i>Mapk14</i>	MAPK14 is one of the four p38 MAPKs which play an important role in the cascades of cellular responses evoked by extracellular stimuli such as proinflammatory cytokines or physical stress leading to direct activation of transcription factors.	(Xu & Derynck, 2010)
 8-3	<i>Cd14</i>	CD14 (CD14 Molecule) is a Protein Coding gene. Among its related pathways are Diseases associated with the TLR signaling cascade and TRAF Pathway.	(Kelley et al., 2013)

ตารางภาคผนวก ค-2 (ต่อ)

โมดูล	ยีนที่พบ	คำอธิบาย	แหล่งอ้างอิง
 <p>8-3</p>	<i>Stat3</i>	<p>The protein encoded by this gene is a member of the STAT protein family. In response to cytokines and growth factors, STAT family members are phosphorylated by the receptor associated kinases, and then form homo- or heterodimers that translocate to the cell nucleus where they act as transcription activators.</p>	(Numata et al., 2005)
 <p>18-2</p>	<i>Tnf</i>	<p>This gene encodes a multifunctional proinflammatory cytokine that belongs to the tumor necrosis factor (TNF) superfamily. This cytokine is mainly secreted by macrophages.</p>	(Madge & Pober, 2000; Clark et al., 2015)
	<i>Ptger2</i>	<p>This gene encodes a receptor for prostaglandin E2, a metabolite of arachidonic acid which has different biologic activities in a wide range of tissues.</p>	(Lacroix & Rivest, 1998)
	<i>Ptgs2</i>	<p>PTGS2 is responsible for production of inflammatory prostaglandins. In cancer cells, PTGS2 is a key step in the production of prostaglandin E2 (PGE2), which plays important roles in modulating motility, proliferation and resistance to apoptosis.</p>	(Hao et al., 2018)

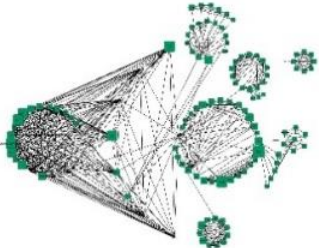











ภาพภาคผนวก ค-1 เครือข่าย GCN ที่ถูกกระตุ้นการตอบสนองการแสดงออกด้วย LPS และการทดสอบด้วยสารออกฤทธิ์ EGCG ถูกทดสอบที่ช่วงเวลา 6 ชั่วโมง (หมายเหตุ: สีแดงหมายถึงการแสดงออกของยีนที่เพิ่มขึ้น สีเขียวหมายถึงการแสดงออกของยีนที่ลดลง สีเทาหมายถึงไม่มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออก สีฟ้าหมายถึงรายชื่อยีนของโมดูลและชุดข้อมูลไม่ตรงกัน)





ภาคผนวก ง

โมดูลย่อยของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน
(Protein-protein interaction network)

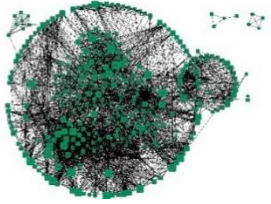
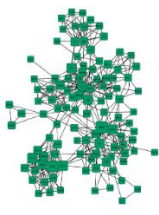

ตารางภาคผนวก ง-1 ตารางแสดงโมดูลย่อยและรายชื่อยีนภายใน โมดูลของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์
ระหว่างโปรตีนที่มีการตอบสนองการอักเสบของแต่ละสภาวะ โดยการค้นหา
ด้วยโปรแกรม Jactivemodule

สภาวะที่ทำการศึกษา (ชั่วโมง)	โมดูลที่	รายชื่อยีนที่อยู่ในโมดูล
 <p>3 ชั่วโมง</p>	 <p>3-1</p>	FGF23, NFKB2, S100B, RELA, NFKB1, CCL5, CCL20, CCL4, CXCL12, CCR8, CXCR6, PPARG, CXCR3, IL6, RETN, WDTC1, CCR3, SIRT1, CXCL9, ADIPOQ, PROM1, CCR1, CDH1, KRT19, CD44, CX3CR1, CXCL10, SRC, SOCS3
	 <p>3-2</p>	CAPZA2, IL6, NFKB2, SIRT1, AGER, S100B, RELA, NFKB1
	 <p>3-3</p>	APPL1, ADIPOQ
	 <p>3-4</p>	IL6, PROM1, CDH1, CD24A, CD44
	 <p>3-5</p>	IL6, ADIPOQ, IRS1, SOCS3
 <p>6 ชั่วโมง</p>	 <p>6-1</p>	CST3, LCN2
	 <p>6-2</p>	HAVCR1, CST3, LCN2
	 <p>6-3</p>	AGTR2, REN1, SERPINE1, ATP6AP2, EDN1

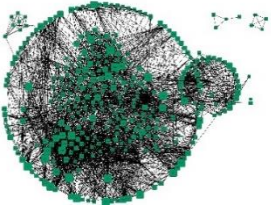
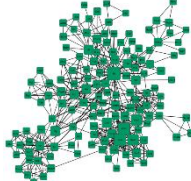
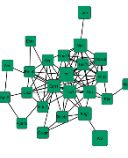


ตารางภาคผนวก ง-1 (ต่อ)

สถานะที่ทำการศึกษา (ชั่วโมง)	โมดูลที่	รายชื่อยีนที่อยู่ในโมดูล
 <p>6 ชั่วโมง</p>	 <p>6-4</p>	AGTR2, REN1, ENPEP, SERPINE1, ATP6AP2, EDN1, ACE2
	 <p>6-5</p>	AGTR2, ACE, REN1, AGT, SERPINE1, ATP6AP2, EDN1, LEPR
 <p>8 ชั่วโมง</p>	 <p>8-1</p>	VEGFA, CLEC7A, KDR, PTPN11, TEK, CHIL1, MMP8, IL2RA, LTF, ELANE, FIGF, NRP1, VEGFC, VEGFB, IL7R, PGF, IL17RC, IL17F, HP, MMP9, IL10RB, VWF, IL17A, CD27, LYVE1, CD28, IL6ST, IL6RA, CSF2RB2, CSF2RB, IL5RA, TLR4, STAT3, CCL1, JAK3, IL2RB, CCR6, MAPK3, CXCL15, TLR5, IL4, CCR8, CCR7, PF4, CXCR3, CXCL13, RETN, CXCL5, WDTC1, CCR3, CXCL9, CXCR2, LEP, CX3CR1, CCR2, IRS1, UTS2, EDN2, EDNRB, BMP4, IFNGR1, IGFBP7, IFNG, IGFBP5, FGF23, JAK2, CDH2, DMP1, PPBP, CXCR4, SERPINE1, CRP, LEPR, AGTR2, ACE, AGT, MMP1B, TIMP2, MMP7

ตารางภาคผนวก ง-1 (ต่อ)

สภาวะที่ทำการศึกษา (ชั่วโมง)	โมดูลที่	รายชื่อยีนที่อยู่ในโมดูล
 8 ชั่วโมง	 8-1	FOXP3, CTLA4, F2, GRP, PLG, TAC1, GAS6, TIMP1, CCKAR, GNAQ, BDKRB1, KNG1, CXCR5, TBX21, GATA3, CTSS, H2-EB1, AVP, H2-AB1, H2-AA, HRH4, ARG1, PTGDR2, APOE, IRS2, ALB, FN1, IGF1, PDGFRB, SRC
	 8-2	CLEC7A, VEGFA, KDR, TEK, CHIL1, PGLYRP1, ORM2, RORC, MMP8, IL2RA, LTF, ELANE, TSLP, FIGF, NRP1, VEGFB, TNFSF4, PGF, IL7R, MRC1, IL17RC, HP, CD163, MMP9, SELE, IL10RB, VWF, IL17A, CD27, CD28, IL6ST, IL6RA, TLR2, CSF2RB2, CSF2RB, IL5RA, TLR4, CCL1, JAK3, GNA14, IL2RB, CCR6, F2RL1, TACR1, CCL19, GNA11, MAPK3, CXCL15, TLR5, IL1RN, TBXA2R, IRAK4, IL4, CCR8, CCR7, IL1F8, IL1F5, PF4, IL6, IL1R2, CXCL13, RETN, CXCL5, WDC1, IL1R1, CCR3, CXCL9, CXCR2, LEP, VCAM1, MAVS, CX3CR1, CXCL1, CCR2, NEK7, P2RX7, PANX1, IRS1, UTS2, EDN2, NLRP3,

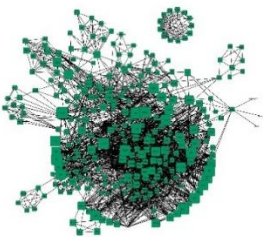
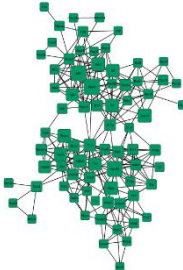

ตารางภาคผนวก ง-1 (ต่อ)

สภาวะที่ทำการศึกษา (ชั่วโมง)	โมดูลที่	รายชื่อยีนที่อยู่ในโมดูล
 8 ชั่วโมง	 8-2	EDNRB, NAIP5, BMP4, PYCARD, IFNGR1, IGFBP7, IFNG, IGFBP5, NLRC4, FGF23, CDH2, DMP1, PPBP, CXCR4, CCL5, CCL4, CRP, LEPR, AGTR2, ACE, REN1, AGT, MMP1A, MMP1B, TIMP2, CD44, MMP7, FOXP3, CTLA4, F2, GRP, PLG, TAC1, GAS6, PTX3, TIMP1, MEFV, CCKAR, GNG4, GNAQ, BDKRB1, HAMP, KNG1, CXCR5, TBX21, GATA3, CTSS, H2-EB1, AVP, H2-AB1, H2-AA, HRH4, ARG1, PTGDR2, FPR3, IRS2, ANXA1, ALB, FN1, IGF1
	 8-3	AGTR2, CCKAR, ACE, F2R, BDKRB1, KNG1, LEP, GNA14, AVP, F2RL1, TACR1, ALB, MAPK3, UTS2, ECE1, EDN2, TBXA2R, AGTR1B, EDNRB, F2, GRP, TAC1, NPS, EDN1
	 8-4	H2-EB1, H2-AB1, H2-AA, CD4
	 8-5	ALDH1A7, ADH1, ALDH1A1

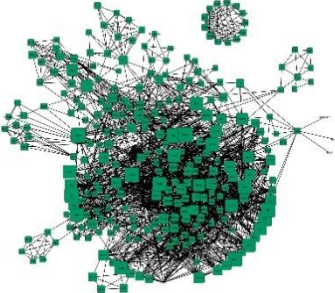
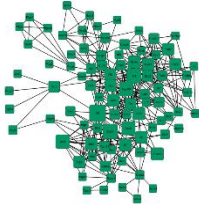
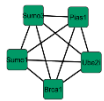
ตารางภาคผนวก ง-1 (ต่อ)

สถานะที่ทำการศึกษา (ชั่วโมง)	โมดูลที่	รายชื่อยีนที่อยู่ในโมดูล
 <p data-bbox="422 1128 539 1167">18 ชั่วโมง</p>	 <p data-bbox="778 1055 815 1084">8-1</p>	<p>JAK1, PTPN11, TNFRSF1A, AKT1, CD44, IL2, PLA2G4A, TCEB2, TCEB1, HYAL2, HMMR, TRAF6, IKBKB, BIRC2, TRAF2, TRAF3, TYK2, IL6ST, TLR2, IL6RA, TRADD, RIPK1, CASP8, RELA, MAPK14, TLR4, TAX1BP1, MAPK3, IRAK4, TLR7, IRAK1, XIAP, MYD88, LEP, UBC, IRF7, MAVS, TANK, IRF3, P2RX7, NAIP2, AIM2, NLRP3, IFNGR2, NAIP5, SOCS1, PYCARD, IL18, IFNGR1</p>
	 <p data-bbox="778 1682 815 1711">8-2</p>	<p>JAK1, JAK2, PTPN11, TNFRSF1A, RUNX1, RORC, AKT1, IRF1, USP21, CD44, IL2, CTLA4, TCEB2, TCEB1, HYAL2, HMMR, TRAF6, IKBKB, BIRC2, TRAF2, IL17A, TRAF3, TYK2, IL6ST, IL6RA, TLR2, TRADD, STAT5A, RIPK1, CASP8, RELA, CXCR5, TLR4, TAX1BP1, BCL6, STAT3, TBX21, GATA3, IL1RL1, IRAK4, IRAK1, IL1RAP, XIAP, CXCR3, IL1R1, MYD88, LEP, UBC, MAVS, TANK, IRF3, TBK1, P2RX7, NAIP2, RUNX3, TNFAIP3, PDGFRB, AIM2, NLRP3, IFNGR2, NAIP5, SOCS1, PYCARD, IL18, IFNGR1, IFNG</p>

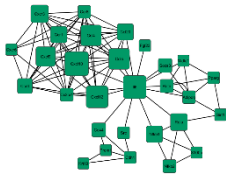
ตารางภาคผนวก ง-1 (ต่อ)

สภาวะที่ทำการศึกษา (ชั่วโมง)	โมดูลที่	รายชื่อยีนที่อยู่ในโมดูล
 <p data-bbox="414 1108 534 1153">18 ชั่วโมง</p>	 <p data-bbox="774 1153 813 1187">8-3</p>	<p>JAK1, JAK2, PTPN11, TNFRSF1A, RUNX1, RORC, AKT1, IRF1, USP21, CD44, IL2, PLA2G4A, TCEB2, TCEB1, HYAL2, HMMR, TRAF6, IKBKB, BIRC2, TRAF2, IL17A, TRAF3, TYK2, IL6ST, TLR2, IL6RA, TRADD, RIPK1, STAT5A, RELA, CASP8, MAPK14, CXCR5, TLR4, STAT3, BCL6, TBX21, GATA3, IL1RL1, MAPK3, TOLLIP, IRAK4, IL4, IL13, TLR7, IRAK1, CFD, IL1RAP, XIAP, CXCR3, IL1A, IL1R1, ADIPOQ, MYD88, LEP, UBC, VCAM1, MAVS, TANK, IRF3, TBK1, APAF1, IRS2, P2RX7, CASP4, NAIP2, RUNX3, PDGFRB, AIM2, NLRP3, IFNGR2, NAIP5, PYCARD, SOCS3, IFNGR1, IL18, CASP1</p>
	 <p data-bbox="774 1769 813 1803">8-4</p>	<p>JAK1, CLEC7A, JAK2, JUN, TGFB1, PTPN11, TNFRSF1A, RUNX1, RORC, AKT1, IRF1, USP21, VEGFB, CD44, IL2, TCEB2, TCEB1, HYAL2, TNFRSF12A, HMMR, LTBR, TNFSF13B, TRAF6, IKBKB, BIRC2, TRAF2, TRAF3, TYK2, IL6ST, IL6RA, TLR2, TRADD, RIPK1, STAT5A, RELA, CASP8, MAPK14, TLR4, TAX1BP1, STAT3, BCL6, PROS1, GATA3, IL1RL1, TOLLIP,</p>

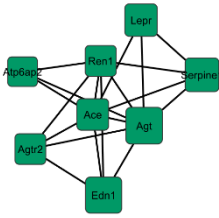
ตารางภาคผนวก ง-1 (ต่อ)

สถานะที่ทำการศึกษา (ชั่วโมง)	โมดูลที่	รายชื่อยีนที่อยู่ในโมดูล
 <p data-bbox="422 1176 534 1220">18 ชั่วโมง</p>	 <p data-bbox="805 1075 853 1120">8-4</p>	<p data-bbox="997 504 1380 1075">PTGES, IRAK4, PTGS1, IL4, TLR7, TBXAS1, IRAK1, PTGIS, PTGES2, IL1RAP, XIAP, CXCR3, IL6, IL1R1, MYD88, LEP, UBC, TNF, VCAM1, CX3CR1, MAVS, TANK, CXCL1, IRF3, TBK1, CCR2, APAF1, NLRP1A, P2RX7, NAIP2, FN1, RUNX3, CST3, TNFAIP3, PDGFRB, AIM2, IFNGR2, IL1B, NAIP5, SOCS1, PYCARD, IL18, IFNGR1, PLCG2, CASP1</p>
	 <p data-bbox="805 1332 853 1377">8-5</p>	<p data-bbox="997 1187 1364 1276">SUMO1, SUMO3, UBE2I, BRCA1, PIAS1</p>

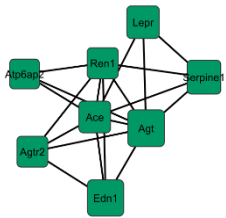
ตารางภาคผนวก ง-2 โมดูลที่ถูกคัดเลือกของ PPIN ในแต่ละช่วงเวลาพร้อมรายชื่อยีนภายในโมดูลและคำอธิบาย

โมดูล	ยีนที่พบ	คำอธิบาย	แหล่งอ้างอิง
 <p>3-1</p>	RELA	NF-kappa-B is composed of NFKB1 or NFKB2 bound to either REL, RELA, or RELB. The most abundant form of NF-kappa-B is NFKB1 complexed with the product of this gene, RELA	(Askari et al., 2010)
	NFKB1	NFKB1 (Nuclear Factor Kappa B Subunit 1) is a Protein Coding gene. Diseases associated with NFKB1 include Immunodeficiency, Common Variable, 12 and Common Variable Immunodeficiency.	(Beinke et al., 2004)
	IL6	This gene encodes a cytokine that functions in inflammation and the maturation of B cells. In addition, the encoded protein has been shown to be an endogenous pyrogen capable of inducing fever in people with autoimmune diseases or infections.	(Falzacappa et al., 2006)

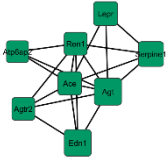
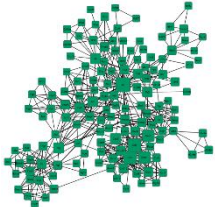
ตารางภาคผนวก ง-2 (ต่อ)

โมดูล	ยีนที่พบ	คำอธิบาย	แหล่งอ้างอิง
 <p data-bbox="450 1026 495 1054">6-5</p>	AGTR2	The protein encoded by this gene belongs to the G-protein coupled receptor 1 family. This receptor has been shown to mediate programmed cell death and this apoptotic function may play an important role in developmental biology and pathophysiology.	(Nguyen et al., 2002)
	ACE	This gene encodes an enzyme involved in catalyzing the conversion of angiotensin I into a physiologically active peptide angiotensin II. Angiotensin II is a potent vasopressor and aldosterone-stimulating peptide that controls blood pressure and fluid-electrolyte balance. This enzyme plays a key role in the renin-angiotensin system.	(Nguyen et al., 2002)
	REN1	Renin is a highly specific endopeptidase, whose only known function is to generate angiotensin I from angiotensinogen in the plasma, initiating a cascade of reactions that produce an elevation of blood pressure and increased sodium retention by the kidney.	(Nguyen et al., 2002)

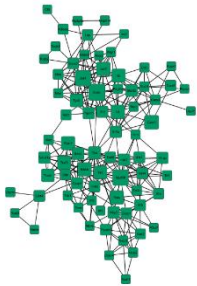
ตารางภาคผนวก ง-2 (ต่อ)

โมดูล	ยีนที่พบ	คำอธิบาย	แหล่งอ้างอิง
 <p>6-5</p>	AGT	The protein encoded by this gene, pre-angiotensinogen or angiotensinogen precursor, is expressed in the liver and is cleaved by the enzyme renin in response to lowered blood pressure. The resulting product, angiotensin I, is then cleaved by angiotensin converting enzyme (ACE) to generate the physiologically active enzyme angiotensin II.	(Zhong et al., 2008)
	SERPINE1	Serine protease inhibitor. Is a primary inhibitor of tissue-type plasminogen activator (PLAT) and urokinase-type plasminogen activator (PLAU). As PLAT inhibitor, it is required for fibrinolysis down-regulation and is responsible for the controlled degradation of blood clots	(Bajou et al., 2008)
	ATP6AP2	Among its related pathways are Agents Acting on the Renin-Angiotensin System Pathway, Pharmacodynamics and Innate Immune System.	(Nguyen et al., 2002)

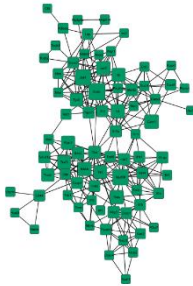
ตารางภาคผนวก ง-2 (ต่อ)

โมดูล	ยีนที่พบ	คำอธิบาย	แหล่งอ้างอิง
 <p>6-5</p>	LEPR	Receptor for hormone LEP/leptin (Probable). On ligand binding, mediates LEP central and peripheral effects through the activation of different signaling pathways such as JAK2/STAT3 and MAPK cascade/FOS.	(Siegmund et al., 2004)
 <p>8-2</p>	TLR4	Cooperates with LY96 and CD14 to mediate the innate immune response to bacterial lipopolysaccharide	(Achek et al., 2016)
	MAPK3	MAPK1/ERK2 and MAPK3/ERK1 are the 2 MAPKs which play an important role in the MAPK/ERK cascade.	(Achek et al., 2016)
	IL6	This gene encodes a cytokine that functions in inflammation and the maturation of B cells.	(Falzacappa et al., 2019)
	IFNG	This gene encodes a soluble cytokine that is a member of the type II interferon class. The encoded protein is secreted by cells of both the innate and adaptive immune systems.	(Achek et al., 2016)

ตารางภาคผนวก ง-2 (ต่อ)

โมดูล	ยีนที่พบ	คำอธิบาย	แหล่งอ้างอิง
 <p data-bbox="436 1005 497 1037">18-3</p>	IKBKB	The protein encoded by this gene phosphorylates the inhibitor in the inhibitor/NF-kappa-B complex, causing dissociation of the inhibitor and activation of NF-kappa-B.	(Cardinez et al., 2018)
	RELA	NF-kappa-B is composed of NFKB1 or NFKB2 bound to either REL, RELA, or RELB. The most abundant form of NF-kappa-B is NFKB1 complexed with the product of this gene, RELA	(Askari et al., 2010)
	MAPK14	MAPK14 is one of the four p38 MAPKs which play an important role in the cascades of cellular responses evoked by extracellular stimuli such as proinflammatory cytokines or physical stress leading to direct activation of transcription factors.	(ZARUBIN et al., 2005)
	TLR4	Cooperates with LY96 and CD14 to mediate the innate immune response to bacterial lipopolysaccharide	(Acheh et al., 2016)

ตารางภาคผนวก ง-2 (ต่อ)

โมดูล	ยีนที่พบ	คำอธิบาย	แหล่งอ้างอิง
 <p data-bbox="436 1061 492 1093">18-3</p>	STAT3	In response to cytokines and growth factors, STAT family members are phosphorylated by the receptor associated kinases, and then form homo- or heterodimers that translocate to the cell nucleus where they act as transcription activators.	(Numata et al., 2005)
	MAPK3	MAPK1/ERK2 and MAPK3/ERK1 are the 2 MAPKs which play an important role in the MAPK/ERK cascade.	(Achek et al., 2016)
	IL1A	The protein encoded by this gene is a member of the interleukin 1 cytokine family. This cytokine is a pleiotropic cytokine involved in various immune responses, inflammatory processes, and hematopoiesis.	(Paolo & Shayakhmetov, 2016)
	MYD88	This gene encodes a cytosolic adapter protein that plays a central role in the innate and adaptive immune response. This protein functions as an essential signal transducer in the interleukin-1 and Toll-like receptor signaling pathways.	(Chen et al., 2013)

ภาคผนวก จ

รายชื่อสินที่อยู่ในวิถีกลไกหลักและมีการรายงานการศึกษาอย่างต่อเนื่อง
ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบ

ตารางภาคผนวก จ-1 รายชื่อยีนการอักเสบจากวิถีกลไกหลักและมีการรายงานอย่างต่อเนื่องสำหรับ
ใช้ในการค้นหาเครือข่ายต้นแบบ

GeneName	Gene/Locus name	OrgMouse
<i>Tnf</i>	Tumor necrosis factor	P06804
<i>Il1b</i>	Interleukin-1 beta	P10749
<i>Il6</i>	Interleukin-6	P08505
<i>Il1a</i>	Interleukin-1 alpha	P01582
<i>Mapk11</i>	Mitogen-activated protein kinase 11	Q9WUI1
<i>Mapk14</i>	Mitogen-activated protein kinase 14	P47811
<i>Mapk12</i>	Mitogen-activated protein kinase 12	O08911
<i>Mapk13</i>	Mitogen-activated protein kinase 13	Q9Z1B7
<i>Mapk3</i>	Mitogen-activated protein kinase 3	Q63844
<i>Mapk1</i>	Mitogen-activated protein kinase 1	P63085
<i>Mapk8</i>	Mitogen-activated protein kinase 8	Q91Y86
<i>Mapk9</i>	Mitogen-activated protein kinase 9	Q9WTU6
<i>Mapk10</i>	Mitogen-activated protein kinase 10	Q61831
<i>Mapk8ip3</i>	C-Jun-amino-terminal kinase-interacting protein 3	Q9ESN9
<i>Ptger3</i>	Prostaglandin E2 receptor EP3 subtype	P30557
<i>Ptger4</i>	Prostaglandin E2 receptor EP4 subtype	P32240
<i>Ptger2</i>	Prostaglandin E2 receptor EP2 subtype	Q62053
<i>Nos2</i>	Nitric oxide synthase, inducible	P29477
<i>Nos3</i>	Nitric oxide synthase, endothelial	P70313
<i>Pik3r6</i>	Phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 6	Q3U6Q4
<i>Stat3</i>	Signal transducer and activator of transcription 3	P42227
<i>Ptgs2</i>	Prostaglandin G/H synthase 2	Q05769
<i>Rela</i>	Transcription factor p65	Q04207
<i>Nfkb3</i>	Transcription factor p65	Q04207

ตารางภาคผนวก จ-1 (ต่อ)

GeneName	Gene/Locus name	OrgMouse
<i>Nfkb1</i>	Nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit	P25799
<i>Nfkbia</i>		
<i>Nfkbia</i>	NF-kappa-B inhibitor alpha	Q9Z1E3
<i>Ikkbb</i>	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta	O88351
<i>Pik3cg</i>	PI3-kinase subunit gamma	Q9JHG7
<i>Ticam1</i>	TIR domain-containing adapter molecule 1	Q80UF7
<i>Tlr4</i>	Toll-like receptor 4	Q9QUK6
<i>P58</i>	Serine/threonine-protein kinase PAK 2	Q69Z98
<i>Myd88</i>	Myeloid differentiation primary response protein MyD88	
<i>Ifng</i>	Interferon gamma	
<i>Chuk</i>	O15111 Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha	
<i>Cd14</i>	Monocyte differentiation antigen CD14	
<i>Il11</i>	Interleukin-11	
<i>Ticam2</i>	TIR domain-containing adapter molecule 2	
<i>Ptger1</i>	Prostaglandin E2 receptor EP1 subtype	