



## โครงการ

# การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

**ชื่อโครงการ** บทบาทของกระบวนการ Histone acetylation ต่อกระบวนการพัฒนาเป็นเซลล์ไขมันของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาจากผู้ป่วยตาโปนจากไทรอยด์

**ชื่อนิสิต** นายจिरายุส ขาวสังข์ รหัสประจำตัว 5932305023

**ภาควิชา** จุลชีววิทยา

**ปีการศึกษา** 2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## โครงการ

### การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

**ชื่อโครงการ**

บทบาทของกระบวนการ Histone acetylation ต่อกระบวนการพัฒนาเป็นเซลล์ไขมันของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาจากผู้ป่วยตาโปนจากไทรอยด์

Role of Histone acetylation on Adipocyte differentiation of orbital fibroblasts from Graves' ophthalmopathy patients

**ชื่อนิสิต**

นายจิรายุส ขาวสังข์

เลขประจำตัว 5932305023

**ภาควิชา**

จุลชีววิทยา

**ปีการศึกษา**

2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อโครงการ	บทบาทของกระบวนการ Histone acetylation ต่อกระบวนการพัฒนา เป็นเซลล์ไขมันของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาจากผู้ป่วยตาโปนจาก ไทรอยด์
โดย	นายจिरายุส ขาวสังข์ รหัสนิต 5932305023
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ	อาจารย์ ดร.ศิตา วีรกุล
ปีการศึกษา	2562

---

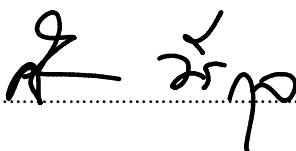
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับโครงการฉบับนี้เป็นส่วน  
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงการวิทยาศาสตร์



..... หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

คณะกรรมการสอบโครงการ



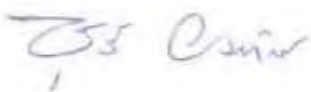
..... อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

(อาจารย์ ดร.ศิตา วีรกุล)



..... กรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ)



..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ชูลี ยมภักดี)

# โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

เรื่อง

บทบาทของกระบวนการ Histone acetylation ต่อกระบวนการพัฒนาเป็นเซลล์ไขมัน  
ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาจากผู้ป่วยตาโปนจากไทรอยด์  
(Role of Histone acetylation on Adipocyte differentiation of  
orbital fibroblasts from Graves' ophthalmopathy patients)

อาจารย์ที่ปรึกษาในโครงการ

อาจารย์ ดร.ศิตา วีรกุล

นิสิตหัวหน้าโครงการ

นายจรรย์ส ขาวสังข์

รหัสประจำตัวนิสิต 5932305023

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2562

## โครงการการเรียนการสอนเพื่อประสบการณ์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ	บทบาทของกระบวนการ Histone acetylation ต่อกระบวนการพัฒนาเป็นเซลล์ไขมันของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาจากผู้ป่วยตาโปนจากไทรอยด์
ชื่อนิสิต	นายจิรายุส ขาวสังข์
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ	อาจารย์ ดร.ศิตา วีรกุล

โรคตาโปนจากไทรอยด์ (Graves' Ophthalmopathy, GO) เป็นโรคที่มีการพัฒนามาจากโรคคอพอกแบบเป็นพิษ (Graves' hyperthyroidism) ถูกจัดเป็นโรคมุมักันต้านเนื้อเยื่อตนเองชนิดหนึ่ง โดยมีสาเหตุการเกิดมาจากการที่ร่างกายผลิต autoantibody ที่สามารถจับกับ Thyroid Stimulating Hormone Receptor (TSHR) ซึ่งถูกแสดงออกบนผิวเซลล์ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา ส่งผลให้เซลล์ดังกล่าวสามารถเพิ่มจำนวนและเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ myofibroblast หรือ เซลล์ adipocyte และเกิดการสะสมของไขมันและขยายขนาดของเนื้อเยื่อรอบดวงตา (tissue expansion) อีกทั้งยังสามารถถูกกระตุ้นได้จาก growth factor ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันบริเวณรอบดวงตา อาทิเช่น PDGF-BB และ IGF-1 ได้ ส่งผลให้ผู้ผู้ป่วยมีอาการต่าง ๆ เช่น ลูกตาถูกดันออกมา จนไม่สามารถปิดตาได้สนิท และอาจเกิดอาการตาบอดในผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรง โดยแนวทางการรักษาในปัจจุบัน ได้แก่ การใช้ยาสเตียรอยด์และการผ่าตัด ซึ่งมีผลข้างเคียงและไม่จำเพาะกับสาเหตุการเกิดโรค ในงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาไปที่บทบาทของ PDGF-BB และ IGF-1 ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทาง epigenetics ประเภท Histone acetylation และ Histone deacetylation ในกระบวนการพัฒนาของเซลล์ไขมัน (Adipocyte differentiation) โดยทำการทดลองเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาในสภาวะต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 14 วัน จากนั้นย้อมไขมันภายในเซลล์ด้วยวิธี Oil Red O staining และสกัด RNA เพื่อวัดระดับการแสดงออกของ *PPAR-γ*, *CD90* และ *HDAC* mRNA ด้วยเทคนิค real-time PCR พบว่า เซลล์ที่ถูกเลี้ยงในสภาวะ Non-differentiation ที่มี PDGF-BB มีการแสดงออกของ *PPAR-γ* ซึ่งเป็น Adipogenic marker ( $p=0.1865$ ) และ *HDAC5* mRNA เพิ่มมากขึ้น ( $p<0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกเลี้ยงในสภาวะ Non-differentiation อีกทั้งการแสดงออกของยีน *PPAR-γ* ยังมีแนวโน้มในการมีความสัมพันธ์แบบบวกกับการแสดงออกของยีน *HDAC5* ( $p=0.1875$ ) จึงสรุปได้ว่า PDGF-BB สามารถกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ Adipocyte differentiation ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ HDAC5 โดยในการทดลองต่อไปควรทดลองเพิ่มเติมโดยใช้ HDAC inhibitor (HDACi) เพื่อยับยั้งการเกิดกระบวนการดังกล่าว เพื่อหาหนทางการรักษาที่จำเพาะต่อกระบวนการ Adipocyte differentiation ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาในผู้ป่วยตาโปนจากไทรอยด์ต่อไป

**Project title** Role of Histone acetylation on Adipocyte differentiation of orbital fibroblasts from Graves' Ophthalmopathy patients

**Investigator** Mr. Chirayus Khawsang

**Project advisor** Sita Virakul, PhD

**Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University**

---

Graves' Ophthalmopathy (GO), also referred to as thyroid eye disease, is an autoimmune disease developed from Graves' hyperthyroidism. Pathophysiology of GO is caused by the autoantibodies released from autoreactive B cells which can bind Thyroid Stimulating Hormone Receptor (TSHR) expressed on orbital fibroblasts. Orbital fibroblasts also were stimulated by growth factors such as Platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) and Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) released from immune cells. This leads to activation of the orbital fibroblasts which increase proliferative activity and differentiate into myofibroblasts or adipocytes. Altogether these processes cause orbital tissue expansion and fat accumulation in adipocyte which contributes to the clinical features of GO, such as edema, proptosis, and blindness in severe cases. Recently therapeutic implications are decompression surgery and use of steroid but there are some side effects which are not specific to the cause of the disease. In this study, focus on the role of PDGF-BB and IGF-1 on Histone acetylation and Histone deacetylation to study in Adipocyte differentiation of Orbital fibroblasts from Graves' Ophthalmopathy patients. So, orbital fibroblasts were cultured in various conditions for 14 days. Adipocyte differentiation was determined by Oil Red O staining and gene expression measurement was done by real-time PCR. PDGF-BB tended to increase *PPAR- $\gamma$*  mRNA expression ( $p=0.1865$ ) and significantly increased *HDAC5* mRNA expression ( $p<0.05$ ). Moreover, levels of *PPAR- $\gamma$*  mRNA tended to positively correlate with the *HDAC5* mRNA expression ( $p=0.1875$ ). These results suggest that PDGF-BB promotes adipocyte differentiation in orbital fibroblasts which drive through HDAC5 activity. Therefore, the HDAC5 and PDGF-BB signaling cascade may represent a target of therapy to interfere with adipocyte differentiation in GO.

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ฉบับนี้สำเร็จไปด้วยดีเนื่องจากความกรุณาของอาจารย์ ดร.ศิตา วีรกุล อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ที่ให้ความรู้ คำปรึกษาต่าง ๆ ตลอดจนการหาแนวทางแก้ไขเพื่อช่วยให้งานวิจัย สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณเงินทุนสนับสนุนงานวิจัย ที่ได้รับจากโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ จากงบประมาณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณสมาชิกห้องวิจัย 1804/12 คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สอนและให้คำแนะนำใน การทำปฏิบัติการ รวมถึงการให้ความช่วยเหลืออื่น ๆ ให้คำปรึกษาและคำแนะนำต่าง ๆ ที่มีประโยชน์ต่าง ๆ

ขอบคุณนางสาวพิมชนก พันธุ์แก้ว และนางสาววิสุทธิดา เปลา ที่คอยเป็นกำลังใจ และช่วยกันแก้ไขปัญหาต่าง ๆ ในผ่านพ้นไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ และสมาชิกห้องปฏิบัติการ 2015 ที่ช่วยเหลือเพื่อ สถานที่ และเครื่องมือในการทำงานวิจัย เพื่อให้งานวิจัยเป็นไปตามวัตถุประสงค์ของโครงการ

ขอขอบคุณอาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ได้ถ่ายทอด ความรู้ในทุก ๆ สาขา รวมถึงคำแนะนำทั้งในด้านการเรียน และการวางแผนต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อตัวผู้วิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่ ได้ให้ ความช่วยเหลือด้านอุปกรณ์ และเครื่องมือต่าง ๆ ที่ใช้ในงานวิจัยนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา พี่ชาย และเพื่อนๆ โดยเฉพาะเพื่อนในกลุ่มทั้ง 12 คน ที่คอยให้ กำลังใจ และคอยสนับสนุนผู้วิจัยเสมอมา จนทำให้งานวิจัยเสร็จสิ้นไปได้ด้วยดี

นายจิรายุส ขาวสังข์

## สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เครื่องมือ วัสดุ เคมีภัณฑ์	7
บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง	10
บทที่ 4 ผลการทดลอง	14
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	19
เอกสารอ้างอิง	23
ภาคผนวก ก	27
ภาคผนวก ข	30



# บทที่ 1

## บทนำ

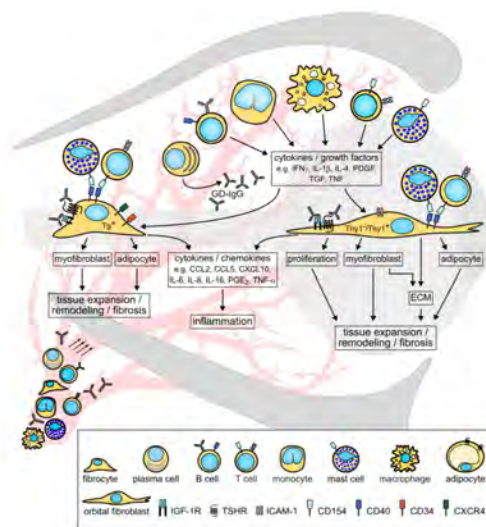
### โรคคอพอกแบบเป็นพิษ (Graves' hyperthyroidism) และโรคตาโปนจากไทรอยด์ (Graves' Ophthalmopathy)

โรคคอพอกแบบเป็นพิษ (Graves' hyperthyroidism) เป็นโรคภูมิคุ้มกันต้านทานเนื้อเยื่อตนเองชนิดหนึ่ง โดยมีสาเหตุการเกิดมาจากการที่ร่างกายผลิต autoantibody ที่สามารถจับกับ Thyroid follicular cell ผ่านทาง TSH receptor (TSHR) ซึ่งเลียนแบบการทำงานของ Thyroid Stimulating Hormone (TSH) เพื่อกระตุ้นการผลิตฮอร์โมนไทรอยด์ ส่งผลให้มีการผลิตฮอร์โมนไทรอยด์ในปริมาณมากผิดปกติ จนไม่สามารถยับยั้งการผลิตได้ด้วยกลไก negative feedback inhibition และทำให้เกิดอาการของผู้ป่วย นั่นคือ คอพอกเนื่องจากต่อมไทรอยด์ที่โตขึ้น น้ำหนักลด หัวใจเต้นเร็วไม่สม่ำเสมอ อ่อนเพลีย สั่น วิดุกังวล นอนไม่หลับ เป็นต้น [1] โดยประมาณ 25-50% ของผู้ป่วยโรคนี้ จะปรากฏอาการทางตาพร้อมด้วย เรียกว่า โรคตาโปนจากไทรอยด์ (Graves' Ophthalmopathy, GO) โดยผู้ป่วยจะแสดงอาการต่าง ๆ ได้แก่ เนื้อเยื่อบริเวณรอบดวงตาและกล้ามเนื้อตาขยายขนาด ส่งผลให้ลูกตาถูกดันออกมา และอาจทำให้หนังตาชั้นบนร่นขึ้น จนไม่สามารถปิดตาได้สนิท รวมถึงมีน้ำตาไหลตลอดเวลาเนื่องจากตาแห้ง และเมื่อกล้ามเนื้อตา รวมถึงเนื้อเยื่อไขมันรอบดวงตาขยายขนาดมากเกินไปจนทับเส้นประสาทบริเวณรอบดวงตา อาจทำให้การส่งกระแสประสาทและการควบคุมลูกตาผิดปกติจนเกิดอาการตาเข และอาจร้ายแรงถึงขั้นทำให้สูญเสียการมองเห็นหรือตาบอดได้ [2, 3] ดังแสดงในรูปที่ 1.1 [3] โรคตาโปนจากไทรอยด์สามารถแบ่งได้เป็น 2 ระยะตามลักษณะทางพยาธิสรีรวิทยา (Pathophysiology) ของโรค ได้แก่ ระยะ early/active GO คือระยะที่มีการอักเสบของเนื้อเยื่อตาจนทำให้เกิดอาการบวม และระยะ late/burnt-out GO ซึ่งเป็นระยะที่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเนื้อเยื่อ (tissue remodeling) และเกิดพังผืด (fibrosis) [4]



รูปที่ 1.1 (A) และ (B) แสดงอาการตาโปนจากโรคไทรอยด์ (Rebecca S. Bahn, 2010)

ในปัจจุบันการรักษาอาการตาโปนจากไทรอยด์จะขึ้นอยู่กับระยะของโรคดังที่กล่าวไว้ข้างต้น กล่าวคือ มีการใช้ยา steroid ในระยะแรกที่มีอาการ (early GO) โดยการรักษาผู้ป่วยมีการตอบสนองต่อการรักษาประมาณ 50-70% [4] แสดงให้เห็นว่าอาการของโรคมีโอกาสกลับมาแสดงได้อีก และเนื่องจากยา steroid มีผลในการกดภูมิคุ้มกัน จึงอาจทำให้ผู้ป่วยมีความเสี่ยงในการติดเชื้อต่าง ๆ ได้ง่ายขึ้น ในขณะที่ระยะที่โรคสงบลง (late GO) เนื้อเยื่อจะมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและเกิดพังผืด จึงมีการรักษาโดยการผ่าตัด (Decompression surgery) เพื่อนำเนื้อเยื่อไขมันส่วนเกินบริเวณหลังดวงตาออก [5-7] อย่างไรก็ตามการรักษาทั้งสองวิธีนี้อาจมีผลข้างเคียงต่อคนไข้และนับเป็นการรักษาที่ปลายเหตุ เพราะ เซลล์ที่มีบทบาทหลักที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคไม่ถูกยับยั้งการทำงานอย่างมีประสิทธิภาพเพียงพอ โดยโรคตาโปนจากไทรอยด์นั้น เกิดลักษณะทางพยาธิสรีรวิทยาจากเซลล์สำคัญที่เรียกว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา (orbital fibroblast) ซึ่งมีการแสดงออกของ TSHR เช่นเดียวกับที่ Thyroid follicular cell จึงสามารถถูกกระตุ้นได้ด้วย autoantibody เช่นเดียวกับที่ Thyroid follicular cell [8] นอกจากนี้ยังสามารถถูกกระตุ้นได้จาก cytokines และ growth factor ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันบริเวณรอบดวงตา อาทิเช่น PDGF-BB [4] และ IGF-1 [36] ส่งผลให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตามีการผลิต cytokines และ chemokines ต่าง ๆ ออกมามากขึ้นจนทำให้เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อ อีกทั้งยังสามารถเพิ่มจำนวนและเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ myofibroblast ที่สามารถหลั่ง extracellular matrix จำพวก hyaluronic acid (HA) ออกมา หรือ เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ adipocyte ส่งผลให้เกิดการสะสมของไขมันและขยายขนาดของเนื้อเยื่อรอบดวงตา (tissue expansion) การเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง (remodeling) และ พังผืด (fibrosis) ดังแสดงในรูปที่ 1.2 [10] โดยในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้สนใจศึกษากลไกการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ไขมัน (adipocyte) ผ่านกระบวนการที่เรียกว่า การพัฒนาของเซลล์ไขมัน (Adipocyte differentiation) เนื่องจากมีรายงานว่าระดับการเกิดอาการตาโปนนั้นสัมพันธ์กับปริมาณของเนื้อเยื่อไขมันรอบดวงตา [11] จึงกล่าวได้ว่าเนื้อเยื่อไขมันเป็นหนึ่งในองค์ประกอบหลักสำคัญที่ทำให้เกิดอาการของโรค โดยการศึกษาถึงกลไกดังกล่าวสามารถนำไปสู่การคิดค้นวิธีการรักษาที่จำเพาะกับสาเหตุการเกิดโรคตาโปนจากไทรอยด์ และได้ผลการรักษาที่มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

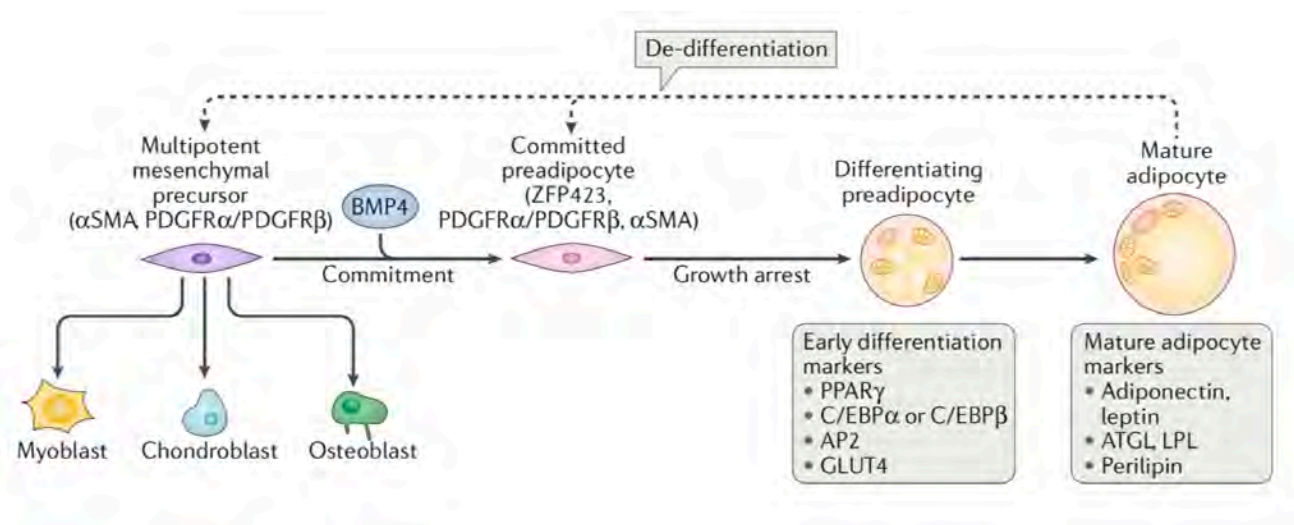


รูปที่ 1.2 Pathophysiology ของการเกิดโรคตาโปนจากโรคไทรอยด์

(Dik, W.A., S. Virakul และ L. van Steensel, 2016)

## การพัฒนาของเซลล์ไขมัน (Adipocyte differentiation)

การพัฒนาของเซลล์ไขมัน (Adipocyte differentiation หรือ Adipogenesis) เป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ไขมัน (mature adipocyte) ของ fibroblast-like progenitor cells [12] ผ่านการทำงานของ transcription factors หลายชนิด เช่น peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) [13, 14] และ CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\delta$ ) [15, 16] เป็นต้น โดยในระยะแรกเซลล์จะมีการแสดงออกของ PPAR- $\gamma$  เพื่อกระตุ้นการแสดงออกของ C/EBP- $\alpha$  โดยจะทำงานร่วมกันเพื่อกระตุ้นการแสดงออกของ adipocyte specific genes ต่าง ๆ และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ mature adipocyte ดังแสดงในรูปที่ 1.3 [13, 14, 17, 18] ซึ่งจะส่งผลให้เซลล์มีลักษณะกลมและมีเม็ดไขมัน (fat droplets) สะสมภายใน cytoplasm [12, 14] โดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา จากผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์นั้นมีความสามารถในการแสดงออกของยีน PPAR- $\gamma$  จากการถูกกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นต่าง ๆ เช่น rosiglitazone [17, 18] รวมถึง Platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) [19] ซึ่งเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาแต่ละเซลล์นั้นมีหน้าที่และลักษณะที่ไม่เหมือนกัน โดยจะมีประชากรที่แสดงออกของแอนติเจนชนิด Thy1 (CD90) บนผิวเซลล์ หรือเรียกว่า Thy1+ และประชากรที่ไม่มีการแสดงออกของ Thy1 หรือ Thy1- โดยประชากร Thy1+ นั้นจะมีความสามารถในการพัฒนาไปเป็นเซลล์ myofibroblast ส่วนประชากร Thy1- จะมีความสามารถในการพัฒนาไปเป็นเซลล์ adipocyte ได้ [20] จึงอาจกล่าวได้ว่าเซลล์ orbital fibroblast จากผู้ป่วยโรคตาโปนที่สามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์ไขมันได้นั้นเป็นประชากร Thy1- และจากรายงานก่อนหน้าพบว่ายังมีกระบวนการทาง epigenetics หรือกระบวนการควบคุมการแสดงออกของยีนโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่สามารถควบคุมกระบวนการ Adipocyte differentiation ได้อีกด้วย [21] แต่ยังไม่มียางานถึงความเกี่ยวข้องระหว่างกระบวนการทาง epigenetics กับกระบวนการ adipocyte differentiation จากผู้ป่วยโรคตาโปนจากไทรอยด์

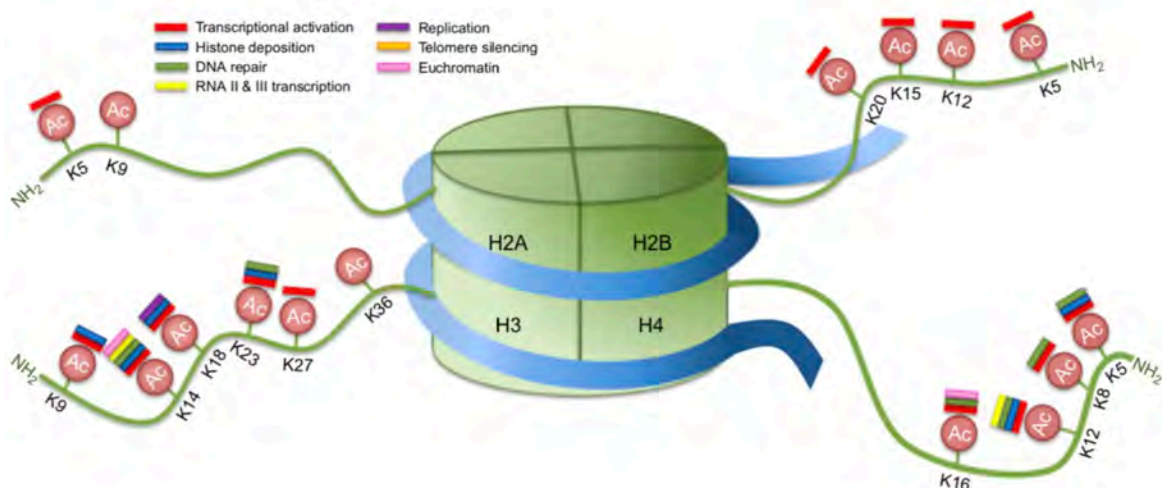


รูปที่ 1.3 Molecular mechanisms ของการเกิดกระบวนการ Adipocyte differentiation

(Alexandra L. Ghaben และ Philipp E. Scherer, 2019)

## Epigenetics

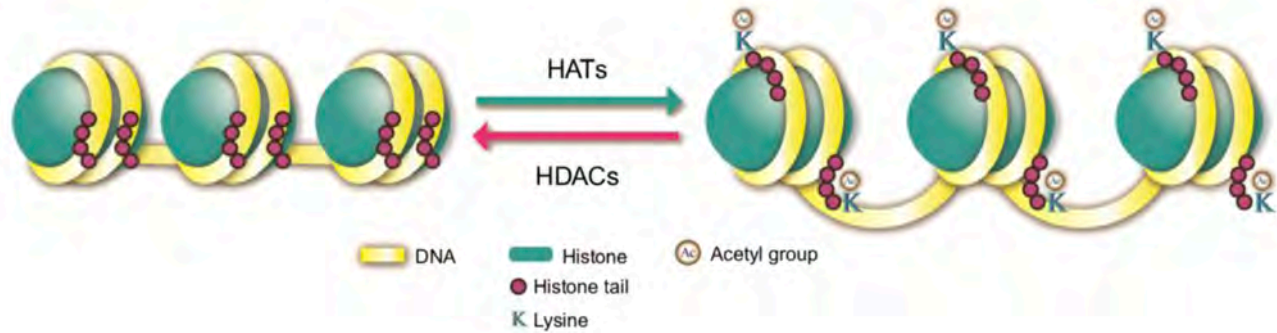
สารพันธุกรรมทั้งหมดของสิ่งมีชีวิต eukaryotic จะหดสั้นและพันกันแน่นเป็นโครมาติน (heterochromatin) ซึ่งมี nucleosome เป็นหน่วยย่อย โดยแต่ละ nucleosome จะประกอบไปด้วย histone octamer ซึ่งเป็นโปรตีนที่มี core histone 4 ชนิด ได้แก่ H2A H2B H3 และ H4 อย่างละ 2 หน่วยถูกพันด้วยสาย DNA และมีหางของโปรตีนฮิสโตน ด้านปลายอะมิโน (N-terminal histone tail) ยื่นออกมาจากบริเวณ core histone ดังแสดงในรูปที่ 1.4 โดยโครงสร้างบริเวณปลายของโปรตีนฮิสโตนนั้นเป็นส่วนของที่สามารถถูกปรับแต่งพันธะ covalent [22] ได้ด้วยกระบวนการทาง epigenetics ต่าง ๆ เช่น Histone acetylation Histone methylation หรือ Histone Phosphorylation เป็นต้น [21] ซึ่งจะส่งผลต่อโครงสร้างของ chromatin และการแสดงออกของยีน [23] ส่งผลให้ยีนมีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นหรือถูกยับยั้งการแสดงออกก็ได้ ขึ้นอยู่กับชนิดของกระบวนการทาง epigenetics [24] อาทิเช่น การเติมหมู่ acetyl บริเวณหางของโปรตีนฮิสโตน จะทำให้ยีนคลายตัวออกจาก histone octamer ส่งผลให้ transcription factor ต่างๆ สามารถเข้ามาจับและเกิดกระบวนการ transcription ของยีนนั้นๆได้ [23, 24]



รูปที่ 1.4 โครงสร้างของโปรตีนฮิสโตน

(Christina Y. Lee และ Patrick A. Grant, 2019)

กระบวนการ histone acetylation เป็นหนึ่งในกระบวนการทาง epigenetics และเป็นกระบวนการสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีนภายในเซลล์ [25, 26] ซึ่งจะประกอบไปด้วยการทำงานของเอนไซม์ 2 ชนิดคือ Histone acetyltransferase (HATs) และ Histone deacetylase (HDACs) [27, 28] โดยเอนไซม์ HAT จะทำหน้าที่เติมหมู่ acetyl บริเวณปลายของโปรตีนฮิสโตน [29] ทำให้ chromatin คลายตัวหลวมขึ้น ส่งผลให้ transcription factor ต่าง ๆ สามารถเข้ามาจับและเกิดกระบวนการ transcription ได้ [30] แต่เอนไซม์ HDAC จะทำหน้าที่ตรงกันข้าม นั่นคือ ทำหน้าที่ลบหมู่ acetyl ออกจากปลายของโปรตีนฮิสโตน [29, 31] ทำให้ chromatin หดตัวพันกันแน่นรอบโปรตีนฮิสโตน และเกิดกระบวนการ transcription ได้ลดลง ดังแสดงในรูปที่ 1.5



รูปที่ 1.5 การทำงานของ HATs และ HDACs (Luan Y. et al, 2016)

งานวิจัยของ Eiko Ishikawa-Kobayashi และคณะได้ศึกษาบทบาทของ Histone acetylation ของยีน *Bmal1* และ D-box binding PAR BZIP transcription factor (*Dbp*) ต่อกระบวนการ Adipocyte differentiation ในเนื้อเยื่อไขมันของหนูทดลอง โดยใช้ inhibitor ต่อ Histone deacetylase (HDACi) ชนิด Suberoylanilid Hydroxamic Acid (SAHA) และ valproic acid ผลการทดลองพบว่าการเพิ่มระดับการเกิด Acetylation บริเวณปลายของโปรตีนฮิสโตนชนิด H3 ที่ตำแหน่ง lysine ที่ 9 (H3K9) บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *Bmal1* และ *Dbp* สามารถลดการเกิดเนื้อเยื่อไขมันได้ [32] จึงสามารถสรุปได้ว่าบทบาทของกระบวนการ Adipocyte differentiation สามารถถูกควบคุมได้ผ่านการทำงานของเอนไซม์ Histone deacetylase อีกทั้งงานวิจัยของ Chisato Suzuki และคณะ ได้เหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีน *Dbp* โดยการให้ HDACi ชนิด MS275 ผ่านกระบวนการ Adipocyte differentiation พบว่าเมื่อใช้ MS275 จะส่งผลให้เกิดการแสดงออกของยีน *Dbp* มากขึ้น และทำให้การแสดงออกของยีน *PPAR-γ* ซึ่งเป็น marker ของเซลล์ adipocyte เพิ่มมากขึ้น จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่ากระบวนการ Adipocyte differentiation สามารถถูกควบคุมได้ผ่านการทำงานของเอนไซม์ Histone acetyltransferase [33]

การศึกษาก่อนหน้าได้แสดงให้เห็นว่าทั้งกระบวนการ histone acetylation และ histone deacetylase มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดกระบวนการ adipocyte differentiation ในสิ่งมีชีวิต ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาบทบาทของกระบวนการ Histone acetylation ซึ่งคาดว่าจะเกี่ยวข้องกับการเกิดกระบวนการ adipocyte differentiation ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาจากผู้ป่วยที่มีอาการตาโปนจากโรคไทรอยด์ โดยใช้ Histone acetyltransferase inhibitor (HATi) และ Histone deacetylase inhibitor (HDACi) เพื่อที่จะศึกษาผลของกระบวนการดังกล่าวได้อย่างจำเพาะ และสามารถยับยั้งที่สาเหตุการเกิดโรคได้โดยตรง เพื่อนำไปสู่แนวทางใหม่ในการรักษาอาการตาโปนจากโรคไทรอยด์ในอนาคต

## วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อศึกษาบทบาทของ PDGF-BB IGF-1 และกระบวนการ histone acetylation ต่อกระบวนการพัฒนาของเซลล์สะสมไขมัน (Adipocyte differentiation) ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาจากผู้ป่วยตาโตนจากโรคไทรอยด์

## สมมติฐาน

PDGF-BB และ IGF-1 สามารถกระตุ้นการเกิดกระบวนการ Adipocyte differentiation ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาจากผู้ป่วยตาโตนจากโรคไทรอยด์ ผ่านการทำงานของเอนไซม์ของ Histone deacetylase หรือ Histone acetyltransferase

## ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. มีทักษะในการทำการทดลองในห้องปฏิบัติการเพิ่มขึ้น รวมถึงมีทักษะในด้านการเลี้ยงเซลล์ การทำเทคนิค Real-Time PCR และ เทคนิค ELISA
2. ทราบบทบาทของกระบวนการ Histone acetylation ต่อกระบวนการพัฒนาของเซลล์สะสมไขมัน (Adipocyte differentiation) ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาจากผู้ป่วยตาโตนจากโรคไทรอยด์ เพื่อนำไปสู่การหาแนวทางใหม่ในการรักษาผู้ป่วยตาโตนจากโรคไทรอยด์

## บทที่ 2

### เครื่องมือ วัสดุ เคมีภัณฑ์

#### 2.1 เครื่องมือและวัสดุ

1. ตู้บ่มเซลล์ควบคุมอุณหภูมิและปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ รุ่น New Brunswick Galaxy 170s incubator (Eppendorf, Hamburg, Germany)
2. ตู้ปลอดเชื้อ biological safety cabinets (Lab micro, Thailand)
3. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น OLYMPUS CKX3-SLP (Olympus, Tokyo, Japan)
4. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Mettmert, Germany)
5. เครื่องปั่นเหวี่ยงสารแบบควบคุมอุณหภูมิ รุ่น 5804 R (Eppendorf, Hamburg, Germany)
6. เครื่องปั่นเหวี่ยงสาร รุ่น 5424 (Eppendorf, Hamburg, Germany)
7. เครื่องอ่านไมโครเพลท รุ่น Anthos 2010 (Biochrom Ltd., Cambridge, United Kingdom)
8. เครื่องชั่งแบบหยาบ 2 ตำแหน่ง รุ่น PG6002-S (Mettler, Greifensee, Switzerland)
9. เครื่องชั่งแบบละเอียด 4 ตำแหน่ง รุ่น AG285 (Mettler, Greifensee, Switzerland)
10. เครื่องผลิตน้ำบริสุทธิ์ Type 1 และ 2 (Thermo Fisher Scientific, USA)
11. เครื่องผสมสาร รุ่น G560E Vortex Mixer Genie 2 (Scientific Industries Inc., NY, USA)
12. ฮีมาไซโตมิเตอร์ (ISOLAB Laborgeräte GmbH, Eschau, Germany)
13. ฟลาสก์เลี้ยงเซลล์ที่มีฝาปิดตัวกรอง Nunclon™ EasYFlask ขนาด 75 และ 175 ตารางเซนติเมตร (Thermo Fisher Scientific, China)
14. ไมโครเพลท 6 หลุม cell culture plate Nunclon™ Delta Surface (Thermo Fisher Scientific, China)
15. หลอดเซนติพีพลาสติก ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร (Thermo Fisher Scientific, Korea)
16. หลอดไมโครเซนติพีพลาสติก ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Axygen, Inc., USA)
17. หลอด cryovial (SPL Life Sciences Co., Ltd., Gyeonggi-do, Korea)
18. เซอโรโลจิคัลปิเปตต์ ขนาด 10 มิลลิลิตร (Thermo Fisher Scientific, Korea)
19. ออโตปิเปตต์ EasYPET3 (Eppendorf, Hamburg, Germany)
20. ไมโครปิเปตต์ ขนาด P10, P100, P200, P1000 (Eppendoff, Hamburg, Germany)
21. ไมโครปิเปตต์ทึบ แบบมีตัวกรองและไม่มีตัวกรอง ขนาด 10 ul, 200 ul, 300 ul และ 1000 ul (Thermo Fisher Scientific, USA)
22. เครื่อง Thermo Scientific™ NanoDrop™ 2000 Spectrophotometers (Thermo Fisher Scientific, USA)
23. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

24. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
25. เครื่อง RT-PCR รุ่น Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Inc., California, USA)
26. เครื่อง PowerPac™ HC High-Current Power Supply (Bio-Rad Inc., California, USA)

## 2.2 เคมีภัณฑ์

### 2.2.1 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเซลล์

1. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Hyclone, Logan, UT, USA)
2. Fetal bovine serum (FBS) (Gibco™ Laboratories, USA)
3. Gentamicin (Gibco™ Laboratories, USA)

### 2.2.2 ส่วนประกอบของ Non-differentiation medium

1. Serum-free DMEM/Ham's F12 (Hyclone, Logan, UT, USA)
2. Biotin (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)
3. Pantothenic acid (Sigma-Aldrich Corp.)
4. Insulin (Sigma-Aldrich Corp.)
5. Transferrin (Merck, Darmstadt, Germany)
6. Triiodothyronine (T3: Sigma-Aldrich Corp.)

### 2.2.3 ส่วนประกอบของ Maintenance medium

1. Serum-free DMEM/Ham's F12 (Hyclone, Logan, UT, USA)
2. Biotin (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)
3. Pantothenic acid (Sigma-Aldrich Corp.)
4. Insulin (Sigma-Aldrich Corp.)
5. Transferrin (Merck, Darmstadt, Germany)
6. Triiodothyronine (T3: Sigma-Aldrich Corp.)
7. Carbaprostaglandin (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA)
8. Rosiglitazone (Sigma-Aldrich Corp.)

### 2.2.4 ส่วนประกอบของ Differentiation medium

1. Serum-free DMEM/Ham's F12 (Hyclone, Logan, UT, USA)
2. Biotin (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)
3. Pantothenic acid (Sigma-Aldrich Corp.)
4. Insulin (Sigma-Aldrich Corp.)
5. Transferrin (Merck, Darmstadt, Germany)
6. Triiodothyronine (T3: Sigma-Aldrich Corp.)
7. Carbaprostaglandin (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA)



8. Rosiglitazone (Sigma-Aldrich Corp.)
9. Dexamethasone (Sigma-Aldrich Corp.)
10. Isobutylmethylxantine (Sigma-Aldrich Corp.)

#### 2.2.5 สารเคมีที่ใช้ในขั้นตอน Oil Red O staining

1. Oil Red O powder (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)
2. PBS (Life technologies, Germany)
3. Isopropanol (Honeywell, Germany)

#### 2.2.6 อื่นๆ

1. RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Austin, Texas, USA)
2. iScript Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (Bio-Rad, Hercules, California, USA)
3. Human Total Adiponectin/Acrp30 Quantikine ELISA kit (Bio-Techne/R&D Systems Inc., U.S.A.)
4. 0.25% Trypsin/EDTA (Gibco™ Laboratories, USA)
5. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) (BioLegend, California, USA)
6. PDGF-BB (220-BB) (Bio-Techne/R&D Systems Inc., U.S.A.)
7. Trypan blue (Gibco™ Laboratories, USA)
8. HDAC inhibitor (Selleck chemicals, Houston, USA)

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการทดลอง

#### 1. การเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา

แยกเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาจากเนื้อเยื่อบริเวณรอบดวงตาของผู้ป่วยตาโปรจากโรคไทรอยด์ ซึ่งอยู่ในระยะ inactive และเข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โดยเนื้อเยื่อจะถูกตัดเป็นชิ้นเล็ก เลี้ยงในอาหาร Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ที่เติม 20% fetal bovine serum (FBS) และ 1% gentamicin จากนั้นบ่มในตู้บ่มควบคุมความชื้นที่อุณหภูมิ 37 °C และปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3 วัน จนกระทั่งเซลล์เต็มหลุม จากนั้นย้ายเซลล์ใส่ฟลasks เลี้ยงเซลล์ โดยใช้ 0.25% trypsin/EDTA และเลี้ยงต่อด้วยอาหาร DMEM ที่เติม 10% FBS ตามวิธีที่ได้รายงานจากงานวิจัยก่อนหน้า [19] โดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาที่ใช้ถูกแยกมาจากคนไข้ 3 คน และใช้ในงานทดลองในช่วง passage อยู่ระหว่าง 4-10

ตารางที่ 3.1 ข้อมูลเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาจากคนไข้

Orbital fibroblast	CAS score	Gender
I_GO_TH4	0/7	Male
I_GO_TH12	0/7	Female
I_GO_TH27	0/7	Male

#### 2. ศึกษาผล PDGF-BB และ IGF-1 ต่อกระบวนการ Adipocyte differentiation

นำเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา จำนวน  $4.0 \times 10^5$  เซลล์ใส่ลงในเพลท 6 หลุมที่มีอาหาร DMEM ที่เติม 10% FBS หลุมละ 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มควบคุมความชื้นที่อุณหภูมิ 37 °C และปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ยึดเกาะกับผิวของเพลท จากนั้นกระตุ้นเซลล์ โดยแบ่งเป็น 4 สถานะการทดลอง ได้แก่

- 2.1 กลุ่มการทดลองควบคุมที่ไม่มีการกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาโดยจะเลี้ยงในอาหาร non-differentiation medium
- 2.2 กลุ่มการทดลองที่มีการกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ไขมัน โดยเลี้ยงเซลล์ในอาหาร Differentiation medium และ Maintenance medium (3 วันแรกจะเลี้ยงในอาหาร Differentiation medium และอีก 7 วันจะเลี้ยงในอาหาร Maintenance medium)
- 2.3 กลุ่มการทดลองเพื่อทดสอบความสามารถในการกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ไขมัน โดยเลี้ยงเซลล์ในอาหาร non-differentiation medium ร่วมกับการเติม PDGF-BB

2.4 กลุ่มการทดลองเพื่อทดสอบความสามารถในการกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ไขมัน โดยเลี้ยงเซลล์ในอาหาร non-differentiation medium ร่วมกับการเติม IGF-1

โดยจะเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลาทั้งหมด 14 วัน โดยมีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3 วัน โดยเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ทุกวันที่ 4, 7, 10 และ 14 เพื่อนำไปวิเคราะห์ ELISA เพื่อดูปริมาณของ Adiponectin จากนั้นเมื่อครบ 14 วัน นำเซลล์ไปย้อม Oil Red O staining เพื่อดูการสะสมไขมันภายในเซลล์ และสกัด RNA เพื่อนำไปทำ RT-PCR ของยีนที่สนใจต่อไป

### 3. ศึกษาผลของ Histone acetyltransferase inhibitor (HATi) และ Histone deacetylase inhibitor (HDACi) ต่อกระบวนการ Adipocyte differentiation

ในกลุ่มการทดลองที่ 2.3 และ 2.4 จากข้อ 2 จะมีการทดลองโดยใช้ HATi และ HDACi ตามความเข้มข้นที่แสดงในตารางที่ 3.2 และตารางที่ 3.3 ตามลำดับ (Selleck chemicals, Houston, USA) โดยจะเติมลงไปในการเลี้ยงเซลล์ในแต่ละสภาวะ ในทุกครั้งที่มีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์

ตารางที่ 3.2 Histone acetyltransferase inhibitor (HATi)

HATi	HAT specificity
C646	p300
MG149	Tip60, MOF
Anacardic acid	p300, p300-CBP
Remodelin	NAT10

ตารางที่ 3.3 Histone deacetylase inhibitor (HDACi)

HDACi	HDAC specificity	Concentration (uM)
Quisinostat	HDAC1	0.08
CAY10683	HDAC2	10
RGFP966	HDAC3	20
PCI-34051	HDAC8	1
Tasquinimod	HDAC 4	20
LMK-235	HDAC4/5	1
Tubastatin	HDAC6	3

### 3. วัดการสะสมไขมันของเซลล์ไขมันโดยวิธี Oil Red O staining

เมื่อทำการเลี้ยงเซลล์ครบ 14 วัน ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย 1% PBS (pH 7.4) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร หลุมละ 2 ครั้ง และย้อมโดยใช้สารละลาย Oil Red O ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่เตรียมได้โดยการผสมสารละลาย 1% Oil red O กับน้ำ milli-Q ในอัตราส่วน 3:2 แล้วกรองผ่านกระดาษกรองที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.45  $\mu\text{m}$  ที่ทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นทั้งหมด 4 ครั้งเพื่อกำจัด Oil Red O ส่วนเกินออก ตามวิธีที่ได้รายงานจากงานวิจัยก่อนหน้า [19] และนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ในการวัดปริมาณสีที่ถูกย้อมติดภายในเซลล์ ทำได้โดยล้าง Oil Red O ที่ติดอยู่กับเซลล์ด้วย absolute isopropanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายที่ล้างได้ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ใน 96-well plate และวัดค่า optical density (OD) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 450 nm

### 4. วัดการแสดงออกของยีน *PPAR- $\gamma$* , *CD90* และ *HDAC* โดยวิธี Real-Time PCR

เมื่อทำการเลี้ยงเซลล์ครบ 14 วัน สกัด RNA ทั้งหมดโดยใช้ RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Austin, Texas, USA) และเปลี่ยนเป็น cDNA โดยใช้ Taqman<sup>TM</sup> Reverse Transcription Reagents (Applied biosystems, California, USA) จากนั้นตรวจสอบการแสดงออกของยีนต่าง ๆ ด้วย Real-Time Quantitative (RQ)-PCR (CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System; Bio-Rad, Hercules, California, USA) โดยใช้ SsoAdvance<sup>TM</sup> Universal Probes super mix (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) และมียีน *ABL* เป็นยีนอ้างอิง โดยใช้ primer-probe ดังตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer และ probe ของยีน *ABL*, *PPAR- $\gamma$* , *CD90* และ *HDAC*

gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Probe (5'FAM-3'TAMRA)
<i>ABL</i>	TGGAGATAACATCTAAGCATAACTAAAGGT	GATGTAGTTGCTTGGGACCCA	CCATTTTTGGTTTGGGCTTCACACCATT
<i>PPAR-<math>\gamma</math></i>	TGACAGCGACTTGGCAATATT	TCTTCAATGGGCTTCACATTCA	CAAACCTGGGCGGTCTCCACTGAG
<i>CD90</i>	TaqMan Gene Expression Assay (Hs00174816_m1), Life Technologies Inc., NY, USA		
<i>HDAC1</i>	TaqMan Gene Expression Assay (Hs00606262_g1), Life Technologies Inc., NY, USA		
<i>HDAC2</i>	TaqMan Gene Expression Assay (Hs00231032_m1), Life Technologies Inc., NY, USA		
<i>HDAC3</i>	TaqMan Gene Expression Assay (Hs00187320_m1), Life Technologies Inc., NY, USA		
<i>HDAC4</i>	TaqMan Gene Expression Assay (Hs01041648_m1), Life Technologies Inc., NY, USA		
<i>HDAC5</i>	TaqMan Gene Expression Assay (Hs00608351_m1), Life Technologies Inc., NY, USA		
<i>HDAC6</i>	TaqMan Gene Expression Assay (Hs00997427_m1), Life Technologies Inc., NY, USA		
<i>HDAC8</i>	TaqMan Gene Expression Assay (Hs00218503_m1), Life Technologies Inc., NY, USA		

### 5. วัดปริมาณของ Adiponectin ที่ถูกหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ Adipocyte โดยวิธี ELISA

เก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ในวันที่ 3 7 10 และ 14 เพื่อนำมาทดสอบ ELISA โดยใช้ Human Total Adiponectin/Acrp30 Quantikine ELISA kit (Bio-Techne/R&D Systems Inc., U.S.A.)

## 6. วิเคราะห์ผลการทดลอง

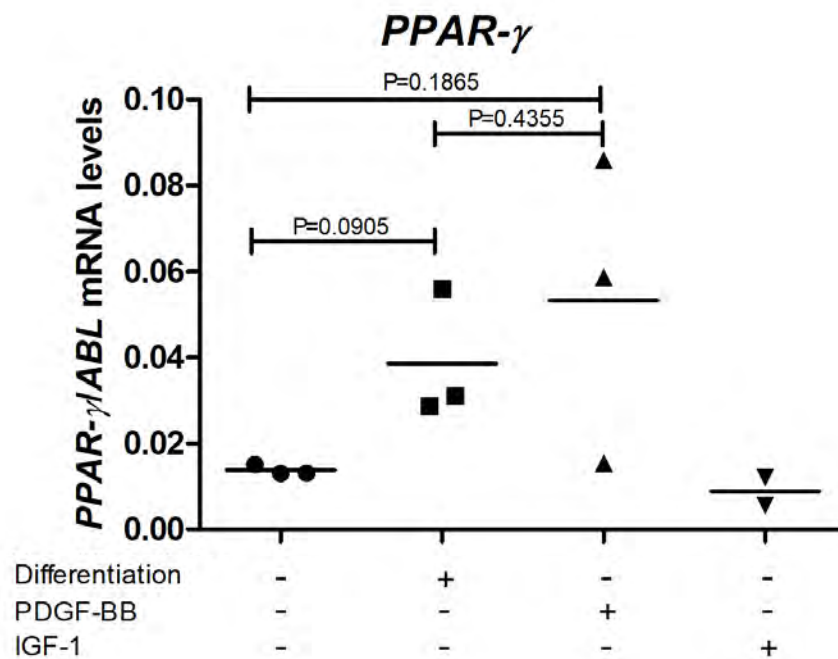
ในการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มใช้การวิเคราะห์แบบ paired Student's  $t$ -test และในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ภายในกลุ่มใช้การวิเคราะห์ทางสถิติแบบ Spearman's correlation โดยจะพิจารณาให้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อค่า  $P < 0.05$

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 1. ผลของ PDGF-BB และ IGF-1 ต่อการแสดงออกของยีน *PPAR-γ* โดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา

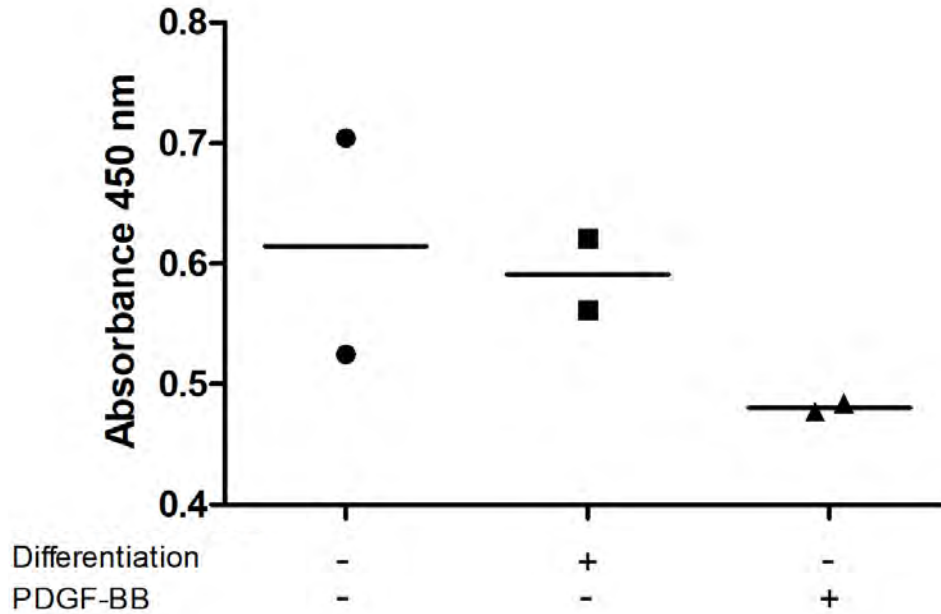
จากรูปที่ 4.1 จะเห็นว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาที่ถูกเลี้ยงในอาหาร Differentiation มีการแสดงออกของยีน *PPAR-γ* เพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสถานะที่เลี้ยงในอาหาร Non-differentiation ( $p=0.0905$ ) ส่วนในสถานะที่เลี้ยงในอาหาร Non-differentiation ที่มีการเติม PDGF-BB พบว่ามีการแสดงออกของยีน *PPAR-γ* เพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสถานะที่เลี้ยงในอาหาร Non-differentiation ( $p=0.1865$ ) และ Differentiation ( $p=0.4355$ ) ส่วนสถานะที่เติม IGF-1 มีการแสดงออกของยีนดังกล่าวที่ไม่แตกต่างกับสถานะที่เลี้ยงในอาหาร Non-differentiation



รูปที่ 4.1 ระดับการแสดงออกของยีน *PPAR-γ* โดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา (N=2-3) จากการวัดด้วยเทคนิค RT-PCR หลังจากถูกเลี้ยงในสถานะ Non-differentiation, Differentiation, Non-differentiation+PDGF-BB และ Non-differentiation+IGF-1 เป็นระยะเวลา 14 วัน โดยให้ ● ▲ ■ ▼ แทนเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาของคนไข้แต่ละคน และ ——— แทนค่าเฉลี่ยของกลุ่มประชากร

## 2. ผลของ PDGF-BB ต่อการสะสมไขมันภายในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา

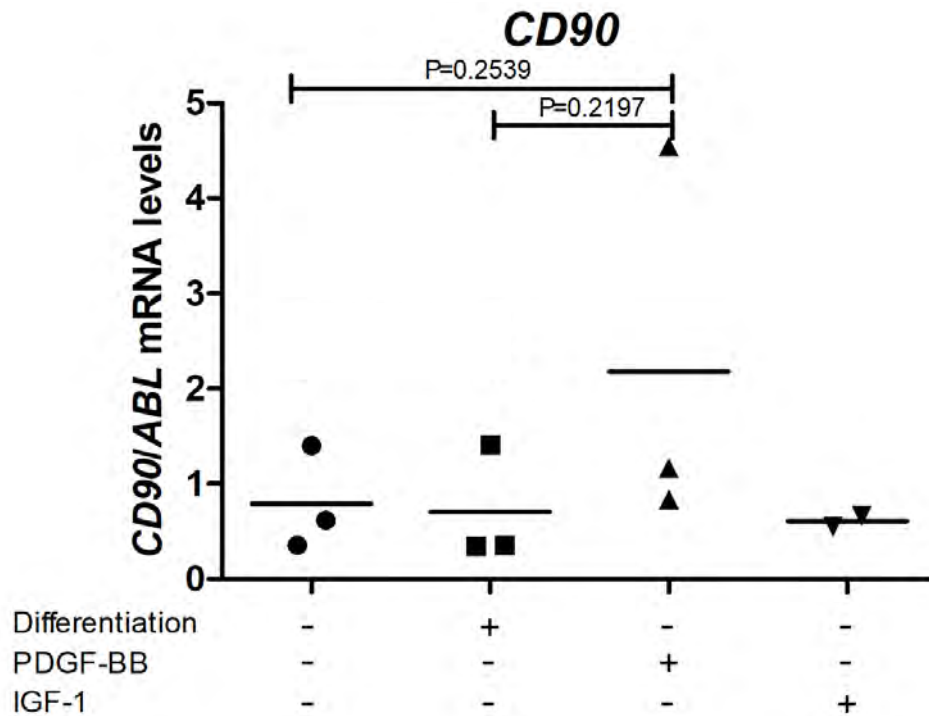
จากรูปที่ 4.2 จะเห็นว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาที่ถูกเลี้ยงในอาหาร Non-differentiation ที่มีการเติม PDGF-BB มีแนวโน้มการสะสมไขมันภายในเซลล์ที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่เลี้ยงในอาหาร Differentiation และ Non-differentiation เพียงอย่างเดียว



รูปที่ 4.2 ปริมาณการสะสมไขมันภายในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา (N=2) จากการย้อมด้วยสี Oil Red O และวัดค่า Absorbance ที่ 450 nm หลังจากถูกเลี้ยงในสภาวะ Non-differentiation, Differentiation และ Non-differentiation+PDGF-BB เป็นระยะเวลา 14 วัน โดยให้ ● ▲ ■ ▼ แทนเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาของคนไข้แต่ละคน และ ——— แทนค่าเฉลี่ยของกลุ่มประชากร

### 3. ผลของ PDGF-BB และ IGF-1 ต่อการแสดงออกของยีน *CD90* โดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา

จากรูปที่ 4.3 จะเห็นว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาที่ถูกเลี้ยงในอาหาร Non-differentiation ที่มีการเติม PDGF-BB มีแนวโน้มการแสดงออกของยีน *CD90* เพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสถานะที่เลี้ยงในอาหาร Non-differentiation ( $p=0.2539$ ) และ Differentiation ( $p=0.2197$ ) ในขณะที่สถานะที่เลี้ยงในอาหาร Non-differentiation ที่มีการเติม IGF-1 มีการแสดงออกของยีนดังกล่าวที่ไม่แตกต่างกับสถานะที่เลี้ยงในอาหาร Non-differentiation

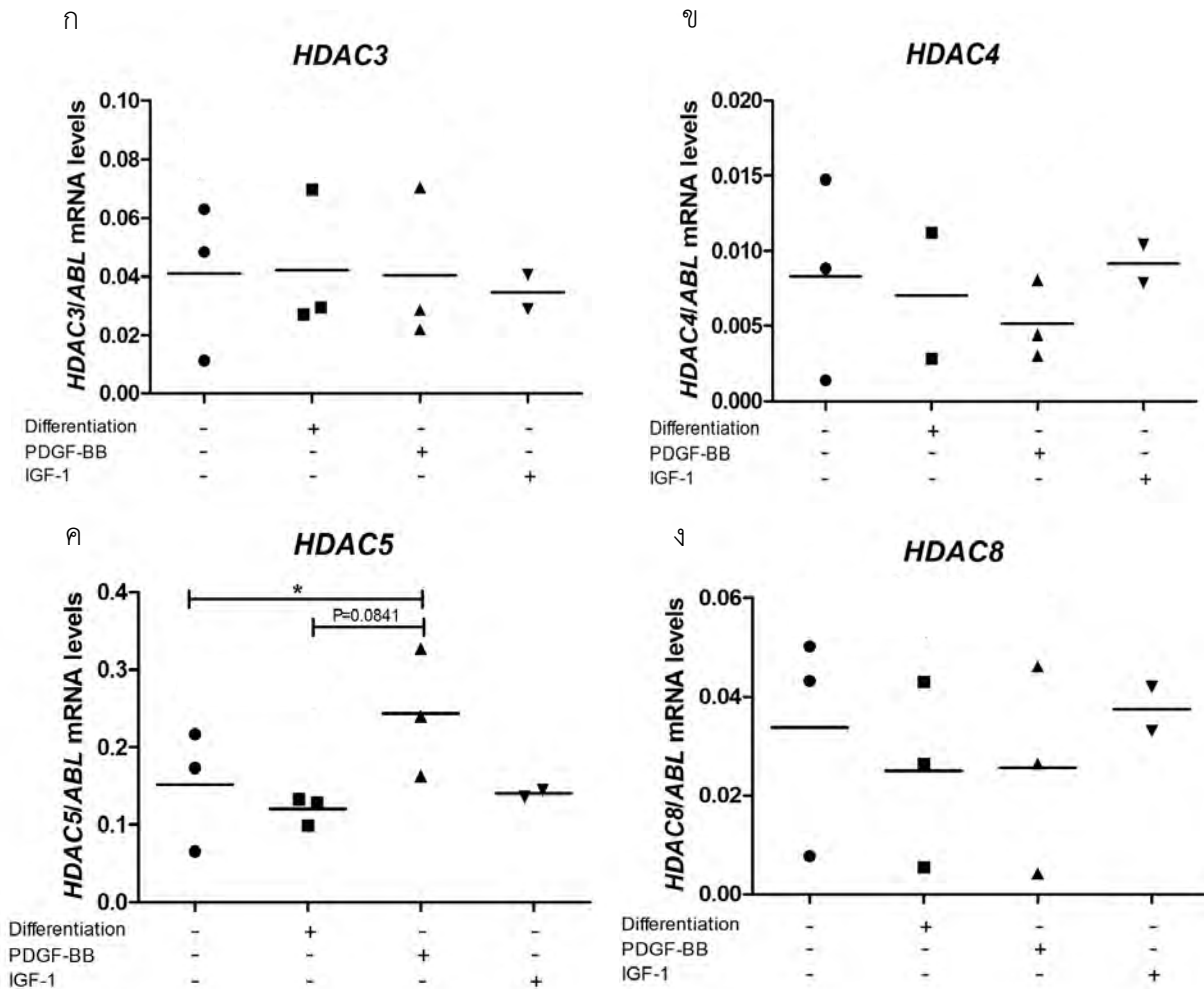


รูปที่ 4.3 ระดับการแสดงออกของยีน *CD90* โดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา (N=2-3) จากการวัดด้วยเทคนิค RT-PCR หลังจากถูกเลี้ยงในสถานะ Non-differentiation, Differentiation, Non-differentiation+PDGF-BB และ Non-differentiation+IGF-1 เป็นระยะเวลา 14 วัน โดยให้ ● ▲ ■ ▼ แทนเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาของคนไข้แต่ละคน และ ——— แทนค่าเฉลี่ยของกลุ่มประชากร



#### 4. ระดับการแสดงออกของเอนไซม์ Histone deacetylase ในระหว่างกระบวนการ Adipocyte differentiation

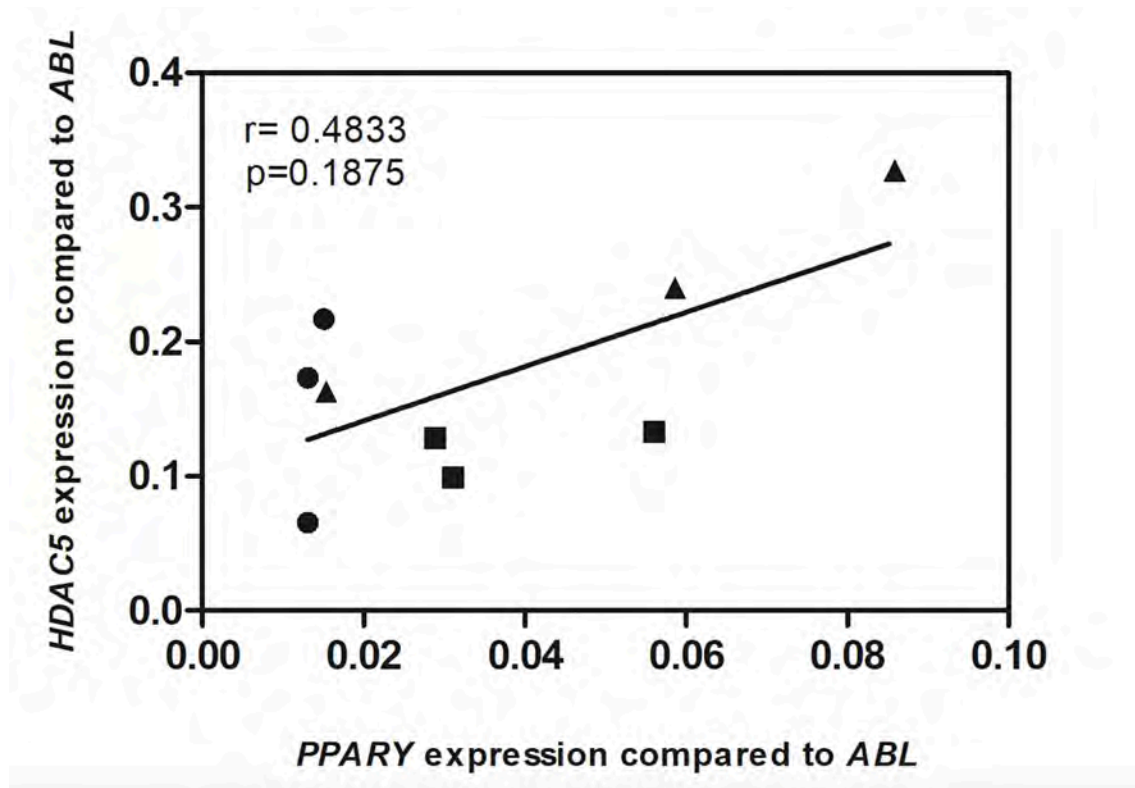
จากรูปที่ 4.4 จะเห็นว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาที่ถูกเลี้ยงในอาหาร Non-differentiation ที่มีการเติม PDGF-BB มีการแสดงออกของยีน *HDAC5* เพิ่มมากขึ้น ( $p < 0.05$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่เลี้ยงในอาหาร Non-differentiation และมีแนวโน้มการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่เลี้ยงในอาหาร Differentiation ( $p = 0.0841$ )



รูปที่ 4.4 ระดับการแสดงออกของยีน *HDAC* โดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา (N=2-3) จากการวัดด้วยเทคนิค RT-PCR หลังจากถูกเลี้ยงในสภาวะ Non-differentiation, Differentiation, Non-differentiation+PDGF-BB และ Non-differentiation+IGF-1 เป็นระยะเวลา 14 วัน โดยให้ ● ▲ ■ ▼ แทนเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาของคนไข้แต่ละคน — แทนค่าเฉลี่ยของกลุ่มประชากร และ \* แทน  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะ Non-differentiation (ก) ยีน *HDAC3* (ข) ยีน *HDAC4* (ค) ยีน *HDAC5* และ (ง) ยีน *HDAC8*

### 5. ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน *PPAR-γ* และยีน *HDAC5* โดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา

จากรูปที่ 4.5 จะเห็นว่าการแสดงออกของยีน *PPAR-γ* และยีน *HDAC5* โดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตามีแนวโน้มในการมีความสัมพันธ์แบบบวก ( $p=0.1875$ ) แต่ยังไม่สัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 4.5 ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน *PPAR-γ* และยีน *HDAC5* โดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา

ที่ถูกเลี้ยงในสภาวะ Non-differentiation, Differentiation และ Non-differentiation+PDGF-BB

เป็นระยะเวลา 14 วัน จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Spearman's correlation analysis

โดยให้ ● ■ ▲ แทนเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาที่ถูกเลี้ยงในอาหาร

Non-differentiation Differentiation และ Non-differentiation+PDGF-BB ตามลำดับ

## บทที่ 5

### อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยก่อนหน้า ซึ่งทดลองเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาในสภาวะ Differentiation ที่มีการเติม PDGF-BB พบว่ามีระดับการแสดงออกของยีน *PPAR-γ* ที่เพิ่มมากขึ้น รวมถึงมีปริมาณการสะสม Triglyceride เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกเลี้ยงในสภาวะ Differentiation เพียงอย่างเดียว จึงสรุปได้ว่า PDGF-BB สามารถส่งเสริมการเกิดกระบวนการ Adipocyte differentiation ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา [19] ในการทดลองนี้เป็นการทดสอบบทบาทของ PDGF-BB ในสภาวะ Non-differentiation ในการกระตุ้นกระบวนการ Adipocyte differentiation โดยตรง ผลการทดลองพบว่า เซลล์ที่ถูกเลี้ยงในสภาวะดังกล่าวมีระดับการแสดงออกของยีน *PPAR-γ* เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกเลี้ยงในสภาวะ Non-differentiation และสภาวะ Differentiation (รูปที่ 4.1) จึงทำให้สรุปได้ว่า PDGF-BB สามารถกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ Adipocyte differentiation ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาได้ แต่จากผลการทดลองที่ได้ต้องทำการทดลองโดยการเพิ่มจำนวนของคนไข้ รวมถึงอาจวัดระดับการแสดงออกของ Adipogenic genes อื่น ๆ ด้วยวิธี real-time PCR (RT-PCR) เพิ่มเติมเช่นยีน *C/EBPα* และ *FABP4* วัดระดับการแสดงออกของโปรตีน *PPAR-γ* *C-EBPα* และ *FABP4* ด้วยวิธี Western blot analysis [34] และวัดปริมาณของ Adipokines ที่เซลล์ไขมันหลั่งออกมาด้วยเทคนิค ELISA [35] เพื่อให้ผลการทดลองที่ได้มีความชัดเจนและน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น

ในงานวิจัยก่อนหน้าได้ทดลองเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาของผู้ป่วยตาโปนจากโรคไทรอยด์ในอาหาร adipogenic culture medium ที่มีการเติม Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) และพบว่า IGF-1 เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ Adipocyte differentiation ในเซลล์ดังกล่าวได้ [36] และเมื่อใช้ Teprotumumab เพื่อยับยั้งการทำงานของ IGF-1 receptor (IGF-1R) สามารถยับยั้งกระบวนการ Adipocyte differentiation ได้ [37] ในการทดลองนี้จึงเป็นการทดสอบบทบาทของ IGF-1 ในสภาวะ Non-differentiation ในการกระตุ้นกระบวนการ Adipocyte differentiation โดยตรง อย่างไรก็ตามระดับการแสดงออกของยีน *PPAR-γ* ในสภาวะดังกล่าวนั้นไม่ได้แตกต่างกับเซลล์ที่ถูกเลี้ยงในสภาวะ Non-differentiation และสภาวะ Differentiation (รูปที่ 4.1) จึงสรุปได้ว่า IGF-1 ไม่มีแนวโน้มในการกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ Adipocyte differentiation ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา อย่างไรก็ตามต้องทำการทดลองต่อไปเพื่อทดสอบบทบาทที่แน่ชัดของ IGF-1 อาทิเช่น การจำนวนของคนไข้ และเปลี่ยนสภาวะที่ใช้ในการทดลอง เป็นต้น

เมื่อสังเกตผลการสะสมไขมันภายในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา พบว่าเซลล์ที่ถูกเลี้ยงในสภาวะ Non-differentiation ที่มีการเติม PDGF-BB มีการสะสมไขมันที่ลดลง (รูปที่ 4.2) อย่างไรก็ตามผลการทดลองในสภาวะ Differentiation ซึ่งเป็นชุด positive control ควรมีการสะสมไขมันภายในเซลล์ที่มากกว่าสภาวะ Non-differentiation ทำให้ไม่สามารถแปรผลการทดลองนี้ได้ จึงควรทำการทดลองซ้ำเพื่อยืนยันผลการทดลอง และควรเพิ่มจำนวนของคนไข้เพื่อให้ผลการทดลองมีความน่าเชื่อถือเพิ่มขึ้น

จากระดับการแสดงออกของยีน *CD90* พบว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาที่ถูกเลี้ยงในสภาวะ Non-differentiation ที่มีการเติม PDGF-BB มีระดับการแสดงออกของยีนดังกล่าวเพิ่มมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะ Non-differentiation และ Differentiation (รูปที่ 4.3) จึงอาจกล่าวได้ว่า PDGF-BB สามารถเพิ่มการแสดงออกของยีนดังกล่าวได้ แต่อย่างไรก็ตามควรมีการทดลองเพิ่มเติมเพื่อยืนยันผลการทดลองดังกล่าว อาทิเช่น การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Western blot analysis เพื่อวัดระดับการแสดงออกของโปรตีน *CD90* หรืออาจใช้เทคนิค Immunofluorescence โดยใช้ antibody ที่จำเพาะกับ *CD90* หรือเทคนิค Flow cytometry เพื่อดูโปรตีน *CD90* ที่มีการแสดงออกบนผิวเซลล์โดยตรง อีกทั้งวิธีการทดลองในงานวิจัยครั้งนี้ เลือกวิเคราะห์ยีนดังกล่าวที่เวลา 14 วัน จึงเป็นไปได้ว่ายีนดังกล่าวอาจถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกหลังจากที่เซลล์เจริญเป็นเซลล์ไขมันที่เจริญเต็มที่แล้ว จึงควรวัดระดับการแสดงออกของยีน *CD90* ในระยะที่เซลล์เป็น preadipocyte และเจริญเต็มที่ที่เป็น mature adipocyte เพื่อดูรูปแบบการแสดงออกของยีนดังกล่าวในระหว่างกระบวนการ Adipocyte differentiation เนื่องจากมีรายงานการศึกษาในเซลล์ 3T3-L1 preadipocytes และ mesenchymal stem cells ของหนู ว่าการแสดงออกของยีน *CD90* ถูกควบคุมด้วยกระบวนการ DNA methylation และจะถูกยับยั้งในระหว่างการเกิดกระบวนการ Adipocyte differentiation [38] อีกทั้งกระบวนการ DNA methylation ดังกล่าวยังเป็นกระบวนการสำคัญในการพัฒนาของเซลล์ preadipocyte ไปเป็นเซลล์ไขมันอีกด้วย [39, 40] จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงบทบาทร่วมกันของกระบวนการ Histone acetylation และ DNA methylation ในการควบคุมการแสดงออกของยีน *CD90* ซึ่งอาจส่งผลต่อการพัฒนาไปเป็นเซลล์ไขมันของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา

งานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า Bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) มีการแสดงออกของยีน *HDAC4* *HDAC5* และ *HDAC6* เพิ่มมากขึ้น ในระหว่างการเกิดกระบวนการ Adipocyte differentiation [41] ซึ่งตรงกับผลการแสดงออกของยีน *HDAC5* ในการทดลองนี้ (รูปที่ 4.4) โดยพบว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาที่ถูกเลี้ยงในสภาวะ Non-differentiation ที่มีการเติม PDGF-BB นั้นมีการแสดงออกของยีน *HDAC5* เพิ่มมากขึ้น ( $p < 0.05$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่เลี้ยงในอาหาร Non-differentiation แต่มีการแสดงออกของยีน *HDAC4* ที่ไม่แตกต่างกับสภาวะที่เลี้ยงในอาหาร Non-differentiation และ Differentiation ซึ่งอาจเป็นเพราะชนิดของเซลล์ที่ใช้ในการทดลองแตกต่างกัน จึงมีรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนแตกต่างกัน จากผลการทดลองที่ได้จึงสรุปได้ว่า *HDAC5* น่าจะกระตุ้นการเกิดกระบวนการ Adipocyte differentiation ผ่านการทำงานของกระบวนการ Histone deacetylation โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว ซึ่งน่าจะทำหน้าที่ในการลบหมู่ acetyl บริเวณหางของโปรตีนฮิสโตนของ adipogenic-suppressor genes ซึ่งจะแปลรหัสไปเป็น Negative regulators ของกระบวนการ adipocyte differentiation ต่อไป ส่งผลให้กระบวนการ transcription ของยีนดังกล่าวเกิดได้น้อยลง และเกิดกระบวนการ adipocyte differentiation ได้มากขึ้น อาทิเช่นยีน Kruppel-like factor 2 (*KLF2*) [42] ซึ่งมีรายงานการศึกษาในเซลล์ human umbilical cord vein endothelial cells (HUVECs) ว่า *HDAC5* สามารถยับยั้งกระบวนการ transcription ของยีน *KLF2* ได้ โดยเกิดจากการมีอันตรกิริยาร่วมกันระหว่าง N-terminal domain (กรดอะมิโนลำดับที่ 201-260) ของ *HDAC5* กับบริเวณ zinc-finger DNA-binding region ของยีน *KLF2* โดยปฏิกิริยานี้สามารถถูกยับยั้งได้ด้วยการเกิดกระบวนการ phosphorylation บริเวณกรดอะมิโน serine ตำแหน่งที่ 259

และ 498 ของ HDAC5 เนื่องจากสถานะการถูกเติมหมู่ฟอสเฟตของเอนไซม์ HDAC5 จะเป็นตัวกำหนดความสามารถในการยับยั้งกระบวนการ transcription ของยีน *KLF2* [43] อย่างไรก็ตามยังเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาสารตั้งต้นหรือโปรตีนชนิดอื่น ๆ ที่ถูกควบคุมโดยเอนไซม์ HDAC5 อีกทั้งควรทำการทดลองเพิ่มเติมเพื่อยืนยันบทบาทของเอนไซม์ HDAC5 ต่อการเกิดกระบวนการ adipocyte differentiation โดยทดลองเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาในอาหาร Non-differentiation+PDGF-BB ร่วมกับการลดการแสดงออกของยีน *HDAC5* โดยใช้ small interfering RNA (siRNA) หรือ short hairpin RNA (shRNA) [34] อีกทั้งควรทำการทดลองเพื่อศึกษาบทบาทที่แน่ชัดของเอนไซม์ HDAC4 ต่อกระบวนการ Adipocyte differentiation เนื่องจากมีรายงานว่าเอนไซม์ HDAC4 มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาด้วย PDGF-BB [44] โดยทดลองเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวในอาหาร Non-differentiation+PDGF-BB ร่วมกับการเพิ่มการแสดงออกของยีน *HDAC4* โดยวิธี Lentivirus infection [34] จากนั้นวัดระดับการแสดงออกของยีน *PPAR- $\gamma$* , *C-EBP $\alpha$*  และ *FABP4* ด้วยวิธี RT-PCR รวมถึงวัดระดับการแสดงออกของโปรตีน *PPAR- $\gamma$* , *C-EBP $\alpha$*  และ *FABP4* ด้วยวิธี Western blot analysis และวัดปริมาณของ Adipokines ที่เซลล์ไขมันหลั่งออกมาด้วยเทคนิค ELISA เพื่อยืนยันบทบาทของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดจากผลการทดลองที่ได้ อย่างไรก็ตามผลการทดลองในครั้งนี้เป็นการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในวันที่ 14 จึงควรทำการวิเคราะห์เพิ่มเติมในระหว่างการเกิดกระบวนการ Adipocyte differentiation โดยทำการวัดการแสดงออกของยีนในระยะที่เซลล์เป็น preadipocyte และเจริญเต็มที่ที่เป็น mature adipocyte เพื่อดูรูปแบบการแสดงออกของยีนในระหว่างกระบวนการดังกล่าว อีกทั้งควรวัดระดับการแสดงออกของยีน HDAC ชนิดอื่น ๆ เพิ่มเติม เช่น *HDAC1*, *HDAC2* และ *HDAC9* เนื่องจากมีรายงานว่าเอนไซม์ HDAC1 และ HDAC2 น่าจะทำงานร่วมกันในการกระตุ้นการเกิดกระบวนการ Adipocyte differentiation ในเซลล์ 3T3-L1 และเซลล์ embryonic fibroblasts ของหนูทดลอง [45]

ในการศึกษาก่อนหน้ายังไม่มีการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ ยีน *PPAR- $\gamma$*  และยีน *HDAC* แต่มีการค้นพบว่าเอนไซม์ HDAC3 และ HDAC4 สามารถยับยั้งการแสดงออกของ *PPAR- $\gamma$*  ในหนูทดลอง [46] และ cortical neurons [47] ได้ตามลำดับ ในงานวิจัยนี้จึงวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน *PPAR- $\gamma$*  และยีน *HDAC5* โดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาด้วยวิธี Spearman's correlation analysis พบว่า การแสดงออกของยีนดังกล่าวมีแนวโน้มในการมีความสัมพันธ์แบบบวก แต่ยังไม่สัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อาจกล่าวได้ว่าเมื่อมีการแสดงออกของยีน *HDAC5* เพิ่มมากขึ้น มีแนวโน้มจะทำให้การแสดงออกของยีน *PPAR- $\gamma$*  เพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน จึงควรทำการทดลองเพิ่มเติม โดยการเพิ่มจำนวนของคอนไซ์ เพื่อให้แนวโน้มของความสัมพันธ์ชัดเจนมากขึ้น อีกทั้งควรเพิ่มรูปแบบการทดลองเพื่อศึกษารูปแบบความสัมพันธ์ระหว่าง *PPAR- $\gamma$*  และเอนไซม์ HDAC5 โดยเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาในสภาวะเดิม ร่วมกับการลดการแสดงออกของยีน *HDAC5* โดยใช้ small interfering RNA (siRNA) หรือ short hairpin RNA (shRNA) จากนั้นทำการวัดระดับการแสดงออกของยีน *PPAR- $\gamma$*  ด้วยวิธี RT-PCR และวัดระดับการแสดงออกของโปรตีน *PPAR- $\gamma$*  ด้วยวิธี Western blot analysis

งานวิจัยนี้ควรมีการต่อยอด โดยเพิ่มการวัดระดับการแสดงออกของยีน *HAT* ชนิดต่าง ๆ เช่น *p300*, *Tip60*, *MOF* และ *NAT10* เป็นต้น โดยผลการทดลองอาจพบการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้นของ *p300* mRNA เนื่องจากมีรายงานว่าเอนไซม์ Histone acetyltransferase ชนิด p300 มีส่วนส่งเสริมให้เกิดการแสดงออกของยีน *C/EBP $\alpha$*  ซึ่งมี

ความสำคัญต่อการพัฒนาเป็นเซลล์ไขมัน [48] และหากมีการทดลองใช้ตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HAT และ HDAC ชนิดต่าง ๆ คาดว่าการใช้ตัวยับยั้งชนิด C646 เพื่อยับยั้งการทำงานของ p300 และการใช้ LMK-235 เพื่อยับยั้งการทำงานของ HDAC5 จะสามารถลดการเกิดกระบวนการพัฒนาของเซลล์ไขมันของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาได้ เนื่องจากมีรายงานว่า C646 สามารถยับยั้งการทำงานของ p300 ที่จะกระตุ้นกระบวนการ Adipocyte differentiation ได้ [49] และควรมีการทดลองใช้ตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ เพิ่มเติม อีกทั้งอาจทดลองใช้ตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HAT และ HDAC ร่วมกันเพื่อศึกษาถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดกระบวนการ adipocyte differentiation

จากผลการทดลองทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่า PDGF-BB สามารถกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ Adipocyte differentiation ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาของผู้ป่วยตาโปนจากโรคไทรอยด์ โดยน่าจะอาศัยการทำงานของเอนไซม์ Histone deacetylase 5 และสามารถทำงานวิจัยเพิ่มเติมต่อไป เพื่อหาหนทางรักษาที่จำเพาะต่อกระบวนการ Adipocyte differentiation ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตาของผู้ป่วยตาโปนจากโรคไทรอยด์ต่อไป

## เอกสารอ้างอิง

1. Cooper, D.S., Hyperthyroidism. *Lancet*, 2003. 362(9382):p.459-68.
2. Smith TJ, Bahn RS, Gorman CA. Connective tissue, glycosaminoglycans, and diseases of the thyroid. *Endocr Rev*, 1989. 10:p.366-391.
3. Bahn, R.S., Graves' ophthalmopathy. *N Engl J Med*, 2010. 362(8):p.726-38.
4. Virakul, S., et al., Platelet-derived growth factor: a key factor in the pathogenesis of graves' ophthalmopathy and potential target for treatment. *Eur Thyroid J*, 2014. 3(4):p.217-26.
5. Konstadinou G. Boboridis et al. Critical Appraisal on Orbital Decompression for Thyroid Eye Disease: A Systematic Review and Literature Search. *Adv Ther*, 2015. 32:p.595–611.
6. Tara L. Braun, Mohin A. Bhadkamkar, Kevin T. Jubbal, Adam C. Weber and Douglas P. Marx. Orbital Decompression for Thyroid Eye Disease. *Semin Plast Sur*, 2017. 31(1):p.40–45.
7. Emmy Y. Li, Tracy Y. Kwok, Andy C. Cheng, Alex C. Wong and Hunter K. Yuen. Fat-removal orbital decompression for disfiguring proptosis associated with Graves' ophthalmopathy: safety, efficacy and predictability of outcomes. *Int. Ophthalmol*, 2015. 35:p.325–329.
8. van Steensel, L. and W.A. Dik, The orbital fibroblast: a key player and target for therapy in graves' ophthalmopathy. *Orbit*, 2010. 29(4):p.202-6.
9. Smith TJ, Hegedus L, Douglas RS. Role of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) pathway in the pathogenesis of Graves' orbitopathy. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2012. 26:p.291-302.
10. Dik, W.A., S. Virakul, and L. van Steensel, Current perspectives on the role of orbital fibroblasts in the pathogenesis of Graves' ophthalmopathy. *Exp Eye Res*, 2016. 142:p.83-91.
11. Seema K., Michael J. C., Philipp E. S. and Rebecca S. B., Evidence for Enhanced Adipogenesis in the Orbits of Patients with Graves' Ophthalmopathy. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. 89(2):p.930-935.
12. Camp, H.S., D. Ren, and T. Leff, Adipogenesis and fat-cell function in obesity and diabetes. *Trends Mol Med*, 2002. 8(9):p.442-7.
13. Elberg, G., J.M.Gimble, and S.Y.Tsai, Modulation of the murine peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 promoter activity by CCAAT/enhancer-binding proteins. *J Biol Chem*, 2000. 275(36):p.27815-22.
14. Moseti, D., A. Regassa, and W. K. Kim, Molecular Regulation of Adipogenesis and Potential Anti-Adipogenic Bioactive Molecules. *Int J Mol Sci*, 2016. 17(1).

15. Darlington, G. J., S.E. Ross, and O.A. MacDougald, The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *J Biol Chem*, 1998. 273(46):p.30057-60.
16. Reusch, J.E., L.A. Colton, and D.J. Klemm, CREB activation induces adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Mol Cell Biol*, 2000. 20(3):p.1008-20.
17. Valyasevi RW, Harteneck DA, Dutton CM, Bahn RS, Stimulation of adipogenesis peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARGamma), and thyrotropin receptor by PPARgamma agonist in human orbital preadipocyte fibroblasts. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002. 87:p.2352-2358.
18. Sorisky A, Pardasani D, Gagnon A, Smith TJ, Evidence of adipocyte differentiation in human orbital fibroblasts in primary culture. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996. 81:p.3428-3431.
19. Sita V. et al, Platelet-Derived Growth Factor-BB enhances adipogenesis in orbital fibroblasts. *Biochem mol biol*, 2015. 56(9):p. 5457-5464.
20. Koumas L, Smith TJ, Feldon S, Blumberg N, Phipps RP. Thy-1 expression in human fibroblast subsets defines myofibroblastic or lipofibroblastic phenotype. *Am J Pathol*, 2003. 163:p.1291-1300.
21. Lee, J.E. and K. Ge, Transcriptional and epigenetic regulation of PPAR gamma expression during adipogenesis. *Cell Biosci*, 2014. 4:p.29.
22. Strahl, B.D. and C.D. Allis, The language of covalent histone modifications. *Nature*, 2000. 403(6765):p.41-5.
23. Kouzarides,T., Chromatin modifications and their function. *Cell*, 2007. 128(4):p.693-705.
24. Bird, A., Perceptions of epigenetics. *Nature*, 2007. 447(7143):p.396-8.
25. Lehrmann, H., L.L. Pritchard, and A. Harel-Bellan, Histone acetyltransferases and deacetylases in the control of cell proliferation and differentiation. *Adv Cancer Res*, 2002. 86:p.41-65.
26. Mai, A. et al., Histone deacetylation in epigenetics: an attractive target for anti cancer therapy. *Med Res Rev*, 2005. 25(3):p.261-309.
27. Marmorstein, R. and S.Y. Roth, Histone acetyltransferases: function, structure, and catalysis. *Curr Opin Genet Dev*, 2001. 11(2):p.155-61.
28. Ayer, D.E., Histone deacetylases: transcriptional repression with SINers and NuRDs. *Trends Cell Biol*, 1999. 9(5):p.193-8.
29. Jin, Q., etal., Distinct roles of GCN5/PCAF-mediated H3K9ac and CBP/p300-mediated H3K18/27ac in nuclear receptor transactivation. *EMBO J*, 2011. 30(2):p.249-62.



30. Xu, W.S., R.B. Parmigiani, and P.A. Marks, Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene*, 2007. 26(37):p.5541-52.
31. Marks, P.A., et al., Histone deacetylase inhibitors as new cancer drugs. *Curr Opin Oncol*, 2001. 13(6):p.477-83.
32. Eiko Ishikawa-Kobayashi et al., Reduced Histone H3K9 Acetylation of Clock Genes and Abnormal Glucose Metabolism in ob/ob Mice. *Chronobiol. Int*, 2012. 29(8):p.982-993.
33. Chisato Suzuki et al., Induction of Dbp by a histone deacetylase inhibitor is involved in amelioration of insulin sensitivity via adipocyte differentiation in ob/ob mice. *Chronobiol. Int*, 2019. 36(7):p.955-968.
34. Yiping Huang et al, Knockdown of lncRNA MIR31HG inhibits adipocyte differentiation of human adipose-derived stem cells via histone modification of FABP4. *Sci. Rep.*, 2017. 7(8080).
35. Liliane Silvano Araújo et al, Analysis of serum inflammatory mediators in type 2 diabetic patients and their influence on renal function. *PLoS One.*, 2020. 15(3).
36. Teck Kim Khoo and Rebecca S. Bahn, Pathogenesis of Graves' Ophthalmopathy: The Role of Autoantibodies. *Thyroid*, 2007. 17(10):p.1013–1018.
37. Dominika Łacheta et al, Immunological Aspects of Graves' Ophthalmopathy. *Biomed Res Int.*, 2019. 7453260.
38. E'Lissa M. Flores, Collynn F. Woeller, Megan L. Falsetta, Martha Susiarjo and Richard P. Phipps. Thy1 (CD90) expression is regulated by DNA methylation during adipogenesis. *FASEB J*, 2019. 33(3):p.3353–3363.
39. Yen Ching Lim, Sook Yoong Chia, Shengnan Jin, Weiping Han, Chunming Ding and Lei Sun. Dynamic DNA methylation landscape defines brown and white cell specificity during adipogenesis. *Mol Metab*, 2016.5(10):p.1033–1041.
40. Robert R. Bowers, Jae Woo Kim, Tamara C. Otto and M. Daniel Lane. Stable stem cell commitment to the adipocyte lineage by inhibition of DNA methylation: Role of the BMP-4 gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006. 103(35):p.13022–13027.
41. Yiping Huang et al, Long Non-coding RNA H19 Inhibits Adipocyte Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells through Epigenetic Modulation of Histone Deacetylases. *Sci. Rep.*, 2016. 6(28897).
42. Stephen R. Farmer, Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab*. 2006. 4(4): p.263–273.

43. Il-Sun Kwon, Weiye Wang, Suowen Xu and Zheng-Gen Jin, Histone deacetylase 5 interacts with Krüppel-like factor 2 and inhibits its transcriptional activity in endothelium. *Cardiovasc Res.*, 2014. 104(1):p.127–137.
44. Supanuch Ekronarongchai, Tanapat Palaga, Preamjit Saonanon, Vannakorn Pruksakorn, Willem A. Dik and Sita Virakul, Roles of Histone Deacetylases in Orbital Fibroblasts from Graves' Ophthalmopathy Patients. TSB2019.
45. Michael Haberland, Michele Carrer, Mayssa H. Mokalled, Rusty L. Montgomery, and Eric N. Olson. Redundant Control of Adipogenesis by Histone Deacetylases 1 and 2. *J Biol Chem*, 2010. 285(19):p.14663–14670.
46. Jiang X, Ye X, Guo W, Lu H and Gao Z, Inhibition of HDAC3 promotes ligand-independent PPAR $\gamma$  activation by protein acetylation. *J Mol Endocrinol.* 2014. 53(2):p.191-200.
47. Yang Yang, Xiaocui Qin, Shuhu Liu, Jianjun Li, Xinhong Zhu, Tianming Gao and Xuemin Wang, Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  is inhibited by histone deacetylase 4 in cortical neurons under oxidative stress. *J. Neurochem.* 2011. 3(118):p.429-439.
48. Tapan K. Chatterjee et. al., Histone deacetylase 9 is a negative regulator of adipogenic differentiation. *J Biol Chem*, 2011. 286(31):p.27836-27847.
49. Ong et al., Regulation of Thermogenic Adipocyte Differentiation and Adaptive Thermogenesis Through Histone Acetylation. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020. 11(95).

## ภาคผนวก

### ภาคผนวก ก

#### อาหารเลี้ยงเซลล์ และสารเคมี

#### 1. อาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM+10% FBS

DMEM	90 มิลลิลิตร
Fetal Bovine Serum	10 มิลลิลิตร
Gentamycin	1 มิลลิลิตร

#### 2. อาหารเลี้ยงเซลล์ Non-differentiation

1:1 serum-free DMEM/Ham's F12	1000 มิลลิลิตร
Gentamicin	100 ไมโครลิตร/100 มิลลิลิตร
Biotin	33 ไมโครโมลาร์
Pantothenic acid	17 ไมโครโมลาร์
Insulin	1 ไมโครโมลาร์
Transferrin	10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
Triiodothyronine (T3)	0.2 นาโนโมลาร์

#### 3. อาหารเลี้ยงเซลล์ Maintenance medium

Non-differentiation medium	
carbaprostaglandin (PGI <sub>2</sub> )	0.2 ไมโครโมลาร์
Rosiglitazone	10 ไมโครโมลาร์

#### 4. อาหารเลี้ยงเซลล์ Differentiation medium

Maintenance medium	
Dexamethasone	10 ไมโครโมลาร์
Isobutylmethylxantine (IBMX)	0.1 มิลลิโมลาร์

### 5. สารละลาย PDGF-BB

PDGF-BB	10 ไมโครกรัม
กรดไฮโดรคลอริก 4 มิลลิโมลาร์	ละลายในน้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร

\*ละลายสาร PDGF-BB ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 4 มิลลิโมลาร์จากนั้นกรองด้วยตัวกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร

### 6. สารละลาย IGF-1 ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร

IGF-1	2.09 มิลลิกรัม
สารละลาย 1% BSA	7.942 มิลลิกรัม

\*ละลายสาร IGF-1 ด้วย 1 % BSA จากนั้นกรองด้วยตัวกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร

### 7. อาหารเลี้ยงเซลล์ Non-differentiation medium+PDGF-BB

Non-differentiation medium	
PDGF-BB	50 ไมโครกรัม/มิลลิกรัม

### 8. อาหารเลี้ยงเซลล์ Non-differentiation medium+IGF-1

Non-differentiation medium	
IGF-1	100 ไมโครกรัม/มิลลิกรัม

### 9. Oil Red O solution

1% Oil-Red-O stock solution	6 มิลลิกรัม
Milli-Q water	4 มิลลิกรัม

### 10. Phosphate Buffer Saline (PBS) ความเป็นกรด-ด่าง 7.4

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	8 กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.2 กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	1.44 กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	0.24 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

\*ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.4 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ นำไปหนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

**11. Freezing media 1**

DMEM	60 มิลลิลิตร
FBS	40 มิลลิลิตร

**12. Freezing media 2**

DMEM	60 มิลลิลิตร
FBS	20 มิลลิลิตร
DMSO	20 มิลลิลิตร

**ภาคผนวก ข**  
ข้อมูลดิบจากการทดลอง

ตารางที่ ข.1 ข้อมูล quantitation cycle (Cq) จากการตรวจวัดการแสดงออกของยีน *PPAR-γ* ด้วยวิธี real-time PCR ของเซลล์ I\_GO\_TH12 ที่ถูกเลี้ยงในแต่ละสภาวะเป็นระยะเวลา 14 วัน

<i>PPARY</i>					
Sample	target	Cq	Cq mean	$\Delta Cq$	$2^{\Delta Cq}$
TH12 ND	<i>ABL</i>	24.74	24.74		
TH12 ND	<i>ABL</i>	24.76	24.75		
TH12 ND	<i>PPARY</i>	31.01	31.00		
TH12 ND	<i>PPARY</i>	31.00	31.00	-6.2545729427431	0.0130974254205981
TH12 D	<i>ABL</i>	24.13	24.18		
TH12 D	<i>ABL</i>	24.22	24.18		
TH12 D	<i>PPARY</i>	29.31	29.29		
TH12 D	<i>PPARY</i>	29.28	29.29	-5.1163675647156	0.0288283571733194
TH12 ND+PD	<i>ABL</i>	25.31	25.28		
TH12 ND+PD	<i>ABL</i>	25.26	25.28		
TH12 ND+PD	<i>PPARY</i>	29.35	29.37		
TH12 ND+PD	<i>PPARY</i>	29.40	29.37	-4.0918851244570	0.0586434941222405
TH12 ND+IGF	<i>ABL</i>	24.59	24.64		
TH12 ND+IGF	<i>ABL</i>	24.69	24.64		
TH12 ND+IGF	<i>PPARY</i>	30.97	31.00		
TH12 ND+IGF	<i>PPARY</i>	31.03	31.00	-6.3613414331725	0.0121631318885412
Neg Ctrl-05	<i>ABL</i>	38.43	38.43		
Neg Ctrl-05	<i>ABL</i>	0.00	0.00		
Neg Ctrl-17	<i>PPARY</i>	0.00	0.00		
Neg Ctrl-17	<i>PPARY</i>	0.00	0.00		

ตารางที่ ข.2 ข้อมูล quantitation cycle (Cq) จากการตรวจวัดการแสดงออกของยีน *CD90* ด้วยวิธี real-time PCR ของเซลล์ I\_GO\_TH12 ที่ถูกเลี้ยงในแต่ละสภาวะเป็นระยะเวลา 14 วัน

<i>Thy1</i>					
Sample	target	Cq	Cq mean	$\Delta Cq$	$2^{\Delta\Delta Cq}$
TH12 ND	<i>ABL</i>	24.74	24.74		
TH12 ND	<i>ABL</i>	24.76	24.75		
TH12 ND	<i>Thy1</i>	25.41	25.44		
TH12 ND	<i>Thy1</i>	25.48	25.44	-0.697025564038	0.616842654577599
TH12 D	<i>ABL</i>	24.13	24.18		
TH12 D	<i>ABL</i>	24.22	24.18		
TH12 D	<i>Thy1</i>	25.66	25.66		
TH12 D	<i>Thy1</i>	25.66	25.66	-1.483052258904	0.357731171634874
TH12 ND+PD	<i>ABL</i>	25.31	25.28		
TH12 ND+PD	<i>ABL</i>	25.26	25.28		
TH12 ND+PD	<i>Thy1</i>	25.06	25.06		
TH12 ND+PD	<i>Thy1</i>	25.06	25.06	0.218220727231	1.163298008408220
TH12 ND+IGF	<i>ABL</i>	24.59	24.64		
TH12 ND+IGF	<i>ABL</i>	24.69	24.64		
TH12 ND+IGF	<i>Thy1</i>	25.51	25.50		
TH12 ND+IGF	<i>Thy1</i>	25.49	25.50	-0.862315036700	0.550069174721602
Neg Ctrl-17	<i>Thy1</i>	0.00	0.00		
Neg Ctrl-17	<i>Thy1</i>	0.00	0.00		

ตารางที่ ข.3 ข้อมูล quantitation cycle (Cq) จากการตรวจวัดการแสดงออกของยีน *HDAC4* ด้วยวิธี real-time PCR ของเซลล์ I\_GO\_TH12 ที่ถูกเลี้ยงในแต่ละสภาวะเป็นระยะเวลา 14 วัน

<i>HDAC4</i>					
Sample	target	Cq	Cq mean	$\Delta Cq$	$2^{\Delta\Delta Cq}$
TH12 ND	<i>ABL</i>	24.74	24.74		
TH12 ND	<i>ABL</i>	24.76	24.75		
TH12 ND	<i>HDAC4</i>	30.82	30.83		
TH12 ND	<i>HDAC4</i>	30.84	30.83	-6.0844823287493	0.0147362951374762
TH12 D	<i>ABL</i>	24.13	24.18		
TH12 D	<i>ABL</i>	24.22	24.18		
TH12 D	<i>HDAC4</i>	30.77	30.65		
TH12 D	<i>HDAC4</i>	30.54	30.65	-6.4788533088764	0.0112116831687221

TH12 ND+PD	<i>ABL</i>	25.31	25.28		
TH12 ND+PD	<i>ABL</i>	25.26	25.28		
TH12 ND+PD	<i>HDAC4</i>	33.17	33.11		
TH12 ND+PD	<i>HDAC4</i>	33.05	33.11	-7.8267779148157	0.0044045858396572
TH12 ND+IGF	<i>ABL</i>	24.59	24.64		
TH12 ND+IGF	<i>ABL</i>	24.69	24.64		
TH12 ND+IGF	<i>HDAC4</i>	31.22	31.23		
TH12 ND+IGF	<i>HDAC4</i>	31.23	31.23	-6.5851694634276	0.0104151724445085
Neg Ctrl-17	<i>HDAC4</i>	38.54	38.54		
Neg Ctrl-17	<i>HDAC4</i>	0.00	0.00		

ตารางที่ ข.4 ข้อมูล quantitation cycle (Cq) จากการตรวจวัดการแสดงออกของยีน *HDAC5* ด้วยวิธี real-time PCR ของเซลล์ I\_GO\_TH12 ที่ถูกเลี้ยงในแต่ละสภาวะเป็นระยะเวลา 14 วัน

<i>HDAC5</i>					
Sample	target	Cq	Cq mean	$\Delta Cq$	$2^{-\Delta Cq}$
TH12 ND	<i>ABL</i>	24.74	24.74		
TH12 ND	<i>ABL</i>	24.76	24.75		
TH12 ND	<i>HDAC5</i>	27.25	27.28		
TH12 ND	<i>HDAC5</i>	27.31	27.28	-2.5310549118873	0.17301212919001
TH12 D	<i>ABL</i>	24.13	24.18		
TH12 D	<i>ABL</i>	24.22	24.18		
TH12 D	<i>HDAC5</i>	27.12	27.13		
TH12 D	<i>HDAC5</i>	27.15	27.13	-2.9573285200295	0.12875242229829
TH12 ND+PD	<i>ABL</i>	25.31	25.28		
TH12 ND+PD	<i>ABL</i>	25.26	25.28		
TH12 ND+PD	<i>HDAC5</i>	27.31	27.34		
TH12 ND+PD	<i>HDAC5</i>	27.37	27.34	-2.0571818205840	0.24028494745535
TH12 ND+IGF	<i>ABL</i>	24.59	24.64		
TH12 ND+IGF	<i>ABL</i>	24.69	24.64		
TH12 ND+IGF	<i>HDAC5</i>	27.52	27.52		
TH12 ND+IGF	<i>HDAC5</i>	27.52	27.52	-2.8785974532811	0.13597398358582
Neg Ctrl	<i>HDAC5</i>	0.00	0.00		
Neg Ctrl	<i>HDAC5</i>	0.00	0.00		



ตารางที่ ข.5 ข้อมูล quantitation cycle (Cq) จากการตรวจวัดการแสดงออกของยีน *HDAC3* ด้วยวิธี real-time PCR ของเซลล์ I\_GO\_TH12 ที่ถูกเลี้ยงในแต่ละสภาวะเป็นระยะเวลา 14 วัน

<i>HDAC3</i>					
Sample	target	Cq	Cq mean	$\Delta Cq$	$2^{\Delta Cq}$
TH12 ND	<i>ABL</i>	24.74	24.74		
TH12 ND	<i>ABL</i>	24.76	24.75		
TH12 ND	<i>HDAC3</i>	28.94	29.12		
TH12 ND	<i>HDAC3</i>	29.29	29.12	-4.368775617	0.048402467
TH12 D	<i>ABL</i>	24.13	24.18		
TH12 D	<i>ABL</i>	24.22	24.18		
TH12 D	<i>HDAC3</i>	29.33	29.26		
TH12 D	<i>HDAC3</i>	29.20	29.26	-5.09	0.029410167
TH12 ND+PD	<i>ABL</i>	25.31	25.28		
TH12 ND+PD	<i>ABL</i>	25.26	25.28		
TH12 ND+PD	<i>HDAC3</i>	30.40	30.42		
TH12 ND+PD	<i>HDAC3</i>	30.43	30.42	-5.13	0.028499136
TH12 ND+IGF	<i>ABL</i>	24.59	24.64		
TH12 ND+IGF	<i>ABL</i>	24.69	24.64		
TH12 ND+IGF	<i>HDAC3</i>	29.29	29.26		
TH12 ND+IGF	<i>HDAC3</i>	29.24	29.26	-4.62	0.040553096
Neg Ctrl-17	<i>HDAC3</i>	0.00	0.00		
Neg Ctrl-17	<i>HDAC3</i>	0.00	0.00		

ตารางที่ ข.6 ข้อมูล quantitation cycle (Cq) จากการตรวจวัดการแสดงออกของยีน *HDAC8* ด้วยวิธี real-time PCR ของเซลล์ I\_GO\_TH12 ที่ถูกเลี้ยงในแต่ละสภาวะเป็นระยะเวลา 14 วัน

<i>HDAC8</i>					
Sample	target	Cq	Cq mean	$\Delta Cq$	$2^{\Delta Cq}$
TH12 ND	<i>ABL</i>	24.74	24.74		
TH12 ND	<i>ABL</i>	24.76	24.75		
TH12 ND	<i>HDAC8</i>	29.08	29.28		
TH12 ND	<i>HDAC8</i>	29.48	29.28	-4.533387597	0.043183153
TH12 D	<i>ABL</i>	24.13	24.18		
TH12 D	<i>ABL</i>	24.22	24.18		
TH12 D	<i>HDAC8</i>	29.11	29.42		
TH12 D	<i>HDAC8</i>	29.74	29.42	-5.245840031	0.026353894

TH12 ND+PD	<i>ABL</i>	25.31	25.28		
TH12 ND+PD	<i>ABL</i>	25.26	25.28		
TH12 ND+PD	<i>HDAC8</i>	30.61	30.53		
TH12 ND+PD	<i>HDAC8</i>	30.44	30.53	-5.244659324	0.026375471
TH12 ND+IGF	<i>ABL</i>	24.59	24.64		
TH12 ND+IGF	<i>ABL</i>	24.69	24.64		
TH12 ND+IGF	<i>HDAC8</i>	29.24	29.22		
TH12 ND+IGF	<i>HDAC8</i>	29.20	29.22	-4.576457565	0.041913024
Neg Ctrl-05	<i>HDAC8</i>	19.26	19.26		
Neg Ctrl-05	<i>HDAC8</i>	0.00	0.00		

ตารางที่ ข.7 ข้อมูล quantitation cycle (Cq) จากการตรวจวัดการแสดงออกของยีน *PPAR-γ* ด้วยวิธี real-time PCR ของเซลล์ I\_GO\_TH27 ที่ถูกเลี้ยงในแต่ละสภาวะเป็นระยะเวลา 14 วัน

<i>PPARY</i>					
Sample	target	Cq	Cq mean	$\Delta Cq$	$2^{\Delta Cq}$
TH27 ND	<i>ABL</i>	24.74	24.71		
TH27 ND	<i>ABL</i>	24.69	24.71		
TH27 ND	<i>PPARY</i>	31.00	31.00		
TH27 ND	<i>PPARY</i>	30.98	30.97	-6.257183706	0.013073745
TH27 D	<i>ABL</i>	27.14	27.21		
TH27 D	<i>ABL</i>	27.28	27.21		
TH27 D	<i>PPARY</i>	32.02	32.22		
TH27 D	<i>PPARY</i>	32.42	32.22	-5.008680479	0.031062538
TH27 ND+PD	<i>ABL</i>	25.34	25.34		
TH27 ND+PD	<i>ABL</i>	25.35	25.34		
TH27 ND+PD	<i>PPARY</i>	31.31	31.37		
TH27 ND+PD	<i>PPARY</i>	31.43	31.37	-6.022111843	0.015387345
TH27 ND+IGF	<i>ABL</i>	24.43	24.52		
TH27 ND+IGF	<i>ABL</i>	24.62	24.52		
TH27 ND+IGF	<i>PPARY</i>	32.04	32.01		
TH27 ND+IGF	<i>PPARY</i>	31.98	32.01	-7.484389267	0.005584372
Neg Ctrl-05	<i>ABL</i>	38.43	38.43		
Neg Ctrl-05	<i>ABL</i>	0.00	0.00		
Neg Ctrl-17	<i>PPARY</i>	0.00	0.00		
Neg Ctrl-17	<i>PPARY</i>	0.00	0.00		

ตารางที่ ข.8 ข้อมูล quantitation cycle (Cq) จากการตรวจวัดการแสดงออกของยีน *CD90* ด้วยวิธี real-time PCR ของเซลล์ I\_GO\_TH27 ที่ถูกเลี้ยงในแต่ละสภาวะเป็นระยะเวลา 14 วัน

<i>Thy1</i>					
Sample	target	Cq	Cq mean	$\Delta Cq$	$2^{\Delta Cq}$
TH27 ND	<i>ABL</i>	24.73739	24.71297		
TH27 ND	<i>ABL</i>	24.68855	24.71297		
TH27 ND	<i>Thy1</i>	26.174	26.20235		
TH27 ND	<i>Thy1</i>	26.23069	26.20235	-1.489374514	0.356166933
TH27 D	<i>ABL</i>	27.14494	27.21064		
TH27 D	<i>ABL</i>	27.27633	27.21064		
TH27 D	<i>Thy1</i>	28.59946	28.71077		
TH27 D	<i>Thy1</i>	28.82208	28.71077	-1.500132618	0.353520892
TH27 ND+PD	<i>ABL</i>	25.34006	25.3444		
TH27 ND+PD	<i>ABL</i>	25.34874	25.3444		
TH27 ND+PD	<i>Thy1</i>	25.59223	25.60427		
TH27 ND+PD	<i>Thy1</i>	25.61632	25.60427	-0.259871664	0.835162209
TH27 ND+IGF	<i>ABL</i>	24.42637	24.52463		
TH27 ND+IGF	<i>ABL</i>	24.6229	24.52463		
TH27 ND+IGF	<i>Thy1</i>	25.0095	25.10487		
TH27 ND+IGF	<i>Thy1</i>	25.20023	25.10487	-0.580234386	0.668855104
Neg Ctrl-17	<i>Thy1</i>	0.00	0.00		
Neg Ctrl-17	<i>Thy1</i>	0.00	0.00		

ตารางที่ ข.9 ข้อมูล quantitation cycle (Cq) จากการตรวจวัดการแสดงออกของยีน *HDAC4* ด้วยวิธี real-time PCR ของเซลล์ I\_GO\_TH27 ที่ถูกเลี้ยงในแต่ละสภาวะเป็นระยะเวลา 14 วัน

<i>HDAC4</i>					
Sample	target	Cq	Cq mean	$\Delta Cq$	$2^{\Delta Cq}$
TH27 ND	<i>ABL</i>	24.73739	24.71297		
TH27 ND	<i>ABL</i>	24.68855	24.71297		
TH27 ND	<i>HDAC4</i>	34.21693	34.20466		
TH27 ND	<i>HDAC4</i>	34.19238	34.20466	-9.491686394	0.001389049
TH27 D	<i>ABL</i>	27.14494	27.21064		
TH27 D	<i>ABL</i>	27.27633	27.21064		
TH27 D	<i>HDAC4</i>				
TH27 D	<i>HDAC4</i>				

TH27 ND+PD	<i>ABL</i>	25.34006	25.3444		
TH27 ND+PD	<i>ABL</i>	25.34874	25.3444		
TH27 ND+PD	<i>HDAC4</i>	33.7435	33.72501		
TH27 ND+PD	<i>HDAC4</i>	33.70652	33.72501	-8.380609369	0.003000442
TH27 ND+IGF	<i>ABL</i>	24.42637	24.52463		
TH27 ND+IGF	<i>ABL</i>	24.6229	24.52463		
TH27 ND+IGF	<i>HDAC4</i>	31.51392	31.51457		
TH27 ND+IGF	<i>HDAC4</i>	31.51521	31.51457	-6.989933612	0.007867202
Neg Ctrl-17	<i>HDAC4</i>	38.54	38.54		
Neg Ctrl-17	<i>HDAC4</i>	0.00	0.00		

ตารางที่ ข.10 ข้อมูล quantitation cycle (Cq) จากการตรวจวัดการแสดงออกของยีน *HDAC5* ด้วยวิธี real-time PCR ของเซลล์ I\_GO\_TH27 ที่ถูกเลี้ยงในแต่ละสภาวะเป็นระยะเวลา 14 วัน

<i>HDAC5</i>					
Sample	target	Cq	Cq mean	$\Delta Cq$	$2^{\Delta Cq}$
TH27 ND	<i>ABL</i>	24.73739	24.71297		
TH27 ND	<i>ABL</i>	24.68855	24.71297		
TH27 ND	<i>HDAC5</i>	28.60634	28.64862		
TH27 ND	<i>HDAC5</i>	28.69091	28.64862	-3.935653381	0.065350705
TH27 D	<i>ABL</i>	27.14494	27.21064		
TH27 D	<i>ABL</i>	27.27633	27.21064		
TH27 D	<i>HDAC5</i>	30.54944	30.54383		
TH27 D	<i>HDAC5</i>	30.53821	30.54383	-3.333189789	0.099222438
TH27 ND+PD	<i>ABL</i>	25.34006	25.3444		
TH27 ND+PD	<i>ABL</i>	25.34874	25.3444		
TH27 ND+PD	<i>HDAC5</i>	28.12269	27.96249		
TH27 ND+PD	<i>HDAC5</i>	27.80228	27.96249	-2.618085696	0.162883718
TH27 ND+IGF	<i>ABL</i>	24.42637	24.52463		
TH27 ND+IGF	<i>ABL</i>	24.6229	24.52463		
TH27 ND+IGF	<i>HDAC5</i>	27.32749	27.31352		
TH27 ND+IGF	<i>HDAC5</i>	27.29955	27.31352	-2.788885683	0.144697742
Neg Ctrl	<i>HDAC5</i>	0.00	0.00		
Neg Ctrl	<i>HDAC5</i>	0.00	0.00		

ตารางที่ ข.11 ข้อมูล quantitation cycle (Cq) จากการตรวจวัดการแสดงออกของยีน *HDAC3* ด้วยวิธี real-time PCR ของเซลล์ I\_GO\_TH27 ที่ถูกเลี้ยงในแต่ละสภาวะเป็นระยะเวลา 14 วัน

<i>HDAC3</i>					
Sample	target	Cq	Cq mean	$\Delta Cq$	$2^{\Delta Cq}$
TH27 ND	<i>ABL</i>	24.74	24.71		
TH27 ND	<i>ABL</i>	24.69	24.71		
TH27 ND	<i>HDAC3</i>	31.25	31.18		
TH27 ND	<i>HDAC3</i>	31.12	31.18	-6.470458607	0.011277111
TH27 D	<i>ABL</i>	27.14	27.21		
TH27 D	<i>ABL</i>	27.28	27.21		
TH27 D	<i>HDAC3</i>	32.29	32.42		
TH27 D	<i>HDAC3</i>	32.54	32.42	-5.20733957	0.027066655
TH27 ND+PD	<i>ABL</i>	25.34	25.34		
TH27 ND+PD	<i>ABL</i>	25.35	25.34		
TH27 ND+PD	<i>HDAC3</i>	30.81	30.86		
TH27 ND+PD	<i>HDAC3</i>	30.90	30.86	-5.510794573	0.021932368
TH27 ND+IGF	<i>ABL</i>	24.43	24.52		
TH27 ND+IGF	<i>ABL</i>	24.62	24.52		
TH27 ND+IGF	<i>HDAC3</i>	29.69	29.64		
TH27 ND+IGF	<i>HDAC3</i>	29.60	29.64	-5.120203759	0.028751803
Neg Ctrl-17	<i>HDAC3</i>	0.00	0.00		
Neg Ctrl-17	<i>HDAC3</i>	0.00	0.00		

ตารางที่ ข.12 ข้อมูล quantitation cycle (Cq) จากการตรวจวัดการแสดงออกของยีน *HDAC8* ด้วยวิธี real-time PCR ของเซลล์ I\_GO\_TH27 ที่ถูกเลี้ยงในแต่ละสภาวะเป็นระยะเวลา 14 วัน

<i>HDAC8</i>					
Sample	target	Cq	Cq mean	$\Delta Cq$	$2^{\Delta Cq}$
TH27 ND	<i>ABL</i>	24.74	24.71		
TH27 ND	<i>ABL</i>	24.69	24.71		
TH27 ND	<i>HDAC8</i>	31.35	31.73		
TH27 ND	<i>HDAC8</i>	32.10	31.73	-7.01375482	0.007738369
TH27 D	<i>ABL</i>	27.14	27.21		
TH27 D	<i>ABL</i>	27.28	27.21		
TH27 D	<i>HDAC8</i>	34.72	34.72		
TH27 D	<i>HDAC8</i>	34.72	34.72	-7.511566065	0.005480161

TH27 ND+PD	<i>ABL</i>	25.34	25.34		
TH27 ND+PD	<i>ABL</i>	25.35	25.34		
TH27 ND+PD	<i>HDAC8</i>	33.30	33.24		
TH27 ND+PD	<i>HDAC8</i>	33.18	33.24	-7.896232413	0.004197563
TH27 ND+IGF	<i>ABL</i>	24.43	24.52		
TH27 ND+IGF	<i>ABL</i>	24.62	24.52		
TH27 ND+IGF	<i>HDAC8</i>	29.36	29.44		
TH27 ND+IGF	<i>HDAC8</i>	29.53	29.44	-4.919956083	0.033032819
Neg Ctrl-05	<i>HDAC8</i>	19.26	19.26		
Neg Ctrl-05	<i>HDAC8</i>	0.00	0.00		

ตารางที่ ข.13 ข้อมูล quantitation cycle (Cq) จากการตรวจวัดการแสดงออกของยีน *PPAR-γ* ด้วยวิธี real-time PCR ของเซลล์ I\_GO\_TH4 ที่ถูกเลี้ยงในแต่ละสภาวะเป็นระยะเวลา 14 วัน

<i>PPARY</i>					
Sample	target	Cq	Cq mean	$\Delta Cq$	$2^{\Delta Cq}$
TH4 ND	<i>ABL</i>	24.31	24.30		
TH4 ND	<i>ABL</i>	24.29	24.30		
TH4 ND	<i>PPARY</i>	30.33	30.34		
TH4 ND	<i>PPARY</i>	30.36	30.34	-6.0452399882308	0.0151426342458043
TH4 D	<i>ABL</i>	26.99	27.02		
TH4 D	<i>ABL</i>	27.06	27.02		
TH4 D	<i>PPARY</i>	31.18	31.18		
TH4 D	<i>PPARY</i>	31.18	31.18	-4.1579736822199	0.0560176905938049
TH4 ND+PD	<i>ABL</i>	24.65	25.56		
TH4 ND+PD	<i>ABL</i>	26.48	25.56		
TH4 ND+PD	<i>PPARY</i>	29.14	29.10		
TH4 ND+PD	<i>PPARY</i>	29.07	29.10	-3.5405902178506	0.0859361992684360
Neg Ctrl-05	<i>ABL</i>	38.43	38.43		
Neg Ctrl-05	<i>ABL</i>	0.00	0.00		
Neg Ctrl-17	<i>PPARY</i>	0.00	0.00		
Neg Ctrl-17	<i>PPARY</i>	0.00	0.00		

ตารางที่ ข.14 ข้อมูล quantitation cycle (Cq) จากการตรวจวัดการแสดงออกของยีน *CD90* ด้วยวิธี real-time PCR ของเซลล์ I\_GO\_TH4 ที่ถูกเลี้ยงในแต่ละสภาวะเป็นระยะเวลา 14 วัน

<i>Thy1</i>					
Sample	target	Cq	Cq mean	$\Delta Cq$	$2^{\Delta Cq}$
TH4 ND	<i>ABL</i>	24.31	24.30		
TH4 ND	<i>ABL</i>	24.29	24.30		
TH4 ND	<i>Thy1</i>	23.80	23.81		
TH4 ND	<i>Thy1</i>	23.82	23.81	0.4854796816321	1.40005129122925
TH4 D	<i>ABL</i>	26.99	27.02		
TH4 D	<i>ABL</i>	27.06	27.02		
TH4 D	<i>Thy1</i>	26.51	26.53		
TH4 D	<i>Thy1</i>	26.55	26.53	0.4947528364081	1.40907932993884
TH4 ND+PD	<i>ABL</i>	24.65	25.56		
TH4 ND+PD	<i>ABL</i>	26.48	25.56		
TH4 ND+PD	<i>Thy1</i>	23.39	23.38		
TH4 ND+PD	<i>Thy1</i>	23.37	23.38	2.1832698474378	4.54181784887589
Neg Ctrl-17	<i>Thy1</i>	0.00	0.00		
Neg Ctrl-17	<i>Thy1</i>	0.00	0.00		

ตารางที่ ข.15 ข้อมูล quantitation cycle (Cq) จากการตรวจวัดการแสดงออกของยีน *HDAC4* ด้วยวิธี real-time PCR ของเซลล์ I\_GO\_TH4 ที่ถูกเลี้ยงในแต่ละสภาวะเป็นระยะเวลา 14 วัน

<i>HDAC4</i>					
Sample	target	Cq	Cq mean	$\Delta Cq$	$2^{\Delta Cq}$
TH4 ND	<i>ABL</i>	24.31	24.30		
TH4 ND	<i>ABL</i>	24.29	24.30		
TH4 ND	<i>HDAC4</i>	31.18	31.12		
TH4 ND	<i>HDAC4</i>	31.06	31.12	-6.8243393415188	0.0088240743272728
TH4 D	<i>ABL</i>	26.99	27.02		
TH4 D	<i>ABL</i>	27.06	27.02		
TH4 D	<i>HDAC4</i>	35.43	35.49		
TH4 D	<i>HDAC4</i>	35.55	35.49	-8.4662245399046	0.0028275641288562
TH4 ND+PD	<i>ABL</i>	24.65	25.56		
TH4 ND+PD	<i>ABL</i>	26.48	25.56		
TH4 ND+PD	<i>HDAC4</i>	32.80	32.52		
TH4 ND+PD	<i>HDAC4</i>	32.23	32.52	-6.9537585379537	0.0080669636029886

Neg Ctrl-17	<i>HDAC4</i>	38.54	38.54		
Neg Ctrl-17	<i>HDAC4</i>	0.00	0.00		

ตารางที่ ข.16 ข้อมูล quantitation cycle (Cq) จากการตรวจวัดการแสดงออกของยีน *HDAC5* ด้วยวิธี real-time PCR ของเซลล์ I\_GO\_TH4 ที่ถูกเลี้ยงในแต่ละสภาวะเป็นระยะเวลา 14 วัน

<i>HDAC5</i>					
Sample	target	Cq	Cq mean	$\Delta Cq$	$2^{\Delta Cq}$
TH4 ND	<i>ABL</i>	24.31	24.30		
TH4 ND	<i>ABL</i>	24.29	24.30		
TH4 ND	<i>HDAC5</i>	26.59	26.50		
TH4 ND	<i>HDAC5</i>	26.42	26.50	-2.2052579717092	0.216845893594492
TH4 D	<i>ABL</i>	26.99	27.02		
TH4 D	<i>ABL</i>	27.06	27.02		
TH4 D	<i>HDAC5</i>	29.96	29.93		
TH4 D	<i>HDAC5</i>	29.91	29.93	-2.9078260362239	0.133246908285259
TH4 ND+PD	<i>ABL</i>	24.65	25.56		
TH4 ND+PD	<i>ABL</i>	26.48	25.56		
TH4 ND+PD	<i>HDAC5</i>	27.12	27.17		
TH4 ND+PD	<i>HDAC5</i>	27.23	27.17	-1.6100445389766	0.327588237482773
Neg Ctrl	<i>HDAC5</i>	0.00	0.00		
Neg Ctrl	<i>HDAC5</i>	0.00	0.00		

ตารางที่ ข.17 ข้อมูล quantitation cycle (Cq) จากการตรวจวัดการแสดงออกของยีน *HDAC3* ด้วยวิธี real-time PCR ของเซลล์ I\_GO\_TH4 ที่ถูกเลี้ยงในแต่ละสภาวะเป็นระยะเวลา 14 วัน

<i>HDAC3</i>					
Sample	target	Cq	Cq mean	$\Delta Cq$	$2^{\Delta Cq}$
TH4 ND	<i>ABL</i>	24.31	24.30		
TH4 ND	<i>ABL</i>	24.29	24.30		
TH4 ND	<i>HDAC3</i>	28.25	28.29		
TH4 ND	<i>HDAC3</i>	28.33	28.29	-3.989967402	0.062936144
TH4 D	<i>ABL</i>	26.99	27.02		
TH4 D	<i>ABL</i>	27.06	27.02		
TH4 D	<i>HDAC3</i>	30.93	30.87		
TH4 D	<i>HDAC3</i>	30.80	30.87	-3.842433975	0.069712734
TH4 ND+PD	<i>ABL</i>	24.65	25.56		



TH4 ND+PD	<i>ABL</i>	26.48	25.56		
TH4 ND+PD	<i>HDAC3</i>	29.48	29.40		
TH4 ND+PD	<i>HDAC3</i>	29.31	29.40	-3.831341117	0.07025082
Neg Ctrl-17	<i>HDAC3</i>	0.00	0.00		
Neg Ctrl-17	<i>HDAC3</i>	0.00	0.00		

ตารางที่ ข.18 ข้อมูล quantitation cycle (Cq) จากการตรวจวัดการแสดงออกของยีน *HDAC8* ด้วยวิธี real-time PCR ของเซลล์ I\_GO\_TH4 ที่ถูกเลี้ยงในแต่ละสภาวะเป็นระยะเวลา 14 วัน

<i>HDAC8</i>					
Sample	target	Cq	Cq mean	$\Delta Cq$	$2^{\Delta Cq}$
TH4 ND	<i>ABL</i>	24.31	24.30		
TH4 ND	<i>ABL</i>	24.29	24.30		
TH4 ND	<i>HDAC8</i>	28.68	28.61		
TH4 ND	<i>HDAC8</i>	28.55	28.61	-4.316561673	0.050186332
TH4 D	<i>ABL</i>	26.99	27.02		
TH4 D	<i>ABL</i>	27.06	27.02		
TH4 D	<i>HDAC8</i>	31.48	31.56		
TH4 D	<i>HDAC8</i>	31.65	31.56	-4.538364025	0.043034454
TH4 ND+PD	<i>ABL</i>	24.65	25.56		
TH4 ND+PD	<i>ABL</i>	26.48	25.56		
TH4 ND+PD	<i>HDAC8</i>	30.05	30.01		
TH4 ND+PD	<i>HDAC8</i>	29.96	30.01	-4.441953599	0.046008569
Neg Ctrl-05	<i>HDAC8</i>	19.26	19.26		
Neg Ctrl-05	<i>HDAC8</i>	0.00	0.00		

ตารางที่ ข.19 ค่า Optical Density (OD) ที่ความยาวคลื่น 450 nm จากการย้อมเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากดวงตา ที่ถูกเลี้ยงในสภาวะต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 14 วัน ด้วยเทคนิค Oil Red O staining

	Condition	Rep1	Rep2	Mean
TH12	Non-diff	0.4866	0.5628	0.5247
	Diff	0.5861	0.5366	0.56135
	Non-diff+PDGF-BB	0.4862	0.4681	0.47715
TH27	Non-diff	0.7047	0.7036	0.70415
	Diff	0.6273	0.6152	0.62125
	Non-diff+PDGF-BB	0.4958	0.4723	0.48405