

ฉบับแปลไทย (Thai Translations)

SARS-CoV-2 infection causes immunodeficiency in recovered patients by downregulating CD19 expression in B cells via enhancing B-cell metabolism

<https://www.nature.com/articles/s41392-021-00749-3>

การติดเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 เป็นสาเหตุของภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องในผู้ป่วยที่ฟื้นตัวโดยการลดการแสดงออกของโปรตีน **CD19** ใน **B Cell** ผ่านการเพิ่มเมตาบอลิซึมของ **B Cell**

บทคัดย่อ (Abstract)

การติดเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 เป็นสาเหตุของการหยุดชะงักทำลายล้าง (disruption) ภูมิคุ้มกันของร่างกายอย่างรุนแรง อย่างไรก็ตามไม่เป็นที่ชัดเจนว่าการควบคุมการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่ถูกทำลายยังคงอยู่และเหมาะสมเข้ากันกับผู้ป่วยที่ฟื้นตัวจากโควิด 19 หรือไม่ ในการศึกษาวิจัยของเราเราได้อธิบายลักษณะของฟีโนไทป์ของ B cell จากผู้ป่วยจำนวน 15 คนที่ฟื้นตัวจากโควิด 19 และพบว่าทั้งในกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดีและในผู้ป่วยที่ฟื้นตัวจากโควิด 19 มีประชากร B cell ใกล้เคียงกันทั้งก่อนและหลังการกระตุ้น B Cell Receptor (BCR) แต่ความถี่ของโรคท่อน้ำดีอักเสบปฐมภูมิ (primary biliary cholangitis - PBC) ในกลุ่มผู้ป่วยโควิด 19 มีการเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับในกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดีก่อนหน้ามีการกระตุ้น อย่างไรก็ตามเปอร์เซ็นต์ของ unswitched memory B cell มีการลดลงในผู้ป่วยที่ฟื้นตัวจากโควิด 19 แต่พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงในกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดีหลังการกระตุ้น B Cell Receptor ที่น่าสนใจคือเราพบว่าการแสดงออกของโปรตีน CD19 มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญแทบจะในทุก ๆ กลุ่มย่อย (subset) ของ B cell ในผู้ป่วยที่ฟื้นตัวจากโควิด 19 นอกจากนี้การส่งสัญญาณของ B Cell Receptor (BCR signaling) และการตอบสนองของ B cell ช่วงแรกเริ่มก็มีการหยุดชะงักเสียหาย (disrupted) หลังการกระตุ้น B Cell Receptor ในเชิงกลไกการทำงานเราพบว่าการแสดงออกของโปรตีน CD 19 ที่ลดลงมีสาเหตุมาจากความผิดปกติของเมตาบอลิซึมระดับเซลล์ โดยสรุปเราพบว่าการติดเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 เป็นสาเหตุของภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องในผู้ป่วยที่ฟื้นตัวโดยการลดการแสดงออกของโปรตีน CD 19 ใน B cell ผ่านการเพิ่มเมตาบอลิซึมของ B cell ซึ่งอาจจะเป็นแนวทางใหม่ในการรักษาผู้ป่วยโควิด 19

บทนำ (Introduction)

ช่วงปลายปี พ.ศ. 2563 เชื้อโคโรนาไวรัสสายพันธุ์ใหม่ (ซาร์สโคโรนาไวรัส 2) ได้รับการระบุว่าเป็นเชื้อที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อทางเดินหายใจชนิดเฉียบพลันรุนแรงชื่อว่าโรคโควิด 19 ผู้ป่วยที่ติดเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 มีการแสดงออกทางคลินิกที่แตกต่างกันอย่างมาก จากไม่มีอาการไปจนถึงมีภาวะอาการของโรคที่คุกคามถึงแก่ชีวิตซึ่งรวมถึงกลุ่มอาการหายใจลำบากเฉียบพลัน (acute Respiratory Distress Syndrome - ARDS) มีหลักฐานที่ทำให้เห็นว่าเชื่อได้ว่าภาวะที่เรียกว่า “cytokine storm” ซึ่งเป็นการกระตุ้นอย่างควบคุมไม่ได้ของการตอบสนองต่อการอักเสบมีส่วนสำคัญในการเกิดกลุ่ม

อาการหายใจลำบากเฉียบพลัน และคล้ายคลึงกับในโรคอื่น ๆ ที่ภาวะ **cytokine storm** ได้รับการกระตุ้น การทำให้การตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่อการอักเสบลดน้อยลงอาจจะช่วยให้ผลของการติดเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ที่รุนแรงมีอาการดีขึ้น^{1,2}

การอักเสบมีความเกี่ยวข้องสัมพันธ์กันกับกิจกรรมไกลโคไลซิส (glycolytic activity) ที่เพิ่มสูงขึ้น³ และเป็นวิธิเมตาบอลิซึมเบื้องต้นที่เชื่อมต่อการสัมพันธ์กับเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันต่าง ๆ ที่ได้รับการกระตุ้น^{4,5} แลคเตทซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (end product) ของกระบวนการไกลโคไลซิสถูกหลั่งโดยเซลล์ระบบภูมิคุ้มกัน และแลคเตทในกระแสเลือดที่เพิ่มสูงขึ้นและการเปลี่ยนแปลงของระดับแลคเตทที่เป็นไปซ้ำ ๆ มีความเกี่ยวข้องสัมพันธ์กันกับอัตราการเสียชีวิตที่เพิ่มสูงขึ้นในผู้ป่วยที่มีภาวะติดเชื้อ⁶ แลคเตทไม่ได้เป็นเพียงแค่ผลิตภัณฑ์สุดท้ายของกระบวนการเมตาบอลิซึมเท่านั้น แต่ยังสามารถถูกนำไปใช้โดยเซลล์ประเภทต่าง ๆ และมีผลทั้งต่อการส่งสัญญาณและต่อเมตาบอลิซึม³ ด้วยเหตุนี้การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่ทำงานมากเกินไป (hyperactive immune response) จึงนำไปสู่องค์ประกอบของเซรัมเมตาบอลิกที่เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะส่งผลต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อไปอีก นอกจากนี้ความผิดปกติของตับและกระบวนการอื่น ๆ ก็ยังมีส่วนทำให้เกิดความผิดปกติของระบบเมตาบอลิซึมในระหว่างการติดเชื้อไวรัส หลักฐานที่อุบัติใหม่เมื่อเร็ว ๆ นี้ทำให้น่าเชื่อถือได้ว่าองค์ประกอบด้านเมตาบอลิซึมของเซรัมจากผู้ป่วยโควิด 19 มีการเปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับในผู้ที่มีสุขภาพดี และการเปลี่ยนแปลงที่จำเพาะเจาะจงต่าง ๆ มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค⁷ เป็นที่น่าเชื่อถือได้ว่าในบรรดาสารชีวเคมีอื่น ๆ ระดับของสารมาเลตที่เข้าวัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก (TCA cycle component malate) สารคาร์บอนิลฟอสเฟตที่เข้าวัฏจักรยูเรีย (urea cycle component carbamoyl phosphate) และสารกัวโนซีนโมโนฟอสเฟตมีการเปลี่ยนแปลงพร้อมกับการดำเนินไปของโรค⁸ ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่าเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันและโดยเฉพาะ B cell มีการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงทางเมตาบอลิซึมเหล่านี้อย่างไร แต่อย่างไรก็ตามจากหลักฐานที่เพิ่มมากขึ้นทำให้น่าเชื่อถือได้ว่าสภาพแวดล้อมทางด้านเมตาบอลิซึมมีบทบาทสำคัญหลักในการกำหนดควบคุมความเป็นไปของ B cell และการทำหน้าที่ของ B cell⁹ การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของกลูโคส การเข้าถึงกรดไขมันสายสั้น (short-chain fatty acids) ปริมาณออกซิเจนที่มีอยู่ ตลอดจนการเปลี่ยนแปลงทางเมตาบอลิซึมอื่น ๆ ล้วนมีผลกระทบอย่างลึกซึ้งต่อการอยู่รอด การกระตุ้น ตลอดจนการเปลี่ยนแปลงของ B cell ⁹ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าสภาพแวดล้อมทางด้านเมตาบอลิซึมที่จำเพาะในผู้ป่วยโควิด 19 ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงต่อชีววิทยาของ B cell

ดูเหมือนว่าบทบาทของ B cell ในการดำเนินของโรคโควิด 19 จะมีหลายแง่มุมและยังไม่ใช่ที่เข้าใจอย่างถ่องแท้ เมื่อเร็ว ๆ นี้มีการรายงานว่าผู้ป่วยโรค agammaglobulinemia ที่ขาดแคลน B cell มีผลที่ดีกว่าจากการป่วยเป็นโรคนี้ ในขณะที่ผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องแบบผันแปรทั่วไป (common variable immune deficiency - CVID) ที่มีความผิดปกติของ B cell แสดงรูปแบบของโรคที่มีความรุนแรงมากกว่า¹⁰ ถึงแม้ว่าจำนวนของผู้ป่วยในการศึกษาวิจัยนี้จะมีอยู่จำกัด แต่จากการสังเกตทำให้น่าเชื่อถือได้ว่า B cell อาจจะทำให้การเจ็บป่วยมีอาการแย่ลงในระยะการติดเชื้อเฉียบพลัน ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าโดยการทำให้การอักเสบรุนแรงเพิ่มมากขึ้น ในทางกลับกันกลุ่มย่อยของ B cell ที่จำเพาะ (specific B-cell subsets) อาจจะมีบทบาทในเชิงการปกป้องระหว่างระยะแรก ๆ ของการติดเชื้อโดยการผลิตแอนติบอดีป้องกันตามธรรมชาติ

สุดท้ายการ **formation** ของ **memory B cells** และเซลล์พลาสมาซึ่งมีอายุยืนยาวเป็นปัจจัยสำคัญในการกำหนดระดับของการปกป้องในกรณีของการเผชิญกับไวรัสซ้ำ

เป้าหมายของการศึกษานี้คือเพื่อประเมินคุณสมบัติการส่งสัญญาณ (**signaling properties**) ของ **B cell** ในผู้ป่วยโควิด 19 นอกจากนี้เราต้องการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเมตาบอลิซึมของเซลล์ที่ได้จากผู้ป่วยโควิด 19 รวมทั้งค้นหาว่าการเปลี่ยนแปลงของความอุดมสมบูรณ์ (**abundance**) ของสารเมตาบอไลต์จำเพาะ (**specific metabolite**) มีผลกระทบอย่างไรบ้างต่อการส่งสัญญาณของ **B cell receptor** เราพบว่าสถานะแวดล้อมของสารไซโตไคน์และสถานะแวดล้อมด้านเมตาบอลิซึมในผู้ป่วยโควิด 19 เป็นตัวกำหนดการส่งสัญญาณของประชากร **B cell**

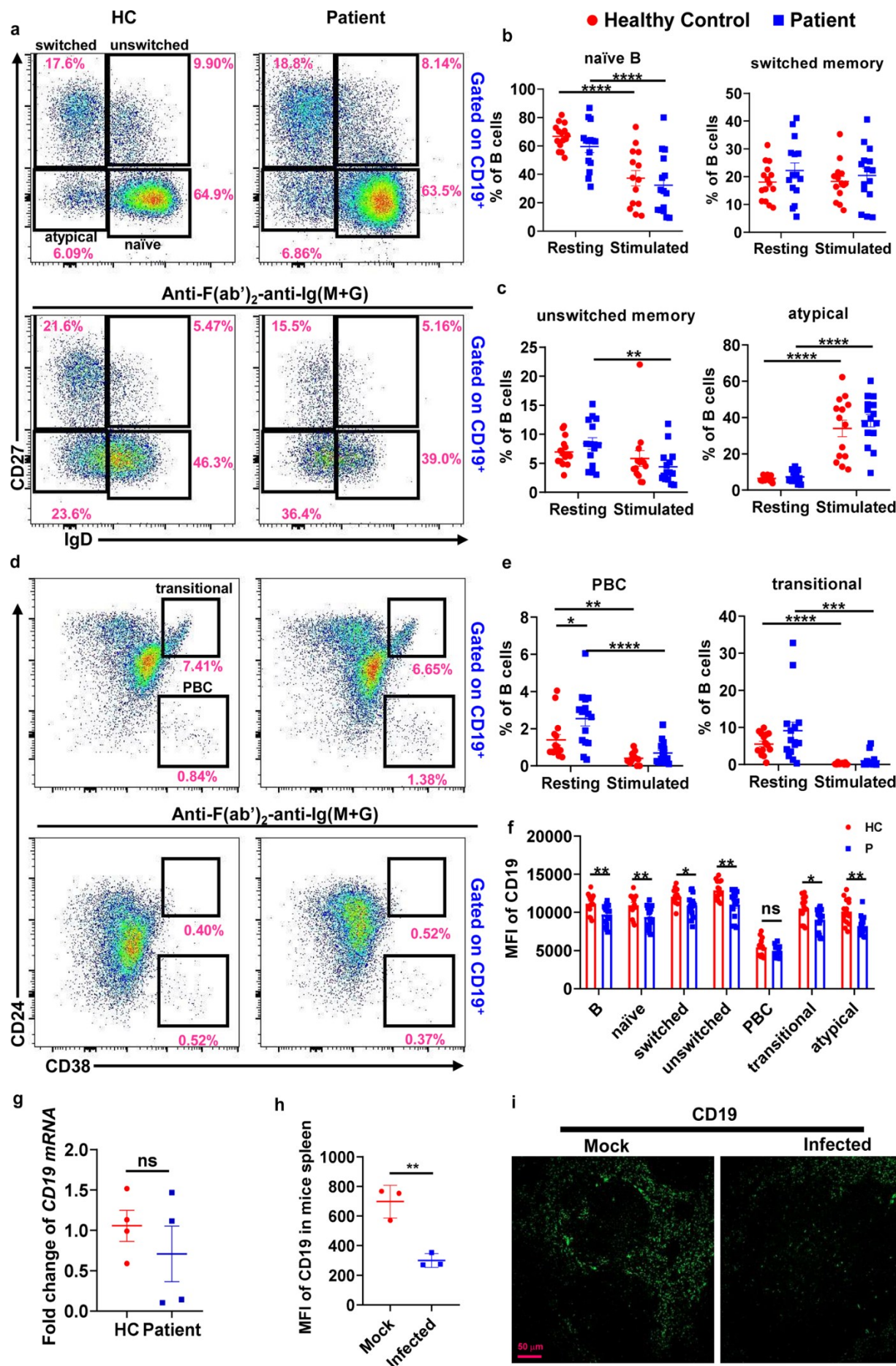
ผลที่ได้ (Results)

การติดเชื้อไวรัสโคโรนาไวรัส 2 ทำให้ **immune phenotype** และการทำงานของ **B cell** ในผู้ป่วยที่ฟื้นตัวจากโรคโควิด 19 เปลี่ยนแปลงไป

กลุ่มย่อยของ **B cell** ที่จำเพาะ (**specific B-cell subsets**) มีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันต้านไวรัสที่อาศัยสารน้ำ (**antiviral humoral immunity**) เพื่อศึกษาว่าการติดเชื้อไวรัสโคโรนาไวรัส 2 มีผลต่อ **B-cell immune phenotype** หรือไม่ ในขั้นแรกเราจึงทำการตรวจ **naive B cells** (**CD27-IgD⁺**), **atypical** (**CD27-IgD⁺**), **switched** (**CD27-IgD⁺**) และ **unswitched** (**CD27-IgD⁺**) **memory B cells**, **transitional B cells** (**CD38-CD24^{hi}**) รวมทั้ง **plasma blast cells** (**PBC, CD38-CD24⁺**) ใน **PBMCs** จากผู้ป่วยที่ฟื้นตัวจากโรคโควิด 19 และในกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดี ขณะที่ในระยะพัก (**resting stage**) กลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดีและกลุ่มผู้ป่วยที่ฟื้นตัวมีประชากร **B cell** ที่ใกล้เคียงกัน แต่ความถี่ของโรคท่อน้ำดีอักเสบปฐมภูมิ (**primary biliary cholangitis - PBC**) ในกลุ่มผู้ป่วยมีการเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับในกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดี เพื่อที่จะศึกษาการตอบสนองของ **B cell** ต่อการส่งสัญญาณที่อาศัย **B Cell Receptor** (**BCR-dependent signaling**) **B cell** ได้รับการกระตุ้นจากแอนติบอดี **F(ab')₂ anti-human Ig(M + G)** เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง ความถี่ของ **naive B cell**, **PBC**, และ **transitional B cell** ที่ได้รับการกระตุ้นทั้งในกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดีมีการลดลง แต่มีการเพิ่มขึ้นในส่วน of **atypical memory B cell** เมื่อเปรียบเทียบกับในระยะพัก (**resting state**) (ภาพประกอบ [1a-e](#)) ความถี่ของ **unswitched memory B cell** ที่ได้รับการกระตุ้นในกลุ่มผู้ป่วยลดลง แต่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงในกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดีเมื่อเปรียบเทียบกับในระยะพัก (ภาพประกอบ [1a, c](#)) ที่น่าสนใจก็คือการแสดงออกของโปรตีน **CD19** ซึ่งเป็นตัวควบคุมที่สำคัญของการส่งสัญญาณของ **B Cell Receptor** (**BCR signaling**) บนพื้นผิวภายนอกของ **B cell** ทั้งหมดและกลุ่มย่อยของ **B-cell** เกือบจะทั้งหมดในผู้ป่วยที่ฟื้นตัวมีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับในกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดี (ภาพประกอบ [1f](#)) อย่างไรก็ตามการแสดงออกของ **CD19 mRNA** ของ **B cells** ในผู้ป่วยที่ฟื้นตัวไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับในกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดี

ดี (ภาพประกอบ [1g](#)) หลังจากใช้การทดลองวิธี immunofluorescence การแสดงออกของโปรตีน CD19 มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญในน้ำมูกของหนูที่ติดเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 เปรียบเทียบกับในหนูที่ไม่มีการติดเชื้อ (โมเดลจำลอง) (ภาพประกอบ [1h,i](#)) ผลที่ได้เหล่านี้บ่งชี้ว่าการติดเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 อาจจะทำให้ immune phenotype และการทำงานของ B cells เปลี่ยนแปลงไปโดยผ่านการยับยั้งชั่วคราวการแสดงออกของโปรตีน CD19

ภาพประกอบ 1.



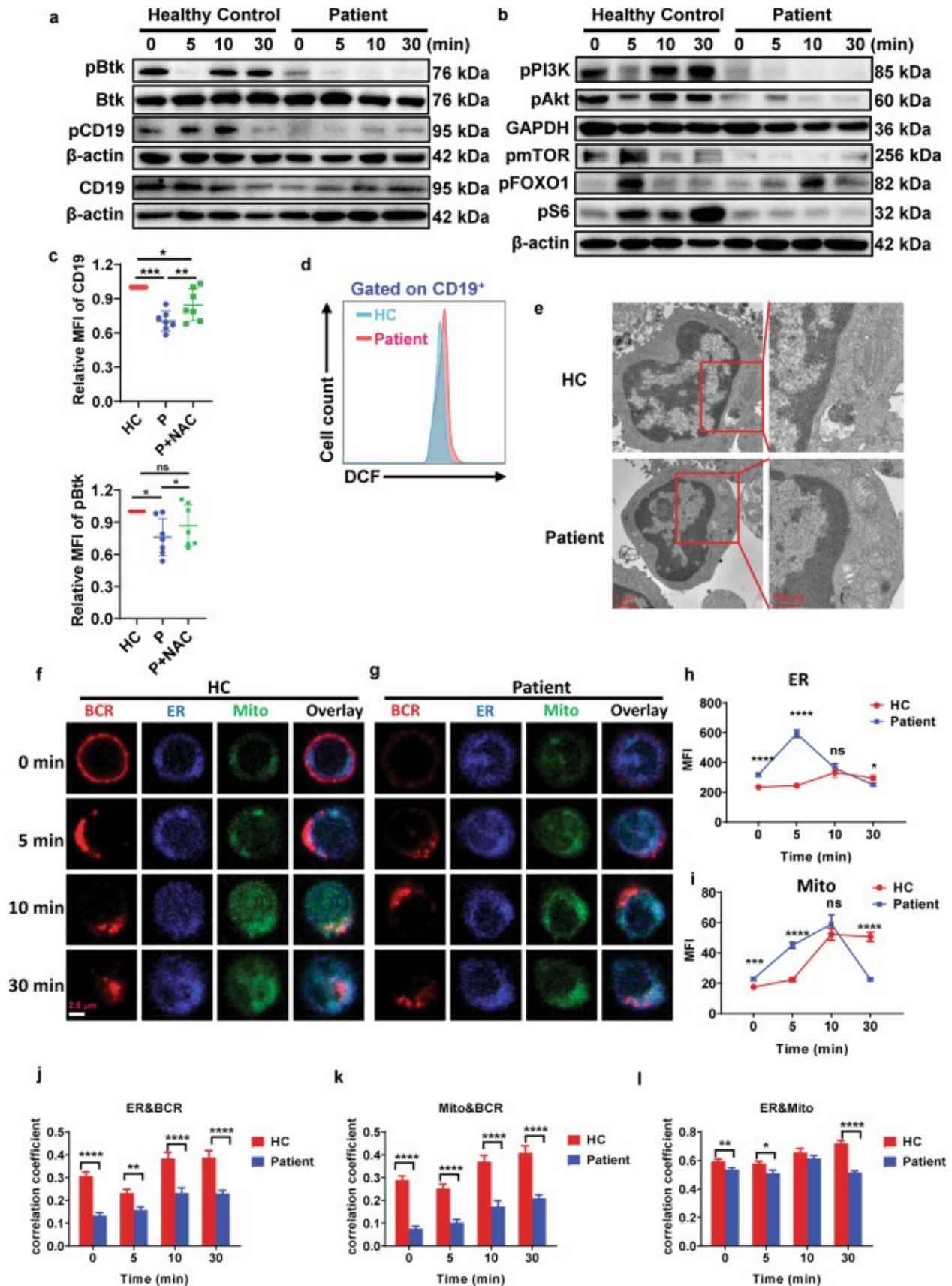
การติดเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ทำให้ immune phenotype และการทำงานของ B cell เปลี่ยนแปลงไป ตลอดจนทำให้การแสดงออกของโปรตีน CD19 บนพื้นผิวภายนอกของ B cell ลดลงในผู้ป่วยโควิด 19 ที่ฟื้นตัว. การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค flow cytometry สำหรับความถี่ของ naive B cells (naive, CD19⁺ IgD⁺ CD27⁻), class-switched B cells (switched, CD19⁺ IgD⁻ CD27⁻), unswitched memory B cells (unswitched, CD19⁺ IgD⁺ CD27⁻), transitional B cells (transitional, CD19⁺ CD24⁺ CD38⁻), plasma blasts (PBC, CD19⁺ CD38⁺ CD24⁻) และ atypical memory B cells (atypical, CD19⁺ IgD⁻ CD27⁻) ใน PBMCs ระหว่างระยะพักและที่ได้รับการกระตุ้นจากผู้ป่วยโควิด 19 ที่ฟื้นตัว ($n = 14-15$) และจากกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดี ($n = 15$). ที่แสดงในภาพประกอบเป็น dot plots ที่เป็นตัวแทน (**a, d**) และเปอร์เซ็นต์เฉลี่ย (\pm SEM) ของประชากร B cell กลุ่มย่อย (**b, c, e**). การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค flow cytometry สำหรับค่า Mean Fluorescence Intensity (MFI) ของโปรตีน CD19 บน B cells ทั้งหมด (B, CD19⁺), naive B cells, class-switched B cells, unswitched memory B cells, transitional B cells, plasma blasts, และ atypical memory B cells ใน PBMCs ระหว่างระยะพักจากผู้ป่วยโควิด 19 ที่ฟื้นตัว ($n = 15$) และจากกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดี ($n = 15$). ระยะพัก (resting) = เซลล์ก่อนการกระตุ้น, ที่ได้รับการกระตุ้น (stimulated) = เซลล์หลังการกระตุ้นด้วย 10 μ g/ml biotin-F(ab')₂-anti-Ig(M + G) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (**f**). การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RT-PCR สำหรับระดับ CD19 mRNA ของ B cell จากผู้ป่วยที่ฟื้นตัว ($n = 4$) และจากกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดี ($n = 4$) (**g**). การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค immunofluorescence สำหรับการแสดงออกของโปรตีน CD19 ในส่วนที่มีพยาธิสภาพของไต (nephritic sections) จากหนูที่ติดเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ($n = 3$) และจากหนูในกลุ่มจำลอง (mock mice) ($n = 3$) ที่แสดงในภาพประกอบเป็นภาพ (images) ที่เป็นตัวแทน (**h, i**). การประเมินทางสถิติดำเนินการโดยใช้การทดสอบชนิด two-tailed Student's *t*-test. นัยสำคัญทางสถิติระบุโดยใช้เครื่องหมายดอกจัน (asterisks): * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, และ **** $p < 0.0001$

การติดเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ทำให้การส่งสัญญาณของ B Cell Receptor (BCR signaling) และเมตาบอลิซึมของ B cell เปลี่ยนแปลงไปในผู้ป่วยโควิด 19 ที่ฟื้นตัว

โปรตีน CD19 เป็นตัวควบคุมที่สำคัญสำหรับการส่งสัญญาณของ B Cell Receptor รวมทั้งการพัฒนา B cell และการตอบสนองของภูมิคุ้มกันที่อาศัยสารน้ำ (humoral immune response) เพื่อที่จะศึกษาว่าการติดเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 มีผลต่อการส่งสัญญาณของ B Cell Receptor (BCR signaling) หรือไม่ B cell จากผู้ป่วยและจากกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดีได้รับการกระตุ้นด้วย biotin-F(ab')₂ anti-human Ig(M + G) และ streptavidin เป็นระยะเวลาตามที่ระบุ และย้อมด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน CD19, phosphorylated CD19, และ downstream signal protein-phosphorylated Btk, รวมทั้งวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Western blotting เราพบว่าระดับของโปรตีน CD19, phosphorylated CD19, และ phosphorylated Btk ทั้งหมดใน B cell จากผู้ป่วยมีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับในกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดี (ภาพประกอบ [2a](#)) โปรตีน CD19 เป็นตัวกระตุ้นที่สำคัญของวิถีการส่งสัญญาณของเอนไซม์ PI3K ในเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย anti-Ig(M + G) ต่อจากนั้นเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย anti-Ig(M + G) ได้รับการตรวจสอบสำหรับการกระตุ้นของเอนไซม์ PI3K และสัญญาณชนิด downstream ของเอนไซม์ PI3K โดยเทคนิค Western blotting ไม่น่าแปลกใจที่เรา

พบว่า phosphorylated PI3K, Akt, FoxO1, S6, และ mTOR ใน B cell จากผู้ป่วยมีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับในกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดี (ภาพประกอบ [2b](#))

ภาพประกอบ 2.



การติดเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ทำให้การส่งสัญญาณของ B Cell Receptor (BCR signaling) และเมตาบอลิซึมของ B cell เปลี่ยนแปลงไปในผู้ป่วยโควิด 19 ที่ฟื้นตัว. B cells จากผู้ป่วยโควิด 19 ที่ฟื้นตัวและจากกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดีได้รับการกระตุ้นด้วย 10 µg/ml biotin-F(ab')₂-anti-Ig(M + G) และ 20 µg/ml streptavidin เป็นเวลาตามที่ระบุ และระดับของ Btk, pBtk, pCD19, CD19, pPI3K, pAkt, pmTOR, pS6, และ pFoxO1 ได้รับการประเมินโดยเทคนิค Western blot. GAPDH หรือ β-actin เป็นตัวควบคุม (control). ที่แสดงในภาพประกอบเป็น blots ที่เป็นตัวแทนของการทดลองที่เป็นอิสระ 3 ครั้ง (a, b). การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค flow cytometry สำหรับค่า Mean Fluorescence Intensity (MFI) ของโปรตีน CD19 และ pBtk บน B cell ที่ได้รับการกระตุ้นเป็นเวลา 5 นาทีจากผู้ป่วยโควิด 19 ที่ฟื้นตัว (n = 7) และจากกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดี (n = 7) ซึ่งได้รับการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยใช้ NAC และไม่ใช่ NAC (c). การประเมินทางสถิติทำโดยใช้การทดสอบแบบ two-tailed Student's t-test. PBMCs จากผู้ป่วยโควิด 19 ที่ฟื้นตัวและจากกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดีได้รับการกระตุ้นด้วย 10 µg/ml biotin-F(ab')₂-anti-Ig(M + G) เป็นเวลา 30 นาที และการผลิตสาร reactive oxygen species (ROS) ได้รับการตรวจวัดใน CD19+ B cells (d). ไมโทคอนเดรียใน B cells จากผู้ป่วยโควิด 19 ที่ฟื้นตัวและจากกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดีได้รับการตรวจวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscopy - TEM). ที่แสดงในภาพประกอบเป็นภาพ (image) ที่เป็นตัวแทนของการทดลองที่เป็นอิสระ 3 ครั้งจาก B cells จำนวนอย่างน้อย 40 เซลล์ (e). Scale bars, 1 µm และ 500 nm. B cell จากผู้ป่วยโควิด 19 ที่ฟื้นตัวและจากกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดีที่ติดป้าย (labeled with) 10 µg/ml AF594-F(ab')₂-anti-Ig(M + G) ได้รับการกระตุ้นที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลาตามที่ระบุและถูกทำให้คงสภาพ (fix) จากนั้นทำให้เซลล์เป็นรูหรือเปิดช่องว่างของเซลล์เมมเบรน (permeabilize) และย้อมด้วย probes ที่จำเพาะต่อ endoplasmic reticulum (ER) และไมโทคอนเดรีย. การวิเคราะห์เซลล์ด้วยเทคนิค confocal analysis สำหรับ ER และไมโทคอนเดรียใน B cells. ที่แสดงในภาพประกอบเป็นภาพ (image) ที่เป็นตัวแทน (f, g), ค่า Mean Fluorescence Intensity (MFI) ของ endoplasmic reticulum (ER) (h) และไมโทคอนเดรีย (i), และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient) ของ B Cell Receptor (BCR) กับ endoplasmic reticulum (ER) (j), B Cell Receptor (BCR) กับไมโทคอนเดรีย (k), และ endoplasmic reticulum (ER) กับไมโทคอนเดรีย (l) จากการทดลองที่เป็นอิสระ 3 ครั้ง. Scale bars, 2.5 µm. การประเมินทางสถิติทำโดยใช้การทดสอบแบบ two-tailed Student's t-test. นัยสำคัญทางสถิติระบุโดยใช้เครื่องหมายดอกจัน (asterisks): * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, และ **** p < 0.0001

ด้วยเหตุที่ว่าการส่งสัญญาณของเอนไซม์ PI3K เป็นตัวควบคุมหลักที่มีความสำคัญสำหรับเมตาบอลิซึมของ B cell และการส่งสัญญาณรีดอกซ์¹¹ เราจึงคาดว่า การติดเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัสทำให้เมตาบอลิซึมของ B cell เปลี่ยนแปลงไปด้วย การผลิตสาร reactive oxygen species (ROS) ที่มีความผิดปกติสามารถนำไปสู่การอยู่รอดที่มีความผิดปกติบกพร่อง (impaired survival) ของ B cell ปกติรวมทั้ง germinal center B cell^{12,13} และสาร reactive oxygen species จากไมโทคอนเดรียก็จะยับยั้งการตอบสนองของภูมิคุ้มกันที่อาศัยสารน้ำโดยผ่านการแสดงออกของโปรตีน CD19 ที่ลดลงใน B cell ของหนู¹⁴ ต่อจากนั้นเราได้ตรวจหาการแสดงออกของโปรตีน CD19 และ phosphorylated Btk บนพื้นผิวภายนอกของ B cells ของผู้ป่วยหลังจากได้รับการเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารต้านอนุมูลอิสระ (N-acetyl cysteine) และพบว่าระดับของโปรตีน CD19 และ pBtk บน B cells ของผู้ป่วยในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารต้านอนุมูลอิสระมีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับใน B cell ของผู้ป่วยที่ไม่ได้รับ

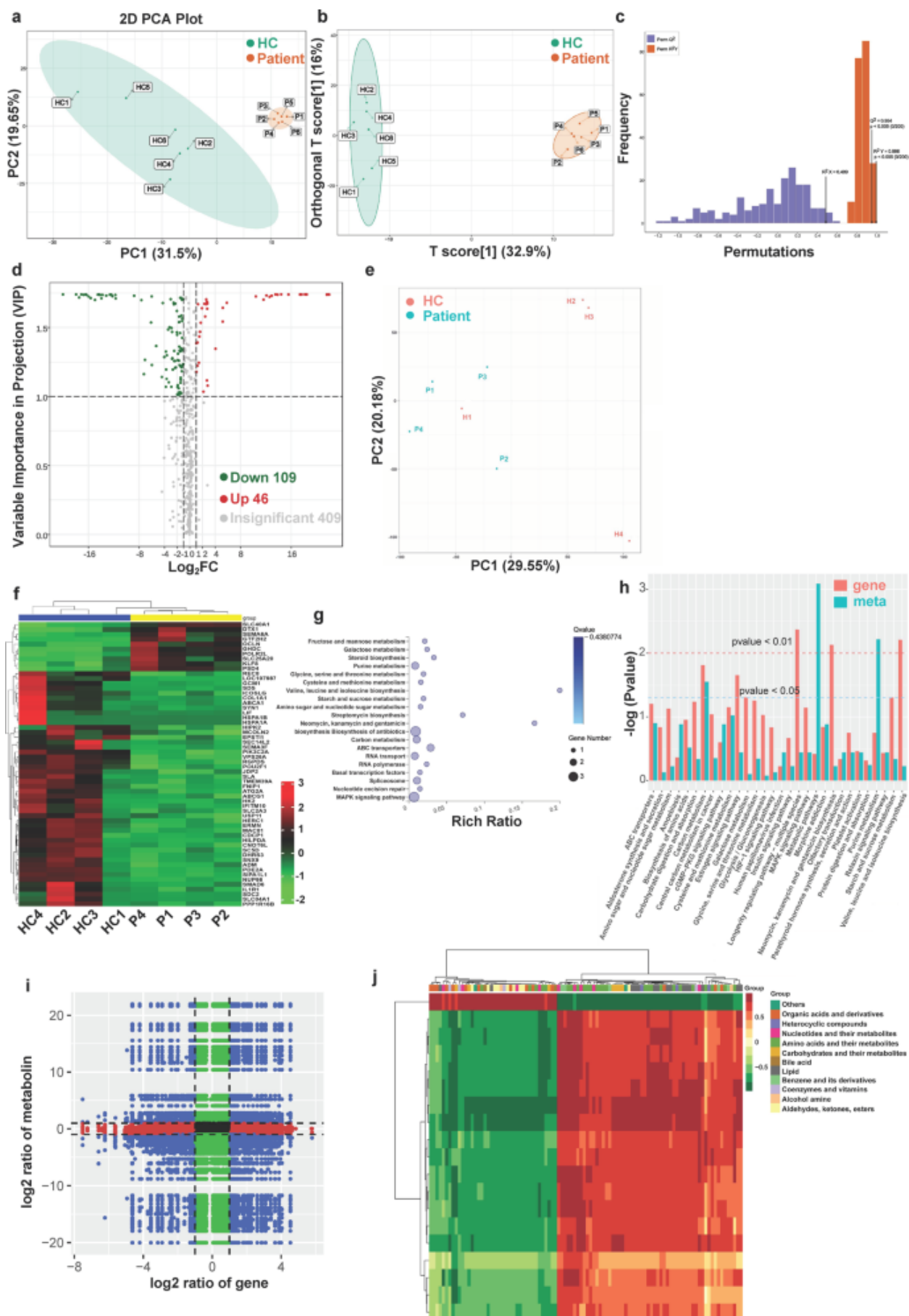
การบำบัดรักษา (ภาพประกอบ [2c](#)) เพื่อที่จะประเมิน redox state ของ B cell จากผู้ป่วยโควิด 19 B cell จากผู้ป่วย และกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดีได้รับการกระตุ้นด้วย $F(ab')_2$ anti-human Ig(M + G) และย้อมด้วย oxidant-sensing fluorescent probe dichlorodihydrofluorescein (DCFH) รวมทั้งตรวจวัดการผลิตสาร reactive oxygen species (ROS) ทั้งหมด เราพบว่า B cell ของผู้ป่วยผลิตสาร reactive oxygen species (ROS) ในปริมาณที่มากกว่าในกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดี (ภาพประกอบ [2d](#)) กลุ่มโปรตีน complex III ที่ฝังตัวอยู่บนเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรีย เป็นสิ่งจำเป็นในการผลิตสาร reactive oxygen species ที่ได้รับการกระตุ้นจากภาวะพร่องออกซิเจน (hypoxia-induced ROS) และการตรวจจับปริมาณออกซิเจนในเซลล์ (cellular oxygen sensing) [15](#) เราได้ตรวจวิเคราะห์ไมโทคอนเดรียใน B cell และพบว่ามีการบวม (swelling) ของไมโทคอนเดรียเพิ่มมากขึ้นใน B cell ของผู้ป่วยเมื่อเปรียบเทียบกับในกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดี (ภาพประกอบ [2e](#)) การรักษาสถานะสมดุลของ endoplasmic reticulum (ER) มีผลต่อเมตาบอลิซึมของ B cell และการตอบสนองต่อ metabolic stress โดยการควบคุมระดับของแคลเซียมในไมโทคอนเดรีย [16](#) เพื่อที่จะศึกษาต่อไปถึงผลของการติดเชื้อไวรัสโคโรนาไวรัส 2 ต่อเมตาบอลิซึมของ B cell B cell จากผู้ป่วย และจากกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดีจึงได้รับการกระตุ้นด้วย $F(ab')_2$ anti-human Ig(M + G) เป็นเวลายาวนานต่าง ๆ กัน และย้อมด้วย ER tracker และ MITO tracker สำหรับไมโทคอนเดรีย รวมทั้งตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค confocal microscopy เราพบว่า ค่า Mean Fluorescence Intensity (MFI) ของ endoplasmic reticulum (ER) และ MITO ของ B cell จากผู้ป่วยมีการเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในนาที่ 0 และนาที่ 5 แต่ลดต่ำลงใน 30 นาที่เมื่อเปรียบเทียบกับในกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดี (ภาพประกอบ [2f-i](#)) นอกจากนี้ colocalization ระหว่าง B Cell Receptor (BCR) และ endoplasmic reticulum (ER) หรือ MITO ก็มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญตลอดการกระตุ้น B cell ในผู้ป่วยเมื่อเปรียบเทียบกับในกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดี (ภาพประกอบ [2j-k](#)) เรายังพบด้วยว่า colocalization ระหว่าง endoplasmic reticulum (ER) กับ MITO มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญในนาที่ 0 นาที่ 5 และนาที่ 30 ใน B cell ของผู้ป่วยเมื่อเปรียบเทียบกับในกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดี (ภาพประกอบ [2l](#)) โดยรวมแล้วผลที่ได้เหล่านี้บ่งชี้ว่าการติดเชื้อไวรัสโคโรนาไวรัส 2 อาจจะทำให้กิจกรรมเมตาบอลิซึมของ B cell เปลี่ยนแปลงไป และทำให้มีการผลิตสาร reactive oxygen species (ROS) เพิ่มมากขึ้น ซึ่งในทางกลับกันทำให้การแสดงออกของโปรตีน CD19 และการส่งสัญญาณที่อิงอาศัย B Cell Receptor (BCR-dependent signaling) ลดน้อยลง

การติดเชื้อไวรัสโคโรนาไวรัส 2 ทำให้ **serum metabolite profile** และ **transcriptome profile** ของ **B cell** เปลี่ยนแปลงไป

เพื่อที่จะศึกษาความแตกต่างขององค์ประกอบทางด้านเมตาบอลิซึมของเซรัมระหว่างผู้ป่วยโควิด 19 ที่ฟื้นตัวกับกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดี เราจึงได้ทำการวิเคราะห์ทางด้านเมตาบอลิซึม มีการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principal component analysis - PCA) กับชุดที่สมบูรณ์ของโมเลกุลหรือเมตาโบไลต์ และใช้การวิเคราะห์ด้วยวิธี orthogonal partial least-squares discriminant analysis (OPLS-DA) เพื่อแยกแยะความแตกต่างของ metabolic

profile ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโควิด 19 ที่ฟื้นตัวกับกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดี (ภาพประกอบ [3a-c](#)) โดยการรวม FC เข้ากับ VIP จากแบบจำลอง OPLS-DA ในที่สุดเมตาบอไลต์จำนวน 155 เมตาบอไลต์ซึ่งในจำนวนนี้ 109 เมตาบอไลต์เป็น downregulated และ 46 เมตาบอไลต์เป็น upregulated ก็ถูกทำให้เปลี่ยนแปลงไปในเซรัมของผู้ป่วยโควิด 19 ที่ฟื้นตัว (ภาพประกอบ [3d](#)) ในบรรดาเมตาโบไลต์ที่เปลี่ยนแปลงไปนี้ระดับของกรดอะมิโน L-arginine, L-glutamic acid, L-isoleucine, L-cystine, และ L-cysteine มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญในเซรัมจากผู้ป่วยโควิด 19 ที่ฟื้นตัว เพื่อที่จะตรวจสอบความถูกต้องของผลที่ได้จากข้อมูลโอมิกส์ ระดับของ glutamic และ cysteine ในเซรัมได้รับการตรวจวัด และเราพบว่าระดับของ glutamic และ cysteine ในเซรัมจากผู้ป่วยโควิด 19 ที่ฟื้นตัวมีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับในกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดี (ภาพประกอบ [1](#)) โดยรวมแล้วผลที่ได้เหล่านี้เป็นพื้นฐานของเหตุผลในการวินิจฉัยว่าองค์ประกอบทางด้านเมตาบอลิซึมของเซรัมทำให้การส่งสัญญาณและการทำงานของ B cell มีการเปลี่ยนแปลงไปอย่างไร

ภาพประกอบ 3.



การติดเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ทำให้องค์ประกอบทางด้านเมตาบอลิซึมของเซลล์และ transcriptome profile ของ B cell เปลี่ยนแปลงไปในการส่งผลกระทบต่อการทำงานของ B Cell Receptor. การวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principal component analysis - PCA) ของเมตาโบลอมเพื่อแสดงให้เห็นความแตกต่างระหว่างตัวอย่างจากผู้ป่วยโควิด 19 ที่ฟื้นตัว (n = 6) และกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดี (n = 6) ตามที่ระบุ (a). การวิเคราะห์ด้วยวิธี orthogonal partial least-squares discriminant analysis (OPLS-DA) แสดงให้เห็นการแยกแยะความแตกต่างที่เป็นไปได้ของเมตาโบลิตในเซลล์จากผู้ป่วยโควิด 19 ที่ฟื้นตัว (n = 6) และจากกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดี (n = 6) ตามที่ระบุ. R2 และ Q2 เป็นตัวแทนของความสอดคล้อง (goodness of fit) และการทำนาย (prediction) ตามลำดับ และค่า p-value แสดงระดับของนัยสำคัญของโมเดล (x axis = predictive components, y axis = orthogonal component) (b, c). โดยการรวม FC เข้ากับ VIP จากโมเดล OPLS-DA, volcano plot แสดงให้เห็นถึงเมตาโบลิตที่มีอยู่อย่างมากมายแตกต่างกันไปในเซลล์จากผู้ป่วยโควิด 19 ที่ฟื้นตัว. 2 กลุ่มซึ่งประกอบด้วย 46 upregulated metabolites และ 109 downregulated metabolites. เมตาโบลิตที่มีอยู่อย่างมากมายแตกต่างกันไปอย่างมีนัยสำคัญได้รับการใส่รหัสสี (color-coded): สีแดงบ่งบอกว่าเป็น upregulated proteins สีเขียวแสดงถึง downregulated proteins (d). การวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principal component analysis - PCA) ของ transcriptome เพื่อแสดงให้เห็นความแตกต่างระหว่างตัวอย่างจากผู้ป่วยโควิด 19 ที่ฟื้นตัว (n = 4) และกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดี (n = 4) ตามที่ระบุ (e). การจัดกลุ่มแผนภูมิความร้อน (heat map) สำหรับยีนที่มีการแสดงออกต่าง ๆ กันใน B cell จากอาสาสมัครกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดีจำนวน 4 คน และผู้ป่วยโควิด 19 ที่ฟื้นตัวจำนวน 4 คน. แกนนอนเป็นตัวแทนตัวอย่างและแกนตั้งเป็นตัวแทนยีนที่มีการแสดงออกต่าง ๆ กัน. สีแดง = สหสัมพันธ์เชิงบวก สีเขียว = สหสัมพันธ์เชิงลบ (f). การวิเคราะห์วิถี KEGG ของยีนในผู้ป่วยโควิด 19 ที่ฟื้นตัวและกลุ่มควบคุม. สีและขนาดของ bubble เป็นตัวแทนของค่า p-value และจำนวนของการ count (g). การวิเคราะห์ KEGG enrichment ของวิถีซึ่งมีอยู่อย่างมากมายแตกต่างกันไปโดยการรวมเมตาโบลิตที่มีอยู่อย่างมากมายแตกต่างกันไปนั้นเข้ากับยีนที่มีการแสดงออกต่าง ๆ กัน ชื่อของวิถีแสดงไว้ที่ด้านล่าง ความสูงของแท่งกราฟที่ยื่นสูงบ่งชี้ถึงค่า p-value ที่ยิ่งลดลง (h). Nine-quadrant plot แสดงให้เห็น multiples ต่าง ๆ กันของยีนและเมตาโบลิตที่มี Pearson's correlation coefficient >0.8 ในแต่ละกลุ่มซึ่งแตกต่างกันโดยใช้เส้นประสีดำ (i). สำหรับเมตาโบลิตและยีนต่าง ๆ กันที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient) มากกว่า 0.8 ในการวิเคราะห์ตามข้างบนนี้แผนภูมิความร้อนซึ่งแบ่งกลุ่มตามค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient) แสดงให้เห็นผลของสหสัมพันธ์ที่ได้รับการคัดเลือก (j)

เราได้ตรวจพบความแตกต่างของ transcriptome ของ B cell ระหว่างผู้ป่วยโควิด 19 ที่ฟื้นตัวและกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดี มีการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principal component analysis - PCA) กับ transcriptome และมีการแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดีกับผู้ป่วยโควิด 19 ที่ฟื้นตัว (ภาพประกอบ 3e) การแสดงออกของ 48 ยีนมีการ downregulate อย่างมีนัยสำคัญ และ 10 ยีนมีการ upregulate อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบผู้ป่วยโควิด 19 ที่ฟื้นตัวกับกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดี (ภาพประกอบ 3f) ต่อจากนั้นเราได้ทำการวิเคราะห์การเพิ่มขึ้นของฟังก์ชันโดยใช้เอนไซม์โกลอมาตริกของยีนและจีโนม (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) functional enrichment analysis) และพบว่า differentiating genes/metabolic genes มีการเพิ่มขึ้นในจำนวนทั้งสิ้น 20 วิถี โดยที่ส่วนมากเป็นวิถีการส่งสัญญาณเมตาบอลิซึม (metabolic signaling pathway) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการสังเคราะห์กรดอะมิโนและเมตาบอลิซึมของกรดอะมิโน

(ภาพประกอบ [3g](#)) และสุดท้ายเพื่อที่จะศึกษาความแตกต่างของยีนที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมและผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ จากเมตาบอลิซึม เราได้ทำการวิเคราะห์ผสมผสานระหว่าง transcriptome กับ metabolome เข้าด้วยกัน เราพบว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมและผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ จากเมตาบอลิซึมมีความผิดปกติ เกี่ยวข้องกับสารานุกรมของยีนและจีโนม (KEGG) ถูกใช้ในการแยกแยะวิถีเมตาบอลิซึม (metabolic pathway) ของยีนและเมตาบอไลต์ เราพบวิถีเมตาบอลิซึม (metabolic pathway) จำนวน 30 วิถีที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดีกับผู้ป่วยโควิด 19 ที่ฟื้นตัว (ภาพประกอบ [3h](#)) ใน transcriptome ระดับของการเพิ่มสูงขึ้นในวิถีการส่งสัญญาณสำหรับ Longevity regulating pathway- multiple species, valine, leucine, and isoleucine biosynthesis, Neomycin, kanamycin, and gentamicin biosynthesis, carbon metabolism, และ estrogen signaling pathway (ภาพประกอบ [3h](#)) ใน metabolome ระดับของการเพิ่มสูงขึ้น (สูงกว่า) ในเมตาบอลิซึมของสารฟิวรีนและเมตาบอลิซึมของคาร์บอน (ภาพประกอบ [3h](#)) เราได้ทำการวิเคราะห์สหสัมพันธ์สำหรับยีนและเมตาบอไลต์ที่ตรวจพบในแต่ละกลุ่มที่แตกต่างกัน Nine-quadrant diagram และ Heat map clustering ถูกใช้เพื่อแสดง multiples ต่าง ๆ กันของเมตาบอไลต์ในแต่ละกลุ่มซึ่งแตกต่างกันที่มี Pearson's correlation coefficient มากกว่า 0.8 เราพบภาวะที่มีอัตราของเมตาบอลิซึมสูงเกินปกติ (hypermetabolic state) ในกลุ่มผู้ป่วยที่ฟื้นตัว (ภาพประกอบ [3i,j](#)) นอกจากนี้เพื่อที่จะตรวจสอบความถูกต้องของผลที่ได้จากข้อมูลโอมิคส์ เราจึงได้ตรวจวัดระดับของ mRNA ของยีนต่าง ๆ ที่แสดงในภาพประกอบ [2f](#) ใน B cell โดยวิธี RT-PCR และพบว่าระดับ mRNA ของ *HK2*, *SLC04A1*, *SDS*, และ *COL1A1* มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญใน B cell ของผู้ป่วยโควิด 19 ที่ฟื้นตัวเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดี (ภาพประกอบ [2](#)) ผลที่ได้เหล่านี้ทำให้น่าเชื่อได้ว่าเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 อาจจะทำให้เมตาบอลิซึมของ B cell มีการเปลี่ยนแปลงไปโดยผ่านวิธีเหล่านี้

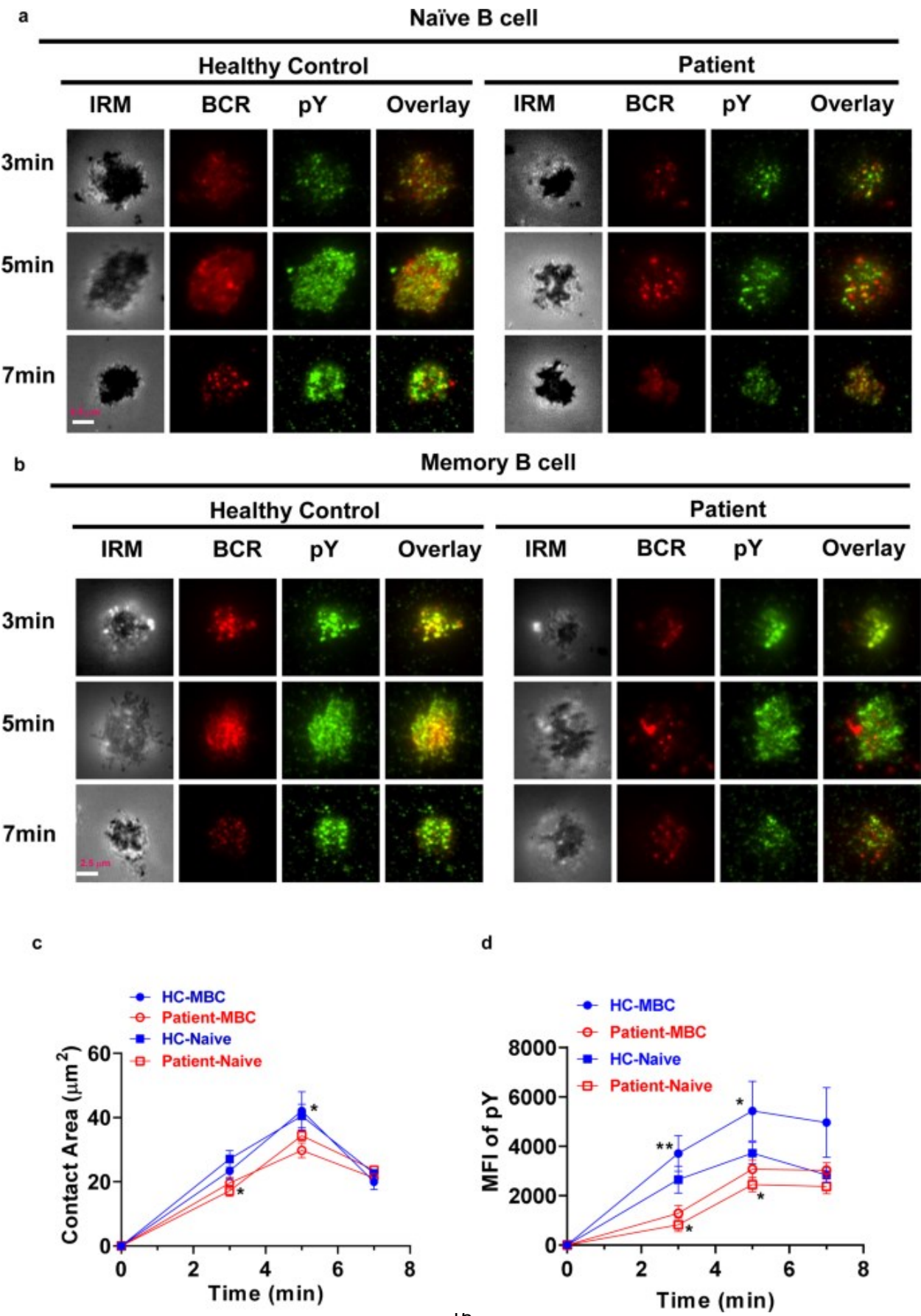
กล่าวโดยสรุปการติดเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 อาจจะมีผลต่อการส่งสัญญาณของ B Cell Receptor (BCR signaling) โดยการเปลี่ยน metabolomics profile และ transcriptome profile ของ B cell

การติดเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ทำให้การส่งสัญญาณของ B Cell Receptor เปลี่ยนแปลงไปโดยการมีผลกระทบต่อการกระตุ้น B cell ในระยะเริ่มแรก

เพื่อศึกษาผลกระทบจากการติดเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ต่อการกระตุ้น B cell และต่อการส่งสัญญาณของ B Cell Receptor ในระยะเริ่มแรก กล้องจุลทรรศน์ชนิด Confocal and total internal reflection fluorescence microscope (TIRFm) ถูกใช้ในการสังเกตการแพร่กระจายของ B cell การรวมกลุ่มของ B Cell Receptor การสะสม signalosome และการส่งสัญญาณของ B Cell Receptor (BCR signaling) B cell จากผู้ป่วยและกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดีได้รับการกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่เกี่ยวข้องกับเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane-associated antigen) ในช่วงระยะเวลายาวนานต่าง ๆ กันและย้อมด้วยแอนติบอดีที่มีความจำเพาะ

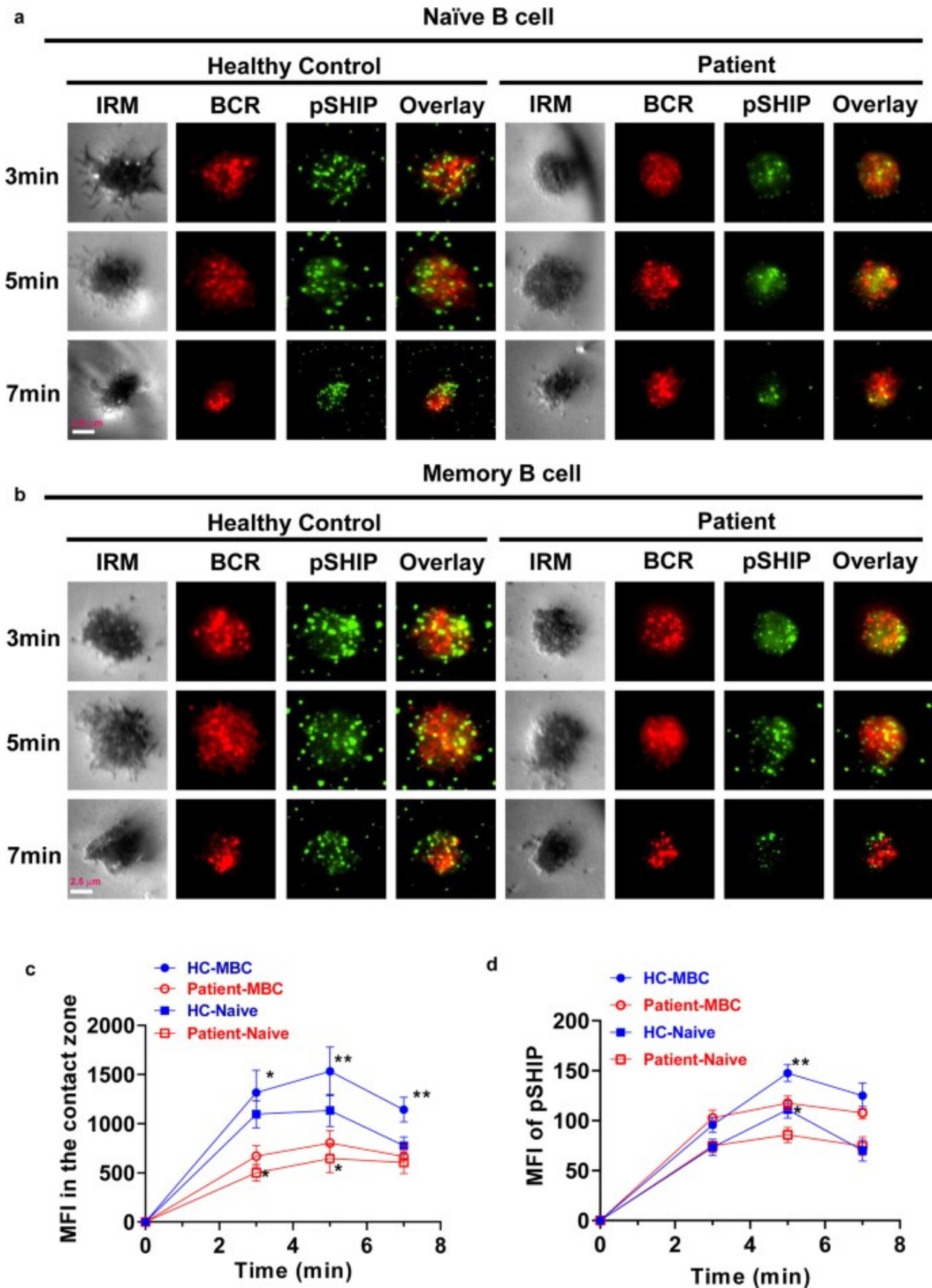
ต่อ pCD19 และ phospho-Tyrosines (pY) AF647-CD27 ถูกใช้เพื่อแยกความแตกต่างระหว่าง naïve B cell (CD27⁻) และ memory B cell (CD27⁺) การแพร่กระจายของ B cell แสดงให้เห็นกับบริเวณที่สัมผัส (contact area) และการรวมกลุ่มของ B Cell Receptor ได้รับการตรวจวัดโดยใช้ค่า Mean Fluorescence Intensity (MFI) สำหรับการแพร่กระจายของ B cell บริเวณที่สัมผัส (contact area) มีการลดลงใน naïve B cell ของผู้ป่วยในนาที่ที่ 3 และลดลงอย่างมีนัยสำคัญใน memory B cell ของผู้ป่วยในนาที่ที่ 5 หลังจากการกระตุ้นเมื่อเปรียบเทียบกับใน naïve B cell และ memory B cell ของกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดี (ภาพประกอบ [4a-c](#)) สำหรับสัญญาณของ B Cell Receptor ทั้งหมดค่า Mean Fluorescence Intensity (MFI) ของ pY มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญในนาที่ที่ 3 และนาที่ที่ 5 ใน naïve B cell ของผู้ป่วยเมื่อเปรียบเทียบกับของ naïve B cell และ memory B cell ของกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดี (ภาพประกอบ [4a, b, d](#)) สำหรับการรวมกลุ่มของ B Cell Receptor ค่า Mean Fluorescence Intensity (MFI) ของ B Cell Receptor มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญในนาที่ที่ 3 และนาที่ที่ 5 ทั้งใน naïve B cell และ memory B cell ของผู้ป่วยเมื่อเปรียบเทียบกับของ naïve B cell และ memory B cell ของกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดี (ภาพประกอบ [5a-c](#)) นอกจากนี้ค่า Mean Fluorescence Intensity (MFI) ของ pSHIP ซึ่งเป็นสัญญาณที่วัดได้จาก cell ที่ไม่มี B Cell Receptor มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญในนาที่ที่ 5 ใน naïve B cell และ memory B cell หลังการกระตุ้น เปรียบเทียบกับของ naïve B cell และ memory B cell ของกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดี (ภาพประกอบ [5a, b, d](#)) สำหรับการกระตุ้นของโปรตีน CD19 ค่า Mean Fluorescence Intensity (MFI) ของ pCD19 มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญในนาที่ที่ 3 และนาที่ที่ 5 ใน naïve B cell และ memory B cell ของผู้ป่วยเมื่อเปรียบเทียบกับของ naïve B cell และ memory B cell ของกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดี (ภาพประกอบ [6a-c](#)) ผลที่ได้เหล่านี้บ่งชี้ว่าการติดเชื้อไวรัสโคโรนาไวรัส 2 ทำให้การส่งสัญญาณของ B Cell Receptor (BCR signaling) เปลี่ยนแปลงไปโดยผ่านการยับยั้งขัดขวางการกระตุ้น naïve B cell และ memory B cell ในระยะแรกเริ่ม

ภาพประกอบ 4.



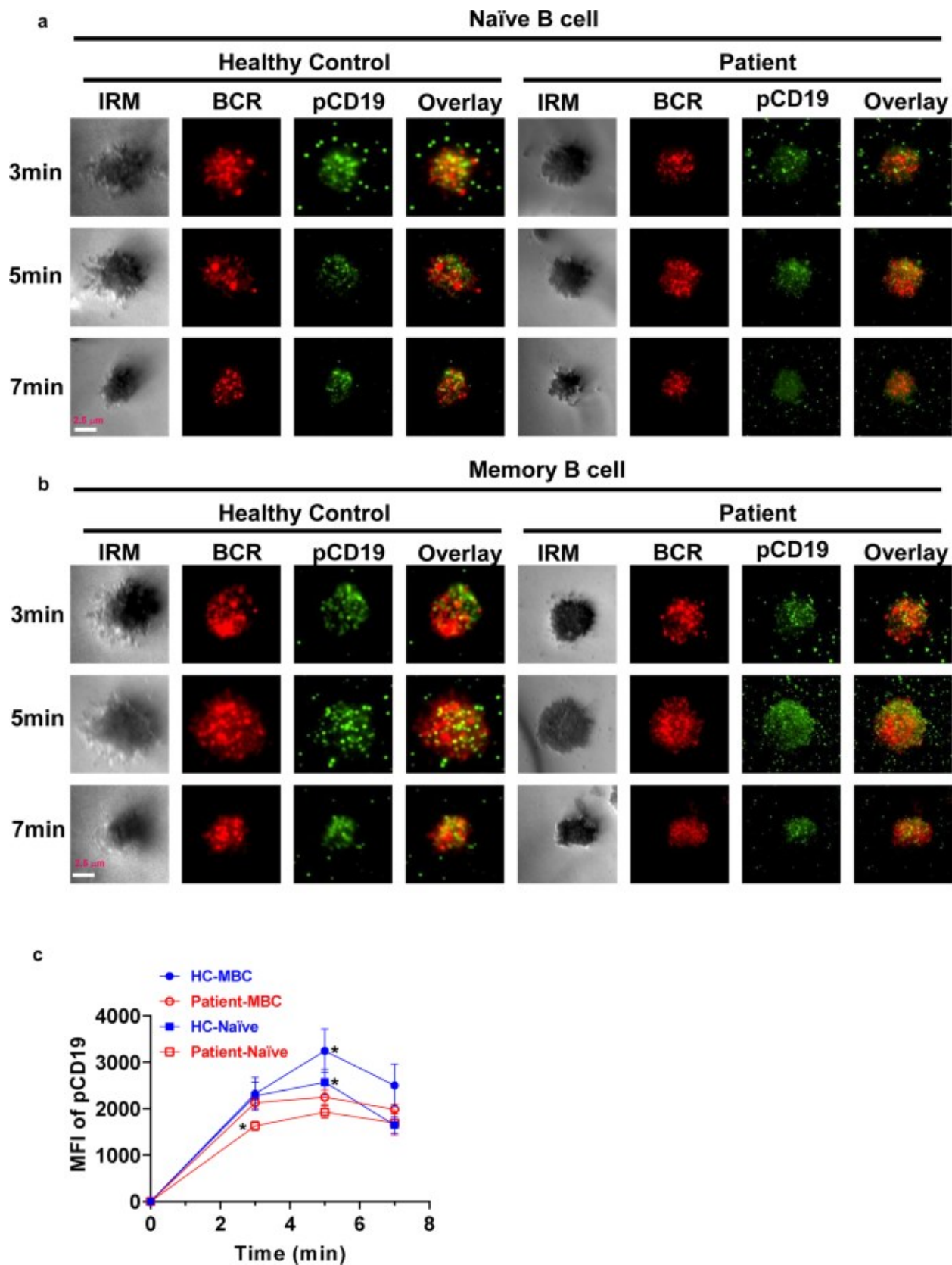
การติดเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ทำให้การส่งสัญญาณของ B Cell Receptor (BCR signaling) เปลี่ยนแปลงไปโดยการส่งผลกระทบต่อการกระตุ้น B cell ในระยะแรกเริ่ม. Naïve B cell (CD27⁻) และ memory B cell (CD27⁺) จากผู้ป่วยโควิด 19 ที่พื้นผิวและจากกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดีได้รับการกระตุ้นด้วย 10 µg/ml AF546-mB-Fab'-anti-Ig ที่โยงกับชั้นไขมันที่เรียงตัวกันสองชั้น (lipid bilayer) ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 นาที 5 นาที และ 7 นาที. ต่อจากนั้นเซลล์ถูกทำให้คงสภาพ (fix) และทำให้เป็นรูหรือเปิดช่องว่างของเซลล์เมมเบรน (permeabilize) แล้วจึงย้อมด้วย Alexa Fluor 647 anti-CD27 and anti-pY (**a**, **b**), ตามด้วย Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG. เซลล์ได้รับการตรวจวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด TIRF microscope. ที่แสดงในภาพประกอบเป็นภาพ (image) ที่เป็นตัวแทน ค่าเฉลี่ย (mean values) ของ B-cell contact area (**c**), และค่า Mean Fluorescence Intensity (MFI) ของ pY (**d**) ใน contact zone จากการทดลองที่เป็นอิสระ 3 ครั้ง. Scale bars, 2.5 µm. การประเมินทางสถิติทำโดยใช้การทดสอบแบบ two-tailed Student's t-test. สัญลักษณ์ทางสถิติระบุโดยใช้เครื่องหมายดอกจัน (asterisks): * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, และ **** $p < 0.0001$

ภาพประกอบ 5.



การติดเชื้อไวรัสโคโรนาไวรัส 2 ยับยั้งขัดขวางการกระตุ้นในระยะเริ่มแรกของ SHIP ใน B cell. Naive B cell (CD27⁻) และ memory B cell (CD27⁺) จากผู้ป่วยโควิด 19 ที่พื้นผิวและกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดีได้รับการกระตุ้นด้วย 10 µg/ml AF546-mB-Fab'-anti-Ig ที่โยงกับชั้นไขมันที่เรียงตัวกันสองชั้น (lipid bilayer) ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 นาที 5 นาที และ 7 นาที. ต่อจากนั้นเซลล์ถูกทำให้คงสภาพ (fix) และทำให้เป็นรูหรือเปิดช่องว่างของเซลล์เมมเบรน (permeabilize) แล้วจึงย้อมด้วย Alexa Fluor 647 anti-CD27 and anti-pSHIP (**a**, **b**), ตามด้วย Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG. เซลล์ได้รับการตรวจวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ TIRF microscope. ที่แสดงในภาพประกอบเป็นภาพที่เป็นตัวแทนและค่า Mean Fluorescence Intensity (MFI) ของ B Cell Receptor (**c**) และ pSHIP (**d**) ใน contact zone จากการทดลองที่เป็นอิสระ 3 ครั้ง. Scale bars, 2.5 µm. การประเมินทางสถิติทำโดยใช้การทดสอบแบบ two-tailed Student's t-test. นัยสำคัญทางสถิติระบุโดยใช้เครื่องหมายดอกจัน (asterisks): * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, และ **** $p < 0.0001$

ภาพประกอบ 6.



การติดเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ยับยั้งขัดขวางการกระตุ้นในระยะเริ่มแรกของโปรตีน CD19 ใน B cell. Naive B cell (CD27⁻) และ memory B cell (CD27⁺) จากผู้ป่วยโควิด 19 ที่พื้นผิวและกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดีได้รับการกระตุ้นด้วย 10 µg/ml AF546-mB-Fab'-anti-Ig ที่โยงกันและกัน บนชั้นไขมันที่เรียงตัวกันสองชั้น (lipid bilayer) ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 นาที 5 นาที และ 7 นาที. ต่อจากนั้นเซลล์ถูกทำให้คงสภาพ (fix) และทำให้เป็นรูหรือเปิดช่องว่างของเซลล์เมมเบรน (permeabilize) แล้วจึงย้อมด้วย Alexa Fluor 647 anti-CD27 and anti-pCD19 (**a, b**), ตามด้วย Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG. เซลล์ได้รับการตรวจวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ TIRF microscope. ที่แสดงในภาพประกอบเป็นภาพที่เป็นตัวแทนและค่า Mean Fluorescence Intensity (MFI) ของ pCD19 (**c**) ใน contact zone จากการทดลองที่เป็นอิสระ 3 ครั้ง. Scale bars, 2.5 µm. การประเมินทางสถิติทำโดยใช้การทดสอบแบบ two-tailed Student's t-test. นัยสำคัญทางสถิติระบุโดยใช้เครื่องหมายดอกจัน (asterisks): * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, และ **** $p < 0.0001$

การอภิปราย (Discussion)

ตามรายงานต่าง ๆ ก่อนหน้านี้การติดเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 เป็นสาเหตุให้เกิดการหยุดชะงักทำลายล้างระบบภูมิคุ้มกัน (immune disruption) การศึกษาวิจัยหลายชิ้นได้รายงานว่าผู้ป่วยโรคโควิด 19 มีจำนวน lymphocyte counts ลดลงและจำนวน myeloid cells เพิ่มขึ้นใน peripheral blood^{17,18} มีรายงานหลายชิ้นเมื่อเร็ว ๆ นี้ที่แสดงให้เห็นภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ (lymphopenia) โดยที่มีจำนวนของ T cells ทั้งชนิด CD4⁺ และชนิด CD8⁺ ลดลงอย่างมหาศาลในผู้ป่วยโรคโควิด 19 ที่มีอาการปานกลางและอาการรุนแรง^{19,20} การวิเคราะห์โดยวิธี flow cytometry ใน peripheral blood mononuclear cell (PBMCs) จากผู้ป่วยโรคโควิด 19 ที่มีอาการได้แสดงให้เห็นถึงการไหลเข้าอย่างมีนัยสำคัญของ granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-producing, activated CD4⁺ T cells and CD14⁺ HLA-DR⁺ inflammatory monocytes (IMs)^{21,22} มีการศึกษาวิจัยจำนวนมากมายหลายชิ้นที่ได้แสดงให้เห็นถึงจำนวนที่ลดลงของ NK cells ใน PBMC ของผู้ป่วยโรคโควิด 19 ซึ่งมีความเกี่ยวข้องสัมพันธ์กันกับความรุนแรงของโรค^{20,23} อย่างไรก็ตามไม่เป็นที่ชัดเจนว่าการควบคุมการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันที่ถูกทำลายยังคงอยู่และเหมาะสมเข้ากันกับผู้ป่วยที่พื้นผิวจากโควิด 19 หรือไม่ ในการศึกษาวิจัยของเราเราได้อธิบายลักษณะของ immune phenotype ของ B cell จากผู้ป่วยจำนวน 15 คนที่พื้นผิวจากโควิด 19 ทั้งกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดีและผู้ป่วยที่พื้นผิวมีประชากร B-cell ที่ใกล้เคียงกันในระยะพักและเมื่อได้รับการกระตุ้น อย่างไรก็ตามความถี่ของของโรคท่อน้ำดีอักเสบปฐมภูมิ (primary biliary cholangitis - PBC) ในกลุ่มผู้ป่วยโควิด 19 มีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับในกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดีก่อนหน้านี้การกระตุ้น และเปอร์เซ็นต์ของ unswitched memory B cells มีการลดลงในผู้ป่วยที่พื้นผิวแต่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงในกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดีหลังจากมีการกระตุ้น B Cell Receptor ที่น่าสนใจยิ่งกว่านั้นก็คือ เราพบว่าการแสดงออกของโปรตีน CD19 มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญในเกือบจะทุกกลุ่มย่อยของ B cell (B-cell subsets) ในผู้ป่วยที่พื้นผิว โปรตีน CD19 เป็นหนึ่งในบรรดาสมาชิกของ B-cell receptor co-complex ซึ่งประกอบด้วย CD19, CD81, CD21, และ CD225 ซึ่งเพิ่มการส่งสัญญาณของแอนติเจน (antigenic signaling) อย่างมีประสิทธิภาพโดยผ่านทาง B cell

receptor (BCR) ดังนั้นถึงแม้ว่าการแสดงออกของโปรตีน CD19 ในผู้ป่วยโควิด 19 ที่พื้นตัวมีการลดลงเล็กน้อยอยู่ในช่วงอาจจะประมาณ 10% แต่ BCR signaling ก็มีการลดลงเป็นส่วนใหญ่ใน B cell ของผู้ป่วยที่พื้นตัวหลังจากมีการกระตุ้น B Cell Receptor โปรตีน CD19 เป็นตัวควบคุมที่สำคัญสำหรับ BCR signaling สำหรับการพัฒนา B cell และสำหรับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยสารน้ำ (humoral immune response) ก่อนหน้านี้นี้เราได้รายงานว่าการลดลงประกอบของเซลล์โปรตีน CD19 นำไปสู่ภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องโดยการควบคุมการกระตุ้นในช่วงต้นของ memory B cells ในผู้ป่วยกลุ่มอาการ Wiskott-Aldrich syndrome [24](#) จึงไม่น่าแปลกใจที่เราพบว่าการส่งสัญญาณของ B Cell Receptor และการตอบสนองของ B cell ในระยะเริ่มแรก รวมทั้งการแพร่กระจายของ B cell การจับกลุ่มกันของ B Cell Receptor ตลอดจน signalosome recruitment ถูกทำให้เสียหาย หยุ ด ชะ จั ก ไป ห ลั ง จ า ก มี ก า ร ก ระ ดั น B Cell Receptor ใน ผู้ ป ว ย ที่ พื น ตั ว ในเชิงกลไกการแสดงออกของโปรตีน CD19 ที่ลดลงมีสาเหตุมาจากการผลิตสาร reactive oxygen species (ROS) ที่เพิ่มขึ้นแทนที่จะเป็น gene transcription ในผู้ป่วยโควิด 19 ที่พื้นตัว เมื่อรวมเข้าด้วยกันแล้วเราชี้ให้เห็นว่าภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องในผู้ป่วยที่พื้นตัวมีสาเหตุมาจากการแสดงออกของโปรตีน CD19 ที่ลดลงซึ่งทำให้การส่งสัญญาณของ B Cell Receptor (BCR signaling) ลดน้อยลง

หลักฐานที่เพิ่มมากขึ้นทำให้น่าเชื่อถือได้ว่าสิ่งแวดล้อมทางด้านเมตาบอลิซึมมีบทบาทสำคัญในการกำหนดควบคุมความเป็นไปและการทำหน้าที่ของ B cell และการเปลี่ยนแปลงของปริมาณออกซิเจนที่มีอยู่และการเปลี่ยนแปลงทางด้านเมตาบอลิซึมอื่น ๆ มีผลอย่างลึกซึ้งต่อการอยู่รอด การกระตุ้น ตลอดจนการเปลี่ยนแปลง (differentiation) ของ B cell [49](#) ในการศึกษาวิจัยของเราในบรรดาเมตาบอไลต์ที่มีการเปลี่ยนแปลงในการวิเคราะห์ serum metabolite profiles ระดับของกรดอะมิโน L-arginine, L-glutamic acid, L-isoleucine, L-cystine, และ L-cysteine มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญในเซลล์ของผู้ป่วยโควิด 19 ที่พื้นตัว ผลที่ได้เหล่านี้บ่งชี้ว่าเมตาบอลิซึมที่หยุดชะงักเสียหายไปอาจจะมีผลต่อการกระตุ้นและการทำหน้าที่ของ B cell ในผู้ป่วยที่พื้นตัว

นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่าการผลิตสาร reactive oxygen species (ROS) ของไมโทคอนเดรียที่เพิ่มสูงขึ้นก็ยังส่งผลให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน CD19 ที่ลดลง [14](#) ซึ่งทำให้การส่งสัญญาณของ B Cell Receptor ลดลง ในการศึกษาวิจัยของเราพบว่าสาร reactive oxygen species (ROS) มีการเพิ่มขึ้นและการแสดงออกของโปรตีน CD19 มีการลดลง และที่น่าสนใจก็คือการแสดงออกของโปรตีน CD19 และการส่งสัญญาณของ B Cell Receptor ได้รับการกู้คืน (rescued) เป็นบางส่วนในผู้ป่วยที่พื้นตัวโดยการใช้สารกำจัดความไม่บริสุทธิ์สำหรับสาร reactive oxygen species (ROS scavenger) คือ N-Acetyl Cysteine (NAC) ผลที่ได้เหล่านี้สอดคล้องกับสิ่งที่มีการรายงานและบ่งชี้ว่าสาร reactive oxygen species (ROS) ที่เพิ่มสูงขึ้นอาจจะมีผลต่อการส่งสัญญาณของ B Cell Receptor ในผู้ป่วยที่พื้นตัวโดยผ่านการยับยั้งขัดขวางการแสดงออกของโปรตีน CD19

โดยการใช้ transcriptome และเมตาบอลิซึมเราพบว่ายีนต่าง ๆ ที่สัมพันธ์กับเมตาบอลิซึมและผลิตภัณฑ์จากเมตาบอลิซึม ถูกทำให้มีความผิดปกติ นอกจากนี้เรายังพบด้วยว่าสาร reactive oxygen species (ROS) ของ B cell ในผู้ป่วยที่พื้นตัวมีการเพิ่มขึ้น ซึ่งบ่งชี้ถึงเมตาบอลิซึมของเซลล์ที่เพิ่มสูงขึ้นของ B cell ในผู้ป่วยที่พื้นตัว การศึกษาวิจัยก่อนหน้านี้ได้รายงานว่า การเปลี่ยนแปลงของสารเมตาบอลิซึมและไขมันมีการแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ที่ชัดเจนกับการดำเนินไปของโรคในผู้ป่วยโควิด 19 เหล่านี้ ซึ่งทำให้น่าเชื่อถือได้ว่าการพัฒนาของโรคโควิด 19 ส่งผลกระทบต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมทั้งหมดในร่างกายผู้ป่วย [825](#) ที่น่าสนใจก็คือการแสดงออกของโปรตีน CD19 ได้รับการกู้คืน (rescued) เป็นบางส่วนในผู้ป่วยที่พื้นตัวโดยการใช้สารกำจัดความไม่บริสุทธิ์สำหรับสาร reactive oxygen species (ROS scavenger) คือ N-Acetyl Cysteine (NAC) เราได้แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มขึ้นของภาวะเมตาบอลิซึมเป็นสาเหตุให้เกิดการแสดงออกที่ลดลงของตัวควบคุมภูมิคุ้มกันคือโปรตีน CD19 ซึ่งมีความสำคัญและภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องในผู้ป่วยที่พื้นตัว นอกจากนี้เรายังพบว่าการแสดงออกของโปรตีน CD19 ก็มีการลดลงเช่นเดียวกันในม้ามของหนูที่ติดเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 เราสามารถกล่าวได้ว่า การแสดงออกของโปรตีน CD19 ก็อาจจะมีการลดลงในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อนี้ด้วยเช่นกัน อาจจะมีควมน่าสนใจในการตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน CD19 ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อเล็กน้อยและที่ติดเชื้อรุนแรงรวมทั้งภาวะเมตาบอลิซึมของ B cells นอกจากนี้สหสัมพันธ์ (correlation) ระหว่างการแสดงออกของโปรตีน CD19 และภาวะเมตาบอลิซึมต่าง ๆ กันของ B cell ก็เป็นสิ่งที่คุ้มค่าในการติดตามต่อไป ที่น่าสนใจมากกว่านั้นก็คือสหสัมพันธ์ (correlation) ระหว่างสาร reactive oxygen species (ROS) ที่เพิ่มขึ้นใน B cell ซึ่งผู้กั้นการแสดงออกของโปรตีน CD19 กับการส่งสัญญาณของ B Cell Receptor ซึ่งอาจจะช่วยแก้ไขเยียวภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องในผู้ป่วยที่พื้นตัว ไม่เป็นที่ทราบว่าคุณป่วยที่พื้นตัวซึ่งมีการแสดงออกของโปรตีน CD19 ลดลงมีความอ่อนแอต่อการติดเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ซ้ำมากขึ้นหรือไม่ ถ้าหากเป็นเช่นนั้นจริงก็อาจจะมีการใช้ตัวควบคุมเมตาบอลิซึมอย่างเช่น N-Acetyl Cysteine (NAC) ในทางคลินิกที่มีศักยภาพในการป้องกันการติดเชื้อเป็นครั้งที่สองของผู้ป่วยที่พื้นตัว

ถึงแม้ว่าเราพบการแสดงออกของโปรตีน CD19 ที่ลดลงแต่ระดับของ CD19 mRNA ก็ไม่มีการเปลี่ยนแปลงใน B cell ของผู้ป่วยที่พื้นตัว ซึ่งบ่งชี้ว่าการติดเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 อาจจะทำให้ระดับของโปรตีน CD19 ลดลงในระหว่างการแปลรหัสหลังการถอดรหัส (post-transcriptional translation) เรายังได้ตรวจสอบโมเลกุลมากมายในวิถีการส่งสัญญาณของ B Cell Receptor (BCR signaling pathway) จากการทำ RNA-Sequencing แต่ก็ไม่พบความแตกต่างของ CD19 mRNA และโมเลกุลในวิถีการส่งสัญญาณของ B Cell Receptor ระหว่างกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดีและกลุ่มผู้ป่วยนั่นคือเหตุผลที่ว่าเพราะเหตุใดวิถีการส่งสัญญาณของ B Cell Receptor จึงไม่ปรากฏในวิถีการส่งสัญญาณ KEGG ที่มีการเพิ่มขึ้น ข้อมูลโอมิกส์เมื่อเร็ว ๆ นี้ได้รับการวิเคราะห์สำหรับ B cell ที่ไม่ได้รับการกระตุ้น แต่อย่างไรก็ตามผลที่ได้จากการทดลองกับ B cell ในหลอดทดลองก็มีการแสดงให้เห็นเมื่อ B cell ได้รับการกระตุ้นจาก F(ab')₂-anti-human Ig (M + G) ดังนั้นจึงดูเหมือนว่าข้อมูลโอมิกส์ไม่สอดคล้องเข้ากันอย่างมีประสิทธิภาพกับผลที่ได้จากการทดลองกับ B cell ในหลอดทดลอง มีความน่าสนใจในการวิเคราะห์ข้อมูลโอมิกส์จาก B cell ที่ได้รับการกระตุ้นจาก F(ab')₂-anti-human Ig (M + G)

การติดเชื้อจากแบคทีเรียและเชื้อราเป็นภาวะแทรกซ้อนปกติทั่ว ๆ ไปในผู้ป่วยที่มีภาวะปอดบวมจากไวรัสและนำไปสู่อัตราการเสียชีวิตที่เพิ่มสูงขึ้น การวิเคราะห์คุณสมบัติในการส่งสัญญาณของ B cell ในผู้ป่วยโควิด 19 น่าจะช่วยให้เข้าใจการประเมินว่าการติดเชื้อโควิด 19 ทำให้ผู้ป่วยอ่อนแอต่อการเจ็บป่วยด้วยโรคอื่น ๆ มากขึ้นหรือไม่ นอกจากนี้แล้วความเข้าใจที่ดีขึ้นเกี่ยวกับการวัดความผิดปกติทางด้านเมตาบอลิซึมที่สังเกตพบในเซลล์ของผู้ป่วยมีผลต่อการส่งสัญญาณของ B cell อย่างไรอาจจะสามารถเป็นแรงบันดาลใจให้มีการพัฒนาวิธีการรักษาใหม่ ๆ ที่มุ่งเป้าไปที่วิถีเมตาบอลิซึมที่จำเพาะ สารประกอบต่าง ๆ ที่เปลี่ยนแปลงเมตาบอลิซึมของเซลล์และภาวะโรคอ้วนได้รับการทดสอบในขณะนี้ ทั้งในขั้นก่อนการศึกษาวินิจฉัยทางคลินิกและในขั้นการศึกษาวินิจฉัยทางคลินิก [26-27-28](#) เพื่อรักษาความผิดปกติโรคภูมิคุ้มกันตนเอง และอาจจะสามารถใช้ประโยชน์ในการลดการตอบสนองของภูมิคุ้มกันที่มากเกินไปในระหว่างการติดเชื้อไวรัสได้

เครื่องมือและวิธีการ (Materials and methods)

ผู้ป่วยและการเก็บเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear ซึ่งประกอบด้วย lymphocytes และ monocyte จากเลือดของมนุษย์ (Patients and PBMCs collection) ผู้ป่วยโรคโควิด 19 ได้รับการสรรหาจากโรงพยาบาลกลางแห่งเมืองหูอัน ในประเทศจีน ผู้ป่วยเหล่านี้สอดคล้องเป็นไปตามเกณฑ์การตรวจวินิจฉัยตามฉบับพิมพ์ครั้งที่ 5 ของแนวทางการตรวจวินิจฉัยและการบำบัดรักษาโรคโควิด 19 ซึ่งกำหนดโดยคณะกรรมการสุขภาพแห่งชาติของประเทศจีน และผู้ป่วยเหล่านี้ได้รับการปล่อยตัวออกจากโรงพยาบาลหลังจากการตรวจหากรดนิวคลีอิกของเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 โดยวิธี RT-PCR มีผลเป็นลบ 2 ครั้งติดต่อกัน อาสาสมัครซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดีซึ่งมีผลการตรวจหากรดนิวคลีอิกของเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 โดยวิธี RT-PCR เป็นลบและมีแอนติบอดีทั้ง IgM และ IgG จำเพาะก็ได้รับการสรรหาจากโรงพยาบาลกลางแห่งเมืองหูอัน ในประเทศจีน เช่นเดียวกัน มีการเก็บตัวอย่างเลือดจากการเจาะเลือดจากปลายนิ้วมือของผู้ป่วยที่ฟื้นตัวจากโควิด 19 (10–12 สัปดาห์หลังจากการตรวจวินิจฉัยครั้งแรกสุด) และของกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดี เซลล์ peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) ได้รับการเพาะแยกเซลล์โดยใช้วิธี Ficoll (GE Ficoll-Paque PLUS, 17144002) ตามขั้นตอนปฏิบัติมาตรฐาน cell viability ในแต่ละตัวอย่างมีค่าสูงเกิน 85% ตัวอย่างพลาสมาได้รับการจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80°C เอกสารแสดงความยินยอมโดยมีการบอกกล่าวได้รับจากอาสาสมัครทุกคน โดยที่มีการอนุมัติเห็นชอบจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมแห่งมหาวิทยาลัย Huazhong University of Science and Technology

ซาร์สโคโรนาไวรัส 2 การเพาะเลี้ยงเซลล์ และการไทเทรตไวรัส (SARS-CoV-2, cell culture, and virus titrations)

เชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 (IVCAS 6.7512) ได้รับและเพาะแยกเชื้อจาก bronchoalveolar lavage fluid ที่เก็บตัวอย่างจากผู้ป่วยโควิด 19 เซลล์ Vero E6 (ATCC® CRL-1586™) ถูกใช้ในการ propagate เชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด DMEM ซึ่งมี 10% FBS, 1 mM L-glutamine รวมทั้ง 1% streptomycin-penicillin และเพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C ใน 5% CO_2 ส่วนที่เป็น cell supernatant ได้รับการปั่นแยก

และเก็บเกี่ยวในวันที่ 3 หลังจากการทำให้ติดเชื้อ เซลล์ Vero E6 ได้รับการ incubate กับ cell supernatant ที่มีการเจือจาง 10-fold serial dilutions และในหนึ่งชั่วโมงต่อมา medium ถูก drop และได้รับการแทนที่ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด DMEM ตัวใหม่ซึ่งได้รับการเสริมด้วย 2% FBS, 1 mM L-glutamine, และ 1% streptomycin–penicillin 3 วันหลังจากการ inoculation และ cytopathic effect (CPE) ได้รับการให้คะแนนและค่า TCID₅₀ ได้รับการคำนวณตามที่อธิบายมาก่อนหน้านี้²⁹

หนูและการทำให้ติดเชื้อ (Mice and infection)

หนูที่ได้รับการดัดแปลงพันธุกรรมซึ่งมีโปรตีน ACE2 ของมนุษย์ (hACE2) (คือหนู HFH4-hACE2) ที่มีภูมิหลังทางพันธุกรรมหลากหลายผสมกัน (C3H, C57BL/6) หนูเหล่านี้ได้รับการบริจาตมาจากห้องปฏิบัติการ Z. Shi's laboratory ตามที่ได้อธิบายมาก่อนหน้านี้³⁰⁻³¹

หนูได้รับการวางยาสลบโดยใช้ tribromoethanol (250 mg/kg) และต่อจากนั้นก็ได้รับการ inoculate ทางรูจมูกโดยใช้ 3×10^4 TCID₅₀ SARS-CoV-2 ใน 50 μ l DMEM สำหรับหนูแต่ละตัวตามที่ได้อธิบายมาก่อนหน้านี้³¹ หนูในกลุ่มจำลอง (mock group) ได้รับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด DMEM ในปริมาณที่เทียบเท่ากัน หนูได้รับการทำการุณยฆาตในวันที่ 7 หลังจากการทำให้ติดเชื้อและม้ามของหนูได้รับการเก็บเกี่ยว การทำให้ติดเชื้อไวรัสดำเนินการในห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุลระดับ 3 (BSL-3) ตามแนวทางการปฏิบัติของคณะกรรมการจริยธรรมในการดูแลสัตว์ทดลองและการทดลองในสัตว์ของสถาบัน (Institutional Animal Care and Ethics Committee of Animal Experimentation) และคณะกรรมการพิจารณาด้านจริยธรรมของสถาบันไวรัสวิทยาหวู่ฮั่น (Institutional Review Board of the Wuhan Institute of Virology) CAS (ethics number WIVA05202003)

การวิเคราะห์เซลล์โดยเทคนิค Flow cytometry

PBMCs จากผู้ป่วยโควิด 19 ที่พื้นผิวและจากอาสาสมัครกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดีได้รับการย้อม (stain) กับแอนติบอดีจำเพาะดังต่อไปนี้ : FITC-anti-CD19 (302206, Biolegend), Pacific Blue-anti-CD38 (356628, Biolegend), PE-anti-CD24 (311106, Biolegend), Alexa Fluor 647 anti-CD27 (302812, Biolegend), และ Brilliant Violet 510-anti-IgD (348220, Biolegend) สำหรับการวิเคราะห์ transformation ของ B cell PBMCs จากผู้ป่วยโควิด 19 ที่พื้นผิวและจากอาสาสมัครกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดีได้รับการ incubate ใน complete medium ที่มี 10 μ g/ml biotin-F(ab')₂ anti-human Ig(M + G) (109-066-127, Jackson) ใน 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เซลล์ได้รับการเก็บรวบรวมและย้อมตามที่อธิบายมาก่อนหน้านี้ on ice เป็นเวลา 30 นาที หลังจากถูกล้าง 2 ครั้งโดยใช้สารละลาย PBS

ตัวอย่างได้รับการเก็บรวบรวมและวิเคราะห์โดยเครื่อง multicolor flow cytometer (Attune NxT, AFC2, ThermoFisher) ข้อมูลได้รับการวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม FlowJo software (TreeStar, USA)

การยับยั้งสาร **reactive oxygen species** และ **phosflow** (ROS inhibition and phosflow)

PBMCs จากผู้ป่วยโควิด 19 ที่ฟื้นตัวและจากอาสาสมัครกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดีได้รับการ incubate ใน complete medium ที่มีหรือไม่มี 10 mM NAC (A7250-50G, Sigma-Aldrich) ใน 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เซลล์ได้รับการเก็บรวบรวมและเชื่อมกับ PE-anti-CD19 (302208, Biolegend) ต่อจากนั้นเซลล์ได้รับการ incubate ด้วย 10 µg/ml biotin-F(ab')₂ anti-human Ig(M + G) on ice เป็นเวลา 30 นาที ตามด้วย 20 µg/ml streptavidin on ice เป็นเวลา 10 นาที และต่อจากนั้น activate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 5 นาที หลังจากทำให้คงสภาพ (fix) ด้วย 4% paraformaldehyde แล้วเซลล์ก็ถูกทำให้เป็นรูหรือเปิดช่องว่างของเซลล์เมมเบรน (permeabilize) ด้วย 0.05% saponin (S4521-10G, Sigma-Aldrich) และย้อมด้วย anti-pBtk (ab52192, Abcam, USA) ตามด้วย Alexa Fluor 647 goat anti-rabbit IgG (A-21245, ThermoFisher, USA) ตัวอย่างได้รับการวิเคราะห์โดยเครื่อง flow cytometer

การติดตามโปรตีนโดยเทคนิควิธี **Western blot**

PBMCs จากผู้ป่วยโควิด 19 ที่ฟื้นตัวและจากอาสาสมัครกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดีได้รับการ incubate ด้วย 10 µg/ml biotin-F(ab')₂ anti-human Ig(M + G) on ice เป็นเวลา 30 นาที และ 20 µg/ml streptavidin on ice เป็นเวลา 10 นาที และต่อจากนั้น activate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลาตามที่ระบุ Cell lysates ถูกใช้สำหรับการทำ electrophoresis ใน SDS-polyacrylamide gel และได้รับการ electrotransfer เข้าสู่ nitrocellulose membrane และต่อจากนั้นได้รับการ probe ด้วยแอนติบอดีจำเพาะต่อไปนี้เป็น anti-pCD19 (Cat# 3571S, Cell Signaling Technology, USA), anti-CD19 (Cat# 90176, Cell Signaling Technology, USA), anti-pBtk (Cat# ab52192, Abcam, USA), anti-Btk (Cat# 8547S, Cell Signaling Technology, USA), anti-pPI3K (Cat# 4228S, Cell Signaling Technology, USA), anti-pAkt (Cat# 4060L, Cell Signaling Technology, USA), anti-pFoxO1 (Cat# 9461S, Cell Signaling Technology, USA), anti-pmTOR (Cat# 5536S, Cell Signaling Technology, USA), และ anti-pS6 (Cat# 4856S, Cell Signaling Technology, USA) หลังจาก incubate กับแอนติบอดีทุติยภูมิที่เกี่ยวข้องแล้วจะเกิดปฏิกิริยาทางอิมมูโนโลยีให้เห็นเป็นแถบซึ่งสามารถตรวจจับ (capture) ได้โดยเครื่อง ChemiDoc XRS + imaging systems (Bio-Rad) β-actin หรือ GAPDH ถูกใช้เป็น loading control

กล้องจุลทรรศน์ชนิด **Confocal and total internal reflection fluorescence microscope (TIRFm)**

สำหรับการวิเคราะห์เซลล์ด้วยเทคนิค confocal analysis เซลล์ B ที่ได้รับการทำให้บริสุทธิ์จากผู้ป่วยโควิด 19 ที่พื้นผิว และจากอาสาสมัครกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดีได้รับการย้อมด้วย 10 µg/ml Alexa Fluor 594-F(ab')₂ anti-human Ig(M + G) (109-586-127, Jackson) (sAg) on ice เป็นเวลา 30 นาทีและ activate เป็นเวลา 0, 5, 10, และ 30 นาทีที่อุณหภูมิ 37 °C หลังจากการกระตุ้น B cell ถูกทำให้คงสภาพ (fix) ด้วย 4% paraformaldehyde และทำให้เซลล์เป็นรูหรือเปิดช่องว่างของเซลล์เมมเบรน (permeabilize) ด้วย 0.05% saponin (S4521-10G, Sigma-Aldrich) และต่อจากนั้นก็ย้อมด้วย AF405-ER-Tracker dyes (E12353, Invitrogen, USA) และ AF647-probes for mitochondria (M7512, Invitrogen, USA) ภาพ (image) ถูกตรวจจับ (capture) โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิด confocal microscope (Nikon) ที่ใช้แสงเลเซอร์ที่มีความยาวคลื่นขนาด 405, 488, และ 546 นาโนเมตร ค่า Mean Fluorescence Intensity (MFI) และ colocalizations ได้รับการวัดโดยใช้ NIS-elements AR 5.01

สำหรับการวิเคราะห์เซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด Confocal and total internal reflection fluorescence microscope (TIRFm) เซลล์ B ใน PBMCs จากผู้ป่วยโควิด 19 ที่พื้นผิวและจากอาสาสมัครกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดีได้รับการ activate ด้วย 10 µg/ml AF546-mB-Fab'-anti-Ig ที่โยงกับชั้นไขมันที่เรียงตัวกันสองชั้น (lipid bilayer) ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นระยะเวลาต่าง ๆ กันเช่นที่กล่าวมานี้ [32](#) ต่อจากนั้นเซลล์ถูกทำให้คงสภาพ (fix) ด้วย 4% paraformaldehyde และทำให้เป็นรูหรือเปิดช่องว่างของเซลล์เมมเบรน (permeabilize) ด้วย 0.5% saponin แล้วจึงย้อมด้วย Alexa Fluor 647 anti-CD27 (302812, Biolegend, USA), anti-pY (05-321, Millipore, Merck, USA), anti-pCD19 (3571S, Cell Signaling Technology, USA), และ pSHIP (3941S, Cell Signaling Technology, USA) ตามด้วย Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (715-165-151, Jackson, USA) และ Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (A-11008, ThermoFisher, USA) ภาพ (image) ได้รับการตรวจจับ (capture) โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Confocal and total internal reflection fluorescence microscope - TIRFm (Nikon) และ interference reflection microscopy (IRM) ข้อมูลได้รับการวิเคราะห์โดยใช้ซอฟต์แวร์ NIS-elements AR 5.01

เทคนิควิธี **Immunofluorescence**

ม้ามของหนู HFH4-hACE2 ไม่ว่าได้รับการทำให้ติดเชื้อหรือไม่ก็ตามถูกทำให้คงสภาพ (fix) ด้วย 4% paraformaldehyde และฝัง (embed) ในพาราฟิน และจากนั้นถูกตัดออกเป็นชิ้น ๆ ขนาด 3.5 มิลลิเมตร สำหรับการตรวจด้วยเทคนิค immunofluorescence ชิ้นส่วนของม้ามถูกล้างเอาพาราฟินออก (de-paraffinize) และ

rehydrate ตามด้วยการคืนสภาพแอนติเจนโดยใช้ความร้อน (heat-induced antigen retrieval) ด้วย EDTA pH = 8.0 เป็นเวลา 15 นาที ต่อจากนั้นตัวอย่างถูกล้างด้วย PBS ซึ่งมี 0.02% Triton X-100 และ block ด้วย 5% BSA ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ต่อจากนั้นย้อมด้วย FITC-CD19 (1:20; Cat# 557398, BD Bioscience) เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง และสุดท้ายเติมสารต้านการซีดจาง (antifade reagent) ลงไปเพื่อป้องกันการลดความเข้มของการเรืองแสง (fluorescence quenching) ภาพ (image) ได้รับการตรวจจับ (capture) โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิด confocal microscope (Nikon) และข้อมูลได้รับการวิเคราะห์โดยใช้ซอฟต์แวร์ NIS-elements AR

การวิเคราะห์ผสมผสานระหว่างด้านการถอดรหัสพันธุกรรมและด้านเมตาบอลิซึมในเซลล์ B และเซรัม (Combined transcriptional and metabolic analysis in B cells and serum)

สำหรับการวิเคราะห์ด้านการถอดรหัสพันธุกรรม (transcriptional analysis) เซลล์ B ใน PBMCs จากอาสาสมัครกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดี ($n = 4$) และจากผู้ป่วยโควิด 19 ที่พื้นตัว ($n = 4$) ได้รับการทำให้บริสุทธิ์โดย human CD19 MicroBeads (130-050-301, Miltenyi) ตามโปรโตคอลมาตรฐานในการวิเคราะห์ RNA sequence สำหรับการวิเคราะห์ด้านเมตาบอลิซึมตัวอย่างเซรัมปริมาณ 50 ไมโครลิตร ($n = 6$ สำหรับอาสาสมัครกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดี และ $n = 6$ สำหรับกลุ่มผู้ป่วย) ได้รับการละลาย (thaw) on ice และเมตาบอลิไตต์ได้รับการสกัดโดยวิธีการมาตรฐานที่ปรับปรุงให้เหมาะกับวัตถุประสงค์³³ กล่าวโดยสรุปคือเมทานอล (ice-cold methanol) 3 ส่วน (โดยปริมาตร) ถูกผสมรวมกันกับเซรัม 1 ส่วน (โดยปริมาตร) หลังจากปั่นหมุน (whirl) ส่วนผสมเป็นเวลา 3 นาทีและปั่นแยก (centrifuge) ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที ส่วนที่เป็น supernatant ถูกเก็บรวบรวมและปั่นแยก (centrifuge) ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที และสุดท้ายเก็บรวบรวมส่วนที่เป็น supernatant อีกครั้งเพื่อทำการวิเคราะห์โดยใช้ระบบ LC-ESI-MS/MS analysis สารสกัดจากตัวอย่างได้รับการวิเคราะห์โดยใช้ระบบ LC-ESI-MS/MS system (UPLC, Shim-pack UFLC SHIMADZU CBM A system, <https://www.shimadzu.com/>; MS, QTRAP® System, <https://sciex.com/>) ตามโปรโตคอลมาตรฐาน

เครื่องสเปกโตรมิเตอร์ชนิด triple quadrupole-linear ion trap mass spectrometer (QTRAP) ถูกใช้ในการทำ LIT and triple quadrupole (QQQ) scans ซึ่งทำงานและควบคุมโดยซอฟต์แวร์ Analyst 1.6.3 software (Sciex) ตามพารามิเตอร์มาตรฐาน หลังจากการปรับจูนเครื่องและการสอบเทียบมวล (mass calibration) แล้ว MRM transitions ที่จำเพาะได้รับการทดสอบตามเมตาบอลิไตต์ที่ elute ภายใน period นี้

ข้อมูลดิบทั้งหมดสำหรับ LC-MS/MS ได้รับการ deposit ใน iProX ภายใต้หมายเลข accession number: PXD018307 สำหรับการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principal component analysis – PCA) ที่เป็นชนิด unsupervised ข้อมูลที่เป็น unit variance scaled data ได้รับการวิเคราะห์โดยโปรแกรม statistics function prcomp within R (www.r-project.org) สำหรับการวิเคราะห์ชนิด HCA (hierarchical cluster analysis) ผลที่ได้ของเมตาบอลิต์แสดงเป็นแผนภูมิความร้อน (heatmap) และ PCC (Pearson correlation coefficients) ระหว่างตัวอย่างต่าง ๆ ได้รับการคำนวณโดยโปรแกรม cor function in R (www.r-project.org) และแสดงเป็นแผนภูมิความร้อน (heatmap) สำหรับการวิเคราะห์ชนิด HCA (hierarchical cluster analysis) สเปกตรัมสีถูกใช้ในการแสดงความเข้มของสัญญาณ (signal intensity) ที่เป็นปกติของเมตาบอลิต์ (unit variance scaling) แบบจำลองการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค orthogonal projection to latent structure discriminant analysis (OPLS-DA) ถูกใช้ในการระบุชี้หาความแตกต่างของ metabolic profiles ระหว่างกลุ่มอย่างมากที่สุด สำหรับการวิเคราะห์เมตาบอลิต์ต่าง ๆ กันที่คัดเลือกเมตาบอลิต์ที่ได้รับการควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (significantly regulated metabolites) ระหว่างกลุ่มกำหนดโดย $VIP \geq 1$ และ absolute Log2FC (fold change) ≥ 1 ค่า VIP values ได้มาจากผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี OPLS-DA ซึ่งก็มี score plots และ permutation plots เกิดจากการใช้โปรแกรม R package MetaboAnalystR ข้อมูลเป็นการแปลงโดยใช้ค่าล็อก (log transform) (คือ log2) และค่าเฉลี่ยอยู่กึ่งกลางก่อนหน้าการวิเคราะห์ด้วยวิธี OPLS-DA การทดสอบการเรียงสับเปลี่ยน (permutation test) (จำนวน 200 permutations) ถูกใช้เพื่อหลีกเลี่ยง overfitting สุดท้ายสำหรับการวิเคราะห์การเพิ่มวิถี (pathway enrichment analysis) มีการใช้ฐานข้อมูล KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) database (<http://www.genome.jp/kegg/>) เพื่อหาวิถีการถ่ายโอนสัญญาณเมตาบอลิซึมที่มีการเพิ่มอย่างสูง (highly enriched metabolic signal transduction pathways) ในเมตาบอลิต์ต่าง ๆ กันระหว่าง 2 กลุ่ม ความแตกต่างระหว่าง 2 กลุ่มระบุโดยการทำ hypergeometric test's และค่า $p\text{-value} < 0.05$ ได้รับการพิจารณาว่าเป็นวิถีที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ (significantly changing pathways)

การตรวจหาสาร reactive oxygen species (ROS detection)

การระบุปริมาณของสาร cysteine และ glutamic

ปริมาณของสาร cysteine และ glutamic ในเซรัมได้รับการระบุโดยใช้ชุดตรวจ cysteine assay kit (BC0185, Beijing Solarbio Science & Technology Co., Ltd, China) และชุดตรวจ glutamic assay kit (BC1585, Beijing Solarbio Science & Technology Co., Ltd, China) ตามลำดับ

การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscopy - TEM)

B cell ที่ได้รับการทำให้บริสุทธิ์จาก PBMCs ของผู้ป่วยโควิด 19 ที่พื้นผิวและของอาสาสมัครกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดีได้รับการทำให้คงสภาพ (fix) ใน 2.5% glutaraldehyde ในสารละลาย 0.1 M phosphate buffer เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 °C ตัวอย่างได้รับการปั่นแยก (centrifuge) และทำให้คงสภาพ (post-fix) ใน 2% OsO₄ ในสารละลาย cacodylate buffer ที่มี pH 7.3 เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 °C ตัวอย่างได้รับการ dehydrate ที่ละชั้นผ่านเอทานอล (30%, 50%, 70%, 90%, 100%) และฝัง (embed) ในระบบ epon ส่วนต่าง ๆ ถูกตัดโดยเครื่อง ultramicrotome (UC7 ultramicrotome; Leica) และวางบน Formvar-coated slot grids และส่วนต่าง ๆ ได้รับการย้อมด้วยสารเลดไนเตรต ส่วนต่าง ๆ ถูกตรวจดูผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (H-7000FA, HITACHI, Japan) และภาพ (image) ได้รับการตรวจด้วยเทคนิควิธี Quantitative RT-PCR

B cell ที่ได้รับการทำให้บริสุทธิ์จาก PBMCs โดย human CD19 MicroBeads (130-050-301, Miltenyi) ถูกใช้ในการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในอาสาสมัครกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดีและผู้ป่วยโควิด 19 ที่พื้นผิว อาร์เอ็นเอในเซลล์ทั้งหมดสกัดโดยน้ำยา Trizol (15596026, ThermoFisher Scientific) และได้รับการถอดรหัสย้อนกลับเป็นดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ขึ้น (complementary DNA) โดยใช้ชุดน้ำยา PrimeScript RT Reagent Kit (RR047A, Takara) และระดับการแสดงออกได้รับการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง CFX96 Touch equipment (Bio-Rad) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ (primer sequence) มีดังต่อไปนี้:

โปรตีน *CD19*:

5' primer: tactatggcactggctgctg

3' primer: cacgttcccgtactggttct

เอนไซม์ *hexokinase 2 (HK2)*:

5' primer: tctatgccatccctgaggac

3' primer: tctctgccttccactccact

โปรตีน *solute carrier organic anion transporter family member 4A1 (SLCO4A1)*:

5' primer: gaagctgccaccttgtttg

3' primer: gctctggagctggctatctg

เอนไซม์ *serine dehydratase (SDS)*:

5' primer: aggccctagcgaagaacaac

3' primer: tcggagattcccctccagtt

ยีน *collagen type I alpha 1 chain (COL1A1)*:

5' primer: gtgctaaagggtgccaatggt

3' primer: ctctcgctttccttctct

ยีน *GAPDH*:

5' primer: acccagaagactgtggatgg

3' primer: ttctagacggcaggtcaggt

การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical analysis)

การทดสอบชนิด unpaired two-tailed Student's *t*-test หรือ paired two-tailed Student's *t*-test ถูกใช้ในการเปรียบเทียบระหว่าง 2 กลุ่ม ความแตกต่างทางสถิติได้รับการวิเคราะห์โดยใช้ซอฟต์แวร์ GraphPad Prism 8 Software (San Diego, CA) ข้อมูลนำเสนอเป็นค่าเฉลี่ยเลขคณิต (mean) และความกระเจิงของค่าเฉลี่ยเลขคณิต (standard error of mean - SEM) ความแตกต่างได้รับการพิจารณาว่ามีความสำคัญเมื่อค่า *p* ต่ำกว่า 0.05. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001, *****p* < 0.0001.

