

ฉบับแปลไทย (Thai Translations)

Persistent clotting protein pathology in Long COVID/Post-Acute Sequelae of COVID-19 (PASC) is accompanied by increased levels of antiplasmin

<https://discordapp.com/channels/@me/876807291582705674/929283477571002429>

พยาธิวิทยาที่เรื้อรังของโปรตีนที่เป็นปัจจัยสำหรับการแข็งตัวของเลือดในภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 มาพร้อมกับระดับที่เพิ่มสูงขึ้นของแอนติพลาสมิน

บทคัดย่อ (Abstract)

ภูมิหลัง (Background)

การติดเชื้อซึ่งได้รับการกระตุ้นจากไวรัสโคโรนาสายพันธุ์กลุ่มอาการทางเดินหายใจเฉียบพลันรุนแรง (SARS-CoV-2) ซึ่งเป็นสาเหตุของของโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ 2019 (COVID-19) มีลักษณะเด่นคือพยาธิวิทยาคลินิกที่เฉียบพลัน (acute clinical pathologies) ซึ่งรวมถึงความผิดปกติต่าง ๆ ของการแข็งตัวของเลือด (coagulopathies) ซึ่งอาจจะมีภาวะของการแข็งตัวของเลือดง่ายกว่าปกติ (hypercoagulation) และการกระตุ้นที่มากผิดปกติของเกล็ดเลือด (platelet hyperactivation) รวมด้วย เมื่อไม่นานมานี้มีการสังเกตพบฟิโนไทป์ชนิดใหม่ของโควิด 19 ในผู้ป่วยภายหลังจากที่ผู้ป่วยเหล่านี้ได้มีการฟื้นตัวอย่างเห็นได้ชัดจากอาการโควิด 19 เฉียบพลัน กลุ่มอาการใหม่ที่ว่าเป็นที่รู้จักกันโดยทั่วไปว่าเป็นภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว (long COVID)/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (Post-Acute Sequelae of COVID-19 หรือ PASC) ในที่นี้เราขอเรียกมันว่าภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC) อาการที่ยังค้างอยู่ก็ยังอยู่ยาวนานได้มากถึง 6 เดือน (หรือนานกว่านั้น) หลังจากการติดเชื้อเฉียบพลัน ซึ่งผู้ป่วยที่รอดชีวิตจากโรคโควิด 19 มักจะบ่นว่ามีอาการเหนื่อยล้า กล้ามเนื้ออ่อนแรง หายใจเร็วและแรง หลับยาก และกระวนกระวายวิตกกังวล หรือหุดหู่ซึมเศร้าอยู่ซ้ำ ๆ จากการที่ลิ่มเลือดสามารถอุดตันเส้นเลือดฝอยขนาดเล็ก ซึ่งทำให้เกิดการยับยั้งขัดขวางการแลกเปลี่ยนออกซิเจน ในการศึกษาวิจัยนี้เราจึงได้ศึกษาว่าอาการต่าง ๆ ที่ยังค้างอยู่นี้ซึ่งมีการแสดงออกในผู้ที่มีภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC) อาจจะมีสาเหตุมาจากการที่มีลิ่มเลือดแข็งตัวขนาดเล็กในพลาสมา (plasma microclots) ในกระแสเลือดซึ่งยับยั้งขัดขวางกระบวนการสลายลิ่มเลือด (fibrinolysis) อยู่หรือไม่

วิธีการ (Methods)

เราได้ใช้เทคนิควิธีการต่าง ๆ รวมถึงโปรตีนอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์และ fluorescence microscopy เพื่อศึกษาตัวอย่างพลาสมาจากผู้ที่มีสุขภาพดี ผู้ที่มีภาวะโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (T2DM) ผู้ป่วยโควิด 19 เฉียบพลัน และผู้ที่มีภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC)

ผลที่ได้จากการศึกษาวิจัย (Results)

เราแสดงให้เห็นว่าตัวอย่างพลาสมาจากผู้ที่มีภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC) ยังคงมีสิ่งตกค้างสะสมที่ผิดปกติขนาดใหญ่หรืออะไมลอยด์ (amyloid) หรือลิ่มเลือดแข็งตัวขนาดเล็ก (microclots) อยู่ นอกจากนี้เรายังแสดงให้เห็นว่าลิ่มเลือดแข็งตัวขนาดเล็กเหล่านี้ทั้งในตัวอย่างพลาสมาของผู้ป่วยโควิด 19 เฉียบพลัน และในตัวอย่างพลาสมาของผู้ที่มีภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 ล้วนมีการยับยั้งขัดขวางกระบวนการการสลายลิ่มเลือด (เมื่อเปรียบเทียบกับพลาสมาจากกลุ่ม controls และจากผู้ที่มีภาวะโรคเบาหวานชนิดที่ 2) แม้แต่หลังจากกระบวนการ trypsinisation แล้วก็ตาม หลังจากกระบวนการ trypsinization ครั้งที่ 2 สิ่งตกค้างสะสมที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ (ลิ่มเลือดแข็งตัวขนาดเล็ก) ได้ถูกทำให้ละลาย (solubilized) เราได้ตรวจพบโมเลกุลต่าง ๆ ที่ทำให้เกิดการอักเสบ (inflammatory molecules) ซึ่งมีการเพิ่มขึ้นเป็นอย่างมากทั้งใน supernatant และที่ติดอยู่ในสิ่งตกค้างสะสมที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ (pellet deposits) ที่ถูกทำให้ละลายของผู้ป่วยโควิด 19 เฉียบพลันและของผู้ที่มีภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC) เมื่อเปรียบเทียบกับในปริมาตรที่เทียบเท่ากันของของเหลวที่ได้รับการย่อยอย่างเต็มที่ (fully digested fluid) ของตัวอย่างจากกลุ่ม control และตัวอย่างจากผู้ที่มีภาวะโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (T2DM) ที่น่าสนใจเป็นพิเศษคือการเพิ่มสูงขึ้นเป็นอย่างมากของ $\alpha(2)$ -antiplasmin ($\alpha 2AP$) และ fibrinogen chains ต่าง ๆ รวมทั้ง Serum Amyloid A (SAA) ซึ่งติดค้างอยู่ในสิ่งตกค้างสะสมที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ (pellet deposits) ที่ถูกทำให้ละลายซึ่งยับยั้งขัดขวางกระบวนการการสลายของลิ่มเลือด (fibrinolysis)

สรุปผลการศึกษาวิจัย (Conclusions)

พยาธิวิทยาของการแข็งตัวของเลือดทั้งในการติดเชื้อโควิด 19 เฉียบพลันและในภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC) อาจจะได้รับประโยชน์จากการทำตามวิธีการในการบำบัดรักษาด้วยการยับยั้งการแข็งตัวของเลือด (anticoagulation therapy) ที่ต่อเนื่อง ในการส่งเสริมสนับสนุนการทำงานของระบบกระบวนการการสลายลิ่มเลือด

บทนำ (Introduction)

การติดเชื้อที่ได้รับการกระตุ้นจากไวรัสโคโรนาสายพันธุ์กลุ่มอาการทางเดินหายใจเฉียบพลันรุนแรง (SARS-CoV-2) ซึ่งเป็นสาเหตุของของโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ 2019 (โควิด 19) มีลักษณะเด่นคือพยาธิวิทยาคลินิกที่เฉียบพลัน (acute clinical pathologies) ซึ่งรวมถึงความผิดปกติต่าง ๆ ของการแข็งตัวของเลือด (coagulopathies) ซึ่งอาจจะส่งผลให้เกิดภาวะเลือดออก (bleeding) และภาวะเกล็ดเลือดต่ำ (thrombocytopenia) การแข็งตัวของเลือดง่ายผิดปกติ (hypercoagulation) ภาวะลิ่มเลือดอุดตันในหลอดเลือดปอด (pulmonary intravascular coagulation) ภาวะลิ่มเลือดอุดตันในหลอดเลือดดำขนาดเล็ก (microangiopathy venous thromboembolism) หรือภาวะลิ่มเลือดอุดตันในหลอดเลือดแดงขนาดเล็ก (microangiopathy arterial thrombosis) [1,2,3,4,5,6,7,8,9] นอกจากนี้การติดเชื้อโควิด 19 เฉียบพลันยังมีลักษณะเด่นคือ inflammatory biomarkers ที่ผิดปกติในกระแสเลือด เกล็ดเลือดที่ได้รับการกระตุ้นมากเกินไป เซลล์เม็ดเลือดแดงที่ได้รับความเสียหาย และแนวโน้มที่มากมายของการเกิดภาวะลิ่มเลือดแข็งตัวขนาดเล็กในปอด [6, 8,9,10,11,12,13,14,15,16] ผู้ป่วยโควิด 19 เฉียบพลันอาจจะประสบกับภาวะเกล็ดเลือดต่ำ (thrombocytopenia) ซึ่งอาจจะนำไปสู่ภาวะเลือดแข็งตัวในหลอดเลือดแบบแพร่กระจาย (disseminated intravascular coagulation [DIC]) ซึ่งอันตรายถึงแก่ชีวิตได้ [17] ปัจจัยความเสี่ยงที่สนับสนุนให้เกิดภาวะเหล่านี้ได้ง่ายขึ้นหรือโรคร่วม (co-morbidities) ซึ่งก็อาจจะนำไปสู่การพยากรณ์โรคที่ไม่ดี (poor prognosis) ของโควิด 19 เฉียบพลันได้เช่นกัน ได้แก่ การมีภาวะโรคหัวใจและหลอดเลือด โรคเบาหวาน ภาวะความดันโลหิตสูง ภาวะโรคอ้วน [3, 8, 9, 18,19,20,21] รวมทั้งโรคมะเร็ง [22] ภาวะแทรกซ้อนต่าง ๆ อย่างเช่น การบาดเจ็บที่ตับ (liver injury) กลุ่มอาการหายใจลำบากเฉียบพลัน (acute respiratory distress syndrome [ARDS]) ภาวะติดเชื้อ (sepsis) การบาดเจ็บของกล้ามเนื้อหัวใจ (myocardial injury) ไตวาย (renal insufficiency) และกลุ่มอาการการทำงานของหลายอวัยวะ (Multiple Organ Dysfunction Syndrome [MODS]) เป็นอาการที่พบได้ทั่วไปเป็นปกติในผู้ป่วยโรคมะเร็งที่ติดเชื้อโควิด 19 [22] นอกจากนี้พลาสมาของผู้ป่วยโควิด 19 ก็ยังมีปริมาณที่มีนัยสำคัญของ amyloid clots ที่ถูกสร้างขึ้นมาก่อนแล้ว [6] และปรากฏการณ์นี้อาจจะเป็นตัวบ่งชี้ถึงการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี (poor prognosis)

เมื่อไม่นานมานี้มีการสังเกตพบฟิโนไทป์ชนิดใหม่ของโควิด 19 ในผู้ป่วยภายหลังจากการที่ผู้ป่วยเหล่านี้ได้มีการฟื้นตัวอย่างเห็นได้ชัดจากอาการโควิด 19 เฉียบพลัน กลุ่มอาการใหม่นี้เรียกขานกันปกติทั่วไปว่าภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว (Long COVID)/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (Post-Acute Sequelae of COVID-19 [PASC]) [23] เราใช้คำศัพท์ว่าภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC) ซึ่งอาจจะสามารถเกี่ยวข้องไปถึงผลสืบเนื่องและภาวะแทรกซ้อนทางการแพทย์อื่น ๆ ที่คงอยู่ได้นานนับสัปดาห์หรือเป็นเดือน ๆ หลังจากการฟื้นตัวจากการเจ็บป่วยเบื้องต้น (initial recovery) และอาจจะรวมถึงผลกระทบระยะยาวมากกว่า 50 อย่าง [24] ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC) แสดงให้เห็นถึงความคล้ายคลึงกันเป็นอย่างมากกับการเจ็บป่วยเรื้อรัง [23, 25,26,27] ซึ่งเป็นที่ทราบกันว่ามีความเกี่ยวข้องสัมพันธ์กันกับการติดเชื้อจากไวรัส อย่างเช่น กลุ่มอาการกล้ามเนื้ออักเสบเรื้อรัง (Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome [ME/CFS]) [28, 29] กลุ่มอาการหัวใจเต้นเร็วระหว่างเปลี่ยนท่า (postural orthostatic

tachycardia syndrome) [30] และกลุ่มอาการภูมิแพ้จากระบบภูมิคุ้มกันด้านทานโรคในร่างกายบกพร่อง (Mast Cell Activation Syndrome) [31, 32] มีการชี้ให้เห็นว่าการกระตุ้นของ mast cell ก็มีบทบาทสำคัญในภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC) ด้วยเช่นกัน อันเนื่องมาจากปฏิกิริยาการตอบสนองที่ผิดปกติ (atypical responses) ต่อไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 โดย mast cells ที่ทำหน้าที่ผิดปกติ [31]

มีการพบว่าอาการต่าง ๆ ที่ยังคงอยู่เนืองอยู่ได้นานถึง 6 เดือน (หรือยาวนานกว่านั้น) หลังการติดเชื้อเฉียบพลัน ซึ่งผู้ป่วยที่รอดชีวิตจากโรคโควิด 19 มักจะบ่นว่ามีอาการเหนื่อย ล้า กล้ามเนื้ออ่อนแรง หายใจเร็วและแรง หัวใจวาย และกระวนกระวายวิตกกังวล หรือหุดหู่ซึมเศร้าอยู่ซ้ำ ๆ [32] ผู้ป่วยที่มีอาการหนักจนรุนแรงในระหว่างที่เข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาลมีแนวโน้มที่จะมีความสามารถในการซึมซับแก๊สของปอดบกพร่องรุนแรง (severe impaired pulmonary diffusion capacities) และภาพวินิจฉัยทางรังสีวิทยาของทรวงอกที่ผิดปกติ (abnormal chest imaging manifestations) มากกว่า และเป็นประชากรกลุ่มเป้าหมายหลักในการทำ interventions เพื่อการฟื้นตัวในระยะยาว [32] แต่อย่างไรก็ตามมีการแสดงให้เห็นว่าประมาณ 32% ของผู้ป่วย (อาสาสมัคร) ที่รายงานว่ามีอาการเหล่านี้ในวันที่ 61 ขึ้นไปหลังจากการติดเชื้อก็ไม่มีอาการในระหว่างที่มีการตรวจหาเชื้อไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 เบื้องต้น [32] มีผู้ป่วยจำนวนมากที่มีการพัฒนาอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC) ด้วยเช่นกันหลังจากการติดเชื้อเล็กน้อย (mild infection) หรือติดเชื้อแต่ไม่มีอาการ (asymptomatic infection) ทั้ง ๆ ที่ไม่ได้รับการเข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาลแต่อย่างใด [33] บรรดานักวิจัยในประเทศอิตาลีได้พบว่า 87.4% ของผู้ป่วยโควิด 19 จำนวน 143 คนมีการรายงานอย่างน้อยหนึ่งอาการใน 60 วันหลังการติดเชื้อ และมีอยู่ 55% ที่มี 3 อาการหรือมากกว่านั้น ตามการศึกษาวินิจฉัยของพวกเขา [25] อาการที่พบได้มากที่สุดโดยทั่วไปได้แก่ : เหนื่อยล้าอ่อนแรง (53.1%) หายใจลำบาก (43.4%) ปวดข้อ (27.3%) และเจ็บหน้าอก (21.7%) ในสหราชอาณาจักรมีการศึกษาวิจัยในผู้ป่วยจำนวน 384 คน (อายุเฉลี่ยของผู้ป่วยเท่ากับ 59.9 ปี; 62% เป็นเพศชาย) ซึ่งได้รับการติดตามอาการเป็นเวลาเฉลี่ย (ค่ากลางมัชฐาน) 54 วันหลังจากได้รับการปล่อยตัวออกจากโรงพยาบาล พบว่า 53% มีการรายงานว่ามีอาการหายใจลำบากเรื้อรัง (persistent breathlessness) 34% มีอาการไอ (cough) 69% มีอาการเหนื่อยล้าอ่อนแรง (fatigue) และ 14.6% มีอาการหุดหู่ซึมเศร้า (depression) [34] ในบรรดาผู้ป่วยที่ได้รับการปล่อยตัวออกจากโรงพยาบาล ซึ่งเป็นผู้ที่มีดัชนีชี้วัดทางชีวภาพที่สูงขึ้น (elevated biomarkers) นี้ 30.1% และ 9.5% มีระดับของ D-dimer และ C reactive protein ตามลำดับสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง 38% ของภาพถ่ายรังสีทรวงอกยังคงมีความผิดปกติโดยที่ 9% มีการเสื่อมสภาพลง [34] ในการศึกษาวิจัยระดับโลกที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในปัจจุบันเกี่ยวกับประเด็นนี้ มีการสำรวจผู้ป่วยที่มีอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC) จำนวน 3,762 คนจาก 56 ประเทศ พบว่าเกือบครึ่งหนึ่งยังคงไม่สามารถทำงานเต็มเวลาได้ หลังจากผ่านไป 6 เดือนนับตั้งแต่มีการติดเชื้อ ส่วนใหญ่เนื่องมาจากมีอาการเหนื่อยล้าอ่อนแรง (fatigue) อาการอ่อนเพลียหลังการออกกำลังกาย (post-exertional malaise) และการสูญเสียความสามารถในการเรียนรู้ (cognitive dysfunction) เป็นหลัก [35]

ในการศึกษาวิจัยนี้เราศึกษาว่าเราสามารถพบโมเลกุลที่มีความผิดปกติ (dysregulated molecules) ในกระแสเลือดที่อาจจะเป็นสาเหตุของอาการต่าง ๆ ที่ยังค้างอยู่ในผู้ที่มีภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC) ได้หรือไม่ อาการเหล่านี้อาจจะมีสาเหตุมาจากการที่มีลิ่มเลือดแข็งตัวในพลาสมา (plasma clots) อยู่ในกระแสเลือดอย่างต่อเนื่องซึ่งยับยั้งขัดขวางกระบวนการการสลายของลิ่มเลือด (fibrinolysis) หรือไม่ ก่อนหน้านี้เราได้แสดงให้เห็นว่ามีสิ่งตกค้างสะสมของไฟบรินหรือไฟบริโนเจนที่ผิดปกติขนาดใหญ่หรืออะไมลอยด์ (amyloid) อยู่ในพลาสมาของผู้ป่วยโควิด 19 เฉียบพลัน [8, 9] ในการศึกษาวิจัยนี้เราแสดงให้เห็นว่าตัวอย่างพลาสมาจากผู้ที่มีภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC) ยังคงมีสิ่งตกค้างสะสมที่ผิดปกติขนาดใหญ่หรืออะไมลอยด์ (amyloid) อยู่ และสิ่งตกค้างสะสมเหล่านี้ไปยับยั้งขัดขวางกระบวนการการสลายของลิ่มเลือด (fibrinolysis) ได้เป็นอย่างมาก แม้แต่มีการย่อยโดยใช้ trypsin ด้วยวิธี 2 ขั้นตอนแล้วก็ตาม เราได้ใช้โปรติโอมิกส์เพื่อที่จะศึกษาการมีอยู่ของโปรตีนทั้งใน supernatant และในสิ่งตกค้างสะสมที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ (pellet deposits) ที่ติดอยู่ซึ่งถูกย่อยแล้ว (หลังจากการย่อยโปรตีนด้วย trypsin) สิ่งที่น่าสนใจเป็นพิเศษก็คือการเพิ่มสูงขึ้นอย่างมากของโมเลกุลที่ทำให้เกิดการอักเสบในระยะเฉียบพลัน Serum Amyloid A (SAA4) และ $\alpha(2)$ -antiplasmin ($\alpha 2AP$) ที่ติดค้างอยู่ในสิ่งตกค้างสะสมที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ (pellet deposits) ซึ่งยับยั้งขัดขวางกระบวนการการสลายลิ่มเลือด (fibrinolysis) ระบบ plasmin-antiplasmin มีบทบาทสำคัญเป็นอย่างมากในการแข็งตัวของเลือดและในกระบวนการการสลายลิ่มเลือด [36] Plasmin และ $\alpha 2AP$ เป็นปัจจัยหลักเบื้องต้นในการสลาย fibrin polymers อย่างมีการควบคุมเป็นปกติไปเป็น fragments ที่สามารถละลายได้ [36, 37]

เครื่องมือและวิธีการ (Materials and methods)

การรับรองทางจริยธรรม

การศึกษานี้ได้รับการรับรองทางจริยธรรมจาก Health Research Ethics Committee (HREC) of Stellenbosch University (South Africa) (reference: N19/03/043, project ID: 9521) วัตถุประสงค์ของการทดลอง ความเสี่ยง ตลอดจนรายละเอียดต่าง ๆ ได้รับการอธิบายให้แก่อาสาสมัคร และได้รับการยินยอมโดยมีการบอกกล่าว (informed consent) ก่อนการเก็บตัวอย่างเลือด ทางคณะผู้วิจัยได้ปฏิบัติตามแนวทางปฏิบัติด้านจริยธรรมการวิจัยและหลักการของปฏิญญาเฮลซิงกิ (Declaration of Helsinki) แนวทางปฏิบัติสำหรับการปฏิบัติทางคลินิกที่ดีแห่งแอฟริกาใต้ (South African Guidelines for Good Clinical Practice) และแนวทางปฏิบัติด้านจริยธรรมการวิจัยของสภาการวิจัยด้านการแพทย์ (Medical Research Council Ethical Guidelines for Research) อย่างเคร่งครัดตลอดระยะเวลาของการศึกษาวิจัยและสำหรับทุก ๆ โปรโตคอลในการศึกษาวิจัย

ข้อมูลทางด้านประชากรศาสตร์และข้อพิจารณาของกลุ่มตัวอย่าง

ตัวอย่างเลือดได้รับการจัดเก็บจากอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี ($N = 13$; เพศชาย 6 คน เพศหญิง 7 คน; อายุเฉลี่ยคือ 52.4 ± 4.8 ปี) เพื่อเป็นกลุ่ม controls อาสาสมัครที่มีสุขภาพดีเหล่านี้ต้องไม่เป็นผู้ที่สูบบุหรี่ หรือมีโรคหัวใจและหลอดเลือด หรือมีภาวะของการแข็งตัวของเลือด หรือเป็นผู้ที่อยู่ระหว่างการตั้งครรภ์ การให้นมบุตร หรือใช้ยาต้านการแข็งตัวของเลือด [38] ผู้ป่วยในการศึกษาวิจัยนี้ได้แก่ผู้ป่วยที่ได้รับการตรวจวินิจฉัยว่าเป็นโควิด 19 (ก่อนการบำบัดรักษา) ($N = 15$; เพศชาย 9 คนและเพศหญิง 6 คน; อายุเฉลี่ยคือ 54.8 ± 15.3 ปี) และผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (T2DM) ($N = 10$; เพศชาย 7 คนและเพศหญิง 3 คน; อายุเฉลี่ยคือ 59.2 ± 15.9 ปี) นอกจากนี้ก็ยังมีผู้ป่วยที่มีภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC) ($N = 11$; เพศชาย 3 คนและเพศหญิง 8 คน; อายุเฉลี่ยคือ 55.7 ± 5.8 ปี) รวมอยู่ด้วย ในจำนวนผู้ป่วยเหล่านี้มีอยู่ 3 รายที่มีอาการของโควิด 19 เฉียบพลันรุนแรงและได้รับการเข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาลที่ซึ่งผู้ป่วยเหล่านี้ได้รับออกซิเจน หนึ่งรายที่ป่วยมีอาการรุนแรงและต้องใช้เครื่องช่วยหายใจ (on ventilation) สองรายมีอาการของโควิด 19 ขั้นปานกลางและได้รับการเข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาลรวมทั้งได้รับออกซิเจน หนึ่งรายมีอาการของโควิด 19 ขั้นปานกลางแต่ไม่ได้รับการเข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาล สี่รายมีอาการของโควิด 19 เฉียบพลันเล็กน้อยและไม่ได้รับการเข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาล ผู้ป่วยเหล่านี้มีอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC) เป็นเวลาอย่างน้อย 2 เดือนหลังจากที่ฟื้นตัวจากโควิด 19 เฉียบพลัน ในบรรดาผู้ที่ที่มีอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC) เหล่านี้ไม่มีรายใดที่มีภาวะโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (T2DM) ก่อนหน้าที่จะถูกวินิจฉัยว่าเป็นโควิด 19 เฉียบพลัน

การเก็บตัวอย่างเลือด

การเจาะเลือดและเก็บตัวอย่างเลือด (citrated blood samples) ทำโดยเจ้าหน้าที่ผู้เจาะเลือดที่มีคุณสมบัติเหมาะสมหรือโดยแพทย์ การเจาะเลือดทำโดยใช้ 4.5 mL sodium citrate (3.2%) tubes (BD Vacutainer®, 369714) และปฏิบัติตามโพรโตคอลการปลดปล่อยมาตรฐาน ตัวอย่างเลือด (whole blood) ได้รับการปั่นแยก (centrifuged) ที่ $3000 \times g$ เป็นเวลา 15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง และตัวอย่างส่วนที่เป็น supernatant platelet poor plasma ได้รับการจัดเก็บและรักษาไว้ในหลอดชนิด 1.5 mL Eppendorf tubes ที่อุณหภูมิ -80°C

การวัดความหนืด

ความหนืดของพลาสมาได้รับการตรวจวัดโดยใช้เครื่อง *microVISC™* viscometer (RheoSense Inc., CA United States) ซึ่งใช้เทคโนโลยีการตรวจจับของไหลจุลภาคชนิด Viscometer/Rheometer On-a-Chip (VROC®) ก่อนการตรวจวิเคราะห์ aliquots ของ platelet poor plasma (PPP) จากตัวอย่างที่ได้รับการเก็บรักษาไว้จะถูก thawed จากที่อุณหภูมิ -80°C เป็น 35°C โดยใช้เครื่อง incubator ตัวอย่างก็ถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 35°C ในเครื่อง incubator ระหว่างการตรวจวัดเพื่อรักษาอุณหภูมิให้คงที่ เนื่องจากว่าเป็นหนึ่งในตัวแปรที่ใช้ในการวัดความหนืด ระหว่างการวัดแต่ละครั้งเครื่อง micro-viscometer

นี้ได้รับการทำความสะอาดโดยใช้สารละลายชนิด 1% Scienceware® Aquet® liquid detergent solution (Sigma-Aldrich, Z273260) เพื่อชำระล้างซึ่งค่าการวัดความหนืดที่มีความเสถียร ค่าความหนืดของพลาสมาคำนวณตามกฎหมายความหนืดนิวตัน (Newton's law of viscosity) :

$$\mu = \tau / Y_{app} = \tau / \dot{\gamma}_{app}$$

โดยที่ μ คือความหนืด (viscosity) , τ คือความเค้นเฉือน (shear stress) และ Y_{app} คืออัตราเฉือน (apparent shear rate)

การตรวจวิเคราะห์ Serum Amyloid A โดยวิธี ELISA

เราได้ทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA กับ platelet poor plasma (PPP) จำนวน 12 ตัวอย่างจากกลุ่ม controls จำนวน 11 ตัวอย่างจากผู้ป่วยโควิด 19 เฉียบพลัน และจำนวน 11 ตัวอย่างจากผู้ที่มีอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC) ชุดตรวจวิเคราะห์ชนิด Human SAA ELISA Kit (SAA1) (E-EL-H2183, Elabscience Biotechnology Inc.) ถูกใช้ในการตรวจวิเคราะห์นี้ โดยทำตามโปรโตคอลของบริษัทผู้ผลิต SAA1 เป็นหนึ่งในจำนวน 2 ชนิดของโปรตีน SAA ในระยะเฉียบพลัน [39]

พยาธิวิทยาของเกล็ดเลือด

ตัวอย่าง whole blood (haematocrit) จากอาสาสมัครซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดี ผู้ป่วยโควิด 19 และจากผู้ที่มีอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC) ได้รับการ exposed กับ fluorescent markers 2 ชนิด คือ CD62P (PE-conjugated) (platelet surface P-selectin) (IM1759U, Beckman Coulter, Brea, CA, USA) และ PAC-1 (FITC-conjugated) (340507, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) CD62P ถูกพบใน granules ของเกล็ดเลือดและต่อจากนั้น translocate ไปที่ผิวของเมมเบรนของเกล็ดเลือด กระบวนการ translocation เกิดขึ้นหลังจากที่ platelet P-selectin ถูกปลดปล่อยจาก cellular granules ในระหว่างการกระตุ้นของเกล็ดเลือด [6, 9] ปริมาณ 4 μ L ของ CD62P และ PAC-1 ถูกเติมลงไป 20 μ L haematocrit หลังจากนั้น haematocrit ที่ได้รับการ exposed กับ markers ก็จะถูก incubated เป็นเวลา 30 นาที (ป้องกันไม่ให้โดนแสง) ที่อุณหภูมิห้อง ความยาวคลื่นสำหรับการดูดกลืนแสง (excitation wavelength) สำหรับ PAC-1 ถูกตั้งไว้ที่ช่วง 450 - 488 nm และความยาวคลื่นสำหรับการคายแสง (emission wavelength) ถูกตั้งไว้ที่ช่วง 499 - 529 nm และสำหรับ CD62P marker ความยาวคลื่นสำหรับการดูดกลืนแสง (excitation wavelength) ถูกตั้งไว้ที่ช่วง 540 - 570 nm และความยาวคลื่นสำหรับการคายแสงถูกตั้งไว้ที่ช่วง 577 - 607 nm ตัวอย่างที่ได้รับการ processed แล้วนี้ถูกมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ชนิด Zeiss Axio Observer 7 fluorescent microscope ซึ่งมีเลนส์ objective ชนิด Plan-Apochromat 63 \times /1.4 Oil DIC M27 (Carl Zeiss Microscopy, Munich, Germany)

Platelet poor plasma (PPP): โปรตีนอะไมลอยด์ (ไฟบรินหรือไฟบริโนเจน) และการแข็งตัวของเลือดที่ผิดปกติในตัวอย่าง **platelet poor plasma** ก่อนและหลังการย่อยด้วย **trypsin** 2 ขั้นตอน

ตัวอย่าง **platelet poor plasma** ทั้งหมดที่เป็น **naïve** จากผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 กลุ่ม **controls** ผู้ป่วยโควิด 19 เฉียบพลัน และจากผู้ป่วยที่มีอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (**Long COVID/PASC**) ได้รับการตรวจวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค **fluorescence microscopy** สำหรับการวิเคราะห์ทางโปรตีโอมิกส์เราใช้ตัวอย่างจากอาสาสมัครซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดีจำนวน 5 ตัวอย่าง จากผู้ป่วยที่มีอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (**Long COVID/PASC**) จำนวน 4 ตัวอย่าง และจากผู้ป่วยโควิด 19 เฉียบพลันจำนวน 9 ตัวอย่าง (รวมทั้งหนึ่งตัวอย่างจากผู้ป่วยโควิด 19 เฉียบพลันที่ตรวจซ้ำซึ่งเก็บตัวอย่างหลังจากครั้งแรก 2 วัน) ตัวอย่าง **platelet poor plasma** ได้รับการเตรียมสำหรับการวิเคราะห์ทางโปรตีโอมิกส์ ก่อนหน้านี้มีอาสาสมัครคนหนึ่งในกลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (**Long COVID/PASC**) ได้รับการเก็บตัวอย่างเลือด (ที่มีสุขภาพดี) ในการศึกษาวิจัยนี้เราก็ได้เปรียบเทียบตัวอย่าง (ที่มีสุขภาพดี) จากอาสาสมัครรายนี้กับตัวอย่างจากอาสาสมัครรายอื่น ๆ ที่เป็นผู้ที่มีอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (**Long COVID/PASC**) ก่อนและหลังการย่อยด้วย **trypsin** ด้วยเช่นกัน

ตัวอย่าง **platelet poor plasma** ที่เป็น **naïve**: เทคนิค **fluorescence microscopy** เพื่อแสดงการแข็งตัวของเลือดที่ผิดปกติและการก่อตัวของลิ่มเลือดขนาดเล็ก

เพื่อที่จะศึกษาการแข็งตัวของเลือดที่ผิดปกติของไฟบริน (ไฟบริโนเจน) และโปรตีนในพลาสมาในตัวอย่าง **platelet poor plasma** ที่เป็น **naïve** ตัวอย่าง **platelet poor plasma** จากอาสาสมัครซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดี ผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ผู้ป่วยโควิด 19 และจากผู้ป่วยที่มีอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (**Long COVID/PASC**) ได้รับการ **exposed** กับ **fluorescent amyloid dye** คือ **Thioflavin T (ThT)** (ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.005 mM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง วิธีการ ThT นี้ได้รับการพัฒนาขึ้นมาเพื่อที่จะทำให้มองเห็น (**visualize**) การแข็งตัวของเลือดที่ผิดปกติในสภาวะที่มีการอักเสบ [40,41,42,43] หลังจากการ **incubation** แล้วปริมาณ 4 uL ของตัวอย่าง **platelet poor plasma** ถูกวางบน **glass slide** และปิดด้วย **coverslip** ความยาวคลื่นสำหรับการดูดกลืนแสง (**excitation wavelength**) สำหรับ ThT ถูกตั้งไว้ที่ช่วง 450 - 488 nm และความยาวคลื่นสำหรับการคายแสง (**emission wavelength**) ถูกตั้งไว้ที่ช่วง 499 - 529 nm และตัวอย่างที่ได้รับการ **processed** แล้วนี้ก็จะถูกมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ชนิด **Zeiss Axio Observer 7 fluorescent microscope** ซึ่งมีเลนส์ **objective** ชนิด **Plan-Apochromat 63×/1.4 Oil DIC M27** (Carl Zeiss Microscopy, Munich, Germany) [5, 8, 9]

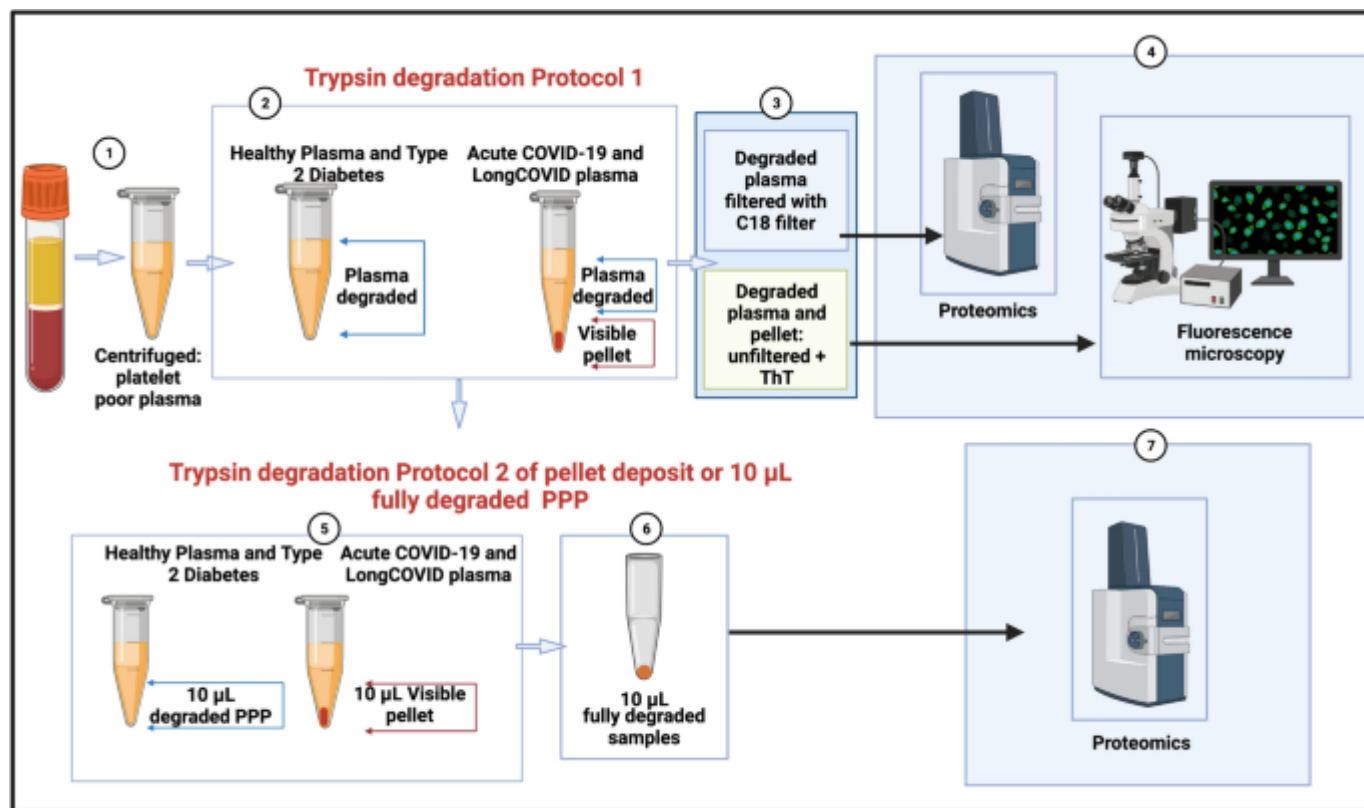
โปรโตคอลการย่อยด้วย **trypsin 2** ขั้นตอนของตัวอย่าง **platelet poor plasma (PPP)**

สารเคมีที่ใช้สำหรับการตรวจวิเคราะห์ทางโปรตีโอมิกส์

น้ำยาต่อไปนี้ได้รับการจัดซื้อจากบริษัท Sigma: ammonium bicarbonate, ammonium acetate, Sodium Chloride (NaCl), Tris, sodium dodecyl sulphate (SDS), Triscarboxyethylphosphine (TCEP), methane methylthiosulfonate, (MMTS), Trifluoroacetic acid (TFA) และ 3 M Empore C18 solid phase extraction discs ส่วน Trypsin ได้รับการจัดซื้อจากบริษัท New England Biosystems และ HILIC MagResyn functionalised particles จาก ReSynBiosciences สำหรับ Acetonitrile ได้รับการจัดซื้อจากบริษัท Romil และ Chloroform ได้รับจากบริษัท Merck

โปรโตคอลการย่อยด้วย trypsin จำนวน 2 โปรโตคอลได้รับการปฏิบัติตาม (ดูภาพประกอบที่ [1](#)) เป็นที่ทราบกันดีว่าเอนไซม์ trypsin ย่อยโปรตีน อย่างไรก็ตามเราได้ดัดแปลงขั้นตอนการย่อยด้วย trypsin สำหรับขั้นตอนการย่อยขั้นแรกในการทดลองนี้วิธี non-denaturing digest (1 Trypsin method) เป็นวิธีการของเราเอง สำหรับขั้นตอนการย่อยขั้นที่ 2 เราได้ทำตามขั้นตอนปฏิบัติในเวปไซต์ https://resynbio.com/wp-content/uploads/2019/12/HILIC_RAPOBD.pdf โดยมีการดัดแปลงดังต่อไปนี้: DTT ถูกแทนที่ด้วย TCEP และ IAA ถูกแทนที่ด้วย MMTS ความเข้มข้นของ trypsin ถูกทำให้ต่ำลงเนื่องจากว่าเราไม่ทราบปริมาณของโปรตีน และระยะเวลาในการ incubation ถูกยืดขยายออกไปเป็น 18 ชั่วโมง

ภาพประกอบที่ 1



โปรโตคอลการย่อยด้วย trypsin จำนวน 2 โปรโตคอล ตามด้วยเทคนิค fluorescence microscopy และโปรตีโอมิกส์ของ platelet poor plasma (PPP) จากอาสาสมัครซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดี ผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (T2DM) ผู้ป่วยโควิด 19 และจากผู้ที่มีอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC). (1) Citrated blood ได้รับการปั่นแยก (centrifuged) เพื่อให้ได้ platelet poor plasma. (2) platelet poor plasma ได้รับการ treated ด้วย trypsin เพื่อให้มีการย่อยโปรตีนในพลาสมา. Platelet poor plasma จากอาสาสมัครซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดีและ platelet poor plasma จากผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (T2DM) ได้รับการย่อยสลาย (degraded) อย่างเต็มที่. ตัวอย่างจากผู้ป่วยโควิด 19 และจากผู้ที่มีอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC) มีการก่อตัวเป็นสิ่งตกค้างสะสมที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ (pellet deposits) ซึ่งไม่ถูกย่อยที่ก้นหลอดทดลอง. (3 และ 4) สำหรับเทคนิค fluorescence microscopy ส่วนที่เป็น supernatants ถูกนำเอาออกไปและ supernatant ที่คงเหลืออยู่ปริมาณ 10 μ L และ/หรือตัวอย่างที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ ได้รับการ exposed กับ thioflavin T (ThT) และถูกมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ชนิด fluorescence microscope. ก่อนการวิเคราะห์ทางโปรตีโอมิกส์ที่อิงเทคนิค liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) ส่วนที่เป็น supernatants ถูกกรองผ่านเครื่องมือสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง (C18 solid phase extraction (SPE) device). (5) โปรโตคอลการย่อยด้วย trypsin ขั้นที่ 2 ได้รับการ

ปฏิบัติตามเพื่อที่จะ (6) ย่อยสลาย (degrade) สิ่งตกค้างสะสมที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ (pellet deposits) ในตัวอย่างจากผู้ป่วยโควิด 19 และตัวอย่างจากผู้ที่มีอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC). วิธีเดียวกันนี้ได้รับการปฏิบัติตามสำหรับตัวอย่าง platelet poor plasma จากอาสาสมัครซึ่งเป็น ผู้ที่มีสุขภาพดีและจากผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (T2DM) (ถึงแม้ว่าตัวอย่างเหล่านี้ไม่มีสิ่งตกค้างสะสมที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ ที่สามารถมองเห็นได้อยู่ก็ตาม). (7) ต่อจากนั้นตัวอย่างที่ได้รับการแยก เซลล์โดยใช้ trypsin 2 ขั้นตอน (double-trypsinized samples) จากกลุ่ม controls จากผู้ป่วยโควิด 19 และจากผู้ที่มีอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC) ก็ได้รับการตรวจวิเคราะห์โดยใช้โปรตีนโอมิกส์. (ภาพประกอบสร้างจาก BioRender.com)

โปรตีนคอลการย่อยด้วย trypsin โปรตีนคอลแรกได้รับการปฏิบัติตามโดยใช้ platelet poor plasma จากอาสาสมัครซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดีจำนวน 5 คน จากผู้ที่มี อาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC) จำนวน 4 คน และจากผู้ป่วยโควิด 19 เฉียบพลันจำนวน 9 คน (รวมทั้งหนึ่งตัวอย่างจากผู้ป่วยโควิด 19 เฉียบพลันที่ตรวจซ้ำซึ่งเก็บตัวอย่างหลังจากครั้งแรก 2 วัน) ข้อมูล โปรตีนโอมิกส์ของ supernatant ได้รับการเก็บรวบรวมจากตัวอย่างเหล่านี้ นอกจากนี้ยังมีการย่อยด้วย trypsin กับตัวอย่างจากอาสาสมัครที่มีภาวะโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (T2DM) จำนวน 4 คนด้วย ในการศึกษาวิจัยนี้เรายังได้รวมตัวอย่างเพื่อตรวจซ้ำ (repeat sample) จากหนึ่งในอาสาสมัครเพื่อยืนยันผลการตรวจ โปรตีนคอลการ แยกสลายเซลล์โดยใช้ trypsin ขั้นที่ 2 ได้รับการปฏิบัติกับสิ่งตกค้างสะสมที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ (pellet deposits) ที่ไม่ถูกย่อยจากตัวอย่างของผู้ป่วยโควิด 19 เฉียบพลัน จำนวน 5 ตัวอย่าง และจากตัวอย่างของผู้ที่มีอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC) จำนวน 4 ตัวอย่าง การแยกสลายเซลล์โดยใช้ trypsin ขั้นที่ 2 นี้ยังได้รับการปฏิบัติกับตัวอย่างพลาสมาจากกลุ่ม control จำนวน 5 ตัวอย่างด้วย

โปรตีนคอลการย่อยด้วย trypsin ขั้นที่ 1 ของ platelet poor plasma ที่เป็น naïve

ตัวอย่าง platelet poor plasma ทั้งหมดได้รับการ exposed กับการย่อยด้วย trypsin ขั้นที่ 1 สำหรับโปรตีนในพลาสมา ตัวอย่างเหล่านี้ถูกเจือจาง 10 ครั้งใน 10 mM ammonium bicarbonate และความเข้มข้นของโปรตีนได้รับการระบุ ตัวอย่างได้รับการทำให้เป็นมาตรฐาน (standardized) ที่ค่าโปรตีนทั้งหมด (total protein) เท่ากับ 1 mg/mL และ trypsin ปริมาณทั้งสิ้น 1 µg (New England Biosystems) ถูกเติมลงในพลาสมาในอัตราส่วนเอนไซม์ต่อ substrate เท่ากับ 1:50 ไม่มีการ reduction หรือการทำ alkylation หลังจากขั้นตอนการย่อยด้วย trypsin ขั้นที่ 1 นี้ตัวอย่างทั้งจากผู้ป่วยโควิด 19 และจากผู้ที่มี อาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC) มีการก่อดังของสิ่งตกค้างสะสมที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ (pellet deposits) ที่สามารถมองเห็นได้ที่ก้นหลอดทดลองหลังจากปั่นแยก (centrifuge) เป็นเวลา 30 นาทีที่ 13,000×g ตัวอย่าง platelet poor plasma จากอาสาสมัครซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดีและจากผู้ป่วยที่มีภาวะเบาหวานชนิดที่ 2 (T2DM) ไม่มีการก่อดังของสิ่งตกค้างสะสมที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ (pellet deposits) ที่ สามารถมองเห็นได้ที่ก้นหลอดทดลองแต่อย่างใด

เทคนิค **Fluorescence microscopy** ของ **supernatant** ที่ได้รับการย่อยสลาย (**degraded**) จาก **trypsin** และสิ่งตกค้างสะสมที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ (**pellet deposits**) ที่สามารถมองเห็นได้

หลังจากขั้นตอนการย่อยด้วย **trypsin** ครั้งแรก **supernatants** ก็ถูกนำออกไปและส่วนที่เหลืออยู่ 10 μL ได้รับการ **exposed** กับ ThT (ตามที่อธิบายมาแล้วก่อนหน้านี้) และ **supernatants** ส่วนที่เหลือได้รับการตรวจวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค **mass spectrometry** (วิธีการแสดงไว้ข้างล่างนี้) ปริมาณ 10 μL ของตัวอย่าง **platelet poor plasma** จากอาสาสมัครซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดีและจากผู้ป่วยที่มีภาวะเบาหวานชนิดที่ 2 (T2DM) ไม่มีสิ่งตกค้างสะสมที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ (**pellet deposits**) ในขณะที่ปริมาณ 10 μL ของตัวอย่าง **platelet poor plasma** จากผู้ป่วยโควิด 19 และจากผู้ที่มีอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC) มีสิ่งตกค้างสะสมที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ (**pellet deposits**) ที่สามารถมองเห็นได้อยู่จริง ๆ ตัวอย่างเหล่านี้ยังถูกทำให้เห็นได้ (**visualized**) โดยการใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิด **Zeiss Axio Observer 7 fluorescent microscope** ซึ่งมีเลนส์ **objective** ชนิด **Plan-Apochromat 63 \times /1.4 Oil DIC M27** (Carl Zeiss Microscopy, Munich, Germany)

การย่อยสิ่งตกค้างสะสมที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ (**pellet deposits**) โดยโพรโตคอลการย่อยด้วย **trypsin** ขั้นที่ 2

ปริมาณ 60 μL ของคลอโรฟอร์มถูกเติมลงใน **platelet poor plasma** ปริมาณ 10 μL ส่วนที่เหลือ ซึ่งมีสิ่งตกค้างสะสมที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ (**pellet deposits**) อยู่ และนำไปปั่นแยก (**centrifuged**) ที่ 13,000 $\times g$ เป็นเวลา 30 นาที **supernatant** ปริมาณ 50 μL ถูกนำออกไป และส่วนที่เหลือถูกทำให้แห้ง (**airdried**) ต่อจากนั้นสิ่งตกค้างสะสมนี้ได้รับการละลายใน 100 mM Tris (pH 8.5) ซึ่งมี 1% sodium dodecyl sulphate (SDS) (Sigma) และ 5 mM (tris(2-carboxyethyl) phosphine) (TCEP, Sigma) อยู่และถูก **reduced** ที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ผลิตภัณฑ์ที่ได้ถูกปล่อยให้เย็นจนมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้องและ **Cysteine residues** ได้รับการ **blocked** โดยใช้ methyl methanethiosulfonate (MMTS, Sigma) ตัวอย่างเหล่านี้ก็ได้รับการตรวจวิเคราะห์โดยใช้ **mass spectrometry** ด้วยเช่นกัน ตัวอย่างโปรตีนที่ได้รับการ **reduced** และการ **thiomethylated** ถูกเจือจางในอัตราส่วน 1:1 ด้วย 200 mM ammonium acetate (Sigma) ซึ่งมี 30% acetonitrile (ACN, Romil), pH 4.5 อยู่ ตัวอย่างได้รับการ **incubated** ด้วยอนุภาคแม่เหล็ก **HILIC** ที่ได้รับการเพิ่มหมู่ฟังก์ชัน (**functionalized**) (ResynBiosciences) ซึ่งได้รับการ **equilibrated** ด้วย 100 mM ammonium acetate ที่มี 15% ACN, pH 4.5 เป็นเวลา 30 min หลังการ **binding** ส่วนที่เป็น **supernatant** ถูกนำออกไปและอนุภาคได้รับการล้าง 2 ครั้งด้วย 95% ACN ปริมาณ 0.1 mg ของ **trypsin** ถูกเติมลงไป ใน 10 mM ammonium bicarbonate สำหรับแต่ละตัวอย่าง ตัวอย่างเหล่านี้ได้รับการ **incubated** ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 °C โดยมีการ **agitation** หลังจากผ่านไป 18 ชั่วโมงส่วนที่เป็น **supernatant** ถูกนำออกไปและอนุภาคได้รับการล้างด้วย 1% trifluoroacetic acid (TFA, Sigma) สิ่งที่ได้ออกจากการล้างได้รับการผสมกับ **supernatant** ครั้งแรก และ **applied** เข้ากับเครื่อง **C₁₈ SPE (3 M Emopore)** ก่อนการตรวจวิเคราะห์

โปรตีนของ platelet poor plasma

หลังจากการย่อยด้วย trypsin ขั้นตอนแรกแล้ว ส่วนที่เป็น supernatants ต้องได้รับการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง (C_{18} and solid phase extraction [SPE]) และการตรวจวิเคราะห์ทางโปรตีนโอมิกส์ ภายหลังจากสิ่งตกค้างสะสมที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ (pellet deposits) ได้รับการทำให้ละลาย (solubilized) ในขั้นตอนการย่อยด้วย trypsin ขั้นที่ 2 สิ่งตกค้างสะสมที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ ที่สามารถละลายได้แล้วในตอนนี้ก็ได้รับการตรวจวิเคราะห์ทางโปรตีนโอมิกส์ด้วยเช่นกัน

เทคนิค liquid chromatography กับ supernatant ที่ได้รับการย่อยสลาย (degraded) และกับสิ่งตกค้างสะสมที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ (pellet deposits) ที่ได้รับการย่อยสลาย (degraded)

ระบบ Dionex nano-RSLC

เทคนิค liquid chromatography ได้รับการดำเนินการด้วยระบบ Thermo Scientific Ultimate 3000 RSLC [44] ซึ่งมีคอลัมน์สำหรับงานวิเคราะห์ (analytical column) ชนิด $20\text{ mm} \times 100\text{ }\mu\text{m}$ C_{18} trap column (Thermo Scientific) และชนิด CSH $25\text{ cm} \times 75\text{ }\mu\text{m}$ $1.7\text{ }\mu\text{m}$ particle size C_{18} column (Waters) ตัวทำละลาย (solvent system) ที่ใช้คือ loading: 2% acetonitrile:water; 0.1% FA; Solvent A: 2% acetonitrile:water; 0.1% FA และ Solvent B: 100% acetonitrile:water ตัวอย่างได้รับการ loaded ลงสู่ trap column โดยการใช้ loading solvent ที่อัตราการไหลเท่ากับ $2\text{ }\mu\text{L/min}$ จากส่วนฉีดสารตัวอย่างอัตโนมัติ (autosampler) ที่ควบคุมอุณหภูมิซึ่งตั้งอุณหภูมิไว้ที่ $7\text{ }^{\circ}\text{C}$ การ loading ดำเนินการเป็นเวลา 5 นาที ก่อนที่ตัวอย่างจะได้รับการ eluted ลงสู่คอลัมน์สำหรับงานวิเคราะห์ (analytical column) อัตราการไหลถูกตั้งไว้ที่ 300 nL/min และ gradient ได้รับการ generated ดังต่อไปนี้ : 5.0%–30%B เกิน 60 นาที และ 30–50%B เป็นเวลา 60 – 80 นาที วิธีการ chromatography ทำที่อุณหภูมิ $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ และส่วนที่เป็น outflow ถูกส่งไปยังเครื่อง mass spectrometer

เทคนิค mass spectrometry ของ platelet poor plasma

เทคนิคการทำ mass spectrometry ดำเนินการโดยใช้เครื่อง Thermo Scientific Fusion mass spectrometer ที่มีแหล่งกำเนิดไอออนชนิด Nanospray Flex ตัวอย่างพลาสมา ก่อนและหลังการเติมโปรตีนส่วนหนาม (ความเข้มข้นสุดท้ายของการสัมผัส (final exposure concentration) เท่ากับ 1 ng mL^{-1}) จากตัวอย่างในกลุ่ม control จำนวน 4 ตัวอย่างได้รับการวิเคราะห์โดยวิธีนี้ ตัวอย่างได้รับการนำเข้าสู่เครื่องผ่านทางตัวปล่อยชนิด stainless-steel nano-bore emitter ข้อมูลได้รับการเก็บรวบรวมใน positive mode ที่มี spray voltage ซึ่งตั้งไว้ที่ 1.8 kV และ ion transfer capillary ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ $275\text{ }^{\circ}\text{C}$ สเปกตรัมได้รับการ calibrated ภายใน โดยใช้ polysiloxane ions ที่ $m/z = 445.12003$ การสแกน MS1 ทำโดยใช้ orbitrap detector ซึ่งตั้งไว้ที่ $120,000$ resolution ซึ่งครอบคลุมสำหรับช่วง scan range ระหว่าง 375 – 1500 ซึ่งมี AGC target อยู่ที่ $4\text{ E}5$ และ injection time สูงสุดเท่ากับ 50 ms ข้อมูลได้มาใน profile mode การทำ MS2 acquisitions ทำโดยใช้การเลือก monoisotopic precursor สำหรับไอออนที่มี

ประจุ + 2 – + 7 และ error tolerance ตั้งไว้ที่ ± 10 ppm Precursor ions ได้รับการคัดเอาออกไปจาก fragmentation หนึ่งครั้งสำหรับช่วงระยะเวลา 60 วินาที Precursor ions ได้รับการคัดเลือกสำหรับ fragmentation ใน HCD mode โดยการใช้เครื่อง quadrupole mass analyser ที่มี HCD energy ตั้งไว้ที่ 30% Fragment ions ถูกตรวจพบในเครื่อง Orbitrap mass analyzer ที่ตั้งไว้ที่ 30,000 resolution AGC target ถูกตั้งไว้ที่ 5E4 และ injection time สูงสุดตั้งไว้ที่ 100 ms ข้อมูลได้มาใน centroid mode

การวิเคราะห์ข้อมูล mass spectrometry

Raw files ที่สร้างจาก mass spectrometer ได้รับการ imported ลงซอฟต์แวร์ Proteome Discoverer v1.4 (Thermo Scientific) และประมวลผลโดยใช้ Sequest HT algorithm การสืบค้นฐานข้อมูล (database interrogation) ได้รับการดำเนินการกับฐานข้อมูล 2019-nCoVpFASTA Semi-tryptic cleavage ที่มี 2 missed cleavages ได้รับการยอมรับให้มีได้ Precursor mass tolerance ถูกตั้งไว้ที่ 10 ppm และ fragment mass tolerance ถูกตั้งไว้ที่ 0.02 Da Demamidation (NQ) และ oxidation (M) ได้รับการยอมรับในฐานะที่เป็น dynamic modifications การตรวจสอบความถูกต้องของเปปไทด์ทำโดยใช้ Target-Decoy PSM validator node ผลที่ได้จากการสืบค้นได้รับการ imported ลงสู่ Scaffold Q+ เพื่อการตรวจสอบความถูกต้องเพิ่มเติม (www.proteomesoftware.com) และเพื่อการทดสอบทางสถิติ มีการทดสอบด้วยวิธี t-test กับชุดข้อมูล และเทคนิค total spectra quantitative method ถูกใช้ในการเปรียบเทียบชุดข้อมูล

สถิติ (Statistics)

การวิเคราะห์ทางสถิติทำโดยใช้ซอฟต์แวร์ Graphpad Prism 8 (version 8.4.3) ข้อมูลทั้งหมดต้องได้รับการทดสอบชนิด Shapiro-Wilks normality tests การทดสอบ T-test ที่ไม่มีการจับคู่ทำกับข้อมูลพาราเมตริก โดยที่ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย (mean) \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ในขณะที่การทดสอบชนิด Mann-Whitney U test ถูกใช้กับข้อมูล non-parametric ที่ไม่จับคู่ และข้อมูลแสดงเป็นค่ากลางมัธยฐาน (median) [Q1–Q3] (ทั้งหมดเป็นการทดสอบแบบ two-tailed)

ผลที่ได้จากการศึกษาวิจัย (Results)

การวิเคราะห์ความหนืดของ platelet poor plasma (แสดงเป็น mPa/seconds)

ในการวิเคราะห์นี้เราได้ทำการวิเคราะห์ platelet poor plasma จากกลุ่ม controls จำนวน 13 คน จากผู้ป่วยที่มีภาวะเบาหวานชนิดที่ 2 (T2DM) จำนวน 10 คน จากผู้ป่วยโควิด 19 เฉียบพลันจำนวน 13 คน และจากผู้ป่วยที่มีอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC) จำนวน 11 คน ข้อมูลมีการกระจายอย่างปกติ และผลการทดสอบชนิด unpaired T-tests แสดงให้เห็นว่าไม่มีความแตกต่างเรื่องความหนืดของ platelet poor plasma ระหว่างกลุ่ม controls กับกลุ่มผู้ป่วยที่มีภาวะเบาหวานชนิดที่ 2 (T2DM) ($p = 0.3$) และระหว่างกลุ่ม controls กับกลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC) ($p = 0.9$) ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญถูกสังเกตพบในระหว่างความหนืดของ platelet poor plasma จากกลุ่ม controls กับกลุ่มผู้ป่วยโควิด 19 เฉียบพลัน ($p = 0.001$) และระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโควิด 19 เฉียบพลันกับกลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC) ($p = 0.002$) ผลที่ได้เหล่านี้ทำให้น่าเชื่อได้ว่าเฉพาะในตัวอย่างของผู้ป่วยโควิด 19 เฉียบพลันเท่านั้นที่ความหนืดของ platelet poor plasma มีการเพิ่มสูงขึ้น โพลีซอมูลดิบและกราฟดูได้จากลิงค์ข้อมูล (ดูลิงค์ข้อมูลดิบ)

การตรวจวิเคราะห์ Serum Amyloid A โดยวิธี ELISA สำหรับ platelet poor plasma

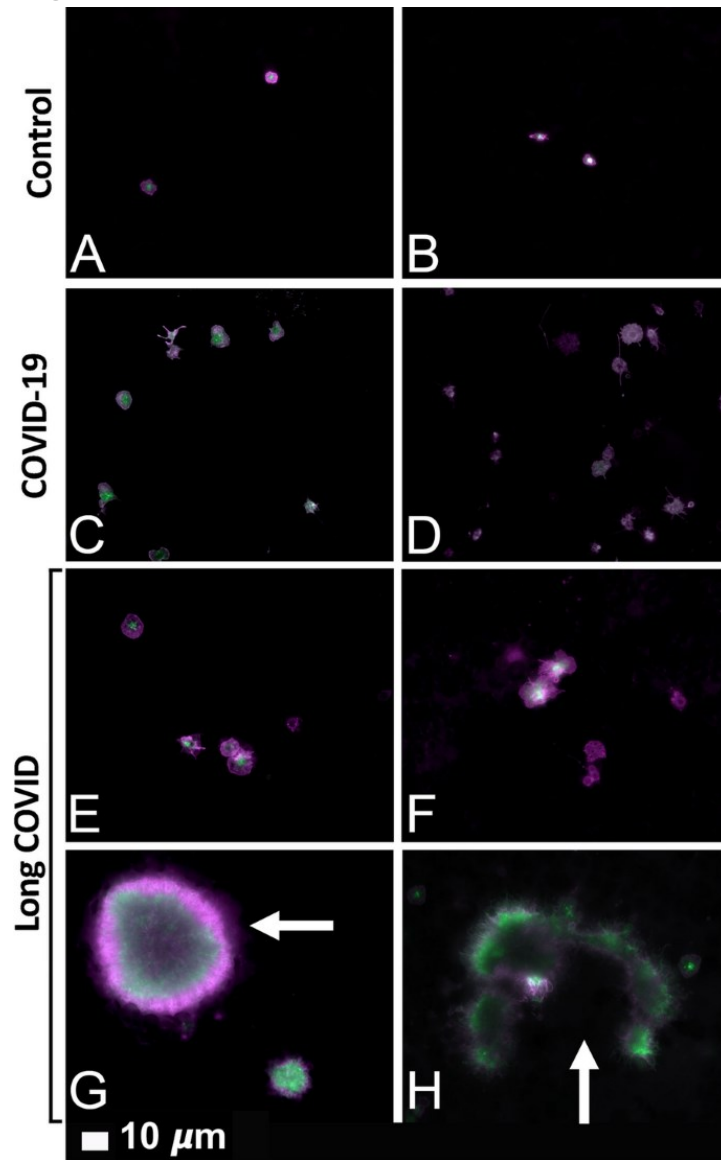
ในการวิเคราะห์นี้เราได้ทำการวิเคราะห์ platelet poor plasma จากกลุ่ม controls จำนวน 12 คน จากผู้ป่วยโควิด 19 เฉียบพลันจำนวน 11 คน และจากผู้ป่วยที่มีอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC) จำนวน 11 คน เราให้ความสนใจเป็นพิเศษกับความเข้มข้นของ SAA1 ในพลาสมา Family ของ SAA protein ของมนุษย์ประกอบด้วย SAA1/SAA2 ระยะเฉียบพลัน ที่รับรู้กันว่าเป็นตัวกระตุ้นเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันทั้งชนิดภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immunity) และภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (adaptive immunity) ชุดใหญ่ และประกอบด้วย constitutive SAA4 [39] การตรวจวิเคราะห์ SAA (1 to 4) โดยวิธี ELISA โดยปกติทำโดยใช้ตัวอย่างเซรัม เมื่อไม่นานมานี้มีการแสดงให้เห็นว่าระดับความเข้มข้นของ serum SAA มีความเกี่ยวข้องสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญและในเชิงบวกกับความรุนแรงของโรคโควิด 19 ที่สูงขึ้นตลอดจนการเสียชีวิต [45] สำหรับบทปริทัศน์ที่ละเอียดครอบคลุมเกี่ยวกับ SAA ดูใน [46] ระดับความเข้มข้นของ serum SAA ในผู้ป่วยโควิด 19 ที่มีการรายงานอยู่ระหว่าง $10 - 300 \text{ mg L}^{-1}$ (ประเภทของ SAA ไม่มีการระบุ) [47] และสามารถสูงเกิน 200 mg L^{-1} สำหรับ SAA1 [48] เราได้วิเคราะห์ข้อมูลของเราโดยใช้การทดสอบแบบ Mann-Whitney test (ข้อมูลที่ไม่ใช่พารามетริก) หรือแบบ unpaired T-test (ข้อมูลพารามетริก) การกระจายความเข้มข้นของ SAA1 มีดังต่อไปนี้ : สำหรับกลุ่ม controls ($3.0 \text{ mg L}^{-1} (\pm 0.9)$) สำหรับกลุ่มผู้ป่วยโควิด 19 เฉียบพลัน ($3.7 \text{ mg L}^{-1} [3.3-5.4]$) และสำหรับกลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลัน

ของโควิด 19 ($3.98 \text{ mg L}^{-1} (\pm 0.43)$) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของระดับความเข้มข้นของ SAA1 ใน platelet poor plasma ระหว่างกลุ่ม controls กับกลุ่มผู้ป่วยโควิด 19 เฉียบพลัน ($p = 0.02$) และระหว่างกลุ่ม controls กับกลุ่มผู้ที่มีอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 ($p = 0.003$) ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของระดับความเข้มข้นของ SAA1 ใน platelet poor plasma ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโควิด 19 เฉียบพลัน กับกลุ่มผู้ที่มีอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 ($p = 0.46$) ไฟล์ข้อมูลดิบและกราฟดูได้จากลิงค์ข้อมูล (ดูลิงก์ข้อมูลด้านล่าง)

พยาธิวิทยาของเกล็ดเลือดจากการที่มองเห็นโดยใช้เทคนิค fluorescence microscopy

ก่อนหน้านี้ เรา (และผู้วิจัยคนอื่น ๆ) ได้สังเกตเห็นว่าเกล็ดเลือดได้รับการกระตุ้นมากผิดปกติ (hyperactivated) ในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (T2DM) เมื่อไม่นานมานี้เรายังได้ยืนยันสิ่งที่สังเกตพบเห็นนี้ในตัวอย่างจากผู้ป่วยโควิด 19 [9] ในการศึกษาวิจัยนี้เราได้แสดงให้เห็นว่าในตัวอย่างที่มีอยู่ในขณะนี้เกล็ดเลือดจากผู้ที่มีอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (long COVID/PASC) ก็ได้รับการกระตุ้นมากผิดปกติ (hyperactivated) ด้วยเช่นกัน (ภาพประกอบที่ 2E, F) โดยที่มีลักษณะที่เพิ่มเติมเข้ามาคือเกล็ดเลือดมีการจับตัวเป็นกระจุก (clumped together platelets) (ภาพประกอบที่ 2G, H)

Fig. 2

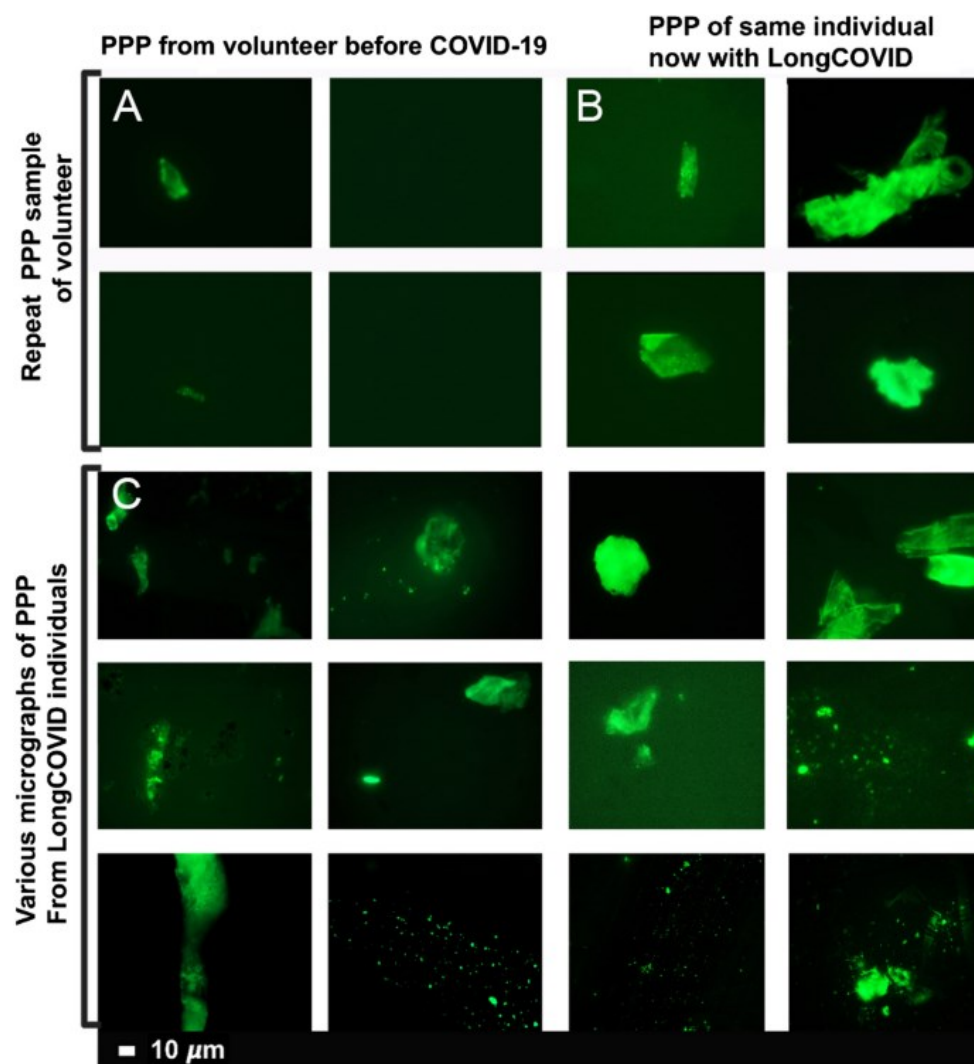


ภาพจากเทคนิค fluorescence microscopy ของตัวอย่าง haematocrit ซึ่งแสดงให้เห็นถึง micrographs ที่เป็นตัวแทนของเกล็ดเลือด. A, B แสดงให้เห็นถึง micrographs ที่เป็นตัวแทนจากอาสาสมัครซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดี. C, D แสดงให้เห็นถึงเกล็ดเลือดที่ได้รับการกระตุ้นมากผิดปกติในผู้ป่วยโควิด 19 และ E-H แสดงให้เห็นถึง micrographs ที่เป็นตัวแทนจากเกล็ดเลือดของผู้ที่มีอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (long COVID/PASC). ลูกศรสีขาวแสดงถึงเกล็ดเลือดที่รวมตัวกัน (aggregated platelets). เกล็ดเลือดใน haematocrit ได้รับการ incubated ด้วย fluorescent markers PAC-1 (green fluorescence) และ CD62P-PE (purple fluorescence).

Platelet poor plasma (PPP): โปรตีนไฟบริน (หรือไฟบริโนเจน) หรืออะไมลอยด์ (amyloid) และการแข็งตัวของเลือดที่ผิดปกติในตัวอย่าง platelet poor plasma ก่อนและหลังการย่อยด้วย trypsin 2 ขั้นตอน

ก่อนหน้านี้เราได้แสดงให้เห็นว่า platelet poor plasma ที่เป็น naïve (ได้รับการ exposed กับ ThT) จากอาสาสมัครซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดีและจากผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (T2DM) มีลิ่มเลือดแข็งตัวขนาดเล็ก (microclots) ที่ผิดปกติในปริมาณที่น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับใน platelet poor plasma จากผู้ป่วยโควิด 19 เฉียบพลัน [8] Marker thioflavin T (ThT) มีการจับยึดกับลิ่มเลือดแข็งตัวขนาดเล็ก (microclots) ที่ผิดปกติ (อะไมลอยด์) ใน platelet poor plasma นั้น [8] ในการศึกษาวิจัยนี้เราได้แสดงให้เห็นว่า platelet poor plasma จากตัวอย่างของผู้ที่มีอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (long COVID/PASC) ก็มีลิ่มเลือดแข็งตัวขนาดเล็ก (microclots) ที่ผิดปกติ (อะไมลอยด์) ในปริมาณมากด้วยเช่นกัน ซึ่งใกล้เคียงกับในตัวอย่าง platelet poor plasma จากผู้ป่วยโควิด 19 เฉียบพลัน ภาพประกอบที่ 3 แสดงตัวอย่างที่เป็น naïve ของอาสาสมัครก่อนหน้านี้ที่จะมีการติดเชื้อโควิด 19 และในระหว่างที่มีภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (long COVID/PASC) (ภาพประกอบ 3A, B) และภาพประกอบ 3C แสดงตัวอย่างที่มากขึ้นของลิ่มเลือดแข็งตัวขนาดเล็ก (microclots) ในตัวอย่าง platelet poor plasma อื่น ๆ จากผู้ที่มีอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (long COVID/PASC)

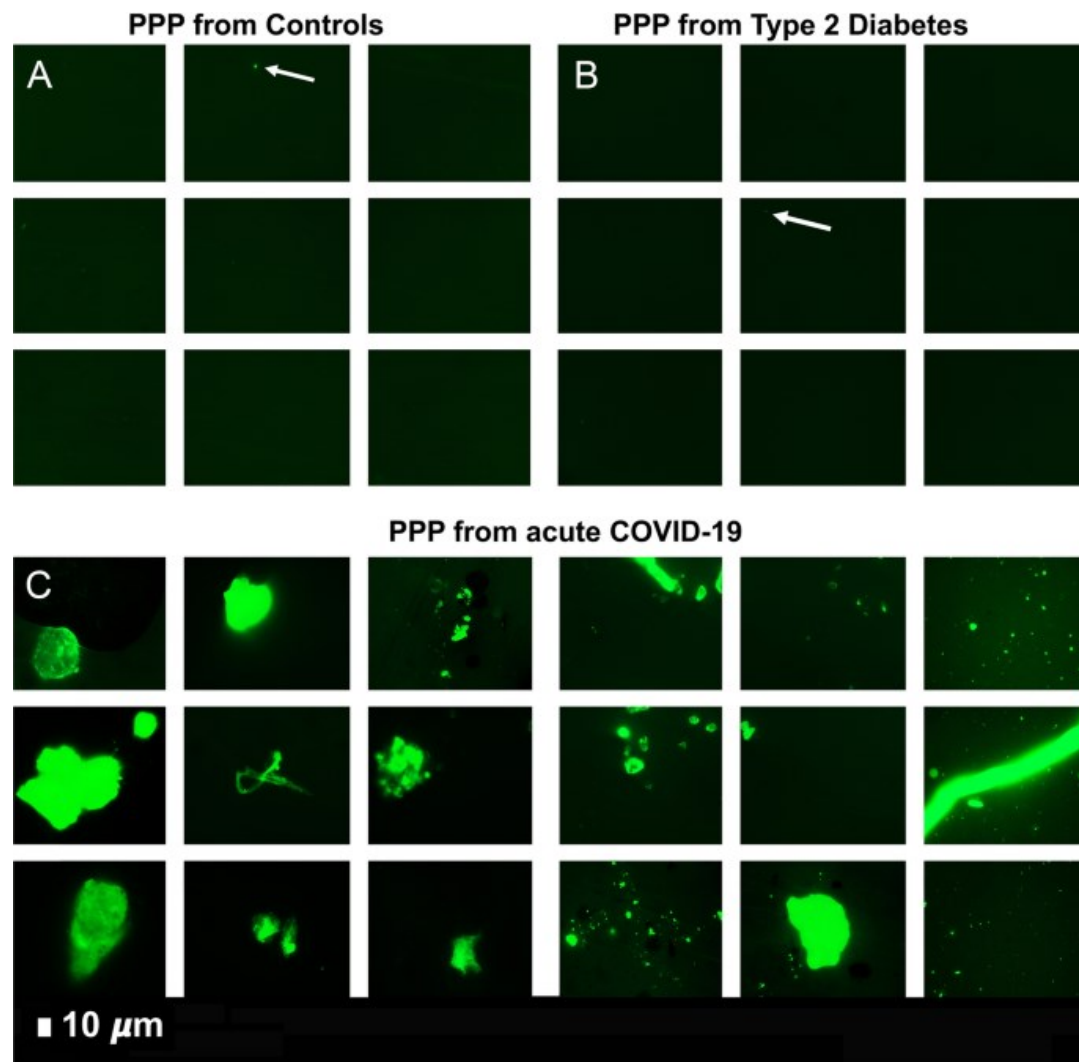
ภาพประกอบที่ 3



Micrographs ของ platelet poor plasma (PPP) (ก่อนหน้าการย่อยด้วย trypsin) ซึ่งมีการเติม thioflavin T (ThT). Marker thioflavin T (ThT) มีการจับยึดกับลิ่มเลือดแข็งตัวขนาดเล็ก (microclots) ที่ผิดปกติ (อะไมลอยด์) ใน platelet poor plasma. **A** ลิ่มเลือดแข็งตัวขนาดเล็ก (microclots) ในอาสาสมัครซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดีก่อนการติดเชื้อโควิด 19 เฉียบพลัน และ **B** อาสาสมัครคนเดียวกันในระหว่างที่มีภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (long COVID/PASC). **C** micrographs ที่เป็นตัวแทนของอาสาสมัครที่มีภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (long COVID/PASC) คนอื่นๆ

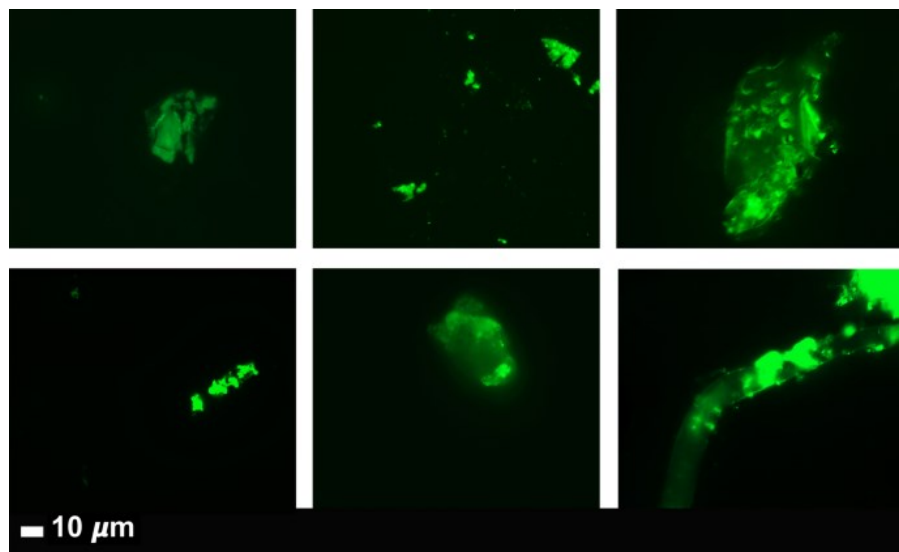
หลังจากนั้นตัวอย่างพลาสมาจากอาสาสมัครซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดี ผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 (T2DM) ผู้ป่วยโควิด 19 และจากผู้ที่มีการมีอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (long COVID/PASC) ก็ได้รับการย่อยด้วย trypsin ขั้นที่ 1 สำหรับในแต่ละตัวอย่างส่วนที่เป็น supernatant ถูกนำออกไปและ ThT ถูกเติมลงไป 10 μL ของตัวอย่างที่เหลือ และถูกมองผ่านด้วยเทคนิค fluorescence microscopy ตามภาพประกอบที่ 4 และ 5 ในส่วนที่เหลืออยู่ 10 μL นี้ มีเม็ดเล็กๆ ที่สามารถมองเห็นได้สำหรับตัวอย่าง platelet poor plasma จากผู้ป่วยโควิด 19 และจากผู้ที่มีการมีอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (long COVID/PASC)

ภาพประกอบที่ 4



Supernatant ของ platelet poor plasma ที่ถูกย่อย (หลังจากการย่อยด้วย trypsin). Marker thioflavin T (ThT) มีการจับยึดกับลิ่มเลือดแข็งตัวขนาดเล็ก (microclots) ที่ผิดปกติ (อะไมลอยด์) ใน platelet poor plasma. **A** Micrographs ของ platelet poor plasma จากอาสาสมัคร ซึ่งเป็น ผู้ที่มีสุขภาพดี; **B** Micrographs ของ platelet poor plasma จากผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (T2DM). ลูกศรสีขาวชี้ให้เห็นบริเวณเล็ก ๆ ที่มีการจับยึดของ ThT ในตัวอย่างจากกลุ่ม controls และจากผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 (T2DM). **C** ลิ่มเลือดแข็งตัวขนาดเล็ก (microclots) ที่มีนัยสำคัญสามารถมองเห็นได้ในพลาสมาจากผู้ป่วยโควิด 19 ตามที่เห็นเป็นสัญญาณสีเขียวใน micrographs ของ platelet poor plasma จากผู้ป่วยโควิด 19

ภาพประกอบที่ 5



Micrographs ที่เป็นตัวแทนของผู้ที่มีภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (long COVID/PASC). ส่วนที่เป็น supernatant ที่ถูกย่อย (platelet poor plasma) หลังจากการย่อยด้วย trypsin ขั้นที่ 1 ซึ่งส่วนที่เป็น supernatant ถูกนำออกไป และ thioflavin T (ThT) ถูกเติมลงไปในส่วนที่เหลืออยู่ 10 μ L. Marker thioflavin T (ThT) มีการจับยึดกับลิ่มเลือดแข็งตัวขนาดเล็ก (microclots) ที่ติดปกติใน platelet poor plasma

โปรตีนของ platelet poor plasma หลังจากการย่อยด้วย trypsin 2 ขั้นตอน

ในเอกสารผลการศึกษาวิจัยนี้เรามุ่งความสนใจไปที่ผลที่ได้จาก โปรตีนที่ได้ออกมาซึ่งน่าสนใจสำหรับการแข็งตัวของเลือดเท่านั้น เช่น fibrinogen, von Willebrand Factor (VWF), SAA4, และ plasminogen กับ $\alpha 2AP$ หลังจากการทำ trypsinization ครั้งแรกแล้ว platelet poor plasma ของกลุ่ม controls ถูกย่อยอย่างเต็มที่ ในขณะที่สิ่งตกค้างสะสมซึ่งยับยั้งขัดขวางกระบวนการการสลายลิ่มเลือด (fibrinolytic-resistant deposit) ถูกปล่อยทิ้งไว้ในตัวอย่างของผู้ป่วยโควิด 19 และ ในตัวอย่างของผู้ที่มีภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (long COVID/PASC) เฉพาะหลังจากการ trypsinization ครั้งที่ 2 เท่านั้นที่สิ่งตกค้างสะสมที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ (pellet deposits) เหล่านี้จากผู้ป่วยโควิด 19 และจากผู้ที่มีภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (long COVID/PASC) สามารถถูกย่อยได้อย่างเต็มที่ โปรตีนใด ๆ ที่ได้รับการดำเนินการและผลที่เราได้แสดงให้เห็นว่าโมเลกุลต่าง ๆ ที่ทำให้เกิดการอักเสบมีการเพิ่มสูงขึ้นเป็นอย่างมากใน supernatant (หลังจากกระบวนการ trypsinization ครั้งแรก) ของตัวอย่างจากผู้ป่วยโควิด 19 และจากผู้ที่มีภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (long COVID/PASC) เมื่อเปรียบเทียบ supernatant จากกลุ่ม controls หลังจากกระบวนการ trypsinization ขั้นที่ 2 แล้วโมเลกุลต่าง ๆ ที่ทำให้เกิดการอักเสบก็ยังคงมีการเพิ่มสูงขึ้นเป็นอย่างมากด้วยเช่นกัน ในสิ่งตกค้างสะสมที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ ที่ได้รับการย่อยแล้วจากผู้ป่วยโควิด 19 และจากผู้ที่มีภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (long COVID/PASC) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างจากกลุ่ม control เราได้นำเสนอผลที่ได้จากการศึกษาของเราในรูปของการเปลี่ยนแปลงเป็นเท่าตัว (fold changes) ของระดับโปรตีน คูในตารางที่ 1 สำหรับผลที่ได้ที่น่าสนใจมากที่สุดจำนวนหนึ่งของสิ่งตกค้างสะสมที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ (pellet deposits) ที่ได้รับการย่อยแล้วนี้ ตามที่แสดงในรูปของการเปลี่ยนแปลงเป็นเท่าตัว (fold changes) (ซึ่งมากกว่า 2) สำหรับโปรตีนที่มีนัยสำคัญมากที่สุดสำหรับการเปรียบเทียบเชิงคู่ (pair-wise comparisons) คูในภาพประกอบที่ 6 สำหรับการพล็อตในภาพรวม (overview plots) ของการกระจายของโปรตีนระหว่างการเปรียบเทียบตัวอย่างเชิงคู่ (ระหว่างกลุ่ม controls กับกลุ่มผู้ป่วยโควิด 19; ระหว่างกลุ่ม controls กับกลุ่มผู้ที่มีภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC); ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโควิด 19 กับกลุ่มผู้ที่มีภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC) ข้อมูลทั้งหมดสำหรับ supernatant และข้อมูลสิ่งตกค้างสะสมที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ (pellet deposits) ที่ได้รับการย่อยแสดงไว้ในส่วน Supplementary Material

ตารางที่ 1. การวิเคราะห์โปรตีโอมิกส์เชิงคู่ของสิ่งตกค้างสะสมที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ (pellet deposits) ที่ถูกย่อยแล้วจากผู้ป่วยโควิด 19 เียบพลันและผู้ที่มีภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเียบพลันของโควิด

19 (Long COVID/PASC) เปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ถูกย่อยอย่างเต็มที่จากกลุ่ม controls และกลุ่มผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2

สิ่งตกค้างสะสมที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ (ลิ้มเลือดแข็งตัวขนาดเล็ก) ที่ถูกย่อยจากตัวอย่างของผู้ป่วยโควิด 19 เียบพลันเปรียบเทียบกับพลาสมาที่ถูกย่อยจากตัวอย่างของกลุ่ม Control

โปรตีนเหล่านี้มีอยู่ในตัวอย่างทั้ง 2 ประเภท และค่าการเปลี่ยนแปลงเป็นเท่าตัว (fold change value) มากกว่า 1 หมายถึงเป็น โปรตีนที่มีความชุกมากกว่าภายในสิ่งตกค้างสะสมที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ (pellet deposits) ที่ถูกย่อยแล้วจากตัวอย่างของผู้ป่วยโควิด 19 โปรตีนเหล่านี้รวมตัวกันอย่างหนาแน่นอยู่ในสิ่งตกค้างสะสมที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ ที่ถูกย่อย

ชื่อโปรตีน	การเปลี่ยนแปลงเป็นเท่าตัว (Fold change)	p-value
vonWillebrandFactor	4.5	0.02
Complement component C4b	4.2	0.05
C-reactive protein	18.7	0.003

สิ่งตกค้างสะสมที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ (pellet deposits) ที่ถูกย่อยจากตัวอย่างลิ้มเลือดแข็งตัวขนาดเล็ก (microclots) ของผู้ที่มีภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC) เปรียบเทียบกับพลาสมาที่ถูกย่อยจากตัวอย่างของกลุ่ม Control

โปรตีนเหล่านี้มีอยู่ในตัวอย่างทั้ง 2 ประเภท และค่าการเปลี่ยนแปลงเป็นเท่าตัว (fold change value) มากกว่า 1 หมายถึงเป็นโปรตีนที่มีความชุกมากกว่าภายในสิ่งตกค้างสะสมที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ (pellet deposits) ที่ถูกย่อยแล้วจากตัวอย่างของผู้ที่มีภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC) โปรตีนเหล่านี้รวมตัวกันอย่างหนาแน่นอยู่ในสิ่งตกค้างสะสมที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ (pellet deposits) ที่ถูกย่อย

Coagulation factor XIII A chain	6.9	0.001
Plasminogen	3	0.001
Fibrinogen alpha chain	4.1	0.0001
α2 antiplasmin (α2AP)	7.98	0.0002
vonWillebrandFactor	10.2	0.001
C-reactive protein	11.2	0.007
Serum Amyloid A (SAA4)	17.5	0.01
Complement component C7	20	0.0002

สิ่งตกค้างสะสมที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ (pellet deposits) ที่ถูกย่อยจากตัวอย่างลิ่มเลือดแข็งตัวขนาดเล็ก (microclots) ของผู้ที่มีภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC) เปรียบเทียบกับสิ่งตกค้างสะสมที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ (pellet deposits) ที่ถูกย่อย (ลิ่มเลือดแข็งตัวขนาดเล็ก) จากตัวอย่างของผู้ป่วยโควิด 19 เฉียบพลัน

โปรตีนเหล่านี้มีอยู่ในตัวอย่างทั้ง 2 ประเภท และค่าการเปลี่ยนแปลงเป็นเท่าตัว (fold change value) มากกว่า 1 หมายถึงเป็นโปรตีนที่มีความชุกมากกว่าภายในสิ่งตกค้างสะสมที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ (pellet deposits) ที่ถูกย่อยแล้วจากตัวอย่างของผู้ที่มีภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC) โปรตีนเหล่านี้รวมตัวกันอย่างหนาแน่นอยู่ภายในสิ่งตกค้างสะสมที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ (pellet deposits) ที่ถูกย่อย

Plasminogen	2.3	0.0007
Fibrinogen B chain	2.8	0.0007
Coagulation factor XIII B	2.7	0.01
Fibrinogen α chain	3.1	0.0002
Complement component C6	7.5	0.01
α2 antiplasmin (α2AP)	9.2	0.0003
Complement factor 1	25	0.0009

พลาสมาที่ถูกย่อยจากตัวอย่างของผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (หลังจากการทำ trypsinization ขั้นที่ 1) เปรียบเทียบกับสิ่งตกค้างสะสมที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ (pellet deposits) ที่ถูกย่อย (ลิ่มเลือดแข็งตัวขนาดเล็ก) ของผู้ที่มีภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC) (หลังจากการทำ trypsinization ขั้นที่ 2)

โปรตีนเหล่านี้มีอยู่ในตัวอย่างทั้ง 2 ประเภท และค่าการเปลี่ยนแปลงเป็นเท่าตัว (fold change value) มากกว่า 1 หมายถึงเป็นโปรตีนที่มีความชุกมากกว่าภายในพลาสมาที่ถูกย่อยจากตัวอย่างของผู้ที่มีภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC)

Cytoskeletal Keratin, type I	24.7	0.01
Cytoskeletal Keratin, type II	14	0.02
C1q subcomponent subunit B	1	0.03

พลาสมาที่ถูกย่อยจากตัวอย่างพลาสมาของกลุ่ม **control** เปรียบเทียบกับตัวอย่างพลาสมาที่ถูกย่อยจากตัวอย่างของผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (ตัวอย่างพลาสมาทั้ง 2 ประเภทได้รับการตรวจวิเคราะห์หลังจากการทำ **trypsinization** ขั้นที่ 1)

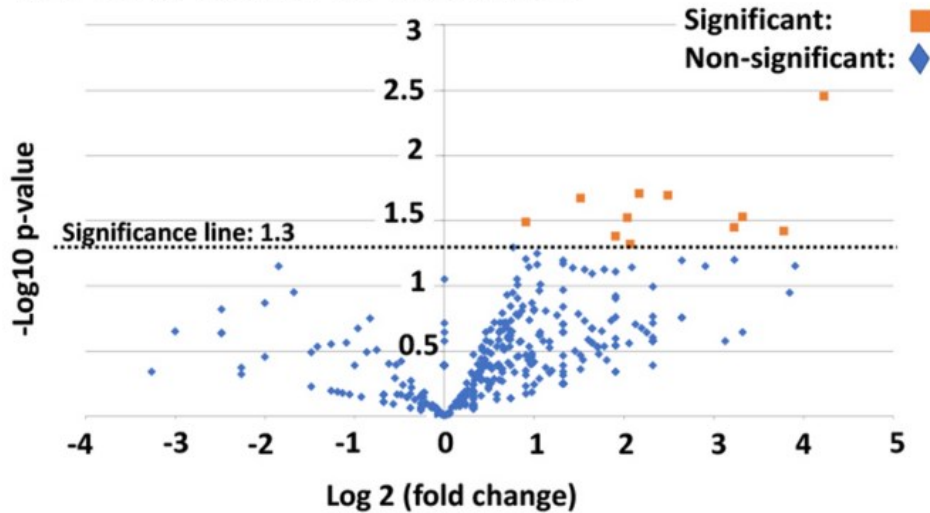
โปรตีนเหล่านี้มีอยู่ในตัวอย่างทั้ง 2 ประเภท และค่าการเปลี่ยนแปลงเป็นเท่าตัว (**fold change value**) มากกว่า 1 หมายถึงเป็นโปรตีนที่มีความชุก

มากกว่าภายในพลาสมาที่ถูกย่อยจากตัวอย่างของผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2

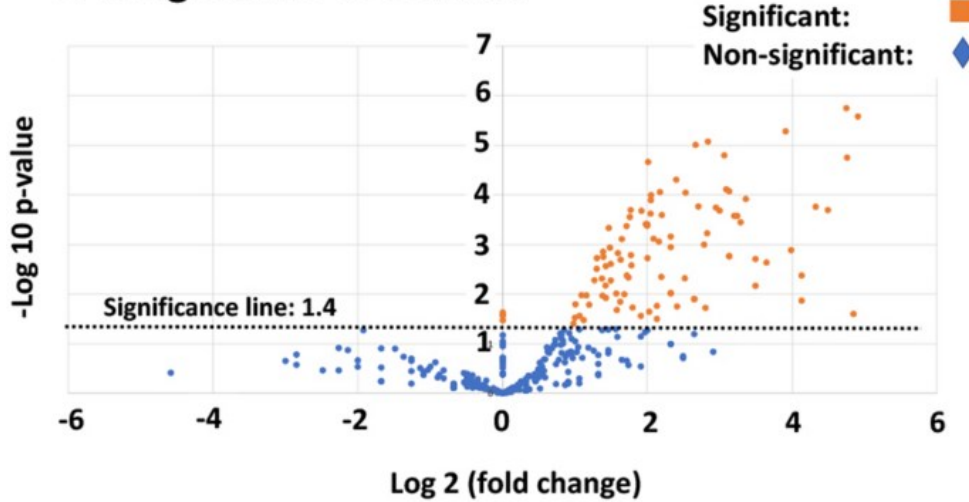
Complement C1r subcomponent-like protein	1.5	0.04
SAA1	2.5	0.03

ตัวอย่างทุกประเภทได้รับการทำ **trypsinization** 2 ขั้นตอน. ระหว่างกลุ่ม **controls** กับกลุ่มผู้ป่วยโควิด 19 เฉียบพลัน; ระหว่างกลุ่ม **controls** กับกลุ่มผู้ที่มีภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (**Long COVID/PASC**); ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโควิด 19 เฉียบพลันกับกลุ่มผู้ที่มีภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (**Long COVID/PASC**). โปรตีนที่แสดงไว้ในที่นี้มีอยู่ในตัวอย่างทั้ง 2 ประเภท; และค่าการเปลี่ยนแปลงเป็นเท่าตัวที่มากกว่า 1 หมายถึงโปรตีนที่มีความชุกมากกว่าในสิ่งตกค้างสะสมที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ (**pellet deposits**) ที่เฉพาะเจาะจงซึ่งถูกย่อย. เราจึงได้ทำการเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงเป็นเท่าตัว (**fold change**) ระหว่างพลาสมาที่ถูกย่อย (หลังจากการทำ **trypsinisation** ขั้นที่ 1) ของตัวอย่างจากกลุ่ม **controls** กับกลุ่มผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (**T2DM**) และระหว่างตัวอย่างจากกลุ่มผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 กับกลุ่มผู้ที่มีภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (**Long COVID/PASC**) (**supernatant** หลังจากการทำ **trypsinization** ขั้นที่ 1 เท่านั้น) อีกด้วย

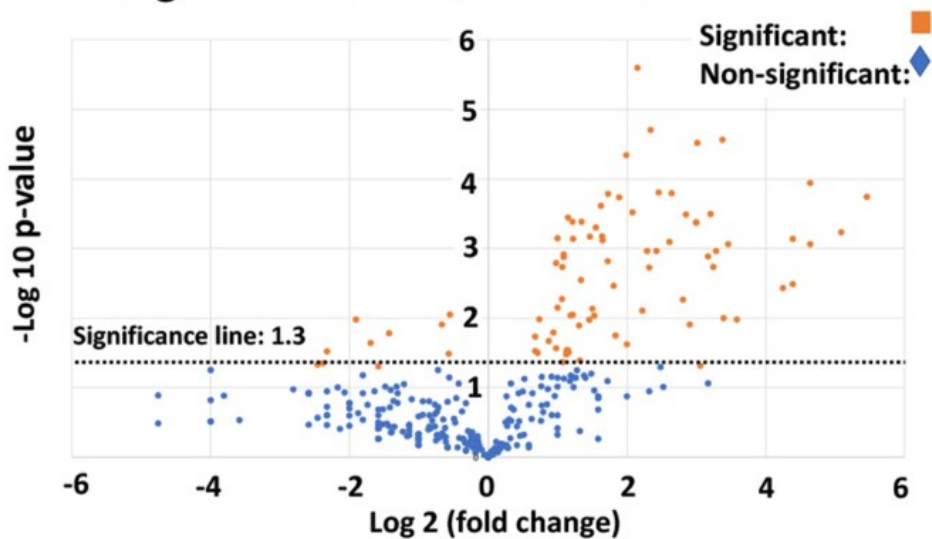
A: Acute COVID-19 vs Control



B: Long COVID vs Control



C: Long COVID vs Acute Covid-19



Volcano plots ของการกระจายของโปรตีนระหว่างการเปรียบเทียบตัวอย่างเชิงคู่ (ระหว่างกลุ่ม **controls** กับกลุ่มผู้ป่วยโควิด 19 ระหว่างกลุ่ม **controls** กับกลุ่มผู้ที่มีภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (**Long COVID/PASC**) และระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโควิด 19 กับกลุ่มผู้ที่มีภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (**Long COVID/PASC**). จุดสีส้มแสดงถึงโปรตีนที่อยู่เหนือระดับนัยสำคัญ (**significance levels**) ตามที่แสดงโดยเส้นประ. การเปลี่ยนแปลงเป็นเท่าตัว (**foldchange**) ได้รับการนำเสนอบนแกน **X** (ค่าลบหมายถึง **down-regulation** และค่าบวกหมายถึง **upregulation**). แกน **Y** แทน **Log(-minus) 10** ของค่า **p-values**

Mass spectrometry ของ supernatants ที่มี platelet poor plasma ที่ผ่านการย่อยแล้ว

โปรตีนโอมิกส์ที่อ้างอิงเทคนิค **mass spectrometry** ยืนยันว่าความเข้มข้นของ **α -fibrinogen chain** มีการเพิ่มขึ้นใน **supernatant** ของกลุ่มผู้ป่วยโควิด 19 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม **controls** และกลุ่มผู้ที่มีภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (**Long COVID/PASC**) ระดับของ **γ chains** และ **β chains** ไม่มีการเปลี่ยนแปลงใน **supernatant** ของตัวอย่างประเภทใด ๆ ระดับของ **antiplasmin** และ **plasminogen** ใกล้เคียงกันใน **supernatant** ของกลุ่ม **controls** กลุ่มผู้ป่วยโควิด 19 และกลุ่มผู้ที่มีภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (**Long COVID/PASC**)

Mass spectrometry ของสิ่งตกค้างสะสมที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ (pellet deposits) ที่ถูกย่อยแล้วเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ถูกย่อย (digested faction) ที่พบใน platelet poor plasma ของกลุ่ม control

โปรตีนโอมิกส์ที่อ้างอิงเทคนิค **mass spectrometry** ยืนยันว่าระดับของปัจจัยในการแข็งตัวของเลือด (**coagulation factor XIII**) คือ **fibrinogen chains** ของ **α fibrinogen** และ **β fibrinogen** มีการเพิ่มสูงขึ้นในสิ่งตกค้างสะสมที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ (**pellet deposits**) ที่ถูกย่อยแล้วจากตัวอย่างของกลุ่มผู้ที่มีภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (**Long COVID/PASC**) เมื่อเปรียบเทียบกับพลาสมาที่ถูกย่อยแล้วจากกลุ่ม **control** และสิ่งตกค้างสะสมที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ (**pellet deposits**) ที่ถูกย่อยแล้วจากผู้ป่วยโควิด 19 เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างจากกลุ่ม **control** และตัวอย่างจากกลุ่มผู้ป่วยโควิด 19 แล้วพบว่าระดับของ **plasminogen** มีการเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในสิ่งตกค้างสะสมที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ (**pellet deposits**) จากกลุ่มผู้ที่มีภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (**Long COVID/PASC**) ไม่มี **SAA4** อยู่ในพลาสมาที่ถูกย่อยแล้วของกลุ่ม **control** แต่มีอยู่ในสิ่งตกค้างสะสมที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ (**pellet deposits**) ที่ถูกย่อยแล้วของตัวอย่างจากกลุ่มผู้ที่มีภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (**Long COVID/PASC**) ผลที่ได้ที่น่าประหลาดใจก็คือว่า **SAA4** มีการเพิ่มสูงขึ้นเป็นอย่างมากในสิ่งตกค้างสะสมที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ (**pellet deposits**) ที่ถูกย่อยแล้ว เราชี้ให้เห็นว่าโมเลกุลเหล่านี้มีการติดค้างและรวมตัวกันอย่างหนาแน่นในลิ่มเลือดแข็งตัวขนาดเล็กที่ยับยั้งขัดขวางกระบวนการการสลายของลิ่มเลือด (**fibrinolysis-resistant microclots**) ซึ่งมีอยู่ในกระแสเลือด **SAA4** เป็นโมเลกุลที่มีการแสดงออกของการสร้างโปรตีนอย่างสม่ำเสมอ (**constitutively expressed**) ซึ่งตรงกันข้ามกับ **SAA1** และ **SAA2** ที่ทั้งสองชนิดนี้ล้วนเป็นโปรตีนในระยะเฉียบพลัน (**acute phase proteins**) เหมือนกัน

Mass spectrometry ของ **supernatants** ที่มี **platelet poor plasma** ที่ถูกย่อย เปรียบเทียบกันระหว่าง ตัวอย่างจากกลุ่ม **controls** กับตัวอย่างจากกลุ่มผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 และระหว่างตัวอย่างจากกลุ่มผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 กับตัวอย่างจากกลุ่มผู้ที่มีภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (**Long COVID/PASC**)

Platelet poor plasma ของกลุ่มผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 และของกลุ่ม **controls** ได้รับการย่อยอย่างเต็มที่หลังจากการทำ **trypsinization** ขั้นแรก โปรตีนโอมิกส์ของ **supernatants** แสดงให้เห็นถึงการเพิ่มสูงขึ้นเป็นเท่าตัวสำหรับโปรตีนชนิด **Complement C1r subcomponent-like protein** และ **SAA1** ในตัวอย่างที่ย่อยแล้วที่มาจากกลุ่มผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (**T2DM**) มากกว่าในตัวอย่างจากกลุ่ม **control** เป็นที่ทราบกันว่าโปรตีน **SAA1** มีการเพิ่มสูงขึ้นในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 [49] การกระตุ้นของ **classical complement pathway** เป็น **multimolecular complex** ซึ่งมี 3 องค์ประกอบย่อยอยู่ด้วยคือ **C1q, C1r, และ C1s** [50] หน่วยย่อย ๆ (subunit) เหล่านี้ก่อตัวเป็น **recognition areas** ของ **complex** และการจับยึดของมันกับเป้าหมายที่เฉพาะเจาะจงนำไปสู่ **formation** ของ **active C1** ซึ่งในทางกลับกันจะกระตุ้น **classical complement pathway** ในลักษณะที่อาศัยหรือไม่อาศัย **immunoglobulin** [50]

เรายังได้เปรียบเทียบ **supernatant** หลังจากการทำ **trypsinization** ขั้นที่ 1 ของตัวอย่างจากกลุ่มผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 และจากกลุ่มผู้ที่มีภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (**Long COVID/PASC**) ในครั้งนี้เราพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงเป็นเท่าตัวอย่างมีนัยสำคัญใน **C1q subcomponent subunit B** และใน **Keratin 2** ประเภทคือ ประเภทที่ 1 และประเภทที่ 2 (**cytoskel** และ **คณะ**)

การอภิปราย (Discussion)

ปัจจุบันนี้เป็นที่ทราบกันดีว่าการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ของหลอดเลือดและกลุ่มอาการของภาวะที่เซลล์เม็ดเลือดแดงถูกทำลายโดยลิ่มเลือดในหลอดเลือดขนาดเล็ก (**thrombotic microangiopathy**) ภาวะลิ่มเลือดแพร่กระจายในหลอดเลือด (**diffuse intravascular coagulation**) ตลอดจนภาวะลิ่มเลือดอุดตันในหลอดเลือดขนาดใหญ่ (**large-vessel thrombosis**) เป็นสาเหตุหลัก ๆ สำหรับการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี (**poor prognosis**) ในกรณีของโควิด 19 [51, 52] โรคประจำตัวเหล่านี้มีการเชื่อมโยงกับกลุ่มอาการการทำหน้าที่ผิดปกติของหลายอวัยวะ (**multisystem organ failure**) และโรค **pulmonary vascular endothelialitis** ด้วย [51, 53] โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเกิดภาวะ **endotheliopathy** ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่ามีความเกี่ยวข้องสัมพันธ์กับการเจ็บป่วยขั้นวิกฤตและการเสียชีวิต [54] มีการชี้แนะด้วยว่าความผิดปกติของเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือด (**endothelial dysfunction**) มีส่วนทำให้เกิดภาวะการอักเสบของหลอดเลือดที่สัมพันธ์กับโควิด 19 (**COVID-19-associated vascular inflammation**) ความผิดปกติในการแข็งตัวของเลือดที่สัมพันธ์กับโควิด 19 (**COVID-19-associated coagulopathy**) และภาวะ **pulmonary fibrinous microthrombi** ของเส้นเลือดฝอยในถุงลมปอด [53] ในบางกรณีผู้ป่วยมีการแสดงออกของการเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของผลิตภัณฑ์จากการสลาย **D-dimer/fibrin** หรือ **fibrinogen** [55] ผลิตภัณฑ์จากการสลาย **D-dimer** และ **fibrin** หรือ **fibrinogen** อาจบ่งบอกถึงความพยายามที่ล้มเหลวของระบบการสลายลิ่ม

เลือด (fibrinolytic system) ในการนำเอา fibrin และเนื้อเยื่อที่ตายแล้ว (necrotic tissue) ออกจากเนื้อเยื่อ parenchyma ของปอด (และออกจากกระแสเลือดด้วย) แต่ถูกกินหรือท่วมนั้นอยู่ในกระบวนการ [56]

สิ่งที่เป็นศูนย์กลางของพยาธิวิทยาของโควิด 19 ก็คือสภาพการณ์ทางพยาธิวิทยาที่มีการเปลี่ยนไปมาอย่างรุนแรงจากภาวะเลือดแข็งตัวเร็วผิดปกติ (hypercoagulation) และภาวะการละลายลิ่มเลือดที่ต่ำผิดปกติ (hypofibrinolysis) ในปี พ.ศ. 2564 Bouck และคณะผู้วิจัยได้พบว่าช่วงเวลาระหว่าง 2 เหตุการณ์ (lag times) ในการก่อตัว (formation) ของ thrombin, plasmin, และ fibrin ถูกทำให้ยืดเยื้อออกไปเมื่อความรุนแรงของโรคโควิด 19 เพิ่มขึ้น [57] ทางผู้เขียนผลงานการวิจัยยังได้อ้างเหตุผลว่าถึงแม้ว่าการที่มี D-dimer อยู่เป็นการชี้ให้เห็นว่า fibrinolytic pathways ยังสมบูรณ์ครบถ้วนและกำลังทำหน้าที่สลาย fibrin อยู่อย่างแข็งขันนั้น แต่การที่ค้นพบสิ่งตกค้างสะสม (deposits) ของ fibrin อยู่ในปอดและในอวัยวะอื่น ๆ ก็เป็นการชี้ให้เห็นว่าความผิดปกติ (dysregulation) ของสมดุลของวิถี (pathways) ในการก่อตัวของไฟบริน (fibrin-forming) และในการสลายไฟบริน (fibrin-dissolving) (หรือการเกิดพลาสมิน [plasmin generation]) เป็นลักษณะที่สำคัญของการเกิดโรค (pathogenesis) โควิด 19 [57]

ผลที่ได้จากการศึกษาวิจัยที่นำเสนอในเอกสารผลงานการศึกษานี้ชี้ให้เห็นถึงความล้มเหลวที่มีนัยสำคัญในกระบวนการสลายลิ่มเลือด (fibrinolytic process) ในระหว่างที่ป่วยเป็นโควิด 19 และในผู้ป่วยที่มีอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC) ด้วย ผลที่ได้จากการศึกษาวิจัยของเราแสดงให้เห็นว่าโปรตีนในพลาสมาในตัวอย่างพลาสมาทั้งจากผู้ป่วยโควิด 19 และจากผู้ที่มีอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC) มีการยับยั้งขัดขวางการสลายลิ่มเลือดเป็นอย่างมากเมื่อมี trypsin ปรากฏการณ์นี้ได้รับการยืนยันจากการที่มองเห็นภาพโดยใช้เทคนิค fluorescence microscopy รวมทั้งเทคนิคโปรตีโอมิกส์ด้วย ความเปลี่ยนแปลงที่มีนัยสำคัญส่วนใหญ่ที่แสดงให้เห็นในการตรวจวิเคราะห์ทางโปรตีโอมิกส์อยู่ในโปรตีนในกระแสเลือด (circulating proteins) ที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือด เราสังเกตเห็นการเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของ fibrinogen chains ตลอดจนโปรตีนในระยะเฉียบพลัน (acute phase proteins) อย่างเช่น SAA4 และ $\alpha 2AP$ ตามที่ได้แสดงไว้ใน การตรวจวิเคราะห์ทางโปรตีโอมิกส์ (ตารางที่ 1) ผลที่ได้จากการศึกษาวิจัยของเราชี้ให้เห็นถึงการเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของ $\alpha 2AP$ ในผู้ป่วยที่มีอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC) เมื่อเปรียบเทียบกับในกลุ่ม controls และในผู้ป่วยที่มีอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยโควิด 19 สำหรับสิ่งตกค้างสะสมที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ ที่ถูกย่อย (digested pellet deposits) ในการศึกษาวิจัยนี้เรายังได้แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างระหว่าง SAA1 กับ SAA4 อีกด้วย SAA1 มีการเพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่าใน platelet poor plasma ทั้งจากผู้ป่วยโควิด 19 เฉียบพลันและจากผู้ที่มีอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC) ตามที่เห็นในการตรวจวิเคราะห์ SAA1 ด้วยเทคนิค ELISA โปรตีน SAA1 และโปรตีนที่เหมือนองค์ประกอบย่อย Complement C1r (Complement C1r subcomponent-like protein) ก็มีการเพิ่มสูงขึ้นเช่นเดียวกันใน supernatant ที่มีพลาสมาที่ถูกย่อยอย่างเต็มที่

ของตัวอย่างจากผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 (หลังจากการทำ **trypsinization** ขั้นที่ 1) เมื่อเปรียบเทียบกับใน **supernatant** ที่มีพลาสมาที่ถูกย่อยอย่างเต็มที่ของตัวอย่างจากกลุ่ม **controls** เป็นที่ทราบกันว่าการเพิ่มสูงขึ้นของโปรตีน **SAA1** ในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 [49] และผลเสียต่อหลอดเลือดของ **complement** กระบวนการอักเสบตลอดจนสภาพแวดล้อมของการเกิดลิ่มเลือดอุดตันอาจจะมีบทบาทสำคัญในพยาธิวิทยาของผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 [58] ในอนาคตควรมีการศึกษาเกี่ยวกับบทบาทของ **complement molecules** อื่น ๆ เช่น **C3, C6 และ C7** ในผู้ป่วยโควิด 19 เฉียบพลันและในผู้มีอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (**Long COVID/PASC**) ต่อไป นอกจากนี้เรายังพบการเพิ่มสูงขึ้นของโปรตีน **VWF** ในตัวอย่างจากผู้ป่วยโควิด 19 เฉียบพลันและจากผู้มีอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (**Long COVID/PASC**) อีกด้วย สิ่งนี้มีนัยสำคัญสำหรับการยึดเกาะของเกล็ดเลือดกับเยื่อผนังหลอดเลือด (**endothelium**) [59] เมื่อโปรตีน **VWF** มีการเพิ่มสูงขึ้นเกล็ดเลือดจะได้รับการกระตุ้นมากขึ้นและมีแนวโน้มมากขึ้นในการยึดเกาะกับเยื่อผนังหลอดเลือด [60]

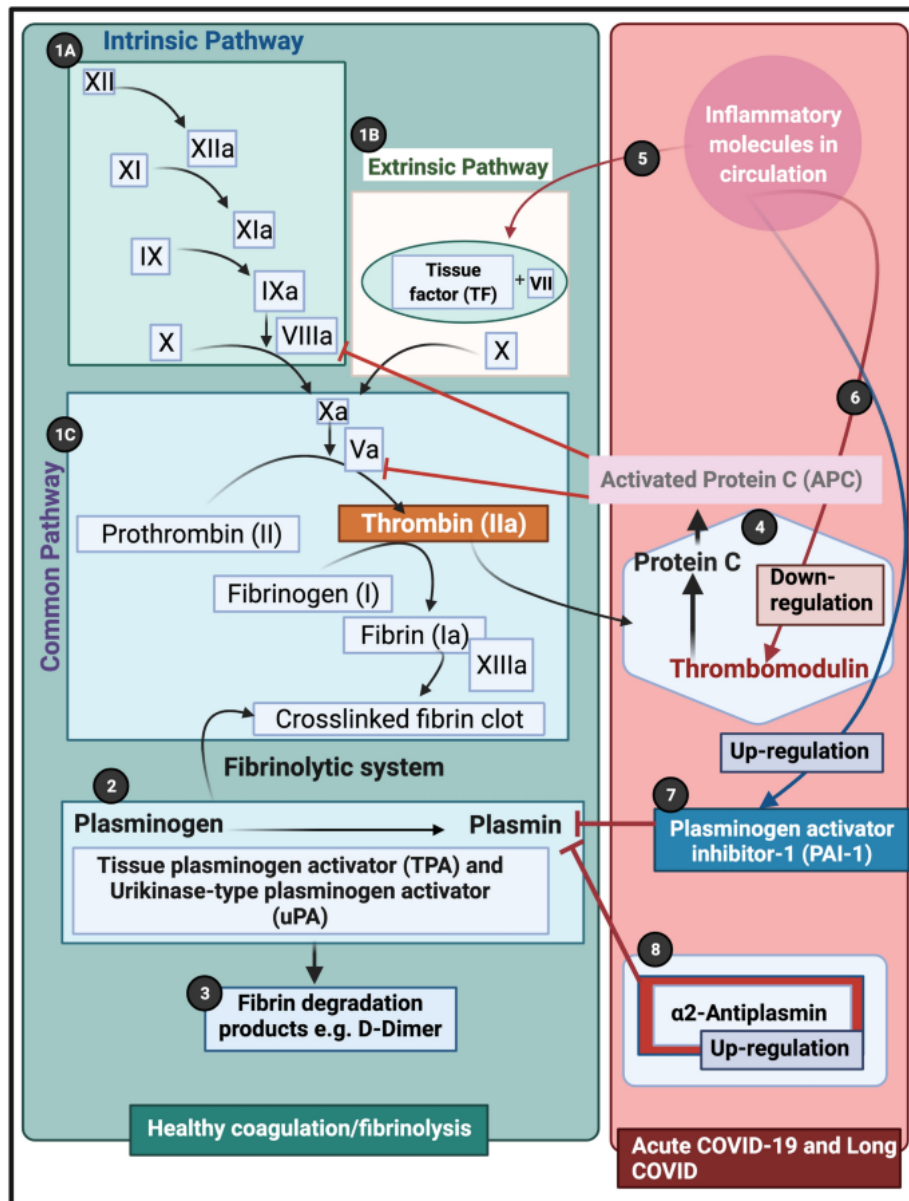
โปรตีน **SAA4** (มีการพบเป็น **apolipoprotein** ของ **HDL** ด้วย) มีการสังเคราะห์อย่างสม่ำเสมอ (**synthesized constitutively**) ในตับ [46] ในการศึกษาวิจัยนี้เรารายงานว่า **SAA4** มีการเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในการวิเคราะห์ทางโปรตีนของสิ่งตกค้างสะสมที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ (**pellet deposits**) ที่ผ่านการย่อยด้วย **trypsin** 2 ขั้นตอนของเรา มีการเพิ่มสูงขึ้นถึง 17 เท่าตัวของ **SAA4** ใน **platelet poor plasma** ของตัวอย่างจากกลุ่มผู้ที่มีอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (**Long COVID/PASC**) เมื่อเปรียบเทียบกับของตัวอย่างจากกลุ่ม **controls** เรารายงานการเปลี่ยนแปลงเป็นเท่าตัว (**fold changes**) ของโปรตีนที่อยู่ในสิ่งตกค้างสะสมที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ ที่ต่อต้านขัดขวางกระบวนการการสลายของลิ่มเลือด (**fibrinolysis-resistant pellet deposits**) ของผู้ป่วยโควิด 19 เฉียบพลันและผู้ที่มีอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (**Long COVID/PASC**) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างของเหลวของกลุ่ม **controls** ซึ่งก็ได้รับการย่อยจากกระบวนการ **trypsinization** 2 ขั้นตอนเหมือนกัน ดังนั้นความเข้มข้นที่แท้จริงในตัวอย่างพลาสมาจึงอาจจะไม่สะท้อนถึงการเปลี่ยนแปลงเป็นเท่าตัว (**fold changes**) ที่เรารายงานในการศึกษาวิจัยนี้ สำหรับโปรตีนที่ติดค้างอยู่ในสิ่งตกค้างสะสมที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ ที่ละลาย (**solubilized pellet deposits**) เมื่อเร็ว ๆ นี้มีการแสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยที่มีคอเลสเตอรอลชนิด **HDL** ในระดับต่ำ ๆ ในระหว่างที่เข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาลมีความเป็นไปได้มากกว่าในการที่จะพัฒนาไปสู่การเจ็บป่วยรุนแรง เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีคอเลสเตอรอลชนิด **HDL** อยู่ในระดับสูง ๆ **Is** [61] และเมื่อเปรียบเทียบกับผู้ที่มีสุขภาพดีในกลุ่ม **controls** ผู้ป่วยเหล่านี้มีความเข้มข้นของคอเลสเตอรอลทั้งหมด (คอเลสเตอรอลชนิด **HDL** และชนิด **LDL**) ลดลงอย่างรวดเร็ว [62] จากการที่มีระดับของคอเลสเตอรอลชนิด **HDL** ในกระแสเลือดลดลง จึงมีความเป็นไปได้ว่าโปรตีน **SAA4** จะได้รับการแยก (**partitioned**) น้อยลงในคอเลสเตอรอลชนิด **HDL**

ที่น่าสนใจเป็นพิเศษคือการปรากฏตัวในเวลาเดียวกันของสิ่งตกค้างสะสมที่ผิดปกติหรืออะไมลอยด์ (**amyloid**) หรือลิ่มเลือดแข็งตัวขนาดเล็ก (**microclots**) และระบบการสลายลิ่มเลือดจากภาวะผิดปกติของโรค (**pathological fibrinolytic system**) สมดุลของ **plasmin** และ **antiplasmin** อาจจะเป็นศูนย์กลางต่อการเกิดปรากฏการณ์นี้

(ดูจากภาพประกอบที่ 7) องค์ประกอบสำคัญอย่างหนึ่งของระบบการสลายลิ่มเลือด (fibrinolytic system) คือการเปลี่ยน zymogen plasminogen ในกระแสเลือดเป็น plasmin ซึ่งเป็นรูปแบบที่ active ของมัน [63, 64] ตัวกระตุ้นจากภายใน (endogenous activators) ของ plasminogen ได้แก่ tissue-type plasminogen activator (tPA) และ urokinase-type plasminogen activator (uPA) [65] ปฏิกิริยาเร่ง (catalytic activity) ของ tPA ส่วนใหญ่มีการพึ่งพาอาศัยการมีอยู่ของไฟบริน เพราะว่าทั้ง tPA และ substrate plasminogen ของมันล้วนมีการจับยึดกับ lysine residues บนไฟบรินและใช้มันเป็น cofactor สำหรับสร้าง plasmin [64] Plasmin เป็น effector protease ของระบบการสลายลิ่มเลือด (fibrinolytic system) ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีสำหรับการที่มันมีส่วนเกี่ยวข้องในการย่อยสลายไฟบริน (fibrin degradation) และนำเอาลิ่มเลือดออกไป [63] Plasmin ยังได้รับการยอมรับว่าเป็น potent modulator ของกระบวนการทางภูมิคุ้มกันวิทยาต่าง ๆ โดยการมีปฏิสัมพันธ์โดยตรงกับเซลล์ชนิดต่าง ๆ รวมทั้งเซลล์ของหลอดเลือด (เซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด เซลล์กล้ามเนื้อเรียบ) อีกด้วย [63] จริง ๆ แล้วดูเหมือนว่าการนำเอาโปรตีนชนิดที่ถูกพับผิดปกติ (misfolded proteins) ออกไปและการบำรุงรักษาไว้ซึ่งสภาวะสมดุลของเนื้อเยื่อ (tissue homeostasis) จะเป็นบทบาทหน้าที่หลักทางด้านสรีรวิทยาของ plasmin [63] นอกจากนี้ plasmin ยังถูกยับยั้งขัดขวางจาก actions ของ serine protease inhibitors ต่าง ๆ เช่น α 2AP อีกด้วย [64] ระดับที่สูงของ α 2AP ในเลือด [66] ซึ่งเป็น covalent inhibitor ที่มีความเร็วเป็นพิเศษ (untrafast) ของ plasmin มีความเชื่อมโยงกับความเสี่ยงที่เพิ่มขึ้นในการเกิดภาวะหลอดเลือดสมองตีบตันหรือภาวะสมองขาดเลือด (ischemic stroke) และความล้มเหลวของการรักษาด้วยการให้ยาละลายลิ่มเลือด (tissue plasminogen activator therapy) ในมนุษย์ [67] นอกจากนี้แล้ว plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) และ α 2AP ยังบำรุงรักษาสภาวะสมดุลที่ละเอียดอ่อนในสภาวะทางสรีรวิทยาปกติอีกด้วย [68] α 2AP มีการเชื่อมโยงข้ามด้วยพันธะโควาเลนต์ (covalently cross-linked) กับไฟบรินในลิ่มเลือด (thrombus) โดย factor XIII (เอนไซม์ transglutaminase) ที่ได้รับการกระตุ้น [69, 70] ซึ่งเป็นแหล่งที่มาหลัก ๆ ของการยับยั้งขัดขวางของลิ่มเลือดในพลาสมาต่อการสลายลิ่มเลือดที่มีพลาสมินเป็นสื่อกลาง (plasmin-mediated fibrinolysis) ในหลอดเลือด [66] ด้วยเหตุนี้จึงมีความเป็นไปได้อย่างยิ่งว่า อย่างเช่นที่เราสังเกตเห็นในตัวอย่างจากผู้ที่มีอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC) ของเรา ถ้าหากว่ามีสิ่งตกค้างสะสมที่ผิดปกติหรืออะไมลอยด์ (amyloid) หรือลิ่มเลือดขนาดเล็ก (microclots) ของไฟบรินหรือของไฟบริโนเจนในกระแสเลือดมากเกินไปในผู้ป่วยโควิด 19 เฉียบพลันหรือในผู้ที่มีอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC) และ α 2AP มีการเพิ่มสูงขึ้นเป็นเท่าตัวอย่างมีนัยสำคัญแล้ว จะทำให้ตัวกระตุ้นจากภายใน (endogenous activators) ของ plasminogen ตลอดจน cascade ของเหตุการณ์ต่าง ๆ ทางสรีรวิทยา (physiological events) ที่จะตามมาซึ่งได้รับการขับเคลื่อนจากการสร้างพลาสมิน (plasmin generation) ประสบความล้มเหลว นอกจากนี้พลาสมินยังช่วยดำเนินการ (process) ให้โปรตีนส่วนหนามของไวรัส (viral S-protein) สามารถเข้าสู่ host cells [65] ที่ซึ่งพลาสมินและ proteases อื่น ๆ ได้ผ่า (cleave) บริเวณ furin site ที่เพิ่งได้รับการ inserted ใหม่ ๆ ในโปรตีนส่วนหนาม (S protein) ของไวรัสโคโรนา SARS-CoV-2 จากภายนอกเซลล์ (extracellularly) ซึ่งช่วยเพิ่มความสามารถในการติดเชื้อ (infectivity) และความรุนแรง (virulence) ของไวรัส [56] การเกี่ยวข้องของ

พลาสมินในการติดขัดกับโปรตีนส่วนหนาม (S protein) ของไวรัสนี้อาจจะมีส่วนเป็นเหตุให้ประสิทธิภาพของพลาสมินลดน้อยลงในการจัดการกับการเพิ่มขึ้นของปริมาณไฟบรินหรือไฟบริโนเจนที่ผิดปกติต่อไป

Fig. 7



แผนภูมิอย่างง่ายของการแข็งตัวของเลือด (ซึ่งดัดแปลงจาก [37, 71, 72] แสดงให้เห็นถึงกระบวนการในผู้ที่สุขภาพดีและในระหว่างเกิดพยาธิสภาพ. (1A) วิถีภายใน (intrinsic pathways) (1B) และวิถีภายนอก (extrinsic pathways) บรรจบกันเป็น (1C) วิถีร่วม (common pathway). วิถีเหล่านี้นำไปสู่การเปลี่ยนไฟบริโนเจนที่ละลายได้ (soluble fibrinogen) ไปเป็นไฟบรินที่ละลายไม่ได้ (insoluble fibrin) ซึ่งได้รับการเร่ง (catalyzed) จากเอนไซม์ทรอมบิน (thrombin). (2) Tissue plasminogen activator (tPA) หรือ urokinase-type plasminogen activator (uPA) เปลี่ยน plasminogen เป็น plasmin. ระบบการสลายลิ่มเลือดในผู้ที่สุขภาพดีเป็นตัวควบคุม (regulates) วิธีการแข็งตัวของเลือด (coagulation pathway) และช่วยในการสลายตัวที่ประสบผลสำเร็จ (successful lysis) ของลิ่มเลือดในไฟบรินที่ละลายไม่ได้ (insoluble fibrin clot). (3) Plasmin ตัด (cleave) fibrin ไปเป็นผลิตภัณฑ์ของการย่อยสลายไฟบริน (fibrin degradation products (FDPs))

รวมทั้ง D-dimer. (4) โปรตีน C และ thrombomodulin ล้วนควบคุม (regulate) การแข็งตัวของเลือด: thrombin จับยึดกับ receptor ของมันคือ thrombomodulin ส่งผลให้เกิดโปรตีน C ที่ถูกกระตุ้น (activated protein C [APC]). หลังจากนั้นโปรตีน C ที่ถูกกระตุ้น (APC) ก็จะยับยั้งขัดขวางทั้ง Va และ VIIIa. (5) โมเลกุลที่มีความผิดปกติซึ่งทำให้เกิดการอักเสบ (dysregulated inflammatory molecules) อาจจะไปรบกวนการแสดงออกของ tissue factor (TF). (6) โมเลกุลที่มีความผิดปกติซึ่งทำให้เกิดการอักเสบ (dysregulated inflammatory molecules) ยังอาจจะ down-regulate thrombomodulin อีกด้วย ซึ่งส่งผลให้เกิดภาวะเลือดแข็งตัวเร็วผิดปกติ (hypercoagulation) เพราะฉะนั้นปฏิกิริยาอาการของ Va และ VIIIa ไม่ได้มีการ modulated อย่างเพียงพอ. (7) โมเลกุลที่มีความผิดปกติซึ่งทำให้เกิดการอักเสบในกระแสเลือดสามารถยับยั้งขัดขวางระบบการสลายลิ่มเลือดโดยผ่านทาง การ up-regulation ของ plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) การ upregulation ของ PAI-1 ไปรบกวนการทำงานของ tissue plasminogen activator (TPA) และในที่สุดก็นำไปสู่ระบบการแข็งตัวที่ผิดปกติ (dysregulated coagulation system). (8) α 2-antiplasmin (α 2AP) ยับยั้งขัดขวาง plasmin และในที่สุดก็จะป้องกันมิให้การสลายลิ่มเลือดที่เพียงพอ (sufficient fibrinolysis) เกิดขึ้นได้

สรุปผล (Conclusion)

ภาวะที่เกิดลิ่มเลือดได้ง่ายกว่าปกติ (hypercoagulability) เป็นภาวะที่ทราบกันดีว่าเกิดร่วมกันกับโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (T2DM) [49, 73] นอกจากนี้ยังเป็นที่ยอมรับเพิ่มมากขึ้นอีกด้วยว่าภาวะที่เกิดลิ่มเลือดได้ง่ายกว่าปกตินี้เป็นภาวะแทรกซ้อนจากการติดเชื้อโควิด 19 และการต้านการแข็งตัวของเลือดได้กลายเป็นศูนย์กลางในการจัดการกับโควิด 19 ที่ครอบคลุมรอบด้าน [65, 74] ดังนั้นการก่อตัวขึ้นของลิ่มเลือดแข็งตัวขนาดเล็กที่มีความผิดปกติอย่างมีนัยสำคัญ (อะไมลอยด์) ซึ่งยับยั้งขัดขวางการสลายลิ่มเลือด (fibrinolysis) ระดับ α 2AP ที่เพิ่มสูงขึ้น และการขึ้น ๆ ลง ๆ (surge) ของโมเลกุลต่าง ๆ ที่ทำให้เกิดการอักเสบในระยะเฉียบพลัน (acute phase inflammatory molecules) จึงอาจจะเป็นตัวการหลัก (central contributors) ของพยาธิสรีรวิทยา (pathophysiology) ของการแข็งตัวของเลือด/การสลายลิ่มเลือดที่ซับซ้อนหลายอย่างทั้งในการติดเชื้อโควิด 19 และในฟีโนไทป์ที่ยังตกค้างเหลืออยู่ (lingering phenotype) คือภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC) การที่เราพบว่าการเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของโมเลกุลที่ผิดปกติ (dysregulated molecules) เมื่อเปรียบเทียบตัวอย่างจากผู้ป่วยโควิด 19 เฉียบพลันกับตัวอย่างจากผู้ที่มีภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC) เป็นสิ่งที่น่าสนใจ และเราคาดว่ามันอาจจะเนื่องมาจากภาวะอักเสบที่ยืดเยื้อในผู้ที่มีภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC) และมีความเป็นไปได้ด้วยว่าอาจจะมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อค้างนาน (persistent infection) จากไวรัส (ถึงแม้ว่าไม่ได้รับการยืนยันในการศึกษาวิจัยนี้) เราขอรับว่าตอนนี้สิ่งที่พบจากเทคนิคโปรตีโอมิกส์บางอย่างควรได้รับการยืนยันโดยการใช้อุปกรณ์ที่มีขนาดใหญ่ขึ้น เนื่องจากว่าอำนาจทางสถิติ (statistical power) ของกลุ่มตัวอย่างในการศึกษาวิจัยนี้มีอยู่จำกัด เรายังแนะนำว่าวิธีการต่าง ๆ อย่างเช่นการวิเคราะห์การวัดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด (platelet aggregometry analysis) และการวิเคราะห์ PT และ PTT ควรได้รับการพิจารณาด้วย ในการศึกษาวิจัยนี้เราสรุปว่า (i) ภาวะที่เกิดลิ่มเลือดได้ง่ายกว่าปกติ (hypercoagulability) มีสาเหตุเนื่องมาจากการเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของโมเลกุลที่ชักนำให้เกิดการอักเสบ (inflammatory molecules) (ii) ลิ่มเลือดแข็งตัวขนาดเล็กในกระแสเลือด (circulating microclots) และเกล็ดเลือดที่ได้รับการกระตุ้นมากผิดปกติ (hyperactivated platelets) และ (iii) ระบบการสลายลิ่มเลือดที่ผิดปกติ

(aberrant fibrinolytic system) ทั้งหมดนี้ล้วนได้รับการขับเคลื่อนจากการทำหน้าที่ผิดปกติ (dysfunction) ของโปรตีนที่เป็นปัจจัยในการแข็งตัวของเลือด (clotting protein) รวมทั้งอุปสงค์และอุปทานของเอนไซม์ที่ใช้อยู่สลาย (lytic enzyme) ที่เป็นศูนย์กลางของภาวะการละลายลิ่มเลือดที่ต่ำผิดปกติ (hypofibrinolysis) และลิ่มเลือดแข็งตัวขนาดเล็กตกค้างต่อเนื่อง (persistent microclots) ก็คือการที่มี $\alpha 2AP$ เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ $\alpha 2AP$ (iv) ความเกี่ยวข้องสัมพันธ์กันระหว่างโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (T2DM) กับการพัฒนาของภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC) จำเป็นจะต้องได้รับการใส่ใจอย่างเร่งด่วนและจะต้องมีการศึกษาวิจัยต่อไป เพื่อที่จะค้นหาความสัมพันธ์กันระหว่างภาวะโรคเบาหวานชนิดที่ 2 กับภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC) ด้วยเหตุนี้พยาธิวิทยาในการแข็งตัวของเลือด (clotting pathologies) ทั้งในการติดเชื้อโควิด 19 เฉียบพลันและในภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC) จึงอาจจะได้รับประโยชน์จากการทำตามวิธีการในการบำบัดรักษาด้วยการยับยั้งการรวมตัวของเกล็ดเลือดอย่างต่อเนื่อง (continued anticoagulation therapy) เพื่อส่งเสริมสนับสนุนการทำงานของระบบการละลายลิ่มเลือด (fibrinolytic system function)