

ฉบับแปลไทย (Thai Translations)

Viral replication in human macrophages enhances an inflammatory cascade and interferon driven chronic COVID-19 in humanized mice

<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.09.27.461948v1>

การจำลองตัวเองของไวรัสในเซลล์แมโครฟาจของมนุษย์สนับสนุนให้เกิดกระบวนการอักเสบเป็นลำดับ

(inflammatory cascade) และสนับสนุนให้เกิดโรคโควิด 19 เรื้อรังที่มีอินเตอร์เฟียร์รอนเป็นตัวขับเคลื่อนในหนูที่ถูกบรรจุสารพันธุกรรมของมนุษย์

## บทคัดย่อ (Abstract)

โควิด 19 เรื้อรังมีลักษณะเด่นคืออาร์เอ็นเอไวรัสที่คงอยู่นานและการตอบสนองของอินเตอร์เฟียร์รอนที่มีอยู่ต่อเนื่อง ซึ่งได้รับการยืนยันและเป็นสิ่งที่จำเป็นสำหรับพยาธิวิทยาในหนูที่ถูกบรรจุสารพันธุกรรม MISTRG6-hACE2 ของมนุษย์ที่ถูกทำให้ติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 เช่นเดียวกับการเกิดโรคในมนุษย์ ไมโนไซต์และแมโครฟาจในหนูที่ถูกบรรจุสารพันธุกรรม MISTRG6-hACE2 ที่ติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 ก็เป็นศูนย์กลางสำหรับพยาธิวิทยาของโรค ในการศึกษาวิจัยนี้เราอธิบายถึงการกลืนกินไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 โดยแมโครฟาจ (tissue resident human macrophages) ซึ่งได้รับการส่งเสริมสนับสนุนจากแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัส เชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 มีการจำลองตัวเองในแมโครฟาจของมนุษย์เหล่านี้ตามที่ปรากฏชัดเจนจากการตรวจพบอาร์เอ็นเอสายคู่ subgenomic viral RNA และการแสดงออกของยีน fluorescent reporter ที่บรรจุรหัสนิวคลีโอไทด์ของไวรัส และเชื้อไวรัสที่ถูกยับยั้งขัดขวางจากการจำลองตัวเองของไวรัส Remdesivir ซึ่งเป็นตัวยับยั้งขัดขวางการจำลองตัวเองของไวรัส ถึงแม้ว่าการขาดแคลนอินเตอร์เฟียร์รอนในตอนเริ่มแรกได้นำไปสู่การอาการของโรคที่รุนแรงมากขึ้น แต่การสกัดกั้นหยุดยั้งการจำลองตัวเองของไวรัสโดยยา Remdesivir หรือกระบวนการ (cascade) ปลายสาย (downstream) ซึ่งได้รับการกระตุ้นจากอินเตอร์เฟียร์รอนโดยการจับแอนติบอดีที่จำเพาะ IFNAR2 ในร่างกายสิ่งมีชีวิตในระยะเรื้อรังของโรคก็เป็นการลดทอนหลาย ๆ ด้านของภาวะอักเสบที่ระบบภูมิคุ้มกันทำงานมากเกินไป (overactive immune-inflammatory response) โดยเฉพาะอย่างยิ่งปฏิกิริยาการอักเสบของแมโครฟาจ และผลสุดท้ายก็คือการเกิดโรคเรื้อรังนั่นเอง

## บทนำ (Introduction)

การติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 เริ่มต้นด้วยการติดเชื้อไวรัสแบบเฉียบพลันซึ่งมีการคลี่คลายสิ้นสุดลงในผู้ป่วยส่วนใหญ่แต่ก็มีประมาณ 10-20% ที่เกิดการเจ็บป่วยเรื้อรัง<sup>1-2</sup> จุดเด่น 2 อย่างของโรคโควิด 19 ในผู้ป่วยอาการรุนแรงและในกลุ่มอาการหลังโควิด (Post-COVID syndrome - PCS) ก็คือการตอบสนองของ อินเตอร์เฟียร์รอนที่มีอยู่ต่อเนื่องและอาร์เอ็นเอของไวรัสที่คงอยู่นาน ซึ่งสามารถตรวจพบได้นานนับหลายเดือนแม้แต่หลังจากสิ้นสุดอาการเฉียบพลันแล้วก็ตาม<sup>3-11</sup> ความเรื้อรังของโรค (chronicity) นี้ได้รับการเน้นย้ำในหนูที่ถูกบรรจุสารพันธุกรรม MISTRG6-hACE2 ของมนุษย์ที่ถูกทำให้ติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 จากอาร์เอ็นเอของไวรัสที่ยังคงอยู่นานและการตอบสนองของอินเตอร์เฟียร์รอน type I ที่มีอยู่ต่อเนื่องในปอดยาวนานถึงอย่างน้อยหนึ่งเดือนภายหลังจากมีการฉีด (inoculate) ไวรัส ซึ่งได้ตรวจพบไวรัสที่สามารถตรวจพบได้เพียงแต่ได้มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (เอกสารผลงานการศึกษาย่อยระหว่างแก้ไขปรับปรุง)<sup>12</sup> เช่นเดียวกับการเกิดโรคในมนุษย์ไมโนไซต์และแมโครฟาจในหนูที่ถูกบรรจุสารพันธุกรรม MISTRG6-hACE2 ที่ติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 ก็เป็นศูนย์กลางสำหรับพยาธิวิทยาของโรคและเป็นแหล่งที่มาหลัก ๆ ของไซโตไคน์ที่มีแนวโน้มทำให้เกิดการอักเสบคือ interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-18, TNF- $\alpha$  และ IL-6 ในปอดที่ติดเชื้อ ในบรรดาไซโตไคน์เหล่านี้ที่เพิ่มสูงขึ้นในผู้ป่วยโควิด 19 พบว่า IL-1 $\beta$ , IL-18 และ IL-6 ยังมีสหสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคอีกด้วย<sup>4-10</sup> จำเป็นจะต้องมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมในการประเมินบทบาทของไซโตไคน์เหล่านี้ รวมทั้งการมีส่วนร่วมเกี่ยวข้องหรือผลกระทบที่อาจจะตามมาจากอาร์เอ็นเอของไวรัสที่คงอยู่นานและการตอบสนองของอินเตอร์เฟียร์รอนในผู้ป่วยโควิด 19 ที่มีอาการรุนแรงและในกลุ่มอาการหลังโควิด (Post-COVID syndrome - PCS) ความสามารถของโมเดลหนูที่ถูกบรรจุสารพันธุกรรม MISTRG6-hACE2 ในการย้ำถึงแง่มุมหลัก ๆ ของโรคโควิด 19 ทำให้เราสามารถทั้งเรียนรู้กลไกเบื้องต้นของการดำเนินของโรคและทดสอบวิธีการรักษาที่เป็นไปได้ที่มุ่งเป้าให้ตรงจุดไปที่กลไกการเกิดโรคเหล่านี้ ในการศึกษาวิจัยนี้เราอธิบายลักษณะเด่นของบทบาทของอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัสในปฏิกิริยาการอักเสบที่มากเกินไปของแมโครฟาจในร่างกายสิ่งมีชีวิต และแสดงให้เห็นว่าผลกระทบของอาร์เอ็นเอของไวรัสที่มีอยู่ต่อเนื่องและการตอบสนองของอินเตอร์เฟียร์รอนที่มีอยู่ต่อเนื่องเป็นสิ่งที่จำเป็นจะต้องมีสำหรับพยาธิกำเนิดในหนูที่ถูกบรรจุสารพันธุกรรม MISTRG6-hACE2 ที่ติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 ต่อจากนั้นเรายังได้แสดงให้เห็นว่าแมโครฟาจ (tissue resident human macrophages) มีการกลืนกินไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 การจำลองตัวเองของไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 ในแมโครฟาจของมนุษย์เหล่านี้เป็นการริเริ่มกระบวนการอักเสบเป็นลำดับ (inflammatory cascade) ซึ่งทำให้แมโครฟาจที่ติดเชื้อได้รับ

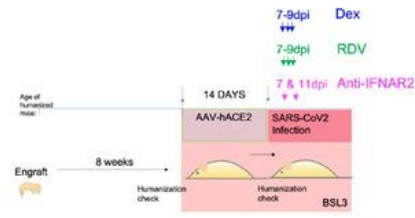
มอบ transcriptome ที่มีลักษณะพิเศษเฉพาะและมีส่วนให้เกิดการตอบสนองของอินเตอร์เฟียร์รอน type I ปลายสาย (downstream) การปิดกั้นการจำลองตัวเองของไวรัสหรือการตอบสนองของอินเตอร์เฟียร์รอนปลายสาย (downstream) ในร่างกายสิ่งมีชีวิตในระหว่างระยะเรื้อรังของโรคเป็นการลดทอนหลาย ๆ ด้านของภาวะอักเสบที่ระบบภูมิคุ้มกันทำงานมากเกินไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งปฏิกิริยาการอักเสบของแมคโครฟาจ และผลสุดท้ายก็คือการเกิดโรคเรื้อรังนั่นเอง

## ผลที่ได้ (Results)

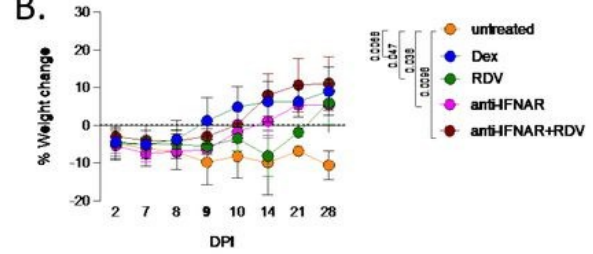
**การมุ่งเป้าให้ตรงจุดไปที่การจำลองตัวเองของไวรัสและการส่งสัญญาณของอินเตอร์เฟียร์รอนปลายสาย (downstream interferon signaling) ทำให้การป่วยโควิด 19 เร็วขึ้นทุเลาลงมีอาการดีขึ้น**

ในโมเดล MISTRG6 กรณีของโควิด 19 เชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 มีการเพิ่มปริมาณสูงสุดใน 4 วันหลังการติดเชื้อ และต่อจากนั้นก็ลดลงไปอยู่ในระดับต่ำกว่า 1000 เท่า ซึ่งจะคงอยู่นานหลายสัปดาห์ 12 และที่คล้ายคลึงกับการติดเชื้อในคนที่คืออาร์เอ็นเอของไวรัสจะยังคงอยู่ในระดับสูงเป็นเวลานานหลายสัปดาห์ 3 เพื่อที่จะทดสอบว่าการตอบสนองของอินเตอร์เฟียร์รอน type I ซึ่งอาศัยอาร์เอ็นเอของไวรัสเป็นตัวขับเคลื่อนของการเกิดโรคเรื้อรังหรือไม่ เราจึงได้ให้ยา Remdesivir หรือแอนติบอดีต้าน IFNAR2 หรือทั้งสองอย่างร่วมกันแก่หนูที่ถูกบรรจุสารพันธุกรรม MISTRG6-hACE2 ที่ถูกทำให้ติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 โดยเริ่มตั้งแต่วันที่ 7 หลังการทำให้ติดเชื้อ ซึ่งในช่วงเวลานี้ไคเตอร์ของไวรัสมีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญแล้ว (ภาพประกอบ 1A) 12 เนื่องจากว่ายา Remdesivir ยับยั้งขั้วของ RNA polymerase ที่อาศัยอาร์เอ็นเอ ของไวรัส (RdRp) 13 ในขณะที่แอนติบอดีต้าน IFNAR2 มุ่งเป้าตรงจุดไปที่ cascade downstream ของการติดเชื้อที่อาศัยอินเตอร์เฟียร์รอน เราจึงได้ตั้งสมมติฐานว่าการมุ่งเป้าตรงจุดไปที่ปัจจัย 2 อย่างนี้ซึ่งทำงานเป็นลำดับต่อเนื่องกันน่าจะลดทอนภาวะอักเสบที่ระบบภูมิคุ้มกันทำงานมากเกินไปและทำให้พยาธิวิทยาของภูมิคุ้มกันมีการคลี่คลายลง ในฐานะที่เป็นตัว control เรายังได้ให้หนูทดลองได้รับยา dexamethasone ซึ่งเป็นหนึ่งในยาไม่กี่ชนิดที่ลดการเข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาลและอัตราการเสียชีวิตได้อย่างมีนัยสำคัญ 14 ยา Dexamethasone ในโมเดลของเราทำให้หลาย ๆ ด้านของพยาธิวิทยาของภูมิคุ้มกันในหนูที่ถูกบรรจุสารพันธุกรรม MISTRG6-hACE2 ที่ติดเชื้อมีการพลิกกลับเป็นตรงกันข้าม (เอกสารผลงานการศึกษาวีซีอยู่ระหว่างแก้ไขปรับปรุง 12) ยา Remdesivir และแอนติบอดีต้าน IFNAR2 เพียงลำพังสามารถบำบัดรักษาได้เป็นบางส่วนและทำให้อาการน้ำหนักลดเรื้อรังรวมทั้งหลาย ๆ ด้านของการกระตุ้นจากระบบภูมิคุ้มกันมีการพลิกกลับเป็นตรงกันข้ามถึงแม้ว่าจะช้ากว่าในกรณีที่ให้ยาทั้งสองชนิดร่วมกันก็ตาม (ภาพประกอบ 1B) อย่างไรก็ตามการให้ยา Remdesivir และ แอนติบอดีต้าน IFNAR2 ร่วมกันก็ทำให้บรรลุถึงการเรียกน้ำหนักตัวที่หายไปกลับคืนมาได้อย่างรวดเร็ว รวมทั้งการกดระดับลึก (profound suppression) ของการอักเสบที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันอย่างมีประสิทธิภาพเช่นเดียวกับยา dexamethasone (ภาพประกอบ 1B-H) ซึ่งทำให้น่าเชื่อได้ว่าเป็นผลเสริมฤทธิ์กันระหว่างยา Remdesivir และแอนติบอดีต้าน IFNAR2 ในระยะการติดเชื้อเรื้อรัง แมคโครฟาจของมนุษย์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบถูกกำจัดเป็นส่วนใหญ่ในปอดของหนูที่ได้รับยา Remdesivir หรือแอนติบอดีต้าน IFNAR2 อย่างใดอย่างหนึ่งแค่เพียงอย่างเดียวและในหนูที่ได้รับยาทั้งสองชนิดร่วมกัน สิ่งนี้ขัดแย้งกับในแมคโครฟาจของถุงมดปอดซึ่งมีการฟื้นฟูในความถี่ที่คล้ายคลึงกับในหนูที่ไม่ติดเชื้อหลังจากที่ได้รับยา (ภาพประกอบ 1E, F) การให้แอนติบอดีต้าน IFNAR2 ร่วมกันกับยา Remdesivir ยังช่วยปิดกั้นการสะสมของ plasmacytoid DCs (pDCs) ในวันที่ 14 หลังการทำให้ติดเชื้อ (14dpi) (ภาพประกอบ 1G) ระดับของ IFNA6 transcript ก็มีการลดลงด้วยหลังจากได้รับยา Remdesivir ร่วมกันกับแอนติบอดีต้าน IFNAR2 ซึ่งสอดคล้องกับการลดลงของ plasmacytoid DCs (pDCs) ซึ่งเป็นผู้ผลิตเบื้องต้นของ IFN $\alpha$  (ภาพประกอบ S1A) โดยรวมแล้วการอักเสบเรื้อรังที่ลดลงทำให้การกระตุ้นเซลล์ T ในปอดลดน้อยเบาบางลง (ภาพประกอบ 1H) และสนับสนุนการฟื้นฟูเนื้อเยื่อปอดที่วัดโดยวิธี histopathological assessment สำหรับปอดที่ติดเชื้อ (ภาพประกอบ 1I)

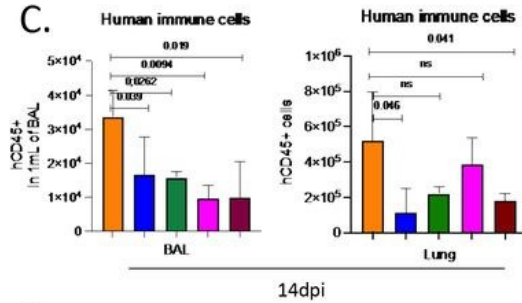
A.



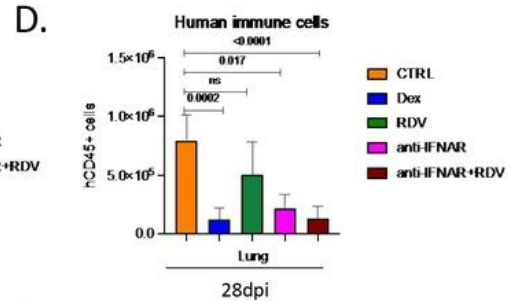
B. Weight change



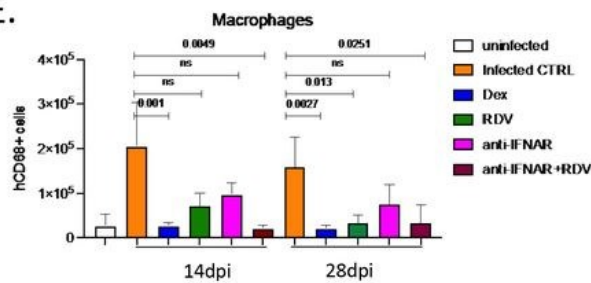
C.



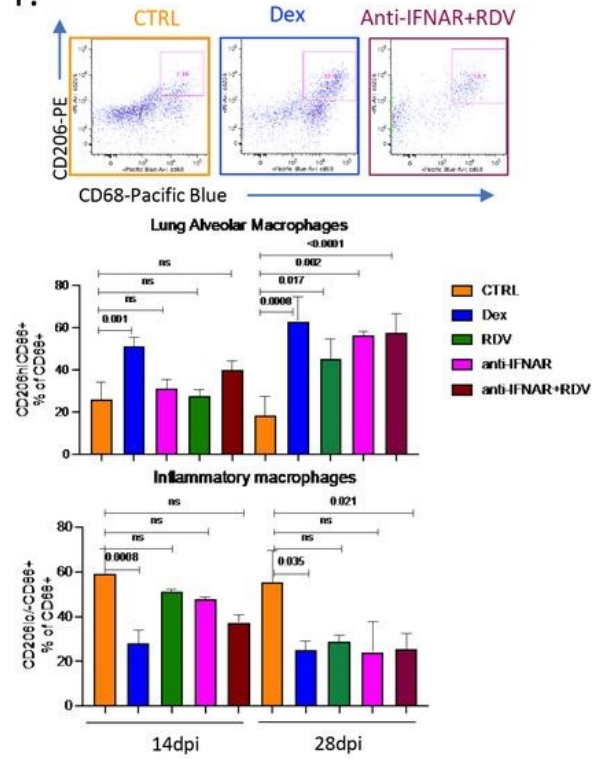
D.



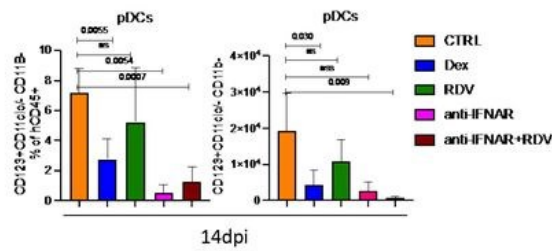
E.



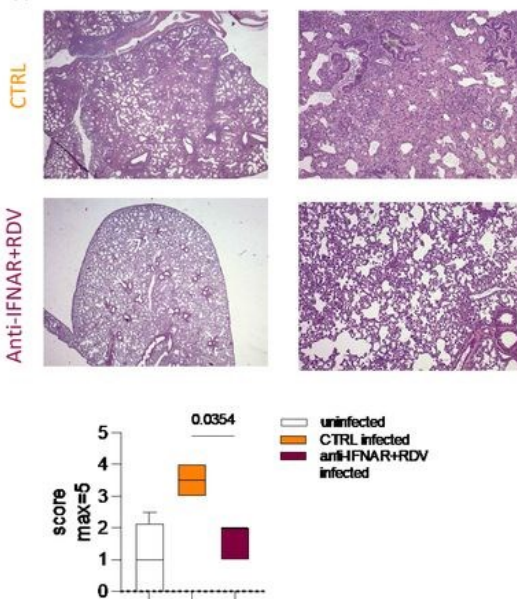
F.



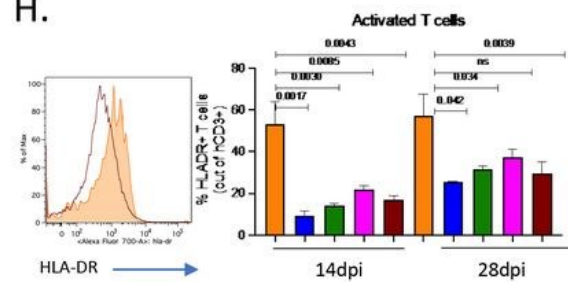
G.



I.



H.



## ภาพประกอบ 1.

A. แผนผังรูปแบบการทดลองการให้ยา remdesivir แอนติบอดีต้าน IFNAR2 หรือยา dexamethasone. หนูที่ถูกบรรจุสารพันธุกรรม MISTRG6-hACE2 ที่ถูกทำให้ติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 ได้รับยา dexamethasone และ Remdesivir ในวันที่ 7,8,9 หลังการทำให้ติดเชื้อ และได้รับแอนติบอดีต้าน IFNAR2 ในวันที่ 7 และ 11 หลังการทำให้ติดเชื้อ. หนูได้รับการตรวจวิเคราะห์ในวันที่ 14 หรือไม่ก็ในวันที่ 28 หลังจากการทำให้ติดเชื้อ

B. การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักในหนูที่ได้รับการทำให้ติดเชื้อหรือในหนูที่เป็น control ในระหว่างการติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 ซึ่งพล็อตเป็นเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเปรียบเทียบกับน้ำหนักแรกเริ่มก่อนการ inoculate เชื้อไวรัส. หนูได้รับยา remdesivir และ dexamethasone ในวันที่ 7,8,9 หลังจากการทำให้ติดเชื้อ และได้รับแอนติบอดีต้าน IFNAR2 ในวันที่ 7 และ 11 หลังจากการทำให้ติดเชื้อ หรือผสมผสานร่วมกันระหว่างยา Remdesivir และแอนติบอดีต้าน IFNAR2. N=4-6. วิธีการทดสอบแบบ Unpaired, two-tailed t-test. ค่าเฉลี่ยเลขคณิต (Mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD).

C. เซลล์ระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์ในปอดในวันที่ 14 หลังจากการทำให้ติดเชื้อและน้ำล้างหลอดลมและถุงลมปอด (BAL) ของหนูที่ถูกบรรจุสารพันธุกรรม MISTRG6-hACE2 ที่ได้รับยา dexamethasone ยา remdesivir แอนติบอดีต้าน IFNAR2 หรือยา Remdesivir ร่วมกับแอนติบอดีต้าน IFNAR2. ค่าเฉลี่ยเลขคณิต (Mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD). วิธีการทดสอบแบบ Unpaired, two-tailed t-test.

D. เซลล์ระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์ในปอดของหนูที่ถูกบรรจุสารพันธุกรรม MISTRG6-hACE2 ในวันที่ 28 หลังจากการทำให้ติดเชื้อ หนูได้รับยา dexamethasone ยา Remdesivir แอนติบอดีต้าน IFNAR2 หรือยา Remdesivir ร่วมกับแอนติบอดีต้าน IFNAR2. ค่าเฉลี่ยเลขคณิต (Mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD). วิธีการทดสอบแบบ Unpaired, two-tailed t-test.

E. แมคโครฟาจของมนุษย์ในปอดของหนูที่ถูกบรรจุสารพันธุกรรม MISTRG6-hACE2 หลังการทำให้ติดเชื้อ (และไม่ทำให้ติดเชื้อ) ในวันที่ 14 หรือวันที่ 28. หนูที่ถูกบรรจุสารพันธุกรรม MISTRG6-hACE2 ที่ถูกทำให้ติดเชื้อได้รับยา dexamethasone ยา remdesivir แอนติบอดีต้าน IFNAR2 หรือยา Remdesivir ร่วมกับแอนติบอดีต้าน IFNAR2.

F. พล็อตและความถี่ที่เป็นตัวแทนจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี flow cytometry สำหรับแมคโครฟาจของถุงลมหรือแมคโครฟาจที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบในปอดของหนูที่ถูกบรรจุสารพันธุกรรม MISTRG6-hACE2 หลังการทำให้ติดเชื้อ (และไม่ทำให้ติดเชื้อ) ในวันที่ 14 หรือวันที่ 28. ค่าเฉลี่ยเลขคณิต (Mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD). วิธีการทดสอบแบบ Unpaired, two-tailed t-test.

G. ความถี่ (ซ้าย) และจำนวน (ขวา) ของ pDCs ในปอดของหนูที่ถูกทำให้ติดเชื้อหรือในกลุ่ม control ในวันที่ 14 หลังจากการทำให้ติดเชื้อ. N=4-6. ค่าเฉลี่ยเลขคณิต (Mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD). วิธีการทดสอบแบบ Unpaired, two-tailed t-test.

H. ฮิสโตแกรมที่เป็นตัวแทนสำหรับการแสดงออกของ HLA-DR ในเซลล์ T ของปอดและความถี่ของเซลล์ T ที่ได้รับการกระตุ้นจาก HLA-DR+ ในหนูที่ถูกทำให้ติดเชื้อหรือในกลุ่ม control ในวันที่ 14 หรือวันที่ 28 หลังจากการทำให้ติดเชื้อ. N=6. ค่าเฉลี่ยเลขคณิต (Mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD). วิธีการทดสอบแบบ Unpaired, two-tailed t-test.

I. รูปภาพที่เป็นตัวแทนของ H&E staining รวมทั้ง box and whisker plot (น้อยสุด ไปหา มากสุด) ของคะแนน histopathological scores ของหนูที่ถูกบรรจุสารพันธุกรรม MISTRG6-hACE2 ที่ได้รับยา Remdesivir ร่วมกับแอนติบอดีต้าน IFNAR2. N=3-6.

การให้แอนติบอดีต้าน **IFNAR2** และยา **Remdesivir** ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดพลิกกลับของ **transcription** ที่ถูกกระตุ้นจากกาการติดเชื้อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับ **gene signature** ของแมคโครฟาจที่เกี่ยวกับการอักเสบ

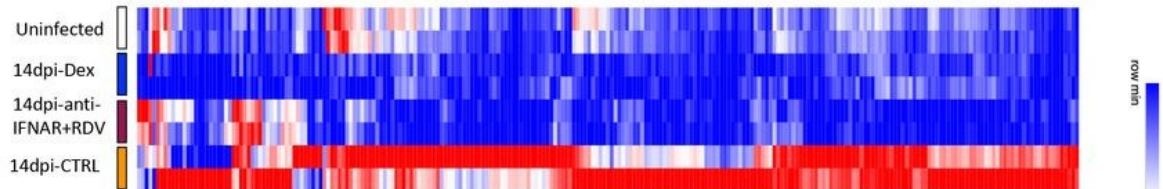
ต่อจากนั้นเราได้ทำการประเมินผลกระทบของการให้แอนติบอดีต้าน **IFNAR2** ร่วมกับยา **Remdesivir** และยา **dexamethasone** ซึ่งเป็นตัว **control** ต่อ **transcriptome** ของระบบภูมิคุ้มกันในหนูที่ถูกบรรจุสารพันธุกรรม **MISTRG6-hACE2** ที่ถูกทำให้ติดเชื้อ โดยการเพ่งความสนใจไปที่ ยีนของมนุษย์ที่ได้รับการควบคุมแตกต่างกัน (**differentially regulated**) ทั้งยา **dexamethasone** แอนติบอดีต้าน **IFNAR2** และยา **Remdesivir** ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดพลิกกลับในหลาย ๆ ด้านของปฏิกิริยาการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่มากเกินไป (**overactive immune response**) ที่เกิดขึ้นในระยะเรื้อรังในวันที่ 14 หลังการทำให้ติดเชื้อไปสู่ในระดับของหนูที่ไม่มีการติดเชื้อ (ภาพประกอบ 2A, S2A) **transcript** ที่ลดลงนี้รวมถึงไซโตไคน์และไซโตไคน์ (**CXCL10, CXCL8**) การตอบสนองที่ทำให้เกิดการอักเสบ (**TLR7, CASP1**) และโมเลกุลต้านไวรัส (**MPO, OAS1, OAS2**) ตลอดจน **ISGs** (**IFITM3, IFITM2, IRF7**) สอดคล้องกับสิ่งที่คล้ายคลึงกันในการประเมินโดยวิธี **flow cytometry** ของเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันและสภาวะของเซลล์เหล่านั้น ยีนที่ถูกกด (**suppressed**) ด้วยยา **dexamethasone** มีการทับซ้อน (**overlap**) อย่างมีนัยสำคัญกับยีนที่ถูกกดอย่างมีนัยสำคัญจากแอนติบอดีต้าน **IFNAR2** ซึ่งให้ร่วมกับยา **Remdesivir** (64% **overlap**, ภาพประกอบ 2A, S2B) ยีนเหล่านี้มีการเพิ่มขึ้นเป็นพิเศษของเครือข่ายไซโตไคน์และไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยาการกระตุ้นที่มากเกินไประหว่างการติดเชื้อไวรัสกับ **ISGs** (ภาพประกอบ S2B-D) ซึ่งเป็นการเน้นย้ำถึงบทบาทอันเป็นศูนย์กลางสำหรับการส่งสัญญาณของอินเตอร์เฟียรอนและเครือข่ายไซโตไคน์และไซโตไคน์ที่ทำให้เกิดการอักเสบในพยาธิวิทยาของโควิด 19 เรื้อรัง เพื่อให้เกิดความเข้าใจลึกซึ้งมากขึ้นเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงของ **transcription** ในระดับเซลล์ เราจึงได้เปรียบเทียบ **single cell transcriptome** ของเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์จากหนูที่ติดเชื้อในระยะท้าย ๆ ของโรคกับหนูที่ไม่มีการติดเชื้อ เราได้แยกแยะ 16 clusters ที่สอดคล้องเข้ากันกับกลุ่มย่อย ๆ ต่าง ๆ มากมายของเซลล์ T ไมโนไซต์ แมคโครฟาจ และเซลล์ B (ภาพประกอบ 2B, S2E) เพื่อที่จะแยกแยะประชากรกลุ่มย่อย ๆ ที่มีความอุดมต่าง ๆ กัน ซึ่งไม่ได้ถูกจำกัดอยู่ใน clusters เหล่านั้น เราจึงได้ใช้วิธี **DA-seq** ซึ่งเป็นวิธีการที่ **multiscale** และมุ่งเป้าตรงจุดไปที่การวัดหาปริมาณ **local DA measure** สำหรับแต่ละเซลล์เพื่อการเปรียบเทียบที่ละเอียดรอบคอบและถูกต้องแม่นยำของ **transcriptomic distribution** ของเซลล์ 15 การวิเคราะห์ **DA-seq** กับข้อมูลของเราเปิดเผยว่าเซลล์ T ไมโนไซต์ และแมคโครฟาจมีส่วนสำคัญในการเปลี่ยนแปลงส่วนใหญ่ที่มีการติดเชื้อเรื้อรังเป็นตัวขับเคลื่อน (ภาพประกอบ 2C) เรามุ่งความสนใจและความพยายามไปที่การอธิบายลักษณะที่ลึกซึ้งมากขึ้นของกลุ่มไมโนไซต์/แมคโครฟาจในระยะแรก ๆ ของการติดเชื้อ (4 วันหลังการติดเชื้อ) หรือระยะท้าย ๆ ของการติดเชื้อ (วันที่ 14 และวันที่ 28 หลังการติดเชื้อ) การวิเคราะห์ด้วยวิธีการนี้ทำให้สามารถอธิบายลักษณะที่ละเอียดของการทำงานของแมคโครฟาจที่เกี่ยวกับการอักเสบในระหว่างช่วงท้าย ๆ ของการติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ **SARS-CoV-2** (ภาพประกอบ 2D) แมคโครฟาจ (**tissue resident macrophages**) เช่น แมคโครฟาจในถุงลมปอดซึ่งเป็นผู้พิทักษ์สำหรับการติดเชื้อในปอดมีการตอบสนองในช่วงสูงสุดของการติดเชื้อ (ภาพประกอบ 2D, S2F cluster 2,3) แต่พยาธิวิทยาและภาวะการอักเสบได้รับการขับเคลื่อนจากไมโนไซต์ที่แทรกซึม (**infiltrating monocytes**) และแมคโครฟาจที่พัฒนามาจากไมโนไซต์ (ภาพประกอบ 2D, S2F clusters 0 และ 1) ถึงแม้ว่าแมคโครฟาจเหล่านี้มีการเปลี่ยนแปลงสภาพ (**differentiate**) ต่อไประหว่างเส้นทางการติดเชื้อ (**course of infection**) แต่ว่าแมคโครฟาจเหล่านี้ก็รักษาลักษณะ **inflammatory signature** และสถานะที่ได้รับการกระตุ้นไว้ซึ่งเห็นได้จากการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นหรือต่อเนื่องของไซโตไคน์ (**CXCL8**) ของ **inflammatory markers** (**TREM1**) รวมทั้งของ **complement involvement** (**C1QB**) ในวันที่ 28 หลังการติดเชื้อ (ภาพประกอบ S2G, H) ที่น่าสนใจก็คือว่าแมคโครฟาจกลุ่มย่อยทั้งหมดมีการเพิ่มขึ้นของ **ISGs** ในช่วงเวลาต่าง ๆ ที่มีการตรวจวิเคราะห์ (ภาพประกอบ S2H) ยีนเหล่านี้ซึ่งได้รับการเพิ่มพูนจาก **ISG** และเพิ่มขึ้นในแมคโครฟาจในวันที่ 14 หรือวันที่ 28 หลังจากการติดเชื้อได้รับการกด (**suppressed**) หลังจากได้รับแอนติบอดีต้าน **IFNAR2** ผสมผสานกับยา **Remdesivir** ซึ่งเริ่มขึ้นในวันที่ 14 หลังจากการติดเชื้อ แต่มีผลที่แข็งแกร่งมีกำลังมากขึ้นในวันที่ 28 หลังจากการติดเชื้อ (ภาพประกอบ 2E) เมื่อรวมสิ่งที่เราค้นพบเหล่านี้เข้าด้วยกันแล้วทำให้เราสามารถสรุปได้ว่าแอนติบอดีต้าน **IFNAR2** และยา **Remdesivir** ที่ให้ในระยะเรื้อรังของการติดเชื้อทำให้การตอบสนองของแมคโครฟาจที่ทำให้เกิดการอักเสบซึ่งมีอาร์เอ็นเอของไวรัสและการส่งสัญญาณของอินเตอร์เฟียรอนที่คงอยู่ต่อเนื่องเป็นตัวขับเคลื่อนมีการบรรเทาเบาบางลง และสุดท้ายเราได้วัดหาปริมาณว่าต่าง ๆ เหล่านี้ส่งผลกระทบอย่างไรและมากน้อยเพียงใดต่อการแสดงออกของ **ISGs** ที่เป็นตัวแทน (**DDX58, IFIH1, IFITM3, IRF7**) หรือต่อ **inflammatory markers** (**IL6**) บนพื้นฐานของรูปแบบการแสดงออก (**expression pattern**) ที่ถูกดำรงรักษาไว้หรือที่มีร่วมกันจาก clusters ต่าง ๆ และการเพิ่มพูนที่คงอยู่ต่อเนื่องในระยะท้าย ๆ ของโรค (วันที่ 14 และวันที่ 28 หลังจากการติดเชื้อ) การแสดงออกของยีนที่เป็นตัวแทนทั้งหมดเหล่านี้มีการลดลงซึ่งเป็นการตอบสนองต่อยาเหล่านี้ (ภาพประกอบ S2I) ยีนบางตัว เช่น **IFITM3** และ **IL6** มีการเพิ่มพูนขึ้นอย่างเป็นพิเศษในกลุ่มแมคโครฟาจ/ไมโนไซต์ ในขณะที่ยีนตัวอื่น ๆ อย่างเช่น **IRF7, DDX58** และ **IFIH1** มีการเพิ่มพูนขึ้นในเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันมากมายเช่นเซลล์ T เซลล์ B และเซลล์มียอิลลอยด์ (ภาพประกอบ S2I) แต่อย่างไรก็ตามปฏิกิริยาการตอบสนองด้านไวรัสที่สำคัญเช่นการผลิต **IFNG** ซึ่งเบื้องต้นหลัก ๆ ได้รับการชักนำเป็นสื่อกลางจาก **cytotoxic T cells** ไม่ได้มีการลดลง (ภาพประกอบ S2J) ทั้ง ๆ ที่มีการกระตุ้นของ **T cell** ลดลง (ภาพประกอบ 1H) ซึ่งเป็นการเน้นถึงผลกระทบที่แข็งแกร่ง (**strong**) แต่เลือกเฟ้น (**selective**) ของแอนติบอดีต้าน **IFNAR2** และยา **Remdesivir** ที่มีต่อพยาธิวิทยาของโควิด 19 เรื้อรังในหนูที่ถูกบรรจุสารพันธุกรรมของมนุษย์ การ

กลับกันอย่างตรงกันข้าม (reversal) ของพยาธิวิทยาของภูมิคุ้มกันนี้ยังมีสหสัมพันธ์กับสุขภาพปอดที่ดีขึ้นซึ่งวัดจากการสูญเสียของ gene signature ที่เกี่ยวข้องสัมพันธ์กับ pre-alveolar type 1 transitional cell state (PATS) ใน pneumocytes ซึ่งได้รับการกระตุ้นในระหว่าง การบาดเจ็บของปอดผู้ป่วยมนุษย์ 11-16-18 สอดคล้องตรงกันกับการเกิดพังผืดในปอดที่สังเกตพบในปอดของผู้ป่วยโควิด 19 ที่มีอาการรุนแรงก็มีการเพิ่มพูนขึ้นเป็น อย่างมากของ PATS program ใน pneumocytes เมื่อเปรียบเทียบกับปอดของผู้ที่มีสุขภาพดี 11 ในหนูที่ถูกบรรจุสารพันธุกรรม MISTRG6-hACE2 ที่ติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 ทั้งยา dexamethasone และแอนติบอดีต้าน IFNAR2 ที่ให้ร่วมกันกับยา Remdesivir ล้วนมีประสิทธิภาพในการพลิกกลับ PATS program นี้ไปสู่ภาวะ baseline ซึ่งไม่มีการติดเชื้อ (ภาพประกอบ S2K)

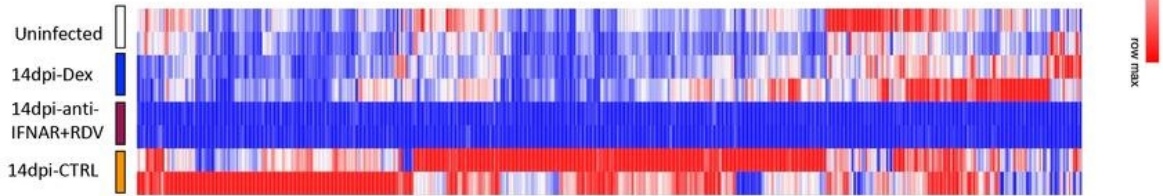


A.

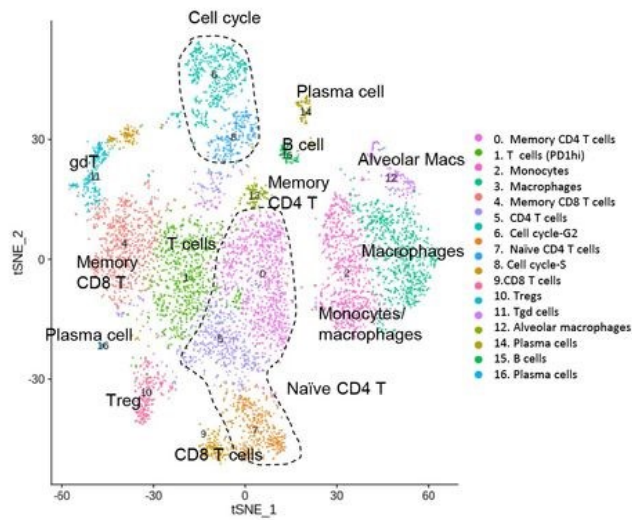
Genes downregulated upon dexamethasone treatment



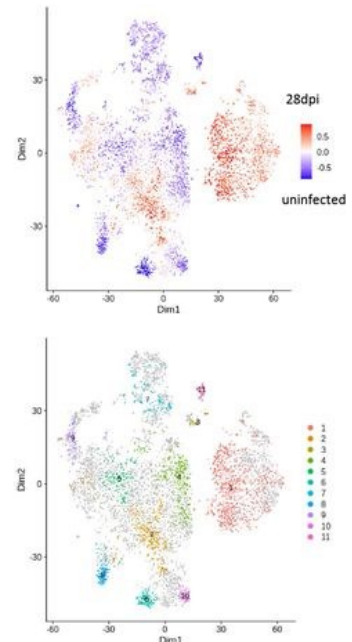
Genes downregulated upon anti-IFNAR+ Remdesivir treatment



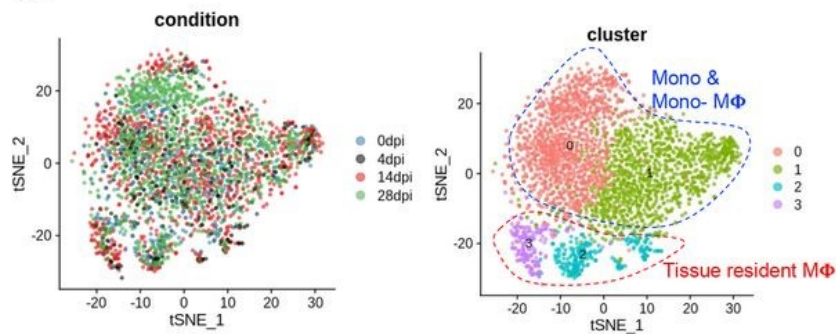
B.



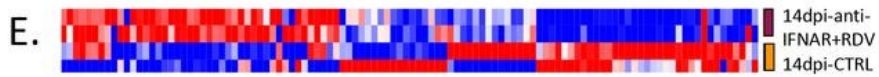
C.



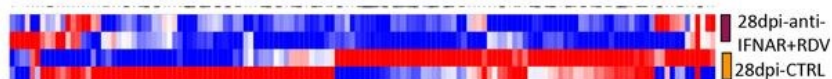
D.



Lungs-14dpi



Lungs-28dpi



## ภาพประกอบ 2.

A. แผนภูมิความร้อน (Heatmap) ของยีนที่ถูกกด (suppressed) จากยา dexamethasone หรือยา Remdesivir ที่ให้ร่วมกับแอนติบอดีต้าน IFNAR2. (Log2, Foldchange >-1; P adj<0.05). การนับจำนวน (counts) ที่ได้รับการ transformed และ normalized ในปอดของหนูที่ถูกบรรจุงูสารพันธุกรรม MISTRG6-hACE2 ที่ไม่มีการติดเชื้อหรือที่ติดเชื้อซึ่งได้รับยาหรือไม่ได้รับยา (สหสัมพันธ์ของ Pearson). ค่า transformed values ที่ต่ำสุดและสูงสุดในแถวซึ่งคำนวณโดยการลบด้วยค่าเฉลี่ยเลขคณิตในแถว (row mean) และหารด้วยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) สำหรับแต่ละยีนตลอดตัวอย่างทั้งหมดถูกทำให้เป็นภาพ (visualized).

B. t-distributed stochastic neighbor embedding (t-SNE) plot และผลที่ได้จากการ clustering สำหรับ scRNA-seq ของเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันของหนูจากปอดที่ไม่มีการติดเชื้อหรือปอดที่ติดเชื้อในวันที่ 28 หลังจากทำให้ติดเชื้อ. Single cell suspensions ของเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันในปอดของมนุษย์ที่ถูกแยก (sorted) ได้รับการ process และ sequence.

C. ประชากรที่มีความอุดมต่าง ๆ กันระหว่างเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันในปอดของมนุษย์ที่ไม่มีการติดเชื้อและที่ติดเชื้อซึ่งแยกแยะโดยวิธี DA-seq. DA-seq เป็นวิธีการที่ multiscale และมุ่งเป้าตรงจุดซึ่งวัดปริมาณ local DA measure สำหรับแต่ละเซลล์เพื่อการเปรียบเทียบที่ละเอียดรอบคอบและถูกต้องแม่นยำของ transcriptomic distributions ของเซลล์ 15.

D. t-distributed stochastic neighbor embedding (t-SNE) plot ของเซลล์เดี่ยวในไนโซต์และแมคโครฟาจของมนุษย์จากวันที่ 4 วันที่ 14 และวันที่ 28 หลังการติดเชื้อและจากปอดที่ไม่ติดเชื้อ.

E. แผนภูมิความร้อน (Heatmap) ของยีนที่ได้รับการแยกแยะว่าเป็นยีนที่ได้รับการควบคุมแตกต่างกัน (differentially regulated) ในวันที่ 14 และวันที่ 28 หลังการติดเชื้อ (ภาพประกอบ 3D) ในไนโซต์และแมคโครฟาจ. การแสดงออกของยีนเหล่านี้ซึ่งเป็นการตอบสนองต่อยา Remdesivir ที่ให้ร่วมกับแอนติบอดีต้าน IFNAR2 ได้รับการพล็อตไว้แล้ว.

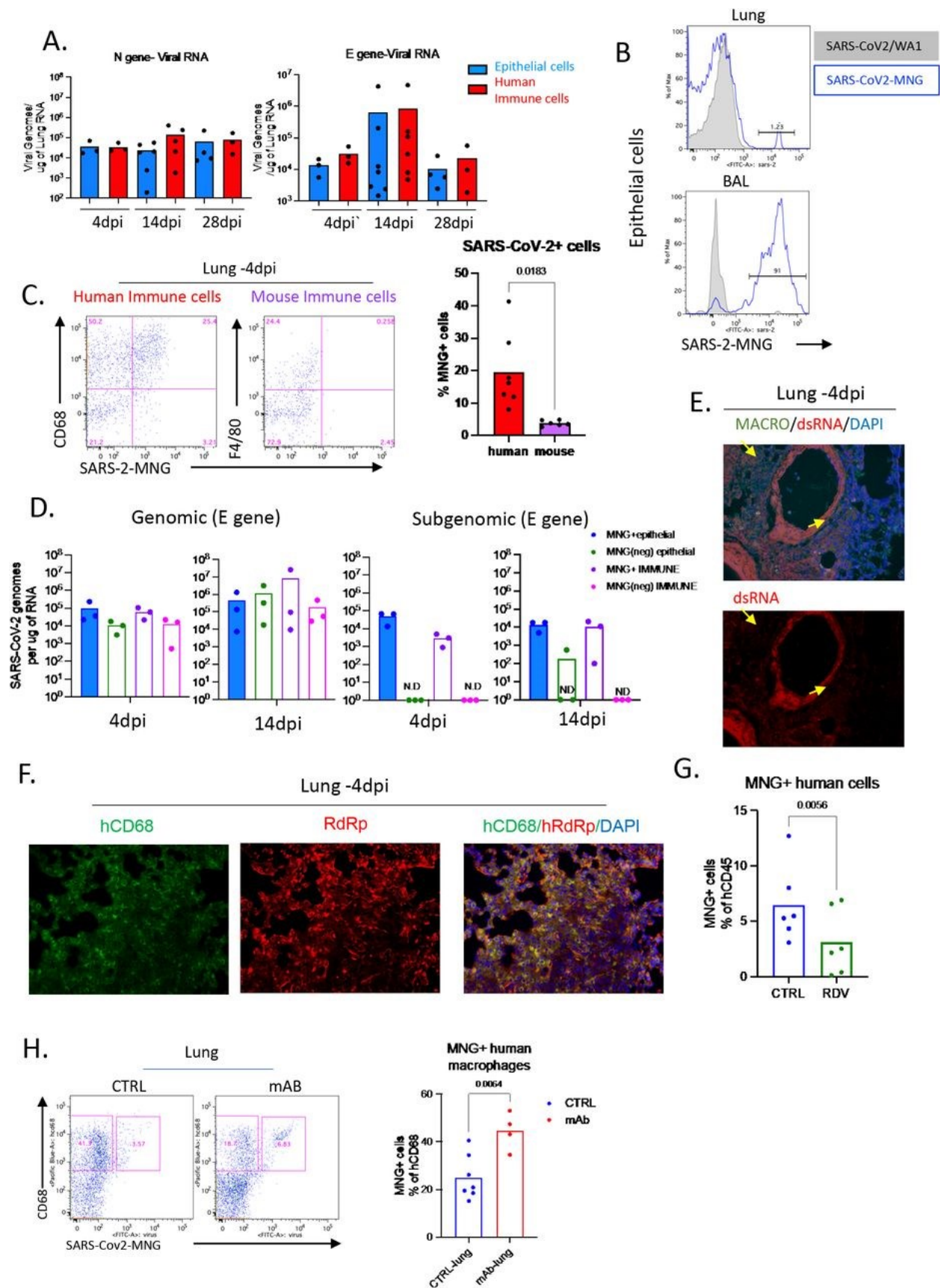
## เชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 มีการจำลองตัวเองในแมคโครฟาจของมนุษย์

ต่อจากนั้นเราได้เริ่มต้นการระบุค้นหาแหล่งที่มาในระดับเซลล์ของอาร์เอ็นเอของไวรัสที่คงอยู่นานและการจำลองตัวเองของไวรัสที่ยังคงมีอยู่ต่อเนื่องในปอดตามที่ตรวจวัดจาก genomic viral RNA และ subgenomic viral RNA ตามลำดับในเนื้อเยื่อปอดทั้งหมด (ภาพประกอบ S3A) อาร์เอ็นเอของไวรัสมีการลดลงหลังจากได้รับยา Remdesivir ซึ่งเป็นตัวยับยั้งขัดขวาง RNA polymerase ที่อาศัยอาร์เอ็นเอของไวรัส (RdRp)<sup>13</sup> นอกจากนี้แล้วยา Remdesivir ยังลดไตเตอร์ของไวรัสและ subgenomic viral RNA จนถึงระดับที่ไม่สามารถตรวจวัดได้ (ภาพประกอบ S3B, C) เพื่อที่จะระบุค้นหาแหล่งที่มาในระดับเซลล์ของอาร์เอ็นเอของไวรัสเราได้แยก (sort) เซลล์เยื่อบุผิวหรือเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์จากหนูที่ถูกบรรจุงูสารพันธุกรรม MISTRG6-hACE2 ที่ถูกทำให้ติดเชื้อ และอย่างที่คาดไว้เราสามารถตรวจพบอาร์เอ็นเอของไวรัสในเซลล์เยื่อบุผิวซึ่งเป็นเป้าหมายหลักของการติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 อย่างไรก็ตามที่เราประหลาดใจก็คือเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์ก็มีอาร์เอ็นเอของไวรัสในระดับที่ใกล้เคียงกันด้วยเช่นกัน (ภาพประกอบ 3A) ถึงแม้ว่า genomic RNA จะมีอยู่อย่างอุดมก็ตามแต่เราก็ไม่สามารถตรวจพบ subgenomic RNA ใดๆ ได้เลยไม่ว่าในเซลล์เยื่อบุผิวหรือเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์ทั้งหมดก็ตาม ซึ่งทำให้น่าเชื่อได้ว่าเฉพาะเพียงส่วนเล็กน้อยของเซลล์เหล่านั้นเท่านั้นที่มีการติดเชื้อ เพื่อให้เห็นภาพและอธิบายลักษณะของเซลล์เหล่านี้ได้ดีขึ้นเราจึงได้ทำให้หนูที่ถูกบรรจุงูสารพันธุกรรม MISTRG6-hACE2 มีการติดเชื้อมี reporter strain ของไวรัสหรือ SARS-CoV-2-mNG<sup>19</sup> ส่วนใหญ่ของเซลล์เยื่อบุผิว (EPCAM+) ในน้ำล้างหลอดลมและถุงลมปอด (bronchioalveolar lavage - BAL) แต่มีแค่เพียงส่วนน้อยของเซลล์เยื่อบุผิวในปอดทั้งหมดเท่านั้นที่มีการติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 ตามที่ตรวจวัดจากเซลล์ที่มีการแสดงออกของ mNG (ภาพประกอบ 3B) การตรวจวิเคราะห์นี้มีความจำเพาะเนื่องจากว่าเฉพาะหนูที่ถูกทำให้ติดเชื้อมี reporter SARS-CoV-2-mNG เท่านั้น ไม่ใช่ติดเชื้อจาก control wild type SARS-CoV-2-WA1 ที่มี



mNG signal ในเซลล์เยื่อบุผิวของม่าน (ภาพประกอบ 3B) เซลล์ระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์มีการแสดง mNG signal ที่ชัดเจนตามที่ได้รับ การชี้ให้เห็นจากการวัดระดับ อาร์เอ็นเอของไวรัสและ mNG+ human immune cells เป็นแมโครฟาจของมนุษย์เป็นส่วนใหญ่ (ภาพประกอบ 3C, S3D) ในทางตรงกันข้ามไม่ว่าแมโครฟาจของหนู หรือเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันของหนูแล้วแต่ไม่มี mNG signals ที่มีนัยสำคัญ ซึ่งทำให้น่าเชื่อถือได้ว่าเฉพาะเพียงเซลล์ระบบ ภูมิคุ้มกันของมนุษย์เท่านั้นที่สามารถทำให้ติดเชื้อมNG (ภาพประกอบ 3C, S3D) แต่อย่างไรก็ตามเนื่องจากแมโครฟาจ มีการกลืนกินเซลล์เราจึงจำเป็นต้องพูดถึงว่าอาร์เอ็นเอของไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 ในเซลล์เหล่านี้มีการ จำลองตัวเองในเซลล์เหล่านี้หรือไม่หรือว่าแค่เพียงได้รับมาจากกระบวนการกลืนกิน (phagocytosis) เซลล์ที่ติดเชื้อ หรือเศษเซลล์เท่านั้น เพื่อให้บรรลุผลในเรื่องนี้ในขั้นแรกเราจึงได้อธิบายลักษณะของ mNG signal ในแมโครฟาจของ มนุษย์จากหนูที่ถูกบรรจุสารพันธุกรรม MISTRG6 ที่ไม่ได้รับการ transduced กับ hACE2 ในหนูเหล่านี้ เซลล์เยื่อบุผิวไม่มีการติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 โดยเฉพาะอย่างยิ่งเนื่องมาจากความแตกต่างระหว่าง ACE2 ของหนูกับ ACE2 ของมนุษย์ซึ่งจำกัดการเข้าสู่เซลล์และการจำลองตัวเองของไวรัส 20 ไม่ว่าหนูเหล่านี้จะมีระดับ ของ mNG signal ที่ใกล้เคียงกันขนาดไหนก็ตามในแมโครฟาจของมนุษย์ในหนูที่มีสารพันธุกรรม AAV-ACE2 ก็แสดงให้เห็นว่าการกลืนกินไวรัสโดยแมโครฟาจของมนุษย์เป็นไปโดยอิสระไม่อาศัยเซลล์เยื่อบุผิวที่ติดเชื้อ (ภาพประกอบ S3E) เพื่อค้นหาว่าไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 มีการจำลองตัวเองในแมโครฟาจของมนุษย์หรือไม่เราได้ทำ การวัดหาคุณลักษณะเด่นที่สำคัญ ๆ ของการจำลองตัวเองของไวรัส ตลอดจนผลิตภัณฑ์จากการจำลองตัวเองของไวรัส subgenomic RNA, double stranded RNA (dsRNA) และเอนไซม์สำคัญในการจำลอง ตัวเอง RNA polymerase ที่อาศัย RNA (RdRp) ลำดับแรกเราวัดหาปริมาณของ genomic viral RNA และ subgenomic viral RNA ใน mNG+ epithelial cells เปรียบเทียบกับใน mNG- epithelial cells หรือเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์ในวันที่ 4 หรือวันที่ 14 หลังการทำให้ติดเชื้อ เฉพาะ mNG+ epithelial cells และ mNG+ human immune cells เท่านั้นแต่ไม่ใช่ mNG-cells ที่มี subgenomic viral RNA ในระดับที่สามารถตรวจพบได้ (ภาพประกอบ 3D) ระดับของ subgenomic RNA ในเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์และในเซลล์เยื่อบุผิวมีใกล้เคียงกัน ซึ่งทำให้น่าเชื่อถือได้ว่า การจำลองตัวเองของไวรัสใน เซลล์ระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์และในเซลล์เยื่อบุผิวมีขอบเขตหรือขนาดที่ใกล้เคียงกัน (ภาพประกอบ 3D) ลำดับที่ 2 เราได้ย้อม สีสำหรับ dsRNA ใน mNG+ cells เพื่อค้นหาว่า mNG signal มีการ colocalized กับ dsRNA ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์พิเศษเฉพาะตัว (exclusive product) ของการจำลองตัวเองของไวรัสหรือไม่ (ภาพประกอบ S3F) และอย่างที่เรากล่าวไว้ mNG และ dsRNA สามารถตรวจพบได้และมีการ colocalized ทั้งในเซลล์เยื่อบุผิวและในแมโครฟาจตามที่เราบ่งชี้โดย MARCO ซึ่งเป็น marker ตัวหนึ่งของ tissue resident macrophages (ภาพประกอบ 3E, S3F, G) ซึ่งยังเป็นการยืนยันถึงการจำลองตัวเองของไวรัส ในแมโครฟาจของมนุษย์ที่มีการติดเชื้อ ลำดับที่ 3 เราสามารถทำให้เห็นภาพ (visualize) viral RdRp ในแมโคร ฟาจของมนุษย์ ถึงแม้ว่าจะมีความเข้มข้นต่ำกว่าที่เห็นในเซลล์เยื่อบุผิวที่มีการติดเชื้อก็ตาม (ภาพประกอบ 3F, S3G) เรา ได้ทดสอบว่ายา Remdesivir ซึ่งขัดขวางยับยั้ง RdRp สามารถจะปิดกั้น mNG signal ได้หรือไม่ เราได้ทำ การ treat (เริ่มในวันที่ 1 หลังการทำให้ติดเชื้อ) หนูที่ถูกบรรจุสารพันธุกรรม MISTRG6-hACE2 ที่ติดเชื้อไวรัสโค โรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 เพื่อค้นหาว่าการจำลองตัวเองของไวรัสซึ่งวัดจาก mNG signal จะถูกยับยั้ง

ชัดขวางหรือไม่ จริง ๆ ที่เคียวหนูที่ได้รับยา Remdesivir มีการลดลงของ mNG signal ที่สอดคล้องกับไตเตอร์ของไวรัสที่ลดลงใกล้เคียงกัน (ภาพประกอบ 3G)



### ภาพประกอบ 3.

A. อาร์เอ็นเอของไวรัสในเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์ (human CD45+) หรือเซลล์เยื่อบุผิว (mouse Epcam+) จากปอดของหนูที่ติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2.

B. mNG signal ในเซลล์เยื่อบุผิว (Epcam+) จากปอดและน้ำล้างหลอดลมและถุงลมปอดของหนูที่ติดเชื้อกับ reporter SARS-CoV-2-mNG หรือ wild type SARS-CoV-2/WA1 ซึ่งเป็นตัว control. mNG มีการแสดงออกในเซลล์ที่ติดเชื้อหลังการจำลองตัวเองของไวรัส.

C. พล็อตที่เป็นตัวแทนจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี flow cytometry ของ mNG signal เปรียบเทียบกับการแสดงออกของ human CD68 หรือ mouse F4/80 และความถี่ของ mNG+ cells ในเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันของปอด (หนูและมนุษย์) จากหนูที่ถูกบรรจุงูสารพันธุกรรม MISTRG6-hACE2 ที่ติดเชื้อกับ reporter SARS-CoV-2-mNG. วิธีการทดสอบแบบ Unpaired, two-tailed t-test.

D. การหาปริมาณ genomic viral RNA และ subgenomic viral RNA (ชิ้น E) ในเซลล์ mNG+ หรือ mNG-epithelial cells หรือเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์.

E. รูปภาพที่เป็นตัวแทนจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี florescent microscopy ของ double stranded RNA (J2 antibody), anti-MARCO antibody และการย้อมสี DAPI ในเนื้อเยื่อปอดที่ถูกทำให้คงสภาพ (fixed) ในวันที่ 4 หลังการทำให้ติดเชื้อ.

F. รูปภาพที่เป็นตัวแทนจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี florescent microscopy ของ RNA polymerase ที่อาศัย RNA (RdRp), anti-CD68 antibody และการย้อมสี DAPI ในเนื้อเยื่อปอดที่ถูกทำให้คงสภาพ (fixed) ในวันที่ 4 หลังการทำให้ติดเชื้อ.

G. mNG+ cells ภายในเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์จากหนูที่ถูกบรรจุงูสารพันธุกรรม MISTRG6-hACE2 ที่ติดเชื้อกับ SARS-CoV-2-mNG ที่ได้รับยา Remdesivir หรือหนูกลุ่ม control ที่ไม่ได้รับยา.

H. พล็อตและความถี่ที่เป็นตัวแทนจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี flow cytometry ของ mNG signal ในเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์ในหนูที่ติดเชื้อ (ในวันที่ 4 หลังการทำให้ติดเชื้อ) ที่ได้รับแอนติบอดีชนิดโมโนโคลน (mAb) หลังจากติดเชื้อได้ 35 ชั่วโมง. วิธีการทดสอบแบบ paired, two-tailed t-test.

### การกลืนกินไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 โดยแมคโครฟาจของมนุษย์ได้รับการส่งเสริมสนับสนุนจากแอนติบอดี

แอนติบอดีสามารถเป็นสื่อกลางชักนำให้เกิดการกลืนกินไวรัสโดยแมคโครฟาจได้ ตัวอย่างเช่นในการติดเชื้อไวรัสเด็งกี 21 เพื่อที่จะทดสอบบทบาทของการกลืนกินไวรัสโดยแมคโครฟาจซึ่งได้รับการชักนำเป็นสื่อกลางจากแอนติบอดีเราจึงให้หนูที่ติดเชื้อได้รับแอนติบอดีชนิดโมโนโคลนที่จำเพาะต่อโปรตีนหนามของไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 22 โดยเริ่มหลังจากที่ติดเชื้อได้ 35 ชั่วโมง จริง ๆ ที่เดียวการให้แอนติบอดีชนิดโมโนโคลน ทำให้เปอร์เซ็นต์ของ mNG+ macrophages ในปอดเพิ่มขึ้น (ภาพประกอบ 3H) เพื่ออธิบายว่าผลที่เกิดขึ้นเหล่านี้เป็นผลของการติดเชื้อที่แท้จริง หรือว่าเนื่องมาจากการจับกลืนกิน (opsonization) ของเซลล์ที่ติดเชื้อซึ่งจะสนับสนุนส่งเสริมกระบวนการกลืนกิน (phagocytosis) ของเซลล์ที่ติดเชื้อ เราจึงได้เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจที่พัฒนามาจากไขกระดูกกับไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 ในหลอดทดลองโดยที่ไม่มีพลาสมาจากผู้ป่วยโควิด 19 จริง ๆ ที่เดียวไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 สามารถถูกกลืนกินโดยแมคโครฟาจที่พัฒนามาจากไขกระดูกและมีการจำลองตัวเองในเซลล์เหล่านี้ตามที่ตรวจวัดจาก mNG signal (ภาพประกอบ S3H) และจากระดับที่สูงของ subgenomic viral RNA (ภาพประกอบ S3K) ปรากฏการณ์นี้เป็นจริงสำหรับแมคโครฟาจประเภทต่าง ๆ กัน เนื่องจากว่าแมคโครฟาจที่พัฒนามาจากไขกระดูก (ที่เปลี่ยนสภาพของเซลล์มาจากไขกระดูกทั้งหมด (whole bone marrow) หรือไม่ก็จากโมโนไซต์ที่ถูกแยก (sorted monocytes)) และแมคโครฟาจในปอดที่ได้มาจากหนูที่ถูกบรรจุงูสารพันธุกรรม MISTRG6-hACE2 ที่ไม่ติดเชื้อทั้งหมดสามารถถูกทำให้ติดเชื้อในขอบเขตหรือขนาดเดียวกัน (ภาพประกอบ S3I) ตามที่ตรวจวัดจาก mNG signal การกลืนกินไวรัสซึ่งได้รับการสนับสนุนส่งเสริมจากแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 และการจำลองตัวเองของไวรัสถูกทำให้ลดลงโดยการปิดกั้น RdRp (คือการใช้ยา Remdesivir) (ภาพประกอบ S3J)

## การอภิปราย (Discussion)

โมเดล MISTRG6 กรณีโควิด 19 เป็นการสะท้อนได้อย่างตรงตามความเป็นจริงถึงลักษณะเฉพาะมากมายหลายอย่างเกี่ยวกับการอักเสบเรื้อรังจากระบบภูมิคุ้มกันในการเกิดโรคในมนุษย์ และเป็นการเปิดโอกาสให้สามารถเข้าใจและกลไกต่าง ๆ ของ immunopathogenesis ในระยะท้าย ๆ ของโรคนี้<sup>12</sup> อย่างเดียวกันกับโรคที่มีอาการรุนแรงในมนุษย์ โรคโควิด 19 ในหนูที่ถูกบรรจุงูสารพันธุกรรม MISTRG6-hACE2 ได้ทำให้เกิดอาร์เอ็นเอของไวรัสที่คงอยู่นาน การตอบสนองของอินเตอร์เฟียร์อนที่เรื้อรัง พร้อมกับการอักเสบเรื้อรังในแมคโครฟาจ การผลิตแอนติบอดีที่ถูกทำให้ช้าลง ตลอดจนภาวะที่มีเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ในเลือดต่ำ (systemic lymphopenia) ซึ่งทั้งหมดนี้สุดท้ายแล้วอาจจะมีส่วนให้เกิดการพัฒนาของพังผืดในปอด (pulmonary fibrosis) ซึ่งได้รับการยืนยันสนับสนุนจากการตรวจวิเคราะห์ทางด้านจุลพยาธิวิทยา (histopathology) และการตรวจวิเคราะห์ transcription ของปอดในระยะท้าย ๆ ของการติดเชื้อ <sup>12</sup> โดยรวมแล้วการศึกษาวิจัยในเชิงกลไกของเราจากโมเดลนี้ชี้เฉพาะไปที่ลำดับการเกิดเหตุการณ์ที่ละขั้น (cascade of events) ซึ่งเกิดต่อเนื่องราว ๆ 2 วันต่อมาหลังการติดเชื้อในเยื่อปอด โดยที่มีการกลืนกินไวรัสหรือเซลล์ที่ติดเชื้อโดย tissue resident macrophages ไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 มีการจำลองตัวเองอย่างน้อยที่สุดก็เป็นบางส่วนในแมคโครฟาจเหล่านี้ ซึ่งทำให้เกิดสื่อกลางในการจำลองตัวเอง (replicative intermediates) และกระตุ้นให้เกิด inflammatory program ผลลัพธ์ของไวรัสในแมคโครฟาจรวมถึง dsRNA, subgenomic viral RNA, การทำให้มองเห็น (visualization) RNA polymerase (RdRp) ของไวรัส และการแสดงออกของยีน fluorescent reporter ที่บรรจุหัตถ์นิวคลีโอไทด์ของไวรัส ซึ่งทั้งหมดนี้ถูกยับยั้งขัดขวางจากยา Remdesivir ซึ่งยับยั้งขัดขวางการจำลองตัวเองของไวรัส อาร์เอ็นเอของไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 ถูกตรวจพบในฟาโกไซตชนิดโมโนนิวเคลียร์ ซึ่งได้รับการอธิบายลักษณะจากการตรวจวิเคราะห์วิธี scRNA-seq กับชิ้นเนื้อปอดจากการตรวจชันสูตรพลิกศพผู้ป่วยโควิด 19 <sup>11,23</sup> สอดคล้องกันกับสิ่งที่เรากันพบเซลล์ CD14<sup>hi</sup>CD16<sup>hi</sup> และแมคโครฟาจในถุงลมปอดมีอาร์เอ็นเอของไวรัสเพิ่มสูงขึ้นเป็นพิเศษ<sup>11,23</sup> เป็นที่น่าสังเกตว่าเซลล์เหล่านี้ไม่มีการแสดงออกร่วมกัน (co-express) ของ traditional viral entry factors คือ ACE2 และ TMPRSS2<sup>8</sup> ถึงแม้ว่าการกลืนกินไวรัสและปฏิกิริยาตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อต้านไวรัสที่ตามมาภายหลังได้รับการเสริมเพิ่มมากขึ้นเมื่อมีแอนติบอดีชนิดโมโนโคลนโมโนโคลนของเรา แต่ไม่ปรากฏว่าการเสริมเพิ่มมากขึ้นนี้มีผลทางพยาธิวิทยาหากเป็นในระยะแรกเริ่ม ประเด็นนี้สอดคล้องกับผลการวิจัยทางคลินิกที่ครอบคลุมกว้างขวางซึ่งแสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยที่ได้รับพลาสมาในระยะพักฟื้นหรือได้รับแอนติบอดีชนิดโมโนโคลนมีการตอบสนองที่ดีต่อการรักษาและสิ่งที่ไม่เกิดขึ้นกับโรคที่เป็นมากขึ้น <sup>24,25</sup> บทบาทสำคัญหลัก ๆ ของอินเตอร์เฟียร์อนในระยะแรกเริ่มของโรค <sup>26,27</sup> ก็ได้รับการแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนในโมเดลของเราจากการที่จำนวนไวรัสเพิ่มสูงขึ้นอย่างมากและภาวะสุขภาพที่ทรุดโทรมลงอย่างมากในระยะเวลาอันสั้นเมื่อปฏิกิริยาการตอบสนองต่อต้านไวรัสถูกทำให้ไร้ความสามารถเร็วเกินไปโดยยา dexamethasone ในช่วงสูงสุด (peak) ของการติดเชื้อ (เอกสารผลงานการศึกษาวิจัยอยู่ระหว่างแก้ไขปรับปรุง <sup>12</sup>) อย่างไรก็ตามในขณะที่ปฏิกิริยาการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อต้านไวรัสในระยะแรกเริ่มมีความสำคัญอย่างมากในการควบคุมโรค แต่ปฏิกิริยาการตอบสนองอย่างเดียวกันนี้ก็อาจก่อให้เกิดอันตรายได้เช่นกันถ้าหากคงอยู่ต่อเนื่อง <sup>28</sup> เราพบว่าการมุ่งเป้าตรงจุดไปที่การจำลองตัวเองของไวรัสที่เรื้อรังหรือไม่ก็การตอบสนองของอินเตอร์เฟียร์อนในระยะท้าย ๆ เป็นการลดทอนหลาย ๆ ด้านของภาวะอักเสบที่ระบบภูมิคุ้มกันทำงานมากเกินไป (overactive immune-inflammatory response) สำหรับการบำบัดรักษาในร่างกายนี่มีขีด โดยเฉพาะอย่างยิ่งปฏิกิริยาการอักเสบของแมคโครฟาจ

โดยรวมแล้วการผสมผสานระหว่างยา Remdesivir กับแอนติบอดีต้าน IFNAR2 สามารถจะเป็นวิธีการบำบัดรักษาที่มีประสิทธิภาพสำหรับโควิด 19 เรื้อรังซึ่งมีการส่งวนการตอบสนองต้านไวรัสของเซลล์ T ที่แตกต่างกับยา dexamethasone กล่าวโดยทั่วไปสิ่งที่ค้นพบจากการศึกษาวิจัยของเราและผลกระทบที่อาจตามมาได้ให้แนวทางทางเลือกเพิ่มเติมในการบำบัดรักษาซึ่งจะต้องมีการศึกษาค้นคว้าต่อไปในคลินิก และอาจจะช่วยแนะนำให้มีการพัฒนาวิธีการบำบัดรักษาวิธีใหม่ ๆ ตลอดจนกระตุ้นให้มีการวิจัยทางคลินิกเพื่อศึกษาวิจัยการบำบัดรักษาแบบผสมผสาน (combinatorial therapies) ที่มุ่งเป้าตรงจุดไปที่อาร์เอ็นเอของไวรัส และการตอบสนองของอินเตอร์เฟียร์อนที่มีอยู่ต่อเนื่อง

# คำอธิบายสัญลักษณ์ภาพประกอบเสริม (Supplementary Figure Legends)

ภาพประกอบเสริม S1:

A. ระดับของ IFNA transcript ที่ตรวจวัดโดยวิธี qPCR ในหนูที่ถูกบรรจจุสารพันธุกรรม MISTRG6-hACE2 ที่ถูกทำให้ติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 ที่ได้รับยาหรือไม่ได้รับยา (control).

ภาพประกอบเสริม S2:

A. การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกัน (similarity comparison) ระหว่างปอดที่ไม่ติดเชื้อ ปอดที่ติดเชื้อ และปอดที่ได้รับการจัดการด้วยยา (therapeutically manipulated) ซึ่งอ้างอิงจากยีนที่ถูกกด (suppressed) จากยา dexamethasone เป็นหลัก. สหสัมพันธ์ของ Pearson.

B. ยีนที่ถูกกด (suppressed) ทั้งจากยา dexamethasone และจากยา Remdesivir ซึ่งให้ร่วมกับแอนติบอดีต้าน IFNAR2 (Log2, Foldchange >-1, P adj<0.05).

C. การวิเคราะห์เครือข่าย (STRING) ของยีนที่ถูกกด (suppressed) ทั้งจากยา dexamethasone และจากยา Remdesivir ซึ่งให้ร่วมกับแอนติบอดีต้าน IFNAR2 (ตามที่แสดงในภาพประกอบเสริม S2B).

D. การวิเคราะห์วิถี (Ingenuity) ของยีนที่ถูกกด (suppressed) ทั้งจากยา dexamethasone และจากยา Remdesivir ซึ่งให้ร่วมกับแอนติบอดีต้าน IFNAR2 (ตามที่แสดงในภาพประกอบเสริม S2B).

E. คลัสเตอร์ที่แยกแยะยีนซึ่งเปรียบเทียบเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์จากปอดที่ติดเชื้อ (28 วันหลังการทำให้ติดเชื้อ) หรือปอดที่ไม่ติดเชื้อ.

F. คลัสเตอร์ที่แยกแยะยีนซึ่งเปรียบเทียบโมโนไซต์และแมคโครฟาจของมนุษย์จากปอดที่ติดเชื้อ (4 วัน 14 วัน หรือ 28 วันหลังการทำให้ติดเชื้อ) หรือปอดที่ไม่ติดเชื้อ.

G. การกระจายตามช่วงเวลา (temporal distribution) ของการเปลี่ยนแปลงของ transcription ที่เกี่ยวข้องสัมพันธ์กับโมโนไซต์และแมคโครฟาจในปอดที่ติดเชื้อ (4 วัน 14 วัน หรือ 28 วันหลังการทำให้ติดเชื้อ) หรือปอดที่ไม่ติดเชื้อ.

H. ภาพบน: แผนภูมิความร้อนของยีนที่เป็นตัวแทนที่ได้รับการควบคุมแตกต่างกัน (differentially regulated) (DEGs) ในแมคโครฟาจของมนุษย์จากปอดที่ติดเชื้อ (4 วัน 14 วัน และ 28 วันหลังการทำให้ติดเชื้อ) เปรียบเทียบกับปอดที่ไม่ติดเชื้อ. ภาพล่าง: การกระจายของยีนที่ได้รับการกระตุ้นจากอินเตอร์เฟียรอนภายใน DEGs เหล่านี้.

I. การแสดงออกเชิงสัมพัทธ์ของยีนที่อินเตอร์เฟียรอนสามารถกระตุ้นชักนำได้หรือยีนที่ทำให้เกิดการอักเสบในหนูที่ถูกบรรจจุสารพันธุกรรม MISTRG6-hACE2 ที่ถูกทำให้ติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 ที่ได้รับยาหรือไม่ได้รับยาในวันที่ 14 หรือ 28 หลังการทำให้ติดเชื้อ. ค่าการแสดงออกพื้นฐาน (baseline expression values) ในหนูที่ไม่ติดเชื้อได้รับการนำเสนอเพื่อการอ้างอิง. ได้รับการ normalized เป็น HPRT1.

J. การแสดงออกเชิงสัมพัทธ์ของ IFNG ในหนูที่ถูกบรรจจุสารพันธุกรรม MISTRG6-hACE2 ที่ถูกทำให้ติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 ที่ได้รับยาหรือไม่ได้รับยาในวันที่ 14 หรือ 28 หลังการทำให้ติดเชื้อ. ค่าการแสดงออกพื้นฐาน (baseline expression values) ในหนูที่ไม่ติดเชื้อได้รับการนำเสนอเพื่อการอ้างอิง. ได้รับการ normalized เป็น HPRT1.

K. ยีนที่เกี่ยวข้องสัมพันธ์กับ pre-alveolar type 1 transitional cell state (PATS) ซึ่งเป็นยีน DEGs ที่มีการเพิ่มพูนมากขึ้นในวันที่ 14 หลังการทำให้ติดเชื้อเปรียบเทียบกับปอดที่ไม่ติดเชื้อและการตอบสนองของยีนเหล่านี้ต่อยา. PATS gene signature มีการเพิ่มขึ้นซึ่งเห็นได้จากการตรวจชิ้นสุตรพลกศผู้ป่วยโควิด 19 ที่ป่วยรุนแรง<sup>11</sup>.



### ภาพประกอบเสริม S3

A. การวัดหาปริมาณ genomic viral RNA และ subgenomic viral RNA ในเนื้อเยื่อปอดชนิด whole homogenized lung tissue ในวันที่ 4 วันที่ 14 และวันที่ 28 หลังการทำให้ติดเชื้อ.

B. การวัดหาปริมาณ genomic viral RNA และ subgenomic viral RNA ในเนื้อเยื่อปอดชนิด whole homogenized lung tissue ในวันที่ 14 หลังการทำให้ติดเชื้อในหนูที่ได้รับยา Remdesivir ซึ่งให้ร่วมกับแอนติบอดีต้าน IFNAR2.

C. การวัดหาปริมาณ genomic viral RNA และ subgenomic viral RNA ในเนื้อเยื่อปอดชนิด whole homogenized lung tissue ในวันที่ 28 หลังการทำให้ติดเชื้อในหนูที่ได้รับยา Remdesivir หรือแอนติบอดีต้าน IFNAR2 หรือยา Remdesivir ร่วมกับแอนติบอดีต้าน IFNAR2.

D. histograms ที่เป็นตัวแทนของการแสดงออกของ mNG ในแมคโครฟาจในปอดของมนุษย์หรือแมคโครฟาจในปอดของหนูที่แยก (isolated) จากน้ำล้างหลอดลมและถุงลมปอด (BAL) ของหนูที่ถูกบรรจจุสสารพันธุกรรม MISTRG6-hACE2 ที่ถูกทำให้ติดเชื้อในวันที่ 4 หลังการทำให้ติดเชื้อ.

E. ความถี่ของ mNG+ cells ภายในแมคโครฟาจของมนุษย์ (hCD68+) ที่แยก (isolated) จากปอดของหนูที่ถูกบรรจจุสสารพันธุกรรม MISTRG6 ที่ได้รับการ transduced กับ AAV-hACE2 (+AAV) หรือที่ไม่ได้รับการ transduced กับ AAV-hACE2 (-AAV) ที่มีการติดเชื้อ. หนูที่ถูกบรรจจุสสารพันธุกรรม MISTRG6 ที่ได้รับการ transduced กับ AAV-hACE2 และที่ไม่ได้รับการ transduced กับ AAV-hACE2 ได้รับการ reconstituted กับ human progenitor cells จากผู้บริจาคเดียวกัน.

F. รูปภาพที่เป็นตัวแทนจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี florescent microscopy แสดงถึง colocalization ของการย้อมสี double stranded RNA (J2 antibody) และ mNG signal และการย้อมสี DAPI ในเนื้อเยื่อปอดที่ถูกทำให้คงสภาพ (fixed) ในวันที่ 4 หลังการทำให้ติดเชื้อ.

G. รูปภาพที่เป็นตัวแทนจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี florescent microscopy แสดงถึง colocalization ของ double stranded RNA (J2 antibody), RNA polymerase ที่อาศัย RNA (RdRp), mouse EpCAM และการย้อมสี DAPI ในเนื้อเยื่อปอดที่ถูกทำให้คงสภาพ (fixed) ในวันที่ 4 หลังการทำให้ติดเชื้อ.

H. ฮิสโตแกรมและความถี่ที่เป็นตัวแทนของ mNG+ cells ในแมคโครฟาจที่พัฒนามาจากไขกระดูกซึ่งได้รับการเพาะเลี้ยงกับ SARS-CoV-2-mNG (หรือไม่ได้รับการเพาะเลี้ยงกับ SARS-CoV-2-mNG). เซลล์ได้รับการ treat กับพลาสมารวม (pooled plasma) จาก controls ซึ่งมีสุขภาพดีหรือจากผู้ป่วยโควิด 19 ระยะพักฟื้น. mNG+ macrophages ได้รับการ pre-gated บนเซลล์ที่มีชีวิต (live-dead stain negative) 48 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ.

I. ฮิสโตแกรมและความถี่ที่เป็นตัวแทนของ mNG+ cells ในแมคโครฟาจที่พัฒนามาจากไขกระดูกและแมคโครฟาจของปอดที่ได้รับการเพาะเลี้ยงกับไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 เมื่อมีพลาสมาของผู้ป่วยโควิด 19 ระยะพักฟื้น. mNG+ macrophages ได้รับการ pre-gated บนเซลล์ที่มีชีวิต (live-dead stain negative) 48 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ.

J. ฮิสโตแกรมและความถี่ที่เป็นตัวแทนของ mNG+ cells ในแมคโครฟาจที่พัฒนามาจากไขกระดูกซึ่งได้รับการเพาะเลี้ยงกับไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 เมื่อได้รับยาหรือไม่ได้รับยา Remdesivir. ค่าเฉลี่ยเลขคณิต (Mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD). วิธีการทดสอบแบบ unpaired t-test.

## เครื่องมือและวิธีการ (Materials and Methods)

### หนูทดลอง

MISTRG6 ได้รับการ generated โดยห้องปฏิบัติการ R. Flavell laboratory โดยการผสมรวมหนูที่ได้รับการ generated โดยห้องปฏิบัติการนี้คือห้องปฏิบัติการของบริษัท Markus Manz and Regeneron Pharmaceuticals โดยอ้างอิงจากภูมิหลัง *Rag2*<sup>-/-</sup> *IL2rg*<sup>-/-</sup> 129xBal/c ที่เสริมด้วยยีนสำหรับมนุษย์ M-CSF, IL-3, SIRPα, thrombopoietin, GM-CSF และ IL-6 ซึ่งได้รับการ knocked เข้าสู่แต่ละตำแหน่งบนยีนของหนู 29-30 หนูที่ถูกบรรจุสารพันธุกรรม MISTRG6 ได้รับการฝากไว้ในห้องปฏิบัติการ Jackson Laboratories และจัดสรรให้แก่หน่วยงานทางการศึกษา หน่วยงานที่ไม่หวังผลกำไร และหน่วยงานภาครัฐภายใต้ข้อตกลงการถ่ายโอนวัสดุอุปกรณ์ Yale-Regeneron (Yale-Regeneron material transfer agreement) ซึ่งได้รับการอนุมัติเห็นชอบจากทุกฝ่ายแล้ว คำแนะนำเกี่ยวกับการให้ได้ว่าซึ่งข้อตกลงการถ่ายโอนวัสดุอุปกรณ์สำหรับสายพันธุ์หนูนี้จะได้รับการจัดหาให้ พร้อมกับข้อมูลเกี่ยวกับสายพันธุ์เมื่อมีการร้องขอ หนูทั้งหมดได้รับการเก็บรักษาไว้ในภาชนะปิดที่ปลอดเชื้อที่จำเพาะพิเศษใน animal facilities ของเรา (ห้องปฏิบัติการชีววิทยาระดับ 1, 2 หรือ 3) ภายใต้โปรโตคอลที่ได้รับการอนุมัติเห็นชอบจากคณะกรรมการการศึกษาวิจัยในสัตว์ทดลอง หนูที่ถูกบรรจุสารพันธุกรรม MISTRG6 ที่ unconstituted ได้รับการเก็บรักษาไว้โดยได้รับการ treat ตามวงจรรอบ (cycling treatment) ด้วยยา enrofloxacin ซึ่งใส่น้ำดื่ม (Baytril, 0.27 mg/ml) การทดลองทั้งหมดในสัตว์ทดลองเป็นไปตามโปรโตคอลของคณะกรรมการการดูแลสัตว์ทดลองและการใช้ประโยชน์จากสัตว์ทดลองของสถาบัน (Institutional Animal Care and Use Committee – IACUC) แห่งมหาวิทยาลัยเยล สำหรับหนูที่ติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 ขั้นตอนการปฏิบัติทั้งหมดทำในห้องปฏิบัติการชีววิทยาระดับ BSL-3 โดยได้รับการอนุมัติเห็นชอบจากคณะกรรมการการดูแลสัตว์ทดลองและการใช้ประโยชน์จากสัตว์ทดลองของสถาบัน (Institutional Animal Care and Use Committee – IACUC) แห่งมหาวิทยาลัยเยล รวมทั้งจากคณะกรรมการด้านอนามัยสิ่งแวดล้อมและความปลอดภัยของมหาวิทยาลัยเยล

### การปลูกถ่าย human CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells เข้าสู่หนู

ตัวอย่างตับจากตัวอ่อนของหนูในครรภ์ถูกตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ และถูก treat กับ collagenase D (Roche, 200 µg/ml) เป็นเวลา 45 นาทีที่อุณหภูมิ 37 °C และถูกเตรียมเพื่อการทำ cell suspension เซลล์ CD34<sup>+</sup> ของมนุษย์ถูกทำให้บริสุทธิ์โดยการปั่นแยกชนิด density gradient centrifugation (Lymphocyte Separation Medium, MP Biomedicals) ตามด้วย positive immunomagnetic selection โดยใช้ EasySep ~ Human CD34 Positive Selection Kit (Stemcell) สำหรับขั้นตอนการทำ intra-hepatic engraftment หนูที่เพิ่งคลอดใหม่ ๆ อายุ 1–3 วันได้รับการฉีด 20,000 fetal liver CD34<sup>+</sup> cells ใน 20 µl ของสารละลาย PBS เข้าสู่ตับโดยใช้เข็มฉีดยาชนิด 22-gauge (Hamilton Company) การใช้ประโยชน์จากวัสดุชิ้นส่วนของมนุษย์ทั้งหมดได้รับการอนุมัติเห็นชอบจากคณะกรรมการการศึกษาวิจัยในคนแห่งมหาวิทยาลัยเยล (Yale University Human Investigation Committee)

### การบริหารจัดการ AAV-hACE2

AAV9 ที่บรรจุหีสวนกลีโอดีของ hACE2 ได้รับการจัดซื้อจาก Vector Biolabs (AAV9-CMV-hACE2) หนูทำให้สลบโดยการใช้อาิ isoflurane ล่าคอส่วนค้ำหน้า (rostral neck) ถูกโกนและฆ่าเชื้อทำความสะอาด ก่อนการกรีดเป็นรอยตัดขนาด 5 มิลลิเมตรและทำให้มองเห็น (visualized) หลอดลม โดยการใช้อาิ syringe สำหรับฉีดอินซูลินชนิด 32 G สารพันธุกรรม AAV-CMV-hACE2 ที่มีความเข้มข้น 10<sup>11</sup> genomic copies ต่อมิลลิลิตร ในปริมาณขนาด (dose) 50 µl ถูกฉีดเข้าไปในหลอดลมของหนู รอยผ่าตัดถูกปิดด้วยวัสดุเย็บแผลชนิด 4-0 Vicryl suture และ/หรือกาวติดเนื้อเยื่อชนิด 3M Vetbond หลังจากนั้นหนูที่ถูกวางยาสลบก็ถูกนำไปใส่ไว้ในกรงที่มีการให้ความอบอุ่นจนกระทั่งฟื้นคืนเต็มที่ ต่อจากนั้นหนูก็ถูกย้ายไปยังห้องปฏิบัติการชีววิทยาระดับ (BSL-3) เพื่อสร้างความคุ้นเคย

## การทำให้ติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 isolate USA-WA1/2020 ได้รับจาก BEI reagent repository ทุกการทดลองเกี่ยวกับการทำให้ติดเชื้อดำเนินการในห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล (BSL-3) ซึ่งได้รับอนุญาตจากทางการมลรัฐคอนเนตทิคัตและมหาวิทยาลัยเยล หนูได้รับการวางยาสลบโดยใช้สาร isoflurane ที่ความเข้มข้น 20% (ปริมาตร/ปริมาตร) ซึ่งได้รับการเจือจางในสาร propylene glycol หนูได้รับเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 ( $1.3 \times 10^6$  PFU) ในปริมาณขนาด 50  $\mu$ l ผ่านทางรูจมูกโดยการใช้อุปกรณ์

## การให้ยา

หนูที่ถูกบรรจุสารพิษกรรม MISTRG6-hACE2 ของมนุษย์ที่ถูกทำให้ติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 ได้รับยา dexamethasone ในขนาด 10 mg/kg เป็นเวลา 3 วัน โดยเริ่มตั้งแต่วันที่ 7 หลังการทำให้ติดเชื้อ หนูได้รับยา Remdesivir ในขนาด 25 mg/kg ตามที่อธิบายมาแล้วก่อนหน้านี้ <sup>31</sup> โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนังเป็นเวลา 3 วันติดต่อกัน โดยเริ่มตั้งแต่วันที่ 7 หลังการทำให้ติดเชื้อ หนูได้รับแอนติบอดีต้าน IFNAR2 ในขนาด 1.5 mg/kg ในวันที่ 7 และ 11 หลังการทำให้ติดเชื้อ

## ไคเตอร์ของไวรัส

หนูถูกทำารุณยฆาตในสาร isoflurane 100% ประมาณครึ่งหนึ่งของปอดข้างขวาถูกใส่ไว้ในหลอด bead homogenizer tube ที่มีสารละลาย PBS ปริมาณ 1 ml และ 2% FBS หลังจากการทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน (homogenization) แล้ว ปริมาณ 300  $\mu$ l ของส่วนผสมนี้ถูกใส่ใน 1ml Trizol (Invitrogen) สำหรับการสกัดอาร์เอ็นเอและการตรวจวิเคราะห์ ปริมาตรที่เหลือของ lung homogenates ถูกทำให้แยกจากเศษซากเซลล์ที่ตายแล้ว (debris) โดยการปั่นแยก (centrifugation) ที่ 3,900 g เป็นเวลา 10 นาที ไคเตอร์ของไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 ที่สามารถทำให้ติดเชื้อได้รับการวัดโดยการตรวจวิธี plaque assay ในเซลล์ Vero E6 (มาตรฐาน) หรือเซลล์ Vero ACE2+TMPRSS2+ (sensitive) ใน DMEM 4% FBS และ 0.6% Avicel RC-581 <sup>32</sup> Plaques ได้รับการ resolved ที่ 48 ชั่วโมงหลังการทำให้ติดเชื้อโดยการทำให้คงสภาพ (fixing) ใน 10% formaldehyde เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตามด้วยการย้อมสีเป็นเวลา 1 ชั่วโมงใน 0.5% crystal violet in 20% ethanol และ plates ได้รับการล้าง (rinsed) ในน้ำเพื่อทำให้มองเห็น (visualize) plaques การเจือจางแบบ multiple dilutions ของ lung homogenates ถูกใช้ในการวัดหาปริมาณไคเตอร์ที่ทำให้ติดเชื้อได้ (จำนวนค่าสูงสุดของ plaques ที่สามารถวัดหาปริมาณได้ = 10 ต่อ ml ของ lung homogenate)

## การตรวจวิเคราะห์อาร์เอ็นเอของไวรัส

อาร์เอ็นเอได้รับการสกัดโดยใช้ RNeasy mini kit (Qiagen) ตามโปรโตคอลของบริษัทผู้ผลิต ระดับของอาร์เอ็นเอของไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 ได้รับการวัดหาปริมาณโดยใช้ชุดตรวจวิเคราะห์ Luna Universal Probe Onestep RT-qPCR kit (New England Biolabs) และ US CDC real-time RT-PCR primer/probe sets สำหรับ 2019-nCoV\_N1 สำหรับแต่ละตัวอย่างใช้ 1  $\mu$ g ของ RNA Subgenomic อาร์เอ็นเอของไวรัสได้รับการวัดหาปริมาณโดยใช้ชุด primer และ probe ที่มุ่งเป้าตรงจุดไปที่ยีน E ตามที่ได้อธิบายไปแล้วก่อนหน้านี้ <sup>33-34</sup> primer-probe sequences เป็นไปดังต่อไปนี้คือ E\_Sarbeco\_F primer: ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT (400 nM ต่อ reaction); E\_Sarbeco probe \_P1: FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BBQ (200nM ต่อ reaction); E\_Sarbeco\_R primer ATATTGCAGCAGTACGCACACA (400 nM ต่อ reaction); E leader specific primer sgLead-F: CGATCTCTTGTAGATCTGTTCTC (400 nM ต่อ reaction)

## การตรวจโดยวิธี Histology และ Immunohistochemistry

แผนกพยาธิวิทยาแห่งมหาวิทยาลัยเยลได้กรุณาให้ความช่วยเหลือในการฝัง (embedding) และการตัด (sectioning) เนื้อเยื่อปอด นักพยาธิวิทยาได้นำปอดตรวจจอบอ่านสไลด์ที่ปกปิด (blinded) และแยกและระบุการแทรกซึมในเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันและพยาธิวิทยาอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อปอดที่ฝังพาราฟิน ถูกล้างพาราฟิน (deparaffinized) ใน xylene และได้รับการคืนน้ำ (rehydrated) หลังจากการคืนสภาพ (retrieval) ของแอนติเจนโดยใช้ 10 mM Sodium Citrate pH 6 แล้ว สไลด์ก็ถูก blocked โดยใช้ 5% BSA ใน PBS ที่มี 0.1% Tween 20 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ต่อจากนั้นตัวอย่างถูก incubated ข้ามคืนกับแอนติบอดีชนิดปฐมภูมิ (primary antibody) ที่เจือจางใน 1% BSA ที่อุณหภูมิ 2-8 °C ในวันต่อมาตัวอย่างถูกล้างและ incubated กับแอนติบอดีชนิดทุติยภูมิฟลูออเรสเซนต์ หลังการล้างตัวอย่างก็ถูก mounted บน DAPI mounting media

## การแยกเซลล์และการวิเคราะห์ด้วยวิธี flow cytometry

หนูทั้งหมดได้รับการตรวจวิเคราะห์เมื่อมีอายุได้ประมาณ 9-11 สัปดาห์ การเลี้ยงเซลล์แขวนลอยแบบเซลล์เดี่ยว (single cell suspensions) ได้รับการเตรียมจากเลือด จาก BAL ของม้าม และปอด หนูถูกทำการ усыновить โดยใช้ 100% isoflurane การล้างหลอดลมและถุงลมปอด (BAL) ทำโดยใช้วิธีมาตรฐานซึ่งใช้สายสวนชนิด 22G (BD) เลือดถูกจัดเก็บจากบริเวณบั้นท้าย (retro-orbitally) หรือไม่ก็จากการเจาะหัวใจ (cardiac puncture) หลังการทำการ усыновить แล้ว การล้างหลอดลมและถุงลมปอด (BAL) ทำโดยใช้วิธีมาตรฐานซึ่งใช้สายสวนชนิด 22G (BD) 35 ปอดได้รับการเก็บเกี่ยว (harvested) ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ (minced) และบ่ม (incubated) ใน digestion cocktail ที่มี 1 mg/ml collagenase D (Sigma) และ 30 µg/ml DNase I (Sigma-Aldrich) ใน RPMI ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 20 นาที ต่อจากนั้นเนื้อเยื่อถูกกรองผ่านตัวกรองที่มีขนาดของรูพรุน 70 µm เซลล์ได้รับการ treated ด้วยสารละลาย ammonium-chloride-potassium buffer และได้รับการ resuspended ในสารละลาย PBS ที่มี 1% FBS เซลล์ชนิดโมโนนิวเคลียร์ได้รับการบ่ม (incubated) ที่อุณหภูมิ 4°C กับ human (BD) and mouse (BioxCell, BE0307) Fc block เป็นเวลา 10 นาที หลังจากการล้างแล้วการเชื่อมติดแอนติบอดีชนิดปฐมภูมิทำที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที หลังการล้างด้วยสารละลาย PBS แล้วเซลล์ถูกทำให้คงสภาพ (fixed) โดยการใส่ 4% paraformaldehyde สำหรับการเชื่อมติดภายในเซลล์ (intracellular staining) เซลล์ถูกล้างด้วยสารละลาย BD permeabilization buffer และย้อมสีใน buffer อย่างเดียวกันเป็นเวลา 45 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ตัวอย่างได้รับการตรวจวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง LSRII flow cytometer (BD Biosciences) ข้อมูลได้รับการวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม FlowJo software

## การทำให้ติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 ในหลอดทดลอง

เซลล์ไขกระดูกได้รับการแยก (isolated) จากกระดูกไขกระดูกของหนูที่ถูกบรรจุสารพันธุกรรม MISTRG6 ซึ่งได้รับการ reconstituted โดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อภายใต้สภาพปลอดเชื้อ สำหรับการเปลี่ยนสภาพเซลล์ (differentiation) กลายเป็น macrophages นั้นเซลล์ไขกระดูกได้รับการ incubated ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin และ recombinant human M-CSF (50ng/ml), GM-CSF (50ng/ml) และ IL-4 (20ng/ml) ที่ความเข้มข้นเท่ากับ  $2 \times 10^6$  ต่อ ml เป็นเวลา 6 วัน ใน 5% CO2 incubator ที่อุณหภูมิ 37°C อาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย 10% FBS ได้รับการเติมเต็มใหม่ด้วยอาหารใหม่ทุก ๆ 3-4 วัน ก่อนการทำให้ติดเชื้อเซลล์ได้รับการเฝ้าสังเกตสำหรับในเรื่องของความละเอียด (granularity) รูปร่างและการเรียงตัวที่ยืดยาวขึ้น (elongated morphology) และการยึดติด (adherence) ที่แข็งแรงมากขึ้นกับ plate ต่อจากนั้นแมโครฟาจของมนุษย์ก็ได้รับการเพาะเลี้ยงกับไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 โดยมีหรือโดยปราศจากพลาสมาของผู้ป่วยและยา Remdesivir ในการเพิ่มพูน (enrich) แมโครฟาจและโมโนไซต์ของมนุษย์เซลล์จากปอดของหนูที่ถูกบรรจุสารพันธุกรรม MISTRG6 ที่ไม่ติดเชื้อได้รับการแยก (sorted) โดยอ้างอิงยึดติดต่อการแสดงออกของ CD11b และ human CD45 ต่อจากนั้นเซลล์เหล่านี้ก็ได้รับการ incubated กับ GM-CSF และ IL-4 เป็นเวลา 48 ชั่วโมงก่อนการเลี้ยงเซลล์กับไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 โดยมีพลาสมาจากผู้ป่วย

## แอนติบอดี

แอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนต่อไปนี้ถูกใช้

แอนติเจนของหนู: CD45 (Clone: 30-F11), F4/80(BM8), CD326 (G8.8); แอนติเจนของมนุษย์: CD45 (HI30), CD3 (UCHT1), CD14 (HCD14), CD16 (3G8), CD19 (HIB19), CD206 (15-2), CD86 (BU63), CD68(Y1/82A), CD11B (M1/70), CD11C (3.9), HLA-DR(LN3), NKp46 (9E2), CD56(MEM-188), CD4(OKT4), CD8(SK1). แอนติบอดีทั้งหมดนี้ได้รับมาจาก Biolegend เว้นแต่จะได้ระบุไว้เป็นอย่างอื่น แอนติบอดีชนิดโมโนโคลน (clone 135 และ 144) ได้รับจาก M. Nussenzweig ตามที่ได้อธิบายมาแล้วก่อนหน้านี้ 22 แอนติบอดีชนิดต้าน IFNAR2 ได้รับการจัดซื้อจาก PBL Assay science (Cat #21385-1) แอนติบอดีชนิดต้าน dsRNA (J2) ได้รับการจัดซื้อจาก Sigma แอนติบอดี RNA Polymerase ที่อาศัยอาร์เอ็นเอไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ SARS-CoV-2 ได้รับการจัดซื้อจาก CellSignaling

### การทำ RNA-sequencing สำหรับเนื้อเยื่อทั้งหมด (bulk whole tissue) ของปอด

อาร์เอ็นเอ ที่แยก (isolated) จากเนื้อเยื่อปอดที่ถูกทำให้เป็นเนื้อเดียวกันที่ใช้สำหรับตรวจวิเคราะห์ transcriptome ของเนื้อเยื่อทั้งหมด (whole tissue) ด้วย Libraries ได้รับการจัดทำด้วยความช่วยเหลือของศูนย์สำหรับการตรวจวิเคราะห์จีโนมแห่งมหาวิทยาลัยเยล (Yale Center for Genomic Analysis) กล่าวโดยย่อ ๆ คือ libraries ได้รับการจัดเตรียมโดยใช้ Illumina rRNA depletion kit และได้รับการ sequenced โดยใช้ NovaSeq ข้อมูลดิบที่อ่านได้จากการทำ sequencing ได้รับการ aligned กับจีโนมผสมของมนุษย์และหนู (human-mouse combined genome) โดยใช้ STAR<sup>36</sup> ได้รับการ annotated และ counted โดยใช้ HTSeq<sup>37</sup> ได้รับการ normalized โดยใช้ DESeq2<sup>38</sup> และได้รับการ graphed โดยใช้ web tool ของ Broad Institute Morpheus การวิเคราะห์ differential expression ก็ทำโดยใช้ DESeq2 สำหรับการแยกแยะระดับยีนที่ได้รับการกระตุ้นจากอินเตอร์เฟอรอน ทำโดยอาศัยเว็บไซต์ <http://www.interferome.org> กับพารามิเตอร์ -In Vivo, -Mus musculus หรือ Homo sapiens -fold change up 2 and down 2

### การแสดงออกของยีน

อาร์เอ็นเอได้รับการสกัดโดยใช้ RNeasy mini kit (Qiagen) ตามโปรโตคอลของบริษัทผู้ผลิต ชุด High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit ถูกใช้ในการทำ cDNA การทำ Quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) ทำโดยใช้ SYBR FAST universal qPCR kit (KAPA Biosystems) KiCqStart primers ที่ออกแบบก่อนล่วงหน้า (predesigned) สำหรับ DDX58, IL-6, IFITM3, IRF7, IFIH1, IFNA6, IFNG และ HPRT1 ได้รับการจัดซื้อจาก Sigma

### 10X Genomics จากการทำ Single Cell RNA Sequencing

การทำ single cell suspensions จากปอดที่ถูกย่อยได้รับการเตรียมสำหรับการทำ droplet-based scRNA-sequencing และเซลล์จำนวน 10000 เซลล์ได้รับการ encapsulated ลงใน droplets โดยการใส่เทคโนโลยี 10X Chromium GEM ในส่วนของ libraries ได้รับการเตรียมขึ้นเอง (in house) โดยใช้ Chromium Next GEM Single Cell 3<sup>+</sup> Reagent Kits v3.1 (10X Genomics) และ scRNA-seq libraries ได้รับการ sequenced โดยใช้ Nova-Seq ข้อมูลดิบที่อ่านได้จากการทำ sequencing ได้รับการ processed โดยใช้เครื่อง Cell Ranger 3.1.0 ซึ่งใช้ human-mouse combined reference ในการสร้าง gene-cell count matrix และเพื่อที่จะแยกความแตกต่างระหว่างเซลล์ของมนุษย์กับเซลล์ของหนู เราได้นับจำนวนของยีนของมนุษย์ (nHuman) และยีนของหนู (nMouse) ที่มีการแสดงออกไม่เป็นศูนย์ในแต่ละเซลล์ และคัดเลือกเซลล์ที่มี nHuman > 20 \* nMouse เป็นเซลล์ของมนุษย์ เมทริกซ์การนับ (count matrix) ของเซลล์ของมนุษย์และยีนของมนุษย์ถูกใช้ในการวิเคราะห์ downstream analysis โดยใช้ Seurat 3.2<sup>39</sup> โดยจำเพาะแล้วเมทริกซ์นี้ถูกกรองเพื่อคัดเซลล์ที่มีคุณภาพต่ำออกไปและเก็บเซลล์ที่มียีนที่ตรวจพบที่มากกว่า 200 ยีนและน้อยกว่า 5000 ยีนและมี transcripts ของไมโทคอนเดรียต่ำกว่า 20% ต่อจากนั้นเราได้ log normalized แต่ละ entry ของเมทริกซ์โดยการคำนวณ log (CPM/100 + 1) โดยที่ CPM ย่อมาจาก counts per million (จำนวนที่นับได้ต่อล้าน) เพื่อที่จะทำให้เห็นภาพประชากรกลุ่มย่อยของเซลล์ใน 2 มิติ เราจึงได้ใช้วิธีการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principal component analysis) ตามด้วย t-SNE ซึ่งเป็นวิธี nonlinear dimensionality reduction method กับข้อมูลที่ได้รับการ log-transformed ต่อจากนั้นการจัดกลุ่มที่อิงตามกราฟ (graph-based clustering) ก็ถูกใช้ในการสร้าง clusters ที่ overlaid บน t-SNE coordinates เพื่อศึกษาหาประชากรเซลล์กลุ่มย่อย ส่วน marker genes สำหรับแต่ละ cluster ของเซลล์ได้รับการแยกแยะโดยใช้ Wilcoxon test กับ Seurat สำหรับค่า P values ที่จัดปรับเราใช้ Bonferroni

## correction

ในการรวมเซลล์จาก DPls ที่แตกต่างกันเข้าด้วยกันเราใช้วิธีการบูรณาการ<sup>39</sup> ใน Seurat เพื่อลบล้าง batch effects ต่อจากนั้นเราได้ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principal component analysis) และเก็บ PCs 30 อันดับบนสุดเป็น input สำหรับ tSNE ซึ่งเป็นวิธี nonlinear dimensionality reduction method ในการฝัง (embed) ข้อมูลใน space 2 มิติสำหรับการทำให้มองเห็น (visualization) ต่อจากนั้นการจัดกลุ่มที่อิงตามกราฟ (graph-based clustering) ที่มี resolution เท่ากับ 0.8 ก็ถูกใช้เพื่อสร้างคลัสเตอร์ที่ overlaid บน t-SNE coordinates เพื่อศึกษาหาประชากรเซลล์กลุ่มย่อย ส่วน marker genes สำหรับแต่ละคลัสเตอร์ของเซลล์ได้รับการแยกแยะโดยใช้วิธีการทดสอบแบบ Wilcoxon test กับ Seurat (สำหรับค่า P values ที่จัดปรับเราใช้ Bonferroni correction) หลังจากการแยกแยะนอกประเภทของเซลล์แล้วเราได้คัดแยกประชากรแมคโครฟาจออกจาก DPls ทั้งหมด และใช้ขั้นตอนต่าง ๆ อย่างเดียวกันตามที่อธิบายไว้ข้างบนเพื่อ re-preprocess ข้อมูลและทำให้เห็น (visualize) ข้อมูล Clusters ได้รับการกำหนดขอบเขตใหม่ (redefined) โดยอ้างอิงจาก resolution เท่ากับ 0.3

## การวิเคราะห์ทางสถิติ

เราใช้การทดสอบชนิด unpaired t-test หรือ paired t-test ในการกำหนดนัยสำคัญทางสถิติสำหรับความเปลี่ยนแปลงของความถี่และจำนวนของเซลล์ระบบภูมิคุ้มกัน ในขณะที่เปรียบเทียบหนูที่มีการติดเชื้อมีหนูในกลุ่ม control ซึ่งไม่ติดเชื้อ หรือระหว่างหนูที่ได้รับยากับหนูที่ไม่ได้รับยา สำหรับการทดลองที่หนูมีการได้รับยาเราใช้วิธีการทดสอบแบบ one-way ANOVA ในการกำหนดนัยสำคัญทางสถิติตลอดทั่วทุกกลุ่มและค่า p value ที่จัดปรับได้รับการรายงานในการหาว่าการวัดหาปริมาณอาร์เอ็นเอของไวรัสมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มต่าง ๆ (treatment groups) หรือระหว่างในห้วงระยะเวลาต่าง ๆ กันหรือไม่ เราได้ใช้วิธีการทดสอบแบบ Mann-Whitney ซึ่งเป็นการทดสอบแบบ two-tailed test เราใช้การทดสอบแบบ one-sample Wilcoxon signed rank test ในการค้นหาว่าการวัดหาไตเตอร์ของไวรัสของ untreated condition มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากระดับปริมาณไวรัสที่ไม่สามารถตรวจพบได้ (หรือไตเตอร์ของไวรัสเท่ากับ 0) หรือไม่