

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 เกิดเลือดที่ได้รับการกระตุ้นมากเกินไป 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 ในผู้ป่วยภายหลังจากผู้ป่วยเหล่านี้ได้มีการฟื้นตัวอย่างเห็นได้ชัดจากอาการโควิด 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] ผู้ป่วยที่มีอาการหนักรุนแรงในระหว่างที่เข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาลมีแนวโน้มที่จะมีความสามารถในการซึมซับแก๊สของปอดบกพร่องรุนแรง (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) ซึ่งได้รับการติดตามอาการเป็นเวลานานถึง (ค่ากลางมัธยฐาน) 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  $52.4 \pm 4.8$  ปี) เพื่อเป็นกลุ่ม controls อาสาสมัครที่มีสุขภาพดีเหล่านี้ต้องไม่เป็นผู้ที่สูบบุหรี่ หรือมีโรคหัวใจและหลอดเลือด หรือมีภาวะของการแข็งตัวของเลือด หรือเป็นผู้ที่อยู่ระหว่างการตั้งครรภ์ การให้นมบุตร หรือใช้ยาต้านการแข็งตัวของเลือด [38] ผู้ป่วยในการศึกษาวิจัยนี้ได้แก่ผู้ป่วยที่ได้รับการตรวจวินิจฉัยว่าเป็นโควิด 19 (ก่อนการบำบัดรักษา) ( $N = 15$ ; เพศชาย 9 คนและเพศหญิง 6 คน; อายุเฉลี่ยคือ  $54.8 \pm 15.3$  ปี) และผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (T2DM) ( $N = 10$ ; เพศชาย 7 คนและเพศหญิง 3 คน; อายุเฉลี่ยคือ  $59.2 \pm 15.9$  ปี) นอกจากนี้ก็ยังมีผู้ป่วยที่มีภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC) ( $N = 11$ ; เพศชาย 3 คนและเพศหญิง 8 คน; อายุเฉลี่ยคือ  $55.7 \pm 5.8$  ปี) รวมอยู่ด้วย ในจำนวนผู้ป่วยเหล่านี้มีอยู่ 3 รายที่มีอาการของโควิด 19 เฉียบพลันรุนแรงและได้รับการเข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาลที่ซึ่งผู้ป่วยเหล่านี้ได้รับออกซิเจน หนึ่งรายที่ผู้ป่วยมีอาการรุนแรงและต้องใช้เครื่องช่วยหายใจ (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  $-80^{\circ}\text{C}$

### 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  $-80^{\circ}\text{C}$  เป็น  $35^{\circ}\text{C}$  โดยใช้เครื่อง incubator ตัวอย่างก็ถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ  $35^{\circ}\text{C}$  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  $\mu$  คือความหนืด (viscosity) ,  $\tau$  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  $\mu$ L ของ CD62P และ PAC-1 ถูกเติมลงไป 20  $\mu$ 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]



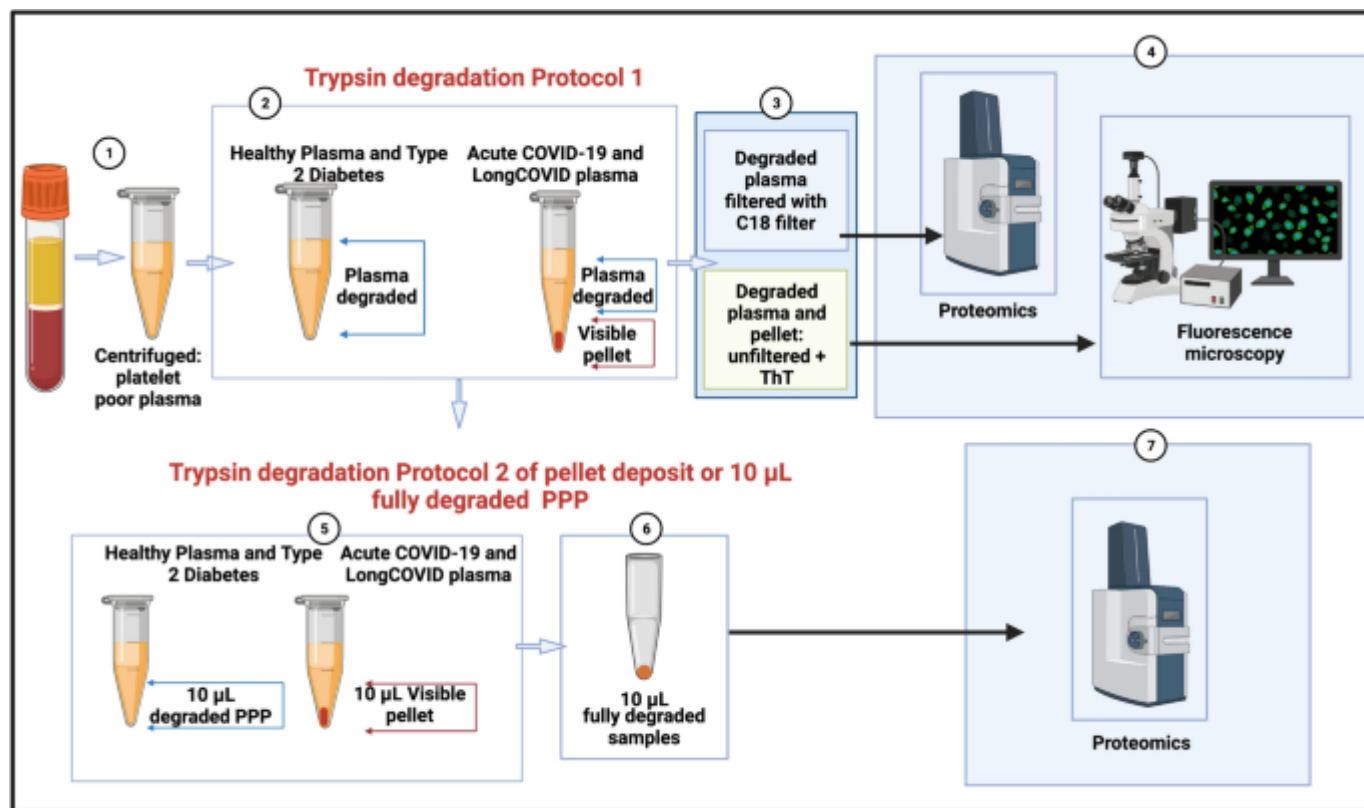
โปรโตคอลการย่อยด้วย **trypsin 2** ขั้นตอนของตัวอย่าง **platelet poor plasma (PPP)**

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](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 µL และ/หรือตัวอย่างที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ ได้รับการ exposed กับ thioflavin T (ThT) และถูกมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ชนิด fluorescence microscope. ก่อนการวิเคราะห์ทางโปรตีโอมิกส์ที่อิงเทคนิค liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) ส่วนที่เป็น supernatants ถูกถอดผ่านเครื่องมือสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง (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)

โพรโตคอลการย่อยด้วย trypsin โพรโตคอลแรกได้รับการปฏิบัติตามโดยใช้ 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 โพรโตคอลการ 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

#### โพรโตคอลการย่อยด้วย 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  $\mu\text{L}$  ได้รับการ **exposed** กับ ThT (ตามที่อธิบายมาแล้วก่อนหน้านี้) และ **supernatants** ส่วนที่เหลือได้รับการตรวจวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค **mass spectrometry** (วิธีการแสดงไว้ข้างล่างนี้) ปริมาณ 10  $\mu\text{L}$  ของตัวอย่าง **platelet poor plasma** จากอาสาสมัครซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดีและจากผู้ป่วยที่มีภาวะเบาหวานชนิดที่ 2 (T2DM) ไม่มีสิ่งตกค้างสะสมที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ (**pellet deposits**) ในขณะที่ปริมาณ 10  $\mu\text{L}$  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**) โดยโปรโตคอลการย่อยด้วย **trypsin** ขั้นที่ 2

ปริมาณ 60  $\mu\text{L}$  ของคลอโรฟอร์มถูกเติมลงใน **platelet poor plasma** ปริมาณ 10  $\mu\text{L}$  ส่วนที่เหลือ ซึ่งมีสิ่งตกค้างสะสมที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ (**pellet deposits**) อยู่ และนำไปปั่นแยก (**centrifuged**) ที่ 13,000 $\times g$  เป็นเวลา 30 นาที **supernatant** ปริมาณ 50  $\mu\text{L}$  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 **C<sub>18</sub> 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  $300\text{ nL/min}$  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  $1\text{ ng mL}^{-1}$ ) จากตัวอย่างในกลุ่ม control จำนวน 4 ตัวอย่างได้รับการวิเคราะห์โดยวิธีนี้ ตัวอย่างได้รับการนำเข้าสู่เครื่องผ่านทางตัวปล่อยชนิด stainless-steel nano-bore emitter ข้อมูลได้รับการเก็บรวบรวมใน positive mode ที่มี spray voltage ซึ่งตั้งไว้ที่  $1.8\text{ kV}$  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  $\pm 10$  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](http://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

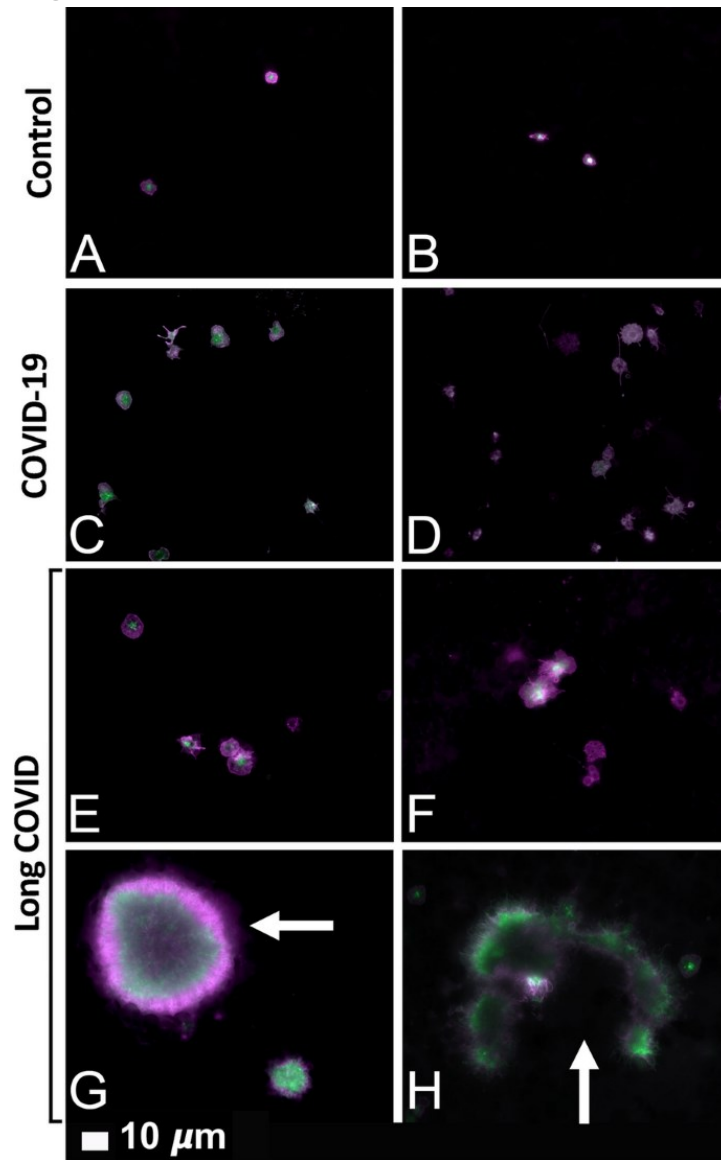
ในการวิเคราะห์นี้เราได้ทำการวิเคราะห์ platelet poor plasma จากกลุ่ม controls จำนวน 12 คน จากผู้ป่วยโควิด 19 เฉียบพลันจำนวน 11 คน และจากผู้ป่วยที่มีอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC) จำนวน 11 คน เราให้ความสนใจเป็นพิเศษกับความเข้มข้นของ SAA1 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  $200 \text{ mg L}^{-1}$  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

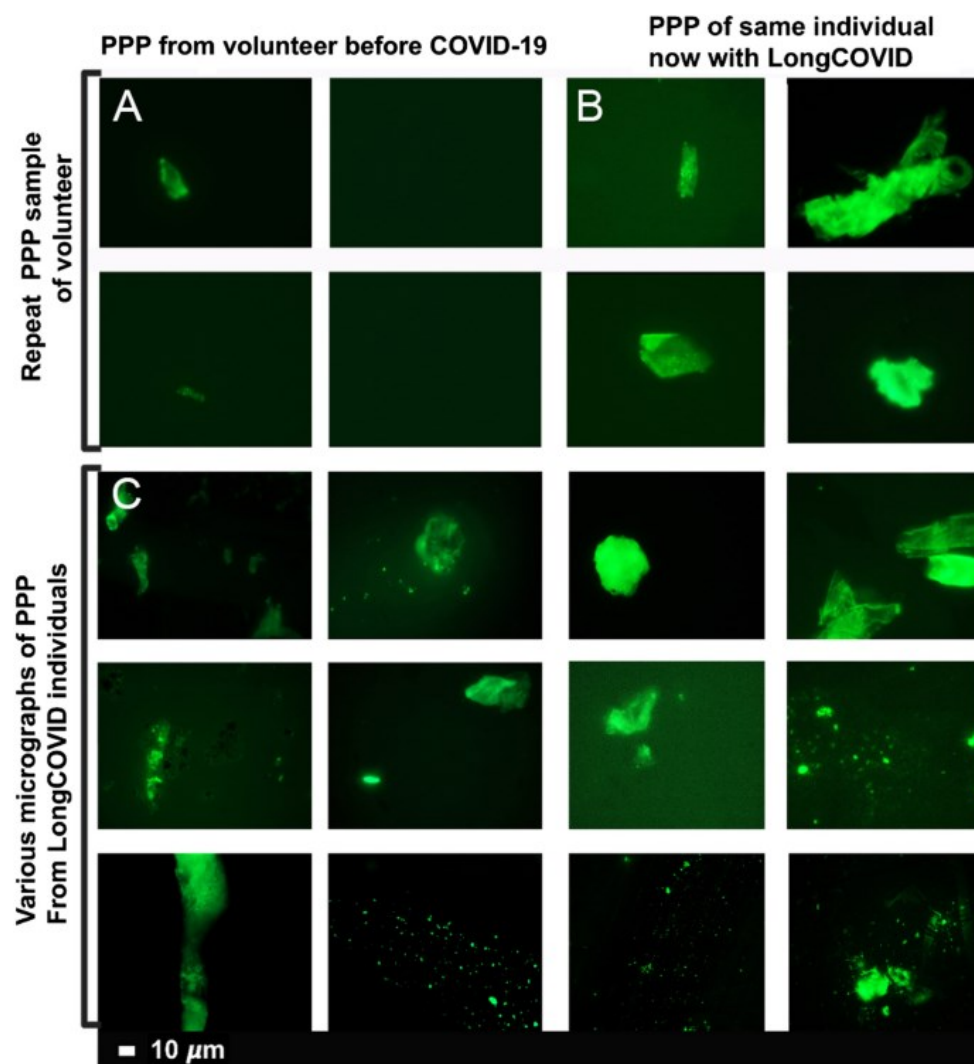


ภาพจากเทคนิค fluorescence microscopy ของตัวอย่าง haematocrit ซึ่งแสดงให้เห็นถึง micrographs ที่เป็นตัวแทนของเกล็ดเลือด. A, B แสดงให้เห็นถึง micrographs ที่เป็นตัวแทนจากอาสาสมัครซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดี. C, D แสดงให้เห็นถึงเกล็ดเลือดที่ได้รับการกระตุ้นมากผิดปกติในผู้ป่วยโควิด 19 และ E-H แสดงให้เห็นถึง 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)

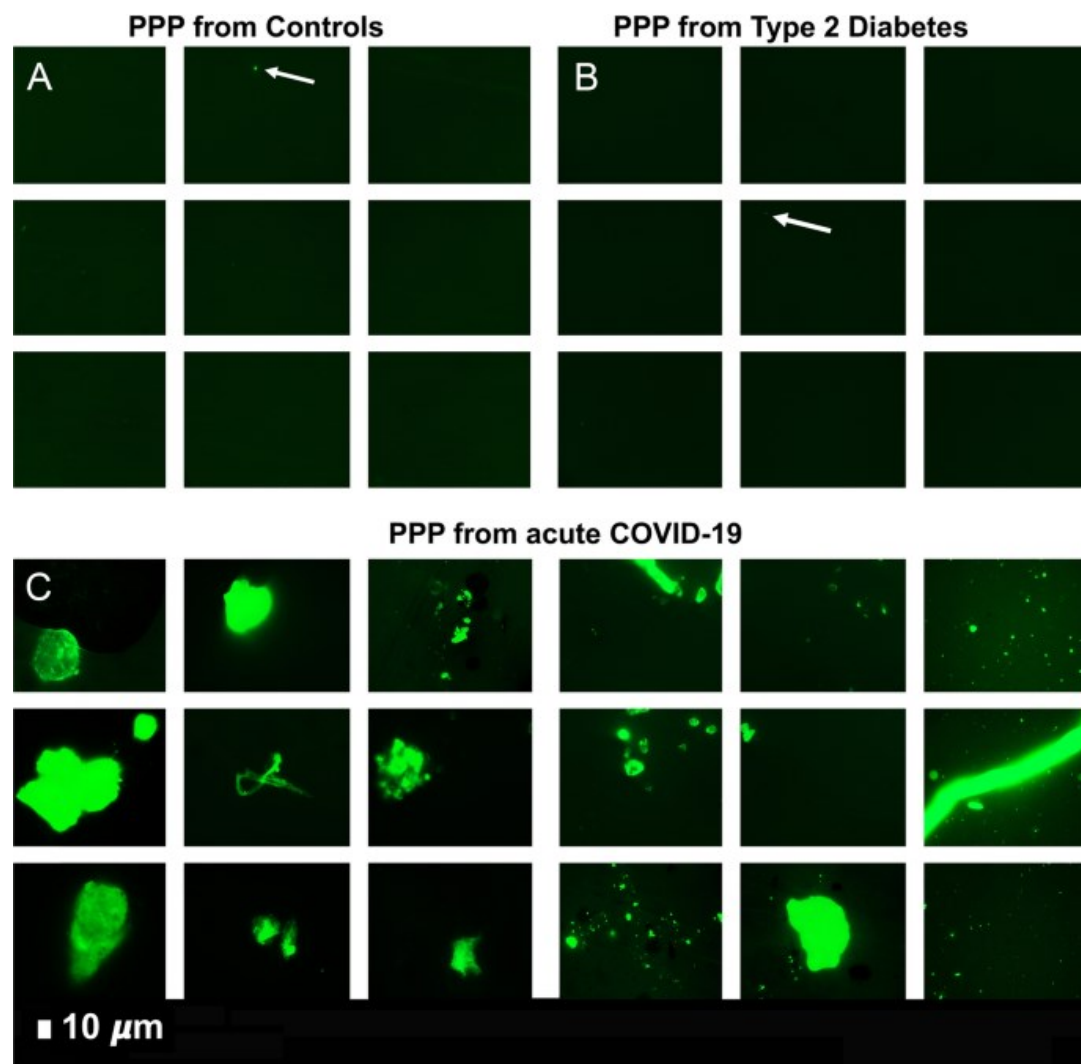
### ภาพประกอบที่ 3



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 และจากผู้ที่มีภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 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 และจากผู้ที่มีภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (long COVID/PASC)

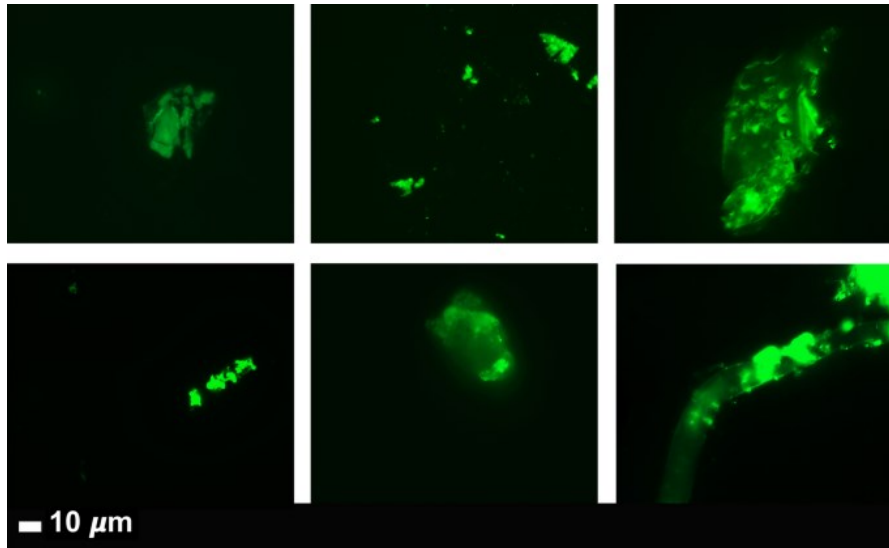
ภาพประกอบที่ 4



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). ลูกศรสีขาวชี้ให้เห็นบริเวณเล็กๆ ที่มีการจับยึดของ ThT ในตัวอย่างจากกลุ่ม controls และจากผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 (T2DM). **C** ลิ่มเลือดแข็งตัวขนาดเล็ก (microclots) ที่มีนัยสำคัญสามารถมองเห็นได้ในพลาสมาจากผู้ป่วยโควิด 19 ตามที่เห็นเป็นสัญญาณสีเขียวใน micrographs ของ platelet poor plasma จากผู้ป่วยโควิด 19



## ภาพประกอบที่ 5



Micrographs ที่ เป็น ตัว แทน ของ ผู้ ที่ มี ภาวะ อากา ร หลง เหลื อ หลัง จาก ติด เชื้อ โค วิ ด 19 ใน ระ ยะ ยาว / ผล ตาม หลัง ระ ยะ เฉี ยบ พ ล้น ของ โค วิ ด 19 (long COVID/PASC). ส่วน ที่ เป็น supernatant ที่ ถูก ย่อย (platelet poor plasma) หลัง จาก การ ย่อย ด้วย trypsin ชั้น ที่ 1 ซึ่ง ส่วน ที่ เป็น supernatant ถูก นำ ออ ก ไป และ thioflavin T (ThT) ถูก เติ ม ลง ไป ใน ส่วน ที่ เหลื อ อยู่ 10  $\mu$ L. Marker thioflavin T (ThT) มี การ จับ ยึด กับ ลิ้ม เติ ด แข็ง ตัว ขนาด เล็ก (microclots) ที่ ติ ด ปก ติ ใน platelet poor plasma

## โปรตีนของ platelet poor plasma หลังจากการย่อยด้วย trypsin 2 ขั้นตอน

ในเอกสารผลการศึกษาวิจัยนี้เรามุ่งความสนใจไปที่ผลที่ได้จากโปรตีนที่ได้ออกมาซึ่งน่าสนใจสำหรับการแข็งตัวของเลือดเท่านั้น เช่น fibrinogen, von Willebrand Factor (VWF), SAA4, และ plasminogen กับ  $\alpha 2AP$  หลังจากการทำ trypsinization ครั้งแรกแล้ว platelet poor plasma ของกลุ่ม controls ถูกย่อยอย่างเต็มที่ ในขณะที่สิ่งตกค้างสะสมที่ยังยังขัดขวางกระบวนการการสลายลิ่มเลือด (fibrinolytic-resistant deposit) ถูกปล่อยทิ้งไว้ในตัวอย่างของผู้ป่วยโควิด 19 และในตัวอย่างของผู้ที่มีภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 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 โปรตีนใดที่ได้รับการดำเนินการและผลที่เราได้แสดงให้เห็นว่าโมเลกุลต่าง 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 ที่ทำให้เกิดการอักเสบก็ยังคงมีการเพิ่มสูงขึ้นเป็นอย่างมากด้วยเช่นกันในสิ่งตกค้างสะสมที่เป็นเม็ดเล็ก 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) ข้อมูลดิบทั้งหมดสำหรับ supernatant และข้อมูลสิ่งตกค้างสะสมที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ (pellet deposits) ที่ได้รับการย่อยแสดงไว้ในส่วน Supplementary Material

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

19 (Long COVID/PASC) เปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ถูกย่อยอย่างเต็มที่จากกลุ่ม controls และกลุ่มผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2

สิ่งตกค้างสะสมที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ (ลิ้มเลือดแข็งตัวขนาดเล็ก) ที่ถูกย่อยจากตัวอย่างของผู้ป่วยโควิด 19 เียบพลันเปรียบเทียบกับพลาสมาที่ถูกย่อยจากตัวอย่างของกลุ่ม Control

โปรตีนเหล่านี้มีอยู่ในตัวอย่างทั้ง 2 ประเภท และค่าการเปลี่ยนแปลงเป็นเท่าตัว (fold change value) มากกว่า 1 หมายถึงเป็นโปรตีนที่มีความชุกมากกว่าภายในสิ่งตกค้างสะสมที่เป็นเม็ดเล็ก 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/ผลตามหลังระยะเยียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC) เปรียบเทียบกับพลาสมาที่ถูกย่อยจากตัวอย่างของกลุ่ม Control

โปรตีนเหล่านี้มีอยู่ในตัวอย่างทั้ง 2 ประเภท และค่าการเปลี่ยนแปลงเป็นเท่าตัว (fold change value) มากกว่า 1 หมายถึงเป็นโปรตีนที่มีความชุกมากกว่าภายในสิ่งตกค้างสะสมที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ (pellet deposits) ที่ถูกย่อยแล้วจากตัวอย่างของผู้ที่มีภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเยียบพลันของโควิด 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)

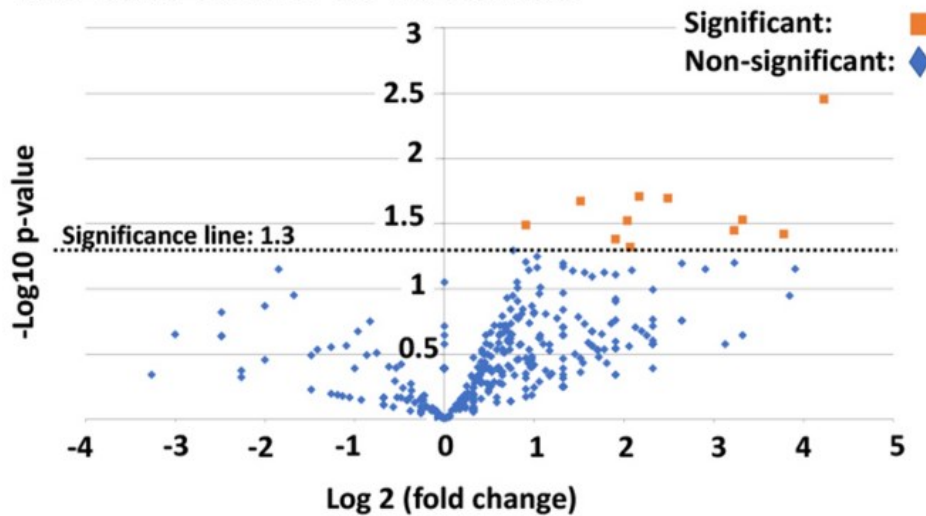
โปรตีนเหล่านี้มีอยู่ในตัวอย่างทั้ง 2 ประเภท และค่าการเปลี่ยนแปลงเป็นเท่าตัว (**fold change value**) มากกว่า 1 หมายถึงเป็นโปรตีนที่มีความชุก

มากกว่าภายในพลาสมาที่ถูกย่อยจากตัวอย่างของผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2

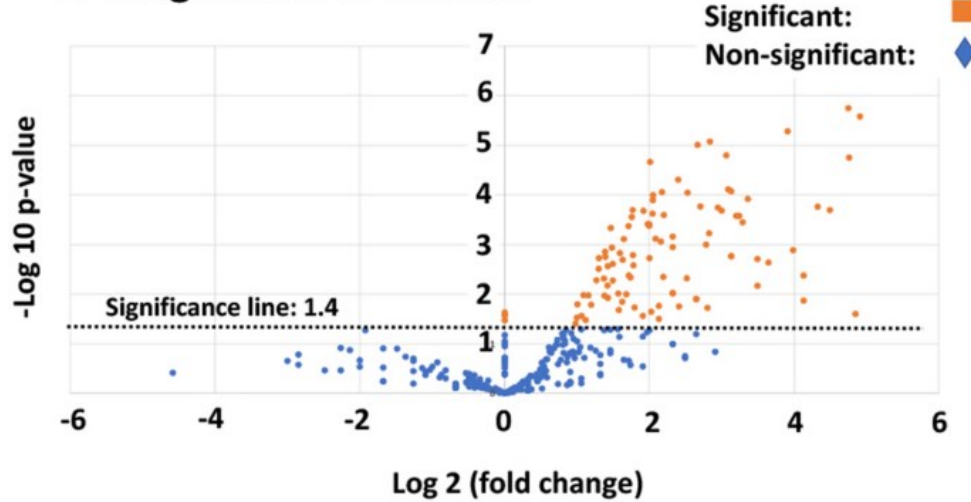
Complement C1r subcomponent-like protein	1.5	0.04
SAA1	2.5	0.03

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

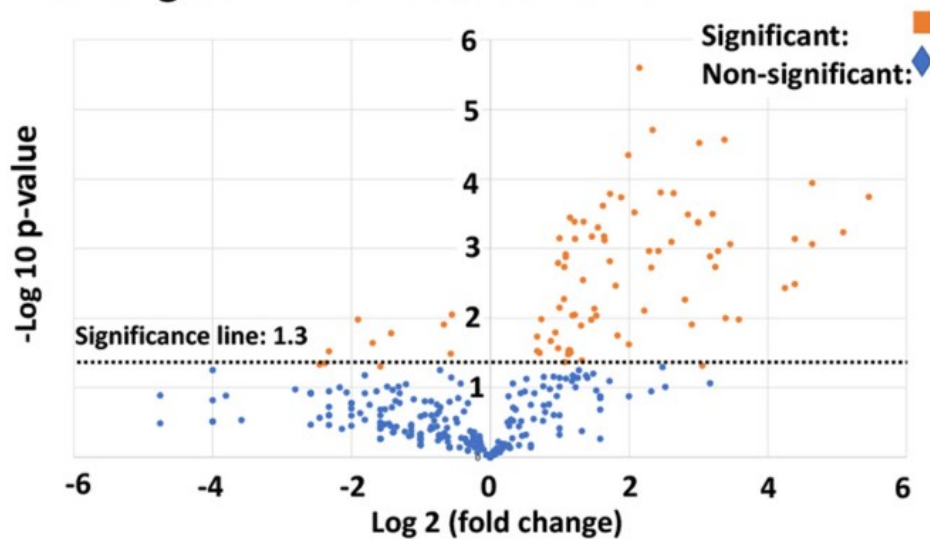
### A: Acute COVID-19 vs Control



### B: Long COVID vs Control



### C: Long COVID vs Acute Covid-19





**Volcano plots** ของการกระจายของโปรตีนระหว่างการเปรียบเทียบตัวอย่างเชิงคู่ (ระหว่างกลุ่มcontrols 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  $\alpha$ -fibrinogen chain มีการเพิ่มขึ้นใน supernatant ของกลุ่มผู้ป่วยโควิด 19 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม controls และกลุ่มผู้ที่มีภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (Long COVID/PASC) ระดับของ  $\gamma$  chains และ  $\beta$  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  $\alpha$  fibrinogen และ  $\beta$  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 และระหว่างตัวอย่าง จากกลุ่มผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 กับตัวอย่างจากกลุ่มผู้ที่มีภาวะอาการหลงเหลือหลังจากติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาว/ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19 (**Long COVID/PASC**)

**Platelet poor plasma** ของกลุ่มผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 และของกลุ่ม **controls** ได้รับการย่อยอย่างเต็มที่หลังจาก การทำ **trypsinization** ขั้นแรก โปรตีนโอมิกส์ของ **supernatants** แสดงให้เห็นถึงการเพิ่มสูงขึ้นเป็นเท่าตัวสำหรับ โปรตีนชนิด **Complement C1r subcomponent-like protein** และ **SAA1** ในตัวอย่างที่ย่อยแล้วที่มาจาก กลุ่มผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 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** และการจับยึดของมันกับเป้าหมายที่เฉพาะเจาะจง นำไปสู่ **formation** ของ **active C1** ซึ่งในทางกลับกันจะกระตุ้น **classical complement pathway** ใน ลักษณะที่อาศัยหรือไม่อาศัย **immunoglobulin** [50]

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

## การอภิปราย (Discussion)

ปัจจุบันนี้เป็นที่ทราบกันดีว่าการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ของหลอดเลือดและกลุ่มอาการของภาวะที่เซลล์เม็ดเลือดแดงถูกทำลาย โดยลิ่มเลือดในหลอดเลือดขนาดเล็ก (**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] ในบางกรณีผู้ป่วยมีการแสดงออก ของการเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของผลิตภัณฑ์จากการสลาย **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) แต่ถูกกินหรือท่วมนั่นอยู่ในกระบวนการ [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 เพิ่มมากขึ้น [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]

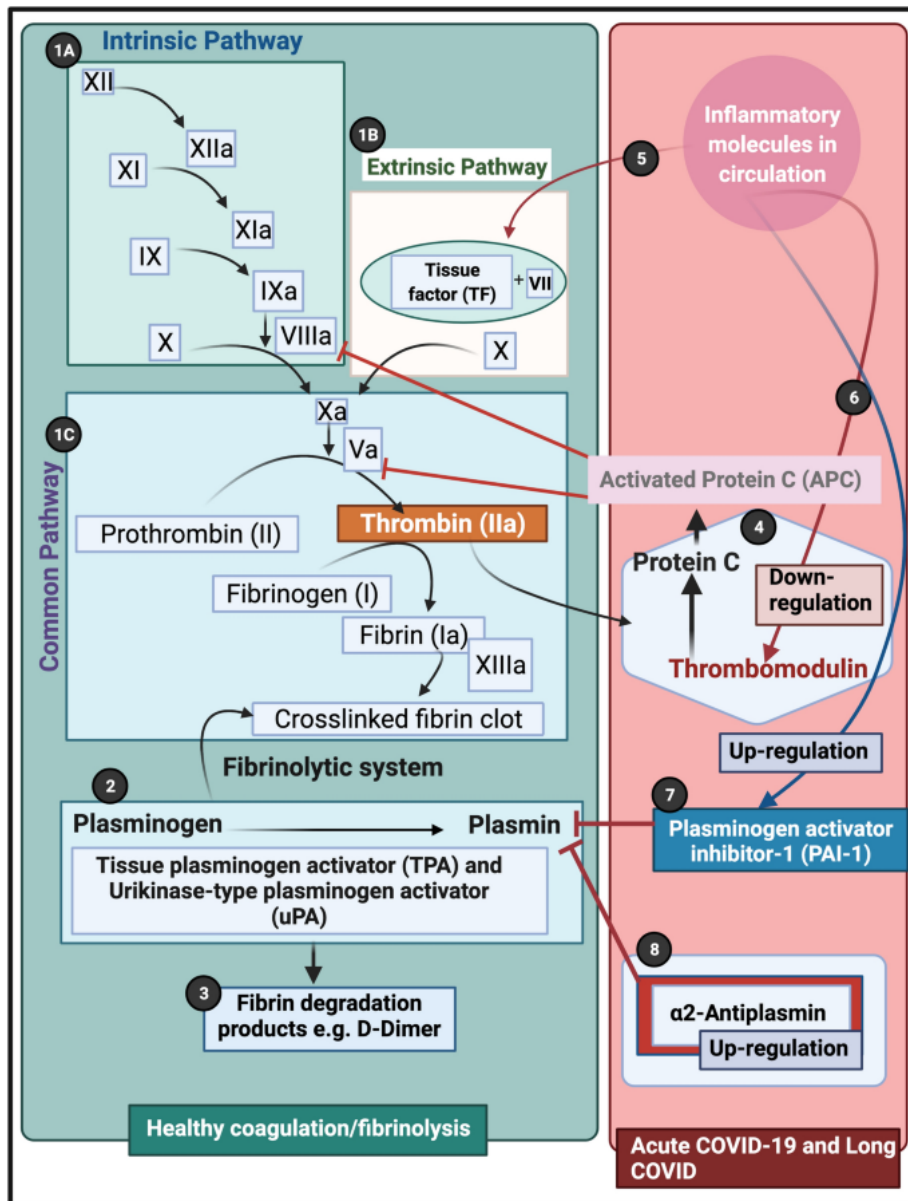
โปรตีน **SAA4** (มีการพบเป็น **apolipoprotein** ของ **HDL** ด้วย) มีการสังเคราะห์อย่างสม่ำเสมอ (**synthesized constitutively**) ในตับ [46] ในการศึกษาวิจัยนี้เรารายงานว่า **SAA4** มีการเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในการวิเคราะห์ทางโปรตีนอิมมูโนสของสิ่งตกค้างสะสมที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ (**pellet deposits**) ที่ผ่านการย่อยด้วย **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 **ls** [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  $\alpha$ 2AP อีกด้วย [64] ระดับที่สูงของ  $\alpha$ 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  $\alpha$ 2AP ยังบำรุงรักษาภาวะสมดุลที่ละเอียดอ่อนในสภาวะทางสรีรวิทยาปกติอีกด้วย [68]  $\alpha$ 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  $\alpha$ 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] แสดงให้เห็นถึงกระบวนการในผู้ที่มีสุขภาพดีและในระหว่างเกิดพยาธิสภาพ. (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. ระบบการสลายลิ่มเลือดในผู้ที่มีสุขภาพดีเป็นตัวควบคุม (regulates) วิธีการแข็งตัวของเลือด (coagulation pathway) และช่วยในการสลายตัวที่ประสบความสำเร็จ (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)  $\alpha$ 2-antiplasmin ( $\alpha$ 2AP) ยับยั้งขัดขวาง plasmin และในที่สุดก็จะป้องกันมิให้การละลายลิ่มเลือดที่เพียงพอ (sufficient fibrinolysis) เกิดขึ้นได้

## สรุปผล (Conclusion)

ภาวะที่เกิดลิ่มเลือดได้ง่ายกว่าปกติ (hypercoagulability) เป็นภาวะที่ทราบกันดีว่าเกิดร่วมกันกับโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (T2DM) [49, 73] นอกจากนี้ยังเป็นที่ยอมรับเพิ่มมากขึ้นอีกด้วยว่าภาวะที่เกิดลิ่มเลือดได้ง่ายกว่าปกตินี้เป็นภาวะแทรกซ้อนจากการติดเชื้อโควิด 19 และการต้านการแข็งตัวของเลือดได้กลายเป็นศูนย์กลางในการจัดการกับโควิด 19 ที่ครอบคลุมรอบด้าน [65, 74] ดังนั้นการก่อตัวขึ้นของลิ่มเลือดแข็งตัวขนาดเล็กที่มีความผิดปกติอย่างมีนัยสำคัญ (อะไมลอยด์) ซึ่งยับยั้งขัดขวางการละลายลิ่มเลือด (fibrinolysis) ระดับ  $\alpha$ 2AP ที่เพิ่มสูงขึ้น และการขึ้น ๆ ลง ๆ (surge) ของโมเลกุลต่าง ๆ ที่ทำให้เกิดการอักเสบในระยะเฉียบพลัน (acute phase inflammatory molecules) จึงอาจจะเป็นตัวการหลัก (central contributors) ของพยาธิสรีรวิทยา (pathophysiology) ของการแข็งตัวของเลือด/การละลายลิ่มเลือดที่ซับซ้อนหลายอย่างทั้งในการติดเชื้อโควิด 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) เราขอรับว่าตอนนี้สิ่งที่พบจากเทคนิคโปรตีโอมิกส์บางอย่างควรได้รับการยืนยันโดยการใช้อุปกรณ์ตัวอย่างที่มีขนาดใหญ่ขึ้น 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) ระบบการละลายลิ่มเลือดที่ผิดปกติ

(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)