

ฉบับแปลไทย (Thai Translation)

Persistence of SARS CoV-2 S1 Protein in CD16+ Monocytes in Post-Acute Sequelae of COVID-19 (PASC) Up to 15 Months Post-Infection

<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.06.25.449905v3>

การคงอยู่ของโปรตีน SARS CoV-2 S1 ในโนโนไซด์ CD16+ ในผลตามหลังระยะเฉียบพลันของการติดเชื้อ SARS-CoV-2 (PASC) ไม่เกิน 15 เดือนหลังการติดเชื้อ

บทคัดย่อ

การรักษาเชื้อโควิด 19 ในระยะเฉียบพลันมีความท้าทายก็จริง หากแต่ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของการติดเชื้อ SARS-CoV-2 (PASC) เองก็อาจส่งผลกระทบกับผู้ติดเชื้อกว่า 30%

ต้นเหตุของอาการที่เกิดขึ้นกับภูมิคุ้มกัน หลังติดเชื้อครั้งแรก 3 เดือนหรือมากกว่า ยังคงยากที่จะอธิบาย

รายงานฉบับนี้ได้มีการสำรวจการมีอยู่ของโปรตีน SARS-CoV-2 S1 ในคน 46 คน โดยทำการวิเคราะห์ T-cell B-cell และโนโนไซด์กลุ่มย่อย ในกลุ่มผู้ป่วยโควิด 19 ร้ายแรง และผู้ป่วยที่ไม่ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของการติดเชื้อ (PASC)

ระดับของโนโนไซด์ ทั้งประเภท immediate (CD14+ และ CD16+) และ non-classical (CD14Lo และ CD16+) นั้นเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ในผู้ป่วยประเภท PASC ที่มีอาการหลังติดเชื้อเฉียบพลัน ไม่เกิน 15 เดือน เมื่อเทียบกับกลุ่มตัวอย่างที่สุขภาพดี ($P=0.002$ และ $P=0.01$ ตามลำดับ)

ตัวเลขที่มีนัยสำคัญของโนโนไซด์ประเภท non-classical ที่มีโปรตีน SARS-CoV-2 S1 ในกลุ่มผู้ติดเชื้อร้ายแรง ($P=0.004$) และผู้ป่วยประเภท PASC ที่มีอาการหลังติดเชื้อเฉียบพลันไม่เกิน 15 เดือน ($P=0.02$)

โนโนไซด์ประเภท non-classical ได้ถูกตรวจแยกจากกลุ่มผู้ป่วย PASC โดยใช้วิธีการ Flow Cytometric โดยโปรตีน SARS-CoV-2 S1 ได้รับการยืนยันผ่านเทคนิคในการวิเคราะห์ผลการวัดสัดส่วนมวลต่อประจุ

เซลล์ของผู้ป่วยโควิด 19 ร้ายแรง 4 ใน 11 คน และ 1 ใน 26 เซลล์ของผู้ป่วยแบบ PASC ยังคงมี SARS-CoV-2 RNA

โนโนไซด์แบบ non-classical ยังสามารถทำให้เกิดอาการอักเสบทั่วทั้งร่างกาย เพื่อตอบสนองต่อ fractalkine/CS3CL1 และ RANTES/CCR5

บทนำ

ผลตามหลังระยะเฉียบพลันของการติดเชื้อ SARS-CoV-2 (PASC) ส่งผลให้สมรรถภาพทางร่างกายลดลง และทำให้เกิดอาการอ่อนเพลียที่เกิดขึ้นในกลุ่มผู้ติดเชื้อ SARS-CoV-2 กว่า 10-30% โดยเมื่อไม่นานมานี้ ได้มีการรายงานถึงอาการทางระบบประสาท ในผู้ติดเชื้อ 30%¹

ตัวเลข และระดับความร้ายแรงของอาการนั้นมีความหลากหลายสูง ทั้งนี้ ในรายงานบางฉบับนำเสนออาการที่แตกต่างกันกว่า 200 ประเภท²

ขณะนี้ ยังไม่มีการระบุชัดเจนถึงต้นเหตุของการเกิด PASC แม้ว่าข้อมูลบางส่วนจะชี้ไปที่ รังໂโรคระดับเนื้อเยื่อ ของ SARS-CoV-2 ที่ยังคงอยู่ ว่าอาจเป็นกลไกที่ทำให้เกิดอาการเหล่านี้ขึ้นได^{3,4}

เรวๆ นี้ ทางกลุ่มผู้วิจัยได้มีการรายงานกระบวนการ Machine Learning ที่ใช้ระบุลักษณะเฉพาะของเซลล์ภูมิคุ้มกัน ในกลุ่มผู้ที่มีอาการ PASC⁵

ในรายงานฉบับเดียวกันนั้น ทางกลุ่มผู้วิจัยยังได้ระบุลักษณะเฉพาะของอาการผิดปกติอยู่ ในเซลล์ภูมิคุ้มกัน ที่มาพร้อมกับ ไข้โต้ไดโน/คีโน/โต้ไดโน เฉพาะ

ลักษณะโดดเด่นของอาการผิดปกติในเซลล์ภูมิคุ้มกัน คือการขยายตัวของเซลล์โนโนไซต์กลุ่มย่อย

โนโนไซต์กลุ่มย่อย ได้ถูกแบ่งออกเป็น 3 ประเภท ตามแบบฟีโนไทป์ และการทำงาน ที่แตกต่างกัน

- โนโนไซต์แบบ classical ที่มีการแสดงฟีโนไทป์แบบ CD14++ และ CD16-
- โนโนไซต์แบบ immediate ที่มีการแสดงฟีโนไทป์แบบ CD14+ และ CD16+
- โนโนไซต์แบบ non-classical ที่มีการแสดง CD 14lo และ CD16+⁶⁻⁷

มากไปกว่านั้น โนโนไซต์กลุ่มย่อยเหล่านี้ยังมีการแสดงเครื่องหมายบนผิวเซลล์ที่แตกต่างกันมาก อาย่างที่ได้กล่าวไปก่อนหน้านี้

โนโนไซต์แบบ classical แสดงตัวรับ ACE-2 Receptor และตัวรับ Putative Receptor ในระดับสูง กับ SARS-CoV-2⁸

โนโนไซต์แบบ intermediate และ non-classical แสดงตัวรับ ACE-2 Receptor ที่น้อยมาก ซึ่งคล้ายกับโนโนไซต์แบบ classical ที่แสดงระดับของตัวรับ Chemokine Receptors CX3R1 และ CCR5 ที่ต่ำ

โนโนไซต์แบบ intermediate แสดง CCR5 ในระดับสูง ในขณะที่โนโนไซต์แบบ non-classical แสดง CX3R1 ในระดับสูง

ในรายงานฉบับนี้ ทางกลุ่มผู้วิจัยได้รายงานความแตกต่างด้านจำนวนศาสตร์ เกี่ยวกับจำนวนของโนโนไซต์กลุ่มย่อย ในกลุ่มผู้ป่วยร้ายแรง และ PASC รวมถึงการมีอยู่ของโปรตีน SARS-CoV-2 ในโนโนไซต์แบบ CD14lo และ CD16+ ในผู้ป่วย PASC ที่มีระยะเวลาติดเชื้อ SARS-CoV-2 ไม่เกิน 16 เดือน

ผลลัพธ์

คล้ายกับอาการอักเสบ หรือติดเชื้ออื่นๆ เช่น ภาวะพิษเหตุติดเชื้อ โรคแพ้ภูมิตัวเอง และโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์⁹ ทางกลุ่มผู้วิจัยพบการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.002$) ของโนโนไซต์ประเภท immediate ทั้ง CD14+ และ CD16+ ในกลุ่มผู้ป่วย PASC เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มตัวอย่างควบคุมที่มีสุขภาพดี

นอกจากนี้ โนโนไซต์ประเภท non-classical ทั้ง CD14lo และ CD16+ เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มผู้ป่วย PASC ($P=0.01$)

ซึ่งโนโนไซต์ทั้งประเภท intermediate และ non-classical ไม่มีการเพิ่มขึ้นในกลุ่มผู้ป่วยโควิด 19 รายแรก (ภาพประกอบ 1)

เนื่องจากในรายงานทั้งจากกลุ่มผู้วิจัยเอง และจากกลุ่มนี้ พบว่าโนโนไซต์ส่วนย่อยสามารถติดเชื้อ HIV เชื้อ HCV เชื้อไวรัสซิกา และไข้เลือดออกได้¹⁰⁻¹² เราได้ทำการคัดกรองเซลล์ Peripheral Blood Mononuclear (PBMCs) จากกลุ่มผู้ป่วย PASC รวมถึงกลุ่มผู้ติดเชื้อโควิด 19 เฉียบพลันร้ายแรง เพื่อหา SARS-CoV-2 RNA (ตารางที่ 1) โดยมีกลุ่มหลังเป็นกลุ่มควบคุม

จากการใช้เทคนิค quantitative digital droplet PCR (ddPCR) ที่มีความละเอียดอ่อนสูง ทางกลุ่มผู้วิจัยพบว่า 36% (4 ใน 11) ในเซลล์ PBMC ของของผู้ป่วยโควิด 19 รายแรกมี SARS-CoV-2 RNA ซึ่งสามารถเปรียบเทียบได้กับ 4% (1 ใน 26) ในเซลล์ PBMC ของกลุ่มผู้ป่วย PASC โดยผู้ป่วย PASC คนเดียวที่มีผลตรวจเป็นบวก มีระยะเวลาหลังติดเชื้อ 15 เดือน

เพื่อที่จะค้นหาต้นเหตุที่ชัดเจน ที่ทำให้เกิดผลการตรวจที่เป็นบวก เมื่อใช้เทคนิค ddPCR ทางกลุ่มผู้วิจัยได้ใช้เทคนิค Flow Cytometry ที่มีพารามิเตอร์สูง กับแอนติบอดี้ B cell T-cell และโนโนไซต์กลุ่มย่อย นอกเหนือจากการย้อมสีเซลล์ ด้วยแอนติบอดี้ เพื่อค้นหาโปรตีน SARS-CoV-2

ดังที่แสดงในภาพประกอบที่ 2 ทางกลุ่มผู้วิจัยได้ค้นพบว่า 73% ของผู้ป่วย PASC (19 ใน 26 คน) และ 91% ของผู้ป่วยโควิด 19 รายแรก (10 ใน 11) มีเซลล์กลุ่มย่อยของ SARS-CoV-2 ในโนโนไซต์กลุ่มย่อย CD14lo และ CD16+

ดังที่แสดงในภาพประกอบที่ 3 จำนวนของเซลล์ที่มี SARS-CoV-2 S1 สูงอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งในกลุ่มผู้ป่วยร้ายแรง ($P=0.004$) และในกลุ่มผู้ป่วย PASC ($P=0.02$)

ส่วนโนโนไซต์แบบ classical และ intermediate ไม่ได้มีการแสดงโปรตีน SARS-CoV-2 S1

เพื่อที่จะยืนยันการมีอยู่ของโปรตีน SARS-CoV-2 S1 ทางทีมผู้วิจัยได้คัดแยกโนโนไซต์ CD14lo และ CD16+ นอกจากนี้ ยังได้ใช้วิธี Ultra High-Performance Liquid Chromatography (UHPLC)

หลังจากขั้นตอนการแยกโปรตีน สารที่ถูกคัดแยกถูกทำให้แห้งในภาวะสูญญากาศ และทำให้เป็นสารแขวนลอยอีกครั้งใน ddH₂O และทำให้บริสุทธิ์ ด้วยการกำจัดแอนติบอดี SARS-CoV-2 S1 อะไร์กิตามที่ไม่มีการเชื่อมโยงข้าม หรือการ cross-link รวมถึงกำจัดสารชำรุดล้าง จากสารละลายบัฟเฟอร์จากการคัดแยกโปรตีน

สาร UHPLC ที่ถูกคัดแยก จะถูกทำให้แห้งในภาวะสูญญากาศ ทำให้เป็นสารแขวนลอยอีกครั้ง ใน HEPES ขนาด 100 mM (pH 8.0 สารอะซีโตในไตรล์ 20%) และผ่านกระบวนการรีดักชัน และแอลกิเลชัน ของชีสเตอีน

หลังจากนั้น กลุ่มตัวอย่างจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซ์โปรตีนเอนโดเพปติดีเดส AspN และ LysC ในอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

เปปไทด์ที่ถูกย่อยแล้วจะถูกนำไปปริเคราะห์ด้วย Agilent 6550 IonFunnel QTOF และ 1290 UHPLC โดยเปรียบเทียบกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วย กับสารที่มีลักษณะเหมือนกัน ซึ่งได้มาจากการส่วนหนึ่งของเชื้อ SARS-CoV-2 S1 ที่มีจำนวนน้อย

ส่วนหนึ่งของเปปไทด์ S1 จากกลุ่มตัวอย่าง จะถูกนำมาหาความเชื่อมโยงกับฐานข้อมูลเปปไทด์ ที่ได้มาจากการย่อยจากส่วนหนึ่งของเปปไทด์ S1 ที่มีจำนวนน้อย

การระบุเปปไทด์นั้น รวมถึงการระบุลักษณะที่เหมือนกันในด้านมวล ลักษณะการกระจายของ ไอโซโทป ประจำของเปปไทด์ และ UHPLC Retention Time (tR)

ดังที่แสดงในภาพประกอบที่ 4 Retention Time (tR) ของตัวอย่างเปปไทด์ NLREFVKFK ของ ส่วนหนึ่งของ S1 ที่ผ่านการย่อยแล้ว และตัวอย่าง LH1-6 นั้นตรงกัน

นอกจากนี้ Mass Spectra ในภาพประกอบที่ 4 นั้นแสดงมวล ลักษณะการกระจายของ ไอโซโทป และประจำของเปปไทด์ ของตัวอย่างเปปไทด์ NLREFVFK ในตัวอย่าง LH1 นั้นตรง กับส่วนหนึ่งของ S1 (ไม่พบร่องรอยการสังเกต LH 2-6)

ด้วยวิธีการวัดนี้ ทำให้สามารถระบุส่วนย่อยเปปไทด์ S1 ในกลุ่มตัวอย่าง LH1-LH6 ได้กว่า 44% (สามารถดูได้ในตารางเสริมที่ 1) ซึ่งเป็นหลักฐานที่เข้ามาเสริมการทดลองด้วยวิธี Flow Cytometry ที่แสดงการมีอยู่ของโปรตีนย่อย S1 ในเซลล์ของผู้ป่วย

การอภิปรายผล

ในรายงานนี้ ทางกลุ่มผู้วิจัยได้พับการเมื่อยุ่งของโพรตีน SARS-CoV-2 ในโนโนไซต์ CD14lo และ CD16+ ถึง 15 เดือน ในผู้ป่วยบางคน และหารือถึงนัยของการเกิดโรคในกลุ่มผู้ป่วย PASC และผู้ป่วยโควิด 19 ร้ายแรง

โนโนไซต์ทั้ง 3 ประเภท ไม่ว่าจะเป็นแบบ classical แบบ intermediate และแบบ non-classical แสดงโนเมเลกุลบนพื้นผิวเซลล์ที่แตกต่างกัน และมีหน้าที่ที่ต่างกันในระบบภูมิคุ้มกัน

ตามปกติแล้ว โนโนไซต์แบบ classical จะแสดงการเกิดโรค ด้วยการผลิต ROS ในระดับที่สูงขึ้น และหลังโนเมเลกุลที่ชักนำการอักเสบ อย่างเช่น IL-6 IL-8 CCL2 CCL3 และ CCL5

โนโนไซต์ประเภท immediate จะมีการแสดงระดับของ CCR5 สูงที่สุด และมีลักษณะโดดเด่น จากรความสามารถในการแสดงแอนติเจน รวมถึงการหลัง TNF- α IL-1 β IL-6 และ CCL3 หากมี การกระตุ้น TLR

โนโนไซต์ประเภท non-classical แสดงระดับของ CX3CR1 ที่สูง และเกี่ยวข้องกับกระบวนการฟากไซโทสิส ทั้งแบบคอมพลีเมนต์ และแบบ Fc gamma-mediated รวมถึงการตอบสนองต่อสารต้านไวรัส⁶

หลังจากการเจริญเติบโต โนโนไซต์ในมนุษย์จะถูกหลังออกมาระบุจากไขกระดูก เป็นโนโนไซต์แบบ classical ที่เข้าไปในระบบหมุนเวียนเลือด

ในปัจจุบัน มีหลักฐานสนับสนุนแน่ชัดว่า โนโนไซต์ประเภท intermediate และ non-classical นั้นเกิดมาจากการโนโนไซต์แบบ classical¹³ ซึ่งได้รับการสนับสนุนด้วยการวิเคราะห์แบบทرانสคริปโตมิกส์ ที่แสดงว่าโนโนไซต์แบบ CD16+ นั้นมีพีโนไทป์ที่เจริญเติบโตมากกว่า¹⁴

ในมนุษย์ โนโนไซต์ที่หมุนเวียนอยู่ในร่างกาย 85% เป็นประเภท classical ในขณะที่อีก 15% ประกอบไปด้วยประเภท intermediate และ non-classical

โนโนไซต์ประเภท classical มีอายุการหมุนเวียนอยู่ที่ 1 วัน ก่อนที่จะถูกถ่ายโอนไปที่เนื้อเยื่อ slavery และแปรสภาพไปเป็นโนโนไซต์ประเภท intermediate และแปรเป็นประเภท non-classical ในที่สุด^{6,13}

ในช่วงการพิจารณาพยาธิสภาพของโรคที่มีอาการติดเชื้อ หรืออักเสบ สัดส่วนของโนโนไซต์ส่วนย่อยแปรเปลี่ยนไปตามการทำงานของส่วนย่อยแต่ละส่วน^{6,13,15}

ผลลัพธ์คร่าวก่อนจากการทางผู้วิจัยแสดงให้เห็นว่า ในช่วงเริ่มต้นของโรค กลุ่ม PASC มีจำนวนโนโโมโนไซต์แบบ classical ลดลง และจำนวนโนโโมโนไซต์แบบ intermediate มากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี⁵

ในรายงานนี้ เราได้มีการนำเสนอจำนวนโนโโมโนไซต์ประเภท non-classical ที่เพิ่มขึ้นในกลุ่ม PASC ในระยะเวลา 6-15 เดือนหลังการติด เมื่อวัดที่วันแรก สำหรับกลุ่มติดเชื้อร้ายแรง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแม้กระบวนการแปรสภาพโนโโมโนไซต์ จาก classical ไป intermediate และไป non-classical จะเกิดขึ้นในกลุ่มผู้ป่วยทั้งสองกลุ่ม การเคลื่อนไหวมีความแตกต่างกัน

ความเกี่ยวข้องทางคลินิก ในการถูกกระตุนของโนโโมโนไซต์ ในกลุ่มผู้ป่วยโควิด 19 และนัยยะของเซลล์เหล่านี้ ในการเป็นโปรตีนที่ติดเชื้อไวรัส ในผู้ป่วย PASC ได้รับการสนับสนุนโดยข้อมูล ที่แสดงการมีอยู่ของโปรตีน S1 ในโนโโมโนไซต์ประเภท non-classical

อนุภาค และ/หรือ โปรตีนที่ติดเชื้อ สามารถแทรกเข้าไปในโนโโมโนไซต์กลุ่มย่อยได้ด้วยวิธีที่แตกต่าง และถูกกำหนดไม่เหมือนกันในผู้ป่วยโควิด 19 ร้ายแรง และผู้ป่วย PASC

โนโโมโนไซต์ประเภท classical โดยส่วนใหญ่นั้นเป็นฟากไไซต์ และแสดงระดับตัวรับ ACE-2 Receptor⁸ ที่สูง

เพราะฉะนั้น พวkmannสามารถถักลืนกินอนุภาคที่ติดเชื้อ และให้เซลล์ที่ติดเชื้อนั้นตายอย่างเป็นระบบ หรือพวkmannอาจเป็นเป้าหมายสำคัญของการติดเชื้อ SARS-CoV-2 ได้

หากเรามองถึงอายุขัยที่สั้น โปรตีนติดเชื้อที่อยู่ในโนโโมโนไซต์แบบ classical สามารถที่จะเปลี่ยนไปเป็นโนโโมโนไซต์แบบ intermediate หรือ non-classical ได้

อ้างอิงจากผลการทดลองของกลุ่มผู้วิจัย กระบวนการนี้เกิดในกลุ่มผู้ป่วยร้ายแรงได้รวดเร็วกว่า กลุ่ม PASC

ความจริงแล้ว ในระยะแรกของการเกิดโรค กลุ่มผู้ป่วยร้ายแรงแสดงจำนวนโนโโมโนไซต์แบบ non-classical ที่เพิ่มขึ้น ในขณะที่ในกลุ่ม PASC มีการเพิ่มขึ้นของโนโโมโนไซต์ทั้งในแบบ intermediate และ non-classical

นอกจากนี้ โนโโมโนไซต์แบบ CD14+CD16+ แสดงตัวรับ ACE-2 Receptors ในระดับปานกลาง และสามารถเป็นเป้าหมายการแพร่เชื้อของ SARS-CoV-2 ได้ เนื่องจาก ได้มีการพิสูจน์แล้วว่า โนโโมโนไซต์สองตัวนี้เป็นเป้าหมายการแพร่เชื้อของ HIV -1 และ HCV¹¹

โนโโมโนไซต์แบบ กอน-classical นั้นได้รับการรายงานว่า มีหน้าที่ดูแลหลอดเลือด โดยการช่วยให้ผนังบุหlodดเลือดสมบูรณ์¹⁶ ตั้งนั้นเซลล์ CD14lo CD16+ ที่มีอยู่แล้ว สามารถถักลืนเซลล์ผนังบุหlodดเลือดติดเชื้อที่ตายแล้ว เพิ่มสัดส่วนของโนโโมโนไซต์แบบ non-classical ที่มีโปรตีน S1

กลไกนี้มีโอกาสเกิดขึ้นในกลุ่ม PASC ที่โปรตีน S1 ถูกตรวจพบ 12-15 เดือน หลังจากการติดเชื้อ ได้มากกว่ากลุ่มผู้ป่วยร้ายแรง

นอกจากนี้ โนโนไซต์แบบ non-classical นั้นยังมีความเชื่อมโยงกับกระบวนการฟานโกไซโธสิส แบบ FcR-mediated¹⁷⁻¹⁸ ซึ่งอาจมีความเกี่ยวข้องกับการกลืนอนุภาคน้ำที่ติดเชื้อ หลังจากการผลิต แอนติบอดี ในช่วงระยะหลังของการติดเชื้อในกลุ่ม PASC

รายงานก่อนหน้านี้ได้มีการระบุจำนวนที่ลดลงของโนโนไซต์ประเภท classical ในขณะที่จำนวนของประเภท intermediate และ non-classical เพิ่มขึ้น ในกลุ่มผู้ป่วยโควิด 19

ดังนั้น การมีอยู่ของโปรตีน S1 ในโนโนไซต์ประเภท non-classical ทั้งในกลุ่มผู้ป่วยร้ายแรง และ PASC อาจมีการเกี่ยวเนื่องกับคุณลักษณะทางคลินิก และผลลัพธ์ของกลุ่มเหล่านี้

ก่อนหน้านี้ ทางผู้วิจัยได้พบว่าผู้ป่วยโควิด 19 ร้ายแรง มี IL -6 IL -10 VEGF และ sCD40L⁵ ในระดับที่สูง

ข้อมูลที่ทางผู้วิจัยเก็บได้ มีความสอดคล้องกับการศึกษาอื่น ที่แสดงความเกี่ยวข้องระหว่างการผลิต IL -6 VEGF และ IL -10 ที่เพิ่มขึ้น กับความร้ายแรงของโรคในโนโนไซต์ประเภท non-classical²⁰⁻²²

ในกรณีของผู้ป่วย PASC การคงอยู่ในกระแสเลือดของโนโนไซต์ประเภท non-classical ที่ติดเชื้อ ในเวลาไม่เกิน 16 เดือนหลังจากติดเชื้อ พบร่วมกับสภาพบางอย่างที่จำเป็นในการคงไว้ของเซลล์ แม้จะไม่พิจารณากลไกการติดเชื้อของโปรตีนที่เป็นไปได้ ที่ได้กล่าวไปด้านบนแล้ว

ทั้งมนุษย์ และหนูทดลอง ได้มีการแสดงว่าโนโนไซต์ประเภท non-classical จำเป็นต้องมี fractalkine (CX3CL1) และ TNF อยู่ในกระบวนการตายของเซลล์อย่างเป็นระบบ และสนับสนุนการอยู่รอดของเซลล์

ข้อมูลก่อนหน้านี้ของผู้วิจัยแสดงระดับของ IFN-γ ที่สูงในผู้ป่วย PASC⁵ ซึ่งสามารถกระตุ้นการสร้าง TNF-α²³

นอกจากนี้ TNF-α และ IFN-γ กระตุ้นการสร้าง CX3CL1/Fractalkine โดยเซลล์บุผิวหลอดเลือด²⁴ ซึ่งจะทำให้เกิดสภาพที่ส่งผลต่อการอยู่รอดของโนโนไซต์ประเภท non-classical

อีกประเด็นสำคัญ คือความคงทนของเซลล์ที่ติด S1 ที่ยังอยู่ในกระแสเลือด โนโนไซต์ประเภท intermediate และระดับของ CCR5 ที่สูง และการร้าวซึมของเซลล์เหล่านี้ อาจเกิดขึ้นได้หากมีการตอบสนองต่อระดับการเดินทางของ CCL4

ทางผู้วิจัยได้แสดงว่า ผู้ป่วย PASC มีระดับ CCL4⁴ ต่ำ และมีการหมุนเวียนเซลล์น้อยในร่างกาย จนกระทั่งเซลล์เหล่านี้แปรสภาพกลายเป็นโนโนไซต์แบบ non-classical

นอกจากนี้ การผลิต CX3CL1/Fractalkine โดยบุผนังหลอดเลือด²³ ที่ถูกกระตุ้นโดย IFN-γ สามารถสร้าง gradient ให้เกิดขึ้นในช่องหลอดเลือด รักษาโนโนไซต์ประเภท non-classical ให้มี CX3CR1 ในระบบหมุนเวียน

โนโนไซต์แบบ non-classical มักถูกเรียกว่าเป็นเซลล์ต้านการอักเสบ²² แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อเรวๆ นี้ เพิ่งมีการรายงานว่า กลุ่มย่อยนี้เองก็สามารถรับฟีโนไทป์ ที่ขึ้นนำการอักเสบ ได้เช่นกัน²⁵

โนโนไทป์ประเภท non-classical รับจุดเด่นของลำดับเซลล์ ซึ่งส่งผลบวกต่อการอยู่รอดในระยะยาวของเซลล์เหล่านี้ ในระบบหมุนเวียน ดังที่ได้อธิบายไปแล้วด้านบน

นอกจากนี้ มันยังเป็นการกระตุ้นภาวะการอักเสบในโนโนไซต์แบบ non-classical ที่สามารถแสดงออกมาเป็น senescence-associated secretory phenotype (SASP) ที่มีลักษณะเด่น เป็นฐาน NF- κ B ที่มีระดับสูง และการสร้างไซโตคิน ที่ขึ้นนำการอักเสบ เช่น IL-1 α TNF- α และ IL-8²⁵

จุดเด่นของ PASC คือความหลายหลายของอาการ ที่เกิดขึ้นในเนื้อเยื่อ และอวัยวะที่มีความหลากราย มีโอกาสว่าอาการเหล่านี้จะมีความเกี่ยวข้องกับฟีโนไทป์ที่ขึ้นนำการอักเสบ ในโนโนไซต์แบบ non-classical ที่เริ่มอายุมากขึ้น

โนโนไซต์แบบ CD141lo CD16+ และโปรตีน S1+ สามารถถูกนำเข้าไปในโครงสร้างทางร่างกาย โดยมีการแสดง fractalkine และช่วยรักษาการบาดเจ็บของหลอดเลือด และเนื้อเยื่อ ระหว่างที่ในสภาพทางพยาธิวิทยา มีโนโนไซต์ส่วนย่อยมีการขยายตัว อよ่างที่ได้แสดงให้เห็นไปแล้วในโนโนไซต์ประเภท non-classical ที่ไม่มีโปรตีน S1

ก่อนหน้านี้ โนโนไซต์แบบ CD16+ ได้ถูกแสดงว่ามีการเคลื่อนตัวไปที่สมองของผู้ป่วย AIDS และแสดง CX3CL1 (fractalkine) และ SDF-1²⁶ ในระดับที่สูง นอกเหนือนั้น ยังมีการตอบสนองเชิงบวก ต่อความเสียหายของ Blood-Brain Barrier (BBB) และระบบประสาท ในอาการสมองเสื่อม อันถูกส่งผลกระทบจาก HIV ผ่านการหลังสารไซโตคิน ที่ขึ้นนำการอักเสบ และสารที่เป็นพิษต่อระบบประสาท

นี่เป็นลำดับที่ปกติในกลุ่มผู้ป่วย PASC และข้อมูลเหล่านี้สามารถแสดงกลไกเบื้องหลังอาการเหล่านี้

ความนำสูนใจ คือ ได้มีการศึกษาไม่น้อยที่กล่าวถึงการเคลื่อนตัวที่เพิ่มขึ้นของโนโนไซต์ CD141o CD16+ หากมีการออกกำลังกาย²⁷

ข้อมูลเหล่านี้สนับสนุนรายงานที่พบว่าอาการของผู้ป่วย PASC แย่ลง หลังจากที่กลับไปออกกำลังกายในแบบเดิมที่ทำก่อนติดเชื้อ

เพื่อเป็นการสรุป กลไกของ PASC ที่ได้อธิบายไปแล้ว เสนอว่าโนโนไซต์ประเภท intermediate ยังคงอยู่ในกระแสเลือด เนื่องจากระดับ CCL4 ที่ต่ำ ทำให้โนโนไซต์ประเภทนี้คงอยู่นานขึ้น ซึ่งจะส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของโนโนไซต์ประเภท non-classical

ประโยชน์ของการใช้แอนติโกนิสต์ CCR5 ในการป้องกันการแพร่กระจายของโนโนไซต์แบบ intermediate และ non-classical ที่เกิดมาจากการดับของ CCL5/RANTES ที่เพิ่มขึ้นในกลุ่ม PASC⁵

นอกจากนี้ ข้อมูลของทีมผู้วิจัยยังเสนอว่า การยับยั้งการส่งทอด CX3CR1/fractalkine เป็นหนึ่งในวิธีการรักษาที่มีศักยภาพ ในการลดการคงอยู่ของโนมโน้ไซด์ประเกท non-classical ที่มีเชื้อ S1 และลดอาการอักเสบในหลอดเลือด อย่างที่ได้อธิบาย⁵ และนำเสนอไป

วิธีดำเนินการวิจัย

ผู้ป่วย

ได้มีการเก็บตัวอย่างโลหิตครบวันไว้ในหลอด EDTA ขนาด 10 มิลลิลิตร และหลอด PPT (Pasma Preparation Tube) ขนาด 10 มิลลิลิตร

กลุ่มตัวอย่างทั้งหมด 144 คน ที่เข้าร่วมการวิจัย แบ่งออกเป็นคนสุขภาพดี 29 คน ผู้ป่วยโควิด 19 ระดับน้อยถึงปานกลาง 26 คน ผู้ป่วยโควิด 19 ระดับร้ายแรง 25 คน และผู้ป่วยโควิด 19 เรื้อรัง (long hauler - LH) 64 คน

อาการป่วยแบบ Long Haulers อุญในภาพประกอบที่ 1

ผู้เข้าร่วมงานวิจัยได้ถูกแบ่งเป็นกลุ่มดังต่อไปนี้

กลุ่มอาการเบา

- 1) มีไข้ ไอ เจ็บคอ วิงเวียน ปวดหัว ปวดตัว คลื่นไส้ ท้องเสีย รับรู้สและกลืนน้อยลง
- 2) ไม่มีอาการของโรคปอดอักเสบจากการถ่ายภาพรังสีทรวงอก (CXR หรือ CT Chest)
- 3) ไม่มีอาการหายใจไม่อิ่ม

กลุ่มอาการปานกลาง

- 1) การตรวจสอบทางรังสีพบอาการปอดอักเสบ และอาการผิดปกติของระบบทางเดินหายใจ
- 2) ความเข้มข้นของออกซิเจนในเลือด (SpO_2) $\geq 94\%$ ในห้องที่มีความดันระดับน้ำทะเล

กลุ่มอาการร้ายแรง

- 1) ความเข้มข้นของออกซิเจนในเลือด (SpO_2) $\geq 94\%$ ในห้องที่มีความดันระดับน้ำทะเล
- 2) แรงดันออกซิเจนในหลอดเลือดแดง (PaO_2) หรือสัดส่วนของออกซิเจนจากการหายใจเข้า ต่ำกว่า 300 mmHg
- 3) มีสารแปลงปลอมซึ่มเข้าไปในปอดมากกว่า 50% ในระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง
- 4) $\text{HR} \geq 125 \text{ bpm}$
- 5) อัตราการหายใจ ≥ 30 ครั้งต่อนาที

กลุ่มวิกฤต

- 1) ระบบหายใจล้มเหลว จำเป็นต้องใช้เครื่องช่วยหายใจ มีการใช้ ECMO และใช้สายออกซิเจนอัตราการไหลสูง มีการทำ Non-Invasive Positive Pressure Ventilation (BiPAP และ CPAP)
- 2) มีภาวะข้อจากการติดเชื้อ มีความดันช่วงหัวใจบีบตัวมากกว่า 90mmHg หรือมีความดันช่วงหัวใจคลายตัวต่ำกว่า 60 mmHg หรือจำเป็นต้องใช้ยากระตุ้นการหดของกล้ามเนื้อหลอดเลือด (levophed vasopressin หรือ epinephrine)
- 3) มีอวัยวะหลายส่วนที่ทำงานผิดปกติ (หัวใจ ตับ ไต CNS หรือมีโรคลิ่มเลือดอุดตัน)

กลุ่มผลตามหลังระยะเฉียบพลันของโควิด 19

- 1) มีอาการเรื้อรังเกิน 3 สัปดาห์หลังจากเริ่มมีอาการครั้งแรก

กลุ่มอาการโควิด 19 เรื้อรัง

- 1) มีอาการเรื้อรังเกิน 12 สัปดาห์หลังจากเริ่มมีอาการครั้งแรก (ตาราง 1S)

ໂປຣໄຟລ໌ກົມືກຸມົມກັນທີມີຄາພາຮາມີເຕອວີສູງ/ເທດນີດ Flow Cytometry

ເຊື່ອລໍາມີເມືດເລືອດຂາວຂົນດິວເຄລີຍສເດີຢວນນັ້ນຖືກແຍກອອກຈາກຮະແສເລືອດ ໂດຍໃຊ້ Lymphoprep density gradient (STEMCELL Technologies ເມືອງແວນຄູເວອ່ຽ ປະເທດແກ່ນາດາ)

ຕັວອຍ່າງເຊື່ອລໍາ 200 ເຊື່ອລໍາ ຖຸກແໜ່ແໜ້ງມາໃນອາຫານເລື່ອງເຊື້ອ ທີ່ມີຊີ່ຮັນຂອງຕັວອ່ອນລຸກວ້າ 90% (HyClone ເມືອງໂລແກນ ຮັບຢູ່ທາໜີ) ແລະ ໄດ້ເມທທີລ ຂໍ້ລົກກໍາໃຊ້ດໍ 10% (Sigma-Aldrich ເມືອງເຊົ່າຫວັດລຸຍ່ສ ຮັບມືສໜີ) ແລະ ຈັດເກັບໃນອຸນຫກມີ -70°C

ເຊື່ອລໍາໄດ້ຖືກຍົມສີ ແລະ ວິເຄຣະໜີ ໂດຍໃຊ້ສ່ວນຜສມແອນຕົບອີ 17 ສີ (ຕາຮາງເສຣິມທີ 1) ລວມຄຶ້ງແອນຕົບອີ SARS-CoV-2 S1 ທີ່ຖືກຕິດຂໍ້ອ PE ໄວດ້ວຍ (ຕາຮາງເສຣິມທີ 1)

เทคนิค Digital Droplet PCR

เครื่องมือ QIAmp Viral Mini Kit (Qiagen, Catalog #52906) ได้ถูกใช้ในการสกัดกรรมนิวคลีอิก จากตัวอย่างพลาสม่า จำนวน 300-400 มิลลิลิตร ตามวิธีการใช้จากผู้ผลิต และได้แยก AVE buffer จำนวน 50 มิลลิลิตร (น้ำที่ปราศจาก RNase และมีสารโซเดียมเออไซด์ 0.04%)

กรดนิวคลีอิกที่ผ่านกระบวนการการทำให้เป็นสารบริสุทธิ์แล้ว ถูกนำไปทำการทดสอบกับเครื่องมือ Bio-Rad SARS-CoV-2 ddPCR Kit (Bio-Rad เมืองเชอร์คิวลีส รัฐแคลิฟอร์เนีย สหรัฐอเมริกา) ทันที

โดยการทดลองนี้ถูกออกแบบมาสำหรับตรวจจับยีน RNase P ของมนุษย์ ในกลุ่มควบคุม และตัวอย่างทางคลินิก

RNA ที่ได้ผ่านกระบวนการแยกสาร ทำให้บริสุทธิ์ จากกลุ่มตัวอย่างพลาสม่า (5.5 มิลลิลิตร) ถูกเดิมลงไปใน master mix ที่มี 2019nCoV triplex assay 1.1 มิลลิลิตร รีเวิร์สแทรนสคริปเทส 2.2 มิลลิลิตร ชูปเปอร์มิกซ์ 5.5 มิลลิลิตร ไดโทโอะทรีทอล 1.1 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 6.6 มิลลิลิตร

หลังจากนั้น สารผสมถูกนำไปผ่านกระบวนการแยกส่วนในละอองขนาดไม่เกิน 20,000 นาโนลิตร ที่อยู่ในรูปของอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน ใน QX200 Automated Droplet Generator (Bio-Rad เมืองเชอร์คิวลีส รัฐแคลิฟอร์เนีย สหรัฐอเมริกา)

ไมโครเพลทประเภท 96-well-real-time-digital droplet polymerase chain reaction (RT-ddPCR) ที่มีละออง ถูกปิดด้วยฟอยล์ โดยใช้แผ่นฟิล์มปิดเพลต และผ่านกระบวนการ thermocycle เพื่อเปลี่ยน RNA ให้กลายเป็น cDNA ก่อน จะใช้เทคนิค PCR ในการเพิ่มปริมาณ cDNA ใน C1000 Touch thermocycler (Bio-Rad เมืองเชอร์คิวลีส รัฐแคลิฟอร์เนีย สหรัฐอเมริกา)

หลังผ่านกระบวนการ PCR ไมโครเพลตถูกใส่เข้าไปใน QX200 Droplet Reader (Bio-Rad เมืองเชอร์คิวลีส รัฐแคลิฟอร์เนีย สหรัฐอเมริกา) และความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนต์ ของละอองแต่ละหยด ถูกวัดผ่านสองช่อง (FAM และ HEX)

ข้อมูลความเข้มของฟลูออเรสเซนต์ ได้รับการวิเคราะห์ด้วยซอฟต์แวร์ QuantaSoft 1.7 และ QuantaSoft Analysis Pro 1.0 (Bio-Rad เมืองเชอร์คิวลีส รัฐแคลิฟอร์เนีย สหรัฐอเมริกา)

การตรวจแยกเซลล์ด้วยวิธี Flow Cytometric

PBMC แข็ง เช่นเดียวกับตัวอย่างที่ได้รับ การตรวจ PBMC ให้หล่อเย็นใน BSA 2% ใน DPBS

เซลล์ที่ได้ถูกทำให้หล่อเย็นใน BSA 2% หลังจากนั้นได้ถูกบ่มเพาะในอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ด้วยแอนติบอดี Alexa Fluor® 488 Anti-CD45 (IncellDx ความเจือจางที่ 1/100) และแอนติบอดี Alexa Fluor® 647 Anti-CD16 ปริมาณ 2.5 ug (BD, Cat. # 55710) และแอนติบอดี PerCP/Cy5.5 Anti-human CD14 ปริมาณ 1 ug (Biolegend, Cat. #325622)

เซลล์ที่ได้ถูกนำไปจำจัดสิ่งเจือปน 2 ครั้ง ด้วย BSA/D-PBS 2% ผ่านการกรอง และเก็บในน้ำแข็งในช่วงระยะเวลาการตรวจแยกเซลล์

ข้อมูลถูกจัดเก็บด้วย Sony SH800 โดยเซลล์ CD45+ ที่การย้อมสีแสดงผลบวก สำหรับทั้ง CD14+ และ CD16+ เท่านั้นที่จะถูกตรวจแยกเข้าไปในหลอดทดลอง ที่มีสารละลาย BSA 2% ปริมาณ 100 uL

การควบคุมความบริสุทธิ์ในการตรวจแยกของ PBMC ได้รับการยืนยันว่ามีค่าสูงกว่า 99% จากการวิเคราะห์ PBMC ที่ตรวจแยกแล้ว ด้วยการใช้แม่พิมพ์ และกลยุทธ์การควบคุมการปลดปล่อยสาร แบบเดิม

การระบุโปรตีนเซลล์เดียว

เซลล์ของผู้ป่วยถูกคัดแยกตามเครื่องหมายบนพีโน่ไทป์ (เหมือนด้านบน) และแข็งแข็งในอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

ตัวอย่างผู้ป่วยที่มีผลเป็นบวกจากการทำ Flow Cytometry และมีจำนวนเซลล์ที่มากพอ ถูกคัดเลือกมาสำหรับการยืนยัน LC-MS

เซลล์ที่ถูกแข็งแข็งแล้ว ถูกทำให้สลาย ด้วย IP Lysis/Wash Buffer จากชุดอุปกรณ์ ตามวิธีการจากผู้ผลิต

Anti-S1 mAb ขนาด 10 ug ถูกใช้ในกระบวนการคัดแยกโปรตีน S1 Spike จากไอลเซทของผู้ป่วยแต่ละคน

หลังจากที่ทำการบ่มเพาะข้ามคืน ด้วยวิธี end-over-end rotation ในอุณหภูมิ 4° C และผ่านการชำระสิ่งเจือปนด้วย IP Lysis/Wash Buffer และ โปรตีน S1 Spike ที่จับตัวแล้ว ถูกซั่ง ด้วย elution buffer จากชุดอุปกรณ์

ผลึกที่ได้จากการซั่งด้วย IP ถูกทำให้แห้งในสูญญากาศ และทำให้กล้ายเป็นสารเขวนloyอิกครั้งในน้ำปริมาณ 20 uL นำมาไว้ด้วยกัน และทำให้บริสุทธิ์ด้วย Agilent 1290 UPLC Infinity II ใน Discovery C8 (Sigma-Aldrich ขนาด 3cm X 2.1mm X 5μm ในอุณหภูมิห้อง) โดยใช้ตัวทำละลายสำหรับเฟสเคลื่อน จากรดไตรฟลูอโรมะซิติก (TFA) 0.1% ในน้ำ หรือในสารอะซีโตในไตรอล

ระดับสีที่แสดงออกมา คือ: อะซีโตในไตรอล 5-75% (0.1% TFA) ใน 4.5 นาที (0.8mL ต่อนาที) ด้วยค่าเริ่มต้น ที่อะซีโตในไตรอล 5% (0.1% TFA) ใน 0.5 นาที (0.8 mL ต่อนาที)

โปรตีนที่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์แล้ว ถูกทำให้แห้งในสูญญากาศ และทำให้กล้ายเป็นสารเขวนloy in 50 μL ใน HEPES ขนาด 100 mM ด้วยค่า pH 8.0 (อะซีโตในไตรอล 20%)

TCEP (100 mM) ขนาด 1μL ถูกเติมลงไป และกลุ่มตัวอย่างถูกเพาะ ในอุณหภูมิ 37° C เป็นเวลา 30 นาที

คลอร์อเซทามีด (500 mM) ปริมาณ 1μL ถูกเติมลงไปในกลุ่มตัวอย่าง และถูกเพาะในอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที

rAspN (Promega 0.5 ug/uL) ขนาด 1 μ และ LysC (Pierce, 1 ug/uL) ขนาด 1μL ถูกเติมลงไป และกลุ่มตัวอย่างได้ถูกเพาะ ในอุณหภูมิ 37° C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ก่อนที่จะทำการวิเคราะห์แบบ LC-MS

การวิเคราะห์ LC-MS

รีคอมบินเนนท์โปรตีน SARS-CoV-2 Spike S1 ที่ถูกย่ออยแล้ว ได้ถูกนำไปวิเคราะห์ผ่านเครื่องวิเคราะห์มวลโมเลกุล แบบความละเอียดสูง เพื่อที่จะสร้างรายการเปปไทด์ ที่แสดงทั้งเวลาที่สารเข้าในคอลัมน์ และมวลโมเลกุล

ระบบ High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) แบบ Agilent 1290 Infinity II และ คอลัมน์การเรียงตัวของเปปไทด์ AdvanceBio (2.1 x 150 mm, 2.7 um) ถูกนำมาใช้ในการแยกเปปไทด์ ก่อนที่จะทำการวิเคราะห์มวล

ในเฟสเคลื่อน ของการแยกเปปไทด์ มีส่วนประกอบของตัวทำละลาย A (0.1% กรดฟอร์มิด ใน H₂O) และตัวทำละลาย B (0.1% กรดฟอร์มิด ใน CH₃CN 90%)

ระดับสีที่แสดงออกมา ดัง

- B 3% ที่ระยะเวลา 0-1 นาที
- B 40% ที่ระยะเวลา 1-30
- B 90% ที่ระยะเวลา 30-33 นาที
- B 90% ที่ระยะเวลา 33-35 นาที
- B 3% ที่ระยะเวลา 37-39 นาที

เปปไทด์ที่ถูกชะแล้ว ถูกนำไปเข้ากระบวนการอิเล็กโทรสเปรย์ ด้วย Dual JetStream ESI ประกอบกับ Agilent 6550 iFunnel time-of-flight MS Analyzer

ข้อมูลถูกจัดเก็บด้วยกระบวนการ MS ในแบบ 2GHz (ขอบเขตรายละเอียดภาพที่ขยายแล้ว) บนสัดส่วนมวลต่อประจุ เป็น 50-1700 Da และกระบวนการ MS/MS

ข้อมูลที่ได้มาถูกจัดเก็บในแบบเซนทรอยด์ และ谱ไฟล์ โดยใช้ซอฟแวร์จัดเก็บข้อมูล Agilent MassHunter Workstation B09

วิธีวิเคราะห์แบบเดียวกัน ถูกนำมาใช้กับกลุ่มตัวอย่างที่ถูกคัดแยกโปรตีนแล้ว จากเซลล์ผู้ป่วยที่ถูกคัดแยกมา ยกเว้นแต่ข้อมูล ms/ms

ภาพและคำบรรยาย

ตารางที่ 1 การวิเคราะห์โมเลกุลของผู้เข้าร่วมการวิจัย

ภาวะการติดเชื้อโควิด 19	<u>Sars-CoV-2 RNA+</u>		ระยะเวลาหลังการติดเชื้อ (เดือน)
	NS	PBMCs	
HC 1	-	-	n/a
HC 2	-	-	n/a
HC 3	-	-	n/a
HC 4	-	-	n/a
HC 5	-	-	n/a
HC 6	-	-	n/a
HC 7	-	-	n/a
HC 8	-	-	n/a
ไม่มีอาการ	+	+	n/a
ร้ายแรง 1	+	-	n/a
ร้ายแรง 2	+	+	n/a
ร้ายแรง 3	+	-	n/a
ร้ายแรง 4	+	-	n/a
ร้ายแรง 5	+	-	n/a
ร้ายแรง 6	+	-	n/a
ร้ายแรง 7	+	+	n/a
ร้ายแรง 8	+	-	n/a
ร้ายแรง 9	+	-	n/a
ร้ายแรง 10	+	+	n/a
ร้ายแรง 11	+	+	13
LH 1	+	-	
LH 2	+	-	14
LH 3	+	-	6
LH 4	+	-	11
LH 5	+	+	15
LH 6	+	-	13
LH 7	+	-	12
LH 8	+	-	7
LH 9	+	-	14
LH 10	+	-	13
LH 11	+	-	12
LH 12	+	-	12
LH 13	+	-	6
LH 14	+	-	14
LH 15	+	-	13

LH 16	+	-	9
LH 17	+	-	11
LH 18	+	-	7
LH 19	+	-	14
LH 20	+	-	11
LH 21	+	-	13
LH 22	+	-	10
LH 23	+	-	8
LH 24	+	-	7
LH 25	+	-	12
LH 26	+	-	15

คำบรรยาย 1 การหาปริมาณโนโนไซต์ประเภท classical intermediate และ non-classical ในกลุ่มผู้ป่วย PASC (LH) โดยพบว่าโนโนไซต์แบบ non-classical เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีภาวะร้ายแรง และ PASC

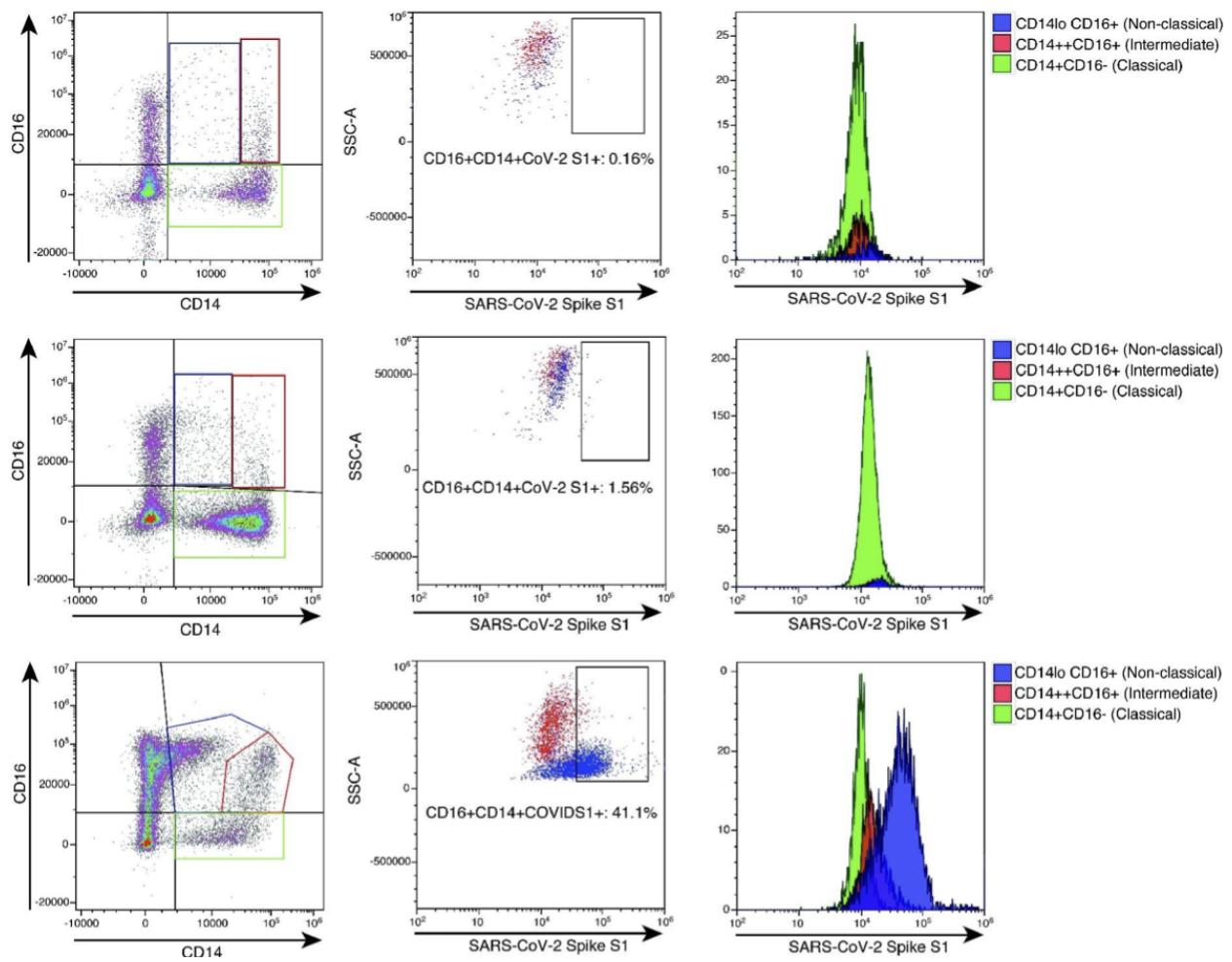
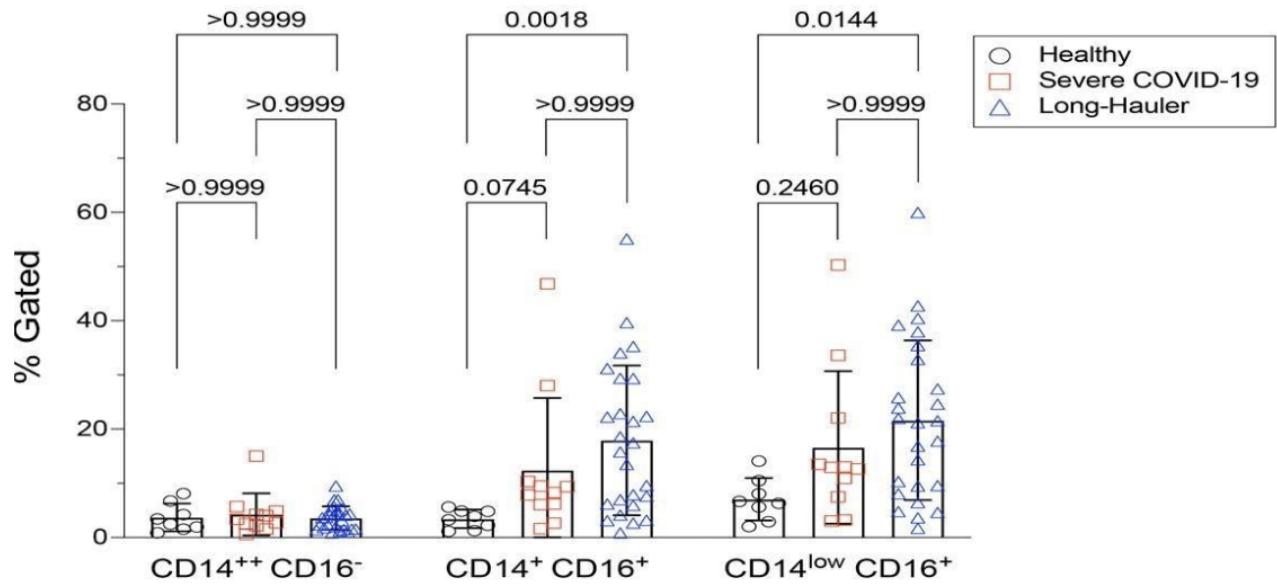
คำบรรยาย 2 การวัดค่า Flow Cytometric แบบค่าพารามิเตอร์สูง ของโปรตีน SARS-CoV-2 S1 ในโนโนไซต์ส่วนย่อย การเคลื่อนที่ของเซลล์ถูกควบคุมไว้ที่ CD45 ก่อนที่จะถูกนำไปวิเคราะห์ทำการแสดง CD14 และ CD16 โดยโนโนไซต์ประเภท classical แสดงสีเขียว โนโนไซต์ประเภท intermediate แสดงสีแดง และโนโนไซต์ประเภท non-classical แสดงสีน้ำเงิน

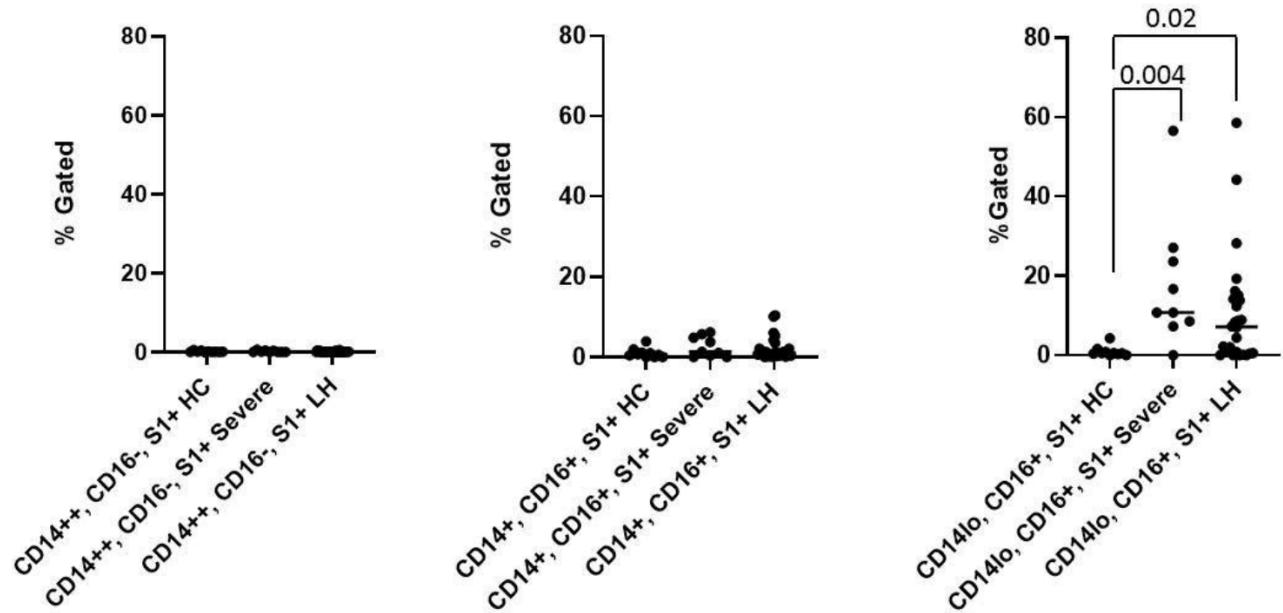
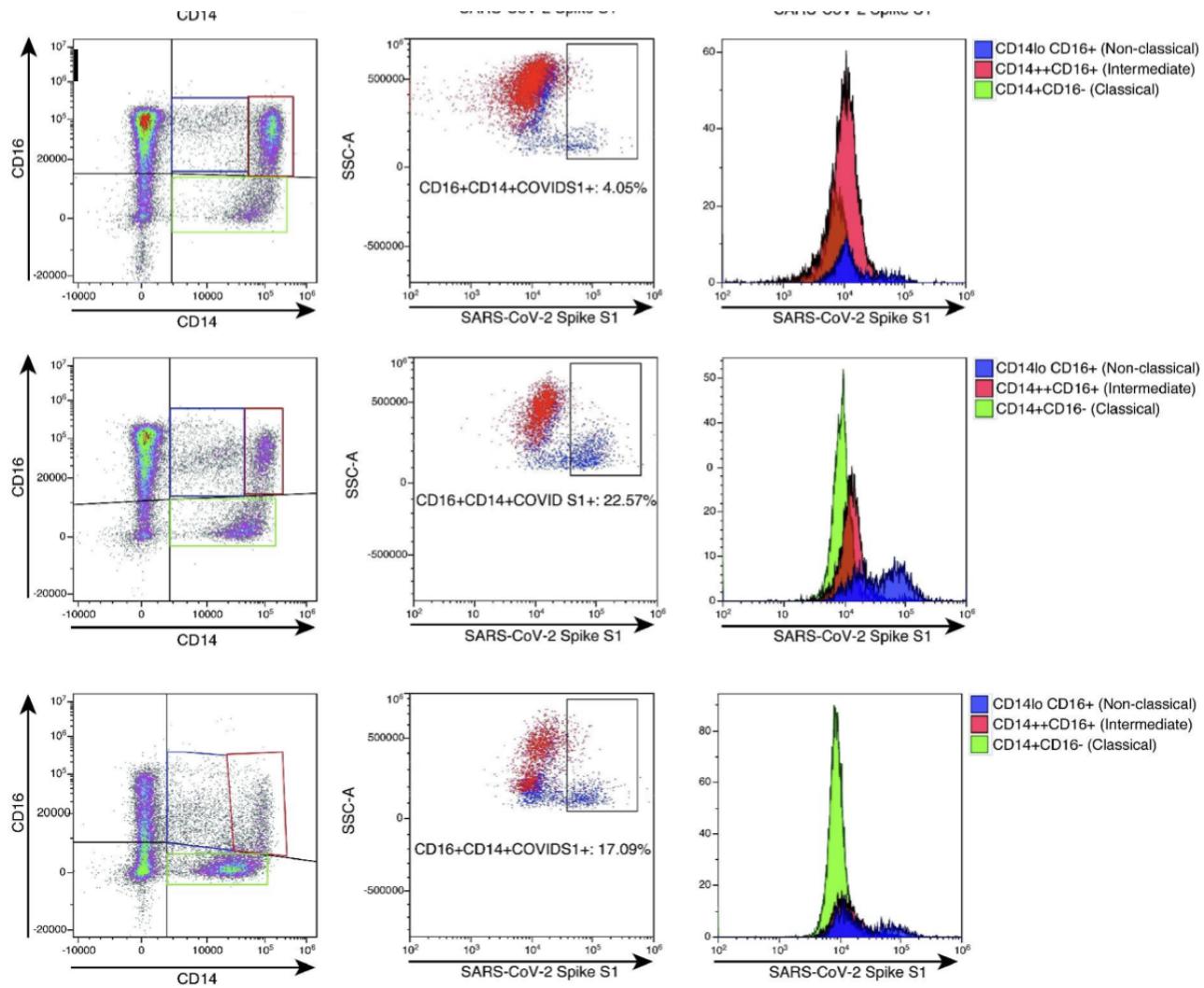
คำบรรยาย 3 การวัดค่าโปรตีน SARS-CoV-2 S1 ในโนโนไซต์ส่วนย่อยที่ถูกแยกออกจากกลุ่มตัวอย่างที่สุขภาพดี (HC) กลุ่มผู้ป่วยโควิด 19 ภาวะร้ายแรง และกลุ่ม PASC (LH) ซึ่งค่าที่วัดออกมากได้มีนัยสำคัญทางสถิติ

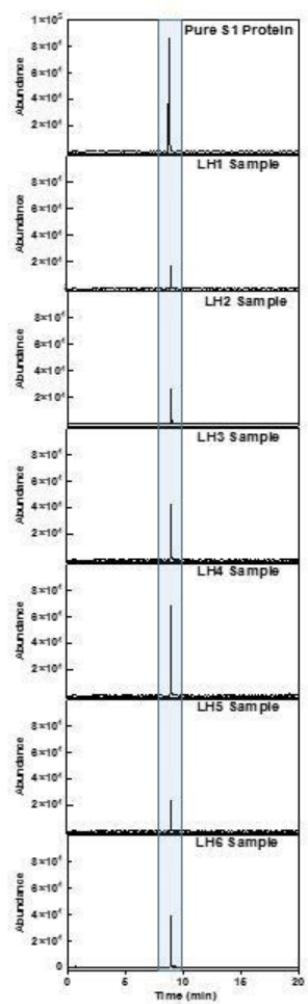
คำบรรยาย 4 การยืนยันของ LC-MS ว่าในกลุ่มตัวอย่าง LH1-6.

ก. มีส่วนย่อยของ S1 อยู่จริง โดย Extracted Ion Chromatogram (EIC) ได้แสดงเป็นไฟต์ NLREFVFK โดยระยะเวลาการเคลื่อนที่ของสารผ่านคอลัมน์ เท่ากับเวลาของเป็นไฟต์ NLREFVFK มาตรฐาน

ข. ค่า Mass Spectra ของ NLREFVFK จากทั้งค่ามาตรฐานที่จำหน่ายทั่วไป และผู้ป่วย LH1 ซึ่งค่า Spectra แสดงค่ามวล และค่าการกระจายตัวของไอโซโทปที่เท่ากัน





A**B**