นันทนิจ จารุเศรณีย์ : การประยุกต์ใช้ใช้เทคโนโลยีฟาจในการศึกษาโรคมะเร็งท่อน้ำดีที่สัมพันธ์กับการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนด้วยพยาธิใบไม้ตับ (APPLICATION OF PHAGE DISPLAY TECHNOLOGY FOR THE STUDY OF CHOLANGIOCARCINOMA ASSOCIATED WITH CONSUMPTION OF FLUKE INFECTED FOOD) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.มณฑารพ ยมาภัย, 155 หน้า.

โรคมะเร็งท่อน้ำดีเป็นหนึ่งในปัญหาสุขภาพที่สำคัญในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ซึ่งเป็นแหล่งที่มีผู้ป่วยโรคนี้มากที่สุดในโลก การตรวจหามะเร็งชนิดนี้ในระยะต้นนั้นทำได้ยากมาก ถึงทำไม่ได้เลย และยังไม่มีวิธีการรักษาที่มีประสิทธิภาพ วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยนี้ คือการพยายามใช้เทคโนโลยีฟาจในการแก้ปัญหานี้ โดยการนำมาประยุกต์ใช้ในการค้นหาเปปไทด์และแอนติบอดีที่สามารถจับอย่างจำเพาะกับเซลล์ KKU-100 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ของเซลล์ที่เตรียมได้จากมะเร็งชนิดนี้ ผลจากกระบวนการคัดหาเส้นเปปไทด์จากคลังของฟาจที่แสดงเปปไทด์หลากหลายชนิดต่างๆ พบเปปไทด์ที่มีโครงสร้างเป็นวงกลม ๒ เส้น ที่สามารถจับกับเซลล์ KKU-100 ได้อย่างจำเพาะเจาะจงโดยมีลำดับกรดอะมิโนคือ ซิสเตอีน ทรีโอนีน ทรีโอนีน โพรลีน โพรลีน ไทโรซีน เวลีน ไซโตซีน (CTTPPYVC) และ ซิสเตอีน ทรีโอนีน ซีรีน โพรลีน โพรลีน ไทโรซีน เวลีน ไซโตซีน (CTSPPYVC) โดยทดสอบยืนยันความสามารถในการจับ ด้วยวิธีอีไลซ่า และการย้อมเซลล์ นอกจากนั้นแล้วเส้นเปปไทด์สังเคราะห์ CTTPPYVC ยังสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์เมื่อทำการทดสอบในจานทดลองด้วย ในขณะเดียวกันยังได้นำเทคโนโลยีฟาจไปใช้คัดหาแอนติ บอดีส่วน scFv ที่สามารถจับกับเซลล์ KKU-100 ได้เป็นจำนวนมาก แอนติบอดีส่วน scFv เหล่านี้ เมื่อผลิตในรูปของ scFv เดี่ยวและ scFv ที่เชื่อมติดกับ เอนไซม์อัลคาไลฟอสฟาเทส (scFv-AP) แล้ว พบว่ายังสามารถจับกับเซลล์เมื่อทดสอบด้วยวิธีการอีไลซ่า การตกตะกอนด้วยอิมมูนและการย้อมเซลล์ แต่ยังไม่พบแอนติบอดีที่สามารถใช้ในการทดสอบโดยวิธีเวสเทิร์นบลอตหรือแอนติบอดีที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ นอกจากนั้นแล้วยังได้ทำการทดสอบความสามารถในการจับของแอนติบอดีเหล่านี้กับเซลล์อื่นๆ เช่น H69, COS-1 และ HepB3 รวมทั้งยังได้นำแอนติบอดีส่วน scFv โคลน YM12 และ YM13 ไปทดสอบผลต่อโครงสร้างของเซลล์ด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared (FTIR) microspectroscpy ซึ่งผลจากการศึกษาพบว่าแอนติบอดีส่วน scFv ทั้งสองชนิด สามารถทำให้โครงสร้างของคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนของเซลล์ KKU-100 เกิดการเปลี่ยนแปลง แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่โครงสร้างของไขมัน ผลจากการศึกษาดังกล่าวมาทั้งหมด แสดงให้เห็นว่าเทคโนโลยีฟาจนั้นมีประสิทธิภาพในการใช้ค้นหาเปปไทด์และแอนติบอดีส่วน scFv ที่จำเพาะกับเซลล์ KKU-100 ได้ ซึ่งทั้งเปปไทด์และแอนติบอดี

ส่วน scFv ที่คัดเลือกมาได้นี้ สามารถนำไปใช้ในการศึกษากลไกการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีได้ ส่วนการนำไปประยุกต์ใช้ในระดับคลีนิคนั้นยังต้องทำการวิจัยและพัฒนาต่อไป

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2552

ลายมือชื่อนักศึกษา นันทกานิจ จารุเศรษฐนัย
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

NANTHANIT JARUSERANEE : APPLICATION OF PHAGE DISPLAY TECHNOLOGY FOR THE STUDY OF CHOLANGIOCARCINOMA ASSOCIATED WITH CONSUMPTION OF FLUKE INFECTED FOOD. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. MONTAROP YAMABHAI, Ph.D., 155 PP.

PHAGE DISPLAY TECHNOLOGY/CHOLANGIOCARCINOMA/ANTIBODY/ PEPTIDE/CELL SURFACE MARKER

Cholangiocarcinoma is one of the most serious health problems in Northeastern region of Thailand, where the prevalence of this form of cancer is the highest in the world. Unfortunately, early detection of this cancer is difficult to impossible and there is still no effective treatment. To overcome this limitation, phage display technology was used to identify peptide ligands and antibody fragments bound selectively to the surface of the cholangiocarcinoma cell line, KKU-100. Affinity selection of various phage-displayed combinatorial peptide libraries yielded two cyclic peptides: CTTPPYVC and CTSPPYVC, bound specifically to KKU-100, as shown by ELISA and cell staining assays The synthetic form of one peptide, CTTPPYVC, could inhibit cell growth *in vitro*. In parallel, a number of human single-chain fragments of variable regions (scFv) antibody fragment were isolated from phage-display libraries bound selectively to the KKU-100 cell surface. These antibody fragments, prepared as soluble scFv or scFv-alkaline phosphatase (scFv-AP) fusions, were evaluated in cell-based ELISA, cell-staining, and immunoprecipitation experiments. None of antibody tested so far yielded a signal by western blot analysis or showed any effects on cell

growth. Cross-reactivity of these antibodies to other cell lines, namely H69, HepG2, COS-1 and HepB3 cells, was also investigated. Moreover, Fourier Transform Infrared (FTIR) microspectroscopy analysis was carried out to observe the effect of two scFv antibodies on KKU-100 cells. The results showed that the YM12 and YM13 scFvs could alter the structure of carbohydrate and protein, but not lipid. Thus, phage display was successfully used to isolate specific peptides and antibodies against KKU-100 cells. These peptides and scFv antibodies have the potential to be used as reagents for the study of cholangiocarcinogenesis, although their clinical applications requires further investigation.

School of Biotechnology

Academic Year 2009

Student's Signature NANTHANIT JARUSERANEE

Advisor's Signature

Co-advisor's Signature

Co-advisor's Signature