บทที่ 1

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาวิจัย

โรคพยาธิใบไม้ตับที่เกิดจาก *Opisthorchis viverrini* เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย โดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือซึ่งพบผู้ป่วยโรคนี้มากถึง 16.6% และเป็นที่ทราบกันดีว่า การติดพยาธิใบไม้ตับมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็งท่อน้ำดีและถูกจัดให้เป็นสารก่อมะเร็ง (IARC., 1994) ทำให้อัตราการตายของผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งท่อน้ำดีในภูมิภาคนี้มีมากกว่า 20% (Sripa et al., 2010) จากภาวะสุขภาพของประชาชนที่มีสาเหตุจากพยาธิใบไม้ตับ ทำให้มีการศึกษาวิจัยมากมายที่มีวัตถุประสงค์เพื่อลดความชุกและอัตราการตายจากการติดพยาธิในประชากร นอกเหนือจากการพยายามปรับเปลี่ยนทัศนคติและพฤติกรรม

เนื่องจากโรคพยาธิใบไม้ตับไม่ใช่โรคที่มีความรุนแรง หากมีการตรวจพบแต่เนิ่นๆ และได้รับการรักษาหรือไม่เกิดการติดพยาธิซ้ำอีก อย่างไรก็ตาม การรักษาโรคพยาธิใบไม้ยังคงใช้การรักษาด้วยการให้กินยา praziquantel ซึ่งเป็นยาเพียงชนิดเดียวในตอนนี้ ที่ให้ผลการรักษามากกว่า 90% ซึ่งยาชนิดนี้ก็มีผลข้างเคียงมากมาย เช่น ผู้ป่วยอาจมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน เวียนศีรษะ ส่งผลทำให้ไม่สามารถทำงานได้ จึงทำให้ผู้ป่วยหลายคนหลีกเลี่ยงการกินยาหรือกินยาไม่ครบตามปริมาณที่กำหนด ประกอบกับพฤติกรรมในการรับประทานปลาแบบสุกๆ ดิบๆ ทำให้การรักษาโรคพยาธิใบไม้ตับไม่ได้ผลและพบการติดพยาธิซ้ำในประชากร จากปัญหาดังกล่าว คณะผู้วิจัยจึงมีความมุ่งหวังที่จะคิดค้นยาตัวใหม่และ/หรือวัคซีนต่อพยาธิเพื่อที่จะลดจำนวนของพยาธิในโฮสต์ซึ่งจะช่วยลดพยาธิสภาพและความรุนแรงของโรคที่จะเกิดในโฮสต์ด้วย

ในหลายการศึกษาที่ผ่านมา มีหลายงานวิจัยที่มีความสนใจในการคิดค้นยาตัวใหม่และวัคซีนต่อการติดโรคพยาธิ เช่น วัคซีนต้านเชื้อมาลาเรีย เป็นต้น โดยมีการคัดแยก/ผลิตโมเลกุลของพยาธิมาทดสอบความสามารถในการเป็นยาหรือวัคซีนในสัตว์ทดลองที่ติดพยาธินั้นๆ ลิวซีนอะมิโนเปปติเดสเป็นเอ็นไซม์ชนิดหนึ่งที่พบในพยาธิหลายชนิดรวมถึง *O. viverrini* ด้วย เอ็นไซม์นี้มีความสำคัญในการดำรงชีวิตของพยาธิ โดยช่วยในการกินอาหารของพยาธิ ช่วยย่อยอาหารที่พยาธิกินเข้าไปให้มีขนาดที่เล็กลงเพื่อให้ดูดซึมได้ดีขึ้น จากเหตุผลนี้ ผู้วิจัยจึงมีสมมติฐานว่า การยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์นี้จะทำให้พยาธิไม่สามารถดูดซึมอาหารที่กินเข้าไปได้เนื่องจากขาดเอ็นไซม์ จากสมมติฐานนี้ ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ โดยผลิตวัคซีนต่อเอ็นไซม์นี้ของ *O. viverrini* เพื่อลดอัตราการติดพยาธิใบไม้ตับและลดพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นในผู้ป่วยตลอดจนลดอัตราการตายจากโรคมะเร็งท่อน้ำดี

2. วัตถุประสงค์

ศึกษาคุณสมบัติของลิวซีนอะมิโนเปปติเดสในการเป็นวัคซีนต่อพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini*

3. ขอบเขตงานวิจัย

ศึกษาคุณสมบัติของลิวซีนอะมิโนเปปติเดสในการเป็นวัคซีนต่อพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ในหนูแฮมสเตอร์ โดยวัดการลดลงของการผลิตไข่และพยาธิระยะตัวเต็มวัย

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถเผยแพร่ผลการศึกษาในวารสารวิจัยระดับชาติ/นานาชาติและหน่วยงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง สามารถนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนาการวิจัยในการป้องโรคพยาธิใบไม้ตับต่อไป

บทที่ 2

วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

พยาธิใบไม้ตับ, *O. viverrini* เป็นพยาธิที่ก่อให้เกิดปัญหาสาธารณสุขในหลายประเทศ ทั้งในประเทศไทยและประเทศใกล้เคียง เช่น ลาว พม่า กัมพูชาและเวียดนาม จากพยาธิสภาพและความรุนแรงของโรคที่นำไปสู่การเป็นมะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งพบในผู้ป่วยที่ติดพยาธิเรื้อรัง ทำให้ International Agency Research on Cancer จัดให้ *O. viverrini* เป็นสิ่งมีชีวิตที่ก่อให้เกิดมะเร็ง (IARC., 1994)

O. viverrini หรือพยาธิใบไม้ตับ เป็นพยาธิที่มีระยะตัวเต็มวัยอาศัยอยู่ในท่อน้ำดีของโฮสต์ เช่น คน สุนัข แมว เป็นต้น จากการที่พยาธิอาศัยอยู่ในท่อน้ำดีบริเวณดังกล่าว จึงเป็นสาเหตุให้พบพยาธิสภาพต่างๆ บริเวณดังกล่าว เช่น พบการอักเสบ พบการสร้าง epithelial cell ที่มากผิดปกติ จนเป็นสาเหตุให้ท่อน้ำดีอุดตัน เป็นต้น และเมื่อมีการติดพยาธิเป็นระยะเวลานานจึงส่งผลให้พยาธิสภาพนั้นรุนแรงมากขึ้น นำไปสู่การเปลี่ยนแปลงในระดับดีเอ็นเอจนทำให้เกิดมิวเตชั่น และพัฒนาไปเป็นมะเร็งท่อน้ำดีในที่สุด ซึ่งกลไกและกระบวนการนั้นยังไม่ทราบแน่ชัด แต่ได้มีข้อสันนิษฐานว่าสาเหตุที่เกิดขึ้นนั้นมาจากพยาธิระยะตัวเต็มวัยนั่นเอง เนื่องจากพยาธิมีการหลั่งสารที่เรียกโดยรวมว่า excretory-secretory products ออกมาเพื่อช่วยให้พยาธิสามารถดำรงชีวิตอยู่ในโฮสต์ได้ โดยใน products ดังกล่าวจะประกอบด้วยสารหลายชนิด โดยหนึ่งในสารนั้นคือเอ็นไซม์ชนิดต่างๆ ที่พยาธิหลั่งออกมาเพื่อช่วยในการกินอาหาร โดยอาหารของพยาธิคือ น้ำดีหรือโปรตีนต่างๆ ของโฮสต์เพื่อช่วยในการเจริญเติบโตและผลิตไข่ นอกจากกินอาหารแล้ว เอ็นไซม์เหล่านี้ยังช่วยเหลือพยาธิในการบุกรุกเข้าไปในเนื้อเยื่อของโฮสต์และทำลายระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ เพื่อช่วยให้พยาธิอยู่รอดในร่างกายโฮสต์

อย่างไรก็ตาม ที่ผ่านมามีการศึกษาถึงเอ็นไซม์ที่พยาธิหลั่งออกมา พบว่าเอ็นไซม์เหล่านี้คือเอ็นไซม์ในกลุ่ม โปรตีเอส (Proteases) ซึ่งมีอยู่หลายชนิด โดยแต่ละชนิดจะมีการทำงานร่วมกันเพื่อให้การทำหน้าที่สมบูรณ์ขึ้น ในพยาธิ *O. viverrini* ได้มีการศึกษาเอ็นไซม์หลายชนิด ได้แก่ cathepsin B (Sripa et al.) และ asparaginyl endopeptidase โดยมีการพัฒนาเอ็นไซม์ดังกล่าวเพื่อเป็น immunodiagnostic antigen และ drug target (Laha et al., 2008) ในการศึกษานี้ ผู้วิจัยจึงมุ่งหวังที่จะพัฒนาเอ็นไซม์ลิวซีนอะมิโนเปปติเดสเป็นวัคซีนเพื่อป้องกันการติดพยาธิใบไม้ตับ

เอ็นไซม์ลิวซีนอะมิโนเปปติเดส เป็นเอ็นไซม์โปรตีเอสชนิดเมทัลโลโปรตีเอส (Merops) ที่แตกต่างจากโปรตีเอสชนิดอื่นโดยมีการทำงานภายในเซลล์ ไม่หลั่งออกนอกเซลล์เหมือนโปรตีเอสชนิดอื่น แต่ในบางการศึกษารายงานว่าเอ็นไซม์ชนิดนี้มีการหลั่งออกนอกเซลล์เพียงเล็กน้อย จึงสามารถพบใน excretory-secretory products ของพยาธิได้ (Marcilla et al., 2008) จากการศึกษาเอ็นไซม์ลิวซีนอะมิโนเปปติเดสของพยาธิ *Schistosome* spp. พบว่าเอ็นไซม์ชนิดนี้มีบทบาทสำคัญในการย่อยอาหารของพยาธิ เนื่องจากเอ็นไซม์ชนิดนี้มีคุณสมบัติเป็นอะมิโนเปปติเดส เอ็นไซม์จึงทำหน้าที่ในการย่อยอาหารที่ถูกย่อยโดยเอ็นไซม์ชนิดอื่น ให้มีอนุภาคที่เล็กลงจนกลายเป็น amino acid เดี่ยวๆ ก่อนที่จะดูดซึมเข้าสู่เซลล์เยื่อบุของพยาธิ นอกจากบทบาทในการย่อยอาหารของพยาธิแล้ว (McCarthy et al., 2004) (Caffrey et al., 2004) ยังพบว่า

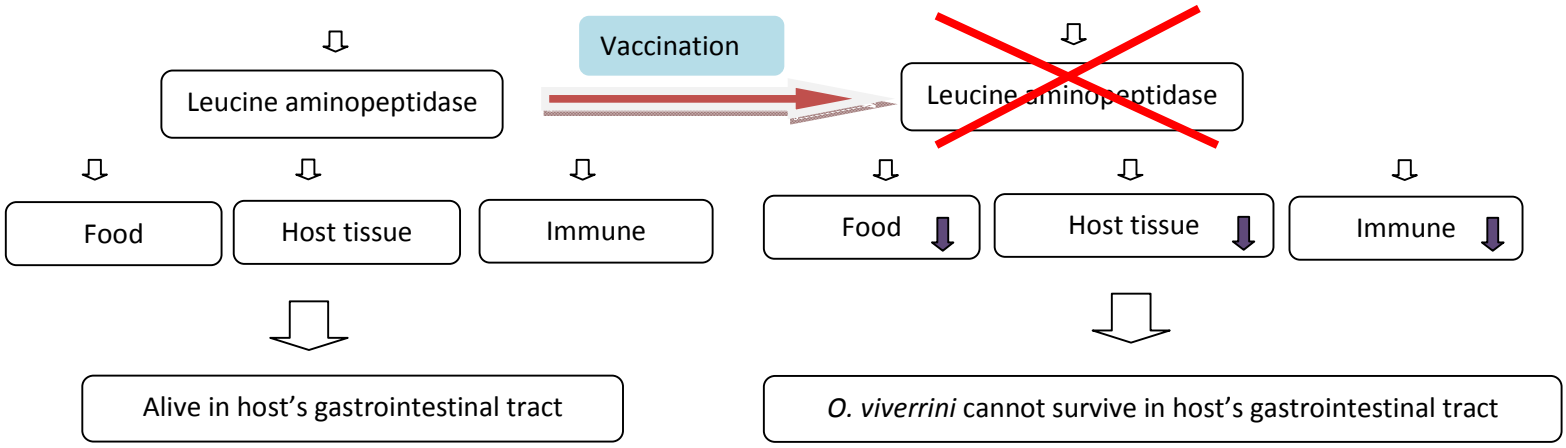
เอ็นไซม์ชนิดนี้มีบทบาทในการฟักเป็นตัวอ่อนของพยาธิด้วย (Xu and Dresden, 1986) และในการศึกษาการติดพยาธิ *Fasciola* spp. ของแกะพบว่าเอ็นไซม์ลิวซีนอะมิโนเปปติเดสของ *Fasciola* spp. มีคุณสมบัติในการเป็นวัคซีนเพื่อป้องกันการติดพยาธิได้ โดยพบการติดพยาธิลดลงถึง 89% (Acosta et al., 2008) (Maggioli et al.,2010)

ในการศึกษากลไกการก่อโรคของพยาธิ *O. viverrini* ได้มีการศึกษาคุณลักษณะของเอ็นไซม์ลิวซีนอะมิโนเปปติเดส โดยได้มีการผลิตเป็นรีคอมบิแนนท์โปรตีน (Sripa J., unpublished) ผู้วิจัยจึงมีความมุ่งหวังที่จะนำรีคอมบิแนนท์โปรตีนจากการศึกษาดังกล่าว มาศึกษาความสามารถของโปรตีนในการเป็นวัคซีนต่อการติดพยาธิ *O. viverrini* โดยทำการทดลองในหนูแฮมสเตอร์

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย



2. วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดส

ยีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดสได้ถูกเพิ่มจำนวนจาก cDNA library ของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* จากนั้น ชิ้นยีนได้ถูกนำไปผูกกับ expression vector, pET15b+ (Invitrogen, USA) และนำเข้าสู่แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) (Invitrogen, USA) และกระตุ้นให้เกิดการสร้างโปรตีนของยีนชนิดนี้ โดยการกระตุ้นแบคทีเรียด้วย 1mM IPTG (Thermoscientific, USA) และเลี้ยงแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 26 °C หลังจากเลี้ยงจนครบเวลา อาหารเลี้ยงเชื้อจะถูกนำมาปั่นแยกเอาเซลล์ของแบคทีเรีย เซลล์ของแบคเรียจะถูกนำมาละลายใน binding buffer และนำไปทำให้เซลล์แตกด้วยการ Freez/thaw ที่อุณหภูมิ -80 °C และ 42 °C ตามลำดับ หลังจากนั้น จะถูกนำไป sonicate ด้วยเครื่อง sonicator เพื่อทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกอย่างสมบูรณ์

หลังจากทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกแล้ว จะถูกนำไปปั่นแยกเอาเซลล์แบคทีเรียทิ้งไป และเอาส่วนที่เป็นสารละลายที่แยกอยู่ส่วนบน มาทำการผ่าน Ni column (Thermoscientific, USA) เพื่อเป็นการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ โปรตีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดสจะถูกแยกออกมาจากสารละลายด้วย Ni column โดยจะทำการชะโปรตีนออกจาก column ด้วย elution buffer โปรตีนที่ถูกชะออกมาจะนำมาตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลและความบริสุทธิ์ด้วยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบน SDS-PAGE และย้อมสี Coomassie blue เพื่อให้เห็นตำแหน่งของโปรตีน และวัดความเข้มข้นของโปรตีนที่ 280 nm ด้วย Nanodrop technology (Thermoscientific, USA) และแบ่งเก็บที่ -20 °C

2.2 การกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูแฮมสเตอร์

หนูแฮมสเตอร์ สายพันธุ์ Syrian golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) เพศผู้ อายุ 6-8 สัปดาห์ จำนวน 15 ตัว ถูกแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว หนูกลุ่มที่ 1 จะเป็นกลุ่มควบคุม จะไม่ถูกฉีด

ด้วยสารใดเลย กลุ่มที่ 2 คือกลุ่มควบคุมผลลบ กลุ่มนี้จะถูกฉีดด้วย Imject™ Alum Adjuvant (Thermoscientific, USA) ร่วมกับ elution buffer และกลุ่มที่ 3 คือ กลุ่มทดลองซึ่งจะถูกกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดีต่อโปรตีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดส โดยโปรตีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดสความเข้มข้น 100 ug จะผสมกับ Imject™ Alum Adjuvant (Thermo science, USA) ในอัตราส่วน 1:1 และฉีดให้หนูแฮมสเตอร์ โดยฉีด subcutaneous บริเวณโคนขาหลังเพื่อกระตุ้นให้หนูแฮมสเตอร์สร้างภูมิคุ้มกัน โดยการฉีดจะทำ 4 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 2 สัปดาห์ ก่อนที่จะฉีดทุกครั้ง จะเจาะเลือดหนูจากตาหนู (orbital sinus) เพื่อดูระดับภูมิคุ้มกันที่ถูกสร้างขึ้น โดยตรวจวัดระดับภูมิคุ้มกันที่สร้างขึ้นด้วยเทคนิค Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) หลังจากการฉีดครั้งสุดท้าย 2 สัปดาห์ จะทำให้หนูแฮมสเตอร์ติดพยาธิใบไม้ตับ โดยการป้อนระยะติดต่อของพยาธิใบไม้ตับ metacercariae จำนวน 50 metacercariae หลังจากการทำให้หนูแฮมสเตอร์ติดพยาธิมาประมาณ 1 เดือน จะเริ่มทำการตรวจอุจจาระของหนูแฮมสเตอร์ทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 9 สัปดาห์ เพื่อตรวจนับไข่พยาธิ โดยนำอุจจาระมาแยกเอาเศษต่างๆ ออกก่อน ด้วยเทคนิค formaline ether concentration technique (Elkins, Haswell-Elkins, and Anderson, 1986) ในสัปดาห์ที่ 9 หนูแฮมสเตอร์จะถูกฆ่าเพื่อตรวจนับระยะตัวเต็มวัยของพยาธิและเก็บอุจจาระจากลำไส้ตรงส่วนสุดท้ายเพื่อตรวจนับไข่พยาธิ

2.3 ตรวจวัดระดับภูมิคุ้มกันด้วยเทคนิค Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ซีรัมหนูแฮมสเตอร์ก่อนและหลังการฉีดกระตุ้นทุกครั้งจะนำมาทำการตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันกับแอนติเจน คือ รีคอมบิแนนท์โปรตีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดสด้วยเทคนิค ELISA ด้วยวิธีการโดยย่อ ดังนี้ รีคอมบิแนนท์โปรตีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดส ความเข้มข้น 1 ug/ml สำหรับการตรวจหาระดับ Total IgG (ZYMED, Thermoscientific, USA) และ 2 ug/ml สำหรับการตรวจหาระดับ IgM และ IgA (ZYMED, Thermoscientific, USA) ใน coating buffer จะถูกเติมลงในหลุมของ 96 well-plates (Nunc Maxi-Sorp Plate, Roskide, Denmark) หลุมละ 100 ul หลังจากนั้น ทิ้งไว้ข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 4 °C เมื่อครบเวลาจะทำการล้างโปรตีนออกด้วย wash buffer จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที ปริมาณ wash buffer ที่ใช้ในการล้างแต่ละครั้ง คือ 200 ul หลังจากล้างเสร็จแล้ว จะทำการเติม 5% skim milk ลงในแต่ละหลุม โดยเติม 200 ul/หลุม และทิ้งไว้ข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 4 °C เติม เมื่อครบเวลาจะทำการล้าง skim milk ออกด้วย wash buffer จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที ปริมาณ wash buffer ที่ใช้ในการล้างแต่ละครั้ง คือ 200 ul จากนั้น จะทำการเติมซีรัมของหนูแฮมสเตอร์ที่ dilution 1:1,000 สำหรับการตรวจหาระดับ Total IgG และ dilution 1:100 สำหรับการตรวจหาระดับ IgM และ IgA โดยเติมซีรัมที่เจือจางแล้วหลุมละ 100 ul หลังจากนั้น ทิ้งไว้ข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 4 °C เมื่อครบเวลาจะทำการล้างซีรัมออกด้วย wash buffer จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที ปริมาณ wash buffer ที่ใช้ในแต่ละครั้งที่ล้าง คือ 200 ul จากนั้น เติม secondary antibody คือ Anti-hamster conjugated Horseradish peroxidase (HRP) โดยถ้าเป็นการตรวจวัดระดับ Total IgG จะใช้ Total IgG Anti-hamster conjugated HRP ที่ dilution 1:10,000 แต่ถ้าเป็นการตรวจวัดระดับ IgM และ IgA จะใช้ IgM และ IgA Anti-hamster conjugated HRP ที่ dilution 1:1,000 โดยจะทิ้งไว้ข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 4 °C เมื่อครบเวลาจะทำการล้าง secondary antibody ออกด้วย wash buffer จำนวน 2 ครั้งๆ ละ 3 นาที และ

ล้าง Phosphate buffer saline (PBS) จำนวน 1 ครั้ง 3 นาที ปริมาณ wash buffer และ PBS ที่ใช้ในแต่ละครั้งที่ล้าง คือ 200 ul หลังจากล้างเสร็จ จะทำการเติม o-Phenylenediamine dihydrochloride (OPD) substrate solution (ZYMED, Thermoscientific, USA) ลงไป หลุมละ 100 ul ทิ้งไว้ที่ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย 0.5 M sulphuric acid (H_2SO_4) หลุมละ 100 µl หลังจากนั้นนำไปตรวจวัดด้วย ELISA reader (TECAN, Austria) ที่ค่า optimal density (OD) 492 nm

2.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

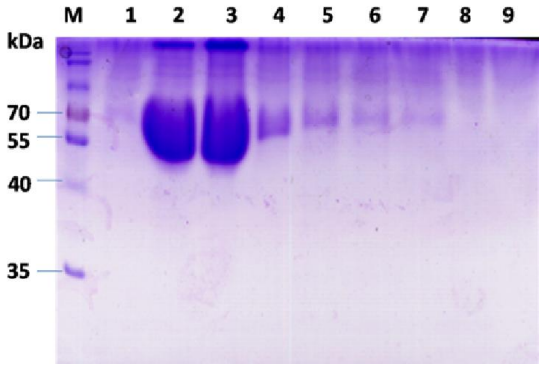
จำนวนการผลิตไข่และจำนวนพยาธิระยะตัวเต็มวัยที่พบในหนูแต่ละกลุ่ม จะถูกนำมาเปรียบเทียบโดยใช้ one way ANOVA ใน SPSS เพื่อประเมินความสามารถในการเป็นวัคซีนของลิวซีนอะมิโนเปปติเดส

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดสในแบคทีเรีย

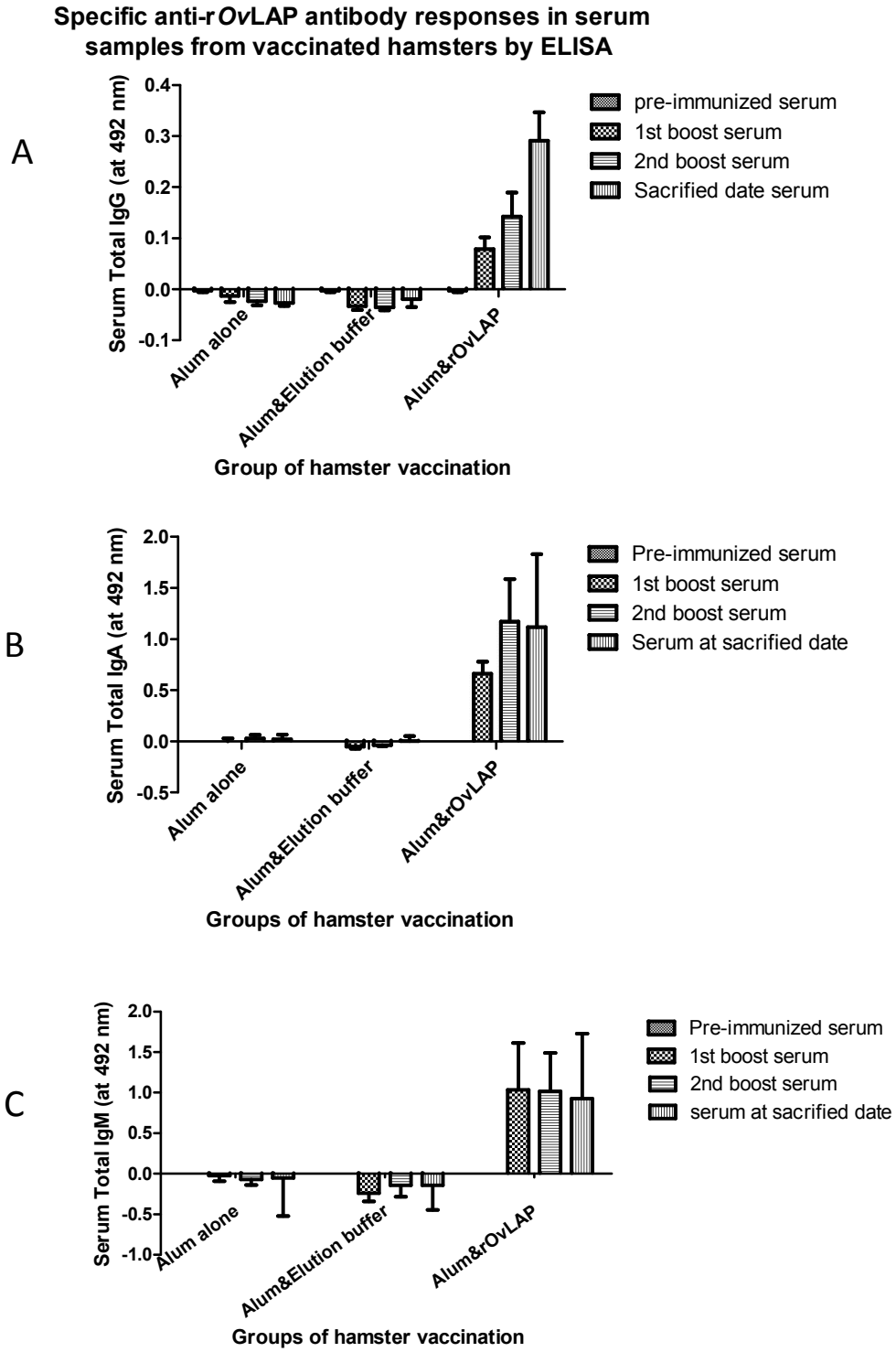
โปรตีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดสของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ถูกผลิตในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) โปรตีนที่ผลิตได้จะถูกนำมาทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยการผ่านคอลัมน์ และนำมาตรวจสอบโดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบนเจล SDS-PAGE โปรตีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดสของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 60 กิโลดาลตัน (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 โปรตีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดสของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 60 กิโลดาลตัน ที่ได้ทำให้บริสุทธิ์โดยการผ่านคอลัมน์ที่เคลือบด้วย Anti-His tag antibody (แถวที่ 1-9 คือ fraction โปรตีนที่ถูกชะออกมาจากคอลัมน์)

2. ระดับแอนติบอดีในหนูแฮมสเตอร์

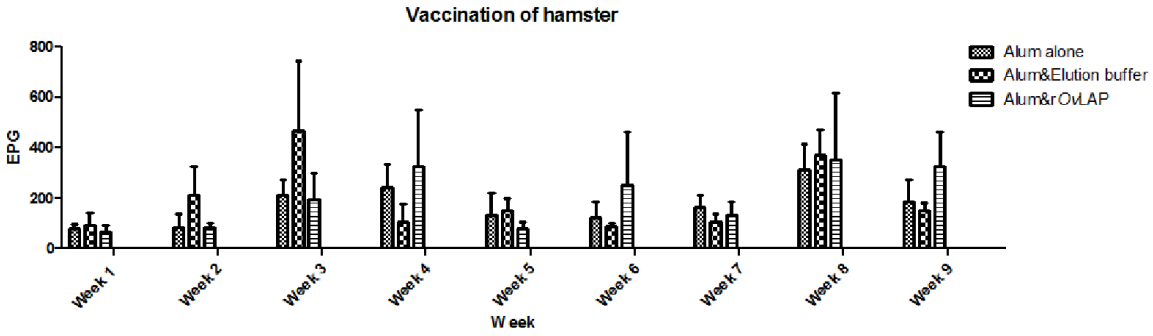
โปรตีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดสของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ที่ผลิตได้จะถูกนำมาฉีดให้กับหนูแฮมสเตอร์ โดยฉีดที่ subcutaneous บริเวณโคนขาหลังทุกๆ 2 สัปดาห์ และก่อนทำการฉีดทุกครั้ง จะมีการเจาะเลือดหนูเพื่อตรวจดูระดับแอนติบอดี IgM, IgA และ Total IgG ต่อสารโปรตีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดสด้วยเทคนิค enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เนื่องจากได้แบ่งหนูออกเป็น 3 กลุ่ม ตามสารที่ฉีดเข้าไป คือ หนูที่ฉีดด้วย alum adjuvant, alum adjuvant กับ elution buffer และ alum adjuvant กับโปรตีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดส และจากการทำ ELISA พบว่า ในซีรัมจากหนูที่ฉีดด้วย alum adjuvant กับโปรตีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดส มีระดับแอนติบอดีต่อโปรตีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดสในระดับที่สูง โดยระดับแอนติบอดียังคงมีอยู่จนถึงสัปดาห์ที่ 10 นับจากวันที่ฉีดสารครั้งสุดท้าย ในขณะที่หนูกลุ่มที่ฉีดด้วย alum adjuvant, alum adjuvant กับ elution buffer ไม่พบระดับแอนติบอดีต่อโปรตีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดส (รูปที่ 2)



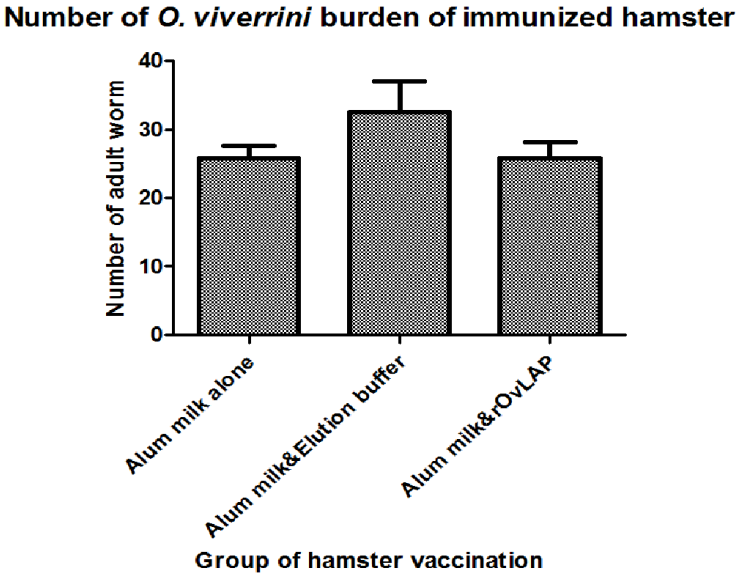
รูปที่ 2 ระดับแอนติบอดี Total IgG (A), IgA (B) และ IgM (C) ต่อโปรตีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดสของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ในหนูแฮมสเตอร์ที่ฉีดด้วย alum adjuvant, alum adjuvant กับ elution buffer และ alum adjuvant กับรีคอมบิแนท์โปรตีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดส พบว่ากลุ่มที่ฉีดด้วย alum adjuvant และ alum adjuvant กับ elution buffer ไม่มีแอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดส แต่ในกลุ่มที่ฉีดด้วย alum adjuvant กับรีคอมบิแนท์โปรตีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดส พบระดับแอนติบอดีต่อรีคอมบิแนท์โปรตีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดสในระดับสูงจนถึงสัปดาห์ที่ 9 หลังจากการฉีดสารครั้งสุดท้าย โดยมีระดับระดับแอนติบอดีชนิด IgA สูงมากกว่า IgM และ Total IgG ตามลำดับ

3. การตรวจพบไข่พยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ในอุจจาระของหนูแฮมสเตอร์

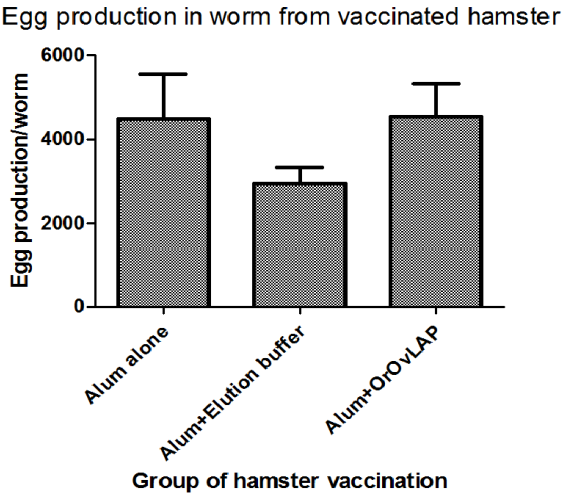
หลังจากทำการฉีดสารให้หนูแฮมสเตอร์ครบตามที่กำหนดแล้ว 2 สัปดาห์หลังจากการฉีดสารครั้งสุดท้าย จะทำการทำให้หนูติดพยาธิใบไม้ตับโดยการป้อนระยะติดต่อ metacercariae จำนวน 50 metacercariae ต่อหนู 1 ตัว หลังจากนั้น 1 เดือน จะทำการเก็บอุจจาระหนูเพื่อนำมาตรวจหาไข่พยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ด้วยเทคนิค formaline concentration โดยจะทำการเก็บอุจจาระหนูทุกสัปดาห์ๆ ละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 8 สัปดาห์ เมื่อถึงสัปดาห์ที่ 9 จะทำการฆ่าหนู โดยจะเก็บอุจจาระจากส่วนลำไส้มาตรวจนับจำนวนไข่พยาธิ (รูปที่ 3) เก็บตับหนูเพื่อมาแยกและนับจำนวนพยาธิใบไม้ตับระยะตัวเต็มวัย โดยพบว่าหนูแฮมสเตอร์ที่ฉีดด้วย alum adjuvant กับรีคอมบิแนท์โปรตีนลีวซีนอะมิโนเปปติเดส มีจำนวนพยาธิระยะตัวเต็มวัยลดลงจากหนูแฮมสเตอร์ที่ฉีดด้วย alum adjuvant กับ elution buffer คิดเป็น 20.77% แต่อย่างไรก็ตามการลดลงของจำนวนพยาธิไม่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (รูปที่ 4) นอกจากนั้นพยาธิจากหนูแต่ละตัวจะถูกนำมาทำให้แตกเพื่อตรวจนับจำนวนไข่พยาธิที่พยาธิแต่ละตัวสามารถผลิตได้ (รูปที่ 5) ซึ่งพบว่า พยาธิที่ได้จากหนูที่ฉีดด้วย alum adjuvant กับรีคอมบิแนท์โปรตีนลีวซีนอะมิโนเปปติเดส มีอัตราการผลิตไข่พยาธิมากกว่าพยาธิที่ได้จากหนูที่ฉีดด้วย alum adjuvant กับ elution buffer แต่การผลิตไข่ของพยาธิที่ได้จากหนู 2 กลุ่มนี้ ไม่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



รูปที่ 3 จำนวนไข่พยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ที่ตรวจพบในอุจจาระหนูแฮมสเตอร์กลุ่มต่างๆ เป็นเวลา 9 สัปดาห์



รูปที่ 4 จำนวนพยาธิระยะตัวเต็มวัยที่ตรวจพบในหนูแฮมสเตอร์กลุ่มต่างๆ พบว่าหนูแฮมสเตอร์ที่ฉีดด้วย alum adjuvant กับรีคอมบิแนท์โปรตีนลีวซีนอะมิโนเปปติเดส มีจำนวนพยาธิระยะตัวเต็มวัยลดลงจากหนูแฮมสเตอร์ที่ฉีดด้วย alum adjuvant กับ elution buffer คิดเป็น 20.77% (P<0.05)



รูปที่ 5 จำนวนไข่พยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ที่ได้จากหนูแฮมสเตอร์ที่ถูกฉีดด้วยสารต่างๆ ผลิตได้ พยาธิที่ได้จากหนูที่ฉีดด้วย alum adjuvant กับรีคอมบิแนท์โปรตีนลีวซีนอะมิโนเปปติเดส มีอัตราการผลิตไข่พยาธิมากกว่าพยาธิที่ได้จากหนูที่ฉีดด้วย alum adjuvant กับ elution buffer แต่การผลิตไข่ของพยาธิที่ได้จากหนู 2 กลุ่มนี้ ไม่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

ลิวซีนอะมิโนเปปติเดสเป็นเอ็นไซม์ในกลุ่มเมทัลโลโปรตีเอสที่ต้องอาศัยโมเลกุลโลหะหรือไอออนต่างๆ เช่น Mg^{2+} และ Ca^{2+} (Matsui, Fowler, and Walling, 2006) มาช่วยทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ดีขึ้น โดยในหนอนพยาธิ ได้มีการรายงานการค้นพบเอ็นไซม์ชนิดนี้ในพยาธิหลายชนิด เช่น *Fasciola* spp. (Acosta, Goni, and Carmona, 1998; Changklungmoa et al., 2012), *Clonorchis sinensis* (Kang et al., 2012), *Schistosome* spp. (McCarthy et al., 2004) เป็นต้น เอ็นไซม์นี้มีบทบาทต่างๆ กันในพยาธิแต่ละชนิด อย่างไรก็ตาม บทบาทของเอ็นไซม์ลิวซีนอะมิโนเปปติเดส คือ ช่วยในการเจริญเติบโตของพยาธิ เช่น ช่วยในการกินอาหาร โดยย่อยอาหารที่พยาธิได้รับมาจากโฮสต์ให้อยู่ในรูปที่พยาธิสามารถดูดซึมไปใช้ได้ (Caffrey et al., 2004) นอกจากนั้น ยังพบอีกว่าเอ็นไซม์ชนิดนี้มีการทำงานภายในเซลล์ ดังนั้น เอ็นไซม์ชนิดนี้จึงไม่สัมผัสกับระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ นอกจากพยาธิจะถูกทำลายด้วยสาร เช่น ยาฆ่าพยาธิซึ่งทำให้พยาธิตายและตัวพยาธิถูกย่อยทำลายด้วยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายโฮสต์ เอ็นไซม์ชนิดนี้จึงจะหลั่งออกนอกเซลล์ของพยาธิและสัมผัสกับระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ในที่สุด จากคุณสมบัตินี้ ทำให้เอ็นไซม์ชนิดนี้สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้เป็นอย่างดี โดยดูได้จากระดับแอนติบอดีของหนูแฮมสเตอร์ที่ฉีดด้วยโปรตีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดสร่วมกับ alum adjuvant พบว่าระดับแอนติบอดีทั้ง Total IgG, IgM และ IgA มีระดับสูงขึ้นเรื่อยๆ แม้จะผ่านมาถึงสัปดาห์ที่ 10 หลังจากการฉีดสารครั้งสุดท้าย และในการศึกษานี้ ยังพบว่า ระดับแอนติบอดีชนิด IgA มีระดับสูงมากกว่า IgM และ Total IgG ตามลำดับ ซึ่งแอนติบอดีชนิด IgA และ IgM จะเป็นแอนติบอดีที่มีบทบาทในการต่อต้านเชื้อจุลชีพที่เข้าสู่ร่างกายทางระบบทางเดินอาหาร ระบบหายใจและทางกระแสเลือด ตามลำดับ และแอนติบอดีชนิด IgM จะเป็นแอนติบอดีชนิดแรกที่ถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นมาหลังจากที่ร่างกายได้รับแอนติเจนครั้งแรก ส่วนแอนติบอดีชนิด IgA นั้น สามารถพบได้ใน secretion ของร่างกาย จากการศึกษานี้ อาจคาดการณ์ได้ว่าแอนติบอดีที่มีบทบาทในการลดจำนวนพยาธิตัวเต็มวัยในหนูแฮมสเตอร์ คือ แอนติบอดีชนิด IgA และ IgM เนื่องจากมีระดับที่สูงกว่า แอนติบอดีชนิด IgG และจากบทบาทของ IgA และ IgM อาจคาดการณ์ได้ว่าการการลดจำนวนพยาธิอาจเกิดขึ้นในระยะแรกของการติดเชื้อ โดยอาจเกิดขึ้นหลังจากที่พยาธิมีการเจริญเติบโตจากระยะ metacercariae

อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าระดับแอนติบอดียังปรากฏอยู่จนกระทั่งถึงวันที่เก็บตัวอย่างพยาธิ แต่แอนติบอดีที่สูงขึ้น ก็ไม่ได้มีผลอย่างชัดเจนต่อการลดลงของพยาธิระยะตัวเต็มวัย แสดงให้เห็นว่า อาจมีแอนติบอดีที่ถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นเพียงบางส่วนที่สามารถเข้าไปถึงตำแหน่งที่พยาธิอาศัยอยู่และมีโอกาสสัมผัสหรือยับยั้งเอ็นไซม์ลิวซีนอะมิโนเปปติเดสได้ ดังนั้น การพัฒนาวัคซีนหรือยาต้านการติดพยาธินอกจากจะศึกษาการออกฤทธิ์/ความจำเพาะต่อพยาธิแล้ว ก็ควรที่จะมีการศึกษาเส้นทางหรือวิธีจะนำวัคซีนหรือยานั้นๆ ไปยังตำแหน่งท่อน้ำดีซึ่งเป็นที่อยู่อาศัยของพยาธิ หรืออาจมีการทำลายตัวพยาธิตั้งแต่ในระยะแรกที่ติดเชื้อให้ได้มากที่สุด ซึ่งในระยะแรก ตัวอ่อนที่พัฒนาจากระยะ metacercariae จะเดินทางจากลำไส้เล็กไปยังบริเวณท่อน้ำดีและถุงน้ำดี

ถึงแม้ว่า แอนติบอดีที่ถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นในการศึกษา จะไม่สามารถลดจำนวนการติดพยาธิได้อย่างมีนัยสำคัญ แต่พบว่า แอนติบอดีที่ถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นก็เป็นส่วนหนึ่งในการลดจำนวนพยาธิ พบว่าแอนติบอดีที่ถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นมานั้น สามารถอยู่ได้นานถึง 10 สัปดาห์หรืออาจมากกว่านั้นก็เป็นได้ แสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติด้านการเป็น immunogen ของโปรตีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดส

เอกสารอ้างอิง

(1994). Infection with liver flukes (*Opisthorchis viverrini*, *Opisthorchis felineus* and *Clonorchis sinensis*). *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* **61,** 121-75.

Acosta, D., Cancela, M., Piacenza, L., Roche, L., Carmona, C., and Tort, J. F. (2008). *Fasciola hepatica* leucine aminopeptidase, a promising candidate for vaccination against ruminant fasciolosis. *Mol Biochem Parasitol* **158**(1)**,** 52-64.

Acosta, D., Goni, F., and Carmona, C. (1998). Characterization and partial purification of a leucine aminopeptidase from *Fasciola hepatica*. *J Parasitol* **84**(1)**,** 1-7.

Buffoni, L., Martinez-Moreno, F. J., Zafra, R., Mendes, R. E., Perez-Ecija, A., Sekiya, M., Mulcahy, G., Perez, J., and Martinez-Moreno, A. (2012). Humoral immune response in goats immunised with cathepsin L1, peroxiredoxin and Sm14 antigen and experimentally challenged with *Fasciola hepatica*. *Vet Parasitol* **185**(2-4)**,** 315-21.

Caffrey, C. R., McKerrow, J. H., Salter, J. P., and Sajid, M. (2004). Blood 'n' guts: an update on schistosome digestive peptidases. *Trends Parasitol* **20**(5)**,** 241-8.

Changklungmoa, N., Chaithirayanon, K., Kueakhai, P., Meemon, K., Riengrojpitak, S., and Sobhon, P. (2012). Molecular cloning and characterization of leucine aminopeptidase from *Fasciola gigantica*. *Exp Parasitol* **131**(3)**,** 283-91.

Hewitson, J. P., and Maizels, R. M. (2014). Vaccination against helminth parasite infections. *Expert Rev Vaccines* **13**(4)**,** 473-87.

Hotez, P. J., Diemert, D., Bacon, K. M., Beaumier, C., Bethony, J. M., Bottazzi, M. E., Brooker, S., Couto, A. R., Freire Mda, S., Homma, A., Lee, B. Y., Loukas, A., Loblack, M., Morel, C. M., Oliveira, R. C., and Russell, P. K. (2013). The Human Hookworm Vaccine. *Vaccine* **31 Suppl 2,** B227-32.

Kang, J. M., Ju, H. L., Ju, J. W., Sohn, W. M., Kim, T. S., Bahk, Y. Y., Hong, S. J., and Na, B. K. (2012). Comparative biochemical and functional properties of two leucine aminopeptidases of *Clonorchis sinensis*. *Mol Biochem Parasitol* **182**(1-2)**,** 17-26.

Laha, T., Sripa, J., Sripa, B., Pearson, M., Tribolet, L., Kaewkes, S., Sithithaworn, P., Brindley, P. J., and Loukas, A. (2008). Asparaginyl endopeptidase from the carcinogenic liver fluke, *Opisthorchis viverrini*, and its potential for serodiagnosis. *Int J Infect Dis* **12**(6)**,** e49-59.

Maggioli, G., Acosta, D., Silveira, F., Rossi, S., Giacaman, S., Basika, T., Gayo, V., Rosadilla, D., Roche, L., Tort, J., and Carmona, C. (2010). The recombinant gut-associated M17 leucine aminopeptidase in combination with different adjuvants confers a high level of protection against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Vaccine* **29**(48)**,** 9057-63.

Marcilla, A., De la Rubia, J. E., Sotillo, J., Bernal, D., Carmona, C., Villavicencio, Z., Acosta, D., Tort, J., Bornay, F. J., Esteban, J. G., and Toledo, R. (2008). Leucine aminopeptidase is an immunodominant antigen of *Fasciola hepatica* excretory and secretory products in human infections. *Clin Vaccine Immunol* **15**(1)**,** 95-100.

Matsui, M., Fowler, J. H., and Walling, L. L. (2006). Leucine aminopeptidases: diversity in structure and function. *Biol Chem* **387**(12)**,** 1535-44.

McCarthy, E., Stack, C., Donnelly, S. M., Doyle, S., Mann, V. H., Brindley, P. J., Stewart, M., Day, T. A., Maule, A. G., and Dalton, J. P. (2004). Leucine aminopeptidase of the human blood flukes, *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *Int J Parasitol* **34**(6)**,** 703-14.

Pinheiro, C. S., Ribeiro, A. P., Cardoso, F. C., Martins, V. P., Figueiredo, B. C., Assis, N. R., Morais, S. B., Caliari, M. V., Loukas, A., and Oliveira, S. C. (2014). A multivalent chimeric vaccine composed of *Schistosoma mansoni* SmTSP-2 and Sm29 was able to induce protection against infection in mice. *Parasite Immunol* **36**(7)**,** 303-12.

Pinlaor, P., Kaewpitoon, N., Laha, T., Sripa, B., Kaewkes, S., Morales, M. E., Mann, V. H., Parriott, S. K., Suttiprapa, S., Robinson, M. W., To, J., Dalton, J. P., Loukas, A., and Brindley, P. J. (2009). Cathepsin F cysteine protease of the human liver fluke, *Opisthorchis viverrini*. *PLoS Negl Trop Dis* **3**(3)**,** e398.

Sripa, B., Bethony, J. M., Sithithaworn, P., Kaewkes, S., Mairiang, E., Loukas, A., Mulvenna, J., Laha, T., Hotez, P. J., and Brindley, P. J. Opisthorchiasis and Opisthorchis-associated cholangiocarcinoma in Thailand and Laos. *Acta Trop* **120 Suppl 1,** S158-68.

Sripa, J., Laha, T., To, J., Brindley, P. J., Sripa, B., Kaewkes, S., Dalton, J. P., and Robinson, M. W. Secreted cysteine proteases of the carcinogenic liver fluke, *Opisthorchis viverrini*: regulation of cathepsin F activation by autocatalysis and trans-processing by cathepsin B. *Cell Microbiol* **12**(6)**,** 781-95.

Sripa, J., Laha, T., To, J., Brindley, P. J., Sripa, B., Kaewkes, S., Dalton, J. P., and Robinson, M. W. (2010). Secreted cysteine proteases of the carcinogenic liver fluke, *Opisthorchis viverrini*: regulation of cathepsin F activation by autocatalysis and trans-processing by cathepsin B. *Cell Microbiol* **12**(6)**,** 781-95.

Suttiprapa, S., Mulvenna, J., Huong, N. T., Pearson, M. S., Brindley, P. J., Laha, T., Wongkham, S., Kaewkes, S., Sripa, B., and Loukas, A. (2009). Ov-APR-1, an aspartic protease from the carcinogenic liver fluke, *Opisthorchis viverrini*: functional expression, immunolocalization and subsite specificity. *Int J Biochem Cell Biol* **41**(5)**,** 1148-56.

Xu, Y. Z., and Dresden, M. H. (1986). Leucine aminopeptidase and hatching of *Schistosoma mansoni* eggs. *J Parasitol* **72**(4)**,** 507-11.