รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การประเมินการเป็นวัคซีนของลิวซีนอะมิโนเปปติเดสต่อการติดพยาธิออพิสทอร์คิส วิเวอรินิ

โดย นางสาวจิตติยวดี ศรีภา และคณะ

กันยายน พ.ศ. 2557

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การประเมินการเป็นวัคซีนของลิวซีนอะมิโนเปปติเดสต่อการติดพยาธิออพิสทอร์คิส วิเวอรินิ

คณะผู้วิจัย

1. นางสาวจิตติยวดี ศรีภา	วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
2. นายเทวราช หล้าหา	ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
3. นายบรรจบ ศรีภา	ศูนย์วิจัยโรคเขตร้อน ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สนับสนุนโดย มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย ม.อุบลฯ ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยในหัวข้อ “การประเมินการเป็นวัคซีนของลิวซีนอะมิโนเปปติเดสต่อการติดพยาธิออพิสทอร์คิส วิเวอรินิ” สำเร็จลุล่วงลงได้ด้วยด้วยความอนุเคราะห์จากงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ 2557 มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.บรรจบ ศรีภา และ รศ.ดร.เทวราช หล้าหา ที่กรุณาให้คำแนะนำ ชี้แนะในเรื่องการทำวิจัย ตลอดจนอำนวยความสะดวกในเรื่องสถานที่ อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีในการทำวิจัยในระหว่างที่ทำการวิจัยที่คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่รวมทั้งนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาศูนย์วิจัยโรคเขตร้อน ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และเจ้าหน้าที่รวมทั้งนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในระหว่างการทำวิจัยที่คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ ท่านคณบดีวิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี รศ.นพ.ป่วน สุทธิพินิจธรรม ที่กรุณาอนุญาตผู้วิจัยให้ไปทำวิจัยที่คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จนทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้

จิตติยวดี ศรีภา

บทสรุปผู้บริหาร

ลิวซีนอะมิโนเปปติเดสเป็นเอ็นไซม์ในกลุ่มเมทัลโลโปรติเอสที่พบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ทั้งสิ่งมีชีวิตที่มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลัง โดยมีการพบว่าลิวซีนอะมิโนเปปติเดสทำหน้าที่หลายอย่างเพื่อให้สิ่งมีชีวิตสามารถดำรงชีวิตและเจริญเติบโตต่อไปได้ ในหนอนพยาธิ พบว่า ลิวซีนอะมิโนเปปติเดสมีบทบาทสำคัญในการกินอาหารของพยาธิ โดยลิวซีนอะมิโนเปปติเดสจะทำหน้าที่ย่อยเปปไทด์สายสั้นๆ ให้กลายเป็นกรดอะมิโนที่สามารถดูดซึมไปใช้ในการเจริญเติบโตของพยาธิต่อไป

การยั้บยั้งการทำงานของลิวซีนอะมิโนเปปติเดสในพยาธิใบไม้ตับ ออร์พิสทอร์คิส วิเวอรินิ จึงน่าจะเป็นการยับยั้งขบวนการกินอาหารของพยาธิได้ ในการศึกษานี้ จึงได้ทดลองโดยการนำรีคอมบิแนท์โปรตีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดสที่ผลิตได้ในแบคทีเรีย มาผสมเข้ากันเป็นอย่างดีกับ alum adjuvant และฉีดให้หนูแฮมสเตอร์ที่บริเวณผิวหนัง หลังจากนั้นจึงทำให้หนูแฮมสเตอร์ติดพยาธิใบไม้ตับ โดยการป้อนระยะติดต่อของพยาธิเข้าทางปากหนู หลังจากนั้น 1 เดือน ได้ทำการเก็บอุจจาระหนูทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 9 สัปดาห์ เพื่อตรวจหาไข่พยาธิใบไม้ตับและประเมินความหนาแน่นของไข่พยาธิต่ออุจจาระ 1 กรัม ซึ่งพบว่า ในหนูแฮมสเตอร์ที่ฉีดด้วยรีคอมบิแนท์โปรตีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดสมีความหนาแน่นของไข่พยาธิเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ แต่ความหนาแน่นของไข่พยาธิไม่ได้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นหนูแฮมสเตอร์ที่ฉีดด้วย alum adjuvant อย่างเดียว และ alum adjuvant ผสมกับ elution buffer นอกจากนั้น พยาธิที่พบในในกลุ่มที่ฉีดด้วยรีคอมบิแนท์โปรตีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดสยังมีอัตราการผลิตไข่พยาธิในอัตราที่สูงกว่าพยาธิที่ได้จากกลุ่มควบคุม แต่อัตราการผลิตไข่ที่สูงขึ้นนั้น ก็ไม่ได้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน และในการศึกษานี้พบว่าในหนูแฮมสเตอร์ที่ฉีดด้วยรีคอมบิแนท์โปรตีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดสมีการตรวจพบจำนวนพยาธิใบไม้ตับในท่อน้ำดีของตับหนูน้อยกว่ากลุ่มควบคุม โดยพบพยาธิระยะตัวเต็มวัยน้อยกว่าถึง 20.77% นอกจากนั้น เมื่อตรวจดูระดับแอนติบอดีต่อรีคอมบิแนท์โปรตีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดส พบว่า หนูแฮมสเตอร์ที่ฉีดด้วยรีคอมบิแนท์โปรตีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดสมีระดับแอนติบอดีต่อโปรตีนชนิดนี้สูงขึ้นเรื่อยๆ จนถึงสัปดาห์ที่ 9 ของการศึกษา โดยมีระดับแอนติบอดีชนิด IgA สูงกว่า IgM และ Total IgG ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่ารีคอมบิแนท์โปรตีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดสมีคุณสมบัติในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูแฮมสเตอร์ได้เป็นอย่างดี แต่แอนติบอดีที่ถูกกระตุ้นขึ้นมาสามารถลดหรือป้องกันการติดพยาธิใบไม้ตับ ออร์พิสทอร์คิส วิเวอรินิ ได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น

จากการศึกษา แสดงให้เห็นว่าอาจมีแอนติบอดีเพียงบางส่วนที่มีโอกาสสัมผัสกับตัวพยาธิ ซึ่งอาจเกิดจาก แอนติบอดีที่ถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นมาไม่สามารถเข้าไปยังตำแหน่งท่อน้ำดีหรือบริเวณที่พยาธิอาศัยอยู่ได้ ในการศึกษาต่อไป จึงควรศึกษาวิธีนำแอนติบอดีที่จำเพาะต่อพยาธิ/วัคซีน/ยา ไปยังตำแหน่งที่พยาธิอาศัยอยู่เพื่อจะได้ทำลายพยาธิได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น หรืออาจมีการทำลายพยาธิตั้งแต่ในระยะแรกของการติดเชื้อซึ่งพยาธิจะมีการเดินทางจากลำไส้เล็กไปยังท่อน้ำดี ซึ่งการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในระบบทางเดินอาหารน่าจะทำได้ง่ายกว่าการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในท่อน้ำดี

บทคัดย่อ

ลิวซีนอะมิโนเปปติเดสเป็นเอ็นไซม์ในกลุ่มเมทัลโลโปรติเอสที่พบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ในพยาธิใบไม้ตับออร์พิสทอร์คิส วิเวอรินิ มีการศึกษาคุณลักษณะของเอ็นไซม์ชนิดนี้ และพบว่าเอ็นไซม์ลิวซีนอะมิโนเปปติเดสมีความเหมาะสมในการพัฒนาเป็นวัคซีน เพื่อลดการเจริญเติบโตและลดอัตราการติดพยาธิใบไม้ตับในโฮสต์ จึงได้ทำการศึกษาการเป็นวัคซีนในหนูแฮมสเตอร์ซึ่งถูกกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดสโดยผสมกับ alum adjuvant พยาธิใบไม้ตับที่ได้จากหนูแฮมสเตอร์ที่กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดสร่วมกับ alum adjuvant มีอัตราการผลิตไข่สูงกว่าพยาธิใบไม้ตับที่ได้จากหนูแฮมสเตอร์ที่ถูกกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันด้วย alum adjuvant อย่างเดียว และ alum adjuvant ร่วมกับ elution buffer ($P<0.05$) และเมื่อนับจำนวนพยาธิระยะตัวเต็มวัยที่พบในท่อน้ำดีในตับของแฮมสเตอร์ที่ถูกฉีดด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดส พบว่า มีจำนวนพยาธิน้อยกว่าจำนวนพยาธิที่พบในกลุ่มควบคุม 20.77% ($P<0.05$) และเมื่อดูระดับแอนติบอดีต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดส พบว่า ระดับแอนติบอดีสูงขึ้นและยังคงมีอยู่จนถึงสัปดาห์ที่ 9 นับจากวันที่ฉีดรีคอมบิแนนท์โปรตีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดสเพื่อกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของแฮมสเตอร์ แสดงให้เห็นว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดสมีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนที่ดีในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์เพื่อป้องกันการติดพยาธิใบไม้ตับ ออร์พิสทอร์คิส วิเวอรินิ

คำสำคัญ : ออร์พิสทอร์คิส วิเวอรินิ, ลิวซีนอะมิโนเปปติเดส, วัคซีน

Abstract

Leucine aminopeptidase, the metalloprotease that found in many organisms both vertebrate and invertebrate was characterized in liver fluke, *Opisthorchis viverrini*. From characterization, *O. viverrini* leucine aminopeptidase (*Ov*LAP) was attractive for vaccine candidate against *O. viverrini* infection in strategy of decrease infection and worm growth. Syrian golden hamsters were used to test the ability of recombinant *Ov*LAP (r*Ov*LAP) protein as potential vaccine antigen. Hamsters vaccinated with alum adjuvant formulated with r*Ov*LAP protein were presented the increase of egg production per worm ($P<0.05$) but the worm reduction was 20.77% when compared with hamster vaccinated with alum adjuvant alone and alum adjuvant formulated with elution buffer ($P<0.05$). Moreover, hamsters anti serum level against r*Ov*LAP protein were increased and remained until week 9 of experiment. From this study indicated that r*Ov*LAP protein is a good antigen for induction host immunity against *O. viverrini* infection.

Key words : *Opisthorchis viverrini*, Leucine aminopeptidase, Vaccine

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทสรุปผู้บริหาร	ii
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	iii
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	iv
สารบัญเรื่อง	v
สารบัญรูปภาพ	vi
บทที่ 1 บทนำ	1
1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาวิจัย	1
2. วัตถุประสงค์	1
3. ขอบเขตงานวิจัย	2
4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	5
1. กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	5
2. วิธีดำเนินการวิจัย	5
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	8
1. การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนลีวซีนอะมิโนเปปติเดสในแบคทีเรีย	8
2. ระดับแอนติบอดีในหนูแฮมสเตอร์	8
3. การตรวจพบไข่พยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ในอุจจาระของหนูแฮมสเตอร์	10
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	12
เอกสารอ้างอิง	14
ภาคผนวก	16
ประวัตินักวิจัย	17

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 โปรตีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดสของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* 8
รูปที่ 2 ระดับแอนติบอดีต่อโปรตีนลีวซีนอะมิโนเปปติเดสของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* 9
รูปที่ 3 จำนวนไข่พยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ที่ตรวจพบในอุจจาระหนูแฮมสเตอร์ 10
รูปที่ 4 จำนวนพยาธิระยะตัวเต็มวัยที่ตรวจพบในหนูแฮมสเตอร์ 11
รูปที่ 5 จำนวนไข่พยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ที่ได้จากหนูแฮมสเตอร์ 11

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

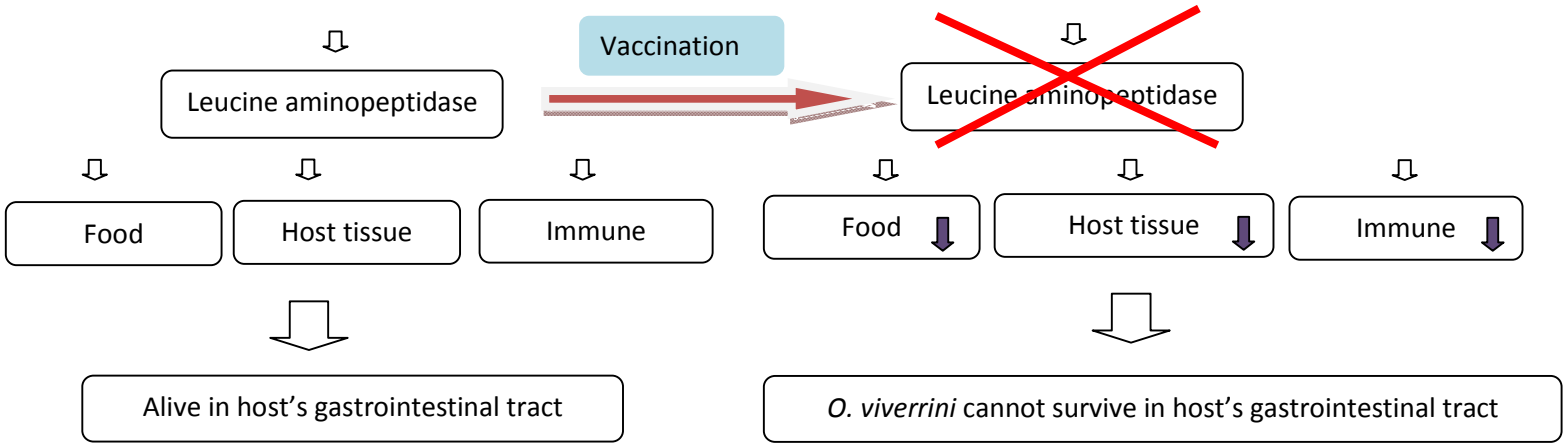
เอ็นไซม์ชนิดนี้มีบทบาทในการฟักเป็นตัวอ่อนของพยาธิด้วย (Xu and Dresden, 1986) และในการศึกษาการติดพยาธิ *Fasciola* spp. ของแกะพบว่าเอ็นไซม์ลิวซีนอะมิโนเปปติเดสของ *Fasciola* spp. มีคุณสมบัติในการเป็นวัคซีนเพื่อป้องกันการติดพยาธิได้ โดยพบการติดพยาธิลดลงถึง 89% (Acosta et al., 2008) (Maggioli et al.,2010)

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

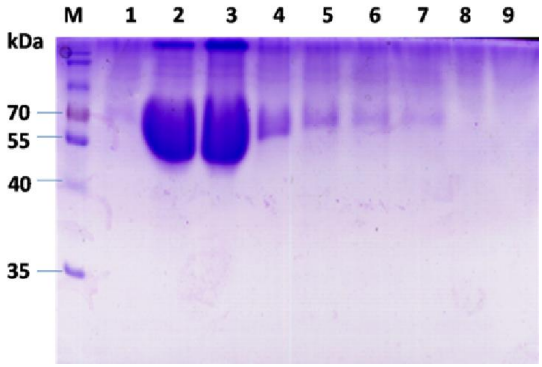
จำนวนการผลิตไข่และจำนวนพยาธิระยะตัวเต็มวัยที่พบในหนูแต่ละกลุ่ม จะถูกนำมาเปรียบเทียบโดยใช้ one way ANOVA ใน SPSS เพื่อประเมินความสามารถในการเป็นวัคซีนของลิวซีนอะมิโนเปปติเดส

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดสในแบคทีเรีย

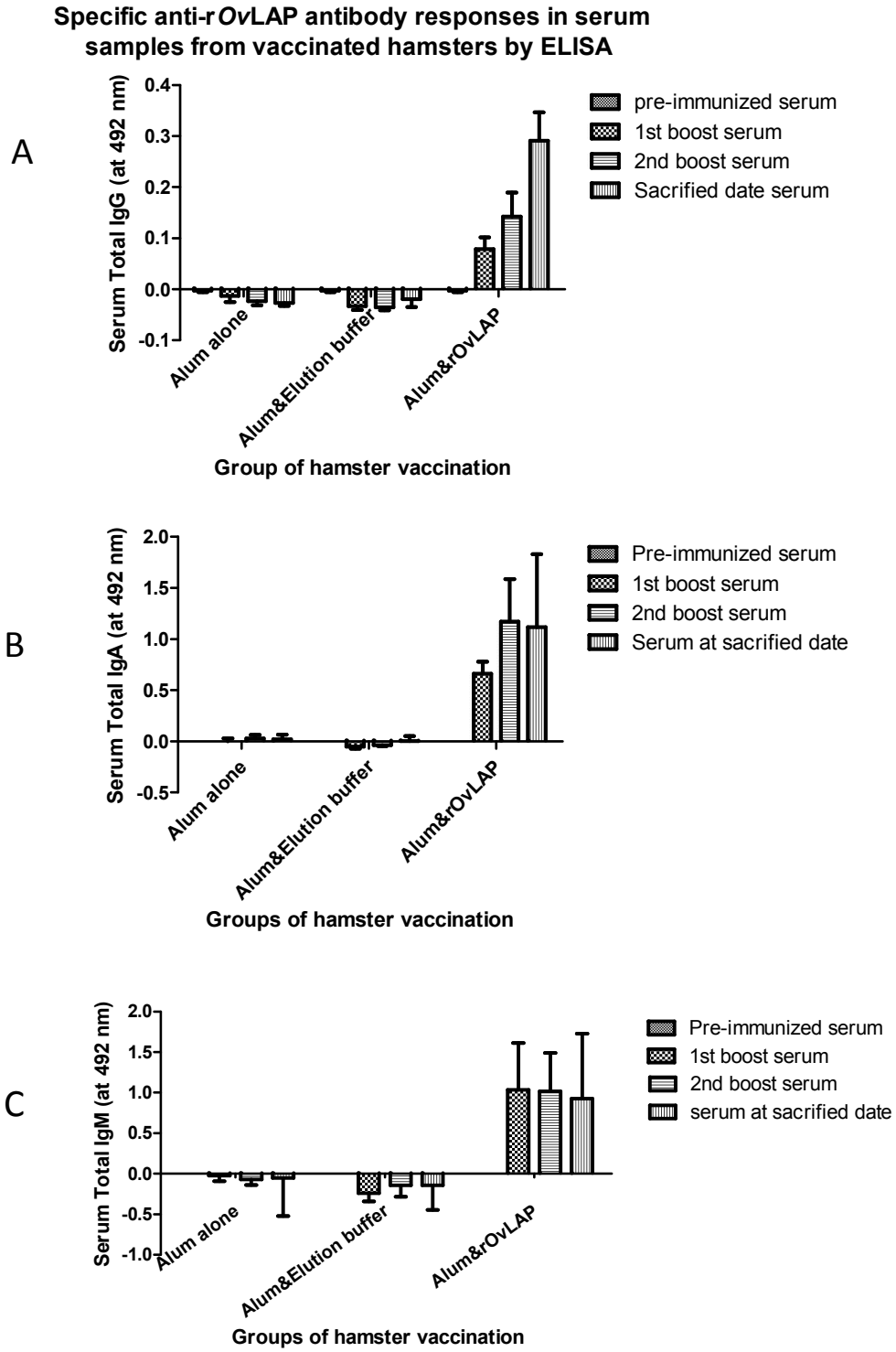
โปรตีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดสของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ถูกผลิตในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) โปรตีนที่ผลิตได้จะถูกนำมาทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยการผ่านคอลัมน์ และนำมาตรวจสอบโดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบนเจล SDS-PAGE โปรตีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดสของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ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

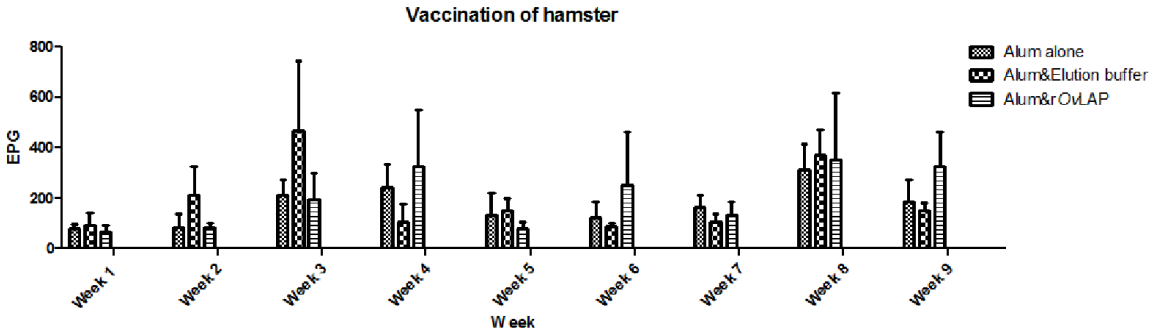
โปรตีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดสของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ที่ผลิตได้จะถูกนำมาฉีดให้กับหนูแฮมสเตอร์ โดยฉีดที่ subcutaneous บริเวณโคนขาหลังทุกๆ 2 สัปดาห์ และก่อนทำการฉีดทุกครั้ง จะมีการเจาะเลือดหนูเพื่อตรวจดูระดับแอนติบอดี IgM, IgA และ Total IgG ต่อสารโปรตีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดสด้วยเทคนิค enzyme-linked 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)



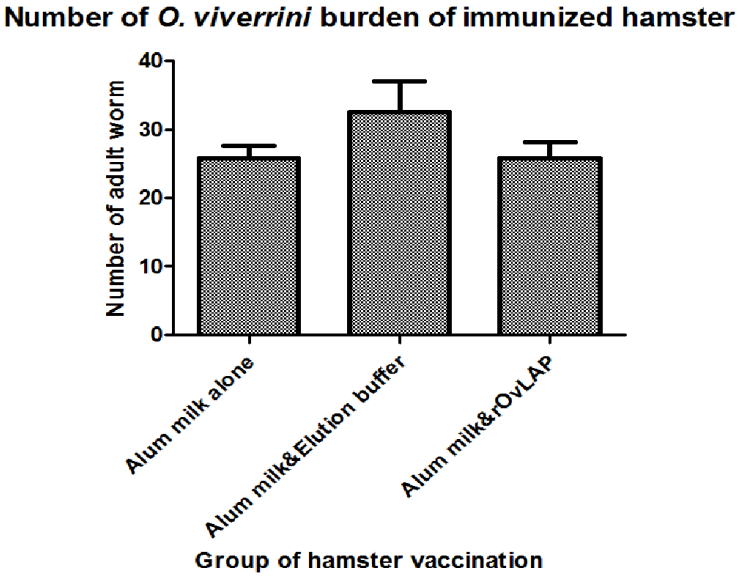
รูปที่ 2 ระดับแอนติบอดี Total IgG (A), IgA (B) และ IgM (C) ต่อโปรตีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดสของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ในหนูแฮมสเตอร์ที่ฉีดด้วย alum adjuvant, alum adjuvant กับ elution buffer และ alum adjuvant กับรีคอมบิแนท์โปรตีนลิวซีนอะมิโนเปปติเดส พบว่ากลุ่มที่ฉีดด้วย alum adjuvant และ alum adjuvant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

3. การตรวจพบไข่พยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ในอุจจาระของหนูแฮมสเตอร์

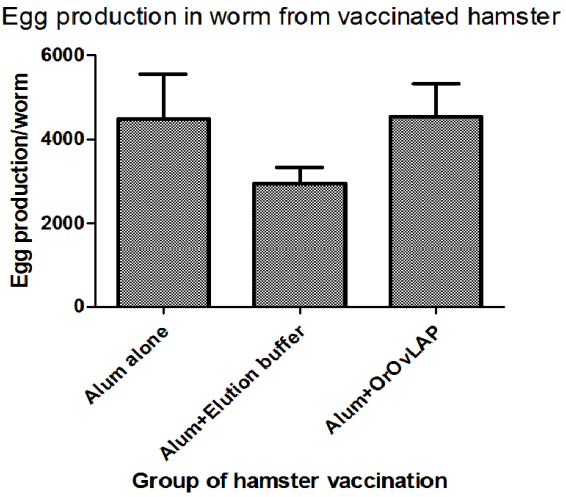
หลังจากทำการฉีดสารให้หนูแฮมสเตอร์ครบตามที่กำหนดแล้ว 2 สัปดาห์หลังจากการฉีดสารครั้งสุดท้าย จะทำการทำให้หนูติดพยาธิใบไม้ตับโดยการป้อนระยะติดต่อ metacercariae จำนวน 50 metacercariae ต่อหนู 1 ตัว หลังจากนั้น 1 เดือน จะทำการเก็บอุจจาระหนูเพื่อนำมาตรวจหาไข่พยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ด้วยเทคนิค formaline 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.

ภาคผนวก

Evaluation of recombinant leucine aminopeptidase as vaccine antigen against *opisthorchis viverrini* infection

Jittiyawadee Sripa[1*], Banchob Sripa[2], Thewarach Laha[3]

[1]College of Medicine and Public Health, Ubon Ratchathani University, Thailand

[2]Tropical Disease Research Laboratory, Department of Pathology, Khon Kaen University, Thailand

[3]Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand

Abstract

Leucine aminopeptidase, the methalloprotease of liver fluke, *Opisthorchis viverrini* (*Ov*LAP) was produced as active recombinant protein in bacteria and tested potential as vaccine in strategy of decrease infection. Active r*Ov*LAP was emulsified with aluminium hydroxide and injected to syrian golden hamsters in the test group (5 hamsters) via subcutaneous route. The control groups were injected with aluminium hydroxide and aluminium hydroxide emulsified with elution buffer, respectively. Infection was induced by orally with *O. viverrini* metacercariae after complete course of injection. High level of humoral immunity of hamster including IgM, IgA and IgG was detected in test group. This immunity was present in serum and persisted in high level throughout course of experiment. Inducted immunity, IgM, IgG and IgA were also present in bile but those antibodies level were detected in lower level than in serum. In test group, partial protection was observed with 20.77% of worm reduction ($P<0.05$) but increase of egg production per worm ($P<0.05$) was found. r*Ov*LAP is highly immunogenicity that indicated as good antigen for induction host immunity. Further studies on r*Ov*LAP as drug target/vaccine are needed to perform. Combine this molecule with other vital predominate molecules or specify local region of induction immunity are needed to considered to further development.

Key words: *Opisthorchis viverrini*, Leucine aminopeptidase, Vaccine

Introduction

Opisthorchiasis and cholangiocarcinoma that caused by *Opisthorchis viverrini* are still the problem in Southeast Asians countries, especially in Northeast of Thailand (Sripa et al., 2007). Due to this problem, the various extensive strategies have been performing to control opisthorchiasis in human host and mammalian host

reservoirs. Although anti-helminthic drug, praziquantel is widely use in aspect of eliminate opisthorchiasis but drug resistance and some adverse effects has been report (van den Enden, 2009). However, tribendimidine has been developed and seems to be efficient for *O. viverrini* treatment but some adverse effects and limitation of drug usage in levamisole and pyrantel resistance strains has been report (Hu, Xiao, and Aroian, 2009; Soukhathammavong et al., 2011). To avoid drug resistance and adverse effect from drug parasite treatment, vaccine and new target of drug action has been attractive to study.

Leucine aminopeptidase (LAP) is the attractive molecule for induction host immunity against helminthic infection. Recombinant LAP protein was proposed as immunogenic molecule that elicits protective Th1 and Th2 humoral immune response in mice infected with *Fasciola gigantica*. This inducted immunity was significantly decrease worm recovery in infected mice (Changklungmoa et al., 2013). Moreover, another report was showed significantly decrease *F. hepatica* recovery from sheep after induction of humoral protective immunity with recombinant LAP protein (Maggioli et al., 2011).

In contrast of opisthorchiasis, protective immunity was occurred during the course of infection and involved in worm elimination at re-infection. (Sirisinha et al., 1983a; Sirisinha et al., 1983b). This protective immunity was decreased 30% of worm recovery after infected hamsters with a small number of flukes prior to single immunization with aqueous somatic extract of adult worms (Wongratanacheewin et al., 2003). Although, vaccination with parasite crude extract and induced immunity by infected with specific parasite were showed high number of worm reduction, but due to the safety reasons, vaccination with specific antigen is recommended. At any rate, there is no report of protective immunity that induction with specific antigen in opisthorchiasis animal model. In the day of the recombinant technologies are available, the recombinant vaccine seem to be more attractive for induction host immunity with reasons of safe, stable and easy to manipulation.

In addition, accomplishment of using recombinant protein including LAP in vaccination against other helminthic infection, thus the effective vaccination with this molecule could be possible in opisthorchiasis hamster model. Therefore, in this study, *O. viverrini* leucine aminopeptidase (*Ov*LAP) that present in all stages of worm, high

immunogenicity and play role as gut-associated enzyme was produced as recombinant protein and assess vaccine efficacy against *O. viverrini* infection in hamster model. The protective efficacy of this vaccine was evaluated in terms of parasitological parameters including worm burden and egg production.

Materials and methods

1. Animals

Male Syrian golden hamsters, aged 6-8 weeks obtained from the Animal Unit, Faculty of Medicine, Khon Kaen University were used in this experiment. The hamsters were divided into 3 groups (5 hamsters per group) for evaluated vaccine trial. All animals ethical and procedures were approved by the Animal Ethics Committee of Khon Kaen University, based on the Ethic of Animal Experimentation of National Research Council of Thailand, Record No. AEKKU 13/2557.

2. Antigen preparation

Purified recombinant *O. viverrini* leucine aminopeptidases (r*Ov*LAP) was prepared to vaccinate into hamsters. Briefly, full length of *Ov*LAP was amplified from adult *O. viverrini* cDNA library with specific primers incorporated with NdeI endonucleases (in bold) (Thermoscientific, USA) and added with stop codon in reverse primer (in bold and underlined). The forward primer was 5' GCG GCG **CAT ATG** ATG TCT GTG AGC CGT AGC GTC3' and reverse primer was 5' GCG GCG **CAT ATG** **<u>TCA</u>** CAG TTT GGA AAC CAC CTC 3'. The amplification reaction was performed and DNA fragment was recovered, purified, cloning into TOPO-T vector (Invitrogen, USA) and then sub-cloning into expression vector, pET 15b+ (Novagen, USA). The recombinant protein of *Ov*LAP was produced in bacterial host, BL21(DE3) and induction for protein expression with 1 mM IPTG at 26 $^{\circ}$C for 8 hrs at a shaking speed of 225 rpm. Then, the bacterial pellet was collected and the supernatant was discarded before re-suspended the pellet with 3 ml native condition binding buffer containing 1X cocktailed proteases inhibitor (without EDTA) (Sigma-Aldrich, USA). The re-suspended pellet was frozen and thawed and then subsequently to sonication. The pellet debris was removed by centrifugation and the supernatant containing r*Ov*LAP protein was collect for protein purification through Ni-NTA resin column (Thermoscientific, USA). Purified protein was analyzed with SDS-PAGE to

observing a single band with coomassie blue and/or protein immunoblot staining with His-Tag antibody. The r*Ov*LAP protein were pooled and concentrated by concentrator (Eppendrof concentrator 5301). The concentrated protein was analyzed by SDS-PAGE and the protein concentration was determined its absorbance at 280 nm (Nanodrop, Thermoscientific, USA).

3. Vaccination

The hamsters were divided into 3 groups, 5 hamsters each, including one test group and two control groups. Each group was injected as the details in table 1. Briefly, the test group were vaccinated with 100 ug in volume of 100 ul of r*Ov*LAP protein formulated with equal volume of Alum Adjuvant. In other control groups were vaccinated with native elution buffer formulated with Alum Adjuvant and Alum Adjuvant alone (Imject^{TM} Alum Adjuvant, Thermoscientific, USA), respectively. All three groups were injected subcutaneously for three times, two weeks interval. Before each injection, the peripheral blood samples were collected from hamsters by retro-orbital eye bleeding. One week after the third injection, all hamsters were challenged infection with 50 metacercariae orally.

4. Determination of worm egg count and worm recovery

At one month after challenged infection, the hamsters were separated to one per cage for feces collection. The feces were collected a week interval for 9 weeks to determined the number of *O. viverrini* egg per gram (EPG) with the quantitative formalin/ethyl acetate concentration technique (Elkins, Haswell-Elkins, and Anderson, 1986). The worm burdens were determined at the day of sacrificed the hamster by counting worms in the liver squashes and hamster feces in intestine were removed for determined *O. viverrini* egg. To determine the egg production per worm, 10 adult worms from each vaccinated group were collected and washed with physiological saline. The worms were homogenized and the numbers of eggs in the uterus were counted under the microscope.

5. Detection of hamster antibody response by ELISA

Pre and post-immunization sera were collected by retro-orbital eye bleeding to determine antibody level against r*Ov*LAP using indirect ELISA. At the day of sacrificed hamsters, blood samples were bled from the heart. All blood samples were

spin at 3000-3,500 rpm at 4 ^{o}C to collected hamster sera. All sera were kept at -20 ^{o}C until testing.

Pre and post immunization sera from hamsters were tested individually by ELISA for the presence of anti-r*Ov*LAP antibody in hamsters from all three groups. For total IgG antibody detection, 1 ug/ml of r*Ov*LAP protein was coated on 96 well-plate (Nunc Maxi-Sorp Immuno Plate, Roskide, Denmark) and incubated for overnight at 4 ^{o}C. Plates were washed and antigen was blocked with 5% skimmilk and incubated at 37 ^{o}C for 2 h. One hundred ul of 1:1000 hamster serum was added and incubated at 37 ^{o}C for 2 h. Plate was washed again and then HRP conjugated anti-hamster IgG (Zymed) at dilution 1:10,000 were added and for 1 h at 37^{o}C. Plate was washed again and freshly prepared OPD substrate solution (1 tablet Zymed in 12 ml of Citrate-phosphate buffer, pH 5.0) was added and incubated for 30 minutes at 37^{o}C. The reaction was stopped by adding 0.5 M sulfuric acid (H_2SO_4) 100µl/well. The ODs were measure on an ELISA reader (TECAN, Austria) at OD 492 nm. Each sample was always assays in duplicate. Each plate included blank (non-coated antigen). For detection of IgM and IgA antibody, all procedures were similar with total IgG antibody detection but the concentration of coated antigen, serum dilution and secondary antibody dilution were changed. 2 ug/ml of r*Ov*LAP protein were coated on 96 well-plate for detecting IgM and IgA antibody against r*Ov*LAP protein. Hamster serum at dilution 1:100 and secondary antibody against IgM and IgA anti-hamster at dilution 1:1,000 were use in measured of IgM and IgA antibody to r*Ov*LAP protein. To measure the antibody level of each sample, the OD values were subtracted from the mean OD of blank in each ELISA plate. Inducted IgM, IgG and IgA was also detect in bile with the same procedure.

6. Statistic analysis

The worm burden, EPG and egg per worm data, antibody level in each group was determined to examine the effects of r*Ov*LAP protein vaccination against *O. viverrini* infection. All statistic analysis was analyzed using GraphPad Prism 5.

Results

1. Total IgG, IgM and IgA levels against r*Ov*LAP protein in hamster

Serum samples from hamsters were tested for the presence of the total IgG, IgM and IgA level against r*Ov*LAP protein by using ELISA (Figure 1). The individual

serum after first, second immunization and after sacrificed hamsters were tested and calculated for mean OD ± SD at 492 nm.

In the group of vaccination with r*Ov*LAP protein, the levels of IgM and IgA antibody against r*Ov*LAP protein were increased rapidly after first vaccinations. In contrast with total IgG antibody level that was slightly increases. In addition, the antibody level of IgM and IgA antibody was also maintained in significant higher level than total IgG antibody. However, IgM antibody level was slightly decreased at the day of sacrificed hamster (week 10 after final vaccination). While, IgA antibody against r*Ov*LAP protein was maintained over the time course of the duration of the experiment. The total IgG, IgM and IgA level of pre-immunized sera and sera from negative control group (immunized with alum adjuvant alone and alum adjuvant formulated with elution buffer) were not raised against r*Ov*LAP protein (data not shown).

In bile, there was detected some of level IgM, IgG and IgA. However, the level of those antibodies was lower than detected in serum (Figure 1).

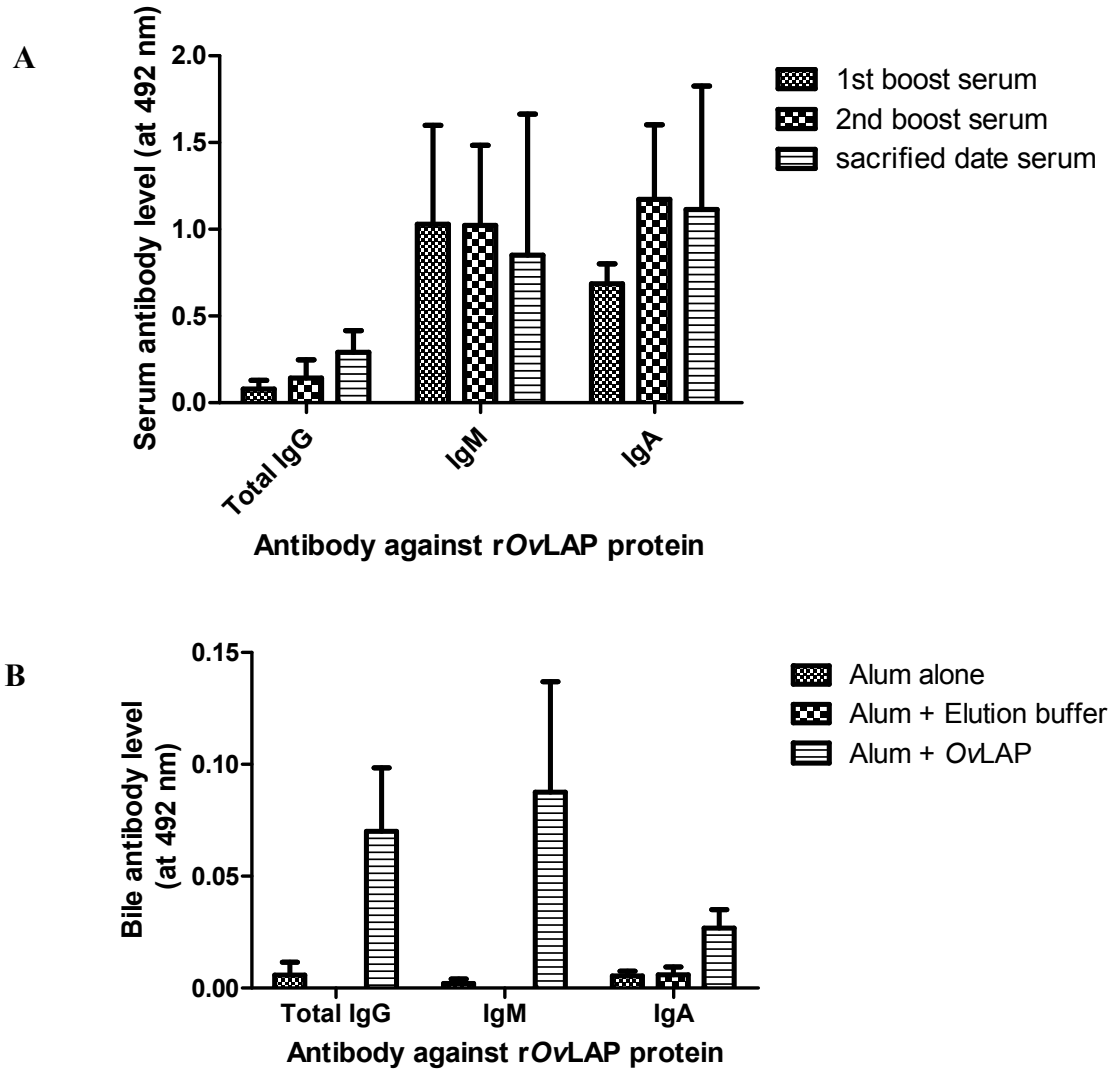


Figure 1 Total IgG, IgM and IgA antibody level against r*Ov*LAP protein in hamster after vaccination. In hamster serum, IgM antibody was showed increase rapidly after first vaccination. While IgA antibody still maintained in high level until week 10 after final vaccination but IgM antibody was slightly decrease. In contrast of total IgG antibody that slightly increases with the lower level than IgM and IgA antibody (A). In bile of hamster, total IgG, IgM and IgA were detected in bile but lower than detected in serum (B).

2. Reduction of worm burden and egg production in vaccinated hamsters

The protection after challenge infection in vaccinated hamsters was determined from egg production rate and worm burden. For egg production rate, feacal egg count was determined in hamster feces for 9 weeks after challenge infection for one month. Egg production of vaccinated hamsters was present as egg per gram (EPG) of feces material. The EPG of all vaccinated hamster groups were gradually increased from week 1 to week 9 of feacal collection schedule. The variation of egg production rate was observed in all three groups of hamster. The difference of mean egg counts between the test group (vaccinated with r*Ov*LAP protein) and the control group (vaccinated with native elution buffer and alum adjuvant alone) was not significant ($P>0.05$) (Figure 2).

Number of egg production per worm was also determined in all three groups of vaccinated hamster. Worms from hamsters that vaccinated with r*Ov*LAP protein was present high rate of egg production. In contrast with control group that presented lower number of egg production per worm. However, there was not significantly different of egg production per worm among three group ($P<0.05$) (Table 1). The average of worm burden in each group of vaccination was determined at the day of sacrificed hamsters. The insignificant number of worm reduction of the test group was observed. The percent of worm reduction in test group was 20.77% when compared with control group ($P<0.05$).

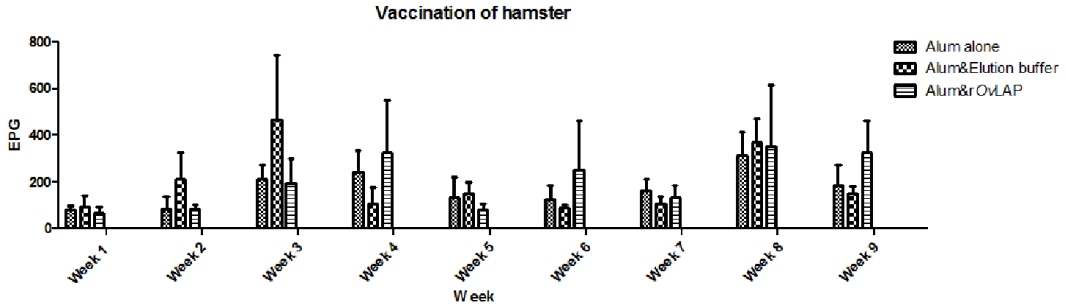


Figure 2 Quantitative fecal egg counts in feces from experimental hamsters that vaccination with r*Ov*LAP protein, elution buffer and alum adjuvant alone. The number of egg count in feces was determined as weekly interval after one month of *O. viverrini* challenged infection with 50 metacercariae. No significant difference was found among number of EPG in three vaccinated group ($P<0.05$). The data of EPG was presented as mean ± SD.

Table 1 Details of vaccination and protection against *O. viverrini* in hamsters vaccinated with r*Ov*LAP protein, elution buffer and alum adjuvant alone.

Group No. 5 hamster/group	Antigen	Route	Dose	Adjuvant	Mean worm burden ± SD	%reduction in worm burdens (*P*-value)	Mean EPG/worm (*P*-value)
1	r*Ov*LAP protein	Subcutaneous	100 ug	Alum adjuvant	25.75 ± 4.856	20.77% ($P<0.05$)	4536 ($P<0.05$)
2	Elution buffer	Subcutaneous	100 ul	Alum adjuvant	32.50 ± 9.147	-	2942 ($P<0.05$)
3	Alum adjuvant	Subcutaneous	100 ul	-	25.80 ± 4.087	-	4490 ($P<0.05$)

Discussion

Leucine aminopeptidases (LAP) has been proposed as the important molecule in biological functions of all organisms (Matsui, Fowler, and Walling, 2006). In helminth, role of LAP in various tasks has been recognized. Gut-associated enzyme also has mentioned as the role of LAP in helminth (McCarthy et al., 2004). The role in egg hatching also report, since decrease of egg hatching was found after knockdown both two discrete of SmLAP genes (Rinaldi et al., 2009). In addition, recombinant LAP was also tested as vaccine potential. Immunity against r*Fh*LAP and r*Fg*LAP were found significant reduction of worm burden (Changklungmoa et al., 2013; Maggioli et al., 2011).

In *O. viverrini*, one discrete of LAP (*Ov*LAP) was found and characterized. Basic features of *Ov*LAP including primary sequence and basic mechanism are corresponds with other helminthic LAP. High immunogenicity was also found in r*Ov*LAP, similar with r*Fh*LAP and r*Fg*LAP. Ability as immunogen and high protection from r*Fh*LAP and r*Fg*LAP vaccination arouse r*Ov*LAP was attractive for tested potential as vaccine against *O. viverrini* infection. Hamsters were vaccinated with r*Ov*LAP via subcutaneous route to induce antibodies production in serum and/or mucosa to block/neutralize/interfere parasite that following infection after full course of injection. The quantity of inducted antibodies including IgM, IgG and IgA was determined in serum and bile using ELISA for convenience and rapidity. Highly increase of immunoglobulin, especially subtype M and A was detected in serum after first vaccination. In contrast with detection in bile that low level of total IgG, IgM and IgA was detected. However, IgG, the important antibody for protection was slightly increased in serum and some of IgG level was detected in bile. Some of those antibodies were diffused from blood vessel to gall bladder and interact with specific region or interrupt function of specific molecule in worm by pass through their mouth or tegument. This interaction may cause parasite death but no effect on parasite reproductive organ since high EPG was determined.

Although, humoral inducted immunity was persisted for almost three months, but few of immunity were diffused into worm habitat. However, some of highly inducted immunity, IgG, IgM and IgA was estimate to diffuse along host's mucosal surface of gastrointestinal tract and could contact with newly excysted larva that crawl

up to their habitat in secondary bile duct. Moreover, inducted immunity against r*Ov*LAP was estimate to effect on various stages of *O. viverrini* since the expression of *Ov*LAP was found throughout their life cycle. However, specific location of inducted immunity production still doubt, but recently, oral vaccine has been established to specify local region of immunity induction to reduction of colonization and protection mucosal region from pathogen. Spore of *Bacillus subtilis* was used as vehicle to deliver vaccine via oral route. Surface of *B. subtilis* spore has been design for expressing specific protein to interact and induce host immune response after feed via oral. Success of induction of high level of local mucosal immunity both sIgA and secreting IgA cells was found after feed animal with *B. subtilis* spore expressing *C. sinensis* LAP (*Cs*LAP) on their surface (Yu et al., 2015). In case of *O. viverrini* that contact with mucosa of host gastrointestinal tract, induction host immunity by orally with spore expressing protein on their surface is attractive to be considered to develop as drug/vaccine against *O. viverrini* infection.

However, inducted immunity against r*Ov*LAP can decrease 20% of worm recovery compared with control groups. The percent of worm reduction was quite similar to vaccination with crude *O. viverrini* metacercarial extract that can reduce 21% of worm burden. In contrast of r*Ov*-CB-1 that can reduce only 18% (Unpublished). This showed that single active molecule of r*Ov*LAP has ability to produce protective immunity against *O. viverrini* infection in similar level of multi-antigenic molecule in metacercarial extracts. Since safe vaccine has been concern, ability of induction effective and specific immunity with low adverse effect from excess antibodies in circulation of single active molecule was attractive than multi-antigenic molecule. Thus, r*Ov*LAP is the first identified molecule of *O. viverrini* that was fascinated to further develop as drug/vaccine target.

However, *O. viverrini* is complex organism that has specialized structure and molecules performing in multi tasks. Several molecules of *O. viverrini* have more than one isoforms that work sequential and concert manner. Inhibition one of important molecule could not breakdown biological process of worm since relevant molecule has been recruited to play their related role. Interruption of predominate vital molecules or relevant molecules would have impact on *O. viverrini* survival. Several molecules of *O. viverrini* has been found vital for maintain their life cycle

(Smout et al., 2009; Suttiprapa et al., 2009). Combination of these vital molecules would be efficient to breakdown parasite life cycle. Moreover, vital molecules that derived from different stages of the parasite's life cycle or different species of the parasite would be elicit a strong immune response and attractive to evaluate for vaccine against *O. viverrini* infection. Similar in previous studies that demonstrated high efficiency of hybrid or multivalent recombinant protein vaccination in infectious disease such as fascioliasis (Jayaraj et al., 2009), schistosomiasis (Chen et al., 2005), malaria (Li et al., 1999), and leishmaniasis (Coler et al., 2002).

Moreover, helminths are long-lived organisms in specific host because they use antigenic variation to escape from the hosts' immune attack. In addition they are developed different strategies for survival in their human host. For example schistosomula can compromise complement function (Ouaissi et al., 1981) and degrade host immunoglobulins (Auriault et al., 1981). Thus, host immune response is not enough to eradicate the parasite. Vaccination is the method to increase host immunity to destroy and eradicate parasite from their host. The highly induction of specific host immune response against the parasite is important for worm elimination. Helminth infections are typically associated with hypereosinophilia, considerable IgE production, mucous mastocytosis, and goblet cells hyperplasia. The vaccinations that can induce these mechanisms may have potential to reduce parasitic infection because these immune parameters are involved in different effector mechanism to worm elimination. Moreover, the combination of the function of humoral and cell mediated host immune response may also increase the reduction of worm and decrease worm egg production (MacDonald, Araujo, and Pearce, 2002). The appropriate induction of immune response mechanisms may allow the rational development of more efficacious *O. viverrivi* vaccine.

Acknowledgement

This research was financially supported by Ubon Ratchathani University, in fiscal year; 2014.

References

Auriault, C., Ouaissi, M. A., Torpier, G., Eisen, H., and Capron, A. (1981). Proteolytic cleavage of IgG bound to the Fc receptor of *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Parasite Immunol* **3**(1)**,** 33-44.

Changklungmoa, N., Kueakhai, P., Riengrojpitak, S., Chaithirayanon, K., Chaichanasak, P., Preyavichyapugdee, N., Chantree, P., Sansri, V., Itagaki, T., and Sobhon, P. (2013). Immunization with recombinant leucine aminopeptidase showed protection against *Fasciola gigantica* in mice. *Parasitol Res* **112**(10)**,** 3653-9.

Chen, Y. X., Wang, L. X., Tang, L. F., Zhang, S. K., Zhang, J., Zeng, X. F., and Yi, X. Y. (2005). [Boost effect of recombinant IL-4 on protection of *Schistosoma japonicum* cathepsin B DNA vaccine in mice against the parasite]. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi* **23**(2)**,** 65-8.

Coler, R. N., Skeiky, Y. A., Bernards, K., Greeson, K., Carter, D., Cornellison, C. D., Modabber, F., Campos-Neto, A., and Reed, S. G. (2002). Immunization with a polyprotein vaccine consisting of the T-Cell antigens thiol-specific antioxidant, *Leishmania major* stress-inducible protein 1, and Leishmania elongation initiation factor protects against leishmaniasis. *Infect Immun* **70**(8)**,** 4215-25.

Elkins, D. B., Haswell-Elkins, M., and Anderson, R. M. (1986). The epidemiology and control of intestinal helminths in the Pulicat Lake region of Southern India. I. Study design and pre- and post-treatment observations on *Ascaris lumbricoides* infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **80**(5)**,** 774-92.

Hu, Y., Xiao, S. H., and Aroian, R. V. (2009). The new anthelmintic tribendimidine is an L-type (levamisole and pyrantel) nicotinic acetylcholine receptor agonist. *PLoS Negl Trop Dis* **3**(8)**,** e499.

Jayaraj, R., Piedrafita, D., Dynon, K., Grams, R., Spithill, T. W., and Smooker, P. M. (2009). Vaccination against fasciolosis by a multivalent vaccine of stage-specific antigens. *Vet Parasitol* **160**(3-4)**,** 230-6.

Li, M., Bi, H., Dong, W., Xu, W., Li, Q., and Li, Y. (1999). A recombinant multi-epitope, multi-stage malaria vaccine candidate expressed in *Escherichia coli*. *Chin Med J (Engl)* **112**(8)**,** 691-7.

MacDonald, A. S., Araujo, M. I., and Pearce, E. J. (2002). Immunology of parasitic helminth infections. *Infect Immun* **70**(2)**,** 427-33.

Maggioli, G., Acosta, D., Silveira, F., Rossi, S., Giacaman, S., Basika, T., Gayo, V., Rosadilla, D., Roche, L., Tort, J., and Carmona, C. (2011). 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.

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.

Ouaissi, M. A., Auriault, C., Santoro, F., and Capron, A. (1981). Interaction between *Schistosoma mansoni* and the complement system: role of IgG Fc peptides in

the activation of the classical pathway by schistosomula. *J Immunol* **127**(4)**,** 1556-9.

Rinaldi, G., Morales, M. E., Alrefaei, Y. N., Cancela, M., Castillo, E., Dalton, J. P., Tort, J. F., and Brindley, P. J. (2009). RNA interference targeting leucine aminopeptidase blocks hatching of *Schistosoma mansoni* eggs. *Mol Biochem Parasitol* **167**(2)**,** 118-26.

Sirisinha, S., Tuti, S., Tawatsin, A., Vichasri, S., Upatham, E. S., and Bunnag, D. (1983a). Attempts to induce protective immunity in hamsters against infection by a liver fluke of man (*Opisthorchis viverrini*). *Parasitology* **86 (Pt 1),** 127-36.

Sirisinha, S., Tuti, S., Vichasri, S., and Tawatsin, A. (1983b). Humoral immune responses in hamsters infected with *Opisthorchis viverrini*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **14**(2)**,** 243-51.

Smout, M. J., Laha, T., Mulvenna, J., Sripa, B., Suttiprapa, S., Jones, A., Brindley, P. J., and Loukas, A. (2009). A granulin-like growth factor secreted by the carcinogenic liver fluke, *Opisthorchis viverrini*, promotes proliferation of host cells. *PLoS Pathog* **5**(10)**,** e1000611.

Soukhathammavong, P., Odermatt, P., Sayasone, S., Vonghachack, Y., Vounatsou, P., Hatz, C., Akkhavong, K., and Keiser, J. (2011). Efficacy and safety of mefloquine, artesunate, mefloquine-artesunate, tribendimidine, and praziquantel in patients with *Opisthorchis viverrini*: a randomised, exploratory, open-label, phase 2 trial. *Lancet Infect Dis* **11**(2)**,** 110-8.

Sripa, B., Kaewkes, S., Sithithaworn, P., Mairiang, E., Laha, T., Smout, M., Pairojkul, C., Bhudhisawasdi, V., Tesana, S., Thinkamrop, B., Bethony, J. M., Loukas, A., and Brindley, P. J. (2007). Liver fluke induces cholangiocarcinoma. *PLoS Med* **4**(7)**,** e201.

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.

van den Enden, E. (2009). Pharmacotherapy of helminth infection. *Expert Opin Pharmacother* **10**(3)**,** 435-51.

Yu, J., Chen, T., Xie, Z., Liang, P., Qu, H., Shang, M., Mao, Q., Ning, D., Tang, Z., Shi, M., Zhou, L., Huang, Y., and Yu, X. (2015). Oral delivery of *Bacillus subtilis* spore expressing enolase of *Clonorchis sinensis* in rat model: induce systemic and local mucosal immune responses and has no side effect on liver function. *Parasitol Res*.

ประวัตินักวิจัยหลัก

ชื่อ นางสาวจิตติยวดี ศรีภา

หน่วยงานที่สังกัด วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ตำแหน่ง อาจารย์

ประวัติการศึกษา

คุณวุฒิ	ปี พ.ศ. ที่จบ	ชื่อสถานศึกษาและประเทศ
ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (ปรสิตวิทยา)	2554	มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประเทศไทย
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ปรสิตวิทยา)	2550	มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประเทศไทย
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)	2548	มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประเทศไทย

งานวิจัย

1. Jex, A. R., Young, N. D., **Sripa, J**., Hall, R. S., Scheerlinck, J. P., Laha, T., Sripa, B., and Gasser, R. B. (2012). Molecular changes in *Opisthorchis viverrini* (Southeast Asian liver fluke) during the transition from the juvenile to the adult stage. *PLoS Negl Trop Dis* **6**(11)**,** e1916.
2. **Sripa, J**., Brindley, P. J., Sripa, B., Loukas, A., Kaewkes, S., and Laha, T. (2012). Evaluation of liver fluke recombinant cathepsin B-1 protease as a serodiagnostic antigen for human opisthorchiasis. *Parasitol Int* 61(1)**,** 191-5.
3. **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.
4. **Sripa, J**., Pinlaor, P., Brindley, P. J., Sripa, B., Kaewkes, S., Robinson, M. W., Young, N. D., Gasser, R. B., Loukas, A., and Laha, T. (2011). RNA interference targeting cathepsin B of the carcinogenic liver fluke, *Opisthorchis viverrini*. *Parasitol Int* 60(3)**,** 283-8.
5. 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.

โครงการที่เป็นหัวหน้าโครงการวิจัย

1. เรื่อง “การตรวจหาเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิออร์พิสทอร์คิส วิเวอรินิ ในปลาน้ำจืดจากอำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี (Detection of *Opisthorchis viverrini* metacercariae in fresh water fish from Warinchamrap district Ubonratchathani province)” ระยะเวลาที่ใช้ในการทำวิจัย 1 ปี (20 มิถุนายน 2555 - 19 มิถุนายน 2556) แหล่งทุนวิจัย: ทุนอุดหนุนการวิจัย ปีงบประมาณ 2555 มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

2. เรื่อง “การศึกษาความชุกและปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้อปรสิตในเชิงพื้นที่ (The incidence and risk factors for opisthorchiasis and cholangiocarcinoma in Ubonratchathani province)” ระยะเวลาที่ใช้ในการทำวิจัย 1 ปี (1 มีนาคม 2556 - 28 กุมภาพันธ์ 2557) แหล่งทุนวิจัย: ทุนอุดหนุนการวิจัย ปีงบประมาณ 2556 มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

3. เรื่อง “การประเมินการเป็นวัคซีนของลิวซีนอะมิโนเปปติเดสต่อการติดพยาธิออร์พิสทอร์คิส วิเวอรินิ (The evaluation of leucine aminopeptidase as vaccine candidate against *Opisthorchis viverrini* infection)” ระยะเวลาที่ใช้ในการทำวิจัย 1 ปี (1 ตุลาคม 2556 - 30 กันยายน 2557) แหล่งทุนวิจัย: ทุนอุดหนุนการวิจัย ปีงบประมาณ 2557 มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

4. เรื่อง “การโคลนและการศึกษาคุณลักษณะของลิวซีนอะมิโนเปปติเดสของพยาธิออร์พิสทอร์คิส วิเวอรินิ (Cloning and characterization of *Opisthorchis viverrini* leucine aminopeptidase)” ระยะเวลาที่ใช้ในการทำวิจัย 2 ปี (2 กรกฎาคม 2555 - 1 กรกฎาคม 2557) แหล่งทุนวิจัย: สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

โครงการที่เป็นผู้ร่วมโครงการวิจัย

1. เรื่อง “การวิจัยพยาธิใบไม้ตับแบบสหวิชาการ (Interdisciplinary research on human liver flukes)”ระยะเวลาที่ใช้ในการทำวิจัย 3 ปี (2556 - 2558) แหล่งทุนวิจัย: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย