สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาวัคซีนจากโปรตีน cathepsin L1 สำหรับป้องกันโรค fasciolosis จากพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica*

Development of a vaccine using cathepsin L1 for protection against fasciolosis by *Fasciola gigantica*

ดร. พรอนันต์ เกื้อไข่
สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์
มหาวิทยาลัยบูรพา

/

๑ มิถุนายน ๒๕๕๗ ถึง ๓๑ พฤษภาคม ๒๕๕๘

W01807 13
- 1 ต.ค. 2558
เริ่มบริการ
15 พ.ย. 2559
357933
W QT 104.9

โครงการวิจัยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ประจำปี พ.ศ. ๒๕๕๗

อภินันทนาการ

สัญญาเลขที่ AHS๐๓/๒๕๕๗

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาวัคซีนจากโปรตีน cathepsin L1 สำหรับป้องกันโรค fasciolosis จากพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica*

Development of a vaccine using cathepsin L1 for protection against fasciolosis by *Fasciola gigantica*

ดร. พรอนันต์ เกื้อไข่
สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์
มหาวิทยาลัยบูรพา

มิถุนายน พ.ศ. ๒๕๕๘

บทคัดย่อ

Fasciola gigantica cathepsinL1 (CathL1) จัดอยู่ในกลุ่มเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนที่มีความสำคัญ มีการแสดงออกมากในเซลล์เยื่อบุทางเดินอาหาร และปล่อยสู่สารที่พยาธิหลั่งออกมา (ES product) ชนิดของ CathL1 ที่แตกต่างกันจะมีการแสดงออกทั้งในตัวอ่อนระยะแรก ๆ และตัวเต็มวัยของพยาธิสำหรับการเคลื่อนที่และย่อยอาหาร ดังนั้น โปรตีน CathL1 น่าจะเป็นเป้าหมายสำหรับการผลิตวัคซีนป้องกันการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ในการศึกษาครั้งนี้ มีการผลิต Recombinant pro-F.gigantica CatL1 (rproFgCatL1) and recombinant mature *F.gigantica* CatL1 (rmatFgCatL1) ในแบคทีเรียสายพันธ์ *Escherichia coli* BL21 ในการทดสอบวัคซีนใช้หนูสายพันธ์ Imprinting Control Region (ICR) กลุ่มละ 10 ตัว โดยมีการฉีดโปรตีนครั้งละ 50 ไมครลิตร เข้าใต้ผิวหนัง หลังจากการฉีดกระตุ้นครั้งสุดท้าย 2 สัปดาห์ ได้ทำให้หนูติดเชื้อโดยป้อนตัวอ่อนพยาธิระยะติดต่อ (metacercariae) ตัวละ 15 metacercariae ซึ่งผลการทดสอบวัคซีนมีการแสดงระดับการป้องกันการติดเชื้อในกลุ่ม rproFgCatL1 และ rmatFgCatL1 เท่ากับ ร้อยละ 39.1, 41.7 และ 44.9, 47.2 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม non vaccinated-infected และ adjuvant-infected controls ตามลำดับ แอนติบอดีในกลุ่มที่ฉีดกระตุ้นด้วยโปรตีนมีการทำปฏิกิริยากับ newly excysted juveniles (NEJ), 4-week-old juveniles and the ES products of 4 week-old juveniles หลังจากทดสอบโดยวิธี immunoblotting และพบว่าในกลุ่มที่ฉีดกระตุ้นด้วยโปรตีนมีการตอบสนองทั้ง Th1 และ Th2 ซึ่งสอดคล้องกับระดับแอนติบอดี IgG1 และ IgG2a ที่เพิ่มขึ้น ระดับของเอนไซม์ตับ aspartate aminotransferase (AST) และ alanine transaminase (ALT) ในกลุ่ม rmatFgCathL1 แสดงให้เห็นการลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม rproFgCathL1 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าหนูกลุ่ม rmatFgCathL1 ลดความเสียหายของเนื้อเยื่อตับ รอยโรคที่เกิดกับตับในกลุ่มวัคซีนลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า โปรตีน rFgCathL1 มีศักยภาพในการเป็นวัคซีนป้องกันพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* และอาจจะมีการทดสอบในสัตว์เคี้ยวเอื้องและมนุษย์ต่อไป

Abstract

In *Fasciola gigantica* cathepsin L1 (CatL1) is a family of predominant proteases that is expressed in caecal epithelial cells and secreted into the excretory-secretory products (ES). CatL1 isotypes are expressed in both early and late stages of the life cycle and the parasites use them for migration and digestion. Therefore, CatL1 is a plausible target for vaccination against this parasite. Recombinant pro-*F.gigantica* CatL1 (rproFgCatL1) and recombinant mature *F.gigantica* CatL1 (rmatFgCatL1) were expressed in *Escherichia coli* BL21.The vaccination was performed in Imprinting Control Region (ICR) mice (n=10) by subcutaneous injection with 50 µg of rproFgCatL1 and rmatFgCatL1 combined with Freund's adjuvant. Two weeks after the second boost, mice were infected with 15 metacercariae by the oral route. The level of protection of rproFgCatL1 and rmatFgCatL1 vaccines was estimated to be 39.1, 41.7% and 44.9, 47.2% when compared with non vaccinated-infected and adjuvant-infected controls, respectively. Antibodies in the immune sera of vaccinated mice were shown by immuno-blotting to react with the native FgCatL1 in the extract of newly excysted juveniles (NEJ), 4-week-old juveniles and the ES products of 4 week-old juveniles. By determining the levels of IgG1 and IgG2a in the immune sera, which are indicative of Th2 and Th1 immune response, respectively, it was found that both Th1 and Th2 responses were significantly increased in rproFgCatL1- and rmatFgCatL1-immunized groups compared with the control groups, with higher levels of Th2 (IgG1) than Th1 (IgG2a). The levels of serum aspartate aminotransferase (AST) and alanine transaminase (ALT) in rmatFgCatL1-immunized group showed a significant decrease when compared to rproFgCatL1-immunized group, indicating that rmatFgCatL1-vaccinated mice had reduced liver parenchyma damage. The pathological lesions of liver in vaccinated groups were significantly decreased when compared with control groups. This study indicates that rFgCatL1 has a potential as a vaccine candidate against *F. gigantica* in mice, and this potential will be tested in ruminants.

Keywords : Vaccine, CathepsinL1, *Fasciola gigantica*, mice

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทนำ	1
ความสำคัญและสรุปความเป็นมาของโครงการฯ	1
การทบทวนวรรณกรรม	2
การพัฒนาวัคซีนโดยคัดเลือกโปรตีนจากกลุ่ม proteases	3
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	4
ผลคาดว่าจะได้รับ	4
ขอบเขตของโครงการวิจัย	4
เนื้อเรื่อง	5
การเพาะเลี้ยงวงชีวิตพยาธิในห้องปฏิบัติการ	5
การติดเชื้อพยาธิใบไม้ในหอย *L. ollula*	5
การเก็บตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย(metacercaria) จากหอยที่ติดเชื้อพยาธิ	5
การสังเคราะห์ recombinant FgCatL1	5
การทดสอบคุณสมบัติของพัฒนาวัคซีนรีคอมบิแนนท์โปรตีน FgCatL1	6
ทดสอบการตอบสนองของระบบภูมคุ้มกัน	7
การตรวจวิเคราะห์ระดับเอนไซม์ตับ	7
วิธีการประเมินผล/ สังเคราะห์ข้อมูล	7
ผลการวิจัย	8
การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน (CathL1)	8
การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน ต่อรีคอมบิแนนท์ FgCatL1	9
การทดสอบวัคซีน	10
Immunoblot	11
ความสัมพันธ์ของระดับแอนติบอดี (IgG1 และ IgG2a) กับจำนวนพยาธิ	12
ระดับเอนไซม์ตับ (AST และ ALT)	14
สรุปผลการวิจัย	16
บรรณานุกรม	17
ภาคผนวก	21

สารบัญตารางและแผนภูมิ

		หน้า
แผนภูมิที่ 1	แสดงแผนงานวิจัยด้านการพัฒนาโปรตีนวัคซีน	6
แผนภูมิที่ 2	แสดงการทำ ELISA	7
ตารางที่ 1	แสดงร้อยละของการป้องกันการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica*	10

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 แสดงผลการสังเคราะห์โปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว 8

รูปที่ 2 แสดงการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (humoral) 9

รูปที่ 3 แสดงผล immunoblotting 11

รูปที่ 4 ความสัมพันธ์ของระดับแอนติบอดี (IgG1 และ IgG2a) กับจำนวนพยาธิ 13

รูปที่ 5 แสดงระดับเอนไซม์ตับ (AST และ ALT) 15

คำอธิบายคำย่อ

Cath L1	Cathepsin L1
NEJ	Newly excysted juvenile
JV	Juvenile
AD	Adult
ES	Excretion-secretion
TA	Tegumental antigen
cDNA	Complementary DNA
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
AP	alkaline phosphatase
NBT/BCIP	nitro-blue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indodyl phosphate
AST	Aspartate aminotransferase
ALT	Alanine transaminase
WB	Whole body
Ig	Immunoglobulin

บทนำ

ความสำคัญและสรุปความเป็นมาของโครงการฯ

Fasciola gigantica เป็นพยาธิที่พบทั่วไปในโค กระบือ แกะ และคน ทั้งในประเทศไทย และประเทศเขตร้อนอื่น ๆ ทั่วโลก เป็นสาเหตุของโรคพยาธิใบไม้ตับในสัตว์ซึ่งทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจด้านเกษตร อุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ของประเทศในอัตราสูง จากการสำรวจพบว่าโค กระบือมีการติดเชื้อเฉลี่ยร้อยละ 11.8 และในบางบริเวณของประเทศไทยอาจมีอัตราการติดเชื้อสูงถึงร้อยละ 85 ดังนั้นพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* จึงเป็นพยาธิที่ส่งผลกระทบโดยตรงต่อเกษตรกรรมและอุตสาหกรรม การเลี้ยงโค กระบือ แพะ และแกะ เนื่องจากทำให้ผลผลิตเนื้อ นม และการใช้แรงงานลดลงอย่างมาก มีการประมาณว่าโรคพยาธิชนิดนี้สร้างความเสียหายให้แก่เกษตรกรปีละประมาณ 300 ล้านบาท (Sukhapesna *et al.*, 1990 : Sirihakim and Pholpark, 1991) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าในประเทศไทย มีคนติดเชื้อพยาธิชนิดนี้ไม่น้อยกว่า 30 รายและอาจมีอีกหลายรายที่ไม่มีการรายงาน และมีแนวโน้มมากขึ้นเนื่องจากมีการขยายตัวของการเลี้ยงสัตว์ในประเทศ เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะ 10 ปีที่แล้วมา

การตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้ตับชนิด *F. gigantica* ในปัจจุบันใช้วิธีตรวจหาไข่พยาธิในอุจจาระของสัตว์ที่ติดเชื้อซึ่งมีความไวและความถูกต้องแม่นยำต่ำ อีกทั้งไม่สามารถตรวจพบการติดเชื้อในระยะเริ่มต้นได้ เนื่องจากจะตรวจพบไข่ก็ต่อเมื่อพยาธิกลายเป็นตัวเต็มวัยที่ปล่อยไข่ออกมา หลังจากติดเชื้อ 10-16 สัปดาห์ ดังนั้นการป้องกันการติดเชื้อโดยการใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีนสามารถช่วยลดการติดเชื้อ *Fasciola spp.* ได้จริง และมีโอกาสประสบความสำเร็จอย่างมากที่จะทำให้ลดการติดเชื้อถึงร้อยละ 95-99 ซึ่งในประเทศไทยจะมีรายงายการติดพยาธิ *F. gigantica* ในคนน้อยนั้น ไม่สามารถสรุปได้ว่าประไทยไม่มีการระบาดของโรค Fasciolosis เป็นเพราะคนส่วนใหญ่ของประเทศไม่ได้รับการตรวจทางการแพทย์ เนื่องจากพฤติกรรมของคนไทยนั้นถ้าอาการของโรคไม่รุนแรงมากก็จะไม่ไปตรวจรักษา ซึ่งถ้าติดเชื้อ *F. gigantica* น้อยก็จะไม่แสดงอาการของโรคมากนัก ในทางตรงกันข้ามคนไทยนิยมบริโภคผักสด และผักบางชนิดนั้นปลูกในน้ำ เช่น ผักกะเฉด ผักบุ้งไทย เป็นต้น ดังนั้นคนไทยจึงตกอยู่ในภาวะเสี่ยงเป็นโรค Fasciolosis จากพฤติกรรมการบริโภคโดยไม่รู้ตัว และอีกประการที่สนับสนุนได้ว่า *F. gigantica* มีการติดในคนได้มากเช่นกันดังมีรายงานการติดเชื้อ *F. gigantica* ในกลุ่มประเทศตะวันออกกลาง และแอฟริกาเหนือ ส่วนการติดเชื้อ *F. hepatica* มีรางานการติดทั้งคนและสัตว์เช่นกัน ในช่วงระยะเวลา 5 ปีที่ผ่านมาคณะผู้วิจัยได้ออกเก็บตัวอย่างพยาธิจากโรงฆ่าสัตว์ เช่น เชียงใหม่ ปทุมธานี เพรชบุรี นครราชสีมา ยังพบวัวและควายติดเชื้อ *F. gigantica* อยู่ หรือสัตว์บางตัวไม่มีตัวพยาธิให้เห็นแต่กลับมีรอยโรคของ fasciolosis ให้เห็นอยู่ แสดงให้เห็นว่าในปัจจุบันการแพร่ระบาดของโรค fasciolosis ในประเทศไทยนั้นไม่ได้ลดลงเลย น่าจะเพิ่มขึ้นมากเสียอีก ภาวะโรคร้อนยิ่งเป็นตัวเร่งของวงจรชีวิตของ *Fasciola* spp. ให้เร็วและเพิ่มขึ้นด้วย ในสถานการณ์ปัจจุบันมีการนำวัวจากประเทศเพื่อนบ้าน เช่น พม่า บังคลาเทศ เข้ามา ซึ่งวัวในแถบนั้นมีการติดเชื้อ *Fasciola* spp. อยู่มาก และในอนาคตมีโอกาสมากที่เชื้อ *F. hepatica* จะมาแพร่ระบาดในประเทศไทยด้วย จึงยิ่งทำให้สถานะ การแพร่ระบาดไม่อาจหายไปได้เลยเนื่องจากพันธุกรรมของ *F. gigantica* และ *F. hepatica* นั้นมีความคล้ายกันร้อยละ 95-100 จึงมีความเป็นไปได้สูงมากที่จะผลิตวัคซีนให้ได้ป้องกันครอบคลุมทั้งสองชนิด และปัญหาโรค fasciolosis ยังเป็นปัญหาทางด้านสาธารณะสุขและปศุสัตว์อยู่มากจึงเป็นโอกาสทางการค้าที่ประเทศไทยจะสามารถผลิตวัคซีนป้องกันโรค fasciolosis ได้เองและสร้างมูลค่ารายได้ให้กับประเทศเป็นอย่างดี

ทบทวนวรรณกรรม (literature review)

Fasciola gigantica เป็นพยาธิในกลุ่ม *Fasciola* spp. ที่มรการแพร่ระบาดแพร่หลายในสัตว์เคี้ยวเอื้องจำพวก วัว, ควาย, แพะ, แกะ รวมทั้งมนุษย์ด้วย การติดเชื้อ *F. gigantica* เป็นสาเหตุของโรค fasciolosis ซึ่งทำให้เกิดความเสียหายของตับ ส่งผลให้การทำงานของตับผิดปกติ และส่งผลให้สัตว์ หรือมนุษย์ที่มีการติดเชื้อจำนวนมาก อาจตายได้ ถึงแม้ว่าวงจรชีวิตของพยาธิชนิดนี้จะมีความสลับ ซับซ้อนแต่การแพร่ระบาดก็ยังพบอย่างแพร่หลายทั่วโลก รวมถึงประเทศไทยด้วย (Sukhapesna et al., 1990; Sirihakim and Pholpark, 1991)

เมื่อสัตว์เคี้ยวเอื้องหรือมนุษย์กินตัวอ่อนระยะติดต่อคือระยะเมตาเซอร์คาเรียเข้าไป ผนังหุ้มตัวอ่อนระยะนี้จะถูกทำลายโดยน้ำย่อยทำให้ตัวอ่อนระยะ newly excysted juvenile (NEJ) ออกจากซีสต์บริเวณลำไส้เล็กของโฮสท์ NEJ จะไชผ่านผนังลำไส้เล็กเข้าไปในช่องท้องภายในลำตัวของโฮสท์ และเคลื่อนไปสู่ตับแล้วเจริญเป็นพยาธิตัวอ่อนซึ่งจะเคลื่อนที่ผ่านเนื้อเยื่อของตับ ทำให้เนื้อเยื่อตับถูกทำลายเกิด haemorrhage และ necrosis ในเนื้อตับ เมื่อพยาธิเจริญเป็นตัวเต็มวัยก็จะเดินทางไปอาศัยในท่อน้ำดีโดยใช้อวัยวะยึดเกาะ (oral และ ventral suckers) เกาะผนังของท่อน้ำดี เนื่องจากมีความต้องการอาหารในปริมาณสูง พยาธิจะทำลายเนื้อเยื่อและเซลล์ของโฮสท์บริเวณที่พยาธิอาศัยอยู่ จากการเคลื่อนที่ไปมา พยาธิใช้ oral sucker กัดหรือฉีกเนื้อเยื่อและเม็ดเลือดเพื่อดูดกิน ในขณะที่หนามบริเวณผนังลำตัวจะครูดและทำลายเนื้อเยื่อของโฮสท์ในขณะที่พยาธิเคลื่อนที่ไปมา เอ็นไซม์และสารที่พยาธิหลั่งออกมาโดยเฉพาะกลุ่ม proteases และ lytic proteins จะช่วยทำลายและย่อยสลายเนื้อเยื่อและเซลล์ของโฮสท์มากยิ่งขึ้น เอ็นไซม์กลุ่ม endoproteases ในสกุล cathepsin L (CathL) ,cathepsin B (CathB) และกลุ่ม exopeptidases ในสกุล leucine aminopeptidase (LAP) เป็นเอนไซม์หลักที่พยาธิหลั่งออกมาในสารคัดหลั่ง (excretion-secretion (ES) material) และพบว่ามีอยู่ในพยาธิตั้งแต่ระยะ NEJ จนกระทั่งระยะตัวเต็มวัย โดยอาจมี isotype ที่ปรับเปลี่ยนไปเช่น CathB3 ถูกสร้างและปล่อยโดย NEJ ในช่วงที่ไชเข้าเนื้อเยื่อของโฮสท์ ส่วน CathB2 พบในขั้นตัวอ่อน และ CathB1 เป็นเอนไซม์หลักในตัวเต็มวัย (Meemon et al., 2004) เอ็นไซม์ทั้งสองกลุ่มมีการกระจายตัวที่ tegumental cells และ caecal epithelial cell ในตัวพยาธิ (Carmona et al., 1993; Smith et al., 1993; Creaney et al., 1996; Wilson et al., 1998; Law et al., 2003; Meemon et al., 2004) เช่นเดียวกับในกลุ่ม CathL1 ในระยะเมตตาเซอร์คาเรีย และ NEJ จะมีการแสดงออกของ CathL1H และ CathL1G เป็นจำนวนมาก พอเป็นระยะ ตัวอ่อนระยะหลัง ๆ จนถึงตังเต็มวัย กลับมีการแสดงออกของ CathL1D และ CathL1 ในปริมาณสูงแทน นอกจากนั้นพยาธิจะขับ lytic protein ที่ช่วยทำให้เซลล์เม็ดเลือดแตก ได้แก่ สารพวก saposin-like protein (SAP) ซึ่งจะจับกับไขมันบนผนังเซลล์ทำให้เกิดรูและทำให้เซลล์ของโฮสท์แตกออกเพื่อเป็นอาหารพยาธิต่อไป

การพัฒนาวัคซีนโดยคัดเลือกโปรตีนจากกลุ่ม proteases

การศึกษาเพื่อทดลองหาวัคซีนป้องกันโรคพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola* spp. เริ่มต้นเมื่อประมาณ 20 ปีที่แล้วมา โดยเริ่มจากการทดลองใช้แอนติเจนที่เตรียมจากพยาธิตัวเต็มวัยทั้งตัว และสารที่พยาธิตัวเต็มวัยหลั่งออกมาโดยไม่มีการทำให้บริสุทธิ์ก่อนนำมาใช้ พบว่าให้ผลในการป้องกันการติดเชื้อได้แต่ไม่ดีเท่าที่ควร วัคซีนที่ให้ผลดีพอสมควรคือวัคซีนที่เตรียมจากพยาธิตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์ตาเรียที่ถูกฉายรังสี ซึ่งสามารถให้ผลในการป้องกันการติดเชื้อได้ถึงร้อยละ 69-80 (Nansen, 1975; Hall and Lang, 1978; Haroun and Hilyer, 1986) แต่มักจะทำให้เกิดสภาวะแทรกซ้อน เช่น การเป็นถุงน้ำ (cysts) ที่อวัยวะต่าง ๆ เช่น ปอด เนื่องจากมีการเคลื่อนที่ของ NEJ ที่ถูกฉายแสงแล้วไปอยู่ที่อวัยวะเหล่านั้นก่อนที่จะสลายไป ต่อมาได้มีการศึกษาทดลอง

โดยใช้วัคซีนที่สกัดจากพยาธิตัวเต็มวัย ซึ่งแยกให้บริสุทธิ์เสียก่อนด้วยวิธีต่าง ๆ พบว่าให้ผลดีพอสมควรในการป้องกันการติดเชื้อพยาธิ แต่ก็เตรียมและทำให้บริสุทธิ์ได้ยาก ปัจจุบันวัคซีนตัวเลือกที่ได้ถูกนำมาใช้คือโปรตีนที่มีความสำคัญในการดำรงชีพของพยาธิดังที่กล่าวมาแล้ว โปรตีนตัวแรก ๆ ที่ถูกนำมาใช้คือโปรตีนในกลุ่ม FABPs (Hillyer et al., 1987; Tendler et al., 1995; Aban et al., 1999)และโปรตีนในกลุ่ม antioxidant enzymes โดยเฉพาะ glutathione-S-transferase (GST) (Sexton et al., 1990; Sexton et al., 1994; Morrison et al., 1996) ต่อมาได้มีการนำโปรตีนในกลุ่ม proteases ได้แก่ Cath L, CathB และ LAP มาใช้ (Changklungmoa et al., 2013; Chantree et al., 2013; Wijffels et al., 1994; Dalton et al., 1996; Estuningsih et al., 1997; Muro et al., 1997; Mulcahy et al., 1998; Piacenza et al., 1999) ซึ่งปรากฏว่าได้ผลดีพอสมควร โดยเฉพาะการใช้ Cath L กับ LAP และ heme โปรตีนทำให้พยาธิตัวเต็มวัยไม่ออกไข่และตายในที่สุด นอกจากนั้นยังมีการศึกษาคุณสมบัติของการเป็นวัคซีนของ recombinant FhSAP-2 ต่อ *F. hepatica* ในกระต่าย และพบว่าโปรตีนนี้มีประสิทธิภาพในการเป็นวัคซีนที่ดี โดยมีจำนวนพยาธิลดลงถึงร้อยละ 81.2 และจำนวนไข่พยาธิในอุจจาระและน้ำดีของสัตว์ ทดลองลดลงร้อยละ 83.8 และ 73 ตามลำดับ (Espino and Hillyer, 2003) และเมื่อเร็ว ๆ นี้ Kueakhai et al. (2013) ได้มีการรายงานผลการทดสอบวัคซีนของ recombinant FgSAP-2 ในหนู ซึ้งให้ร้อยละของการป้องกันอยู่ที่ 76.4–78.5

การฉีดกระตุ้นให้สัตว์สร้างภูมิคุ้มกันด้วยวัคซีนที่ผลิตจาก cDNA ของโปรตีนเป้าหมาย เป็นกรรมวิธีที่ใช้อย่างกว้างขวางในปัจจุบัน พบว่า DNA vaccine ป้องกันการติดเชื้อไวรัส แบคทีเรีย และปรสิตได้อย่างมีประสิทธิภาพในสัตว์หลายชนิด (Alarcon et al., 1999; Kalinna, 1997) การใช้ DNA วัคซีนแทนโปรตีนวัคซีน เป็นการหลีกเลี่ยงปัญหาและความยุ่งยากหลายประการ เช่น การให้ได้มาซึ่งโปรตีนบริสุทธิ์จากโปรตีนธรรมชาติ (native protein) ที่มีปริมาณน้อยมาก หรือเลี่ยงการสังเคราะห์โปรตีนจากการวิธีพันธุวิศวกรรมซึ่งมักได้ในปริมาณที่น้อยและทำให้บริสุทธิ์จากโปรตีนของ prokaryotic or eukaryotic expression systems ได้ยากเนื่องจากมักเกิดการปนเปื้อนจากโปรตีนของเซลล์เจ้าบ้านขึ้นได้ นอกจากนั้นแล้ว DNA vaccine ยังเก็บรักษาง่ายโดยไม่ต้องแช่แข็งเหมือนโปรตีนวัคซีน อีกทั้งพกพาสะดวก การฉีดกระตุ้นสัตว์ที่ติดเชื้อด้วย DNA วัคซีน ยังมีข้อดีอีกประการหนึ่งคือ ไม่สร้างความเสี่ยงที่พยาธิจะแปรกลับไปเป็น pathogenic form อีก (Donnelly et al., 1997; Alarcon et al., 1999; Ogra et al., 1991; Weeks-Levy et al., 1991) และยังชักนำให้สัตว์สร้างทั้ง humoral และ cell-mediated immunity ได้ (Tang et al., 1992)

ได้มีการทดลองฉีดกระตุ้นหนูทดลองที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับชนิด *F. hepatica* ด้วย cDNA ของ glutathione S-transferase (GST) ของพยาธิใบไม้ตับชนิด *F. hepatica* ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 28 kDa พบว่า DNA vaccine ดังกล่าวสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลองได้ดี (Smooker et al., 1999) ส่วน cDNA ของโปรตีนเป้าหมายชนิดอื่น (FABP, Cath B/L, SAP, LAP, AE) ยังไม่มีการทดลองนำมาใช้เป็นวัคซีนในการป้องกันโรคพยาธิจาก *F. gigantica*

การทดสอบวัคซีนโดยการใช้ recombinant proteins และ cDNA ของแอนติเจนดังกล่าวข้างต้นเกือบทั้งหมดกระทำในพยาธิ *F. hepatica* ซึ่งเป็นพยาธิในเขตอบอุ่น แต่ยังมีไม่การทดลองใช้ใน *F. gigantica* เพราะฉะนั้น CathL1 ก็เป็นโปรตีนอีกตัวหนึ่งที่น่าสนใจที่จะพัฒนาเป็นวัคซีนป้องกันโรค fasciolosis เนื่องจาก CathL1 เป็นโปรตีนที่มีการตรวจพบในปริมาณสูงใน ES products จึงน่าจะเป็นโปรตีนที่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันที่ดี และน่าจะมีศักยภาพในการป้องกันที่ดี

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

การพัฒนาและปรับปรุงศักยภาพของวัคซีนที่สามารถป้องกันการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* โดยใช้รีคอมบิแนนท์ pro FgCathL1 และ mature FgCathL1 ในหนูทดลอง (ICR)

1. ผลิต รีคอมบิแนนท์โปรตีน FgCathL1 (recombinant pro FgCathL1 และ mature FgCathL1) ในแบคทีเรีย *E. coli* และ ทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ (purification)
2. ศึกษาทดสอบศักยภาพการเป็นวัคซีนของรีคอมบิแนนท์ pro FgCathL1 และ mature FgCathL1 ในหนู ICR
3. ศึกษาการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน ต่อรีคอมบิแนนท์ pro FgCathL1 และ mature FgCathL1

ผลที่คาดว่าจะได้รับ

การเผยแพร่ในวารสารระดับนานาชาติ

คาดว่าจะสามารถตีพิมพ์บทความวิชาการในวารสารนานาชาติที่มี impact factor ค่อนข้างดี (Q1 หรือ Q2) 1 บทความ หรือนำเสนอผลงานในการประชุมนานาชาติ

ขอบเขตของการวิจัย

เป็นการทดสอบประสิทธิภาพความเป็นวัคซีนของ FgCathL1 ทั้งในรูปแบบ pro FgCathL1 และ mature FgCathL1 ในหนู พร้อมทั้งตรวจสอบการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน และทดสอบการทำงานของตับโดยการตรวจหาระดับของเอนไซม์ในซีรั่ม เช่น AST, ALT และ GGT

วิธีการดำเนินการวิจัย (research methodology)

การเพาะเลี้ยงวงชีวิตพยาธิในห้องปฏิบัติการ

นำเอาตัวอ่อนระยะไมราซิเดียมจากไข่พยาธิไปติดเชื้อในหอย *Lymnaea ollula* ซึ่งนำมาจากประเทศญี่ปุ่นเพื่อให้ได้ตัวอ่อนพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรียสำหรับการทดลองได้อย่างต่อเนื่อง เนื่องจากหอย *L. ollula* เป็นพันธุ์ที่มีความทนต่อการติดเชื้อพยาธิกว่าหอย *Radix rubiginosa* ซึ่งเป็นพาหะกลางของพยาธิใบไม้ตับ โค กระบือ ตามธรรมชาติในประเทศไทย การเพาะเลี้ยงหอย *L. ollula* กระทำโดยนำหอยตัวเต็มวัยใส่ในอ่างพลาสติก ขนาด เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 22 ซ.ม. สูงประมาณ 9 ซ.ม. ใส่น้ำให้ระดับน้ำสูงกว่าก้นอ่างประมาณ 5 ซม. ให้ออกซิเจนโดยใช้เครื่องพ่นอากาศลงไปในอ่างน้ำตลอดเวลาและให้แสงสว่างโดยใช้ไฟนีออนขนาด 40W เป็นเวลา 8 ซ.ม. ต่อวัน ให้อาหารคือผักกาดหอมและสาหร่ายเซลล์เดียว

การติดเชื้อพยาธิใบไม้ในหอย *L. ollula*

(1) นำเอาไข่พยาธิที่ได้จากถุงน้ำดีของโคหรือกระบือที่ติดเชื้อพยาธิมาล้างน้ำดีออกด้วยน้ำที่ปราศจากคลอรีน จากนั้นรวมเอาไข่ที่ได้ใส่จานแก้ว (petri dish) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 16 ซม. เติมน้ำให้ท่วมฝา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจดูการพัฒนาของไข่พยาธิทุกวันภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (dissecting microscope) พยาธิใช้เวลาประมาณ 14-16 วัน จึงจะเจริญเป็นระยะไมราซิเดียม และฟักออกมาจากไข่

(2) นำหอยที่โตเต็มที่ขนาดประมาณ 4-5 มม. แยกออกมาใส่ถ้วยพลาสติกซึ่งบรรจุน้ำปราศจากคลอรีน ดูดเอาตัวอ่อนพยาธิระยะไมราซิเดียม จำนวน 2 ตัว ใส่ลงไปในถ้วยที่ใส่หอยไว้แล้วใช้หลอดไฟขนาด 40W ส่องห่าง ๆ เพื่อช่วยกระตุ้นไมราซิเดียซึ่งไวต่อแสง ตั้งถ้วยทิ้งไว้ประมาณ 1 ชม. เพื่อให้ไมราซิเดียวไชเข้าไปในหอย หลังจากนั้นแยกเอาหอยออกมาเลี้ยงตามปกติ

การเก็บตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย(metacercaria) จากหอยที่ติดเชื้อพยาธิ

จากการศึกษาพบว่า ตัวอ่อนพยาธิใช้เวลาในการเจริญในหอยประมาณ 6 สัปดาห์ จึงจะได้ตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรีย (cercaria) ซึ่งจะออกจากหอยมาว่ายอยู่ในน้ำ หลังการติดเชื้อได้สัปดาห์ที่ 5 จึงเริ่มตรวจดูหอยที่ติดเชื้อไว้ และแยกหอยที่ติดเชื้อออกมาเลี้ยงรวมกันในที่ซึ่งพรางแสง เพื่อป้องกันไม่ให้ตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียออกมาจากหอย

สำหรับการเก็บตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียดำเนินการดังต่อไปนี้

(1) นำหอยที่ได้ติดเชื้อไว้แล้วแยกใส่ถ้วยพลาสติกใสที่มีน้ำปราศจากคลอรีนทำเช่นนี้ทุกวันเว้นวัน
(2) ใช้แผ่นพาลสติกบางใสขนาด 5x5 ซม. ใส่ลงในถ้วย
(3) ใช้โคมไฟขนาด 40W ส่องกระตุ้นให้เซอร์คาเรียออกจากหอย
(4) ตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียที่ออกมาจากหอยจะว่ายอยู่ในน้ำระยะเวลาสั้น ๆ แล้วจึงเกาะกับแผ่นพลาสติก สลัดหางทิ้ง สร้างซิสต์ระยะเมตาเซอร์คาเรียขึ้นมา
(5) หลังจากนั้นประมาณ 2 ชม. แยกเอาหอยออกไปเลี้ยงตามเดิม นำเอาแผ่นพลาสติกออกมาส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ เก็บแผ่นพลาสติกที่มีเมตาเซอร์คาเรียไว้ในตู้เย็น ซึ่งเมตาเซอร์คาเรียจะมีชีวิตอยู่ได้ประมาณ 1 สัปดาห์

การสังเคราะห์ recombinant FgCathL1

กระบวนการผลิต recombinant FgCathL1 ในรูปแบบ pro FgCathL1 และ active FgCathL1 ทำโดยใช้ expression vector ของระบบการแสดงออกในแบคทีเรีย (prokaryotic system) คือ pET-30b หลังจากนั้นจึงนำ vector เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (host cell) ซึ่งคือเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* จากนั้น

ปล่อยให้เซลล์แบคทีเรียเจริญเติบโต และเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของจีนและสุดท้ายทำให้เซลล์แบคทีเรียสลายและทำให้โปรตีนบริสุทธิ์

การทดสอบคุณสมบัติของวัคซีนรีคอมบิแนนท์โปรตีน recombinant protein vaccine

กระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยทั้งในรูปของ pro FgCathL1 และ mature FgCathL1 โดยผสมกับสาร adjuvants เช่น Freund ในการศึกษาส่วนนี้ผู้ทำการวิจัยจะทำการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูทดลองต่อ recombinant proteins เป้าหมาย (pro FgCathL1 และ mature FgCathL1) โดยเลือกใช้ Freund's เป็น adjuvant โดยทำการฉีดกระตุ้น ทางใต้ผิวหนัง (subcutanous) โดยแบ่งหนู ICR ออกเป็น 5 กลุ่มทดลอง กลุ่มทดลองละ 10 ตัว ได้แก่

กลุ่มที่ 1 ไม่มีการฉีดกระตุ้น และไม่ติดเชื้อ

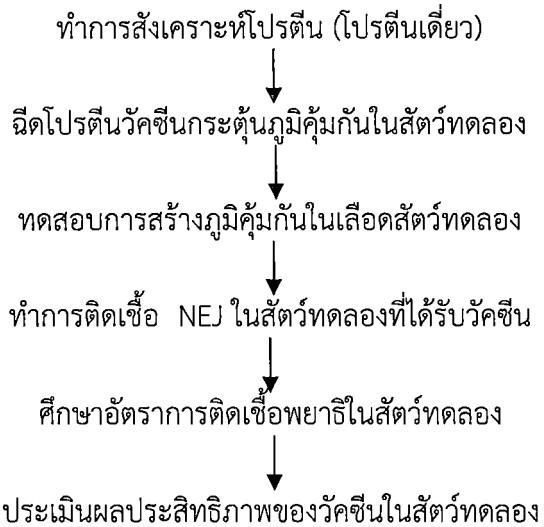
กลุ่มที่ 2 ทำการฉีดกระตุ้นด้วยบัฟเฟอร์ที่ไม่มีโปรตีนผสม และติดเชื้อ

กลุ่มที่ 3 ทำการฉีดกระตุ้นเข้าใต้ผิวหนังด้วย 50 ไมโครลิตรของ adjuvant ต่อครั้ง เป็นกลุ่มควบคุมที่ 3 และติดเชื้อ

กลุ่มที่ 4 ทำการฉีดกระตุ้นเข้าใต้ผิวหนังด้วย recombinant pro FgCathL1 50 ไมโครกรัม ปนกับ adjuvant ต่อครั้ง และติดเชื้อ

กลุ่มที่ 5 ทำการฉีดกระตุ้นเข้าใต้ผิวหนังด้วย recombinant mature FgCathL1 50 ไมโครกรัม ปนกับ adjuvant ต่อครั้ง และติดเชื้อ

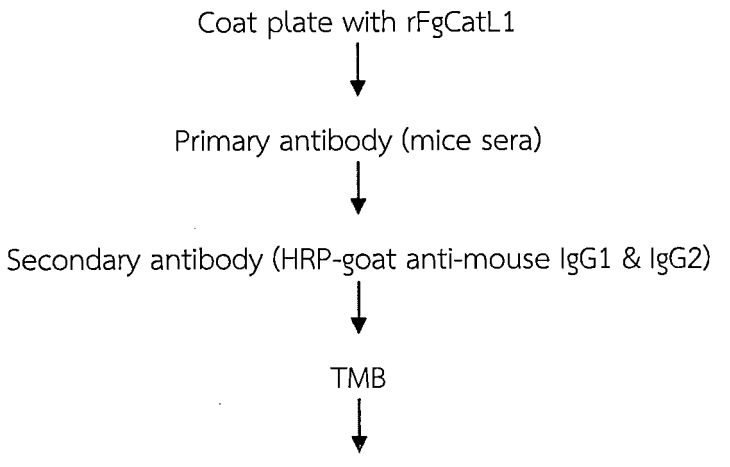
นำโปรตีนจำนวน 50 ไมโครกรัม ซึ่งละลายอยู่ในบัฟเฟอร์ (Phosphate Buffer Saline) ผสมกับ Freund' s Adjuvant ในปริมาณเท่า ๆ กัน และผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันจนกระทั่งเหนียวข้นไม่แตกตัวกระจาย และจับตัวเป็นกลุ่มเมื่อหยดทดสอบลงในน้ำ จากนั้นฉีดเข้าช่องท้องหนูหรือใต้ผิวหนังโดยฉีดทั้งหมด 3 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 3 สัปดาห์ โดยผสมโปรตีน Complete Freund's Adjuvant สำหรับการฉีดครั้งแรก และจะผสมโปรตีนกับ Incomplete Freund's Adjuvant สำหรับการฉีดครั้งต่อไป เมื่อครบ 2 สัปดาห์หลังจากฉีดครั้งที่ 3 จะเก็บเลือกจากหางหนู และทุกๆ 2 สัปดาห์ก็จะมีการเก็บเลือดหนูเพื่อทดสอบการสร้างภูมิคุ้มกันในหนู และจากนั้นจะทำการทดสอบการป้องกันการติดเชื้อพยาธิ



แผนภูมิที่ 1 แสดงแผนงานวิจัยด้านการพัฒนาโปรตีนวัคซีน เพื่อกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันการติดเชื้อพยาธิ

ทดสอบการตอบสนองของระบบภูมคุ้มกัน

ทำการวัดระดับของ immunoglobulin (Ig) โดยเฉพาะ IgG1 และ IgG2 เพื่อดูการตอบสนองต่อ รีคอมบิแนนท์ FgCathL1 โดยวิธี indirect ELISA



แผนภูมิที่ 2 แสดงการทำ ELISA

การนับจำนวนพยาธิ

หนูถูกทำให้ตายด้วย ether หลังจากการทำให้หนูติดเชื้อพยาธิ 4 สัปดาห์ แล้วนำตับหนูออกมาใส่ในน้ำเกลือ และฉีกตับหนูให้เป็นชิ้นเล็กๆ ปล่อยให้ตัวพยาธิออกมาจากตับ หลังจากนั้นนับจำนวนพยาธิจากตับของหนูแต่ละตัว เพื่อนำไปคำนวณหาร้อยละของการป้องกันการติดเชื้อต่อไป

ตรวจวัดระดับ liver enzymes ในเลือด

ตรวจวัดระดับ เอนไซม์ตับ (AST, ALT และGGT) เพื่อตรวจวัดความผิดปกติของตับ ด้วยเครื่องอัตโนมัติ (automatic machine)

วิธีการประเมินผล/ สังเคราะห์ข้อมูล

1. ทำการคำนวณหาค่า % protection ของกลุ่มที่ 4 และ 5 โดยเทียบกับกลุ่มที่ 2 และ 3 ดังสูตรด้านล่าง

   % Protection = (A - B)/A X 100

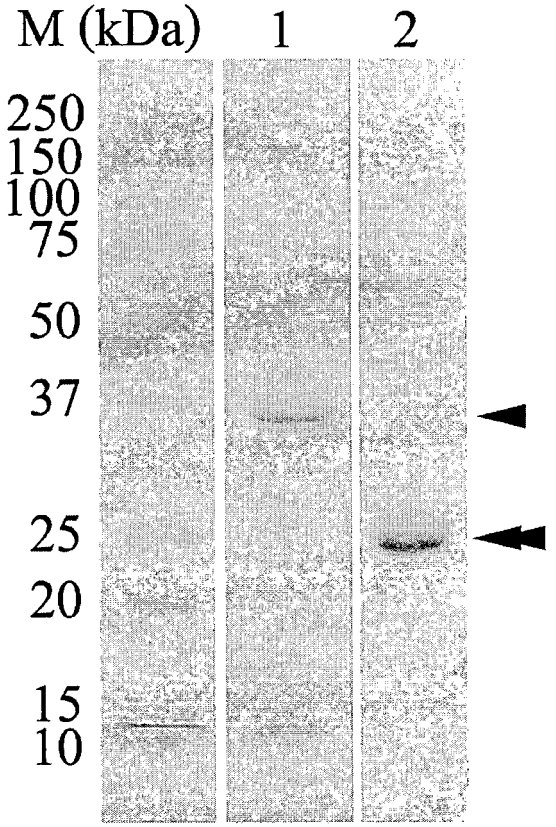
   ‘‘A” ค่าเฉลี่ยของ worm recovery จากกลุ่มควบคุมที่ 1 หรือ 2

   ‘‘B” ค่าเฉลี่ยของ worm recovery จากกลุ่มทดสอบที่ 3 หรือ 4
2. เปรียบเทียบ ระดับของแอนติบอดี และ เอนไซม์ตับ ของกลุ่มทดสอบกับกลุ่มควบคุม โดยใช้ one-way ANOVA and Kruskal-Wallis Test และ ใช้โปรแกรม SPSS version 18.0 ในการคำนวณ และ ที่ $p \leq 0.05$ ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการวิจัย

1.ผลิต รีคอมบิแนนท์โปรตีน FgCathL1 (recombinant pro FgCathL1 และ mature FgCathL1) ในแบคทีเรีย *E. coli* และ ทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ (purification)

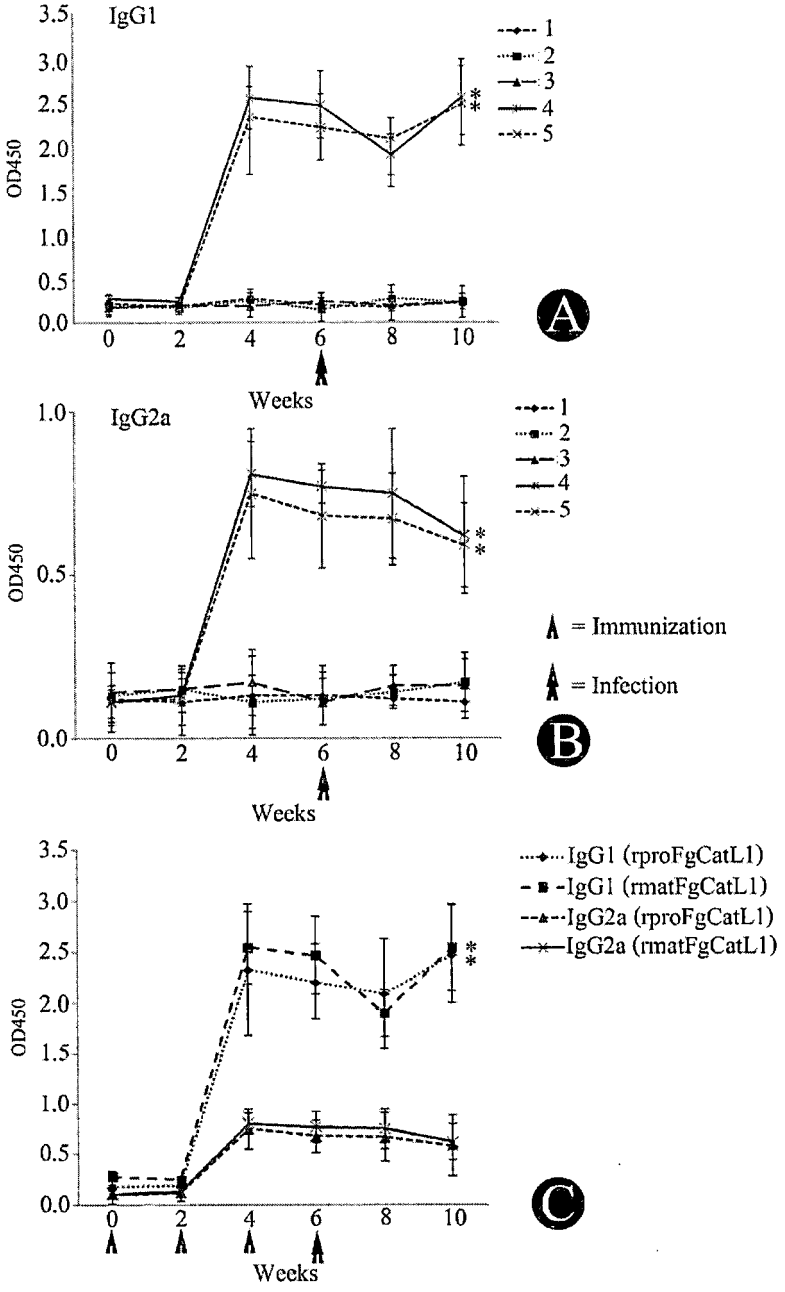
โปรตีน FgCathL1 (recombinant pro FgCathL1 และ mature FgCathL1) ถูกสังเคราะห์ขึ้นโดยการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีน pro CathL1 และ mature CathL1 แล้วนำผลที่ได้มาเชื่อมต่อกับเวคเตอร์ pET30b เพื่อทำการสังเคราะห์โปรตีนในแบคทีเรีย *E. coli* แล้วนำไปทำให้โปรตีนบริสุทธิ์โดยใช้ Ni-NTA column โปรตีนที่ได้มีขนาด 35 และ 25 กิโลดาลตัล ตามลำดับ (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 แสดงผลการสังเคราะห์โปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว (purified protein) ของ rproFgCathL1 น้ำหนักโมเลกุล 35 กิโลดาลตัน (single arrow) และ rmatFgCathL1 น้ำหนักโมเลกุล 25 กิโลดาลตัน (double arrow)

2. ศึกษาทดสอบศักยภาพการเป็นวัคซีนของรีคอมบิแนนท์ proFgCathL1 และ matFgCathL1 ในหนู ICR และการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน ต่อรีคอมบิแนนท์ pro FgCathL1 และ mature FgCathL1

จากการทำให้หนูติดพยาธิโดยการป้อนตัวอ่อนพยาธิใบไม้ตับ (*F. gigantica*) ในระยะ Metacercaria พบว่าโปรตีน proFgCathL1 และ rmatFgCathL1 สามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ humoral ได้ โดยมีระดับของ Immunoglobulin (Ig) ชนิด IgG1และ IgG2a ในกระแสเลือดสูงขึ้น (รูปที่ 2)



<u>รูปที่ 2</u> แสดงการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (humoral) โดยเฉพาะ IgG1 และ IgG2a พบว่าทั้งในกลุ่มที่มีการกระตุ้นด้วย rproFgCathL1 และ rmatFgCathL1 สามารถกระตุ้นภูมคุ้มกันได้ทั้ง IgG1 และ IgG2a (2A & 2B) แต่ระดับของ IgG1 จะสูงกว่า IgG2a ;1=Uninfected control, 2=Infected control, 3=Adjuvant control, 4=rproFgCathL1, 5=rmatFgCathL1

3. ผลการทดสอบวัคซีน

4 สัปดาห์หลังจากทำให้หนูติดเชื้อโดยป้อนตัวอ่อนพยาธิระยะติดต่อ (metacercariae) ตัวละ 15 metacercariae ผลการทดสอบวัคซีนมีการแสดงระดับการป้องกันการติดเชื้อในกลุ่ม rproFgCathL1 และ rmatFgCathL1 เท่ากับ ร้อยละ 39.1, 41.7 และ 44.9, 47.2 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม non vaccinated-infected และ adjuvant-infected controls ตามลำดับ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1.

ตางรางแสดงร้อยละของการป้องกันการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* หลังจากฉีดกระตุ้นด้วย rproFgCathL1 และ rmatFgCathL1

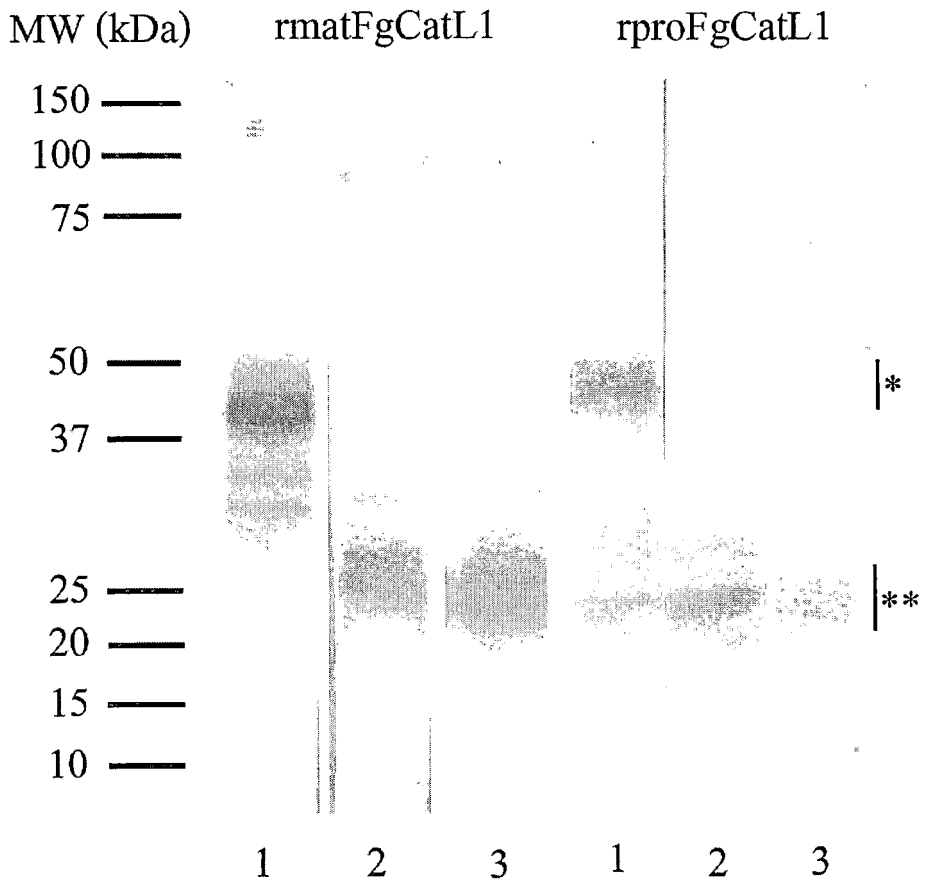
Groups	Mice	Treatments	Reduction (%)
1.Uninfected Control	10	Non-immunized and uninfected	_
2.Infected Control	10	Non-immunized and infected	_
3.Adjuvant Control	10	Immunized with Adjuvant and infected	_
4.rproFgCathL1	10	50 µg of rproFgCathL1 and infected	41.7 [a] *, 39.1 [b]*
5.rmatFgCathL1	10	50 µg of rmatFgCathL1 and infected	47.2 [a] *, 44.9 [b]*

* Significant in worm reduction compared with control groups ($p < 0.05$).

[a] Percent reduction, compared with group 2, [b] Percent reduction, compared with group 3

4. ผล immunoblotting

โปรตีน cathL1 ที่สกัดได้จากการตัวพยาธิตัวอ่อน (newly excysted juvenile) (1), ตัวอ่อนระยะ 4 สัปดาห์ (WB) (2) และ ES ของตัวอ่อนระยะ 4 สัปดาห์ (3) มาวิเคราะห์โดยวิธี SDS-PAGE และทดสอบการทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีจากหนูในกลุ่มวัคซีน โดยวิธี immunoblotting พบว่า ในกลุ่ม rproFgCathL1 และ rmatFgCathL1 ทำปฏิกิริยากับโปรตีน CathL1 ที่ 38-48 กิโลดาลตัน (รูปที่ 3 เลน 1 และ 4) และทำปฏิกิริยากับ WB และ ES ของตัวอ่อนระยะ 4 สัปดาห์ ที่ 25-28 กิโลดาลตัน (รูปที่ 3 เลน 2, 5 และ 3, 6)



รูปที่ 3 แสดงผล immunoblotting

* แสดงตำแหน่งของ pro-protein

** แสดงตำแหน่งของ mature protein

5. ความสัมพันธ์ของระดับแอนติบอดี (IgG1 และ IgG2a) กับ จำนวนพยาธิ

ความสัมพันธ์ระหว่างระดับของ IgG1และ IgG2a และจำนวนพยาธิที่จุด ทำให้ติดเชื้อ (infection) และ termination (รูปที่. 4) พบว่าค่าที่ได้ IgG1 มีค่าที่สูงกว่า IgG2a (IgG1 showed stronger correlations than IgG2a) ซึ่งมีค่าดังนี้: IgG1 at infection , r = -0.654 ($p<0.05$); IgG1 at termination ,r = -0.176 (p=0.63); IgG2a at infection , r = -0.056 (p=0.88); IgG2a at termination , r = 0.148 (p=0.68). นอกจากนี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างระดับของ IgG1และ IgG2a และจำนวนพยาธิในกลุ่ม rproFgCathL1-vaccinated IgG1 ที่จุด ทำให้ติดเชื้อ (infection), r = 0.367 (p=0.30);IgG1 at termination , r = 0.349 (p=0.32) ;IgG2a at infection , r = -0.104 (p=0.78);IgG2a at termination ,r = -0.232 (p=0.52)

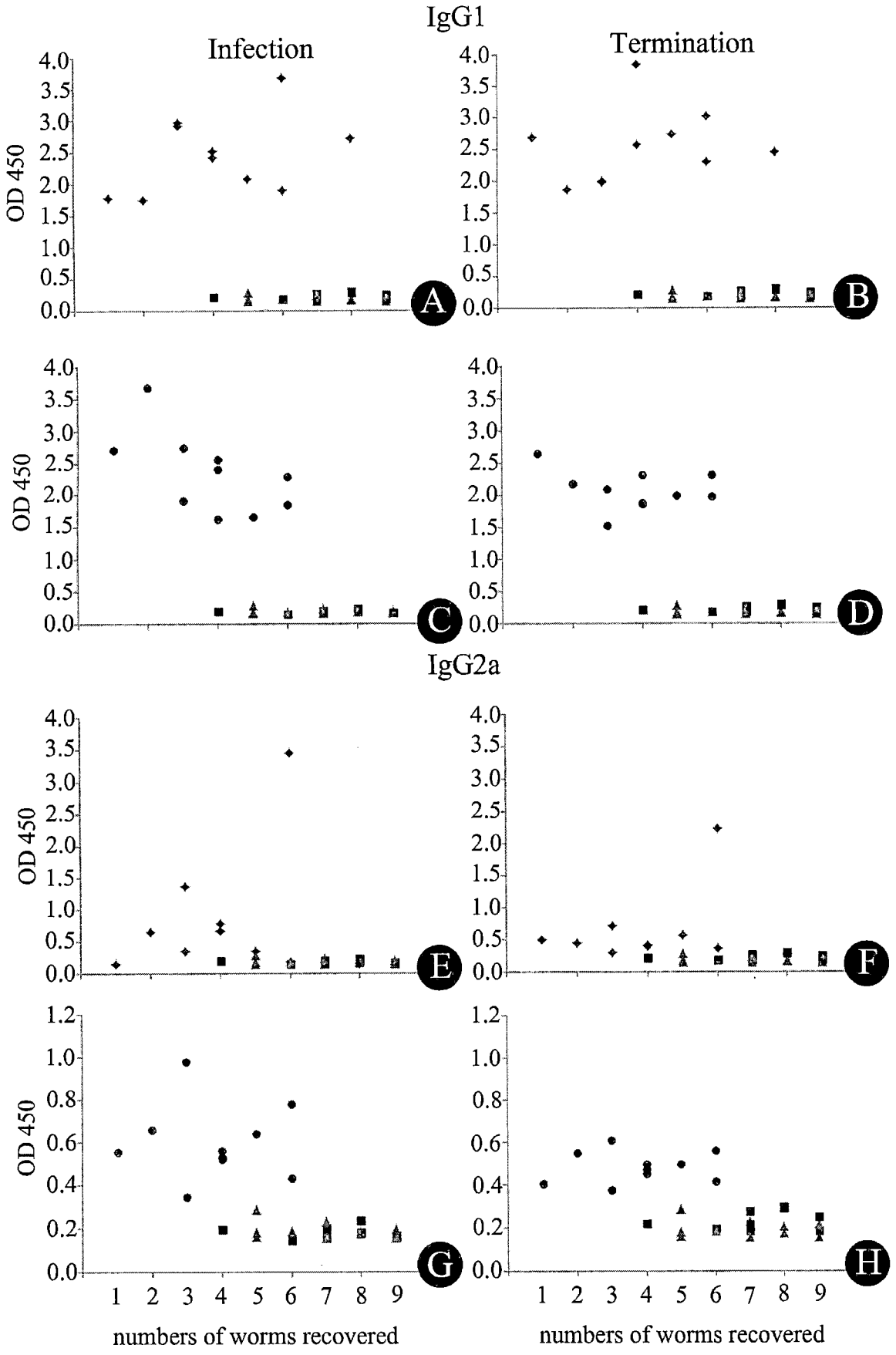
♦ = คือระดับของ OD_{450} และจำนวนพยาธิในกลุ่ม rproFgCathL1 vaccinated group

● = คือระดับของ OD_{450} และจำนวนพยาธิในกลุ่ม rmatFgCathL1 vaccinated group

■ = คือระดับของ OD_{450} และจำนวนพยาธิในกลุ่ม the adjuvant and infected control group

▲ = คือระดับของ OD_{450} และจำนวนพยาธิในกลุ่ม non immunized and infected control group

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131



รูปที่ 4 ความสัมพันธ์ของระดับแอนติบอดี (IgG1 และ IgG2a) กับ จำนวนพยาธิ

615.372
พ2967ก
ว558

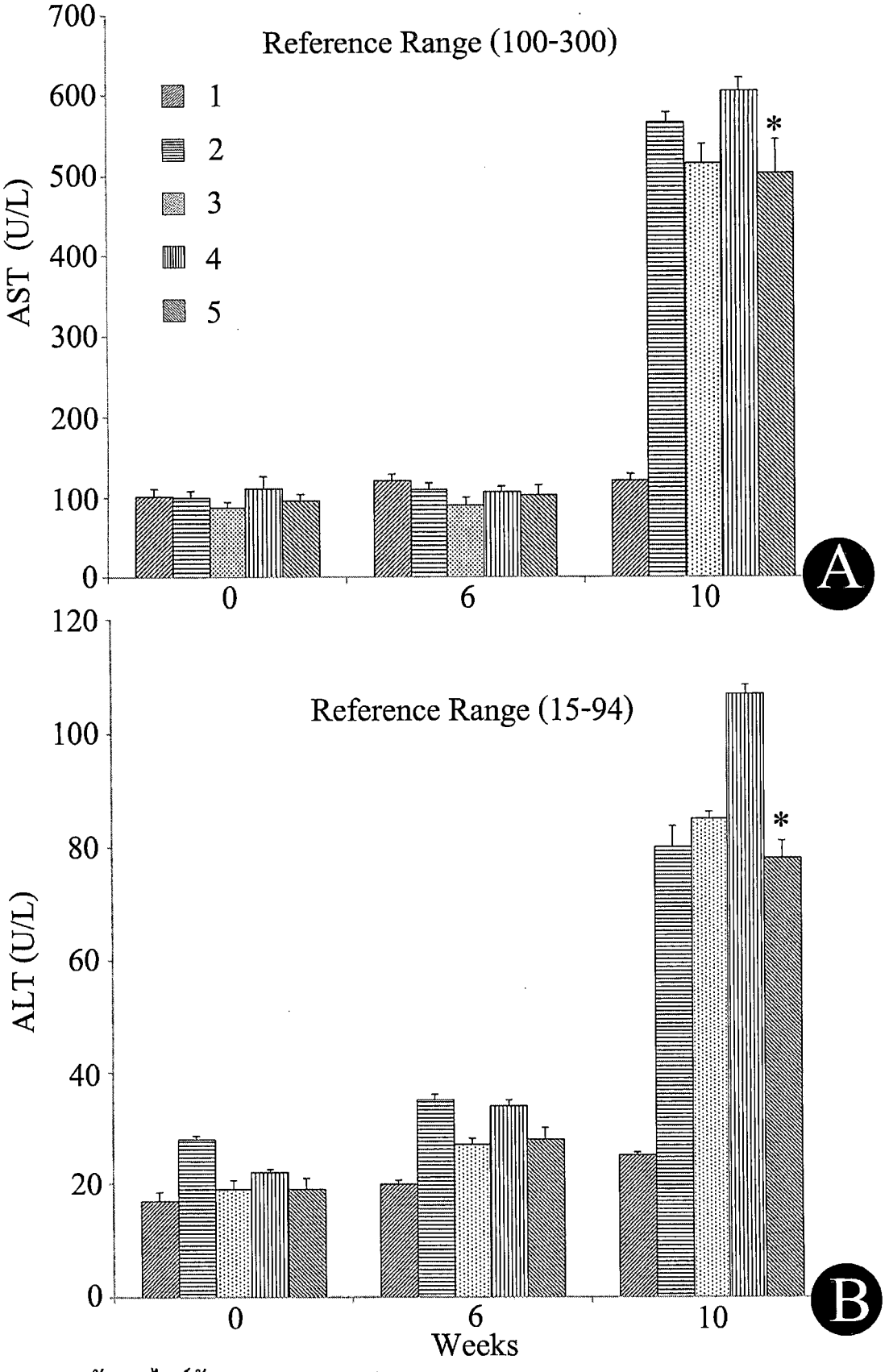
357933

6. ระดับเอนไซม์ตับ (AST และ ALT)

ระดับเอนไซม์ตับ (AST และ ALT) มีค่าสูงขึ้นที่จุด termination ทุกกลุ่ม ยกเว้นกลุ่ม non-immunized and uninfected แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม rproFgCathL1-immunized and infected และ rmatFgCathL1-immunized and infected พบว่าระดับเอนไซม์ของกลุ่ม rmatFgCathL1-immunized and infected มีค่าต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.05$ (รูปที่ 5)

* เท่ากับมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม rproFgCathL1-immunized and infected

(1) non-immunized and uninfected
(2) non-immunized and infected
(3) Freund's adjuvant and infected
(4) rproFgCathL1-immunized and infected
(5) rmatFgCathL1-immunized and infected



รูปที่ 5 แสดงระดับเอนไซม์ตับ (AST และ ALT)

สรุปผลการวิจัย

สรุปโครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์โดยรวมคือ การทดสอบศักยภาพการเป็นวัคซีนจากการใช้ recombinant proteins ที่สังเคราะห์จาก cDNA ของยีน pro CathL1 matur CathL1 และการศึกษาการตอบสนองของแอนติบอดี (IgG1, IgG2a) รวมถึงระดับเอนไซม์ตับ (AST และ ALT) ด้วย

ผู้วิจัยได้ทำการสังเคราะห์ยีน (cDNA) ของ pro CathL1 และ mature CathL1 ได้สำเร็จ โดยการใช้วิธี screening cDNA libraries ของพยาธิ *F. gigantica* ระยะตัวเต็มวัย (Adult, AD) ด้วย primers ที่ออกแบบและสังเคราะห์จากยีนที่คล้ายกันจากพยาธิ *F. hepatica* ค้นได้จากฐานข้อมูล NCBI จากนั้นได้ทำการสังเคราะห์ recombinant proteins การนำ recombinant proteins pro CathL1 และ mature CathL1 มาทดสอบศักยภาพในการเป็นวัคซีนในหนู โดยการ immunize หนูด้วย recombinant proteins ผสมกับ Freud's adjuvant เป็นเวลา 6 สัปดาห์ แล้วติดเชื้อพยาธิด้วยการป้อน metacercaria 15 อันต่อหนูหนึ่งตัว เพื่อประเมิณค่า percent protection พบว่าระดับของการป้องกันการติดเชื้อในกลุ่ม rproFgCatL1 และ rmatFgCatL1 เท่ากับ ร้อยละ 39.1, 41.7 และ 44.9, 47.2 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม non vaccinated-infected และ adjuvant-infected controls ตามลำดับ และแอนตอบอดีจากหนูในกลุ่มวัคซีนมีการทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่สกัดได้จากตัวพยาธิระยะตัวอ่อนระยะแรก และตัวอ่อนระยะ 4 สัปดาห์ โดยโปรตีน proFgCathL1 และ rmatFgCathL1 สามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ humoral ได้ โดยมีระดับของ Immunoglobulin (Ig) ชนิด IgG1และ IgG2a ในกระแสเลือดสูงขึ้น และระดับการเพิ่มขึ้นของแอนติบอดียังมีความสัมพันธ์กับการลดลงของจำนวนพยาธิอีกด้วย โดยเฉพาะระดับของ IgG1 ส่วนระดับของเอนไซม์ตับ (AST และ ALT) ที่บ่งบอกถึงความเสียหายของเนื้อเยื่อตับ พบว่าในกลุ่ม rmatFgCathL1 มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม rproFgCathL1 อย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.05$

ผลงานที่ได้รับจากโครงการ

ได้รับการตอบรับตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ ๑ เรื่อง ที่มี impact factor ปี ๒๕๕๗ เท่ากัน ๒.๒๗๐ และจัดอยู่ในควอไทม์ที่ ๑ (Q1) (ภาคผนวก)

1) Kueakhai P, Changklungmoa N, Chaichanasak P, Jaikua W, Itagaki T, Sobhon P. Vaccine poteintial of recombinant cathepsinL1 against Fasciola gigantica in mice. Acta Trop 2015; Inpress.

บรรณานุกรม

Aban JL, Ramajo V, Arellano JL, Oleaga A, Hillyer GV, Muro A, 1999. A fatty acid binding protein from *Fasciola hepatica* induced protection in C57/BL mice from challenge infection with *Schistosoma bovis. Vet Parasitol.* 83: 107-121.

Alarcon JB, Waine GW, McManus DP, 1999. DNA vaccines: technology and application as anti-parasite and anti-microbial agents. *Adv Parasitol.* 42: 343-410.

Bruhn H, 2005. A short guided tour through functional and structural features of saposin-like proteins. *Biochem J.* 389: 249-257.

Carmona C, Dowd AJ, Smith AM, Dalton JP, 1993. Cathepsin L proteinase secreted by *Fasciola hepatica in vitro* prevents antibody-mediated coxinophil attachment to newly excysted juveniles. *Mol Biochem Parasitol.* 62: 9-17.

Changklungmoa N, Kueakhai K, Riengrojpitak S, Chaithirayanon K, Chaichanasak P, Preyavichyapugdee N, Chantree P, Sansri V, Itagaki T, Sobhon P, 2013. Immunization with recombinant leucine aminopeptidase showed protection against *Fasciola gigantica* in mice. *Parasitology Research.* 112, 3653–3659.

Chantree P, Phatsara M, Meemon K, Chaichanasak P, Changklungmoa N, Kueakhai P, Lorsuwannarat N, Sangpairoj K, Songkoomkrong S, Wanichanon C, Itagaki T, Sobhon P, 2013 Vaccine potential of recombinant cathepsin B against *Fasciola gigantica. Experimental Parasitology* 135:102-109.

Creaney J, Wilson L, Dosen M, Sandeman RM, Spithill TW, Parsons JC, 1996. Fasciola hepatica: irradiation-induced alterations in carbohydrate and cathepsin-B protease expression in newly excysted juvenile liver fluke. *Exp Parasitol.* 83: 202-215.

Dalton JP, McGonigle S, Rolph TP, Andrews SJ, 1996. Induction of protective immunity in cattle against infection with *Fasciola hepatica* by vaccination with cathepsin L proteinases and with hemoglobin. *Infect Immun.* 64: 5066-5074.

Donnelly JJ, Ulmer JB, Shiver JW, Liu MA, 1997. DNA vaccines. *Annue Rev Immunol.* 15: 617-648.

Espino AM, Hillyer GV, 2003. Molecular cloning of a member of the Fasciola hepatica saposin-like protein family. *J Parasitol.* 89: 545-552.

Espino AM, Morales A, Delgado B, Rivera FM, Figueroa O, Suárez E, 2010. Partial immunity to *Fasciola hepatica* in mice after vaccination with FhSAP2 delivered as recombinant protein or DNA construct. *Ethnicity and Disease* 20, S1-17-23.

Estuningsih SE, Smooker PM, Wiedosari E, Widjajanti S, Vaiano S, Partoutomo S, Spithill TW, 1997. Evaluation of antigens of *Fasciola gigantica* as vaccines against tropical fasciolosis in cattle. *Int J Parasitol.* 27: 1419-1428.

Golden O, Flynn R.J, Reed C, Sekiya M, Donnelly S.M, Stack C., et al. 2010. Protection of cattle against a natural infection of *Fasciola hepatica* by vaccination with recombinant cathepsin L1 (rFhCL1). *Vaccine.* 28, 5551-5557.

Hall RF, Lang BZ, 1978. The development of an experimental vaccine against *Fasciola hepatica* in cattle. *Proc Annu Meet U S Anim Health Assoc.* 82: 56-60.

Haroun ET, Hillyer GV, 1986. Resistance to fascioliasis—a review. *Vet Parasitol.* 20: 63-93.

Hillier GV, Haroun ET, Hemandez A, de Galanes MS, 1987. Acquired resistance of *Fasciola hepatica* in cattle using a purified adult worm antigen. *Am J Trop Med Hyg.* 37: 363-369.

Jayaraj R, Piedrafita D, Dynon K, Grams R, Spithill TW, Smooker PM, 2010. Liver fluke vaccines: Vaccination against fasciolosis by a multivalent vaccine of recombinant stage-specific antigens. *Procedia in Vaccinology* 2: 82-85.

Jayaraj R, Piedrafita D, Dynon K, Grams R, Spithill TW, Smooker PT, 2009. Vaccination against fasciolosis by a multivalent vaccine of stage-specific antigens. *Vet Parasitol.* 160: 230-236.

Kalinna BH, 1997. DNA vaccines for parasitic infections. *Immunol Cell Biol.* 75: 370-375.

Kueakhai P, Changklungmoa N, Riengrojpitak S, Chaichanasak P, Meemon K, Chaithirayanon K, Chantree P, Sansri V, Itagaki T, Sobhon P, 2013. Vaccine potential of recombinant saposin-like protein 2 against *Fasciolosis gigantica* in mice. *Vaccine*, Accepted.

Law RH, Smooker PM, Irving JA, Piedrafita D, Ponting R, Kennedy NJ, Whisstock JC, Pike RN, Spithill TW, 2003. Cloning and expression of the major secreted cathepsin B-like protein from juvenile *Fasciola hepatica* and analysis of immunogenicity following liver fluke infection. *Infect Immun.* 76: 6921-6932.

Maggioli G, Acosta D, Silveira F, Rossi S, Giacaman S, Basika T, et al. 2012. 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, 9057-9063.

Meemon K, Grams R, Vichari-Grams S, Hofmann A, Korge G, Viyanant V, Upatham ES, Habe S, Sobhon P, 2004. Molecular cloning and analysis of stage and tissue-specific expression of cathepsin B encoding genes from *Fasciola gigantica*. *Mol Biochem Parasitol.* 136: 1-10.

Morrison CA, Colin T, Sexton JL, Bowen F, Wieker J, Friedel T, Spithill TW, 1996. Protection of cattle against *Fasciola hepatica* infection by vaccination with glutathione S-transferas. *Vaccine.* 14: 1603-1612.

Mulcahy G. O'Connor F, McGonigle S, Dowd A, Clery DG, Andrews SJ, Dalton JP, 1998. Correlation of specific antibody titre and avidity with protection in cattle immunized against *Fasciola hepatica. Vaccine.* 16: 932-939.

Muro A, Ramajo V, Lopez J, Simon F, Hillyer GV, 1997. *Fasciola hepatica*: vaccination of rabbits with native and recombinant antigens related to fatty acid binding proteins. *Vet Parasitol.* 69: 219-229.

Nansen P, 1975. Resistance in cattle of *Fasciola hepatica* induced by gamma-ray attenuated larvae: results from a controlled field trial. *Res Vet Sci.* 19: 278-283.

Ogra PL, Faden HS, Abraham R, Duffy LC, Sun M, Minor PD, 1991. Effect of prior immunity on the shedding of virulent revertant virus in feces after oral immunization with live attenuated poliovirus vaccines. *J Infect Dis.* 164: 191-194.

Piacenza L, Acosta D, Basmadjian I, Dalton JP, Carmona C, 1999. Vaccination with cathepsin L proteinases and with leucine aminopeptidase induces high levels of protection against fascioliasis in sheep. *Infect Immun.* 67: 1954-1961.

Raina OK, Nagar G, Varghese A, Prajitha G, Alex A, Maharana BR, et al. 2011. Lack of protective efficacy in buffaloes vaccinated with *Fasciola gigantica* leucine aminopeptidase and peroxiredoxin recombinant proteins. *Acta Tropica*, 118, 217-222.

Reed MB, Spithill TW, Strugnell RA, Panaccio M, 1998. *Fasciola hepatica*: stage-specific expression of novel gene sequences as identified by differential display. *Exp Parasitol.* 89: 169-179.

Reed MB, Strugnell RA, Panaccio M, Spithill TW, 2000. A novel member of the NK-lysin protein famity is developmentally regulated and secreted by *Fasciola hepatica*. *Mol Biochem Parasitol.* 105: 297-303.

Reszka N, Cornelissen JB, Harmsen MM, Bienkowska-Szewczyk K, de Bree J, Boersma WJ, Rijsewijk FA, 2005. *Fasciola hepatica* procathepsin L3 protein expressed by a baculovirus recombinant can partly protect rats against fasciolosis. *Vaccine.* 23: 2987-2993.

Sansri V, Meemon K, Changklungmoa N, Kueakhai P, Chantree P, Chaichanasak P, Lorsuwannarat N, Itagaki T, Sobhon P. Protection against *Fasciola gigantica* infection in mice by vaccination with recombinant juvenile-specific cathepsin L. Vaccine 2015; 33(13): 1596-1601.

Sexton JL, Milner AR, Panaccio M, Waddington J, Wijffels G, Chandler D, Thompson C, Wilson L, Spithill TW, Mitchell GF, et al., 1990. Glutathione S-transferase. Novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *J Immunol.* 145: 3905-3910.

Sexton JL, Wilee MC, Colin T. Wijiffels GL, Salvatore L, Feil S, Parker MW, Spithill TW, Morrison CA, 1994. Vaccination of sheep against *Fasciola hepatica* with glutathione S-transferase. Identification and mapping of antibody epitopes on a three-dimensional model of the antigen. *J Immunol.* 152: 1861-1872.

Smith AM, Dowd AJ, McGonigle S, Keegan PS, Brennan G, Trudgett A, Dalton JP, 1993. Purification of a cathepsin L-like proteinase secreted by adult *Fasciola hepatica*. *Mol Biochem Parasitol.* 62: 1-8.

Smooker PM, Steeper KR, Drew DR, Strugnell RA, Spithill TW, 1999. Humoral responses in mice following vaccination with DNA encoding glutathione S-transferase of *Fasciola*

hepatica: effects of mode of vaccination and the cellular compartment of antigen expression. *Parasite Immunol.* 21: 357-364.

Srihakim S, Pholpark M, 1991. Problem of fascioliasis in animal husbandry in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 22: 352-355.

Sukhapesna V, Sarataphan N, Tuntasuvan D, Sangiamkuksana S, 1990. A study on epidemiology of liver fluke infections in buffaloes. *Thai J Vet Med.* 20: 527-534.

Tang DC, DeVit M, Johnston SA, 1992. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature.* 356: 152-154.

Tendler M, Vilar MM, Brito CA, Freire NM, Katz N, Simpson A, 1995. Vaccination against schistosomiasis and fascioliasis with the new recombinant antigen Sm14: potential basis of a multi-valent anti-helminth vaccine. *Mem Inst Oswaldo Crus.* 90: 255-256.

Weeks-Levy C, Tatem JM, DiMichele SJ, Waterfield W, Georgiu AF, Mento SJ, 1991. Identification and characterization of a new base substitution in the vaccine strain of Sabin 3 poliovirus. *Virology.* 185: 934-937.

Wijiffels GL, Salvatore L, Dosen M, Waddington J, Wilson L, Thompson C, Campbell N, Sexton J, Wicker J, Bowen F, et al., 1994. Vaccination of sheep with purified cysteine proteinases of *Fasciola hepatica* decreases worm fecundity. *Exp Parasitol.* 78: 132-148.

Wilson LR, Good RT, Panaccio M, Wijiffels GL, Sandeman RM, Spithill TW, 1998. *Fasciola hepatica*: characterization and cloning of the major cathepsin B protease secreted by newly excysted juvenile liver fluke. *Exp Parasitol.* 88: 85-94.