



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของยา Praziquantel ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ใน
หนูแฮมสเตอร์ที่เกิดการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับซ้ำ (*Opisthorchis viverrini*)

โดย

ผศ.ดร.สพ.ญ. ธีดารัตน์ บุญมาศ

มิถุนายน 2551

รายงานฉบับสมบูรณ์

ผลของยา Praziquantel ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ใน
หนูแฮมสเตอร์ที่เกิดการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับซ้ำ (*Opisthorchis viverrini*)

โดย

ผศ.ดร.สพ.ญ. ฐิตารัตน์ บุญมาศ

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการแสดงออกในระดับยีนของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิด apoptosis ในหนูแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับและหลังการให้พราซิควานเทล (praziquantel) ที่เวลาต่างกัน รวมทั้งการติดเชื้อและรักษาซ้ำ โดยทำการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับในหนูแฮมสเตอร์และให้ praziquantel เพื่อศึกษาพยาธิสภาพหลังการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับและหลังการได้รับยา praziquantel โดยการย้อมสี hematoxylin and eosin (H&E) ศึกษาการแสดงออกของยีนต่างๆด้วยวิธี reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) และ real time RT-PCR ศึกษา immunohistostaining ของ excretory and secretory (ES) antigen ของพยาธิใบไม้ตับเพื่อเป็นการยืนยันว่าหลังการได้รับยาแล้วมีการแตกกระจายของ antigen ของพยาธิใบไม้ตับและใช้ TUNEL assay เพื่อศึกษาการตายเซลล์ที่เกิดขึ้นที่เซลล์ใด

ผลการการศึกษาการเปลี่ยนแปลงด้านพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับพบว่าหนูทุกกลุ่มที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับมีเซลล์อักเสบ (inflammatory cells) จำพวก eosinophils, neutrophils และ mononuclear cells รอบๆผนังท่อทางเดินน้ำดีที่มีพยาธิอาศัยอยู่ โดยจำนวน inflammatory cells เพิ่มขึ้นซึ่งสัมพันธ์กับระยะเวลาของการติดเชื้อโดยจะเริ่มสูงอย่างเด่นชัดที่ 21 วันและสูงที่สุดที่ 30 วันและค่อยๆลดต่ำลงที่ 60 วันและ 90 วันตามลำดับ และสำหรับในกลุ่มที่รักษาด้วยยา praziquantel พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของเซลล์อักเสบที่ชั่วโมงที่ 6 และลดลงในชั่วโมงที่ 24 หลังการรักษา การศึกษา immunohistostaining ของ ES antigen ของพยาธิใบไม้ตับพบมี positive staining ที่ตัวپرลิต epithelial bile ducts และ inflammatory cells การศึกษาในระดับ mRNA ด้วยวิธี RT-PCR และ real time RT-PCR ได้ผลสอดคล้องกันคือ พบการแสดงออกของยีน Bcl-2-associated protein X (BAX), caspase 9, p53, และ protein kinase B (PKB) ในทุกกลุ่มการทดลอง แต่ระดับการแสดงออกของยีนในแต่ละกลุ่มการทดลองนั้นมีค่าแตกต่างกันดังนี้ รูปแบบการแสดงออกของยีน BAX, PKB และ p53 ทั้งในกลุ่มที่ติดเชื้อพยาธิหลังจากที่มีการติดเชื้อพยาธิระดับการแสดงออกของยีนทั้งสามชนิดจะเพิ่มขึ้นประมาณวันที่ 14 และเพิ่มขึ้นสูงที่สุดในวันที่ 30 และลดลงหลังจากวันที่ 60 ของการติดเชื้อ ในหนูที่ติดเชื้อเป็นเวลา 90 วันและรักษาพยาธิใบไม้ตับด้วยยา praziquantel ที่เวลาต่างๆกัน พบว่าหลังการรักษาในชั่วโมงที่ 6-12 มีการแสดงออกของ apoptosis-related genes เพิ่มขึ้นและลดลงที่ชั่วโมงที่ 24 ผลของ TUNEL assay พบว่ามี apoptotic cell ที่นิวเคลียสของเซลล์ท่อทางเดินน้ำดีและเซลล์อักเสบ สำหรับการการศึกษาทางด้านพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับที่มีการติดเชื้อซ้ำและรักษาด้วยยา praziquantel พบว่าได้ผลไม่แตกต่างกันจากการติดเชื้อครั้งแรกแล้วรักษาซ้ำที่เวลาต่างๆกันยกเว้น มี inflammatory cells สูงมากกว่าการติดเชื้อครั้งแรกและมีผนังท่อทางเดินน้ำดีที่หนากว่าเนื่องจากระยะเวลาในการติดเชื้อนานและติดเชื้อครั้งที่ 2 ถึงแม้ว่า praziquantel จะมีประโยชน์ในการรักษาโรคพยาธิใบไม้ตับ แต่หลังการรักษาอาจมีผลทางอ้อมในช่วงระยะเวลาสั้นๆ

Abstract

The aim of this study was to investigate the apoptosis-related gene expression in hamster opisthorchiasis and after praziquantel treatment at various times including reinfection and retreatment. Hamsters were infected with *Opisthorchis viverrini* metacercariae then treated with praziquantel. Histopathological analyses of liver tissues were studied by staining the sections with hematoxylin and eosin using light microscopy. The expression of apoptosis-related genes [i.e., Bcl-2-associated protein X (BAX), caspase 9, p53, and protein kinase B (PKB)] was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and real-time RT-PCR. The immunohistostaining of excretory and secretory (ES) antigen of *O. viverrini* used to confirm the parasite broken and antigen spread out. TUNEL assay was used to localize the apoptotic cell death.

The histopathological changes of liver tissues show the aggregation of inflammatory cells (i.e., eosinophils, neutrophils and mononuclear cells) surrounding the hepatic bile ducts were observed in all infected hamsters. The number of inflammatory cells is correlated with the time of infection, the highest was on day 30 and gradually decreased on day 60 and 90 respectively. In treatment group, the highest was 6 hr post treatment and gradually decreased at 24 hr post treatment. The immunohistochemical staining shows the positive staining at the parasite bodies, epithelial bile duct and inflammatory cells. TUNEL assay was positive reaction at inflammatory cells and nuclei of epithelial bile ducts. The mRNA expression results show that BAX, Akt/PKB, p53, and caspase 9 expression were observed in all groups but difference in expression level. Those genes significantly increased on day 30 post infection and gradually decreased on day 60 and 90 respectively. In treatment groups, Those genes significantly increased at 6 hr post treatment and gradually decreased nearly to the uninfected control and 24 hr post treatment, perhaps due to a decrease in inflammatory cells. The results of reinfection and retreatment were the same as that of single infection and treatment excepted the inflammatory cells were higher and fibrosis surrounding the hepatic bile duct was thicker. Although using praziquantel has an advantage in killing parasites, our results show the effect of praziquantel treatment from host immune response that induces increased apoptosis-related genes in the short term.

รหัสโครงการ (Project Code): MRG 4980156

ชื่อโครงการ: ผลของยา Praziquantel ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์
ในหนูแฮมสเตอร์ที่เกิดการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับซ้ำ (*Opisthorchis viverrini*)

Project Title : Effect of Praziquantel on apoptosis-related gene expressions in Golden
hamster reinfected with liver fluke (*Opisthorchis viverrini*)

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน (Investigator) :

1. ผศ.ดร.สพ.ญ. ธิดารัตน์ บุญมาศ
Assistant professor Dr. Thidarut Boonmars
ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University
E-mail Address : bthida@kku.ac.th
2. รศ.ดร. ไพบุลย์ สิทธิถาวร
Associate professor Dr. Paiboon Sithithaworn
ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University
E-mail Address: paib_sit@kku.ac.th

ระยะเวลาโครงการ (Project Period) : 2 ปี (years)

คำหลัก (Keywords) : opisthorchiasis, praziquantel, re-infection, indirect effect

กิตติกรรมประกาศ

รายงานการวิจัยเรื่อง ผลของยา Praziquantel ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ในหนูแฮมสเตอร์ที่เกิดการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับซ้ำ (*Opisthorchis viverrini*) เป็นโครงการที่จัดทำขึ้น โดยได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2549-2551 เพื่อนำข้อมูลไปใช้เป็นองค์ความรู้ใหม่ในการใช้ยารักษาที่เหมาะสม ที่อาจเป็นปัจจัยเสี่ยงเกี่ยวข้องกับการพัฒนาเป็นมะเร็งท่อน้ำดี เพื่อให้ประชาชนได้ทราบถึงผลเสียหรือเกิดอันตรายต่อสุขภาพ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รศ.ดร. ไพบุลย์ สิทธิถาวร ที่ได้ให้คำปรึกษาแนะนำและช่วยเหลือตลอดมา ขอขอบคุณภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นที่ได้ให้สถานที่ในการทำงานวิจัย นอกจากนี้ขอขอบคุณศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี ทีมงานวิจัยทุกท่านเจ้าหน้าที่ภาคปรสิตทุกท่านที่ได้ช่วยเหลือโครงการเป็นอย่างดีและมหาวิทยาลัยขอนแก่นที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย

ขอขอบคุณ คุณพ่อเสรี คุณแม่ภรรณิกา และครอบครัว ที่เป็นกำลังใจ ทำให้รายงานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ท้ายที่สุดในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ขออุทิศ ให้แก่สัตว์ทดลองทุกตัวที่เสียสละชีวิตก่อให้เกิดงานวิจัยอันมีค่าขึ้นมา

ผู้วิจัยหวังว่า รายงานวิจัยฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ให้แก่ผู้สนใจ นักศึกษา และประชาชนทั่วไป ซึ่งจะเป็นแนวทางในการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป หากงานวิจัยนี้มีข้อผิดพลาดประการใด ผู้วิจัยขออภัยเป็นอย่างสูง

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธิดารัตน์ บุญมาศ

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

มิถุนายน 2551

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
รายละเอียดโครงการ	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญเรื่อง	จ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทนำ	1
วิธีการทดลอง	3
ผลการศึกษาส่วนที่ 1	11
ผลการศึกษาส่วนที่ 2	20
อภิปรายและวิจารณ์	25
สรุปและเสนอแนะ	28
บรรณานุกรม	29
ภาคผนวก	32
Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.	33
การนำเสนอผลงาน	34
การตีพิมพ์ผลงาน	36
จริยธรรมในสัตว์ทดลอง	51

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษา apoptosis-related genes โดยวิธี RT-PCR	7
ตารางที่ 2 ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษา apoptosis-related genes โดยวิธี real time RT-PCR	7
ตารางที่ 3 ไพร์เมอร์ที่ใช้เป็นยีนควบคุมโดยวิธี RT-PCR และ real time RT-PCR	7

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 พยาธิสภาพของเนื้อตับในหนูแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ	11
ภาพที่ 2 พยาธิสภาพของเนื้อตับในหนูแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ หลังได้รับยา praziquantel	12
ภาพที่ 3 การย้อมสี Immunohistochemical ของเนื้อตับในหนูแฮมสเตอร์ที่ ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ ด้วย anti-excretory secretory polyclonal antibody	13
ภาพที่ 4 ภาพ agarose gel electrophoresis ที่ย้อมด้วย ethidium bromide จากการทำ RT-PCR	14
ภาพที่ 5 กราฟการแสดงออกของ apoptosis-related genes โดยใช้ RT-PCR (ติดเชื้อและรักษาครั้งแรก)	16
ภาพที่ 6 ระดับการแสดงออกของยีน apoptosis-related genes โดยใช้ real time RT-PCR (ติดเชื้อและรักษาครั้งแรก)	18
ภาพที่ 7 การย้อม apoptotic cell โดยใช้ TUNEL analysis ในเนื้อเยื่อตับ	19
ภาพที่ 8 พยาธิสภาพภายในเนื้อเยื่อตับ โดยการย้อมสี H&E ในหนูแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อ พยาธิใบไม้ตับซ้ำ	20
ภาพที่ 9 แสดงภาพการย้อม apoptotic cell death ด้วยวิธี TUNEL ในเนื้อเยื่อตับ ของหนูแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับซ้ำ	21
ภาพที่ 10 ระดับการแสดงออกของยีน apoptosis-related genes โดยใช้ real time RT-PCR (ติดเชื้อและรักษาซ้ำ)	24

บทนำ

พยาธิใบไม้ตับ (*Opisthorchis viverrini*; OV) เป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งท่อน้ำดี (IARC., 1994 ; 1997) ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย (WHO, 2004) การติดเชื้อในชุมชนส่วนใหญ่เกิดจากการติดเชื้อพยาธิซ้ำบ่อยๆ ซึ่งมีการใช้ยารักษาพยาธิอยู่เป็นประจำ ยาที่มีประสิทธิภาพและใช้รักษาคนที่ติดพยาธิใบไม้ตับได้ผลดีในปัจจุบันคือ Praziquantel โดยยาจะมีฤทธิ์ทำลายผนังเซลล์ของพยาธิ (Apinhasmit and Sobhon, 1996) การที่ผนังเซลล์ของพยาธิแตกสลายน่าจะนำไปสู่การปล่อยไข่และโปรตีนซึ่งเป็นแอนติเจนของพยาธิออกมาจำนวนมาก และสามารถไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ทำให้มีการตอบสนองของเซลล์อักเสบจำนวนมากต่อแอนติเจนของพยาธิ ซึ่งจะทำให้เกิดการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายอยู่เสมอๆ ปัจจุบันมีหลักฐานชัดเจนว่าการติดเชื้อเป็นเวลานาน ๆ ทำให้เกิดการอักเสบแบบเรื้อรังและสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็ง (Bunnag et al., 1984; Jongsuksuntigul and Imsomboon, 1997; Ohshima and Bartsch, 1994; Upatham et al., 1988) โดยอนุมูลอิสระชนิดออกซิเจนหรือไนโตรเจนที่สร้างจากเซลล์อักเสบไม่เพียงแต่จะทำลายเฉพาะพยาธิหรือแอนติเจนของพยาธิแต่ยังทำลายเซลล์ของโฮสต์โดยผ่านกระบวนการออกซิเดชัน (oxidative damage) ซึ่งสามารถทำความเสียหายให้กับสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ เช่น ดีเอ็นเอ โปรตีนและไขมัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอทำให้เกิดการผ่าเหล่าของยีนและนำไปสู่การเกิดมะเร็งตามมา (Pinlaor et al., 2003) นอกจากนี้ผลของอนุมูลอิสระและไซโตไคน์ต่าง ๆ ที่สร้างขึ้นระหว่างกระบวนการอักเสบ ยังสามารถไปกระตุ้นการแสดงออกของกลุ่มยีนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้อง เช่น stress response genes และ cell proliferation genes เป็นต้น (Lodish et al., 2000) การแสดงออกของกลุ่มยีนนี้จะควบคุมการแบ่งตัวและการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ การที่เซลล์แบ่งตัวเพิ่มมากขึ้นก็ทำให้เกิด hyperplasia ซึ่งพบในการติดพยาธิใบไม้ตับ และเซลล์ที่มีรูปร่างผิดปกติก็สูญเสียหน้าที่และไม่สามารถควบคุมภาวะสมดุลของร่างกายได้หรือผลของดีเอ็นเอที่ถูกทำลายก็สามารถไปกระตุ้นการแสดงออกของกลุ่ม cell cycle regulatory genes เช่น p53 ซึ่งเป็น tumor suppressor gene เพื่อให้เซลล์หยุดการแบ่งตัวและมีการซ่อมแซมดีเอ็นเอที่ผิดปกติ ถ้าดีเอ็นเอที่ผิดปกติไม่สามารถซ่อมแซมได้จะไปกระตุ้นกลุ่ม apoptotic genes เพื่อให้เกิดการตายของเซลล์ตามมา ซึ่งถ้ายีนที่ควบคุมการแบ่งตัวและการตายของเซลล์ผิดปกติไปก็ทำให้เซลล์สูญเสียหน้าที่และทำให้เกิดมะเร็งได้อีกทางหนึ่ง (Sandri and Carraro., 1999)

จากผลการศึกษาในสัตว์ทดลองที่ติดพยาธิใบไม้ในตับพบว่าการระบาดเจ็บที่เกิดขึ้นจาก free radicle ต่อดีเอ็นเอ สัมพันธ์กับจำนวนเซลล์อักเสบตรงบริเวณที่มีการอักเสบ มีอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น และ ส่งผลให้เกิดการบาดเจ็บของไขมัน ทำให้เนื้อเยื่อตับถูกทำลายอย่างรุนแรง การเปลี่ยนแปลงนี้จะขึ้นอยู่กัระยะเวลาหลังการติดเชื้อ ซึ่งจะพบภาวะ oxidative damage มากในการติดเชื้อระยะเฉียบพลัน นอกจากนี้ยังพบว่าการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและภาวะ oxidative damage จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อมีการติดเชื้อซ้ำๆ แต่ในการติดเชื้อระยะเรื้อรังความรุนแรงเหล่านี้จะลดลง (Pinlaor et al ., 2004b) เนื่องจากร่างกายมีระบบเอ็นไซม์ในการซ่อมแซม (scavenging enzyme

system) แม้ว่าการใช้ยารักษาพยาธิในอดีตที่ผ่านมาจะแสดงให้เห็นว่าตัวยา Praziquantel เองไม่เป็นอันตรายต่อโฮสต์ แต่ยังไม่เคยมีการศึกษาว่าฤทธิ์การกำจัดพยาธิของยาจะส่งผลทางอ้อมต่อโฮสต์โดยการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน และเกิดกระบวนการอักเสบ แล้วทำให้เกิดการแสดงออกของกลุ่มยีนต่างๆ เช่น apoptosis genes, cell proliferation genes และ cell cycle regulatory genes ซึ่งการเปลี่ยนแปลงในระดับยีนนี้ไม่สามารถดูได้จากเปลี่ยนแปลงทางด้านพยาธิวิทยา ถ้าเหตุการณ์เช่นนี้คือทั้งการติดเชื้อและการได้รับยาเกิดขึ้นซ้ำๆ กันเป็นระยะเวลานาน จะเป็นการเพิ่มโอกาสให้เกิดการทำลายดีเอ็นเอมากขึ้น โดยมีการเหนี่ยวนำการแสดงออกของกลุ่มยีนต่าง ๆ พวกนี้ ซึ่งอาจเป็นปัจจัยส่งเสริมให้ก่อมะเร็งได้ง่ายยิ่งขึ้น นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังพบว่าความรุนแรงของการเกิดกระบวนการออกซิเดชันหลังการติดเชื้อขึ้นอยู่กับระยะเวลาซึ่งสอดคล้องกับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน ดังนั้นการรักษาด้วยยา Praziquantel อาจช่วยเพิ่มภาวะวิกฤติของ oxidative DNA damage แล้วส่งผลต่อการ แสดงออกยีนแตกต่างกันตามระยะเวลาหลังการได้รับยาขณะที่มีการติดเชื้อ ปัจจุบันภายหลังจากที่มีการใช้ยา Praziquantel กันอย่างแพร่หลายจนทำให้ความชุกของพยาธิใบไม้ตับลดลงแต่อุบัติการณ์ของการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีนั้นยังไม่มีแนวโน้มที่ชัดเจนว่าจะลดลง นอกจากนี้การที่มียาฆ่าพยาธิยังทำให้ประชาชนไม่เลิกรับประทานอาหารสุก ๆ ดิบ ๆ จึงเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ความชุกของพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดียังคงสูงอยู่ในปัจจุบัน

ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจศึกษาถึงผลของยาในการรักษาพยาธิใบไม้ตับโดยศึกษาในระดับโมเลกุลที่เชื่อมโยงในการเกิดมะเร็ง โดยเน้นการศึกษาการแสดงออกของยีนต่าง ๆ เช่น Apoptosis, cell proliferation genes, cell cycle regulatory genes บางชนิด ซึ่งผู้วิจัยคาดว่าจะเกิดความกระจ่าง ชัดเกี่ยวกับผลที่เกิดขึ้นในระดับยีนซึ่งการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นนั้นไม่สามารถบอกความแตกต่างได้

นอกจากนี้ถ้าพิสูจน์ให้เห็นชัดเจนในผลของยาอาจจะส่งผลให้ในการรักษาโรคพยาธิใบไม้ตับด้วยยาชนิดนี้ต้องคำนึงถึงการเปลี่ยนแปลงในระดับโมเลกุลด้วย และอาจจะให้การพิจารณาหรือคำนึง ถึงการให้สารต้านการอักเสบและสารต้านอนุมูลอิสระ เพื่อลดอันตรายจากการเกิดออกซิไดส์ร่วมกับยารักษาพยาธิในกลุ่มคนที่มีความหนาแน่นของพยาธิมาก ซึ่งเป็นกลุ่มเสี่ยงที่จะเกิดมะเร็ง จะเป็นการป้องกันและลดอุบัติการณ์ของมะเร็งท่อน้ำดีอีกทางหนึ่ง

วิธีการทดลอง

1. อุปกรณ์และสารเคมี

1.1 สัตว์ทดลอง

หนูแฮมสเตอร์เพศผู้ อายุประมาณ 6-8 สัปดาห์จำนวน 40-80 ตัว จากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

1.2 ปลาในวงศ์ปลาตะเพียน

หาซื้อจากแหล่งระบาดของพยาธิใบไม้ตับในจังหวัดขอนแก่น

1.3 อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการเตรียมตัวอ่อนระยะ *metacercariae*

10 % pepsin, 0.85% NaCl, 0.1% HCl, เครื่องปั่น (blender) shaking water bath ตะแกรง sedimentation jar กล้อง stereomicroscope

1.4 อุปกรณ์และสารเคมีในการเลี้ยงสัตว์ทดลอง

กรงหนู ขี้เลื่อย ตู้อบ ขวดน้ำ

1.5 อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการที่ใช้ในการทำ **polymerase chain reaction (PCR)** และ **real time RT-PCR**

TRIZOL reagent, TRIZOL reagent (Invitrogen, USA), Chloroform, Isopropanol, 75% ethyl alcohol, absolute alcohol, Diethylocarbonate (DEPC), DNase, human placenta ribonuclease inhibitor (HPRI) (Invitrogen), 10x DNase buffer, phenol + chloroform, Olig (dT) ((Invitrogen), M-MLV Reaction Buffer, RNase inhibitors, M-MLV RT (Invitrogen), Sterile water, Tag DNA polymerase (Takara, Japan), Forward primer, Reverse primer, glass homogenizer, water bath, Thermal Cycler, Vortex mixer, Automatic pipette, Pipette Tips, Microcentrifuge, Microcentrifuge tube, sybergreen, multi- real time plate

1.6 อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการทำ **Gel electrophoresis**

ผง agarose, 1x TBE buffer, gel tray comb, 6x loading dye, loading buffer, ethidium bromide

2. การออกแบบการทดลอง

ส่วนที่ 1 การศึกษาวิจัยครั้งนี้ใช้หนูแฮมสเตอร์ (Syrian hamster, *Mesocricetus auratus*) เพศผู้ อายุ 6 ถึง 8 สัปดาห์ จากหน่วยสัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ทำการป้อนตัวอ่อน ระยะติดต่อ *metacercariae* ของพยาธิใบไม้ตับ โดยแบ่งเป็นกลุ่มต่างๆดังนี้ กลุ่มควบคุม หลังติดเชื้อ 14, 21, 30 และ 90 วัน ส่วนอีกกลุ่มการทดลองจะเลี้ยงหนูไว้เป็นเวลา 3 เดือน หลังจากนั้นทำการให้ยา Praziquantel (Biltricide®, Bayer) ขนาด 400 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม โดยแบ่งหนูออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ตัว มีกลุ่มทดลอง ดังนี้

กลุ่มที่ 1 หนูที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับแต่ไม่ได้รับยา Praziquantel โดยให้ 2 % cremophore แล้วฆ่าหนูหลังป้อน ที่เวลา 6 ชั่วโมง

กลุ่มที่ 2 หนูที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับและหลังจากได้รับยา Praziquantel แล้วเป็นเวลา 6 ชั่วโมง

กลุ่มที่ 3 หนูที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับและหลังจากได้รับยา Praziquantel แล้วเป็นเวลา 12 ชั่วโมง

กลุ่มที่ 4 หนูที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับและหลังจากได้รับยา Praziquantel แล้วเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ส่วนที่ 2 เป็นหนูที่เหลือจากการรักษาในส่วนที่ 1 นำมาทำการติดเชื้อซ้ำหลังการรักษา ประมาณ 1 สัปดาห์และรักษาซ้ำโดยให้ยา Praziquantel (Biltricide®, Bayer) ขนาด 400 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม โดยแบ่งหนูออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ตัว มีกลุ่มทดลอง ดังนี้

กลุ่มที่ 1 หนูที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับแต่ไม่ได้รับยา Praziquantel โดยให้ 2 % cremophore แล้วฆ่าหนูหลังป้อน ที่เวลา 6 ชั่วโมง

กลุ่มที่ 2 หนูที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับและหลังจากได้รับยา Praziquantel แล้วเป็นเวลา 6 ชั่วโมง

กลุ่มที่ 3 หนูที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับและหลังจากได้รับยา Praziquantel แล้วเป็นเวลา 12 ชั่วโมง

กลุ่มที่ 4 หนูที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับและหลังจากได้รับยา Praziquantel แล้วเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

โดยมีขั้นตอนการทดลองดังนี้

1. ทำการรวบรวม ตัวอ่อนระยะ metacerciae ของพยาธิใบไม้ในตับ *O.viverrini* เพื่อนำมา ป้อนสัตว์ทดลอง

2. เลี้ยงทดลองในห้องทดลองที่มีอุณหภูมิ 22-28 องศาเซลเซียส ด้วยอาหารอัดเม็ด สำเร็จรูปเป็นโดยให้กินปริมาณมากพอและมีน้ำบรรจุอยู่ในกรงเลี้ยงหนูให้ดื่มน้ำตลอดเวลา ทำการ เปลี่ยนขี้เลื่อยในกรงหนูทุก 3 วัน

3. ทำการเหนี่ยวนำให้หนูมีการติดพยาธิโดยการป้อนตัวอ่อนระยะ metacercariae จำนวน 50 ซีตส์ต่อหนู 1 ตัวป้อนเข้าทางปากของหนู โดยการใช้สายยาง

4. ทำการเก็บตัวอย่างที่ระยะเวลาต่างๆของการติดเชื้อ

5. ก่อนครบกำหนดตามระยะเวลา 3 เดือนประมาณ 1 สัปดาห์ ตรวจสอบการติดพยาธิ โดยการเก็บมูลหนูมาตรวจหาไข่พยาธิใบไม้ตับ เฉพาะตัวที่ตรวจพบไข่พยาธิจึงทำการป้อนยา Praziquantel ขนาด 400 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม โดยฆ่าหนูด้วยอีเทอร์ที่เวลา 6, 12, 24 ชั่วโมง หลังจากได้รับยา แล้วทำการผ่าตัดเปิดหน้าท้อง นำส่วนบริเวณหัวของตับซึ่งเป็น บริเวณที่มีพยาธิอาศัยอยู่มาศึกษา

6. นำตัวไปทำการสกัด Total RNA แล้วไปวัดความเข้มข้น และเปลี่ยนเป็น cDNA โดยอาศัยเอนไซม์ Reverse Transcriptase (RT)

7. ทำ RT-PCR เพื่อการแสดงออกของยีนคือ apoptosis-related genes ; p53 BAX, Caspase 9 และ Caspase 3 ซึ่งเป็น mitochondrial apoptotic gene ส่วน PKB เป็น anti-apoptotic gene ของหนูแต่ละกลุ่มทดลองในระยะเวลาต่างกัน เปรียบเทียบกับยีนที่มีการแสดงออกอย่างสม่ำเสมอ มีการเปลี่ยนแปลงน้อย (house keeping gene) คือ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (MG3PDH)

8. นำ PCR Product มาแยกใน agarose gel อ่านผลภายใต้ UV light ถ่ายภาพ agarose gel ที่ได้มาวัดความเข้มของ band โดยใช้โปรแกรม Scion Image (Scion Co., Frederick, MD, USA.)

9. ทำการยืนยันผลที่ได้อีกครั้งโดยใช้ real time- RT-PCR ใช้ เครื่อง ABI 7500

3. วิธีการทดลอง (Methods)

3.1 การเตรียมตัวอ่อนระยะ metacercariae ของพยาธิใบไม้ในตับ *Opisthorchis viverrini*

นำปลาในกลุ่มวงศ์ตะเพียนที่มีการติดเชื้อตามแหล่งน้ำธรรมชาติในจังหวัดขอนแก่น โดยปลาที่ได้จะนำมาสับให้เป็นชิ้นขนาดเล็ก จากนั้นนำไปปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น (blender) ในสารละลายเปปซิน (1 % pepsin, 0.85 % NaCl, 0.1% HCl) เป็น เวลา 3-5 นาที แล้วผสมเนื้อปลาที่ละเอียดด้วยสารละลายเปปซินอีกครั้ง ในอัตราส่วน 4:6 โดยปริมาตร แล้วนำไปบ่มใน shaking water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำปลาที่ย่อยแล้วมากรองด้วยตะแกรงที่มีรูขนาดต่างๆ คือขนาดตะแกรง 1,000, 425, 106 และ 50 ไมโครเมตร ตามลำดับ โดยใช้เกลือ (0.85% NaCl) เป็นตัวเจือจาง นำตะกอนที่ได้มาตกตะกอนใน sedimentation jar เพื่อเลือกหา metacercariae ของพยาธิใบไม้ในตับด้วยกล้อง stereomicroscope โดย metacercaria ที่ได้จะถูกเก็บไว้ในน้ำเกลือที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เมื่อครบตามจำนวนที่ต้องการจึงนับแยกเอาเฉพาะ metacercaria ที่มีชีวิตนำไปป้อนให้แฮมสเตอร์ โดยป้อน 50 metacercariae ต่อหนูหนึ่งตัว

3.2 การป้อนตัวอ่อนระยะ metacercariae ของพยาธิใบไม้ในตับ *O.viverrini* ให้สัตว์ทดลอง

นับ metacercaria เฉพาะที่มีชีวิต (มองเห็นการเคลื่อนไหวภายในซีสต์) จำนวน 50 ซีสต์ ที่เตรียมไว้ นำมาป้อนหนูแฮมสเตอร์ โดยดูพยาธิที่นับจำนวนไว้ในน้ำเกลือปริมาณไม่เกิน 1 มิลลิลิตร ป้อนพยาธิทางปากโดยสอดท่อ polyethylene tube ที่ต่อจากปลายเข็มเข้าทางปาก เข้าหลอดอาหารของหนู แล้วจึงปล่อยพยาธิเข้าไปในขณะที่แฮมสเตอร์สลบจากการดมด้วยอีเทอร์ หลังจากนั้นประมาณ 1-3 นาที แฮมสเตอร์ก็จะฟื้นกลับมาเป็นปกติ

3.3 การสกัด Total RNA จากตับโดยใช้ Trizol® reagent (Univitrogen, USA)

1. Homogenization : ตัดตับหนูขนาด 0.5 x 0.5 เซนติเมตร น้ำหนักประมาณ 300 มิลลิกรัม นำมา homogenize ด้วย glass homogenizer แล้วเติม Trizol® reagent 1.5 มิลลิตร ทำการบดเพื่อให้เซลล์แตก นำมาใส่ tube ขนาด 1.5 มิลลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นแยกที่ 12,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ใส่ tube ใหม่
2. Separation phase : เติม Chloroform 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 นาที นำไปปั่นแยกที่ 12,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ใส่ tube ใหม่
3. DNA, RNA Precipitation : เติม Isopropanol 750 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นแยกที่ 12,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ได้ตะกอน RNA และ DNA สีขาวอยู่ที่ก้นหลอด เทส่วนใสทิ้ง ทำการล้างตะกอนด้วย 75% ethyl alcohol ที่เย็นโดยการกลั้วเบาๆ แล้วจึงเท 75% ethyl alcohol ทิ้ง จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 10-20 นาที
4. Re-dissolving DNA และ RNA: ละลายตะกอนด้วย DEPC-treated water 100 ไมโครลิตร เมื่อละลายหมดแล้ว ทำการ heat shock โดยนำไปต้มในเครื่อง water bath ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หลังจากนั้นทำลาย DNA ด้วย DNase 12.5 ไมโครลิตร HPRI 2.5 ไมโครลิตร, 10x DNase buffer 2.5 ไมโครลิตร โดยใช้ DNA 210 ไมโครลิตร ซึ่งปริมาตรรวม เท่ากับ 250 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปต้มในเครื่อง water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที
5. Stop reaction: ทำการหยุดปฏิกิริยาและทำการแยกชั้นโปรตีนด้วย phenol+ chloroform (1:1 โดยปริมาตร 125+125 ไมโครลิตร) นำไปปั่นแยกที่ 12,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วนำส่วนใสใส่ tube ใหม่
6. RNA precipitation: ทำการตกตะกอน RNA ด้วย 1/10 โดยปริมาตรของ 2.5M Sodium acetate และ 2.5 ของ absolute ethyl alcohol นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 ถึง -80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วนำไปปั่นแยกที่ 12,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ได้ตะกอน RNA สีขาวอยู่ที่ก้นหลอด เทส่วนใสทิ้ง ทำการล้างตะกอนด้วย 75 % ethyl alcohol โดยการนำไปปั่นแยกที่ 12,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้งตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง
7. Re-dissolving RNA : ทำละลายตะกอนด้วย DEPC-treated water 100 ไมโครลิตร เมื่อละลายหมดแล้ว ทำการ heat shock โดยนำไปต้มในเครื่อง water bath ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จะได้ RNA แล้วนำไปวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 260 และ 260/280 นาโนเมตร แล้วคำนวณความเข้มข้นของ total RNA เพื่อทำ cDNA ต่อไป

ไพรเมอร์จะส่งเคราะห์จากหน่วยบริการ ชีวภาพ (Bioservice Unit, BSU : <http://bsu.biotec.or.th>) ไพรเมอร์แต่ละคู่ที่ใช้มีลำดับเบสและความยาวของ PCR products ขนาดต่าง ๆ ดังตาราง ข้างล่าง

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา apoptosis-related gene โดยวิธี RT-PCR

Gene	Product length	Sequence	GenBank Accession number/reference
		upper line: forward primer bottom line: reverse primer	
Akt /PKB	434 bp	5'GCCTTGCTTCGCTCTGTGAC3' 5'AGCCGAGCGGTAAAGGATTC3'	Boonmars et al.,2005
BAX	419 bp	5' CACCTGAGCTGACCTTGGAG 3' 5' GAGGACTCCAGCCACAAAGA 3'	Boonmars et al.,2005
Caspase 9	474 bp	5' ACCAATGGGACTCACAGCAA 3' 5' AGGATGACCACCACAAAGCA 3'	Boonmars et al.,2005

ตารางที่ 2 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา apoptosis-related gene โดยวิธี real time RT- PCR

Gene	Product length	Sequence upper line: forward primer bottom line : reverse primer	Reference
Akt/PKB	201 bp	GGTGATCCTGGTGAAGGAGA GCGTACTCCATGACAAAGCA	M94335
BAX	215 bp	AGCTGCAGAGGATGATTGCT CTCTCGGAGGAAGTCCAGTG	AJ582075.1
Caspase 9	205 bp	GATGCTGTCCCCTATCAGGA GGGACTGCAGGTCTTCAGAG	NM 015733
P53	232 bp	AAGGCGATAGTTTGGCTCCT CTGGGGTCTTCCAGTGTGAT	Y08900

ตารางที่ 3 ไพรเมอร์ที่ใช้เป็นยีนควบคุมโดยวิธี RT-PCR และ real time RT-PCR

Gene	Product length	Sequence upper line: forward primer bottom line : reverse primer	Reference
MG3PDH	228 bp	5'GGCATTGTGGAAGGGCTCAT 5' GACACATTGGGGGTAGGAACAC3'	Boonmars et al.,2005

3.4 การทำ Reverse transcription โดยใช้ M-MLV

RNA ที่ได้จะถูกนำมาทำเป็น cDNA ตามวิธีการของบริษัทผู้ผลิต M-MLV (Wordmedic) ดังนี้ นำ Total RNA มาละลายในอัตราส่วน 1:7 โดยจุด RNA มา 1 ไมโครลิตร (ประมาณ 3 ไมโครกรัม) และ Oligo(dT) 1 ไมโครลิตร ปริมาณรวมเท่ากับ 15 ไมโครลิตร โดยการเติมน้ำ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วเก็บไว้ในน้ำแข็ง จากนั้นทำการเตรียม สารละลายดังนี้ M-MLV RT 1 ไมโครลิตร dNTP, dCTP, dGTP, dTTP อย่างละ 1.25 ไมโครลิตร) ปริมาณรวมเท่ากับ 25 ไมโครลิตรโดยการเติมน้ำ จากนั้นนำไปบ่มในเครื่อง water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ทำการ heat shock ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หลังจากนั้นจะได้ cDNA ซึ่งจะถูกนำมาใช้เป็น template เพื่อทำ PCR และ real time RT-PCR ต่อไป

3.5 การทำ PCR

1. นำ cDNA template มาละลายในอัตราส่วน 1:10 ก่อน แล้วทำการเตรียม PCR reaction mix ใน tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ดังนี้ cDNA 1 ไมโครลิตร dNTP mix 1 ไมโครลิตร, 10x buffer 1 ไมโครลิตร sterile distilled water 5 ไมโครลิตร Taq DNA polymerase 0.04 ไมโครลิตร Forward primer 1 ไมโครลิตรและ Reverse primer 1 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 10 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่น

2. นำเข้าเครื่อง Thermal cycler และทำการตั้งโปรแกรมดังนี้

2.1 บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 นาที

2.2 ทำ PCR cycle (25-35 cycles)

94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที

56 -60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที

(แตกต่างกันไปแล้วแต่ไพรเมอร์)

72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที

2.3 รุ่ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.6 การทำ Gelelectrophoresis

เตรียม 1.5-2 % agarose gel electrophoresis โดยนำผง agarose มาละลาย I X TBE โดยการใช้ microwave จนผง agarose ละลาย รอให้เย็นแล้วจึงเทน้ำวุ้นลงใน gel tray ที่มี comb จัดวางแล้วรอจนวุ้นแข็งตัวแล้ว ดึง comb จากนั้นนำ gel ใส่ลง electrophoresis tank โดยให้ well ที่เกิดจาก comb อยู่ไปทางขั้วลบวางตัวในแนวราบ แล้วทำการเติม electrophoresis buffer คือ IX TBE buffer ลงใน electrophoresis tank ลงไปจนท่วม gel จากนั้นทำผสม 1 loading dye 2 ไมโครลิตรกับ PCR product 8 ไมโครลิตรลงใน well ของ gel จนครบ จากนั้นทำการเปิดฝา

ครอบแล้วเปิดเครื่องให้กระแสไฟฟ้าวิ่งผ่าน gel โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30-40 นาที จึงนำมานำมาย้อมด้วย ethidium bromide เป็นเวลา 30-40 นาที แล้วมาล้างน้ำออก แล้วนำมาอ่านผลและถ่ายรูปภายใต้ UV light

3.7 การคำนวณเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีน

นำ PCR product มาแยกใน agarose gel แล้วอ่านผลภายใต้ UV light ถ่ายภาพ agarose gel ที่ได้มาวัดความเข้มของ band โดยใช้โปรแกรม win 3.2 แล้วคำนวณระดับการแสดงออกของยีนเปรียบเทียบกับการแสดงออกของ MG3PDH โดยใช้สูตรดังนี้

$$= \text{Gene sample/MG3PDH of sample}$$

3.8 การออกแบบ Apoptosis related primers เพื่อใช้ในขบวนการ RT-PCR

Apoptosis-related primers จะถูกออกแบบภายใต้ published sequence โดยใช้ program oligo 4.1 และจากที่เคยตีพิมพ์แล้วของผู้วิจัยเอง ซึ่งได้แก่ BAX, PKB caspase9, caspase3 และ Endogenous control gene: MG3PDH ซึ่งใช้เป็นยีนควบคุม

3.9 การตรวจสอบ Specific primers

cDNA ที่เตรียมไว้จะถูกนำมาใช้เป็น template เพื่อทำ PCR product แล้ว หลังจากที่ได้ PCR product ทำ agarose gel electrophoresis เพื่อดู specific band ที่เกิดขึ้น

3.10 การทำ real time RT-PCR

การทำ real time RT-PCR จะใช้ SYBR[®] Green และใช้เครื่อง ABIprism 7500 sequence detector system (Applied Biosystems, Foster City, CA) ในการทำ real time RT-PCR reaction ประกอบด้วย 3 ไมโครลิตร ของ single strand cDNA, และ 1 ไมโครลิตร ของ 1X PCR buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.3, 20 mM KCl, 5 mM (NH₄)₂SO₄), 5 mM dNTPs, 5 pmole forward และ reverse primer, 0.5X SYBR Green, และ 1 U ของ Hot start Taq DNA polymerase (MBI Fermentous, St. Leon-Rot, Germany) สำหรับ PCR cycling conditions คือ 95 องศาเซลเซียส for 10 นาที จำนวน 40-50 cycles ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที, และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วย 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที การแสดงออกของยีนแบบ Relative expression ของยีน BAX, Akt/PKB, p53 and Caspase 9 จะคำนวณโดยอาศัยค่า comparative Ct method (Gerard *et al.* 1998) โดยเปรียบเทียบกับ G3PDH gene

3.11 การทำ paraffin block เพื่อศึกษา light microscopic observation และ apoptosis โดย TUNEL assay

ตับครึ่งหนึ่งที่เหลือจากหนูแต่ละตัวจะนำมาเองด้วย 10 % formalin ไว้ประมาณ 24 ชั่วโมง ที่ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นจะนำมาทำตามขั้นตอน การ ทำ paraffin block เพื่อใช้ในการ ย้อมสี hematoxylin and eosin staining (H&E) และการย้อม TUNEL

3.12 วิเคราะห์ ข้อมูล

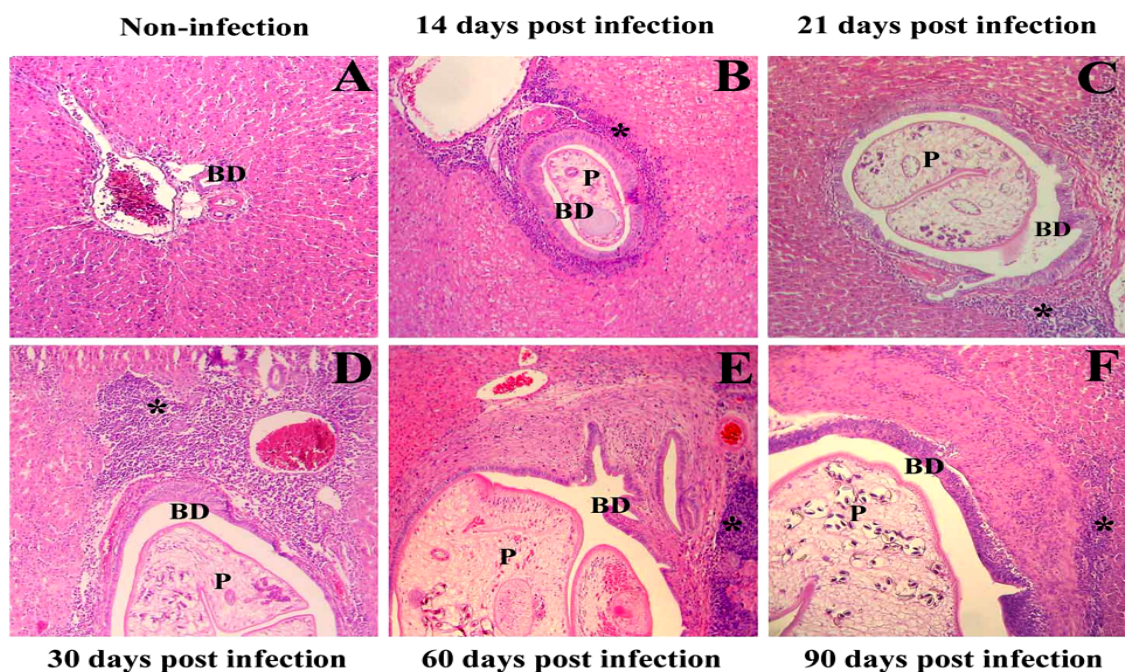
ข้อมูลที่ได้ทั้งหมดจะนำมาวิเคราะห์ด้วยคอมพิวเตอร์ โปรแกรม Scion image, STATA version 6.0 และ SPSS version 10.0 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย mean ของประชากรสองกลุ่มใช้ student pair T-test ทดสอบเปรียบเทียบกลุ่ม ใช้ Anova analysis

ผลการศึกษา

ส่วนที่ 1

การศึกษาลักษณะทางพยาธิวิทยากายวิภาค (Histopathology)

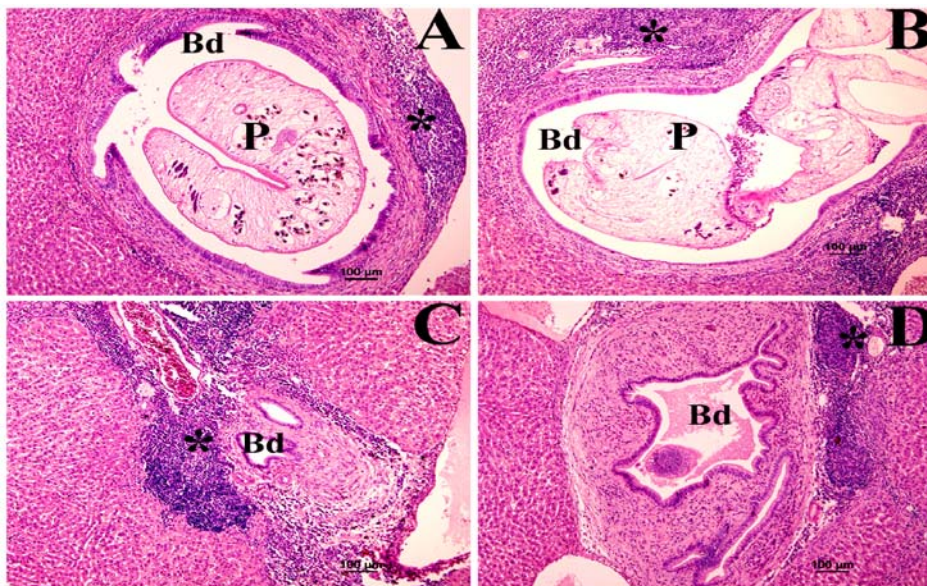
การศึกษาทางด้านพยาธิสภาพภายในของเนื้อเยื่อตับได้แสดงไว้ในภาพที่ 1 พบว่าหนูปกติที่ไม่ได้รับเชื้อไม่พบเซลล์อักเสบรอบๆผนังท่อน้ำดี (ภาพที่ 1A) ส่วนหนูที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ มี เซลล์อักเสบรอบ ๆ ผนังท่อน้ำดีในวันที่ 14 (ภาพที่ 1B) โดยจะมีจำนวนเซลล์อักเสบจำพวก eosinophils, neutrophils และ mononuclear cells รอบ ๆ ผนังท่อน้ำดีที่มียาอาศัยอยู่ ซึ่งจะเพิ่มสูงขึ้นสัมพันธ์กับระยะเวลาของการติดเชื้อโดยจะสูงที่มากที่สุด 30 วัน (ภาพที่ 1D) และค่อย ๆ ลดต่ำลงที่ 90 วัน ตามลำดับ(ภาพที่1F) โดยที่ 90 วัน จะพบเซลล์อักเสบเล็กน้อยส่วนใหญ่เป็น Lymphoid follicles และ plasma cells และมีการหนาตัวของผนังท่อน้ำดีเพิ่มขึ้น โดยมี fibrosis เกิดขึ้น (ภาพที่ 1E และ1F ตามลำดับ)



ภาพที่ 1 พยาธิสภาพภายในของเนื้อเยื่อตับ โดยการย้อม H&E ในหนูแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ จากภาพแสดง กลุ่มหนูปกติ (A) หนูที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับที่ 14 วัน (B), 21 วัน (C), 30 วัน (D), 60 วัน (E), และ 90 วัน (F) โดยอักษร P แทนพยาธิ *O. viverrini*, Bd แทนท่อน้ำดี, * แทนเซลล์อักเสบกำลังขยาย 10x

การศึกษาลักษณะทางพยาธิวิทยาภายในของเนื้อเยื่อตับในหนูแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับภายหลังการให้ยา Praziquantel (Histopathology)

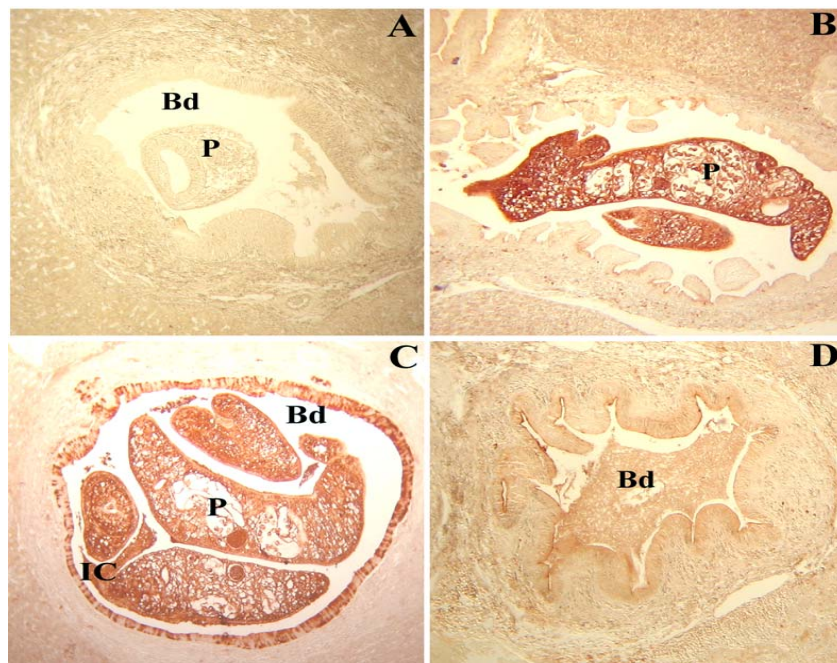
แสดงการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพภายในของเนื้อเยื่อตับในหนูแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับและที่ได้รับยา praziquantel (ภาพที่ 2) พบว่ามีการเกิด fibrosis รอบ ๆ ท่อทางเดินน้ำดีของหนูที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับและในหนูที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับที่ได้รับยา praziquantel และพบว่าในหนูที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับที่ได้รับยา praziquantel มีจำนวนเซลล์อักเสบจำนวนมากกว่ากลุ่มหนูที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับที่ 90 วัน (ภาพที่ 2A) โดยที่ 6 ชั่วโมงหลังจากได้รับยา praziquantel ส่วนใหญ่แล้วพยาธิจะถูกทำลาย และจะมีการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์อักเสบ รอบ ๆ ท่อทางเดินน้ำดีที่มีตัวพยาธิ (ภาพที่ 2B) ซึ่ง inflammatory cells ส่วนใหญ่แล้วที่พบระหว่าง 6-12 ชั่วโมงหลังการได้รับยา praziquantel เช่น eosinophils, mononuclear cells และ neutrophils กับ lymphoid aggregation (ภาพที่ 2B และ 2C ตามลำดับ) และที่ 24 ชั่วโมงภายหลังได้รับยา praziquantel พบว่าไม่พบตัวพยาธิซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าจะถูกทำลายไปหมดแล้ว (ภาพที่ 2D)



ภาพที่ 2 พยาธิสภาพภายในเนื้อเยื่อตับ โดยการย้อม H&E ในหนูแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ จากภาพแสดง กลุ่มหนูที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับแต่ไม่ได้รับยา praziquantel (A) หนูที่มีการติดเชื้อ พยาธิใบไม้ตับหลังจากได้รับยา praziquantel แล้วเป็นเวลา 6 ชั่วโมง (B) 12 ชั่วโมง (C) และ 24 ชั่วโมง (D) โดยอักษร P แทน พยาธิ *O. viverrini* Bd แทน ท่อทางเดินน้ำดี * แทน เซลล์อักเสบ ภาพกำลังขยาย 10x

การศึกษาลักษณะทางภูมิพยาธิวิทยา (Immunopathology)

การศึกษาทางด้านแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับภายในของเนื้อเยื่อตับบริเวณท่อน้ำดีของหนูที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับแต่ไม่ได้รับยา Praziquantel (ภาพที่ 3B), หนูที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับหลังจากได้รับยา praziquantel แล้วเป็นเวลา 12 ชั่วโมง(ภาพที่ 3C) และ 24 ชั่วโมง (ภาพที่3D) โดยการย้อม immunology ซึ่งจะทำการตรวจหา *Opisthorchis* antigen โดยใช้ Excretory Secretory (ES) antibody แสดงไว้ในภาพที่ 3 พบว่ามีปฏิกิริยาการจับกันของแอนติเจนและแอนติบอดีที่ผนังตัวของพยาธิ (ภาพที่3B และ 3C ตามลำดับ) ซึ่งจะติดสีมากบริเวณเซลล์เยื่อบุผนังท่อน้ำดี (epithelial cells bile duct) และเซลล์อักเสบในกลุ่มหนูที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้หลังการให้ยา praziquantel ซึ่งแสดงให้เห็นว่าพยาธิมีการถูกทำลายและมีการแตกสลายของแอนติเจนอย่างมาก ทำให้พบการติดสีที่ไซโตพลาสซึมของ epithelial cells ของท่อน้ำดี และที่เซลล์อักเสบด้วย ส่วนภาพที่ 3A เป็น negative control ที่ปราศจากแอนติบอดี

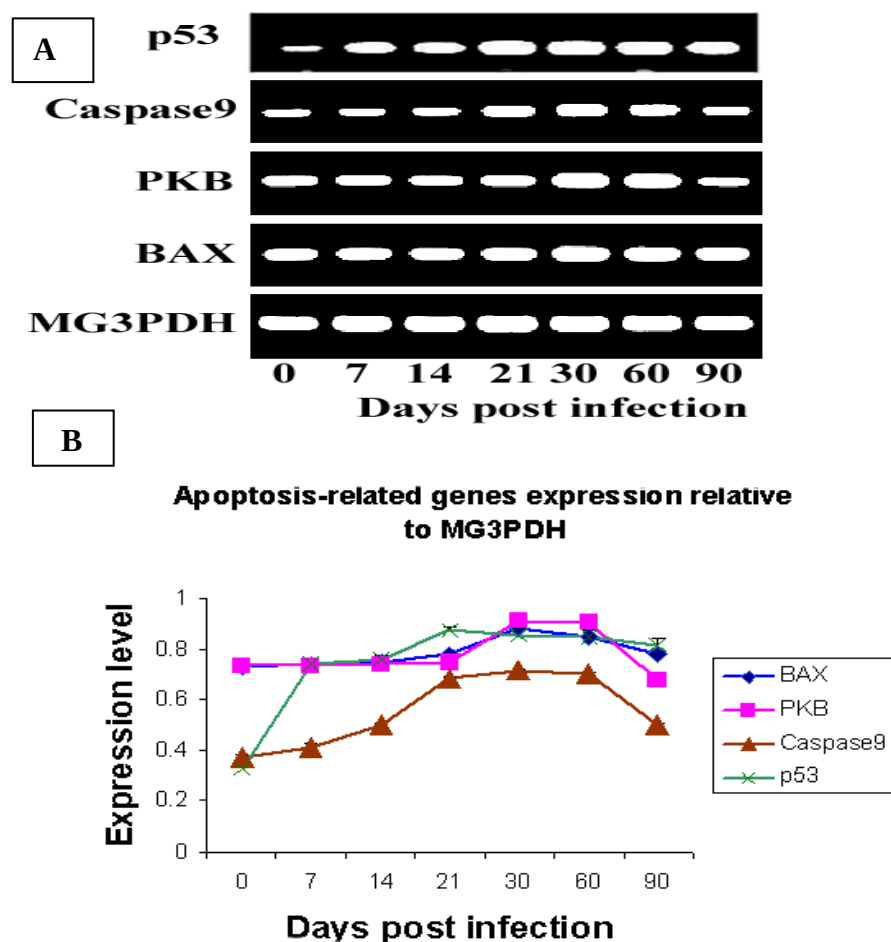


ภาพที่ 3 การย้อม Immunohistochemistry ของเนื้อเยื่อตับในหนูแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับด้วย anti-excretory secretory polyclonal antibody จากภาพแสดงกลุ่มหนูที่มีการติดเชื้อพยาธิ ใบไม้ตับที่เป็น negative control คือปราศจากแอนติบอดี (A) หนูที่มีการติดเชื้อ พยาธิใบไม้ตับที่ไม่ได้รับยา(B) หลังจากได้รับยา praziquantel แล้วเป็นเวลา 12 ชั่วโมง (C) และ 24 ชั่วโมง (D) ซึ่งสีแสดงน้ำตาลแสดงผล positive โดยอักษร P แทน พยาธิ *O. viverrini* Bd แทน ท่อน้ำดี IC แทนเซลล์อักเสบ ภาพกำลังขยาย 10x

การศึกษาโดยวิธี **semiquantitative RT-PCR** ต่อการแสดงออกของยีนที่สัมพันธ์กับการเกิด **apoptosis** ในหนูแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ ณ.เวลาต่าง ๆ กัน

จากการศึกษาการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิด apoptosis ในหนูแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับเป็นเวลา 0, 7, 14, 21, 30, 60 และ 90 วัน หลังติดเชื้อ ได้ผลดังนี้

พบการแสดงออกของ MG3PDH ซึ่งเป็นยีนควบคุม (house keeping gene) พบว่าในทุกกลุ่มการทดลองมีการแสดงออกของยีนนี้ และระดับของการแสดงออก (expression level) อยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 4) พบการแสดงออกของยีน BAX, PKB และ p53 ในทุกกลุ่มการทดลอง แต่ระดับการแสดงออกของยีนในแต่ละกลุ่มการทดลองนั้นมีค่าแตกต่างกัน ดังนี้ รูปแบบการแสดงออกของยีน BAX, PKB, caspase9 และ p53 ทั้งในกลุ่มที่ติดเชื้อพยาธิพบว่า หลังจากที่มีการติดเชื้อพยาธิระดับการแสดงออกของยีนทั้งสี่ชนิดจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นประมาณวันที่ 7 และเพิ่มขึ้นสูงที่สุดในวันที่ 30 และลดลงหลังจากวันที่ 60 ของการติดเชื้อ



ภาพที่ 4 ภาพ agarose gel electrophoresis ที่ย้อมด้วย ethidium bromide จากการทำ RT-PCR ของยีน BAX, PKB, caspase9, p53 และ MG3PDH ในหนูแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับเป็นเวลา 0, 7, 14, 21, 30, 60 และ 90 วันหลังติดเชื้อ

การศึกษาโดยวิธี *semiquantitative RT-PCR* ต่อการแสดงออกของยีนที่สัมพันธ์กับการเกิด apoptosis ในหนูแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อมาลาเรียโดยไม่ดื่มน้ำและหลังการให้ยา Praziquantel แล้วเป็นเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง

การศึกษาผลการแสดงออกของยีนในกลุ่ม apoptosis ของหนูที่ติดเชื้อมาลาเรียโดยไม่ดื่มน้ำ หลังการให้ยา Praziquantel แล้วเป็นเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่ามีแถบแบนของ PCR products แถบเดียวในแต่ละยีน และขนาดของ PCR products แต่ละยีนมีขนาดตรงกับที่ต้องการ โดยเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน ซึ่งบ่งบอกถึงความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ใช้ โดยมีการแสดงออกของยีนทุกตัวที่ศึกษาในหนูที่ติดเชื้อมาลาเรียเป็นเวลา 3 เดือนทั้งในกลุ่มที่ได้รับยาและไม่ได้รับยา และการแสดงออกของยีนเหล่านั้นจะสูงขึ้น แตกต่างกันในแต่ละเวลาหลังจากทำการให้ยา praziquantel เมื่อเปรียบเทียบกับยีนควบคุม glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (MG3PDH) โดยมีระดับการแสดงออก ดังนี้ (ภาพที่ 5A)

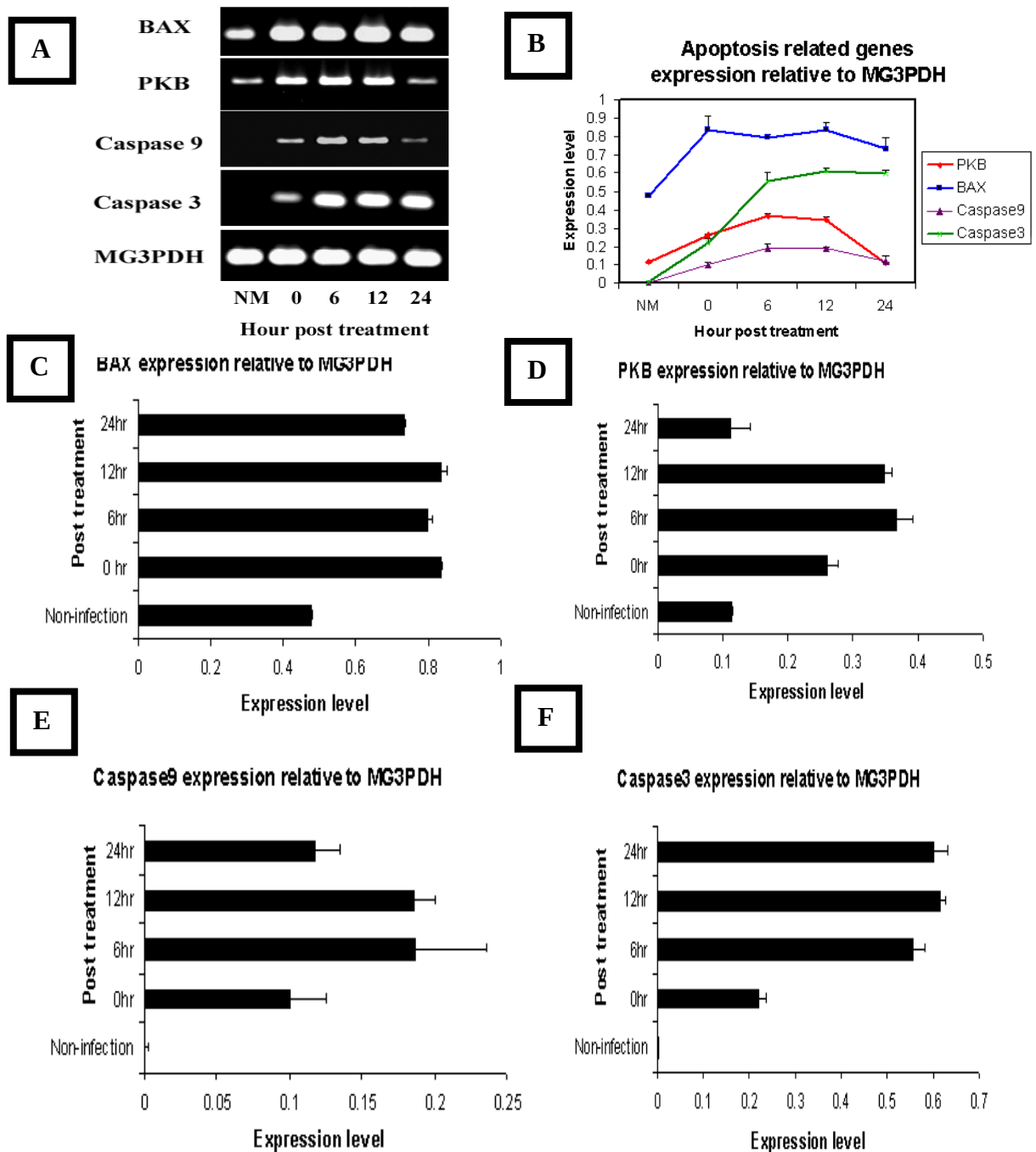
1. ระดับการแสดงออกของยีน BAX พบว่ามีระดับการแสดงออกของยีน BAX เพิ่มขึ้นในกลุ่มหลังได้รับยา praziquantel ที่เวลา 6, 12, 24 ชั่วโมง โดยมีการแสดงออกสูงที่สุดที่เวลา 12 ชั่วโมงและลดต่ำลงที่เวลา 24 ชั่วโมง ในหนูที่มีการติดเชื้อมาลาเรียที่ได้รับยา praziquantel เมื่อเปรียบกับหนูที่มีการติดเชื้อมาลาเรียโดยไม่ดื่มน้ำแต่ไม่ได้รับยา praziquantel

2. ระดับการแสดงออกของยีน Akt/PKB พบว่ามีระดับการแสดงออกของยีน Akt/PKB เพิ่มขึ้นในกลุ่มหลังได้รับยา praziquantel ที่เวลา 6, 12, 24 ชั่วโมง โดยมีการแสดงออกสูงที่สุดที่เวลา 6 ชั่วโมงและลดต่ำลงที่เวลา 24 ชั่วโมงในหนูที่มีการติดเชื้อมาลาเรียที่ได้รับยา praziquantel เปรียบกับหนูที่มีการติดเชื้อมาลาเรียโดยไม่ดื่มน้ำแต่ไม่ได้รับยา praziquantel

3. ระดับการแสดงออกของยีน Caspase 9 พบว่ามีระดับการแสดงออกของยีน Caspase 9 เพิ่มขึ้นในกลุ่มหลังได้รับยา praziquantel ที่เวลา 6, 12, 24 ชั่วโมง โดยมีการแสดงออกสูงที่สุดที่เวลา 12 ชั่วโมง และลดต่ำลงที่เวลา 24 ชั่วโมงในหนูที่มีการติดเชื้อมาลาเรียที่ได้รับยา praziquantel เชื้อมาลาเรียโดยไม่ดื่มน้ำแต่ไม่ได้รับยา praziquantel

4. ระดับการแสดงออกของยีน Caspase 3 พบว่ามีระดับการแสดงออกของยีน Caspase 3 เพิ่มขึ้นในกลุ่มหลังได้รับยา praziquantel ที่เวลา 6, 12, 24 ชั่วโมง โดยมีการแสดงออกสูงที่สุดที่เวลา 12 ชั่วโมง และลดต่ำลงที่เวลา 24 ชั่วโมง ในหนูที่มีการติดเชื้อมาลาเรียที่ได้รับยา praziquantel เชื้อมาลาเรียโดยไม่ดื่มน้ำแต่ไม่ได้รับยา praziquantel

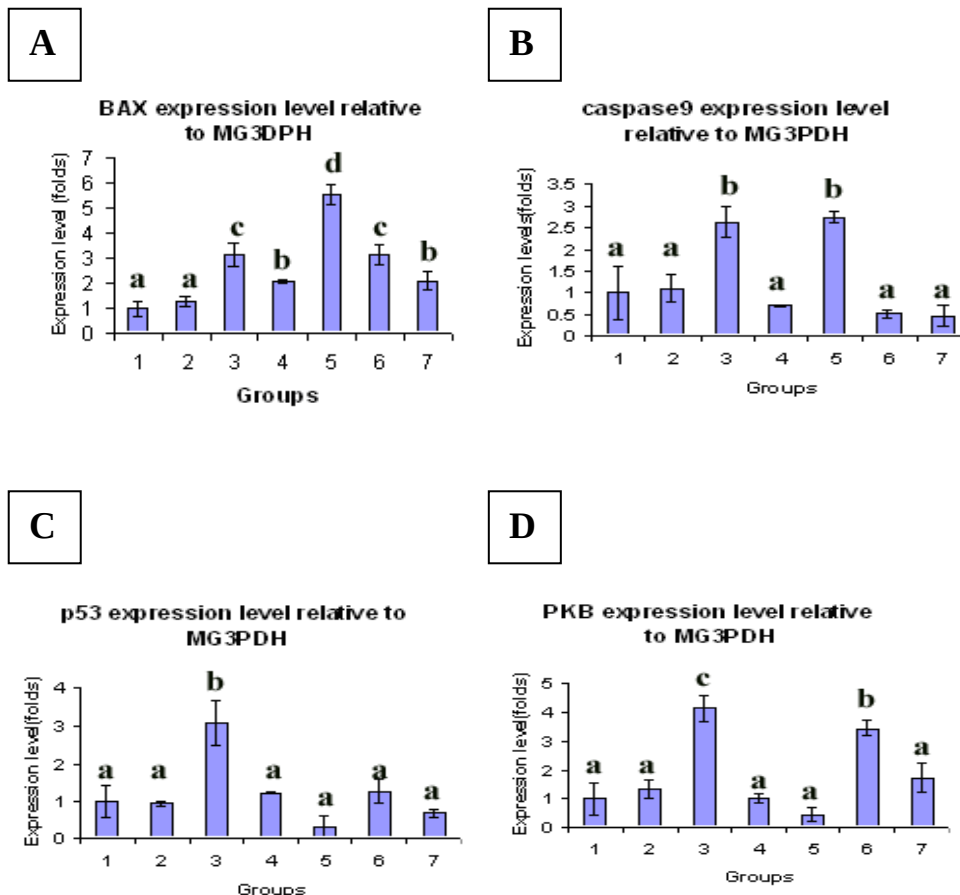
โดยการแสดงออกของยีน BAX, Akt/PKB Caspase 9 และ Caspase 3 มีระดับการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นหลังการให้ยา praziquantel



ภาพที่ 5 semi-quantitative RT-PCR แสดงภาพ agarose gel electrophoresis ที่ย้อมด้วย ethidium bromide (A) และทำการถ่ายภาพหลังจากนั้นนำวัดขนาดและความเข้มข้นของ band แล้ววิเคราะห์เปรียบเทียบสัดส่วนของยีนต่างๆกับยีนควบคุมแล้วนำมาทำกราฟของการแสดงออกของยีนต่างๆดังนี้ ยีน BAX (B), PKB (C), caspase9 (D), caspase3 (E) ในหนูแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับในเวลา 90 วันหลังติดเชื้อที่ 0, 6, 12 และ 24 ชั่วโมงหลังการรักษาด้วยยา praziquantel

การศึกษาโดยวิธี Relative real time PCR ต่อการแสดงออกของยีนที่สัมพันธ์กับการเกิด Apoptosis ในหนูแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับที่ 14, 30 และ 90 วัน และหลังจากการให้ยา Praziquantel แล้วเป็นเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง

การแสดงออกของยีน BAX, caspase9, p53 และ Akt/PKB ในหนูแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ จากภาพแสดงกลุ่มหนูปกติหนูที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับที่ 14, 30 และ 90 วัน และหนูที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับหลังจากได้รับยา praziquantel แล้วเป็นเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 6A) พบว่า การแสดงออกของยีน BAX ในทุกกลุ่มการทดลองมีระดับการแสดงออกของยีนแตกต่างกัน (ภาพที่ 6A) โดยระดับการแสดงออกของยีน BAX เพิ่มขึ้นที่ 14 วัน และมีแนวโน้มลดลงที่ 90 วัน ซึ่งหลังจากที่มีการติดเชื้อ (14, 30, 90 วัน) มีระดับการแสดงออกของยีน BAX สูงกว่ากลุ่มหนูปกติ โดยจะแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 30 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูปกติหนูที่มีการติดเชื้อพยาธิที่ 14 และ 90 วัน ตามลำดับ ($p < 0.05$) และที่ 14 วันมีระดับการแสดงออกของยีน BAX เพิ่มขึ้น แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูปกติ โดยระดับการแสดงออกของยีน BAX มีแนวโน้มลดลงที่ 90 วัน ส่วนกลุ่มหนูที่มีการติดเชื้อพยาธิที่ภายหลังได้รับยา praziquantel ที่ 6 ชั่วโมง มีระดับการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มหนูที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับหลังจากได้รับยา praziquantel แล้วเป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมงกลุ่มหนูปกติหนูที่มีการติดเชื้อพยาธิที่ 14, 30 และ 90 วัน ตามลำดับ ($p < 0.05$) ส่วนการแสดงออกของยีน caspase9 (ภาพที่ 6B), p53 (ภาพที่ 6C) และ Akt/PKB (ภาพที่ 6D) มีรูปแบบการแสดงออกของยีน คล้ายคลึงกับยีน BAX โดยระดับการแสดงออกของยีนเหล่านี้จะสูงขึ้นในหนูที่มีการติดเชื้อพยาธิที่ 30 วันและหนูที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับหลังจากได้รับยา praziquantel แล้วเป็นเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ($P < 0.05$)



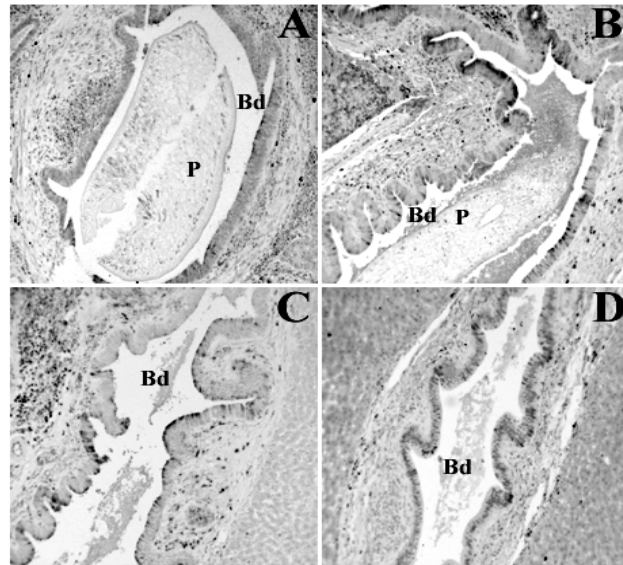
ภาพที่ 6 ระดับการแสดงออกของยีน BAX (A), caspase9 (B), p53 (C) และ PKB (D)

เปรียบเทียบกับยีนควบคุม MG3PDH (เท่า) โดย 1 แทนหนูปกติ, 2 แทน หนูที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับที่ 14 วัน 3 แทน กลุ่มที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับที่ 30 วัน 4 แทน หนูที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับที่ 90 วัน หรือ กลุ่มหนูที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ 90วัน แต่ไม่ได้รับยา praziquantel , 5 แทน หนูที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ 90 วัน หลังจากได้รับยา praziquantel แล้วเป็นเวลา 6 ชั่วโมง 6 แทน หนูที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ 90 วันหลังจากได้รับยา praziquantel แล้วเป็นเวลา 12 ชั่วโมง 7 แทน หนูที่มีการติดเชื้อพยาธิ ใบไม้ตับ 90 วันหลังจากได้รับยา praziquantel แล้วเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การศึกษาการตายของเซลล์ (Apoptotic assay)

เพื่อศึกษาถึงการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายหลังจากที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับเป็นเวลา 90 วันหลังจากได้รับยา praziquantel ต่ออัตราการเพิ่มขึ้นของการตายเซลล์ ภาพที่ 7 แสดงการเกิด apoptosis ของเนื้อเยื่อตับในแต่ละกลุ่มการทดลอง คือ หนูที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับที่ไม่ได้รับยา praziquantel (A) หนูที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับและได้รับยา praziquantel แล้ว เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (B) หนูที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ 90 วันและได้รับยา

praziquantel แล้วเป็นเวลา 12 ชั่วโมง (C) และหนูที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ 90 วันหลังและได้รับยา praziquantel แล้วเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (D) พบว่าเกิดผล positive ที่ nucleuse ของ inflammatory cells และ epithelial bile duct พบว่าจะเกิดผล positive เล็กน้อยที่ inflammatory cells และ epithelial bile duct ในหนูที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับที่ไม่ได้รับยา praziquantel และ ที่ 24 ชั่วโมงภายหลังจากได้รับยา praziquantel โดยพบว่าส่วนใหญ่จะมี apoptotic cells ของ inflammatory cells และ epithelial bile duct ของหนูที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับและได้รับยา praziquantel แล้วเป็นเวลา 6 และ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ



ภาพที่ 7 การย้อม apoptosis โดยใช้ TUNEL assay ในเนื้อเยื่อตับของกลุ่มหนูที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับแต่ไม่ได้รับยา praziquantel (A), หนูที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับหลังจากได้รับยา praziquantel แล้วเป็นเวลา 6 ชั่วโมง (B) 12 ชั่วโมง (C) และ 24 ชั่วโมง (D) ซึ่งถูกแสดงผล positive โดยอักษร P แทน พยาธิ *O. viverrini*, Bd แทน ท่อทางเดินน้ำดี

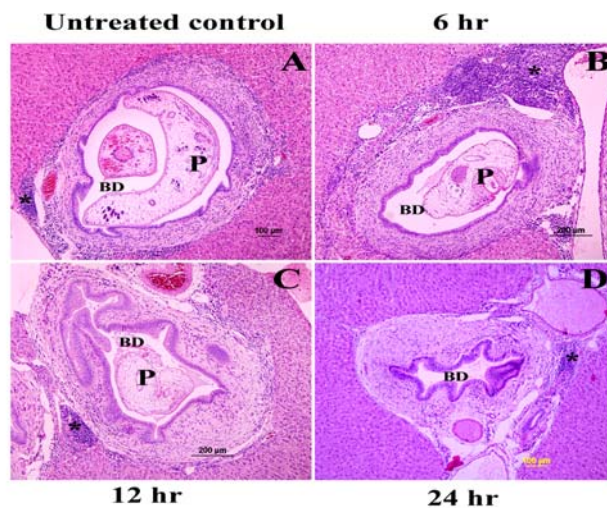
ผลการศึกษา

ส่วนที่ 2

การศึกษาการแสดงออกของ **apoptosis –related genes** ในหนูที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับซ้ำ ภายหลังการให้ยา **Praziquantel** พร้อมทั้งให้การรักษาซ้ำ

การศึกษาลักษณะทางพยาธิวิทยากายวิภาคของหนูที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับซ้ำภายหลังการให้ยา **Praziquantel** พร้อมทั้งให้การรักษาซ้ำ (**Histopathology**)

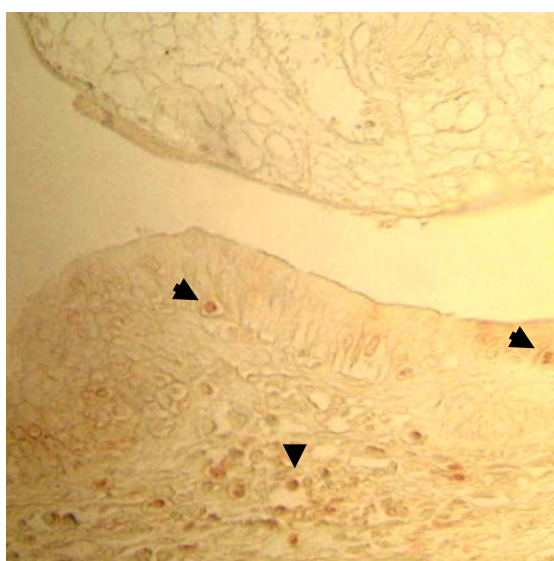
การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของหนูแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับซ้ำหลังจากการรักษาด้วยยา praziquantel และรักษาซ้ำ (ภาพที่ 8) พบว่าการเกิด fibrosis ค่อนข้างหนาขึ้น รอบ ๆ ท่อทางเดินน้ำดีของทั้งหนูที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับซ้ำและหนูที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับซ้ำที่ได้รับยา praziquantel และนอกจากนี้ยังพบว่ามีจำนวนเซลล์อักเสบรอบ ๆ ท่อทางเดินน้ำดีมากกว่ากลุ่มหนูที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับซ้ำแต่ไม่ได้รับยา praziquantel (ภาพที่ 8A) โดยที่ 6 ชั่วโมงหลังจากได้รับยา praziquantel ส่วนใหญ่แล้วพยาธิจะถูกทำลาย และจะมีการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์อักเสบรอบ ๆ ท่อทางเดินน้ำดีที่มีตัวพยาธิ (ภาพที่ 8B) ซึ่ง inflammatory cells ส่วนใหญ่แล้วจะพบระหว่าง 6-12 ชั่วโมงหลังการได้รับยา praziquantel เช่น eosinophils, mononuclear cells และ neutrophils กับ lymphoid aggregation (ภาพที่ 8B และ 8C ตามลำดับ) และที่ 24 ชั่วโมงภายหลังได้รับยา praziquantel พบว่าไม่พบตัวพยาธิซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าอาจจะถูกทำลายไปหมดแล้ว (ภาพที่ 8D)



ภาพที่ 8 พยาธิสภาพภายในเนื้อเยื่อตับ โดยการย้อมสี H&E ในหนูแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับซ้ำ จากภาพแสดงกลุ่มหนูที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับซ้ำแต่ไม่ได้รับยา praziquantel (A), หนูที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับซ้ำหลังจากได้รับยา praziquantel แล้วเป็นเวลา 6 ชั่วโมง (B), 12 ชั่วโมง (C) และ 24 ชั่วโมง (D) โดยอักษร P แทนพยาธิ *O.viverrini*, Bd แทน ท่อทางเดินน้ำดี, * แทน เซลล์อักเสบ ภาพกำลังขยาย 10x

การศึกษาการตายของเซลล์ (Apoptotic assay)

เพื่อเป็นการยืนยันว่ามีการเกิดการตายของเซลล์ขึ้นจริง โดยใช้ TUNEL assay (ภาพที่ 9) แสดงการเกิด apoptosis ในเนื้อเยื่อตับของหนูแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับซ้ำแต่ไม่ได้รับยา praziquantel และหนูที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับซ้ำที่ได้รับยา praziquantel พบว่าเกิดผล positive ในทุกกลุ่มการทดลอง ซึ่งจะพบ apoptotic cells ที่ nucluse ของ inflammatory cells และ epithelial bile duct ของหนูที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับซ้ำและหนูที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับซ้ำที่ได้รับยา praziquantel



ภาพที่ 9 แสดงภาพการย้อม apoptotic cell death ด้วยวิธี TUNEL ในเนื้อเยื่อตับของหนูแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับซ้ำและรักษาด้วยยา praziquantel โดยที่ปลายหัวลูกศรแสดง apoptotic cell death

การศึกษาโดยวิธี Relative real time RT-PCR ต่อการแสดงออกของยีนที่สัมพันธ์กับการเกิด Apoptosis ในหนูที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับที่เวลา 14, 30 และ 90 วันหลังการติดเชื้อ และหนูที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับซ้ำและได้รับยา Praziquantel แล้วเป็นเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง

จากการศึกษาการแสดงออกของยีนแบบ Relative expression ของยีน BAX, PKB, caspase9 และ p53 ที่เกี่ยวข้องกับการเกิด apoptosis ของหนูที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับที่เวลา 14, 30 และ 90 วันหลังการติดเชื้อ และหนูที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับซ้ำและได้รับยา Praziquantel แล้วเป็นเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง โดยใช้เทคนิค Relative real time PCR ซึ่งคำนวณค่า

comparative Ct ทำการเปรียบเทียบกับยีนควบคุม G3PDH เป็นจำนวนเท่า โดยมีระดับการแสดงออกดังนี้

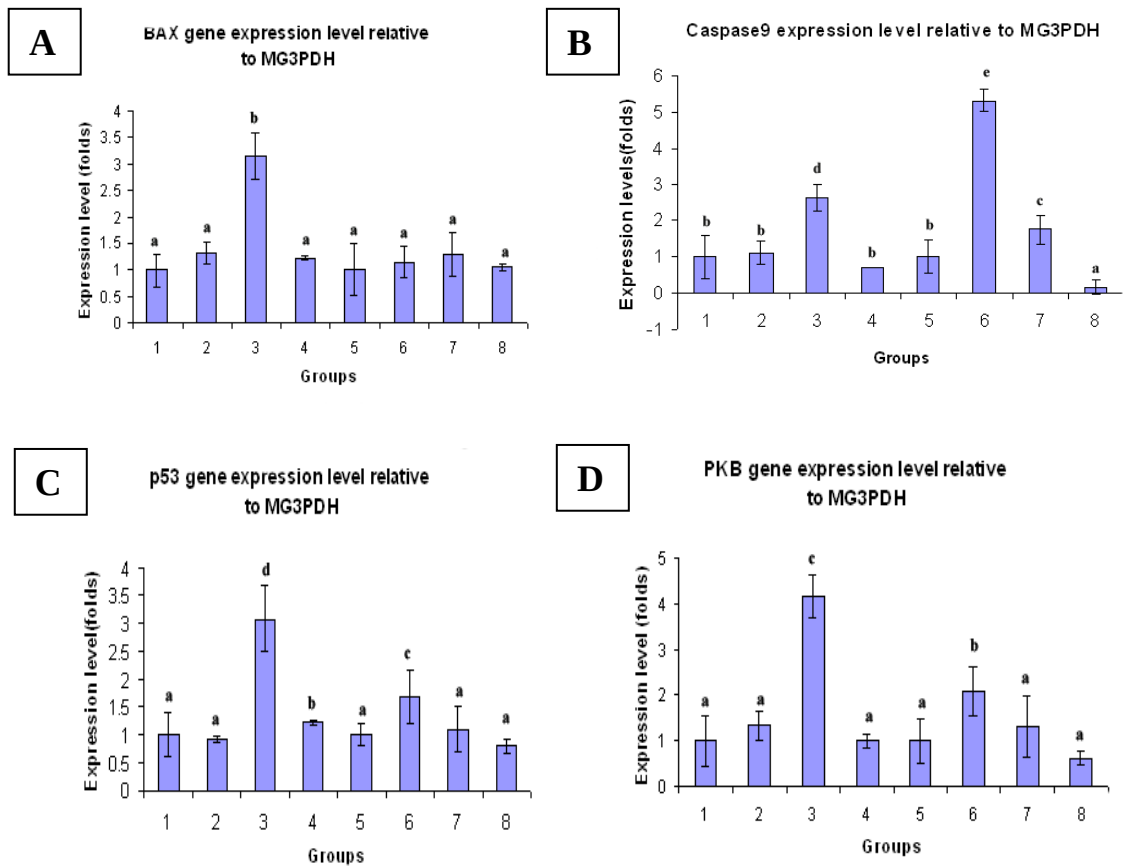
1. ระดับการแสดงออกของยีน BAX พบว่า มีระดับการแสดงออกของยีน BAX ในทุกกลุ่มการทดลองโดยมีระดับการแสดงออกของยีนแตกต่างกัน (ภาพที่ 10A) โดยระดับการแสดงออกของยีน BAX เพิ่มขึ้นที่ 14 วันโดยสูงที่สุดที่ 30 วันและมีแนวโน้มลดต่ำลงที่ 90 วัน หลังการติดเชื้อ และมีการเพิ่มขึ้นอีกครั้งในหนูที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับซ้ำและหลังจากได้รับยา praziquantel ที่ 6 และ 12 ชั่วโมงตามลำดับ และลดต่ำลงที่ 24 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบทางสถิติพบว่า หนูที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ ที่ 30 วันมีระดับการแสดงออกของยีนสูงที่สุด โดยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูปกติ, หนูที่มีการติดเชื้อพยาธิที่ 14 และ 90 วัน, หนูที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับซ้ำและหลังจากได้รับยา praziquantel ที่ เวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมงและหนูที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับซ้ำแต่ไม่ได้รับยา praziquantel โดยลำดับรองลงมาที่มีระดับการแสดงออกของยีน BAX สูงเป็นอันดับสอง

2. ระดับการแสดงออกของยีน caspase9 พบว่า มีระดับการแสดงออกของยีน caspase9 ในทุกกลุ่มการทดลองโดยมีระดับการแสดงออกของยีนแตกต่างกัน(ภาพที่ 10B) โดยระดับการแสดงออกของยีน caspase9 เพิ่มขึ้นที่ 14 วัน และมีแนวโน้มลดต่ำลงที่ 90 วัน และเพิ่มขึ้นอีกครั้งในหนูที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับซ้ำและหลังจากได้รับยา praziquantel ที่ 6 และสูงที่สุดที่เวลา 12 ชั่วโมง และลดต่ำลงที่ 24 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบทางสถิติพบว่า หนูที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับซ้ำและหลังจากได้รับยา praziquantel ที่ 6 ชั่วโมง มีระดับการแสดงออกของยีนสูงที่สุด โดยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูปกติ, หนูที่มีการติดเชื้อพยาธิที่ 14, 30 และ 90 วัน หนูที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับซ้ำและหลังจากได้รับยา praziquantel ที่ 12 และ 24 ชั่วโมงและหนูที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับซ้ำแต่ไม่ได้รับยา praziquantel โดยลำดับรองลงมาที่มีระดับการแสดงออกของยีน caspase9 สูงเป็นอันดับสอง คือ หนูที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ ที่ 30 วันหลังการติดเชื้อ โดยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับทุกกลุ่มการทดลอง

3. ระดับการแสดงออกของยีน p53 พบว่า มีระดับการแสดงออกของยีน p53 ในทุกกลุ่มการทดลองโดยมีระดับการแสดงออกของยีนแตกต่างกัน(ภาพที่ 10C) โดยระดับการแสดงออกของยีน p53 เพิ่มขึ้นที่ 30 วัน และลดต่ำลงที่ 90 วัน และเพิ่มขึ้นอีกครั้งในหนูที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับซ้ำและหลังจากได้รับยา praziquantel ที่เวลา 6 ชั่วโมงและค่อยๆลดต่ำลงที่ 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบทางสถิติพบว่า หนูที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ ที่ 30 วันมีระดับการแสดงออกของยีนสูงที่สุด โดยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูปกติ, หนูที่มีการติดเชื้อพยาธิที่ 14 และ 90 วัน, หนูที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับซ้ำและหลังจากได้รับยา praziquantel ที่เวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง และหนูที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับซ้ำแต่ไม่ได้รับยา praziquantel โดยลำดับรองลงมาที่มีระดับการแสดงออกของยีน p53 สูงเป็นอันดับสอง คือ หนูที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับซ้ำและหลังจากได้รับยา praziquantel ที่ 6 ชั่วโมงโดยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับทุกกลุ่มการทดลอง

4. ระดับการแสดงออกของยีน Akt/PKB พบว่า มีระดับการแสดงออกของยีน Akt/PKB ในทุกกลุ่มการทดลองโดยมีระดับการแสดงออกของยีนแตกต่างกัน(ภาพที่ 10D) โดยระดับการแสดงออกของยีน Akt/PKB เพิ่มขึ้นที่ 14 วัน โดยจะเพิ่มสูงที่สุดที่ 30 วัน และลดต่ำลงที่ 90 วัน และเพิ่มสูงขึ้นอีกครั้งในหนูที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับซ้ำและหลังจากได้รับยา praziquantel ที่เวลา 6 ชั่วโมงและค่อยๆลดต่ำลงที่ 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบทางสถิติพบว่า หนูที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ ที่ 30 วันมีระดับการแสดงออกของยีนสูงที่สุด โดยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูปกติ, หนูที่มีการติดเชื้อพยาธิที่ 14 และ 90 วัน, หนูที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับซ้ำและหลังจากได้รับยา praziquantel ที่เวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมงและหนูที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับซ้ำแต่ไม่ได้รับยา praziquantel โดยลำดับรองลงมาที่มีระดับการแสดงออกของยีน Akt/PKB สูงเป็นอันดับสอง คือ หนูที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับซ้ำและหลังจากได้รับยา praziquantel ที่ 6 ชั่วโมงโดยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับทุกกลุ่มการทดลอง

โดยการแสดงออกของยีน BAX, Caspase 9, p53 และ Akt/PKB มีระดับการแสดงออกของยีนเพิ่มสูงขึ้นในหนูที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับและจะสูงขึ้นอีกครั้งในหนูที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับซ้ำภายหลังจากได้รับยา praziquantel โดยแต่ละยีนจะมีระดับการแสดงออกของยีนคล้ายคลึงกัน โดยระดับการแสดงออกของยีนเหล่านี้จะเริ่มสูงขึ้นในหนูที่มีการติดเชื้อพยาธิที่ 14 วันและสูงที่สุดที่ 30 วันและจะลดต่ำลงที่ 90 วันหลังการติดเชื้อ จากนั้นจะเพิ่มสูงอีกครั้งในหนูที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับหลังจากได้รับยา praziquantel โดยจะเพิ่มสูงขึ้นที่ 6 ชั่วโมงจากนั้นจะค่อยๆลดต่ำลงที่ 12 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ



ภาพที่ 10 Relative real time PCR แสดงระดับการแสดงออกของยีน BAX (A), caspase9 (B), p53 (C) และ PKB (D) เปรียบเทียบกับยีนควบคุม MG3PDH (เท่า) โดย 1 แทนหนูปกติ, 2 แทน หนูที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับที่ 14 วัน 3 แทน กลุ่มที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับที่ 30 วัน 4 แทน หนูที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับที่ 90 วัน, 5 แทน หนูที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับซ้ำแต่ไม่ได้รับยา praziquantel , 6 แทน หนูที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับซ้ำ หลังจากได้รับยา praziquantel แล้วเป็นเวลา 6 ชั่วโมง, 7 แทน หนูที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับซ้ำและหลังจากได้รับยา praziquantel แล้วเป็นเวลา 12 ชั่วโมง, 8 แทน หนูที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับซ้ำหลังจากได้รับยา praziquantel แล้วเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

อภิปราย/วิจารณ์ (Discussion)

สรุปผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

ปัจจุบันมีการใช้ยา praziquantel เพื่อรักษาการติดเชื้อพยาธิ โดยผลของยา praziquantel มีฤทธิ์ในการฆ่าพยาธิใบไม้โดยไม่ทำลายผนังลำตัวของพยาธิ ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัย (ภาพที่ 2 และ 3) โดยผลการศึกษายา praziquantel ที่ผ่านมาต่อการลดพยาธิสภาพของการติดเชื้อพยาธิ ได้แก่ shistosomiasis (Richards et al. 1989; Richter 2000) และ opisthorchiasis (Hutradilok et al. 1983; Pungpak et al. 1998) ซึ่งผลของยามีผลในการฆ่าพยาธิแต่ขณะเดียวกัน มีผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นคือ ทำให้มีการผลิตอนุมูลอิสระ และมีการสร้างไนตริกออกไซด์ ออกมามากในขณะที่มีการกำจัดพยาธิซึ่งอาจเป็นอันตรายกับ host ได้ ดังนั้นจึงมีการศึกษายีนที่สัมพันธ์กับกระบวนการเกิดพยาธิสภาพในการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ โดยมียีนที่มีรายงานการศึกษาที่ผ่านมา คือที่ยีนที่เกี่ยวกับ free radicals (iNOS, NO), growth factor signaling (TGFB1, PGF, IGFBP1, IGFBP3), signal transduction pathways(TGF-beta)] (Pinlaor et al. 2004a, b; Jinawath et al. 2006; Thuwajit et al. 2006) ดังนั้น จึงมีความสนใจที่ศึกษาผลของยา Praziquantel ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ในหนูแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ (*Opisthorchis viverrini*) หลังการรักษาด้วยยา praziquantel ในระยะเวลาสั้นๆ

หลังจากที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ พยาธิจะมีการหลั่งแอนติเจนออกมา ทำให้ไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายให้มีการตอบสนอง ส่งผลทำให้มีการสร้างไนตริกออกไซด์ออกมา โดยมีการศึกษาที่ผ่านมาทั้งในมนุษย์ และในสัตว์ทดลอง (Pinlaor et al. 2006) โดยจากสาเหตุเหล่านี้ ตามที่ได้กล่าวมาเป็นปัจจัยหนึ่งซึ่งส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์ ซึ่งการเพิ่มขึ้นของกระบวนการตายของเซลล์สัมพันธ์กับจำนวนเซลล์อักเสบที่เกิดขึ้นทั้งหมด ถึงแม้ว่าทฤษฎีเดิมของการตายของเซลล์ จะพบว่าไม่เกี่ยวข้องกับเซลล์อักเสบ แต่ความในความเป็นจริงแล้ว พบว่าเซลล์อักเสบสามารถทำลายเซลล์ได้ ตลอดจนการสร้างอนุมูลอิสระทั้ง ROS และ NO (Hussain PS et al 2004; Kim Y et al., 2000; Forrester et al., 1996) และนำไปสู่กระบวนการตายของเซลล์

โดยผลของการศึกษา แสดงถึงประสิทธิภาพยา praziquantel หลังการรักษาที่ระยะเวลาสั้นๆ พบว่ายาามีผลไปกระตุ้นพยาธิให้มีการหลั่ง ES และ crude antigen ออกมามาก ส่งผลให้มีการตอบสนองของภูมิคุ้มกันของร่างกายและการชุมนุมของเซลล์อักเสบล้อมรอบตัวพยาธิ ซึ่งแสดงให้เห็นโดยผลของการย้อมวิธี immunolocalization เพื่อหา OV-ES protein (ภาพที่ 3) ซึ่งเมื่อมีการติดเชื้อพยาธิ แอนติเจนหรือสารคัดหลั่งที่ปล่อยออกมาจากตัวพยาธิมีผลทำให้ไปกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย และมีการสร้างไนตริกออกไซด์ออกมามากในระหว่างที่มีร่างกายมีความพยายามที่จะกำจัดพยาธิ ในบริเวณที่มีการติดเชื้อ ซึ่งจากการศึกษาโดยการให้ยารักษาในระยะเวลาสั้นๆที่ 6 และ 12 ชั่วโมงหลังการรักษาพบว่า การใช้ยา praziquantel ทำให้เกิดการแตกสลายของผนังตัวพยาธิที่เป็นผลให้ crude และ ES antigen ที่อยู่ในตัวของพยาธิ แพร่ออกสู่ภายนอก และเนื่องจากการที่มีการหลั่งสารออกจากตัวพยาธิซึ่งจะไปกระตุ้นให้เซลล์

อีกเสบมาบริเวณท่อทางเดินน้ำดีที่มีพยาธิอาศัยอยู่เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่หลั่งออกมา ทำให้เมื่อมีการย้อมสีจะติดสีชัดเจนให้ผล positive ที่ผนังท่อทางเดินน้ำดีและเซลล์อีกเสบที่ 6 และ 12 ชั่วโมงมากกว่า 24 ชั่วโมง เนื่องจากที่ 24 ชั่วโมง มีหลุดลอกของผนังลำตัวพยาธิออกหมดแล้วและมีจำนวนของเซลล์อีกเสบลดลง จึงเป็นเหตุผลว่าการให้ยารักษาในระยะเวลานั้นๆที่ 6 และ 12 ชั่วโมงหลังการรักษาทำไมผนังเซลล์ของผนังท่อทางเดินน้ำดีและเซลล์อีกเสบมีการติดสีมากกว่าที่กลุ่มที่มีการติดเชื้อที่ไม่ได้รับยา และหลังการให้ยาที่ 24 ชั่วโมง ซึ่งในภาวะที่มีการติดเชื้อปกติพบว่าจะมีเพียง ES antigen หลั่งออกมาเท่านั้น แต่เมื่อมีการให้ยารักษาพบว่า จะมี protein ที่มีทั้ง crude และ ES antigen ออกมาจากตัวพยาธิ

จากผลของการศึกษาโดยใช้เทคนิค RT-PCR (ภาพที่ 4,5) สัมพันธ์กับการศึกษาโดยใช้เทคนิค real time RT-PCR (ภาพที่ 6) หลังจากการติดเชื้อที่ 14 วันและ 30 วัน มีระดับการแสดงออกของยีน BAX, caspase9, p53 และ anti-apoptotic gene คือ Akt/PKB เพิ่มขึ้นสอดคล้องกับจำนวนเซลล์อีกเสบที่เพิ่มสูงขึ้นรอบๆท่อทางเดินน้ำดี (ภาพที่ 1, 2, 8) จากผลของการศึกษานี้สอดคล้องกับระดับการแสดงออกของยีน apoptotic และยีน anti-apoptotic ในหนูที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับหลังจากได้รับยา praziquantel ที่ 6 และ 12 มีความคล้ายคลึงกับ หนูที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับที่ 30 วัน ซึ่งสอดคล้องกับพยาธิสภาพที่มีการเปลี่ยนแปลง และจำนวนของเซลล์อีกเสบ

จากผลของการย้อม Apoptotic ในกลุ่มหนูหลังได้รับยา praziquantel ที่ 6 และ 12 พบว่าการเพิ่มจำนวนของเซลล์ apoptotic ใน T เซลล์และนิวเคลียสของผนังชั้นนอกท่อทางเดินน้ำดี (ภาพที่ 7,9) ซึ่งการย้อม Apoptotic เป็นจุดสำคัญในการศึกษาการเพิ่มจำนวนเซลล์ Apoptotic ที่สัมพันธ์กับระดับการแสดงออกของยีนในหนูที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับที่ได้รับยา praziquantel

ในกลไกปกติของ apoptotic mitochondrial pathway เริ่มจากการเพิ่มขึ้นของ BAX จะไปกระตุ้นการเปิดของรูที่อยู่ภายนอกเยื่อหุ้มเซลล์ในไมโทคอนเดรียและหลังจากนั้นไซโตโครมซี จะถูกปล่อยออกมาและไปจับกับ Apaf1 และ Caspase 9 ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดการตายของเซลล์มาตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีอีกหลายสาเหตุเกี่ยวกับการเพิ่มจำนวนเซลล์ Apoptosis ที่สัมพันธ์กับการแสดงออกของยีนในกลไกอื่นๆ เช่น BCL-2, MDM2 ส่วน Akt/PKB เป็นยีนที่มีคุณสมบัติเป็น anti-apoptosis ซึ่งสามารถยับยั้งการเกิด apoptosis ตลอดจนสามารถไปยับยั้ง Caspase 9 ได้อย่างไรก็ตามผลของการศึกษาอาจจะสนับสนุนความเกี่ยวกับเป็นไปได้ในเรื่องของการเพิ่มจำนวนเซลล์ตาย จากกลไกของ apoptotic mitochondrial pathway และการยับยั้งการเกิด apoptosis ในคนที่เป็โรคพยาธิใบไม้ตับและการได้รับยา praziquantel ในการรักษา ซึ่งทั้งตัวพยาธิและ ES ที่ผลิตออกมาจากพยาธิมีผลในการไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ และทำให้มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์อีกเสบ ส่งผลให้มีระดับการแสดงออกของยีน BAX, Caspase 9, p53 and Akt/PKB ที่เพิ่มขึ้น สำหรับหนูเป็นโรคพยาธิใบไม้ตับและการได้รับยา praziquantel ในการรักษา พยาธิจะตายโดยจะมีการแตกสลายของผนังเซลล์ มีการปล่อย crude และ ES antigen ที่อยู่ในตัวของพยาธิ แพร่ออกสู่ภายนอก แล้วมีผลทำให้ไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยจะเห็นได้จากการมีกรรวมตัวของเซลล์อีกเสบและมีการสร้างอนุมูลอิสระจำนวนมากบริเวณรอบๆตัวพยาธิที่

เพิ่มขึ้น (Pinlaor et al. 2004a, b, 2006) ซึ่งการเกิด DNA damage และ DNA fragmentation อย่างฉับพลันอาจจะมีผลไปเพิ่มให้เซลล์ให้เกิด apoptosis มากขึ้น ดังนั้น การเกิด apoptosis ที่สัมพันธ์กับการแสดงออกของยีนมีระดับการแสดงออกที่สูงขึ้น และจะลดลงใกล้เคียงกับกลุ่มหนูที่มีการติดเชื้อที่ไม่ได้รับยา จากผลของการศึกษานับสนุนการเพิ่มจำนวนของเซลล์อักเสบและอนุมูลอิสระ โดยมีการเพิ่มสูงขึ้นของยีนที่สัมพันธ์กับการเกิด apoptosis ซึ่งมีรายงานในหนูเมาส์ที่มีการติดเชื้อ *T. spiralis* ในกล้ามเนื้อ โดยมีการแสดงออกของยีน BAX, Caspase 9, Apaf-1, Caspase 3 and Akt/PKB ระหว่างที่มีการรวมตัวกันของเซลล์อักเสบ ในระยะแรกของการติดเชื้อในกล้ามเนื้อ อย่างไรก็ตาม มีการแสดงออกของยีนลดลงในช่วงระยะของ capsule formation ใกล้เคียงกับหนูปกติ ซึ่งในระยะ capsule formation นี้จะมีเซลล์อักเสบเล็กน้อย (Boonmars et al. 2004; Wu et al. 2005a, b) อย่างไรก็ตาม การย้อม apoptotic localization จะพบเฉพาะในนิวเคลียส ของ *Trichinella* nurse cell เท่านั้น แต่จะไม่พบใน เซลล์อักเสบ (Boonmars et al. 2004; Wu et al. 2005a, b) จากผลการทดลองนี้สามารถตรวจสอบการเกิด apoptosis ในเซลล์เนื้อเยื่อไม่ได้เกิดในเซลล์อักเสบ ซึ่งเป็นการย้อม apoptotic ตรงตำแหน่ง nuclei ของ inflammatory cells และ epithelial bile duct เท่านั้น (ภาพที่ 7,9) ฉะนั้นรูปแบบของการแสดงออกของยีนที่สัมพันธ์กับการเกิด apoptosis ในหนูแฮมสเตอร์ที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ อาจจะเกี่ยวข้องทั้งในเรื่องของการเพิ่มขึ้นของ apoptotic T cell และ epithelial hepatic bile duct. ผลของการศึกษานับสนุนผลการรักษาด้วยยา praziquantel ภายในระยะเวลาสั้นๆ มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มจำนวน apoptosis หรือการทำให้เซลล์ถูกทำลาย

สรุปและเสนอแนะตลอดจนประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลวิจัยที่ได้

ผลของการศึกษานี้สนับสนุนผลการรักษาด้วยยา praziquantel ภายในระยะเวลาสั้นๆ มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มจำนวน apoptosis หรือการทำให้เซลล์ถูกทำลาย มีการรายงานเกี่ยวกับการรักษาด้วยยาฆ่าหลายๆครั้ง อาจเป็นสาเหตุทำให้เกิด DNA หรือ protein mutation และอาจพัฒนาไปสู่การเป็นมะเร็งได้ ซึ่งประชากรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย พบว่ามีการติดเชื้อช้ำอยู่เป็นประจำอันเนื่องมาจากพฤติกรรมการบริโภคปลาวงศ์ตะเพียนที่ปรุงไม่สุก เช่น ปลาจ่อม ปลาต้ม ปลาร้า ก้อยปลา เป็นต้น ถ้าในครัวเรือนใดตรวจพบว่าเป็นพยาธิชนิดนี้อาจบ่งชี้ได้ว่าสมาชิกในครอบครัวเป็นโรคพยาธินี้ด้วย อีกทั้งการนิยมนับประทานของหมักดองซึ่งทำให้ได้รับสารจำพวกไนโตรซามีน ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง ซึ่งบอกไปถึงความเสี่ยงของการเป็นโรคมะเร็งท่อน้ำดีในอนาคตด้วย พฤติกรรมเหล่านี้ไม่สามารถปรับเปลี่ยนได้หรือปรับเปลี่ยนได้ค่อนข้างยาก อีกทั้งมีการรักษาด้วยยาอยู่บ่อยครั้ง ซึ่งนั่นหมายถึงร่างกายจะต้องมีการซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่ได้รับการบาดเจ็บอยู่เสมออีกทั้งเป็นผลร่วมกับการกระตุ้นเซลล์อักเสบจากสารจำพวกไนโตรซามีนอยู่เป็นประจำ ซึ่งเป็นเหตุนำไปสู่การผ่าเหล่าของยีนและการพัฒนากลายเป็นมะเร็ง การศึกษานี้จึงอาจเป็นองค์ความรู้ใหม่ที่ทราบถึงการรักษาด้วยยา praziquantel ฆ่าๆในสัตว์ทดลองซึ่งถึงแม้จะไม่ใช่ว่าผลเสียโดยตรงจากยาแต่เป็นผลพลอยได้ซึ่งอาจจะไม่ตึงนักและคาดว่าจะสามารถใช้หลักการหรือผลที่เกิดขึ้นมาอธิบายถึงผลในมนุษย์ และอาจเป็นปัจจัยเสี่ยงในการพัฒนาเป็นมะเร็ง และที่น่าสนใจคือ การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย อาจจะเป็นปัจจัยเสี่ยงอย่างหนึ่งที่อาจเกี่ยวข้องกับการพัฒนาเป็นมะเร็งท่อน้ำดีได้ อย่างไรก็ตามการศึกษาในคนอาจจะทำให้กระจ่างขึ้นแต่การจะนำคนมาเป็นโมเดลศึกษาก็น่าจะผิดหลักจริยธรรม ดังนั้นการศึกษาเชิงลึกในหลอดทดลองในอนาคตข้างหน้าอาจมีความจำเป็นทำให้เกิดความกระจ่างและเป็นที่ยอมรับของวงการแพทย์และสาธารณสุขมากขึ้นถึงผลที่ตามมาหลังการรักษาด้วยยา praziquantel รวมทั้งการนำไปใช้เป็นข้อควรระวังในการจ่ายยาและให้คำแนะนำแก่คนไข้ บุคคลทั่วไปที่มีการซื้อยารับประทานเองอยู่บ่อยครั้ง ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะพิสูจน์สมมุติฐานนี้ต่อไป

บรรณานุกรม

1. Apinhasmit W and Sobhon P (1996) *Opisthorchis viverrini*: effect of praziquantel on the adult tegument. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 27(2):304-311.
2. Gerard CJ, Olsson K, Ramanathan R, Reading C and Hanania EG. (1998) Improved quantitation of minimal residual disease in multiple myeloma using real-time polymerase chain reaction and plasmid-DNA complementarity determining region III standards. *Cancer Res* 58: 3957-3964.
3. Boonmars T, Wu Z, Nagano I and Takahashi Y. (2004) Expression of apoptosis-related factors in muscles infected with *Trichinella spiralis*. *Parasitology* 128(Pt 3):323-332.
4. Boonmars T, Wu Z, Nagano I and Takahashi Y. (2005) *Trichinella pseudospiralis* infection is characterized by more continuous and diffuse myopathy than *T. spiralis* infection. *Parasitol Research* 97: 13-20.
5. IARC. (1994) Infection with liver flukes (*Opisthorchis viverrini*, *Opisthorchis felinus* and *Clonorchis sinensis*). *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 61:121-175.
6. Hutradilok N, Ruenwongsa P, Thamavit W and Upatham ES. (1983) Liver collagen in *Opisthorchis viverrini* infected hamsters following praziquantel treatment. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 14(3):290-293.
7. IARC. (1997) Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Polychlorinated Dibenzo-Para-Dioxins and Polychlorinated Dibenzofurans. Lyon, France, 4-11 February 1997. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*. 69:1-631.
8. Jinawath N, Chamgramol Y, Furukawa Y, Obama K, Tsunoda T, Sripa B, Pairojkul C and Nakamura Y. (2006) Comparison of gene expression profiles between *Opisthorchis viverrini* and non-*Opisthorchis viverrini* associated human intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hepatology* 44(4):1025-1038.
9. Kim SJ, I Kim HG, Oh CD, Hwang SG, Song W-K, Yoo YJ, Kang SS and Chun JS. (2002) p38 Kinase-dependent and -independent Inhibition of Protein Kinase C δ and ϵ Regulates Nitric Oxide-induced Apoptosis and Dedifferentiation of Articular Chondrocytes. *J Biol Chem* 277: 30375-30381.
10. Kuwano K and Hara N. (2000) Signal Transduction Pathways of Apoptosis and Inflammation Induced by the Tumor Necrosis Factor Receptor Family *Am J Respir Cell Mol Biol* 22:147-149.
11. Lodish H BA, Zipursky LS, Matsudaira P, Baltimore D and Darnell J. (2000) *Molecular cell Biology*. New York: W. H. FREEMAN.

12. Pinlaor S, Hiraku Y, Yongvanit P, Tada-Oikawa S, Ma N, Pinlaor P, Sithithaworn P, Sripa B, Murata M, Oikawa S and others(2006) iNOS-dependent DNA damage via NF-kappaB expression in hamsters infected with *Opisthorchis viverrini* and its suppression by the antihelminthic drug praziquantel. *Int J Cancer* 119(5):1067-1072.
13. Pinlaor S, Hiraku Y, Ma N, Yongvanit P, Semba R, Oikawa S, Murata M, Sripa B, Sithithaworn P and Kawanishi S. (2004a) Mechanism of NO-mediated oxidative and nitrative DNA damage in hamsters infected with *Opisthorchis viverrini*: a model of inflammation-mediated carcinogenesis. *Nitric Oxide* 11(2):175-183.
14. Pinlaor S, Ma N, Hiraku Y, Yongvanit P, Semba R, Oikawa S, Murata M, Sripa B, Sithithaworn P and Kawanishi S. (2004b) Repeated infection with *Opisthorchis viverrini* induces accumulation of 8-nitroguanine and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanine in the bile duct of hamsters via inducible nitric oxide synthase. *Carcinogenesis* 25(8):1535-1542.
15. Pinlaor S, Yongvanit P, Hiraku Y, Ma N, Semba R, Oikawa S, Murata M, Sripa B, Sithithaworn P and Kawanishi S. (2003) 8-nitroguanine formation in the liver of hamsters infected with *Opisthorchis viverrini*. *Biochem Biophys Res Commun* 309(3):567-571.
16. Pungpak S, Radomyos P, Radomyos BE, Schelp FP, Jongsuksuntigul P, Bunnag D. (1998) Treatment of *Opisthorchis viverrini* and intestinal fluke infections with Praziquantel. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 29(2):246-249.
17. Richards F, Jr., Sullivan J, Ruiz-Tiben E, Eberhard M, Bishop H. (1989) Effect of praziquantel on the eggs of *Schistosoma mansoni*, with a note on the implications for managing central nervous system schistosomiasis. *Ann Trop Med Parasitol* 83(5):465-472.
18. Richter J. (2000) Evolution of schistosomiasis-induced pathology after therapy and interruption of exposure to schistosomes: a review of ultrasonographic studies. *Acta Trop* 77(1):111-131.
19. Sripa B. (2003) Pathobiology of opisthorchiasis: an update. *Acta Trop* 88(3):209-220.
20. Supanvanich S, Supanvanich K and Pawabut P. (1981) Field trial of praziquantel in human opisthorchiasis in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 12(4):598-602.
21. Thuwajit C, Thuwajit P, Uchida K, Daorueang D, Kaewkes S, Wongkham S and Miwa M. (2006) Gene expression profiling defined pathways correlated with fibroblast cell proliferation induced by *Opisthorchis viverrini* excretory/secretory product. *World J Gastroenterol* 12(22):3585-3592.

22. WHO. (2004) Food -borne trematode infections in Asia. Report of the joint WHO/FAO.WHO Regional Office for the Western Pacific, RS 2002 GE/40 (VTN) : 1-62.
23. Wu Z, Nagano I, Boonmars T and Takahashi Y. (2005a) Tumor necrosis factor receptor- mediated apoptosis in *Trichinella spiralis*-infected muscle cells. *Parasitology* 131(Pt 3):373-381.
24. Wu Z, Nagano I, Boonmars T and Takahashi Y. (2005b) A spectrum of functional genes mobilized after *Trichinella spiralis* infection in skeletal muscle. *Parasitology* 130(Pt 5):561-573.

ภาคผนวก (Appendix)

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ หรือผลงานตามที่ได้คาดไว้ในสัญญาโครงการ
 - 1) **Boonmars T**, Srirach P, Kaewsamut B, Srisawangwong T, Pinlaor S, Pinlaor P, Yongvanit P, Sithithaworn P. Apoptosis-related gene expression in hamster opisthorchiasis post praziquantel treatment. *Parasitol Res.* 2008 Feb;102(3):447-55.
 - 2) **Boonmars T**, Srisawangwong T, Srirach P, Kaewsamut B, Pinlaor S, Sithithaworn P. Apoptosis-related gene expressions in hamsters re-infected with *Opisthorchis viverrini* and re-treated with praziquantel. *Parasitol Res.* 2007 Dec;102(1):57-62.
2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์
 - เชิงสาธารณะ
ใช้ในการเผยแพร่สู่ชุมชนให้รับทราบถึงข้อดีข้อเสียและผลที่ตามมาในการซื้อขายรับประทานเองบ่อยๆ รวมทั้งให้สุศึกษาในการเฝ้าระวังการเกิดโรค
 - เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)
ผลงานที่ได้นำมาใช้ในการเรียนการสอนระดับปริญญาตรี โทและเอก รวมทั้งโครงการนี้ได้มีส่วนช่วยในการผลิตบัณฑิตระดับปริญญาโทจำนวน 1 คน
3. อื่น ๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หนังสือ การจดสิทธิบัตร)
 - 1) **Boonmars T**, Srisawangwong T, Srirach P, Kaewsamut B, Pinlaor S, Yongvanit P, Sithithaworn P. Effect of praziquantel on apoptosis-related gene expression in hamster opisthorchiasis. Joint International Tropical Medicine Meeting and Parasitic Food & water borne zoonoses 2006. The Miracle Grand convention Hotel, Bangkok, Thailand. 28 Nov-1 Dec 2006.

EFFECTS OF PRAZIQUANTEL ON APOPTOSIS-RELATED GENE EXPRESSION IN HAMSTER OPISTHORCHIASIS

Thidarut Boonmars^{1,2}, Pranee Sriraj¹, Butsara Kaewsamut¹, Somchai Pinlaor^{1,2}, Puangrat Yongvanit^{2,3}, Tuanchai Srisawangwaong¹, Paiboon Sithithaworn^{1,2}

¹Department of Parasitology; ²Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center; ³Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, 40002, Thailand
Email: boonmars@yahoo.com

OPISTHORCHIASIS is caused by *Opisthorchis viverrini* (OV), which in turn is a risk factor for cholangiocarcinoma (CCA). Despite the effectiveness of praziquantel, the drug of choice for opisthorchiasis, the prevalence of opisthorchiasis and CCA remains high. Using praziquantel appears to affect the host's cells as cell walls are degraded and inflammation, also apoptotic cell death. Free radicals, such as nitrogen radicals and cytokines, cause DNA damage leading to cell death and also DNA mutation which are a risk factor for CCA. Animal models of opisthorchiasis were conducted to investigate apoptosis-related gene expression profiles. Hamsters were divided into two groups: (i) the untreated praziquantel group (control, non-infection and post-infection with OV for 3 months); and, (ii) the treated praziquantel group (praziquantel post-treatment at 6, 12, 24 hr) and fed *ad libitum* at the Animal Unit, Faculty of Medicine, Khon Kaen University. Liver samples were collected at each time point. The reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed to detect the apoptosis-related gene expression in hamster livers [i.e., the apoptosis gene Bcl-2 associated protein X (BAX), protein kinase B (PKB), Caspase 9 and Caspase 3]. The results showed that the housekeeping gene was observed in all samples with a similar density. BAX, PKB, Caspase 3 and Caspase 9 were decreased at 6 hr post-treatment and then increased slightly at 12 hr and gradually decreased to near untreated control levels and 24 hr post-treatment, perhaps due to a decrease in inflammatory cells. The present study has shown a significant disadvantage of using praziquantel for hamster opisthorchiasis; that it may indirectly affect the host's cells through apoptosis-related gene expression by liberating free radicals and inducing inflammation. ▀

EFFECTS OF PRAZIQUANTEL ON APOPTOSIS-RELATED GENE EXPRESSION IN HAMSTER OPISTHORCHIASIS

Thidarut Boonmars^{1,2}, Pranee Sriraj¹, Butsara Kaewsamut¹, Somchai Pinlaor^{1,2},
Puangrat Yongvanit^{2,3}, Tuanchai Srisawangwaong¹, Paiboon Sithithaworn^{1,2}

¹Department of Parasitology; ²Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center; ³Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, 40002, Thailand
Email: boonmars@yahoo.com

OPISTHORCHIASIS is caused by *Opisthorchis viverrini* (OV), which in turn is a risk factor for cholangiocarcinoma (CCA). Despite the effectiveness of praziquantel, the drug of choice for opisthorchiasis, the prevalence of opisthorchiasis and CCA remains high. Using praziquantel appears to affect the host's cells as cell walls are degraded and inflammation, also apoptotic cell death. Free radicals, such as nitrogen radicals and cytokines, cause DNA damage leading to cell death and also DNA mutation which are a risk factor for CCA. Animal models of opisthorchiasis were conducted to investigate apoptosis-related gene expression profiles. Hamsters were divided into two groups: (i) the untreated praziquantel group (control, non-infection and post-infection with OV for 3 months); and, (ii) the treated praziquantel group (praziquantel post-treatment at 6, 12, 24 hr) and fed *ad libitum* at the Animal Unit, Faculty of Medicine, Khon Kaen University. Liver samples were collected at each time point. The reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed to detect the apoptosis-related gene expression in hamster livers [i.e., the apoptosis gene Bcl-2 associated protein X (BAX), protein kinase B (PKB), Caspase 9 and Caspase 3]. The results showed that the housekeeping gene was observed in all samples with a similar density. BAX, PKB, Caspase 3 and Caspase 9 were decreased at 6 hr post-treatment and then increased slightly at 12 hr and gradually decreased to near untreated control levels and 24 hr post-treatment, perhaps due to a decrease in inflammatory cells. The present study has shown a significant disadvantage of using praziquantel for hamster opisthorchiasis; that it may indirectly affect the host's cells through apoptosis-related gene expression by liberating free radicals and inducing inflammation. ▀

Apoptosis-related gene expression in hamster opisthorchiasis post praziquantel treatment

T. Boonmars · P. Srirach · B. Kaewsamut ·
T. Srisawangwong · S. Pinlaor · P. Pinlaor ·
P. Yongvanit · P. Sithithaworn

Received: 31 July 2007 / Accepted: 26 October 2007
© Springer-Verlag 2007

Abstract The aim of this study was to investigate the apoptosis-related gene expression in hamster opisthorchiasis after praziquantel treatment. Hamsters were infected with *Opisthorchis viverrini* metacercariae then treated with praziquantel. The expression of apoptosis-related genes [i.e., apoptosis gene Bcl-2-associated protein X (BAX), caspase 9, p53, and protein kinase B (PKB)] was detected by real-time reverse transcription polymerase chain reaction. Histopathological analyses of liver tissues were studied by staining the sections with hematoxylin and eosin using light microscopy. Apoptotic assay was used to localize the apoptotic cell death. The results show that BAX, Akt/PKB, p53, and caspase 9 expression level were significantly increased on day 30 post infection and at 6 h post treatment and gradually decreased nearly to the uninfected control and 24 h post treatment, perhaps due to

a decrease in inflammatory cells. Apoptotic staining was positive reaction at inflammatory cells and nuclei of epithelial bile ducts. Although using praziquantel has an advantage in killing parasites, our results show the effect of praziquantel treatment from host immune response that induces increased apoptosis-related genes in the short term due to an increase in inflammatory cells surrounding the bile ducts.

Introduction

Opisthorchiasis caused by *Opisthorchis viverrini* (OV) is prevalent mainly in Thailand, Lao People's Democratic Republic, and Cambodia. In Thailand, approximately 8 million people are infected with OV (WHO 2004); moreover, the distribution of opisthorchiasis has marked regional clumping and is highly endemic in Northeast Thailand, where the occurrence of cholangiocarcinoma (CCA) is the highest in the world (IARC 1994, 1997). Although praziquantel, the drug of choice for opisthorchiasis, has been widely used (Pungpak et al. 1998), opisthorchiasis and CCA remain the leading cause of death in this region. This may be due in part to local eating habits, which increase the risk of OV re-infection and, relatedly, the development of CCA. Although recent reports showed that praziquantel could reduce a risk factor for the pathogenesis of CCA (Pinlaor et al. 2006), frequent treatment with praziquantel may be detrimental to the host through inflammation.

People are infected with OV by ingesting raw or inadequately cooked cyprinoid fish infested with metacercaria, the infective stage of flukes. After ingestion, the metacercariae were excysted as a result of gastric and intestinal juices. The excysted juvenile flukes migrate up

T. Boonmars (✉) · P. Srirach · B. Kaewsamut ·
T. Srisawangwong · S. Pinlaor · P. Sithithaworn
Department of Parasitology, Faculty of Medicine,
Khon Kaen University,
Khon Kaen 40002, Thailand
e-mail: boonmars@yahoo.com

T. Boonmars · P. Srirach · B. Kaewsamut · S. Pinlaor ·
P. Yongvanit · P. Sithithaworn
Liver Fluke and Cholangiocarcinoma, Faculty of Medicine,
Khon Kaen University,
Khon Kaen 40002, Thailand

P. Yongvanit
Department of Biochemistry, Faculty of Medicine,
Khon Kaen University,
Khon Kaen 40002, Thailand

P. Pinlaor
Department of Clinical Microbiology,
Associated Medical Sciences, Khon Kaen University,
Khon Kaen 40002, Thailand

the common bile duct into the intrahepatic bile ducts where they mature and fertilize. Some worms were found in the common bile duct, cystic duct, or gall bladder. During infection, at the early stages of infection, the liver is changed due to the inflammatory response around the juvenile flukes in the intrahepatic bile ducts. The severity of inflammation gradually increases and reaches a maximum about 1 month post infection (as evidenced by proliferation of mononuclear cells and eosinophils infiltrates around the intrahepatic bile ducts). The virulence of the disease also involves the host's own immune response such as cytokine expression, resultant free radicals, and apoptosis through the Fas ligand, TNF α and mitochondrial pathways (Lodish et al. 2000). Chronic infection for many years is associated with several hepatobiliary diseases (Sripa 2003), which are in turn associated with the development of hepatobiliary cancer and CCA, albeit the precise genesis remains obscure.

Praziquantel is an effective antihelminthic widely used for treatment of opisthorchiasis. The chemoactivity of the medication damages the tegument of worms, leading to vacuolization, swelling, and finally disruption and detachment of the tegument and parasite death (Apinhasmit and Sobhon 1996). Although praziquantel is useful for treatment of trematodes, its side effects include mild headache, lassitude, sleepiness, and diarrhea (Supanvanich et al. 1981; Pungpak et al. 1998).

Moreover, our preliminary findings indicated that inflammatory cells were more numerous surrounding the hepatic bile duct after praziquantel treatment; therefore, we hypothesized that after praziquantel treatment, residual parasite antigens stimulated the host cellular immune response and the release of free radicals leading to cell damage and apoptosis. This would be a distinct disadvantage of praziquantel treatment of persons infected with OV, which we intended to investigate using a hamster model. Real-time reverse transcription polymerase chain reaction (real-time RT-PCR) was used to investigate apoptosis-related gene expression [i.e., Bcl-2-associated protein X (BAX), Akt/PKB, p53, and caspase 9] during OV infection, pre- and posttreatment. Light microscopy was used to investigate the histopathological change, immunolocalization of OV excretory secretory (ES) protein, and apoptotic cell death.

Materials and methods

Parasites and infection

OV metacercariae were obtained from naturally infected cyprinoid fish captured from a fresh water reservoir in an endemic area of Khon Kaen, Northeast Thailand. Fresh fish were minced and digested with pepsin HCl, filtrated, and then washed with normal saline until it was clear.

Metacercariae were isolated and identified under a dissecting microscope. Finally, they were divided into groups of 50 metacercariae for infecting hamsters by intragastric intubation. Male hamsters, aged 6–8 weeks, from the Animal Unit, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, were used in the experiments. The protocol was approved by the Animal Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Khon Kane University, Thailand (Ethical Clearance no AEKKU0023105).

They were divided into three groups: uninfected group, OV-infected group, and praziquantel-treated group. Hamsters were killed 14, 30, and 90 days post infection (dpi) and the sample prepared according to conventional methods for light microscopic observation, immunohistolocalization, and real-time RT-PCR.

Praziquantel treatment

Praziquantel purchased from Medicpharma, Bangkok, Thailand was used in this experiment. A dosage of 400 mg/kg was orally given to each hamster. Uninfected hamsters treated with praziquantel constituted the control. OV-infected hamsters at 3 months were divided to four groups as follows: (1) infected control group; (2) 6 h post treatment; (3) 12 h post treatment; and, (4) 24 h post treatment. All of the hamster groups were fed ad libitum and maintained at the Animal Unit, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand. Hamsters were killed on schedule, and the sample prepared according to conventional methods for light microscopic observation, immunohistolocalization, and real-time RT-PCR.

Light microscopic observation

Liver samples were processed for light microscopic observation according to Boonmars et al. (2004) i.e., fixed with 10% formalin solution and the liver samples processed in a conventional manner and stained with hematoxylin and eosin staining.

Immunohistochemical staining for OV-ES protein

Deparaffinized sections of infected hamster livers from the infected control group and the 6-, 12-, and 24-h post treatment groups were processed for immunostaining. The sections were blocked with 5% skim milk in phosphate-buffered saline (PBS), incubated with 1:50 dilution of the rabbit polyclonal antibodies against OV-ES antigen (performed in our laboratory according to the conventional method) for 1 h at 37°C, and washed three times with 0.05% Tween 20 in PBS. The labeled second antibody used was 1:100 diluted goat anti-rabbit IgG–horseradish peroxidase antibodies (ZYMED Laboratories, San Francisco,

CA, USA) and diaminobenzidine (visual marker) according to the manufacturer's instructions. The negative control study was performed using rabbit normal serum instead of the rabbit polyclonal antibodies against OV-ES antigen.

Primers for quantitative reverse transcription

The primer pairs for apoptosis-related gene expression (BAX, Akt/PKB, p53, and caspase 9) and endogenous control (MG3PDH, mouse glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase) were designed based on the published sequence (Table 1).

RNA extraction and cDNA preparation

RNA extracted from whole liver at the hilar region (250 mg), obtained from the uninfected group, the infected control groups (0, 14, 30 and 90 dpi), and the treated groups (6 h, 12 h, and 24 h), was used for analysis. Total RNA was isolated using TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The isolated RNA was treated with DNase (RQ1 RNase-Free DNase, Promega, Madison, WI, USA) and Ribonuclease Inhibitor (Takara Shuzo, Kyoto, Japan) in buffer (400 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 60 mM MgCl₂, and 20 mM diethoethritol, pH 7.5). The treated RNA was extracted and precipitated with phenol/chloroform and ethanol and dissolved in RNase-free water (100 µl). Total RNA was reverse-transcribed into cDNA using Oligo (dT)15 primers (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) and M-MLV (Invitrogen, USA). The cDNA was kept at -80°C until use.

SYBR Green real-time RT-PCR assay

Real-time PCR using the SYBR® Green method on an ABIprism 7500 sequence detector system (Applied Bio-

systems, Foster City, CA) was performed to analyze the relative quantification of mRNA expression. The reaction contained 3 µl of 1:5 diluted-single strand cDNA, 1× PCR buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.3, 20 mM KCl, 5 mM (NH₄)₂SO₄), 10 mM dNTPs, 5 pmol forward and reverse primer, 0.5× SYBR Green, and 1 U of Hot start *Taq* DNA polymerase (MBI Fermentous, St. Leon-Rot, Germany). The PCR cycling conditions were 95°C for 10 min, then 40 cycles of 95°C for 15 s, 60°C for 30 s, and 72°C for 1 min, followed by 72°C for 10 min. At each cycle, the accumulated PCR products were detected by monitoring the increasing in fluorescence of the reporter dye from dsDNA-binding SYBR Green. After PCR, a melting curve was constructed in the range of 60 to 99°C. All data were analyzed using the Rotor Gene 5 software (Corbett, Australia). Relative expression of BAX, Akt/PKB, p53, and caspase 9 mRNA was calculated using the comparative Ct method as previously described (Gerard et al. 1998). All values were normalized to the G3PDH gene and reported as fold change over background levels detected in untreated control or before drug treatment as a calibrator.

Apoptotic assay

To confirm apoptosis-related gene expression profile result, terminal uridine deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) analysis was used to evaluate apoptosis on the liver sections using a commercially available kit (Wako Chemicals, Tokyo, Japan), and sections were examined by light microscope.

Statistical analysis

The data of relative gene expression level in each group were presented in three hamsters as mean±SD. Statistic comparison between normal control and OV infection

Table 1 Summary of the primer pairs for real-time RT-PCR

Gene	Product length	Sequence	GenBank accession number/reference
		Upper line: forward primer Bottom line: reverse primer	
Akt (PKB)	201 bp	GGTGATCCTGGTGAAGGAGA GCGTACTCCATGACAAAGCA	M94335
BAX	215 bp	AGCTGCAGAGGATGATTGCT CTCTCGGAGGAAGTCCAGTG	AJ582075.1
Caspase 9	205 bp	GATGCTGTCCCCTATCAGGA GGGACTGCAGGTCTTCAGAG	NM_015733
P53	232 bp	AAGGCGATAGTTTGGCTCCT CTGGGGTCTTCCAGTGTGAT	Y08900
MG3PDH	228 bp	5'GGCATTGTGGAAGGGCTCAT 3' 5' GACACATTGGGGGTAGGAACAC3'	Boonmars et al. 2005

before treatment and parziquantel-treated hamster group, was performed using one-way ANOVA, with Duncan tests (SPSS v.11.5, USA; and EXCEL Microsoft, USA). Value of $p < 0.05$ was taken to be significant.

Results

Light microscopic observation

It was shown from Fig. 1 that the inflammation around bile duct was not observed in uninfected group (Fig. 1a). Inflammation around that parasite was clearly observed on day 14 (Fig. 1b). The severity of inflammation gradually increases and reaches a maximum on day 30 (Fig. 1d) by proliferation of mononuclear cells and eosinophilic infiltrates around the intrahepatic bile ducts. The inflammatory reactions tended to decrease on days 60–90 post infection. Lymphoid follicles, as well as plasma infiltration, were

predominantly observed (Fig. 1e,f). Thickened and dilated hepatic bile duct was observed clearly (Fig. 1b–f). At 6 h posttreatment, most of the parasites were killed, and the host immune response increased by increasing inflammatory cells surrounding the parasites and hepatic bile ducts (Fig. 2b). Eosinophils, mononuclear cells, and neutrophils with lymphoid aggregation were predominant at 6–12 h post treatment (Fig. 2b and c, respectively). At 24 h post treatment, parasite bodies could not be observed as if they were degraded (Fig. 2d). Figure 3 shows apoptotic cell death (condensed nuclei) of T cells, and bile duct epithelial cell was observed in OV-infected and treated groups.

Immunohistochemical staining

Figure 4 shows the immunohistochemical staining of OV-ES protein on deparaffinized sections of infected livers at 90 dpi (Fig. 4a), 6 h (Fig. 4b), 12 h (Fig. 4c) and 24 h post treatment (Fig. 4d). The parasite body and its tegument

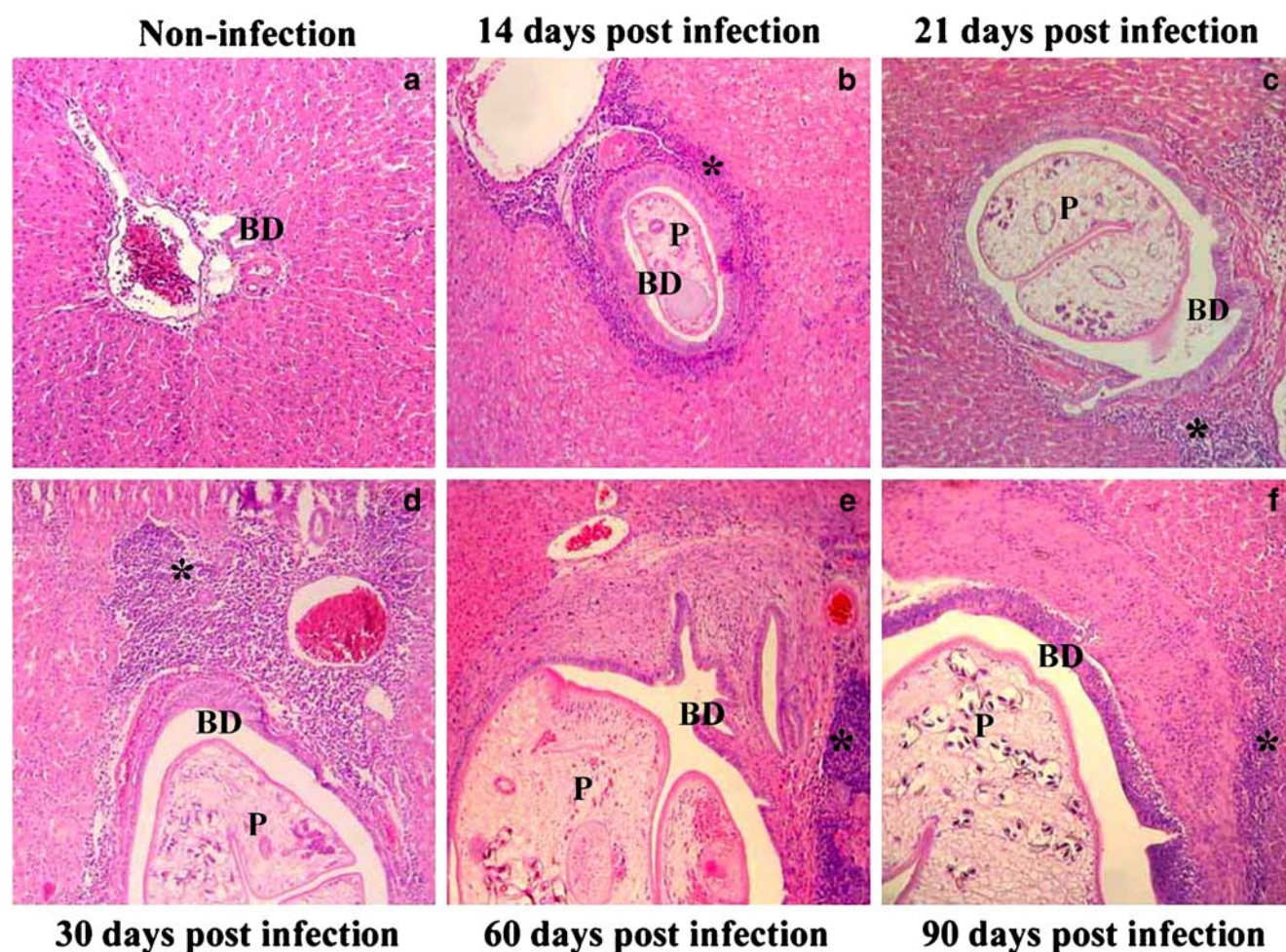
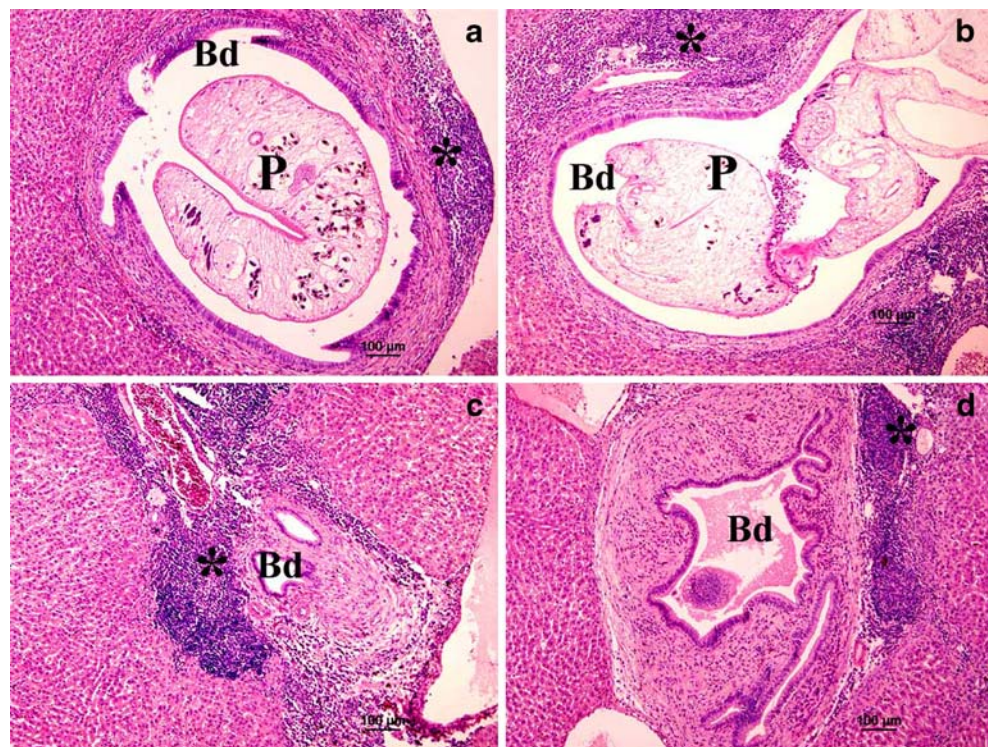


Fig. 1 Histopathological studies of infected livers at various stages [on days 14 (b), 21 (c), 30 (d), 60 (e), and 90 (f) post infection] compared to the normal liver (a). P Parasite; BD bile ducts; asterisk

inflammatory cells infiltrate. Note the inflammations during infection were observed at 14 dpi and predominantly at 30 dpi as that gene-expression observation. Original magnification: $\times 10$

Fig. 2 Histopathological study of the livers of *Opisthorchis viverrini*-infected hamsters.

a Untreated control at 90 dpi; **b** treated with praziquantel at 6 h post treatment; **c** 12 h post treatment; **d** 24 h post treatment; *P* parasite; *Bd* bile duct; asterisk inflammatory cell. Original magnification: $\times 10$



were positive for ES protein staining (Fig. 4a–c). Strong positive staining for OV-ES protein was also observed in bile duct epithelial cells and the inflammatory cells of the praziquantel-treated group (Fig. 4b,c). At 24 h post treatment, the parasites were degraded so that very light positive staining was observed at epithelial cells of bile ducts (Fig. 4d). The well-developed round nucleoli were negative for staining. The negative control was negative for

the OV-ES protein staining which confirmed staining specificity (data not shown).

Relative real-time RT-PCR of apoptosis-related gene expression

Figure 5 shows the BAX, caspase 9, p53, and Akt/PKB gene expression profiles on uninfected control, OV-infected (14, 30, and 90 dpi), and praziquantel-treated on short time (6, 12, and 24 h) that were evaluated in the liver. The BAX expression was observed in all groups but different in the expression level (Fig. 5a). The BAX gene-expression level was increased on 14 dpi and tends to decrease on 90 dpi. After infection (14, 30, and 90 dpi), the BAX gene-expression level was higher than the uninfected control. A significant increased of BAX expression level in opisthorchiasis was observed at 30 dpi compared with in the uninfected control and 14 and 90 dpi groups ($P < 0.05$). On 14 dpi, the BAX expression was increased but not significantly different from normal control group. The BAX expression level tends to decrease at 90 dpi. In treated praziquantel group at 6 h, the BAX expression level was significantly increased when compared with 12 and 24 h post treatment, 90 dpi before treatment, uninfected control, 14 dpi, and 30 dpi ($P < 0.05$). Interestingly, the caspase 9 (Fig. 5b), p53 (Fig. 5c), and Akt/PKB (Fig. 5d) expression profiles were similar to BAX. In brief, the highest gene expressions were observed at 30 dpi and 6–12 h post treatment ($P < 0.05$).

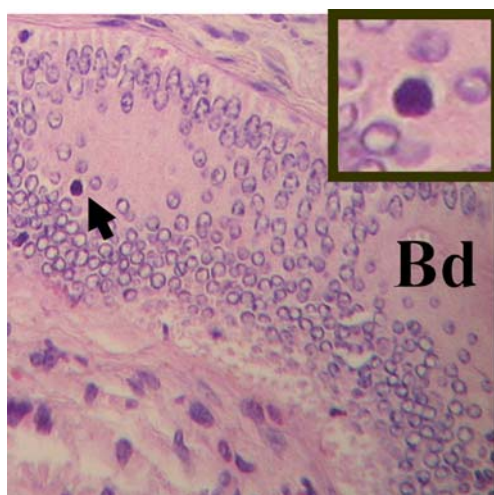
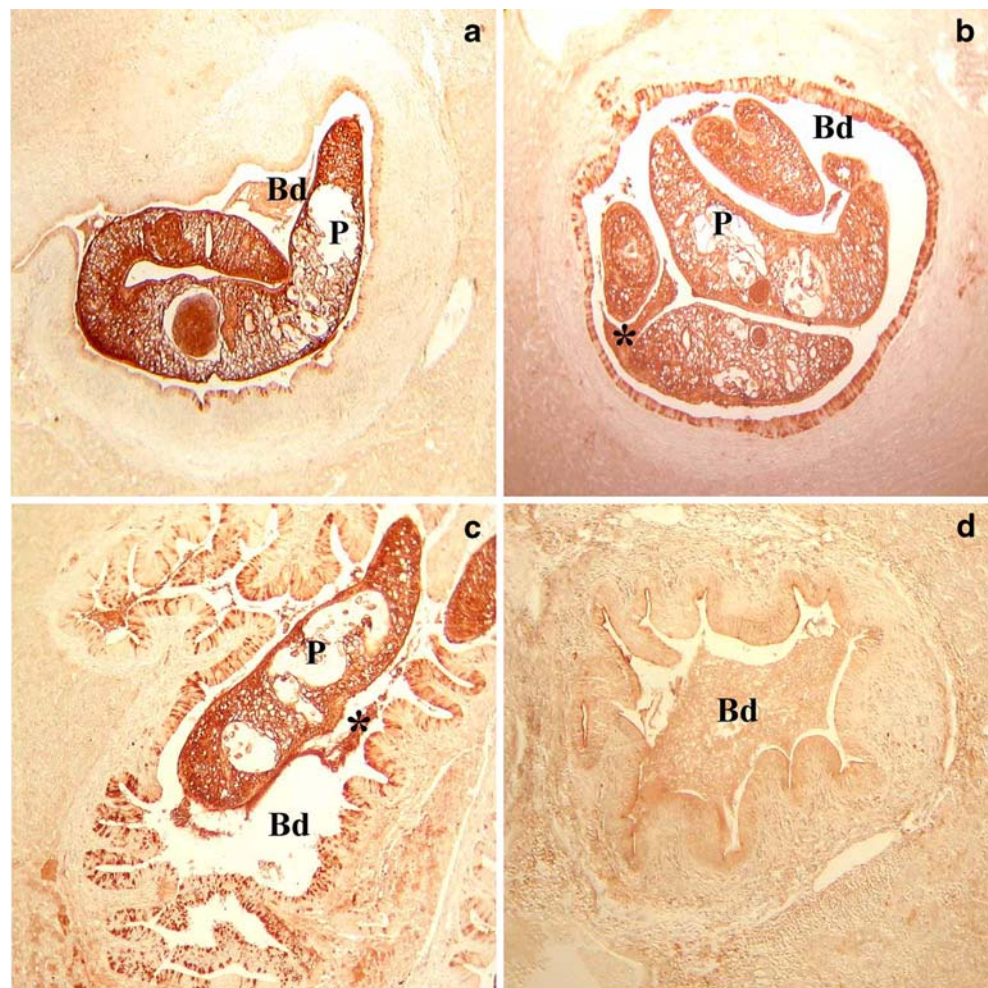


Fig. 3 The apoptotic cell death in liver sections. *Bd* Bile duct; arrows apoptotic cell (condensed nucleus). Original magnification: $\times 10$. Upper right panel is apoptotic cell death with high magnification

Fig. 4 Immunohistochemical staining for anti-excretory secretory polyclonal antibody after reaction with deparaffinized sections of infected liver. **a** Untreated control; **b** at 6 h post treatment; **c** 12 h post treatment; **d** 24 h post treatment. Dark color indicates the positive reaction. *P* Parasite; *Bd* bile duct; *asterisk* inflammatory cells. Original magnification: $\times 10$



Apoptotic assay

Apoptotic assay was done to clarify whether the immune response post treatment enhanced the apoptotic cell death. Figure 6 shows that the apoptosis was observed in all liver tissue in each group. The positive reaction was observed at the nuclei of inflammatory cells and epithelial bile duct.

Discussion

Up to date, disadvantages of using praziquantel for parasitic treatment have been obscured. The advantages of praziquantel as an anti-trematode (by destroying the parasite tegument) are well known (Apinhasmit and Sobhon 1996) that agreed with our present result (Figs. 2 and 3). It is effective in reducing the pathology of parasitic infection, such as shistosomiasis (Richards et al. 1989; Richter 2000) and opisthorchiasis (Hutradilok et al. 1983; Pungpak et al. 1998), and free radicals and nitric oxide products (Pinlaor et al. 2006). By contrast, praziquantel's effectiveness in killing parasites may also have uninvestigated disadvan-

tages. There are many genes involved in pathological process of OV infection, but a few genes had reported [i.e., free radicals (iNOS, NO), growth factor signaling (TGFB1, PGF, IGFBP1, IGFBP3), signal transduction pathways (TGF-beta; Pinlaor et al. 2004a, b; Jinawath et al. 2006; Thuwajit et al. 2006). Thus, we investigated hamster opisthorchiasis on apoptosis-related gene expression in a short duration study of posttreatment.

The normally apoptotic mitochondrial pathway is started from increased BAX which induces the opening of the outer membrane pore of the mitochondria, and then cytochrome c would be released and bind with Apaf1 and caspase 9, causing the cell-death cascade. There are many kinds of apoptotic gene regulation in each pathway (i.e., BCL-2, MDM2). Akt/PKB is one of them that is well-known in anti-apoptosis as it can inhibit apoptosis through caspase 9 (Lodish et al. 2000; Boonmars et al. 2004, 2005).

It is known that OV infection induces host immunologic activity, parasite-specific responses and/or parasite products and NO synthesis in human and animal models (Pinlaor et al. 2006). These causes constitute one range of factors that predispose to apoptotic cell death. The increased apoptotic

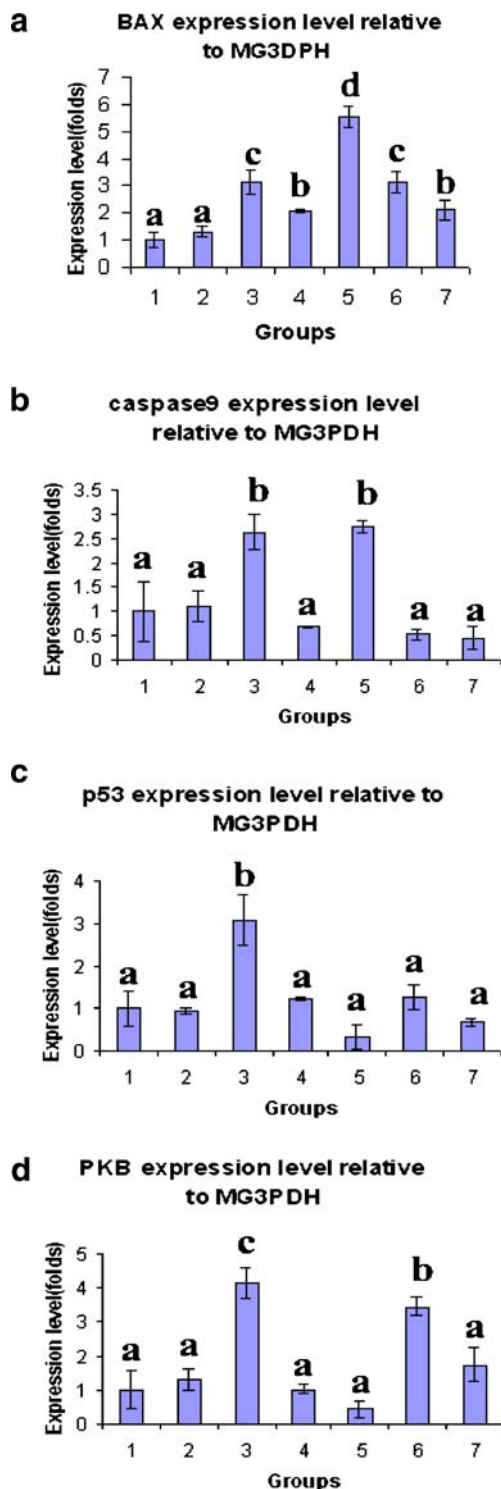


Fig. 5 The BAX (a), caspase 9 (b), p53 (c) and PKB (d) expression level (folds) relative to MG3PDH. 1 Non-infected control, 2 14 days post infection (dpi), 3 30 dpi, 4 90 dpi or untreated control, 5 90 dpi, 6 h post treatment, 6 12 h post treatment, 7 24 h post treatment. Note that all genes were increased during infection on 30 days post infection and 6–12 h post treatment. Values are given as mean±SD from three hamsters in each group. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at $P < 0.05$. Duncan procedure

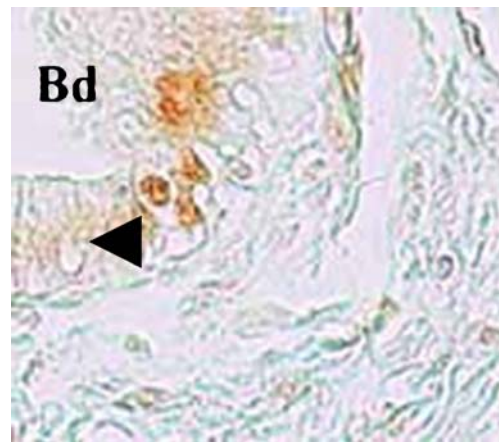


Fig. 6 The apoptotic staining using TUNEL analysis in liver sections. Bd Bile duct; arrows positive staining. Original magnification: $\times 10$

cell death correlated with the aggregation of inflammatory cells. Although the old theory is that the apoptosis will occur without inflammatory cell, the truth is inflammatory cells can cause cell damage through free radicals such as reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) (Kim et al. 2002; Kuwano and Hara 2000) which led to cell death. Our results show the effectiveness of how praziquantel treatment increases parasite ES and crude antigen, leading to increased host immune response and aggregated inflammatory cells as shown in histopathological changes and the immunolocalization of OV-ES protein results (Figs. 2b,c and 4b,c) especially at 6 and 12 h post treatment; the tegument wall was broken that resulted in the crude and ES antigen of parasite spreading out; that is why the epithelial bile duct and inflammatory cells had positive strong staining than that of untreated control and at 24 h post treatment. Surprisingly, the intensity of inflammatory cells surrounding the hepatic bile duct in praziquantel-treated group was higher than day 30 post infection which was the peak time point of the inflammatory cell aggregation.

Our real-time RT-PCR result (Fig. 5) suggests that after OV infection at early (14 dpi) and transient stage (30 dpi), the apoptotic gene expression level (BAX, caspase 9, p53) and anti-apoptotic gene (Akt/PKB) were increased due to the increasing inflammatory cells surrounding the hepatic bile duct (Fig. 1b–d). These results were supported by the expression level of apoptotic genes, and anti-apoptotic gene in treated praziquantel group at 6 and 12 h were similar as that of 30 dpi which was correlated to the pathological changes and aggregation of inflammatory cells. This may suggest that the host immune response post treatment caused apoptotic cell death.

Apoptotic staining result shows apoptotic cell in T cells and nuclei of epithelial bile ducts (Fig. 6). The most important point of our study is the increasing apoptosis-

related gene expression level which was indirectly induced by praziquantel treatment.

So far, our present results may suggest the possible way of increasing cell death through apoptotic mitochondrial pathway and its inhibitor in OV infection and OV infection followed by praziquantel treatment. The parasite is dead by praziquantel treatment, then antigenic material was released from broken-down parasites, which increases a host immune response as presented in aggregation of inflammatory cells and increasing free radicals surrounding the infected area (Pinlaor et al. 2004a, b, 2006). DNA damage and fragmentation would immediately increase predisposing cells to apoptosis, thus apoptosis-related gene expressions (BAX, caspase 9, p53, and Akt/PKB) would be at high levels and then decrease to nearly the same as the infected control group.

Data supporting the increased aggregation of inflammatory cells and free radicals increasing apoptosis-related genes have been reported with respect to *Trichinella spiralis* infection in mouse muscle, where the expression of apoptosis-related genes (BAX, caspase 9, Apaf-1, caspase 3, and Akt/PKB) occurred during aggregation of inflammatory cells at the early stages of muscle infection. Subsequently, levels reduced to near the uninfected control during completed capsule formation with only a few inflammatory cells being observed (Boonmars et al. 2004; Wu et al. 2005a, b). However, apoptotic localization was observed only in nuclei of *Trichinella* nurse cell but not the inflammatory cells (Wu et al. 2005a, b). In addition, this result could confirm that apoptosis happens in the cell tissue but not the inflammatory cells. These apoptotic staining data conversed with our result that its apoptotic cell death localized at the nuclei of inflammatory cells and epithelial bile duct (Fig. 6). Therefore, the expression of apoptosis-related gene profiles in hamster opisthorchiasis may involve both the increasing apoptotic T cell and epithelial hepatic bile duct. Our study suggests that praziquantel treatment was indirectly related to a short duration increase in apoptotic cell death or cell damage through host immune response.

It is well known that repeated healing many times may cause DNA or protein mutation, leading to cancer development. It is real that people, especially in Northeast Thailand, are re-infected and re-treated many times; that means many times, tissue repairing occurs. This reason may lead to gene mutation and CCA development. This new finding may be used to be aware that the repeated praziquantel treatment in man may lead to risk for CCA development. Interestingly, this host immune response post praziquantel treatment may be one kind of risk factor that may be associated with CCA development. Therefore, further studies are needed to explore this hypothesis.

Acknowledgments The study was supported in part by a grant from the Research Foundation of the Faculty of Medicine, Khon Kaen University; the Commission on Higher Education and the Thailand Research Fund MRG4980156. We thank the Department of Parasitology, Liver Fluke and Cholangiocarcinoma, Research Center and the Animal Experimental Unit, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Department of Parasitology, Gifu University School of Medicine, Japan and Dr. Watcharin Loilom for their support and Mr. Bryan Roderick Hamman for assistance with the English-language presentation of the manuscript.

References

- Apinhasmit W, Sobhon P (1996) *Opisthorchis viverrini*: effect of praziquantel on the adult tegument. Southeast Asian J Trop Med Public Health 27(2):304–311
- Boonmars T, Wu Z, Nagano I, Takahashi Y (2004) Expression of apoptosis-related factors in muscles infected with *Trichinella spiralis*. Parasitology 128(Pt 3):323–332
- Boonmars T, Wu Z, Nagano I, Takahashi Y (2005) *Trichinella pseudospiralis* infection is characterized by more continuous and diffuse myopathy than *T. spiralis* infection. Parasitol Res 97:13–20
- Gerard CJ, Olsson K, Ramanathan R, Reading C, Hanania EG (1998) Improved quantitation of minimal residual disease in multiple myeloma using real-time polymerase chain reaction and plasmid-DNA complementarity determining region III standards. Cancer Res 58:3957–3964
- Hutradilok N, Ruenwongsa P, Thamavit W, Upatham ES (1983) Liver collagen in *Opisthorchis viverrini* infected hamsters following praziquantel treatment. Southeast Asian J Trop Med Public Health 14(3):290–293
- IARC (1994) Infection with liver flukes (*Opisthorchis viverrini*, *Opisthorchis felinus* and *Clonorchis sinensis*). IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 61:121–175
- IARC (1997) Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: polychlorinated dibenzo-para-dioxins and polychlorinated dibenzofurans. Lyon, France, 4–11 February 1997. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 69:1–631
- Jinawath N, Chamgramol Y, Furukawa Y, Obama K, Tsunoda T, Srija B, Paironkul C, Nakamura Y (2006) Comparison of gene expression profiles between *Opisthorchis viverrini* and non-*Opisthorchis viverrini* associated human intrahepatic cholangiocarcinoma. Hepatology 44(4):1025–1038
- Kim SJ, Kim HG, Oh CD, Hwang SG, Song W-K, Yoo YJ, Kang SS, Chun JS (2002) p38 Kinase-dependent and -independent inhibition of protein kinase C and α regulates nitric oxide-induced apoptosis and dedifferentiation of articular chondrocytes. J Biol Chem 277:30375–30381
- Kuwano K, Hara N (2000) Signal transduction pathways of apoptosis and inflammation induced by the tumor necrosis factor receptor family. Am J Respir Cell Mol Biol 22:147–149
- Lodish HBA, Zipursky LS, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J (2000) Molecular cell biology. Freeman, New York
- Pinlaor S, Hiraku Y, Ma N, Yongvanit P, Semba R, Oikawa S, Murata M, Srija B, Sithithaworn P, Kawanishi S (2004a) Mechanism of NO-mediated oxidative and nitrative DNA damage in hamsters infected with *Opisthorchis viverrini*: a model of inflammation-mediated carcinogenesis. Nitric Oxide 11(2):175–183
- Pinlaor S, Ma N, Hiraku Y, Yongvanit P, Semba R, Oikawa S, Murata M, Srija B, Sithithaworn P, Kawanishi S (2004b) Repeated infection with *Opisthorchis viverrini* induces accumulation of 8-nitroguanine and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanine in the

- bile duct of hamsters via inducible nitric oxide synthase. *Carcinogenesis* 25(8):1535–1542
- Pinlaor S, Hiraku Y, Yongvanit P, Tada-Oikawa S, Ma N, Pinlaor P, Sithithaworn P, Sripa B, Murata M, Oikawa S, others (2006) iNOS-dependent DNA damage via NF-kappaB expression in hamsters infected with *Opisthorchis viverrini* and its suppression by the antihelminthic drug praziquantel. *Int J Cancer* 119(5):1067–1072
- Pungpak S, Radomyos P, Radomyos BE, Schelp FP, Jongsuksuntigul P, Bunnag D (1998) Treatment of *Opisthorchis viverrini* and intestinal fluke infections with Praziquantel. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 29(2):246–249
- Richards F Jr., Sullivan J, Ruiz-Tiben E, Eberhard M, Bishop H (1989) Effect of praziquantel on the eggs of *Schistosoma mansoni*, with a note on the implications for managing central nervous system schistosomiasis. *Ann Trop Med Parasitol* 83(5):465–472
- Richter J (2000) Evolution of schistosomiasis-induced pathology after therapy and interruption of exposure to schistosomes: a review of ultrasonographic studies. *Acta Trop* 77(1):111–131
- Sripa B (2003) Pathobiology of opisthorchiasis: an update. *Acta Trop* 88(3):209–220
- Supanvanich S, Supanvanich K, Pawabut P (1981) Field trial of praziquantel in human opisthorchiasis in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 12(4):598–602
- Thuwajit C, Thuwajit P, Uchida K, Daorueang D, Kaewkes S, Wongkham S, Miwa M (2006) Gene expression profiling defined pathways correlated with fibroblast cell proliferation induced by *Opisthorchis viverrini* excretory/secretory product. *World J Gastroenterol* 12(22):3585–3592
- WHO (2004) Food-borne trematode infections in Asia. Report of the joint WHO/FAO.WHO Regional Office for the Western Pacific, RS 2002 GE/40 (VTN):1–62
- Wu Z, Nagano I, Boonmars T, Takahashi Y (2005a) Tumor necrosis factor receptor-mediated apoptosis in *Trichinella spiralis*-infected muscle cells. *Parasitology* 131(Pt 3):373–381
- Wu Z, Nagano I, Boonmars T, Takahashi Y (2005b) A spectrum of functional genes mobilized after *Trichinella spiralis* infection in skeletal muscle. *Parasitology* 130(Pt 5):561–573

Apoptosis-related gene expressions in hamsters re-infected with *Opisthorchis viverrini* and re-treated with praziquantel

T. Boonmars · T. Srisawangwong · P. Srirach ·
B. Kaewsamut · S. Pinlaor · P. Sithithaworn

Received: 18 June 2007 / Accepted: 14 August 2007 / Published online: 13 September 2007
© Springer-Verlag 2007

Abstract Our objective was to reveal whether host immune response in hamster opisthorchiasis post-praziquantel treatment could induce apoptotic cell death in inflammatory cells. We, therefore, investigated apoptosis-related gene expression in hamsters re-infected with *Opisthorchis viverrini* (OV) and re-treated with praziquantel. Hamsters were re-infected with OV metacercariae then re-treated with praziquantel. The expression of apoptosis-related genes (i.e. apoptosis gene Bcl-2 associated protein X [BAX], caspase 9, p53 and protein kinase B [PKB]) was detected by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. Histopathological analyses of liver tissues were performed by staining the sections with haematoxylin and eosin using light microscopy. The results show that BAX, Akt/PKB, p53 and caspase 9 expression levels were significantly increased on day 30 post-infection and at 6 h post-treatment and gradually decreased to a level near the uninfected control and at 24 h post-treatment, perhaps because of a decrease in inflammatory cells. Apoptotic cell death was observed at the nuclei of epithelial cells of the bile ducts and of T cells. Our results suggest that repeated infection with OV and re-treatment with praziquantel induces a host immune response that increases inflamma-

tory cells, which in turn leads to increase, apoptosis-related gene expression in the short term post-treatment.

Introduction

The occurrence of cholangiocarcinoma (CCA) is highly endemic in Northeast Thailand and is the highest in the world. Several risk factors for CCA, such as radiation, parasite infection and chronic inflammation, have been reported (IARC 1994, 1997; WHO 2004). Opisthorchiasis-associated CCA was most often observed and remains the leading cause of death in this region (WHO 2004), in part because of local dietary habits, which increase the risk of *Opisthorchis viverrini* (OV) re-infection, which is related to the development of CCA.

Although recent reports show that praziquantel could reduce the risk for the pathogenesis of CCA (Pinlaor et al. 2006), frequent treatment with praziquantel may be detrimental to the host through the inflammation process. The opisthorchiasis-pathological changes include the aggregation of inflammatory cells surrounding the intra- and extra-hepatic bile ducts. Chronic infection with OV for many years is associated with several hepatobiliary diseases (Sripa 2003), which are in turn associated with the development of hepatobiliary cancer and CCA, albeit the precise genesis remains obscure.

Praziquantel is an effective anti-helminthic drug widely used for treatment of opisthorchiasis. The chemo-activity of the medication damages the tegument of worms leading to vacuolization, swelling and finally disruption and detachment of the tegument and parasite death. Although praziquantel is useful for treatment of trematodes, there is no report about its virulent side effects (Supanvanich et al. 1981).

T. Boonmars (✉) · T. Srisawangwong · P. Srirach ·
B. Kaewsamut · S. Pinlaor · P. Sithithaworn
Department of Parasitology, Faculty of Medicine,
Khon Kaen University,
Khon Kaen 40002, Thailand
e-mail: boonmars@yahoo.com

T. Boonmars · P. Srirach · B. Kaewsamut · S. Pinlaor ·
P. Sithithaworn
Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center,
Faculty of Medicine, Khon Kaen University,
Khon Kaen 40002, Thailand

Our preliminary findings indicate that inflammatory cells were more numerous surrounding the hepatic bile duct after praziquantel treatment; therefore, we hypothesized that after praziquantel re-treatment, residuals of parasite antigens enhance the stimulation of the host cellular immune response and the release of free radicals, leading to cell damage and apoptosis. This would be a distinct effect of praziquantel treatment in persons infected with OV, which we intended to investigate using a hamster model.

Materials and methods

Parasites and infection

OV metacercariae were obtained from naturally infected cyprinoid fish captured from a fresh water reservoir in an endemic area of Khon Kaen, Northeast Thailand. Fresh fish were minced and digested with pepsin–HCl, filtrated and then washed with normal saline solution until the solution was clear. Metacercariae were isolated and identified under a dissecting microscope. Finally, the metacercariae were divided into groups of 50 for infecting hamsters via intragastric intubation.

Male hamsters, 6 to 8 weeks old, from the Animal Unit, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, were used in the experiments. The hamsters were divided into three groups (i.e. the OV-infected group, the uninfected group [normal control] and the OV-re-infected praziquantel treatment or re-treated group). Hamsters were killed on days 14, 30 and 90 post-infection. The liver samples were prepared according to conventional methods for light microscopic observation and real-time reverse transcription polymerase chain reaction (real-time RT-PCR). This protocol was approved by the Animal Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Khon Kean University, Thailand (Ethical Clearance no. AEKKU0023105).

Real-time RT-PCR was used to investigate the apoptosis-related gene expression (i.e. BAX, Akt/PKB, p53 and caspase 9) during OV infection and pre- and post-praziquantel treatment. Light microscopy was used to investigate the histopathological changes and apoptotic cell death.

Praziquantel treatment

Praziquantel, purchased from the Medicpharma, Bangkok, Thailand, was used in this experiment. A dosage of 400 mg/kg was given orally to each hamster. Uninfected hamsters treated with praziquantel constituted the control. Three months after infection, OV-infected hamsters were treated with praziquantel and re-infected with OV within a week then re-treated with praziquantel on day 30 post-infection. Fours groups of hamsters were studied in this experiment: (1) untreated control at 90 days post-infection (dpi), (2) OV-re-infected praziquantel re-treatment at 6, (3) 12 and (4) 24 h post-treatment. All of the hamster groups were fed ad libitum and maintained at the Animal Unit, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand.

Light microscopic observation

Liver samples were processed for light microscopic observation according to Boonmars et al. (2004), i.e. fixed with 10% formalin solution, processed in a conventional manner and stained with haematoxylin and eosin.

Primers for quantitative reverse transcription

The primer pairs for apoptosis-related gene expression (i.e. BAX, Akt/PKB, p53 and caspase 9) and endogenous controls (MG3PDH, mouse glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) were designed based on the published sequence (Tables 1 and 2).

RNA extraction

Ribonucleic acid (RNA) was extracted from whole liver at the hilar region (200 mg), obtained from the uninfected group, the infected control groups (0, 14, 30 and 90 dpi) and the treated groups (6, 12 and 24 h), were used for messenger RNA (mRNA) analysis. Total RNA was isolated using TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. The isolated RNA was treated with DNase (RQ1 RNase-Free DNase, Promega, Madison, WI) and Ribonuclease Inhibitor (Takara Shuzo, Kyoto, Japan) in buffer (400 mM Tris–HCl, 100 mM NaCl, 60 mM

Table 1 Summary of the primer pairs for real-time RT-PCR

Gene	Product length (bp)	Sequence—forward primer; reverse primer	GenBank accession number
Akt (PKB)	201	GGTGATCCTGGTGAAGGAGA; GCGTACTCCATGACAAAGCA	M94335
BAX	215	AGCTGCAGAGGATGATTGCT; CTCTCGGAGGAAGTCCAGTG	AJ582075.1
Caspase 9	205	GATGCTGTCCCCTATCAGGA; GGGACTGCAGGTCTTCAGAG	NM_015733
p53	232	AAGGCGATAGTTTGGCTCCT; CTGGGGTCTTCCAGTGTGAT	Y08900

Table 2 Summary of the primer pairs for endogenous control (mouse glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase, MG3PDH)

Gene	Product length (bp)	Sequence—forward primer; reverse primer	Reference
MG3PDH	228	5'-GGCATTGTGGAAGGGCTCAT-3'; 5'-GACACATTGGGGGTAGGAACAC-3'	Boonmars et al. 2005

MgCl₂ and 20 mM diethoethreitol, pH 7.5). The treated RNA was extracted and precipitated with phenol/chloroform and ethanol and dissolved in RNase-free water (100 µL). The total RNA was reverse transcribed into complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) using Oligo (dT)15 primers (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) and Moloney Murine Leukaemia Virus (Invitrogen, USA). The cDNA was kept at -20°C until used.

SYBR Green real-time PCR assay

The real-time RT-PCR using the SYBR® Green method on an ABIprism 7500 sequence detector system (Applied Biosystems, Foster City, CA) was performed to analyse the relative quantification of mRNA expression. The real-time RT-PCR reaction contained 3 µL of 1:5 diluted single-strand cDNA, 1× PCR buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.3, 20 mM KCl, 5 mM (NH₄)₂SO₄), 10 mM deoxynucleotide phosphates, 5 pmole forward and reverse primer, 0.5× SYBR Green and 1 U of Hot start *Taq* DNA polymerase (MBI Fermentous, St. Leon-Rot, Germany). The PCR-cycling conditions were 95°C for 10 min, then 40 cycles of 95°C for 15 s, 60°C for 30 s and 72°C for 1 min, followed by 72°C for 10 min. At each cycle, the accumulated PCR products were detected by monitoring the increase in fluorescence of the reporter dye from double-strand DNA-binding SYBR Green. After PCR, a melting curve was constructed in the range of 60 to 99°C. All of the data were analysed using the Rotor Gene 5 software (Corbett, Australia). Relative expression of BAX, Akt/PKB, p53 and caspase 9 mRNA was calculated using the comparative Ct method as previously described (Gerard et al. 1998). All values were normalized to the G3PDH gene and reported as fold changes over background levels, detected in untreated control or before drug treatment as a calibrator.

Statistical analysis

The data of relative gene expression levels in each group were represented in three hamsters as mean±SD. The statistical comparison between the normal control or untreated control and the parziquantel-treated groups was performed using a one-way analysis of variance, with Duncan tests (SPSS v.11.5, USA; and EXCEL Microsoft, USA). A $p < 0.05$ was required for statistical significance.

Results

Pathological changes in OV infection

Figure 1 demonstrates that inflammation surrounding the extra- and intra-hepatic bile ducts does not occur in the uninfected group (Fig. 1a), while inflammation surrounding the parasite was clearly observed on day 14 (Fig. 1b). The severity of inflammation gradually increased and reached a maximum on day 30 (Fig. 1c) demonstrated by the infiltration of mononuclear cells and eosinophils around the intra-hepatic bile ducts. The inflammatory reactions tended to decrease on day 90 post-infection. Lymphoid follicles as well as plasma infiltration were predominant and thickened, and dilated hepatic bile ducts were clearly observed (Fig. 1d).

Pathological changes in hamster opisthorchiasis post praziquantel treatment

Figure 2 shows the pathological changes in OV-re-infected livers followed by praziquantel re-treatment. The fibrosis,

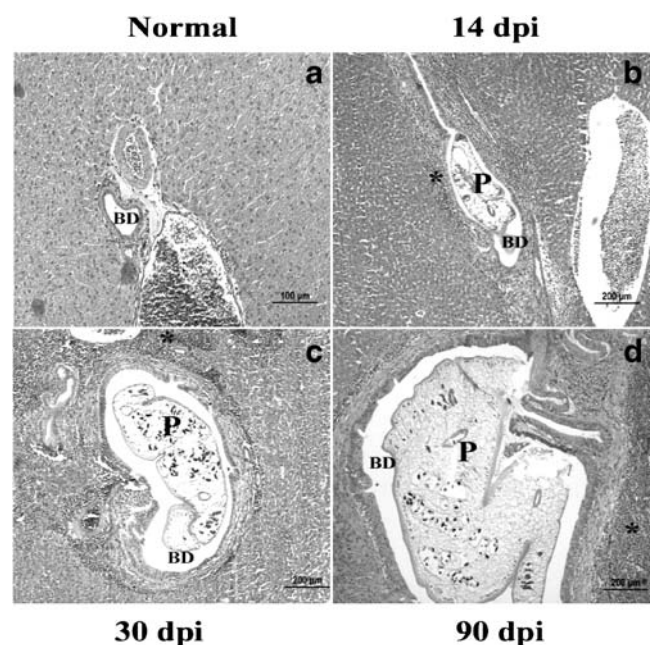


Fig. 1 Histopathological study of the livers of *Opisthorchis viverrini*-infected hamsters. Uninfected control (a), OV-infected on 14 (b), 30 (c) and 90 dpi (d), P parasite, Bd bile duct, asterisk, inflammatory cell. Original magnification=×10

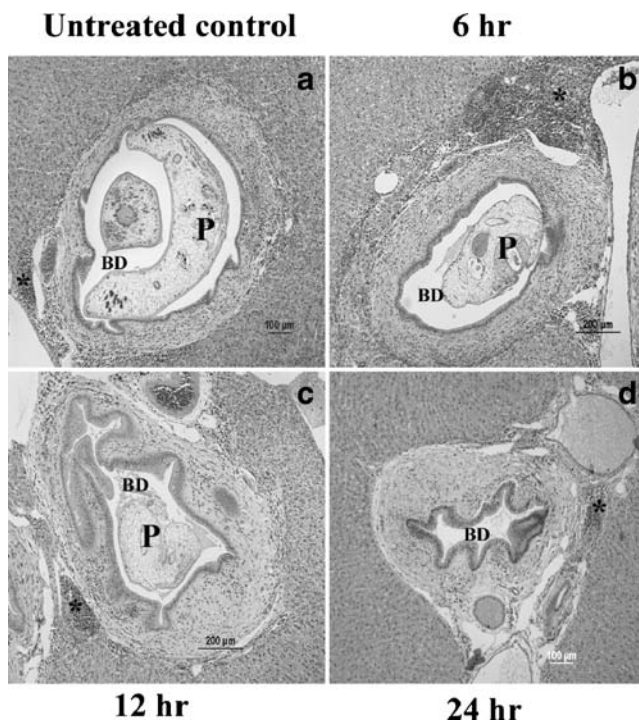


Fig. 2 Histopathological study of the livers of *Opisthorchis viverrini*-re-infected hamsters. Untreated control at 90 dpi (a), re-treated with praziquantel at 6 h post-treatment (b), 12 h post-treatment (c) and 24 h post-treatment (d); P parasite, Bd bile duct, asterisk, inflammatory cell. Original magnification= $\times 10$

surrounding the hepatic bile duct of OV-re-infected and untreated control groups, was largest at 90 dpi with numerous inflammatory cells (Fig. 2a). At 6 h post-treatment, most of the parasites were killed, and the inflammatory cells increased in number surrounding the parasites and the hepatic bile ducts (Fig. 2b). The inflammatory cells especially eosinophils, mononuclear cells and neutrophils with lymphoid aggregation were predominant at 6 to 12 h post-treatment (Fig. 2b,c). At 24 h post-treatment, parasites could not be observed suggesting they were degraded (Fig. 2d). It is interesting to note that the apoptotic cell death (condense nucleus) were observed in all groups (Fig. 3).

Relative real-time PCR of apoptosis-related gene expression

Figure 4 shows that apoptosis-related gene expression in uninfected control, OV-infected (14, 30 and 90 dpi) and OV-re-infected praziquantel re-treatment (6, 12 and 24 h) groups and the untreated control groups was observed in the liver. The BAX expression was observed in all groups but different in the expression level. The BAX gene expression level increased on 14 dpi and tended to decrease by 90 dpi and seemed to increase again at 6 and 12 h in the OV-re-infected praziquantel re-treatment groups albeit not

significantly (Fig. 4a). The highest expression level was observed at 30 dpi. The caspase-9 gene expression profile was the same as that of BAX gene, but the highest expression level was observed 6 h post-treatment (Fig. 4b). The p53 and Akt/PKB gene expression profiles were similar to the BAX gene, but those increased by 14 dpi and tended to decrease by 90 dpi and significantly increased again at 6 and 12 h in the OV-re-infected praziquantel re-treatment group (Fig. 4c,d).

Discussion

The disadvantages of using praziquantel for parasitic treatment have been obscured because of the well-known advantages of praziquantel as an anti-trematode agent (by destroying the parasite tegument; Apinhasmit and Sobhon 1996). It is indeed effective in reducing the pathology of parasitic infection such as schistosomiasis (Richards et al. 1989; Richter 2000) and opisthorchiasis (Pungpak et al. 1998). It also reduces free radicals and nitric oxide (NO) products induced by OV-infection (Pinlaor et al. 2004a, b). Recently, Pinlaor et al. (2006) reported that after praziquantel, no effect on cell damage through the pathological changes and inducible NO synthase-dependent DNA damage via nuclear factor-kappaB expression was observed for a long time. Notwithstanding praziquantel's effectiveness in killing parasites, it may have uninvestigated, serious, short-duration post-treatment disadvantages. We sought to determine which key points may reveal the effect of praziquantel on cell damage.

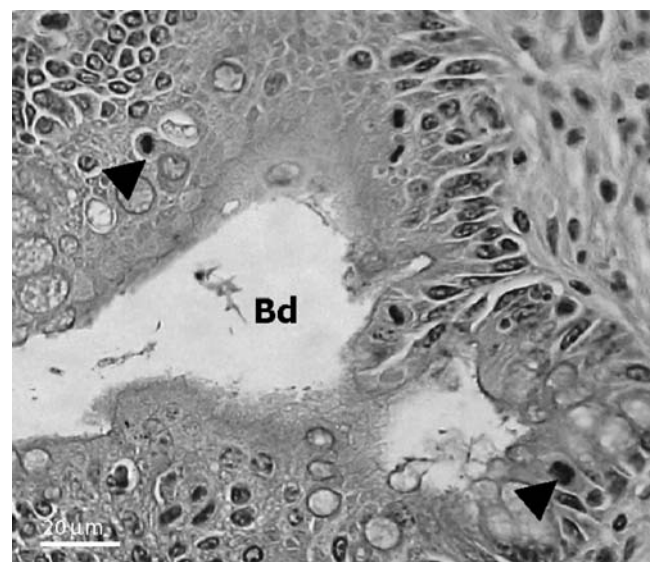
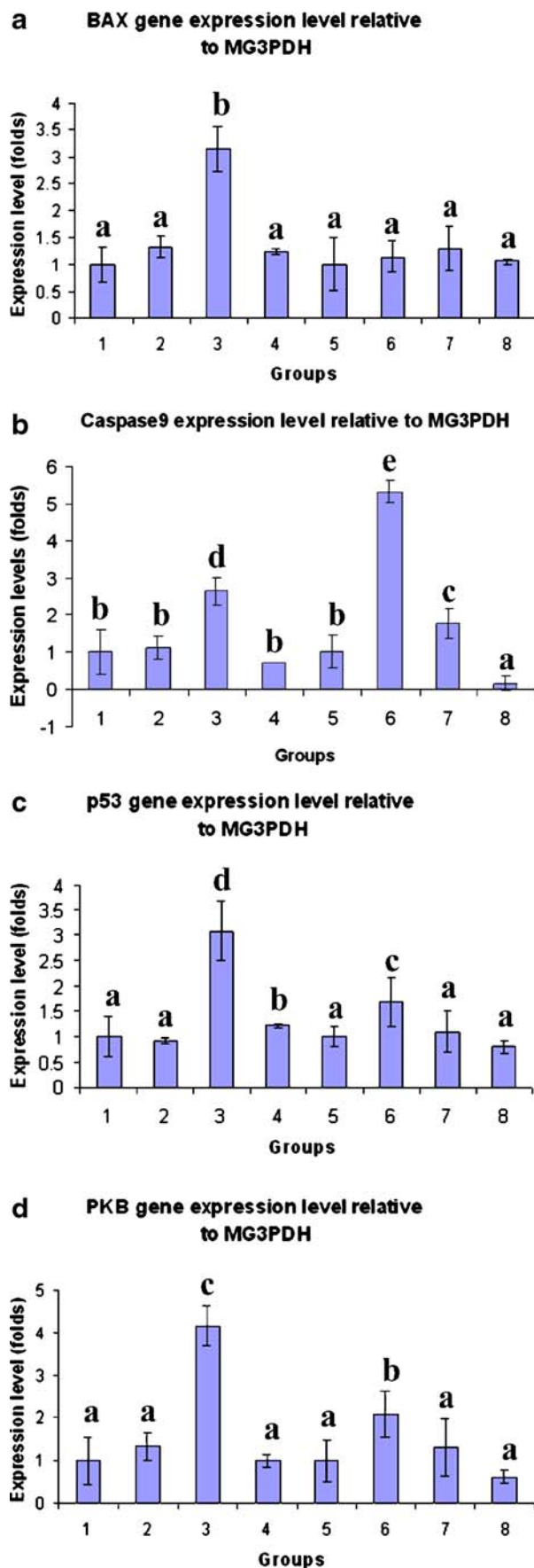


Fig. 3 High magnification of apoptosis in the hamster opisthorchiasis and praziquantel-re-treated liver sample. Bd Hepatic bile duct, arrow, apoptotic cell death (condense nucleus). Original magnification= $\times 40$



It is well established that OV infection induces host immunologic activities, parasite-specific responses and/or parasite products and NO synthesis in human and animal models (Pinlaor et al. 2004a, b), which is why we observed the aggregation of inflammatory cells 30 dpi. In the case of praziquantel treatment, large numbers of inflammatory cells were observed 6 h post-treatment, when the broken tegument resulted in leakage of parasite waste products, which might trigger a host immune response. Enlargement of the hepatic bile duct was observed after prolonged infection in a time-dependent manner (Sripa 2003; Pinlaor et al. 2006). Apoptosis was observed in T cells and the nuclei of bile duct epithelial cells (Fig. 3). The most important point of our study is that increasing apoptosis-related gene expression level was indirectly induced by praziquantel treatment through the host immune response inflammatory cells.

The normally apoptotic mitochondrial pathway starts from increased BAX, which induces opening of the outer membrane pore of the mitochondria so that cytochrome *c* would be released and bind with Apaf1 and caspase 9 causing the cell death cascade. There are many kinds of apoptotic gene regulators (either/or inhibitors or anti) in each pathway (i.e. BCL-2, MDM2), and Akt/PKB is one that is well-known for inhibiting apoptosis through caspase 9 (Boonmars et al. 2004; Lodish et al. 2000).

Thus far, our present results suggest a possible way of increasing cell death through the apoptotic mitochondrial pathway and its inhibitor in opisthorchiasis and opisthorchiasis treated with praziquantel. Antigenic materials released from broken-down parasites increase the host immune response as demonstrated by the aggregation of inflammatory cells and increasing free radicals surrounding the infected area (Pinlaor et al. 2006). DNA damage and fragmentation would immediately increase the predisposing of cells to apoptosis, which would lead to increase expression of apoptosis-related gene expression (i.e. BAX, caspase 9, p53 and Akt/PKB) to nearly the same as the infected control group.

Our real-time RT-PCR result (Fig. 4) shows that after OV infection, the apoptotic genes (i.e. BAX, caspase9, p53) and anti-apoptotic gene (Akt/PKB) expression levels were significantly increased at day 30 because of increasing inflammatory cells surrounding the hepatic bile

◀ **Fig. 4** The relative real-time RT-PCR has shown that the BAX (a), caspase-9 (b), p53 (c) and PKB (d) expression level (folds) relative to MG3PDH. Uninfected control (1), OV-infected on 14 (2), 30 (3), 90 dpi (4), Untreated control at 90 dpi (5), OV-re-infected followed by praziquantel re-treatment at 6 h post-treatment (6), 12 h post-treatment (7) and 24 h post-treatment (8). Values are given as mean±SD from three hamsters in each group. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at $P<0.05$. Duncan procedure

duct (Fig. 1). It is surprising to note that the expression level of apoptotic genes and the anti-apoptotic gene in the praziquantel-treated group at 6 h were similar to that of those treated 30 dpi because of increasing inflammatory cells. This present report may be the first to document these pathological changes after praziquantel treatment.

Data supporting the increased aggregation of inflammatory cells and free radicals inducing increased apoptosis-related genes have been reported (Kuwano and Hara 2000; Kim et al. 2002) with respect to *T. spiralis* infection in mouse muscle where the expression of apoptosis-related genes (BAX, caspase 9, Apaf-1, caspase 3 and Akt/PKB) occurred during aggregation of inflammatory cells in the early stages of infection. Subsequently, the levels were reduced to near the uninfected control after completed capsule formation with only a few inflammatory cells being observed (Boonmars et al. 2004; Wu et al. 2005a, b).

The immune system can result in excessive tissue remodelling, loss of tissue architecture because of tissue destruction, protein and DNA alterations because of oxidative stress and, under some circumstances, increase risk of cancer development. Chronic inflammation is also a risk factor for cancer development included in CCA (Shacter and Weitzman 2002). Repeated healing may cause DNA or protein mutation leading to cancer development. People, especially in Northeast Thailand, are re-infected and re-treated many times, indicating repeated tissue repairs, which may bring about gene mutation and CCA development. This new finding indicates a caveat on repeated praziquantel treatments, as praziquantel may be associated with CCA development by inducing the host immune response. Further studies are needed to explore this hypothesis.

Acknowledgements This study was supported in part by a grant from the Research Foundation of the Faculty of Medicine, Khon Kaen University, the Commission on Higher Education and the Thailand Research Fund. We thank the Department of Parasitology, Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center and the Animal Experimental Unit, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, the Department of Parasitology, Gifu University School of Medicine, Japan and Dr. Watcharin loilom for their supportive contributions and Mr. Bryan Roderick Hamman for assistance with the English language preparation of the manuscript.

References

- Apinhasmit W, Sobhon P (1996) *Opisthorchis viverrini*: effect of praziquantel on the adult tegument. Southeast Asian J Trop Med Public Health 27(2):304–311
- Boonmars T, Wu Z, Nagano I, Takahashi Y (2004) Expression of apoptosis-related factors in muscles infected with *Trichinella spiralis*. Parasitology 128(Pt 3):323–332
- Boonmars T, Wu Z, Nagano I, Takahashi Y (2005) *Trichinella pseudospiralis* infection is characterized by more continuous and diffuse myopathy than *T. spiralis* infection. Parasitol Res 97:13–20
- Gerard CJ, Olsson K, Ramanathan R, Reading C, Hanania EG (1998) Improved quantitation of minimal residual disease in multiple myeloma using real-time polymerase chain reaction and plasmid-DNA complementarity determining region III standards. Cancer Res 58:3957–3964
- IARC (1994) Infection with liver flukes (*Opisthorchis viverrini*, *Opisthorchis felinus* and *Clonorchis sinensis*). IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 61:121–175
- IARC (1997) Working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Polychlorinated dibenzo-para-dioxins and polychlorinated dibenzofurans. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 69:1–631 Lyon, France, 4–11 February 1997
- Kim SJ, Kim HG, Oh CD, Hwang SG, Song W-K, Yoo YJ, Kang SS, Chun JS (2002) p38 kinase-dependent and -independent inhibition of protein kinase C and α regulates nitric oxide-induced apoptosis and dedifferentiation of articular chondrocytes. J Biol Chem 277:30375–30381
- Kuwano K, Hara N (2000) Signal transduction pathways of apoptosis and inflammation induced by the tumor necrosis factor receptor family. Am J Respir Cell Mol Biol 22:147–149
- Lodish HBA, Zipursky LS, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J (2000) Molecular cell biology. Freeman, New York
- Richards F Jr, Sullivan J, Ruiz-Tiben E, Eberhard M, Bishop H (1989) Effect of praziquantel on the eggs of *Schistosoma mansoni*, with a note on the implications for managing central nervous system schistosomiasis. Ann Trop Med Parasitol 83(5):465–472
- Richter J (2000) Evolution of schistosomiasis-induced pathology after therapy and interruption of exposure to schistosomes: a review of ultrasonographic studies. Acta Trop 77(1):111–131
- Pinlaor S, Hiraku Y, Ma N, Yongvanit P, Semba R, Oikawa S, Murata M, Sripa B, Sithithaworn P, Kawanishi S (2004a) Mechanism of NO-mediated oxidative and nitrative DNA damage in hamsters infected with *Opisthorchis viverrini*: a model of inflammation-mediated carcinogenesis. Nitric Oxide 11(2):175–183
- Pinlaor S, Ma N, Hiraku Y, Yongvanit P, Semba R, Oikawa S, Murata M, Sripa B, Sithithaworn P, Kawanishi S (2004b) Repeated infection with *Opisthorchis viverrini* induces accumulation of 8-nitroguanine and 8-oxo-7,8-dihydro-2-deoxyguanine in the bile duct of hamsters via inducible nitric oxide synthase. Carcinogenesis 25(8):1535–1542
- Pinlaor S, Hiraku Y, Yongvanit P, Tada-Oikawa S, Ma N, Pinlaor P, Sithithaworn P, Sripa B, Murata M, Oikawa S et al (2006) iNOS-dependent DNA damage via NF-kappaB expression in hamsters infected with *Opisthorchis viverrini* and its suppression by the antihelminthic drug praziquantel. Int J Cancer 119(5):1067–1072
- Pungpak S, Radomyos P, Radomyos BE, Schelp FP, Jongsuksuntigul P, Bunnag D (1998) Treatment of *Opisthorchis viverrini* and intestinal fluke infections with praziquantel. Southeast Asian J Trop Med Public Health 29(2):246–249
- Shacter E, Weitzman SA (2002) Chronic inflammation and cancer. Oncology 16:217–232
- Sripa B (2003) Pathobiology of opisthorchiasis: an update. Acta Trop 88(3):209–220
- Supanvanich S, Supanvanich K, Pawabut P (1981) Field trial of praziquantel in human opisthorchiasis in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 12(4):598–602
- WHO (2004) Food-borne trematode infections in Asia. Report of the joint WHO/FAO.WHO Regional Office for the Western Pacific, RS 2002 GE/40 (VTN), pp 1–62
- Wu Z, Nagano I, Boonmars T, Takahashi Y (2005a) Tumor necrosis factor receptor-mediated apoptosis in *Trichinella spiralis*-infected muscle cells. Parasitology 131(Pt 3):373–381
- Wu Z, Nagano I, Boonmars T, Takahashi Y (2005b) A spectrum of functional genes mobilized after *Trichinella spiralis* infection in skeletal muscle. Parasitology 130(Pt 5):561–573