

- B. Migratory tracks ที่เกิดขึ้นใหม่ (Mt) มีขนาดใหญ่ พบ fibrin (fi), เม็ดเลือดแดง (RBC), และ neutrophils (ne)
- C. Portal tract มีขนาดใหญ่ขึ้นพบ hyperplasia ของท่อน้ำดีขนาดเล็ก (b), ก้อน thrombus ใน hepatic portal vein (ลูกศร), เนื้อเยื่อตับ (hp)
- D. เป็นภาพกำลังขยายสูงของภาพ 10 C. แสดง hyperplasia ของท่อน้ำดีขนาดเล็ก (b), ก้อน thrombus ใน hepatic portal vein (ลูกศร) และ neutrophils (ne)
- E-H, 35 DPI
- E. เยื่อหุ้มตับ (c) หนาตัวขึ้น เนื่องจากมี fibrin และ inflammatory cells ส่วนใหญ่ ประกอบด้วย neutrophils, เนื้อเยื่อตับ (hp), migratory track (m)
- F. เนื้อเยื่อตับถูกทำลายเป็นบริเวณกว้าง พบตัวอ่อนของพยาธิ (J) อยู่ในเนื้อเยื่อตับ (hp)
- G. Portal tract มีขนาดมากใหญ่ขึ้นพบ hyperplasia ของท่อน้ำดีขนาดเล็ก (b), ก้อน thrombus ใน hepatic portal vein (th), เนื้อเยื่อตับ (hp)
- H. เป็นภาพกำลังขยายสูงของภาพ 10 G. แสดง hyperplasia ของท่อน้ำดีขนาดเล็ก (bd), พบ fibroblast (fr) รอบๆ ท่อน้ำดี

รูปที่ 1.1-14

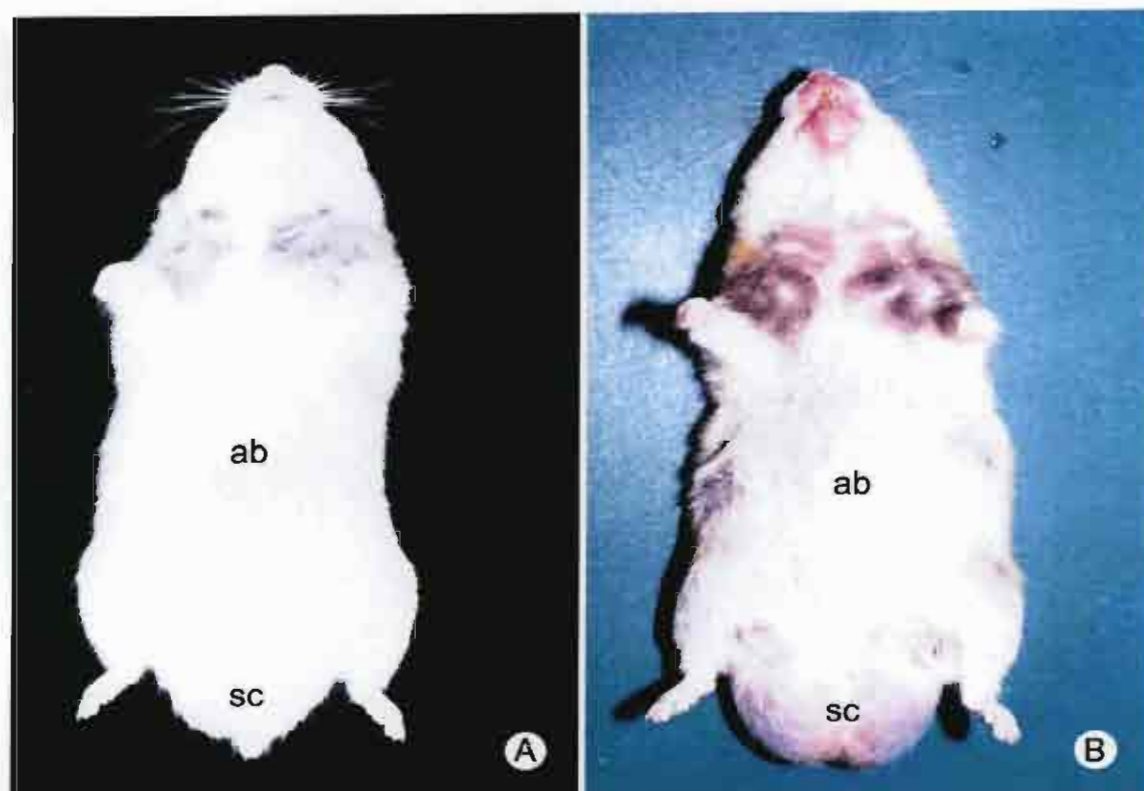
กราฟแสดงค่าทางโลหิตวิทยาที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญของเมาส์

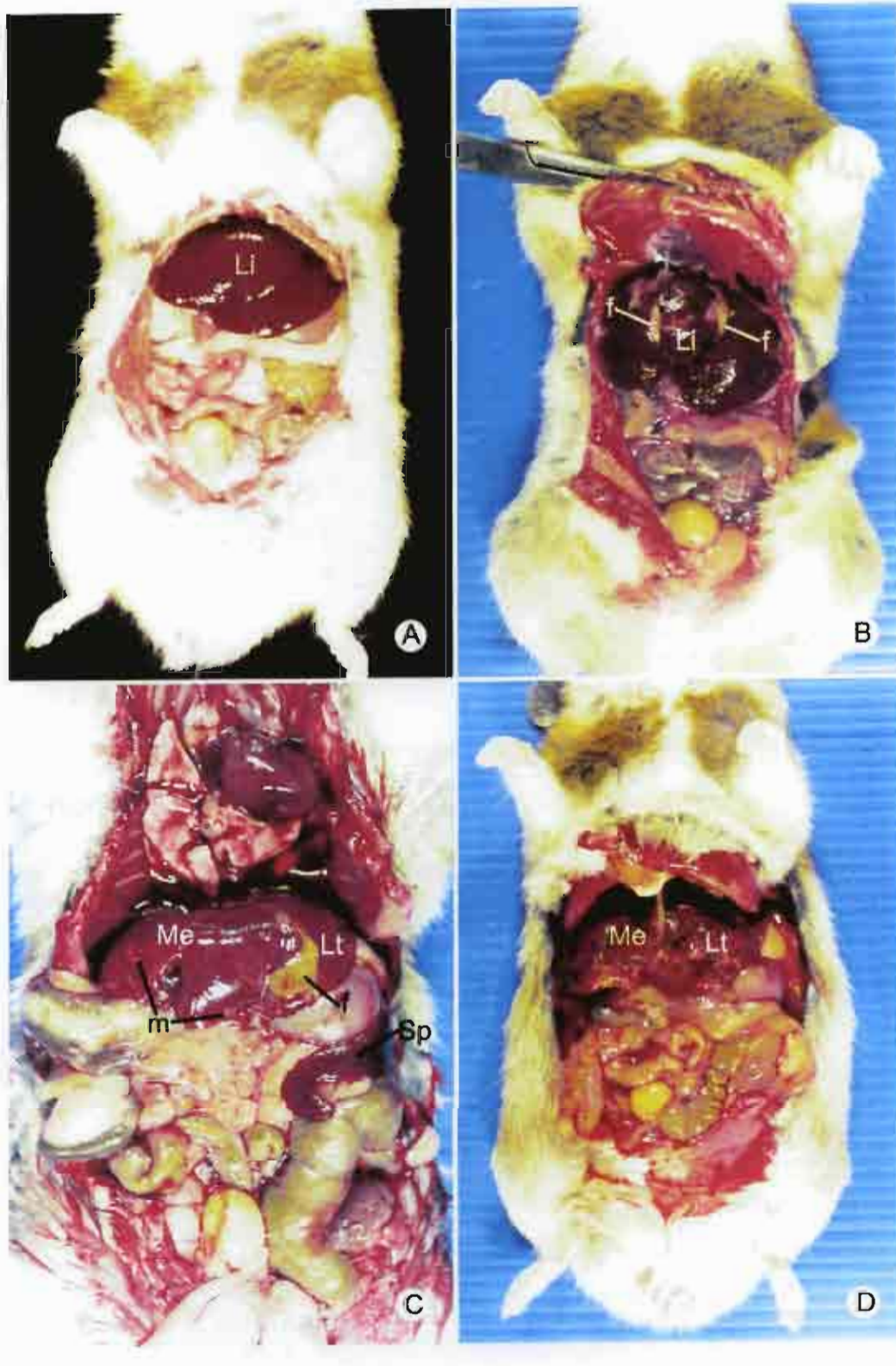
- A. แสดงจำนวนเม็ดเลือดแดงของสัตว์ทดลองทั้ง 2 กลุ่ม ซึ่งมีการลดลงของค่าเฉลี่ยในสัตว์ทดลองกลุ่ม 2 ที่ 35 DPI
- B. แสดงค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นของสัตว์ทดลองทั้ง 2 กลุ่ม ซึ่งมีการลดลงของค่าเฉลี่ยในสัตว์ทดลองกลุ่ม 2 ที่ 21 DPI และ 35 DPI
- C. แสดงจำนวนเม็ดเลือดขาวของสัตว์ทดลองทั้ง 2 กลุ่ม ซึ่งมีการเพิ่มขึ้นของค่าเฉลี่ยในสัตว์ทดลองกลุ่ม 2 ที่ 35 DPI

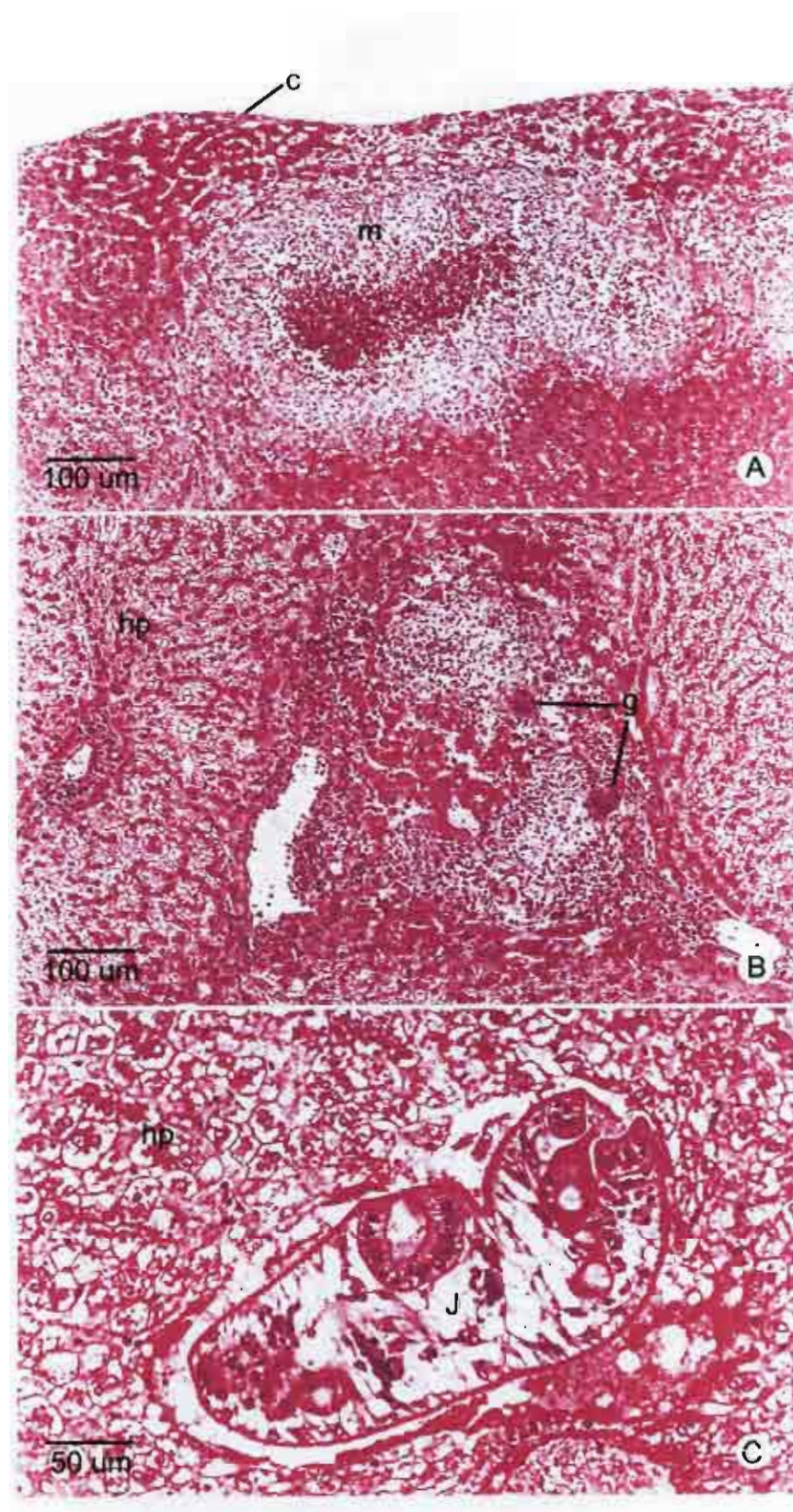
รูปที่ 1.1-15

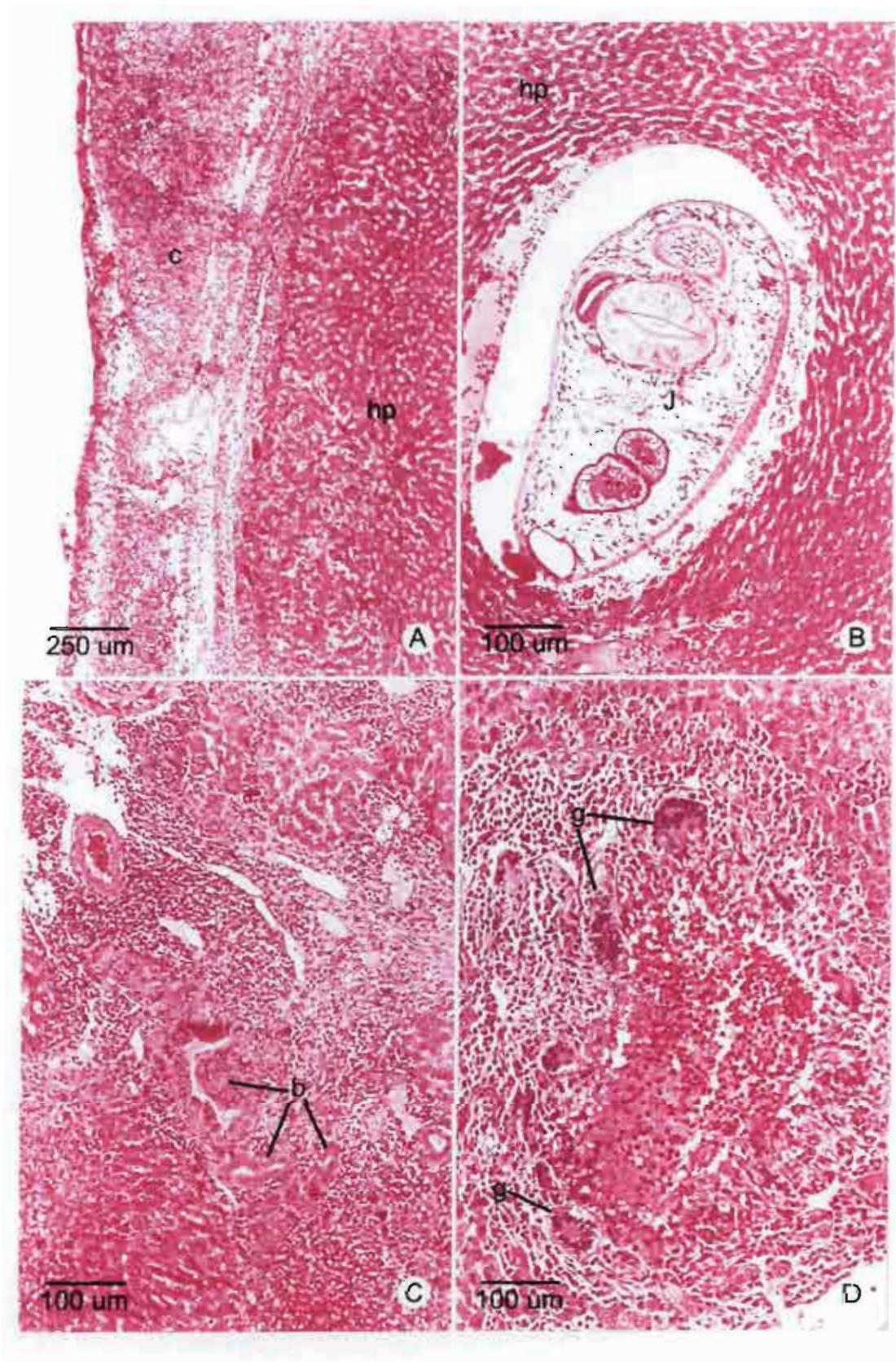
กราฟแสดงค่า Hepatic enzyme และ serum protein ที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญของหนูเมาส์

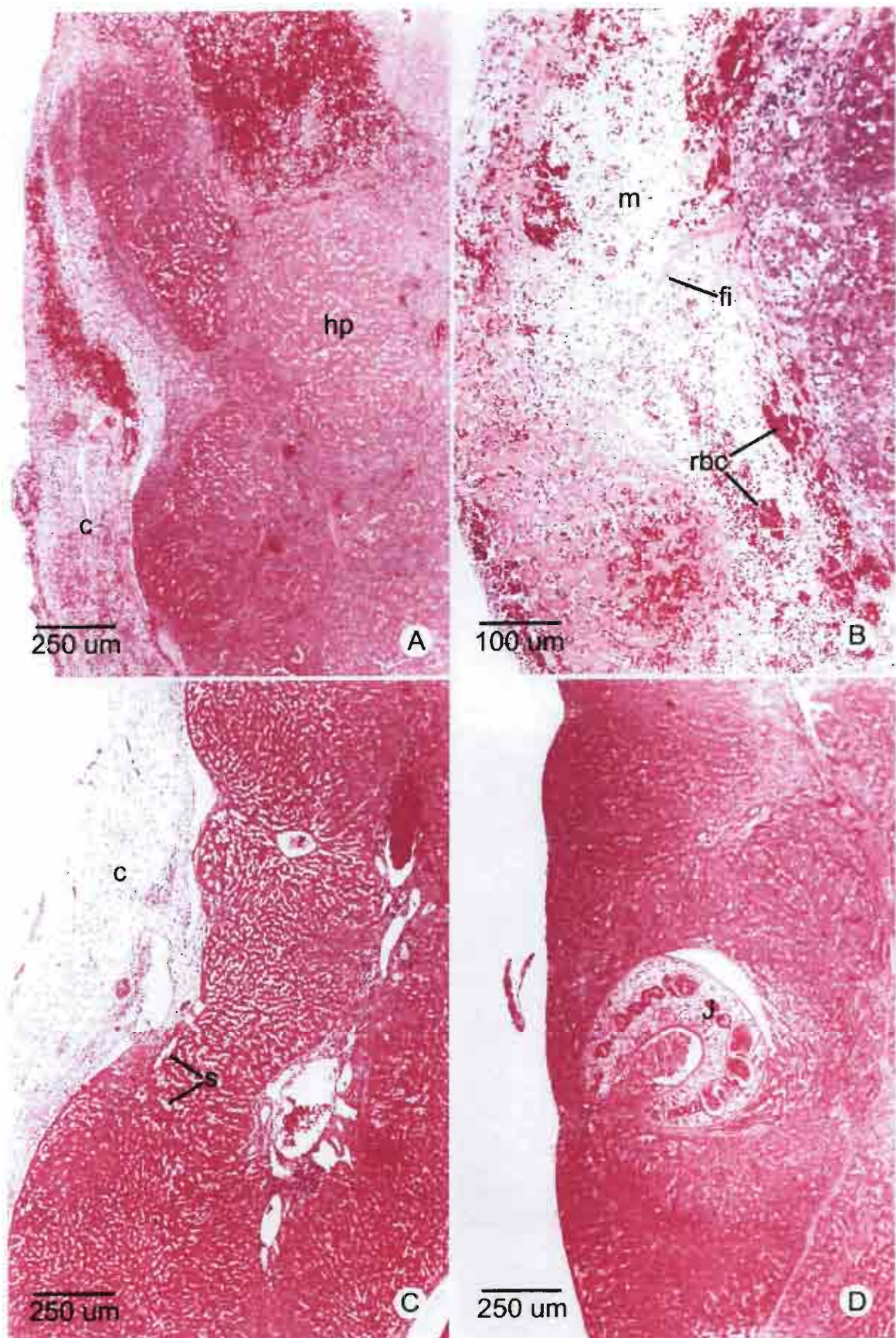
- A. แสดงปริมาณของเอนไซม์ ALT ในเซรัมของสัตว์ทดลองทั้ง 2 กลุ่ม ซึ่งมีการเพิ่มขึ้นของค่าเฉลี่ยในสัตว์ทดลองกลุ่ม 2 ที่ 35 DPI
- B. แสดงปริมาณของ albumin ในสัตว์ทดลองทั้ง 2 กลุ่ม ซึ่งมีการลดลงของค่าเฉลี่ยในสัตว์ทดลองกลุ่ม 2 ที่ 35 DPI

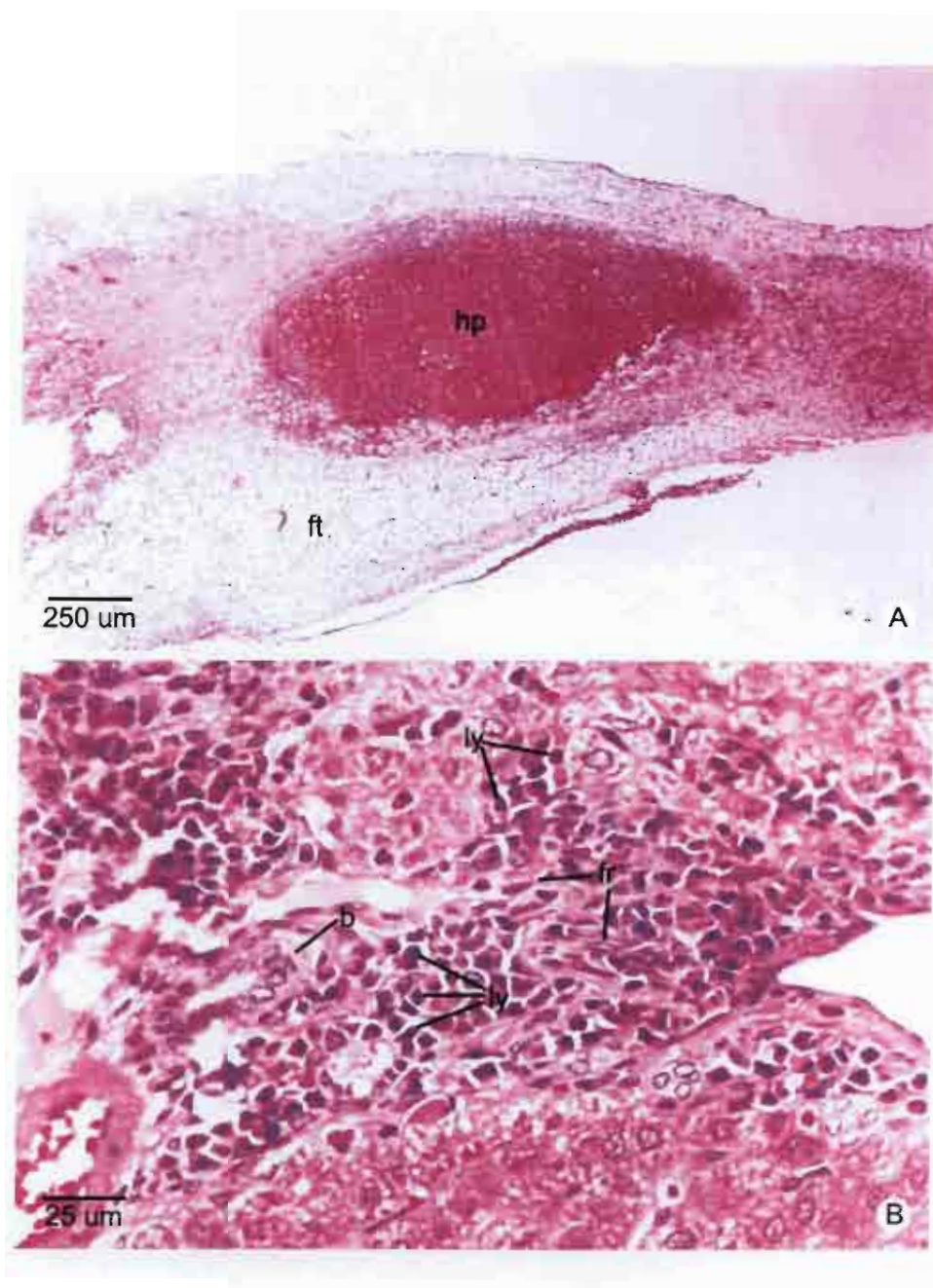




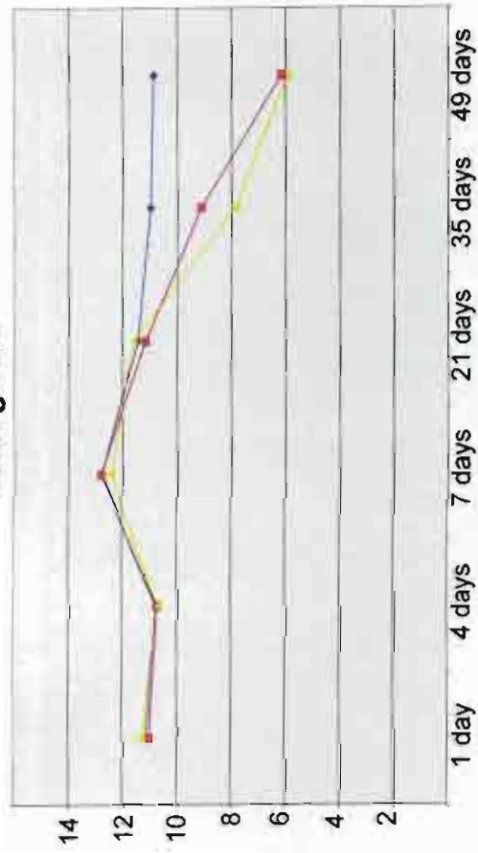




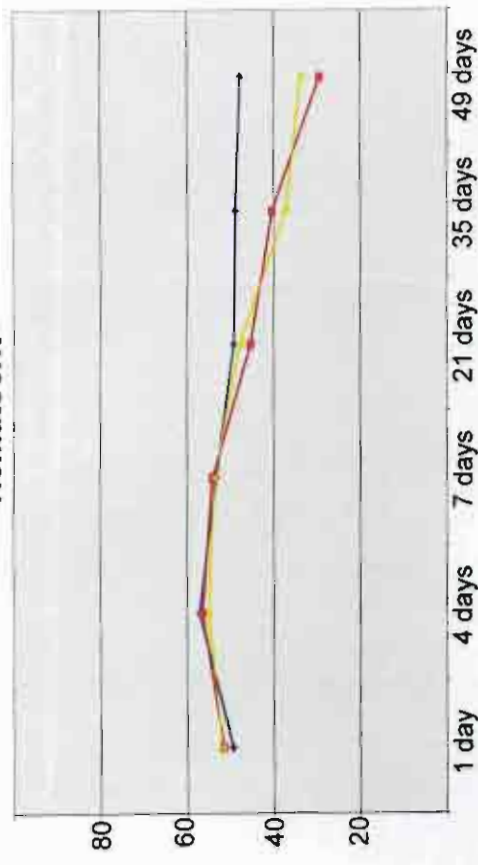




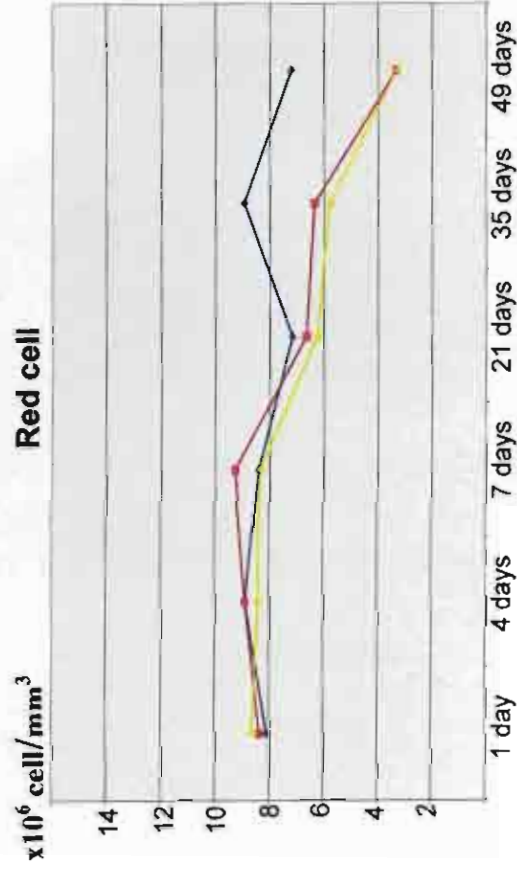
Hemoglobin



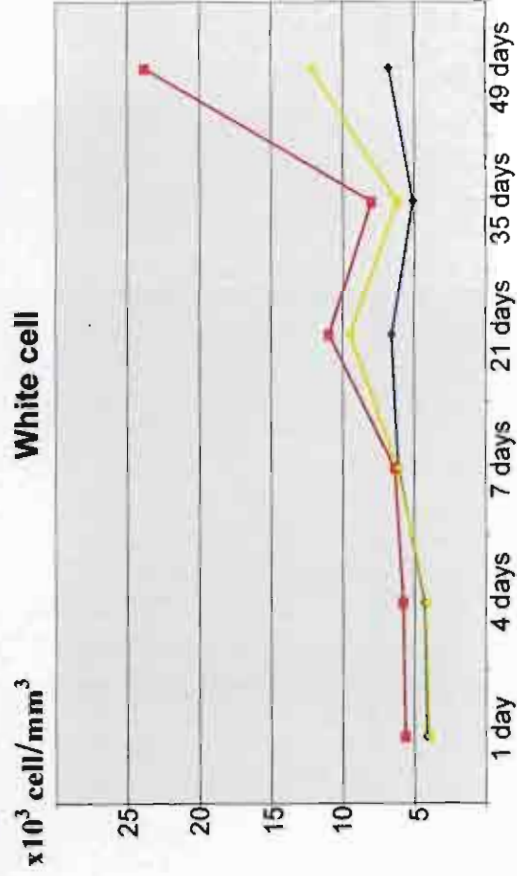
Hematocrit



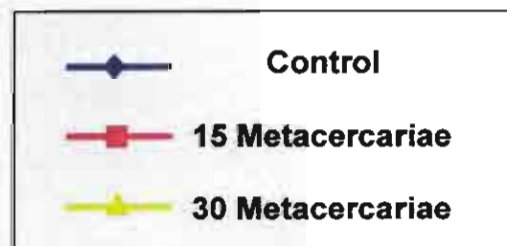
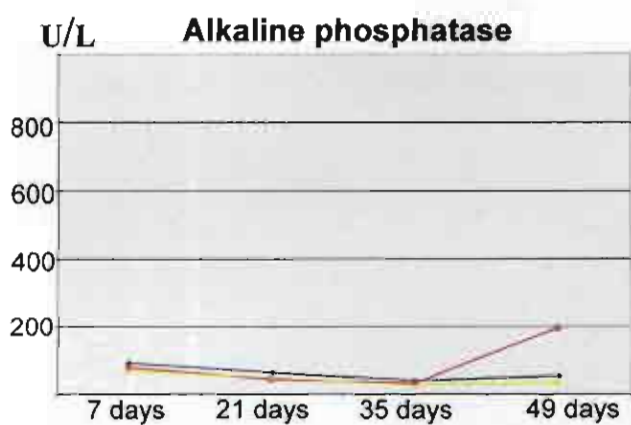
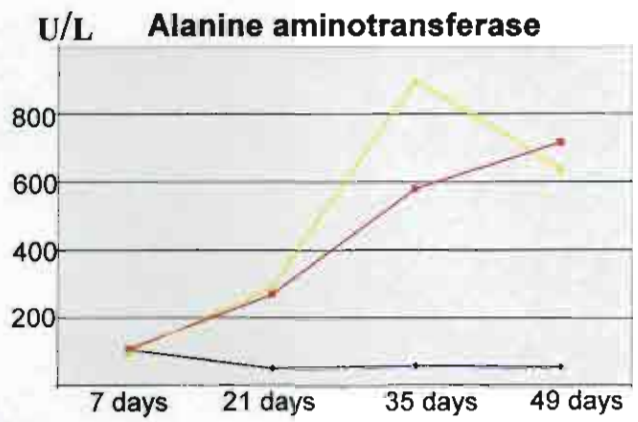
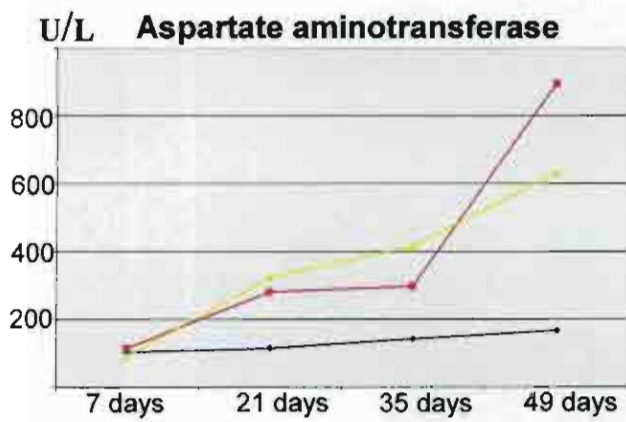
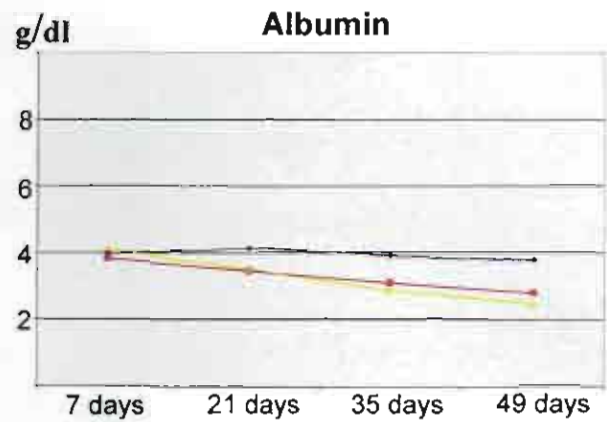
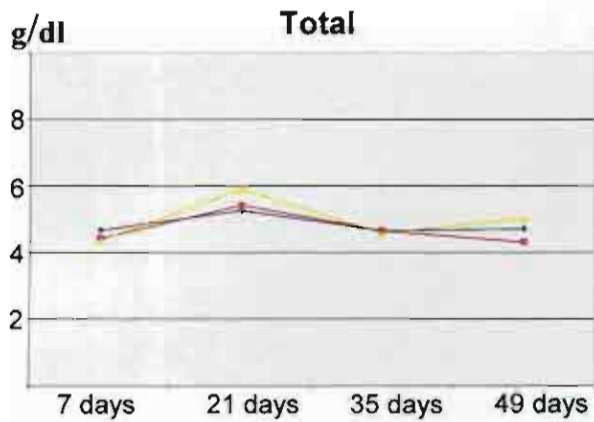
Red cell

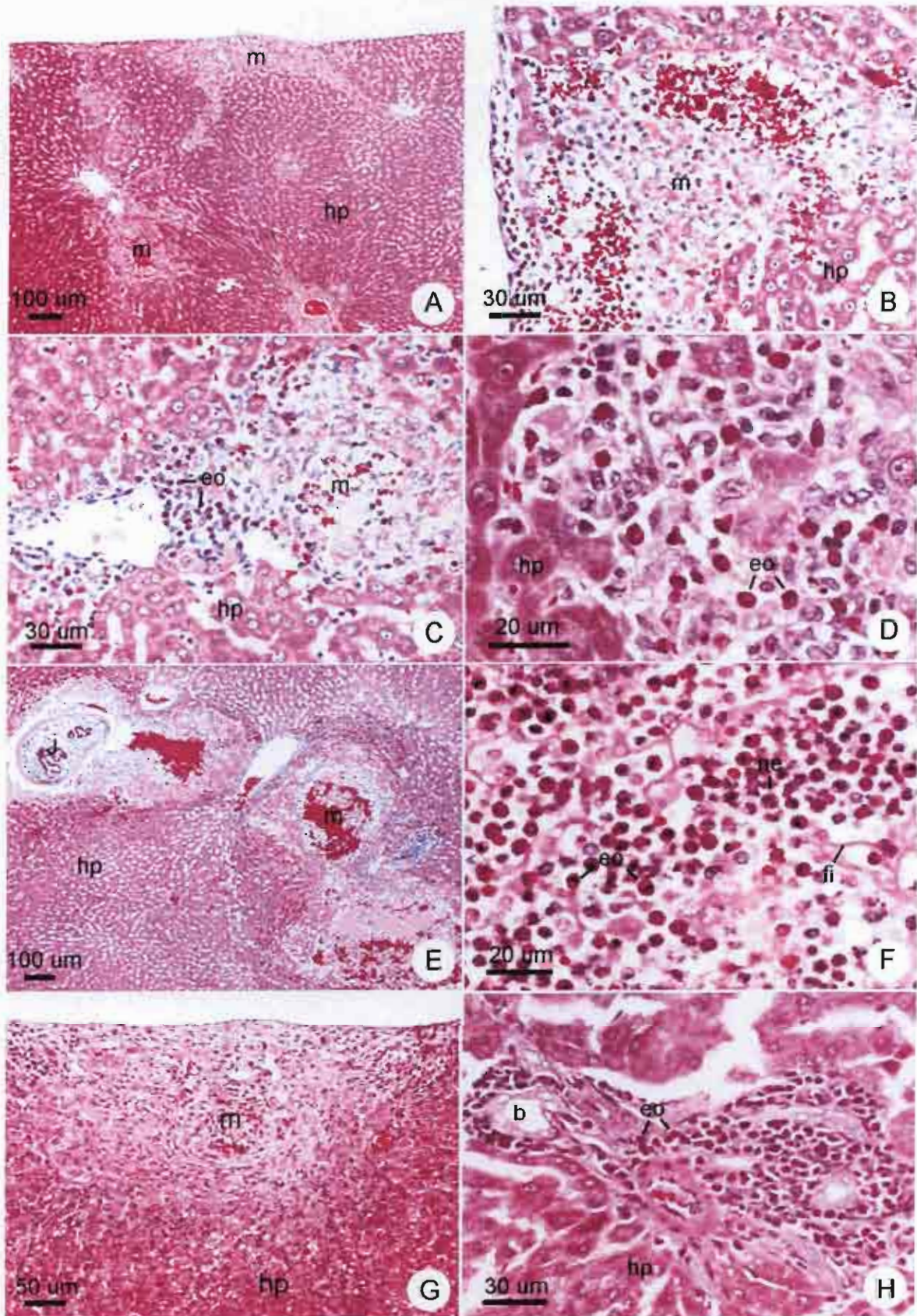


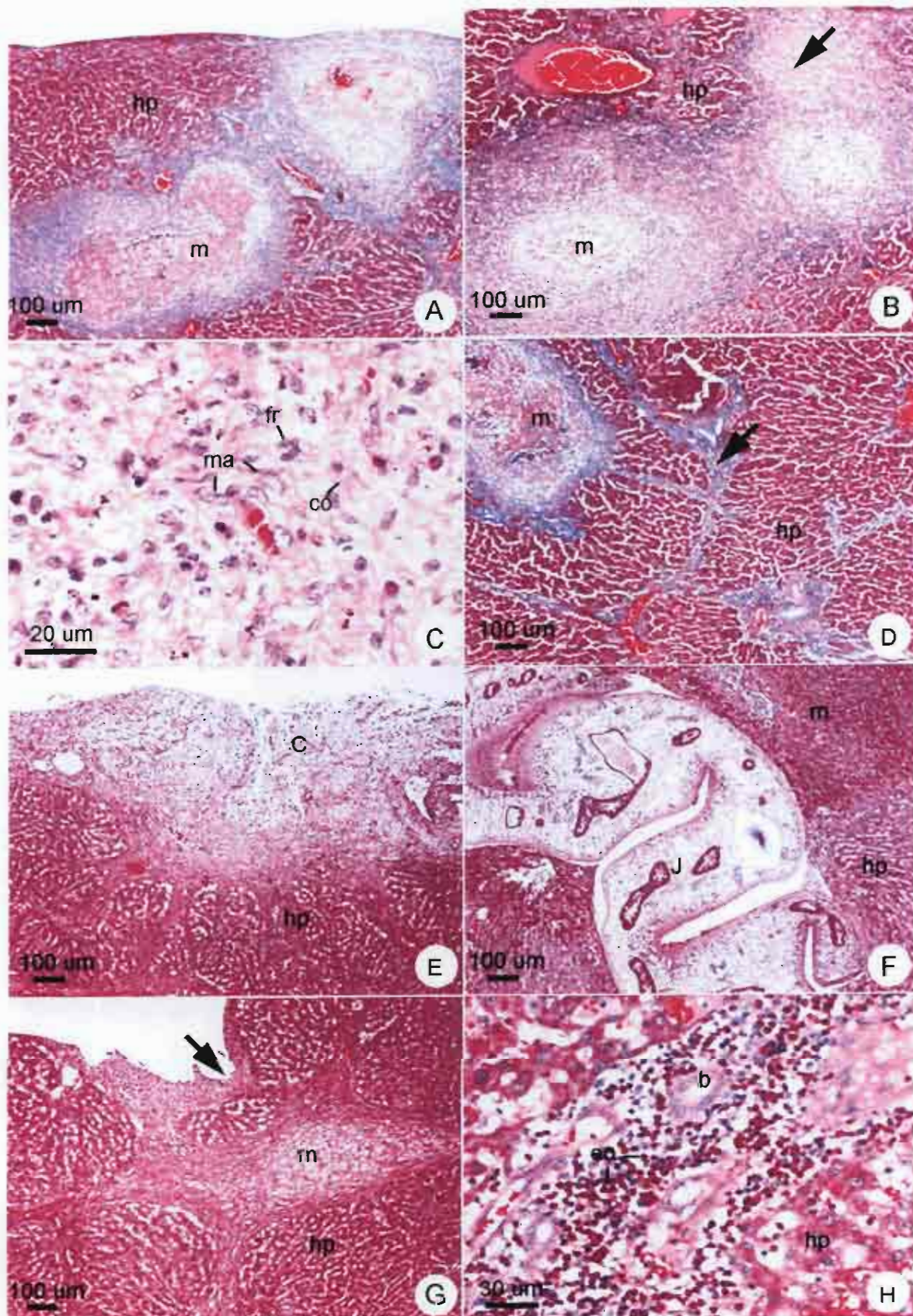
White cell

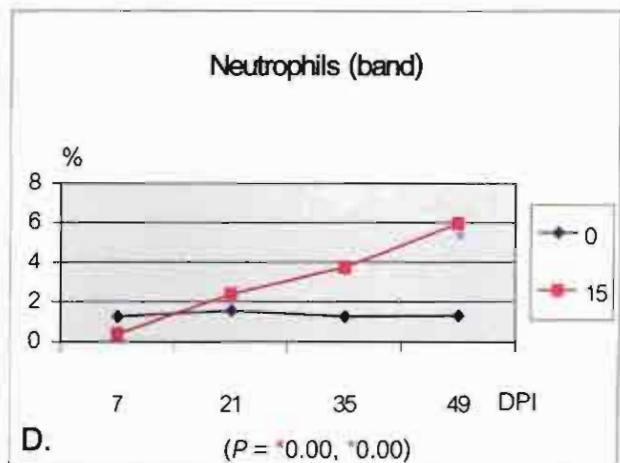
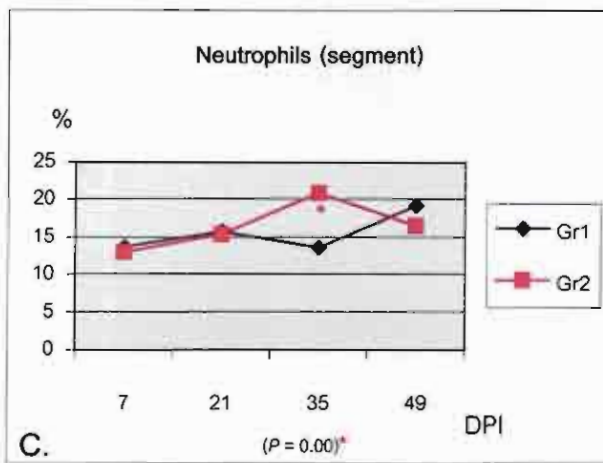
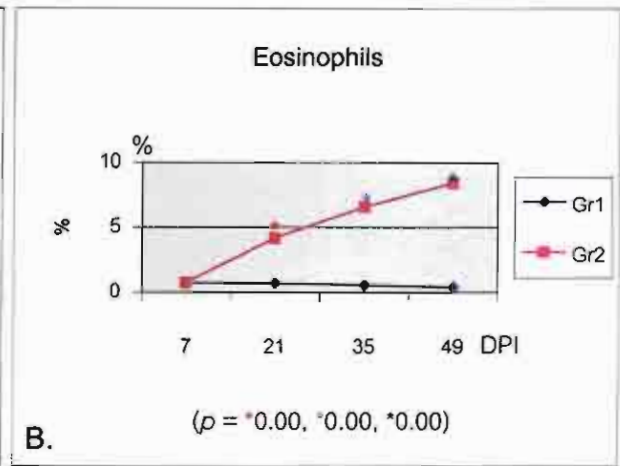
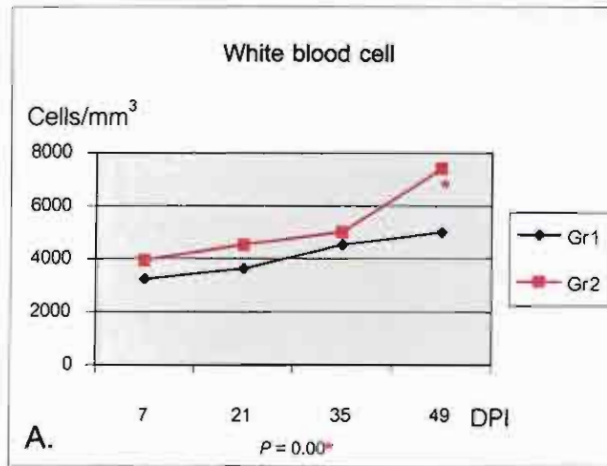


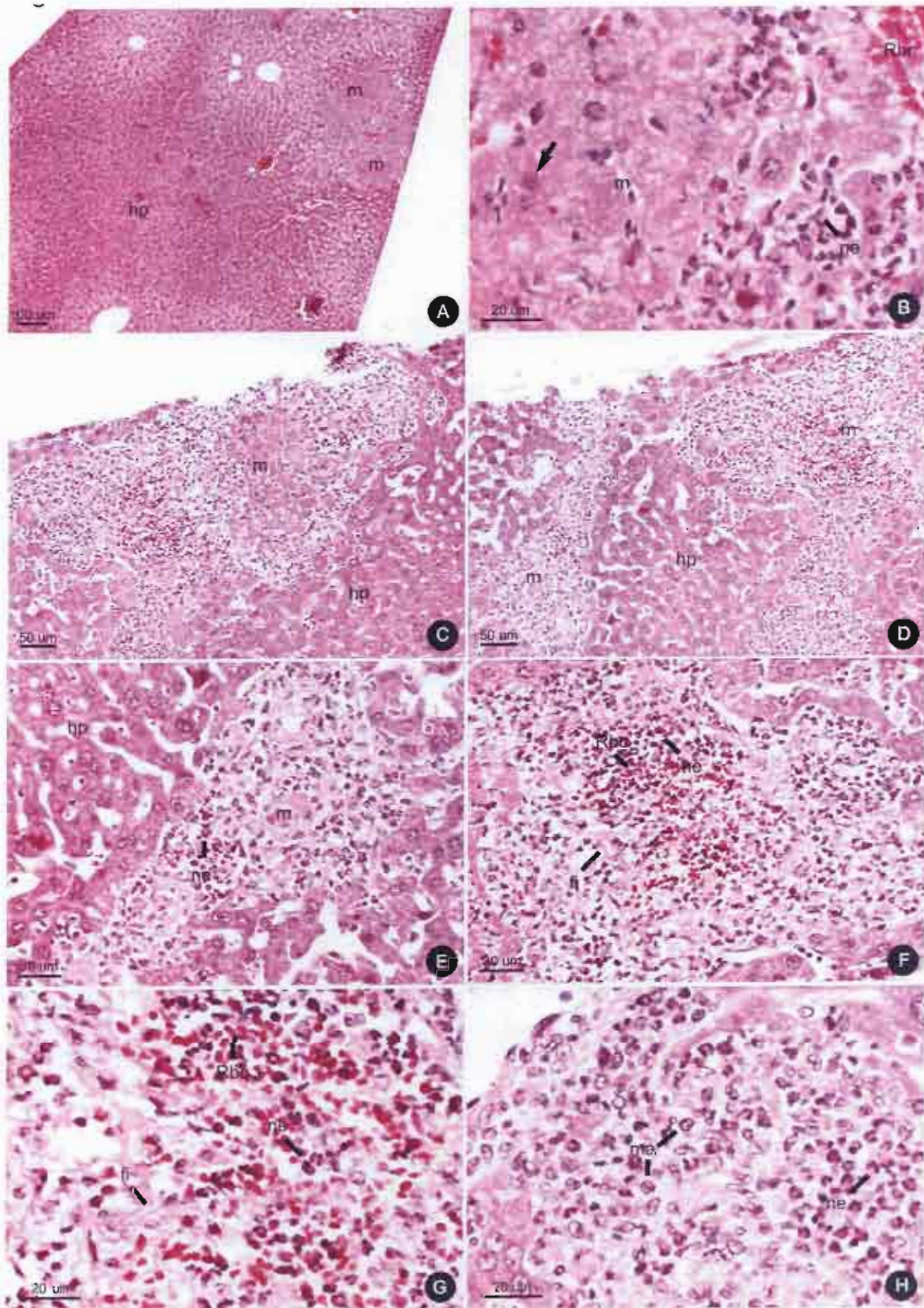
Control 15 Metacercariae 30 Metacercariae

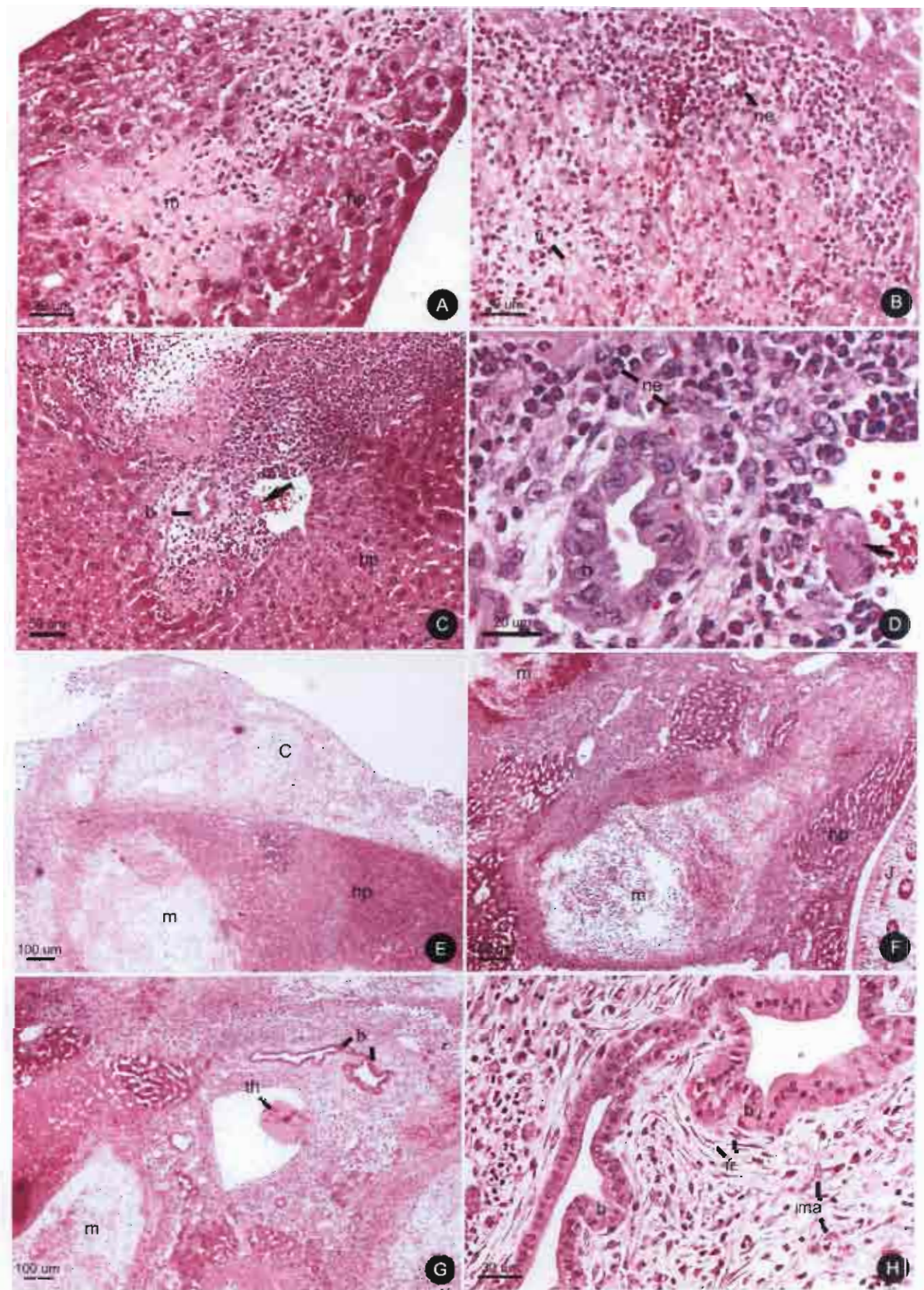


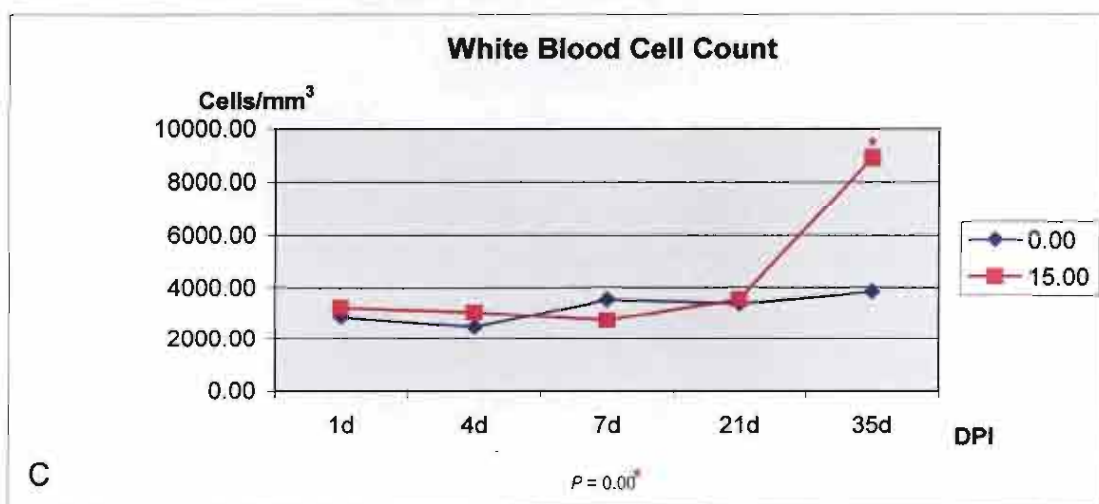
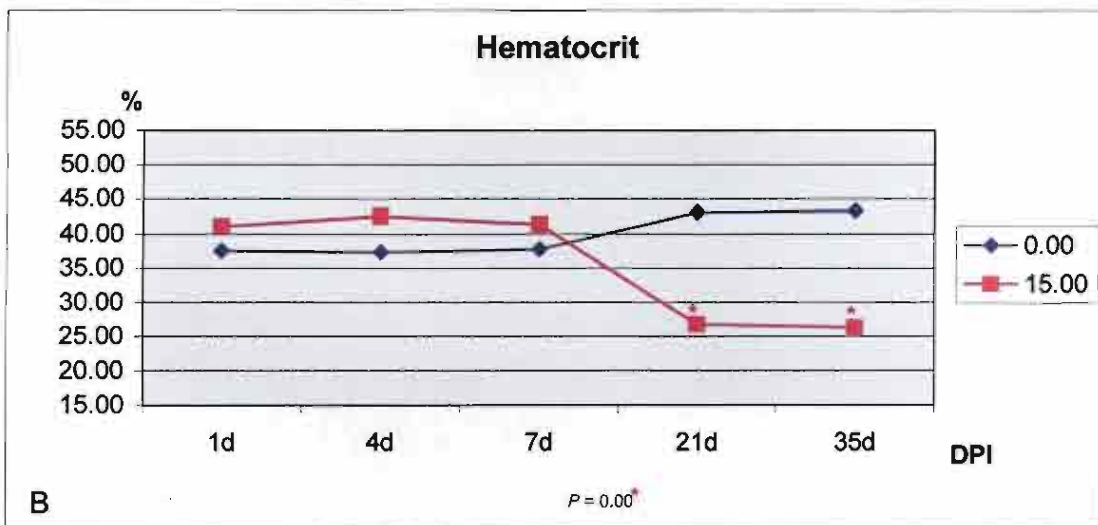
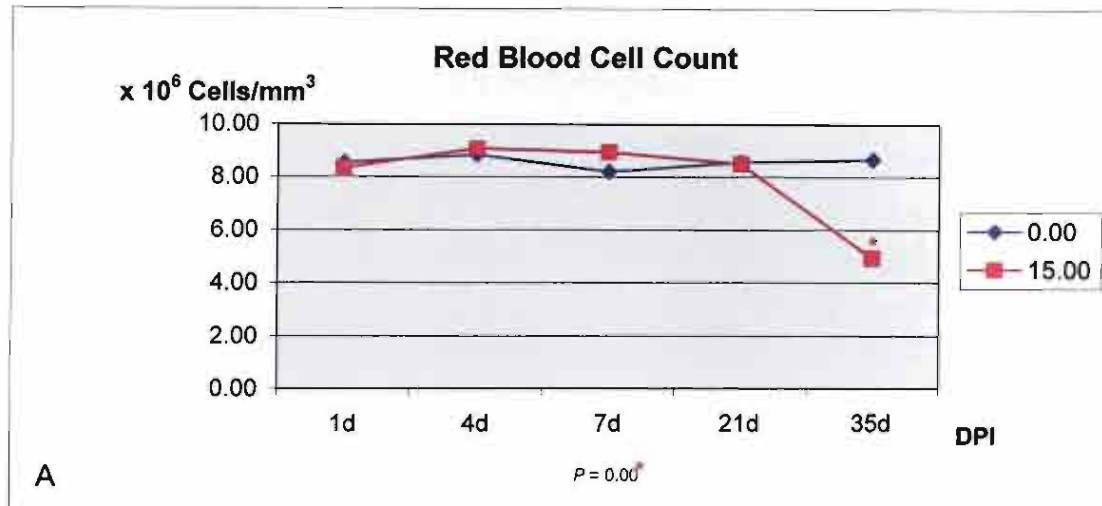


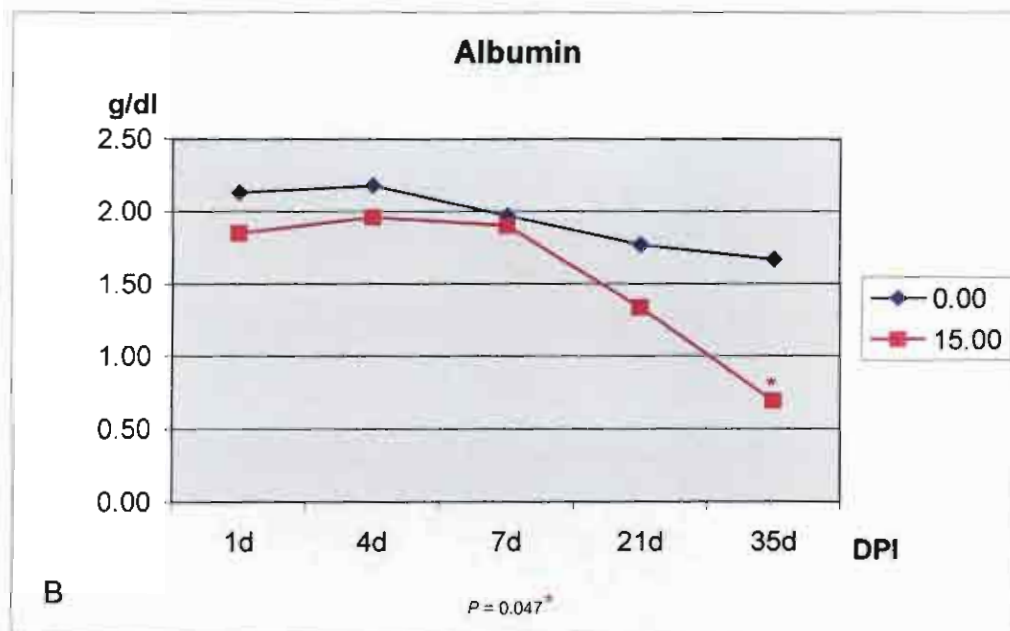
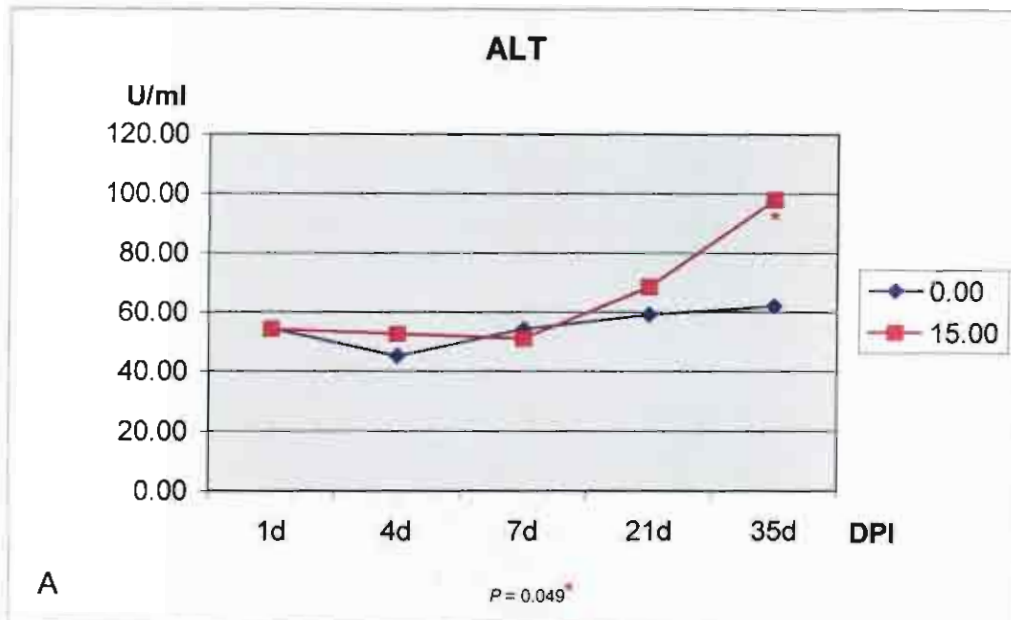












1.2. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ภูมิคุ้มกัน ระดับแอนติบอดี และคุณลักษณะของแอนติเจนในช่องท้องและกระแสโลหิตของหนูทดลองที่ได้รับการกระตุ้นด้วยแอนติเจนจากพยาธิตัวเต็มวัย

การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ (*Fasciola gigantica*) ในสัตว์ชนิดต่างๆ แสดงให้เห็นว่าสัตว์แต่ละชนิดมีความรุนแรงของการติดเชื้อต่างกัน ข้อมูลจากการตรวจนับจำนวนพยาธิในตับของสัตว์ทดลองที่ติดเชื้อพยาธิทำให้สามารถแบ่งสัตว์ทดลองออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีความไว (susceptibility) ต่อการติดเชื้อพยาธิ เช่น หนูแฮมสเตอร์ หนูเมาส์ และหนูตะเภา ในขณะที่หนูแรจด์อยู่ในกลุ่มที่มีความทนทาน (resistance) ต่อการติดเชื้อพยาธิ

ดังนั้นหนูเมาส์และหนูแรจด์จึงถูกนำมาใช้เป็นตัวแทนของสัตว์ทดลองจากทั้งสองกลุ่ม เพื่อทำการศึกษาความแตกต่างของระบบภูมิคุ้มกันอันเป็นสาเหตุที่ทำให้สัตว์ทดลองทั้งสองชนิดมีความรุนแรงของการติดเชื้อต่างกัน โดยทำการตรวจวัดระดับแอนติบอดี และคุณลักษณะของแอนติเจนในช่องท้องและในกระแสโลหิต ที่ระยะเวลาต่างๆ หลังการฉีดกระตุ้นด้วยแอนติเจนสกัดจากพยาธิตัวเต็มวัยทั้งตัว (whole body antigens)

1.2.1. วิธีทดลอง

การสกัดแอนติเจนจากพยาธิตัวเต็มวัย

นำพยาธิใบไม้ตับระยะตัวเต็มวัยที่เก็บมาจากท่อน้ำดีในตับวัว (จากโรงฆ่าสัตว์เทศบาลจังหวัดปทุมธานี) มาล้างในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (0.85% NaCl) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ขั้นตอนต่อไปนำพยาธิมาบดในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.1 M PBS, pH 7.4) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยใช้เครื่อง homogenizer ตามด้วยการสั่นสะเทือนด้วยเสียงความถี่สูง (Sonication) จากนั้นนำมาผ่านขั้นตอนการ rotation เพื่อให้สารละลายเข้ากันได้กับเนื้อพยาธิที่ถูกบด แล้วจึงนำสารละลายทั้งหมดไปปั่นแยกตะกอนออกโดยเครื่องปั่นความเร็วสูงเป็นเวลา 15 นาที ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ของเหลวใสส่วนบนคือโปรตีนสกัดจากพยาธิตัวเต็มวัย โดยนำโปรตีนที่สกัดได้ไปตรวจวัดปริมาณโดยวิธีของ Lowry และปรับความเข้มข้นให้เป็น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วจึงนำมาแบ่งเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ซึ่งจะถูกนำไปใช้เป็นแอนติเจนในขั้นต่อไป

การฉีดสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูทดลอง

สัตว์ทดลองทั้งสองชนิดได้แก่ หนูเมาส์ (ICR Mouse) เพศผู้ อายุ 8 สัปดาห์ (เลี้ยงในกรงพลาสติก มีวัสดุรองนอน) และหนูแรท (Wistar Rat) เพศผู้ อายุ 6 สัปดาห์ (เลี้ยงในกรงเหล็กแบบแขวน) ซึ่งถูกเลี้ยงด้วยอาหารเม็ดสำเร็จรูปและมีน้ำดื่มตลอดเวลา ในหน่วยสัตว์ทดลอง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยแบ่งหนูแต่ละชนิดออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 35 ตัว นำสัตว์ทดลองในกลุ่มที่ 1 มาฉีดสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้าทางช่องท้องในปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ในขณะที่สัตว์ทดลองในกลุ่มที่ 2

ได้รับแอนติเจนปริมาณ 250 ไมโครกรัมใน 0.5 มิลลิลิตร โดยวิธีการเดียวกัน สัตว์ทดลองในกลุ่มที่3 และกลุ่มที่ 4 ได้รับการฉีดสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์และแอนติเจนด้วยปริมาณและวิธีการเดียวกันกับสัตว์ทดลองในกลุ่มที่1 และกลุ่มที่2 แตกต่างกันที่สัตว์ทดลองในกลุ่มที่3 และกลุ่มที่ 4 ถูกฉีดกระตุ้นซ้ำด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์และแอนติเจนในปริมาณและวิธีการเดียวกันกับการกระตุ้นครั้งแรก โดยเว้นระยะเวลาการกระตุ้นทั้งสองครั้งให้ห่างกัน 2 สัปดาห์ หลังจากการฉีดกระตุ้นครั้งสุดท้าย ทำการสุ่มสัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว ที่เวลา 4, 7, 14, 21, 28, 35 และ 49 วัน นำสัตว์มาทำการสลับด้วยไอระเหยของสารอีเทอร์ เพื่อเก็บตัวอย่างได้แก่ น้ำล้างช่องท้องและเซรัม เพื่อที่จะใช้ในการทดลองต่อไป (ตารางที่ 1.2-1)

ตารางที่ 1.2-1 การออกแบบกลุ่มทดลองเพื่อศึกษาการตอบสนองของหนูทดลองต่อแอนติเจนสกัดจากพยาธิตัวเต็มวัยที่ระยะเวลาต่างๆ

Group	Intraperitoneal Injection		Protein (µg/animal)	Number of Sacrificed Mice or Rats (Days Post Injection, DPI)						
	First	Second		4	7	14	21	28	35	49
1	PBS	-	0	5	5	5	5	5	5	5
2	WB	-	250	5	5	5	5	5	5	5
3	PBS	PBS	0	5	5	5	5	5	5	5
4	WB	WB	500	5	5	5	5	5	5	5

หมายเหตุ กลุ่มที่1 ถูกออกแบบให้เป็นกลุ่มควบคุมสำหรับกลุ่มที่2 ซึ่งได้รับการฉีดแอนติเจนเพียงครั้งเดียว ในขณะที่กลุ่มที่3 ถูกออกแบบให้เป็นกลุ่มควบคุมสำหรับกลุ่มที่4 ซึ่งได้รับการฉีดแอนติเจนซ้ำ

PBS = สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

WB = โปรตีนสกัดจากพยาธิตัวเต็มวัย (whole body extract)

การนับจำนวนและการจำแนกชนิดเซลล์ภูมิคุ้มกันโดยกล้องจุลทรรศน์

การนับจำนวนเซลล์ภูมิคุ้มกันในช่องท้องทำโดยนำน้ำล้างช่องท้องที่เก็บได้จากหนูทดลองแต่ละตัวมาหยดลงบน counting chamber และปิดด้วยแผ่น coverslip เพื่อนับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ในขณะที่การนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวจากกระแสโลหิตทำโดยนำเลือดมาผสมกับสารละลายกรดอะซิติก 2% เพื่อทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดงออกให้เหลือแต่เซลล์เม็ดเลือดขาว แล้วจึงนำมาหยดลงบน counting chamber และทำการตรวจนับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เช่นเดียวกันกับการนับจำนวนเซลล์ภูมิคุ้มกันในช่องท้อง

การจำแนกชนิดของเซลล์ภูมิคุ้มกันจากช่องท้อง และการจำแนกชนิดเซลล์เม็ดเลือดขาวจากกระแสโลหิตของหนูทดลองทำโดยนำน้ำล้างช่องท้องและเลือดที่เก็บได้จากหนูทดลองแต่ละตัวมาหยดลงบนกระจกสไลด์ จากนั้นให้หยดน้ำล้างช่องท้องและหยดเลือดแผ่ออกเป็นแผ่นบางบนกระจกสไลด์ หลังจากทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องแล้วจึงนำแผ่นสไลด์ที่ได้มาแช่ในสารละลาย methanol เพื่อคงสภาพของเซลล์บนกระจกสไลด์ จากนั้นนำมาย้อมสี (Hematoxylin & Eosin) เพื่อให้เห็นนิวเคลียสและไซโตพลาสซึมเซลล์ได้อย่างชัดเจน จากนั้นจึงจำแนกชนิดของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันที่เป็นลักษณะที่จำเพาะของเซลล์แต่ละชนิดได้แก่ ขนาดของเซลล์ ขนาดและรูปร่างของนิวเคลียส และการติดสีของไซโตพลาสซึมตามคุณสมบัติของสารที่บรรจุอยู่ในกรานูล

การตรวจวัดระดับแอนติบอดีโดยวิธี ELISA

ตรวจวัดระดับแอนติบอดีในช่องท้องได้จากสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ได้จากการล้างช่องท้องของหนูทดลอง (peritoneal lavage fluid) โดยหลังจากการล้างช่องท้องแล้ว นำสารละลายที่ได้มาปั่นให้ตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เพื่อแยกให้เซลล์ตกตะกอนและได้แอนติบอดีอยู่ในสารละลายส่วนบน ในขณะที่การตรวจวัดแอนติบอดีในการแสเลือดทำโดยนำเลือดที่เจาะเก็บจากหัวใจของสัตว์ทดลองมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เม็ดเลือดตกตะกอน (clotting) จากนั้นเก็บสารละลายส่วนบนมาปั่นแยกตะกอนออกจากเซรุ่ม โดยปั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บสารละลายส่วนบนคือ เซรุ่ม ซึ่งเป็นส่วนที่มีแอนติบอดีละลายอยู่ เก็บน้ำล้างช่องท้องและเซรุ่มไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาตรวจวัดระดับแอนติบอดีโดยวิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

การตรวจวัดระดับแอนติบอดีโดยวิธี ELISA ทำโดยเคลือบผิวของภาตหลุม (96-well plate) ด้วยสารสกัดจากพยาธิตัวเต็มวัย (WB) ที่ความเข้มข้น 1.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วล้างแอนติเจนส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านขบวนการฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิและความดันสูง (autoclaved water) จากนั้นหยอดสารละลาย 0.25% bovine serum albumin, 0.05% tween20 ใน 0.01 M PBS, pH 7.2 หลุมละ 100 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เพื่อป้องกันการจับตัวระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่ไม่จำเพาะ เมื่อล้างสารละลายดังกล่าวออกแล้วจึงใส่สารละลายที่ต้องการตรวจวัดระดับแอนติบอดี ได้แก่ น้ำล้างช่องท้องของหนูเมาส์เจือจาง 1:100, น้ำล้างช่องท้องของหนูแรทเจือจาง 1:200, เซรุ่มของหนูเมาส์เจือจาง 1:400 และเซรุ่มของหนูแรทเจือจาง 1:800 โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง แล้วจึงล้างออกและใส่แอนติบอดีจำเพาะต่อหนูเมาส์หรือหนูแรท ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (horse radish peroxidase) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงล้างออกและใส่สารละลายซับสเตรท (ส่วนผสมระหว่าง ซิเตรตบัฟเฟอร์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และ o-Phenylenediamine dihydrochloride) โดยให้ปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์และซับสเตรทเกิดที่อุณหภูมิ 37

องศาเซลเซียส นาน 30 นาที (ในขณะที่ปฏิกิริยาดำเนินอยู่จะเห็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาเป็นสีส้ม โดยมีความเข้มของสีต่างกันไปตามปริมาณของแอนติบอดีในหลุมนั้นๆ) แล้วจึงหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมกรดซัลฟูริก (6N H_2SO_4) ลงไปหลุมละ 100 ไมโครลิตร ขั้นตอนสุดท้ายคือทำการตรวจวัดค่า optical density (O.D.) ในเครื่องอ่าน ELISA โดยเลือกใช้แผ่นกรองแสงสำหรับแสงที่มีความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ค่า O.D. ที่วัดได้ในแต่ละหลุมจะถูกบันทึกและนำมาใช้ในการเปรียบเทียบระดับแอนติบอดีของหนูในแต่ละกลุ่ม

ค่าที่ได้จากการวัดระดับแอนติบอดีในช่องท้องและในเซรัมของหนูทดลองแต่ละกลุ่มถูกนำมาคำนวณ หาค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่ม และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้การวิเคราะห์แบบ Student *t* - test โดยถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ $P < 0.05$

การตรวจหาคุณลักษณะของแอนติเจนที่กระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันแบบสร้างแอนติบอดี (Humoral immune response) โดยวิธี Immunoblotting

การตรวจหาคุณลักษณะของแอนติเจนที่มีความสามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในหนูทำได้โดยใช้สองขั้นตอนคือ การแยกชนิดโปรตีนสกัดจากพยาธิตัวเต็มวัยตามขนาดโมเลกุลด้วยกระแสไฟฟ้า (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) และการนำโปรตีนสกัดที่แยกชนิดอยู่บนแผ่น acrylamide gel มาถ่ายลงบนแผ่น nitrocellulose เพื่อทำปฏิกิริยากับน้ำล้างช่องท้องและเซรัมที่คัดเลือกมาจากหนูแต่ละกลุ่ม

การแยกชนิดโปรตีนสกัดจากพยาธิตัวเต็มวัยด้วยวิธี SDS-PAGE

นำโปรตีนสกัดจากพยาธิตัวเต็มวัยมาผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ (0.5M Tris-Cl, Sodium dodecyl sulfate, Dithiothreitol, Glycerol และ Bromophenol blue) ซึ่งมีส่วนผสมที่สามารถรีดิวซ์โปรตีนให้อยู่ในรูปของโครงสร้างปฐมภูมิ (primary structure) จากนั้นนำสารผสมดังกล่าวมาหยอดบน acrylamide gel (แต่ละแผ่นประกอบด้วย 12.5% separating gel และ 4% stacking gel) โดยแต่ละแผ่นของ acrylamide gel มีการหยอด molecular weight standards เพื่อใช้ในการวัดหาขนาดของโปรตีนที่ตรวจพบ การแยกโปรตีนกระทำโดยปล่อยกระแสไฟฟ้าผ่านในปริมาณ 40 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลานาน 60 นาที ใน electrophoresis buffer (Tris-Cl, Glycine, SDS, pH 8.3) เมื่อผ่านกระบวนการแยกโปรตีนบนแผ่น acrylamide gel แล้วจึงถ่ายโปรตีนลงบนแผ่น nitrocellulose ผ่านเข้าสู่กระบวนการ immunoblotting ต่อไป

การตรวจหาแอนติเจนที่มีความสามารถในการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในหนูด้วยวิธี Immunoblotting

นำโปรตีนที่อยู่บนแผ่น acrylamide gel หลังจากผ่านกระบวนการ electrophoresis แล้ว มาถ่ายลงบนแผ่น nitrocellulose ใน transfer buffer (Tris-Cl, Glycine, Methanol, pH 9.2) โดยควบคุมให้กระแสไฟฟ้าที่ใช้มีความต่างศักย์คงที่ที่ 20 โวลต์ นาน 60 นาที เมื่อถ่ายโปรตีนแล้วทำการย้อมแผ่น

nitrocellulose ด้วยสีย้อม Ponceau S และล้างสีย้อมส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น ทำให้สามารถมองเห็นว่าโปรตีนที่ถูกแยกโดย gel electrophoresis นั้นได้ถูกถ่ายมาลงบนแผ่น nitrocellulose แล้ว จากนั้นจึงตัดแผ่น nitrocellulose ออกเป็น strips ตามแต่ละเลนของโปรตีน เก็บ strips ของ molecular weight standard ไว้เพื่ออ้างอิงขนาดโมเลกุลของโปรตีน ในขณะที่ strips ของโปรตีนสกัดจากพยาธิตัวเต็มวัยถูกนำมาล้างในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.01M PBS, pH 7.2) แล้วจึงนำมาใส่ในสารละลาย 5% skim milk เพื่อป้องกันการจับตัวระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่ไม่มีความจำเพาะเจาะจง จากนั้นจึงนำแต่ละ strips มาใส่ในน้ำล้างช่องท้องหรือเซรัมที่ได้จากหนูในแต่ละกลุ่ม (โดยทำการเจือจางเซรัมเดียวกันกับการวัดระดับแอนติบอดีในหัวข้อ 3.) โดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วจึงล้างออกด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ แล้วจึงใส่แอนติบอดีจำเพาะต่อหนูเมาส์หรือหนูแรท ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (horse radish peroxidase) ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง เมื่อล้างแอนติบอดีที่ติดฉลากกับเอนไซม์ออกแล้วจึงใส่ซับสเตรท (ส่วนผสมระหว่าง Diaminobenzidine, Nickel chloride, 50mM Tris-Cl, 150mM Sodium chloride และ Hydrogen peroxide) โดยในขณะที่ใส่ซับสเตรทลงไปเพื่อทำปฏิกิริยาพบว่าตำแหน่งของโปรตีนจะปรากฏเป็นแถบสีดำของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น โดยปล่อยให้ปฏิกิริยาดำเนินต่อไปเป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำกลั่น หลังจากทึว้างแผ่น strips ไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องแล้วจึงนำมาวัดหาค่า relative mobility (R_f) เพื่อนำมาเปรียบเทียบกับ molecular weight standard และคำนวณหาขนาดโมเลกุลของโปรตีนต่อไป

1.2.2. ผลการทดลอง

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันโดยเซลล์

หนูเมาส์

มีการตอบสนองของเซลล์ภูมิคุ้มกันในช่องท้องของหนูเมาส์ที่ได้รับเชื้อพยาธิโดยมีจำนวนเซลล์เพิ่มมากขึ้น (มีค่าเฉลี่ยระหว่าง 1.177×10^3 - 1.780×10^3 cell/mm³) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อพยาธิ (มีค่าเฉลี่ยระหว่าง 0.873×10^3 - 1.160×10^3 cell/mm³) โดยพบว่าค่าของจำนวนเซลล์ภูมิคุ้มกันในช่องท้องที่เพิ่มขึ้นนี้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ที่เวลา 4, 7, 21 และ 49 วันหลังการได้รับการฉีดด้วยเชื้อพยาธิ (DPI) ในขณะที่การนับจำนวนเซลล์ภูมิคุ้มกันในช่องท้องของกลุ่มหนูเมาส์ที่ได้รับการฉีดกระตุ้นซ้ำก็ให้ผลการทดลองเช่นเดียวกันคือ กลุ่มทดลองมีจำนวนเซลล์มากกว่ากลุ่มควบคุม โดยพบว่ามีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่เวลา 4 DPI จนถึงสิ้นสุดการทดลองคือ 49 DPI (ตารางที่ 1.2-2 และ 1.2-3, รูปที่ 1.2-1A)

ผลการจำแนกชนิดเซลล์ภูมิคุ้มกันในช่องท้องของหนูเมาส์ในกลุ่มควบคุมพบว่าประกอบด้วย โมโนไซต์/มาโครฟาจ (50-65%) ลิมโฟไซต์ (30-45%) มาสต์เซลล์ (3-5%) นิวโทรฟิล (0.2-2.8%) และอีโอสิโนฟิล (0-2.4%) โดยหลังจากการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยเชื้อพยาธิพบว่ามีส่วนของลิมโฟไซต์เพิ่มขึ้น

ที่ช่วงเวลา 7, 14 และ 35 DPI และการเพิ่มขึ้นของสัดส่วนลิมโฟซัยท์ในช่องท้องของหนูเมาส์ที่ได้รับการฉีดเชื้อพยาธิเข้ายังสามารถพบได้ในลักษณะที่คล้ายคลึงกันโดยพบที่ช่วงเวลา 7, 14, 21 และ 28 DPI (ตารางที่ 1.2-4)

จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวจากกระแสเลือดของหนูเมาส์ที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยเชื้อพยาธิมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 4.785×10^3 - 6.415×10^3 cell/mm³ และในหนูเมาส์ที่ได้รับการฉีดกระตุ้นเข้าพบว่าจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวมีค่าเฉลี่ยระหว่าง 4.465×10^3 - 4.915×10^3 cell/mm³ ซึ่งค่าที่ตรวจนับได้จากหนูในกลุ่มทดลองทั้งสองกลุ่มมีค่ามากกว่าค่าที่ตรวจนับได้จากหนูในกลุ่มควบคุม (มีค่าเฉลี่ยระหว่าง 4.350×10^3 - 4.715×10^3 cell/mm³) ในทุกช่วงเวลาของการทดลอง อย่างไรก็ตามการเปรียบเทียบจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวระหว่างหนูในกลุ่มทดลองที่ได้รับเชื้อพยาธิและกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อพยาธิไม่พบว่ามีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างหนูทั้งสองกลุ่มนี้ (ตารางที่ 1.2-2 และ 1.2-3, รูปที่ 1.2-1B)

การจำแนกชนิดของเซลล์เม็ดเลือดขาวพบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม โดยพบสัดส่วนของลิมโฟซัยท์มากกว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดอื่นคือ 71.2-83.3% และพบโมโนซัยท์ (ซึ่งพบเป็นสัดส่วนที่มากที่สุดรองลงมา) แค่เพียง 0.1-0.8% และสามารถพบกรานูโลซัยท์ ชนิดนิวโทรฟิลมีค่าเฉลี่ยของสัดส่วนประมาณ 15-30% และกรานูโลซัยท์ชนิดอื่น (อีโอสิโนฟิลและเบซิฟิล) ในสัดส่วนที่น้อยมากคือ 0-0.7% (ตารางที่ 1.2-5)

หนูแรท

เซลล์ภูมิคุ้มกันจากช่องท้องของหนูแรทในกลุ่มที่ได้รับการฉีดเชื้อพยาธิมีจำนวนเฉลี่ยระหว่าง 2.622×10^3 - 4.765×10^3 cell/mm³ ซึ่งมีค่าสูงกว่าการตรวจนับจากหนูแรทในกลุ่มควบคุมโดยมีจำนวนเฉลี่ยระหว่าง 2.307×10^3 - 2.809×10^3 cell/mm³ ในขณะที่จำนวนเซลล์ภูมิคุ้มกันจากช่องท้องของหนูแรทในกลุ่มที่ได้รับเชื้อพยาธิเข้ามีจำนวนเซลล์ที่สูงกว่าที่ตรวจนับได้จากหนูที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยเชื้อพยาธิครั้งเดียว โดยมีค่าเฉลี่ยระหว่าง 3.801×10^3 - 4.853×10^3 cell/mm³ โดยพบว่ามีค่าสูงสุดที่เวลา 28 DPI และจากการคำนวณทางสถิติของจำนวนเซลล์ภูมิคุ้มกันจากช่องท้องของหนูแรททั้งในกลุ่มที่ได้รับการฉีดเชื้อพยาธิครั้งเดียวหรือกลุ่มที่ได้รับการฉีดเชื้อพยาธิซ้ำ (โดยนำมาเปรียบเทียบกับจำนวนเซลล์ภูมิคุ้มกันจากช่องท้องของหนูแรทในกลุ่มควบคุม) พบว่าจำนวนเซลล์ภูมิคุ้มกันจากหนูทั้งสองกลุ่มมีค่ามากกว่าจำนวนเซลล์ภูมิคุ้มกันจากหนูในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกช่วงเวลาของการทดลองคือ ตั้งแต่ 4 DPI จนถึง 49 DPI (ตารางที่ 1.2-6 และ 1.2-7, รูปที่ 1.2-2A)

ผลการจำแนกชนิดเซลล์ภูมิคุ้มกันในช่องท้องของหนูแรทในกลุ่มควบคุมพบว่ามีสัดส่วนของโมโนซัยท์/มาโครฟาจมากกว่าชนิดอื่น (เช่นเดียวกับที่พบในช่องท้องของหนูเมาส์) โดยพบในสัดส่วน 40-50% และพบลิมโฟซัยท์ 25-35%) จากการตรวจสอบสัดส่วนของกรานูโลซัยท์ในช่องท้องของหนูแรทพบว่ามีสัดส่วน 25-30% หลังจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูแรทโดยฉีดด้วยเชื้อพยาธิพบว่าสัดส่วนของโมโน

ชัยท์/มาโครฟาจ และอีโอสิโนฟิลเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูในกลุ่มควบคุม ในเกือบช่วงเวลาของการทดลอง โดยค่าสูงสุดที่วัดได้อยู่ในกลุ่มหนูแรทที่ได้รับการฉีดกระตุ้นซ้ำโดยพบที่ช่วงเวลา 28 DPI จากการเพิ่มขึ้นของสัดส่วนโมโนชัยท์/มาโครฟาจ และอีโอสิโนฟิลนี้เป็นผลทำให้สัดส่วนของลิมโฟไซต์และนิวโทรฟิลในช่องท้องของหนูแรทลดลง อย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน (ตารางที่ 1.2-8)

จำนวนเม็ดเลือดขาวในกระแสเลือดของหนูแรทที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยเชื้อพยาธิมีค่าเฉลี่ยระหว่าง $5.485 \times 10^3 - 6.285 \times 10^3 \text{ cell/mm}^3$ และการตรวจนับในกลุ่มหนูแรทที่ได้รับการกระตุ้นซ้ำพบว่าค่าเฉลี่ยจำนวนเม็ดเลือดขาวระหว่าง $7.530 \times 10^3 - 9.640 \times 10^3 \text{ cell/mm}^3$ แม้ว่าจำนวนที่ตรวจนับได้นี้มีค่ามากกว่าค่าที่ตรวจนับได้จากหนูในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อพยาธิในทุกช่วงเวลาของการทดลอง แต่การเปรียบเทียบทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม ไม่พบว่ามีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ยกเว้นจำนวนเซลล์จากหนูในกลุ่มที่ได้รับการฉีดเชื้อพยาธิกระตุ้นซ้ำที่เวลา 49 DPI) (ตารางที่ 1.2-6 และ 1.2-7, รูปที่ 1.2-2B)

ผลการจำแนกชนิดเซลล์เม็ดเลือดขาวของหนูแรทในกลุ่มควบคุม สามารถพบเม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆได้เช่นเดียวกับที่พบในหนูเมาส์ โดยพบมากที่สุดคือ ลิมโฟไซต์ในสัดส่วน 75-85% รองลงมาคือนิวโทรฟิล ในสัดส่วน 15-20% และโมโนชัยท์ 0.5-3% แม้ว่าจะพบอีโอสิโนฟิลในสัดส่วนที่น้อยที่สุด (0.5-2.5%) แต่พบว่าหลังจากการกระตุ้นซ้ำสัดส่วนของอีโอสิโนฟิลเพียงชนิดเดียวที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 1.2-9)

ภาพถ่ายตัวอย่างเซลล์ภูมิคุ้มกันในช่องท้องของหนูทดลองที่พบโดยการตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ได้ถูกแสดงอยู่ในรูปที่ 1.2-3 และภาพถ่ายตัวอย่างเซลล์เม็ดเลือดขาวจากการสไลด์นิตของหนูทดลองได้ถูกแสดงไว้ในรูปที่ 1.2-4

ตารางที่ 1.2-2 ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ภูมิคุ้มกันในห้องท้องและเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสเลือดของหนูเมาส์ในแต่ละช่วงเวลาของการทดลองหลังจากการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยโปรตีนสกัดจากพยาธิตัวเต็มวัย

กลุ่ม	การฉีดกระตุ้น		ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัม / หนู1ตัว)	ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนค่าเฉลี่ย ของจำนวนเซลล์ที่ช่วงเวลาต่างๆของการทดลอง (×10 ³ เซลล์/สเปกนาตัมลิตร)						
	1 ครั้ง	2 ครั้ง		4	7	14	21	28	35	49
เซลล์ในห้องท้อง										
1. CMPC1	PBS	-	0	0.884±0.094	1.113±0.034	1.027±0.113	0.873±0.037	0.974±0.130	1.017±0.127	1.116±0.137
2. MPC1	WB	-	250	1.239±0.071	1.436±0.091	1.699±0.150	1.177±0.028	1.406±0.164	1.780±0.285	1.558±0.190
3. CMPC2	PBS	PBS	0	1.031±0.087	1.318±0.176	1.066±0.118	1.269±0.116	1.162±0.064	1.083±0.093	1.309±0.149
4. MPC2	WB	WB	500	2.207±0.228	3.090±0.164	1.932±0.171	1.968±0.152	1.367±0.042	1.837±0.204	1.996±0.191
เซลล์เม็ดเลือดขาว										
1. CMWC1	PBS	-	0	4.560±0.528	4.490±0.434	4.525±0.271	4.465±0.225	4.405±0.340	4.540±0.410	4.580±0.154
2. MWC1	WB	-	250	5.335±0.363	5.135±0.348	6.415±0.952	5.235±0.420	4.935±0.427	5.410±0.699	4.785±0.205
3. CMWC2	PBS	PBS	0	4.715±0.220	4.350±0.407	4.510±0.127	4.505±0.236	4.545±0.236	4.435±0.342	4.505±0.143
4. MWC2	WB	WB	500	4.700±0.300	4.465±0.029	4.915±0.231	4.680±0.164	4.655±0.154	4.665±0.228	4.620±0.392

หมายเหตุ : PBS - สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์, WB - โปรตีนสกัดจากพยาธิตัวเต็มวัย, MPC1 - เซลล์ในห้องท้องของกลุ่มหนูเมาส์ที่ฉีดกระตุ้นครั้งแรก, CMPC1 - เซลล์ในห้องท้องของกลุ่มหนูเมาส์ที่ฉีดกระตุ้นครั้งที่ 2, WB - เซลล์ในห้องท้องของกลุ่มหนูเมาส์ที่ฉีดกระตุ้นครั้งแรก, CMPC2 - เซลล์ในห้องท้องของกลุ่มหนูเมาส์ที่ฉีดกระตุ้นครั้งที่ 2, WB - เซลล์ในห้องท้องของกลุ่มหนูเมาส์ที่ฉีดกระตุ้นครั้งที่ 2, CMWC1 - เซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มหนูเมาส์ที่ฉีดกระตุ้นครั้งแรก, CMWC2 - เซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มหนูเมาส์ที่ฉีดกระตุ้นครั้งที่ 2, WB - เซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มหนูเมาส์ที่ฉีดกระตุ้นครั้งที่ 2, CMWC1 - เซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มหนูเมาส์ที่ฉีดกระตุ้นครั้งที่ 2, CMWC2 - เซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มหนูเมาส์ที่ฉีดกระตุ้นครั้งที่ 2

ตารางที่ 1.2-3 ค่าการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติระหว่างค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ในช่องท้อง หรือ เซลล์เม็ดเลือดขาวของหนูเมาส์ระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม ในแต่ละช่วงเวลาของการทดลอง

คู่เปรียบเทียบ	ช่วงเวลา (DPI)	n	Significant value (P)
เซลล์ในช่องท้อง			
- CMPC1 – MPC1	4	5	0.018
	7	5	0.028
	14	5	0.051
	21	5	0.001
	28	5	0.198
	35	5	0.116
	49	5	0.024
- CMPC2 – MPC2	4	5	0.009
	7	5	0.001
	14	5	0.017
	21	5	0.041
	28	5	0.006
	35	5	0.056
	49	5	0.029
เซลล์เม็ดเลือดขาว			
- CMWC1 – MWC1	4	5	0.219
	7	5	0.439
	14	5	0.163
	21	5	0.187
	28	5	0.495
	35	5	0.225
	49	5	0.494
- CMWC2 – MWC2	4	5	0.971
	7	5	0.797
	14	5	0.102
	21	5	0.329
	28	5	0.757
	35	5	0.540
	49	5	0.778

หมายเหตุ : มีความแตกต่างเมื่อ $p < 0.05$, MPC1 – เซลล์ในช่องท้องของกลุ่มหนูเมาส์ที่ถูกฉีดกระตุ้นครั้งเดียว, CMPC1 – เซลล์ในช่องท้องของกลุ่มควบคุมของ MPC1, MPC2 – เซลล์ในช่องท้องของกลุ่มหนูเมาส์ที่ถูกฉีดกระตุ้นสองครั้ง, CMPC2 – เซลล์ในช่องท้องของกลุ่มควบคุมของ MPC2, MWC1 – เซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มหนูเมาส์ที่ถูกฉีดกระตุ้นครั้งเดียว, CMWC1 – เซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มควบคุมของ MWC1, MWC2 – เซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มหนูเมาส์ที่ถูกฉีดกระตุ้นสองครั้ง, CMWC2 – เซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มควบคุมของ MWC2

ตารางที่ 1.2-4 ค่าเฉลี่ยของสัดส่วนเซลล์ภูมิคุ้มกันชนิดต่างๆในช่องท้องของหนูเมาส์ในแต่ละช่วงเวลาของการทดลองหลังจากการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยโปรตีนสกัดจากพยาธิตัวเต็มวัย

เวลา (DPI)	กลุ่ม	ค่าเฉลี่ย + ค่าเบี่ยงเบนค่าเฉลี่ย ของสัดส่วนเซลล์ (%)				
		ลิมโฟซัยท์	โมโนซัยท์ / มาโครฟาจ	นิวโทรฟิล	อีโอสิโนฟิล	เบโซฟิล / มาสเซลล์
4	CMPC1	38.80±1.59	54.60±1.20	2.40±0.74	0.40±0.24	3.80±0.37
	MPC1	40.20±1.68	52.60±2.11	2.40±0.74	0.60±0.40	4.20±0.73
	CMPC2	38.80±1.77	55.80±1.35	1.40±0.24	0.20±0.20	3.80±0.48
	MPC2	44.20±1.49	49.20±0.96	2.20±0.58	0.60±0.40	3.80±0.48
7	CMPC1	36.20±1.71	57.00±1.37	2.00±0.44	0.60±0.24	4.20±0.80
	MPC1	42.20±1.01	52.20±1.15	1.40±0.50	0.40±0.24	3.80±0.86
	CMPC2	42.60±2.63	49.60±2.58	2.00±0.44	0.40±0.24	5.40±0.40
	MPC2	50.20±1.49	45.80±0.91	0.60±0.40	0.20±0.20	3.20±0.58
14	CMPC1	33.80±1.93	59.80±1.71	2.80±0.91	0.60±0.24	3.00±0.44
	MPC1	46.20±1.59	47.40±2.03	1.40±0.24	0.20±0.20	4.80±0.86
	CMPC2	38.40±1.56	54.00±1.48	2.00±0.31	0.80±0.37	4.80±0.48
	MPC2	47.00±2.19	47.4±2.03	0.80±0.37	0.60±0.40	4.20±0.58
21	CMPC1	27.60±1.20	65.20±1.11	2.40±0.50	0.80±0.37	4.00±0.63
	MPC1	41.60±1.07	51.40±1.16	2.00±0.44	0.60±0.24	4.40±0.81
	CMPC2	35.60±2.37	56.20±0.965	2.40±0.67	1.40±0.40	4.40±0.67
	MPC2	48.00±2.02	46.80±1.06	0.60±0.40	0.60±0.40	4.00±0.44
28	CMPC1	35.00±3.86	58.80±4.23	1.20±0.20	0.40±0.24	4.60±1.07
	MPC1	45.20±1.46	48.60±1.07	1.40±0.50	0.40±0.24	4.40±0.67
	CMPC2	35.00±1.89	55.80±1.77	2.80±0.48	1.00±0.54	5.40±0.60
	MPC2	45.20±2.05	48.60±1.74	1.40±0.50	0.20±0.20	4.60±0.50
35	CMPC1	38.60±2.06	55.20±1.82	1.60±0.40	0.60±0.40	4.00±0.63
	MPC1	46.80±1.06	49.00±1.09	0.60±0.40	0	3.60±0.50
	CMPC2	47.00±1.78	46.80±1.31	1.40±0.40	0.20±0.20	4.60±0.50
	MPC2	48.4±1.28	45.60±1.12	0.20±0.20	0.40±0.40	3.60±0.50
49	CMPC1	42.40±1.36	51.40±2.24	1.80±0.37	0.40±0.40	4.00±1.04
	MPC1	46.40±1.50	48.60±1.63	1.00±0.54	0.20±0.20	3.80±0.66
	CMPC2	42.00±1.41	48.60±1.69	1.80±0.20	2.40±0.58	5.20±0.58
	MPC2	42.80±1.65	52.4±1.77	0.60±0.40	0.80±0.37	3.40±0.40

หมายเหตุ : DPI - วันหลังจากการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกัน, MPC1 - เซลล์ในช่องท้องของกลุ่มหนูเมาส์ที่ถูกฉีดกระตุ้นครั้งเดียว, CMPC1 - เซลล์ในช่องท้องของกลุ่มควบคุมของ MPC1, MPC2 - เซลล์ในช่องท้องของกลุ่มหนูเมาส์ที่ถูกฉีดกระตุ้นสองครั้ง, CMPC2 - เซลล์ในช่องท้องของกลุ่มควบคุมของ MPC2

ตารางที่ 1.2-5 ค่าเฉลี่ยของสัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆในช่องท้องของหนูเมาส์ที่แต่ละช่วงเวลาของการทดลองหลังจากการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยโปรตีนสกัดจากพยาธิตัวเต็มวัย

เวลา (DPI)	กลุ่ม	ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนค่าเฉลี่ย ของสัดส่วนเซลล์ (%)				
		ลิมโฟไซต์	โมโนไซต์ / มาโครฟาจ	นิวโทรฟิล	อีโอสิโนฟิล	เบโซฟิล / มาสเซลล์
4	CMWC1	71.20 $\pm$ 1.53	0.40 $\pm$ 0.01	28.10 $\pm$ 1.65	0.30 $\pm$ 0.12	0
	MWC1	75.50 $\pm$ 1.78	0.70 $\pm$ 0.25	23.80 $\pm$ 1.66	0	0
	CMWC2	78.80 $\pm$ 2.01	0.50 $\pm$ 0.22	20.50 $\pm$ 2.16	0.20 $\pm$ 0.12	0
	MWC2	74.60 $\pm$ 4.36	0.80 $\pm$ 0.20	24.20 $\pm$ 4.45	0.40 $\pm$ 0.18	0
7	CMWC1	71.00 $\pm$ 3.38	0.60 $\pm$ 0.18	28.20 $\pm$ 3.19	0.30 $\pm$ 0.12	0
	MWC1	72.40 $\pm$ 2.75	0.60 $\pm$ 0.18	26.80 $\pm$ 2.94	0.20 $\pm$ 0.12	0
	CMWC2	81.20 $\pm$ 1.61	0.60 $\pm$ 0.18	17.90 $\pm$ 1.52	0.30 $\pm$ 0.12	0
	MWC2	83.30 $\pm$ 3.16	0.50 $\pm$ 0.15	15.50 $\pm$ 2.85	0.70 $\pm$ 0.25	0
14	CMWC1	68.70 $\pm$ 1.57	0.60 $\pm$ 0.18	30.60 $\pm$ 1.56	0.20 $\pm$ 0.12	0
	MWC1	73.50 $\pm$ 2.31	0.30 $\pm$ 0.12	26.10 $\pm$ 2.28	0.10 $\pm$ 0.01	0
	CMWC2	73.30 $\pm$ 2.29	0.60 $\pm$ 0.18	26.00 $\pm$ 2.17	0.10 $\pm$ 0.01	0
	MWC2	73.00 $\pm$ 1.30	0.40 $\pm$ 0.29	26.40 $\pm$ 1.10	0.20 $\pm$ 0.12	0
21	CMWC1	71.90 $\pm$ 1.31	0.70 $\pm$ 0.20	27.40 $\pm$ 1.47	0.10 $\pm$ 0.01	0
	MWC1	68.90 $\pm$ 1.81	0.10 $\pm$ 0.01	31.00 $\pm$ 1.86	0	0
	CMWC2	78.20 $\pm$ 1.09	0.30 $\pm$ 0.12	21.20 $\pm$ 1.25	0.30 $\pm$ 0.20	0
	MWC2	76.30 $\pm$ 1.78	0.30 $\pm$ 0.20	23.30 $\pm$ 1.65	0.10 $\pm$ 0.01	0
28	CMWC1	76.00 $\pm$ 3.18	0.50 $\pm$ 0.22	23.50 $\pm$ 3.25	0	0
	MWC1	74.60 $\pm$ 2.58	0.20 $\pm$ 0.12	25.20 $\pm$ 2.64	0	0
	CMWC2	76.10 $\pm$ 2.98	0.40 $\pm$ 0.18	23.20 $\pm$ 2.77	0.30 $\pm$ 0.12	0
	MWC2	74.70 $\pm$ 2.08	0.20 $\pm$ 0.12	25.10 $\pm$ 2.12	0	0
35	CMWC1	74.60 $\pm$ 2.75	0.70 $\pm$ 0.30	24.50 $\pm$ 2.51	0.20 $\pm$ 0.12	0
	MWC1	77.90 $\pm$ 3.51	0.20 $\pm$ 0.12	21.90 $\pm$ 3.45	0	0
	CMWC2	80.70 $\pm$ 2.79	0.40 $\pm$ 0.18	18.70 $\pm$ 2.63	0.20 $\pm$ 0.12	0
	MWC2	81.50 $\pm$ 1.89	0.30 $\pm$ 0.12	18.20 $\pm$ 1.83	0	0
49	CMWC1	77.70 $\pm$ 2.14	0.30 $\pm$ 0.12	21.90 $\pm$ 2.29	0.10 $\pm$ 0.01	0
	MWC1	80.70 $\pm$ 1.88	0.10 $\pm$ 0.10	19.10 $\pm$ 1.82	0.10 $\pm$ 0.01	0
	CMWC2	79.70 $\pm$ 2.93	0.60 $\pm$ 0.18	19.70 $\pm$ 2.92	0	0
	MWC2	79.10 $\pm$ 2.41	0.60 $\pm$ 0.18	20.10 $\pm$ 2.50	0.20 $\pm$ 0.12	0

หมายเหตุ : DPI – วันหลังจากการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกัน, MWC1 – เซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มหนูเมาส์ที่ถูกฉีดกระตุ้นครั้งเดียว, CMWC1 – เซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มควบคุมของ MWC1, MWC2 – เซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มหนูเมาส์ที่ถูกฉีดกระตุ้นสองครั้ง, CMWC2 – เซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มควบคุมของ MWC2

ตารางที่ 1.2-6 ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ภูมิคุ้มกันในช่องท้องและเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสเลือดของหนูแรกในแต่ละช่วงเวลาของการทดลองหลังจากการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยโปรตีนสกัดจากพยาธิตัวเต็มวัย

กลุ่ม	การฉีดกระตุ้น		ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัม / หนู1ตัว)	ค่าเฉลี่ย + ค่าเบี่ยงเบนค่าเฉลี่ย ของจำนวนเซลล์ในช่วงเวลาต่างๆของการทดลอง (x10 ³ เซลล์/สไลด์ภาชนะที่มีลิตร)						
	1 ครั้ง	2 ครั้ง		4	7	14	21	28	35	49
เซลล์ในช่องท้อง										
1. CRPC1	PBS	-	0	2.427±0.116	2.809±0.184	2.485±0.097	2.537±0.119	2.602±0.062	2.584±0.142	2.307±0.054
2. RPC1	WB	-	250	4.765±0.264	4.635±0.299	3.282±0.191	3.322±0.097	3.175±0.105	3.257±0.160	2.622±0.098
3. CRPC2	PBS	PBS	0	2.380±0.163	2.487±0.141	2.515±0.192	2.607±0.113	2.796±0.071	2.735±0.112	2.460±0.069
4. RPC2	WB	WB	500	4.405±0.308	4.127±0.299	4.120±0.523	4.425±0.525	4.853±0.581	4.080±0.333	3.801±0.535
เซลล์เม็ดเลือดขาว										
1. CRWC1	PBS	-	0	5.635±0.817	5.620±0.258	5.390±0.574	5.020±0.336	5.295±0.383	5.060±0.485	5.411±0.413
2. RWC1	WB	-	250	5.975±0.825	6.285±0.400	6.000±0.547	6.190±0.689	5.485±0.345	5.910±0.435	5.750±0.441
3. CRWC2	PBS	PBS	0	5.170±0.430	5.720±0.733	5.910±0.672	5.490±0.512	5.820±0.360	5.745±0.506	5.195±0.389
4. RWC2	WB	WB	500	8.895±1.966	9.640±1.927	9.290±1.176	8.850±1.330	8.035±1.633	7.530±1.644	8.370±1.454

หมายเหตุ : PBS - สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์. WB - โปรตีนสกัดจากพยาธิตัวเต็มวัย. RPC1 - เซลล์ในช่องท้องของกลุ่มหนูแรกที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วย. CRPC1 - เซลล์ในช่องท้องของกลุ่มหนูของ RPC1.
 RPC2 - เซลล์ในช่องท้องของกลุ่มหนูแรกที่ถูกฉีดกระตุ้นสองครั้ง. CRPC2 - เซลล์ในช่องท้องของกลุ่มหนูของ RPC2. RWC1 - เซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มหนูแรกที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วย. CRWC1 - เซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มหนูของ RWC1. RWC2 - เซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มหนูแรกที่ถูกฉีดกระตุ้นสองครั้ง. CRWC2 - เซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มหนูของ RWC2

ตารางที่ 1.2-7 ค่าการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติระหว่างค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ในช่องท้อง หรือ เซลล์เม็ดเลือดขาวของหนูแระระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม ในแต่ละช่วงเวลาของการทดลอง

คู่เปรียบเทียบ	ช่วงเวลา (DPI)	n	Significant value (P)
เซลล์ในช่องท้อง			
- CRPC1 – RPC1	4	5	0.003
	7	5	0.014
	14	5	0.032
	21	5	0.004
	28	5	0.006
	35	5	0.043
	49	5	0.049
- CRPC2 – RPC2	4	5	0.004
	7	5	0.011
	14	5	0.039
	21	5	0.040
	28	5	0.023
	35	5	0.038
	49	5	0.072
เซลล์เม็ดเลือดขาว			
- CRWC1 – RWC1	4	5	0.816
	7	5	0.304
	14	5	0.493
	21	5	0.071
	28	5	0.767
	35	5	0.365
	49	5	0.486
- CRWC2 – RWC2	4	5	0.194
	7	5	0.107
	14	5	0.060
	21	5	0.067
	28	5	0.251
	35	5	0.307
	49	5	0.049

หมายเหตุ : มีความแตกต่างเมื่อ $p < 0.05$, RPC1 – เซลล์ในช่องท้องของกลุ่มหนูแระที่ถูกฉีดกระตุ้นครั้งเดียว, CRPC1 – เซลล์ในช่องท้องของกลุ่มควบคุมของ RPC1, RPC2 – เซลล์ในช่องท้องของกลุ่มหนูแระที่ถูกฉีดกระตุ้นสองครั้ง, CRPC2 – เซลล์ในช่องท้องของกลุ่มควบคุมของ RPC2, RWC1 – เซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มหนูแระที่ถูกฉีดกระตุ้นครั้งเดียว, CRWC1 – เซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มควบคุมของ RWC1, RWC2 – เซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มหนูแระที่ถูกฉีดกระตุ้นสองครั้ง, CRWC2 – เซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มควบคุมของ RWC2

ตารางที่ 1.2-8 ค่าเฉลี่ยของสัดส่วนเซลล์ภูมิคุ้มกันชนิดต่างๆในช่องท้องของหนูแรทที่แต่ละช่วงเวลาของการทดลองหลังจากการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยโปรตีนสกัดจากพยาธิตัวเต็มวัย

เวลา (DPI)	กลุ่ม	ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนค่าเฉลี่ย ของสัดส่วนเซลล์ (%)				
		ลิมโฟซัยท์	โมโนซัยท์ / มาโครฟาจ	นิวโทรฟิล	อีโอสิโนฟิล	เบโซฟิล / มาสเซลล์
4	CRPC1	34.40 $\pm$ 2.31	41.00 $\pm$ 1.78	7.20 $\pm$ 1.06	9.20 $\pm$ 2.03	8.20 $\pm$ 1.01
	RPC1	19.20 $\pm$ 1.01	45.60 $\pm$ 1.43	3.80 $\pm$ 0.86	20.60 $\pm$ 1.07	10.80 $\pm$ 1.06
	CRPC2	28.60 $\pm$ 2.87	45.20 $\pm$ 2.65	4.80 $\pm$ 0.73	9.20 $\pm$ 1.52	12.20 $\pm$ 1.06
	RPC2	19.80 $\pm$ 1.88	49.40 $\pm$ 2.44	2.60 $\pm$ 0.40	18.80 $\pm$ 2.47	9.40 $\pm$ 1.32
7	CRPC1	31.20 $\pm$ 1.74	45.20 $\pm$ 2.17	6.60 $\pm$ 1.24	8.20 $\pm$ 1.31	8.80 $\pm$ 0.66
	RPC1	15.40 $\pm$ 1.72	51.80 $\pm$ 1.85	3.40 $\pm$ 0.50	19.60 $\pm$ 1.50	9.80 $\pm$ 1.39
	CRPC2	24.80 $\pm$ 1.24	49.60 $\pm$ 1.96	6.00 $\pm$ 1.00	10.00 $\pm$ 1.51	9.60 $\pm$ 0.67
	RPC2	15.60 $\pm$ 1.12	52.40 $\pm$ 2.50	3.00 $\pm$ 0.44	19.20 $\pm$ 3.10	9.80 $\pm$ 1.49
14	CRPC1	30.80 $\pm$ 1.59	47.00 $\pm$ 2.02	5.20 $\pm$ 1.39	7.80 $\pm$ 1.11	9.20 $\pm$ 1.28
	RPC1	20.60 $\pm$ 1.43	51.40 $\pm$ 1.80	3.80 $\pm$ 0.37	13.80 $\pm$ 1.74	10.40 $\pm$ 0.92
	CRPC2	26.40 $\pm$ 1.02	47.40 $\pm$ 1.07	4.60 $\pm$ 0.40	9.20 $\pm$ 0.58	12.40 $\pm$ 0.50
	RPC2	18.80 $\pm$ 1.59	51.80 $\pm$ 1.59	2.60 $\pm$ 0.40	16.80 $\pm$ 1.49	10.00 $\pm$ 0.54
21	CRPC1	28.00 $\pm$ 2.73	43.60 $\pm$ 2.13	8.20 $\pm$ 1.15	9.20 $\pm$ 0.37	11.00 $\pm$ 1.22
	RPC1	26.40 $\pm$ 2.78	50.20 $\pm$ 2.26	2.60 $\pm$ 0.40	12.40 $\pm$ 2.52	8.40 $\pm$ 1.80
	CRPC2	26.80 $\pm$ 1.39	50.20 $\pm$ 1.62	4.00 $\pm$ 0.31	10.20 $\pm$ 0.58	8.80 $\pm$ 0.86
	RPC2	19.00 $\pm$ 0.94	52.40 $\pm$ 2.87	2.80 $\pm$ 0.37	17.60 $\pm$ 2.58	8.20 $\pm$ 0.73
28	CRPC1	32.80 $\pm$ 1.74	43.20 $\pm$ 3.20	6.80 $\pm$ 1.15	7.40 $\pm$ 1.07	9.80 $\pm$ 1.93
	RPC1	23.40 $\pm$ 1.53	48.60 $\pm$ 2.44	2.80 $\pm$ 0.37	14.40 $\pm$ 1.50	10.80 $\pm$ 0.96
	CRPC2	25.80 $\pm$ 1.82	49.80 $\pm$ 2.13	5.40 $\pm$ 0.40	9.40 $\pm$ 0.50	9.60 $\pm$ 1.50
	RPC2	17.60 $\pm$ 2.01	49.80 $\pm$ 2.03	3.00 $\pm$ 0.31	21.60 $\pm$ 0.97	8.00 $\pm$ 1.00
35	CRPC1	27.60 $\pm$ 1.53	46.80 $\pm$ 1.88	5.40 $\pm$ 0.87	10.20 $\pm$ 1.24	10.00 $\pm$ 0.83
	RPC1	24.40 $\pm$ 1.50	46.20 $\pm$ 1.15	3.80 $\pm$ 0.86	12.60 $\pm$ 0.92	13.00 $\pm$ 0.89
	CRPC2	28.20 $\pm$ 1.56	48.60 $\pm$ 1.12	4.40 $\pm$ 0.92	9.60 $\pm$ 0.50	9.20 $\pm$ 0.73
	RPC2	16.20 $\pm$ 1.28	53.00 $\pm$ 1.34	3.20 $\pm$ 0.58	18.00 $\pm$ 1.30	9.60 $\pm$ 0.92
49	CRPC1	29.60 $\pm$ 2.31	44.00 $\pm$ 2.28	6.40 $\pm$ 1.28	8.20 $\pm$ 1.01	11.80 $\pm$ 1.68
	RPC1	22.00 $\pm$ 2.91	48.40 $\pm$ 1.36	4.20 $\pm$ 0.80	13.20 $\pm$ 1.35	12.20 $\pm$ 0.86
	CRPC2	29.00 $\pm$ 1.51	46.40 $\pm$ 1.63	5.00 $\pm$ 0.63	9.40 $\pm$ 1.16	10.20 $\pm$ 0.86
	RPC2	19.00 $\pm$ 0.70	49.60 $\pm$ 2.06	2.20 $\pm$ 0.37	19.00 $\pm$ 1.14	10.20 $\pm$ 0.58

หมายเหตุ : DPI – วันหลังจากการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกัน, RPC1 – เซลล์ในช่องท้องของกลุ่มหนูแรทที่ถูกฉีดกระตุ้นครั้งเดียว, CRPC1 – เซลล์ในช่องท้องของกลุ่มควบคุมของ RPC1, RPC2 – เซลล์ในช่องท้องของกลุ่มหนูแรทที่ถูกฉีดกระตุ้นสองครั้ง, CRPC2 – เซลล์ในช่องท้องของกลุ่มควบคุมของ RPC2

ตารางที่ 1.2-9 ค่าเฉลี่ยของสัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆในช่องท้องของหนูแรทที่แต่ละช่วงเวลาของการทดลองหลังจากการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยโปรตีนสกัดจากพยาธิตัวเต็มวัย

เวลา (DPI)	กลุ่ม	ค่าเฉลี่ย + ค่าเบี่ยงเบนค่าเฉลี่ย ของสัดส่วนเซลล์ (%)				
		ลิมโฟซัยท์	โมโนซัยท์ / มาโครฟาจ	นิวโทรฟิล	อีโอสิโนฟิล	เบโซฟิล / มาสเซลล์
4	CRWC1	83.80±0.81	1.40±0.29	14.30±1.16	0.50±0.22	0
	RWC1	81.50±2.63	1.70±0.25	16.30±2.61	0.50±0.15	0
	CRWC2	83.70±1.52	1.30±0.25	14.40±1.56	0.60±0.29	0
	RWC2	75.10±3.12	2.80±0.33	19.60±3.06	2.50±0.54	0
7	CRWC1	83.60±1.88	2.10±0.36	13.60±1.97	0.70±0.12	0
	RWC1	81.20±1.58	1.90±0.29	16.40±1.37	0.50±0.15	0
	CRWC2	78.80±2.28	1.50±0.44	19.10±1.94	0.60±0.18	0
	RWC2	82.70±1.67	2.30±0.51	13.00±1.83	2.00±0.41	0
14	CRWC1	81.40±1.90	1.60±0.18	16.50±2.00	0.50±0.15	0
	RWC1	80.60±2.67	1.10±0.01	17.70±2.76	0.60±0.24	0
	CRWC2	85.20±2.36	0.90±0.01	13.20±2.38	0.70±0.20	0
	RWC2	85.20±0.96	1.20±0.25	12.00±1.06	1.60±0.24	0
21	CRWC1	84.90±1.10	0.60±0.18	13.90±0.91	0.60±0.18	0
	RWC1	81.20±2.22	1.40±0.18	15.90±2.38	1.50±0.15	0
	CRWC2	84.60±2.15	0.70±0.12	14.20±2.10	0.50±0.22	0
	RWC2	81.70±2.75	1.10±0.01	15.70±2.50	1.50±0.31	0
28	CRWC1	85.20±1.21	0.80±0.20	13.50±1.09	0.50±0.22	0
	RWC1	79.40±1.66	1.10±0.29	18.50±1.60	1.00±0.22	0
	CRWC2	79.70±3.30	1.10±0.29	18.90±3.06	0.30±0.20	0
	RWC2	82.10±3.46	1.20±0.25	15.30±3.34	1.40±0.18	0
35	CRWC1	84.40±1.83	1.10±0.18	14.00±1.85	0.50±0.22	0
	RWC1	78.50±1.67	1.30±0.20	18.90±1.58	1.30±0.25	0
	CRWC2	80.60±1.43	1.20±0.37	17.80±1.54	0.40±0.18	0
	RWC2	77.90±1.67	1.00±0.15	19.40±1.66	1.70±0.12	0
49	CRWC1	86.40±1.86	0.60±0.10	12.40±1.77	0.60±0.18	0
	RWC1	83.50±1.25	1.00±0.15	14.30±1.49	1.20±0.25	0
	CRWC2	86.60±2.73	0.80±0.20	12.20±2.69	0.40±0.18	0
	RWC2	79.60±2.93	1.20±0.25	17.6±2.83	1.60±0.29	0

หมายเหตุ : DPI - วันหลังจากการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกัน, RWC1 - เซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มหนูแรทที่ถูกฉีดกระตุ้นครั้งเดียว, CRWC1 - เซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มควบคุมของ RWC1, RWC2 - เซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มหนูแรทที่ถูกฉีดกระตุ้นสองครั้ง, CRWC2 - เซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มควบคุมของ RWC2

การเปลี่ยนแปลงของระดับแอนติบอดี

หนูเมาส์

การวัดค่า optical density (O.D.) โดยวิธี ELISA เพื่อแสดงระดับของแอนติบอดีในน้ำล้างช่องท้องและในเซรัมของหนูเมาส์แต่ละกลุ่ม (ตารางที่ 1.2-10) ทำให้ทราบว่าระดับแอนติบอดีในน้ำล้างช่องท้องของหนูเมาส์ที่ได้รับแอนติเจนครั้งเดียวที่เวลา 4 DPI มีค่า O.D. = 0.254 ± 0.038 โดยระดับแอนติบอดีของหนูกลุ่มนี้ค่อยๆ เพิ่มขึ้นจนมีค่า O.D. สูงสุดคือ 0.693 ± 0.088 ที่เวลา 35 DPI และเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (49 DPI) ค่า O.D. ลดลงเล็กน้อยมาอยู่ที่ 0.598 ± 0.098 ในขณะที่ระดับแอนติบอดีที่ตรวจพบในน้ำล้างช่องท้องของหนูเมาส์กลุ่มที่ได้รับการฉีดแอนติเจนกระตุ้นซ้ำมีค่าสูงสุดที่ช่วงเวลา 4 DPI (O.D. 0.769 ± 0.156) จากนั้นพบว่าระดับแอนติบอดีลดลงจนมีค่า O.D. ต่ำสุดที่เวลา 21 DPI (O.D. = 0.546 ± 0.050) และเพิ่มขึ้นอีกครั้งจนมีค่า O.D. = 0.715 ± 0.101 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง

ระดับแอนติบอดีที่ตรวจพบในเซรัมของหนูเมาส์แสดงค่า O.D. สูงสุดคือ 1.018 ± 0.037 ที่เวลา 7 DPI และมีค่าลดลงจนต่ำสุดที่ 21 DPI (O.D. = 0.633 ± 0.031) จากนั้นจึงมีระดับของแอนติบอดีเพิ่มขึ้นอีกครั้งโดยมีค่า O.D. = 0.938 ± 0.126 , 0.849 ± 0.081 และ 0.860 ± 0.115 ที่เวลา 28, 35 และ 49 DPI ตามลำดับ เมื่อพิจารณาค่า O.D. ที่ตรวจวัดในกลุ่มของหนูเมาส์ที่ได้รับแอนติเจนกระตุ้นซ้ำพบว่าระดับแอนติบอดีที่ช่วงเวลาต่างๆ หลังการได้รับแอนติเจนมีความคล้ายกันกับระดับแอนติบอดีที่ตรวจพบในน้ำล้างช่องท้องของหนูเมาส์ที่ได้รับแอนติเจนซ้ำแต่แตกต่างกันที่ระดับแอนติบอดีในเซรัมมีค่าสูงกว่าเล็กน้อย โดยมีค่า O.D. สูงสุดที่เวลา 4 DPI (O.D. = 1.130 ± 0.163) จากนั้นระดับแอนติบอดีลดลงจนมีค่า O.D. ต่ำสุดที่เวลา 21 DPI (O.D. = 0.731 ± 0.080) และเพิ่มขึ้นอีกครั้งจนมีค่า O.D. = 1.025 ± 0.172 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง

นอกจากนี้ระดับแอนติบอดีในหนูกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนได้ถูกนำไปเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยแสดงความแตกต่างของระดับแอนติบอดีของหนูเมาส์แต่ละกลุ่มด้วยค่า O.D. ในแผนภูมิแท่ง (รูปที่ 1.2-5) จาก รูปที่ 1.2-5A แสดงให้เห็นว่าความแตกต่างระหว่างแอนติบอดีในน้ำล้างช่องท้องของหนูเมาส์ที่ได้รับแอนติเจนเพียงครั้งเดียวกับกลุ่มควบคุม เริ่มเห็นความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 1.2-11) ที่เวลา 28 DPI และต่อเนื่องไปจนถึง 49 DPI ในขณะที่ความแตกต่างระหว่างแอนติบอดีในน้ำล้างช่องท้องของหนูเมาส์ที่ได้รับแอนติเจนกระตุ้นซ้ำมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ที่เวลา 7 DPI และ 14 DPI เท่านั้น เมื่อพิจารณาระดับแอนติบอดีในเซรัมของหนูกลุ่มที่ได้รับแอนติเจนกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 1.2-5B) พบว่าในกลุ่มที่ได้รับแอนติเจนครั้งเดียวแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 1.2-11) ที่เวลา 14 DPI และต่อเนื่องไปจนถึงจบการทดลอง ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับแอนติเจนกระตุ้นซ้ำสามารถเห็นความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ได้รวดเร็วก็คือที่เวลา 4 DPI

ตารางที่ 1.2-10 ค่า optical density แสดงถึงระดับแอนติบอดีที่ตรวจวัดได้จากน้ำล้างช่องท้องและเซรัมของหนูเมาส์ในช่วงเวลาต่างๆหลังการฉีดกระตุ้นด้วยโปรตีนสกัดจากพยาธิตัวเต็มวัย

กลุ่ม	การฉีดกระตุ้น		ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัม / หนู1ตัว)	Antibody titers (O.D. at 492 nm) ของหนูเมาส์ในช่วงเวลาต่างๆหลังการฉีดกระตุ้น						
	1 ครั้ง	2 ครั้ง		4	7	14	21	28	35	49
น้ำล้างช่องท้อง										
1. CMLF1	PBS	-	0	0.210±0.030	0.263±0.046	0.324±0.033	0.344±0.032	0.386±0.051	0.333±0.039	0.310±0.058
2. MLF1	WB	-	250	0.254±0.038	0.450±0.096	0.544±0.095	0.475±0.120	0.612±0.052	0.693±0.088	0.598±0.098
3. CMLF2	PBS	PBS	0	0.327±0.060	0.322±0.061	0.376±0.048	0.358±0.044	0.387±0.054	0.414±0.076	0.412±0.057
4. MLF2	WB	WB	500	0.769±0.156	0.651±0.066	0.565±0.047	0.546±0.050	0.646±0.083	0.592±0.036	0.715±0.101
เซรัม										
1. CMS1	PBS	-	0	0.336±0.040	0.345±0.039	0.321±0.040	0.392±0.048	0.395±0.045	0.435±0.052	0.372±0.027
2. MS1	WB	-	250	0.453±0.031	1.018±0.037	0.813±0.120	0.633±0.031	0.938±0.126	0.849±0.081	0.860±0.115
3. CMS2	PBS	PBS	0	0.321±0.048.0	0.346±0.030	0.327±0.035	0.319±0.021	0.352±0.042	0.387±0.041	0.371±0.041
4. MS2	WB	WB	500	1.130±0.163	0.962±0.075	0.872±0.081	0.731±0.080	0.856±0.126	1.091±0.097	1.025±0.172

หมายเหตุ : PBS - สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์, WB - โปรตีนสกัดจากพยาธิตัวเต็มวัย, MLF1 - น้ำล้างช่องท้องของหนูเมาส์ที่ถูกฉีดกระตุ้นครั้งเดียว, CMLF1 - น้ำล้างช่องท้องของกลุ่มควบคุมของ MLF1, MLF2 - น้ำล้างช่องท้องของกลุ่มหนูเมาส์ที่ถูกฉีดกระตุ้นครั้ง, CMLF2 - น้ำล้างช่องท้องของกลุ่มควบคุมของ MLF2, MS1 - เซรัมของกลุ่มหนูเมาส์ที่ถูกฉีดกระตุ้นครั้งเดียว, CMS1 - เซรัมของกลุ่มควบคุมของ MS1, MS2 - เซรัมของกลุ่มหนูเมาส์ที่ถูกฉีดกระตุ้นครั้ง, CMS2 - เซรัมของกลุ่มควบคุมของ MS2

ตารางที่ 1.2-11 ค่าการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติระหว่างค่า optical density ในน้ำล้างช่องท้อง หรือเซรัมของหนูเมาส์ระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม ในแต่ละช่วงเวลาของการทดลอง

คู่เปรียบเทียบ	ช่วงเวลา (DPI)	n	Significant value (P)
เซลล์ในช่องท้อง			
- CMLF1 – MLF1	4	5	0.442
	7	5	0.151
	14	5	0.059
	21	5	0.267
	28	5	0.024
	35	5	0.027
	49	5	0.046
- CMLF2 – MLF2	4	5	0.101
	7	5	0.041
	14	5	0.029
	21	5	0.082
	28	5	0.066
	35	5	0.145
	49	5	0.053
เซลล์เม็ดเลือดขาว			
- CMS1 – MS1	4	5	0.105
	7	5	0.000
	14	5	0.019
	21	5	0.002
	28	5	0.006
	35	5	0.007
	49	5	0.007
- CMS2 – MS2	4	5	0.011
	7	5	0.002
	14	5	0.001
	21	5	0.012
	28	5	0.027
	35	5	0.001
	49	5	0.022

หมายเหตุ : มีความแตกต่างเมื่อ $p < 0.05$, MLF1 – น้ำล้างช่องท้องของกลุ่มหนูเมาส์ที่ถูกฉีดกระตุ้นครั้งเดียว, CMLF1 – น้ำล้างช่องท้องของกลุ่มควบคุมของ MLF1, MLF2 – น้ำล้างช่องท้องของกลุ่มหนูเมาส์ที่ถูกฉีดกระตุ้นสองครั้ง, CMLF2 – น้ำล้างช่องท้องของกลุ่มควบคุมของ MLF2, MS1 – เซรัมของกลุ่มหนูเมาส์ที่ถูกฉีดกระตุ้นครั้งเดียว, CMS1 – เซรัมของกลุ่มควบคุมของ MS1, MS2 – เซรัมของกลุ่มหนูเมาส์ที่ถูกฉีดกระตุ้นสองครั้ง, CMS2 – เซรัมของกลุ่มควบคุมของ MS2

หนูแรท

ระดับแอนติบอดีที่ตรวจวัดในน้ำล้างช่องท้องและเซรัมของหนูแรทกลุ่มต่างๆถูกแสดงโดยค่า O.D. ดังตารางที่ 1.2-12 และ รูปที่ 1.2-6

ระดับแอนติบอดีที่ตรวจวัดในน้ำล้างช่องท้องของหนูแรทกลุ่มที่ได้รับแอนติเจนครั้งเดียวมีค่า O.D. เริ่มต้นที่ 4 DPI คือ 0.437 ± 0.105 โดยระดับแอนติบอดีเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่นานขึ้นจนสามารถวัดค่า O.D. ที่เวลา 49 DPI ได้ 1.125 ± 0.046 ในขณะที่ระดับแอนติบอดีในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นซ้ำ แสดงความแตกต่างจากกลุ่มแรกคือ สามารถวัดค่า O.D. ได้สูงสุดที่ 4 DPI (O.D. = 2.316) และค่อยๆ ลดลงมาอยู่ที่ O.D. = 1.577 ± 0.181 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างหนูกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นครั้งเดียวและกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นซ้ำพบว่า หนูกลุ่มที่ได้รับแอนติเจนกระตุ้นซ้ำมีระดับแอนติบอดีสูงกว่ากลุ่มที่กระตุ้นด้วยแอนติเจนเพียงครั้งเดียวตลอดทุกระยะเวลาของการทดลอง (รูปที่ 1.2-6A)

ระดับแอนติบอดีที่ตรวจพบในเซรัมของหนูแรทกลุ่มที่ได้รับแอนติเจนครั้งเดียวมีค่า O.D. ค่อนข้างสูงตั้งแต่เวลา 4 DPI (1.095 ± 0.115) โดยเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาจนสูงสุดที่เวลา 28 DPI (1.867 ± 0.130) จากนั้นมีการเปลี่ยนแปลงจนมีค่า O.D. = 1.679 ± 0.236 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ในขณะที่ระดับแอนติบอดีในเซรัมของหนูกลุ่มที่ได้รับแอนติเจนกระตุ้นซ้ำมีค่า O.D. สูงมากตั้งแต่ 4 DPI คือ 2.342 ± 0.173 (ซึ่งเป็นค่าที่สูงที่สุดของการทดลอง) จากนั้นระดับแอนติบอดีลดลงมาเล็กน้อยจนเกือบคงที่จนสิ้นสุดการทดลอง โดยมีค่า O.D. อยู่ระหว่าง 1.968 ± 0.141 ถึง 2.135 ± 0.134 (รูปที่ 1.2-6B)

เมื่อพิจารณาความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุม พบว่าระดับแอนติบอดีในทุกๆ กลุ่มทดลองมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ (ยกเว้นระดับแอนติบอดีที่พบในน้ำล้างช่องท้องที่เวลา 4 DPI ของหนูกลุ่มที่ได้รับแอนติเจนครั้งเดียว) (ตารางที่ 1.2-13) นอกจากนี้ยังพบว่าหนูแรททุกกลุ่มที่ได้รับแอนติเจนกระตุ้นซ้ำมีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ อีกด้วย (รูปที่ 1.2-6A, B)

ตารางที่ 1.2-12 ค่า optical density แสดงถึงระดับแอนติบอดีที่ตรวจวัดได้จากน้ำล้างช่องท้องและเซรัมของหนูแรทในช่วงเวลาต่างๆหลังการฉีดกระตุ้นด้วยโปรตีนสกัดจากพยาธิตัวเต็มวัย

กลุ่ม	การฉีดกระตุ้น		ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัม / หนูตัว)	Antibody titers (O.D. at 492 nm) ของหนูเมาส์ในช่วงเวลาต่างๆหลังการฉีดกระตุ้น								
	1 ครั้ง	2 ครั้ง		4	7	14	21	28	35	49		
น้ำล้างช่องท้อง												
1. CRLF1	PBS	-	0	0.123±0.013	0.163±0.017	0.138±0.017	0.179±0.013	0.194±0.031	0.164±0.011	0.158±0.022		
2. RLF1	WB	-	250	0.437±0.105	0.474±0.109	0.538±0.075	0.657±0.097	0.511±0.061	1.016±0.105	1.125±0.046		
3. CRLF2	PBS	PBS	0	0.139±0.015	0.212±0.163	0.178±0.031	0.239±0.021	0.191±0.030	0.199±0.024	0.240±0.051		
4. RLF2	WB	WB	500	2.316±0.230	2.049±0.146	1.709±0.306	1.846±0.159	1.898±0.180	1.700±0.210	1.577±0.181		
เซรัม												
1. CRS1	PBS	-	0	0.258±0.043	0.425±0.059	0.423±0.049	0.404±0.038	0.474±0.028	0.414±0.040	0.483±0.046		
2. RS1	WB	-	250	1.095±0.115	1.135±0.040	1.305±0.206	1.445±0.136	1.867±0.130	1.178±0.144	1.679±0.236		
3. CRS2	PBS	PBS	0	0.395±0.019	0.456±0.026	0.309±0.025	0.420±0.036	0.437±0.028	0.445±0.037	0.413±0.037		
4. RS2	WB	WB	500	2.342±0.173	1.976±0.144	2.003±0.243	1.975±0.115	2.135±0.134	1.978±0.089	1.968±0.141		

หมายเหตุ : PBS - สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์, WB - โปรตีนสกัดจากพยาธิตัวเต็มวัย, RLF1 - น้ำล้างช่องท้องของหนูเมาส์ที่ฉีดกระตุ้นครั้งเดียว, CRLF1 - น้ำล้างช่องท้องของกลุ่มควบคุมของ RLF1, RLF2 - น้ำล้างช่องท้องของกลุ่มหนูเมาส์ที่ฉีดกระตุ้นสองครั้ง, CRLF2 - น้ำล้างช่องท้องของกลุ่มควบคุมของ RLF2, RS1 - เซรัมของกลุ่มหนูเมาส์ที่ฉีดกระตุ้นครั้งเดียว, CRS1 - เซรัมของกลุ่มควบคุมของ RS1, RS2 - เซรัมของกลุ่มหนูเมาส์ที่ฉีดกระตุ้นสองครั้ง, CRS2 - เซรัมของกลุ่มควบคุมของ RS2

ตารางที่ 1.2-13 ค่าการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติระหว่างค่า optical density ในน้ำล้างช่องท้อง หรือเซรัมของหนูแระระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม ในแต่ละช่วงเวลาของการทดลอง

คู่เปรียบเทียบ	ช่วงเวลา (DPI)	n	Significant value (P)
เซลล์ในช่องท้อง			
- CRLF1 – RLF1	4	5	0.038
	7	5	0.053
	14	5	0.007
	21	5	0.011
	28	5	0.000
	35	5	0.002
	49	5	0.000
- CRLF2 – RLF2	4	5	0.001
	7	5	0.000
	14	5	0.007
	21	5	0.001
	28	5	0.001
	35	5	0.002
	49	5	0.001
เซลล์เม็ดเลือดขาว			
- CRS1 – RS1	4	5	0.004
	7	5	0.001
	14	5	0.024
	21	5	0.002
	28	5	0.000
	35	5	0.012
	49	5	0.010
- CRS2 – RS2	4	5	0.000
	7	5	0.001
	14	5	0.002
	21	5	0.000
	28	5	0.000
	35	5	0.000
	49	5	0.001

หมายเหตุ : มีความแตกต่างเมื่อ $p < 0.05$, RLF1 – น้ำล้างช่องท้องของกลุ่มหนูแระที่ถูกฉีดกระตุ้นครั้งเดียว, CRLF1 – น้ำล้างช่องท้องของกลุ่มควบคุมของ RLF1, RLF2 – น้ำล้างช่องท้องของกลุ่มหนูแระที่ถูกฉีดกระตุ้นสองครั้ง, CRLF2 – น้ำล้างช่องท้องของกลุ่มควบคุมของ RLF2, RS1 – เซรัมของกลุ่มหนูแระที่ถูกฉีดกระตุ้นครั้งเดียว, CRS1 – เซรัมของกลุ่มควบคุมของ RS1, RS2 – เซรัมของกลุ่มหนูแระที่ถูกฉีดกระตุ้นสองครั้ง, CRS2 – เซรัมของกลุ่มควบคุมของ RS2

ผลการวิเคราะห์คุณลักษณะของแอนติเจนโดยวิธี immunoblotting

หนูเมาส์

จากการตรวจหาแอนติเจนโดยใช้แอนติบอดีจากน้ำล้างช่องท้อง พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับแอนติเจนครั้งเดียวสามารถพบแถบโปรตีนที่มีสีค่อนข้างจาง (รูปที่ 1.2-7A) โดยเริ่มสังเกตเห็นเมื่อ 21 DPI ซึ่งเป็นแถบที่มีขนาดโมเลกุล 100 kDa และที่เวลา 49 DPI สามารถเห็นแถบโปรตีนที่มีขนาด 100, 66, 49.5, 45, 36, 32.5, 29.5 และ 28.5 ได้ ในขณะที่การใช้แอนติบอดีจากหนูกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นซ้ำ สามารถเห็นแถบโปรตีนที่มีสีเข้มกว่ากลุ่มแรก (รูปที่ 1.2-7B) สามารถแบ่งแถบโปรตีนที่พบออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีโมเลกุลใหญ่ (135, 100, 94.5, 79 และ 66 kDa) และกลุ่มที่มีโมเลกุลเล็ก (22.5 และ 21 kDa)

การตรวจหาแอนติเจนโดยใช้แอนติบอดีจากเซรัมหนูกลุ่มที่ได้รับแอนติเจนครั้งเดียว พบว่ามีแถบโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลตั้งแต่ 115, 100, 66, 45, 31 และ 25 kDa (รูปที่ 1.2-7C) โดยเริ่มเห็นแถบโปรตีนได้ชัดเจนเมื่อ 21 DPI ซึ่งเห็นเฉพาะแถบของโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ ส่วนแถบของโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลเล็กสามารถเห็นได้เฉพาะที่เวลา 49 DPI เท่านั้น ในขณะที่การตรวจหาแอนติเจนโดยใช้เซรัมของหนูกลุ่มที่ได้รับแอนติเจนกระตุ้นซ้ำสามารถเห็นแถบโปรตีนที่มีสีเข้มได้ตั้งแต่ที่เวลา 4 DPI และสามารถเห็นได้ทั้งแถบโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลเล็กและขนาดโมเลกุลใหญ่ด้วย โดยมีแถบโปรตีนที่เห็นได้ชัดเจนคือ 135, 100, 90, 75, 66, 57, 45, 36, 32.5, 31, 28, 25, 21, 19 และ 6 kDa (รูปที่ 1.2-7D)

หนูแรท

แถบโปรตีนที่พบโดยการติดฉลากด้วยแอนติบอดีจากน้ำล้างช่องท้องของหนูแรทกลุ่มที่ได้รับแอนติเจนครั้งเดียว ได้แก่ แถบโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ (115, 100, 97, 75 และ 66 kDa) โดยสามารถเห็นแถบโปรตีนสีค่อนข้างจางเมื่อเวลา 7 DPI และสามารถเห็นแถบโปรตีนสีเข้มอย่างชัดเจนที่เวลา 21, 35 และ 49 DPI (รูปที่ 1.2-8A) และเมื่อติดฉลากด้วยแอนติบอดีจากน้ำล้างช่องท้องหนูกลุ่มที่ได้รับแอนติเจนกระตุ้นซ้ำ พบว่าสามารถเห็นแถบโปรตีนมากขึ้นกว่าที่พบในกลุ่มแรก โดยแถบโปรตีนที่พบได้แก่ 200, 116, 97, 90, 84, 75, 72, 66, 57, 45, 25 และ 21 kDa โดยแถบโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่สามารถเห็นได้ในทุกช่วงเวลาของการทดลองด้วยสีที่มีความเข้มต่างกัน แต่แถบโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก (45, 25 และ 21 kDa) สามารถเห็นได้เฉพาะที่เวลา 35 และ 49 DPI เท่านั้น (รูปที่ 1.2-8B)

การใช้การติดฉลากด้วยแอนติบอดีจากเซรัมของหนูกลุ่มที่ได้รับแอนติเจนครั้งเดียวพบแถบโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลตั้งแต่ 116, 100, 97, 66, 45, 31, 25, 21 และ 6 kDa โดยแถบโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่สามารถเห็นได้ตั้งแต่ที่เวลา 4 DPI ในขณะที่แถบโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก (31, 25, 21 และ 6 kDa) เริ่มสังเกตเห็นได้ที่เวลา 21 DPI (รูปที่ 1.2-8C) ในการตรวจหาแอนติเจนโดยใช้แอนติบอดีจากเซรัมของหนูแรทกลุ่มที่ได้รับแอนติเจนกระตุ้นซ้ำ ทำให้สามารถเห็นแถบโปรตีนได้มากที่สุดได้แก่โปรตีนที่มีขนาดโมเลกุล 200, 135, 100, 97, 90, 72, 66, 63.5, 57, 45, 42, 38, 36, 31, 25, 22.5, 21

และ 6 kDa โดยเริ่มสังเกตเห็นได้ตั้งแต่ที่เวลา 4 DPI จนถึงสิ้นสุดการทดลอง โดยมีความเข้มของสีแต่ละแถบโปรตีนแตกต่างกันไปในแต่ละช่วงเวลา (รูปที่ 1.2-8D)

แถบโปรตีนที่พบจากการตรวจหาในหนูทั้งสองชนิดได้ถูกนำมาเปรียบเทียบไว้ในตารางที่ 1.2-14

ตารางที่ 1.2-14 แสดงการตรวจพบแถบโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลต่างๆในหนูทั้งสองชนิด

แถบโปรตีน (kDa)	หนูเมสส์	หนูแรท
200®	-	++
135	++	+
115	++	++
100	++	+
97®	-	++
94.5	+	-
90	+	+
84®	-	+
75	+	+
72®	-	++
66	++	++
63.5®	-	+
57®	-	+
49.5	+	-
45	+	++
42	+	-
38®	-	+
36	+	+
32.5	+	-
31	+	+
28	+	-
25	+	+
22.5	+	+
21	+	++
19	+	-
6	+	++

kDa - กิโลดาลตัน

+

- แถบโปรตีนที่ถูกตรวจพบได้

++

- แถบโปรตีนที่ถูกตรวจพบได้โดยมีความเข้มมาก

®

- แถบโปรตีนที่ถูกตรวจพบเฉพาะในหนูแรท

1.2.3. สรุปผลการทดลอง

การทดลองในครั้งนี้ทำให้ทราบว่าหลังจากที่หนูทดลองได้รับเชื้อพยาธิแล้ว หนูทดลองสามารถตอบสนองทางภูมิคุ้มกันทั้งโดยเซลล์และโดยแอนติบอดี ในการตอบสนองโดยเซลล์พบว่าหลังการได้รับการกระตุ้นโดยเชื้อพยาธิใบไม้ตับ จำนวนเซลล์ภูมิคุ้มกันในช่องท้องของหนูเมาส์และหนูแรทมีค่าเฉลี่ยเพิ่มมากขึ้นกว่าหนูในกลุ่มควบคุมประมาณ 1.5 เท่า โดยพบว่าชนิดของเซลล์ที่พบได้มากที่สุดในช่องท้องของหนูทั้งสองชนิดคือ โมโนไซต์/มาโครฟาจ อย่างไรก็ตามพบความแตกต่างระหว่างหนูทดลองทั้งสองชนิดคือในช่องท้องของหนูเมาส์มีกรานูโลไซต์ประมาณ 5-10% ในขณะที่ในช่องท้องของหนูแรทมีกรานูโลไซต์ประมาณ 25-30% โดยหลังจากที่หนูทดลองได้รับเชื้อพยาธิแล้วพบว่าหนูเมาส์มีสัดส่วนของลิมโฟไซต์ในช่องท้องมากขึ้น ในขณะที่หนูแรทมีสัดส่วนของอีโอสิโนฟิลเพิ่มมากขึ้น ในการทดลองเดียวกันการตรวจวัดปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาวในหนูทั้งสองชนิดพบว่ามีความเพิ่มขึ้นแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยพบว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดหลักที่พบในกระแสเลือดของหนูทั้งสองชนิดคือ ลิมโฟไซต์ อย่างไรก็ตามพบว่าอีโอสิโนฟิลในกระแสโลหิตของหนูแรทที่ได้รับเชื้อพยาธิซ้ำมีสัดส่วนเพิ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับสัดส่วนของอีโอสิโนฟิลในหนูแรทในกลุ่มควบคุม

การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันโดยแอนติบอดีของหนูทดลองทั้งสองชนิดต่อการได้รับแอนติเจนซึ่งสกัดจากพยาธิใบไม้ตับตัวเต็มวัยนั้นมีความแตกต่างกัน โดยการสร้างแอนติบอดีตอบสนองต่อแอนติเจนจากพยาธิตัวเต็มวัยในช่องท้องของหนูแรทเกิดขึ้นได้รวดเร็วและรุนแรง (มีค่า 4.7 เท่าของกลุ่มควบคุม) กว่า การตอบสนองที่เกิดขึ้นในช่องท้องของหนูเมาส์ (1.6 เท่าของกลุ่มควบคุม) นอกจากนี้การตอบสนองต่อการได้รับแอนติเจนซ้ำของหนูแรทยังมีประสิทธิภาพมากกว่าหนูเมาส์ โดยระดับแอนติบอดีของหนูแรทที่ถูกกระตุ้นซ้ำเพิ่มมากขึ้น โดยมากกว่ากลุ่มควบคุม 9.3 เท่า ในขณะที่การตอบสนองในหนูเมาส์นั้นมากกว่ากลุ่มควบคุมเพียง 1.7 เท่า ยิ่งกว่านั้นการกระตุ้นซ้ำในหนูแรททำให้ระดับแอนติบอดีในช่องท้องสูงตลอดการทดลอง โดยการกระตุ้นซ้ำในหนูเมาส์สามารถทำให้ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของระดับแอนติบอดีในช่องท้องมีอยู่ถึง 14 DPI เท่านั้น เช่นเดียวกับกับระดับแอนติบอดีที่ตรวจพบในเซรัมของหนูแรทก็มีการตอบสนองที่รวดเร็วและรุนแรงกว่าหนูเมาส์ด้วย โดยระดับแอนติบอดีที่พบในเซรัมของหนูแรทมีค่ามากกว่ากลุ่มควบคุม 3.4 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับหนูเมาส์ที่มีระดับแอนติบอดีมากกว่ากลุ่มควบคุม 2.1 เท่า และระดับแอนติบอดีในเซรัมของหนูแรทที่ตอบสนองต่อการได้รับแอนติเจนซ้ำมีค่ามากกว่ากลุ่มควบคุม 5 เท่า ในขณะที่ระดับแอนติบอดีในเซรัมของหนูเมาส์นั้นสูงกว่ากลุ่มควบคุมเพียง 2.7 เท่า ปัจจัยต่างๆเหล่านี้อาจเป็นสาเหตุประการหนึ่งที่ทำให้หนูแรทมีความทนทานต่อการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับได้มากกว่าหนูเมาส์

แอนติเจนที่ตรวจพบโดยใช้แอนติบอดีจากน้ำในช่องท้องของหนูแรทนั้นสามารถมองเห็นได้อย่างชัดเจนและมีความหลากหลายของแอนติเจนที่ขนาดโมเลกุลต่างๆกันมากกว่าแอนติเจนที่พบในหนูเมาส์

อย่างไรก็ตามแอนติเจนที่พบว่ามีแถบสีเข้มอย่างชัดเจนนั้นมีความคล้ายคลึงกันทั้งในหนูแรท (100, 97, 66, 45, 31, 25 และ 21 kDa) และหนูเม้าส์ (100, 66, 45, 31 และ 21 kDa) โดยแอนติเจนที่มีขนาดโมเลกุลเล็กเช่น 31, 25, และ 21 kDa สามารถเห็นได้ชัดเจนที่ระยะเวลาสุดท้ายของการทดลองคือ 49 DPI หรือในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นซ้ำเท่านั้น ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าขนาดโมเลกุลที่ค่อนข้างเล็กทำให้ต้องใช้เวลานานในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่สร้างแอนติบอดี แอนติเจนที่สามารถสังเกตเห็นได้ชัดเจนเหล่านี้จึงมีความน่าสนใจสำหรับการศึกษาเพื่อพัฒนาไปเป็นวัคซีนในการป้องกันการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับต่อไป

คำอธิบายรูปประกอบผลการวิจัยหัวข้อเรื่องที่ 1.2

- รูปที่ 1.2-1 แผนภูมิแท่งแสดงจำนวนเซลล์ภูมิคุ้มกันในช่องท้อง (A) และจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาว (B) ในกลุ่มหนูเมาส์ที่เวลาต่างๆหลังการฉีดกระตุ้นด้วยโปรตีนสกัดจากพยาธิตัวเต็มวัย (DPI – ระยะเวลาหลังการฉีดกระตุ้น, MPC1 – เซลล์ในช่องท้องของกลุ่มหนูเมาส์ที่ถูกฉีดกระตุ้นครั้งเดียว, CMPC1 – เซลล์ในช่องท้องของกลุ่มควบคุมของ MPC1, MPC2 – เซลล์ในช่องท้องของกลุ่มหนูเมาส์ที่ถูกฉีดกระตุ้นสองครั้ง, CMPC2 – เซลล์ในช่องท้องของกลุ่มควบคุมของ MPC2, MWC1 – เซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มหนูเมาส์ที่ถูกฉีดกระตุ้นครั้งเดียว, CMWC1 – เซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มควบคุมของ MWC1, MWC2 – เซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มหนูเมาส์ที่ถูกฉีดกระตุ้นสองครั้ง, CMWC2 – เซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มควบคุมของ MWC2)
- รูปที่ 1.2-2 แผนภูมิแท่งแสดงจำนวนเซลล์ภูมิคุ้มกันในช่องท้อง (A) และจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาว (B) ในกลุ่มหนูแรท ที่เวลาต่างๆหลังการฉีดกระตุ้นด้วยโปรตีนสกัดจากพยาธิตัวเต็มวัย (DPI – ระยะเวลาหลังการฉีดกระตุ้น, RPC1 – เซลล์ในช่องท้องของกลุ่มหนูแรทที่ถูกฉีดกระตุ้นครั้งเดียว, CRPC1 – เซลล์ในช่องท้องของกลุ่มควบคุมของ RPC1, RPC2 – เซลล์ในช่องท้องของกลุ่มหนูแรทที่ถูกฉีดกระตุ้นสองครั้ง, CRPC2 – เซลล์ในช่องท้องของกลุ่มควบคุมของ RPC2, RWC1 – เซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มหนูแรทที่ถูกฉีดกระตุ้นครั้งเดียว, CRWC1 – เซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มควบคุมของ RWC1, RWC2 – เซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มหนูแรทที่ถูกฉีดกระตุ้นสองครั้ง, CRWC2 – เซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มควบคุมของ RWC2)
- รูปที่ 1.2-3 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดาแสดงตัวอย่างของเซลล์ภูมิคุ้มกันที่พบในช่องท้องของหนูทดลอง
(mon/mac – โมโนไซต์/มาโครฟาจ, lym – ลิมโฟไซต์, mas – มาสต์เซลล์, eos – อีโอซิโนฟิล, rbc – เม็ดเลือดแดง)
- รูปที่ 1.2-4 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดาแสดงตัวอย่างของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่พบในกระแสโลหิตของหนูทดลอง
(lym – ลิมโฟไซต์, seg_neu – นิวโทรฟิล_ชนิดเซกเมนต์, ba_neu – นิวโทรฟิล_ชนิดแบน, eos – อีโอซิโนฟิล, rbc – เม็ดเลือดแดง)

- รูปที่ 1.2-5 ค่า optical density แสดงถึงระดับแอนติบอดีในน้ำล้างช่องท้อง (A) หรือเซรัม (B) ของหนูเม้าส์ระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม ในแต่ละช่วงเวลาของการทดลองหลังการฉีดกระตุ้นด้วยโปรตีนสกัดจากพยาธิตัวเต็มวัย
- (DPI – ระยะเวลาหลังการฉีดกระตุ้น, MLF1 – เซลล์ในช่องท้องของกลุ่มหนูเม้าส์ที่ถูกฉีดกระตุ้นครั้งเดียว, CMLF1 – เซลล์ในช่องท้องของกลุ่มควบคุมของ MLF1, MLF2 – เซลล์ในช่องท้องของกลุ่มหนูเม้าส์ที่ถูกฉีดกระตุ้นสองครั้ง, CMLF2 – เซลล์ในช่องท้องของกลุ่มควบคุมของ MLF2, MS1 – เซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มหนูเม้าส์ที่ถูกฉีดกระตุ้นครั้งเดียว, CMS1 – เซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มควบคุมของ MS1, MS2 – เซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มหนูเม้าส์ที่ถูกฉีดกระตุ้นสองครั้ง, CMS2 – เซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มควบคุมของ MS2)
- รูปที่ 1.2-6 ค่า optical density แสดงถึงระดับแอนติบอดีในน้ำล้างช่องท้อง (A) หรือเซรัม (B) ของหนูแรทระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม ในแต่ละช่วงเวลาของการทดลองหลังการฉีดกระตุ้นด้วยโปรตีนสกัดจากพยาธิตัวเต็มวัย
- (DPI – ระยะเวลาหลังการฉีดกระตุ้น, RLF1 – เซลล์ในช่องท้องของกลุ่มหนูแรทที่ถูกฉีดกระตุ้นครั้งเดียว, CRLF1 – เซลล์ในช่องท้องของกลุ่มควบคุมของ RLF1, RLF2 – เซลล์ในช่องท้องของกลุ่มหนูแรทที่ถูกฉีดกระตุ้นสองครั้ง, CRLF2 – เซลล์ในช่องท้องของกลุ่มควบคุมของ RLF2, RS1 – เซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มหนูแรทที่ถูกฉีดกระตุ้นครั้งเดียว, CRS1 – เซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มควบคุมของ RS1, RS2 – เซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มหนูแรทที่ถูกฉีดกระตุ้นสองครั้ง, CRS2 – เซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มควบคุมของ RS2)
- รูปที่ 1.2-7 ภาพถ่ายแผ่นไนโตรเซลลูโลสแสดงแถบโปรตีนที่ตรวจสอบโดยวิธี immunoblotting
- (A) ใช้แอนติบอดีจากน้ำล้างช่องท้องของหนูเม้าส์ที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วยโปรตีนสกัดจากพยาธิตัวเต็มวัยโดยฉีดครั้งเดียว
- (B) ใช้แอนติบอดีจากน้ำล้างช่องท้องของหนูเม้าส์ที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วยโปรตีนสกัดจากพยาธิตัวเต็มวัยโดยฉีดกระตุ้นสองครั้ง
- (C) ใช้แอนติบอดีจากเซรัมของหนูเม้าส์ที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วยโปรตีนสกัดจากพยาธิตัวเต็มวัยโดยฉีดครั้งเดียว
- (D) ใช้แอนติบอดีจากเซรัมของหนูเม้าส์ที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วยโปรตีนสกัดจากพยาธิตัวเต็มวัยโดยฉีดกระตุ้นสองครั้ง

รูปที่ 1.2-8

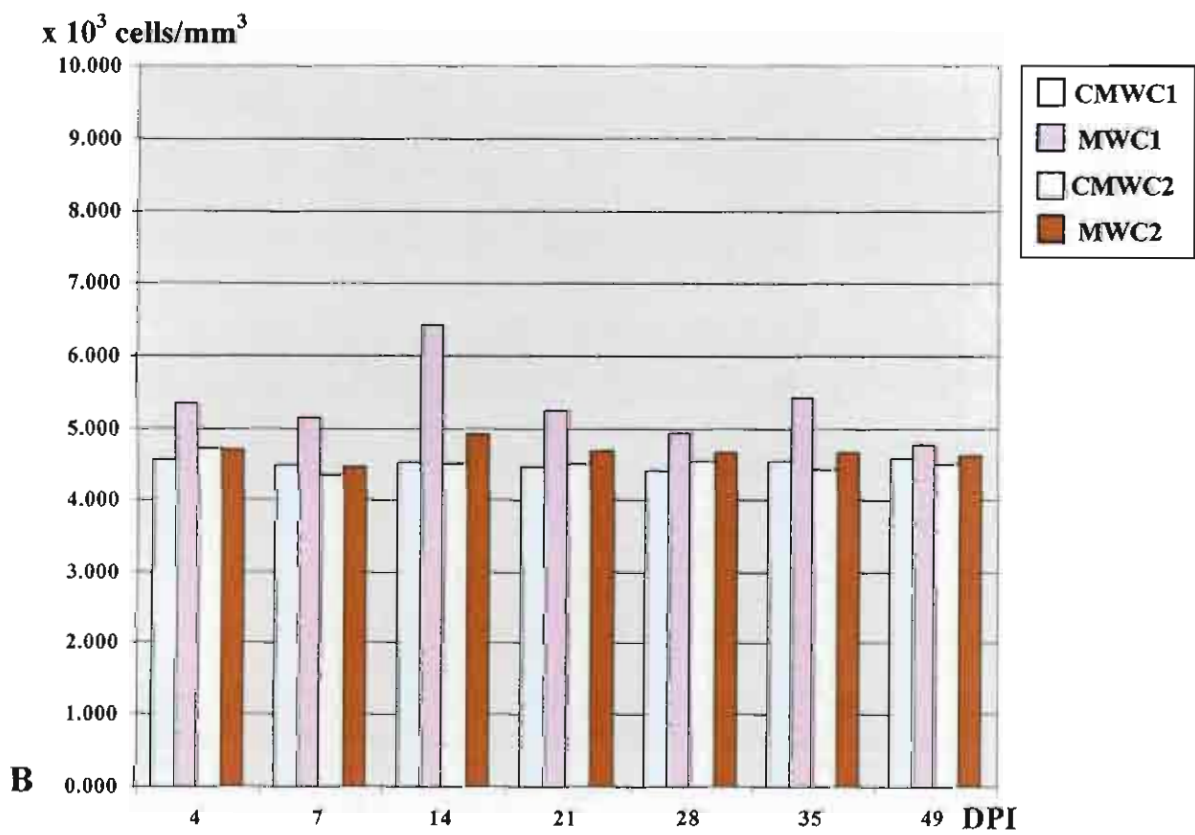
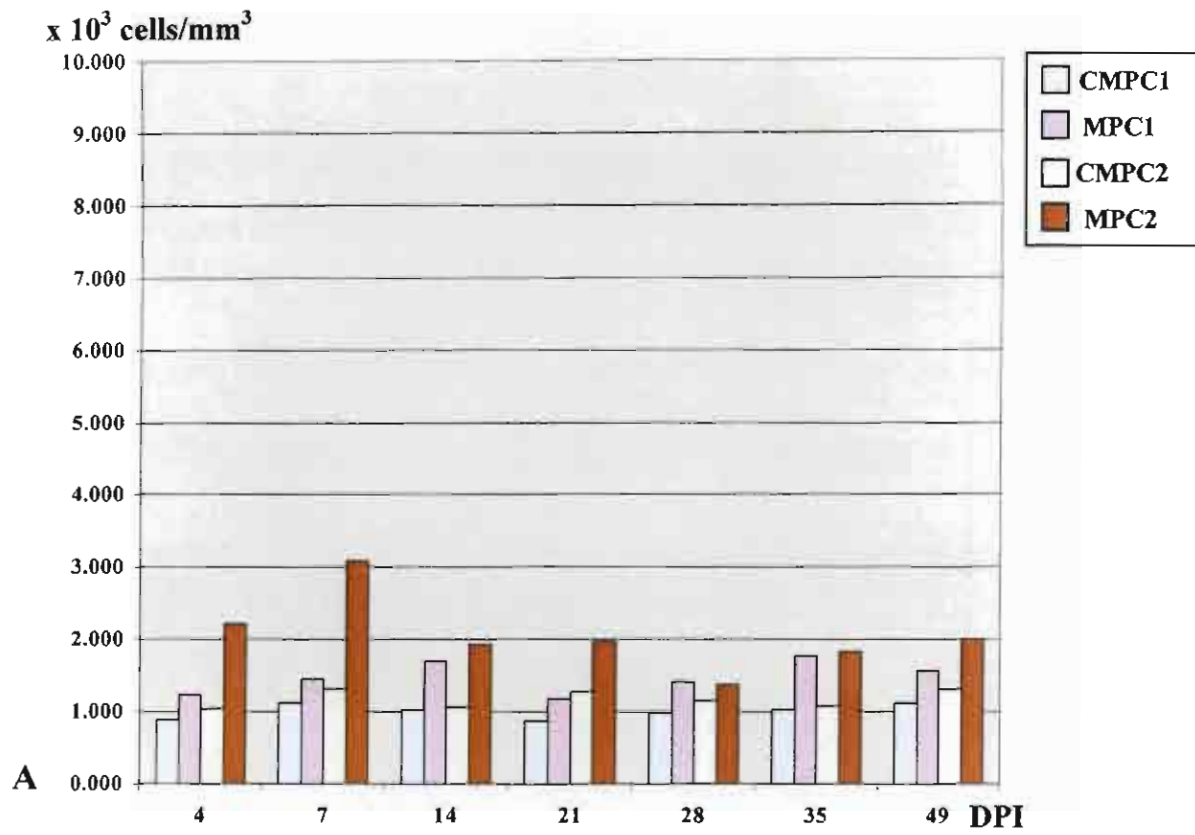
ภาพถ่ายแผ่นไนโตรเซลลูโลสแสดงแถบโปรตีนที่ตรวจสอบโดยวิธี immunoblotting

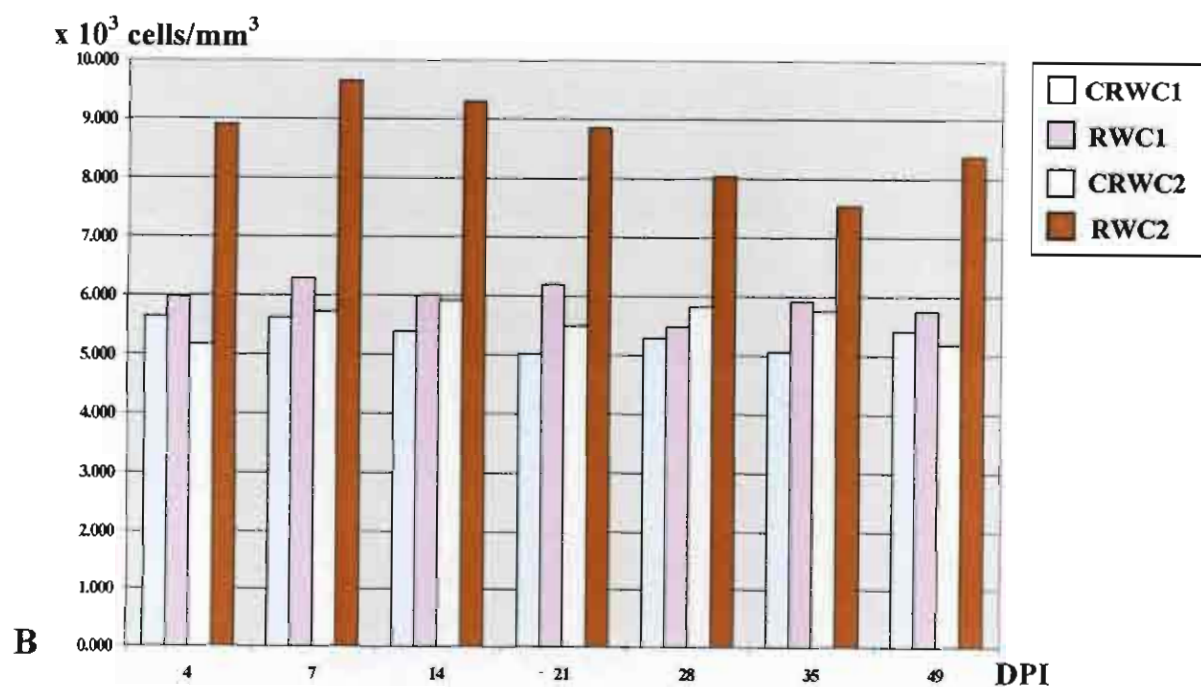
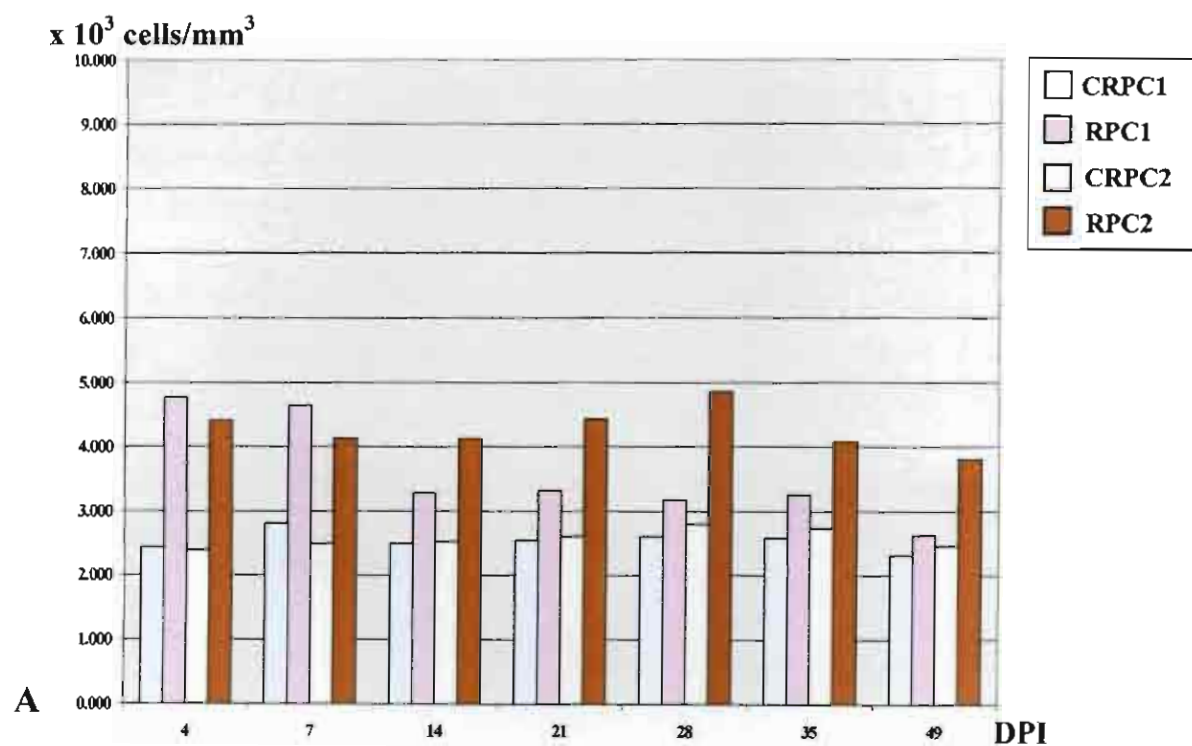
(A) ใช้แอนติบอดีจากน้ำล้างช่องท้องของหนูแรทที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วยโปรตีนสกัดจากพยาธิตัวเต็มวัยโดยฉีดครั้งเดียว

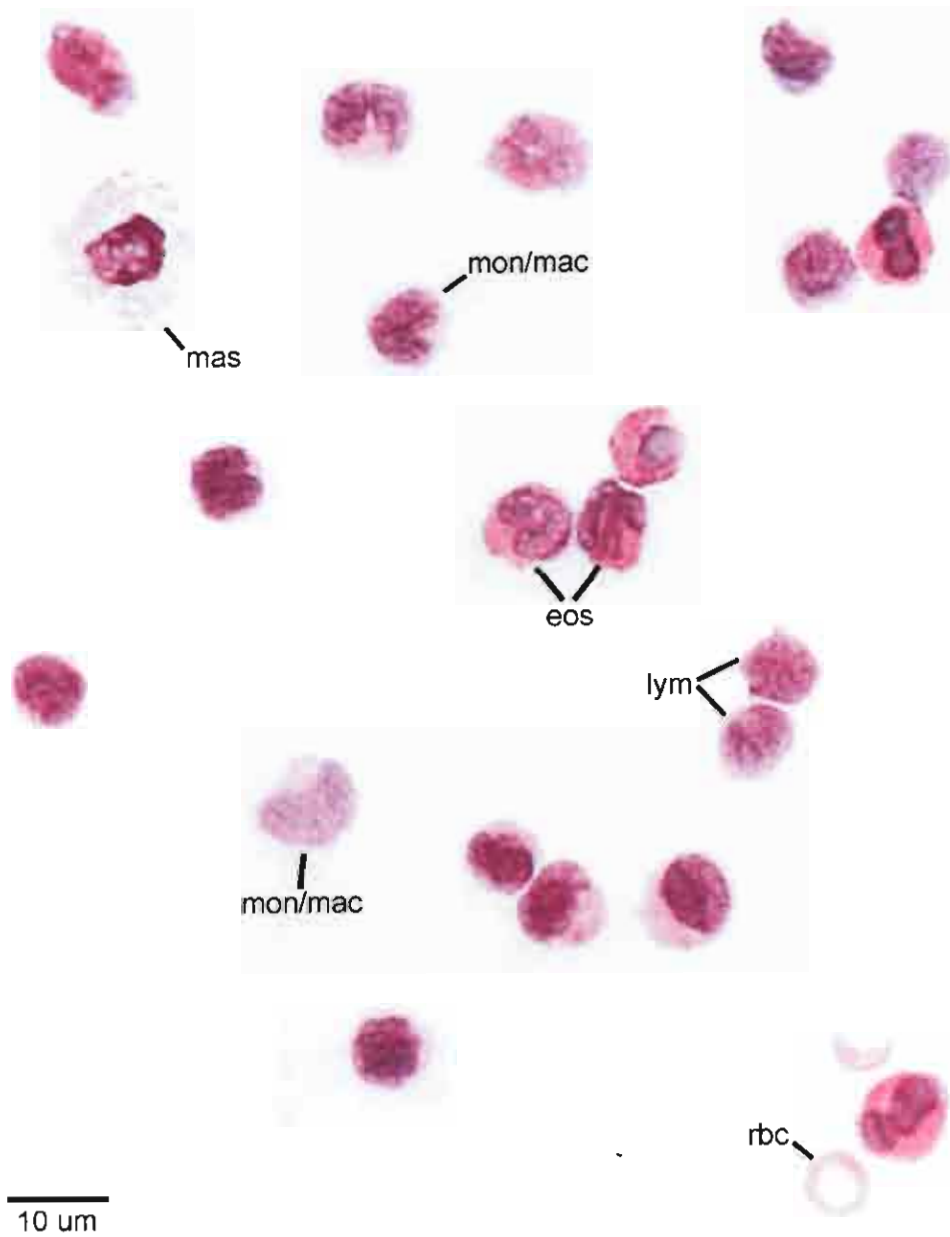
(B) ใช้แอนติบอดีจากน้ำล้างช่องท้องของหนูแรทที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วยโปรตีนสกัดจากพยาธิตัวเต็มวัยโดยฉีดกระตุ้นสองครั้ง

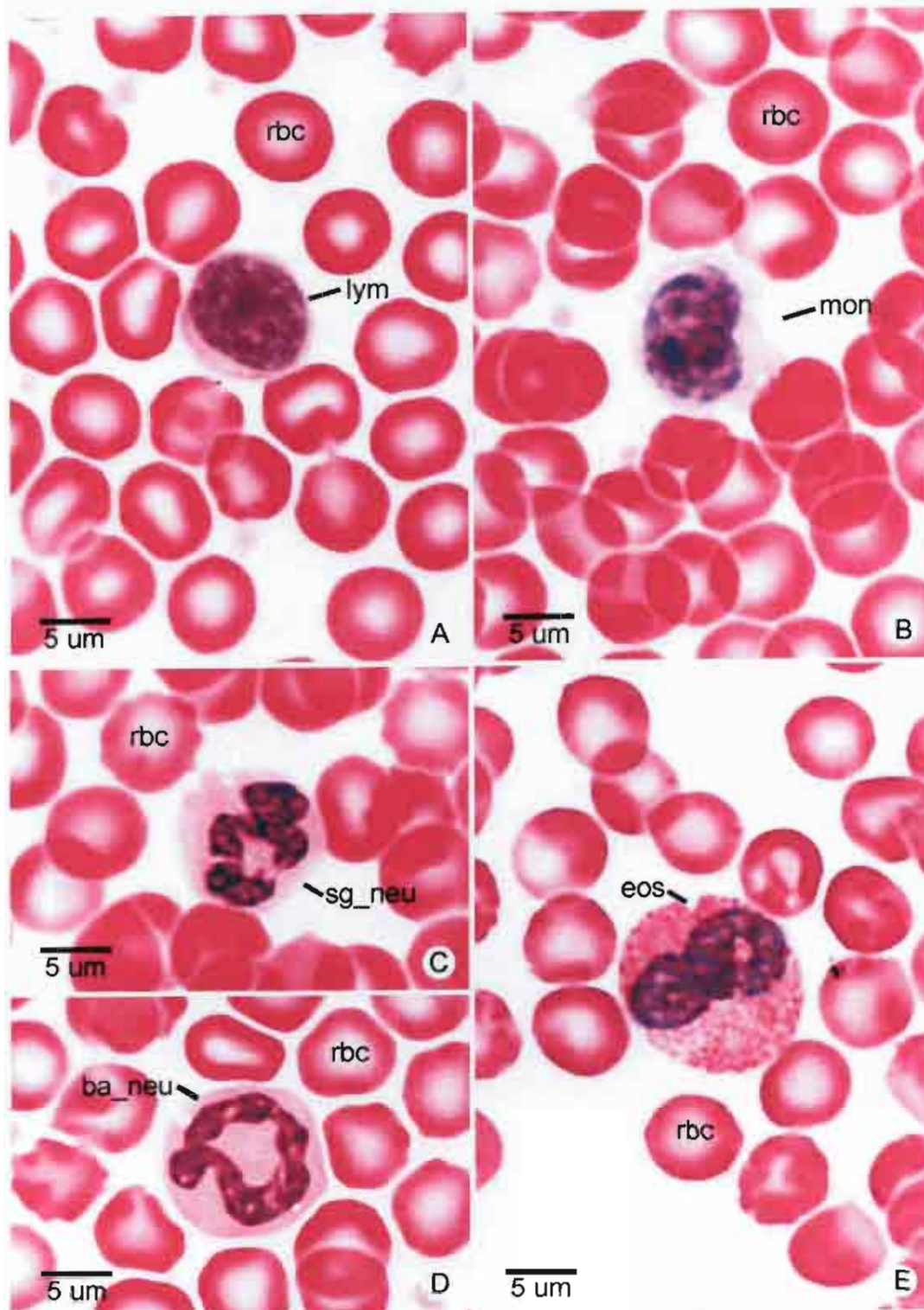
(C) ใช้แอนติบอดีจากเซรัมของหนูแรทที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วยโปรตีนสกัดจากพยาธิตัวเต็มวัยโดยฉีดครั้งเดียว

(D) ใช้แอนติบอดีจากเซรัมของหนูแรทที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วยโปรตีนสกัดจากพยาธิตัวเต็มวัยโดยฉีดกระตุ้นสองครั้ง

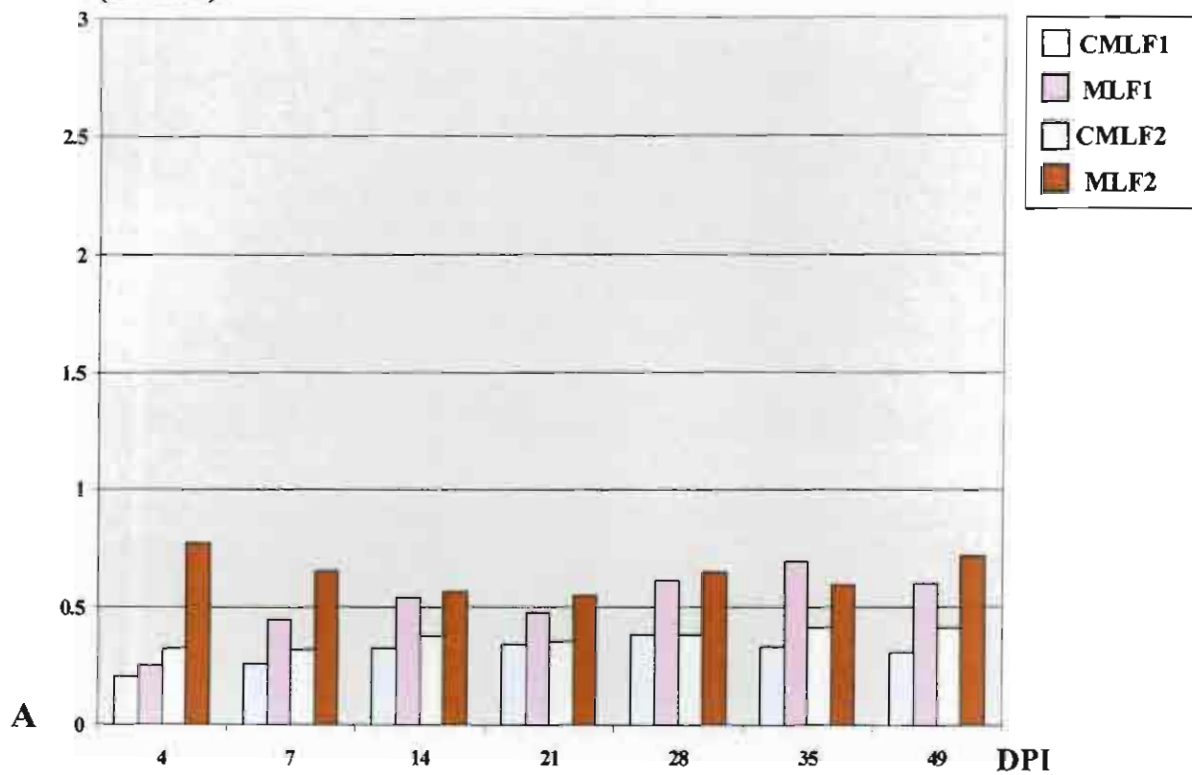




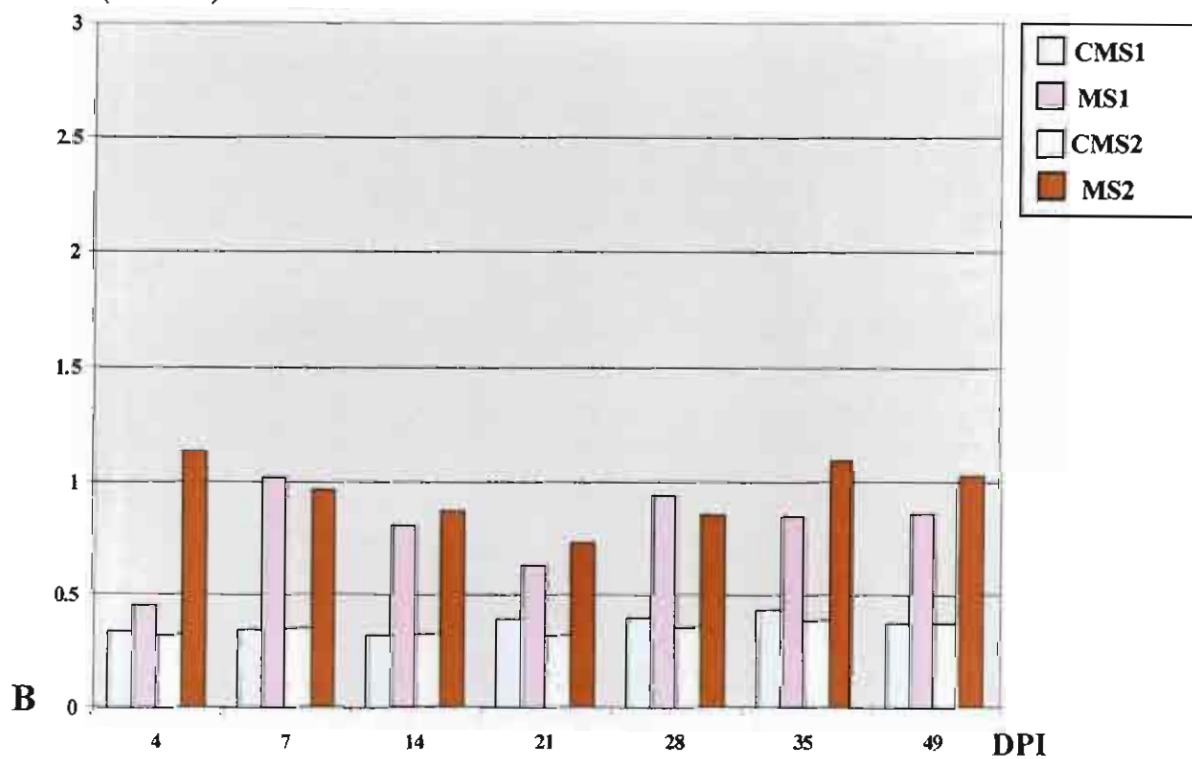


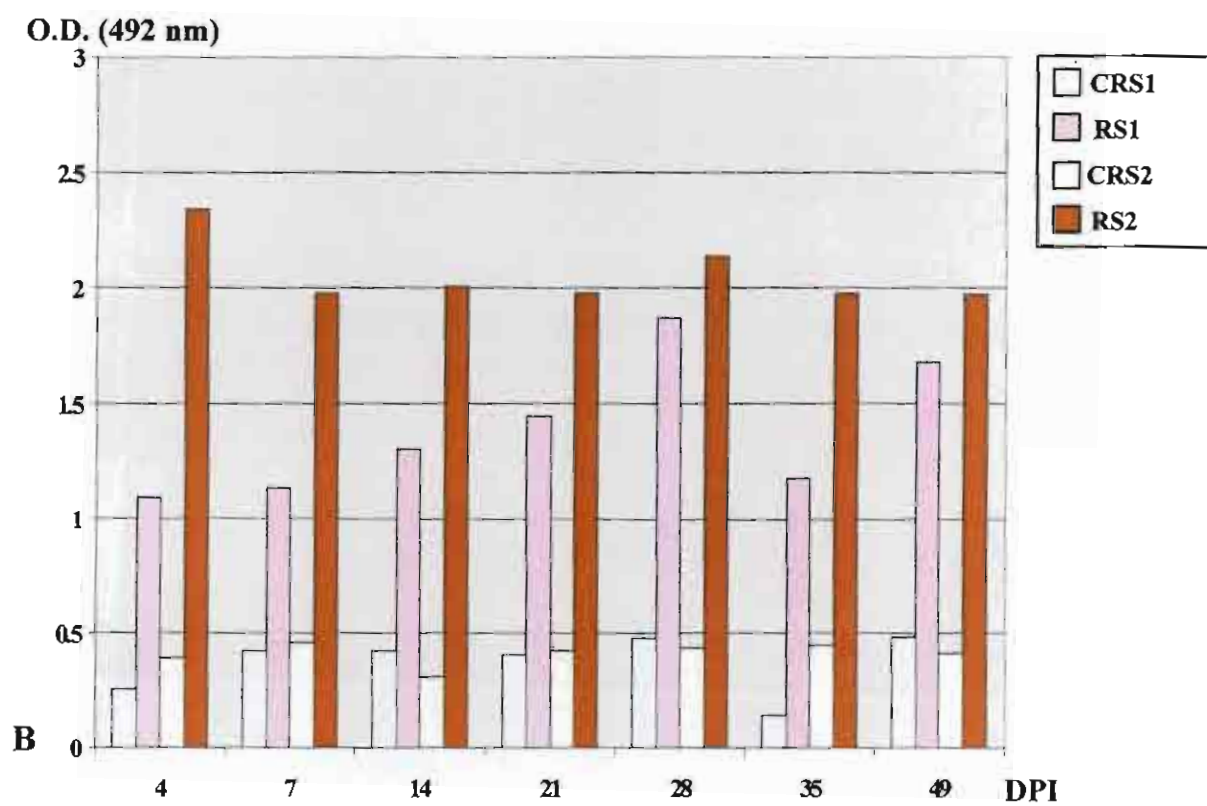
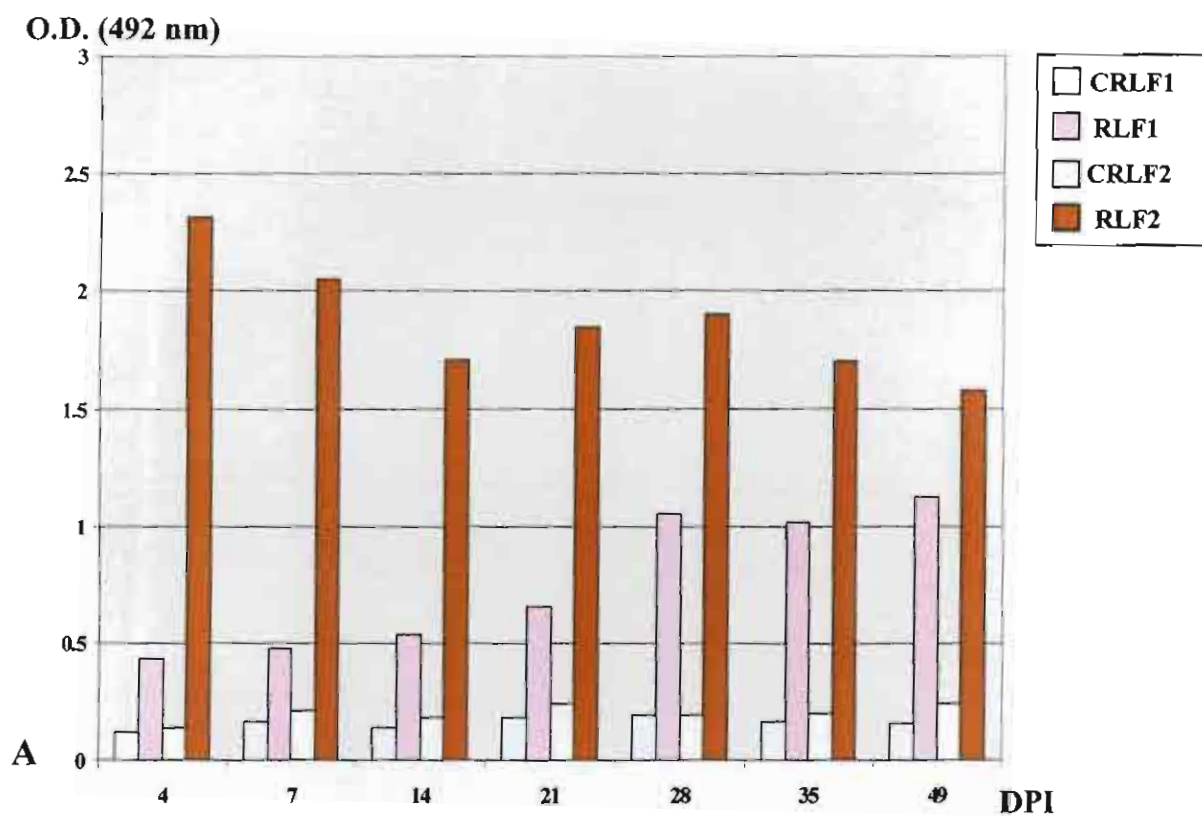


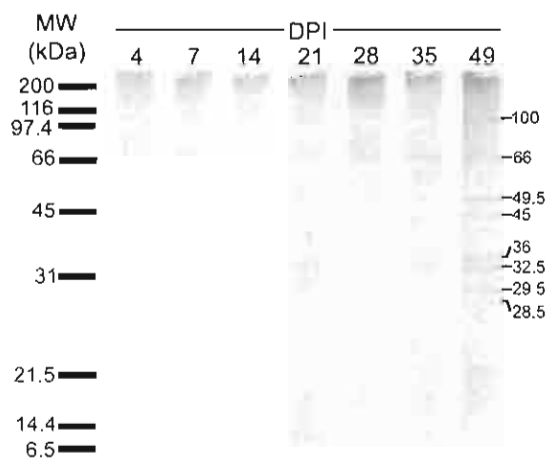
O.D. (492 nm)



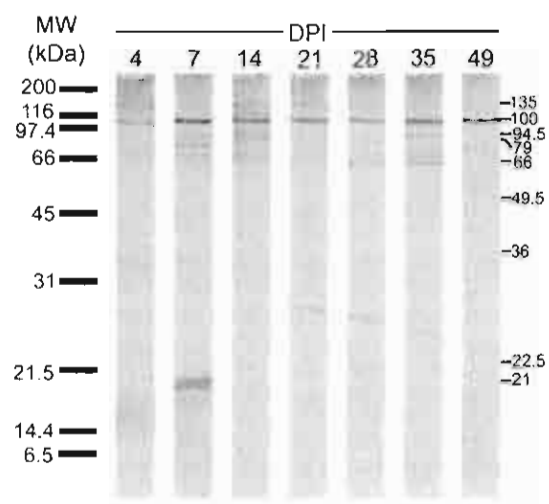
O.D. (492 nm)



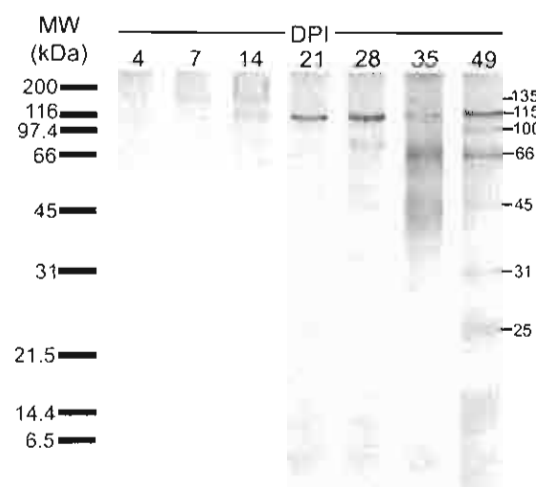




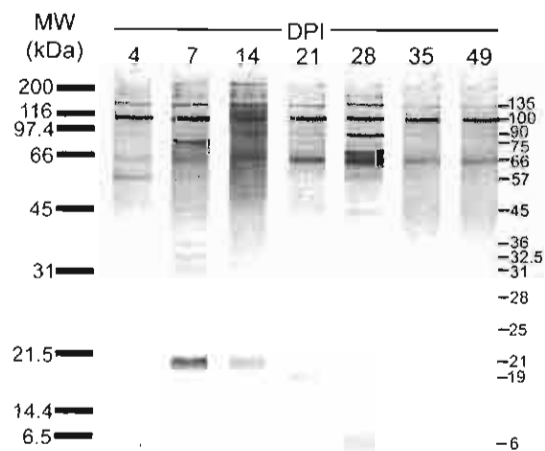
A



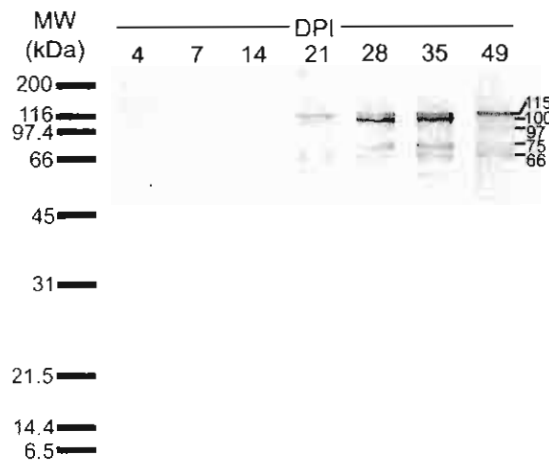
B



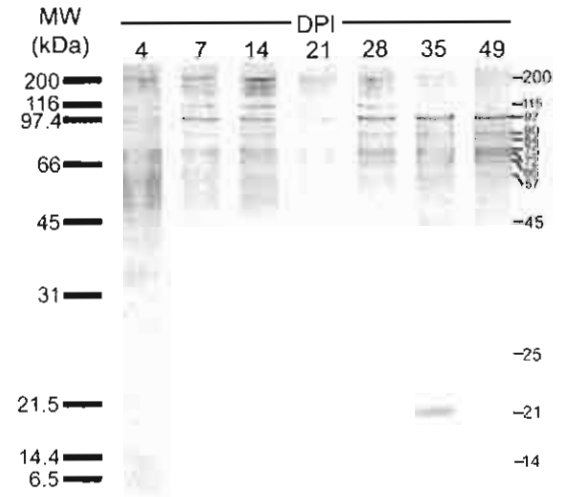
C



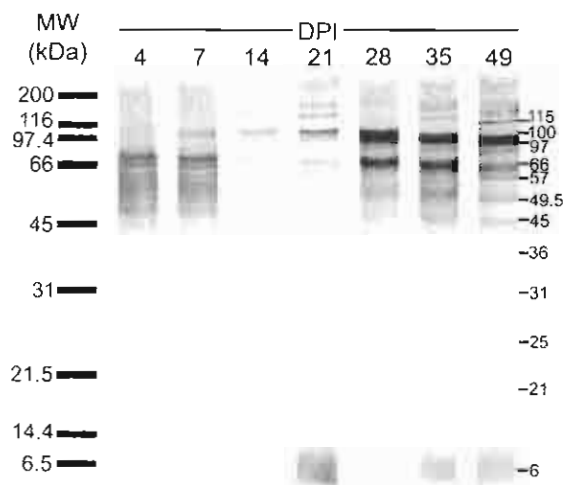
D



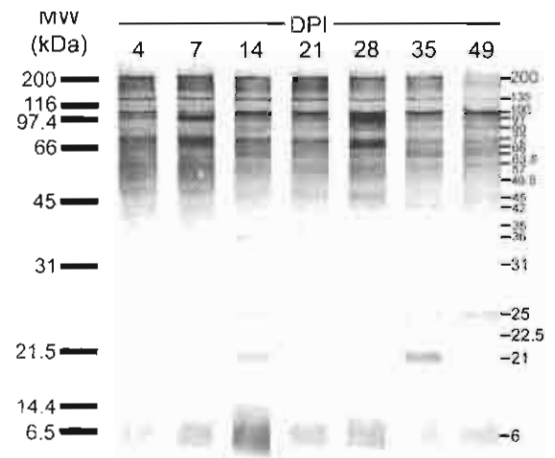
A



B



C



D

1.3. การสังเคราะห์ การศึกษาคุณลักษณะ การกระจายและการทดสอบศักยภาพในการเป็น วัคซีนของ cathepsin B (Cat B)

จากการศึกษาวิจัยที่ผ่านมาในพยาธิใบไม้เลือด (*Schistosoma* spp.) และ พยาธิใบไม้ตับ *F. hepatica* พบว่า เอนไซม์ cathepsin B มีบทบาทสำคัญในการย่อยทำลายเนื้อเยื่อของ host เพื่อให้พยาธิสามารถไชผ่านผนังลำไส้ไปยังตับและช่วยในการย่อยอาหารของพยาธิเองด้วย นอกจากนี้ กลุ่มเอนไซม์ cathepsin ยังมีบทบาทเกี่ยวข้องกับกลไกการหลีกหนีจากระบบภูมิคุ้มกันของ host (immune evasion) เพื่อป้องกันตัวพยาธิจากปฏิกิริยาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของ host อีกทางหนึ่งด้วย จากเหตุผลข้างต้น ทำให้เกิดความสนใจในการค้นหาชิ้นที่สังเคราะห์เอนไซม์ cathepsin B ศึกษาคุณสมบัติทั่วไป บริเวณที่มีการกระจายตัว รวมถึงการทดสอบศักยภาพการเป็นวัคซีนของเอนไซม์ตัวนี้ต่อพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* เพราะวัคซีนที่ได้รับน่าจะสามารถป้องกันพยาธิในช่วงที่ไชผ่านลำไส้ของ host และยับยั้งกระบวนการย่อยอาหารและระบบ immune evasion ของพยาธิในช่วงต่างๆ ได้อีกด้วย

ดังนั้น ในการศึกษานี้เราได้ทำเพื่อสังเคราะห์ชิ้นที่ควบคุมเอนไซม์ cathepsin B และศึกษาคุณลักษณะ คุณสมบัติ ทั่วไปของยีนและเอนไซม์ดังกล่าว รวมทั้งการแสดงออกของยีนและเอนไซม์นี้ในเนื้อเยื่อของพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* และการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนต่อพยาธิใบไม้ตับชนิดนี้ด้วย โดยการกระตุ้นด้วย cDNA ของ cathepsin B

1.3.1. การสังเคราะห์ cDNA libraries และ screen หา cathepsin B genes ในพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ระยะต่างๆ

การสังเคราะห์ cDNA library ทำได้โดยใช้ SMART IV cDNA library construction kit (CLONTECH) และใช้สารพันธุกรรม RNA ที่สกัดมาจากพยาธิใบไม้ตับระยะตัวเต็มวัย ระยะตัวอ่อน (Newly excysted juvenile; NEJ) และระยะ metacercariae เป็นตัวตั้งต้น เพื่อนำมาสกัด messenger RNA และเป็นตัวต้นแบบในการทำ polymerase chain reaction (PCR) เพื่อสร้างสาย double-stranded cDNA ที่เชื่อมต่อกับ SMART IV oligonucleotide primer (ปลาย 5') และ CDS/III primer (ปลาย 3') ซึ่งมีตำแหน่ง recognition ของเอนไซม์ *Sfi*IA กับ *Sfi*IB อยู่ที่ปลายทั้งสองตามลำดับ จากนั้นสาย cDNA สายยาวที่ได้จะถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Sfi*IA และ *Sfi*IB แล้วถูกนำมาเชื่อมต่อกับ λ TriplEx2 arms และเก็บไว้ใน bacteriophage เป็น libraries ในที่สุด

วิธีการ screen หา cathepsin B genes ใน cDNA library ทำได้โดย 3 ขั้นตอน ดังนี้ ขั้นแรกการสังเคราะห์ชิ้นส่วนของยีน cathepsin B ขั้นตอนที่สองคือการนำยีนที่ได้มาติดกับสารหรือสีที่สามารถวัดได้ (ในที่นี้คือ radioisotope 32 P) ขั้นตอนที่สามคือการนำ probe ที่สร้างได้ไป screen cDNA library และวิเคราะห์ลำดับเบสของ positive clones

การสังเคราะห์ชิ้นส่วนของ cathepsin B gene

cDNA libraries ของพยาธิทั้ง 3 ระยะถูกนำมาผสมรวมกับ forward primer (5'-TGG CCA CAA TGC TGG ACG-3') reverse primer (5'-TCA AAG ACG TGG CAT TCC-3') ซึ่งเป็นลำดับเดียวกันกับ ยีน *F. hepatica* cathepsin B (GenBank number: U58000) และ 10X PCR buffer dNTP mix และ เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase แล้วจึงเข้าสู่กระบวนการ PCR โดยเครื่อง Thermal cycler ซึ่ง ประกอบด้วยรายละเอียดดังนี้

94°C นาน 2 นาที

35 รอบของ 94°C 1 นาที 55°C 1 นาที 72°C 1 นาที

72°C นาน 5 นาที

หลังจากนั้น ผลผลิต PCR ที่ได้นำมาทดสอบบนเจล agarose ผลที่ได้พบว่า primers มีความจำเพาะต่อยีน cathepsin B ใน cDNA library ของพยาธิระยะ NEJ และ metacercariae ขณะที่ cDNA library ของพยาธิระยะตัวเต็มวัยแสดง bands ที่ไม่จำเพาะมากมาย ชิ้นส่วนยีน cathepsin B จำเพาะที่ได้มาจาก cDNA library ของพยาธิระยะ NEJ และ metacercariae จึงได้นำมาใช้ในการติดสี (labeling) ต่อไป (รูปที่ 1.3-1)

การติดสีชิ้นส่วน cathepsin B

การติดสีชิ้นส่วนเพื่อสร้างเป็น cathepsin B probe ทำได้โดยใช้ HexaLabel DNA Labeling kit ด้วย radioactive ^{32}P -dCTP ชิ้นส่วนของยีน cathepsin B ถูกนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100°C นาน 5-10 นาที และหลังจากนั้นนำมารวมกับ hexanucleotide Mix C (ประกอบด้วย dGTP, dATP, dTTP และ ^{32}P -dCTP) Klenow fragment (exo-) DNA polymerase จุ่มแช่ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 5 นาที สุดท้ายปฏิกิริยาถูกระงับโดยการผสมด้วยสารละลาย 0.5 M EDTA, pH 8.0

การย้อมเกาะ bacteriophage ลงบนแผ่น nitrocellulose

ขั้นแรกทำการเพิ่มจำนวน colony ของแบคทีเรีย XL1-Blue ใน 15 ml LB/maltose/MgSO₄ broth และ incubate พร้อมทั้งเขย่าที่ 37°C นาน 1 คืน หลังจากนั้นทำการตะกอน colony เหล่านี้โดยการปั่นที่ 5000 rpm นาน 5 นาที แล้วนำมาผสมอยู่ใน 10 mM MgSO₄ โดยให้ OD₆₀₀ มีค่าประมาณ 0.5-1 ขั้นตอนต่อมา นำ bacteriophage ของแต่ละ cDNA library มาผสมรวมกับ XL1-Blue culture ที่ได้จากขั้นตอนแรกปริมาณ 300 ไมโครลิตร เพื่อให้ได้ bacteriophage ประมาณ 50000 pfu ต่อ plate สารประกอบ (mixture) ที่ได้นี้นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 20 นาที ก่อนผสมกับ LB top agarose ปริมาณ 6.5 มิลลิลิตรและเทอย่างรวดเร็ลงบน LB/MgSO₄ plate หลังเสร็จกระบวนการนี้แล้วนำ plate ไปเก็บไว้ในตู้บอดูอุณหภูมิ 37°C ทิ้งไว้จนกระทั่ง bacteriophage เจริญเติบโตที่จุด plaques ที่เกิดขึ้น ขยายใหญ่และเข้ามาใกล้กัน ซึ่งใช้เวลาประมาณ 8-10 ชั่วโมง แล้วจึงนำ plate มาเก็บไว้ที่ 4°C อย่างน้อย 1 ชั่วโมง ต่อจากนั้นนำแผ่น nitrocellulose มาวางไว้บน plate เพื่อให้ bacteriophage ถูกดูดซับ ขึ้นมา

แล้วจึงนำแผ่น nitrocellulose ที่ได้มาแช่ในสารละลาย denaturing ซึ่งประกอบด้วย 0.5 N NaOH กับ 1.5 M NaCl นาน 2-5 นาที ตามด้วยสารละลาย neutralizing (0.5 M Tris-HCl, pH 7.4 และ 1.5 M NaCl) นาน 5 นาที และสารละลาย 2X SSC สุดท้ายนำแผ่น nitrocellulose นี้มาอบที่อุณหภูมิ 80°C นาน 30 นาทีถึง 2 ชั่วโมง และเก็บไว้ในตู้เย็น

การย้อมเกาะ cathepsin B probe บนแผ่น nitrocellulose

นำแผ่น nitrocellulose ที่ผ่านกระบวนการข้างต้นมาจุ่มแช่ในสารละลาย hybridization ที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการ denature cathepsin B probe ด้วยสารละลาย 1 N NaOH และใส่ลงไปในสารละลาย hybridization ที่มีแผ่น nitrocellulose อยู่ แล้วแช่ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 42-45°C นาน 1 คืน วันต่อมาทำการ แผ่น nitrocellulose ด้วยสารละลาย 2X SSC/0.2% SDS จำนวน 2 ครั้งๆละ 30 นาที ตามด้วยสารละลาย 0.1XSSC/0.1% SDS อีก 1 ครั้งที่อุณหภูมิ 65°C นาน 30 นาทีถึง 1 ชั่วโมง หลังจากแผ่น nitrocellulose ได้ซับน้ำจนแห้งแล้ว นำมาพันด้วย plastic และวางไว้บน S&S IC imaging Cassette แล้วนำแผ่นฟิล์ม X-ray มาวางทับบนแผ่น nitrocellulose อีกชั้นหนึ่ง นำตัว Cassette นี้ไปเก็บที่ -80°C เป็นเวลา 1-10 วัน หลังจากนั้นทำการ develop ฟิล์ม X-ray และล้างเพื่อให้ปรากฏปฏิกิริยา positive ให้เห็น หลังจากทำการซ้อนทับแผ่นฟิล์มที่ได้กับ plate ดันแบบที่มี bacteriophage อยู่แล้ว positive clone แต่ละตัวที่ได้ถูกขูดออกมาจาก plate และจุ่มแช่ในสารละลาย SM หรือ lambda elution ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 1 คืน ทั้งหมดที่กล่าวข้างต้นเป็นการทำ primary screening แต่การทำให้ได้ positive clone ที่บริสุทธิ์นั้น ควรทำซ้ำอีก 1-2 ครั้งๆที่เรียกว่า secondary และ tertiary screening ตามลำดับ วิธีการทำ secondary และ tertiary screening เหมือนกับการทำ primary screening แต่ใช้ plate ขนาดเล็กกว่าและให้ได้ plaques เต็มๆขึ้นมา

ผลจากการ screening พบว่า library จากพยาธิระยะ metacercaria แสดงจำนวน positive clones ทั้งหมดประมาณ 270 clones และ library จากพยาธิระยะตัวอ่อน NEJ แสดง positive clones จำนวนทั้งหมดประมาณ 100 clones ขณะที่ library จากพยาธิระยะตัวเต็มวัยแสดง positive clones จำนวน 12 clones จากผลที่ได้นี้ แสดงให้เห็นว่า ยีน cathepsin B แสดงออกของในพยาธิระยะตัวอ่อน มากกว่าตัวเต็มวัย ซึ่งก็สนับสนุนสมมติฐานที่ว่าเอนไซม์ cathepsin B นี้เกี่ยวข้องกับการไผผ่านผนังลำไส้ ในระยะแรกๆ ของการติดเชื้อ (รูปที่ 1.3-2)

การเปลี่ยน λ TriplEx2 bacteriophage เป็น pTriplEx2 plasmid ด้วยวิธี *in vivo* excision

ทำการเพิ่มปริมาณ colony ของแบคทีเรีย *E. coli* BM25.8 ในสารละลาย LB medium ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 31°C นาน 1 คืน จากนั้นนำกลุ่ม colony เหล่านี้มาผสมรวมกับสาร 1 M $MgCl_2$ และ positive clone ที่ได้มาจากการทำ secondary screening ปริมาณ 150 ไมโครลิตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 31°C นาน 30 นาที จากนั้นใส่ LB broth ลงไปในสาร mixture นั้น และ incubate พร้อมเขย่า

ต่ออีก 1 ชั่วโมง สุดท้ายนำ cell suspension ปริมาณ 1-10 ไมโครลิตรเพาะเลี้ยงบน LB/carbenicillin plate และเก็บไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 31°C เป็นเวลา 1 คืน

การหาลำดับเบสและวิเคราะห์ผล

หลังจากที่ได้ pTriplEx2 plasmid ที่แยกออกมาจาก แต่ละ colony ของ *E. coli* BM25.8 แล้ว plasmid ที่ได้แต่ละตัวถูกนำส่งมาตรวจหาลำดับเบสที่บริษัท MWG AG Biotech ประเทศเยอรมันนี หรือ ที่หน่วยบริการชีวภาพ สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ การวิเคราะห์ผลของลำดับเบสทำได้ โดยใช้ MacMolly Lite (Softgene), BLAST, และโปรแกรม BioEdit

ยีน cathepsin B จากพยาธิทั้งสามระยะได้ถูกค้นพบและถูกนำส่ง GenBank database ภายใต้รหัสดังนี้ ยีน cathepsin B จากพยาธิระยะตัวเต็มวัยชื่อ FG cat-B1 และได้รับรหัสเป็น AY227673 (รูปที่ 1.3-3) ยีน cathepsin B จากพยาธิระยะตัวอ่อน NEJ ชื่อ FG cat-B2 และได้รับรหัสเป็น AY227674 (รูปที่ 1.3-4) ยีน cathepsin B จากพยาธิระยะ metacercariae ชื่อ FG cat-B3 และได้รับรหัสเป็น AY227675 (รูปที่ 1.3-5) ยีน FG cat-B1 แสดงความยาวของ open reading frame ที่ 1008 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งกำหนดรหัสสำหรับโปรตีน 335 amino acids ยีน FG cat-B2 แสดงความยาวของ open reading frame ที่ 1020 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งกำหนดรหัสสำหรับโปรตีน 339 amino acids ยีน FG cat-B3 แสดงความยาวของ open reading frame ที่ 1014 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งกำหนดรหัสสำหรับโปรตีน 337 amino acids หลังจากนั้นได้นำลำดับของ amino acids ที่แปลงมาจากรหัส DNA ของยีน cathepsin B ทั้งสาม มาเปรียบเทียบกันและเปรียบเทียบกับลำดับจากยีน cathepsin B ของ species ต่างๆ (รูปที่ 1.3-6) พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของ cathepsin B ถูกแสดงออกในรูป preproenzyme และตำแหน่งของ preregion ของ cathepsin B อยู่ในช่วงกรดอะมิโนตัวแรกจนถึงตัวที่ 15 ตำแหน่งของ proregion อยู่ในช่วงกรดอะมิโนในตัวที่ 16-85 ส่วนของกรดอะมิโนที่เหลือ (กรดอะมิโน 250 ตัวสำหรับยีน FG cat-B1 กรดอะมิโน 254 ตัวสำหรับยีน FG cat-B2 และกรดอะมิโน 252 ตัวสำหรับยีน FG cat-B3) จะกำหนดรหัสสำหรับ mature enzyme ตำแหน่งที่ conserve ต่างๆ ของ cysteine proteinase เช่น thiol cathepsin consensus pattern และ catalytic sites (ตำแหน่ง Cys29 His200 และ Asn220) ก็ปรากฏอยู่ในยีน cathepsin B ทั้งสาม รวมทั้งตำแหน่ง cysteine residue ที่เป็น disulphide bridges ทั้งหมด 12 ตำแหน่งก็ได้ปรากฏอยู่ในลำดับเบสด้วย นอกจากนี้ยีน cathepsin B ทั้งสามยังแสดงตำแหน่ง conserve ของ occluding loop ซึ่งเป็นตำแหน่งที่จำเพาะสำหรับ cathepsin B และไม่พบในยีน cathepsin กลุ่มอื่นๆ ตำแหน่ง occluding loop นี้มีความสำคัญที่ทำให้เอนไซม์ cathepsin B สามารถเกิดกระบวนการ exopeptidase ต่อสารตั้งต้นที่จำเพาะได้ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ากรดอะมิโน His110 และ His111 เป็นตัวหลักสำคัญที่ทำให้เกิดกระบวนการดังกล่าว ซึ่งมักถูก conserve เอาไว้ในยีน cathepsin B ทั่วไป รวมทั้งของมนุษย์หรือแม้กระทั่งพยาธิใบไม้เลือด Schistosoma แต่ในยีน cathepsin B ของพยาธิใบไม้ตับ Fasciola นั้นพบว่า เฉพาะกรดอะมิโน His110 เท่านั้นที่ถูก conserve เอาไว้ ขณะที่กรดอะมิโน His111

ได้ถูกแทนที่ด้วยกรดอะมิโน Leu ในยีน FG cat-B1 กรดอะมิโน Val ในยีน FG cat-B2 และกรดอะมิโน Gly ในยีน FG cat-B3 อย่างไรก็ตามความสามารถของเอนไซม์ cathepsin B จากพยาธิตัวตืด Fasciola ในการเกิดกระบวนการ exopeptidase น่าจะยังมีอยู่ เนื่องจากการวิจัยที่ผ่านมาพบว่าการ mutate ของตำแหน่งกรดอะมิโน His111 ไปเป็นตัวอื่นไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางความสามารถมากนัก อย่างไรก็ตามจึงน่าสนใจที่จะศึกษาถึงกระบวนการ exopeptidase ของเอนไซม์ cathepsin B ในพยาธิตัวตืดต่อไปในอนาคต

ค่าแสดงความเหมือน (identity) ระหว่างยีน cathepsin B ของพยาธิตัวตืดทั้งสาม ได้แสดงไว้ในตารางที่ 1.3-1 ซึ่งพบว่ายีน cathepsin B ทั้งสามมีค่า identity ระหว่าง 64-79 % โดยยีน FG cat-B1 มีค่า identity ใกล้เคียงกับยีน FG cat-B3 มากกว่ายีน FG cat-B2 อย่างไรก็ตามยีน FG cat-B2 นี้มีความเหมือนกับยีน cathepsin B จากพยาธิตัวตืด *F. hepatica* (GenBank no. U58000) ถึง 99% และมีแค่กรดอะมิโน 3 ตัวเท่านั้นที่แตกต่างกัน กรดอะมิโนดังกล่าวสองตัวแรกอยู่ที่ตำแหน่ง preregion และอีกตัวหนึ่งที่ตำแหน่ง proregion ซึ่งจะเห็นได้ว่ากรดอะมิโนที่แตกต่างกันทั้งสามนี้อยู่ในตำแหน่งที่ไม่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทำปฏิกิริยา (catalyse) ของเอนไซม์เลยเนื่องจากจะถูกตัดออกในขั้นตอน post-translation จึงมีความเป็นไปได้ว่ายีน cathepsin B (โดยเฉพาะ FG cat-B2) ค่อนข้าง conserve ในพยาธิตัวตืดทั้งสอง ค่า identity ของยีน cathepsin B ในพยาธิตัวตืดนี้ลดลงเมื่อเทียบกับยีนจากสิ่งมีชีวิตประเภทอื่น โดยเฉพาะในมนุษย์ซึ่งพบว่ามีอยู่ประมาณ 44%

ตารางที่ 1.3-1 แสดงค่า identity ของยีน cathepsin B ของพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* (FG cat-B1, FG cat-B2, FG cat-B3) กับพยาธิใบไม้ตับ *F. hepatica* และพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma* spp. และมนุษย์

	FG cat-B1	FG cat-B2	FG cat-B3	FH U58000	FH AJ488928*	FH Z22768*	SJ X70968	SM M21309	HS L16510
FG cat-B1	1	0.81	0.91	0.81	0.79	0.56	0.67	0.67	0.62
FG cat-B2	0.65	1	0.81	0.99	0.80	0.56	0.70	0.70	0.67
FG cat-B3	0.79	0.64	1	0.82	0.79	0.57	0.67	0.69	0.65
FH U58000	0.65	0.99	0.64	1	0.80	0.56	0.70	0.70	0.67
FH AJ488928*	0.69	0.65	0.66	0.65	1	0.54	0.66	0.65	0.65
FH Z22768*	0.35	0.36	0.35	0.36	0.38	1	0.55	0.55	0.53
SJ X70968	0.48	0.49	0.49	0.49	0.52	0.56	1	0.89	0.68
SM M21309	0.49	0.49	0.50	0.49	0.52	0.37	0.74	1	0.65
HS L16510	0.44	0.45	0.44	0.45	0.48	0.40	0.46	0.46	1

The similarity values between the different sequences analyzed using the GONNET matrix are shown in *italic*, while their identity values are shown in plain text formatting.

* Only the available partial sequences were used for calculation. FH = *Fasciola hepatica*, SJ = *Schistosoma japonicum*, SM = *Schistosoma mansoni*, HS = *Homo sapiens*. U58000 (26, complete sequence is reported in 27), AJ488928 (unpublished); Z22768 (28); X70968 (77); M21309 (76); L16510 (75) are accession numbers of cathepsin B sequences available from GenBank™.

1.3.2. การศึกษาจำนวน Gene copy ของยีน cathepsin B ในพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica*

การศึกษาหาจำนวน gene copy ของยีน cathepsin B ในพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ทำโดยวิธี southern hybridization ขั้นแรกทำการสกัด genomic DNA จากพยาธิใบไม้ตับโดยการบดให้ละเอียดในสารละลาย extraction solution (0.1 M Tris-HCl, pH 8, 0.1 M NaCl, 20 mM EDTA) และกำจัดโปรตีนออกโดยการผสมกับสารละลาย proteinase K กับ 1% SDS ที่อุณหภูมิ 50°C นาน 60 นาที จากนั้นโปรตีนเหล่านี้ถูกกำจัดออกด้วยสาร phenol-chloroform หลังจากนั้นสารพันธุกรรม RNA ถูกย่อยและกำจัดออกด้วยสาร RNase A ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 60 นาที สารพันธุกรรม genomic DNA ที่เหลืออยู่ถูกตรวจและวัดค่าความเข้มข้นโดย spectrophotometry ขั้นตอนต่อมา นำสารพันธุกรรม genomic DNA ปริมาณ 5 ไมโครกรัมย่อยด้วยเอนไซม์ restriction *EcoRI*, *PstI* และเอนไซม์ทั้งสองตัวผสมกัน แล้วนำมาแยกในเจล 0.7% agarose ก่อน transfer ลงสู่แผ่น nylon โดยวิธีการ capillary transfer ในสารละลาย 10X SSC ปฏิบัติ hybridization ระหว่างแผ่น nylon ที่มีสารพันธุกรรม genomic DNA เกาะอยู่กับ cathepsin B probe ซึ่งสังเคราะห์ขึ้นโดยใช้ digoxigenin (DIG) RNA labeling kit (Roche) ที่มี DIG เกาะอยู่บนสาย antisense probe ได้ทำในสารละลายผสม hybridization (50% formamide, 5X SSC, 2% blocking reagent (Roche), 0.02% SDS) ที่อุณหภูมิ 50°C นาน 15 ชั่วโมง ปฏิบัติ detection เกิดขึ้นโดยใช้สาร alkaline phosphatase (1:5000) และ CDP-Star (Roche) เพื่อแสดง chemiluminescence

ผลการศึกษาพบว่าชิ้นส่วนของสารพันธุกรรม genomic DNA จำนวน 5-6 ชิ้นสามารถตรวจจับได้ด้วย FG cat-B1 DIG antisense RNA probe ความยาวตั้งแต่ 4-23 kb และหนึ่งชิ้นส่วนในจำนวนนี้สามารถตรวจจับได้อย่างเด่นชัดและแตกต่างกันออกไปในแต่ละ genomic DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์แตกต่างกัน รูปแบบการ hybridization ที่พบนี้แสดงให้เห็นว่าเป็น cathepsin B ในพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* จัดเป็นประเภท multiple family (รูปที่ 1.3-7)

1.3.3. ขนาด mRNA gene transcript ของยีน cathepsin B ในพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica*

การศึกษาหาขนาด gene transcripts ของยีน cathepsin B นี้ทำได้โดยวิธี Northern hybridization ซึ่งใช้สารพันธุกรรม total RNA ของพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* เป็นสารตั้งต้น การสกัด total RNA จากพยาธิใบไม้ตับทำได้โดยการบดพยาธิให้ละเอียดในสารละลาย TRIzol (Life Technologies) สกัดโดยใช้ chloroform และตกตะกอนด้วยสาร isopropanol จากนั้นทำการแยก total RNA ตามขนาดในเจล 1.2% agarose ละลายในสาร 1X MOPS และ 2.2 M formaldehyde และย้ายลงสู่แผ่น nylon ปฏิบัติ hybridization กับ DIG-RNA antisense cathepsin B probe ทำเช่นเดียวกับใน southern hybridization แต่ที่อุณหภูมิ 68°C ภายหลังจากนั้นก็ถูกตรวจจับได้โดยสาร alkaline phosphatase และ CDP-star chemiluminescence

ผลการศึกษพบว่า cathepsin B probe ได้ยัดเกาะกับ gene transcript ที่ขนาดประมาณ 1.4 kb (รูปที่ 1.3-8C) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าจากความยาวประมาณ 1300 bp ที่คำนวณจากนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง coding region รวมกับส่วนปลายของ poly (A)⁺ กับปลาย 3' ที่เหลืออีกประมาณน้อยกว่า 100 bp เป็นส่วนที่เกินทางด้านปลาย 5' นอกจากนี้ผลการศึกษายังพบอีกว่า ยีน cathepsin B มีการแสดงออกที่แตกต่างกันในพยาธิแต่ละระยะ โดยยีน cathepsin B จะแสดงออกอย่างมากในพยาธิระยะตัวอ่อน metacercariae และ NEJ และจะเริ่มลดลงในพยาธิระยะตัวอ่อนที่กำลังเจริญเติบโตในตับ และจะเหลือน้อยมากในพยาธิระยะตัวเต็มวัย (รูปที่ 1.3-8 A-B)

1.3.4. การแสดงออกของยีน cathepsin B ในพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ระยะต่างๆ

การศึกษาในครั้งนี้กระทำเพื่อพิสูจน์การแสดงออกของยีน cathepsin B ทั้งสามในพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่ กล่าวคือยีน cathepsin B แต่ละตัวจะแสดงออกเฉพาะในพยาธิระยะใดระยะหนึ่งหรือว่ามีการแสดงออกในทุกระยะเพื่อกระทำบทบาทหน้าที่ร่วมกันในการต่อต้านปฏิกิริยาตอบสนองภูมิคุ้มกันจาก host เพื่อความอยู่รอด

การศึกษาจึงได้กระทำโดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) และ hybridization โดยอาศัย primers ที่จำเพาะต่อยีน cathepsin B ยีนใดยีนหนึ่ง การสังเคราะห์ primers ที่จำเพาะทำได้โดยการเรียงลำดับเบสของยีน cathepsin B ทั้งสาม และเลือกหาตำแหน่งที่ปรากฏเฉพาะในยีนใดยีนหนึ่ง แต่ไม่ปรากฏในยีนที่เหลือ (nonconserved region) มา 2 ตำแหน่ง คู่ primers จำเพาะที่สังเคราะห์ขึ้นได้แสดงไว้ในตารางที่ 1.3-2 จากนั้นคู่ primers ที่จำเพาะนี้จะถูกนำมาใช้เพื่อเพิ่มปริมาณสาย fragment ของยีน cathepsin B โดยวิธี PCR ร่วมกับเอนไซม์ Taq DNA polymerase และ dNTPs โดยใช้ cDNA libraries เป็นสายต้นแบบ ปฏิกริยา PCR ทำในเครื่อง Thermal cycler ที่อุณหภูมิ 94°C, 54°C, 72°C นาน อุณหภูมิละ 1 นาทีเป็นจำนวน 30 รอบ จากนั้นผลิตผล PCR ที่ได้ถูกนำลงบนแผ่น nylon ด้วยวิธี capillary transfer ในสารละลาย 10X SSC จากนั้นนำแผ่นที่ได้มาอบที่อุณหภูมิ 80°C นาน 2 ชั่วโมง เพื่อให้สาย DNA ยึดเกาะกับแผ่น nylon ได้แน่นขึ้น ต่อมานำแผ่น nylon นี้มา hybridize กับ DIG RNA antisense cathepsin B probe ที่อุณหภูมิ 55°C ในสารละลาย hybridization แผ่น nylon ที่ได้ทำการ hybridize เสร็จแล้วถูกนำมาล้างในสารละลาย 2X SSC ผสมกับ 0.1% SDS ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง และต่อด้วยการล้างในสารละลายผสมของ 0.1X SSC กับ 0.1% SDS ที่อุณหภูมิ 45-65 °C นาน 15 นาทีอีก 2 ครั้ง ทั้งนี้เพื่อล้างเอา probe ที่ไม่ยัดเกาะกับสาย DNA ออก จากนั้นนำแผ่น nylon ลงแช่ในสารละลาย 1X blocking reagent (Roche) นาน 30 นาที และตามด้วยสารละลาย 1X blocking reagent ผสมกับ anti-DIG-Alkaline phosphatase conjugate ในอัตราส่วน 5000:1 นานอีก 30 นาที แผ่น nylon ถูกนำมาล้างอีกครั้งเพื่อกำจัด anti-DIG Alkaline phosphatase conjugate ที่ไม่เกาะกับ probe ออก ด้วยสารละลาย washing ซึ่งประกอบด้วยสารละลาย Maleic acid (1M Maleic acid, 0.15

M NaCl) ผสมกับ 0.3% Tween-20 เป็นเวลา 15 นาทีจำนวน 2 ครั้ง สุดท้ายแผ่น nylon ถูกกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาสีในสารละลาย Nitroblue tetrazolium salt (NBT)/ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP)

ผลการศึกษาในครั้งนี้ (แสดงในรูปที่ 1.3-9) พบว่า ยีน FG cat-B1 สามารถถูกตรวจจับได้ในพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ทั้ง 3 ระยะ (ตัวเต็มวัย, ตัวอ่อน newly excysted juvenile, metacercariae) ขณะที่ ยีน FG cat-B2, และยีน FG cat-B3 สามารถถูกตรวจจับได้เฉพาะในพยาธิระยะตัวอ่อน newly excysted juvenile และระยะ metacercariae จากผลการศึกษาครั้งนี้จะเห็นได้ว่า ยีน FG cat-B1 แสดงออกในพยาธิใบไม้ตับทั้ง 3 ระยะและอาจเป็นไปได้ว่าในทุกระยะของพยาธิชนิดนี้ ขณะที่ ยีน FG cat-B2 และยีน FG cat-B3 แสดงออกเฉพาะพยาธิใบไม้ตับในระยะ metacercariae และระยะตัวอ่อน newly excysted juvenile และจะหยุดสังเคราะห์เมื่อพยาธิเจริญถึงตัวเต็มวัย ทั้งนี้เป็นไปได้ว่า ยีน FG cat-B1 จะเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยอาหารของพยาธิ เช่นเดียวกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอนไซม์ชนิดอื่นๆ เช่น cathepsin L เนื่องจากเป็นยีนที่พยาธิชนิดนี้จำเป็นต้องใช้ในทุกระยะของช่วงอายุ ขณะที่ ยีน FG cat-B2 และยีน FG cat-B3 ที่แสดงออกในพยาธิเฉพาะระยะตัวอ่อน น่าจะมีบทบาทในการไชผ่านผนังลำไส้ของ host และการเคลื่อนที่ไปยังตับ เนื่องจากพยาธิใบไม้ตับระยะตัวอ่อนนี้มีเฉพาะระบบการหลั่งของสาร (secretory) และยังไม่มีการพัฒนาของระบบการดูดซึม (adsorptive) จึงทำให้เชื่อว่ายีนทั้งสองไม่น่าจะเกี่ยวข้องกับระบบย่อยอาหารของพยาธิ

ตารางที่ 1.3-2 คู่ primers ที่จำเพาะที่ใช้ในการวิเคราะห์ทาง PCR

ชุด	Primers	สายนิวคลีโอไทด์	ขนาดผลผลิต PCR
ชุดที่ 1	FG cat-B1(Forward)	5'-TCGTCGTAGACTATGTTCG-3'	810 bp
	FG cat-B1(Reverse)	5'-GTAAATCGTACTGACAGG-3'	
ชุดที่ 2	FG cat-B2(Forward)	5'-CACGGCGCCAGCCAGTGC-3'	506 bp
	FG cat-B2(Reverse)	5'-TGAATTTACCGGCCACG-3'	
ชุดที่ 3	FG cat-B3(Forward)	5'-TCCTCATAAACAAGGCTCG-3'	1087 bp
	FG cat-B3(Reverse)	5'-TCAGAATGCGAACACACG-3'	

1.3.5. การแสดงออกของยีน B ในเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ศึกษาโดยวิธี *in situ* hybridization

การวิเคราะห์ตำแหน่งของการแสดงออกของยีนทั้งสองในเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ซึ่งได้ทำโดยวิธี *in situ* hybridization วิธีการทำเริ่มจากการนำเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* มาทำการตรึงด้วยสาร 4% paraformaldehyde ที่ละลายใน phosphate buffer saline (PBS) นำมาผ่านกระบวนการซึมผ่านด้วยแอลกอฮอล์ แล้วนำมาทำการฝังใน paraffin ต่อมาชิ้นเนื้อจะถูกตัดให้มีขนาด

หนาที่ 10 ไมโครเมตร นำชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพยาธิที่ถูกตัดแล้วมา hybridize กับ RNA probe ของยีน cathepsin B ซึ่งถูกสังเคราะห์ขึ้นโดยวิธี *in vivo* transcription ของ DIG-RNA labeling kit (Roche) ที่อุณหภูมิ 45°C ในสารละลาย hybridization buffer (40% deionized formamide, 10% dextran sulfate, 1X Denhardt's solution, 4X SSC, 10 mM dithiothreitol, 1 mg/ml yeast t-RNA, 1 mg/ml denatured and sheared salmon sperm DNA) หลังจากนั้นจึงนำไปจุ่มแช่ใน anti-DIG alkaline phosphatase (1:1000) นาน 2 ชั่วโมง และนำไปทำปฏิกิริยากับสารละลาย NBT/BCIP เพื่อทำให้เกิดสี

ผลจากการทำ *in situ* hybridization ด้วย cathepsin B antisense RNA probe พบว่า cathepsin B สามารถตรวจพบได้ที่เนื้อเยื่อ caecal epithelium ของท่อทางเดินอาหารของพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ซึ่งรวมทั้งเนื้อเยื่อ tegumental epithelium ของท่อทางเดินอาหารส่วนบนด้วย และที่เซลล์ของเนื้อเยื่อผิว (tegument) (รูปที่ 1.3-10) นอกจากนี้ cathepsin B ยังถูกตรวจพบได้ในระบบสืบพันธุ์ของพยาธิ ทั้งที่เป็นของเพศผู้และเพศเมีย ซึ่งได้แก่ เซลล์ของ Mehlis gland เซลล์ของ prostate gland เซลล์ vitelline ภายในมดลูกและไข่ และเซลล์ spermatocytes ในอันทะเป็นต้น (รูปที่ 1.3-11) การกระจายตัวจากผลของการติดสีของ cathepsin B mRNA ในพยาธิตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์มีลักษณะคล้ายกับที่พบในพยาธิระยะตัวเต็มวัย คือมีการติดสีที่ตำแหน่งเนื้อเยื่อ caecum และที่เซลล์เนื้อเยื่อผิว ขณะที่ยังไม่พบการติดสีที่ระบบสืบพันธุ์เนื่องจากระบบดังกล่าวของพยาธิตัวอ่อนนี้ยังไม่พัฒนา จากการศึกษานี้จึงทำให้กล่าวได้ว่า cathepsin B เป็นเอนไซม์ใน caecum เช่นเดียวกับที่พบในพยาธิใบไม้ตับ *F. hepatica* และน่าจะมีความสำคัญในการไถ่ผ่านผนังลำไส้และเนื้อเยื่อต่างๆ ของ host ในระหว่างที่พยาธิตัวอ่อนเคลื่อนผ่านจากลำไส้มายังตับ การศึกษาในพยาธิตัวเต็มวัยครั้งนี้ทำให้เชื่อว่า cathepsin B น่าจะมีบทบาทที่เกี่ยวข้องในการสืบพันธุ์และระบบการป้องกันตัวของพยาธิด้วย

1.3.6. การศึกษาการกระจายตัวของโปรตีน cathepsin B ในเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* โดยแอนติบอดีที่สังเคราะห์ขึ้นจากวิธี cDNA immunization

แอนติบอดีต่อโปรตีน cathepsin B ได้สังเคราะห์ขึ้นโดยวิธี cDNA immunization โดยขั้นแรกทำการสังเคราะห์ recombinant plasmid DNA ที่มีชิ้นส่วนของยีน cathepsin B แทรกอยู่ภายใน โดยการขยายชิ้นส่วน open reading frame ของยีนนี้ด้วยวิธี PCR โดยใช้คู่ primer ที่จำเพาะต่อส่วนปลาย 5' และปลาย 3' ของยีนซึ่งมี restriction site ของเอนไซม์ *EcoRI* และ *XbaI* อยู่ จากนั้นทำการตัดชิ้นส่วน open reading frame นี้และ plasmid DNA ด้วยเอนไซม์ทั้งสอง และทำการเชื่อมต่อกับชิ้นส่วนดังกล่าวกับ plasmid DNA ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase plasmid DNA ที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้คือ pCI plasmid (รูปที่ 1.3-12) ซึ่งเป็น expression plasmid ที่นิยมใช้ตัวหนึ่ง

ก่อนจะทำการฉีดกระตุ้นในสัตว์ทดลอง recombinant pCI-cathepsin B plasmid ต้องถูกสกัดโดยใช้ Endofree plasmid extraction kit (QIAGEN) เพื่อกำจัดเอา endotoxin ของแบคทีเรียออกไป

การฉีดกระตุ้นในครั้งนี้ทำในหนูทดลอง mice โดยแบ่งเป็นกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วย pCI plasmid อย่างเดียวกับกลุ่มทดลองที่ฉีดด้วย recombinant cathepsin B cDNAs การกระตุ้นแต่ละครั้งจะฉีดในปริมาณ 100 ไมโครกรัม ทาง intramuscular route ตรงกล้ามเนื้อ quadriceps ระยะห่าง 2 สัปดาห์ จำนวนทั้งหมด 3 ครั้ง ในแต่ละครั้งทำการเก็บเลือดจากหางหนูโดยใช้ capillary tube แล้วนำมาทดสอบหาค่า titer ของแอนติบอดีโดยวิธี ELISA แอนติบอดีจากหนูทดลองที่ให้ค่า titer สูงสุดถูกนำมาใช้ในการศึกษาการกระจายของแอนติเจน cathepsin B ในเนื้อเยื่อของพยาธิใบไม้ตับโดยเทคนิคทาง immunofluorescence และ immunoperoxidase

เทคนิคทาง immunofluorescence

เนื้อเยื่อพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ถูกตรึงในสารละลายผสม 4% paraformaldehyde กับ 0.1 M Phosphate-buffered saline (PBS) นาน 4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นจึงนำไปฝังในสาร Tissue Freezing Medium และทำการตัดที่ความเย็น (cryosection) หนาประมาณ 8 ไมโครเมตร หลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อที่ตัดเรียบร้อยแล้วมาตรึงด้วย acetone ที่อุณหภูมิ -10°C นาน 10 นาที ทำให้แห้งแล้วจึงนำมาทำการป้องกันการจับเกาะที่ไม่จำเพาะ (nonspecific binding) ด้วยสารละลาย 0.1% glycine และ 4% BSA นานอย่างละ 30 นาทีตามลำดับ จากนั้นนำเนื้อเยื่อมาจุ่มแช่กับแอนติบอดีที่ได้สังเคราะห์ขึ้น และต่อด้วยแอนติบอดีตัวที่สอง FITC-conjugated goat antimouse IgG แล้วทำการทดสอบการเรืองแสง fluorescence ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ fluorescence

เทคนิคทาง immunoperoxidase

เนื้อเยื่อพยาธิใบไม้ตับถูกตรึงในสารละลายผสม 4% paraformaldehyde เช่นเดียวกับการศึกษาทาง immunofluorescence จากนั้นนำไปผ่านขั้นตอนการซึมผ่านด้วยแอลกอฮอล์และการฝังใน paraffin แล้วจึงทำการตัดที่ความหนาประมาณ 8 ไมโครเมตร เนื้อเยื่อที่ตัดเรียบร้อยแล้วนำมา deparafinized ด้วยสาร xylene แล้วจึงทำการอบในไมโครเวฟ เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง และทำการป้องกันการจับเกาะที่ไม่จำเพาะด้วยสาร 0.3% H₂O₂ และ normal goat serum นานอย่างละ 30 นาที จากนั้นนำเนื้อเยื่อมาจุ่มแช่กับแอนติบอดีที่ได้สังเคราะห์ขึ้น และต่อด้วยแอนติบอดีตัวที่สอง HRP-conjugated rabbit antimouse IgG แล้วทำการย้อมติดสีด้วยสารละลาย AEC จนกระทั่งสีที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างซับสเตรตกับ HRP เป็นที่น่าพอใจ จึงทำการ counter-stain ด้วยสารละลาย haematoxylin

ผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่า แอนติบอดีต่อ cathepsin B มีความจำเพาะต่อเนื้อเยื่อของพยาธิใบไม้ตับในส่วนเยื่อหุ้มท่อนทางเดินอาหาร ที่บริเวณเนื้อเยื่อผิว (tegument) ของพยาธิ และส่วนเนื้อเยื่อในระบบสืบพันธุ์ทั้งของเพศชายและหญิง การเรืองแสง fluorescence พบตรง cytoplasm ของท่อนทางเดินอาหารของพยาธิ ที่ภายในส่วนอันตะและไข่ และที่เซลล์ของ vitelline ภายในไข่ของพยาธิ รวมทั้งที่เซลล์เนื้อเยื่อผิวพยาธิและที่บริเวณขอบผิว (รูปที่ 1.3-13) การติดสี AEC ก็พบตรงท่อนทางเดินอาหารของพยาธิ ที่ภายในส่วนอันตะและไข่ และที่ตัวอสุจิภายในมดลูกของพยาธิ รวมทั้งที่เซลล์เนื้อเยื่อผิวพยาธิและที่

บริเวณขอบผิว (รูปที่ 1.3-14) ผลการศึกษาทาง immunofluorescence และ immunoperoxidase localization ที่ได้ในครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาทาง *in situ* hybridization จากการศึกษาที่สอดคล้องกันทั้งสองนี้จึงทำให้สามารถเข้าใจทิศทางการลำเลียงของเอนไซม์ cathepsin B จากแหล่งผลิตสู่แหล่งใช้งานได้อย่างคร่าวๆ ดังนี้คือ การสังเคราะห์เอนไซม์ cathepsin B เกิดขึ้นที่เนื้อเยื่อบุผิว caecal ของท่อทางเดินอาหารจากนั้นจะถูกลำเลียงออกมาสู่ตัวท่อเพื่อทำการย่อยสลายอาหารแล้วทำการดูดซึมต่อไป การสังเคราะห์เอนไซม์ cathepsin B ยังสามารถเกิดขึ้นได้ที่เนื้อเยื่อบุผิวของท่อทางเดินอาหารส่วนบนซึ่งเป็นชนิด tegumental-type และที่เซลล์ของเนื้อเยื่อผิว ซึ่งเอนไซม์ cathepsin B จากแหล่งนี้จะถูกลำเลียงออกมาเคลือบที่ผิวพยาธิเพื่อเป็นด่านในการต่อสู้กับภูมิคุ้มกันจาก host โดยการตัดและทำลาย immunoglobulin ที่จะเข้ามาทำลายพยาธิทางผิวเช่นกับผลรายงานจากการวิจัยอื่นๆ นอกจากนี้เอนไซม์ cathepsin B ยังถูกสังเคราะห์จากเซลล์ของ vitelline โดยตรงเพื่อใช้ในกระบวนการสร้างเปลือกไข่ ซึ่งเป็นที่น่าสนใจในบทบาทนี้ของเอนไซม์ cathepsin B อย่างมาก และคงจะต้องมีการศึกษากลไกทางชีวเคมีของเอนไซม์ cathepsin B ต่อเซลล์ของ vitelline รวมทั้งเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ของพยาธิต่อไป

1.3.7. การทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีน cathepsin B โดยการฉีดกระตุ้นทาง cDNA-pCI vectors

หนูทดลอง mice ได้ถูกนำมาใช้ในการทดสอบครั้งนี้ โดยแบ่งเป็นกลุ่มจำนวน 7 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่หนึ่งถึงสามเป็นกลุ่มควบคุม กลุ่มแรกเป็นกลุ่มที่ไม่มีการฉีดกระตุ้นด้วยสารใดๆ กลุ่มที่สองถูกฉีดด้วยสารละลาย TE อย่างเดียว กลุ่มที่สามถูกฉีดกระตุ้นด้วย pCI vector ส่วนกลุ่มที่สี่ถึงเจ็ดเป็นกลุ่มทดลอง กลุ่มที่สี่ฉีดกระตุ้นด้วย cathepsin B1-pCI plasmids กลุ่มที่ห้าฉีดกระตุ้นด้วย cathepsin B2-pCI plasmids กลุ่มที่หกฉีดกระตุ้นด้วย cathepsin B3-pCI plasmids และกลุ่มสุดท้ายฉีดกระตุ้นด้วย cathepsin B-pCI plasmids ที่ผสมรวมกันทั้งสามยีน การกระตุ้นแต่ละครั้งจะฉีดในปริมาณ 100 ไมโครกรัม ทาง intramuscular route ตรงกล้ามเนื้อ quadriceps ระยะห่าง 2 สัปดาห์ จำนวนทั้งหมด 3 ครั้ง และในขณะเดียวกันจะทำการเก็บเลือดจากหางหนูโดยใช้ capillary tube ที่ประมาณสองสัปดาห์ หลังจากการฉีดกระตุ้นแต่ละครั้ง แล้วนำมาทดสอบหาค่า titer ของแอนติบอดีโดยวิธี ELISA จากนั้นอีกสองสัปดาห์หลังจากการฉีดกระตุ้นครั้งสุดท้าย หนูทดลองเหล่านี้จะถูกป้อนทางปากด้วย metacercariae ของพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* จากนั้นอีกสี่สัปดาห์ ทำการฆ่าหนูทดลอง และเก็บพยาธิตัวอ่อน เพื่อนำมาเปรียบเทียบกับระหว่างพยาธิที่ได้จากหนูทดลองกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลอง และหาค่าประสิทธิภาพของวัคซีน (เทียบจากร้อยละของ protection) ค่าตัวแปรต่างๆ แสดงในตารางที่ 1.3-3

ค่า titer ของแอนติบอดีนำมาวัดที่ OD492 นาโนเมตร แสดงในรูปที่ 15 และปรากฏว่า ที่สัปดาห์ที่สองหลังจากการฉีดกระตุ้นครั้งสุดท้าย ค่า titer ของแอนติบอดีมีค่าประมาณ 37.75% (ELISA plate coat ด้วยแอนติเจนของ crude parasite) และประมาณ 18.5% (ELISA plate coat ด้วยแอนติเจนของ

recombinant *F. hepatica* cathepsin B) สูงกว่า preimmune sera ของแต่ละกลุ่มรวมทั้งซีรัมของกลุ่มควบคุม ซีรัมของหนูทดลองกลุ่มที่ฉีดกระตุ้นด้วย cathepsin B-pCI plasmids ผสมรวมกันแสดงค่า titer ของแอนติบอดีเพิ่มขึ้นตั้งแต่สัปดาห์ที่สองหลังจากการฉีดกระตุ้นครั้งแรก ในขณะที่ซีรัมของหนูทดลองกลุ่มที่ฉีดกระตุ้นด้วย cathepsin B2-pCI plasmids และ cathepsin B3-pCI plasmids แสดงค่า titer ของแอนติบอดีเพิ่มขึ้นตั้งแต่สัปดาห์ที่สองหลังจากการฉีดกระตุ้นครั้งสุดท้าย หรือสัปดาห์ที่หกหลังจากการกระตุ้นครั้งแรก จากตารางที่ 1.3-3 พบว่าค่าน้ำหนักอวัยวะต่างๆ ของหนูในกลุ่มควบคุมและทดลอง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) แต่พบว่าหนูกลุ่มทดลองแสดงค่าร้อยละของ protection เท่ากับ 26 % เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ฉีดกระตุ้นด้วยสารใดๆ และเมื่อนำมาเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ฉีดกระตุ้นด้วย TE buffer หรือ pCI vector แล้วพบว่าค่าร้อยละของ protection ลดลงเท่ากับ 2.8 %

ตารางที่ 1.3-3 ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักตัวและอวัยวะของหนูทดลองกลุ่มต่างๆ และร้อยละของ protection ของกลุ่มทดลองเทียบกับกลุ่มควบคุม

	Normal	TE	pCI	FG cat-B1	FG cat-B2	FG cat-B3	FG cat-B(mix)*
Number of mice	9	10	10	9	8	9	7
Mouse weight (g)	40.23 ± 1.61	37.12 ± 0.81	37.42 ± 1.25	38.85 ± 0.87	42.61 ± 1.21	40.55 ± 0.59	41.64 ± 2.36
Liver weight (g)	2.42 ± 0.12	2.07 ± 0.13	2.15 ± 0.14	2.34 ± 0.19	2.89 ± 0.24	2.66 ± 0.16	3.08 ± 0.29
Spleen weight (g)	0.34 ± 0.02	0.27 ± 0.03	0.30 ± 0.04	0.36 ± 0.05	0.46 ± 0.06	0.46 ± 0.05	0.52 ± 0.07
Worms	6.44 ± 1.55	4.90 ± 0.99	4.90 ± 0.82	4.78 ± 1.24	4.75 ± 1.03	4.67 ± 1.12	4.86 ± 1.16
Protection** (%)							
-compared to normal	-	23.91	23.91	25.78	26.24	27.48	24.53
-compared to TE/pCI	-	-	-	2.45	3.06	4.69	0.82
Worm size (cm)							
Length	0.35 ± 0.02	0.30 ± 0.02	0.33 ± 0.02	0.38 ± 0.02	0.39 ± 0.01	0.39 ± 0.01	0.52 ± 0.01
Width	0.16 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.22 ± 0.01

* Mice immunized with mixed FG cat-B vaccines were sacrificed at 5 weeks after challenge, while other immunized groups with individual FG cat-B vaccine were sacrificed at 4 weeks.

** Percentage of protection was calculated by the following formula: $[(A-B)/A] \times 100$

A = mean number of worms from the control group, B = mean number of worms from the experimental group

คำอธิบายรูปประกอบผลการวิจัยหัวข้อเรื่องที่ 1.3

- รูปที่ 1.3-1 ผลิตผล PCR ที่ได้จากการใช้ forward และ reverse primers ในการขยาย sequence ใน cDNA library ของพยาธิทั้ง 3 ระยะ โดยในช่องที่ 1 แสดงผลิตผลจาก cDNA library ของพยาธิระยะตัวเต็มวัย ช่องที่ 2 จาก cDNA library ของพยาธิระยะตัวอ่อน NEJ ช่องที่ 3 จาก cDNA library ของพยาธิระยะ metacercariae
- รูปที่ 1.3-2 फिल्म X-ray ภายหลังจากการ hybridize ด้วย cathepsin B probe
- รูปที่ 1.3-3 ผลการ submit ยีน FG cat-B1 ใน Data Base ซึ่งสามารถสืบค้นได้ในเว็บไซต์ NCBI
- รูปที่ 1.3-4 ผลการ submit ยีน FG cat-B2 ใน Data Base ซึ่งสามารถสืบค้นได้ในเว็บไซต์ NCBI
- รูปที่ 1.3-5 ผลการ submit ยีน FG cat-B3 ใน Data Base ซึ่งสามารถสืบค้นได้ในเว็บไซต์ NCBI
- รูปที่ 1.3-6 การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน cathepsin B จากพยาธิใบไม้ในตับ (FG cat-B1, FG cat-B2, FG cat-B3) เปรียบเทียบกับลำดับเบส ของยีน cathepsin B จากพยาธิใบไม้ในตับ *F. hepatica* (FH-U58000, FH-AJ488928, FH-Z22768) พยาธิใบไม้เลือด *S. japonicum* (SJ-X70968) *S. mansoni* (SM-M21309) และจากมนุษย์ (HS-L16510)
- รูปที่ 1.3-7 แสดงผลของ southern hybridization ของสารพันธุกรรม genomic DNA ด้วย cathepsin B probe สารพันธุกรรม genomic DNA ปริมาณ 5 ไมโครกรัมถูกตัดด้วย เอนไซม์ *EcoRI* (ช่องที่1) *PstI* (ช่องที่2) และ *EcoRI/PstI* (ช่องที่3) ก่อนการ hybridization ขณะที่ λ DNA ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI/HindIII* เป็น standard marker แสดงในช่องซ้ายมือ
- รูปที่ 1.3-8 แสดงผลของ Northern hybridization (A-B) แสดงสารพันธุกรรม total RNA (5 ไมโครกรัม) สกัดมาจากพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ระยะ metacercariae (ช่องที่ 1) NEJ (ช่องที่ 2) ตัวอ่อน 6 สัปดาห์ (ช่องที่ 3) และตัวเต็มวัย (ช่องที่ 4) และภายหลังจากการ hybridize ด้วย cathepsin B probe (B) ขณะที่ (C) แสดงสารพันธุกรรม total RNA (25 ไมโครกรัม) สกัดมาจากพยาธิตัวเต็มวัยและ hybridize ด้วย cathepsin B probe (high range RNA ladder , MBI Fermentas , แสดงด้านซ้ายมือ)

- รูปที่ 1.3-9 แสดงผลย้อมการ hybridize ผลิตผล PCR ด้วย cathepsin B probe ช่องที่ 1, 4, 7 เป็นผลิตผล PCR ที่ได้จากคู่ primers ของ FG cat-B1 ช่องที่ 2, 5, 9 เป็นผลิตผล PCR ที่ได้จากคู่ primers ของ FG cat-B2 ช่องที่ 3, 6, 9 เป็นผลิตผล PCR ที่ได้จากคู่ primers ของ FG cat-B3 โดยในช่องที่ 1, 2, 3 ใช้ cDNA library ของพยาธิใบไม้ตับระยะตัวเต็มวัยเป็นสายต้นแบบ ช่องที่ 4, 5, 6 ใช้ cDNA library ของพยาธิใบไม้ตับระยะตัวอ่อน newly excysted juvenile เป็นสายต้นแบบ ช่องที่ 7, 8, 9 ใช้ cDNA library ของพยาธิใบไม้ตับระยะ metacercariae เป็นสายต้นแบบ
- รูปที่ 1.3-10 การกระจายตัวของ cathepsin B mRNA ในพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* พบที่เนื้อเยื่อส่วน caecum (Ca) เยื่อบุผิวของท่อทางเดินอาหารชนิด tegumental-type (Tt) เนื้อเยื่อผิว (Tg) อังทะ (Te) เซลล์ของต่อม vitelline (Vg) เมื่อเทียบกับ negative control (E) และพยาธิตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ (B)
- รูปที่ 1.3-11 การกระจายตัวของ cathepsin B mRNA ในระบบสืบพันธุ์ของพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ตัวเต็มวัย พบที่เซลล์ของต่อมลูกหมาก (Pg) ถุง cirrus (Ci) ช่องสืบพันธุ์เพศหญิง (female genital canal) (Fc) เซลล์ของต่อม Mehlis' (Mg) เซลล์ vitelline ในไข่ (D) และเซลล์ภายในอังทะ (E)
- รูปที่ 1.3-12 โครงสร้างและส่วนประกอบของ pCI mammalian expression vector
- รูปที่ 1.3-13 แสดงการเรืองแสง fluorescence ในเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ภายหลังจากการทำ immunolocalization ด้วยแอนติบอดีต่อ cathepsin B (ภาพ B-F) เปรียบเทียบกับตัวควบคุม (A) ซึ่งเป็นแอนติบอดีก่อนการฉีดกระตุ้น การเรืองแสงเกิดขึ้นที่เนื้อเยื่อท่อทางเดินอาหาร (B) เซลล์ของอังทะ (B-C) เซลล์ vitelline ภายในต่อม vitelline (C) เซลล์ของไข่ (D) เซลล์ vitelline ภายในไข่และมดลูก (E-F)
- รูปที่ 1.3-14 แสดงการย้อมติดสี AEC ในเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ภายหลังจากการทำ immunolocalization ด้วยแอนติบอดีต่อ cathepsin B ที่ได้จากการทำ cDNA immunization ที่บริเวณเนื้อเยื่อท่อทางเดินอาหาร (B) เซลล์ของอังทะ (C) เซลล์ vitelline ภายในต่อม vitelline (D) เซลล์ vitelline และตัวอสุจิภายในมดลูก (E) เซลล์ของรังไข่ (F)

รูปที่ 1.3-15 แสดงค่า titer ของแอนติบอดีของหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง ELISA plate coat ด้วยแอนติเจนของ crude adult (panel A) coat ด้วยแอนติเจนของ crude 6 week-old (panel B) coat ด้วยแอนติเจนของ recombinant *F. hepatica* cathepsin B (panel C) ค่า titer ของแอนติบอดีวัดที่ OD492 แสดงบนแกน Y และสัปดาห์หลังจากการกระตุ้น แสดงบนแกน X

