รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์
ทุนอุดหนุนการวิจัยเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2552

ชื่อแผนการวิจัย (Research Program)

(ภาษาไทย) การศึกษาภูมิคุ้มกันวิทยาเชิงลึกของโรคเท้าช้าง: มุ่งสู่การป้องกันภาวะเท้าช้างและการกำจัดโรคอย่างถาวร

(ภาษาอังกฤษ) Advanced immunological study of lymphatic filariasis: Towards prevention of chronic pathology and permanent disease elimination

ผู้วิจัยหลัก / หัวหน้าโครงการ

ศ.พญ.ดร.สุรางค์ นุชประยูร คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะผู้ร่วมวิจัย

รศ.ดร.จินตนา จิรถาวร คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นพ.ดร.อนุพงศ์ สุจริยากุล กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข

น.ส.วิวรพรรณ สรรประเสริฐ หน่วยปฏิบัติการวิจัยโรคเท้าช้าง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

น.ส.อลิสา จันทร์ปี หน่วยปฏิบัติการวิจัยโรคเท้าช้าง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนโดยทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2552 ขอขอบพระคุณ ศ. นพ. ยง ภู่วรวรรณ และ นพ.สราวุธ สุวัณณทัพพะ ที่ให้คำแนะนำที่มีประโยชน์แก่โครงการ ขอขอบคุณนายสุเทพ มณเฑียรทอง นายกฤษณะ สุขอ่วม นายไทยบุญยงค์ พ่วงพี และเจ้าหน้าที่ประจำศูนย์โรคติดต่อนำโดยแมลงที่ 8.3 แม่สอด อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างภาคสนาม และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่หน่วยปฏิบัติการวิจัยโรคเท้าช้าง และศูนย์วิจัยคณะแพทยศาสตร์ (CHULA-MRC) ตลอดจนเจ้าหน้าที่ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือด้านเทคนิคทางห้องปฏิบัติการ

บทคัดย่อ

โรคเท้าช้าง (Lymphatic filariasis) เกิดจากพยาธิ 2 ชนิดหลัก คือ *Wuchereria bancrofti* และ *Brugia malayi* ทางองค์การอนามัยโลกได้กำหนดให้โรคเท้าช้างเป็นโรคทางปรสิตที่ควรกำจัดให้หมดไปภายในปี พ.ศ. 2563 โดยมีแนวทางหลักในการควบคุมและป้องกันโรคเท้าช้างคือการจัดให้มีโปรแกรมการรักษาแบบหมู่ โดยให้ยา diethylcarbamazine (DEC) ร่วมกับยา albendazole แก่ประชากรในพื้นที่ที่มีความชุกของโรคสูง และการควบคุมพยาธิภาวะ ปัญหาที่สำคัญของการรักษาโรคเท้าช้าง คือ การใช้ยา DEC ที่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาหลังการรักษา กลไกของการเกิดพยาธิสภาพของโรคและการเกิดปฏิกิริยาหลังการรักษายังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดได้ จึงเป็นอุปสรรคที่สำคัญอย่างยิ่งต่อการกำจัดโรค การศึกษาภูมิคุ้มกันวิทยาเชิงลึกของโรคเท้าช้างจะช่วยให้การกำจัดโรคสำเร็จลงได้อย่างยั่งยืน ผลการศึกษาในปีที่ 3 นี้ ได้ศึกษารูปแบบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันหลังการรักษาโรคเท้าช้าง โดยวัดระดับไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ได้แก่ interleukin (IL)-6 และ tumor necrosis factor (TNF)-α ในผู้ป่วยกลุ่มที่มีปฏิกิริยาหลังการรักษาน้อย (mild) ปฏิกิริยาหลังการรักษาปานกลาง (moderate) และปฏิกิริยาหลังการรักษาชนิดรุนแรง (severe) หลังการรักษาด้วยยา DEC เมื่อเปรียบเทียบกันระดับไซโตไคน์ในกระแสเลือดก่อนการรักษาด้วยยา DEC พบว่าผู้ป่วยโรคเท้าช้างมีระดับ IL-6 และ TNF-α สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังการรักษา ($P < 0.05$) โดยพบว่าระดับของไซโตไคน์ IL-6 สอดคล้องกับระดับความรุนแรงของปฏิกิริยาหลังการรักษา ในขณะที่ระดับ ไซโตไคน์ TNF-α สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเฉพาะในกลุ่มผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่เกิดปฏิกิริยาหลังการรักษาชนิดรุนแรงเท่านั้น สำหรับการวัดระดับไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการต้านการอักเสบ IL-10 มีระดับสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเฉพาะในกลุ่มผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่เกิดปฏิกิริยาหลังการรักษาชนิดปานกลางและชนิดรุนแรงเท่านั้น โดยถูกปล่อยออกมาในระดับสูงสุดที่เวลา 12-24ชั่วโมงหลังการรักษา ในขณะที่ ระดับไซโตไคน์ IL-12 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังการรักษา และไม่พบความสัมพันธ์ของระดับของไซโตไคน์กับระดับความรุนแรงของปฏิกิริยาหลังการรักษา (โครงการย่อยที่ 1) และจากการทบทวนวรรณกรรมตลอดจนค้นหาจากฐานข้อมูลได้พบยีน peptidoglycan-associated lipoprotein (*pal*) มีความน่าสนใจที่ใช้ศึกษาทางอิมมูนวิทยาต่อไป จึงได้ทำการโคลนและสร้างโปรตีนบริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการ และวัดระดับแอนติบอดีชนิดต่างๆ ที่จำเพาะต่อโปรตีน PAL ในกระแสเลือดของผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่มีการติดเชื้อปัจจุบัน (active infections) ทั้งผู้ป่วยที่ตรวจพบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด (Ag+/Mf+) และตรวจไม่พบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด (Ag+/Mf-) กลุ่มผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่มีพยาธิสภาพเรื้อรัง (chronic pathology; CP) ตลอดจนกลุ่มคนปกติที่อาศัยอยู่ในแหล่งชุกชุมของโรคเท้าช้าง (endemic normals; EN) (Ag-/Mf-) พบว่าแอนติบอดีชนิด IgG3 ที่จำเพาะต่อ

โปรตีน PAL มีระดับสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มการติดเชื้อปัจจุบัน ซึ่งตรวจพบแอนติเจนที่จำเพาะต่อพยาธิโรคเท้าช้าง (Ag+/Mf- และ Ag+/Mf+) เปรียบเทียบกับระดับของแอนติบอดีในกลุ่มคนปกติที่อาศัยอยู่ในแหล่งชุกชุมของโรคเท้าช้าง (P = 0.003) โดยพบการสูงขึ้นของระดับแอนติบอดีอย่างมีนัยสำคัญในผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่ตรวจพบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด (Ag+/Mf+) (P = 0.04) (โครงการย่อยที่ 2) สำหรับการศึกษาความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน toll-like receptor 2 (*tlr-2*) กับความไวรับและการเกิดพยาธิสภาพของโรคเท้าช้าง ได้ตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *TLR2* แบบ -197 to -174 ins/del ซึ่งอยู่ในบริเวณ 5' untranslated region (5'UTR) โดยใช้เทคนิค allele-specific polymerase chain reaction (AS-PCR) และตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมแบบการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์เพียงตำแหน่งเดียว (single nucleotide polymorphisms; SNPs) ของยีน *TLR2* แบบ +597 T/C และ +1350 T/C ในบริเวณ exon 3 โดยใช้เทคนิค polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis (PCR-RFLP) พบว่าความถี่จีโนไทป์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมทั้ง 3 ตำแหน่งที่ทดสอบ -197 to -174 ins/del, +597 T/C, และ +1350 T/C อยู่ในสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (P>0.05) อัลลีล -197 to -174del สัมพันธ์กับความเสี่ยงที่จะเป็นโรคเท้าช้าง ([P = 0.005], OR= 2.21 [95% CI = 1.25-3.92] อัลลีล +597C และ +1350C เพิ่มความเสี่ยงต่อการติดเชื้อโรคเท้าช้าง ([P = 0.001], OR= 2.58 [95% CI = 1.40-4.75], และ [P = 0.0121], OR= 2.37 [95% CI = 1.19-4.77], ตามลำดับ) นอกจากนี้ยังพบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมทั้ง 3 ตำแหน่งถ่ายทอดไปร่วมกัน *TLR2* haplotype แบบ -197 to -174del/+597C/+1350C (delCC) สัมพันธ์กับความไวรับโรคเท้าช้างอย่างมีนัยสำคัญ จากการพยากรณ์โดยใช้ซอฟแวร์ Mfold พบว่า RNA ของ -197 to -174 del มีความเสถียรน้อยกว่า RNA ของ -197 to -174 ins อย่างมีนัยสำคัญ การศึกษานี้เป็นการศึกษาทางด้านระบาดวิทยาเชิงพันธุศาสตร์เบื้องต้นซึ่งชี้ให้เห็นว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *TLR2* แบบ -197 to -174 ins/del, +597 T/C, และ +1350 T/C มีความสัมพันธ์กับความไวรับโรคเท้าช้าง (โครงการย่อยที่ 3)

Abstract

Lymphatic filariasis, caused by *Wuchereria bancrofti* and *Brugia malayi*, is targeted to be eliminated globally as a public health problem by the year 2020. The main intervention tool employed by the national elimination program is mass drug administration (MDA) of diethylcarbamazine (DEC) and albendazole to endemic populations, and control of morbidity. One of the serious concerns with this mass chemotherapeutic approach to control lymphatic filariasis is that it can be accompanied by adverse reactions, thus, compromising compliance. However, the exact etiology of the adverse reactions is largely unknown. Advanced researches on immunology, and pathogenesis in lymphatic filariasis are needed to develop potential tools to sustain success in lymphatic filariasis elimination. In this study, the lymphatic filariasis immune response patterns after treatment were studied. The inflammatory cytokines; interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor (TNF)-α; levels were determined in patients with mild, moderate, and severe adverse reactions after treatment with DEC. The levels of IL-6 and TNF-α were significantly increased at 24 hours after treatment. While the levels of IL-6 were correlated with the severity of the adverse reactions, the levels of TNF-α were increased only in patients with severe adverse reactions. The levels of anti-inflammatory cytokine (:- IL-10) were significantly increased in patients with moderate and severe adverse reaction at 12-24 hours after treatment, while the regulatory cytokine (:- IL-12) levels were significantly decreased at 24 hours after treatment. But no correlation between the IL-12 levels and the severity of adverse reactions was observed (subproject 1). Analysis of available database suggested that peptodiglycan-associated lipoprotein (*pal*) was a candidate gene for immunological study (subproject 2). The protein was cloned and expressed in the laboratory. Anti-PAL antibody responses were assayed in blood samples collected from the lymphatic filariasis patients. The anti-PAL IgG3 antibodies were significantly increased in the patients with active infection ($P = 0.003$). In addition, anti-WSP IgG1 antibody was significantly increased in the microfilaremic patients ($P = 0.02$) (subproject 2). The results of our study indicate that *TLR2* -196 to -174 ins/del, +597 T/C, and +1350 T/C polymorphisms associated with bancroftian filariasis in Thailand (subproject 3).

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อ	3
Abstract	5
สารบัญ	6
สารบัญตาราง	7
สารบัญภาพ	8
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	9
บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	10
วัตถุประสงค์	16
ขอบเขตการวิจัย	17
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	18
วิธีดำเนินการวิจัย	
รูปแบบการวิจัย	19
การกำหนดพื้นที่ และ ประชากรเป้าหมาย	19
วัตถุตัวอย่างในการวิจัย	19
การเก็บรวบรวมข้อมูล	19
สถานที่ทำการทดลองและเก็บข้อมูล	19
ขั้นตอนการดำเนินงาน	20
ผลการวิจัย	25
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	47
บรรณานุกรม	49
ประวัตินักวิจัยและคณะ	54
ภาคผนวก	72

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ความถี่อัลลีลและความถี่จีโนไทป์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *TLR2* ในผู้ป่วยโรคเท้าช้างและในกลุ่มควบคุม	42
ตารางที่ 2	ค่าสัมประสิทธิ์ Linkage disequilibrium ($\|D'\|$) ในกลุ่มความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *TLR2*	44
ตารางที่ 3	ความถี่ Haplotype ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *TLR2* (-197 to -174 ins/del, +597 T/C และ+1350 T/C) ในผู้ป่วยโรคเท้าช้างและในกลุ่มควบคุม	45

สารบัญภาพ

		หน้า
รูปที่ 1	ระดับของไซโตไคน์ IL-6 ในกระแสเลือดของผู้ป่วยโรคเท้าช้างหลังการรักษาด้วยยา diethylcarbamazine	27
รูปที่ 2	ระดับของไซโตไคน์ TNF-α ในกระแสเลือดของผู้ป่วยโรคเท้าช้างหลังการรักษาด้วยยา diethylcarbamazine	28
รูปที่ 3	ระดับของไซโตไคน์ IL-10 ในกระแสเลือดของผู้ป่วยโรคเท้าช้างหลังการรักษาด้วยยา diethylcarbamazine	29
รูปที่ 4	ระดับของไซโตไคน์ IL-12 ในกระแสเลือดของผู้ป่วยโรคเท้าช้างหลังการรักษาด้วยยา diethylcarbamazine	30
รูปที่ 5	โปรตีน peptidoglycan associated lipoprotein (PAL) ที่แยกให้บริสุทธิ์	32
รูปที่ 6	ค่า optical density ที่ความยาวช่วงคลื่นแสง 450 nm (OD450) ในการวัดระดับแอนติบอดี ชนิด IgM ที่จำเพาะต่อโปรตีน peptidoglycan associated lipoprotein (PAL) ในกระแสเลือดของผู้ป่วยโรคเท้าช้าง	34
รูปที่ 7	ค่า optical density ที่ความยาวช่วงคลื่นแสง 450 nm (OD450) ในการวัดระดับแอนติบอดี ชนิด IgG1 ที่จำเพาะต่อโปรตีน peptidoglycan associated lipoprotein (PAL) ในกระแสเลือดของผู้ป่วยโรคเท้าช้าง	35
รูปที่ 8	ค่า optical density ที่ความยาวช่วงคลื่นแสง 450 nm (OD450) ในการวัดระดับแอนติบอดี ชนิด IgG2 ที่จำเพาะต่อโปรตีน peptidoglycan associated lipoprotein (PAL) ในกระแสเลือดของผู้ป่วยโรคเท้าช้าง	36
รูปที่ 9	ค่า optical density ที่ความยาวช่วงคลื่นแสง 450 nm (OD450) ในการวัดระดับแอนติบอดี ชนิด IgG3 ที่จำเพาะต่อโปรตีน peptidoglycan associated lipoprotein (PAL) ในกระแสเลือดของผู้ป่วยโรคเท้าช้าง	37
รูปที่ 10	ค่า optical density ที่ความยาวช่วงคลื่นแสง 450 nm (OD450) ในการวัดระดับแอนติบอดี ชนิด IgG4 ที่จำเพาะต่อโปรตีน peptidoglycan associated lipoprotein (PAL) ในกระแสเลือดของผู้ป่วยโรคเท้าช้าง	38
รูปที่ 11	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอหลังจากนำไปวิ่งผ่านกระแสไฟฟ้า และ Chromatogram จากการทำ DNA sequencing ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *TLR2*	40

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

DEC	=	Diethlycarbamazine
EDTA	=	Ethylenediamine tetraacetic acid
ELISA	=	Enzyme-linked immunosorbent assay
ICT	=	Immunochromatographic test
IL-6	=	Interleukin-6
ITFDE	=	International Task Force of Disease Eradication
MDA	=	Mass Drug Administration
ml	=	Milliliter
PBS	=	Phosphate Bufferd Saline
pg	=	Picogram
pRBCs	=	Packed red blood cells
SNPs	=	Single Nucleotide Polymorphisms
TLR	=	Toll-Like Receptor
TNF-α	=	Tumor Necrosis Factor-Alpha
WHO	=	World Health Organization

บทนำ

❑ ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ปัญหาการอุบัติใหม่ของโรคเท้าช้าง: ภาวะคุกคามสู่ประชากรไทย

โรคเท้าช้าง (Lymphatic filariasis) ซึ่งเกิดจากหนอนพยาธิ 2 ชนิดหลักคือ *Wuchereria bancrofti* และ *Brugia malayi* ซึ่งเป็นปัญหาทั้งระดับชาติและนานาชาติ ผู้ติดพยาธิโรคเท้าช้างส่วนมากจะไม่ปรากฏอาการ แต่จะมีพยาธิโรคเท้าช้างตัวเต็มวัยอยู่ในระบบทางเดินน้ำเหลือง และปล่อยตัวอ่อนระยะไมโครฟิลาเรีย (microfilaria) ออกมาสู่กระแสเลือด ทำให้สามารถแพร่เชื้อสู่ผู้อื่นได้โดยมียุงเป็นพาหะ จากการที่มักไม่ปรากฏอาการของโรค ผู้ป่วยจึงไม่ได้รับการรักษาตั้งแต่ระยะแรก จนกระทั่งเกิดพยาธิสภาพที่ก่อให้เกิดความพิการและทุพพลภาพอย่างถาวร ไม่สามารถกลับสู่สภาวะปกติได้ ผู้ป่วยจึงไม่สามารถดำเนินกิจวัตรประจำวันได้เป็นปกติ ก่อให้เกิดการว่างงานและการสูญเสียรายได้ทั้งในระดับบุคคล ครอบครัว และชุมชน เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจและสังคม และส่งผลกระทบต่อการพัฒนาความเจริญและเศรษฐกิจของประเทศชาติและประชาคมโลกไม่ต่ำกว่าแสนล้านบาทต่อปี ทางองค์การอนามัยโลกได้กำหนดให้โรคเท้าช้างเป็นโรคทางปรสิตที่ควรกำจัดให้หมดไปเป็นโรคแรกภายในปี พ.ศ. 2563 ในประเทศไทยเองโดยกระทรวงสาธารณสุขได้จัดให้มีโครงการการกำจัดโรคเท้าช้างในปี พ.ศ. 2545-2549 และมีการประเมินผลในปี พ.ศ. 2550 โรคเท้าช้างในประเทศไทยจำกัดอยู่ในแหล่งโรคชุกชุมสูงในบางพื้นที่ โดยเฉพาะเขตชายแดนไทย-พม่า (จากพยาธิโรคเท้าช้าง *W. bancrofti* rural strain) และภาคใต้ (จากพยาธิโรคเท้าช้าง *B. malayi*) นอกจากนี้ ปัญหาแรงงานต่างด้าว โดยเฉพาะแรงงานชาวพม่าที่มีอัตราการตรวจพบเชื้อพยาธิโรคเท้าช้าง *W. bancrofti* urban strain ที่นำโดยยุงรำคาญในระดับสูง แม้ว่ายุงรำคาญของไทยจะไม่เคยมีรายงานว่านำโรคได้ตามธรรมชาติ แต่พบว่ามีความสามารถในการเป็นพาหะนำโรคเท้าช้างสายพันธุ์พม่าในห้องปฏิบัติการ และเนื่องจากตามเมืองใหญ่ เช่น กรุงเทพมหานครจะมีแหล่งน้ำเสียที่เป็นแหล่งเพาะพันธุ์ยุงรำคาญมาก ทำให้คนไทยมีความเสี่ยงที่จะติดโรคเท้าช้างจากพยาธิสายพันธุ์พม่าที่จะเป็นโรคอุบัติใหม่ (re-emerging disease) ถ้าไม่มีมาตรการการควบคุมและป้องกันที่เพียงพอ

ปัญหาด้านอิมมูนวิทยา การควบคุมและรักษาโรคเท้าช้าง

แนวทางการควบคุมและป้องกันโรคเท้าช้างขององค์การอนามัยโลก มีหลัก 2 ประการ ได้แก่ (1) การควบคุมการแพร่เชื้อ (control of transmission) โดยการจัดให้มีโปรแกรมการรักษาแบบหมู่ (mass drug administration; MDA) ในพื้นที่ที่มีความชุกของโรคสูง โดยการให้ยารักษาโรคเท้าช้างแก่ประชาชนทุกคนในพื้นที่ทุก 6 เดือน หรือทุกปี และ (2) การควบคุมพยาธิภาวะ (control morbidity) คือการควบคุมการอักเสบของต่อมและทางเดินน้ำเหลือง เพื่อป้องกันการเกิดภาวะเท้าช้างที่เป็นภาวะทุพพลภาพถาวรของผู้ติดเชื้อ

ยารักษาโรคเท้าช้างในปัจจุบัน คือ ยา Diethylcarbamazine (DEC) ซึ่งแม้ว่ายา DEC จะมีประสิทธิภาพสูงในการทำลายไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด (microfilaricidal effect) โดยมีผลทำให้ปลอกหุ้มตัว (sheath) ของพยาธิลอกหลุด และเกิดการสลายของออร์แกเนลล์ (organelle) ในเซลล์ของไมโครฟิลาเรีย อย่างไรก็ตาม ยาไม่สามารถทำลายตัวเต็มวัย (macrofilaricidal effect) ได้ทั้งหมด จึงทำให้ไม่สามารถรักษาโรคให้หายขาดได้ จำเป็นต้องมีการให้การรักษาซ้ำหลายครั้ง

ปัญหาที่สำคัญของการใช้ยา DEC อีกประการคือ การเกิดปฏิกิริยาหลังการรักษา (drug-associated adverse reaction) เช่น ปวดศีรษะ มีไข้ อ่อนเพลีย มึนงง เบื่ออาหาร คลื่นไส้ และอาเจียน บางรายเป็นมากจนต้องเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล ซึ่งส่งผลให้ได้รับความร่วมมือในการรักษาลดลงกว่า 50% จึงเป็นอุปสรรคที่สำคัญต่อการกำจัดและควบคุมป้องกันโรคเป็นอย่างมาก กลไกการเกิดปฏิกิริยาหลังการรักษานี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่สันนิษฐานว่าเกิดจากแอนติเจนที่ปลดปล่อยออกมาอย่างมากมายจากตัวพยาธิที่กำลังจะตายหรือพยาธิที่ตายแล้วเนื่องจากฤทธิ์ของยาที่ได้รับเข้าไป ซึ่งแอนติเจนที่ปล่อยออกมานี้เป็นตัวกระตุ้นให้มีการสร้าง pro-inflammatory cytokines ต่างๆ จนทำให้เกิดปฏิกิริยาหลังการรักษาดังกล่าว นอกจากนี้ จากการพบ CD4+ T cells กลุ่มใหม่คือ T regulatory-(Tr) cell ซึ่งทำหน้าที่ยับยั้งการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกัน โดยการหลั่ง IL-10 และ TGF-β และพบบทบาทของ Tr cell ที่จำเพาะต่อการติดเชื้อพยาธิฟิลาเรีย *Onchocera volvulus* ที่ทำให้เกิดการกดระบบภูมิคุ้มกันในผู้ที่ติดเชื้อ แต่ยังไม่มีรายงานการศึกษากลไกการควบคุมการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของเซลล์กลุ่มนี้ในการติดเชื้อพยาธิโรคเท้าช้างทั้ง *W. bancrofti* และ *B. malayi* มาก่อน

อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาวิจัยในปัจจุบันหรือข้อมูลที่สนับสนุนที่จะอธิบายการเกิดปฏิกิริยาหลังการรักษานี้ยังไม่เพียงพอในการอธิบายโมเลกุลสาเหตุที่แน่ชัด ดังนั้น การศึกษาถึง

โมเลกุลที่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาหลังการรักษา จึงเป็นสิ่งจำเป็นและเป็นประโยชน์ อันจะนำไปสู่การศึกษาถึงวิธีป้องกันการเกิดปฏิกิริยาหลังการรักษาดังกล่าว ซึ่งจะส่งผลให้การควบคุม ป้องกันและกำจัดโรคในโครงการกำจัดโรคเท้าช้างสำเร็จได้ตามเป้าหมาย

<u>การวิจัยทางอิมมูนวิทยาเชิงลึกเพื่อป้องกันภาวะทุพพลภาพโรคเท้าช้าง</u>

- ***พยาธิกำเนิดของโรคเท้าช้าง***

การดำเนินโรคของโรคเท้าช้างจะเป็นไปอย่างช้าๆ โดยใช้ระยะเวลานานหลายปีจนเกิดภาวะเท้าช้างในที่สุด แม้ว่าโรคเท้าช้างจะไม่เป็นอันตรายถึงชีวิต แต่พยาธิสภาพในระยะเรื้อรังของโรคเป็นสาเหตุของความทุพพลภาพเป็นอันดับสองของโลกที่ก่อให้เกิดความพิการอย่างถาวรซึ่งไม่สามารถกลับเป็นปกติได้ ดังนั้น การเข้าใจถึงกลไกการเกิดพยาธิสภาพของโรคจะมีประโยชน์อย่างยิ่งเพื่อการป้องกันและควบคุมการเกิดพยาธิสภาพเรื้อรังของโรคเท้าช้าง อย่างไรก็ตาม โรคเท้าช้างเป็นโรคติดเชื้อที่มีกลไกการเกิดพยาธิสภาพซับซ้อนที่สุดโรคหนึ่ง เนื่องจากพยาธิโรคเท้าช้างมีวงชีวิตที่ซับซ้อน อาศัยโฮสต์ตัวกลางหลายชนิด อีกทั้งมีกลไกการหลบหลีกการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่หลากหลาย ซึ่งข้อมูลสนับสนุนในปัจจุบันไม่เพียงพอในการอธิบายให้แน่ชัดถึงสาเหตุและกลไกการเกิดพยาธิสภาพของโรคเท้าช้าง ผลการศึกษาวิจัยในปัจจุบันชี้ให้เห็นว่าพยาธิสภาพของโรคในผู้ป่วยแต่ละรายจะแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ ผลของพยาธิโรคเท้าช้างโดยตรงต่อระบบทางเดินน้ำเหลือง การระคายเคืองของทางเดินน้ำเหลืองและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อสารต่าง ๆ ที่พยาธิหลั่งออกมา รวมทั้งการติดเชื้อซ้ำ (secondary infections) จากแบคทีเรียและเชื้อรา โดยเฉพาะในบริเวณที่เท้าบวมโต ทำให้เกิดพยาธิสภาพความรุนแรงของโรคมากขึ้น ดังนั้นการศึกษาถึงปัจจัยที่เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพจึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง อันจะนำไปสู่การศึกษาถึงวิธีป้องกันการเกิดพยาธิสภาพของโรค ตามนโยบายขององค์การอนามัยโลก ซึ่งจะส่งผลให้การควบคุมและป้องกันโรคในโครงการกำจัดโรคเท้าช้างของไทยและองค์การอนามัยโลกประสบผลสำเร็จได้

- ***การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของโรคเท้าช้าง***

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อพยาธิโรคเท้าช้างจะต่างจากโรคติดเชื้ออื่นๆ ซึ่งการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันมักจะสอดคล้องกับปริมาณของเชื้อที่ก่อโรค แต่สำหรับโรคเท้าช้างในผู้ป่วยซึ่งพบไมโครฟิลาเรียแต่ไม่มีอาการแสดงของโรค มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อแอนติเจน

ของพยาธิน้อย (antigen specific hyporesponsiveness) ในขณะที่ในผู้ป่วยที่มีอาการเรื้อรังซึ่งมักไม่พบไมโครฟิลาเรียจะมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อแอนติเจนของพยาธิสูง

ผลจากการศึกษารูปแบบไซโตไคน์ของผู้ป่วยโรคเท้าช้างในปัจจุบันยังให้ผลที่แตกต่างกันไป แต่ในเบื้องต้นพบว่าผู้ป่วยที่ไม่มีอาการจะมีระดับของไซโตไคน์จาก T helper cells ชนิดที่ 1 (Th1 cells) (เช่น interferon-gamma; IFN-□ และ Tumor Necrosis Factor-Alpha;□TNF-□) ต่ำ ส่วนในผู้ป่วยเรื้อรังมีการสร้างไซโตไคน์จาก Th1 cells สูงขึ้น จึงเชื่อว่าไมโครฟิลาเรียมีแอนติเจนที่กดการกระตุ้น Th1 cells จึงทำให้ผู้ป่วยไม่มีอาการแสดงเกิดขึ้น และไม่สามารถกำจัดพยาธิออกจากร่างกายได้ ในทางกลับกัน ผู้ป่วยโรคเท้าช้างเรื้อรังซึ่งมักจะตรวจไม่พบไมโครฟิลาเรียจะกลับมีการตอบสนองทางด้าน Th1 สูงขึ้นซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดพยาธิสภาพต่างๆ แม้ว่าการศึกษาต่างๆ จะชี้ได้ว่าการตอบสนองของ T helper cells มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการเกิดพยาธิสภาพของโรคเท้าช้าง แต่ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่าภูมิคุ้มกันที่สามารถป้องกันโรคได้ (protective immune response) เป็น Th cells ชนิด Th1 หรือ Th2 อีกทั้งในปัจจุบันยังมีการพบ Tr cells ซึ่งมีบทบาทต่อการเกิดโรคด้วยเช่นกัน ดังนั้น การศึกษารูปแบบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อพยาธิโรคเท้าช้าง โดยเฉพาะภูมิคุ้มกันที่สามารถป้องกันโรค ได้ จึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง ซึ่งจะนำไปสู่การศึกษาถึงวิธีป้องกันโรค และการพัฒนาการรักษาใหม่ เช่น การประยุกต์ใช้ immunotherapy หรือการพัฒนายาใหม่ที่สามารถกำจัดพยาธิตัวเต็มวัยได้แต่ไม่เกิดผลข้างเคียง และส่งผลให้โครงการกำจัดโรคเท้าช้างของไทยและองค์การอนามัยโลกประสบผลสำเร็จได้

- ***บทบาทของแบคทีเรีย Wolbachia ในพยาธิฟิลาเรีย***

แบคทีเรีย *Wolbachia* เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ภายในเซลล์ (intracellular bacteria) ที่พบได้เฉพาะในสัตว์ขาข้อ และในพยาธิฟิลาเรียเท่านั้น จากการศึกษาโดยวิธีทางอณูชีววิทยาพบว่าแบคทีเรีย *Wolbachia* นั้นมีลักษณะลำดับเบสที่ใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่พบในสัตว์ขาข้อ ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ทำให้สัตว์ขาข้อมีการสืบพันธุ์ผิดปกติไป จึงทำให้นักวิทยาศาสตร์สนใจศึกษาบทบาทของแบคทีเรีย *Wolbachia* ในพยาธิฟิลาเรียกันอย่างแพร่หลาย ทั้งในการเป็นเป้าหมายในการรักษาโรคเท้าช้าง เพื่อเสริมหรือทดแทนยาเดิมที่ใช้อยู่ในปัจจุบันที่มีข้อจำกัดอยู่ดังที่กล่าวแล้ว รวมถึงบทบาทของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่มีต่อการเกิดพยาธิสภาพของโรค โดยเฉพาะในปฏิกิริยาหลังการรักษา

- ***พยาธิสภาพของโรคเท้าช้างสัมพันธ์กับแบคทีเรีย Wolbachia***

จากการศึกษาบทบาทของแบคทีเรีย *Wolbachia* ต่อการเกิดปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันของร่างกาย พบว่าสารสกัดจากพยาธิ *B. malayi* สามารถกระตุ้นให้เซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ (macrophage) หลั่งสารพวก pro-inflammatory cytokines ที่มีผลต่อการเกิดพยาธิสภาพได้มากกว่าสารสกัดจาก *Acanthocheilonema viteae* ซึ่งเป็นพยาธิฟิลาเรียที่ไม่พบแบคทีเรีย *Wolbachia* แสดงให้เห็นว่าแอนติเจนที่สำคัญต่อการกระตุ้นแมคโครฟาจให้มีการหลั่ง pro-inflammatory cytokines นั้นมาจากแบคทีเรีย *Wolbachia* จึงสันนิษฐานว่าแบคทีเรีย *Wolbachia* น่าจะมีบทบาทในการเกิดพยาธิสภาพ โดยเฉพาะในปฏิกิริยาหลังการรักษา

จากการพบแบคทีเรีย *Wolbachia* ในพยาธิโรคเท้าช้างดังกล่าว ทีมวิจัยจึงมีความสนใจในการศึกษาบทบาทต่างๆ ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ในพยาธิโรคเท้าช้าง โดยมุ่งเน้นถึงบทบาทต่อการเกิดพยาธิสภาพของโรคเท้าช้าง และบทบาทต่อปฏิกิริยาหลังการรักษาโรคเท้าช้าง ซึ่งจะรองรับกับโครงการกำจัดโรคเท้าช้างขององค์การอนามัยโลกทั้งมาตรการในการควบคุมการแพร่กระจายของโรคและมาตรการในการป้องกันการเกิดพยาธิสภาพเรื้อรังในผู้ป่วย

เป็นที่ทราบแล้วว่าพยาธิสภาพจากการติดเชื้อโดยการกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่ทำให้หลั่งสาร TNF-□, IL-12 และ IL-8 ของเชื้อเกิดจากการกระตุ้นผ่านตัวรับ Toll-Like Receptor (TLR) ชนิด TLR-2, TLR-4 และ TLR-6 การมีความหลากหลายทางพันธุกรรม (polymorphism) ของยีนดังกล่าวที่มีผลต่อการรับสัญญาณจากการกระตุ้นโดย lipopolysaccharides (LPS) ทำให้สัตว์ทดลองมีความไวรับ (susceptibility) ต่อ LPS น้อยลง และการใช้ antagonist ต่อ TLR-2, TLR-4 และ TLR-6 น่าจะมีประโยชน์ในการรักษาโรคติดเชื้อที่พยาธิสภาพเกิดจาก LPS

เนื่องจากไม่พบยีนที่ใช้สร้าง LPS จากฐานข้อมูลยีโนมของแบคทีเรีย *Wolbachia* ทำให้มีการศึกษาถึงบทบาทของโปรตีนจากแบคทีเรีย *Wolbachia* ต่อการกระตุ้นให้ร่างกายสร้าง pro-inflarmmatory cytokines พบว่า *Wolbachia* surface protein (WSP) สามารถกระตุ้นการสร้าง pro-inflammatory cytokines ผ่าน TLR-2 และ TLR-6 ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ของ WSP กับ TLR ดังนั้นการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ TLR-2 และ TLR-6 รวมถึงการศึกษาการแสดงออกบนผิวเซลล์ของ TLR-2 และ TLR-6 และการสร้าง inflammatory cytokines เมื่อถูกกระตุ้นด้วย WSP และโปรตีนเป้าหมายอื่น (ขณะนี้อยู่ระหว่างทดสอบ candidate proteins) เพื่อดูความสัมพันธ์กับ

อาการแสดงทางคลินิกของผู้ป่วย จะเป็นข้อมูลที่สำคัญในการอธิบายกลไกการเกิดพยาธิสภาพของโรคเท้าช้าง และนำไปสู่การพัฒนาการป้องกันพยาธิสภาพ และการรักษาที่เหมาะสม

อนึ่ง การค้นพบแบคทีเรีย *Wolbachia* ในพยาธิฟิลาเรีย เป็นกุญแจที่สำคัญในการศึกษาวิจัยเชิงโมเลกุล เพื่อนำไปสู่การศึกษาโมเลกุลเป้าหมายใหม่ในการพัฒนาการรักษาโรคเท้าช้าง และการศึกษาโมเลกุลที่มีความสำคัญต่อการเกิดพยาธิสภาพเพื่อตอบปัญหากลไกการเกิดพยาธิสภาพของโรคเท้าช้างที่ยังไม่ทราบแน่ชัดในปัจจุบัน ซึ่งโมเลกุลที่ค้นพบนี้จะสามารถนำไปตอบคำถามผลของแบคทีเรีย *Wolbachia* ต่อภูมิคุ้มกันของร่างกายและประยุกต์ใช้ในการพัฒนาการตรวจวินิจฉัยที่มีประสิทธิภาพ การพัฒนาตัวติดตามและพยากรณ์การเกิดพยาธิสภาพของโรค รวมไปถึงการพัฒนายาหรือวัคซีนป้องกันโรคเท้าช้างและควบคุมพยาธิสภาพที่มีประสิทธิภาพ เพื่อพัฒนาทุนทางสังคม แก้ไขปัญหาความยากจน และยกระดับคุณภาพชีวิตของคนไทยเพื่อเป็นรากฐานพัฒนาทางเศรษฐกิจ และจะส่งผลให้สามารถวางแผนการควบคุม ป้องกัน และกำจัดโรคให้หมดไปได้อย่างยั่งยืนแท้จริง อีกทั้งยังเป็นข้อมูลที่สำคัญในการประยุกต์ใช้ในโรคติดเชื้อปรสิตอื่น

❑ วัตถุประสงค์

1. ศึกษาปัจจัยและกลไกการเกิดพยาธิสภาพ และการเกิดปฏิกิริยาหลังการรักษาของโรคเท้าช้าง เพื่อให้ได้องค์ความรู้ใหม่เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนายารักษา ตลอดจนวัคซีนป้องกันการเกิดพยาธิสภาพของโรคเท้าช้างที่มีประสิทธิภาพตามนโยบายหลักในการกำจัดโรคเท้าช้างขององค์การอนามัยโลก

2. ศึกษาโมเลกุลของพยาธิโรคเท้าช้างและ/หรือแบคทีเรีย *Wolbachia* (อาศัยอยู่ภายในเซลล์ของพยาธิโรคเท้าช้าง) ที่สัมพันธ์กับการเกิดพยาธิสภาพ และการเกิดปฏิกิริยาหลังการรักษาของโรคเท้าช้าง ซึ่งองค์ความรู้ใหม่ที่ได้จะนำไปสู่การพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ป้องกันโรคและการเกิดพยาธิสภาพของโรคเท้าช้าง เพื่อนำไปสู่การกำจัดโรคเท้าช้างได้อย่างยั่งยืน และป้องกันการอุบัติใหม่ของโรคเท้าช้าง

3. ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนทางภูมิคุ้มกันที่สัมพันธ์กับการดำเนินโรคของการติดเชื้อพยาธิโรคเท้าช้าง และการเกิดปฏิกิริยาหลังการรักษาของโรคเท้าช้าง เพื่อพัฒนาเป็นตัวติดตามการพยากรณ์การเกิดพยาธิสภาพของโรค และการเกิดปฏิกิริยาหลังการรักษา เพื่อพิจารณาแนวทางการรักษาที่ดียิ่งขึ้น

4. สร้างนักวิจัยรุ่นใหม่ที่มีศักยภาพระดับปริญญาโท-เอกที่มีความรู้คู่คุณธรรม มีความชำนาญในงานวิจัยระดับลึก ซึ่งจะเป็นทรัพยากรบุคคลที่มีคุณค่าแก่สังคม และประเทศชาติ และมีความพร้อมที่จะผลิตผลิตภัณฑ์ เทคโนโลยีการแพทย์และนวตกรรมอื่นๆ ต่อไปในอนาคต อันเป็นการสนับสนุนการดำเนินการตามนโยบายแห่งชาติ ในการพัฒนาคนและสังคมสู่การพัฒนาทางเศรษฐกิจและสังคมต่อไป

❑ ขอบเขตการวิจัย

การศึกษาในครั้งนี้จะศึกษาปัจจัยและกลไกการเกิดพยาธิสภาพ และการเกิดปฏิกิริยาหลังการรักษาของโรคเท้าช้าง เพื่อให้ได้องค์ความรู้ใหม่ ซึ่งเป็นแนวทางในการศึกษาการพัฒนายารักษาตัวติดตามการพยากรณ์โรค ตลอดจนวัคซีนป้องกันการเกิดพยาธิสภาพของโรคเท้าช้างที่มีประสิทธิภาพ เพื่อป้องกันการอุบัติใหม่ของโรคเท้าช้าง และกำจัดโรคเท้าช้างอย่างยั่งยืนตามนโยบายขององค์การอนามัยโลก โดยทำการสำรวจหาผู้ที่ตรวจพบพยาธิโรคเท้าช้าง *Wuchereria bancrofti* ที่มีและไม่มีพยาธิสภาพ ในแหล่งชุกชุมของโรคเท้าช้าง รวมทั้งกลุ่มควบคุม* ที่ไม่ติดเชื้อ โดยเก็บตัวอย่างเลือดก่อนและหลังการรักษา ตัวอย่างเลือดที่ได้มาจะถูกนำมาศึกษารูปแบบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อโรคเท้าช้าง โดยศึกษาความสำคัญและความสัมพันธ์ระหว่างไซโตไคน์ จาก Th1 และ Th2 cells และการเกิดพยาธิสภาพ อีกทั้งการเกิดปฏิกิริยาหลังการรักษาโรคเท้าช้าง นอกจากนี้ ยังศึกษาถึงความสัมพันธ์กับระดับไมโครฟิลาเรีย ระดับแอนติเจนที่จำเพาะต่อพยาธิโรคเท้าช้างในกระแสเลือด การเกิดพยาธิสภาพ และการเกิดปฏิกิริยาหลังการรักษา ข้อมูลรูปแบบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในผู้ติดเชื้อโรคเท้าช้างกลุ่มต่างๆ จะทำให้เข้าใจถึงชนิดของภูมิคุ้มกันที่สามารถทำลายพยาธิได้ ซึ่งจะเป็นแนวทางพัฒนาการรักษาโรคเท้าช้างต่อไป

นอกจากนี้ การศึกษาโมเลกุลของพยาธิโรคเท้าช้างและ/หรือแบคทีเรีย *Wolbachia* (ซึ่งอาศัยอยู่ภายในเซลล์ของพยาธิโรคเท้าช้าง) ที่สัมพันธ์กับการเกิดพยาธิสภาพ และการเกิดปฏิกิริยาหลังการรักษาของโรคเท้าช้าง จะทำโดยการเลือกโปรตีนซึ่งมีความสามารถในการเป็นแอนติเจนจากฐานข้อมูลเบื้องต้นที่ได้แล้วจึงโคลนยีนที่สนใจนั้นและสร้างโปรตีนในห้องปฏิบัติการ เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ต่อการเกิดพยาธิสภาพกับสิ่งตัวอย่างจากผู้ป่วยและ/หรือในสัตว์ทดลองต่อไป

สำหรับการพัฒนาตัวติดตามการพยากรณ์โรคนั้น จะทำการศึกษารูปแบบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนในระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ ยีนของตัวรับบนผิวเซลล์ ที่สัมพันธ์กับการดำเนินโรคและ/หรือการปฏิกิริยาหลังการรักษาของการติดเชื้อหนอนพยาธิโรคเท้าช้าง

❑ ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

---

* กลุ่มควบคุม คือประชากรที่อาศัยอยู่ในแหล่งชุกชุมของโรค ได้รับพยาธิโรคเท้าช้างจากการกัดของยุงอย่างต่อเนื่อง แต่ตรวจไม่พบทั้งไมโครฟิลาเรีย และแอนติเจนของพยาธิโรคเท้าช้างในกระแสเลือด รวมทั้งไม่มีอาการแสดงของโรคเท้าช้างเป็นเวลานานอย่างน้อย 10 ปี

1. ทราบสถานการณ์ของโรคเท้าช้างในประเทศไทยโดยเทคนิคเชิงลึก ทั้งอัตราการติดเชื้อ อัตราการเกิดพยาธิสภาพ และอัตราการเกิดปฏิกิริยาหลังการรักษา เพื่อเป็นแหล่งอ้างอิงระดับชาติและนานาชาติ

2. ทราบกลไกการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของการเกิดพยาธิสภาพ และการเกิดปฏิกิริยาหลังการรักษาของโรคเท้าช้าง ซึ่งสามารถพัฒนาไปสู่แนวทางการรักษาโรคเท้าช้างแนวใหม่โดยประยุกต์ใช้ immunotherapy

3. ทราบโมเลกุลของพยาธิโรคเท้าช้างและ/หรือแบคทีเรีย *Wolbachia* (ซึ่งอาศัยอยู่ภายในเซลล์ของพยาธิโรคเท้าช้าง) ที่มีความสำคัญต่อการเกิดพยาธิสภาพและปฏิกิริยาหลังการรักษาของโรคเท้าช้าง ซึ่งสามารถพัฒนาไปสู่การผลิตยารักษาโรคเท้าช้างและ/หรือวัคซีนป้องกันพยาธิสภาพได้

4. ทราบรูปแบบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนทางภูมิคุ้มกันที่สัมพันธ์กับการดำเนินของโรคเท้าช้าง และการเกิดปฏิกิริยาหลังการรักษาของโรคเท้าช้าง ซึ่งสามารถนำไปสู่การพัฒนาเป็นตัวติดตามในการพยากรณ์โรคได้

5. นักวิจัยรุ่นใหม่ที่มีศักยภาพสูง มีความรู้คู่คุณธรรม มีความชำนาญในงานวิจัยระดับลึกและมีความสามารถในสหสาขาวิชาเพื่อประยุกต์ใช้ในระดับชุมชนและสาธารณสุขได้อย่างเป็นรูปธรรม

6. ผลงานวิชาการเผยแพร่ในงานประชุมวิชาการระดับชาติและนานาชาติ อย่างน้อย 1-2 เรื่องต่อปี

7. ผลงานตีพิมพ์ทั้งระดับชาติและนานาชาติอย่างน้อย 1-2 เรื่องต่อปี

วิธีดำเนินการวิจัย

- **รูปแบบการวิจัย (Research design)**

  รูปแบบการศึกษาเป็นแบบ Analytical Research

- **การกำหนดพื้นที่ และ ประชากรเป้าหมาย (Target population)**

  สำรวจผู้ที่ตรวจพบพยาธิโรคเท้าช้าง *W. bancrofti* และผู้ที่ตรวจไม่พบพยาธิโรคเท้าช้าง *W. bancrofti* จากประชากรที่อาศัยอยู่ในแหล่งชุกชุมของโรคเท้าช้าง ประชากรตัวอย่างทุกคนจะผ่านกระบวนการให้ความยินยอมโดยได้รับข้อมูล (informed consent) ในการเข้าร่วมโครงการด้วยความสมัครใจ ภายหลังการชี้แจงรายละเอียดของโครงการ โดยจะได้รับข้อมูลอย่างครบถ้วนซึ่งมีการสื่อสารโดยใช้ล่าม

- **วัดอุตัวอย่าง**

  เลือดจากการเจาะปลายนิ้วเพื่อตรวจหาไมโครฟิลาเรียของพยาธิโรคเท้าช้าง *W. bancrofti* และเลือดจากการเจาะเส้นเลือดดำบริเวณข้อพับแขนประมาณ 5 มิลลิลิตรจากผู้ป่วยที่ตรวจพบไมโครฟิลาเรีย แล้วนำมาผสมกับ ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) ซึ่งเป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด เพื่อตรวจทางห้องปฏิบัติการ

- **การเก็บรวบรวมข้อมูล (Data collection)**

  ทำการศึกษาวัดระดับไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด ระดับแอนติเจนที่จำเพาะต่อพยาธิโรคเท้าช้าง *W. bancrofti* และระดับของไซโตไคน์ต่างๆ ในกระแสเลือดของผู้เข้าร่วมโครงการ ทั้งก่อนและหลังการได้รับยารักษาโรคเท้าช้าง และเก็บรวบรวมข้อมูลแบ่งกลุ่มตามรูปแบบการติดเชื้อ และการได้รับยา เพื่อวิเคราะห์และสรุปผล โดยใช้โปรแกรมการวิเคราะห์ทางคอมพิวเตอร์ Microsoft Excel 6.0 และ SPSS 11.5

- **สถานที่ทำการทดลองและเก็บข้อมูล**

  - หน่วยปฏิบัติการวิจัยโรคเท้าช้าง ภาควิชาปรสิตวิทยา และ ศูนย์วิจัย (CHULA-MRC) คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
  - พื้นที่ภาคสนาม: แหล่งชุกชุมของโรคเท้าช้างในความดูแลของสำนักงานควบคุมโรคที่ 8 จังหวัดนครสวรรค์ กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข

❑ ขั้นตอนการดำเนินงาน

ขั้นที่ 1 การวัดระดับของไซโตไคน์ในพลาสม่า

ตรวจวัดระดับไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (:- IL-6, TNF-□) ไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการต้านอักเสบ (:- IL-10) และไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมบทบาทของ T lymphocyte (:- IL-12) โดยวิธี Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (eBioscience Inc., San Diego, CA)

ขั้นที่ 2 การรวบรวมข้อมูลและวิเคราะห์ข้อมูล

บันทึกและวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมการวิเคราะห์ทางคอมพิวเตอร์ โดยใช้ chi-square tests และ unpaired Student's t-test ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างผลการตรวจวิเคราะห์ต่างๆ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ขั้นที่ 3 การสกัดสารพันธุกรรมของพยาธิโรคเท้าช้างและแบคทีเรีย *Wolbachia*

นำไมโครฟิลาเรียมาล้างด้วย Phosphate Bufferd Saline (PBS) แล้วจึงนำมาย่อยใน lysis buffer จากนั้นจึงสกัดสารพันธุกรรมโดยวิธี phenol-chloroform

ขั้นที่ 4 การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของยีน

เพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของยีนที่สนใจโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction; PCR) ดังรายละเอียดในผลการวิจัย

ขั้นที่ 5 การโคลนยีน

นำ PCR product มาทำ gel electrophoresis หลังจากนั้นจึงตัดแถบของ DNA ดังกล่าวออกจากเจลมา purify โดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen Inc, Valencia, CA) หลังจากตรวจสอบ PCR product ที่ได้จากการ purify จากเจล โดยนำมาทำการ run gel electrophoresis แล้วนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเจลเชื่อมต่อเข้ากับ pET-TOPO® vector (Invitrogen, Carlsbad, CA) แล้วจึงนำข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *Escherichia coli* strain Top10

ขั้นที่ 6 การวิเคราะห์ลำดับสายนิวคลีโอไทด์

นำโคลนที่คัดเลือกได้ไปวิเคราะห์ลำดับสายนิวคลีโอไทด์ โดยใช้ T7 primers และอ่านผลด้วย automated sequencer

ขั้นที่ 7 การเตรียมแอนติเจน recombinant peptidoglycan associated lipoprotein (PAL)

สร้างโปรตีน PAL โดยการเหนี่ยวนำเซลล์เจ้าบ้าน *Escherechia coli* BL-21 ซึ่งมี vector ที่สอดแทรกยีน *pal* ด้วย isopropyl β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) แล้วสกัดแยกโปรตีนจากเซลล์เจ้าบ้านโดยวิธี sonication และทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้วิธี affinity chromatography (Ni-NTA resin; QIAGEN, Valencia, CA)

ขั้นที่ 8 การตรวจวัด anti-peptidoglycan associated lipoprotein (PAL) IgG subclass antibodies

วัดระดับของ anti-PAL IgG subclass antibodies ในพลาสม่าของผู้ป่วยโดยวิธี Indirect ELISA

ขั้นที่ 9 การสกัดสารพันธุกรรมจากผู้ป่วยโรคเท้าช้าง

ปั่นแยกเม็ดเลือดขาวจากเลือดของผู้ป่วยโรคเท้าช้าง จากนั้นนำมาสกัดสารพันธุกรรมของผู้ป่วยโดยใช้วิธี salting out

ขั้นที่ 10 การคัดเลือกความหลากหลายของยีน TLR2 ในการศึกษา

ยีน *TLR2* ประกอบด้วย 3 exon โดยที่ exon 1 และ exon 2 ไม่แปลรหัสเป็นโปรตีน (noncoding exon) ส่วนที่แปลรหัสเป็นโปรตีน TLR2 อยู่ใน exon 3 การคัดเลือกความหลากหลายของยีน *TLR2* มาจากการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง และจากฐานข้อมูลของความหลากหลายทางพันธุกรรมแบบการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์เพียงตำแหน่งเดียว (single nucleotide polymorphisms; SNPs) ใน HAPMAP (Hapmap database; available at: http://hapmap.org/)

ขั้นที่ 11 การทำจีโนไทป์ยีน *TLR2*

- ***การศึกษาจีโนไทป์ยีน TLR2 ตำแหน่ง -197 to -174 ins/del***

ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ตำแหน่ง -197 to -174 ins/del ใน exon 1 ของยีน *TLR2* โดยเทคนิค Allele-specific polymerase chain reaction (AS-PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ -197 to -174-F (5'-CTCGGAGGCAGCGAGAAA-3' และ -197 to -174-R (5'-CTGGGCCGTGCAAA GAAG-3') ปริมาตรในการทำ PCR 25 □L ประกอบด้วย PCR buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 1.5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl) (MBI Fermentas, Ontario, Canada), dATP, dCTP, dGTP, และ dTTP (MBI Fermentus) อย่างละ 200 μM, เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 1.0 ยูนิต (MBI Fermentus), ไพรเมอร์ข้างละ 10 pmol ดีเอ็นเอเป้าหมาย 50-100 ng นำสารละลายทั้งหมดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ (Perkin Elmer thermal cycler, Gene Amp #2400) โดยใช้โปรแกรม ดังนี้ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 58 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที จำนวน 35 รอบ จากนั้นวิเคราะห์รูปแบบของแถบดีเอ็นเอโดยนำผลผลิตพีซีอาร์ไปวิ่งผ่านกระแสไฟฟ้า (gel electrophoresis) และย้อมด้วย ethidium bromide และนำไปส่องภายใต้แสงยูวี

- ***การศึกษาจีโนไทป์ยีน TLR2 ตำแหน่ง +597 T/C***

ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ตำแหน่ง +597 T/C ใน exon 3 ของยีน *TLR2* โดยเทคนิค polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis (PCR-RFLP) โดยใช้ไพรเมอร์ 597-F (5'- CCTGAGAGTGGGAAATATGGAC-3') และ +597-R (5'-CTCCATTAAGGGTACAGTCATC-3') ในการทำ PCR เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมซึ่งเป็นตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mae* II โดยใช้ปริมาตรในการทำ PCR 50 μL ประกอบด้วย PCR buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 1.5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl) (MBI Fermentas, Ontario, Canada), dATP, dCTP, dGTP, และ dTTP (MBI Fermentus) อย่างละ 200 μM, เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 1.0 ยูนิต (MBI Fermentus), ไพรเมอร์ข้างละ 10 pmol ดีเอ็นเอเป้าหมาย 75-100 ng นำสารละลายทั้งหมดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ (Perkin Elmer thermal cycler, Gene Amp #2400) โดยใช้โปรแกรม ดังนี้ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 52 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที จำนวน 35 รอบ จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mae* II (MBI Fermentus) 5 ยูนิต วิเคราะห์รูปแบบของแถบดีเอ็นเอโดยนำไปวิ่งผ่านกระแสไฟฟ้าและนำไปย้อมด้วย ethidium bromide และนำไปส่องภายใต้แสงยูวี

- ***การศึกษาจีโนไทป์ยีน TLR2 ตำแหน่ง +1350 T/C***

ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ตำแหน่ง +1350 ใน exon 3 ของยีน *TLR2* โดยเทคนิค PCR-RFLP โดยใช้ไพรเมอร์ +1350-F (5'- AGCCTGTGAGGATGCCTG-3') และ +1350-R (5'-AACATGGGTAAGAGGGAGGC-3') ในการทำ PCR เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมซึ่งเป็นตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BstMW* I โดยใช้สภาวะในการทำพีซีอาร์เดียวกับ การศึกษาจีโนไทป์ยีน *TLR2* ตำแหน่ง +597 T/C หลังจากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BstMW* I (MBI Fermentus) 5 ยูนิต

- **การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตพีซีอาร์**

ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) เพื่อยืนยันผลการหาจีโนไทป์ โดยสุ่มเลือกจากกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุมจำนวนกลุ่มละ 5 คน โดยใช้ Big Dye Terminator kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) และเครื่อง ABI PRISM 3100 DNA Sequencer (Applied Biosystems) จากนั้นจึงวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ซอฟแวร์ Chromas LITE version 2.01 Software (http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html)

ขั้นที่ 12 การวิเคราะห์ Haplotype

ทดสอบหารูปแบบความหลากหลายทางพันธุกรรมของทั้ง 3 ตำแหน่งร่วมกัน (haplotype analysis) ในการเพิ่มความเสี่ยงความไวรับต่อโรคเท้าช้าง โดยใช้โปรแกรม Phase v2.0.2

ขั้นที่ 13 การวิเคราะห์การถ่ายทอดไปร่วมกัน Pair-wise linkage Disequilibrium (LD)

ทดสอบการถ่ายทอดไปร่วมกัน Pair-wise linkage Disequilibrium (LD) ของความหลากหลายทางพันธุกรรมทั้ง 3 ตำแหน่ง โดยใช้โปรแกรม Java LINkage Disequilibrium Plotter (JLIN)

ขั้นที่ 14 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

หาความถี่อัลลีล (allele frequency) โดยการนับจำนวนรูปแบบความหลากหลายทางพันธุกรรมหารด้วยจำนวนโครโมโซมทั้งหมด ส่วนความถี่จีโนไทป์ (genotype frequency) หาโดยการนับรูปแบบความหลากหลายทางพันธุกรรมและหารด้วยจำนวนผู้ที่มีรูปแบบความหลากหลายทางพันธุกรรมดังกล่าว ทดสอบสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg Equilibrium; HWE) โดยการเปรียบเทียบค่าความถี่จีโนไทป์ที่คาดหวังกับค่าที่ได้จริงโดยใช้สถิติ Chi-square (□2) วิเคราะห์ค่าทางสถิติเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ต่อความไวรับของโรคเท้าช้าง โดยเปรียบเทียบความถี่อัลลีลและความถี่จีโนไทป์ของผู้ป่วยโรคเท้าช้างเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม □2 test ในการเปรียบเทียบความ

แตกต่าง วิเคราะห์ค่า odds ratios (OR) และ 95% confidence interval (CI) หากค่า *P* value น้อยกว่า <0.05 ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการวิจัย

โครงการ "การศึกษาภูมิคุ้มกันวิทยาเชิงลึกของโรคเท้าช้าง: มุ่งสู่การป้องกันภาวะเท้าช้างและการกำจัดโรคอย่างถาวร" ประกอบด้วย 3 โครงการย่อยนี้เป็นโครงการวิจัยต่อเนื่อง 3 ปี (พ.ศ. 2550-2552) ผลการศึกษาในปีแรกนั้น (รายละเอียดในภาคผนวก) ได้ทำการสำรวจโรคเท้าช้างในประชากรทั้งหมด 7,898 ราย (อายุ 22.63 ± 16.56; 1-80 ปี) ที่อาศัยอยู่ใน 6 อำเภอซึ่งเป็นแหล่งชุกชุมของโรคเท้าช้าง ได้แก่ อำเภอแม่สอด พบพระ ท่าสองยาง แม่ระมาด อุ้มผาง ในจังหวัดตาก และอำเภอสังขละบุรีในจังหวัดกาญจนบุรี พบโรคเท้าช้างในประชากรจำนวน 49 ราย คิดเป็นอัตราความชุกร้อยละ 0.62 โดยเป็นเพศชาย 36 ราย (ร้อยละ 73.5) (อายุ 32.22±17.47; 4-80 ปี) และเพศหญิง 13 ราย (ร้อยละ 26.5) (อายุ 33.54±16.28; 13-60 ปี) และจากการติดตามการรักษาในประชากรจำนวน 65 ราย พบการเกิดปฏิกิริยาหลังการรักษาในประชากรจำนวน 17 ราย (ร้อยละ 26.2) จากการศึกษารูปแบบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของโรคเท้าช้าง พบระดับไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ได้แก่ interleukin-6 (IL-6) และ tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่มีพยาธิสภาพเรื้อรัง (โครงการย่อยที่ 1) และได้ทบทวนวรรณกรรมตลอดจนค้นหาจากฐานข้อมูลได้ยีน *Wolbachia* surface protein (WSP) และ peptidoglycan-associated lipoprotein (*pal*) ที่น่าสนใจเพื่อโคลนและสร้างโปรตีนที่ใช้ศึกษาทางอิมมูนวิทยา (โครงการย่อยที่ 2) ตลอดจนได้ยีนเป้าหมาย (toll-like receptor 2; *tlr-2*) ในการทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (โครงการย่อยที่ 3)

ผลการวิจัยในปีที่ 2 นั้น (รายละเอียดในภาคผนวก) ได้ทำการศึกษาระดับไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการต้านการอักเสบได้แก่ interleukin-10 (IL-10) และไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมบทบาทของ T lymphocyte ได้แก่ interleukin (IL)-12 พบระดับไซโตไคน์ IL-10 สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพเรื้อรัง ในขณะที่ระดับของไซโตไคน์ IL-12 สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งในกลุ่มผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อปัจจุบัน และผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพเรื้อรัง ($P < 0.05$) นอกจากนี้ การศึกษาระดับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อพยาธิโรคเท้าช้างพบว่า แอนติบอดีชนิด IgG4 มีระดับสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อปัจจุบัน (โครงการย่อยที่ 1) นอกจากนี้จากการศึกษาโปรตีนทั้งหมดของพยาธิโรคเท้าช้างและแบคทีเรียโวลบาเชีย เพื่อหาโปรตีนเป้าหมายที่สำคัญต่อการเกิดพยาธิสภาพของโรคเท้าช้าง พบโปรตีนที่น่าสนใจได้แก่ โปรตีน WSP และ โปรตีน PAL จึงได้ทำการโคลนและสร้างโปรตีนดังกล่าวและได้ทำการตรวจวัดระดับแอนติบอดีต่อโปรตีน WSP ในผู้ป่วยกลุ่มต่างๆ พบว่าแอนติบอดีชนิด IgG1 และ IgG3 มีระดับสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อปัจจุบัน ($P < 0.05$) นอกจากนี้ ยังพบแอนติบอดีชนิด IgG1 มีระดับสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่มีพยาธิสภาพ ($P < 0.05$) (โครงการ

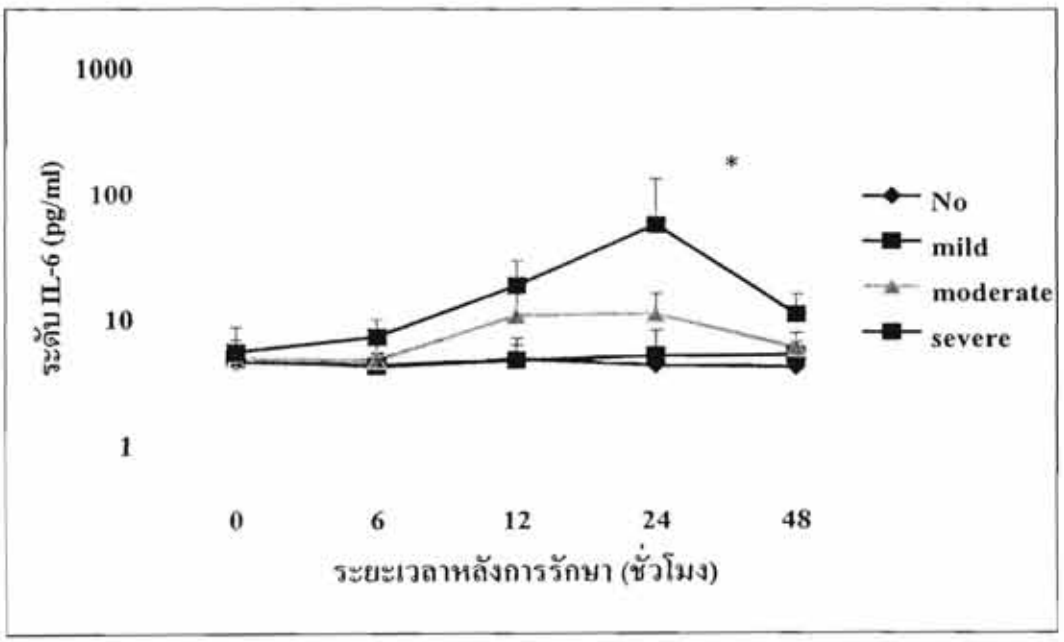
ย่อยที่ 2) รวมทั้งศึกษาความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน toll-like receptor 2 (*tlr-2*) กับความไวรับและการเกิดพยาธิสภาพของโรคเท้าช้าง พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญระหว่าง SNP ของยีน *tlr-2* ที่ตำแหน่ง +597 กับความไวรับต่อการเกิดโรคเท้าช้าง (โครงการย่อยที่ 3)

ผลการวิจัยในปีที่ 3 นี้ได้ทำการศึกษาระดับไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบและการต้านการอักเสบ ตลอดจนไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมบทบาทของ T lymphocyte ในผู้ป่วยหลังการรักษาด้วยยา diethylcarbamazine (โครงการย่อยที่ 1) นอกจากนี้ยังได้ทำการตรวจวัดระดับแอนติบอดีต่อโปรตีน PAL ในผู้ป่วยกลุ่มต่างๆ (โครงการย่อยที่ 2) รวมทั้งศึกษาความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *tlr-2* ที่ตำแหน่ง -197 to -174 และที่ตำแหน่ง +1350 กับความไวรับของการติดพยาธิโรคเท้าช้าง (โครงการย่อยที่ 3)

<u>โครงการย่อยที่ 1</u> "รูปแบบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของโรคเท้าช้าง: บทบาทของไซโตไคน์จาก T helper cells และแอนติบอดี IgG ชนิดต่างๆ"

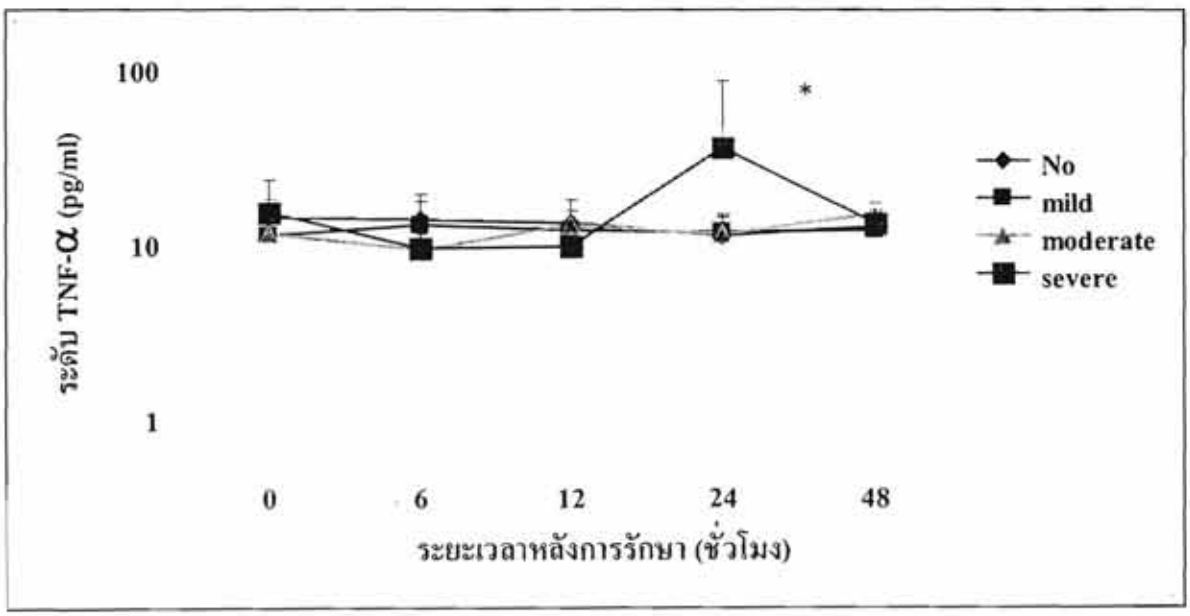
- **รูปแบบและระดับของการสร้างไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบหลังการรักษาด้วยยา diethylcarbamazine**

ได้ทำการวัดระดับไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ได้แก่ interleukin (IL)-6 และ tumor necrosis factor (TNF)-α ในผู้ป่วยกลุ่มที่มีปฏิกิริยาหลังการรักษาน้อย (mild) ปฏิกิริยาหลังการรักษาปานกลาง (moderate) และปฏิกิริยาหลังการรักษาชนิดรุนแรง (severe) หลังการรักษาด้วยยา DEC เมื่อเปรียบเทียบกันระดับไซโตไคน์ในกระแสเลือดก่อนการรักษาด้วยยา DEC พบว่าผู้ป่วยโรคเท้าช้างมีระดับ IL-6 สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเปรียบเทียบกันระดับไซโตไคน์ในกระแสเลือดก่อนการรักษาด้วยยา DEC ($P < 0.05$) โดยพบว่าไซโตไคน์ถูกปล่อยออกมาในระดับสูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังการรักษา (รูปที่ 1) นอกจากนี้ ยังพบว่าระดับของไซโตไคน์ยังสอดคล้องกับระดับความรุนแรงของปฏิกิริยาหลังการรักษา



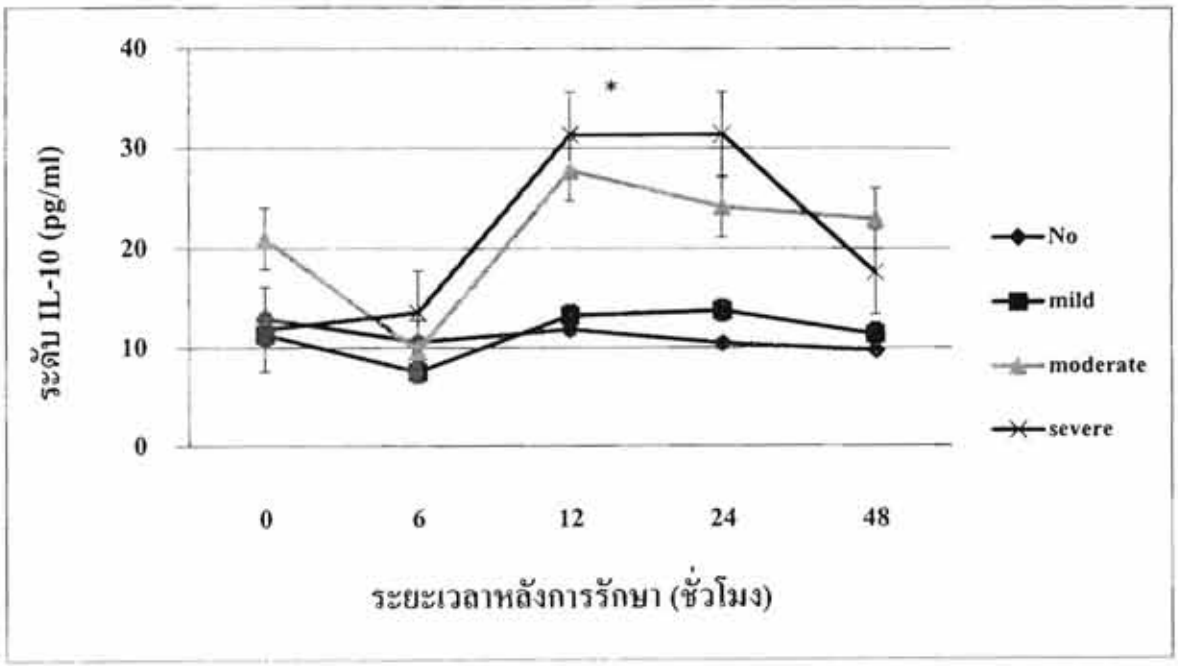
<u>รูปที่ 1</u> ระดับของไซโตไคน์ชนิด IL-6 ในกระแสเลือดของผู้ป่วยโรคเท้าช้างภายหลังการรักษาด้วยยา diethylcarbamazine (DEC) แบ่งตามปฏิกิริยาหลังการรักษาระดับน้อย (mild) ปานกลาง (moderate) รุนแรง (severe) และไม่มีปฏิกิริยาหลังการรักษา (no reaction); (*) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับระดับของไซโตไคน์ในกระแสเลือดก่อนการรักษา (unpaired t-test)

สำหรับการวัดระดับไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ TNF-α ในผู้ป่วยหลังการรักษาด้วยยา DEC พบว่าผู้ป่วยโรคเท้าช้างมีระดับ TNF-α สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับระดับไซโตไคน์ในกระแสเลือดก่อนการรักษาด้วยยา DEC ($P < 0.05$) เฉพาะในกลุ่มผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่เกิดปฏิกิริยาหลังการรักษาชนิดรุนแรงเท่านั้น [ค่า TNF-α = 35.2 pg/ml (6.9-91.4 pg/ml)] (รูปที่ 2) โดยพบว่าไซโตไคน์ TNF-α มีระดับสูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังการรักษาผู้ป่วยโรคเท้าช้างด้วยยา DEC



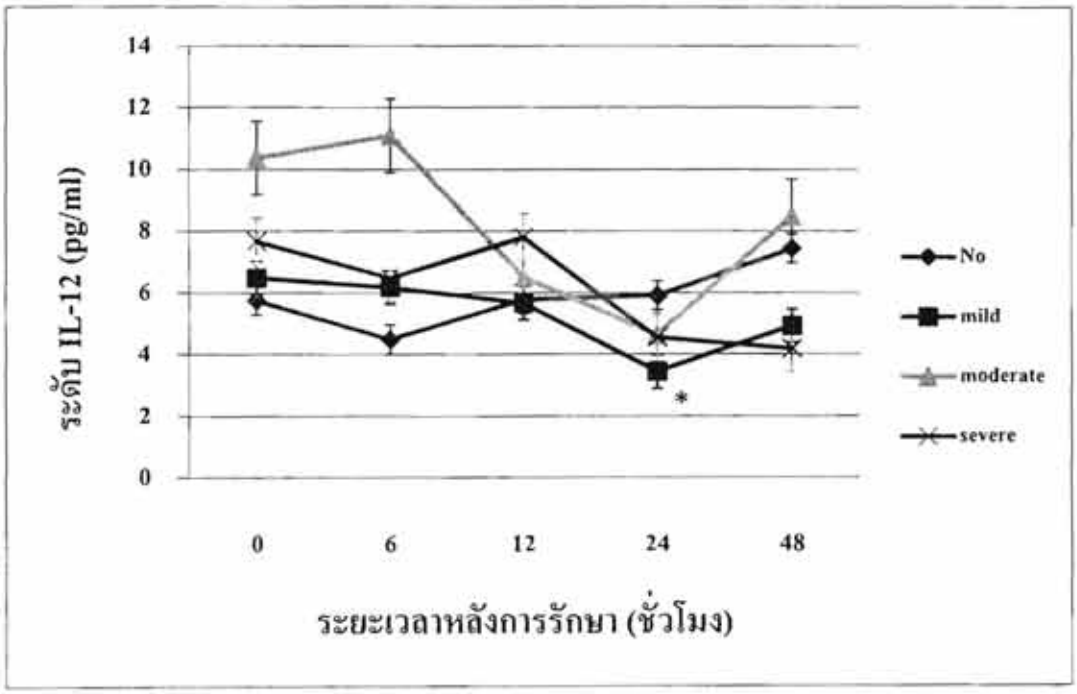
รูปที่ 2 ระดับของไซโตไคน์ชนิด TNF-α ในกระแสเลือดของผู้ป่วยโรคเท้าช้างภายหลังการรักษาด้วยยา diethylcarbamazine (DEC) แบ่งตามปฏิกิริยาหลังการรักษาระดับน้อย (mild) ปานกลาง (moderate) รุนแรง (severe) และไม่มีปฏิกิริยาหลังการรักษา (no reaction); (*) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับระดับของไซโตไคน์ในกระแสเลือดก่อนการรักษา (unpaired t-test)

สำหรับการวัดระดับไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการต้านการอักเสบ IL-10 ในผู้ป่วยโรคเท้าช้างหลังการรักษาด้วยยา DEC พบว่าผู้ป่วยมีระดับ IL-10 สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเปรียบเทียบกันระดับไซโตไคน์ในกระแสเลือดก่อนการรักษาด้วยยา DEC เฉพาะในกลุ่มผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่เกิดปฏิกิริยาหลังการรักษาชนิดปานกลางและชนิดรุนแรงเท่านั้น ($P < 0.05$) โดยถูกปล่อยออกมาในระดับสูงสุดที่เวลา 12-24 ชั่วโมงหลังการรักษา (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 ระดับของไซโตไคน์ชนิด IL-10 ในกระแสเลือดของผู้ป่วยโรคเท้าช้างภายหลังการรักษาด้วยยา diethylcarbamazine (DEC) แบ่งตามปฏิกิริยาหลังการรักษาระดับน้อย (mild) ปานกลาง (moderate) รุนแรง (severe) และไม่มีปฏิกิริยาหลังการรักษา (no reaction); (*) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับระดับของไซโตไคน์ในกระแสเลือดก่อนการรักษา (unpaired t-test)

สำหรับการวัดระดับไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมบทบาทของ T lymphocyte ได้แก่ IL-12 ในผู้ป่วยโรคเท้าช้างหลังการรักษาด้วยยา DEC พบว่าผู้ป่วยมีระดับ IL-12 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเปรียบเทียบกันระดับไซโตไคน์ในกระเสเลือดก่อนการรักษาด้วยยา DEC ($P < 0.05$) ที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังการรักษา อย่างไรก็ตาม ไม่พบความสัมพันธ์ของระดับของไซโตไคน์ชนิด IL-12 กับระดับความรุนแรงของปฏิกิริยาหลังการรักษา (รูปที่ 4)

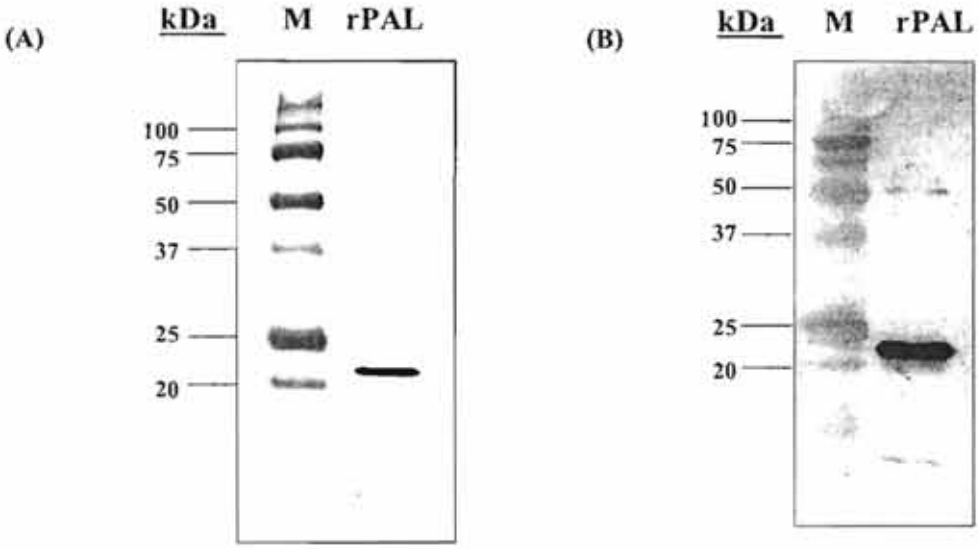


รูปที่ 4 ระดับของไซโตไคน์ชนิด IL-12 ในกระแสเลือดของผู้ป่วยโรคเท้าช้างภายหลังการรักษาด้วยยา diethylcarbamazine (DEC) แบ่งตามปฏิกิริยาหลังการรักษาระดับน้อย (mild) ปานกลาง (moderate) รุนแรง (severe) และไม่มีปฏิกิริยาหลังการรักษา (no reaction); (*) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับระดับของไซโตไคน์ในกระแสเลือดก่อนการรักษา (unpaired t-test)

<u>โครงการที่ 2</u> **"การศึกษาโมเลกุลที่มีความสำคัญต่อการเกิดพยาธิสภาพและปฏิกิริยาหลังการรักษาของโรคเท้าช้าง เพื่อการพัฒนาสู่การรักษาและวัคซีนป้องกันโรค"**

- **การสร้างโปรตีน peptidoclycan associated lipoprotein (PAL)**

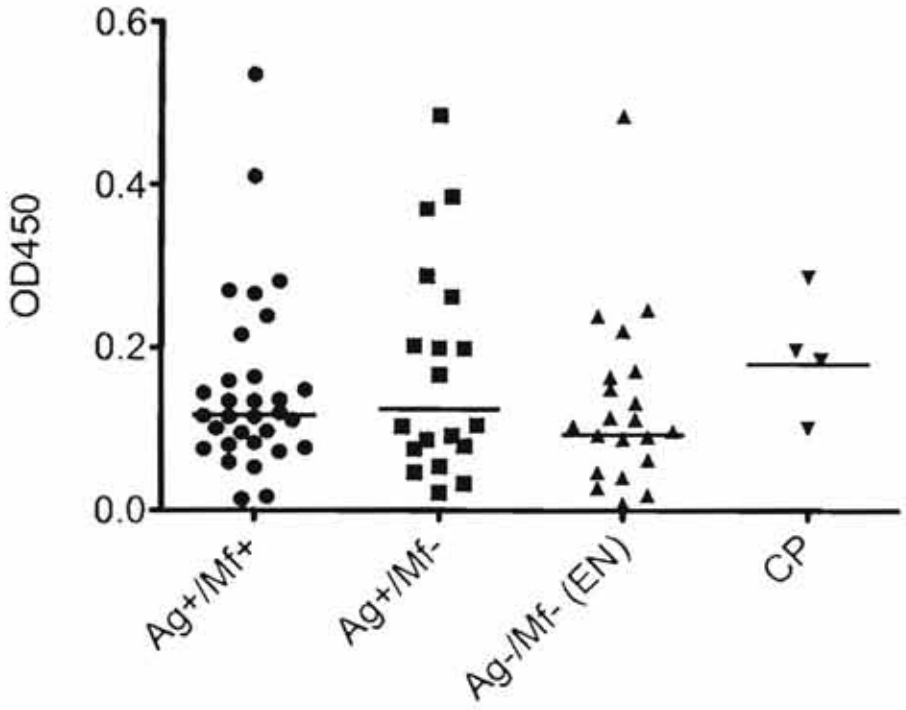
Recombinant *pal* clone ที่ได้รับการยืนยันความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว ได้ถูกนำมาทำการทดสอบเพื่อหาเวลาและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสร้างโปรตีน PAL โดยทำการเลี้ยงแบคทีเรีย *Escherichia coli* ที่มี *pal* clone อยู่ภายในและเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วเหนี่ยวนำ (induction) ให้สร้างโปรตีนด้วย isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) แล้วทำการสกัดโปรตีนจากเซลล์ที่เวลาต่างๆ โดยเก็บส่วนน้ำใส (supernatant) และส่วนตะกอน (pellet) เมื่อตรวจโปรตีนในส่วนต่างๆ ด้วยวิธี sodium dodecyl sulfate polyacrylamide-gel electrophoresis (SDS-PAGE) พบว่ามีการสร้างโปรตีนอยู่ในรูป inclusion bodies และมีการผลิตโปรตีนในปริมาณมากที่สุดที่ 4 ชั่วโมงหลังการเหนี่ยวนำ เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนแล้วได้ทำการสร้างโปรตีนจำนวนมากและแยกให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography โดยใช้ Ni-NTA resin ทำให้สามารถแยกโปรตีน PAL ออกจากโปรตีนอื่นๆ ของ *E. coli* ได้ (รูปที่ 5)



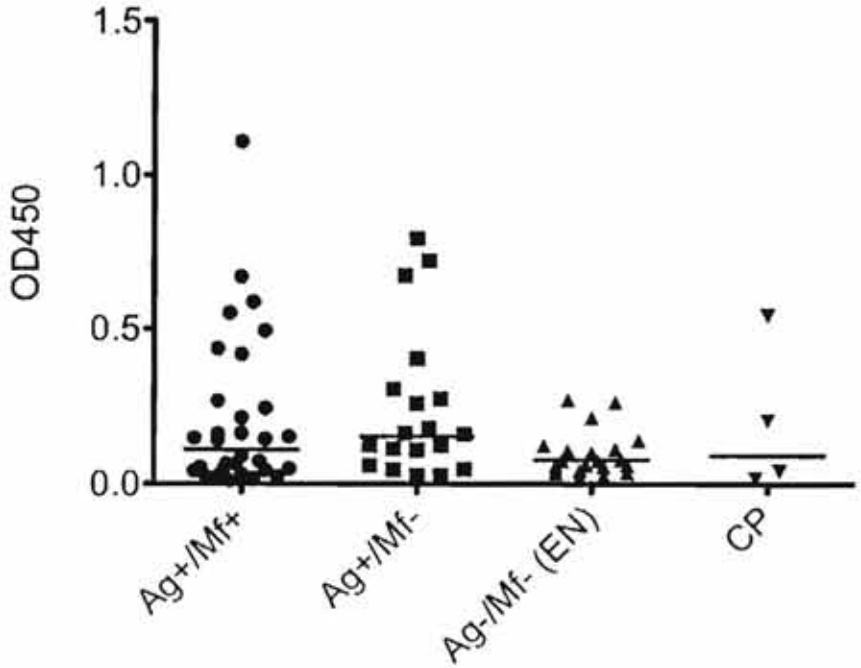
รูปที่ 5 โปรตีน peptidoglycan associated lipoprotein (PAL) ที่แยกให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography โดยใช้ Ni-NTA resin นำมาแยกโดย SDS-PAGE แล้วย้อมด้วย Coomassie Blue staining (A) และ Western blot analysis by anti-His-HRP (B) พบโปรตีน PAL ที่ 22 kDa;
M: Molecular weight marker

- **การศึกษารูปแบบและระดับของการสร้างแอนติบอดีชนิดต่างๆ ที่จำเพาะต่อโปรตีน peptidoglycan associated lipoprotien (PAL)**

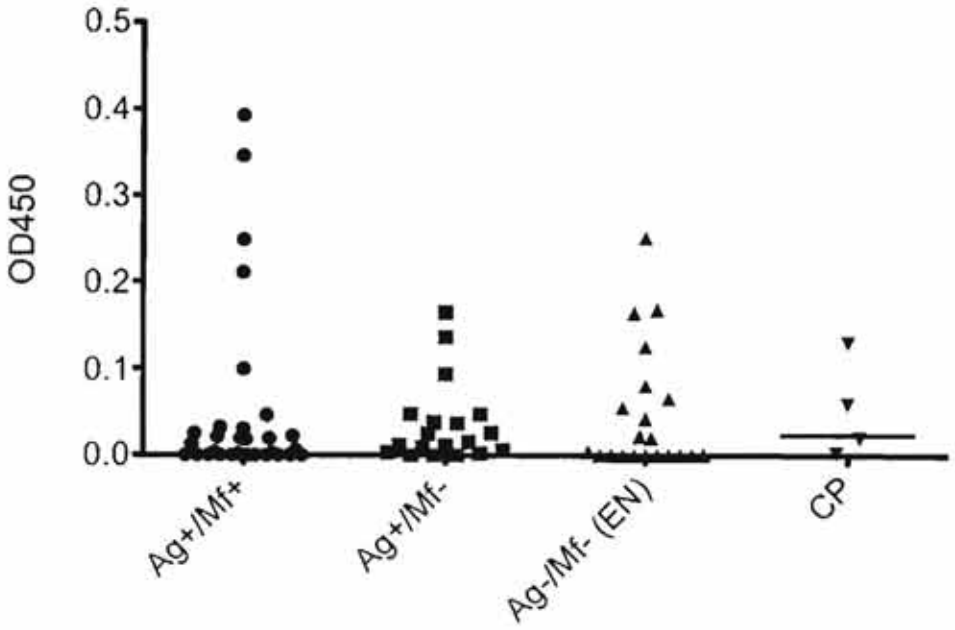
ได้ทำการวัดระดับแอนติบอดีชนิด IgM และ ชนิด IgG ทั้ง 4 subclasses ที่จำเพาะต่อโปรตีน PAL ในกระแสเลือดของผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่มีการติดเชื้อปัจจุบัน (active infections) ทั้งกลุ่มผู้ป่วยที่ตรวจพบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด (Ag+/Mf+) และตรวจไม่พบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด (Ag+/Mf-) กลุ่มผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่มีพยาธิสภาพเรื้อรัง (chronic pathology; CP) ตลอดจนกลุ่มคนปกติที่อาศัยอยู่ในแหล่งชุกชุมของโรคเท้าช้าง (endemic normals; EN) (Ag-/Mf-) (รูปที่ 6-10) โดยพบว่าแอนติบอดีชนิด IgG3 ที่จำเพาะต่อโปรตีน PAL มีระดับสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มการติดเชื้อปัจจุบัน ซึ่งตรวจพบแอนติเจนที่จำเพาะต่อพยาธิโรคเท้าช้าง (Ag+/Mf- และ Ag+/Mf+) เปรียบเทียบกับระดับของแอนติบอดีในกลุ่มคนปกติที่อาศัยอยู่ในแหล่งชุกชุมของโรคเท้าช้าง (P = 0.003) โดยพบการสูงขึ้นของระดับแอนติบอดีอย่างมีนัยสำคัญในผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่ตรวจพบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด (Ag+/Mf+) (P = 0.04) (รูปที่ 9) อย่างไรก็ตาม ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของระดับแอนติบอดีชนิด IgG3 ที่จำเพาะต่อโปรตีน PAL ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพ เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อปัจจุบันและกลุ่มคนปกติที่อาศัยอยู่ในแหล่งชุกชุมของโรคเท้าช้าง นอกจากนี้ยังไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของระดับแอนติบอดีชนิด IgM, IgG1, IgG2, และ IgG4 ในกลุ่มผู้ป่วยต่างๆ



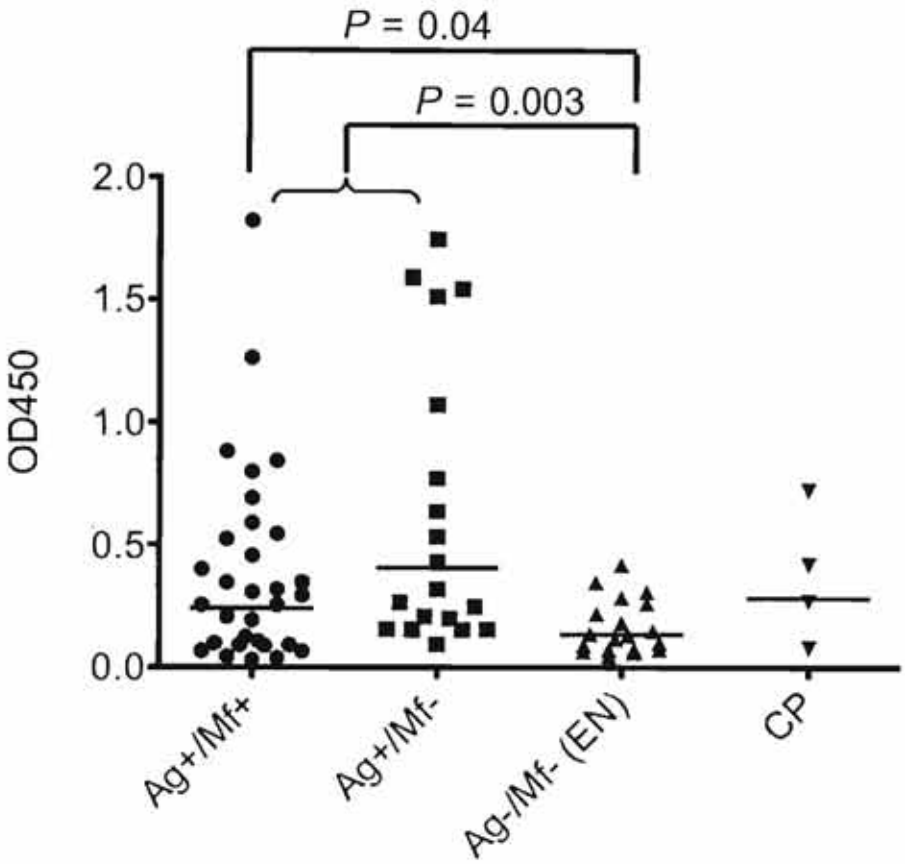
รูปที่ 6 ค่า optical density ที่ความยาวช่วงคลื่นแสง 450 nm (OD450) ในการวัดระดับแอนติบอดีชนิด IgM ที่จำเพาะต่อโปรตีน peptidoglycan associated lipoprotien (PAL) ในกระแสเลือดของผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่มีการติดเชื้อปัจจุบัน (active infections) ทั้งที่ตรวจพบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด (Ag+/mf+) และตรวจไม่พบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด (Ag+/mf-) คนปกติที่อาศัยอยู่ในแหล่งชุกชุมของโรคเท้าช้าง (endemic normals; EN) และผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่มีพยาธิสภาพเรื้อรัง (chronic pathology; CP) โดยวิธี indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) จุดแต่ละจุดแสดงระดับแอนติบอดีของแต่ละคน แถบเส้นแสดงค่าเฉลี่ยของระดับแอนติบอดีในแต่ละกลุ่ม



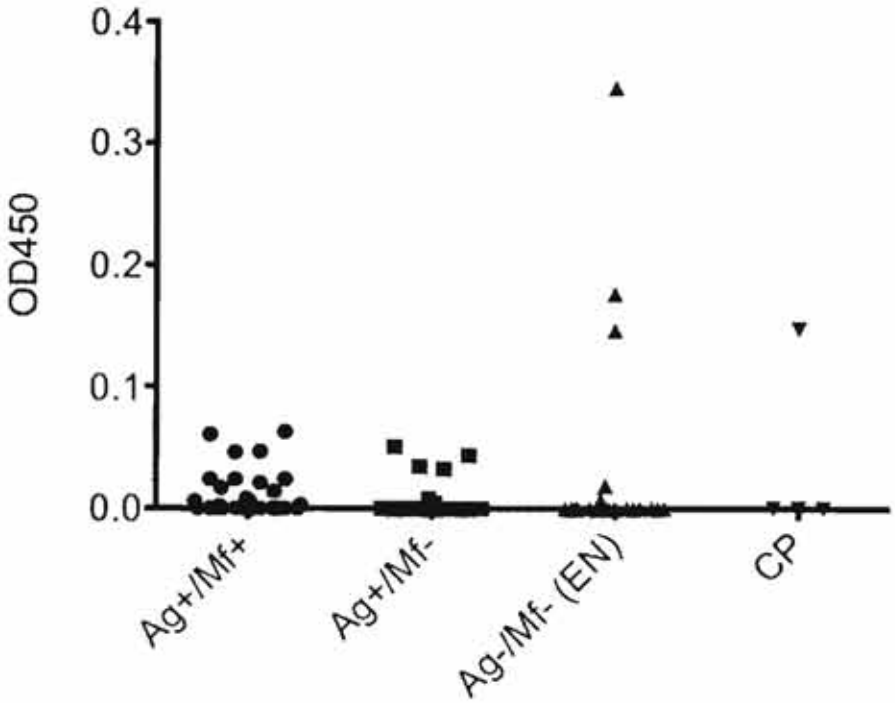
รูปที่ 7 ค่า optical density ที่ความยาวช่วงคลื่นแสง 450 nm (OD450) ในการวัดระดับแอนติบอดีชนิด IgG1 ที่จำเพาะต่อโปรตีน peptidoglycan associated lipoprotien (PAL) ในกระแสเลือดของผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่มีการติดเชื้อปัจจุบัน (active infections) ทั้งที่ตรวจพบไมโครฟีลาเรียในกระแสเลือด (Ag+/mf+) และตรวจไม่พบไมโครฟีลาเรียในกระแสเลือด (Ag+/mf-) คนปกติที่อาศัยอยู่ในแหล่งชุกชุมของโรคเท้าช้าง (endemic normals; EN) และผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่มีพยาธิสภาพเรื้อรัง (chronic pathology; CP) โดยวิธี indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) จุดแต่ละจุดแสดงระดับแอนติบอดีของแต่ละคน แถบเส้นแสดงค่าเฉลี่ยของระดับแอนติบอดีในแต่ละกลุ่ม



รูปที่ 8 ค่า optical density ที่ความยาวช่วงคลื่นแสง 450 nm (OD450) ในการวัดระดับแอนติบอดีชนิด IgG2 ที่จำเพาะต่อโปรตีน peptidoglycan associated lipoprotien (PAL) ในกระแสเลือดของผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่มีการติดเชื้อปัจจุบัน (active infections) ทั้งที่ตรวจพบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด (Ag+/mf+) และตรวจไม่พบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด (Ag+/mf-) คนปกติที่อาศัยอยู่ในแหล่งชุกชุมของโรคเท้าช้าง (endemic normals; EN) และผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่มีพยาธิสภาพเรื้อรัง (chronic pathology; CP) โดยวิธี indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) จุดแต่ละจุดแสดงระดับแอนติบอดีของแต่ละคน แถบเส้นแสดงค่าเฉลี่ยของระดับแอนติบอดีในแต่ละกลุ่ม



รูปที่ 9 ค่า optical density ที่ความยาวช่วงคลื่นแสง 450 nm (OD450) ในการวัดระดับแอนติบอดีชนิด IgG3 ที่จำเพาะต่อโปรตีน peptidoglycan associated lipoprotien (PAL) ในกระแสเลือดของผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่มีการติดเชื้อปัจจุบัน (active infections) ทั้งที่ตรวจพบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด (Ag+/mf+) และตรวจไม่พบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด (Ag+/mf-) คนปกติที่อาศัยอยู่ในแหล่งชุกชุมของโรคเท้าช้าง (endemic normals; EN) และผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่มีพยาธิสภาพเรื้อรัง (chronic pathology; CP) โดยวิธี indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) จุดแต่ละจุดแสดงระดับแอนติบอดีของแต่ละคน แถบเส้นแสดงค่าเฉลี่ยของระดับแอนติบอดีในแต่ละกลุ่ม (*) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)



รูปที่ 10 ค่า optical density ที่ความยาวช่วงคลื่นแสง 450 nm (OD450) ในการวัดระดับแอนติบอดีชนิด IgG4 ที่จำเพาะต่อโปรตีน peptidoglycan associated lipoprotien (PAL) ในกระแสเลือดของผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่มีการติดเชื้อปัจจุบัน (active infections) ทั้งที่ตรวจพบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด (Ag+/mf+) และตรวจไม่พบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด (Ag+/mf-) คนปกติที่อาศัยอยู่ในแหล่งชุกชุมของโรคเท้าช้าง (endemic normals; EN) และผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่มีพยาธิสภาพเรื้อรัง (chronic pathology; CP) โดยวิธี indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) จุดแต่ละจุดแสดงระดับแอนติบอดีของแต่ละคน แถบเส้นแสดงค่าเฉลี่ยของระดับแอนติบอดีในแต่ละกลุ่ม

<u>โครงการย่อยที่ 3</u> **"การพัฒนาตัวติดตามเพื่อพยากรณ์การเกิดภาวะเท้าช้างและการเกิดปฏิกิริยาหลังการรักษา"**

ในปี 2004 Noguchi และคณะได้รายงานความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *TLR* แบบ -197 to -174 insertion/deletion (ins/del) ในส่วน 5' untranslated region (UTR) โดยที่อัลลีล -197 to -174 del ส่งผลให้การเป็น promoter ลดลง ต่อมามีรายงานว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมดังกล่าวเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็งในชาวญี่ปุ่น ด้วยความน่าสนใจของความหลากหลายทางพันธุกรรมดังกล่าวจึงได้คัดเลือกมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้

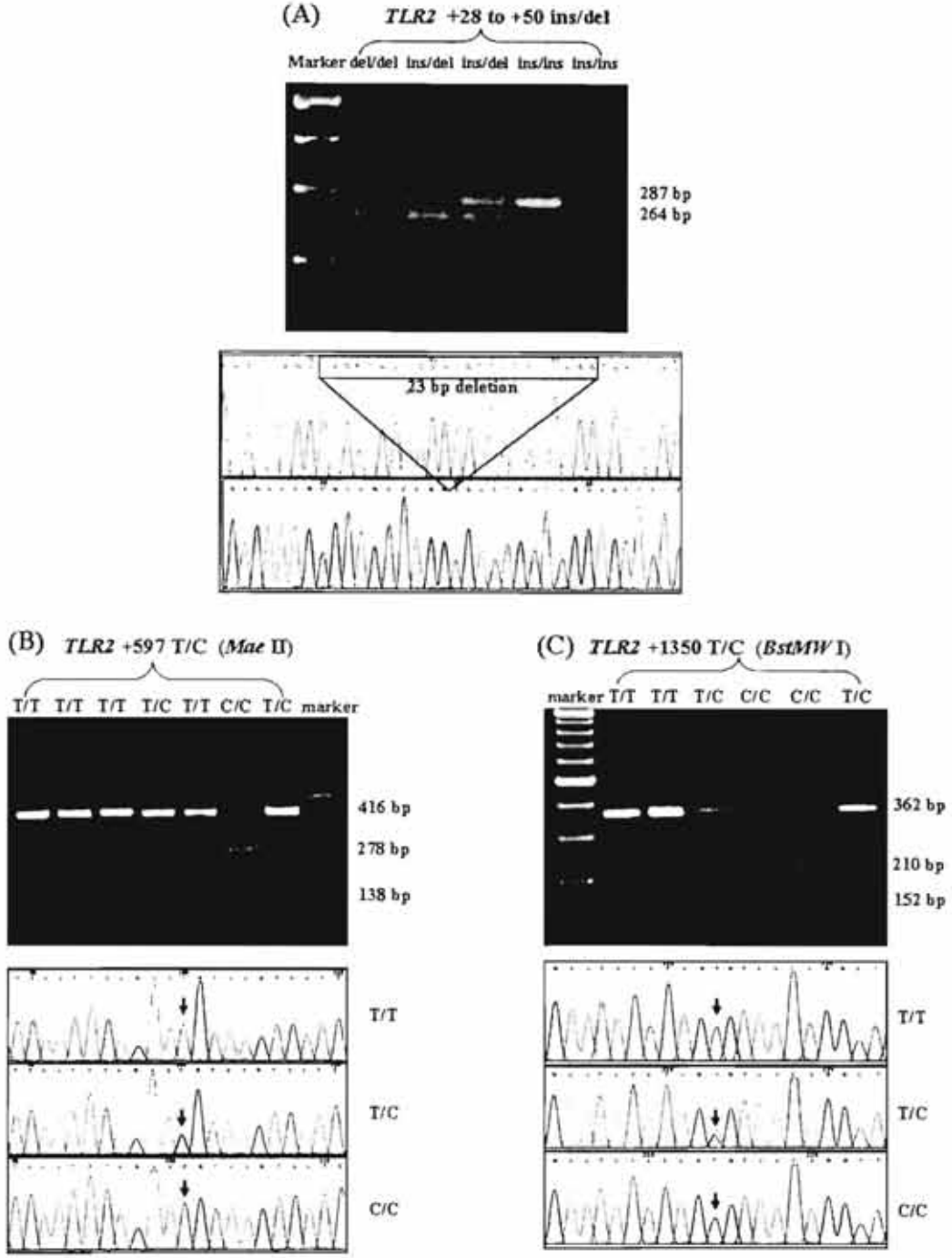
จากฐานข้อมูล HAPMAP ทำการเลือก SNPs ที่มีความถี่ของอัลลีลมากกว่า 5% ในกลุ่มประชากรชาวจีนและชาวญี่ปุ่นซึ่งเป็นตัวแทนประชากรชาวเอเชีย ซึ่งทำให้ได้ SNPs 2 ตำแหน่ง คือ +597 T/C, Asn199Asn, rs3804099 และ +1350 T/C, Ser450Ser, rs3804100 ซึ่งทั้งสองตำแหน่งอยู่ใน exon 3

ผลการศึกษาพบว่าความถี่ของจีโนไทป์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *TLR2* ทั้ง 3 ตำแหน่งที่ทดสอบ -197 to -174 ins/del, +597 T/C, และ +1350 T/C อยู่ในสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (P>0.05) รูปแบบแถบดีเอ็นเอหลังจากนำไปวิ่งผ่านกระแสไฟฟ้าและ chromatogram ของลำดับเบสแสดงในรูปที่ 11

TLR2 -197 to -174 ins/ins homozygote เห็นแถบดีเอ็นเอ 1 แถบที่ขนาด 264 bp ในขณะที่ *TLR2* -197 to -174 del/del homozygote เห็นแถบดีเอ็นเอ 1 แถบที่ขนาด 286 bp สำหรับ *TLR2* -197 to -174 ins/del heterozygote เห็นแถบดีเอ็นเอ 2 แถบที่ขนาด 286 และ 264 bp

TLR2 +597 T/T homozygote ไม่มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mae* II จึงไม่ถูกตัด เห็นแถบดีเอ็นเอ 1 แถบที่ขนาด 416 bp สำหรับ *TLR2* +597 C/C homozygote ซึ่งมีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mae* II เห็นแถบดีเอ็นเอ 2 แถบที่ขนาด 138 และ 278 bp ส่วน *TLR2* +597 T/C heterozygote แถบดีเอ็นเอ 3 แถบที่ขนาด138, 278 และ 416 bp

TLR2 +1350 T/T homozygote ไม่มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BstMW* I จึงไม่ถูกตัด เห็นแถบดีเอ็นเอ 1 แถบที่ขนาด 362 bp สำหรับ *TLR2* +1350 C/C homozygote ซึ่งมีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BstMW* I เห็นแถบดีเอ็นเอ 2 แถบที่ขนาด 152 และ 210 bp ส่วน *TLR2* +1350 T/C heterozygote แถบดีเอ็นเอ 3 แถบที่ขนาด152, 210 และ 362 bp



<u>รูปที่ 11</u> รูปแบบของแถบดีเอ็นเอหลังจากนำไปวิ่งผ่านกระแสไฟฟ้า และ Chromatogram จากการทำ DNA sequencing ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *TLR2* ที่ตำแหน่ง (A) -197 to -174 ins/del, (B) +597 T/C, และ (C) +1350 T/C สามเหลี่ยมแสดงการขาดหายของลำดับเบส 23 bp ในขณะที่ลูกศรชี้ตำแหน่งของความหลากหลายทางพันธุกรรม การยืนยันรูปแบบความหลากหลายทางพันธุกรรมของของยีน *TLR2* โดยการหาลำดับเบสซึ่ง ให้รูปแบบของความหลากหลายทางพันธุกรรมสอดคล้องกับ PCR-RFLP

การกระจายตัวของความถี่จีโนไทป์และความถี่อัลลีล

เปรียบเทียบความถี่อัลลีลและความถี่จีโนไทป์ของผู้ป่วยโรคเท้าช้างกับของกลุ่มควบคุม เพื่อวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมดังกล่าวต่อความไวรับของโรคเท้าช้าง ความถี่อัลลีลและความถี่จีโนไทป์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ตำแหน่ง -197 to -174 ins/del ในบริเวณ 5' UTR, +597 T/C และ +1350 T/C ใน exon 3 ของยีน *TLR2* ในผู้ป่วยโรคเท้าช้างและใน endemic normals แสดงใน**ตารางที่ 1**

พบอัลลีล -197 to -174del ในกลุ่มผู้ป่วยโรคเท้าช้าง (23.4%) สูงกว่าในกลุ่มควบคุม (13.0%) อย่างมีนัยสำคัญ โดยที่ผู้ที่มีอัลลีล -197 to -174del มีความไวรับต่อโรคเท้าช้างที่เกิดจาก *W. bancrofti* มากกว่ากลุ่มควบคุมถึง 2.04 เท่า ([*P* = 0.0027], OR= 2.04 [95%CI = 1.27-3.30]) และจากการเปรียบเทียบจีโนไทป์ พบผู้ที่เป็นพาหะของอัลลีล -197 to -174del (ins/del และ del/del) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคเท้าช้าง (ความถี่จีโนไทป์แบบ ins/ins, ins/del และ del/del เท่ากับ 60.9%, 31.3% และ7.8% ตามลำดับ) สูงกว่าในกลุ่มควบคุม (ความถี่จีโนไทป์แบบ ins/ins, ins/del และ del/del เท่ากับ 77.5%, 18.9%, และ 3.6% ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นผู้ที่เป็นมีจีโนไทป์แบบ ins/del และ del/del มีความเสี่ยงต่อโรคเท้าช้างที่เกิดจาก *W. bancrofti* มากกว่าผู้ที่มีจีโนไทป์แบบ ins/ins ถึง 2.21 เท่า [*P* = 0.005], OR= 2.21 [95%CI = 1.25-3.92]

พบอัลลีล +597C ในกลุ่มผู้ป่วยโรคเท้าช้าง (19.1%) สูงกว่าในกลุ่มควบคุม (9.1%) อย่างมีนัยสำคัญ โดยที่ผู้ที่มีอัลลีล +597C มีความไวรับต่อโรคเท้าช้างที่เกิดจาก *W. bancrofti* มากกว่ากลุ่มควบคุมถึง 2.38 เท่า ([*P* = 0.001], OR = 2.38 [95%CI = 1.38-4.11]) และจากการเปรียบเทียบจีโนไทป์ พบผู้ที่เป็นพาหะของอัลลีล +597C (T/C และ C/C) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคเท้าช้าง (ความถี่จีโนไทป์ T/T, T/C และ C/C เท่ากับ 64.9%, 32.0% และ 3.1% ตามลำดับ) สูงกว่าในกลุ่มควบคุม (ความถี่จีโนไทป์ T/T, T/C และ C/C เท่ากับ 82.6%, 16.7% และ 0.7 ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นผู้ที่เป็นมีจีโนไทป์แบบ T/C และ C/C มีความเสี่ยงต่อการเป็นโรคเท้าช้างที่เกิดจาก *W. bancrofti* มากกว่าผู้ที่มีจีโนไทป์แบบ T/T 2.58 เท่า[*P* = 0.001], OR= 2.58 [95%CI = 1.40-4.75]

พบอัลลีล +1350C ในกลุ่มผู้ป่วยโรคเท้าช้าง (12.9%) สูงกว่าในกลุ่มควบคุม (6.5%) อย่างมีนัยสำคัญ โดยที่ผู้ที่มีอัลลีล +1350C มีความไวรับต่อโรคเท้าช้างที่เกิดจาก *W. bancrofti* มากกว่ากลุ่มควบคุมถึง 2.12 เท่า ([*P* = 0.0189], OR = 2.12 [95%CI = 1.12-4.04]) และจากการเปรียบเทียบจีโนไทป์ พบผู้ที่เป็นพาหะของอัลลีล +1350C (T/C and C/C) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคเท้าช้าง (ความถี่จีโนไทป์แบบ T/T, T/C และ C/C เท่ากับ 75.0%, 24.2% และ 0.8% ตามลำดับ) สูงกว่าในกลุ่มควบคุม (ความถี่จีโนไทป์ 87.7%, 11.6% และ 0.7% ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นผู้ที่เป็นมีจีโนไทป์แบบ T/C และ C/C มีความเสี่ยงต่อการเป็นโรคเท้าช้างที่เกิดจาก *W. bancrofti* มากกว่าผู้ที่มีจีโนไทป์แบบ T/T 2.37 เท่า [*P* = 0.0121], OR= 2.37 [95%CI = 1.19-4.77]

ตารางที่ 1 ความถี่อัลลีลและความถี่จีโนไทป์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *TLR2* ในผู้ป่วยโรคเท้าช้างและในกลุ่มควบคุม

	ผู้ป่วยโรคเท้าช้าง n = 128		กลุ่มควบคุม n =138
-197 to -174 ins/del			
ความถี่อัลลีล			
ins	196 (76.6%)		240 (87.0%)
del	60 (23.4%)		36 (13.0%)
OR (95%CI)		2.04 (1.27-3.30)	
P		**0.0027***	
ความถี่จีโนไทป์			
ins/ins	78 (60.9%)		107 (77.5%)
ins/del	40 (31.3%)		26 (18.9%)
del/del	10 (7.8%)		5 (3.6%)
Dominant model[a]			
OR (95%CI)		2.21 (1.25-3.92)	
P		**0.005***	
+597 T/C			
ความถี่อัลลีล			
T	207 (80.9%)		251 (90.9%)
C	49 (19.1 %)		25 (9.1%)
OR (95%CI)		2.38 (1.38-4.11)	
P		**0.001***	
ความถี่จีโนไทป์			
T/T	83 (64.9%)		114 (82.6%)
T/C	41(32.0%)		23 (16.7%)
C/C	4 (3.1%)		1 (0.7%)
Dominant model[a]			
OR (95%CI)		2.58 (1.40-4.75)	
P		**0.001***	

+1350 T/C			
ความถี่อัลลีล			
T	223(97.1%)		258 (93.5%)
C	33 (12.9 %)		18 (6.5%)
OR (95%CI)		2.12 (1.12-4.04)	
P		**0.0189***	
ความถี่จีโนไทป์			
T/T	96(75.0%)		121 (87.7%)
T/C	31(24.2%)		16 (11.6%)
C/C	1(0.8%)		1 (0.7%)
Dominant model[a]			
OR (95%CI)		2.37 (1.19-4.77)	
P		**0.0121***	

* มีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$

[a] ins/ins เปรียบเทียบกับ (ins/del และ del/del)

[b] T/T เปรียบเทียบกับ (T/C and C/C)

Linkage disequilibrium (LD)

คำนวนค่า pairwise LD coefficients $|D'|$ เพื่อทดสอบการถ่ายทอดไปร่วมกันของความหลากหลายทางพันธุกรรมทั้ง 3 ตำแหน่ง โดยใช้โปรแกรม Java LINkage Disequilibrium Plotter (JLIN) (Carter *et al.*, 2006) **(ตารางที่ 2)** พบการถ่ายทอดไปร่วมกันของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *TLR2* ทั้ง 3 ตำแหน่งอย่างมีนัยสำคัญ ความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ตำแหน่ง -197 to -174 ins/del ถ่ายทอดไปร่วมกับความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ตำแหน่ง +597 T/C และ +1350 T/C อย่างมีนัยสำคัญ ($|D'|$ = 0.70814 และ 0.6543 ตามลำดับ) และความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ตำแหน่ง +597 T/C ถ่ายทอดไปร่วมกับความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ตำแหน่ง +1350 อย่างมีนัยสำคัญ ($|D'|$ = 0.8100)

ตารางที่ 2 ค่าสัมประสิทธิ์ Linkage disequilibrium ($|D'|$) ในกลุ่มความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *TLR2*

$\|D'\|$	-197 to -174 ins/del	+597 T/C	+1350 T/C
-197 to -174 ins/del	-	0.70814	0.6543
+ 597 T/C	-	-	0.8100
+ 1350 T/C	-	-	-

ความสัมพันธ์ระหว่าง haplotypes ของยีน *TLR2* และโรคเท้าช้าง

เพื่อทดสอบหารูปแบบความหลากหลายทางพันธุกรรมของร่วมกันทั้ง 3 ตำแหน่ง คือ *TLR2* -197 to -174 ins/del, +597 T/C และ +1350 T/C ในการเพิ่มโอกาสความเสียงความไวรับต่อโรคเท้าช้าง จึงได้วิเคราะห์ค่า haplotypes โดยใช้โปรแกรม Phase v2.0.2 (**ตารางที่ 3**)

TLR2 haplotype ซึ่งประกอบด้วยอัลลีล -197 to -174del, อัลลีล +597C, และอัลลีล +1350C (-197 to -174del/+597C/+1350C; delCC) พบมากในผู้ป่วยโรคเท้าช้าง (12.5%) มากกว่ากลุ่มควบคุม (4.3%) อย่างมีนัยสำคัญ ([P = 0.0011], OR = 3.14 [95%CI = 1.52-6.63]) ดังนั้นผู้ที่มี haplotype แบบ delCC มีความเสี่ยงในการเป็นโรคเท้าช้างมากกว่าผู้ที่มี haplotype แบบอื่นๆ ถึง 3.14 เท่า ในทางกลับกันผู้ที่มี haplotype ซึ่งประกอบด้วยอัลลีล -197 to -174ins อัลลีล +597T และอัลลีล +1350T (-197 to -174ins/+597T/+1350T; insTT) พบมากในกลุ่มควบคุม (83.7%) มากกว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคเท้าช้าง (75.4%) อย่างมีนัยสำคัญ (OR = 0.60, 95%CI = 0.38-0.94, P = 0.0231) ซึ่งอาจจะมีผลในการป้องกันการเป็นโรคเท้าช้าง (protective effect) เนื่องจากความหลากหลายทางพันธุกรรมของทั้ง 3 แบบ อยู่ในตำแหน่งที่แตกต่างกัน จึงสามารถสรุปได้ว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมทั้ง 3 ตำแหน่งสัมพันธ์กับความไวรับต่อโรคเท้าช้าง

ตารางที่ 3 ความถี่ Haplotype ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *TLR2* (-197 to -174 ins/del, +597 T/C และ+1350 T/C) ในผู้ป่วยโรคเท้าช้างและในกลุ่มควบคุม

ความถี่ Haplotype	ผู้ป่วยโรคเท้าช้าง (n=256)	กลุ่มควบคุม (n=276)	*P*-value
-197 to -174ins/+597T/+1350T	193 (75.4%)	231 (83.7%)	0.0231[a]
other haplotype	63 (24.6(%)	45 (16.3%)	
-197 to -174del/+597C/+1350C	32 (12.5%)	12 (4.3%)	0.0011[b]
other haplotype	224 (87.5%)	264 (95.7%)	
-197 to -174del/+597T/+1350T	14 (5.5%)	18 (6.5%)	0.7429
other haplotype	242 (94.5%)	258 (93.5%)	
-197 to -174del/+597C/+1350T	12 (4.7%)	7 (2.5%)	0.2703
other haplotype	244 (95.3%)	269 (97.5%)	
-197 to -174ins/+597C/+1350T	4 (1.6%)	3 (1.1%)	0.7157[c]
other haplotype	252 (98.4%)	273 (98.9%)	
-197 to -174ins/+597C/+1350C	1 (0.4%)	3 (1.1%)	0.6246[c]
other haplotype	255 (99.6%)	273 (98.9%)	
-197 to -174ins/+597T/+1350C	0 (0.0%)	3 (1.1%)	0.2496[c]
other haplotype	256 (100.0%)	273 (98.9%)	

[a] $P = 0.0231$, OR = 0.60, 95%CI = 0.38-0.94

[b] $P = 0.0011$, OR = 3.14, 95%CI = 1.52-6.63

[c] Fisher exact test

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากศึกษารูปแบบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันหลังการรักษาโรคเท้าช้างที่สัมพันธ์กับการเกิดปฏิกิริยาหลังการรักษา พบว่าไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ได้แก่ interleukin (IL)-6 และ tumor necrosis factor (TNF)-α สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังการรักษา ($P < 0.05$) โดยพบว่าระดับของไซโตไคน์ IL-6 สอดคล้องกับระดับความรุนแรงของปฏิกิริยาหลังการรักษา นอกจากนี้ยังพบการสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของระดับไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการต้านการอักเสบ IL-10 ในกลุ่มผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่เกิดปฏิกิริยาหลังการรักษาชนิดปานกลางและชนิดรุนแรงที่เวลา แสดงถึงมีการอักเสบของทางเดินน้ำเหลืองของผู้ป่วย และมีการสร้างไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบและและมีการสร้างไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการต้านการอักเสบขึ้นมาเพื่อลดปฏิกิริยาการอักเสบที่เกิดขึ้นภายหลังการรักษาอย่างต่อเนื่อง

การศึกษาอัตราส่วนระหว่างระดับไซโตไคน์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบกับไซโตไคน์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการต้านการอักเสบเป็นตัวติดตามที่ดีของการดำเนินโรคของการติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือดและการเลือกแนวทางการรักษา (Gogos et al., 2000) อย่างไรก็ตาม การศึกษาอัตราส่วนระหว่างระดับไซโตไคน์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบกับไซโตไคน์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการต้านการอักเสบในผู้ป่วยโรคเท้าช้างหลังการรักษาแต่ละราย ไม่พบความสัมพันธ์ของอัตราส่วนดังกล่าวกับความรุนแรงของความรุนแรงของปฏิกิริยาหลังการรักษา แสดงให้เห็นถึงรูปแบบที่จำเพาะของการเกิดปฏิกิริยาหลังการรักษาของโรคเท้าช้าง ดังนั้นการศึกษาหาโมเลกุลที่เป็นสาเหตุของการเกิดปฏิกิริยาหลังการรักษา การพัฒนายาใหม่ ตลอดจนการเฝ้าระวังผู้ป่วยในระหว่างการรักษาแบบหมู่ของโครงการกำจัดโรคเท้าช้างจึงมีความจำเป็นเป็นอย่างยิ่ง

นอกจากนี้จากการศึกษาระดับไซโตไคน์ IL-12 ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมบทบาทของ T lymphocyte ที่ถูกสร้างขึ้นมาเพื่อตอบสนองต่อแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในเซลล์ซึ่งเป็นภูมิคุ้มกันแบบมีแต่กำเนิดในระยะเริ่มต้น (early innate immune response) และกระตุ้น T cell ให้มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะโดยผ่านเซลล์ อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาระดับไซโตไคน์ IL-12 ในผู้ป่วยโรคเท้าช้างหลังการรักษาไม่พบการสร้างไซโตไคน์ IL-12 สูงขึ้นภายหลังการรักษา และไม่พบความสัมพันธ์ของระดับของไซโตไคน์ IL-12 กับระดับความรุนแรงของปฏิกิริยาหลังการรักษา จึงสันนิษฐานว่าไม่มีการสร้างภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะและภูมิคุ้มจำต่อแอนติเจนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิกิริยาหลังการรักษา ซึ่งสอดคล้องกับการเกิดปฏิกิริยาหลังการรักษาซ้ำในผู้ป่วยที่ได้รับยา DEC ในครั้งต่อไป

จากรูปแบบการเกิดปฏิกิริยาการรักษาที่มีรูปแบบคล้ายกับรูปแบบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือด และจากการค้นพบแบคทีเรียโวลบาเชียในพยาธิโรคเท้าช้าง ดังนั้นแบคทีเรียโวลบาเชียจึงน่าจะมีบทบาทสำคัญในการก่อให้เกิดพยาธิสภาพและก่อให้เกิดปฏิกิริยาหลังการรักษาของโรคเท้าช้าง จากการทบทวนวรรณกรรมตลอดจนค้นหาจากฐานข้อมูลของแบคทีเรียโวลบาเชียได้พบโปรตีน *Wolbachia* surface protein (WSP) และ peptidoglycan-associated lipoprotein (PAL) คาดว่าเป็นโปรตีนหลักของแบคทีเรียโวลบาเชียที่สัมพันธ์กับการเกิดพยาธิสภาพของโรคเท้าช้าง จึงได้ทำการโคลนและสร้างโปรตีนบริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการ และวัดระดับแอนติบอดีชนิดต่างๆ ที่จำเพาะต่อโปรตีน WSP และ PAL ในกระแสเลือดของผู้ป่วยโรคเท้าช้างซึ่งมีอาการทางคลินิกต่างๆ พบว่าแอนติบอดีชนิด IgG3 ที่จำเพาะต่อโปรตีน PAL มีระดับสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่ตรวจพบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดเท่านั้น ไม่พบการสูงขึ้นในผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่ตรวจไม่พบไมโครฟิลาเรีย และไม่พบความสัมพันธ์ของระดับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน PAL กับการเกิดพยาธิสภาพเรื้อรังของโรคเท้าช้าง

ในขณะที่ผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อปัจจุบันมีการสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของแอนติบอดีชนิด IgG1 และ IgG3 ที่จำเพาะต่อโปรตีน WSP นอกจากนี้ แอนติบอดีชนิด IgG1 ที่จำเพาะต่อโปรตีน WSP ยังมีระดับสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่มีพยาธิสภาพ ซึ่งสอดคล้องกับการพบแอนติบอดีชนิด IgG1 ที่จำเพาะต่อพยาธิโรคเท้าช้างสัมพันธ์กับการเกิดพยาธิสภาพเรื้อรังของโรคเท้าช้าง ดังนั้นโปรตีน WSP จึงน่าจะเป็นโปรตีนที่สำคัญที่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาการอักเสบและก่อให้เกิดพยาธิสภาพโรคเท้าช้างได้ ซึ่งการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาพบการสร้างแอนติบอดีต่อโปรตีน WSP มีความสัมพันธ์กับการที่สัตว์ติดเชื้อพยาธิฟิลาเรียในสัตว์ ทั้งนี้ พบการสร้างแอนติบอดีต่อโปรตีน WSP ในแมวที่ติดเชื้อพยาธิ *D. immitis* สำหรับการตรวจหาแอนติบอดีต่อโปรตีน WSP ในคน พบว่าสัมพันธ์กับการเกิดโรค โดยในผู้ป่วยโรค pulmonary dirofilariasis จากการติดเชื้อพยาธิ *D. immitis* จะมีระดับของแอนติบอดีต่อ WSP สูงกว่าคนปกติในพื้นที่เดียวกัน นอกจากนี้ การสร้างแอนติบอดีต่อโปรตีน WSP ยังมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดพยาธิสภาพของโรคเท้าช้าง โดยพบการสร้างแอนติบอดีต่อโปรตีน WSP สัมพันธ์กับการเกิดภาวะระบบน้ำเหลืองอักเสบในลิงที่ติดพยาธิโรคคเท้าช้าง *B. malayi*และในผู้ป่วยโรคเท้าช้างจากพยาธิ *W. bancrofti*

ในการศึกษานี้เราพบความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *TLR2* แบบ -197 to -174 ins/del, +597 T/C และ +1530 T/C และความไวรับต่อโรคเท้าช้าง ความหลากหลายทางพันธุกรรมแบบ *TLR2* +597 T/C (Asn199Asn) และ +1350 T/C (Ser450Ser) ไม่ได้ทำให้กรดอะมิโนเกิดการเปลี่ยนแปลง กลไกความหลากหลายทางพันธุกรรมแบบไม่เปลี่ยนแปลง

กรดอมิโนที่ส่งผลต่อความไวรับต่อการติดเชื้อพยาธิโรคเท้าช้าง *W. bancrofti* ยังคงไม่ทราบชัดเจน ซึ่งมันอาจจะมีอิทธิพลต่อการแสดงออกของโปรตีนได้หลายทาง เช่น อาจจะเปลี่ยนแปลงการ mRNA splicing, ความเสถียรของ mRNA (mRNA stability), และระดับการ transcription ของยีน (Bidwell *et al.*, 1998) ความหลากหลายทางพันธุกรรมแบบ +597 T/C และ +1350 T/C ถ่ายทอดไปร่วมกันกับความหลากหลายทางพันธุกรรมแบบ 23 bp (-197 to -174) ins/del ซึ่งอยู่ในบริเวณ 5' UTR ของยีน *TLR2* ความหลากหลายทางพันธุกรรมแบบ -197 to -174 ins/del อาจส่งผลต่อการทำหน้าที่ของ promoter หรือความเสถียรของ mRNA *TLR2* ซึ่งจะส่งผลต่อระดับโปรตีน TLR2 และการส่งสัญญาณของ TLR2 จากการศึกษาเมื่อเร็วๆ นี้มีพบว่าอัลลีล *TLR2* -197 to -174del สัมพันธ์กับความไวรับต่อการเกิดโรคมะเร็งกระเพาะอาหาร (non-cardiac gastric cancer; NCGC) ในผู้ติดเชื้อ *Helicobacter pylori* ชาวญี่ปุ่น (Noguchi *et al.*, 2004) โดยการขาดหายไปของลำดับเบสในตำแหน่งที่ -197 to -174 มีผลทำให้การแสดงออกของยีน TLR2 ลดลง เนื่องจากบริเวณดังกล่าวทำหน้าที่เป็น promoter (Tahara *et al.*, 2007) ซึ่งอาจจะสะท้อนถึงปริมาณการแปลรหัสเป็นโปรตีน TLR2 งานวิจัยต่อไปต้องการการพิสูจน์ในเรื่องนี้

มีรายงานพบผลของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *TLR2* ที่ตำแหน่งและแบบต่างๆ สัมพันธ์กับความไวรับต่อโรคติดเชื้อ (Kang and Chae, 2001; Ogus *et al.*, 2004; Schroder *et al.*, 2005; Thuong *et al.*, 2007) เช่น สำหรับความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *TLR2* แบบ +2029 C/T (Arg677Trp) ใน exon 3 ซึ่งเป็นการกลายพันธุ์แบบเปลี่ยนแปลงกรดอมิโน (mis-sense mutation) มีความสัมพันธ์กับความไวรับต่อโรคเรื้อน (lepromatous leprosy) (Kang and Chae, 2001; Kang *et al.*, 2002; Bochud *et al.*, 2003) ต่อมาพบความหลากหลายทางพันธุกรรมแบบของยีน *TLR2* แบบ +2258 G/A (Arg753Gln) ใน exon 3 มีความสัมพันธ์กับความไวรับต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย staphylococcal ในกระแสเลือด ซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *TLR2* แบบเดียวกันนี้ยังสัมพันธ์กับโรควัณโรค (tuberculosis) และโรคไลม์ (Lyme disease) (Lorenz *et al.*, 2000; Schroder *et al.*, 2005; Yim *et al.*, 2006) นอกจากนี้ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *TLR2* แบบ +597 T/C (Asn199Asn) ซึ่งอยู่ใน exon 3 ความสัมพันธ์กับความไวรับต่อโรคสมองอักเสบจากวัณโรคปอดในชาวเวียดนาม (Thuong *et al.*, 2007) ส่วนความหลากหลายทางพันธุกรรมของไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite polymorphism) ใน intron 2 ของยีน *TLR2* มีความสัมพันธ์กับความไวรับต่อโรควัณโรคปอด (Yim *et al.*, 2006)

ความหลากหลายทางพันธุกรรมแต่ละตำแหน่งในการศึกษานี้มีความสัมพันธ์กับโรคเท้าช้าง และพบความสัมพันธ์มากขึ้นเมื่อวิเคราะห์แบบ haplotype ซึ่งวิเคราะห์ความสัมพันธ์รูปแบบความหลากหลายทางพันธุกรรมทั้งสามตำแหน่งไปพร้อมๆ กัน โดยพบว่า *TLR2* haplotype -197 to -174del/+597C/+1350C เพิ่มความความเสี่ยงต่อการติดโรคเท้าช้างอย่างมีนัยสำคัญ ทางผู้วิจัย

สัณนิษฐานว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมแบบ -197 to -174 ins/del, +597 T/C และ +1350 T/C สัมพันธ์กับการสร้างโปรตีน TLR2 ทำให้การรับสัญญาณจาก *Wolbachia* ลดลง ส่งผลให้ความไวรับต่อโรคเท้าช้างที่เกิดจาก *W. bancrofti* เพิ่มขึ้น เนื่องจากความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน TLR2 อาจทำให้การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อโรคเท้าช้างบกพร่อง ซึ่งทำให้พยาธิโรคเท้าช้างอาศัยอยู่ในร่างกายได้นานยิ่งขึ้น

กล่าวโดยสรุปงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นทางด้านระบาดวิทยาเชิงพันธุกรรมซึ่งพบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *TLR2* แบบ -197 to -174 ins/del, +597 T/C, และ +1350 T/C มีความน่าสนใจในการพิสูจน์ทราบของความไวรับต่อโรคเท้าช้าง การศึกษาต่อไปต้องการการพิสูจน์ความสำคัญของการทำหน้าที่ของความหลากหลายทางพันธุกรรม แต่อย่างไรก็ตามควรตระหนักถึงการสัมพันธ์ของโรคเท้าช้างกับความหลากหลายทางพันธุกรรมที่พบอาจจะถ่ายทอดไปร่วมกันกับความหลากหลายทางพันธุกรรมอื่นที่ไม่ได้ระบุในยีน *TLR2* หรือยีนใกล้เคียงอื่นๆ

บรรณานุกรม

1. Babu S, Ganley LM, Klei TR, Shultz LD, Rajan TV. (2000) Role of gamma interferon and interleukin-4 in host defense against the human filarial parasite *Brugia malayi*. Infection and Immunity. 68: 3034-3035.

2. Behbehani K. (1998) Candidate parasitic diseases. Bulletin of the World Health Organization. 76 Suppl 2: 64-67.

3. Bhumiratana A, Koyadun S, Suvannadabba S, Karnjanopas K, Rojanapremsuk J, Buddhirakkul P, Tantiwattanasup W. (1999) Field trial of the ICT filariasis for diagnosis of *Wuchereria bancrofti* infections in an endemic population of Thailand. The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health. 30: 562-568.

4. Bhunia B, Bhandary YP, Reddy MV, Harinath BC. (2003) Analysis of IgG subclasses and IgE antibodies across the clinical spectrum of bancroftian filariasis in an endemic area. Indian journal of pathology and microbiology. 46: 113-117.

5. Bidwell JP, Alvarez M, Feister H, Onyia J, Hock J (1998) Nuclear matrix proteins and osteoblast gene expression. Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research. 13: 155-167.

6. Bochud PY, Hawn TR, Aderem A (2003) Cutting edge: a Toll-like receptor 2 polymorphism that is associated with lepromatous leprosy is unable to mediate mycobacterial signaling. Journal of immunology. 170; 3451-3454.

7. Das PK. (2002) Prospects of elimination of lymphatic filariasis in India. ICMR Bulletin. 32.

8. Day KP. (1991) The endemic normal in lymphatic filariasis: a static concept. Parasitology Today. 7: 341-343.

9. Dimock KA, Eberhard ML, Lammie PJ. (1996) Th1-like antifilarial immune responses predominate in antigen-negative persons. Infection and Immunity. 64: 2962-2967.

10. Dreyer G, Pires ML, de Andrade LD, Lopes E, Medeiros Z, Tenorio J, Coutinho A, Noroes J, Figueredo-Silva J. (1994) Tolerance of diethylcarbamazine by microfilaraemic and

amicrofilaraemic individuals in an endemic area of Bancroftian filariasis, Recife, Brazil. Transactions of Royal Society of Tropical Medicine Hygiene. 88: 232-236.

11. Freedman DO. (1998) Immune dynamics in the pathogenesis of human lymphatic filariasis. Parasitology Today. 14: 229-234.

12. Freedman DO, Nutman TB, Ottesen EA. (1989) Protective immunity in bancroftian filariasis. Selective recognition of a 43-kD larval stage antigen by infection-free individuals in an endemic area. The Journal of clinical investigation. 83: 14-22.

13. Gogos CA, Drosou E, Bassaris HP, Skoutelis A. Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. *J Infect Dis* 2000; 181:176–180

14. Haarbrink M, Abadi GK, Buurman WA, Dentener MA, Terhell AJ, Yazdanbakhsh M. (2000) Strong association of interleukin-6 and lipopolysaccharide-binding protein with severity of adverse reactions after diethylcarbamazine treatment of microfilaremic patients. The Journal of Infectious Diseases. 182: 564-569.

15. Haarbrink M, Terhell AJ, Abadi GK, Mitsui Y, Yazdanbakhsh M. (1999) Adverse reactions following diethylcarbamazine (DEC) intake in 'endemic normals', microfilaraemics and elephantiasis patients. Transactions of Royal Society of Tropical Medicine Hygiene. 93: 91-96.

16. Haarbrink M, Terhell AJ, Abadi GK, Mitsui Y, Yazdanbakhsh M. (1999) Inflammatory cytokines following diethylcarbamazine (DEC) treatment of different clinical groups in lymphatic filariasis. Transactions of Royal Society of Tropical Medicine Hygiene. 93: 665-672.

17. Halma MAT, Wheelhouse NM, Barder MD, Powell JJ, Fearon KCH, Ross JA. (2005) Interferon—γ polymorphisms correlate with duration of survival in pancreatic cancer. Human Immunology. 65: 1405-1408.

18. Hise AG, Daehnel K, Gillette-Ferguson I, Cho E, McGarry HF, Taylor MJ, Golenbock DT, Fitzgerald KA, Kazura JW, Pearlman E. (2007) Innate immune responses to endosymbiotic *Wolbachia* bacteria in *Brugia malayi* and *Onchocerca volvulus* are dependent on TLR2, TLR6, MyD88, and Mal, but not TLR4, TRIF, or TRAM. Journal of Immunology. 178:1068-1076.

19. Hoerauf A, Brattig N. (2002) Resistance and susceptibility in human onchocerciasis--beyond Th1 vs. Th2. Trends in Parasitoloty. 18: 25-31.

20. Jenson JS, O'Connor R, Osborne J, Devaney E. (2002) Infection with *Brugia* microfilariae induces apoptosis of CD4(+) T lymphocytes: a mechanism of immune unresponsiveness in filariasis. European journal of immunology. 32: 858-867.

21. Jitpakdi A, Choochote W, Panart P, Insun P, Panart K, Pitasawat B, Prajakwong S. (1999) Variation in microfilariae and infective stages of two types of *Wuchereria bancrofti* from the Thai-Myanmar border. Journal of Helminthology. 73: 317-321.

22. Kang TJ, Lee SB, Chae GT (2002) A polymorphism in the toll-like receptor 2 is associated with IL-12 production from monocyte in lepromatous leprosy. Cytokine. 20: 56-62.

23. Kang TJ, Chae GT (2001) Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients. FEMS immunology and medical microbiology. 31: 53-58.

24. Karnjanopas K. (1997) The susceptibility of some strains *Culex quinquefasciatus* in Thailand to nocturnal periodic *Wuchereria bancrofti*. Journal of Public Health. 27: 169-177.

25. Kwan-Lim GE, Forsyth KP, Maizels RM. (1990) Filarial-specific IgG4 response correlates with active *Wuchereria bancrofti* infection. Journal of Immunology. 145: 4298-42305.

26. Lawrence RA. (2001) Immunity to filarial nematodes. Veterinary parasitology. 100: 33-44.

27. Maizels RM, Lawrence RA. (1991) Immunological tolerance: the key feature in human filariasis? Parasitoogy Today. 7: 271-276.

28. Molyneux DH, Bradley M, Hoerauf A, Kyelem D, Taylor MJ. (2003) Mass drug treatment for lymphatic filariasis and onchocerciasis. Trends in parasitology. 19: 516-22.

29. Nuchprayoon S, Porksakorn C, Junpee A, Sanprasert V. (2003) Comparative Assessment of the Og4C3 ELISA to ICT Filariasis Test: A study in Myanmar migrants of Thailand. Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology. 21: 253-257.

30. Nuchprayoon S, Sangprakarn S, Junpee A, Nithiuthai S, Chungpivat S, Poovorawan Y. (2003) Differentiation of *Brugia malayi* and *Brugia pahangi* by PCR-RFLP of ITS-1 and ITS-2. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 34 (Suppl 2): 67-73.

31. Nuchprayoon S, Sanprasert V, Porksakorn C, Nuchprayoon I. (2003) Bancroftian filariasisi in an endemic area of Thailand-Myanmar border. Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology. 21: 179-188.

32. Nuchprayoon S, Yentakam S, Sangprakarn S, Junpee A. (2001) Endemic bancroftian filariasis in Thailand: detection by Og4C3 antigen capture ELISA and the polymerase chain reaction. Journal of the Medical Association of Thailand. 84:1300-1307.

33. Noguchi E, Nishimura F, Fukai H, Kim J, Ichikawa K, Shibasaki M, Arinami T (2004) An association study of asthma and total serum immunoglobin E levels for Toll-like receptor polymorphisms in a Japanese population. Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology. 34: 177-183.

34. Ogus AC, Yoldas B, Ozdemir T, Uguz A, Olcen S, Keser I, Coskun M, Cilli A, Yegin O (2004) The Arg753GLn polymorphism of the human toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease. The European respiratory journal. 23: 219-223.

35. Ottesen EA, Duke BOL, Karam M, Behbehani K. (1997) Strategies and tools for the control/elimination of lymphatic flariasis. Bulletin of the World Health Organization. 75: 491-503.

36. Porksakorn C, Nuchprayoon S, Park K, Scott AL. (2007) Proinflammatory cytokine gene expression by murine macrophages in response to *Brugia malayi Wolbachia* surface protein. Mediators of Inflammation. 2007: 84318.

37. Porto I, Leone AM, Crea F, Andreotti F. (2005) Inflammation, genetics, and ischemic heart disease: focus on the major histocompatibility complex (MHC) genes. Cytokine 29: 187-196.

38. Ravichandran M, Mahanty S, Kumaraswami V, Nutman TB, Jayaraman K. (1997) Elevated IL-10 mRNA expression and downregulation of Th1-type cytokines in microfilaraemic individuals with *Wuchereria bancrofti* infection. Parasite Immunology. 19: 69-77.

39. Sartono E, Kruize YC, Partono F, Kurniawan A, Maizels RM, Yazdanbakhsh M. (1995) Specific T cell unresponsiveness in human filariasis: diversity in underlying mechanisms. Parasite Immunology. 17: 587-594.

40. Schroder NW, Diterich I, Zinke A, Eckert J, Draing C, von Baehr V, Hassler D, Priem S, Hahn K, Michelsen KS, Hartung T, Burmester GR, Gobel UB, Hermann C, Schumann RR (2005) Heterozygous Arg753Gln polymorphism of human TLR-2 impairs immune activation by Borrelia burgdorferi and protects from late stage Lyme disease. Journal of immunology. 175: 2534-2540

41. Shih W, Chetty R, Tsao MS. (2005) Expression profiling by microarrays in colorectal cancer (Review). Oncol Rep. 13: 517-524.

42. Sironi M, Bandi C, Sacchi L, Di Sacco B, Damiani G, Genchi C. (1995) Molecular evidence for a close relative of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* in a filarial worm. Molecular and biochemical parasitology. 74:2 223-7.

43. Specht S, Volkmann L, Wynn T, Hoerauf A. (2004) Interleukin-10 (IL-10) counterregulates IL-4-dependent effector mechanisms in murine filariasis. Infection and Immunity. 72: 6287-6293.

44. Sumethvanich C, Choochote W, Panart K, Jitpakdi A, Panart P. (1996) Comparative morphometry of nocturnally periodic and subperiodic *Wuchereria bancrofti* microfilaria. The Journal of Tropical Medicine and Parasitology. 19: 55-60.

45. Tahara T, Arisawa T, Wang F, Shibata T, Nakamura M, Sakata M, Hirata I. Nakano H (2007) Toll-like receptor 2 -196 to 174del polymorphism influences the susceptibility of Japanese people to gastric cancer. Cancer science. 98: 1790-1794.

46. Taylor MJ, Cross HF, Bilo K. (2000) Inflammatory responses induced by the filarial nematode *Brugia malayi* are mediated by lipopolysaccharide-like activity from endosymbiotic *Wolbachia* bacteria. The Journal of experimental medicine. 191:1429-1436.

47. Thuong NT, Hawn TR, Thwaites GE, Chau TT, Lan NT, Quy HT, Hieu NT, Aderem A, Hien TT, Farrar JJ, Dunstan SJ (2007) A polymorphism in human TLR2 is associated with increased susceptibility to tuberculous meningitis. Genes and immunity. 8: 422-428.

48. Triteeraprapab S. (1997) Update in lymphatic filariasis: a re-emerging disease of Thailand. Chulalongkorn Medical Journal. 41: 611-622.

49. Triteeraprapab S, Karnjanopas K, Porksakorn C, Sai-Ngam A, Yentakam S, Loymak S. (2001) Lymphatic filariasis caused by *Brugia malayi* in an endemic area of Narathiwat Province, southern of Thailand. Journal of the Medical Association of Thailand. 84 Suppl 1:S182-8.

50. Triteeraprapab S, Kanjanopas K, Suwannadabba S, Sangprakarn S, Poovorawan Y and Scott AL. (2000) Transmission of the nocturnal periodic strain of *Wuchereria bancrofti* by *Culex quinquefasciatus*: Establishing the potential for urban filariasis in Thailand. Epidemiology and Infection. 125(1): 207-212.

51. Triteeraprapab S, Nuchprayoon I, Porksakorn C, Poovorawan Y, Scott AL. (2001) High prevalence of *Wuchereria bancrofti* infection among Myanmar migrants in Thailand. Annals of tropical medicine and parasitology. 95: 535-538.

52. Triteeraprapab S, Songtrus J. (1999) High prevalence of bancroftian filariasis in Myanmar-migrant workers: a study in Mae Sot district, Tak province, Thailand. Journal of the Medical Association of Thailand. 82: 735-9.

53. Triteeraprapab S, Thumpanyawat B, Sangprakarn S. (1998) *Wuchereria bancrofti*- specific circulating antigen for diagnosis of bancroftian filariasis. Chulalongkorn Medical Journal. 42:267-277.

54. Turner PF, Rockett KA, Ottesen EA, Francis H, Awadzi K, Clark IA. (1994) Interleukin-6 and tumor necrosis factor in the pathogenesis of adverse reactions after treatment of lymphatic filariasis and onchocerciasis. The Journal of Infectious Disease. 169:1071-1075.

55. Weil GJ, Lammie PJ, Weiss N. (1997) The ICT filariasis test: a rapid-format antigen test for diagnosis of bancroftian filariasis. Parasitology Today. 13: 401-404.

56. Wilson M, Seymour R, Henderson B. (1998) Bacterial perturbation of cytokine networks. Infections and Immunity. 66:2401-2409.

57. WHO (2003) Lymphatic filariasis: progress report on the program in 2002. Weekly Epidemiological Record, 2003. 78: 171-179.

58. Yim JJ, Adams AA, Kim JH, Holland SM (2006) Evolution of an intronic microsatellite polymorphism in Toll-like receptor 2 among primates. Immunogenetics. 58: 740-745.

ประวัตินักวิจัยและคณะ

ผู้วิจัยหลัก / หัวหน้าโครงการ

1. ชื่อผู้วิจัยหลัก (ภาษาไทย) รศ.พญ.ดร. สุรางค์ นุชประยูร

   (ภาษาอังกฤษ) Surang Nuchprayoon M.D., Ph.D., M.P.H.

2. ตำแหน่งปัจจุบัน

   รองศาสตราจารย์

3. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail

   หน่วยปฏิบัติการวิจัยโรคเท้าช้าง ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

   ถ. พระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

   โทรศัพท์ 0-2256-4387 โทรสาร 02-252-5944

   E-mail: fmedstt@md.chula.ac.th

4. ประวัติการศึกษา

ปริญญา	สาขาวิชา	มหาวิทยาลัย	ปี พ.ศ. ที่ได้รับ
แพทยศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยม)		จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2530
Master of Public Health	Immunology and infectious Diseases	Johns Hopkins University, USA	2535
Doctor of Philosophy	Molecular Parasitology and Immunology	Johns Hopkins University, USA	2538
อนุมัติบัตร	พยาธิวิทยาคลินิก	แพทยสภา	2546

5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชา

   Molecular Parasitology and Immunology

   Lymphatic filariasis

6. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย เป็นต้น

   6.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย

   -

   6.2 หัวหน้าโครงการวิจัย

   6.2.1 "Early detection of bancroftian filariasis in children and young individuals using IgG4 assays" (หัวหน้าโครงการ)

   6.2.2 "การวินิจฉัยโรคเท้าช้างที่เกิดจากเชื้อ *Wuchereria bancrofti* ในระยะแรกเริ่มโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสและการตรวจทางน้ำเลือง" (หัวหน้าโครงการ)

   6.2.3 "Poylmerase chain reaction-based detection of *Wuchereria bancrofti* in *Culex quinquefasciatus*" (หัวหน้าโครงการ)

6.2.4 "บทบาทของโวลบาเกียในการเกิดพยาธิสภาพผลข้างเคียงต่อยารักษาโรคเท้าช้าง (The role of *Wolbachia* in the pathogenesis of chemotherapy-induced adverse reactions in lymphatic filariasis)" (หัวหน้าโครงการ)

6.2.5 "การศึกษาเปรียบเทียบสายพันธุ์ของเชื้อพยาธิโรคเท้าช้าง *Wuchereria bancrofti* ในคนไทยและแรงงานอพยพ (Study and differentiation of *Wuchereria bancrofti* strains in Thais and migrant workers)" (หัวหน้าโครงการ)

6.2.6 "ความสัมพันธ์ของแอนติบอดี IgG ชนิดต่างๆ ที่จำเพาะต่อโปรตีน *Wolbachia* surface protein (WSP) ในผู้ป่วยโรคเท้าช้าง (Association between specific anti-WSP IgG subclasses and clinical manifestation in lymphatic filariasis patients)" (หัวหน้าโครงการ)

6.2.7 "ผลของยา Doxycycline ในการเพิ่มประสิทธิภาพการรักษาและลดอาการข้างเคียงของยา Diethylcarbamazine (DEC) ในการรักษาผู้ป่วยโรคเท้าช้าง (Effects of doxycycline on increasing of efficacy and decreasing of adverse drug reactions from treatment of lymphatic filariasis patients with Diethylcarbamazine (DEC))" (หัวหน้าโครงการ)

6.2.8 "ผลของยาปฏิชีวนะต่อเชื้อ *Wolbachia* spp. เพื่อนำไปใช้ในการรักษาโรคเท้าช้าง (Effects of antimicrobial agents against *Wolbachia* spp. for treatment of filariasis)" (ผู้ร่วมวิจัย)

6.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

- **Triteeraprapab S.** 1989 *Blastocystis hominis*: A neglected intestinal protozoan parasite. Chulalongkorn Medical Journal. 33: 343-348.
- **Triteeraprapab S**, Richie TL, Tuan RS, Shepley KJ, Dinman JD, Neubert TA, and Scott AL. 1995 Molecular cloning of a gene expressed during early embryonic development in *Onchocerca volvulus*. Molecular and Biochemical Parasitology. 69: 161-171.
- **Triteeraprapab S,** 1997 "Want to do research.....Who can help" Chulalongkorn Medical Journal. 41: 345-346.
- **Triteeraprapab S.** 1997 update in lymphatic filariasis: a re-emerging diesease of Thailand. Chulalongkorn Medical Journal. 41: 611-622.
- **Triteeraprapab S**, Jongwutiwes S, Chanthachume N. 1997 The prevalence rates of human intestinal parasites in Mae-la-moong, Umphang, Tak province, a rural area of Thailand. Chulalongkorn Medical Journal. 41: 649-658.
- **Triteeraprapab S.** 1998 New vaccine introduction: Summary from "The First Asia-Pacific Regional Consultation on Economic and Policy Considerations in New Vaccine Introduction" Chulalongkorn Medical Journal. 42(10): 925-933.
- **Triteeraprapab S**, Nuchprayoon I. 1998 Eosinophilia, anemia, and parasitism in a rural region of Northwest Thailand. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 29(3): 584-590.

- **Triteeraprapab S**, Thumpanyawat B, Sangprakarn S. 1998 *Wuchereria bancrofti*- specific circulating antigen for diagnosis of bancroftian filariasis. Chulalongkorn Medical Journal. 42: 267-277.
- **Triteeraprapab S**, and Songtrus J. 1999 High prevelence of bancroftian filariasis in Myanmar migrants : A study in Mae sot, Tak province, Thailand. Journal of Medical Association of Thailand. 82: 734-739.
- **Triteeraprapab S**, Akrabovorn P, Promtomg J, Chuenta K. 1999 High prevalence of hookworm infection in a population of Northeastern Thailand after an opisthorchiasis control program. Chulalongkorn Medical Journal. 43(2): 99-108.
- **Triteeraprapab S**, Thumpanyawat B, Nuchprayoon I and Thanamun B. 2000 Eosinophilia with low prevalence of parasitism in a rural area of Maha Sarakham after yearly mass treatment with mebendazle. Chulalongkorn Medical Journal. 44(6): 423-432.
- **Triteeraprapab S**, Kanjanopas K, Suwannadabba S, Sangprakarn S, Poovorawan Y and Scott AL. 2000 Transmission of the nocturnal periodic strain of *Wuchereria bancrofti* by *Culex quinquefasciatus*: Establishing the potential for urban filariasis in Thailand. Epidemiology and Infection. 125(1): 207-212.
- **Triteeraprapab S**, Nuchprayoon I, C Porksakorn, Poovorawan Y and Scott AL. 2000 High prevalence of *Wuchereria bancrofti* infection among Myanmar migrants of Thailand. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 95(5): 535-538.
- **Triteeraprapab S**, Karnjanopas K, Porksakorn C, Sai-ngam A, Yentakan S and Loymak S. 2001 Lymphatic filariasis caused by *Brugia malayi* in am endemic area of Narathiwat province, Southern of Thailand. Journal of the Medical Association of Thailand. June 84 (suppl 1): S182-S188.
- Nuchprayoon I, Sai-Ngam A, Suntrarachun, S, Noiphrom J, Pakmanee N, Chanhome L, **Nuchprayoon S**, Sitprija V. 2001 Molecular Cloning of Phospholipase A2 from a Thai Russell's Viper Venom Gland cDNA Library. Journal of the Medical Association of Thailand. 84 (suppl 1): S99-S105.
- Saksirisampant W, Chawengkiattikul R, Kraivichain K, **Nuchprayoon S**. 2001 Specific IgE Antibody Responses to Somatic and Excretory-Secretory Antigens of Third Stage *G. spinigerum* Larvae in Human Gnathostomiasis. Journal of the Medical Association of Thailand. 84 (suppl 1): S173-S181.
- **Nuchprayoon S**, Yentakam S, Sangprakarn S and Junpee A. 2001 Endemic Bancroftion filariasis in Thailand : detection by Og4C3 antigen capture ELISA and the Polymerase Chain Reaction. Journal of the Medical Association of Thailand. September 84 (9): 1300-1307.
- Saksirisampant W, Kulkaew K, **Nuchprayoon S**, Yentakham S and Wiwanitkit V. 2002 A survey of the infective larvae of *Gnathostoma spinigerum* in swamp eels bought in a local market in Bangkok, Thailand. Annals of Tropical Medicine & Parasitology.96(2): 191-195.

- **Nuchprayoon S,** Siriyasatien P, Kraivichian K, Porksakorn C, Nuchproayoon I. 2002 Prevalence of Parasitic Infections among Thai Patients at the King Chulalongkorn Memorial Hospital, Bangkok, Thailand. Journal of the Medical Association of Thailand. June 85(Suppl 1) :S415-S423.
- Saksirisampant W, **Nuchprayoon S,** Wiwanitkit V, Kraivichian K, Suwansaksri J. 2002 Prevalence and intensity of third stage *Gnathostoma spinigerum* larvae in swamp eels sold in three large markets in Bangkok, Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. June 33 (Suppl 3): 60-62.
- Saksirisampant W, Wiwanitkit V, Akrabovorn P, **Nuchprayoon S.** 2002 Parasitic infections in Thai workers that pursue overseas employment : The need for a screening program. The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health. Vol 33 (Suppl 3) :110-112.
- Nuchprayoon I, Sanpavat S, **Nuchprayoon S.** (2002) Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations in Thailand: G6PD Viangchan (871G>A) is the most common deficiency variant in the Thai population. Hum Mutation 19(2):185.
- Siriyasatien P, Yingyourd P, **Nuchprayoon S.** 2003 Efficacy of Albendazole against early and late stage of *Trichinella spiralis* infection in mice. Journal of the Medical Association of Thailand.86 (Suppl 2) : S257-S262.
- Saksirisampant W, **Nuchprayoon S,** Wiwanitkit V, Yenthakam S, Ampavasiri A. 2003 Intestinal parasitic infestations among children in an orphanage in Pathum Thani Province. Journal of the Medical Association of Thailand. 86 (Suppl 2) : S263-S270.
- **Nuchprayoon S,** Sanprasert V, Suntravat M, Kraivichian K, Saksirisampant W, Nuchprayoon I. 2003 Study of specific IgG subclass antibodies for diagnosis of *Gnathostoma spinigerum*. Parasitology Research. 91:137-143.
- **Nuchprayoon S,** Sangprakarn S, Junpee A, Nithiuthai S, Chungpivat S, Poovorawan Y. 2003 Differentiation of *Brugia malayi* and *Brugia pahangi* by PCR-RFLP of ITS-1 and ITS-2. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 34 (Suppl 2) : 67-73.
- **Nuchprayoon S,** Porksakorn C, Junpee A, Sangprakarn S, Poovorawan Y. 2003 Comparative assessment of an Og4C3 ELISA and an ICT filariasis test: A study of Myanmar in Thailand. Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology. 21: 253-257.
- **Nuchprayoon S,** Sanprasert V, Porksakorn C , Nuchprayoon I. 2003 Prevalence of Brancroftian Filariasis on the Thai-Myanmar Border. Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology. 21:179-188.
- Sritangratanakul S, **Nuchprayoon S,** Nuchprayoon I. 2004 Pneumocystis Pneumonia: An Update. Journal of the Medical Association of Thailand. 87 (Suppl 2) : S309-S417.

- Kraivichian K, **Nuchprayoon S**, Sitichalernchai P, Chaicumpa W, Yentakam S. 2004 Treatment of cutaneous Gnathostomiasis with ivermectin. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 71(5) : 623-628.
- Saksirisampant W, Prownebon J, Kammarnee P, Thaisom S, Yentakam S, **Nuchprayoon S.** 2004 Prevalence of Paraitism among Students of the Karen Hill-Tribe in Mae Chame District, Chaing Mai Province, Thailand. Journal of the Medical Association of Thailand. 87 (Suppl 2) : S278-S283.
- Jaijakul S, **Nuchprayoon S**. 2005 Treatment of lymphatic filariasis: An update. Chulalongkorn Medical Journal. July 49: 401-421.
- Sanprasert V, jaratsing P, Nuchprayoon I, **Nuchprayoon S**. 2005 Computer-Assisted Instruction in Parasitology: A Cross-Over Design. Journal of the Medical Association of Thailand. 88 (Suppl 4) : S214-S219.
- Jaijakul S, Saksirisampant W, Prownebon J, Junpee A, Yenthakam S, Mungthin M, Leelayoova S, **Nuchprayoon S**. 2005 *Pneumocystis jiroveci* in HIV/AIDS Patients: Detection by FTA Filter Paper together with PCR in Noninvasive Induced Sputum Specimens. Journal of the Medical Association of Thailand. 88 (Suppl 4) : S294-S299.
- Siriyasatein P, Tangthongchaiwiriya K, Kraivichian K, **Nuchprayoon S**, Tawatsin A, Tahvara U. 2005 Decrease of Mosquito Salivary Gland Proteins after a Blood Meal: An Implication for Pathogenesis of Mosquito Bite Allergy. Journal of the Medical Association of Thailand. 88 (Suppl 4) : S255-S259.
- Charuruks N, Milintagas A, Watanaaboonyoungcharoen P, Kalayanachati A, **Nuchprayoon S**. 2005 Annual Labaratory Checkup: Early Signs of Health Promblems in Young and Middle-Age Adults. Bnormal Results of Annual Laboratory Checkup in Young Adults. 36 (3): 769-774.
- **Nuchprayoon S**, Junpee A, Poovorawan Y, Scott AL. Detection and differentiation of filarial parasites by universal primers PCR and RFLP analysis. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 73(5): 895-900.
- **Nuchprayoon S**, Junpee A, Nithiuthai S, Chungpivat S, Suvannadabba S, Poovorawan Y. 2006 Detection of filarial parasites in domestic cats by PCR-RFLP of ITS1. Veterinary Parasitology. 140: 366-372.
- Saksirisampant W, Prownebon J, Kulkumthorn M, Yenthakam S, Janpla S, **Nuchprayoon S**. 2006 Prevalence of intestinal parasitic infections among school children in the central region of Thailand. J Med Assoc Thai. 89(11):1928-33.
- Porksakorn C, **Nuchprayoon S**, Park K, Scott AL. 2007 Proinflammatory cytokine gene expression by murine macrophages in response to *Brugia malayi Wolbachia* surface protein. Mediators of Inflammation. 2007:84318.

- **Nuchprayoon S**, Junpee A, Poovorawan Y. 2007 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) for differentiation between Thai and Myanmar strains of *Wuchereria bancrofti*. Filaria Journal. 6(1):6.
- **Nuchprayoon S**, Saksirisampant W, Jaijakul S, Nuchprayoon I. 2007. Flinders technology associates (FTA) filter paper-based DNA extraction with polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Pneumocystis jirovecii* from respiratory specimens of immunocompromised patients. Journal of Clinical Laboratory Analysis. 21(6): 382-386.
- Junpee A, **Nuchprayoon S**, Poovorawan Y. 2007 Genomic-based discovery and validation of novel anti-filarial drugs. Asian Biomedicine. 1(4): 327-344.
- Tiawsirisup S, Sripatranusorn S, Oraveerakul K, **Nuchprayoon S**. 2008. Distribution of mosquito (Diptera: Culicidae) species and *Wolbachia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) infections during the bird immigration season in Pathumthani province, central Thailand. Parasitology Research. 102(4): 731-735.

6.4 งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย และสถานภาพในการทำ

- "การศึกษาภูมิคุ้มกันวิทยาเชิงลึกของโรคเท้าช้าง: มุ่งสู่การป้องกันภาวะเท้าช้างและการกำจัดโรคอย่างถาวร (Advanced immunological study of lymphatic filariasis: Towards prevention of chronic pathology and permanent disease elimination)" เป็นผู้วิจัยหลัก (ระหว่างดำเนินการ)
- "ผลของยาต้านจุลชีพที่มีต่อไมโครฟิลาเรียของพยาธิโรคเท้าช้างบรูเกีย มาลาไย (Effects of antimicrobial agents on the *Brugia malayi* microfilariae)" เป็นผู้วิจัยหลัก (ระหว่างดำเนินการ)

ผู้ร่วมโครงการวิจัยคนที่ 1

1. **ชื่อผู้วิจัย** (ภาษาไทย) รศ. ดร. จินตนา จิรถาวร

   (ภาษาอังกฤษ) Chintana Chirathaworn, Ph.D

2. **ตำแหน่งปัจจุบัน**

   รองศาสตราจารย์

3. **หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail**

   ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

   ถ. พระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

   โทรศัพท์ 0-2252-8181 ต่อ 3666 โทรสาร 02-252-5952

   E-mail: fmedcch@md.chula.ac.th

4. **ประวัติการศึกษา**

ปริญญา	สาขาวิชา	มหาวิทยาลัย	ปี พ.ศ. ที่ได้รับ
B.Sc.	Medical Technology	Chulalongkorn University	1985
Ph.D.	Microbiology	University of Kansas, USA	1999

5. **สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ ระบุสาขาวิชา**

   Microbiology

   Immunology

6. **ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย เป็นต้น**

   6.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย

   -

   6.2 หัวหน้าโครงการวิจัย

   - "การศึกษาพยาธิสภาพและพยาธิกำเนิดของโรคเล็ปโตสไปโรซิสในสัตว์ทดลองที่ได้รับเชื้อเล็ปโตสไปราที่ผ่านเข้าไปในสัตว์ทดลองจำนวนครั้งต่างกันเพื่อการพัฒนาวัคซีนการตรวจวินิจฉัย" ได้รับทุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2548- 2549
   - การจับของเชื้อเล็ปโตสไปรากับเมตริกซ์นอกเซลล์
   - การเปรียบเทียบการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเล็ปโตสไปราด้วยวิธี ELISA และ dot-ELISA
   - การพัฒนาวิธี Dipstick เพื่อใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM ต่อเชื้อเล็ปโตสไปรา
   - การโคลนและการแสดงออกของโปรตีนผิวเซลล์ชั้นนอกของเชื้อเล็ปโตสไปราLipL32
   - การพัฒนาวิธี Dipstick เพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเล็ปโตสไปราโดยใช้โปรตีนผิวเซลล์ส่วนนอก, LipL32 เป็นแอนติเจน

- การศึกษาการแสดงออกของ scavenger receptor, LOX-1 ในเซลล์เอ็นโดธีเลียมที่ได้รับเชื้อเฮอร์ปีซ์ ซิมเพล็กไวรัสไทป์ 1
- กลไกการกระตุ้น apoptosis ใน T lymphocyte ที่ได้รับเชื้อ herpes simplex virus
- การศึกษาพยาธิสภาพและพยาธิกำเนิดของโรคเล็ปโตสไปโรซิสในสัตว์ทดลองที่ได้รับเชื้อเล็ปโตสไปราที่ผ่านเข้าไปในสัตว์ทดลองจำนวนครั้งต่างกันเพื่อการพัฒนาวัคซีนและการตรวจวินิจฉัย

6.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

- Siriwan T, Sukonthaman A, **Chirathaworn C**, Buranasin P, Thammanichanon C. 1988 Epidemiological study of *M. pneumoniae* infection in Nakhon Ratchasima. J Med Assco Thai. 7(2): 87-91.
- Chunhaswasdikul B, Sukonthaman A, Payanandana V, Chiewvit P, **Chirathaworn C.** 1988 Respiratory tract infection in adolescence caused by *Mycoplasma pneumoniae*. Thai J Tuberc Chest Dis. 9: 191-200.
- Tatiyakavee K, Sakulramrung R, **Chirathaworn C**. 1991 Serum immunoglobulin G subclass levels in normal Thai young adults. Chula Med J. 35(9): 557-562.
- Likitnukul S, **Chirathaworn C**. 1992 Prevalence of complement fixing antibody to *Mycoplasma pneumoniae* in Thai children. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 23(1): 147-151.
- Butler Y, Tibbetts SA, **Chirathaworn C**, Benedict SH. 1995 Modulation of T cell morphology and induction of homotypic adhesion by a protein kinase inhibitor. Cell Immunol. 163(1): 129-138.
- **Chirathaworn C**, Tibbetts SA, Chan MA, Benedict SH. 1995 Crosslinking of ICAM-1 on T cells induces transient tyrosine phosphorylation and inactivation of cdc2 kinase. J Immunol.(cutting edge) 155(12): 5479-5482.
- Sindhuphak R, Leelaprute A, **Chirathaworn C**, Issaravanich S. 1998 Immunities in heroin addicts with and without HIV-1 infections. J Health Science. 7(3): 324-329.
- Tibbetts SA, **Chirathaworn** C, Nakashima M, Joih S, Siahaan T, Chan MA, Benedict SH. 1999 Peptides derived from ICAM-1 and LFA-1 modulate T cell adhesion and immune function in mixed lymphocyte culture. Transplantation. 68(5): 685-692.
- Tirawatnapong S, and **Chirathaworn C**. 1999 Macroscopic slide cell agglutination test for rapid diagnosis of Leptospirosis. Chula Med J. 43(3): 141-146.
- Potteiger JA, Can MA, Haff GG, Mathew S, Schroeder CA, Haub MD, **Chirathaworn C**, Tibbetts SA, McDonald J, Omoike O, Benedict SH. 2001 Training status influences T cell responses in women following acute resistance exercise. Strength Cond Res. 15(2): 185-191.
- **Chirathaworn C**, Lertpokasombat K, Hanvivatvong O, Teerawatanapong S. 2001 Development of enzyme-linked immunosorbent assay and dot-enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Leptospira specific IgM antibodies. Chula Med J. 45 (11): 965-970.
- Bhattarakosol P, **Chirathaworn C**, Chimma Pattamawan.2002 Replication of Herpes Simplex Virus in T lymphocytes J Med Assoc Thai. 85 (Suppl 1): S399-S406.
- Charuruks N, Vanavanitkun Y, Seublinvong T, Werawatanakumpa S, Eiam-oung S, Jindamaporn A, **Chirathaworn C**, Panyavorawuch V, Ruangvejvorachai P. 2002 Situation of laboratory service and instrument in Thailand: a descriptive study from questionnaires. J Med Asso Thai. 85 (Suppl 1): S253-S261.

- **Chirathaworn C**, Kohlmeier JE, Tibbetts SA, Rumsey LM, Chan MA, Benedict SH. 2002 Stimulation through intercellular adhesion molecule-1 provides a seconds signal for T cell activation. J Immunol. 168(11):5530-5537.
- Jitsurong S, **Chirathaworn C**, Brown NF, Beacham IR, Tumwasorn S. Searching for virulence Burkholderia pseudomallei genes by immunoscreening the lambda ZAPII expressed genomic library. 2003 Southeast Asian J trop Med Public Health. 34(4): 810-821.
- Chimma P, **Chirathaworn C**, Bhattarakosol P. 2004 Increased Susceptibility of Herpes simplex virus-1 Growth in Phytohemagglutinin-Activated T Lymphocytes Caused by Upregulation of Herpesvirus Entry Mediator A mRNA Expression. Intervirology. (1): 14-18.
- **Chirathaworn C**, Pongpanich A, Poovorawan Y. 2004 Herpes simplex virus 1 induced LOX-1 gene expression in an endothelial cell line, ECV304 cells. Viral Immunol. 17(2): 308-314.
- Pongpanich A, Bhattarakosol P, **Chirathaworn C**. 2004 Induction of Apoptosis by Herpesm Simplex Virus in Jurkat Cells is Partly Through Caspase-3, - 8 and - 9 activation. J Med Assoc Thai. 87(Suppl 2): S140-145.
- Kohno Y, Tanimoto A, **Chirathaworn C**, Shimajiri S, Tawara A, Sasaguri Y. 2004 GM-CSF activates RhoA, integrin and MMP expression in human monocytic cells. Pathol Int. 54(9): 693-702.
- Boonyod D, Poovorawan Y, Bhattarakosol P, **Chirathaworn C**. 2005 LipL32, an outer membrane protein of Leptospira, as an antigen in a dipstick assay for diagnosis of Leptospirosis. Asian Pacific J Allergy Immunol. 23: 133-141.
- Sa-nguanmoo P, Vejchapipat P, Chongsrisawat V, **Chirathaworn C**, Honsawek S, Theamboonlers A, Poovorawan Y. 2007 Analysis of connective tissue growth factor promoter polymorphism in Thai children with biliary atresia. J Med Assoc Thai. 90(2):251-7.

6.4 งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย และสถานภาพในการทำ

- "การจับของเชื้อเล็ปโตสไปรากับเมตริกซ์นอกเซลล์" เป็นผู้วิจัยหลัก (ระหว่างดำเนินการ)
- "การศึกษาพยาธิสภาพและพยาธิกำเนิดของโรคเล็ปโตสไปโรซิสในสัตว์ทดลองที่ได้รับเชื้อเล็ปโตสไปราที่ผ่านเข้าไปในสัตว์ทดลองจำนวนครั้งต่างกันเพื่อการพัฒนาวัคซีนและการตรวจวินิจฉัย" เป็นผู้วิจัยหลัก (ระหว่างดำเนินการ)
- "Clinical course of HIV-1 infection and steroid hormone contraception" เป็นผู้วิจัยร่วม (ระหว่างดำเนินการ)
- "การศึกษาภูมิคุ้มกันวิทยาเชิงลึกของโรคเท้าช้าง: มุ่งสู่การป้องกันภาวะเท้าช้างและการกำจัดโรคอย่างถาวร (Advanced immunological study of lymphatic filariasis: Towards prevention of chronic pathology and permanent disease elimination)" เป็นผู้วิจัยร่วม

ผู้ร่วมโครงการวิจัยคนที่ 2

1. ชื่อผู้วิจัย (ภาษาไทย) นพ.ดร.อนุพงศ์ สุจริยากุล
   (ภาษาอังกฤษ) Anupong Sujariyakul, M.D., Ph.D.

2. ตำแหน่งปัจจุบัน
   นายแพทย์ 9 ผู้อำนวยการ

3. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail
   สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 8 จังหวัดนครสวรรค์ กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข
   โทรศัพท์ 056-229413 โทรสาร 056-226620
   E-mail : anupongho@yahoo.com

4. ประวัติการศึกษา

ปริญญา	สาขาวิชา	มหาวิทยาลัย	ปี พ.ศ. ที่ได้รับ
แพทยศาสตรบัณฑิต	-	ม. สงขลานครินทร์	2525
อนุมัติบัตร	เวชศาสตร์ป้องกันคลินิค	แพทยสภา	2536
ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต	ระบาดวิทยา	ม. สงขลานครินทร์	2543

5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ
   Epidemiology

6. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย
   6.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย
   -
   6.2 หัวหน้าโครงการวิจัย
   -
   6.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว
   - **Sujariyakul A**, Wonghiranrachata W. 2003 Surveillance of Vector-Borne Disease in Prakphanang Basin Project Area. Journal of Health Science. 12(1): P68-74 (in Thai)
   - **Sujariyakul A**, et al. 2003 Efficiency and acceptance of using Zeta-cypermethrin 2.5% mixed with Dichlorvos 20% in *Aedes* spp. Control. Journal of Medical Science. (in Thai)
   - **Sujariyakul A.**, Wonghiranrachata W. Efficiency of Temephos on Aedes aegypti Linnaeus (1762) larvae in 14 Southern provinces. Disease Control Journal 2003: 29 (2) April – June, P115-119 (in Thai)
   - **Sujariyakul A**, Thongsri K. 2002 Sensitivity of *P. falciparum* in vivo on the Thai -Myanmar Border in 2001. Journal of Health Science. 11(6): P843-851 (in Thai)

- Chongsuviwatwong V, **Sujariyakul A**, Pannarunothai S. 1999 Who gains and who loses under Thai DRG payment? Casemix Journal, 1 (3).

6.4 งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย

"การศึกษาภูมิคุ้มกันวิทยาเชิงลึกของโรคเท้าช้าง: มุ่งสู่การป้องกันภาวะเท้าช้างและการกำจัดโรคอย่างถาวร (Advanced immunological study of lymphatic filariasis: Towards prevention of chronic pathology and permanent disease elimination)" เป็นผู้วิจัยร่วม

ผู้ร่วมโครงการวิจัยคนที่ 3

1. **ชื่อผู้วิจัย** (ภาษาไทย) นางสาววิวรพรรณ สรรประเสริฐ

   (ภาษาอังกฤษ) Vivornpun Sanprasert, B.Sc.

2. **ตำแหน่งปัจจุบัน**

   -

3. **หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail**

   หน่วยปฏิบัติการวิจัยโรคเท้าช้าง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

   ถ. พระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

   โทรศัพท์ 02-256-4000 ต่อ 3567 โทรสาร -

   E-mail: vivornpun@yahoo.com

4. **ประวัติการศึกษา**

ปริญญา	สาขาวิชา	มหาวิทยาลัย	ปี พ.ศ. ที่ได้รับ
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง)	เทคนิคการแพทย์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2544
วิทยาศาสตรคุษฎีบัณฑิต	สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	กำลังศึกษา

5. **สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ**

   -

6. **ประสบการณ์วิจัย**

   6.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย

   -

   6.2 หัวหน้าโครงการวิจัย

   -

   6.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

   - Nuchprayoon S, **Sanprasert V**, Suntravat M, Kraivichian K, Saksirisampant W, Nuchprayoon I. 2003 Study of specific IgG subclass antibodies for diagnosis of *Gnathostoma spinigerum*. Parasitology Research. 91: 137–143.
   - Nuchprayoon S, Porksakorn C, Junpee A, **Sanprasert V**, Poovorawan Y. 2003 Comparative assessment of an Og4C3 ELISA and an ICT filariasis test: A study of Myanmar in Thailand. Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology. 21: 253-257.
   - Nuchprayoon S, **Sanprasert V**, Porksakorn C, Nuchprayoon I. 2003 Prevalence of bancroftian filariasis on the Thai-Myanmar border. Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology. 21(3):179-88.

- **Sanprasert V,** Jaratsing P, Nuchprayoon I, Nuchprayoon S. 2005 Computer-assisted instruction in parasitology: A cross-over design. Journal of the Medical Association of Thailand. 88 (Suppl 4): S214-S219.

6.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

- "การศึกษาภูมิคุ้มกันวิทยาเชิงลึกของโรคเท้าช้าง: มุ่งสู่การป้องกันภาวะเท้าช้างและการกำจัดโรคอย่างถาวร (Advanced immunological study of lymphatic filariasis: Towards prevention of chronic pathology and permanent disease elimination)" เป็นผู้วิจัยร่วม

ผู้ร่วมโครงการวิจัยคนที่ 4

1. **ชื่อผู้วิจัย** (ภาษาไทย) นางสาวพรพรรณ จรัสสิงห์

   (ภาษาอังกฤษ) Pornpun Jaratsing, M.Sc.

2. **ตำแหน่งปัจจุบัน**

   -

3. **หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail**

   หน่วยปฏิบัติการวิจัยโรคเท้าช้าง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

   ถ. พระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

   โทรศัพท์ 02-256-4000 ต่อ 3567 โทรสาร -

   E-mail: noo_ying_pj@yahoo.com

4. ประวัติการศึกษา

ปริญญา	สาขาวิชา	มหาวิทยาลัย	ปี พ.ศ. ที่ได้รับ
วิทยาศาสตรบัณฑิต	ชีววิทยา	มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร	2545
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	วิทยาศาสตร์การแพทย์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2546-2549

5. **สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ**

   -

6. **ประสบการณ์วิจัย**

   6.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย

   -

   6.2 หัวหน้าโครงการวิจัย

   -

   6.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

   - Sanprasert V, **Jaratsing P**, Nuchprayoon I, Nuchprayoon S. 2005 Computer-assisted instruction in parasitology: A cross-over design. Journal of the Medical Association of Thailand. 88 (Suppl 4): S214-S219.

   6.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

   - "การศึกษาภูมิคุ้มกันวิทยาเชิงลึกของโรคเท้าช้าง: มุ่งสู่การป้องกันภาวะเท้าช้างและการกำจัดโรคอย่างถาวร (Advanced immunological study of lymphatic filariasis: Towards prevention of chronic pathology and permanent disease elimination)" เป็นผู้วิจัยร่วม

ที่ปรึกษาโครงการวิจัยคนที่ 1

1. ชื่อ (ภาษาไทย) ศ.นพ.ยง ภู่วรวรรณ

(ภาษาอังกฤษ) Yong Poovorawan, M.D.

2. ตำแหน่งปัจจุบัน

ที่ปรึกษาโครงการวิจัย

3. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail

ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสตับอักเสบ

ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ 02-256-4909

4 ประวัติการศึกษา

ปริญญา	สาขาวิชา	มหาวิทยาลัย	ปี พ.ศ. ที่ได้รับ
แพทยศาสตรบัณฑิต	-	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2517

5. ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์เผยแพร่ย้อนหลัง 3 ปี (ระบุแหล่งพิมพ์และปีที่ตีพิมพ์)

- Chutinimitkul S, Suwannakarn K, Chieochansin T, Mai LQ, Damrongwatanapokin S, Chaisingh A, Amonsin A, Landt O, Songserm T, Theamboonlers A, Poovorawan Y. H5N1 Oseltamivir-resistance detection by real-time PCR using two high sensitivity labeled TaqMan probes. J Virol Methods. 2006
- Chongsrisawat V, Yoocharoen P, Theamboonlers A, Tharnaphornpilas P, Warinsathien P, Sinlaparatsamee S, Paupunwatana S, Chaiear K, Khwanjaipanich S, Poovorawan Y. Hepatitis B seroprevalence in Thailand: 12 years after hepatitis B vaccine integration into the national expanded programme on immunization. Trop Med Int Health. 2006 Oct;11(10):1496-502.
- Chieochansin T, Chutinimitkul S, Payungporn S, Theamboonlers A, Tangkijvanich P, Komolmit P, Poovorawan Y. Rapid detection of lamivudine-resistant hepatitis B virus mutations by PCR-based methods. Tohoku J Exp Med. 2006 Sep;210(1):67-78.
- Nopporpanth S, Sablon E, De Nys K, Lien TX, Brouwer J, Van Brussel M, Smits SL, Poovorawan Y, Osterhaus AD, Haagmans BL. Genotyping hepatitis C viruses from southeast Asia by a novel line probe assay that simultaneously detects core and 5' untranslated regions. J Clin Microbiol. 2006 Nov;44(11):3969-74.
- Hussain Z, Das BC, Husain SA, Polipalli SK, Ahmed T, Begum N, Medhi S, Verghese A, Raish M, Theamboonlers A, Poovorawan Y, Kar P. Virological course of hepatitis A virus as determined by real time RT-PCR: Correlation with biochemical, immunological and genotypic profiles. World J Gastroenterol. 2006 Aug 7;12(29):4683-8.
- Amonsin A, Chutinimitkul S, Pariyothorn N, Songserm T, Damrongwantanapokin S, Puranaveja S, Jam-On R, Sae-Heng N, Payungporn S, Theamboonlers A, Chaisingh A, Tantilertcharoen R, Suradhat S, Thanawongnuwech R, Poovorawan Y. Genetic characterization of influenza A viruses (H5N1) isolated from 3rd wave of Thailand AI outbreaks. Virus Res. 2006;122(1-2):194-9.

- Sookpotarom P, Vejchapipat P, Chittmittrapap S, Sookpotarom P, Vejchapipat P, Chittmittrapap S, Chongsrisawat V, Chandrakamol B, Poovorawan Y. Short-term results of Kasai operation for biliary atresia: experience from one institution. Asian J Surg. 2006 Jul;29(3):188-92.
- Honsawek S, Kongtawelert P, Pothacharoen P, Khongphatthanayothin A, Chongsrisawat V, Poovorawan Y. Increased levels of serum hyaluronan in patients with dengue infection. J Infect. 2006
- Thong-Ngam D, Tangkijvanich P, Lerknimitr R, Mahachai V, Theamboonlers A, Poovorawan Y. Diagnostic role of serum interleukin-18 in gastric cancer patients. World J Gastroenterol. 2006. 12(28):4473-7.
- Noppornpanth S, Lien TX, Poovorawan Y, Smits SL, Osterhaus AD, Haagmans BL. Identification of a naturally occurring recombinant genotype 2/6 hepatitis C virus. J Virol. 2006. 80(15):7569-77.
- Khongphatthanayothin A, Phumaphuti P, Thongchaiprasit K, Poovorawan Y. Serum levels of sICAM-1 and sE-selectin in patients with dengue virus infection. Jpn J Infect Dis. 2006 Jun;59(3):186-8.
- Vejchapipat P, Theamboonlers A, Chongsrisawat V, Poovorawan Y. An evidence of intestinal mucosal injury in dengue infection. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2006 Jan;37(1):79-82.
- Phakdeewirot P, Payungporn S, Chutinimitkul S, Theamboonlers A, Poovorawan Y. Prevalence and molecular characterization of the polymerase gene of gibbon lymphocryptovirus. J Med Primatol. 2006 Jun;35(3):136-43.
- Chutinimitkul S, Bhattarakosol P, Srisuratanon S, Eiamudomkan A, Kongsomboon K, Damrongwatanapokin S, Chaisingh A, Suwannakarn K, Chieochansin T, Theamboonlers A, Poovorawan Y. H5N1 influenza A virus and infected human plasma. Emerg Infect Dis. 2006 Jun;12(6):1041-3.
- Payungporn S, Chutinimitkul S, Chaisingh A, Damrongwantanapokin S, Nuansrichay B, Pinyochon W, Amonsin A, Donis RO, Theamboonlers A, Poovorawan Y. Discrimination between highly pathogenic and low pathogenic H5 avian influenza A viruses. Emerg Infect Dis. 2006;12(4):700-1.
- Nuchprayoon S, Junpee A, Nithiuthai S, Chungpivat S, Suvannadabba S, Poovorawan Y. Detection of filarial parasites in domestic cats by PCR-RFLP of ITS1. Vet Parasitol. 2006 Sep 10;140(3-4):366-72.
- Songsermn T, Amonsin A, Jam-on R, Sae-Heng N, Meemak N, Pariyothorn N, Payungporn S, Theamboonlers A, Poovorawan Y. Avian influenza H5N1 in naturally infected domestic cat. Emerg Infect Dis. 2006 Apr;12(4):681-3.
- Samransamruajkit R, Prapphal N, Deelodegenavong J, Poovorawan Y. Plasma soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) in pediatric ARDS during high frequency oscillatory ventilation: a predictor of mortality. Asian Pac J Allergy Immunol. 2005 Dec;23(4):181-8.
- Hirankarn N, Kimkong I, Kummee P, Tangkijvanich P, Poovorawan Y. Interleukin-1beta gene polymorphism associated with hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus infection. World J Gastroenterol. 2006 Feb 7;12(5):776-9.
- Poovorawan Y, Hutagalung Y, Chongsrisawat V, Boudville I, Bock HL. Dengue virus infection: a major cause of acute hepatic failure in Thai children. Ann Trop Paediatr. 2006 Mar;26(1):17-23.
- Nuchprayoon S, Junpee A, Poovorawan Y. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) for differentiation between Thai and Myanmar strains of *Wuchereria bancrofti*. Filaria Journal. 2007; 6(1):6.

ที่ปรึกษาโครงการวิจัยคนที่ 2

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นพ. สราวุธ สุวรรณธัพพะ

(ภาษาอังกฤษ) Dr. Saravudh Suvannadabba

2. ตำแหน่งปัจจุบัน

ที่ปรึกษาโครงการวิจัย

3. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail

กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข

โทรศัพท์ 01-8385830

4. ประวัติการศึกษา

ปริญญา	สาขาวิชา	มหาวิทยาลัย
แพทยศาสตรบัณฑิต		จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
MPH	Epidemiology	University of Hawaii, USA
Bachelor in Public Health	Gen. Adm	Sukhothaithammathirat University, Thailand

5. ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์เผยแพร่ย้อนหลัง 3 ปี (ระบุแหล่งพิมพ์และปีที่ตีพิมพ์)

- Nuchprayoon S, Junpee A, Nithiuthai S, Chungpivat S, Suvannadabba S, Poovorawan Y. Detection of filarial parasites in domestic cats by PCR-RFLP of ITS1. Vet Parasitol. 2006 Sep 10;140(3-4):366-72.
- Sithiprasasna R, Patpoparn S, Attatippaholkun W, Suvannadabba S, Srisuphanunt M. The geographic information system as an epidemiological tool in the surveillance of dengue virus-infected *Aedes* mosquitos. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2004 Dec;35(4):918-26.
- Saelim V, Brogdon WG, Rojanapremsuk J, Suvannadabba S, Pandii W, Jones JW, Sithiprasasna R. Bottle and biochemical assays on temephos resistance in *Aedes aegypti* in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2005 Mar;36(2):417-25.
- Wongkamchai S, Choochote W, Jitpuckdee A, Suvannadabba S, Loymak S, Sakolvaree Y, Tapchaisri P, Chaicumpa W. An antigen detection assay for diagnosing filariasis. Asian Pac J Allergy Immunol. 2003 Dec;21(4):241-51.
- Bhumiratana A, Wattanakull B, Koyadun S, Suvannadabba S, Rojanapremsuk J, Tantiwattanasup W. Relationship between male hydrocele and infection prevalences in clustered communities with uncertain transmission of Wuchereria bancrofti on the Thailand-Myanmar border. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2002 Mar;33(1):7-17.
- Kanjanopas K, Choochote W, Jitpakdi A, Suvannadabba S, Loymak S, Chungpivat S, Nithiuthai S. Brugia malayi in a naturally infected cat from Narathiwat Province, southern Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2001 Sep;32(3):585-7.

ภาคผนวก

ผลการวิจัยในปีงบประมาณ 2550

- **การสำรวจผู้ป่วยโรคเท้าช้าง**

การศึกษานี้ได้ดำเนินการสำรวจโรคเท้าช้างในประชากรจำนวน 7,898 ราย ที่อาศัยอยู่ใน 6 อำเภอซึ่งเป็นแหล่งชุกชุมของโรคเท้าช้าง ได้แก่ อำเภอแม่สอด พบพระ ท่าสองยาง แม่ระมาด อุ้มผาง ในจังหวัดตาก และอำเภอสังขละบุรีในจังหวัดกาญจนบุรี โดยการตรวจหาแอนติเจนที่จำเพาะต่อพยาธิโรคเท้าช้าง โดยวิธี immunochromatographic test (ICT) พบผู้ติดพยาธิโรคเท้าช้างจำนวน 49 ราย คิดเป็นอัตราความชุกของโรคเท้าช้างร้อยละ 0.62 (ตารางที่ 1) และพบผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพจำนวน 4 ราย คิดเป็นอัตราร้อยละ 0.05

ตารางที่ 1 อัตราความชุกของโรคเท้าช้างโดยการตรวจหาแอนติเจนที่จำเพาะต่อพยาธิโรคเท้าช้าง จำแนกตามอำเภอที่สำรวจ

พื้นที่		ประชากรที่สำรวจ (ราย)	จำนวนคนที่ตรวจพบแอนติเจน (ราย)	อัตราความชุก (%)	จำนวนผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพ (ราย)(%)
จังหวัด	อำเภอ				
ตาก	แม่สอด	2,693	29	1.08	2 (0.07)
	ท่าสองยาง	1,984	11	0.55	0
	พบพระ	1,621	0	0	0
	อุ้มผาง	1,133	2	0.18	1 (0.09)
	แม่ระมาด	217	0	0	0
กาญจนบุรี	สังขละบุรี	250	7	2.80	1 (0.4)
รวม		**7,898**	**49**	**0.62**	**4 (0.05)**

- **อายุของประชากรที่ติดเชื้อพยาธิโรคเท้าช้าง**

ในจำนวนผู้ติดเชื้อพยาธิโรคเท้าช้าง *Wuchereria bancrofti* จำนวน 49 ราย มีอายุเฉลี่ย 32.6 ± 17.0 ปี (อายุระหว่าง 4-80 ปี) (ตารางที่ 2) โดยเป็นเพศชาย 36 ราย (73.5%) อายุเฉลี่ย 32.22±17.47 ปี (4-80 ปี) เพศหญิง 13 ราย (26.5%) อายุเฉลี่ย 33.54±16.28 ปี (13-60 ปี)

ตารางที่ 2 ข้อมูลพื้นฐาน ของผู้ป่วยที่ตรวจพบแอนติเจนที่จำเพาะต่อพยาธิโรคเท้าช้าง จำแนกตามอำเภอที่ตรวจพบ

พื้นที่		จำนวนคนที่ตรวจพบแอนติเจน (ราย)	เพศ		อายุเฉลี่ย ± SD (ช่วงอายุ)
จังหวัด	อำเภอ		ชาย (%)	หญิง (%)	
ตาก	แม่สอด	29	22 (75.9)	7 (24.1)	24.5 ± 13.89 (4-55)
	ท่าสองยาง	11	7 (63.6)	4 (36.4)	43.0 ± 12.53 (22-60)
	อุ้มผาง	2	2 (100)	0	40.5 ± 17.68 (28-53)
กาญจนบุรี	สังขละบุรี	7	5 (71.4)	2 (28.6)	47.3 ± 17.69 (28-80)
รวม		**49**	**36 (73.5)**	**13 (26.5)**	**32.6 ± 17.0 (4-80)**

- **การบันทึกประวัติการเกิดพยาธิสภาพ**

จากการสำรวจผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่มีพยาธิสภาพ พบผู้มีพยาธิสภาพจำนวน 4 ราย (ตารางที่ 3) อายุเฉลี่ย 57.50±15.55 (อายุระหว่าง 45-80 ปี) เป็นเพศชาย 3 ราย (75%) และเพศหญิง 1 ราย (25%) โดยเป็นผู้มีขาโต 3 ราย และอัณฑะโต 1 ราย

ตารางที่ 3 การเกิดพยาธิสภาพของผู้ป่วยโรคเท้าช้าง จำแนกตามจังหวัดที่ตรวจพบ

จังหวัด	จำนวนผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพ (ราย)	เพศ		อายุเฉลี่ย ± SD (ช่วงอายุ)	พยาธิสภาพที่ตรวจพบ
		ชาย (%)	หญิง (%)		
ตาก	3	2 (66.7)	1 (33.3)	50.0 ± 5.0 (45-55)	ขาโต
กาญจนบุรี	1	1 (100)	0	80	อัณฑะโต
รวม	**4**	**3 (75)**	**1 (25)**	**57.5 ± 15.55 (45-80)**	

- **การตรวจไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดและการตรวจแอนติเจน**

จากการตรวจนับจำนวนไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดของผู้ให้ผลบวกจากการตรวจหาแอนติเจนด้วยวิธี ICT ทั้ง 49 ราย พบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดในผู้ป่วย (Ag+/Mf+) จำนวน 16 ราย อายุเฉลี่ย 26.75±15.96 ปี (อายุระหว่าง 10-55 ปี) (ตารางที่ 4) โดยเป็นเพศชาย 12 ราย (75.0%) อายุเฉลี่ย 24.42±13.19 ปี (อายุระหว่าง 10-53 ปี) เพศหญิง 4 ราย (25.0%) อายุเฉลี่ย 33.75±23.40 ปี (อายุระหว่าง 13-55 ปี) (ตารางที่ 4) โดยมีจำนวนไมโครฟิลาเรียในเลือด 17-2,133 ตัวต่อเลือด 1 มิลลิลิตร แต่ตรวจไม่พบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดของผู้ตรวจพบแอนติเจน (Ag+/Mf-) จำนวน 33 ราย การตรวจหาแอนติเจนที่จำเพาะต่อพยาธิตัวเต็มวัยของพยาธิโรคเท้าช้างด้วยวิธี ICT ให้ผลความไวกว่าการตรวจหาไมโครฟิลาเรียถึง 2.3 เท่า อย่างไรก็ตาม ตรวจไม่พบทั้งแอนติเจนและไมโครฟิลาเรียในผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพ

นอกจากนี้ได้ทำการรวบรวมอาสาสมัครคนปกติที่อาศัยอยู่ในแหล่งชุกชุมของโรคเท้าช้างที่อาศัยอยู่ในพื้นที่นานกว่า 10 ปี แต่ตรวจไม่พบแอนติเจนที่จำเพาะต่อพยาธิโรคเท้าช้าง และตรวจไม่พบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด รวมทั้งไม่มีอาการแสดงของโรคเท้าช้าง เพื่อเป็นกลุ่มควบคุม จำนวน 16 ราย อายุเฉลี่ย 31.13 ± 12.26 ปี (อายุระหว่าง 14-50 ปี) เป็นเพศชาย 9 ราย (56.3%) เพศหญิง 7 ราย (43.7%) และอายุในประชากรแต่ละกลุ่มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4)

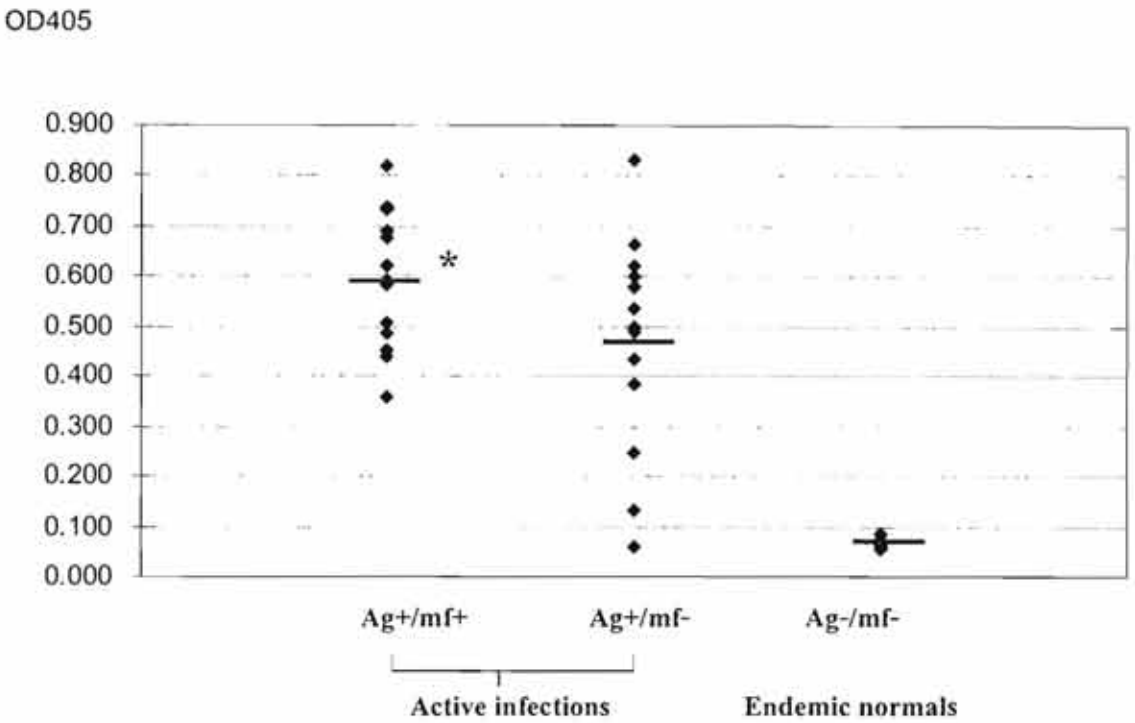
ตารางที่ 4 การจัดแบ่งกลุ่มประชากร

การเกิดพยาธิสภาพ	การตรวจแอนติเจน	การตรวจหาไมโครฟิลาเรีย	จำนวนไมโครฟิลาเรีย (ตัว/เลือด 1 มล.)	จำนวน (ราย)	เพศ		อายุเฉลี่ย ± SD (ช่วงอายุ)
					ชาย (%)	หญิง (%)	
ไม่มีพยาธิสภาพ	Ag +ve	Mf+ve	17-2,133	16	12 (75.0)	4 (25.0)	26.75 ± 15.96 (10-55 ปี)
		Mf-ve	0	33	24 (72.7)	9 (27.3)	32.35 ± 16.02 (4-60 ปี)
	Ag –ve	Mf-ve	0	16	9 (56.3)	7 (43.7)	31.13 ± 12.26 (14-50 ปี)
มีพยาธิสภาพ	Ag –ve	Mf-ve	0	4	3(75.0)	1 (25.0)	57.50 ± 15.55 (45-80 ปี)
		รวม		**69**	**48 (69.6)**	**21 (30.4)**	**33.00 ± 15.98 (4-80 ปี)**

- **ระดับแอนติเจนที่จำเพาะต่อพยาธิตัวเต็มวัยในผู้ป่วยโรคเท้าช้าง**

โรคเท้าช้าง

จากการตรวจวัดระดับแอนติเจนของพยาธิตัวเต็มวัยในกระแสเลือดโดยวิธี Og4C3 ELISA (TropBio Pty Ltd, Townsville, Australia) พบว่าค่าเฉลี่ยของระดับแอนติเจนที่จำเพาะต่อพยาธิตัวเต็มวัยในกลุ่มผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่ตรวจพบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด (Ag+/Mf+) (mean $\pm$ SD = 0.59$\pm$0.14) ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกลุ่มผู้ป่วยที่ตรวจไม่พบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด (Ag+/Mf-) (mean $\pm$ SD = 0.47$\pm$0.22) (P = 0.095) แต่มีระดับแอนติเจนของพยาธิตัวเต็มวัยสูงกว่ากลุ่มคนปกติที่อาศัยอยู่ในแหล่งชุกชุมของโรคเท้าช้าง (endemic normals) (mean $\pm$ SD = 0.058$\pm$0.01) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) (รูปที่ 1)



<u>รูปที่ 1</u> ระดับแอนติเจนที่จำเพาะต่อพยาธิตัวเต็มวัยในผู้ป่วยโรคเท้าช้างโรคเท้าช้างที่มีการติดเชื้อปัจจุบัน (active infections) ทั้งที่ตรวจพบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด (Ag+/mf+) และตรวจไม่พบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด (Ag+/mf-) และคนปกติที่อาศัยอยู่ในแหล่งชุกชุมของโรคเท้าช้าง (endemic normals) จุดแต่ละจุดแสดงระดับแอนติเจนของแต่ละคน แถบเส้นแสดงค่าเฉลี่ยของระดับแอนติเจนในแต่ละกลุ่ม * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$)

- **การรักษาผู้ป่วยโรคเท้าช้างและติดตามการเกิดปฏิกิริยาหลังการรักษา**

ผู้ป่วยโรคเท้าช้างทุกรายจะได้รับยา diethylcarbamazine (DEC) ขนาด 300 มิลลิกรัม ทั้งในผู้ที่ตรวจพบไมโครฟิลาเรียและตรวจไม่พบไมโครฟิลาเรีย นอกจากนี้ผู้ที่อาศัยอยู่ในแหล่งชุกชุมของโรคเท้าช้างที่มีความชุกของโรคสูงจะได้รับยา DEC ทุกรายเช่นกันในการรักษาหมู่ (Mass Drug Administration; MDA) โดยกรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข ผลการติดตามและบันทึกการเกิดปฏิกิริยาหลังการรักษาโดยการสอบถาม และตรวจวัดอุณหภูมิ ความดันโลหิต ชีพจร และตรวจร่างกายโดยแพทย์ พบมีผู้เกิดปฏิกิริยาหลังการรักษาจำนวน 17 ราย คิดเป็นร้อยละ 26.2% (ตารางที่ 5) โดยเป็นผู้ที่ตรวจพบทั้งแอนติเจนและไมโครฟิลาเรีย (Ag+/Mf+) 11 ราย คิดเป็นร้อยละ 68.8 ในขณะที่ผู้ที่ตรวจพบเฉพาะแอนติเจน (Ag+/Mf-) ตรวจพบ 4 ราย คิดเป็นร้อยละ 12.1 และผู้ที่เป็นกลุ่มควบคุม (Ag-/Mf-) มีเพียง 2 ราย คิดเป็นร้อยละ 12.5

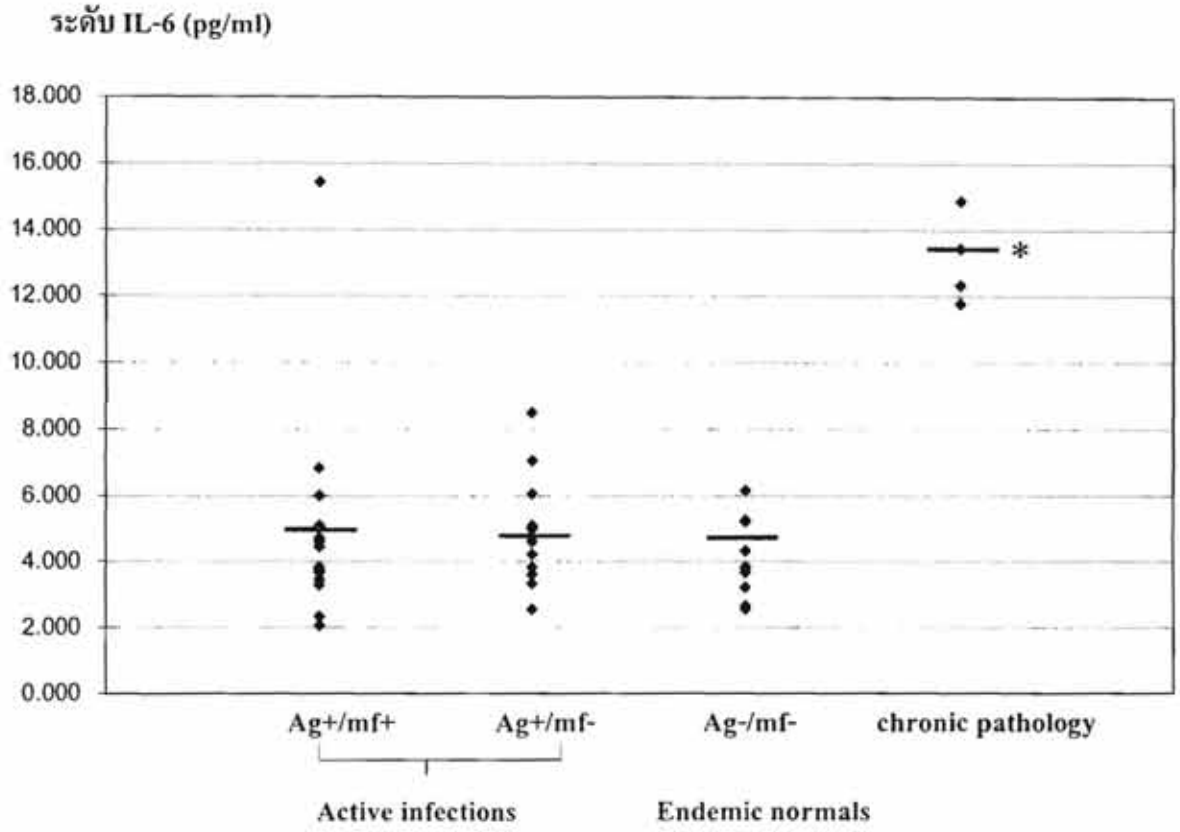
ตารางที่ 5 การติดตามและบันทึกการเกิดปฏิกิริยาหลังการรักษา

ผลการวินิจฉัย	จำนวน (ราย)	อัตราการเกิดปฏิกิริยาหลังการรักษา (%)	ค่าเฉลี่ยความรุนแรงของปฏิกิริยาหลังการรักษา
Ag+ / mf+	16	11 (68.8)	1.20
Ag+ / mf-	33	4 (12.1)	0.29
Ag- / mf-	16	2 (12.5)	0.13
รวม	**65**	**17 (26.2)**	**0.60**

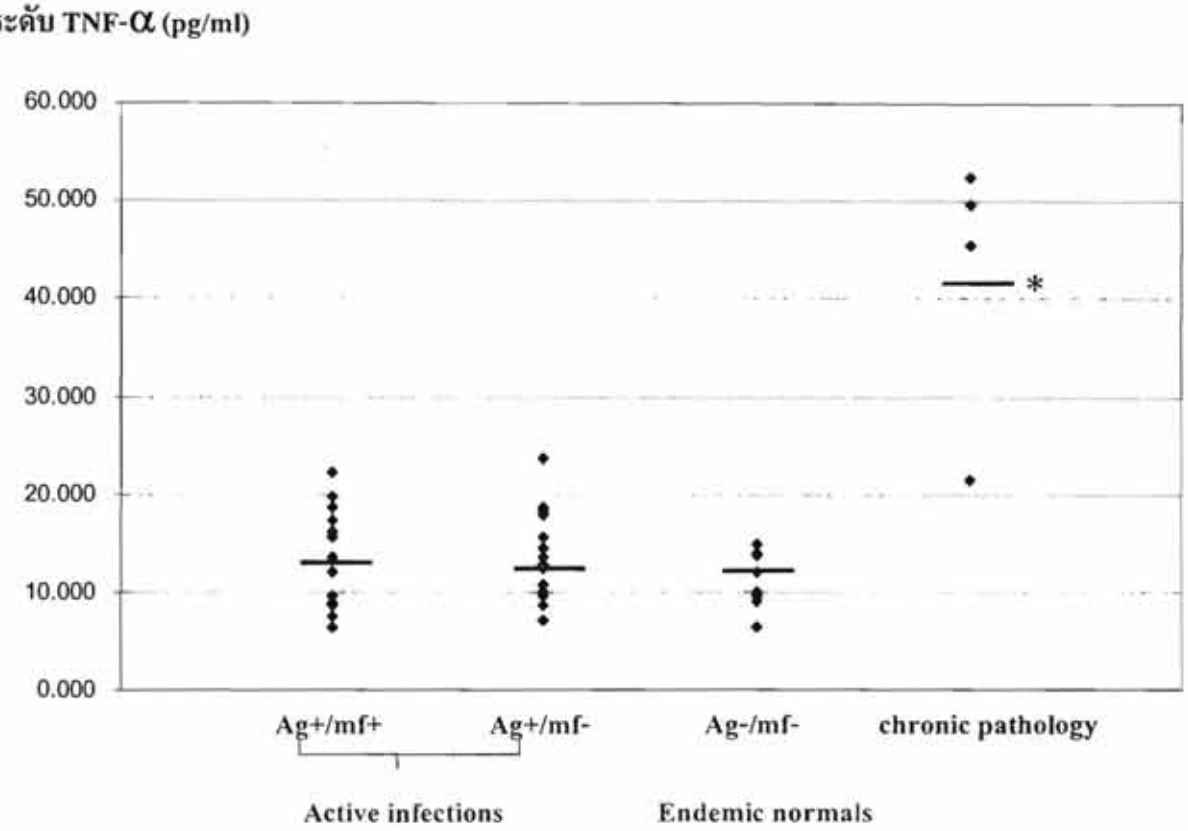
<u>โครงการย่อยที่ 1</u> **"รูปแบบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของโรคเท้าช้าง: บทบาทของไซโตไคน์จาก T helper cells และแอนติบอดี IgG ชนิดต่างๆ"**

- **รูปแบบและระดับของการสร้างไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ**

การวัดระดับไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ได้แก่ interleukin-6 (IL-6) และ tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) ในประชากรกลุ่มต่างๆ พบว่าระดับไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบทั้งสองชนิดในผู้ป่วยโรคเท้าช้างทั้งกลุ่มที่ตรวจพบไมโครฟิลาเรีย (Ag+/Mf+) (IL-6: 4.89$\pm$3.18; TNF-α: 13.01$\pm$5.07) และตรวจไม่พบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด (Ag+/Mf-) (IL-6: 4.77$\pm$1.59; TNF-α: 13.81$\pm$4.64) ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากคนปกติที่อาศัยอยู่ในแหล่งชุกชุมของโรคเท้าช้าง (endemic normals) (IL-6: 4.23$\pm$1.08; TNF-α: 12.12$\pm$2.66) ($P > 0.01$) ในขณะที่ผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่มีพยาธิสภาพเรื้อรัง มีระดับไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบทั้งสองชนิดสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) (IL-6: 13.12$\pm$1.37; TNF-α: 42.42$\pm$14.19) (รูปที่ 2 และรูปที่ 3)



<u>รูปที่ 2</u> ระดับของไซโตไคน์ interleukin-6 ในกระแสเลือดของผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่มีการติดเชื้อปัจจุบัน (active infections) ทั้งที่ตรวจพบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด (Ag+/mf+) และตรวจไม่พบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด (Ag+/mf-) คนปกติที่อาศัยอยู่ในแหล่งชุกชุมของโรคเท้าช้าง (endemic normals) และผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่มีพยาธิสภาพเรื้อรัง (chronic pathology) จุดแต่ละจุดแสดงระดับแอนติเจนของแต่ละราย แถบเส้นแสดงค่าเฉลี่ยของระดับแอนติเจนในแต่ละกลุ่ม * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$)

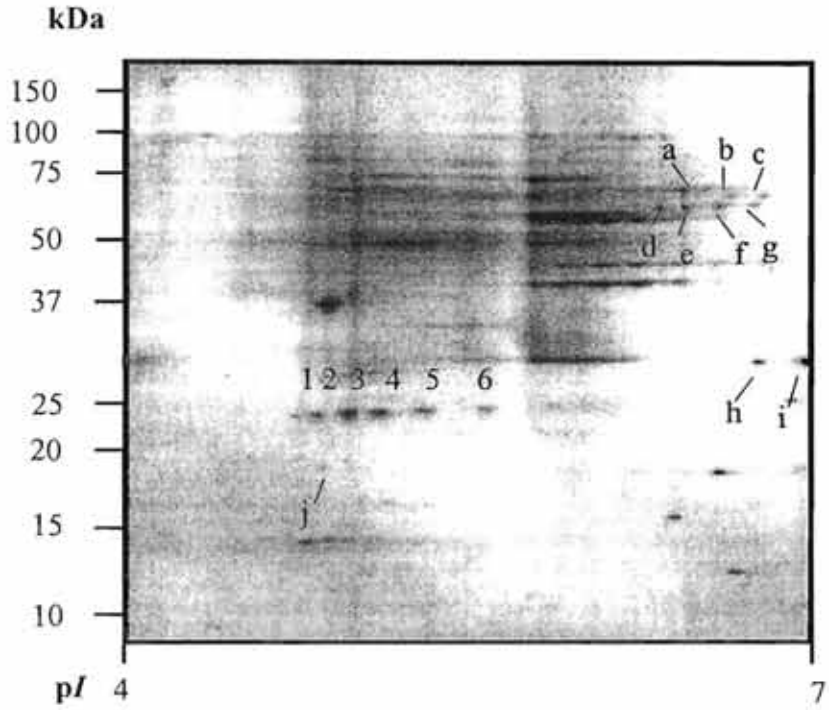


รูปที่ 3 ระดับของไซโตไคน์ tumor necrosis factor-α ในกระแสเลือดของผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่มีการติดเชื้อปัจจุบัน (active infections) ทั้งที่ตรวจพบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด (Ag+/mf+) และตรวจไม่พบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด (Ag+/mf-) คนปกติที่อาศัยอยู่ในแหล่งชุกชุมของโรคเท้าช้าง (endemic normals) และผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่มีพยาธิสภาพเรื้อรัง (chronic pathology) จุดแต่ละจุดแสดงระดับแอนติเจนของแต่ละราย แถบเส้นแสดงค่าเฉลี่ยของระดับแอนติเจนในแต่ละกลุ่ม *แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$)

<u>โครงการที่ 2</u> "การศึกษาโมเลกุลที่มีความสำคัญต่อการเกิดพยาธิสภาพและปฏิกิริยาหลังการรักษาของโรคเท้าช้าง เพื่อการพัฒนาสู่การรักษาและวัคซีนป้องกันโรค"

- **ฐานข้อมูลโปรตีนของพยาธิโรคเท้าช้างและแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่อาศัยอยู่ในพยาธิโรคเท้าช้าง**

ผลจากการศึกษาโปรตีนทั้งหมดของพยาธิโรคเท้าช้างและแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่อาศัยในพยาธิโรคเท้าช้างโดยวิธี 2-dimentional electrophoresis (รูปที่ 4) และ Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight-Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS) ทำให้ทราบลำดับอะมิโนเอซิดของโปรตีนแต่ละจุด โดยพบโปรตีนทั้งที่ทราบหน้าที่และโปรตีนกลุ่มใหม่ที่ยังไม่ทราบหน้าที่ (ตารางที่ 6; จุด a-j) ได้แก่ surface proteins, ribosomal protein L6P/L9E, L14, L22, L23, L31, S16, NADH dehydrogenase I chain D, Transposase IS5 family OrfB, Adenylosuccinate lyase transcriptional regulator, และ hypothetical protein อีก 2 ตัว คาดว่าโปรตีนกลุ่มนี้น่าจะเป็นโปรตีนเป้าหมายที่สำคัญต่อการเกิดพยาธิสภาพของโรคเท้าช้างต่อไป



<u>รูปที่ 4</u> โปรตีนของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่สกัดจากพยาธิโรคเท้าช้าง *Brugia malayi* ซึ่งแยกได้โดย 2-dimensional gel electrophoresis

ตารางที่ 6 โปรตีนของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่วิเคราะห์ได้จาก Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight-Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS)

Spots	Observed MW (kDa)/pI	Identified proteins	Calculated MW (kDa) / pI	Scores
1	24.5/4.8	Ribosomal protein L6P/L9E	20.145/ 9.38	25
2	24.5/5.0	Surface protein	26.070/ 4.89	40
3	24.5/5.1	Surface protein	26.070/ 4.89	48
4	24.5/5.3	Surface protein	26.070/ 4.89	32
5	24.5/5.6	Surface protein	26.070/ 4.89	31
6	24.5/5.9	NADH dehydrogenase I chain D	44.628/ 5.45	29
a	58.3/5.7	Transposase, IS5, family OrfB	7.357/ 9.61	18
b	58.3/5.9	Ribosomal protein S16	12.360/ 10.17	10
c	58.3/6.0	Adenylosuccinate lyase	48.932/ 7.14	26
d	58.3/5.8	Ribosomal protein L22	12.665/ 10.42	15
e	58.3/6.1	Ribosomal protein L14	12.753/ 10.21	14
f	58.3/6.2	Ribosomal protein L23	11.225/ 10.15	19
g	58.3/6.3	Ribosomal protein L31	7.926/ 8.01	26
h	45.2/6.6	Transcriptional regulator, putative	10.752/ 10.17	23
i	45.2/6.8	Hypothetical protein	15.902/ 9.39	16
j	18.5/4.9	Hypothetical protein	13.106/ 4.82	17

<u>โครงการย่อยที่ 3</u> **"การพัฒนาตัวติดตามเพื่อพยากรณ์การเกิดภาวะเท้าช้างและการเกิดปฏิกิริยาหลังการรักษา"**

- **ยีนในระบบภูมิคุ้มกันที่สัมพันธ์กับการเกิดพยาธิสภาพของโรคและการเกิดปฏิกิริยาหลังการรักษาของโรคเท้าช้าง**

การทบทวนยีนในระบบภูมิคุ้มกันที่สัมพันธ์กับการเกิดพยาธิสภาพของโรคและการเกิดปฏิกิริยาหลังการรักษาของโรคเท้าช้าง ทำให้ทราบได้กลุ่มโมเลกุลของ candidate cytokines/receptors เพื่อศึกษาในเชิงลึกถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมต่อไป (ตารางที่ 7) โดยมียีนที่สำคัญของผู้ป่วยกลุ่มที่ตรวจพบไมโครฟิลาเรียแต่ไม่เกิดพยาธิสภาพ ได้แก่ ยีนของ IL-4, IL-5, และ IL-10 และยีนที่สำคัญของผู้ป่วยกลุ่มที่ตรวจไม่พบไมโครฟิลาเรีย แต่เกิดพยาธิสภาพ ได้แก่ ยีนของ IL-12, INF-γ, TNF-α, IL-2, และ IL-18 ในขณะที่ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิกิริยาหลังการรักษาของโรคเท้าช้าง ได้แก่ ยีนของ TLR-2, TLR-4, IL-6, TNF-α, IL-1β, IL-8, และ IL-12

ตารางที่ 7 ยีนในระบบภูมิคุ้มกันที่สัมพันธ์กับการเกิดพยาธิสภาพโรคและการเกิดปฏิกิริยาหลังการรักษาของโรคเท้าช้าง

พยาธิสภาพ	ยีนของตัวรับบนผิวเซลล์ และ ยีนของไซโตไคน์เป้าหมาย (Candidate cytokines/receptors)
ผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่ตรวจพบไมโครฟิลาเรีย แต่ไม่เกิดพยาธิสภาพ (Immunotolerance)	IL-4
	IL-10
	IL-5
ผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่ตรวจไม่พบไมโครฟิลาเรีย แต่เกิดพยาธิสภาพ (Immunopathology)	IL-12
	INF-γ
	TNF-α
	IL-2
	IL-18
ผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่เกิดปฏิกิริยาหลังการรักษาของโรคเท้าช้าง (Adverse reaction)	TLR-2
	TLR-4
	IL-6
	TNF-α
	IL-1β
	IL-8
	IL-12

- **ความหลากหลายทางพันธุกรรม (Single Nucleotide Polymorphisms; SNPs) ของยีนในระบบภูมิคุ้มกันที่สัมพันธ์กับการเกิดพยาธิสภาพโรคและการเกิดปฏิกิริยาหลังการรักษาของโรคเท้าช้าง**

การทบทวนความหลากหลายทางพันธุกรรม (Single Nucleotide Polymorphisms; SNPs) * ของยีนในระบบภูมิคุ้มกันที่สัมพันธ์กับการเกิดพยาธิสภาพโรคและการเกิดปฏิกิริยาหลังการรักษาของโรคเท้าช้างจากฐานข้อมูล International HapMap (www.hapmap.org) ทำให้สามารถรวบรวมข้อมูล SNP สำหรับกลุ่มประชากร 4 ชาติพันธุ์ ได้แก่ แอฟริกัน-อเมริกัน คอเคเซียน ชาวจีน และชาวญี่ปุ่น โดยได้คัดเลือก SNPs ที่มีค่าความถี่อัลลีล (allele frequency) มากกว่า 2 และ อยู่ในบริเวณ promoter และ exon จากกลุ่มประชากรชาวจีน และชาวญี่ปุ่น ซึ่งมีชาติพันธุ์ใกล้เคียงคนไทยและพม่ามากที่สุด (ตารางที่ 8)

ทั้งนี้ ในการศึกษาเบื้องต้นจะทำการศึกษา SNP ใน TLR-2 ในบริเวณ 2 ตำแหน่ง ได้แก่ rs3804099 และ rs3804100 เนื่องจาก SNPs ดังกล่าวอยู่ในบริเวณ exon และมีค่าความถี่อัลลีลสูงในกลุ่มชาวจีนและญี่ปุ่น (ตารางที่ 9) อีกทั้งมีรายงานพบว่า SNP ทั้ง 2 ตำแหน่งนี้มีความถี่ของอัลลีลที่สูงมากในชาวเวียดนามและมีความสัมพันธ์กับความไวรับ (susceptibility) ต่อการเกิดโรคสมองอักเสบจากเชื้อวัณโรค จึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาเป็นลำดับแรก

---

* Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) คือความหลากหลายทางพันธุกรรมของดีเอ็นเอระหว่างมนุษย์ในแต่ละคนที่เกิดจากความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์เพียงตำแหน่งเดียว แต่อาจจะมีความสัมพันธ์กับลักษณะทางกายภาพที่แสดงออกมา

ตารางที่ 8 จำนวน SNP ของยีนในระบบภูมิคุ้มกันที่สัมพันธ์กับการเกิดพยาธิสภาพโรค และการปฏิกิริยาหลังการรักษาของโรคเท้าช้างที่ได้รับการคัดสรรจากข้อมูล International HapMap

พยาธิสภาพ	ยีนของตัวรับบนผิวเซลล์ และ ยีนของไซโตไคน์เป้าหมาย (Candidate cytokines/receptors)	จำนวน SNPs
ผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่ตรวจพบไมโครฟิลาเรีย แต่ไม่เกิดพยาธิสภาพ (Immunotolerance)	IL-4	4
	IL-10	4
	IL-5	2
ผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่ตรวจไม่พบไมโครฟิลาเรีย แต่เกิดพยาธิสภาพ(Immunopathology)	IL-12	8
	INF-γ	3
	TNF-α	0
	IL-2	0
	IL-18	0
ผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่เกิดปฏิกิริยาหลังการรักษาของโรคเท้าช้าง (Adverse reaction)	TLR-2	4
	TLR-4	3
	IL-6	2
	TNF-α	0
	IL-1β	0
	IL-8	2
	IL12	0

ตารางที่ 9 ความถี่อัลลีล (allele) ของ SNPs ในยีน TLR-2 ที่เลือกมาทำการศึกษา

gene	SNP	SNP location	Allele	Population Allele frequency				Reference
					China	Japan	Vietnam	
TLR-2	rs3804099	Exon (N199N) symnonymous	T597C	T	0.633	0.711	0.64	www.hapmap.org Thuong *et al.*, 2007
				C	0.367	0.289	0.36	
	rs3804100	Exon (S450S) symnonymous	T1350C	T	0.633	0.767	0.75	www.hapmap.org Thuong *et al.*, 2007
				C	0.337	0.233	0.25	

โครงการ "การศึกษาภูมิคุ้มกันวิทยาเชิงลึกของโรคเท้าช้าง: มุ่งสู่การป้องกันภาวะเท้าช้างและการกำจัดโรคอย่างถาวร" ประกอบด้วย 3 โครงการย่อยนี้เป็นโครงการวิจัยต่อเนื่อง 3 ปี (พ.ศ. 2550-2552) ผลการศึกษาในปีแรกนั้น (รายละเอียดในภาคผนวก) ได้ทำการสำรวจโรคเท้าช้างในประชากรทั้งหมด 7,898 ราย (อายุ 22.63 ± 16.56; 1-80 ปี) ที่อาศัยอยู่ใน 6 อำเภอซึ่งเป็นแหล่งชุกชุมของโรคเท้าช้าง ได้แก่ อำเภอแม่สอด พบพระ ท่าสองยาง แม่ระมาด อุ้มผาง ในจังหวัดตาก และอำเภอสังขละบุรีในจังหวัดกาญจนบุรี พบโรคเท้าช้างในประชากรจำนวน 49 ราย คิดเป็นอัตราความชุกร้อยละ 0.62 โดยเป็นเพศชาย 36 ราย (ร้อยละ 73.5) (อายุ 32.22±17.47; 4-80 ปี) และเพศหญิง 13 ราย (ร้อยละ 26.5) (อายุ 33.54±16.28; 13-60 ปี) และจากการติดตามการรักษาในประชากรจำนวน 65 ราย พบการเกิดปฏิกิริยาหลังการรักษาในประชากรจำนวน 17 ราย (ร้อยละ 26.2) จากการศึกษารูปแบบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของโรคเท้าช้าง พบระดับไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ได้แก่ interleukin-6 (IL-6) และ tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่มีพยาธิสภาพเรื้อรัง (โครงการย่อยที่ 1) และได้ทบทวนวรรณกรรมตลอดจนค้นหาจากฐานข้อมูลได้ยีน peptidoglycan-associated lipoprotein (*pal*) และ heat shock protein 60 (*hsp60*) ที่น่าสนใจเพื่อโคลนและสร้างโปรตีนที่ใช้ศึกษาทางอิมมูนวิทยา (โครงการย่อยที่ 2) ตลอดจนได้ยีนเป้าหมาย (toll-like receptor 2; *tlr-2*) ในการทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (โครงการย่อยที่ 3)

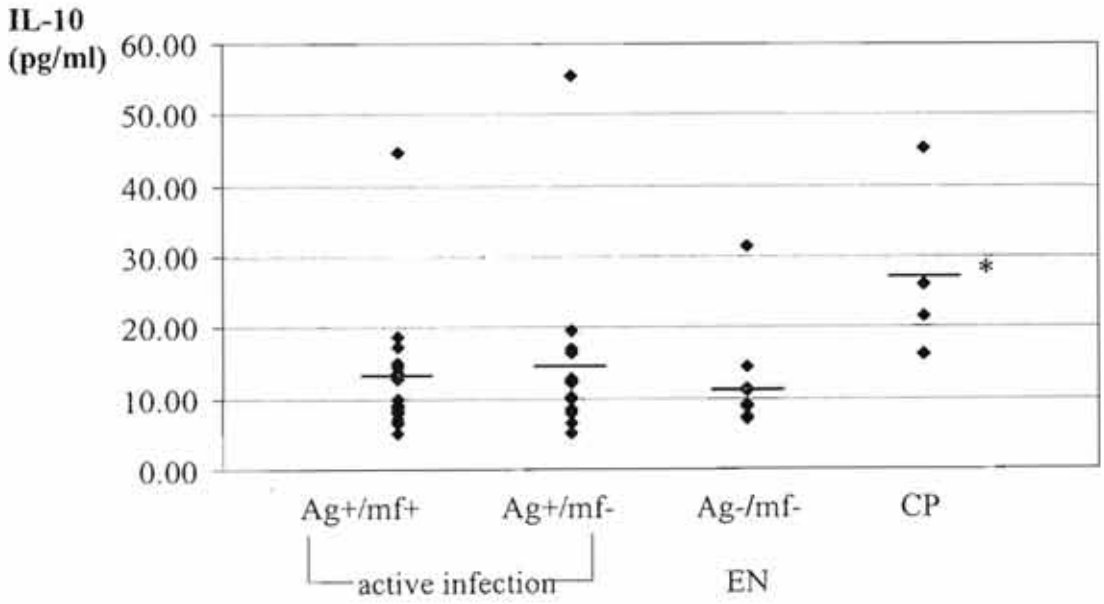
ผลการวิจัยในปีที่ 2 นี้ ได้ทำการศึกษาระดับไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการต้านการอักเสบและไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมบทบาทของ T lymphocyte ตลอดจนได้วัดระดับของแอนติบอดีที่จำเพาะต่อพยาธิโรคเท้าช้าง (โครงการย่อยที่ 1) นอกจากนี้จากการศึกษาโปรตีนทั้งหมดของพยาธิโรคเท้าช้างและแบคทีเรียโวลบาเชีย เพื่อหาโปรตีนเป้าหมายที่สำคัญต่อการเกิดพยาธิสภาพของโรคเท้าช้าง พบโปรตีนที่น่าสนใจได้แก่ โปรตีน *Wolbachia* surface protein (WSP) โปรตีน PAL และโปรตีน HSP60 จึงได้ทำการโคลนและสร้างโปรตีนดังกล่าวและได้ทำการตรวจวัดระดับแอนติบอดีต่อโปรตีน WSP ในผู้ป่วยกลุ่มต่างๆ (โครงการย่อยที่ 2) รวมทั้งศึกษาความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *tlr-2* กับความไวรับของการติดพยาธิโรคเท้าช้าง (โครงการย่อยที่ 3)

ผลการวิจัยในปีงบประมาณ 2551

โครงการย่อยที่ 1 **"รูปแบบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของโรคเท้าช้าง: บทบาทของไซโตไคน์จาก T helper cells และแอนติบอดี IgG ชนิดต่างๆ"**

- **รูปแบบและระดับของการสร้างไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการต้านการอักเสบ**

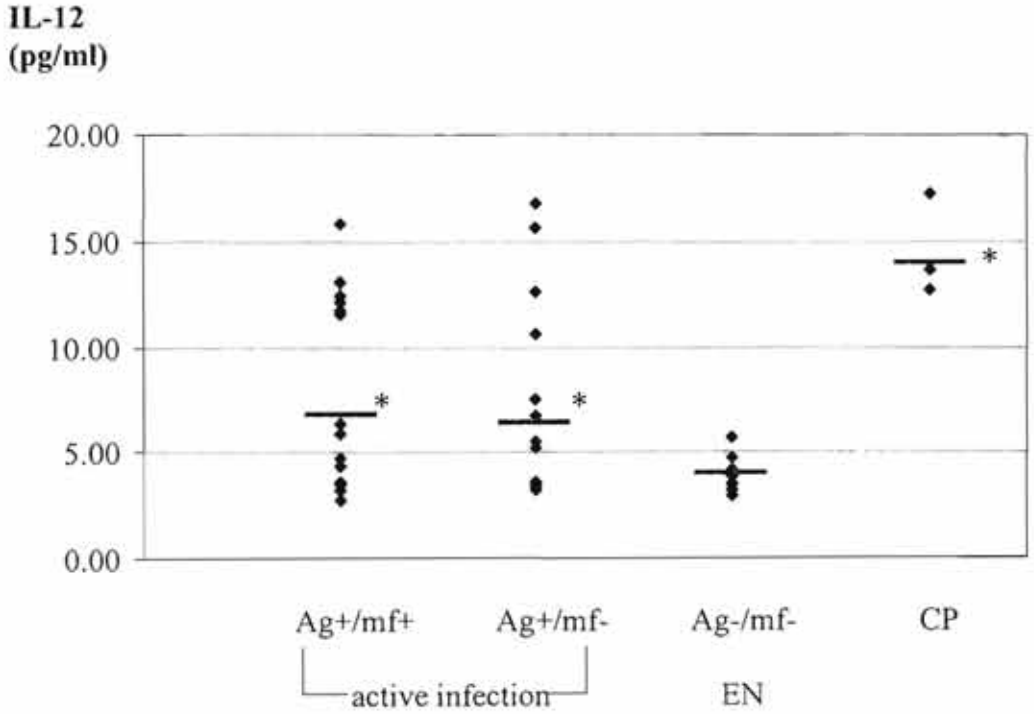
ได้ทำการวัดระดับไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการต้านการอักเสบ ได้แก่ interleukin (IL)-10 ในประชากรกลุ่มต่างๆ พบว่าผู้ป่วยโรคเท้าช้างทั้งกลุ่มที่ตรวจพบไมโครฟิลาเรียและตรวจไม่พบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดมีระดับ IL-10 ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากคนปกติที่อาศัยอยู่ในแหล่งชุกชุมของโรคเท้าช้าง (endemic normals) ($P > 0.05$) ในขณะที่ผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่มีพยาธิสภาพเรื้อรังมีระดับ IL-10 สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 ระดับของไซโตไคน์ IL-10 ในกระแสเลือดของผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่มีการติดเชื้อปัจจุบัน (active infections) ทั้งที่ตรวจพบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด (Ag+/mf+) และตรวจไม่พบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด (Ag+/mf-) คนปกติที่อาศัยอยู่ในแหล่งชุกชุมของโรคเท้าช้าง (endemic normals; EN) และผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่มีพยาธิสภาพเรื้อรัง (chronic pathology; CP) จุดแต่ละจุดแสดงระดับไซโตไคน์ของแต่ละคน แถบเส้นแสดงค่าเฉลี่ยของระดับไซโตไคน์ในแต่ละกลุ่ม ดาวแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ในการเปรียบเทียบกับคนปกติที่อาศัยอยู่ในแหล่งชุกชุมของโรคเท้าช้างด้วยวิธีทางสถิติ unpaired t-test

- **รูปแบบและระดับของการสร้างไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมบทบาทของ T lymphocyte**

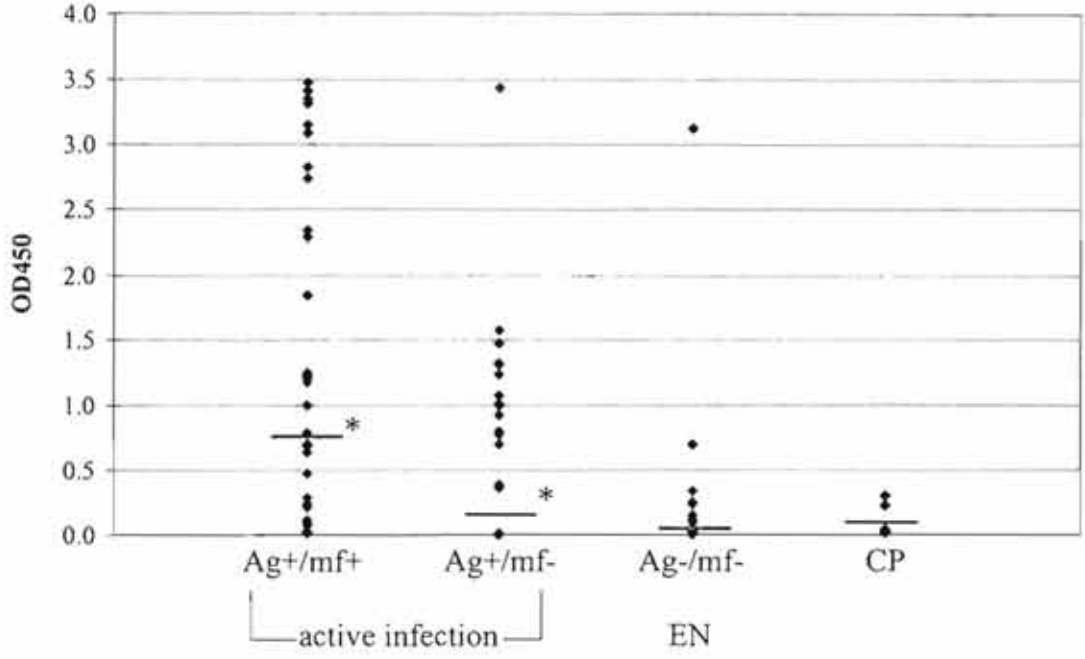
ได้ทำการวัดระดับไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมบทบาทของ T lymphocyte ได้แก่ interleukin (IL)-12 ในประชากรกลุ่มต่างๆ พบว่าผู้ป่วยโรคเท้าช้างทั้งกลุ่มที่ตรวจพบไมโครฟีลาเรียและตรวจไม่พบไมโครฟีลาเรียในกระแสเลือด รวมทั้งผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่มีพยาธิสภาพเรื้อรังมีระดับ IL-12 สูงกว่ากลุ่มคนปกติที่อาศัยอยู่ในแหล่งชุกชุมของโรคเท้าช้าง (endemic normals) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 ระดับของไซโตไคน์ IL-12 ในกระแสเลือดของผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่มีการติดเชื้อปัจจุบัน (active infections) ทั้งที่ตรวจพบไมโครฟีลาเรียในกระแสเลือด (Ag+/mf+) และตรวจไม่พบไมโครฟีลาเรียในกระแสเลือด (Ag+/mf-) คนปกติที่อาศัยอยู่ในแหล่งชุกชุมของโรคเท้าช้าง (endemic normals; EN) และผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่มีพยาธิสภาพเรื้อรัง (chronic pathology; CP) จุดแต่ละจุดแสดงระดับไซโตไคน์ของแต่ละคน แถบเส้นแสดงค่าเฉลี่ยของระดับไซโตไคน์ในแต่ละกลุ่ม ดาวแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ในการเปรียบเทียบกับคนปกติที่อาศัยอยู่ในแหล่งชุกชุมของโรคเท้าช้างด้วยวิธีทางสถิติ unpaired t-test

- **รูปแบบและระดับของการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อพยาธิโรคเท้าช้าง**

ได้ทำการวัดระดับ anti-filarial IgG1 และ IgG4 antibodies ในประชากรกลุ่มต่างๆ พบว่าผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่ติดเชื้อปัจจุบัน (active infection) ทั้งกลุ่มที่ตรวจพบไมโครฟิลาเรียและตรวจไม่พบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด (Ag+/mf+ and Ag+/mf-) มีระดับ anti-filarial IgG4 antibodies (ค่าเฉลี่ย OD = 0.47) สูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพ (ค่าเฉลี่ย OD = 0.07) และกลุ่มคนปกติที่อาศัยอยู่ในแหล่งชุกชุมของโรคเท้าช้าง (endemic normals) (ค่าเฉลี่ย OD = 0.03) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (รูปที่ 3) ในขณะที่ไม่พบความแตกต่างของระดับ anti-filarial IgG1 antibodies ในผู้ป่วยกลุ่มต่างๆ ($P > 0.05$)

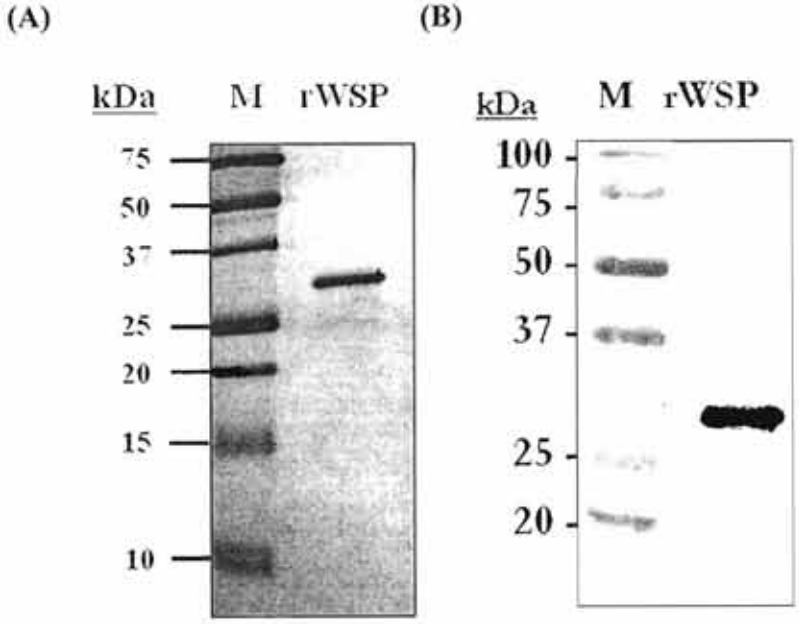


รูปที่ 3 ระดับของ anti-filarial IgG4 antibodies ในกระแสเลือดของผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่มีการติดเชื้อปัจจุบัน (active infections) ทั้งที่ตรวจพบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด (Ag+/mf+) และตรวจไม่พบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด (Ag+/mf-) คนปกติที่อาศัยอยู่ในแหล่งชุกชุมของโรคเท้าช้าง (endemic normals; EN) และผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่มีพยาธิสภาพเรื้อรัง (chronic pathology; CP) จุดแต่ละจุดแสดงระดับแอนติบอดีของแต่ละคน แถบเส้นแสดงค่าเฉลี่ยของระดับแอนติบอดีในแต่ละกลุ่ม ดาวแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ในการเปรียบเทียบกับคนปกติที่อาศัยอยู่ในแหล่งชุกชุมของโรคเท้าช้างด้วยวิธีทางสถิติ unpaired t-test

โครงการที่ 2 **"การศึกษาโมเลกุลที่มีความสำคัญต่อการเกิดพยาธิสภาพและปฏิกิริยาหลังการรักษาของโรคเท้าช้าง เพื่อการพัฒนาสู่การรักษาและวัคซีนป้องกันโรค"**

- **การสร้างโปรตีน Wolbachia surface protein (WSP)**

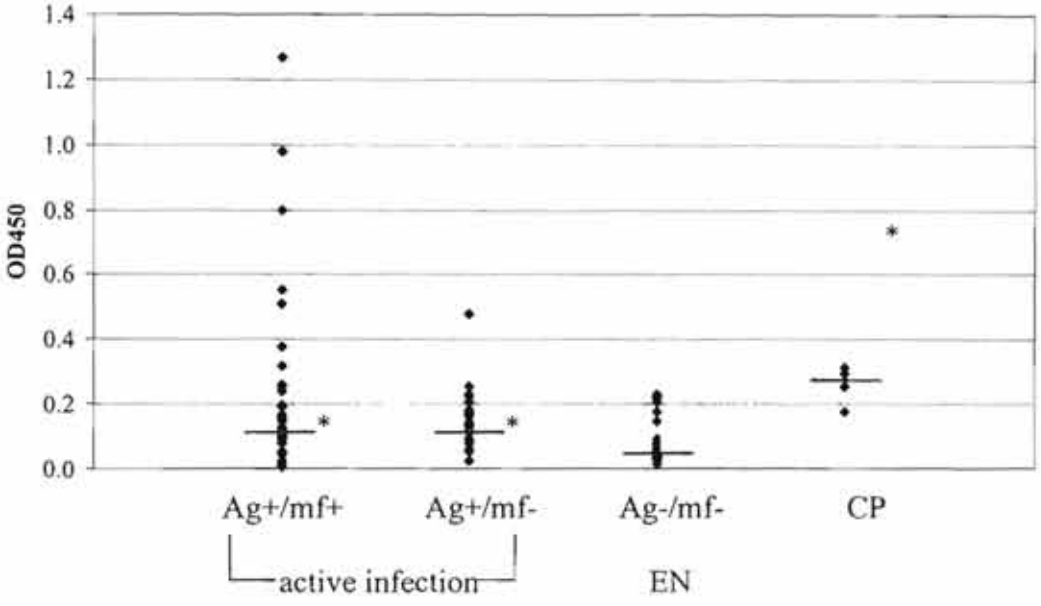
Recombinant *wsp* clone ที่ได้รับการยืนยันความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว ได้ถูกนำมาทำการทดสอบเพื่อหาเวลาและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสร้างโปรตีน WSP โดยทำการเลี้ยง *E. coli* ที่มี *wsp* gene ในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วเหนี่ยวนำให้สร้างโปรตีนด้วย IPTG แล้วทำการสกัดโปรตีนจากเซลล์ที่เวลาต่างๆ เก็บส่วนน้ำใส และส่วนตะกอน พบว่ามีการสร้างโปรตีนอยู่ในรูป inclusion bodies และมีการสร้างโปรตีนในปริมาณมากที่สุดที่ 8 ชั่วโมงหลังการเหนี่ยวนำ เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมในการสร้างโปรตีนแล้ว ได้ทำการสร้างโปรตีนจำนวนมากและแยกให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography โดยใช้ Ni-NTA resin สามารถแยกโปรตีน WSP ออกจากโปรตีนอื่นๆ ของ *E. coli* ได้ (รูปที่ 4)



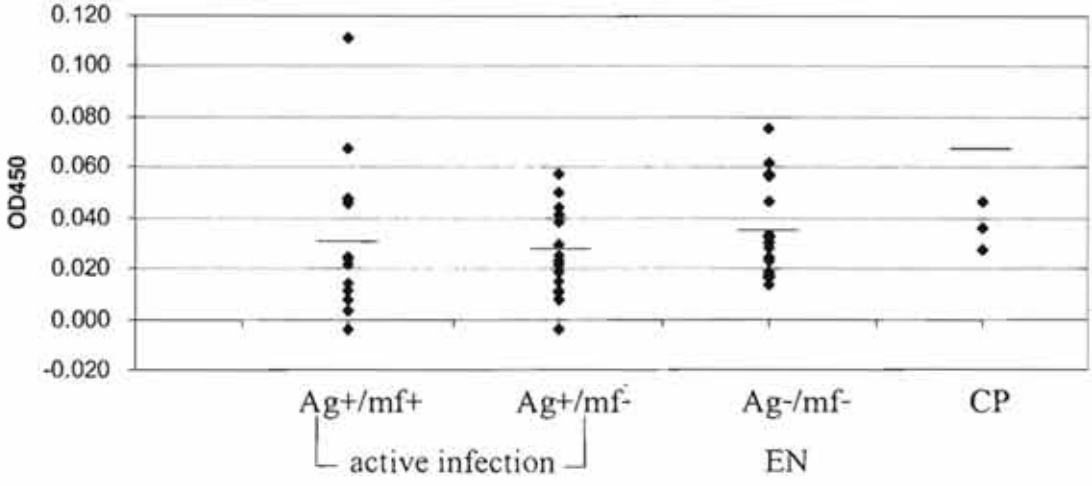
รูปที่ 4 โปรตีน WSP ที่แยกให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography โดยใช้ Ni-NTA resin แล้วย้อมด้วย Silver staining (A) และ Western blot analysis by anti-His-HRP (B)

- **การศึกษารูปแบบและระดับของการสร้างแอนติบอดีชนิดต่างๆ ที่จำเพาะต่อโปรตีน *Wolbachia* Surface Protein (WSP)**

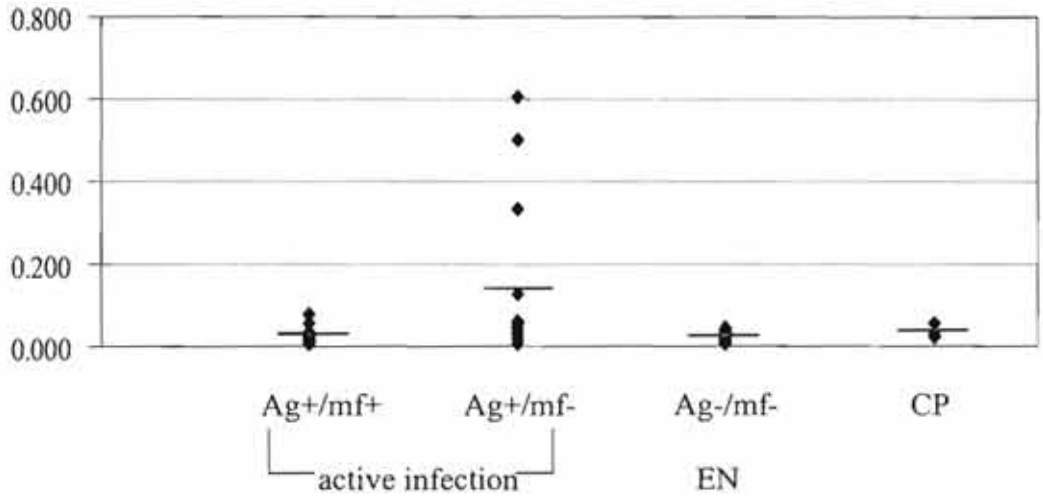
ได้ทำการวัดระดับแอนติบอดีชนิด IgG ทั้ง 4 subclasses ที่จำเพาะต่อโปรตีน WSP ในกระแสเลือดของผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่มีการติดเชื้อปัจจุบัน (active infections) ทั้งกลุ่มผู้ป่วยที่ตรวจพบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด (Ag+/mf+) และตรวจไม่พบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด (Ag+/mf-) กลุ่มผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่มีพยาธิสภาพเรื้อรัง (chronic pathology) ตลอดจนกลุ่มคนปกติที่อาศัยอยู่ในแหล่งชุกชุมของโรคเท้าช้าง (endemic normals) พบว่าแอนติบอดี ชนิด IgG1 และ IgG3 ที่จำเพาะต่อโปรตีน WSP มีระดับสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มการติดเชื้อปัจจุบัน ($P < 0.05$) นอกจากนี้พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพมีระดับแอนติบอดีชนิด IgG1 ที่จำเพาะต่อโปรตีน WSP สูงกว่าในกลุ่มคนปกติที่อาศัยอยู่ในแหล่งชุกชุมของโรคเท้าช้างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) อย่างไรก็ตามพบว่าปริมาณแอนติบอดีชนิด IgG2 และ IgG4 ที่จำเพาะต่อโปรตีน WSP ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง ($P > 0.05$)



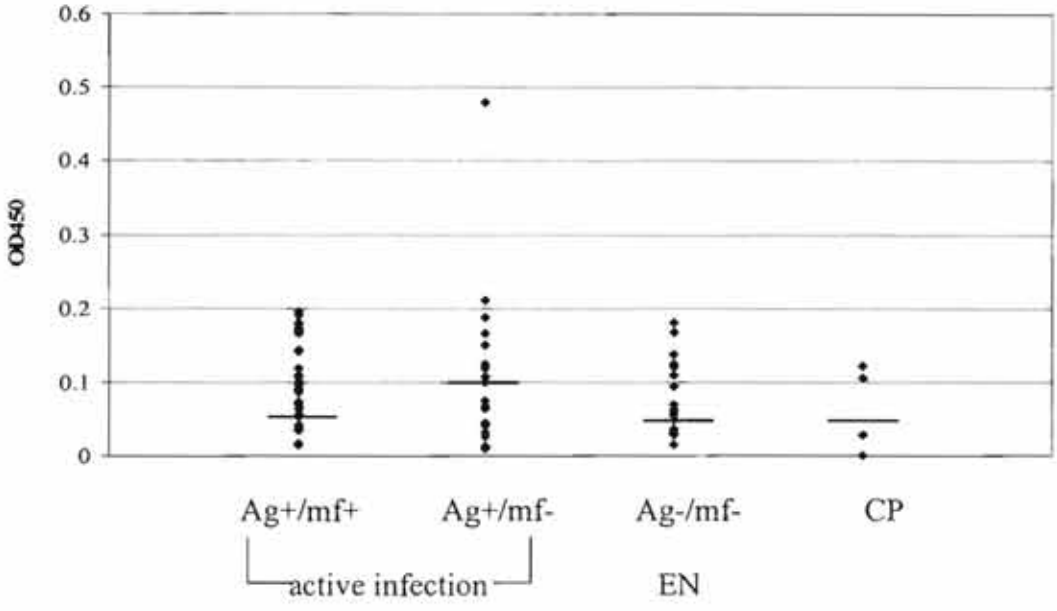
รูปที่ 5 ค่า optical density ที่ความยาวช่วงคลื่นแสง 450 nm (OD450) ในการวัดระดับแอนติบอดีชนิด IgG1 ที่จำเพาะต่อโปรตีน *Wolbachia* Surface Protein (WSP) ในกระแสเลือดของผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่มีการติดเชื้อปัจจุบัน (active infections) ทั้งที่ตรวจพบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด (Ag+/mf+) และตรวจไม่พบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด (Ag+/mf-) คนปกติที่อาศัยอยู่ในแหล่งชุกชุมของโรคเท้าช้าง (endemic normals; EN) และผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่มีพยาธิสภาพเรื้อรัง (chronic pathology; CP) โดยวิธี indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) จุดแต่ละจุดแสดงระดับแอนติเจนของแต่ละคน แถบเส้นแสดงค่าเฉลี่ยของระดับแอนติเจนในแต่ละกลุ่ม ดาวแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) จุดแต่ละจุดแสดงระดับแอนติเจนของแต่ละคน แถบเส้นแสดงค่าเฉลี่ยของระดับไซโตไคน์ในแต่ละกลุ่ม ดาวแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ในการเปรียบเทียบกับคนปกติที่อาศัยอยู่ในแหล่งชุกชุมของโรคเท้าช้างด้วยวิธีทางสถิติ unpaired t-test



รูปที่ 6 ค่า optical density ที่ความยาวช่วงคลื่นแสง 450 nm (OD450) ในการวัดระดับแอนติบอดีชนิด IgG2 ที่จำเพาะต่อโปรตีน *Wolbachia* Surface Protein (WSP) ในกระแสเลือดของผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่มีการติดเชื้อปัจจุบัน (active infections) ทั้งที่ตรวจพบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด (Ag+/mf+) และตรวจไม่พบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด (Ag+/mf-) คนปกติที่อาศัยอยู่ในแหล่งชุกชุมของโรคเท้าช้าง (endemic normals; EN) และผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่มีพยาธิสภาพเรื้อรัง (chronic pathology; CP) โดยวิธี indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) จุดแต่ละจุดแสดงระดับแอนติเจนของแต่ละคน แถบเส้นแสดงค่าเฉลี่ยของระดับแอนติเจนในแต่ละกลุ่ม ดาวแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) จุดแต่ละจุดแสดงระดับแอนติเจนของแต่ละคน แถบเส้นแสดงค่าเฉลี่ยของระดับไซโตไคน์ในแต่ละกลุ่ม ดาวแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ในการเปรียบเทียบกับคนปกติที่อาศัยอยู่ในแหล่งชุกชุมของโรคเท้าช้างด้วยวิธีทางสถิติ unpaired t-test



รูปที่ 7 ค่า optical density ที่ความยาวช่วงคลื่นแสง 450 nm (OD450) ในการวัดระดับแอนติบอดีชนิด IgG3 ที่จำเพาะต่อโปรตีน *Wolbachia* Surface Protein (WSP) ในกระแสเลือดของผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่มีการติดเชื้อปัจจุบัน (active infections) ทั้งที่ตรวจพบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด (Ag+/mf+) และตรวจไม่พบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด (Ag+/mf-) คนปกติที่อาศัยอยู่ในแหล่งชุกชุมของโรคเท้าช้าง (endemic normals; EN) และผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่มีพยาธิสภาพเรื้อรัง (chronic pathology; CP) โดยวิธี indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) จุดแต่ละจุดแสดงระดับแอนติเจนของแต่ละคน แถบเส้นแสดงค่าเฉลี่ยของระดับแอนติเจนในแต่ละกลุ่ม ดาวแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) จุดแต่ละจุดแสดงระดับแอนติเจนของแต่ละคน แถบเส้นแสดงค่าเฉลี่ยของระดับไซโตไคน์ในแต่ละกลุ่ม ดาวแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ในการเปรียบเทียบกับคนปกติที่อาศัยอยู่ในแหล่งชุกชุมของโรคเท้าช้างด้วยวิธีทางสถิติ unpaired t-test



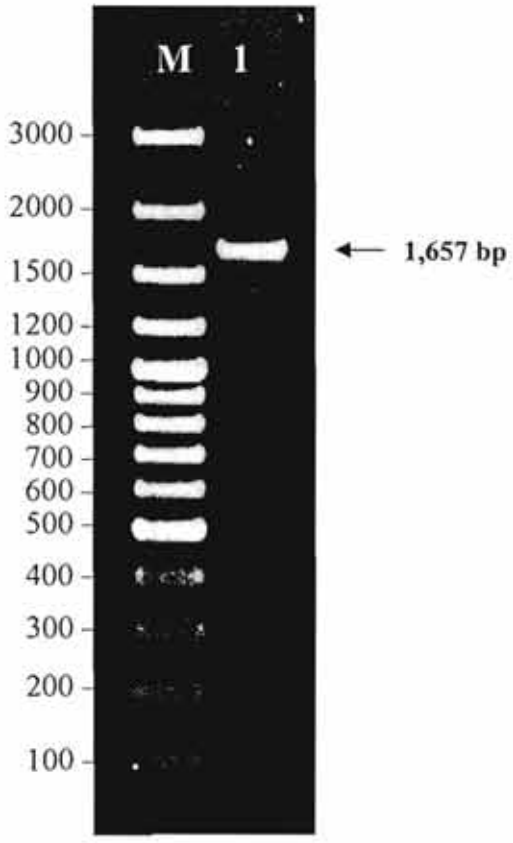
รูปที่ 8 ค่า optical density ที่ความยาวช่วงคลื่นแสง 450 nm (OD450) ในการวัดระดับแอนติบอดีชนิด IgG4 ที่จำเพาะต่อโปรตีน *Wolbachia* Surface Protein (WSP) ในกระแสเลือดของผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่มีการติดเชื้อปัจจุบัน (active infections) ทั้งที่ตรวจพบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด (Ag+/mf+) และตรวจไม่พบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด (Ag+/mf-) คนปกติที่อาศัยอยู่ในแหล่งชุกชุมของโรคเท้าช้าง (endemic normals; EN) และผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่มีพยาธิสภาพเรื้อรัง (chronic pathology; CP) โดยวิธี indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) จุดแต่ละจุดแสดงระดับแอนติเจนของแต่ละคน แถบเส้นแสดงค่าเฉลี่ยของระดับแอนติเจนในแต่ละกลุ่ม ดาวแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) จุดแต่ละจุดแสดงระดับแอนติเจนของแต่ละคน แถบเส้นแสดงค่าเฉลี่ยของระดับไซโตไคน์ในแต่ละกลุ่ม ดาวแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ในการเปรียบเทียบกับคนปกติที่อาศัยอยู่ในแหล่งชุกชุมของโรคเท้าช้างด้วยวิธีทางสถิติ unpaired t-test

- **การโคลนยีน *hsp60* (*heat shock protein 60*) ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ในพยาธิโรคเท้าช้าง *Brugia malayi***

ได้ออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มจำนวนยีน *hsp60* ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ใน *Dirofilaria immitis* ให้ได้ความยาวทั้งยีนจากจุดเริ่มต้น (start codon) และจุดสิ้นสุด (stop codon) ของยีน ซึ่งมีความยาว 1,653 bp โดยใช้ไพรเมอร์และสภาวะในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (ตารางที่ 1) สำหรับ forward primer ได้ใส่เบส CACC ไว้ด้านหน้า เพื่อประโยชน์สำหรับการโคลน PCR product เข้าสู่ pET100/D-TOPO vector หลังจากนำ PCR product ไปวิ่งผ่านกระแสไฟฟ้า (gel electrophoresis) พบว่าได้ PCR product ตามขนาดที่ต้องการ คือ 1,657 bp (รูปที่ 9)

<u>ตารางที่ 1</u> ลำดับเบสของไพรเมอร์และสภาวะในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสเพื่อเพิ่มจำนวนยีน *hsp60*

ไพรเมอร์	ลำดับเบสของไพรเมอร์	สภาวะในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส
Forward	5'- CACCATGACTAATGTAGTAGTGTC -3'	94°C 5 นาที
		94°C 30 วินาที }
Reverse	5'- TTAGAATCCATTCATTCCACCCATG -3'	50°C 30 วินาที } 35 รอบ
		72°C 3 นาที 20 วินาที }
		72°C 7 นาที



รูปที่ 9 การเพิ่มจำนวนยีน *hsp60* ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ในพยาธิโรคเท้าช้าง *Brugia malayi* โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส

แถว M: 100 bp DNA marker

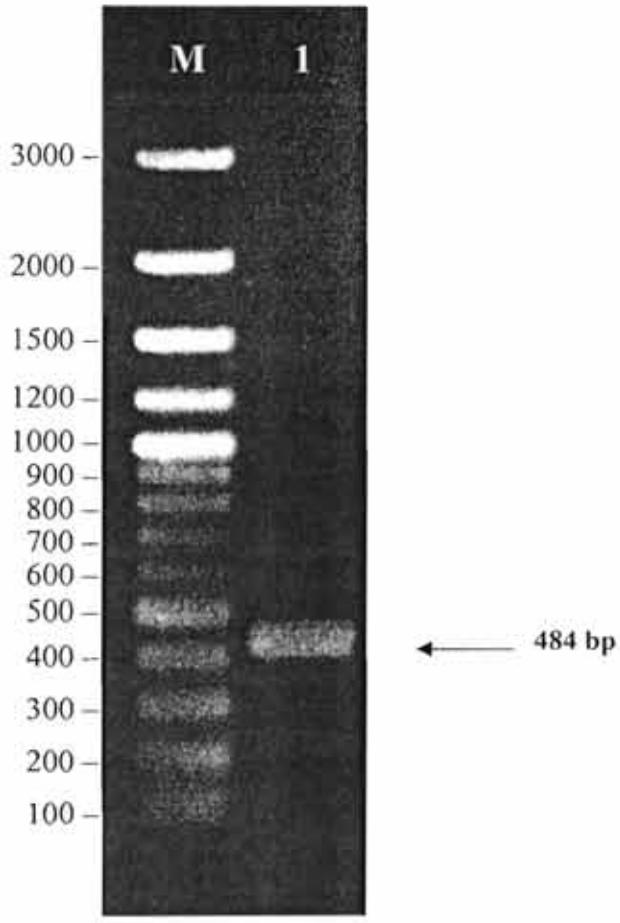
แถวที่ 1: PCR product ยีน *hsp60* ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ใน *B. malayi* (1,657 bp)

- **การโคลนยีน *pal* (*peptidoglycan associated lipoprotien*) ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ใน พยาธิโรคเท้าช้าง *Brugia malayi***

ได้ออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มจำนวนยีน *pal* ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ใน *B. malayi* ให้ได้ความยาวทั้งยีนจากจุดเริ่มต้น (start codon) และจุดสิ้นสุด (stop codon) ของยีน ซึ่งมีความยาว 480 bp โดยใช้ไพรเมอร์และสภาวะในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (ตารางที่ 2) สำหรับ forward primer ได้ใส่เบส CACC ไว้ด้านหน้า เพื่อประโยชน์สำหรับการโคลน PCR product เข้าสู่ pET100/D-TOPO vector ต่อไป ซึ่งจากการเพิ่มจำนวนยีน *pal* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสแล้วนำ PCR product ไปวิ่งผ่านกระแสไฟฟ้า (gel electrophoresis) พบว่าได้ PCR product ตามขนาดที่ต้องการ คือ 484 bp (รูปที่ 10)

ตารางที่ 2 ลำดับเบสของไพรเมอร์และสภาวะในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส เพื่อเพิ่มจำนวนยีน *pal*

ไพรเมอร์	ลำดับเบสของไพรเมอร์	สภาวะในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส
Forward	5'- CACCTGCTCAAAAAGAGGAGTG -3'	95°C 3 นาที
		95°C 1 นาที
Reverse	5'- CGGAGCCTATTTTTTCATTCCAG -3'	39°C 30 วินาที } 5 รอบ
		72°C 1 นาที
		95°C 1 นาที
		50°C 30 วินาที } 30 รอบ
		72°C 1 นาที
		72°C 7 นาที



รูปที่ 10 การเพิ่มจำนวนยีน *pal* ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ในพยาธิโรคเท้าช้าง *Brugia malayi* โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส

แถว M: 100 bp DNA marker

แถวที่ 1: PCR product ยีน *pal* ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ใน *B. malayi* (484 bp)

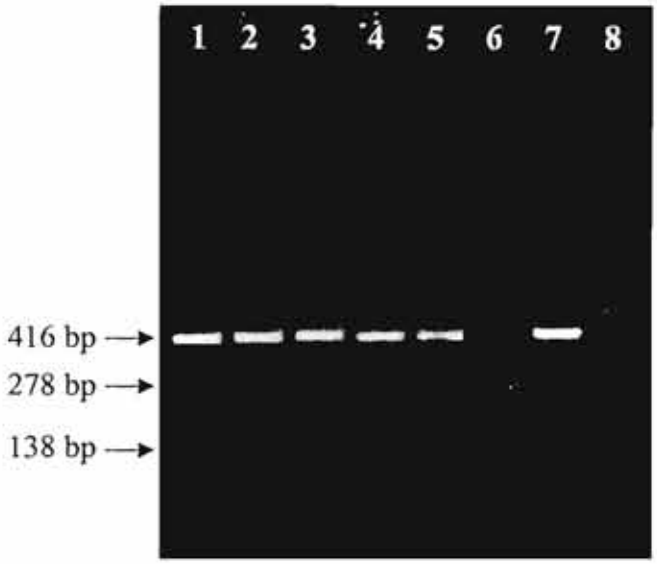
โครงการย่อยที่ 3 **"การพัฒนาตัวติดตามเพื่อพยากรณ์การเกิดภาวะเท้าช้างและการเกิดปฏิกิริยาหลังการรักษา"**

- **การพัฒนาเทคนิคในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (Single Nucleotide Polymorphisms; SNPs) ของยีน toll-like receptor-2 (*tlr2*)**

ได้พัฒนาเทคนิคในการตรวจหาความหลากหลายทางพันธุกรรม (Single Nucleotide Polymorphisms; SNPs) ของยีน toll-like receptor-2 (*tlr2*) ในตำแหน่ง+597 (T>C) (refSNP ID: rs3804099) ซึ่งอยู่ใน exon 3 โดยใช้เทคนิค Polymerase chain reaction-linked restriction fragment length polymorphism โดยใช้ไพรเมอร์และสภาวะในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (ตารางที่ 3) และนำผลผลิตพีซีอาร์ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mae* II ซึ่งทำให้ได้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอหลังจากนำไปวิ่งผ่านกระแสไฟฟ้า (gel electrophoresis) ดังรูปที่ 11

ตารางที่ 3 ลำดับเบสของไพรเมอร์และสภาวะในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสในการหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน(*tlr2* ในตำแหน่ง+597)

ไพรเมอร์	ลำดับเบสของไพรเมอร์	สภาวะในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส
+597-F	5'- CCTGAGAGTGGGAAATATGGAC-3'	95°C 5 min,
		95°C 30 sec ⎫
+597-R	5'- CTCCATTAAGGGTACAGTCATC-3'	52°C 30 sec ⎬ 35 cycles
		72°C 30 sec ⎭
		72°C 7 min



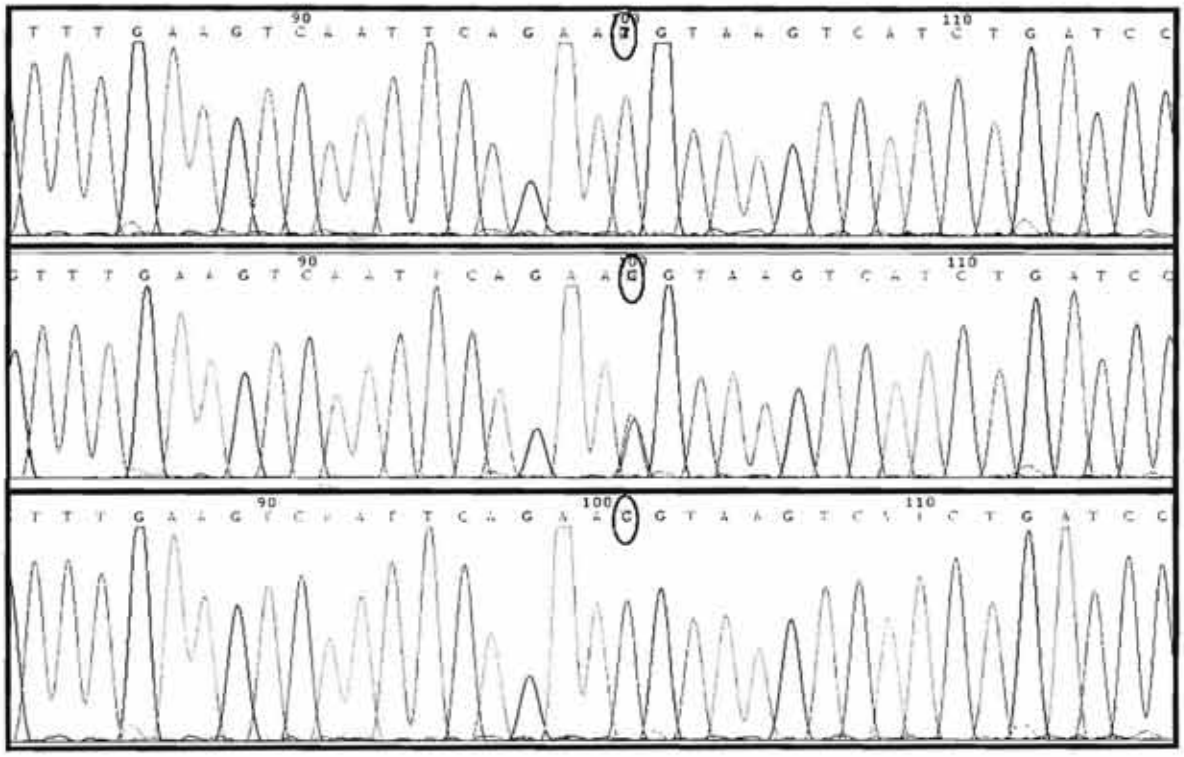
<u>รูปที่ 11</u> การตรวจหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของของยีน *tlr2* ที่ตำแหน่ง +597 โดยใช้เทคนิค PCR–RFLP ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mae* II

แถวที่ 1-3, 5, 7: homozygous of +597T (416 bp)

แถวที่ 4: heterozygous of +597T/C (416 + 278 + 138)

แถวที่ 6: homozygous of +597C (278 + 138)

ได้ทำการยืนยันรูปแบบความหลากหลายทางพันธุกรรมของของยีน *tlr2* ที่ตำแหน่ง +597 โดยการสุ่มบางตัวอย่างมาทำการหาลำดับเบส (DNA sequencing) (รูปที่ 12) ซึ่งให้รูปแบบของความหลากหลายทางพันธุกรรมสอดคล้องกับ PCR-RFLP



รูปที่ 12 Chromatogram รูปแบบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *tlr2* ที่ตำแหน่ง +597 จากการทำ DNA sequencing

A: homozygous of +597T

B: heterozygous +597T/C

C: homozygous of +597C

- **ความหลากหลายทางพันธุกรรม (Single Nucleotide Polymorphisms; SNPs) ของยีน Toll-like receptor-2 ที่สัมพันธ์กับความไวรับต่อการเกิดโรคเท้าช้าง**

ได้ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของของยีน TLR2 ที่ตำแหน่ง +597 โดยเทคนิค PCR-RFLP ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อแบบมีฤทธิ์ (มีไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด หรือให้ผลบวกกับการตรวจหาแอนติเจนโดยวิธีไอซีที immunochromatographic test (ICT) หรือ *W. bancrofti*-specific Og4C3 antigen) จำนวน 112 คน และในอาสาสมัครคนปกติที่อาศัยอยู่ในแหล่งชุกชุมของโรคเท้าช้าง (endemic normals) ที่ตรวจไม่พบแอนติเจนที่จำเพาะต่อพยาธิโรคเท้าช้าง และตรวจไม่พบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด เพื่อเป็นกลุ่มควบคุมจำนวน 151 คน (ตารางที่ 4) จากนั้นนำความถี่ของ genotype และ allele ที่พบในผู้ป่วยเปรียบเทียบกับ endemic normals โดยใช้ Chi-square (χ^2) test ในการเปรียบเทียบความแตกต่าง

ผลการศึกษาพบว่าความถี่ของ genotype ของ endemic normals อยู่ในสมดุลของ Hardy-Weinberg (P>0.05) พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบความถี่ของ allele ของผู้ป่วยและ endemic normals (odds ratio (OR) 2.18, 95% confidence interval (CI): 1.34-3.56, P=0.002) นอกจากนี้ยังพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบความถี่ของ genotype แบบ TC ของผู้ป่วยและ endemic normals (OR= 2.17, 95% CI= 1.24-3.81, P=0.01) แสดงให้เห็นว่ารูปแบบของ genotype แบบ TC ของยีน TLR2 ที่ตำแหน่ง +597 มีความสัมพันธ์กับความไวรับต่อการเกิดโรคเท้าช้าง

ตารางที่ 4 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของของยีน TLR2 ที่ตำแหน่ง +597 ในผู้ป่วยและอาสาสมัครคนปกติ

ความถี่	ผู้ป่วย (n = 112)	Endemic normal (n = 151)	OR (95% CI)	P value
Alleles				
T	178 (0.795)	270 (0.894)	1	
C	46 (0.205)	32 (0.106)	**2.18 (1.34-3.56)**	**0.002***
Genotypes				
TT	70 (0.625)	120 (0.795)	1	
TC	38 (0.339)	30 (0.198)	**2.17 (1.24-3.81)**	**0.01***
CC	4 (0.036)	1 (0.007)	6.86 (0.75-62.58)	0.05

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$