

บทคัดย่อ โรคภูมิแพ้ เช่น โรคหอบหืด (Asthma) และ โรคโพรงจมูกอักเสบจากภูมิแพ้ หรือ โรคแพ้อากาศ (Allergic rhinitis) จัดเป็นปัญหาสำคัญที่ประเทศไทยกำลังเผชิญในขณะนี้ โดยในช่วงเวลา 10 ปีที่ผ่านมา อัตราความชุกของโรคภูมิแพ้ได้เพิ่มสูงขึ้นประมาณ 3 เท่าในคนไข้ที่เป็นเด็กและผู้ใหญ่ โรคภูมิแพ้เหล่านี้ไม่เพียงแต่จะส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิต แต่ยังส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจของประเทศไทยอีกด้วย สารก่อภูมิแพ้จากไรฝุ่นจัดเป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคภูมิแพ้ จากสารก่อภูมิแพ้จากไรฝุ่นประมาณ 20 ชนิด สารก่อภูมิแพ้กลุ่มที่ 1, 2, และ 3 นับว่าเป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดภาวะภูมิแพ้ ในประเทศไทย มีการศึกษาพบว่า ไรฝุ่นบ้านสายพันธุ์ *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) และ *Dermatophagoides farinae* (Df) เป็นสายพันธุ์ที่พบมาก แต่ในปัจจุบัน การตรวจหาสาเหตุของโรคภูมิแพ้ ยังจำเป็นต้องใช้ตัวไรฝุ่นสกัดจากทั้งสองสายพันธุ์ ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ เนื่องจากยังไม่มีการผลิตตัวไรฝุ่นสกัดเพื่อการตรวจสอบในประเทศไทย นอกจากนี้ ยังมีการใช้ตัวไรฝุ่นสกัดจากต่างประเทศในการรักษาอาการโรคภูมิแพ้จากไรฝุ่น (Immunotherapy) ซึ่งอาจจะไม่เหมาะที่จะใช้กับผู้ป่วยในประเทศ เนื่องจาก ปัญหาด้านความหลากหลายทางชีวภาพ (Genetic polymorphisms) ของยีนที่กำหนดการสร้างสารก่อภูมิแพ้ และมีราคาแพง ดังนั้น โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ

1. ศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพ (Genetic polymorphisms) ของยีนที่กำหนดการสร้างสารก่อภูมิแพ้ กลุ่มที่ 1, 2, และ 3 จากไรฝุ่น Dp และ Df ที่พบในประเทศไทย รวมทั้งการผลิตสารก่อภูมิแพ้ (recombinant allergens) เพื่อนำไปพัฒนาเป็นสารเพื่อการตรวจสอบ
2. ศึกษาผลกระทบของความหลากหลายทางชีวภาพของยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนต่อปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนและเซลล์ของภูมิคุ้มกัน IgE และ polyclonal T cells
3. ศึกษาจัดอันดับของสารก่อภูมิแพ้ กลุ่มที่ 1, 2, และ 3 ในการเป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดภาวะภูมิแพ้ในผู้ป่วยคนไทย

ผลการทดลองพบว่า มีความหลากหลายทางชีวภาพ (Genetic polymorphisms) ของยีนที่กำหนดการสร้างสารก่อภูมิแพ้ กลุ่มที่ 1, 2, และ 3 จากไรฝุ่น Dp และ Df ที่พบในประเทศไทย และผลจากความหลากหลายทางชีวภาพของยีน ก็คือการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนหลายชนิด ซึ่งมีทั้งที่เป็นการค้นพบใหม่ที่เฉพาะในสารก่อภูมิแพ้ที่พบในประเทศไทย และที่เคยพบแล้วในประเทศอื่นๆ ผลการตรวจสอบสารก่อภูมิแพ้ กลุ่มที่ 1, 2, และ 3 ที่ผลิตได้จากเซลล์ยีสต์สายพันธุ์ *Pichia pastoris* โดยวิธี SDS-PAGE, Western blot, ELISA, และ mass fingerprint ได้ยืนยันว่าเป็นสารก่อภูมิแพ้ กลุ่มที่ 1, 2, และ 3 จริง ผลการศึกษาผลกระทบของความหลากหลายทางชีวภาพต่อปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนและเซลล์ของภูมิคุ้มกัน IgE พบว่า การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนหลายชนิดของสารก่อภูมิแพ้ กลุ่มที่ 1 มีผลไปเพิ่มความรุนแรงต่อปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนและเซลล์ของภูมิคุ้มกัน (IgE) ในขณะที่การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนหลายชนิดของ กลุ่มที่ 2 มีผลไปเพิ่ม หรือลด ความรุนแรงต่อปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนและเซลล์ของภูมิคุ้มกัน (IgE) ขึ้นอยู่กับชนิดของกรดอะมิโน นอกจากนี้ การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนหลาย

ชนิดของ กลุ่มที่ 2 ยังมีผล ไปเพิ่มการเพิ่มปริมาณของเซลล์ของภูมิคุ้มกัน polyclonal T cells ผลการศึกษาอันดับของสารก่อภูมิแพ้ ในการก่อให้เกิดภาวะภูมิแพ้ในผู้ป่วยคนไทย พบว่า สารก่อภูมิแพ้ กลุ่มที่ 2 ก่อให้เกิดภาวะภูมิแพ้ในผู้ป่วยคนไทยได้มากที่สุด รองลงมาเป็น สารก่อภูมิแพ้ กลุ่มที่ 1 ผลการศึกษายังพบว่า กลุ่มที่ 2 และ กลุ่มที่ 1 จัดเป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดภาวะภูมิแพ้ในผู้ป่วยคนไทย ในทางตรงกันข้าม สารก่อภูมิแพ้ กลุ่มที่ 3 ไม่ได้เป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดภาวะภูมิแพ้ในผู้ป่วยคนไทย

ผลงานวิจัยของโครงการนี้แสดงให้เห็นว่า สารก่อภูมิแพ้ กลุ่มที่ 2 ก่อให้เกิดภาวะภูมิแพ้ในผู้ป่วยคนไทยได้มากที่สุด และการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนหลายชนิด ซึ่งเป็นผลมาจากความหลากหลายทางชีวภาพของยีนที่กำหนดการสร้างสารก่อภูมิแพ้ สามารถไปเพิ่ม หรือ ลดความรุนแรงต่อปฏิสัมพันธ์ระหว่าง โปรตีนและเซลล์ของภูมิคุ้มกัน (IgE) และ สามารถไปเพิ่มปริมาณของเซลล์ของภูมิคุ้มกัน polyclonal T cells อีกด้วย

Abstract In the past decade, the prevalence of respiratory allergic diseases such as asthma and allergic rhinitis among Thai population is increasing dramatically. These allergic diseases have been shown to have a great impact on quality of life as well as economy. House dust mite (HDM) proteins or allergens are the most common allergen causing these allergic diseases in Thai population. Up-to-date, twenty groups of HDM allergens have been identified. However, in Europe and America, group 1, 2, and 3 allergens are shown to be major HDM allergens which >75% of allergic patients have specific IgE against. Recently, genetic polymorphisms, causing missense mutations resulting in changing allergenicity and T-cell responses, of genes coding for group 1 and 2 allergens have been reported in many countries. Interestingly, certain mutations have been found to be exclusive to one country while some mutations are common among the same group from many countries. Thus, information regarding local variants would be more useful than information of variant found in other regions. This study aimed to examine genetic polymorphisms of HDM allergen group 1, 2, and 3, as well as examine effects of mutations on allergenicity and T-cell responses. This study, also, determined what might be major allergens for Thai allergic population.

Results of dust sampling around Bangkok showed that *Dermatophagoides farinae* (Df) mites were dominant species followed by *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) mites. The genetic polymorphisms analysis showed there were numbers of both nonsense and missense mutations found in 3 allergen groups. There were a number of novel polymorphisms found only in Thai dust mite allergens. Yeast *Pichia pastoris* expressed-recombinant group 1, 2, and 3, of both Der p and Der f proteins were successfully purified and confirmed their identities by SDS-PAGE, western blotting, ELISA, and mass fingerprint. Also, an identity of recombinant group 1, 2, and 3 were confirmed by mass fingerprint. The results of direct binding ELISA and western blotting found that majority of Thai allergic patients had specific IgE to group 2 followed by group 1 allergen whereas a few number of Thai allergic patients had specific IgE to group 3. The results from analysis of missense mutations of group 1 and 2 variants found that all tested group 1 variants were more allergenic than the nature one. However, for group 2, some variants had less allergenic than others. Interestingly, when tested for T-cell responses, three variants had gained ability to stimulate T cell proliferation except one that did not stimulate.

In conclusion, HDM group 2 allergen is the major allergen for Thai allergic patients in Bangkok. Genetic polymorphisms of group 1 and 2 allergens causing missense mutations could alter allergenicity as well as ability to stimulate proliferation of polyclonal T cells