บทคัดย่อ

T 165000

โครงการที่ 1 การศึกษาพยาธิชีววิทยา การสังเคราะห์และวิเคราะห์คุณลักษณะของแอนติเจนและยีนของพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica* ที่มีศักยภาพในการพัฒนาวิธีตรวจสอบการติดเชื้อและวัคซีน

1.1. **พยาธิชีววิทยาของการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับในหนูทดลองแฮมสเตอร์ หนูแรท และหนูเมาส์**

การศึกษาพยาธิสภาพของการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับในครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ออกแบบการทดลองการติดเชื้อพยาธิในสัตว์ทดลอง 3 ชนิดคือ หนูแฮมสเตอร์ หนูแรท และหนูเมาส์ เพื่อหาสัตว์ทดลองขนาดเล็กที่สามารถใช้เป็นตัวอย่างในการทดสอบวัคซีนและยา ผลจากการทดลองติดเชื้อพยาธิในหนูทดลองทั้ง 3 ชนิด แสดงให้เห็นว่าหนูแฮมเตอร์มีความต้านทานต่อการติดเชื้อพยาธิน้อยที่สุด จึงง่ายต่อการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับมากที่สุด โดยพบจำนวนพยาธิในตับและพยาธิสภาพของตับซึ่งถูกทำลายมากที่สุด สัตว์ทดลองที่มีความต้านทานสูงกว่าคือหนูเมาส์ ในขณะที่หนูแรทมีความต้านทานต่อการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับมากที่สุด โดยมีจำนวนพยาธิในตับหลังการติดเชื้อพยาธิน้อยที่สุด และยังพบว่าตับของหนูแรทมีพยาธิสภาพน้อยที่สุดด้วย ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากการสร้างภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะและแบบจำเพาะของหนูแรทนั้นมีประสิทธิภาพดีกว่าหนูทดลองชนิดอื่น ดังนั้นผลการทดลองจึงบ่งชี้ว่าหนูเมาส์มีความสามารถในการสร้างภูมิคุ้มกันในระดับปานกลางซึ่งน่าจะเหมาะสมที่จะนำหนูชนิดนี้มาใช้ในการทดสอบวัคซีน โดยที่หนูแฮมสเตอร์น่าจะเหมาะสมที่จะใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของยาฆ่าพยาธิได้

1.2. **การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ภูมิคุ้มกัน ระดับแอนติบอดี และคุณลักษณะของแอนติเจนในช่องท้องและกระแสโลหิตของหนูทดลองที่ได้รับการกระตุ้นด้วยแอนติเจนจากพยาธิตัวเต็มวัย**

การเพิ่มจำนวนอย่างมีนัยสำคัญของอีโอซิโนฟิลและระดับของแอนติบอดีที่พบได้อย่างชัดเจนในหนูแรท (ระดับแอนติบอดีในหนูแรทมีค่าสูงกว่าในหนูเมาส์ถึง 5.5 เท่า) น่าจะเป็นลักษณะสำคัญที่ทำให้หนูแรทมีความต้านทานต่อการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับมากกว่าหนูเมาส์ นอกจากนี้การวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการทดลองทำให้สรุปได้ว่า หนูแรทมีภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (innate immunity) ที่สามารถต้านทานการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับได้ดี แม้ว่าไม่เคยได้รับเชื้อพยาธิชนิดนี้มาก่อน ในขณะที่หนูเมาส์มีภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะไม่เพียงพอที่จะต้านการติดเชื้อพยาธิดังกล่าวได้เช่นหนูแรท แต่ก็มีการสร้างภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเช่นการสร้างแอนติบอดีได้ในระดับหนึ่ง ดังนั้นการทดลองเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันการติดเชื้อพยาธิจึงควรเลือกใช้หนูเมาส์เพื่อที่จะได้แสดงประสิทธิภาพของวัคซีนได้อย่างชัดเจน

1.3. **การสังเคราะห์ คุณลักษณะ การกระจายและประสิทธิภาพการเป็นวัคซีนของ cathpesin B**

เราได้ทำการสังเคราะห์ cDNA และ recombinant proteins ของแอนติเจนหลายตัวที่น่าจะมีศักยภาพในการเป็นวัคซีนได้ โดยในลำดับแรกเราได้สังเคราะห์ยีน cathepsin B จากพยาธิใบไม้ตับ *F.*

gigantica ระยะตัวเต็มวัย ตัวอ่อน (NEJ) และระยะ metacercariae cDNAs ที่สังเคราะห์ได้ถูกกำหนดชื่อเป็น FG catB-1 FG catB-2 และ FG catB-3 ซึ่งแสดงความเหมือนกันประมาณ 64% ถึง 79% พบว่า FG cat-B1 แสดงออกในพยาธิทุกระยะ ขณะที่ FG cat-B2 และ FG cat-B3 แสดงออกในพยาธิระยะ metacercariae ระยะตัว NEJ และระยะตัวอ่อนเท่านั้น โดยแสดงออกในเซลล์เนื้อเยื่อบุท่อทางเดินอาหาร ในเซลล์ที่อยู่ใต้ต่อท่อทางเดินอาหารส่วนต้น และในเซลล์ชั้นผิว นอกจากนี้ยังพบในเนื้อเยื่อของอวัยวะสืบพันธุ์ซึ่งรวมถึงเซลล์ของ Mehlis และ vitelline อัณฑะและไข่ ซึ่งอาจสรุปได้ว่าเอนไซม์ cathepsin B2, B3 มีบทบาทในการย่อยเนื้อเยื่อของโฮสท์เพื่อการไชและเคลื่อนผ่านไปสู่ตับของพยาธิตัวอ่อน และเอนไซม์ cathepsin B1 อาจทำหน้าที่ย่อยอาหารทั่วไปเพื่อให้ได้สารอาหารแก่พยาธิอีกโดยเฉพาะพยาธิตัวเต็มวัย หนูเมาส์สามารถถูกกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Cat B โดยการฉีดกระตุ้นด้วย Cat B cDNA-pCI vector constructs ประสิทธิภาพการเป็นวัคซีนของ cathepsin B cDNA สามารถป้องกันการติดเชื้อในหนูเมาส์ที่ใช้ทดสอบได้ 26% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

1.4. **การสังเคราะห์ คุณลักษณะ การกระจายและประสิทธิภาพการเป็นวัคซีนของ** cathepsin L

ยีน cathepsin L ถูกสังเคราะห์จากพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ระยะตัวเต็มวัยระยะตัวอ่อน (NEJ) และระยะ metacercariae โดยยีน FG catL-1G และ FG catL-1H แสดงออกในระยะ metacercaria และ NEJ ส่วนยีน FG catL-1A แสดงออกในพยาธิตัวเต็มวัย ลำดับกรดอะมิโนของยีนทั้งสามนี้แสดงความเหมือนกันประมาณ 70% ถึง 75% พบว่า cathepsin L แสดงออกเฉพาะในเซลล์เนื้อเยื่อบุท่อทางเดินอาหาร cathepsin L จึงน่าจะมีบทบาทหลักในการย่อยอาหารของพยาธิ หนูเมาส์สามารถถูกกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Cat L โดยใช้ Cat L cDNA-pCI vector constructs ประสิทธิภาพการเป็นวัคซีนของ cathepsin L cDNA สามารถป้องกันการติดเชื้อในหนูทดลองได้ 40% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

1.5. **การสังเคราะห์ การศึกษาคุณลักษณะ การกระจาย และการทดสอบศักยภาพการเป็นวัคซีนของโปรตีน** Glutathione S-transferase (GST)

ยีนของโปรตีน GST ถูกสังเคราะห์มาจากพยาธิตัวเต็มวัยโดยวิธี RT-PCR ทำให้ได้ cDNA ซึ่งนำมาสังเคราะห์โปรตีน recombinant GST (rGST) แล้วนำมาฉีดกระตุ้นในหนูเมาส์เพื่อเก็บโพลีโคลนัลแอนติบอดี (PoAb) จากการตรวจสอบการกระจายของ GST ในเนื้อเยื่อของพยาธิใบไม้ตับระยะต่างๆ โดยวิธี Immunoperoxidase พบว่าโปรตีน GST มีปริมาณมากที่สุดในเนื้อเยื่อ parenchyma ในทุกๆระยะของพยาธิ นอกจากนี้ในพยาธิตัวเต็มวัยยังสามารถเห็นปริมาณและการกระจายตัวของโปรตีน GST ในเซลล์ของเนื้อเยื่อ parenchyma เป็น 3 ระดับ คือ ระดับสูง ระดับปานกลาง และระดับต่ำ นอกจากเนื้อเยื่อ parenchyma แล้ว ยังพบว่าโปรตีน GST กระจายตัวอยู่ในระดับต่ำอยู่เนื้อเยื่ออัณฑะและรังไข่ของพยาธิตัวเต็มวัย แต่ไม่พบว่ามีโปรตีน GST อยู่ในชั้นผิว (tegument), caecum หรือ vitelline gland เลย ส่วนในตัวอ่อนสามารถพบการกระจายของโปรตีน GST ใน tegument ที่ระดับปานกลาง พบว่าหนู

เมาส์ที่ได้รับการฉีดวัคซีน rGST แบบ intradermal มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับลดลง 84.16% เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนพยาธิที่นับได้ในหนูชุดควบคุมที่ไม่ได้รับการฉีดวัคซีน นอกจากนี้พบว่า rGST จากพยาธิใบไม้ตับสามารถลดการติดเชื้อพยาธิใบไม้เลือดได้ 58.08%

1.6. **การสังเคราะห์ การศึกษาคุณลักษณะ การกระจาย และการทดสอบศักยภาพการเป็นวัคซีนของ** Fatty acid binding protein (FABP)

Fatty acid binding protein (FABPs) เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งซึ่งมีหน้าที่ช่วยในการขนส่งกรดไขมันและคอเรสเตอรอลเข้าไปในตัวพยาธิเพื่อนำไปใช้ในกระบวนการสร้างไขมันของตัวพยาธิเอง จึงคาดว่า FABP น่าจะเป็นโมเลกุลที่สำคัญในการนำมาศึกษาประสิทธิภาพในการเป็นวัคซีนเพื่อป้องกันโรคพยาธิใบไม้ตับได้ เราได้สังเคราะห์ cDNA ของโปรตีน FABP โดยวิธี RT-PCR จากการเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนของพยาธิใบไม้ตับชนิดนี้กับลำดับกรดอะมิโนจากโฮสต์ของพยาธิ เช่น หนูเมาส์ และมนุษย์ พบว่ามีความเหมือนเพียง 23-32% จึงมีความเป็นได้ที่จะนำ FABP มาใช้เป็นวัคซีนในการป้องกันการติดเชื้อพยาธิโดยไม่น่าจะเกิดปัญหาภูมิคุ้มกันทำร้ายตัวเองของโฮสต์ ผลการผลิตโปรตีน FABP โดยวิธีทางพันธุวิศวกรรมในแบคทีเรียทำให้ได้โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 14.5 กิโลดาลตัน โปรตีนดังกล่าวได้ถูกนำมาใช้ในการผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดี (MoAb) เมื่อใช้ MoAb ตรวจสอบการกระจายพบว่า FABP ปรากฏอยู่อย่างหนาแน่นมากที่สุดในเซลล์ของเนื้อเยื่อพาเรนไคมา โดยเฉพาะในเซลล์พาเรนไคมาชนิดที่ 2 (Pc2) จึงเป็นไปได้ว่า Pc2 มีหน้าที่ในการควบคุมกระบวนการเมตาบอลิซึมของไขมันเป็นหลัก นอกจากนี้ยังพบว่า MoAb ต่อ FABP มีความจำเพาะต่อพยาธิชนิดนี้และต่อพยาธิใบไม้เลือด ในการทดสอบประสิทธิภาพการป้องกันการติดเชื้อพยาธิในหนูเมาส์ โดยใช้ FABPcDNA พบว่าหนูเมาส์ที่ถูกฉีดกระตุ้นโดยวิธี intradermal และวิธี intramuscular สามารถลดปริมาณการติดเชื้อพยาธิได้ 55.88% และ 43.13% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยวัคซีน FABPcDNA

1.7. **การสังเคราะห์ การศึกษาคุณลักษณะ และการกระจายของโปรตีน** 14-3-3

เราได้ผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนชั้นผิวของพยาธิใบไม้ตับที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 29-30 kDa พร้อมกับการผลิต โพลีโคลนัลแอนติบอดีต่อแอนติเจนจากชั้นผิว เพื่อนำไปใช้ในการเสาะหายีนที่จำเพาะต่อผิวพยาธิใบไม้ตับของตัวเต็มวัย โมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความจำเพาะต่อน้ำหนักโมเลกุลที่ 28.5 kDa ซึ่งสามารถพบได้ในทุกระยะของพยาธิ ยกเว้นสารคัดหลั่ง โพลีโคลนัลแอนติบอดีต่อชั้นผิวพยาธิสามารถ screen พบยีนของ Fg14-3-3 protein, zeta isoform แต่ไม่พบยีนที่มีความจำเพาะต่อชั้นผิว โดยการใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดีเมื่อเปรียบเทียบลำดับความเหมือนของกรดอะมิโนระหว่าง Fg14-3-3 และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมชนิด ต่างๆ พบว่ามีค่าความเหมือนของกรดอะมิโนอยู่ในช่วง 55.0-57.8% การวิเคราะห์ phylogenetic tree พบว่ายีน Fg14-3-3 protein อยู่ในกลุ่มเดียวกับ *Schistosome mansoni* protein1 และ *S. japonicum* protein1 พบการแสดงออกของยีน

(mRNA transcripts) ในเซลล์เยื่อบุทางเดินอาหาร, เซลล์เนื้อเยื่อพาเรนไคมา และในเซลล์ชั้นผิวพยาธิ แต่ไม่พบในเซลล์กล้ามเนื้อ นอกจากนี้ยังพบในเซลล์ต่อมลูกหมากและอัณฑะของอวัยวะสืบพันธุ์ในเพศผู้ รวมถึงเซลล์ของ Mehlis'gland, vitelline และไข่ในเพศเมีย หลังจากนั้นได้สังเคราะห์โปรตีน 14-3-3 ที่ติดฉลากด้วย Histidine (rFg14-3-3-6xHistagged fursion protein) พบว่าโปรตีนที่สังเคราะห์ได้มีน้ำหนักโมเลกุล 30 kDa เพื่อนำไปผลิตโพลีโคลนัลแอนติบอดีต่อโปรตีนในกระต่าย โพลีโคลนัลแอนติบอดีสามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีน 14-3-3 ซึ่งในทุกระยะของพยาธิได้แก่ ระยะ metacercariae, NEJ, ตัวอ่อน 4 และ 7 สัปดาห์ และตัวเต็มวัย สามารถตรวจพบแอนติบอดีต่อ Fg14-3-3 จากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *F.gigantica* ในกระต่ายตั้งแต่ระยะ 2 สัปดาห์หลังการติดเชื้อในกระต่ายและปฏิกิริยายังคงพบต่อเนื่อง จนถึงระยะสิ้นสุดการทดลองที่ 10 สัปดาห์ ดังนั้นแอนติเจนนี้ค่อนข้างมี ความจำเพาะ และอาจสามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อแบบ immunodiagnosis ได้

1.8. การสังเคราะห์ การศึกษาคุณลักษณะ การแสดงออกของยีน Vitelline B และการผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อโปรตีน vitelline B เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบการติดเชื้อพยาธิ

ผลการสังเคราะห์ยีนของโปรตีน vitelline B โดยวิธี RT-PCR ทำให้ได้ cDNA ที่มีขนาด 810 คู่เบส เมื่อนำมาผ่านการแปลงเป็นลำดับกรดอะมิโนและเปรียบเทียบกับ vitelline B1 และ vitelline B2 ของพยาธิใบไม้ตับสายพันธุ์ *F. hepatica* พบว่ามีความคล้ายคลึงกัน 93% และ 83% ตามลำดับ จากการศึกษาโดยวิธี *in situ* hybridization ตรวจพบ mRNA ของยีน vitelline B อยู่ในเซลล์ ของ vitelline gland จากนั้นได้ทำการตัดต่อพันธุกรรมเข้าไปในแบคทีเรีย และกระตุ้นด้วยสาร IPTG เพื่อให้แบคทีเรียผลิตโปรตีน vitelline B เมื่อนำโปรตีนที่ได้มาผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Ni-NTA-agarose affinity column และตรวจแยกโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE และ immunoblotting พบ Vit B โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 31 กิโลดาลตัน นำ vitelline B มาใช้ในการผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดี และนำโมโนโคลนัลแอนติบอดีมาใช้ในการตรวจหาการกระจายของโปรตีน vitelline B ในเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้ตับระยะตัวเต็มวัยพบว่ามีการกระจายของโปรตีน vitelline B จำเพาะอยู่ใน eggshell granule, eggshell globule ของเซลล์ vitelline ที่เจริญเต็มที่ รวมทั้งในไข่และเปลือกไข่ด้วย

จากการศึกษาดังกล่าวข้างต้น แอนติเจนและยีนที่น่าจะมีศักยภาพในการเป็นวัคซีนสูงคือ Cat L, GST และ FABP ส่วนโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่น่าจะนำไปพัฒนาวิธีตรวจสอบสภาพติดเชื้อได้คือ MoAb ต่อ FABP และ MoAb ต่อแอนติเจนในชั้นผิวที่ 28.5 กิโลดาลตัน

โครงการที่ 2 การควบคุมกระบวนการสร้างและหลั่งเซลล์สืบพันธุ์โดยประสาทฮอร์โมนในหอยเป๋าฮื้อ

จากการศึกษาด้วยวิธี dot-blot ELISA ทำให้ทราบว่าสารสื่อประสาทและสารขยายสัญญาณประสาทหลักที่มีอยู่ในปมประสาทคือ เซโรโทนิน (5HT), GABA และ FMRFamide พบว่ามี 5HT และ

FMRFamide ในปมประสาทที่อัณฑะและรังไข่ ส่วน GABA พบในปมประสาทและปุ่มรับสัมผัสทีกระจายอยู่ตามหนวดแต่ไม่พบในอัณฑะและรังไข่ นอกจากนี้ยังพบ prostaglandin E2 ในปมประสาทและ gonad แต่ไม่พบฮอร์โมนเพศ dihydrotestosterone และ estradiol อยู่เลย

2.1. การศึกษาลักษณะการกระจายของสารสื่อประสาท serotonin ในปมประสาทของหอยเป๋าฮื้อตัวเต็มวัย

พบการกระจายของเซลล์ประสาทเซโรโทนินในปมประสาทของหอยเป๋าฮื้อ *H. asinina* ซึ่งเป็นเซลล์ประสาทสองชนิดในปมประสาทซีรีบรัล (cerebral), พลูโรพีดัล (pleuropedal) และ วิสเซอรัล (visceral) ซึ่งเป็นเซลล์ขนาดใหญ่และเซลล์ขนาดกลาง เซลล์ประสาทขนาดใหญ่มีแขนงประสาท (axon) ยื่นยาวออกจากตัวเซลล์จึงน่าจะเป็น motor neuron ส่วนเซลล์ขนาดกลางน่าจะเป็น neurosecretory cell เนื่องจากไม่พบแขนงประสาทออกจากตัวเซลล์ จำนวนของเซลล์ประสาทเซโรโทนินพบมากในปมประสาทซีรีบรัลและพลูโรพีดัล แต่ในปมประสาทวิสเซอรัลมีจำนวนของเซลล์ประสาทน้อยกว่า นอกจากนี้ยังพบเซโรโทนินกระจายอยู่ในถุงหุ้มและแผ่นเยื่อเกี่ยวพันของรังไข่โดยเฉพาะใน proliferative และ premature stages จากผลการศึกษาดังกล่าวสรุปได้ว่า เซโรโทนินเป็นสารสื่อประสาทที่สำคัญใน *H. asinina* โดยอาจมีบทบาททั้งในการเคลื่อนไหวและการสืบพันธุ์

2.2. การศึกษาการกระจายตัวของสารสื่อประสาท GABA ในปมประสาทและอวัยวะรับสัมผัสของหนวดในหอยเป๋าฮื้อตัวเต็มวัย

พบการกระจายของ GABA ในปมประสาท cerebral, pleuropedal และ viceral ซึ่งส่วนใหญ่เป็น neurosecretory แบบ NS_2 โดยมีจำนวนมากที่สุดในปมประสาท cerebral และน้อยที่สุดในปมประสาท visceral ไม่พบ GABA ใน gonad แต่พบการกระจายของ GABA ในหนวดโดยเฉพาะในneuroepithelial cells ซึ่งเป็นเซลล์รับความรู้สึกที่บริเวณปุ่มรับความรู้สึกบนผิวของหนวด

2.3. การศึกษาลักษณะการกระจายของสารสื่อประสาท FMRFamide ในปมประสาทและอวัยวะรับสัมผัสพิเศษของหนวดในหอยเป๋าฮื้อตัวเต็มวัย

พบว่ามี FMRFamide เซลล์ในปมประสาท cerebral, pleuro-pedal และ visceral ganglion โดยเซลล์เหล่านี้เป็น neurosecretory cells (NS) 3 ชนิดคือ NS1, NS2 และ NS3 จำนวนเซลล์มีมากที่สุดในปมประสาท pleuro-pedal และมีน้อยที่สุดในปมประสาท visceral นอกจากนี้ยังพบ FMRF ในใยประสาท ใน capsule และ trabeculae ของรังไข่และ testis และเส้นประสาทส่วนปลายที่ไปเลี้ยง atrium, gill, intestine และ กล้ามเนื้อ pedal สันนิษฐานว่า FMRFamide มีบทบาทในการควบคุมการเคลื่อนไหวที่เกี่ยวกับการทำงานของอวัยวะหลายระบบรวมทั้งอวัยวะสืบพันธุ์

2.4. การสังเคราะห์ การแสดงออก และการศึกษาลักษณะการกระจายของฮอร์โมนกระตุ้นการตกไข่ (egg-laying hormone) ในปมประสาทและรังไข่ของหอยเป๋าฮื้อตัวเต็มวัย

เราได้สังเคราะห์โปรตีน Egg-laying-hormone ในหอยเป๋าฮื้อ (aELH) โดยการเชื่อมต่อกับ *Schistosoma japonicum* GST ซึ่งเรียกว่า GST-aELH ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 33 กิโลดาลตัน แล้ว

นำโปรตีนไปฉีดกระต่ายเพื่อผลิตแอนติบอดีต่อโปรตีน GST-aELH และดูดซับด้วยโปรตีน GST จนมีความจำเพาะต่อ aELH เท่านั้น จากผลการศึกษาการกระจายตัวโดยใช้แอนติบอดีดังกล่าวพบว่ามี aELH อยู่ใน neurosecretory (NS) cells ชนิดที่ 1 และ 2 ใน neurite ของ neuropil และช่องเลือดภายในแผ่นเยื่อเกี่ยวพันรอบปมประสาท cerebral, pleuropedal และ visceral โดยเซลล์ที่พบส่วนใหญ่จะอยู่ในปมประสาท pleuropedal และมีจำนวนเพียงเล็กน้อยในปมประสาท visceral นอกจากนี้ยังพบการกระจายในกลุ่มเซลล์ของ statocyst และเส้นประสาทที่เกี่ยวข้องด้วย ส่วนในรังไข่พบ aELH ใน granular cells ในแผ่นเยื่อเกี่ยวพัน trabeculae และบริเวณถุงหุ้มรังไข่ ฮอร์โมนชนิดนี้ซึ่งน่าจะมีส่วนควบคุมการตกไข่มีการติดสีปานกลางในไซโตปลาสซึมของไข่ระยะพัฒนาเต็มที่และเซลล์ล้อมไข่ที่อยู่ข้างเคียง

2.5. อิทธิพลของ serotonin, FMRFamide, prostaglandin E (PG_E) และ egg-laying hormone (aELH) ต่อการเจริญเติบโตและการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ในหอยเป๋าฮื้อ

ในการทดลองนี้ได้ทำการศึกษาผลของสารสื่อประสาท serotonin และฮอร์โมนประสาท egg-laying hormone (ELH), FMRFamide และ prostaglandin (PG_E) ที่คาดว่าน่าจะมีผลต่อการกระตุ้นการปล่อยน้ำเชื้อและไข่ รวมถึงผลในการเร่งการเจริญเติบโตในหอยเป๋าฮื้อ สรุปได้ว่า ฮอร์โมนประสาททั้ง 4 ชนิดสามารถใช้กระตุ้นการปล่อยน้ำเชื้อและไข่ในหอยเป๋าฮื้อชนิดนี้ได้ การฉีดกระตุ้นด้วย serotonin ที่ความเข้มข้น 10^{-3} M สามารถกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ทั้งในหอยเพศผู้และเพศเมีย โดยในหอยเพศผู้พบการปล่อยของน้ำเชื้อหลังการฉีดกระตุ้นประมาณ 3-4 ชั่วโมง ส่วนหอยเพศเมียพบการปล่อยของไข่หลังการฉีดกระตุ้นประมาณ 5 ชั่วโมง ส่วนการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมนประสาท ELH ที่ความเข้มข้น 100 μg สามารถกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ได้ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย สำหรับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนประสาท FMRFamide ที่ความเข้มข้น 10^{-3} M และ 10^{-6} M และ PG_E ที่ความเข้มข้น 10^{-3} M สามารถกระตุ้นได้เฉพาะการปล่อยของน้ำเชื้อหลังการฉีดกระตุ้นประมาณ 2-4 ชั่งโมง นอกจากช่วยกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์แล้วยังพบว่า ฮอร์โมนประสาทเหล่านี้สามารถเร่งการเจริญเติบโตในหอยเป๋าฮื้อตัวอ่อนได้ด้วยเมื่อเทียบกับกลุ่มหอยที่ไม่ได้รับการฉีดด้วยฮอร์โมน โดยสารฮอร์โมนที่มีอิทธิพลมากที่สุดคือ FMRFamide ที่ความเข้มข้น 200 ng/g body weight (BW) ลำดับรองลงมาคือฮอร์โมน PG_E ที่ความเข้มข้น 20 ng/g BW, สารสื่อประสาท serotonin ที่ความเข้มข้น 20 ng/g BW และ ELH ที่ความเข้มข้น 200 ng/g BW หอยที่ได้รับ serotonin และ aELH มีการพัฒนาของต่อมอัณฑะและรังไข่เร็วขึ้นถึงแม้จะมีขนาดตัวเล็กกว่า

2.6. กระบวนการปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์อสุจิกับเซลล์ไข่ในหอยเป๋าฮื้อ

ผลการบันทึกเวลาขณะทำการผสมเซลล์อสุจิกับเซลล์ไข่พบว่าเซลล์อสุจิว่ายผ่านชั้น jelly ของไข่และไปจับกับชั้น vitelline envelope พร้อมเกิด acrosome reaction ภายใน 3 นาที จากนั้นไข่เกิด first polar body และ second polar body ที่ 8 และ 10 นาทีแล้วไซโกตเริ่มการแบ่งเซลล์ที่เวลา 20 นาที โดยพบว่าเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงสุด (75%) เมื่อผสมเซลล์ไข่กับอสุจิในอัตราส่วน 1:200 โปรตีนที่แยกจากชั้น jelly (EJ) และ vitelline envelope (VE) ของไข่เป็นไกลโคโปรตีนขนาดใหญ่ พบว่าโปรตีนสกัดจาก EJ ไม่สามารถกระตุ้นให้เกิด acrosome reaction ได้แม้ว่าจะใช้ที่ความเข้มข้นของโปรตีนที่ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรถึง 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แต่ EJ ที่ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรสามารถกระตุ้นให้เซลล์อสุจิว่ายน้ำเร็วขึ้น ส่วนโปรตีนจาก VE สามารถกระตุ้น acrosome reaction ได้เมื่อใช้ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ABSTRACT

TE 165000

1. Immunopathobiology, syntheses and characterizations of *Fasciola gigantica* antigens and encoding genes with diagnostic and vaccine potentials

1.1. Immunopathobiology of *Fasciola gigantica* infection in small laboratory animals

In order to find appropriate small laboratory animals suitable for testing vaccine candidates for fasciolosis by *F. gigantica*, immunopathological as well as humoral immune responses of hamsters, mice, and rats were evaluated. It was found that rats were the most resistant to parasite infection probably because they posses strong innate as well as acquired immunity, whereas hamsters were the most susceptible because they could generate only weak immune response against the parasites. Mice exhibited intermediate susceptibility to the infection and could produce certain level of immune responses.

1.2. Profiles of immune cells and antibody levels in response to infection by *Fasciola gigantica* adult antigens in small laboratory animals

The strong immune responses in rats were characterized by high levels of immune cells, especially eosinophils, and antibody. Hence rats and hamsters were not suitable for vaccine testing, but hamsters may be good model for testing the effect of drug because of their low resistance. Mice were considered to be the most suitable small animals for vaccine testing because of their intermediate resistance.

1.3. Molecular cloning, characterization, localization, and vaccine potential of cathepsin B

Several vaccine candidates have been cloned and characterized. Cathepsin B posses three genes in a single family, i.e., FG catB-1, FG catB-2, and FG catB-3. FG catB-1 was expressed in all stages, while FG catB-2 and FG catB-3 were expressed in metacercariae and newly excysted juvenile (NEJ), and older juvenile, respectively. The enzymes were detected principally in the caecal epithelial cells, tegumental cells and cells of Mehlis and vitelline gland. The enzymes could be responsible for parasite's tissue invasion (FG cat-B2, FG catB-3) and general digestion (FG catB-1), and in as yet undefined reproductive process. When cDNA-pCI vector were tested for vaccine efficacy in mice it showed 26% protection.

1.4. Molecular cloning, characterization, localization, and vaccine potential of cathepsin L

Three genes encoding cathepsin L were also cloned and characterized. CatL-1G and CatL-1H were expressed in NEJ and metacercaria, while CatL-1A was expressed in adult

stage. These enzymes were detected exclusively in cells of caecal epithelium, thus may function mainly in digestion of nutrients. cDNA-pCI vector construct exhibited 40% protection.

1.5 Molecular cloning, characterization, localization, and vaccine potential of Glutathione *S*-Transferase (GST)

A gene encoding glutathione S-transferase (GST) was cloned, characterized, and recombinant GST synthesized. GST was presented in all stages of the parasite and was most concentrated in the parenchyma, while its level in the tegument and caecum was decreased as the parasites grow older. Recombinant GST exhibited good vaccine potential with 84%, 80% and 79% protection for intradermal, subcutaneous and intramuscular injections. Further, it also exhibited strong cross protection against *Schistosoma mansoni* (58%).

1.6. Molecular cloning, characterization, localization and vaccine potential of fatty acid binding protein

A gene encoding fatty acid binding protein (FABP) was cloned, characterized, and the recombinant protein was expressed. Monoclonal antibody against FABP was produced and used for FABP localization. FABP was detected in all stages of the parasite, and was most concentrated in parenchymal cells. In the adult, these cells were classified into 3 types based on the quantity of FABP in their cytoplasm and ultrastructural features. cDNA-pCI construct could provide 56% and 43% protection by intradermal and intramuscular routes, respectively. MoAb exhibited cross reaction only with FABP of Schistosoma spp. hence is quite specific and may be a good candidate for immunodiagnosis.

1.7. Molecular cloning, characterization and localization of *Fasciola gigantica* 14-3-3 protein

A gene encoding 14-3-3 protein was cloned and characterized, and the recombinant protein expressed. An equivalent native protein was presented in the cells of all tissues of all stages except muscle. It was highly concentrated in the tegument where it may have a role in signal transduction. Because of its consistent presence in most tissues and fairly low identity with the mammalian protein, it could be another vaccine candidate. A monoclonal antibody against 28.5 kDa tegumental protein was produced. This protein was quite unique and abundant in the tegument, and appeared to be quite distinct from 14-3-3 protein. Since this MoAb was quite specific to tegumental protein at 28.5 kDa and showed limited cross reaction only with similar protein in Schistosoma spp., it is another good candidate for immunodiagnosis.

1.8. Molecular cloning, characterization and localization of *Fasciola gigantica* eggshell proteins

A gene encoding an egg-shell protein, vitelline B1, was cloned and characterized, and the recombinant protein expressed. MoAb against recombinant vitelline B1 was produced and used for localizing the protein, which was presented in vitelline cells in vitelline gland and vitelline cells as well as egg shell protein in and around the mature ovum. This MoAb may also be a good candidate for immunodiagnosis in detecting the egg or egg shell antigens.

2. Neuroendocrine controls of gametogenesis and spawning in a tropical abalone, *Haliotis asinina*

By dot-blot ELISA it was determined that the major neurotransmitters and neuromodulators in the neural ganglia of the abalone were 5-HT, GABA, FMRFamide. 5-HT and FMRFamide were also strongly present in the gonad, while GABA was presented in the epipodial tentacles.

2.1. Distribution of serotonergic neurons and fibers in the nervous system, and gonad

Serotonergic neurons were immunohistochemically localized in the cerebral, pleuropedal, and visceral ganglia. All were large size neurons which were the giant neurons (NR_1) and medium size neurosecretory cells (NS_1). The 5-HT cells were most abundant in cerebral and pleuropedal ganglia and least abundant in visceral ganglia. In addition, 5-HT was presented in nerve fibers within the neuropil of all ganglia. In the gonad 5-HT was detected in the connective tissue trabeculae and capsule of ovary, especially at proliferative and premature stages, while the testis exhibited only low amount of 5-HT.

2.2. Distribution of GABAergic neurons and fibers in the nervous system and sensory organs of tentacles

GABAergic neurons were also detected in the cerebral, pleuropedal, and viseral ganglia, with the highest number in cerebral and visceral ganglia and lowest number in pleuropedal ganglia. Most appeared to be neurosecretory cells (NS_2). GABA could not be detected in the gonad but was strongly presented in the neuroepithelial cells in the sensory papillae of the tentacles, and in the nerve fibers within the tentacular core.

2.3. Distribution of FMRFamide neurons and fibers in the nervous system and sensory organs of tentacles

FMRFamidergic neurons were presented in all three ganglia, with the most numerous number in pleuropedal and least numerous in cerebral ganglia. Most appeared to be

neurosecretory cells (NS_1, NS_2 and NS_3). Strong immunoreactivity was also detected in the ovarian and testicular capsule, and weak immunoreactivity detected in trabeculae.

2.4. Cloning, expression and localization of abalone egg-laying hormone (aELH) in the neural ganglia and ovary

A recombinant abalone egg-laying hormone (aELH) was expressed as a fusion protein GST-aELH from cDNA of Haliotis spp. AntiGST-aELH was produced by immunizing rabbit with the recombinant protein. This antibody was vigoriously preabsorbed with GST, so that only anti-aELH activity remained and used for localizing aELH. It was found that aELH was localized in neurosecretory cells (NS_1, NS_2), neurites in the neuropil, and blood sinuses in the connective tissue sheath of cerebral, pleuropedal and viseral ganglia. The positive cells were most numerous in cerebral and pleuropedal ganglia and least numerous in viseral ganglia. Immunoreactivity to aELH was also detected in ovarian capsule and granular cells in trabeculae, and follicular cells adjacent to mature oocytes, as well as in the cytoplasm of the latter.

2.5. Effects of serotonin, FMRFamide, prostaglandin E (PG_E) and egg-laying hormone (aELH) on growth, and spawning induction

Administration of the 5-HT, aELH could stimulate the release of both sperm and eggs in sexually mature male and female, while FMRF and PG_{E2} could induce only spermiation. FMRF tended to stimulate more somatic growth while 5-HT and aELH tended to promote maturation of gonad early than usual.

2.6. The process of sperm-egg interaction in *Haliotis asinina*

When mature sperm and eggs were released, they fertilized externally, and the process is completed within 10 minutes. The zygote began to cleave within 20 minutes. The highest yield of fertilization (70%) was obtained at the ratio of egg to sperm at 1:200. The egg was covered by jelly coat (EJ) and vitelline membrane (VJ). EJ most likely play role in stimulating sperm chemoattraction and sperm motility, while VJ could stimulate acrosomal reaction.