

อภิปรายและวิจารณ์ผล

โรคภูมิแพ้ไผ่ฝุ่นนับว่าเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขของประเทศไทย เนื่องจากมีอัตราชุกประมาณร้อยละ 60-80 ของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้คนไทย การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับสารก่อภูมิแพ้ไผ่ฝุ่นจึงได้รับความสนใจอย่างมาก เพราะเป็นสารก่อภูมิแพ้หลักในบ้านและเป็นสาเหตุสำคัญของโรคภูมิแพ้ จึงมีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับสารก่อภูมิแพ้ไผ่ฝุ่นอยู่เป็นจำนวนมากและดำเนินมาอย่างต่อเนื่อง ตามการพัฒนาของเทคโนโลยีใหม่ๆ ที่นำมาประยุกต์ใช้ในการวิจัย โดยเฉพาะการศึกษาเกี่ยวกับโครงสร้างระดับโมเลกุล เพื่อคุณสมบัติ คุณลักษณะ องค์ประกอบและหน้าที่ทางเคมีและชีววิทยาของสารก่อภูมิแพ้ไผ่ฝุ่นนั้นๆ ในช่วง 10 ปีมานี้ จึงมีความก้าวหน้าขององค์ความรู้ใหม่ๆ เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง แม้ว่าปัจจุบันสามารถแยกชนิดโปรตีนของสารก่อภูมิแพ้ไผ่ฝุ่นได้แล้วถึงกว่า 20 ชนิดแล้ว แต่การศึกษาสารก่อภูมิแพ้ไผ่ฝุ่นด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ร่วมกับอิมมูโนมิกส์ ซึ่งเป็นการแยกโปรตีนแบบสอง ทิศทางจะทำให้มีการกระจายตัวของจุดโปรตีนได้ดีกว่ายอมทำให้ได้องค์ความรู้ใหม่ๆ และอาจทำให้พบสารก่อภูมิแพ้จากไผ่ชนิดใหม่ได้ ดังนั้น การศึกษาวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาสารก่อภูมิแพ้จากไผ่สายพันธุ์ *D. pteronyssinus* ซึ่งเป็นไผ่สายพันธุ์ที่พบมากที่สุดในประเทศไทย ตามรายงานการสำรวจความชุกและการแพร่กระจายของไผ่สายพันธุ์ต่างๆ ที่พบในฝุ่นตามที่อยู่อาศัยในประเทศไทย (Malainual *et al.*, 1995)

ผลการศึกษาหาสารก่อภูมิแพ้ไผ่สายพันธุ์ *D. pteronyssinus* ด้วยวิธี 2DE Gel Electrophoresis และ 2DE-IgE immunoblotting ในการศึกษาครั้งนี้แสดงในรูปที่ 3.9 A และ 3.9 B (ปีที่ 1) พบว่า โปรตีนจากสารสกัดหยาบจากตัวไผ่ที่ผ่านการแยกแบบสองทิศทางในช่วง pH range กว้าง (3-10) สามารถพบจุดโปรตีนมากกว่า 50 จุด และเป็นโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลทั้งในกลุ่มที่มากและในกลุ่มที่น้อย และจำนวนจุดโปรตีนที่พบในการศึกษานี้มากกว่าโปรตีนของสารก่อภูมิแพ้ไผ่ที่มีการค้นพบซึ่งมีรายงานในวารสารวิชาการแล้ว โดยที่ผ่านมามักเป็นการศึกษาโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE ที่มีการแยกของโปรตีนแบบทิศทางเดียวแสดงว่า เทคนิคโปรตีโอมิกส์ร่วมกับอิมมูโนมิกส์สามารถแยกโปรตีนที่ซ้อนทับกันอยู่ให้กระจายตัวออกมา ทำให้พบโปรตีนที่เป็นสารก่อภูมิแพ้ไผ่ชนิดใหม่เพิ่มขึ้น เพราะการแยกแบบสองทิศทางนั้นโปรตีนจะถูกแยกในทิศทางแรกด้วยความแตกต่างกันของ *pI* ในแต่ละโปรตีนด้วยวิธี isoelectric-focusing (IEF) ต่อจากนั้นทำการแยกในทิศทางที่สอง โดยความแตกต่างกันของขนาดโมเลกุลของแต่ละโปรตีน ด้วยวิธี SDS-PAGE

แม้ว่าการแยกโปรตีนแบบสองทิศทางในช่วง pH range กว้าง (3-10) พบจุดโปรตีนมากกว่าเดิมที่เคยมีการค้นพบมาแล้วก็ตาม แต่อาจมีการซ้อนทับกันของจุดโปรตีนดังที่กล่าวมาแล้วแต่เป็นการซ้อนทับในช่วง ดังนั้น การแยกโปรตีนในแต่ละช่วง pH range จะช่วยให้มีการแยกโปรตีนได้มากขึ้น ทำให้ได้จุดโปรตีนเดี่ยว (single protein spot) และมีความแม่นยำมากขึ้นกว่าเดิมในการคัดเลือกเพื่อตัดจุดโปรตีนเดี่ยวจากเจลและส่งไปจำแนกชนิด (identify) โดยวิธีแมสสเปกโตรเมตรี ในการศึกษาครั้งนี้จึงดำเนินการวิเคราะห์หัตถ์ด้วยการแยกโปรตีนในแต่ละ pH range และเนื่องจากพบว่าพบจุดโปรตีนในช่วง pH range มากกว่า 5 จึงกำหนด pH range ที่การดำเนินวิเคราะห์หัตถ์ต่อเป็น pH 5.0-6.5, 6.2-7.5 และ 7.0-11. ดังแสดงผลในภาพรวมในรูปที่ 3.11

ในความเป็นจริงความเป็นสารก่อภูมิแพ้ (allergenicity) ของไผ่ทุกสายพันธุ์รวมทั้งสายพันธุ์ *D. pteronyssinus* ที่สามารถกระตุ้นให้ร่างกายเกิดการตอบสนองนั้นไม่ได้ขึ้นอยู่กับว่า สารก่อ

ภูมิแพ้นั้นเป็นสารก่อภูมิแพ้หลัก (major allergen) เพียงชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงอย่างเดียว แต่อาจเป็นสารก่อภูมิแพ้รอง (minor allergen) หรืออาจเป็นส่วนประกอบย่อยของสารก่อภูมิแพ้ (allergen component) หลายๆ ชนิดร่วมกัน ซึ่งองค์ประกอบย่อยที่สามารถกระตุ้นให้ร่างกายเกิดปฏิกิริยาตอบสนองต่อ (host immune response) ได้เช่นเดียวกัน และมีความแตกต่างกันไปในแต่ละราย (individual allergen recognition) จึงทำให้ผู้ป่วยโรคภูมิแพ้มีอาการแสดงที่แตกต่างกันไปตามปฏิกิริยาตอบสนองต่อสารก่อภูมิแพ้ที่จำเพาะในแต่ละราย จึงเป็นที่มาของการจัดแบ่งสารก่อภูมิแพ้เป็น major allergen, minor allergen, isoallergen และ allergen variants ความหลากหลายของการตอบสนองต่อสารก่อภูมิแพ้ที่พบนี้ อาจขึ้นอยู่กับภาวะพันธุกรรม intrinsic factor และสิ่งแวดล้อมของผู้ป่วยแต่ละราย เมื่อแยกสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นแต่ละชนิดออกมาได้จึงจำเป็นต้องศึกษาถึงคุณลักษณะของสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นชนิดนั้นๆ โดยเฉพาะความเป็นสารก่อภูมิแพ้ (allergenicity) ที่สัมพันธ์กับอัตราของการแพ้สารก่อภูมิแพ้นั้นๆ ดังนั้นเพื่อให้ได้ความหลากหลายในการตอบสนองนี้ ในการศึกษาจึงใช้ pooled serum ในการดูปฏิกิริยาตอบสนองที่จะบ่งชี้ความเป็นสารก่อภูมิแพ้ อย่างที่กล่าวมาแล้วว่า มีการเรียกชื่อสารก่อภูมิแพ้ (Allergen Nomenclature) ถูกกำหนดคณะกรรมการองค์การอนามัยโลก (WHO) และ International Union of Immunological Societies (I.U.I.S.) ในปัจจุบันสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นสายพันธุ์ Dp มีการกำหนดจัดหมวดหมู่เป็น 15 กลุ่ม ได้แก่ *Der p 1-11*, *Der p 14*, *Der p 20*, *Der p 21* และ *Der p 23* (Thomas et al, 2007; Thomas, 2010) ผลการศึกษาสารก่อภูมิแพ้ในการศึกษานี้ได้แสดงในตารางที่ 3.4 พบจุดโปรตีนจากไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. pteronyssinus* ที่ทำปฏิกิริยากับไอจีอี 22 จุดที่ส่งไปจำแนกชนิด โปรตีนเหล่านี้จัดว่าเป็นองค์ประกอบของสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่น เนื่องจากเป็นจุดที่ทำปฏิกิริยากับ IgE ในเลือดผู้ป่วย โปรตีนที่พบส่วนใหญ่คือ โปรตีนที่เป็นสารก่อภูมิแพ้หลักของไรฝุ่นคือ *Der p 1* และสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นที่มีรายงานแล้ว ได้แก่ *Der p 3*, *Der p 11*, *Der p 14* ส่วนสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นชนิดใหม่ที่ค้นพบ และยังไม่เคยมีรายงานว่าเป็นสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. pteronyssinus* คือ myosin heavy chain และ Triosephosphate Isomerase ซึ่งมีรายงานเป็นว่าสารก่อภูมิแพ้ในกุ้ง ดังนั้นจึงต้องนำมาทำการศึกษาต่อเพื่อให้ทราบว่ามีอัตราการตรวจพบอย่างไรในผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ไรฝุ่นคนไทย และเพื่อใช้เป็นข้อมูลประกอบขึ้นทะเบียนว่าเป็น “สารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นชนิดใหม่”

ในการคัดเลือกสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นที่จะนำมาผลิตด้วยวิธีพันธุวิศวกรรมนั้นมีหลักการสำคัญคือ ควรจะคัดเลือกผลิตสารก่อภูมิแพ้หลัก (major allergen) เพราะเป็นสารก่อภูมิแพ้ที่ประชากรส่วนใหญ่ในแต่ละท้องถิ่นแพ้ เมื่อผลิตได้แล้วก็สามารถนำสารก่อภูมิแพ้หลักที่ผลิตได้ไปสู่การพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัย และการดูแลรักษาผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ไรฝุ่น รวมทั้งการนำไปใช้ในการสำรวจหาสารก่อภูมิแพ้ในสิ่งแวดล้อมต่อไป ดังนั้น ในการศึกษาปีที่ 2 จึงมีวัตถุประสงค์ดำเนินการศึกษาวิจัยต่อถึงประเภทของสารก่อภูมิแพ้หลักไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. pteronyssinus* ว่ามีอัตราการตรวจพบอย่างไรในผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ไรฝุ่นคนไทย และทำการผลิตสารก่อภูมิแพ้เหล่านี้ด้วยวิธีพันธุวิศวกรรม โดยชนิดของสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นที่เลือกจะศึกษาวิจัยต่อคือ *Der p 1* และ *Der p 2* ซึ่งมีรายงานว่า เป็นสารก่อภูมิแพ้หลัก (major allergen) ในผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ไรฝุ่นทั่วโลก แต่ยังไม่เคยมีการศึกษารายละเอียดในประเทศไทย

เป็นที่ทราบกันดีว่า สารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นที่พบมากที่สุดในพื้นที่และเป็นตัวชี้วัดที่สำคัญ เพราะเป็นสารก่อภูมิแพ้หลักที่สำคัญมาจาก 2 ส่วน คือ 1) ส่วนแรกเป็นส่วนที่มาจากมูลของไร (fecal

allergens) มีชื่อว่า Der p 1 มีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 24-26 กิโลดาลตัน (Kilodalton; kDa) พบได้ในมูลและในต่อมที่อยู่บริเวณรอบๆ gut ของไร เป็นสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นที่มีรายงานพบเป็นตัวแรก และมีปริมาณมากที่สุด ในสภาพการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ Tovey และคณะพบว่า ไรฝุ่นถ่ายมูลได้ประมาณ 20 ก่อนต่อวัน แต่ละก่อนมี Der p 1 เท่ากับ 100 picogram สารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่น Der p 1 ชนิดนี้เป็นสารในกลุ่ม papain-like cysteine protease จึงมีความเป็นสารก่อภูมิแพ้ (allergenecity) สูงสามารถเกิดปฏิกิริยาจับกับ IgE ในซีรัม (IgE binding activity) ผู้ป่วยโรคหืดได้ดี มีรายงานว่าค่า IgE binding activity ของ Der p 1 ในผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ไรฝุ่นที่ทำการทดสอบอยู่ระหว่าง 60 -100% จึงจัดเป็น สารก่อภูมิแพ้หลักของสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่น องค์การอนามัยโลก ได้กำหนดค่ามาตรฐานสากล หรือ index of exposure ของการได้รับสารก่อภูมิแพ้จากไรฝุ่นไว้ว่า ถ้าพบ Der p 1 ในฝุ่นเกิน 2 µg/g dust (เท่ากับไรฝุ่น 100 ตัว) จะเสี่ยงต่อการก่อโรค หรือเกิน 10 µg/g dust (ไรฝุ่น 500 ตัว) จะทำให้เกิดอาการหอบหืดเฉียบพลันได้ 2) ส่วนที่มาจากตัวของไร (mite body allergens) มีชื่อว่า Der p 2 มีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 14-17 กิโลดาลตัน มีปริมาณรองลงมา แต่ยังจัดเป็นสารก่อภูมิแพ้หลักของสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นด้วยเช่นกัน

แม้ว่าการหลีกเลี่ยงไม่สัมผัสกับสารก่อภูมิแพ้ (allergen avoidance) เป็นวิธีที่ดีที่สุดและวิธีเบื้องต้นในการดูแลรักษาผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ที่สามารถป้องกันไม่ให้เกิดอาการของโรค แต่มักจะทำได้ยากและไม่ได้ผลดีโดยเฉพาะสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่น ที่เป็นสารก่อภูมิแพ้ที่ฟุ้งกระจายในอากาศ (aeroallergen) เมื่อการหลีกเลี่ยงไม่สัมผัสกับสารก่อภูมิแพ้ ไม่ได้ผลและผู้ป่วยยังมีอาการอยู่ จึงต้องมีการรักษาโดยใช้ยาซึ่งเป็นการรักษาตามอาการ ในรายที่การรักษาโดยใช้ยาไม่ได้ผลดีเพียงพอ หรือผู้ป่วยที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา จึงจำเป็นต้องให้การรักษาโดยใช้วิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกัน (immunotherapy) โดยการฉีดวัคซีนภูมิแพ้ (therapeutic allergen vaccine) ซึ่งวัคซีนภูมิแพ้เป็นวัคซีนรักษาไม่ใช่วัคซีนป้องกัน มีหลักการคือการใช้สารก่อภูมิแพ้ในขนาด (dose) น้อยๆ และเพิ่มขึ้นตามความเหมาะสม เพื่อให้ร่างกายเกิดความคุ้นเคยและลดการตอบสนองเมื่อได้รับสารก่อภูมิแพ้นั้นๆ อีก จึงต้องได้รับวัคซีนอย่างต่อเนื่องเป็นเวลาอย่างน้อย 3-5 ปี จึงเป็นที่มาของการผลิตวัคซีนภูมิแพ้หรือสารสกัดสารก่อภูมิแพ้ที่มีความบริสุทธิ์สูง หรือสารก่อภูมิแพ้ที่เป็นรีคอมบิแนนท์ โปรตีน

สารสกัดสารก่อภูมิแพ้ที่มีความบริสุทธิ์สูง หมายถึง สารสกัดสารก่อภูมิแพ้ที่มีการปนเปื้อนด้วยโปรตีนอื่นๆ หรือส่วนประกอบอื่นๆ ที่ไม่ใช่สารก่อภูมิแพ้ต่ำ และถ้าเป็นสารสกัดสารก่อภูมิแพ้ตามธรรมชาติที่มีความบริสุทธิ์สูง จะมีประโยชน์และเหมาะสมในการใช้เป็นวัคซีนภูมิแพ้ (therapeutic allergen vaccine) รวมทั้งน้ำยาในการตรวจวินิจฉัยภาวะภูมิแพ้ แต่อย่างไรก็ตามการใช้วัคซีนภูมิแพ้ซึ่งสกัดจากวัตถุดิบในธรรมชาติมีข้อเสียและข้อจำกัดหลายประการ โดยเฉพาะวัตถุดิบที่นำมาสกัด เพราะมีความหลากหลายในแต่ละรุ่นของวัตถุดิบที่นำมาสกัด จึงทำให้มีปริมาณของสารก่อภูมิแพ้ไม่เท่ากันในแต่ละรุ่นของการผลิต และนอกจากนี้ตามมาตรฐานที่ใช้กันในปัจจุบันทั่วโลก ยังใช้สารสกัดหยาบ (crude extract) เป็นวัคซีนภูมิแพ้ โดยสกัดจากวัตถุดิบในธรรมชาตินั้นจะมีการปนเปื้อนของโปรตีนอื่นๆ หรือส่วนประกอบอื่นๆ ที่ไม่ใช่สารก่อภูมิแพ้ จึงมักทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนต่างๆ ที่ไม่คาดคิด จึงเป็นที่มาของการผลิตวัคซีนภูมิแพ้หรือสารสกัดสารก่อภูมิแพ้ที่มีความบริสุทธิ์สูง หรือสารก่อภูมิแพ้ที่เป็นรีคอมบิแนนท์ โปรตีน (Vrtala et al, 2014)

การศึกษานี้จึงเริ่มต้นโดยผลิตสารก่อภูมิแพ้ตามธรรมชาติ (native allergen) จากตัวไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. pteronyssinus* ชนิด Der p 1 และ Der p 2 ซึ่งเรียกว่า native Der p 1 & Der p 2 ก่อนเพื่อให้ได้ข้อมูลรายละเอียดซึ่งเป็นการศึกษาแรกในประเทศไทย และยังใช้ native Der p 1 & Der p 2 นี้ในการเปรียบเทียบคุณสมบัติความเป็นสารก่อภูมิแพ้ (allergenicity) และความแรงของการเป็นสารก่อภูมิแพ้ (allergenic potency) ของรีคอมบิแนนท์ โปรตีนที่ผลิตขึ้นมา ผู้วิจัยเลือกใช้เทคนิค affinity column chromatography ในการผลิตสารก่อภูมิแพ้ตามธรรมชาติของไรฝุ่น เนื่องจากเรามี โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นชนิด Der p 1 และ Der p 2 และวิธีนี้ไม่ยุ่งยากและได้สารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นชนิด Der p 1 และ Der p 2 ที่มีความบริสุทธิ์สูง

เป็นเวลานานกว่า 15 ปีแล้วที่มีการริเริ่มมีการผลิตสารก่อภูมิแพ้ที่เป็นรีคอมบิแนนท์ โปรตีน โดยใช้วิธีทางพันธุวิศวกรรมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของน้ำยาสกัดที่ใช้ทดสอบและวัคซีนภูมิแพ้ และนำมาทดแทนสารก่อภูมิแพ้ที่สกัดจากวัตถุดิบธรรมชาติ เพราะการผลิตรีคอมบิแนนท์ โปรตีน สามารถควบคุมมาตรฐานการผลิตให้ได้มีสารก่อภูมิแพ้ที่มีคุณสมบัติเหมือนกันและมีปริมาณที่เท่ากันได้ดีกว่า นอกจากนี้โปรตีนที่ไม่ใช่สารก่อภูมิแพ้จะถูกคัดแยกออกไป และยังสามารถที่จะนำมาใช้ในการศึกษาการตอบสนองทางวิทยาภูมิคุ้มกันโดยเฉพาะการศึกษา B cell และ T cell epitopes (Jeong *et al.*, 2006) การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาวัคซีนภูมิแพ้ในปัจจุบันจึงมุ่งเน้นที่จะใช้วัคซีนที่ผลิตจาก recombinant allergens, recombinant hypoallergenic allergen derivatives และ allergen-derived T-cell peptides เนื่องจากรายงานการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ามีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับวัคซีนภูมิแพ้จากวัตถุดิบในธรรมชาติแต่มีความปลอดภัยสูงกว่า (Chen *et al.*, 2006) และเชื่อว่าอาจนำไปพัฒนาเป็นวัคซีนป้องกันโรคภูมิแพ้ในอนาคต (Chen *et al.*, 2012)

ส่วนการผลิตสารก่อภูมิแพ้ที่เป็นรีคอมบิแนนท์ โปรตีนของ Der p 1 และ Der p 2 ในการทดลองนี้การเลือกใช้ protein expression vector ในการผลิตสารก่อภูมิแพ้ที่เป็นรีคอมบิแนนท์ โปรตีนของ Der p 1 และ Der p 2 นี้ได้ทำการทดลองและพบว่า pET 20b⁺ vector (protein expression vector) เป็น expression vector ที่ดีเหมาะจะใช้ในการศึกษานี้ เพราะมีคุณสมบัติเป็น strong promoter จึงทำให้สามารถผลิตโปรตีนได้มาก และโปรตีนที่ได้อยู่ในส่วนที่เป็นสารละลาย (soluble part) ซึ่งทำให้ง่ายต่อการแยกออกจาก bacterial lysate ได้ง่ายโดยการปั่นแยก และเมื่อนำไปแยกพบว่า สารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นชนิด Der p 1 และ Der p 2 ของไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. pteronyssinus* อยู่ในส่วนของส่วนที่เป็นสารละลาย (รูปที่ 3.21 และ 3.22 ตามที่ต้องการ

การตรวจสอบลักษณะรูปแบบของโปรตีน (Protein profiles) ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผลิตได้ด้วยเทคนิค SDS-PAGE (รูปที่ 3.21 และ 3.22) พบว่าขนาดของโมเลกุลของ recombinant Der p 1 มีขนาด 24 กิโลดัลตัน และขนาดของโมเลกุล recombinant Der p 2 มีขนาดประมาณ 16 กิโลดัลตัน ใกล้เคียงกับที่เคยมีรายงานไว้ รวมทั้งผลจาก amino acid sequencing (รูปที่ 3.23) ในการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่า รีคอมบิแนนท์ โปรตีนที่ผลิตได้เป็น Der p 1 และ Der p 2 จริง

ในการเปรียบเทียบคุณสมบัติความเป็นสารก่อภูมิแพ้ (allergenicity) ของรีคอมบิแนนท์ โปรตีน ที่ผลิตขึ้นมากับสารก่อภูมิแพ้ตามธรรมชาติไรฝุ่นด้วยวิธี IgE-ELISA โดยการทำปฏิกิริยากับซีรัมของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ไรฝุ่น (กลุ่มเป้าหมาย) และกลุ่มควบคุม (normal control) พบว่า IgE binding activity ของสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่น native Der p 1 ที่ผลิตได้ มีค่าสูงมากคิดเป็น 96.67%

(ดังแสดงในตารางที่ 3.5) แสดงว่า สารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่น native Der p 1 ที่ผลิตได้จัดเป็น สารก่อภูมิแพ้หลัก (major allergen) ในผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ไรฝุ่นคนไทยที่ทำการทดสอบ เพราะมีค่า IgE binding activity มากกว่า 50% ของกลุ่มผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ไรฝุ่นที่ทำการทดสอบ ซึ่งผลการศึกษาที่ได้นี้สอดคล้องกับผลการศึกษาที่มีรายงานจากประเทศต่างๆ ทั่วโลก ถ้าพิจารณาถึงแหล่งที่มาของสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่น (source of allergen) ชนิดนี้ในตัวไรฝุ่น จากผลการศึกษาวิจัยที่ได้รายงานไว้คือ 90% ของสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นมาจากมูลไรฝุ่น เมื่อทำการวิเคราะห์หาลึกลงไปจะพบว่า Der p 1 เป็นสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นที่พบอยู่ในมูลไรฝุ่น จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้ มีผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ไรฝุ่นจำนวนมากแพ้สารก่อภูมิแพ้ Der p 1 จึงจัดสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่น Der p 1 เป็นสารก่อภูมิแพ้หลัก (major allergen) และผลการศึกษาวิจัยนี้ให้ผลสอดคล้องกับข้อเท็จจริงนี้

ในการศึกษาหาความเป็นสารก่อภูมิแพ้ของ recombinant Der p 1 ที่ผลิตได้ พบว่ามีค่า IgE binding activity เพียง 43.33% (ดังแสดงในตารางที่ 3.6) แสดงว่า สารก่อภูมิแพ้ recombinant Der p 1 ที่ผลิตได้ จัดเป็นสารก่อภูมิแพ้รอง (minor allergen) และมีความเป็นสารก่อภูมิแพ้ต่ำกว่า native Der p 1 ที่ผลิตได้ ซึ่งเป็นสารก่อภูมิแพ้หลัก ดังนั้น recombinant Der p 1 ที่ผลิตได้มีความเป็นสารก่อภูมิแพ้ (allergenecity) และความแรงของการเป็นสารก่อภูมิแพ้ (allergenic potency) แตกต่างกับสารก่อภูมิแพ้ธรรมชาติของไรฝุ่นชนิด Der p 1 (native Der p 1) ดังนั้น IgE binding epitope ของ recombinant Der p 1 และ native Der p 1 น่าจะมีความแตกต่างกัน อาจจะไม่สามารถนำไปใช้ทดแทนสารก่อภูมิแพ้ธรรมชาติของไรฝุ่นชนิด Der p 1 ในการใช้เป็นวัคซีนภูมิแพ้ (therapeutic allergen vaccine) รวมทั้งน่าจะใช้ในการตรวจวินิจฉัยภาวะภูมิแพ้ของ สาร ก่อ ภูมิ แพ้ ไรฝุ่นชนิด Der p 1 แม้ว่า recombinant Der p 1 ที่ผลิตได้ไม่สามารถใช้เป็นสารก่อภูมิแพ้ในวัตถุประสงค์ดังกล่าวมาแล้ว แต่ยังสามารถนำไปใช้เป็นสารมาตรฐานของชุดทดสอบเพื่อตรวจหาและวัดปริมาณสารก่อภูมิแพ้จากไรฝุ่นชนิด Der p 1 ในฝุ่นบ้านด้วยวิธี sandwich ELISA

ในกรณีนี้หากต้องการเพิ่มความเป็นสารก่อภูมิแพ้ของ recombinant Der p 1 ให้เทียบเคียงกับ native Der p 1 นั้น จำเป็นต้องมีการหา concentration of recombinant allergen ที่เหมาะสมโดยการเพิ่ม concentration ของ recombinant Der p 1 มากขึ้น เพื่อให้ specific IgE antibody ที่จำเพาะต่อ binding epitope ของ recombinant Der p 1 มีโอกาสจับกับ recombinant Der p 1 ได้ซึ่งอาจนำมาใช้งานแทน native Der p 1 ได้

ส่วนในการศึกษาหาความเป็นสารก่อภูมิแพ้ของ native และ recombinant Der p 2 ที่ผลิตได้ พบว่า IgE binding activity ของสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่น native Der p 2 ที่ผลิตได้ มีค่าสูงคิดเป็น 83.33% (ดังแสดงในตารางที่ 3.7) แสดงว่า สารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่น native Der p 2 ที่ผลิตได้นี้เป็นสารก่อภูมิแพ้หลัก (major allergen) ในผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ไรฝุ่นคนไทยที่ทำการทดสอบ ซึ่งสอดคล้องกับที่มีรายงานในประเทศต่างๆ ทั่วโลกเช่นกัน source ของสารก่อภูมิแพ้ Der p 2 แตกต่างจากสารก่อภูมิแพ้ Der p 1 เนื่องจากอยู่ในตัวไรฝุ่นไม่ใช่ในมูลไรฝุ่น จึงมีอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้พบอัตราการของการแพ้สารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่น Der p 2 ต่ำกว่าสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่น Der p 1 เมื่อทำการศึกษาหาความเป็นสารก่อภูมิแพ้ของ recombinant Der p 2 ที่ผลิตได้ พบว่ามีค่า IgE binding activity คิดเป็น 73.33% (ดังแสดงในตารางที่ 3.8) แสดงว่า สารก่อภูมิแพ้ recombinant

Der p 2 ที่ผลิตได้จัดเป็นสารก่อภูมิแพ้หลัก (major allergen) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ไรฝุ่นคนไทยที่ทำการทดสอบ และมีความเป็นสารก่อภูมิแพ้ใกล้เคียงกับ native Der p 2 ที่ผลิตได้ ซึ่งเป็นสารก่อภูมิแพ้หลัก ดังนั้น recombinant Der p 2 ที่ผลิตได้มีความเป็นสารก่อภูมิแพ้ (allergenicity) และความแรงของการเป็นสารก่อภูมิแพ้ (allergenic potency) ใกล้เคียงกับ สารก่อภูมิแพ้ธรรมชาติของไรฝุ่นชนิด Der p 2 บ่งชี้ว่า IgE binding epitope ของ recombinant Der p 2 และ native Der p 2 น่าจะมีความคล้ายคลึงกัน จึงน่าจะสามารถนำไปใช้ทดแทนสารก่อภูมิแพ้ตามธรรมชาติของไรฝุ่นชนิด Der p 2 ในการใช้เป็นวัคซีนภูมิแพ้ (therapeutic allergen vaccine) และน้ำยาในการตรวจวินิจฉัยภาวะภูมิแพ้ของสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นชนิด Der p 2 ซึ่งต้องนำไปทดสอบปฏิกิริยาภูมิแพ้ในสัตว์ทดลองและในมนุษย์ ตามลำดับต่อไปด้วยการทดสอบปฏิกิริยาภูมิแพ้ทางผิวหนัง (skin prick test) ทางผิวหนัง และยังสามารถนำไปใช้เป็นสารมาตรฐานของชุดทดสอบเพื่อตรวจหาและวัดปริมาณสารก่อภูมิแพ้จากไรฝุ่นชนิด Der p 2 ในฝุ่นบ้านด้วยวิธี sandwich ELISA เช่นกัน

ดังนั้น ในการศึกษาวิจัยนี้สามารถผลิตได้ทั้งสารก่อภูมิแพ้ตามธรรมชาติและรีคอมบิแนนท์โปรตีนของสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่น Der p 1 และ 2 และยังพบว่า รีคอมบิแนนท์โปรตีนของสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่น Der p 2 ที่ผลิตได้เป็นเป็นสารก่อภูมิแพ้หลัก (major allergen) ในผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ไรฝุ่นคนไทยที่ทำการทดสอบ น่าจะสามารถนำไปพัฒนาเป็นน้ำยาวินิจฉัยในการตรวจภาวะแพ้ไรฝุ่น และใช้เป็นวัคซีนสำหรับรักษาโรคภูมิแพ้ไรฝุ่น ส่วนรีคอมบิแนนท์โปรตีน ของสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่น Der p 1 สามารถนำไปใช้เป็นสารมาตรฐานของชุดทดสอบเพื่อตรวจหาและวัดปริมาณสารก่อภูมิแพ้จากไรฝุ่นชนิด Der p 1 ในฝุ่นบ้านด้วยวิธี sandwich ELISA ได้

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การศึกษาหาสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. pteronyssinus* ด้วยวิธี 2DE Gel Electrophoresis และ 2 DE-IgE immunoblotting ในการศึกษาพบจุดโปรตีนจากไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. pteronyssinus* ที่ทำปฏิกิริยากับไอจีอี 22 จุดที่ส่งไปจำแนกชนิด โปรตีนส่วนใหญ่คือโปรตีนที่เป็นสารก่อภูมิแพ้หลักของไรฝุ่นคือ Der p 1 และสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นที่มีรายงานแล้ว ได้แก่ Der p 3, Der p 11, Der p 14 ส่วนสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นชนิดใหม่ที่ค้นพบคือ myosin heavy chain และ Triosephosphate Isomerase ที่ควรนำมาทำการศึกษาต่อไป เพื่อให้ทราบว่ามีอัตราการตรวจพบอย่างไรในผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ไรฝุ่นคนไทย

นอกจากนี้ ยังพบว่าการศึกษาสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. pteronyssinus* ด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ร่วมกับอิมมูโนมิกส์สามารถแยกโปรตีนได้ดีกว่า ทำให้พบโปรตีนที่เป็นสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นชนิดใหม่ ซึ่งจะนำไปสู่การศึกษาหา isoallergen ของสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นจากปฏิกิริยาตอบสนองต่อไอจีอี ดังนั้นในการศึกษาเพื่อค้นพบสารก่อภูมิแพ้ชนิดใหม่ในสารก่อภูมิแพ้อื่นๆ เช่น สารก่อภูมิแพ้แมลงสาบ สารก่อภูมิแพ้จากตัวต่อ ผึ้ง แตน มด รวมทั้งสารก่อภูมิแพ้จากอาหาร จึงควรศึกษาด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์

ในการศึกษาปีที่ 2 ได้คัดเลือกที่จะผลิตสารก่อภูมิแพ้หลักได้แก่ Der p 1 และ Der p 2 ในรูปของสารก่อภูมิแพ้ตามธรรมชาติ (native allergen) และสารก่อภูมิแพ้รีคอมบิแนนท์ (recombinant allergen) ซึ่งสามารถทำการผลิตได้ตามที่วางแผนไว้ โดยได้ทำการผลิตสารก่อภูมิแพ้รีคอมบิแนนท์ในแบคทีเรีย พบว่า สามารถผลิตได้ง่าย ในปริมาณมากตามที่ต้องการ มีความบริสุทธิ์สูง สารก่อภูมิแพ้รีคอมบิแนนท์ทั้ง 2 ชนิด สามารถนำไปใช้เป็นสารมาตรฐานของชุดทดสอบเพื่อตรวจหาและวัดปริมาณสารก่อภูมิแพ้จากไรฝุ่นบ้านด้วยวิธี sandwich ELISA ส่วนสารก่อภูมิแพ้รีคอมบิแนนท์ Der p 2 ที่ผลิตได้สามารถนำไปพัฒนาต่อไปเป็นน้ำยาวินิจฉัยในการตรวจภาวะแพ้รวมถึงใช้เป็นวัคซีนสำหรับรักษาโรคภูมิแพ้ไรฝุ่น โดยต้องนำไปทดสอบปฏิกิริยาภูมิแพ้ด้วยการทดสอบปฏิกิริยาภูมิแพ้ทางผิวหนัง (skin prick test) ทางผิวหนัง (in vivo test) ในสัตว์ทดลอง และในมนุษย์ตามลำดับต่อไป

บรรณานุกรม

- Burr ML, Butland BK, King S, Vauhan-Williams E. Changes in asthma prevalence: two surveys 15 years apart. Arch Dis Child 1989; 64: 1452-6.
- Charpin D, Kleisbauer JP, Lanteaume A, Razzouk H, Vervloet D, Toumi M, Faraj F, Charpin J. Asthma and allergy to house-dust mites in populations living in high altitudes. Chest 1988; 93: 758-61.
- Chen KW, Blatt K, Thomas WR, Swoboda I, Valent P, Valenta R, Vrtala, S. Hypoallergenic Der p 1/Der p 2 combination vaccines for immunotherapy of house dust mite allergy. J Allergy Clin Immunol 2012; 130: 435-43.
- Chen KW, Focke-Tejkl M, Blatt K, Kneidinger M, Gieras A, Dall'Antonia F, et.al. Carrier-bound nonallergenic Der p 2 peptides induce IgG antibodies blocking allergen-induced basophil activation in allergic patients. Eur J Allergy Clin Immunol 2012; 67: 609-21.
- Choovavivathanavanich P, Oshima S, Miyamoto T, Kanthavichitra N, Suwanprateep P. Mite sensitivity studies on *Dermatophagoides farinae* and house-dust allergy in Thai subjects. J Med Assoc Thai 1971; 54: 826-35.
- Dangsuwan T, Vichyanond P. Pattern of allergy skin testing results among adult and pediatric patients in Thailand. Abstract presented at the XIV International Conference of Allergology and Clinical Immunology. Sydney, Australia 2002.
- Diraphat P, Sookrung N, Chaicumpa W, et al. Recombinant American cockroach component, Per a1, reactive to IgE of allergic Thai patients. Asian Pac J Allergy Immunol 2003; 21: 11-20.
- Jeong KY, Hong CS, Yong TS. Recombinant Allergens for Diagnosis and Immunotherapy of Allergic Disorders, with Emphasis on Cockroach Allergy. Curr Protein Peptide Sci 2006; 7: 57-71.
- Malainual N, Vichyanond P, Phan-urai P. House dust mite fauna in Thailand. Clin Exp Allergy 1995; 25: 554-60.
- Kongpanichkul A, Vichyanond P, Tuchinda M. Allergen skin test reactivities among asthmatic Thai children. J Med Assoc Thai 1997; 80: 69-75.
- Pope AM, Patterson R, Burge H, eds. Indoor allergens. Assessing and controlling adverse health effects. Washington DC: National Academic Press, 1993.
- Rowntree S, Cogswell JJ, Platts-Mills TA, Mitchell EB. Development of IgE and IgG antibodies to food and inhalant allergens in children at risk of allergic disease. Arch Dis Child 1985; 60: 727-35.
- Sookrung N, Chaicumpa W, Diraphat P, et al. Cockroach allergen detection and cockroach allergens of allergic Thai patients. Asian Pac J Allergy Immunol 2003; 21: 1-9.

- Sookrung N, Chaicumpa W, Tubgtrongchitr A, *et al.* *Periplaneta americana* arginine kinase as a major allergen among Thai patients with major cockroach allergies. *Env Hlth Pers* 2006; 114: 875-80.
- Sporik R, Holgate ST, Platts-Mills TA, Cogswell JJ. Exposure to house-dust mite allergen (Der p I) and the development of asthma in childhood. A prospective study. *N Engl J Med* 1990; 323: 502-7.
- Sporik R, Ingram JM, Price W, Sussman JH, Honsinger RW, Platts-Mills TA. Association of asthma with serum IgE and skin test reactivity to allergens among children living at high altitude. Tickling the dragon's breath. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 1388-92.
- Thomas WR, Heinrich TK, Smith WA, Hales BJ. Pyroglyphid house dust mite allergens. *Protein Pept Lett.* 2007; 14(10): 943-53.
- Thomas WR. Geography of house dust mite allergens. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2010; 28(4): 211-24.
- Traidl-Hoffmann C, Jakob T, Behrendt H. Determinants of allergenicity. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123: 558-66.
- Tungtrongchitr A, Sookrung N, Munkong N, Mahakittikun V, Chinabut P, Chaicumpa W, Bunnag C, Vichyanond P. The levels of cockroach allergen in relation to cockroach species and allergic diseases in Thai patients. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2004; 22: 115-21.
- Vichyanond P, Jirapongsananuruk O, Visitsunthorn N, Tuchinda M. Prevalence of asthma, rhinitis and eczema in children from the Bangkok area using the ISAAC (International Study for Asthma and Allergy in Children) questionnaires. *J Med Assoc Thai* 1998; 81: 175-184.
- Vrtala S, Huber H, Thomas WR. Recombinant house dust mite allergens. *Methods.* 2014; 66(1): 67-74.
- Wongsathuaythong S, Lakshana P. House dust mite survey in Bangkok. *J Med Assoc Thai* 1972; 55: 271-286.
- Yong TS, Jeong KY. Household Arthropod Allergens in Korea. *Korean J Parasitol* 2009; 47: S143-S53.