

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

สรุปโครงการวิจัย

ปัจจุบันโรคภูมิแพ้จัดเป็นโรคเรื้อรังของประชากรไทยที่มีอุบัติการณ์ที่เพิ่มสูงขึ้น มีผลกระทบต่อเศรษฐกิจและสังคมอย่างมาก แนวคิดของแผนงานวิจัยนี้ คือต้องการศึกษาให้ครอบคลุมโรคภูมิแพ้ไผ่ฝุ่น ตั้งแต่ตัวไผ่ฝุ่นบ้าน สารก่อภูมิแพ้ไผ่ฝุ่น และการรักษาโรคภูมิแพ้ไผ่ฝุ่นแบบใหม่ โดยการศึกษาเกี่ยวกับตัวไผ่ฝุ่นบ้านเป็นการศึกษาที่จะพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยแยกสายพันธุ์ของไผ่ฝุ่นที่พบในบ้านพักอาศัยทั่วไป การศึกษาสารก่อภูมิแพ้จากไผ่ฝุ่นสายพันธุ์ *Dermatophagoides pteronyssinus* ที่ผู้ป่วยชาวไทยแพ้ รวมทั้งการศึกษาหาวิธีการรักษาโรคภูมิแพ้แบบใหม่ด้วย fully human monoclonal antibodies เมื่อประสบความสำเร็จจะเป็นแนวทางในการวิจัยและพัฒนาสารก่อภูมิแพ้ชนิดอื่นต่อไป

การพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยสายพันธุ์ของไผ่ฝุ่นด้วยเทคนิค PCR ได้คัดเลือกยีนที่นำมาใช้ในการตรวจจำแนก ได้แก่ ยีน internal transcribe spacer 2 (ITS2) ซึ่งใช้จำแนกไผ่ฝุ่นสายพันธุ์ *Dermatophagoides pteronyssinus* และสายพันธุ์ *Dermatophagoides farinae* และยีน Cytochrome oxidase subunit I (CoxI) ซึ่งใช้จำแนกไผ่ฝุ่นสายพันธุ์ *Blomia tropicalis* ออกแบบคู่ primer ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR จากยีนเหล่านี้ และพัฒนาวิธีเป็นการตรวจด้วยวิธี Multiplex PCR และพบว่า วิธีที่พัฒนามานี้มีความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) สามารถใช้จำแนกไผ่ฝุ่นทั้งสามสายพันธุ์ในระดับสูง เป็นวิธีที่ง่ายและสะดวกสามารถดำเนินการตรวจได้ในเวลาสั้น ได้ผลเร็วกว่าการจำแนกสายพันธุ์ไผ่ฝุ่นภายใต้กล้องจุลทรรศน์อย่างมาก

การศึกษาสารก่อภูมิแพ้ไผ่ฝุ่นสายพันธุ์ *D. pteronyssinus* ด้วยเทคนิคโปรตีนโอมิกส์และอิมมูโนโอมิกส์ พบโปรตีนจากไผ่ฝุ่นสายพันธุ์นี้ ที่ทำปฏิกิริยากับไอจีอี 22 จุด โปรตีนส่วนใหญ่เป็นโปรตีนที่เป็นสารก่อภูมิแพ้หลักของไผ่ฝุ่นคือ Der p 1 และสารก่อภูมิแพ้ไผ่ฝุ่นที่มีรายงานแล้ว ได้แก่ Der p 3, Der p 11, Der p 14 ส่วนสารก่อภูมิแพ้ไผ่ฝุ่นชนิดใหม่ที่ค้นพบคือ myosin heavy chain และ Triosephosphate Isomerase ซึ่งควรนำมาทำการศึกษาต่อไป ในการศึกษาครั้งนี้ คณะผู้วิจัยสามารถผลิตได้ทั้งสารก่อภูมิแพ้ตามธรรมชาติและรีคอมบิแนนท์ของสารก่อภูมิแพ้ไผ่ฝุ่นสายพันธุ์ *D. pteronyssinus* ชนิด Der p 1 และ Der p 2 และพบว่า สารก่อภูมิแพ้รีคอมบิแนนท์ Der p 2 ที่ผลิตได้เป็นสารก่อภูมิแพ้หลัก จึงน่าจะสามารถนำไปพัฒนาเป็นน้ำยาวินิจฉัยภาวะแพ้ไผ่ฝุ่น และเป็นวัคซีนรักษาโรคภูมิแพ้ไผ่ฝุ่น ส่วนสารก่อภูมิแพ้รีคอมบิแนนท์ Der p 1 สามารถนำไปใช้เป็นสารมาตรฐานของชุดทดสอบเพื่อตรวจหาและวัดปริมาณสารก่อภูมิแพ้จากไผ่ฝุ่นชนิด Der p 1 ในฝุ่นบ้านด้วยวิธี sandwich ELISA ได้

การเตรียมแอนบอดีของมนุษย์ชนิดโมโนโคลนาลที่ยับยั้งการทำงานของโปรตีนไทมิสโตรโมล ลิมโฟพอยิตินสำหรับรักษาโรคภูมิแพ้ไผ่ฝุ่น โดยใช้เทคนิคโดยวิธี molecular cloning, recombinant protein expression และ purification พบว่าโปรตีนที่ผลิตได้มีขนาดประมาณ 15 KDa ซึ่ง recombinant protein นี้จะนำไปใช้เป็นแอนติเจนเพื่อทำการผลิตแอนติบอดีชนิดโมโนโคลนาลของมนุษย์ที่สามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีน TSLP ต่อไป

ข้อเสนอแนะ

การตรวจด้วยวิธี Multiplex PCR ที่พัฒนามานี้มีความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของการตรวจจำแนกไรฝุ่นทั้งสามสายพันธุ์ในระดับสูง อย่างไรก็ตาม วิธี Multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้ให้ผลการตรวจและจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นในเชิงคุณภาพ (บวก หรือ ลบ) เท่านั้น ไม่สามารถบอกปริมาณของไรฝุ่นที่มีอยู่ในตัวอย่างฝุ่นได้ จึงควรพัฒนาเป็นวิธีการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นด้วยวิธี quantitative PCR ต่อไป

สารก่อภูมิแพ้รีคอมบิแนนท์ Der p 1 และ 2 ที่ผลิตด้วยวิธีพันธุวิศวกรรมในการศึกษานี้ ได้ทำการผลิตในแบคทีเรียที่เรียกว่า สามารถผลิตได้ง่าย ในปริมาณมากตามที่ต้องการ มีความบริสุทธิ์สูง สารก่อภูมิแพ้รีคอมบิแนนท์ทั้ง 2 ชนิด สามารถนำไปใช้เป็นสารมาตรฐานของชุดทดสอบเพื่อตรวจหาและวัดปริมาณสารก่อภูมิแพ้จากไรฝุ่นบ้านด้วยวิธี sandwich ELISA ส่วนสารก่อภูมิแพ้รีคอมบิแนนท์ Der p 2 ที่ผลิตได้สามารถนำไปพัฒนาต่อเป็นน้ำยาวินิจฉัยในการตรวจภาวะแพ้ รวมถึงใช้เป็นวัคซีนสำหรับรักษาโรคภูมิแพ้ไรฝุ่น โดยต้องนำไปทดสอบประสิทธิภาพภูมิแพ้ด้วยการทดสอบประสิทธิภาพภูมิแพ้ทางผิวหนัง (skin prick test) ในสัตว์ทดลอง และในมนุษย์ (in vivo test) ตามลำดับต่อไป

การรักษาด้วย fully human monoclonal antibodies ที่ยับยั้งการทำงานของโปรตีน TSLP ซึ่งยังไม่ทราบกลไกการทำงานของ human monoclonal antibodies นี้จึงควรที่จะศึกษาต่อไปว่า molecule ของ antibody จับกับส่วนไหนของ TSLP Protein หากทราบจะเป็นประโยชน์ในการศึกษากลไกการยับยั้งการทำงานของ TSLP ได้

บทคัดย่อรวม

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ปัจจุบันโรคภูมิแพ้และภาวะความเจ็บป่วยจากโรคภูมิแพ้มีอุบัติการณ์ที่เพิ่มสูงขึ้นทั่วโลก โดยเฉพาะในประเทศที่กำลังพัฒนารวมทั้งประเทศไทย การศึกษาในประเทศไทย พบว่า สารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นเป็นสารก่อภูมิแพ้ที่ก่อให้เกิดการแพ้ในผู้ป่วยด้วยโรคภูมิแพ้มากที่สุด โดยมีไรฝุ่นบ้าน เป็นตัวผลิตสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นที่เป็นสาเหตุก่อให้เกิดอาการของโรคภูมิแพ้ไรฝุ่น

แนวคิดของแผนงานวิจัยนี้คือ การพัฒนากระบวนการวิจัยภายใต้กรอบของโรคภูมิแพ้ไรฝุ่น ให้ครอบคลุมทั้งการอัตรารูขุมและการกระจายตัวของไรฝุ่นในบ้านพักอาศัย โดยพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยสายพันธุ์ของไรฝุ่นด้วยเทคนิค PCR ศึกษาสารก่อภูมิแพ้จากไรฝุ่นสายพันธุ์ที่ผู้ป่วยแพ้ รวมทั้งการรักษาด้วย fully human monoclonal antibodies เมื่อประสบความสำเร็จจะเป็นแนวทางในการวิจัยและพัฒนาสารก่อภูมิแพ้ชนิดอื่นต่อไป

วัตถุประสงค์ เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยสายพันธุ์ของไรฝุ่นด้วยเทคนิค PCR มาใช้จำแนกชนิด (genus, species) และศึกษาหาอัตรารูขุมและการกระจายตัวของไรฝุ่นในบ้านพักอาศัย ศึกษาสารก่อภูมิแพ้จากไรฝุ่นสายพันธุ์ *D. pteronyssinus* โดยใช้เทคนิคโปรตีโอมิกส์และอิมมูโนมิกส์ เพื่อให้ทราบถึงชนิดของสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นที่ผู้ป่วยแพ้ คัดเลือกสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นที่สำคัญนำมาทำการผลิตเพื่อใช้เป็นสารก่อภูมิแพ้มาตรฐานที่สามารถใช้ในการตรวจวินิจฉัย และรักษาผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ไรฝุ่น และพัฒนาแอนติบอดีต้นแบบสำหรับรักษาโรคภูมิแพ้ที่เกิดจากผลของโปรตีน TSLP

วิธีการดำเนินการวิจัยและผลการวิจัย

การจำแนกสายพันธุ์ของไรฝุ่นที่พบบ่อยในประเทศไทย ได้แก่ *Dermatophagoides pteronyssinus* (DP), *Dermatophagoides farinae* (DF) และ *Blomia tropicalis* (BT) ต้องอาศัยบุคลากรที่มีความชำนาญทางด้านไรวิทยา จึงทำให้ข้อมูลเกี่ยวกับความชุกชุมและการแพร่กระจายของไรฝุ่นตามบ้านเรือนค่อนข้างจำกัด งานวิจัยนี้ได้ศึกษาข้อมูลเกี่ยวกับยีนชนิดต่างๆ ของไรฝุ่น 3 สายพันธุ์ที่พบบ่อยในประเทศไทย มาออกแบบและพัฒนาวิธีตรวจจำแนกสายพันธุ์ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล คณะผู้วิจัยได้นำวิธี multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้มาใช้ในการตรวจสอบสายพันธุ์ไรฝุ่นในตัวอย่างฝุ่นจริงที่เก็บจากที่อยู่อาศัยจำนวน 100 หลังคาเรือน (ตัวอย่าง) โดยเปรียบเทียบกับ การตรวจด้วยวิธีการลอยตัวควบคู่กับการวินิจฉัยด้วยวิธี flotation+กล้องจุลทรรศน์

ยีนที่นำมาพัฒนาวิธีการตรวจจำแนก ได้แก่ ยีน internal transcribe spacer 2 และยีน Cytochrome oxidase subunit I โดยออกแบบคู่ primer ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR จากยีนเหล่านี้ ผลการศึกษาพบว่า วิธี multiplex PCR ตรวจพบไรฝุ่นจำนวน 46 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 37.10 สามารถจำแนกได้เป็นสายพันธุ์ *D. pteronyssinus* จำนวน 31 ตัวอย่าง สายพันธุ์ *D. farinae* จำนวน 29 ตัวอย่าง และสายพันธุ์ *B. tropicalis* จำนวน 29 ตัวอย่าง ในขณะที่การตรวจด้วยวิธี flotation+กล้องจุลทรรศน์สามารถพบไรฝุ่นในตัวอย่างจำนวน 24 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 24.49 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ต่างๆ จำนวน 19, 10 และ 0 ตัวอย่าง ตามลำดับ เมื่อนำผลการตรวจสอบตัวอย่างฝุ่น มาจับคู่กันพบว่า ตัวอย่างฝุ่นที่มีข้อมูลตรงกันสำหรับการตรวจสอบทั้งสองวิธี มีจำนวน 65 ตัวอย่าง เป็นผลบวก (พบไรฝุ่น) จำนวน 14 ตัวอย่าง และเป็นผลลบ (ไม่พบไรฝุ่น) จำนวน 51 ตัวอย่าง คิดเป็นความไวของวิธีการตรวจ (sensitivity) เท่ากับร้อยละ 54.17 ความจำเพาะ (specificity) เท่ากับร้อยละ 68.92 และความแม่นยำ (accuracy) เท่ากับร้อยละ 65.31 ตามลำดับ

การที่ค่าความไวและความจำเพาะของวิธี multiplex PCR ค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี flotation+กล้องจุลทรรศน์ ทั้งนี้เนื่องจากวิธี multiplex PCR สามารถตรวจพบไรฝุ่นได้มากกว่า โดยเฉพาะในตัวอย่างที่เป็นผลลบจากวิธี flotation+กล้องจุลทรรศน์ ดังนั้นการตรวจหาไรฝุ่นด้วยวิธี multiplex PCR จึงเหมาะสมสำหรับการตรวจตัวอย่างฝุ่นจำนวนมาก (screening) ในขณะที่วิธี flotation+กล้องจุลทรรศน์ เหมาะสำหรับการยืนยันสายพันธุ์ไรฝุ่นสำหรับจำนวนตัวอย่างฝุ่นที่ไม่มาก วิธีตรวจจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นที่คณะผู้วิจัยพัฒนาขึ้นนี้เป็นประโยชน์ต่อการดูแลสุขภาพผู้ป่วยภูมิแพ้ได้เป็นอย่างดี เพราะเป็นวิธีที่ง่ายและสะดวก บุคลากรห้องปฏิบัติการตามโรงพยาบาลหรือตามห้องปฏิบัติการอื่นๆ สามารถดำเนินการตรวจได้ ใช้เวลาสั้น ออกผลได้เร็วกว่าการจำแนกสายพันธุ์ไรฝุ่นภายใต้กล้องจุลทรรศน์อย่างมาก

สารสกัดหยาบจากตัวไรฝุ่นถูกแยกแบบสองทิศทางด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ แล้วนำโปรตีนที่ผ่านการแยกที่อยู่บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส ไปทำปฏิกิริยากับซีรัมรวมของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้คนไทย ที่ทำการศึกษา นำโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับไอจีอี (IgE) ในซีรัมของผู้ป่วยไปจำแนกชนิดโดยวิธีแมสสเปกโตรเมตรี (mass spectrometry) แล้วนำไปเปรียบเทียบกับแผนที่สายโปรตีน (peptide mass maps) ในแฟ้มข้อมูล พบว่า มีโปรตีนจากไรฝุ่น *D. pteronyssinus* ที่ทำปฏิกิริยากับไอจีอี 22 จุด ที่ส่งไปจำแนกชนิด โปรตีนส่วนใหญ่เป็นโปรตีนที่เป็นสารก่อภูมิแพ้หลักของไรฝุ่นคือ Der p 1 ส่วนสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่นชนิดใหม่ที่ค้นพบ คือ myosin heavy chain และ Triosephosphate Isomerase ในการศึกษาปีที่ 2 คณะผู้วิจัยได้เลือกที่จะผลิตสารก่อภูมิแพ้หลักชนิด Der p 1 และ Der p 2 โดยใช้เทคนิค affinity column chromatography ในการผลิตสารก่อภูมิแพ้ตามธรรมชาติ (native allergen) ส่วนสารก่อภูมิแพ้รีคอมบิแนนท์ (recombinant allergen) ผลิตด้วยเทคนิคพันธุ

วิศวกรรมในแบคทีเรีย พบว่า สามารถผลิตได้ง่ายในปริมาณมากตามที่ต้องการและมีความบริสุทธิ์สูง ผลการตรวจสอบลักษณะรูปแบบของโปรตีนและ amino acid sequencing สรุปได้ว่า สารก่อภูมิแพ้ตามธรรมชาติ และสารก่อภูมิแพ้รีคอมบิแนนท์ที่ผลิตได้เป็น Der p 1 และ Der p 2 จริง โดยมีขนาดโมเลกุลเป็น 24 และ 16 กิโลดัลตัน การศึกษาคุณสมบัติความเป็นสารก่อภูมิแพ้ของสารก่อภูมิแพ้ที่ผลิตขึ้นมาด้วยวิธี IgE-ELISA พบว่า สารก่อภูมิแพ้ตามธรรมชาติ Der p 1 และ Der p 2 และสารก่อภูมิแพ้รีคอมบิแนนท์ Der p 2 ที่ผลิตได้เป็นสารก่อภูมิแพ้หลัก เนื่องจากมี IgE binding activity คิดเป็น 96.67%, 83.33% และ 73.33% ตามลำดับ แต่สารก่อภูมิแพ้รีคอมบิแนนท์ Der p 1 ที่ผลิตได้มี IgE binding activity เพียง 43.33% จึงเป็นสารก่อภูมิแพ้รอง

การศึกษานี้พบว่า การศึกษาสารก่อภูมิแพ้ด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ร่วมกับอิมมูโนมิกส์นั้นสามารถแยกโปรตีนได้ดีกว่า และคณะผู้วิจัยสามารถผลิตสารก่อภูมิแพ้ไรฝุ่น *D. pteronyssinus* ชนิด Der p 1 และ Der p 2 ได้ทั้งที่เป็นสารก่อภูมิแพ้ตามธรรมชาติ และสารก่อภูมิแพ้รีคอมบิแนนท์ และพบว่า สารก่อภูมิแพ้รีคอมบิแนนท์ Der p 2 ที่ผลิตได้เป็นสารก่อภูมิแพ้หลัก จึงน่าจะสามารถนำไปพัฒนาเป็นน้ำยาวินิจฉัยภาวะแพ้ไรฝุ่น และเป็นวัคซีนรักษาโรคภูมิแพ้ไรฝุ่น ส่วนสารก่อภูมิแพ้รีคอมบิแนนท์ Der p 1 สามารถนำไปใช้เป็นสารมาตรฐานของชุดทดสอบเพื่อตรวจหาและวัดปริมาณสารก่อภูมิแพ้จากไรฝุ่นชนิด Der p 1 ในฝุ่นบ้านด้วยวิธี sandwich ELISA ได้

Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) หรือ interleukin 50 (IL-50) เป็นโปรตีนที่หลั่งจาก epithelial cells บริเวณทางเดินหายใจที่มีการตอบสนองต่อสารก่อภูมิแพ้ ซึ่งสามารถกระตุ้นให้เซลล์ในร่างกาย เช่น Dendritic cells (DCs), T cells, mast cells, NKT cells และ เซลล์อื่นๆ ให้หลั่ง T helper 2 (Th2) cytokines เช่น IL-5, IL-6, IL-10 และ IL-13 เป็นต้น รวมถึง mediators ต่างๆ มีผลการกระตุ้นให้เกิด airway hyper-responsiveness (AHR) มีการอักเสบ และ atopic dermatitis ในผู้ป่วย มีการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าเมื่อยับยั้งการทำงานของ TSLP ในหนูทดลองจะสามารถยับยั้งไม่ให้เซลล์อักเสบชนิดอีโอซิโนฟิลเข้าไปในทางเดินหายใจและสามารถป้องกันการเกิดการอักเสบในทางเดินหายใจได้ ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงเตรียม recombinant human TSLP เพื่อนำโปรตีนดังกล่าวมาใช้ในเป็นแอนติเจนเพื่อคัดเลือก phage clones ที่ display HuScFv ที่จับกับ TSLP จาก human antibody phage display library คณะผู้วิจัยได้ทำการสกัดอาร์เอ็นเอจาก epithelial cell line ที่ถูกกระตุ้นสารก่อภูมิแพ้ แล้วทำการเปลี่ยน RNA ให้เป็น cDNA ทำการเพิ่มจำนวนยีน TSLP โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน โดยพบว่า PCR product ที่ได้มีขนาดประมาณ 489 bp แล้วโคลนยีนที่เป็นรหัสของ TSLP ของมนุษย์เข้าไปใน expression vector นำ recombinant vector เข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* ทำการ induce ให้ transformed *E. coli* ผลิต recombinant TSLP แล้วทำการ purify recombinant TSLP ออกจากโปรตีนอื่นๆของแบคทีเรียด้วย affinity column วิเคราะห์โปรตีนที่ได้ด้วยวิธี SDS-PAGE และ LC MS/MS พบว่าโปรตีนที่ผลิตได้มีขนาดประมาณ 15 KDa ซึ่ง recombinant TSLP ที่ผลิตขึ้นสามารถเพิ่มการแสดงออกของ OX40L บนผิวของ Myeloid dendritic cells ได้ จากนั้นนำ TSLP ที่ผลิตขึ้นเป็นแอนติเจนเป้าหมายในการทำ Bio-panning เพื่อคัดเลือก phage clones ที่ display human ScFv จากการคัดเลือก 192 โคลน พบว่า 49 โคลนมี huScFv gene และ 20 โคลนสามารถสร้าง HuScFv ได้ จากการทดสอบการจับของ HuScFv ดังกล่าว ต่อ human TSLP ด้วยวิธี indirect ELISA พบว่ามี crude HuScFv จำนวน 10 clones คือ clones no. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12 และ 16 ให้ผลบวกใน indirect ELISA จากนั้นนำ human antibodies ทั้ง 10 โคลน ไปทำการทดสอบ

ประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของ TSLP พบว่า มี 2 โคลนของ TSLP specific monoclonal antibodies คือ โคลนที่ 5 และ 7 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการการแสดงออกของ OX40L บนผิวของ TSLP treated-Myeloid dendritic cells ได้ ถือได้ว่าเป็นการศึกษาแรกที่สามารถผลิตแอนติบอดีของมนุษย์ชนิดสายเดี่ยวที่มีความสามารถในการจับอย่างจำเพาะกับ TSLP และรบกวนการทำงานของ TSLP protein ได้ ซึ่งอาจจะยับยั้งการอักเสบในทางเดินหายใจได้ แต่ต้องทำการทดลองต่อไป