

การแสดงออกของอินดิวิซิเบิลไนตริกออกไซด์ซินเทเรส (inducible nitric oxide synthase, iNOS) และไซโคลออกซิจีเนสสอง (cyclooxygenase-2, COX-2) ผ่านเอ็นเอฟแคฟฟาบี (NF-κB) ในโรคพยาธิใบไม้ตับ: การศึกษาจากสัตว์ทดลองไปสู่คน

บทคัดย่อ—การติดพยาธิ *Opisthorchis viverrini* (OV) เหนี่ยวนำไนเตรตีฟและออกซิเดทีฟดีเอ็นเอดาเมตผ่านกระบวนการอักเสบเรื้อรังนำไปสู่การเกิดมะเร็งท่อน้ำดีในคน เพื่อพิสูจน์กลไกของพยาธิ OV เหนี่ยวนำการตอบสนองต่อกระบวนการอักเสบ เราจึงศึกษาการแสดงออกของอินดิวิซิเบิลไนตริกออกไซด์ซินเทเรส (inducible nitric oxide synthase, iNOS) เอ็นเอฟแคฟฟาบี (NF-κB) ไซโคลออกซิจีเนสสอง (cyclooxygenase-2, COX-2) โทลไลรีเซพเตอร์ แอนติออกซิแดชันไนโตรซิม และอินเฟมมาตอรีไซโตไคน์ใน (1) เซลล์มะเร็งแมคโครฟาจชนิด RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิ OV, ใน (2) ติบหนูแฮมสเตอร์ที่ให้พยาธิ OV ร่วมกับสารก่อมะเร็ง *N*-nitrosodimethylamine (NDMA) และใน (3) เซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ที่ติดพยาธิ OV กระตุ้นด้วยแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิ OV

1) ในเซลล์มะเร็งแมคโครฟาจชนิด RAW 264.7 ที่กระตุ้นด้วยแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิ OV ผลการตรวจโดยวิธี flow cytometry และ immunocytochemistry แสดงว่าแอนติเจน OV เหนี่ยวนำการแสดงออกของ TLR2 แต่ไม่ใช่ TLR4 ผลการตรวจโดยวิธี Western blotting และ immunocytochemistry พบว่า NF-κB, iNOS และ COX-2 ถูกแสดงออกในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7 ที่กระตุ้นด้วยแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิ OV ตามความเข้มข้น จากผลที่พบนี้แนะนำว่าพยาธิ OV เหนี่ยวนำการตอบสนองต่อกระบวนการอักเสบผ่านทาง TLR2 เพื่อให้มีการแสดงออกของ NF-κB ไปเหนี่ยวนำการแสดงออกของ iNOS และ COX-2

2) ในหนูแฮมสเตอร์ที่ป้อนด้วยพยาธิ OV ร่วมกับสารก่อมะเร็ง NDMA พยาธิ OV เสริมฤทธิ์กับสารก่อมะเร็ง NDMA เหนี่ยวนำให้หนูเป็นมะเร็งท่อน้ำดี ผลการตรวจทางพยาธิฮิสโตพบว่าการติดพยาธิ OV อย่างเดียวเหนี่ยวนำให้เกิดเนื้อเยื่อเกี่ยวพันรอบท่อน้ำดี ในขณะที่หนูกลุ่มที่ให้สารก่อมะเร็ง NDMA และ OV เสริมฤทธิ์ทำให้เกิดท่อน้ำดีขนาดเล็กและมะเร็งท่อน้ำดีที่ 6 เดือน ผลการตรวจโดยวิธี RT-PCR และ real-Time RT-PCR พบว่า OV ร่วมกับสารก่อมะเร็ง NDMA เสริมฤทธิ์เพิ่มการแสดงออกของอิน iNOS, NF-κB และ COX-2 สัมพันธ์กับกระบวนการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี การแสดงออกของ antioxidant enzymes เช่น Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1), Mn SOD (SOD2), catalase (CAT) และ glutathione peroxidase (GPx) ลดลง ในขณะที่การแสดงออกของ iNOS และ COX-2 เพิ่มขึ้น แนะนำว่าเกิดภาวะ oxidative และ nitrative stress การสะสมของ Proliferative cell nuclear antigen (PCNA) ตัวบ่งชี้ของการแบ่งตัวของเซลล์ ในเยื่อบุผิวท่อน้ำดีและในเซลล์อักเสบสัมพันธ์กับการแสดงออกของอิน เหล่านี้ ผลการศึกษานี้แนะนำว่าการแสดงออกของ iNOS, NF-κB และ COX-2 เกี่ยวข้องกับผลของการเสริมฤทธิ์กันของสารก่อมะเร็ง NDMA และการติดพยาธิ OV ดังนั้นอินเหล่านี้และผลผลิตของอินอาจเป็น

ประโยชน์เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ภาวะเสี่ยงการเป็นมะเร็ง และอาจเป็นเงินเป้าหมายในการใช้สาร
ป้องกันการเกิดมะเร็งต่อไป

3) ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนที่ติดพยาธิ OV ที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิ OV ผลการตรวจโดยวิธี real-time RT-PCR พบว่าแอนติเจน OV เหนี่ยวนำการแสดงออกของจีน IL-1, TLR-2, NF- κ B, COX-2, SOD2 และ CAT ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนปกติ การแสดงออกของจีน IL-1, NF- κ B, SOD2 เพิ่มขึ้นในระยะแรกที่ 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นการแสดงออกของ TLR-2, COX-2 และ CAT เพิ่มขึ้นที่ 12 ชั่วโมงหลังการกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิ OV อัตราส่วนของการแสดงออกในระดับ mRNA ของ COX-2/CAT, prooxidant/antioxidant เพิ่ม 12 และ 26 เท่า เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนที่ติดพยาธิ OV และกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิ OV พบว่าแบบแผนของการแสดงออกของจีนเหล่านี้คล้ายกับในคนปกติ ยกเว้นการแสดงออกของจีน TLR-2 เพิ่มขึ้นในระยะแรกที่ 6 ชั่วโมง หลังการกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิ OV น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งว่า อัตราส่วนของการแสดงออกในระดับ mRNA ของ COX-2/CAT เพิ่มเป็น 140, 90, 30, และ 40 เท่า เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และสูงกว่าในคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ผลการศึกษานี้แนะนำว่าแอนติเจนของพยาธิ OV เหนี่ยวนำภาวะออกซิเดทีฟสเตรสผ่านการตอบสนองต่อกระบวนการอักเสบ ซึ่งอาจนำไปใช้สารป้องกันการเกิดมะเร็งในการติดพยาธิ OV ที่สัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี

คำสำคัญ: อินดิวิซิเบิลไนตริกออกไซด์ซินเทเรส ไซโคออกซิจีเนสสอง เอ็นเอฟแคฟฟาปี โทลไลรีเซฟเตอร์สอง แอนติออกซิแดชเอนไซม์ อินเฟมมาตอรีไซโตไคน์ พยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini*, สารไนโตรไซโตเมทิลลามีน มะเร็งท่อน้ำดี

Expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) via NF- κ B in opisthorchiasis: from animal to human study

Abstract— *Opisthorchis viverrini* (OV) infection induces nitrative and oxidative DNA damage through chronic inflammation, leading to cholangiocarcinoma (CCA) development in human. To clarify the mechanism of OV-induced inflammatory response, we investigated the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS), nuclear factor-kappaB (NF- κ B), cyclooxygenase-2 (COX-2), Toll-like receptor (TLR), antioxidant enzymes, and inflammatory cytokine in (1) RAW 264.7 macrophage cell line treated with an extract of OV antigen, in (2) the liver of hamsters treated with OV and *N*-nitrosodimethylamine (NDMA) and in (3) white blood cell of OV-infected patient treated with an extract of OV antigen.

1) In RAW 264.7 macrophage cell line treated with an extract of OV antigen, flow cytometry and immunocytochemistry showed that OV antigen induced the expression of TLR2 but not TLR4. Western blotting and immunocytochemistry revealed that NF- κ B, iNOS and COX-2 were expressed in RAW 264.7 cells treated with OV antigen in a dose-dependent manner. These results suggest that OV induces inflammatory response through TLR2-mediated pathway leading to NF- κ B-mediated expression of iNOS and COX-2.

2) In the liver of hamsters treated with OV and NDMA, OV and NDMA synergistically induced CCA in hamsters. Histopathological examination revealed that OV infection alone induced fibrosis around bile duct, whereas NDMA and OV synergistically induced the formation of small bile ducts and CCA at 6 months. RT-PCR and real-Time RT-PCR showed that OV plus NDMA induced synergistically increased the expression of iNOS, NF- κ B and COX-2 in relation to CCA development. Expression of genes of antioxidant enzymes, such as Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1), Mn SOD (SOD2), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) genes, was decreased, while the expression of iNOS and COX-2 increased, suggesting that oxidative and nitrative stress occurred. Proliferative cell nuclear antigen (PCNA) accumulation, indicating cell proliferation, in the bile duct epithelium and inflammatory cells was associated with the expression of these genes. These results suggest that the expression of iNOS, NF- κ B and COX-2 is involved in the synergistic carcinogenic

effect of NDMA and OV infection. Therefore, these genes and their products may be useful biomarkers to evaluate the potential risk of development of tumor and the candidate genes for cancer chemoprevention.

3) In white blood cell (WBC) of OV-infected subjects treated with an extract of OV antigen, real-time RT-PCR revealed that OV antigen induced the expression of IL-1, TLR-2, NF- κ B, COX-2, and SOD2, CAT mRNA in WBC of healthy subject. Expression of IL-1, NF- κ B, SOD2 mRNA increased earlier at 6h and then expression of TLR-2, COX-2 and CAT genes increased at 12h post-treatment with an extract of OV antigen. The ratio of COX-2/CAT, prooxidant/antioxidant, mRNA expression increased 12- and 26-fold compared with untreated control. In WBC of OV-infected subjects treated with an extract of OV antigen revealed that expression profile of these genes were similar to healthy subjects, except TLR-2 gene increased earlier at 6h post-treatment with an extract of OV antigen. Interestingly, the ratio of COX-2/CAT mRNA expression increased 140, 90, 30, and 40-fold compared with untreated control and these levels were significantly higher than those of healthy subject. These results suggest that OV antigen induces oxidative stress through inflammatory response which may implicate for chemoprevention in OV infection-associated CCA development.

Keywords— inducible nitric oxide synthase, NF- κ B, cyclooxygenase-2, Toll-like receptor-2, antioxidant enzymes, inflammatory cytokine, *Opisthorchis viverrini*, *N*-nitrosodimethylamine, cholangiocarcinoma

สรุปโครงการวิจัย (Executive Summary)

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โรคพยาธิใบไม้ตับ (Opisthorchiasis) ที่เกิดจากการติดพยาธิใบไม้ตับ (*Opisthorchis viverrini*; OV) และโรคมะเร็งท่อน้ำดีพบมากที่สุดที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย มีหลักฐานจากการศึกษาทั้งในด้านระบาดวิทยาและในสัตว์ทดลองมากมายที่แสดงว่า การติดพยาธิใบไม้ตับ OV เป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งท่อน้ำดี ในปัจจุบันแม้ว่าความชุกของพยาธิใบไม้ตับมีแนวโน้มจะลดลงตามลำดับแต่ความชุกนี้ก็ยังคงสูงอยู่ ดังนั้นจึงส่งผลให้โรคมะเร็งท่อน้ำดียังคงเป็นปัญหาสำคัญในภูมิภาคนี้ ถึงแม้กลไกการเกิดโรคมะเร็งท่อน้ำดีที่สัมพันธ์กับการติดพยาธิใบไม้ตับยังไม่ทราบแน่ชัดแต่ก็มีหลักฐานชัดเจนว่าพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นสัมพันธ์กับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ในชุมชนส่วนใหญ่พบว่าการติดเชื้อพยาธิซ้ำๆ ซึ่งคณะผู้วิจัยเองก็ได้แสดงให้เห็นในสัตว์ทดลองแล้วว่าการติดเชื้อซ้ำๆ สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตอบสนองของเซลล์อักเสบอย่างรวดเร็วและเกิดพยาธิสภาพรุนแรงขึ้นตามลำดับของเวลาที่ในการติดพยาธิ โดยจะส่งผลให้เกิดการบาดเจ็บของดีเอ็นเอ ทั้งจากกระบวนการออกซิเดชันและในเตรชั่นเพิ่มมากขึ้นในหนูที่ติดพยาธิซ้ำๆ มากกว่าหนูที่มีการติดพยาธิครั้งเดียว และมีการสร้างสารไนตริกออกไซด์ (nitric oxide; NO) ผ่านการแสดงออกของเอนไซม์อินดิวซิเบิลไนตริกออกไซด์ซินเทส (inducible nitric oxide synthase: iNOS) การบาดเจ็บของดีเอ็นเอที่พบนี้ไม่ได้พบเฉพาะที่เซลล์เยื่อบุผิวของท่อน้ำดี แต่ยังสามารถพบได้ที่เซลล์อักเสบหรือเซลล์เม็ดเลือดขาว

ปัจจุบันเป็นที่ทราบแล้วว่า กระบวนการอักเสบโดยผ่านเซลล์อักเสบมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคหลายๆชนิดรวมทั้งโรคมะเร็ง เนื่องจากมีการสร้างสารอนุมูลอิสระชนิดออกซิเจนและไนโตรเจน เช่น ไนตริกออกไซด์ เพิ่มขึ้นและอนุมูลอิสระเหล่านี้จะไปทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอตามมา การสะสมของดีเอ็นเอที่ผิดปกติสามารถนำไปสู่การกลายพันธุ์ ถ้าการกลายพันธุ์นี้เกิดกับยีนกระตุ้นหรือยับยั้งก็สามารถกลายเป็นมะเร็งในที่สุดได้ ฉะนั้นจึงมีการตรวจวัดหารอยบาดเจ็บของดีเอ็นเอเพื่อตรวจหาความสัมพันธ์ในการดำเนินโรค โดยสามารถตรวจวัดได้ในเซลล์ต่างๆไป เช่น เซลล์เม็ดเลือดขาว นอกจากนี้เซลล์เม็ดเลือดขาวและพยาธิใบไม้ตับเองยังได้จัดเป็นสารก่อมะเร็งชนิดที่หนึ่งที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งได้ ดังนั้นจึงน่าสนใจเป็นอย่างยิ่งว่าพยาธิเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระชนิด NO โดยผ่านการแสดงออกของ iNOS ได้อย่างไรหรือผ่านกลไกอะไร จนเกิดการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอ ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าความผิดปกติของดีเอ็นเอไม่เฉพาะที่เยื่อบุผิวท่อน้ำดีอาจรวมทั้งเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ผิดปกติ อาจจะเป็นจุดเริ่มต้นในการเกิดมะเร็งต่อไป เนื่องจากเซลล์เม็ดเลือดขาวเองมีบทบาทสำคัญในการป้องกันและต่อต้านเชื้อโรคผ่านการแสดงออกของไซโตไคน์หลายชนิด และการแสดงออกของจีนหรือการตอบสนองต่อแอนติเจน

เดิมของเม็ดเลือดขาวน่าจะแตกต่างกัน ตามระดับความรุนแรงของพยาธิสภาพหรือระบบภูมิคุ้มกันของแต่ละคน

ปกติแล้วแอนติเจนของพยาธิโดยทั่วไป สามารถกระตุ้นให้มีการสร้างอนุมูลอิสระ NO โดยผ่าน Toll-like receptor 2 และทรานสคริปชันแฟคเตอร์ NF-KB แล้วมีการสร้าง iNOS และ cyclooxygenase-2 (COX-2) การแสดงออกของ iNOS เพิ่มขึ้นสามารถสร้างอนุมูลอิสระชนิด NO แล้วส่งผลให้เกิดดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไป เช่น 8-nitroguanine ดังที่เราเคยรายงานแล้ว และเหนี่ยวนำการแสดงออกของ COX-2 นอกจากนี้ iNOS และ COX-2 ยังสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการอักเสบผ่าน pro-inflammatory cytokines ต่างๆ เช่น TNF- α และ COX-2 ยังแสดงออกมากในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีด้วย จึงเป็นที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งว่าแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้าง NO จนทำให้ดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไป ผ่านการแสดงออกของ NF-KB, COX-2, iNOS และ Toll-like receptor หรือไม่ และการแสดงออกของจีนเหล่านี้สัมพันธ์กับพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นหรือการดำเนินไปของพยาธิสภาพที่ผิดปกติของระบบท่อน้ำดีและสัมพันธ์กับโรคพยาธิใบไม้ตับจนเปลี่ยนแปลงเป็นมะเร็งท่อน้ำดีหรือไม่ ซึ่งในปัจจุบันก็มีหลักฐานชัดเจนแล้วว่า การแสดงออกของจีน NF-KB สัมพันธ์กับการดำเนินของโรคมะเร็งกระเพาะอาหารที่เกิดจากการติดเชื้อ *Helicobacter pylori* และการแสดงออกของ COX-2 ก็สัมพันธ์กับการดำเนินของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งเต้านม เป็นต้น ดังนั้น NF-KB และ COX-2 จึงเป็นเป้าหมายของการใช้สารยับยั้งในการป้องกันการเกิดมะเร็ง (cancer chemoprevention) ได้ด้วย ซึ่งถ้าเราสามารถพิสูจน์ให้เห็นจริงว่า การแสดงออกของจีนเหล่านี้สัมพันธ์กับการเกิดพยาธิสภาพหรือการดำเนินการของโรคในผู้ป่วยจริงและทราบกลไกนี้แล้ว อาจจะใช้สารยับยั้งการควบคุมการแสดงออกของจีนได้ เพื่อป้องกันความผิดปกติของดีเอ็นเออันเป็นการป้องกันการเกิดมะเร็งได้อีกทางหนึ่ง

โครงการนี้ เป็นส่วนหนึ่งในโครงการที่คณะผู้วิจัยกำลังดำเนินการอยู่ร่วมกับคณะวิจัยจากกระทรวงสาธารณสุขในการศึกษาและติดตามผลของผู้ป่วยที่เคยมีประวัติการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ และมีความผิดปกติของระบบท่อน้ำดีในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ นอกจากนี้โครงการนี้ยังเป็นโครงการที่เชื่อมต่อกับโครงการที่ นักวิจัยที่ปรึกษาของผู้วิจัยเองจะทำต่อไป ในการตรวจวัดระดับสารอนุมูลอิสระโมเลกุลในดีเอ็นเอของผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของระบบท่อน้ำดีและผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี ดังนั้นโครงการนี้ไม่เพียงแต่จะเป็นประโยชน์ในการตอบคำถามกลไกในการเกิดการบาดเจ็บของดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีและการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ แต่ยังเป็นประโยชน์ในการเชื่อมต่อกับระดับของสารอนุมูลอิสระโมเลกุลในดีเอ็นเอที่จะทำการตรวจวัดในผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของระบบท่อน้ำดีและเป็นโรคพยาธิใบไม้ตับรวมถึงผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี อันจะเป็นประโยชน์ในการตรวจคัดกรองกลุ่มเสี่ยงที่จะเกิดมะเร็งท่อน้ำดีได้ หรือตรวจหามะเร็งในระยะแรกได้ซึ่งเป็นการลดอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งท่อน้ำดีได้อีกทางหนึ่ง และยังสามารถนำเอาผลจากการศึกษาในครั้งนี้ไปเลือกใช้สารยับยั้งการเกิดมะเร็งต่อไป โดยการศึกษาในปีงบประมาณ 2548 จะศึกษาในสัตว์ทดลองโดยตรวจวัดการแสดงออกของ iNOS, NF-KB และ COX-2 สัมพันธ์กับพยาธิสภาพที่เกิดจากโรคพยาธิใบไม้ตับจนกลายเป็นมะเร็งท่อน้ำดีและกระบวนการของเซลล์อักเสบหรือไม่อย่างไร ส่วนในการศึกษาในปีงบประมาณ 2549 จะศึกษาในผู้ป่วยที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ และมีพยาธิสภาพของระบบท่อน้ำดี

แตกต่างกันที่สัมพันธ์กับการติดพยาธิใบไม้ตับรวมทั้งในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี โดยใช้แอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับกระตุ้นในเซลล์เม็ดเลือดขาวของประชากรที่ศึกษา และถ้าโครงการนี้สำเร็จ ทางคณะผู้วิจัยก็จะศึกษาถึงผลของการใช้สารยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์เหล่านี้คือ ดีเอ็นเอทั้งในสัตว์ทดลองและในผู้ป่วย ในปี 2550 และ 2551 ต่อไป อึ้งผู้วิจัยได้เชิญ Prof. Shosuke Kawanishi จากมหาวิทยาลัยมิเอะ ประเทศญี่ปุ่นมาเป็นที่ปรึกษาความร่วมมือจากต่างประเทศ เนื่องจากเป็นผู้ที่มีความชำนาญในการวิจัยด้านการเกิดออกซิเดชันและไนเตรชัน จากอนุมูลอิสระต่อสารชีวโมเลกุลโดยเฉพาะต่อดีเอ็นเอ เป็นผู้ให้คำปรึกษาในการทำวิจัยในครั้งนี้ ร่วมกับผู้วิจัยอาวุโสจากประเทศไทย

2. วัตถุประสงค์

- 2.1 เพื่อศึกษาและพิสูจน์ให้เห็นว่า พยาธิใบไม้ตับสามารถกระตุ้นการสร้างอนุมูลอิสระชนิด NO มีการแสดงออกของจิ้น (inducible nitric oxide synthase: iNOS) และ cyclooxygenase-2 (COX-2) และเอ็นเอฟแคฟฟาบี (NF-KB) ซึ่งการแสดงออกของจิ้นเหล่านี้สัมพันธ์กับการดำเนินไปของโรคจนกระทั่งกลายเป็นโรคมะเร็งท่อน้ำดีหรือไม่อย่างไร
- 2.2 เพื่อศึกษาการสร้าง NO และการแสดงออกของจิ้นและโปรตีน iNOS, NF-KB, COX-2 และ Toll-like receptor 2 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับจากประชากรที่มีพยาธิสภาพของระบบท่อน้ำดีแตกต่างกัน โดยตรวจคัดกรองด้วยวิธีอัลตราซาวนด์ และการติดพยาธิใบไม้ตับทั้งในอดีตและปัจจุบัน ในประชากรสามกลุ่มคือ กลุ่มคนปกติ กลุ่มผู้ที่เป็นโรคพยาธิใบไม้ตับ และกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี เพื่อศึกษาดูการแสดงออกของจิ้นหรือโปรตีนและการสร้างอนุมูลอิสระชนิด NO ในประชากรแต่ละกลุ่มที่ศึกษาต่างกันหรือไม่อย่างไร

3. ระเบียบวิธีวิจัย

- 3.1 **ศึกษาในสัตว์ทดลอง** กระตุ้นหนูด้วยพยาธิใบไม้ตับและสารก่อมะเร็งเพื่อให้มีพยาธิสภาพแตกต่างกันจนกระทั่งหนูเกิดมะเร็งท่อน้ำดีโดยแบ่งหนูเป็น 4 กลุ่ม 1) หนูปกติ 2) ป้อนด้วยพยาธิ OV อย่างเดียว 3) ให้สารก่อมะเร็ง *N*-nitrosodimethylamine (NDMA) อย่างเดียว และ 4) ให้ร่วมกันทั้งสองชนิด แล้วฆ่าหนูในระยะเวลาต่างๆ เช่น หนึ่งเดือน สามเดือน และหกเดือน (จนกระทั่งหนูกลายเป็นมะเร็งท่อน้ำดี ประมาณ 6 เดือน) แล้วตรวจวัดการแสดงออกของจิ้นในระดับ mRNA และ/หรือระดับโปรตีนของเอ็นไซม์ iNOS, NF-KB และ COX-2 ในเนื้อเยื่อตับ รวมทั้งวัดระดับการสร้างสารอนุมูลอิสระ NO ในรูปของไนเตรต/ไนไตรในเลือดหรือในเนื้อเยื่อตับ โดยศึกษาเปรียบเทียบกับ การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา
- 3.2 **ศึกษาในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโดยทำการศึกษาดังนี้**
การออกแบบการทดลอง จากประชากรทั้งหมดที่ทำการศึกษาวิจัย แบ่งเป็นสามกลุ่ม ตามความรุนแรงของโรค แต่ละกลุ่มจะสุ่มเลือกมากลุ่มละ 3-5 ตัวอย่าง ประกอบด้วย 1) กลุ่มคนปกติและมีระบบท่อน้ำดีปกติไม่ติดพยาธิใบไม้ตับทั้งในอดีตและปัจจุบัน 2) กลุ่มผู้ป่วยที่ติด

พยาธิใบไม้ตับในความหนาแน่นของพยาธิระดับต่างๆ และมีความผิดปกติของระบบท่อน้ำดีระดับต่างๆกัน และ 3) กลุ่มผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี จากประชากรทั้งสามกลุ่มจะเก็บเลือดแล้วแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมดแล้วนำมากระตุ้นด้วยแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับ ในระยะเวลาและความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วตรวจวัดการสร้าง NO โดยอาศัย Griess' reaction ตรวจวัดการแสดงออกของ iNOS, NF-KB และ COX-2 โดยจะวัดการแสดงออกในระดับ mRNA โดยเทคนิค real-time PCR และตรวจการแสดงออกของโปรตีนโดยวิธี immunocytochemistry โดยทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน TLR2, iNOS, NF-KB และ COX-2

3.3 เทคนิคที่ใช้ศึกษา

1) การศึกษาในสัตว์ทดลอง จัดซื้อปลาจากแหล่งระบาดของพยาธิใบไม้ตับ ย่อยปลา เก็บรวบรวมระยะติดต่อของพยาธิ แล้วป้อนหนูด้วยระยะติดต่อของพยาธิ (metacercaria) ตัวละ 50 metacercaria ร่วมกับสารก่อมะเร็ง (NDMA) เลี้ยงหนูไว้และแบ่งเป็นกลุ่มตามระเบียบวิธีวิจัย ฆ่าหนูตามระยะเวลาที่กำหนด เก็บเลือดและตับ ตัวอย่างเลือดจะทำการตรวจวัดระดับการสร้างสารอนุมูลอิสระชนิด NO โดยวัดในรูปของไนเตรด/ไนไตรต์โดยอาศัยปฏิกิริยา Griess' reaction ส่วนตัวอย่างเนื้อเยื่อตับ (โดยเฉพาะบริเวณรอบท่อน้ำดีที่เกิดการอักเสบ) จะแบ่งออกเป็นสามส่วนเท่าๆกัน และทำการตรวจวัดดังนี้ 1) จุ่มในน้ำยาแช่ RNA แล้วเก็บไว้ที่ -80°C เพื่อนำมาสกัด mRNA เพื่อวัดปริมาณ mRNA ของ iNOS, NF-KB และ COX-2 โดยอาศัยเทคนิค real-time PCR 2) จุ่มในไนโตรเจนเหลว แล้วเก็บไว้ที่ -80°C เพื่อนำมาตรวจปริมาณโปรตีนของ iNOS, NF-KB และ COX-2 โดยวิธี Western blotting เนื้อเยื่อตับจะถูก homogenate วัดความเข้มข้นของปริมาณโปรตีนแล้ว run electrophoresis ถ่ายโปรตีนลงเมมเบรน แล้วทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน iNOS, NF-KB และ COX-2 แล้ววัดสัญญาณด้วย chemiluminescence 3) เนื้อเยื่อส่วนที่สามจะนำมาแช่ใน 10% neutral formalin เพื่อทำ tissue embedding ตัดชิ้นเนื้อ (tissue section) แล้วนำชิ้นเนื้อมาตรวจด้วยเทคนิค immunohistochemistry โดยจะย้อมด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน iNOS, NF-KB และ COX-2 ตรวจวัดสีโดยอาศัย peroxidase หรือ fluorescence ต่อไป tissue section บางส่วนจะนำมาย้อมสี hematoxylin and eosin เพื่อตรวจการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพและการดำเนินของโรค (เนื่องจากไม่มีแอนติบอดีต่อ TLR2 ที่ทำปฏิกิริยาได้ในหนูแฮมสเตอร์ ดังนั้นจึงไม่ทำการตรวจ TLR2 ในการศึกษาในสัตว์ทดลอง ส่วนการศึกษา NF-KB ที่แสดงว่ามีการ transactivation จาก cytoplasm เข้าจับกับ promoter region ในนิวเคลียส จะตรวจโดยการ localization โดยเทคนิค immunohistochemistry แทนวิธี Electrophoretic mobility shift assay: EMSA)

2) การศึกษาในเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับ จัดซื้อปลาจากแหล่งระบาดของพยาธิใบไม้ตับ ย่อยปลา เก็บรวบรวมระยะติดต่อของพยาธิ

แล้วป้อนหนูด้วยระยะติดต่อนของพยาธิ (metacercaria) ตัวละ 100 metacercaria เลี้ยง หนูไว้ 3 เดือน ฆ่าหนูเก็บรวบรวมพยาธิมาเพาะเลี้ยงเพื่อเตรียม excretory secretory antigen นำแอนติเจนมากระตุ้นกับเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมดกับประชากรที่ศึกษา โดยใช้ ความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสม เก็บสารอาหารที่เลี้ยงเซลล์เพื่อนำมาตรวจวัดระดับ การสร้างสารอนุมูลอิสระชนิด NO โดยวัดในรูปของไนเตรด/ไนไตรท์ อาศัยปฏิกิริยา Griess' reaction เก็บเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนของพยาธิ แช่ในน้ำยา RNA แล้วเก็บไว้ที่ -80°C เพื่อนำมาสกัด mRNA แล้วทำการตรวจวัดการแสดงออกของ TLR2, iNOS, NF-KB และ COX-2 โดยอาศัยเทคนิค real-time PCR เซลล์บางส่วนจะนำไป ตรวจโปรตีนเหล่านี้ด้วยวิธี immunocytochemistry โดยทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่ จำเพาะต่อโปรตีน TLR2, iNOS, NF-KB และ COX-2 แล้วตรวจวัดสีโดยอาศัย peroxidase หรือสารเรืองสี fluorescence

- 3.4 สถิติที่ใช้วิเคราะห์ ข้อมูลที่ได้ทั้งหมดจะนำมาวิเคราะห์ด้วยคอมพิวเตอร์ โปรแกรม STATA version 6.0 และ SPSS version 10.0 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย mean ของประชากรสองกลุ่ม ใช้ student pair T-test ทดสอบเปรียบเทียบ 3 กลุ่มใช้ Anova analysis

4. แผนการดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการในแต่ละช่วง 6 เดือน

กิจกรรม	ปีที่ 1		ปีที่ 2	
	เดือนที่ 1-6	7-12	1-6	7-12
1. ย่อยปลาและเก็บ metacercaria, infect หนู เลี้ยงหนู ฆ่าหนูเก็บตัวอย่าง	←→			
2. ป้อนพยาธิให้หนู เลี้ยงหนู เก็บพยาธิ เตรียมแอนติเจน	←→			
3. ทดสอบในสัตว์ทดลอง	←→			
4. ตรวจวิเคราะห์ รายงานผล	←→			
5. สรุปผลและจัดทำรายงานวิจัย		←→		
6. ตรวจแยกผู้ป่วย			←→	
7. เก็บเลือดและเพาะเลี้ยง			←→	
8. ตรวจวิเคราะห์ รายงานผล			←→	
9. สรุปผลและจัดทำรายงานวิจัย				←→

5. ผลงานหัวข้อเรื่องที่กำลังจะตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติในแต่ละปี

ปีที่ 1: ชื่อเรื่องที่กำลังจะตีพิมพ์ : Expression of NF-KB, iNOS and COX-2 associated with the progression of cholangiocarcinoma development in animal model

ชื่อวารสารที่กำลังจะตีพิมพ์ : Carcinogenesis มีค่า impact factor = 5.405

ปีที่ 2: ชื่อเรื่องที่สำคัญที่จะตีพิมพ์: Expression of NF-KB, iNOS and COX-2 through TLR-2 association with the severity of opisthorchiasis-induced the hepatobiliary disease

ชื่อวารสารที่สำคัญที่จะตีพิมพ์ : Cancer Research มีค่า impact factor = 8.318

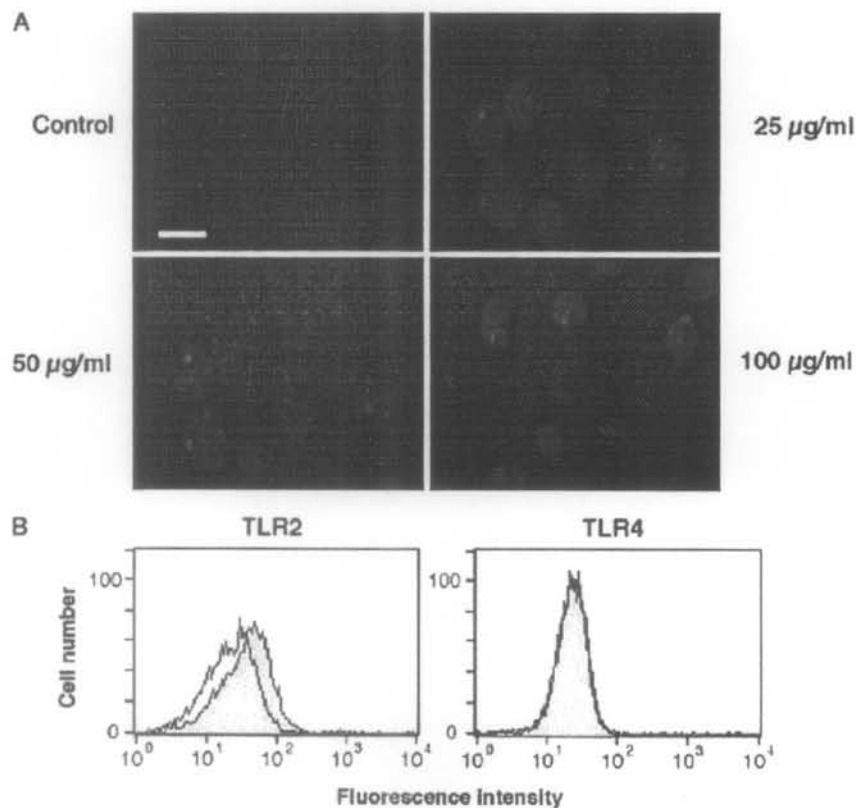
6. งบประมาณโครงการ (ตามระยะเวลาโครงการที่ได้เสนอรับทุน)

หมวด	ปีที่ 1	ปีที่ 2	รวม
1. หมวดค่าตอบแทน			
- ค่าตอบแทนหัวหน้าโครงการ	120,000	120,000	240,000
2. หมวดค่าวัสดุ	90,000	90,000	180,000
- ค่าหนูแฮมสเตอร์			
- ค่าปลา			
- น้ำยาและสารเคมีสำหรับย่อยปลา เช่น pepsin, NaCl และ HCl			
- antibody TLR2, iNOS, NF-KB, COX-2 - peroxidase conjugate			
- น้ำยาและอุปกรณ์สำหรับตรวจวิธี H&E stain และ immunohistochemistry			
- ชุดน้ำยาสกัด RNA			
- ค่าวัสดุอุปกรณ์ในสำนักงาน			
- น้ำยาตรวจโดยวิธี Real-time PCR			
- น้ำยาตรวจโดยวิธี Western-blotting			
- น้ำยาตรวจวัดระดับการสร้าง NO			
3. หมวดค่าใช้สอยและอื่นๆ	30,000	30,000	60,000
- ค่าถ่ายเอกสารและสืบค้นสารสนเทศ			
- ค่าสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์และค่าโคลนจีน			
- ค่าอาการแสดงผิดปกติ ติดกับต่างประเทศ และสำนักพิมพ์			
- ค่าเดินทางไปเสนอผลงานและรายงานความก้าวหน้า			
- ค่าจ้างออกไปซื้อปลา			
- ค่าจ้างเหมาจ่ายผู้ช่วยวิจัย 5 คน เพื่อย่อยปลา หาและเก็บรวบรวม metacercaria จำนวน 4 คน และคนเลี้ยงหนูอีก จำนวน 1 คน			
- ค่าจ้างเหมาจ่ายผู้ช่วยล้างอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ			
- ค่าจ้างพิมพ์รายงาน			
รวมงบประมาณโครงการ	240,000	240,000	480,000

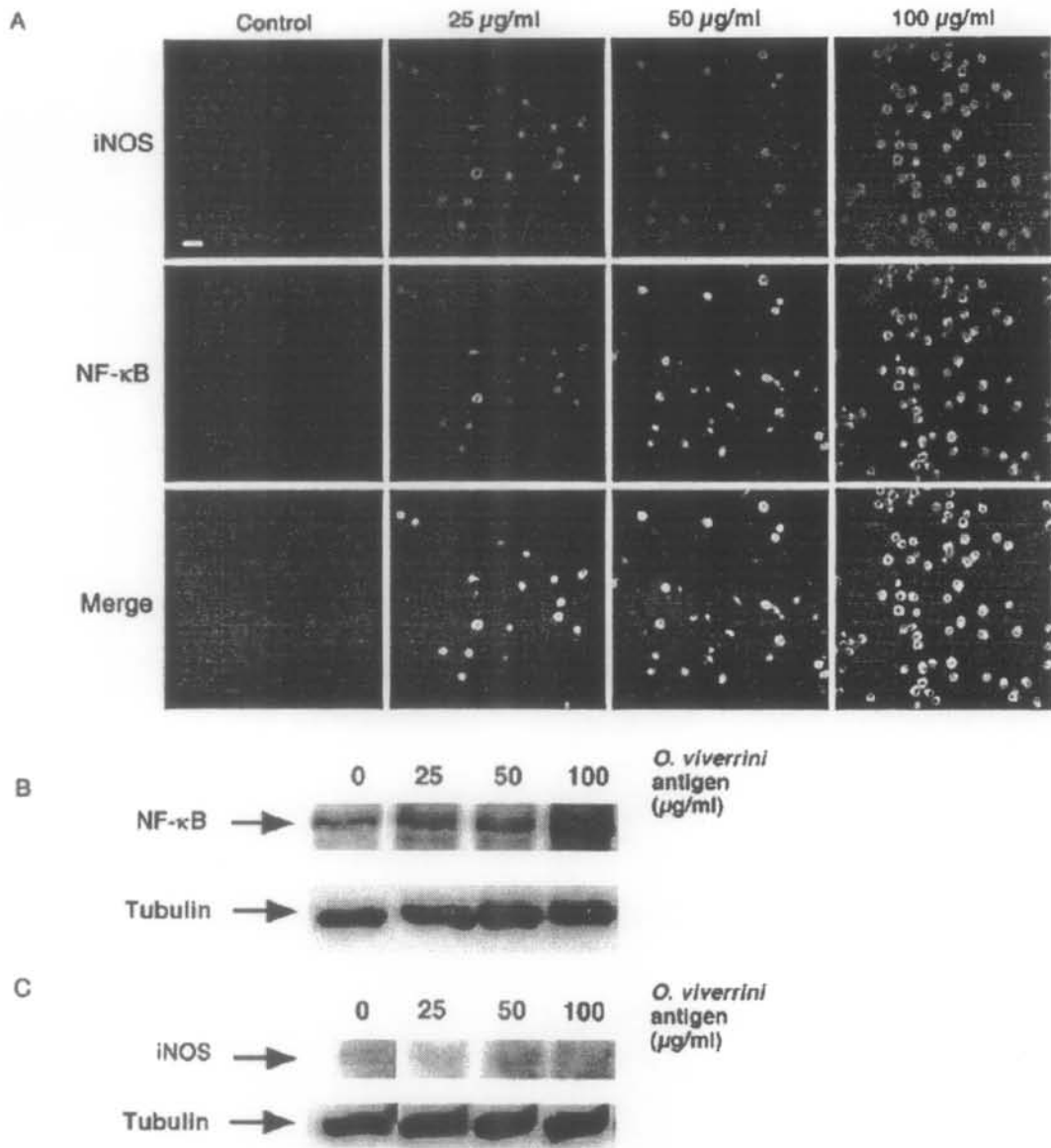
เนื้อหาทางวิจัย

การวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 3 ส่วน ดังนี้

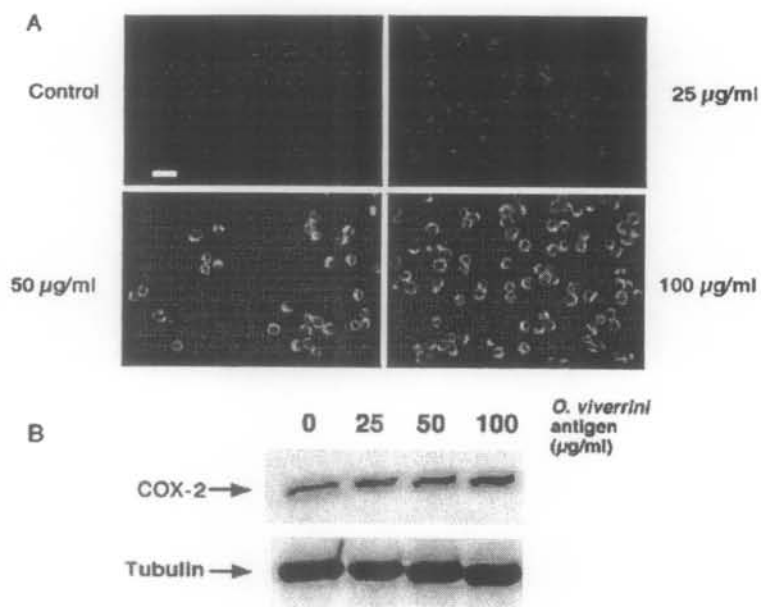
1. การเพาะเลี้ยง RAW 264.7 macrophage cell line ถูกกระตุ้นด้วย แอนติเจนที่สกัดจากพยาธิ OV โดยตรวจการแสดงออกของ TLR2 และ TLR4 โดยวิธี flow cytometry และ immunocytochemistry ตรวจการแสดงออกของ NF- κ B และ iNOS โดยวิธี double immunofluorescence และ Western blotting และตรวจการแสดงออกของ COX-2 โดยวิธี Western blotting และ immunocytochemistry ในเซลล์มะเร็งแมคโครฟาจชนิด RAW 264.7 ที่กระตุ้นด้วยแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิ OV ผลการตรวจโดยวิธี flow cytometry และ immunocytochemistry แสดงว่าแอนติเจน OV เหนี่ยวนำการแสดงออกของ TLR2 แต่ไม่ใช่ TLR4 ผลการตรวจโดยวิธี Western blotting และ immunocytochemistry พบว่า NF- κ B, iNOS และ COX-2 ถูกแสดงออกในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7 ที่กระตุ้นด้วยแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิ OV ตามความเข้มข้น จากผลที่พบนี้สรุปว่าพยาธิ OV เหนี่ยวนำการตอบสนองต่อกระบวนการอักเสบผ่านทาง TLR2 เพื่อให้มีการแสดงออกของ NF- κ B ไปเหนี่ยวนำการแสดงออกของ iNOS และ COX-2 ผลการศึกษาสรุปได้ดังแสดงในรูปภาพดังนี้



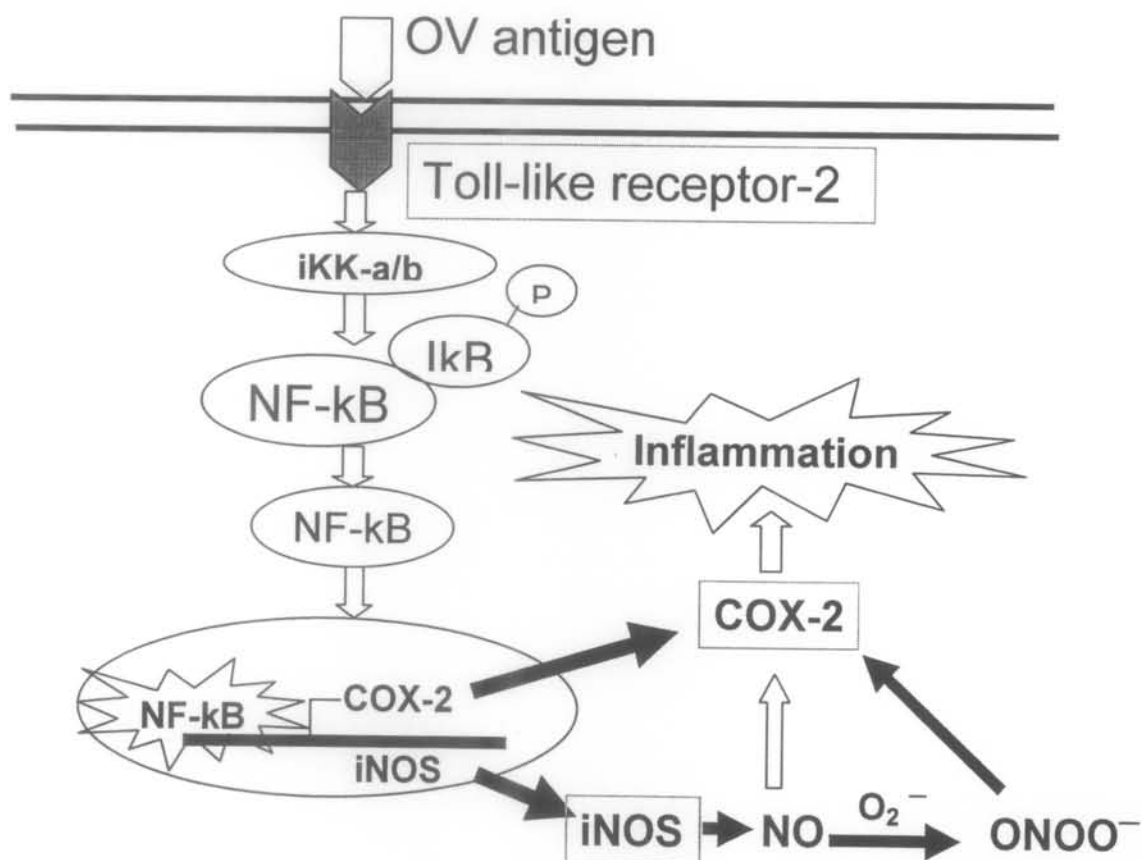
รูปภาพที่ 1 การแสดงออกของ TLR ใน RAW 264.7 macrophage cell line ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิ OV (A) immunohistochemistry ย้อมด้วย anti-TLR-2 antibody และ (B) flow cytometry ย้อมด้วย anti-TLR-2 หรือ anti-TLR-4 antibody



รูปภาพที่ 2 การแสดงออกของ iNOS และ NF- κ B ใน RAW 264.7 macrophage cell line ถูกกระตุ้นด้วย แอนติเจนที่สกัดจากพยาธิ OV (A) double immunofluorescence ย้อมด้วย anti-iNOS และ anti-NF- κ B antibodies และ (B) Western blotting of NF- κ B (C) Western blotting of iNOS เปรียบเทียบกับ tubulin



รูปภาพที่ 3 การแสดงออกของ COX-2 ใน RAW 264.7 macrophage cell line ถูกกระตุ้นด้วย แอนติเจนที่สกัดจากพยาธิ OV (A) immunofluorescence ย้อมด้วย anti-COX-2 antibody และ (B) Western blotting of COX-2 เปรียบเทียบกับ tubulin

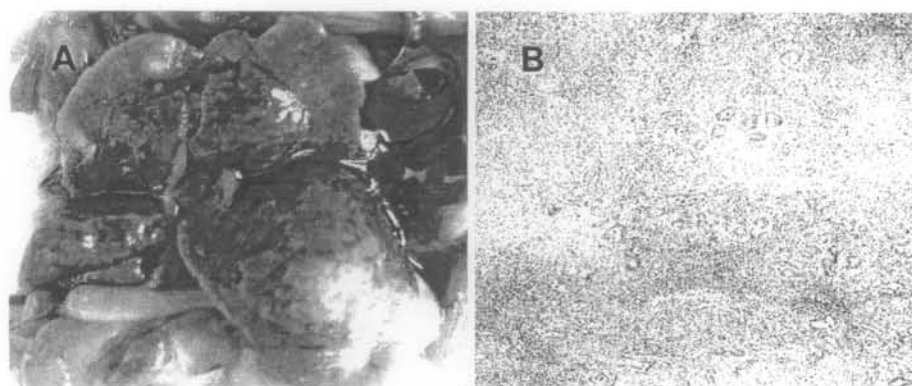


รูปภาพที่ 4 สรุปลงไกที่อาจเป็นไปได้ของการกระตุ้นด้วยแอนติเจนของพยาธิ OV ต่อการตอบสนองต่อกระบวนการอักเสบ

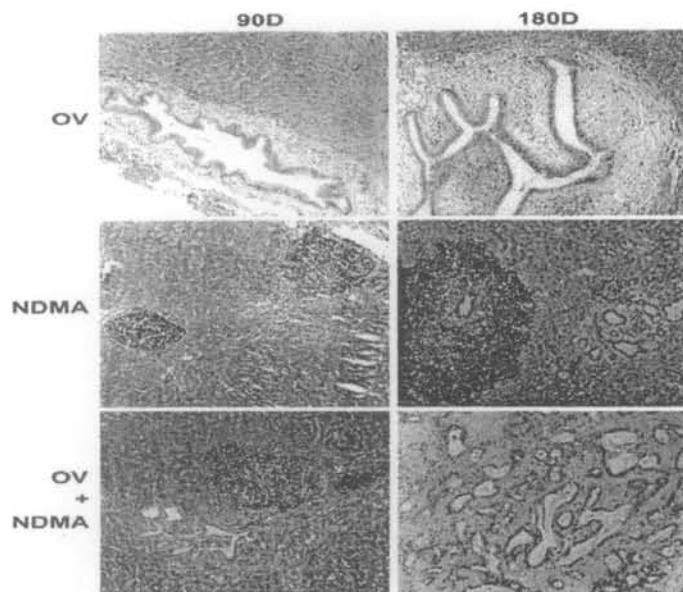
2. ผลการศึกษาในสัตว์ทดลอง ที่ให้พยาธิ OV ร่วมกับสารก่อมะเร็ง NDMA

ในหนูแฮมสเตอร์ที่ป้อนด้วยพยาธิ OV ร่วมกับสารก่อมะเร็ง NDMA จะเหนี่ยวนำให้หนูเป็นมะเร็งท่อน้ำดี ผลการตรวจทางพยาธิฮีสโตพบว่าการติดพยาธิ OV อย่างเดียวเหนี่ยวนำให้เกิดเนื้อเยื่อเกี่ยวพันรอบท่อน้ำดี ในขณะที่หนูกลุ่มที่ให้สารก่อมะเร็ง NDMA และ OV เสริมฤทธิ์ทำให้เกิดท่อน้ำดีขนาดเล็กและมะเร็งท่อน้ำดีที่ 6 เดือน ผลการตรวจโดยวิธี RT-PCR และ real-Time RT-PCR พบว่า OV ร่วมกับสารก่อมะเร็ง NDMA เสริมฤทธิ์เพิ่มการแสดงออกของจีน iNOS, NF- κ B และ COX-2 สัมพันธ์กับกระบวนการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี การแสดงออกจีน antioxidant enzymes เช่น Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1), Mn SOD (SOD2), catalase (CAT) และ glutathione peroxidase (GPx) ลดลงในขณะที่การแสดงออกของ iNOS และ COX-2 เพิ่มขึ้น และน่าจะเกิดภาวะ oxidative และ nitrative stress การสะสมของ Proliferative cell nuclear antigen (PCNA) ตัวบ่งชี้ของการแบ่งตัวของเซลล์ ในเยื่อบุผิวท่อน้ำดีและในเซลล์อักเสบสัมพันธ์กับการแสดงออกของจีนเหล่านี้ ผลการศึกษานี้แนะนำว่าการแสดงออกของ iNOS, NF- κ B และ COX-2 เกี่ยวข้องกับผลของการเสริมฤทธิ์กันของสารก่อมะเร็ง NDMA และการติดพยาธิ OV ดังนั้นจีนเหล่านี้และผลผลิตของจีน อาจเป็นประโยชน์เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ภาวะเสี่ยงการเป็นมะเร็ง และอาจเป็นเงินเป้าหมายในการใช้สารป้องกันการเกิดมะเร็งต่อไป

2.1 ผลการศึกษาทางพยาธิวิทยา

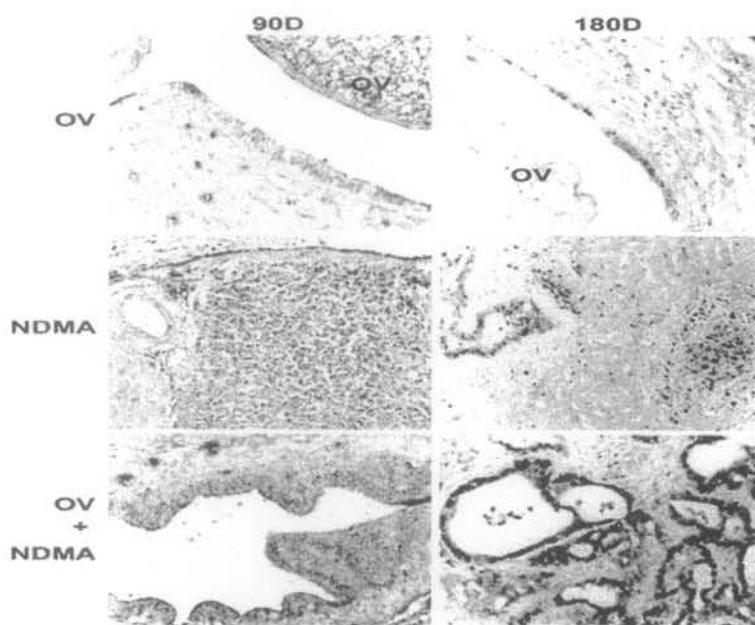


รูปภาพที่ 5 แสดงมะเร็งท่อน้ำดีในหนูแฮมสเตอร์ ที่ได้รับพยาธิใบไม้ตับ OV และสารก่อมะเร็ง ในเดือนที่ 6 (A) เป็นภาพที่มองด้วยตา (B) ภาพถ่ายจากการย้อมสี hematoxylin และ eosin



รูปภาพที่ 6 แสดงพยาธิสโตในตับหนูแฮมสเตอร์ที่ติดพยาธิใบไม้ตับ OV หรือ สารก่อมะเร็ง (NDMA) เพียงอย่างเดียว และ OV + NDMA ในวันที่ 90 วัน และวันที่ 180 พบว่า หนูที่ให้พยาธิ OV + NDMA จะเป็นมะเร็งท่อน้ำดี

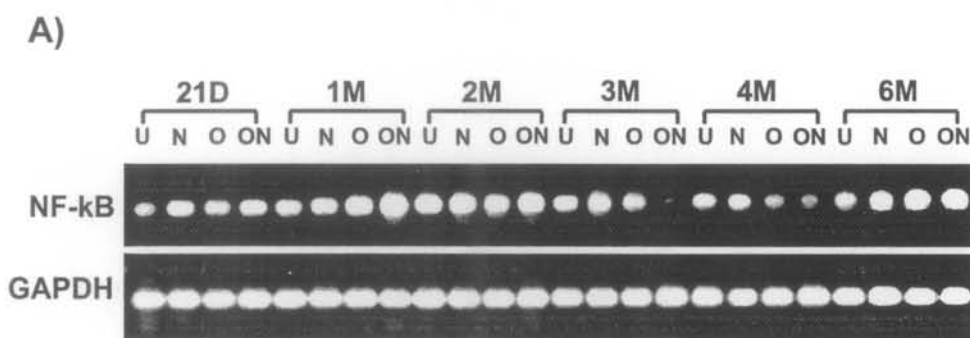
2.2 ผลการแสดงออกของ Proliferative cell nuclear antigen (PCNA) ตัวบ่งชี้ของการแบ่งตัวของเซลล์ โดยวิธี immunohistochemistry



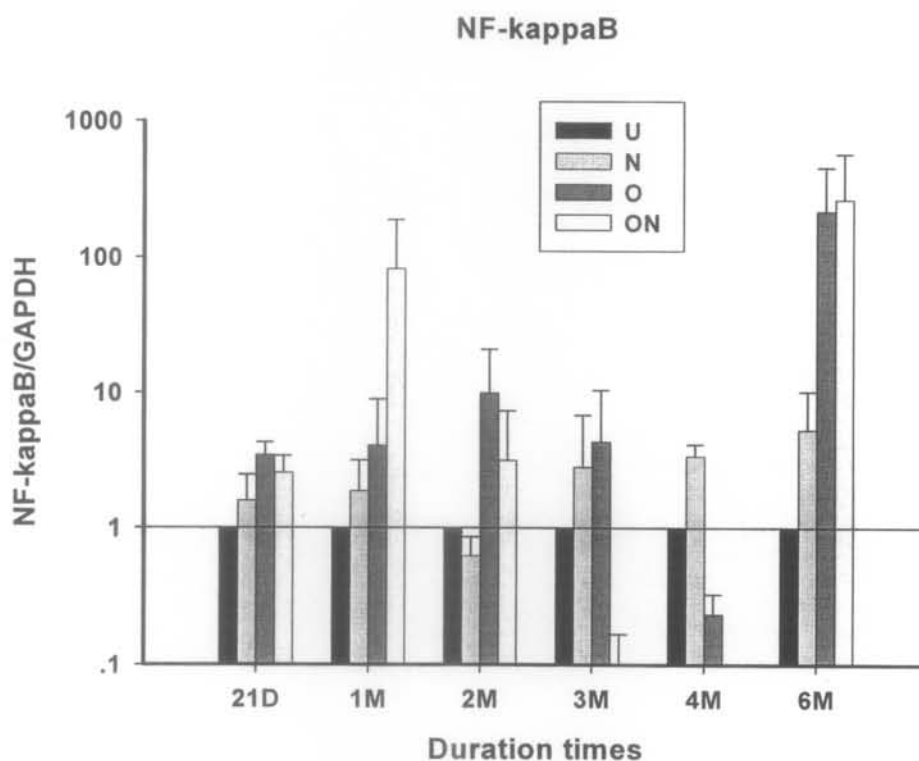
OV = *O. viverrini*, D = day

รูปภาพที่ 7 การแสดงออกของ PCNA ในตับหนูแฮมสเตอร์ที่ติดพยาธิใบไม้ตับ OV และใน มะเร็งท่อน้ำดี ในวันที่ 90 และวันที่ 180 (เดือนที่ 6) โดยย้อมด้วย anti-PCNA antibody พบว่า PCNA แสดงออกมากที่สุดเนื้อมะเร็งท่อน้ำดี

2.3 การแสดงออกในระดับ mRNA ของจีน iNOS, NF-kB, COX-2 และ antioxidant enzymes ในตับหนูแฮมสเตอร์ที่ติดพยาธิใบไม้ตับ OV และสารก่อมะเร็ง NDMA โดยเทคนิค RT-PCR และ real-time RT-PCR



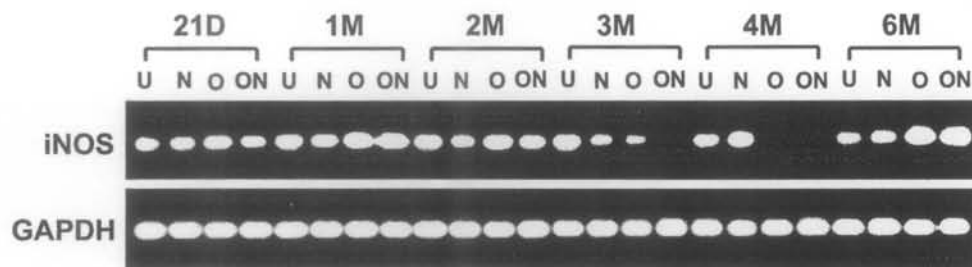
B)



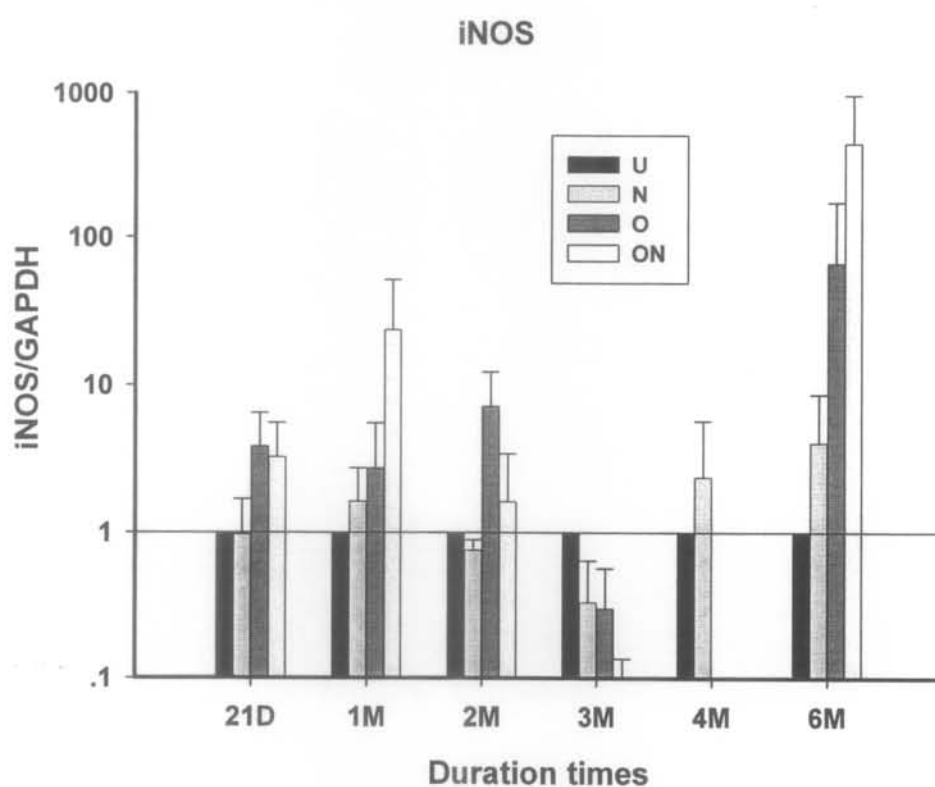
U= normal hamster, N = NDMA, O = *O. viverrini*, ON = *O. viverrini* + NDMA, D = day, M = month

รูปภาพที่ 8 การแสดงออกของจีน NF-kB ในตับหนูแฮมสเตอร์ที่ติดพยาธิใบไม้ตับ OV และในมะเร็งท่อน้ำดี โดยวิธี real-time RT-PCR (A) แยกใน 2% agarose gel electrophoresis (B) ระดับการแสดงออกของจีน NF-kB เปรียบเทียบกับ GAPDH โดยคำนวณการแสดงออกแบบ Ct method จากหนู 3 ตัว และการทดลองทำซ้ำ 2 ครั้ง การแสดงออกของจีน NF-kB สูงที่สุดในหนูกลุ่มที่ให้พยาธิ OV + NDMA โดยเฉพาะเดือนที่ 1 และ 6

A)

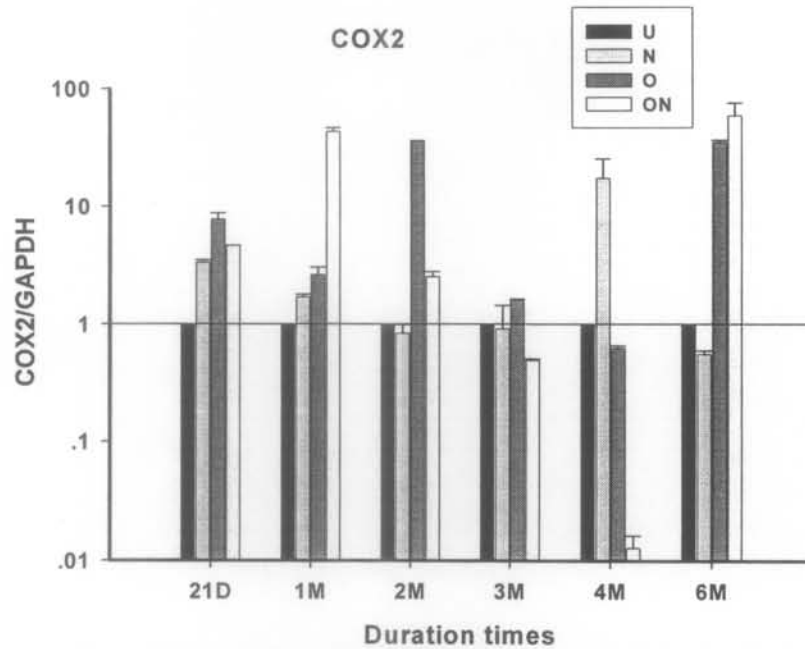


B)



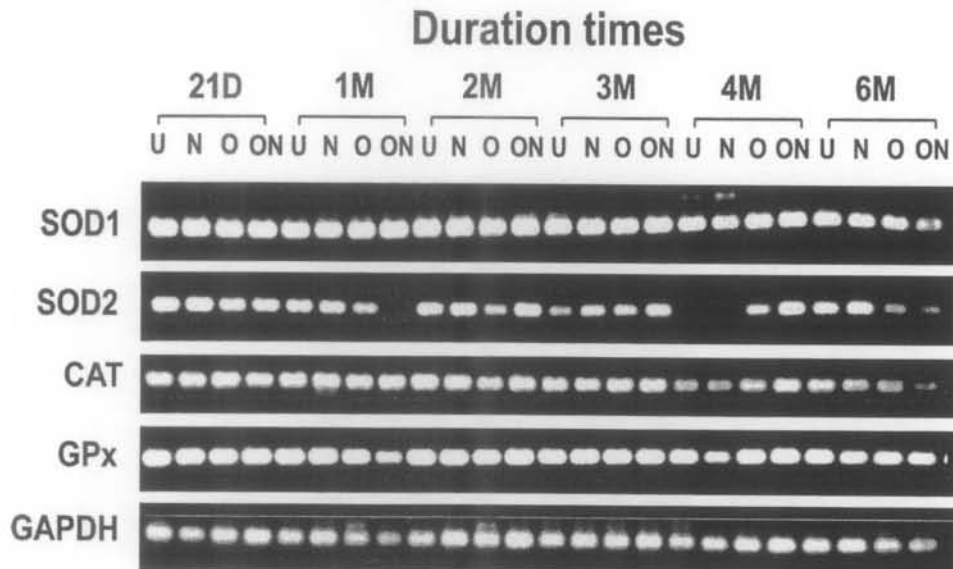
U= normal hamster, N = NDMA, O = *O. viverrini*, ON = *O. viverrini* + NDMA, D = day, M = month

รูปภาพที่ 9 การแสดงออกของจีน iNOS ในตับหนูแฮมสเตอร์ที่ติดพยาธิใบไม้ตับ OV และในมะเร็งท่อน้ำดี โดยวิธี real-time RT-PCR (A) ผลการแยกใน 2% agarose gel electrophoresis (B) ระดับการแสดงออกของจีน iNOS เปรียบเทียบกับ GAPDH โดยคำนวณการแสดงออกแบบ Ct method จากหนู 3 ตัว และการทดลองทำซ้ำ 2 ครั้ง การแสดงออกของจีน iNOS สูงที่สุดในหนูกลุ่มที่ให้พยาธิ OV + NDMA โดยเฉพาะเดือนที่ 1 และ 6



U= normal hamster, N = NDMA, O = *O. viverrini*, ON = *O. viverrini* + NDMA, D = day, M = month

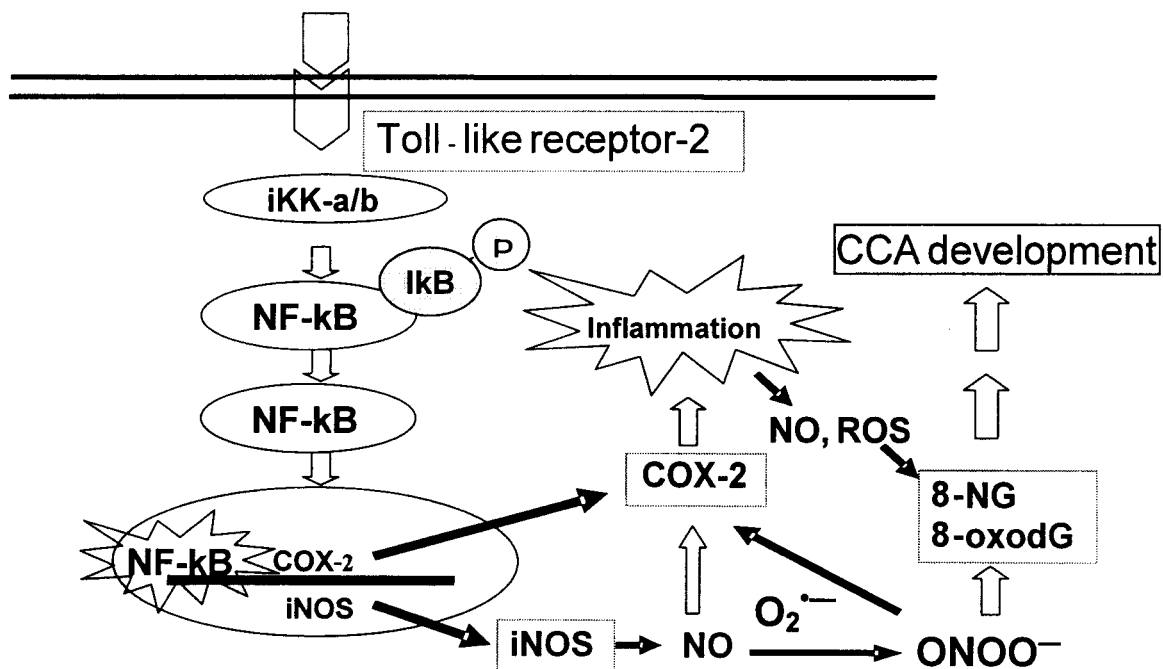
รูปภาพที่ 10 การแสดงออกของจีน COX-2 ในตับหนูแฮมสเตอร์ที่ติดพยาธิใบไม้ตับ OV และในมะเร็งท่อน้ำดี โดยวิธี real-time RT-PCR ระดับการแสดงออกของจีน COX-2 เปรียบเทียบกับ GAPDH โดยคำนวณการแสดงออกแบบ Ct method จากหนู 3 ตัว และการทดลองทำซ้ำ 2 ครั้ง การแสดงออกของจีน COX-2 สูงที่สุดในหนูกลุ่มที่ให้พยาธิ OV + NDMA โดยเฉพาะเดือนที่ 1 และ 6



U= normal hamster, N = NDMA, O = *O. viverrini*, ON = *O. viverrini* + NDMA, D = day, M = month

รูปภาพที่ 11 การแสดงออกของจีน SOD1, SOD2, CAT, GPx ในตับหนูแฮมสเตอร์ที่ติดพยาธิใบไม้ตับ OV และในมะเร็งท่อน้ำดี โดยวิธี RT-PCR เปรียบเทียบกับ GAPDH โดยแยกใน 2% agarose gel electrophoresis จากหนู 3 ตัว และการทดลองทำซ้ำ 2 ครั้ง การแสดงออกของจีนเหล่านี้ต่ำที่สุดในหนูกลุ่มที่ให้พยาธิ OV + NDMA โดยเฉพาะเดือนที่ 6

OV antigen



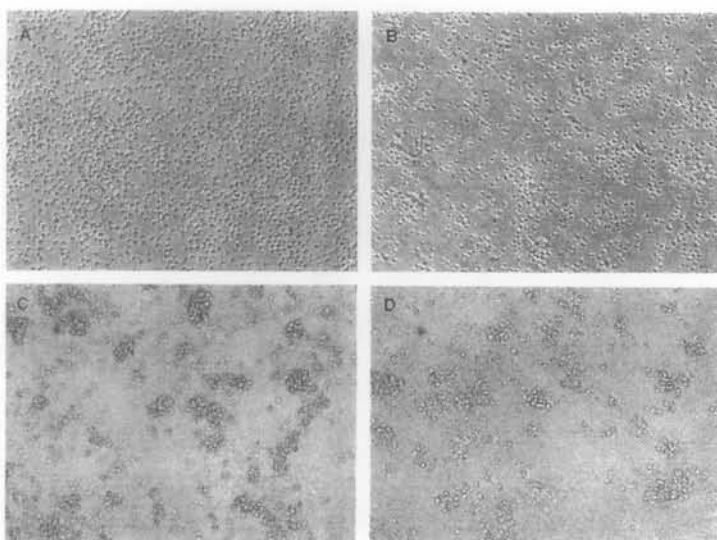
8-NG = 8-nitroguanine, 8-oxodG = 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine

รูปภาพที่ 12 สรุปกลไกการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีที่อาจเป็นไปได้ในหนูแฮมสเตอร์ที่ติดพยาธิใบไม้
 ดับ OV และได้รับสารก่อมะเร็ง NDMA ผ่านการแสดงออกของจีน NF-κB, iNOS และ
 COX-2

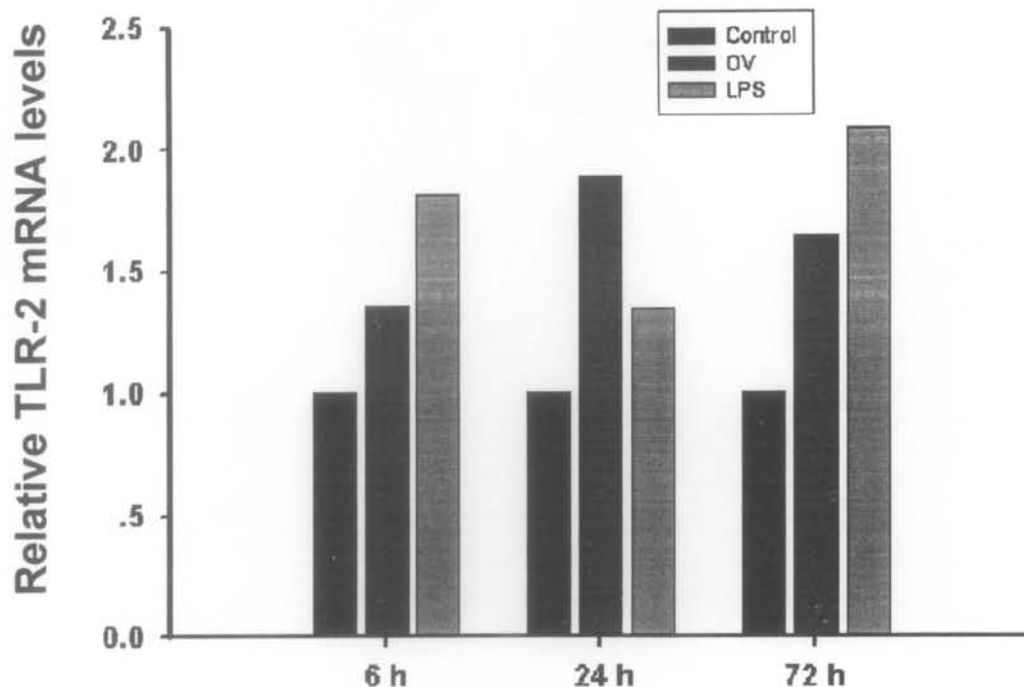
3) การศึกษาในเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนทีติดพยาธิใบไม้ตับ OV ที่ถูกกระตุ้นด้วย แอนติเจนที่สกัดจากพยาธิ OV

ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนทีติดพยาธิ OV ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิ OV เปรียบเทียบกับคนปกติ ผลการตรวจโดยวิธี real-time RT-PCR พบว่าแอนติเจน OV เหนี่ยวนำ การแสดงออกของจีน IL-1, TLR-2, NF-κB, COX-2, SOD2 และ CAT ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของ คนปกติ การแสดงออกของจีน IL-1, NF-κB, SOD2 เพิ่มขึ้นในระยะแรกที่ 6 ชั่วโมง หลังจากนั้น การแสดงออกของ TLR-2, COX-2 และ CAT เพิ่มขึ้นที่ 12 ชั่วโมงหลังการกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่ สกัดจากพยาธิ OV อัตราส่วนของการแสดงออกในระดับ mRNA ของ COX-2/CAT, prooxidant/antioxidant เพิ่ม 12 และ 26 เท่าเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมของเซลล์ที่ไม่ได้ถูก กระตุ้น ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนทีติดพยาธิ OV และกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิ OV พบว่าแบบแผนของการแสดงออกของยีนเหล่านี้คล้ายกับในคนปกติ ยกเว้นการแสดงออกของ จีน TLR-2 เพิ่มขึ้นในระยะแรกที่ 6 ชั่วโมง หลังการกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิ OV น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งว่าอัตราส่วนของการแสดงออกในระดับ mRNA ของ COX-2/CAT เพิ่มเป็น 140, 90, 30, และ 40 เท่าเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และสูงกว่าในคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ผล การศึกษานี้แนะนำว่าแอนติเจนของพยาธิ OV เหนี่ยวนำภาวะออกซิเดทีฟสเตรสผ่านการ ตอบสนองต่อกระบวนการอักเสบ ซึ่งอาจนำไปใช้สารป้องกันการเกิดมะเร็งในการติดพยาธิ OV ที่ สัมพันธ์กับมะเร็งท่อน้ำดี

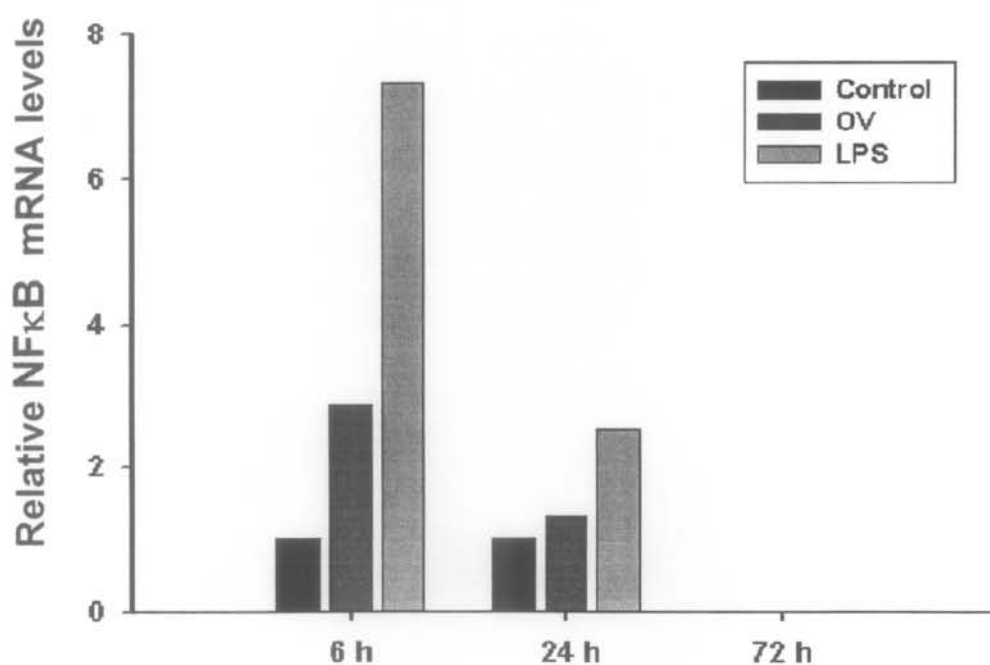
3.1 แสดงการหาภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว และกระตุ้นด้วย แอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับ OV



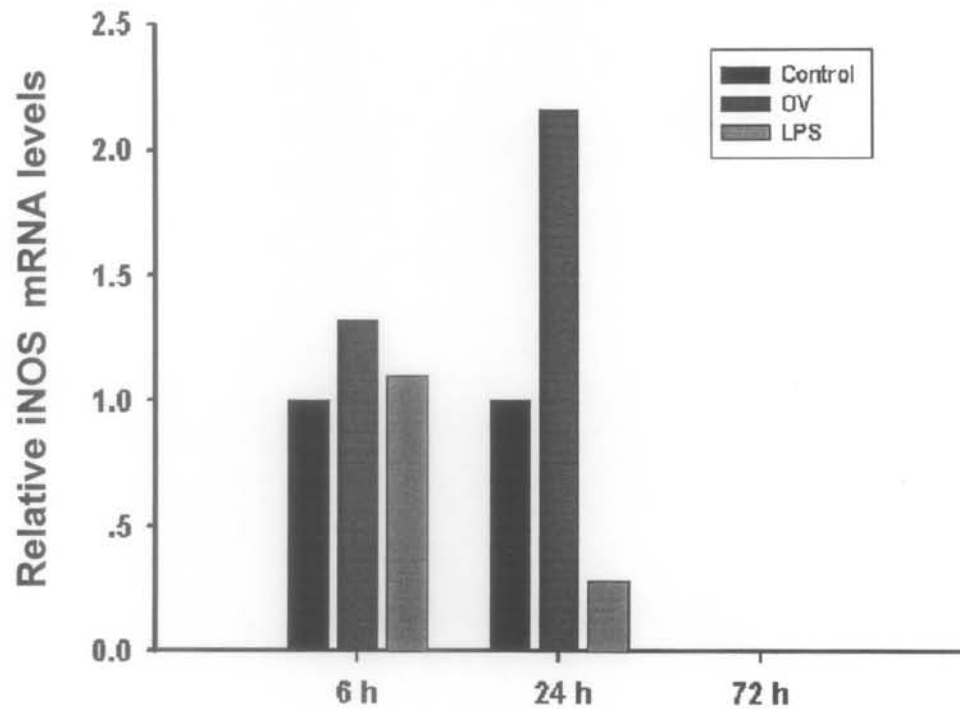
รูปภาพที่ 13 แสดงรูปร่างของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 + 20%FCS (A) เซลล์ที่กระตุ้นด้วย OV crude extract เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไม่ใส่ OV-antigens และ LPS กระตุ้น (B) กระตุ้นด้วย 100 ug/ml of OV-crude extract (C) และ กระตุ้นด้วย 10 ug/ml LPS (D)



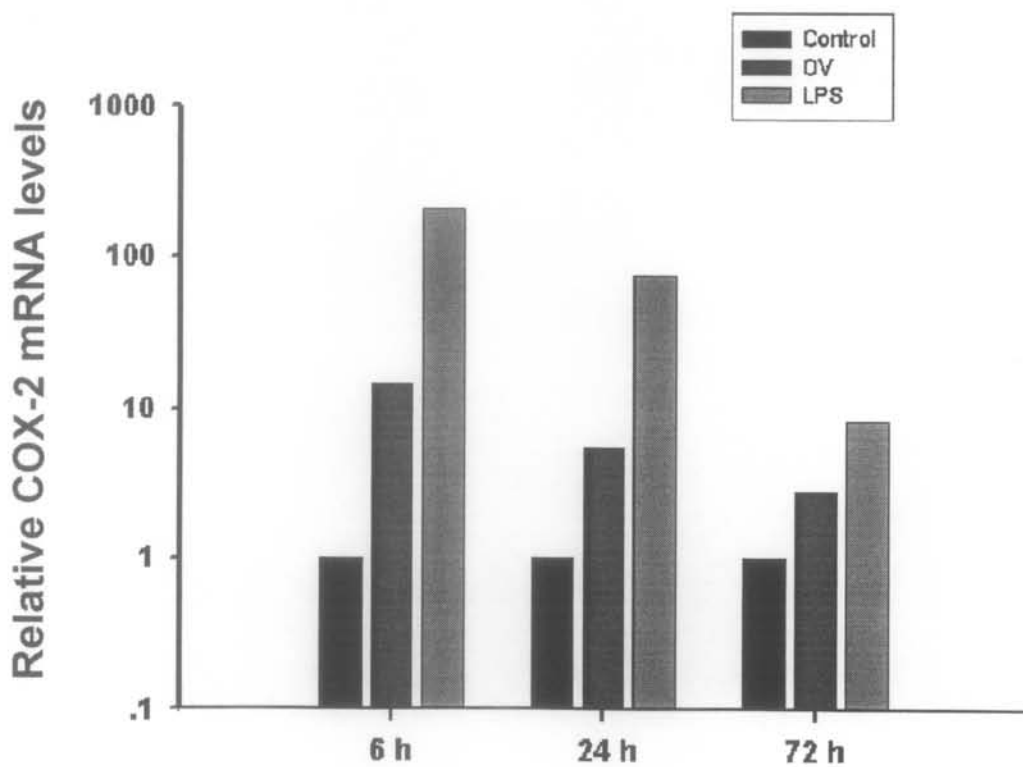
รูปภาพที่ 14 การแสดงออกของจีน TLR-2 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เพาะเลี้ยงและถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับ OV ที่เวลา 6, 24 และ 72 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับ GAPDH ตรวจโดยวิธี real-time RT-PCR analysis



รูปภาพที่ 15 การแสดงออกของจีน NF- κ B ในเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เพาะเลี้ยงและถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับ ที่เวลา 6, 24 และ 72 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับ GAPDH ตรวจโดยวิธี real-time RT-PCR analysis



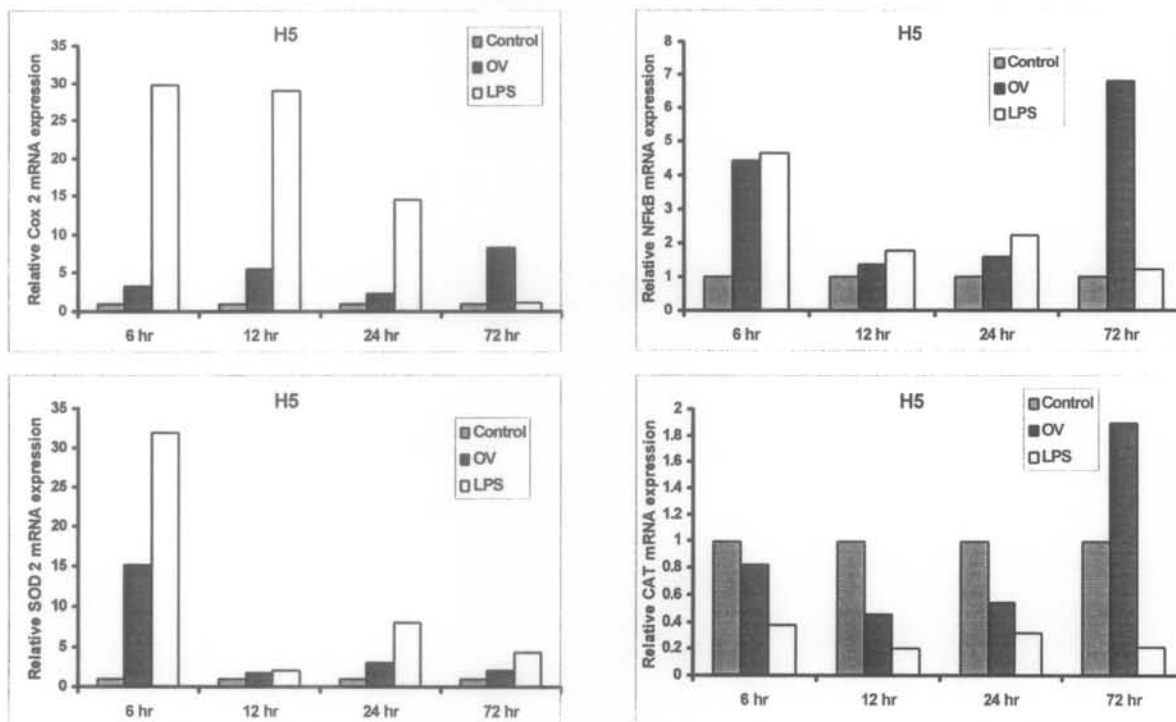
รูปภาพที่ 16 การแสดงออกของจีน iNOS ในเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เพาะเลี้ยงและถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับ ที่เวลา 6, 24 และ 72 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับ GAPDH



รูปภาพที่ 17 การแสดงออกของจีน COX-2 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เพาะเลี้ยงและถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับ ที่เวลา 6, 24 และ 72 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับ GAPDH

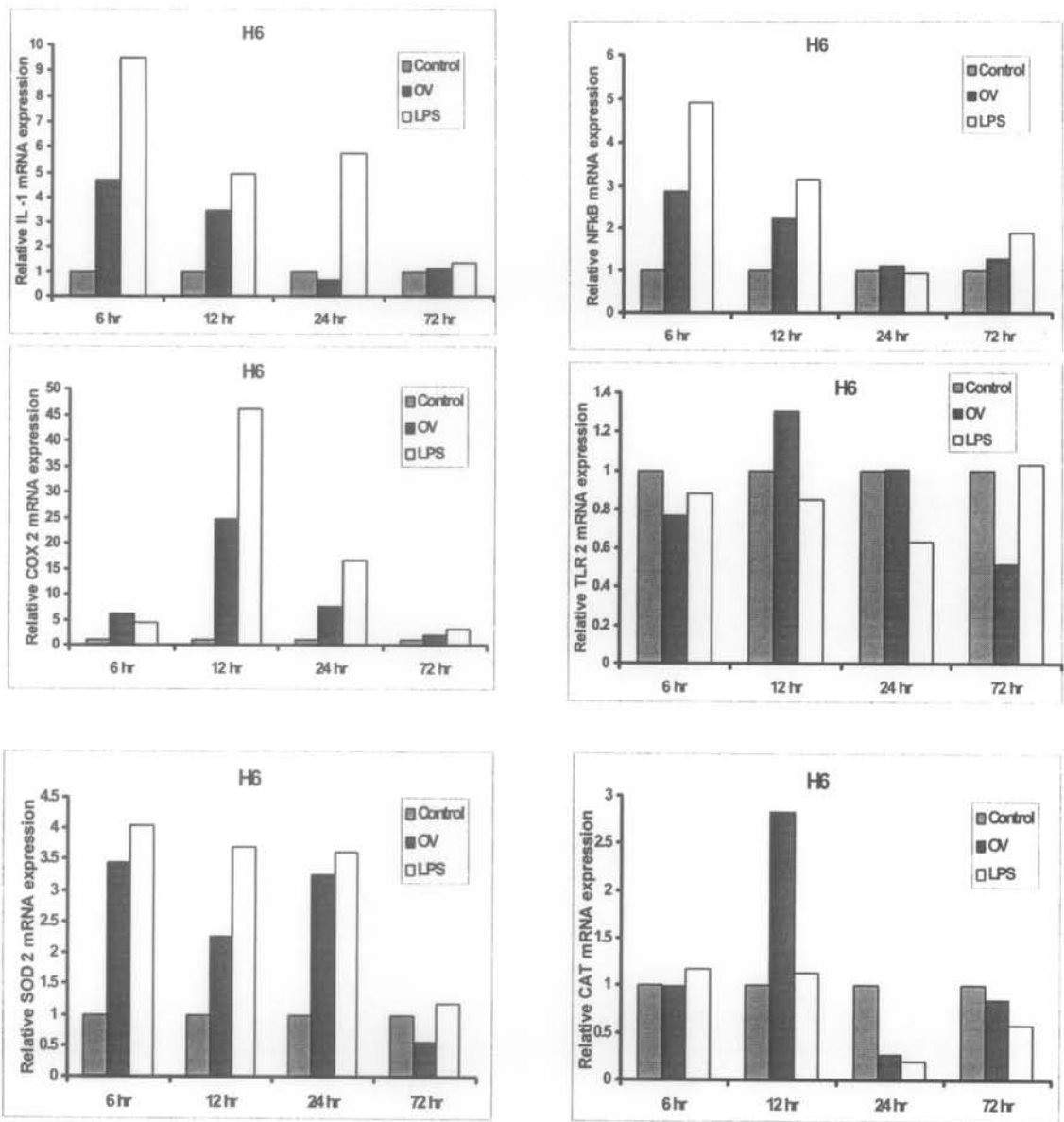
3.2 การแสดงออกของจีน TLR2, COX2, NF-kB, SOD2, CAT และ IL-1 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวเมื่อกระตุ้นด้วย OV crude antigens ตรวจโดยวิธี real-time RT-PCR

3.2.1 ในคนปกติ เมื่อกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนปกติด้วยสารสกัดจากตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้ตับ (OV crude antigens) ความเข้มข้น 100 ug/ml พบว่า OV crude antigens กระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของจีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบและกระบวนการสร้างสารอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ไม่ได้รับการกระตุ้น ผ่านการแสดงออกของจีนต่างๆ ดังต่อไปนี้ IL-1 เป็น inflammatory cytokine ที่จะกระตุ้นให้เกิดกระบวนการอักเสบ รวมถึง TLR2, NFkB และ COX2 ซึ่งเป็นจีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างอนุมูลอิสระ อย่างไรก็ตามเมื่อทำการตรวจวัดปริมาณการแสดงออกของจีน SOD2 และ CAT ซึ่งเป็นจีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต้านอนุมูลอิสระ พบว่า OV crude antigens สามารถกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของจีนกลุ่มนี้เช่นเดียวกัน การแสดงออกของจีนแต่ละจีนจะมีรูปแบบแผนของการแสดงออกที่แตกต่างกัน แต่เมื่อพิจารณาถึงสมดุลของระบบ oxidant/anti-oxidant ในการทดลองนี้ใช้ค่า Relative COX2/CAT mRNA expression เป็นตัวบ่งชี้สมดุลดังกล่าว พบว่าสัดส่วนการแสดงออกของจีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารอนุมูลอิสระมีมากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระ แสดงให้เห็นว่า OV crude antigens สามารถกระตุ้นให้เกิดภาวะ oxidative stress จากการเสียสมดุลซึ่งส่งผลให้มีเหนี่ยวนำให้เกิดการกระตุ้นการแสดงออกของจีนที่เกี่ยวข้องกับระบบ oxidant มากกว่าระบบ antioxidant นอกจากนี้แล้วจากผลการทดลองพบว่า รูปแบบของภาวะ oxidative stress ในเม็ดเลือดขาวนั้นจะค่อยๆสูงขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นด้วย OV crude antigens และสูงสุดที่ 12-24 ชั่วโมงหลังการกระตุ้น จากนั้นภาวะ oxidative stress จะค่อยๆลดต่ำลงซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากกระบวนการ cell repairing ผ่านการแสดงออกของจีน SOD2 และ CAT โดยที่การกระตุ้น oxidative stress นั้นน่าจะเป็นผลมาจากการกระตุ้นผ่านทาง TH1 cytokine คือ IFN-g จากนั้นกระตุ้นให้เกิดกระบวนการอักเสบผ่านการแสดงออกของยีน IL1 ถึงอย่างไรก็ตามภาวะ oxidative stress ที่เกิดขึ้นนั้นไม่รุนแรงเมื่อเทียบกับคนไข้ที่ติดพยาธิใบไม้ตับ

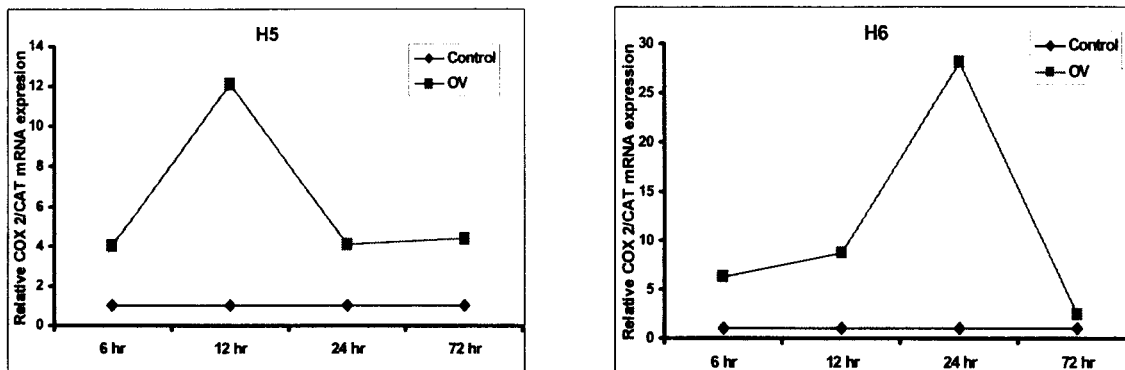


รูปภาพที่ 18 แสดง Relative mRNA expression ของจีน COX2, NF-kB, SOD และ CAT ในเม็ดเลือดขาวของคนปกติที่ถูกกระตุ้นด้วย OV crude antigens ในเวลาต่าง ๆ กัน ของคนปกติอาสาสมัครหมายเลข H5, Control: เม็ดเลือดขาวที่เพาะเลี้ยงในอาหาร RPMI-1640 ที่มี 20% fetal calf serum gold และ 1% penicilin+streptomycin, OV: เม็ดเลือดขาวที่เพาะเลี้ยงในอาหาร RPMI-1640 ที่มี 20% fetal calf serum gold และ 1% penicilin+streptomycin ร่วมกับ 100 ug/ml ของ OV crude antigens, LPS: เม็ดเลือดขาวที่เพาะเลี้ยงในอาหาร RPMI-1640 ที่มี 20% fetal calf serum gold และ 1% penicilin+streptomycin ร่วมกับ 1ug/ml ของ lipopolysacaride (LPS) ในการทดลองนี้ใช้เป็น positive control ผลการแสดงผลของจีนคำนวณแบบ relative Ct method เปรียบเทียบกับ GAPDH การแสดงผลของจีน NF-kB และ COX2 แสดงออกตั้งแต่ 6-72 ชั่วโมง และสูงสุดที่ 72 ชั่วโมง ส่วนการแสดงผลของจีน SOD2 และ CAT เพิ่มขึ้นตั้งแต่ 6-72 ชั่วโมง และสูงสุดที่ 6 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ

จจ
QH
447
ส239

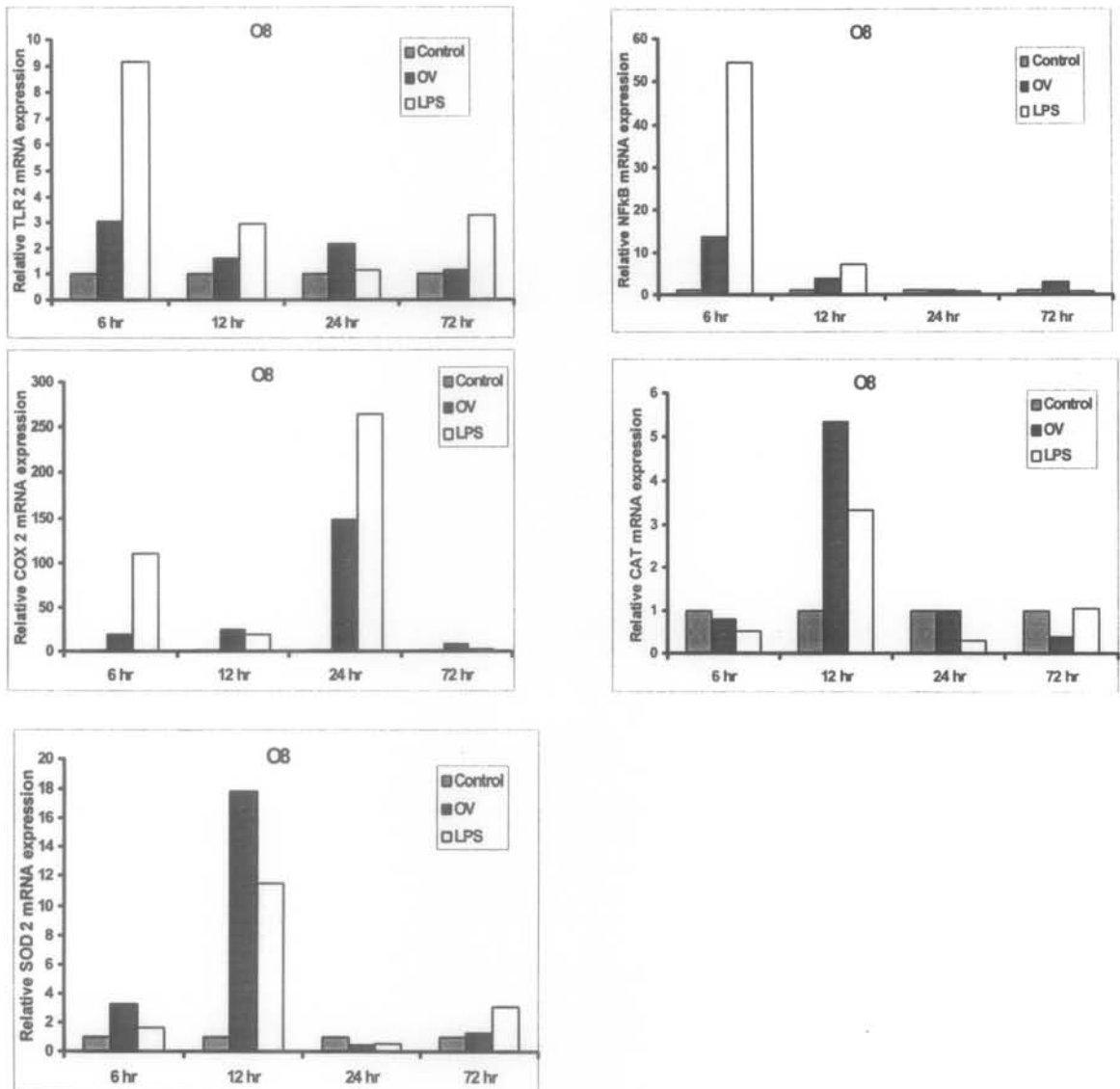


รูปภาพที่ 19 แสดง Relative mRNA expression ของยีน IL-1, COX2, TLR2, NF-kB, SOD และ CAT ในเม็ดเลือดขาวของคนปกติที่ถูกกระตุ้นด้วย OV crude antigens ในเวลาต่าง ๆ กันของคนปกติอาสาสมัครหมายเลข H6 ภาวะการเพาะเลี้ยงเซลล์ของ control, OV และ LPS และการคำนวณเหมือนกับคำอธิบายในรูปภาพที่ 18 ผลการแสดงผลของ IL-1 และ NF-kB นั้นถูกกระตุ้นให้แสดงออกสูงสุดที่ 6 ชั่วโมง การแสดงออกของยีน COX2 และ TLR2 สูงสุดที่ 12 ชั่วโมง ส่วนการแสดงออกของยีน SOD2 สูงสุดที่ 6 ชั่วโมง แต่ถูกยับยั้งที่ 72 ชั่วโมงหลังการกระตุ้น การแสดงออกของยีน CAT สูงสุดที่ 12 ชั่วโมง แต่ถูกยับยั้งการแสดงผลที่ 24 และ 72 ชั่วโมง

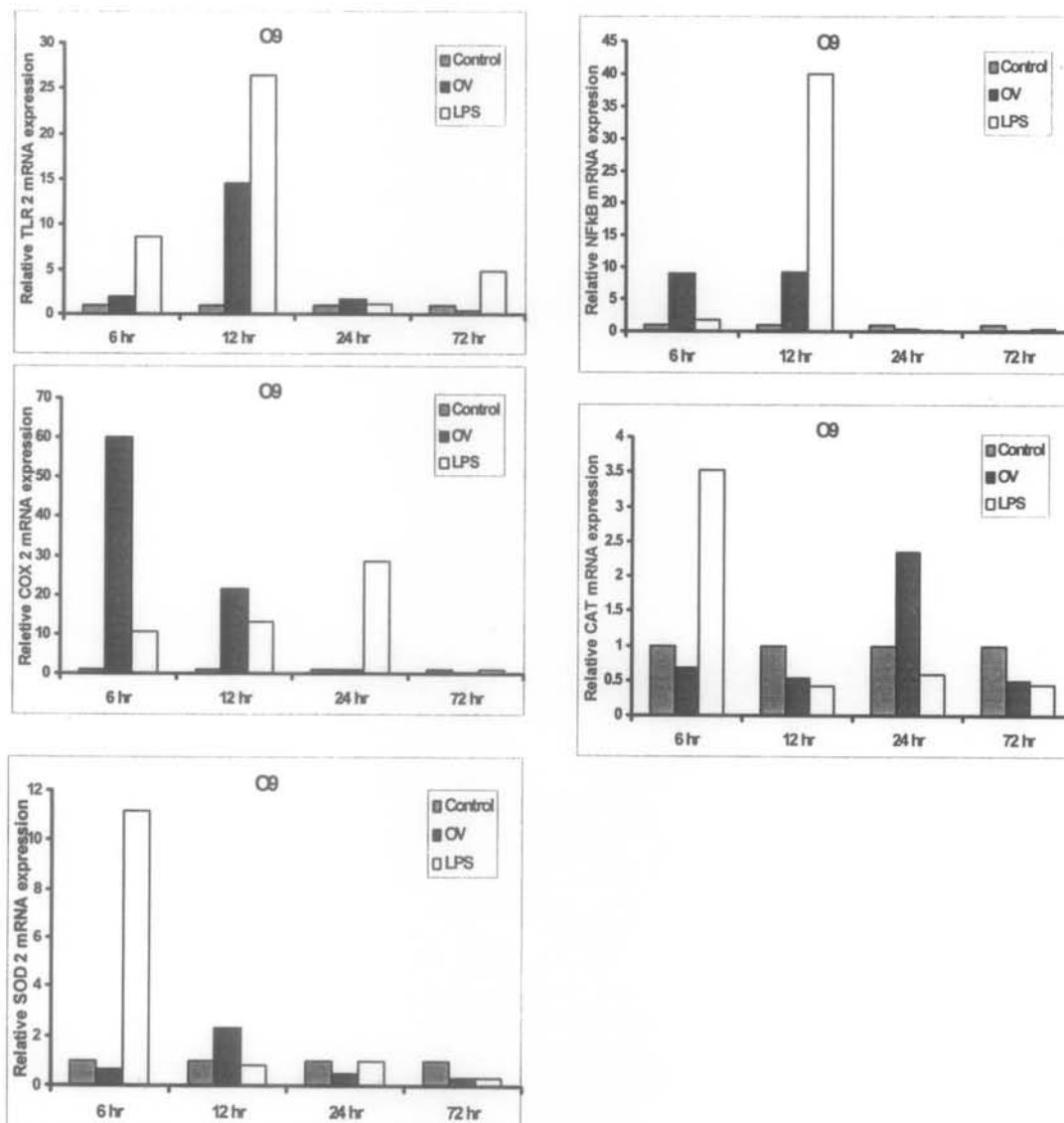


รูปภาพที่ 20 แสดงแบบแผนของการตอบสนองของ Relative COX2/CAT mRNA expression ตัวบ่งชี้ภาวะ oxidative stress ในอาสาสมัครคนปกติหมายเลข H5 และ H6 ที่ถูกกระตุ้นด้วย OV crude antigens พบว่า อัตราส่วนของการแสดงออกในระดับ mRNA ของ COX-2/CAT, prooxidant/antioxidant เพิ่มขึ้น 12 และ 26 เท่า เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมของเซลล์ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้น โดยพบว่าเวลา 12 และ 24 ชั่วโมงหลังการกระตุ้นตามลำดับ

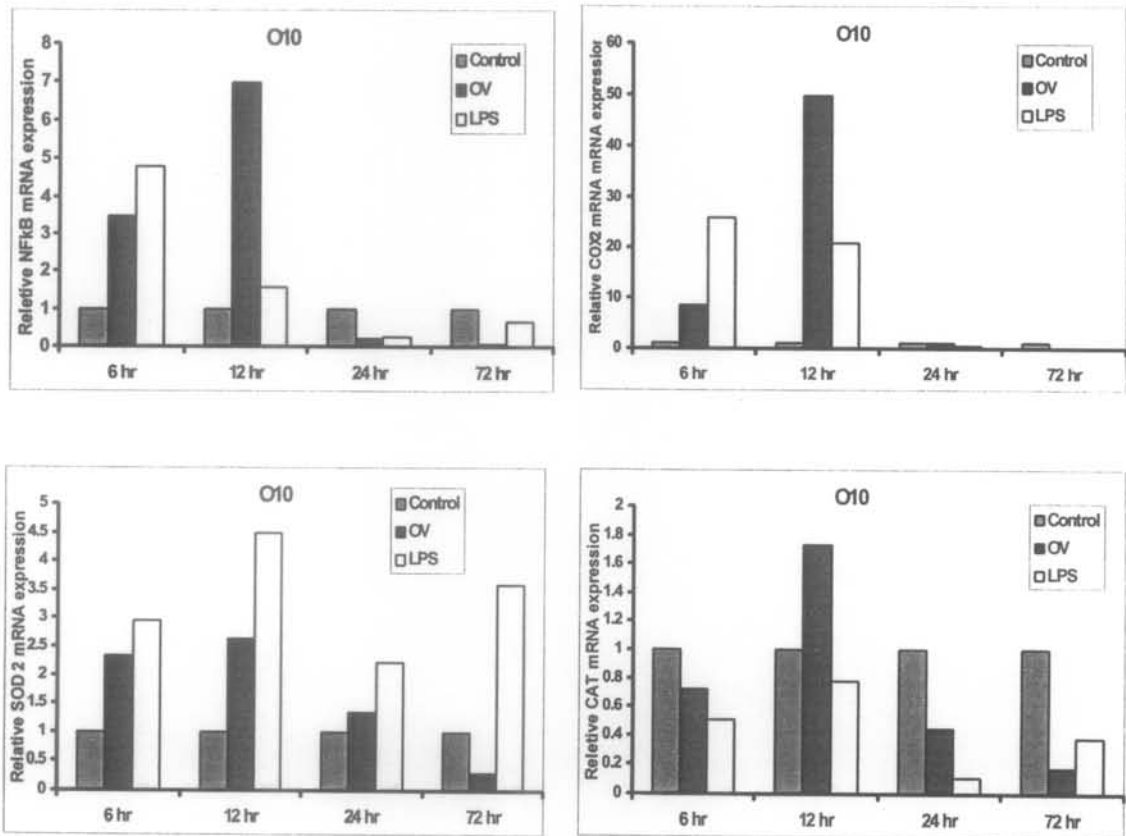
3.2.2 ในคนที่ติดพยาธิใบไม้ตับ OV เมื่อกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนที่ไม่ติดพยาธิใบไม้ตับด้วยสารสกัดจากตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้ตับ (OV crude antigens) ความเข้มข้น 100 ug/ml พบว่า OV crude antigens กระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบและกระบวนการสร้างสารอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ไม่ได้รับการกระตุ้น ผ่านการแสดงออกของยีนต่างๆ ดังต่อไปนี้ IL-1, TLR2, NFkB และ COX2 ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างอนุมูลอิสระ อย่างไรก็ตามเมื่อทำการตรวจวัดปริมาณของการแสดงออกของยีน SOD2 และ CAT ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต้านอนุมูลอิสระ พบว่า OV crude antigens สามารถกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีนกลุ่มนี้เช่นเดียวกัน โดยแบบแผนของการแสดงออกของยีนเหล่านี้คล้ายกับในคนปกติ แต่เมื่อพิจารณาถึงสมดุลของระบบ oxidant/anti-oxidant ในการทดลองนี้ใช้ค่า Relative COX2/CAT mRNA expression พบว่ามีสัดส่วนเพิ่มเป็น 140, 90, 30, และ 40 เท่าเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และสูงกว่าในคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังพบว่าความเร็วของการตอบสนองในแต่ละคนแตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะระบบภูมิคุ้มกันของแต่ละบุคคลแตกต่างกัน



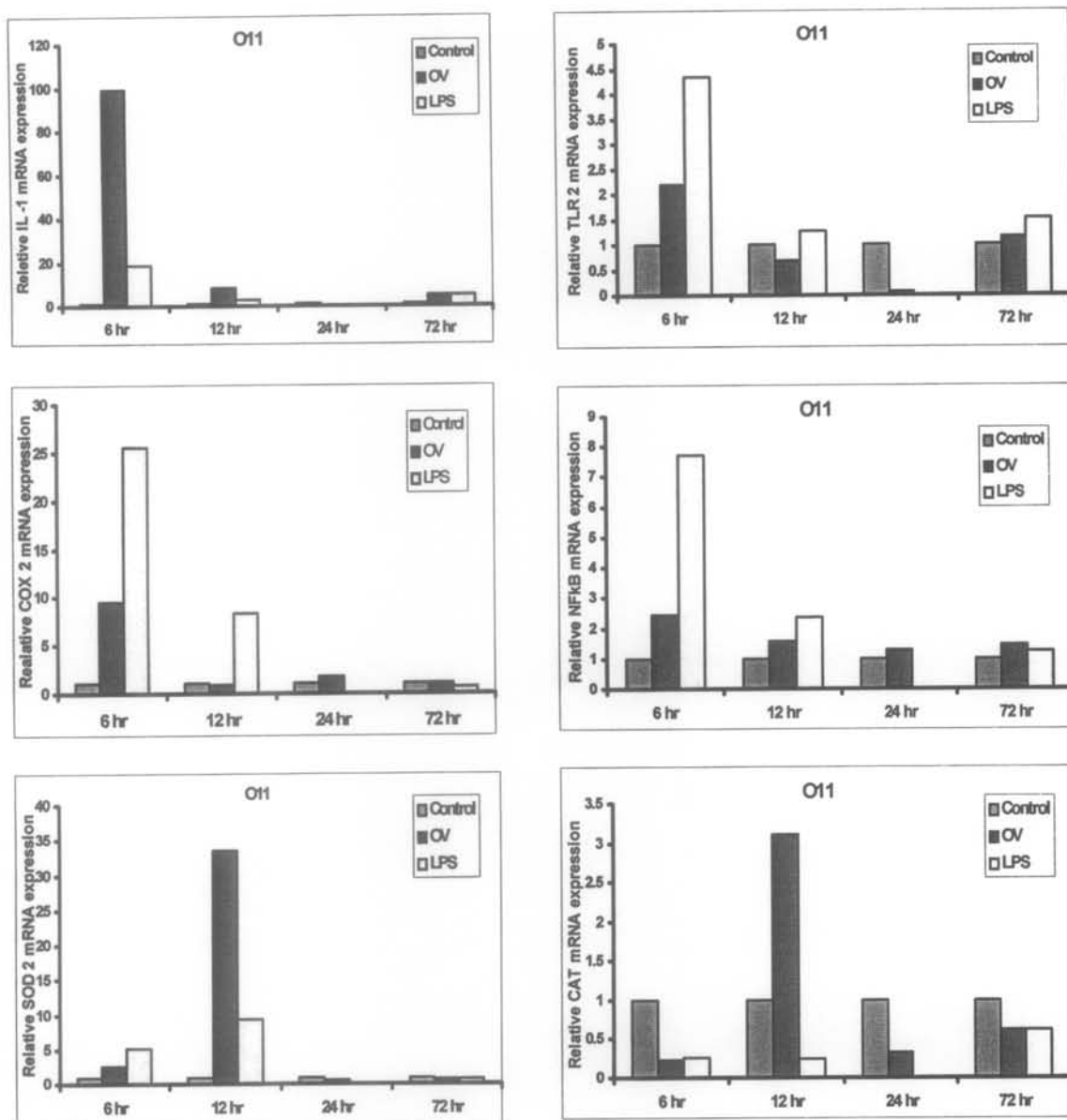
รูปภาพที่ 21 แสดง Relative mRNA expression ของยีน TLR2, NF- κ B COX2 , SOD2 และ CAT ในเม็ดเลือดขาวของคนทีติดพยาธิใบไม้ตับ OV ถูกกระตุ้นด้วย OV crude antigens ในเวลาต่างๆกัน ในอาสาสมัครหมายเลข O8 ภาวะการเพาะเลี้ยงเซลล์ของ control, OV และ LPS และการคำนวณเหมือนกับคำอธิบายในรูปภาพที่ 18 การแสดงออกของยีน TLR2 และ NF- κ B สูงสุดที่ 6 ชั่วโมง การแสดงออกของยีน SOD2 และ CAT สูงสุดที่ 12 ชั่วโมง และการแสดงออกของยีน COX-2 สูงสุดที่ 24 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่า การแสดงออกของยีน CAT ถูกยับยั้งที่ 72 ชั่วโมง



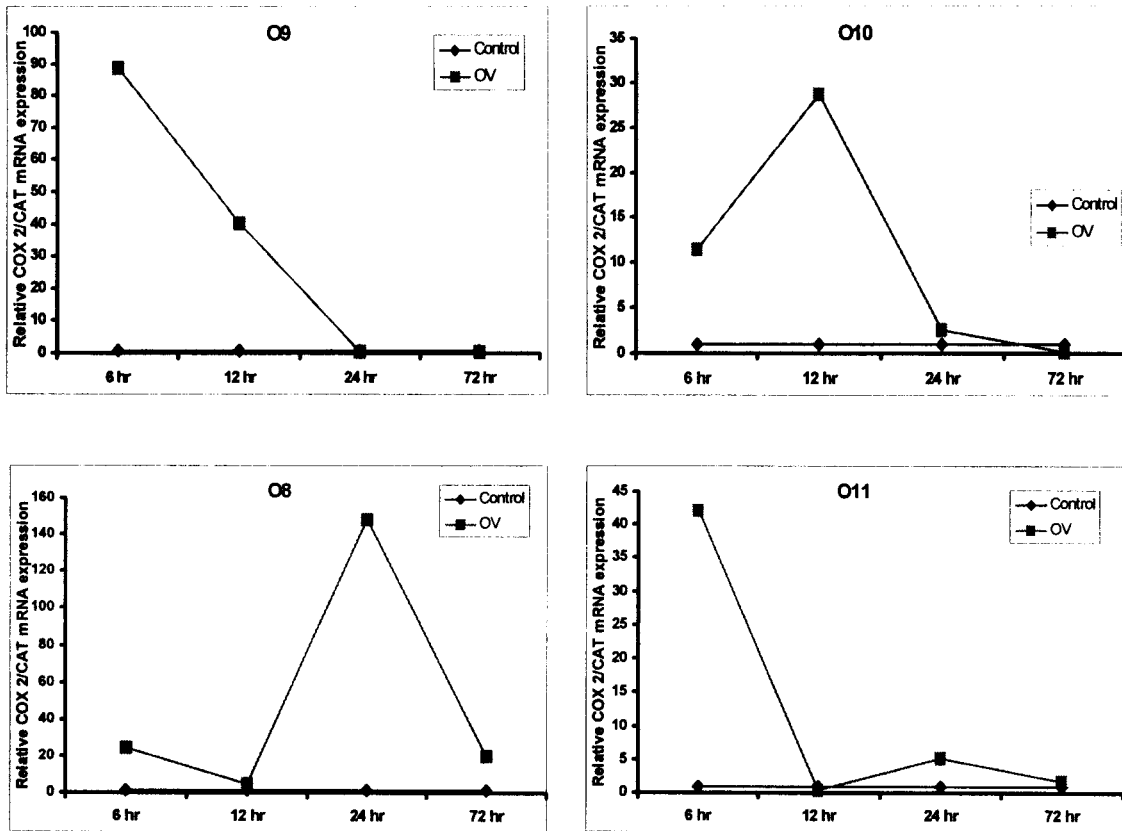
รูปภาพที่ 22 แสดง Relative mRNA expression ของจีน TLR2, NFkB COX2 , SOD และ CAT ในเม็ดเลือดขาวของคนที่ติดพยาธิใบไม้ตับ OV ถูกกระตุ้นด้วย OV crude antigens ในเวลาต่าง ๆ กัน ของอาสาสมัครหมายเลข O9 ภาวะการเพาะเลี้ยงเซลล์ของ control, OV และ LPS และการคำนวณเหมือนกับคำอธิบายในรูปภาพที่ 18 พบว่าการแสดงออกของจีนเหล่านี้มีทั้งแสดงออกเพิ่มสูงขึ้น และถูกยับยั้งการแสดงออกในเวลาที่แตกต่างกัน



รูปภาพที่ 23 แสดง Relative mRNA expression ของยีน NF-kB, COX2, SOD และ CAT ในเม็ดเลือดขาวของคนทีติดพยาธิใบไม้ตับ OV ถูกกระตุ้นด้วย OV crude antigens ในเวลาต่างๆกัน ของอาสาสมัครหมายเลข O10 ภาวะการเพาะเลี้ยงเซลล์ของ control, OV และ LPS และการคำนวณเหมือนกับคำอธิบายในรูปภาพที่ 18 การแสดงออกของยีนพบว่า การแสดงออกของยีน NF-kB, COX-2 และ SOD2 นั้นถูกกระตุ้นให้แสดงออกสูงขึ้นตั้งแต่ 6 ชั่วโมงแรก และระดับสูงสุดที่ 12 ชั่วโมง ส่วนที่ 72 ชั่วโมง การแสดงออกจะต่ำกว่ากลุ่มควบคุม การแสดงออกของยีน CAT นั้นถูกกระตุ้นสูงสุดที่ 12 ชั่วโมง ส่วนที่เวลาอื่นพบว่ามีการแสดงออกต่ำกว่ากลุ่มควบคุม



รูปภาพที่ 24 แสดง Relative mRNA expression ของจีน TLR2, NF-kB, COX2, SOD และ CAT ในเม็ดเลือดขาวของคนไข้ที่ติดพยาธิใบไม้ตับ OV ถูกกระตุ้นด้วย OV crude antigens ในเวลาต่างๆกัน ของอาสาสมัครหมายเลข O11 ภาวะการเพาะเลี้ยงเซลล์ของ control, OV และ LPS และการคำนวณเหมือนกับคำอธิบายในรูปภาพที่ 18 พบว่าการแสดงออกของจีน IL-1, TLR-2, COX-2 และ NF-kB แสดงออกสูงสุดที่ 6 ชั่วโมง ส่วนการแสดงออกของ SOD2 และ CAT สูงสุดที่ 12 ชั่วโมง และต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่เวลา 24-72 ชั่วโมง หลังการกระตุ้นด้วย OV crude antigens



รูปภาพที่ 25 แสดงรูปแบบของการตอบสนองของ Relative COX2/CAT mRNA expression ตั้ว บ่งชี้ภาวะ oxidative stress ในอาสาสมัครคนที่ติดพยาธิใบไม้ตับ OV ถูกกระตุ้นด้วย OV crude antigens ในเวลาต่างๆกัน พบว่าแต่ละคนมีความเร็วและแบบแผนของการตอบสนองแตกต่างกัน และมีระดับของอัตราส่วนสูงมากเป็น 90, 30, 140 และ 40 เท่า เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

Output ที่ได้จากโครงการ

โครงการวิจัยนี้นอกจากจะสามารถตีพิมพ์ผลงานวิจัยในวารสารวิชาการระดับนานาชาติแล้ว ยังเป็นการพัฒนานักวิจัยผู้รับทุน และสามารถผลิตนักวิจัยหน้าใหม่ได้ดังนี้

1. เป็นการส่งเสริมการวิจัยแก่นักวิจัยผู้รับทุน ให้สามารถผลิตผลงานวิจัยอย่างต่อเนื่องหลังจากจบการศึกษาในระดับปริญญาเอก และเป็นการพัฒนานักวิจัยผู้รับทุนเองโดยสามารถเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาหลักแก่นักศึกษาในระดับบัณฑิตศึกษา จนกระทั่งสามารถผลิตนักวิจัยหน้าใหม่ให้สำเร็จการศึกษาในระดับปริญญาโทสาขาปรสิตวิทยา จำนวน 2 คน นอกจากนี้ยังเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วมแก่นักศึกษาในระดับปริญญาเอกสาขาชีวเคมีอีกจำนวน 3 คน และปัจจุบันเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาหลักของนักศึกษาในระดับปริญญาเอกสาขาปรสิตวิทยา จำนวน 1 คน และคาดว่าจะในปีการศึกษาใหม่นี้จะมีนักศึกษาในระดับปริญญาโท สาขาปรสิตวิทยา อีกจำนวน 1 คน

2. ผลิตนักวิจัยหน้าใหม่

โครงการวิจัยนี้สามารถผลิตนักวิจัยหน้าใหม่ ภายใต้โครงการคปก.สาขาชีวเคมีทางการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ของ รศ.ดร.พวงรัตน์ ยงวณิชย์ ซึ่งเป็น mentor แก่ผู้วิจัย จำนวน 2 คน คือ

1.1 การศึกษาในสัตว์ทดลองเป็นส่วนหนึ่งในวิทยานิพนธ์ของนางสาวสมคิด เดชะคำภู ปัจจุบันกำลังศึกษาในระดับปริญญาเอก ชั้นปีที่ 4

1.2 การศึกษาในคนเป็นส่วนหนึ่งในวิทยานิพนธ์ของนางสาวเรณู ทานนท์ ปัจจุบันกำลังศึกษาในระดับปริญญาเอก ชั้นปีที่ 5 และคาดว่าจะสำเร็จการศึกษาในปีการศึกษานี้ ประมาณเดือน เมษายน 2551

3. ได้องค์ความรู้ใหม่

- ได้องค์ความรู้ในการตอบสนองของเซลล์อักเสบต่อแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับ OV ผ่านกระบวนการอักเสบและมีการสร้างอนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์ ไปทำลายสารชีวโมเลกุลและก่อพยาธิสภาพของโรคตามมา ผ่านการแสดงออกของจีน TLR2, NF-kB แล้วมีการแสดงออกของ iNOS และ COX2

- ได้ทราบถึงบทบาทของจีน iNOS, COX-2, NF-kB, SOD1, SOD2, GPx และ CAT ในกระบวนการก่อมะเร็งท่อน้ำดีที่เกิดจากพยาธิใบไม้ตับผ่านกระบวนการอักเสบ ซึ่งข้อมูลนี้จะได้นำมาทดลองหาสารเพื่อนำมาป้องกันโรคมะเร็งท่อน้ำดีต่อไป

4. ผลงานวิจัยสามารถตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

4.1 ตีพิมพ์เผยแพร่ไปแล้ว 1 เรื่อง

Pinlaor, S., Tada-Oikawa, S., Hiraku, Y., Pinlaor, P., Ma, N., Sithithaworn, P., and Kawanishi, S. (2005). *Opisthorchis viverrini* antigen induces the expression of Toll-like receptor 2 in macrophage RAW cell line. *Int J Parasitol* 35(6), 591-6.

4.2 คาดว่าจะตีพิมพ์เผยแพร่อีก 2 เรื่อง

1. Synergistic effect of *Opisthorchis viverrini* infection and *N*-nitrosodimethylamine on the expression of iNOS, NF-kappaB and COX-2 in an animal model of cholangiocarcinoma. โดยจะส่งไปตีพิมพ์ที่ *Carcinogenesis* หรือ *Cancer Science*
2. Induction of mRNA expression involving in oxidative and nitrative stress in white blood cells co-cultured with *Opisthorchis viverrini* antigen คาดว่าจะตีส่งไปตีพิมพ์ที่: *Int J Parasitol*

5. กิจกรรมอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง ได้แก่

ผลงานอื่น ๆ เช่นการไปเสนอผลงาน การได้รับเชิญไปเป็นวิทยากร

1. นำเสนอผลการวิจัยแบบโปสเตอร์ในการประชุมเพื่อเสนอผลงานวิจัยของนักวิจัยรุ่นใหม่ และพบกับเมธีวิจัยอาวุโส สกว. เมื่อเดือนตุลาคม 2549 เรื่อง “Synergistic effect of *Opisthorchis viverrini* infection and *N*-nitrosodimethylamine on the expression of iNOS, NF-kappaB and COX-2 in an animal model of cholangiocarcinoma” โดย Somchai Pinlaor et, al.

2. นำเสนอผลการวิจัยแบบโปสเตอร์ในการประชุมระดับนานาชาติ APOCP ที่กรุงเทพฯ เมื่อวันที่ 3-4 พฤศจิกายน 2549 นี้เรื่อง “induction of mRNA expression involving in oxidative and nitrative stress in white blood cells co-cultured with *Opisthorchis viverrini* crude extract” โดย Raynoo Thanan et, al. และได้รับรางวัลชนะเลิศของการประกวดผลงานในการนำเสนอแบบโปสเตอร์

3. ผู้วิจัยเป็นวิทยากรในการประชุมอบรมเชิงปฏิบัติการปรสตีวิทยาครั้งที่ 3-4 ในวันที่ 3-4 พฤษภาคม 2550 และวันที่ 17-18 พฤษภาคม 2550 นี้ ที่คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยเป็นวิทยากรในหัวข้อเรื่อง “กลไกการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีจากการติดพยาธิใบไม้ตับ: จากอดีตจนถึงปัจจุบัน”

4. ผู้วิจัยใช้เป็นข้อมูลประกอบการเรียนการสอนในระดับบัณฑิตศึกษา แก่นักศึกษาระดับปริญญาโท-เอกสาขาปรสตีวิทยา

- รหัส 364 702 วิชา Advanced Parasitology ในหัวข้อ กลไกการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี บรรยายจำนวน 2 ชั่วโมง

- รหัส 364 703 วิชา Experimental Parasitology ในหัวข้อ การเพาะเลี้ยงพยาธิใบไม้ และประโยชน์การนำมาใช้ บรรยายจำนวน 1 ชั่วโมง ปฏิบัติการ 12 ชั่วโมง