บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

ในสิ่งแวดล้อมธรรมชาติ การติดเชื้อปรสิต trypanosome ในตัวปลาเกิดขึ้นเมื่อมีปลิงที่มีเชื้อปรสิต trypanosome มาดูดเลือดปลา โดยขณะที่กำลังดูดเลือดจะมีการถ่ายทอดปรสิตให้แก่ตัวปลา หลังจากนั้นปรสิตจะมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนในกระแสเลือดของตัวปลา (Woo, 1981) ซึ่งเป็นลักษณะเดียวกับการทดลองครั้งนี้ แต่การทดลองในครั้งนี้ทำให้ปลาติดเชื้อปรสิต trypanosome โดยการฉีดตัวปรสิตเข้าไป พบปรสิตในกระแสเลือดเป็นครั้งแรกเมื่อเวลาผ่านไป 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นปรสิต trypanosome จะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อยๆ กระทั่งมีจำนวนประมาณ 10^7-10^8 ตัว/มิลลิลิตร ปลาส่วนหนึ่งที่ไม่สามารถทนต่อปรสิตได้ก็จะตาย เช่นเดียวกับการทดลองของ Woo (1981) ที่พบว่าในของเหลวหรือน้ำช่องท้องของปลาที่ตายมีปริมาณ trypanosome อยู่ประมาณ $4.3x10^7$ ตัว/มิลลิลิตร ส่วนปลาที่รอดชีวิตก็จะมีความสามารถในการกำจัดปรสิตออกจากกระแสเลือดได้ โดยปรสิตจะค่อยๆ ลดจำนวนลงจนไม่พบปรสิตในกระแสเลือด ซึ่งใช้เวลาตั้งแต่ 9-27 วันขึ้นกับตัวปลา แต่การทดลองก่อนหน้านี้พบว่าปลาทองใช้เวลามากกว่า 48 วัน (Lom, 1973) ปลา plaice ใช้เวลาประมาณ 70 วัน (Woo, 1981) และใช้เวลามากกว่า 65 วัน (Wang and Belosevic, 1994) นอกจากนี้ Wang และ Belosevic (1994) กล่าวว่า การตายของปลาอาจลดลงได้ ถ้าปลาได้รับปรสิตจำนวนน้อยลง โดยทดลองฉีด *T. danilewskyi* จำนวน $0.5x10^6$ $1.0 x10^6$ และ $2.0 x10^6$ ตัว/มิลลิลิตร ให้กับปลาทองพบว่ามีอัตราการตายร้อยละ 29.2 43.8 และ 68.8 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าเมื่อทดลองฉีดปรสิต trypanosome จำนวน $1.0x10^7$ ตัว/มิลลิลิตร พบปลาตายร้อยละ 50 และ 80 แต่ถ้าฉีดปรสิตจำนวน $1.0x10^5$ ตัว/มิลลิลิตร พบปลาตายเพียงร้อยละ 20 เท่านั้น เช่นเดียวกับการทดลองของ Nazrul Islam และ Woo (1991) ซึ่งไม่พบการตายของปลาทอง ที่ได้รับ *T. danilewskyi* จำนวนน้อย (3,800 ปรสิต/ตัวปลา) แต่ถ้าปลาได้รับจำนวนปรสิตมากขึ้น ($1.0x10^5$ ปรสิต/มิลลิลิตร) ปลาก็จะตาย อาจเนื่องจากปรสิตปริมาณต่ำๆ ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันมีเวลาพอเพียงในการตอบสนองต่อการติดเชื้อปรสิตและสามารถกำจัดปรสิตได้

จากการศึกษาชนิดและปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาวในเลือดปลาดุกพันธ์ผสม ก่อนและหลังจากได้รับสารทดสอบ 1 สัปดาห์ สามารถตรวจพบเซลล์เม็ดเลือดขาว 4 ชนิด ได้แก่ ทรอมโบซัยท์ ลิมโฟซัยท์ นิวโตรฟิล และโมโนซัยท์ แต่ไม่พบเม็ดเลือดขาวชนิดอีโอซิโนฟิล และ

เบโซฟิล ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาชนิดของเซลล์เม็ดเลือดขาวในปลาดุกด้านที่ไม่พบเบโซฟิล และอีโอซิโนฟิล ในระบบการหมุนเวียนเลือด (ชะลอ และคณะ 2530) แต่จากการศึกษาในปลากดอเมริกัน (Williams and Warner, 1976) และปลาเทราท์ (Anderson, 1974) สามารถพบทั้งเบโซฟิล และอีโอซิโนฟิล ในขณะที่ Fijan (2002) ศึกษาในปลากดอเมริกันด้วย ปรากฏว่าไม่พบเบโซฟิล

การศึกษาจำนวนเม็ดเลือดขาว พบว่า จำนวนเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนซัยท์ ในกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับ sonicated antigen และกลุ่มที่ได้รับ Freund's แอดจูแวนท์ มีจำนวนลดลง โดยกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับ Freund's แอดจูแวนท์ มีจำนวนโมโนซัยท์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ อาจจะเป็นผลมาจาก โมโนซัยท์ออกไปยังบริเวณช่องท้องตรงที่ฉีดสาร เหมือนกับกลุ่มที่ได้รับ sonicated antigen ที่ลดลงบ้าง แต่ไม่มากเท่ากับกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับ Freund's แอดจูแวนท์ แต่กลุ่มที่ได้รับ sonicated antigen ผสม Freund's แอดจูแวนท์ กลับมีปริมาณมากขึ้น และพบว่า จำนวนของนิวโตรฟิลก่อนและหลังทดลองมีลักษณะเดียวกับโมโนซัยท์ แสดงว่า sonicated antigen อาจมีผลไปกระตุ้นให้เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันเช่น T-cell สร้างสารไปกระตุ้นให้มีการสร้าง นิวโตรฟิลและโมโนซัยท์มากขึ้น เช่น Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) เช่นเดียวกับในสัตว์ชั้นสูง (สุทธิพันธ์, 2529; Kanellos *et al*., 1999) ส่วนจำนวนลิมโฟซัยท์ในกลุ่มที่ได้รับ sonicated antigen และ sonicated antigen ผสม Freund's แอดจูแวนท์จะลดลง ขณะที่กลุ่มอื่นเพิ่มขึ้น ซึ่งต่างกับในสัตว์ชั้นสูงที่ ถ้าหากได้รับสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน จำนวนลิมโฟซัยท์จะเพิ่มขึ้น อาจเป็นไปได้ว่าในปลา เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารที่เป็นแอนติเจนลิมโฟซัยท์อาจเข้าไปอยู่ในอวัยวะของระบบภูมิคุ้มกันเช่น ไตส่วนหน้า และม้าม

ผลการศึกษาความสามารถในการจับกินของเม็ดเลือดขาวจากปลาที่ได้รับการฉีด sonicated antigen พบว่าปลากลุ่มที่ได้รับ sonicated antigen และ sonicated antigen ผสม Freund's แอดจูแวนท์ มีเปอร์เซ็นต์ฟาโกซัยโตซีสสูงกว่ากลุ่มควบคุม แสดงว่า sonicated antigen มีผลทำให้เกิดกระบวนการจับกิน (phagocytosis) ดีขึ้น ซึ่งเป็นกระบวนการตอบสนองภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (non-specific immunity) (ไหม, 2543) ส่วน Freund's แอดจูแวนท์ ไม่มีผลในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ เนื่องจากเปอร์เซ็นต์ฟาโกซัยโตซีส ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม Kaushik (1999) กล่าวว่า มาโครฟาจมีบทบาทในการต่อต้านโรค trypanosomiasis โดยไนตริกออกไซด์ (nitric oxide) ที่ผลิตโดยมาโครฟาจสามารถทำให้ปรสิต trypanosome แตกสลาย

การศึกษาการหาแอนติเจนที่จะใช้เป็นวัคซีนในครั้งนี้มีการเตรียมแอนติเจน 2 แบบคือ ใช้ความร้อน 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (heat-killed antigen) และการทำให้เซลล์ของ

ปรสิตแตกโดยใช้เครื่อง sonicator (sonicated antigen) พร้อมทั้งผสมแอดจูแวนท์คือ เบต้า-กลูแคน (ผสมกับ heat-killed antigen) และ complete and incomplete freund's oil adjuvant (ผสมกับsonicated antigen) แล้วนำไปฉีดให้ปลา จากการทดลองใช้ heat-killed antigen พบว่ากลุ่มที่ได้รับ heat-killed antigen มีจำนวนปรสิตน้อยที่สุด แต่ในกลุ่มที่ได้รับ heat-killed antigen ผสมเบต้า-กลูแคน กลับมีมากกว่ากลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามจำนวนปรสิตในทุกกลุ่มทดลองมีค่าใกล้เคียงกัน แสดงว่า heat-killed antigen ไม่ได้เพิ่มความสามารถในการกำจัดเชื้อปรสิต ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Evans และ Lumsden (1979 อ้างโดย Bienek *et al*., 2002) พบว่าปลาทองที่ได้รับ trypanosome ซึ่งฆ่าด้วยความร้อนไม่ประสบความสำเร็จในการป้องกัน ส่วนการทดลองใช้ sonicated antigen นั้น พบว่าจำนวน trypanosome ในกระแสเลือด เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อและอัตราการเพิ่มขึ้นของกลุ่มที่ได้รับ sonicated antigen และ sonicated antigen ผสม Freund's แอดจูแวนท์ น้อยกว่ากลุ่มควบคุม ส่วนการกำจัดเชื้อปรสิตจะดีกว่าในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับ Freund's แอดจูแวนท์ แต่ไม่มีความแตกต่างกัน หลังจากไม่พบปรสิตในกระแสเลือด 1 สัปดาห์ทำการฉีดปรสิตซ้ำจำนวน $1.0x10^5$ ตัว/มิลลิลิตร พบว่าส่วนใหญ่ไม่ติดเชื้อปรสิตซ้ำ จากปลา 32 ตัว มีการติดเชื้อปรสิต 13 ตัว และมีเพียง 2 ตัวเท่านั้นที่ติดเชื้อมากกว่า 1 วัน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Woo (1981) กล่าวไว้ว่า ปลาที่รอดชีวิตจากการติดเชื้อจะมีภูมิคุ้มกันเป็นเวลานาน และไม่กลับมาติดเชื้อปรสิตชนิดเดิมอีก

จากผลการทดลองทั้งหมดในครั้งนี้ยังไม่อาจกล่าวได้ว่าแอนติเจนที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้สามารถใช้เป็นวัคซีนที่ดีได้ จึงควรมีการศึกษาการตอบสนองภูมิคุ้มกันด้านเซลล์เพิ่ม หรืออาจต้องหาวิธีเตรียมแอนติเจนแบบอื่น เพื่อที่จะสามารถกระตุ้นให้เกิด immunoprotection ต่อเจ้าบ้านโดยนำไปใช้ประโยชน์ในการป้องกันและควบคุมการเกิดโรค trypanosomiasis เช่นรายงานการทดลองพบว่ามีการใช้ส่วนประกอบต่างๆ ของปรสิต trypanosome เตรียมเป็นแอนติเจนดังนี้ flagellar pocket antigen (Mkunza *et al*., 1995) excretory-secretory product (Bienek, 2002) ทูบูลิน (tubulin) ที่แยกได้จากแฟลกเจลลา (Lubega, 2002) แอนติเจนที่เตรียมโดยการนำตัวปรสิตมาแช่แข็ง-ละลาย (freeze-thraw) สลับกันหลายๆ ครั้ง (Cuna *et al*., 2002) และการแยกโปรตีนส่วนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 64 กิโลดาลตัน (kDa) จาก *T. cruzi* (Uzcanga *et al*., 2002) สำหรับแอดจูแวนท์ ทั้งเบต้า-กลูแคน และ Freund's แอดจูแวนท์ เพียงอย่างเดียวไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดภูมิต้านทานต่อปรสิตได้ โดยดูจากผลการทดลองเรื่องความสามารถในการการจับกินของเม็ดเลือดขาว และความสามารถในการกำจัดเชื้อ ซึ่งต่างกับ Bayne และ Gerwick (2001) ที่กล่าวว่า แอดจูแวนท์เพียงอย่างเดียวสามารถชักนำให้เกิดการต้านทานเชื้อโรค (pathogen) สูง

โดยสันนิษฐานว่า อาจจะไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะที่อยู่ในร่างกายมาแต่กำเนิด (innate immune system)

เมื่อนำซีรัมปลาในระยะต่างๆ มาตรวจหาแอนติบอดีโดยวิธี passive hemagglutination พบว่า ในระยะก่อนทดลองไม่พบค่าแอนติบอดี และในแต่ละระยะให้ค่าแอนติบอดีที่ต่ำคือ อยู่ในช่วง 1:2-1:128 ซึ่งแตกต่างจากใช้ excretory-secretory ในการกระตุ้นปลาทอง เมื่อนำซีรัมมาตรวจสอบโดยวิธี ELISA ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวกว่า พบว่าปลาที่ถูกกระตุ้นด้วย excretory-secretory ผสม Freund's complete adjuvant หลังจากได้รับการกระตุ้นครั้งที่ 2 และ 3 มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น 20 เท่าจากกลุ่มควบคุม (Bienek, 2002) แต่จากการศึกษาครั้งนี้ ปริมาณแอนติบอดีที่พบจะแตกต่างกันมาก ซึ่งไม่สามารถอธิบายกลไกการเกิดแอนติบอดีในแต่ละกลุ่มการทดลอง อาจเนื่องจากปลาที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ แม้ว่าจะซื้อจากบ่อเลี้ยงเดียวกัน แต่ก็ไม่สามารถแน่ใจได้ว่ามาจากพ่อแม่เดียวกันทั้งหมด ควรใช้สัตว์ทดลองที่เป็น inbred คือมีการผสมพันธุ์ในพ่อแม่เดียวกัน หรือครอบครัวอย่างน้อย 20 generation เพื่อที่จะได้มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกัน อย่างไรก็ตามปลาสามารถสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจน trypanosome ที่ใช้ทดลองได้

จากการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อปรสิต trypanosome ครั้งนี้พบว่า สามารถผลิตได้ โดยการฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกระต่ายด้วย sonicated antigen ผสมรวมกับ Freund's แอดจูแวนท์ กระต่ายที่ถูกกระตุ้น 2 ครั้ง สามารถผลิตแอนติบอดีต่อปรสิต trypanosome ได้ต่ำกว่ากระต่ายที่ได้รับการกระตุ้น 3 ครั้ง จะสังเกตเห็นว่า ปริมาณแอนติบอดีต่อ sonicated antigen ของtrypanosome ทั้งในปลา และกระต่ายให้ค่าไตเตอร์ที่ค่อนข้างต่ำ อาจเป็นเพราะมีความเป็นแอนติเจนที่ไม่ดี และโครงสร้างโมเลกุลที่ไม่ซับซ้อน แต่ไม่ใช่เพราะมีโมเลกุลขนาดเล็ก เพราะจากการทำ SDS-PAGE พบว่าแอนติเจนประกอบด้วยโปรตีน 3 แถบ โดยมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 72.3 56.07-46.33 และ 32.30-24.00 kDa ซึ่งคล้ายกับการศึกษาขนาดของโมเลกุลของแอนติเจนที่เป็น soluble ของ *T. cruzi* ซึ่งเตรียมโดยนำ trypanosome ไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้ละลาย ทำเช่นนี้สลับกัน 4 ครั้ง พบว่าให้แถบโปรตีนอยู่ในช่วง 14-100 kDa แต่แอนติเจนส่วนใหญ่ของ *T. cruzi* จะมีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า 43 kDa (Cuna *et al*., 2000)

การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีเพื่อที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาแอนติเจนจากซีรัมปลา พบว่าไม่ประสบผลสำเร็จ อาจเป็นเพราะว่า ปริมาณแอนติบอดีของกระต่ายต่อปรสิต

trypanosome ที่ใช้ตรวจมีค่าไตเตอร์เพียง 1:80 เมื่อตรวจโดยวิธี Dot-blot ELISA หรือ trypanosome ชนิดนี้ไม่มีแอนติเจนในซีรัม

บทที่ 5

สรุป

จากการศึกษาการผลิตวัคซีนและโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อปรสิต trypanosome ในปลาดุกพันธ์ผสมครั้งนี้ สามารถสรุปได้ว่า

1. sonicated antigen ร่วมกับ Freund's แอดจูแวนท์ ให้ผลในการกำจัดปรสิตได้ดีกว่า heat-killed antigen ร่วมกับเบต้า-กลูแคน
2. sonicated antigen เพิ่มความสามารถในการจับกินของเม็ดเลือดขาว และสามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีได้ทั้งในปลา และกระต่าย แต่เป็นปริมาณที่ค่อนข้างต่ำ
3. หลังจากที่ปลาดุกพันธ์ผสมเคยได้รับเชื้อปรสิต trypanosome ไม่มีการติดเชื้อปรสิตซ้ำ หรือติดเพียง 1 วันหลังจากได้รับเชื้อ
4. โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตเพื่อตรวจหาแอนติเจน ในซีรัมปลา พบว่าไม่สามารถตรวจพบแอนติเจนในซีรัมปลาโดยวิธี Dot-Blot ELISA