

## บทที่ 5

### อภิปรายผลการทดลอง

การศึกษารูปแบบโปรตีนของพยาธิปากขอในงานวิจัยนี้ มุ่งศึกษาความซับซ้อนขององค์ประกอบโปรตีน ในตัวแก่พยาธิปากขอชนิด *N.americanus* ทั้งตัวผู้และตัวเมียแยกเป็นรายตัวแต่ในการศึกษา อื่นๆ เช่นของ Pritchard และคณะ (1990) จะทำโดยรวมตัวอย่างพยาธิ(pool)หลายๆ ตัวในแต่ละเพศ หรือ ในระยะต่างๆ ของวงจรชีวิตเข้าด้วยกัน นอกจากนี้การเก็บตัวอย่างที่ใช้ศึกษา ยังเก็บตัวอย่างพยาธิจากโฮสต์เฉพาะ (definite host) ตามธรรมชาติ ขณะที่การศึกษาอื่น ๆ ได้ตัวอย่างพยาธิจากที่เพาะเลี้ยงไว้นสัตว์ทดลอง Carr และ Pritchard (1986) ได้กล่าวยอมรับว่าการศึกษาของเขาซึ่งได้ตัวอย่างพยาธิ *N.americanus* รุ่นที่ 75 ที่เพาะเลี้ยงไว้ในห้องทดลองนั้น รูปแบบของโปรตีนหรือแอนติเจน ที่เขาใช้อยู่นั้น ไม่เพียงแต่มีความแตกต่างของ phenotype เท่านั้นแต่มี genotype variation ด้วย ซึ่งทำให้แตกต่างจากปรสิตในธรรมชาติมาก สังเกตได้ง่าย ๆ จากการที่ขนาดของพยาธิที่เลี้ยงในห้องทดลองมีขนาดเล็กลง

วิธีการเก็บตัวอย่างพยาธิจากธรรมชาติโดยตรงสำหรับการศึกษานี้ ทำโดยให้ยาขับพยาธิ Albendazole แก่ผู้ป่วยที่ติดเชื้อพยาธิปากขอแล้วคัดเลือกตัวแก่พยาธิปากขอออกจากอุจจาระ ทำความสะอาดถึง อย่างน้อย 20 ครั้ง ก่อนจะแยกเก็บพยาธิแต่ละตัวไว้ใน  $-20^{\circ}\text{C}$  และทุกขั้นตอนระหว่างการทดลองกระทำภายใต้  $4^{\circ}\text{C}$  ดังนั้นองค์ประกอบโปรตีนรวมทั้งกรดไขมันในตัวพยาธิคงจะไม่สูญเสีย บนเป็นอนหรือเปลี่ยนแปลงจากยา Albendazole เนื่องจากกลไกการออกฤทธิ์ของ Albendazole ซึ่งเป็นยา ในกลุ่ม Benzimidazole ออกฤทธิ์โดยขัดขวางการ polymerization ของ tubulin ซึ่งเป็นองค์ประกอบของ cytoskeleton microtubule (Lacey, 1990)

ดังนั้นรูปแบบโปรตีนของตัวแก่พยาธิปากขอที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ เป็นรูปแบบโปรตีนจากตัวพยาธิซึ่งได้จากโรสส์ตามธรรมชาติคือ จากคนโดยตรง จึงน่าจะมีการศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนของพยาธิจากการเลี้ยงในห้องทดลอง กับของพยาธิจากธรรมชาติต่อไป

เนื่องจากศึกษารูปแบบโปรตีนในพยาธิแต่ละ 1 ตัว ซึ่งมีความเข้มข้นโปรตีนรวมระหว่าง 200-1,000 มค.ก./มล.ต่อ 1 ตัว พยาธิและปริมาณโปรตีนที่ใช้ในการแยกด้วย SDS-PAGE ใช้ 1.4 มค.ก ต่อ 1 ช่องเจล ทำให้มีตัวอย่างเหลือเก็บเพื่อศึกษาเพิ่มเติมในครั้งต่อไป และเนื่องจากปริมาณโปรตีนที่ใช้น้อยจึงเลือกใช้ Silver stain ซึ่งสามารถย้อมติดโปรตีน 0.01 นาโนกรัมต่อพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตร (Merril และคณะ, 1981) แล้วย้อมสีทับด้วย Coomassie blue R ซึ่งจะช่วยให้ความไวการติดสีของโปรตีนอีกประมาณ 10 เท่า นั่นคือ โปรตีน 20 พิโคกรัม ก็จะย้อมติดสีเห็นเป็นแถบได้ นอกจากนี้ glycoprotein และ lipoprotein จะติดสีเทาๆ และ น้ำตาลเหลืองตามลำดับ

การเปรียบเทียบจำนวนแถบโปรตีนทั้งหมดที่ได้จากการศึกษาตัวแก่พยาธิปากขอตัวผู้กับตัวแก่พยาธิปากขอตัวเมียพบว่า จำนวนแถบของโปรตีนที่พบในตัวแก่พยาธิปากขอตัวเมียมีมากกว่าตัวแก่พยาธิปากขอตัวผู้ ซึ่งต่างจากผลที่พบในพยาธิใบไม้ในเลือดที่ได้ตัวอย่างจากประเทศฟิลิปปินส์ และที่ได้จากเกาะพอร์โมซา ซึ่งพบว่าแถบโปรตีนในตัวผู้มากกว่าตัวเมีย ตัวผู้พบ 23,29 แถบ ขณะที่ตัวเมียพบเพียง 26,25 แถบ ตามลำดับ (Ruff และคณะ, 1973) ถึงแม้พยาธิใบไม้ในเลือด มีการแบ่งเพศชัดเจนเช่นเดียวกับพยาธิปากขอ จึงเป็นไปได้ว่าเทคนิคการย้อมซึ่งใช้สีต่างกันคือการศึกษาพยาธิใบไม้ในเลือดย้อมด้วย Aniline blue black และแยกด้วย disc electrophoresis อาจจะไวไม่เท่า เอสดีเอส เพจ และย้อมสีเงินทับด้วย Coomassie blue ดังที่ใช้ในงานวิจัยนี้ หรือจำนวนแถบที่ต่างนี้เกิดเนื่องจากพยาธิปากขอแม้จะมีรูปร่างกลมคล้ายกันแต่อยู่ต่างกลุ่ม (Phylum) กับพยาธิใบไม้ในเลือด และหรือ เนื่องจากตัวเมียของพยาธิปากขอมีขนาดใหญ่กว่าตัวผู้ แต่ตัวผู้ของพยาธิใบไม้ในเลือดมีขนาดใหญ่กว่าตัวเมียเช่นกัน จึงพบจำนวนแถบของโปรตีนในตัวผู้ได้มาก

จากผลการศึกษารูปแบบโปรตีนของตัวแก่พยาธิปากขอ 38 ตัวโดยเทคนิค SDS-PAGE ซึ่งพบความซับซ้อนและหนาแน่นมากของแถบโปรตีนในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 31.5-66.2 Kd เหมือนๆ กันในพยาธิปากขอตัวแก่ทุกตัวที่ศึกษา โปรตีนน้ำหนักโมเลกุล 40 Kd เป็นอีกแถบหนึ่งซึ่งพบในพยาธิปากขอทั้งตัวผู้และตัวเมีย แต่ในพยาธิปากขอตัวเมียแต่ละตัวนั้นความเข้มของการติดสีจะแตกต่างกัน ซึ่งยืนยันความต่างนี้ด้วยการวัดโดยเดนซิโตมิเตอร์ การศึกษาของ วิไล สักดีศิริสัมพันธ์ และคณะ (2529) ซึ่งศึกษารูปแบบโปรตีนจากตัวอ่อนระยะติดต่อของพยาธิตัวจิ๊ดไม่พบแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 66.2 Kd ขึ้นไป แต่พบโปรตีนในช่วง 31.5-66.2 Kd ซึ่งมีความเข้มของการติดสีและความถี่ของแถบคล้ายๆ กับงานวิจัยนี้ จึงสันนิษฐานว่าแถบโปรตีน ซึ่งมีปริมาณค่อนข้างมาก และมากชนิดที่อยู่ในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 31.5-66.2 Kd ที่พบในตัวหนอนพยาธิตัวกลมหลายชนิด คงจะเป็นโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของผิวพยาธิ การศึกษาของ Pritchard และคณะ (1988) ได้หาองค์ประกอบโปรตีน ส่วนผิวของพยาธิปากขอ *N.americanus* พบว่าเป็นแถบโปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุล 14, 47, 40, 55, 67, 42 และ 100 Kd และเป็นโปรตีน Collagen เชื่อมติดกันด้วยพันธะ disulphide ส่วนใหญ่ (ซึ่งเหมือนกับพยาธิตัวกลมชนิดอื่น ๆ จำนวนมาก) ที่ทำในพยาธิปากขอ

โปรตีน MW ประมาณ 17 Kd พบเป็นแถบหนาและติดสีเข้ม เป็นองค์ประกอบที่พบในตัวแก่พยาธิปากขอทุกตัวและพบในพยาธิตัวกลมชนิดอื่น ๆ ด้วยไม่ว่าการแยกโปรตีนจะใช้วิธีการอิเล็กโตรโฟรีซิสที่มีหรือไม่มีสารรีดิวส์ (A.Dharmkrong-AT และ S.Sirishina, 1983) ดังนั้นแถบโปรตีนน้ำหนักโมเลกุล 17 Kd จึงน่าจะเป็นโปรตีนแบบโซ่เดี่ยว (single chain) และโปรตีนนี้อาจจะมีความสำคัญและสามารถสกัดไปสำหรับใช้ศึกษาพัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยพยาธิปากขอ โดยนำหลักการทางอิมมูโนวินิจฉัยต่อไป

ผลการเปรียบเทียบความต่างในรูปแบบโปรตีนที่พบในพยาธิปากขอตัวผู้กับตัวเมีย จำนวนแถบ และความเข้มของการติดสีของโปรตีนในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 97.5–200 Kd ในตัวแก่พยาธิปากขอตัวผู้มีน้อยกว่าตัวเมีย และโดยเฉพาะแถบโปรตีนน้ำหนักโมเลกุล 200 Kd นั้นไม่พบในตัวผู้เลย แต่พบในตัวแก่พยาธิปากขอตัวเมียทุกตัว จึงน่าจะเป็นไปได้ว่าแถบโปรตีนที่น้ำหนัก 200 Kd นี้เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับอวัยวะสืบพันธุ์เฉพาะตัวเมีย

ตัวอย่างพยาธิปากขอที่ใช้ศึกษาเก็บมาจากพื้นที่ 2 แห่งคือ กาญจนบุรี และโรงพยาบาลเวชศาสตร์เขตร้อน ในกรุงเทพมหานคร ซึ่งโรงพยาบาลแห่งนี้รับผู้ป่วยมาจากทุกจังหวัดของประเทศไทย แต่เนื่องจากผู้ทำการศึกษาไม่ได้เก็บข้อมูลสถานที่ติดเชื้อของผู้ป่วย จึงไม่อาจวิเคราะห์รูปแบบโปรตีนของตัวแก่พยาธิปากขอซึ่งอาจแตกต่างกันเนื่องจากสภาพทางภูมิศาสตร์ เช่น การศึกษาของ Ruff และคณะ (1993) พบความแตกต่างทั้งรูปแบบโปรตีนและจำนวนโปรตีนของพยาธิใบไม้ในเลือดซึ่งมาจาก ประเทศญี่ปุ่น เมืองพอร์ตโรมา และประเทศฟิลิปปินส์

ผลการศึกษาครั้งนี้จึงพบว่า ตัวแก่พยาธิปากขอตัวผู้ แต่ละตัวมีความแตกต่างในรูปแบบโปรตีน ตัวแก่พยาธิปากขอตัวเมียแต่ละตัวมีความแตกต่างในรูปแบบโปรตีน นอกจากนี้ตัวแก่พยาธิปากขอตัวผู้และตัวเมียมีแถบโปรตีนที่ต่างกันอย่างชัดเจน ทั้งในด้านจำนวนแถบรวม และมีแถบโปรตีนจำเพาะที่พบเฉพาะตัวเมีย แต่ก็มีแถบโปรตีนบางส่วนซึ่งพบได้ในตัวแก่ของพยาธิปากขอทั้งสองตัว จึงมีประโยชน์ในด้านอนุกรมวิธาน ที่จะทำให้สามารถแบ่งพยาธิปากขอ *N. americanus* ออก เป็นชนิดย่อย ๆ ได้ และยังสามารถศึกษาความสัมพันธ์ ของรูปแบบโปรตีนของพยาธิปากขอ กับความแตกต่างด้านภูมิศาสตร์ของพื้นที่ที่มีอัตราติดเชื้อพยาธิปากขอสูงกับต่ำ เพื่อประโยชน์ในการพัฒนาคุณภาพชีวิตของประชากรในพื้นที่เหล่านั้นให้ดีขึ้น นอกจากนี้ยังสามารถศึกษาความสัมพันธ์ของรูปแบบโปรตีน และการดื้อยาของพยาธิปากขอเพื่อประโยชน์ด้านการพัฒนายาใหม่ต่อไป

การเก็บตัวอย่างพยาธิปากขอจากอุจจาระผู้ป่วยในการศึกษารุ่นนี้ พบพยาธิปากขอชนิด *A. ceylanicum* ตัวผู้และตัวเมียอย่างละ 1 ตัว และจากการศึกษาชนิดของตัวแก่พยาธิปากขอ ของภาควิชาปรสิตวิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้พบ *A. ceylanicum* ในคนไทยบ่อยขึ้นทุกที และพบได้มากกว่า *A. duodenale* เสียอีก ซึ่งยังไม่อาจหาเหตุผลมาสนับสนุนการเพิ่มจำนวนการติดเชื้อ ของพยาธิชนิดนี้ได้ในปัจจุบันอย่างไรก็ดี การศึกษานี้ ไม่ได้ทำการเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนของพยาธิปากขอในคนทั้ง 3 ชนิด เนื่องจากพบพยาธิปากขอชนิด *Ancylostoma* เพียง 3 ตัว การศึกษาของ Fenglin และคณะ (1980) ซึ่งเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนของ *N. americanus*, *A. duodenale*, และ *A. caninum* พบว่าพยาธิ 2 ตัว หลังจะมีแถบโปรตีนเฉพาะชนิดของพยาธิ ซึ่งมีค่า Rf เท่ากับ 0.086 และ 0.635 ตามลำดับ ดังนั้นจึงน่าจะมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อเปรียบเทียบ รูปแบบโปรตีนของพยาธิปากขอที่พบในคนทั้ง 3 ชนิดเป็นรายตัวโดยเฉพาะ *A. ceylanicum* น่าจะมีการศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนของพยาธิในช่วงเวลา และ แหล่งที่พบซึ่งแตกต่างกันด้วย

ผลการศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนของ *N. americanus* อาจ สามารถนำแถบโปรตีน ที่มีความเหมือนหรือความต่างไปมาประยุกต์ใช้ทางด้านการวินิจฉัยโรคซึ่งอาศัยหลักการทางอิมมูโนเรลยี หรือศึกษาทางด้านการระบาดวิทยา ด้านการดื้อยาของพยาธิ และ ด้านอนุกรมวิธาน เพื่อให้เข้าใจถึงชีววิทยาของพยาธิปากขอในคน ต่อไป.

## สรุป

ศึกษารูปแบบโปรตีนพยาธิปากขอ *N.americanus* แต่ละตัวทั้งหมด 38 ตัว เป็นตัวผู้ และตัวเมียอย่างละ 19 ตัว ตัวอย่างพยาธิทั้งหมดได้จากการเก็บแยกจากอุจจาระผู้ป่วย ซึ่งตรวจพบไข่พยาธิปากขอทางห้องปฏิบัติการ และได้รับยาฆ่าพยาธิ Albendazole การเปรียบเทียบองค์ประกอบโปรตีนของพยาธิแต่ละตัว ในตัวเมีย ตัวผู้ และระหว่างตัวเมีย กับตัวผู้ ศึกษาโดยวิธี เอสดีเอส เพจ แล้วย้อมสีด้วย Silver ทับด้วย Coomassie blue พบว่าในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 14.4-200 Kd มีแถบโปรตีนประมาณ 36-42 แถบ โปรตีน น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 17 Kd พบในทุกตัวของพยาธิปากขอ ระดับความเข้มของโปรตีน น้ำหนักโมเลกุล 116 และ 40 Kd สามารถแบ่งกลุ่มพยาธิปากขอตัวเมียได้ 5 กลุ่ม ส่วน การพบและไม่พบแถบโปรตีนน้ำหนักโมเลกุล 82 และ 17 Kd ทำให้สามารถแบ่งกลุ่ม พยาธิปากขอตัวผู้ได้ 3 กลุ่ม แต่แถบโปรตีนน้ำหนักโมเลกุล 200 Kd จะพบเฉพาะในพยาธิ ปากขอตัวเมียเท่านั้น