



เรื่อง

การทดสอบความไวของยาต่อเชื้อลิวมาเนียดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ไทย

(*Leishmania siamensis*)

โดย

รศ. นพ. เผด็จ สิริยะเสถียร

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รศ. นสพ. สนธยา เตียวศิริทรัพย์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

พ.ศ. 2556

กิตติกรรมประกาศ

(Acknowledgement)

งานวิจัยเรื่อง การทดสอบความไวของยาต่อเชื้อไลชมาเนียดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ไทย (*Leishmania siamensis*) สามารถดำเนินการให้สำเร็จได้โดยได้รับการสนับสนุนจาก ทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2556 อีกทั้งได้รับความร่วมมือจากบุคลากร จากหน่วยกีฏวิทยา ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าผลงานวิจัยนี้จะก่อให้เกิดประโยชน์ในการพัฒนาการควบคุม ป้องกันโรคและการรักษาโรคไลชมาเนีย ก่อนที่เชื้อนี้จะแพร่กระจายไปทั่วประเทศและช่วยให้ผู้ป่วย เมื่อที่มีอาการ ได้รับการรักษาที่จำเพาะและรวดเร็วและทันที่

ชื่อโครงการวิจัย การทดสอบความไวของยาต่อเชื้อไลชมาเนียคัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ไทย

(*Leishmania siamensis*)

ชื่อผู้วิจัย เพลิง สิริยะเสถียร และ สนธยา เตียวศิริทรัพย์

เดือน และ ปี ที่ทำวิจัยเสร็จ เมษายน 2557

บทคัดย่อ

ปัจจุบันโรคไลชมาเนียที่เกิดจากเชื้อ *Leishmania siamensis* ในผู้ป่วยที่อาศัยอยู่ในประเทศไทยมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น ซึ่งพบทั้งในผู้ป่วยที่มีระดับภูมิคุ้มกันปกติ และผู้ป่วยที่มีระดับภูมิคุ้มกันบกพร่อง นอกจากนี้ยังมีผู้ที่ติดเชื้อแต่ยังไม่มีอาการแสดงออกมาซึ่งไม่ทราบจำนวนอีกด้วย การรักษาผู้ป่วยเหล่านี้ในประเทศไทยมีเพียงยา Amphotericin B ซึ่งพบว่ามียอัตรากลับเป็นซ้ำสูง คณะผู้วิจัยจึงเห็นว่าควรต้องมีการทดสอบความไวของเชื้อไลชมาเนียในประเทศไทยต่อยาชนิดอื่นๆ ซึ่งมีผลในการกำจัดเชื้อนี้ได้ เพื่อการรักษาผู้ป่วยอย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งจากการศึกษานี้ได้ทำการศึกษาทั้งสองระยะคือ ระยะ Promastigote และ Amastigote จากตัวอย่างเชื้อที่แยกได้จากไขกระดูกและชิ้นเนื้อของผู้ป่วย โดยเชื้อที่แยกได้จากชิ้นเนื้อนั้นมาจากผู้ป่วยรายเดิมซึ่งเกิดการกลับเป็นโรคซ้ำอีกครั้ง ผลการทดสอบพบว่าเชื้อไลชมาเนียระยะ Promastigote และ ระยะ Amastigote ที่แยกได้จากชิ้นเนื้อนั้นมีค่า IC50 มากกว่าเชื้อไลชมาเนียทั้งสองระยะที่แยกได้จากไขกระดูกประมาณสองเท่า ส่วนยา Miltefosine และ Pentamidine ให้ผลไปในทางเดียวกันทั้งจากการแยกเชื้อได้จากไขกระดูกและชิ้นเนื้อ ต่อมาได้ทำการศึกษากับยีนที่คือยา Amphotericin B คือ ยีน SCMTA และ γ -GCS พบว่าอาจจะมีการดื้อยาเกิดขึ้นในเชื้อที่แยกได้จากชิ้นเนื้อเมื่อเทียบกับการศึกษาก่อนหน้านี้ และการศึกษาการคัดแปลงพันธุกรรมของเชื้อ *L. siamensis* โดยใช้ยีนที่ได้รับการอนุเคราะห์จากต่างประเทศได้ผลไม่ติดกับเชื้อ *L. siamensis* ผู้วิจัยหวังว่าผลงานนี้จะมีประโยชน์อย่างมากในการรักษาและควบคุมโรคก่อนที่จะมีการกระจายของโรคไปทั่วประเทศ

Project Title Drug sensitivity in genetically transformed *Leishmania siamensis*

Name of the Investigators Padet Siriyasatien and Sonthaya Tiawsirisup

Year 2014

Abstracts

Autochthonous leishmaniasis cases in Thailand are dramatically increased. The disease was found in both immunocompetent and immunocompromise hosts and then asymptomatic are not investigated. In Thailand, amphotericin B (AmB) is only used in the treatment, and recurrent after amphotericin B treatment. Nevertheless, the study of antileishmanial drug sensitivity has not been determined for *L. siamensis* yet. In this study we determined the sensitivity of the antileishmanial drug sensitivity by using colorimetric by rezasurin base assay in the *In vitro* and *Ex vivo* of *L. siamensis*. The results revealed that Amphotericin B showed approximately two-fold higher in the isolated from tissue of relapse case than bone marrow in both stages of *L. siamensis*, but Miltefosine and Pentamidine were not different in each isolation. The results confirmed with the expression patterns of the two transcripts of gene SCMTA and γ -GCS are found that *L. siamensis* may be resist to the Amphotericin B as the same previously reported, absence of ergosterol. *L. siamensis* transformed with plasmid vector contained GFP was not stable. We hope this study could be useful in the improvements in diagnosis and treatment of leishmaniasis before the spread of the disease across the country, and help patients when the symptoms occur and given prompt treatment.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ii
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	iii
สารบัญตาราง	v
สารบัญรูปภาพ	vi
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	viii
บทนำ	1
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
วิธีดำเนินการวิจัย	24
ผลการทดลอง	35
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	53
เอกสารอ้างอิง	54

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 ยาเคมีบำบัดที่ใช้ในการรักษาโรคโลหิตมาเนีย 18

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่ PCR 26

ตารางที่ 3.2 แสดง Thermal cycler condition 26

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบและสัดส่วนของสารที่ใช้ในการทำให้เกิดปฏิกิริยาเชื่อมต่อ 28

ตารางที่ 4.1 ค่า % Inhibition ที่คำนวณได้จากคูคกลินแสง Fluorescence
จากการทดสอบความไวต่อยาแต่ละชนิดในเชื้อโลหิตมาเนียระยะ
Promastigote โดยใช้สี Resazurin หรือ PrestoBlue® reagent 44

ตารางที่ 4.2 ค่า % Inhibition ที่คำนวณได้จากคูคกลินแสง Fluorescence
จากการทดสอบความไวต่อยาแต่ละชนิดในเชื้อโลหิตมาเนียระยะ
Amastigote โดยใช้สี Resazurin หรือ PrestoBlue® reagent 45

ตารางที่ 4.3 แสดงค่า IC 50 ของยาแต่ละชนิดต่อเชื้อโลหิตมาเนียระยะ Promastigote
และ ระยะ Amastigote 46

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพที่ 2.1 เชื้อลิวมาเนียในระยะ Amastigotes ย้อมด้วยสี Giemsa	5
ภาพที่ 2.2 ระยะ Promastigotes จากเพาะเลี้ยงเชื้อลิวมาเนียจากไขกระดูก ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Schneider's insect medium	5
ภาพที่ 2.3 วงจรชีวิตของเชื้อลิวมาเนีย	6
ภาพที่ 2.4 ลักษณะของรีนฝอยทราย	9
ภาพที่ 4.1 ระยะ Promastigotes จากการเพาะเลี้ยงเชื้อลิวมาเนียจากไขกระดูก	35
ภาพที่ 4.2 ระยะ Amastigotes จากการ infect เชื้อ Promastigote ในเซลล์ macrophage cell line	36
ภาพที่ 4.3 ปริมาณจำกัดที่ PCR ที่ตำแหน่งยีน ITS 1 สามารถตรวจเจอเชื้อได้	37
ภาพที่ 4.4 ผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ของดีเอ็นเอ <i>L. siamensis</i> บน 1.5 % agarose gel ของเซลล์เพาะเลี้ยงในแต่ละ Isolation ขนาด 379	38
ภาพที่ 4.5 แสดงลำดับเบสของเชื้อลิวมาเนีย <i>L. siamensis</i> ขนาด 379 bp	39
ภาพที่ 4.6 กราฟการเจริญเติบโตของเชื้อลิวมาเนียระยะ promastigotes ที่แยกได้จากไขกระดูกและชิ้นเนื้อ	40
ภาพที่ 4.7 ตัวอย่างการทดสอบความไวต่อยาของเชื้อลิวมาเนียด้วยสี resazurin กับยาในแต่ละความเข้มข้นเปรียบเทียบระหว่างเชื้อลิวมาเนียที่แยก ได้จากไขกระดูกและชิ้นเนื้อระยะ Promastigote เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม	43

ภาพที่ 4.8 กราฟแสดงการเปรียบเทียบ % Inhibition ต่อยาแต่ละความเข้มข้น ทั้งในระยะ Promastigote และ ระยะ Amastigote ที่สามารถแยกเชื้อได้ จากไขกระดูกและชั้นเนื้อ	47
ภาพที่ 4.9 ผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR บน 1.5 % agarose gel ของเซลล์เพื่อศึกษาการคือยา Amphotericin B	48
ภาพที่ 4.10 แสดงผลการนำยีนเรืองแสง GFP เข้าสู่เซลล์ Promastigotes	48
ภาพที่ 4.11 ลักษณะของเชื้อหลังทำการคัดเลือกเชื้อที่มีการเรืองแสง	49
ภาพที่ 4.12 กราฟการแยกชนิดของเซลล์ที่เรืองแสงด้วย Flow cytometry	50
ภาพที่ 4.13 แสดงผลจากการทำ PCR จากตัวอย่างลิซมาเนียที่ดัดแปลงพันธุกรรม	51
ภาพที่ 4.14 Map of the pCR 2.1- L.d rDNA pr- α IRNEO α IR-GFP plasmid	52
ภาพที่ 4.15 แสดงการตัด stable GFP plasmid DNA ด้วยเอนไซม์ BstXI M1kb: Marker 1 kb	52

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ตัวย่อ	คำอธิบาย
A	adenine เบสอะดีนีน ส่วนประกอบของกรดนิวคลีอิก
G	guanine เบสกวานีน ส่วนประกอบของกรดนิวคลีอิก
C	cytosine เบสไซโตซีน ส่วนประกอบของกรดนิวคลีอิก
T	thymine เบสไทมีน ส่วนประกอบของกรดนิวคลีอิก
%	percent (เปอร์เซ็นต์)
µg	microgram(s) (ไมโครกรัม)
µl	microlitre(s), 10 ⁻⁶ litre (ไมโครลิตร)
µM	micromolar(s) (ไมโครโมลาร์)
bp	base pair(s) (คู่เบส)
cm	centimeter(s) (เซนติเมตร)
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
ddH ₂ O	deionized distilled water (น้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ)
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
et al.	et alii (latin), and others
g	gram (s) (กรัม)
L	litre (ลิตร)
M	molar(s) (โมลาร์)

mg	milligram(s) (มิลลิกรัม)
ml	milliliter(s), 10^{-3} litre (มิลลิลิตร)
mM	millimolar (มิลลิโมลาร์)
NCBI	National Center for Biotechnology Information หน่วยงานในประเทศ สหรัฐอเมริกาที่มีหน้าที่เก็บรวบรวมข้อมูลเทคโนโลยีชีวภาพ
ng	nanogram(s), 10^{-9} gram (นาโนกรัม)
°C	degree Celsius (องศาเซลเซียส)
OD	optical density
PCR	polymerase chain reaction (ปฏิกิริยาพีซีอาร์)
pH	The negative logarithm of the concentration of hydrogen ions
rpm	revolutions per minute (รอบต่อนาที)
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i> (polymerase)
UV	ultraviolet

1. บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคติดเชื้อลิชมาเนียเป็นโรคที่มีแมลงริ้นฝอยทรายเพชเมีย (sand fly) ซึ่งเป็นแมลงที่ดูดกินเลือดคนและสัตว์เป็นพาหะ ซึ่งโรคนี้เกิดจากโปรโตซัวในตระกูลลิชมาเนีย โดยมีมากกว่า 20 ชนิดที่ก่อโรคในคน โรคลิชมาเนียเป็นโรคติดต่อเรื้อรัง (Lainson และ Shaw, 1987) สามารถพบได้ทั้งในคนและสัตว์หลายชนิด เช่น สุนัข แมว ม้า วัว แกะ กระรอก กระแต และ หนู เป็นต้น โรคลิชมาเนียมีสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเป็นแหล่งรังโรคตามธรรมชาติ (Pearson และ De Queiroz Sousa, 1994) ปัจจุบันพบมีการระบาดใน 88 ประเทศทั่วโลก ซึ่งกว่า 72 ประเทศ เป็นประเทศที่กำลังพัฒนา การแสดงออกของโรคจะใช้เวลาหลายเดือนซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ และภาวะภูมิคุ้มกันของผู้ป่วย โดยอาการของโรคแบ่งได้ 3 แบบ คือ แบบที่มีอาการที่ผิวหนัง (Cutaneous leishmaniasis) ซึ่งจะพบตุ่มเล็กๆ ที่ผิวหนังและแตกออกเป็นแผล แบบที่มีอาการที่อวัยวะภายใน (Visceral leishmaniasis) หรือโรค kala azar (Kala azar) ผู้ป่วยจะมีอาการไข้เรื้อรัง น้ำหนักลด ซีด ม้ามและตับโต และแบบที่เกิดขึ้นกับเยื่อเมือก (Mucocutaneous leishmaniasis) ซึ่งจะมีลักษณะคล้ายกับที่เกิดขึ้นที่ผิวหนัง แต่จะเกิดแผลจะแพร่ไปในอวัยวะที่มีเยื่อเมือก เช่น จมูก ปาก เป็นต้น (Murray et al., 2005; Desjeux, 2004; Davies et al., 2003) อาการแสดงของโรคขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อลิชมาเนียและระดับภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยซึ่งจะทำให้เกิดอาการแสดงที่แตกต่างกัน โรคลิชมาเนียมีการระบาดไม่ต่ำกว่า 74 ประเทศ เช่น ประเทศในแถบตะวันออกเฉียงใต้ แอฟริกาเหนือ อเมริกากลาง และตอนเหนือของอเมริกาใต้ เป็นต้น (Pearson และ Sousa, 1996) ปัจจุบันเชื้อลิชมาเนียมีการติดต่อเพิ่มมากขึ้นซึ่งขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของลิชมาเนียและภูมิศาสตร์ของแต่ละประเทศ (Robert, 2006)

โรคไลชมาเนียในประเทศไทยนั้น ในช่วงปี ค.ศ. 1960-1986 มีการรายงาน โรคไลชมาเนียในผู้ป่วยไทย ที่เดินทางออกนอกประเทศไปในแหล่งระบาดของโรคไลชมาเนียโดยเฉพาะผู้ที่ไปทำงานในประเทศ ในแถบตะวันออกเฉียงกลาง และในปัจจุบันพบว่าโรคไลชมาเนียสามารถพบในผู้ป่วยที่อาศัยอยู่ใน ประเทศไทยและไม่เคยเดินทางออกนอกประเทศมาก่อน (Autochthonous visceral leishmaniasis) และพบว่ามีจำนวนเพิ่มมากขึ้น (Suttinont et al., 1987; Thisyakorn et al, 1999; Viriyavejakul et al., 1997; Kongkaew et al., 2007; Maharom et al., 2008; Sukmee et al, 2008; Suankratay et al, 2010; Chusri et al., 2012; Bualert et al., 2012; Phumee et al., 2013) โดยพบมากทางจังหวัดภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้เป็นส่วนใหญ่ ซึ่ง สุขุมิ และคณะ ได้ค้นพบเชื้อไลชมาเนียสายพันธุ์ไทย หรือ *L. siamensis* (Sukmee et al, 2008) โดยการศึกษาจากลำดับเบสที่ได้เทียบกับฐานข้อมูลสากล หรือ GenBank พบว่าลำดับเบสแตกต่างออกไปจากสายพันธุ์ที่มีรายงานก่อนหน้านี้ และใช้เทคนิคการใส่ เอนไซม์ที่ตัดจำเพาะเพื่อแยกสายพันธุ์ของเชื้อไลชมาเนีย (PCR-RFLP) พบว่าแถบแบนมีลักษณะที่ แตกต่างออกไปจากสายพันธุ์อื่น โรคไลชมาเนียสายพันธุ์ไทยนี้สามารถพบทั้งในผู้ป่วยที่มีระดับ ภูมิคุ้มกันปกติ และผู้ป่วยที่มีระดับภูมิคุ้มกันต่ำเช่นผู้ป่วยเอดส์ โดยอาการแสดงของ โรคไลชมาเนีย สายพันธุ์ไทยนี้มีทั้งอาการที่แสดงออกทางอวัยวะภายใน แสดงอาการทางผิวหนัง และแสดงอาการ ทั้งอวัยวะภายในร่วมกับอาการทางผิวหนัง (Sukmee et al, 2008; Suankratay et al, 2010; Chusri et al., 2012; Bualert et al., 2012; Phumee et al., 2013) โดยจำนวนผู้ป่วยซึ่งมีทั้งที่รายงานและไม่ได้ รายงานรวมแล้วกว่า 20 ราย ซึ่งสามารถพบทั้งในผู้ป่วยที่มีระดับภูมิคุ้มกันปกติ และผู้ป่วยที่มี ระดับภูมิคุ้มกันบกพร่อง นอกจากนี้ยังไม่รวมถึงผู้ที่ติดเชื้อแต่ยังไม่มีอาการแสดงออกมาซึ่งไม่ ทราบจำนวน และได้พบการติดเชื้อของเชื้อไลชมาเนียสายพันธุ์ไทยนี้ในวัวและม้าในประเทศ เยอรมัน (Muller et al., 2009) สวิตเซอร์แลนด์ (Lobsiger et al., 2010) และ สหรัฐอเมริกา (Reuss et

al., 2012) จากการแพร่ระบาดของนอกประเทศของลิชมาเนียสายพันธุ์ไทยนั้นจึงจำเป็นต้องอย่างยิ่งที่ต้องมีการควบคุมการแพร่ระบาดของโรคนี้

ในการรักษาโรคลิชมาเนียที่เกิดจากเชื้อลิชมาเนียสายพันธุ์ต่างๆจะมีแนวทางการรักษาที่แตกต่างกัน โดยใช้ยา chemotherapy ที่นิยมใช้ในปัจจุบันมีดังนี้ pentavalent (Sbv), amphotericin B (AB), miltefosine (MF), paromomycin (PM) และ sodium stibogluconate (SAG) เป็นต้น การดื้อยาหรือไวต่อยานั้นมักขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของลิชมาเนียด้วย การรักษาผู้ป่วยเหล่านี้ในประเทศไทยมีเพียงยา Amphotericin B ซึ่งพบว่ามียอัตรากลับเป็นซ้ำสูง คณะผู้วิจัยจึงเห็นว่าควรต้องมีการทดสอบความไวของเชื้อลิชมาเนียในประเทศไทยต่อยาคือชนิดอื่นๆ ซึ่งมีผลในการกำจัดเชื้อนี้ด้วย เพื่อการรักษาผู้ป่วยอย่างมีประสิทธิภาพ โดยศึกษาความไวของยาคือเชื้อลิชมาเนียสายพันธุ์ไทยทั้งใน *In vitro* และ *Ex vivo* ด้วยเทคนิคที่ทำให้เกิดสารมีสี (colorimetric assay) โดยใช้สี resazurin ซึ่งการศึกษาวิจัยครั้งนี้จะเป็นประโยชน์อย่างมากในการรักษาและควบคุมโรคก่อนที่จะมีการกระจายของโรคไปทั่วประเทศ

2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เชื้อลิวมาเนีย (*Leishmania spp.*) (WHO, 2007; Lainson และ Shaw, 1987; Maltezou, 2010)

จัดอยู่ใน

Kingdom: Protista

Subkingdom: Protozoa

Phylum: Sarcomastigophora

Subphylum: Mastigophora

Class: Zoomastigophora

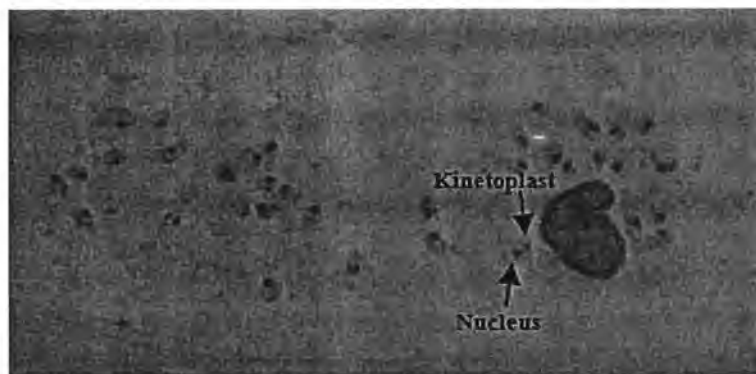
Order: Kinetoplastida

Suborder: Trypanomatina

Family: Trypanosomatidae

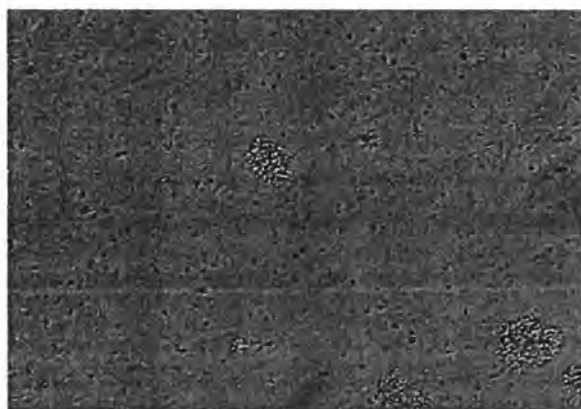
Genera: *Leishmania* spp.

วงจรชีวิตของเชื้อลิวมาเนียประกอบด้วย 2 ระยะคือระยะ Amastigote และระยะ Promastigote โดยระยะ Amastigote เป็นระยะที่จะพบเฉพาะในคนหรือสัตว์ที่มีกระดุกสันหลังรูปร่างของเชื้อเป็นลักษณะกลมรี เคลื่อนที่ไม่ได้ ขนาดประมาณ 2-4 μm อาศัยอยู่ใน cytoplasm ของเซลล์ Macrophage และเพิ่มจำนวนด้วยวิธีการแบบแยกออกเป็นสอง (Binary fission) ใน Macrophage ลักษณะภายในของเชื้อลิวมาเนียจะมีนิวเคลียสขนาดใหญ่เห็นเด่นชัดและมี Kinetoplast เป็นแท่งตั้งฉากกับนิวเคลียส โดยเชื้อสามารถตรวจพบได้ใกระดุก เลือด ม้ามและต่อมน้ำเหลือง และผิวหนัง เป็นต้น (ภาพที่ 2.1)



ภาพที่ 2.1 เชื้อลิวมาเนียในระยะ Amastigotes ข้อมด้วยสี Giemsa

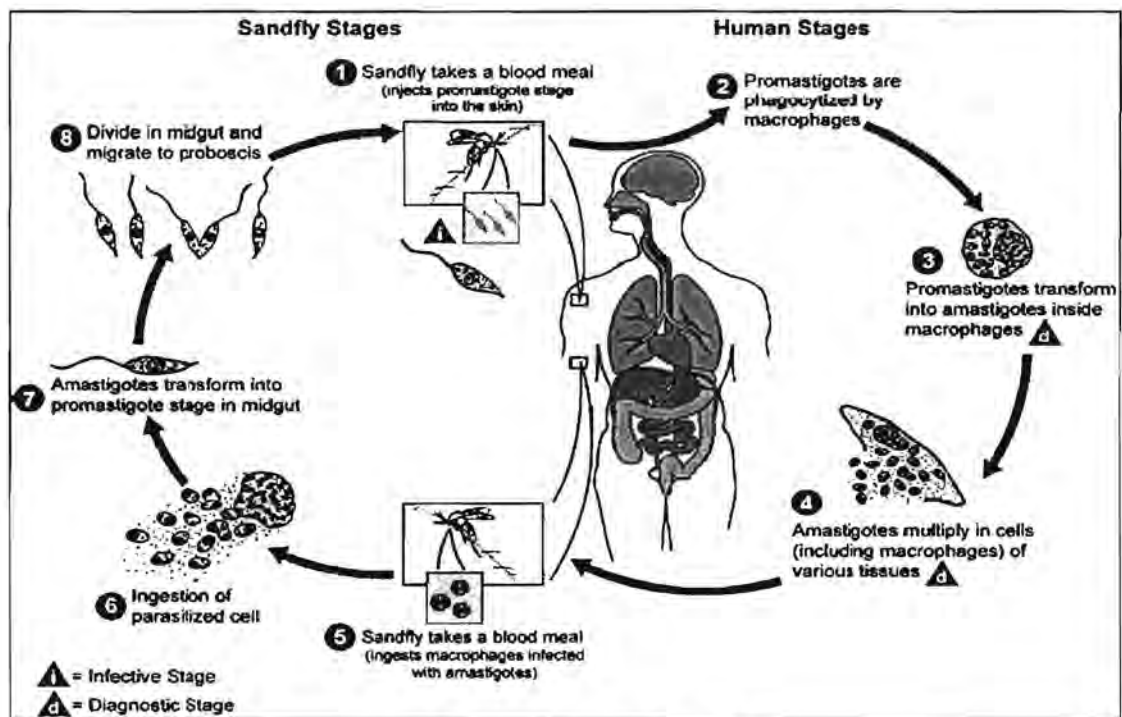
ระยะ Promastigote เป็นระยะที่จะพบเฉพาะในริ้นฝอยทราย และการเพาะเลี้ยงเท่านั้น รูปร่างของเชื้อเป็น รูปกระสวย เคลื่อนที่ได้เพราะมีหาง (Flagella) มีขนาดประมาณ 15-20 x 1.5-3.5 μm เชื้อจะอยู่นอกเซลล์ (Extracellular) และสามารถเพิ่มจำนวนได้ด้วยวิธีการแบบ แยกออกเป็นสอง (Binary fission) เช่นกันเชื้อจะมีนิวเคลียสขนาดใหญ่เห็นเด่นชัดและ Kinetoplast จะกลายเป็นหางเพื่อใช้ในการเคลื่อนที่สามารถตรวจพบได้ในทางเดินอาหารส่วนกลาง (Middle gut) ของแมลงริ้นฝอยทรายหรือจากการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารที่เตรียมเป็นการเพาะ (ภาพที่ 2.2)เช่น Schneider's insect medium



ภาพที่ 2.2 ระยะ Promastigotes จากเพาะเลี้ยงเชื้อลิวมาเนียจากไขกระดูกด้วยอาหารเลี้ยง

เชื้อ Schneider's insect medium

วงจรชีวิตของเชื้อลิวมาเนียเริ่มจากแมลงจำพวกริ้นฝอยทรายตัวเมียดูดกินเลือดของคนหรือสัตว์ที่เป็นโรคแล้วได้รับเชื้อ และเมื่อแมลงริ้นฝอยทรายเพศเมียที่มีเชื้อลิวมาเนียดูดกินเลือดและปล่อย promastigote เข้าไปในร่างกายของคนหรือสัตว์เชื้อจะเข้าสู่ macrophage และเปลี่ยนรูปร่างเป็น amastigote พร้อมทั้งแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้นจน macrophage แดกออกทำให้ amastigote ออกจาก macrophage กระจายไปสู่เซลล์ใหม่และจะมีการเพิ่มจำนวนเรื่อยไป เมื่อริ้นฝอยทรายกัดและดูดกินเลือดของคนหรือสัตว์จะรับ amastigote เข้าไปในทางเดินอาหาร หลังจากนั้น amastigote จะเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็น promastigote และถ่ายทอดเชื้อโรคสู่คนและสัตว์ต่อไป (Desjeux, 2001; Bates, 2007) (ภาพที่ 2.3)



ภาพที่ 2.3 วงจรชีวิตของเชื้อลิวมาเนีย

ที่มา : <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Leishmaniasis.htm>

2.2 ไร้น้อยทราย (Sand fly) พาหะนำโรคลิชมาเนีย

ไร้น้อยทรายมีขนาด 2-3 มิลลิเมตร ซึ่งเล็กกว่าขุงประมาณ 1/3 เท่า มีสีน้ำตาลและจะมีขนปกคลุมจำนวนมาก (ภาพที่ 2.4) จะบินแบบกระโดด (hopping) ในระยะทางสั้นๆ ตอนกลางวันชอบเกาะพักอยู่ตามที่กำบัง ที่มีมืดและอับชื้น เช่น รุสค์ตัวกัดแทะ จอมปลวก รอยแตกของสิ่งก่อสร้างเก่าๆ ทั้งเพชู้และเพชเมียดูดกินน้ำเลี้ยงต้นไม้ และน้ำหวานดอกไม้เป็นอาหาร แต่เฉพาะเพชเมียนั้นมีปากแบบแทงดูดที่ดูดกินเลือดของคนและสัตว์ ส่วนมากชอบออกหากินนอกบ้านในเวลากลางคืน มีน้อยชนิดที่หากินตอนกลางวัน การแยกเพศสังเกตได้ที่ท้ายสุดของท้อง ตัวเมียปลายท้องมนไม่มี terminalia ต่างจากตัวผู้ ระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญเติบโตแตกต่างกันขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและความอุดมสมบูรณ์ของอาหาร ส่วนใหญ่ประมาณ 28-42 วัน ไร้น้อยทรายเพชเมียมักฟักจากคักแด้หลังเพชผู้และเมื่ออายุยืนยาวกว่า ผสมพันธุ์ครั้งเดียว โดยสามารถเก็บน้ำเชื้อของตัวผู้ได้ตลอดชีวิต นอกจากนี้เมื่อได้รับเชื้อ โรคแล้วก็สามารถนำเชื้อ โรคตลอดชีวิตเช่นเดียวกัน (พลสีลา และ คณะ 2555) ไร้น้อยทรายมีความสำคัญทางการแพทย์คือ ทำให้เกิดการแพ้บริเวณที่ถูกกัด นอกจากนี้ยังเป็นแมลงพาหะนำโรคลิชมาเนีย (Leishmaniasis) โรค Sand fly fever (Arezki et al., 2008) โรคชานดิปุระ (Chandipura) (Fontenille et al., 1994)

ปัจจุบันพบไร้น้อยทรายมากกว่า 1,000 ชนิด ชนิดที่สามารถเป็นพาหะนำโรคลิชมาเนียได้มีประมาณ 90 ชนิด (Poche et al., 2011) การกระจายตัวของไร้น้อยทรายพบทั่วไปในเขตร้อน (tropical) ใกล้เคียงร้อน (subtropical) และเขตอบอุ่น ซึ่งครอบคลุมทั้งในเขตโลกเก่า (Old World) และเขตโลกใหม่ (New World) (Adler and Theodor, 1957) สำหรับประเทศไทยนั้นข้อมูลเกี่ยวกับการกระจายตัวของไร้น้อยทรายในแต่ละพื้นที่ได้เริ่มมีการศึกษาเพิ่มมากขึ้น ซึ่งอาจเป็นข้อมูลที่สามารถเชื่อมโยงพื้นที่ที่พบไร้น้อยทรายกับการเกิดโรคลิชมาเนีย ชนิดของไร้น้อยทรายที่มีรายงานในประเทศไทยมีอย่างน้อย 27 ชนิด โดยพบกระจายอยู่ทั่วไปในทุกพื้นที่ของประเทศไทย (Polseela

et al., 2007) การศึกษาชนิดของริ้นฝอยทรายในพื้นที่ต่างๆของประเทศไทยนั้น พบริ้นฝอยทรายที่มีรายงานความสามารถในการเป็นพาหะนำโรคได้มี 2 ชนิด คือ *P. argentipes* และ *P. major major* (Apiwathanasorn et al., 1989) ซึ่ง *P. Argentipes* เป็นริ้นฝอยทรายที่ได้รับการยืนยันการนำเชื้อ *L. donovani* ซึ่งทำให้เกิดโรค Visceral Leishmaniasis ในอินเดีย (Killick- Kendrick, 1999) มีรายงานพบว่าริ้นฝอยทรายสกุล *Phlebotomus* สามารถถ่ายทอดเชื้อ *Leishmania* spp. ได้มากกว่า 40 ชนิดในเขตโลกเก่า และสกุล *Lutzomyia* spp. สามารถถ่ายทอดได้ถึง 30 ชนิดในเขตอเมริกา ส่วนในคาบสมุทรอินเดียพบว่า *Phlebotomus* spp. สามารถถ่ายทอดเชื้อได้ 11 ชนิดและ *Sergentomyia* spp. สามารถถ่ายทอดเชื้อได้ 35 ชนิด (Lane และ Crossky, 1993) ซึ่งเชื้อลิชมาเนียนั้น สามารถติดต่อได้ทั้งในคนและสัตว์ (WHO, 1990)

อย่างไรก็ตามจังหวัดที่มีผู้ป่วยติดเชื้อไม่มีการรายงานเกี่ยวกับแมลงริ้นฝอยทรายที่เป็นพาหะของโรคลิชมาเนียมาก่อน แต่ก่อนหน้านั้นในประเทศไทยมีการศึกษาเกี่ยวกับริ้นฝอยทรายที่เป็นพาหะของเชื้อลิชมาเนียโดยสำรวจการกระจายตัวของแมลงริ้นฝอยทรายรวมทั้งแหล่งที่อยู่ของริ้นฝอยทราย ซึ่งพบทางภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย พบสกุล *Sergentomyia*, *Phlebotomus* และ *Idiophlebotomus*. ซึ่ง *Sergentomyia* เป็นสกุลที่พบมากที่สุดในประเทศไทย และมีการพบสายพันธุ์ *Phlebotomus argentipes* เพียง 1 เพอร์เซ็นต์ (Apiwathnasorn et al., 1989; Apiwathnasorn et al., 1993) ต่อมาในปี 2009 มีการศึกษาสำรวจริ้นฝอยทรายที่จังหวัดทางภาคใต้สามจังหวัดคือ จังหวัดพังงา สุราษฎร์ธานี และ นครศรีธรรมราช ซึ่งเป็นพื้นที่ที่พบผู้ป่วยติดเชื้อลิชมาเนีย พบริ้นฝอยทรายสายพันธุ์ *Sergentomyia gemmea* มากที่สุดจำนวน 81.4 เพอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ *S. iyengari*, *S. barraudi*, *S. indica*, *S. silvatica* และ *S. perturbans* อีกทั้งยังพบสายพันธุ์ *P. argentipes* (Sukra et al., 2013) และมีรายงาน

ว่าพบเชื้อลิซมาเนียสายพันธุ์ไทยในริ้นฝอยทรายชนิด *S. (Neophlebotomus) gemmea* บริเวณที่ผู้ป่วยอาศัย ในจังหวัดตรัง ภาคใต้ของประเทศไทย (Kanjanopas et al., 2013)



ภาพที่ 2.4 ลักษณะของริ้นฝอยทราย

2.3 โรคลิซมาเนีย (Leishmaniasis)

โรคลิซมาเนีย (Leishmaniasis) เป็นโรคที่สามารถติดต่อจากคนสู่คน จากสัตว์สู่สัตว์ และจากสัตว์สู่คน (Zoonosis) สาเหตุเกิดจากเชื้อโปรโตซัวลิซมาเนีย (*Leishmania* spp.) เช่น *L. donovani* complex (*L. donovani*, *L. infantum* และ *L. chagasi*), *L. mexicana* complex (*L. mexicana*, *L. amazonensis* และ *L. venezuelensis*), *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica* และ subgenus *Viannia* เช่น *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis* และ *L. (V.) peruviana* (Kato et al., 2010) โดยมีแมลงเป็นพาหะ คือริ้นฝอยทราย (Sand fly) ในตระกูล *Phlebotomus* spp. และ *Lutzomyia* spp. โรคลิซมาเนียพบได้ทั้งในมนุษย์และสัตว์หลายชนิด เช่น สุนัข แมว วัว แกะ กระรอก กระแต หนู ควาย และม้า โดยคนเป็นโฮสต์โดยบังเอิญ (Accidental host)

จากหลักฐานการบันทึกในยุคอินคา มีรายงานการเกิดโรคนี้นี้ตั้งแต่ช่วงศตวรรษที่ 15-16 ปัจจุบันพบมีการระบาดใน 88 ประเทศทั่วโลก พบว่ากว่า 72 ประเทศ เป็นประเทศที่กำลังพัฒนา โดยมีสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเป็นแหล่งรังโรคตามธรรมชาติ ในประเทศแถบเมดิเตอร์เรเนียน รัสเซีย และจีน พบว่าสุนัขและสุนัขป่าเป็นแหล่งรังโรคที่สำคัญ ประเทศในเขตซับซาราของทวีปแอฟริกา มี civet และ สัตว์กินเนื้อขนาดเล็กเป็นแหล่งรังโรค ส่วนในประเทศอินเดีย และเคนยา พบว่าคนเป็นแหล่งรังโรคที่สำคัญมากที่สุด โรคลีชมาเนียที่อาการแสดงที่อวัยวะภายใน (VL) พบกว่า 90% ใน 5 ประเทศหลัก ได้แก่ บังกลาเทศ อินเดีย เนปาล ชูดาน และบราซิล และ 90% ของการเกิดโรคแบบแสดงอาการที่บริเวณผิวหนัง (CL) พบในประเทศ อัฟกานิสถาน อัลดีเรีย เปรู อิหร่าน ซาอุดีอาระเบีย บราซิลและซีเรีย จากการสำรวจ พบว่าโรคนี้นี้มีความชุกปีละ 12 ล้านคน โดยพบว่าประชากรกว่า 350 ล้านคน อยู่ในความเสี่ยงที่อาจติดโรคนี้นี้ และมีผู้เสียชีวิตเฉลี่ยปีละ 1,000 คน แนวโน้มของการเกิดโรคในแต่ละปี พบเป็นแบบ CL ปีละ 1-1.5 ล้านคน และแบบ VL ปีละ 0.5 ล้านคน และยังพบว่าผู้หญิงมีโอกาสเป็นโรคสูงกว่าผู้ชายถึง 1.4 เท่า ยิ่งไปกว่านั้นยังพบว่า การเกิดโรคนี้นี้มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับระดับการพัฒนาทางด้านเศรษฐกิจ ตลอดจนการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรม และสิ่งแวดล้อม ซึ่งส่งผลให้มีการสัมผัสรับฟยทราฟเพิ่มมากขึ้น ได้แก่ การบุกกรุป่าเพื่อสร้างที่อยู่อาศัยและที่ทำกิน การสร้างเขื่อน เป็นต้น ในยุโรปพบมีความเสี่ยงสูงในผู้ย้ายเสพติดชนิดผิดเข้เส้น ส่วนในแอฟริกาและอินเดียพบมีความเสี่ยงสูงในผู้อพยพ คนงาน และคนขับรถบรรทุก และยังพบเป็นโรคแทรกซ้อนในผู้ป่วยโรคเอดส์

อาการของโรคแสดงออกเป็น 3 รูปแบบ คือ

- อาการแสดงที่บริเวณผิวหนัง (Cutaneous leishmaniasis) อาการที่ผิวหนังจะเกิดบริเวณที่ถูกริ้นฟยทราฟกัด คือเกิดเป็นตุ่มแดง และเริ่มกว้างขึ้น ขอบแผลมีลักษณะนูน พบน้ำเลือดหรือน้ำเหลืองแห้งติดบนแผล เมื่อแผลหาย อาจเกิด

แผลเป็นได้ และพบว่าประมาณ 10 % ของแผลเหล่านี้จะกลายเป็นแผลลักษณะคล้ายแผลซิฟิลิสหรือวัณโรคที่ผิวหนัง บริเวณกลางแผลมีลักษณะปกติ แต่ขอบแผลจะบวมแดง แผลนี้ใช้เวลานานหลายปีกว่าจะหาย (Maltezou, 2010)

- อาการแสดงที่อวัยวะภายใน (Visceral leishmaniasis) หรือ โรคคาลา อาซา (Kala Azar) ผู้ป่วยจะมีอาการอ่อนเพลีย ท้องโต คลื่นไส้ อาเจียน ผิวหนังแห้ง ดับโต ม้ามโต ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะ และบางรายจะมีค้อนน้ำเหลืองโตด้วย เลือดซีด เม็ดเลือดขาวต่ำกว่า 4,000/ลบ.มม. เกล็ดเลือดและอัลบูมินต่ำ ถ้าไม่ได้รับการรักษาจะเสียชีวิต ซึ่งมักจะเสียชีวิตจากภาวะแทรกซ้อน ถือว่าเป็นลักษณะโรคที่รุนแรง (Maltezou, 2010)
- อาการแสดงที่เชื้อเมือก (Mucocutaneous leishmaniasis) ซึ่งจะมีลักษณะคล้ายกับที่เกิดขึ้นที่ผิวหนังแต่จะเกิดแผลลูกกลมในอวัยวะที่มีเชื้อเมือก เช่น จมูก ปาก ผู้ป่วยมีไข้ ซีด อ่อนเพลีย น้ำหนักลด อาจทำให้รูปหน้าผิดไปจากเดิม หากอาการรุนแรงและไม่ได้รับการรักษาก็ถึงกับเสียชีวิตได้เช่นกัน (Maltezou, 2010)

2.4 สถานะการณโรคลิชมาเนียในประเทศไทย

โรคลิชมาเนียส่วนใหญ่ที่พบในประเทศไทยนั้น มักพบในคนไทยที่มีประวัติการเดินทางไปในแหล่งระบาดของโรคโดยเฉพาะประเทศทางตะวันออกกลาง จะโดยลักษณะไปท่องเที่ยวทำงาน หรือ ติดต่อทางธุรกิจ ติดเชื้อกลับมา แต่ต่อมาพบว่าผู้ป่วยที่ไม่มีประวัติการเดินทางไปต่างประเทศสามารถเกิดโรคนี้อีกได้เช่นกัน ซึ่งมักจะพบผู้ป่วยลิชมาเนีย ในจังหวัดทางภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ของประเทศไทยเป็นส่วนใหญ่ (Suttinont et al.,1987; Viriyavejakul et al., 1997; Thisyakorn et al, 1999; Kongkaew et al., 2007; Maharom et al., 2008; Sukmee et al, 2008; Suankratay et al, 2010; Chusri et al., 2012; Bualert et al., 2012; Phumee et al.,2013) เชื้อลิชมาเนีย

ที่พบในประเทศไทยนั้น ได้มีผู้ค้นพบว่าเป็นเชื้อสายพันธุ์ใหม่คือ *L. siamensis* (Sukmee et al., 2008) ซึ่งน่าแปลกใจว่าจังหวัดที่มีผู้ป่วยติดเชื้อ ไม่มีการรายงานเกี่ยวกับแมลงรึ้นฝอยทรายที่เป็นพาหะของโรคนี้มาเนิ่นมาก่อน

ในปี พ.ศ. 2528 ถึง พ.ศ. 2529 มีรายงานพบผู้ป่วยชาวไทยรวมจำนวน 11 รายซึ่งในจำนวน 5 รายนี้มีประวัติเดินทางไปทำงานในประเทศแถบตะวันออกเฉียงใต้ซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีโรคนี้เป็นโรคประจำถิ่นส่วนอีก 6 รายเป็นผู้ป่วยที่ไม่มีประวัติเดินทางไปทำงานในประเทศที่มีโรคนี้เลยและไม่พบปัจจัยเสี่ยงในการติดเชื้อจากต่างประเทศแต่อย่างใด (Suttinont et al., 1987)

ปีพ.ศ. 2539 ผู้ป่วยเด็กหญิงอายุ 2 ขวบ 9 เดือนอาศัยอยู่ในจังหวัดสุราษฎร์ธานีโดยพบเชื้อ *L. donovani* แต่ไม่พบรายงานในสัตว์ บริเวณที่เกิดโรคพบรึ้นฝอยทรายสกุล *P. stantoni* และ *S. perturbans* (Thisyakorn et al., 1999)

ปีพ.ศ. 2548 ผู้ป่วยชาย อายุ 40 ปี อาศัยอยู่ที่จังหวัดน่าน มีอาการไข้ขึ้นๆลงๆ บวมน้ำซีดดับและม้ามโตมีประวัติคิกขาบ้า ผื่น และ เหล้า พบเชื้อ *L. donovani* พบแอนติบอดีไคเตอร์ในโค 3 ตัวและแมว 1 ตัวโดยวิธี direct agglutination test พบรึ้นฝอยทรายสกุล *S. gammea*, *S. barraudi* และ *P. stantoni* (Kongkaew et al., 2007)

ปีพ.ศ. 2549 ผู้ป่วยชายอายุ 55 ปี อาศัยอยู่ในจังหวัดพังงา ผู้ป่วยมีอาการไข้หนาวสั่น ซีดดับและม้ามโตพบเชื้อใหม่ *L. siamensis* พบแอนติบอดีไคเตอร์ในแมว 9 ตัวโดยวิธี direct agglutination test พบรึ้นฝอยทรายสกุล *S. gemmea*, *S. barraudi*, *S. indiacca* และ *P. stantoni* (Sukmee et al., 2008)

เดือนกรกฎาคม ปีพ.ศ. 2550 พบผู้ป่วยชายอายุ 66 ปี อาศัยอยู่ในกรุงเทพมหานคร ผู้ป่วยเป็นโรคความดันโลหิตสูงและเบาหวานมาก่อน เชื้อที่พบได้แก่ *L. infantum* ไม่พบแอนติบอดีไคเตอร์ในสัตว์ไม่พบรึ้นฝอยทรายชนิดใดๆเนื่องจากเวลานั้นมีฝนตกหนัก (Maharom et al., 2008)

ปีพ.ศ. 2550 พบผู้ป่วยชาย อายุ 45 ปี อาศัยอยู่ในจังหวัดเชียงราย ประวัติของผู้ป่วยพบเชื้อ HIV ซีด ดับและม้ามโต พบเชื้อ *L. siamensis* โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ ผลบวกใน เลือด buffy coat น้ำลาย และชิ้นเนื้อ ปีพ.ศ. 2552 พบผู้ป่วยชาย อายุ 37 ปี อาศัยอยู่ในจังหวัดจันทบุรี มีประวัติ ท้องเที่ยวทางตอนเหนือของอินโดนีเซีย ประวัติของผู้ป่วยพบเชื้อ HIV มาก่อน และเป็นไวรัสตับ อักเสบชนิดซี พบเชื้อ *L. siamensis* (Suankratay et al., 2010)

ปีพ.ศ. 2553 พบผู้ป่วยหญิง อายุ 5 ปี อาศัยอยู่ในจังหวัดสตูล มีประวัติเป็น β -thalassemia trait ซีด ดับและม้ามโต พบเชื้อ *L. siamensis* พบแอนติบอดีไตเตอร์ใน โท 3 ตัว แมว 1 ตัว สุนัข 9 ตัว และหนู 2 ตัวโดยวิธี direct agglutination test พบรีนฝอยทรายสกุล *P. argentipes*, *S. barraudi*, *S. iyengari*, *S. gammea* และ *S. indica* (สุขมี 2553)

ปีพ.ศ. 2553 พบผู้ป่วยหญิง อายุ 32 ปี อาศัยอยู่ในจังหวัดตรัง ประวัติของผู้ป่วย พบเชื้อ HIV มาก่อน ซีด ดับและม้ามโตพบเชื้อ *L. siamensis* โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ ผลบวกใน ไชกระดูก เลือด และชิ้นเนื้อ สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อได้ (Bualert et al., 2012)

ปีพ.ศ. 2554 พบผู้ป่วยชาย อายุ 46 ปี อาชีพทำสวนยาง อาศัยอยู่ในจังหวัดสงขลา ประวัติ ของผู้ป่วย พบเชื้อ HIV มาก่อน ซีด ดับและม้ามโตพบเชื้อ *L. siamensis* โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ ผลบวกใน ไชกระดูก เลือด buffy coat น้ำลาย ปัสสาวะ และสามารถเพาะเลี้ยงเชื้อได้ (Chusri et al., 2012; Phumee et al., 2013)

ปีพ.ศ. 2554 พบผู้ป่วยชาย อายุ 30 ปี อาชีพเจ้าของร้านสัตว์เลี้ยง อาศัยอยู่ในจังหวัดตรัง ประวัติของผู้ป่วย พบเชื้อ HIV มาก่อน ซีด ดับและม้ามโต พบเชื้อ *L. siamensis* โดยใช้เทคนิคพีซี อาร์ ผลบวกใน ไชกระดูก เลือด buffy coat น้ำลาย ปัสสาวะและชิ้นเนื้อ (Chusri et al., 2012; Phumee et al., 2013)

ปีพ.ศ. 2555 พบผู้ป่วยชาย อายุ 52 ปี อาชีพชาวไร่ อาศัยอยู่ในจังหวัดลำพูน ซีด คับและม้ามโต พบเชื้อ *L. siamensis* โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ ผลบวกใน ไชกระดูก เลือด buffy coat น้ำลายและปัสสาวะ และสามารถเพาะเลี้ยงเชื้อได้

ปีพ.ศ. 2556 พบผู้ป่วยชาย อาศัยอยู่ในจังหวัดลำพูน ประวัติของผู้ป่วย พบเชื้อ HIV มาก่อน ซีด คับและม้ามโต พบเชื้อ *L. siamensis* โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ ผลบวกใน ไชกระดูก เลือด buffy coat น้ำลายและปัสสาวะ และสามารถเพาะเลี้ยงเชื้อได้

ปีพ.ศ. 2556 พบผู้ป่วยชาย อาศัยอยู่ในจังหวัดเชียงใหม่ประวัติของผู้ป่วย พบเชื้อ HIV มาก่อน ซีด คับและม้ามโต พบเชื้อ *L. siamensis* โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ ผลบวกใน ไชกระดูก เลือด buffy coat น้ำลายและปัสสาวะ และสามารถเพาะเลี้ยงเชื้อได้

ผู้ป่วยชาวพม่าที่ติดเชื้อลิซมาเนียสายพันธุ์ไทย

ปีพ.ศ. 2554 พบผู้ป่วยชาวพม่าเพศชาย อายุ 34 ปี ประวัติของผู้ป่วยเป็น HIV ซีด คับและม้ามโต พบเชื้อ *L. siamensis* โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ ผลบวกใน เลือด buffy coat น้ำลาย และชิ้นเนื้อ (Phumee et al., 2013)

ปีพ.ศ. 2555 พบผู้ป่วยชาวพม่า เพศชาย อายุ 60 ปี ผู้ป่วยเป็นเบาหวานและได้รับยา prednisolone พบเชื้อ *L. siamensis* โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ ผลบวกใน เลือด buffy coat น้ำลาย ปัสสาวะและชิ้นเนื้อ (Phumee et al., 2013)

ปีพ.ศ. 2555 พบผู้ป่วยชาวพม่า เพศหญิง อายุ 22 ปี ผู้ป่วยไม่มีอาการแสดงมากับบิดาที่ติดเชื้อ *L. siamensis* พบเชื้อ *L. siamensis* โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ ผลบวกใน buffy coat และ น้ำลาย (Phumee et al., 2013)

2.5 การติดเชื้อร่วมกันระหว่างโรคลิชมาเนียและ HIV

การติดเชื้อร่วมกันระหว่างโรคลิชมาเนียและ HIV นั้นมีรายงานครั้งแรกเมื่อปีค.ศ. 1985 ต่อมาในปีค.ศ. 1994 พบว่ามีการติดเชื้อร่วมเพิ่มขึ้นในประเทศทางยุโรปใต้ เช่น ฝรั่งเศส อิตาลี โปรตุเกศ และสเปน โดยสเปนพบมากที่สุดประมาณ 57% (Alvar et al., 1997, Desjeux, 2003) และจากการศึกษาการแพร่กระจายและการระบาดของโรคที่มีการติดเชื้อร่วมกันนั้นพบว่ามี การติดเชื้อร่วมกันเพิ่มจำนวนมากขึ้นทั่วโลกตั้งแต่ปีค.ศ. 1999 (Desjeux et al., 1998) ซึ่งการติดเชื้อร่วมดังกล่าวเป็นลักษณะอาการแสดงของโรคลิชมาเนียลักษณะรูปแบบใหม่ซึ่งมีรายงานว่าพบการติดเชื้อร่วมในประเทศต่างๆมากกว่า 35 ประเทศ ซึ่ง WHO พบว่าจำนวนผู้ป่วยที่ติดเชื้อร่วมทั่วโลกมีจำนวนประมาณ 39.5 ล้านคน ซึ่ง 1 ใน 3 ของผู้ป่วยเหล่านี้ อาศัยอยู่ในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคลิชมาเนียเป็นส่วนใหญ่ (Alvar et al., 2008) โรคลิชมาเนียที่ติดเชื้อร่วมกับ HIV นั้นส่วนใหญ่มักจะพบในลักษณะรูปแบบร่วมของ Visceral leishmaniasis (VL) เช่น *L. infantum*, *L. donovani* พบประมาณ 90 % ส่วนใหญ่พบว่ามีจำนวน CD4+ T cells น้อยกว่า 200 cell/mm³ (Morales et al., 2002) และ ลักษณะรูปแบบร่วมของโรคทางผิวหนัง (Cutaneous leishmaniasis (CL) เช่น *L. braziliensis* *L. mexicana* และ *L. amazonensis* สามารถพบอาการแสดงที่ผิวหนังได้เช่นกัน ลักษณะรอยโรคที่ผิวหนังสามารถปรากฏได้หลายรูปแบบเช่น Papulonodular, Ulcerative, Infiltrative, Lepromatous, และ Diffuse Psoriasis-like, Keloid, Histoid หรือ Kaposi-like lesion อีกทั้งพบการติดเชื้อร่วมกับกลุ่มโลกใหม่ (New World) มากประมาณ 63% (Rabello et al., 2003) สำหรับการรักษานั้นจะใช้ยาตัวเดียวกับการรักษาอาการที่แสดงออกทางอวัยวะภายใน (Visceral leishmaniasis) ที่ไม่มีการติดเชื้อร่วมเช่น pentavalent antimonials และ liposomal amphotericin B (Lindoso et al., 2012) แต่มักพบว่าการรักษาเป็นไปในทางที่แย่งและกลับเป็นโรคใหม่ได้อีก อย่างไรก็ตาม ประสิทธิภาพของการรักษาจะขึ้นอยู่กับอาการของผู้ป่วยแต่ละคน (WHO, 2010; Cruz et al., 2006)

จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยโรคโลหิตมาเนียที่ติดเชื้อ HIV ร่วมด้วย (Leishmania/HIV co-infection) จะส่งผลกระทบต่อผู้ป่วยโรคโลหิตมาเนียในทางลบคือ เชื้อ HIV จะทำให้การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยถูกทำลาย เพิ่มโอกาสการเกิดโรคโลหิตมาเนียเมื่อได้รับเชื้อได้เร็วขึ้น มีปริมาณของเชื้อโลหิตมาเนียสายพันธุ์ต่างๆ ในเลือดและไขกระดูกมากขึ้น และเพิ่มโอกาสการติดเชื้อฉวยโอกาสอื่นๆตามมา ส่งผลให้เกิดการระบาดของโรคโลหิตมาเนียจากเดิมที่มีรายงานผู้ป่วยเป็นรายๆ กลายเป็นการระบาดในวงกว้าง เพราะผู้ป่วย HIV/AIDS ที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ที่มีโรคโลหิตมาเนียเป็นโรคประจำถิ่นจะเสี่ยงต่อการเกิดโรคโลหิตมาเนีย ผู้ป่วยเหล่านี้โอกาสการตรวจวิเคราะห์ทางซีโร โลยีให้ผลเป็นบวกต่ำ และมีอัตราการรักษาล้มเหลวสูงขึ้น ตลอดจนเพิ่มโอกาสการเสียชีวิตของผู้ป่วยโรคโลหิตมาเนียมากขึ้น

2.6 ยาเคมีบำบัดที่ใช้ในการรักษาโรคโลหิตมาเนีย (Neal et al., 1995; Mondal et al., 2010; Bhargava และ Singh, 2012)

ยาที่ใช้ในการรักษาโรคโลหิตมาเนียนั้นจะขึ้นอยู่กับประเภทและอาการของโรค โดยยาที่ใช้สำหรับรักษาโรคโลหิตมาเนียโดยทั่วไปได้แก่ Amphotericin B, Pentavalent antimonials, Pentamidine, Miltefosine และ Paromomycin (ตารางที่ 2.1) ยารักษาเฉพาะโรคนั้นมักจะมีอาการแทรกซ้อนมาก และมีราคาแพง จึงต้องใช้อย่างระมัดระวัง และอยู่ในการดูแลของแพทย์ การรักษาผู้ป่วยเหล่านี้ในประเทศไทยมีเพียงยา Amphotericin B ซึ่งพบว่าเมื่ออัตราการกลับเป็นโรคซ้ำสูง โดย Amphotericin B เป็นยาปฏิชีวนะที่ผลิตได้จาก *Streptomyces nodosus* ใช้รักษาโรคโลหิตมาเนียทั้ง Visceral leishmaniasis และ Cutaneous leishmaniasis นิยมใช้ยานี้รักษาในประเทศอินเดียเนื่องจากมีราคาไม่แพง พบว่ามีการกลับมาเป็นโรคใหม่อีกประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการดื้อยาอาจเกิดจากกลไกที่ยาอาจเกิดการซึมผ่านผนังเซลล์ของเชื้อเข้าไปยังเซลล์เมมเบรนได้น้อยลง อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ ergosterol ในเซลล์เมมเบรน ยานี้มีพิษต่อไตซึ่งมีความสัมพันธ์กับขนาด

ยาที่ใช้ การปรับขนาดยาเพิ่มขึ้นทำได้ยาก จึงมีการผลิตยาในรูปแบบ ลิพิดซึ่งมีหลายรูปแบบ เช่น liposomal amphotericin B และ amphotericin B lipid complex หรือ amphotericin B sodium cholesteryl sulfate ขึ้น เพื่อลดผลข้างเคียง โดยเฉพาะอย่างยิ่งพิษต่อไตและปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นขณะให้ ยา โดยฤทธิ์ต้านเชื้อ ไม่ด้อยลง

ตารางที่ 2.1 ยาเคมีบำบัดที่ใช้ในการรักษาโรคโลหิตมาเนีย

ชื่อยา	คุณสมบัติและการนำไปใช้	คำอธิบาย	ผลกระทบต่อผู้ป่วยโรคโลหิตมาเนีย
เพนตะวาเลนต์แอนติโมนีเอส (Pentavalent Antimonials)	เป็นสารประกอบ Polymeric organometallic complexes โดยใช้ฉีดเข้าหลอดเลือดดำ หรือ ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ปริมาณที่ใช้ 20 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว (กิโลกรัม) ต่อวัน ใช้ทั้งหมด 20 วัน	เป็นยาที่ใช้มาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1911 ใช้สำหรับผู้ป่วย แสดงอาการภายใน (VL) และแสดงอาการที่ผิวหนัง (CL) พบการดื้อยาในแคว้นมคธ ประเทศอินเดีย และมีการตอบสนองต่อการรักษาที่แตกต่างกันในผู้ป่วย CL ยาที่ใช้ทั่วไปอยู่ในกลุ่ม sodium stibogluconate (SSG) ซึ่งมีราคาถูก	เกิดผื่นแดง อาการบวม น้ำ อาการปวดท้อง วิงเวียน และ กลั้วเลือดดำ
Amphotericin B fungizone	Polyene antibiotic เป็นยาปฏิชีวนะที่ผลิตได้จาก <i>Streptomyces nodosus</i> โดยใช้ฉีดเข้าหลอดเลือดดำ ปริมาณที่ใช้: 0.5 - 1.0 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว (กิโลกรัม) ต่อวัน ใช้ทั้งหมด 8 สัปดาห์จำนวนทั้งหมดที่ใช้ในการรักษา 1.5 - 2 กรัม	ใช้สำหรับผู้ป่วย VL, CL และแสดงอาการที่เยื่อเมือก (MCL) เป็น first-line drug สำหรับรักษา VL ประเทศอินเดียซึ่งมีการดื้อยา antimonial	ภาวะ azotemia (อะโซทีเมีย) หรือ ภาวะที่ร่างกายมีค่า creatinine และ BUN สูง เกินกว่าค่าปกติหรือมีการคั่งของของเสีย โลหิตจาง ภาวะเกลือโปแตสเซียมต่ำ
Amphotericin B ambisome	เป็นชนิด Unilamellar liposome โดยใช้ฉีดเข้าหลอดเลือดดำ	ให้ผลการรักษาที่ดีที่สุดในรูปแบบลิปิดสำหรับผู้ป่วย VL และ WHO ใช้ 18-50 mg ampoule ในการรักษา PKDL and MCL	เพ้อ ความดันโลหิตต่ำ คลื่นไส้ อาเจียน เบื่ออาหาร และ ปวดศีรษะ
มิลเลทโฟซีน (Miltefosine)	เป็น Hexadecylphosphocholine ใช้เป็นยารับประทาน	เป็น First oral drug สำหรับผู้ป่วย VL มีประสิทธิภาพในการต้านบางรูปแบบของผู้ป่วย CL ห้ามใช้ขณะตั้งครรภ์	อาการคลื่นไส้ อาเจียนและ / หรือ ท้องเสีย creatinine และ LFT เพิ่มขึ้น
Amphotericin B formulations	เป็นสารประกอบ Lipidic formulations โดยใช้ฉีดเข้าหลอดเลือดดำ	เป็นสารประกอบลิปิดซึ่งประกอบด้วย Abelcet, Amphocil, Amphomul และ multilamellar liposome ใช้ในการรักษาผู้ป่วย VL	ใช้ หนาวสั่น คลื่นไส้ เบื่ออาหาร ปวดศีรษะ อาเจียนและ ความดันโลหิตต่ำ
พารโอมัยซิน (Paromomycin)	เป็นสารประกอบ Aminoglycoside (also known as aminosidine or monomycin) ผลิตได้จาก <i>Streptomyces rimosus</i> ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ สำหรับผู้ป่วยที่มีอาการที่อวัยวะภายในและใช้เฉพาะที่สำหรับผู้ป่วยที่มีอาการทางผิวหนัง	ใช้ในการรักษาผู้ป่วย VL ในประเทศอินเดีย ใช้ Phase III สำหรับผู้ป่วย VL ทางตะวันออกของประเทศแอฟริกา มีประสิทธิภาพน้อยกว่าในประเทศชูดาน ใช้เฉพาะที่สำหรับผู้ป่วย CL ในรูปแบบ methyl benzethonium chloride และ ใช้เฉพาะที่ร่วมกับ gentamicin and surfactants ใน Phase III trial ใช้รักษาได้ดีกับผู้ป่วยที่ติดเชื้อ <i>L. mexicana</i> และ <i>L. major</i>	ได้รับการบาดเจ็บ เกิดผื่นแดง อาการบวม น้ำตื้นพอง และมีผลต่อการได้ยิน
เพนทามิดีน (Pentamidine)	เป็น Diamidine, as isethionate salt ใช้ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ปริมาณยาที่ใช้ 2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว (กิโลกรัม) ต่อวัน ทั้งหมด 7 วัน	ใช้เฉพาะที่สำหรับผู้ป่วย CL ในประเทศอเมริกา ได้เท่านั้น	คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย น้ำตาลในเลือดสูง และเป็นพิษต่อหัวใจ
Sitamaquine	เป็น 8-aminoquinoline analog ใช้เป็นยารับประทาน	ใช้ทดสอบในผู้ป่วย VL ในประเทศเคนยาและบราซิล พบว่ามีความสำเร็จที่ค่อนข้างจำกัด	ปวดท้อง ปวดศีรษะ อาเจียน อาการอาหารไม่ย่อยและผิวหนังคล้ำ

การใช้ยาเคมีบำบัดในปัจจุบันสำหรับการรักษาผู้ป่วยที่มีอาการทางอวัยวะภายใน ยาที่นิยมใช้คือ pentavalent antimony [sodium stibogluconate (SSG) หรือ meglumine antimoniate], polyene amphotericin B (deoxycholate salt หรือ liposomal formulation, AmBisomew), alkylphosphocholine miltefosine และ aminoglycoside paromomycin ซึ่งสามารถใช้การรักษาแบบใช้ยาร่วมกันสองตัวเพื่อลดระยะเวลา และลดการดื้อยาของลิซมาเนียสายพันธุ์ต่างๆ ในการรักษา แต่อย่างไรก็ตามต้องอยู่ในความดูแลของแพทย์และอาจมีอันตรายต่อผู้ป่วย

2.7 เทคนิคที่ใช้ในการศึกษาความไวต่อยาของเชื้อลิซมาเนียปัจจุบัน (Fumarola et al., 2004) มีดังนี้

ในการศึกษาความไวของยาต่อเชื้อลิซมาเนียสามารถทำได้ทั้งในระยะ Promastigotes, Intracellular amastigotes และ Axenic amastigotes วิธีที่นิยมใช้ส่วนใหญ่ได้แก่

- การศึกษาโดยการตรวจนับเซลล์ผ่านกล้องจุลทรรศน์ (Direct counting) โดยการนับเซลล์ที่มีชีวิตที่สามารถเคลื่อนที่ได้ของระยะ Promastigote และยังสามารถใช้สีย้อมเพื่อคำนวณหาอัตราการมีชีวิตโดยคำนวณจากเซลล์เป็นและเซลล์ตายเช่นสี Trypan blue และ Neutral red หลังจากนั้นทำการคำนวณหาค่าความไวหรือการยับยั้งของยาเป็นต้น วิธีนี้มีข้อดีคือทำงานง่าย ค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์น้อย แต่วิธีการนี้มีข้อเสียที่ต้องอาศัยผู้ที่มีความเชี่ยวชาญในการสังเกตการเปลี่ยนแปลงของเชื้อ และใช้เวลาค่อนข้างมาก
- การวิเคราะห์ด้วยการวัดความเข้มของสี (Colorimetric methods) เป็นวิธีที่ใช้แพร่หลายในห้องปฏิบัติการ เช่น ELISA โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนของเชื้อและวัดสารที่ปล่อยออกมาของเชื้อ และเทคนิค MTT เป็นวิธีวัดความเป็นพิษในเซลล์ซึ่งเทคนิคนี้เหมาะสำหรับเซลล์ชนิดยึดเกาะแต่เซลล์ลิซมาเนียนั้นเป็นเซลล์แขวนลอย

และอาหารเลี้ยงเซลล์ของลิชมาเนียยังมีผลต่อปฏิกิริยาจึงทำให้ได้ผลที่ผิดพลาดและไม่แม่นยำ

- เทคนิคการนำ DNA เข้าสู่เซลล์เป้าหมายเพื่อติดตามการเรืองแสง (Reporter gene technology) Reporter gene ที่นิยมใช้กันทั่วไปเพื่อเข้าสู่ภายในเซลล์เป้าหมายได้แก่ chloramphenicol acetyltransferase (CAT), β -galactosidase, Fluorescent protein (GFP), Luciferase และ glucuronidase เป็นต้น ส่วน Reporter gene ที่นิยมใช้ภายนอกเซลล์ได้แก่ human growth hormone (HGH) และ secreted alkaline phosphatase (SEAP) (D'Aiuto et al., 2008). ในการศึกษานี้ได้เลือกใช้ GFP เป็น reporter gene เพื่อใช้ในการติดตามการเรืองแสง GFP ซึ่งได้มาจากแมงกะพรุน (*Aequorea victoria*) ปัจจุบัน GFP เป็นที่นิยมในการศึกษาการคัดกรองยาต้านจุลชีพสำหรับโรคทางด้านปรสิตเนื่องจาก GFP เป็นวิธีที่ใช้ทั่วไป ง่ายต่อการติดตามผล ต้นทุนต่ำและปลอดภัย (Kain, 1999) และสามารถนำไปศึกษาต่อทางด้าน drug high throughput screening ต่อไปในอนาคต

2.8 การศึกษาความไวของยาต่อเชื้อลิชมาเนีย

การศึกษาความไวของยาต่อเชื้อลิชมาเนียสามารถทำได้ทั้งใน *In vitro*, *Ex vivo* และ *In vivo* ซึ่งผลที่ได้จะมีความไวแตกต่างกันออกไปซึ่งขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของลิชมาเนีย ซึ่งปัจจุบันพบว่าเชื้อลิชมาเนียมีการดื้อยามากขึ้นเรื่อยๆ ในแต่ละประเทศ โดยเฉพาะในเมือง Bihar ประเทศอินเดีย (Singh, 2012) และในกลุ่มประเทศที่มีการระบาดของโรคลิชมาเนียซึ่งประเทศเหล่านี้จะมีอัตราการดื้อยามากขึ้น ในปัจจุบันการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับความไวต่อยาของเชื้อลิชมาเนียแต่ละชนิดแต่ละประเทศจึงมีการศึกษาแพร่หลายมากขึ้นเพื่อช่วยเหลือผู้ป่วยที่ติดเชื้อได้ทันที่และรักษาได้ตรงอาการของโรค และปัจจุบันยังไม่มีวัคซีนในการป้องกันโรคนี้และยาที่ใช้มักจะมีผลเสียต่อผู้ป่วย

โดยตรง ดังนั้นจึงมีการศึกษาวิจัยที่หลากหลายเช่น การศึกษากลไกการดื้อยา การศึกษาพัฒนายา การให้ยาเพื่อป้องกันการดื้อยา เป็นต้น ปัจจุบันมีการศึกษาหาค่าปริมาณความเข้มข้นของยาที่ยับยั้ง การเพิ่มจำนวนเชื้อได้ 50% ในระยะต่างๆของเชื้อลิซมาเนียสายพันธุ์ต่างๆเช่น IC50 ของเชื้อ *L. infantum* ในระยะ promastigotes มีค่าเท่ากับ 2.5 μM สามารถกระตุ้น early programmed cell death ได้ประมาณ 49.6% (Sands et al., 1985) และมีการศึกษาใน *L. donovani* ทั้งในระยะ Promastigote และ amastigote พบว่า ค่า IC50 ของ Amphotericin B ในระยะ amastigote คือ 0.1-0.4 μM สำหรับ ยา Miltefosine มีค่า IC50 ประมาณ 0.7-4 μM ในทั้งสองระยะ และ Sodium stibogluconate IC50 > 64 $\mu\text{g SbV/ml}$ ในระยะ Promastigote แต่ในระยะ amastigote มีประสิทธิภาพมากกว่าซึ่งมี IC50 22-28 $\mu\text{g SbV/ml}$ (Vermeersch et al., 2009) และ Amphotericin B ต่อเชื้อ *L. (Viannia) braziliensis* ในระยะ Promastigote มี IC50 = 29.57 $\mu\text{g/ml}$ และพบว่า *L. viannia guyanensis* ใน French Guyana มีการดื้อ Pentamidine (acher et al., 2001) มีการศึกษาการส่งถ่ายยีนที่สร้างสารเรืองแสงเข้าไปในเซลล์เช่น GFP เป็นตัวติดตามผลในการทดสอบความไวต่อยาการศึกษา โดยทั่วไปจะ ศึกษาในเชื้อลิซมาเนียระยะ amastigote ใน macrophage มีการศึกษาพบว่า *L. donovani* และ *L. braziliensis* ไวต่อยา sodium stibogluconate (SAG) มากกว่า *L. major*, *L. tropica*, และ *L. Mexicana* (Allen and Neal, 1989, Berman, 1981, Neal et al., 1995) 3-5 เท่า Berman และคณะ (1982) พบว่าเชื้อลิซมาเนียมีการดื้อยา pentavalent และมีการศึกษาในกัวเตมาลาพบว่าเชื้อลิซมาเนีย มีความไวต่อยา sodium stibogluconate ซึ่งขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ที่แตกต่างกันไป *L. braziliensis* ไวต่อ ยาประมาณ 96 เปอร์เซ็นต์มากกว่าเชื้อ *L. mexicana* ซึ่งไวต่อยาประมาณ 57 เปอร์เซ็นต์ (Navin et al., 1992) จากการศึกษาข้างต้นจะเห็นได้ว่าเชื้อแต่ละสายพันธุ์จะให้ยาที่แตกต่างกันออกไปดังนั้น ผู้วิจัยจึงต้องการศึกษาทดสอบความไวของยาต่อเชื้อลิซมาเนียสายพันธุ์ไทย *L. siamensis* เพื่อหา ยาที่ใช้ในการรักษาโรคที่เหมาะสมและป้องกันการดื้อยาต่อไปในอนาคต

คำถามวิจัย

เชื้อไลชมาเนียสายพันธุ์ไทยมีความไวต่อยาที่แตกต่างกันหรือไม่

วัตถุประสงค์

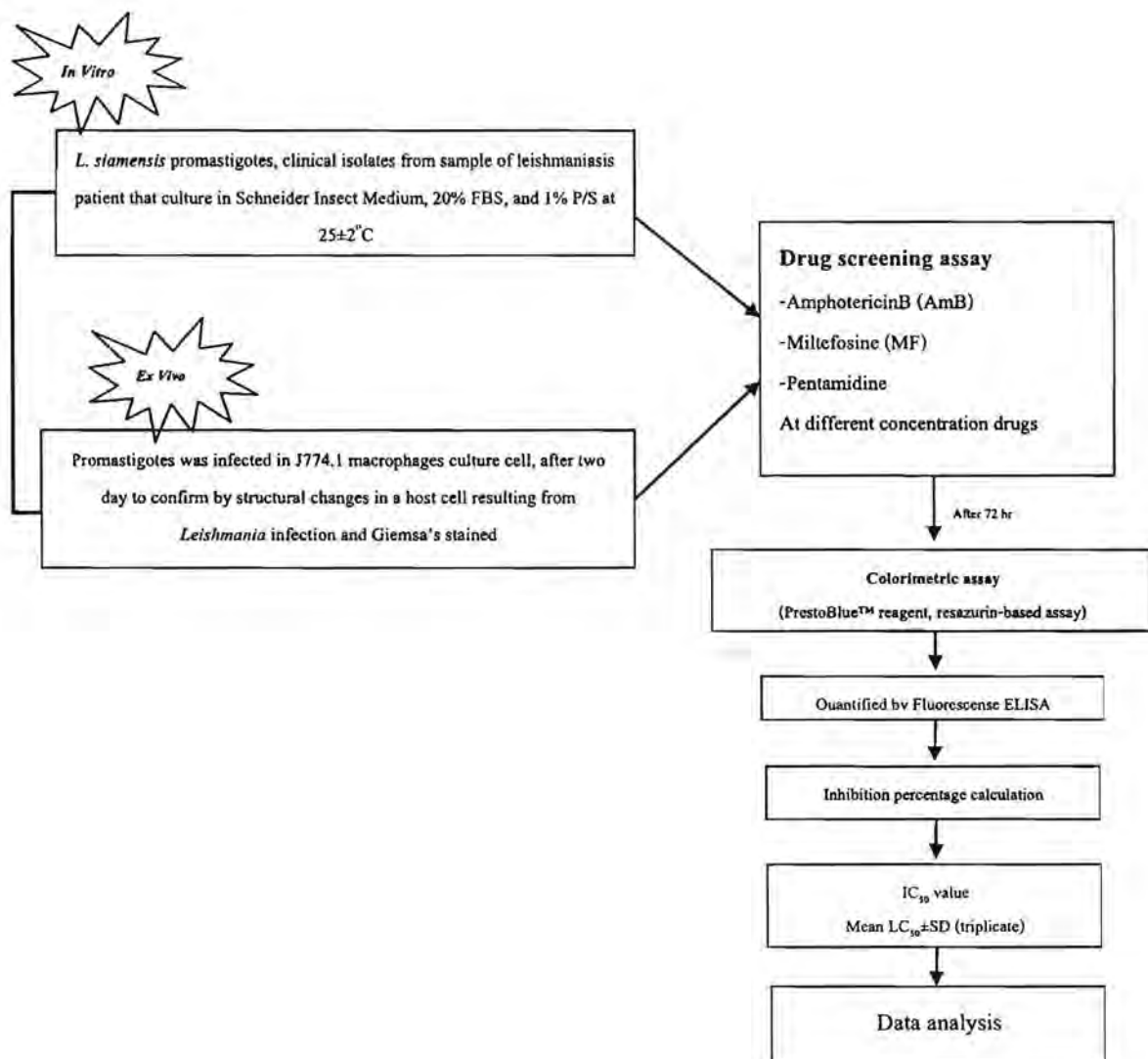
เพื่อศึกษาความไวของยาต่อเชื้อไลชมาเนียสายพันธุ์ไทยทั้งใน *In vitro* และ *Ex vivo*

สมมติฐาน

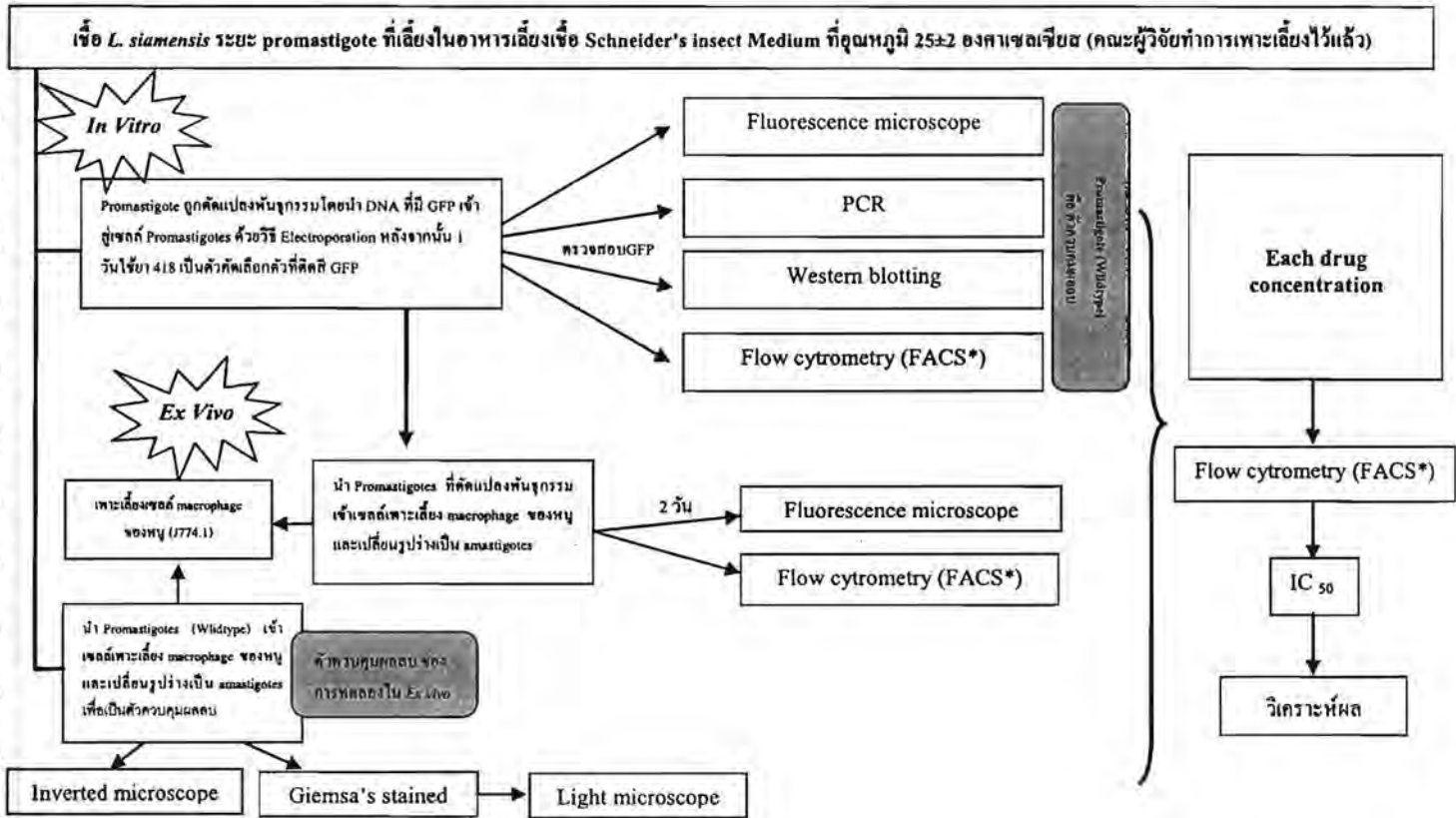
เชื้อไลชมาเนียสายพันธุ์ไทยมีความไวต่อยาที่แตกต่างกัน

กรอบแนวความคิด

ทำการทดสอบความไวต่อยา AmphotericinB (AmB) Miltefosine (MF) และ Pentamidine (PD) ในแต่ละความเข้มข้น โดยใช้เทคนิคที่ทำให้เกิดสารมีสีซึ่งในการศึกษานี้ใช้สี Resazurin เป็นอินดิเคเตอร์



ในกรณีนี้จะทำการยืนยันผลด้วยการคัดแปลงพันธุกรรมของเชื้อลิซมาเนีย โดยมี DNA ที่มี GFP เข้าไปในเซลล์



*FACS: Fluorescence-activated cell sorting

3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

การศึกษาวิจัยนี้จะใช้เชื้อลิซมาเนีย *L. siamensis* ซึ่งแยกจากเลือดของผู้ป่วยและได้มีการเพาะเลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการของคณะผู้วิจัยแล้ว (Phumee et al., 2013) โดยมีทั้งหมด 2 isolation

ซึ่ง

Isolation 1 (Code: BM) สามารถแยกได้จากไขกระดูกของผู้ป่วย

Isolation 2 (Code: Tissue) สามารถแยกได้จากชิ้นเนื้อของผู้ป่วยคนเดียวกับ

Isolation 1 แต่เกิดเป็น โรคซ้ำอีกครั้ง

3.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์จากไขกระดูก และ ชิ้นเนื้อจากคนไข้ที่จังหวัดสงขลาที่ได้จากการศึกษาก่อนหน้านี้ (Phumee et al., 2013) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะซึ่งจำลองสภาวะเลียนแบบในตัวรีนฝอยทราย อาหารที่ใช้ก็คือ Schneider's insect medium ที่ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เลี้ยงใน 24 well plates สังเกตเซลล์ทุก 24 ชั่วโมง จะสามารถเห็นเชื้อประมาณ 2-3 วันหลังจากเพาะเลี้ยงจากตัวอย่างเมื่อเห็นตัวเชื้อจะทำการแบ่งเซลล์ออกเป็นสองส่วนแล้วเติมอาหารลงไปเพิ่มอีกหนึ่งส่วนเพื่อเป็นการโคจรตัวเชื้อและทำไปเรื่อยๆจนเห็นเฉพาะตัวเชื้อ

3.3 การตรวจวินิจฉัยเชื้อลิซมาเนีย

3.3.1 ตรวจหาตัวเชื้อลิซมาเนีย โดยการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์

นำเซลล์เพาะเลี้ยงทั้งสอง Isolation ทำสเมียร์ ย้อมด้วยสี Giemsa เพื่อหาตัวเชื้อ โดย fix ก่อนย้อมใน Absolute methanol 2-3 นาที และทิ้งให้แห้ง เตรียมสีโดยใช้อัตราส่วน Giemsa stock solution : buffered water (pH 7.0-7.2) = 1:20 ผสมสีให้เข้ากันย้อมสไลด์ ใช้เวลาย้อมประมาณ 20

นาที่ ล้างสีออกด้วยน้ำ ทิ้งสไลด์ไว้ให้แห้ง นำสไลด์ที่ย้อมสีแล้วไปตรวจโดยมองผ่านกล้องจุลทรรศน์

3.3.2 เทคนิค PCR ตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อลิซมาเนียและหาสายพันธุ์ของลิซมาเนีย ทำการสกัด DNA จากเซลล์เพาะเลี้ยงทั้งสอง Isolation นำมาทำ PCR ในการวิจัยครั้งนี้จะใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน ITS1 ซึ่งออกแบบไว้โดย Spanakos และ คณะ (Spanakos et al., 2008) ซึ่งมี sequence primer คือ

LeF5'-TCC GCC CGA AAG TTC ACC GAT A-3'

LeR 5'-CCA AGT CAT CCA TCG CGA CAC G-3'

โดยส่วนของยีนที่ทำการศึกษาที่มีความผันแปรสูงจึงทำให้สามารถจำแนกชนิดของเชื้อลิซมาเนียได้ ซึ่งนอกจากจะมีเบสที่แตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์และขนาดของ PCR ที่ได้ยังแตกต่างกันตามสายพันธุ์อีกด้วย โดยลิซมาเนียสายพันธุ์ไทยนี้จะได้ขนาด PCR ที่ 379 เบส (Chusri et al., 2012) ทำการโคลนนิ่งและหาลำดับเบสเพื่อยืนยันผล

การทำปฏิกิริยาถูกลูโซ่ PCR

ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นยีน ITS1 โดยใช้สารละลายที่มีองค์ประกอบกับสัดส่วนที่เหมาะสม (ตารางที่ 3.1) ภายใต้สภาวะที่พอเหมาะ (ตารางที่ 3.2) โดยใช้ Thermal cycler condition ที่ควบคุมโดยเครื่องเพิ่มปริมาณสาร DNA (PCR Mastercycler® pro (Eppendorf, Germany) นำผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา PCR มาตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยให้ดีเอ็นเอที่สนใจเคลื่อนที่คู่ไปกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder, Fermentas®) ในแผ่นเจล (1.5 % Agarose gel) ภายใต้กระแสไฟฟ้า เมื่อย้อมดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียม โบรไมด์ แล้วตรวจดูดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) จะเห็นดีเอ็นเอเรืองแสงเป็นแถบ และเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานก็จะสามารถบอกได้ว่าผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีขนาดเท่าไร โดยคาดว่าชิ้นผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีขนาดประมาณ 379 bp

สุดท้ายจึงเก็บผลิตภัณฑ์ PCR (PCR product) ที่ได้ไว้ที่ 2-8 °C จนกว่าจะนำมาใช้ใน

ขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่ PCR

สารที่เป็นองค์ประกอบ	ปริมาตร (μl)
10X <i>Taq</i> buffer	2.5
2 mM dNTP	2.5
25 mM MgCl ₂	2.5
10 μM forward primer	0.4
10 μM reverse primer	0.4
<i>Taq</i> DNA polymerase; Invitrogen [®] (5U/μl)	0.2
DNA template (200 ng/μl)	6.0
dH ₂ O	10.5
รวม	25.0

ตารางที่ 3.2 แสดง Thermal cycler condition

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
Initial PCR activation step	94	5	1
ปฏิกิริยาลูกโซ่ของ 3 ขั้นตอนเกิดวนซ้ำกัน ประกอบด้วย			
Denaturation	94	1	40
Annealing	65	1	
Extension	72	1	
Final extension	72	7	1

การโคลนสายนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 (Cloning)

ใช้วิธีเชื่อมต่อบริเวณของชิ้น ITS1 เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาเชื่อมต่อกับพลาสมิดเวกเตอร์ pGEM T Easy ซึ่งรวมอยู่ในชุดทดสอบสำเร็จรูป ของบริษัท promega โดยอาศัยเอนไซม์ T4 DNA ligase เป็นตัวทำปฏิกิริยาเชื่อมต่อ (ligation reaction) ส่วนประกอบที่ใช้ในการทำให้เกิดปฏิกิริยา ปริมาตรรวม 2.5 μ l แสดงดังตารางที่ 3.3 ทำปฏิกิริยาโดยนำสารละลายทั้งหมดผสมให้เข้ากันแล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการถ่ายโอนพลาสมิดสายผสมเข้าสู่ competent cells ด้วยวิธี heat shock ที่อุณหภูมิ 42 °C 45 วินาที คัดเลือกโดยอาศัยโคโลนีสีฟ้าขาว จากคุณสมบัติของพลาสมิด pGEM T Easy ที่ได้รับการออกแบบให้มีบริเวณ *lacZ* gene ซึ่งทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์ β -galactosidase ที่ย่อยสาร X-gal แล้วให้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีฟ้า คุณสมบัติข้อนี้สามารถนำมาคัดเลือกเซลล์ *E. coli* ที่ได้รับพลาสมิดที่มีชิ้นส่วน ITS1 ออกจากเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดที่ไม่มีชิ้นส่วน ITS1 ได้ โดยเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดที่ไม่มีชิ้นส่วน ITS1 แทรกชิ้น *lacZ* จะยังคงทำงานและย่อย X-gal ได้ ทำให้เซลล์เหล่านี้เจริญเป็นโคโลนีสีฟ้า ตรงข้ามกับเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดที่มีชิ้นส่วน ITS1 แทรกกันบริเวณ *lacZ* gene ออกจากกัน ทำให้ชิ้น *lacZ* ไม่สามารถทำงานได้ เซลล์เหล่านี้จะเจริญเป็นโคโลนีสีขาวครีม และทำการขึ้นชั้นผลการโคลนด้วยเทคนิค colony PCR เมื่อให้ผลบวกนำ นำเซลล์เลี้ยงใน อาหาร LB broth ผสม ยาแอมพิซิลิน 100 μ g/ml บ่มบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็วรอบ 200 rpm อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์สำหรับนำไปสกัดเอาเฉพาะพลาสมิดสายผสมออกจากเซลล์แบบที่เรียกต่อไป การสกัดพลาสมิดจะใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปสำหรับสกัดพลาสมิด Invisorb® Spin Plasmid mini Kit ของบริษัท Invitex ประเทศเยอรมันนี้

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบและสัดส่วนของสารที่ใช้ในการทำให้เกิดปฏิกิริยาเชื่อมต่อ

องค์ประกอบ	ปริมาตร/ปฏิกิริยา (μl)
pGEM [®] -T Easy Vector (50 ng/μl)	1.25
2X Rapid Ligation buffer	0.25
T ₄ DNA Ligase (3U/μl)	0.25
DNA จากผลิตภัณฑ์ PCR (50 ng/μl)	0.75
รวม	2.5

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide sequencing)

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ ITS1 ในการทดลองนี้ใช้วิธีรับบริการตรวจวิเคราะห์ จากบริษัท 1st BASE DNA sequencing services ประเทศมาเลเซีย โดยใช้ไพรเมอร์ T7 (5' ATT ATGCT GAGTG ATATC CC 3') และยืนยันความแม่นยำของลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละตัวอย่าง ด้วยการส่งไปวิเคราะห์อย่างน้อย 3 โคลนต่อหนึ่งตัวอย่าง

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1

ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แสดงค่าในรูปกราฟ sequence electropherogram ถูกพิจารณาความถูกต้องโดยใช้โปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor version 7.0.5.3 โดยบริเวณที่เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ประกอบด้วยส่วนของยีน ITS1 และไพรเมอร์ทั้งสองข้าง บันทึกลำดับนิวคลีโอไทด์เฉพาะส่วนของยีน ITS1 ในรูปแบบ Fasta format ไว้ในโปรแกรม Notepad สำหรับใช้วิเคราะห์ข้อมูลต่อไป

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล

เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์เทียบกับฐานข้อมูล NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ด้วยโปรแกรมออนไลน์ BLASTN 2.2.26+ (Basic Local Alignment Search Tools) ซึ่งเป็นโปรแกรมที่ใช้ตรวจสอบความเหมือนหรือการซ้ำกันของลำดับนี้

วคลีไอโทค (sequence) เทียบกับฐานข้อมูลทั้งหมด ผลการเปรียบเทียบความเหมือนจะถูกวิเคราะห์ด้วยสถิติอย่างมีนัยสำคัญ และตัดสินจากค่า percentage identities

3.4 การวัดอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์

นำเซลล์มาเพาะเลี้ยงในถาดหลุมเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุม (24-well plate) ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยมีจำนวนเซลล์ตั้งต้น 100,000 เซลล์ต่อหลุม เป็นเวลา 7 วัน เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกวัน เมื่อครบทุก 24 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย โดยใช้สี trypan blue ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (inverted microscopic) โดยใช้ hemacytometer เพื่อนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์เซลล์รอดชีวิตซึ่งทำซ้ำทั้งหมดสามครั้ง

3.5 การทดสอบความไวต่อยา

In vitro (ระยะ Promastigote)

ทำการศึกษาในเซลล์ระยะ promastigote ซึ่งยาที่ใช้มี 3 ชนิดคือ amphotericinB (AmB), miltefosine (MF) และ pentamidine โดยใช้ความเข้มข้นที่แตกต่างกันดังนี้

- AmphotericinB (สั่งซื้อจากบริษัท Merck ทำการละลายด้วย DMSO) ที่ความเข้มข้น 2, 1.5, 1, 0.5, 0.3, 0.25, 0.2 และ 0.15 μM
- Miltefosine (สั่งซื้อจากบริษัท Merck ทำการละลายด้วย ddH₂O) ที่ความเข้มข้น 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10 และ 5 μM
- Pentamidine (สั่งซื้อจากบริษัท sigma ทำการละลายด้วย ddH₂O) ที่ความเข้มข้น 60, 50, 30, 20, 10, 8, 5 และ 3 μM

ความเข้มข้นของยาดังกล่าวได้ศึกษาจากความเข้มข้นของยาที่พบในพลาสมาหรือซีรัมของมนุษย์ที่ถูกฉีดเข้าหลอดเลือดดำในการศึกษาก่อนหน้านี้ (Serenio and Lemesre, 1997)

โดยจะนำเซลล์ promastigote ระยะ late log phase จำนวน 2×10^7 cells/ml โดยนำเซลล์ใส่ใน 96 well plates แล้วเติมยาตามความเข้มข้นสุดท้ายต่างๆดังที่กล่าวข้างต้น นำไปบ่มที่ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมงเมื่อครบเวลา นำมาทำการศึกษาคือการใช้ resazurin เป็นอินดิเคเตอร์ ซึ่งเมื่อถูก reduced ด้วย mitochondrial reductase จะเป็นเป็นสีชมพูของสี rezorufin ซึ่งมีคุณสมบัติในการเป็น fluorescent ซึ่งจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีชมพู หลังจากนั้นทิ้งไว้ 60 นาที โดยสีจะถูกวัด absorption ด้วยเครื่อง ELISA แบบ Spectrofluorometer ที่ excitation 560 nm และ emission ที่ 590 nm ทำกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า % Inhibition และความเข้มข้นของยาแต่ละความเข้มข้นและคำนวณค่า IC 50 (คือปริมาณความเข้มข้นของยาที่ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเชื้อได้ 50%) จากสมการ logarithm ทำซ้ำสามครั้ง โดยใช้เซลล์ที่ไม่ใส่ยาเป็นตัวควบคุม ทำซ้ำสามครั้ง ซึ่งค่า IC50 สามารถคำนวณได้จากสูตร

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{\text{Absorbance (control)} - \text{Absorbance (sample)}}{\text{Absorbance (control)}} \times 100$$

Ex vivo (ระยะ Amastigote)

เพาะเลี้ยง macrophage ของหนู (J774.1) (ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.วัชรวิ ลิมปนสิทธิกุล) โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ DMEM ที่ 37 °C และ 5% CO₂ จนกระทั่งเซลล์โตได้ 80% นำเซลล์ระยะ Promastigote ให้ติดเชื้อเข้าเซลล์เพาะเลี้ยง macrophage ของหนู (J774.1) ซึ่งใช้ infection ratio คือ 20 promastigotes : 1 macrophage cell line โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ DMEM ที่ 37 °C และ 5% CO₂ ประมาณ 1-2 วัน และทำการล้างเซลล์ promastigote ที่ไม่ถูก phagocytosis ออก

นำมาทำการทดสอบยา ซึ่งยาที่ใช้มี 3 ชนิดคือ amphotericinB (AmB), miltefosine (MF) และ pentamidine โดยใช้ความเข้มข้นที่แตกต่างกันดังนี้

- AmphotericinB (สั่งซื้อจากบริษัท Merck ทำการละลายด้วย DMSO) ที่ความเข้มข้น 2, 1.5, 1, 0.5, 0.3, 0.25, 0.2 และ 0.15 μM
- Miltefosine (สั่งซื้อจากบริษัท Merck ทำการละลายด้วย ddH₂O) ที่ความเข้มข้น 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10 และ 5 μM
- Pentamidine (สั่งซื้อจากบริษัท sigma ทำการละลายด้วย ddH₂O) ที่ความเข้มข้น 60, 50, 30, 20, 10, 8, 5 และ 3 μM

โดยจะนำเซลล์ จำนวน 2×10^7 cells/ml โดยนำเซลล์ใส่ใน 96 well plates แล้วเติมยาตามความเข้มข้นสุดท้ายต่างๆดังที่กล่าวข้างต้น นำไปบ่มที่ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมงเมื่อครบเวลา นำมาทำการศึกษาสีโดยใช้ resazurin เป็นอินดิเคเตอร์ ซึ่งเมื่อถูก reduced ด้วย mitochondrial reductase จะเป็นเป็นสีชมพูของสี rezorufin ซึ่งมีคุณสมบัติในการเป็น fluorescent ซึ่งจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีชมพู ทั้งไว้ 60 นาที โดยสีจะถูกวัด absorption ด้วยเครื่อง ELISA แบบ Spectrofluorometer โดยทำการ excitation ที่ 560 nm และ emission ที่ 590 nm ทำกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า % Inhibit และความเข้มข้นของยาแต่ละความเข้มข้นและคำนวณค่า IC 50 (คือปริมาณความเข้มข้นของยาที่ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเชื้อได้ 50%) จากสมการ logarithm ทำซ้ำสามครั้งโดยใช้ เซลล์ที่ไม่ใส่ยาเป็นตัวควบคุม ซึ่งค่า IC50 สามารถคำนวณได้จากสูตร

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{\text{Absorbance (control)} - \text{Absorbance (sample)}}{\text{Absorbance (control)}} \times 100$$

3.6 การยืนยันผลการดื้อยา

ศึกษาเกี่ยวกับยีนที่มีการดื้อยา

ทำการสกัด RNA และทำ RT-PCR ในยีนตำแหน่ง γ -glutamylcysteine synthetase (γ -GCS; encoded by the *gsh1* gene) (Purkait et al., 2012)

Forward primer: 5' AGCGATAAACCGCTCGTACTGTGA 3'

Reverse primer: 5' ATGTTGTCAAAGTGCTCCGTGTGC 3'

และยีน S-adenosyl-Lmethionine: C-24- Δ -sterolmethyltransferase (SCMT) A

Forward primer: 5' CATCTTCCCTCCCTTTCCTC 3'

Reverse primer: 5' CCGCATGAACAACAGAGAGA 3'

โดยใช้ Housekeeping gene คือ α -tubulin

Forward primer: 5' TTCGTAGACTGGTGTCCAAGTGG 3'

Reverse primer: 5' ATACCCTCACCGACGTACCAGTG 3'

ทำการยืนยันผลโดยใช้เทคนิคตัดแปลงพันธุกรรมของเชื้อลิวมาเนีย

เทคนิคตัดแปลงพันธุกรรมของเชื้อลิวมาเนียโดยนำ DNA ที่มี GFP (ได้ความอนุเคราะห์จาก professor papadopoulou ประเทศแคนาดา) โดย integrate เข้าสู่เซลล์ระยะ promastigotes โดยวิธี electroporation คัดเลือกตัวที่เรืองแสงออกจากตัวไม่เรืองแสงโดยใช้ยา G418 ซึ่งตัวที่เรืองจะมียีนที่ดื้อต่อยา G418 จึงมีชีวิตรอดได้ และตรวจสอบหาเชื้อลิวมาเนียที่ได้รับการส่งถ่ายยีนโดย Fluorescence microscope เพื่อดูเซลล์ที่ติดสี เทคนิค PCR เพื่อดูยีน GFP เทคนิค Western blotting เพื่อดูการแสดงออกของเซลล์ที่ติดสี และแยกเซลล์ที่ติดสีโดยเทคนิค Fluorescence-activated cell sorting (FACS) เมื่อได้เซลล์ที่ติดสีอย่างต่อเนื่องในแต่ละครั้งของการแบ่งตัวของเซลล์ จะนำมาทำการศึกษาความไวต่อยา

In vitro

นำเซลล์ promastigote ที่ตัดแปลงพันธุกรรมระยะ late log phase จำนวน 2×10^7 cells/ml โดยนำเซลล์ใส่ใน 96 well plates แล้วเติมยาตามความเข้มข้นสุดท้ายต่างๆดังที่กล่าวข้างต้น นำไปบ่มที่ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมงเมื่อครบเวลานำไปส่องดูด้วยกล้อง Fluorescence microscope เพื่อดูเซลล์ที่ติดสีและแยกเซลล์ติดสี โดยวิธี Flow Cytometry และคำนวณค่า IC 50 (คือปริมาณความเข้มข้นของยาที่ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเชื้อได้ 50%) ทำซ้ำสามครั้ง โดยใช้ Wild type promastigote (promastigote ที่ไม่ได้ทำการตัดแปลงพันธุกรรม) เป็นตัวควบคุม

Ex vivo

เพาะเลี้ยง macrophage ของหนู (J774.1) (ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.วัชร ลิมปนสิทธิกุล) โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ DMEM ที่ 37°C และ 5% CO_2 จนกระทั่งเซลล์โตได้ 80% นำระยะ Promastigote ที่ตัดแปลงพันธุกรรม ให้ติดเชื้อเข้าเซลล์เพาะเลี้ยง macrophage ของหนู (J774.1) ซึ่งใช้ infection ratio คือ 20 promastigotes : 1 macrophage cell line โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ DMEM ที่ 37°C และ 5% CO_2 ประมาณ 1-2 วัน และทำการล้างเซลล์ promastigote ที่ไม่ถูก phagocytosis ออกด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ เซลล์ระยะ promastigote จะเปลี่ยนรูปร่างเป็น amastigote อยู่ใน cytoplasm ของ macrophage หลังจากนั้น 2 วันนำเซลล์ที่ได้ดูผ่านกล้อง Fluorescence microscope เพื่อดูการติดสีของเซลล์ amastigotes และทำการศึกษาเพื่อหาเชื้อลีชมาเนียที่ได้รับการส่งถ่ายขึ้นโดยใช้เทคนิค Flow cytometry (FACS) การทดสอบความไวต่อยาของเชื้อ *L. siamensis* ระยะ amastigotes คัดแปลงพันธุกรรม โดยจะนำเซลล์ ระยะ amastigote คัดแปลงพันธุกรรม โดยนำเซลล์ใส่ใน 96 well plates แล้วเติมยาตามความเข้มข้นสุดท้ายต่างๆดังที่กล่าวข้างต้น นำไปบ่มที่ 37°C และ 5% CO_2 เป็นเวลา 72 ชั่วโมงเมื่อครบเวลานำไปส่องดูด้วยกล้อง Fluorescence microscope เพื่อดูเซลล์ที่ติดสีและแยกเซลล์ติดสี โดยวิธี Flow Cytometry และคำนวณค่า IC 50

(คือปริมาณความเข้มข้นของยาที่ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเชื้อได้ 50%) ทำซ้ำสามครั้งโดยใช้ Wild type amastigote (amastigote ที่อยู่ใน macrophage ซึ่งไม่ได้ทำการตัดแปลงพันธุกรรม) เป็นตัวควบคุม

3.6 การวิเคราะห์ผลข้อมูล

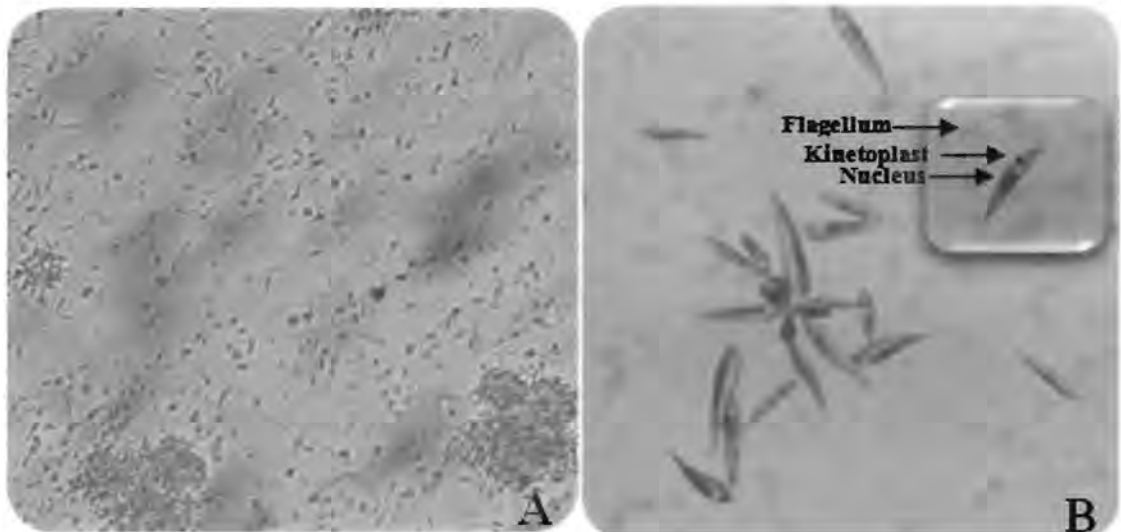
คำนวณค่า IC 50 ในแต่ละการทดลอง โดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel 2007 เป็นตัววิเคราะห์ผลค่าที่ได้จะออกมาในค่า mean±SD ผลการทดลองที่ได้จะนำเสนอในรูปแบบตาราง การทดสอบทางสถิติที่ใช้เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ศึกษา ผลที่ได้รับจะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อ P-value < 0.05

4. ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาด้านสัตววิทยา

ระยะ Promastigote (*In Vitro*)

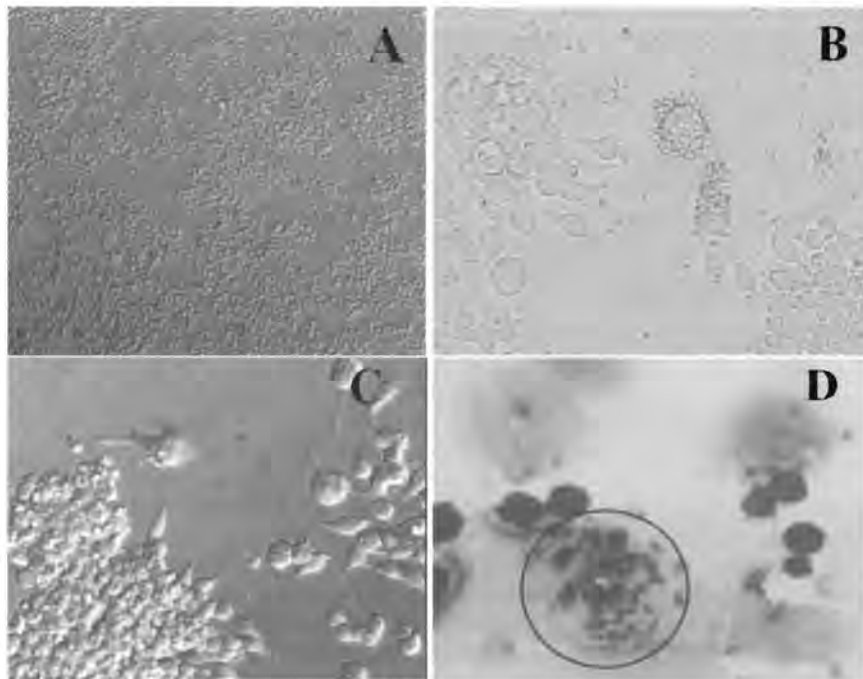
จากการนำไขกระดูกและชิ้นเนื้อมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะ คือ Schneider Insect Medium กับ 20% heat-inactivated fetal bovine serum และ 1 %Pen/Strep จะเห็นเชื้อระยะ Promastigotes ซึ่งมีลักษณะเป็นรูปกระสวยเคลื่อนที่ได้เพราะมีหาง (Flagellate) มี kinetoplast อยู่ด้านหน้าและมีนิวเคลียสขนาดใหญ่อยู่ตรงกลางลำตัว สามารถเพิ่มจำนวนได้ด้วยวิธีการแบบ Binary fission สามารถตรวจพบได้ในทางเดินอาหารส่วนกลาง (Middle gut) ของรึ้นฝอยทรายหรือจากการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารที่เตรียมเป็นการเฉพาะเช่น Schneider Insect Medium (ภาพที่ 4.1 A) และนำเซลล์ มาย้อมด้วยสี Giemsa ดังภาพที่ 4.1B



ภาพ ที่ 4.1 ระยะ Promastigotes จากการเพาะเลี้ยงเชื้อลิขมาเนียจากไขกระดูกด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Schneider Insect Medium (A) และนำมาย้อมด้วยสี Giemsa (B)

ระยะ Amastigote (*Ex vivo*)

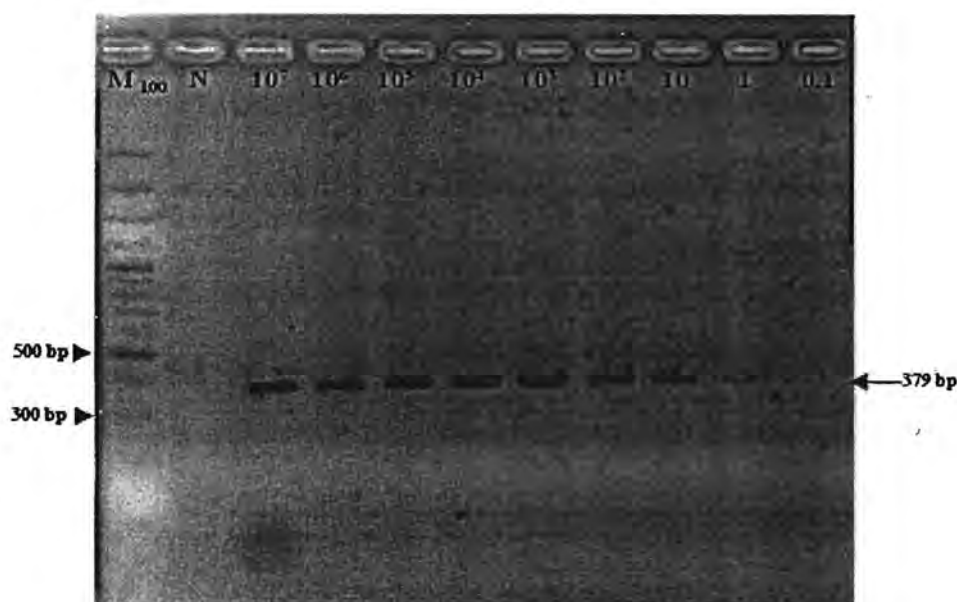
จากการศึกษาการ Infection ของเชื้อ promastigote เข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด macrophage ของหนู (J774A.1 cell) ในหลอดทดลอง (*In vitro*) เพื่อให้เชื้อในระยะ promastigote ที่มีลักษณะเป็นกระสวย สามารถเคลื่อนที่ได้ เปลี่ยนเป็นระยะ amastigote ที่มีรูปร่างกลมรี ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ (ภาพที่ มาช้อมสีด้วย Giemsa จะเห็นเชื้อระยะ amastigotes ซึ่งมีรูปร่างกลมรีมีนิวเคลียสขนาดใหญ่เห็นเด่นชัดและKinetoplast ซึ่งมีลักษณะเป็นแท่งตั้งฉากกับนิวเคลียสไม่มี flagellum จึงไม่สามารถเคลื่อนที่ได้พบในไซโตพลาสซึมของ macrophage และเพิ่มจำนวนด้วยวิธี Binary fission ดัง (ภาพที่ 4.2)



ภาพที่ 4.2 A: ลักษณะของ macrophage cell line ปกติ B: ลักษณะของเชื้อลิซมาเนียที่เข้า infect ใน macrophage cell line ในเวลา 3-4 ชั่วโมงหลัง infection C: ลักษณะของ macrophage cell line ที่ติดเชื้อลิซมาเนียซึ่งหลังจากล้างส่วนที่ไม่ infect ออกประมาณ 48 ชั่วโมง, B: ช้อมด้วยสี Giemsa stain จะเห็นเป็นระยะ amastigote ลักษณะกลมรี (วงกลมสีแดง)

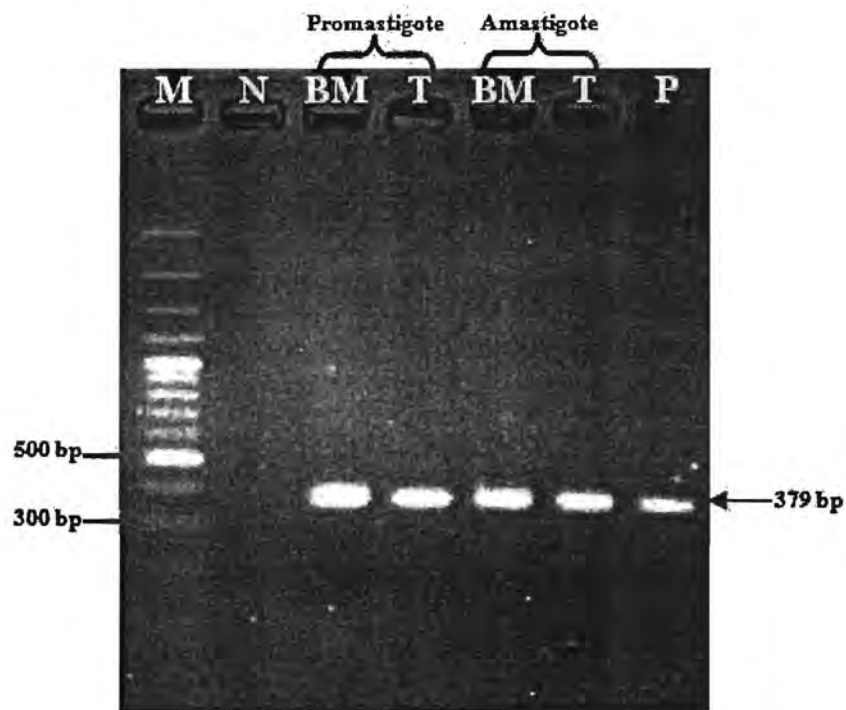
4.2 การศึกษาทางด้านอนุชีววิทยา

ทำการศึกษาการตรวจเชื้อลิซมาเนียด้วยเทคนิค PCR ที่ตำแหน่งยีน ITS1 ให้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 379 bp เพื่อศึกษาว่าสามารถตรวจเชื้อได้ต่ำสุดที่ความเข้มข้นประมาณเท่าไร โดยเริ่มต้นที่จำนวนสูงสุด 2.4×10^7 cells/ml พบว่าจำนวนที่ตรวจได้ต่ำสุดคือที่ 2.4 cell/ml (ภาพที่ 4.3)



ภาพที่ 4.3 ปริมาณจำกัดที่ PCR ที่ตำแหน่งยีน ITS 1 สามารถตรวจเจอเชื้อได้โดยเรียงตั้งแต่ความเข้มข้น 2.4×10^7 cells/ml ถึง 2.4×10^{-1} cells/ml

และเพื่อให้มั่นใจว่าเซลล์เพาะเลี้ยงคือเชื้อลิซมาเนียจริงและลำดับเบสแตกต่างระยะ amastigote และ ระยะ promastigote หรือไม่ จึงนำเซลล์เพาะเลี้ยงแต่ละ Isolation มาศึกษาทางด้านอนุชีววิทยาด้วยเทคนิค PCR (Polymerase chain reaction) ในส่วนของยีน internal transcribed spacer 1 และ 5.8S ribosomal RNA gene ซึ่งได้ขนาด 379 bp (ภาพที่ 4.4) ซึ่งผลที่ได้พบว่าไม่มีความแตกต่างกันของลำดับเบสระหว่างเซลล์ลิซมาเนียระยะ Promastigote และ ระยะ Amastigote (ภาพที่ 4.5)



ภาพที่ 4.4 ผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ของดีเอ็นเอ *L. siamensis* บน 1.5 % agarose gel ของเซลล์เพาะเลี้ยงในแต่ละ Isolation ขนาด 379

Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder, Fermentas)

Lane N คือ ตัวควบคุมผลลบ (ddH₂O)

Lane P คือ ตัวควบคุมผลบวก (จาก DNA ของไขกระดูกที่มาจากผู้ป่วย)

Lane BM คือ เซลล์เพาะเลี้ยงที่แยกได้จากไขกระดูก ทั้งระยะ Promastigote และ Amastigote

Lane T คือ เซลล์เพาะเลี้ยงที่แยกได้จากชิ้นเนื้อทั้งระยะ Promastigote และ Amastigote

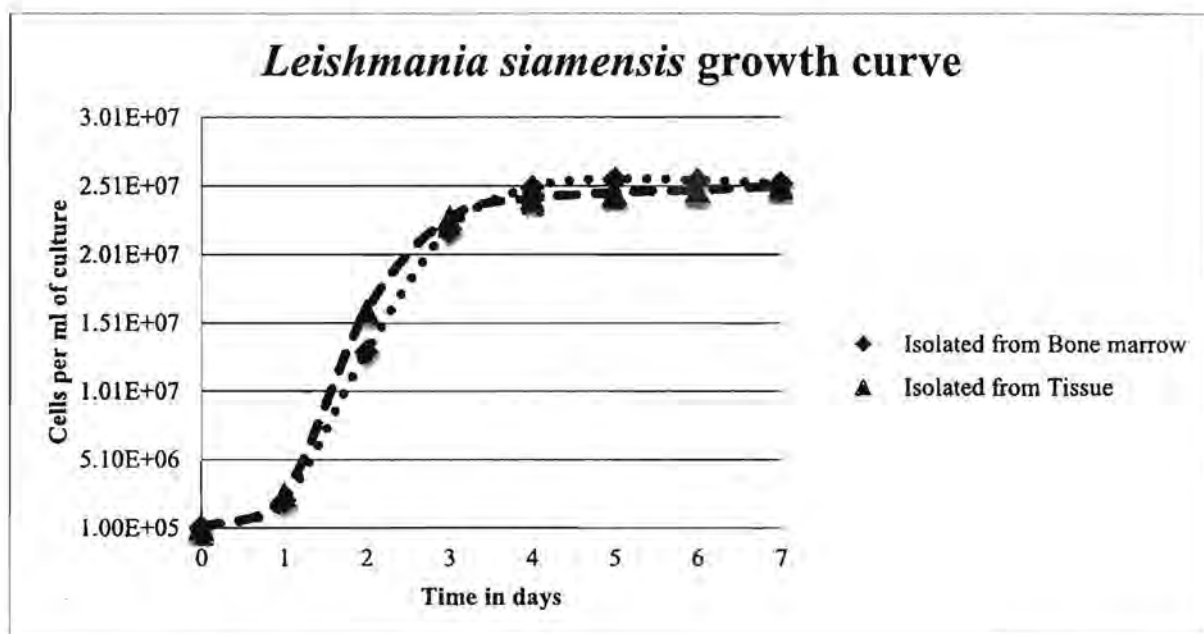


ภาพที่ 4.5 แสดงลำดับเบสของเชื้อลิวมาเนีย *L. siamensis* ขนาด 379 bp

BM (P) คือ ลำดับเบสจากเซลล์เพาะเลี้ยงระยะ Promastigote ที่แยกได้จากไขกระดูก
 Tissue (P) คือ ลำดับเบสจากเซลล์เพาะเลี้ยงระยะ Promastigote ที่แยกได้จากชิ้นเนื้อ
 BM (A) คือ ลำดับเบสจากเซลล์เพาะเลี้ยงระยะ Amastigote ที่แยกได้จากไขกระดูก
 Tissue (A) คือ ลำดับเบสจากเซลล์เพาะเลี้ยงระยะ Amastigote ที่แยกได้จากชิ้นเนื้อ
 BM from patient คือ ตัวอย่าง DNA ที่ได้จากไขกระดูก

4.3 การวัดอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์

กราฟการเจริญเติบโต (Growth curve) ของเชื้อลิวมาเนียระยะ promastigotes ที่แยกได้จากไขกระดูก และชิ้นเนื้อ ไม่มีความแตกต่างกัน (ภาพที่ 4.6)



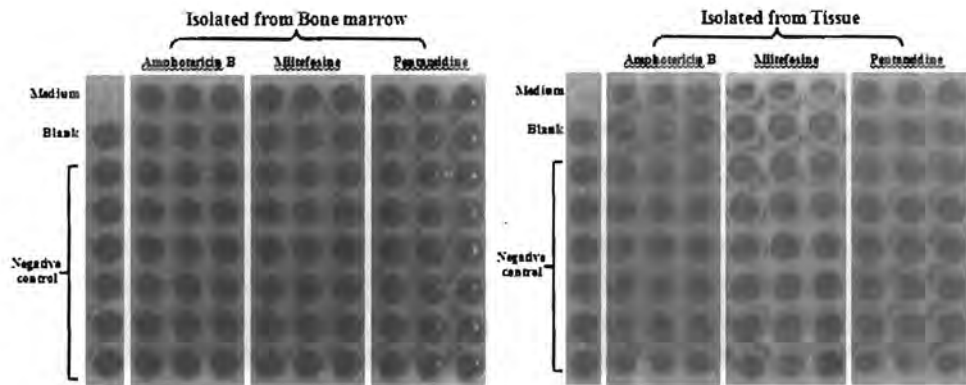
ภาพที่ 4.6 กราฟการเจริญเติบโตของเชื้อลิวมาเนียระยะ promastigotes ที่แยกได้จากไขกระดูกและชิ้นเนื้อ

4.4 การทดสอบความไวต่อยาทั้งสอง Isolation ทำทั้งระยะ Promastigote และ Amastigote

ทำการทดสอบความไวต่อยาของเชื้อลิวมาเนียด้วยเทคนิคที่ทำให้เกิดสารมีสี (colorimetric assay) โดยใช้สี resazurin (ภาพที่ 4.7) และนำไปวัดค่า Absorbance ด้วยเครื่อง ELISA แบบ Spectrofluorometer ที่ excitation ที่ 560 nm และ emission ที่ 590 nm แล้วนำค่า Absorbance ที่ได้มาคำนวณค่า % Inhibition และทำกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า % Inhibition เทียบกับในแต่ละ

ความเข้มข้นของยาและคำนวณค่า IC50 จากสมการ logarithm โดยใช้เซลล์ที่ไม่ใส่ยาเป็นตัวควบคุม ค่า % Inhibition ที่ได้จากการทดสอบความไวต่อยาในแต่ละความเข้มข้นในเชื้อลิซมาเนีย ระยะ Promastigote และ ระยะ Amastigote โดยทำซ้ำทั้งหมดสามครั้ง และรายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย Mean±SD ตามตารางที่ 4.1 และ 4.2 ตามลำดับ ค่า IC50 ของยาแต่ละชนิดในระยะ Promastigote และ ระยะ Amastigote พบว่าเชื้อทั้งสองระยะให้ผลไปในทางเดียวกัน แต่ที่น่าสนใจคือเชื้อทั้งในระยะ Promastigote และ ระยะ Amastigote มีความไวต่อยา Amphotericin B แตกต่างกันในเซลล์เพาะเลี้ยงที่แยกได้จากไขกระดูกกับเซลล์เพาะเลี้ยงที่แยกได้จากชิ้นเนื้อประมาณสองเท่า (ตารางที่ 4.3 และ ภาพที่ 4.8) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเชื้อที่แยกได้จากชิ้นเนื้อเป็นชิ้นเนื้อของผู้ป่วยที่กลับมาเป็นโรคซ้ำซึ่งเชื้ออาจมีการดื้อยาเกิดขึ้นได้ ดังนั้นจึงทำการศึกษาคู่โดยศึกษาชิ้นส่วนที่มีการดื้อยาซึ่งยีนที่ใช้คือ SCMTA (S-adenosyl-Lmethionine:C-24- Δ -sterol methyltransferase) เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญใน sterol biosynthetic pathway ซึ่งสร้าง C-24 transmethylation เป็นกุญแจสำคัญในการสร้าง ergosterol โดยการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าถ้าเชื้อลิซมาเนียที่ดื้อต่อยา Amphotericin B เมื่อนำมาศึกษาด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา หรือ RT-PCR จะไม่พบแบนผลิตภัณฑ์ PCR ทั้งในเชื้อที่ดื้อยา Amphotericin B และ เชื้อที่ไวต่อยา Amphotericin B (Pourshafie et al., 2004) และอีกหนึ่งยีน คือ γ -GCS ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ trypanothione ซึ่งผลที่ได้พบว่าเชื้อลิซมาเนียที่ดื้อต่อยา Amphotericin B จะให้แบนชัดกว่าเชื้อที่ไวต่อยา และในการศึกษานี้สามารถพบแบนผลิตภัณฑ์ PCR ของเชื้อลิซมาเนียที่แยกได้จากชิ้นเนื้อที่ตำแหน่งยีน γ -GCS มีความเข้มมากกว่าเมื่อเทียบกับเชื้อที่แยกได้จากไขกระดูกซึ่งใช้ α -Tubulin เป็น housekeeping gene ทำซ้ำสามครั้งเพื่อยืนยันผล (ภาพที่ 4.9) และในยีนตำแหน่ง SCMTA ไม่พบแบนผลิตภัณฑ์ PCR เช่นกัน (ไม่แสดงข้อมูล) จากการศึกษาดังกล่าวเป็นสิ่งที่น่าสนใจ ดังนั้นผู้วิจัยจะทำการศึกษาคู่ในส่วนของการศึกษาการทดสอบความไวต่อยา Amphotericin B โดยใช้เทคนิค

การนำ DNA เข้าสู่เซลล์เป้าหมายเพื่อติดตามการเรืองแสงของเซลล์ต่อไปในอนาคต ซึ่งได้ทำการศึกษาได้ยังไม่สำเร็จและจะทำการศึกษาต่อไปในอนาคต ในที่นี้ผู้วิจัยมีผลบางส่วนที่ได้ทำไว้ซึ่งการศึกษานี้ใช้เทคนิค electroporation ในการส่งถ่ายยีนที่มี GFP ซึ่งยีนดังกล่าวอยู่ใน plasmid vector ที่ได้รับการอนุเคราะห์จาก Professor Papadopoulou (Singh et al., 2009) และจะทำการทดสอบความไวต่อยาที่ใช้ในการรักษาโรคโลหิตมาเนียโดยวัดปริมาณสารเรืองแสงที่เปลี่ยนแปลงใน ระยะ Promastigote (*In vitro*) พบว่ามีการเรืองแสงของยีนในตัว promastigote เมื่อดูผ่านกล้องจุลทรรศน์เรืองแสง (Fluorescence microscope) (ภาพที่ 4.10) ทำการคัดเลือกตัวเชื้อที่มียีนเรืองแสงโดยใช้ยา G418 เพื่อทำลายตัวที่ไม่เรืองแสงโดยปรับความเข้มข้นของยาตามลำดับ โดยทำทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งแบบน้ำและแบบวุ้น (ภาพที่ 4.11) ตัวที่มียีนเรืองแสงจะมีชีวิตส่วนตัวที่ไม่เรืองแสงจะตาย การที่ใช้ยา G418 เป็นตัวคัดเลือกเนื่องจาก ยีน GFP ที่ใส่ไปมีส่วนที่คล้าย G418 หลังจากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปทำ Cell Sorting by Flow Cytometry เพื่อแยกตัวที่มียีนเรืองแสงออกจากตัวที่ไม่เรืองแสง (ภาพที่ 4.12) ทำการเลี้ยงเซลล์ที่มีการเรืองแสงต่อไปจนไม่พบว่ามีตัวไม่เรืองแสงเหลืออยู่ ซึ่งในการศึกษานี้พบว่าเซลล์แบ่งตัวแล้วมีบางตัวแบ่งตัวแล้วไม่เรืองแสงจึงทำให้จำนวนที่เรืองแสงลดจำนวนลง



ภาพที่ 4.7 ตัวอย่างการทดสอบความไวต่อยาของเชื้อไลชมาเนียด้วยสี resazurin กับยาในแต่ละความเข้มข้นเปรียบเทียบระหว่างเชื้อไลชมาเนียที่แยกได้จากไขกระดูกและชิ้นเนื้อระยะ Promastigote เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 4.1 ค่า % Inhibition ที่คำนวณได้จากดูดกลืนแสง Fluorescence จากการทดสอบความ

ไวต่อยาแต่ละชนิดในเชื้อลิซมาเนียระยะ Promastigote โดยใช้สี Resazurin หรือ PrestoBlue®

reagent

Drug Name	Drug Concentration (μM)	% Inhibition							
		Promastigotes isolated from Bone marrow				Promastigotes isolated from Tissue biopsy			
		1 st	2 nd	3 rd	$\bar{X} \pm \text{SD}$	1 st	2 nd	3 rd	$\bar{X} \pm \text{SD}$
Amphotericin B	2	91.817	92.538	92.690	92.348 \pm 0.466	61.437	60.126	60.563	60.709 \pm 0.667
	1.5	81.531	83.462	83.656	82.883 \pm 1.175	55.400	55.251	53.084	54.578 \pm 1.296
	1	69.386	70.312	70.253	69.984 \pm 0.518	46.789	47.332	45.276	46.466 \pm 1.065
	0.5	50.152	51.264	51.585	51.000 \pm 0.752	33.008	33.255	31.687	32.650 \pm 0.843
	0.3	32.646	33.621	32.478	32.915 \pm 0.617	20.981	23.504	20.357	21.614 \pm 1.667
	0.25	27.775	26.946	26.449	27.057 \pm 0.670	17.595	19.717	18.062	18.458 \pm 1.115
	0.2	20.846	21.545	20.608	21.000 \pm 0.487	13.810	14.613	12.215	13.546 \pm 1.220
	0.15	14.827	14.733	14.405	14.655 \pm 0.221	4.642	5.994	7.316	5.984 \pm 1.337
Miltefosine	60	88.939	89.776	90.132	89.616 \pm 0.613	86.662	87.661	88.549	87.624 \pm 0.944
	50	82.970	83.852	83.417	83.413 \pm 0.441	82.591	83.310	81.599	82.500 \pm 0.859
	40	74.419	77.241	76.389	76.016 \pm 1.448	74.324	76.160	75.243	75.242 \pm 0.918
	30	66.803	68.746	67.656	67.735 \pm 0.974	66.214	67.857	67.838	67.303 \pm 0.943
	20	54.687	56.487	56.411	55.862 \pm 1.018	54.429	56.588	55.341	55.453 \pm 1.084
	15	45.415	47.071	48.204	46.897 \pm 1.403	46.368	46.499	47.837	46.901 \pm 0.813
	10	33.173	34.437	35.150	34.254 \pm 1.001	36.029	35.401	37.439	36.290 \pm 1.044
	5	14.762	12.972	17.090	14.941 \pm 2.065	16.423	17.295	17.954	17.224 \pm 0.768
Pentamidine	60	90.602	90.607	91.053	90.754 \pm 0.259	87.392	90.214	87.617	88.408 \pm 1.569
	50	84.774	84.108	84.831	84.571 \pm 0.402	80.778	83.132	81.020	81.643 \pm 1.295
	30	72.032	72.092	72.086	72.070 \pm 0.033	69.690	71.284	68.370	69.781 \pm 1.459
	20	62.428	61.459	61.422	61.770 \pm 0.571	58.959	61.020	57.884	59.288 \pm 1.593
	10	46.322	46.889	46.105	46.439 \pm 0.405	43.531	45.601	42.727	43.953 \pm 1.483
	8	40.274	39.318	39.022	39.538 \pm 0.654	38.372	38.870	36.043	37.761 \pm 1.509
	5	28.926	28.861	26.630	28.139 \pm 1.307	27.695	29.631	26.678	28.002 \pm 1.500
	3	14.137	13.989	16.277	14.801 \pm 1.280	11.319	16.373	11.837	13.176 \pm 2.781

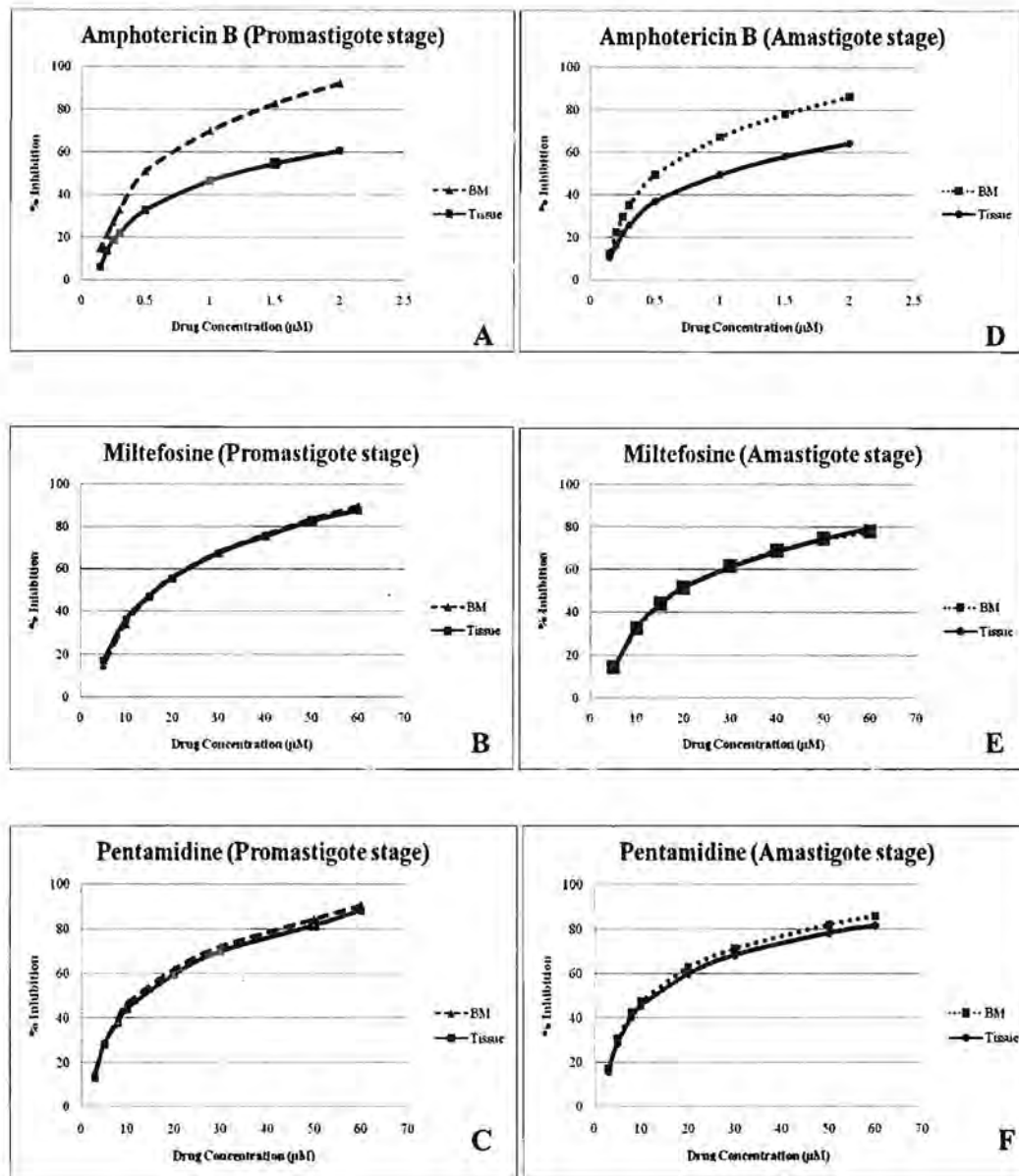
ตารางที่ 4.2 ค่า % Inhibition ที่คำนวณได้จากจุดกลืนแสง Fluorescence จากการทดสอบความไว

ต่อยาแต่ละชนิดในเชื้อลิซมาเนียระยะ Amastigote โดยใช้สี Resazurin หรือ PrestoBlue® reagent

Drug Name	Drug Concentration (μ M)	% Inhibition							
		Amastigotes isolated from Bone marrow				Amastigotes isolated from Tissue biopsy			
		1 ⁿ	2 nd	3 rd	$\bar{X} \pm SD$	1 ⁿ	2 nd	3 rd	$\bar{X} \pm SD$
Amphotericin B	2	84.169	88.593	86.097	86.286 \pm 2.218	65.240	65.154	63.011	64.468 \pm 1.263
	1.5	76.696	79.890	77.869	78.152 \pm 1.616	58.576	58.357	57.807	58.247 \pm 0.396
	1	66.325	68.193	67.015	67.178 \pm 0.944	50.017	49.840	49.013	49.623 \pm 0.536
	0.5	48.498	50.348	49.896	49.581 \pm 0.964	36.657	37.298	37.403	37.119 \pm 0.404
	0.3	34.588	35.671	34.896	35.052 \pm 0.558	24.458	25.963	26.648	25.690 \pm 1.120
	0.25	29.050	28.957	30.625	29.544 \pm 0.937	19.870	22.471	23.561	21.967 \pm 1.897
	0.2	22.602	21.130	23.461	22.398 \pm 1.179	14.533	17.740	16.628	16.300 \pm 1.628
	0.15	11.040	13.591	11.785	12.139 \pm 1.312	8.867	11.111	12.113	10.697 \pm 1.662
Miltefosine	60	77.158	79.796	76.794	77.916 \pm 1.638	80.413	78.473	79.455	79.447 \pm 0.970
	50	73.360	76.125	73.486	74.324 \pm 1.561	75.844	73.923	73.746	74.504 \pm 1.164
	40	68.835	69.681	67.931	68.816 \pm 0.875	69.538	67.680	68.032	68.417 \pm 0.987
	30	60.316	63.079	60.963	61.452 \pm 1.445	62.347	60.333	60.471	61.050 \pm 1.125
	20	51.206	52.557	50.319	51.361 \pm 1.127	51.927	50.830	52.101	51.619 \pm 0.689
	15	43.005	45.515	43.171	43.897 \pm 1.404	42.350	44.604	44.421	43.792 \pm 1.251
	10	32.188	32.327	31.843	32.119 \pm 0.249	32.387	33.198	33.239	32.941 \pm 0.481
	5	16.012	13.906	13.180	14.366 \pm 1.471	12.816	15.074	14.374	14.088 \pm 1.156
Pentamidine	60	85.459	86.995	85.180	85.878 \pm 0.977	81.706	81.548	82.407	81.887 \pm 0.457
	50	81.770	83.039	81.391	82.067 \pm 0.863	79.082	77.984	78.218	78.428 \pm 0.579
	30	72.141	71.981	69.084	71.069 \pm 1.721	69.302	67.001	68.897	68.400 \pm 1.229
	20	63.039	63.329	61.474	62.614 \pm 0.998	62.036	57.214	59.884	59.711 \pm 2.416
	10	48.198	48.052	45.630	47.293 \pm 1.442	46.454	43.927	46.333	45.571 \pm 1.426
	8	43.635	42.371	40.383	42.130 \pm 1.640	41.244	37.321	42.451	40.338 \pm 2.682
	5	33.918	28.191	28.739	30.283 \pm 3.160	29.847	26.568	29.353	28.589 \pm 1.768
	3	18.072	15.617	17.294	16.994 \pm 1.255	17.289	14.280	16.444	16.005 \pm 1.552

ตารางที่ 4.3 แสดงค่า IC₅₀ ของยาแต่ละชนิดต่อเชื้อลิวมาเนียระยะ Promastigote และ ระยะ Amastigote

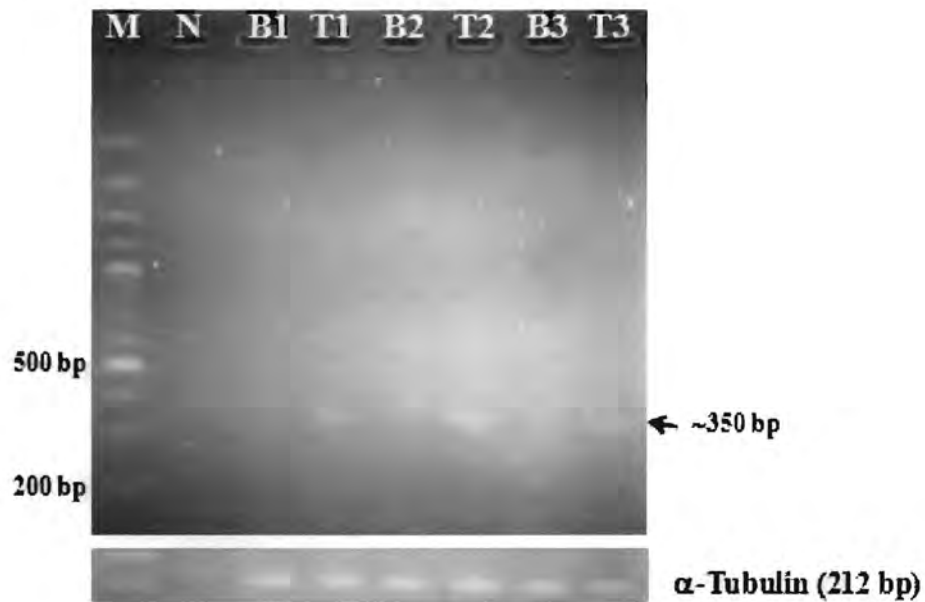
Drug Name	IC ₅₀ (μM)			
	ระยะ Promastigote ($\bar{X} \pm SD$)		ระยะ Amastigote ($\bar{X} \pm SD$)	
	Isolated from Bone marrow	Isolated from Tissue	Isolated from Bone marrow	Isolated from Tissue
Amphotericin B	0.508±0.006	1.186±0.049	0.537±0.017	0.992±0.020
Miltefosine	16.498±0.511	16.249±0.359	19.548±0.678	19.400±0.079
Pentamidine	12.132±0.077	13.132±0.850	11.899±0.615	13.180±0.901



ภาพที่ 4.8 กราฟแสดงการเปรียบเทียบ % Inhibition ต่อยา (Amphotericin B, Miltefosine และ Pentamidine) แต่ละความเข้มข้นทั้งในระยะ Promastigote (A-C) และ ระยะ Amastigote (D-F) ที่สามารถแยกเชื้อได้จากไขกระดูกและชิ้นเนื้อ

BM คือเชื้อดริชมาเนียทั้งระยะ Promastigote และ ระยะ Amastigote ที่แยกได้จากไขกระดูก

Tissue คือเชื้อดริชมาเนียทั้งระยะ Promastigote และ ระยะ Amastigote ที่แยกได้จากชิ้นเนื้อ



ภาพที่ 4.9 ผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR บน 1.5 % agarose gel จากชิ้น γ -GCS ของเซลล์ที่มีการดื้อยา Amphotericin B

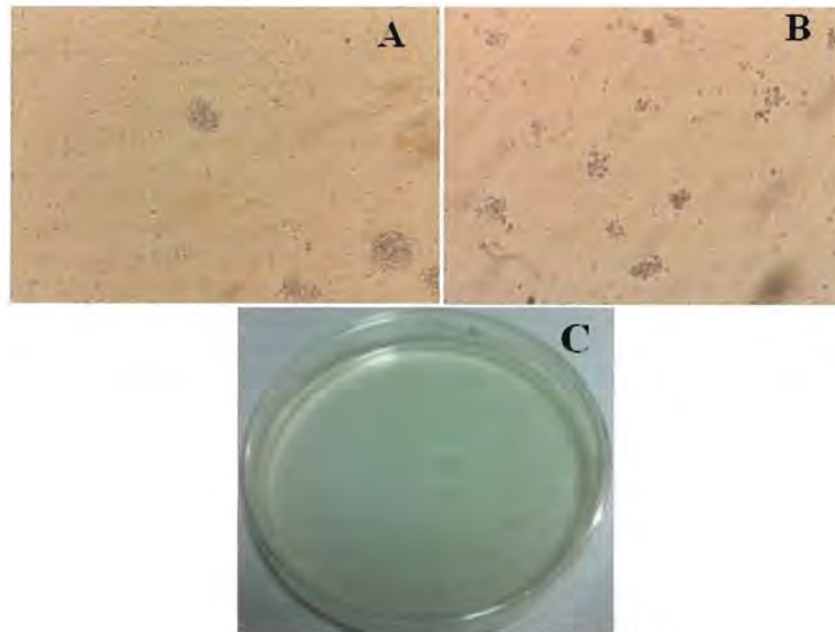
Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder, Fermentas)

Lane B1-B3 คือ เซลล์ที่แยกได้จากไขกระดูกครั้งที่ 1-3

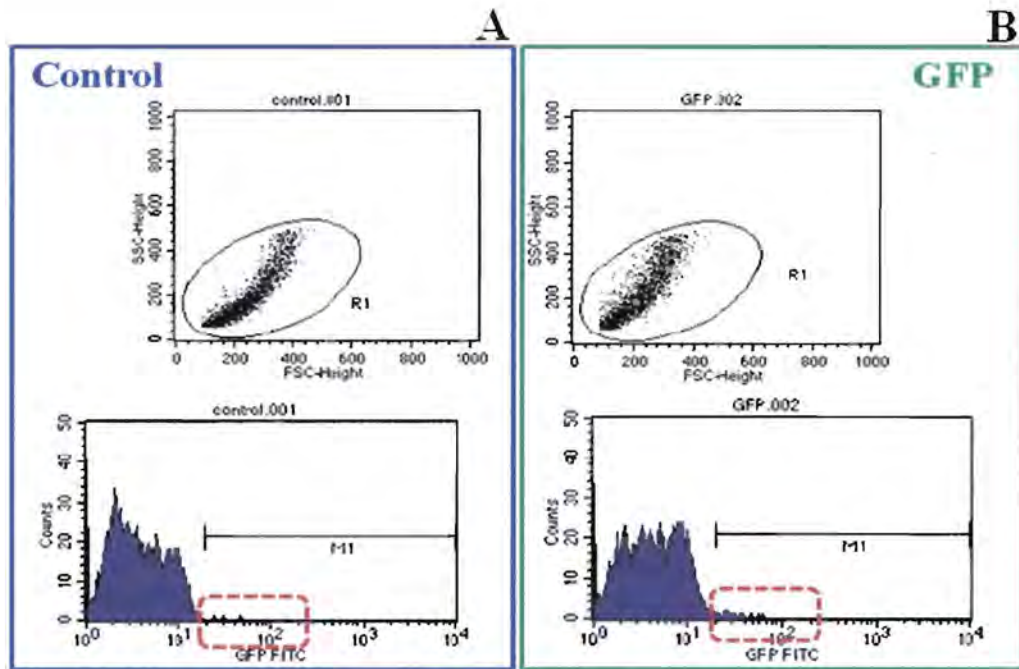
Lane T1-T3 คือ เซลล์ที่แยกได้จากไขกระดูกครั้งที่ 1-3



ภาพที่ 4.10 แสดงผลการนำชิ้นเรืองแสง GFP เข้าสู่เซลล์ Promastigotes; A: Promastigotes ที่ดูด้วย light microscope (วงกลมสีแดง) B: Promastigotes ที่มีการเรืองแสงสีเขียวของ GFP เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เรืองแสง (เซลล์ที่ไม่มีชิ้นเรืองแสง GFP จะมองไม่เห็น)



ภาพที่ 4.11 ลักษณะของเชื้อ A: ลักษณะของเชื้อ Promastigote ที่ตัดแปลงพันธุกรรมก่อนใส่ยา G418 เพื่อทำลายตัวที่ไม่เรืองแสง เซลล์จะมีรูปร่างที่ชัดเจน มีการเคลื่อนที่โดยอาศัย flagellar, B: ลักษณะของเชื้อ promastigote ที่ตัดแปลงพันธุกรรมหลังใส่ยา G418 เซลล์จะมีการตาย ไม่มีการเคลื่อนที่ ไม่คงรูปร่างเดิม C: ลักษณะของเชื้อเมื่อเลี้ยงในอาหารวุ้นที่มียา G418 ถ้าเซลล์ไหนมีชิ้นเรืองแสงจะเห็นเป็น โคลินี่



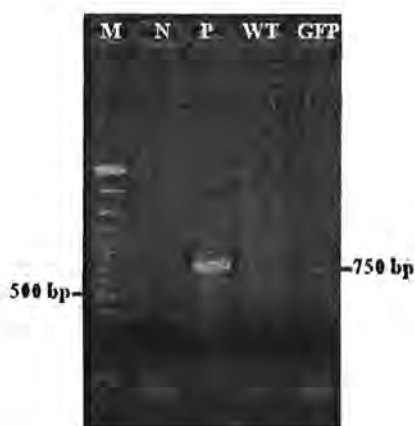
ภาพที่ 4.12 กราฟการแยกชนิดของเซลล์ที่เรืองแสงและไม่เรืองแสงโดย Flow Cytometry (FACs),
 A: กราฟลักษณะของเซลล์ปกติที่ไม่ได้ทำการคัดแปลงพันธุกรรม, B: กราฟลักษณะของเซลล์ที่ทำการคัดแปลงพันธุกรรม

ทำการตรวจหา GFP โดยเทคนิค PCR ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ EGFP gene (ภาพที่ 4.13)

GFPBAC F-5'- ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA-3'

GFPBAC R-5'- CGTCCATGCCGAGAGTGATCC-3'

(Dr.Toshiki Tamura): 750 bp



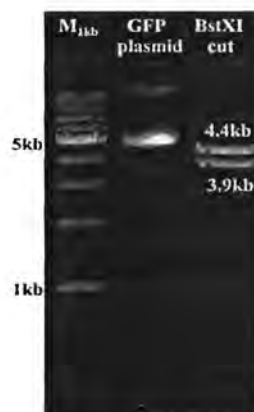
ภาพที่ 4.13 แสดงผลจากการทำ PCR จากตัวอย่างลิซมาเนียที่ตัดแปลงพันธุกรรม M: Marker 100 bp, P: Positive จาก plasmid DNA ของ GFP, WT: promastigote ที่ไม่ได้ใส่ GFP (Wild type), GFP: promastigote ที่ใส่ GFP

หลังจากที่พบว่า การ transfection ด้วย Transient transfection เชื่อสามารถแบ่งตัวได้ แต่บางตัวไม่สามารถเรืองแสงได้ ทำให้จำนวนที่เรืองแสงลดน้อยลงซึ่งไม่เหมาะต่อการทดสอบความไว ต่อยา ดังนั้นจึงทำการทดลองใหม่โดยใช้เป็น Stable transfection ซึ่งได้ความอนุเคราะห์ Stable GFP จาก Professor Papadopoulou, Infectious Diseases Research Center, CHUL Research Center, Laval University, Quebec, Canada (ภาพที่ 4.14) ซึ่ง plasmid มีส่วนที่คือต่อ neomycin gene ดังนั้นจึงใช้ยา G418 เป็นตัวคัดเลือกเนื่องจากลิซมาเนียเป็นยูคาริโอต ตัวที่เรืองแสงสามารถคือต่อยา G418 ดังนั้นตัวที่ไม่เรืองแสงจึงถูกทำลาย โดย plasmid นี้สามารถเข้าไป Integrate ในนิวเคลียสของเซลล์ และสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ที่ติดสีได้เพิ่มจำนวนมากขึ้นซึ่งจำเป็นจะต้องตัด Plasmid DNA ด้วย BstXI จะได้ 2 ชิ้น ตามขนาดของ vector และ promoter ทั้งหมดรวม ~8.3 kb (~3.9 and ~4.4) (ภาพที่ 4.15) จำเป็นต้องตัด plasmid DNA ให้เป็นเส้นตรงเพราะจำทำให้ GFP สามารถเข้าไป

Integrate ในนิวเคลียสของเซลล์ และสามารถเพิ่มจำนวนตัวที่เรืองแสงได้มากขึ้น เมื่อตัดเอนไซม์ แล้วนำไป transfection ด้วย electroporation ซึ่งอยู่ระหว่างดำเนินการ



ภาพที่ 4.14 Map of the pCR 2.1- L.d rDNA pr- α IRNEO α IR-GFP plasmid



ภาพที่ 4.15 แสดงการตัด stable GFP plasmid DNA ด้วยเอนไซม์ BstXI M_{1kb}: Marker 1 kb

การศึกษา คัดแปลงพันธุกรรมของเชื้อลิซมาเนียโดยนำ DNA ที่มี GFP เข้าเซลล์และทำการทดสอบยาอยู่ในระหว่างการทดลอง ซึ่งถ้าประสบความสำเร็จจะทำการศึกษาในระดับ High-Throughput Drug Screening เพื่อศึกษากลไกการดื้อยาโดยศึกษาการแสดงออกของเชื้อที่ดื้อยาและไม่ดื้อยาที่มีการคัดแปลงพันธุกรรมว่ามีการแสดงออกแตกต่างกันอย่างไรในเชื้อลิซมาเนียสายพันธุ์ *L. siamensis* เพื่อประโยชน์ในการรักษาและพัฒนาวัคซีนมาเพื่อควบคุมเชื้อลิซมาเนีย *L. siamensis* ได้ในอนาคต

5. สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า ยา Miltefosine และ Pentamidine ให้ค่า IC50 ไปในทางเดียวกันทั้งจากเชื้อที่แยกได้จากไขกระดูกและชิ้นเนื้อ และที่น่าสนใจคือเชื้อลิซมาเนียระยะ Promastigote และ ระยะ Amastigote ที่แยกได้จากชิ้นเนื้อนั้นมีค่า IC50 มากกว่าเชื้อลิซมาเนียทั้งสองระยะที่แยกได้จากไขกระดูกประมาณสองเท่า ซึ่งเป็นไปได้ว่าเชื้อที่แยกได้จากชิ้นเนื้อนั้นมาจากผู้ป่วยที่มีการกลับเป็นโรคซ้ำ ซึ่งเชื่อว่าจะเริ่มมีการดื้อยาเกิดขึ้น และได้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีนที่ดื้อยา Amphotericin B คือ ยีน SCMTA และ γ -GCS พบว่าอาจจะมี การดื้อยาเกิดขึ้นในเชื้อที่แยกได้จากชิ้นเนื้อของผู้ป่วยที่เกิดโรคซ้ำเมื่อเทียบกับการศึกษาก่อนหน้านี้ แต่อย่างไรก็ตามจำเป็นจะต้องใช้เทคนิค qRealtime RT-PCR เพื่อหาปริมาณการแสดงออกของยีนที่มีการดื้อยา Amphotericin B และขณะนี้ผู้วิจัยอยู่ระหว่างการศึกษาคัดแปลงพันธุกรรมของเชื้อ *L. siamensis* เพื่อขึ้นชั้นการดื้อยา Amphotericin B ของเชื้อ *L. siamensis* ต่อไปในอนาคต ซึ่งการศึกษาคัดแปลงพันธุกรรมนั้นจะมีประโยชน์อย่างมากในการศึกษาในระดับ High-throughput screening (HTS) โดยจะศึกษาโปรตีนที่มีการแสดงออกที่แตกต่างกันในเซลล์ดัดแปลงพันธุกรรมที่ดื้อและไม่ดื้อต่อยา Amphotericin B เพื่อปรับปรุง พัฒนาและหาตัวยาใหม่เพื่อรักษาโรคลิซมาเนียที่เกิดจากเชื้อลิซมาเนียสายพันธุ์ไทย (*L. siamensis*) โดยตรง

6. เอกสารอ้างอิง

ธีรยุทธ สุขมี. 2549. โรค Visceral Leishmaniasis (Kala Azar) ในประเทศไทยปี 2549. รายงานเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาประจำสัปดาห์. 37(21): 364 - 367.

ธีรยุทธ สุขมี. 2553. โรคติดเชื่ออุบัติใหม่ในประเทศไทย: ลิซมาเนียซิส. เอกสารประกอบการบรรยายของสำนักงานสาธารณสุขอำเภอสีเกา จังหวัดตรัง ในวันที่ 23 ธันวาคม 2553.

Acher M, Carme B, Sainte Marie D, Couppie P, Clyti E, Guibert P, et al. Influence of clinical presentation on the efficacy of a short course of pentamidine in the treatment of cutaneous leishmaniasis in French Guiana. *Ann Trop Med Parasitol*. Jun 2001;95(4):331-6.

Adler S, Theodor O, 1957. Transmission of disease agents by phlebotominae sand flies. *Ann RevEntomol* 2: 203-226.

Adler S. *Leishmania*, *Advances in Parasitology*. In: Dawes D, eds. New York: Academic Press, 1964: 35-96

Allen S and Neal RA. 1989. The in vitro susceptibility of macrophages infected with amastigotes of *Leishmania* spp. to pentavalent antimonial drugs and other compounds with special relevance to cutaneous isolates. In D. T. Hart (ed.), *Leishmaniasis*. Plenum Press, New York, N.Y. p.711-720.

Alvar J, et al., 2008. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clinical microbiological reviews*. 21(2): 334-359.

Alvar J, et al., 1997. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin. Microbiol. Rev* 10:298-319.

Arezki I, Sarah T, Grégory M, Boussad H, Xavier de L, Rémi NC, 2008. Sand fly Fever Sicilian Virus, Algeria. *Emerg Infect Dis* 14: 795-797.

Apiwathnasorn C, Sucharit S, Surathin K, Deesin T, 1993. Anthropophilic and zoophilic phlebotomine sandflies (Diptera:Psychodidae) from Thailand. *J Am Mosq Control Assoc* 9: 135-137.

Apiwathnasorn C, et al., 1989. A brief survey of phlebotomine sandflies in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 20: 429-432.

Bates PA, 2007. Transmission of *Leishmania metacyclic promastigotes* by phlebotomine sandflies. *Int. J. Parasitol* 37: 1097-1106.

Berman JD, 1981. Activity of imidazoles against *Leishmania tropica* in human macrophage cultures. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 30: 566-569.

Bhargava P, Singh R, 2012. Developments in Diagnosis and Antileishmanial Drugs. *Interdiscip Perspect Infect Dis*: 1-13. doi:10.1155/2012/626838.

Bualert L, Charungkiattikul W, Thongsuksai P, et al., 2012. Case Report: Autochthonous Disseminated Dermal and Visceral Leishmaniasis in an AIDS Patient, Southern Thailand, Caused by *Leishmania siamensis*. *Am J Trop Med Hyg* 86(5): 821-824.

Chusri S, Hortiwakul T, Silpapojakul K, Siriyasatien P, 2012. Case Report: Consecutive Cutaneous and Visceral Leishmaniasis Manifestations Involving a Novel *Leishmania* Species in Two HIV Patients in Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 87(1): 76-80.

Cruz I, Nieto J, Moreno J, Canavate C, Desjeux P, Alvar J. 2006. *Leishmania/HIV* coinfections in the second decade. *Indian J Med Res* 123(3): 357-388.

Davies CR, Kaye P, et al., 2003. Leishmaniasis: new approaches to disease control. *BMJ* 326: 377-382.

Desjeux P, 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 27: 305-318.

Desjeux P and Alvar J, 2003. Leishmania/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Ann Trop Med Parasitol* 97(Suppl. 1): 3-15.

Desjeux P. Leishmania and HIV in gridlock, World Health Organization and UNAIDS, 1998, WHO/CTD/LEISH/98.9 and UNAIDS/98.23.

Fontenille D, Traore-Lamizana M, Trouillet J, Leclerc A, Mondo M, Ba Y, Digoutte JP, Zeller HG, 1994. First isolations of arboviruses from phlebotomine sand flies in West Africa. *Am J Trop Med Hyg* 50(5): 570-574.

Fumarola L, Spinelli R, Brandonisio O, 2004. In vitro assays for evaluation of drug activity against *Leishmania* spp. *Res Microbiol* 155(4):224-230.

Kanjanopas K, Siripattanapipong S, Ninsaeng U, Hitakarun A, Jitkaew S, Kaewtaphaya P, Tan-ariya P, Mungthin M, Charoenwong C, Leelayoova S, 2013. *Sergentomyia (Neophlebotomus) gemmea*, a potential vector of *Leishmania siamensis* in southern Thailand. *BMC Infect Dis* 13: 333.

Kato H, Gomez EA, Cáceres AG, Uezato H, Mimori T, Hashiguchi Y, 2010. Molecular Epidemiology for Vector Research on Leishmaniasis. *Int J Environ Res Public Health* 7: 814-826.

Killick-Kendrick R, 1999. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin Dermatol* 17: 279-289.

Kongkaew W, Siriarayaporn P, Leelayoova S, et al., 2007. Autochthonous visceral leishmaniasis: a report of a second case in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 38: 8–12.

Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographic distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, eds. *The Leishmaniasis in biology and medicine*. Vol 1. London: Academic Press, 1987:1-120.

Lindoso JAL, Costa JML and Goto ITQH. 2012. Review of the current treatments for leishmaniasis. *Research and Reports in Tropical Medicine* 3: 69-77.

Lobsiger L, Muller N, Schweizer T, et al., 2010. An autochthonous case of cutaneous bovine leishmaniasis in Switzerland. *Vet Parasitol* 169: 408–414.

Maharom P, Siripattanapipong S, Mungthin M, 2008. Visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 39: 988–990.

Maltezou HC. Leishmaniasis. In: Maltezou HC, Gikas A, editors. *Tropical and emerging infectious diseases*. Kerala, India: Research Signpost. 2010: 163–185.

Morales MAI, Cruz I, Rubio JM, Chicharro C, Cañavate C, Laguna F, Alvar J., 2002. Relapses versus reinfections in patients coinfecting with *Leishmania infantum* and human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* 185: 1533–1537.

Müller N, Welle M, Lobsiger L, Stoffel MH, Boghenbor KK, Hilbe M, Gottstein B, Frey CF, Geyer C, von Bomhard W, 2009. Occurrence of *Leishmania* spp. in cutaneous lesions of horses in central Europe. *Vet Parasitol* 166: 346–351.

Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG, 2005. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366: 1561-1577.

Navin TR, Arana BA, Arana FE, Berman JD, Chajon JF. 1992. Placebo-controlled clinical trial of sodium stibogluconate (Pentostam) versus ketoconazole for treating cutaneous leishmaniasis in Guatemala. *Journal of infectious diseases* 165: 528-534.

Neal RA, Allen S, McCoy N, Oliaro P and Croft SL, 1995. The sensitivity of *Leishmania* species to aminosidine. *Antimicrobial Agents Chemother* 35: 577-584.

Pearson RD, Sousa AQ, 1996. Clinical spectrum of Leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 22: 1-13.

Pearson RD, De Queiroz Sousa, A. *Leishmania* species: visceral (kalaazar), cutaneous, and mucosal leishmaniasis. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. 4th eds. New York: Churchill Livingstone, 1994:2428-2442.

Phumee A, Kraivichian K, Chusri S, Noppakun N, Vibhagool A, Sanprasert V, Tampanya V, Wilde H, Siriyasatien P, 2013. Detection of *Leishmania siamensis* DNA in Saliva by Polymerase Chain Reaction. *Am J Trop Med Hyg* 89(5):899-905.

Polseela R, Apiwathnasorn C, Samung Y, 2007. Seasonal variation of cave-dwelling phlebotomine sand flies (Diptera:Psychodidae) in Phra Phothisat cave, Saraburi, Province. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 38: 1011-1015.

Pourshafie M, Morand S, Virion A, Rakotomanga M, Dupuy C, Loiseau PM, 2004. Cloning of S-adenosyl-L-methionine:C-24- Δ -sterolmethyltransferase (ERG6) from *Leishmania*

donovani and characterization of mRNAs in wild-type and amphotericin B-resistant promastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 2409–2414.

Purkait B, Kumar A, Nandi N, Sardar AH, Das S, Kumar S, Pandey K, Ravidas V, Kumar M, De T, Singh D, Das P, 2012. Mechanism of amphotericin B resistance in clinical isolates of *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother* 56(2):1031-1041.

Rabello A, Orsini M, Disch J, 2003. *Leishmania/HIV* co-infection in Brazil: an appraisal. *Ann Trop Med Parasitol* 97 Suppl 1:17–28.

Reuss SM, Dunbar MD, Mays MB, Owen JL, Mallicote MF, Archer LL, Wellehan JF Jr, 2012. Autochthonous *Leishmania siamensis* in Horse, Florida, USA. *Emerg Infect Dis* 18: 1545-1547.

Roberts MTM, 2006. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. *Br Med Bull* 75-76: 115-130.

Sands M, Kron MA, Brown RB. Pentamidine: a review. *Rev Infect Dis.* 1985 Sep-Oct;7(5):625-34.

Sereno, D., and J. L. Lemesre. 1997. Axenically cultured amastigote forms as an in vitro model for investigation of antileishmanial agents. *Antimicrob. Agents Chemother* 41: 972-976.

Spanakos G, Piperaki ET, Menounos PG, Tegos N, Fletmetakis A, Vakalis NC, 2007. Detection and species identification of Old World *Leishmania* in clinical samples using a PCR-based method. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102: 46-53.

Suankratay C, Suwanpimolkul G, Wilde H, Siriyasatien P, 2010. Case Report: Autochthonous Visceral Leishmaniasis in a Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Infected Patient: The First in Thailand and Review of the Literature. *Am J Trop Med Hyg* 82(1): 4–8.

Sukmee T1, Siripattanapipong S, Mungthin M, Worapong J, Rangsin R, Samung Y, Kongkaew W, Bumrungsana K, Chanachai K, Apiwathanasorn C, Rujirojindakul P, Wattanasri S, Ungchusak K, Leelayoova S, 2008. A suspected new species of *Leishmania*, the causative agent of visceral leishmaniasis in a Thai patient. *Int J Parasitol* 38: 617–622.

Sukra K, Kanjanopas K, Amsakul S, Rittaton V, Mungthin M, Leelayoova S, 2013. A survey of sandflies in the affected areas of leishmaniasis, southern Thailand. *Parasitol Res* 112(1): 297–302.

Suttinont P, Thammanichanont C, Chantarakul N, 1987. Visceral leishmaniasis: a case report. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 18: 103–106.

Thisyakorn U., Jongwutiwes S., Vanichsetakul P. and Lertsapcharoen P, 1999. Visceral leishmaniasis: the first indigenous case report in Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 93: 23–24.

Varela MR, Munoz DL, Robledo SM, Kolli BK, Dutta S, Chang KP, Muskus C, 2009. *Leishmania (Viannia) panamensis*: an in vitro assay using the expression of GFP for screening of antileishmanial drug. *Exp Parasitol* 122: 134–139.

Vermeersch M, da Luz RI, Toté K, Timmermans JP, Cos P, Maes L, 2009. In vitro susceptibilities of *Leishmania donovani* promastigote and amastigote stages to antileishmanial reference drugs: practical relevance of stage-specific differences. *Antimicrob Agents Chemother* 53(9):3855–3859

Viriyaajakul P, Viravan C, Riganti M, Punpoowong B, 1997. Imported cutaneous leishmaniasis in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 28: 558–562.

World Health Organization. 2007. Leishmaniasis. Available from: <http://www.who.int> (accessed 11.04.2007).

World Health Organization (WHO). Control of Leishmaniases: report of a meeting of the WHO Expert Committee. Geneva: WHO; 2010.