บทที่ 1

บทนำ

นับตั้งแต่ Darwin ได้จัดหมวดหมู่ของสิ่งมีชีวิตออกเป็นสาขาต่าง ๆ ตามสายวิวัฒนาการ โดยอาศัยรูปร่างลักษณะถิ่นที่กำเนิดอาศัย หรือตามสภาพภูมิประเทศนั้น ๆ แล้ว ในปี 1962 Pauly (cited by Brodie and Ryckman, 1975) กล่าวว่า "ไม่มีสัตว์ในไฟลัมใด ที่มีสมาชิกซึ่งหาตำแหน่งที่แน่นอนไม่ได้" ความจริงอันนี้จึงกลายเป็นปัญหาใหญ่ที่นักอนุกรมวิธานสมัยต่อมาต้องคิดค้นหาวิธีการต่าง ๆ มาช่วยในการพิจารณาจัดจำแนกสิ่งมีชีวิต หรือหาตำแหน่งที่แน่นอนในสายวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ ให้ถูกต้อง และได้ใช้การหาความแตกต่างในระดับโมเลกุลของสิ่งมีชีวิตในการจัดตำแหน่งของสมาชิกในกลุ่มให้แน่นอนขึ้น ซึ่งอาจมีสมาชิกบางตัวต้องเปลี่ยนตำแหน่งในสายวิวัฒนาการใหม่ หรือในบางตัวที่อยู่ในตำแหน่งที่ถูกต้องแล้ว ก็จะเป็นการยืนยันสนับสนุนความจริงอีกครั้งหนึ่ง

การศึกษาความสัมพันธ์ระดับโมเลกุลในสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ โดยเฉพาะในพวกปาราสิต และจุลินทรีย์มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง เพราะนอกจากจะเป็นประโยชน์ในทางอนุกรมวิธานแล้ว ยังเป็นประโยชน์ต่อทางการแพทย์อีกด้วย เป็นที่ทราบกันดีว่า พวกปาราสิตมีคุณสมบัติเป็นแอนติเจน มีการดำรงชีวิตที่ค่อนข้างซับซ้อน (Wilson, et al, 1969; Mc Gregor and Wilson, 1971) และมีความสามารถที่จะเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแอนติเจน เพื่อต่อต้านระบบอิมมูนของโฮสต์ได้ (Brown and Brown, 1965) ปาราสิตที่อยู่ในพื้นที่แตกต่างกันจะมีระบบอิมมูนที่แตกต่างกัน (Sadun, et al, 1966) นอกจากนี้พวกปาราสิตยังมีความสามารถในการพัฒนาตัวเองให้สามารถทนต่อสารเคมี หรือ ยาได้ดี (Peters, 1970)มีบ่อยครั้งที่เราพบว่า ยาที่เคยใช้รักษาโรคปาราสิตชนิดหนึ่งได้เมื่อเวลานาน ๆ เข้า การใช้ยาตัวเดิมกลับไม่ได้ผล ทั้งนี้มีสาเหตุมาจากการที่

ปาราสิตนั้นได้พัฒนาตัวเองให้ต้านทานต่อยาชนิดนั้นได้ ดังนั้นการศึกษาในระดับโมเลกุลของ T. vaginalis เกี่ยวกับสายพันธุ์ทางพันธุกรรมจึงเป็นสิ่งที่อาจจะนำไปสู่การอธิบายระบบอิมมูน การรักษา และระบาดวิทยาได้

การศึกษาเอ็นไซม์อีเล็คโตรฟอรีซีส เป็นการศึกษาระดับโมเลกุลที่นิยมใช้ในทางอนุกรมวิธานมากที่สุดอันหนึ่งนอกเหนือจากการใช้เทคนิคทางอิมมูโน โดยที่ทั้งสองวิธีสามารถแสดงความคล้ายคลึง หรือความแตกต่างด้านพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตได้ดี (Reeves and Bischoff, 1968) ทั้งนี้เพราะเอ็นไซม์ หรือสารประกอบโปรตีนในสิ่งมีชีวิตแต่ละสายพันธุ์ที่มีต้นกำเนิดร่วมกันทางพันธุกรรม (genetically homogenous line) จะคงที่เสมอไม่เปลี่ยนแปลง ในเมื่อยีนและเอ็นไซม์มีความสัมพันธ์โดยตรง ดังนั้นความแตกต่างหรือความคล้ายคลึงกันของเอ็นไซม์ที่ได้จากการศึกษาโดยวิธีอีเล็คโตรฟอรีซีสจึงเชื่อมโยงไปถึงความแตกต่างหรือความคล้ายคลึงกันของยีนด้วย และเป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่คงที่ในการจำแนกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้อย่างดียิ่ง เพราะฉะนั้นถ้ายีนเปลี่ยนแปลงไป หรืออีกนัยหนึ่ง ในปาราสิตแต่ละตัวมียีนที่ให้เอ็นไซม์ชนิดเดียวกันผิดไปแม้แต่เพียงเล็กน้อย เอ็นไซม์ที่ปรากฏออกมาก็จะต่างกันไปด้วย ดังนั้นการศึกษาถึงความแตกต่าง หรือความคล้ายคลึงกันของเอ็นไซม์จึงเป็นตัวบ่งชี้ถึงความแตกต่างของสัตว์ในระดับเสตรน หรือไทพ์ได้เป็นอย่างดี

การศึกษาอีเล็คโตรฟอรีซีสเริ่มมาจาก Tiselius (In Brodie and Ryckman, 1967) ซึ่งได้รับรางวัลโนเบลสาขาวิชาเคมีในปี ค.ศ. 1948 โดยที่ในปี ค.ศ. 1937 Tiselius ได้ประดิษฐ์เครื่องมืออีเล็คโตรฟอรีซีสสำหรับแยกสารละลายโปรตีนขึ้นมาเป็นคนแรก เขาทำการทดลองโดยใช้หลอดแก้วรูปตัวยู บรรจุบัฟเฟอร์เป็นตัวกลาง (supporting medium) และใส่สารละลายโปรตีนที่ต้องการแยกลงในหลอดแก้วรูปตัวยูตรงกลางระหว่างบัฟเฟอร์ แล้วผ่านกระแสไฟฟ้าเข้าบัฟเฟอร์ พร้อมกับต้องคอยสังเกตุผลตลอดเวลาที่ทำอีเล็คโตรฟอรีซีส แต่การทดลองโดยวิธีนี้ไม่สามารถแยกโปรตีนแต่ละชนิดออกจากกันได้โดยเด็ดขาด ทั้งนี้เนื่องจาก

มีการซ้อนทับของแถบโปรตีนมากเกินไป

ระยะต่อมาได้มีการปรับปรุงเทคนิคของอีเล็คโตรฟอรีซีสให้ดีขึ้นเรื่อย ๆ มีการนำเอาเจล และกระดาษกรองมาใช้เป็นตัวกลางแทนสาร ละลายบัฟเฟอร์ร่วมกับการย้อมสีเพื่อดูตำแหน่งของโปรตีน จะปรากฏตำแหน่งของโปรตีนบนเจล หรือกระดาษกรองเป็นแถบเรียกว่า "โซน" (zone) โซนเหล่านี้แยกกันชัดเจนยิ่งกว่าเดิมมาก นอกจากนั้นได้มีการนำเอาอะซิเตท เซลลูโลส โพลีอะซิเตท (acetate cellulose polyacetate) มาใช้เป็นตัวกลาง จนถึงปัจจุบัน เทคนิคเกี่ยวกับอีเล็คโตรฟอรีซีสได้พัฒนาแตกต่างกันไปหลายแบบแล้วแต่ความสะดวก หรือความเหมาะสมของการทดลอง เช่น สตาร์ช เจล อีเล็คโตรฟอรีซีส (starch gel electrophoresis) โพลีอคริลาไมด์ อีเล็คโตรฟอรีซีส (polyacrylamide electrophoresis) ฯลฯ อย่างไรก็ตามเทคนิคต่าง ๆ ที่ได้พัฒนามาตั้งแต่ต้นจนถึงปัจจุบันต่างก็อาศัยหลักการอันเดียวกันที่ว่า อีเล็คโตรฟอรีซีสคือการแยกและวิเคราะห์สารที่มีประจุไฟฟ้าด้วยสนามไฟฟ้า สารที่มีประจุไฟฟ้าสามารถเคลื่อนที่ได้ในสนามไฟฟ้า และความสามารถในการเคลื่อนที่ของสารเหล่านี้ขึ้นอยู่กับประจุไฟฟ้า รูปร่าง ขนาดโมเลกุลของสาร และความสามารถในการถูกดูดซึมโดยตัวกลาง สารใดที่มีขนาดโมเลกุลเท่ากันแต่มีประจุไฟฟ้าสุทธิไม่เท่ากัน สารที่มีประจุไฟฟ้าสุทธิมากกว่าจะเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าได้เร็วกว่าสารที่มีประจุไฟฟ้าสุทธิน้อยกว่า และในทางกลับกันสารใดที่มีประจุไฟฟ้าสุทธิเท่ากันแต่มีขนาดโมเลกุลหรือรูปร่างโมเลกุลไม่เหมือนกันจะเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าต่างกัน สารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่า หรือมีรูปร่างกลม ผิวเรียบ จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าสารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่า หรือมีรูปร่างไม่ได้ส่วน การเคลื่อนที่ของประจุไฟฟ้ามีทิศทางการเคลื่อนที่เข้าหาอีเล็คโตรดในทิศทางตรงข้ามกับประจุที่มีอยู่บนสารนั้น คือ โมเลกุลของสารที่มีประจุสุทธิเป็นบวกจะเคลื่อนที่เข้าหาอีเล็คโตรดขั้วลบ และโมเลกุลของสารที่มีประจุสุทธิเป็นลบ จะเคลื่อนที่เข้าหาอีเล็คโตรดขั้วบวก ส่วนสารที่ไม่มีประจุไฟฟ้าหรือมีประจุไฟฟ้าสุทธิเป็นศูนย์ในตัวกลางนั้น ๆ จะไม่มีการเคลื่อนที่

ในธรรมชาติเอ็นไซม์ทุกตัวมีประจุไฟฟ้า เนื่องจากเอ็นไซม์เป็นสารประกอบโปรตีนชนิดหนึ่งซึ่งโมเลกุลประกอบด้วยกรดอะมิโนหลาย ๆ ตัวมาเรียงต่อกัน กรดอะมิโนจะมีทั้งหมู่คาร์บอกซิลและหมู่อะมิโน เอ็นไซม์หรือโปรตีนจะมีประจุลบเมื่อมีหมู่คาร์บอกซิลอิสระมากกว่าหมู่อะมิโน และมีประจุบวกเมื่อมีหมู่อะมิโนอิสระมากกว่าหมู่คาร์บอกซิล และถ้ามีหมู่อะมิโนอิสระเท่ากับหมู่คาร์บอกซิลอิสระ โมเลกุลนั้นจะมีประจุสุทธิเป็นศูนย์หรืออยู่ที่จุดไอโซอีเล็คตริค

โปรตีนหรือเอ็นไซม์ในอีเล็คโตรฟอรีซีสจะมีประจุสุทธิเป็นพวกหรือลบขึ้นอยู่กับความเป็นกรดด่างของบัฟเฟอร์ในระบบนั้น ๆ ที่จุดไอโซอีเล็คตริคของเอ็นไซม์ถ้าเพิ่มความเป็นกรดด่างให้มากขึ้น หมู่อะมิโนจะถูกทำให้เป็นตัวกลางลงเรื่อย ๆ โดยเบสที่มีอยู่ในบัฟเฟอร์นั้น ดังนั้นเอ็นไซม์จะมีประจุสุทธิเป็นลบของหมู่คาร์บอกซิล ในทางตรงกันข้าม ถ้าลดความเป็นกรดด่างลง หมู่คาร์บอกซิลจะถูกทำให้เป็นตัวกลางขึ้นเรื่อย ๆ โดยกรดที่มีอยู่ในบัฟเฟอร์นั้น ในที่สุดประจุสุทธิของเอ็นไซม์จะเป็นบวกของหมู่อะมิโน ดังสมการ

$$HOOC-\overset{R}{\underset{|}{C}}H-NH_3^+ \xleftarrow{H^+} {}^-OOC-\overset{R}{\underset{|}{C}}H-NH_3^+ \xrightarrow{OH^-} NH_2-\overset{R}{\underset{|}{C}}H-COO^- + H_2O$$

เอ็นไซม์บางตัวประกอบด้วยหน่วยย่อยซึ่งทำให้เอ็นไซม์ตัวนั้นมีโครงสร้างมากกว่าหนึ่งชนิด โดยที่แต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติทางกายภาพแตกต่างกัน แต่สามารถเร่งปฏิกิริยาที่มีสับเสตรทตัวเดียวกันได้ Markert and Moller (1959) ได้เรียกแบบฟอร์มของเอ็นไซม์ที่มีคุณสมบัติเช่นนี้ว่า "ไอโซไซม์" หรือ "ไอโซเอ็นไซม์" ความแตกต่างทางกายภาพและโครงสร้างของไอโซไซม์เหล่านี้จะเป็นตัวทำให้เกิดประจุไฟฟ้าสุทธิที่ความเป็นกรดด่างในระดับต่าง ๆ ไม่เท่ากัน จึงถูกแยกจากกันได้ด้วยวิธีอีเล็คโตรฟอรีซีส

การศึกษาอีเล็คโตรฟอรีซีสในสายอนุกรมวิธาน ได้กระทำกันอย่างกว้างขวาง ได้นำเอาประโยชน์จากอีเล็คโตรฟอรีซีสมาใช้ในการจำแนกสัตว์ออกเป็น

สปีชีส์ ซับสปีชีส์และไทพ์ เช่น Allen (1968) ศึกษาใน Tetrahymena pyriformi และในปี 1971 เขาได้ศึกษาใน Paramecium aurelia Carter (1970) ศึกษาเชื้อมาลาเรียในสัตว์พันแทะ และได้นำมาใช้กับเชื้อมาลาเรียในคนในปี1973 (Carter and Mc Gregor, 1973; Carter and Voller, 1973; 1975) การศึกษาในโปรโตวัวชนิดอื่น ๆ เช่น trypanosome (Bagster and Parr, 1973; Parr, et al, 1974; Kilgour, et al, 1975; Toye, 1974; Godfrey and Kilgour, 1976); euglena (Karn and Hudock, 1973); leishmania (Gardner, et al, 1974; Kilgour, et al, 1974); coccidia (Rollinson, 1975; Shirley, 1975) และ babesia (Momen, 1975)

การศึกษาทางด้านอนุกรมวิธานของ T. vaginalis โดยวิธีอีเล็คโตรฟอรีซีส ได้มีการทดลองในหมู่นักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่นได้แก่ Takayanaki, Enriquez and Kambara, (1971) ได้ทำการศึกษาเอ็นไซม์อะมัยเลสของ T. vaginalis โดยวิธีอีเล็คโตรฟอรีซีส สามารถจำแนก T. vaginalis ออกเป็น 9 ไทพ์ Tanaka (1971) ศึกษาเอ็นไซม์มาเลท ดีไฮโดรจิเนส ของ T. vaginalis โดยวิธีอีเล็คโตรฟอรีซีส สามารถจำแนก T. vaginalis ออกเป็น 5 ไทพ์ และในประเทศไทย สุภาภรณ์ (2522) ศึกษาเอ็นไซม์กลูโคสฟอสเฟต ดีไฮโดรจิเนส ของ T. vaginalis โดยวิธีสตาร์ช เจล อีเล็คโตรฟอรีซีส สามารถจำแนก T. vaginalis ออกเป็น 7 ไทพ์ จะเห็นได้ว่าการศึกษาอนุกรมวิธานของ T. vaginalis โดยใช้เอ็นไซม์เพียงตัวเดียวก็สามารถจำแนก T. vaginalis ออกเป็นไทพ์ต่าง ๆ ได้มากชนิด ดังนั้นถ้าได้ศึกษาเอ็นไซม์ของ T. vaginalis ในตัวอย่างเดียวกันให้มากชนิดขึ้นจะทำให้จำแนกชนิดได้ละเอียดยิ่งขึ้น พร้อมทั้งทำให้ทราบคุณสมบัติทางชีวเคมีและพันธุกรรมของ T. vaginalis เพิ่มขึ้น ซึ่งจะเป็นผลดีต่อการศึกษาในอนาคตได้ โดยอาจใช้เป็นความรู้พื้นฐานในการศึกษาเกี่ยวกับพยาธิสภาพและระบาดวิทยา หรือนำไปทดสอบความไวต่อยา

(drug sensitivity) หรือการดื้อยา (drug resistance) ที่ใช้อยู่ในปัจจุบันได้ จึงได้ศึกษาเอ็นไซม์โดยวิธีสตาร์ช เจล อีเล็คโตรฟอรีซีสใน T. vaginalis จำนวน 100 สายพันธุ์บริสุทธิ์ เพิ่มต่อจากสุภาภรณ์ (2522) โดยศึกษาเอ็นไซม์กลูตาเมท ดีไฮโดรจิเนส แลคเตท ดีไฮโดรจิเนส มาเลท ดีไฮโดรจิเนส และมาลิค เอ็นไซม์ เหตุที่เลือกศึกษาเอ็นไซม์ทั้งสี่ตัวนี้ เพราะเป็นเอ็นไซม์ที่อยู่ในวิถีไกลโคไลซีส (Wellerson and Kupferberg, 1962) ซึ่งเป็นวิถีที่ให้พลังงานที่สำคัญแก่ปาราสิต และเป็นวิถีที่มีเอ็นไซม์มากกว่าวิถีต่าง ๆ จากการที่ได้ทดลองศึกษาเอ็นไซม์ของ T. vaginalis ในขั้นต้น พบว่าเอ็นไซม์ทั้งสี่ชนิดนี้มีปริมาณมากพอที่จะตรวจพบความแตกต่างของรูปแบบไอโซไซม์ได้ โดยเฉพาะมาเลท ดีไฮโดรจิเนส และมาลิค เอ็นไซม์ เป็นเอ็นไซม์ที่มีความสามารถสูง (Baernstein, 1961; Brugerollie and Metenier, 1973; Doi, et al, 1979) นอกจากนี้ Tanaka (1971) ก็เคยศึกษาเอ็นไซม์ อีเล็คโตรฟอรีซีส ของมาเลท ดีไฮโดรจิเนส โดยใช้เทคนิคของ อะซิเตท เซลลูโลส อีเล็คโตรฟอรีซีส และดิสค์ อีเล็คโตรฟอรีซีส ซึ่งสามารถนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบให้ชัดเจนยิ่งขึ้น

การศึกษาครั้งนี้ได้เลือกเก็บตัวอย่างเชื้อ T. vaginalis จากโรงพยาบาลบางรัก กรุงเทพมหานคร เนื่องจากโรงพยาบาลแห่งนี้เป็นสถานที่รับตรวจรักษาโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์โดยตรง และได้ใช้วิธีวินิจฉัยโรคพยาธิทริโคโมแนสโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อจากผู้ป่วยในอาหารเลี้ยงเชื้อ CPLM ของ Johnson and Trussell (1943) จึงสะดวกต่อการเก็บตัวอย่างเชื้อ T. vaginalis อีกทั้งโรงพยาบาลบางรักยังเป็นศูนย์กลางในการตรวจดูเชื้อจากคัลเจอร์ที่ส่งมาจากสถานกามโรค สาขาต่าง ๆ ในกรุงเทพมหานคร ดังนั้นการเก็บตัวอย่างเชื้อ T. vaginalis จากโรงพยาบาลบางรักเพียงแห่งเดียวสามารถครอบคลุมพื้นที่การระบาดของโรคพยาธิทริโคโมแนสในกรุงเทพมหานครได้กว้างขวางมาก อันอาจจะนำผลจากการศึกษาครั้งนี้ไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาต่อเกี่ยวกับการระบาด

ของโรคในกรุงเทพมหานครต่อไป ได้แบ่งหัวข้องานวิจัยออกดังนี้

1. ศึกษาเอ็นไซม์กลูโคส ฟอสเฟต ไอโซเมอเรส ของ T. vaginalis โดยใช้วิธีของสุภาภรณ์ (2522)

2. ศึกษาเอ็นไซม์ กลูตาเมท ดีไฮโดรจิเนส แลคเตท ดีไฮโดรจิเนส มาเลท ดีไฮโดรจิเนส และมาลิค เอ็นไซม์ ของ T. vaginalis โดยใช้วิธีของ Carter and Walliker, 1977; Harris and Hopkinson, 1976.

3. ศึกษาการจำแนกไทพ์ของ T. vaginalis โดยอาศัยความแตกต่างในรูปแบบของเอ็นไซม์ แต่ละตัวที่ปรากฏขึ้นบนเจล ภายหลังจากการทำอีเล็คโตรฟอรีซีส

4. ศึกษาการจำแนกไทพ์ ของ T. vaginalis โดยอาศัยความแตกต่างของเอ็นไซม์กลูโคส ฟอสเฟต ไอโซเมอเรส ร่วมกับกลูตาเมท ดีไฮโดรจิเนส แลคเตท ดีไฮโดรจิเนส มาเลท ดีไฮโดรจิเนส และมาลิค เอ็นไซม์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย