สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 6

วิจารณ์

จากผลการศึกษาเอ็นไซม์ กลูโคส ฟอสเฟต ไอโซเมอเรส ใน *T. vaginalis* จำนวน 242 สายพันธุ์บริสุทธิ์ ทำให้สามารถจำแนก *T. vaginalis* ออกตามรูปแบบของไอโซไซม์ ของ กลูโคส ฟอสเฟต ไอโซเมอเรส ได้ 2 ไทพ์ คือ *T. vaginalis* แบบที่สี่ และ แบบที่แปด (แผนภาพที่ 11) โดยพบแบบที่สี่สูงถึง 96.69% ไอโซไซม์ของ กลูโคส ฟอสเฟต ไอโซเมอเรส แถบที่ 3 เป็นไอโซไซม์ที่มีสมรรถภาพต่ำ ส่วนแถบที่ 4 และ 5 เป็นไอโซไซม์ที่มีความสามารถในการทำงานสูงปานกลาง เป็นเหตุให้การทดลองใน *T. vaginalis* สายพันธุ์บริสุทธิ์เดียวกัน บางครั้งไม่พบไอโซไซม์แถบที่ 3, 4 หรือ 5 ทำให้จัดเป็น *T. vaginalis* แบบที่ห้า, แบบที่หก หรือแบบที่เจ็ดได้ ต่อเมื่อทดลองซ้ำอีกหลาย ๆ ครั้ง จนแน่ใจว่า *T. vaginalis* สายพันธุ์บริสุทธิ์นั้น มีไอโซไซม์แถบที่ 3, 4 และ 5 จึงจะสรุปว่า เป็น *T. vaginalis* แบบที่สี่ ซึ่งประกอบด้วย ไอโซไซม์แถบที่ 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 ไอโซไซม์ทั้งหกแถบนี้มีอยู่ใน *T. vaginalis* ทั้ง 242 สายพันธุ์บริสุทธิ์ แต่ *T. vaginalis* จำนวน 8 สายพันธุ์บริสุทธิ์ หรือ 3.31% มีไอโซไซม์ แถบที่ 2 เพิ่มขึ้นมา จึงจัดให้เป็น *T. vaginalis* แบบที่แปด ซึ่งแตกต่างจาก *T. vaginalis* แบบที่สอง (สุภาภรณ์, 2522) โดยแบบที่สองไม่มีไอโซไซม์แถบที่ 3, 4 และ 5

จากการที่ *T. vaginalis* จำนวน 42 สายพันธุ์บริสุทธิ์ ซึ่งได้เพาะเลี้ยงต่อจากสุภาภรณ์ (2522) เปลี่ยนรูปแบบของไอโซไซม์ของ กลูโคส ฟอสเฟต ไอโซเมอเรส ซึ่งเป็น *T. vaginalis* แบบที่ห้า, แบบที่หก และแบบที่เจ็ด มาเป็น *T. vaginalis* แบบที่สี่เพียงแบบเดียวนั้น อาจมีผลจากการที่ได้เพาะเลี้ยง *T. vaginalis* แบบอะซินิค ซึ่งผิดจากสภาพธรรมชาติเป็นเวลานานถึงสามปี ทำให้

เกิดการผันแปรในขบวนการสังเคราะห์เอ็นไซม์ ซึ่งน่าจะได้มีการศึกษาเกี่ยวกับระยะเวลาที่เพาะเลี้ยง T. vaginalis แบบอะซินิคเทียบกับการเปลี่ยนแปลงในรูปแบบของเอ็นไซม์ หรือ ศึกษารายละเอียดเกี่ยวกับยีน ที่ควบคุมการสังเคราะห์เอ็นไซม์กลูโคส ฟอสเฟต ไอโซเมอเรส ต่อไป

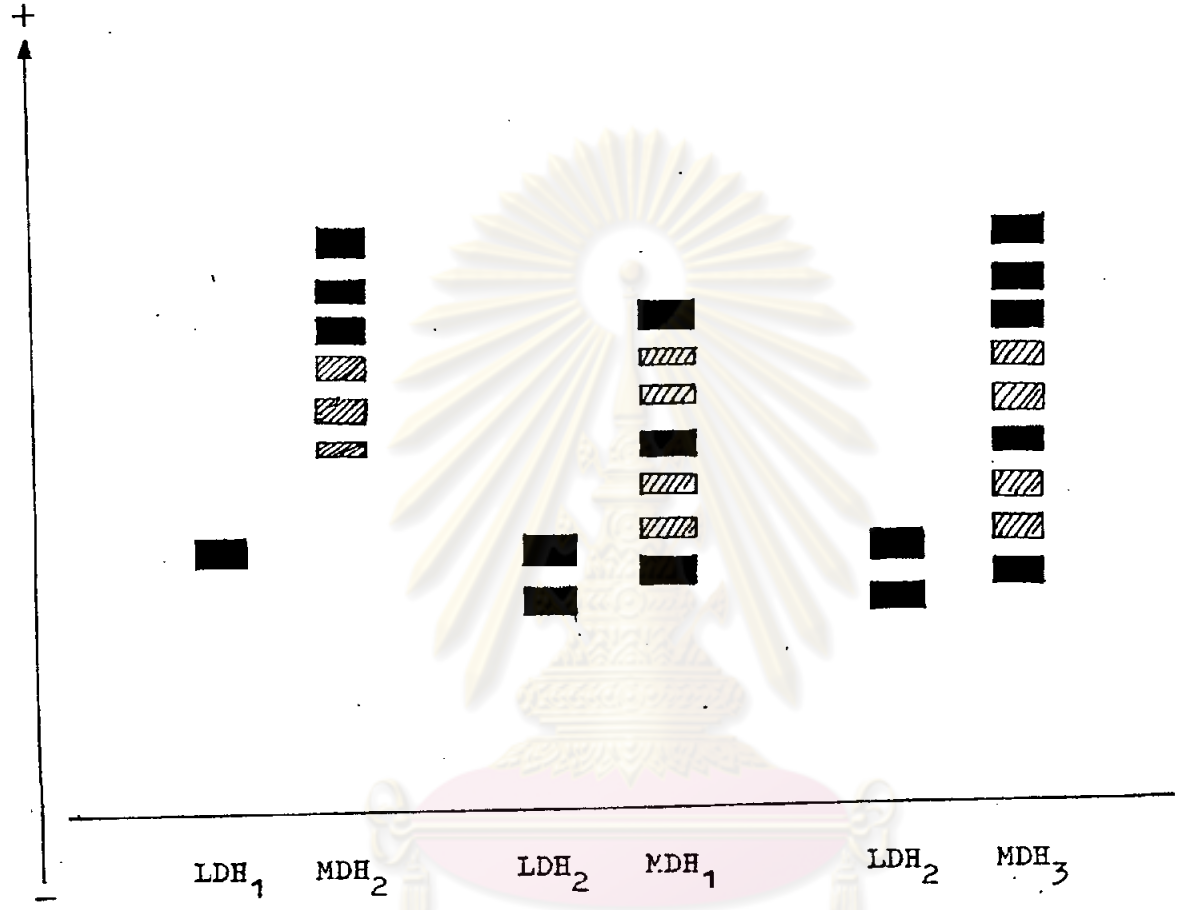
จากผลการศึกษา มาลิค เอ็นไซม์ ใน T. vaginalis พบว่า มีไอโซไซม์ 8 แถบสามารถแบ่ง T. vaginalis จำนวน 242 สายพันธุ์บริสุทธิ์ ออกเป็น 3 ไทพ์ คือ T. vaginalis แบบที่หนึ่ง, แบบที่สอง และแบบที่สาม ซึ่งทั้งสามไทพ์มีไอโซไซม์แถบที่ 3,5,6,7 และ 8 เป็นไอโซไซม์ร่วม สำหรับ T. vaginalis แบบที่สามมีไอโซไซม์แถบที่ 1 และ 2 ซึ่งมีสมรรถภาพต่ำติดสีย้อมได้น้อย ทำให้ไม่สามารถบันทึกผลการทดลองด้วยภาพถ่ายได้ แต่สามารถวิเคราะห์ผล โดยใช้แสงไฟส่องใต้แผ่นเจล และแยก T. vaginalis แบบที่สามออกจากแบบที่สองได้ ส่วนไอโซไซม์แบบที่หนึ่งสามารถแยกความแตกต่างออกจากไอโซไซม์แบบที่สอง และแบบที่สามได้ชัดเจน (แผนภาพที่ 11 และรูปที่ 5) และพบได้เพียง 3.31% ซึ่งน่าจะได้มีการศึกษาต่อเกี่ยวกับระบาดวิทยาของโรคร่วมกับการศึกษา มาลิค เอ็นไซม์เป็นอย่างยิ่ง นอกจากนี้ เอ็นไซม์ แอสเส บัฟเฟอร์ ที่ใช้ในการย้อมสีเพื่อดูแถบการทำงานของมาลิค เอ็นไซม์ ซึ่งเป็น tris - HCl ที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 ต่างจากเอ็นไซม์ แอสเส บัฟเฟอร์ ที่ใช้ในการย้อมเอ็นไซม์ตัวอื่น ๆ เพราะมาลิคเอ็นไซม์ จะทำงานได้ดีที่สุดที่ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.5 (Doi, et.al., 1979) ผลดีอีกอย่างจากการใช้เอ็นไซม์ แอสเส บัฟเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 คือ พื้นสีของเจลไม่เปลี่ยนเป็นสีดำ ถึงแม้จะทิ้งเจลไว้ที่อุณหภูมิ 37°C นานถึง 3 ชั่วโมง

T. vaginalis จำนวน 242 สายพันธุ์บริสุทธิ์ ถูกแบ่งตามเอ็นไซม์กลูตาเมท ดีไฮโดรจิเนส และ เอ็นไซม์ แลคเตท ดีไฮโดรจิเนส ออกเป็นอย่างละ 2 ไทพ์ คือ T. vaginalis ที่มีไอโซไซม์ของกลูตาเมท ดีไฮโดรจิเนส แบบที่หนึ่ง, แบบที่สอง และ T. vaginalis ที่มีไอโซไซม์ของแลคเตท ดีไฮโดรจิเนส แบบที่

หนึ่ง และแบบที่สอง จากรูปแบบของไอโซไซม์ของกลูตาเมท ดีไฮโดรจิเนส แบบที่สอง และ แลคเตท ดีไฮโดรจิเนส แบบที่สอง (แผนภาพที่ 11) ซึ่งประกอบด้วยไอโซไซม์ 2 แถบคือ ไอโซไซม์แถบที่ 1 และ 2 ทำให้คิดว่าอาจเกิดจากการที่ผู้ป่วยที่มี mixed infection คือ T. vaginalis ที่มีไอโซไซม์แถบที่ 1 และ T. vaginalis ที่มีไอโซไซม์ แถบที่ 2 ถ้าเป็นเช่นนี้ แสดงว่า การแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ยังไม่ได้สายพันธุ์บริสุทธิ์จริง แต่จากการทดลองใน T. vaginalis 242 สายพันธุ์บริสุทธิ์ไม่พบว่ามี T. vaginalis สายพันธุ์บริสุทธิ์ใด ที่มีไอโซไซม์ของกลูตาเมท ดีไฮโดรจิเนส เฉพาะแถบที่ 1 เพียงแถบเดียว หรือมีไอโซไซม์ของเอ็นไซม์แลคเตท ดีไฮโดรจิเนส เฉพาะแถบที่ 2 เพียงแถบเดียว นอกจากนี้ ยังพบ T. vaginalis ที่มีไอโซไซม์ของกลูตาเมท ดีไฮโดรจิเนส แบบที่สอง และมีไอโซไซม์ของแลคเตท ดีไฮโดรจิเนส แบบที่สอง ได้ถึง 10.33% และ 38.43% ตามลำดับ จึงอาจสรุปได้ว่า T. vaginalis ทั้งสองแบบนี้เป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์จริง

จากผลการศึกษาเอ็นไซม์ มาเลท ดีไฮโดรจิเนส พบว่า มีความสัมพันธ์กับเอ็นไซม์ แลคเตท ดีไฮโดรจิเนส ดังนี้ ถ้าพบ T. vaginalis ที่มีไอโซไซม์ของแลคเตท ดีไฮโดรจิเนสแบบที่หนึ่ง จะพบไอโซไซม์ของ มาเลท ดีไฮโดรจิเนส แบบที่สองเสมอ หรือถ้า T. vaginalis มีไอโซไซม์ของ แลคเตท ดีไฮโดรจิเนส แบบที่สอง ไอโซไซม์ของ มาเลท ดีไฮโดรจิเนสที่พบจะต้องเป็นแบบที่หนึ่ง จากแผนภาพที่ 11 พบว่า ถ้า T. vaginalis มีไอโซไซม์แถบที่ 2 ของ แลคเตท ดีไฮโดรจิเนส จะพบไอโซไซม์ แถบที่ 7, 8 และ 9 ของ มาเลท ดีไฮโดรจิเนสเสมอ ดังนั้น T. vaginalis ที่มีไอโซไซม์ของ มาเลท ดีไฮโดรจิเนส แบบที่สามจึงมีไอโซไซม์ของ แลคเตท ดีไฮโดรจิเนส แบบที่สองด้วย

สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างไอโซไซม์ ของ มาเลท ดีไฮโดรจิเนส และ แลคเตท ดีไฮโดรจิเนสนี้ อาจจะเป็นไปได้ว่า ยีนควบคุม หรือยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอ็นไซม์ทั้งสองตัวนี้ อยู่บนโครโมโซมตัวเดียวกัน ในตำแหน่งที่ใกล้ชิดกันมาก ดังนั้นเมื่อเกิดความผันแปร ทำให้ T. vaginalis สังเคราะห์เอ็นไซม์ แลคเตท



แผนภาพที่ 12 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างไอโซไซม์ ของเอ็นไซม์แลคเตท ดีไฮโดรจิเนส และ มาเลท ดีไฮโดรจิเนส ที่พบใน T. vaginalis จำนวน 2/2 สายพันธุ์บริสุทธิ์ สี่เหลี่ยมที่มีเส้นขวางแสดงถึงไอโซไซม์ที่มีการทำงานต่ำ สี่เหลี่ยมที่มีเส้นทึบแสดงถึงไอโซไซม์ที่มีการทำงานสูง

ดีไฮโดรจิเนส ที่มีไอโซไซม์ แถบที่ 2 ขึ้น จะส่งผลกระทบต่อยีนของเอ็นไซม์ มาเลท ดีไฮโดรจิเนส ทำให้เกิดมีไอโซไซม์แถบที่ 7, 8 และ 9 ปรากฏขึ้นแทนไอโซไซม์แถบที่ 1 และ 2 หรือในทางกลับกัน ความผันแปรอาจเกิดกับยีนของเอ็นไซม์ มาเลท ดีไฮโดรจิเนส ก่อน แล้วจึงส่งผลไปที่ยีนของเอ็นไซม์ แลคเตท ดีไฮโดรจิเนส ความสัมพันธ์ฉันนี้ เป็นสิ่งที่น่าสนใจยิ่ง และน่าจะได้ทำการศึกษาอย่างละเอียดต่อไป

ส่วน T. vaginalis ซึ่งมีไอโซไซม์ ของ มาเลท ดีไฮโดรจิเนส แบบที่สาม พบได้ 8 สายพันธุ์บริสุทธิ์ ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วย 2 คนนั้น เป็นไปได้ว่า ผู้ป่วยทั้งสองนี้ อาจได้รับเชื้อ T. vaginalis 2 ไทพ์ ในเวลาเดียวกัน คือ ได้รับ T. vaginalis ที่มีไอโซไซม์ของ มาเลท ดีไฮโดร์จิเนส แบบที่หนึ่ง และแบบที่สอง จากการที่ได้ทำการแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ก่อนทำอีเล็คโตรฟอรีซิส ซึ่งวิธีแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ โดยการโคลนนี้ Takayanaki, et al , (1971) ยอมรับว่าเป็นวิธีแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่ได้ผลค่อนข้างแน่นอน และในการทดลอง ได้ทำการแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ T. vaginalis ตัวอย่างละ 4 สายพันธุ์บริสุทธิ์ พบว่าทั้ง 8 สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่ได้จากคนไข้ 2 คนนั้น ให้ผลเหมือนกันคือ มีไอโซไซม์ของ แลคเตท ดีไฮโดรจิเนส แบบที่สอง และมีไอโซไซม์ของ มาเลท ดีไฮโดรจิเนส แบบที่สาม ทุกสายพันธุ์บริสุทธิ์ และได้ทดลองนำเอาสายพันธุ์บริสุทธิ์มาโคลนใหม่อีกสองครั้ง ผลการทำอีเล็คโตรฟอรีซีสเหมือนเดิม จึงคิดว่า T. vaginalis แบบที่สามเป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์จริง แต่ผลการทดลองที่ได้นี้ ต่างจากผลการศึกษาเอนไซม์ มาเลท ดีไฮโดรจิเนส ของ T. vaginalis ในประเทศญี่ปุ่น (Tanaka, 1971) ทั้งนี้เพราะใช้วิธีการแตกต่างกัน Tanaka ใช้ 2 วิธี ซึ่งทำใน T. vaginalis ตัวอย่างเดียวกัน คือ อะซิเตท เซลลูโลส อีเล็คโตรฟอรีซีส และ ดิสค์ เจล อีเล็คโตรฟอรีซีส ผลการทดลองพบว่า การใช้เทคนิค อะซิเตท เซลลูโลส อีเล็คโตรฟอรีซีส พบไอโซไซม์ 3 แถบ และไม่สามารถแยกความแตกต่างของไอโซไซม์ทั้งสามแถบออกจากกันได้ชัดเจน ส่วนการใช้เทคนิค ดิสค์ เจล อีเล็คโตรฟอรีซีส ร่วมกับการวิเคราะห์ด้วยเครื่องเดนสิโตมิเตอร์ พบไอโซไซม์ 8 แถบ และสามารถแยกแถบไอโซไซม์ที่อยู่ในตำแหน่ง

เดียวกันออกจากกันได้โดยอาศัยความสามารถของไอโซไซม์ในการติดสีย้อมไม่เท่ากัน ทำให้สามารถจำแนก T. vaginalis จำนวน 11 ตัวอย่าง ออกเป็น 5 ไทพ์ ส่วนการทดลองโดยใช้เทคนิค สตาร์ช เจล อีเล็คโตรฟอรีซีส ได้วิเคราะห์ผลด้วยตาเปล่า ไม่สามารถแยกแถบของไอโซไซม์ที่อยู่ในตำแหน่งเดียวกัน แต่มีความสามารถไม่เท่ากันออกจากกันได้ ทำให้แยกไอโซไซม์ได้เป็น 9 แถบ และสามารถจำแนก T. vaginalis จำนวน 242 สายพันธุ์บริสุทธิ์ได้เพียง 3 ไทพ์

จากผลการศึกษาเอ็นไซม์ กลูโคส ฟอสเฟส ไอโซเมอเรส กลูตาเมท ดีไฮโดรจิเนส แลคเตท ดีไฮโดรจิเนส มาเลท ดีไฮโดรจิเนส และ มาลิก เอ็นไซม์ ใน T. vaginalis จำนวน 242 สายพันธุ์บริสุทธิ์ ทำให้สามารถจัดแบ่ง T. vaginalis ออกเป็น 13 ไทพ์ ซึ่งจำนวนไทพ์ควรจะมากกว่านี้ ทั้งนี้เพราะว่า T. vaginalis ที่มีกลุ่มไอโซไซม์ของ กลูโคส ฟอสเฟต ไอโซเมอเรส แบบที่หนึ่ง, แบบที่สอง และแบบที่สาม (สุภาภรณ์, 2522) ได้ตายไปในระหว่างทำการทดลอง นอกจากนี้ T. vaginalis แบบที่ห้า, แบบที่หก และแบบที่เจ็ด ที่เหลือ เมื่อถูกเลี้ยงแบบอะซินิคเป็นเวลานาน เกิดมีไอโซไซม์เพิ่ม ทำให้กลายเป็นแบบที่สี่ทั้งสิ้น

การนำเอาไทพ์ของไอโซไซม์ที่ได้จากการศึกษาเอ็นไซม์อีเล็คโตรฟอรีซีส มาใช้ในการจำแนก T. vaginalis นี้ เป็นวิธีที่ละเอียดอ่อน และมีประสิทธิภาพมากวิธีหนึ่งนอกเหนือจากการจำแนก โดยใช้คุณสมบัติทางด้านอิมมูโน การจำแนก T. vaginalis โดยใช้คุณสมบัติทางด้านอิมมูโน ได้ศึกษากันมากในหมู่นักวิทยาศาสตร์ชาวโปแลนด์ รัสเซีย และ ฝรั่งเศส (Honigberg, 1970) และสามารถจำแนก T. vaginalis ออกเป็นไทพ์ต่าง ๆ ด้วยจำนวนที่แตกต่างกันไป ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสถานที่ เวลา และจำนวนตัวอย่างเชื้อที่นำมาศึกษา อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษาทั้งสองวิธีโดยดูจาก T. vaginalis ที่ได้ จะพบว่า การแยกโดยคุณสมบัติทางด้านอิมมูโน มีความละเอียดอ่อนน้อยกว่าการแยกโดยอาศัยเอ็นไซม์ อีเล็คโตรฟอรีซีส นอกจากนี้การศึกษาเอ็นไซม์อีเล็คโตรฟอรีซีส เป็นการศึกษาเอ็นไซม์ที่มีอยู่จริง ใน

T. vaginalis จึงสามารถนำผลมาพิจารณาร่วมกันได้ ทำให้จำแนกชนิดของ T. vaginalis ได้ละเอียดยิ่งขึ้น ดังเช่น การศึกษาครั้งนี้ ซึ่งศึกษาเอ็นไซม์ห้าตัว ใน T. vaginalis ที่เก็บมาจากผู้ป่วยในกรุงเทพมหานครเพียงแห่งเดียว แต่สามารถจำแนก T. vaginalis ได้ถึง 13 ชนิด ขณะที่การศึกษาทางด้านอิมมูโนใน T. vaginalis จากยุโรปตอนกลาง และยุโรปตะวันออก โดย Estonian group (cited by Honigberg, 1970) สามารถจำแนก T. vaginalis ได้เพียง 4 ไทพ์ เท่านั้น นอกจากนี้การศึกษาทางด้านอิมมูโนไม่ใช่เป็นการศึกษาตัวปาราสิตโดยตรง แต่ศึกษาปฏิกิริยาตอบโต้ต่อปาราสิต ซึ่งเกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิตที่เป็นโฮสต์ หรือโปรโตซัวอื่น จึงไม่อาจนำผลที่ได้มารวมเข้าด้วยกันอย่างการศึกษาเอ็นไซม์อีเล็คโตร-ฟอรีซีส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย