หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

เอ็นไซม์ อีเล็คโตรฟอรีซิส (enzyme electrophoresis) เป็นวิธีจำแนกสิ่งมีชีวิตที่มีประสิทธิภาพวิธีหนึ่ง นอกเหนือไปจากการจำแนกสิ่งมีชีวิต โดยอาศัยรูปร่างลักษณะถิ่นกำเนิดที่อยู่อาศัยหรือตามสภาพภูมิประเทศ หรือแบ่งตามโฮสต์ที่สิ่งมีชีวิตนั้น ๆ อาศัยอยู่รวมทั้งตามวิธีทางอิมมิวโนโลยี่ ทั้งนี้เพราะว่าเทคนิคของเอ็นไซม์ อีเล็คโตรฟอรีซิสเกี่ยวข้องกับการแยกแบบฟอร์มต่าง ๆ ของเอ็นไซม์หรือไอโซไซม์ ซึ่งไอโซไซม์นี้ใช้เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรม (genetic marker) ที่ดีในการจำแนกพันธุกรรม หรือสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตออกจากกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพวกจุลินทรีย์ ความแตกต่างของเอ็นไซม์ (enzyme variation)จะเป็นตัวแบ่งแยกสปีชีส์และซับสปีชีส์ รวมทั้งสเตรนออกจากกันได้อย่างชัดเจนนอกเหนือไปจากการจำแนกด้วยวิธีธรรมดาทั่วไป และทำให้สามารถศึกษาพันธุกรรมทางชีวเคมี (biochemical genetic) ได้ด้วย เช่น ความแตกต่างของยีนและความถี่ของยีนในสิ่งมีชีวิตแต่ละกลุ่ม

ไอโซไซม์คืออะไร? จากคุณสมบัติของเอ็นไซม์ส่วนใหญ่ที่ว่า เอ็นไซม์หนึ่ง ๆ สามารถมีได้หลายแบบฟอร์มและสามารถทำปฏิกริยาเดียวกันได้ด้วย Markert และ Moller (1959) ได้เรียกแบบฟอร์มของเอ็นไซม์ที่มีคุณสมบัติเช่นนี้ว่า "ไอโซไซม์ หรือ ไอโซเอ็นไซม์ (isoenzyme)" หรือกล่าวอีกนัยหนึ่ง ไอโซไซม์ก็คือ เอ็นไซม์ที่มีสับเสตรทเหมือนกันและเร่งปฏิกริยาเดียวกัน แต่มีคุณสมบัติทางกายภาพและโครงสร้างต่างกัน ซึ่งสามารถแยกออกจากกันได้โดยวิธีอีเล็คโตรฟอรีซิส นั่นคือ ประจุไฟฟ้าสุทธิของแต่ละไอโซม์จะต่างกัน ตัวอย่างเช่น เอ็นไซม์ แลคเตท ดีไฮโดรจีเนสในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งแต่ละโมเลกุลมี

4 หน่วยย่อย หน่วยย่อยนี้มี 2 ชนิด ซึ่งมีโครงสร้างและคุณสมบัติแตกต่างกันคือ ชนิด M ซึ่งพบมากในกล้ามเนื้อ และชนิด H ซึ่งพบมากในหัวใจ ดังนั้นไอโซไซม์ของเอ็นไซม์แลคเตทดีไฮโดรจีเนสในเนื้อเยื่อต่าง ๆ จึงมีอยู่ 5 ประเภทด้วยกันคือ M_4, M_3H, M_2H_2, MH_3 และ H_4 แต่ละตัวจะมีคุณสมบัติทางกายภาพผิดกัน และอาจแยกออกจากกันได้โดยวิธีอีเล็คโตรฟอรีซิส คุณสมบัติทางจลน์ที่ผิดกันคือ ถึงแม้ว่าทุกตัวจะสามารถเร่งปฏิกริยาเดียวกัน คือ

$$\text{Lactate} + NAD^+ \rightleftharpoons \text{Pyruvate} + NADH + H^+$$

แต่หน่วยย่อย H จะถูกยับยั้งโดยไพรูเวทที่มีความเข้มข้นสูง ไอโซไซม์ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อย H เป็นส่วนใหญ่ จึงมีความสามารถเร่งปฏิกริยาได้ดีต่อเมื่อแลคเตทมากกว่าไพรูเวทอยู่มาก และปฏิกริยาดำเนินไปทางขวา ส่วนไอโซไซม์ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อย M เป็นส่วนใหญ่ จะสามารถทำงานได้ดีเมื่อมีไพรูเวทอยู่มาก และจะเร่งปฏิกริยาให้ดำเนินไปทางซ้ายได้ดี เป็นต้น ไอโซไซม์อาจจะพบได้ภายในเซลเดียวกัน และอาจมีแบบของไอโซไซม์ที่ต่างกันระหว่างเซลของเนื้อเยื่อที่ต่างกัน หรือต่างกันภายในเซลที่อยู่ในระยะการเติบโตต่าง ๆ และไม่เพียงแต่จะพบภายในสัตว์ตัวหนึ่งตัวใดเพียงตัวเดียว แต่จะพบในสมาชิกอื่นที่อยู่ในสปีชีส์เดียวกันด้วย (Harris and Hopkinson, 1976)

การศึกษาแบบฟอร์มต่าง ๆ ของเอ็นไซม์นี้มีได้หลายวิธี เช่น ศึกษาโดยเทคนิคของอีเล็คโตรฟอรีซิส, เรซิน โครมาโตกราฟฟี่ (resin chromatography), ฟิงเกอร์-พริ้นท์แพทเทอร์น (fingerfrint pattern), คุณสมบัติทางอิมมิวโนโลยี่ และคุณสมบัติในการทำปฏิกริยาของเอ็นไซม์ เป็นต้น ซึ่งวิธีที่ดีที่สุดและนิยมใช้กันมากที่สุด คือ เทคนิคทางอีเล็คโตรฟอรีซิส (Kaplan, 1963 ; Brodie and Ryckman, 1967 ; Carter and Walliker, 1977) ร่วมกับการย้อมสีทางฮิสโตเคมิสตรีเพื่อติดตามโซนการทำงานของเอ็นไซม์ (enzyme activity zone)

จากคุณสมบัติของเอ็นไซม์ที่ส่วนใหญ่มีโอโซไซม์นี่เอง นักอนุกรมวิธานจึงนิยมนำเทคนิคของเอ็นไซม์อีเล็คโตรฟอรีซิสมาใช้ในการจำแนกสัตว์ออกเป็นสปีชีส์ ซับสปีชีส์ ไทพ์ และสเตรนได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยในปี ค.ศ. 1968 Allen ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับไอโซไซม์ของโปรโตซัว Tetrahymena pyriformi ปี ค.ศ. 1970 Carter ได้ทดลองใช้กับเชื้อมาเลเรียของสัตว์ฟันแทะ และได้นำมาใช้กับมาเลเรียของคนในปี 1973 (Carter and Mc Gregor, 1973 ; Carter and Voller, 1973 ; Carter and Voller, 1975) นอกจากนี้ก็ยังได้มีผู้นำวิธีการนี้ไปใช้กับโปรโตซัวที่เป็นปาราสิตชนิดอื่น ๆ อีก เช่น trypanosome (Bagster and Parr, 1973; Kilgour and Godfrey, 1973 ; Toye, 1974 ; Kilgour, et al , 1975 ; Godfrey and Kilgour, 1976) leishmania (Gardner, 1974 ; Kilgour, 1974) coccidia (Rollinson, 1975 ; Shirley, 1975) และ babesia (Momen, 1975) โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลงานของ Carter and Walliker (1977) เขาได้ใช้เอ็นไซม์กลูโคส-ฟอสเฟต ไอโซเมอเรส ฟอสโฟ กลูโคเนท ดีไฮโดรจีเนส แลคเตท ดีไฮโดรจีเนส และกลูตาเมท ดีไฮโดรจีเนส เป็นตัวจำแนกเชื้อมาเลเรียที่เป็นปาราสิตในสัตว์ฟันแทะที่พบในทวีปอาฟริกา ซึ่งเดิมเชื้อมาเลเรียเหล่านี้ถูกจำแนกโดยใช้ถิ่นกำเนิดตามภูมิศาสตร์ รูปร่างและโฮสต์ที่ปาราสิตนั้นอาศัยอยู่ เมื่อ Carter ได้นำวิธีทางเอ็นไซม์อีเล็คโตรฟอรีซิสมาใช้ก็สามารถให้ข้อมูลในการจำแนกปาราสิตเหล่านี้ออกเป็นซับสปีชีส์ได้มากขึ้น และเขายังพบว่า Plasmodium chabaudi สามารถจำแนกออกเป็นสองซับสปีชีส์ได้ก็โดยอาศัยความแตกต่างของเอ็นไซม์

อีเล็คโตรฟอรีซิสเป็นวิธีซึ่งใช้ในการแยกและวิเคราะห์สารต่าง ๆ ที่มีประจุไฟฟ้า โดยอาศัยหลักที่ว่า สารที่มีประจุไฟฟ้าต่างกัน ย่อมมีแรงเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าต่างกัน สารใดถ้ามีขนาดโมเลกุลเท่ากันแต่มีประจุไฟฟ้าไม่เท่ากัน สารที่มีประจุไฟฟ้ามากกว่าจะเคลื่อนที่ไปในสนามไฟฟ้าได้เร็วกว่า ในทางกลับกัน โมเลกุลของสารขนาดเล็กมักเคลื่อนที่ได้เร็ว

กว่าโมเลกุลขนาดใหญ่ที่มีประจุเท่ากัน ดังนั้นโมเลกุลของสารใดที่มีประจุน้อยก็จะไม่ค่อยมีการเคลื่อนที่ ส่วนโมเลกุลที่ไม่มีประจุ หรือมีประจุสุทธิเท่ากับศูนย์ก็จะอยู่กับที่ไม่มีการเคลื่อนที่เลย โมเลกุลของสารในอีเล็คโตรฟอรีซิสมีการเคลื่อนที่เข้าหาอีเล็คโทรดในทิศทางตรงข้ามกับประจุที่มีอยู่บนสารนั้น คือ โมเลกุลที่มีประจุบวกจะวิ่งไปยังขั้วลบ โมเลกุลที่มีประจุลบจะวิ่งไปยังขั้วบวก

ประจุไฟฟ้าของสารในอีเล็คโตรฟอรีซิสนี้ขึ้นอยู่กับความเป็นกรดด่าง (pH) ของบัฟเฟอร์ในอีเล็คโตรฟอรีซิส เช่น โปรตีนที่ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน ซึ่งมีทั้งหมู่คาร์บอกซิลิค (carboxylic group, COO^-) และหมู่อะมิโน (amino group, NH_3^+) โปรตีนนั้นจะมีประจุบวกต่อเมื่อมีหมู่อะมิโนมากกว่า และจะมีประจุลบเมื่อมีหมู่คาร์บอกซิลมากกว่า หรือจะเป็นกลางเมื่อมีหมู่อะมิโนเท่ากับหมู่คาร์บอกซิล หรือที่เรียกว่า อยู่ที่จุดไอโซอีเล็คทริค (isoelectric point) ที่จุดนี้ ถ้าเพิ่มความเป็นกรดด่างของบัฟเฟอร์ให้มากขึ้น หมู่อะมิโนจะถูกทำให้เป็นกลางมากขึ้นเรื่อย ๆ โดยเบสที่มีอยู่ในบัฟเฟอร์ ดังนั้นกรดอะมิโนจะมีประจุสุทธิเป็นลบของหมู่คาร์บอกซิล (COO^-) ในทางตรงกันข้าม ประจุสุทธิของกรดอะมิโนจะเป็นบวกเมื่อความเป็นกรดด่างลดลง ส่วนใหญ่แล้วแมคโครโมเลกุลและโมเลกุลอื่น ๆ ที่มีความสำคัญในชีวเคมี มักจะมีประจุอยู่บ้างไม่มากก็น้อย ขึ้นอยู่กับหมู่ $-NH_3^+$ $-COO^-$ $-PO_4^{-3}$ เป็นต้น

อีเล็คโตรฟอรีซิส เป็นวิธีที่ดีสุดวิธีหนึ่งในการแยกและเตรียมสารให้บริสุทธิ์ประโยชน์อีกอย่างหนึ่ง คือ ใช้หาจุดไอโซอีเล็คทริคของโมเลกุล และยังใช้หาไอโซไซม์ของเอ็นไซม์ได้ด้วย (Nerenberg, 1973)

จากผลการศึกษาความแตกต่างของเอ็นไซม์โดยเอ็นไซม์อีเล็คโตรฟอรีซิสของนักวิทยาศาสตร์ทั้งหลายนี้ Carter and Walliker (1977) ได้สรุปว่าเทคนิคของเอ็นไซม์อีเล็คโตรฟอรีซิส เป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุดในการจำแนกสัตว์ ทั้งนี้เพราะว่า คุณสมบัติของ

เอ็นไซม์ในแต่ละสายพันธุ์ที่มีต้นกำเนิดร่วมกันทางพันธุกรรม (genetically homogeneous line) จะคงที่เสมอไปไม่เปลี่ยนแปลง และในเมื่อยีนและเอ็นไซม์มีความสัมพันธ์กันโดยตรง ดังนี้แบบฟอร์มต่าง ๆ ของเอ็นไซม์หรือไอโซไซม์ที่ถูกแยกออกจากกันโดยเทคนิคทางเอ็นไซม์อีเล็คโตรฟอรีซิส จะเชื่อมโยงไปถึงความแตกต่างกันระหว่างยีนด้วย และจะเป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่คงที่ในการจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์ต่าง ๆ ได้อย่างดียิ่ง เพราะฉะนั้น ถ้ายีนมีการเปลี่ยนแปลงไป หรืออีกนัยหนึ่งในปาราสิตแต่ละตัวมียีนที่ให้เอ็นไซม์ชนิดเดียวกันผิดไปแม้แต่เพียงเล็กน้อย เอ็นไซม์ที่ปรากฏออกมาก็จะต่างกันไปด้วย ดังนั้นการศึกษาถึงความแตกต่างของเอ็นไซม์ชนิดเดียวกันนี้ก็สามารถที่จะเป็นตัวบ่งชี้ถึงความแตกต่างของสัตว์ในระดับสเตรนหรือไทพ์ได้เป็นอย่างดี

สำหรับการศึกษาเอ็นไซม์ของ Trichomonas vaginalis นั้น ยังไม่ค่อยแพร่หลายนัก ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาเกี่ยวกับเอ็นไซม์ในวิถีไกลโคไลซิส (glycolytic pathway) (Wirtschafter, 1954 ; Wirtschafter and Jahn, 1956 ; Baernstein, 1959 ; Wellerson and Kupferberg, 1962 ; Seama, 1953 ; Wirtschafter, Saltman and Jahn, 1956 ; Asami, 1956 ; Baernstein, 1961) และเอ็นไซม์ฮิสโตเคมิสตรี (enzyme histochemistry) (Sharma, et al , 1967 (a) ; 1967 (b)) ส่วนการศึกษาเอ็นไซม์อีเล็คโตรฟอรีซิสของ T.vaginalis มีผู้ทำการศึกษากันน้อยมาก มีกลุ่มนักวิทยาศาสตร์ญี่ปุ่น คือ Takayanaki, Enriquez and Kambara (1971) ได้ศึกษาถึงเรื่องอะมัยเลส ไอโซไซม์ ของ T.vaginalis ที่พบในผู้ป่วยนอกของโรงพยาบาลต่าง ๆ ในประเทศญี่ปุ่น ผลที่ได้พบว่า T.vaginalis 258 สายพันธุ์บริสุทธิ์ (clone) ที่ได้จากคนไข้จำนวน 65 ราย มีไอโซไซม์ 8 ไอโซไซม์ จัดแบ่งได้เป็น 9 รูปแบบ (pattern) โดยใช้เทคนิคของเซลโลไซส์เจล อีเล็คโตรฟอรีซิส (cellosize gel electrophoresis) และมีผลงานของนักวิทยาศาสตร์ญี่ปุ่นอีกคนหนึ่ง คือ Tanaka, 1971 ศึกษาไอโซไซม์ของเอ็นไซม์ มาเลท ดีไฮโดรจีเนส ใน T.vaginalis

เหมือนกัน โดยใช้เทคนิคของอะซิเตท เซลลูโลส อีเล็คโตรฟอรีซิส (acetate cellulose electrophoresis) และ ดิสค์ อีเล็คโตรฟอรีซิส (disc-electrophoresis) พบว่า มีไอโซไซม์ของมาเลท ดีไฮโดรจีเนสอยู่ 8 ไอโซไซม์ และสามารถแบ่งเป็นไทพ์ได้ 5 ไทพ์

จากผลงานและแนวทางการทดลองของนักวิทยาศาสตร์ญี่ปุ่นทั้งสองคนนี้ ทำให้ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะค้นคว้าทดลองหาไอโซไซม์กับ T.vaginalis ซึ่งเป็นตัวทำให้เกิดโรคพยาธิในช่องคลอดสตรีที่เป็นกันอย่างแพร่หลายในหมู่คนไทยดูบ้าง เพราะโรคพยาธิทริโคโมแนสหรือโรคพยาธิในช่องคลอดสตรีที่เกิดจาก ปาราสิตชนิดนี้ ได้นำปัญหาที่ยุ่งยากมาสู่ผู้เป็นโรคนี้อย่างมาก ดังเช่นที่ Hume, 1978 ได้กล่าวไว้ว่า ถ้าผู้ใดเป็นโรคนี้แล้วจะทำให้เกิด

1. โรคพยาธิทริโคโมแนสมักจะทำให้เกิดแผลที่บริเวณปากมดลูก ซึ่งอาจจะนำไปสู่การเป็นเนื่องอก (malignant transformation)

2. ถ้าเป็นโรคพยาธิทริโคโมแนสแบบเรื้อรังจะทำให้เซลมีการแปรรูปที่ไม่แน่นอน (cellular atypia) ซึ่งจะทำให้การวินิจฉัยโรคผิดไปได้

3. ถ้าได้รับเชื้อ T.vaginalis นี้เป็นเวลานาน จะทำให้เป็นหมันแบบชั่วคราวได้ ซึ่งถ้าได้รับการรักษาให้หายแล้วก็จะทำให้สามารถกลับตั้งครรภ์ได้อีก การเป็นหมันชั่วคราวนี้ Hynie, et al , 1960 กล่าวว่า อาจเกิดจาก

   - เมื่อปากมดลูกมีการอักเสบเนื่องจาก T.vaginalis ช่องคลอดและปากมดลูกจะเต็มไปด้วยหนอง ทำให้ปากมดลูกอุดตัน และถ้ามีการอักเสบภายในปากมดลูกด้วยก็จะยิ่งทำให้เชื้ออสุจิไม่สามารถเคลื่อนที่ผ่านปากมดลูกเข้าไปได้

- เกิดจากสารพิษ (toxin)ที่สร้างขึ้นโดย T.vaginalis (ในกรณีที่ได้รับเชื้อเข้าไปมาก และได้รับเชื้ออสุจิน้อย) สารพิษนี้จะไปทำให้เชื้ออสุจิเคลื่อนที่ได้น้อยลง หรือไม่มีการเคลื่อนเลย ถ้าได้รับสารพิษนี้เป็นจำนวนมาก

4. ถ้ามารดาในขณะที่ตั้งครรภ์เป็นโรคพยาธิทริโคโมแนส ลูกที่จะเกิดไม่ว่าเป็นผู้หญิงหรือผู้ชายมีโอกาสที่จะเป็นโรคนี้ได้ด้วย

5. ผู้ชายเมื่อเป็นโรคนี้มักจะไม่ค่อยแสดงอาการ อาการที่เกิดขึ้นทั่วไป คือ จะมีการอักเสบที่ต่อมลูกหมาก และเอปิดิไดมิส

6. ทำให้การวินิจฉัยโรคสับสนได้ในกรณีที่มีเชื้อ T.vaginalis ในระบบทางเดินปัสสาวะด้วย

7. พบว่ายาที่ใช้ในการรักษา โดยเฉพาะอย่างยิ่ง metronidazole ($Flagyl^R$) ที่เป็นที่นิยมใช้กันมากเพราะ ใช้รับประทานขนาดเดียวและเพียงครั้งเดียวก็หาย ปัจจุบันพบว่าเป็นสารที่ทำให้เกิดมะเร็งในหนูไมซ์ และทำให้เกิดการผ่าเหล่าในแบคทีเรีย

การศึกษาไอโซไซม์ของ T.vaginalis ในประเทศไทยครั้งนี้ จะเป็นการศึกษาเกี่ยวกับไอโซไซม์ของเอ็นไซม์ กลูโคส ฟอสเฟต ไอโซเมอเรส ใน T.vaginalis ที่ได้จากคนไข้นอกแผนกนรีเวชกรรมของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และศูนย์บริการสาธารณสุขดินแดง กรุงเทพมหานคร เหตุที่เลือกใช้ เอ็นไซม์กลูโคส ฟอสเฟต ไอโซเมอเรส ในการศึกษาครั้งนี้เพราะ เป็นเอ็นไซม์หนึ่งในวิถีไกลโคไลซิส ซึ่งเป็นวิถีที่ให้พลังงานแก่ปาราสิตได้มากที่สุด และเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถีนี้ก็เป็นเอ็นไซม์ที่มีมากที่สุดในจำนวนเอ็นไซม์ที่มีในวิถีต่าง ๆ และจากการได้ทดลองศึกษาเอ็นไซม์ของ T.vaginalis มาก่อนพบว่า กลูโคส ฟอสเฟต ไอโซเมอเรส เป็นเอ็นไซม์ที่มีแบบฟอร์มต่าง ๆ เป็นจำนวนมากและมากกว่าเอ็นไซม์

อื่น ๆ ซึ่งจะทำให้มีความแตกต่างของแบบของไอโซไซม์ได้มาก จะทำให้สามารถแบ่ง T.vaginalis ออกเป็นแบบได้อย่างชัดเจน

เอ็นไซม์ กลูโคส ฟอสเฟต ไอโซเมอเรสนี้ เป็นเอ็นไซม์ตัวที่สองในวิถีไกลโค-ไลซิสสามารถไอโซเมอไรส์ (isomerize) กลูโคส -6- ฟอสเฟตให้เป็นฟรุคโตส -6- ฟอสเฟต

D-glucose -6- phosphate $\rightleftharpoons$ D-fructose -6- phosphate

ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ จะเป็นประโยชน์ในด้านการจำแนกสิ่งมีชีวิต วิวัฒนาการและการศึกษาเกี่ยวกับการทดสอบความไวต่อยา (drug sensitivity) หรือการดื้อยา (drug resistant) และในกรณีที่ metronidazole ซึ่งนิยมใช้ในการรักษาอาจสามารถทำให้เกิดโรคข้างเคียง คือ มะเร็งได้ การนำผลของการศึกษาครั้งนี้ไปศึกษาเกี่ยวกับการทดสอบยา ก็จะมีประโยชน์มากยิ่งขึ้น เช่น อาจจะเป็นส่วนช่วยทำให้เกิดความเข้าใจขึ้นได้ว่า เพราะเหตุใดปาราสิตจึงเกิดการดื้อยาที่ใช้และสเตรนที่ดื้อต่อยานี้แพร่กระจายไปได้อย่างไร