บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กลูโคซีรีโบรซิเดส(*glucocerebrocidase : GBA*) (commard *et al.*, 2000) เป็นยีนมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 1q21 (Winfield *et al.*,1997) ทำหน้าที่ในการควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์กลูโคซีรีโบรซิเดส (glucocerebrocidase enzyme) เอนไซม์ชนิดนี้ทำหน้าที่ในกระบวนการย่อยสลายกลูโคซิลเซราไมด์ (glucosylceramide) ให้มีขนาดโมเลกุลเล็กลง เพื่อเปลี่ยนไปเป็นกลูโคส(glucose)และเซราไมด์ (ceramide) (Grobowski *et al.*,1996) เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานของร่างกาย เมื่อร่างกายไม่สามารถสร้างเอนไซม์กลูโคซีรีโบรซิเดสได้ จึงทำให้เกิดการสะสมของกลูโคซิลเซราไมด์ ตามอวัยวะต่างๆ เช่น ตับ ม้าม ไขกระดูก ทำให้อวัยวะเหล่านี้มีขนาดใหญ่ขึ้นและสูญเสียหน้าที่ เกิดภาวะเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว และเกล็ดเลือดต่ำ รวมทั้งเกิดภาวะกระดูกพรุน (Ponce *et al.*,1997) กลุ่มอาการเหล่านี้เป็นอาการของโรคเก๊าเชอร์ (Gaucher disease) ซึ่งเป็นโรคที่เกิดจากความผิดปกติทางพันธุกรรมชนิดหนึ่ง (Cramer *et al.*, 1998) เนื่องจากโรคชนิดนี้ไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ วิธีที่ช่วยให้คุณภาพชีวิตของผู้ป่วยดีขึ้นก็คือ การให้เอนไซม์ทดแทน (enzyme replacement therapy : ERT) เอนไซม์ที่ใช้ในการรักษาแบบทดแทนนี้มีชื่อว่า กลูโคซีรีโบรซิเดส ในปัจจุบันมีอยู่ 2 ชนิดคือ แอลกลูเซเดส (alglucerase) มีชื่อทางการค้าคือ เซเรเดส (ceredase) ซึ่งสกัดได้จากรก(Brady and Barton, 1994) และ อิมไมกลูเซเรส (imiglucerase) มีชื่อทางการค้าคือ เซเรไซม์ (cerezyme) เป็นเอนไซม์ที่ได้จากเทคนิคดีเอ็นเอรีคอมบิแนนท์โปรตีน โดยใช้เซลล์ไข่ของหนูแฮมสเตอร์(chiness hamster ovary) (Grobowski *et al*, 1995; Henry, 2000; Weinreb, 2002)

ปัจจุบันการให้เอนไซม์ทดแทนได้เข้ามามีบทบาทและความสำคัญในการรักษาโรคทางพันธุกรรมหลายชนิดโดยเฉพาะโรคที่เกี่ยวข้องกับ lysosomal storage disorder ที่มีสาเหตุมาจากภาวะพร่องเอนไซม์(Beutler, 1981) เอนไซม์มีความสำคัญในกระบวนการควบคุมปฏิกิริยาเมตาบอลิสมของร่างกาย ในอดีตการรักษาผู้ป่วยที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ทำได้โดยการให้เอนไซม์ทดแทนที่ได้จากการสกัดจากสิ่งมีชีวิตโดยตรง เช่น รก (placenta) ต่อมาจึงได้มีการพัฒนาระบบในการผลิตเอนไซม์ทดแทนโดยการใช้เทคนิคดีเอ็นเอรีคอมบิแนนท์เทคโนโลยี ซึ่งมีบทบาทในทางการแพทย์เป็นอย่างมากในปัจจุบัน ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมีอื่นๆ โดยเฉพาะสารเคมีที่ถูกพัฒนาเพื่อใช้เป็นยาพบว่าผลิตภัณฑ์รีคอมบิแนนท์โปรตีนใช้ระยะเวลาพัฒนาสั้นกว่าสารเคมี และมีความเป็นพิษที่เกิดจากการใช้ต่ำกว่าสารเคมี เนื่องจากเป็นการผลิตโมเลกุลโปรตีนที่เหมือนกันกับสารที่อยู่ในร่างกายตามธรรมชาติ และผลิตได้ในปริมาณมาก (วัชรี ลิมปนสิทธิกุล,

2541) ตัวอย่างของระบบการผลิตได้แก่ เช่น รีคอมบิแนนท์ฮิวแมนอินซูลิน (recombinant human insulin)(John, 1983) และรีคอมบิแนนท์ ฮิวแมน โกรทฮอร์โมน (recombinant growth hormone) ผลิตภัณฑ์รีคอมบิแนนท์ ที่ใช้อยู่ในปัจจุบันอยู่ในรูปของ รีคอมบิแนนท์โปรตีน (recombinant protein) ที่ผ่านมาระบบการผลิตโปรตีนสำคัญทางการแพทย์อยู่บนพื้นฐานของเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แบคทีเรีย และยีสต์ ซึ่งมักจะพบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อโรคของสิ่งมีชีวิตที่ใช้เป็นระบบ (Larrick and Thomas, 2001; Gomard and Faye, 2004) และผลผลิตที่ได้ไม่มีเสถียรภาพเท่าที่ควร (Campbell *et al*., 2004) อีกทั้งยังมีต้นทุนในการผลิตสูง เนื่องจากผลผลิตที่ได้น้อย เกิดปัญหาในกระบวนการสกัด รวมทั้งยากที่จะผลิตในระบบการผลิตขนาดใหญ่ (Gomard and Faye, 2004) ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์ ที่ได้จากระบบ มีราคาสูงตามไปด้วย (Richter, 1999) ตัวอย่างการรักษาโดยการใช้เอนไซม์ทดแทนในผู้ป่วยโรค Gaucher ในประเทศแคนาดามีค่าใช่จ่ายในการรักษาเฉลี่ยประมาณ 70,000- 500,000 ดอลลาส์สหรัฐต่อคนต่อปี (Clarke *et al*.,2001) ในปัจจุบันจึงเริ่มมีการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมในการถ่ายยีนที่ต้องการเข้าไปในพืชมาช่วย(Gidding, 2000; Daniell, 2004) เนื่องจากพืชสามารถเจริญเติบโตได้ง่าย เพิ่มปริมาณได้อย่างรวดเร็ว สามารถผลิตในระบบขนาดใหญ่ได้ มีต้นทุนในการผลิตต่ำกว่า รวมทั้งให้ผลผลิตโปรตีนในระบบของเซลล์ยูคาริโอตเช่นเดียวกับในสัตว์แต่มีข้อดีกว่าที่ไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อโรคต่างๆ (Crammer *et al*., 1996; Koproski *et al*., 2004)

พืชที่เหมาะสำหรับนำมาใช้เป็นระบบในการผลิตโปรตีน ควรเป็นพืชที่มีอัตราการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว สามารถปลูกและเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ตลอดทั้งปี ดังนั้นตัวอย่างพืชที่นำมาใช้เป็นระบบในการผลิตโปรตีนในช่วงแรกจึงได้แก่ ต้นยาสูบ เนื่องจากมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตเพื่อไปสกัดได้ตลอดเวลา (Slater *et al*., 2004) นอกจากนี้ยังมีผู้รายงานการใช้พืชชนิดอื่น เช่น ถั่วอัลฟาฟ่า โครเลอร์ ผักกาดหอม (Lettuce) ข้าวโพด ถั่วเหลือง มันฝรั่ง แครอท มะเขือเทศ ต่างได้รับการพัฒนาเป็นพืชทางเลือกเช่นกัน(Gomard and Faye, 2004) พืชเหล่านี้ได้รับการศึกษาและพัฒนาในรูปสิทธิบัตรในต่างประเทศแล้ว ทำให้การนำพัฒนาต่อยอดเพื่อให้เกิดเป็นเทคโนโลยีของคนไทยมีข้อจำกัด นอกจากนี้แล้วพืชดังกล่าวยังมีแหล่งกำเนิดในต่างประเทศ การพัฒนาพันธุ์พืชในท้องถิ่นที่เหมาะสมกว่าจึงมีความสำคัญ

กระสัง (*Peperomia pellucida* (L.) *kunth*) เป็นพืชล้มลุกขนาดเล็กมีลำต้นเขียวใส ใบอวบน้ำ สูงประมาณ 20 – 40 เซนติเมตร มีลำต้นตั้งตรง มีใบเดี่ยวเรียงแบบสลับ ใบเดี่ยวรูปหัวใจปลายแหลม ขอบใบเรียบ แผ่นใบด้านบนมีสีเขียว ด้านล่างมีสีเขียวนวล ก้านใบยาว 1-2 เซนติเมตร ช่อดอกยาว 2-4.5 เซนติเมตร ดอกมีขนาดเล็กเป็นช่อออกที่ปลายยอด มีเม็ดสีขียวอ่อน และเมื่อแก่จัดกลายเป็นสีเขียวเข้มเกือบดำ ขยายพันธุ์โดยการปักชำและเพาะเมล็ด กระสังพบได้

ในทุกท้องถิ่นและทุกฤดูกาล โดยเฉพาะบริเวณที่มีความชุ่มชื้นสูงจะสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว วงชีวิตตั้งแต่เมล็ดจนถึงออกดอกและกลายเป็นเมล็ดอีกครั้งใช้เวลาประมาณ 5-8 สัปดาห์ นอกจากนี้ กระสังเป็นพืชสมุนไพรที่ใช้กันมาแต่อดีต โดยใช้กระสังตำเพื่อพอกฝีหรือคั้นเอาน้ำมาทาแผลฝีที่มีหนองเพราะกระสังมีฤทธิ์ต้านการอักเสบและมีฤทธิ์แก้ปวด รวมทั้งมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียด้วย (มูลนิธิสุขภาพไทย, 2549)

แม้ว่ากระสังจะถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มของพืชสมุนไพรก็ตาม แต่โดยทั่วไปแล้วกระสังถูกมองว่าเป็นวัชพืชจึงทำให้มีผู้ศึกษาค้นคว้าน้อยมาก เนื่องจากคุณสมบัติของกระสังที่เลี้ยงง่ายและมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วนี่เอง จึงได้รับความสนใจที่จะพัฒนากระสังซึ่งเป็นพืชท้องถิ่นเพื่อใช้เป็นระบบในการผลิตโปรตีนที่ได้จากแหล่งพันธุกรรม

การนำกระสังมาใช้เป็นพืชตัวอย่างในการศึกษาการถ่ายยีน จำเป็นต้องเข้าใจวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาวะปลอดเชื้อ ศึกษาการชักนำให้เจริญเติบโตเพื่อใช้เป็นระบบสำหรับการถ่ายยีน เข้าใจรูปแบบการคัดเลือกขณะถ่ายยีนด้วย (selectable marker) เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการเชื่อมโยงไปสู่ความเป็นไปได้ในการพัฒนาการผลิตโปรตีนที่ใช้แหล่งพันธุกรรมท้องถิ่น

ดังนั้นวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จึงมุ่งเน้นการศึกษาการแสดงออกของยีนกลูโคซีรีโบรซิเดส เพื่อเป็นโมเดลในการศึกษาการแสดงออกของยีนในกระสัง

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ศึกษาการแสดงออกของยีนกลูโคซีรีโบรสิเดสของคนในกระสัง *Peperomia pellucida* (L.) kunth ที่ได้รับการถ่ายยีน

ขอบเขตของการวิจัย

พัฒนาระบบในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระสังซึ่งประกอบด้วยระบบการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ปลอดเชื้อและศึกษาการชักนำให้เจริญเติบโตเพื่อใช้เป็นระบบในการถ่ายยีน สังเคราะห์ชุดโครงสร้างของยีนกลูโคซีรีโบรซิเดส รวมถึงการถ่ายชุดโครงสร้างของยีนเข้าไปในกระสังและศึกษาการแสดงออกของยีน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนากระสังให้เป็นระบบในการผลิตเอนไซม์กลูโคซีรีโบรซิเดส และผลพลอยได้ในรูปโครงสร้างของชุดยีนและ ระบบการถ่ายยีนที่เหมาะสมกับกระสัง