หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

Opisthorchis viverrini เป็นชื่อของพยาธิใบไม้ตับชนิดหนึ่ง ที่เป็นสาเหตุให้เกิดโรคพยาธิใบไม้ตับ (Opisthorchiasis) ในคน ในประเทศไทย ประชากรส่วนใหญ่ที่มีภูมิลำเนาและอาศัยอยู่ในบริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือนั้น จะเป็นโรคนี้ถึงร้อยละ 35 (กระทรวงสาธารณสุข, 2525) โรคนี้จะค่อย ๆ ทำลายสุขภาพของผู้ป่วยให้เสื่อมโทรมลงไปจนถึงกับเสียชีวิตได้ นอกจากนี้ยังมีผลต่อความสูญเสียทางเศรษฐกิจของประเทศอีกด้วย นับเป็นโรคหนอนพยาธิที่สำคัญชนิดหนึ่งที่เป็นปัญหาทั้งทางการแพทย์ และทางสาธารณสุข ซึ่งเป็นอุปสรรคที่สำคัญอย่างยิ่งในการพัฒนาประเทศในปัจจุบัน

ในประเทศไทยได้เริ่มมีการสำรวจและศึกษาเกี่ยวกับการระบาด ลักษณะอาการของโรคนี้กันอย่างจริงจังตั้งแต่ปี พ.ศ. 2498 และเรื่อยมาจนถึงปัจจุบัน (Sadun, 1955 ; Harinasuta and Vajrasthira, 1957, 1959, 1960 ; Wykoff et al, 1965 ; Viyanant et al, 1983 ; เป็นต้น) กระทรวงสาธารณสุขได้รายงานครั้งล่าสุดว่าในปี 2530 มีประชากรของประเทศไทยเป็นโรคพยาธิใบไม้ตับนี้ถึง 7 ล้านคน ถึงแม้ในขณะนี้จะมียาที่ใช้รักษาโดยการกำจัดพยาธิออกจากร่างกายผู้ป่วยได้อย่างมีประสิทธิภาพแล้ว (Vivathanasesth et al, 1982) ก็ยังไม่สามารถควบคุมหรือกำจัดโรคนี้ให้หมดสิ้นไปได้ ทั้งนี้เนื่องจากประชากรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีอุปนิสัยที่ชอบบริโภคอาหารที่ประกอบขึ้นอย่างสุก ๆ ดิบ ๆ โดยเฉพาะก้อยปลา (เป็นอาหารที่ทำจากปลาดิบ) ตลอดจนขาดความรู้ในเรื่องการถ่ายอุจจาระให้ถูกสุขลักษณะ ทำให้มีการแพร่กระจายของไข่พยาธิไปตามแหล่งน้ำ เข้าสู่สัตว์ที่เป็นโฮสต์ตัวกลางซึ่งได้แก่ หอยและปลาน้ำจืดบางชนิด ซึ่งยังมีอยู่เป็นจำนวนมากในภูมิภาคดังกล่าว อีกทั้งผู้ป่วยในระยะแรก ๆ จะไม่มีอาการปรากฏให้เห็นเด่นชัด ดังนั้นผู้ป่วยเหล่านี้เองจะทำหน้าที่เป็นผู้ถ่ายทอดเชื้อ (carrier) อยู่ตลอดเวลา ผู้ป่วยจะทราบว่าเป็นโรคนี้ก็ต่อเมื่อมีพยาธิเข้าไปอาศัยอยู่ที่บริเวณตับเป็นจำนวนมาก และจะมีอาการท้องอืด อาหารไม่ย่อย เจ็บบริเวณตับ ตับโต มีอาการดีซ่านเกิดขึ้น (Harinasuta and Vajrasthira, 1960 ; Harinasuta, 1969)

ด้วยเหตุที่เป็นปรสิตสำคัญที่ทำให้เกิดโรคพยาธิใบไม้ตับในประเทศไทย จึงมีผู้สนใจศึกษาเกี่ยวกับพยาธิใบไม้ตับ O. viverrini ในด้านต่าง ๆ เช่น ลักษณะทางชีววิทยาตลอดจนวงจรชีวิต การติดเชื้อและการระบาดของพยาธิในประชากร ตลอดจนการทำให้เกิดโรค ลักษณะอาการของโรค อัตราการติดเชื้อพยาธิ ความชุกชุมของพยาธิในบริเวณที่มีการระบาด ตลอดจนระบาดวิทยาของโรค (วันชัย ผาติหัตถการ และคณะ, 2526 ; Viyanant et al, 1983) ระบบภูมิคุ้มกันอันเกิดจากการกระตุ้นของพยาธินี้ในสัตว์ทดลอง (Jenechaiwat et al, 1980 ; Sirisingh et al, 1982, 1983) ตลอดจนศึกษาหาวิธีตรวจวินิจฉัยโรคนี้ให้ได้ดียิ่งขึ้น โดยการตรวจหาปริมาณสารประกอบบางชนิดในซีรั่ม และน้ำดีของผู้ป่วย เปรียบเทียบกับค่าที่หาได้คนปกติ (Migsena et al, 1983) เป็นต้น ในด้านการศึกษาทางด้านอนุกรมวิธาน เพื่อตรวจสอบชนิดของพยาธินี้ กระทำโดยการศึกษาลักษณะต่าง ๆ ภายนอกของพยาธิที่เก็บตัวอย่างมาจากการผ่าศพของผู้ป่วยที่เสียชีวิตด้วยโรคนี้ โดยเปรียบเทียบตามที่ได้มีผู้ศึกษาและบันทึกไว้ก่อนโดย Poirier (1886) นอกจากนั้นยังมีการศึกษารูปแบบของเฟลมเซลล์ (flame cell) ในตัวอ่อนระยะเซอคาเรีย (cercaria) (Wykoff et al, 1965) และระยะเมตาเซอคาเรีย (metacercaria) (Vajrasthira et al, 1961) ซึ่งช่วยในการตรวจสอบ ชนิดของพยาธิชนิดนี้ได้ดียิ่งขึ้น ยังไม่มีการศึกษาให้ละเอียดลงไปในระดับโมเลกุลเพื่อนำมาจำแนกพยาธิชนิดนี้ออกเป็นชนิดย่อย ดังมีผู้นิยมศึกษาในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ

การศึกษาในระดับโมเลกุลในทางอนุกรมวิธานที่นิยมศึกษากันมากวิธีหนึ่งก็คือ การศึกษาเอนไซม์อีเล็คโตรฟอรีซีส ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถแสดงความคล้ายคลึงหรือความแตกต่างทางด้านพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตได้ดี (Reeves and Bischoff, 1968) เพราะเอนไซม์หรือสารประกอบโปรตีนในสิ่งมีชีวิต จะถูกสร้างและควบคุมโดยหน่วยย่อยทางพันธุกรรมคือ ยีน สิ่งมีชีวิตแต่ละสายพันธุ์ที่มีต้นกำเนิดร่วมกันทางพันธุกรรมจะมีเอนไซม์หรือสารประกอบโปรตีนที่คงที่ไม่เปลี่ยนแปลง เมื่อเอนไซม์และยีนมีความสัมพันธ์กันโดยตรง ดังนั้นความแตกต่างหรือคล้ายคลึงกันของรูปแบบของเอนไซม์ที่ได้จากการศึกษาโดยวิธีอีเล็คโตรฟอรีซีส จึงเชื่อมโยงไปถึงความแตกต่างหรือความคล้ายคลึงกันของยีนด้วย เพราะถ้ายีนเปลี่ยนแปลงไป หรือสิ่งมีชีวิตแต่ละตัวมียีนที่ให้เอนไซม์ชนิดเดียวกันผิดไปแม้เพียงเล็กน้อย เอนไซม์ที่ปรากฏออกมาก็จะต่างกันไปด้วย ดังนั้นการศึกษาถึงความแตกต่างหรือคล้ายคลึงกันของเอนไซม์ จึงเป็นตัวบ่งชี้ถึงความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตในระดับสเตรน (strain) หรือไทพ์ (type) ได้เป็นอย่างดี

อีเล็คโตรฟอรีซีส คือการแยกและวิเคราะห์สารที่มีประจุไฟฟ้าด้วยสนามไฟฟ้า โดยอาศัยหลักการที่โมเลกุลของสารใดที่มีรูปร่าง ขนาด และประจุไฟฟ้าสุทธิไม่เท่ากัน จะเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าได้ไม่เท่ากัน สารใดที่มีขนาดโมเลกุลเท่ากัน แต่มีประจุไฟฟ้าสุทธิไม่เท่ากัน สารที่มีประจุไฟฟ้าสุทธิมากกว่าจะเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าได้เร็วกว่าสารที่มีประจุไฟฟ้าสุทธิน้อยกว่า และในทางกลับกันถ้าสารใดมีประจุไฟฟ้าสุทธิเท่ากันแต่มีขนาดหรือรูปร่างโมเลกุลไม่เท่ากัน ก็จะเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าต่างกัน สารที่มีขนาดเล็กกว่าหรือมีรูปร่างกลม หรือผิวเรียบก็จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าสารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่หรือมีรูปร่างไม่ได้ส่วน การเคลื่อนที่ของสารที่มีประจุไฟฟ้าสุทธิจะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วไฟฟ้าที่ตรงข้ามกับประจุสุทธิที่มีอยู่บนสารนั้น ถ้าโมเลกุลของสารที่มีประจุสุทธิเป็นบวก จะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วไฟฟ้าขั้วลบ และโมเลกุลของสารที่มีประจุสิทธิเป็นลบก็จะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วไฟฟ้าขั้วบวก ส่วนสารที่มีประจุไฟฟ้าสุทธิเป็นศูนย์ในตัวกลางนั้น ๆ จะไม่มีการเคลื่อนที่ เทคนิคในการทำอีเล็คโตรฟอรีซีสมีหลายแบบแล้วแต่ความสะดวกหรือเหมาะสมต่อการทดลอง เช่น สตาร์ช เจล อีเล็คโตรฟอรีซีส (Starch gel electrophoresis) โพลิอะคริลาไมด์ อีเล็คโตรฟอรีซีส (Polyacrylamide electrophoresis) เซลลูโลสอะซีเตท อีเล็คโตรฟอรีซีส (Cellulose acetate electrophoresis) เป็นต้น แต่ละวิธีล้วนอาศัยหลักการเดียวกันดังได้กล่าวแล้ว

เอนไซม์ทุกตัวมีประจุไฟฟ้า เนื่องจากเอนไซม์เป็นสารประกอบโปรตีนชนิดหนึ่ง ซึ่งโมเลกุลประกอบด้วยกรดอะมิโนหลายตัวมาเรียงต่อกัน กรดอะมิโนจะมีทั้งหมู่คาร์บอกซิลและหมู่อะมิโน เอนไซม์หรือโปรตีนจะมีประจุลบเมื่อมีหมู่คาร์บอกซิลอิสระมากกว่าหมู่อะมิโน และมีประจุบวกเมื่อมีหมู่อะมิโนอิสระมากกว่าหมู่คาร์บอกซิล และถ้ามีหมู่อะมิโนอิสระเท่ากับหมู่คาร์บอกซิลอิสระ โมเลกุลนั้นก็จะมีประจุสุทธิเป็นศูนย์ โปรตีนหรือเอนไซม์ในอีเล็กโตรฟอรีซีสจะมีประจุสุทธิเป็นบวกหรือลบ ขึ้นอยู่กับความเป็นกรดด่างของบัฟเฟอร์ในระบบนั้น ๆ ที่จุดไอโซอีเล็คตริกของเอนไซม์ ถ้าเพิ่มค่าความเป็นกรดด่างให้มากขึ้น หมู่อะมิโนจะถูกทำให้เป็นกลางลงเรื่อย ๆ โดยด่างที่มีอยู่ในบัฟเฟอร์นั้น ดังนั้นเอนไซม์จะมีประจุสุทธิเป็นลบของหมู่คาร์บอกซิล ในทางตรงข้ามถ้าลดค่าความเป็นกรดด่างลง หมู่คาร์บอกซิลจะถูกทำให้เป็นกลางขึ้นเรื่อยโดยกรดที่มีอยู่ในบัฟเฟอร์นั้น ในที่สุดประจุของเอนไซม์จะเป็นบวกของหมู่อะมิโนดังสมการ

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

เอนไซม์บางตัวประกอบด้วยหน่วยย่อยซึ่งทำให้เอนไซม์ตัวนั้นมีโครงสร้างมากกว่าหนึ่งชนิด โดยที่แต่ละชนิดมีคุณสมบัติทางกายภาพแตกต่างกัน แต่สามารถเร่งปฏิกิริยาที่มีสับสเตรท (substrate) เดียวกันได้ Market และ Moller (1959) เรียกแบบฟอร์มของเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติเช่นนี้ว่า "ไอโซไซม์" หรือ "ไอโซเอนไซม์" ความแตกต่างทางกายภาพและโครงสร้างของเอนไซม์เหล่านี้จะเป็นตัวทำให้เกิดประจุไฟฟ้าสุทธิในโมเลกุลของเอนไซม์ไม่เท่ากันแม้จะอยู่ในสารละลายที่มีความเป็นกรดด่างเดียวกัน หรือในระบบบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน ซึ่งจะถูกแยกออกจากกันโดยวิธีอีเล็คโตรฟอรีซีส

จากหลักการและความสำคัญของการศึกษาเอนไซม์อีเล็คโตรฟอรีซีสที่ได้กล่าวนี้ จึงใคร่ที่จะศึกษาถึงความแตกต่างในระดับโมเลกุลของพยาธิใบไม้ตับ O.viverrini ด้วยวิธีการนี้บ้าง เนื่องจากการศึกษาเอนไซม์อีเล็คโตรฟอรีซีสนี้ เป็นวิธีที่มีผู้นิยมใช้ศึกษาถึงความแตกต่างหรือศึกษาคุณลักษณะ ของสายพันธุ์ที่ใกล้ชิดกันของสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ โดยเฉพาะในพยาธิ เช่น เสาวนิต ชาญเชี่ยว (2524) ศึกษาในโปรโตซัว Trichomonas vaginalis, Flockhart และคณะ (1982) ศึกษาในพยาธิ Trichinella spp., Oothuman และคณะ (1983) ได้ศึกษาความแตกต่างระหว่าง Brugai malayi และ B.pahangi, Agatsuma (1980) ศึกษารูปแบบของเอนไซม์ในพยาธิใบไม้ตับ Fasciola sp. ที่พบในประเทศญี่ปุ่น เป็นต้น ซึ่งผลจากการที่ได้ศึกษาความแตกต่างรูปแบบเอนไซม์ในพยาธิใบไม้ตับ O.viverrini นี้ นอกจากจะสามารถแบ่งพยาธิออกเป็นชนิดย่อยเพื่อประกอบการศึกษาทางอนุกรมวิธานของพยาธิชนิดนี้ได้สมบูรณ์ขึ้นมาแล้ว อาจจะเป็นประโยชน์สำหรับการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการป้องกันและรักษาโรคพยาธิใบไม้ตับ ทั้งยังอาจจะเป็นข้อมูลที่เกี่ยวข้องในการวินิจฉัยและรักษาโรคอื่น ๆ ที่เกี่ยวเนื่องมาจากพยาธิใบไม้ตับนี้ เช่น โรคมะเร็งที่บริเวณตับ ได้ประสบผลสำเร็จดียิ่งขึ้นในอนาคต

ในการศึกษาครั้งนี้ ได้เก็บตัวอย่างพยาธิใบไม้ตับ O.viverrini จากโรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น เนื่องจากที่โรงพยาบาลนี้มีประชาชนนิยมมารับการรักษามาก ทั้งผู้ที่อาศัยอยู่ในจังหวัดขอนแก่น และจากจังหวัดใกล้เคียง เช่น กาฬสินธุ์ ร้อยเอ็ด มหาสารคาม เป็นต้น ซึ่งเป็นจังหวัดที่ประชาชนมีอัตราการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับค่อนข้างสูง (Harinasuta, 1969) นำพยาธิที่ยังมีชีวิตกลับมาที่กรุงเทพ ฯ เพื่อศึกษารูปแบบเอนไซม์ กลูโคสฟอสเฟต ไอโซเมอเรส (GPI) ฟอสโฟกลูโคมิวเตส (PGM) และกลูโคส-6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจิเนส (G-6PD) ด้วยวิธีเซลลูโลส อะซีเตท อีเล็คโตรฟอรีซีส รวมทั้งศึกษา

ในลักษณะเดียวกันนี้ในพยาธิใบไม้ตับ O.viverrini ที่ได้จากตับของสัตว์ทดลอง โกลเดน แฮมสเตอร์ (Golden hamster; Mesocricetus auratus) เพื่อเปรียบเทียบด้วย เพราะสามารถที่จะนำพยาธิระยะโตเต็มวัยมาศึกษาได้ง่ายกว่าการรอเอาพยาธิที่ยังมีชีวิตจากคน เนื่องจากสามารถทำให้ติดเชื้อพยาธิชนิดนี้ในแฮมสเตอร์ได้ง่ายกว่าสัตว์ทดลองชนิดอื่น นอกจากนี้พยาธิสภาพของตับแฮมสเตอร์เนื่องจากการติดเชื้อ พยาธิชนิดนี้ ก็คล้ายคลึงกับในคน (Harinasuta, 1969)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย