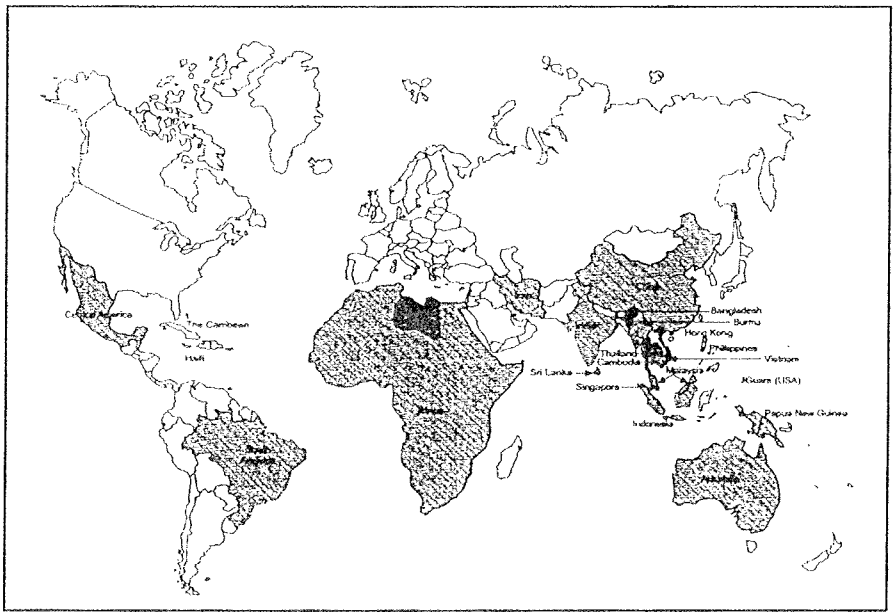
บทที่ 1
บทนำ

1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

เชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia pseudomallei* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อร้ายแรงคือ Melioidosis เชื้อนี้เป็นแบคทีเรียแกรมลบ สัณฐานของโคโลนีมีลักษณะหยัก มีสีครีมหรือสีแทน สามารถเคลื่อนไหวโดยใช้ส่วนที่เรียกว่าแฟลกเจลลา (flagella) และสามารถย่อยสลายน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส มอลโตส แลคโตส แมนนิทอล และน้ำตาลโมเลกุลคู่ เซลโลไบโอส เพื่อนำไปใช้เป็นสารอาหารภายในเซลล์ได้ (Delost, 1997) ได้มีรายงานเกี่ยวกับการระบาดของโรคติดเชื้อ Melioidosis ทั้งในคนและสัตว์ทั่วโลกโดยเฉพาะในภูมิภาคโซนร้อนครอบคลุมประเทศในแถบอาฟริกา เอเชียตะวันออกเฉียงใต้และทางตอนเหนือของประเทศออสเตรเลีย (Woods et al., 1999) (รูปที่ 1.1) การศึกษาครั้งแรกพบว่าเชื้อนี้ปนเปื้อนอยู่ในดินโคลนและแหล่งน้ำนิ่ง แต่สามารถแพร่กระจายอย่างรวดเร็วไปในอากาศในสภาพร้อนชื้นและในช่วยหน้าฝน

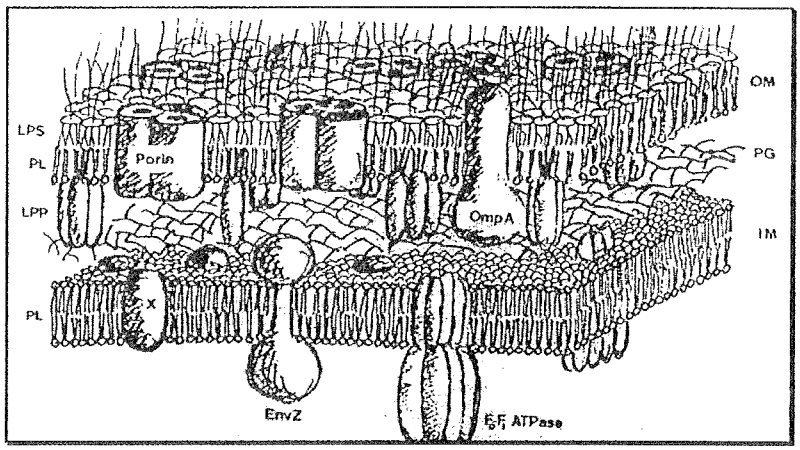


รูปที่ 1.1 แสดงพื้นที่บนแผนที่โลกที่มีการระบาดของโรค Melioidosis
พื้นที่สีเทาแสดงการพบเชื้อปนเปื้อนอยู่ตามแหล่งดินและน้ำ ส่วนพื้นที่สีดำแสดงการระบาดรุนแรง (Ellis and Titball, 1999)

อาการเจ็บป่วยอันเป็นสาเหตุมาจากการติดเชื้อ *B. pseudomallei* สามารถเกิดขึ้นได้ในหลายลักษณะทั้งแบบเฉียบพลัน กึ่งเฉียบพลัน และแบบเรื้อรัง ลักษณะอาการของโรคแบบเฉียบพลันโดยทั่วไปคือ ปอดบวม เป็นไข้ และเกิดสภาวะ leukocytosis ภายใน 2 ถึง 3 วัน หลังจากการติดเชื้อ ในกรณีผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงจะเกิดอาการระบบหายใจล้มเหลว เกิดฝีหนองบริเวณผิวหนังและอวัยวะภายในต่าง ๆ เช่น สมอง เยื่อหุ้มหัวใจ ตับ และกระดูก เป็นต้น

ส่วนผู้ที่มีการติดเชื้อแบบเรื้อรังอาจมีพัฒนาการไปสู่โรควัณโรคหรือโรคมะเร็งปอดได้ การติดเชื้อเกิดจากการหายใจเอาเชื้อที่ปะปนมากับฝุ่นละอองที่กระจายอยู่ในอากาศหรือสัมผัสกับสิ่งของที่มีเชื้อโรคปนเปื้อนอยู่ แต่การติดต่อสัมผัสโดยตรงระหว่างผู้ป่วยพบว่ามีโอกาสเกิดขึ้นได้น้อย ผู้ป่วยด้วยโรคนี้มีอัตราการเสี่ยงต่อการเสียชีวิตสูงถ้าไม่ได้เข้ารับการรักษาอย่างทันท่วงที โดยหนึ่งในสามของผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะมีรายงานว่าเสียชีวิต

สำหรับกลไกการเกิดโรคนั้นมีการศึกษาพบว่าเชื้อ *B. pseudomallei* ผลิตทอกซินบางชนิดซึ่งมีผลยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอและโปรตีนของ macrophage การที่เชื้อแบคทีเรียสามารถเพิ่มจำนวนได้ใน macrophage เช่นเดียวกับ polynuclear phagocyte อาจเกี่ยวข้องกับการฟักตัวของเชื้อในผู้ป่วยเป็นเวลานาน ๆ ก่อนแสดงอาการ ได้มีรายงานว่าลักษณะโครงสร้างภายในเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียมีบทบาทต่อการทำงานเบื้องต้นของแบคทีเรีย (Gotoh et al., 1994) โดยภายในโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียแกรมลบจะมีโปรตีนชนิดหนึ่งเรียกว่า พอริน (porin) โปรตีนนี้ทำหน้าที่นำสารต่าง ๆ เข้าหรือออกจากเซลล์เนื่องจากโปรตีนนี้มีโครงสร้างพิเศษคือทำหน้าที่เป็น ช่อง (channel) (Nakae, 1976) ดังแสดงในรูปที่ 1.2

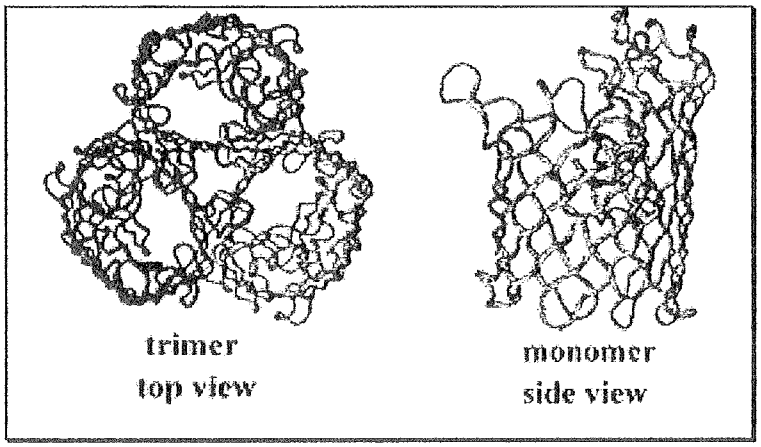


รูปที่ 1.2 โครงสร้างของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบที่มีพอรินเป็นองค์ประกอบ

พอรินจะฝังตัวอยู่ในส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) และมีคุณสมบัติให้โมเลกุลที่มีขั้วที่มีขนาดเล็กกว่า 600 ดาลตัน เช่น น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว น้ำตาลโมเลกุลคู่ รวมทั้งยาปฏิชีวนะหลาย ๆ กลุ่ม ผ่านอาจจะโดยขบวนการแพร่ (non-specific diffusion) หรือแบบเลือกผ่าน (selective diffusion) ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของช่องพอริน นอกจากนี้ส่วนของโปรตีนที่อยู่ในชั้นเพปทิโดไกลแคน ยังมีส่วนร่วมในการรักษารูปร่างของเซลล์และทำหน้าที่เป็นตัวรับ (receptor) ที่จำเพาะของ bacteriophage และ bacteriolycin อีกด้วย (Albert I' et al., 1995)

โปรตีนพอรินที่ได้รับการศึกษามากทั้งทางด้านโครงสร้าง หน้าที่ และยีนที่แสดงออก มีสามชนิดคือ OmpF OmpC และ PhoE ซึ่งเป็นโปรตีนจากเชื้อ *E. coli* (Rocque and McGroarty, 1989; Cowan et al., 1992; Cowant et al., 1995; Nikaido, 1994) จากการศึกษาโครงสร้างสามมิติของโปรตีน OmpF และ PhoE พบว่าประกอบด้วยหน่วยย่อย ๆ สามหน่วยที่เหมือนกัน โดยแต่ละหน่วยจะประกอบด้วยสายบีต้า จำนวน 16 สายมาจัดเรียงตัวในทิศตรงข้าม

กัน โดยส่วนที่เป็น loop จะทำหน้าที่เชื่อมสายบีต้า ทำให้เกิดโครงสร้าง barrel ที่มีลักษณะเป็นช่องขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 1.3



รูปที่ 1.3 โครงสร้างสามมิติทั่วไปของพอรินจาก *E. coli*

การศึกษาการทำงานของพอริน OmpC และ PhoE โดยเทคนิค site-directed mutagenesis ช่วยอธิบายกลไกการนำสารผ่านเข้า-ออกของสารของแบคทีเรีย *E. coli* โดยพบว่าส่วนของ restriction loop ที่ยื่นเข้าไปในช่องของพอริน มีความสำคัญในการกำหนดขนาดของโมเลกุลที่จะผ่านเข้า-ออกจาก pore (Cowan et al., 1992) พอรินอีกชนิดหนึ่งคือ OmpG จากเชื้อ *E. coli* เช่น สามารถสร้างช่องจากหน่วยย่อยเดียว โดยทำหน้าที่ในการผ่านของน้ำตาลโมโน- ได- และ ไตรแซคคาไรด์ (Behlau et al., 2001) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาโปรตีนพอรินในแบคทีเรียแกรมลบอื่น ๆ เช่น จากเชื้อ *Serratia marcescens*, *Proteus vulgaris*, *Burkholderia* (formerly *Pseudomonas*) *aeruginosa*, *Aeromonas salmonicida*, *Chlamydia trachomatis*, *Rhodopseudomonas capsulate*, *R. spaeroides*, *Paracoccus dentrificans*, *Neisseria gonorrhoeae* และเชื้อ *Brucella* หลาย ๆ ชนิด (Hancock et al., 1979; Douglas et al., 1981; Darveau et al., 1983; Bavoil et al., 1984; Douglas et al., 1984; Flammann and Weckesser, 1984; and Gotoh et al., 1989) จากการศึกษาโครงสร้างของพอรินจากแบคทีเรียหลายชนิดพบว่าพอรินมีโครงสร้างร่วมกันคือมีสัดส่วนของสายบีต้าชีท เป็นองค์ ประกอบหลัก (Nikaido and Baara, 1985)

ผลงานวิจัยหลายชิ้นให้ข้อสรุปว่าพอรินมีบทบาทสำคัญในการกำหนดพยาธิสภาพของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคหลายชนิด โดยมีส่วนเกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรีย ทำให้การรักษาโรคติดเชื้อโดยแบคทีเรียหลายโรคไม่ประสบความสำเร็จ ตัวอย่างการศึกษาได้แก่

1. พอริน MOMP จากเชื้อ Chlamydia เป็นโปรตีนขนาด 40 kDa มีส่วนเกี่ยวข้องกับพยาธิสภาพของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ ได้แก่ ทำให้เป็นหมัน การแท้งบุตร ตาบอด โรคปอดบวม หลอดลมอักเสบ โรคภูมิแพ้ โรคหลอดเลือดอุดตัน และ Alzheimer's จากการเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนระหว่างพอริน MOMP ของแบคทีเรียหลายชนิด ประกอบกับการทดลองทำ Epitope Mapping Studies พบว่า โปรตีนนี้มี immunogenic epitopes ในส่วนของ variable segments ที่เหนี่ยวนำการสร้าง neutralizing antibodies ที่สามารถช่วย

ป้องกันการติดเชื้อ Chlamydia ในแกะ ทำให้โมเลกุล MOMP เป็นเป้าหมายสำคัญในการพัฒนา และวัคซีนป้องกันโรค (Wyllie et al., 1999)

2. พอริน OpcPO ที่แยกจากเชื้อ *B. cepacia* พบว่ามีบทบาทสำคัญต่อการก่อโรค cystic fibrosis เนื่องจากโปรตีนนี้มี low susceptibility ต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่ม β-lactam ทำให้เชื้อดื้อต่อยาในกลุ่มนี้ (Tsujimoto et al., 1997)
3. พอริน OMF และ OMP จากการศึกษาในเชื้อแบคทีเรียสามชนิดคือ เชื้อ *B. aeruginosa* เชื้อ *Stenotrophomonas maltophilia* และเชื้อ *B. cepacia* โดยวิธี Tripatite Efflux Systems พบว่าโปรตีนมีส่วนเกี่ยวข้องต่อการดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายกลุ่มโดยกลไกที่เรียกว่า Multi-resistance Mechanism
4. พอริน OM-1 และ OM-2 จากเชื้อ *B. pseudomallei* จากการการผ่านเข้าออกของสารผ่านช่องพอรินทั้งสองโดยวิธี liposome swelling assay และ antimicrobial agent susceptibility test พบว่าโปรตีน OM-1 ทำหน้าที่เป็นช่องผ่านของโมเลกุลมีขั้วขนาดเล็ก ๆ เช่น น้ำตาลโมโนแซคคาไรด์ และอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาในกลุ่ม β-lactam aminoglycosides macrolides และ polymyxins ของเชื้อ *B. pseudomallei* (Gotoh et al., 1994)

เนื่องจากพอรินทำหน้าที่เป็นโปรตีนหน้าด่านในการเลือกผ่านสารอาหาร โปรตีนนี้จึงมีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของแบคทีเรีย และความเกี่ยวข้องกับการดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย ทำให้การศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของพอรินมีความสำคัญอย่างมากต่อการเข้าใจกลไกการทำงานของโปรตีน ซึ่งจะมีความสำคัญต่อการออกแบบโครงสร้างยาปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพต่อไป นอกจากนี้โมเลกุลของพอรินยังมีส่วนที่มีความเป็น immunogenic สูง ดังนั้นจึงมีประโยชน์ต่อการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อหลายชนิด รวมทั้ง melioidosis

1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ประเมินผลความสามารถของโปรตีนที่สกัดจากเยื่อเซลล์ด้านนอก (outer membrane proteins) ของเชื้อ *B. pseudomallei* ในการสร้างช่องพอริน
2. การแยกยีนพอรินจากเชื้อ *B. pseudomallei* และศึกษาความสามารถในการแสดงออกของโปรตีนพอรินในแบคทีเรีย *E. coli*
3. ศึกษาหน้าที่ในการนำสารต่าง ๆ เช่น น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และยาปฏิชีวนะผ่านช่องพอรินที่ผลิตจาก *E. coli*
4. การศึกษาโครงสร้างของโปรตีนพอรินเพื่อนำไปสู่การอธิบายกลไกการแพร่ของสารผ่านช่องพอริน

1.3. ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้ต้องการสกัดโปรตีนที่อยู่ที่เยื่อเซลล์ด้านนอกของเชื้อ *B. pseudomallei* แล้วนำโปรตีนที่สกัดได้มาทดสอบคุณสมบัติการเป็นช่องพอรินโดยศึกษาอัตราการนำโมเลกุลที่มีขั้วขนาดเล็ก เช่น น้ำตาลแซคคาไรด์ขนาดต่าง ๆ ผ่านเข้าช่องพอริน หลังจากนั้นจะทำการสกัดและโคลนยีนและศึกษาการแสดงออกของยีนพอรินใน *E. coli* แล้วจะทำการทดสอบการความสามารถในการสร้างช่องของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่สกัดได้ โดยใช้เทคนิค liposome swelling assay โดยจะทดสอบกับน้ำตาลโมเลกุลต่าง ๆ รวมทั้งยาปฏิชีวนะด้วย หลังจากนั้นจะ

ทำการศึกษาเปรียบเทียบโครงสร้างของพอรินที่สร้างจากเชื้อ *E. coli* กับพอรินที่สร้างจากเชื้อ *B. pseudomallei* โดยมีเป้าหมายที่จะเข้าใจกลไกการต้านยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียนี้

1.4. ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัยนี้มี 3 ประการหลักคือ

1. เป็นองค์ความรู้ในการวิจัย เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยที่ยังไม่มีผู้ใดดำเนินงานมาก่อน จึงคาดว่าผลสัมฤทธิ์จากการวิจัยจะสามารถตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารนานาชาติที่มี impact factor มากกว่า 1.5 ได้อย่างน้อย 2 เรื่อง และการเผยแพร่ในรูปโปสเตอร์หรือการบรรยายอีก 1-2 ในที่ประชุมระดับนานาชาติอย่างน้อย 1 ครั้ง
2. เป็นการสร้างนักวิจัยรุ่นเยาว์ผ่านหลักสูตรบัณฑิตศึกษาของสาขาวิชาชีวเคมีและสาขาวิชาเคมี ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยเทคโนโลยีที่จะนำมาใช้ในงานวิจัยจัดเป็นความเชี่ยวชาญเฉพาะทางระดับสูงที่มีการถ่ายทอดน้อยมากในสถาบันการศึกษาอื่น ๆ ในประเทศไทย
3. องค์ความรู้ที่ได้เป็นการค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับแนวทางป้องกันโรคติดเชื้อร้ายแรง melioidosis ซึ่งผลงานวิจัยจะเป็นการบริการข้อมูลที่สำคัญต่อหน่วยงานแพทย์ของรัฐและเอกชน และสถาบันวิจัยทางการแพทย์ระดับนานาชาติที่จะคิดค้นคว้าหาทางป้องกันโรคติดเชื้อดังกล่าว

หน่วยงานที่จะนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
2. สถาบันวิจัยทางการแพทย์ เช่น คณะแพทยศาสตร์ คณะเวชศาสตร์เขตร้อน ของมหาวิทยาลัยทั่วประเทศ
3. หน่วยงานระดับนานาชาติ เช่น สถาบันวิจัยทางการแพทย์ระดับนานาชาติ และองค์การอนามัยโลก
4. หน่วยงาน R & D ของหน่วยงานเอกชนที่มีเป้าหมายในการผลิตยาปฏิชีวนะหรือผลิตวัคซีนป้องกันโรค melioidosis