

บทที่ 2

บททวนวรรณกรรม

2.1 คุณสมบัติของเชื้อ *Vibrio cholerae* และการก่อโรค

เชื้อ *V. cholerae* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่เป็นสาเหตุสำคัญของอหิวาตกโรค เชื้อดังกล่าวจัดอยู่ใน family Vibrionaceae รูปร่าง curve rods สามารถเจริญได้ในที่ไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) (57) เมื่อมีการแบ่งกลุ่มของเชื้อตามลักษณะโครงสร้างของ O-antigen พบว่า สามารถแบ่งได้มากกว่า 200 serogroups (15, 16) ถึงแม้กลุ่มเชื้อที่พบมากที่สุดในการก่อให้เกิดการระบาดของอหิวาตกโรคเป็นกลุ่มเชื้อ O1 และ O139 แต่ขณะเดียวกันกลุ่มเชื้อ non-O1/non-O139 ก็มีความเกี่ยวข้องกับการระบาดของอหิวาตกโรคเช่นกัน (36) โดยกลุ่มเชื้อดังกล่าวสามารถแยกได้จากผู้ป่วย acute secretory diarrhea ทั่วโลก (56) ก่อให้เกิดการระบาดของอหิวาตกโรคเฉพาะถิ่นในหลายประเทศ ได้แก่ การระบาดของ *V. cholera* O10 และ O12 ที่ประเทศเปรู ในเดือนกุมภาพันธ์ 1994 (11) การระบาดของ *V. cholera* O10 ในประเทศอินเดีย (47) รวมทั้งการระบาดของเชื้อกลุ่ม non-O1 ในค่ายอพยพชาวกัมพูชาในประเทศไทย (2) อีกทั้งยังมีความเกี่ยวข้องกับโรคอื่นๆ เช่น septicemia (1) หรือเป็นสาเหตุทำให้เซลล์ luminal epithelium ใน colon เกิด necrosis (48) สำหรับ virulence gene ของเชื้อพบว่าต่างกับกลุ่ม O1 โดยกลุ่ม non-O1 มักตรวจไม่พบยีน *ctxA*, *tcpA* แต่โดยทั่วไปจะมีท็อกซินอื่นที่พบว่ามีเกี่ยวข้องในการก่อโรค ได้แก่ El Tor hemolysin (28, 29, 62), RTX หรือ Repeat in toxin รวมถึง exocellular enzymes เช่น hemagglutinin/protease (29)

2.2 El Tor hemolysin หรือ *Vibrio cholerae* cytotoxin (VCC)

สำหรับ El Tor Haemolysin หรือ *Vibrio cholerae* cytotoxin (VCC) เป็น exotoxin ที่สร้างมาจากยีน *hlyA* โดยขั้นตอนการสร้างที่ท็อกซินเริ่มจากการสังเคราะห์ pro-toxin monomer ที่มี signal peptide ความยาว 25 amino acid บริเวณ n-terminal ซึ่งตำแหน่งนี้เป็นตำแหน่งที่จะถูกตัดในระหว่างการขนส่งโปรตีนจาก cytosol ไปสู่ periplasmic space ทำให้ pro-toxin monomer เปลี่ยนเป็น mature toxin (38, 39, 61) หลังจากนั้น mature toxin จะสามารถสร้าง heptameric oligomers ในบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ที่มี cholesterol โดยการแทรกโครงสร้างเข้าไปใน lipid bilayers เพื่อสร้าง anion-selective pores ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 nm. (65, 66) ทำให้เกิดเป็น pore-forming toxin (34, 63, 64) ซึ่งมีผลเป็นพิษต่อเซลล์ได้แก่ การทำให้เซลล์หลายชนิด เช่น Vero cells, HeLa cells เกิดการบาดเจ็บ เซลล์แตก (lysis) หรือทำให้เกิด vacuole ภายในเซลล์ซึ่งจะไปทำลายโครงสร้าง intracellular membrane หรือรบกวนการแลกเปลี่ยนไอออนระหว่างเซลล์ และมีผลทำให้เกิด local intestinal inflammatory (8, 17, 35, 37) นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่ม vascular permeability ของผิวหนังกระด้างและทำให้หนูตาย (60) รวมถึงมีการศึกษาพบว่า purified protein ของที่

ออกซินส่งผลให้เกิด fluid accumulation ใน rabbit ileal loops (66) หรือทำให้เกิดการตายอย่างรวดเร็วในหนู (27, 41) ท็อกซินดังกล่าวยังสามารถกระตุ้นเอนไซม์ caspase-3 ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในกระบวนการ apoptosis เหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ในลำไส้เล็กด้วยเมื่อทำการทดสอบใน cell line ชนิดต่าง ๆ เช่น Caco-2 cells, CHO cells, C2BBel cells หรือทำให้เซลล์ลำไส้เล็กถูกทำลายโดยทำให้ villi สั้นลง หลอดน้ำเหลืองพองโต (50) อีกทั้งยังมีการศึกษาพบว่า ท็อกซินนี้สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการหลั่งของ chloride ใน mucosa ของลำไส้เล็กในมนุษย์ ทำให้ Na^+ และน้ำเกิดการเคลื่อนที่ออกจากลำไส้มากขึ้น ส่งผลให้เพิ่มอัตราการเกิด fluid accumulation (13) ดังนั้น VCC จึงถือเป็นเป็นปัจจัยที่ส่งเสริมการก่อโรคในเชื้อกลุ่ม non-O1/non-O139 ที่ไม่มียีน *ctxA* และ *tcpA*

2.3 Repeats-in-toxin (RTX)

Repeats-in-toxin (RTX) เป็นท็อกซินอีกชนิดที่มีบทบาทเกี่ยวข้องในการเกิด cytotoxic รวมถึงยีนดังกล่าวยังสามารถใช้ในการตรวจหา biotype ของเชื้อในกลุ่ม O1 ท็อกซินชนิดนี้สามารถสร้างได้ทั้งจากเชื้อ *Vibrio cholerae* และกลุ่มเชื้อแบคทีเรียแกรมลบอื่นๆ ลักษณะทั่วไปของท็อกซินคือ เป็นกลุ่มท็อกซินที่มีขนาดใหญ่มีขนาดมวลโมเลกุลตั้งแต่ 100-177 kDa และบริเวณ C-terminal จะเป็น GD-rich nonapeptide repeats (GGXGXDX[L/I/V/W/Y/F]X), เมื่อ X เป็นกรดอะมิโนใดๆ ซึ่งบริเวณนี้มีความสำคัญในขั้นตอนการสร้างเป็น -roll structure เพื่อจับกับ Ca^{2+} รวมถึงมีบทบาทในการแทรกตัวของท็อกซินเข้าไปใน cytoplasmic membrane ของยูคาริโอตเซลล์ (46) ยีนกลุ่ม RTX ประกอบด้วย *rtxA*, *rtxB*, *rtxC* และ *rtxD* โดย *rtxA* ซึ่งเป็นยีนที่ใหญ่ที่สุดใน genome ของเชื้อ *V. cholerae* (23, 32, 51) ทำหน้าที่สร้าง multifunctional autoprocessing RTX toxin (MARTX_{VC}) พบได้ทั้งในเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม (7, 10, 12, 45) ท็อกซินกลุ่มนี้เป็น family ใหม่มีลักษณะที่สำคัญคือ มีขนาดใหญ่ (> 350 kDa) บริเวณ N- และ C-terminal glycine rich repeats และ autoprocessing cysteine protease ทำหน้าที่ในการขนส่งท็อกซินเข้าสู่ cytosol ของ eukaryotic cells (53) ส่วน *rtxC* ทำหน้าที่สร้าง acyltransferase ในขณะที่ *rtxB* และ *rtxD* มีความเกี่ยวข้องกับ ATP-binding cassette transporter system ซึ่งมีบทบาทในการขนส่ง toxin (32) มีการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่า *rtxA* และ *rtxC* สามารถใช้ในการแบ่งแยก classical และ seventh pandemic El Tor strain ได้ โดยพบว่า ยีน *rtxC* จะพบเฉพาะใน El Tor strain (14) เท่านั้น บทบาทของท็อกซินที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคได้แก่ การเหนี่ยวนำให้เกิด cytotoxic ใน HEP-2 cell (7) ในการศึกษาเกี่ยวกับ lung infection พบว่า ท็อกซินมีความเกี่ยวข้องกับการเพิ่มระดับ inflammation และ tissue damage (21, 24) การทำให้เกิด rounding ใน nonpolarized cells และสูญเสียความแข็งแรงของ paracellular tight junctions ของ polarized cells (22, 23) อีกทั้งท็อกซินดังกล่าวยังมีความเกี่ยวข้องกับ depolymerization ของ actin และการสูญเสียโครงสร้างเซลล์ซึ่งมีสาเหตุจากการเกิด actin cross-linking และ Rho GTPase inactivation สำหรับ actin cross-linking นั้นเนื่องจากในยีนของท็อกซินมีบริเวณที่เรียกว่า actin cross-linking domain (ACD) ทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ ACD ไปจับกับ actin ทำให้ actin monomer สร้างพันธะ covalent เชื่อมกัน

กลายเป็น multimer และเกิดการ disassembly ของ actin (9) ในขณะที่บทบาทของ Rho GTPase inactivation พบว่า กลไกการก่อให้เกิด cell rounding ยังไม่แน่ชัด อย่างไรก็ตามที่ออกซินดังกล่าวถือเป็น multifunctional toxin ที่ก่อให้เกิดการ disassembly ของ cytoskeleton ได้โดยกลไกทั้งทางตรงและทางอ้อม นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงความเกี่ยวข้องระหว่างที่ออกซินกับ immune cells พบว่า ที่ออกซินดังกล่าวมีบทบาทในการป้องกันการกำจัดแบคทีเรียออกจากลำไส้ (42, 43) โดยการชะลอหรือยับยั้งกระบวนการเกิด phagocytosis ทำให้เชื้อสามารถอยู่รอดในร่างกายต่อไปได้ (52)

2.4 Hemagglutinin/Protease

สำหรับเอนไซม์ hemagglutinin / protease เป็น soluble zinc metalloenzyme ที่สร้างโดยยีน *hapA* ทำหน้าที่ตัด subunit A ของ cholera toxin เป็น A1 และ A2 fragments เกิดเป็น active form ของ cholera toxin หรือสามารถย่อยสลายโครงสร้างโปรตีนของ host ที่มีส่วนประกอบของ mucin (20) และ occludin ใน tight junctions (33, 59) ทำให้เกิด paracellular permeability มากยิ่งขึ้น ช่วยในการแทรกผ่านชั้น mucin ทำให้เกิดการติดเชื้อแพร่กระจายในบริเวณระบบทางเดินอาหารได้ดี (55) หรือทำให้ลักษณะโครงสร้างของ MDCK-I epithelial cells และการจัดเรียงตัวของ filamentous actin (F-actin) เกิดการเปลี่ยนแปลง (58) Halpern และคณะทำการศึกษา purified HAP พบว่า มี activities ที่ต่างกันถึง 4 ส่วน คือ hemagglutination, protease activities และอีก 2 activities ที่มีบทบาทต่อการอยู่รอดของเชื้อในสิ่งแวดล้อมคือ การย่อยสลาย glycoprotein ของ chironomid egg masses เพื่อใช้เป็นแหล่งสารอาหาร (25, 26) และการป้องกันไม่ให้ไข่ของ chironomid ฟักเป็นตัว สอดคล้องกับการศึกษาของ Benitez และคณะที่พบว่า เอนไซม์ดังกล่าวถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างในภาวะที่มีสารอาหารจำกัดและสามารถถูกยับยั้งการสร้างได้โดยกลูโคส (4) การศึกษาอื่นพบว่า เอนไซม์นี้ยังมีบทบาทช่วยให้เชื้อเกิดการหลุดจาก human intestinal epithelial cells ทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อจากคนไปสู่สิ่งแวดล้อม (19, 20)

