

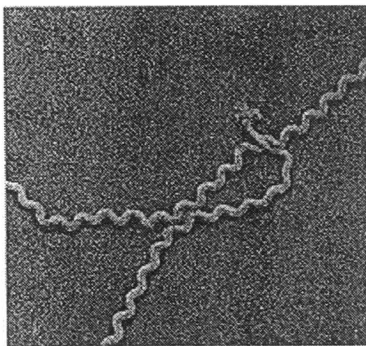
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

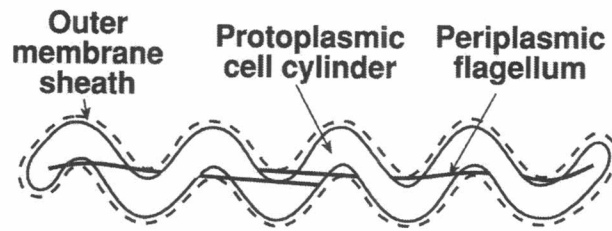
โรคเลปโตสไปโรซิส (Leptospirosis)

เชื้อก่อโรค

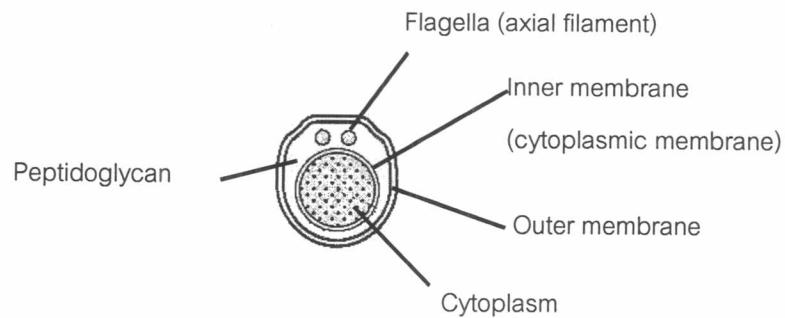
โรคเลปโตสไปโรซิส (Leptospirosis) เกิดจากเชื้อ *Leptospira* ใน order Spirochaetales ซึ่งเชื้อที่ทำให้เกิดโรคคือ *Leptospira interrogans* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นเกลียว (coiled) ขนาดเล็ก ยาว 6-20 ไมโครเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.1 ไมโครเมตร โดยมากปลายทั้งสองข้างหรือข้างใดข้างหนึ่งจะโค้งหรืองอเป็นขอ (hook)⁽¹⁷⁾ เคลื่อนไหวด้วยการหมุนรอบแกนยาว มองเห็นยากมากด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา ต้องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมืด (darkfield microscope)⁽¹⁷⁾ (รูปที่ 1) มี periplasmic flagellum (axial filament) 2 อัน (รูปที่ 2) โครงสร้างภายในของเชื้อ *Leptospira* เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนจะเห็นว่าภายในเซลล์เป็น protoplasmic cylinder ประกอบด้วย peptidoglycan และ cytoplasmic membrane ซึ่งห่อหุ้ม cytoplasm (รูปที่ 3) ด้านนอกผนังเซลล์ประกอบด้วย โปรตีน ไขมัน และ lipopolysaccharide (LPS) ซึ่ง LPS จะมีคุณสมบัติเหมือนกับแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่น ไม่มีคุณสมบัติเป็น toxin จึงไม่เกี่ยวข้องกับการทำให้เกิดความรุนแรงของโรค แต่มีความสำคัญเป็นแอนติเจนเกี่ยวกับกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันและการวินิจฉัยโรค⁽¹⁸⁾ โครงสร้างในส่วนที่เป็นน้ำตาลของ LPS จะเป็นตัวบอกความแตกต่างของ species โปรตีนผนังชั้นนอกของเชื้อมากมายหลายชนิดถูกสกัดออกได้ เช่น heat shock protein, LipL36, LipL41 และ LipL32⁽¹⁹⁾ ซึ่งโปรตีนผนังชั้นนอกเหล่านี้จะแสดงออกต่อเมื่อเกิดการติดเชื้อ *Leptospira*



รูปที่ 1 แสดงลักษณะของเชื้อ *Leptospira*⁽¹⁾



รูปที่ 2 โครงสร้างภายนอกของเชื้อ *Leptospira*⁽²⁰⁾



รูปที่ 3 โครงสร้างภายในของเชื้อ *Leptospira*⁽²¹⁾

เชื้อ *Leptospira* มี 2 กลุ่ม คือ

1. เชื้อที่ไม่ก่อโรค (non-pathogenic) จะอยู่อิสระในสภาพแวดล้อม (free-living saprophyte) คือ *Leptospira biflexa*

2. เชื้อที่ทำให้เกิดโรค (pathogenic) คือ *Leptospira interrogans*

เชื้อทั้ง 2 กลุ่ม ถ้าดูจากรูปร่างลักษณะไม่สามารถแยกความแตกต่างออกจากกันได้ เชื้อนี้เป็นพวก aerobic และต้องการสารพวก long-chain fatty acid สำหรับการเจริญเติบโต เชื้อเติบโตได้ดีที่ 28-30 °C

ตัวอย่างการแบ่งเชื้อก่อโรคและไม่ก่อโรสดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 Classification of *Leptospira* species⁽²²⁾

Species	Serovar	Reference strain	Serogroup
Pathogens			
<i>L. interrogans</i>	australis	Ballico	Australis
	bratislava	Jez Bratislava	Australis
	bataviae	Van Tienen	Bataviae
	canicola	Hond utrecht IV	Canicola
	hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis
	icterohaemorrhagiae	RGA	Icterohaemorrhagiae
	copenhageni	M 20	Icterohaemorrhagiae
	lai	Lai	Icterohaemorrhagiae
	pomona	Pomona	Pomona
	pyrogenes	Salinem	Pyrogenes
	hardjo	Hardjoprjitno	Sejroe
	<i>L. alexanderi</i>	manhao3	L 60
<i>L. fainei</i>	hurstbridge	BUT 6	Hurstbridge
<i>L. inadai</i>	lyme	10	Lyme
<i>L. kirschneri</i>	bim	1051	Autumnalis
	cynopteri	3522 C	Cynopteri
	grippotyphosa	Moskva V	Grippotyphosa
	mozdok	5621	Pomona
	panama	CZ 214K	Panama
<i>L. meyeri</i>	semaranga	Veldrat	Semarang
		Semarang 173	
<i>L. borgpetersenii</i>	ballum	Mus 127	Ballum
	castellonis	Castellon 3	Ballum
	javanica	Veldrat	Javanica
		Bataviae 46	
	sejroe	M 84	Sejroe
	tarassovi	Perepillitsin	Tarassovi

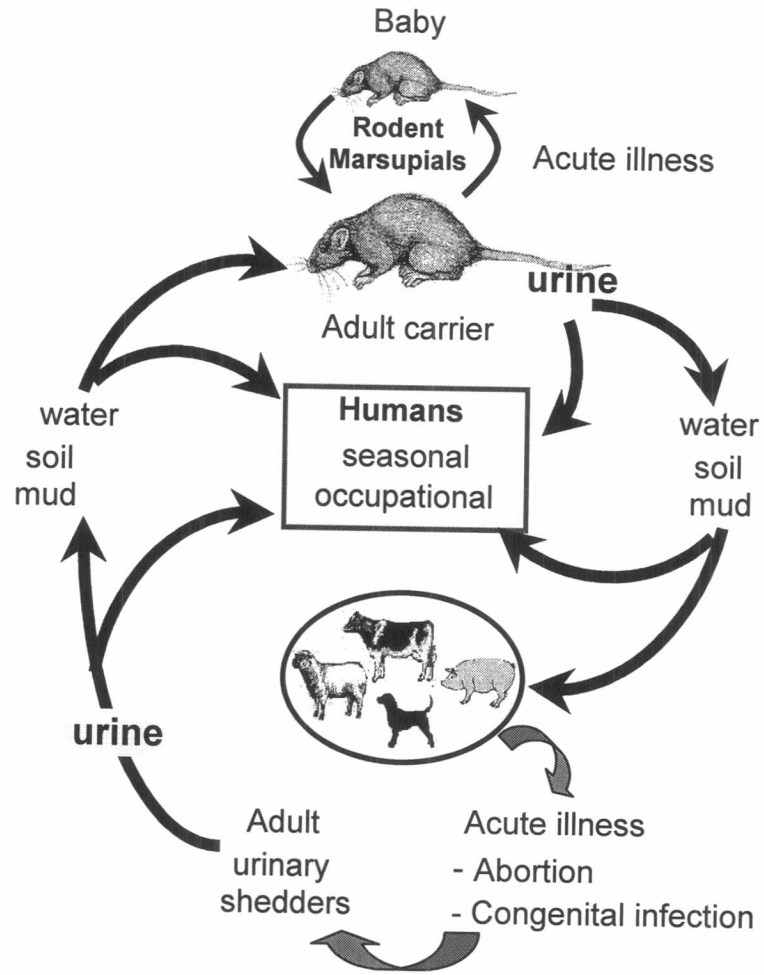
ตารางที่ 1 Classification of *Leptospira* species (ต่อ)

Species	Serovar	Reference strain	Serogroup
<i>L. weillii</i>	celledoni	Celledoni	Celledoni
<i>L. noguchii</i>	forbragg	Fort Bragg	Autumnalis
<i>L. santarosai</i>	brasiliensis	An 776	Bataviase
	georgia	LT 117	Mini
Genomospecies 1	pingchang	80-412	Ranarum
Genomospecies 4	hualin	LT11-33	Icterohaemorrhagiae
Genomospecies 5	saopaulo	Sao Paulo	Semarang
Saprophytes (Non-pathogen)			
Genomospecies 3	holland	Waz Holland (P438)	Holland
<i>L. biflexa</i>	patoc	Patoc I	Semarang
<i>L. wolbachii</i>	codice	CDC	

การแพร่กระจายของโรค

สัตว์ที่เป็นพาหะของโรคจะไม่แสดงอาการแต่มีการติดเชื้อที่ท่อไต (renal tubule) เชื้อจะเจริญอยู่ในไตและจะขับออกมาพร้อมกับปัสสาวะ และสามารถปล่อยเชื้อออกมาได้เป็นเวลานานหลายสัปดาห์หลายเดือนหรือตลอดชีวิต

แหล่งของเชื้อ leptospires ที่สำคัญคืออยู่ในไตของสัตว์ที่เป็นพาหะของโรค โดยเฉพาะหนู เมื่อหนูปล่อยเชื้อออกมากับปัสสาวะ ทำให้มีการแพร่ไปในฝูงสัตว์ จากการเลียกินปัสสาวะ การสัมผัสปัสสาวะในสิ่งแวดล้อม ตลอดจนมีการติดเชื้อจากแม่ไปยังลูกได้ หรือการติดต่อทางผสมพันธุ์ของสัตว์ที่มีการติดเชื้อเรื้อรัง เชื้อจะแพร่กระจายเข้าสู่อวัยวะต่างๆ ในร่างกาย โดยเฉพาะที่ไต เป็นอวัยวะหลักที่เชื้อจะอาศัยแบ่งตัวเพิ่มจำนวนในท่อไต (proximal convoluted tubules) โดยจะสร้างโคโลนีที่ผนังท่อไตนี้และแบ่งตัวเพิ่มจำนวน เชื้อบางส่วนจะหลุดออกมาพร้อมกับของเสียที่ขับถ่ายออกมากับปัสสาวะ ทำให้มีการแพร่กระจายของโรค (รูปที่ 4) ได้



รูปที่ 4 แสดงการแพร่กระจายของโรค⁽¹⁷⁾

กลไกการเกิดโรค

เชื้อเข้าสู่ร่างกายได้ทั้งทางตรงและทางอ้อม ทางตรงโดยการไชผ่านผิวหนังที่มีบาดแผล ผิวหนังที่เปียกชุ่ม หรือตามเยื่อเมือก เช่น เยื่อบุในตา จมูก ปาก หรือผ่านทางรกขณะตั้งครรภ์ ทางอ้อมอาจได้รับเชื้อโดยการหายใจเอาเชื้อที่ปนเปื้อนอยู่ในอากาศ ในรูปของ microscopic droplet การดื่มน้ำ สามารถทำให้เกิดโรคได้ เมื่อเชื้อเข้าสู่ร่างกายสามารถแพร่กระจายเข้าสู่กระแสเลือดได้รวดเร็ว และแพร่กระจายไปทุกอวัยวะ

เชื้อจะทำให้เกิดการทำลาย endothelial cell ของหลอดเลือดเล็กๆ ที่ว่างกาย ทำให้มีเลือดออกจากหลอดเลือดฝอย และมีเลือดออกในอวัยวะต่างๆ ได้ การเกิดพยาธิสภาพอาจเนื่องมาจาก glycolipo-protein (GLP)⁽²³⁾ toxin ของเชื้อ ซึ่งเป็น long-chain fatty acids ซึ่งเป็นตัวแทรกเข้าไปในผนังเซลล์ของหลอดเลือด (ไปยับยั้ง long-chain fatty acids ที่มีในผนังเซลล์) ทำให้เซลล์หลอดเลือดแตก ส่วนของ cytoplasm จะถูกปล่อยออกนอกเซลล์ทำให้เซลล์ตายในที่สุด

การเกิดจุดเลือดออกที่ว่างกาย (petechial haemorrhages) ในอวัยวะและเนื้อเยื่อต่างๆ ของร่างกายที่มีการติดเชื้อ จะพบได้บ่อยมาก เช่น ปอด^(24,25) ถ้าทำลายหลอดเลือดที่ cortex ของไต อาจทำให้เกิดการตายของเซลล์บุท่อไต⁽⁵⁾ และในที่สุดทำให้ไตวาย การทำลายหลอดเลือดที่ตับ ทำให้ผู้ป่วยมีตัวเหลือง เซลล์ตับตายและตับวาย

ในการกำจัดเชื้อออกจากกระแสเลือด LPS จากเชื้อ leptospire จะกระตุ้นให้ร่างกายสร้าง IgM ซึ่งจะทำปฏิกิริยาจำเพาะกับ LPS epitopes ที่จำเพาะของแต่ละ serovar ที่ติดเชื้อ เมื่อ IgM จับกับ LPS จะทำให้เชื้อถูกจับกิน (opsonization)⁽²⁶⁾ โดยเซลล์เม็ดเลือดขาว (phagocytes) ที่อยู่ในที่ต่างๆ เช่น ตับ ม้าม ปอด ต่อมน้ำเหลือง มีผลทำให้เชื้อในกระแสเลือดลดลง

อาการของโรค

โรคนี้มีระยะฟักตัว (incubation period) ประมาณ 7-14 วัน อาการทางคลินิกแบ่งเป็น 2 ระยะ คือ^(27,28)

1. ระยะแรก (leptospiremic phase) เป็นระยะ 4-9 วันแรกของการดำเนินโรค ระยะนี้สามารถแยกเชื้อเลปโตสไปราได้จากเลือดและน้ำไขสันหลัง จะมีอาการไข้สูงแบบทันทีทันใด ปวดศีรษะ ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อมาก โดยเฉพาะกล้ามเนื้อน่อง อาการตาแดงซึ่งมักพบในวันที่ 3-4 วันแรกของโรค มีผื่นขึ้นบางครั้ง

2. ระยะที่สอง (immune phase) เป็นระยะที่ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเลปโตสไปรา อากาโรในระยะนี้จะเริ่ม 1-3 วันหลังจากผู้ป่วยหายจากไข้ในระยะแรกแล้วกลับมีอาการไข้ คือมีอาการไข้ลงสลับกับไข้ขึ้น อากาโรในระยะนี้มักไม่รุนแรง ตรวจน้ำไขสันหลังพบลักษณะของเยื่อหุ้มไขสันหลังอักเสบ และพบเม็ดเลือดขาวมากในน้ำไขสันหลัง

ในผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงจะมีอาการตับและไตวาย โลหิตจาง และมีเลือดออกที่ปอด

การวินิจฉัยโรค

การวินิจฉัยโรคทำได้โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อเลปโตสไปราจากเลือด และน้ำไขสันหลัง ได้ในสัปดาห์แรกของการติดเชื้อ หลังจากนั้นควรเพาะเชื้อจากปัสสาวะซึ่งอาจพบเชื้อได้นานถึง 30 วัน แต่วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อใช้เวลานาน จึงใช้วิธีทาง serology ตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อก่อโรค ซึ่งวิธีมาตรฐานที่ใช้คือ microscopic agglutination test (MAT) วิธีนี้ใช้เชื้อเลปโตสไปราซีโรวารต่างๆ ที่พบก่อโรคบ่อยในประเทศไทย เป็นแอนติเจนนำมาทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีในซีรัมของผู้ป่วย แล้วนำมาตรวจดูปฏิกิริยาการจับตัวตกตะกอนด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมืด (darkfield microscope)

การรักษา

การรักษา จะให้ยาปฏิชีวนะ มักจะใช้ยา penicillin, erythromycin, doxycycline ซึ่งการให้ยาปฏิชีวนะดังกล่าวช่วยลดความรุนแรงของโรคและภาวะแทรกซ้อน

โดยสรุปพยาธิสภาพที่เกิดขึ้น ขึ้นกับปัจจัยของจำนวนเชื้อ ปัจจัยที่ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ (cytotoxic foactor) เช่น glycolipoprotein เป็นต้น

รายงานการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับเชื้อ *Leptospira*

Dobrina และคณะ⁽²⁹⁾ ทำการศึกษาผลของเปปติโดกลัยแคน (peptidoglycan) ของเชื้อ *L.interrogans* พบว่า มีการเพิ่มขึ้นของระดับ neutrophil ที่มาเกาะติดเซลล์เยื่อเมือกหลอดเลือด โดยการเกาะติดขึ้นกับระยะเวลาที่สัมผัสเชื้อ และจำนวนของเชื้อสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เม็ดเลือดขาว neutrophil มาเกาะติดเซลล์เยื่อเมือกหลอดเลือดที่เพาะเลี้ยง ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากลไกที่ bacteria ทำให้เกิดการอักเสบได้ทั้งเฉพาะที่และทั้งร่างกาย

Cinco และคณะ⁽⁹⁾ ทำการศึกษาเปปติโดกลัยแคน (peptidoglycan) ของเชื้อ *L.interrogans* โดยทำการทดลองเปปติโดกลัยแคนที่สกัดได้ใน human peripheral blood

mononuclear cell พบว่าสามารถกระตุ้นให้เม็ดเลือดขาวปลดปล่อย tumor necrosis factor- α (TNF- α) ซึ่งเป็น proinflammatory cytokine ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ

Barnett และคณะ⁽¹²⁾ ทำการศึกษา การแสดงออกและการกระจายตัวของส่วนประกอบในโปรตีนผนังชั้นนอกของเชื้อ leptospira ในขณะที่ได้มีการติดเชื้อ โดยทำการทดลองในหนู hamster ทำให้หนูติดเชื้อ *L.kirschneri* เมื่อครบระยะเวลาหลังจากทำให้ติดเชื้อ เก็บ serum มาตรวจ และนำชิ้นเนื้อตับและไต มาตรวจทาง immunohistochemical พบว่าการแสดงออกของโปรตีน LipL36 ลดลงเมื่ออยู่ในร่างกาย แต่จะตรวจพบที่เนื้อเยื่อไต

Haake และคณะ⁽³⁰⁾ ทำการศึกษา การแสดงออกของโปรตีน LipL32 ในขณะที่สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีการติดเชื้อ leptospira โดยที่ LipL32 เป็น lipoprotein สำคัญที่พบใน leptospira พบว่า LipL32 มีระดับสูงในขณะที่ยังมีชีวิตและในขณะที่มีการติดเชื้อ ซึ่งโปรตีนบางชนิดจะพบเฉพาะในขณะเพาะเลี้ยงและไม่พบในขณะที่มีการติดเชื้อ เช่น LipL36 เป็นต้น

Yang และคณะ⁽¹³⁾ ทำการศึกษา โดยนำโปรตีนผนังชั้นนอกของเชื้อก่อโรคและไม่ก่อโรค ทดสอบกับเซลล์ของไตหนูที่เพาะเลี้ยง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทำ electrophoretic mobility shift assay เพื่อดูการจับของ OMP กับ DNA ของ NF-kappa B ซึ่งเป็น transcription factor หลักที่ตอบสนองต่อการบาดเจ็บและการอักเสบ พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของ MCP-1, RANTES, iNOS mRNA ในเซลล์ที่ทดสอบกับ OMP ของเชื้อที่ก่อโรค นั่นคือ OMP ของเชื้อที่ก่อโรค มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับ gene ที่ตอบสนองต่อการอักเสบ โดยผ่านทาง NF-kappa B pathway

เกี่ยวกับโครงสร้างและผนังเซลล์ของแบคทีเรียทั่วไป⁽³¹⁾

แคปซูล

เป็นโครงสร้างชั้นนอกสุดของแบคทีเรีย ขนาดของแคปซูลของแบคทีเรียแต่ละชนิดจะแตกต่างกัน สารที่เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ในแคปซูลของแบคทีเรียคือ polysaccharide แคปซูลมีหน้าที่ป้องกันแบคทีเรียจากสิ่งต่างๆ ที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ และที่สำคัญที่สุดคือแคปซูลจะช่วยให้แบคทีเรียเกาะติดกับพื้นผิวใดๆ ได้ทั้งในสภาวะธรรมชาติและสภาวะก่อโรค ซึ่งจะเพิ่มศักยภาพในการเจริญเติบโตและการก่อโรค

ผนังเซลล์

ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก

แบคทีเรียแกรมบวกมีผนังเซลล์หนาประมาณ 20-80 นาโนเมตร ซึ่งหนากว่าแบคทีเรียแกรมลบ องค์ประกอบส่วนใหญ่คือเปปติโดไกลัยแคน (60-100%) สำหรับแบคทีเรียแกรมลบชั้นเปปติโดไกลัยแคนจะบางกว่า ซึ่งอยู่ในช่องว่างระหว่างเยื่อหุ้มชั้นนอกและเยื่อหุ้มเซลล์ที่เรียกว่า periplasmic space (รูปที่ 5) องค์ประกอบที่สำคัญของผนังเซลล์ ได้แก่

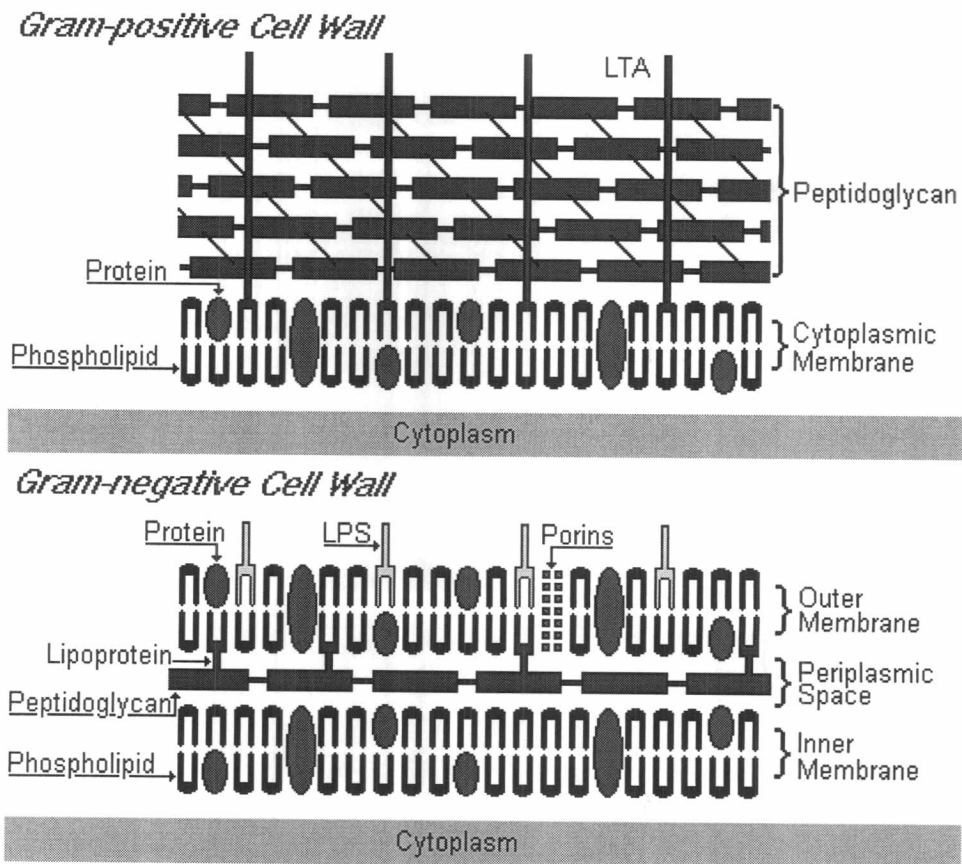
เปปติโดไกลัยแคน (peptidoglycan) เป็นโพลิเมอร์ขนาดใหญ่ มีองค์ประกอบ 3 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นกระดูกสันหลัง หรือสายกลัยแคน เป็นโพลีแซคคาไรด์ที่เป็นสายยาว ประกอบด้วยหน่วยย่อยคือ N-acetylmuramic acid (NAM) และ N-acetylglucosamine (NAG) ส่วนที่สองเป็นเปปไทด์ 1 ชุด มี 4 ตัว (tetrapeptides) ห้อยต่ออยู่กับ N-acetylmuramic acid ได้แก่ L-alanine, D-glutamic acid, L-lysine, D-alanine และส่วนที่สามเป็นเปปไทด์อีกชุดซึ่งเชื่อมเปปติโดไกลัยแคนสายที่ใกล้กันทางขวาง ในแบคทีเรียแกรมบวกจะประกอบด้วยเปปติโดไกลัยแคน 40 เส้น ซึ่งประกอบกันเป็น 90% ขององค์ประกอบของผนังเซลล์ แบคทีเรียแกรมลบจะมีเปปติโดไกลัยแคนเพียงเส้นเดียว และประกอบกันเป็น 5-20% ขององค์ประกอบของผนังเซลล์

กรดทีโคอิก เป็นโพลิเมอร์ที่ละลายน้ำได้ ประกอบด้วยไรบิตอล (ribitol เป็น sugar alcohol ที่มีคาร์บอน 5 ตัว) หรือ กลีเซอรอล (glycerol เป็น sugar alcohol ที่มีคาร์บอน 3 ตัว) เชื่อมต่อกันโดยพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ (phosphodiester linkage) เป็นเส้นยาว กรดทีโคอิกมีอยู่ 2 ชนิด คือ กรดทีโคอิกที่ผนังเซลล์ ซึ่งเชื่อมต่อกับเปปติโดไกลัยแคนด้วยพันธะโควาเลนต์ (covalent bond) และกรดทีโคอิกที่เยื่อหุ้มเซลล์หรือกรดไลโปทีโคอิก (lipoteichoic acid) ซึ่ง

เชื่อมต่อกับกลัยโคไลปิด (glycolipid) ของเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยพันธะโควาเลนต์ และมีรวมอยู่มากในมีโซโซม (mesosomes) แบคทีเรียแกรมบวกบางเชื้อสายจะไม่มีกรดทีโคอิกชนิดที่อยู่ในผนังเซลล์ แต่แบคทีเรียทุกตัวมีกรดทีโคอิกชนิดที่เชื่อมต่อกับเยื่อหุ้มเซลล์

ไลปิดเป็นองค์ประกอบส่วนน้อยของผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก ยกเว้นพวก Mycobacteria ซึ่งมีไลปิดในผนังเซลล์ถึงหนึ่งในสามขององค์ประกอบและเป็นกรดมัยโคอิก (mycoic acid) เป็นส่วนใหญ่

บางครั้งในผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกอาจมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบและถูกเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์หรือโมโนวาเลนต์ เช่น M protein ของ Streptococci group A ซึ่งเป็นแอนติเจนสำคัญที่อาจเกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อพวกนี้



รูปที่ 5 โครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย⁽³²⁾

ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ

ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบบางกว่าแกรมบวก แต่มีส่วนประกอบทางเคมีและโครงสร้างซับซ้อนมากกว่า คือประกอบด้วยเยื่อหุ้มชั้นนอก และชั้นเปปติโดไกลัยแคน ซึ่งอยู่ในช่องว่างระหว่างเยื่อหุ้มชั้นนอกและเยื่อหุ้มเซลล์ที่เรียกว่า periplasmic space

เยื่อหุ้มชั้นนอก มีรูปร่างและโครงสร้างเช่นเดียวกับเยื่อหุ้มเซลล์ แต่มีฟอสโฟไลปิด (phospholipid) และโปรตีนน้อยกว่า นอกจากนี้มีส่วนประกอบที่พบเฉพาะในเยื่อหุ้มชั้นนอก คือ ไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide หรือ LPS) เยื่อหุ้มชั้นนอกเป็นส่วนที่เกี่ยวกับการผ่านเข้าออกของสารละลายหลายชนิด และยังมี receptors สำหรับแบคทีริโอเฟจ (bacteriophage) และแบคทีริโอซิน (bacteriocins) นอกจากนี้มีหน้าที่อื่นๆ เช่น การแบ่งตัว การถ่ายทอดพันธุกรรม แบบ conjugation มีระบบต่างๆ ที่ช่วยให้สารอาหารและโมเลกุลเล็กๆ ผ่านเข้าไปใน periplasmic space และยังเป็นส่วนที่ร่วมกับ เปปติโดไกลัยแคนในการสร้างความแข็งแรงให้กับผนังเซลล์

ไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide หรือ LPS) เป็นส่วนประกอบที่มีเฉพาะในผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบเท่านั้น และมีความสำคัญทั้งในแง่โครงสร้างและหน้าที่ เพราะเป็นส่วนประกอบของแอนติเจนที่ผิวเซลล์ คือ O antigens และ endotoxin ไลโปโพลีแซคคาไรด์เป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงและซับซ้อนประกอบด้วยส่วนที่เป็นไลปิด เรียกว่า lipid A ต่อดูดอยู่กับโพลีแซคคาไรด์ที่เป็นแกนกลาง (core polysaccharides) ซึ่งจะเหมือนกัน สำหรับแบคทีเรียในสกุลเดียวกัน และส่วนปลายที่เป็น โพลีแซคคาไรด์จำเพาะ (specific polysaccharide region) ซึ่งเป็นหน่วยซ้ำๆ ของน้ำตาลที่มีคาร์บอนในโมเลกุล 3 ตัว (triose) หรือ 5 ตัว (pentose) ต่อกันเป็นสาย เรียกว่า O-specific chains โพลีแซคคาไรด์ส่วนปลายนี้จะยื่นออกมาจากเยื่อหุ้มชั้นนอก จึงเป็นส่วนที่ป้องกันเซลล์จากแอนติบอดี (antibody) และคอมพลีเมนต์ (complement) ส่วนประกอบทั้งสามส่วนของไลโปโพลีแซคคาไรด์เรียงกันเป็นลักษณะดังนี้

ส่วนที่เป็นโพลีแซคคาไรด์จำเพาะ (O-specific side chains)	โพลีแซคคาไรด์ที่เป็นแกนกลาง (core polysaccharide)	ไลปิด เอ (lipid A)
--	--	-----------------------

โปรตีนที่เยื่อหุ้มชั้นนอก โปรตีนที่เยื่อหุ้มชั้นนอกมีหลายชนิด แบ่งออกได้เป็น 2 พวก คือ โปรตีนที่พบเป็นส่วนใหญ่ (major proteins) แต่มีไม่กี่ชนิดซึ่งเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยเปปไทด์ประมาณ 5 ชนิด อีกพวกหนึ่งเป็นโปรตีนที่มีประมาณ 20-30 ชนิด แต่พบได้เป็นส่วนน้อย (minor

proteins) โปรตีนที่พบเป็นส่วนใหญ่แบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่หนึ่งเรียกว่า pore-forming proteins หรือ porins เป็นส่วนที่ช่วยให้สารละลายผ่านเข้าออกเยื่อหุ้มชั้นนอกได้ กลุ่มที่สองเรียกว่า non-porin proteins ยังไม่ทราบหน้าที่แน่นอน และกลุ่มที่สามคือไลโปโปรตีน (lipoproteins) เป็นกลุ่มของโปรตีนที่เล็กที่สุดแต่มีมากที่สุดที่เยื่อหุ้มชั้นนอก เป็นส่วนสำคัญที่ทำให้เยื่อหุ้มชั้นนอกคงสภาพและเป็นส่วนที่ยึดติดกับเปปติโดกลัยแคนด้วยพันธะโควาเลนต์และสอดปลายส่วนที่เป็นไลโปติดเข้าไปในเยื่อหุ้มชั้นนอก

Periplasmic space ช่องว่างระหว่างเยื่อหุ้มชั้นนอกและเยื่อหุ้มเซลล์ที่เรียกว่า periplasmic space อาจเห็นได้ในแบคทีเรียแกรมลบ แต่จะมองไม่เห็นเลยหรือเห็นได้ยากในแบคทีเรียแกรมบวก ทั้งนี้เนื่องจากความดันออสโมติกภายในเซลล์สูงถึง 5-20 บรรยากาศ เมื่อเทียบกับ 3-5 บรรยากาศในเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ ช่องว่างนี้ประกอบด้วยสารที่มีลักษณะเป็นวุ้นซึ่งจะแตกต่างกันขึ้นกับสภาวะที่เลี้ยงเชื้อและจะแตกต่างกันในเชื้อแต่ละตัว สารที่มีลักษณะเป็นวุ้นดังกล่าวค่อนข้างเหนียวและมีโครงสร้างเป็นโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharides) ซึ่งผลิตเป็นสัดส่วนผกผันกับความดันออสโมติกของอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ โอลิโกแซคคาไรด์ใน periplasmic space เป็นโพลิเมอร์ของ D-glucose ที่มีความยาวประมาณ 8-10 หน่วย หรือบางครั้งถูกแทนที่ด้วยกลีเซอรอลฟอสเฟต (glycerol phosphate) และฟอสฟาทีดีลเอทานอลามีน (phosphatidyl ethanolamine) และบางครั้งก็เป็น โอ-ซักซินิลเอสเตอ์ (o-succinyl ester) และมีเอนไซม์หลายชนิด เช่น ฟอสฟาเทส (phosphatase) นิวคลีเอส (nuclease) เพนิซิลลิเนส (penicillinase) หรือบีตา-แลกแทมเมส (β -lactamase) ซึ่งถูกควบคุมด้วยพลาสมิด (plasmid) นอกจากนี้ยังมีโปรตีน เปปติโดกลัยแคนซึ่งอยู่ใน periplasmic space จะถูกห่อหุ้มล้อมด้วยวุ้นและเชื่อมต่อกับเยื่อหุ้มชั้นนอกด้วยไลโปโปรตีน

หน้าที่ของผนังเซลล์

นอกจากหน้าที่สำคัญในการป้องกันและรักษาความดันภายในเซลล์แล้ว ผนังเซลล์ยังมีบทบาทสำคัญในการแบ่งตัว และยังทำหน้าที่เป็นสารตัวแรก (precursor) ในขบวนการสังเคราะห์สารต่างๆ ผนังเซลล์ชั้นต่างๆ เป็น antigenic determinants ที่สำคัญของผิวเซลล์ ไลโปโพลีแซคคาไรด์ในผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบมีคุณสมบัติเป็นเอนโดทอกซิน (endotoxin) โดยปกติผนังเซลล์จะยอมให้สารต่างๆ ผ่านเข้าออกเซลล์ได้โดยไม่เลือกเฉพาะสารใดสารหนึ่ง อย่างไรก็ตามเยื่อหุ้มชั้นนอกของผนังเซลล์ในแบคทีเรียแกรมลบจะขัดขวางสารที่มีโมเลกุลใหญ่ๆ เช่น แอนติบอดี และ lytic enzymes ไม่ให้ผ่านเข้าเซลล์ จึงมีส่วนช่วยในการป้องกันเซลล์

Endothelial cell

Endothelial cell เป็นเซลล์ชั้นในสุด (tunica intima) ของผนังหลอดเลือด และเป็นเซลล์ชนิดเดียวที่เป็นส่วนประกอบในหลอดเลือดฝอย (capillaries) endothelial cell เป็น squamous epithelial cell เรียงตัวชั้นเดียวติดต่อกัน (monolayer) อยู่นอกผนังหลอดเลือด ทำหน้าที่เป็น plasma membrane ของ plasma และ extracellular fluid ทั้งแบบ active และ passive transport โดย endothelial cell จะมีลักษณะคล้ายภูเขาว่างอยู่บนเยื่อหุ้ม (basement membrane) ที่อยู่ด้านบนของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ ซึ่ง endothelial cell จะทำงานประสานกับเซลล์กล้ามเนื้อเรียบโดยทำหน้าที่เป็นตัวรับสัญญาณจากสิ่งเร้าต่างๆ แล้วแปลผลกลับมายังกล้ามเนื้อเรียบ vascular endothelial cell ทั้งหมดภายในร่างกายมีประมาณ 60 ล้านล้านเซลล์หรือประมาณ 3 กิโลกรัม อันมีขนาดใกล้เคียงกับเซลล์ตับที่เป็นอวัยวะที่ใหญ่ที่สุดในร่างกาย⁽³³⁾

endothelial cell สามารถสังเคราะห์ กักเก็บ และหลั่งสารต่าง ๆ มากมาย ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพหลายอย่าง⁽³⁴⁾ บทบาทหน้าที่ของ endothelial cell พอสรุปได้ดังนี้คือ

1. ทำหน้าที่เป็นตัวกั้นและควบคุมการขนส่ง น้ำ solute และเซลล์ ระหว่าง vascular space และ tissue compartment โดยทำหน้าที่ควบคุม permeability ของสาร โดยอาศัย pore system และสามารถควบคุมการเข้าออกของเซลล์เม็ดเลือดขาว ในภาวะอักเสบหรือ atherosclerosis โดยอาศัย transmigration^(33,34,35)
2. เป็นเซลล์เป้าหมายในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย^(36,37)
3. เปลี่ยนแปลงสารต่าง ๆ ให้เป็นสารที่มีฤทธิ์หรือหมดฤทธิ์ เช่น เปลี่ยน angiotensin I ให้เป็น angiotensin II หรือ เปลี่ยน bradykinin ให้เป็น Inactive peptide^(33,34,37,38)
4. ควบคุม hemostatic homeostasis ควบคุมการแข็งตัวของเลือด ผ่านทาง Platelets, Blood protein และ fibrinolytic system^(38,39)
5. ควบคุม vascular smooth muscle proliferation⁽³⁸⁾
6. ควบคุมแรงดึงตัวของหลอดเลือด^(33,33,40)

ซึ่งบทบาทหน้าที่การควบคุมการดึงตัวของหลอดเลือดนั้นเป็นบทบาทหน้าที่สำคัญอย่างหนึ่งของ vascular endothelium โดย ในภาวะ shear stress, pressure หรือ hypoxia รวมทั้งสารเคมีต่างๆ เช่น catecholamine, serotonin, histamine, norepinephrine, bradykinin, substance P เป็นต้น สามารถกระตุ้นให้ endothelial cell สร้างสารและหลั่งสารต่างๆ แล้วสามารถออกฤทธิ์ต่อแรงดึงตัวของกล้ามเนื้อเรียบได้ ซึ่งมีทั้งที่เป็น vasoconstrictor ซึ่งมีคุณสมบัติทำให้หลอดเลือดหดตัว สารในกลุ่มนี้ถ้าสร้างมาจาก endothelial cell จะเรียก

ว่า Endothelium-Derived Constricting Factor(EDCF) ซึ่งมีด้วยกันหลายชนิด ได้แก่ endothelin, superoxide anions, thromboxane A_2 , endoperoxide เป็นต้น ส่วนอีกกลุ่มได้แก่ vasodilator ซึ่งมีคุณสมบัติทำให้หลอดเลือดคลายตัว สารในกลุ่มนี้ ถ้าสร้างมาจาก endothelial cell จะเรียกว่า Endothelium-Derived Relaxing Factors (EDRF) ซึ่งมีด้วยกัน 3 ชนิดได้แก่ prostacyclin (PGI_2), nitric oxide (NO), Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factors (EDHF) ⁽³⁸⁾ ซึ่งสารที่ endothelial cell สร้างขึ้นจะไปออกฤทธิ์ยัง smooth muscle cell โดยกระตุ้นให้ smooth muscle cell หดหรือคลายตัวตามการออกฤทธิ์ ของสารนั้นๆ นอกจากนี้ endothelial cells มี adhesion molecules เช่น P-selectin, E-selectin, ICAM และ VCAM ที่จะทำให้เกิดเลือดขาวสามารถเกาะติดกับ endothelium และเกิดปฏิกิริยาตามมา ได้แก่ inflammation⁽⁴¹⁾

การเกิดความเสียหายของ endothelial cell หรือ endothelial cell ไม่สามารถทำงานได้ตามปกติจะทำให้การทำงานของร่างกายผิดปกติไป เพราะสมดุลของร่างกายถูกรบกวน นอกจากนั้นในภาวะ hypertension, atherosclerosis หรือ diabetes จะพบภาวะความผิดปกติของ endothelial cell ร่วมด้วยทั้งสิ้น ดังนั้น endothelial cell จึงมีบทบาทสำคัญในร่างกายเป็นอย่างยิ่ง⁽³³⁾

ในที่นี้ขอกล่าวถึงเฉพาะสารในกลุ่ม Endothelium-Derived Relaxing Factors (EDRF) ที่มีฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดคลายตัวเท่านั้น

Endothelium-Derived Relaxing Factors (EDRF)

สารและปัจจัยที่กระตุ้นการหลั่ง EDRF จาก endothelial cell
เท่าที่ทราบสามารถสรุปได้คือ⁽⁴⁰⁾

1. Autonomic neurotransmitters & Biogenic Amine

- Acetylcholine
- Norepinephrine
- Histamine
- Serotonin

2. Peptides
 - Bradykinin
 - Calcitonin gene related peptide
 - Vasopressin
 - Substance P
 - Thrombin
 - Vasoactive intestinal peptide ๗๑๗
3. Nucleotides
 - Adenosine diphosphate (ADP)
 - Adenosine triphosphate (ATP)
 - Uridine Triphosphate (UTP) ๗๑๗
4. Others substances
 - Fatty acid (Arachidonic acid)
 - Growth factors
 - Cytokines ๗๑๗
5. Physicochemical Factors
 - Shear stress
 - Hypoxia
 - Electrical stimulation

Nitric oxide (NO)

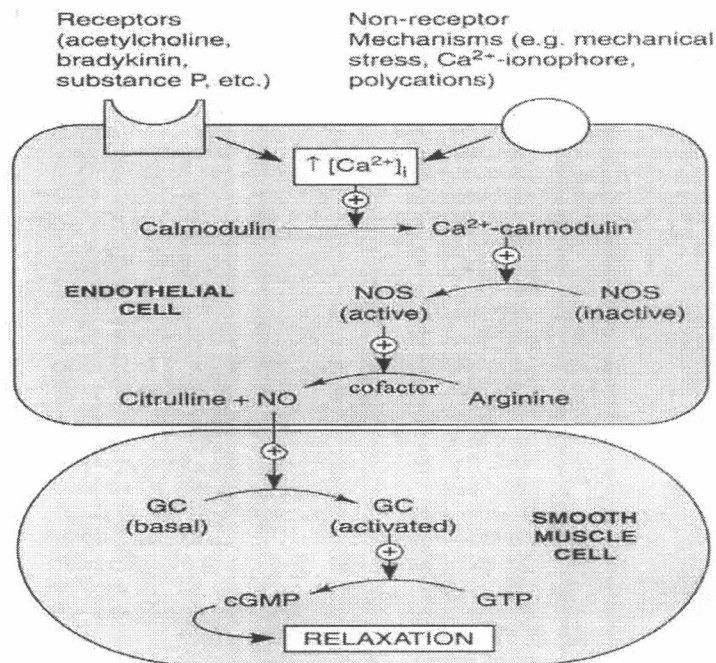
Nitric oxide เป็นสารที่สร้างจาก endothelial cell ที่ทำให้เกิดการคลายตัวของหลอดเลือด nitric oxide เป็น endogenously synthesized gas ซึ่งทำหน้าที่เป็น cell signaling ในร่างกาย ในธรรมชาติ nitric oxide เป็นก๊าซที่มีความเป็นพิษสูง แต่ในร่างกาย nitric oxide เป็นสารโมเลกุลเล็กที่มีบทบาทสำคัญในร่างกาย

Nitric oxide เป็นก๊าซใสไม่มีสี ละลายได้ดีทั้งในน้ำและไขมัน จึงสามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ดี จึงสามารถซึมผ่านจากเซลล์ที่สร้างออกไปสู่เซลล์เป้าหมายได้ Nitric oxide มี half life สั้นมากเพียง 3-5 วินาทีเท่านั้น หลังจากนั้น ในภาวะที่มีออกซิเจนจะสลายตัวให้ nitrate (NO_3^-) และ nitrite (NO_2^-) ซึ่งคงตัวมากกว่า^(36,38,42)

ในปัจจุบันได้มีการศึกษาพบว่า nitric oxide มีบทบาทต่อหลายระบบในร่างกาย โดยเป็นสารสำคัญในการควบคุมแรงตึงตัวของหลอดเลือด ด้วยการทำให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือด (vasodilator) โดยทำหน้าที่เป็น paracrine hormone มีบทบาทในการควบคุม penile erection ทำให้หัวใจบีบตัวลดลง ในระบบประสาทมีความสำคัญต่อการเรียนรู้และการจดจำ รวมทั้งเป็น neurotransmitter ตัวหนึ่งในระบบประสาทส่วนปลาย นอกจากนี้ nitric oxide ยังเป็น cytotoxic และยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด (โดยทำงานเสริมฤทธิ์กันกับ PGI_2) รวมถึงสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบอีกด้วย^(43,44)

การสร้าง nitric oxide อาศัยการทำงานของ nitric oxide synthase enzyme family (NOS) ซึ่งมีด้วยกัน 3 isoforms คือ neuronal NOS (nNOS, NOS-1), inducible NOS (iNOS, NOS-2) และ endothelial NOS (eNOS, NOS-3) ซึ่งใน Endothelial cell จะพบ eNOS isoform⁽³⁶⁾ การกระตุ้น NOS ใน endothelial cell สามารถกระตุ้นได้โดย acetylcholine, bradykinin, serotonin, adenosine, histamine เป็นต้น⁽³⁹⁾ โดยการกระตุ้น NOS นั้นต้องอาศัย Ca^{2+} และ calmodulin ในขณะที่สารตั้งต้นในการสร้าง nitric oxide คือ guanido nitrogen atom ของ L-arginine โดยมี nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) เป็น co-substrate และมี tetrahydrobiopterin, flavin adenine dinucleotide (FAD), flavin mononucleotide (FMN) และ heme เป็น co-factors ได้ product คือ nitric oxide และ L-citrulline กระบวนการสังเคราะห์ nitric oxide สามารถสรุปได้ดังรูปที่ 6

Nitric oxide ที่สร้างขึ้นจะออกจากเซลล์ไปกระตุ้น Guanylate cyclase ที่กล้ามเนื้อเรียบให้มีการสร้าง 3',5'-Guanosine monophosphate (cGMP) เพิ่มมากขึ้น และทำให้ Ca^{2+} ภายในเซลล์ลดลง ส่งผลให้เกิดหลอดเลือดคลายตัวในที่สุด การสังเคราะห์ Nitric oxide สามารถยับยั้งได้โดย L-arginine analogue เช่น N^G -nitro-L-arginine โดยการแย่งจับกับ L-arginine⁽⁴⁰⁾



รูปที่ 6 แสดงการสังเคราะห์ Nitric oxide⁽⁴⁴⁾

Tumor necrosis factor (TNF)

มี 2 ชนิด คือ TNF- α และ TNF- β TNF- α ส่วนใหญ่สร้างโดย mononuclear phagocyte ที่จับกินสิ่งแปลกปลอม และ TNF- β ส่วนใหญ่สร้างโดย T-lymphocyte (ทั้งชนิด helper และ cytotoxic) ที่กระตุ้นด้วยแอนติเจนจำเพาะหรือไมโตเจน ฤทธิ์ของ TNF^(45,46) ได้แก่

- ส่งเสริมการเดินทางออกจากเส้นเลือดของเม็ดเลือดขาว โดยออกฤทธิ์กระตุ้น endothelial cell ที่บุผนังหลอดเลือดให้สร้าง adhesion molecule บนผิวเซลล์เพิ่มขึ้น ทำให้การเกาะติดระหว่างเซลล์ดังกล่าวกับ phagocyte หรือ lymphocyte เพิ่มขึ้น นั่นคือ TNF ส่งเสริมปฏิกิริยาการอักเสบ (inflammation)

- ส่งเสริม phagocytosis ของ polymorphonuclear cell ทั้งขั้นตอน ingestion, degranulation และ intracellular killing และส่งเสริมการสร้าง hydrogen peroxide ใน macrophage

- ทำให้การปรากฏตัวของแอนติเจน MHC ทั้ง class I และ class II เพิ่มขึ้น มีผลให้การทำหน้าที่ของ cytotoxic T lymphocyte และ helper T-lymphocyte ดีขึ้นตามลำดับ

- กระตุ้น mononuclear phagocyte, endothelial cell ฯลฯ ให้หลั่ง IL-1, IL-6, IL-8 และ TNF

- ทำลายเซลล์เนื้องอก ซึ่งทำลายได้ 2 วิธี วิธีหนึ่งคือ การชักนำให้เซลล์เนื้องอกสร้างสารบางอย่างซึ่งสามารถทำให้เซลล์เนื้องอกเองแตกสลาย ตัวอย่างของสารดังกล่าวได้แก่ protease, lysosomal enzyme, toxic free radical ส่วนอีกวิธีหนึ่งทำให้การทำหน้าที่ของ endothelial cell ในการควบคุม coagulation และ fibrinolysis เสียไป เป็นเหตุให้เกิด fibrin deposition ในเส้นเลือด และนำไปสู่ hemorrhagic necrosis ของเนื้องอก

- ทำให้เกิดอาการไข้ และมีการสร้าง acute phase protein

- ทำให้เกิดภาวะ cachexia ซึ่งเชื่อว่าเกิดจาก TNF ไปขัดขวางหน้าที่การทำงานของ lipoprotein lipase (LPL) และเอนไซม์อื่นๆ ใน adipose tissue ทำให้เก็บไขมันไว้ไม่ได้ และ TNF ทำให้ carbohydrate metabolism ใน monocyte เพิ่มขึ้น เป็นเหตุให้มีการใช้กลูโคสมากเกินไปจนพลังงานที่สะสมอยู่ในร่างกายหมดไป

- ทำให้เกิด toxic (septic) shock syndrome กลุ่มอาการนี้มักพบในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียกรัมลบในกระแสเลือด endotoxin หรือ lipopolysaccharide จากแบคทีเรียจะกระตุ้นให้มีการหลั่ง TNF ออกมาในปริมาณมาก TNF มีฤทธิ์ทำให้เส้นเลือดขยายตัวเป็นเหตุให้ความดันเลือดลดและปริมาณของเลือดที่ไปเลี้ยงเนื้อเยื่อต่างๆ ลดลง ฤทธิ์ต่อ endothelial cell ที่บุผนังหลอดเลือดทำให้เกิด intravascular coagulation และ hemorrhagic necrosis