บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

โรคท้องร่วงที่เกิดจากเชื้อ *E. coli* ในลูกสุกรระยะก่อนหย่านม นับว่าเป็นปัญหาสำคัญอย่างมาก และก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจต่ออุตสาหกรรมการผลิตสุกร จากปัญหาดังกล่าวทำให้มีการใช้ยาปฏิชีวนะเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจก่อให้เกิดปัญหาการดื้อยาของเชื้อโรคตามมา สำหรับแนวทางที่จะช่วยแก้ไขปัญหาได้อย่างยั่งยืน คือ การใช้องค์ความรู้ทางอณูพันธุศาสตร์เข้ามาช่วยในการคัดเลือกสุกรที่ต้านทานต่อโรคท้องร่วง ดังตัวอย่างที่ปรากฏความสำเร็จอย่างชัดเจนในการใช้เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอสำหรับการจำแนกยีนที่ต้านทานต่อโรคท้องร่วงของสุกรหลังหย่านม โดยการคัดเลือกสุกรที่มีลำดับเบสที่ตำแหน่ง 307 ของยีน Fucosyltransferase 1 (*FUT1*) เป็นอัลลีล A ทำให้สุกรมีลักษณะที่ต้านทานต่อการยึดเกาะของเชื้อ *E. coli* ที่เป็นสาเหตุของโรคท้องร่วงได้ (Meijerink *et al.*, 2000) ในการศึกษาครั้งนี้ต้องการค้นหายีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันระหว่างสุกรที่มีฟีโนไทป์ต้านทานและอ่อนแอต่อเชื้อ K88-*E. coli* ในลูกสุกรระยะก่อนหย่านม เพื่อใช้เป็นแนวทางในการศึกษายีนที่อาจจะมีความสัมพันธ์หรือควบคุมลักษณะดังกล่าว

5.1 การจำแนกฟีโนไทป์ที่ต้านทานและอ่อนแอต่อเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคท้องร่วงในลูกสุกรก่อนหย่านม

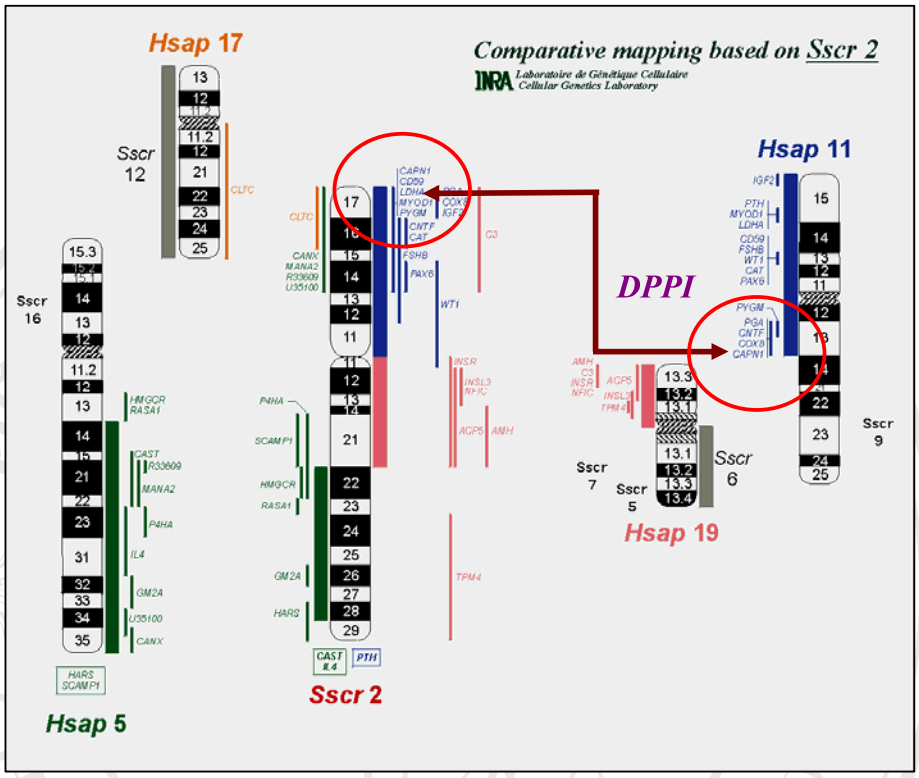
การเกิดโรคท้องร่วงในลูกสุกรก่อนหย่านมมีความสัมพันธ์กับการยึดเกาะของเชื้อ K88-*E. coli* กับตัวรับบน brush border ของผนังลำไส้ของลูกสุกร โดยสามารถแบ่งออกได้ 2 ลักษณะ คือ ฟีโนไทป์ที่ปรากฏตัวรับและไม่ปรากฏตัวรับบน brush border ของผนังลำไส้ โดยทำให้ลูกสุกรในระยะก่อนหย่านมมีความอ่อนแอหรือต้านทานต่อการยึดเกาะของเชื้อดังกล่าวได้ จากการศึกษาลักษณะฟีโนไทป์ในลูกสุกรระยะก่อนหย่านมด้วยวิธี adhesion test สามารถจำแนกลูกสุกรได้เป็น 2 กลุ่ม (ต้านทาน/อ่อนแอ) โดยมีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะประมาณ 32% และ 7% ในลูกสุกรสายพันธุ์ทางการค้า และลูกสุกรพันธุ์พื้นเมือง ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงาน ของ Baker *et al*. (1997) และ Sellwood *et al*. (1980) ที่ศึกษาการยึดเกาะของเชื้อ K88-*E. coli* กับ brush borderในลูกสุกรสายพันทางการค้าเปรียบเทียบกับลูกสุกรพันธุ์เมืองและพบว่าในลูกสุกรสายพันทางการค้ามีแนวโน้มการยึดเกาะของเชื้อกับตัวรับสูงกว่าลูกสุกรพันธุ์พื้นเมือง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

5.2 การจำแนกยีนที่ต้านทานหรืออ่อนแอต่อการยึดเกาะของเชื้อ *E.coli* ที่เป็นสาเหตุของโรคท้องร่วง

จากการทดลองพบว่าเทคนิค DDRT-PCR เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงในการศึกษาการแสดงของยีนที่แตกต่างกันในลูกสุกรระยะก่อนหย่านมที่มีลักษณะฟีโนไทป์ที่ต้านทานหรืออ่อนแอต่อการยึดเกาะของเชื้อ *E. coli* ที่เป็นสาเหตุของโรคท้องร่วง สอดคล้องกับการทดลองของ Xiao-Hong *et al*. (2004) ซึ่งใช้เทคนิค DDRT-PCR จำแนกยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะความต้านทานหรืออ่อนแอต่อโรคท้องร่วงจากม้ามของลูกสุกร และพบยีนที่แสดงออกแตกต่างในสุกรที่อ่อนแอ ได้แก่ *mammalian Nck adaptor protein 1* และ *human LINE-1 reverse transcriptase* อย่างไรก็ตามความต้านทานหรืออ่อนแอต่อเชื้อ K88-*E. coli* ขึ้นอยู่กับการเกาะเชื้อดังกล่าวกับตัวรับบนผนังลำไส้ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกเซลล์เป้าหมายเป็น brush border เพื่อวิเคราะห์หายีนที่แตกต่างกันในลูกสุกรที่มีฟีโนไทป์ต้านทานและอ่อนแอต่อเชื้อ K88-*E. coli* โดยพบ ESTs จำนวน 2 โคลน คือ PZP18B3 และ PZP24B2 มีความคล้ายคลึงกับยีน Dipeptidyl-peptidase I precursor (*DPPI*) และยีน S-Adenosylhomocysteine hydrolase (*AHCY*) ตามลำดับ โดยที่ ยีน *DPPI* หรืออีกชื่อหนึ่งเรียกว่า cathepsin C เป็น cysteine protease ในกลุ่มไลโซโซมที่มีคุณสมบัติในการตัดโมเลกุลของกรดอะมิโนสองตัวท้ายออกจากโปรตีนหรือสายเปปไทด์ได้ และไม่สามารถทำงานได้เมื่อสารตั้งต้นหรือกรดอะมิโนตัวท้ายอยู่ในสภาพอัดตัวกันแน่น ซึ่งทำให้เอนไซม์ไม่สามารถแยกส่วนที่เป็น imino nitrogen ของโปรลีน หรือ amino nitrogen ของไลซีนและอาร์จินีนออกจากกันได้ (Hsiung *et al*., 2005) ซึ่งสันนิษฐานได้ว่า ยีน DPPI มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการสร้างของโมเลกุลตัวรับที่มีคุณสมบัติเป็นไกลโคโปรตีน(Francis *et al*., 1998: Grange *et al*., 2002) โดยยีน *DPPI* มีผลต่อโปรตีนหรือเปปไทด์บางตัวที่อยู่บน brush border ของผนังลำไส้ ทำให้โปรตีนดังกล่าวมีคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการยึดเกาะของเชื้อ K88-*E. coli* ยีน *DPPI* ในคน ตั้งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 11q14.1-11q14.3 และจากการวิเคราะห์แผนที่ในเชิงเปรียบเทียบ (comparative mapping) ระหว่างคนและสุกร พบว่ายีน *DPPI* ในสุกรตั้งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 2 (ภาพ 23)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

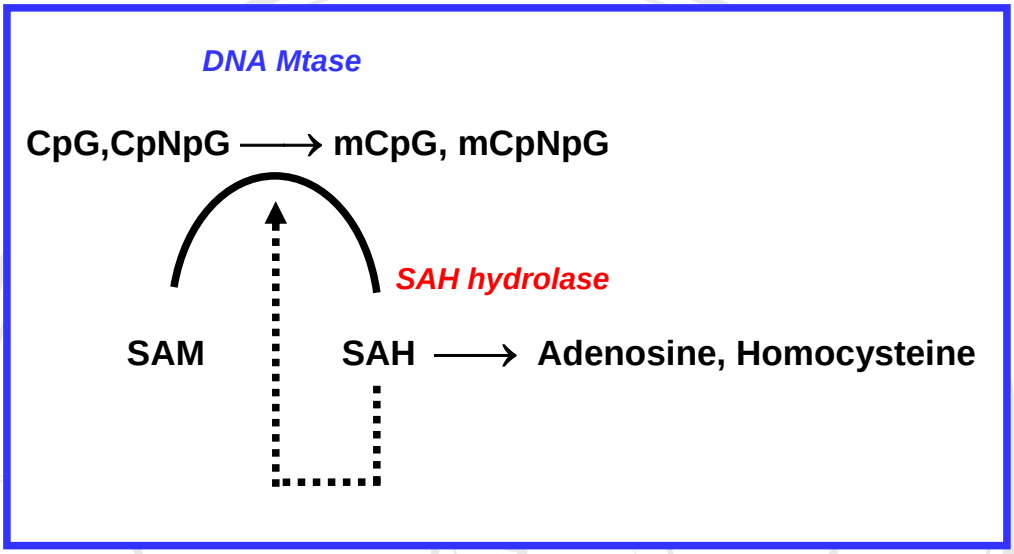


ภาพ 23 แสดง comparative mapping ของยีน *DPPI* หรือ *CAPN1* ของสุกรกับคน (ที่มา : http://www.toulouse.inra.fr/lgc/pig/compare/SSCHTML/SC12S .HTM)

ยีน *AHCY* ทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์ S-Adenosylhomocysteine hydrolase ที่เปลี่ยน S-adenosylhomocysteine (AdoHcy) ไปเป็น adenosine (Ado) และ L-homocysteine (Hcy) ด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส พบว่าหากเอนไซม์ *AHCY* ถูกยับยั้งการทำงาน จะทำให้ปริมาณของ AdoHcy ภายในเซลล์สูงมากเกินไปและมีผลย้อนกลับ (reverse effect) ทำให้ปริมาณของเอนไซม์ S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases เพิ่มขึ้น (ภาพ 24) ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ เช่น การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชั่น (DNA methylation) ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีนที่มีผลต่อการถอดรหัสของยีน (Yang *et al*., 2003) โดยทำให้เอนไซม์ RNA polymerase ไม่สามารถจดจำตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน ทำให้ไม่สามารถถอดและแปลรหัสไปเป็นโปรตีนเพื่อแสดงออกทาง ฟีโนไทป์ (Strathdee *et al*., 2004) ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าการลดระดับการแสดงออกของยีน *ACHY* ในสุกรที่มีฟีโนไทป์ต้านทานต่อโรคนั้นอาจมีผลต่อกระบวนการเมทิลเลชั่น (methylation) บริเวณโปรโมเตอร์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนที่เป็นตัวรับของเชื้อ K88-*E. coli* โดยทำให้สุกรขาดตัวรับและเป็นผลให้เกิดลักษณะ

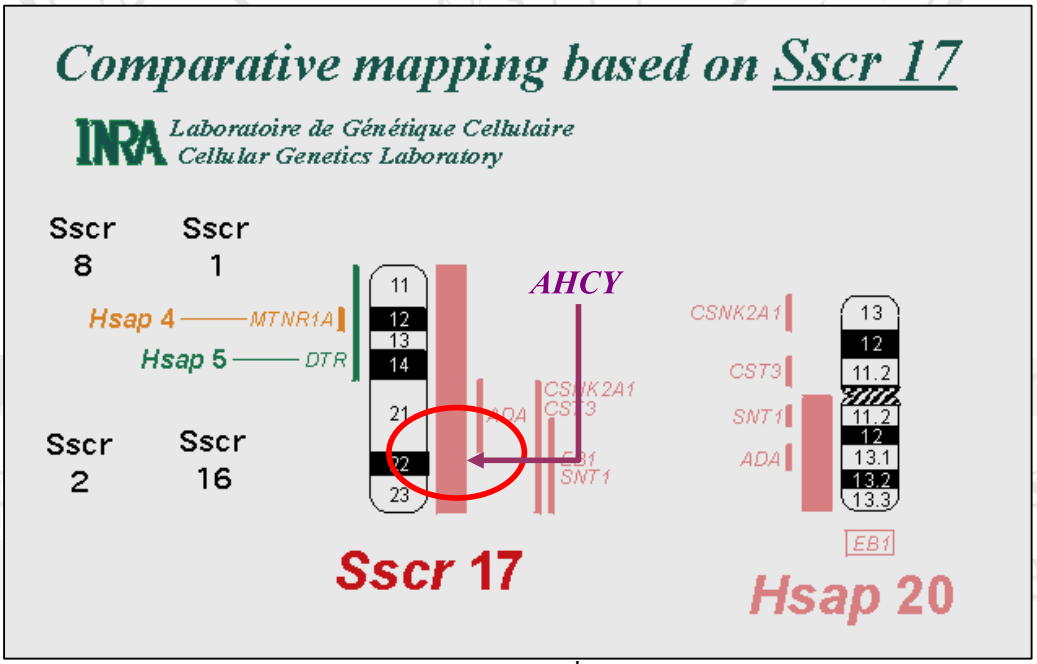
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ที่ต้านทานต่อโรคท้องร่วงขึ้น สำหรับตำแหน่งของยีน *ACHY* ในสุกรนั้นตั้งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 17q22 (ภาพ 25)



ภาพ 24 การทำงานของเอนไซม์ S-Adenosylhomocysteine hydrolase

(ดัดแปลงจาก Yang *et al*., 2003)



ภาพ 25 แสดงตำแหน่งของยีน *AHCY* บนโครโมโซมที่ 17 ของสุกร

(ที่มา : http://www.toulouse.inra.fr/lgc/pig/compare/SSCHTML/SSC17S .HTM)

จากการจำแนกยีนที่แสดงออกใน brush border ของลูกสุกรที่มีฟีโนไทป์ต้านทานและอ่อนแอต่อเชื้อ K88-*E. coli* พบเครื่องหมาย cDNA ที่อาจมีศักยภาพต่อการค้นหาสาเหตุที่แท้จริงของการอ่อนแอต่อเชื้อ K88-*E. coli* ที่เป็นสาเหตุของโรคท้องร่วงของลูกสุกรในระยะก่อนหย่านม อย่างไรก็ตาม ขั้นตอนต่อไปควรยืนยันการแสดงออกของยีนหรือ EST ดังกล่าวด้วย Quantitative real time PCR เพื่อใช้เป็น candidate gene สำหรับศึกษาลักษณะที่ต้านทานหรืออ่อนแอต่อโรคท้องร่วงในลูกสุกร นอกจากนี้การใช้เทคนิค microarray ซึ่งเป็นเทคนิคที่ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาข้อมูลการแสดงออกยีนในระดับจีโนม (Chen *et al*., 2004) เข้ามาประยุกต์ใช้ในการค้นหา candidate gene สำหรับความต้านทานหรืออ่อนแอต่อโรคท้องร่วงในลูกสุกรก่อนหย่านมจะช่วยให้ทราบข้อมูลรวมถึงกลไกการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องได้ชัดเจนขึ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved