

เชื้อมาลาเรีย: จีโนมิกส์ และ ชีวเคมี กับตำแหน่งเป้าหมายในการพัฒนายารักษาโรคมาลาเรีย

จิระพันธ์ กริ่งไกร *

สุดารัตน์ กริ่งไกร **

Krungkrai J, Krungkrai S. Malaria parasite: Genomics, biochemistry and drug target for antimalarial development. Chula Med J 2006 Feb; 50(2): 127 - 42

Malaria remains a global health problem attributed by its major cause of morbidity and mortality in developing and tropical countries. Of these, 400-500 million people are infected with the parasite, and two million die each year. Plasmodium falciparum, the etiologic agent of the most lethal and severe form of the four species that infect humans, is resistant to most of the currently available antimalarial drugs. The need of more efficacious agents — particularly rational drugs that exploit metabolic pathways and targets unique to the malaria parasite — is therefore urgent. The basic knowledge of the current genomics and biochemistry of the parasite are essential to the design and development of new antimalarial drugs. This paper reviews the most recent information on P. falciparum genomics and metabolomics, and will apply the data for drug development, and also identify the molecular targets of the drug.

Keywords: Malaria, Plasmodium falciparum, Genomics, Biochemistry, Drug target, Antimalarial drug.

Reprint request: Krungkrai J. Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand. E-mail: fmedjkk@md2.md.chula.ac.th.

Received for publication. September 30, 2005.

* ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต

จิระพันธ์ กริ่งไกร, สุदारัตน์ กริ่งไกร. เชื้อมาลาเรีย: จีโนมิคส์ และ ชีวเคมี กับตำแหน่งเป้าหมายในการพัฒนายารักษาโรคมาลาเรีย. จุฬาลงกรณ์เวชสาร 2549 ก.พ; 50(2): 127 - 42

มาลาเรียเป็นโรคที่มีอุบัติการณ์ และอัตราการเสียชีวิตสูงในประชากรตามภูมิภาคร้อนชื้นทั่วโลก มีการติดเชื้อมาลาเรียประมาณ 400-500 ล้านคน และเสียชีวิตด้วยโรคนี้ประมาณ 2 ล้านคนต่อปี ปัญหาที่สำคัญในการรักษาคือ เชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum* มีการดื้อต่อยารักษาที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน จึงมีความจำเป็นในการพัฒนายาชนิดใหม่โดยอาศัยองค์ความรู้เกี่ยวกับข้อมูลจีโนมิกส์ และชีวเคมีของเชื้อมาลาเรีย บทความนี้จะสรุปความรู้ก้าวหน้าของจีโนมิกส์ และการนำองค์ความรู้ดังกล่าวของเชื้อที่มีอยู่ในขณะนี้ไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนายาชนิดใหม่ รวมทั้งจะแสดงตำแหน่งโมเลกุลเป้าหมายในวิถีเมตาบอลิซึมต่าง ๆ ที่คาดว่าจะได้ยาชนิดใหม่ไปยับยั้งที่ตำแหน่งเหล่านี้ได้และไปทำลายเชื้อมาลาเรียที่มีการดื้อต่อยาได้

คำสำคัญ : เชื้อมาลาเรีย, *Plasmodium falciparum*, จีโนมิกส์, ชีวเคมี, ตำแหน่งเป้าหมายของยา, ยารักษาโรคมาลาเรีย

วัตถุประสงค์ :

1. เพื่อให้ทราบความรู้ความก้าวหน้าด้านจีโนมิกส์ของเชื้อมาลาเรียที่ทำให้เกิดโรคในคน
2. เพื่อให้เข้าใจถึงความรู้พื้นฐานชีวเคมีของเชื้อมาลาเรีย
3. เพื่อให้ทราบตำแหน่งเป้าหมายใหม่ในการพัฒนายารักษาโรคมาลาเรียในอนาคต
4. เพื่อให้เข้าใจแนวทางในการพัฒนายารักษาโรคมาลาเรีย โดยอาศัยความรู้ด้านจีโนมิกส์และชีวเคมีของเชื้อมาลาเรีย

มาลาเรียเป็นโรคที่มีอุบัติการณ์และอัตราการเสียชีวิตสูงในประชากรตามภูมิภาคที่มีอากาศร้อนชื้นทั่วโลก รองจากการติดเชื้อนิวโมเนีย (pneumococcal acute respiratory infections) และวัณโรค (tuberculosis) จากข้อมูลขององค์การอนามัยโลก⁽¹⁾ พบว่ามีการติดเชื้อมาลาเรียประมาณ 400-500 ล้านคนในแต่ละปี และเสียชีวิตด้วยโรคนี้ประมาณ 2 ล้านคนต่อปี โดยมีสาเหตุจากการติดเชื้อ *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* หรือ *Plasmodium ovale* ชนิดใดชนิดหนึ่งหรือ 2 ชนิดปนกัน^(2,3) สำหรับโรคนี้ในประเทศไทย จากสถิติปี 1998 ของกระทรวงสาธารณสุข พบว่ามีอัตราการติดเชื้อประมาณ 100 ราย และการเสียชีวิตประมาณ 1.26 รายต่อประชากร 1 แสนคน⁽⁴⁾

การติดเชื้อชนิด *P. falciparum* ทำให้เกิดโรคมาลาเรียชนิดรุนแรง (severe malaria) ผู้ป่วยบางรายอาจเป็นมาลาเรียขั้นสมอง (cerebral malaria) มีอาการแทรกซ้อนที่รุนแรง อาทิเช่น ภาวะเลือดจางรุนแรง (severe

anemia) ไตวาย (renal failure) ปอดบวมน้ำ (pulmonary edema) ระดับน้ำตาลในเลือดต่ำ (hypoglycemia) มีเลือดออก (bleeding) ชักรุนแรง (repeated generalized convulsion) ภาวะกรดสูง (acidemia/acidosis) และ บัสสาวะสีดํา (malaria hemoglobinuria) เป็นต้น ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้⁽⁵⁾ ปัญหาที่สำคัญในการรักษาคือ เชื้อมาลาเรีย ดังกล่าวมีการดื้อต่อยารักษาที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน รวมทั้งยาหลายชนิดมีข้อจำกัดในการใช้ อาทิเช่น ความเป็นพิษ คุณภาพไม่ดี และราคาแพง เป็นต้น (ตารางที่ 1) ในช่วงปี 1975-1997 ได้มีการพัฒนายาทั่ว ๆ ไปถึง 1,223 ชนิด แต่มียาใหม่นำมาใช้สำหรับรักษาโรคมาลาเรียเพียง 3 ชนิดคือ halofantrine, mefloquine และ malarone และในระยะ 3-4 ปีที่ผ่านมา ได้มีความพยายามมากขึ้นของหลายองค์กรที่ให้ทุนสำหรับการพัฒนายารักษาโรคมาลาเรียชนิดใหม่ โดยอาศัยองค์ความรู้เกี่ยวกับข้อมูลจีโนมิกส์ (genomics) และชีวเคมีของเชื้อมาลาเรียมาใช้

Table 1. Overview of antimalarial drugs.

Drug	Target	Main limitation ¹
Chloroquine	food vacuole	resistance
Quinine	not known	compliance/safety/resistance
Amodiaquine	not known	safety/resistance
Mefloquine	not known	(safety)/resistance/(cost)
Primaquine	not known	safety
Halofantrine	not known	safety/resistance/cost
Artemisinin (artemether, arteether, artesunate)	food vacuole	compliance/(safety)/(GMP) ² /(cost)
Sulfadoxine-pyrimethamine (Fansidar ^R)	folate pathway (DHPS-DHFR) ³	resistance
Atovaquone-proguanil (Malarone ^R)	mitochondrion-folate	resistance / potential/cost
Lumefantrine-artemether (Coartem ^R)	not known-food vacuole	(compliance)/resistance/potential(cost)
Antibiotics used in combination	apicoplast	(safety)/(cost)

¹ Liabilities placed in brackets refer to issues that are less serious for the drug in question than those liabilities not placed in brackets.

² GMP= good manufacture practice.

³ DHPS-DHFR= dihydropteroate synthase-dihydrofolate reductase .

ในปัจจุบัน Malaria Genome Project สำหรับเชื้อ *P. falciparum* ได้สำเร็จลงแล้ว^(6,7) และใกล้จะสำเร็จแล้วสำหรับเชื้อ *P. yoelii* ที่ติดเชื้อเฉพาะในหนูถีบจักร⁽⁸⁾ ส่วนข้อมูลสำหรับเชื้อ *P. vivax* คาดว่าจะสำเร็จเร็ว ๆ นี้⁽⁹⁾ ข้อมูลจีโนมิกส์ ที่ได้ดังกล่าวทำให้ความรู้พื้นฐานด้านชีวเคมีของเชื้อ *P. falciparum* มีความกระจ่างชัดขึ้นถึงแม้จะต้องรอการศึกษาต่อไปอีกในยุคหลังจีโนมิกส์ (post-genomics era) ซึ่งเป็นการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับหน้าที่การทำงานของ genome เหล่านี้ อาทิเช่น gene knockout, transcriptomics, DNA microarrays, RNA interference, proteomics, metabolomics เป็นต้น เพื่อให้ข้อมูลพื้นฐานมีความสมบูรณ์ขึ้นและประยุกต์ใช้งานได้

บทความนี้จะเน้นการนำองค์ความรู้ทางจีโนมิกส์และชีวเคมีของเชื้อไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนายารักษา มาลาเรียชนิดใหม่ได้ และจะยกตัวอย่างตำแหน่งโมเลกุลเป้าหมาย (molecular drug targets) ในวิถีเมตาบอลิซึมต่าง ๆ ที่คาดว่าจะได้ยาใหม่ไปยับยั้งที่ตำแหน่งเหล่านี้ได้ และไปทำลายเชื้อมาลาเรียที่มีการติดต่อมาได้ในที่สุด

จีโนมิกส์และชีวเคมีของเชื้อมาลาเรีย

(Genomics and biochemistry of malaria parasite)

ตั้งแต่ปี 1996 The Institute for Genomic Research, The Wellcome Trust Sanger Institute และ Stanford Genome Technology Center ได้ร่วมกันทำ

Table 2. Malaria parasites have three genomes: one chromosomal and two organellar genomes.

Genome	Size	Numbers of		
		Genes&protein	RNA genes	Protein targeting
Chromosomal DNAs	2.28 Mb	5,268	43	4,471 (cytosol/membrane)
Chromosome 1	0.64 Mb	143	0	ND ¹
2	0.95 Mb	223	1	ND
3	1.06 Mb	239	2	ND
4	1.20 Mb	237	5	ND
5	1.34 Mb	312	5	ND
6	1.38 Mb	312	3	ND
7	1.35 Mb	277	7	ND
8	1.32 Mb	295	0	ND
9	1.54 Mb	365	0	ND
10	1.69 Mb	403	0	ND
11	2.04 Mb	492	2	ND
12	2.27 Mb	526	3	ND
13	2.75 Mb	672	5	ND
14	3.29 Mb	769	2	ND
Extrachromosomal (organellar) DNAs				
Mitochondrial DNA	6 kb ²	3		246
Apicoplast DNA	35 kb ³	30		551

¹ND= not determined.

² linear DNA with A+T = 69 %

³ circular DNA with A+T= 86 %

Malaria Genome Project โดยมีจุดมุ่งหมายในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ genome ในเชื้อ *P. falciparum* ซึ่งมี chromosomes อยู่ทั้งสิ้น 14 คู่ที่เรียงขนาดจากเล็กไปใหญ่ (chromosome 1 มีขนาด 0.64 Mb → chromosome 14 มีขนาด 3.29 Mb) โดยอาศัยความช่วยเหลือจากบริษัท Cerela Genomics ในการจัดเรียงลำดับของแต่ละ gene ลงบนแต่ละ chromosome และกำหนดว่าเป็น gene ที่ code สำหรับ protein และ gene สำหรับ RNA อะไรบ้าง รวมทั้งไปทำหน้าที่ที่ไหนบ้าง (protein targeting) อาทิ เช่น ไซโตซอล (cytosol) เยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ไมโทคอนเดรีย (mitochondria) หรือ apicoplast (ตารางที่ 2) เชื้อ *P. falciparum* genome มีประมาณ 5,300 genes (ทั้ง nuclear genomes และ extrachromosomal genomes ซึ่งก็ได้แก่ genome ใน mitochondria และ apicoplast) และได้ประกาศความสำเร็จเมื่อเดือนตุลาคม ปี 2002 ที่ผ่านมานี้⁽⁶⁾

Genome ของเชื้อ *P. falciparum* มีลักษณะสำคัญต่าง ๆ ได้นำมาเปรียบเทียบกับ genomes ของ *P. vivax*, ยุงพาหะ *Anopheles* spp. รวมทั้งของ

มนุษย์^(6, 10-14) นอกจากนี้เชื้อมาลาเรียยังมี genome อันที่ 2 อยู่ที่ออร์กาเนล ไมโทคอนเดรีย ซึ่งมีขนาด 6 kb และเป็นเส้นตรง (linear DNA) จะมี genes เพียง 3 ชนิด และมี genome อันที่ 3 อยู่ที่ออร์กาเนล apicoplast ซึ่งมีขนาด 35 kb และเป็นวงกลม (circular DNA) จะมี genes ประมาณ 30 ชนิด (ตารางที่ 3) ออร์กาเนลไมโทคอนเดรีย และ apicoplast มีระบบ transcription และ translation เป็นแบบเซลล์โพรคาริโอต (prokaryotic cell) และแบคทีเรีย จึงเป็นตำแหน่งเป้าหมายของยา antibiotics (ตารางที่ 1) ขณะนี้ยังได้ใช้ประโยชน์ของ 6kb-DNA จากไมโทคอนเดรีย บอกถึงการวิวัฒนาการซึ่งเชื่อว่า *P. falciparum* แยกมาจาก *P. reichenowi* ของลิงชิมแปนซีเมื่อประมาณ 5 -10 ล้านปีก่อน และมีจุดกำเนิดที่ทวีปแอฟริกา และกระจายไปสู่ภูมิภาคต่าง ๆ ทั่วโลกเมื่อประมาณ 5 หมื่นปีที่ผ่านมานี้⁽¹⁵⁾ ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลการวิเคราะห์ single nucleotide polymorphisms (SNPs) บน chromosome 3 ที่บอกจุดกำเนิดของ *P. falciparum* ว่ามีอายุ ประมาณ 1 แสนปีกว่า⁽¹⁶⁾

Table 3. Unique characteristics of genomes in *P. falciparum*, *P. vivax*, *Anopheles* spp. and human.

Characteristic	<i>P. falciparum</i> ¹	<i>P. vivax</i>	<i>Anopheles</i>	Human
Size (Mb)	23	24	280	2,900
(A+T) content (%)	81	60	ND ²	59
Number of genes	5,268	5,126	15,000	31,000
Hypothetical protein (%)	60	ND	ND	ND
Gene density (kb per gene)	4.3	4.4	ND	ND
Genes with introns (%)	54	ND	ND	>90
Percent coding	53	ND	ND	<5
Number of exons per gene	2.4	ND	ND	ND
Microsatellites frequency	++	+	ND	++++
SNPs (site)	10,000 ³	ND	400,000	1,420,000

¹ Comparative genomics of *P. falciparum* and *Arabidopsis thaliana* shows the most similarity.^(6, 12)

² ND= not determined.

³ SNPs (single nucleotide polymorphisms) of *P. falciparum* is only determined in chromosome 3 (~403 sites), the value is based on our calculation for all 14 chromosomes, assuming 1 SNP site per 2.3 kb).

ในการศึกษาชีวเคมีของเชื้อ *P. falciparum* ในขณะนี้ทราบว่าโปรตีนที่ทำหน้าที่ต่าง ๆ แล้ว 39% ของจำนวนโปรตีนทั้งหมด อาทิเช่น structural proteins, cell adhesion, chaperone, defense/immunity, carrier, transporter, โปรตีนควบคุมกระบวนการ transcription และ translation และเอนไซม์ เป็นต้น (ตารางที่ 4) มีโปรตีนที่คาดไว้แต่ยังไม่ทราบหน้าที่อีก 61 % ของจำนวนโปรตีน นอกจากนี้ยังได้มีการจัดทำ website metabolomics ของ metabolic pathways ต่าง ๆ ของเชื้อ *P. falciparum* ⁽¹⁷⁾ โดยใช้แผนที่ภาพของ Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway ⁽¹⁸⁾ และความรู้จากการศึกษาทางชีวเคมีในช่วง 30-40 ปีที่ผ่านมา รวมทั้งข้อมูลจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ใน Malaria Genome Project ^(6,8,9) สามารถเชื่อมโยงฐานข้อมูลต่าง ๆ เช่น Entrez, Swiss-protein database, KEGG เป็นต้น

ภาพรวมเมตาบอลิซึมของเชื้อมาลาเรีย

(Overview of malaria parasite metabolism)

ข้อมูลทันสมัยจาก Malaria Genome Project พบว่า เชื้อ *P. falciparum* มีเอนไซม์ 733 ชนิด (ประมาณ 14 % ของจำนวนโปรตีนทั้งหมด 5,268 ชนิด, ตารางที่ 4)

สามารถสร้างวิถีเมตาบอลิซึม (metabolic pathways) ต่าง ๆ อาทิเช่น glycolysis, tricarboxylic acid cycle (Krebs cycle), electron transport pathway, pentose phosphate pathway, fatty acid biosynthetic pathway, heme biosynthetic pathway, coenzyme Q biosynthesis, shikimic acid pathway, amino acid metabolism, purine และ pyrimidine pathway, folate metabolism และ hemoglobin catabolic pathway (รูปที่ 1)

วิถีเมตาบอลิซึมเหล่านี้อาจถูกจัดแบ่งแยกเป็นส่วนต่าง ๆ ที่บางวิถีเมตาบอลิซึมไม่พบในเซลล์ของมนุษย์ อาทิเช่น ออร์แกเนลล์ apicoplast หรือบางวิถีเมตาบอลิซึม อาจพบได้ในเซลล์ของมนุษย์แต่มีลักษณะต่าง ๆ ของเอนไซม์ในวิถีนั้น ๆ แตกต่างไป เช่น การสลายน้ำตาลกลูโคส จะเป็นแบบไม่ใช้ O_2 (anaerobic glycolysis) หรือบางวิถีเมตาบอลิซึมมีความเหมือนกันกับวิถีที่พบในเซลล์แบคทีเรีย อาทิเช่นวิถีการสังเคราะห์โคเอนไซม์โฟเลต ซึ่งใช้เป็นตำแหน่งเป้าหมายของยารักษามาลาเรียกลุ่ม antifolates ตัวอย่างเช่น pyrimethamine, cycloguanil, sulfonamides เป็นต้น ความรู้ความเข้าใจลักษณะที่เป็นเอกลักษณ์จำเพาะของวิถีเมตาบอลิซึมเหล่านี้ที่พบได้ในเชื้อ *P. falciparum* โดยเฉพาะเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยา

Table 4. Possibly molecular functions predicted from *P. falciparum* genomics.

Function	% of total protein
Structural molecule	3
Cell adhesion molecule	2
Chaperone	2
Defense/Immunity protein	2
Enzyme	14
Enzyme regulator	1
Ligand binding or carrier	10
Transporter	2
Transcription regulator	1
Translation regulator	1
Other	1
No assignment	61

จำเพาะอาจจะเป็นตำแหน่งโมเลกุลเป้าหมาย สำหรับการพัฒนายารักษามาลาเรียชนิดใหม่ รวมทั้งเป็นเอนไซม์ ตำแหน่งเป้าหมายของยารักษาที่ใช้ในปัจจุบันได้ (รูปที่ 2) เมื่อปี 2002 Robert Ridley ผู้เชี่ยวชาญของ องค์การอนามัยโลกได้สรุปตำแหน่งเป้าหมายไว้ในวิถี

เมตาบอลิซึมต่าง ๆ ที่พบทั้งในสโตนไซโตซอล ถุงอาหาร (food vacuole) ไมโตคอนเดรีย apicoplast รวมทั้งเยื่อหุ้มเซลล์ โดยอาศัยองค์ความรู้เกี่ยวกับชีวเคมีของเชื้อมาลาเรียและแนวทางการพัฒนายารักษามาลาเรียชนิดใหม่ (19)

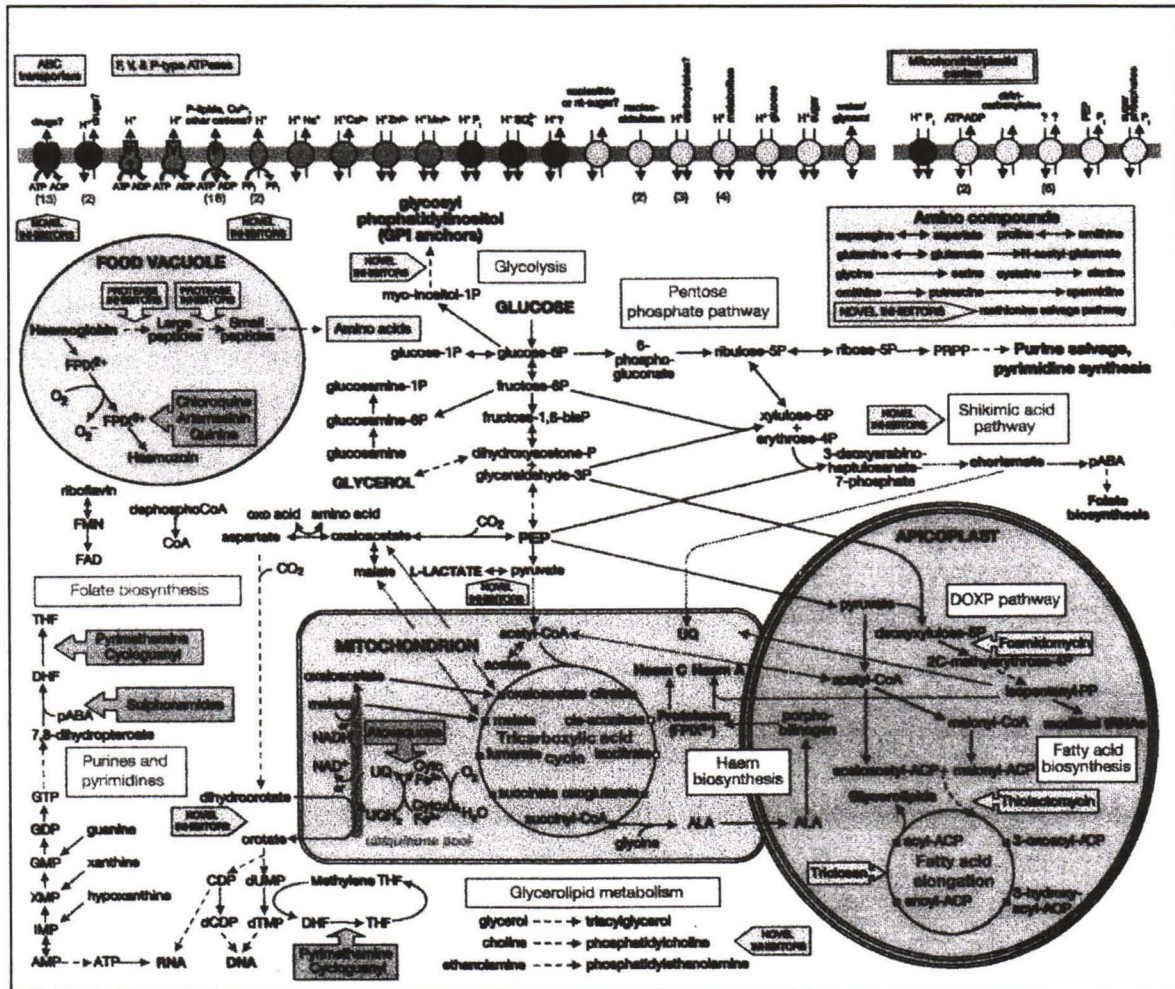


Figure 1. Overview of metabolism in *P. falciparum*. Glucose and glycerol are carbon sources. Broken lines indicate several omitted steps of a metabolic pathway. In various metabolic pathways, anaerobic glycolysis to generate ATP operates in cytosol, Krebs cycle exists in a mitochondrion and operates only in sexual gametocytes but not in asexual stages, heme and fatty acid synthesis operate in apicoplast, hemoglobin catabolic pathway operates in food vacuole. The known antimalarial drug targets are also illustrated (Ref. 6).

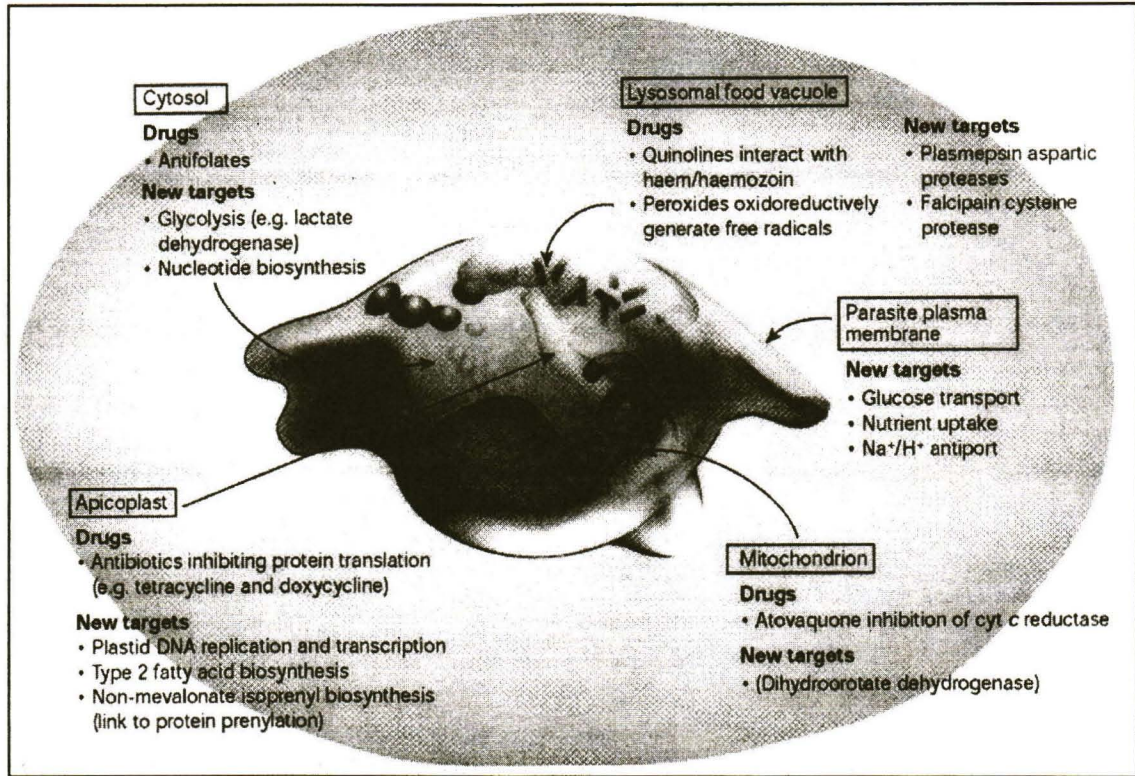


Figure 2. Growing trophozoite stage of *P. falciparum* in a human red cell. The organellar (mitochondrion, apicoplast, food vacuole) and cytosolic metabolic pathways are possible targets for new antimalarial development. Lists of about 20 enzymes in the pathways are also proposed (Ref. 19).

เมตาบอลิซึมของโคเอนไซม์โฟเลต (Metabolism of coenzyme folate)

โคเอนไซม์โฟเลตทำหน้าที่เป็นตัวให้และ/หรือตัวรับหน่วยคาร์บอนในปฏิกิริยาต่าง ๆ ในวิถีเมตาบอลิซึมของเพียวรีน, ไพริมิดีน, กรดอะมิโน รวมทั้งในขั้นตอนแรกๆของการสังเคราะห์โปรตีน เชื้อมาลาเรียจะสังเคราะห์โฟเลตขึ้นใช้เองโดยเริ่มจากสารตั้งต้น guanosine 5'-triphosphate (GTP) เหมือนกับในเซลล์แบคทีเรียที่เป็น *de novo* pathway ในขณะที่เซลล์ของมนุษย์ไม่สามารถสังเคราะห์ได้เอง⁽²⁰⁾ นอกจากนี้เขี่ยยังมี shikimic acid pathway ที่จะสังเคราะห์ p-aminobenzoic acid (pABA) ให้กับวิถีสังเคราะห์โฟเลตด้วย⁽²²⁾ ขณะนี้พบว่ามี gene สำหรับเอนไซม์ในวิถีโฟเลตครบยกเว้น dihydroneopterin aldolase ที่ยังตรวจสอบไม่ได้⁽²³⁾ ในวิถีนี้มีเอนไซม์

dihydropteroate synthase (DHPS) เป็นตำแหน่งเป้าหมายของยา sulfonamides และเอนไซม์ dihydrofolate reductase (DHFR) เป็นตำแหน่งเป้าหมายของยา pyrimethamine และ cycloguanil การเกิดผ่าเหล่าของ genes ที่ให้เอนไซม์ทั้ง 2 ทำให้มีการสังเคราะห์เอนไซม์ที่ผิดปกติบริเวณ active site จะไม่สามารถจับกับยาดังกล่าวได้ดี เกิดมีภาวะการดื้อยาของเชื้อที่พบได้ในทุกภูมิภาคของโลกที่มีการระบาดของมาลาเรีย⁽²¹⁾

เมตาบอลิซึมของเพียวรีนและไพริมิดีน (Metabolism of purine and pyrimidine)

วิถีการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ของทั้งเพียวรีนและไพริมิดีน เป็นตำแหน่งเป้าหมายในการพัฒนาการรักษา มาลาเรียกลุ่มใหม่ (รูปที่ 1 และ 2) เชื้อมาลาเรียจะ

สังเคราะห์เพียวรีนนิวคลีโอไทด์โดยอาศัยการดึงเบสมาจากเซลล์เจ้าบ้าน (salvage pathway) และไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นได้เอง ซึ่งต่างจากเซลล์ของมนุษย์ ดังนั้นถ้ายับยั้งเอนไซม์ในการดึงเบสมาใช้ จะสามารถฆ่าเชื้อมาลาเรียได้ เอนไซม์ที่มีการศึกษากันมากคือ purine nucleoside phosphorylase (PNP) และ hypoxanthine guanine xanthine phosphoribosyltransferase (HGXPRT) เอนไซม์ PNP จะเร่งปฏิกิริยา phosphorolysis ของ inosine ให้ hypoxanthine จากนั้นเอนไซม์ HGXPRT จะเติมหมู่ ribosyl phosphate ให้ hypoxanthine, xanthine หรือ guanine ได้เป็น inosine 5'-monophosphate (IMP), xanthosine 5'-monophosphate (XMP) และ guanosine 5'-monophosphate (GMP) ตามลำดับที่ต่างจากเอนไซม์นี้ของมนุษย์ (รูปที่ 1) genes ของทั้งเอนไซม์ HGXPRT และ PNP ของเชื้อ *P. falciparum* ได้ถูกโคลนและแสดงออกได้ในเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จึงทำให้มีการศึกษาถึงสารยับยั้งที่มีโครงสร้างเหมือนกับ transition state ของเอนไซม์ทั้ง 2 ได้ คือ สาร immucillin GP⁽²⁴⁾ และสาร immucillin G^(25, 26) โดยอาศัยโครงสร้าง 3 มิติที่ได้จาก x-ray crystallography ของเอนไซม์ HGXPRT ในเชื้อ *P. falciparum*⁽²⁷⁾ สาร immucillin G จับกับเอนไซม์ PNP ของเชื้อ (K_d เท่ากับ 0.03 nM) ได้ดีกว่าเอนไซม์ของมนุษย์ถึง 30 เท่า และมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อมาลาเรียได้ที่ IC_{50} (ระดับความเข้มข้นที่ทำให้เชื้อตายไปครึ่งหนึ่ง) เท่ากับ 50 nM⁽²⁶⁾ ส่วนสาร immucillin GP และสาร immucillin HP ซึ่งมีหมู่ฟอสเฟตที่ปลาย 5' ของน้ำตาลไรโบส จับกับเอนไซม์ HGXPRT ของเชื้อและเอนไซม์ HGPRRT ของมนุษย์ได้ดีพอ ๆ กัน และไม่มีรายงานการทดสอบฤทธิ์ฆ่าเชื้อมาลาเรียของสารทั้งสอง^(24, 27)

เชื้อ *P. falciparum* สามารถสังเคราะห์ไพริมิดีนนิวคลีโอไทด์ได้เอง (de novo) และไม่ใช้การดึงไพริมิดีนจากเซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งแตกต่างไปจากเซลล์ของมนุษย์⁽²⁸⁾ ดังนั้นถ้ายับยั้งเอนไซม์ในการสังเคราะห์ดังกล่าว ก็จะสามารถฆ่าเชื้อมาลาเรียได้โดยไม่ทำอันตรายต่อเซลล์ของมนุษย์ กลุ่มวิจัยของเราได้ศึกษาเอนไซม์ในวิถีการ

สังเคราะห์ไพริมิดีนอย่างต่อเนื่อง เอนไซม์ dihydroorotate dehydrogenase (DHOD) ของเชื้อมีความแตกต่าง โดยเฉพาะที่ active site จากเอนไซม์ของมนุษย์ และเป็นตำแหน่งเป้าหมายใหม่ที่จะใช้พัฒนายารักษา มาลาเรีย⁽²⁸⁻³¹⁾

เมตาบอลิซึมของการย่อยสลายฮีโมโกลบิน (Metabolism of hemoglobin breakdown)

เชื้อ *P. falciparum* มีความสามารถอย่างจำกัด ในการสังเคราะห์กรดอะมิโนขึ้นเอง ถึงแม้ว่าจะมี shikimic acid pathway ช่วยสังเคราะห์กรดอะมิโนชนิด aromatic ได้บ้าง รวมทั้งมีความสามารถในการเปลี่ยนกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ กลับไปมาได้บ้าง (รูปที่ 1) เป็นผลทำให้เชื้อ มีการดึงกรดอะมิโนเกือบทั้งหมดมาใช้โดยตรงจากเซลล์เจ้าบ้านหรือการสลายฮีโมโกลบินของเม็ดเลือดแดงที่ถูกกินเข้าไปในถุงอาหารของตัวเชื้อ (ประมาณ 60 -70 % ของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง) เพื่อให้ได้กรดอะมิโนไปใช้ในวิถีเมตาบอลิซึมต่าง ๆ และฮีโมที่สร้างขึ้นอาจเป็นที่จับของยา chloroquine รวมทั้งยาสมุนไพรจีน artemisinin และอนุพันธ์ของมัน ในระหว่างปี 1988-1990 Daniel Goldberg และคณะ⁽³²⁾ ได้เริ่มศึกษากระบวนการสลายโกลบินในถุงอาหารของเชื้อ *P. falciparum* และค้นพบวิถีการสลายโกลบินที่จัดเป็นระเบียบโดยอาศัยเอนไซม์ที่เป็น acidic proteases หลายชนิดทั้งที่เป็น aspartate proteases เรียกชื่อเฉพาะว่า "plasmepsin" I, II, IV และ cysteine proteases ซึ่งเรียกว่า "falcipains"⁽³³⁾

เอนไซม์ plasmepsin I (PM I) จะสลายโกลบินสลายแอลฟา ก่อนที่จำเพาะตำแหน่งเดียว จากนั้น PM II, PM IV, falcipains, facilylins จะสลายให้โกลบินเส้นสั้น ๆ แล้วจึงถูกเอนไซม์อื่น ๆ เช่น aminopeptidases สลายต่อให้กรดอะมิโนอิสระ โครงสร้างของเอนไซม์ PM II ของเชื้อมาลาเรียถือเป็นโครงสร้างแรกของเอนไซม์ในเชื้อที่มีการค้นพบ^(34, 35) เอนไซม์ PM II เป็นตำแหน่งเป้าหมายใหม่ในการพัฒนายารักษา มาลาเรีย⁽³⁶⁻³⁸⁾ โดยจะมีบริเวณ active site ต่างจากเอนไซม์ aspartate

proteases ของมนุษย์เช่น pepsin, cathepsin D เป็นต้น สารยับยั้งที่จับเอนไซม์ PM II ของเชื้อ (K_i เท่ากับ 0.07 μM) ได้ดีกว่าเอนไซม์ cathepsin ของมนุษย์ประมาณ 22 เท่า สารยับยั้งดังกล่าวอาทิเช่น allophenylnorstatine KNI-727 มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ได้ที่ IC_{50} เท่ากับ 10 μM . (37, 38)

เมตาบอลิซึมของลิปิด (Metabolism of lipid)

เชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ไม่สามารถสังเคราะห์ cholesterol ได้เอง จะอาศัยดึงจากเซลล์เจ้าบ้านมาใช้ แต่มีความสามารถในการสังเคราะห์ phospholipids (PL) บางชนิดขึ้นได้เอง เช่น phosphati-

dylethanolamine (PE) และ phosphatidylcholine (PC) โดยผ่าน Kennedy pathway เหมือนกับในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ในเชื้อมาลาเรียพบว่าทั้ง PE และ PC จะเป็นส่วนประกอบส่วนใหญ่ถึง 90 % ของ PL ทั้งหมด สำหรับ phosphatidylserine (PS) ซึ่งเป็นส่วนประกอบประมาณ 5 % ของ PL จะถูกสังเคราะห์จากเอนไซม์ PS synthase (PSS) ที่มีคุณสมบัติเหมือนกับในเซลล์แบคทีเรีย นอกจากนี้ยังมีการเปลี่ยน serine ไปเป็น ethanolamine โดยเอนไซม์ serine decarboxylase (SDn) ที่ต่างไปจากเซลล์ของมนุษย์ (รูปที่ 3) สำหรับการสังเคราะห์ phosphatidylinositol (PI) ในเชื้อจะคล้ายกับในเซลล์ของมนุษย์ (39, 40)

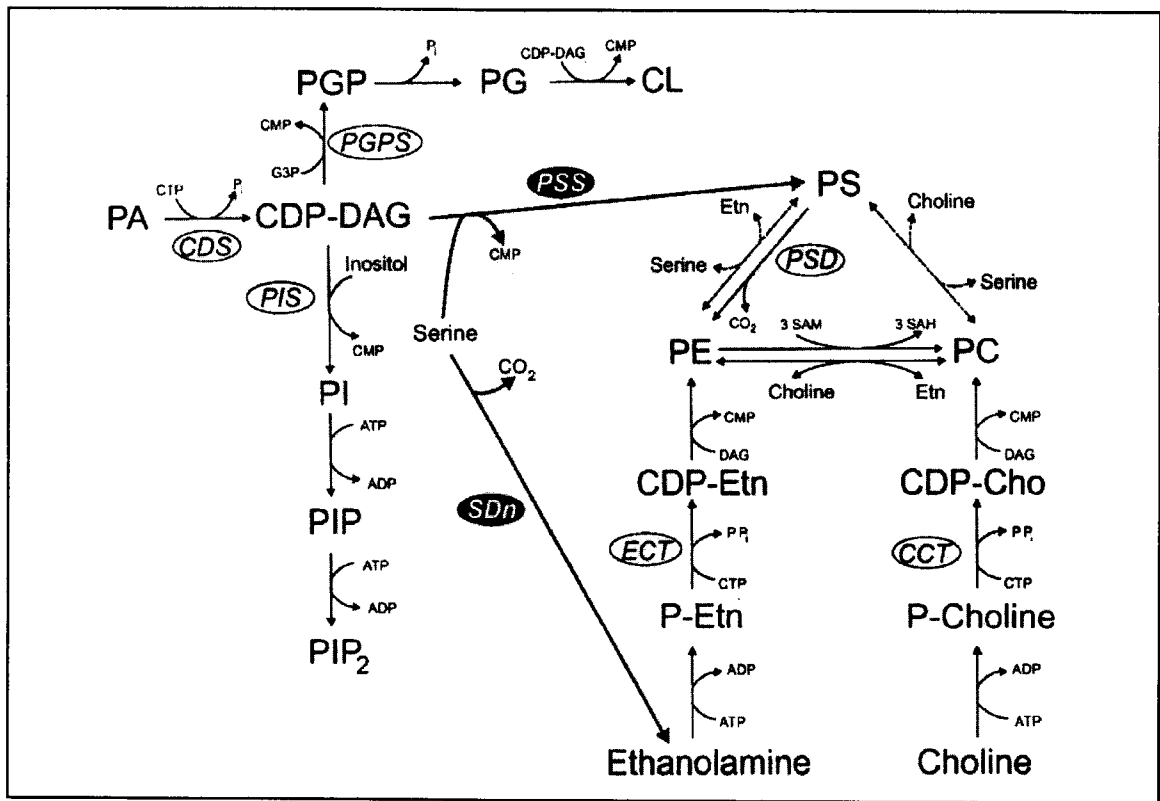


Figure 3. Biosynthesis of phospholipid (PL) in *P. falciparum*. Phosphatidylethanolamine (PE) and phosphatidylcholine (PC) synthetic reactions are typically Kennedy pathway. Bold lines indicate the reactions operating in the malaria parasite, but absence from human cell: CDP-DAG → PS and serine → ethanolamine. Broken lines show the reactions existing in human cell, but no significance in the malaria parasite. Most abbreviations are found in the text (Ref. 39).

เนื่องจากเชื้อมาลาเรียมี apicoplast ซึ่งเป็นออร์แกเนลล์ที่ได้จาก secondary endosymbiosis จาก algae ชนิดหนึ่งแต่ไม่สามารถทำหน้าที่สังเคราะห์แสงได้^(41, 42) ใน apicoplast มีการสังเคราะห์สาร isoprenoid เช่น isopentenyl diphosphate โดย deoxyxylulose 5-phosphate (DOXP) pathway ซึ่งเป็นแบบ non-mevalonate pathway (รูปที่ 1) โดยจะไม่พบ pathway แบบนี้ในเซลล์มนุษย์ สาร isoprenoid ดังกล่าวไปจับกับโปรตีนหลายชนิดเกิดกระบวนการ farnesylation ขึ้น DOXP

pathway ก็เป็นตำแหน่งเป้าหมายหนึ่งในการพัฒนายารักษา มาลาเรียกลุ่มใหม่ เช่น fosmidomycin (เป็น herbicide ชนิดหนึ่ง) ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 2-C-methyl-D-erythrose 4-phosphate synthase ในปฏิกิริยาการสังเคราะห์ methylerythrose phosphate จาก DOXP^(6, 19, 41, 42)

ออร์แกเนลล์ apicoplast ยังมีระบบการสังเคราะห์ mRNA และโปรตีนเป็นแบบของเซลล์แบคทีเรีย จึงเป็นตำแหน่งของยา antibiotics ที่ใช้ในการรักษาร่วมกับ

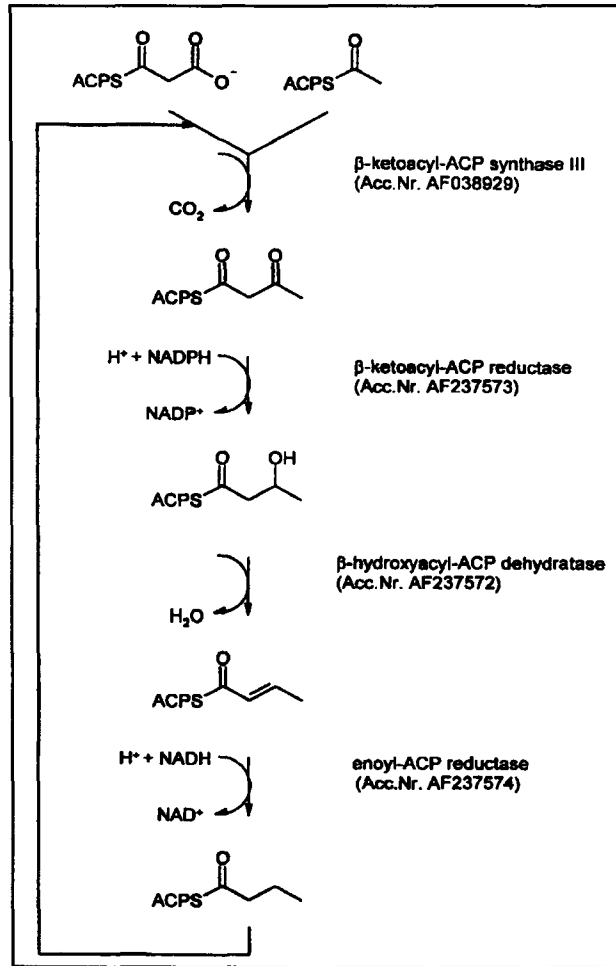


Figure 4. Four enzymatic steps in elongation of fatty acid biosynthesis in *P. falciparum*. The enzymes are shown with the GenBank database accession numbers (in brackets). Enzyme NADH-dependent enoyl-ACP reductase, catalyzes conversion of *trans*-2-enoyl-ACP into Acyl-ACP, serves as molecular drug target of antibacterial tricosan, Genz-8575 and Genz-10850.

ยารักษามาลาเรียตัวอื่น (quinine) ที่ใช้อยู่ อาทิเช่น tetracycline, doxycycline และ clindamycin เป็นต้น (ตารางที่ 1, รูปที่ 2) ^(41, 42) นอกจากนี้ apicoplast จะมีการสังเคราะห์กรดไขมันเป็นแบบที่ II ซึ่งต่างจากของสัตว์ทั่วไปและของมนุษย์ซึ่งเป็นแบบที่ I การสังเคราะห์กรดไขมันแบบที่ II จะพบได้ใน plastid ของพืช ใน algae และในเซลล์แบคทีเรีย เอนไซม์ในการสังเคราะห์กรดไขมันแบบที่ II นี้มีคุณสมบัติจำเพาะคือ เอนไซม์ทั้ง 7 ชนิดที่ใช้สำหรับการสังเคราะห์กรดไขมันจะไม่รวมกันเป็นกลุ่ม เอนไซม์ 7 ชนิดบนโปรตีนเดียวกัน (multifunctional single polypeptide) แตกต่างไปจากเอนไซม์นี้ ที่พบในแบบที่ I (รูปที่ 4)

เอนไซม์ NADH-dependent enoyl-ACP reductase ของเชื้อมาลาเรียเป็นตำแหน่งเป้าหมายโดยสาร tricosan (ซึ่งเป็นยาฆ่าเชื้อแบคทีเรียชนิดหนึ่ง) จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว โดยไปจับกับเอนไซม์ได้ดีที่ K_i ประมาณ $0.05 \mu\text{M}$ สามารถฆ่าเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ IC_{50} ในระดับ $0.7-1.5 \mu\text{M}$ ^(43, 44) และฆ่าเชื้อมาลาเรีย *P. berghei* ในหนูทดลองได้หมดที่ระดับ 38 mg/kg ⁽⁴⁴⁾ ได้มีการศึกษาโครงสร้าง 3 มิติของเอนไซม์จากเชื้อมาลาเรียแล้ว รวมทั้งสาร tricosan และสาร Genz-8575 และ Genz-10850 (ได้จากการทำ high-throughput screening) ที่ไปจับกับบริเวณ active site ^(43, 45) ความรู้ความเข้าใจดังกล่าวทำให้เอนไซม์ enoyl-ACP reductase ที่ใช้สังเคราะห์กรดไขมันแบบที่ II ในเชื้อมาลาเรียเป็นตำแหน่งเป้าหมายที่มีความเป็นไปได้สูงที่จะพัฒนายารักษามาลาเรียชนิดใหม่ได้

บทสรุปและแนวโน้มการศึกษาวิจัย

(Conclusion and research trend)

ในระยะ 2-3 ปีที่ผ่านมาหลังจากที่มีองค์ความรู้ด้านจีโนมิกส์ของเชื้อมาลาเรียแล้ว ⁽⁴⁶⁾ ทำให้องค์ความรู้พื้นฐานด้านชีววิทยา ⁽⁴⁷⁾ และด้านชีวเคมีที่ศึกษาต่อเนื่องเป็นเวลานาน ⁽⁴⁸⁾ มีความเข้าใจกระจ่างชัดยิ่งขึ้นในวิถีเมตาบอลิซึมต่าง ๆ ของเชื้อมาลาเรีย ทั้งที่บางวิถีมีความ

เหมือนและมีความแตกต่างจากเซลล์ของมนุษย์ที่เป็นเจ้าบ้าน สามารถนำไปประยุกต์ในการพัฒนายารักษามาลาเรียชนิดใหม่ที่อาศัยตำแหน่งเป้าหมายที่เป็นเอนไซม์ในวิถีเมตาบอลิซึมที่มีเอกลักษณ์จำเพาะต่อเชื้อ และไม่ทำอันตรายต่อเซลล์ของมนุษย์ จะเป็นวิธีการหนึ่งที่จะได้ยาที่ใช้ในการควบคุมโรคมาลาเรียต่อไปได้ ⁽⁴⁸⁻⁵¹⁾

ในระยะทุก ๆ 5 ปี ข้างหน้า มีการคาดหมายว่าจะมียาใหม่เพิ่มขึ้น 1 ชนิดให้ได้ ขณะนี้ องค์กรต่าง ๆ ที่ให้ความสนใจมีมากขึ้น อาทิเช่น Global Fund to Fight AIDS, Tuberculosis and Malaria ⁽⁵²⁾, the Multilateral Initiative on Malaria in Africa ^(53, 54), the Medicines for Malaria Venture ^(19, 55) และ the Roll Back Malaria ⁽⁵⁶⁾ โดยมีองค์การอนามัยโลกเป็นผู้ประสานการให้ทุนการวิจัย และพัฒนายารักษามาลาเรียตัวใหม่ อย่างไรก็ตามกระบวนการในการพัฒนาายาตัวหนึ่ง ๆ จะต้องอาศัยสหศาสตร์ (multi-disciplinary) และสหทรัพยากร (multi-resources) มาร่วมกันใช้เพื่อสร้างความสำเร็จ โดยบทบาทของชีวเคมีรวมทั้งข้อมูลทางจีโนมิกส์ จะให้ตำแหน่งเป้าหมายที่คาดว่าจะพัฒนาสารยับยั้งหรือสารนำ (lead compounds) ที่ไปสู่ยารักษามาลาเรียชนิดใหม่ ๆ ได้ ⁽⁵⁷⁻⁶¹⁾

อ้างอิง

1. World Health Organization, Tropical Diseases Research: Progress 1995 -1996, Thirteenth Programme Report of the UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. TDR Geneva: 1997
2. Greenwood B, Marsh K, Snow R. Why do some African children develop severe anemia. *Parasitol Today* 1991 Oct;7(10):277-81
3. Knight JC, Udalova I, Hill AV, Greenwood BM, Peshu N, Marsh K, Kwiatkowski D. A polymorphism that affects OCT-1 binding to the TNF promoter region is associated with