พันธุศาสตร์ของเชื้อมาลาเรีย: จากงานวิจัยพื้นฐานสู่การพัฒนายาต้านมาลาเรีย

Genetics of Malaria Parasites: from Basic Research to Development of Anti-Malaria Drugs

สิทธิพร ภัทรดิลกรัตน์*

Sittiporn Pattaradilokrat*

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย Sittiporn.P@Chula.ac.th

Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

บทคัดย่อ

การดื้อยาของเชื้อมาลาเรียเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขและในการควบคุมโรคมาลาเรีย ส่วนหนึ่งเกิดจากความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียตามธรรมชาติ การพัฒนายารักษาโรคมาลาเรียชนิดใหม่จำเป็นต้องอาศัยความรู้ทางพันธุศาสตร์เพื่อสร้างความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกการดื้อยา ความรู้เหล่านี้ยังช่วยในการพัฒนาออกแบบโครงสร้างของยาและการคัดเลือกเป้าหมายของยาใหม่ๆ บทความวิชาการฉบับนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเผยแพร่ความรู้เกี่ยวกับวงจรชีวิตและพันธุศาสตร์ของเชื้อมาลาเรีย ตลอดจนการใช้ประโยชน์จากงานวิจัยทางพันธุศาสตร์ในการคัดเลือกยาที่มีประสิทธิภาพตลอดจนในการค้นหายีนเป้าหมายของเชื้อมาลาเรียสู่การพัฒนายาที่เหมาะสม

คำสำคัญ การทดลองผสมข้ามพันธุ์ การระบุตำแหน่งของยีน การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารต้านมาลาเรีย

Abstract

Antimalarial drug resistance is the major public health problem and hinders malaria control. This is partly due to the genetic variation of malaria parasites in nature. Development of new anti-malarial drugs will require knowledge on genetic basis of malaria parasites to aid in understanding of mechanisms of anti-malaria drug resistance. Such knowledge will contribute to improvement of drug design and to rational selection of novel anti-malarial drug targets. This review aims to present the overview of malaria parasite's life cycle, with special focus on genetics of malaria parasites. This review also describes the applications of genetic studies for selection of effective drugs and malarial targets for drug development.

Keywords genetic cross, genetic mapping, anti-malarial chemical screening

*Corresponding author. E-mail : Sittiporn.P@Chula.ac.th

บทนำ

โรคมาลาเรียเป็นโรคติดต่อเขตร้อนที่มียุงก้นปล่องเป็นพาหะ มีสาเหตุมาจากโปรโตซัวในสกุล *Plasmodium* โรคมาลาเรียในมนุษย์มีสาเหตุมาจากเชื้อมาลาเรีย 4 ชนิด ได้แก่ *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovalae* และ *P. malariae* นอกจากนี้ยังมีเชื้อมาลาเรียในสิงแสมและลิงกัง เช่น *P. knowlesi* ที่สามารถระบาดมาสู่มนุษย์ (Collins, 2012) ได้เช่นกัน การระบาดของเชื้อมาลาเรียถือเป็นปัญหาที่สำคัญทางสาธารณสุขทั้งในประเทศไทยและระดับภูมิภาค รายงานในปี ค.ศ. 2010 พบว่ามีผู้ป่วยด้วยโรคมาลาเรียมากกว่า 200 ล้านคนทั่วโลกและพบว่ามีผู้เสียชีวิตกว่า 6 แสนคน (Alonso & Tanner, 2013) ปัญหาสำคัญในการควบคุมโรคมาลาเรียเกิดจากการระบาดของเชื้อมาลาเรียดื้อยา การใช้ยาปลอมและการขาดแคลนยาใหม่ๆ ที่มีราคาถูกและประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังมีปัญหาอื่นๆ เช่น การดื้อยาฆ่าแมลงของยุงพาหะ (Chaccour *et al*., 2012; Eastman & Fidock, 2009; Ranson *et al*., 2011) ดังนั้นงานวิจัยพัฒนายารักษาโรคมาลาเรียใหม่ๆ ตลอดจนงานวิจัยพัฒนาวัคซีนต้านเชื้อมาลาเรีย จึงมีความจำเป็นเพื่อให้การป้องกันโรคมาลาเรียดำเนินการไปอย่างมีประสิทธิภาพและได้ผล

การพัฒนายาต้านเชื้อมาลาเรียจำเป็นต้องอาศัยความรู้พื้นฐานทางชีววิทยาและพันธุศาสตร์ของเชื้อมาลาเรียเพื่อคัดเลือกยีนและโปรตีนเป้าหมายที่เหมาะสมในการผลิตยา ในปัจจุบันได้มีการศึกษาลำดับเบสและแผนที่จีโนมของเชื้อมาลาเรียที่มีการระบาดในมนุษย์และในสัตว์ทดลอง องค์ความรู้เหล่านี้มีประโยชน์อย่างมากในการคัดเลือกยีนที่เหมาะสมสำหรับพัฒนาเป็นเป้าหมายในการผลิตยาต้านมาลาเรีย บทความวิชาการฉบับนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเผยแพร่ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับพันธุศาสตร์ของเชื้อมาลาเรีย และการประยุกต์ใช้ความรู้พันธุศาสตร์เพื่อสร้างความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกการดื้อยาและหาเป้าหมายที่เหมาะสมในการพัฒนายาต้านมาลาเรียในอนาคต

วงจรชีวิตและพันธุศาสตร์ของเชื้อมาลาเรียในมนุษย์

เชื้อมาลาเรียในมนุษย์และในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทุกชนิดมีวงจรชีวิตคล้ายคลึงกัน (ภาพที่ 1) ประกอบด้วยการเจริญและการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศในเซลล์ตับและเซลล์เม็ดเลือดแดง รวมถึงการสร้างเซลล์สืบพันธุ์หรือแกมมีต (gamete) เพื่อการพัฒนาวงจรชีวิตในยุงก้นปล่อง (*Anopheles* spp.) ซึ่งเป็นพาหะของโรคมาเรีย

วงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรียในมนุษย์เริ่มต้นเมื่อยุงก้นปล่องที่มีเชื้อมาลาเรียดูดเลือดและปล่อยเชื้อในระยะสปอโรซอยต์ (sporozoite) จากต่อมน้ำลายเข้าสู่ร่างกายของมนุษย์ เชื้อมาลาเรียจะผ่านเข้าสู่ชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันใต้ผิวหนังและจากนั้นจะเคลื่อนที่เข้าสู่หลอดเลือดและไหลไปตามกระแสเลือดทั่วร่างกาย (Rankin *et al*., 2010) ทั้งนี้เชื้อมาลาเรียที่สามารถเข้าสู่เซลล์ตับจะเจริญและสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศแบบซิโซโกนี (schizogony) เชื้อมาลาเรียที่ได้จะอยู่ในระยะเมอโรซอยต์ (merozoite) และเมื่อเมอโรซอยต์เจริญเต็มที่จะออกมาจากเซลล์ตับและเข้าสู่กระแสเลือด การเจริญของเชื้อมาลาเรียในระยะตับเป็นระยะที่ไม่แสดงอาการและไม่ก่อพยาธิสภาพ

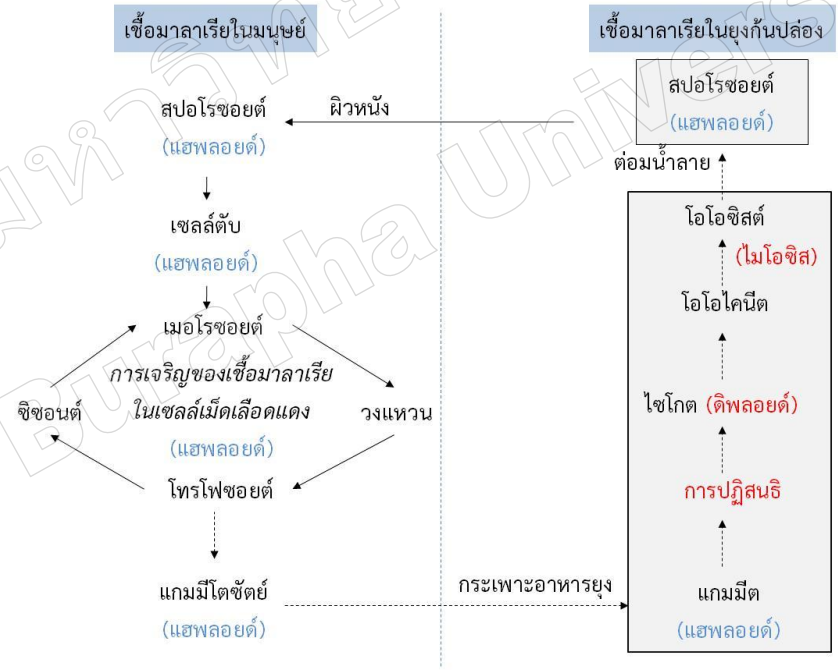
การเจริญของเชื้อมาลาเรียในเซลล์เม็ดเลือดแดงมีขั้นตอนต่างๆ (Tilley *et al*., 2011) ดังนี้ เมอโรซอยต์เข้าสู่กระแสเลือดและสัมผัสกับเซลล์เม็ดเลือดแดง จากนั้นเชื้อมาลาเรียจะเข้าไปภายในเซลล์เม็ดเลือดแดงและเจริญเป็นระยะวงแหวน (ring form) กิจกรรมที่สำคัญในระยะนี้ ได้แก่ การดูดซึมสารอาหาร ฮีโมโกลบิน (hemoglobin) และโปรตีนต่างๆ

ภายในเซลล์เม็ดเลือดแดงและพลาสมาเพื่อใช้สร้างสารอินทรีย์ต่างๆ ต่อไปเชื้อมาลาเรียจะขยายขนาดของเซลล์และกลายเป็นโทรโฟซอยต์ (trophozoite) และมีกิจกรรมสำคัญ เช่น การจำลองดีเอ็นเอ (DNA replication) หลังจากนั้นเชื้อมาลาเรียจะกลายเป็นซิซอนต์ (schizont) เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะพบเซลล์ที่มีนิวเคลียสจำนวนมาก แต่ละนิวเคลียสจะมีเยื่อหุ้มเซลล์มาหุ้มล้อมรอบ ทำให้พบเมอโรซอยต์จำนวนมากอยู่ภายในซิซอนต์ เมื่อเมอโรซอยต์ที่พัฒนาอย่างสมบูรณ์จะเปลี่ยนแปลงโครงสร้างค้ำจุน (cytoskeleton) ของเซลล์เม็ดเลือดแดง ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงแตกออกและปล่อยให้เมอโรซอยต์กลับสู่กระแสเลือดอีกครั้ง การแบ่งเซลล์ของเชื้อมาลาเรียในเซลล์เม็ดเลือดแดงจัดเป็นการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเช่นเดียวกับระยะการเจริญในเซลล์ตับ

การเจริญของเชื้อมาลาเรียในเซลล์เม็ดเลือดแดงเป็นระยะที่มีความสำคัญในทางคลินิคและในการวิจัยเกี่ยวกับยารักษาโรคมาลาเรีย เนื่องจากเป็นระยะที่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพของโรคมาลาเรีย องค์การอนามัยโลก (World Health Organization) ได้ออกมาตรการให้ประเทศที่มีการระบาดของโรคมาลาเรียรักษาผู้ป่วยโดยใช้ยาในกลุ่ม อาร์ติมิซินิน (artemisinin) และอนุพันธ์ของอาร์ติมิซินิน เช่น อาร์ทีซูเนต (artersunate) ร่วมกับยาตัวอื่นๆ ที่มีฤทธิ์การทำงานแตกต่างจากอาร์ติมิซินิน เช่น เมโฟควิน (mefloquine) เป็นต้น การรักษาวิธีนี้เรียกว่า Artemisinin Combination Therapy (ACT) (WHO, 2001) การรักษาโดยใช้ยาหลายชนิดมีข้อดี เช่น เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพและความสำเร็จในการรักษาให้กับผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียดื้อยา ตลอดจนเป็นการเพิ่มการคัดเลือกทางธรรมชาติเพื่อชะลอการดื้อยาของเชื้อมาลาเรีย (Eastman & Fidock, 2009) แต่อย่างไรก็ตามพบว่า มีการระบาดของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ที่ดื้อต่อยาอาร์ติมิซินินในเขตชายแดนระหว่างประเทศไทยและกัมพูชา และระหว่างประเทศไทยและประเทศพม่า (Dondrop *et al*., 2009; Na-Bangchang & Karbwang, 2013; Phyo *et al*., 2012) ดังนั้นการวิจัยค้นคว้ายาต้านมาลาเรียใหม่ๆ เพื่อช่วยแก้ปัญหาการระบาดของเชื้อมาลาเรียดื้อยาจึงมีความสำคัญเป็นอย่างมาก

นอกจากนี้เชื้อมาลาเรียในเซลล์เม็ดเลือดแดงสามารถพัฒนากลายเป็นแกมมีโตซัยต์ (gametocyte) และเข้าสู่กลไกการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual reproduction) (ภาพที่ 1) (Vaughan, 2007) เมื่อผู้ป่วยที่มีแกมมีโตซัยต์ในกระแสเลือดถูกยุงก้นปล่องกัด แกมมีโตซัยต์จะเข้าสู่กระเพาะอาหารของยุงและพัฒนาต่อไปกลายเป็นเซลล์สืบพันธุ์หรือแกมมีต (gamete) แกมมีตเพศผู้และเพศเมียจะปฏิสนธิและกลายเป็นไซโกต (zygote) ระยะไซโกตเป็นระยะสั้นๆ ก่อนที่เซลล์จะเปลี่ยนแปลงรูปร่างกลายเป็นระยะโอโอไคนีต (ookinete) ซึ่งสามารถเคลื่อนที่ผ่านผนังกระเพาะอาหาร (midgut) ของยุงและพัฒนาต่อไปเป็นโอโอซิสต์ (oocyst) ต่อมาเชื้อมาลาเรียภายในโอโอซิสต์จะมีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (meiosis) เพื่อลดจำนวนชุดของโครโมโซมลงครึ่งหนึ่ง ได้เป็นเชื้อมาลาเรียในระยะสปอโรซอยต์ (sporozoite) หลังจากนั้นสปอโรซอยต์จะเพิ่มจำนวนโดยการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศภายในโอโอซิสต์และพัฒนาจนเจริญเต็มที่ แล้วจึงถูกปล่อยเข้าสู่แอ่งเลือด (haemocoel) สปอโรซอยต์ที่เคลื่อนที่เข้าไปอาศัยในต่อมน้ำลายของยุงจะสามารถถ่ายทอดและขยายพันธุ์สู่มนุษย์ต่อไป เชื้อมาลาเรียตั้งแต่ระยะไซโกตจนถึงระยะโอโอซิสต์เป็นช่วงชีวิตที่มีจำนวนโครโมโซม 2 ชุดหรือดิพลอยด์ (diploid) ในขณะที่สปอโรซอยต์และระยะอื่นๆ ของเชื้อมาลาเรียในมนุษย์จะมีจำนวนโครโมโซมเพียง 1 ชุดหรือแฮพลอยด์ (haploid) (Sinden & Hartley, 1985)

ความเข้าใจเกี่ยวกับวงจรชีวิตที่ซับซ้อนของเชื้อมาลาเรีย มีประโยชน์อย่างยิ่งในการอธิบายถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมและลักษณะฟีโนไทป์ต่างๆ ที่พบในเชื้อมาลาเรียตามธรรมชาติ ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียเกิดขึ้นได้จาก 2 กระบวนการ ได้แก่ (1) การกลายพันธุ์หรือมิวเทชั่น (mutation) ซึ่งอาจเกิดขึ้นระหว่างการจำลองดีเอ็นเอเมื่อเชื้อมาลาเรียมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ที่พบภายในเซลล์ตับ เซลล์เม็ดเลือดแดงหรือโอโอซิสต์ และ (2) การแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรม (genetic recombination) ซึ่งเกิดขึ้นภายหลังจากการปฏิสนธิและการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสภายในกระเพาะอาหารของยุง การแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมเป็นปัจจัยหลักที่ก่อให้เกิดความหลากหลายของเชื้อมาลาเรียตามธรรมชาติ ซึ่งพบได้บ่อยในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคมาลาเรียสูง เช่น ประเทศต่างๆ ตอนกลางทวีปแอฟริกาและในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Conway, 2007) ความหลากหลายทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นจะแสดงออกมาเป็นฟีโนไทป์ต่างๆ ของเชื้อมาลาเรีย เช่น การดื้อต่อยารักษาโรคมาลาเรีย (drug resistant phenotype) เป็นต้น ทั้งนี้เมื่อเชื้อมาลาเรียที่มีพันธุกรรมแตกต่างกันถูกถ่ายทอดเข้ามาสู่ในยุงตัวเดียวกัน ก็จะมีโอกาสแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมระหว่างกัน ซึ่งจะเป็นการเพิ่มโอกาสในการสร้างเชื้อมาลาเรียชนิดใหม่ที่มีสายพันธุ์แตกต่างจากเดิม เช่น เชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ดื้อยาหลายชนิด (multidrug resistant malaria) เป็นต้น ดังนั้นการศึกษาความหลากหลายของเชื้อมาลาเรียในธรรมชาติจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการพัฒนาวิธีการควบคุมและป้องกันโรคมาลาเรีย



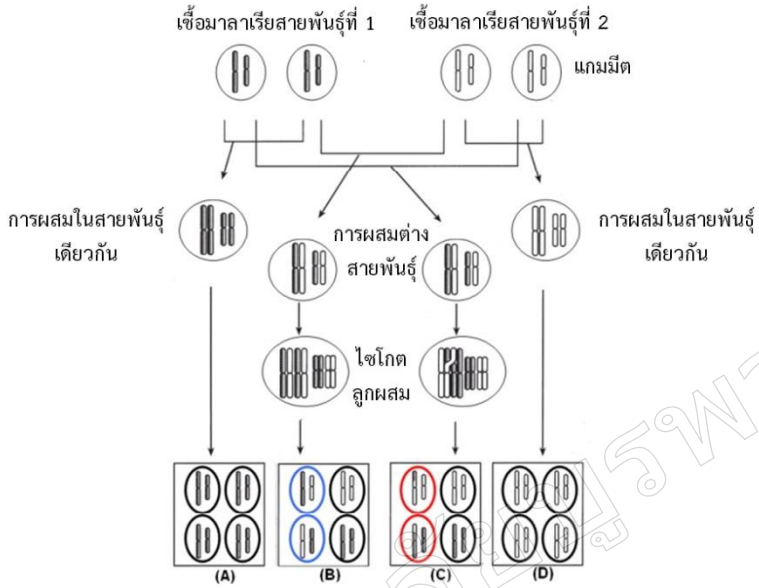
ภาพที่ 1 วงจรชีวิตเชื้อมาลาเรียของมนุษย์

การระบุยีนที่ใช้เป็นเป้าหมายของยาต้านมาลาเรีย

หัวใจสำคัญในการศึกษาพันธุศาสตร์ของเชื้อมาลาเรียได้แก่ การระบุตำแหน่งยีนควบคุมฟีโนไทป์ที่สำคัญ (gene mapping) ที่เป็นประโยชน์ในการควบคุมโรคมาลาเรีย เช่น ยีนที่ใช้เป็นเป้าหมายของยาหรือวัคซีน ขั้นตอนในระบุยีนที่ควบคุมฟีโนไทป์ เริ่มจากการคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อมาลาเรียที่มีฟีโนไทป์ที่ต้องการศึกษา เช่น ถ้าต้องการศึกษายีนที่ควบคุมการดื้อยาคลอโรควิน (chloroquine) จะต้องเตรียมเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาคลอโรควิน และสายพันธุ์ที่ไวต่อยา เช่น *P. falciparum* สายพันธุ์ Dd2 และ HB3 ตามลำดับ (Wellems *et al*., 1990) นำเชื้อมาลาเรียทั้ง 2 สายพันธุ์มาทดลองผสมข้ามพันธุ์ (genetic cross) เพื่อผลิตสายพันธุ์ลูกผสม (recombinant progeny) แล้วจึงแยกสายพันธุ์ลูกผสมออกมาเพื่อทำการศึกษาจีโนไทป์ (genotype) ข้อมูลจีโนไทป์ที่ได้จะใช้เป็นแผนที่ยีน (genetic linkage map) ซึ่งจะช่วยให้ผู้วิจัยทราบว่ายีนต่างๆ ที่พบในสายพันธุ์ลูกผสมถูกถ่ายทอดมาจากสายพันธุ์ดื้อยาหรือสายพันธุ์ที่ไวต่อยา และนำมาใช้เปรียบเทียบกับฟีโนไทป์เชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ลูกผสม (phenotyping) เพื่อระบุตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะที่ต้องการศึกษาต่อไป

เทคนิคการทดลองผสมข้ามสายพันธุ์เชื้อมาลาเรียได้มีการนำมาใช้ในการศึกษาเป็นครั้งแรกกับเชื้อมาลาเรียในหนูไมซ์ (สิทธิพร ภัทรดิลกรัตน์, 2556; Pattaradilokrat *et al*., 2011) ซึ่งต่อมาได้ประยุกต์ใช้กับเชื้อมาลาเรียในมนุษย์ การทดลองผสมข้ามสายพันธุ์ในเชื้อมาลาเรียในหนูไมซ์และมนุษย์อาศัยหลักการเช่นเดียวกับการแลกเปลี่ยนพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียตามธรรมชาติ ในขณะนี้ *P. falciparum* เป็นเชื้อมาลาเรียของมนุษย์เพียงชนิดเดียวที่สามารถเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการและผสมข้ามสายพันธุ์ได้เป็นผลสำเร็จ ในปัจจุบันได้มีเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ลูกผสมที่เกิดจากการทดลองผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่าง (1) สายพันธุ์ 3D7 และ HB3 (2) ระหว่างสายพันธุ์ Dd2 และ HB3 และ (3) ระหว่างสายพันธุ์ 7G8 และ GB4 (Hayton *et al*., 2008; Walliker *et al*., 1987; Wellems *et al*., 1991)

การผสมข้ามสายพันธุ์ของเชื้อมาลาเรียของมนุษย์เริ่มจากการเลี้ยงเชื้อมาลาเรียให้เจริญเป็นระยะแกมมีโตซัยต์ จากนั้นจึงนำเลือดที่มีแกมมีโตซัยต์ไปเลี้ยงยุงก้นปล่อง เพื่อให้เชื้อมาลาเรียเจริญต่อไปในยุง การปฏิสนธิระหว่างแกมมีตอาจเกิดระหว่างเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์เดียวกัน (self-fertilization) และเชื้อมาลาเรียต่างสายพันธุ์กัน (cross-fertilization) (ภาพที่ 2) การปฏิสนธิระหว่างเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์เดียวกันจะทำให้ได้ไซโกตที่มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกับสายพันธุ์พ่อหรือแม่ ในขณะที่การปฏิสนธิระหว่างเชื้อมาลาเรียต่างสายพันธุ์จะทำให้ได้ไซโกตลูกผสม (hybrid oocyst) ซึ่งจะผลิตเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ผสม (recombinant progeny) ในขั้นต่อไปเป็นการแยกและศึกษาจีโนไทป์ของเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ลูกผสม การแยกเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ลูกผสมออกจากเชื้อที่มีสายพันธุ์พ่อหรือแม่ทำได้โดยการนำลิงชิมแพนซี (*Pan troglodytes*) ไปให้ยุงที่มีเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ลูกผสมกัด สปอโรซอยต์จากต่อมน้ำลายยุงจะถูกถ่ายทอดเข้าสู่สัตว์ทดลองและพัฒนาต่อไปในจนถึงระยะเซลล์เม็ดเลือดแดง จากนั้นจึงแยกเชื้อมาลาเรียในระยะเซลล์เม็ดเลือดแดงและนำมาโคลน (cloning) ในห้องปฏิบัติ เชื้อมาลาเรียที่ได้จะมีต้นที่กำเนิดมาจากเซลล์เดียว ในขั้นตอนสุดท้ายเป็นการนำโคลนของเชื้อมาลาเรียไปศึกษาจีโนไทป์เพื่อแยกเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ลูกผสมออกจากเชื้อที่มีลักษณะเหมือนกับสายพันธุ์พ่อหรือแม่ได้



ภาพที่ 2 การสร้างเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ลูกผสม เมื่อแกมมีตของเชื้อมาลาเรียสองสายพันธุ์ที่มีจีโนไทป์แตกต่างกัน (สายพันธุ์ที่ 1 มีโครโมโซมสีดำและสายพันธุ์ที่ 2 มีโครโมโซมสีขาว) ถูกถ่ายทอดในพาหะตัวเดียวกัน แกมมีตจะสามารถผสมได้ทั้งจากสายพันธุ์เดียวกัน (self-fertilization) และต่างสายพันธุ์ (cross-fertilization) การผสมในสายพันธุ์เดียวกันจะได้เซลล์รุ่นลูกที่มีจีโนไทป์เหมือนกับสายพันธุ์พ่อหรือแม่ (อักษร A และ D) ในขณะที่การผสมระหว่างแกมมีตต่างสายพันธุ์ จะได้ไซโกตสายพันธุ์ลูกผสม (hybrid oocyst) ซึ่งทำหน้าที่สร้างเชื้อมาลาเรียลูกผสม (recombinant progeny) เชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ลูกผสมสามารถเกิดได้จากการแยกตัวอย่างอิสระของโครโมโซม (independent assortment) หรือเกิดจากการครอสซิ่งโอเวอร์ (crossing over) (อักษร B และ C ตามลำดับ) (ดัดแปลงจาก Pattaradilokrat, 2008)

การจีโนไทป์เชื้อมาลาเรียเพื่อจำแนกเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ลูกผสม (genotyping) สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การใช้เทคนิค restriction fragment length polymorphism (RFLP), amplified fragment length polymorphism (AFLP) และ microsatellite typing (Pattaradilokrat *et al*., 2013) แต่เนื่องจากเทคนิคเหล่านี้ได้รับการพัฒนาก่อนที่จีโนมของเชื้อมาลาเรียจะเสร็จสมบูรณ์ ดังนั้นจำนวนของเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ที่ได้จากแต่ละเทคนิคจะมีจำนวนน้อย และเทคนิคเหล่านี้ยังมีขั้นตอนยุ่งยาก อย่างไรก็ดีข้อมูลจีโนไทป์ของเชื้อมาลาเรียลูกผสมที่ศึกษาด้วยเทคนิคเหล่านี้ ช่วยให้นักวิจัยสร้างแผนที่แสดงการแลกเปลี่ยนพันธุกรรมบนโครโมโซมต่างๆ ของเชื้อมาลาเรีย (recombination map) ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการระบุตำแหน่งของลำดับเบสและยีนต่างๆ ในจีโนมของเชื้อมาลาเรีย (Su *et al*., 1999) และช่วยในการประกอบลำดับเบสในจีโนมของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ให้ได้รับความสำเร็จ (Gardner *et al*., 2002) ข้อมูลจีโนมของเชื้อมาลาเรียนี้ช่วยให้นักวิจัยสามารถสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอได้เพิ่มขึ้น จึงนำมาสู่การพัฒนาเทคนิคจีโนไทป์ใหม่ๆ ของเชื้อมาลาเรียได้ทั้งจีโนม

(Pattaradilokrat *et al*., 2013) เช่น เทคนิค DNA microarray และ next-generation sequencing เป็นต้น ทำให้นักวิจัยสามารถศึกษาความหลากหลายของยีนในเชื้อมาลาเรียต่างๆ ในระยะเวลารวดเร็ว

จีโนมของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ขนาดเท่ากับ 23 ล้านเบส ประกอบด้วยยีนทั้งหมดประมาณ 5,500 ยีน เรียงตัวอยู่บนโครโมโซมต่างๆ 14 แท่งภายในนิวเคลียส (Gardner *et al*., 2002) นอกจากนี้เชื้อมาลาเรียยังมีดีเอ็นเอภายในไมโทคอนเดรีย (mitochondria) ขนาดหกพันเบส และดีเอ็นเอในออร์กาเนลเอพิโคพลาสต์ (apicoplast) ขนาดสามหมื่นห้าพันเบส ความรู้จีโนมเหล่านี้มีประโยชน์หลายด้าน โดยเฉพาะการค้นหายีนอาจจะใช้สำหรับพัฒนาต่อไปเป็นวัคซีนหรือยาต้านมาลาเรีย ตัวอย่าง เช่น การใช้เทคโนโลยีชีวสารสนเทศ (Bioinformatics) (ชมภูนุช วิรุณานนท์ และ วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล, 2553) เพื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีนต่างๆ ซึ่งจะช่วยให้นักวิจัยสามารถระบุยีนที่พบเฉพาะในเชื้อมาลาเรียแต่ไม่พบในจีโนมของมนุษย์ ข้อมูลของยีนที่มีความจำเพาะต่อเชื้อมาลาเรียเหล่านี้อาจนำมาใช้เลือกเป้าหมายของยา (Fatumo *et al*., 2011; Florent *et al*., 2010) นอกจากนี้ข้อมูลจากการศึกษาเปรียบเทียบจีโนมของเชื้อมาลาเรียในคนและสัตว์ทดลองชนิดต่างๆ พบว่า ประมาณ 50% ของยีนทั้งหมดในจีโนมของเชื้อมาลาเรียเป็นยีนที่ไม่ทราบหน้าที่และกลไกการทำงานที่แน่ชัด (hypothetical proteins) ซึ่งยีนเหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นยีนที่พบเฉพาะในเชื้อมาลาเรียเท่านั้น ดังนั้นการศึกษาหน้าที่และการทำงานของยีนเหล่านี้อาจจะช่วยให้นักวิจัยสามารถระบุยีนใหม่ๆ ที่สามารถนำมาพัฒนาเป็นเป้าหมายของยาได้เช่นกัน

การตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารเคมีในห้องปฏิบัติการ (*in vitro* chemical screening) เป็นวิธีหนึ่งที่นำมาใช้ตรวจสอบฟีโนไทป์ (phenotyping) ของเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ลูกผสม ในการทดสอบ นำเชื้อมาลาเรียในระยะเซลล์เม็ดเลือดแดงมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการพร้อมกับสารเคมีหรือยาที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน และนำค่าอัตราการเจริญเติบโตในแต่ละความเข้มข้นของสารเคมีมาเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากชุดการทดลองควบคุม ผลที่ได้จะนำมาใช้คำนวณค่าความเข้มข้นของสารที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียได้ 50% หรือ 90% (เรียกว่าค่า IC_{50} หรือ IC_{90} ตามลำดับ) ระบบทดสอบในปัจจุบันได้มีการพัฒนาให้มีประสิทธิภาพสูง สามารถทดสอบยาได้มากกว่า 1,500 ชนิดต่อครั้ง (Eastman *et al.,* 2013; Yuan *et al*., 2011) ผลที่ได้จากการทดลองนอกจากจะช่วยให้นักวิจัยทดสอบและระบุยาใหม่ๆ ที่มีประสิทธิภาพสูงในเวลาอันรวดเร็วแล้ว ค่า IC_{50} หรือ IC_{90} ยังสามารถใช้ในการจำแนกเชื้อที่ดื้อต่อยาและไวต่อยา ตลอดจนใช้เป็นวิธีในการตรวจสอบฟีโนไทป์ของเชื้อมาลาเรีย เรียกว่า differential chemical phenotypes (DCP) (Yuan *et al*., 2009)

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารเคมีในห้องปฏิบัติการโดยใช้เชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ลูกผสมระหว่าง *P. falciparum* สายพันธุ์ Dd2 และ HB3 และระหว่างสายพันธุ์ 7G8 และ GB4 ทำให้นักวิจัยทราบว่ากลไกการดื้อต่อยาต้านเชื้อมาลาเรียหลายชนิดเกิดขึ้นจากความแปรผันทางพันธุกรรม เช่น การกลายพันธุ์ในยีน chloroquine resistant transporter (*crt*) บนโครโมโซม 7 มีผลต่อการตอบสนองต่อยาคลอโรควินและยาควินิน (Fidock *et al*., 2000; Ferdig *et al*., 2004) นอกจากนี้ผลจากการทดสอบในห้องปฏิบัติการของทีมวิจัยของผู้เขียน พบว่า มียารักษาโรคบางชนิดในมนุษย์เช่น mibefradil และ NNC55-0396 ซึ่งปัจจุบันใช้เป็นยารักษาโรคความดันโลหิตสูง (hypertension) สามารถออกฤทธิ์ที่ยีน *crt* ของเชื้อมาลาเรียเช่นเดียวกับยาคลอโรควินและสามารถยับยั้งเชื้อมาลาเรียที่ดื้อต่อยาคลอโรควินได้ดี และนอกจากนี้ยังได้พบยีน multidrug

resistance transporter (*mdr-1*) และยีน dihydrofolate reductase (*dhfr*) ในเชื้อมาลาเรียเป็นเป้าหมายของสารเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ กว่า 200 ชนิด (Yuan *et al*., 2009; Yuan *et al*., 2011) ข้อมูลเหล่านี้จะช่วยให้นักวิจัยทราบถึงยีนที่อาจจะใช้เป็นเป้าหมายหลักในการพัฒนายาต้านมาลาเรีย เพราะมีความสัมพันธ์กับการตอบสนองของสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ เป็นจำนวนมาก

บทสรุป

ในปัจจุบันได้มีการวิจัยและพัฒนาค้นหายาต้านมาลาเรียใหม่ๆ อย่างต่อเนื่อง เช่น การสกัดแยกสารเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากธรรมชาติ (Guantai & Chibale, 2011) การสังเคราะห์สารเคมีใหม่ (Gamo *et al*., 2010; Guiguemde *et al*., 2010) ตลอดจนการดัดแปลงยาที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพดีอยู่แล้วให้มีประสิทธิภาพเพิ่มสูงขึ้น เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพผสานกับข้อมูลทางพันธุศาสตร์ จีโนมิกซ์และข้อมูลจากเทคโนโลยีชีวสารสนเทศของเชื้อมาลาเรีย ข้อมูลเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ต่อนักวิจัยในการศึกษาเปรียบเทียบสมบัติใหม่ๆ ของยาหรืออนุพันธ์ทางเคมี ตลอดจนสามารถประยุกต์ใช้หายีนเป้าหมายใหม่ของยา และนำไปใช้สำหรับออกแบบยาสำหรับการรักษาโรคมาลาเรียและการป้องกันการระบาดของเชื้อมาลาเรียดื้อยาในอนาคตได้อย่างเหมาะสม

เอกสารอ้างอิง

ชมภูนุช วิรุณานนท์ และ วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล (2553) ชีวสารสนเทศ : การประยุกต์ใช้ในงานวิจัยวิทยาศาสตร์ชีวภาพ. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*. *15*(2), 99-106.

สิทธิพร ภัทรดิลกรัตน์ (2556) โรคมาลาเรียในหนูไมซ์: โมเดลสู่การค้นพบยาต้านมาลาเรียใหม่ในมนุษย์. *วารสารวิทยาศาสตร์ มข*. *41*(3), 532-541.

Alonso, P.L., & Tanner, M. (2013). Public health challenges and prospects for malaria control and elimination. *Nature Medicine*, *19*, 150-155.

Chaccour, C.J., Kaur, H., Mabey, D., & Del Pozo, J.L. (2012). Travel and fake artesunate: a risky business. *Lancet*, *380*, 1120.

Collins, W.E. (2012). *Plasmodium knowlesi*: a malaria parasite of monkeys and humans. *Annual Review of Entomology*, *57*, 107-121.

Conway, D.J. (2007). Molecular epidemiology of malaria. *Clinical Microbiology Reviews*, *20,* 188–204.

Dondorp, A.M., Nosten, F., Yi, P., Das, D., Phyo, A.P., Tarning, J., Lwin, K.M., Ariey, F., Hanpithakpong, W., Lee, S.J., Ringwald, P., Silamut, K., Imwong, M., Chotivanich, K., Lim, P., Herdman, T., An, S.S., Yeung, S.,

Singhasivanon, P., Day, N.P., Lindegardh, N., Socheat, D., & White, N.J. (2009). Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *New England Journal of Medicine, 361,* 455-467.

Eastman, R.T., & Fidock, D.A. (2009). Artemisinin-based combination therapies: a vital tool in efforts to eliminate malaria. *Nature Review Microbiolology*, *7*, 864-874.

Eastman, R.T., Pattaradilokrat, S., Raj, D.K., Dixit, S., Deng, B., Miura, K., Yuan, J., Tanaka, T.Q., Johnson, R.L., Jiang, H., Huang, R., Williamson, K.C., Lambert, L.E., Long, C., Austin C.P., Wu, Y., & Su, X.Z. (2013) A class of tricyclic compounds blocking malaria parasite oocyst development and transmission. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *57,* 425-435.

Fatumo, S., Plaimas, K., Adebiyi, E., & König, R. (2011). Comparing metabolic network models based on genomic and automatically inferred enzyme information from *Plasmodium* and its human host to define drug targets *in silico*. *Infection, Genetics and Evolution*. *11*, 708-715.

Ferdig, M.T., Cooper, R.A., Mu, J., Deng, B., Joy, D.A., Su, X.Z., & Wellems, T.E. (2004) Dissecting the loci of low-level quinine resistance in malaria parasites. *Molecular Microbiology*, *52*, 985-997.

Fidock, D.A., Nomura, T., Talley, A.K., Cooper, R.A., Dzekunov, S.M., Ferdig, M.T., Ursos, L.M., Sidhu, A.B., Naudé, B., Deitsch, K.W., Su, X.Z., Wootton, J.C., Roepe, P.D., & Wellems, T.E. (2000) Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Molecular Cell*, *6*, 861-871.

Florent, I., Maréchal, E., Gascuel, O., & Bréhélin, L. (2010) Bioinformatic strategies to provide functional clues to the unknown genes in *Plasmodium falciparum* genome. *Parasite*, *17*(4), 273-283.

Gamo, F.J., Sanz, L.M., Vidal, J., de Cozar, C., Alvarez, E., Lavandera, J.L., Vanderwall, D.E., Green, D.V., Kumar, V., Hasan, S., Brown, J.R., Peishoff, C.E., Cardon, L.R., & Garcia-Bustos, J.F. (2010) Thousands of chemical starting points for antimalarial lead identification. *Nature*, *465*, 305-310.

Gardner, M.J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R.W., Carlton, J.M., Pain, A., Nelson, K.E., Bowman, S., Paulsen, I.T., James, K., Eisen, J.A., Rutherford, K., Salzberg, S.L., Craig, A., Kyes, S., Chan, M.S., Nene, V., Shallom, S.J., Suh, B., Peterson, J., Angiuoli, S., Pertea, M., Allen, J., Selengut, J., Haft, D., Mather, M.W., Vaidya, A.B., Martin, D.M., Fairlamb, A.H., Fraunholz, M.J., Roos, D.S., Ralph, S.A., McFadden, G.I., Cummings, L.M., Subramanian, G.M., Mungall, C., Venter, J.C., Carucci, D.J.,

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Hoffman, S.L., Newbold, C., Davis, R.W., Fraser, C.M., & Barrell, B. (2002). Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*, *419*, 498-511.

Guantai, E., & Chibale, K. (2011) How can natural products serve as a viable source of lead compounds for the development of new/novel anti-malarials? *Malaria Journal*, *10*(Suppl 1), S2.

Guiguemde, W.A., Shelat, A.A., Bouck, D., Duffy, S., Crowther, G.J., Davis, P.H., Smithson, D.C., Connelly, M., Clark, J., Zhu, F., Jiménez-Díaz, M.B., Martinez, M.S., Wilson, E.B., Tripathi, A.K., Gut, J., Sharlow, E.R., Bathurst, I., El Mazouni, F., Fowble, J.W., Forquer, I., McGinley, P.L., Castro, S., Angulo-Barturen, I., Ferrer, S., Rosenthal, P.J., Derisi, J.L., Sullivan, D.J., Lazo, J.S., Roos, D.S., Riscoe, M.K., Phillips, M.A., Rathod, P.K., Van Voorhis, W.C., Avery, V.M., & Guy, R.K. (2010) Chemical genetics of *Plasmodium falciparum*. *Nature*, *465*, 311-315.

Hayton, K., Gaur, D., Liu, A., Takahashi, J., Henschen, B., Singh, S., Lambert, L., Furuya, T., Bouttenot, R., Doll, M., Nawaz, F., Mu, J., Jiang, L., Miller, L.H., & Wellems, T.E. (2008) Erythrocyte binding protein PfRH5 polymorphisms determine species-specific pathways of *Plasmodium falciparum* invasion. *Cell Host Cell and Microbes*, *4*, 40-51.

Na-Bangchang, K., & Karbwang, J. (2013). Emerging artemisinin resistance in the border areas of Thailand. *Expert Review of Clinical Pharmacololgy, 6*, 307-322.

Pattaradilokrat, S. (2008) *Linkage Group Selection to Investigate Genetic Determinants of Complex traits of Malaria Parasite.* Doctoral Dissertation, School of Biological Sciences, University of Edinburgh.

Pattaradilokrat, S., Li., J., & Su, X.z. (2011) Protocol for production of a genetic cross of the rodent malaria parasites. *Journal of Visualized Experiments. 47*, 2365

Pattaradilokrat, S., Mu, J., Awadalla, P. & Su. X.z. (2013) Genome Diversity and Applications in Genetic Studies of the Human Malaria Parasites *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax.* In J.M. Cartlon, S.L. Perkins, & K.W. Deitsch. (Eds), *Malaria Parasites: Comparative Genomics, Evolution and Molecular Biology.* (pp. 59-90) Norfolk: Caister Academic Press.

Phyo, A.P., Nkhoma, S., Stepniewska, K., Ashley, E.A., Nair, S., McGready, R., Ier Moo, C., Al-Saai, S., Dondorp, A.M., Lwin, K.M., Singhasivanon, P., Day, N.P., White, N.J., Anderson, T.J., & Nosten, F. (2012) Emergence of artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: a longitudinal study. *Lancet*, *379,* 1960-1966.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Rankin, K.E., Graewe, S., Heussler, V.T., & Stanway, R.R. (2010). Imaging liver-stage malaria parasites. *Cellular Microbiolology*, *12*, 569-579.

Ranson, H., N'guessan, R., Lines, J., Moiroux, N., Nkuni, Z., & Corbel, V. (2011). Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control? *Trends in Parasitology*, *27*, 91-98.

Sinden, R.E., & Hartley, R.H. (1985). Identification of the meiotic division of malarial parasites. *Journal of Protozoology*, *32*, 742-744.

Su, X., Ferdig, M.T., Huang, Y., Huynh, C.Q., Liu, A., You, J., Wootton, J.C., & Wellems, T.E. (1999). A genetic map and recombination parameters of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science*, *286*, 1351-1353.

Tilley, L., Dixon, M.W., & Kirk, K. (2011). The *Plasmodium falciparum*-infected red blood cell. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *43,* 839-842.

Vaughan, J.A. (2007) Population dynamics of *Plasmodium* sporogony. *Trends in Parasitology*, *23,* 63-70.

Walliker, D. Quakyi, I.A., Wellems, T.E., McCutchan, T.F., Szarfman, A., London, W.T., Corcoran, L.M., Burkot, T.R., & Carter, R. (1987) Genetic analysis of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science*, *236*, 1661-1666.

Wellems, T.E., Panton, L.J., Gluzman, I.Y., do Rosario, V.E., Gwadz, R.W., Walker-Jonah, A., & Krogstad, D.J. (1990) Chloroquine resistance not linked to *mdr*-like genes in a *Plasmodium falciparum* cross. *Nature*, *345*, 253-255.

WHO. (2001). *Antimalarial Drug Combination Therapy*, *Report of a WHO Technical Consultation.* Geneva; Roll Back Malaria/WHO.

Yuan, J., Cheng, K.C., Johnson, R.L., Huang, R., Pattaradilokrat, S., Liu, A., Guha, R., Fidock, D.A., Inglese, J., Wellems, T.E., Austin, C.P., & Su, X.Z. (2011). Chemical genomic profiling for antimalarial therapies, response signatures, and molecular targets. *Science, 333,* 724-729.

Yuan, J., Johnson, R.L., Huang, R., Wichterman, J., Jiang, H., Hayton, K., Fidock, D.A., Wellems, T.E., Inglese, J., Austin, C.P., & Su, X.Z. (2009). Genetic mapping of targets mediating differential chemical phenotypes in *Plasmodium falciparum*. *Nature Chemical Biology*, *5*, 765-771.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University