หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

มาลาเรียเป็นโรคติดเชื้อที่สำคัญที่สุดในชนบทไทยซึ่งก่อให้เกิดการสูญเสียทรัพยากรบุคคล ในการพัฒนาชาติอย่างใหญ่หลวง มีรายงานว่าอัตราการเป็นโรคได้เพิ่มขึ้นจาก 2.9 ราย ต่อประชากร 1000 คนในปี พ.ศ. 2516 เป็น 8.9 รายต่อประชากร 1000 คนในปี พ.ศ. 2523 (Harinasuta และคณะ , 1982) ปี พ.ศ. 2524 มีผู้ป่วยมาลาเรียจากทุกจังหวัดทั้งประเทศ จำนวน 163,428 ราย ซึ่งเพิ่มมากกว่าสถิติของ พ.ศ. 2523 ถึงร้อยละ 32 สถิติล่าสุดของปี พ.ศ. 2525 พบว่าจำนวนผู้ป่วยมาลาเรียที่เข้ามารับการรักษาสูงถึง 420,799 ราย โดยมีผู้เสียชีวิต 3779 ราย (สุรินทร์ พินิจพงศ์, 2527) ซึ่งมีผลให้จำนวนผู้ป่วยมาลาเรียยังคงเป็นหนึ่งใน 10 อันดับแรกของผู้ป่วยในโรงพยาบาลทั่วประเทศ (Amaranuntakit, 1984)

โรคมาลาเรียเกิดจากการติดเชื้อพลาสโมเดียม (Plasmodium sp.) ซึ่งเป็นยูคาริโอตจำพวกสัตว์เซลล์เดียว (โปรโตซัว ; protozoa) และจัดอยู่ในชั้นสปอโรซัว (sporozoa) พลาสโมเดียมชนิด (species) ที่เป็นสาเหตุสำคัญของโรคในประเทศไทยเป็นเชื้อชนิด พลาสโมเดียม ฟาลซีพารัม (P.falciparum) 70 เปอร์เซนต์ และ พลาสโมเดียม ไวแวกซ์ (P.vivax) 30 เปอร์เซนต์ (จรูญเวสม์ และคณะ, 2520) แต่บางท้องที่มาลาเรียเนื่องจากการติดฟาลซีพารัมอาจสูงถึง 98.38 - 99.19 เปอร์เซนต์ (Amaranuntakit, 1984) เชื้อพลาสโมเดียมที่พบเฉพาะในคนอีก 2 ชนิดได้แก่ พลาสโมเดียม มาลาริอี (P.malariae) และพลาสโมเดียม โอวัลเล (P.ovale) สองชนิดหลังนี้ไม่พบในประเทศไทย มีรายงานว่าอาการป่วยจะรุนแรงที่สุดจากการติดเชื้อฟาลซีพารัม ซึ่งถ้าไม่ได้รับการรักษาที่ถูกต้อง อาจมีอาการของมาลาเรียขึ้นสมอง (cerebral malaria) และถึงแก่ชีวิตในที่สุด นอกจาก จะทำให้เกิดโรคมาลาเรียในคนแล้ว พลาสโมเดียมบางชนิดยังทำให้เกิดโรคในสัตว์มีกระดูกสันหลังประเภทอื่น ๆ เช่น สัตว์ฟันแทะ ลิง นก เป็ด งู เป็นต้น

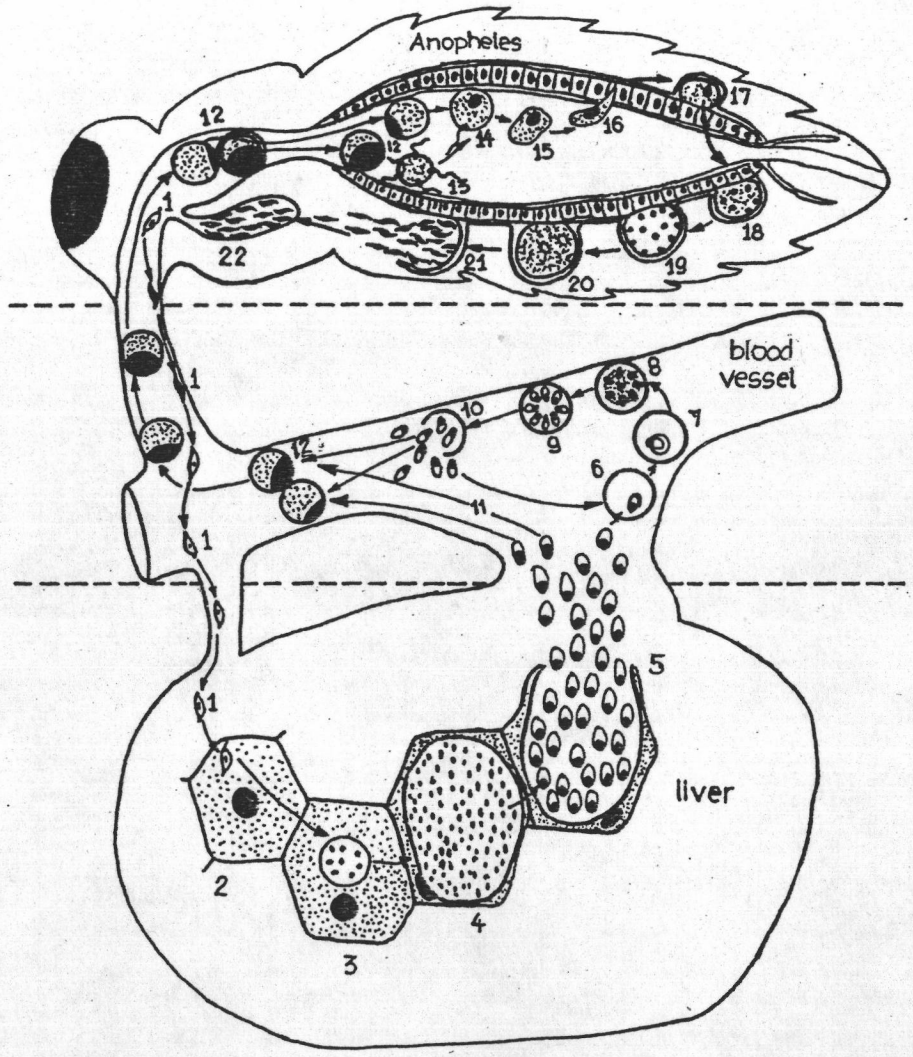
1.1 วงชีพของพลาสโมเดียม

การดำรงชีวิตของพลาสโมเดียมจะสมบูรณ์ได้ต้องอาศัยเซลล์เจ้าเรือน 2 ประเภท คือ ยุงก้นปล่อง (Anopheles sp.) ตัวเมียและสัตว์มีกระดูกสันหลัง (รูปที่ 1 แสดงถึงวงชีพของพลาสโมเดียมในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม) เมื่อยุงก้นปล่องตัวเมียที่มีสปอโรซอยต์ (sporozoites) ของเชื้อพลาสโมเดียมกัดสัตว์เพื่อกินเลือดจะปล่อยน้ำลายออกมา เพื่อเจือจางเลือดและช่วยมิให้เลือดแข็งตัว สปอโรซอยต์จากต่อมน้ำลาย (หมายเลข 1 ในรูป) จะเข้าสู่กระแสเลือดไปยังเซลล์พาเรนไคมา (parenchymal cells) ของตับ ณ ที่นี้จะเกิดการเจริญเติบโตและแบ่งตัวอย่างไม่มีเพศ (asexual reproduction) จนได้ลูกหลานชนิดไม่มีเพศเรียกไซซอนต์ (shizonts) การแบ่งตัวระยะนี้เรียก pre-erythrocytic shizogony (หมายเลข 2-4) ผลสุดท้ายเซลล์พาเรนไคมาจะแตกออก เมอโรซอยต์ (merozoites) จากไซซอนต์จะถูกปล่อยเข้าสู่กระแสเลือด (หมายเลข 5) และบุกรุกเม็ดเลือดแดง เจริญเป็นระยะวงแหวน (ring form) ต่อด้วยระยะโทรโฟซอยต์ (trophozoite) แล้วจึงมีการแบ่งตัวแบบไม่มีเพศที่ระยะไซซอนต์ (shizont) ได้ชิโซซอยต์ (shizozoites) จำนวนมากมาย เรียกกระบวนการเจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงนี้ว่า erythrocytic shizogony (หมายเลข 6-9)

เมื่อไซซอนต์เจริญเต็มที่เม็ดเลือดแดงจะแตก (หมายเลข 10) ปล่อยชิโซซอยต์เข้าสู่วงจรในเม็ดเลือดแดงเซลล์ใหม่ ซึ่งชิโซซอยต์บางตัวหลังจากไซเข้าเม็ดเลือดแดงแล้วอาจเจริญและเปลี่ยนแปลง (differentiate) เป็นแกมีโตไซต์ (gametocyte) เพศผู้และเพศเมีย (หมายเลข 12) พลาสโมเดียมบางชนิดแกมีโตไซต์อาจเจริญมาจากเมอโรซอยต์ในเซลล์พาเรนไคมา (หมายเลข 11) เมื่อยุงก้นปล่องตัวเมียมากัดสัตว์ที่เป็นโรคก็จะรับเอาเชื้อในระยะแกมีโตไซต์นี้เข้าสู่ร่างกายเกิดการผสมพันธุ์และเจริญเติบโตจนได้เป็นระยะสปอโรซอยต์ ซึ่งพร้อมที่จะแพร่เชื้อต่อไปเป็นวัฏจักร (หมายเลข 13-22)

1.2 แหล่งของพิวรีน (purine) และไพริมิดีน (pyrimidine)

Polet และ Barr (1968) ทำการทดลองโดยวิธีทางรังสีแบบ in vitro พบว่าเม็ดเลือดแดงของลิงที่ติดเชื้อ พลาสโมเดียม โนลีซาย (P.knowlesi) สามารถนำสารประกอบพิวรีน (อะดีนีน (adenine) อะดีโนซีน (adenosine) กวาโนซีน (guanosine)



รูปที่ 1. วงชีพของพลาสโมเดียมในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม
(Landau และ Boulard , 1978)

และไฮโปแซนธีน (hypoxanthine)) จากอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าสู่เซลล์และตรวจพบในส่วนของโมเลกุลกรดนิวคลีอิค แต่เมื่อทำการทดลอง เช่นเดียวกันโดยใช้ไพริมิดีน (ไธมีน (thymine) ไธมิดีน (thymidine) และอื่น ๆ) แทนกลับไม่พบการนำเข้าเลย ผลการทดลองในลักษณะเดียวกันนี้ได้รับการยืนยันอีกครั้งหนึ่ง เมื่อทำการทดลองกับเม็ดเลือดแดงหนูไมซ์ ซึ่งติดเชื้อ พลาส์โมเดียม เบอจิอาย (P.berghei) และพลาส์โมเดียม วิงกิอาย (P.vinckei) (Bungener และ Nielson, 1969)

Tracy และSherman (1972) พบว่าการนำอะดีโนซีนเข้าสู่เม็ดเลือดแดงของเป็ดที่ติดเชื้อพลาส์โมเดียม โลฟูเร (P.lophurae) จะถูกยับยั้งด้วยไฮโปแซนธีนและอิโนซีน (inosine) ซึ่งทั้งคู่ต่างก็เป็นพิวรีนที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าอะดีโนซีน แต่จะไม่ถูกยับยั้งด้วยอะดีนีน กวานีน (guanine) และอะดีโนซีนโตรฟอส์เฟต (ATP) สันนิษฐานว่าอะดีโนซีนจะถูกเปลี่ยนไปเป็นอิโนซีนในระหว่างขั้นตอนการนำเข้าหรือก่อนหน้าเล็กน้อยและถูกขนย้าย (transport) ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงในตำแหน่งเดียวกันไฮโป-แซนธีน

นอกจากนี้ยังมีผู้ทำการทดลองติดตามการนำเข้าของสารตั้นตอสำหรับการสังเคราะห์พิวรีน ในพลาส์โมเดียมหลายชนิด อาทิเช่น พลาส์โมเดียม โลฟูเร (Walsh และ Sherman, 1968) พลาส์โมเดียม เบอจิอาย (Sherman, 1977) และพลาส์โมเดียม วิงกิอาย (Konigk, 1977) ไม่ปรากฏว่ามีการนำเข้าของกรดฟอร์มิคและกรดอะมิโนไกลซีน ในขณะที่ไบคาร์บอเนตสามารถผ่านเข้าเซลล์ของพลาส์โมเดียม และใช้เป็นองค์ประกอบส่วนหนึ่งของโมเลกุลกรดนิวคลีอิค นอกจากนี้ยังพบแอคติวิตี ของเอนไซม์อย่างน้อย 6 ตัว ในวิถีเมตา-บอลิสมของการสังเคราะห์ไพริมิดีนอีกด้วย

หลักฐานเหล่านี้ทำให้อาจสรุปได้ว่าพลาส์โมเดียมสังเคราะห์ไพริมิดีนแบบ de novo ได้ ส่วนพิวรีนจะได้รับโดยตรงจากเซลล์เจ้าเรือน ซึ่งเชื่อว่าแหล่งที่สำคัญคือ ATP ในเซลล์เม็ดเลือดแดงนั่นเอง และจะถูกเปลี่ยนแปลงโดยอาศัยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เป็นไฮโป-แซนธีนก่อนที่จะถูกลำเลียงเข้าสู่เซลล์ พลาส์โมเดียมเพื่อเป็นตั้นตอของการสังเคราะห์พิวรีนโมเลกุลอื่น ๆ ต่อไป (Sherman, 1979)

1.3 เมตาบอลิสมของโคเอนไซม์โฟเลต (folate metabolism)

1.3.1 การสังเคราะห์ไดไฮโดรโฟเลต (dihydrofolate)

ปัจจุบันความเข้าใจเกี่ยวกับวิถีเมตาบอลิสมของโคเอนไซม์โฟเลตค่อนข้างจะแจ่มชัดแล้วในแบคทีเรีย พืช และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (อาจรวมถึงสัตว์มีกระดูกสันหลังอื่น ๆ) ได้รับโฟเลตจากแหล่งภายนอกเซลล์ (exogeneous sources) เช่น สารอาหารแล้วจะถูกรีดิวซ์เป็นไดไฮโดรโฟเลต (dihydrofolate) ด้วยแอคติวิตีของเอนไซม์โฟเลต รีดักเตส (folate reductase) ในขณะที่แบคทีเรียและพืชสังเคราะห์โคเอนไซม์โฟเลตแบบ de novo สำหรับสิ่งมีชีวิตจำพวกโปรโตซัว ซึ่งรวมถึงพลาสโมเดียมยังได้รับการศึกษากันน้อยมาก (Hitching และ Burchall, 1965)

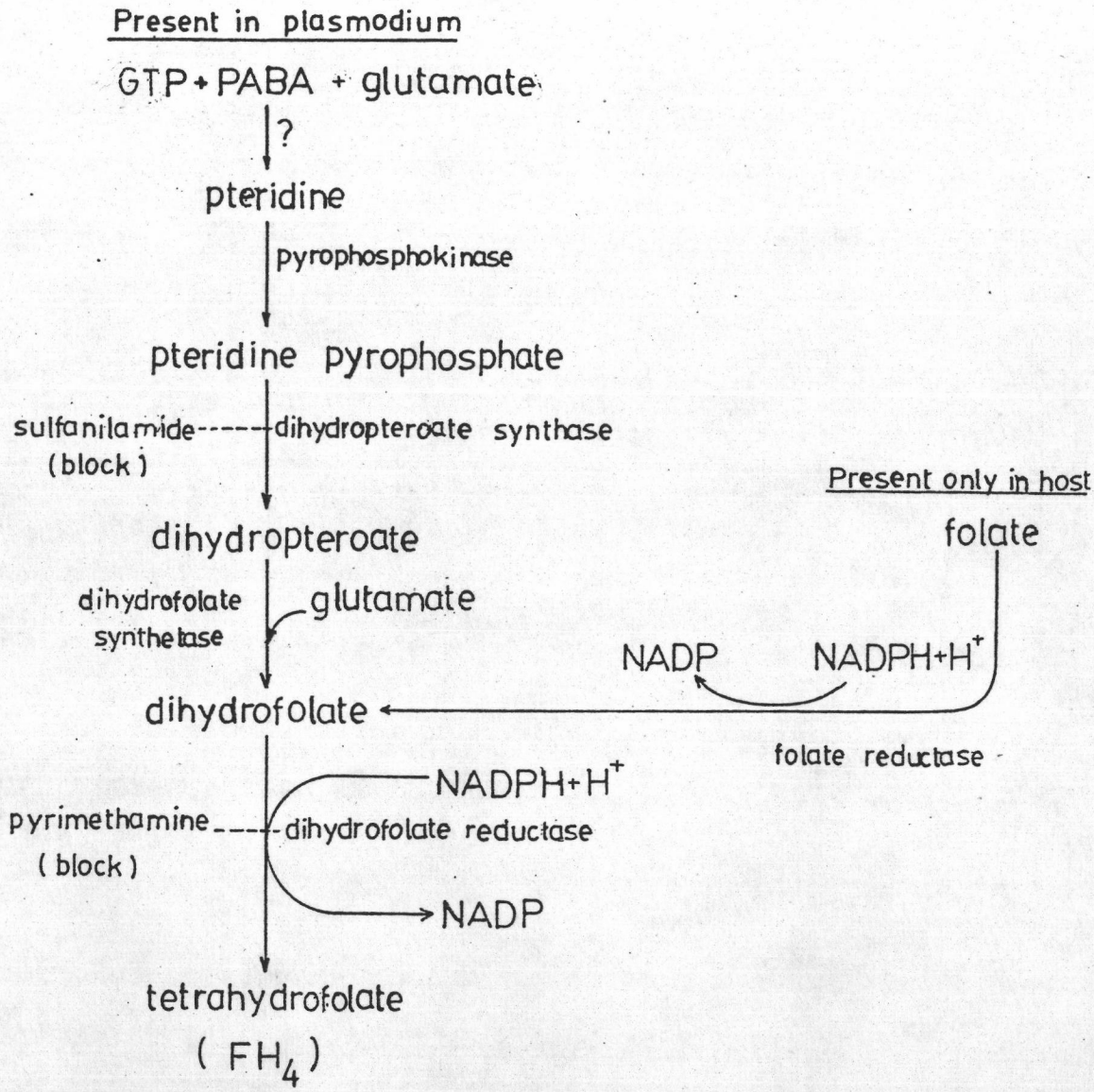
Coggeshall (1940) รายงานเป็นครั้งแรกว่า ซัลฟานิลาไมด์ (sulfanilamide) ซึ่งเป็นสารที่มีโครงสร้างคล้ายกรดพาราอะมิโนเบนโซอิค (p-aminobenzoic acid ; PABA) สามารถใช้รักษาโรคมาลาเรียในคนได้ จึงนับเป็นครั้งแรกที่แสดงให้เห็นถึงบทบาทของ PABA ต่อการเจริญของพลาสโมเดียม

Glenn และ Manwell (1956) รายงานว่าโฟเลตสามารถกระตุ้นการเจริญของ พลาสโมเดียม เฮกซามีเรียม (P.hexamerium) โดยมี lag period 24 ชั่วโมง (ทำการทดลอง in vitro) แต่ต่อมา Trager (1958) พบว่า พลาสโมเดียม โลฟูเร จะมีการเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีลิวโคโวริน (leucovorin) (ส่วนผสมของโฟลิเนต (folinate) และ 5-ฟอร์มิล-เตตระไฮโดรโฟเลต (5-formyltetrahydrofolate)) แต่จะไม่เกิดขึ้นเมื่อเสริมด้วยโฟเลต แต่เพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ยังไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนโฟลิเนตเป็นเตตระไฮโดรโฟเลต จึงเชื่อว่าการเจริญของ พลาสโมเดียม โลฟูเร น่าจะเป็นผลจาก 5-ฟอร์มิล-เตตระไฮโดรโฟเลตเอง

Jacobs (1964) ทำการทดลองให้ PABA เป็นอาหารเสริมแก่หนูไมซ์ทางปาก พบว่าหนูจะไวต่อการติดเชื้อพลาสโมเดียม เบอจิอาย ได้มากขึ้นถ้าหากหนูได้รับ PABA อย่างน้อยวันละ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ในขณะที่ปริมาณโฟเลตในระดับเดียวกันจะมีผลต่อความไวของการติดเชื้อต่ำกว่ามาก Ferone และ Hitching (1966) ศึกษาทางด้านเอนไซม์เมื่อใช้พลาสโมเดียม เบอจิอาย เป็นแม่แบบ (model) รายงานว่าไม่พบแอคติวิตีของ

เอนไซม์โฟเลต รีดักเตส จึงไม่น่าจะใช้สารโฟเลตได้โดยตรง แต่พบว่ามีเอนไซม์ที่ใช้ไดไฮโดรโฟเลตเป็นสับสเตรต โดยมี NADPH เป็นโคเอนไซม์ และถูกยับยั้งได้ด้วยไพรีเมธามีน (pyrimethamine) ซึ่งเป็นสารพวกแอนติโฟเลต (antifolate) จึงเชื่อว่าเอนไซม์นี้น่าจะเป็นเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส ซึ่งผลงานวิจัยนี้เท่ากับช่วยสนับสนุนสมมติฐานการสังเคราะห์โคเอนไซม์โฟเลตแบบ de novo

Ferone (1973) พบว่าเอนไซม์ที่เตรียมจาก พลาสโมเดียม เบอจิอาย พลาสโมเดียม โลฟูเร พลาสโมเดียม โนลิซาย และพลาสโมเดียม กัลลิเนเซียม (P.gallinaceum) สามารถสังเคราะห์ไดไฮโดรพเทอโรเอต (dihydropteroate) และไดไฮโดรโฟเลตจาก 2-อะมิโน-4-ไฮดรอกซี-6-ไฮดรอกซีเมทธิล-7,8-ไดไฮโดรพเทอริดีน (ไฮดรอกซีเมทธิลไดไฮโดรพเทอริดีน ; 2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyl-7,8-dihydropteridine (hydroxymethyldihydropteridine)) ซึ่งแสดงว่าอย่างน้อยพลาสโมเดียมน่าจะมีเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส (dihydropteroate synthase) และไดไฮโดรโฟเลต ซินเธเตสด้วย จากหลักฐานเหล่านี้ประกอบกับข้อมูลที่รวบรวมจากการศึกษาในพลาสโมเดียมหลายชนิดโดย Ferone (1977) อีกทั้งยังพบแอคติวิตีของไดไฮโดรพเทอริดีน ไพโรฟอสโฟไคเนส (pyrophosphokinase) ในพลาสโมเดียม ชาบอดี (P.chabaudi) และพลาสโมเดียม เบอจิอาย และสามารถสกัดเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส ได้จากพลาสโมเดียมเหล่านี้ (Konigk, 1974-1975) ทำให้เชื่อว่าพลาสโมเดียมทั่ว ๆ ไป น่าจะสังเคราะห์ไดไฮโดรโฟเลตแบบ de novo เช่นเดียวกับแบคทีเรีย คือสังเคราะห์จากโมเลกุลของสารตั้งต้น 3 ชนิด ได้แก่ PABA กวาโนซีนไตรฟอสเฟต (guanosine triphosphate; GTP) และกลูตาเมต (glutamate) (รูปที่ 2) สำหรับการที่โฟเลตมีผลเสริมการเจริญของพลาสโมเดียมนั้นเข้าใจว่าเป็นผลจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการแตกสลาย (degradation) ของโฟเลตโดยวิธีใดวิธีหนึ่ง ผลิตภัณฑ์เหล่านั้นอาจได้แก่ พาราอะมิโนเบนโซอิลกลูตาเมต (p-aminobenzoyl glutamate) GTP หรือโมเลกุลของพเทอริดีน (Thompson และ Werbel, 1972)

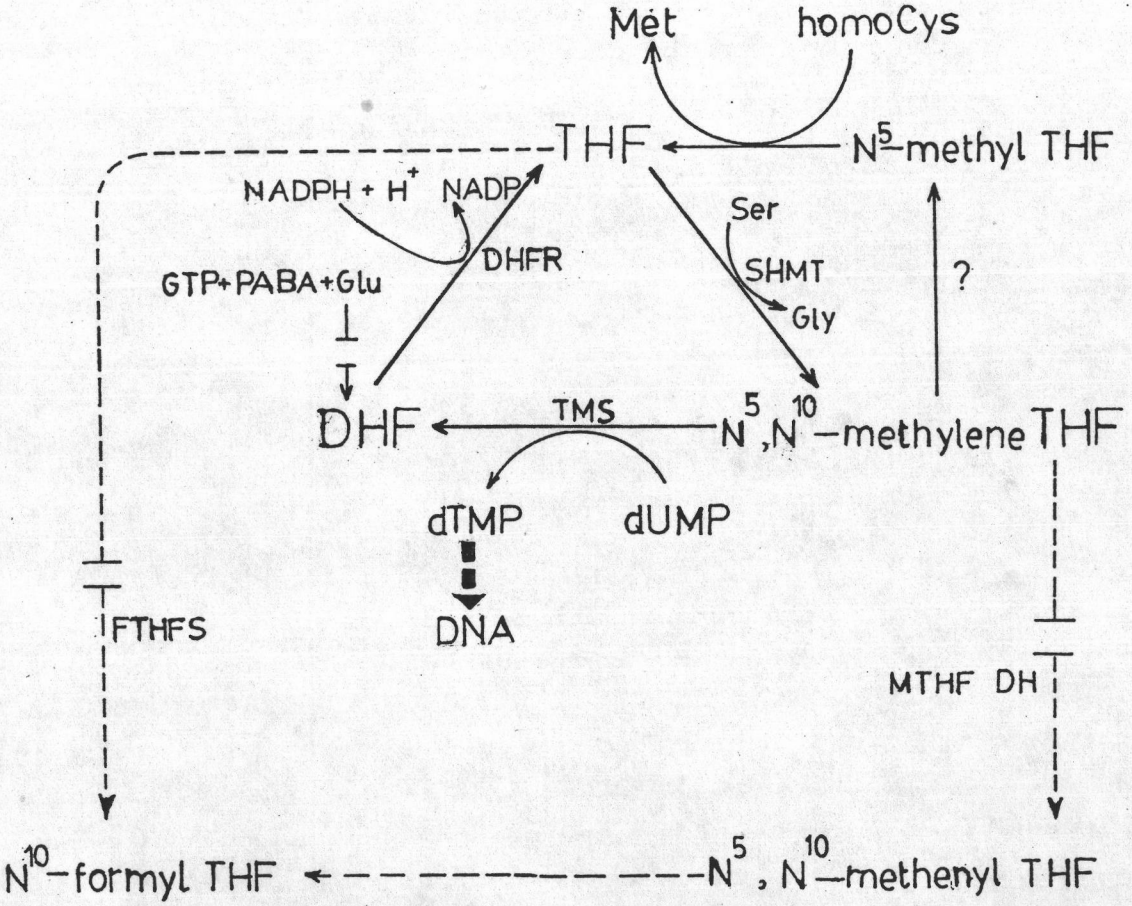


รูปที่ 2. การสังเคราะห์โคเอนไซม์โฟเลตในพลาสโมเดียมและเซลล์เจ้าเรือนทั่วๆไป (Ferone, 1966 และ Sherman, 1979)

1.3.2 เมตาบอลิส่มของเตตระไฮโดรโฟเลต

ผลจากการค้นพบของ Ferone และ Hitching (1966) ที่ว่ามีแอคติวิตีของเอนไซม์ ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส ในพลาส่โมเดียม เบอจิอาย นับเป็นหลักฐานแรกที่แส่ดงให้เห็นว่าหลังจากที่มีการสังเคราะห์ไดไฮโดรโฟเลตแบบ de novo แล้วจะถูกรีดิวซ์เป็นเตตระไฮโดรโฟเลตเข้าสู่วิถีเมตาบอลิส่มของเตตระไฮโดรโฟเลต ในสิ่งมีชีวิตจำพวกโปรโตซัวหรือแม้แต่พลาส่โมเดียมเองวิถีดังกล่าวได้รับการศึกษากันน้อยมาก อย่างไรก็ดี Platzer (1972) ได้ตั้งส่มมติฐานของวัฏจักรการสังเคราะห์ไธมิดิลเลต (thymidylate synthesis cycle) ขึ้นอย่างส่มบูรณ์ในพลาส่โมเดียม โลฟูเร โดยที่ส่ามารถติดตามพบแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวัฏจักรครบทั้ง 3 ตัว คือไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส (DHFR) เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทรานส่เฟอเรส่ (serine hydroxymethyl transferase ; SHMT) และ ไธมิดิลเลต ซินเตส่ (thymidylate synthase; TMS) (รูปที่ 3) ซึ่งเอนไซม์ตัวหลังนี้ยังพบใน พลาส่โมเดียม เบอจิอาย (Reid และ Friedkin, 1973) และ พลาส่โมเดียม ฆาบอดี (Walter และคณะ , 1970) อีกด้วย

Langer และคณะ (1969) ศึกษาโดยใช้ พลาส่โมเดียม เบอจิอาย เป็นแม่แบบรายงานถึงปฏิกิริยาการสังเคราะห์กรดอะมิโนเมทไธโอนีน (methionine) โดยมี 5-เมทธิล-เตตระไฮโดรโฟเลต (N^5-methyltetrahydrofolate) เป็นแหล่งของหมู่เมทธิล (methyl group) ต่อมา Smith และคณะ (1976) พบปฏิกิริยาเดียวกันนี้ เมื่อทำการทดลองด้วย พลาส่โมเดียม โนลิซาย Platzer (1972) พบแอคติวิตีของเอนไซม์ฟอร์มิล-เตตระไฮโดรโฟเลต ซินเธเตส่ (formyl-tetrahydrofolate synthetase;FTHFS) และเอนไซม์เมทธิลีนเตตระไฮโดรโฟเลต ดีไฮโดรจีเนส่ (methylene-tetrahydrofolate dehydrogenase; MTHF DH) การพบเอนไซม์ทั้ง 3 ตัวนี้ ทำให้ Sherman (1979) ตั้งส่มมติฐานของเมตาบอลิส่มของเตตระไฮโดรโฟเลตในพลาส่โมเดียม เพิ่มเติมจากวัฏจักรการสังเคราะห์ไธมิดิลเลต ซึ่งเส่นอโดย Platzer ดังที่กล่าวแล้วข้างต้น



รูปที่ 3. สมมติฐานของเตตระไฮโดรโฟเลตเมตาบอลิสม ในพลาสโมเดียม (Platzer, 1972 และ Sherman, 1979)

1.4 เคมีบำบัด (Chemotherapy) และการดื้อยา (Drug resistance) ของมาลาเรีย

สารเคมีชนิดแรกที่ใช้รักษาโรคมาลาเรียคือ ควินิน (quinine) ซึ่งเป็นสารที่สกัดจากต้นซินโคนา (Cinchona sp.) โดยเป็นที่รู้จักกันตั้งแต่ปี ค.ศ. 1600 การใช้ควินินรักษาโรคนั้นก่อให้เกิดผลข้างเคียง (side effect) มากมาย อาทิเช่น คลื่นไส้ อาเจียน หูอื้อ เป็นต้น และยังมีราคาแพง จึงมีการสังเคราะห์สารเคมีขึ้นมาใช้แทน สารสังเคราะห์ตัวแรกคือ พามาควิน (pamaquine) แต่ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายคือ คลอโรควิน (chloroquine)

การรักษาโรคมาลาเรียทางเคมีบำบัด ทำได้โดยใช้สารเคมีสังเคราะห์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของพลาสโมเดียมในระยะต่าง ๆ กันของวงชีพ สารเคมีเหล่านี้ แบ่งเป็นกลุ่มใหญ่ ๆ ตามการออกฤทธิ์ได้เป็น 3 กลุ่ม (Peters และ Howells, 1978) กลุ่มที่หนึ่งคือสารประกอบพวกอะมิโนควิโนลีน (aminoquinolines) ได้แก่อนุพันธ์ของ 4-อะมิโนควิโนลีน และ 8-อะมิโนควิโนลีน สารเคมีกลุ่มนี้มีผลต่อทุกระยะการเจริญของพลาสโมเดียมในเซลล์เจ้าเรือน กลุ่มที่สองเป็นสารประกอบที่เรียกว่าแอนติเมตาบอไลต์ (antimetabolites) ตัวอย่างเช่น ไพริเมธามีน และยาซัลฟา (sulfa drugs) มีผลเช่นเดียวกับสารกลุ่มแรก ยกเว้นเพียงแต่ไม่ยับยั้งระยะที่พลาสโมเดียมจะเปลี่ยนแปลงไปเป็นแกมีโตไซต์ และสารกลุ่มสุดท้ายคือพวกที่ออกฤทธิ์ทำลายพลาสโมเดียมในระยะที่บุกรุกเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือด สารเคมีกลุ่มนี้ที่รู้จักกันดีได้แก่ควินินและคลอโรควิน นอกจากสารเคมีสังเคราะห์แล้วปฏิชีวนสารบางชนิด เช่น เตตระไซคลิน (tetracyclin) ก็ใช้รักษาโรคมาลาเรียด้วย โดยใช้ควบคู่ไปกับสารกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งที่กล่าวแล้ว

ตารางที่ 1 ตัวอย่างสารเคมีที่ใช้บำบัดโรคมาลาเรีย และระยะการเจริญในวงชีพของพลาสโมเดียมที่ถูกผลกระทบ (Peters และ Howells, 1978)

Stage affected	Compounds
Asexual blood stages	Chloroquine and other 4-aminoquinolines, mepacrine, quinine and some quinine analogues
	4-quinolinemethanols, 9-phenanthrenemethanols
	primaquine and other 8-aminoquinolines
	naphthoquinones, sulphones
	sulphonamides, sulphones
	pyrimethamine
	proguanil, cycloguanil and related triazines
	tetracycline and related analogues
	clindamycin and related analogues
Gametocytes (immature)	All the above
Gametocytes (mature)	?
Sporogonic stages	Naphthoquinones, quinolones
	sulphonamides, sulphones
	pyrimethamine
	proguanil,cycloguanil and related analogues
	? antibiotics
Pre-erythrocytic stages	Primaquine and other 8-aminoquinolines
	napthoquinones, quinolones
	sulphonamides, sulphones
	pyrimethamine
	proguanil,cycloguanil and related triazines
	tetracycline,clindamycin and analogues

ถึงแม้จะพบว่าสารเคมีทั้งที่สกัดได้จากธรรมชาติ และสังเคราะห์ขึ้นโดยวิธีเคมีหลายชนิดดังกล่าวมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของพลาสโมเดียมแล้วก็ตาม การบำบัดรักษาโรคมาลาเรียก็ยังต้องพบกับความยุ่งยากในเรื่องของการที่เชื้อพลาสโมเดียมสร้างความต้านทานต่อยา หรือที่เรียกว่าดื้อยา การดื้อยาของเชื้อ พลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม ต่อคลอโรควิน เริ่มพบตั้งแต่ปี 1961 ซึ่ง Young และ Moore รายงานการต้านคลอโรควินในประเทศโคลอมเบีย Degowin และ Powell (1965) พบปัญหาเดียวกันที่ประเทศมาลาเซีย สำหรับประเทศไทยคลอโรควินเข้ามามีบทบาทใช้รักษาโรคมาลาเรีย ตั้งแต่สมัยสงครามโลกครั้งที่ 2 และมีรายงานเป็นครั้งแรกถึงการต้านทาน ในพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม เมื่อปี 1962 (Young และคณะ, 1963; สุพัฒน์ เนยปฏิมานนท์, 2507 ; Harinasuta และคณะ, 1965) Harinasuta (1976) และ Colwell (1976) รายงานตรงกันว่าเชื้อฟาลซิพารัมที่ดื้อต่อคลอโรควินนี้มีระบาดไปทั่วประเทศ ยาที่นำมาใช้แทนคลอโรควินคือยาพวกซัลฟาโดยอาจใช้โดด ๆ หรือใช้ควบคู่กับไพริเมธามีน ตัวที่นิยมมากที่สุดคือ แฟนสิดาร์ (Fansidar) ซึ่งประกอบด้วยไพริเมธามีน 25 มิลลิกรัม และอนุพันธ์ซัลฟานิลาไมด์ (sulfanilamide) ที่เรียกว่าซัลฟาดอกซีน (sulfadoxine) จำนวน 500 มิลลิกรัม นอกจากนี้ก็มียาชนิดอื่นซึ่งมีสัดส่วนของไพริเมธามีนต่ออนุพันธ์ของซัลฟาชนิดอื่นต่าง ๆ กันออกไปด้วย ทั้งนี้อนุพันธ์ซัลฟาและไพริเมธามีนสามารถเสริมฤทธิ์ (synergism) กันได้ (Rollo, 1955)

1.5 ปัญหาการต้านไพริเมธามีน

ในระยะแรกที่ยาแฟนสิดาร์ถูกนำมาใช้ในประเทศไทย นับตั้งแต่ปี พ.ศ. 2515 ปรากฏว่าให้ผลเป็นที่น่าพอใจ มีอัตราการรักษาหายขาดสูงถึง 85 เปอร์เซ็นต์ (Hall,1974) อย่างไรก็ดีภายหลังพบว่าผลการรักษาหายขาดของยานี้ต่อมาลาเรียฟาลซิพารัมลดน้อยลงเรื่อย ๆ จากรายงานของศูนย์มาลาเรีย เขต 1 โรงพยาบาลพระพุทธบาท อัตราหายขาดเมื่อใช้ยาแฟนสิดาร์ลดเหลือเพียง 10 เปอร์เซ็นต์ (Harinasuta,1980) หน่วยงาน AFRIMS ทำการศึกษาในผู้ป่วยบริเวณชายแดนไทย-กัมพูชา (ช่วงปี 1979-1980) ปรากฏว่ามีอัตราการหายขาด 9.1 เปอร์เซ็นต์ และเพิ่มเป็น 19.4 เปอร์เซ็นต์ เมื่อได้รับยาแฟนสิดาร์ครั้งละ 2 และ 3 เม็ดตามลำดับ เข้าใจว่าการที่อัตราการหายขาดลดลง และต้องเพิ่มขนาด (dose) ของยาเนื่องจากมาลาเรียฟาลซิพารัมสร้างความต้านทานต่อไพริเมธามีน จนกระทั่ง Thaithong

และ Beale (ปี 1980) ทดสอบความไวต่อไพริเมธามีนของ พลาสโมเดียม ฟาลซีพารัม แบบ in vitro พบว่าเชื้อส่วนใหญ่ในประเทศไทย สร้างความต้านทานขึ้นตลอดจนอัตราการแพร่กระจายกว้างขวางมากจนเกือบทุกจังหวัด

สุพัฒน์ เนยปฏิมานนท์ และ ชลิต ธรรมรักษา (2526) รายงานผลการรักษาผู้ป่วยมาลาเรียฟาลซีพารัม จากเขตจังหวัดจันทบุรี กาญจนบุรี ลพบุรี ปราจีณบุรี นครนายกและสระบุรี โดยยาแฟนสิดาร์ขนาด 3 เม็ดต่อครั้ง มีผลให้ผู้ป่วยที่ยังมีอาการของโรคไม่รุนแรงและไม่เคยได้รับเคมีบำบัดมาก่อน หายขาดเพียง 8 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอีก 92 เปอร์เซ็นต์นั้น เชื้อพลาสโมเดียมยังคงมีชีวิตอยู่ในกระแสเลือด

จากสาเหตุที่พลาสโมเดียม ฟาลซีพารัม ลดความไวต่อไพริเมธามีน วงการแพทย์ของไทยจึงกลับมาใช้ควินินเป็นยาหลักสำหรับบำบัดโรค แต่ผลการรวบรวมข้อมูลระหว่างปี 1981-1982 แสดงให้เห็นว่าเชื้อฟาลซีพารัม ถึง 22 เปอร์เซ็นต์ เริ่มมีลักษณะต้านยาควินิน (Duriyananda และ Noeypatimanond, 1982)

วิธีการที่จะทำให้มาลาเรียดื้อยาช้าลงคือ กำหนดขอบเขตของการใช้หรือใช้สารเคมีหลายตัวร่วมกัน เช่น ควินิน/เตตระไซคลิน (Noeypatimanond และคณะ, 1983) หรือใช้สารเคมีชนิดใหม่ ๆ มาเป็นองค์ประกอบของยา ตัวอย่างเช่น อะโมไดอาควิน (amodiaquine) หรือเมโฟลควิน (mefloquine) สารเหล่านี้จะมีประสิทธิภาพในการรักษาต่อไปได้ดี จำเป็นต้องป้องกันมิให้เกิดการต้านขึ้นใน พลาสโมเดียม ฟาลซีพารัม ซึ่งทำได้โดยใช้ร่วมกับสารอื่น เช่น อะโมไดอาควิน/เตตระไซคลิน (Noeypatimanond และคณะ, 1983) เมโฟลควิน/ไพริเมธามีน เมโฟลควิน/ซัลฟาดอกซีน เป็นต้น ทั้ง ๆ ที่สารเหล่านี้อาจไม่มีการเสริมฤทธิ์กันเลย (Kreier, 1980)

แม้ว่าจะแก้ปัญหาการดื้อยาด้วยวิธีใดก็ตาม ในที่สุดก็จะเกิดปัญหาการต้านยาขึ้นมาได้ ทิศทางการศึกษาวิจัยยารักษาโรคมาลาเรียในอนาคต จึงมุ่งไปสู่ปฏิกิริยาการออกฤทธิ์ของสารเคมีที่ใช้เป็นยากันอยู่ และกลไกการสร้างความต้านทาน เลือกสรรวิธีการใหม่สำหรับทดสอบผลกระทบของสารเคมีต่อพลาสโมเดียม เช่น ทำการทดลองกับสัตว์ทดลอง ศึกษาให้รู้ถึงวิถีเมตาบอลิสม ในพลาสโมเดียม ซึ่งอาจมีความแตกต่างหรือไม่พบในเซลล์เจ้าเรือน (parasite specific) เพื่อเป็นแนวทางค้นคว้าสารสังเคราะห์ที่มีคุณสมบัติของ selective enzyme inhibitors

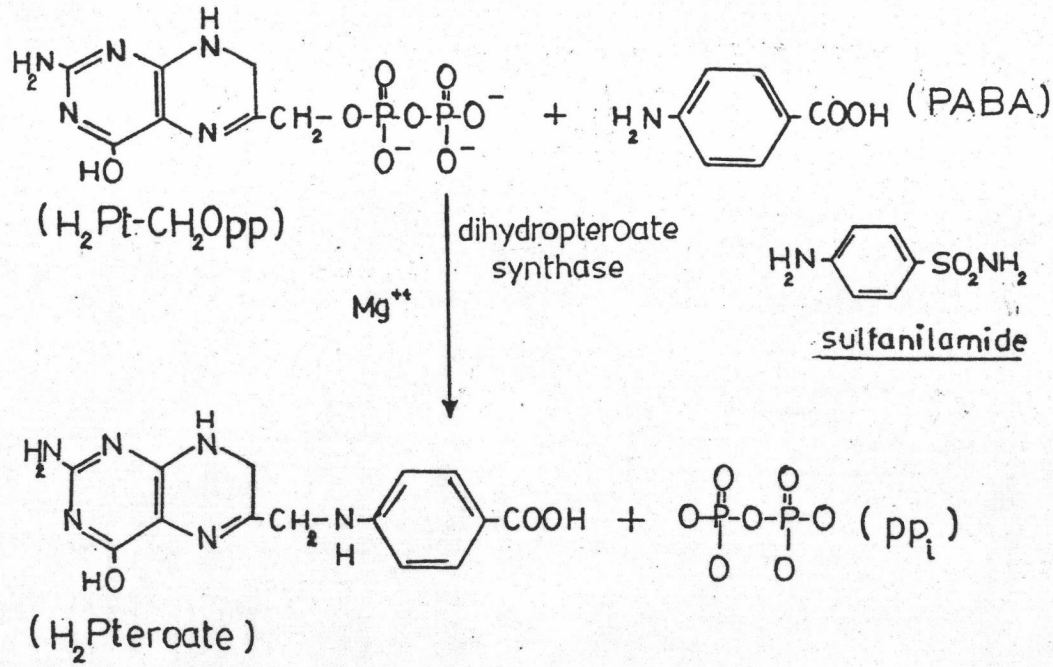
(Kreier, 1980 และ วิเชียร พุทธศรีจารุ, 2526) ซึ่งจะมีผลต่อพลาสโมเดียมแต่ไม่มีผลต่อเซลล์เจ้าเรือนหรือหากมีก็มีผลน้อยมาก

กลุ่มพลาสโมเดียมที่เป็นประโยชน์ในการศึกษาวิจัยเพื่อเชื่อมโยงความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์และการต้านยาของมาลาเรียของมนุษย์ ได้แก่ พลาสโมเดียม เบอจิอาย, พลาสโมเดียม วิงกิอาย, พลาสโมเดียม ฟาบอดี และ พลาสโมเดียม โยลิอาย (P.yoelii)ซึ่งอาศัยสัตว์ฟันแทะจำพวกหนูเป็นเจ้าเรือน เนื่องจากประการที่หนึ่งสะดวกต่อการจัดการ (manipulate) โดยสามารถเพาะเลี้ยงในสัตว์ที่ง่ายต่อการดูแลรักษาตามห้องทดลองคือ หนูไมซ์ (mice) เป็นผลให้เตรียมตัวอย่างเลือดติดเชื้อซึ่งมีเปอร์เซนต์พาราไซต์ในเลือดสูงได้คราวละมาก ๆ ประการที่สองสรีรวิทยาและวงชีพใกล้เคียงกันมาลาเรียของคนและประการสำคัญเป็นพลาสโมเดียมของสัตว์ทดลองกลุ่มเดียวที่สามารถเหนี่ยวนำให้สร้างความต้านทานต่อยาหลายชนิด เช่น คลอโรควินและไพริเมธามีนได้ Walliker และคณะ (1975) สร้างสายพันธุ์ของ พลาสโมเดียม ฟาบอดี ชนิดต้านยาที่ยังคงมีชีวิตอยู่ได้เมื่อหนูติดเชื้อได้รับไพริเมธามีนทางช่องท้อง (intraperitoneal) เป็นเวลาติดต่อกัน 4 วันได้มากที่สุดถึง 19 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว Diggens (1970) และ Morgan (1974) ได้รายงานว่าการต้านไพริเมธามีนของ พลาสโมเดียม โยลิอาย ในหนูไมซ์จะยังคงอยู่ได้ตลอดการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง (serial blood passages)

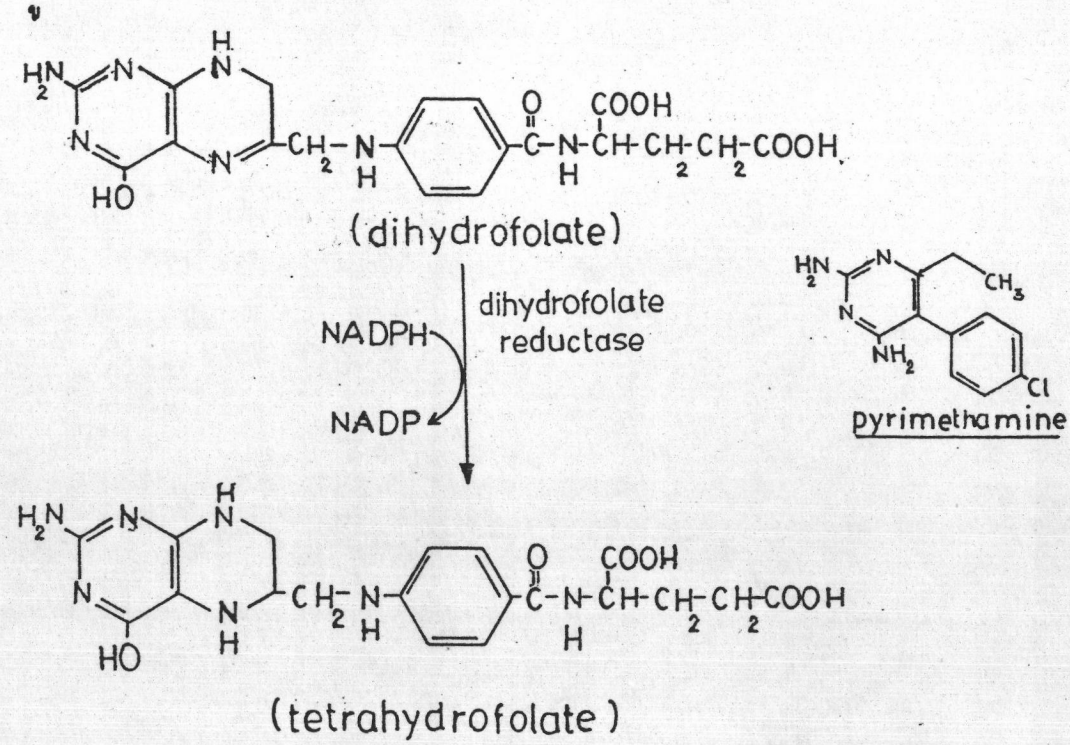
1.6 ผลกระทบของการต้านไพริเมธามีนต่อคุณสมบัติทางชีวเคมีของพลาสโมเดียม

จากหลักฐานที่รายงานโดย Ferone และ Hitching (1966) ทำให้เชื่อว่าไพริเมธามีนใช้รักษาโรคมาลาเรียโดยมีผลกระทบด้วยการยับยั้งโดยตรงต่อเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเตส เนื่องจากโครงสร้างคล้ายคลึงกับไดไฮโดรโฟเลต (รูปที่ 4 ข.) และการยับยั้งนี้ส่งผลไปถึงขบวนการสังเคราะห์ดีออกซีไธมิดิลเลต ซึ่งจำเป็นต่อการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิค ทำให้การแบ่งเซลล์ของพลาสโมเดียมหยุดชะงักทั้งนี้เพราะไม่สามารถใช้สารดังกล่าวทดแทนได้จากเซลล์เจ้าเรือน Ploydanai (1982) ทำการทดลองโดยวิธี in vitro พบว่าไพริเมธามีนจะยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเม็ดเลือดแดงติดเชื้อ (parasitemia) ได้ พลาสโมเดียมจะต้องอยู่ในช่วงการเจริญระยะวงแหวนกับโทรโฟซอยต์อันเป็นระยะก่อนการแบ่งนิวเคลียส Ferone (1977) ได้รายงานว่าเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จะมีความไวต่อ

รูปที่ 4ก.



รูปที่ 4ข.



รูปที่ 4. ปฏิกิริยาของเอนไซม์ ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส (ก.) และไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส (ข.) รวมทั้งโครงสร้างของตัวยับยั้งที่เกี่ยวข้อง

008830

การยับยั้งด้วยไพริเมธามีน น้อยกว่าเอนไซม์เดียวกันจากพลาสโมเดียมประมาณ 10^2 - 10^3 เท่า สำหรับซัลฟานิลาไมด์ ซึ่งเป็นองค์ประกอบร่วมในยาแฟนลิดาร์นั้น มีโครงสร้างคล้ายกับโมเลกุลของ PABA จึงคาดว่าออกฤทธิ์เริ่มที่ เอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส (Ferone,1973) (รูปที่ 4 ก.)

การต้านไพริเมธามีนนั้นอาจเนื่องมาจากการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ (sponteneous mutation) หรือเหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นภายใต้สภาวะความกดดัน (drug pressure) โดยไพริเมธามีนเองดังที่ปรากฏในพลาสโมเดียมของหนู (Rollo, 1952 ; Yoeli และคณะ, 1969; Diggens, 1970) ซึ่งกรณีหลังนี้มักพบควบคู่กับการเปลี่ยนแปลงความไวต่อซัลฟานิลาไมด์ด้วย (Beale, 1980)

Ferone (1969) กับ Diggens และคณะ (1970) แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสจาก พลาสโมเดียม เบอจิอาย ที่ต้านไพริเมธามีน จะจับกับไพริเมธามีนได้แน่นน้อยลงพร้อมทั้งปริมาณเอนไซม์ก็สูงกว่าสายพันธุ์ที่ไม่ต้าน

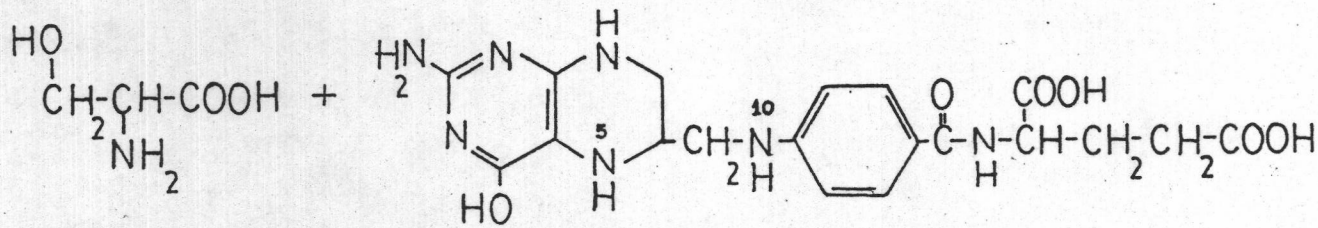
Ploydanai (1982) ทดสอบการต้านไพริเมธามีนใน พลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม โดยวิธี in vitro พบว่าแอคติวิตีจำเพาะของไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสในไอโซเลต (isolate) ที่ต้านไพริเมธามีนจะมีค่าสูงกว่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ในไอโซเลตที่ไวต่อไพริเมธามีน นอกจากนี้ยังศึกษาการนำเข้าของไพริเมธามีนโดยวัดปริมาณ ^{14}C-pyrimethamine ในเซลล์เม็ดเลือดแดง พบว่าเมื่อให้เซลล์สัมผัส กับ ^{14}C-pyrimethamine ในช่วงระยะเวลาอันสั้น ๆ ไพริเมธามีนจะถูกนำเข้าสู่เม็ดเลือดแดงติดเชื้อไอโซเลตที่ไม่ต้านไพริเมธามีนมากกว่าเม็ดเลือดแดงติดเชื้อไอโซเลตที่ต้าน และเม็ดเลือดแดงปกติตามลำดับอย่างมีนัยสำคัญ

Ratanaphan และ Ruenwongsa (1983) รายงานว่า พลาสโมเดียม ฆาบอดี ที่ต้านไพริเมธามีนจะมีแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไธมิดิลเลต ซินเตสลดลง และความสามารถของเอนไซม์ในการจับกับสับสเตรต ดีออกซียูริดิลเลต (dUMP) ไม่เปลี่ยนแปลงเท่าใดนัก แต่จะจับกับ 5,10-เมทธิลีนเตตระไฮโดรโฟเลต (5,10-methylene THF) ได้ดีขึ้นประมาณ 2 เท่า

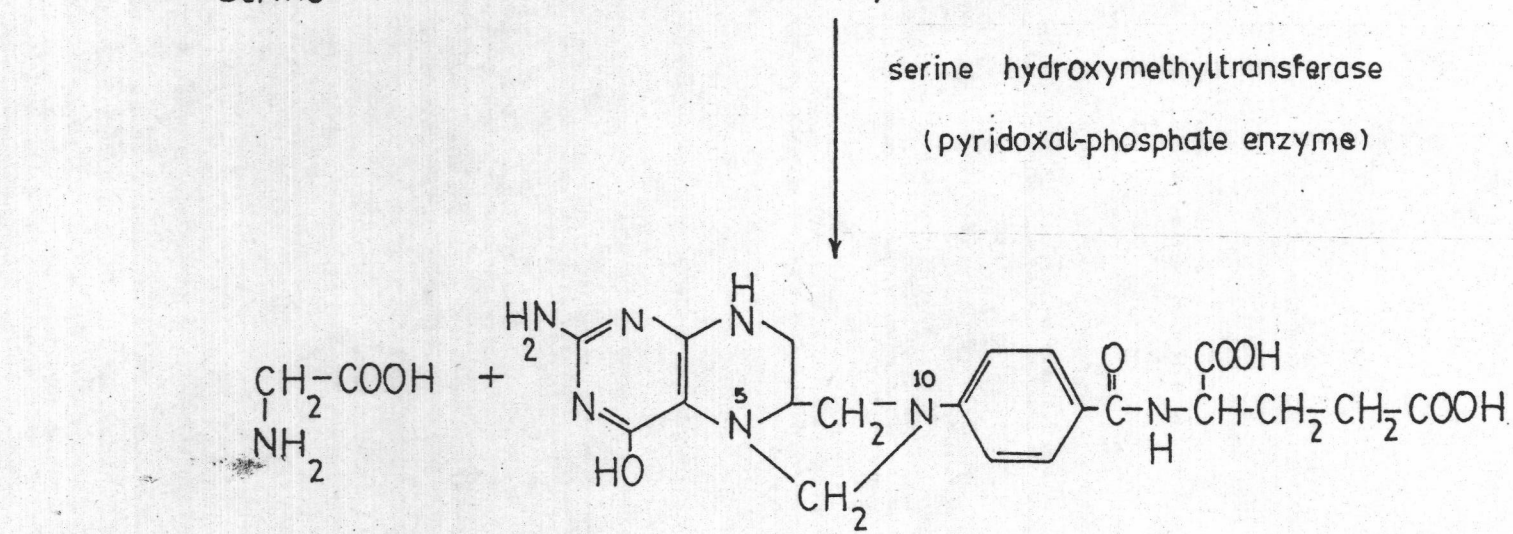
จากเอกสารที่รวบรวมมาทั้งหมดจะเห็นได้ว่ากลไกการต้านไพริเมธามีนในพลาสโมเดียมยังได้รับการศึกษากันน้อยมาก ไม่ว่าจะเป็นวิถีการสังเคราะห์ไดไฮโดรโฟเลตซึ่งเป็นวิถีที่มีความ

เฉพาะตัวสำหรับพลาสโมเดียม และมีรายงานแล้วว่าถูกผลกระทบจากการต้านไพริเมธามีน วิถีเมตาบอลิสมของเตตระไฮโดรโฟเลต การควบคุม (regulation) ของวัฏจักรการสังเคราะห์ดีออกซีไธมิดิลเลต หรือกลไกอื่น ๆ เกี่ยวกับเมตาบอลิสมของไพริเมธามีนเอง เช่น การนำไพริเมธามีนเข้าสู่เซลล์พลาสโมเดียม เป็นต้น ซึ่งปัจจุบันถึงแม้ว่าการก้าวเข้าสู่ความเข้าใจกลไกต่าง ๆ เหล่านี้อาจศึกษาได้โดยตรงในพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม ซึ่งเป็นต้นเหตุของมาลาเรียในคนเนื่องจากสามารถเพาะเลี้ยงเชื้อ in vitro ในจานเพาะเชื้อ (Trager และ Jensen, 1976) แต่ยังมีอุปสรรคหลายอย่าง เช่น ปัญหาการเตรียมตัวอย่างเลือดที่ติดเชื้อพลาสโมเดียมปริมาณมาก ๆ ต้องมีห้องปฏิบัติการที่มีระบบและการจัดการเป็นพิเศษ เพื่อความสะดวกในการทำงาน อีกทั้งสารอาหารและวัสดุที่ใช้ก็มีราคาแพงมากทำให้การศึกษาวิจัยด้านนี้ไม่สามารถดำเนินไปได้เท่าที่ควร ดังนั้นการใช้พลาสโมเดียม ซึ่งทำให้เกิดโรคในหนูไมซ์ เป็นแม่แบบจึงนับว่ามีความสำคัญเป็นอย่างมากสำหรับเชื่อมโยงความรู้มาสู่พลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม และ พลาสโมเดียมชนิดอื่นในคน พลาสโมเดียมที่ได้เปรียบเหนือชนิดอื่น ๆ สำหรับการเป็นแม่แบบ คือ พลาสโมเดียม ยาบอดี ทั้งนี้เพราะมีคุณลักษณะทางชีวภาพ (biological features) ใกล้เคียงกับ พลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม มากที่สุด และการเจริญเป็นแบบ synchronous shizogony สามารถกำหนดเวลาให้ได้ระยะการเจริญ ตามต้องการได้ (Newbold และคณะ, 1982)

ในการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาเปรียบเทียบกระบวนการนำเข้าของไพริเมธามีนในแง่ของลักษณะและปริมาณการนำเข้าระหว่างเม็ดเลือดแดงปกติและเม็ดเลือดแดงติดเชื้อ พลาสโมเดียม ยาบอดี โดยดัดแปลงจากวิธีที่พัฒนาโดย Ploydanai (1982) รวมทั้งใช้ พลาสโมเดียม ยาบอดี ซึ่งต้านไพริเมธามีนต่างกัน เพื่อศึกษาผลกระทบของการต้านไพริเมธามีนต่อกระบวนการนำเข้าดังกล่าว ตลอดจนคุณสมบัติทางชีวเคมีและระดับเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส ไดโฮโดรโฟเลต รีดักเตส และ เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทรานสเฟอเรส ซึ่งคาดว่าจะเป็นพื้นฐานความรู้ที่จะใช้อธิบายถึงกลไกการต้านไพริเมธามีน อันจะนำไปสู่การปรับปรุงประสิทธิภาพของการรักษาโรคมาลาเรียด้วยไพริเมธามีน หรืออาจนำไปสู่การคิดค้นสารแอนติโฟลต่อเอนไซม์เป้าหมายใหม่นอกเหนือจากไดโฮโดรโฟเลต รีดักเตส



serine + tetrahydrofolate



glycine + N^5, N^{10}-methylene tetrahydrofolate

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 5. ปฏิกิริยาของเอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทิลทรานสเฟอเรส

ขั้นตอนของการวิจัยมีดังต่อไปนี้

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ในเม็ดเลือดแดงติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ พลาสโมเดียม ฆ่าบอดี

2. ศึกษาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการสกัด ^{14}C-pyrimethamine หลังจากถูกนำเข้าเซลล์

3. ศึกษาสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine

4. ศึกษาเปรียบเทียบผลกระทบของอุณหภูมิ pH สารที่เป็นแหล่งพลังงานและสารยับยั้งขบวนการสร้างพลังงานต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ในเม็ดเลือดแดงติดเชื้อที่ต้านไพริเมธามีนต่างกัน

5. ศึกษาเปรียบเทียบลักษณะการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงในสภาวะการทดลองการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine

6. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมพลาสโมเดียม ฆ่าบอดี ให้มีเซลล์อิสระจากเม็ดเลือดแดงติดเชื้อ

7. ศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของระดับเอนไซม์ รวมทั้งคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส ในเชื้อที่ต้านไพริเมธามีนต่างกัน

8. ศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของระดับเอนไซม์ รวมทั้งคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส ในเชื้อที่ต้านไพริเมธามีนต่างกัน

9. ศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของระดับเอนไซม์ รวมทั้งคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทรานสเฟอเรส ในเชื้อที่ต้านไพริเมธามีนต่างกัน