รายงานปริทัศน์ (Review Articles)

พันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา

Genetics Drug Resistant Malaria

จิราภรณ์ คุ้ยทรัพย์ โครงการบัณฑิตศึกษาสาขาชีววิทยาศาสตร์
วรรณา ชัยเจริญกุล คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

กาญจนา รังษีหิรัญรัตน วิทยาลัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มาลาเรียเป็นโรคติดเชื้อที่เป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุขของประเทศแถบร้อนและร้อนชื้นโดยมียุงก้นปล่องเป็นพาหะนำโรค มาลาเรียเกิดจากการติดเชื้อโปรโตซัวในจีนัส Plasmodium ก่อให้เกิดโรคในคนและสัตว์ แต่เชื้อที่ก่อให้เกิดโรคในคนมีเพียง 5 ชนิด ได้แก่ *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* และ *P. knowlesi* แต่ละปีมีผู้ติดเชื้อประมาณ 300 ล้านคนทั่วโลกและมีผู้เสียชีวิตจากโรคนี้ประมาณ 1.5-2.7 ล้านคน ประเทศไทยมีรายงานการระบาดของมาลาเรียส่วนใหญ่จากพื้นที่จังหวัดตามแนวชายแดน โดยเฉพาะบริเวณที่เป็นภูเขาสูงหรือเป็นป่าทึบตามแนวชายแดนไทย-พม่า ชายแดนไทย-กัมพูชาและชายแดนไทย-มาเลเซีย ปี 2553 กรมควบคุมโรคมีรายงานพบผู้ป่วยทั้งประเทศจำนวน 45,629 ราย เป็นชาวไทย 18,371 ราย และชาวต่างชาติ 27,257 ราย เมื่อเปรียบเทียบกับปี 2552 พบจำนวนผู้ป่วยชาวไทยเพิ่มขึ้นร้อยละ 6.1 ขณะที่ผู้ป่วยชาวต่างชาติเพิ่มขึ้นร้อยละ 30.26 ปัญหาสำคัญอย่างหนึ่งที่ทำให้แนวโน้มจำนวนผู้ป่วยเพิ่มมากขึ้นคือปัญหาการดื้อต่อยาของเชื้อมาลาเรีย

การรักษาโรคมาลาเรียในประเทศไทยที่ผ่านมามีการใช้ยาหลายชนิดในการรักษาผู้ติดเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม เช่น ยาคลอโรควิน (Chloroquine) ยาควินิน (Quinine) ยาซัลฟาดอกซิน-ไพริเมทามีน (Sulfadoxine-pyrimethamine) ยาเมฟโฟลควิน (Mefloquine) ซึ่งในปัจจุบันยาส่วนใหญ่ใช้ไม่ได้ผล เนื่องจากเชื้อมาลาเรียได้พัฒนาตนเองให้สามารถต้านทานต่อยาที่ใช้รักษา ปัจจุบันมีเพียงยากลุ่มอนุพันธ์ของอาร์ติมิซินิน (Artemisinin) ที่สามารถใช้รักษาโรคมาลาเรียจากเชื้อชนิดฟัลซิพารัมได้ อย่างไรก็ตามการใช้ยาในกลุ่มนี้ตัวเดียวพบว่ามีอัตราการเกิด recrudescence ได้สูง จึงมีความจำเป็นต้องให้ร่วมกับยาในกลุ่มอื่น เช่นยาเมฟโฟลควิน ส่วนการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิดไวแวกซ์ ปัจจุบันใช้ยาคลอโรควิน (Chloroquine) และไพรมาควิน (Primaquine) เป็นยามาตรฐานหลักในการรักษา ปัจจุบันพบแนวโน้มของความไวของเชื้อต่อยาก็เริ่มลดลง ดังนั้นหากเชื้อมาลาเรียทั้งสองชนิดนี้สามารถพัฒนาตัวเองจนดื้อต่อยาหลักทั้งสองขนานที่ใช้อยู่ในปัจจุบันก็จะส่งผลให้ต้องมีการพัฒนายาชนิดใหม่ๆ มาใช้ในการรักษาต่อไป ซึ่งมีค่าใช้จ่ายที่สูงมาก ปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้องกับ เชื้อมาลาเรีย คน และพาหะนำโรค ส่งผลให้เกิดการดื้อต่อยาของเชื้อมาลาเรีย เช่น การใช้ยาต้านมาลาเรียอย่างไม่ถูกต้อง รวมถึงการใช้ยาที่ไม่ต่อเนื่อง การใช้ยาที่ไม่ได้มาตรฐาน เป็นเหตุให้เชื้อมาลาเรียพัฒนาตนเองโดยการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของมันเพื่อให้อยู่รอดใน

สภาวะที่มียา ส่งผลให้เกิดการดื้อยาได้ ปัจจัยทางด้านผู้ป่วยเองก็ส่งผลต่อความรุนแรงของโรคมาลาเรียได้ นอกจากนี้ภาวะโลกร้อนและการดื้อต่อยาฆ่าแมลงของยุงพาหะก็ทำให้โรคนี้มีการระบาดออกไปได้อย่างกว้างขวางมากยิ่งขึ้น ดังนั้นการศึกษากลไกที่ทำให้เกิดการดื้อยาของเชื้อจึงมีความจำเป็นต่อการควบคุมและกำจัดโรคมาลาเรียในอนาคต

การดื้อยาระดับโมเลกุลของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม

เชื้อฟัลซิปารัมมาลาเรียที่ดื้อต่อยาต้านมาลาเรียได้หลายชนิดนับเป็นอุปสรรคสำคัญในการควบคุมโรคมาลาเรีย อย่างไรก็ตามการดื้อยาของเชื้อมาลาเรียอาจเกิดขึ้นได้จากปัจจัยต่างๆ สำหรับกลไกการดื้อยาของเชื้อมาลาเรียอาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนหรือเอนไซม์เป้าหมายที่ยาต้องไปจับ ทำให้ยาไม่สามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีนหรือเอนไซม์ดังกล่าวได้ เช่น การดื้อยาในกลุ่มแอนติโฟเลต (antifolate), ยาในกลุ่มซัลฟา (sulfa) และอะโตวาโควน (atovaquone) เป็นต้น หรืออาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติการขนส่งยาสู่ตำแหน่งเป้าหมายในเซลล์ เช่น การดื้อยาคลอโรควิน (chloroquine), เมโฟลควิน (mefloquine) และฮาโลแฟนทริน (halofantrine) เป็นต้น อย่างไรก็ตามการดื้อยาชนิดหนึ่งๆ อาจเกิดขึ้นได้จากหลายกลไกร่วมกัน จากการศึกษาทางด้านชีววิทยาระดับโมเลกุลพบว่า การกลายพันธุ์หรือการเพิ่มจำนวนชุดของยีนมีผลต่อความไวของยา ในปัจจุบันนี้มีการค้นพบยีนหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา

ยีน *Pfmdr 1*

ในช่วงหลายปีที่ผ่านมามีการศึกษาถึงลักษณะการดื้อยาของเมฟโฟลควิน ในเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิปารัม ซึ่งจะมีการดื้อข้าม (cross resistance) ระหว่างยาเมฟโฟลควิน ฮาโลแฟนทริน และควินิน กลไกการดื้อต่อยาเมฟโฟลควินในระดับชีววิทยาระดับโมเลกุล พบว่าขึ้นอยู่กับยีน *pfmdr1* ยีนนี้มีความสัมพันธ์กับการตอบสนองต่อยาเมฟโฟลควินทั้งเชื้อที่เลี้ยงในห้องทดลองและเชื้อที่แยกได้จากการศึกษาผู้ป่วยในพื้นที่ (Wilson *et al*., 1989; Wilson *et al*., 1993; Price *et al*., 1999) Wilson และคณะ (1989) ศึกษาเชื้อที่เลี้ยงในห้องทดลอง พบว่าเชื้อที่มีจำนวนชุด (copy number) ของยีน *pfmdr1* มากขึ้น (amplification) จะมีความสัมพันธ์กับการลดลงของการตอบสนองต่อยาเมฟโฟลควิน หลังจากนั้นได้มีการทดสอบเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยก็พบความสัมพันธ์นี้เช่นกัน (Wilson *et al*., 1993) ถึงแม้ว่าการศึกษาในประเทศไทยโดย Price และคณะ พบว่าเชื้อ *P. falciparum* ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่แสดงการดื้อต่อยาเมฟโฟลควิน ส่วนหนึ่งเท่านั้นที่มีการเพิ่มจำนวนชุดของยีน *pfmdr1* ความสัมพันธ์นี้ได้มีการยืนยันโดยการทดลองทำให้เชื้อดื้อต่อเมฟโฟลควิน (*In vitro* selection for mefloquine resistance) พบว่าเชื้อเหล่านี้มีการเพิ่มจำนวนชุดของยีน *pfmdr1* มากขึ้น (Cowman *et al*., 1994; Peel *et al*., 1994) อย่างไรก็ตามการศึกษาเชื้อ *P. falciparum* ที่แยกได้จากผู้ป่วยมาลาเรียประเทศไทย ทั้งที่ทำโดย Price กับคณะ (2004) และ Chaiyaroj กับคณะ (Chaiyaroj *et al*.,1999) พบเชื้อที่ดื้อต่อยาเมฟโฟลควิน บางสายพันธุ์มียีน *pfmdr1* ชุดเดียว นอกจากนี้ยังมีรายงานเชื้อที่ทำให้ดื้อต่อเมฟโฟลควิน บางสายพันธุ์ที่ไม่มีการเพิ่มจำนวนชุดของยีน *pfmdr1* (Lim *et al*., 2005) ซึ่งผลการทดลองนี้ตรงกับที่พบในการทดลองที่ทำให้เชื้อดื้อต่อฮาโลแฟนทริน (*In vitro* selection for halofantrine resistance) เชื้อนี้แสดงลักษณะดื้อข้ามต่อเมฟโฟลควิน และไม่พบการเพิ่มจำนวนชุดของยีน *pfmdr1* เมื่อเทียบกับเชื้อแม่พันธุ์ (Ritchie *et al*., 1996) ซึ่งบ่งชี้ว่าเชื้อเหล่านี้อาจมีกลไกการดื้อยาอื่นๆ อย่างไรก็ตามกลไกอื่นที่เชื่อว่ามีผลทำให้เชื้อดื้อยาเมฟโฟลควิน ในปัจจุบันยังคงมีความเกี่ยวข้องกับยีน *pfmdr1* กล่าวคือ เชื้อที่มีลักษณะของยีนเป็น wild type จะดื้อต่อยากลุ่มนี้มากกว่าเชื้อที่มีลักษณะยีนที่กลายพันธุ์ (Mungthin *et al*., 1999; Reed *et al*., 2000) ลักษณะการกลายพันธุ์ของยีน *pfmdr1* ที่มีการรายงานคือตำแหน่ง 86, 184, 1034, 1042 และ 1246 (Wilson *et al*.,

1993; Price *et al*., 1999; Lopes *et al*., 2002) การทดลองโดยใช้ระบบ Transfection ในเชื้อ *P. falciparum* พบว่าเมื่อมีการถ่ายทอดยีน *pfmdr1* ชนิด wild type ที่ตำแหน่ง 1034, 1042 และ 1246 จะทำให้เชื้อเปลี่ยนแปลงความไวต่อยากลุ่มควิโนลีน (Reed *et al*., 2000)

อย่างไรก็ตามการศึกษายีน *pfmdr1* กับผลการรักษาหายของผู้ป่วยติดเชื้อฟัลซิปารัมมาลาเรีย ณ บริเวณชายแดนไทยพม่า พบว่า การกลายพันธุ์ของยีนนี้ที่ตำแหน่ง 86 จะเพิ่มระดับ IC_{50} ของยาเมฟโฟควินจาก 19.0 เป็น 52 นาโนโมลาร์ แต่ไม่มีผลต่อการทำนายผลการรักษาฟัลซิปารัมมาลาเรียในผู้ป่วยเมื่อรักษาด้วยยาเมฟโฟลควินแบบเดี่ยวๆ (Price *et al*., 2004) แต่จำนวนชุดของยีน *pfmdr1* เป็นตัวชี้วัดผลการรักษาด้วยยาเมฟโฟควินได้ดีที่สุด โดยพบว่าเมื่อจำนวนชุดของยีนเพิ่มมากขึ้น ผลการรักษาผู้ป่วยด้วยยาเมฟโฟควินแบบเดี่ยวๆ จะล้มเหลวมากขึ้น ซึ่งจำนวนชุดของยีนกับการทำนายผลการรักษาจะมีค่าความไวถึงร้อยละ 71 และมีค่าความจำเพาะถึงร้อยละ 78 (sensitivity and specificity) (Price *et al*., 2004) ความสัมพันธ์ของยีน *pfmdr1* กับผลการศึกษาแบบ *in vivo* ของยากลุ่มควิโนลีน จะพบว่าค่าความเสี่ยงที่ผู้ป่วยจะมีผลการรักษาล้มเหลวในกลุ่มเชื้อฟัลซิปารัมที่มีจำนวนชุดของยีนมากกว่า 3 จะมีค่า 3.2-6.3 เท่าของกลุ่มเชื้อที่มีจำนวนชุดของยีนเพียงชุดเดียว เมื่อรักษาด้วยยากลุ่มเมฟโฟลควินหรือเมื่อใช้ร่วมกับยาอาร์ติซูเนต (Price *et al.,* 2004; 2006)

ยีน *Pfcrt*

นอกจากยีน *pfmdr1* แล้ว ยังพบว่ายีน *pfcrt* ก็เป็นยีนที่มีความสำคัญกับการดื้อยากลุ่มควิโนลีนด้วยเช่นกัน โดยเฉพาะยาคลอโรควิน ซึ่งจากการศึกษา allelic exchange ระหว่างเชื้อที่ไวและดื้อต่อยาคลอโร-ควิน ทำให้มีการค้นพบยีน *pfcrt* (Fidock *et al*., 2000) จากการศึกษาเชื้อฟัลซิปารัมในหลายๆ พื้นที่จะพบการกลายพันธุ์หลายตำแหน่งด้วยกัน แต่ที่มีความสำคัญมากที่สุดคือ K76T ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจาก lysine เป็น threonine โดยจะพบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งอื่นๆ 74, 75, 220, 271, 326, 356, และ 371 ร่วมด้วยเสมอ การศึกษาต่อมาโดย Sidhu (Sidhu *et al*., 2002) แสดงให้เห็นว่าการกลายพันธุ์ของยีน *pfcrt* เป็นกุญแจสำคัญของการดื้อยาคลอโรควิน และจากการศึกษาเชื้อมาลาเรียในบริเวณต่างๆ พบความสัมพันธ์ของการกลายพันธุ์กับการดื้อยาคลอโรควินทั้งจากทวีปแอฟริกา (Babiker *et al*., 2001; Basco and Ringwald, 2001; Djimde *et al*., 2001; Mayor *et al*., 2001), ทวีปเอเชีย (Chen *et al*., 2001; Pillai *et al*., 2001), และทวีปอเมริกาใต้ (Vieira *et al*., 2001) อย่างไรก็ตามพบว่าบางครั้งถึงแม้เชื้อจะมีการกลายพันธุ์แต่เชื้อก็ยังไวต่อยาคลอโรควิน (Ariey *et al*., 2002; Thomas *et al*., 2002)

ยีน *Pfatp6*

การดื้อยากลุ่มอาร์ติมิซินินของเชื้อฟัลซิปารัมมาลาเรียกำลังเป็นที่ได้รับความสนใจมาก ถึงแม้ว่าจะมีผู้เสนอว่ายากลุ่มนี้มีกลไกการออกฤทธิ์ที่ไม่จำเพาะเจาะจง ซึ่งไม่น่าจะเกิดการดื้อยาได้ แต่อาจเกิดการดื้อยาเนื่องจากการกลายพันธุ์ของยีน drug transporters เช่น *pfcrt* หรือ *pfmdr1* (Krishna *et al*., 2006) จากการศึกษาในห้องปฏิบัติการและการศึกษา transfection พบว่า การกลายพันธุ์ของยีน *pfmdr1* จะทำให้เชื้อไวต่อยาอาร์ติมิซินินมากขึ้น (hypersensitivity) (Reed *et al*., 2000; Duraisingh *et al*., 2000; Sidhu *et al*., 2005) และการศึกษาเชื้อฟัลซิปารัมมาลาเรียจากผู้ป่วยก็ให้ผลที่คล้ายกัน (Duraisingh *et al*., 2000; Pickard *et al*., 2003) นอกจากนี้ยังพบว่ายีน *pfcrt* มีผลต่อระดับ IC_{50} ของยากลุ่มอาร์ติมิซินินด้วย แต่มีผลค่อนข้างน้อย (Sidhu *et al*., 2002) หรืออาจจะไม่มีผลต่อยากลุ่มอาร์ติมิซินินเลย (Lakshmanan *et al*., 2005) ต่อมามีผู้เสนอว่าการดื้อยาน่าจะขึ้นอยู่กับยีน pfatp6 เพราะเป็นยีนที่ถอดรหัสเป็นโปรตีน sarco/endoplasmic reticulum calcium-dependent ATPase (SERCA)-type ATP6 ซึ่งเป็นโปรตีนหลักในการออกฤทธิ์ของยากลุ่มอาร์ติมิซินิน (Eckstein-Ludwig *et al*., 2003)

การศึกษาเชื้อฟัลซิปารัมมาลาเรียที่ได้จากผู้ป่วยจำนวนมากตั้งแต่ปีค.ศ. 1997 ค่า IC_{50} ของเชื้อบางตัวในประเทศ French Guiana ต่อยาอาร์ทีมิเตอร์มีค่าสูงมาก เมื่อทำการทดสอบในหลอดทดลองซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อไวต่อยาอาร์ติมิเตอร์ลดลง (Jambou *et al.,* 2005) แต่เชื้อเหล่านี้มีความไวต่อยาชนิดอื่นตรงข้ามกับยาอาร์ติมิเตอร์ จากการศึกษาลำดับยีน *pfatp6* พบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 769 (S769N) โดยพบว่าเชื้อฟัลซิปารัมมาลาเรียที่มีการกลายพันธุ์ในตำแหน่งนี้จะมีค่า median IC_{50} ของยาอาร์ติมิเตอร์เท่ากับ 79.4 นาโนโมลาร์ (37.2-109.3 นาโนโมลาร์) ในขณะที่เชื้อมาลาเรียที่ไม่มีการกลายพันธุ์จะมีค่าเท่ากับ 1.7 นาโนโมลาร์ (0.98-3.6 นาโนโมลาร์) ซึ่งมีค่าสูงกว่าถึง 20 เท่า (Jambou *et al.,* 2005) ต่อมามีการศึกษาลำดับยีน *pfatp6* ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายาอาร์ติมิซินินจะเข้าไปจับกับบริเวณ thapsigargin binding cleft ซึ่งการกลายพันธุ์ในบริเวณ binding site นี้โดยเฉพาะตำแหน่งที่ 263 จะมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงระดับยาอาร์ติมิซินิน (Uhlemann *et al*., 2005) ถึงแม้ว่าการศึกษาเชื้อฟัลซิพารัมจากผู้ป่วยในบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้จะไม่พบความสัมพันธ์ของการกลายพันธุ์ในยีนนี้กับการเปลี่ยนแปลงระดับ IC50 ของยาอาร์ติซูเนต (Price et al., 2004) แต่มีการรายงานการกลายพันธุ์ของยีนนี้ในหลายตำแหน่งด้วยกันจากหลากหลายพื้นที่ทั้งในประเทศไทยและในแอฟริกาเช่น T226C, C727T, G1291A, A1721C, G2306A, T1204G, A1612G, T2694A (Krishna et al., 2010) เป็นต้น

การดื้อยาระดับโมเลกุลของเชื้อมาลาเรียชนิดไวแวก

มาลาเรียชนิดไวแวกซ์เป็นเชื้อที่พบมากรองจากชนิดฟัลซิปารัม แต่ละปีมีผู้ติดเชื้อประมาณ 70 ถึง 80 ล้านคนทั่วโลก (Mendis *et al.,* 2001) ปัจจุบันพบอุบัติการณ์ใหม่ของโรคนี้ในหลายประเทศ เช่น เกาหลี ยีน และรัสเซีย (Chai 1999; Sleigh *et al.,* 1998; Leclerc *et al.,* 2004) ในประเทศไทยมีรายงานผู้ป่วยมาลาเรียเมื่อประมาณ 30-40 ปีที่ผ่านมา โดยอัตราส่วนผู้ป่วยชนิดฟัลซิปารัมต่อไวแวกซ์ เท่ากับ 70:30 แต่ปัจจุบันพบการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของการติดเชื้อมาลาเรียทั้งสองชนิดในอัตราส่วนพอๆ กันคือ 50:50 และในบางพื้นที่อาจพบอัตราส่วนของมาลาเรียชนิดไวแวกซ์สูงชนิดฟัลซิปารัม (Congpuong *et al.,* 2002) ปัจจุบันยาคลอโรควินและไพรมาควินถูกใช้เป็นยามาตรฐานหลักในการรักษามาเรียชนิดไวแวกซ์ ถึงแม้ว่าจะยังไม่มีรายงานการดื้อยาคลอโรควินต่อเชื้อมาลาเรียชนิดไวแวกซ์ในประเทศไทย แต่ประสิทธิภาพของยาลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับอดีตที่ผ่านมา (Congpuong *et al.,* 2002) นอกจากนี้เมื่อประมาณปี 1989 มีรายงานการดื้อยาคลอโรควินเกิดขึ้นครั้งแรกในประเทศปาปัวนิวกินี (Rieckmann *et al.,* 1989) และต่อมามีรายงานในหลายประเทศรวมทั้งประเทศในแถบเอเชียด้วย ได้แก่ อินโดนีเซีย (Baird *et al.,* 1991) พม่า (Marlar *et al.,* 1995) อินเดีย (Dua *et al.,* 1996) เวียดนาม (Phan *et al.,* 2002) และเกาหลี (Lee *et al.,* 2009) ปัจจุบันยังไม่เป็นที่ทราบกันดีถึงสาเหตุแท้จริงที่ทำให้เกิดการดื้อต่อยาที่ใช้ในการรักษาโรคมาลาเรียชนิดไวแวกซ์ แต่จากการศึกษาถึงกลไกที่อาจทำให้เกิดการดื้อต่อยาที่ใช้ในการรักษาเชื้อมาลาเรียชนิดนี้ ทำให้ทราบว่าการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียชนิดนี้ส่งผลให้เกิดการดื้อยาต่อที่ใช้ในการรักษาได้

ยีน *Pvmdr 1*

ยีน *Pvmdr 1* และ *Pvcrt-o* เป็นโปรตีนที่อยู่บนเมมเบรนของเชื้อมาลาเรียทำหน้าที่ในการขับยาออกจากเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบยีนดังกล่าวในเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิปารัมซึ่งมีการศึกษาอย่างแพร่หลายและพบว่าการเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *Pfmdr 1* และ *Pfcrt* มีความสัมพันธ์กับการดื้อต่อยาต้านมาลาเรียหลายชนิด แต่สำหรับเชื้อมาลาเรียชนิดไวแวกซ์นั้น เมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *Pfmdr1* ซึ่ง

เป็นยีนที่มีความสัมพันธ์กับการดื้อยาคลอโรควินในเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิปารัมพบว่า ไม่พบการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโน ที่ตำแหน่ง 91, 189, 1071, 1079 และ 1291 ใน *Pvmdr1* ซึ่งตรงกับตำแหน่งกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 86, 184, 1034, 1042 และ 1246 ใน *Pfmdr1* ที่มีรายงานว่าเป็นกรดอะมิโนตำแหน่งหลักที่มีความสัมพันธ์กับการดื้อยาคลอโรควิน อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่ากรดอะมิโนตำแหน่ง 976 (Y976F) ของ *Pvmdr1* มีความเกี่ยวข้องกับการเพิ่มค่า IC50 ต่อยาคลอโรควิน ถึง 1.7 เท่า (Suwanarusk *et al.,* 2007) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 976 (Y976F) 20% ของเชื้อมาลาเรียชนิดไวแวกซ์ในอำเภอแม่สอด จังหวัดตาก ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน Y976F 17.9% 13.3% และ 100% ในเชื้อมาลาเรียชนิดไวแวกซ์ในประเทศไทย พม่า และปาปัวนิวกินี ตามลำดับ ซึ่งสัมพันธ์กับรายงานงานพบการดื้อต่อยาคลอโรควินของเชื้อมาลาเรียชนิดไวแวกซ์ที่พบในปาปัวนิวกินี

ยีน *Pvcrt-o*

ยีน *Pvcrt-o* เป็นโปรตีนที่อยู่บนเมมเบรนของเชื้อมาลาเรียทำหน้าที่ในการขับยาออกจากเซลล์ เช่นเดียวกับยีน *Pvmdr 1* การศึกษายีน *Pvcrt-o* ในเชื้อมาลาเรียชนิดไวแวกซ์ ซึ่งเป็นยีนที่คล้ายกับยีน *Pfcrt* พบว่า การแทรก (insertion) ของนิวคลีโอไทด์สามตัว (AAG) ซึ่งถอดรหัสเป็นกรดอะมิโน lysine (K) ที่ตำแหน่งที่ 10 (K10) มีความเกี่ยวของกับการลดลงของค่า IC50 ต่อยาคลอโรควิน (Suwanarusk *et al.,* 2007) ซึ่ง K10 insertion นี้มีรายงานพบมากในเชื้อไวแวกซ์มาลาเรียจากประเทศไทย (56%) และพม่า (46.2%) (Lu *et al.,* 2011) ในขณะที่พบเพียงหนึ่งตัวอย่างจากประเทศอินโดนีเซียเท่านั้น ดังนั้นยีน *Pvcrt-o* ของเชื้อมาลาเรียชนิดไวแวกซ์จึงเป็น molecular marker ในการติดตามการดื้อยาของเชื้อมาลาเรียชนิดนี้ได้

ยีน Plasmodium vivax dihydrofolate reductase (Pvdhfr)

ยีน *Plasmodium vivax dihydrofolate reductase (Pvdhfr)* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของยารักษามาลาเรียกลุ่มแอนติโฟเลท (antifolate) แต่เนื่องจากปัญหาเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมดื้อต่อยาฟัลฟาดอกซิน-ไพริเมทามีน (sulfadoxine-pyrimethamine) ในปลายทศวรรษที่ 70 ที่พบมากกว่า 90% (Harinasuta *et al,* 1967) ทำให้ต้องมีการเปลี่ยนยาที่ใช้ในการรักษาเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมในหลายประเทศ (WHO 1984) แต่จากการที่ในหลายพื้นที่พบการแพร่ระบาดของเชื้อทั้งชนิดฟัลซิปารัมและไวแวกซ์ จึงทำให้เชื้อมาลาเรียชนิดไวแวกซ์มีโอกาสสัมผัสกับยาฟัลฟาดอกซิน-ไพริเมทามีนที่ใช้ในการรักษา รวมทั้งยาในกลุ่มแอนติโฟเลท (antifolate) ซึ่งมีกลไกการออกฤทธิ์เหมือนกันด้วย จึงอาจส่งผลให้เชื้อมาลาเรียชนิดไวแวกซ์มีการพัฒนาตัวเองเพื่อดื้อต่อยาที่ใช้ในการรักษาเช่นเดียวกับเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมได้ จากการศึกษารูปแบบการกลายพันธุ์ของยีน *Pvdhfr* พบว่าเกี่ยวข้องกับการดื้อยากลุ่มแอนติโฟเลทที่ใช้ในการรักษา (Imwong *et al.,* 2001, Gregson and Plowe, 2005) โดยการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนที่ตำแหน่งต่างๆ สำหรับการกระจายของรูปแบบการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนที่พบนั้นจะแตกต่างกันไปในแต่ละพื้นที่ ซึ่งเกี่ยวข้องกับประวัติการใช้ยาฟัลฟาดอกซิน-ไพริเมทามีนในการรักษาเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิปารัมมาก่อน อุบัติการณ์การกลายพันธุ์ของยีน *Pvdhfr* และ *Pvdhps* นั้นพบได้ในหลายประเทศ เช่น อินโดนีเซีย อินเดีย ศรีลังกา อัฟกานิสถาน อิหร่าน ปาปัวนิวกินี มาดากัสกา และไทย โดยพบการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนถึง 20 ตำแหน่ง (Hawkins *et al*., 2007) สำหรับการศึกษาในประเทศไทยพบการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนในยีน *Pvdhfr* ที่ตำแหน่ง 57, 58, 61, 117 and 173 (Imwong *et al*., 2003, Barnadas *et al*., 2008) ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการดื้อยาในกลุ่มแอนติโฟเลท (Imwong *et al*., 2001, Hawkins *et al*., 2007)

ยีน Plasmodium vivax dihydropteroate synthase (Pvdhps)

ยีน *Plasmodium vivax dihydropteroate synthase (Pvdhps)* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของยารักษามาลาเรียกลุ่มแอนติโฟเลท (antifolate) เช่นเดียวกับยีน *Pvdhfr* การศึกษาการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนในยีนนี้พบว่าในประเทศไทยมีการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโน 5 ตำแหน่ง ได้แก่ 382, 383, 512, 553 และ 585 (Hawkins *et al.,* 2007, Barnadas *et al*., 2008, Rungsihirunrat *et al*., 2008) นอกจากนี้การศึกษารูปแบบการกลายพันธุ์ของยีน *Pvdhfr* พบว่ามีความเกี่ยวข้องกับการดื้อยากลุ่มแอนติโฟเลทที่ใช้ในการรักษา (Imwong *et al*., 2001, Gregson & Plowe, 2005) เช่นกัน

จากการศึกษาที่ผ่านมาจะเห็นได้ว่าองค์ความรู้ที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาของเชื้อมาลาเรียได้แก่ระบบการทำงานและความสัมพันธ์ของยีนที่เกี่ยวของกับการออกฤทธิ์ของยาที่ใช้ในการรักษา หรืออีกนัยหนึ่งคือเกี่ยวข้องกับการดำรงชีวิตของเชื้อมาลาเรีย ซึ่งในอนาคตอาจเป็นเป้าหมายในการผลิตยาต้านมาลาเรียชนิดใหม่เพื่อใช้ในการรักษา รวมถึงการเลือกใช้ยีนหรือลำดับเบสที่เหมาะสม (biomarker) ในการวินิจฉัยเฝ้าระวังการดื้อยา หรือติดตามการเปลี่ยนแปลงของเชื้อ ซึ่งส่งผลต่อการควบคุมการเกิดโรคมาลาเรียต่อไปได้

เอกสารอ้างอิง

1. Ariey F, Randrianarivelojosia M, Duchemin JB *et al.* Mapping of a *Plasmodium falciparum pfcrt* K76T mutation: a useful strategy for controlling chloroquine resistance in Madagascar. J Infect Dis 2002; 185: 710-2.
2. Babiker HA, Pringle SJ, Abdel-Muhsin A, Mackinnon M, Hunt P, Walliker D. High-level Chloroquine resistance in Sudanese isolates of *Plasmodium falciparum* is associated with mutations in the chloroquine resistance transporter gene *pfcrt* and the multidrug resistance Gene *pfmdr1*. J Infect Dis 2001; 183: 1535-8.
3. Baird JK, Basri H, Purnomo Bangs, MJ, Subianto B, Patchen LC, Hoffman SL, 1991. Resistance to chloroquine by *Plasmodium vivax* in Irian Jaya, Indonesia. Am. J. Trop. Med. Hyg. 44, 547–552.
4. Barnadas C., Tichit M., Bouchier C., Ratsimbasoa A., Randrianasolo L., Raherinjafy R., Jahevitra M., Picot S., Ménard D. 2008. *Plasmodium vivax dhfr* and *dhps* mutations in isolates from Madagascar and therapeutic response to sulphadoxine-pyrimethamine. Malar. J. 7: 35.
5. Basco LK, Ringwald P. Analysis of the key *pfcrt* point mutation and in vitro and in vivo response to chloroquine in Yaounde, Cameroon. J Infect Dis 2001; 183: 1828-31.
6. Chai JY. 1999. Re-emerging *Plasmodium vivax* malaria in the Republic of Korea. The Korean Journal of parasitology. 37: 129-143.
7. Chaiyaroj SC, Buranakiti A, Angkasekwinai P, Looressuwan S, Cowman AF. Analysis of mefloquine resistance and amplification of pfmdr1 in multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* isolates from Thailand. Am J Trop Med Hyg 1999; 61: 780 – 3.
8. Chen N, Russell B, Staley J, Kotecka B, Nasveld P, Cheng Q. Sequence polymorphisms in *pfcrt* are strongly associated with chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. J Infect Dis 2001; 183: 1543 – 5.
9. Congpuong K, Na-Bangchang K, Thimasarn K, Tasanor U and Wernsdorfer WH. 2002. Sensitivity of *Plasmodium vivax* to chloroquine in Sa Kaeo Province, Thailand. Acta tropica. 83: 117-121.
10. Cowman AF, Galatis d, Thompson JK. Selection for mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* is linked to amplification of the pfmdr1 gene and cross-resistance to halofantrine and quinine. Proc Natl Acad Sci U S A 1994; 91: 1143-7.
11. Djimde A, Doumbo OK, Cortese JF et al. A molecular marker for chloroquine – resistant Falciparum malaria. N Engl J Med 2001; 344: 257-63.
12. Dua, V.K., Kar, P.K., Sharma, V.P., 1996. Chloroquine resistant *Plasmodium vivax* malaria in India. Trop. Med. Int. Health 1, 816–819.
13. Duraisingh MT, Jones P, Sambou I, von Seidlein L, Pinder M, Warhurst DC. The tyrosine – 86 allele of the *pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum* is associated with increased sensitivity to the anti-malarials mefloquine and artemisisnin. Mol Biochem Parasitol 2000; 108: 13-23.

14. Eckstein-Ludwig U, Webb RJ, Van Goethem ID et al. Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. Nature 2003; 424: 957-61.
15. Gregson A., Plowe C.V. 2005. Mechanisms of resistance of malaria parasites to antifolates. Pharmacol. Rev. 57: 117-145.
16. Harinasuta T., Viravan C., Reid H.A. 1967. Sulphamethoxine in chloroquine – resistant malaria in Thailand. Lancet. 1:1117-1119.
17. Hawkins V.N, Joshi H., Rungsihirunrat K., Na-Bangchang K., Sibley C.H. 2007. Antifolates can have a role in the treatment of *Plasmodium vivax*. Trends Parasitol. 23: 213 – 222.
18. Imwong M., Pukrittayakamee S., Looareesuwan S., Pasvol G., Poirreiz J., White N.J., Snounou G. 2001. Association of genetic mutations in *Plasmodium vivax* DHFR with resistance to sulfadoxine-pyrimethamine: geographical and clinical correlates.
Antimicrob. Agents Chemother. 45: 3122-3127.
19. Imwong M., Pukrittayakamee S., Rénia L., Letourneur F., Charlieu J.P., Leartsakulpanich U., Looareesuwan S., White N.J., Snounou G. 2003. Novel point mutations in the dihydrofolate reductase gene of *Plasmodium vivax*: evidence for sequential selection bydrug pressure. Antimicrob. Agents Chemother. 47: 1514-1521.
20. Jambou R, Legrand E, Niang M et al. Resistance of *Plasmodium falciparum* field isolates to *in – vitro* artemether and point mutations of the SERCA-type PfATPase6. Lancet 2005; 366: 1960 – 3.
21. Krishna S, Pulcini S, Fatih F, Staines H. Artemisinins and the biological basis for the PfATP6/SERCA hypothesis. Trends Parasitol 2010; 26: 517-23.
22. Krishna S, Woodrow CJ, Staines HM, Haynes RK, Mercereau-Puijalon O. Re – evaluation of how artemisinins work in light of emerging evidence of in vitro resistance. Trends Mol Med 2006; 12: 200-5.
23. Lakshmanan V, Bray PG, Verdier-Pinard D et al. A critical role for PfCRT K76T in *Plasmodium falciparum* verapamil-reversible chloroquine resistance. EMBO J 2005; 24: 2294 – 305.
24. Leclerc MC, Menegon M, Cligny A, *et al.* 2004. Genetic diversity of *Plasmodium vivax* isolates from Azerbaijan. Malaria journal. 3: 40.
25. Lee, K.S., Kim, T.H., Kim, E.S., Lim, H.S., Yeom, J.S., Jun, G., Park, J.W., 2009. Short report: chloroquine-resistant *Plasmodium vivax* in the Republic of Korea. Am. J. Trop. Med. Hyg. 80, 215–217.
26. Lim P, Chim P, Sem R et al. In vitro monitoring of *Plasmodium falciparum* susceptibility to artesunate, mefloquine, quinine and chloroquine in Cambodia: 2001-2002. Acta Trop 2005; 93: 31 – 40.
27. Lopes D, Rungsihirunrat K, Nogueira F et al. Molecular characterisation of drug – resistant *Plasmodium falciparum* from Thailand. Malar J 2002; 1: 12.
28. Lu, F., Lim, CS., Nam, DN., Kim, K., Lin, K., Kim, TS., Lee, HW., Chen, JH., Wang, YW., Sattabongkot, J., and Han, ET. 2011. Genetic polymorphism in *Pvmdr1* and *Pvcrt – o* genes in relation to *in vitro* drug susceptibility of *Plasmodium vivax* isolates from malaria – endemic countries. Acta. Trop. 117: 69-75.
29. Marlar T, Myat Phone K, Aye Yu s, Khaing Khiang G, Ma S, et al. 1995. Development of resistance to chloroquine by *Plasmodium vivax* in Myanmar. Trans r Soc Trop Med Hyg 89: 307 – 308.
30. Mayor AG, Gomez-Olive X, Aponte JJ et al. Prevalence of the K76T mutation in the putative *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter (*pfcrt*) gene and its relation to chloroquine resistance in Mozambique. J Infect Dis 2001; 183: 1413-6.
31. Mendis K, Sina BJ, Marchesini P and Carter R. 2001. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. The American journal of tropical medicine and hygiene. 64: 97-106.
32. Mungthin M, Bray PG, Ward SA. Phenotypic and genotypic characteristics of recently adapted isolates of *Plasmodium falciparum* from Thailand. Am J Trop Med Hyg 1999; 60: 469-74.
33. Peel SA, Bright P, Yount B, Handy J, Baric RS. A strong association between mefloquine and halofantrine resistance and amplification, overexpression, and mutation in the P – glycoprotein gene homolog (*pfmdr*) of *Plasmodium falciparum in vitro*. Am J Trop Med Hyg 1994; 51: 648 – 58.
34. Phan GT, de Vries PJ, Tran BQ, Le HQ, Nguyen NV, et al. 2002. Artemisinin or chloroquine for blood stage *Plasmodium vivax* malaria in Vietnam. Trop. Med. Int. Health. 7: 858 – 864.

35. Pickard AL, Wongsrichanalai C, Purfield A et al. Resistance to antimalarials in Southeast Asia and genetic polymorphisms in pfmdr1. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 2418-23.

36. Pillai DR, Labbe AC, Vanisaveth V *et al. Plasmodium falciparum* malaria in Laos: chloroquine treatment outcome and predictive value of molecular markers. J Infect Dis 2001; 183: 789 – 95.

37. Price RN, Cassar C, Brockman A et al. The *pfmdr1* gene is associated with a multidrug – resistant phenotype in *Plasmodium falciparum* from the western border of Thailand. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 2943 – 9.

38. Price RN, Uhlemann AC, Brockman A et al. Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased *pfmdr1* gene copy number. Lancet 2004; 364: 438 – 47.

39. Price RN, Uhlemann AC, van Vugt M et al. Molecular and pharmacological determinants of the therapeutic response to artemether-lumefantrine in multidrug-resistant Plasmodium falciparum malaria. Clin Infect Dis 2006; 42: 1570-7.

40. Reed MB, Saliba KJ, Caruana SR, Kirk K, Cowman AF. Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*. Nature 2000; 403: 906-9. Rieckmann KH, Davis DR, and Hutton DC. 1989. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine? Lancet ii:1183 – 1184.

41. Ritchie GY, Mungthin M, Green JE, Bray PG, Hawley SR, Ward SA. *In vitro* selection of halofantrine resistance in *Plasmodium falciparum* is not associated with increased expression of Pgh1. Mol Biochem Parasitol 1996; 83:35-46.

42. Rungsihirunrat K., Sibley C.H., Mungthin M., Na-Bangchang K. 2008. Geographical distribution of amino acid mutations in *Plasmodium vivax dhfr* and *dhps* from malaria endemic areas of Thailand. Am. J. Trop. Med. Hyg. 78: 462-467.

43. Sidhu AB, Valderramos SG, Fidock DA. *pfmdr1* mutations contribute to quinine resistance and enhance mefloquine and artemisinin sensitivity in *Plasmodium falciparum*. Mol Microbiol 2005; 57: 913-26.

44. Sidhu AB, Verdier – Pinard D, Fidock DA. Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria parasites conferred by *pfcrt* mutations. Science 2002; 298: 210 – 3.

45. Sleigh AC, Liu XL, Jackson S, Li P and Shang LY. 1998. Resurgence of vivax malaria in Henan Province, China. Bulletin of the World Health Organization. 76: 265 – 270.

46. Suwanarusk, R., Russell, B., Chavchich, M., Chalfein, F., Kenangalem, E., Kosaisavee, V., Prasetyorini, B., Piera, KA., Barends, M., brockman, A., Lek-Uthai, U., anstey, NM., Tjitra, E., Nosten, F., Cheng, Q., and Price, RN. 2007. Chloroquine Resistant *Plasmodium vivax in vitro* characterization and association with molecular polymorphisms. PLosONE. 2(10) E1089.

47. Thomas SM, Ndir O, Dieng T *et al. In vitro* chloroquine susceptibility and PCR analysis of *pfcrt* and *pfmdr1* polymorphisms in *Plasmodium falciparum* isolates from Senegal. Am J Trop Med Hyg 2002; 66: 474-80.

48. Uhlemann AC, Ramharter M, Lell B, Kremsner PG, Krishna S. Amplification of *Plasmodium falciparum* multidrug resistance gene 1 in isolates from Gabon. J Infect Dis 2005; 192: 1830-5.

49. Vieira PP, das Gracas Alecrim M, da Silva LH, Gonzalez-Jimenez I, Zalis MG. Analysis of the PfCRT K76T mutation in *Plasmodium falciparum* isolates from the Amazon region of Brazil. J Infect Dis 2001; 183: 1832 – 3.

50. WHO Technical Report Series No. 711, 1984 (Advances in malaria chemotherapy Report of WHO Scientfic Group).

51. Wilson CM, Serrano AE, Wasley A, Shanker AH, Wirth DF. Amplification of a gene related to mammalian mdr genes in drug-resistant *Plasmodium falciparum*. Science 1989; 244:

52. Wilson CM, Volkman SK, Thaithong S et al. Amplification of *pfmdr1* associated with mefloquine and halofantrine resistance in *Plasmodium falciparum* from Thailan. Mol Biochem Parasitol 1993; 57: 151 – 60.