

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : TRG5980016

ชื่อโครงการ : ผลของยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินต่อโปรตีน PI3K

ของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมในเม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินผิดปกติ

ชื่อนักวิจัย : ดร. ญุช มุหะหมัด

ศูนย์วิจัยค้นคว้าและพัฒนา

สำนักงานวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีชั้นสูง มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

E-mail Address : nurah_ab@yahoo.com

ระยะเวลาโครงการ : 3 ปี (ขยายเวลา: 1 มิถุนายน 2561-31 พฤษภาคม 2562)

ความหลากหลายของฮีโมโกลบินเป็นความผิดปกติทางพันธุกรรมที่ทำให้โฮสต์สามารถต้านทานการติดเชื้อมาลาเรียได้ อย่างไรก็ตาม ความบกพร่องทางคุณภาพของฮีโมโกลบินเพียงเล็กน้อย เช่น ผู้ที่มีเม็ดเลือดที่เป็นพาหะธาลัสซีเมีย พาหะฮีโมโกลบินอี และพาหะฮีโมโกลบินซีเอส ไม่มีผลป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียนอกจากนี้สภาวะที่เกิดจากการสร้างฮีโมโกลบินที่ไม่สมบูรณ์ทำให้เชื้อต้องปรับตัวเพื่อดำรงชีวิต และส่งผลให้เชื้อมาลาเรียมีการตอบสนองต่อยาต้านมาลาเรียต่างจากเชื้อที่ติดในเม็ดเลือดปกติ ซึ่งอาจนำไปสู่การดื้อต่อยาต้านมาลาเรีย การศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาความไวและปฏิกิริยาระหว่างยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินต่อเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมที่ติดในเม็ดเลือดแดงที่มีความหลากหลายของฮีโมโกลบิน และ เพื่อศึกษาการออกฤทธิ์ของยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินต่อการทำงานของโปรตีน *p*PI3K ในการผลิตไขมัน PI(3)P โดยนำเลือดจากอาสาสมัครที่มีผลการวิเคราะห์เม็ดเลือดแดงและ hemoglobin typing ปกติ และผิดปกติในสายเบต้าและแอลฟา มาใช้เลี้ยงเชื้อมาลาเรียและนำเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ 3D7 (ไวต่อยาคลอโรควิน) และ K1 (ดื้อต่อยาคลอโรควิน) ที่เจริญในเม็ดเลือดที่มีฮีโมโกลบินลักษณะต่างๆ มาทดสอบความไวต่อยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินทั้งในรูปแบบยาเดี่ยวและยาผสมโดยวิธี SYBR green และวิเคราะห์ผลการศึกษาความไวของเชื้อต่อยาในรูปแบบยาเดี่ยวจากค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญเติบโต (Inhibitory concentration, IC) ส่วนผลของการทดสอบแบบยาผสมแสดงผลด้วยค่า sum fractional ICs (Σ FICs) และ isobologram การศึกษาผลของยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินต่อการทำงานของโปรตีน *p*PI3K วัดจากปริมาณไขมัน PI(3)P โดยวิธี ELISA ผลการศึกษาพบว่า อาสาสมัครจำนวน 25 คน แบ่งเป็นกลุ่มที่มีฮีโมโกลบินปกติจำนวน 10 คน ผิดปกติของฮีโมโกลบินที่สายเบต้า 12 คน (พาหะฮีโมโกลบินอี 10 คนและพาหะเบต้าธาลัสซีเมีย 2 คน) อาสาสมัครที่มีความผิดปกติของฮีโมโกลบินที่สายแอลฟา 3 คน (พาหะแอลฟาธาลัสซีเมีย 2 คน และพาหะฮีโมโกลบินซีเอส 1 คน) เชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ 3D7 ในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะเบต้าธาลัสซีเมีย พาหะแอลฟาธาลัสซีเมีย และพาหะฮีโมโกลบินซีเอสมีความไวต่อยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินมากกว่าเชื้อที่ติดในเม็ดเลือดแดงปกติหรือเม็ดเลือดแดงที่

เป็นพาหะฮีมโกลบินอี นอกจากนี้เชื้อที่ติดในเม็ดเลือดที่เป็นพาหะเบต้าธาลัสซีเมียที่มีความไวต่อยาไพเพอราควินมากกว่าเชื้อที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดอื่นๆ ส่วนเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ K1 มีเพียงเชื้อที่เจริญในเม็ดเลือดที่เป็นพาหะเบต้าธาลัสซีเมียที่มีความไวของเชื้อต่อยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินลดลง การศึกษาความไวของเชื้อมาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดลักษณะต่างๆ ต่อยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินในรูปแบบยาผสมพบว่า ไม่เกิดปฏิกิริยาระหว่างยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินในเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมทั้งสายพันธุ์ 3D7 และ K1 ที่เจริญอยู่ในเม็ดเลือดแดงปกติ รวมทั้งเชื้อสายพันธุ์ 3D7 ที่ติดในเม็ดเลือดที่เป็นพาหะแอลฟาธาลัสซีเมีย และเชื้อสายพันธุ์ K1 ที่ติดในเม็ดเลือดที่เป็นพาหะฮีมโกลบินซีเอส แต่พบการต้านฤทธิ์ระหว่างกันเมื่อทดสอบในเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมทั้งสองสายพันธุ์ที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดที่เป็นพาหะฮีมโกลบินอีหรือพาหะเบต้าธาลัสซีเมียและเม็ดเลือดที่เป็นพาหะฮีมโกลบินซีเอสเฉพาะเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ และพบการเสริมฤทธิ์ต่อกันของยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินในเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ K1 ที่อยู่ในเม็ดเลือดที่เป็นพาหะแอลฟาธาลัสซีเมีย การศึกษาผลของยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินต่อไขมัน PI(3)P พบว่า ปริมาณการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวมีการเพิ่มขึ้นจากค่าอ้างอิง (2.5 เท่า) ในเชื้อมาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงปกติจำนวน 2 ตัวอย่าง (20 เปอร์เซ็นต์) โดยมีปริมาณเท่ากับ 3.32 และ 3.54 เท่า และเม็ดเลือดที่มีฮีมโกลบินผิดปกติกลุ่มละ 1 ตัวอย่างคือ เชื้อในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะฮีมโกลบินอี จำนวน 1 ตัวอย่าง (10 เปอร์เซ็นต์) โดยมีปริมาณไขมัน PI(3)P เท่ากับ 13.19 เท่า พาหะเบต้าธาลัสซีเมีย จำนวน 1 ตัวอย่าง (50 เปอร์เซ็นต์) โดยมีปริมาณไขมัน PI(3)P เท่ากับ 5.35 เท่า และพาหะฮีมโกลบินซีเอส จำนวน 1 ตัวอย่าง (100 เปอร์เซ็นต์) โดยมีปริมาณไขมัน PI(3)P เท่ากับ 4.31 เท่า แต่ไม่พบความแตกต่างในการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวเมื่อสัมผัสยาไพเพอราควิน การศึกษานี้สรุปได้ว่า ความหลากหลายของฮีมโกลบิน โดยเฉพาะพาหะฮีมโกลบินอีและพาหะเบต้าธาลัสซีเมีย มีผลต่อการตอบสนองต่อยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมในหลอดทดลอง รวมทั้งการทำงานของเอนไซม์ *PfPI3K* จากปริมาณไขมัน PI(3)P ที่ถูกสร้างขึ้นเมื่อสัมผัสกับยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินิน ซึ่งอาจสัมพันธ์กับการกลายพันธุ์ของยีน *PfKelch1* และนำไปสู่การดื้อยาของกลุ่มอาร์ติมิซินิน จึงควรมีการศึกษาประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ของยาสูตรผสมไดไฮโดรอาร์ติมิซินิน-ไพเพอราควินในผู้ป่วยมาลาเรียที่มีความหลากหลายของฮีมโกลบิน เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการเฝ้าระวังการเกิดการดื้อยาของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมต่อยาขนานหลัก (ไดไฮโดรอาร์ติมิซินิน-ไพเพอราควิน) ต่อไป

คำสำคัญ: *Plasmodium falciparum*, hemoglobinopathies, dihydroartemisinin (DHA), piperazine (PPQ), phosphatidylinositol-3-phosphate [PI(3)P], phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)

Abstract

Project Code : TRG5980016

Project Title : Effects of dihydroartemisinin and piperaquine on phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) activity in *Plasmodium falciparum*-infected hemoglobinopathic RBCs

Investigator : Dr. Phunuch Muhamad
Drug Discovery and Development Center,
Office of Advanced Science and Technology, Thammasat University

E-mail Address : nurah_ab@yahoo.com

Project Period : 3 years (extend period: 1 June 2018-31 May 2019)

Hemoglobin polymorphisms are genetic diversity that protect host from malaria infection. However, mild hemoglobin abnormalities such as thalassemia traits, hemoglobin E trait and hemoglobin CS trait cannot protect host from malaria infection. Furthermore, incomplete hemoglobin production leads to parasite adaptation for living in uncommon condition and causes different antimalarial response which may leads to drug resistant malaria. The objectives of this study were (i) to investigate *in vitro* sensitivity and interaction of *Plasmodium falciparum* infected in normal and abnormal hemoglobinopathic RBCs to dihydroartemisinin (DHA) and piperaquine (PPQ) and (ii) to determine effect of DHA and PPQ on *Pf*PI3K activity via PI(3)P production in *Plasmodium falciparum* infected in normal and abnormal hemoglobinopathic RBCs. Twenty-five volunteers who present normal hemoglobin, alpha and beta heterozygous hemoglobinopathies according to the reports of their complete blood count (CBC) and hemoglobin typing were included to the study. *P. falciparum* strains 3D7 (chloroquine sensitive) and K1 (chloroquine resistance) were cultured with blood taken from volunteers and used for *in vitro* sensitivity both single drug and combination by SYBR green method and interpreted the results from inhibitory concentration (IC) values for single drug whereas sum fractional ICs (Σ FICs) and isobologram plot were applied for combination drugs. In addition, effect of DHA and PPQ on *Pf*PI3K activity as PI(3)P production was measured by ELISA. The results shown that among 25 volunteers of which 10 people have normal hemoglobin, 12 people are defect in beta chain (10 people

have hemoglobin E trait and 2 people are beta thalassemia trait) and 3 people carry alpha chain hemoglobin abnormality hemoglobin (2 people are alpha thalassemia trait and 1 person is hemoglobin CS trait). *In vitro* sensitivity found that *P. falciparum* strain 3D7 infected in beta thalassemia trait, alpha thalassemia trait and hemoglobin CS trait RBCs are more sensitive to DHA compared to that *P. falciparum* strain 3D7 infected in hemoglobin E trait and normal hemoglobin RBCs while *P. falciparum* strain 3D7 infected in beta thalassemia trait RBC is the most sensitive to PPQ compared to others. For *P. falciparum* strain K1, decreasing of DHA and PPQ sensitivity found only in parasite infected in beta thalassemia trait RBC. For *P. falciparum* strain K1, decreasing of DHA and PPQ sensitivity found only in parasite infected in beta thalassemia trait RBCs. Study of drug interaction revealed no interaction between DHA and PPQ in *P. falciparum* strain 3D7 and K1 infected in normal RBC as well as 3D7 strain infected in alpha thalassemia trait and K1 strain infected in hemoglobin CS trait. Antagonistic effect has been observed in parasite infected in beta thalassemia trait or hemoglobin E trait RBCs including parasite strain 3D7 infected in hemoglobin CS RBCs. Synergistic effect found in *P. falciparum* strain K1 infected in alpha thalassemia trait RBC. Effect of on *Pf*PI3K shows increasing of PI(3)P expression upper than reference value (2.5 times) in 2 samples or 20 percent of *P. falciparum* strain 3D7 grown in normal RBC (3.32 and 3.54 times) and 1 sample of each hemoglobinopathic RBCs *i.e.*; hemoglobin E trait 1 sample or 10 percent (13.19 times), beta thalassemia trait 1 sample or 50 percent (5.35 times) and hemoglobin CS trait 1 sample or 100 percent (4.31 times) but the PI(3)P expression is not influence by PPQ exposure. The study concludes that hemoglobin polymorphisms especially, hemoglobin E trait and beta thalassemia trait affect to *in vitro* DHA and PPQ response including *Pf*PI3K activity via PI(3)P production after DHA exposure that may relate to mutation of *Pf*Kelch1 and results in the resistance to artemisinins. Therefore, treatment efficacy of dihydroartemisinin-piperaquine combination in malaria patients who have hemoglobin polymorphism should be further investigated to gain knowledge for monitoring of *P. falciparum* resistance to the first line drug (dihydroartemisinin-piperaquine).

Keywords: *Plasmodium falciparum*, hemoglobinopathies, dihydroartemisinin (DHA), piperaquine (PPQ), phosphatidylinositol-3-phosphate [PI(3)P], phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)