

(ทุนส่งเสริมนักวิจัยรุ่นใหม่)

สัญญาเลขที่ TRG5980016



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

ผลของยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินต่อโปรตีน PI3K
ของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมในเม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินผิดปกติ
(Effects of dihydroartemisinin and piperazine
on phosphatidylinositol 3- kinase (PI3K) activity
in *Plasmodium falciparum*-infected hemoglobinopathic RBCs)

โดย

ดร. ภูษ ข มุหะหมัด

พฤษภาคม 2562

(ทุนส่งเสริมนักวิจัยรุ่นใหม่)

สัญญาเลขที่ TRG5980016

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

ผลของยาไดไฮโดรอาร์ทีมิซินินและไพเพอราควินต่อโปรตีน PI3K
ของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมในเม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินผิดปกติ
(Effects of dihydroartemisinin and piperazine
on phosphatidylinositol 3- kinase (PI3K) activity
in *Plasmodium falciparum*-infected hemoglobinopathic RBCs)

โดย

ดร. ภูษณ มุทะหมัด

สังกัด ศูนย์วิจัยคั่นควาและพัฒนายา

สำนักงานวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีขั้นสูง มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและ

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. และมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญ

หัวข้อ	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	1
บทคัดย่อ	2
Abstract	5
สรุปโครงการ (Executive Summary)	8
บทที่ 1 บทนำ	24
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	27
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	56
บทที่ 4 ผลการทดลอง	63
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	89
เอกสารอ้างอิง	94
Output ที่ได้จากโครงการ	101
ภาคผนวก	
ก. Poster presentation	102
ข. Manuscript for publication	105
ค. ผลการวิเคราะห์	135

สารบัญรูปภาพ

หัวข้อ	หน้า
รูปที่ 2.1 วงจรชีวิตของมาลาเรีย	31
รูปที่ 2.2 รูปร่างของมาลาเรียระยะในเม็ดเลือดแดง	32
รูปที่ 2.3 จำนวนผู้ป่วยและผู้เสียชีวิตด้วยโรคมาลาเรียในประเทศไทยระหว่างปี 2550-2560	34
รูปที่ 2.4 อุบัติการณ์ของโรคมาลาเรียในประเทศไทยของประชากรไทยและต่างชาติ ในปี พ.ศ.2555	35
รูปที่ 2.5 โครงสร้างของยาอาร์ติมิซินิน ยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินิน ยาคลอโรควินและยาไพเพอราควิน	39
รูปที่ 2.6 Isobologram ลักษณะต่างๆ ที่อาจเกิดจากปฏิกิริยาระหว่างยา A และยา B	42
รูปที่ 2.7 การกระจายของโรคธาลัสซีเมียและมาลาเรียในปี 1940s และความชุกของประชากรที่มีความหลากหลายของฮีโมโกลบินในประเทศไทย	46
รูปที่ 2.8 พื้นที่ที่พบความไวของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมต่อยาต้านมาลาเรียลดลง และพื้นที่ที่มีการดื้อต่อยาต้านมาลาเรียหลายชนิดจากการศึกษาของ WHO	52
รูปที่ 3.1 การเตรียมหลุมยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินในอัตราส่วนต่างๆ เพื่อทดสอบความไวของเชื้อมาลาเรียต่อยาต้านมาลาเรีย	59
รูปที่ 4.1 ตัวอย่างกราฟจากการวิเคราะห์ชนิดของฮีโมโกลบินด้วยวิธี capillary electrophoresis	65
รูปที่ 4.2 การเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ 3D7 ในเม็ดเลือดที่มีฮีโมโกลบินชนิดต่างๆ (เปอร์เซ็นต์เชื้อมาลาเรียในเม็ดเลือดและอัตราการติดเชื้อมาลาเรียเมื่อเทียบกับเม็ดเลือดแดงปกติ	69
รูปที่ 4.3 การเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ 3D7 ในเม็ดเลือดที่มีฮีโมโกลบินชนิดต่างๆ ในช่วงเวลา 48, 96 และ 144 ชั่วโมง	70
รูปที่ 4.4 Isobologram แสดงปฏิกิริยาระหว่างยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินต่อการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ 3D7 และ K1	84
รูปที่ 4.5 กราฟมาตรฐานของไขมัน PI(3)P และกราฟการแสดงออกของไขมัน PI(3)P ของเชื้อมาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดชนิดต่างๆ ภายหลังการสัมผัสยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินิน (DHA) หรือไพเพอราควิน (PPQ)	88

สารบัญตาราง

หัวข้อ	หน้า
ตารางที่ 2.1 ยาสูตรผสมในกลุ่มอาร์ติมิซินิน เพื่อใช้เป็นยาขนานหลักในการรักษาโรคมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมที่ไม่มีอาการแทรกซ้อนตามคำแนะนำของ WHO	38
ตารางที่ 2.2 ฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบบ่อยในประเทศไทย	47
ตารางที่ 2.3 ตัวอย่างความหลากหลายของฮีโมโกลบินที่มีผลต่อการติดเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม	51
ตารางที่ 4.1 ความสมบูรณ์ของเม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินชนิดต่างๆ	67
ตารางที่ 4.2 ความเข้มข้นของยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินชนิดต่างๆเท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ (IC ₁₀)	77
ตารางที่ 4.3 ความเข้มข้นของยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินชนิดต่างๆเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC ₅₀)	78
ตารางที่ 4.4 ความเข้มข้นของยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินชนิดต่างๆเท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ (IC ₉₀)	79
ตารางที่ 1ผ การวิเคราะห์ทางโลหิตวิทยาของอาสาสมัคร	135
ตารางที่ 2ผ ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินิน (DHA) และไพเพอราควิน (PPQ) ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ 3D7 ได้ 10, 50 และ 90 เปอร์เซ็นต์ (IC ₁₀ , IC ₅₀ และ IC ₉₀)	136
ตารางที่ 3ผ ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินิน (DHA) และไพเพอราควิน (PPQ) ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ K1 ได้ 10, 50 และ 90 เปอร์เซ็นต์ (IC ₁₀ , IC ₅₀ และ IC ₉₀)	137
ตารางที่ 4ผ ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของไขมัน PI(3)P หลังสัมผัสยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินิน (DHA) และไพเพอราควิน (PPQ)	138

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณการสนับสนุนเงินทุนวิจัยจาก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) สำหรับนักวิจัยรุ่นใหม่ ร่วมกับมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (สัญญาทุนเลขที่ TRG5980016) และคำแนะนำการดำเนินการวิจัยจากอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัย ศาสตราจารย์ ดร.เกศรา ณ บางช้าง นอกจากนี้ ขอขอบคุณนักเทคนิคการแพทย์ (ทนพญ. วราภรณ์ บุปผา) และเจ้าหน้าที่ผู้ปฏิบัติงานประจำห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติทุกท่าน ที่ให้ความอนุเคราะห์ตรวจวิเคราะห์ความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด (CBC) และชนิดของฮีโมโกลบิน (hemoglobin typing) คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ใช้ห้องเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีความปลอดภัยทางชีวภาพระดับที่ 2 (BSL-2) วิทยาลัยแพทยศาสตร์นานาชาติจุฬาภรณ์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์กล้องจุลทรรศน์สำหรับถ่ายภาพ สำนักงานวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีขั้นสูง มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ที่สนับสนุนเครื่องมือวิเคราะห์/ทดสอบ (microplate reader) สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณอาสาสมัครทุกท่านที่ให้ความร่วมมืออย่างดียิ่งทำให้โครงการวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

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 $p\text{PI3K}$ ในการผลิตไขมัน $\text{PI}(3)\text{P}$ โดยนำเลือดจากอาสาสมัครที่มีผลการวิเคราะห์เม็ดเลือดแดงและ hemoglobin typing ปกติ และผิดปกติในสายเบต้าและแอลฟา มาใช้เลี้ยงเชื้อมาลาเรียและนำเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ 3D7 (ไวต่อยาคลอโรควิน) และ K1 (ดื้อต่อยาคลอโรควิน) ที่เจริญในเม็ดเลือดที่มีฮีโมโกลบินลักษณะต่างๆ มาทดสอบความไวต่อยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินทั้งในรูปแบบยาเดี่ยวและยาผสมโดยวิธี SYBR green และวิเคราะห์ผลการศึกษาความไวของเชื้อต่อยาในรูปแบบยาเดี่ยวจากค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญเติบโต (Inhibitory concentration, IC) ส่วนผลของการทดสอบแบบยาผสมแสดงผลด้วยค่า sum fractional ICs (ΣFICs) และ isobologram การศึกษาผลของยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินต่อการทำงานของโปรตีน $p\text{PI3K}$ วัดจากปริมาณไขมัน $\text{PI}(3)\text{P}$ 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* และนำไปสู่การื้อยาของกลุ่มอาร์ติมิซินิน จึงควรมีการศึกษาประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ของยาสูตรผสมไดไฮโดรอาร์ติมิซินิน-ไพเพอราควินในผู้ป่วยมาลาเรียที่มีความหลากหลายของฮีมโกลบิน เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการเฝ้าระวังการเกิดการื้อยาของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมต่อยาขนานหลัก (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 piperazine 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 piperazine (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)

สรุปโครงการ

(Executive Summary)

ผลของยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินต่อโปรตีน PI3K
ของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพาร์มในเม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินผิดปกติ
(Effects of dihydroartemisinin and piperazine on
phosphatidylinositol 3- kinase (PI3K) activity in
Plasmodium falciparum-infected hemoglobinopathic RBCs)

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โรคธาลัสซีเมียชนิดอัลฟ่า (α -thal) หรือเบต้า (β -thal) และฮีโมโกลบินชนิดอี (Hb E) เป็นความหลากหลายของฮีโมโกลบินที่พบในพื้นที่เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ควบคู่กับการระบาดของโรคมาลาเรีย (Kuesap et al., 2015) ความหลากหลายของฮีโมโกลบินเป็นความผิดปกติทางพันธุกรรมที่สามารถต้านทานการติดเชื้อมาลาเรีย อย่างไรก็ตาม ผู้ที่มียีนที่เป็นพาหะจะมีคุณภาพของฮีโมโกลบินเพียงเล็กน้อย ซึ่งไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียได้ (Taylor et al., 2013) กระบวนการสร้างฮีโมโกลบินที่ไม่สมบูรณ์ จะทำให้เหลือเศษของฮีโมโกลบินที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเครียดที่เกิดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) ซึ่งมีผลต่อความไวของยาด้านมาลาเรีย เม็ดเลือดที่มีความหลากหลายของฮีโมโกลบิน เช่น ฮีโมโกลบินชนิดเอช (Hb H) ฮีโมโกลบินชนิดเอช/ฮีโมโกลบินชนิดซีเอส (Hb H/Hb CS) เบต้าธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินชนิดอี (β -thal/Hb E) มีความเข้มข้นของยาอาร์ติมิซินินทั้งในส่วนเยื่อหุ้มเซลล์และไซโตซอลมากกว่าเม็ดเลือดแดงปกติ และมีความไวต่อยาด้านมาลาเรียลดลงเช่นกัน (Charoenteeraboon et al., 2000) การที่มียาด้านมาลาเรียสะสมอยู่ในเม็ดเลือดเป็นเวลานานโดยที่ไม่สามารถฆ่าเชื้อให้ตายได้ ทำให้เชื้อได้สัมผัสกับยาและพัฒนาเป็นเชื้อดื้อยาได้ ประเทศในพื้นที่เอเชียตะวันออกเฉียงใต้โดยเฉพาะประเทศไทยเป็นพื้นที่ที่มีเชื้อมาลาเรียที่ดื้อยาด้านมาลาเรียหลายชนิดระดับสูง ทำให้ต้องมีการปรับนโยบายการรักษาโรคมาลาเรียโดยใช้ยาสูตรผสมในกลุ่มอาร์ติมิซินิน (artemisinin combination therapy, ACT) เป็นยาขนานหลักตามคำแนะนำของ WHO ประเทศไทยใช้ยาผสมระหว่างอาร์ติซูเนทและเมโฟลควินเพื่อรักษาโรคมาลาเรียชนิดฟัลซิพาร์มตั้งแต่ปี 1994 (Na-Bangchang and Karbwang, 2009) และจากการใช้ยาสูตรผสมนี้เป็นเวลา 20 ปี พบว่า ประสิทธิภาพการรักษาด้วยยาสูตรนี้ลดลงอยู่ที่ 80 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการติดตามผลการรักษาเป็นเวลา 42 วัน (Na-Bangchang et al., 2010) ยาสูตรผสมระหว่างไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินเป็นยาอีกสูตรหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ทดแทนได้ ยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินเป็นเมทาบอลไลท์ของยาในกลุ่มอาร์ติมิซินิน ที่มีประสิทธิภาพและฤทธิ์ดีกว่าตัวยาตั้งต้น (Hien and White, 1993) การออกฤทธิ์ของยาในกลุ่มนี้สัมพันธ์กับโครงสร้างที่มีออกซิเจนอยู่ภายในเซลล์ ซึ่งสามารถสร้างอนุมูลอิสระเมื่อทำปฏิกิริยากับเหล็ก (Ferrous ion) และอนุมูลอิสระนี้จะเป็นตัวกลางที่มีความเป็นพิษใน food vacuole ของเชื้อมาลาเรีย (Gopalakrishnan and Kumar, 2015) การศึกษาเมื่อไม่นานมานี้พบว่า เชื้อมาลาเรียที่

ดื้อต่อยาอาร์ติมิซินินที่พบในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มีการกลายพันธุ์ของโปรตีน *P. falciparum* Kelch13 (*PfKelch13*) และนำมาใช้เป็นเครื่องหมายในการศึกษาเป้าหมายการออกฤทธิ์ของยาในระดับโมเลกุล (Ariey et al., 2014) การกลายพันธุ์ของโปรตีน *PfKelch13* ยับยั้งการจับกันของ *PfPI3K* (phosphatidylinositol 3-kinase) ทำให้เกิด *PfKelch13-PfPI3K* ลดลงและมี polyubiquitination ลดลง ทำให้ลดการย่อย *PfPI3K* จึงเหลือ *PfPI3K* ในเซลล์เพิ่มขึ้น ไดไฮโดรอาร์ติมิซินินสามารถยับยั้งการทำงานของ *PfPI3K* ได้และส่งผลให้มีปริมาณ PI(3)P (phosphatidylinositol 3-phosphate) ลดลง (Mbengue et al., 2015) นอกจากนี้ โปรตีน *PfPI3K* ยังมีส่วนเกี่ยวข้องกับการขนส่งฮิโมโกลบิน ซึ่งเป็นแหล่งอาหารของเชื้อมาลาเรีย การยับยั้งการทำงานของโปรตีน *PfPI3K* ทำให้เกิดการสะสมฮิโมโกลบินเกิดเป็นถุงในไซโทพลาสซึมและป้องกันการขนส่งไปสู่ food vacuole (Vaid et al., 2010). คลอโรควินออกฤทธิ์โดยยับยั้งการรวมตัวกันของ food vacuole กับถุงของฮิโมโกลบิน (Hoppe et al., 2004) ไพเพอราควินเป็นยาต้านมาลาเรียในกลุ่ม aminoquinoline ออกฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรียในหลอดทดลองทั้งสายพันธุ์ที่ไวและดื้อต่อยาต้านมาลาเรีย อย่างไรก็ตาม เป้าหมายของการออกฤทธิ์ของยาไพเพอราควินในระดับโมเลกุลยังไม่ทราบแน่ชัด แต่จากที่มีโครงสร้างเคมีคล้ายคลึงกับคลอโรควิน จึงเป็นเหตุให้สามารถยอมรับว่าไพเพอราควินออกฤทธิ์เช่นเดียวกับคลอโรควิน เช่น การยับยั้งการสร้างฮิโมโซอิน (Krugliak et al., 2002) การกลายพันธุ์ของโปรตีน *PfCRT* ไม่มีผลต่อการสะสมของไพเพอราควินใน food vacuole ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายาชนิดนี้ไม่มีกลไกการดื้อยาเหมือนคลอโรควิน (Bray et al., 2006).

จากข้อมูลดังกล่าวมาสามารถคาดการณ์ได้ว่า ผลของยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินต่อโปรตีน *PfPI(3)PK* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมที่ติดในเม็ดเลือดแดงที่มีความหลากหลายของฮิโมโกลบิน การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความไวของเชื้อมาลาเรียที่ติดในเม็ดเลือดแดงที่มีความหลากหลายของฮิโมโกลบินต่อยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควิน ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้ จะทำให้ทราบเป้าหมายในการออกฤทธิ์และการดื้อยาทั้งสองชนิด

2. วัตถุประสงค์

- 2.1 เพื่อศึกษาความไวและปฏิกิริยาระหว่างยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินต่อเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมที่ติดในเม็ดเลือดแดงที่มีความหลากหลายของฮิโมโกลบิน และ
- 2.2 เพื่อศึกษาการออกฤทธิ์ของยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินต่อการทำงานของโปรตีน *PfPI3K* ในการผลิตไขมัน PI(3)P

3. ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 อาสาสมัครและตัวอย่างเลือด

ข้อมูลลักษณะเม็ดเลือดของอาสาสมัครจำนวน 50 คน ถูกคัดกรองจากความสมบูรณ์ของเม็ดเลือดแดง และจำแนกชนิดฮิโมโกลบิน โดยวิธี capillary electrophoresis อาสาสมัครที่มีลักษณะเม็ดเลือดและฮิโมโกลบินปกติ และอาสาสมัครที่มีฮิโมโกลบินผิดปกติที่สายเบต้าและแอลฟา คือพาหะฮิโมโกลบินอี พาหะเบต้าธาลัสซีเมีย พาหะแอลฟาธาลัสซีเมีย และพาหะฮิโมโกลบินซีเอส (constant

spring, CS) จำนวน 25 คน จะได้รับการขอความยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย และเจาะเลือดจำนวน 18 มิลลิลิตรโดยใช้หลอดเก็บเลือดที่มีสารกันเลือดแข็งชนิด EDTA

3.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม

เชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ 3D7 (ไวต่อยาคลอโรควิน) และ K1 (ดื้อต่อยาคลอโรควิน) จะนำมาเลี้ยงในหลอดทดลองอย่างต่อเนื่องตามวิธีของ Trager และ Jensen (Trager and Jensen, 1976) ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด RPMI 1640 ที่ประกอบด้วย NaHCO_3 เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์, serum เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ HEPES pH 7.4 เข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ gentamicin เข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เม็ดเลือดแดงเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ และปรับบรรยากาศด้วยก๊าซผสมที่มี CO_2 เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์, O_2 เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ และ N_2 เข้มข้น 90 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นนำเชื้อไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณเชื้อจะเลี้ยงในเจริญเติบโตอยู่ที่ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยเปลี่ยนอาหารทุกๆ 48 ชั่วโมง และปรับเชื้อให้อยู่ในระยะวงแหวนด้วยการบ่มกับสารละลายน้ำตาลซอพิทอลความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์

3.3 การศึกษาการติดเชื้อมาลาเรียในเม็ดเลือดชนิดต่างๆ

เชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ 3D7 ระยะวงแหวน ที่มีปริมาณเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ ถูกนำมาผสมกับเม็ดเลือดแดงปกติ เม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินอี เม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะเบต้าธาลัสซีเมีย เม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะแอลฟาธาลัสซีเมีย หรือเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินซีเอส ในอัตราส่วน 1:10 ให้ได้ปริมาณเชื้อในการทดสอบเท่ากับ 0.5 เปอร์เซ็นต์ และผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีปริมาณเม็ดเลือด 1 เปอร์เซ็นต์ นำเชื้อที่เตรียมได้ 100 ไมโครลิตรมาเลี้ยงในถาด 96 หลุม เป็นเวลา 48, 96 และ 144 ชั่วโมง ภายใต้บรรยากาศที่มี CO_2 เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ O_2 เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ และ N_2 เข้มข้น 90 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลานำเม็ดเลือดมาเตรียมเป็นฟิล์มเลือดชนิดบางและตรวจสอบการเจริญเติบโตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า โดยแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ปริมาณเชื้อและรูปร่างของเชื้อมาลาเรีย

3.4 การทดสอบความไวของเชื้อมาลาเรียต่อยาด้านมาลาเรีย

เชื้อมาลาเรียระยะวงแหวนที่เลี้ยงกับเม็ดเลือดที่มีฮีโมโกลบินปกติ หรือเม็ดเลือดที่มีฮีโมโกลบินผิดปกติที่จะใช้ทดสอบในอัตราส่วนเม็ดเลือดแดงแก่ต่อเม็ดเลือดแดงที่ใช้ทดสอบเท่ากับ 1:20 อย่างน้อย 48 ชั่วโมง และเจริญเติบโตอย่างน้อย 2 เปอร์เซ็นต์ ถูกนำมาเตรียมให้มีความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ในเม็ดเลือด 1 เปอร์เซ็นต์ การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินทำในถาด 96 หลุม ตามวิธีของ Rieckmann และ Bennette (Bennett et al., 2004, Rieckmann et al., 1978) โดยเตรียมยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินความเข้มข้นตั้งต้นเท่ากับ 10 มิลลิโมลาร์ในเอทานอลความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์และเตรียมยาไพเพอราควินความเข้มข้นตั้งต้นเท่ากับ 10

มิลลิโมลาร์ในกรดแลคติกความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (Basco and Ringwald, 2003) จากนั้นจะเตรียมให้ได้ความเข้มข้นสำหรับทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยไดไฮโดรอาร์ติมิซินินจะเตรียมให้เป็น 40 นาโนโมลาร์ และทดสอบในช่วงความเข้มข้น 0.16-20 นาโนโมลาร์ ส่วนไพเพอราควินจะเตรียมให้ได้ความเข้มข้น 600 นาโนโมลาร์ และทดสอบในช่วงความเข้มข้น 2.34-300 นาโนโมลาร์ สำหรับการทดสอบยาผสมระหว่างไดไฮโดรอาร์ติมิซินินกับยาไพเพอราควินจะใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นเหมือนกับการทดสอบยาเดี่ยวและจะเตรียมเป็นยาผสมในอัตราส่วนไดไฮโดรอาร์ติมิซินินต่อไพเพอราควินเท่ากับ 0:10, 3:7, 5:5, 7:3, และ 10:0 จากนั้นจะบ่มเชื้อปริมาณ 100 ไมโครลิตรกับยาปริมาณ 100 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เมื่อครบเวลาตรวจสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโดยย้อมดีเอ็นเอด้วยสี SYBR green I ที่ผสมกับน้ำยาที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก และเติมลงในหลุมทดสอบหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่ความยาวคลื่นสำหรับกระตุ้นเท่ากับ 485 นาโนเมตร และความยาวคลื่นที่วัดสัญญาณฟลูออเรสเซนส์เท่ากับ 530 นาโนเมตร (Bennett, et al., 2004) ผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาด้านมาลาเรีย ทั้ง 2 ชนิดแบบยาเดี่ยวแสดงเป็นค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ส่วนการทดสอบแบบยาผสมแสดงผลเป็น ΣFIC (fractional inhibitory concentration) และการสร้างกราฟ isobologram

การคำนวณค่า ΣFIC_{50} ทำได้โดย (ค่า IC_{50} ของยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินที่ผสมอัตราส่วนต่างๆ/ค่า IC_{50} ของยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินที่เป็นยาเดี่ยว) + (ค่า IC_{50} ของยาไพเพอราควินที่ผสมอัตราส่วนต่างๆ/ค่า IC_{50} ของยาไพเพอราควินที่เป็นยาเดี่ยว) ซึ่งใช้เกณฑ์ว่า ถ้าค่า sum FIC มากกว่า 1 จะเป็นการต้านฤทธิ์ น้อยกว่า 1 จะเป็นการเสริมฤทธิ์ และเท่ากับ 1 จะเป็นการเพิ่มฤทธิ์ (Bell, 2005)

การสร้าง isobologram ทำโดยการ plot ค่า FIC_{50} ของยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินอัตราส่วนต่างๆในแกน X และ plot ค่า FIC_{50} ของยาไพเพอราควินอัตราส่วนต่างๆในแกน Y ซึ่ง isobologram แสดงถึงการเสริมฤทธิ์ (synergism) เมื่อเส้นกราฟอยู่ต่ำกว่า additive line ไม่มีปฏิกิริยาต่อกัน (no interaction) เมื่อเส้นกราฟอยู่ในแนว additive line และต้านฤทธิ์ (antagonism) เมื่อเส้นกราฟอยู่เหนือ additive line

3.5 การศึกษาการทำงานของโปรตีน phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) จากการวัดปริมาณไขมัน phosphatidylinositol 3-phosphate (PI(3)P) หลังจากสัมผัสกับยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควิน

3.5.1 การบ่มเชื้อมาลาเรียกับยาด้านมาลาเรีย

เชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ 3D7 ที่เลี้ยงกับเม็ดเลือดที่มีฮีโมโกลบินปกติหรือฮีโมโกลบินผิดปกติอย่างน้อย 48 ชั่วโมง ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ในเม็ดเลือดเข้มข้น 1

เปอร์เซ็นต์ นำมาบ่มกับยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินความเข้มข้น 4 นาโนโมลาร์ในอาหารเชื้อ RPMI 1640 ที่มี Albumax II ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (Mbengue et al., 2015) หรือยาไพเพอราควินที่ความเข้มข้น 40 นาโนโมลาร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 ที่มี Albumax II ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนตัวอย่างควบคุม จะบ่มกับอาหารเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 ที่มี Albumax II ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6 และ 24 ชั่วโมงเช่นเดียวกันกับตัวอย่างที่สัมผัสยา

3.5.2 การสกัดไขมัน phosphatidylinositol 3-Phosphate (PI(3)P)

เมื่อครบเวลาการบ่มกับยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินหรือไพเพอราควิน จะปั่นแยกเม็ดเลือดออกจากสารละลายยาหรืออาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็ว 1,500 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และล้างเม็ดเลือดด้วย 1xPBS ที่แช่เย็น อีก 2 รอบ เม็ดเลือดแดงปริมาณ 50 ไมโครลิตรที่มีเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม 2 เปอร์เซ็นต์ จะนำมาทำให้แตกโดยผสมกับสารละลายซาโปนินความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ใน PBS ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เชื้อมาลาเรียที่ได้ (ประมาณ 2×10^6 เซลล์) จะนำมาล้างด้วย PBS ที่เย็น 2 ครั้ง โดยปั่นเหวี่ยงความเร็ว 5,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

จากนั้นล้างตะกอนด้วย Trichloroacetic acid (TCA) ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ใน 1 มิลลิโมลาร์ EDTA 2 ครั้ง โดยปั่นเหวี่ยงความเร็ว 5,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ ปกติ เป็นเวลา 5 นาที สกัดส่วนไขมันที่มีคุณสมบัติเป็นกลางโดยบ่มตะกอนกับ $\text{MeOH}:\text{CHCl}_3$ (อัตราส่วน 2:1) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที แล้วปั่นแยกตะกอนที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อทิ้งส่วนใสด้านบน ทำซ้ำ 2 ครั้ง ตามด้วยการสกัดไขมันที่มีคุณสมบัติเป็นกรดโดยบ่มตะกอนกับ $\text{MeOH}:\text{CHCl}_3:12\text{ M HCl}$ (อัตราส่วน 80:40:1) ปริมาตร 750 ไมโครลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 25 นาที แล้วปั่นแยกตะกอนที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ และทิ้งตะกอน แยกโปรตีนออกจากส่วนใสนี้โดยผสมกับ CHCl_3 ปริมาตร 750 ไมโครลิตรและ HCl ความเข้มข้น 0.1 N ปริมาตร 450 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที แล้วปั่นแยกส่วนสารละลายที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใสด้านล่าง (organic phase) ในหลอดใหม่ และระเหยให้แห้งโดยใช้ก๊าซไนโตรเจน และแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาวัดปริมาณภายหลัง (Mbengue, et al., 2015)

3.5.3 การวัดปริมาณไขมัน phosphatidylinositol-3-phosphate (PI(3)P)

การวัดปริมาณไขมัน PI(3)P ทำโดยการเทียบปริมาณโปรตีนที่พบในตัวอย่างกับกราฟมาตรฐานที่สร้างระหว่างปริมาณไขมัน PI(3)P ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0-400 พิโคโมล และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร โดยแต่ละตัวอย่างรวมทั้งสารมาตรฐานทุก

ความเข้มข้นจะทำซ้ำ 2 ครั้ง ขั้นตอนแรกจะต้องบ่มตัวอย่างทั้งหมดรวมทั้งสารมาตรฐานทุกความเข้มข้น ปริมาตร 60 ไมโครลิตร (ยกเว้น Blank) กับสาร PI(3)P detector ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ในถาด 96 หลุม เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำสารที่ผสมไว้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมในถาดหลุมอีกถาดหนึ่งที่มี antibody ตัวแรกเคลือบอยู่ (detection plate) และบ่มให้เข้ากันโดยการเขย่าต่อเนื่องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างสารที่อยู่ในถาดหลุมออกด้วย PBS-T ที่ได้มาพร้อมกับชุดทดสอบ หลุมละ 200 ไมโครลิตร 3 ครั้ง เติม secondary detector ซึ่งเป็น antibody ตัวที่ 2 ที่มีเอนไซม์ติดอยู่ ลงถาดหลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มให้เข้ากันโดยการเขย่าต่อเนื่องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างสารที่อยู่ในถาดหลุมออกด้วย PBS-T หลุมละ 200 ไมโครลิตร เติมสาร TMB หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด 30 นาที เพื่อให้ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ที่ติดอยู่กับ antibody ในแต่ละหลุมได้เป็นสารสีฟ้า เติม H_2SO_4 ความเข้มข้น 1 N ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา จะได้สารละลายสีเหลือง และนำถาดหลุมไปวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานมาสร้างกราฟมาตรฐานแบบ sigmoidal dose response-variable slope curve (four-parameter logistic, 4PL) analysis โดยใช้โปรแกรม Graphpad Prism เวอร์ชัน 8.0 (Mbengue, et al., 2015)

3.6 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการวิเคราะห์ทางโลหิตวิทยาของอาสาสมัคร ปริมาณเชื้อที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดง ค่า IC_{50} ค่า $\Sigma FICs$ และปริมาณไขมัน PI(3)P ของเชื้อมาลาเรียหลังจากสัมผัสกับยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินิน และไพเพอราควินของเชื้อมาลาเรียที่อยู่ในเม็ดเลือดมีฮีโมโกลบินปกติ พาหะฮีโมโกลบินอี พาหะเบต้าธาลัสซีเมีย พาหะแอลฟาธาลัสซีเมีย และพาหะฮีโมโกลบินซีเอส แสดงพารามิเตอร์ทางสถิติเป็นค่ามัธยฐาน (ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์) และนำผลมาเปรียบเทียบกับเชื้อมาลาเรียในเม็ดเลือดปกติโดยใช้ Mann-Whitney U test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 16.0

4. ผลการศึกษา

4.1 ตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัคร

ตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัคร 25 คน ที่เข้าร่วมโครงการวิจัยมีความสมบูรณ์ของเม็ดเลือดแดงแตกต่างกัน ทั้งความผิดปกติของฮีโมโกลบินที่สายเบต้า (พาหะฮีโมโกลบินอีและพาหะเบต้าธาลัสซีเมีย) และความผิดปกติของฮีโมโกลบินที่สายแอลฟา (พาหะแอลฟาธาลัสซีเมียและพาหะฮีโมโกลบินซีเอส) ซึ่งสามารถจัดกลุ่มอาสาสมัครเป็น 5 กลุ่ม ตามชนิดฮีโมโกลบิน คือ กลุ่มที่ 1 อาสาสมัครที่มีเม็ดเลือดแดงปกติจำนวน 10 คน กลุ่มที่ 2 อาสาสมัครที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินอีจำนวน 10 คน กลุ่มที่ 3 อาสาสมัครที่เป็นพาหะเบต้าธาลัสซีเมียจำนวน 2 คน กลุ่มที่ 4 อาสาสมัครที่เป็นพาหะแอลฟาธาลัส

ซีเมียจำนวน 2 คน และกลุ่มที่ 5 อาสาสมัครที่เป็นพาหะอีโมโกลบินซีเอส (constant spring, CS) จำนวน 1 คน

การวิเคราะห์ความสมบูรณ์ของเม็ดเลือดแดงของอาสาสมัครที่มีอีโมโกลบินชนิดต่างๆ [ค่ามัธยฐาน (ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์)] พบว่า จำนวนเม็ดเลือดแดงในกลุ่มอาสาสมัครที่มีอีโมโกลบินปกติไม่แตกต่างจากจำนวนเม็ดเลือดแดงจากอาสาสมัครกลุ่มอื่น แต่ความเข้มข้นของอีโมโกลบินและขนาดของเม็ดเลือดแดงในกลุ่มที่มีอีโมโกลบินปกติมีค่ามากกว่าอาสาสมัครกลุ่มอื่นๆ โดยความเข้มข้นของอีโมโกลบินในกลุ่มที่มีอีโมโกลบินปกติมีค่าเท่ากับ 14.3 (12.2-15.0) กรัมต่อเดซิลิตร ซึ่งมีความสูงกว่าอาสาสมัครกลุ่มอื่น โดยอาสาสมัครที่เป็นพาหะอีโมโกลบินอิมมีค่าความเข้มข้นของอีโมโกลบินเท่ากับ 12.6 (10.2-13.6) กรัมต่อเดซิลิตร พาหะเบต้าธาลัสซีเมียมีค่าเท่ากับ 11.2 (11.2-11.3) กรัมต่อเดซิลิตร พาหะแอลฟาธาลัสซีเมียมีค่าเท่ากับ 11.2 (11.1-11.3) กรัมต่อเดซิลิตร และพาหะอีโมโกลบินซีเอสมีค่าเท่ากับ 13.9 กรัมต่อเดซิลิตร ขนาดของเม็ดเลือดแดงในกลุ่มที่มีอีโมโกลบินปกติมีค่าเท่ากับ 85.3 (77.3-87.8) เฟมโตลิตร ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าเม็ดเลือดแดงของอาสาสมัครกลุ่มอื่น โดยอาสาสมัครที่เป็นพาหะอีโมโกลบินชนิดอิมมีค่าเท่ากับ 73.7 (64.7-83.6) เฟมโตลิตร พาหะเบต้าธาลัสซีเมียมีค่าเท่ากับ 65.4 เฟมโตลิตร และพาหะแอลฟาธาลัสซีเมียมีค่าเท่ากับ 68.0 (67.0-69.1) เฟมโตลิตร

นอกจากนี้ ความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงในกลุ่มที่มีอีโมโกลบินปกติมีค่ามากกว่าอาสาสมัครที่เป็นพาหะอีโมโกลบินอี พาหะเบต้าธาลัสซีเมีย พาหะแอลฟาธาลัสซีเมีย แต่ไม่แตกต่างจากอาสาสมัครที่เป็นพาหะอีโมโกลบินซีเอส ซึ่งความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงในกลุ่มที่มีอีโมโกลบินปกติมีค่าเท่ากับ 43.1 (35.9-45.0) เปอร์เซ็นต์ อาสาสมัครที่เป็นพาหะอีโมโกลบินซีเอสมีค่าเท่ากับ 44.6 เปอร์เซ็นต์ อาสาสมัครที่เป็นพาหะอีโมโกลบินอิมมีค่าเท่ากับ 38.2 (32.3-41.2) เปอร์เซ็นต์ พาหะเบต้าธาลัสซีเมียมีค่าเท่ากับ 36.4 (36.1-36.8) เปอร์เซ็นต์ พาหะแอลฟาธาลัสซีเมียมีค่าเท่ากับ 35.4 (34.5-36.3) เปอร์เซ็นต์

4.2 การติดเชื้อมาลาเรียในเม็ดเลือดชนิดต่างๆ

ความสมบูรณ์ของอีโมโกลบินที่แตกต่างกัน ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ 3D7 ระยะวงแหวนจนถึงระยะที่เพิ่มจำนวนได้ (schizont-merozoite) แต่ความหนาแน่นของเชื้อเป็นอีกปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการดังกล่าว โดยเชื้อที่เลี้ยงในเม็ดเลือดแดงที่มีส่วนผสมของเม็ดเลือดแดงปกติเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (1 multiplication period) มีการเพิ่มจำนวนจากเชื้อปริมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็น 1.04 (0.935-1.460) เปอร์เซ็นต์ [ค่ามัธยฐาน (ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์)] ส่วนเชื้อที่เจริญในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะอีโมโกลบินอิมมีค่าเท่ากับ 0.87 (0.624-1.396) เปอร์เซ็นต์ พาหะเบต้าธาลัสซีเมียมีค่าเท่ากับ 0.64 (0.551-0.723) เปอร์เซ็นต์ พาหะแอลฟาธาลัสซีเมียมีค่าเท่ากับ 0.99 (0.874-1.105) เปอร์เซ็นต์และพาหะอีโมโกลบินซีเอสมีค่าเท่ากับ 0.36 เปอร์เซ็นต์ การเจริญเติบโตของเชื้อในเม็ดเลือดแดงปกติหลังจากเลี้ยง 96 ชั่วโมง (2

multiplication periods) มีปริมาณเพิ่มขึ้นสูงที่สุดถึง 2.99 (2.11-5.397) เปอร์เซ็นต์ เชื้อที่เจริญในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินอีมีค่าเท่ากับ 1.60 (0.575-3.341) เปอร์เซ็นต์ พาหะเบต้าธาลัสซีเมียมีค่าเท่ากับ 0.73 (0.483-0.975) เปอร์เซ็นต์ พาหะแอลฟาธาลัสซีเมียมีค่าเท่ากับ 1.67 (0.761-2.576) เปอร์เซ็นต์ และพาหะฮีโมโกลบินซีเอสมีค่าเท่ากับ 1.20 เปอร์เซ็นต์ การเจริญเติบโตของเชื้อในเม็ดเลือดแดงปกติหลังจากเลี้ยง 144 ชั่วโมง (3 multiplication periods) มีปริมาณลดลงเหลือ 1.19 (0.935-4.96) เปอร์เซ็นต์ เชื้อที่เจริญในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินอีมีค่าเท่ากับ 0.87 (0.626-1.396) พาหะเบต้าธาลัสซีเมียมีค่าเท่ากับ 0.86 (0.483-0.975) และพาหะฮีโมโกลบินซีเอสมีค่าเท่ากับ 1.01 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ค่ามัธยฐานปริมาณเชื้อที่เจริญในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะแอลฟาธาลัสซีเมียมีค่าสูงสุด โดยปริมาณเท่ากับ 1.92 (0.874-2.961) เปอร์เซ็นต์

อย่างไรก็ตาม การเจริญเติบโตของเชื้อในเม็ดเลือดแดงลักษณะต่างๆ ทั้ง 3 ช่วงเวลาไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) โดยมีค่ามัธยฐาน (ช่วงความเชื่อมั่น 95%) ของเชื้อที่เจริญในเม็ดเลือดแดงปกติมีค่าเท่ากับ 1.19 (1.044-2.991) เปอร์เซ็นต์ พาหะฮีโมโกลบินชนิดอีมีค่าเท่ากับ 0.87 (0.868-1.601) เปอร์เซ็นต์ พาหะเบต้าธาลัสซีเมียมีค่าเท่ากับ 0.73 (0.637-0.858) เปอร์เซ็นต์ พาหะแอลฟาธาลัสซีเมียมีค่าเท่ากับ 1.67 (0.989-1.917) เปอร์เซ็นต์ และพาหะฮีโมโกลบินซีเอสมีค่าเท่ากับ 1.01 (0.359-1.202) เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ การพัฒนารูปร่างของเชื้อมาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินผิดปกติ ไม่มีความแตกต่างจากเม็ดเลือดปกติอย่างชัดเจน มีเพียงการเจริญเติบโตที่ช้าลงในเชื้อที่อยู่ในเม็ดเลือดที่เป็นพาหะเบต้าและแอลฟาธาลัสซีเมีย รวมทั้งการพบเมอโรโซยท์ของเชื้อมาลาเรียที่เจริญในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะแอลฟาธาลัสซีเมียมีจำนวนลดลง

4.3 ความไวของเชื้อมาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดชนิดต่างๆ ต่อยาต้านมาลาเรีย

4.3.1 ผลการทดสอบความไวของเชื้อมาลาเรียต่อยาไฮโดรอาร์ติมิซินิน (DHA) และไพเพอราควิน (PPQ) แบบยาเดี่ยว (single drug)

การทดสอบความไวของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมที่เจริญในเม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินปกติและผิดปกติต่อยาต้านมาลาเรียไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินทั้งหมด 25 ตัวอย่าง พบว่า ค่าความเข้มข้นของยาที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียที่เจริญในเม็ดเลือดแดงชนิดต่างๆ ไม่แตกต่างกัน โดยความไวของเชื้อสายพันธุ์ 3D7 (ไวต่อยาคลอโรควิน) จะมีความไวต่อยาไฮโดรอาร์ติมิซินินต่ำกว่าสายพันธุ์ K1 แต่มีความไวต่อยาไพเพอราควินสูงกว่าสายพันธุ์ K1 (ไวต่อยาคลอโรควิน)

ค่าความเข้มข้นของยาไฮโดรอาร์ติมิซินิน [มัธยฐาน (ช่วงความคลาดเคลื่อน 95 เปอร์เซ็นต์)] ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ 3D7 ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) เท่ากับ 3.42 (2.69-4.90) นาโนโมลาร์ โดยผล IC_{50} ในเชื้อมาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงปกติเท่ากับ 4.22 (2.69-6.31) นาโนโมลาร์ เม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินอีเท่ากับ 3.79 (2.87-5.40) นาโนโมลาร์ พาหะเบต้าธาลัสซีเมียเท่ากับ 1.80

(1.54-2.06) นาโนโมลาร์ พาหะแอลฟาธาลัสซีเมียเท่ากับ 2.79 (2.16-3.42) นาโนโมลาร์ และพาหะฮีโมโกลบินซีเอสเท่ากับ 2.32 (1.47-3.04) นาโนโมลาร์ ส่วนค่า IC_{50} ของยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ K1 มีค่าเท่ากับ 2.45 (1.65-3.40) นาโนโมลาร์ โดยผล IC_{50} ในเชื้อมาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงปกติเท่ากับ 2.74 (2.41-4.09) นาโนโมลาร์ เม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินอีเท่ากับ 2.71 (1.34-4.66) นาโนโมลาร์ พาหะเบต้าธาลัสซีเมียเท่ากับ 3.08 (1.65-4.51) นาโนโมลาร์ พาหะแอลฟาธาลัสซีเมียเท่ากับ 1.84 (1.61-2.06) นาโนโมลาร์ และพาหะฮีโมโกลบินซีเอสเท่ากับ 0.76 (0.55-1.21) นาโนโมลาร์

ค่าความเข้มข้นของยาไพเพอราควิน [มัธยฐาน (ช่วงความคลาดเคลื่อน 95 เปอร์เซนต์)] ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ 3D7 ได้ 50 เปอร์เซนต์ (IC_{50}) เท่ากับ 35.9 (28.8-43.2) นาโนโมลาร์ โดยผล IC_{50} ในเชื้อมาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงปกติเท่ากับ 41.0 (28.4-54.1) นาโนโมลาร์ เม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินอีเท่ากับ 32.8 (20.5-39.0) นาโนโมลาร์ พาหะเบต้าธาลัสซีเมียเท่ากับ 28.2 (24.5-31.9) นาโนโมลาร์ พาหะแอลฟาธาลัสซีเมียเท่ากับ 57.4 (53.1-61.8) นาโนโมลาร์ และพาหะฮีโมโกลบินซีเอสเท่ากับ 32.2 (32.1-32.6) นาโนโมลาร์ ส่วนค่า IC_{50} ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ K1 มีค่าเท่ากับ 62.3 (50.2-68.5) นาโนโมลาร์ โดยผล IC_{50} ในเชื้อมาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงปกติเท่ากับ 63.1 (50.5-78.9) นาโนโมลาร์ เม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินอีเท่ากับ 56.6 (38.2-94.0) นาโนโมลาร์ พาหะเบต้าธาลัสซีเมียเท่ากับ 77.6 (67.8-87.5) นาโนโมลาร์ พาหะแอลฟาธาลัสซีเมียเท่ากับ 59.3 (50.2-68.5) นาโนโมลาร์ และพาหะฮีโมโกลบินซีเอสเท่ากับ 30.3 (20.2-153.9) นาโนโมลาร์

4.3.2 ผลการทดสอบความไวของเชื้อมาลาเรียต่อยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินิน (DHA) และไพเพอราควิน (PPQ) แบบยาผสม (combination drug)

ปฏิกริยาระหว่างยาประเมินจากค่าเฉลี่ยของ $\sum$ Fraction IC_{50} (FIC_{50}) และลักษณะของกราฟ Isobologram พบว่า ไม่เกิดปฏิกริยาระหว่างยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินในเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมทั้งสายพันธุ์ 3D7 และ K1 ที่เจริญอยู่ในเม็ดเลือดแดงปกติ โดยค่ามัธยฐาน (ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์) ของ $\sum FIC_{50}$ เท่ากับ 1.051 (1.000-1.125) และ 1.002 (1.000-1.078) เมื่อทดสอบในเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ 3D7 และ K1 ตามลำดับ รวมทั้งเม็ดเลือดที่เป็นพาหะแอลฟาธาลัสซีเมียในเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ 3D7 โดยมีค่า $\sum FIC_{50}$ เท่ากับ 1.000 (0.889-1.184) และในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินซีเอสเฉพาะเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ K1 ซึ่งมีค่า $\sum FIC_{50}$ เท่ากับ 1.000 (0.942-1.296) โดยทุกตัวอย่างมีพิกัดใน isobologram อยู่บนเส้น additive ซึ่งแสดงว่ายาทั้งสองชนิดนี้ไม่มีปฏิกริยาต่อกัน (no interaction)

การต้านฤทธิ์ระหว่างยาทั้งสองชนิดพบในเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมทั้งสองสายพันธุ์ที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดที่เป็นพาหะฮิโมโกลบินอี โดยค่ามัธยฐาน (ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์) ของ $\sum FIC_{50}$ เท่ากับ 1.106 (1.000-1.464) และ 1.268 (1.000-1.438) เมื่อทดสอบในเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ 3D7 และ K1 ตามลำดับ หรือพาหะเบต้าธาลัสซีเมีย โดยมีค่า $\sum FIC_{50}$ เท่ากับ 1.000 (0.996-1.402) และ 1.252 (1.000-1.428) เมื่อทดสอบในเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ 3D7 และ K1 ตามลำดับ รวมทั้งเม็ดเลือดที่เป็นพาหะฮิโมโกลบินซีเอสเฉพาะเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ 3D7 โดยมีค่า $\sum FIC_{50}$ เท่ากับ 1.000 (0.956-1.642) และทุกตัวอย่างมีพิกัดใน isobologram ส่วนใหญ่อยู่เหนือเส้น additive ซึ่งแสดงว่ายาทั้งสองชนิดนี้มีการต้านฤทธิ์ต่อกัน (antagonism)

การเสริมฤทธิ์ต่อกันของยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินพบในเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ K1 ที่อยู่ในเม็ดเลือดที่เป็นพาหะแอลฟาธาลัสซีเมีย โดยมีค่า $\sum FIC_{50}$ เท่ากับ 0.883 (0.662-1.000) และทุกตัวอย่างมีพิกัดใน isobologram อยู่ใต้เส้น additive ซึ่งแสดงว่ายาทั้งสองชนิดนี้การเสริมฤทธิ์กัน (synergism)

4.4 ผลของยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินต่อการทำงานของโปรตีน phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) จากการวัดปริมาณไขมัน phosphatidylinositol 3-Phosphate (PI(3)P) ของเชื้อมาลาเรีย

การแสดงออกของไขมัน PI(3)P ในเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ 3D7 (ไวต่อยาคลอโรควิน) ที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงชนิดต่างๆ ระหว่างตัวอย่างที่สัมผัสยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่สัมผัสยา [มัธยฐาน (ช่วงความคลาดเคลื่อน 95 เปอร์เซ็นต์)] พบว่าการแสดงออกของไขมัน PI(3)P ของเชื้อมาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงต่างๆ ไม่แตกต่างกัน โดยเชื้อมาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงปกติมีการแสดงออกของไขมัน PI(3)P เพิ่มขึ้น 1.17 (1.00-3.32) เท่า เชื้อมาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะฮิโมโกลบินอีมีการแสดงออกของไขมัน PI(3)P เพิ่มขึ้น 1.03 (1.00-13.19) เท่า เชื้อมาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะเบต้าธาลัสซีเมียมีการแสดงออกของไขมัน PI(3)P เพิ่มขึ้น 3.87 (2.39-5.35) เท่า เชื้อมาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะแอลฟาธาลัสซีเมียมีการแสดงออกของไขมัน PI(3)P เพิ่มขึ้น 1.05 เท่า โดยมีการแสดงออกระหว่างช่วงที่มีการลดลง 0.36 เท่า ถึงการแสดงออกเพิ่มขึ้น 1.75 เท่า และเชื้อมาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะฮิโมโกลบินซีเอสมีการแสดงออกของไขมัน PI(3)P เพิ่มขึ้น 4.31 เท่า ซึ่งจากการวิเคราะห์โดยใช้เกณฑ์การมีไขมัน PI(3)P เพิ่มขึ้น 2.5 เท่า (Mbengue, et al., 2015) พบตัวอย่างที่มีปริมาณไขมัน PI(3)P เพิ่มขึ้นมากกว่า 2.5 เท่า หลังจากสัมผัสยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินิน จำนวน 5 ตัวอย่าง จากเชื้อที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงปกติ จำนวน 2 ตัวอย่าง คิดเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาณไขมัน PI(3)P เท่ากับ 3.32 และ 3.54 เท่า) เม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะฮิโมโกลบินอี จำนวน 1

ตัวอย่าง คิดเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาณไขมัน PI(3)P เท่ากับ 13.19 เท่า) หรือพาหะเบต้าธาลัสซีเมีย จำนวน 1 ตัวอย่าง คิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาณไขมัน PI(3)P เท่ากับ 5.35 เท่า) หรือพาหะฮีโมโกลบินซีเอส จำนวน 1 ตัวอย่าง คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาณไขมัน PI(3)P เท่ากับ 4.31 เท่า)

การแสดงออกของไขมัน PI(3)P ในเซลล์มาลาเรียสายพันธุ์ 3D7 (ไวต่อยาคลอโรควิน) ที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงชนิดต่างๆ ระหว่างตัวอย่างที่สัมผัสยาไพเพอราควินเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่สัมผัสยา [มัธยฐาน (ช่วงความคลาดเคลื่อน 95 เปอร์เซ็นต์)] พบว่า การแสดงออกของไขมัน PI(3)P ของเซลล์มาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงต่างๆ ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) โดยเซลล์มาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงปกติมีการแสดงออกของไขมัน PI(3)P เพิ่มขึ้น 1.10 เท่า โดยมีการแสดงออกระหว่างช่วงที่มีการลดลง 0.76 เท่า ถึงการแสดงออกเพิ่มขึ้น 1.51 เท่า เซลล์มาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินอีมีการแสดงออกของไขมัน PI(3)P เพิ่มขึ้น 1.05 เท่า โดยมีการแสดงออกระหว่างช่วงที่มีการลดลง 0.73 เท่า ถึงการแสดงออกเพิ่มขึ้น 1.58 เท่า เซลล์มาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะเบต้าธาลัสซีเมียมีการแสดงออกของไขมัน PI(3)P เพิ่มขึ้น 1.25 เท่า โดยมีการแสดงออกระหว่างช่วงที่มีการลดลง 0.97 เท่า ถึงการแสดงออกเพิ่มขึ้น 1.54 เท่า เซลล์มาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะแอลฟาธาลัสซีเมียมีการแสดงออกของไขมัน PI(3)P เพิ่มขึ้น 1.07 เท่า โดยมีการแสดงออกระหว่างช่วงที่มีการลดลง 0.65 เท่า ถึงการแสดงออกเพิ่มขึ้น 1.49 เท่า และเซลล์มาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินซีเอสมีการแสดงออกของไขมัน PI(3)P ลดลง 0.54 เท่า

5. อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

เซลล์มาลาเรียเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนโดยอาศัยโปรตีน globin จากฮีโมโกลบินของโฮสต์เพื่อดำรงชีวิต และความหลากหลายของฮีโมโกลบินที่เกิดจากการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโน globin สายแอลฟาและเบต้า ทำให้เซลล์มาลาเรียเจริญเติบโตได้น้อยกว่าเม็ดเลือดแดงที่ฮีโมโกลบินปกติ และสามารถยับยั้งไม่ให้เกิดอาการของโรคมาลาเรียที่รุนแรงได้ (Kuesap et al., 2015, Taylor and Fairhurst, 2014) การศึกษานี้ใช้ตัวอย่างเลือดที่มีฮีโมโกลบินปกติ พาหะฮีโมโกลบินอี พาหะเบต้าธาลัสซีเมีย พาหะแอลฟาธาลัสซีเมีย พาหะฮีโมโกลบินซีเอส ซึ่งจากการวิเคราะห์ความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน ความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดง และขนาดของเม็ดเลือดแดงของอาสาสมัครทั้ง 25 คน พบว่ามีความแตกต่างเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับเม็ดเลือดแดงปกติ จึงพบว่าเซลล์มาลาเรียสามารถติดเข้าไปเจริญเติบโตในเม็ดเลือดเหล่านี้ได้ แต่อาจจะมีความลดลง

ความไวของเซลล์มาลาเรียต่อยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินในเม็ดเลือดลักษณะต่างๆ พบว่า เซลล์มาลาเรียชนิดฟลิกซิวาร์มสายพันธุ์ 3D7 ในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะเบต้าธาลัสซีเมีย พาหะแอลฟาธาลัสซีเมีย และพาหะฮีโมโกลบินซีเอสมีความไวต่อยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินมากกว่าเชื้อที่ติดในเม็ดเลือดแดงปกติหรือ เม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินอี สำหรับความไวของเซลล์มาลาเรียสายพันธุ์ 3D7 ต่อยาไพเพอราควินไม่แตกต่างกันในเชื้อที่ติดในเม็ดเลือดชนิดต่างๆ ยกเว้นเชื้อที่ติดในเม็ดเลือดที่เป็นพาหะเบต้าธาลัสซีเมียที่มีความ

ไวต่อยาไฟเพอราควินมากกว่าเชื้อที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดอื่นๆ ส่วนเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ K1 มีเพียงเชื้อที่เจริญในเม็ดเลือดที่เป็นพาหะเบต้าธาลัสซีเมียที่มีความไวของเชื้อต่อยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไฟเพอราควินลดลง ดังนั้น จากการศึกษาความไวของเชื้อต่อยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไฟเพอราควินในรูปแบบยาเดี่ยว พบว่า เชื้อมาลาเรียที่เจริญในเม็ดเลือดที่มีฮีโมโกลบินผิดปกติจะมีความไวต่อยาทั้งสองชนิดเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจมีผลมาจากเม็ดเลือดแดงดังกล่าวมีสถานะที่ไม่เหมาะสมในการเจริญเติบโตเมื่อเทียบกับเม็ดเลือดแดงปกติ ทำให้เชื้อไม่แข็งแรงและถูกกำจัดได้ง่าย ดังที่มีการศึกษาในเม็ดเลือดแดงที่เป็นแอลฟาธาลัสซีเมีย หรือฮีโมโกลบินเอช (Cheng et al., 2005) และเม็ดเลือดแดงที่เป็นฮีโมโกลบินเอส หรือฮีโมโกลบินซี (Cyrklaff et al., 2016) การศึกษาความไวของเชื้อมาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดลักษณะต่างๆ ต่อยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไฟเพอราควินในรูปแบบยาผสมพบว่า ไม่เกิดปฏิกริยาระหว่างยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไฟเพอราควินในเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมทั้งสายพันธุ์ 3D7 และ K1 ที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงปกติ เช่นเดียวกับการศึกษาที่มีก่อนหน้านี้ (Davis et al., 2006) ยกเว้นเม็ดเลือดที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินอีหรือพาหะเบต้าธาลัสซีเมียที่พบการต้านฤทธิ์ระหว่างกันเมื่อทดสอบในเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมทั้งสายพันธุ์ และเม็ดเลือดที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินซีเอสที่พบการต้านฤทธิ์ในเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ 3D7 นอกจากนี้ การศึกษานี้พบการเสริมฤทธิ์ต่อกันของยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไฟเพอราควินในเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ K1 ที่อยู่ในเม็ดเลือดที่เป็นพาหะแอลฟาธาลัสซีเมีย ซึ่งการแสดงออกของปฏิกริยาระหว่างยาที่แตกต่างกันในเชื้อที่เจริญในเม็ดเลือดชนิดต่างๆ แสดงให้เห็นถึงการตอบสนองต่อยาที่ต่างกัน (Hastings and Hodel, 2014)

เชื้อมาลาเรียสามารถสร้างโปรตีน phosphatidylinositol (PI) ได้เองจากการนำ อินซิทอล (inositol) จากซีรัมของโฮสต์หรือจากการสังเคราะห์ (Ramakrishnan et al., 2013) ซึ่งไขมัน PI จะถูกเติมหมู่ฟอสเฟตที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 โดยเอนไซม์ phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) ได้เป็น phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการส่งสัญญาณในการทำงานของไขมัน (lipid signaling) การติดต่อสื่อสารระหว่างเซลล์ (cell signaling) และการขนส่งส่วนประกอบต่างๆ ไปที่เยื่อหุ้มเซลล์ (membrane trafficking) (Balla, 2013) การเพิ่มขึ้นของไขมัน PI(3)P เพียง 2.5 เท่า ซึ่งถือว่าเป็นปริมาณเล็กน้อย แต่มีผลต่อกระบวนการส่งสัญญาณในการทำงานของไขมัน โดยการถูกกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงตามลำดับชั้น จนสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการดื้อยาได้ (Mbengue, et al., 2015) จากการศึกษาผลของยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินต่อไขมัน PI(3)P พบตัวอย่างที่มีปริมาณไขมัน PI(3)P เพิ่มขึ้นหลังจากสัมผัสยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินจากเชื้อที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงปกติ 2 ตัวอย่าง คิดเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ เม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินอี 1 ตัวอย่าง คิดเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ พาหะเบต้าธาลัสซีเมีย จำนวน 1 ตัวอย่าง คิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ พาหะฮีโมโกลบินซีเอสจำนวน 1 ตัวอย่าง คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่พบความแตกต่างในการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวเมื่อทดสอบเชื้อที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดชนิดต่างๆ ต่อยาไฟเพอราควิน

การเพิ่มขึ้นของไขมัน PI(3)P เหนี่ยวนำให้เกิดการดื้อยาของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมระยะที่อาศัยในเม็ดเลือดได้ โดยจากการศึกษาในเชื้อระยะวงแหวนที่เจริญเติบโตอยู่ในช่วง 0-3 ชั่วโมงที่สัมผัสกับยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินความเข้มข้น 4 นาโนโมลาร์เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ปริมาณไขมัน PI(3)P ที่เพิ่มขึ้น อาจจะมีผลต่อการลดความเป็นพิษของยากลุ่มอาร์ติมิซินินและนำไปสู่การดื้อยาของเชื้อมาลาเรียได้ ดังนั้น ปริมาณของ

ไขมัน PI(3)P ที่เพิ่มขึ้นสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการดื้อยาในกลุ่มอาร์ติมิซินิน แม้ว่าไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน (Bhattacharjee et al., 2018) จากการศึกษาก่อนหน้านี้ที่แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะของยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินต่อโปรตีน *PfPI3K* ที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นในเชื้อที่มีการกลายพันธุ์ *PfKelch1* ซึ่งใช้โปรตีนเป็นเป้าหมายในการกำจัดเชื้อมาลาเรียได้ ปริมาณไขมัน PI(3)P แสดงถึงการทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ของโปรตีน *PfPI3K* ที่พบมากในระยะวงแหวน ซึ่งเป็นระยะเดียวกับที่พบการดื้อยาในตัวอย่างผู้ป่วยจากคลินิกและเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *PfKelch13* ที่ตำแหน่งสำคัญ คือ C580Y และ R539T (Mbengue, et al., 2015) จากการศึกษาก่อนหน้านี้ที่แสดงให้เห็นว่าชีรุ่มของผู้ที่มีฮีโมโกลบินผิดปกติ เช่น ธาลัสซีเมีย และฮีโมโกลบินอี จะมีภาวะเครียดที่เกิดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) สูง จึงอาจมีทำให้เชื้อมาลาเรียที่ติดในเม็ดเลือดเหล่านี้สามารถปรับตัวได้ง่าย การเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *PfKelch13* อาจเป็นผลจากการปรับตัวของเชื้อเมื่อต้องดำรงชีวิตอยู่ในภาวะเครียดที่เกิดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) สูง เชื้อมาลาเรียชนิดฟลิกซ์พาร์มสายพันธุ์ F32-ART5 เป็นเชื้อที่ทนต่อยาอาร์ติมิซินิน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเชื้อเจริญอยู่ในระยะวงแหวนและโทรโฟซอยท์ (Menard et al., 2015) นอกจากนี้ เชื้อมาลาเรียชนิดฟลิกซ์พาร์มสายพันธุ์ 3D7 ที่เจริญเติบโตในภาวะที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนสูงจะทนต่อยาอาร์ติมิซินินและลูมิแฟนทรินได้มากกว่าเชื้อสายพันธุ์เดียวกันที่เจริญเติบโตในภาวะที่มีออกซิเจนปกติ (5%) (Duffy and Avery, 2017) จึงแสดงให้เห็นว่า นอกจากการสัมผัสต่อยาต้านมาลาเรียเป็นประจำแล้ว สภาวะที่เชื้อเจริญเติบโตก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่ง ที่ทำให้เชื้อมาลาเรียสามารถปรับตัวให้ทนต่อยาต้านมาลาเรียชนิดใดชนิดหนึ่งได้ (Duffy and Avery, 2018)

การศึกษานี้สรุปได้ว่า ความหลากหลายของฮีโมโกลบินมีผลต่อการตอบสนองต่อยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินของเชื้อมาลาเรียชนิดฟลิกซ์พาร์มรวมทั้งการทำงานของเอนไซม์ PI3K จากปริมาณไขมัน PI(3)P ที่ถูกสร้างขึ้นหลังการสัมผัสกับยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินิน ซึ่งอาจสัมพันธ์กับการกลายพันธุ์ของยีน *PfKelch1* และนำไปสู่การดื้อยาในกลุ่มอาร์ติมิซินิน

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โรคธาลัสซีเมียชนิดอัลฟ่า (α -thal) หรือเบต้า (β -thal) และฮีโมโกลบินชนิดอี (Hb E) เป็นความหลากหลายของฮีโมโกลบินที่พบในพื้นที่เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ควบคู่กับการระบาดของโรคมาลาเรีย (Kuesap, et al., 2015) ความหลากหลายของฮีโมโกลบินเป็นความผิดปกติทางพันธุกรรมที่สามารถต้านทานการติดเชื้อมาลาเรีย อย่างไรก็ตาม ผู้ที่มียีนที่เป็นพาหะจะมีคุณภาพของฮีโมโกลบินเพียงเล็กน้อย ซึ่งไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียได้ (Taylor et al., 2013) กระบวนการสร้างฮีโมโกลบินที่ไม่สมบูรณ์จะทำให้เหลือเศษของฮีโมโกลบินที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเครียดที่เกิดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) ซึ่งมีผลต่อความไวของยาด้านมาลาเรีย เม็ดเลือดที่มีความหลากหลายของฮีโมโกลบิน เช่น ฮีโมโกลบินชนิดเอช (Hb H) ฮีโมโกลบินชนิดเอช/ฮีโมโกลบินชนิดซีเอส (Hb H/Hb CS) เบต้าธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินชนิดอี (β -thal/Hb E) มีความเข้มข้นของยาอาร์ติมิซินินทั้งในส่วนเยื่อหุ้มเซลล์และไซโตซอลมากกว่าเม็ดเลือดแดงปกติ และมีความไวต่อยาด้านมาลาเรียลดลงเช่นกัน (Charoenteeraboon et al., 2000) การที่มียาด้านมาลาเรียสะสมอยู่ในเม็ดเลือดเป็นเวลานานโดยที่ไม่สามารถฆ่าเชื้อให้ตายได้ ทำให้เชื้อได้สัมผัสกับยาและพัฒนาเป็นเชื้อดื้อยาได้ ประเทศในพื้นที่เอเชียตะวันออกเฉียงใต้โดยเฉพาะประเทศไทยเป็นพื้นที่ที่มีเชื้อมาลาเรียที่ดื้อยาด้านมาลาเรียหลายชนิดระดับสูง ทำให้ต้องมีการปรับนโยบายการรักษาโรคมาลาเรีย โดยใช้ยาสูตรผสมในกลุ่มอาร์ติมิซินิน (artemisinin combination therapy, ACT) เป็นยาขนานหลัก ตามคำแนะนำของ WHO ประเทศไทยใช้ยาผสมระหว่างอาร์ติซูนเนทและเมโฟฟลควินเพื่อรักษาโรคมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมตั้งแต่ปี 1994 (Na-Bangchang and Karbwang, 2009) และจากการใช้ยาสูตรผสมนี้เป็นเวลา 20 ปี พบว่า ประสิทธิภาพการรักษาด้วยยาสูตรนี้ลดลงอยู่ที่ 80 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการติดตามผลการรักษาเป็นเวลา 42 วัน (Na-Bangchang et al., 2010) ยาสูตรผสมระหว่างไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินเป็นยาอีกสูตรหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ทดแทนได้ ยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินเป็นเมทาบอลิท์ของยากลุ่มอาร์ติมิซินิน ที่มีประสิทธิภาพและฤทธิ์ดีกว่าด้วยยาดั้งเดิม (Hien and White, 1993) การออกฤทธิ์ของยากลุ่มนี้สัมพันธ์กับโครงสร้างที่มีออกซิเจนอยู่ในเซลล์ ซึ่งสามารถสร้างอนุมูลอิสระเมื่อทำปฏิกิริยากับเหล็ก (Ferox ion) และอนุมูลอิสระนี้จะเป็นตัวกลางที่มีความเป็นพิษใน food vacuole ของเชื้อมาลาเรีย (Gopalakrishnan and Kumar, 2015) การศึกษาเมื่อไม่นานมานี้พบว่า เชื้อมาลาเรียที่ดื้อต่อยาอาร์ติมิซินินที่พบในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มีการกลายพันธุ์ของโปรตีน *P. falciparum* Kelch13 (*PfKelch13*) และนำมาใช้เป็นเครื่องหมายในการศึกษาเป้าหมายการออกฤทธิ์ของยาในระดับโมเลกุล (Ariey et al., 2014) การกลายพันธุ์ของโปรตีน *PfKelch13* ยับยั้งการจับกันของ *PfPI3K* (phosphatidylinositol 3-kinase) ทำให้เกิด *PfKelch13*–

PfPI3K ลดลงและมี polyubiquitination ลดลง ทำให้ลดการย่อย PfPI3K จึงเหลือ PfPI3K ในเซลล์เพิ่มขึ้น ไดไฮโดรอาร์ติมิซินินสามารถยับยั้งการทำงานของ PfPI3K ได้และส่งผลให้มีปริมาณ PI(3)P (phosphatidylinositol 3-phosphate) ลดลง (Mbengue, et al., 2015) นอกจากนี้ โปรตีน PfPI3K ยังมีส่วนเกี่ยวข้องกับการขนส่งฮิโมโกลบิน ซึ่งเป็นแหล่งอาหารของเชื้อมาลาเรีย การยับยั้งการทำงานของโปรตีน PfPI3K ทำให้เกิดการสะสมฮิโมโกลบินเกิดเป็นถุงในไซโตพลาสซึมและป้องกันการขนส่งไปสู่ food vacuole (Vaid et al., 2010). คลอโรควินออกฤทธิ์โดยยับยั้งการรวมตัวกันของ food vacuole กับถุงของฮิโมโกลบิน (Hoppe et al., 2004) ไพเพอราควินเป็นยาต้านมาลาเรียในกลุ่ม aminoquinoline ออกฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรียในหลอดทดลองทั้งสายพันธุ์ไวและดื้อต่อยาต้านมาลาเรีย อย่างไรก็ตาม เป้าหมายของการออกฤทธิ์ของยาไพเพอราควินในระดับโมเลกุลยังไม่ทราบแน่ชัด แต่จากที่มีโครงสร้างเคมีคล้ายกับคลอโรควิน จึงเป็นเหตุให้สามารถยอมรับว่าไพเพอราควินออกฤทธิ์เช่นเดียวกับคลอโรควิน เช่น การยับยั้งการสร้างฮิโมโซอิน (Krugliak et al., 2002) การกลายพันธุ์ของโปรตีน PfCRT ไม่มีผลต่อการสะสมของไพเพอราควินใน food vacuole ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายานี้ไม่มีกลไกการดื้อยาเหมือนคลอโรควิน (Bray et al., 2006).

จากข้อมูลดังกล่าวมาสามารถคาดการณ์ได้ว่า ผลของยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินต่อโปรตีน PfPI(3)PK สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมที่ติดในเม็ดเลือดแดงที่มีความหลากหลายของฮิโมโกลบิน การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความไวของเชื้อมาลาเรียที่ติดในเม็ดเลือดแดงที่มีความหลากหลายของฮิโมโกลบินต่อยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควิน ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้ จะทำให้ทราบเป้าหมายในการออกฤทธิ์และการดื้อยาทั้งสองชนิด

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1.2.1 เพื่อศึกษาความไวและปฏิกิริยาระหว่างยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินต่อเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมที่ติดในเม็ดเลือดแดงที่มีความหลากหลายของฮิโมโกลบิน และ
- 1.2.2 เพื่อศึกษาการออกฤทธิ์ของยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินต่อการทำงานของโปรตีน PfPI3K ในการผลิตไขมัน PI(3)P

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยนี้ศึกษาความไวและปฏิกิริยาระหว่างยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินและการทำงานของโปรตีน PfPI3K ของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมที่ติดในเม็ดเลือดแดงที่มีความหลากหลายของฮิโมโกลบิน

- อาสาสมัครจะถูกคัดเลือกเข้าโครงการวิจัยจากผลการวิเคราะห์เม็ดเลือดแดงและ hemoglobin typing
- การทดสอบทุกอย่างจะดำเนินการโดยเปรียบเทียบผลระหว่างเชื้อมาลาเรียที่ติดในเม็ดเลือดแดงที่มีความหลากหลายของฮีโมโกลบินและฮีโมโกลบินปกติ
- การศึกษาความไวของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ 3D7 และ K1 ต่อยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควิน ทั้งในรูปแบบยาเดี่ยวและยาผสมโดยวิธี SYBR green และผลการศึกษาในรูปแบบยาเดี่ยวแสดงเป็นค่า IC_{50} ส่วนผลของการทดสอบแบบยาผสมแสดงผลด้วยค่า $\Sigma FICs$ และ isobologram
- การศึกษาผลของยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินต่อการทำงานของโปรตีน *PfPI3K* วัดจากปริมาณไขมัน $PI(3)P$ โดยวิธี ELISA

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

2.1 โรคมาลาเรีย

2.1.1 ลักษณะทั่วไปเกี่ยวกับมาลาเรีย

โรคมาลาเรียเกิดจาก เชื้อ *Plasmodium spp.* ซึ่งจัดเป็นโปรโตซัวในกระแสเลือด (blood parasite) อยู่ใน Phylum Apicomplexa, Class Sporozoa ปัจจุบันมีรายงานเชื้อ *Plasmodium* ที่ก่อโรคในคนมี 5 ชนิด 6 สายพันธุ์ (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2016, WHO, 2018)

- *Plasmodium falciparum* หรือมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม พบในแถบทวีปแอฟริกา อเมริกาใต้ และเอเชีย เป็นสายพันธุ์ที่พบมากที่สุดในประเทศไทยตลอดระยะเวลาหลายปีที่ผ่านมา โดยเฉพาะแถบชายแดน เชื้อมาลาเรียชนิดนี้จัดเป็นเชื้อที่มีความรุนแรงและอันตรายมากที่สุด เนื่องจากเชื้อสามารถเข้าสู่สมองและทำให้เกิดอาการมาลาเรียขึ้นสมอง (Cerebral malaria) (พิรพรรณ ตันอารีย์, 2014, ยุทธนา หมั่นดี, 2551)

- *Plasmodium vivax* หรือมาลาเรียชนิดไวแวกซ์ พบทั่วไปในแถบลาตินอเมริกา ตุรกี จีน และอินเดียตอนกลาง แต่พบน้อยในแถบแอฟริกาตะวันตก ในประเทศไทยในอดีตพบมากรองจากเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม แต่ปัจจุบันพบว่าการระบาดมากขึ้น จนมีสัดส่วนเทียบเท่ากับหรือมากกว่ามาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม (พิรพรรณ ตันอารีย์, 2014, สำนักกระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข, 2562) ผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิดนี้ อาจกลับมาเป็นโรคซ้ำ (Relapse) หลังได้รับการรักษาหาย เนื่องจากเชื้อมาลาเรียชนิดนี้อาจมีระยะ Hypnozoite หลงเหลืออยู่ในเซลล์ของตับได้
- *Plasmodium malariae* หรือมาลาเรียชนิดมาลาเรียอี พบบริเวณทวีปแอฟริกาตะวันออก และประเทศอินเดียทางตะวันตก ซึ่งในประเทศไทยจะพบเชื้อชนิดนี้น้อยมาก (พิรพรรณ ตันอารีย์, 2014)
- *Plasmodium ovale* หรือมาลาเรียชนิดวัลเล่ พบมากในแอฟริกาตะวันตก ฟิลิปินส์ ออสเตรเลียเหนือ หมู่เกาะโซโลมอน และนิวกินี สำหรับประเทศไทยพบน้อยมาก และมักพบบริเวณจังหวัดชายแดน ซึ่งมีมาลาเรียชุกชุม และอาจเกิดการกลับมาเป็นโรคซ้ำได้เช่นเดียวกับชนิดไวแวกซ์ (พิรพรรณ ตันอารีย์, 2014)
- *Plasmodium knowlesi* หรือมาลาเรียชนิดโนเลซี พบในทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ บริเวณแหลมมลายูอินโดนีเซีย ฟิลิปินส์ และเกาะไต้หวัน พบมากในประเทศมาเลเซีย และอินโดนีเซีย เป็นเชื้อที่ติดต่อกันจากสัตว์สู่คน (Zoonosis) โดยมีลิงแสม ลิงกัง และค่าง เป็นโฮสต์สุดท้าย (definitive host) ในธรรมชาติ (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2016, พิรพรรณ ตันอารีย์, 2014)

โรคมาลาเรียเป็นโรคติดต่อในเขตร้อน (Tropical zone) และกึ่งเขตร้อน (Subtropical zone) โดยมักพบในบริเวณที่เป็นป่าเขา (กัญญนันท์ ฤกษ์ศิริวัฒน์, 2559) การกระจายตัวของเชื้อมาลาเรียขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ ความชื้น และยุงพาหะ มีจำนวนประชากรโดยประมาณมากกว่า 2 พันล้านคนอาศัยอยู่ในแหล่งระบาด และพื้นที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อมาลาเรีย มีรายงานผู้ป่วยแสดงอาการของโรคจากทั่วโลกปีละประมาณ 300-500 ล้านคน มีผู้เสียชีวิตประมาณปีละ 1-2 ล้านคน โดยเฉพาะเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 5 ปี (สลิล ศิริอุดมภาส, 2557) แหล่งระบาดของเชื้อมาลาเรียในประเทศไทย พบอยู่บริเวณป่าเขาชายแดนของประเทศ โดยเฉพาะบริเวณชายแดนไทย-พม่า และไทย-กัมพูชา การกำจัดเชื้อมาลาเรียทำได้ยาก เนื่องจากลักษณะภูมิประเทศที่เอื้ออำนวยต่อการแพร่พันธุ์ของยุงก้นปล่อง และประชากรที่อาศัยอยู่ในเขตชายแดน ประกอบอาชีพสวนยางพารา สวนปาล์ม รวมถึงพบปัญหาการดื้อยาของเชื้อมาลาเรียในหลายพื้นที่ของประเทศไทย (รักษพงศ์ เวียงเจริญ, 2556, สมิง เก้าเจริญ และคณะ, 2557)

2.1.2 การติดต่อของโรคมาลาเรีย

เชื้อมาลาเรียติดต่อผ่านยุงพาหะ คือ ยุงก้นปล่องเพศเมีย (female Anopheles spp.) ยุงที่สามารถแพร่เชื้อมาลาเรียในประเทศไทยที่สำคัญมี 6 ชนิด คือ

- *Anopheles minimus* เป็นยุงพาหะหลักที่สำคัญพบทั่วไปทั้งประเทศ อาศัยอยู่ตามชายป่า ชอบวางไข่ในลำธารใสไหลเอื่อยๆบริเวณเชิงเขา เป็นพาหะที่แพร่เชื้อบริเวณหมู่บ้าน และชายป่าหรือเชิงเขา ร่วมกับ *A.dirus*
- *Anopheles dirus* เป็นยุงก้นปล่อง อาศัยบริเวณป่าทึบและวางไข่ในน้ำนิ่ง
- *Anopheles maculatus* คล้ายกับ *A. minimus* เป็นพาหะเฉพาะหลักทางภาคใต้
- *Anopheles sundaicus* เป็นยุงพาหะรอง อาศัยอยู่บริเวณชายแดน ชอบวางไข่ในแอ่งหิน ซึ่งมีน้ำกร่อยตามริมทะเล เช่น ระยอง จันทบุรี ตราด เป็นต้น
- *Anopheles aconitus* มีความสำคัญน้อยมาก ชอบอาศัยบริเวณนาข้าว
- *Anopheles pseudowillmori* เป็นยุงพาหะรอง พบบริเวณป่าเขาตอนเหนือของประเทศ (พิรพรรณ ตันอารีย์, 2014, ยุทธนา หมั่นดี, 2551, รุ่งระวี ทิพย์มนตรี และ นารถดา ชันธิกุล, 2555)

2.1.3 วงจรชีวิตของมาลาเรีย

เชื้อ *Plasmodium spp.* มีวงจรชีวิตที่คล้ายคลึงกัน แต่จะมีรูปร่างบางระยะ และระยะเวลาการเจริญเติบโตของเชื้อแตกต่างกัน (รูปที่ 2.1 และ 2.2) การเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียแบ่งเป็นวงจรชีวิตในยุง ซึ่งมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (Sporogonic cycle) และวงจรชีวิตในคน ซึ่งมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (Schizogonic cycle) โดยแบ่งออกเป็นระยะใหญ่ๆ คือ การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศนอกเม็ดเลือดแดง (Exoerythrocytic schizogony) และการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศในเม็ดเลือดแดง (Erythrocytic schizogony)

วงจรชีวิตในยุง

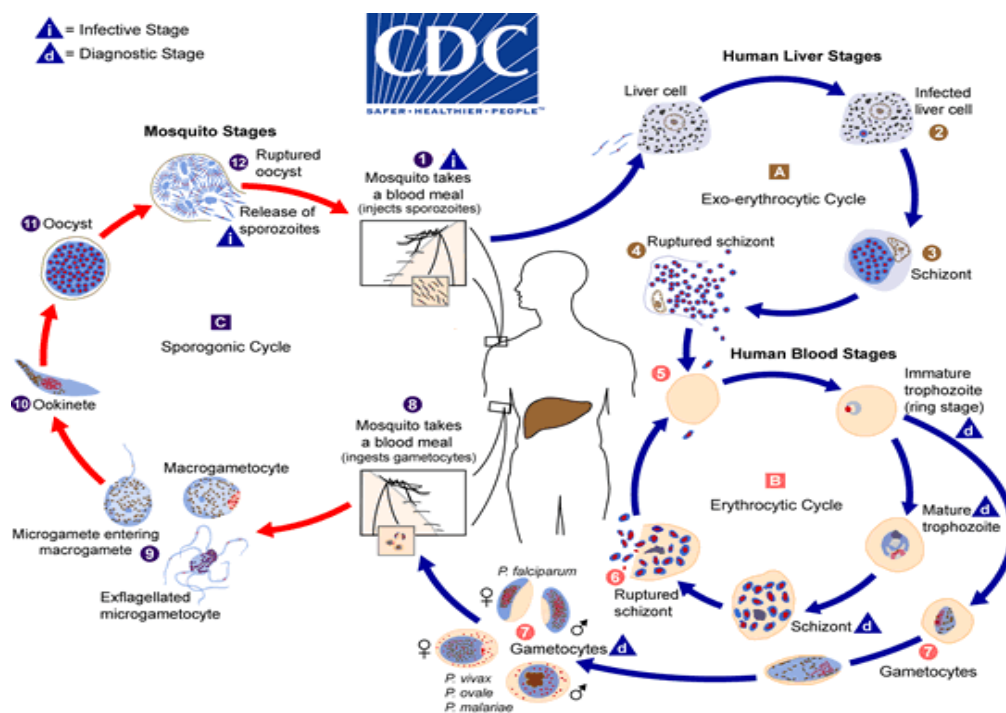
วงจรชีวิตในยุงเริ่มต้นเมื่อยุงก้นปล่องตัวเมียกัดและดูดเลือดผู้ป่วยที่ติดเชื้อ โดยยุงจะได้รับระยะแกมีโตไซต์ทั้งเพศผู้ (microgametocyte) และเพศเมีย (macrogametocyte) เข้าไปในกระเพาะอาหารของยุง ภายใน 5-30 นาที เชื้อมาลาเรียระยะไม่มีเพศจะถูกย่อยสลายพร้อมกับเม็ดเลือดแดงซึ่งเป็นอาหารของยุง ส่วนเชื้อมาลาเรียระยะมีเพศจะไม่ถูกย่อยสลาย โดยระยะแกมีโตไซต์เพศผู้ จะแบ่งนิวเคลียสแล้วสร้างไซโทพลาสซึมและแฟลกเจลลัม เจริญเป็นไมโครแกมีต (microgamete) ประมาณ 6-8 ตัว ส่วนระยะแกมีโตไซต์เพศเมียจะเคลื่อนที่ออกจากผนังเม็ดเลือดแดง แบ่งตัวเป็นแมโครแกมีต (macrogamete) จากนั้นเซลล์สืบพันธุ์ทั้ง 2 เซลล์ จะเกิดการปฏิสนธิกัน (fertilization) เกิดเป็นตัวอ่อน (zygote) ใช้เวลาทั้งหมดประมาณ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้น 12-24 ชั่วโมง ตัวอ่อนจะเปลี่ยนรูปร่างให้เรียวยาวแหลมเรียกว่า โอโอไคไนต์ (ookinete) เคลื่อนไหวช้า ๆ และแทรกผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์บุผนังกระเพาะอาหารของยุงเข้าไปอยู่ระหว่างผนังด้านนอกและด้านในของกระเพาะอาหารของยุง จากนั้นเจริญต่อไปเป็นถุงที่เรียกว่า โอโอซิสต์ (oocyst) ซึ่งภายในจะมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเกิดเป็นเซลล์รูปกระสวย เรียกว่า สปอโรซอยต์ (sporozoites)

จำนวนมาก โอโอซิสต์เมื่อแก่เต็มที่ถึงจะแตกและปล่อยสปอโรซอยต์เข้าสู่ช่องว่างในลำตัว (haemocoel) ในที่สุดจะเข้าไปอยู่ในต่อมน้ำลายของยุงพร้อมที่จะถ่ายทอดสู่คนต่อไป (กัญญนันท์ กฤษศิริวัฒนันท์, 2559)

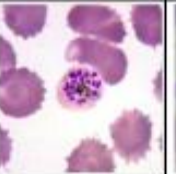
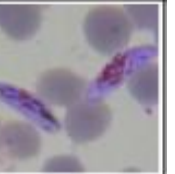
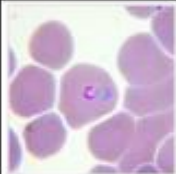
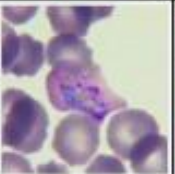
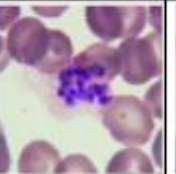
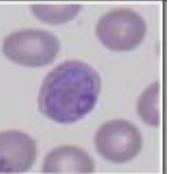
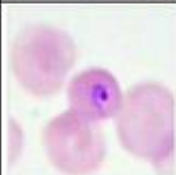
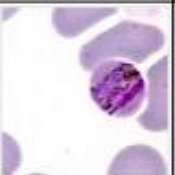
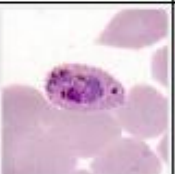
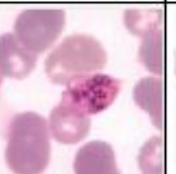
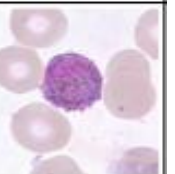
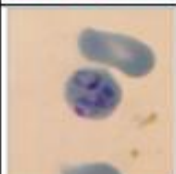
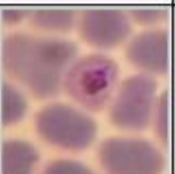
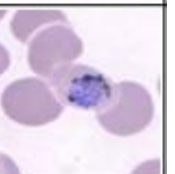
วงจรชีวิตในคน

ระยะที่อยู่ในตับ (Exoerythrocytic stages) เป็นระยะที่เชื้อมาลาเรียเจริญเติบโตในคน เมื่อยุงก้นปล่องที่มีเชื้อมาลาเรียระยะสปอโรซอยต์ (sporozoites) กัดคนจะปล่อยเชื้อเข้าสู่กระแสเลือด หลังจากนั้นประมาณ 30-40 นาที เชื้อมาลาเรียระยะสปอโรซอยต์ (sporozoites) จะเข้าสู่เซลล์ตับ และมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศโดยวิธี Schizogony ได้ระยะเมโรซอยต์ (merozoite) จำนวนมากจนทำให้เซลล์ตับแตก และเชื้อมาลาเรียระยะเมโรซอยต์จะถูกปล่อยเข้าสู่กระแสเลือด การเจริญเติบโตในเซลล์ตับ เรียกว่า Exo-erythrocyte schizogony ใช้เวลาประมาณ 5-16 วัน ทั้งนี้ สปอโรซอยต์ของเชื้อมาลาเรียบางชนิด เช่น ไวแวกซ์ และโอวัลเล่ จะมีระยะแฝงในเซลล์ตับซึ่งจะหยุดพักการเจริญไปชั่วขณะ อาจนานเป็นเดือนหรือเป็นปี เชื้อระยะหยุดพักนี้จะเป็นสาเหตุของการเกิดอาการซ้ำกลับ (relapse) ทำให้เกิดไข้มาลาเรียซ้ำในภายหลังได้ เรียกเชื้อมาลาเรียระยะนี้ว่า ฮิพโนซอยต์ (hypnozoite) (กองแก้ว ย้วนบุญหลิม และศรีวิชา ครุฑสูตร, 2558, กัญญนันท์ กฤษศิริวัฒนันท์, 2559)

ระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดง (Erythrocytic stages) เป็นระยะที่เชื้อมาลาเรียแบ่งตัวเพิ่มจำนวนในเม็ดเลือดแดงของคน หลังจากที่เซลล์ตับแตก แล้วเมโรซอยต์ (merozoite) จำนวนมากถูกปล่อยเข้าสู่กระแสเลือด เมโรซอยต์จะเคลื่อนที่เข้าเกาะติดเม็ดเลือดแดงใหม่ จากนั้นจึงเคลื่อนที่เข้าสู่เม็ด และจะเจริญแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเป็นระยะ ring form (early trophozoite), growing trophozoite, late trophozoite, immature schizont และ mature schizont ตามลำดับ เรียกการเจริญแบ่งตัวเพิ่มจำนวนนี้ว่า erythrocytic schizogony โดยในระยะ mature schizont จะมีเมโรซอยต์จำนวนมาก (ประมาณ 8-32 ตัว ขึ้นกับชนิดของเชื้อมาลาเรีย) เมื่อเม็ดเลือดแดงแตก เมโรซอยต์จะติดเชื้อเข้าสู่เม็ดเลือดแดงใหม่ ซึ่งใช้เวลาแตกต่างกันตามชนิดของเชื้อมาลาเรีย หลังจากเมโรซอยต์เข้าสู่เม็ดเลือดแดงตัวใหม่ อาจมีการพัฒนาไปเป็นระยะแกมมาโตไซด์ (gametocyte) ซึ่งมีทั้งระยะแกมมาโตไซด์เพศผู้และเพศเมีย รอให้ยุงก้นปล่องมากัด แล้วรับเชื้อระยะแกมมาโตไซด์เข้าไป เพื่อแบ่งตัวเพิ่มจำนวนในตัวยุง และแพร่เชื้อต่อไป (กัญญนันท์ กฤษศิริวัฒนันท์, 2559)



รูปที่ 2.1 วงจรชีวิตของมาลาเรีย การเจริญของเชื้อมาลาเรียในยุง เมื่อยุงกัดปล่อยตัวเมียกัดคนยุงจะปล่อยเชื้อมาลาเรียระยะสปอโรซอยต์ จากต่อมน้ำลายเข้าสู่กระแสเลือดของคน (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2016)

Stages Species	Ring	Trophozoite	Schizont	Gametocyte
<i>P. falciparum</i>				
<i>P. vivax</i>				
<i>P. malariae</i>				
<i>P. ovale</i>				
<i>P. knowlesi</i>				

รูปที่ 2.2 รูปร่างของมาลาเรียระยะในเม็ดเลือดแดง (Poostchi et al., 2018)

2.2 สถานการณ์โรคมาลาเรียในประเทศไทย

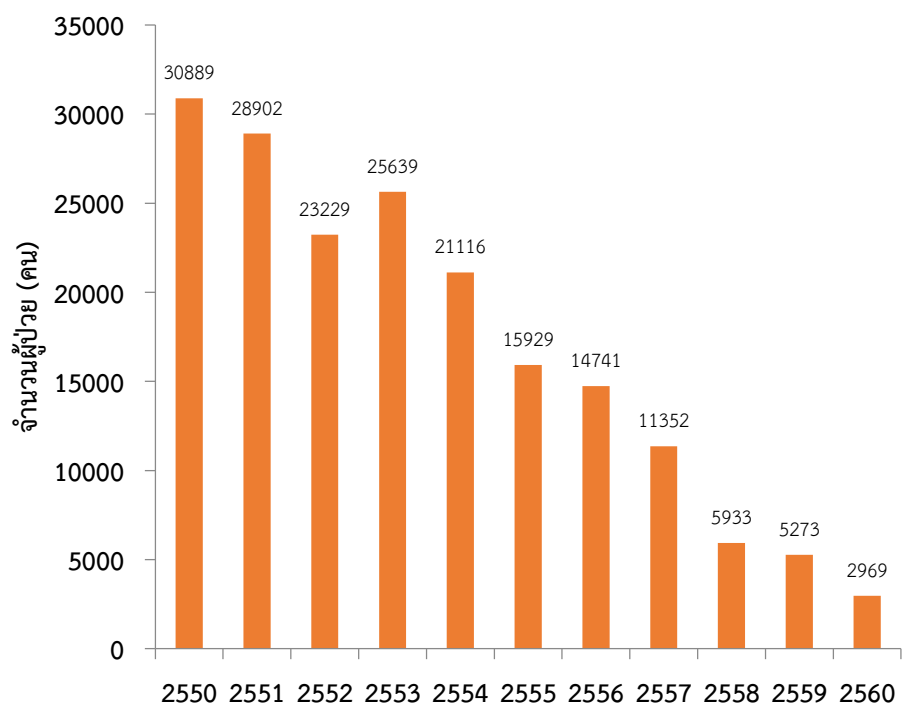
จากข้อมูลสถิติของผู้ป่วยมาลาเรียระหว่างปี 2550-2560 พบว่า จำนวนผู้ป่วยและผู้เสียชีวิตจากโรคมาลาเรียลดลงอย่างต่อเนื่อง จากผู้ป่วยในปี 2550 จำนวน 30,889 คน เหลือเพียง 2,969 คนในปี 2560 ส่วน

ผู้เสียชีวิตจากจำนวน 38 คนในปี 2550 ลดลงเหลือต่ำกว่า 10 คนตั้งแต่ปี 2556 (รูปที่ 2.3) ผู้ป่วยส่วนใหญ่มีอายุระหว่าง 15-24 ปี ประกอบอาชีพเกษตรกรรม รับจ้าง และนักเรียน (สำนักกระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข, 2562)

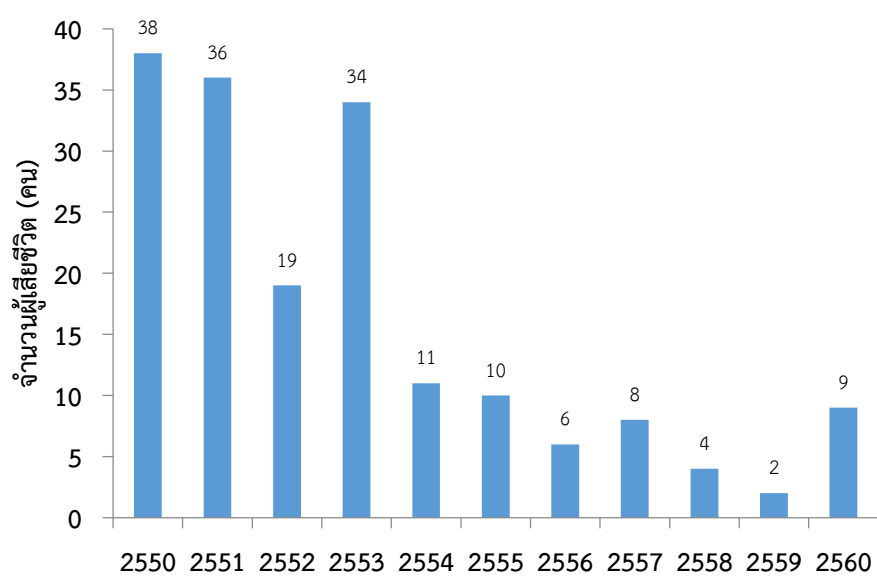
ผู้ป่วยโรคมาลาเรียที่พบในประเทศไทยกระจายอยู่ตามชายแดนไทย-พม่า กัมพูชา และมาเลเซีย การควบคุมโรคมีอุปสรรคจากการเดินทางข้ามพรมแดนของผู้ใช้แรงงานและการมียุงพาหะที่เหมาะสม จากรายงานของศูนย์ควบคุมโรคที่นำโดยแมลงพบว่า ในปี 2555 มีผู้ป่วยโรคมาลาเรียที่ติดเชื้อมาเลเรียชนิดไวแวกซ์ประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ และชนิดฟลซิพาร์ม 40 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 2.4.) ซึ่งการใช้ยาสูตรผสมอาร์ติซูเนท-เมฟโฟลควิน มีผลทำให้อัตราส่วนของผู้ที่ติดเชื้อมาเลเรียชนิดฟลซิพาร์มลดลง นอกจากนี้ มีการพบผู้ติดเชื้อมาเลเรียชนิดโนเวลลี (*P. knowlesi*) ในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย

ยุงก้นปล่องชนิด *Anopheles dirus*, *maculatus*, และ *minimus* เป็นยุงพาหะของโรคมาลาเรียที่พบมากในพื้นที่ป่าตามแนวชายแดนไทย-พม่า และ พื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย ทำให้มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อมาเลเรียในระดับสูง การเปลี่ยนแปลงทางภูมิอากาศ การประกอบอาชีพ และสิ่งแวดล้อม มีผลกระทบต่อ การแพร่กระจายโรคอย่างมาก เช่น การพัฒนาการปลูกต้นยางในประเทศเป็นการเพิ่มพื้นที่แพร่กระจายของยุงพาหะและเพิ่มโอกาสการเกิดเชื้ออุบัติซ้ำในบางพื้นที่ (Corbel et al., 2013) และการที่ประชากรส่วนใหญ่ใช้ยาต้านมาเลเรียอย่างไม่ถูกต้อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งไม่เห็นความสำคัญกับการรับประทานยาให้ครบตรงเวลา จึงทำให้เกิดการดื้อยาทั้งในเชื้อมาเลเรียชนิดฟลซิพาร์มและชนิดไวแวกซ์ ซึ่งทำให้ยาที่ใช้รักษาในปัจจุบันหมดประสิทธิภาพ (Bhumiratana et al., 2013)

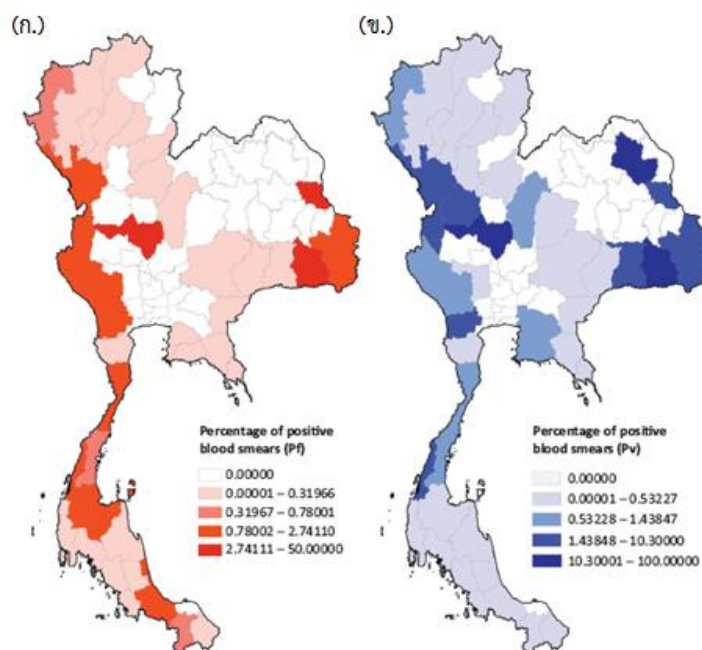
(ก.)



(ข.)



รูปที่ 2.3 (ก.) จำนวนผู้ป่วยและ (ข.) ผู้เสียชีวิต ด้วยโรคมาลาเรียในประเทศไทยระหว่างปี 2550-2560



รูปที่ 2.4 อุบัติการณ์ของโรคมาลาเรียในประเทศไทยของประชากรไทยและต่างชาติ ในปี พ.ศ.2555
 (ก.) แสดงการกระจายของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม (ข.) แสดงการกระจายของมาลาเรียชนิด
 ไวแวกซ์ (Corbel, et al., 2013)

2.3 การรักษาโรคมาลาเรียที่ไม่มีอาการแทรกซ้อน (uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria)

องค์การอนามัยโลก (WHO) ได้แนะนำให้ใช้ยาสูตรผสมกลุ่มอาร์ติมิซินิน (artemisinin-based combination therapies, ACTs) เป็นยาขนานแรกการรักษาโรคมาลาเรียในประเทศที่มีการระบาดของเชื้อมาลาเรีย ตั้งแต่ปี 2004 (Hommel, 2008) ยาผสมกลุ่มอาร์ติมิซินินนี้มีหลายสูตรและค่าครึ่งชีวิตของยาขึ้นอยู่กับยาด้านมาลาเรียที่มาใช้ร่วม เช่น เมฟโฟลควิน ลูมิแฟนทรีน ซัลฟาดอกซิน-ไพริเมทามีน ตามที่แสดงใน ตารางที่ 2.1 (WHO, 2011)

ไพริมาควินเป็นยาที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อมาลาเรียระยะในตับและจ่ายให้แก่ผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ที่มีการติดต่อของมาลาเรียในระดับต่ำจนถึงปานกลาง เพื่อกำจัดเชื้อระยะแกมีโตไซท์ ควบคู่กับการใช้ยาด้านมาลาเรียที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อในเม็ดเลือด โดยให้ผู้ป่วยรับประทานขนาด 0.75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม 1 ครั้ง (WHO, 2001).

ยาขนานรองสำหรับการรักษามาลาเรีย คือ

- ยาอาร์ติซูนร่วมกับเตตราไซคลีนหรือดอกซีไซคลีนหรือคลินดามัยซิน เป็นเวลา 7 วันหรือ
- ยาคิวินร่วมกับเตตราไซคลีนหรือดอกซีไซคลีนหรือคลินดามัยซิน เป็นเวลา 7 วัน (WHO, 2010a)

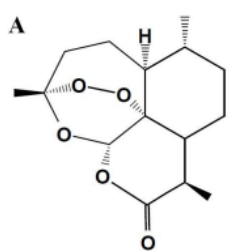
2.3.1 ยาสูตรผสมไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควิน

ยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินิน (DHA) เป็นเมทาโบไลต์ที่ออกฤทธิ์ของยาในกลุ่มอาร์ติมิซินิน (รูปที่ 2.5 ก.) กลไกการออกฤทธิ์ของยากกลุ่มอาร์ติมิซินินยังไม่ทราบแน่ชัด อย่างไรก็ตาม ออกซิเจนที่อยู่ภายในโครงสร้างสามารถทำปฏิกิริยากับเหล็ก (Fe) หรือฮีม ทำให้เกิดอนุมูลอิสระได้ (Olliaro, 2001) ยาไพเพอราควิน (PPQ) (รูปที่ 2.5 ข.) เป็นยาที่มีโครงสร้าง bis-4-aminoquinoline ซึ่งมีค่าครึ่งชีวิตของยายาวนานถึง 5 สัปดาห์ (Gimode et al., 2015) แม้ว่ากลไกการออกฤทธิ์ของยานี้ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่มีการศึกษาพบว่า PPQ มีการสะสมอยู่ใน food digestive vacuole และสามารถยับยั้งกระบวนการ heme polymerization นอกจากนี้ การถ่ายยารูปเชื้อมาลาเรียระยะโทรโฟซอยท์ที่ติดในหนูเมื่อได้รับยา PPQ ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบการเปลี่ยนรูปร่างของ digestive vacuole และมีการสะสมของฮีมโซอิน ทำให้สามารถคาดการณ์ว่า PPQ ออกฤทธิ์ที่ digestive vacuole (Petersen et al., 2011) PPQ มีการใช้อย่างแพร่หลายในประเทศจีนตั้งแต่ปี 1980 โดยใช้ในรูปแบบยาเดี่ยวเพื่อทดแทนยาคลอโรควินในการรักษาและป้องกันโรคมาลาเรียและพบว่ายานี้มีประสิทธิภาพและความปลอดภัยเมื่อทดสอบทั้งในหลอดทดลองและสัตว์ทดลอง ความไวของเชื้อมาลาเรียต่อยา PPQ ไม่สัมพันธ์กับการกลายพันธุ์ของยีน *pfcr* และไม่พบการดื้อยาข้ามระหว่างคลอโรควินและไพเพอราควินเมื่อทดสอบในเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมจำนวน 280 ตัวอย่าง ทำให้สามารถใช้ยา PPQ ในพื้นที่ที่มีการดื้อยาคลอโรควินได้ (Pascual et al., 2013)

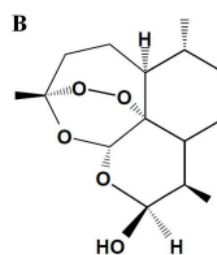
ตารางที่ 2.1 ยาสูตรผสมในกลุ่มอาร์ติมิซินิน เพื่อใช้เป็นยาขนานหลักในการรักษาโรคมาลาเรียชนิดฟลซิ-
พาร์มที่ไม่มีอาการแทรกซ้อนตามคำแนะนำของ WHO

ยาในกลุ่มอาร์ติมิซินิน	ยาที่ใช้ร่วม	ค่าครึ่งชีวิตของยาที่ใช้ร่วม
Artesunate	Mefloquine	2-3 สัปดาห์
Artemether	Lumifantrine	3-4 วัน
Artesunate	Amodiaquine	~10 วัน
Artesunate	Sulfadoxine- pyrimethamine	3-7 วัน
Dihydroartemisinin	Piperaquine	4-5 สัปดาห์

(ก.)

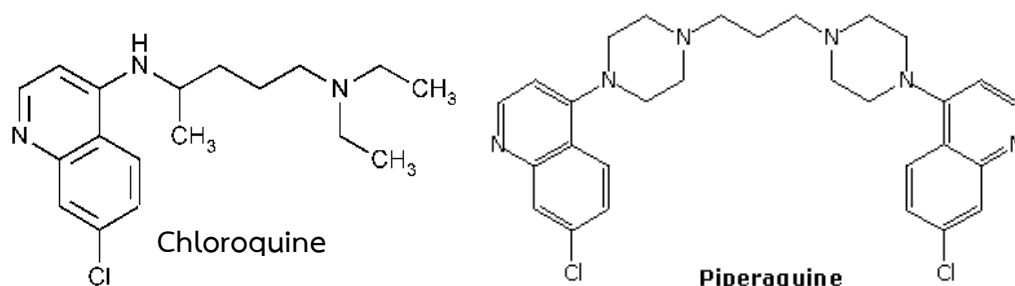


Artemisinin



Dihydroartemisinin

(ข.)



รูปที่ 2.5 (ก.) โครงสร้างของยาอาร์ติมิซินินและยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินิน (Jansen, 2010)

(ข.) โครงสร้างของยาคลอโรควินและยาไพเพอราควิน

การใช้ยาสูตรผสมสูตรจะช่วยให้เชื้อพัฒนาให้เกิดการดื้อยาช้าขึ้น จึงมีการศึกษาเพื่อหาสูตรผสมที่เหมาะสมจากยาที่มีอยู่แล้วและยาใหม่ สำหรับยาสูตรผสมระหว่างไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควิน ถือว่าเป็นคู่ที่เหมาะสมที่สุด (Basco and Ringwald, 2003) ในการศึกษาในระดับหลอดทดลองพบว่ายาสูตรผสมนี้ไม่เกิดปฏิกิริยาระหว่างยาในเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ K1 และแสดงการต้านฤทธิ์เล็กน้อยในสายพันธุ์ 3D7 (Davis, et al., 2006) การศึกษาในปี 2007-2014 พบว่ายาสูตรผสมระหว่างไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินมีประสิทธิภาพในการรักษาโรคมาลาเรียในแถบชายแดนจีน-พม่า (Liu et al., 2015) การศึกษาในกัมพูชาระหว่างปี 2010-2011 พบประสิทธิภาพของการรักษาโดยให้ยา 2 วัน และติดตามผล 42 วัน เท่ากับ 85 เปอร์เซ็นต์ (ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์: 69–94) และประสิทธิภาพการรักษาเมื่อได้รับยา 3 วันและติดตามผลการรักษา 42 วันเท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ (ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์: 75–97) (Lon et al., 2014) อย่างไรก็ตาม การศึกษาในปี 2011-2013 แสดงให้เห็นการกลับเป็นซ้ำในพื้นที่ประเทศกัมพูชาตะวันตกสูงถึง 15.4 เปอร์เซ็นต์ แต่พบเพียง 2.5 เปอร์เซ็นต์ ในกัมพูชา

ตะวันออก ซึ่งปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดการรักษาด้วยยาสูตรผสมระหว่างไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินลัมเหลวมาจากการติดเชื้อที่มีการกลายพันธุ์ของยีนตำแหน่ง K13 (Leang et al., 2015)

2.4 การวิเคราะห์ปฏิกิริยาการใช้ยาต้านมาลาเรียร่วมกัน (analyse of antimalarial drug interaction)

เมื่อยาอย่างน้อย 2 ชนิด เข้าสู่ร่างกายพร้อมกัน มีโอกาสที่จะมีปฏิกิริยาระหว่างกันได้ มีผลทำให้เพิ่มประสิทธิภาพหรือลดประสิทธิภาพของยาตัวเดิม และอาจเพิ่มหรือลดอาการข้างเคียงที่เกิดขึ้นจากยาได้ ซึ่งผลของปฏิกิริยาระหว่างยาสามารถแบ่งเป็น

การเพิ่มฤทธิ์ของยาเดิม ได้แก่

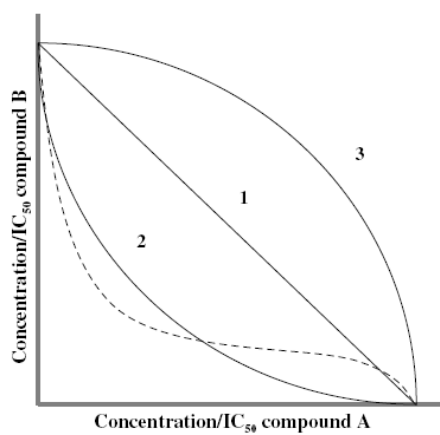
1. การเพิ่มศักยภาพ (potentiation) คือ ยาตัวหนึ่งจะสามารถทำให้ยาอีกตัวหนึ่งจากที่ไม่มีฤทธิ์ กลายเป็นออกฤทธิ์ได้
2. การเสริมฤทธิ์ (synergism หรือ synergistic) คือ ยาทั้งสองตัวมีฤทธิ์ทั้งคู่ เมื่อมาใช้ร่วมกันทำให้ออกฤทธิ์ได้เป็นทวีคูณจากเดิม
3. การเพิ่มฤทธิ์ (additive) คือ ยาทั้งสองตัวมีฤทธิ์ทั้งคู่ เมื่อนำมาใช้ร่วมกันทำให้ออกฤทธิ์เท่ากับ ฤทธิ์ของยาสองตัวรวมกัน

การลดฤทธิ์ของยาเดิม ได้แก่

การต้านฤทธิ์ (antagonism หรือ antagonistic) คือ ยาตัวหนึ่งหรือทั้งสองตัวเมื่อนำมาใช้ร่วมกันมีผลลดการออกฤทธิ์ของยาอีกตัวหนึ่งได้

การศึกษาการใช้ยาร่วมกันนิยมใช้ Isobologram เป็นการวิเคราะห์ผลทั้งการเสริมฤทธิ์หรือการต้านฤทธิ์กัน โดยลักษณะกราฟที่แสดงว่าเป็นการเพิ่มฤทธิ์ (additive) จะเป็นเส้นตรง การเสริมฤทธิ์จะมีลักษณะกราฟเป็นเว้าเข้า (concave) และการต้านฤทธิ์ จะมีลักษณะกราฟเป็นโค้งออก (convex) ในการสร้าง Isobologram สามารถทำได้โดย การลงจุดที่แสดงค่า IC_{50} ในกราฟ ซึ่ง แกน x จะเป็น IC_{50} ของยา A ส่วน แกน y จะเป็นค่า IC_{50} ของยา B ในกรณีที่ทดสอบปฏิกิริยาระหว่างยา 2 ชนิด ค่าที่จะใช้ในการลงจุดในกราฟ อาจจะเป็นค่า FIC (fraction inhibitory concentration) แทนค่า IC_{50} ของยาแต่ละชนิด ในแต่ละอัตราส่วนที่ผสมกันได้ (รูปที่ 2.6)

นอกจากนี้ การคำนวณหาค่า sum FIC ($\sum FIC$) ซึ่งเป็นการรวมค่า FIC ของทั้งยา A และยา B ที่จุดกึ่งกลางของกราฟ เป็นวิธีหนึ่งในการแสดงว่าปฏิกิริยา 2 ชนิดนี้ที่เกิดขึ้น เป็นแบบเพิ่มฤทธิ์ เสริมฤทธิ์ หรือต้านฤทธิ์ได้ ซึ่งใช้เกณฑ์ว่า ถ้าค่า sum FIC มากกว่า 1 จะเป็นการต้านฤทธิ์ น้อยกว่า 1 จะเป็นการเสริมฤทธิ์ และเท่ากับ 1 จะเป็นการเพิ่มฤทธิ์ (Bell, 2005)



รูปที่ 2.6 Isobologram ลักษณะต่างๆ ที่อาจเกิดจากปฏิกิริยาระหว่างยา A และยา B
 หมายเลข 1 แสดงลักษณะการเพิ่มฤทธิ์ 2 แสดงลักษณะการเสริมฤทธิ์ และ 3 แสดง
 ลักษณะการต้านฤทธิ์ (Bell, 2005)

2.5 ความผิดปกติของลักษณะเม็ดเลือดและฮีโมโกลบินที่สัมพันธ์กับการติดเชื้อมาลาเรีย

ความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ทำให้เกิดความผิดปกติของเม็ดเลือด เช่น ธาลัสซีเมีย และโรคมาลาเรียมีการกระจายร่วมกัน (รูปที่ 2.7) และถูกถ่ายทอดมาจากรุ่นพ่อแม่ของมนุษย์เป็นเวลานาน 5,000-10,000 ปี ทำให้เกิดความแตกต่างทางพันธุกรรมในแต่ละกลุ่มประชากร หรือบุคคล แม้ว่าจะอาศัยอยู่ในพื้นที่เดียวกัน สิ่งแวดล้อมเดียวกัน หรือมีโอกาสติดเชื้อมาลาเรียเท่ากัน ผู้ที่มีความผิดปกติของเม็ดเลือดแดง เช่น sickle cell anemia, thalassemia, G6PD deficiency และ ovalocytosis จะทนต่อการติดเชื้อมาลาเรีย ความหลากหลายทางพันธุกรรมเหล่านี้ เกิดจากความแตกต่างในยีนที่ตำแหน่งเฉพาะเพียงเล็กน้อย แต่ทำให้มีการแสดงออกของโปรตีนลดลง หรือเปลี่ยนแปลงโปรตีนที่สร้างขึ้น (Hedrick, 2011)

2.6 ความหลากหลายของฮีโมโกลบิน

● ธาลัสซีเมีย

ธาลัสซีเมียเป็นความผิดปกติของปริมาณฮีโมโกลบิน โดยอาจมีความผิดปกติในสายบีต้า ซึ่งเรียกว่า บีต้าธาลัสซีเมีย หรือ สายอัลฟา ซึ่งเรียกว่า อัลฟา ธาลัสซีเมีย

- **อัลฟา ธาลัสซีเมีย** เกิดจากความผิดปกติของยีนบนโครโมโซมที่ 16 ซึ่งในภาวะปกติจะ แสดงเป็น $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ การขาดหายไปของยีนทั้งสองสายทำให้เกิดโรคธาลัสซีเมีย ซึ่งมี 2 ลักษณะ คือ α^0 หรือ α thal-1 และ α^+ หรือ α thal-2 ธาลัสซีเมีย ซึ่งมีความรุนแรงต่างกัน α^+ ธาลัสซีเมียแบบ $-\alpha/\alpha\alpha$ จะไม่แสดงความผิดปกติ ส่วน α^+ ธาลัสซีเมียแบบ $-\alpha/-\alpha$ จะพบความผิดปกติเล็กน้อย เช่น ภาวะซีด และมีฮีโมโกลบินต่ำ ธาลัสซีเมีย แบบ α^0 ที่เป็น heterozygous มียีน α หายไป 1 ข้าง ซึ่งแสดงเป็น $--/\alpha\alpha$ และหากยีนขาดหายไปทั้ง 2 ข้าง แบบ $--/--$ จะทำให้ผู้ป่วยไม่สามารถมีชีวิตอยู่ได้
- **เบต้า ธาลัสซีเมีย** เกิดจากการขาดหายของยีนที่ควบคุมการผลิตโปรตีน globin ชนิด เบต้า บนโครโมโซมที่ 11 ทำให้มีปริมาณโปรตีนชนิดนี้ลดลง และเหลือ globin ชนิดอัลฟา ที่เป็นอิสระ ทำให้เกิดภาวะเครียดที่เกิดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) และมีการทำลาย

เยื่อหุ้มเซลล์ผู้ป่วยที่เป็น heterozygous จะมีอาการซีดและลักษณะเม็ดเลือดมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย ในขณะที่ homozygous จะมีอาการซีดอย่างรุนแรง และมีชีวิตอยู่ได้ไม่นาน (López et al., 2010)

โรคธาลัสซีเมียพบในประชากรหลายพื้นที่ เช่น พื้นที่รอบทะเลเมดิเตอร์เรเนียน ทวีปแอฟริกา เอเชียใต้ ตะวันออกกลาง จีน และหมู่เกาะในมหาสมุทรแปซิฟิกฝั่งตะวันตก แอลฟา ธาลัสซีเมีย พบมากในประเทศอินเดีย และหมู่เกาะในมหาสมุทรแปซิฟิก ส่วนเบต้า ธาลัสซีเมีย พบมากในแถบทะเลเมดิเตอร์เรเนียนและทวีปเอเชีย **รูปที่ 2.7 (ก.)** (Bauduer, 2013) จากการศึกษาในปี 2540 พบผู้ป่วยธาลัสซีเมียในประเทศไทยประมาณ 600,000 คน และ 40 เปอร์เซ็นต์ หรือ 24,000,000 คนเป็นพาหะของโรค โดยความชุกของผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียหรือฮีโมโกลบินอีในพื้นที่ต่างๆแสดงใน **รูปที่ 2.7 (ข.)** (Ratanasiri, 2007)

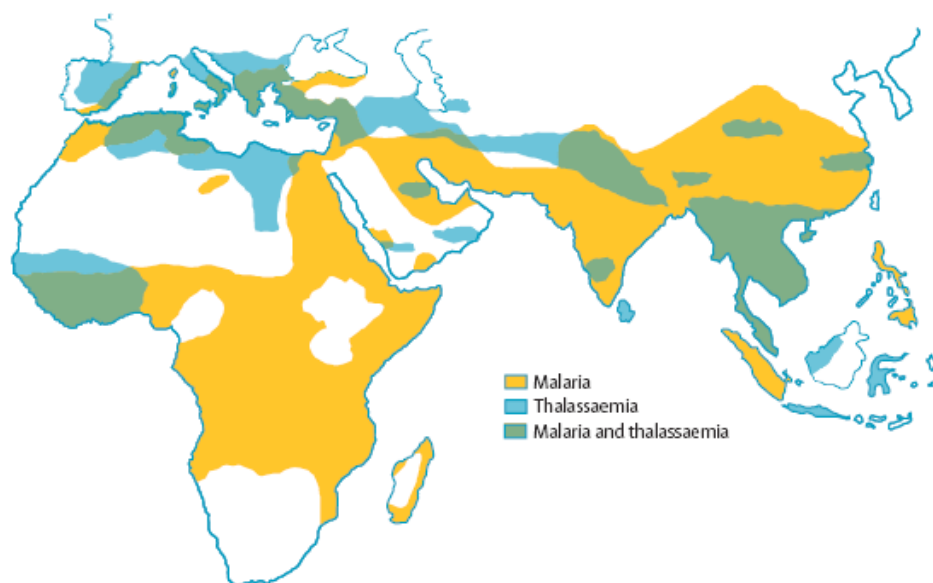
● ความผิดปกติของโครงสร้างฮีโมโกลบินอื่นๆ

- **ฮีโมโกลบินอี (Hb E)** เกิดจากการกลายพันธุ์ของโปรตีน globin สายเบต้า ตำแหน่งที่ 26 จากกลูตามิก એસิดเป็นไลซีน (Glu → Lys) ทำให้เม็ดเลือดขาดความยืดหยุ่นและเสียรูปร่าง ผู้ที่เป็น homozygous จะมีขนาดเม็ดเลือดแดงเล็กกว่าปกติ และมีความเข้มข้นของฮีโมโกลบินต่ำ ฮีโมโกลบิน E พบได้ทั่วไปในประชากรแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งช่วยให้อัตราการติดเชื้อมาลาเรียลดลง (López, et al., 2010)
- **ฮีโมโกลบินเอส (Hb S)** เกิดจากการกลายพันธุ์ของโปรตีน globin สายเบต้า ตำแหน่งที่ 6 จากวาลีนเป็นกลูตามีน (Val → Glu) ทำให้เกิดลักษณะเม็ดเลือดแดงผิดปกติ (sickle cells) และทำให้เกิดการอุดตันในเส้นเลือดขนาดเล็ก ผู้ป่วยที่พบส่วนใหญ่เป็น heterozygous ส่วนผู้ป่วยที่เป็น homozygous จะเสียชีวิตตั้งแต่อายุยังน้อย (Bauduer, 2013)
- **ฮีโมโกลบินซี (Hb C)** เกิดจากการกลายพันธุ์ของโปรตีน globin สายเบต้า ตำแหน่งที่ 6 จาก กลูตามิก એસิดเป็นไลซีน (Glu → Lys) ผู้ที่มีการกลายพันธุ์แบบ heterozygous จะไม่มีอาการรุนแรงเท่ากับผู้ที่ เป็น sickle cells แบบ homozygous แต่สามารถป้องกันการเกิดโรคมาลาเรียที่รุนแรงได้ (Bauduer, 2013)
- **ฮีโมโกลบินคอนสแตนท์สปริง (Hb CS)** เป็นความผิดปกติของฮีโมโกลบินที่พบในประชากรพื้นที่เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เกิดจากการกลายพันธุ์ของโปรตีน globin สายแอลฟา ตำแหน่งที่ 142 จาการหัสหยุดเป็นกรดอมิโนกลูตามีน (stop codon → Gln) จึงสามารถสังเคราะห์

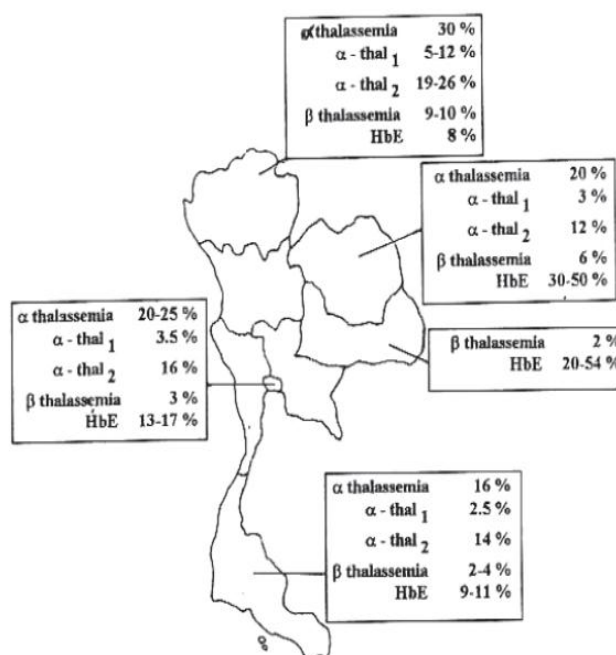
กรดอะมิโนได้อีก 31 ตำแหน่ง ทำให้สายโปรตีน globin มีความยาวเพิ่มขึ้นแต่ไม่มีความเสถียร (Jomoui et al., 2015)

นอกจากความผิดปกติของฮีโมโกลบินที่ได้กล่าวข้างต้น ยังคงมีฮีโมโกลบินชนิดอื่นๆ ที่พบในประชากรไทย (กิตติ ต่อจรัส, 2013) ตามที่แสดงในตารางที่ 2.2

(ก.)



(ข.)



รูปที่ 2.7 (ก.) การกระจายของโรคธาลัสซีเมียและมาลาเรียในปี 1940s (ก่อนที่มาลาเรียจะหมดไปจากทวีปยุโรปตอนใต้) (Vento et al., 2006) (ข.) ความชุกของประชากรที่มีความหลากหลายของฮีโมโกลบินในประเทศไทย (α thal-1 คือ α^0 -thalassemia และ α thal-2 คือ α^+ -thalassemia) (Ratanasiri, 2007)

ตารางที่ 2.2 ฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบบ่อยในประเทศไทย

Hemoglobin	Mutation	Base change
α-thalassemia		
Hb Q Thailand	α 34 Asp→His	<u>G</u> AC→ <u>C</u> AC
Hb Suan Dok	α 109 Leu→Arg	C <u>T</u> G→C <u>G</u> G
Hb Quong Sze	α 125 Leu→Pro	C <u>T</u> G→C <u>C</u> G
Hb Pak Num Po	α 131/132 insertion	+T
Hb Constant Spring (CS)	α C terminal elongation	<u>I</u> AA→ <u>C</u> AA
Hb Pakse'	α C terminal elongation	<u>I</u> AA→ <u>T</u> A <u>I</u>
β-thalassemia		
Hb C	β 6 Glu→Lys	<u>G</u> AG→ <u>A</u> AG
Hb S	β 6 Glu→Lys	<u>G</u> AG→ <u>G</u> IG
Hb Siriraj	β 7 Glu→Lys	<u>G</u> AG→ <u>A</u> AG
Hb Malay	β 19 Asn→Ser	A <u>A</u> C→A <u>G</u> C
Hb E	β 26 Glu→Lys	<u>G</u> AG→ <u>A</u> AG
Hb Pygos	β 83 Gly→Asp	G <u>G</u> C→G <u>A</u> C
Hb D Punjab	β 121 Glu→Gln	<u>G</u> AA→ <u>C</u> AA
Hb Khon Kaen	β 123-125 (-8bp)	-ACCCCACC
Hb Dhonburi	β 126 Val→Gly	G <u>T</u> G→G <u>G</u> G
Hb Hope	β 136 Gly→Asp	G <u>G</u> T→G <u>A</u> T
Hb Tak	β C terminal elongation	+AC
$\delta\beta$-thalassemia		
Hb Leporee Washington-Boston	δ 87- β 116 fusion	deletion
Hb Leporee-Hollandia	δ 22- β 50 fusion	deletion

(กิตติ ต่อจรัส, 2013)

2.7 กลไกในการป้องกันการติดเชื้อมาลาเรีย

ความหลากหลายของเม็ดเลือดแดงทำให้เกิดสถานะที่ไม่เหมาะสมต่อการติดเชื้อหรือดำรงชีวิตของเชื้อมาลาเรีย และสามารถยับยั้งไม่ให้เชื้อเข้าสู่เม็ดเลือดแดงหรือส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ แรงการกำจัดโดยระบบคุ้มกัน หรือป้องกันการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดติดเชื้อมีเม็ดเลือดแดงหรือ ผนังหลอดเลือด (Bauduer, 2013)

ตัวอย่างกลไกของเม็ดเลือดแดงเป็น sickle cell trait (HbAS) ที่ทนต่อการติดเชื้อมาลาเรีย คือ การมีภาวะเครียดที่เกิดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) เพิ่มขึ้น และ microRNA ของโฮสต์สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียได้ โดยทำให้เกิด

- การยับยั้งการ transcription ของ parasite และ การแสดงออกของโปรตีน
- ความผิดปกติในการขนส่งโปรตีน
- การแสดงออกของโปรตีน PfEMP ลดลง ทำให้ลดการเกิด cytoadherence แต่เพิ่มการถูกกำจัดโดยม้ามผ่านทางกระบวนการ phagocytosis
- การมีปริมาณ hematochrome เพิ่มขึ้น
- การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้น มีผลให้มีปริมาณ antibody เพิ่มขึ้น (Lelliott et al., 2015)

ความสามารถในการป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียของแต่ละบุคคลมีความสัมพันธ์กับความผิดปกติทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับเม็ดเลือดแดง เช่น ความผิดปกติระดับโครงสร้างเซลล์ การกลายพันธุ์ของโปรตีนที่ผิวเซลล์ การขาดเอนไซม์ที่จำเป็นหรือการเปลี่ยนแปลงฮีโมโกลบิน (de Mendonça et al., 2012) ความผิดปกติเหล่านี้ มีการกระจายในประชากรแต่ละพื้นที่แตกต่างกัน ซึ่งส่งผลให้มีอาการหรือความรุนแรงของโรค ที่หลากหลาย นอกจากนี้ ยังจำเพาะต่อเชื้อมาลาเรียต่างชนิดกันความผิดปกติของฮีโมโกลบินที่ทำให้อัตราการติดเชื้อในเม็ดเลือดแดงลดลง เช่น α -thalassemia trait ฮีโมโกลบิน H ฮีโมโกลบิน AE และ β -thalassemia/HbE หรือลดการเจริญเติบโตของเชื้อ เช่น ฮีโมโกลบิน H, β -thalassemia แบบไม่รุนแรงฮีโมโกลบิน SS, ฮีโมโกลบิน AS, ฮีโมโกลบิน CC, ฮีโมโกลบิน EE และฮีโมโกลบิน F (Taylor, et al., 2013) ตัวอย่างความหลากหลายของเม็ดเลือดแดงที่สัมพันธ์ต่อความไวของการติดเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม แสดงในตารางที่ 2.2

2.8 การตอบสนองต่อยาด้านมาลาเรีย

เชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมที่ติดเชื้อในเม็ดเลือดที่เป็นฮีโมโกลบิน H และ/หรือฮีโมโกลบิน CS จะดื้อต่อยาอาร์ติมิซินินและคลอโรควินมากกว่าเชื้อที่ติดในเม็ดเลือดปกติ ความแตกต่างของความไวของเชื้อที่ติดในเม็ดเลือดที่เป็นฮีโมโกลบิน H นั้น อาจมาจากภาวะ oxidative stress ที่เกิดขึ้นในเม็ดเลือดแดง (Yuthavong et al., 1989) แต่ระดับการดื้อต่อยาอาร์ติมิซินินของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมที่ติดในเม็ดเลือดที่เป็นเบต้าธาลัสซีเมียร่วมกับฮีโมโกลบิน E จะต่ำกว่าในเม็ดเลือดที่เป็นธาลัสซีเมียชนิดอัลฟาการดื้อยานี้มาจากเม็ดเลือดที่เป็นธาลัสซีเมีย ชนิดอัลฟา จะนำยาอาร์ติมิซินินเข้าสู่เซลล์ได้มากกว่าเม็ดเลือดปกติ แล้วไปจับกับ ฮีโมโกลบิน H และทำให้ยาหมดประสิทธิภาพ (Charoenteeraboon, et al., 2000) เม็ดเลือดที่เป็นฮีโมโกลบิน E มีการตอบสนองต่อยาอาร์ติมิซินิน

ดีมาก และสามารถกำจัดเชื้อได้อย่างรวดเร็ว (Hutagalung et al., 2000) นอกจากนี้ เชื้อมาลาเรียที่ติดในเม็ดเลือดแดงตัวแก่ที่เป็นธาลัสซีเมียต้องการยาที่ยับยั้งการเจริญเติบโต 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) มากกว่าเม็ดเลือดปกติ นอกจากนี้การให้ยาร่วมกับสารต้านอนุมูลอิสระมีผลทำให้ค่า IC_{50} ของยาอาร์ติมิซินินเพิ่มขึ้น (Senok et al., 1997) ประสิทธิภาพของยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินจะลดลง เมื่อสัมผัสกับฮีมที่เยื่อหุ้มเม็ดเลือดแดงที่เป็นธาลัสซีเมีย ชนิดอัลฟา แต่ไม่มีผลกระทบมากนักกับเยื่อหุ้มเม็ดเลือดแดงที่เป็นเบต้าธาลัสซีเมียร่วมกับฮีโมโกลบิน E กลไกที่ทำให้ยาหมดประสิทธิภาพ อาจมาจากการเกิดปฏิกิริยากับฮีม ทำให้ส่วน endoperoxide ของยาถูกทำลาย (Vattanaviboon et al., 2002)

2.9 การดื้อยาด้านมาลาเรียหลายชนิดของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมและการเริ่มต้นการดื้อยาในกลุ่มอาร์ติมิซินิน

ยาด้านมาลาเรียกลุ่มที่มีโครงสร้างของควิโนลีนถูกใช้เป็นยาหลักสำหรับการรักษาโรคมาลาเรีย จนกระทั่งเชื้อเกิดการดื้อยา (รูปที่ 2.8) โดยการดื้อยาคลอโรควินในพื้นที่เอเชียตะวันออกเฉียงใต้และอเมริกาใต้เกิดขึ้นในช่วงทศวรรษ 1965 และกระจายไปสู่พื้นที่แอฟริกาตะวันออกในช่วงทศวรรษที่ 1970 ทำให้มีการเปลี่ยนมาใช้ยาร่วมซัลฟาดอกซิน-ไพริเมธามีนในปี 1967 แต่การดื้อยาซัลฟาดอกซิน-ไพริเมธามีนเกิดขึ้นในต้นทศวรรษที่ 1990 จึงต้องมีการเปลี่ยนมาใช้ยาเมฟโลควินในปี 1985 และเกิดการดื้อยาในปี 1989 จนนำไปสู่การใช้ยาอะโรวาโคควินในปี 1996 แต่เชื้อมาลาเรียมีการดื้อยาเกิดขึ้นในปีนั้น (Hyde, 2005, Lin et al., 2010)

ยาอาร์ติมิซินินและอนุพันธ์ ถูกนำมาใช้ทดแทนยาด้านมาลาเรียที่เกิดการดื้อยา โดยอาร์ติมิซินินถูกนำมาใช้ในประเทศจีนในรูปแบบยาเดี่ยวตั้งแต่ทศวรรษที่ 1970 จากฤทธิ์ที่สามารถลดปริมาณเชื้อในกระแสเลือดได้อย่างรวดเร็ว แต่ยังคงมีข้อเสียที่มีประสิทธิภาพในการรักษาต่ำ หากใช้เป็นยาเดี่ยวในระยะสั้นๆ จึงมีการปรับใช้ร่วมกับยาด้านมาลาเรียชนิดอื่น การที่ยาอาร์ติมิซินินสามารถฆ่าเชื้อในปริมาณมากในช่วงแรก ทำให้เชื่อที่มีโอกาสสัมผัสกับยาด้านมาลาเรียที่นำมาใช้ร่วมกันนั้นน้อยและลดโอกาสการพัฒนาให้มีการกลายพันธุ์ของยีนดื้อยา นอกจากนี้ ยาอาร์ติมิซินินยังมีฤทธิ์ฆ่าแกมโตไซต์จึงทำให้ลดการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาได้ (White, 2004)

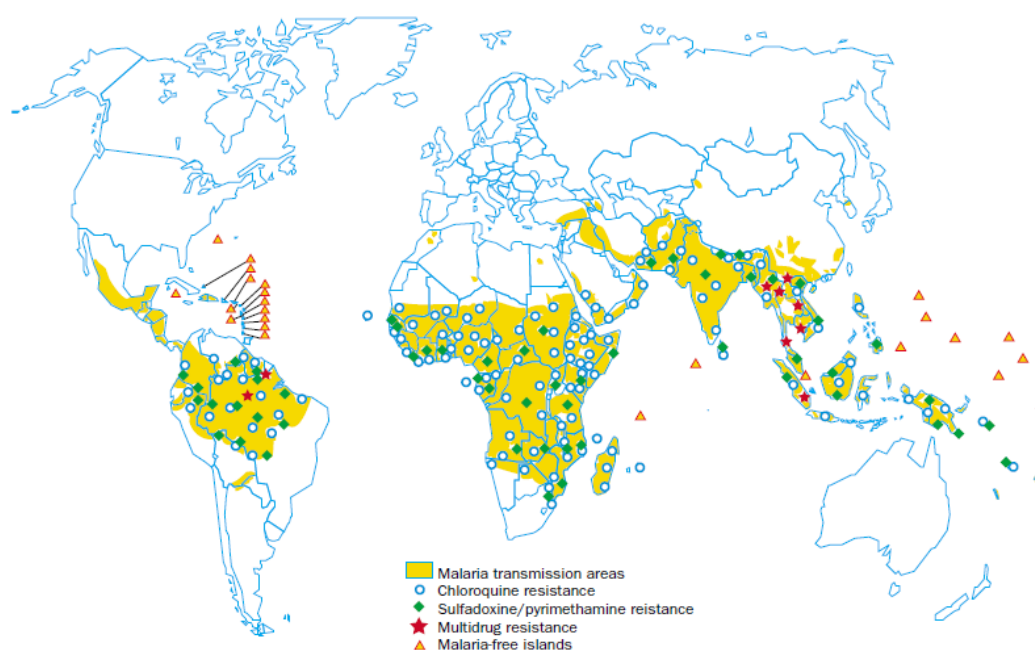
ตารางที่ 2.3 ตัวอย่างความหลากหลายของฮีโมโกลบินที่มีผลต่อการติดเชื้อมาลาเรียชนิดพัลซิพาร์ม

ความหลากหลายของ เม็ดเลือดแดง	พื้นที่	กลไกการป้องกันการติดเชื้อ		
		Inv.	Gro.	Cytoad.
α thalassaemia-1 (--/ $\alpha\alpha$)	แถบทะเลทรายซาฮารา	ปกติ	ลดลง	ลดลง
α thalassaemia-2 (- α / $\alpha\alpha$)	เมดิเตอร์เรเนียน ตะวันออกกลาง	ลดลง / ปกติ	ลดลง / ปกติ	ลดลง
HbH thalassaemia (-/- α)	อินเดีย เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (ทั่วพื้นที่ระบาดของ มาลาเรีย)		ลดลง	ลดลง
β^0 thalassaemia (-/ β)		ปกติ	ลดลง	ไม่ทราบแน่ชัด
Hemoglobin AS	แอฟริกาตะวันตก ตะวันออกกลาง บางส่วน	ลดลง/ ปกติ	ลดลง	ลดลง
Hemoglobin SS	ของประเทศอินเดีย	ลดลง / เพิ่มขึ้น	ลดลง	ลดลง
Hemoglobin AC, CC	แอฟริกาตะวันตก	ปกติ	ลดลง	ลดลง

Hemoglobin AE	ประเทศอินเดียตะวันออก	ลดลง	ปกติ	ไม่ทราบแน่ชัด
Hemoglobin EE	เอเชียตะวันออกเฉียงใต้	ลดลง/ ปกติ	ลดลง/ ปกติ	ไม่ทราบแน่ชัด

Iva. = invasion, Gro = growth, Cytoad = cytoadherence

(Bauduer, 2013, Lelliott, et al., 2015)



รูปที่ 2.8 พื้นที่ที่พบความไวของเชื้อมาลาเรียชนิดฟลิกซิพารัมต่อยาต้านมาลาเรียลดลง และพื้นที่ที่มีการดื้อต่อยาต้านมาลาเรียหลายชนิดจากการศึกษาของ WHO (Wongsrichanalai et al., 2002)

2.10 ความหลากหลายของฮิโมโกลบินและการออกฤทธิ์ของยากลุ่มอาร์ติมิซินิน

การศึกษาในหลอดทดลองพบว่า เชื้อมาลาเรียที่ติดในเม็ดเลือดแดงที่เป็นฮิโมโกลบิน H และ/หรือฮิโมโกลบิน CS จะมีแนวโน้มที่จะดื้อต่อยาอาร์ติซินมากกว่าเม็ดเลือดแดงปกติ ความแตกต่างของความไวของเชื้อมาลาเรียที่ติดในเม็ดเลือดแดงที่เป็นฮิโมโกลบิน H ต่อยาคลอโรควินและอาร์ติซินมีผลมาจากการออกฤทธิ์ในเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและการมีเอนไซม์ในกระบวนการดังกล่าวเพิ่มขึ้น (Yuthavong, et al., 1989) กลไกการดื้อยาเป็นความจำเพาะของโฮสต์ ซึ่งทั้งเม็ดเลือดแดงปกติและผิดปกติมีความสามารถออกฤทธิ์ของยากลุ่มอาร์ติมิซินินได้ แต่เม็ดเลือดแดงที่เป็นธาลัสซีเมียจะมียาสะสมและสามารถลดการออกฤทธิ์ของยาได้มากกว่าเม็ดเลือดปกติ เชื้อมาลาเรียที่ติดในเม็ดเลือดแดงที่เป็นแอลฟาธาลัสซีเมีย (ฮิโมโกลบิน H) และ/หรือฮิโมโกลบิน CS) จะดื้อต่อยาที่เป็นอนุพันธ์ของอาร์ติมิซินินมากกว่าเชื้อมาลาเรียที่ติดในเม็ดเลือดแดงที่เป็นเบต้าธาลัสซีเมียหรือฮิโมโกลบินอีจะดื้อต่อยาที่เป็นอนุพันธ์ของอาร์ติมิซินินน้อยกว่า (Charoenteeraboon, et al., 2000, Hutagalung, et al., 2000) อิมที่เยื่อหุ้มเม็ดเลือดแดงมีผลทำให้การออกฤทธิ์ของยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินลดลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแอลฟาธาลัสซีเมีย แต่เบต้าธาลัสซีเมียหรือฮิโมโกลบินอีไม่มีผลกระทบมากนัก กลไกที่ยับยั้งการออกฤทธิ์อาจจะมีผลจากอิม เหล็ก หรือ อนุพันธ์ของออกซิเจนที่ว่องไวไปทำลายโมเลกุลของออกซิเจนภายในโครงสร้าง ทำให้ไม่สามารถไปทำปฏิกิริยากับเชื้อมาลาเรียได้ (Vattanaviboon, et al., 2002) และพบว่า ค่าความเข้มข้นของยาอาร์ติมิซินินในการฆ่าเชื้อมาลาเรียที่ติดในเม็ดเลือดที่เป็นธาลัสซีเมียที่มีอายุมากได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่มีสารต้านอนุมูลอิสระมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (Senok, et al., 1997)

2.11 ไขมัน phosphatidylinositol 3-Phosphate (PI(3)P) และ โปรตีน phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)

Phosphatidylinositol (PI) เป็น phospholipid ที่สำคัญในเซลล์ยูคาริโอต เมื่อถูกเติมฟอสเฟตในหมู่ hydroxyl ที่ส่วน inositol ด้วยเอนไซม์ phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) ได้เป็นไขมัน PI(3)P ซึ่งทำหน้าที่เป็นไขมันโครงสร้างในเยื่อหุ้มเซลล์ มีบทบาทหลักในการขนส่งของเยื่อหุ้ม การเคลื่อนที่ของเซลล์ การเป็นส่วนประกอบของโครงสร้างเซลล์ (cytoskeletal) การสร้างดีเอ็นเอ การแบ่งเซลล์ การยึดเกาะของเซลล์ และการส่งสัญญาณของเซลล์ โปรตีน phosphatidylinositol-3-kinases (PI3K) เป็นเอนไซม์ในกระบวนการ phosphorylation ของ phosphatidylinositol,

phosphatidylinositol-4 phosphate (PI4P) หรือ phosphatidylinositol-4,5 biphosphate [PI(4,5)P₂] ที่ตำแหน่งที่ 3 ของวง inositol ได้เป็น phosphatidylinositol-3 phosphate (PI(3)P), phosphatidylinositol-3,4 biphosphate [PI(3,4)P₂], หรือ phosphatidylinositol-3,4,5 triphosphate [PI(3,4,5)P₃] (Tawak et al., 2010).

เอนไซม์ phosphatidylinositol-3-kinases (PI3K) กลุ่มที่ 1 ซึ่งสร้าง PI(3,4)P₂ และ PI(3,4,5)P₃ ส่วน PI3K กลุ่มที่ 3 มีความจำเพาะต่อกระบวนการ phosphorylation ของ PI ที่สร้าง PI(3)P ซึ่งสาร PI(3)P พบใน vacuole และ endosome ของเยื่อหุ้มของยีสต์และเซลล์ของสัตว์ที่เลี้ยงลูกด้วยนม

2.12 ไขมัน phosphatidylinositol 3-Phosphate (PI(3)P) และโปรตีน phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) ในเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมและการติดต่อกับกลุ่มอาร์ติมิซินิน

เอนไซม์ *Pf*PI3K ทำหน้าที่ในกระบวนการ endocytosis นำสารอาหารจากโฮสต์และการขนส่งอีโมโกลบินในเชื้อมาลาเรีย การยับยั้ง *Pf*PI3K ทำให้เกิดการสะสมของอีโมโกลบินในไซโตพลาสซึมของเชื้อ ซึ่งจะเกิดการไม่ให้ขนส่งถึง food vacuole เพื่อย่อยสลายต่อไป เชื้อมาลาเรียจึงขาดสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและเป็นสาเหตุที่ทำให้เชื้อตาย (Vaid, et al., 2010) เอนไซม์ *Pf*PI3K ทำให้เกิดกระบวนการ phosphorylation ของ phosphatidylinositol (PI) ได้เป็นไขมัน PI(3)P ปริมาณของเอนไซม์ *Pf*PI3K ควบคุมโดย *Pf*Kelch13 (K13) ซึ่งเป็นโปรตีนที่จับกับ *Pf*PI3K และการเติมหมู่ ubiquitin (Ub) ที่เอนไซม์ *Pf*PI3K จะทำให้เกิดการย่อยสลายของเอนไซม์ (Mbengue, et al., 2015)

ไขมัน PI(3)P ของเชื้อมาลาเรียไม่พบในระยะในยุงและระยะในตับ แต่พบเฉพาะระยะที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดเท่านั้น โดยพบมากภายในและเยื่อหุ้มของ food vacuole, apicoplast และเยื่อหุ้มเซลล์ในถุงที่มีลักษณะเหมือนไลโซโซม (Tawak, et al., 2010) PI(3)P สามารถพบใน endoplasmic reticulum (ER) ที่ตำแหน่งใกล้เคียงกับที่พบโปรตีน K13 และพบว่าโปรตีนทั้ง PI(3)P และ K13 ทำงานร่วมกันในกระบวนการสร้างโปรตีน *Pf*EMP1 ในระยะวงแหวนและถูกขนส่งไปที่ผิวเม็ดเลือดแดงของโฮสต์เพื่อทำหน้าที่เกาะกับผนังหลอดเลือดหรือเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้ออื่นๆ (cytoadherent) (Bhattacharjee, et al., 2018) นอกจากนี้ ปริมาณไขมัน PI(3)P สัมพันธ์กับการทำงานของเอนไซม์ PI3K และมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามระยะการเจริญเติบโต โดยมีปริมาณมากที่สุดในระยะไซซอนต์ (Tawak, et al., 2010)

ในปัจจุบัน ผู้ป่วยมาลาเรียที่ใช้ยาต้านมาลาเรียกลุ่มอาร์ติมิซินินมีอัตราการกลับเป็นซ้ำสูงเนื่องจากยาในกลุ่มนี้มีค่าครึ่งชีวิตสั้น (ประมาณ 4 ชั่วโมง) นอกจากนี้ การศึกษาในหลอดทดลองพบว่า เชื้อมาลาเรียที่แยกจากจากผู้ป่วยมีความไวของเชื้อต่อยาลดลง ความล่าช้าในการกำจัดเชื้อออกจากกระแสเลือด (parasite clearance time) หลังจากรับการรักษาด้วยยาอาร์ติมิซินินในรูปแบบยาเดี่ยวหรือยาสูตรผสมอาร์ติมิซินินกับยาชนิดอื่น (artemisinin-based combination therapy, ACT) บ่งบอกถึงการเปลี่ยนแปลงความไวของเชื้อต่อยาอาร์ติมิซินิน โดยการสูญเสียความสามารถในการฆ่าเชื้อระยะวงแหวนอาจเป็นสัญญาณเริ่มต้นของการเกิดการดื้อยาอาร์ติมิซินิน (Dondorp et al., 2009) จากการศึกษาเชื้อ

มาลาเรียในหนู พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *ubp1* ที่ถอดรหัสเป็นเอนไซม์ในกระบวนการ deubiquitination สัมพันธ์กับการดื้อยาอาร์ติมิซินิน (Petersen, et al., 2011) เชื้อมาลาเรียดื้อยาอาร์ติมิซินินที่แยกได้จากผู้ป่วยมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณ *PfPI3K* ร่วมกับการพบการกลายพันธุ์ของโปรตีน K13 ที่ตำแหน่ง 580Y, 493H 539T และ 543T จึงใช้การกลายพันธุ์เหล่านี้เป็นเครื่องหมายที่บ่งบอกถึงการดื้อยาอาร์ติมิซินินและไดไฮโดรอาร์ติมิซินิน ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ *PfPI3K* ในเชื้อมาลาเรียระยะวงแหวน การกลายพันธุ์ของยีน K13 ทำให้การจับกับโปรตีน *PfPI3K* ที่มาจากกระบวนการ Polyubiquitination ลดลง จึงย่อยสลายโปรตีน *PfPI3K* ลดลง และมีปริมาณ *PfPI3K* และ PI(3)P เพิ่มขึ้น ทำให้เชื้อทนต่อยาได้ (Mbengue, et al., 2015) เชื้อมาลาเรียจากพื้นที่เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ที่มีการกลายพันธุ์ของโปรตีน K13 มีระยะเวลาการฆ่าเชื้อที่ระยะวงแหวนนานขึ้น และบ่งบอกถึงการดื้อต่อยาอาร์ติมิซินิน การกลายพันธุ์นี้ทำให้เชื้อทนต่อภาวะความเครียดออกซิเดทีฟ ทำให้เชื้อมีความไวต่อยาลดลงและระยะเวลาการกำจัดเชื้อยาวนานขึ้น ส่งผลให้เชื้อมีศักยภาพในการดำรงชีวิตและมีการกลับเป็นซ้ำได้ (Winzeler and Manary, 2014)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อาสาสมัครและตัวอย่างเลือด

ข้อมูลลักษณะเม็ดเลือดของอาสาสมัครจำนวน 50 คน ถูกคัดกรองจากคุณสมบัติของเม็ดเลือดแดง และจำแนกชนิดฮีโมโกลบิน โดยวิธี capillary electrophoresis อาสาสมัครที่มีลักษณะเม็ดเลือดและฮีโมโกลบินปกติ และอาสาสมัครที่มีฮีโมโกลบินผิดปกติที่สายเบต้าและแอลฟา คือพาหะฮีโมโกลบินอี พาหะเบต้าธาลัสซีเมีย พาหะแอลฟาธาลัสซีเมีย และพาหะฮีโมโกลบินซีเอส (constant spring, CS) จำนวน 25 คน จะได้รับการขอความยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย และเจาะเลือดจำนวน 18 มิลลิลิตรโดยใช้หลอดเก็บเลือดที่มีสารกันเลือดแข็งชนิด EDTA

3.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม

เชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ 3D7 (ไวต่อยาคลอโรควิน) และ K1 (ดื้อต่อยาคลอโรควิน) จะนำมาเลี้ยงในหลอดทดลองอย่างต่อเนื่องตามวิธีของ Trager และ Jensen (Trager and Jensen, 1976) ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด RPMI 1640 ที่ประกอบด้วย NaHCO_3 เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์, serum เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ HEPES pH 7.4 เข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ gentamicin เข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เม็ดเลือดแดงเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ และปรับบรรยากาศด้วยก๊าซผสมที่มี CO_2 เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์, O_2 เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ และ N_2 เข้มข้น 90 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นนำเชื้อไปบ่มในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณเชื้อจะเลี้ยงในเจริญเติบโตอยู่ที่ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยเปลี่ยนอาหารทุกๆ 48 ชั่วโมง และปรับเชื้อให้อยู่ในระยะวงแหวนด้วยการบ่มกับสารละลายน้ำตาลซอพิทอลความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์

3.3 การศึกษาการติดเชื้อมาลาเรียในเม็ดเลือดชนิดต่างๆ

เชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ 3D7 ระยะวงแหวน ที่มีปริมาณเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ ถูกนำมาผสมกับเม็ดเลือดแดงปกติ เม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินอี เม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะเบต้าธาลัสซีเมีย เม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะแอลฟาธาลัสซีเมีย หรือเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินซีเอส ในอัตราส่วน 1:10 ให้ได้ปริมาณเชื้อในการทดสอบเท่ากับ 0.5 เปอร์เซ็นต์ และผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีปริมาณเม็ดเลือด 1 เปอร์เซ็นต์ นำเชื้อที่เตรียมได้ 100 ไมโครลิตรมาเลี้ยงในภาชนะ 96 หลุม เป็นเวลา 48, 96 และ 144 ชั่วโมง ภายใต้บรรยากาศที่มี CO_2 เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์, O_2 เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ และ N_2 เข้มข้น 90 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลานำเม็ด

เลือดมาเตรียมเป็นฟิล์มเลือดชนิดบางและตรวจสอบการเจริญเติบโตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า โดยแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ปริมาณเชื้อและรูปร่างของเชื้อมาลาเรีย

3.4 การทดสอบความไวของเชื้อมาลาเรียต่อยาต้านมาลาเรีย

เชื้อมาลาเรียระยะวงแหวนที่เลี้ยงกับเม็ดเลือดที่มีฮีโมโกลบินปกติ หรือเม็ดเลือดที่มีฮีโมโกลบินผิดปกติที่จะใช้ทดสอบในอัตราส่วนเม็ดเลือดแดงแก่ต่อเม็ดเลือดแดงที่ใช้ทดสอบเท่ากับ 1:20 อย่างน้อย 48 ชั่วโมง และเจริญเติบโตอย่างน้อย 2 เปอร์เซ็นต์ ถูกนำมาเตรียมให้มีความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ในเม็ดเลือด 1 เปอร์เซ็นต์ การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินทำในถาด 96 หลุม ตามวิธีของ Rieckmann และ Bennette (Bennett, et al., 2004, Rieckmann, et al., 1978) โดยเตรียมยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินความเข้มข้นตั้งต้นเท่ากับ 10 มิลลิโมลาร์ในเอทานอลความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์และเตรียมยาไพเพอราควินความเข้มข้นตั้งต้นเท่ากับ 10 มิลลิโมลาร์ในกรดแลคติกความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (Basco and Ringwald, 2003) จากนั้นจะเตรียมให้ได้ความเข้มข้นสำหรับทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยไดไฮโดรอาร์ติมิซินินจะเตรียมให้เป็น 40 นาโนโมลาร์ และทดสอบในช่วงความเข้มข้น 0.16-20 นาโนโมลาร์ ส่วนไพเพอราควินจะเตรียมให้ได้ความเข้มข้น 600 นาโนโมลาร์ และทดสอบในช่วงความเข้มข้น 2.34-300 นาโนโมลาร์ สำหรับการทดสอบยาผสมระหว่างไดไฮโดรอาร์ติมิซินินกับยาไพเพอราควินจะใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นเหมือนกับการทดสอบยาเดี่ยวและจะเตรียมเป็นยาผสมในอัตราส่วนไดไฮโดรอาร์ติมิซินินต่อไพเพอราควินเท่ากับ 0:10, 3:7, 5:5, 7:3, และ 10:0 (รูปที่ 3.1) จากนั้นจะบ่มเชื้อปริมาณ 100 ไมโครลิตรกับยาปริมาณ 100 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เมื่อครบเวลาตรวจสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโดยย้อมดีเอ็นเอด้วยสี SYBR green I ที่ผสมกับน้ำยาที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก และเติมลงในหลุมทดสอบหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่ความยาวคลื่นสำหรับกระตุ้นเท่ากับ 485 นาโนเมตร และความยาวคลื่นที่วัดสัญญาณ ฟลูออเรสเซนส์เท่ากับ 530 นาโนเมตร (Bennett, et al., 2004) ผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านมาลาเรียทั้ง 2 ชนิดแบบยาเดี่ยวแสดงเป็นค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ส่วนการทดสอบแบบยาผสมแสดงผลเป็น ΣFIC (fractional inhibitory concentration) และการสร้างกราฟ isobologram

การคำนวณค่า ΣFIC_{50} ทำได้โดย (ค่า IC_{50} ของยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินที่ผสมอัตราส่วนต่างๆ/ค่า IC_{50} ของยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินที่เป็นยาเดี่ยว) + (ค่า IC_{50} ของยาไพเพอราควินที่ผสมอัตราส่วนต่างๆ/ค่า IC_{50} ของยาไพเพอราควินที่เป็นยาเดี่ยว) ซึ่งใช้เกณฑ์ว่า ถ้าค่า sum FIC มากกว่า 1 จะเป็นการต้านฤทธิ์ น้อยกว่า 1 จะเป็นการเสริมฤทธิ์ และ เท่ากับ 1 จะเป็นการเพิ่มฤทธิ์ (Bell, 2005)

การสร้าง isobologram ทำโดยการ plot ค่า FIC_{50} ของยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินอัตราส่วนต่างๆในแกน X และ plot ค่า FIC_{50} ของยาไพเพอราควินอัตราส่วนต่างๆในแกน Y ซึ่ง isobologram

รูปที่ 3.1 การเตรียมหลุมยาไดไฮโดรอาร์คิมิซินินและไพเพอราควินในอัตราส่วนต่างๆ เพื่อทดสอบความไวของเชื้อมาลาเรียต่อยาต้านมาลาเรีย

3.5 การศึกษาการทำงานของโปรตีน phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) จากการวัดปริมาณไขมัน phosphatidylinositol 3-phosphate (PI(3)P) หลังจากสัมผัสกับยาไดไฮโดรอาร์คิมิซินินและไพเพอราควิน

3.5.1 การบ่มเชื้อมาลาเรียกับยาต้านมาลาเรีย

เชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ 3D7 ที่เลี้ยงกับเม็ดเลือดที่มีฮีโมโกลบินปกติหรือฮีโมโกลบินผิดปกติอย่างน้อย 48 ชั่วโมง ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ในเม็ดเลือดเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ นำมาบ่มกับยาไดไฮโดรอาร์คิมิซินินความเข้มข้น 4 นาโนโมลาร์ในอาหารเชื้อ RPMI 1640 ที่มี Albumax II ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (Mbengue, et al., 2015) หรือยาไพเพอราควินที่ความเข้มข้น 40 นาโนโมลาร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 ที่มี Albumax II ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนตัวอย่างควบคุมจะบ่มกับอาหารเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 ที่มี Albumax II ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6 และ 24 ชั่วโมงเช่นเดียวกันกับตัวอย่างที่สัมผัสยา

3.5.2 การสกัดไขมัน phosphatidylinositol 3-Phosphate (PI(3)P)

เมื่อครบเวลาการบ่มกับยาไดไฮโดรอาร์คิมิซินินหรือไพเพอราควิน จะปั่นแยกเม็ดเลือดออกจากสารละลายยาหรืออาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็ว 1,500 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และล้างเม็ดเลือดด้วย 1xPBS ที่แช่เย็นอีก 2 รอบ เม็ดเลือดแดงปริมาณ 50 ไมโครลิตรที่มีเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม 2 เปอร์เซ็นต์

จะนำมาทำให้แตกโดยผสมกับสารละลายซาโปนินความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ใน PBS ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เชื้อมาลาเรียที่ได้ (ประมาณ 2×10^6 เซลล์) จะนำมาล้างด้วย PBS ที่เย็น 2 ครั้ง โดยปั่นเหวี่ยงความเร็ว 5,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

จากนั้นล้างตะกอนด้วย Trichloroacetic acid (TCA) ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ใน 1 มิลลิโมลาร์ EDTA 2 ครั้ง โดยปั่นเหวี่ยงความเร็ว 5,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิปกติ เป็นเวลา 5 นาที สกัดส่วนไขมันที่มีคุณสมบัติเป็นกลางโดยบ่มตะกอนกับ MeOH:CHCl₃ (อัตราส่วน 2:1) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที แล้วปั่นแยกตะกอนที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อทิ้งส่วนใสด้านบน ทำซ้ำ 2 ครั้ง ตามด้วยการสกัดไขมันที่มีคุณสมบัติเป็นกรดโดยบ่มตะกอนกับ MeOH: CHCl₃: 12 M HCl (อัตราส่วน 80:40:1) ปริมาตร 750 ไมโครลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 25 นาที แล้วปั่นแยกตะกอนที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใสด้านบน ใส่หลอดใหม่ และทิ้งตะกอน แยกโปรตีนออกจากส่วนใสนี้ โดยผสมกับ CHCl₃ ปริมาตร 750 ไมโครลิตรและ HCl ความเข้มข้น 0.1 N ปริมาตร 450 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที แล้วปั่นแยกส่วนสารละลายที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใสด้านล่าง (organic phase) ในหลอดใหม่ และระเหยให้แห้งโดยใช้ก๊าซไนโตรเจน และแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาวัดปริมาณภายหลัง (Mbengue, et al., 2015)

3.5.3 การวัดปริมาณไขมัน phosphatidylinositol-3-phosphate (PI(3)P)

การวัดปริมาณไขมัน PI(3)P ทำโดยการเทียบปริมาณโปรตีนที่พบในตัวอย่างกับกราฟมาตรฐานที่สร้างระหว่างปริมาณไขมัน PI(3)P ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0-400 พิโคโมล และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร โดยแต่ละตัวอย่างรวมทั้งสารมาตรฐานทุกความเข้มข้นจะทำซ้ำ 2 ครั้ง ขั้นตอนแรกจะต้องบ่มตัวอย่างทั้งหมดรวมทั้งสารมาตรฐานทุกความเข้มข้น ปริมาตร 60 ไมโครลิตร (ยกเว้น Blank) กับสาร PI(3)P detector ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ในถาด 96 หลุม เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำสารที่ผสมไว้ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมในถาดหลุมอีกถาดหนึ่งที่มี antibody ตัวแรกเคลือบอยู่ (detection plate) และบ่มให้เข้ากันโดยการเขย่าต่อเนื่องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างสารที่อยู่ในถาดหลุมออกด้วย PBS-T ที่ได้มาพร้อมกับชุดทดสอบ หลุมละ 200 ไมโครลิตร 3 ครั้ง เติม secondary detector ซึ่งเป็น antibody ตัวที่ 2 ที่มีเอนไซม์ติดอยู่ ลงถาดหลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มให้เข้ากันโดยการเขย่าต่อเนื่องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างสารที่อยู่ในถาดหลุมออกด้วย PBS-T หลุมละ 200 ไมโครลิตร เติมสาร TMB หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด 30 นาที เพื่อให้ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ที่ติดอยู่กับ antibody ในแต่ละหลุมได้เป็น

สารสีฟ้า เติม H_2SO_4 ความเข้มข้น 1 N ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา จะได้สารละลายสีเหลือง และนำภาตหลุมไปวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานมาสร้างกราฟมาตรฐานแบบ sigmoidal dose response-variable slope curve (four-parameter logistic, 4PL) analysis โดยใช้โปรแกรม Graphpad Prism เวอร์ชัน 8.0 (Mbengue, et al., 2015)

3.6 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการวิเคราะห์ทางโลหิตวิทยาของอาสาสมัคร ปริมาณเชื้อที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดง ค่า IC_{50} , ค่า ΣFICs และปริมาณไขมัน $\text{PI}(3)\text{P}$ ของเชื้อมาลาเรียหลังจากสัมผัสกับยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินิน และไพเพอราควินของเชื้อมาลาเรียที่ในเม็ดเลือดมีอีโมโกลบินปกติ พาหะอีโมโกลบินอี พาหะเบต้าธาลัสซีเมีย พาหะแอลฟาธาลัสซีเมีย และพาหะอีโมโกลบินซีเอส แสดงพารามิเตอร์ทางสถิติเป็นค่ามัธยฐาน (ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์) และนำผลมาเปรียบเทียบกับเชื้อมาลาเรียในเม็ดเลือดปกติโดยใช้ Mann-Whitney U test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ โดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 16.0

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัคร

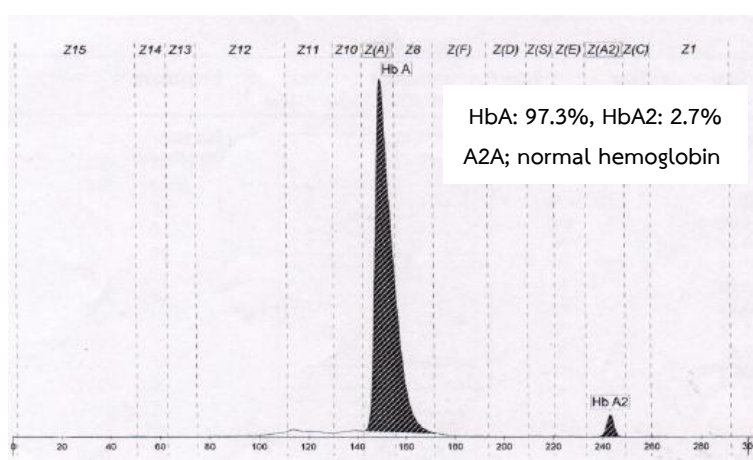
ตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัคร 25 คน ที่เข้าร่วมโครงการวิจัยมีความสมบูรณ์ของเม็ดเลือดแดงแตกต่างกัน ทั้งความผิดปกติของฮีโมโกลบินที่สายเบต้า (พาหะฮีโมโกลบินอีและพาหะเบต้าธาลัสซีเมีย) และความผิดปกติของฮีโมโกลบินที่สายแอลฟา (พาหะแอลฟาธาลัสซีเมียและพาหะฮีโมโกลบินซีเอส) ซึ่งสามารถจัดกลุ่มอาสาสมัครเป็น 5 กลุ่ม ตามชนิดฮีโมโกลบิน (**รูปที่ 4.1**) คือ กลุ่มที่ 1 อาสาสมัครที่มีเม็ดเลือดแดงปกติจำนวน 10 คน กลุ่มที่ 2 อาสาสมัครที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินอีจำนวน 10 คน กลุ่มที่ 3 อาสาสมัครที่เป็นพาหะเบต้าธาลัสซีเมียจำนวน 2 คน กลุ่มที่ 4 อาสาสมัครที่เป็นพาหะแอลฟาธาลัสซีเมียจำนวน 2 คน และกลุ่มที่ 5 อาสาสมัครที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินซีเอส (constant spring, CS) จำนวน 1 คน

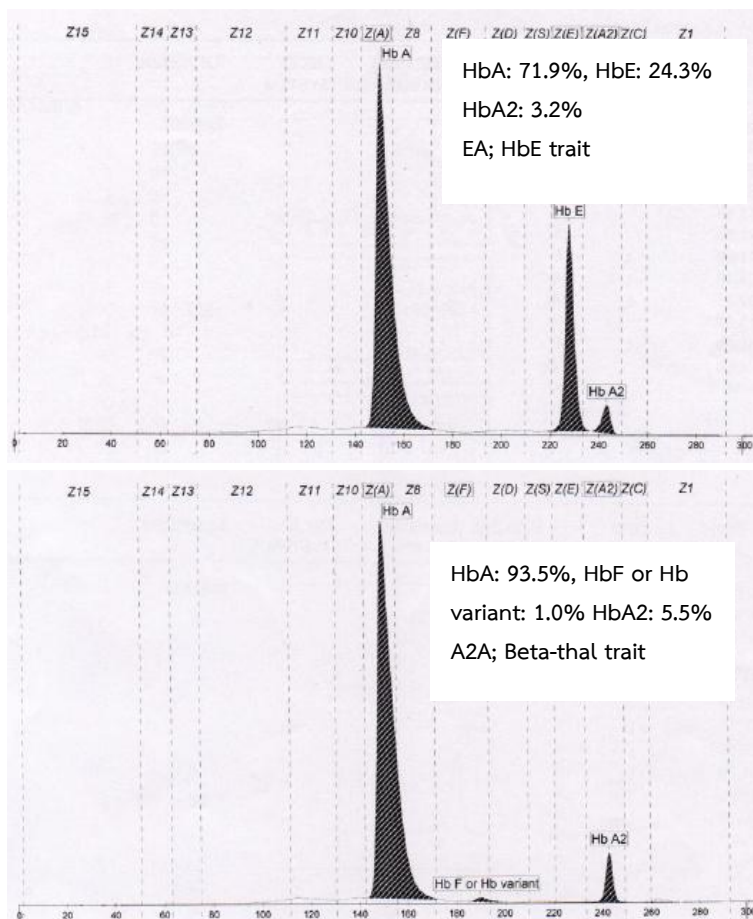
ความสมบูรณ์ของเม็ดเลือดแดง [มัธยฐาน (ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์)] ของอาสาสมัครที่มีฮีโมโกลบินชนิดต่างๆ แสดงใน**ตารางที่ 4.1** โดยจำนวนเม็ดเลือดแดงในกลุ่มที่มีฮีโมโกลบินปกติมีค่าเท่ากับ 5.0×10^6 (4.1×10^6 - 5.3×10^6) เซลล์ต่อไมโครลิตร ซึ่งไม่แตกต่างจากจำนวนเม็ดเลือดแดงจากอาสาสมัครกลุ่มอื่น โดยจำนวนเม็ดเลือดแดงในอาสาสมัครที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินอีมีค่าเท่ากับ 5.0×10^6 (4.8×10^6 - 5.8×10^6) เซลล์ต่อไมโครลิตร พาหะแอลฟาธาลัสซีเมียมีค่าเท่ากับ 5.2×10^6 (5.0×10^6 - 5.4×10^6) เซลล์ต่อไมโครลิตร และพาหะฮีโมโกลบินซีเอสมีค่าเท่ากับ 5.2×10^6 เซลล์ต่อไมโครลิตร ส่วนกลุ่มอาสาสมัครที่เป็นพาหะเบต้าธาลัสซีเมียมีจำนวนเม็ดเลือดแดงมากที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 5.7×10^6 (5.5×10^6 - 6.0×10^6) เซลล์ต่อไมโครลิตร

ความเข้มข้นของฮีโมโกลบินในกลุ่มที่มีฮีโมโกลบินปกติมีค่าเท่ากับ 14.3 (12.2-15.0) กรัมต่อเดซิลิตร ซึ่งมีความมากกว่าอาสาสมัครกลุ่มอื่น โดยอาสาสมัครที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินอีมีค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบินเท่ากับ 12.6 (10.2-13.6) กรัมต่อเดซิลิตร พาหะเบต้าธาลัสซีเมียมีค่าเท่ากับ 11.2 (11.2-11.3) กรัมต่อเดซิลิตร พาหะแอลฟาธาลัสซีเมียมีค่าเท่ากับ 11.2 (11.1-11.3) กรัมต่อเดซิลิตร และพาหะฮีโมโกลบินซีเอสมีค่าเท่ากับ 13.9 กรัมต่อเดซิลิตร

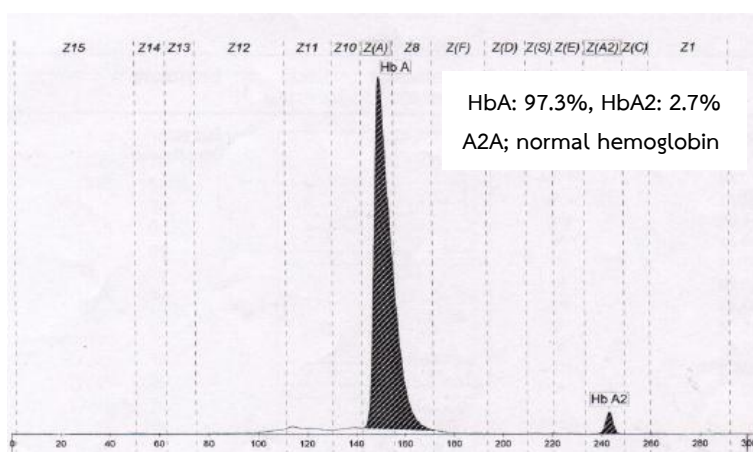
ความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงในกลุ่มที่มีฮีโมโกลบินปกติมีค่าเท่ากับ 43.1 (35.9-45.0) เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความมากกว่าอาสาสมัครกลุ่มอื่น โดยอาสาสมัครที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินอีมีค่าเท่ากับ 38.2 (32.3-41.2) เปอร์เซ็นต์ พาหะเบต้าธาลัสซีเมียมีค่าเท่ากับ 36.4 (36.1-36.8) เปอร์เซ็นต์ พาหะแอลฟาธาลัสซีเมียมีค่าเท่ากับ 35.4 (34.5-36.3) เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่แตกต่างจากอาสาสมัครที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินซีเอสมีค่าเท่ากับ 44.6 เปอร์เซ็นต์

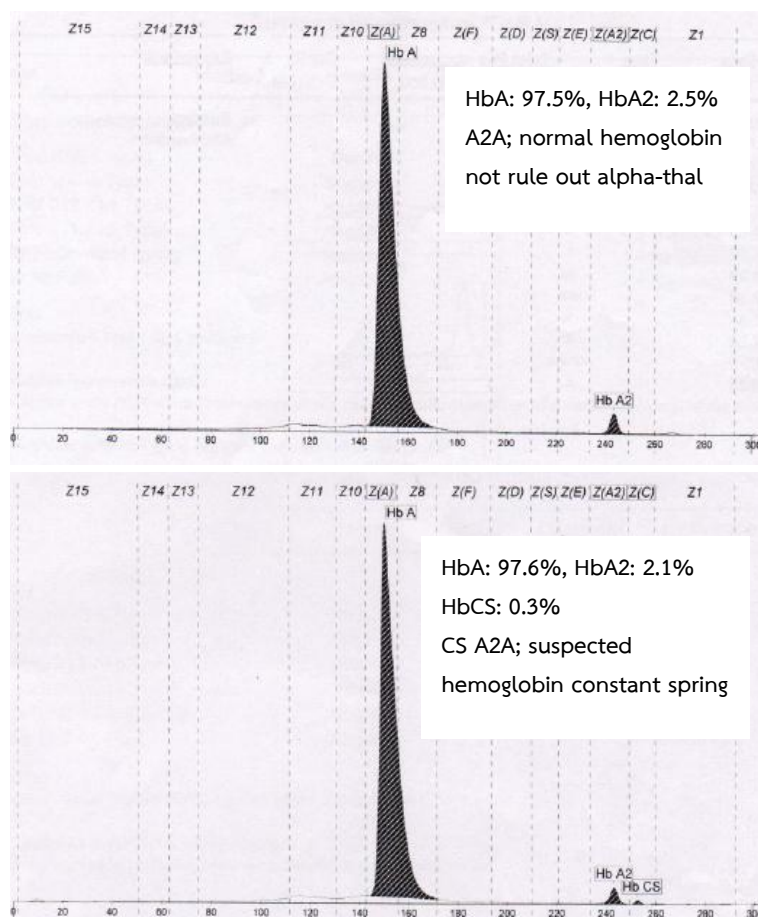
ขนาดของเม็ดเลือดแดงในกลุ่มที่มีฮีโมโกลบินปกติมีค่าเท่ากับ 85.3 (77.3-87.8) เฟมโตลิตร ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าเม็ดเลือดของอาสาสมัครกลุ่มอื่น โดยอาสาสมัครที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินชนิดอีมีค่าเท่ากับ 73.7 (64.7-83.6) เฟมโตลิตร พาหะเบต้าธาลัสซีเมียมีค่าเท่ากับ 65.4 เฟมโตลิตร และพาหะแอลฟาธาลัสซีเมียมีค่าเท่ากับ 68.0 (67.0-69.1) เฟมโตลิตร





รูปที่ 4.1 (ก.) ตัวอย่างกราฟจากการวิเคราะห์ชนิดของฮีโมโกลบินด้วยวิธี capillary electrophoresis ของฮีโมโกลบินปกติและผิดปกติในสายเบต้า โดยเทียบจากช่วงค่าอ้างอิงของฮีโมโกลบิน A: 96.8-97.8%, A2: 2.2-3.2% และ F $\leq$ 0.5%





รูปที่ 4.1 (ข.) ตัวอย่างกราฟจากการวิเคราะห์ชนิดของฮีโมโกลบินด้วยวิธี capillary electrophoresis ของฮีโมโกลบินปกติและผิดปกติในสายแอลฟา โดยเทียบจากช่วงค่าอ้างอิงของฮีโมโกลบิน A: 96.8-97.8%, A2: 2.2-3.2% และ F $\leq$ 0.5%

ตารางที่ 4.1 ความสมบูรณ์ของเม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินชนิดต่างๆ

ความหลากหลายของฮีโมโกลบิน	ความสมบูรณ์ของเม็ดเลือดแดง [มัธยฐาน (ช่วงความเชื่อมั่น 95%)]			
	จำนวนเม็ดเลือดแดง ($\times 10^6$ เซลล์ต่อไมโครลิตร)	ความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน (กรัมต่อเดซิลิตร)	ความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดง (เปอร์เซ็นต์)	ขนาดของเม็ดเลือดแดง (เฟมโตลิตร)
ฮีโมโกลบินปกติ	5.0 (4.1-5.3)	14.3 (12.2-15.0)	43.1 (35.9-45.0)	85.3 (77.3-87.8)
พาหะฮีโมโกลบินอี	5.0 (4.8-5.8)	12.6 (10.2-13.6)	38.2 (32.3-41.2)	73.7(64.7-83.6)
พาหะเบต้าธาลัสซีเมีย	5.7 (5.5-6.0)	11.2 (11.2-11.3)	36.4 (36.1-36.8)	65.4*

พาหะแอลฟาธาลัสซีเมีย	5.2 (5.0-5.4)	11.2 (11.1-11.3)	35.4 (34.5-36.3)	68.0 (67.0-69.1)
พาหะฮีโมโกลบินซีเอส*	5.2	13.9	44.6	-

* จำนวนตัวอย่างเท่ากับ 1

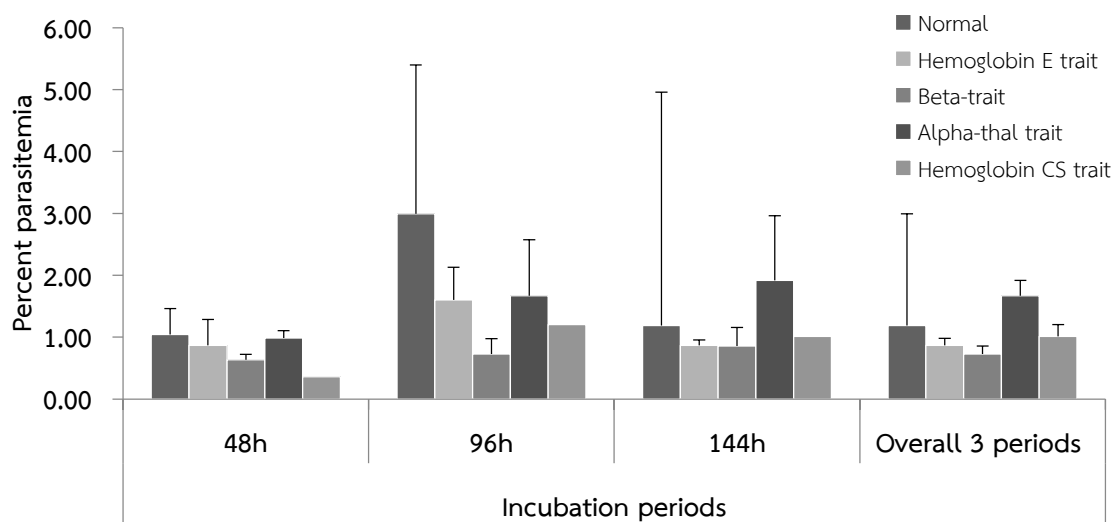
4.4 การติดเชื้อมาลาเรียในเม็ดเลือดชนิดต่างๆ

ความสมบูรณ์ของฮีโมโกลบินที่แตกต่างกัน ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ 3D7 ระยะเวลาจนถึงระยะที่เพิ่มจำนวนได้ (schizont-merozoite) แต่ความหนาแน่นของเชื้อเป็นอีกปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการดังกล่าว [รูปที่ 4.2 (ก.) และ (ข.)] โดยเชื้อที่เลี้ยงในเม็ดเลือดแดงที่มีส่วนผสมของเม็ดเลือดแดงปกติเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (1 multiplication period) มีการเพิ่มจำนวนจากเชื้อปริมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็น 1.04 (0.935-1.460) เปอร์เซ็นต์ [ค่ามัธยฐาน (ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์)] ส่วนเชื้อที่เจริญในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินซีเอสมีค่าเท่ากับ 0.87 (0.624-1.396) เปอร์เซ็นต์ พาหะเบต้าธาลัสซีเมียมีค่าเท่ากับ 0.64 (0.551-0.723) พาหะแอลฟาธาลัสซีเมียมีค่าเท่ากับ 0.99 (0.874-1.105) เปอร์เซ็นต์ เปอร์เซ็นต์และพาหะฮีโมโกลบินซีเอสมีค่าเท่ากับ 0.36 เปอร์เซ็นต์ การเจริญเติบโตของเชื้อในเม็ดเลือดแดงปกติหลังจากเลี้ยง 96 ชั่วโมง (2 multiplication periods) มีปริมาณเพิ่มขึ้นสูงที่สุดถึง 2.99 (2.11-5.397) เปอร์เซ็นต์ เชื้อที่เจริญในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินซีเอสมีค่าเท่ากับ 1.60 (0.575-3.341) เปอร์เซ็นต์ พาหะเบต้าธาลัสซีเมียมีค่าเท่ากับ 0.73 (0.483-0.975) เปอร์เซ็นต์ พาหะแอลฟาธาลัสซีเมียมีค่าเท่ากับ 1.67 (0.761-2.576) เปอร์เซ็นต์ และ

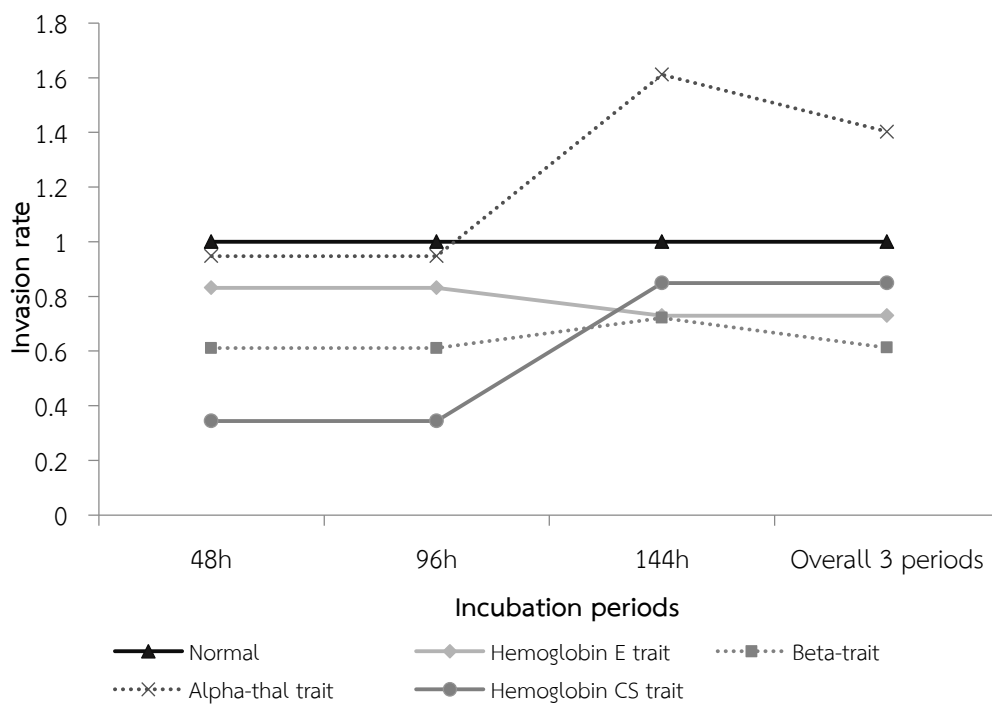
พาหะฮีโมโกลบินซีเอสมีค่าเท่ากับ 1.20 เปอร์เซ็นต์ การเจริญเติบโตของเชื้อในเม็ดเลือดแดงปกติหลังจากเลี้ยง 144 ชั่วโมง (3 multiplication periods) มีปริมาณลดลงเหลือ 1.19 (0.935-4.96) เปอร์เซ็นต์ เชื้อที่เจริญในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินซีมีค่าเท่ากับ 0.87 (0.626-1.396) พาหะเบต้าธาลัสซีเมียมีค่าเท่ากับ 0.86 (0.483-0.975) และพาหะฮีโมโกลบินซีเอสมีค่าเท่ากับ 1.01 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ค่ามัธยฐานปริมาณเชื้อที่เจริญในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะแอลฟาธาลัสซีเมียมีค่าสูงสุด โดยปริมาณเท่ากับ 1.92 (0.874-2.961) เปอร์เซ็นต์

อย่างไรก็ตาม การเจริญเติบโตของเชื้อในเม็ดเลือดแดงลักษณะต่างๆ ทั้ง 3 ช่วงเวลาไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) โดยมีค่ามัธยฐาน (ช่วงความเชื่อมั่น 95%) ของเชื้อที่เจริญในเม็ดเลือดแดงปกติมีค่าเท่ากับ 1.19 (1.044-2.991) เปอร์เซ็นต์ พาหะฮีโมโกลบินซีมีค่าเท่ากับ 0.87 (0.626-1.396) เปอร์เซ็นต์ พาหะเบต้าธาลัสซีเมียมีค่าเท่ากับ 0.73 (0.483-0.975) เปอร์เซ็นต์ พาหะแอลฟาธาลัสซีเมียมีค่าเท่ากับ 1.67 (0.989-1.917) เปอร์เซ็นต์ และพาหะฮีโมโกลบินซีเอสมีค่าเท่ากับ 1.01 (0.359-1.202) เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ การพัฒนารูปร่างของเชื้อมาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินผิดปกติ ไม่มีความแตกต่างจากเม็ดเลือดปกติอย่างชัดเจน มีเพียงการเจริญเติบโตที่ช้าลงในเชื้อที่อยู่ในเม็ดเลือดที่เป็นพาหะเบต้าและแอลฟาธาลัสซีเมีย รวมทั้งการพบเมอโรซอยท์ของเชื้อมาลาเรียที่เจริญในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะแอลฟาธาลัสซีเมียมีจำนวนลดลง **รูปที่ 4.3 ก.-ค.**

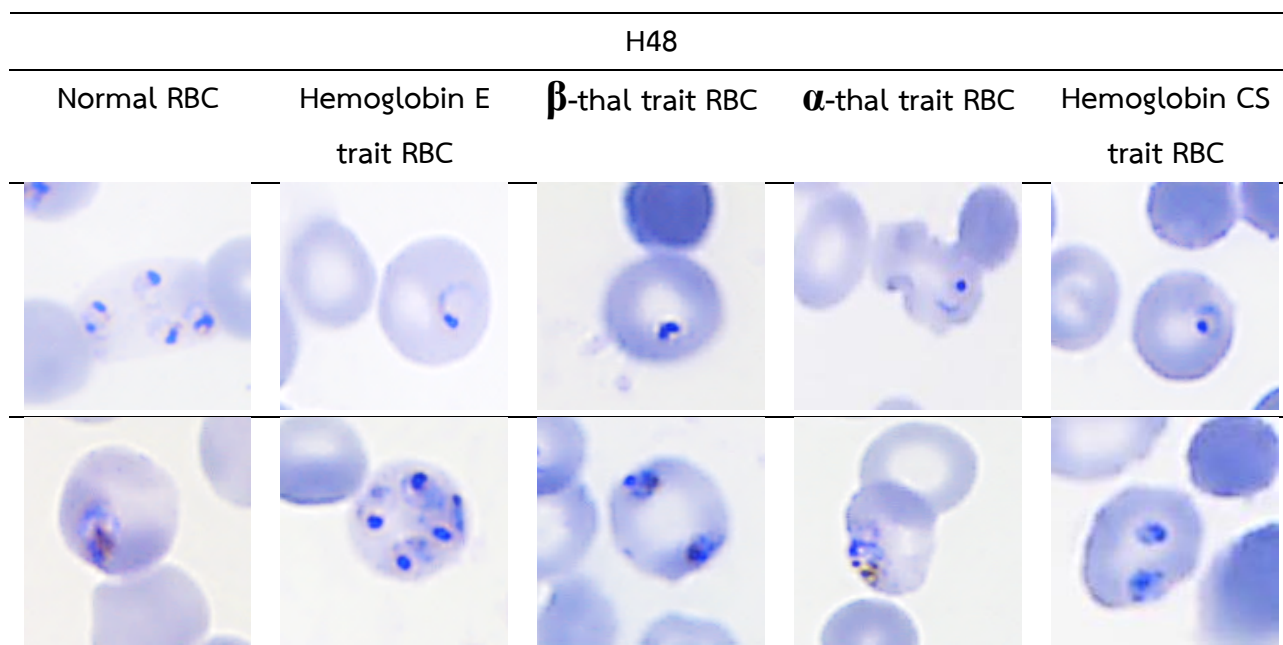
(ก.)

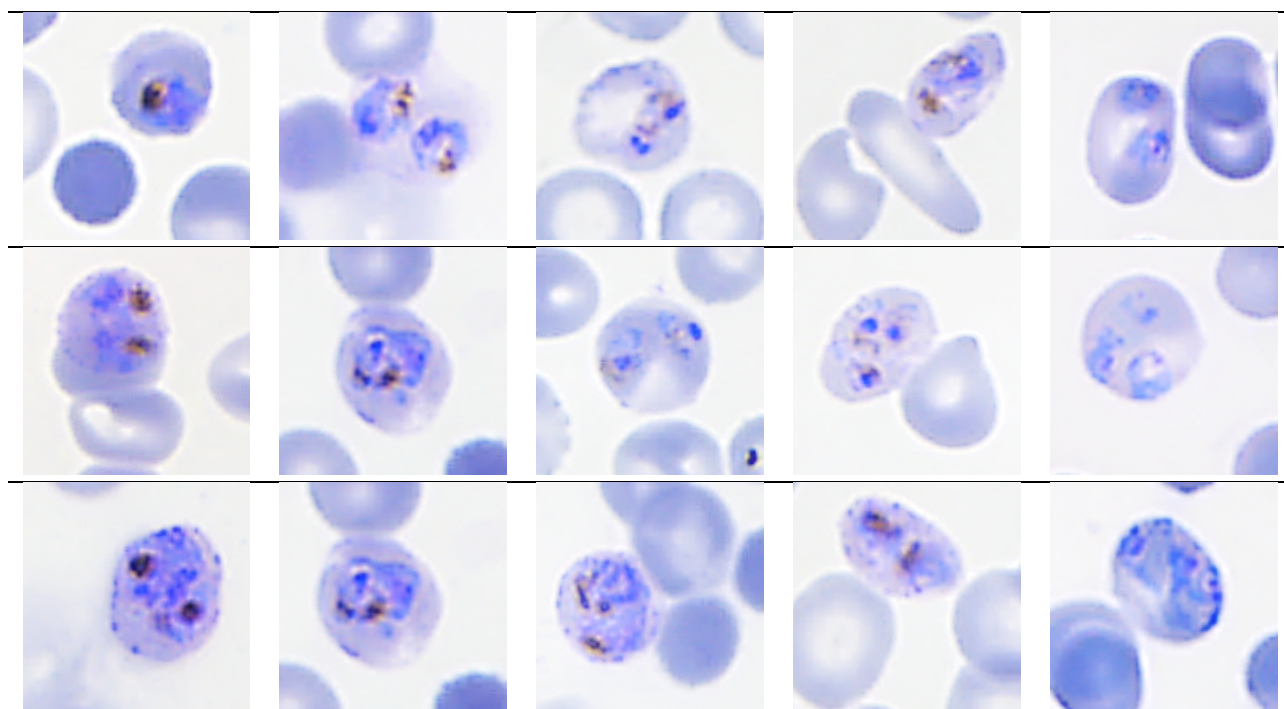


(ข.)



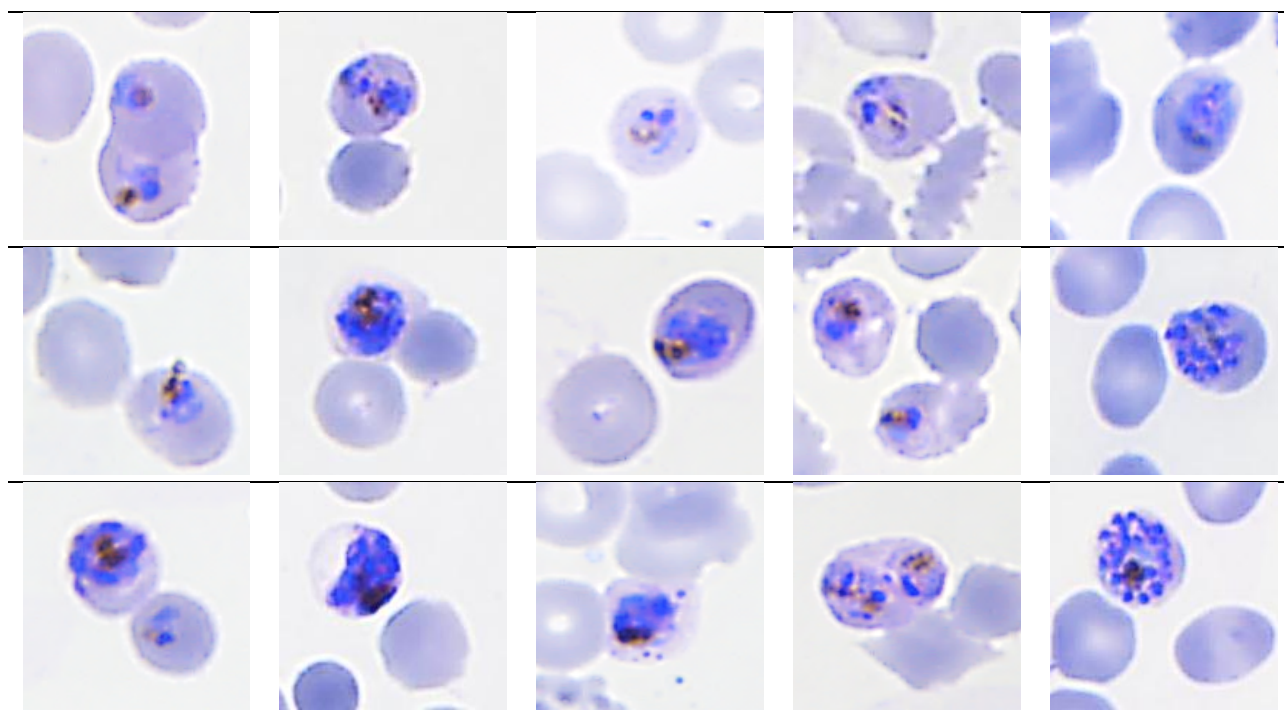
รูปที่ 4.2 การเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ 3D7 ในเม็ดเลือดที่มีฮีโมโกลบินชนิดต่างๆ (ก.) เพอร์เซ็นต์เชื้อมาลาเรียในเม็ดเลือด (ข.) อัตราการติดเชื้อมาลาเรียเมื่อเทียบกับเม็ดเลือดแดงปกติ



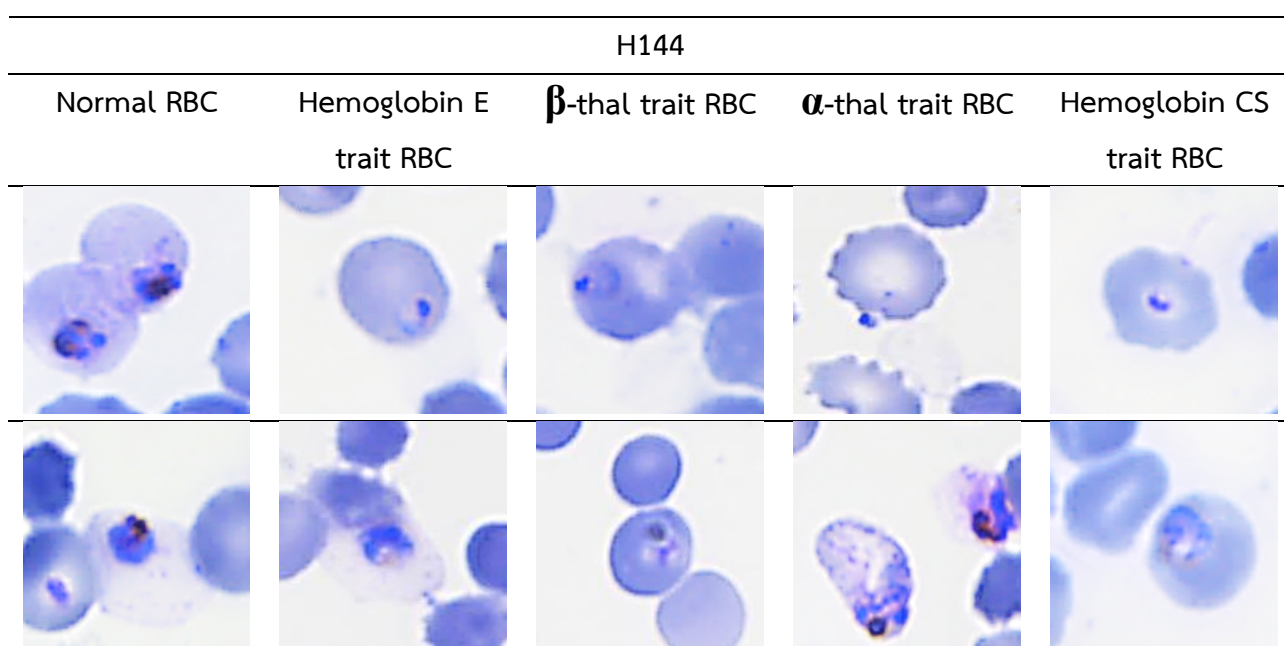


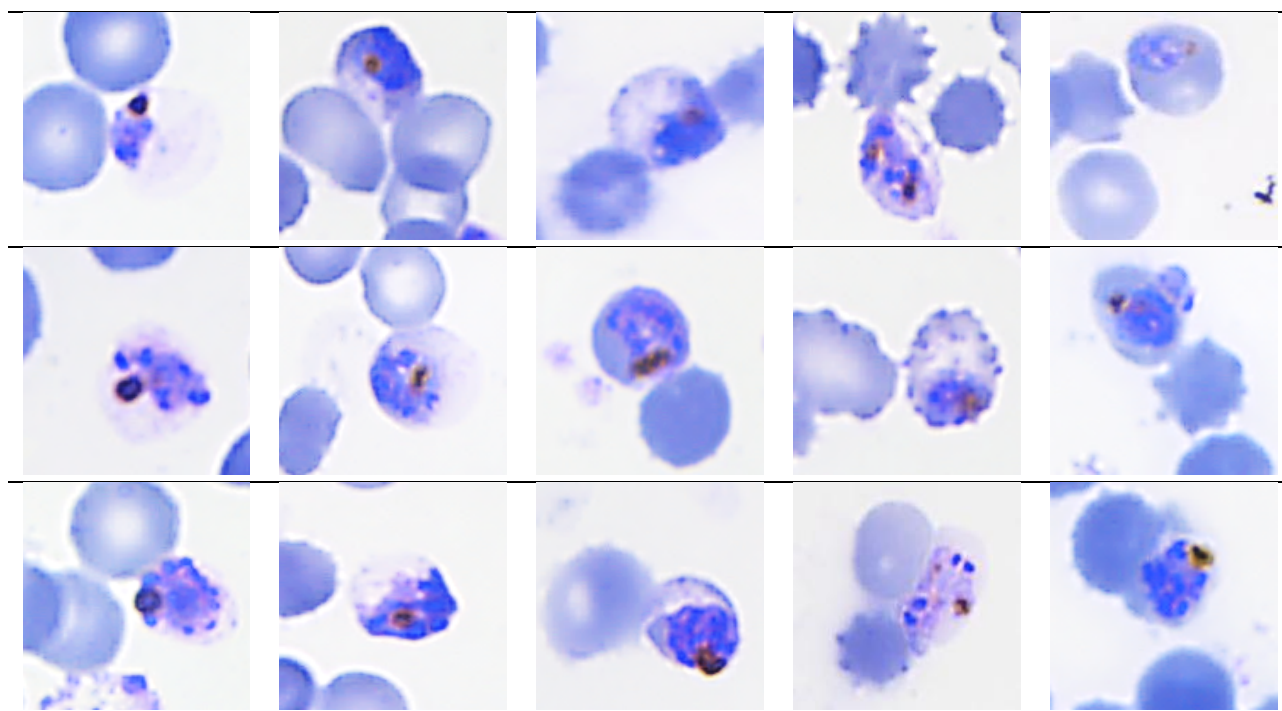
รูปที่ 4.3 (ก.) การเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ 3D7 ในเม็ดเลือดที่มีฮีโมโกลบิน ชนิดต่างๆ ในช่วงเวลา 48 ชั่วโมง

H96				
Normal RBC	Hemoglobin E trait RBC	β -thal trait RBC	α -thal trait RBC	Hemoglobin CS trait RBC



รูปที่ 4.3 (ข.) การเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ 3D7 ในเม็ดเลือดที่มีฮีโมโกลบินชนิดต่างๆ ในช่วงเวลา 96 ชั่วโมง





รูปที่ 4.3 (ค.) การเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ 3D7 ในเม็ดเลือดที่มีฮีโมโกลบินชนิดต่างๆ ในช่วงเวลา 144 ชั่วโมง

4.5 ความไวของเชื้อมาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดชนิดต่างๆ ต่อยาต้านมาลาเรีย

4.5.1 ผลการทดสอบความไวของเชื้อมาลาเรียต่อยาไฮโดรอาร์ติมิซินิน (DHA) และไพเพอราควิน (PPQ) แบบยาเดี่ยว (single drug)

การทดสอบความไวของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมที่เจริญในเม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินปกติและผิดปกติต่อยาต้านมาลาเรียไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินทั้งหมด 25 ตัวอย่าง พบว่า ค่าความเข้มข้นของยาที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียที่เจริญในเม็ดเลือดแดงชนิดต่างๆ ไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 4.2) โดยความไวของเชื้อสายพันธุ์ 3D7 (ไวต่อยาคลอโรควิน) จะมีความไวต่อยาไฮโดรอาร์ติมิซินินต่ำกว่าสายพันธุ์ K1 แต่มีความไวต่อยาไพเพอราควินสูงกว่าสายพันธุ์ K1 (ไวต่อยาคลอโรควิน)

ความเข้มข้นของยาไฮโดรอาร์ติมิซินิน [มัธยมฐาน (ช่วงความคลาดเคลื่อน 95 เปอร์เซ็นต์)] ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ 3D7 ได้ 10 เปอร์เซ็นต์ (IC_{10}) เท่ากับ 2.04 (1.36-2.62) นาโนโมลาร์ โดยผล IC_{10} ในเชื้อมาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงปกติเท่ากับ 2.44 (1.07-3.47) นาโนโมลาร์ เม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะ

อีโมโกลบินอีเท่ากับ 2.23 (1.52-2.82) นาโนโมลาร์ พาหะเบต้าธาลัสซีเมียเท่ากับ 1.05 (0.95-1.16) นาโนโมลาร์ พาหะแอลฟาธาลัสซีเมียเท่ากับ 1.41 (1.30-1.52) นาโนโมลาร์ และพาหะอีโมโกลบินซีเอสเท่ากับ 1.38 (0.51-2.04) นาโนโมลาร์

ค่าความเข้มข้นของยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินิน [มัธยฐาน (ช่วงความคลาดเคลื่อน 95 เปอร์เซ็นต์)] ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ 3D7 ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) เท่ากับ 3.42 (2.69-4.90) นาโนโมลาร์ โดยผล IC_{50} ในเชื้อมาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงปกติเท่ากับ 4.22 (2.69-6.31) นาโนโมลาร์ เม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะอีโมโกลบินอีเท่ากับ 3.79 (2.87-5.40) นาโนโมลาร์ พาหะเบต้าธาลัสซีเมียเท่ากับ 1.80 (1.54-2.06) นาโนโมลาร์ พาหะแอลฟาธาลัสซีเมียเท่ากับ 2.79 (2.16-3.42) นาโนโมลาร์ และพาหะอีโมโกลบินซีเอสเท่ากับ 2.32 (1.47-3.04) นาโนโมลาร์

ค่าความเข้มข้นของยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินิน [มัธยฐาน (ช่วงความคลาดเคลื่อน 95 เปอร์เซ็นต์)] ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ 3D7 ได้ 90 เปอร์เซ็นต์ (IC_{90}) เท่ากับ 6.86 (4.66-8.76) นาโนโมลาร์ โดยผล IC_{90} ในเชื้อมาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงปกติเท่ากับ 7.78 (4.97-15.92) นาโนโมลาร์ เม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะอีโมโกลบินอีเท่ากับ 8.65 (5.02-10.28) นาโนโมลาร์ พาหะเบต้าธาลัสซีเมียเท่ากับ 3.09 (2.50-3.68) นาโนโมลาร์ พาหะแอลฟาธาลัสซีเมียเท่ากับ 5.88 (3.67-8.09) นาโนโมลาร์ และพาหะอีโมโกลบินซีเอสเท่ากับ 4.22 (3.90-4.52) นาโนโมลาร์

ค่าความเข้มข้นของยาไพเพอราควิน [มัธยฐาน (ช่วงความคลาดเคลื่อน 95 เปอร์เซ็นต์)] ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ 3D7 ได้ 10 เปอร์เซ็นต์ (IC_{10}) เท่ากับ 20.58 (16.2-23.3) นาโนโมลาร์ โดยผล IC_{10} ในเชื้อมาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงปกติเท่ากับ 21.5 (7.6-31.0) นาโนโมลาร์ เม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะอีโมโกลบินอีเท่ากับ 17.9 (11.4-23.3) นาโนโมลาร์ พาหะเบต้าธาลัสซีเมียเท่ากับ 17.3 (16.7-17.9) นาโนโมลาร์ พาหะแอลฟาธาลัสซีเมียเท่ากับ 28.4 (27.8-29.1) นาโนโมลาร์ และพาหะอีโมโกลบินซีเอสเท่ากับ 22.5 (22.5-22.8) นาโนโมลาร์

ค่าความเข้มข้นของยาไพเพอราควิน [มัธยฐาน (ช่วงความคลาดเคลื่อน 95 เปอร์เซ็นต์)] ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ 3D7 ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) เท่ากับ 35.9 (28.8-43.2) นาโนโมลาร์ โดยผล IC_{50} ในเชื้อมาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงปกติเท่ากับ 41.0 (28.4-54.1) นาโนโมลาร์ เม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะอีโมโกลบินอีเท่ากับ 32.8 (20.5-39.0) นาโนโมลาร์ พาหะเบต้าธาลัสซีเมียเท่ากับ 28.2 (24.5-31.9) นาโนโมลาร์ พาหะแอลฟาธาลัสซีเมียเท่ากับ 57.4 (53.1-61.8) นาโนโมลาร์ และพาหะอีโมโกลบินซีเอสเท่ากับ 32.2 (32.1-32.6) นาโนโมลาร์

ค่าความเข้มข้นของยาไพเพอราควิน [มัธยฐาน (ช่วงความคลาดเคลื่อน 95 เปอร์เซ็นต์)] ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ 3D7 ได้ 90 เปอร์เซ็นต์ (IC_{90})

เท่ากับ 57.3 (46.0-99.4) นาโนโมลาร์ โดยผล IC_{90} ในเชื้อมาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงปกติเท่ากับ 86.8 (57.3-155.8) นาโนโมลาร์ เม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะฮิโมโกลบินอีเท่ากับ 49.7 (29.9-99.4) นาโนโมลาร์ พาหะเบต้าธาลัสซีเมียเท่ากับ 46.4 (36.0-56.9) นาโนโมลาร์ พาหะแอลฟาธาลัสซีเมียเท่ากับ 119.5 (102.8-136.2) นาโนโมลาร์ และพาหะฮิโมโกลบินซีเอสเท่ากับ 46.0 (45.9-46.6) นาโนโมลาร์

ความเข้มข้นของยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินิน [มาตรฐาน (ช่วงความคลาดเคลื่อน 95 เปอร์เซ็นต์)] ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ K1 ได้ 10 เปอร์เซ็นต์ (IC_{10}) เท่ากับ 1.50 (1.10-1.76) นาโนโมลาร์ โดยผล IC_{10} ในเชื้อมาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงปกติเท่ากับ 1.64 (1.20-1.93) นาโนโมลาร์ เม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะฮิโมโกลบินอีเท่ากับ 1.74 (0.94-2.53) นาโนโมลาร์ พาหะเบต้าธาลัสซีเมียเท่ากับ 1.20 (1.06-1.33) นาโนโมลาร์ พาหะแอลฟาธาลัสซีเมียเท่ากับ 1.19 (1.10-1.28) นาโนโมลาร์ และพาหะฮิโมโกลบินซีเอสเท่ากับ 0.45 (0.30-0.48) นาโนโมลาร์

ค่าความเข้มข้นของยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินิน [มาตรฐาน (ช่วงความคลาดเคลื่อน 95 เปอร์เซ็นต์)] ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ K1 ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) เท่ากับ 2.45 (1.65-3.40) นาโนโมลาร์ โดยผล IC_{50} ในเชื้อมาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงปกติเท่ากับ 2.74 (2.41-4.09) นาโนโมลาร์ เม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะฮิโมโกลบินอีเท่ากับ 2.71 (1.34-4.66) นาโนโมลาร์ พาหะเบต้าธาลัสซีเมียเท่ากับ 3.08 (1.65-4.51) นาโนโมลาร์ พาหะแอลฟาธาลัสซีเมียเท่ากับ 1.84 (1.61-2.06) นาโนโมลาร์ และพาหะฮิโมโกลบินซีเอสเท่ากับ 0.76 (0.55-1.21) นาโนโมลาร์

ค่าความเข้มข้นของยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินิน [มาตรฐาน (ช่วงความคลาดเคลื่อน 95 เปอร์เซ็นต์)] ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ K1 ได้ 90 เปอร์เซ็นต์ (IC_{90}) เท่ากับ 3.67 (2.91-7.24) นาโนโมลาร์ โดยผล IC_{90} ในเชื้อมาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงปกติเท่ากับ 4.03 (3.21-18.08) นาโนโมลาร์ เม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะฮิโมโกลบินอีเท่ากับ 4.65 (2.41-7.80) นาโนโมลาร์ พาหะเบต้าธาลัสซีเมียเท่ากับ 9.24 (2.57-15.91) นาโนโมลาร์ พาหะแอลฟาธาลัสซีเมียเท่ากับ 2.66 (1.96-3.35) นาโนโมลาร์ และพาหะฮิโมโกลบินซีเอสเท่ากับ 1.23 (1.03-3.27) นาโนโมลาร์

ความเข้มข้นของยาไพเพอราควิน [มาตรฐาน (ช่วงความคลาดเคลื่อน 95 เปอร์เซ็นต์)] ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ K1 ได้ 10 เปอร์เซ็นต์ (IC_{10}) เท่ากับ 31.5 (24.3-36.4) นาโนโมลาร์ โดยผล IC_{10} ในเชื้อมาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงปกติเท่ากับ 31.0 (24.3-45.1) นาโนโมลาร์ เม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะฮิโมโกลบินอีเท่ากับ 30.0 (13.7-43.2) นาโนโมลาร์ พาหะเบต้าธาลัสซีเมียเท่ากับ 42.2 (36.4-48.0) นาโนโมลาร์ พาหะแอลฟาธาลัสซีเมียเท่ากับ 22.5 (7.6-37.4) นาโนโมลาร์ และพาหะฮิโมโกลบินซีเอสเท่ากับ 18.4 (7.2-79.1) นาโนโมลาร์

ค่าความเข้มข้นของไฟเพอรากวิน [มัทธฐาน (ช่วงความคลาดเคลื่อน 95เปอร์เซ็นต์)] ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ K1 ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) เท่ากับ 62.3 (50.2-68.5) นาโนโมลาร์ โดยผล IC_{50} ในเชื้อมาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงปกติเท่ากับ 63.1 (50.5-78.9) นาโนโมลาร์ เม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะฮิโมโกลบินอีเท่ากับ 56.6 (38.2-94.0) นาโนโมลาร์ พาหะเบต้าธาลัสซีเมียเท่ากับ 77.6 (67.8-87.5) นาโนโมลาร์ พาหะแอลฟาธาลัสซีเมียเท่ากับ 59.3 (50.2-68.5) นาโนโมลาร์ และพาหะฮิโมโกลบินซีเอสเท่ากับ 30.3 (20.2-153.9) นาโนโมลาร์

ค่าความเข้มข้นของยาไฟเพอรากวิน [มัทธฐาน (ช่วงความคลาดเคลื่อน 95 เปอร์เซ็นต์)] ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ K1 ได้ 90 เปอร์เซ็นต์ (IC_{90}) เท่ากับ 127.7 (107.3-155.3) นาโนโมลาร์ โดยผล IC_{90} ในเชื้อมาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงปกติเท่ากับ 126.9 (107.0-155.3) นาโนโมลาร์ เม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะฮิโมโกลบินอีเท่ากับ 129.8 (56.6-242.6) นาโนโมลาร์ พาหะเบต้าธาลัสซีเมียเท่ากับ 144.6 (129.7-159.5) นาโนโมลาร์ พาหะแอลฟาธาลัสซีเมียเท่ากับ 168.8 (125.4-212.3) นาโนโมลาร์ และพาหะฮิโมโกลบินซีเอสเท่ากับ 56.7 (50.0-299.5) นาโนโมลาร์

ตารางที่ 4.2 ความเข้มข้นของยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ มาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินชนิดต่างๆ เท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ (IC₁₀) โดยแสดงข้อมูล เป็นค่ามัธยฐาน (ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์)

ความหลากหลายของ ฮีโมโกลบิน	เชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ที่ไวต่อยาคลอโรควิน (3D7)		เชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาคลอโรควิน (K1)	
	ยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินิน (นาโนโมลาร์)	ยาไพเพอราควิน (นาโนโมลาร์)	ยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินิน (นาโนโมลาร์)	ยาไพเพอราควิน (นาโนโมลาร์)
ตัวอย่างทั้งหมด	2.04 (1.36-2.62)	20.6 (16.2-23.3)	1.50 (1.10-1.76)	31.5 (24.3-36.4)
ฮีโมโกลบินปกติ	2.44 (1.07-3.47)	21.5 (7.6-31.0)	1.64 (1.20-1.93)	31.0 (24.3-45.1)
พาหะฮีโมโกลบินอี	2.23 (1.52-2.82)	17.9 (11.4-23.3)	1.74 (0.94-2.53)	30.0 (13.7-43.2)
พาหะเบต้าธาลัสซีเมีย	1.05 (0.95-1.16)	17.3 (16.7-17.9)	1.20 (1.06-1.33)	42.2 (36.4-48.0)
พาหะแอลฟาธาลัสซีเมีย	1.41 (1.30-1.52)	28.4 (27.8-29.1)	1.19 (1.10-1.28)	22.5 (7.6-37.4)
พาหะฮีโมโกลบินซีเอส	1.38 (0.51-2.04)	22.5 (22.5-22.8)	0.45 (0.30-0.48)	18.4 (7.2-79.1)

ตารางที่ 4.3 ความเข้มข้นของยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ มาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินชนิดต่างๆ เท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC₅₀) โดยแสดงข้อมูล เป็นค่ามัธยฐาน (ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์)

ความหลากหลายของ	เชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ที่ไวต่อยาคโลโรควิน (3D7)		เชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาคโลโรควิน (K1)	
	ยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินิน (นาโนโมลาร์)	ยาไพเพอราควิน (นาโนโมลาร์)	ยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินิน (นาโนโมลาร์)	ยาไพเพอราควิน (นาโนโมลาร์)
ตัวอย่างทั้งหมด	3.42 (2.69-4.90)	35.9 (28.8-43.2)	2.45 (1.65-3.40)	62.3 (50.2-68.5)
อีโมโกลบินปกติ	4.22 (2.69-6.31)	41.0 (28.4-54.1)	2.74 (2.41-4.09)	63.1 (50.5-78.9)
พาหะอีโมโกลบินอี	3.79 (2.87-5.40)	32.8 (20.5-39.0)	2.71 (1.34-4.66)	56.6 (38.2-94.0)
พาหะเบต้าธาลัสซีเมีย	1.80 (1.54-2.06)	28.2 (24.5-31.9)	3.08 (1.65-4.51)	77.6 (67.8-87.5)
พาหะแอลฟาธาลัสซีเมีย	2.79 (2.16-3.42)	57.4 (53.1-61.8)	1.84 (1.61-2.06)	59.3 (50.2-68.5)
พาหะอีโมโกลบินซีเอส	2.32 (1.47-3.04)	32.2 (32.1-32.6)	0.76 (0.55-1.21)	30.3 (20.2-153.9)

ตารางที่ 4.4 ความเข้มข้นของยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงที่มีอีโมโกลบินชนิดต่างๆ เท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ (IC₉₀) โดยแสดงข้อมูลเป็นค่ามัธยฐาน (ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์)

ความหลากหลายของ	เชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ที่ไวต่อยาคโลโรควิน (3D7)		เชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาคโลโรควิน (K1)	

อีโมโกลบิน	ยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินิน (นาโนโมลาร์)	ยาไพเพอราควิน (นาโนโมลาร์)	ยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินิน (นาโนโมลาร์)	ยาไพเพอราควิน (นาโนโมลาร์)
ตัวอย่างทั้งหมด	6.86 (4.66-8.76)	57.3 (46.0-99.4)	3.67 (2.91-7.24)	127.7 (107.3-155.3)
อีโมโกลบินปกติ	7.78 (4.97-15.92)	86.8 (57.3-155.8)	4.03 (3.21-18.08)	126.9 (107.0-155.3)
พาหะอีโมโกลบินอี	8.65 (5.02-10.28)	49.7 (29.9-99.4)	4.65 (2.41-7.80)	129.8 (56.6-242.6)
พาหะเบต้าธาลัสซีเมีย	3.09 (2.50-3.68)	46.4 (36.0-56.9)	9.24 (2.57-15.91)	144.6 (129.7-159.5)
พาหะแอลฟาธาลัสซีเมีย	5.88 (3.67-8.09)	119.5 (102.8-136.2)	2.66 (1.96-3.35)	168.8 (125.4-212.3)
พาหะอีโมโกลบินซีเอส	4.22 (3.90-4.52)	46.0 (45.9-46.6)	1.23 (1.03-3.27)	56.7 (50.0-299.5)

4.5.2 ผลการทดสอบความไวของเชื้อมาลาเรียต่อยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินิน (DHA) และไพเพอราควิน (PPQ) แบบยาผสม (combination drug)

การทดสอบความไวของเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ที่ไวต่อยาคลอโรควิน (3D7) และสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาคลอโรควิน (K1) ต่อยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินเมื่อใช้ร่วมกับไพเพอราควิน ในอัตราส่วนของยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินิน:ยาไพเพอราควินเท่ากับเป็น 0:10, 3:7, 5:5, 7:3 และ 10:0 โดยความเข้มข้นสูงสุดของยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและยาไพเพอราควินเท่ากับ 20 และ 300 นาโนโมลาร์ตามลำดับ ปฏิกริยาระหว่างยาประเมินจากค่าเฉลี่ยของ $\sum$ Fraction IC_{50} (FIC_{50}) และลักษณะของกราฟ Isobologram (รูปที่ 4.4)

ผลปฏิกิริยาระหว่างยาของยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและยาไพเพอราควินเมื่อใช้ร่วมกันต้านเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม

● มาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ 3D7 ที่ติดในเม็ดเลือดแดงปกติ

การศึกษาปฏิกิริยาระหว่างยาของไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินในเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ 3D7 ในเม็ดเลือดแดงปกติ จำนวน 10 ตัวอย่าง ที่ทำซ้ำตัวอย่างละ 3 ครั้ง พบว่าผลรวมของ fraction inhibitory concentration 50% (ΣFIC_{50}) [ค่ามัธยฐาน (ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์)] เท่ากับ 1.051 (1.000-1.125) และมี isobologram อยู่ในแนวเส้น additive ซึ่งแสดงว่ายาทั้งสองชนิดนี้ไม่มีปฏิกิริยาต่อกัน (no interaction) เมื่อทดสอบในเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ 3D7 ที่ติดในเม็ดเลือดแดงปกติ

● มาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ 3D7 ที่ติดในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินอี

การศึกษาปฏิกิริยาระหว่างยาของไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินในเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ 3D7 ในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินอี จำนวน 10 ตัวอย่าง ที่ทำซ้ำตัวอย่างละ 3 ครั้ง พบว่าผลรวมของ fraction inhibitory concentration 50% (ΣFIC_{50}) [ค่ามัธยฐาน (ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์)] เท่ากับ 1.106 (1.000-1.464) และมี isobologram อยู่เหนือแนวเส้น additive ซึ่งแสดงว่ายาทั้งสองชนิดนี้มีการต้านฤทธิ์ต่อกัน (antagonism) เมื่อทดสอบในเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ 3D7 ที่ติดในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินอี

● มาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ 3D7 ที่ติดในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะเบต้าธาลัสซีเมีย

การศึกษาปฏิกิริยาระหว่างยาของไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินในเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ 3D7 ในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะเบต้าธาลัสซีเมียจำนวน 2 ตัวอย่าง ที่ทำซ้ำตัวอย่างละ 3 ครั้ง พบว่าผลรวมของ fraction inhibitory concentration 50% (ΣFIC_{50}) [ค่ามัธยฐาน (ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์)] เท่ากับ 1.000 (0.996-1.402) และมีพิกัดใน isobologram ส่วนใหญ่อยู่เหนือแนวเส้น additive ซึ่งแสดงว่ายาทั้งสองชนิดนี้มีการต้านฤทธิ์ต่อกัน (antagonism) เมื่อทดสอบในเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ 3D7 ที่ติดในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะเบต้าธาลัสซีเมีย

● มาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ 3D7 ที่ติดในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะแอลฟาธาลัสซีเมีย

การศึกษาปฏิกิริยาระหว่างยาของไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินในเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ 3D7 ในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะแอลฟาธาลัสซีเมียจำนวน 2 ตัวอย่าง ที่ทำซ้ำตัวอย่างละ 3 ครั้ง พบว่าผลรวมของ fraction inhibitory concentration 50% (ΣFIC_{50}) [ค่ามัธยฐาน

(ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์)] เท่ากับ 1.000 (0.889-1.184) และมีพิกัดใน isobologram ส่วนใหญ่อยู่ในแนวเส้น additive ซึ่งแสดงว่ายาทั้งสองชนิดนี้ไม่มีปฏิกิริยาต่อกัน (no interaction) เมื่อทดสอบในเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ 3D7 ที่ติดในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะแอลฟาธาลัสซีเมีย

- **มาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ 3D7 ที่ติดในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินซีเอส**

การศึกษาปฏิกิริยาระหว่างยาของไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินในเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ 3D7 ในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินซีเอสจำนวน 1 ตัวอย่าง ที่ทำซ้ำ 3 ครั้ง พบว่าผลรวมของ fraction inhibitory concentration 50% ($\sum \text{FIC}_{50}$) [ค่ามัธยฐาน (ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์)] เท่ากับ 1.000 (0.956-1.642) และมีพิกัดใน isobologram ส่วนใหญ่อยู่เหนือเส้น additive ซึ่งแสดงว่ายาทั้งสองชนิดนี้มีการต้านฤทธิ์ต่อกัน (antagonism) เมื่อทดสอบในเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ 3D7 ที่ติดในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินซีเอส

- **มาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ K1 ที่ติดในเม็ดเลือดแดงปกติ**

การศึกษาปฏิกิริยาระหว่างยาของไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินในเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ K1 ในเม็ดเลือดแดงปกติ จำนวน 10 ตัวอย่าง ที่ทำซ้ำตัวอย่างละ 3 ครั้ง พบว่าผลรวมของ fraction inhibitory concentration 50% ($\sum \text{FIC}_{50}$) [ค่ามัธยฐาน (ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์)] เท่ากับ 1.002 (1.000-1.078) และมี isobologram อยู่ในแนวเส้น additive ซึ่งแสดงว่ายาทั้งสองชนิดนี้ไม่มีปฏิกิริยาต่อกัน (no interaction) เมื่อทดสอบในเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ K1 ที่ติดในเม็ดเลือดแดงปกติ

- **มาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ K1 ที่ติดในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินอี**

การศึกษาปฏิกิริยาระหว่างยาของไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินในเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ K1 ในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินอี จำนวน 10 ตัวอย่าง ที่ทำซ้ำตัวอย่างละ 3 ครั้ง พบว่าผลรวมของ fraction inhibitory concentration 50% ($\sum \text{FIC}_{50}$) [ค่ามัธยฐาน (ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์)] เท่ากับ 1.268 (1.000-1.438) และมี isobologram อยู่เหนือแนวเส้น additive ซึ่งแสดงว่ายาทั้งสองชนิดนี้มีการต้านฤทธิ์ต่อกัน (antagonism) เมื่อทดสอบในเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ K1 ที่ติดในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินอี

- **มาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ K1 ที่ติดในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะเบต้าธาลัสซีเมีย**

การศึกษาปฏิกิริยาระหว่างยาของไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินในเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ K1 ในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะเบต้าธาลัสซีเมียจำนวน 2 ตัวอย่าง ที่ทำซ้ำตัวอย่างละ 3 ครั้ง พบว่าผลรวมของ fraction inhibitory concentration 50% (ΣFIC_{50}) [ค่ามัธยฐาน (ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์)] เท่ากับ 1.252 (1.000-1.428) และมี isobologram อยู่เหนือแนวเส้น additive ซึ่งแสดงว่ายาทั้งสองชนิดนี้มีการต้านฤทธิ์ต่อกัน (antagonism) เมื่อทดสอบในเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ K1 ที่ติดในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะเบต้าธาลัสซีเมีย

- **มาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ K1 ที่ติดในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะแอลฟาธาลัสซีเมีย**

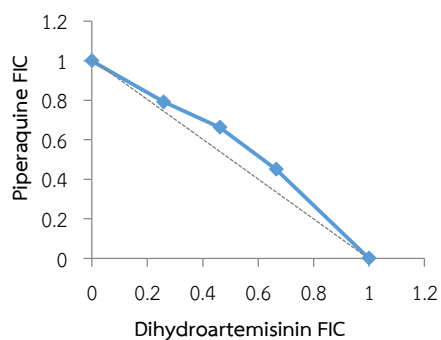
การศึกษาปฏิกิริยาระหว่างยาของไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินในเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ K1 ในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะแอลฟาธาลัสซีเมียจำนวน 2 ตัวอย่าง ที่ทำซ้ำตัวอย่างละ 3 ครั้ง พบว่าผลรวมของ fraction inhibitory concentration 50% (ΣFIC_{50}) [ค่ามัธยฐาน (ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์)] เท่ากับ 0.883 (0.662-1.000) และมี isobologram อยู่ใต้เส้น additive ซึ่งแสดงว่ายาทั้งสองชนิดนี้เสริมฤทธิ์กัน (synergism) เมื่อทดสอบในเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ K1 ที่ติดในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะแอลฟาธาลัสซีเมีย

- **มาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ K1 ที่ติดในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินซีเอส**

การศึกษาปฏิกิริยาระหว่างยาของไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินในเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ K1 ในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินซีเอสจำนวน 1 ตัวอย่าง ที่ทำซ้ำ 3 ครั้ง พบว่าผลรวมของ fraction inhibitory concentration 50% (ΣFIC_{50}) [ค่ามัธยฐาน (ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์)] เท่ากับ 1.000 (0.942-1.296) และมี isobologram อยู่ในแนวเส้น additive ซึ่งแสดงว่ายาทั้งสองชนิดนี้ไม่มีปฏิกิริยาต่อกัน (no interaction) เมื่อทดสอบในเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ K1 ที่ติดในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินซีเอส

อีโมโกลบินปกติ

เชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ที่ไวต่อยาคลอโรควิน
(3D7)

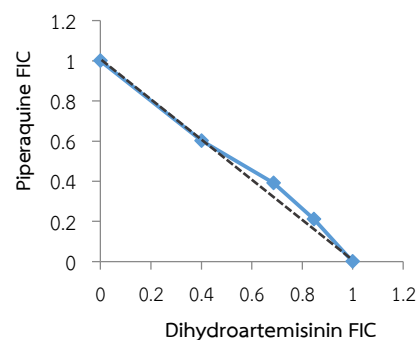


$$\sum FIC = 1.051 (1.000-1.125)$$

Interaction: no interaction

(ไม่มีปฏิกิริยาต่อกัน)

เชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาคลอโรควิน
(K1)

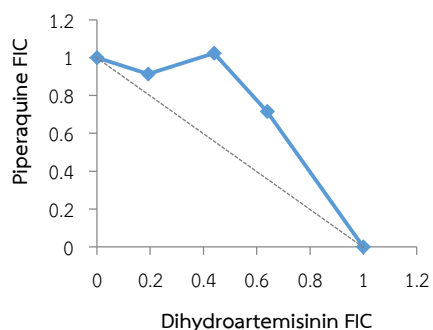


$$\sum FIC = 1.002 (1.000-1.078)$$

Interaction: no interaction

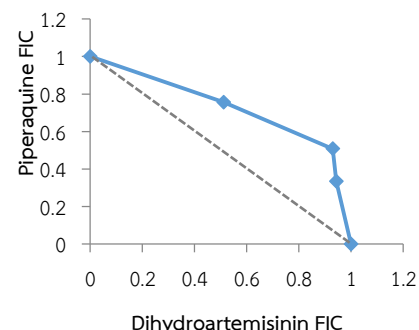
(ไม่มีปฏิกิริยาต่อกัน)

พาหะอีโมโกลบินชนิดอี



$$\sum FIC = 1.106 (1.000-1.464)$$

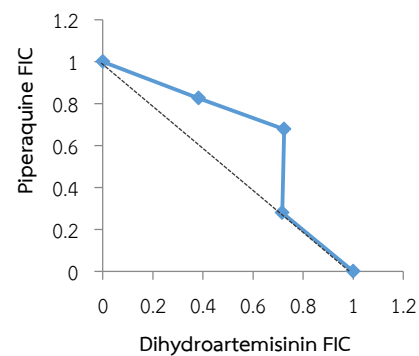
Interaction: antagonism (ต้านฤทธิ์)



$$\sum FIC = 1.268 (1.000-1.438)$$

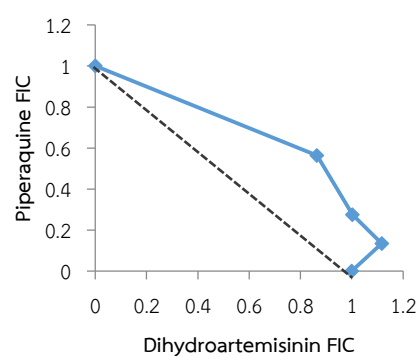
Interaction: antagonism (ต้านฤทธิ์)

พาหะเบต้าธาลัสซีเมีย



$$\sum FIC = 1.000 (0.996-1.402)$$

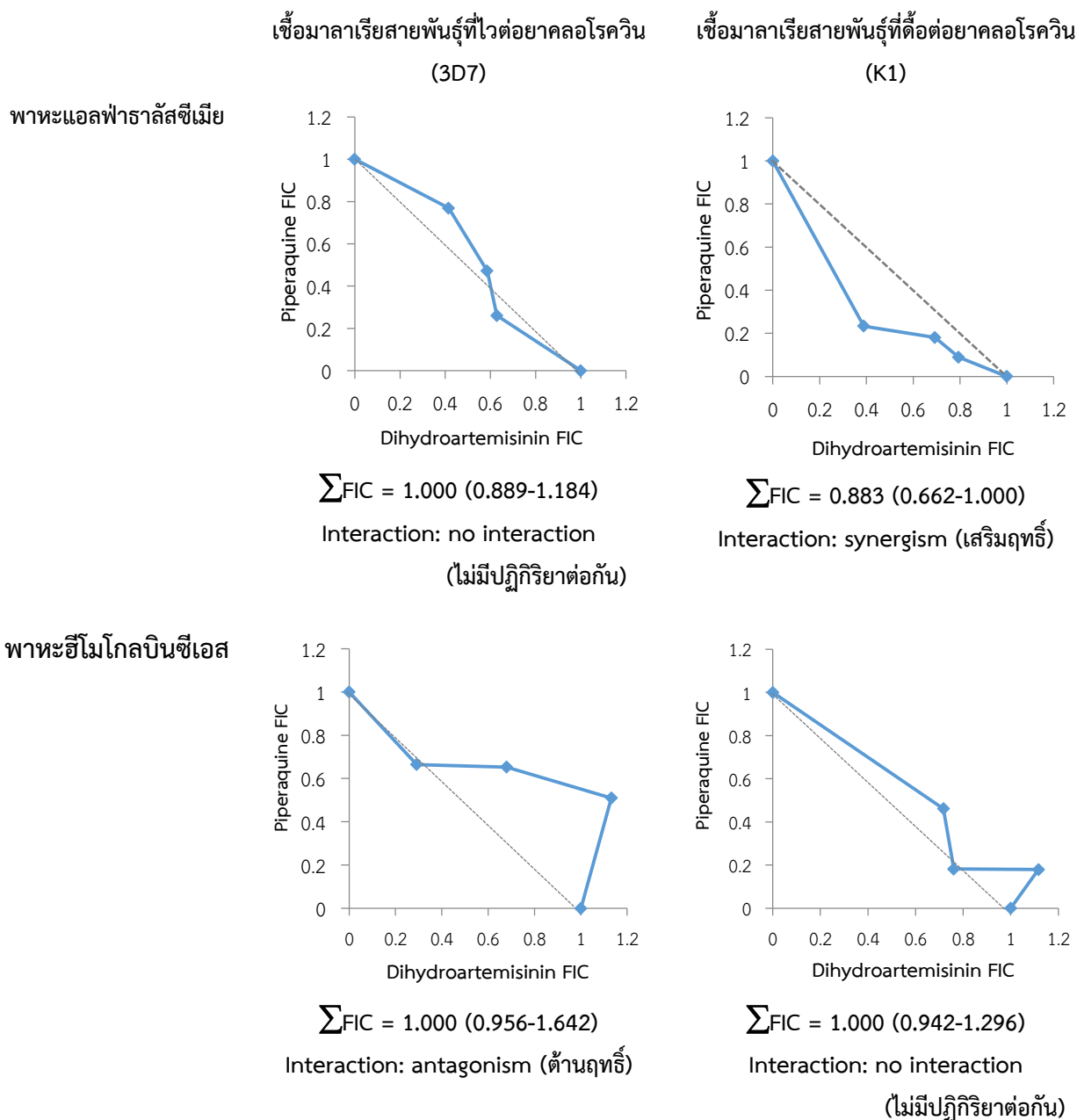
Interaction: antagonism (ต้านฤทธิ์)



$$\sum FIC = 1.252 (1.000-1.428)$$

Interaction: antagonism (ต้านฤทธิ์)

รูปที่ 4.4 (ก.) Isobologram แสดงปฏิกิริยาระหว่างยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินต่อการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียชนิดพลาสมาสายพันธุ์ 3D7 และ K1 ในเม็ดเลือดที่มีฮีโมโกลบินปกติ พาหะฮีโมโกลบินอีและพาหะเบต้าธาลัสซีเมีย



รูปที่ 4.4 (ข.) Isobologram แสดงปฏิกิริยาระหว่างยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินต่อการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียชนิดพลาสมาสายพันธุ์ 3D7 และ K1 ในเม็ดเลือดที่มีฮีโมโกลบินที่เป็นพาหะแอลฟาธาลัสซีเมียและพาหะฮีโมโกลบินซีเอส

4.4 ผลของยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินต่อการทำงานของโปรตีน phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) จากการวัดปริมาณไขมัน phosphatidylinositol 3-Phosphate (PI(3)P) ของเชื้อมาลาเรีย

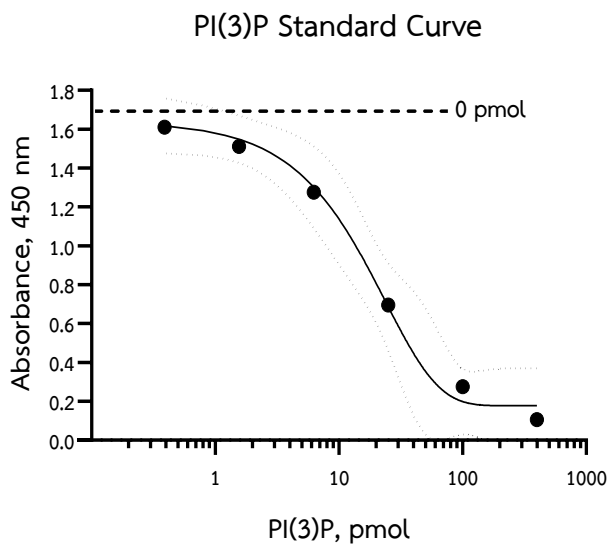
ปริมาณไขมัน PI(3)P ของเชื้อมาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดชนิดต่างๆ วัดได้จากกราฟมาตรฐานที่สร้างระหว่างตัวอย่างที่มีปริมาณไขมัน PI(3)P เข้มข้นระหว่าง 0-400 พิโคโมล และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร (รูปที่ 4.5) การแสดงออกของโปรตีนคำนวณจากปริมาณโปรตีนของตัวอย่างที่สัมผัสกับยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินหรือไพเพอราควินเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่สัมผัสกับยา (control samples)

การแสดงออกของไขมัน PI(3)P ในเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ 3D7 (ไวต่อยาคลอโรควิน) ที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงชนิดต่างๆ ระหว่างตัวอย่างที่สัมผัสยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่สัมผัสยา [มัธยฐาน (ช่วงความคลาดเคลื่อน 95 เปอร์เซ็นต์)] พบว่า การแสดงออกของไขมัน PI(3)P ของเชื้อมาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงต่างๆ ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) โดยเชื้อมาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงปกติมีการแสดงออกของไขมัน PI(3)P เพิ่มขึ้น 1.17 (1.00-3.32) เท่า เชื้อมาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะฮิโมโกลบินอีมีการแสดงออกของไขมัน PI(3)P เพิ่มขึ้น 1.03 (1.00-13.19) เท่า เชื้อมาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะเบต้าธาลัสซีเมียมีการแสดงออกของไขมัน PI(3)P เพิ่มขึ้น 3.87 (2.39-5.35) เท่า เชื้อมาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะแอลฟาธาลัสซีเมียมีการแสดงออกของไขมัน PI(3)P เพิ่มขึ้น 1.05 เท่า โดยมีการแสดงออกระหว่างช่วงที่มีการลดลง 0.36 เท่า ถึงการแสดงออกเพิ่มขึ้น 1.75 เท่า และเชื้อมาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะฮิโมโกลบินซีเอสมีการแสดงออกของไขมัน PI(3)P เพิ่มขึ้น 4.31 เท่า ซึ่งจากการวิเคราะห์โดยใช้เกณฑ์การมีไขมัน PI(3)P เพิ่มขึ้น 2.5 เท่า (Mbengue, et al., 2015) พบตัวอย่างที่มีปริมาณไขมัน PI(3)P เพิ่มขึ้นมากกว่า 2.5 เท่า หลังจากสัมผัสยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินิน จำนวน 5 ตัวอย่าง จากเชื้อที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงปกติ จำนวน 2 ตัวอย่าง คิดเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาณไขมัน PI(3)P เท่ากับ 3.32 และ 3.54 เท่า) เม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะฮิโมโกลบินอี จำนวน 1 ตัวอย่าง คิดเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาณไขมัน PI(3)P เท่ากับ 13.19 พิโคกรัม) หรือพาหะเบต้าธาลัสซีเมีย จำนวน 1 ตัวอย่าง คิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาณไขมัน PI(3)P เท่ากับ 5.35 เท่า) หรือพาหะฮิโมโกลบินซีเอส จำนวน 1 ตัวอย่าง คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาณไขมัน PI(3)P เท่ากับ 4.31 เท่า)

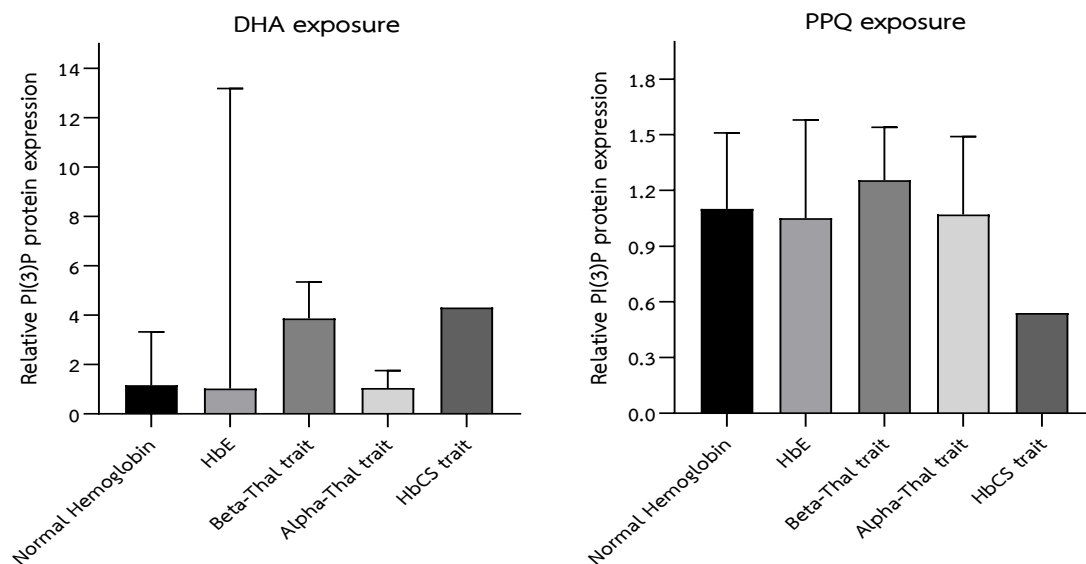
การแสดงออกของไขมัน PI(3)P ในเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ 3D7 (ไวต่อยาคลอโรควิน) ที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงชนิดต่างๆ ระหว่างตัวอย่างที่สัมผัสยาไพเพอราควินเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่สัมผัสยา [มัธยฐาน (ช่วงความคลาดเคลื่อน 95 เปอร์เซ็นต์)] พบว่า การแสดงออกของไขมัน PI(3)P ของเชื้อมาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงต่างๆ ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) โดย เชื้อมาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงปกติมีการแสดงออกของไขมัน PI(3)P เพิ่มขึ้น 1.10 เท่า โดยมีการแสดงออกระหว่างช่วงที่มีการลดลง 0.76 เท่า ถึงการแสดงออกเพิ่มขึ้น 1.51 เท่า เชื้อมาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะฮิโมโกลบินอีมีการแสดงออกของไขมัน PI(3)P เพิ่มขึ้น 1.05 เท่า โดยมีการ

แสดงออกระหว่างช่วงที่มีการลดลง 0.73 เท่า ถึงการแสดงออกเพิ่มขึ้น 1.58 เท่า เชื้อมาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะเบต้าธาลัสซีเมียมีการแสดงออกของไขมัน PI(3)P เพิ่มขึ้น 1.25 เท่า โดยมีการแสดงออกระหว่างช่วงที่มีการลดลง 0.97 เท่า ถึงการแสดงออกเพิ่มขึ้น 1.54 เท่า เชื้อมาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะแอลฟาธาลัสซีเมียมีการแสดงออกของไขมัน PI(3)P เพิ่มขึ้น 1.07 เท่า โดยมีการแสดงออกระหว่างช่วงที่มีการลดลง 0.65 เท่า ถึงการแสดงออกเพิ่มขึ้น 1.49 เท่า และเชื้อมาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินซีเอสมีการแสดงออกของไขมัน PI(3)P ลดลง 0.54 เท่า

(ก.)



(ข.)



รูปที่ 4.5 (ก.) กราฟมาตรฐานของไขมัน PI(3)P ความเข้มข้นระหว่าง 0-400 พิโคโมลและการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร **(ข.)** กราฟการแสดงออกของไขมัน PI(3)P ของเซลล์มาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดชนิดต่างๆ ภายหลังการสัมผัสยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินิน (DHA) หรือไพเพอราควิน (PPQ) เทียบกับตัวอย่างควบคุม (control) [มัธยฐาน (ช่วงความคลาดเคลื่อน 95%)]

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

เชื้อมาลาเรียเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนอยู่ในร่างกายโฮสต์โดยอาศัยอยู่ในเม็ดเลือดแดง ดังนั้นลักษณะของเม็ดเลือดแดงเป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อที่สำคัญ การติดเชื้อเม็ดเลือดแดงของเชื้อมาลาเรียต้องมีการเชื่อมต่อกันระหว่างโปรตีนของเม็ดเลือดแดงและโปรตีนของเชื้อมาลาเรีย การเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียต้องอาศัยโปรตีน globin จากฮีโมโกลบินเพื่อดำรงชีวิต ดังนั้น คุณภาพของฮีโมโกลบินจึงมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย ความหลากหลายของฮีโมโกลบินที่เกิดจากการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโน globin สายแอลฟา และเบต้า ทำให้เชื้อมาลาเรียเจริญเติบโตได้น้อยกว่าเม็ดเลือดแดงที่ฮีโมโกลบินปกติ และสามารถยับยั้งไม่ให้เกิดอาการของโรคมาลาเรียที่รุนแรงได้ (Kuesap, et al., 2015, Taylor and Fairhurst, 2014)

การศึกษานี้ใช้ตัวอย่างเลือดที่มีฮีโมโกลบินปกติ พาหะฮีโมโกลบินอี พาหะเบต้าธาลัสซีเมีย พาหะแอลฟาธาลัสซีเมีย พาหะฮีโมโกลบินซีเอส ซึ่งจากการวิเคราะห์ความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน ความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดง และขนาดของเม็ดเลือดแดงของอาสาสมัครทั้ง 25 คน พบว่ามีความแตกต่างเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับเม็ดเลือดแดงปกติ จึงพบว่าเชื้อมาลาเรียสามารถติดเชื้อเข้าไปเจริญเติบโตในเม็ดเลือดเหล่านี้ได้ แต่อาจจะมีปริมาณลดลง และแสดงให้เห็นว่าความผิดปกติของเม็ดเลือดแดงเหล่านี้ไม่มีผลป้องกันการติดเชื้อมาลาเรีย (Kuesap, et al., 2015, Sugiarto et al., 2018) โดยค่าความสมบูรณ์ของเม็ดเลือดที่สัมพันธ์กับการเจริญเติบโตหรือเพิ่มจำนวนของเชื้อมาลาเรีย ได้แก่ ค่า MCV, MCH และ MCHC (Glushakova et al., 2014) และผลการศึกษานี้พบว่า ปริมาณเชื้อที่เจริญเติบโตและติดเชื้อเม็ดเลือดแดงที่มีความผิดปกติต่างๆ ในช่วงระยะเวลา 3 รอบของการเจริญเติบโตหรือ ประมาณ 144 ชั่วโมง ไม่มีความแตกต่างจากเม็ดเลือดปกติ ซึ่งค่ามัธยฐาน (ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์) ของเชื้อที่เจริญในเม็ดเลือดแดงปกติมีค่าเท่ากับ 1.19 (1.044-2.991) เปอร์เซ็นต์ พาหะฮีโมโกลบินชนิดอีมีค่าเท่ากับ 0.87 (0.868-1.601) เปอร์เซ็นต์ พาหะแอลฟาธาลัสซีเมียมีค่าเท่ากับ 1.67 (0.989-1.917) เปอร์เซ็นต์ พาหะเบต้าธาลัสซีเมียมีค่าเท่ากับ 0.73 (0.637-0.858) เปอร์เซ็นต์ และพาหะฮีโมโกลบินซีเอสมีค่าเท่ากับ 1.01 (0.359-1.202) เปอร์เซ็นต์ เชื้อมาลาเรียที่ติดในเม็ดเลือดแดงส่วนใหญ่มีปริมาณสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 96 ยกเว้นเชื้อมาลาเรียที่ติดในเม็ดเลือดที่ป็นพาหะแอลฟาธาลัสซีเมียที่พบเชื้อปริมาณสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 144 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ พาธักและคณะ ที่พบว่าความผิดปกติของเม็ดเลือดแดงทั้งส่วนของฮีโมโกลบินและโปรตีนที่เยื่อหุ้มเม็ดเลือดแดงมีผลต่อการเพิ่มจำนวนและการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียและเชื้อมาลาเรียจะเพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อยๆ กระทั่งสูงสุดที่ 96 ชั่วโมง จากนั้นจะลดจำนวนลง ซึ่งอาจมีผลมาจากความหนาแน่นที่มากเกินไปจนสารอาหารและอากาศไม่เพียงพอต่อการดำรงชีวิต (Pathak et al., 2018) และจากการศึกษาของ มนัส โคตรปุย และคณะที่วิเคราะห์ความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรีย พบว่า ความเข้มข้นของฮีโมโกลบินจะลดลงเมื่อปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้น (Kotepui et al., 2015) นอกจากนี้ พบว่า เม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะเบต้าธาลัสซีเมียมีความทนต่อการติดเชื้อมาลาเรียได้ดีที่สุด

ความไวของเชื้อมาลาเรียต่อยาไโดไฮโดรอาร์ติมิซินินในเม็ดเลือดลักษณะต่างๆ พบว่า เชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ 3D7 ในเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะเบต้าธาลัสซีเมีย พาหะแอลฟาธาลัสซีเมีย

และพาหะฮีมโกลบินซีเอสมีความไวต่อยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินมากกว่าเชื้อที่ติดในเม็ดเลือดแดงปกติหรือเม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะฮีมโกลบินอี สำหรับความไวของเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ 3D7 ต่อยาไพเพอราควินไม่แตกต่างกันในเชื้อที่ติดในเม็ดเลือดชนิดต่างๆ ยกเว้นเชื้อที่ติดในเม็ดเลือดที่เป็นพาหะเบต้าธาลัสซีเมียที่มีความไวต่อยาไพเพอราควินมากกว่าเชื้อที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดอื่นๆ ส่วนเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ K1 มีเพียงเชื้อที่เจริญในเม็ดเลือดที่เป็นพาหะเบต้าธาลัสซีเมียที่มีความไวของเชื้อต่อยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินลดลง ดังนั้น จากการศึกษาความไวของเชื้อต่อยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินในรูปแบบยาเดี่ยว พบว่า เชื้อมาลาเรียที่เจริญในเม็ดเลือดที่มีฮีมโกลบินผิดปกติจะมีความไวต่อยาทั้งสองชนิดเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจมีผลมาจากเม็ดเลือดแดงดังกล่าวมีสภาวะที่ไม่เหมาะสมในการเจริญเติบโตเมื่อเทียบกับเม็ดเลือดแดงปกติ ทำให้เชื้อไม่แข็งแรงและถูกกำจัดได้ง่าย ดังที่มีการศึกษาในเม็ดเลือดแดงที่เป็นแอลฟาธาลัสซีเมีย หรือฮีมโกลบินเอช (Cheng, et al., 2005) และเม็ดเลือดแดงที่เป็นฮีมโกลบินเอส หรือฮีมโกลบินซี (Cyrklaff, et al., 2016) อย่างไรก็ตาม การมีความไวของยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินลดลงในเชื้อมาลาเรียที่ติดในเม็ดเลือดที่เป็นฮีมโกลบินอี อาจมีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงการกระจายตัวของยาในส่วนประกอบของเซลล์ ตามที่มีการศึกษาพบว่า เม็ดเลือดที่เป็นฮีมโกลบินเอช ฮีมโกลบินเอช/ฮีมโกลบินซีเอส หรือเบต้าธาลัสซีเมีย/ฮีมโกลบินอี จะมีปริมาณยาอาร์ติมิซินินที่เยื่อหุ้มเม็ดเลือดแดงมากกว่าส่วนไซโตซอล (Charoenteeraboon, et al., 2000) นอกจากนี้ การใช้ยา 2 ชนิดร่วมกัน (combination therapy) ซึ่งเป็นแนวทางปฏิบัติตามคำแนะนำ ของ WHO ที่มีวัตถุประสงค์เพื่อ เพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา ลดปริมาณยาที่ใช้ผู้ป่วย ลดความเป็นพิษ และลดโอกาสเกิดเชื้อดื้อยา ทำให้การรักษามาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมในปัจจุบันมีการบริหารยาร้อยละ 2 ชนิดร่วมกัน (Hastings and Hodel, 2014) การศึกษาความไวของเชื้อมาลาเรียที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดลักษณะต่างๆ ต่อยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินในรูปแบบยาผสมพบว่า ไม่เกิดปฏิกิริยาระหว่างยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินในเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมทั้งสายพันธุ์ 3D7 และ K1 ที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงปกติ เช่นเดียวกับการศึกษาที่มีก่อนหน้านี้ (Davis, et al., 2006) ในขณะที่เม็ดเลือดที่เป็นพาหะฮีมโกลบินอีหรือพาหะเบต้าธาลัสซีเมียที่พบการต้านฤทธิ์ระหว่างกันเมื่อทดสอบในเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมทั้งสองสายพันธุ์ และเม็ดเลือดที่เป็นพาหะฮีมโกลบินซีเอสที่พบการต้านฤทธิ์ในเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ 3D7 นอกจากนี้ การศึกษานี้พบการเสริมฤทธิ์ต่อกันของยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินในเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมสายพันธุ์ K1 ที่อยู่ในเม็ดเลือดที่เป็นพาหะแอลฟาธาลัสซีเมีย ซึ่งการแสดงออกของปฏิกิริยาระหว่างยาที่แตกต่างกันในเชื้อที่เจริญในเม็ดเลือดชนิดต่างๆ แสดงให้เห็นถึงการตอบสนองต่อยาที่ต่างกัน (Hastings and Hodel, 2014)

การดำรงชีวิตของเชื้อมาลาเรียจำเป็นต้องใช้ไขมันที่มีหมู่ฟอสเฟต เรียกว่า phospholipid โดยสร้างจากการประกอบส่วนกรดอะมิโนที่มีขั้ว เช่น โคลีน (choline) เอทานอลามีน (ethanolamine) หรือซีรีน (serine) จากซีรัมของโฮสต์ (Ben Mamoun et al., 2010, Dechamps et al., 2010) ในขณะที่เชื้อมาลาเรียสามารถสร้างโปรตีน phosphatidylinositol (PI) ได้เองจากการนำ อินอซิทอล (inositol) จากซีรัมของโฮสต์ หรือจากการสังเคราะห์ (Ramakrishnan, et al., 2013) ซึ่งไขมัน PI จะถูกเติมหมู่ฟอสเฟตที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 โดยเอนไซม์ phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) ได้เป็น phosphatidylinositol-3-phosphate

(PI3P) ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการส่งสัญญาณในการทำงานของไขมัน (lipid signaling) การติดต่อสื่อสารระหว่างเซลล์ (cell signaling) และการขนส่งส่วนประกอบต่างๆ ไปที่เยื่อหุ้มเซลล์ (membrane trafficking) (Balla, 2013) การเพิ่มขึ้นของไขมัน PI(3)P เพียง 2.5 เท่า ซึ่งถือว่าเป็นปริมาณเล็กน้อย แต่มีผลต่อกระบวนการส่งสัญญาณในการทำงานของไขมัน โดยการถูกกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงตามลำดับชั้น จนสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการดีดยาได้ (Mbengue, et al., 2015) จากการศึกษาผลของยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินต่อไขมัน PI(3)P พบตัวอย่างที่มีปริมาณไขมัน PI(3)P เพิ่มขึ้นมากกว่า 2.5 เท่า หลังจากสัมผัสยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินิน จำนวน 5 ตัวอย่าง จากเชื้อที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงปกติ 2 ตัวอย่าง คิดเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาณไขมัน PI(3)P เท่ากับ 3.32 และ 3.54 เท่า) เม็ดเลือดแดงที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินอี 1 ตัวอย่าง คิดเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาณไขมัน PI(3)P เท่ากับ 13.19 เท่า) หรือพาหะเบต้าธาลัสซีเมีย 1 ตัวอย่าง คิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาณไขมัน PI(3)P เท่ากับ 5.35 เท่า) หรือพาหะฮีโมโกลบินซีเอส 1 ตัวอย่าง คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาณไขมัน PI(3)P เท่ากับ 4.31 เท่า) แต่ไม่พบความแตกต่างในการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวเมื่อทดสอบเชื้อที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดชนิดต่างๆ ต่อยาไพเพอราควิน การเพิ่มขึ้นของไขมัน PI(3)P เหนี่ยวนำให้เกิดการดีดยาของเชื้อมาเลียชนิดฟัลซิพารัมระยะที่อาศัยในเม็ดเลือดได้ โดยจากการศึกษาในเชื้อระยะวงแหวนที่เจริญเติบโตอยู่ในช่วง 0-3 ชั่วโมงที่สัมผัสกับยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินความเข้มข้น 4 นาโนโมลาร์เป็นเวลา 6 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม แม้ว่ายาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินสามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดที่ติดเชื่อมมาเลียสายพันธุ์ CS2 แต่การกลายพันธุ์ของยีน *PfKelch13* ตำแหน่ง C580Y ไม่มีผลต่อการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือด (cytoadherence) จึงสามารถอธิบายได้ว่า ยีน *PfKelch13* ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของโปรตีน *PfPI3K* ซึ่งสัมพันธ์ปริมาณไขมัน PI(3)P ที่หมุนเวียนในเชื้อมาเลียและทำให้ปริมาณโปรตีน VAR2CSA ลดลง แต่ไม่เกี่ยวข้องกับกลไกการเพิ่มขึ้นของไขมัน PI(3)P เพื่อทำหน้าที่ขนส่งโปรตีน *PfEMP1* ไปยังเม็ดเลือดแดง และทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง อย่างไรก็ตาม ปริมาณไขมัน PI(3)P ที่เพิ่มขึ้นจากทั้งสองกลไกนี้อาจจะมีผลต่อการลดความเป็นพิษของยาในกลุ่มอาร์ติมิซินินและนำไปสู่การดีดยาของเชื้อมาเลียได้ ดังนั้น ปริมาณของไขมัน PI(3)P ที่เพิ่มขึ้นสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการดีดยาของกลุ่มอาร์ติมิซินิน แม้ว่าไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน (Bhattacharjee, et al., 2018) จากการศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะของยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินต่อโปรตีน *PfPI3K* ที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นในเชื้อที่มีการกลายพันธุ์ *PfKelch1* ซึ่งใช้โปรตีนเป็นเป้าหมายในการกำจัดเชื้อมาเลียได้ ปริมาณไขมัน PI(3)P แสดงถึงการทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ของโปรตีน *PfPI3K* ที่พบมากในระยะวงแหวน ซึ่งเป็นระยะเดียวกับที่พบการดีดยาในตัวอย่างผู้ป่วยจากคลินิกและเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *PfKelch13* ที่ตำแหน่งสำคัญ คือ C580Y และ R539T (Mbengue, et al., 2015) การยับยั้งการทำงานของโปรตีน *PfPI3K* มีผลต่อการขนส่งโปรตีนฮีโมโกลบินไม่ให้เกิดการย่อยที่ food vacuole ทำให้เชื้อขาดแคลนแหล่งโปรตีนและไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ (Vaid, et al., 2010) แต่การวิจัยนี้มีปริมาณเชื้อมาเลียที่ใช้ทดสอบไม่เพียงพอต่อการศึกษาค้นคว้าของยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินต่อปริมาณฮีโมโกลบินจึงไม่มีข้อมูลส่วนนี้ แม้ว่าการดีดต่อยาไพเพอราควินอาจจะไม่มีความสัมพันธ์กับการดีดยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินในส่วนของการกลายพันธุ์ของยีน K13 (C580Y) แต่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของยีน *plasmepsin 2/3* และการกลายพันธุ์ของยีน crt 4 ตำแหน่ง คือ T93S, H97Y, F145I, และ I218F ประกอบ

กับเชื้อมาลาเรียที่พบอยู่ในพื้นที่เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศไทย เป็นเชื้อที่ดื้อต่อยาหลายชนิดจึงมีโอกาพัฒนาให้ดื้อต่อยาไพเพอราควินได้ง่ายขึ้น (van der Pluijm et al., 2019)

จากการศึกษาก่อนหน้าที่แสดงให้เห็นว่าซีรัมของผู้ที่มีฮีโมโกลบินผิดปกติ เช่น ธาลัสซีเมีย และฮีโมโกลบินอี จะมีภาวะเครียดที่เกิดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) สูง จึงอาจมีทำให้เชื้อมาลาเรียที่ติดในเม็ดเลือดเหล่านี้สามารถปรับตัวได้ง่าย การเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *PfKelch13* อาจเป็นผลจากการปรับตัวของเชื้อเมื่อต้องดำรงชีวิตอยู่ในภาวะเครียดที่เกิดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) สูง เชื้อมาลาเรียชนิดฟลชีพาร์มสายพันธุ์ F32-ART5 เป็นเชื้อที่ทนต่อยาอาร์ติมิซินิน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเชื้อเจริญอยู่ในระยะวงแหวนและโทรโฟซอท์ (Menard, et al., 2015) นอกจากนี้ เชื้อมาลาเรียชนิดฟลชีพาร์มสายพันธุ์ 3D7 ที่เจริญเติบโตในภาวะที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนสูงจะทนต่อยาอาร์ติมิซินินและลูมิแฟนทรินได้มากกว่าเชื้อสายพันธุ์เดียวกันที่เจริญเติบโตในภาวะที่มีออกซิเจนปกติ (5%) (Duffy and Avery, 2017) จึงแสดงให้เห็นว่า นอกจากการสัมผัสต่อยาต้านมาลาเรียเป็นประจำแล้ว สภาพที่เชื้อเจริญเติบโตก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่ง ที่ทำให้เชื้อมาลาเรียสามารถปรับตัวให้ทนต่อยาต้านมาลาเรียชนิดใดชนิดหนึ่งได้ (Duffy and Avery, 2018)

การศึกษานี้สรุปได้ว่า ความหลากหลายของฮีโมโกลบิน โดยเฉพาะพาหะฮีโมโกลบินอีและพาหะเบต้าธาลัสซีเมีย มีผลต่อการตอบสนองต่อยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินและไพเพอราควินของเชื้อมาลาเรียชนิดฟลชีพาร์มรวมทั้งการทำงานของเอนไซม์ PI3K จากปริมาณไขมัน PI(3)P ที่ถูกสร้างขึ้นหลังจากการสัมผัสกับยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินิน ซึ่งอาจสัมพันธ์กับการกลายพันธุ์ของยีน *PfKelch1* และนำไปสู่การดื้อยากลุ่มอาร์ติมิซินิน

เอกสารอ้างอิง

- Ariey F, Witkowski B, Amaratunga C, Beghain J, Langlois A, Khim N, Kim S, Duru V, Bouchier C, Ma L, et al. (2014). A Molecular Marker of Artemisinin-Resistant *Plasmodium Falciparum* Malaria. *Nature*, 505(7481).
- Balla T (2013). Phosphoinositides: Tiny Lipids with Giant Impact on Cell Regulation. *Physiol Rev*, 93(3), 1019-137.
- Basco L and Ringwald P (2003). *In Vitro* Activities of Piperaquine and Other 4-Aminoquinolines against Clinical Isolates of *Plasmodium Falciparum* in Cameroon. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(4), 1391-4.
- Bauduer F (2013). Red Cell Polymorphisms and Malaria: An Evolutionary Approach. *Bull. Mém. Soc. Anthropol*, 25, 55-64.
- Bell A (2005). Antimalarial Drug Synergism and Antagonism: Mechanism and Clinical Significance. *FEMS microbiology letters*, 253, 171-84.
- Ben Mamoun C, Prigge ST and Vial H (2010). Targeting the Lipid Metabolic Pathways for the Treatment of Malaria. *Drug Dev Res*, 71(1), 44-55.
- Bennett T, Paguio M, Gligorijevic B, Seudieu C, Kosar A, Davidson E and Roepe P (2004). Novel, Rapid, and Inexpensive Cell-Based Quantification of Antimalarial Drug Efficacy. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(5), 1807-10.
- Bhattacharjee S, Coppens I, Mbengue A, Suresh N, Ghorbal M, Slouka Z, Safeukui I, Tang HY, Speicher DW, Stahelin RV, et al. (2018). Remodeling of the Malaria Parasite and Host Human Red Cell by Vesicle Amplification That Induces Artemisinin Resistance. 131(11), 1234-47.
- Bhumiratana A, Intarapuk A, Sorosjinda-Nunthawarasilp P, Maneekan P and Koyadun S (2013). Border Malaria Associated with Multidrug Resistance on Thailand-Myanmar and Thailand-Cambodia Borders: Transmission Dynamic, Vulnerability, and Surveillance. *Biomed Res Int*, 2013, 363417.
- Bray P, Mungthin M, Hastings I, Biagini G, Saidu D, Lakshmanan V, Johnson D, Hughes R, Stocks P, O'Neill P, et al. (2006). PfCRT and the Trans-Vacuolar Proton Electrochemical Gradient: Regulating the Access of Chloroquine to Ferriprotoporphyrin IX. *Mol Microbiol*, 62(1), 238-51.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2016). "Cdc - Malaria - About Malaria - Biology,"

- Charoenteeraboon J, Kamchonwongpaisan S, Wilairat P, Vattanaviboon P and Yuthavong Y (2000). Inactivation of Artemisinin by Thalassaemic Erythrocytes. *Biochem Pharmacol*, 59(11), 1337-44.
- Cheng M-l, Ho H-y, Tseng H-c, Lee C-H, Shih L-y and Chiu DT-y (2005). Antioxidant Deficit and Enhanced Susceptibility to Oxidative Damage in Individuals with Different Forms of α -Thalassaemia. *British Journal of Haematology*, 128(1), 119-27.
- Corbel V, Nosten F, Thanispong K, Luxemburger C, Kongmee M and Chareonviriyaphap T (2013). Challenges and Prospects for Dengue and Malaria Control in Thailand, Southeast Asia. *Trends Parasitol*, 29(12), 623-33.
- Cyrklaff M, Srismith S, Nyboer B, Burda K, Hoffmann A, Lasitschka F, Adjalley S, Bisseye C, Simporé J, Mueller A-K, et al. (2016). Oxidative Insult Can Induce Malaria-Protective Trait of Sick and Fetal Erythrocytes. *Nature Communications*, 7, 13401.
- Davis T, Hamzah J, Ilett K, Karunajeewa H, Reeder J, Batty K, Hackett S and Barrett P (2006). *In Vitro* Interactions between Piperaquine, Dihydroartemisinin, and Other Conventional and Novel Antimalarial Drugs. *Antimicrob Agents Chemother*, 50(8), 2883-5.
- de Mendonça V, Gonçalves M and Barral-Netto M (2012). The Host Genetic Diversity in Malaria Infection. *J Trop Med*, 2012.
- Dechamps S, Shastri S, Wengelnik K and Vial HJ (2010). Glycerophospholipid Acquisition in Plasmodium - a Puzzling Assembly of Biosynthetic Pathways. *Int J Parasitol*, 40(12), 1347-65.
- Dondorp A, Nosten F, Yi P, Das D, Phyo A, Tarning J, Lwin K, Ariey F, Hanpithakpong W, Lee S, et al. (2009). Artemisinin Resistance in *Plasmodium Falciparum* Malaria. *N Engl J Med*, 361(5), 455-67.
- Duffy S and Avery V (2018). Routine *In Vitro* Culture of Plasmodium Falciparum: Experimental Consequences? *Trends Parasitol*, 34(7), 564-75.
- Duffy S and Avery VM (2017). Plasmodium Falciparum *In Vitro* Continuous Culture Conditions: A Comparison of Parasite Susceptibility and Tolerance to Anti-Malarial Drugs Throughout the Asexual Intra-Erythrocytic Life Cycle. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, 7(3), 295-302.
- Gimode W, Kiboi D, Kimani F, Wamakima H, Burugu M and Muregi F (2015). Fitness Cost of Resistance for Lumefantrine and Piperaquine-Resistant *Plasmodium Berghei* in a Mouse Model. *Malar J*, 14, 38.
- Glushakova S, Balaban A, McQueen PG, Coutinho R, Miller JL, Nossal R, Fairhurst RM and Zimmerberg J (2014). Hemoglobinopathic Erythrocytes Affect the Intraerythrocytic Multiplication of Plasmodium Falciparum *In Vitro*. *The Journal of infectious diseases*, 210(7), 1100-09.

- Gopalakrishnan A and Kumar N (2015). Antimalarial Action of Artesunate Involves DNA Damage Mediated by Reactive Oxygen Species. *Antimicrob Agents Chemother*, 59(1), 317-25.
- Hastings IM and Hodel EM (2014). Pharmacological Considerations in the Design of Anti-Malarial Drug Combination Therapies - Is Matching Half-Lives Enough? *Malaria journal*, 13, 62-62.
- Hedrick P (2011). Population Genetics of Malaria Resistance in Humans. *Heredity (Edinb)*, 107(4), 283-304.
- Hien T and White N (1993). Qinghaosu. *Lancet*, 341(8845), 603-8.
- Hommel M (2008). The Future of Artemisinins: Natural, Synthetic or Recombinant? *J Biol*, 7(38), 1-5.
- Hoppe H, van Schalkwyk D, Wiehart U, Meredith S, Egan J and Weber B (2004). Antimalarial Quinolines and Artemisinin Inhibit Endocytosis in *Plasmodium Falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(7), 2370-8.
- Hutagalung R, Wilairatana P, Looareesuwan S, Brittenham G and Gordeuk V (2000). Influence of Hemoglobin E Trait on the Antimalarial Effect of Artemisinin Derivatives. *J Infect Dis*, 181(4), 1513-6.
- Hyde J (2005). Drug-Resistant Malaria. *Trends Parasitol*, 21(11), 494-98.
- Jansen F (2010). The Pharmaceutical Death-Ride of Dihydroartemisinin. *Malar J*, 9, 212.
- Jomoui W, Fucharoen G, Sanchaisuriya K, Nguyen VH and Fucharoen S (2015). Hemoglobin Constant Spring among Southeast Asian Populations: Haplotypic Heterogeneities and Phylogenetic Analysis. *PLoS One*, 10(12), e0145230.
- Kotepui M, Piwkharn D, PhunPhuech B, Phiwklam N, Chupeerach C and Duangmano S (2015). Effects of Malaria Parasite Density on Blood Cell Parameters. *PLoS One*, 10(3), e0121057-e57.
- Krugliak M, Zhang J and Ginsburg H (2002). Intraerythrocytic *Plasmodium Falciparum* Utilizes Only a Fraction of the Amino Acids Derived from the Digestion of Host Cell Cytosol for the Biosynthesis of Its Proteins. *Mol Biochem Parasitol*, 119(2), 249-56.
- Kuesap J, Chaijaroenkul W, Rungsihirunrat K, Pongjantharasatien K and Na-Bangchang K (2015). Coexistence of Malaria and Thalassemia in Malaria Endemic Areas of Thailand. *Korean J Parasitol*, 53(3), 265-70.
- Leang R, Taylor W, Bouth D, Song L, Tarning J, Char M, Kim S, Witkowski B, Duru V, Domergue A, et al. (2015). Evidence of *Plasmodium Falciparum* Malaria Multidrug Resistance to Artemisinin and Piperaquine in Western Cambodia: Dihydroartemisinin-Piperaquine Open-Label Multicenter Clinical Assessment. *Antimicrob Agents Chemother*, 59(8), 4719-26.
- Lelliott P, McMorran B, Foote S and Burgio G (2015). The Influence of Host Genetics on Erythrocytes and Malaria Infection: Is There Therapeutic Potential? *Malar J*, 14, 289.

- Lin J, Juliano J and Wongsrichanalai C (2010). Drug-Resistant Malaria: The Era of Act. *Curr Infect Dis Rep*, 12(3), 165-73.
- Liu H, Yang H, Tang L, Li X and Huang F (2015). *In Vivo* Monitoring of Dihydroartemisinin-Piperaquine Sensitivity in *Plasmodium Falciparum* Along the China-Myanmar Border of Yunnan Province, China from 2007 to 2013. *Malar J*, 14, 47.
- Lon C, Manning J, Vanachayangkul P, So M, Sea D, Se Y, Gosi P, Lanteri C, Chaorattanakawee S, Sriwichai S, et al. (2014). Efficacy of Two Versus Three-Day Regimens of Dihydroartemisinin-Piperaquine for Uncomplicated Malaria in Military Personnel in Northern Cambodia: An Open-Label Randomized Trial. *PLoS One*, 9(3), e93138.
- López C, Saravia C, Gomez A, Hoebeke J and Patarroyo M (2010). Mechanisms of Genetically-Based Resistance to Malaria. *Genes*, 467(1-2), 1-12.
- Mbengue A, Bhattacharjee S, Pandharkar T, Liu H, Estiu G, Stahelin R, Rizk S, Njimoh D, Ryan Y, Chotivanich K, et al. (2015). A Molecular Mechanism of Artemisinin Resistance in *Plasmodium Falciparum* Malaria. *Nature*, 520(7549), 683-7.
- Menard S, Ben Haddou T, Ramadan AP, Ariey F, Iriart X, Beghain J, Bouchier C, Witkowski B, Berry A, Mercereau-Puijalon O, et al. (2015). Induction of Multidrug Tolerance in *Plasmodium Falciparum* by Extended Artemisinin Pressure. *Emerg Infect Dis*, 21(10), 1733-41.
- Na-Bangchang K and Karbwang J (2009). Current Status of Malaria Chemotherapy and the Role of Pharmacology in Antimalarial Drug Research and Development. *Fundam Clin Pharmacol*, 23(4), 387-409.
- Na-Bangchang K, Ruengweerayut R, Mahamad P, Ruengweerayut K and Chaijaroenkul W (2010). Declining in Efficacy of a Three-Day Combination Regimen of Mefloquine-Artesunate in a Multi-Drug Resistance Area Along the Thai-Myanmar Border. *Malar J*, 9, 273.
- Olliaro P (2001). Mode of Action and Mechanisms of Resistance for Antimalarial Drugs. *Pharmacol Ther*, 89(2), 207-19.
- Pascual A, Madamet M, Bertaux L, Amalvict R, Benoit N, Travers D, Cren J, Taudon N, Rogier C, Parzy D, et al. (2013). *In Vitro* Piperaquine Susceptibility Is Not Associated with the *Plasmodium Falciparum* Chloroquine Resistance Transporter Gene. *Malar J*, 12, 431.
- Pathak V, Colah R and Ghosh K (2018). Effect of Inherited Red Cell Defects on Growth of *Plasmodium Falciparum*: An *in Vitro* Study. *Indian J Med Res*, 147(1), 102-09.
- Petersen I, Eastman R and Lanzer M (2011). Drug-Resistant Malaria: Molecular Mechanisms and Implications for Public Health. *FEBS Lett*, 585(11), 1551-62.
- Poostchi M, Silamut K, Maude RJ, Jaeger S and Thoma G (2018). Image Analysis and Machine Learning for Detecting Malaria. *Transl Res*, 194, 36-55.
- Ramakrishnan S, Serricchio M, Striepen B and Butikofer P (2013). Lipid Synthesis in Protozoan Parasites: A Comparison between Kinetoplastids and Apicomplexans. *Prog Lipid Res*, 52(4), 488-512.

- Ratanasiri T (2007). Prevention and Control of Thalassemia in Obstetric Practice. *Srinagarind Med J*, 22(4), 471-6.
- Rieckmann K, Campbell G, Sax L and Mrema J (1978). Drug Sensitivity of *Plasmodium Falciparum* an in-Vitro Microtechnique. *Lancet*, 311, 22-23.
- Senok A, Nelson E, Li K and Oppenheimer S (1997). Thalassaemia Trait, Red Blood Cell Age and Oxidant Stress: Effects on *Plasmodium Falciparum* Growth and Sensitivity to Artemisinin. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 91(5), 585-9.
- Sugiarto SR, Moore BR, Makani J and Davis TME (2018). Artemisinin Therapy for Malaria in Hemoglobinopathies: A Systematic Review. *Clin Infect Dis*, 66(5), 799-804.
- Tawk L, Chicanne G, Dubremetz J, Richard V, Payraastre B, Vial H, Roy C and Wengelnik K (2010). Phosphatidylinositol 3-Phosphate, an Essential Lipid in Plasmodium, Localizes to the Food Vacuole Membrane and the Apicoplast. *Eukaryot Cell*, 9(10), 1519-30.
- Taylor S, Cerami C and Fairhurst R (2013). Hemoglobinopathies: Slicing the Gordian Knot of *Plasmodium Falciparum* Malaria Pathogenesis. *PLoS Pathog*, 9(5), e1003327.
- Taylor SM and Fairhurst RM (2014). Malaria Parasites and Red Cell Variants: When a House Is Not a Home. *Current opinion in hematology*, 21(3), 193-200.
- Trager W and Jensen JB (1976). Human Malaria Parasites in Continuous Culture. *Science*, 193(4254), 673-5.
- Vaid A, Ranjan R, Smythe W, Hoppe H and Sharma P (2010). Pfpi3k, a Phosphatidylinositol-3 Kinase from *Plasmodium Falciparum*, Is Exported to the Host Erythrocyte and Is Involved in Hemoglobin Trafficking. *Blood*, 115(12), 2500-7.
- van der Pluijm RW, Imwong M, Chau NH, Hoa NT, Thuy-Nhien NT, Thanh NV, Jittamala P, Hanboonkunupakarn B, Chutasmit K, Saelow C, et al. (2019). Determinants of Dihydroartemisinin-Piperaquine Treatment Failure in *Plasmodium Falciparum* Malaria in Cambodia, Thailand, and Vietnam: A Prospective Clinical, Pharmacological, and Genetic Study. *The Lancet Infectious Diseases*.
- Vattanaviboon P, Siritanaratkul N, Ketpirune J, Wilairat P and Yuthavong Y (2002). Membrane Heme as a Host Factor in Reducing Effectiveness of Dihydroartemisinin. *Biochem Pharmacol*, 64(1), 91-8.
- Vento S, Cainelli F and Cesario F (2006). Infections and Thalassaemia. *Lancet Infect Dis*, 6(4), 226-33.
- White N (2004). Antimalarial Drug Resistance. *J Clin Invest*, 113(8), 1084-92.
- WHO (2010a). "Guidelines for the Treatment of Malaria," Geneva: World Health Organization,
- WHO (2001). "The Use of Antimalarial Drugs," WHO, Geneva, Switzerland: WHO,
- WHO (2018). "Who- Home/News/Fact Sheets/Detail/Malaria,"
- WHO (2011). "World Malaria Report : 2011," Switzerland: WHO,
- Winzeler E and Manary M (2014). Drug Resistance Genomics of the Antimalarial Drug Artemisinin. *Genome Biol*, 15(11), 544.

- Wongsrichanalai C, Pickard A, Wernsdorfer W and Meshnick S (2002). Epidemiology of Drug-Resistant Malaria. *Lancet Infect Dis*, 2, 209-18.
- Yuthavong Y, Butthep P, Bunyaratvej A and Fucharoen S (1989). Decreased Sensitivity of Artesunate and Chloroquine of *Plasmodium Falciparum* Infecting Hemoglobin H and/or Hemoglobin Constant Spring Erythrocytes. *J Clin Invest*, 2(83), 502-5.
- กองแก้ว ย้วนบุญหลิม และศรีวิชา ครุฑสูตร (2558). "โรคมาลาเรีย (Malaria),"
- กัญญนันท์ กฤษศิริวัฒนันท์ (2559). *Basic Medical Apicomplexa, Microspora & Ciliophora*. กรุงเทพมหานคร: บริษัท เอเชีย ดิจิตอลการพิมพ์ จำกัด.
- กิตติ ต่อจรัส (2013). Molecular Basis of Thalassemia and Hemoglobin Disorder. *Royal Thai Army Medical Journal*, 66(1), 35-40.
- พีรพรรณ ตันอารีย์ (2014). "มาลาเรีย : โรคที่คนไทยควรทำความรู้จักให้ดี," ผลงานวิจัยสู่สังคม : คณะวิทยาศาสตร์มหิดล.
- ยุทธนา หมั่นดี (2551). บทบาททวนวิชาการ: มาลาเรีย. . วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่, 41(3), 156-66.
- รักษพงศ์ เวียงเจริญ (2556). "มาลาเรีย I (Malaria),"
- รุ่งระวี ทิพย์มนตรี และ นารัตนา ชันธิกุล (2555). ความรู้เรื่องไข้มาลาเรียสำหรับอาสาสมัครสาธารณสุข. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยสำนักโรคติดต่ออันตรายโดยแมลง นนทบุรี.
- สมิง เก้าเจริญ และคณะ (2557). "แนวทางเวชปฏิบัติในการรักษาผู้ป่วยมาลาเรียในประเทศไทย. ,"
- สลิล ศิริอุดมภาส (2557). "ไข้จับสั่น Malaria,"
- สำนักกระบวนวิชา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข (2562). "ระบบรายงานการเฝ้าระวังโรค (Malaria),"

Output ที่ได้จากโครงการ

1. Output จากการวิจัย

- โครงการวิจัยนี้สร้างองค์ความรู้เกี่ยวกับความไวและปฏิกิริยาระหว่างยาในหลอดทดลองของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมที่ติดในเม็ดเลือดที่มีฮีโมโกลบินลักษณะต่างๆ ต่อยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินิน และไพเพอราควิน รวมทั้งการทำงานของเอนไซม์ *PFPI3K* ของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมที่ติดในเม็ดเลือดที่มีฮีโมโกลบินลักษณะต่างๆ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการเฝ้าระวังการเกิดการดื้อยาของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมต่อยาขนานหลัก (ไดไฮโดรอาร์ติมิซินิน-ไพเพอราควิน) ต่อไป
- โครงการวิจัยนี้ได้สร้างโอกาสให้นักวิจัยใหม่ได้รับการส่งเสริมศักยภาพและประสบการณ์ในการทำวิจัย เพื่อให้มีความสามารถในการสร้างผลงานวิจัยที่มีคุณภาพในอนาคตได้

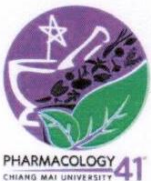
2. Output จากการเผยแพร่ข้อมูลโดยการตีพิมพ์

- ข้อมูลบางส่วน of โครงการวิจัยนี้ หัวข้อ “*In Vitro* Activities of Dihydroartemisinin and Piperaquine Against Plasmodium falciparum-Infected Hemoglobinopathic Red Blood Cells” ถูกนำเสนอในรูปแบบโปสเตอร์ ในงานประชุมวิชาการประจำปีสมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 41 วันที่ 14-15 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2562 ณ โรงแรมเชียงใหม่ แกรนด์วิว แอนด์ คอนเวนชัน เซ็นเตอร์ จังหวัดเชียงใหม่
- ข้อมูลที่ได้จากโครงการวิจัยนี้จะสามารถตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารระดับนานาชาติที่มี impact factor >1 จำนวน 1 เรื่อง

ภาคผนวก

ก. Abstract for poster presentation

3/4/2019 เล่มบทคัดย่อ งานประชุมประจำปีสมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 41 | FlipHTML5






**THE 41ST PHARMACOLOGICAL AND
THERAPEUTIC SOCIETY OF THAILAND MEETING**

ABSTRACT

HERBAL AND COMPLEMENTARY
MEDICINE INNOVATION:
EAST MEETS WEST

ประชุมวิชาการประจำปีสมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย
ครั้งที่ 41
14 – 15 กุมภาพันธ์ 2562
ณ โรงแรมเชียงใหม่ แกรนด์วิว แอนด์ คอนเวนชัน เซ็นเตอร์ จ.เชียงใหม่

PH-002

***In vitro* Activities of Dihydroartemisinin and Piperaquine against *Plasmodium falciparum*-Infected Hemoglobinopathic Red Blood Cells**Phunuch Muhamad^{1,3}, Waraporn Bubpha² and Kesara Na-Bangchang^{3,4,*}**ABSTRACT**

INTRODUCTION: Thalassemia and hemoglobin E are hemoglobinopathies which are commonly found in populations living in malaria endemic areas. Ineffective hemoglobin production leaves over debris or unbound hemoglobin-induced oxidative stress that influences parasite growth and antimalarial drug sensitivity.

OBJECTIVES: The aim of the study was to investigate *in vitro* sensitivity and interaction of the artemisinin-based combination therapy (ACT), *i. e.*, dihydroartemisinin (DHA) and piperazine (PPQ) on *Plasmodium falciparum*-infected hemoglobinopathic red blood cells (RBCs).

METHODS: Twenty-one samples identified as normal (n = 10), hemoglobin E (n = 10), and alpha-thalassemia (n = 1) RBCs were used for cultivation of 3D7 (chloroquine sensitive) and K1 (chloroquine resistant) *P. falciparum* clones. Both parasite clones were exposed to DHA and PPQ at the maximum concentrations of 20 and 300 nM, respectively. Antimalarial activities of each drug and the combination (DHA: PPQ at the ratio of 0: 10, 3: 7, 5: 5, 7: 3, and 10: 0) were determined using SYBR green I assay.

RESULTS: The median IC₅₀ (95% CI) of both drugs were slightly different among *P. falciparum* 3D7 and K1 clones infected in normal, alpha-thalassemic or hemoglobin E RBCs. *P. falciparum* 3D7 clone infected in alpha-thalassemic RBCs were the most sensitive to DHA [median IC₅₀ = 2.01 (1.80-2.66) nM], while the parasite clone infected in hemoglobin E RBCs are the most sensitive to PPQ [28.7 (20.5-37.1)]. No antimalarial interaction between DHA and PPQ was found in both clones of *P. falciparum*-infected normal RBCs. In the *P. falciparum*-infected hemoglobin E RBCs, the antagonistic interaction was found in the 3D7 clone, but not in the K1 clone. In the *P. falciparum*-infected alpha-thalassemic RBCs, the interaction between DHA and PPQ was synergistic in the K1 but not in 3D7 (no interaction) clone.

CONCLUSIONS: These results suggest that hemoglobinopathic RBCs influences antimalarial activities of DHA and PPQ and this may result in variability in antimalarial treatment outcomes.

Keywords: Dihydroartemisinin, piperazine, *Plasmodium falciparum*, hemoglobinopathic RBCs

¹ Drug Discovery and Development Center, Office of Advanced Science and Technology, Thammasat University, Patumthani 12120, Thailand.

² Medical Technology Laboratory, Thammasat University Hospital, Patumthani 12120, Thailand.

³ Center of Excellence in Pharmacology and Molecular Biology of Malaria and Cholangiocarcinoma, Chulabhorn International College of Medicine, Thammasat University, Patumthani 12120, Thailand.

⁴ Graduate Program in Bioclinical Sciences, Chulabhorn International College of Medicine, Thammasat University, Patumthani 12120, Thailand.



In Vitro Activities of Dihydroartemisinin and Piperaquine Against *Plasmodium falciparum*-Infected Hemoglobinopathic Red Blood Cells



Phunuch Muhamad¹, Waraporn Bubpha², Kesara Na-Bangchang^{3,4*}

¹ Drug Discovery and Development Center, Office of Advanced Science and Technology, Thammasat University, Patumthani, Thailand;

e-mail: nurah_ab@yahoo.com

² Medical Technology Laboratory, Thammasat University Hospital, Patumthani, Thailand

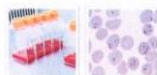
³ Center of Excellence in Pharmacology and Molecular Biology of Malaria and Cholangiocarcinoma, Chulabhorn International College of Medicine, Thammasat University, Patumthani, Thailand

⁴ Graduate Program in Bioclinical Sciences, Chulabhorn International College of Medicine, Thammasat University, Patumthani, Thailand; e-mail: kesaratmu@yahoo.com

INTRODUCTION: Abnormal hemoglobin is a genetic defect commonly found in population living in malaria endemic area. These host gene polymorphisms have been reported to confer resistance to malaria infection. However, hemoglobin quality in heterozygous allele carrier is slightly decreased and might not protect red blood cells (RBCs) from malaria infection. Ineffective hemoglobin production leaves over debris or unbound hemoglobin-induced oxidative stress that influences parasite growth and antimalarial drug sensitivity.

OBJECTIVE: To investigate *in vitro* sensitivity and interaction of the artemisinin-based combination therapy (ACT), *i.e.*, dihydroartemisinin (DHA) and piperaquine (PPQ) on *Plasmodium falciparum*-infected hemoglobinopathic red blood cells (RBCs).

METHODS:



P. falciparum (K1, 3D7) cultivation

A. Parasite growth assessment

- 0.5% ring stage 3D7 parasite cultivation with normal RBCs or hemoglobinopathic RBCs by ratio of 1:10
- Determination of parasite growth at 48, 96 and 144 hours incubation



B.&C. In vitro sensitivity test

- 2% ring stage both 3D7 and K1 parasites
- In vitro sensitivity test of DHA and PPQ performed as single compound and fixed combination ratios: 0:10, 3:7, 5:5, 7:3 and 10:0.
- Maximum concentrations of DHA and PPQ were 20 and 300 nM, respectively

Parasite growth evaluation

- Microscopic observation and SYBR green I DNA staining

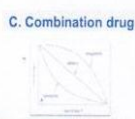
A. Parasite growth in normal or hemoglobinopathic RBC



- Percent parasitemia = (no. of infected RBCs/non-infected RBCs) × 100 by counting of 10 oil power fields
- Fluorescent intensity obtained from microplate reader software and subtract by value of parasite background

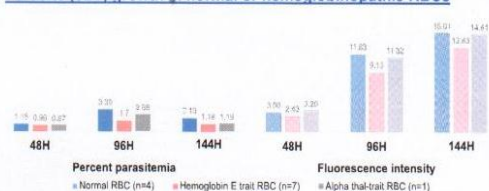


- Antimalarial activity of single drug presents as IC_{50}
- Drug combination interaction assesses from isobologram and average sum fractional IC_{50} (FIC_{50})
- FIC_{50} of compound A is IC_{50} of compound A in combination/ IC_{50} when tested as single compound
- Sum FIC_{50} is FIC_{50} of compound A + FIC_{50} of compound B at the same ratio
- Mean sum FIC_{50} >1 indicates antagonist, =1 indicates no interaction, <1 indicates synergism



RESULTS:

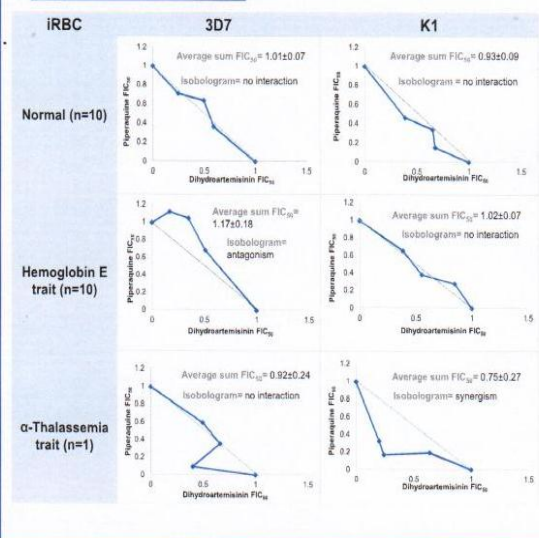
A. Parasite (3D7) growth in normal or hemoglobinopathic RBCs



B. In vitro antimalarial activity of DHA and PPQ of various infected RBCs

Compounds	median IC_{50} (95% CI), nM	Infected Red Blood Cells (iRBCs)		
		Normal (n=10)	Hemoglobin E trait (n=10)	α -Thalassemia trait (n=1)
Dihydroartemisinin (DHA)	3D7	3.38 (2.50-4.78)	4.64 (3.45-5.41)	2.01 (1.80-2.66)
	K1	2.36 (1.43-3.90)	2.57 (1.43-3.95)	2.05 (1.96-2.17)
Piperaquine (PPQ)	3D7	40.9 (26.6-54.1)	28.7 (20.5-37.1)	60.3 (58.6-66.5)
	K1	66.2 (54.2-74.8)	52.5 (38.2-81.6)	50.1 (46.5-53.9)

C. Drug combination interaction



Acknowledgement: The study was supported by Center of Excellence in Pharmacology and Molecular Biology of Malaria and Cholangiocarcinoma of Thammasat University and Thailand Research Fund (TRF) co-funding with Thammasat University for new investigator (Dr. Phunuch Muhamad-TRG5980016) as well as Office of Advanced Science and Technology, Thammasat University for providing of scientific instrument (microplate reader).

CONCLUSIONS: Abnormal hemoglobin effects to invasion as well as growth of malaria parasites in RBCs. Dihydroartemisinin-piperaquine (DHA-PPQ) combination shows potential antimalarial activity against both 3D7 and K1 *P. falciparum* clones. These results suggest that hemoglobinopathic RBCs influences antimalarial activities of DHA and PPQ and this may result in variability in antimalarial treatment outcomes.

๗. Manuscript for publication

Manuscript type: Original article

Article title: Effects of hemoglobin polymorphisms on *in vitro* dihydroartemisinin and piperazine sensitivity and phosphatidylinositol-3- phosphate (PI3P) expression in *Plasmodium falciparum*

Running title: Dihydroartemisinin and piperazine sensitivity and PI3P production Of *Plasmodium falciparum* infected hemoglobinopathic RBCs

Authors: Phunuch Muhamad¹, Aida Samae¹, Waraporn Bubpha², Kesara Na-Bangchang^{1,3,4*}

*Corresponding author

Affiliation: 1. Drug Discovery and Development Center, Office of Advanced Science and Technology, Thammasat University, Patumthani 12120
 2. Medical Technology Laboratory, Thammasat University Hospital, Patumthani 12120
 3. Center of Excellence in Pharmacology and Molecular Biology of Malaria and Cholangiocarcinoma, Chulabhorn International College of Medicine, Thammasat University, Patumthani 12120
 4. Graduate Program in Bioclinical Sciences, Chulabhorn International College of Medicine, Thammasat University, Patumthani 12120

Author contributions: Study concept and design: KN and PM, Acquisition of data: PM and AS, Analysis and interpretation of data: WB and PM, Drafting of manuscript: PM and Critical revision: PM and KN

Acknowledgements

The study was supported by The Thailand Research Fund (TRF) and Thammasat University, research grant for new investigator (grant no.: TRG5980016). Authors would like to thank Thammasat University Hospital to facilitate blood analysis, Faculty of Allied Health Sciences to provide Biosafety Level-2 (BSL-2) Laboratory, Chulabhorn International College

of Medicine, Thammasat University to support camera connected microscope and Office of Advanced Science and Technology, Thammasat University to support analysis instrument (microplate reader). In the last, authors would like to thank all volunteers who did well participation.

Conflict of interest statement: The authors declared that there is no conflict of interest.

Abstract

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 to investigate *in vitro* sensitivity and interaction of *Plasmodium falciparum* infected in normal and abnormal hemoglobinopathic RBCs to dihydroartemisinin (DHA) and piperazine (PPQ) as well as effect on *Pf*PI3K activity via PI(3)P production. Twenty-five blood samples that include normal hemoglobin, hemoglobin E trait, beta thalassemia trait, alpha thalassemia trait and hemoglobin CS trait were cultured with *P. falciparum* strains 3D7 (chloroquine sensitive) and K1 (chloroquine resistance). *In vitro* sensitivity of dihydroartemisinin and piperazine as single drug and combination was investigated 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 result of *in vitro* sensitivity test shown *P. falciparum* strain 3D7 infected in beta thalassemia trait, alpha thalassemia trait and hemoglobin CS trait

RBCs are more sensitive to DHA compared to the parasite infected in hemoglobin E trait and normal hemoglobin RBCs while the parasite 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. 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 DHA on *Pf*PI3K shows increasing of PI(3)P expression upper than reference value (2.5 times) in 2 samples of *P. falciparum* strain 3D7 infected in normal RBC, 1 sample of hemoglobin E trait, 1 sample of beta thalassemia trait and 1 sample of hemoglobin CS trait 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 artemisinin resistance.

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

1. Introduction

Alpha, beta thalassemia and hemoglobin E are hemoglobin polymorphisms found in Southeast Asia together with malaria (Kuesap et al., 2015). Hemoglobin variants are genetic

diversity that can protect host from malaria infection but mild hemoglobin abnormalities in heterozygous carrier still sensitive to malaria infection (Taylor et al., 2013). In addition, incomplete hemoglobin production always left hemoglobin debris and induced oxidative stress which influent to antimalarial response (Hansson et al., 2015). Accumulation of artemisinin at RBCs membrane compartment instead of cytosol found in hemoglobinopathic RBCs such as hemoglobin H, hemoglobin H/hemoglobin CS and beta-thalassemia/hemoglobin E that results in decreasing of antimalarial sensitivity (Charoenteeraboon et al., 2000).

Long time drug exposure without parasite clearance activity can induce resistance mechanism in parasite. Consequently, Southeast Asia countries especially, Thailand is area covering by multidrug resistant malaria. To cope the multidrug resistant malaria, WHO recommended using artemisinin combination therapy, ACT as the first line treatment of uncomplicated falciparum malaria and artesunate-mefloquine has been adopted in Thailand malaria treatment policy since 1994 but 20 years later, treatment efficacy of the combination reduced to 80% after 42 days follow up (Na-Bangchang and Karbwang, 2009, Na-Bangchang et al., 2010). According to the background of mefloquine resistance and poor treatment efficacy, artesunate-mefloquine combination has been replaced by dihydroartemisinin-piperaquine for uncomplicated falciparum malaria in Thailand since 2015. The fix dose combination provided the convenient administration and its efficacy as well as safety were evaluate from several projects conducted in multidrug including artemisinin resistance areas (Denis et al., 2002, Leang et al., 2013, Myint et al., 2007, Naing et al., 2012, WHO, 2008). Furthermore, dihydroartemisinin-piperaquine can be used for prophylaxis propose as there was study showed increasing the dihydroartemisinin-piperaquine dosage and extending the dose schedule to four monthly doses result in a predicted relative reduction in malaria incidence of up to 58% during the high transmission season (Chotsiri et al., 2019).

Dihydroartemisinin is a metabolite of artemisinin, its activity related to free radical production from the oxygen molecules that will react with ferrous ion and become toxic to malaria parasite (Gopalakrishnan and Kumar, 2015). Artemisinins resistant malaria has been reported in Southeast Asia countries by presenting of *P. falciparum* Kelch13 (*PfKelch13*) gene related to protein mutation (Ariey et al., 2014). *PfKelch13* mutation decreases binding affinity to enzyme phosphatidylinositol 3-kinase (*PfPI3K*) results in reduction of PI3K degradation by polyubiquitination process and increased phosphatidylinositol 3-phosphate [PI(3)P]

production. Dihydroartemisinin inhibits *Pf*PI3K activity results in low PI(3)P production (Mbengue et al., 2015).

Piperaquine is a chloroquine derivative that has longer half-life and shows antimalarial activity in both chloroquine sensitive and chloroquine resistance *P. falciparum* (Krugliak et al., 2002). The mode of action of piperaquine has not been confirmed but assumed to be similar to chloroquine as heme polymerization inhibition but different mechanism of resistance to chloroquine (Bray et al., 2006, Krugliak, et al., 2002).

The emergence of artemisinin resistance in this area can induce resistant pressure on piperaquine as well as treatment failure from dihydroartemisinin and piperaquine combination. Therefore this study were to investigate *in vitro* sensitivity and interaction of *Plasmodium falciparum* infected in normal and abnormal hemoglobinopathic RBCs to dihydroartemisinin (DHA) and piperaquine (PPQ) including effect on *Pf*PI3K activity via PI(3)P production.

2. Materials and methods

2.1 Chemical and reagent

RPMI, HEPES, gentamicin and albumax II were supplied by Invitrogen (Carlsbad, CA, United States). Chloroquine, dihydroartemisinin, piperaquine tetraphosphate tetrahydrate SYBR Green I, saponin and Trichloroacetic acid (TCA) were purchased from Sigma Aldrich Inc. (St. Louis, MO, USA). Ethanol, methanol and chloroform was purchased from RCI Labscan Co. Ltd. (Bangkok, Thailand). Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) was purchased from Affymetrix/USB (Santa Clara, CA, USA). PBS tablets was purchased from VWR (Radnor, PA, USA) PI(3)P Mass ELISA was purchased from Echelon Biosciences (Lake City, UT, USA).

2.2 Volunteer and blood samples

A total of 25 subjects was included in the study according to their complete blood count (CBC) and hemoglobin typing data obtain during screening process. After giving informed consent, venous blood (18 ml) was collected in vacuum EDTA tube and used for the following investigation within 2 weeks. The study was approved by ethical committee group 3 project no. 090/2559.

2.3 Parasite cultivation

The *P. falciparum* strains 3D7 (chloroquine sensitive) and K1 (chloroquine resistant) were continuously cultured according to the method of Trager and Jensen (Trager and Jensen, 1976) in complete media containing 0.2% NaHCO₃, 10% serum, 25 mM HEPES pH 7.4, 15 mg/ml gentamicin, 5% RBC and adjust atmosphere by flushing gas containing 5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂ for 30 seconds then incubated at 37 °C. The parasite was maintained at 5% parasitemia and changed media every 48 hours. Ring stage parasite was synchronized by 5% sorbitol.

2.4 Investigation of parasite invasion

Five percent *P. falciparum* strain 3D7 at ring stage was mixed with normal hemoglobin or hemoglobinopathic RBCs by 1:10 to obtain final of 0.5% parasitemia then diluted with complete media to be 1% hematocrit. Distribute 100 µl parasite mixture on 96 well plate and incubate under 5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂ at 37 °C for 48, 96 and 144 hours. The parasite was harvested and made thin film. Parasite density and morphology were examined under 100x microscope.

2.5 Assessment of in vitro sensitivity

P. falciparum at ring stage was cultured with normal hemoglobin or hemoglobinopathic RBCs as ratio 1:20 of infected RBC: tested RBC for at least 48 hours and multiplied to at least 2%. The parasite was prepared to 2% parasitemia and 1% hematocrit for *in vitro* sensitivity test according to methods of Rieckmann and Bennette (Bennett et al., 2004, Rieckmann et al., 1978). Antimalarial drug was prepared as stock solution at 10 mM by 50% ethanol for chloroquine and dihydroartemisinin while 0.5% lactic acid was used for piperazine tetraphosphate tetrahydrate (Basco and Ringwald, 2003). Working solution was prepared with complete media and exposed to 100 µl parasite mixture at final concentration range of 0.16-20 nM for dihydroartemisinin, 2.34-300 nM for piperazine and 20 nM of chloroquine was included to confirm 3D7 and K1 strains. For combination test, the dihydroartemisinin concentration 40 nM and piperazine concentration 600 nM were mixed by ratio dihydroartemisinin: piperazine as 0:10, 3:7, 5:5, 7:3, and 10:0. The testing plate was incubated at 37 °C for 48 hours. Parasite DNA content was stain by SYBR green I diluted in lysis buffer and measure fluorescence intensity by using microplate reader (Verioskan flashTM, Waltham, MA, United StatesThermo, USA) at

exciting and emission wavelength as 485 and 530 nm, respectively (Bennett, et al., 2004).

The experiment was done three times in triplicate each. The IC_{50} values (concentrations that inhibit the parasite growth by 50%) used as indicators of each antimalarial activity were determined from log-dose-response curves using the CalcuSynTM version 1.1 (BioSoft, Cambridge, UK). The drug interaction was evaluated using ΣFIC_{50} by (dihydroartemisinin IC_{50} from each combination ratio/ of dihydroartemisinin IC_{50} as single drug) + (piperaquine IC_{50} from each combination ratio/ of piperaquine IC_{50} as single drug) and interpreted as antagonism if $\Sigma FIC > 1$, no interaction if $\Sigma FIC = 1$ and synergism if $\Sigma FIC < 1$ (Bell, 2005). Furthermore, isobologram plot of combination test can be interpreted as antagonism if graph showed convex or located above additive line, no interaction if graph located long additive line and synergism if graph showed concave or located below additive line (Bell, 2005).

2.6 Determination of phosphatidylinositol 3-phosphate (PI(3)P) production

P. falciparum strain 3D7 was cultured with tested RBCs (normal hemoglobin or hemoglobinopathic RBCs) at least 48 hours and 2% parasitemia. The parasite was prepared to 2% parasitemia in 1% hematocrit. Dihydroartemisinin concentration 4 nM or piperaquine concentration 40 nM in complete media containing 0.5% albumax II were exposed to parasite for 6 (Mbengue, et al., 2015) and 24 hours, respectively. The complete media was use for negative control parallel to drug exposed samples. Parasite was harvested and lysed RBC with 0.1% (w/v) cold saponin. The pellet was washed by 5% Trichloroacetic acid Acid (TCA) in 1 mM EDTA and extract lipid compartment 2 times by shaking incubation with MeOH:CHCl₃ (ratio 2:1) at room temperature for 10 minutes and discarded supernatant. The pellet was further extracted by shaking incubation of MeOH: CHCl₃: 12 M HCl (ratio 80:40:1) at room temperature for 25 minutes and collected supernatant and discarded pellet. The contaminated protein was separated by mixing with CHCl₃ and 0.1 N HCl. Clear solution at bottom (organic phase) was collected then dried under N₂ and kept at -20 °C for PI(3)P measurement. PI(3)P was quantitated according to protocol described in PI(3)P Mass ELISA (K-3300) (Mbengue, et al., 2015). The PI(3)P expression was calculated from ratio of PI(3)P in drug exposed sample/PI(3)P in untreated sample.

2.7 Data analysis

Quantitative data (parasite density, IC_{50} , $\Sigma FICs$ and PI(3)P) presented as median (95% CI) and compared median by using Mann-Whitney U test. Statistical significance level was set at $\alpha = 0.05$ for all tests. Analysis was performed by SPSS version 16.0.

3. Results

3.1 Blood sample analysis

The hemoglobin typing of 25 blood samples can allocate volunteers to 3 groups of which (i) normal hemoglobin 10 people, (ii) beta globin polymorphisms 12 people: 10 people have hemoglobin E trait and 2 people have beta-thalassemia trait and (iii) beta globin polymorphisms 3 people: 2 people have alpha-thalassemia trait and 1 person has hemoglobin CS trait.

Complete blood count analysis (CBC) found indifferent in RBC number of the 3 groups but hemoglobin concentration and mean corpuscular volume (MCV) of volunteers who has normal hemoglobin was higher than others. Median (95% CI) of hemoglobin concentration in normal hemoglobin volunteers was 14.3 (12.2-15.0) g/dl, hemoglobin E trait was 12.6 (10.2-13.6) g/dl, beta-thalassemia trait was 11.2 (11.2-11.3) g/dl, alpha-thalassemia trait was 11.2 (11.1-11.3) g/dl and hemoglobin CS trait was 13.9 g/dl. For size of RBC, the MCV of volunteer who has normal hemoglobin was 85.3 (77.3-87.8) fL that is the biggest than others, MCV of hemoglobin E trait volunteer was (64.7-83.6) fL, beta-thalassemia was 65.4 fL and alpha-thalassemia trait was 68.0 (67.0-69.1) fL but cannot determine in hemoglobin CS trait sample.

However, hematocrit of normal hemoglobin volunteer is similar to hemoglobin CS that was higher than samples of hemoglobin E trait, beta-thalassemia trait and alpha-thalassemia trait. Hematocrit of normal hemoglobin and hemoglobin CS were 43.1 (35.9-45.0)% and 44.6%, respectively whereas the value in hemoglobin

E was 38.2 (32.3-41.2)%, beta-thalassemia was 36.4 (36.1-36.8)% and alpha-thalassemia was 35.4 (34.5-36.3)%.

3.2 Effect of hemoglobinopathies *P. falciparum* invasion

Hemoglobin polymorphisms slightly affected to invasion, growth and multiplication of *P. falciparum* strain 3D7 but parasite density is an additional factor involved in the processes (**Figure 1**). After 48 hours (1 multiplication period) incubation, malaria parasite which was cultured with tested RBCs either normal or hemoglobinopathic RBC can multiply from 0.5% parasitemia at the beginning to 1.04 (0.935-1.460)% [median (95% CI)] for parasite infected in normal hemoglobin RBC while the value in hemoglobin E trait was 0.87 (0.624-1.396)%, beta-thalassemia trait was 0.64 (0.551-0.723)%, alpha-thalassemia trait was 0.99 (0.874-1.105)% and hemoglobin CS was 0.36%.

Increasing of parasite invasion after 96 hours incubation (2 multiplication periods) found in all types of RBCs as percent parasitemia in normal hemoglobin RBCs was 2.99 (2.11-5.397)% and was the most highest compared to others at every periods. The result in hemoglobin E trait was 1.60 (0.575-3.341)%, beta-thalassemia trait was 0.73 (0.483-0.975)%, alpha-thalassemia was 1.67 (0.761-2.576)% and hemoglobin CS was 1.20%.

Decreasing of parasite invasion found in almost type of RBCs after 144 hours (3 multiplication periods) as parasite infected in normal hemoglobin RBC was 1.19 (0.935-4.96)%, hemoglobin E trait was 0.87 (0.626-1.396)%, beta-thalassemia trait was 0.86 (0.483-0.975)% and hemoglobin CS trait was 1.01% whereas percent parasitemia in alpha-thalassemia trait was increased to 1.92 (0.874-2.961)%.

Nevertheless, parasite invasion of all types of RBCs during 3 observation periods [median (95% CI)] is indifferent ($p > 0.05$). Parasitemia of normal hemoglobin RBC was 1.19 (1.044-2.991)%, hemoglobin E trait was 0.87 (0.868-1.601), beta-thalassemia trait was 0.73 (0.637-0.858)%, alpha-thalassemia trait was 1.67 (0.989-1.917)% and hemoglobin CS trait was 1.01 (0.359-1.202)%. Furthermore, parasite morphology examination during the 3 periods revealed hemoglobinopathies were not much impact to parasite growth according to only slower parasite development found in beta and alpha-thalassemia trait RBCs and decreasing of merozoite number was observed in parasite infected in alpha-thalassemia trait **Figure 2**.

3.3 Effect of hemoglobinopathies on dihydroartemisinin and piperazine sensitivity to *P. falciparum*

Single drug

In vitro sensitivity of dihydroartemisinin (DHA) and piperazine (PPQ) in *P. falciparum* strain 3D7 (chloroquine sensitive) and K1 (chloroquine resistance) infected in normal hemoglobin and hemoglobinopathic RBCs revealed indifferent in 25 samples ($p>0.05$). Inhibitory concentration [median (95% CI)] (**Table 1**) was unique by parasite strain, 3D7 parasite was less sensitive to DHA [IC_{50} : 3.42 (2.69-4.90) nM] but more sensitive to PPQ [IC_{50} : 35.9 (28.8-43.2) nM]. In contrast, parasite strain K1 was more sensitive to DHA [IC_{50} : 2.45 (1.65-3.40) nM] but less sensitive to PPQ [IC_{50} : 62.3 (50.2-68.5) nM].

DHA IC_{50} in parasite strain 3D7 infected in normal hemoglobin RBC was 4.22 (2.69-6.31) nM, hemoglobin E trait was 3.79 (2.87-5.40) nM, beta-thalassemia trait was 1.80 (1.54-2.06) nM, alpha-thalassemia trait was 2.79 (2.16-3.42) nM and hemoglobin CS trait was 2.32 (1.47-3.04) nM. The results investigated from parasite strain K1 infected in normal hemoglobin RBC was 2.74 (2.41-4.09) nM, hemoglobin E trait was 2.71 (1.34-4.66) nM, beta-thalassemia trait was 3.08 (1.65-4.51) nM, alpha-thalassemia trait was 1.84 (1.61-2.06) nM and hemoglobin CS trait was 0.76 (0.55-1.21) nM.

PPQ IC_{50} in parasite strain 3D7 infected in normal hemoglobin RBC was 41.0 (28.4-54.1) nM, hemoglobin E trait was 32.8 (20.5-39.0) nM, beta-thalassemia trait was 28.2 (24.5-31.9) nM, alpha-thalassemia trait was 57.4 (53.1-61.8) nM and hemoglobin CS trait was 32.2 (32.1-32.6) nM. The PPQ IC_{50} in parasite strain K1 infected in normal hemoglobin RBC was 63.1 (50.5-78.9) nM, hemoglobin E trait was 56.6 (38.2-94.0) nM, beta-thalassemia trait was 77.6 (67.8-87.5) nM, alpha-thalassemia trait was 59.3 (50.2-68.5) nM and hemoglobin CS trait was 30.3 (20.2-153.9) nM.

Combination drug

Drug interaction between dihydroartemisinin (DHA) and piperazine (PPQ) was evaluated from $\sum$ Fraction IC_{50} (FIC_{50}) [median (95% CI)] and isobologram (**Figure 3**). No drug interaction between DHA and PPQ was observed in *P. falciparum* strains 3D7 and K1 infected in normal hemoglobin RBC by $\sum FIC_{50}$ was 1.051 (1.000-1.125) and 1.002 (1.000-1.078) in 3D7 and K1, respectively. Furthermore, no drug interaction also

found in parasite strain 3D7 infected in alpha-thalassemia trait RBC as $\sum FIC_{50}$ was 1.000 (0.889-1.184) and K1 parasite infected in hemoglobin CS trait by the $\sum FIC_{50}$ was 1.000 (0.942-1.296). The isobologram of the samples was on or close to additive line.

Antagonistic effect has been observed in parasite strains 3D7 and K1 infected in hemoglobin E trait [$\sum FIC_{50}$ in 3D7 and K1: 1.106 (1.000-1.464) and 1.268 (1.000-1.438)] and beta-hemoglobin trait [$\sum FIC_{50}$ in 3D7 and K1: 1.000 (0.996-1.402) and 1.252 (1.000-1.428)]. In addition, the antagonism also found in parasite strain 3D7 infected in hemoglobin CS trait RBC as $\sum FIC_{50}$ was 1.000 (0.956-1.642). The antagonistic effect was interpreted together with isobologram plot and almost data point were located above additive line and tended to illustrate as convex curve.

Synergistic effect was observed in parasite strain K1 infected in alpha-thalassemia trait RBCs by the $\sum FIC_{50}$ was 0.883 (0.662-1.000) and all of data points were below additive line or form as concave curve.

3.4 Effect of hemoglobinopathies on *P. falciparum* PI(3)P expression following dihydroartemisinin and piperaquine exposure

PI(3)P expression in *P. falciparum* strain 3D7 infected in either normal hemoglobin or hemoglobinopathic RBCs after dihydroartemisinin (DHA) and piperaquine (PPQ) exposure was determined and compared with untreated control. In DHA exposure, both decreasing and increasing of PI(3)P expression has been observed but indifferent among all types of RBCs ($p>0.05$) as median (95% CI) of PI(3)P expression in parasite infected in normal hemoglobin RBC was 1.17 (1.00-3.32) times, hemoglobin E trait 1.03 (1.00-13.19) times, beta-thalassemia trait was 3.87 (2.39-5.35) times, alpha-thalassemia was 1.05 (0.36-1.75) times and hemoglobin CS was 4.31 times. Using cut off at 2.5 times PI(3)P expression (Mbengue, et al., 2015) in individual sample found 5 samples have PI(3)P expression upper than the cut off values as 2 samples of normal hemoglobin or 20 percent (PI(3)P expression: 3.32 and 3.54 times), 1 of hemoglobin E trait or 10 percent (PI(3)P expression: 13.19 times), 1 of beta-thalassemia or 50 percent (PI(3)P expression: 5.35 times) and 1 of hemoglobin CS trait or 100 percent (PI(3)P expression: 4.31 times).

In contrast PI(3)P is slightly changed after PPQ exposure for 24 hours by both decreasing and increasing of PI(3)P expression were found but not significant different ($p>0.05$). PI(3)P expression [median (95% CI)] of normal hemoglobin was 1.10 (0.76-1.51) times, hemoglobin E trait was 1.05 (0.73-1.58) times, beta-thalassemia trait was 1.25 (0.97-1.54) times, alpha-thalassemia was 1.07 (0.65-1.49) and hemoglobin CS was 0.54 times

4. Discussion and conclusion

Malaria is an intracellular parasite that has grown and multiplied in host RBC. Consequently, RBC proteins both extracellular and intracellular are factors involved in malaria infection. The infection initiated from the binding between parasite protein of merozoite stage and host RBCs membrane then lived and developed inside RBC by consumption of globin protein degraded from hemoglobin. Abnormality hemoglobin RBCs from defection of alpha or beta chains globin protein production caused poor parasite growth and can protect host from severe malaria (Kuesap, et al., 2015, Taylor and Fairhurst, 2014). The study compared effect of antimalarial response and PI(3)P production in parasite infected in normal hemoglobin RBCs and hemoglobinopathic RBCs. Total of 25 RBC samples taken from volunteers who has normal, hemoglobin E trait, beta-thalassemia trait, alpha-thalassemia trait and hemoglobin CS shown slightly different among their Complete Blood Count (CBC) and can be infected by *P. falciparum* both 3D7 and K1 strains. Parameters related to malaria infection and multiplication included MCV, MCH and MCHC which confers to hemoglobin contents and mild hemoglobin abnormality cannot protect host from malaria infection (Glushakova et al., 2014, Sugiarto et al., 2018). Investigation of parasite infection during 144 hours or 3 multiplication periods found indifferent rate of infection by maximum parasitemia of almost type RBCs presented at 96 hours incubation period but parasite infected in alpha thalassemia trait RBCs showed maximum parasitemia at 144 hours. The finding conform to explanation of Pathak and Kotepui as completion of RBCs both hemoglobin and membrane protein affect to parasite growth and multiplication. The maximum rate of parasite growth usually found at 96 hours and gradually decrease, the situation probably caused by insufficient essential nutrient and suitable air for high parasite density (Kotepui et al., 2015, Pathak et al., 2018).

In addition this study also found that beta-thalassemia trait RBCs was the most resistance from parasite infection.

In vitro sensitivity of *P. falciparum* infected in hemoglobinopathic RBCs to dihydroartemisinin and piperazine revealed parasite strain 3D7 in beta-thalassemia trait, alpha-thalassemia trait and hemoglobin CS trait are the most sensitive to dihydroartemisinin compared to normal or hemoglobin E trait while indifferent for piperazine sensitivity among parasite infected in normal or hemoglobinopathic RBCs except, parasite strain 3D7 infected in beta-thalassemia trait was the most sensitive to piperazine. However, parasite strain K1 infected in beta-thalassemia trait RBCs which the sensitivity to dihydroartemisinin and piperazine was decrease. Inappropriate intracellular RBCs condition such as alpha-thalassemia, hemoglobin H (Cheng et al., 2005), hemoglobin S and hemoglobin C (Cyrklaff et al., 2016) suppressed parasite growth and produce weak parasites that prompt to be eliminate and more sensitive to antimalarial drug. Decreasing of dihydroartemisinin sensitivity in parasite infected in hemoglobin E RBCs may cause from accumulation at RBCs components as reported in previous study that found accumulation of artemisinin at RBCs membrane more than cytosol in hemoglobinopathic RBCs such as hemoglobin H, hemoglobin H/hemoglobin CS and beta-thalassemia/hemoglobin E (Charoenteeraboon, et al., 2000). Combination therapy, at least 2 drugs were administration together, has been recommended by WHO to overcome drug resistance reduce drug quantity then decrease toxicity (Hastings and Hodel, 2014). This study found no interaction between dihydroartemisinin and piperazine in *P. falciparum* strain 3D7 and K1 infected in normal hemoglobin RBCs that same as the report in previous study (Davis et al., 2006). Antagonistic effect was observed in *P. falciparum* strain 3D7 and K1 infected in hemoglobin E trait and beta-thalassemia trait RBCs whereas synergistic effect presented only in parasite strain K1 infected in alpha-thalassemia trait RBCs. Difference of drug interaction of parasite infected in hemoglobinopathic RBCs confers to diversity of antimalarial drug response (Hastings and Hodel, 2014).

Malaria parasites required essential phospholipids for their living. The polar amino acids such as choline, ethanolamine or serine have been imported from host serum through RBCs membrane to form phospholipids (Ben Mamoun et al., 2010, Dechamps et al., 2010) while phosphatidylinositol (PI) has been synthesis within parasite by incorporation of inositol from host serum or de novo production (Ramakrishnan et al.,

2013). The phosphate group has been added to PI at carbon position 3 by enzyme phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) to be phosphatidylinositol-3-phosphate [PI(3)P]. The PI(3)P functions for lipid signaling, cell signaling and membrane protein trafficking (Balla, 2013). Increasing of PI(3)P expression even only 2.5 times which is very small amount can impact to lipid signaling cascade and be able to induce drug resistance (Mbengue, et al., 2015). Using 2.5 times as cut off for PI(3)P expression found increasing of PI(3)P expression in 5 samples of which 2 samples (20 percent) of parasite infected in normal RBCs [PI(3)P: 3.32 and 3.54 times], 1 sample (10 percent) of parasite infected in hemoglobin E trait RBCs [PI(3)P: 13.19 times], 1 sample (50 percent) of parasite infected in beta-thalassemia trait RBCs [PI(3)P: 5.35 times] and 1 sample (100 percent) of parasite infected in hemoglobin CS trait RBCs [PI(3)P: 4.31 times] but none of sample altered PI(3)P expression after piperazine exposure. The study in ring stage parasite after 0-3 hours infection exposed by 4 nM dihydroartemisinin for 6 hours revealed increasing of PI(3)P and induction of dihydroartemisinin resistance in *P. falciparum*. PI(3)P played a role in *PfEMP1* transportation to RBCs membrane and promoted cytoadherence. Dihydroartemisinin can inhibit cytoadherence in *P. falciparum* strain CS2 but did not relate to *PfKelch13* mutation at position C580Y. Increasing of PI(3)P of both pathways may be a part of adaptation to neutralize artemisinin toxicity and caused drug resistance. Therefore, over PI(3)P expression allowed *P. falciparum* to develop resistance to artemisinins even no gene mutation has been observed (Bhattacharjee et al., 2018). Beside of the familiar to frequently exposed antimalarial drug, living under unusual condition can develop tolerance parasite clone and lead to resistance to antimalarial drugs (Duffy and Avery, 2018). *P. falciparum* strain 3D7 living under condition with high oxygen concentration is more tolerance to artemisinin and lumefantrine than the parasite grown under normal condition (Duffy and Avery, 2017). The previous study found elevation of oxidative stress substance in serum collected from hemoglobinopathies people such as thalassemia and hemoglobin E so, malaria infected in the population will change its biological mechanisms that may include mutation of *PfKelch13* for living under the high oxidative stress condition (Menard et al., 2015).

Although mechanism of piperazine resistance is not relate to dihydroartemisinin resistance from *PfKelch13* (C580Y) but it involved by plasmepsin 2/3 amplification and mutation of *Pfcr* gene at positions T93S, H97Y, F145I, and I218F. Moreover, the pressure of multidrug resistance antimalarial drug including dihydroartemisinin in Southeast Asia

can accelerate parasite resistance to piperazine (van der Pluijm et al., 2019). The study concludes that hemoglobin polymorphisms especially, hemoglobin E trait and beta thalassemia trait affect to *in vitro* DHA and PPQ response including PI(3)P production after DHA exposure that may relate to mutation of *PfKelch1* and results in the resistance to artemisinins.

References

- Ariey F, Witkowski B, Amaratunga C, Beghain J, Langlois A, Khim N, Kim S, Duru V, Bouchier C, Ma L, et al. (2014). A Molecular Marker of Artemisinin-Resistant *Plasmodium Falciparum* Malaria. *Nature*, **505**(7481).
- Balla T (2013). Phosphoinositides: Tiny Lipids with Giant Impact on Cell Regulation. *Physiol Rev*, **93**(3), 1019-137.
- Basco L and Ringwald P (2003). *In Vitro* Activities of Piperazine and Other 4-Aminoquinolines against Clinical Isolates of *Plasmodium Falciparum* in Cameroon. *Antimicrob Agents Chemother*, **47**(4), 1391-4.
- Bell A (2005). Antimalarial Drug Synergism and Antagonism: Mechanism and Clinical Significance. *FEMS microbiology letters*, **253**, 171-84.
- Ben Mamoun C, Prigge ST and Vial H (2010). Targeting the Lipid Metabolic Pathways for the Treatment of Malaria. *Drug Dev Res*, **71**(1), 44-55.
- Bennett T, Paguio M, Gligorijevic B, Seudieu C, Kosar A, Davidson E and Roepe P (2004). Novel, Rapid, and Inexpensive Cell-Based Quantification of Antimalarial Drug Efficacy. *Antimicrob Agents Chemother*, **48**(5), 1807-10.
- Bhattacharjee S, Coppens I, Mbengue A, Suresh N, Ghorbal M, Slouka Z, Safeukui I, Tang HY, Speicher DW, Stahelin RV, et al. (2018). Remodeling of the Malaria Parasite and Host Human Red Cell by Vesicle Amplification That Induces Artemisinin Resistance. **131**(11), 1234-47.
- Bray P, Mungthin M, Hastings I, Biagini G, Saidu D, Lakshmanan V, Johnson D, Hughes R, Stocks P, O'Neill P, et al. (2006). PfCRT and the Trans-Vacuolar Proton Electrochemical Gradient: Regulating the Access of Chloroquine to Ferriprotoporphyrin IX. *Mol Microbiol*, **62**(1), 238-51.

- Charoenteeraboon J,Kamchonwongpaisan S,Wilairat P,Vattanaviboon P and Yuthavong Y (2000). Inactivation of Artemisinin by Thalassemic Erythrocytes. *Biochem Pharmacol*, **59**(11), 1337-44.
- Cheng M-l,Ho H-y,Tseng H-c,Lee C-H,Shih L-y and Chiu DT-y (2005). Antioxidant Deficit and Enhanced Susceptibility to Oxidative Damage in Individuals with Different Forms of ALPHA-Thalassaemia. *British Journal of Haematology*, **128**(1), 119-27.
- Chotsiri P,Zongo I,Milligan P,Compaore YD,Somé AF,Chandramohan D,Hanpithakpong W,Nosten F,Greenwood B,Rosenthal PJ, et al. (2019). Optimal Dosing of Dihydroartemisinin-Piperaquine for Seasonal Malaria Chemoprevention in Young Children. *Nature Communications*, **10**(1), 480-80.
- Cyrklaff M,Srismith S,Nyboer B,Burda K,Hoffmann A,Lasitschka F,Adjalley S,Bisseye C,Simpore J,Mueller A-K, et al. (2016). Oxidative Insult Can Induce Malaria-Protective Trait of Sickle and Fetal Erythrocytes. *Nature Communications*, **7**, 13401.
- Davis T,Hamzah J,Ilett K,Karunajeewa H,Reeder J,Batty K,Hackett S and Barrett P (2006). *In Vitro* Interactions between Piperaquine, Dihydroartemisinin, and Other Conventional and Novel Antimalarial Drugs. *Antimicrob Agents Chemother*, **50**(8), 2883-5.
- Dechamps S,Shastri S,Wengelnik K and Vial HJ (2010). Glycerophospholipid Acquisition in Plasmodium - a Puzzling Assembly of Biosynthetic Pathways. *Int J Parasitol*, **40**(12), 1347-65.
- Denis MB,Davis TM,Hewitt S,Incardona S,Nimol K,Fandeur T,Poravuth Y,Lim C and Socheat D (2002). Efficacy and Safety of Dihydroartemisinin-Piperaquine (Artekin) in Cambodian Children and Adults with Uncomplicated Falciparum Malaria. *Clin Infect Dis*, **35**(12), 1469-76.
- Duffy S and Avery V (2018). Routine in Vitro Culture of Plasmodium Falciparum: Experimental Consequences? *Trends Parasitol*, **34**(7), 564-75.
- Duffy S and Avery VM (2017). Plasmodium Falciparum in Vitro Continuous Culture Conditions: A Comparison of Parasite Susceptibility and Tolerance to Anti-Malarial Drugs Throughout the Asexual Intra-Erythrocytic Life Cycle. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, **7**(3), 295-302.
- Glushakova S,Balaban A,McQueen PG,Coutinho R,Miller JL,Nossal R,Fairhurst RM and Zimmerberg J (2014). Hemoglobinopathic Erythrocytes Affect the Intraerythrocytic Multiplication of Plasmodium Falciparum in Vitro. *The Journal of infectious diseases*, **210**(7), 1100-09.

- Gopalakrishnan A and Kumar N (2015). Antimalarial Action of Artesunate Involves DNA Damage Mediated by Reactive Oxygen Species. *Antimicrob Agents Chemother*, **59**(1), 317-25.
- Hansson SR, Nääv Å and Erlandsson L (2015). Oxidative Stress in Preeclampsia and the Role of Free Fetal Hemoglobin. *Frontiers in physiology*, **5**, 516-16.
- Hastings IM and Hodel EM (2014). Pharmacological Considerations in the Design of Anti-Malarial Drug Combination Therapies - Is Matching Half-Lives Enough? *Malaria journal*, **13**, 62-62.
- Kotepui M, Piwkhram D, PhunPhuech B, Phiwklam N, Chupeerach C and Duangmano S (2015). Effects of Malaria Parasite Density on Blood Cell Parameters. *PLoS One*, **10**(3), e0121057-e57.
- Krugliak M, Zhang J and Ginsburg H (2002). Intraerythrocytic *Plasmodium Falciparum* Utilizes Only a Fraction of the Amino Acids Derived from the Digestion of Host Cell Cytosol for the Biosynthesis of Its Proteins. *Mol Biochem Parasitol*, **119**(2), 249-56.
- Kuesap J, Chaijaroenkul W, Rungsihirunrat K, Pongjantharasatien K and Na-Bangchang K (2015). Coexistence of Malaria and Thalassemia in Malaria Endemic Areas of Thailand. *Korean J Parasitol*, **53**(3), 265-70.
- Leang R, Barrette A, Bouth DM, Menard D, Abdur R, Duong S and Ringwald P (2013). Efficacy of Dihydroartemisinin-Piperaquine for Treatment of Uncomplicated *Plasmodium Falciparum* and *Plasmodium Vivax* in Cambodia, 2008 to 2010. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **57**(2), 818.
- Mbengue A, Bhattacharjee S, Pandharkar T, Liu H, Estiu G, Stahelin R, Rizk S, Njimoh D, Ryan Y, Chotivanich K, et al. (2015). A Molecular Mechanism of Artemisinin Resistance in *Plasmodium Falciparum* Malaria. *Nature*, **520**(7549), 683-7.
- Menard S, Ben Haddou T, Ramadani AP, Ariey F, Iriart X, Beghain J, Bouchier C, Witkowski B, Berry A, Mercereau-Puijalon O, et al. (2015). Induction of Multidrug Tolerance in *Plasmodium Falciparum* by Extended Artemisinin Pressure. *Emerg Infect Dis*, **21**(10), 1733-41.

- Myint HY,Ashley EA,Day NPJ,Nosten F and White NJ (2007). Efficacy and Safety of Dihydroartemisinin-Piperaquine. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **101**(9), 858-66.
- Na-Bangchang K and Karbwang J (2009). Current Status of Malaria Chemotherapy and the Role of Pharmacology in Antimalarial Drug Research and Development. *Fundam Clin Pharmacol*, **23**(4), 387-409.
- Na-Bangchang K,Ruengweerayut R,Mahamad P,Ruengweerayut K and Chaijaroenkul W (2010). Declining in Efficacy of a Three-Day Combination Regimen of Mefloquine-Artesunate in a Multi-Drug Resistance Area Along the Thai-Myanmar Border. *Malar J*, **9**, 273.
- Naing C,Mak JW,Aung K and Wong JYR (2012). Efficacy and Safety of Dihydroartemisinin-Piperaquine for Treatment of Uncomplicated Plasmodium Falciparum Malaria in Endemic Countries: Meta-Analysis of Randomised Controlled Studies. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **107**(2), 65-73.
- Pathak V,Colah R and Ghosh K (2018). Effect of Inherited Red Cell Defects on Growth of Plasmodium Falciparum: An in Vitro Study. *Indian J Med Res*, **147**(1), 102-09.
- Ramakrishnan S,Serricchio M,Striepen B and Butikofer P (2013). Lipid Synthesis in Protozoan Parasites: A Comparison between Kinetoplastids and Apicomplexans. *Prog Lipid Res*, **52**(4), 488-512.
- Rieckmann K,Campbell G,Sax L and Mrema J (1978). Drug Sensitivity of *Plasmodium Falciparum* an in-Vitro Microtechnique. *Lancet*, **311**, 22-23.
- Sugiarto SR,Moore BR,Makani J and Davis TME (2018). Artemisinin Therapy for Malaria in Hemoglobinopathies: A Systematic Review. *Clin Infect Dis*, **66**(5), 799-804.
- Taylor S,Cerami C and Fairhurst R (2013). Hemoglobinopathies: Slicing the Gordian Knot of *Plasmodium Falciparum* Malaria Pathogenesis. *PLoS Pathog*, **9**(5), e1003327.
- Taylor SM and Fairhurst RM (2014). Malaria Parasites and Red Cell Variants: When a House Is Not a Home. *Current opinion in hematology*, **21**(3), 193-200.
- Trager W and Jensen JB (1976). Human Malaria Parasites in Continuous Culture. *Science*, **193**(4254), 673-5.
- van der Pluijm RW,Imwong M,Chau NH,Hoa NT,Thuy-Nhien NT,Thanh NV,Jittamala P,Hanboonkunupakarn B,Chutasmit K,Saelow C, et al. (2019). Determinants of Dihydroartemisinin-Piperaquine Treatment Failure in *Plasmodium Falciparum* Malaria in Cambodia, Thailand, and Vietnam: A Prospective Clinical, Pharmacological, and Genetic Study. *The Lancet Infectious Diseases*.

WHO (2008). "Global Malaria Control and Elimination: Report of a Meeting on Containment of Artemisinin Tolerance.," WHO, Geneva, Switzerland: WHO,

Table and figures

Table 1 Dihydroartemisinin (DHA) and piperazine (PPQ) IC₅₀ in *P. falciparum* infected in normal hemoglobin or hemoglobinopathic RBCs. The data presented as median (95%CI), nM.

Hemoglobin polymorphisms	3D7 (chloroquine sensitive)		K1 (chloroquine resistance)	
	DHA	PPQ	DHA	PPQ
All	3.42 (2.69-4.90)	35.9 (28.8-43.2)	2.45 (1.65-3.40)	62.3 (50.2-68.5)
Normal hemoglobin	4.22 (2.69-6.31)	41.0 (28.4-54.1)	2.74 (2.41-4.09)	63.1 (50.5-78.9)
Hemoglobin E trait	3.79 (2.87-5.40)	32.8 (20.5-39.0)	2.71 (1.34-4.66)	56.6 (38.2-94.0)
Beta-thalassemia trait	1.80 (1.54-2.06)	28.2 (24.5-31.9)	3.08 (1.65-4.51)	77.6 (67.8-87.5)
Alpha-thalassemia trait	2.79 (2.16-3.42)	57.4 (53.1-61.8)	1.84 (1.61-2.06)	59.3 (50.2-68.5)
Hemoglobin CS trait	2.32 (1.47-3.04)	32.2 (32.1-32.6)	0.76 (0.55-1.21)	30.3 (20.2-153.9)

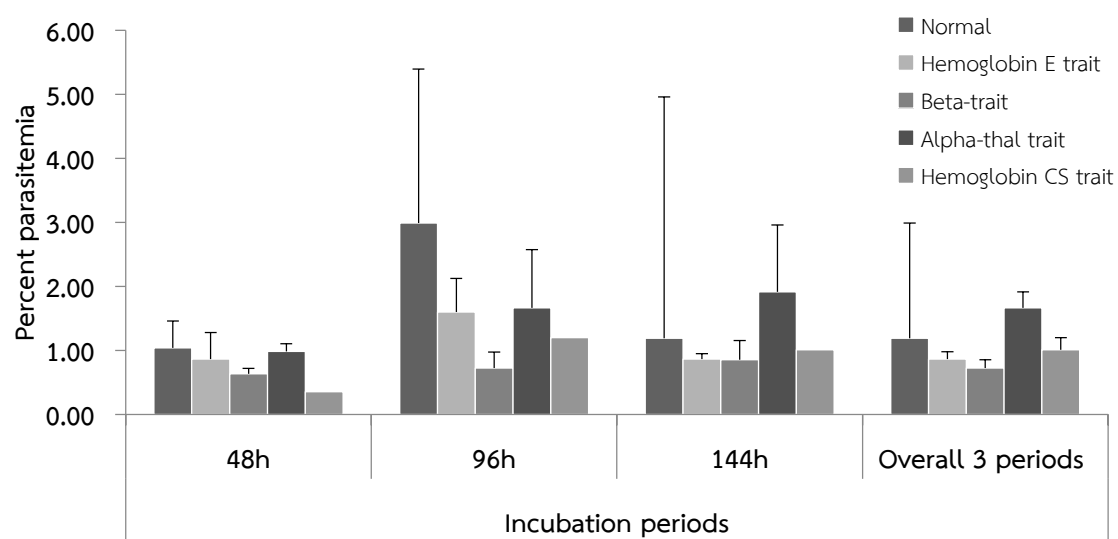


Figure 1 Invasion of *P. falciparum* strain 3D7 in normal hemoglobin or hemoglobinopathic RBCs during 144 hours (3 multiplication periods)

Normal RBC	Hemoglobin E trait RBC	Beta-thal. trait RBC	Alpha-thal. trait RBC	Hemoglobin CS trait RBC
H48				

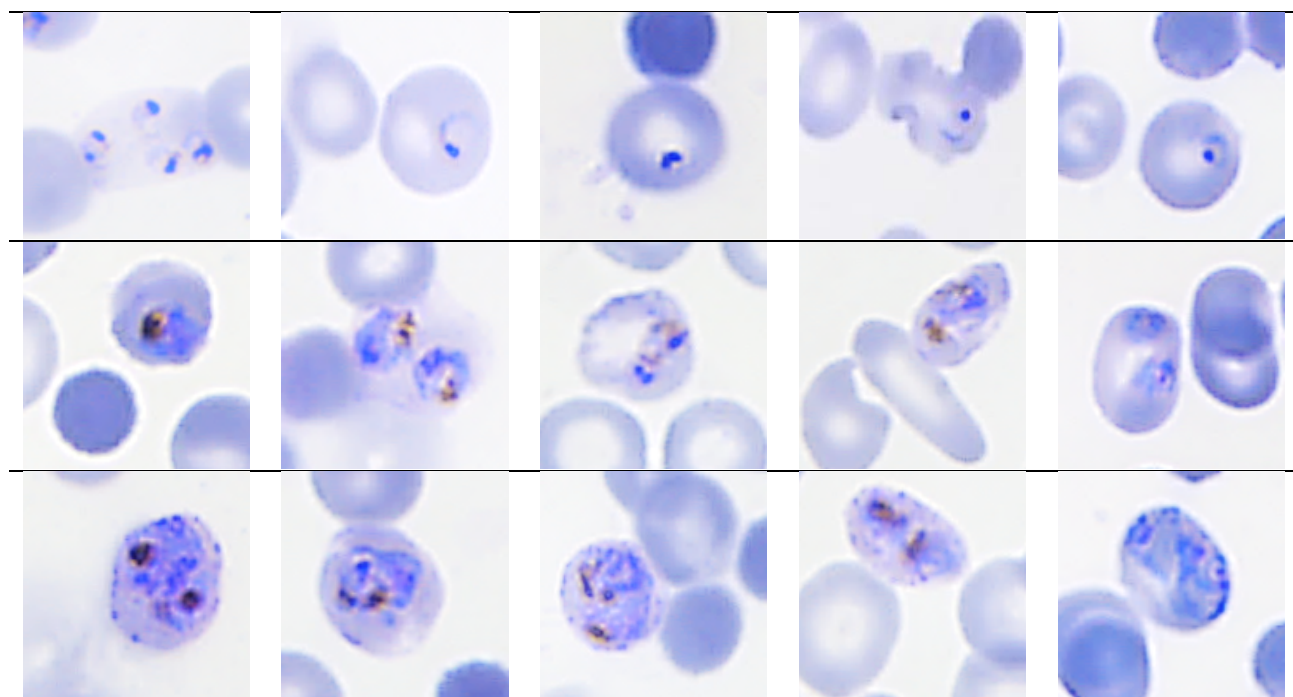


Figure 2 Morphology of *P. falciparum* strain 3D7 infected in normal hemoglobin or hemoglobinopathic RBCs after 48 (1 multiplication period) cultivation

Normal RBC	Hemoglobin E trait RBC	Beta-thal. trait RBC	Alpha-thal. trait RBC	Hemoglobin CS trait RBC
H96				

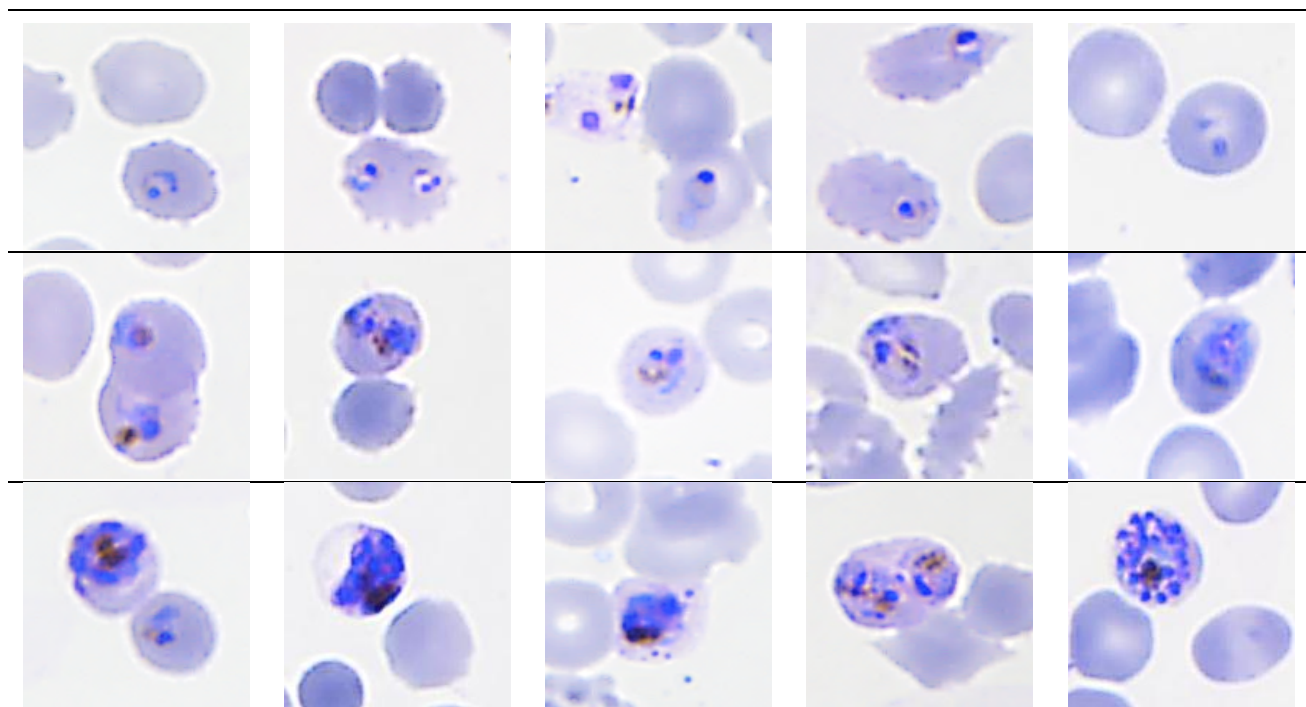


Figure 2 (cont.) Morphology of *P. falciparum* strain 3D7 infected in normal hemoglobin or hemoglobinopathic RBCs after 96 (2 multiplication periods) cultivation.

Normal RBC	Hemoglobin E trait RBC	Beta-thal. trait RBC	Alpha-thal. trait RBC	Hemoglobin CS trait RBC
H144				

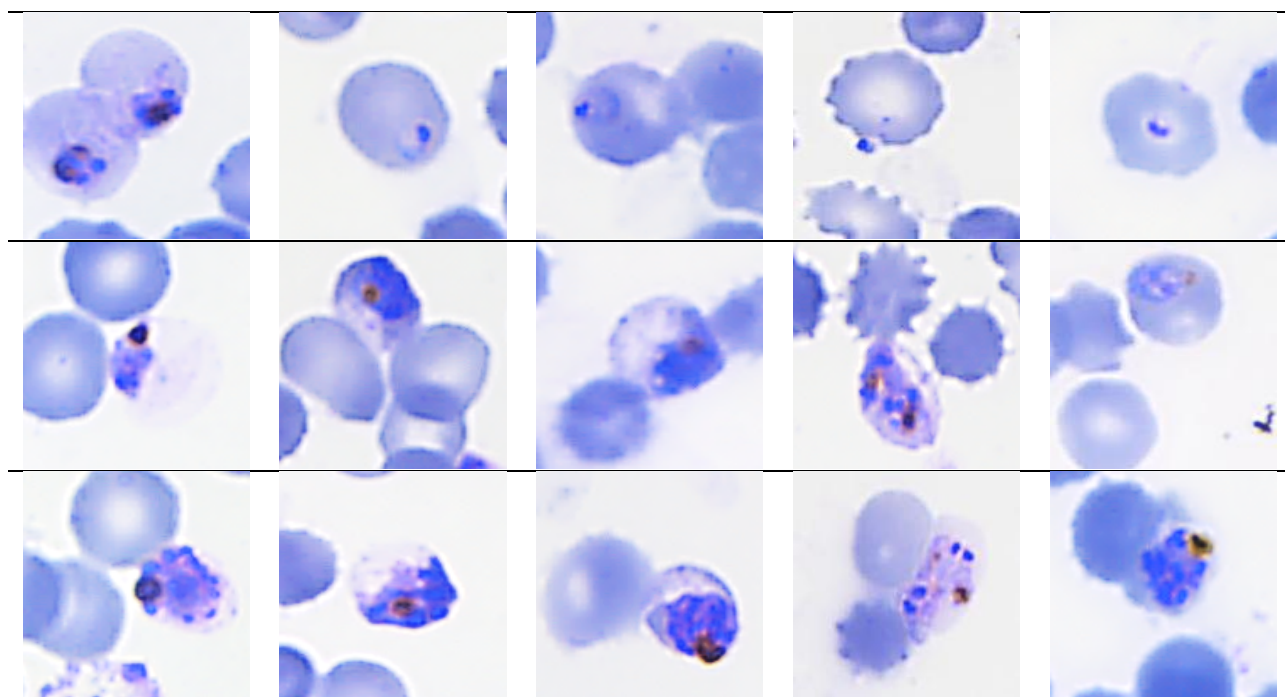
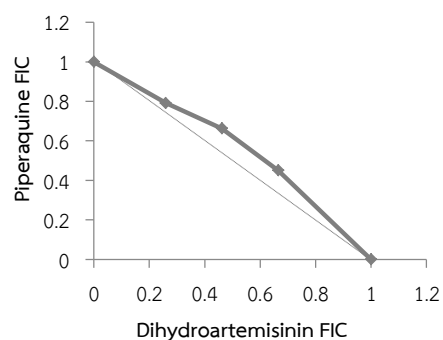


Figure 2 (cont.) Morphology of *P. falciparum* strain 3D7 infected in normal hemoglobin or hemoglobinopathic RBCs after 144 hours (3 multiplication periods) cultivation.

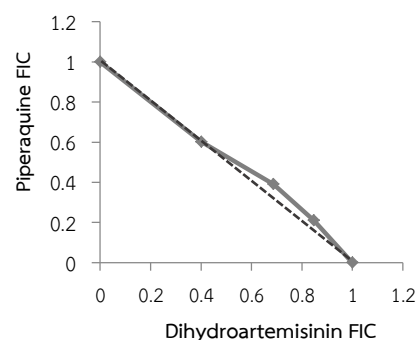
3D7 (chloroquine sensitive)

K1 (chloroquine resistance)

Normal hemoglobin

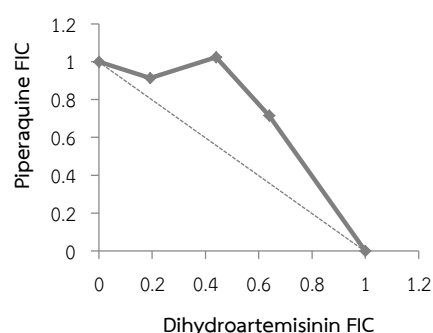
$$\sum FIC = 1.051 (1.000-1.125)$$

Interaction: no interaction



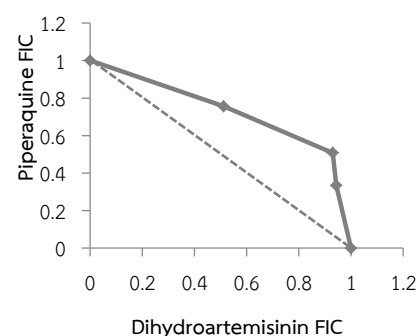
$$\sum FIC = 1.002 (1.000-1.078)$$

Interaction: no interaction

Hemoglobin E trait

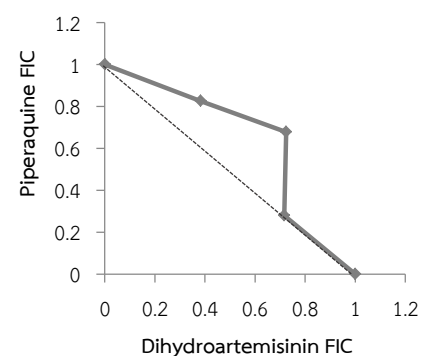
$$\sum FIC = 1.106 (1.000-1.464)$$

Interaction: antagonism



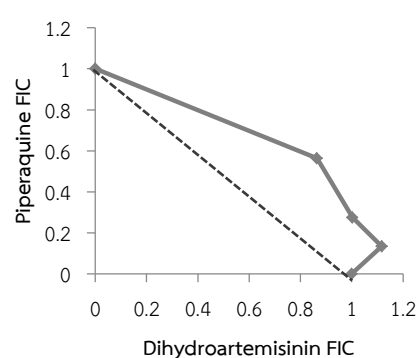
$$\sum FIC = 1.268 (1.000-1.438)$$

Interaction: antagonism

Beta-thalassemia trait

$$\sum FIC = 1.000 (0.996-1.402)$$

Interaction: antagonism



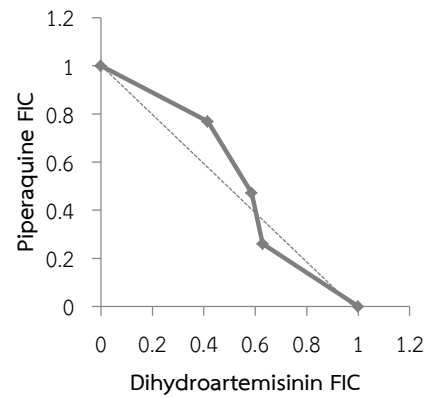
$$\sum FIC = 1.252 (1.000-1.428)$$

Interaction: antagonism

Figure 3 Isobologram presented drug interaction between dihydroartemisinin and piperazine of *P. falciparum* strain 3D7 and K1 infected in normal hemoglobin and hemoglobinopathic RBCs.

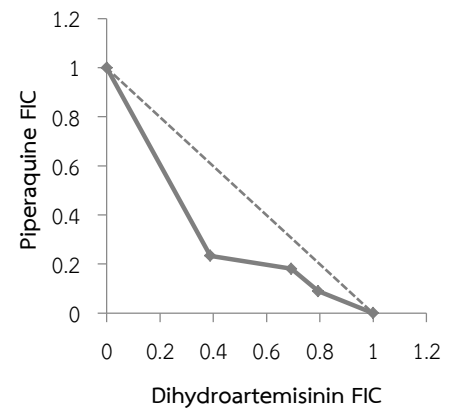
3D7 (chloroquine sensitive)**K1 (chloroquine resistance)**

Alpha-thalassemia trait



$$\Sigma \text{FIC} = 1.000 (0.889-1.184)$$

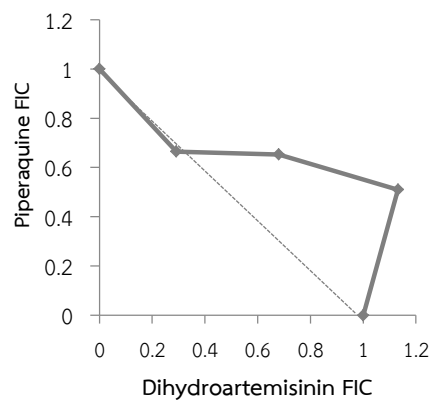
Interaction: no interaction



$$\Sigma \text{FIC} = 0.883 (0.662-1.000)$$

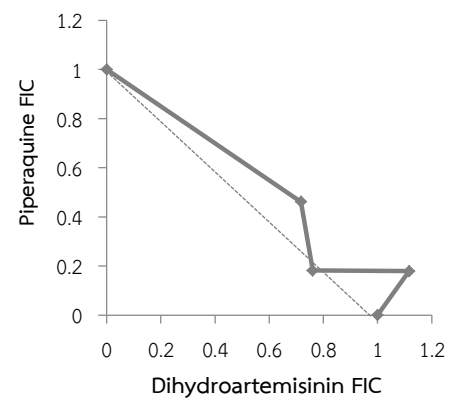
Interaction: synergism

Hemoglobin CS trait



$$\Sigma \text{FIC} = 1.000 (0.956-1.642)$$

Interaction: antagonism



$$\Sigma \text{FIC} = 1.000 (0.942-1.296)$$

Interaction: no interaction

Figure 3 (cont.) Isobologram presented drug interaction between dihydroartemisinin and piperazine of *P. falciparum* strain 3D7 and K1 infected in normal hemoglobin and hemoglobinopathic RBCs.

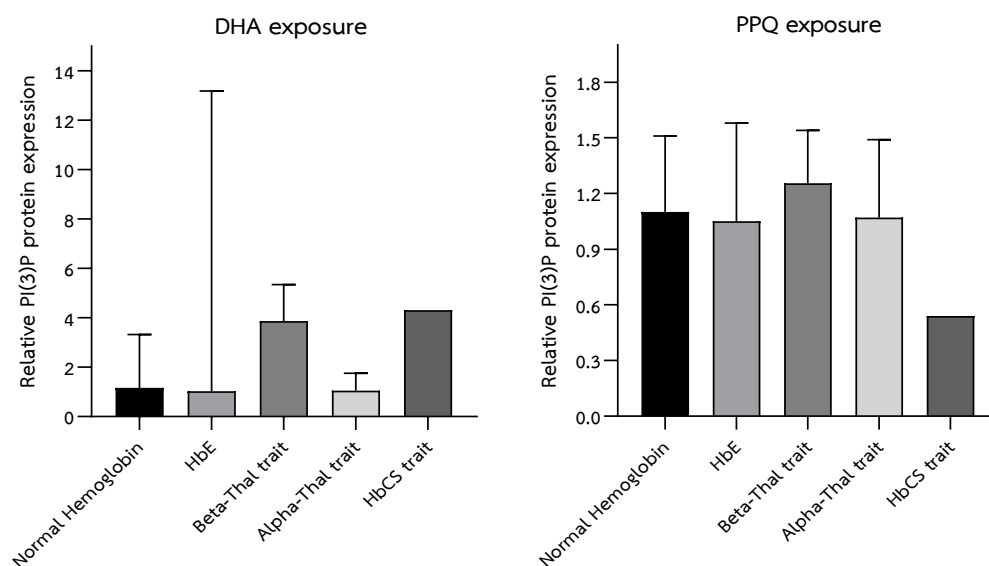


Figure 4 PI(3)P expression of *P. falciparum* strain 3D7 infected in normal hemoglobin, hemoglobin E trait, beta-thalassemia trait, alpha-thalassemia trait and hemoglobin CS trait RBCs after exposed to dihydroartemisinin and piperazine. The data presented as median (95% CI).

ค. ผลการวิเคราะห์

ตารางที่ 1ผ การวิเคราะห์ทางโลหิตวิทยาของอาสาสมัคร

รหัส	Complete blood count						Hemoglobin typing
	RBC ($10^6/\mu\text{l}$)	HGB (gm%)	HCT (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (%)	
AL-001	5.42	11.3	36.3	67	20.8	31	A ₂ A: Normal, not rule out alpha thalassemia*
AL-002	4.99	11.1	34.5	69.1	22.3	32.3	A ₂ A: Normal, not rule out alpha thalassemia*
BE-002	5.96	11.2	36.8	-	-	-	A ₂ A HbF or Hb variant : Beta thalassemia trait
BE-003	5.52	11.3	36.1	65.4	20.4	31.2	A ₂ A HbF or Hb variant : Beta thalassemia trait
CS-001	5.16	13.9	44.6	-	-	-	CS A ₂ A: Hb constant spring trait*
E-005	4.8	12.6	40.1	83.6	26.2	31.3	EA: HbE trait
E-006	5.03	12	36.2	71.8	23.8	33.2	EA: HbE trait
E-007	5.09	13	39	76.7	25.6	33.4	EA: HbE trait
E-008	4.95	12.5	37.4	75.7	25.3	33.4	EA: HbE trait
E-009	4.99	10.2	32.3	64.7	20.4	31.6	EA: HbE trait
E-012	5.78	13.6	41.2	71.3	23.5	32.9	EA: HbE trait
N-001	3.97	10	30.7	77.3	25.3	32.7	A ₂ A: Normal
N-002	4.15	12.2	35.9	86.5	29.4	34	A ₂ A: Normal
N-003	3.99	12.5	37.2	93.1	31.3	33.6	A ₂ A: Normal
N-005	4.69	13.7	40.3	85.9	29.1	33.9	A ₂ A: Normal
N-007	5.08	15	44.6	87.8	29.5	33.6	A ₂ A: Normal
N-008	5.3	15	44.9	84.7	28.3	33.4	A ₂ A: Normal
N-009	5.87	14.4	45.2	76.9	24.4	31.8	A ₂ A: Normal
N-010	5.27	14.3	42.6	81	27.1	33.4	A ₂ A: Normal
N-011	5.22	15.6	45.2	86.5	29.8	34.5	A ₂ A: Normal
N-012	4.11	10	31.3	75.7	24.4	32.2	A ₂ A: Normal
N-013	5.41	14.9	45	83.2	27.5	33	A ₂ A: Normal
N-014	4.94	14.5	43.6	88.3	29.4	33.3	A ₂ A: Normal

* ส่งตรวจยืนยันในระดับโมเลกุล

- AL-001: Alpha Thal-1 Trait (SEA deletion), AL-002: Alpha Thal-2 Trait (3.7 kb+4.2 kb deletion), CS-001: Hemoglobin constant spring trait

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินิน (DHA) และไฟเพอราควิน (PPQ) ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียชนิดพลาสโมเดียมสายพันธุ์ 3D7 (ไวต่อยาคลอโรควิน) ได้ 10, 50 และ 90 เปอร์เซ็นต์ (IC₁₀, IC₅₀ และ IC₉₀)

รหัส	ลักษณะฮีโมโกลบิน	IC ₁₀ (nM)		IC ₅₀ (nM)		IC ₉₀ (nM)	
		DHA	PPQ	DHA	PPQ	DHA	PPQ

N-001	อีโมโกลบินปกติ	1.01	7.6	2.46	59.8	8.28	203.6
N-005	อีโมโกลบินปกติ	1.36	4.4	2.45	63.9	5.46	155.8
N-007	อีโมโกลบินปกติ	1.96	26.3	3.40	62.3	4.97	79.9
N-008	อีโมโกลบินปกติ	2.23	31.2	3.90	53.2	6.86	93.6
N-009	อีโมโกลบินปกติ	3.14	19.0	1.11	42.1	8.60	43.7
N-010	อีโมโกลบินปกติ	2.82	23.4	4.09	64.9	7.28	62.1
N-011	อีโมโกลบินปกติ	0.99	25.6	2.62	78.9	2.19	73.2
N-012	อีโมโกลบินปกติ	3.47	31.0	2.41	113.6	11.46	112.6
N-013	อีโมโกลบินปกติ	2.66	19.7	6.24	68.5	15.92	125.9
N-014	อีโมโกลบินปกติ	4.40	14.1	2.86	50.5	18.72	57.3
E-002	อีโมโกลบินอี	1.52	15.6	1.30	54.5	6.37	35.6
E-003	อีโมโกลบินอี	2.17	14.1	1.34	38.2	5.49	29.9
E-004	อีโมโกลบินอี	2.62	19.7	3.95	81.6	4.66	45.0
E-005	อีโมโกลบินอี	2.82	23.3	1.95	58.7	8.53	55.4
E-006	อีโมโกลบินอี	2.89	20.6	3.04	46.4	10.28	64.0
E-007	อีโมโกลบินอี	2.53	3.4	4.66	20.5	10.10	17.1
E-008	อีโมโกลบินอี	2.29	11.4	2.38	43.9	14.38	46.9
E-009	อีโมโกลบินอี	2.06	16.3	4.83	64.9	8.76	99.4
E-010	อีโมโกลบินอี	1.04	22.1	2.30	94.0	9.79	124.6
E-012	อีโมโกลบินอี	1.65	25.1	4.36	129.2	5.02	52.4
BE-002	พาหะเบต้าธาลัสซีเมีย	1.16	17.9	4.51	67.8	3.68	56.9
BE-003	พาหะเบต้าธาลัสซีเมีย	0.95	16.7	1.65	87.5	2.51	36.0
AI-001	พาหะแอลฟาธาลัสซีเมีย-1	1.30	29.1	2.06	50.2	3.67	136.2
AI-002	แอลฟาธาลัสซีเมีย-2	1.52	27.8	1.61	68.5	8.09	102.8
CS-001	พาหะอีโมโกลบินซีเอส	1.31	22.6	0.84	68.1	4.21	46.2

ตารางที่ 3ผ ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินิน (DHA) และไพเพอราควิน (PPQ) ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียชนิดพัลซิพารัมสายพันธุ์ K1 (ดื้อต่อยาคลอโรควิน) ได้ 10, 50 และ 90 เปอร์เซ็นต์ (IC₁₀, IC₅₀ และ IC₉₀)

รหัส	ลักษณะอีโมโกลบิน	IC ₁₀ (nM)		IC ₅₀ (nM)		IC ₉₀ (nM)	
		DHA	PPQ	DHA	PPQ	DHA	PPQ
N-001	อีโมโกลบินปกติ	1.67	31.6	2.46	59.8	3.67	107.3
N-005	อีโมโกลบินปกติ	1.65	32.4	2.45	63.9	3.64	126.1
N-007	อีโมโกลบินปกติ	1.20	30.5	3.40	62.3	18.09	127.7
N-008	อีโมโกลบินปกติ	1.63	27.0	3.90	53.2	7.24	105.3
N-009	อีโมโกลบินปกติ	0.70	16.7	1.11	42.1	1.77	119.8
N-010	อีโมโกลบินปกติ	1.51	29.3	4.09	64.9	16.00	155.3

N-011	อีโมโกลบินปกติ	1.76	45.2	2.62	78.9	3.21	138.0
N-012	อีโมโกลบินปกติ	1.52	64.0	2.41	113.6	3.83	202.0
N-013	อีโมโกลบินปกติ	2.76	32.9	6.24	68.5	18.35	144.1
N-014	อีโมโกลบินปกติ	1.93	24.3	2.86	50.5	4.22	107.0
E-002	อีโมโกลบินอี	0.71	28.6	1.30	54.5	2.41	108.5
E-003	อีโมโกลบินอี	0.94	25.8	1.34	38.2	1.91	56.6
E-004	อีโมโกลบินอี	2.52	43.2	3.95	81.6	6.20	154.3
E-005	อีโมโกลบินอี	1.31	33.6	1.95	58.7	2.91	102.7
E-006	อีโมโกลบินอี	1.84	13.5	3.04	46.4	5.01	200.6
E-007	อีโมโกลบินอี	2.79	13.7	4.66	20.5	7.80	30.7
E-008	อีโมโกลบินอี	1.63	17.1	2.38	43.9	3.48	124.3
E-009	อีโมโกลบินอี	2.10	31.5	4.83	64.9	11.17	135.4
E-010	อีโมโกลบินอี	1.28	33.4	2.30	94.0	4.28	280.3
E-012	อีโมโกลบินอี	2.53	69.0	4.36	129.2	7.54	242.6
BE-002	พาหะเบต้าธาลัสซีเมีย	1.33	36.4	4.51	67.8	15.91	129.7
BE-003	พาหะเบต้าธาลัสซีเมีย	1.06	48.0	1.65	87.5	2.57	159.5
AL-001	พาหะแอลฟาธาลัสซีเมีย-1	1.28	7.6	2.06	50.2	3.35	212.3
AL-002	แอลฟาธาลัสซีเมีย-2	1.10	37.4	1.61	68.5	1.97	125.4
CS-001	พาหะอีโมโกลบินซีเอส	0.41	34.9	0.84	68.1	1.84	135.4

ตารางที่ 4ผ ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของไขมัน PI(3)P หลังสัมผัสยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินิน (DHA) และไฟ-
เพอราควิน (PPQ)

รหัส	ความเข้มข้นของไขมัน PI(3)P (pmol)			ความเข้มข้นของไขมัน PI(3)P (pmol)		
	DHA	Ctrl (DHA)	DHA/Ctrl	PPQ	Ctrl (PPQ)	PPQ/Ctrl
N-001	18.48	18.57	1.00	24.24	21.99	1.10
N-005	13.18	11.31	1.17	24.24	22.1	1.10
N-007	12.4	3.74	3.32	3.74	9.12	0.41
N-008	19.65	19.65	1.00	13.59	17.92	0.76
N-009	16.34	10.96	1.49	12.78	7.59	1.68
N-010	15.37	16.34	0.94	14.02	12.78	1.10
N-011	16.68	16.34	1.02	16.34	16.18	1.01
N-012	21.43	6.06	3.54	10.63	7.06	1.51
N-014	39.81	20.68	1.93	38.61	31.14	1.24
E-005	8.07	8.07	1.00	12.78	8.07	1.58
E-006	12.78	12.78	1.00	5.7	7.82	0.73
E-007	21.11	21.11	1.00	21.77	19.25	1.13
E-008	23.14	21.77	1.06	22.44	22.44	1.00

E-009	18.48	11.08	1.67	10.74	9.8	1.10
E-012	13.59	1.03	13.19	7.59	9.4	0.81
BE-002	14.91	6.25	2.39	17.38	17.92	0.97
BE-003	7.59	1.42	5.35	4.11	2.67	1.54
AL-001	2.75	7.59	0.36	7.59	5.09	1.49
AL-002	10.63	6.06	1.75	8.07	12.4	0.65
CS-001	5.52	1.28	4.31	4.37	8.07	0.54