Executive Summary

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

การดื้อยาของเชื้อมาเลเรียโดยเฉพาะสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดความรุนแรงต่อมนุษย์มากที่สุด คือ พลาสโมเดียม ฟัลซิปารัม (*Plasmodium falciparum*) ยังคงเป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุขทั่วโลก โดยเฉพาะในประเทศที่กำลังพัฒนา โดยจะสังเกตได้จากการที่ยังคงมีอัตราการตายจากโรคมาเลเรียในแต่ละปีสูงถึง 2.5 ล้านคนและพบมากในเด็ก ๆ แถบทวีปแอฟริกา ในปัจจุบันยังไม่มีวัคซีนหรือยาที่ใช้ในการป้องกันและรักษาโรคมาเลเรียที่มีประสิทธิภาพเพียงพอ จึงได้มีความพยายามอย่างมากในการค้นหาและพัฒนาตัวยาใหม่ๆ เพื่อใช้เป็นยาเป้าหมายและให้เกิดผลในการรักษาโรคมาเลเรียให้มากที่สุด โดยเฉพาะยาที่ออกฤทธิ์โดยตรงต่อกระบวนการเมตาโบลิสมของเชื้อมาเลเรีย จากการศึกษาของทีมงานวิจัย (Krungkrai et al. 2001) ได้ค้นพบว่าเอ็นไซม์คาร์โบนิค แอนไฮเดรส (carbonic anhydrase) ในเชื้อ *P. falciparum* มีบทบาทและความสำคัญเป็นอย่างมากต่อการดำรงชีพของเชื้อ *P. falciparum* และมีคุณลักษณะทางชีวเคมีที่มีลักษณะจำเพาะและแตกต่างจากเอ็นไซม์คาร์โบนิค แอนไฮเดรส ที่พบในมนุษย์ นอกจากนั้นตัวยับยั้งของเอ็นไซม์ยังมีผลในการขัดขวางการเจริญเติบโตของ *P. falciparum* ในจานทดลอง (*in vitro)* และพบเอนไซม์คาร์โบนิค แอนไฮเดรส อย่างน้อย 3 ไอโซไซม์ในเชื้อ *P. falciparum* ต่อมาทีมงานวิจัย (Ruengprapavut et al. 2004) ได้ทำการสืบหายีนและทำการโคลนยีนพร้อมทั้งศึกษาการแสดงออกของยีนคาร์โบนิค แอนไฮเดรสในเชื้อ *P. falciparum* สายสั้นเรียกว่า PfCAI พบว่าลำดับเบสของยีน PfCA I สายสั้นมีความเหมือนกันกับ carbonic anhydrase (CA) ใน *Plasmodium yoelii* และใน Human CA และจัดอยู่ในกลุ่มอัลฟา (α) โดยมีจำนวนกรดอะมิโน 235 ตัวและมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 2.7 กิโลดัลตัน เอ็นไซม์ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์แล้วสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ นอกจากนั้นยาในกลุ่ม acetazolamide และ sulfanilamide มีผลยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ PfCA I รวมทั้งได้มีศึกษาถึงผลของการยับยั้งเอ็นไซม์ PfCA I โดยยาในกลุ่ม aromatic sulfanamides (Krungkrai et al. 2004) และผลที่มีต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. falciparum* พบว่ามียาหลายตัวในกลุ่มนี้มีผลยับยั้งการทำงานของ PfCA I (ค่าK_i อยู่ในช่วง 0.080-1.230 μM) โดยตัวที่มีผลยับยั้งเอ็นไซม์มากที่สุดได้แก่ 4-(3,4-dichlorophenylureido-ethyl)-benzenesulfonamide มีค่า K_i 80 nM เนื่องจากยาตัวนี้มีคุณสมบัติละลายได้ดีในไขมันจึงมีผลยับยั้งวงจรการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. falciparum* ด้วย โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2 μM ดังนั้นการยับยั้งเอ็นไซม์คาร์โบนิค แอนไฮเดรส น่าจะมีผลต่อการสังเคราะห์ไพริมิดินในเชื้อ *P. falciparum* แต่จะไม่มีผลต่อมนุษย์ ดังนั้นการศึกษาหายาตัวใหม่ในกลุ่ม aromatic sulfanamides และสืบหายีนตัวใหม่ของ PfCA สายยาวหรือ PfCA II เพื่อศึกษาถึงความจำเพาะและผลในการยับยั้งของยาในกลุ่มนี้ที่มีต่อเอ็นไซม์คาร์โบนิค แอนไฮเดรสที่ได้จากทั้ง PfCA I และ PfCA II และทำให้เกิดผลข้างเคียงน้อยที่สุดจึงเป็นเรื่องที่จำเป็นเร่งด่วน เพื่อเป็นแนวทางในการค้นหาและพัฒนายาเป้าหมายสำหรับใช้รักษาโรคมาเลเรียให้ได้มีประสิทธิภาพมากที่สุด นอกจากนี้ต้นทุนในการผลิตยาในกลุ่มนี้ยังต่ำมีจึงมีความเหมาะสมอย่างยิ่งที่จะค้นคว้าและพัฒนาเพื่อนำไปใช้ในกลุ่มประเทศที่ยากจน

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. โคลนยีนและศึกษาการแสดงออกของยีน carbonic anhydrase (CA) สายยาวของเชื้อ *Plasmodium falciparum* (PfCA II) ใน *E. Coli*
2. สกัดและทำเอ็นไซม์ให้บริสุทธิ์ เพื่อนำไปศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีต่าง ๆ เช่น หาค่าทางจลนศาสตร์ K_m, K_i เป็นต้น และเปรียบเทียบค่าที่ได้กับเอ็นไซม์คาร์โบนิค แอนไฮเดรสสายสั้น (PfCA I) รวมทั้งเอ็นไซม์ CA ที่สกัดจากการเพาะเลี้ยงในจานทดลอง (*in vitro)*
3. ศึกษารูปแบบ (model) และโครงสร้างของเอ็นไซม์ในรูปที่อิสระและรูปที่จับกับตัวยับยั้งในกลุ่ม aromatic sulfonamides โดยใช้ structure-activity relationship (SAR)
4. ศึกษาและเปรียบเทียบผลของตัวยับยั้งในกลุ่ม aromatic sulfonamides ที่มีต่อเอ็นไซม์ CA ทั้ง PfCA I และ PfCA II
5. ศึกษาและเปรียบเทียบผลของตัวยับยั้งในกลุ่ม aromatic sulfonamides ที่มีต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Plasmodium falciparum*

3. ระเบียบวิธีวิจัย

การวิจัยครั้งนี้มุ่งศึกษาไปที่ยีนของ carbonic anhydrase (CA) สายยาวของเชื้อ *P. falciparum* (PfCA II) ค้นหายีนและศึกษาการแสดงออกใน *E. Coli* เพื่อให้ได้เอ็นไซม์ในปริมาณที่เพียงพอเพื่อนำไปศึกษาและค้นหาตัวยับยั้งของเอ็นไซม์ในกลุ่ม aromatic sulfanamides เพื่อใช้เป็นยาเป้าหมายในการรักษาโรคมาเลเรียต่อไป และมีขั้นตอนในการดำเนินงานดังต่อไปนี้

3.1 สืบหายีน carbonic anhydrase สายยาวของเชื้อ *P. falciparum* (PfCA II) ในฐานข้อมูลของมาเลเรีย โดยใช้โปรแกรม BLAST (Altschul et al. 1990) ออกแบบ primer เพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนยีนในจีโนม (genomic DNA) เพื่อให้ได้ยีน PfCA II ที่มีความยาวมากที่สุดโดยวิธี PCR (polymerase chain reaction)

3.2 ยีน PfCA II ที่ได้จากการทำ PCR จากข้อ 3.1 (full-length PfCA) จะนำไปหาลำดับเบส และจะถูกนำไปโคลนในพลาสมิดที่มีลำดับของฮิสทิดีนติดอยู่ (His-tagged sequence) เช่น QIAexpress® vectors (Qiagen) เพื่อให้ง่ายต่อการทำให้เอ็นไซม์บริสุทธิ์ เมื่อทราบลำดับเบสของ PfCA II รวมทั้งลำดับของกรดอะมิโนแล้วนำไปเปรียบเทียบความเหมือน (homology) กับ CA ที่ได้จากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ

3.3 ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้ได้เอ็นไซม์ที่บริสุทธิ์ในปริมาณ 10-30 มิลลิกรัม เช่น ดูเวลาที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำของ IPTG (time for IPTG induction) หาปริมาณที่เหมาะสมของ IPTG ในการเหนี่ยวนำ หรือศึกษาหาอุณหภูมิที่เพาะเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในระหว่างการเหนี่ยวนำ หรือการใช้ RIG พลาสมิด เป็นต้น จากขั้นตอนทั้งหมดที่กล่าวมานี้คาดว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร จะได้โปรตีนลูกผสมออกมาประมาณ 2-5 มิลลิกรัม

3.4 นำโปรตีนที่ได้จากข้อ 3.3 ไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยวิธีโครมาโตกราฟฟีโดยใช้ sulfonamide-affinity chromatography (Chirica et al. 2001) แล้วนำไปแยกต่อโดยใช้เทคนิค FPLC (Fast-Protein Liquid Chromatography) ใช้คอลัมน์ anion exchange และ gel filtration เรียกเอนไซม์ที่สกัดจากวิธีนี้ว่า recombinant PfCA II และนำไปศึกษาการทำงานของเอ็นไซม์ โดยวิธีสเปคโตรโฟโตเมตรี (Krungkrai et al. 2001) รวมถึง

การศึกษาลักษณะทางชีวเคมีทั่วไป เช่น ศึกษาทางจลนศาสตร์เพื่อหาค่า K_m K_i เป็นต้น และเปรียบเทียบค่าที่ได้กับเอนไซม์ PfCA I และเอ็นไซม์ที่สกัดได้จากการเพาะเลี้ยงในจานทดลอง (*in vitro*)

3.5 ศึกษารูปแบบ (model) และโครงสร้างของเอนไซม์ CA ในรูปที่อิสระ (free) และรูปที่จับกันเป็นคอมเพล็ก (complexed) กับตัวยับยั้งในกลุ่ม aromatic sulfonamides ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการของ Professor Dr. Supuran, C.T. และ Professor Dr. Scozzafava, A. โดยใช้ structure-activity relationship (SAR)

3.6 ศึกษาผลของยาในกลุ่ม aromatic sulfonamides ในการยับยั้งเอ็นไซม์ PfCA II และ PfCA I

3.7 ศึกษาผลของยาในกลุ่ม aromatic sulfonamides ที่มีต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Plasmodium falciparum*

4. แผนการดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการในแต่ละช่วง 6 เดือน

ระยะเวลาการวิจัย (เดือน)												
กิจกรรม	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
1. สืบหายีน PfCA II จากฐานข้อมูล	←	→										
2. ออกแบบไพร์เมอร์พร้อมทั้งเพิ่มปริมาณยีน PfCA II		←	→									
3. โคลนยีน PfCA II และศึกษาการแสดงออก			←	—	—	→						
4. สกัดเอ็นไซม์ศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆทางชีวเคมี							←	—	—	—	→	
5. เขียนบทความวิจัยฉบับสมบูรณ์											←	→

5. ผลงาน/หัวข้อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติในแต่ละปี

ปีที่ 1 : ชื่อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์ : -

ชื่อวารสารที่คาดว่าจะตีพิมพ์ : -

ปีที่ 2 : ชื่อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์ : Inhibition of *Plasmodium falciparum* carbonic anhydrase with aromatic sulfonamides

ชื่อวารสารที่คาดว่าจะตีพิมพ์ : "*Mol. Biochem. Parasitol.*" มี impact factor 2.882 หรือ "*Biochim. Biophys. Res. Commun.*" มี impact factor 2.836 หรือ "*J. Med. Chem.*" มี impact factor 2.836 หรือ "*Eur. J. Med. Chem.*" มี impact factor 1.681

6. งบประมาณโครงการ

รายการ	ปีที่ 1	ปีที่ 2	รวม
1. หมวดค่าตอบแทน			
- ค่าตอบแทนหัวหน้าโครงการ 5,000 บาท/เดือน	60,000	60,000	120,000
2. หมวดค่าวัสดุ			
2.1 ค่าสารเคมี			
- ค่าสังเคราะห์ primer	10,000	-	10,000
- ค่าอาหารเลี้ยงเชื้อมาเลเรีย	15,000	15,000	30,000
- ค่าสารเคมีทางอณูชีววิทยา	60,000	30,000	90,000
- ค่าสารเคมีทางชีวเคมี	10,000	50,000	60,000
- ค่าวิเคราะห์ต่างๆ เช่น หาลำดับเบส	10,000	10,000	20,000
- ค่าเครื่องแก้ว และวัสดุสิ้นเปลือง	10,000	10,000	20,000
2.2 ค่าวัสดุสำนักงาน ค่าถ่ายเอกสาร	5,000	5,000	10,000
รวมงบประมาณโครงการ	**180,000**	**180,000**	**360,000**