

บทบาทของยาต้านแคลเซียมในการรักษามาลาเรีย

ศศ.ดร. จุฬามาต สัตยวิวัฒน์

ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

มาลาเรียเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศในเขตร้อน ซึ่งรวมทั้งประเทศไทยด้วย ได้มีความพยายามหาวิธีการต่าง ๆ เพื่อที่จะกำจัดมาลาเรียให้หมดสิ้นไป แต่ก็ไม่ประสบความสำเร็จปัจจัยที่สำคัญ คือความล้มเหลวในการกำจัดยุงซึ่งเป็นพาหะของโรคและปัญหาเชื้อดื้อยา ดังนั้นจึงได้มีความพยายามที่จะพัฒนายาใหม่ ๆ ขึ้นทั้งจากการสังเคราะห์ทางเคมี การสกัดสารบริสุทธิ์จากสมุนไพรและการทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อมาลาเรียของยาอื่น ๆ ที่มีอยู่ในท้องตลาด เช่น ยาฆ่าเชื้อรา ketoconazole และยาต้านแคลเซียม เช่น verapamil เป็นต้น

บทบาทของแคลเซียมต่อเชื้อมาลาเรีย

แคลเซียมไอออน เป็นสิ่งจำเป็นสำหรับกลไกการควบคุมการทำงานต่าง ๆ ของเซลล์โดยทั่วไปแล้วเซลล์จะต้องใช้พลังงานเป็นจำนวนมากพอที่จะทำให้ระดับของประจุแคลเซียมอิสระใน cytoplasm อยู่ในระดับต่ำในกรณีของเม็ดเลือดแดงทำได้โดยการ

1. มี plasma membrane binding Ca^{++}
2. มี low membrane Ca^{++} permeability
3. active extrusion by Ca^{++} , Mg^{++} ATPase pump

ในภาวะที่มีการเพิ่มปริมาณของ Ca^{++} ภายในเซลล์มากผิดปกติจะพบว่าเม็ดเลือดแดงจะมี deformability ลดลง

ได้มีผู้พบว่าการศึกษาที่เชื้อมาลาเรียเข้าไปในเม็ดเลือดแดงจะส่งผลให้ปริมาณของแคลเซียมทั้งหมดภายในเม็ดเลือดแดงมีค่าสูงกว่าเม็ดเลือดแดงที่ไม่ได้ติดเชื้อที่นำส่งเกิดคือถ้าหากมีการเพิ่มปริมาณแคลเซียมอิสระมาก ๆ ในเซลล์ มักจะทำให้เกิด crenation แต่การไม่เกิดลักษณะเช่นนี้ในเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อมาลาเรียแสดงว่าปริมาณของแคลเซียมอิสระอาจจะไม่มากพอทำให้เกิด crenation จากการใส่แคลเซียมติดฉลากกัมมันตภาพรังสี (^{45}Ca) พบว่าแคลเซียมจะจับอยู่กับส่วนที่เป็น erythrocyte membrane มีผู้เสนอว่าปริมาณของแคลเซียมอิสระที่เพิ่มมากขึ้นเล็กน้อยแต่ก็เพียงพอที่จะกระตุ้นเอ็นไซม์ต่าง ๆ ได้เช่น procalpain จะถูกกระตุ้นเป็น active form (calpain) ซึ่งย่อย hemoglobin ได้

สำหรับบทบาทของแคลเซียมต่อเชื้อมาลาเรียพบว่าหลังจาก invasion แล้ว extracellular calcium จะมีความสำคัญมากต่อการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย หากระดับของแคลเซียมต่ำกว่า $100 \mu\text{mol}$ จะหยุดการเจริญเติบโตของเชื้อได้ แต่หลังจาก ring stage แล้วการลด extracellular calcium จะไม่หยุดการเจริญเติบโตของเชื้อแต่จะชะดขวาง reinvasion สำหรับบทบาทของแคลเซียมต่อเอ็นไซม์ต่าง ๆ ของเชื้อกำลังอยู่ในขั้นการวิจัยอยู่ เช่น parasite serine protease เป็นต้น

Calmodulin ค้นพบเมื่อปี ค.ศ. 1970 เป็นโปรตีนที่จับแคลเซียมที่เป็นอิสระแล้วสามารถกระตุ้นการทำงานของเอ็นไซม์ได้หลายชนิด พบว่า calmodulin กระตุ้นการทำงานของ Ca^{++} -dependent enzymes เช่น phosphodiesterase, kinases เป็นต้น แคลเซียมเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย พบว่า calmodulin มีความสำคัญใน cellular metabolic activities ต่าง ๆ โดยเฉพาะที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์และการแบ่งตัวของเซลล์

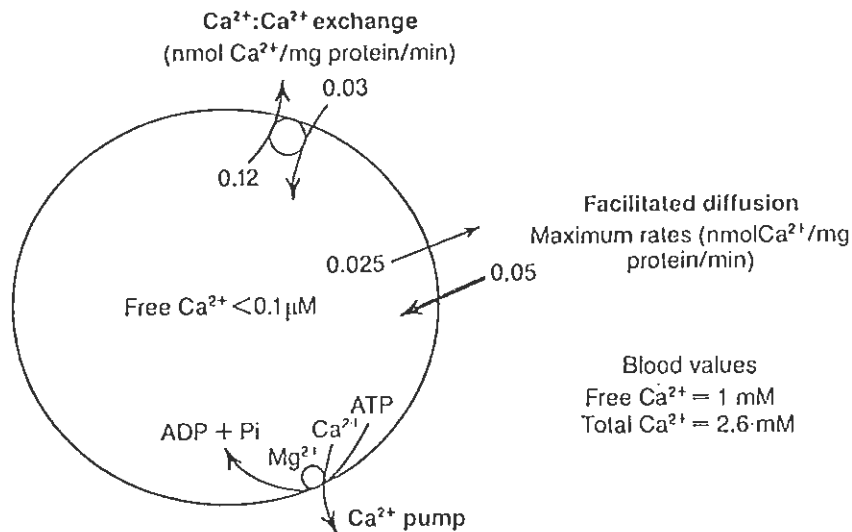


Fig. 1. Ca^{2+} fluxes in normol human erythrocytes. Properties of the Ca^{2+} pump: number of pumps per erythrocyte = 2000 (0.5% of the membrane protein); $K_{\text{Ca}} = 10^{-6}$ M or less, under optimal assay conditions; $K_m < 10$ μM ATP, for the phosphorylation reaction; maximal velocity of Ca^{2+} translocation in human red cells ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein/min²): with calmodulin = 0.065, without calmodulin = 0.014. (Data from Ref. 1.)

* Estimated assuming a membrane protein content of 10 g/l red cells.

ยาด้านแคลเซียมและฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อมาลาเรีย

ยาด้านแคลเซียมมีตำแหน่งในการออกฤทธิ์ต่าง ๆ กัน ยาที่นำมาใช้ทดสอบประสิทธิภาพฆ่าเชื้อมาลาเรียได้แก่ยาด้านฤทธิ์แคลเซียมที่เรียกว่า calcium channel blocker เช่น verapamil และพวกที่เป็น calmodulin antagonists เช่น chlorpromazine, cyclosporin A เป็นต้น เนื่องจากยาฆ่าเชื้อมาลาเรียที่มีใช้กันมาช้านาน เช่น quinacrine, quinine และ chloroquine มีผู้รายงานว่ามีความสัมพันธ์เป็น calmodulin antagonists ด้วย จึงมีผู้ให้ความสนใจและได้มีการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อมาลาเรียและความแรงในการเป็น calmodulin antagonists เป็นจำนวนมากและพบว่าส่วนใหญ่มีความสัมพันธ์กัน

การดื้อยากลอโรควิน

ในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียเฉียบพลัน การใช้ยาที่ออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อได้อย่างรวดเร็ว มีความสำคัญมาก คลอโรควินเป็นยาที่ดื้อออกฤทธิ์ได้เร็ว แต่ปัญหาที่เกิดขึ้น คือ เชื้อมาลาเรียในคน *Plasmodium falciparum* ดื้อยา ซึ่งปัญหานี้พบมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1960 เป็นต้นมา

คลอโรควินฆ่าเชื้อมาลาเรียได้อย่างไร? ก่อนปี ค.ศ. 1986 นักวิทยาศาสตร์ได้ให้ความสนใจว่ามีทางเป็นได้ดังนี้

1. Ferriprotoporphyrin ix (FP) complexation hypothesis คลอโรควินออกฤทธิ์โดยการทำให้ FP เข้าไปถูกจับไว้ใน malaria pigment ได้ช้าลง ทำให้ FP อิสระสามารถออกฤทธิ์ทำลายเซลล์ได้

2. Lysosomotropic weak base hypothesis คลอโรควินเป็น weak base เมื่อผ่านผนังเซลล์จะอยู่ในสภาพเป็น singly positively charged แต่เมื่อเข้าเซลล์แล้ว จะเป็น doubly protonated ซึ่งจะผ่านออกไม่ได้ จึงจะทำให้มีการสะสมของยาซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพความเป็นกรดต่างของ acidic organelles เช่น lysosomes และ phagosomes ทำให้ขัดขวางการย่อยสลาย haemoglobin ทำให้เชื้อตาย เพราะขาดกรดอะมิโนที่จะนำไปสังเคราะห์เป็นโปรตีน

ในระยะหลัง ๆ ได้มีผู้เสนอว่าฤทธิ์ในการเป็น calmodulin antagonist น่าจะมีความสัมพันธ์กับการฆ่าเชื้อมาลาเรีย ดังนั้นจึงยังไม่สามารถสรุปได้ว่ากลไกที่แท้จริง เป็นอย่างไร? และกลไกที่กล่าวมาข้างต้นมีความสัมพันธ์กันอย่างไร? และกลไกใดจะมีความสำคัญมากน้อยกว่ากัน

ทำไมเชื้อมาลาเรียจึงดื้อยาคลอโรควิน มีผู้เชื่อกันว่าเชื้อที่ดื้อยาจะมีการเก็บสะสมของยาคลอโรควินน้อยกว่าเชื้อที่ยังไวต่อมา ทำไมจึงเป็นเช่นนั้น?

ยาต้านแคลเซียมและการเพิ่มประสิทธิภาพยาคลอโรควินในภาวะเชื้อดื้อยา

แนวความคิดในการนำยาด้านแคลเซียม verapamil มาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพยาคลอโรควินในภาวะเชื้อดื้อยา (reversal of chloroquine resistance) ได้มาจากการวิจัยที่พบว่ายาที่รักษาโรคมะเร็ง จะมีการเกิดการดื้อยาขึ้น เช่นยาพวก Vinca alkaloids, anthracyclines เป็นต้น ประสิทธิภาพของยาเหล่านี้ขึ้นอยู่กับความสามารถในการสะสมของยาในเซลล์มะเร็งและพบว่าเมื่อดื้อยาลักษณะหนึ่งมักจะดื้อกับยาลักษณะอื่น ๆ ด้วย จึงให้คำจำกัดความว่า multidrug resistance และเมื่อศึกษาให้ลึกซึ้งต่อไปพบว่า การดื้อยาของเซลล์มะเร็งเกิดเนื่องจากการมีวิธีการขับยาออกจากเซลล์ได้เพิ่มขึ้นอย่างมากทำให้ยาไม่ถูกสะสมภายในเซลล์มะเร็งถ้าหากมีขัดขวางการขับยาออกจากเซลล์ ยานั้นก็จะถูกสะสมได้และฆ่าเซลล์มะเร็งได้ จากการใช้ verapamil พบว่าทำให้เซลล์มะเร็งที่ดื้อยากลับไวต่อยาอีก จากแนวความคิดนี้จึงมีการนำเอา verapamil มาใช้เพื่อ reverse chloroquine resistance ในเชื้อ *Plasmodium falciparum* และพบว่า verapamil ทำให้เชื้อที่ดื้อยาคลอโรควินกลับสภาพเป็นเชื้อที่ไวต่อมาคลอโรควินได้

ปัจจุบันมีการใช้ verapamil เพื่อเสริมฤทธิ์ของยารักษามะเร็งในผู้ป่วยที่ดื้อยา พบว่ามี MDR₁ gene expression เพื่อสร้าง P-glycoprotein มากขึ้น สำหรับเชื้อมาลาเรียที่ดื้อยาคลอโรควินพบว่า verapamil ทำให้เชื้อกลับไวต่อยาคลอโรควินได้อีก โดยขนาดยา verapamil ที่ใช้ในหลอดทดลองน้อยกว่าขนาดที่มีฤทธิ์เป็น antimalarial drug เชื่อกันว่า P-glycoprotein ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ pump ซึ่งทำหน้าที่ขับยาออกจากเซลล์จัดอยู่ในพวก ATP-driven transport system จะมีบทบาทสำคัญโดยทำให้เพิ่มการขับถ่ายยาคลอโรควินออกจากเซลล์โดยอาศัย pump ทำให้มีปริมาณยาในเซลล์ลดน้อยลง ในเชื้อมาลาเรียพบว่ามี gene 2 ชนิด ซึ่ง code P-glyco-protein อยู่ซึ่งเรียกว่า pfmdr₁ และ pfmdr₂

สรุป

ได้มีการพบว่า calcium channel blockers (verapamil) และ calmodulin inhibitors มี antimalarial activity นอกจากนั้นยังพบว่า verapamil สามารถทำให้เซลล์มะเร็งและเชื้อมาลาเรียที่ดื้อยากลับมีความไวต่อยาได้อีก โดยอธิบายว่า การดื้อยาเกิดจากการสร้าง P-glycoprotein ซึ่ง coded โดย MDR₁

ในคน) pfmdr_1 (ในเชื้อมาลาเรีย) เพิ่มขึ้น P-glycoprotein ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ pump ที่คอยขับยาออกจากเซลล์ เป็นขบวนการที่ต้องอาศัย ATP ทำให้มีปริมาณยาที่ตำแหน่งออกฤทธิ์น้อยลง verapamil แย่งที่จับของยา ซึ่งจับกับ P-glyco-protein ทำให้ ยาไม่ถูกขับออกจากเซลล์จึงมีการสะสมภายในเซลล์ เนื่องจาก calcium antagonists มีฤทธิ์ต่อหลอดเลือด หัวใจ ด้วยการให้ยากลุ่มนี้อาจทำให้เกิด อาการข้างเคียงเกี่ยวกับระบบหมุนเวียนเลือดได้

ยาด้านแคลเซียมเป็นกลุ่มยาที่มีตำแหน่งการออกฤทธิ์ได้หลายแห่ง ในการรักษาโรคทางระบบไหลเวียนเลือด และระบบประสาท อาศัยการออกฤทธิ์ของยาซึ่งตำแหน่งออกฤทธิ์อยู่ที่ voltage-sensitive L-type channel นอกจากจับกับ channel นอกจากจับกับ channel เหล่านี้แล้ว calcium antagonist ยังจับได้กับโปรตีนซึ่งเป็น transporter เช่น ATP-dependent efflux pump (p-glycoprotein) แต่มี affinity ต่ำกว่า L-type channels นอกจากนั้นยังมีการค้นพบว่า เมื่อใช้ isomers ของ verapamil, gallopamil และ devapamil ซึ่งจับกับ L-channels ได้ไม่ดี ก็พบว่าทำให้เชื้อที่ดื้อยากลับมีความไวต่อยาได้อีก ดังนั้นแนวทางต่อไปคือการพยายามหาว่าที่ออกฤทธิ์ที่ P-glycoprotein โดยตรงและมี affinity สูง เพื่อหลีกเลี่ยงอาการข้างเคียง

แต่เนื่องจากมีรายงานว่ายาที่เป็น calmodulin inhibitors จำนวนมากยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียได้ บทบาทของแคลเซียมที่เกี่ยวกับสรีรวิทยาของเชื้อ และการดื้อยาจะต้องมีการศึกษาต่อไป

บรรณานุกรม

22. Akiyama S, Shiraishi N, Kuratomi Y, et al. Circumvention of multiple-drug resistance in human cancer cells by thioridazine, trifluoperazine, and chlorpromazine. *JNCI* 1986;76:839-844.
2. Bitonti AJ, Sjoerdsma A, McCann PP, et al. Reversal of chloroquine resistance in malaria parasite *Plasmodium falciparum* by desipramine. *Science* 1988;242:1301-1303.
3. Bunnag D and Harinasuta T. The current status of drug resistance in malaria. *Inter. J Parasitology* 1987;17:169-180.
4. Dickson RB, Gottesman MM. Understanding of the molecular basis of drug resistance in cancer reveals a new targets for chemotherapy. *Trends Pharmacol Sci* 1990;11:305-307.
5. Ferrante J, Triggle DJ. Drug-and disease-induced regulation of voltage-dependent calcium channels. *Pharmacol Rev* 1990;42:29-44.
6. Fitch CD. Antimalarial schizontocides: Ferriprotoporphyrin IX interaction hypothesis. *Parasitology Today* 2:330-331, 1986.
7. Foote SJ et al. Several alleles of the multidrug-resistance gene are closely linked to chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Nature* 1990;345:255-258.
8. Ford JM, Hait WN. Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer. *Pharmacol Rev* 1990;42:156-199.
9. Geary TG, Jensen JB, Ginsburg H. Uptake of (^3H) chloroquine by drug-sensitive and-resistant strains of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochem Pharmacol* 1986;
10. Krishna S, Squire-Pollard L. Calcium metabolism in malaria-infected erythrocytes. *parasitology today* 1990;6:196-198.
11. Krogstad DJ, Gluzman IY, Kyle DE, et al., Efflux of chloroquine from *Plasmodium falciparum*: Mechanism of chloroquine resistance. *Science* 1987;238:1283-1285.
12. Lazo JS, Bahnson RR. Pharmacological modulators of DNA-interactive antitumor drugs. *Trends Pharmacol Sci* 1989;10:369-373.
13. Martin SK, Oduola AMJ, Milhous WK. Reversal of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* by verapamil. *Science* 1987;235:899-901.
14. Mazumdar B, Mukherjee S, NagDas Sk, et al. The interaction of chloroquine with transport ATPase and acetylcholinesterase in microsomal membranes of rat *in vitro* and *in vivo*. *Biochem International* 1988;16:35-44.

15. Merkli B, Richle R. The inhibitory effect of a drug combination on the development of mefloquine resistance in *Plasmodium berghei*. *Ann Trop Med Parasit* 1980;74:1-9.
16. Newbold C. The path of drug resistance. *Nature* 1990;345:202-203.
17. Peters W. Antimalarial drug resistance : An increasing problem. *Br Med Bull* 1982;38:187-192.
18. Prozialeck WC, Weiss B. Inhibition of calmodulin by phenothiazines and related drugs : structure-activity relationship. *J Pharmacol Exp Ther* 1982;222:509-516.
19. Rasmussen H, Barrett PQ. Calcium messenger system : A integrated view. *Physiol Rev* 1984;64:938-984.
20. Rogan AM, Hamilton TC, Young RC, et al., Reversal of adriamycin resistance by verapamil in human ovarian cancer. *Science* 1984;224:994-996.
21. Salomone S, Godfraind T. Drugs that reverse chloroquine resistance in malaria. *Trends Pharmacol Sci* 1990;11:476.
22. Scheibel LW, Colombani PM, Hess AD, et al., Calcium and calmodulin antagonists inhibit human malaria parasites (*Plasmodium falciparum*) : Implications for drug design. *Proc Natl Acad Sci* 1987;84:7310-7314.
23. Satayavivad J, Wongswatkul O., Bunnag D, et al; Flunarizine and verapamil inhibit chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* growth in vitro. *Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth* 1987; 18:253-258.
24. Tanabe K, Mikkelsen RB, Wallach DFH. Calcium transport of *Plasmodium chabaudi*-infected erythrocytes *J Cell Biol* 1982;93:680-684.
25. Tanabe K, Kato M, Izumo A, et al., *Plasmodium chabaudi* : In vivo effects of Ca^{2+} antagonists on chloroquine-resistant and chloroquine-sensitive parasites. *Exp Parasitol* 1990;70:419-426.
26. Warhurst DC. Antimalarial schizontocides : Why a permease is necessary. *Parasitology Today* 1986;2:331-334.
27. Wellems TE et al., Chloroquine resistance not linked to *mdr*-like genes in *Plasmodium falciparum* cross. *Nature* 1990;345:254-255.
28. Ye. Z, Van Dyke K. Reversal of chloroquine resistance in *falciparum* malaria independent of calcium channels. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;155:476-481.
29. Zernig G. Widening potential for Ca^{2+} antagonists : non-L-type Ca^{2+} Channel interaction. *Trends Pharmacol Sci* 1990;11:38-44.