

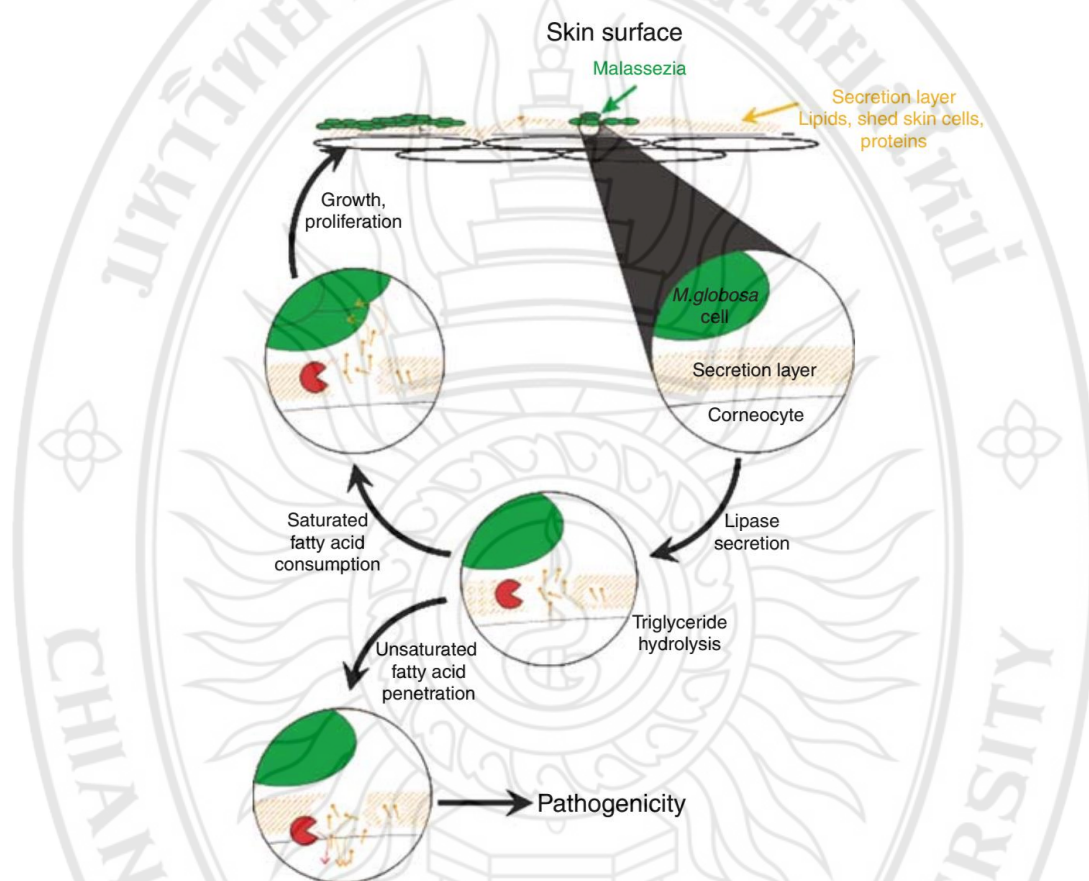
บทที่ 2

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เชื้อ *Malassezia* เป็น Basidiomycete yeast ที่พบได้ทั่วไปบนผิวหนังของคนและสัตว์เลื้อยคลาน และเป็นสาเหตุก่อโรคผิวหนังหลายโรคเช่น เกื้อน (pityriasis versicolor (PV)), seborrheic dermatitis (SD), dandruff และ atopic dermatitis (AD) [1,2] และมีรายงานพบสภาวะติดเชื้อ *Malassezia* ในกระแสเลือด (sepsis) ได้ในเด็กทารกผ่านทางสายให้อาหารทางหลอดเลือด (catheter) [3] ในปัจจุบันเชื้อ *Malassezia* ได้รับการจำแนกแล้วกว่า 18 สปีชีส์ได้แก่ *M. arunaloakei*, *M. brasiliensis*, *M. caprae*, *M. cuniculi*, *M. dermatis*, *M. equina*, *M. furfur*, *M. globosa*, *M. japonica*, *M. nana*, *M. obtuse*, *M. pachydermatis*, *M. psittaci*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. sympodialis*, *M. vespertilionis* และ *M. yamatoensis* [4-7] โดยเชื้อ *Malassezia* ทุกสปีชีส์ยกเว้น *M. pachydermatis* มีคุณสมบัติเป็น lipid-dependent เนื่องจากขาดยีนที่สร้างเอนไซม์สังเคราะห์กรดไขมัน จึงจำเป็นต้องพึ่งพาแหล่งไขมันจากสิ่งแวดล้อมซึ่งก็คือไขมันบนผิวหนังของเจ้าบ้านในการเจริญเติบโต [8]

แม้ว่า *Malassezia* เป็นเชื้อยีสต์ที่สามารถพบได้บนผิวหนังของมนุษย์ทุกคน แต่ใช้ว่ามนุษย์ทุกคนจะต้องเป็นโรคผิวหนังจาก *Malassezia* เสมอไป โดยมีผู้ป่วยเป็นบางส่วนของประชากรเท่านั้น ในปัจจุบันยังไม่ทราบสาเหตุหรือกลไกในการก่อโรคที่แน่ชัด จากการศึกษาเชิงเปรียบเทียบระหว่างผิวหนังคนปกติและผิวหนังบริเวณรอยโรคพบว่ามีความแตกต่างหลายประการเช่น ปริมาณเชื้อ, ชนิดหลักของเชื้อ (predominant species) ที่แตกต่างไปตามชนิดโรคและภูมิประเทศ, สัณฐานของเชื้อ, ค่า pH ของผิวหนัง เป็นต้น [9] มีรายงานว่า เมื่อ pH เพิ่มขึ้น เชื้อ *M. sympodialis* จะสร้างสารก่อภูมิแพ้ Mala s 11 เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับสภาพแวดล้อมของผิวหนังผู้ป่วย AD ที่มีค่า pH สูงกว่าผิวหนังปกติคือมีค่า pH สูงกว่า 6 (ผิวหนังปกติมีค่า pH ประมาณ 5.5) [10] แต่การสร้างสารก่อภูมิแพ้ที่เพิ่มขึ้นไม่สามารถอธิบายปรากฏการณ์สภาวะเพิ่มจำนวนอย่างผิดปกติ (hyper proliferation) ของเชื้อ *Malassezia* บนผิวหนังที่ปรากฏรอยโรคได้ เพราะสารก่อภูมิแพ้ดังกล่าวเป็นเพียงสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่เชื้อสร้างขึ้นเท่านั้น ไม่ได้เป็นสารที่จำเป็นต่อการเจริญของเชื้อโดยตรง ในประเด็นนี้ มีผู้เสนอแบบจำลองสมมุติฐานการก่อโรคของเชื้อ *Malassezia* ว่าเนื่องจากเชื้อ *Malassezia* ที่ก่อโรคบนผิวหนังมนุษย์ทุกสปีชีส์เป็นสปีชีส์ที่ต้องการไขมันจากสิ่งแวดล้อมในการเจริญเติบโตหรือเป็น lipid-dependent species เชื้อจึงต้องหลั่งเอนไซม์ lipase ออกมาภายนอกเซลล์เพื่อย่อยไขมันบนผิวหนังให้อยู่ในรูปกรดไขมันที่สามารถดูดซึมใช้

ในเซลล์เพื่อการเจริญได้ โดยกรดไขมันจำนวนหนึ่งจะถูกนำไปใช้ในการเจริญเติบโตของเชื้อ และบางส่วนก็ซึมไปได้ผิวหนัง เมื่อเชื้อสร้างและหลั่งเอนไซม์ lipase มากขึ้น กรดไขมันบนผิวหนังก็เพิ่มมากขึ้น เชื้อต่อสภาวะเพิ่มจำนวนอย่างผิดปกติของเชื้อ และกรดไขมันที่เพิ่มขึ้นนี้ บางส่วนอาจซึมลงสู่ผิวหนังชั้นล่างก่อให้เกิดอาการระคายเคืองและอักเสบได้อีกด้วย [11] (ภาพที่ 2.1)



ภาพที่ 2.1 แบบจำลองการก่อโรคของเชื้อ *Malassezia*

ที่มา : DeAngelis et al. (2007)

หลักฐานที่สนับสนุนสมมุติฐานนี้คือ ผลการวิเคราะห์จีโนมของ *M. globosa* และ *M. restricta* พบยีนที่บันทึกข้อมูลของเอนไซม์ lipase เป็นจำนวนมากคือ 14 (13) และ 5 (3) ยีนตามลำดับ (ตัวเลขในวงเล็บแสดงจำนวนยีนที่คาดว่าเป็นยีนของ secretory lipase) [8] โดยลำดับกรดอะมิโนของ ORF ของยีน lipase แสดงให้เห็นว่าเกือบทุก lipase เป็น secretory lipase ที่มี secretory signal peptide ซึ่งเป็นสัญญาณเฉพาะสำหรับโปรตีนที่ถูกส่งไปภายนอก

เซลล์เมื่อมีการสังเคราะห์ แสดงให้เห็นว่าเกือบทั้งหมดเป็นเอนไซม์สำหรับหลั่งสู่ภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme หรือ secretory enzyme) เพื่อย่อยไขมันบนผิวหนัง [12,13]

สำหรับการศึกษาความสัมพันธ์ของ lipase และการก่อโรคนั้น มีรายวิจัยที่พบว่าเชื้อ *Malassezia* ไอโซเลทที่แยกได้จากผิวหนังรอยโรคมีกิจกรรมเอนไซม์ lipase ภายนอกเซลล์ (extracellular lipase activity) สูงกว่าไอโซเลทที่แยกได้จากผิวหนังปกติ [14] และเมื่อฐานข้อมูล whole genome ของ *M. globosa* และ *M. restricta* เสร็จสมบูรณ์ [12] การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับ เอนไซม์ lipase ในเชื้อ *Malassezia* ได้ก้าวหน้าอย่างมากในเชื้อ 2 สปีชีส์นี้ โดยยีน *LIP1* ของ *M. globosa* ได้ถูกนำมาศึกษาคุณสมบัติความจำเพาะต่อซับสเตรทและการแสดงออกของยีนในแต่ละไอโซเลทของ *M. globosa* [11] ต่อมาการศึกษาโครงสร้างสามมิติของผลึกเอนไซม์ Lip1 และใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ชื่อ Glide Schrödinger ช่วยคำนวณหาสารเคมีในฐานข้อมูลที่มีโครงสร้างที่เหมาะสมสามารถจับกับตำแหน่งสำคัญของเอนไซม์นี้ได้ ซึ่งมีประโยชน์อย่างมากในการหากลุ่มสารเคมีที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่มีความจำเพาะสูง และสามารถนำไปใช้พัฒนายารักษาโรคจากเชื้อ *M. globosa* [15] แต่อย่างไรก็ตามต่อมาได้พบว่าเอนไซม์ lipase ชนิดหลักที่ *M. globosa* หลั่งภายนอกเซลล์นั้นไม่ใช่ Lip1 แต่เป็นเอนไซม์ *MgLip2* จากยีน *MgLIP2* [16] นอกจากนี้เมื่อศึกษาการแสดงออกของยีน lipase ทั้ง 13 ยีนในระดับ transcription ของ *M. globosa* และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์โดยใช้ expression vector ของยีสต์ *Pichia pastoris* พบว่าเอนไซม์ที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์และระดับการแสดงออกในระดับ transcription สูงสุด และมีความจำเพาะต่อไขมัน triglyceride ที่พบได้มากบนผิวหนังคือเอนไซม์ *MgLip2* [17] สำหรับเชื้อ *M. restricta* พบว่าเอนไซม์ lipase ที่มีการแสดงออกสูงสุดคือ Lip5 ที่บันทึกในยีน *MRES_03670* [18]

สำหรับการศึกษาเอนไซม์ lipase ของเชื้อ *M. furfur* พบว่ามีรายงานน้อยมากเมื่อเทียบกับ *M. globosa* และ *M. restricta* แม้ว่าเชื้อ *M. furfur* จะมีความสำคัญไม่แพ้กัน เพราะเป็นสปีชีส์ที่พบมากในผู้ป่วยโรคเกลื้อนและเป็นเพียงสปีชีส์ที่พบในคนเพียงสปีชีส์เดียวที่สามารถก่อสภาวะติดเชื้อในกระแสเลือดได้ [19] จากการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของเอนไซม์ lipase ของ *M. furfur* พบว่า optimum pH เท่ากับ 5.0 ซึ่งใกล้เคียงกับค่า pH ของผิวหนัง และเมื่อเติมสาร sodium taurocholate (STC) ที่กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ lipase พบว่าเชื้อมีการเจริญเติบโตมากขึ้นและมีการสร้างสายราเพิ่มขึ้นตามปริมาณของ STC ที่เติมลงไป แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของเอนไซม์นี้ต่อการเจริญเติบโตของ *M. furfur* [20] ต่อมาในรายงานวิจัยของ [21] ที่ใช้เทคนิค Fast protein liquid chromatography (FPLC) วิเคราะห์ secretory protein ที่เชื้อ *M. furfur* สร้าง พบพีกของกิจกรรมเอนไซม์ lipase ที่แตกต่างกันจำนวน 3 พีก แสดงให้เห็นว่าน่าจะมี secretory lipase อย่างน้อย 3 ชนิด และค่า optimum pH ของ lipase เหล่านั้นเท่ากับ 7 แต่ในรายงานนี้ผู้วิจัยยังไม่สามารถสกัดเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ได้ ซึ่งต่อมา มีการ

ใช้ expression vector ของ *P. pastoris* ศึกษากิจกรรมเอนไซม์ lipase ของยีน *MfLIP1* ของ *M. furfur* พบว่าเอนไซม์ lipase ที่ได้เป็น secretory lipase เพราะพบ N-terminal signal peptide จำนวน 26 amino acids และมี optimum temperature ที่ 40 °C และ optimum pH เท่ากับ 5.8 สามารถไฮโดรไลซ์ไขมันชนิดต่าง ๆ และ Tween ได้ และกิจกรรมเอนไซม์ถูกยับยั้งด้วยไอออนของโลหะที่มีประจุ 2⁺ (divalent metal ion) [22] แต่หลังจากนั้น ก็ไม่มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับ lipase ของ *M. furfur* ทางอนุชีววิทยาอีกเลย และยังไม่มีฐานข้อมูล whole genome ที่สมบูรณ์ของ *M. furfur* แต่ในฐานข้อมูลยีนของ GenBank ในปัจจุบันพบว่ามียีน lipase ของ *M. furfur* ที่แตกต่างกันจำนวนทั้งสิ้น 6 ยีน โดยเป็น complete sequence จำนวน 4 ยีน (*LIP1-4*) และ partial sequence จำนวน 2 ยีน (*LIP5-6*)

อย่างไรก็ตาม รายงานการศึกษาเกี่ยวกับยีนและเอนไซม์ lipase ในเชื้อ *Malassezia* ทั้งหมดที่มีในปัจจุบันเป็นเพียงการศึกษาภายใต้สภาวะใดสภาวะหนึ่งที่เชื้อเจริญในห้องปฏิบัติการเท่านั้น ยังไม่มีรายงานการศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของกิจกรรมเอนไซม์หรือการแสดงออกของยีนภายใต้เงื่อนไขสภาพแวดล้อมที่ต่างกัน แม้แต่ในเชื้อ *M. globosa* และ *M. restricta* ที่มีฐานข้อมูล whole genome สมบูรณ์ก็ยังไม่มีการศึกษาในลักษณะนี้ แต่เนื่องจากเชื้อ 2 สปีชีส์นี้เลี้ยงยากมากในอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงไม่เหมาะสมในการนำมาศึกษาในห้องปฏิบัติการ ซึ่งในข้อนี้ *M. furfur* มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นโมเดลในการศึกษาการก่อโรคในห้องปฏิบัติการมากกว่า *M. globosa* และ *M. restricta* เนื่องจากเลี้ยงค่อนข้างง่ายกว่ามาก และมีความสำคัญในการก่อโรคในคนเช่นเดียวกัน ซึ่งการศึกษากการแสดงออกของยีน lipase เหล่านี้ภายใต้สภาวะ pH ที่ต่างกัน จะช่วยให้เข้าใจบทบาทและความสัมพันธ์ของสภาวะแวดล้อมที่ส่งผลต่อการแสดงออกของยีนกลุ่ม lipase ซึ่งประโยชน์ที่จะได้นอกจากองค์ความรู้ในการอธิบายกลไกการก่อโรคของเชื้อ *M. furfur* แล้ว ยังสามารถนำไปต่อยอดสำหรับการพัฒนาออกแบบสารเคมีหรือยาที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ lipase ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อใช้ในการรักษาโรคที่เกิดจาก *M. furfur* ได้อีกด้วย