บทที่ 2

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เชื้อ *Malassezia* เป็น Basidiomycete yeast ที่พบได้ทั่วไปบนผิวหนังของคนและสัตว์เลือดอุ่น และเป็นสาเหตุก่อโรคผิวหนังหลายโรคเช่น เกลื้อน (pityriasis versicolor (PV)), seborrheic dermatitis (SD), dandruff และ atopic dermatitis (AD) [1,2] เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีรายงานพบสภาวะติดเชื้อ *Malassezia* ในกระแสเลือด (sepsis) จาก *Malasseia* ในเด็กทารกผ่านทางสายให้อาหารทางหลอดเลือด (catheter) [3] ในปัจจุบันเชื้อ *Malassezia* ได้รับการจำแนกแล้วกว่า 18 สปีชีส์ได้แก่ *M. arunalokei, 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 สปีชีส์ที่พบมากในมนุษย์คือ *M. furfur*, *M. globosa* และ *M. restricta* [8]

แม้ว่า *Malassezia* เป็นเชื้อยีสต์ที่สามารถพบได้บนผิวหนังของมนุษย์ทุกคน แต่มีบางเคสเท่านั้นที่ป่วยเป็นโรคผิวหนัง ซึ่งในปัจจุบันยังไม่ทราบสาเหตุหรือกลไกในการก่อโรคของเชื้อ *Malassezia* ที่แน่ชัด จากการศึกษาเชิงเปรียบเทียบระหว่างผิวหนังคนปกติและผิวหนังบริเวณรอยโรคพบว่ามีความแตกต่างหลายประการเช่น ปริมาณเชื้อ, ชนิดหลักของเชื้อ (predominant species) ที่แตกต่างไปตามชนิดโรคและภูมิประเทศ, สัณฐานของเชื้อ, ค่า pH ของผิวหนัง เป็นต้น [9-11] เพื่ออธิบายกลไกการเกิดโรค ได้มีการศึกษาถึง virulence factor ต่าง ๆ ที่เชื้อสร้างขึ้นมา และหนึ่งในสิ่งที่เป็นเอกลักษณ์โดดเด่นคือ เมื่อนำตัวอย่างเชื้อจากผิวหนังบริเวณรอยโรคเกลื้อนมาย้อมสีสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จะพบสัณฐานของเชื้อ *Malassezia* ที่เปลี่ยนไปเป็นสายราที่ปะปนร่วมกับสัณฐานแบบยีสต์ ทางการแพทย์ได้เรียกลักษณะเชื้อรูปแบบนี้ว่า “spaghetti and meatballs” ในขณะที่ตัวอย่างเชื้อจากผิวหนังปกติจะพบเพียงสัณฐานแบบยีสต์เท่านั้น [12] ดังนั้นการกลายเป็นสายราของเชื้อ *Malassezia* จึงมีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับการเกิดโรคเกลื้อน แต่อย่างไรก็ตามกลไกการเปลี่ยนไปเป็นสายราของเชื้อยังเป็นปริศนา จากอุปสรรคหลายประการในการศึกษาเชื้อ *Malassezia* ในห้องปฏิบัติการ โดยเฉพาะความยากในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Malassezia* ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไป เนื่องจากคุณสมบัติความต้องการไขมันที่แตกต่างจากเชื้อชนิดอื่น และเมื่อนำเชื้อที่เป็น

สายราหรือยีสต์มาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ เชื้อทุกไอโซเลทจะเจริญเป็นยีสต์ ไม่กลับไปเป็นสายราอีกต่อไป

เดิมเคยเชื่อกันว่าการสร้างสายราจะเกิดได้ในผู้ป่วย (*in vivo*) เท่านั้น ไม่สามารถสร้างได้ในห้องปฏิบัติการ [13] แต่ก็มีคณะวิจัยบางกลุ่มเชื่อว่าสามารถสร้างสายราของ *Malassezia* ในห้องปฏิบัติการได้ โดยกลุ่มแรก ๆ ที่ศึกษาได้ตั้งข้อสังเกตถึงสภาวะแวดล้อม และสารที่ประกอบในอาหารที่อาจกระตุ้นให้เชื้อสร้างสายรา ได้มีรายงานว่าการผสม cholesterol และ cholesterol-ester ลงไปในอาหารช่วยกระตุ้นให้เชื้อ *M. furfur* สร้างสายราได้มากที่สุดประมาณ 20% [14] และบางคณะวิจัยได้สร้างเงื่อนไขการเจริญของเชื้อให้อยู่ภายใต้สภาวะใกล้เคียงกับบนผิวหนังมนุษย์ เช่น การเติมไอออนบางชนิด การปรับค่า pH การปรับความเข้มข้นของ CO_2 [15,16] และปรับชนิดของกรดอะมิโนในอาหาร [17] แต่พบว่าสามารถกระตุ้นการสร้างสายราได้จำนวนน้อยและส่วนมากเป็นเซลล์ที่มีลักษณะยาว ที่แตกต่างจากที่พบบนผิวหนัง ซึ่งต่อมาได้มีคณะวิจัยนำอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดที่เคยทดสอบกับเชื้อ *Malassezia* มาตรวจสอบและปรับปรุงสูตรอาหารและเงื่อนไขการเลี้ยงใหม่ พบว่าอาหารสูตรใหม่สามารถสร้างสายราที่มีความยาวกว่าของเดิมและได้ผลประมาณ 40% [18] แต่อย่างไรก็ตามถือว่าผลที่ได้ยังไม่เพียงพอที่จะนำมาใช้ศึกษาในขั้นต่อไป เนื่องจากยังมีเซลล์ยีสต์ที่ไม่กลายเป็นสายราปะปนอยู่ค่อนข้างสูงนั่นเอง และอาหารที่มีความซับซ้อนของส่วนประกอบค่อนข้างมากทำให้ยากลำบากในการเตรียม ต่อมาได้ใช้อาหารสูตร Minimal medium agar ที่ผสมกับ L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) และ kojic acid ในการกระตุ้นสายรา [19] ซึ่งพบว่ามีการกลายเป็นสายราที่สูงกว่ารายงานก่อนหน้านี้มาก แต่สายราที่ได้สามารถสร้างได้ในอาหารแบบแข็งเท่านั้น และมีลักษณะคล้ายสายราเทียม (pseudohyphae) มากกว่าสายราแท้ (hyphae) ซึ่งต่อมาได้ใช้อาหารสูตร Induction medium และสามารถกระตุ้นการสร้างสายราของ *M. furfur* ได้ดีเช่นเดียวกัน ทั้งในอาหารแบบเหลวและแข็ง และสายราที่ได้มีการแตกแขนง (septate branching hyphae) คล้ายกับที่พบบนผิวหนังผู้ป่วยมากกว่า ทั้งยังพบอีกว่าเชื้อ *M. furfur* ในระยะสายราจะมีการสร้างเอนไซม์ lipase และ protease ที่เป็น virulence factor มากกว่าระยะที่เป็นยีสต์ [20] สนับสนุนสมมุติฐานที่ว่าสายรามีความสัมพันธ์กับการก่อโรคของ *M. furfur*

ใน dimorphic fungi ที่เป็นเชื้อราก่อโรคชนิดอื่น เช่น *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, และ *Ustilago maydis* มีรายงานการศึกษากลไกการสร้างสายราค่อนข้างละเอียด และพบ pathway สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสายราและ pathogenicity ของเชื้อ เช่น การลบยีน *CDG1* ใน *C. albicans* ทำให้สูญเสียการสร้างสายรา และลดความรุนแรงของการติดเชื้อในหนูทดลอง [21] การพบว่ากลุ่มยีน *DRK1*, *RYP1-3*, และ *SREB* ทำงานร่วมกันเป็น gene networks ที่ควบคุมการเปลี่ยนสัณฐาน (phase transition) ในรากลุ่ม thermally dimorphic fungi [22] และ

พบว่าใน *C. albicans* คู่ของยีน *PRA1/ZPS1* มีการแสดงออกที่สูงขึ้นในระยะสายรา ยีน *PRA1* ควบคุมการสร้างโปรตีน PRA1 ที่หลั่งออกไปนอกเซลล์เพื่อจับกับไอออนสังกะสี (Zinc ion) แล้วนำเข้ามาสู่ในเซลล์โดยโปรตีน ZRT1 ที่อยู่บนผิวเซลล์ [23] เป็นต้น เหล่านี้ชี้ให้เป็นว่ามีกระบวนการแสดงออกของยีนหรือชุดยีนที่ซับซ้อนที่แสดงออกหรือถูกยับยั้งการแสดงออกในระหว่างการเปลี่ยนรูปจากยีสต์เป็นสายรา (หรือในทางกลับกันที่เปลี่ยนรูปจากสายราเป็นยีสต์) แต่ในปัจจุบันยังไม่พบรายงานวิจัยการศึกษาการสร้างสายราที่อธิบายกลไกในระดับโมเลกุลของเชื้อ *Malassezia*

ฐานข้อมูลจีโนมของ *Malassezia* สปีชีส์ต่าง ๆ ในปัจจุบันได้มีความสมบูรณ์มากขึ้น มีรายงานเผยแพร่ข้อมูลจีโนมของ *M. globosa, M. restricta*, และ *M. sympodialis* บนฐานข้อมูล GenBank [9,24] จึงคาดว่าสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการศึกษากระบวนการการแสดงออกของยีนต่าง ๆ ของ *Malassezia* สปีชีส์อื่นได้ด้วย เพราะสามารถนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีนไปเปรียบเทียบจากฐานข้อมูลเหล่านี้ได้โดยตรง เชื้อ *M. furfur* มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นโมเดลในการศึกษาการก่อโรคในห้องปฏิบัติการมากกว่า *M. globosa* และ *M. restricta* เนื่องจากเลี้ยงง่ายกว่าและมีการศึกษาค่อนข้างมาก ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน เทคนิคที่ทันสมัยและได้ข้อมูลแม่นยำที่สุดและละเอียดที่สุดในปัจจุบันคือ transcriptome analysis แต่ต้องใช้เครื่องมือที่ทันสมัยและมีค่าใช้จ่ายที่สูงมาก แต่ยังมีอีกวิธีคือการทำ cDNA-randomly amplified polymorphic DNA (cDNA-RAPD) ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบรูปแบบแถบ DNA ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้แม่พิมพ์ (template) เป็น cDNA ที่ได้จากการการสังเคราะห์จาก mRNA ของเชื้อยีสต์แต่ละระยะ ซึ่งหากเชื้อมีการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันก็จะให้แถบ DNA ที่แตกต่างกันด้วย ถึงแม้จะระบุยีนได้เพียงบางส่วนและครอบคลุมไม่เท่ากับ transcriptome analysis ที่สามารถระบุ mRNA ทั้งหมดได้ แต่ก็ทำได้ง่ายกว่าด้วยเครื่องมืออุปกรณ์ทางอณูชีววิทยาในห้องปฏิบัติการทั่วไปได้ มีรายงานวิจัยที่ใช้เทคนิค cDNA-RAPD กับสิ่งมีชีวิตพวกฟังไจการระบุยีนที่แสดงออกในระยะต่าง ๆ ของเห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*) พบว่ายีน triacylglycerol lipase, cytochrome P450และ sterol 14 alpha-demethylase ไม่มีการแสดงออกในระยะที่เป็นสายรา แต่แสดงออกในระยะที่กลายเป็นดอกเห็ดแล้ว แสดงให้เห็นว่าเทคนิคนี้สามารถใช้ระบุยีนที่มีความสำคัญในการสร้างดอกเห็ดของเห็ดนางรมได้ [25] ดังนั้นเทคนิคดังกล่าวน่าจะใช้ตรวจสอบเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในระดับ transcription และนำไปใช้ระบุยีนที่จำเพาะในระยะต่าง ๆ ของ *M. furfur* ได้เช่นกัน ซึ่งคาดหวังว่าจะช่วยให้ทราบยีนสำคัญที่แสดงออกจำเพาะต่อแต่ละระยะของเชื้อได้