บทความปริทัศน์
(Review article)

กระบวนการสังเคราะห์น้ำตาลทรีฮาโลสกับเป้าหมายใหม่เพื่อการพัฒนายาต้านเชื้อรา

ศรีสมบัติ พุฒิกมลกุล
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

บทคัดย่อ

อัตราการตายเนื่องจากภาวะติดเชื้อราในระบบต่างๆ (systemic mycoses) เพิ่มสูงขึ้นมากในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง ในขณะที่ยาต้านเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการรักษามีจำกัดและมีผลข้างเคียงค่อนข้างรุนแรง ทำให้มีการพัฒนายาต้านเชื้อราชนิดใหม่ ปัจจัยสำคัญที่การพัฒนายาต้องพิจารณาคือความสามารถของเชื้อราในการวิวัฒนาการกลไกต่างๆ เพื่อการอยู่รอดเมื่อต้องเผชิญหน้ากับสภาวะเครียดและไม่เหมาะสมต่อการเจริญในสิ่งแวดล้อมและในร่างกายมนุษย์ ดังนั้น เป้าหมายหลักของการพัฒนายาต้านเชื้อราจึงมุ่งไปที่กระบวนการทางชีวเคมีของเชื้อราที่สำคัญในการปรับตัวภายใต้สภาวะเครียด กลไกที่น่าสนใจที่พบในเชื้อราแต่ไม่พบในมนุษย์ คือกระบวนการสังเคราะห์น้ำตาลโมเลกุลคู่ทรีฮาโลส (trehalose) โดยเชื้อราใช้ Trehalose-6-Phosphate Synthase/Trehalose-6-Phosphate Phosphatase pathway เป็นกระบวนการหลักในการสังเคราะห์น้ำตาลนี้ พบว่ากระบวนการนี้เกี่ยวข้องกับกลไกการควบคุมเมตาบอลิซึมอื่นๆ และการสร้างผนังเซลล์ของเชื้อราด้วย การทำให้เชื้อรามียีน *tps2* กลายพันธุ์ (mutant) จนไม่สามารถสร้างเอนไซม์ทรีฮาโลสซิกส์ฟอสเฟตฟอสฟาเทส (trehalose-6-phosphate phosphatase) จะส่งผลให้เกิดการสะสม trehalose-6-phosphate จนมีผลให้ส่วนประกอบของผนังเซลล์ผิดปกติ และลดความรุนแรงในการก่อโรคในหนูทดลอง โดยลักษณะที่เปลี่ยนไปเหล่านี้พบในเชื้อราก่อโรคในมนุษย์สามชนิด คือ *Candida albicans, Cryptococcus neoformans* และ *Aspergillus fumigatus* ผลที่ได้นี้สนับสนุนการพัฒนายาต้านเชื้อราที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทรีฮาโลสซิกส์ฟอสเฟตฟอสฟาเทส อย่างไรก็ตาม ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงประสิทธิภาพในการรักษาเชื้อรากลุ่ม dimorphic fungi ที่ก่อโรคในมนุษย์ด้วย และต้องศึกษาผลของระบบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อราที่มีผนังเซลล์ผิดปกติจากการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้

คำสำคัญ: น้ำตาลทรีฮาโลส โรคติดเชื้อราในระบบต่างๆ ยาต้านเชื้อรา

ผู้นิพนธ์หลัก
ศรีสมบัติ พุฒิกมลกุล
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
114 สุขุมวิท 23 เขตวัฒนา กรุงเทพ 10110
อีเมล์: srisombat@g.swu.ac.th

Trehalose biosynthesis pathway as a promising new target for antifungal drug development

Srisombat Puttikamonkol

Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University, Thailand

Abstract

High mortality rates associated with systemic mycoses have dramatically increased in immuno-compromised patients. With limitedly available antifungal drugs and their adverse drug reactions, much effort is being focused on new antifungal drug development. Fungi have evolved multifactorial mechanisms to survive various stress conditions encountered in the environment and in vivo during infection. Targeting the biochemical pathways utilized by the fungus to adapt to stress conditions is one proposed approach for the development of new antifungal drugs. Biosynthesis of the disaccharide trehalose is one such target that is not found in humans. The Trehalose-6-Phosphate Synthase/ Trehalose-6-Phosphate Phosphatase pathway is the main mechanism fungi utilized for trehalose biosynthesis and has been found to have a critical role in regulating fungal metabolic homeostasis and integrity of fungal cell wall. Mutants *tps2* and trehalose-6-phosphate phosphatase activity displayed an increased accumulation of trehalose-6-phosphate intermediate, cell wall alteration, and attenuation of the virulence in the murine models of systemic mycoses. The consistent results were found in human fungal pathogens; *Candida albicans, Cryptococcus neoformans,* and *Aspergillus fumigatus* suggesting that the trehalose biosynthesis pathway is a promising target for antifungal drug development. However, finding a broad spectrum fungicidal drug against human fungal pathogens must also consider the outcome on the pathogenic dimorphic fungi. Importantly, the consequences of host immune responses against fungi must also be taken into account when the fungal cell wall exhibits changes through the inhibition of the trehalose biosynthesis pathway.

Keywords: Trehalose, Systemic mycoses, Antifungal drug

Corresponding author:

Srisombat Puttikamonkul

Department of Microbiology, Faculty of Medicine,

Srinakharinwirot University, Thailand

114 Sukhumvit 23, Wattana, Bangkok 10110

E-mail: srisombat@g.swu.ac.th

■ บทนำ

เชื้อราทั่วๆ ไปไม่ก่อโรคพบได้ในดิน น้ำ อากาศ ปะปนอยู่ในสิ่งแวดล้อม และทำหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลายสารอินทรีย์ที่เน่าเปื่อย ให้หมุนเวียนในระบบนิเวศน์ แต่ยังมีเชื้อราหลายชนิดที่สามารถก่อโรคได้ในระดับความรุนแรงต่อชีวิตของคน สัตว์ และพืชต่างๆ กัน ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรานั้น ทั้งนี้ร่างกายของคนมีกลไกและระบบภูมิคุ้มกันทำหน้าที่ต่อสู้และป้องกันไม่ให้เชื้อราเจริญเติบโต แต่ในภาวะที่ร่างกายไม่สามารถสร้างภูมิคุ้มกันได้ปกติ เช่น ผู้ป่วยเอดส์ ผู้ป่วยที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกันเป็นเวลานานเนื่องจากการปลูกถ่ายอวัยวะ ผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือด หรือผู้ป่วยเบาหวาน พบติดเชื้อราแบบ systemic mycoses มากขึ้นในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา ซึ่งมีความรุนแรงถึงชีวิต โดยส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อ *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, และ *Aspergillus fumigatus*

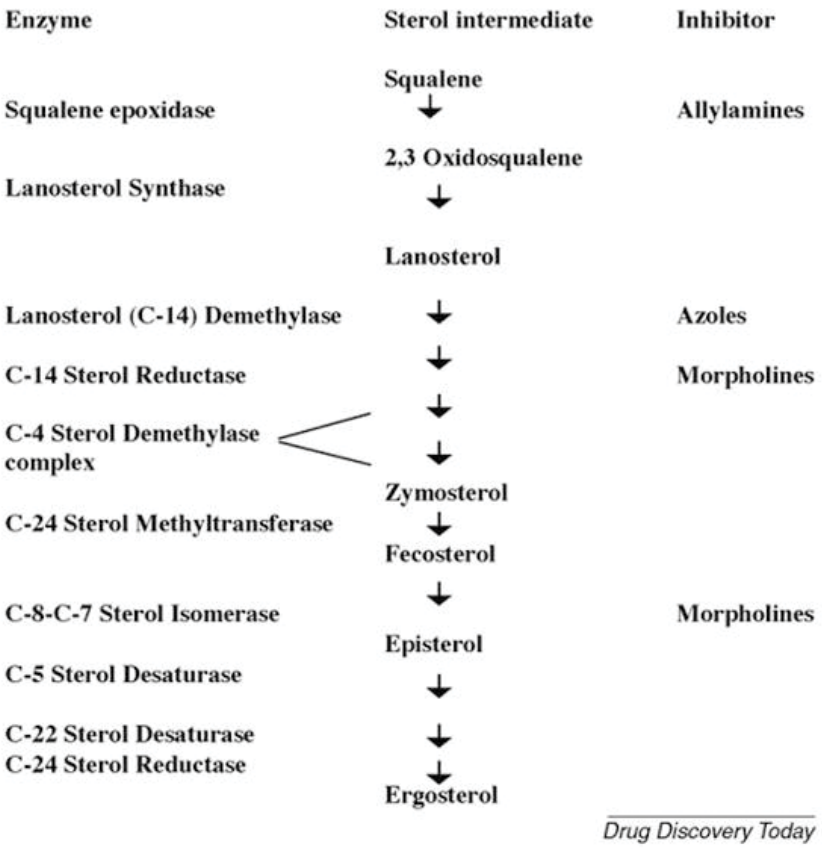
■ แนวทางการรักษาโรคติดเชื้อราในปัจจุบัน

ยาต้านเชื้อราที่ใช้รักษา systemic mycoses ในปัจจุบันมี 6 กลุ่ม คือ Polyene, Azoles, Pyrimidine analog, Echinocandins, Allylamine และ Griseofulvin โดยยาส่วนใหญ่จะมีเป้าหมายยับยั้งเอนไซม์สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์ ergosterol ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อรา (cell membrane)[1,2] ดังแสดงในรูปที่ 1 เช่น

1) ยากลุ่ม Azoles เช่น Ketoconazole, Fluconazole, Itraconazole, Voriconazole, Posaconazole จะจับกับเอนไซม์ 14α-sterol demethylase
2) ยากลุ่ม Allylamine เช่น Terbinafine จับกับเอนไซม์ squalene epoxidase ซึ่งไม่สามารถใช้เป็นยาหลักในการรักษา systemic mycoses ได้
3) ยากลุ่ม Morpholine เช่น Fenpropimorph จับกับเอนไซม์ C8-C7 sterol isomerase และ C14 sterol reductase โดยออกฤทธิ์ fungicidal แต่ใช้ในภาคเกษตรกรรมเท่านั้น ยังไม่อนุญาตให้ใช้ในมนุษย์ มีเพียง Amorolfine ในกลุ่มนี้เพียงชนิดเดียวที่สามารถใช้เป็น topical form บริเวณผิวหนังภายนอกเท่านั้น
4) ยากลุ่ม Polyene ที่สามารถจับกับ ergosterol ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เป็นรู และเสียสภาพ เช่น Amphotericin B และ Nystatin

ประสิทธิภาพของยาต่อการรักษานั้นแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อราก่อโรค โดยยุคแรกๆ ใช้ Amphotericin B เป็นยาหลักในการรักษาโรคติดเชื้อราชนิดรุนแรง แต่ผลข้างเคียงของยาทำให้เกิดผลเสียต่อการทำงานของไต เกิดไตวายแบบเฉียบพลัน[3] ส่วนยากลุ่ม Azoles นั้นออกฤทธิ์ยับยั้งแบบ fungistatic activity ซึ่งทำให้เกิดการดื้อยาเกิดขึ้นและพบมากในเชื้อ *Candida* species ที่ดื้อยาต่อ Fluconazole[4] โดยทั่วไปนิยมใช้ Azoles ในการรักษาโรค candidemia และ cryptococcosis แต่ใช้ได้ผลไม่ดีนักกับราสายใย เช่น *A. fumigatus* ยกเว้นยา Voriconazole ซึ่งเป็นยาตัวใหม่ ที่ให้ผลดีในการรักษา invasive aspergillosis แต่อย่างไรก็ตาม ผลข้างเคียงของยาโดยตรงเป็นพิษต่อตับ และพบอัตราการตายในระหว่างการรักษาสูงถึง 30-50% ขึ้นอยู่กับสภาพภูมิคุ้มกันของผู้ป่วย[5]

ยาต้านเชื้อราที่มีประสิทธิภาพนั้นมีน้อย และมีผลข้างเคียงสูง ซึ่งเป็นผลมาจากลักษณะเซลล์ขั้นพื้นฐานของเชื้อราและคนเป็นกลุ่มยูแคริโอต (eukaryotic organisms) เหมือนกัน ด้วยความจำกัดในการรักษาโรคติดเชื้อ systemic mycoses ที่พบในปัจจุบันเหล่านี้ ทำให้มีความต้องการยาต้านเชื้อราที่มีคุณสมบัติ broad spectrum ออกฤทธิ์แบบ fungicidal activity และไม่รบกวนหรือส่งผลข้างเคียงรุนแรงต่อผู้ป่วยจึงเป็นที่ต้องการสูงมาก ทั้งนี้กลไกเป้าหมายของการออกแบบยาตัวใหม่ต้องเป็นกลไกสำคัญต่อการมีชีวิตอยู่ของเชื้อราและควรพบในเชื้อราก่อโรคทุกชนิด ที่สำคัญต้องไม่พบกลไกนี้ในมนุษย์ เพื่อให้การศึกษาวิจัยหากลไกเป้าหมายนี้ประสบความสำเร็จ นักวิจัยได้ศึกษากลไกต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการก่อโรคของเชื้อราชนิดต่างๆ อย่างมากมาย โดยพบกระบวนการสังเคราะห์น้ำตาลทรีฮาโลสนั้นมีคุณสมบัติของกลไกเป้าหมายตามต้องการ และได้มีการศึกษามาแล้วในเชื้อราก่อโรคหลายชนิด



รูปที่ 1 กระบวนการสังเคราะห์ Ergosterol และยาต้านเชื้อราที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ ในกระบวนการนี้ ที่มา: Gauwerky K, Borelli C, Korting HC. Targeting virulence: a new paradigm for antifungals. Drug Discov Today 2009;14:214-22.

การค้นพบน้ำตาลโมเลกุลคู่ทรีฮาโลส และคุณสมบัติของน้ำตาลชนิดนี้ในสิ่งมีชีวิต

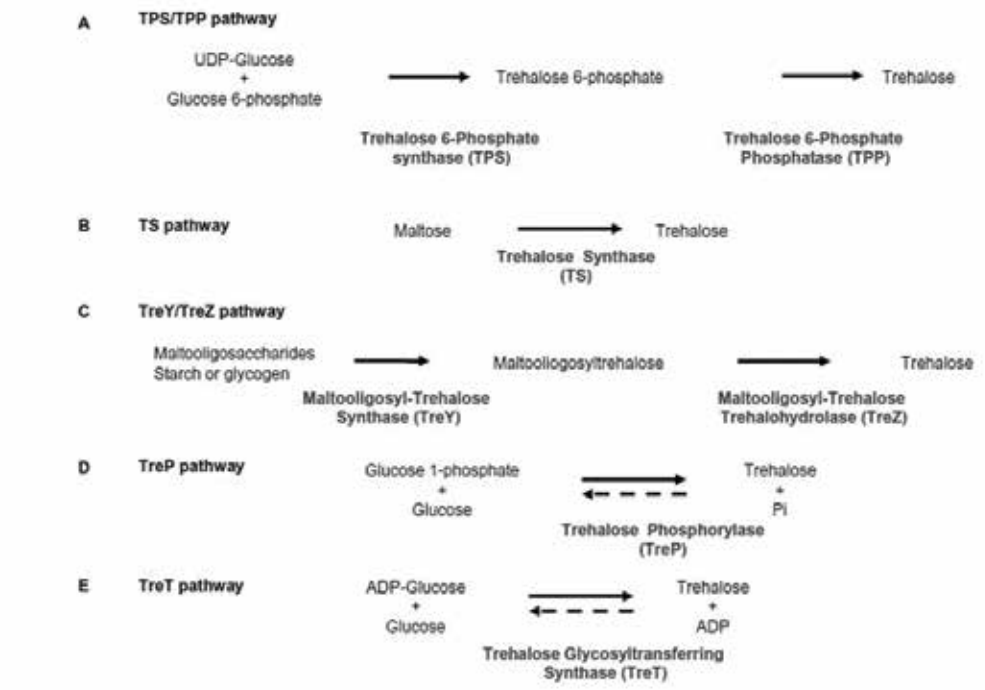
น้ำตาลทรีฮาโลสนั้นถูกค้นพบด้วยความบังเอิญ และแยกได้จากโครงสร้างสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อรา ที่มักพบสร้างบนฝักข้าวไรย์ (rye) ที่เรียกว่า เออกอต (ergot) ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1832 โดย H.A.L.Wiggers ที่มาของชื่อน้ำตาลนั้นเริ่มต้นขึ้นเมื่อปี ค.ศ. 1858 โดย M. Berthelot ได้พบน้ำตาลชนิดนี้ในปลอกดักแด้ (cocoons of beetles) ที่มีชื่อเรียกว่า ทรีฮาลา (trehala)[6-8] น้ำตาลทรีฮาโลสพบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิตเกือบทุกชนิด เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา พืช และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังจำพวกแมลง และเป็นที่น่าสังเกตว่า มนุษย์ไม่สามารถสังเคราะห์น้ำตาลทรีฮาโลส แต่มีความสามารถในการย่อยน้ำตาลนี้ไปใช้ได้ด้วยเอนไซม์ทรีฮาเลส (trehalase)[9-11] การที่สิ่งมีชีวิตสังเคราะห์น้ำตาลโมเลกุลคู่ทั่วๆ ไปนั้นเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานคาร์โบไฮเดรต โดยทั่วไปน้ำตาลโมเลกุลคู่จะถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ที่จำเพาะและเปลี่ยนเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น น้ำตาลกลูโคส เพื่อให้เซลล์สามารถนำไปใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึมได้ทันทีในภาวะที่สิ่งมีชีวิตไม่สามารถดูดซึมอาหารได้จากภายนอกเซลล์ เนื่องจากสิ่งมีชีวิตจำพวกยีสต์นั้นนอกจากจะสะสมน้ำตาลเก็บไว้ใช้ในรูปไกลโคเจนแล้ว ยังพบมีการสะสมของน้ำตาลทรีฮาโลสในปริมาณมากภายใต้สภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ เช่น การเจริญเข้าสู่ระยะพักตัว (stationary phase) การขาดธาตุอาหาร เหล่านี้ล้วนกระตุ้นการสังเคราะห์และสะสมตัวของน้ำตาลทรีฮาโลส[12] ในเชื้อราส่วนใหญ่ จะมีการสะสมของน้ำตาลทรีฮาโลสไว้ในระยะสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ (conidia) ซึ่งพบว่าเมื่อสปอร์ของเชื้อราได้รับการกระตุ้นให้เจริญ ในขณะที่มีการงอกของสายใย ระดับน้ำตาลทรีฮาโลสจะถูกย่อยสลายเพื่อนำไปใช้ในการเจริญอย่างรวดเร็ว ดังนั้น เป็นที่ชัดเจนว่า คุณสมบัติของน้ำตาลทรีฮาโลสนั้นไม่เพียงแต่เป็นแหล่งพลังงานเท่านั้นแต่ยังมีความสำคัญที่ช่วยให้สิ่งมีชีวิตสามารถทนต่อสภาวะขาดน้ำ ภาวะอุณหภูมิ

สูงและต่ำกว่าปกติ โดยทั้งนี้สามารถอธิบายได้จากโครงสร้างเคมีของน้ำตาลโมเลกุลคู่ทรีฮาโลสที่เกิดจากการเชื่อมน้ำตาลสองโมเลกุลด้วยกัน ที่ตำแหน่งแอลฟา α-α-(1$\longrightarrow$1) ด้วยพันธะ glycosidic bond การสร้างพันธะชนิดนี้ช่วยให้น้ำตาลมีคุณสมบัติพิเศษสามารถทนต่ออุณภูมิสูงและการย่อยสลายด้วยกรด[13] คุณสมบัติที่สำคัญของน้ำตาลทรีฮาโลสในการรักษาสภาพเซลล์สิ่งมีชีวิตในสภาวะขาดน้ำ โดยที่โมเลกุลของน้ำตาลจะไปแทนที่โมเลกุลของน้ำและสร้างพันธะไฮโดรเจนกับผนังเซลล์และส่วนประกอบของเซลล์ทำให้เป็นการป้องกันเซลล์ที่โดยทั่วไปจะเสื่อมสภาพจากสภาวะขาดน้ำ และสามารถคืนสภาพกลับสู่สภาวะปกติได้อีกครั้งเมื่อมีน้ำ หรือสภาวะแวดล้อมเหมาะสม[14-16] มีการวิจัยเกี่ยวกับคุณสมบัติของน้ำตาลทรีฮาโลสในแง่อื่นๆ และพบว่าการสังเคราะห์น้ำตาลทรีฮาโลสในสิ่งมีชีวิตจำพวกแบคทีเรียนั้นพบว่าช่วยให้แบคทีเรียสามารถทนต่อสภาวะเครียดได้หลากหลาย เช่น ความร้อน ความเย็น ความผิดปกติของความเข้มข้น (osmotic stress) ความเค็ม และที่สำคัญในแบคทีเรียก่อโรควัณโรค Mycobacteria นั้น พบว่าน้ำตาลทรีฮาโลสเป็นส่วนประกอบสำคัญของผนังเซลล์ ซึ่งช่วยทำให้เชื้อวัณโรคสามารถทนต่อยาได้อีกด้วย[17-20]

กระบวนการสังเคราะห์น้ำตาลทรีฮาโลส

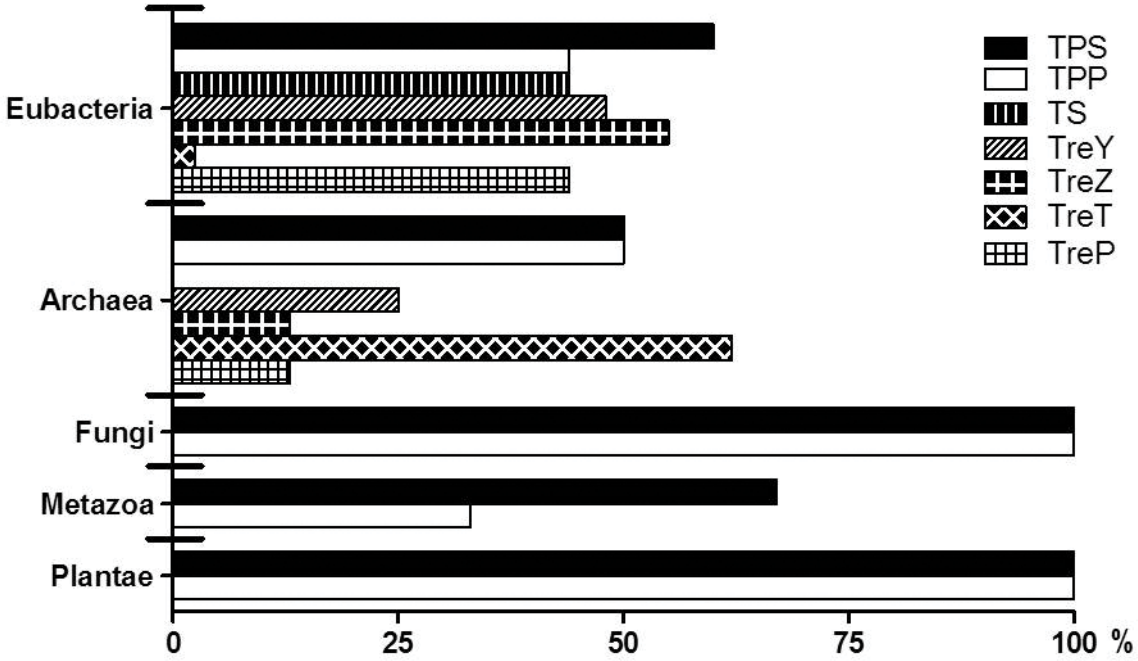
เนื่องจากน้ำตาลทรีฮาโลสมีความสำคัญต่อเซลล์สิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิดดังที่ได้กล่าวมาแล้ว สิ่งมีชีวิตเหล่านี้สามารถสังเคราะห์น้ำตาลทรีฮาโลสได้จาก 5 กระบวนการต่างๆ กัน ดังต่อไปนี้ (รูปที่ 2)

1. กระบวนการสังเคราะห์ที่พบมากที่สุดในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดคือ TPS/TPP pathway การสังเคราะห์น้ำตาลทรีฮาโลสด้วยวิธีนี้ พบได้ทั่วไปในแบคทีเรีย เชื้อรา แมลง สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง และพืช (รูปที่ 3) ซึ่งกระบวนการนี้ต้องอาศัยเอนไซม์สองชนิดในกระบวนการสังเคราะห์ โดยเริ่มจากเอนไซม์ตัวแรก trehalose-6-phosphate synthase (TPS, Tps1) จะทำหน้าที่เชื่อมน้ำตาลกลูโคสสองโมเลกุลที่อยู่ในรูป UDP-glucose และ glucose-6-phosphate ให้เป็นสาร trehalose-6-phosphate (T6P intermediate) หลังจากนั้น เอนไซม์ตัวที่สอง หรือ trehalose-6-phosphate phosphatase (TPP, Tps2) จะทำหน้าที่ตัดโมเลกุลฟอสเฟต (Pi) ออกจากสาร intermediate และสร้างน้ำตาลทรีฮาโลสเป็นผลปฏิกิริยา ดังแสดงในรูปที่ 2(A)



รูปที่ 2 กระบวนการสังเคราะห์น้ำตาลทรีฮาโลส

ที่มา: Avonce N, Mendoza-Vargas A, Morett E, et al. Insights on the evolution of trehalose biosynthesis. BMC Evol Biol 2006;doi:10.1186/1471-2148-6-109.



รูปที่ 3 กระบวนการสังเคราะห์น้ำตาลทรีฮาโลสที่พบในสิ่งมีชีวิต แสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์ comparative analysis ของลำดับเบสเปรียบเทียบกันอย่างน้อยหนึ่ง pathway

ที่มา: Avonce N, Mendoza-Vargas A, Morett E, et al. Insights on the evolution of trehalose biosynthesis. BMC Evol Biol 2006;doi:10.1186/1471-2148-6-109.

2. TS pathway เป็นกระบวนการสังเคราะห์น้ำตาลทรีฮาโลสได้โดยตรงจากโมเลกุลน้ำตาลมอลโทส รูปที่ 2(B) พบได้ในแบคทีเรีย จำพวก *Pseudomonas stutzeri, Pimelobacter sp., Mycobacterium smegmatis, Arthrobacter aurescens* และ *Enterobacter hormaechei*[21-25] โดยการทำงานของเอนไซม์ trehalose synthase (TS)

3. TreY/TreZ pathway เป็นกระบวนการสังเคราะห์ที่ต้องการการทำงานร่วมกันของเอนไซม์สองตัว maltooligosyl trehalose synthase และ maltooligosyl trehalose trehalohydrolase โดยจะเปลี่ยนสารเริ่มต้นจำพวกแป้ง (glycogen and starch) ไปเป็นน้ำตาลทรีฮาโลส โดยมีการค้นพบกระบวนการนี้ในสิ่งมีชีวิตจำพวกแบคทีเรียทั่วไป และแบคทีเรียชนิดทนความร้อน *(Thermophilic archaea)* เช่น *Sulfolobus acidocaldarius*[26] รูปที่ 2(C)

4. TreP pathway เป็นกระบวนการสังเคราะห์น้ำตาลทรีฮาโลสจากน้ำตาลกลูโคส (glucose-1-phosphate และ glucose) ด้วยเอนไซม์ชนิดเดียว ซึ่งสามารถทำงานแบบผันกลับได้ (reversible enzyme) โดยเอนไซม์ trehalose phosphorylase (TreP) นี้จะกระตุ้นปฏิกิริยาทั้งการสร้างและสลายตัวของน้ำตาลทรีฮาโลส โดยทั้งนี้ขึ้นอยู่กับระดับของโมเลกุลฟอสเฟต ที่จะเป็นตัวกำหนดทิศทางของปฏิกิริยา รูปที่ 2(D) พบกระบวนการนี้ในแบคทีเรีย ทั้งนี้ภายหลังพบในสาหร่าย *(Euglena gracilis)* และเห็ดรา เช่น *Agaricus bisporus*[27, 28] ในงานวิจัยพบว่า กระบวนการ TreP pathway อาจเป็นกระบวนการเดียวที่เห็ดกลุ่มนี้ใช้ในการสังเคราะห์น้ำตาลทรีฮาโลส เนื่องจากไม่พบเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์แบบ TPS/TPP pathway[27]

5. TreT pathway เป็นกระบวนการสังเคราะห์น้ำตาลทรีฮาโลสจากน้ำตาลกลูโคส (ADP-Glucose และ Glucose) ด้วยเอนไซม์ trehalose glycosyltransferring synthase (TreT) ที่สามารถทำงานแบบผันกลับได้ รูปที่ 2(E) พบกระบวนการสังเคราะห์นี้ในแบคทีเรียชนิดทนความร้อน *Thermococcus litoralis* และ *Pyrococcus horikoshii*[29, 30]

■ น้ำตาลทรีฮาโลสกับความสามารถในการก่อโรคติดเชื้อรา

การสังเคราะห์น้ำตาลทรีฮาโลสในสิ่งมีชีวิตกลุ่มเชื้อรานั้น ได้มีการศึกษาแล้วโดยละเอียดในโมเดลของราหรือยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* โดยพบสังเคราะห์ได้ด้วยกระบวนการแสดงในรูปที่ 2(A)[10,31-33] พบปฏิกิริยาการสังเคราะห์น้ำตาลด้วย TPS/TPP pathway นี้เป็นปฏิกิริยาหลักในยีสต์และราสายใย (รูปที่ 3)[34] เนื่องจากการสะสมของน้ำตาลทรีฮาโลสมักพบปริมาณสูงในภาวะที่ไม่เหมาะสม[12] และมีคุณสมบัติพิเศษในการป้องกันเซลล์ยีสต์ในสภาวะอุณหภูมิสูง ภาวะขาดน้ำ และทำให้เซลล์มีชีวิตรอดจากสภาวะไม่เหมาะสมได้ดีขึ้น[35-37] น้ำตาลทรีฮาโลสและกระบวนการสังเคราะห์จึงนับว่ามีความสำคัญมากกว่าการสังเคราะห์ขึ้นเพื่อเป็นแหล่งพลังงานของเซลล์เท่านั้น และการวิจัยพื้นฐานระดับอณูชีววิทยาเกี่ยวกับคุณลักษณะของเชื้อราก่อโรคในคนแบบ systemic mycoses เป็นความต้องการเพื่อการพัฒนาไปสู่ยาต้านเชื้อราที่มีประสิทธิภาพ ด้วยปัจจัยสำคัญที่มุ่งศึกษากระบวนการสังเคราะห์น้ำตาลทรีฮาโลสในราเหล่านี้ คือ ไม่พบกระบวนการสังเคราะห์น้ำตาลนี้ในมนุษย์

เชื้อราก่อโรค กลุ่มยีสต์ *C. albicans* และ *C. neoformans* เป็นเชื้อราที่ก่อโรคในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง ได้มีการศึกษาผลของการขาดยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์น้ำตาลทรีฮาโลส โดยการสร้างยีสต์สายพันธุ์ใหม่ ให้บกพร่องยีนที่เป็นตัวกำหนดการสร้างเอนไซม์สำคัญ คือ *tps1* พบว่าเชื้อ mutant ไม่สามารถสร้างสายใย hyphal form ในภาวะที่มีซีรัมในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นคุณสมบัติสำคัญในการก่อโรคของยีสต์ *C. albicans* และผลของการบกพร่องยีน *tps1* ทำให้เชื้อลดความรุนแรงในการก่อโรคในหนูทดลอง นอกจากนี้ยังพบว่าผลของการขาดยีน *tps2* และเอนไซม์ตัวที่สองของกระบวนการนี้ให้ผลเช่นเดียวกันในหนูทดลอง ซึ่งเป็นผลมาจากการสะสมของสาร T6P intermediate ทำให้เกิดสภาวะเป็นพิษและส่งผลต่อการสร้างผนังเซลล์[38,39]

การบกพร่องยีน *tps1* หรือ *tps2* ใน *C. neoformans* มีผลรุนแรงทำให้เชื้อ mutant ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิร่างกาย ดังนั้น เชื้อไม่สามารถก่อโรคได้ในสัตว์ทดลอง นอกจากนี้ ยังพบผลเช่นเดียวกันในเชื้อ *Cryptococcus gattii* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงมากกว่า โดยปกติสามารถก่อโรคได้ในคนทั่วไปที่มีภาวะภูมิคุ้มกันปกติ[40,41]

เชื้อราก่อโรค กลุ่มราสายใย การศึกษากระบวนการสังเคราะห์น้ำตาลทรีฮาโลสในราสายใยนั้นเริ่มต้นงานวิจัยในเชื้อราที่ก่อโรคไหม้ของข้าว (rice blast disease) เช่น *Magnaporthe oryzae* และ *Fusarium graminearum* ซึ่งพบว่า เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการนี้มีความสำคัญต่อการสร้างโครงสร้างสำคัญที่เชื้อราสามารถแทรกตัวเข้าไปในเซลล์พืชได้ และการบกพร่องของเอนไซม์ทำให้เชื้อราไม่ก่อโรคในข้าว และธัญพืช อย่างมีนัยสำคัญ[42,43]

สำหรับ *A. fumigatus* เชื้อราสายใยก่อโรคในผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่องนั้น พบว่าการบกพร่องยีนสองชุดที่กำหนดการทำงานของเอนไซม์ TPS ตัวเดียวกัน (*tpsA* และ *tpsB*) ส่งผลให้เชื้อรา mutant ไม่สามารถสังเคราะห์น้ำตาลทรีฮาโลสได้ แต่ไม่มีผลต่อความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อชนิดนี้ในหนูทดลอง[44] ในขณะที่ภาวะบกพร่องยีน *orlA (tps2)* ที่กำหนดการทำงานของเอนไซม์ TPP ตัวที่สองนั้นมีผลต่อการสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศของเชื้อ *A. fumigatus* โดยเชื้อ mutant ไม่สามารถสร้างสปอร์ได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไป และมีการสะสมของสาร T6P intermediate ในสปอร์ที่สร้างได้เมื่อมีสาร osmotic stabilizing เช่น sorbitol เป็นส่วนประกอบ ทั้งนี้ลักษณะของผนังเซลล์ของเชื้อ *A. fumigatus* อาจเปลี่ยนแปลงไปทำให้ลดความแข็งแรงของผนังเซลล์ลง และผลรวมของการเปลี่ยนแปลงนี้ลดความรุนแรงในการก่อโรคในหนูทดลองอย่างมีนัยสำคัญ[45]

การศึกษาระดับอณูชีววิทยาของเชื้อราก่อโรคนั้นเป็นพื้นฐานสำคัญในการวิจัยและพัฒนาไปถึงการออกแบบสารเคมีที่มีคุณสมบัติในการจับกับเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์น้ำตาลทรีฮาโลส ซึ่งการวิจัยล่าสุดใน *M. oryzae* นั้น กลุ่มนักวิจัยชาวสิงคโปร์ได้ใช้โปรแกรมจำลองการจับกันของเอนไซม์ Tps1 และสารสังเคราะห์ 400,000 ชนิดในฐานข้อมูล พบสารสังเคราะห์ที่สามารถจับกันได้กับโครงสร้างเอนไซม์ของ Tps1 ได้ดีที่สุดหนึ่งชนิด และมีความเป็นไปได้ที่จะใช้เป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Tps1 เพื่อใช้ในการควบคุมโรคไหม้ของข้าว[46] ในขณะที่เชื้อรากลุ่มที่ก่อโรคในคนมีความแตกต่างตรงที่ เอนไซม์ Tps2 เกี่ยวข้องกับการก่อโรคมากกว่า Tps1 โดยแสดงให้เห็นถึงการ

เสียสมดุลย์ของการควบคุมการทำงานในขบวนการไกลโคไลซิส (glycolysis) ทั้งนี้เนื่องจากการสะสมของสารตัวกลางของปฏิกิริยา หรือ T6P ทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เฮกโซไคเนส (hexokinase) ซึ่งมีความสำคัญมากในปฏิกิริยาสลายน้ำตาลกลูโคสไปเป็นพลังงานและสารตั้งต้นของกระบวนการสร้างผนังเซลล์[45] ผลการทดลองที่เกิดจากความบกพร่องของเอนไซม์ Tps2 ใน *C. albicans, C. neoformans, C. gattii,* และ *A. fumigatus* นั้นสอดคล้องกันโดย การสะสมของ T6P มีผลทำให้เชื้อราทั้งกลุ่มยีสต์และราสายใยเกิดการเปลี่ยนแปลงในด้านกายภาพ ลดการสร้างสปอร์ เชื้อไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิร่างกาย และลดความรุนแรงในการก่อโรคเมื่อทดสอบในหนูทดลอง[39-41,45] การวิจัยและพัฒนายาต้านเชื้อราที่มีความจำเพาะกับกระบวนการสังเคราะห์น้ำตาลทรีฮาโลสนี้ยังคงอยู่ในระดับวิจัยและพัฒนา เพื่อให้มั่นใจว่าผลของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Tps2 นี้จะมีความจำเพาะและให้ผลสอดคล้องกันเพื่อประสิทธิภาพของยาแบบ broad spectrum ครอบคลุมเชื้อรากลุ่ม dimorphic fungi ซึ่งพบเป็นปัญหารุนแรงทำให้เสียชีวิตได้ [47,48]

สรุปผล

คุณสมบัติของน้ำตาลโมเลกุลคู่ทรีฮาโลสมีความสำคัญในการป้องกันเซลล์สิ่งมีชีวิตให้ทนต่อความแห้ง ความร้อน ความเย็น ความไม่สมดุลย์ของสิ่งแวดล้อมได้ ในขณะเดียวกันการวิจัยในแบคทีเรียก่อวัณโรคในคน (Mycobacteria)[19, 20, 23] รวมถึงงานวิจัยในเชื้อราทั้งกลุ่มที่ก่อโรคในพืช เช่น *M. oryzae* และ *F. graminearum* และกลุ่มเชื้อราที่ก่อโรคในคน เช่น *C. albicans, C. neoformans, C. gattii* และ *A. fumigatus* แสดงให้เห็นความสำคัญของกระบวนการสังเคราะห์น้ำตาลทรีฮาโลสเป็นส่วนหนึ่งของกลไกการก่อโรคทั้งในพืชและคน การศึกษาเอนไซม์และกระบวนการสังเคราะห์น้ำตาลทรีฮาโลสในเชื้อราต่างๆ ที่ก่อโรคในคนนั้นเป็นความพยายามเพื่อการออกแบบยาต้านเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อราได้แบบจำเพาะ เนื่องจากกระบวนการสังเคราะห์น้ำตาลชนิดนี้ไม่เกิดขึ้นในมนุษย์ ทั้งนี้ต้องมีการศึกษาให้ละเอียดถึงผลกระทบที่เกิดขึ้นเมื่อการสังเคราะห์น้ำตาลทรีฮาโลสนี้เกี่ยวข้องกับการสร้างผนังเซลล์ เพราะกลไกการตอบสนองของร่างกายเมื่อพบสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย เช่น ผนังเซลล์ของเชื้อรา ชนิดเบต้ากลูแคน (β-glucan) คือส่วนที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกาย[49] ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของส่วนประกอบของผนังเซลล์อาจมีผลต่อการรับรู้ของระบบภูมิคุ้มกันของคน (immune recognition) ซึ่งหากเกิดการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบที่ควบคุมไม่ได้มากเกินไป อาจเป็นผลร้ายมากกว่าผลดีต่อผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่องที่พบเป็นโรคจากเชื้อราเหล่านี้ การศึกษาวิจัยเพื่อการพัฒนายาต้านเชื้อราจึงมีความจำเป็นต้องศึกษาวิจัยควบคู่กันไปทั้งในระดับอณูชีววิทยาของเชื้อราและภูมิคุ้มกันวิทยาของคนเพื่อความก้าวหน้าในการพัฒนาเป็นยารักษาโรคติดเชื้อราต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Gauwerky K, Borelli C, Korting HC. Targeting virulence: a new paradigm for antifungals. Drug Discov Today 2009;14:214-22.
2. Pumirat P, Tunyong W, Luplertlop N. Medical Mycology. J Med Health Sci (in Thai) 2013;20:31-44.
3. Carrillo-Munoz AJ, Giusiano G, Ezkurra PA, et al. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. Rev Esp Quimioter 2006;19:130-9.
4. Onyewu C, Blankenship JR, Del Poeta M, et al. Ergosterol biosynthesis inhibitors become fungicidal when combined with calcineurin inhibitors against *Candida albicans, Candida glabrata,* and *Candida krusei*. Antimicrob Agents Chemother 2003;47:956-64.
5. Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF, et al. Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. N Engl J Med 2002;347:408-15.

6. Crowe JH, Hoekstra FA, Crowe LM. Anhydrobiosis. Annu Rev Physiol 1992;54:579-99.
7. Thevelein JM. Regulation of trehalose mobilization in fungi. Microbiol Rev 1984;48:42-59.
8. Singer MA, Lindquist S. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae:* the Yin and Yang of trehalose. Trends Biotechnol 1998;16:460-8.
9. Ishihara R, Taketani S, Sasai-Takedatsu M, et al. Molecular cloning, sequencing and expression of cDNA encoding human trehalase. Gene 1997;202:69-74.
10. Gancedo C, Flores CL. The importance of a functional trehalose biosynthetic pathway for the life of yeasts and fungi. FEMS Yeast Res 2004;4:351-9.
11. Murray IA, Coupland K, Smith JA, et al. Intestinal trehalase activity in a UK population: establishing a normal range and the effect of disease. Br J Nutr 2000;83:241-5.
12. Lillie SH, Pringle JR. Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae:* responses to nutrient limitation. J Bacteriol 1980;143:1384-94.
13. Richards AB, Krakowka S, Dexter LB, et al. Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. Food Chem Toxicol 2002;40:871-98.
14. Sano F, Asakawa N, Inoue Y, et al. A dual role for intracellular trehalose in the resistance of yeast cells to water stress. Cryobiology 1999;39:80-7.
15. Crowe LM, Reid DS, Crowe JH. Is trehalose special for preserving dry biomaterials? Biophys J 1996;71:2087-93.
16. Sun WQ, Leopold AC, Crowe LM, et al. Stability of dry liposomes in sugar glasses. Biophys J 1996;70:1769-76.
17. Elbein AD, Pan YT, Pastuszak I, et al. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. Glycobiology 2003;13:17R-27R.
18. Kandror O, DeLeon A, Goldberg AL. Trehalose synthesis is induced upon exposure of *Escherichia coli* to cold and is essential for viability at low temperatures. Proc Natl Acad Sci USA 2002;99:9727-32.
19. Murphy HN, Stewart GR, Mischenko VV, et al. The OtsAB pathway is essential for trehalose biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis.* J Biol Chem 2005;280:14524-9.
20. Woodruff PJ, Carlson BL, Siridechadilok B, et al. Trehalose is required for growth of *Mycobacterium smegmatis.* J Biol Chem 2004;279:28835-43.
21. Lee JH, Lee KH, Kim CG, et al. Cloning and expression of a trehalose synthase from *Pseudomonas stutzeri* CJ38 in *Escherichia coli* for the production of trehalose. Appl Microbiol Biotechnol 2005;68:213-9.
22. Nishimoto T, Nakano M, Nakada T, et al. Purification and properties of a novel enzyme, trehalose synthase, from *Pimelobacter sp.* R48. Biosci Biotechnol Biochem 1996;60:640-4.
23. Pan YT, Koroth Edavana V, Jourdian WJ, et al. Trehalose synthase of *Mycobacterium smegmatis:* purification, cloning, expression, and properties of the enzyme. Eur J Biochem 2004;271:4259-69.

24. Xiuli W, Hongbiao D, Ming Y, et al. Gene cloning, expression, and characterization of a novel trehalose synthase from *Arthrobacter aurescens.* Appl Microbiol Biotechnol 2009;83:477-82.
25. Yue M, Wu XL, Gong WN, et al. Molecular cloning and expression of a novel trehalose synthase gene from *Enterobacter hormaechei*. Microb Cell Fact 2009; doi: 10.1186/1475-2859-8-34.
26. Maruta K, Mitsuzumi H, Nakada T, et al. Cloning and sequencing of a cluster of genes encoding novel enzymes of trehalose biosynthesis from thermophilic archaebacterium *Sulfolobus acidocaldarius.* Biochim Biophys Acta 1996;1291:177-81.
27. Wannet WJ, Op den Camp HJ, Wisselink HW, et al. Purification and characterization of trehalose phosphorylase from the commercial mushroom *Agaricus bisporus.* Biochim Biophys Acta 1998;1425:177-88.
28. Aisaka K, Masuda T. Production of trehalose phosphorylase by *Catellatospora ferruginea.* FEMS Microbiol Lett 1995;131:47-51.
29. Woo EJ, Ryu SI, Song HN, et al. Structural insights on the new mechanism of trehalose synthesis by trehalose synthase TreT from *Pyrococcus horikoshii.* J Mol Biol 2010;404:247-59.
30. Qu Q, Lee SJ, Boos W. TreT, a novel trehalose glycosyltransferring synthase of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis.* J Biol Chem 2004;279:47890-7.
31. Cabib E, Leloir LF. The biosynthesis of trehalose phosphate. J Biol Chem 1958;231:259-75.
32. Elliott B, Haltiwanger RS, Futcher B. Synergy between trehalose and Hsp104 for thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae.* Genetics 1996;144:923-33.
33. Vuorio OE, Kalkkinen N, Londesborough J. Cloning of two related genes encoding the 56-kDa and 123-kDa subunits of trehalose synthase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae.* Eur J Biochem 1993;216:849-61.
34. Avonce N, Mendoza-Vargas A, Morett E, et al. Insights on the evolution of trehalose biosynthesis. BMC Evol Biol 2006;doi:10.1186/1471-2148-6-109.
35. De Virgilio C, Simmen U, Hottiger T, et al. Heat shock induces enzymes of trehalose metabolism, trehalose accumulation, and thermotolerance in *Schizosaccharomyces pombe,* even in the presence of cycloheximide. FEBS Lett 1990;273:107-10.
36. Hottiger T, Schmutz P, Wiemken A. Heat-induced accumulation and futile cycling of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae.* J Bacteriol 1987;169:5518-22.
37. Winkler K, Kienle I, Burgert M, et al. Metabolic regulation of the trehalose content of vegetative yeast. FEBS Lett 1991;291:269-72.
38. Zaragoza O, Blazquez MA, Gancedo C. Disruption of the *Candida albicans* TPS1 gene encoding trehalose-6-phosphate synthase impairs formation of hyphae and decreases infectivity. J Bacteriol 1998;180:3809-15.
39. Zaragoza O, de Virgilio C, Ponton J, et al. Disruption in *Candida albicans* of the TPS2 gene encoding trehalose-6-phosphate phosphatase affects cell integrity and decreases infectivity. Microbiology 2002;148:1281-90.

40. Petzold EW, Himmelreich U, Mylonakis E, et al. Characterization and regulation of the trehalose synthesis pathway and its importance in the pathogenicity of *Cryptococcus neoformans.* Infect Immun 2006;74:5877-87.
41. Ngamskulrungroj P, Himmelreich U, Breger JA, et al. The trehalose synthesis pathway is an integral part of the virulence composite for *Cryptococcus gattii.* Infect Immun 2009;77:4584-96.
42. Song XS, Li HP, Zhang JB, et al. Trehalose 6-phosphate phosphatase is required for development, virulence and mycotoxin biosynthesis apart from trehalose biosynthesis in *Fusarium graminearum.* Fungal Genet Biol 2014;63:24-41.
43. Foster AJ, Jenkinson JM, Talbot NJ. Trehalose synthesis and metabolism are required at different stages of plant infection by *Magnaporthe grisea.* Embo J 2003;22:225-35.
44. Al-Bader N, Vanier G, Liu H, et al. Role of trehalose biosynthesis in *Aspergillus fumigatus* development, stress response, and virulence. Infect Immun 2010;78:3007-18.
45. Puttikamonkul S, Willger SD, Grahl N, et al. Trehalose 6-phosphate phosphatase is required for cell wall integrity and fungal virulence but not trehalose biosynthesis in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus.* Mol Microbiol 2010;77:891-911.
46. Xue Y, Shui G, Wenk MR. TPS1 drug design for rice blast disease in *magnaporthe oryzae.* Springerplus 2014;doi: 10.1186/2193-1801-3-18.
47. Vanittanakom N, Cooper CR, Jr., Fisher MC, et al. *Penicillium marneffei* infection and recent advances in the epidemiology and molecular biology aspects. Clin Microbiol Rev 2006;19:95-110.
48. Abreue Silva MA, Salum FG, Figueiredo MA, et al. Important aspects of oral paracoccidioidomycosis--a literature review. Mycoses 2013;56:189-99.
49. Brown GD, Gordon S. Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. Nature 2001;413:36-7.