

# บทที่ 1

## บทนำ

### ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

มาลาเรียเป็นโรคติดต่อชนิดหนึ่งที่พบมากในประเทศเขตร้อนทั่วโลก ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการเจ็บป่วยและการเสียชีวิตที่สำคัญโรคหนึ่ง จากรายงานขององค์การอนามัยโลก พบว่าในแต่ละปีมีผู้ติดเชื้อมาลาเรียประมาณ 200-300 ล้านคน โดยพบอุบัติการณ์ของการเกิดโรคสูงที่สุดในประเทศแถบทวีปแอฟริกาและเป็นสาเหตุที่ทำให้เด็กเสียชีวิตด้วยโรคนี้ประมาณปีละ 2 ล้านคน (WHO, 1997) ประมาณว่าประชากรโลกมากกว่าครึ่งหนึ่งอาศัยอยู่ในท้องถิ่นที่มีความเสี่ยงต่อการได้รับเชื้อมาลาเรีย (WHO, 1985) ดังนั้นจึงถือได้ว่ามาลาเรียเป็นโรคที่มีความรุนแรงและเป็นปัญหาที่สำคัญทางด้านสาธารณสุขของโลก

เชื้อมาลาเรียเป็นโปรโตซัวชนิดหนึ่งใน phylum Apicomplexa class Sporozoa genus *Plasmodium* ประกอบด้วย species ต่าง ๆ ประมาณ 120 ชนิด แต่มีเพียง 4 ชนิดที่ทำให้เกิดโรคในคนได้แก่ *Plasmodium falciparum* *Plasmodium vivax* *Plasmodium malariae* และ *Plasmodium ovale* โดยมีวงจรชีวิตในการเจริญเติบโตที่อาศัยโฮสต์ 2 ชนิด ได้แก่ การเจริญเติบโตที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual reproduction) ในยุงก้นปล่อง (anopheline mosquito) เรียกว่า sporogony และการเจริญเติบโตที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction) ในคนหรือสัตว์มีกระดูกสันหลังเรียกว่า schizogony ประกอบด้วยระยะการเจริญเติบโตในตับและเม็ดเลือดแดง เวลาที่ใช้ในการเจริญเติบโตก็จะแตกต่างกันไป การเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนในเม็ดเลือดแดงจะมีความสัมพันธ์ในการก่อให้เกิดพยาธิสภาพและอาการเจ็บป่วย ในคน โดยที่ *P. falciparum* เป็นชนิดที่ทำให้เกิดอาการที่รุนแรงและพบได้มากที่สุด

ภายหลังสงครามโลกครั้งที่ 2 องค์การอนามัยโลกได้รณรงค์ให้มีการควบคุมโรคมาลาเรียอย่างเข้มงวด มาตรการที่สำคัญประการหนึ่งได้แก่ การใช้สารเคมีฆ่าแมลง เพื่อกำจัดยุงก้นปล่องที่เป็นพาหะของโรค ตลอดจนการค้นคว้าและการผลิตยารักษาโรคที่มีประสิทธิภาพ ส่งผลให้อุบัติการณ์ของการติดเชื้อมาลาเรียมีแนวโน้มลดลง แต่หลังจากนั้นไม่นานกลับพบว่าอุบัติการณ์การติดเชื้อมาลาเรียกลับเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากเชื้อมาลาเรีย โดยเฉพาะ *P. falciparum* เกิดการดื้อยาที่เคยใช้รักษาได้ผลตลอดจนยุงก้นปล่องดื้อต่อยาฆ่าแมลง

ดังนั้นมาตรการที่สำคัญประการหนึ่งที่น่าจะมีประโยชน์คือการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรค มาลาเรีย (Wernsdorfer, 1991)

สำหรับสถานการณ์มาลาเรียในประเทศไทย มีแนวโน้มของอุบัติการณ์ของโรคลดลงอย่างต่อเนื่อง แต่ในปี พ.ศ. 2531 จนถึงปัจจุบันพบจำนวนผู้ป่วยโรคมาลาเรียเพิ่มมากขึ้น การกระจายของจำนวนผู้ป่วยพบได้มากในจังหวัดชายแดนที่ติดต่อกับประเทศเพื่อนบ้านได้แก่ ประเทศเมียนมาร์ กัมพูชา มาเลเซียและลาว สาเหตุที่สำคัญประการหนึ่งที่ทำให้แนวโน้มการเกิดโรคสูงขึ้น เนื่องจากมีแรงงานต่างชาติเข้ามาทำงานเพิ่มมากขึ้นประกอบกับการแพร่กระจายเชื้อมาลาเรียสูงมากในบริเวณท้องที่ชายแดน ทั้งนี้เนื่องจากพื้นที่มักเป็นป่าเขาซึ่งเอื้ออำนวยต่อการเพาะพันธุ์ยุงพาหะและการแพร่เชื้อ รวมทั้งการอพยพย้ายถิ่นของประชากร นอกจากนี้จำนวนผู้ป่วยมาลาเรียทางภาคใต้ได้เพิ่มมากขึ้น ทำให้ส่งผลกระทบต่อสถานการณ์โรคมาลาเรีย สำหรับการแยกชนิดของเชื้อจากผู้ป่วยทั่วประเทศ ในปี พ.ศ. 2540 พบว่าผู้ติดเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* เป็นส่วนใหญ่ประมาณร้อยละ 51.19 *P. vivax* ประมาณร้อยละ 48.45 *P. malariae* ประมาณร้อยละ 0.03 ที่เหลือเป็นการติดเชื้อหลายชนิดร่วมกัน (mixed infection) ประมาณร้อยละ 0.33 (กองมาลาเรีย, 2542)

เนื่องจากภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อมาลาเรียในธรรมชาติมักพบเฉพาะในกลุ่มประชากรที่อาศัยอยู่ในบริเวณที่มีอัตราการแพร่เชื้อมาลาเรียสูงซึ่งได้รับเชื้อบ่อยและมีการเจ็บป่วยจากการติดเชื้อมาลาเรียหลายครั้ง ภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นมีประสิทธิภาพที่ไม่สมบูรณ์ (partial protection) กล่าวคือ ทำให้ผู้มีเชื้อมาลาเรียอยู่ในร่างกายมีอาการแสดงของโรคไม่รุนแรงหรือมีอาการแสดงน้อยมาก แต่ยังสามารถตรวจพบเชื้อมาลาเรียระยะที่มีการเพิ่มจำนวนแบบไม่ใช้เพศในเม็ดเลือดแดงได้ นอกจากนี้ภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นมักจะอยู่ได้ไม่นาน เว้นแต่จะได้รับการกระตุ้นให้มีการติดเชื้อมาลาเรียบ่อย ๆ ดังนั้นแนวทางในการผลิตวัคซีนจึงมุ่งหวังให้เกิดประสิทธิภาพของภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อมาลาเรียดีกว่าการถูกกระตุ้นจากการติดเชื้อมาลาเรียในธรรมชาติ นอกจากนี้ภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นมีความจำเพาะต่อแต่ละระยะของการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย (stage-specific) ตลอดจนมีความจำเพาะต่อเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิด (species-specific) และมีความจำเพาะต่อแต่ละสายพันธุ์ด้วย (strain-specific) ดังนั้นวัคซีนที่น่าจะมีประสิทธิภาพดีจึงควรครอบคลุมหลายระยะของการเจริญเติบโตของเชื้อ และทุกสายพันธุ์ของมาลาเรีย (Nussenzweig et al., 1994)

ระยะการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียในเม็ดเลือดแดงมีหลายระยะแต่พบว่า มีเพียงระยะเมโรโซอิต (merozoite) เท่านั้นที่สามารถมีชีวิตอยู่ในพลาสมาได้ในช่วงเวลาสั้น ๆ ก่อนที่จะบุกรุก (invade) เข้าสู่เม็ดเลือดแดงใหม่ ระยะนี้จึงอาจถูกภูมิคุ้มกันของคนที่ทำลายได้ ดังนั้นระยะเมโรโซอิตจึงเป็นเป้าหมายที่สำคัญในการพัฒนาเป็นองค์ประกอบ

ส่วนหนึ่งของวัคซีนป้องกันมาลาเรีย (malaria subunit vaccine) จากการศึกษาโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในระยะเมอริโธซอยต์ของ *P. falciparum* พบว่ามีโปรตีนหลายชนิด แต่ชนิดที่พบปริมาณมากที่สุดคือ ไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 180-220 kDa เรียกว่า merozoite surface protein 1 (MSP1) (Holder, 1988) ซึ่งเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่และมีความหลากหลายในรูปแบบแอนติเจน (antigenic diversity) ในแต่ละสายพันธุ์ จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายพันธุ์ต่าง ๆ พบว่าโปรตีน ชนิดนี้ถูกสร้างจากยีนพื้นฐานเพียง 2 รูปแบบ (allelic dimorphism) กล่าวคือจะพบการ แทนที่ของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide substitution) ในตำแหน่งหนึ่ง ๆ เพียง 2 ชนิดเท่านั้นได้แก่กลุ่ม MAD20 (MAD20 type) และกลุ่ม K1 (K1 type) จากการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ ทำให้เกิดความแตกต่างหรือคล้ายคลึงกันในแต่ละสายพันธุ์ ดังนั้นจึงสามารถแบ่งยีน PfMSP1 ได้เป็นบริเวณต่าง ๆ 17 บริเวณ (blocks) ซึ่งประกอบด้วยบริเวณที่มีความคล้ายคลึงกันสูงมาก ร้อยละ 87-97 เรียกว่า conserved block ซึ่งมี 5 บริเวณ บริเวณที่มีความคล้ายคลึงกันปานกลาง ร้อยละ 65-77 เรียกว่า semi-conserved block มี 5 บริเวณ และบริเวณที่มีความคล้ายคลึงกันน้อย ร้อยละ 10-38 เรียกว่า variable block มีจำนวน 7 บริเวณ โดยทั้ง 17 บริเวณนี้มีพื้นฐานของยีน 2 รูปแบบ แต่ยกเว้นในบริเวณที่ 2 (block 2) แบ่งเป็น 3 กลุ่ม โดย 2 กลุ่มประกอบด้วยบริเวณที่มีการสร้างกรดอะมิโนซ้ำกันดังกล่าว (tripeptide repeats) ได้แก่กลุ่ม MAD20 และ K1 สำหรับกลุ่มที่ 3 ไม่มีการสร้างกรดอะมิโนสามตัวที่เรียงซ้ำกันเป็นชุด ๆ คือกลุ่ม RO33 นอกจากนี้ยังพบความแตกต่างของจำนวน tripeptide repeats และลำดับของนิวคลีโอไทด์ในกลุ่ม MAD20 และ K1 ดังนั้นทั้ง 2 กลุ่มจึงมีความหลากหลายสูง (Certa et al., 1987; Jongwutiwes et al., 1992; Jiang et al., 2000) ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทำให้สามารถอธิบายการเกิดความหลากหลายของแอนติเจนของ MSP1 ในแต่ละสายพันธุ์ได้จากการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรม (genetic recombination) ระหว่างสายพันธุ์ที่ต่างกันในขณะที่เชื้อมาลาเรียสืบพันธุ์โดยอาศัยเพศในยุงก้นปล่อง (Tanabe et al., 1987; Jongwutiwes et al., 1992; Kerr et al., 1994)

จากการที่ MSP1 เป็นโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่และมีความแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ดังนั้นลักษณะโครงสร้างสามมิติ (tertiary structure) อาจมีการบดบังส่วนที่เป็น epitope ที่สำคัญของการเป็นวัคซีนที่ดี ดังนั้นในทางปฏิบัติจึงต้องอาศัยเฉพาะส่วนที่มีขนาดใหญ่เกินไปและยังคงความสามารถกระตุ้นให้โฮสต์เกิดภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อมาลาเรีย

แม้ว่าหน้าที่ของ MSP1 ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่เชื่อว่าน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการลุกลามเข้าสู่เม็ดเลือดแดง จากการศึกษาในหลอดทดลอง โดยใช้ polyclonal และ monoclonal antibody ต่อ MSP1 ของ *P. falciparum* พบว่าสามารถป้องกันการบุกรุกของเมอริโธซอยต์เข้าสู่เม็ดเลือดแดงใหม่ต่อไปได้และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย (Freeman

et al., 1980; Cheung et al., 1986; Holder et al., 1988; Chang et al., 1989; Lyon et al., 1989; Blackman et al., 1990; Chang et al., 1992) นอกจากนี้การศึกษาผลการตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่อแอนติเจนในสัตว์ทดลอง โดยการฉีด MSP1 ในรูปของโปรตีนที่บริสุทธิ์ (purified protein) หรือโพลีเปปไทด์จากการสังเคราะห์ขึ้นมา (synthetic peptides) หรือการสร้างโพลีเปปไทด์จากเซลล์ชนิดอื่น (recombinant polypeptides) พบว่าสามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ *P. falciparum* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้น MSP1 น่าจะเป็นองค์ประกอบของวัคซีนที่สำคัญต่อการป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียในระยะการเจริญเติบโตแบบไม่อาศัยเพศแบบไม่อาศัยในเม็ดเลือดแดง (Cheung et al., 1986; Holder and Freeman, 1982; Siddiqui et al., 1987; Herrera et al., 1990)

จากการศึกษาในเชิงระบาดวิทยาถึงความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองของแอนติบอดีต่อส่วนต่าง ๆ ของ MSP1 พบว่าบริเวณ C-terminus ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนขนาด 19 kDa สามารถกระตุ้นให้โฮสต์เกิดภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อและป้องกันการเกิดอาการของโรคมาลาเรียที่รุนแรง อย่างไรก็ตามอุบัติการณ์ของการตรวจพบแอนติบอดีต่อโปรตีนขนาด 19 kDa ในกลุ่มประชากรที่ติดเชื้อตามธรรมชาติเกิดขึ้นน้อยมาก (Al-Yaman et al., 1996; Egan et al., 1996; Doodoo et al., 1999; Cavanagh et al., 2001) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องอาศัยบริเวณอื่น ๆ ของ MSP1 ร่วมด้วยเพื่อเป็นองค์ประกอบของมาลาเรียวัคซีน

ในการศึกษาแอนติบอดีต่อ MSP1 ที่เกิดขึ้นภายหลังการติดเชื้อมาลาเรียในกลุ่มประชากรจำนวนมากพบว่าแอนติบอดีต่อบริเวณ N-terminus ของ MSP1 โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 3 ตัวเรียงซ้ำกันเป็นชุด ๆ (tripeptide repeats) หรือบริเวณที่ 2 มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการป้องกันการติดเชื้อมาลาเรีย (Conway et al., 2000; Cavanagh et al., 2001) นอกจากนี้แอนติบอดี ดังกล่าวยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Locher et al., 1996; Jouin et al., 2001)

อย่างไรก็ตาม MSP1 ในบริเวณ tripeptide repeats มีความหลากหลายในองค์ประกอบตลอดจนจำนวนของการซ้ำกันเป็นชุด ๆ ของกรดอะมิโน แม้ว่าจะมีผู้ที่ศึกษาความหลากหลายของบริเวณดังกล่าวในระดับนิวคลีโอไทด์ แต่ก็ยังไม่มีการศึกษาในประชากรมาลาเรียจำนวนมากในพื้นที่เขตปรากฏโรคในระยะเวลาต่าง ๆ กัน ดังนั้นข้อมูลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างผู้ป่วยในประเทศไทยสามารถนำไปใช้ประโยชน์เป็นพื้นฐานสำคัญของการนำไปสู่การออกแบบวัคซีนป้องกันมาลาเรีย ตลอดจนการศึกษาพันธุกรรมของประชากร (population genetics) ของเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ในธรรมชาติของเขตปรากฏโรคอีกด้วย