บทที่ 2

สอบสวนเอกสาร

อนุกรมวิธานของเชื้อมาลาเรีย

เชื้อมาลาเรียเป็นโปรโตซัวชนิดหนึ่งจัดอยู่ใน phylum Apicomplexa เนื่องจากมีองค์ประกอบภายในเซลล์ที่เรียกว่า apical complex เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน อันประกอบด้วย polar rings, microtubule, rhoptry และ microneme ซึ่งอยู่ทางด้านหน้าของเซลล์ในบางระยะ เช่น เมอร์โรซอยต์ (merozoite) และสปอร์โรซอยต์ (sporozoite) เป็นต้น จัดอยู่ใน class Sporozoea โดยมีการเพิ่มจำนวนได้ทั้งแบบอาศัยเพศ (sexual reproduction) และแบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction) มีระยะโอโอซีสต์ (oocyst) ภายในประกอบด้วยสปอร์โรซอยต์ซึ่งเป็นระยะติดต่ออยู่เป็นจำนวนมาก พบแฟลกเจลลา (flagella) เฉพาะในระยะไมโครแกมมีต (microgamete) มีเท้าเทียม (pseudopod) สำหรับการกินอาหารไม่ใช้ในการเคลื่อนที่ จัดอยู่ใน subclass Coccidia โดยมีวงชีวิตที่ประกอบด้วยกระบวนการสร้างเมอร์โรซอยต์ (merogony) กระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบใช้เพศ(gametogony) และกระบวนการสร้างสปอร์โรซอยต์ (sporogony) จัดอยู่ใน order Eucoccidiida โดยกระบวนการสร้างเมอร์โรซอยต์เกิดขึ้นในสัตว์มีกระดูกสันหลัง จัดอยู่ใน suborder Haemosporina เนื่องจากไม่มีโคนอยด์ (conoid) ระยะสปอร์โรซอยต์ อยู่เป็นอิสระนอกเซลล์ของโฮสต์ กระบวนการสร้างสปอร์โรซอยต์เกิดขึ้นในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง การเจริญเติบโตของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (microgamont) และเพศเมีย (macrogamete) แยกจากกันโดยเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้จะเจริญเป็นไมโครแกมมีต 8 ตัวที่มีแฟลกเจลลา ระยะไซโกต (zygote) สามารถเคลื่อนที่ได้เรียกว่า โอโอไคนีต (ookinete) การติดต่อสู่คนโดยอาศัยแมลงดูดเลือด (blood-sucking insect) คือ ยุงในgenus *Anopheles* จัดอยู่ใน family Plasmodiidae โดยพบในเลือดของ

สัตว์จำพวก นก สัตว์เลื้อยคลาน และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม การเจริญแบบไม่อาศัยเพศเกิดขึ้นในสัตว์มีกระดูกสันหลัง โดยกระบวนการแบ่งนิวเคลียสหลายครั้ง ในเซลล์เดิม เรียกเซลล์ที่อยู่ในระยะดังกล่าวว่าไชซอนต์ (schizont) ซึ่งเมื่อเกิดการแบ่งไซโตปลาสซึมจะได้เซลล์ที่มีนิวเคลียสเดียวจำนวนมากเรียกแต่ละเซลล์ว่าเมอร์โรซอยต์สำหรับ การสืบพันธุ์แบบใช้เพศเกิดขึ้นเพียงครั้งเดียวในยุงก้นปล่องเชื้อมาลาเรียที่ทำให้เกิดโรคในคนจัดอยู่ใน genus *Plasmodium* โดยมีช่วงชีวิตที่มีการเพิ่มจำนวนโดยไม่อาศัยเพศเกิดขึ้นครั้งแรกในเซลล์ตับของคนเรียกว่า exoerythrocytic schizogony (Beaver et al., 1984)

เชื้อมาลาเรียใน genus *Plasmodium* ประกอบด้วย species ต่าง ๆ ประมาณ 120 species แต่ชนิดที่ทำให้เกิดโรคในคนเป็นส่วนใหญ่มี 4 ชนิด ได้แก่ *P.falciparum, P.vivax, P.malariae* และ *P.ovale* นอกจากนี้ยังพบว่า *Plasmodium* ที่ทำให้เกิดโรคใน primate หลายชนิดอาจติดต่อสู่คนได้แก่ *P.knowlesi, P.inui inui, P.inui shortti, P.brazilianum, P.schetzi, P.cynomolgi bastianelli, P.cynomolgi cynomolgi, P.cynomolgi ceylonensis, P.simium* และ *P.simiovale* (Spencer, 1986) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *P.simiovale* และ *P.vivax* มีรูปร่างที่คล้ายคลึงกันมาก การแยกชนิดจำเป็นต้องอาศัยการทดสอบทางอิมมูนวิทยา หรือการตรวจสอบพันธุกรรมของเชื้อ (Qari et al., 1993)

ศูนย์วิทยทรัพยากร

การกระจายทางภูมิศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โรคมาลาเรียมีการแพร่กระจายในประเทศต่าง ๆ ทั่วโลก โดยเฉพาะประเทศที่อยู่ในบริเวณแถบร้อนจะมีการกระจายของโรคมากกว่าบริเวณอื่น ได้แก่ ประเทศในทวีปอาฟริกา อเมริกากลาง อเมริกาใต้ เอเชีย และโอเชียเนีย ประมาณว่ามีประชากรโลกกว่า 2.6 พันล้านคนอาศัยอยู่ในบริเวณที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อมาลาเรีย คิดเป็นร้อยละ 55 ของประชากรโลก (UNDP, 1985) โดย

ประชากรประมาณ 2.2 พันล้านคนอาศัยอยู่ในบริเวณที่มีมาตรการควบคุมมาลาเรีย และประชากรประมาณ 400 ล้านคนอาศัยอยู่ในบริเวณที่ไม่มีมาตรการดังกล่าว ซึ่งเป็นประเทศส่วนใหญ่ทางตอนล่างของทะเลทรายซาฮาราในอาฟริกา

สำหรับประเทศที่เชื่อว่าไม่มีเชื้อมาลาเรียแพร่กระจายอยู่ ได้แก่ ยุโรป (ยกเว้นตุรกี) แคนาดา สหรัฐอเมริกา ประเทศแถบคาริเบียน จอร์แดน คูเวท บาเรห์น กาตาร์ อิสราเอล เลบานอน ฮองกง สิงค์โปร์ ไซปรัส ญี่ปุ่น เกาหลีเหนือและใต้ ไต้หวัน บรูไน นิวซีแลนด์ ออสเตรเลีย เลโซโธ ซีเชลล์ บางหมู่เกาะของโอเชียเนียและตูนิเซีย (UNDP, 1984)

เชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคมาลาเรียส่วนใหญ่เกิดจาก *P.falciparum* และ *P. vivax* โดยพบ *P.falciparum* มากกว่าชนิดอื่น ๆ ในทวีปอาฟริกา ไฮติ สาธารณรัฐโดมินิกัน เฟรนช์กินเนีย สุรินาม เอเชีย และปาปัวนิวกินี ในประเทศที่พบ *P.vivax* มากกว่าชนิดอื่น ๆ ได้แก่ ประเทศแถบลาตินอเมริกา จีน ตุรกี และ อินเดีย สำหรับ *P.malariae* พบได้ทั่วไป แต่ไม่บ่อยกว่า *P.falciparum* และ *P.vivax* ส่วน *P.ovale* นั้นพบมากในทวีปอาฟริกามากกว่าบริเวณอื่นของโลก นอกจากนี้ *P.vivax* พบได้น้อยมากหรือแทบไม่พบเลยในบริเวณอาฟริกาตะวันตก

ในประเทศไทยพบผู้ป่วยจากการติดเชื้อมาลาเรียชุกชุมในบางบริเวณของประเทศได้แก่ พื้นที่ในจังหวัด แม่ฮ่องสอน ตาก น่าน แพร่ นครราชสีมา สระบุรี ปราจีนบุรี ฉะเชิงเทรา ชลบุรี ตราด ระยอง จันทบุรี กาญจนบุรี ระนอง สงขลา ตรัง พังงา กระบี่ และ สตูล โดยมาตรการควบคุมและป้องกันโรคมาลาเรียดำเนินงานโดยกองมาลาเรีย กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข (กองมาลาเรีย 2533)

วงชีวิตและการเจริญเติบโตของมาลาเรีย

เชื้อมาลาเรียมีวงชีวิตที่ต้องอาศัยสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังคือยุงก้นปล่องโดยมีการเจริญแบบใช้เพศ (sexual development) กล่าวคือเมื่อยุงก้นปล่อง

ดูดเลือดคนที่มีระยะแกมมีโตไซต์ (gametocytes) เข้าไปในกระเพาะอาหาร แกมมีโตไซต์เพศเมีย (female gametocyte) จะเจริญเป็นเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (female gamete) ส่วน แกมมีโตไซต์เพศผู้ (male gametocyte) จะเกิดกระบวนการที่เรียกว่า exflagellation ทำให้เกิดเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (male gamete) จำนวน 8 ตัวที่มีแฟลกเจลลา การเจริญดังกล่าวใช้เวลาเพียงประมาณ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นเมื่อเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้เกิดการปฏิสนธิกับเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียเจริญเป็นไซโกต ซึ่งยังคงอยู่ในช่องว่าง (lumen) ของกระเพาะอาหารยุง เมื่อไซโกตมีการยื่นเท้าเทียมเพื่อเคลื่อนที่ผ่านผนังกระเพาะอาหารของยุงเรียกระยะนี้ว่าโอโอไคนีต โดยเชื่อว่ากระบวนการไชผ่านเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารนั้นอาจใช้ช่องทางระหว่างเซลล์เยื่อบุหรือทะลุผ่านเซลล์เยื่อบุแล้วเจริญอยู่ที่ผนังด้านนอกของกระเพาะอาหาร โดยมีเยื่อบุกระเพาะอาหารด้านนอกปกคลุมอยู่ เรียกระยะดังกล่าวว่าโอโอซีสต์ เมื่อโอโอซีสต์มีการเจริญต่อไป สปอร์โรบลาส (sporoblast) ภายในจะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเกิดเป็นสปอร์โรซอยต์ซึ่งในระยะแรกจะยังมีส่วนติดกันอยู่ เมื่อสปอร์โรซอยต์เจริญเต็มที่สปอร์โรบลาสจะมีขนาดเล็กลงและสลายไปในที่สุด สปอร์โรซอยต์ที่เกิดขึ้นจะมีจำนวนประมาณ 1 ถึง 2 พันตัวในโอโอซีสต์ดังกล่าว (Rosenberg & Rungsiwongse, 1991; Meis et al., 1992) ซึ่งระยะนี้โอโอซีสต์จะมีขนาดใหญ่มากขึ้นเป็นลำดับโดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 50 ไมครอน ยุงหนึ่งตัวอาจมีโอโอซีสต์อยู่เป็นจำนวนมาก เมื่อสปอร์โรซอยต์เจริญเต็มที่จะแตกออกจากโอโอซีสต์ แล้วกระจายไปตามช่องว่างในทรวงอก (thoracic cavity) และเคลื่อนที่ไปสู่ต่อมน้ำลายของยุงและสะสมอยู่ในน้ำลายเป็นจำนวนมากระยะนี้ยุงที่มีสปอร์โรซอยต์ในต่อมน้ำลายสามารถแพร่เชื้อมาลาเรียโดยสปอร์โรซอยต์ซึ่งปะปนมากับน้ำลายยุงขณะกัดคนหรือสัตว์มีกระดูกสันหลังที่เหมาะสมจะเป็นโฮสต์ต่อไป ระยะเวลาที่เชื้อมาลาเรียเจริญในยุงแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับอุณหภูมิของสภาวะแวดล้อม กล่าวคือถ้าอุณหภูมิสูงจะเจริญเร็วกว่าอุณหภูมิต่ำแต่ทั้งนี้ต้องอยู่ในช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสม นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อมาลาเรียและชนิดของยุงด้วย โดยทั่วไประยะเวลาที่เจริญในยุงประมาณ 8 ถึง 35 วัน (Spencer, 1986)

ยุงก้นปล่องซึ่งเป็นพาหะนำเชื้อมาลาเรียสู่คนมีหลายชนิดโดยมีการแพร่กระจายแตกต่างกันไปตามสภาวะทางภูมิศาสตร์ ในประเทศไทยยุงก้นปล่องที่เป็นพาหะที่สำคัญได้แก่ *Anopheles dirus* มีแหล่งเพาะพันธุ์บริเวณแหล่งน้ำสะอาดบริเวณซอกหินหรือตามหลุมน้ำในป่า นอกจากนี้ยังมี *A.minimus* มีแหล่งเพาะพันธุ์บริเวณลำธารที่น้ำสะอาดและไหลเอื่อย *A.maculatus* มีแหล่งเพาะพันธุ์บริเวณซอกหินที่แสงแดดส่องถึง *A.sundaicus* มีแหล่งเพาะพันธุ์บริเวณน้ำกร่อยและหลุมน้ำที่ขังอยู่ตามหาดหิน และ *A.aconitus* มีแหล่งเพาะพันธุ์บริเวณทุ่งนาหรือแหล่งน้ำที่มีวัชชพืชอยู่ ดังนั้นแหล่งระบาดของมาลาเรียจึงมักอยู่ใกล้กับแหล่งเพาะพันธุ์ของยุงที่เป็นพาหะเหล่านี้ (จันทชุม, 2534)

เมื่อยุงที่มีเชื้อมาลาเรียกัดคนจะปล่อยระยะสปอร์โรซอยต์เข้าสู่กระแสเลือด ภายในเวลาประมาณ 1 ชั่วโมงจะเข้าสู่เซลล์ตับโดยอาศัยกระบวนการที่ซับซ้อนและเกิดขึ้นรวดเร็วจึงเชื่อว่าน่าจะเป็นกลไกที่อาศัยตัวตอบรับ (receptor mediated mechanism) เนื่องจากที่ผิวของสปอร์โรซอยต์ถูกคลุมด้วยโปรตีนหลายชนิดแต่ที่พบมากที่สุด คือโปรตีนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 40 KD เรียกว่า circumsporozoite protein (CSP) (Dame et al., 1984; Arnot et al., 1985; Nussenzweig & Nussenzweig, 1990) โดยแอนติบอดีต่อ CSP สามารถยับยั้งการลุกลามของสปอร์โรซอยต์เข้าสู่เซลล์ตับชนิด HepG2 ในหลอดทดลองได้อย่างมีประสิทธิภาพ(Yoshida et al., 1980; Nussenzweig & Nussenzweig, 1990) นอกจากนี้ CSP ยังมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่มีความเหมือนกันในมาลาเรียต่างชนิดกันและมีคุณลักษณะเป็น cell-adhesive motif โดยประกอบด้วยกลุ่มของกรดอะมิโนที่เป็นเบส (basic) และที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) (Rich et al., 1990) ทั้งนี้ cell-adhesive motif ดังกล่าวยังพบได้ในโปรตีนบนผิวของสปอร์โรซอยต์อีกชนิดหนึ่งที่มีปริมาณน้อยกว่า เรียกว่า thrombospondin-related anonymous protein (TRAP) หรือ sporozoite surface protein 2 (SSP2) (Robson et al., 1988; Cochrane et al., 1990; Hollingdale et al., 1990) จากการศึกษาพบว่า cell-adhesive motif ดังกล่าวจะทำปฏิกิริยากับบริเวณ

basolateral ของเซลล์ตับใน space of Dissce อย่างไรก็ตามกลไกการเข้าสู่เซลล์ตับของสปอร์โรซอยต์อาจต้องอาศัยโมเลกุลหรือ โปรตีนอีกหลายชนิด (Cerami et al., 1992)

ภายหลังจากที่สปอร์โรซอยต์เข้าสู่เซลล์ตับแล้วจะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างลักษณะในการเจริญเติบโตและมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้น เรียกระยะที่อยู่ในเซลล์ตับว่า hepatic stage หรือ exoerythrocytic stage ระยะนี้จะมีการแบ่งนิวเคลียสหลายครั้งภายในไซโตปลาสซึมอันเดียวกัน ทำให้ระยะนี้มีหลายนิวเคลียสในเซลล์เดียวเรียกว่าไซซอนต์ จนในที่สุดเมื่อมีการแบ่งไซโตปลาสซึมทำให้แต่ละเซลล์มีนิวเคลียสเดียว เรียกว่าเมอร์โรซอยต์ เรียกกระบวนการเพิ่มจำนวนของเซลล์นี้ว่า schizogony ในขณะที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของมาลาเรียนี้โปรตีนบนผิวของมาลาเรียก็จะเปลี่ยนไปด้วยเช่นกัน โปรตีนที่พบมากในระยะนี้ ประกอบด้วยโปรตีนบางชนิดที่พบในระยะสปอร์โรซอยต์ และระยะเมอร์โรซอยต์ รวมทั้งโปรตีนที่เป็นแอนติเจนที่พบเฉพาะระยะที่อยู่ในตับ (liver-stage antigens) (Guerin-Marchand et al., 1987; Winger et al., 1990) มาลาเรียต่างชนิดกันจะมีจำนวนเมอร์โรซอยต์แตกต่างกัน กล่าวคือ *P.falciparum* จะมีจำนวนเมอร์โรซอยต์ประมาณ 30,000 ถึง 40,000 ตัว ในขณะที่ *P.ovale* และ *P.malariae* จะมีเมอร์โรซอยต์ประมาณ 15,000 ตัวส่วน *P.vivax* จะมีประมาณ 10,000 ตัว นอกจากนี้ระยะเวลาที่สปอร์โรซอยต์เจริญจนเกิดเป็นเมอร์โรซอยต์ในตับก็แตกต่างกันไปตามชนิดของมาลาเรีย โดย *P.falciparum* ใช้เวลาประมาณ 5.5 ถึง 7 วัน *P.vivax* ใช้เวลา 8 วัน *P.ovale* ใช้เวลา 9 วัน และ *P.malariae* ใช้เวลา 14 ถึง 15 วัน (Spencer, 1986)

สปอร์โรซอยต์ของ *P.falciparum* และ *P.malariae* เมื่อเข้าสู่เซลล์ตับแล้วจะมีการเจริญเติบโตต่อไปทั้งหมด แต่สำหรับ *P.vivax* และ *P.ovale* นั้นส่วนหนึ่งจะเปลี่ยนแปลงและเจริญต่อไปเช่นเดียวกับ *P.malariae* และ *P.falciparum* แต่จะมีบางส่วนที่เข้าสู่เซลล์ตับแล้วหยุดพักการเจริญเติบโตชั่วขณะ แล้วจึงกลับมาเจริญต่อไปอีกซึ่งจะใช้เวลาแตกต่างกันขึ้นกับสายพันธุ์และ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชนิดของมาลาเรียโดยอาจยาวนานเพียงไม่กี่เดือน หรืออาจจะนานเป็นปีก็ได้ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดไข้กลับ (relapse) ในผู้ป่วย เรียกระยะที่มาลาเรียหยุดพักการเจริญในเซลล์ตับชั่วขณะว่า hypnozoite (Krotoski et al., 1980; Krotoski et al., 1982)

เมื่อเมอร์โรซอยต์แตกออกจากเซลล์ตับ จะออกมาเป็นอิสระนอกเซลล์ในกระแสเลือดชั่วขณะ จึงเป็นเวลาที่เมอร์โรซอยต์มีโอกาสสัมผัสกับสารต่าง ๆ ในกระแสเลือดโดยตรงรวมทั้ง immunoglobulins และเซลล์อื่น ๆ ดังนั้นภายในระยะเวลาเพียงไม่กี่นาทีเมอร์โรซอยต์จะเข้าสู่เม็ดเลือดแดง ซึ่งขบวนการเข้าสู่เม็ดเลือดแดงนี้มีความซับซ้อนประกอบด้วยหลายขั้นตอน ได้แก่ขั้นการเกาะติดกับเม็ดเลือดแดงแบบไม่เฉพาะเจาะจง (nonspecific attachment) โดยใช้ด้านใดของเมอร์โรซอยต์ก็ได้ หลังจากนั้นเมอร์โรซอยต์จะหันด้านหน้าให้สัมผัสกับผิวเม็ดเลือดแดง (reorientation) ระยะนี้เม็ดเลือดแดงจะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างชั่วขณะ (deformation of the erythrocyte) ระยะต่อมาจะมีการสร้างรอยเชื่อมต่อ (junction) ระหว่างบริเวณด้านหน้า (apical end) ของเมอร์โรซอยต์กับผิวเม็ดเลือดแดงทำให้เมอร์โรซอยต์ค่อย ๆ ลุกลามเข้าสู่เม็ดเลือดแดงโดยมีการสร้างเยื่อหุ้ม vacuole ให้ติดต่อกับเยื่อหุ้มเซลล์ของเม็ดเลือดแดง หลังจากนั้นเมอร์โรซอยต์จะเคลื่อนเข้าในเม็ดเลือดแดงโดยการเคลื่อนตัวของรอยเชื่อมต่อดังกล่าว จนในที่สุดจะมีการเชื่อมปิด (sealing) ของเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงและเยื่อหุ้ม vacuole (Aikawa et al., 1978) ระยะเวลาที่ใช้ทั้งหมดประมาณ 1 ถึง 2 นาทีเท่านั้น ปรากฏการณ์ดังกล่าวเชื่อว่าเป็นกลไกที่ต้องอาศัยตัวตอบรับเช่นกัน โดยพบว่าโปรตีนบนผิวเมอร์โรซอยต์ที่สำคัญที่น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการดังกล่าวมีหลายชนิด ได้แก่ merozoite surface protein 1 (MSP1) (Holder & Blackman 1994), merozoite surface protein 2 (MSP2) (Smythe et al., 1988), erythrocyte binding protein (Pirson & Perkins 1985; Chitis & Miller 1994) และ rhoptry proteins (Bushell et al., 1988; Ridley et al., 1990; Harnyuttanakorn

et al., 1992) เป็นต้น ซึ่งกระบวนการเข้าสู่เม็ดเลือดแดงของมาลาเรียนี้ต้องอาศัยเอ็นไซม์ proteases อีกหลายชนิด (Breton & Silva 1993) ส่วนตัวตอบรับบนผิวเม็ดเลือดแดงที่น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องสำหรับ *P. falciparum* ได้แก่ erythrocyte glycophorin A และ erythrocyte glycophorin B (Sim et al., 1994) สำหรับ *P.vivax* ได้แก่ Duffy negative blood group (Chaudhuri et al., 1994) นอกจากนี้มาลาเรียต่างชนิดกันยังสามารถลุกลามเข้าเม็ดเลือดแดงที่มีอายุแตกต่างกัน กล่าวคือ *P.vivax* และ *P.ovale* สามารถลุกลามเข้าได้เฉพาะเม็ดเลือดแดงที่มีอายุน้อย (reticulocyte) ส่วน *P.malariae* ลุกลามเข้าในเม็ดเลือดแดงที่มีอายุมาก (senescent erythrocyte) แต่สำหรับ *P.falciparum* สามารถลุกลามเข้าเม็ดเลือดแดงได้ทุกช่วงอายุ (Nagel & Roth, 1989)

ภายหลังจากเมอร์โรซอยต์เข้าสู่เม็ดเลือดแดงแล้วจะมีการเจริญต่อไป โดยมี vacuole ขนาดใหญ่อยู่ภายในเซลล์ทำให้นิวเคลียสถูกดันไปด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ ระยะนี้เมื่อย้อมเลือดด้วยสียิมซา (giemsa) จะเห็นมาลาเรียมีรูปร่างคล้ายแหวน โดยส่วนไซโตปลาสซึมติดสีน้ำเงินและนิวเคลียสติดสีแดงเรียกระยะนี้ว่า ring stage ซึ่งการเจริญของมาลาเรียภายในเม็ดเลือดแดงจะดำเนินต่อไปภายในเยื่อหุ้มมาลาเรียเรียกว่า parasitophorous vacuole ดังนั้นมาลาเรียจึงไม่ได้สัมผัสโดยตรงกับไซโตปลาสซึมของเม็ดเลือดแดงมาลาเรีย ที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงจะได้อาหารจากการกินฮีโมโกลบิน (hemoglobin) โดยอาศัยกระบวนการพินโนไซโตซิส (pinocytosis) กล่าวคือจะมีการหว่ำเข้า (invagination) ของเยื่อหุ้มตัวเชื้อมาลาเรียและเยื้อหุ้ม parasitophorous vacuole เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนจะมีรูปร่างคล้ายปากเรียกว่า cytostome ในขณะเดียวกันส่วนของไซโตปลาสซึมของเม็ดเลือดแดงจะไหลเข้าไปในส่วนที่หว่ำเข้าดังกล่าว แล้วจะมีการเชื่อมปิดของคอคอดกลายเป็น food vacuole ในที่สุด (Aikawa et al., 1978) นอกจากนี้มาลาเรียยังมีกระบวนการขนส่งน้ำตาลกลูโคส กรดไขมัน กรดอะมิโน เกลือแร่ต่าง ๆ ตลอดจนพิวรีนนิวคลีโอไทด์ (purine nucleosides) ผ่านเข้าสู่เซลล์ (Sherman

1988; Krishna & Ng 1989; Ligelbach 1993) เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต ในขณะเดียวกันก็จะมีการขนส่งโปรตีนต่าง ๆ จากมาลาเรียไปสู่ไซโตปลาสซึมของเม็ดเลือดแดงโดยอาจจะอยู่ในรูปของ membrane-bound vesicles (Aikawa et al., 1986) หรืออาจจะแทรกอยู่ใน โครงสร้างเยื่อหุ้มเม็ดเลือดแดง (cytoskeleton) (Wiser 1991) เมื่อไม่นานนี้มีผู้สังเกตุว่าสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลมาก ๆ อาจเข้าสู่มาลาเรียโดยผ่านทางท่อเล็ก ๆ ติดต่อระหว่างมาลาเรียสู่ภายนอกของเม็ดเลือดแดงเรียกว่า parasitophorous duct (Pouvelle et al., 1991; Taraschi & Pouvelle, 1994) ซึ่งอาจจะเป็นปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นเพียงชั่วคราวเนื่องจากไม่สามารถตรวจพบโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Fujioka & Aikawa, 1993)

เมื่อมาลาเรียมีการเจริญมากขึ้นระยะวงแหวนจะเปลี่ยนเป็นระยะโทรโฟซอยต์ (trophozoite) โดยมีไซโตปลาสซึมแผ่ขยายออกมีลักษณะเป็นเท้าเทียม ระยะนี้เชื้อจะมีการเจริญรวดเร็วโดยอาศัยฮีโมโกลบินจากเม็ดเลือดแดงเป็นอาหารเป็นส่วนใหญ่ฮีโมโกลบินจะถูกย่อยสลายเป็นฮีม (heme)และโกลบิน (globin) มาลาเรียสามารถย่อยสลายฮีมให้เป็น ferriprotoporphyrin IX ซึ่งเป็นสารที่มีพิษต่อเซลล์ ดังนั้นมาลาเรียจึงมีกระบวนการกำจัดสารดังกล่าวโดยอาศัยเอ็นไซม์ heme polymerase ทำให้สารดังกล่าวรวมตัวกันเป็นโพลีเมอร์ (polymer) และไม่มีพิษ ปรากฏเป็นจุดสีน้ำตาลปนดำเรียกว่า malarial pigment หรือ hemozoin ให้เห็นภายในไซโตปลาสซึมของมาลาเรีย เอ็นไซม์ดังกล่าวถูกขัดทางการทำงานโดยยา chloroquine (Wellems, 1992) ในระยะโทรโฟซอยต์มีการขนส่งโปรตีนหลายชนิดจากมาลาเรียสู่เม็ดเลือดแดง โดยอาจอยู่ในรูปของ caveola-vesicle complex (Aikawa et al., 1986) ปรากฏให้เห็นในไซโตปลาสซึมของเม็ดเลือดแดงเมื่อย้อมด้วยสียิมซาเป็นจุดสีชมพู โดยมีรูปร่างแตกต่างกันไปตามชนิดของมาลาเรีย สำหรับ *P.falciparum* จะเห็นเป็นจุดใหญ่หรือเป็นแท่งสั้น ๆ เรียกว่า Maurer's cleft สำหรับ *P.vivax* และ *P.ovale* จะเห็นเป็นจุดเล็ก ๆ ขนาดเท่า ๆ กันกระจายทั่วไป

เรียกว่า Schuffner's dot และ *P.malariae* จะเห็นเป็นจุดเล็กละเอียดกระจายทั่วไปเรียกว่า Ziemann's dot

โทรโฟซอยต์เมื่อเจริญต่อไปจะมีการแบ่งนิวเคลียสหลายครั้งภายในไซโตปลาสซึมเดิมทำให้เกิดระยะไซซอนต์ซึ่งมีหลายนิวเคลียส เรียกกระบวนการนี้ว่า schizogony หลังจากนั้นเมื่อไซซอนต์เจริญเต็มที่แล้วจะมีการแบ่งไซโตปลาสซึมทำให้แต่ละเซลล์มีนิวเคลียสเดียว เรียกระยะดังกล่าวว่าไซซอนต์ระยะหลัง (late schizont) และเรียกแต่ละเซลล์ภายในว่าเมอร์โรซอยต์ ในช่วงนี้ malarial pigment จะถูกกำจัดออกนอกเซลล์ของมาลาเรียโดยทิ้งไว้ในส่วนของ parasitophorous vacuole จำนวนเมอร์โรซอยต์ที่เกิดขึ้นแตกต่างกันไปตามชนิดของมาลาเรีย โดย *P.falciparum* จะให้เมอร์โรซอยต์มีจำนวนตั้งแต่ 8 ถึง 26 เมอร์โรซอยต์ ส่วน *P.vivax* มีจำนวน 12 ถึง 24 เมอร์โรซอยต์ สำหรับ *P.malariae* และ *P.ovale* มีจำนวนตั้ง 6 ถึง 12 เมอร์โรซอยต์ ต่อมาเมอร์โรซอยต์จะออกจากเม็ดเลือดแดงโดยการแตกตัวของเม็ดเลือดแดง (hemolysis) และเป็นอิสระในกระแสเลือดชั่วขณะ พร้อมที่จะเข้าสู่เม็ดเลือดแดงใหม่ และมีการเจริญเป็นระยะต่าง ๆ ดังกล่าวต่อไป เรียกระยะที่มีการเจริญและเพิ่มจำนวนโดยไม่ใช้เพศภายในเม็ดเลือดแดงว่า asexual erythrocytic cycle ซึ่ง *P.falciparum* ใช้เวลาน้อยที่สุดประมาณ 36 ถึง 48 ชั่วโมง ส่วน *P.vivax* และ *P.ovale* ใช้เวลาประมาณ 48 ชั่วโมง สำหรับ *P.malariae* ใช้เวลานานที่สุดคือ 72 ชั่วโมง นอกจากนี้ที่เมอร์โรซอยต์ออกจากเม็ดเลือดแดงนั้น จะมีการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงและมีความสัมพันธ์กับการเกิดอาการไข้หนาวสั่นในผู้ป่วย (Quinn & Strickland, 1986; Warrell et al., 1990)

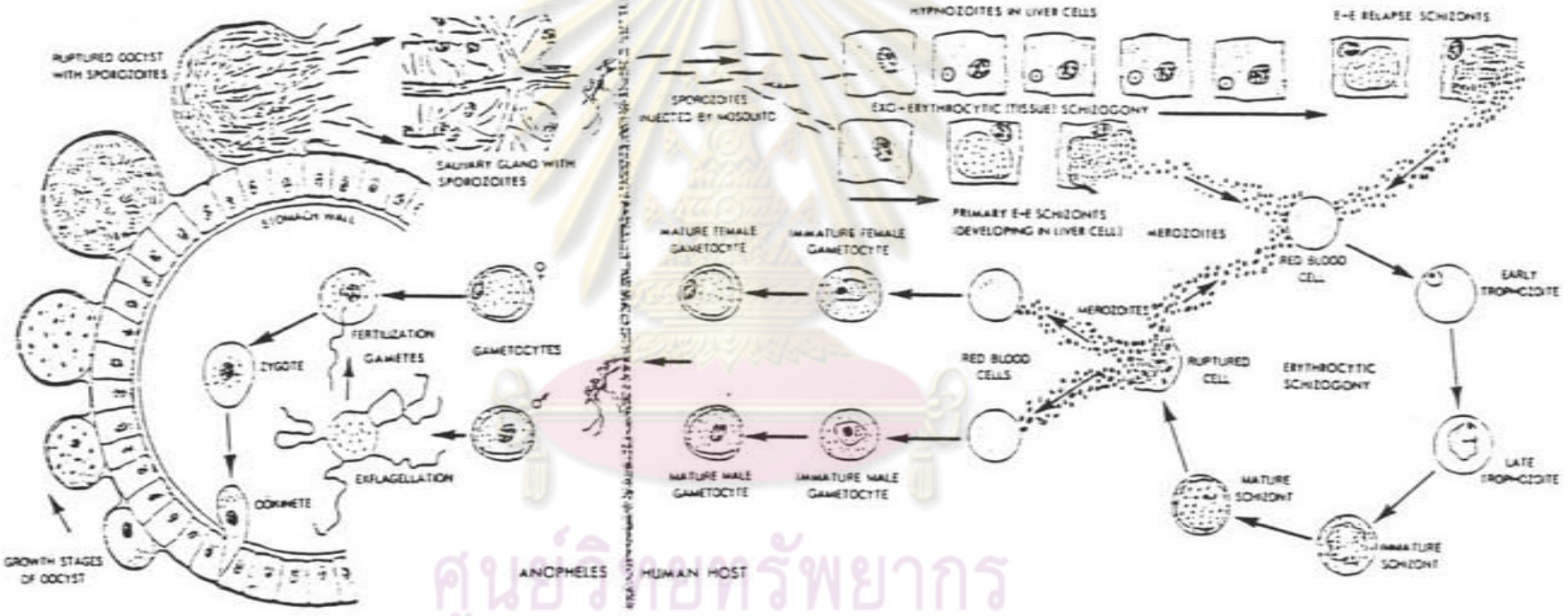
ระยะที่มาลาเรียเจริญอยู่ในเม็ดเลือดแดงแบบไม่ใช้เพศ (asexual erythrocytic cycle) นี้เมื่อเกิดขึ้นหลายรอบแล้ว เมอร์โรซอยต์ที่เกิดในรอบหลัง ๆ บางส่วนจะมีการเจริญต่อไปเป็นเซลล์สืบพันธุ์เรียกว่าแกมมีโตไซต์ (gametocyte) ซึ่งเกิดขึ้นเมื่อเม็ดเลือดแดงที่มีมาลาเรียอยู่ในม้าม ไขกระดูกและอวัยวะภายในอื่น ๆ โดยจะมีขั้นตอนการเจริญและเปลี่ยนแปลงรูปร่างหลาย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ระยะซิ่งเมื่อเจริญเต็มที่แกมมีโตไซต์ของ *P.falciparum* จะมีรูปร่างคล้ายพระจันทร์เสี้ยว (crescent form) หรือกล้วยหอม โดยแกมมีโตไซต์เพศผู้จะมีลักษณะอ้วนและสั้นกว่าแกมมีโตไซต์เพศเมีย ส่วนแกมมีโตไซต์ของ *P.vivax, P.malariae* และ *P.ovale* มีรูปร่างกลมรีโดยแกมมีโตไซต์เพศเมียมีขนาดใหญ่กว่าแกมมีโตไซต์เพศผู้เช่นเดียวกัน เมื่อย้อมด้วยสียิมซาไซโตปลาสซึมของแกมมีโตไซต์ตัวผู้จะติดสีน้ำเงินปนแดงในขณะที่แกมมีโตไซต์เพศเมียติดสีน้ำเงินเข้ม เนื่องจากไรโบโซม(ribosome) ของแกมมีโตไซต์เพศเมียมีมากกว่าแกมมีโตไซต์เพศผู้ นอกจากนี้จะพบนิวเคลียสบริเวณส่วนกลางของเซลล์ โดยแกมมีโตไซต์เพศผู้จะติดสีแดงอ่อนและอยู่กระจายกัน ส่วนแกมมีโตไซต์เพศเมีย ติดสีแดงเข้มและอยู่อัดกันแน่น(compact)เนื่องจากแกมมีโตไซต์เพศเมียมีนิวคลีโอลัส (nucleolus) ชัดเจน และขนาดใหญ่เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอน โดยทั่วไปเมื่อแกมมีโตไซต์เจริญเต็มที่จึงจะออกมาในกระแสเลือดที่เลี้ยงอวัยวะภายนอก (peripheral blood) และระยะเวลาตั้งแต่ตรวจพบมาลาเรียในเลือด (ระยะ asexual forms) จนถึงเวลาที่ตรวจพบแกมมีโตไซต์ สำหรับ *P.falciparum* ประมาณวันที่ 8 หรือวันที่ 15 ส่วน *P.vivax* และ *P.ovale* ประมาณวันที่ 5 สำหรับ *P.malariae* ตั้งแต่วันที่ 5 หรือวันที่ 23 ซึ่งในช่วงเวลาดังกล่าว เมื่อยุงก้นปล่องดูดเลือดคนระยะแกมมีโตไซต์จะเจริญต่อในกระเพาะอาหารของยุงต่อไป (Spencer, 1986) วงชีวิตของมาลาเรียแสดงในรูปที่ 1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Figure 1 Diagram illustrating the life cycle of human malaria (Bruce-Chwatt, 1985).



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อณูชีววิทยาของเชื้อมาลาเรีย

วิวัฒนาการ

ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อมาลาเรียเมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ

เชื้อมาลาเรียเป็นเซลล์ชนิด eukaryote กล่าวคือมีนิวเคลียชัดเจนนอกจากนี้ยังมี small subunit ribonucleoprotein, intron, capped และ polyadenylated mRNA รวมถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของอาร์เอ็นเอ และโปรตีนที่มีคุณลักษณะของเซลล์ประเภท eukaryote จากการศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของอาร์เอ็นเอใน small subunit ribosomal ของ *P.berghei* กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของอาร์เอ็นเอของ eukaryote อื่น ๆ พบว่าบรรพบุรุษของเชื้อมาลาเรียได้แยกสายวิวัฒนาการออกจากสายบรรพบุรุษ (ancestor) ของ eukaryote ร่วมกันค่อนข้างเร็ว ซึ่งการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สร้างอาร์เอ็นเอชนิดไรโบโซมที่มีขนาด 5.8S ของ *P.falciparum* ให้ผลยืนยันการวิเคราะห์ผลดังกล่าวเช่นกัน (Weber, 1988) เมื่อไม่นานมานี้มีผู้ค้นพบดีเอ็นเอที่อยู่นอกนิวเคลียส (extrachromosomal DNA) ของ *P.falciparum* พบว่าเป็นดีเอ็นเอสายคู่ที่เป็นวงปิด (closed circular double stranded DNA) ซึ่งมีขนาด 35 kb และจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ามีความสัมพันธ์กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอภายในคลอโรพลาส (Wilson et al., 1991)

ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อมาลาเรียต่างชนิดกัน

เชื้อมาลาเรียที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์มีกระดูกสันหลังมีหลายชนิดจากการศึกษายีนที่สร้าง circumsporozoite surface protein (CSP) ของมาลาเรีย 6 ชนิด ได้แก่ *P.yoelii, P.berghei, P.vivax, P. cynomolgi, P.knowlesi* และ *P.falciparum* พบว่าสามารถแบ่งเชื้อ

มาลาเรียดังกล่าวออกได้เป็น 3 กลุ่ม กลุ่มแรกเป็นมาลาเรียของหนู ได้แก่ *P. yoelii* และ *P.berghei* กลุ่มที่ทำให้เกิดโรคในลิงและคน ได้แก่ *P.vivax, P.cynomolgi* และ *P.knowlesi* กลุ่มสุดท้ายคือ *P.falciparum* ซึ่งทำให้เกิดโรคเฉพาะในคน ข้อมูลดังกล่าวเมื่อวิเคราะห์ยีนที่สร้างโปรตีนอื่น ๆ โดยวิธี hybridization ได้แก่ actin, tubulin, dihydrofolate reductase และ thymidylate synthase พบว่าให้ผลสอดคล้องกัน (Weber, 1988)

พันธุกรรมของมาลาเรีย

มาลาเรียมีจำนวนโครโมโซมในระยะต่าง ๆ ของการเจริญส่วนใหญ่เพียงชุดเดียว(haploid) ยกเว้นระยะที่มีการปฏิสนธิและเจริญเป็นโอโอไคนิตต์ในยุง ซึ่งจะเกิดขึ้นเพียงช่วงเวลาสั้น ๆ แม้ว่ามาลาเรียจะมีบางระยะที่มีหลายนิวเคลียสแต่ละนิวเคลียสจะมีโครโมโซมเพียงชุดเดียวเช่นกัน จากการศึกษาโดยใช้กระแสไฟฟ้าแยกโครโมโซมของมาลาเรีย พบว่า *P.falciparum* มี 14 โครโมโซมซึ่งมีจำนวนเท่ากันทุกสายพันธุ์ อย่างไรก็ตามมาลาเรียชนิดเดียวกันจะมีความแตกต่างกันของลักษณะต่าง ๆ ดังเช่นใน *P.falciparum* พบว่าสายพันธุ์ที่ต่างกันจะมีความแตกต่างของรูปแบบไอโซเอ็นไซม์ (isoenzyme)(Thaithong et al., 1981) ซึ่งมาลาเรียต่างชนิดกันจะมีรูปแบบของไอโซเอ็นไซม์ต่างกัน (Thaithong et al., 1989) การดื้อยา (Thaithong et al., 1981; Thaithong 1983; Thaithong et al., 1988) คุณลักษณะของแอนติเจนต่าง ๆ (Thaithong et al., 1984) ตลอดจนโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบเมื่อตรวจสอบด้วยการแยกโดยใช้กระแสไฟฟ้า 2 ทิศทาง (two-dimensional electrophoresis) (Fenton et al., 1985) จากการศึกษาในระดับของลำดับนิวคลีโอไทด์หรือการวิเคราะห์ความยาวของโครโมโซมหลังจากการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ (chromosomal restriction fragment length polymorphism analysis) พบหลักฐานที่น่าเชื่อว่ามาลาเรียมีการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรม (genetic recombination) ระหว่างการผสมพันธุ์ขณะที่อยู่ใน

ยุงเกิดขึ้น ดังผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ merozoite surface protein 1 (MSP1) ของ *P.falciparum* (Walliker et al., 1987)

พันธุประชากรของมาลาเรีย

(population genetics of malaria)

มาลาเรียมีความหลากหลายของโปรตีนชนิดต่าง ๆ ที่เป็นองค์ประกอบในสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน จากการศึกษาดีเอ็นเอของยีนที่สร้างโปรตีนของ *P. falciparum* merozoite surface protein 1 (MSP1) (Holder & Freeman 1982), merozoite surface protein 2 (MSP2) (Smythe et al., 1988), S-antigen (Anders et al., 1983) และโปรตีนแอนติเจนอื่น ๆ พบว่าอัลลีลที่ต่างกันบางแบบสามารถอธิบายได้จากการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรม(genetic recombination) ระหว่างอัลลีลต้นแบบ (parental alelle) ซึ่งน่าจะเกิดขึ้นในขณะที่มีการสืบพันธุ์แบบใช้เพศในกระเพาะอาหารของยุง ดังนั้นลักษณะพันธุประชากรของมาลาเรียจึงขึ้นอยู่กับโอกาสที่อัลลีลที่ต่างกันเกิดแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมอย่างไม่จำเพาะเจาะจง (random) ดังนั้นลูกหลาน (progeny) ที่เกิดขึ้นย่อมมีความแตกต่างกันและมีอัลลีลใหม่ ๆ เพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้อัลลีลดังกล่าวจะต้องเหมาะสมในการมีชีวิตรอดต่อไปได้ (Walliker, 1991)

อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์โดยใช้ข้อมูลของความหลากหลายในรูปแบบไอโซเอ็นไซม์ พบว่าพันธุประชากรของโปรโตซัวหลายชนิด ได้แก่ *Giardia, Entamoeba, Naegleria, Trypanosome* และ *Plasmodium* มีลักษณะโครงสร้างประชากรที่เป็นสายพันธุ์ (clonal population structure) เนื่องจากประชากรดังกล่าวมีการกระจายของลักษณะต่าง ๆ อย่างไม่สมดุลย์ (linkage disequilibrium) กล่าวคือจีโนไทพ์ (genotype) ในบางโลไซ (loci) ที่ต่างกันนั้นพบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับมาลาเรียนั้นเชื่อว่าการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมในขณะมีการสืบพันธุ์แบบใช้เพศอาจเกิดขึ้นได้บ้างแต่ไม่มีความสำคัญหรือเกิดขึ้นไม่บ่อยเท่ากับการเจริญโดยการเพิ่มจำนวนของ

สายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่งให้มากขึ้น ทั้งนี้ความแตกต่างหรือความหลากหลายของสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ปรากฏอาจเป็นผลจากวิวัฒนาการที่เบี่ยงเบน (deviate) ไปจากสายพันธุ์บรรพบุรุษ (ancestral clones) ในอดีตอันยาวนาน (Tibayrenc et al., 1990)

แนวความคิดทั้งสองแบบมีความแตกต่างกันแม้จะเป็นการวิเคราะห์จากข้อมูลที่มีอยู่อย่างจำกัด อย่างไรก็ตามการเข้าใจถึงกลไกอันแท้จริงจะมีประโยชน์ในการวางแผนและควบคุมการแพร่กระจายของโรคมาลาเรีย ดังนั้นการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สร้างแอนติเจนต่าง ๆ ของสายพันธุ์หรือ strain ในกลุ่มตัวอย่างที่ได้จากผู้ป่วยให้มากขึ้นจะทำให้เข้าใจถึงลักษณะพันธุประชากรของมาลาเรียดีขึ้น

ลักษณะของจีโนม (genome) ของมาลาเรีย

จากการวัดขนาดจีโนมของมาลาริย โดยวิธี cytofluorimetry, reassociation kinetics, purification yield และ pulsed-field electrophoresis พบว่า *Plasmodium falciparum* และ *Plasmodium berghei* ประกอบด้วย 2-4 X 10^7 base pairs ต่อจีโนม haploid หรือต่อนิวเคลียสซึ่งมีจำนวนใกล้เคียงกับยีสต์ (Weber 1988)

องค์ประกอบนิวคลีโอไทด์ในดีเอ็นเอของมาลาเรียชนิดต่าง ๆ ล้วนมี A+T อยู่มากกว่า G+C โดย A+T มีมากถึงร้อยละ 70 ถึง 80 ผลที่เกิดจากการที่มีองค์ประกอบของ A+T ที่มากนี้ทำให้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะภายใน(restriction endonucleases) ตัดดีเอ็นเอของมาลาเรียแตกต่างกับดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ นอกจากนี้การที่มี A+T สูง ๆ ทำให้เกิดความไม่คงสภาพ(instability) ของดีเอ็นเอของมาลาเรียที่มีความยาวมาก ๆ ใน *Escherichia coli* และทำให้การสร้างโปรตีนของมาลาเรียจาก *E.coli* เป็นไปได้ยาก (Goman et al., 1982)

การใช้เทคนิคการแยกโครโมโซมของมาลาเรียโดยวิธีแยกโดยใช้สนามไฟฟ้าเป็นห้วง (pulsed-field electrophoresis) และการตรวจสอบแถบ

ดีเอ็นเอบนแผ่นไนลอนเมมเบรน (Southern blot hybridization) ทำให้สามารถบอกตำแหน่งของยีนที่สร้างแอนติเจนต่าง ๆ ของมาลาเรียในแต่ละโครโมโซมได้ซึ่งยีนที่สร้างแอนติเจนเหล่านี้อยู่กระจัดกระจายบนโครโมโซมต่าง ๆ ทั้ง 14 โครโมโซมโดยแต่ละโครโมโซมมีขนาดแตกต่างกัน นอกจากนี้โครโมโซมเดียวกันในสายพันธุ์ที่ต่างกันก็มีขนาดแตกต่างกันด้วย โดยมีขนาดตั้งแต่ 0.75 ถึง 3.5 Mb (Corcoran et al., 1986) อย่างไรก็ตามโครโมโซมในสายพันธุ์เดียวกันที่ได้จากระยะการเจริญที่แตกต่างกันจะมีขนาดเท่ากันเสมอ ในการศึกษาโดยการทดลองผสมข้ามพันธุ์ (genetic cross) ระหว่างสายพันธุ์ต้นแบบที่มีลักษณะแตกต่างกันพบว่าลูกหลาน (progeny) ที่เกิดขึ้นอาจมีขนาดของโครโมโซมเท่ากับ ยาวกว่า หรือสั้นกว่าของสายพันธุ์พ่อแม่ ซึ่งอาจเกิดจากการขาดหาย (deletion) การเพิ่มปริมาณ (duplication) หรือการแลกเปลี่ยน (recombination) ระหว่างโครโมโซมโดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณที่ดีเอ็นเอมีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำกัน (repetitive DNA) หรือดีเอ็นเอที่ไม่จำเป็นในการมีชีวิต (nonessential DNA) ซึ่งพบมากถึงร้อยละ 4 ของจีโนมทั้งหมด(Weber, 1988; Ravetch, 1989)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของมาลาเรียมีความแตกต่างกันของ A+T ที่เป็นองค์ประกอบโดยบริเวณที่ไม่ได้สร้างโปรตีน (noncoding region) จะมี A+T สูงกว่าบริเวณที่สร้างโปรตีน (coding region) ดังนั้นความแตกต่างดังกล่าวอาจใช้เป็นตัวทำนายว่าบริเวณใดเป็นบริเวณของดีเอ็นเอที่สร้างโปรตีน นอกจากนี้ยังพบว่า mRNA มักจะมีปริมาณ A มากกว่า T อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สร้างแอนติเจนต่าง ๆ พบว่าส่วนใหญ่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำกันเป็นชุด (tandem DNA repeats)เป็นองค์ประกอบอยู่ โดยมีเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่ไม่มีดีเอ็นเอที่มีลำดับซ้ำกันเลย นอกจากนี้องค์ประกอบและจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำกันเป็นชุดของสายพันธุ์ที่ต่างกันก็มักจะต่างกันด้วย เชื่อว่ายีนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำกันของมาลาเรียนั้นอาจมีส่วนในการสร้างแอนติเจนที่ทำให้เกิดการตอบสนองทางอิมมูนของโฮสต์ที่ไม่มีประสิทธิภาพ (ineffective immune response) ทำให้มาลาเรียไม่ถูกทำลายไปจาก

ระบบภูมิต้านทานของโฮสต์ สำหรับในเชิงวิวัฒนาการนั้นถ้าเปรียบเทียบระหว่างส่วนดีเอ็นเอที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำกันกับบริเวณที่ไม่ซ้ำกันของลำดับนิวคลีโอไทด์เดียวกัน ในกรณีที่มีการเพิ่มจำนวน (duplication) ของยีนจะพบว่าโอกาสที่จะมีการเปลี่ยนแปลงของส่วนดีเอ็นเอที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำกันจะมีมากว่าส่วนที่ไม่มีดีเอ็นเอที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำกัน ดังนั้นส่วนของยีนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำกันจึงมีวิวัฒนาการที่รวดเร็วกว่าส่วนของยีนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่ซ้ำกัน(Bhasin et al., 1985)

ยีนของมาลาเรียส่วนใหญ่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สร้างโปรตีนต่อเนื่องกัน (single open reading frame) แต่บางชนิดมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ได้สร้างโปรตีนแทรกอยู่ภายในยีน (intron) เช่นเดียวกันกับ eukaryotes อื่น ๆ นอกจากนี้ยังพบว่า บริเวณรอยต่อระหว่างลำดับนิวคลีโอไทดที่ไม่ได้สร้างโปรตีนและลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สร้างโปรตีน (intron/exon และ exon/intron junctions) ของมาลาเรียมีลำดับนิวคลีโอไทด์ค่อนข้างคงที่ (consensus sequence) คล้ายกับ eukaryote ชนิดอื่น ๆ คือมีลำดับเป็น GTANG... และ ...A/T TAG ตามลำดับ (N คือนิวคลีโอไทด์ A, G, T หรือ C) (Weber, 1988)

อาการแสดงของโรคมาลาเรีย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดยทั่วไปผู้ป่วยด้วยโรคมาลาเรียจะมีอาการไข้ (fever) หนาวสั่น (chill) เหงื่อออก (sweating) ซึ่งอาการเหล่านี้จะเกิดขึ้นซ้ำ ๆ กัน โดยเว้นช่วงเวลาใกล้เคียงกัน เรียกว่า paroxysm ซึ่งมีความสัมพันธ์กับระยะที่เมอร์โรซอยต์แตกออกจากเม็ดเลือดแดง ดังนั้นจึงมีความสัมพันธ์กับระยะเวลาที่มาลาเรียเจริญแบบไม่ใช้เพศในเม็ดเลือดแดงตั้งแต่ระยะวงแหวน จนถึงไชซอนต์ระยะหลัง มาลาเรียที่เกิดจาก *P.falciparum* จะมีการจับไข้ทุก ๆ 36 ถึง 48 ชั่วโมง สำหรับ *P.vivax* และ *P. ovale* จะมีการจับไข้ทุก ๆ 48 ชั่วโมง ส่วน *P.malariae* มีไข้ทุก ๆ 72 ชั่วโมง อาการไข้จากมาลาเรียนี้เชื่อว่า

เกิดจากท็อกซิน (toxin) ของมาลาเรียกระตุ้นให้ macrophage หลั่ง tumor necrosis factor-α (TNE-α) และ interleukin-1 นอกจากอาการดังกล่าวแล้วมาลาเรียยังทำให้ผู้ป่วยมีอาการซีด (anemia) โดยกลไกการแตกของเม็ดเลือดแดงที่มีมาลาเรียในระยะที่เมอร์โรซอยต์ออกจากเซลล์ รวมทั้งการแตกของเม็ดเลือดแดงที่ไม่มีมาลาเรียโดยปฏิกิริยาทางอิมมูนและภาวะที่ไขกระดูกมีการสร้างเม็ดเลือดแดงลดลง (dyserythropoiesis) (Miller et al., 1994)

สำหรับมาลาเรียที่เกิดจาก *P.falciparum* อาการแทรกซ้อนที่รุนแรงอื่น ๆ ได้แก่ ภาวะมาลาเรียขึ้นสมอง (cerebral malaria) ภาวะน้ำตาลในกระแสเลือดต่ำกว่าปกติ (hypoglycemia) ภาวะไตวาย (renal failure) ภาวะน้ำท่วมปอดที่ไม่ได้เกิดจากหัวใจวาย (noncardiac pulmonary edema) ภาวะความดันโลหิตต่ำกว่าปกติ (algid malaria) ภาวะดีซ่าน (jaundice) ตลอดจนภาวะที่เลือดเป็นกรดมากกว่าปกติ (acidosis) โดยอาการแทรกซ้อนที่สำคัญและเป็นสาเหตุการตายจากการติดเชื้อ *P.falciparum* ที่สำคัญที่สุดคือภาวะมาลาเรียขึ้นสมอง (Warrell et al., 1990; Miller et al., 1994)

แม้ว่ามาลาเรียชนิดอื่นนอกจาก *P.falciparum* มักไม่ทำให้ผู้ป่วยถึงแก่ชีวิต แต่สำหรับ *P.vivax* นับว่าเป็นมาลาเรียที่พบได้บ่อยรองลงมาและก่อให้เกิดการเจ็บป่วยอันเป็นผลกระทบต่อภาวะทางเศรษฐกิจและยังมีระยะพักตัวของเชื้อในตับอันก่อให้เกิดไข้กลับ (relapse) ได้ ถ้าไม่ได้รับยาที่ใช้รักษาที่เหมาะสม (Ettling et al., 1989)

วัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย

จากความไม่ประสบผลสำเร็จของการควบคุมมาลาเรียโดยการใช้ยาฆ่าแมลงและการใช้ยาป้องกันโรค เนื่องจากทั้งยุงก้นปล่องที่เป็นพาหะของโรคและเชื้อมาลาเรียมีการดื้อต่อยาหลายชนิด ดังนั้นมาตรการที่น่าจะมีบทบาทสำคัญคือการ

ผลิตวัคซีนป้องกันมาลาเรียที่ได้ผล หลักการค้นหาโปรตีนที่น่าจะเป็นองค์ประกอบของวัคซีนป้องกันมาลาเรียนั้นมีผู้ทำการศึกษามากมีหลายวิธี ได้แก่ (1) การศึกษาโปรตีนที่ผิวของระยะที่มาลาเรียเข้าสู่เซลล์ซึ่งมี 2 ระยะ ได้แก่ ระยะสปอร์โรซอยต์มีโปรตีนที่ผิวสำคัญ 2 ชนิดคือ circumsporozoite protein (CSP) (Nussenzweig & Nussenzweig, 1990) และ sporozoite surface protein 2 (SSP2) หรือเรียกว่า thrombospondin-related anonymous protein (TRAP) (Robson et al., 1988; Cochrane et al., 1990; Hollingdale et al., 1990) ส่วนระยะเมอร์โรซอยต์มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญที่ผิวหลายชนิด โปรตีนที่พบมากคือ merozoite surface protein 1 (MSP1) และ merozoite surface protein 2 (MSP2) (2) การศึกษาโปรตีนของมาลาเรียบนเยื่อหุ้มเม็ดเลือดแดงโดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะวงแหวน โปรตีนที่พบมากมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 155 KD เรียกว่า ring-infected erythrocyte surface antigen (RESA/Pf155) (Perlman et al., 1984; Wanidworanun et al., 1987) นอกจากนี้ยังมีโปรตีนของมาลาเรียระยะที่อยู่ในตับ (liver-stage specific antigens) (Guerin-Marchand et al., 1987; Winger et al., 1990) และระยะที่มาลาเรียมีการสืบพันธุ์โดยใช้เพศ (sexual stage) (Kaslow et al., 1988) (3) การค้นหาโปรตีนซึ่งทำปฏิกิริยากับน้ำเหลือง (sera) ของผู้ที่มีภูมิคุ้มกันต่อมาลาเรียเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งต้องเปรียบเทียบกับการทำปฏิกิริยากับน้ำเหลืองของผู้ที่ไม่มีภาวะภูมิคุ้มกันดังกล่าว (4) การศึกษาโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีชนิด monoclonal ซึ่งสามารถทำลายหรือหยุดยั้งการเจริญของมาลาเรียในหลอดทดลอง (Udomsangpetch et al., 1989) (5) การทดลองฉีดโปรตีนที่ถูกแยกให้เป็นแถบต่าง ๆ ตามน้ำหนักโมเลกุลทำให้บริสุทธิ์แล้วฉีดเข้าลิงทดลอง เพื่อดูภาวะการกระตุ้นภูมิต้านทานที่สามารถป้องกันการเกิดโรค ซึ่งโปรตีนที่แยกได้นี้สามารถนำมาหาลำดับกรดอะมิโน (amino acid sequence) ที่เป็นองค์ประกอบได้ (Patarroyo et al., 1987)

ทิศทางการพัฒนาวัคซีนป้องกันมาลาเรียแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มตามระยะการเจริญและกลวิธีป้องกันมาลาเรียดังนี้ (Nussenzweig & Long, 1994)

1.วัคซีนป้องกันมาลาเรียในระยะก่อนที่เชื้อจะเข้าสู่เม็ดเลือดแดง (pre-erythrocytic stage vaccine) โปรตีนที่สำคัญได้แก่ CSP และ SSP2 วัตถุประสงค์คือ การยับยั้งหรือป้องกันไม่ให้สปอร์โรซอยต์เข้าสู่เซลล์ตับจึงเป็นการป้องกันตั้งแต่เริ่มต้นของการได้รับระยะติดต่อจากยุงก้นปล่อง นอกจากนี้มีผู้ให้ความสนใจเกี่ยวกับแอนติเจนที่จำเพาะต่อระยะที่มาลาเรียอยู่ในตับ (liver-stage specific antigens) มากขึ้นโดยมุ่งหวังไม่ให้สปอร์โรซอยต์ที่เข้าสู่เซลล์ตับแล้วมีการเจริญต่อไปอีก (Nussenzweig & Long, 1994)

2.วัคซีนป้องกันมาลาเรียระยะที่มีการเจริญโดยไม่ใช้เพศในเม็ดเลือดแดง (asexual erythrocytic stage vaccine) โปรตีนที่สำคัญได้แก่ MSP1, MSP2, RESA/Pf155 นอกจากนี้ยังมีโปรตีนอีกหลายชนิดที่อาจมีส่วนสำคัญ เช่น rhoptry proteins, SERA (serine repeat antigen), EBA-175 (erythrocyte binding antigen) และ AMA-1 (apical membrane antigen) วัตถุประสงค์คือการยับยั้งการเจริญหรือทำลายเชื้อมาลาเรียในระยะที่มีการเจริญในเม็ดเลือดแดงแบบไม่ใช้เพศ ตลอดจนการป้องกัน การลุกลามของเมอร์โรซอยต์สู่เม็ดเลือดแดงทำให้วงจรของการเจริญในเม็ดเลือด แดงสิ้นสุดลง (Nussenzweig & Long, 1994)

3.วัคซีนยับยั้งการแพร่กระจายของมาลาเรียระยะที่มีการสืบพันธุ์โดยใช้เพศ (sexual stage vaccine) โปรตีนที่สำคัญได้จากระยะแกมมีโตไซต์และแกมมีตของมาลาเรีย โดยภูมิต้านที่เกิดขึ้นไม่สามารถป้องกันผู้ได้รับวัคซีนจากการติดเชื้อมาลาเรียแต่จะยับยั้งการเจริญของแกมมีตในยุงเป็นการป้องกันไม่ให้มาลาเรียแพร่ กระจายต่อไป วัคซีนระยะนี้จึงมีชื่อเรียกว่า transmission blocking vaccine (Kaslow et al., 1988)

นอกจากนี้ยังมีโปรตีนอีกหลายชนิดที่มีส่วนเกียวข้องกับเกิดพยาธิกำเนิดของโรคมาลาเรีย (pathogenesis) ที่รุนแรงโดยเฉพาะอย่างยิ่งมาลาเรียขึ้นสมอง โปรตีนดังกล่าวแม้ว่าจะไม่สามารถยับยั้งการเกิดโรคหรือแพร่กระจาย

ของโรคมาลาเรียแต่จะป้องกันไม่ให้ผู้ที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิด *P.falciparum* มีอาการที่รุนแรงหรือเรียกว่าเป็น anti-disease vaccine (Wahlgren et al., 1994) สำหรับวัคซีนป้องกันมาลาเรียชนิด *P.vivax* แม้ว่าจะยังไม่มีการศึกษาอย่างกว้างขวางแต่หลักการผลิตวัคซีนคล้ายคลึงกับวัคซีนป้องกันมาลาเรียชนิด *P.falciparum* ซึ่งการศึกษาโปรตีนหรือแอนติเจนลักษณะเดียวกันของมาลาเรียที่เกิดในหนูทดลอง เช่น *P.yoelli* (Burns et al., 1989) และ *P.chabaudi* (Wanidworanun et al., 1987) มักจะให้ผลการป้องกันมาลาเรียคล้ายกัน

Merozoite Surface Protein 1 (MSP1)

โปรตีนที่สร้างบนผิวของระยะเมอร์โรซอยต์ของ *P.falciparum* ที่พบมากที่สุดเป็นโปรตีนที่มีขนาด 185 ถึง 200 KD โปรตีนดังกล่าวสามารถชักนำให้เกิดภูมิต้านทานต่อการติดเชื้อมาลาเรียชนิด *P.falciparum* ในสัตว์ทดลองได้ (Siddiqui et al., 1987; Herrera et al., 1990; Herrera et al., 1992) นอกจากนี้แอนติบอดีชนิด polyclonal และ monoclonal ต่อโปรตีนนี้ยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของมาลาเรียในหลอดทดลอง (Cheung et al., 1986; Holder et al., 1988; Chang et al., 1989; Lyon et al., 1989; Blackman et al., 1990; Chang et al., 1992) ดังนั้นโปรตีนดังกล่าว จึงมีความสำคัญในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีนสำหรับป้องกันมาลาเรียในระยะที่มาลาเรียเจริญโดยไม่ใช้เพศในเม็ดเลือดแดง โปรตีนชนิดนี้มีชื่อเรียกหลายชื่อได้แก่ precursor to major merozoite surface antigens (PMMSA), merozoite surface protein precursor (MSPP), polymorphic schizont antigen (PSA), p190, gp195, pf195 และ pf200 จากการศึกษาต่อมาพบว่าโปรตีนบนผิวของมาลาเรียชนิด *P.vivax* ที่มีคุณสมบัติคล้ายกันมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 200 KD เรียกชื่อย่อว่า Pv200 (Del Portillo et al., 1988,1991; Gibson et al., 1992)

นอกจากนี้ยังพบว่าบนผิว merozoite ยังมีโปรตีนอีกชนิดหนึ่งที่มีน้ำหนักโมเลกุล 36 ถึง 56 KD (Smythe et al., 1988) เพื่อป้องกันการสับสนจึงมีผู้แนะนำให้เรียกโปรตีนชนิดแรกว่า merozoite surface antigen protein 1 (MSP1) หรือ merozoite surface antigen 1 (MSA1) และเรียกโปรตีนชนิดหลังว่า merozoite surface protein 2 (MSP2) หรือ merozoite surface antigen 2 (MSA2)

MSP1 ถูกสร้างขึ้นตั้งแต่ระยะที่เริ่มต้นของการแบ่งนิวเคลียสในระยะไซซอนต์ และปรากฏที่ผิวของมาลาเรียในไซซอนต์ระยะหลัง หรือ เมอร์โรซอยต์ จากการศึกษา mRNA ของระยะต่างๆ ในช่วงที่มี schizogony พบว่ามี mRNA ของ MSP1 อยู่ถึงร้อยละ 1 แม้ว่าจะไม่พบ MSP1 บนผิวของเม็ดเลือดแดงที่มีมาลาเรียอยู่แต่พบว่าระยะไซซอนต์ที่อยู่ในตับ (exoerythrocytic stage) มีการสร้าง MSP1 ซึ่งมีคุณลักษณะเช่นเดียวกับ MSP1 ในระยะที่มาลาเรียอยู่ในเม็ดเลือดแดง (Tanabe, 1992)

ในครั้งแรกมีผู้ศึกษายีนที่สร้าง MSP 1 ของ *P.falciparum* ก่อนต่อมาจึงมีการศึกษายีนที่สร้าง MSP 1 ของมาลาเรียชนิดอื่นๆ ได้แก่ *P.vivax*, *P.yoelii* และ *P.chabaudi* (Lewis 1989; Delersnijder et al., 1990; Lew & Back 1990) โดยพบว่า MSP1 ของ *P.falciparum* (pfMSP1) มีองค์ประกอบของนิวคลีโอไทด์ที่มี A+T สูงที่สุดในขณะที่ MSP1 ของ *P.vivax* (Pv200) มี A+T ต่ำที่สุด ยีนที่สร้าง MSP1 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สร้างโปรตีนต่อเนื่องกัน (single open reading frame) และปรากฏอยู่เพียงชุดเดียว (single copy) ต่อจีโนม haploid จำนวนกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของ pfMSP1 มีความแตกต่างกันตั้งแต่ 1,631 ถึง 1,726 ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ที่ศึกษาทำให้น้ำหนักโมเลกุลของ pfMSP1 มีความแตกต่างกัน สำหรับ Pv200 พบว่ามีความแตกต่างกันในน้ำหนักโมเลกุลเช่นกัน (Holder, 1988; Tanabe, 1992)

โครงสร้างโดยทั่วไปของ MSP1

ในส่วน N-terminus ของ MSP1 ประกอบด้วยเพปไทด์สัญญาณ (signal peptide) ที่มีส่วนในการขนส่งโปรตีนผ่านเยื่อหุ้ม endoplasmic reticulum พบว่ากรดอะมิโน 20 ตัวแรกในบริเวณ N-terminus ส่วนใหญ่ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic residues) และมีลำดับกรดอะมิโน คล้ายคลึงกันระหว่างมาลาเรียต่างชนิดกัน เชื่อว่าเพปไทด์สัญญาณดังกล่าวจะถูกตัดออกในตำแหน่งระหว่าง cysteine และ valine ในขณะที่เริ่มมีการสร้างโปรตีน MSP1 จาก mRNA (translation) (Lyon et al., 1986; Holder et al., 1987; Cooper et al., 1992) ในส่วนต่อจากเพปไทด์สัญญาณของ PfMSP1 จะเป็นบริเวณของ tripeptide repeats สำหรับบริเวณที่มี repeats ของ Pv200 จะอยู่ในส่วนกลางของโปรตีน ในบริเวณ C-terminus ประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิด hydrophobic บริเวณนี้ยังมีลำดับกรดอะมิโนที่มีลักษณะของ glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor (Smythe et al., 1991) และ epidermal growth factor (EGF)-like domains (Blackman et al., 1991; Jongwutiwes et al., 1993) อันประกอบด้วย cysteine residue จำนวนมากและมีลำดับตลอดจนองค์ประกอบกรดอะมิโนคล้ายคลึงกันระหว่างมาลาเรียต่างชนิดกัน เชื่อว่า EGF-like domain อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ (cell-to-cell interactions) (Engel, 1989) ลักษณะโครงสร้างของ MSP1 ในส่วนอื่น ๆ นั้นไม่พบว่ามีกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำเหมือน N-terminus และ C-terminus อันเป็นลักษณะของโปรตีนที่อยู่บนผิวเซลล์ด้านนอก (surface protein) ของ MSP1

การย่อย MSP1 ให้ได้ชิ้นส่วนขนาดเล็กลง (processing)

MSP1 ของ *P.falciparum* ถูกสร้างขึ้นในลักษณะของโปรตีนตั้งต้น (precursor protein) โดยจะมีการตัดโปรตีนออกเป็น 4 ส่วน (fragment) ในขั้นต้น (primary processing) ได้แก่ โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 80/83

KD, 42/45 KD, 36/38 KD และ 28/50 KD (Holder et al., 1985) ซึ่งเกิดขึ้นทั้งในไชซอนต์ที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงและไชซอนต์ที่อยู่ในเซลล์ตับ (Lyon et al., 1986; Szarfman et al., 1988; Suhrbier et al., 1989) นอกจากนี้ชิ้นส่วนโปรตีนที่ถูกตัดแล้ว (processed fragment) ขนาด 42/45 KD ยังถูกตัดออกเป็นโปรตีนที่มีขนาดเล็กลงต่อไปอีกในขั้นที่สอง (secondary processing) ได้แก่ชิ้นส่วนที่มีขนาด 30/33 KD และ 19 KD (Blackman et al., 1991a, 1991b; Blackman & Holder, 1992) ซึ่งเกิดขึ้นก่อนหรือในขณะที่เมอร์โรซอยต์ลุกลามเข้าสู่เม็ดเลือดแดง โดยโปรตีนขนาด 30/33 KD จะหลุดออกจากผิวของเมอร์โรซอยต์และตรวจพบได้ในน้ำเหลืองของผู้ป่วย (McBride & Heidrich, 1987) โปรตีนที่มีขนาด 19 KD ซึ่งเป็นโพลีเพปไทด์ที่มีอณุมูลของน้ำตาลเชื่อมอยู่ (glycosylated polypeptide) จะถูกนำเข้าสู่เม็ดเลือดแดงเม็ดใหม่ในขณะที่เมอร์โรซอยต์เข้าเม็ดเลือดแดงทำให้สามารถตรวจพบโปรตีนที่มีขนาด 19 KD ของ MSP1 จนถึงระยะวงแหวน (Blackman et al., 1990; Cooper et al., 1992) สำหรับโปรตีนชิ้นอื่น ๆ จะคงอยู่ที่ผิวของเมอร์โรซอยต์ชั่วขณะแล้วจึงถูกปลดปล่อยสู่พลาสมา การตัดโปรตีนออกเป็นชิ้นส่วนต่าง ๆ เกิดขึ้นในตำแหน่งเฉพาะและต้องอาศัยเอ็นไซม์ย่อยสลายโปรตีน (proteolytic enzymes) ของมาลาเรีย (Lyon et al., 1986; Holder et al., 1987; Blackman et al., 1991a) แม้ว่าการตัดโปรตีนออกเป็นส่วน ๆ ใน Pv200 ของ *P.vivax* ยังไม่มีการศึกษาลึกซึ้งเหมือน MSP1 ของ *P.falciparum* แต่เชื่อว่าน่าจะเกิดขึ้นคล้ายกัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หน้าที่ของ MSP1

หน้าที่ของ MSP1 ยังไม่ทราบชัดเจน แต่ MSP1 ที่ทำให้บริสุทธิ์ (purified MSP1) สามารถจับกับหมู่กรดไซอะลิค (sialic acid residue) บนผิวของเม็ดเลือดแดงเฉพาะของคนและของลิง *Saimiri* ที่ *P.falciparum* สามารถเจริญได้เท่านั้น แอนติบอดีชนิด monoclonal ต่อส่วนที่มีน้ำตาลเชื่อมอยู่ (glycosylated domain) ของไกลโคฟอร์ริน

(glycophorin) สามารถป้องกันการจับกันระหว่าง MSP1 และหมู่กรดไซอะลิค นอกจากนี้แอนติบอดีชนิด monoclonal ต่อโพลีเพปไทด์ในส่วน C-terminal ที่มีขนาด 19 KD สามารถยับยั้งการจับกันระหว่าง MSP1 และเม็ดเลือดแดง เนื่องจากหมู่กรดไซอะลิคของไกลโคฟอร์รินเป็นตัวตอบรับ (receptor) สำหรับเมอร์โรซอยต์ของ *P.falciparum* ดังนั้น PfMSP1 อาจเป็นตัวจับ (ligand) หรือเป็นองค์ประกอบบางส่วนของตัวจับสำหรับตัวตอบรับดังกล่าว (Holder & Blackman 1994)

ความหลากหลายของ MSP1

ความแตกต่างของ MSP1 ระหว่างมาลาเรียชนิดต่างๆ

จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สร้าง MSP1 ระหว่าง *P.falciparum*, *P.vivax*, *P.yoelii* และ *P.chabaudi* (Tanabe, 1992) โดยทั่วไปจะเห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สร้าง MSP1 มีความผันแปรภายในมาลาเรียชนิดเดียวกัน (ร้อยละ 51 สำหรับ *P.falciparum* และร้อยละ 81 สำหรับ *P.vivax*) น้อยกว่าระหว่างมาลาเรียต่างชนิดกัน (ร้อยละ 32 ถึง 38) แต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สร้าง MSP1 ของ *P.yoelli* และ *P.chabaudi* มีความคล้ายกันค่อนข้างมากถึงร้อยละ 69

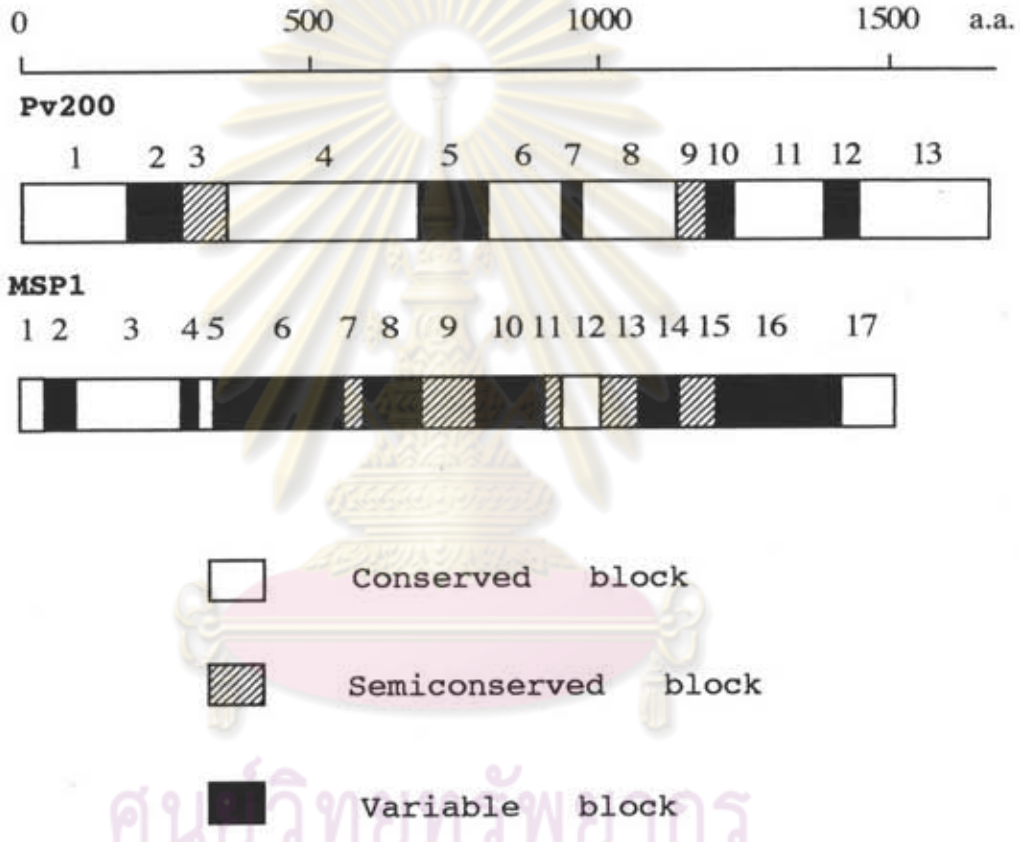
ลักษณะโครงสร้างของยีน Pv200 หรือ MSP1 ของ *P. vivax*

จากการเปรียบเทียบระหว่าง Belem strain และ Salvador-1 strain พบว่ายีน Pv200 มีองค์ประกอบของลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งมีความผันแปร (sequence variation) ไปตามสายพันธุ์เช่นเดียวกับ PfMSP1 และประกอบด้วย conserved block โดยมีความคล้ายคลึงกันมากกว่าร้อยละ 90 มีทั้งหมด 6 บริเวณ ได้แก่ blocks 1, 4, 6, 8, 11 และ 13 semiconserved block มี ความคล้ายคลึงกันระหว่างร้อยละ 50 ถึง 90 มีทั้งหมด 2 บริเวณ ได้แก่ blocks 3 และ 9 และ variable block มีความคล้ายคลึงกันน้อยกว่าร้อยละ 50 มีทั้งหมด 5 บริเวณได้แก่ blocks 2, 5, 10 และ 12 ซึ่งบาง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บริเวณมีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกันระหว่าง MSP1 ของมาลาเรียชนิดอื่น (interspecies conserved blocks) (Gibson et al., 1992; Cooper, 1993) ดังแสดงในรูปที่ 2 ลักษณะโครงสร้างโดยทั่วไปพบว่าส่วน 5' และ 3' ซึ่งตรงกับ N-terminus และ C-terminus มีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์สูง (sequence conservation) และยังเป็นบริเวณที่สร้างเพปไทด์สัญญาณ และ GPI anchor sequence รวมทั้ง EGF-like domain ตามลำดับ ในส่วน N-terminus ยังพบว่ามีบริเวณที่น่าจะจับกับเม็ดเลือดแดง (putative red cell binding domain) เช่นเดียวกับ PfMSP1 ในบริเวณ block 3 ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนที่มีความคล้ายคลึงกันดังแสดงในรูปที่ 2 นอกจากนี้ยังพบบริเวณที่มีความผันแปรในองค์ประกอบและจำนวนของ repeats ในบริเวณ block 5 โดยมีความแตกต่างกันตามสายพันธุ์เช่นเดียวกับบริเวณ block 2 ของ PfMSP1 (Tanabe et al., 1987) เมื่อพิจารณาบริเวณที่เป็น conserved block พบว่ามีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide substitution) ในสายพันธุ์ที่ต่างกันเช่นเดียวกับ PfMSP1 และถ้าวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในต่างสายพันธุ์ของยีน Pv200 จะพบว่ามีตำแหน่งที่น่าจะมีการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอระหว่างสายพันธุ์ที่ต่างกัน(potential crossover sites) หลายตำแหน่งทั้งในบริเวณ conserved block และบริเวณ variable block ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดความหลากหลายของแอนติเจน (antigenic diversity) ในโปรตีนนี้ได้ (Cheng et al., 1993) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาอัลลีลของ PfMSP1 พบว่าการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมในยีน (intragenic recombination) ระหว่างอัลลีลต้นแบบ (prototypic allele) ชนิด K1 และ อัลลีลต้นแบบชนิด MAD20 น่าจะเกิดขึ้นในส่วน 5' ของยีนตั้งแต่บริเวณ block 1 ถึง block 5 ส่วนที่เหลือตั้งแต่ block 6 ถึง block 17 นั้นพบว่ามีการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมในยีนภายในกลุ่มอัลลีลเดียวกัน (ภายในกลุ่มอัลลีลชนิด K1 หรือ MAD20) เท่านั้น (Jongwutiwes et al., 1992; Jongwutiwes., 1993) ข้อมูลดังกล่าว

Figure 2 Schematic representations of Pv200 of *P. vivax* (Gibson et al., 1992) and MSP1 of *P. falciparum.* (Tanabe et al., 1987).



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สำหรับยีน Pv200 ยังมีอยู่อย่างจำกัดและจำเป็นต้องมีการศึกษาในส่วนต่าง ๆ จากหลายสายพันธุ์

สมมุติฐานในด้านวิวัฒนาการของ MSP1

มีผู้ตั้งสมมุติฐานว่าอัลลีลบรรพบุรุษของ MSP1 (ancestral allele) มีต้นกำเนิดมาจากบรรพบุรุษ 2 สาย ดังตัวอย่างของ PfMSP1 พบว่าความผันแปร ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ blocks 2, 3, 4, 8, 10, 14 และ 16 เกิดขึ้น ก่อนที่จะมีการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมระหว่างอัลลีลต้นแบบทำให้ MSP1 มีลักษณะ 2 รูปแบบ (dimorphic) หลังจากนั้น MSP1 จะมีวิวัฒนาการต่อไปเมื่อมาลาเรียอยู่ในโฮสต์ต่างชนิดกัน โดยความผันแปรส่วนใหญ่ยังคงอยู่ในบริเวณ blocks 2, 3, 4, 8, 10, 14 และ 16 ซึ่งอาจเกิดจากผลของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของโฮสต์หรือปัจจัยอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง (Cooper, 1993)

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อ MSP1

ผู้ป่วยมาลาเรียหรือผู้ที่อยู่ในถิ่นระบาดของโรคมาลาเรียนั้นพบว่ามีแอนติบอดีต่อ PfMSP1 และ Pv200 จากการศึกษาโดยใช้โพลีเพปไทด์ในส่วน N-terminus ของ PfMSP1 เป็นแอนติเจนสำหรับการตรวจโดยวิธี enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) พบว่าผู้ป่วย 84 รายจาก 85 รายที่เป็นโรคมาลาเรียอยู่นั้นมี แอนติบอดีต่อ PfMSP1 และมีระดับสูงสุดภายใน 2 สัปดาห์หลังจากการติดเชื้อแล้วค่อย ๆ ลดลงเหลือครึ่งหนึ่งภายในเวลาประมาณ 1 เดือน และไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนมาลาเรียที่อยู่ในเม็ดเลือดแดง (parasitemia) และแอนติบอดีต่อ PfMSP1 ในส่วน N-terminus ดังกล่าว (Brown et al., 1991)

ในการศึกษาทำนองเดียวกันในประเทศมาลี (Mali) เบอร์กีนาฟาโซ (Burkina Faso) และแกมเบีย (The Gambia) โดยใช้โพลีเพปไทด์จากส่วนต่าง ๆ ครอบคลุมประมาณร้อยละ 80 ของ MSP1 ทั้ง 2 อัลลีลต้นแบบ พบว่า

แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ MSP1 ของ *P.falciparum* (PfMSP1-specific antibodies) เกิดขึ้นภายหลังการติดเชื้อและระดับแอนติบอดีจะเพิ่มมากขึ้นตามอายุของผู้ติดเชื้อ นอกจากนี้แอนติบอดีที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่จะตอบสนองต่อโพลีเพปไทด์จาก variable blocks ในกลุ่มประชากรที่มีแอนติบอดีต่อโพลีเพปไทด์ ในส่วน N-terminus ที่มีขนาด 83 KD จะมีความเสี่ยงต่อการเป็นมาลาเรียชนิด *P.falciparum* ลดลงจากผู้ที่ไม่มีแอนติบอดีร้อยละ 50 (Fruh et al., 1991., Tolle et al., 1992) และผู้ที่มีแอนติบอดีดังกล่าวถ้าเป็นมาลาเรียจะมีปริมาณมาลาเรียที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงไม่สูง (Muller et al., 1989) แม้ว่าแอนติบอดีต่อ conserved block ของ PfMSP1 จะมีระดับลดลงอย่างรวดเร็ว แต่แอนติบอดีต่อ variable block จะคงระดับสูงอยู่ได้นานหลายเดือนแม้จะไม่ได้รับเชื้อใหม่ อนึ่งผู้ที่มีแอนติบอดีต่อ PfMSP1 ในส่วนโพลีเพปไทด์ขนาด 83 KD และ 42 KD จะมีภาวะภูมิคุ้มกันทางคลินิคบางส่วน (partial clinical immunity) กล่าวคือไม่มีอาการไข้แม้จะมีเชื้อในกระแสเลือดระยะที่เจริญในเม็ดเลือดแดงโดยไม่ใช้เพศ (asexual erythrocytic stages) ก็ตาม (Riley et al., 1992)

การศึกษาภาวะภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลองและในคน

การศึกษาบทบาทของ MSP1 ในหนูทดลองพบว่า MSP1 ของ *P.yoelli* และของ *P.chabaudi* สามารถชักนำให้เกิดภาวะภูมิต้านทานต่อการติดเชื้อภายหลังได้ (Freeman et al., 1980; Burns et al., 1989; Lew & Back, 1990) ต่อมามีผู้ทดลองใช้ MSP1 ที่ทำให้บริสุทธิ์ (purified PfMSP1) และโปรตีนที่สร้างโดยการรวมตัวกับโปรตีนชนิดอื่น (recombinant proteins) หรือเพปไทด์สังเคราะห์ (synthetic peptides) จากบางส่วนของ PfMSP1 เป็นวัคซีนในลิงทดลองโดยผสมใน Freund's complete adjuvant (FCA) สำหรับการฉีดครั้งแรกและผสมใน Freund's incomplete adjuvant (FIA) ในการฉีดครั้งต่อมาพบว่าสามารถชักนำให้เกิดการป้องกันการติดเชื้อแบบสมบูรณ์ (complete protection) กล่าวคือหลังจากฉีดเชื้อ

I16758614

เข้าไปภายหลัง ไม่พบว่ามีมาลาเรียในกระแสเลือดเลย ซึ่งเกิดขึ้นเมื่อ MSP1 ที่ใช้เป็นวัคซีนนั้นเหมือนกับ MSP1 ของเชื้อที่ฉีดเข้าไป (homologous challenge) (Siddiqui et al., 1987) หรืออาจเกิดการป้องกันการติดเชื้อบางส่วน (partial protection) กล่าวคือ สามารถตรวจพบมาลาเรียในกระแสเลือดได้ในระดับต่ำ และจะค่อย ๆ หายไปเองในที่สุดภายหลังจากฉีดเชื้อเข้าไป ปรากฏการณ์นี้เกิดขึ้นเมื่อ MSP1 ที่ใช้เป็นวัคซีนต่างกับ MSP1 ของเชื้อที่ฉีดเข้าไป (heterologous challenge) (Perrin et al., 1984; Herrera et al., 1990;Hui et al., 1991; Herrera et al., 1992) แสดงว่าภูมิต้านทางที่เกิดขึ้นต่อ MSP1 ในส่วน conserved block และ variable block ต่างมีความสำคัญเช่นกัน แอนติบอดีที่เกิดขึ้นนี้สามารถยับยั้งการลุกลามของเมอร์โรซอยต์เข้าเม็ดเลือดแดงและยับยั้งการเจริญของมาลาเรียในเม็ดเลือดแดงได้ (Hui & Siddiqui, 1987)

จากการทดลองโดยฉีด MSP1 ของ *P.chabaudi* หรือ *P.yoelli* เข้าหนูทดลอง (Marjarian et al., 1984; Burns et al., 1989; Lew & Back, 1990) และผลิตแอนติบอดีชนิด monoclonal ต่อส่วนต่าง ๆ ของ MSP1 พบว่าแอนติบอดีชนิด monoclonal บางชนิดที่เกิดขึ้นเมื่อฉีดเข้าหนูทดลองตัวอื่นที่ไม่เคยได้รับวัคซีนหรือไม่เคยติดเชื้อมาลาเรียมาก่อน สามารถป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียในหนูดังกล่าวได้ (passive transfer of protection) (Majarian et al., 1984)

ในการทดลองใช้เพปไทด์สังเคราะห์จากบริเวณ block 3 ของ PfMSP1 เชื่อมต่อกับ tetrapeptide repeats ของ CSP ของ *P.falciparum* เชื่อมกับบางส่วนของแอนติเจนขนาด 35 KD และ 55 KD เรียกว่า SPf66 ฉีดเข้าอาสาสมัคร 5 ราย พบว่า 3 รายมีภาวะการป้องกันการติดเชื้อบางส่วน (partial protection) โดยเชื้อ *P.falciparum* จะหายไปได้เองในที่สุดซึ่ง SPf66 กำลังถูกนำมาใช้ทดลองประสิทธิภาพในการป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียในภาคสนามในประเทศต่าง ๆ หลายประเทศที่อยู่ในเขตปรากฏโรคมาลาเรีย (Patarroyo et al., 1988)