

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนสปอโรซอยต์ทีรีโอไนน์แอสปาราจिनริชโปรตีน
ในพลาสมิเดียม พัลชิปาร์มจากผู้ป่วยในประเทศไทย



นายเกรียงไกร การชัยศรี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต


สาขาวิชาปรสิตวิทยาทางการแพทย์ ภาควิชาปรสิตวิทยา

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SEQUENCE ANALYSIS OF THE *Plasmodium falciparum*
SPOROZOITE THREONINE-ASPARAGINE-RICH PROTEIN GENE FROM PATIENTS IN THAILAND



Mr. Kriangkrai Karnchaisri

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Parasitology

Department of Parasitology

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2007

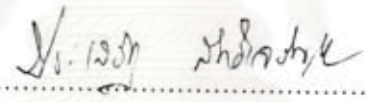
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนสปอร์โรซอยด์ที่รีโอโนนแอสปาราจีน
ริชโปรตีนในพลาสมิเดียม ฟัลซิพารัมจากผู้ป่วยในประเทศไทย
โดย นายเกรียงไกร การชัยศรี
สาขาวิชา ประสิดิทยาทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์นายแพทย์ สมชาย จงวุฒิเวศย์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จตุรงค์ พุทธิพรทิพย์

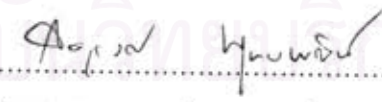
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

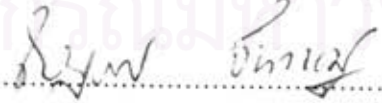

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(รองศาสตราจารย์นายแพทย์อดิศร ภัทราดุลย์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์ประเสริฐ สิริทิเจริญชัย)


..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์นายแพทย์สมชาย จงวุฒิเวศย์)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จตุรงค์ พุทธิพรทิพย์)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ณัฐรุต จันทชุม)

เกรียงไกร การชัยศรี: การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนสปอร์โซอิต์ทรีโอนีนแอสปาราจีน
 ริชโปรตีนในพลาสโมเดียม ฟัลซิพารัมจากผู้ป่วยในประเทศไทย. (SEQUENCE ANALYSIS
 OF THE *Plasmodium falciparum* SPOOROZITE THREONINE-ASPARAGINE-RICH
 PROTEIN GENE FROM PATIENTS IN THAILAND) อ. ที่ปรึกษา: รศ. นพ. สมชาย
 จงวุฒิเวศย์, อ. ที่ปรึกษาร่วม: ผศ. ดร. จตุรงค์ พุทธิพรทิพย์, 96 หน้า.

สปอร์โซอิต์ทรีโอนีนแอสปาราจีนริชโปรตีน (STARP) เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งของเชื้อ
 พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม ซึ่งอยู่บนผิวของสปอร์โซอิต์ และเป็นโปรตีนที่มีศักยภาพในการเป็น
 องค์ประกอบของวัคซีนสำหรับป้องกันโรคมาลาเรีย จากการศึกษาพบว่าเปปไทด์สังเคราะห์จากส่วน
 ต่างๆ ของโปรตีน STARP สามารถเกาะติดกับเซลล์ตับในหลอดทดลองได้ดีมาก นอกจากนี้
 แอนติบอดีต่อ STARP สามารถยับยั้งการรุกรานของสปอร์โซอิต์เข้าสู่เซลล์ตับได้ ดังนั้นโปรตีน
 ดังกล่าวน่าจะมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการรุกรานของสปอร์โซอิต์เข้าสู่เซลล์ตับ เนื่องจาก
 โปรตีนส่วนใหญ่ที่อยู่บนผิวของเชื้อมาลาเรียมักจะมีหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่
 ละตัวอย่างอันอาจเป็นอุปสรรคในการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย ครอบคลุมถึงปัจจุบันขอบเขต
 ความหลากหลายของยีน STARP ในระดับนิวคลีโอไทด์ยังไม่มีการศึกษามาก่อน ดังนั้นจึง
 ทำการศึกษาโดยใช้ตัวอย่างทั้งหมด 52 ตัวอย่าง จากผู้ป่วยมาลาเรียที่มีเชื้อพลาสโมเดียม
 ฟัลซิพารัม จากจังหวัดตากและกาญจนบุรี ซึ่งเก็บรวบรวมในปี พ.ศ.2547-2548 ทำการเพิ่ม
 ปริมาณดีเอ็นเอของยีน STARP ทั้งหมดโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสและวิเคราะห์ลำดับ
 นิวคลีโอไทด์โดยตรงจากผลิตภัณฑ์ได้ จากการศึกษาพบการติดเชื่อมสมระหว่างเชื้อมาลาเรียที่มี
 อัลลีลของ STARP แตกต่างกัน 8 ตัวอย่าง ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยตรงจาก
 ตัวอย่างดังกล่าวได้ ดังนั้นจึงวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 44 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับลำดับ
 นิวคลีโอไทด์ที่มีการศึกษามาก่อนในสายพันธุ์ T9/96 ซึ่งพบว่าการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ 4
 ตำแหน่ง และทุกตำแหน่งล้วนทำให้เกิดการเปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโน เป็นที่น่าสังเกตว่ากรด
 อะมิโนที่เปลี่ยนไปนั้นส่วนใหญ่ยังคงคุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์เช่นเดิม แสดงว่าการเปลี่ยนแปลง
 ดังกล่าวน่าจะมีข้อจำกัดในหน้าที่หรือโครงสร้างบางประการในโปรตีนชนิดนี้ นอกจากนี้ยังพบการ
 เพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปของกรดอะมิโนที่ซ้ำกันเป็นชุดในบริเวณที่มีกรดอะมิโนซ้ำกัน 45 ตัว และ 10
 ตัว อันส่งผลให้ยีนดังกล่าวมีขนาดแตกต่างกันเล็กน้อย ดังนั้นความหลากหลายที่มีอยู่อย่างจำกัดใน
 โปรตีน STARP ของพลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม จึงน่าจะเป็นข้อสนับสนุนในการนำไปเป็น
 องค์ประกอบของวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย

ภาควิชา ประสาทวิทยา
 สาขาวิชา ประสาทวิทยาทางการแพทย์
 ปีการศึกษา 2550

ลายมือชื่อนิสิต..... กะเอวใจ กะโหลก
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4874706530 : MAJOR MEDICAL PARASITOLOGY

KEY WORD: SEQUENCE ANALYSIS / SPOROZOITE THREONINE-ASPARAGINE-RICH PROTEIN / *Plasmodium falciparum* / THAILAND

KRIANGKRAI KARNCHAI SRI: SEQUENCE ANALYSIS OF THE *Plasmodium falciparum* SPOROZOITE THREONINE-ASPARAGINE-RICH PROTEIN GENE FROM PATIENTS IN THAILAND. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. SOMCHAI JONGWUTIWES, M.D, Ph.D, THESIS COADVISOR: ASST. PROF. CHATURONG PUTAPORNTIP, PH.D., 96 pp.

The sporozoite threonine-asparagine-rich protein (STARP) of *Plasmodium falciparum* is located on the membrane of sporozoites and has been considered a potential candidate for malaria vaccine development. Recent studies have shown that synthetic peptides derived from STARP bind efficiently to hepatocytes in culture. Furthermore, antibodies directed against STARP are capable of blocking sporozoite invasion into hepatocytes, suggesting that the protein plays a crucial role in the process of hepatic invasion by sporozoites. Meanwhile, most malarial surface proteins exhibit sequence polymorphism among isolates that could hinder an effective malaria vaccine design. To date, the extent of sequence variation in the *P. falciparum* STARP gene from clinical isolates remains unknown. From 2004 to 2005, we recruited 52 blood samples from patients who got *P.falciparum* infections from Tak and Kanchanaburi Provinces for analysis. The STARP gene was amplified by the polymerase chain reaction spanning the entire gene, followed by direct sequencing. Results revealed that 8 of these isolates harbored multiple STARP alleles whose sequences could not be determined by direct sequencing method. Thus, 44 sequences of the remaining isolates were compared with the sequence of clone T9/96. In total, 4 nucleotide substitutions were observed and all substituted codons resulted in amino acid exchanges. Importantly, most of the altered amino acids retained their physicochemical properties, suggesting that some functional or structural constraints occurred in this protein. Besides, insertion/deletion of the repeat units was found in the 45-amino acid repeats and the 10-amino acid repeat region, accounting for a minor variation in size of this gene among isolates. Therefore, limited sequence variation in STARP of *P. falciparum* has encouraged malaria vaccine incorporation.

Department Parasitology

Field of study Medical Parasitology

Academic year 2007

Student's signature..... *intuol sr mritud's*

Advisor's signature..... *Somchai J.*

Co-advisor's signature..... *Chaturong Putaporn*

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงในความกรุณาของ รองศาสตราจารย์นายแพทย์สมชาย จงวุฒิวเศศย์ อาจารย์ที่ปรึกษา ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้ความรู้ ข้อแนะนำในการแก้ปัญหาต่างๆ ในการศึกษาวิจัยและให้ความช่วยเหลือต่อข้าพเจ้าเป็นอย่างดีตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น และขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จตุรงค์ พุทธิพิทยีย์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้ความรู้ สนับสนุน ความคิดเห็นต่างๆ ในการศึกษาวิจัย ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องวิทยานิพนธ์มาด้วยดียิ่ง ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ณัฐรุส จันทชุม และผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ประเสริฐ สิทธิเจริญชัย ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ อาจารย์สุณีย์ สีธรรมใจ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ตลอดจนคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง คุณมาลี เจริญกร คุณอุรัสยา พัฒนวงศ์ คุณทวีศักดิ์ แซ่เตีย ที่ได้ให้คำแนะนำ ความช่วยเหลือและมีมิตรภาพอันดีเสมอมา

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา-มารดา พี่น้อง และเพื่อนๆ ทุกคนที่ให้กำลังใจ คำปรึกษาและให้การสนับสนุนข้าพเจ้าในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้มาโดยตลอด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
อนุกรมวิธานของเชื้อมาลาเรีย.....	5
การกระจายทางภูมิศาสตร์.....	6
วงชีวิตและการเจริญเติบโตของมาลาเรีย.....	7
อาการแสดงของโรคมาลาเรีย.....	16
อณูชีววิทยาของเชื้อมาลาเรีย.....	17
วัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย.....	19
Circumsporozoite protein.....	21
Sporozoite threonine asparagine rich protein	22
3. วิธีดำเนินการวิจัย.....	25
รูปแบบงานวิจัย.....	25
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	25
คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	25
ขนาดของกลุ่มประชากร.....	26
เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	27
การเก็บตัวอย่างเลือด.....	30
การนับจำนวนเชื้อ.....	30
การสกัดดีเอ็นเอ.....	31
การออกแบบ oligonucleotides สำหรับใช้เป็น PCR Primer.....	32

	หน้า
การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยวิธี PCR.....	34
การตรวจผลผลิต PCR โดยวิธี gel electrophoresis.....	34
การ purify PCR product โดยใช้ QIAquick PCR Purification Kit.....	34
การวิเคราะห์ลำดับเบสของ DNA.....	35
4. ผลการทดลอง.....	36
ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน STARP โดยวิธี PCR.....	36
การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน STARP.....	42
การวิเคราะห์กรดอะมิโนของยีน STARP.....	43
การวิเคราะห์ลักษณะอัลลีลที่พบทั้งหมดของยีน STARP.....	45
5. อภิปรายผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	46
รายการอ้างอิง.....	50
ภาคผนวก.....	58
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	83

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1. แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งที่เปลี่ยนแปลงไปของยีน STARP.....	38
2. แสดงการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ Intron.....	39
3. แสดงการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ Rp45.....	40
4. แสดงการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ในส่วนของRp10.....	41
5. แสดงลักษณะอัลลีลที่พบทั้งหมดของยีน STARP.....	44



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพประกอบ	หน้า
1. แสดงวงชีวิตของเชื้อมาลาเรีย.....	12
2. แสดงการกระจายตัวของเชื้อมาลาเรีย.....	13
3. แสดงจังหวัดที่มีอัตราการติดเชื้อมาลาเรีย โดยเรียงลำดับจากมากไปน้อย ในประเทศไทย ปีพ.ศ. 2546.....	14
4. แสดงระยะต่างๆ ในวงชีวิตของเชื้อ <i>P.falciparum</i>	15
5. แสดงจำนวนโครโมโซมที่พบในวงชีวิตของเชื้อมาลาเรีย.....	18
6. แสดงโครงสร้างของยีน STARP ใน <i>P.falciparum</i>	24
7. แสดงตำแหน่งของ primer ต่างๆ ที่ใช้ในทำ PCR.....	33
8. แสดงผลการวิเคราะห์ผลผลิต PCR ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis.....	37

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

มาลาเรียหรือไข้จับสั่นเป็นโรคติดเชื้อที่เป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขของประเทศไทย และประเทศอื่นๆ ในเขตร้อนทั่วโลก โดยทำให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพและชีวิตของประชาชน องค์การอนามัยโลกประมาณว่าประชากรทั่วโลกกว่า 300 ถึง 500 ล้านคน มีการติดเชื้อมาลาเรีย ในแต่ละปี (1) และพบว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียมีอัตราการเสียชีวิตประมาณ 1-2 ล้านคนต่อปี (2)

สำหรับประเทศไทยพบเชื้อมาลาเรียได้ในหลายจังหวัดทางแถบชายแดนด้านตะวันออก ติดกับประเทศกัมพูชาเช่น ตราด จันทบุรี ปราจีนบุรี ทางด้านตะวันตกติดกับประเทศพม่าเช่น กาญจนบุรี ตาก แม่ฮ่องสอน และทางภาคใต้เช่น ยะลา นครศรีธรรมราช นราธิวาส ปัตตานี โดยผู้ติดเชื้อมาลาเรียส่วนใหญ่มักพบในวัยทำงาน โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ที่ใช้แรงงาน ซึ่งเป็นการสูญเสีย ผลผลิตของประเทศส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจและการพัฒนาของประเทศ

มาลาเรียเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อโปรโตซัว ซึ่งจัดอยู่ใน phylum Apicomplexa class Sporozoa และ genus *Plasmodium* โดยมียุงก้นปล่องเพศเมีย (*Anopheles* spp.) เป็นพาหะ นำโรค เชื้อมาลาเรียที่ทำให้เกิดโรคในคนมี 4 ชนิด ได้แก่ *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* และ *Plasmodium malariae* เชื้อมาลาเรียมีระยะต่างๆ ในการเจริญ หลายระยะและมีวงชีวิตในการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual reproduction) ในยุง และการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction) ในคน โดยเกิดขึ้นที่เซลล์ตับเป็นระยะเริ่มต้น และเข้าสู่เม็ดเลือดแดงในที่สุด ซึ่งเชื้อที่พบบ่อยคือเชื้อ *P. falciparum* และเชื้อ *P. vivax* โดยเชื้อ *P. falciparum* เป็นเชื้อที่ก่อความรุนแรงมากที่สุดในบรรดาเชื้อทั้งหมด

ปัญหาสำคัญที่เป็นอุปสรรคในการรักษาป้องกันและควบคุมโรค คือการดื้อยาหลายชนิด ของเชื้อมาลาเรียในเขตพื้นที่ก่อโรค และยุงก้นปล่องที่เป็นพาหะนำโรคสามารถปรับตัวให้มีความ ทนทานต่อยาฆ่าแมลง ดังนั้นมาตรการอันหนึ่งที่น่าจะมีประโยชน์ในการควบคุมการแพร่กระจาย ของโรคมาลาเรียคือ การผลิตวัคซีนสำหรับป้องกันโรคมาลาเรีย (3)

ภายหลังการติดเชื้อมาลาเรียระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายจะมีการตอบสนองต่อแอนติเจน (antigen) ที่ผิวของเชื้อมาลาเรียในแต่ละระยะของการเจริญเติบโต โดยแต่ละระยะมีรูปร่าง ลักษณะตลอดจนโปรตีนซึ่งเป็นองค์ประกอบแตกต่างกันตามระยะที่เปลี่ยนแปลงไป ทำให้ภูมิ ด้้านทานที่เกิดขึ้นในคนมีความจำเพาะต่อระยะของเชื้อเช่นกัน ดังนั้นการผลิตวัคซีนป้องกันโรค มาลาเรียที่ดีจึงควรมีองค์ประกอบของโปรตีนที่ได้มาจากหลายระยะในวงชีวิตของมาลาเรีย (4)

ระยะสปอร์โรซอยต์เป็นระยะหนึ่งที่มีความสำคัญอย่างยิ่งในวงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรีย เนื่องจากระยะสปอร์โรซอยต์เป็นระยะติดต่อและอยู่เป็นอิสระในกระแสเลือดช่วงสั้นๆ ก่อนที่จะเข้าสู่เซลล์ตับ ดังนั้นจึงมีโอกาสถูกทำลายได้โดยแอนติบอดี ระยะดังกล่าวจึงน่าจะเป็นเป้าหมายสำคัญในการผลิตวัคซีนเพื่อป้องกันโรคมาลาเรียได้ โดยเริ่มต้นจากการใช้สปอร์โรซอยต์ของ *P. gallinaceum* ซึ่งผ่านการฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตฉีดเข้าไปในสัตว์ปีก พบว่าสามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อมาลาเรียได้ (5) เมื่อทำการศึกษาโดยฉีดสปอร์โรซอยต์ของ *P. berghei* ที่ผ่านการฉายรังสีเอกซ์เข้าไปในหลอดเลือดดำของหนูทดลอง ต่อมาภายหลังจึงทำการฉีดเชื้อมาลาเรียระยะสปอร์โรซอยต์ที่สามารถก่อโรคได้ในหนูดังกล่าว พบว่าภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นจากการฉีดเชื้อที่ผ่านการฉายรังสีเอกซ์นั้นสามารถป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียได้ (6) ซึ่งพบว่าแอนติบอดีที่หนูสร้างขึ้นนั้นสามารถทำให้โปรตีนบนผิวของสปอร์โรซอยต์ เกิดการเกาะกลุ่มกันรอบๆ สปอร์โรซอยต์ จึงเรียกชื่อโปรตีนชนิดนี้ว่า circumsporozoite protein (CSP) และนับเป็นโปรตีนชนิดแรกบนผิวของสปอร์โรซอยต์ที่นำมาทดลองใช้ในการผลิตวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย (7) จากการศึกษาในภายหลังพบว่า CSP เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 40 กิโลดาลตัน ซึ่งมีโครงสร้างคือ ด้าน N-terminus และ C-terminus ประกอบด้วยบริเวณที่มีกรดอะมิโนคล้ายกันระหว่าง CSP ของเชื้อมาลาเรียต่าง species กันเรียกว่า region I และ region II ตามลำดับ (8) และบริเวณส่วนกลางมีกรดอะมิโน 4 ตัวเรียงตัวซ้ำกันเป็นชุดคือ asparagine, alanine, asparagine, proline (NANP) และ asparagine, valine, glutamic acid, proline (NVDP) (9) โดยพบว่าบริเวณ repeat ใน CSP ของ *P. falciparum* ประกอบด้วย B cell epitope ซึ่งแอนติบอดีต่อบริเวณดังกล่าวสามารถยับยั้งการลุกลามของสปอร์โรซอยต์เข้าสู่เซลล์ตับในการทดลองในห้องปฏิบัติการ (10) และยับยั้งความสามารถในการเป็นระยะติดต่อของสปอร์โรซอยต์ของ *P. falciparum* และ *P. vivax* (11)

จากการศึกษาบริเวณที่เป็น T cell epitope ใน CSP ของ *P. falciparum* พบว่ามีบริเวณดังกล่าวใน C-terminus ประกอบด้วย T helper epitope อย่างน้อย 2 ตำแหน่งคือ Th2R และ Th3R (12) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความหลากหลายในลำดับเบสสูง เนื่องจากบริเวณเหล่านี้มีรูปแบบการแทนที่ของเบสใน codon ของ epitope แตกต่างกันตามสายพันธุ์ของเชื้อ และการแทนที่ของเบสใน Th2R และ Th3R จะทำให้ codon นั้นเปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโนเสมอ (13),(14) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนนี้ทำให้การตอบสนองของ T cell ต่อบริเวณดังกล่าวลดลงหรือไม่ตอบสนองเลย จากการศึกษาความหลากหลายในลำดับเบสที่เกิดขึ้นจึงสามารถอธิบายการหลบหลีกของเชื้อมาลาเรียต่อระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ (15) ด้วยเหตุนี้จึงเริ่มมีการทดลองค้นหาโปรตีนชนิดใหม่เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพให้กับวัคซีนในระยะนี้ ซึ่งภายหลังพบว่าจากการทดลองใช้ CSP ร่วมกับ thrombospondin-related adhesion protein (TRAP) ของ *P. yoelli* ซึ่งเป็นเชื้อ

มาลาเรียของหนู เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีน พบว่าเมื่อใช้โปรตีนทั้ง 2 ชนิดร่วมกัน สามารถกระตุ้นให้หนูเกิดภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อมาลาเรียดังกล่าวได้อย่างสมบูรณ์ ในขณะที่ถ้าใช้โปรตีนเพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง พบว่าสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อมาลาเรียดังกล่าวได้ไม่สมบูรณ์ แสดงว่าภูมิคุ้มกันที่ให้ประสิทธิภาพสมบูรณ์สำหรับวัคซีนป้องกันมาลาเรียในระยะก่อนที่เชื้อจะเข้าสู่เม็ดเลือดแดง (pre-erythrocytic stage vaccine) เป็นผลรวมจากการกระตุ้นด้วยโปรตีนบนผิวสปอริโซยต์มากกว่า 1 ชนิด (16) นอกจากนี้ CSP และ TRAP ที่จัดว่าเป็นโปรตีนที่สำคัญต่อการพัฒนาวัคซีนป้องกันมาลาเรียในระยะก่อนที่เชื้อจะเข้าสู่เม็ดเลือดแดงแล้ว ยังมีโปรตีนอื่นๆ ที่พบในระยะดังกล่าว อีกทั้งน่าจะมีส่วนในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีน เช่น sporozoite threonine-asparagine-rich protein (STARP) (17), sporozoite and liver stage antigen (SALSA) (18) และ liver-stage-specific antigen 1,2 และ 3 (LSA 1,2,3) (19) เป็นต้น

เนื่องจากการศึกษาเกี่ยวกับ STARP ยังมีอยู่อย่างจำกัด ดังนั้นองค์ความรู้เกี่ยวกับโปรตีนชนิดนี้จึงต้องมีการศึกษาต่อไป อย่างไรก็ตามพบว่า STARP เป็นโปรตีนที่พบบนผิวของระยะสปอริโซยต์ และระยะที่เชื้อมาลาเรียเริ่มเจริญในเซลล์ตับ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 78 กิโลดาลตัน มีขนาดความยาวของยีนประมาณ 2.7 กิโลเบส โดยมีโครงสร้างคือ มีบริเวณ exon และมีบริเวณ intron คั่นกลาง ทางด้าน 5' และ 3' มีส่วนที่เป็น non-repetitive region และในส่วนกลางมีส่วน repetitive region ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ mosaic (M) region, Rp45 region เป็นบริเวณที่มี repeat ที่มีกรดอะมิโนซ้ำกันชุดละ 45 ตัว มีทั้งหมด 2 ชุด และ Rp10 region ประกอบด้วย repeat ที่มีกรดอะมิโน 10 ตัว เรียงซ้ำกันประมาณ 26 ชุด เป็นที่น่าสังเกตว่ากรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในส่วนกลางของ STARP มักเป็นกรดอะมิโนชนิดชอบน้ำ (hydrophilic) อย่างไรก็ตามขอบเขตความหลากหลายของยีนดังกล่าว ยังไม่ทราบชัดเจนเนื่องจากปัจจุบันมีข้อมูลลำดับเบสของยีนดังกล่าวจาก 3 ตัวอย่างเท่านั้น (17) แม้ว่าจะมีการศึกษาความหลากหลายของยีน STARP จากตัวอย่างที่ได้จากเขตปรากฏโรคบางแห่ง แต่การศึกษาดังกล่าวเป็นการตรวจสอบเพียงขนาดความยาวของยีนเท่านั้น (20) ซึ่งไม่สามารถบอกความแตกต่างในระดับกรดอะมิโนได้

สำหรับหน้าที่ของโปรตีน STARP ต่อระยะสปอริโซยต์นั้นยังไม่ทราบชัดเจน แต่จากการศึกษาผลของแอนติบอดีต่อ STARP กับการลุกลามของระยะสปอริโซยต์เข้าสู่เซลล์ตับนั้นพบว่า แอนติบอดีดังกล่าวสามารถยับยั้งการลุกลามของสปอริโซยต์ได้อย่างมีประสิทธิภาพถึงร้อยละ 90 ซึ่งมีค่าสูงกว่าผลของแอนติบอดีต่อ CSP ในการยับยั้งระยะสปอริโซยต์ไม่ให้เข้าสู่เซลล์ตับ และยังพบว่าความสามารถในการยับยั้งการลุกลามดังกล่าวของแอนติบอดีต่อ STARP มีความแปรผันโดยตรงกับปริมาณแอนติบอดี (21) และจากการทดลองใช้ synthetic peptide จาก

ส่วนต่างๆ ของโปรตีน STARP เพื่อทำการเกาะติดกับเซลล์ตับในหลอดทดลองพบว่า synthetic peptide อย่างน้อย 12 ชนิด สามารถเกาะติดกับเซลล์ตับได้ดีมาก โดยพบว่า peptide เหล่านี้พบได้ทั้งส่วน N-terminus บริเวณส่วนกลางที่มี repeat และทางด้าน C-terminus ดังนั้นจึงเป็นการสนับสนุนว่า STARP มีส่วนสำคัญในขั้นตอนการเกาะติดของสปอร์โรซอยต์กับเซลล์ตับในกระบวนการลุกลามเข้าสู่เซลล์ตับ (22) การศึกษาศักยภาพของ STARP ในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีนนั้น พบว่าเมื่อใช้ synthetic peptide ที่ผนวกส่วนของ STARP เข้ากับส่วนของ LSA 1, LSA 3 และ SALSA พบว่า peptide ดังกล่าวสามารถกระตุ้นทั้ง T cell และ B cell ได้ดีรวมทั้งยังมีความจำเพาะต่อโปรตีนเหล่านี้ที่อยู่บนผิวของสปอร์โรซอยต์ และระยะเริ่มแรกที่เชื้อมาลาเรียเจริญในเซลล์ตับทั้งในกรณีที่ใช้ลิง *Aotus* (23) และลิง chimpanzee (24) ในการทดลอง นอกจากนี้ยังพบ cytotoxic T cell epitope ใน STARP ซึ่งน่าจะเป็นเป้าหมายสำคัญต่อกระบวนการทำลายเชื้อมาลาเรียที่อยู่ในเซลล์ตับต่อไป (25)

อย่างไรก็ตามอุปสรรคสำคัญประการหนึ่งของการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียคือ ความหลากหลายในรูปแบบแอนติเจนของเชื้อมาลาเรีย (antigenic polymorphism) เนื่องจากเชื้อมาลาเรียมีการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมเกิดขึ้นในระหว่างที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ทำให้เชื้อมาลาเรียรุ่นถัดไปอาจมีองค์ประกอบทางพันธุกรรมแตกต่างกัน ส่งผลให้เกิดความหลากหลายในรูปแบบของโปรตีนรวมถึงแอนติเจน ทำให้เกิดผลกระทบต่ออาการตอบสนองของภูมิคุ้มกันของคนทั้งปฏิกิริยาต่อแอนติบอดีและการตอบสนองของ T lymphocyte (26) อีกทั้งการศึกษาเกี่ยวกับโปรตีน STARP ยังไม่มีการศึกษาขอบเขตความหลากหลายในรูปแบบแอนติเจนอย่างกว้างขวาง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาขอบเขตความหลากหลายในรูปแบบแอนติเจนของเชื้อมาลาเรียที่เกิดขึ้นในธรรมชาติในประเทศไทย อีกทั้งข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดังกล่าวจากผู้ป่วยในประเทศไทยยังไม่มีผู้ทำการศึกษามาก่อน การใช้ตัวอย่างที่ได้จากผู้ป่วยดังกล่าวจะนำไปสู่ความเข้าใจพื้นฐานทางด้านพันธุกรรมของยีนที่สร้างโปรตีนชนิดนี้ได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

อนุกรมวิธานของเชื้อมาลาเรีย

เชื้อมาลาเรียจัดเป็นโปรโตซัวชนิดหนึ่ง ที่จัดอยู่ในกลุ่มยูคาริโอต (eukaryote) ซึ่งมีองค์ประกอบของเยื่อหุ้มนิวเคลียส (nucleus membrane) และสามารถแยกนิวเคลียสออกจากไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ได้อย่างชัดเจน สามารถจัดหมวดหมู่ในอนุกรมวิธานได้ดังนี้

Kingdom Protista

Subkingdom Protozoa

Phylum Apicomplexa

Class Sporozoa

Subclass Coccidia

Order Eucoccidiida

Suborder Haemosporina

Family Plasmodiidae

Genus *Plasmodium*

เชื้อมาลาเรียใน genus *Plasmodium* ประกอบด้วย species ประมาณ 120 ชนิด ซึ่งมีทั้งที่พบในสัตว์ปีก สัตว์ฟันแทะหรือในลิง ได้แก่ *Plasmodium galiinaceum*, *Plasmodium yoelli* และ *Plasmodium knowlesi* เรียงตามลำดับ แต่เชื้อมาลาเรียชนิดที่พบและทำให้เกิดโรคในคนมี 4 ชนิด ได้แก่ *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* และ *Plasmodium ovale* ซึ่งในจำนวนเชื้อมาลาเรียทั้งหมดนี้ *Plasmodium falciparum* มีความสำคัญทางการแพทย์มากที่สุดเพราะเป็นชนิดที่ก่อความรุนแรงในคนมากที่สุดรองลงมาคือ *Plasmodium vivax* นอกจากนี้ยังพบว่า *Plasmodium* ที่พบในลิง primate หลายชนิดสามารถติดต่อสู่คนเช่น *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium cynomolgi* และ *Plasmodium simium* เป็นต้น (27,28,29)

การกระจายทางภูมิศาสตร์

การแพร่กระจายของเชื้อมาลาเรียนั้นพบได้ทั่วโลกระหว่างเส้นรุ้งที่ 64 องศาเหนือถึง 32 องศาใต้ โดยเฉพาะประเทศที่อยู่ในบริเวณแถบร้อนจะมีการกระจายของโรคมากกว่าบริเวณอื่น ได้แก่ประเทศในทวีปเอเชีย อเมริกากลางและตอนใต้ ยุโรป และแอฟริกา ดังแสดงในรูปที่ 2 ตามการรายงานขององค์การอนามัยโลกพบว่าประชากรทั่วโลกกว่า 300 ถึง 500 ล้านคนมีการติดเชื้อมาลาเรียในแต่ละปี (1) และพบว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียมีอัตราการเสียชีวิตประมาณ 1-2 ล้านคนต่อปี (2) โดยที่ร้อยละ 60 ของผู้ป่วย และร้อยละ 80 ของการตายจากโรคมาลาเรียทั้งหมดเกิดขึ้นในทวีปแอฟริกาและประชากรแอฟริกาที่ตายด้วยโรคมาลาเรียปีละมากกว่า 1 ล้านคน ซึ่งเกิดขึ้นจากการได้รับเชื้อ *P.falciparum* (30)

สำหรับการแพร่กระจายของเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิดในพื้นที่ต่างๆ พบว่าเชื้อมาลาเรียที่เป็นสาเหตุของโรคส่วนใหญ่เกิดจาก *P.falciparum* และ *P.vivax* โดยพบมากในเขตร้อนและเขตอบอุ่นในทวีปแอฟริกา อเมริกาและเอเชีย ส่วน *P.vivax* พบมากในประเทศแถบละตินอเมริกา จีน ตุรกี และอินเดีย สำหรับ *P.malariae* พบการแพร่กระจายได้ทั่วไปแม้จะมีอุบัติการณ์พบเชื้อต่ำ และ *P.ovale* พบได้น้อยเช่นกันแต่มักพบมากในทวีปแอฟริมากว่าบริเวณอื่นๆ

สำหรับในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2546 พบผู้ป่วยจากการติดเชื้อมาลาเรียชุกชุมในบางบริเวณของประเทศโดยเฉพาะจังหวัดที่ติดกับชายแดนของประเทศพม่า ลาว มาเลเซีย และกัมพูชา ได้แก่ พื้นที่ในจังหวัด ตาก ยะลา กาญจนบุรี จันทบุรี แม่ฮ่องสอน เชียงใหม่ ประจวบคีรีขันธ์ นครศรีธรรมราช ชุมพร สุราษฎร์ธานี ดังแสดงในรูปที่ 3 ปัจจุบันการติดเชื้อมาลาเรียมีแนวโน้มลดลงมากจากที่เคยพบผู้ป่วยชาวไทยจำนวน 168,370 คน ในปี พ.ศ. 2535 เหลือเพียง 30,612 คน ในปี พ.ศ. 2547 คิดเป็นอัตราป่วยหรือมีอุบัติการณ์ของโรคมาลาเรีย 0.51 ต่อประชากร 1000 คนและมีผู้ป่วยตายจากโรคมาลาเรีย 230 คน (31) แม้ว่าจำนวนผู้ป่วยจะลดลงอย่างมากโดยลำดับแต่โรคมาลาเรียยังถือเป็นโรคประจำท้องถิ่นที่ต้องเฝ้าระวังของประเทศไทย ซึ่งการระบาดของโรคมาลาเรียในประเทศไทยปรากฏมากใน 2 ช่วงของปี ได้แก่ ในช่วงฤดูฝน คือเดือนมิถุนายนถึงสิงหาคม และฤดูหนาว คือเดือน พฤศจิกายนถึงธันวาคม (32) โดยมาตรการควบคุมและป้องกันโรคมาลาเรียดำเนินงานโดยกองมาลาเรีย กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข

วงชีวิตและการเจริญเติบโตของมาลาเรีย

วงชีวิตของเชื้อมาลาเรียประกอบด้วยวงจรเจริญเติบโตแบบอาศัยเพศในยุงก้นปล่องเพศเมีย (sexual development) และการเจริญเติบโตแบบไม่อาศัยเพศในคน (asexual development) ซึ่งประกอบด้วยวงจรเจริญเติบโตในเซลล์ตับและการเจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงตามลำดับ

เมื่อยุงก้นปล่องเพศเมียดูดเลือดคนที่มีเชื้อมาลาเรียโดยอาจมีเชื้อปะปนกันหลายระยะตั้งแต่ระยะ gametocyte เท่านั้นที่จะเจริญต่อไปเมื่อเข้าไปในกระเพาะอาหารของยุง ซึ่งแกมมาโตไซต์จะเจริญเป็นแกมมาต (gamete) โดยแกมมาโตไซต์เพศผู้ (microgametocyte) จะมีการแบ่งนิวเคลียสเป็น 3 ครั้งและมีการสร้างแฟลกเจลลา (flagella) กระบวนการดังกล่าวนี้เรียกว่า exflagellation ซึ่งจะได้เซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (microgametes) จำนวน 8 ตัว มีลักษณะยาวรีคล้ายเส้นด้าย นิวเคลียสอยู่ตรงกลางเซลล์มีลักษณะอัดแน่น (compact) และยืดยาวออกเนื่องจากการเรียงตัวของโครโมโซม การเจริญดังกล่าวใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง ส่วนแกมมาโตไซต์เพศเมีย (macrogametocyte) จะเจริญเป็นเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (macrogamete) เมื่อเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ปฏิสนธิกับเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียแล้วจะเจริญเป็นไซโกต (zygote) มีขนาดประมาณ 6 ไมโครเมตร มีรูปร่างกลม ซึ่งกระบวนการดังกล่าวยังคงอยู่ภายในช่องว่าง (lumen) กระเพาะอาหารของยุง

หลังจากนั้นประมาณ 20 นาที ไซโกตจะเริ่มเปลี่ยนแปลงรูปร่าง โดยมีการยึดตัวยาวขึ้นและเจริญเป็นโอโอไคเน็ต (ookinete) ซึ่งมีขนาดประมาณ 15-19 ไมโครเมตร กว้าง 1-2.7 ไมโครเมตร บางส่วนของไซโตพลาสซึมจะเปลี่ยนเป็นเท้าเทียม (pseudopod) เพื่อการเคลื่อนที่ผ่านผนังกระเพาะอาหารของยุง จากนั้นจะเคลื่อนที่ไซผ่านเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารแล้วเจริญอยู่ที่ผิวด้านนอกกระเพาะอาหารของยุง โดยมีเยื่อบุกระเพาะอาหารด้านนอกปกคลุมอยู่ เรียกระยะนี้ว่าโอโอซิสต์ (oocyst) ซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 50 ไมโครเมตร และภายในมีสปอร์โรบลาส (sporoblast) เมื่อโอโอซิสต์เจริญต่อไป สปอร์โรบลาสภายในจะมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเกิดเป็นสปอร์โรซอยต์ (sporozoite) ซึ่งในระยะแรกจะยังมีส่วนติดกันอยู่ เมื่อสปอร์โรซอยต์เจริญเต็มที่ สปอร์โรบลาสจะมีขนาดเล็กลงและสลายไปในที่สุด

สปอร์โรซอยต์ที่เกิดขึ้นจะมีจำนวนประมาณ 1,000-2,000 ตัวในโอโอซิสต์ดังกล่าว (33) ซึ่งระยะนี้โอโอซิสต์จะมีขนาดใหญ่มากขึ้นเป็นลำดับโดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 50 ไมครอน โดยยุงหนึ่งตัวอาจมีโอโอซิสต์อยู่เป็นจำนวนมาก เมื่อสปอร์โรซอยต์เจริญเต็มที่ จะแตกออกจากโอโอซิสต์ ซึ่งมีความยาวประมาณ 11 ไมโครเมตร และความกว้างประมาณ 1 ไมโครเมตร โดยจะกระจายไปตามช่องว่างในทรวงอก (thoracic cavity) และเคลื่อนที่ไปสู่ต่อมน้ำลายของยุงและสะสมอยู่ในน้ำลายเป็นจำนวนมาก ระยะนี้ยุงที่มีสปอร์โรซอยต์ในต่อมน้ำลายของยุงสามารถแพร่เชื้อมาลาเรียโดยสปอร์โรซอยต์ซึ่งปะปนมากับน้ำลายยุงขณะกัดคนหรือสัตว์มีกระดูกสันหลังที่

เหมาะสมจะเป็นโฮสต์ต่อไป ระยะเวลาที่เชื้อมาลาเรียเจริญในยุงแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับอุณหภูมิของสภาพแวดล้อม ซึ่งโดยทั่วไประยะเวลาที่เจริญในยุงประมาณ 8-35 วัน อีกทั้งอยู่กับชนิดของเชื้อมาลาเรียเช่น อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส *P.falciparum* ใช้เวลาประมาณ 9-10 วัน ใกล้เคียงกับ *P.vivax* ซึ่งใช้เวลา 8-10 วัน ในขณะที่ *P.malariae* และ *P.ovale* ใช้เวลาประมาณ 14-16 วัน และ 12-14 วัน ตามลำดับ (34)

ยุงก้นปล่อง (*Anopheles* spp.) ซึ่งเป็นพาหะนำเชื้อมาลาเรียสู่คนมีหลายชนิดโดยมีการแพร่กระจายแตกต่างกันไปตามสภาวะทางภูมิศาสตร์ เช่น ในทวีปแอฟริกายุงพาหะหลักคือ *A.gambiae* complex ส่วนในทวีปอเมริกาใต้ได้แก่ *A.darlingi* สำหรับยุง *A.stephensi* พบมากในประเทศอินเดีย สำหรับในประเทศไทยยุงก้นปล่องที่เป็นพาหะที่สำคัญได้แก่ *A.dirus*, *A.minimus* และ *A.maculatus* โดยที่ *A.dirus* มีแหล่งเพาะพันธุ์บริเวณแหล่งน้ำสะอาดบริเวณชอกหินหรือตามหลุมน้ำในป่า *A.minimus* มีแหล่งเพาะพันธุ์บริเวณลำธารที่น้ำสะอาดและไหลเอื่อย *A.maculatus* มีแหล่งเพาะพันธุ์บริเวณชอกหินที่แสงแดดส่องถึง (35) ยุงในกลุ่มนี้มีบทบาทสำคัญต่อการแพร่เชื้อมาลาเรียในพื้นที่ภูมิประเทศเป็นป่าเขา สวนยางและสวนผลไม้ ปัจจัยที่สำคัญที่มีอิทธิพลต่อการแพร่เชื้อมาลาเรียในธรรมชาติได้แก่ การแพร่กระจายชนิดของยุง นิเวศการกัด อายุขัยของยุง และความหนาแน่นในแต่ละฤดูกาล

เมื่อยุงก้นปล่องเพศเมียที่มีเชื้อมาลาเรียกัดคนจะปล่อยเชื้อระยะสปอร์โรซอยต์ ภายในเวลาประมาณ 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง สปอร์โรซอยต์จะเข้าสู่เซลล์ตับโดยอาศัยกระบวนการที่ซับซ้อนและเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วจึงเชื่อว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับกลไกที่อาศัยตัวตอบรับ (receptor mediated mechanism) โดยมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างสปอร์โรซอยต์และเซลล์ตับ (hepatocyte) ซึ่งเกี่ยวข้องกับ thrombospondin domain หรือ region II-plus ซึ่งเป็น cell-adhesive motif ประกอบด้วยกลุ่มของกรดอะมิโนที่เป็นเบส (basic) และไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) (36) โดยจะพบใน circumsporozoite protein (CSP) และ thrombospondin-related adhesion protein (TRAP) ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบบนผิวของสปอร์โรซอยต์ โดยจะจับกับ sulfated glycans ที่บริเวณ basolateral domain ของเซลล์ตับ ในส่วนของ Disse space (37) โดยแอนติบอดีต่อ circumsporozoite protein และ thrombospondin-related adhesion protein สามารถยับยั้งการลุกลามของสปอร์โรซอยต์เข้าสู่เซลล์ตับได้อย่างมีประสิทธิภาพในหลอดทดลอง (38-42)

เมื่อสปอร์โรซอยต์ลุกลามเข้าสู่เซลล์ตับแล้วจะเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนมากขึ้นแบบไม่อาศัยเพศ เรียกระยะต่างๆที่อยู่ในเซลล์ตับนี้ว่า exo-erythrocytic stage หรือ hepatic stage หรือ pre-erythrocytic stage ระยะนี้จะมีการแบ่งนิวเคลียสหลายครั้งภายในไซโตพลาสซึมอันเดียวกันทำให้เกิดระยะไซซอนต์ (schizont) เมื่อระยะไซซอนต์เจริญเต็มที่ไซโตพลาสซึมจะถูกแยกไปอยู่กับแต่ละนิวเคลียส ทำให้แต่ละเซลล์มีนิวเคลียสเดียวเรียกว่าเมอริโรซอยต์ (merozoite) ซึ่งมีขนาด

ประมาณ 1 ไมโครเมตร กระบวนการเพิ่มจำนวนเซลล์โดยไม่อาศัยเพศดังกล่าวนี้เรียกว่า schizogony ภายในเมอริโซซอยต์ไม่มีองค์ประกอบของ malaria pigment หรือ hemozoin เนื่องจากระยะที่เชื้อมาลาเรียเจริญในตับไม่ได้อาศัยฮีโกลบินเป็นอาหาร เชื้อมาลาเรียต่างชนิดกัน จะมีจำนวนเมอริโซซอยต์แตกต่างกัน กล่าวคือ *P.falciparum* จะมีจำนวนเมอริโซซอยต์ประมาณ 30,000 ถึง 40,000 ตัว ที่เกิดจากสปอร์โรซอยต์เพียงตัวเดียว ในขณะที่ *P.vivax* นั้นแต่ละสปอร์โรซอยต์ จะเจริญเป็นเมอริโซซอยต์ ประมาณ 10,000 ตัว ส่วน *P.ovale* และ *P.malariae* มีประมาณ 15,000 ตัว นอกจากนี้ระยะเวลาที่สปอร์โรซอยต์เจริญจนเกิดเป็นเมอริโซซอยต์ในตับมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อมาลาเรีย กล่าวคือ *P.falciparum* ใช้เวลาประมาณ 5.5-7 วัน *P.vivax* ใช้เวลาประมาณ 6-8 วัน *P.ovale* ใช้เวลาประมาณ 9 วัน *P.malariae* ใช้เวลาประมาณ 14-16 วัน (34,43)

สำหรับระยะสปอร์โรซอยต์ของ *P.falciparum* และ *P.malariae* เมื่อเข้าสู่เซลล์ตับแล้วจะมีการเจริญเติบโตต่อไปตลอดระยะ pre-erythrocytic stage ทั้งหมดโดยไม่มีระยะที่หยุดพักการเจริญชอนอยู่ในตับ แต่สำหรับ *P.vivax* และ *P.ovale* นอกจากจะมีการเจริญเติบโตเข้าสู่เซลล์ตับตลอดระยะดังกล่าวแล้ว จะมีการหยุดพักการเจริญชั่วคราวจนกว่าจะถึงระยะเวลาหนึ่งจึงกลับมาเจริญต่อไปอีกซึ่งใช้เวลาแตกต่างกันขึ้นกับสายพันธุ์และชนิดของเชื้อมาลาเรีย โดยอาจใช้เวลาเพียงไม่กี่เดือนหรืออาจจะนานเป็นปี เรียกระยะที่เชื้อมาลาเรียหยุดพักการเจริญเติบโตในเซลล์ตับว่า hypnozoite (44,45) ซึ่งระยะดังกล่าวจะเป็นสาเหตุทำให้ผู้ป่วยมีอาการของไข้กลับ (relapse)

หลังจากที่เมอริโซซอยต์แตกออกจากเซลล์ตับจะออกมาอยู่ภายนอกเซลล์ในกระแสเลือด ในระยะเวลาเพียงชั่วขณะเพื่อลูกกลมเข้าสู่เม็ดเลือดแดง จึงเป็นเวลาที่มีโอกาสสัมผัสกับสารต่างๆ ในกระแสเลือดโดยตรงรวมทั้งแอนติบอดีและสารอื่นๆ ดังนั้นภายในระยะเวลาเพียงประมาณ 30-60 วินาที เมอริโซซอยต์จะเข้าสู่เม็ดเลือดแดง ซึ่งกระบวนการเข้าสู่เม็ดเลือดแดงนี้มีความซับซ้อนประกอบด้วยหลายขั้นตอนได้แก่ ขั้นตอนการเกาะติดกับเม็ดเลือดแดงแบบไม่เฉพาะเจาะจง (nonspecific attachment) โดยใช้ด้านใดของเมอริโซซอยต์ก็ได้ หลังจากนั้นเมอริโซซอยต์จะหันด้านหน้าให้สัมผัสกับผิวเม็ดเลือดแดง (reorientation) ซึ่งระยะนี้เม็ดเลือดแดงจะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างชั่วคราว (deformation of the erythrocyte) ระยะต่อมาจะมีการสร้างรอยเชื่อมต่อ (junction) ระหว่างบริเวณด้านหน้า (apical end) ของเมอริโซซอยต์ กับผิวเม็ดเลือดแดง หลังจากนั้นเมอริโซซอยต์จะเคลื่อนที่เข้าสู่เม็ดเลือดแดงโดยมีการเคลื่อนตัวของรอยเชื่อมดังกล่าว จนในที่สุดจะมีการเชื่อมปิด (sealing) ของเยื่อหุ้มเม็ดเลือดแดงพร้อมกับการเกิดเยื่อหุ้ม vacuole ล้อมรอบเมอริโซซอยต์ (46) โดยกระบวนการทั้งหมดนั้นเชื่อว่าเป็นกลไกที่ต้องอาศัยตัวตอบรับเช่นกัน โดยพบว่าโปรตีนบนผิวเมอริโซซอยต์ที่สำคัญที่น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการดังกล่าวมีหลายชนิด ได้แก่ merozoite surface protein 1 (MSP-1) (47), merozoite

surface protein 2 (MSP-2) (48), erythrocyte binding protein (49) ส่วนตัวตอบรับบนผิวเม็ดเลือดแดงที่น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องสำหรับ *P.falciparum* ได้แก่ erythrocyte glycoprotein A และ erythrocyte glycoprotein B (50) สำหรับ *P.vivax* ได้แก่ Duffy positive blood group (51) นอกจากนี้มาลาเรียต่างชนิดกันยังสามารถกลุกลามเข้าเม็ดเลือดแดงที่มีอายุแตกต่างกัน กล่าวคือ *P.vivax* และ *P.ovale* สามารถกลุกลามเข้าได้เฉพาะเม็ดเลือดแดงที่มีอายุน้อย (reticulocyte) ส่วน *P.malariae* กลุกลามเข้าในเม็ดเลือดแดงที่มีอายุมาก (senescent erythrocyte) แต่สำหรับ *P.falciparum* สามารถกลุกลามเข้าเม็ดเลือดแดงได้ทุกช่วงอายุ จึงทำให้มีอัตราการพบเชื้อในเม็ดเลือดแดงได้สูงกว่าเชื้อมาลาเรียชนิดอื่นๆ (52)

ภายหลังจากเมอริโซซอइटเข้าสู่เม็ดเลือดแดงแล้วจะมีการเจริญเติบโตต่อไป เมอริโซซอइटในเม็ดเลือดแดงจะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างลักษณะคล้ายวงแหวน โดยเมื่อย้อมเลือดด้วยสียิมซา (Giemsa) จะเห็นไซโตพลาสซึมติดสีน้ำเงินเป็นริ้วแหวนและมีนิวเคลียสที่ติดสีม่วงหรือแดงเป็นหัวแหวน เรียกระยะดังกล่าวว่าระยะวงแหวน (ring stage หรือ ring form) โดยมี vacuole ขนาดใหญ่อยู่ภายในเซลล์ทำให้นิวเคลียสถูกดันไปด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ ซึ่งการเจริญของเชื้อมาลาเรียภายในเม็ดเลือดแดงจะดำเนินต่อไปภายในเยื่อหุ้มมาลาเรียเรียกว่า parasitophorous vacuole ดังนั้นเชื้อมาลาเรียจึงไม่ได้สัมผัสโดยตรงกับไซโตพลาสซึมของเม็ดเลือดแดง เมื่อเชื้อมาลาเรียมีการเจริญเติบโตต่อไป ไซโตพลาสซึมจะมีการขยายตัวออกแต่ยังไม่มีการแบ่งตัว ทำให้มีรูปร่างลักษณะไม่แน่นอน อาจพบลักษณะคล้ายเท้าเทียม (pseudopod) และส่วนของ vacuole มีขนาดเล็กกลวง เรียกระยะดังกล่าวว่า ระยะโทรโฟซอइटที่กำลังเจริญเติบโต (growing trophozoite)

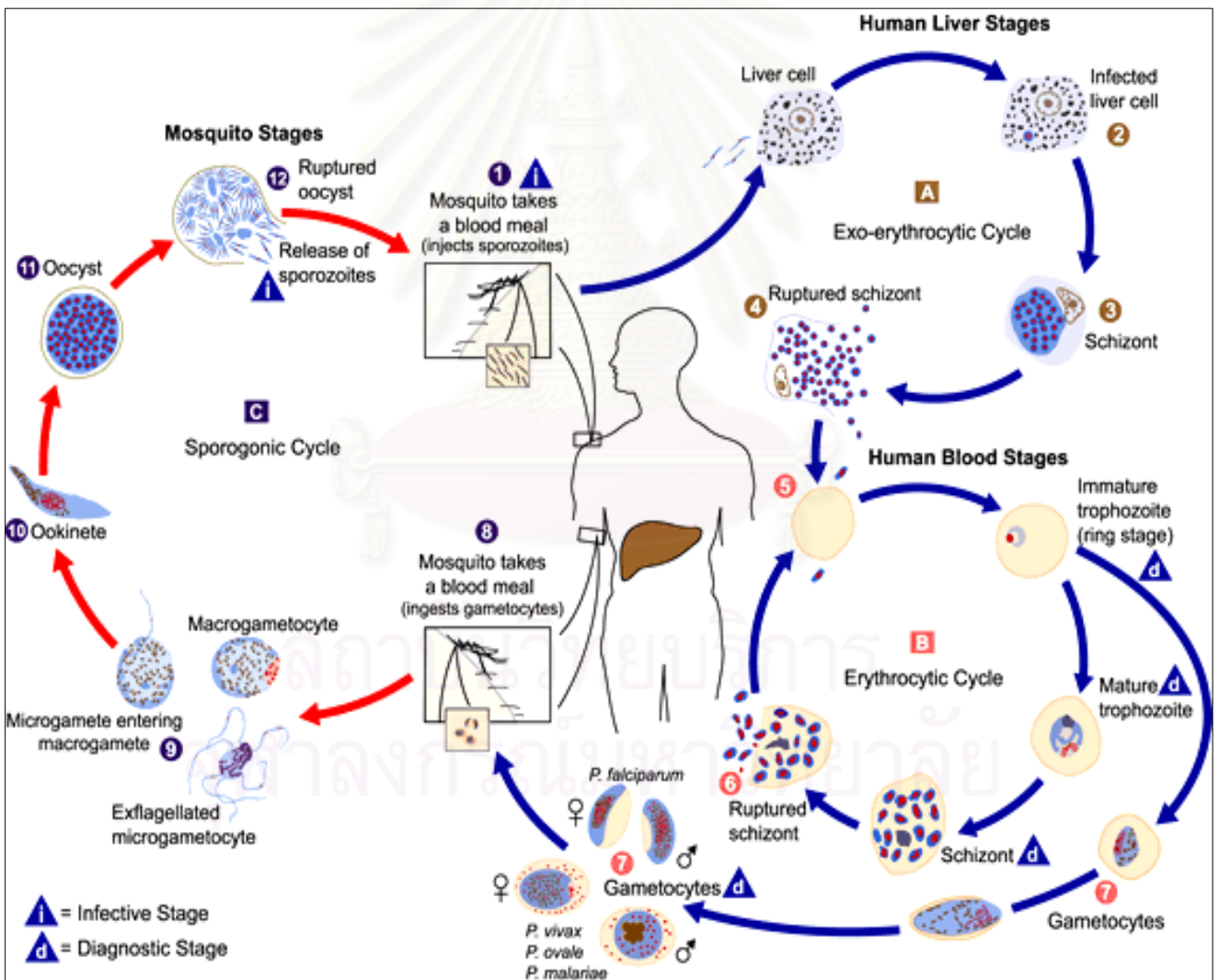
ระยะนี้เชื้อที่กำลังเจริญเติบโตจะอาศัยสารต่างๆ ในเม็ดเลือดแดงเป็นหลัก โดยอาหารส่วนใหญ่จะได้จากกระบวนการย่อยสลายฮีโมโกลบิน ซึ่งจะถูกละลายเป็นฮีม (heme) และโกลบิน (globin) แต่เชื้อมาลาเรียไม่สามารถย่อยสลายฮีมให้สมบูรณ์ โดยสิ้นสุดการย่อยสลายฮีมให้เป็น ferriprotoporphyrin IX ซึ่งเป็นสารมีพิษต่อเชื้อมาลาเรีย ดังนั้นเชื้อมาลาเรียจึงมีกระบวนการกำจัดสารดังกล่าวในรูปกากอาหาร ซึ่งมีลักษณะเป็นเม็ดสีน้ำตาลทองหรือน้ำตาลปนดำอยู่ในไซโตพลาสซึมของเชื้อมาลาเรีย เรียกลักษณะดังกล่าวว่า malarial pigment หรือ hemozoin ซึ่งเป็นโพลีเมอร์ของฮีมและไม่มีพิษ (53) ในระยะโทรโฟซอइटนี้เชื้อมาลาเรียจะปลดปล่อยโปรตีนหลายชนิดสู่เม็ดเลือดแดง อาจจะอยู่ในรูปของ caveola-vesicle complex ซึ่งสามารถพบได้ในไซโตพลาสซึมของเม็ดเลือดแดงโดยอยู่ติดกับด้านในของเยื่อหุ้มเซลล์ (54) เมื่อย้อมด้วยสียิมซาและดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นเป็นจุดสีชมพู มีลักษณะรูปร่างแตกต่างกันไปตามชนิดของเชื้อมาลาเรีย โดยที่ *P.falciparum* จะพบ Meurer's dots มีลักษณะรูปร่างเป็นจุดใหญ่หรือแท่งสั้นๆ ส่วน *P.vivax* และ *P.ovale* จะพบ Schuffner's dots มีลักษณะรูปร่างเป็นจุดเล็กๆ ขนาดที่เท่ากันกระจายทั่วไป ส่วน *P.malariae* จะพบ Ziemann's dots เห็นเป็นจุดละเอียด

กระจายทั่วไป ในขณะที่เดียวกันเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อมาลาเรียตั้งแต่ระยะ growing trophozoite เป็นต้นไปจะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและการติดสียิมซาโดย *P.vivax* เม็ดเลือดแดงจะมีขนาดโตขึ้นและติดสีซีดลง ส่วน *P.ovale* มีขนาดโตขึ้นเล็กน้อยและมักเป็นรูปรีโดยมีปลายแต่ละด้านเป็นแฉก (fimbriation) ในขณะที่ *P.falciparum* และ *P.malariae* ไม่พบการเปลี่ยนแปลงชัดเจน ซึ่งความแตกต่างของเหล่านี้สามารถใช้ในการจำแนกเชื้อมาลาเรียได้ (34)

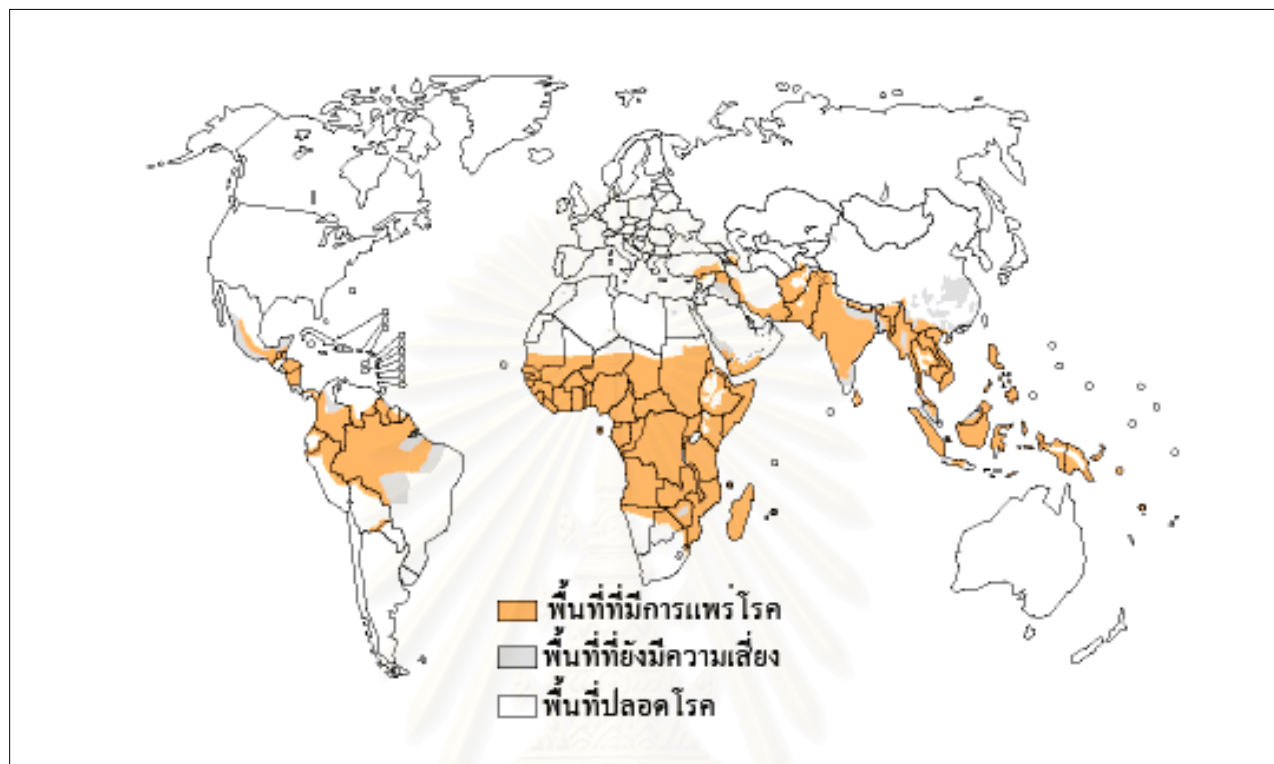
ระยะโทรฟโซอิตที่มีนิวเคลียสเดียวนั้นเมื่อเจริญต่อไปจะมีการแบ่งนิวเคลียสหลายครั้ง ภายในไซโตพลาสซึมเดียวกันทำให้เกิดระยะไซซอนต์ระยะแรก (early schizont) และเมื่อไซซอนต์เจริญเต็มที่ที่มีการแบ่งไซโตพลาสซึมทำให้แต่ละเซลล์มีนิวเคลียสเดียวเรียกระยะนี้ว่า ไซซอนต์ระยะหลัง (late schizont) และภายในประกอบด้วยเมอริโรซอइट เรียกกระบวนการแบ่งตัวนี้ว่า schizogony ในช่วงนี้ malarial pigment จะถูกกำจัดออกนอกเซลล์ของเชื้อมาลาเรียและทิ้งไว้ใน parasitophorous vacuole จำนวนเมอริโรซอइटที่เกิดขึ้นภายในเม็ดเลือดแดงจะมีจำนวนแตกต่างกันไปตามชนิดของเชื้อมาลาเรีย โดย *P.falciparum* จะมีจำนวนเมอริโรซอइटประมาณ 8-26 ตัว ส่วน *P.vivax* มีจำนวน 12-24 ตัว สำหรับ *P.malariae* และ *P.ovale* มีจำนวนตั้งแต่ 6-12 ตัว (34) เมื่อเม็ดเลือดแดงแตก (hemolysis) เมอริโรซอइटในระยะหลังจะออกมาอยู่ในกระแสเลือดและพร้อมที่จะเข้าสู่เม็ดเลือดแดงใหม่และมีการเจริญเป็นระยะดังกล่าวต่อไป เรียกระยะที่มีการเจริญและเพิ่มจำนวนโดยไม่ใช้เพศภายในเม็ดเลือดแดงว่า asexual erythrocytic cycle ซึ่งระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศในเม็ดเลือดแดงตั้งแต่ระยะวงแหวนจนถึงระยะเมอริโรซอइटจะแตกต่างกัน กล่าวคือ *P.falciparum* ใช้เวลาประมาณ 36-48 ชั่วโมง เรียกว่า subtertian หรือ malignant tertian malaria สำหรับ *P.vivax* และ *P.ovale* ใช้เวลาประมาณ 48 ชั่วโมง เรียกว่า tertian malaria ส่วน *P.malariae* ใช้เวลาประมาณ 72 ชั่วโมง เรียกว่า quartan malaria ช่วงเวลาที่เมอริโรซอइटแตกออกจากเม็ดเลือดแดงจะมีความสัมพันธ์กับการเกิดอาการแสดงของโรคในผู้ป่วยมาลาเรีย โดยจะทำให้เกิดมีอาการไข้หนาวสั่น (55)

เมื่อเมอริโรซอइटเข้าสู่เม็ดเลือดแดงและเจริญเติบโตต่อไปหลายๆ รอบจะมีเมอริโรซอइटบางตัวไม่เข้าสู่วงจรการเจริญเติบโตแบ่งตัว แต่จะมีการเจริญต่อไปเป็นเซลล์สืบพันธุ์ระยะแกมมีโตไซต์ (gametocyte) ซึ่งเกิดขึ้นเมื่ออยู่ในม้าม ไชกระดูกและอวัยวะภายในอื่นๆ ทั้งนี้ปัจจัยที่กระตุ้นการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวมีหลายประการ ส่วนหนึ่งเกี่ยวข้องกับการที่ระยะการเจริญแบบไม่อาศัยเพศในเม็ดเลือดแดงได้รับแรงกดดัน เช่นการได้รับยาต้านมาลาเรีย การสร้างแอนติบอดีของโฮสต์ ตลอดจนสารจากตัวเชื้อเอง ซึ่งระยะแกมมีโตไซต์ประกอบด้วยแกมมีโตไซต์เพศผู้และเพศเมีย โดยในระยะแกมมีโตไซต์ของ *P.falciparum* จะมีรูปร่างคล้ายพระจันทร์เสี้ยว (crescent form) แกมมีโตไซต์เพศผู้มีลักษณะอ้วนและสั้นกว่าแกมมีโตไซต์เพศเมีย ในขณะที่แกมมีโตไซต์

ของ *P.vivax* *P.malariae* และ *P.ovale* จะมีรูปร่างกลมรี (oval shape) เมื่อย้อมสีิมซาพบว่า แกมมีโตไซต์เพศเมียไซโตพลาสซึมติดสีฟ้าเข้ม นิวเคลียสมีขนาดเล็กติดสีแดงเข้ม ส่วน แกมมีโตไซต์เพศผู้ไซโตพลาสซึมจะติดสีฟ้าจางกว่า นิวเคลียสมีขนาดใหญ่และติดสีอ่อนกว่า เนื่องจากจำนวน ไรโบโซมของแกมมีโตไซต์เพศเมียมีมากกว่าแกมมีโตไซต์เพศผู้ สำหรับระยะเวลาที่แกมมีโตไซต์เริ่มปรากฏในกระแสเลือดนั้นมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อมาลาเรียโดย *P.falciparum* ใช้เวลาประมาณ 8-15 วัน ส่วน *P.vivax* และ *P.ovale* ใช้เวลาประมาณ 5 วัน สำหรับ *P.malariae* ใช้เวลาประมาณ 5-23 วัน หลังจากที่ยุงก้นปล่องเพศเมียดูดเลือดคนที่มีเชื้อ ระยะเวลาแกมมีโตไซต์เข้าไป เชื้อมาลาเรียจะเจริญเติบโตในกระเพาะอาหารของยุงต่อไป (56) ดังแสดงในรูปที่ 1

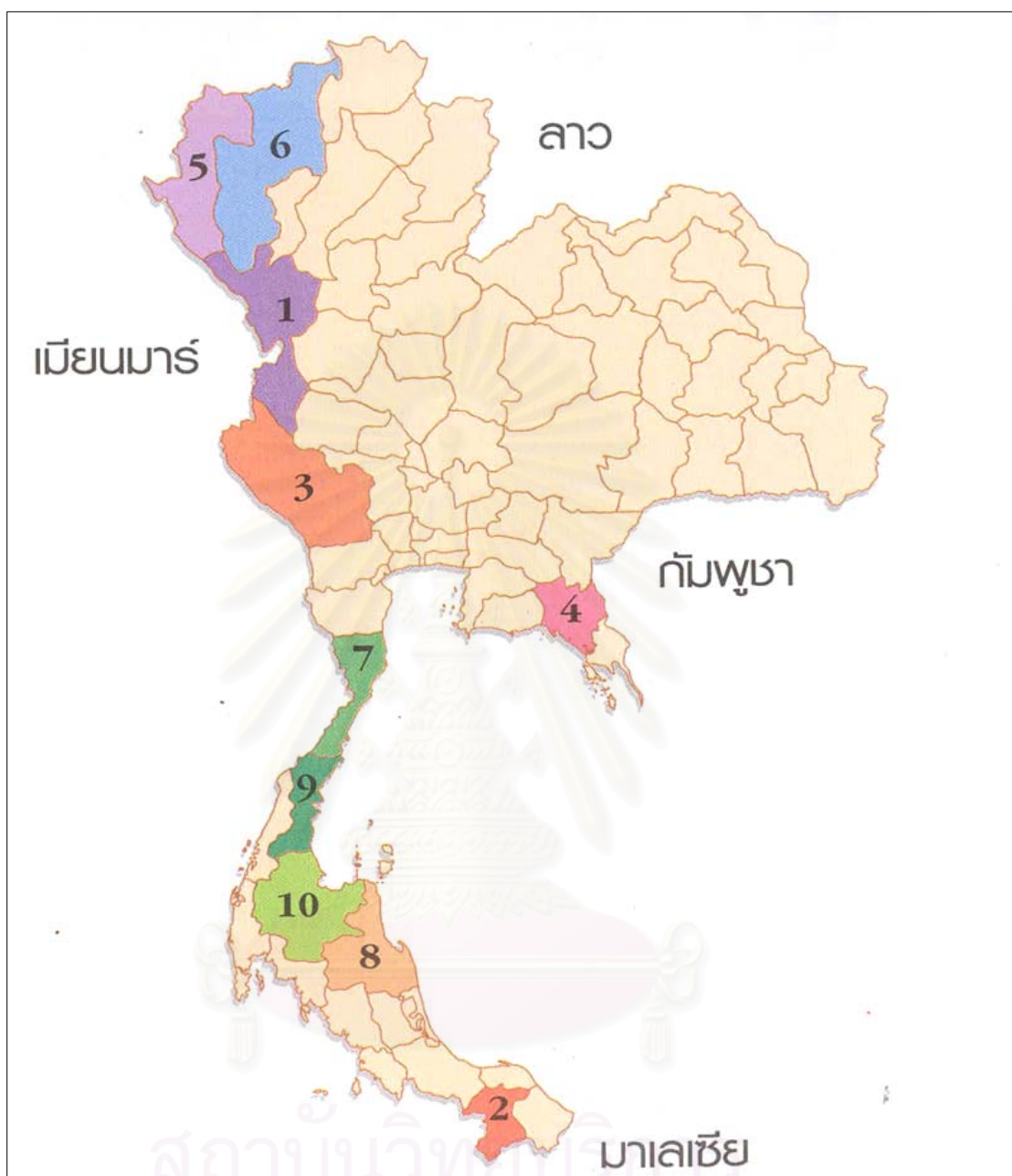


รูปที่ 1 แสดงวงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรีย(www.dpd.cdc.gov)

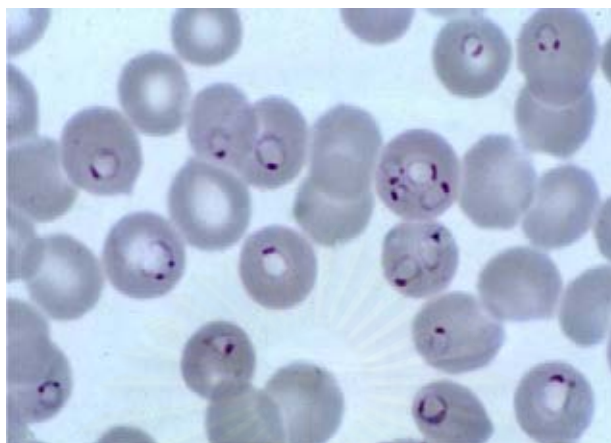


รูปที่ 2 แสดงการกระจายทางภูมิศาสตร์ของเชื้อมาลาเรีย (www.med.cmu.ac.th)

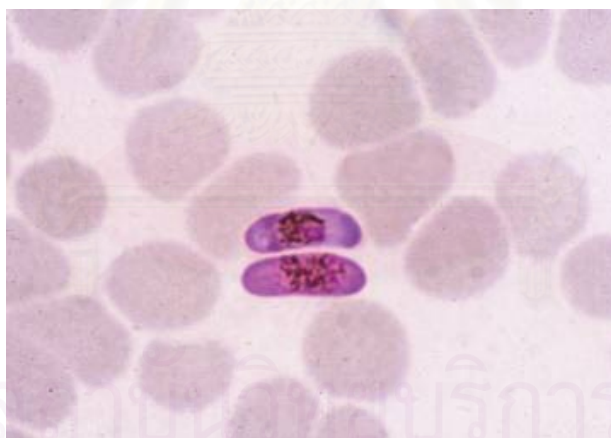
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3 แสดงจังหวัดที่มีอัตราการติดเชื้อมาลาเรีย โดยเรียงลำดับจากมากไปน้อย ในประเทศไทย ปีพ.ศ. 2546 หมายเลข 1 คือ ตาก, หมายเลข 2 คือ ยะลา, หมายเลข 3 คือ กาญจนบุรี, หมายเลข 4 คือ จันทบุรี หมายเลข 5 คือ แม่ฮ่องสอน, หมายเลข 6 คือ เชียงใหม่, หมายเลข 7 คือ ประจวบคีรีขันธ์, หมายเลข 8 คือ นครศรีธรรมราช, หมายเลข 9 คือ ชุมพร และหมายเลข 10 คือ สุราษฎร์ธานี (กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข)



A



B

รูปที่ 4 แสดงระยะต่างๆ ในวงจรชีวิตของเชื้อ *P.falciparum* โดยรูป A คือ ระยะวงแหวน (ring form) และรูป B คือ ระยะแกมมิตไซต์เพศผู้และเพศเมีย (www.phil.cdc.gov)

อาการแสดงของโรคมาลาเรีย

อาการของผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อมาลาเรียจะมีอาการไข้ หนาวสั่น ซึ่งอาการเหล่านี้จะเกิดขึ้นซ้ำๆ เป็นช่วงเวลาค่อนข้างสม่ำเสมอ ซึ่งประกอบด้วย 3 ระยะคือ

1. ระยะหนาวสั่น (cold stage) ผู้ป่วยจะมีอาการหนาวสั่นทั้งตัว ไข้ขึ้น ร่วมกับอาการปวดศีรษะ ปวดกล้ามเนื้อ ปวดเมื่อยตามตัว คลื่นไส้ ผื่นหงายซัด แรงดันเลือดเพิ่มขึ้น ใช้เวลาประมาณ 15-60 นาที

2. ระยะไข้ตัวร้อน (hot stage) ผู้ป่วยจะมีไข้สูง คลื่นไส้ อาเจียน หน้าแดง ตัวแดง ซีพจรเต้นแรง ระยะนี้ใช้เวลาประมาณ 1-4 ชั่วโมง

3. ระยะเหงื่อออก (sweating stage) ผู้ป่วยจะมีเหงื่อออกทั่วตัว ไม่มีไข้ แต่ระยะนี้ผู้ป่วยมักจะมีอาการอ่อนเพลียและมักจะนอนพักในระยะนี้ ใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง

การเกิดอาการเหล่านี้ซ้ำๆกัน โดยเว้นช่วงเวลาที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งเรียกว่า paroxysm โดยอาการที่เกิดขึ้นจะสัมพันธ์กับระยะที่เมอริโรซอยต์แตกตัวออกจากเม็ดเลือดแดง (57) ดังนั้นเมื่อครบรอบการเจริญเติบโตแบบไม่อาศัยเพศในเม็ดเลือดแดงแล้วจะทำให้มีอาการไข้หนาวสั่นเกิดขึ้น โดยที่เชื้อชนิด *P.falciparum* จะทำให้เกิดอาการไข้ทุกๆ 36-48 ชั่วโมง สำหรับ *P.vivax* และ *P.ovale* จะมีการจับไข้ทุกๆ 48 ชั่วโมงหรือมีไข้วันเว้นวัน ส่วน *P.malariae* มีไข้ทุกๆ 72 ชั่วโมงหรือมีไข้วันเว้นสองวัน เชื่อว่าอาการที่เกิดขึ้นมีสาเหตุจากการปลดปล่อยสารพิษของเชื้อมาลาเรียกระตุ้นให้ macrophage หลั่ง tumor necrosis factor- α (TNF- α) และ interleukin-1 นอกจากอาการดังกล่าวแล้วเชื้อมาลาเรียยังทำให้ผู้ป่วยมีอาการซีด (anemia) โดยกลไกการแตกของเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อมาลาเรียในระยะที่เมอริโรซอยต์ออกจากเซลล์ การแตกของเม็ดเลือดแดงปกติโดยปฏิกิริยาทางอิมมูนและภาวะที่ไขกระดูกมีการสร้างเม็ดเลือดแดงลดลง (dyserythropoiesis) ทำให้การสร้างเม็ดเลือดแดงไม่มีประสิทธิภาพ (ineffective erythropoiesis) (58)

ถึงแม้ว่าเชื้อมาลาเรียทั้ง 4 ชนิด ทำให้เกิดอาการไข้หนาวสั่นคล้ายกัน แต่เชื้อมาลาเรียชนิด *P.falciparum* ทำให้เกิดพยาธิสภาพและภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรงมากที่สุดและเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตได้ สำหรับอาการแทรกซ้อนที่พบได้แก่ ภาวะมาลาเรียขึ้นสมอง (cerebral malaria) ภาวะไตวายเฉียบพลัน (acute renal failure) ภาวะน้ำท่วมปอดเฉียบพลัน (acute pulmonary edema) ภาวะเลือดเป็นกรด (metabolic acidosis) ภาวะไข้สูงผิดปกติ (hyperpyrexia) ภาวะดีซ่าน (jaundice) ภาวะการหายใจล้มเหลวเฉียบพลัน (acute respiratory insufficiency) ภาวะความดันเลือดต่ำจนเกิดอาการช็อค (algid malaria) ภาวะน้ำตาลในกระแสเลือดต่ำกว่าปกติ (hypoglycemia) แต่อาการแทรกซ้อนที่สำคัญและเป็นสาเหตุการตายจากการติดเชื้อ *P.falciparum* ที่อันตรายที่สุดคือ ภาวะมาลาเรียขึ้นสมอง (57,59)

ปัจจุบันพบว่า สาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคมาลาเรียชนิดรุนแรงและมาลาเรียขึ้นสมอง คือ sequestration หรือการที่เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรียระยะที่เจริญมากกว่าระยะวงแหวน หลบซ่อนอยู่ในหลอดเลือดที่หล่อเลี้ยงอวัยวะภายใน เนื่องจากเม็ดเลือดแดงดังกล่าวมีคุณสมบัติ การเกาะติดเป็นกลุ่มก้อนและเกาะติดผนังหลอดเลือด ทำให้เกิดการอุดตันภายในหลอดเลือด (microvascular obstruction) ดังนั้นสารอาหารและออกซิเจนจึงไปเลี้ยงอวัยวะต่างๆ ได้ไม่เพียงพอ อย่างไรก็ตามหลังจากที่อาการไข้มาลาเรียหายไปแล้ว แต่ถ้ายังมีเชื้อมาลาเรียเหลืออยู่ใน ร่างกาย ซึ่งอาจจะลดลงจากการได้รับยารักษาโรคมาลาเรียจนตรวจไม่พบได้ด้วยวิธีการตรวจฟิล์ม เลือด แต่หลังจากนั้นเชื้อมาลาเรียที่ดื้อยาหรือหลงเหลืออยู่ในร่างกาย เพิ่มจำนวนมากขึ้นจนตรวจ พบได้อีกครั้งพร้อมกับอาการไข้กลับ เรียกกระบวนการนี้ว่า recrudescence

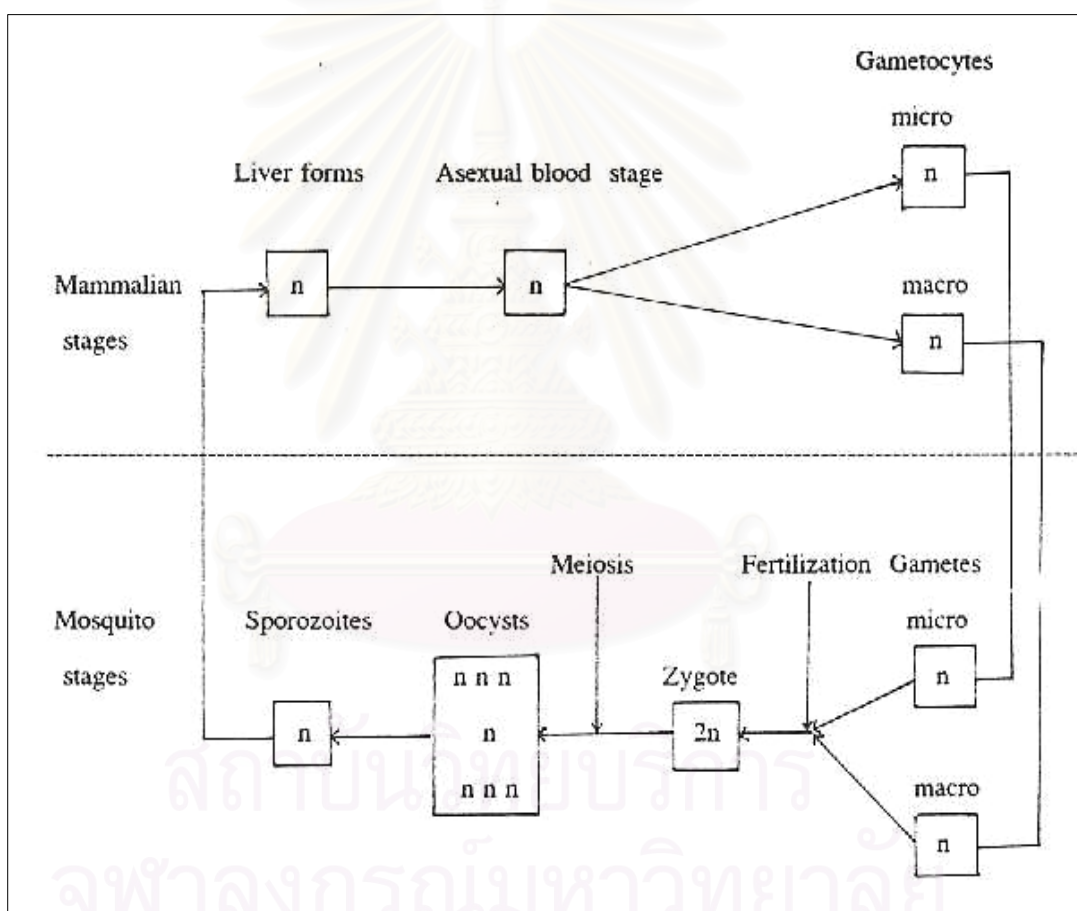
อณูชีววิทยาของเชื้อมาลาเรีย

การศึกษ้อณูชีววิทยาของเชื้อมาลาเรียทำให้เกิดองค์ความรู้ใหม่ๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อ การศึกษาเชื้อมาลาเรียทั้งในด้านของวิทยาศาสตร์พื้นฐาน วิทยาศาสตร์ประยุกต์เพื่อเป็นประโยชน์ ต่อการรักษาและควบคุมโรคมาลาเรียได้อย่างถูกต้อง โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็น องค์ประกอบของเชื้อมาลาเรียและเปรียบเทียบระหว่างแต่ละชนิด ทำให้พบว่า *P.falciparum* มี สายวิวัฒนาการที่ใกล้เคียงกับ *P.galinaceum* ซึ่งเป็นเชื้อมาลาเรียที่พบในนก (60) ซึ่งการ วิเคราะห์ดังกล่าวนั้นเป็นการวิเคราะห์โดยใช้ยีน small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) ดังนั้น *P.falciparum* อาจเกิดขึ้นจากการวิวัฒนาการข้ามโฮสต์ของเชื้อมาลาเรียที่พบในนกมาสู่คน นอกจากนี้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ SSU rRNA, CSP, STARP พบว่าสาย วิวัฒนาการของ *P.falciparum* จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อมาลาเรียที่พบในลิงชิมแปนซีคือ *P.reichenowi* (20,61,62) สำหรับเชื้อ *P.vivax* จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อมาลาเรียที่ทำให้เกิดโรค ในลิง macaque ได้แก่ *P.simum*, *P.inui*, *P.knowlesi* และ *P.cynomolgi* (61)

จากการศึกษาดังกล่าวได้แสดงความสัมพันธ์ของสายวิวัฒนาการของเชื้อมาลาเรียที่ทำให้ เกิดโรคในคน พบว่าในแต่ละชนิดมีอายุสายวิวัฒนาการที่แตกต่างกัน โดย *P.vivax* และ *P.malariae* มีสายวิวัฒนาการที่ใกล้เคียงกันมากกว่า *P.falciparum* สำหรับ *P.ovale* แม้ว่าจะมี ต้นกำเนิดของสายวิวัฒนาการแตกต่างจากทั้ง 3 ชนิด แต่มีระยะเวลาของวิวัฒนาการที่ใกล้เคียง กับ *P.vivax* มากกว่า *P.falciparum* และ *P.malariae* (62)

จากการศึกษาโครโมโซมของเชื้อมาลาเรีย โดยวิธีการแยกโดยใช้กระแสไฟฟ้าเป็นห่วง (pulse field gel electrophoresis) พบว่า *P.falciparum* ประกอบด้วยโครโมโซมทั้งหมด 14 แท่ง จากการวัดขนาดจีโนมของเชื้อมาลาเรียชนิด *P.falciparum* และ *P.berghei* โดยวิธี

cytofluorimetry, reassociation kinetics และ purification yield plus field electrophoresis พบว่ามีขนาดจีโนมประมาณ $2-4 \times 10^7$ bp ต่อจีโนม haploid (63) โดยแต่ละโครโมโซมมีขนาดแตกต่างกันและโครโมโซมเดียวกันในสายพันธุ์ที่ต่างกันก็จะมีขนาดแตกต่างกัน ซึ่งมีขนาดตั้งแต่ 800 – 3500 kb สำหรับโครโมโซมในสายพันธุ์เดียวกัน ถึงแม้ว่าระยะการเจริญเติบโตจะแตกต่างกันแต่จำนวนโครโมโซมนั้นเท่ากัน โดยจำนวนโครโมโซมเกือบทุกระยะของการเจริญเติบโตส่วนใหญ่จะมีเพียงชุดเดียว (haploid) ซึ่งได้แก่ระยะเมอริโรซอยต์ แกมมีโตไซต์ แกมมีต และสปอโรซอยต์ ยกเว้นระยะเดียวที่มีจำนวนโครโมโซมสองชุดคือ ระยะไซโกต (64)



รูปที่ 5 แสดงจำนวนชุดโครโมโซมที่พบในวงชีวิตของเชื้อมาลาเรีย (65)

จากการศึกษาลำดับเบสของจีโนมของเชื้อมาลาเรียชนิดต่างๆ จะมีองค์ประกอบของเบส adenine (A) และ thymine (T) สูงถึงร้อยละ 70-80 โดย *P.falciparum* มีองค์ประกอบของเบส A และ T ร้อยละ 82 (66) ในขณะที่เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอของ *Escherichia coli* มีองค์ประกอบของ A และ T ใกล้เคียงกับ guanine (G) และ cytosine (C) โดยองค์ประกอบของ A และ T พบได้มากในบริเวณที่ไม่ได้สร้างโปรตีน (noncoding region) สูงถึงร้อยละ 80-90 (67,68) สำหรับในบริเวณที่มีการสร้างโปรตีน(coding region) พบร้อยละ 70 ดังนั้นคุณลักษณะดังกล่าวอาจแสดงให้เห็นว่าบริเวณใดเป็นบริเวณที่มีการสร้างโปรตีน และยังมีผลต่อการใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะภายใน (restriction endonucleases) ตัดดีเอ็นเอของเชื้อมาลาเรียแตกต่างจากดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตอื่นๆ

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สร้างแอนติเจนต่างๆ พบว่าส่วนใหญ่มีองค์ประกอบของลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำกันเป็นชุด (tandem DNA repeat) โดยมีเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่ไม่มีดีเอ็นเอที่มีลำดับซ้ำกันเลย นอกจากนี้องค์ประกอบและจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำกันเป็นชุดของสายพันธุที่แตกต่างกันก็มักจะต่างกันด้วย เช่นลักษณะโครงสร้างในบริเวณปลายสุดของโครโมโซมทั้ง 2 ข้าง (telomere) มีองค์ประกอบของเบสในลำดับนิวคลีโอไทด์เรียงซ้ำกันเป็นชุดๆ ติดต่อกัน ประกอบด้วย GGGTT(T/C)A หรือเรียกว่า G-rich tandem repeats (69) ซึ่งบริเวณดังกล่าวอาจมีบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมในขณะที่เซลล์กำลังแบ่งตัวแบบไมโอซิส (meiosis) ทำให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการเรียงตัวซ้ำกันมีโอกาสเกิดการเปลี่ยนแปลงมากกว่าบริเวณที่ไม่มีการเรียงซ้ำกัน (70) ซึ่งยีนที่มีบริเวณดังกล่าวอาจมีส่วนในการสร้างแอนติเจนที่ทำให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของโฮสต์ที่ไม่มีประสิทธิภาพ (ineffective immune response) ทำให้เชื้อมาลาเรียไม่ถูกทำลายไปจากระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์

วัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย

ปัญหาสำคัญที่เป็นอุปสรรคในการรักษาป้องกันและควบคุมโรค คือการดื้อยาหลายชนิดของเชื้อมาลาเรียในเขตพื้นที่ก่อโรค และยุงก้นปล่องที่เป็นพาหะนำโรคสามารถปรับตัวให้มีความทนทานต่อยาฆ่าแมลง ดังนั้นมาตรการอันหนึ่งที่น่าจะมีประโยชน์ในการควบคุมการแพร่กระจายของโรคมาลาเรียคือ การผลิตวัคซีนสำหรับป้องกันโรคมาลาเรีย (3) แต่เนื่องจากเชื้อมาลาเรียมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและระยะต่างๆ ระหว่างการเจริญเติบโตในวงชีวิต รวมทั้งโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นในแต่ละระยะมีความแตกต่างกัน ส่งผลให้คุณสมบัติการเป็นแอนติเจนส่วนใหญ่มีความจำเพาะสำหรับเชื้อมาลาเรียแต่ละระยะ ดังนั้นภูมิคุ้มกันที่สร้างขึ้นมักมีความจำเพาะสำหรับ

แต่ละระยะของเชื้อมาลาเรียเช่นกันเช่น ภูมิคุ้มกันต่อระยะสปอร์โซอยต์จะไม่มีผลต่อระยะ เมอร์โรซอยต์เป็นต้น (71)

ดังนั้นแนวทางการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียจึงต้องคำนึงถึงคุณลักษณะดังกล่าว โดยสามารถแบ่งชนิดของวัคซีนตามเป้าหมายในการยับยั้งหรือทำลายเชื้อมาลาเรียตามระยะในวงชีวิตของเชื้อมาลาเรีย

1. วัคซีนป้องกันมาลาเรียในระยะก่อนที่เชื้อจะเข้าสู่เม็ดเลือดแดง (pre-erythrocytic stage vaccine) วัตถุประสงค์คือ เพื่อป้องกันสปอร์โซอยต์เข้าสู่เซลล์ตับและยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียในเซลล์ตับ โปรตีนที่สำคัญได้แก่ circumsporozoite protein (CSP) (7), thrombospondin related adhesive protein (TRAP) (42), sporozoite threonine asparagine rich protein (STARP) (17), liver-stage-specific antigen 1, 2 และ 3 (LSA 1,2,3) (19) เป็นต้น

2. วัคซีนป้องกันมาลาเรียระยะที่เจริญในเม็ดเลือดแดง (asexual erythrocytic stage vaccine) วัตถุประสงค์คือ เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียและป้องกันการบุกรุกของเชื้อมาลาเรียเข้าสู่เม็ดเลือดแดง โปรตีนที่สำคัญได้แก่ merozoite surface protein 1, 2, 3 (MSP 1, 2, 3) (47,48,72), apical membrane protein 1 (AMA1) (73), ring-infected erythrocyte surface antigen (RESA) (74) เป็นต้น

3. วัคซีนป้องกันการแพร่กระจายเชื้อมาลาเรียระยะที่มีการสืบพันธุ์โดยอาศัยเพศ (sexual stage vaccine) วัตถุประสงค์คือ เพื่อสร้างภูมิคุ้มกันต้านทานยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์สืบพันธุ์ของเชื้อมาลาเรียในยุงพาหะกล่าวคือผู้ที่ได้รับวัคซีนจะไม่มีภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อมาลาเรีย แต่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียที่อยู่ในยุงพาหะ โดยผู้ที่ได้รับวัคซีนร่างกายจะมีการสร้างแอนติบอดีตอบสนองต่อเชื้อมาลาเรียในระยะที่มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ดังนั้นยุงที่กัดผู้ได้รับวัคซีนจะไม่สามารถกระจายเชื้อไปสู่ผู้อื่นได้ Pfs230 (75), Pfs25 (76), Pfs28 (77) เป็นต้น

อย่างไรก็ตาม วัคซีนป้องกันมาลาเรียที่มีประสิทธิภาพจึงควรครอบคลุมเชื้อในหลายๆ ระยะพร้อมกัน เพื่อป้องกันการหลุดรอดจากการทำลายของภูมิคุ้มกันของร่างกายเมื่อเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงระยะของการเจริญเติบโต สำหรับโปรตีนในระยะก่อนที่เชื้อจะเข้าสู่ระยะเม็ดเลือดแดงนั้นเป็นระยะแรกที่เชื้อมาลาเรียเข้าสู่ร่างกายของคน ซึ่งมีบทบาทมากที่สุดอย่างหนึ่งในการพิจารณาเป็นองค์ประกอบของวัคซีนป้องกันเชื้อมาลาเรีย

Circumsporozoite protein

เป็นโปรตีนที่พบมากที่สุดบนผิวของระยะสปอโรซอยต์ซึ่งทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยสปอโรซอยต์ที่ผ่านการฉายรังสีเอ็กซ์ ปฏิกิริยาดังกล่าวทำให้ CSP หลุดลอกออกจากผิวของระยะสปอโรซอยต์ โดยการเกิด cross-linking กับแอนติบอดี (78) ทำให้สปอโรซอยต์ตายในที่สุด (7) จากการศึกษา CSP สำหรับเชื้อมาลาเรียของหนู ลิง และคน พบว่าแม้โปรตีนเหล่านี้จะมีน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน โดยมีน้ำหนักตั้งแต่ 40-79 กิโลดาลตัน แต่พบว่า CSP มีโครงสร้างโดยทั่วไปคล้ายกันกล่าวคือด้าน N-terminus และ C-terminus ของโปรตีนประกอบด้วยบริเวณที่มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกันระหว่าง CSP ของเชื้อมาลาเรียต่างสปีชีส์กัน เรียกว่า region I และ region II ตามลำดับ (8) สำหรับบริเวณส่วนกลางของโปรตีนประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโนเรียงตัวซ้ำกันเป็นชุด (repeat) ซึ่งใน CSP ของ *P.falciparum* ประกอบด้วยกรดอะมิโน 4 ตัวเรียงตัวซ้ำกันเป็นชุด (tetrapeptide repeats) โดยส่วนใหญ่ประกอบด้วยกรดอะมิโน asparagine, alanine, asparagine และ praline (NANP) และส่วนน้อยประกอบด้วยกรดอะมิโน asparagines, valine, glutamic acid และ praline (NVDP) โดยจำนวนชุดของลำดับกรดอะมิโน NANP และ NVDP มีความแตกต่างกันตามสายพันธุ์ของเชื้อ เช่น จากการศึกษาตัวอย่างเชื้อ *P.falciparum* จากผู้ป่วยในประเทศไทยพบจำนวน tetrapeptide repeats ตั้งแต่ 40-51 หน่วย แตกต่างตามสายพันธุ์ของเชื้อ (14)

บริเวณ repeats ใน CSP ของ *P.falciparum* ประกอบด้วย B cell epitope ซึ่งแอนติบอดีต่อบริเวณดังกล่าวสามารถยับยั้งการลุกลามของสปอโรซอยต์เข้าสู่เซลล์ตับในการทดลองได้ (10) และยับยั้งความสามารถในการเป็นระยะติดต่อกันของสปอโรซอยต์ของ *P.falciparum* และ *P.vivax* (11) นอกจากนี้แอนติบอดีชนิดโคลนเดี่ยว (monoclonal antibody) ต่อ repeats ของ CSP ของ *P.berghei* เมื่อฉีดเข้าหนูทดลองพบว่าสามารถป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียชนิดเดียวกันได้ (79) แอนติบอดีนี้อาจทำหน้าที่ปิดกั้นตัวจับ (ligand) และตัวรับ (receptor) ระหว่างสปอโรซอยต์กับเซลล์ตับ (39) หรือทำให้สปอโรซอยต์ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ (80)

แม้ว่าแอนติบอดีต่อ tetrapeptide repeats ใน CSP ของ *P.falciparum* สามารถยับยั้งการลุกลามของสปอโรซอยต์เข้าสู่เซลล์ตับและมีความสัมพันธ์กับการเกิดภาวะภูมิคุ้มกันต่อเชื้อมาลาเรียจากการทดลองในอาสาสมัคร แต่ในธรรมชาติกลับพบว่าผู้ที่อยู่ในเขตปรากฏโรคมาลาเรียส่วนใหญ่มีแอนติบอดี repeats และยังคงติดเชื้อมาลาเรียได้เช่นเดียวกับผู้ที่ไม่มียแอนติบอดี แสดงว่าแอนติบอดีดังกล่าวยังไม่เพียงพอต่อการป้องกันโรคมาลาเรียได้ในธรรมชาติ (81)

Sporozoite threonine-asparagine-rich protein

บนผิวของระยะสปอโรไซซอइटของเชื้อมาลาเรียชนิด *P.falciparum* มีโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบอยู่หลายชนิด ซึ่งนอกจากจะพบโปรตีน CSP แล้วยังมีโปรตีนอีกชนิดหนึ่งที่มีความสามารถในการเป็น candidate vaccine โปรตีนดังกล่าวคือ sporozoite threonine-asparagine-rich protein จากการศึกษพบว่า STARP เป็นโปรตีนที่พบบนผิวของระยะสปอโรไซซอइट, ระยะที่เชื้อมาลาเรียเริ่มเจริญในเซลล์ตับ และระยะเริ่มต้นก่อนเข้าเม็ดเลือดแดง โดยมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 78 กิโลดาลตัน มีขนาดความยาวของยีนประมาณ 2.7 กิโลเบส โดยมีโครงสร้างคือ มีบริเวณ exon และมีบริเวณ intron คั่นกลางขนาด 175 bp ที่มี typical consensus splice donor/acceptor sites ทางด้าน 5' และ 3' มีส่วนที่เป็น non-repetitive region และในส่วนของกลาง มีส่วน repetitive region ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ mosaic (M) region, Rp45 region เป็นบริเวณที่มี repeat ที่มีกรดอะมิโนซ้ำกันชุดละ 45 ตัว มีทั้งหมด 2 ชุด และ Rp10 region ประกอบด้วย repeat ที่มีกรดอะมิโน 10 ตัว เรียงซ้ำกันประมาณ 26 ชุด (17) ดังแสดงใน รูปที่ 6

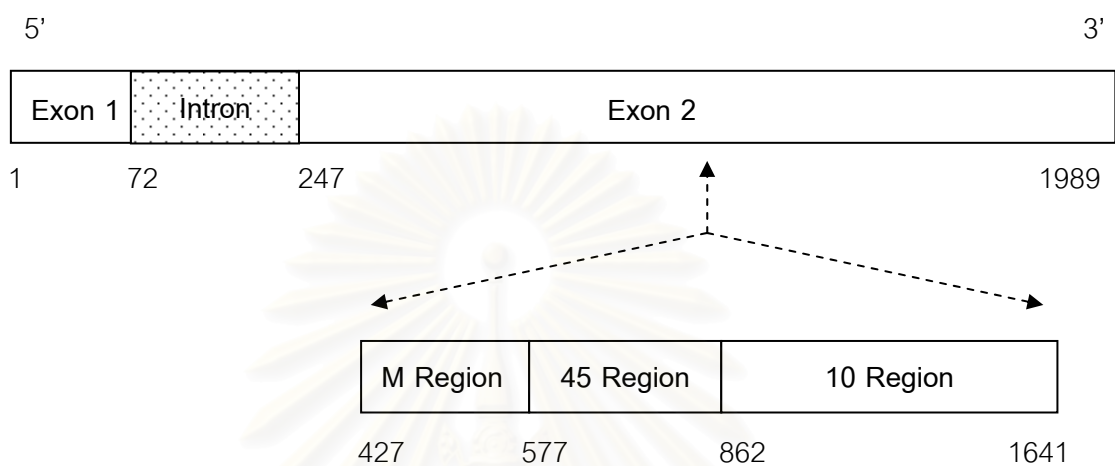
ลำดับเบสของยีน STARP ประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิด asparagine ร้อยละ 25.2 และ threonine ร้อยละ 19.3 ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่พบมากที่สุดในการถอดรหัสยีน STARP เนื่องจากส่วนประกอบที่เป็นกรดอะมิโนดังกล่าวทำให้โปรตีนนี้มีจำนวนของ N-linked glycosylation (Asn-X-Ser/Thr) site ปริมาณสูงมากถึง 38 พันธะจากทั้งหมด ลำดับของกรดอะมิโนจากปลาย N-terminus จะมีส่วนไร้ประจุและ hydrophobic ซึ่งส่วนที่มีประจุบวกสั้นๆ อยู่หน้าหน้าและมีส่วนที่มีขั้วและประจุอยู่ตามหลัง ส่วนต่างๆดังกล่าวนี้ได้แสดงบทบาทเป็น signal sequence peptide (82) และยังมีส่วนที่เป็น hydrophobic อีกส่วนอยู่ที่ปลาย C-terminus ซึ่งเป็นส่วนไร้ประจุและ hydrophobic สั้นๆ 2 ส่วน

บริเวณ Rp45 region และ Rp10 region จะมีส่วนเหลื่อมล้ำกันอยู่ ซึ่งบริเวณ Rp45 region นั้นส่วนซ้ำทั้งสองจะถูกรักษาสภาพไว้อย่างสมบูรณ์ในระดับกรดอะมิโนและนิวคลีโอไทด์ ในทางตรงกันข้ามส่วนซ้ำใน Rp10 region นั้นจะมีความยาวแตกต่างกัน อีกทั้งมีการแทนที่และขาดหายอย่างมีลำดับของกรดอะมิโน โดยมี 24 - 26 ส่วนซ้ำ ลำดับซ้ำดังกล่าวนี้อาจเป็นเพราะ กำบังต่อ epitope ที่เกี่ยวข้องก็เป็นได้ในรูปแบบที่คล้ายคลึงกับ gametocyte-specific antigen Pf11-1 (83) ทั้งๆที่มีการแทนที่และขาดหายไปของกรดอะมิโน แต่ส่วนใหญ่บริเวณ Rp10 นั้นก็ยังคงโครงสร้าง β -turn structure ซึ่งเป็นตัวบอกถึงข้อจำกัดทางโครงสร้างมากกว่าที่เป็นโครงสร้างขั้นปฐมภูมิ ที่อาจจะเกิดกระบวนการต่างๆได้บนบริเวณนี้ เหมือนกับโปรตีน CSP ซึ่งมี repeat variant ที่เหมาะกับการคงโครงสร้าง β -turn structure ซึ่งมีอยู่เป็นปกติใน NANP

repeats จากการศึกษา immunofluorescence assay (IFA) และ immunoelectron microscopy (IEM) ซึ่งใช้แอนติบอดีของหนูและมนุษย์มาตรวจสอบ STARP ซึ่งเกี่ยวข้องกับแอนติเจนที่ผิว พบว่ามีการกระจายของโปรตีนที่ผิวผิดปกติไปซึ่งต่างจากการกระจายตัวของ CSP และ sporozoite antigen อื่นๆที่มักจะอยู่แยกจากกันบนพื้นผิวอย่างชัดเจน อย่างไรก็ตาม STARP ก็ยังแตกต่างจาก TRAP ตรงที่ได้ผลบวกโดย IFA ที่ใช้ anti-STARP antibodies (84) ดังนั้นการแสดงผลของ STARP อย่างคงที่อาจจะให้เป้าหมายที่มีประสิทธิภาพสำหรับ sporozoite-specific antibodies อย่างไรก็ตามขอบเขตความหลากหลายของยีนดังกล่าว ยังไม่ทราบชัดเจนเนื่องจากปัจจุบันมีข้อมูลลำดับเบสของยีนดังกล่าวจาก 3 ตัวอย่างเท่านั้น (17) แม้ว่าจะมีการศึกษาความหลากหลายของยีน STARP จากตัวอย่างที่ได้จากเขตปรากฏโรคบางแห่ง แต่การศึกษาดังกล่าวเป็นการตรวจสอบเพียงขนาดความยาวของยีนเท่านั้น (20) ซึ่งไม่สามารถบอกความแตกต่างในระดับกรดอะมิโนได้

สำหรับหน้าที่ของโปรตีน STARP ต่อระยะสปอริโซอิตนั้นยังไม่ทราบชัดเจน แต่จากการศึกษาผลของแอนติบอดีต่อ STARP ในบริเวณ Rp10 กับการลุกลามของระยะสปอริโซอิตเข้าสู่เซลล์ตับนั้นพบว่า แอนติบอดีดังกล่าวสามารถยับยั้งการลุกลามของสปอริโซอิตได้อย่างมีประสิทธิภาพถึงร้อยละ 48 - 90 ซึ่งมีค่าสูงกว่าผลของแอนติบอดีต่อ CSP ในการยับยั้งระยะสปอริโซอิตไม่ให้เข้าสู่เซลล์ตับ และยังพบว่าความสามารถในการยับยั้งการลุกลามดังกล่าวของแอนติบอดีต่อ STARP มีความแปรผันโดยตรงกับปริมาณแอนติบอดี (21) และจากการทดลองใช้ synthetic peptide จากส่วนต่างๆ ของโปรตีน STARP เพื่อทำการเกาะติดกับเซลล์ตับในหลอดทดลองพบว่า synthetic peptide อย่างน้อย 12 ชนิด สามารถเกาะติดกับเซลล์ตับได้ดีมาก โดยพบว่า peptide เหล่านี้พบได้ทั้งส่วน N-terminus บริเวณส่วนกลางที่มี repeat และทางด้าน C-terminus โดยพบเป็นจำนวน 3, 7 และ 2 ตำแหน่ง ตามลำดับ ทำให้สันนิษฐานว่าแอนติบอดีต่อบริเวณ Rp10 มีความสำคัญต่อการยับยั้งสปอริโซอิตของ *P.falciparum* เข้าสู่เซลล์ตับ (22)

การศึกษาศักยภาพของ STARP ในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีนนั้น พบว่าเมื่อใช้ synthetic peptide ที่ผนวกส่วนของ STARP เข้ากับส่วนของ LSA 1, LSA 3 และ SALSA พบว่า peptide ดังกล่าวสามารถกระตุ้นทั้ง T cell และ B cell ได้ดีรวมทั้งยังมีความจำเพาะต่อโปรตีนเหล่านี้ที่อยู่บนผิวของสปอริโซอิต และระยะเริ่มแรกที่เชื้อมาลาเรียเจริญในเซลล์ตับทั้งในกรณีที่ใช้ลิง *Aotus* (23) และลิง chimpanzee (24) ในการทดลอง นอกจากนี้ยังพบ cytotoxic T cell epitope ใน STARP ซึ่งน่าจะเป็นเป้าหมายสำคัญต่อกระบวนการทำลายเชื้อมาลาเรียที่อยู่ในเซลล์ตับต่อไป (25) ดังนั้นจึงเป็นการสันนิษฐานว่า STARP มีส่วนสำคัญในขั้นตอนการเกาะติดของสปอริโซอิตกับเซลล์ตับในกระบวนการลุกลามเข้าสู่เซลล์ตับ อีกทั้งบางบริเวณ epitope ต่อโปรตีน STARP สามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อการผลิตวัคซีนป้องกันเชื้อมาลาเรียได้



รูปที่ 6 แสดงโครงสร้างของยีน STARP ใน *P.falciparum*

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย

เป็นการศึกษาเชิงพรรณนา (descriptive study)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน STARP ในเชื้อ *Plasmodium falciparum* จากตัวอย่างในประเทศไทย
2. เพื่อวิเคราะห์การแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ ในแต่ละตำแหน่งของอัลลีลที่แตกต่างกัน และในระดับกรดอะมิโน

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

ประชากรเป้าหมาย (target population) คือ ผู้ป่วยมาลาเรียที่มารับบริการตรวจรักษา ณ หน่วยควบคุมโรคติดต่อ นำโดยแมลง ในจังหวัดตาก และจังหวัดกาญจนบุรี

ประชากรตัวอย่าง (population sample) คือ กลุ่มตัวอย่างเลือด (whole blood) ที่เก็บมาจากประชากรเป้าหมาย

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (polymerase chain reaction) เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะส่วนอย่างจำเพาะในหลอดทดลอง โดยอาศัยเอนไซม์จำเพาะเป็นตัวเร่งการเกิดปฏิกิริยา ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

การตรวจฟิล์มเลือดหนา (thick blood film) คือ การตรวจวินิจฉัยด้วยการย้อมสีเลือดบนกระจกสไลด์ การย้อมลักษณะนี้จะไม่เห็นเม็ดเลือดแดง ทำให้พบเชื้อมาลาเรียได้ง่ายกว่าแต่บางครั้งไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นเชื้อมาลาเรียชนิดใด จำเป็นที่ต้องเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจฟิล์มเลือดบาง

การตรวจฟิล์มเลือดบาง (thin blood film) คือ การตรวจวินิจฉัยด้วยการย้อมสีเลือดบนกระจกสไลด์ การย้อมลักษณะนี้จะมีการตรึงด้วย absolute methanol ก่อนที่จะนำไปย้อมสี เพื่อให้ให้เห็นเม็ดเลือดแดง ดังนั้นจึงสามารถวินิจฉัยโดยใช้ลักษณะของเม็ดเลือดแดงและตัวเชื้อมาลาเรียเปรียบเทียบกันได้

ขนาดของกลุ่มประชากร

การคำนวณตัวอย่างอาศัยข้อมูลด้านระบาดวิทยาจากรายงานประจำปี พ.ศ. 2548 ของสำนักงานโรคติดต่อฯ โดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข พบว่ามีอัตราการติดเชื้อมาลาเรียในจังหวัดตาก ร้อยละ 1.27 ดังนั้นจึงกำหนดให้

ผู้ป่วยมีอัตราการติดเชื้อมาลาเรียในจังหวัดตาก 1.27% ($P = 0.0127$)

และกำหนดให้มีค่าความคลาดเคลื่อนได้ไม่เกิน 5% ($d = 0.05$)

กำหนดให้ระดับความเชื่อมั่นในการสรุปข้อมูล 95%

$$\text{สูตร } Z_{\alpha/2} = Z_{0.05/2} = 1.96 \text{ (two tail)}$$

$$P = \text{อัตราการเกิดโรค} = 0.0127$$

$$Q = 1 - 0.0127 = 0.987$$

$$d = \text{acceptable error} = 0.05$$

$$n = \text{ขนาดตัวอย่าง}$$

$$\text{แทนค่าสูตร } n = Z^2_{\alpha/2} PQ/d^2$$

$$n = (1.96)^2 (0.0127)(0.987)/(0.05)^2$$

$$n = 20 \text{ คน}$$

แต่เนื่องจากเพื่อให้การวิเคราะห์ข้อมูลที่มีความถูกต้องมากขึ้น จึงทำการศึกษาตัวอย่างประชากร 50 ตัวอย่าง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

อุปกรณ์

เครื่องปั่นความเร็วสูงที่ควบคุมอุณหภูมิและเวลาได้ (high speed refrigerated microcentrifuge, Tomy)

เครื่องปั่นความเร็วสูงขนาดเล็ก

เครื่องชั่งน้ำหนักละเอียดอ่านค่าได้ทศนิยม 4 ตำแหน่ง

ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส

ตู้เย็น -80 องศาเซลเซียส

ไมโครปิเปตต์อัตโนมัติ (automatic adjustable micropipette) ขนาด 10, 100 และ 1,000 ไมโครลิตร

เครื่อง laminar flow

กล้องจุลทรรศน์

เครื่องควบคุมอุณหภูมิและเวลาอัตโนมัติ (PCR cycle)

เครื่องแยกแถบดีเอ็นเอโดยกระแสไฟฟ้า

เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง

ตู้ปลอดเชื้อ

ตู้เลี้ยงเชื้อพร้อมเครื่องเขย่า

ตู้อบสำหรับเพาะเชื้อ

ตู้อบแห้ง

หม้อนึ่งปลอดเชื้อภายใต้ความดันและอุณหภูมิสูง

หน้ากากกันแสงอุลตราไวโอเล็ต

แหล่งกำเนิดแสงอุลตราไวโอเล็ต

กล้องถ่ายภาพดิจิทัล

เครื่องยิงกระแสไฟฟ้า (*E.coli* pulser)

นาฬิกาจับเวลา

อ่างน้ำรับอุณหภูมิ

เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า

เครื่องไมโครเวฟ

วัสดุ

กระจกสไลด์ ขนาด 2.5 x 75 เซนติเมตร

กระบอกฉีดน้ำ

กระบอกตวง ขนาด 10, 50, 100 และ 1000 มิลลิลิตร

กล่องโฟมใส่น้ำแข็ง

กระดาษติดฉลาก

กล่องพลาสติก

ขวดสำหรับใส่สารเคมี

ถุงมือยาง

ถุงพลาสติก

ที่วางหลอดทดลอง สำหรับหลอดขนาด 0.5 และ 1.5 มิลลิลิตร

แท่งแก้วสำหรับคน

ปิเกตอร์ ขนาด 10, 50, 100, 200, 500, 1000 มิลลิลิตร

ปิเปตต์ทิพ (pipette tip) ขนาด 10, 100, 1000 ไมโครลิตร

พาราฟิล์ม

ไม้จิ้มฟัน

หลอดทดลองขนาดเล็กชนิดมีฝาปิด (microtube) ขนาด 0.1, 0.5, 1.5 มิลลิลิตร

แผ่นพลาสติกอย่างบาง

สำลี

หนังยาง

สารเคมี

1. สารเคมีทั่วไป

absolute ethanol

absolute methanol

agarose

agarose, low gelling temperature

cleaning solution

disodium ethylenediamine tetracetic acid (EDTA)

disodium hydrogen phosphate

sodium oxaloacetate

double distilled water

ethidium bromide

giemsa stain

glycerol

mineral oil

2. สารเคมีที่เป็น Reagent Kit

QIAGEN DNA Extraction Kit

QIAGEN PCR Reagent Kit

QIAGEN DNA Purification Kit

ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit

3. เอนไซม์

proteinase K

LA *Taq* polymerase

T4 DNA ligase

4. Oligonucleotides

STARPF0 : 5'-CATAAGAAAATCTTTATACCACCAG-3'

STARPR0 : 5'-TTAGTACATAAAAACACTACATATAG-3'

STARPF1 : 5'-CACAGGCACAAAGGAAACAG-3'

STARPR1 : 5'-GTATTAGTATTATCCGTGGTTGTTG-3'

5. ดีเอ็นเอมาตรฐาน

λ /Hind III marker

การเก็บตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างเลือดโดยใช้วิธีเจาะจากหลอดเลือดดำที่แขนปริมาตร 3 มิลลิลิตร เก็บในหลอดที่มีสารกันเลือดแข็งตัวคือ ethylene diamine tetracetic acid (EDTA) นำตัวอย่างเลือดดังกล่าวเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิประมาณ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปสกัดดีเอ็นเอ ซึ่งนำแต่ละตัวอย่างมาทำการตรวจวินิจฉัยโดยการย้อมฟิล์มเลือดชนิดหนาและบางด้วยสีิมซ่าแล้วตรวจหาเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่ห้องปฏิบัติการของภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อตรวจแยกชนิด ปริมาณเชื้อมาลาเรีย

การนับจำนวนเชื้อ

วิธีการตรวจฟิล์มเลือดบาง (thin blood film)

หยดเลือดประมาณ 1-2 ไมโครลิตร ลงบนสไลด์กระจกที่สะอาด โดยหยดเลือดอยู่ห่างจากปลายด้านหนึ่งของสไลด์ ทำการไถเลือดที่หยดไว้ด้วยปลายสไลด์อีกแผ่นหนึ่งที่มีขอบเรียบโดยแตะปลายดังกล่าวที่หยดเลือดทำมุมเอียงกับแผ่นสไลด์ที่มีเลือดหยดประมาณ 30-45 องศา เลื่อนสไลด์สำหรับไถถอยหลังให้ขอบด้านหนึ่งแตะกับหยดเลือด แล้วทำการไถเลือดด้วยความเร็วสม่ำเสมอไปในทิศทางตรงข้ามกับตำแหน่งที่หยดเลือดไว้ในตอนแรก รอให้ฟิล์มเลือดแห้งสนิท จากนั้นนำไปตรึงด้วย absolute methanol เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งไว้ให้แห้งสนิท จากนั้นนำไปย้อมสีในอัตราส่วนสีิมซ่า 1 ส่วน ต่อ บัฟเฟอร์ 20 ส่วน เป็นเวลา 30 นาที จึงล้างสีออกด้วยน้ำประปา ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

วิธีการนับจำนวนเชื้อ

ใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย objective lens 40x เลื่อนหาบริเวณที่เม็ดเลือดแดงมีการกระจายตัวสม่ำเสมอและเรียงตัวกันเป็นชั้นเดียว โดยปกติแล้วจะพบในบริเวณส่วนปลายของฟิล์มเลือด จากนั้นเปลี่ยนกำลังขยายเป็น objective lens 100x นับจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมดที่พบใน 3 วงกล้อง คำนวณหาจำนวนวงกล้องที่จะพบเม็ดเลือดแดงทั้งหมด 10,000 เซลล์ แล้วนับจำนวนเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อมาลาเรียต่อเม็ดเลือดแดงทั้งหมด 10,000 เซลล์ โดยนับจำนวนเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อมาลาเรียที่พบในวงกล้องเท่ากับจำนวนวงกล้องที่คำนวณได้ แล้วคำนวณเป็นค่าร้อยละ ตัวอย่างเช่น นับจำนวนเม็ดเลือดแดงในวงกล้อง 3 วงกล้องได้เท่ากับ 990 เซลล์ จำนวนวงกล้องที่จะพบเม็ดเลือดแดงทั้งหมด 10,000 เซลล์เท่ากับ $10,000 \times 3/990$ เท่ากับ 30 วงกล้อง ดังนั้นจะต้องนับจำนวนเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อที่พบใน 30 วงกล้อง สมมุติว่านับ

จำนวนเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อเท่ากับ 50 เซลล์ต่อเม็ดเลือดแดงทั้งหมด 10,000 เซลล์ คิดเป็นอัตรา การติดเชื้อในเลือดของผู้ป่วยรายนี้เท่ากับร้อยละ 0.50

วิธีการตรวจฟิล์มเลือดชนิดหนา (thick blood film)

การย้อมฟิล์มเลือดชนิดหนาวิธีนี้คล้ายกับวิธีการย้อมฟิล์มเลือดชนิดบาง ยกเว้น ขั้นตอนการตรึงด้วย absolute methanol ซึ่งไม่ต้องใช้สำหรับการย้อมฟิล์มเลือดชนิดหนา เนื่องจากต้องการให้เม็ดเลือดแดงแตกในระหว่างขั้นตอนการย้อม ซึ่งมีขั้นตอนคือ หยดเลือด ประมาณ 3-5 ไมโครลิตร โดยหยดลงที่จุดศูนย์กลางของสไลด์ ทำการเกลี่ยเลือดให้เป็นวงโดยใช้ มุมของสไลด์อีกแผ่นหนึ่ง โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.5-2 เซนติเมตร เมื่อเลือดแห้งสนิท แล้วจึงนำไปย้อมด้วยสีย้อมฆ่าในอัตราส่วนเช่นเดียวกับวิธีการย้อมสีชนิดบาง ซึ่งต้องระวังไม่ให้ ฟิล์มเลือดนั้นหนามากจนเกินไปเพราะจะทำให้การติดสีไม่ดีอาจหลุดลอกออกจากสไลด์ในขั้นตอน การย้อมสี ในทางตรงข้ามถ้าฟิล์มเลือดบางเกินไปจะทำให้เสียเวลาในการตรวจหาเชื้อมาลาเรีย ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์

วิธีการนับจำนวนเชื้อ

ใช้อกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย objective lens 40x เลื่อนหาเม็ดเลือดขาวใน บริเวณที่มีการกระจายตัวสม่ำเสมอ แล้วเปลี่ยนกำลังขยาย objective lens เป็น 100x นับจำนวน เชื้อมาลาเรียต่อเม็ดเลือดขาว 200 ตัว แล้วสามารถคำนวณหาเชื้อต่อเลือด 1 มิลลิลิตร โดย ค่าเฉลี่ยเม็ดเลือดขาวเท่ากับ 8,000 เซลล์ต่อเลือด 1 ไมโครลิตร ตัวอย่างเช่น นับจำนวนเชื้อ มาลาเรียในแต่ละวงกล้องพบจำนวนเชื้อมาลาเรีย 100 ตัวต่อเม็ดเลือดขาว 200 ตัว ถ้าประมาณ ว่าเลือด 1 ไมโครลิตร มีเม็ดเลือดขาวเฉลี่ยประมาณ 8,000 ตัว ดังนั้นความหนาแน่นของเชื้อ มาลาเรียในเลือด มีจำนวนประมาณ 4,000 ตัว

การสกัดดีเอ็นเอ

1. ทำการสกัดโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอของบริษัท QIAGEN โดยนำเลือด 20 ไมโครลิตร มาเติมบัฟเฟอร์ ATL 160 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน
2. เติม Proteinase K 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส ประมาณ 12 ชั่วโมง หรือจนกว่าจะละลาย
3. นำหลอดที่บ่มไว้มาเติมบัฟเฟอร์ AL 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
4. เติม เอทานอล (96-100%) 200 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน

5. ดูดสารละลายในหลอด ใส่ลงใน QIAamp Spin Column แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 8000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นจึงนำ QIAamp Spin Column มาใส่ใน collection tube หลอดใหม่

6. เติมน้ำฟเฟออร์ AW1 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 8000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นจึงนำ QIAamp Spin Column มาใส่ใน collection tube หลอดใหม่

7. เติมน้ำฟเฟออร์ AW2 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 14000 rpm เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นจึงนำ QIAamp Spin Column มาใส่ใน collection tube หลอดใหม่แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 14000 เป็นเวลา 1 นาที

8. นำ QIAamp Spin Column มาใส่ใน collection tube หลอดใหม่ เติมน้ำฟเฟออร์ AE แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 8000 rpm เป็นเวลา 1 นาที

9. ดูดดีเอ็นเอที่ได้เก็บไว้ในหลอดทดลองขนาดกลาง 0.5 มิลลิลิตร นำดีเอ็นเอที่สกัดได้เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็น template สำหรับทำ PCR ต่อไป

การออกแบบ oligonucleotides สำหรับใช้เป็น PCR Primer

การออกแบบ Primer โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ sporozoite threonine-asparagines-rich protein หรือ STARP เป็นต้นแบบ ซึ่งใช้ข้อมูลอ้างอิงจาก www.ncbi.nlm.nih.gov หมายเลข Z 26314 ของ *P. falciparum* (clone T9/96) ทำการออกแบบ primer โดยคำนวณจากสูตรอุณหภูมิหลอมตัว (Melting temperature, T_m) ของ primer

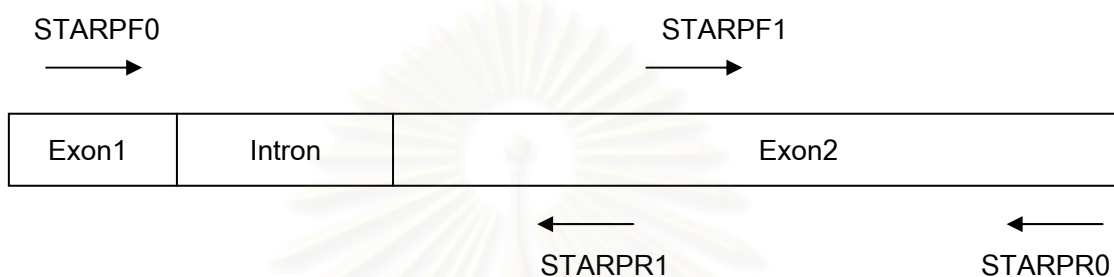
$$T_m = 4 (G+C) + 2 (A+T)$$

ข้อควรระวังในการออกแบบ primer คือ

1. ต้องคำนึงถึงความยาวของ primer ซึ่งควรมีความยาว 20-30 นิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วยเบสชนิด guanine และ cytosine ประมาณร้อยละ 50-60 ขึ้นไป และมีการกระจายตัวของเบสต่างๆ เหมือนกันกับลำดับเบสที่ต้องการจะเพิ่มจำนวน
2. ควรหลีกเลี่ยงการใช้ primer ที่มี polypurines หรือ polypyrimidine
3. ในส่วนบริเวณปลาย 3' ของ primer ไม่ควรมีลำดับเบสที่เป็น complementary กัน เพื่อป้องกันการจับคู่กันเองของ primer (primer-dimer)

4. การเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer แต่ละส่วนไม่ควรมีลำดับเบสที่เหมือนกัน เมื่ออ่านจากทิศทาง 5' ไปทาง 3' และ 3' ไปทาง 5' เพื่อป้องกันปลาย 3' งอมาจับกับ primer สายเดียวกันเกิดเป็นโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure)

5. ค่า T_m ของ primer ควรใกล้เคียงกันและอยู่ในช่วง 50-80 องศาเซลเซียส



รูปที่ 7 แสดงตำแหน่งของ primer ต่างๆ ที่ใช้ในการทำ PCR

STARPF0 : 5'-CATAAGAAAATCTTTATACCACCAG-3'

(ตรงกับตำแหน่งเบสที่ 681-705 ของยีน STARP ใน *P.falciparum*)

STARPR0 : 5'-TTAGTACATAAAAACTACATATAG-3'

(ตรงกับตำแหน่งเบสที่ 2730-2753 ของยีน STARP ใน *P.falciparum*)

STARPF1 : 5'-CACAGGCACAAAGGAAACAG-3'

(ตรงกับตำแหน่งเบสที่ 1788-1807 ของยีน STARP ใน *P.falciparum*)

STARPR1 : 5'-GTATTAGTATTATCCGTGGTTGTTG-3'

(ตรงกับตำแหน่งเบสที่ 1853-1877 ของยีน STARP ใน *P.falciparum*)

โดยในขั้นตอนการทำ PCR จะใช้ STARPF0 และ STARPR0 ส่วนในขั้นตอนการหาลำดับเบส (sequencing) จะใช้ primer ทั้ง 4 แบบ ดังแสดงในรูปที่ 7

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอร์เรส

1. นำดีเอ็นเอที่สกัดไว้มาใช้เป็นแม่แบบสำหรับทำ PCR โดยจะต้องใช้องค์ประกอบที่จำเป็นต่อการทำปฏิกิริยาต่อ 1 ตัวอย่าง ในปริมาณสารละลายสุทธิ 30 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอที่สกัดไว้ 2 ไมโครลิตร, primer ทั้ง forward และ reverse อย่างละ 0.26 ไมโครลิตร, 10X PCR Buffer 3 ไมโครลิตร, $MgCl_2$ 3 ไมโครลิตร, dNTP 2.5 มิลลิโมลาร์ จำนวน 4.8 ไมโครลิตร เพื่อเป็นสารตั้งต้นของการทำปฏิกิริยาสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์, *Taq* DNA polymerase 0.3 ไมโครลิตร เพื่อใช้เป็นเอ็นไซม์เร่งปฏิกิริยา และน้ำกลั่น 16.38 ไมโครลิตร

2. นำหลอดที่มีส่วนผสมของการทำ PCR เข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิและเวลาอัตโนมัติ ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนการทำให้ดีเอ็นเอแยกสาย (DNA denaturation) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที, ขั้นตอนการทำให้ primer จับกับสายดีเอ็นเอแม่แบบ (primer-template annealing) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0.4 นาที และขั้นตอนการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ (primer extension) ที่อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ซึ่งทำปฏิกิริยาทั้งหมด 35 รอบ จากนั้นนำ PCR products ที่ได้ไปตรวจผลผลิตผล PCR

การตรวจผลผลิตผล PCR โดยวิธี gel electrophoresis

เตรียมอะกาโรสที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1 และ 1X TBE 300 มิลลิลิตร ใน electrophoresis chamber นำผลผลิตผล PCR ที่เตรียมไว้ผสมกับ loading dye 1 ไมโครลิตร หยอดลงในหลุมเจล ซึ่งใช้ λ Hind III เป็นดีเอ็นเอบอกขนาด (marker) เพื่อใช้เปรียบเทียบขนาดกับผลผลิตผล PCR โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำเจลไปย้อมด้วย ethidium bromide 15 นาที นำไปดูการเรืองแสงของดีเอ็นเอ ภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ต และถ่ายภาพไว้เพื่อวัดขนาดของแถบดีเอ็นเอ โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอบอกขนาด

การ purify PCR product โดยใช้ QIAquick PCR Purification Kit

1. ใส่ 5 เท่าของ PB buffer ต่อปริมาตร 1 เท่า PCR product และเขย่าให้เข้ากัน ดูดทั้งหมดใส่ใน QIAquick spin column บัน 13,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศา เซลเซียส 1 นาที ที่มีส่วนใส่ที่อยู่ในหลอดข้างล่าง column ไป และใส่กลับที่เดิม

2. เติม PE buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ใน column และบัน 13,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ที่มีส่วนใส่ที่อยู่ในหลอดข้างล่าง column และใส่หลอดกลับที่เดิม

3. ปั่นให้ column แห่งที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทิ้งหลอดที่อยู่ด้านล่างcolumn ไป นำหลอด 1.5 มิลลิลิตรมาใส่แทน
4. เติม EB buffer 30 ไมโครลิตร ตรงกลาง membrane ของ column ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที และนำไปปั่น 13,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

การวิเคราะห์ลำดับเบสของ DNA

เป็นการวิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ (automated DNA sequencing) เป็นวิธีการหาลำดับเบสของ DNA โดยอาศัยหลักการของ dideoxy chain termination แตกต่างกันตรงที่การติดฉลาก DNA จะใช้สารเรืองแสง เช่น dRhodamine dye terminator แทนการใช้สารกัมมันตภาพรังสี โดยอาศัยการติดตามการเรืองแสงของสีต่างๆ กัน 4 ชนิด สำหรับเบส 4 ตัว คือ A C G T สีที่ใช้ในการติดฉลากแต่ละตัว เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงเลเซอร์ จะเรืองแสงในช่วงความยาวคลื่นแตกต่างกัน และแสงที่ปรากฏจะแตกต่างกัน โดยจะเห็นเป็นสีเขียว สีดำ สีน้ำเงิน และสีแดง ตามลำดับ ด้วยเครื่อง ABI Prism 310 Genetic Analyzer

เมื่อได้ผลของลำดับเบสทั้งหมดของยีน STARP นำมาศึกษาลำดับเบสโดยการทำ alignment ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Bioedit และ ClustalX เพื่อวิเคราะห์ความหลากหลายของลำดับเบสที่เกิดขึ้นในยีน STARP

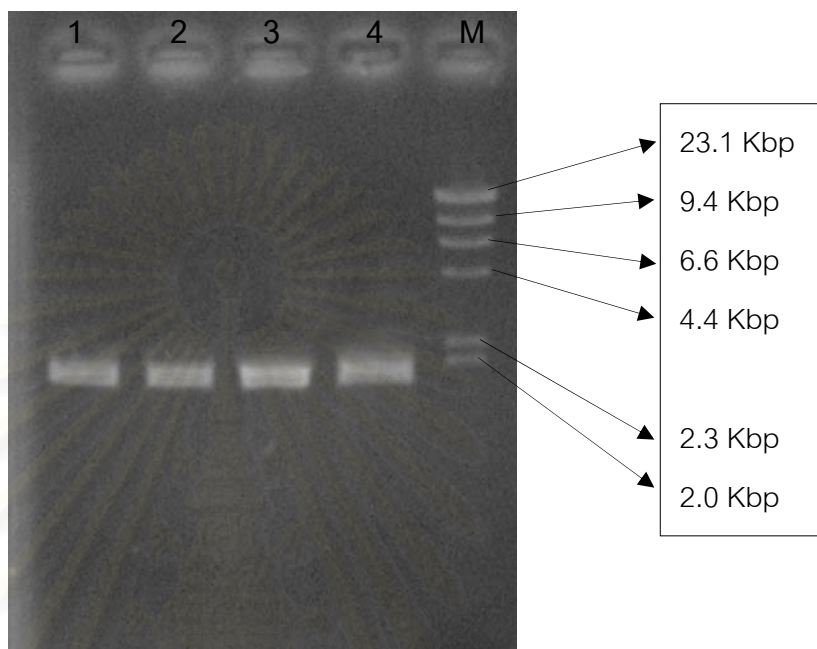
บทที่ 4

ผลการทดลอง

ตัวอย่างเชื้อมาลาเรียชนิด *P.falciparum* ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ทำการเก็บรวบรวมระหว่างปี พ.ศ. 2548 จำนวน 15 ตัวอย่าง ได้แก่ตัวอย่าง TM2, TM5, TM27, TM32 จากจังหวัดกาญจนบุรี และ TM3, TM9, TM11, TM21, TM22, TM23, TM24, TM25, TM26, TM33 และ TM45 จากจังหวัดตาก พบอัตราการติดเชื้อมาลาเรียโดยประมาณจากจำนวนเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อมาลาเรียอยู่ (parasitemia) ตรวจพบตั้งแต่ร้อยละ 0.01 ถึง 0.06 ระยะเวลาเจริญของ *P.falciparum* ที่ตรวจพบนั้นพบมีหลายระยะ ได้แก่ ระยะวงแหวน ระยะโทโรพอยต์ ระยะไซซอนต์ และระยะแกมมีโตไซต์ นอกจากนี้ยังมีตัวอย่างเชื้อมาลาเรีย (ตัวอย่างเชื้อได้รับความอนุเคราะห์จาก รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ สมชาย จงวุฒิวาศย์) จำนวน 29 ตัวอย่าง ซึ่งเก็บรวบรวมในปี พ.ศ. 2547 จากจังหวัดตาก ได้แก่ตัวอย่าง A83, A99, A100, AF1, AF3, AF4, AF5, B82, B91, B111, B112, B113, B114, CH1, CH7, CH13, K59, MK32, MK109, PN18, RB5, S118, S151, SK1, SK20, SK37, T137, TD505 และ TD511 รวมทั้งหมด 44 ตัวอย่าง

ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน STARP โดยอาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน STARP โดยอาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส จากการใช้ primer คือ STARPF0 และ STARPR0 ซึ่งครอบคลุมยีน STARP จากการวิเคราะห์ผลผลิต PCR จำนวน 44 ตัวอย่าง ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel ความเข้มข้นร้อยละ 1 และเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานบอกขนาดคือ $\lambda/Hind$ III พบว่าผลผลิตที่นำมาวิเคราะห์มีขนาดประมาณ 2,000 bp ซึ่งเป็นขนาดที่อยู่ในช่วงที่ต้องการศึกษา อย่างไรก็ตามพบว่าตัวอย่างส่วนใหญ่พบทั้งแถบดีเอ็นเอเข้มสามารถสังเกตได้อย่างชัดเจนและมีบางตัวอย่างที่พบแถบดีเอ็นเอจาง ทั้งนี้อาจจะเกี่ยวข้องกับปริมาณของดีเอ็นเอในตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา เนื่องจากบางตัวอย่างมีดีเอ็นเออยู่น้อยเกินไปและเก็บไว้เป็นเวลานาน เมื่อนำมาใช้ในการทดลองจึงให้แถบดีเอ็นเอที่จางกว่าตัวอย่างอื่นๆ แต่อย่างไรก็ตามจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน STARP โดยอาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส ไม่พบแถบดีเอ็นเอมากกว่า 1 แถบในตัวอย่างเดียวกัน



รูปที่ 8 แสดงผลการวิเคราะห์ผลผลิต PCR ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis เรียงตามหมายเลข 1, 2, 3, 4 คือ ตัวอย่าง Tm43, TM47, B84 และ B85 ตามลำดับ และตัวอักษร M คือดีเอ็นเอบอกขนาด (marker) โดยใช้ λ /Hind III

ตารางที่ 1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งที่เปลี่ยนแปลงไปของยีน STARP

Isolates	nucleotide position*	codon	amino acid	type of nucleotide substitution
Tm3, SK20, K59, PN18, A 83, AF5, S151, Tm33, AF1, AF4, MK109, Tm21, Tm27, CH7, A100, A99, CH1, CH13, MK32, RB5, SK1, TD511, SK37, TM11, TM23, TM9,	20	AGG AAG	Arg Lys	Transition
B91, AF3, B82, B111, B112, B113, B114, T137, TM5, TM22, TM24, TM26, TM32, TM45, TD505				
B111, B112, B113, B114, T137, TM5, TM22, TM24, TM26, TM32, TM45	1123	GAT AAT	Asp Asn	Transition
CH7	1321	ACA CCA	Thr Pro	Transversion
TM3, SK20, K59, PN18, TM2, S118, TM25, TM27, TM21, MK109, AF4, AF1, TM33, S151, AF5, A83	1382, 13833	ACA AAC	Thr Asn	Transversion

* ตำแหน่งตามลำดับเบสในสายพันธุ์ T9/96 ซึ่งไม่รวม intron

ตารางที่ 2 แสดงการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ Intron

samples	repeats
T9/96	ATATATATATATATATATATAT- -
AF4	ATATATATATATATATATATATAT
A83, AF1, TM21	ATATATATATATATATATATAT- - - -
B91, Tm3, SK20, K59, PN18, AF5, S151, Tm33, MK109, Tm27, CH7, A100, A99, CH1, CH13, MK32, RB5, SK1, TD511, SK37, TM11, TM23, TM9, AF3, B82, B111, B112, B113, B114, T137, TM5, TM22, TM24, TM26, TM32, TM45, TD505, TM25, TM2, S118	ATATATATATATAT- - - - - - - - - -

ตารางที่ 3 แสดงการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ Rp45

ตัวอย่าง	จำนวน copy ของ Rp45
Tm3, SK20, K59, PN18, A 83, AF5, S151, Tm33, AF1, AF4, MK109, Tm21, Tm27, CH7, A100, A99, CH1, CH13, MK32, RB5, SK1, TD511, SK37, TM11, TM23, TM9, AF3, B82, B111, B112, B113, B114, T137, TM5, TM22, TM24, TM26, TM32, TM45, TD505, TM25, TM2, S118	1
B91, T9/96	2

ตารางที่ 4 แสดงการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ Rp10

ตัวอย่าง	ตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงใน Rp10*		
	ตำแหน่งที่ 1454-1483	ตำแหน่งที่ 1483-1484	ตำแหน่งที่ 1547-1576
B91, AF3, B82, B111, B112, B113, B114, T137, TM5, TM22, TM24, TM26, TM32, TD45, TD505	Deletion	insertion	-
A83, AF4, AF1, TM21, AF5, S151, MK109, TM33, TM27, TM2, S118, TM25	-	insertion	deletion
PN18, TM3, SK20, K59	-	insertion	-

* ตำแหน่งตามลำดับเบสในสายพันธุ์ T9/96 ซึ่งไม่รวม intron

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน STARP

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน STARP จากทั้งหมด 44 ตัวอย่างเปรียบเทียบกับยีน STARP จาก T9/96 ซึ่งเป็นต้นแบบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เคยมีการศึกษา (17) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ยาวที่สุดคือ B91 มีความยาว 1979 bp เทียบเท่ากับกรดอะมิโน 604 ตัวและลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สั้นที่สุดมีความยาว 1844 bp หรือกรดอะมิโน 559 ตัว โดยในส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์นับรวมส่วนที่เป็น intron และพบว่าส่วนของ G-C content และ A-T content คิดเป็นร้อยละ 21 และ 78 เรียงตามลำดับ โดยในการวิเคราะห์แต่ละส่วนของยีน STARP พบว่ามีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 4 ตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่งที่ 20, 1123, 1321, 1382

ในตำแหน่งที่ 20 ซึ่งเป็นส่วนของ exon 1 มีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์จาก G เป็น A ส่งผลให้ codon เปลี่ยนจาก AGG เป็น AAG โดย codon ทั้ง 2 ชนิดเป็นรหัสที่ใช้ในการสร้างกรดอะมิโนต่างชนิดกัน ดังนั้นเมื่อมีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ตามลำดับดังกล่าว จะทำให้เปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโนจาก Arg เป็น Lys ซึ่งพบในตัวอย่าง Tm3, SK20, K59, PN18, A 83, AF5, S151, Tm33, AF1, AF4, MK109, Tm21, Tm27, CH7, A100, A99, CH1, CH13, MK32, RB5, SK1, TD511, SK37, TM11, TM23, TM9, B91, AF3, B82, B111, B112, B113, B114, T137, TM5, TM22, TM24, TM26, TM32, TM45 และ TD505 สำหรับตำแหน่งที่ 1123 ซึ่งเป็นส่วนของ exon 2 มีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์จาก A เป็น G ส่งผลให้ codon เปลี่ยนจาก AAT เป็น GAT และทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนจาก Asn เป็น Asp ซึ่งพบในตัวอย่าง B111, B112, B113, B114, T137, TM5, TM22, TM24, TM26, TM32 และ TM45 ในตำแหน่งที่ 1321 มีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์จาก A เป็น C ทำให้ codon เปลี่ยนจาก ACA เป็น CCA จึงทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนจาก Thr เป็น Pro ซึ่งพบในตัวอย่างเดียวคือ CH7 และในตำแหน่งที่ 1382 มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์เกิดขึ้น 2 แบบใน 1 codon คือ เปลี่ยนจาก A เป็น C และ C เป็น A หรือ AAC เป็น ACA ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนจาก Thr เป็น Asn ดังแสดงในตารางที่ 1 ทั้งนี้การเปรียบเทียบการแทนที่ของ codon ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากสายพันธุ์ T9/96 เป็นมาตรฐาน

ในส่วนของ intron มีการเปลี่ยนแปลงแบบ insertion และ deletion เกิดขึ้น โดยบริเวณนี้เริ่มต้นจากตำแหน่งที่ 73 ถึง 239 (นับตำแหน่งจากยีนที่รวม intron) การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวจะเกิดขึ้นในบริเวณที่เป็น T-A ซ้ำๆ ดังแสดงในตารางที่ 2 ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่มีความสำคัญในการถอดรหัสเป็นโปรตีน นอกจากนี้ในบริเวณ intron ของ STARP ไม่พบการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ นอกจากการแทนที่แบบ point mutation ที่เกิดขึ้นในบริเวณ exon1 และ exon2 แล้ว ยังมีการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ซ้ำกันเป็นชุดทั้งในส่วนของ Rp45 และ Rp10 เกิดขึ้นโดยทำการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เคยมีการศึกษาคือ สายพันธุ์ T9/96 ในส่วนของ Rp45 มีลำดับซ้ำขาดไป 1 ชุด คือตัวอย่าง Tm3, SK20, K59, PN18, A 83, AF5, S151,

Tm33, AF1, AF4, MK109, Tm21, Tm27, CH7, A100, A99, CH1, CH13, MK32, RB5, SK1, TD511, SK37, TM11, TM23, TM9, AF3, B82, B111, B112, B113, B114, T137, TM5, TM22, TM24, TM26, TM32, TM45, TD505, TM25, TM2 และ S118 ยกเว้นตัวอย่าง B91 และในส่วนของ Rp10 มีการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ซ้ำกัน 3 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่ 1454-1483 มี deletion เกิดขึ้น 15 ตัวอย่าง ได้แก่ B91, AF3, B82, B111, B112, B113, B114, T137, TM5, TM22, TM24, TM26, TM32, TD45 และ TD505 ระหว่างตำแหน่งที่ 1483-1484 มี insertion เกิดขึ้น 31 ตัวอย่าง ได้แก่ B91, AF3, B82, B111, B112, B113, B114, T137, TM5, TM22, TM24, TM26, TM32, TD45, TD505, A83, AF4, AF1, TM21, AF5, S151, MK109, TM33, TM27, TM2, S118, TM25, PN18, TM3, SK20 และ K59 และตำแหน่งที่ 1547-1576 มี deletion เกิดขึ้น 12 ตัวอย่าง ได้แก่ A83, AF4, AF1, TM21, AF5, S151, MK109, TM33, TM27, TM2, S118 และ TM25 ดังแสดงในตารางที่ 4

การวิเคราะห์กรดอะมิโนของยีน STARP

การแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เกิดขึ้นในตารางที่ 1 ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลง 4 ตัว จาก Arg, Asp, Thr, Thr เป็น Lys, Asn, Pro, Asn ในตำแหน่งที่ 7, 375, 441, 461 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาคุณสมบัติของกรดอะมิโนดังกล่าวพบว่า ตำแหน่งที่ 375 เปลี่ยนจาก Asp (มีประจุเป็นกรด) เป็น Asn (ไม่มีประจุ) แต่ยังเป็นกรดอะมิโนที่มีขั้ว (polar) และในตำแหน่งที่ 441 เปลี่ยนจาก Threonine (มีขั้ว) เป็น Proline (ไม่มีขั้ว) นอกจากนั้นเป็นการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่คงคุณสมบัติเหมือนเดิม

การเปลี่ยนแปลงลำดับซ้ำที่เกิดขึ้นในส่วนของ Rp45 และ Rp10 จากตารางที่ 3 และ 4 ทำให้เกิดกรดอะมิโนเพิ่มขึ้น (insertion) และหายไป (deletion) เป็นลำดับส่วนแตกต่างกันไป โดยกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 182-226 พบการหายไปของลำดับกรดอะมิโน NTSTENTSATKKVTENVI TNQILTGN NNTTNTSTTEHNNININTNT พบในทุกตัวอย่างยกเว้นตัวอย่าง B91 เท่านั้น ในตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ 427-436 พบการหายไปของลำดับกรดอะมิโน NTKATDNNNT ของตัวอย่าง B91, AF3, B82, B111, B112, B113, B114, T137, TM5, TM22, TM24, TM26, TM32, TD45 และ TD505 ในตำแหน่งระหว่างกรดอะมิโนที่ 436-437 พบการเพิ่มขึ้นของลำดับกรดอะมิโน KIISPDNNNT ซึ่งพบในตัวอย่าง A83, AF4, AF1, TM21, AF5, S151, MK109, TM33, TM27, TM2, S118, TM25, PN18, TM3, SK20, K59, B91, AF3, B82, B111, B112, B113, B114, T137, TM5, TM22, TM24, TM26, TM32, TD45 และ TD505 และในกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 467-477 พบการหายไปของลำดับกรดอะมิโน KTISDNNNT ซึ่งพบในตัวอย่าง A83, AF4, AF1, TM21, AF5, S151, MK109, TM33, TM27, TM2, S118 และ TM25

ตารางที่ 5 แสดงลักษณะอัลลีลที่พบทั้งหมดของยีน STARP

Isolates	ตำแหน่งที่ 20	ตำแหน่งที่ 1123	ตำแหน่งที่ 1321	ตำแหน่งที่ 1382	intron	Rp45	Rp10 1454-1483	Rp10 1483-1484	Rp10 1547-1576
T9/96	A	G	A	CA	11	2	ปกติ	ปกติ	ปกติ
TM2	A	G	A	AC	7	1	ปกติ	+	-
TM25	A	G	A	AC	7	1	ปกติ	+	-
S118	A	G	A	AC	7	1	ปกติ	+	-
TM5	G	A	A	CA	7	1	-	+	ปกติ
TM22	G	A	A	CA	7	1	-	+	ปกติ
TM24	G	A	A	CA	7	1	-	+	ปกติ
TM26	G	A	A	CA	7	1	-	+	ปกติ
TM32	G	A	A	CA	7	1	-	+	ปกติ
TM45	G	A	A	CA	7	1	-	+	ปกติ
B111	G	A	A	CA	7	1	-	+	ปกติ
B112	G	A	A	CA	7	1	-	+	ปกติ
B113	G	A	A	CA	7	1	-	+	ปกติ
B114	G	A	A	CA	7	1	-	+	ปกติ
T137	G	A	A	CA	7	1	-	+	ปกติ
CH7	G	G	C	CA	7	1	ปกติ	ปกติ	ปกติ
SK37	G	G	A	CA	7	1	ปกติ	ปกติ	ปกติ
TM9	G	G	A	CA	7	1	ปกติ	ปกติ	ปกติ
TM11	G	G	A	CA	7	1	ปกติ	ปกติ	ปกติ
TM23	G	G	A	CA	7	1	ปกติ	ปกติ	ปกติ
TD511	G	G	A	CA	7	1	ปกติ	ปกติ	ปกติ
A99	G	G	A	CA	7	1	ปกติ	ปกติ	ปกติ
A100	G	G	A	CA	7	1	ปกติ	ปกติ	ปกติ
CH1	G	G	A	CA	7	1	ปกติ	ปกติ	ปกติ
CH13	G	G	A	CA	7	1	ปกติ	ปกติ	ปกติ
MK32	G	G	A	CA	7	1	ปกติ	ปกติ	ปกติ
RB5	G	G	A	CA	7	1	ปกติ	ปกติ	ปกติ
SK1	G	G	A	CA	7	1	ปกติ	ปกติ	ปกติ
AF3	G	G	A	CA	7	1	-	+	ปกติ
TD505	G	G	A	CA	7	1	-	+	ปกติ
B82	G	G	A	CA	7	1	-	+	ปกติ
B91	G	G	A	CA	7	2	-	+	ปกติ
K59	G	G	A	AC	7	1	ปกติ	+	ปกติ
PN18	G	G	A	AC	7	1	ปกติ	+	ปกติ
SK20	G	G	A	AC	7	1	ปกติ	+	ปกติ
TM3	G	G	A	AC	7	1	ปกติ	+	ปกติ
TM27	G	G	A	AC	7	1	ปกติ	+	-
TM33	G	G	A	AC	7	1	ปกติ	+	-
AF5	G	G	A	AC	7	1	ปกติ	+	-
MK109	G	G	A	AC	7	1	ปกติ	+	-
S151	G	G	A	AC	7	1	ปกติ	+	-
A83	G	G	A	AC	10	1	ปกติ	+	-
AF1	G	G	A	AC	10	1	ปกติ	+	-
TM21	G	G	A	AC	10	1	ปกติ	+	-
AF4	G	G	A	AC	12	1	ปกติ	+	-

การวิเคราะห์ลักษณะอัลลีลที่พบทั้งหมดของยีน STARP

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน STARP จากทั้งหมด 44 ตัวอย่างเปรียบเทียบกับยีน STARP จาก T9/96 ซึ่งเป็นต้นแบบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เคยมีการศึกษา (17) พบว่าเมื่อเรียงลำดับตามลักษณะความแตกต่างของอัลลีลสามารถแบ่งกลุ่มอัลลีลเป็น 10 แบบ ได้แก่

อัลลีลที่ 1 คือ TM2, TM25, S118

อัลลีลที่ 2 คือ TM5, TM22, TM24, TM26, TM32, TM45, B111, B112, B113, B114, T137

อัลลีลที่ 3 คือ CH7

อัลลีลที่ 4 คือ SK37, TM9, TM11, TM23, TD511, A99, A100, CH1, CH13, MK32, RB5, SK1

อัลลีลที่ 5 คือ AF3, TD505, B82

อัลลีลที่ 6 คือ B91

อัลลีลที่ 7 คือ K59, PN18, SK20, TM3

อัลลีลที่ 8 คือ TM27, TM33, AF5, MK109, S151

อัลลีลที่ 9 คือ A83, AF1, TM21

อัลลีลที่ 10 คือ AF4

โดยพบว่าอัลลีลที่ 2 และ 4 พบได้มากที่สุดคือ 11 และ 12 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 24 และ 27 เรียงตามลำดับ พบอัลลีลที่ 3, 6 และ 10 น้อยที่สุด คือพบเพียงอย่างละ 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละอย่างละ 2.2 ดังแสดงในตารางที่ 5

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ปัจจุบันโรคมาลาเรียยังคงเป็นโรคติดต่อที่เป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขของโลก ทำให้เกิดอัตราการเจ็บป่วยและเสียชีวิตของประชากรโลกนับล้านคนต่อปี (1),(2) สำหรับในประเทศไทยจะพบโรคมาลาเรียในบริเวณชายแดนที่ติดกับประเทศเพื่อนบ้านเช่น ทางด้านที่ติดกับพม่า และกัมพูชา ซึ่งพบโรคนี้ได้ทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ ทำให้ส่งผลเสียต่อการพัฒนาประเทศทั้งในด้านแรงงานและเศรษฐกิจของประเทศ โดยปัญหาที่เป็นอุปสรรคสำคัญต่อการรักษาป้องกันและควบคุมโรคมาลาเรีย คือการดื้อยารักษาโรคมาลาเรีย และการปรับตัวของยุงก้นปล่องที่เป็นพาหะของโรค ให้สามารถทนทานต่อยาฆ่าแมลงและมีพฤติกรรมหากินที่แตกต่างจากเดิม ถึงแม้ว่าจะมีมาตรการป้องกันและควบคุมโรคมาลาเรีย เช่นการให้สุขศึกษาที่ดีแก่ชุมชน การใช้มุ้งอาบสารเคมี การทำลายแหล่งเพาะพันธุ์ของยุงพาหะ มาตรการดังกล่าวนี้ยังไม่สามารถที่จะควบคุมโรคมาลาเรียได้ ดังนั้นมาตรการอันหนึ่งที่น่าจะเพิ่มประสิทธิภาพของการควบคุมการแพร่กระจายของโรคมาลาเรียได้คือ การพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย (3) ซึ่งวัคซีนที่มีประสิทธิภาพควรจะประกอบด้วยองค์ประกอบจากหลายระยะของเชื้อมาลาเรีย (4)

STARP เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่พบบนผิวของระยะสปอริโซอิต ระยะเวลาที่เชื้อมาลาเรียเริ่มเจริญในเซลล์ตับ และระยะเริ่มต้นก่อนเข้าเม็ดเลือดแดง (17) ซึ่งมีคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้เป็นองค์ประกอบของวัคซีน (vaccine candidate) เนื่องจากมีการศึกษาผลของแอนติบอดีต่อ STARP กับการลุกลามของระยะสปอริโซอิตเข้าสู่เซลล์ตับนั้นพบว่า แอนติบอดีต่อ STARP ที่เกิดขึ้นสามารถยับยั้งการลุกลามของสปอริโซอิตไม่ให้เข้าสู่เซลล์ตับได้ถึงร้อยละ 90 โดยผลที่ได้มีค่ามากกว่าผลของแอนติบอดีต่อโปรตีน CSP (circumsporozoite protein) ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบบนผิวของสปอริโซอิตและมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเข้าสู่เซลล์ตับ (21) และจากการศึกษาโดยใช้โปรตีนสังเคราะห์จากส่วนต่างๆของโปรตีน STARP กับเซลล์ตับในหลอดทดลองพบว่า มีโปรตีนหลายชนิดที่สามารถเกาะติดกับเซลล์ตับในหลอดทดลองได้ ซึ่งโปรตีนเหล่านี้พบได้ทั้งในบริเวณ N-terminus บริเวณส่วนกลางที่มี repeat และทางด้าน C-terminus ดังนั้นจึงเป็นข้อสนับสนุนว่า STARP น่าจะมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเกาะติดของสปอริโซอิตกับเซลล์ตับในกระบวนการลุกลามเข้าสู่เซลล์ตับเช่นเดียวกับที่พบในโปรตีน CSP (22) การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เป็นการศึกษาค้นคว้าครั้งแรก เพื่อดู variation ของยีน STARP จากตัวอย่างในประเทศไทย พบว่า variation ของยีนดังกล่าวมีอยู่ในระดับต่ำ เนื่องจากพบการเปลี่ยนแปลงในลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ point mutation เพียง 4 ตำแหน่งเท่านั้น นอกจากนั้นเป็นการเปลี่ยนแปลงของลำดับ

นิวคลีโอไทด์ที่ซ้ำกันเป็นชุดที่พบในส่วน Rp45 และ Rp10 แต่ส่วนอื่นๆของยีน ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ซึ่งแสดงว่ายีนนี้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คงรูปแบบของยีน โดยเฉพาะทางด้านปลาย N-terminus ซึ่งเป็นตำแหน่งที่เป็น signal peptide และทางด้านปลาย C-terminus โดยพบการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ทั้งชนิด transition และ transversion โดยพบทั้ง 2 ชนิด อย่างละเท่าๆกัน คือร้อยละ 50 และ ร้อยละ 50 ตามลำดับ เป็นที่น่าสังเกตว่าการแทนที่และการขาดหายไปของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ซ้ำกันเป็นชุดในบริเวณ Rp45 และ Rp10 จะเปลี่ยนแปลงไปอย่างมีลำดับ โดยเฉพาะบริเวณ Rp10 ซึ่งเป็นบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เรียงซ้ำกันเป็นชุดโดยแต่ละชุดอาจมีลำดับเบสที่แตกต่างกัน (degeneration sequence) การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นลักษณะนี้ น่าจะเกี่ยวข้องกับกลไก slipped strand mispairing ระหว่างส่วนของยีนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำกันเป็นชุด โดยเกิดขึ้นจากการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียในขณะที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศซึ่งเป็นรูปแบบอย่างหนึ่งที่ทำให้เกิดความหลากหลายในรูปแบบแอนติเจน (antigenic polymorphism) ของเชื้อมาลาเรีย (85)

สำหรับหน้าที่ของยีน STARP ยังไม่ทราบถึงหน้าที่อย่างแน่ชัด ยังคงต้องทำการศึกษาต่อไป อย่างไรก็ตามโดยทั่วไปโปรตีนส่วนที่มีกรดอะมิโนซ้ำๆกัน มักจะสามารถกระตุ้น B cell ได้โดยไม่อาศัย T cell (T independent B cell response) คล้ายกับบริเวณของ tetrapeptide repeats ของ CSP ซึ่งสามารถกระตุ้น B cell ให้มีการสร้างแอนติบอดีโดยไม่ต้องอาศัย T cell แต่ประสิทธิภาพของแอนติบอดีที่สร้างขึ้นอาจมีประสิทธิภาพต่ำ เนื่องจากแอนติบอดีที่เกิดขึ้นจะจับกับแอนติเจนได้ไม่ดี (low affinity) และมักไม่เกิดการจดจำแอนติเจนในภายหลัง (poor memory formation) ทำให้การทำลายเชื้อมาลาเรียไม่มีประสิทธิภาพอย่างเต็มที่ (86) ดังนั้นความหลากหลายของลำดับกรดอะมิโนในบริเวณดังกล่าว อาจส่งผลต่อการกระตุ้นการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันให้สร้างแอนติบอดีเพื่อทำลายและยับยั้งเชื้อมาลาเรียที่ไม่มีประสิทธิภาพเกิดขึ้น ซึ่งอาจเป็นกลไกอย่างหนึ่งที่ทำให้เชื้อมาลาเรียสามารถหลบเลี่ยงการตอบสนองของโฮสต์ได้ ส่งผลให้ไม่สามารถป้องกันหรือกำจัดเชื้อมาลาเรียได้ ดังนั้นในบริเวณ Rp10 ของยีน STARP จึงน่าจะเกิดกลไกนี้เช่นเดียวกัน ซึ่งเป็นบริเวณที่มีลักษณะคล้ายกับบริเวณดังกล่าวในยีน CSP

นอกจากนี้ในส่วนของยีน CSP ของ *P. falciparum* ยังพบบริเวณที่เป็น T cell epitope ซึ่งเป็น T helper epitope และพบ cytotoxic T cell epitope โดยใน epitope เหล่านี้เป็นบริเวณที่มีความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์สูง (12) และการแทนที่ที่เกิดขึ้นนั้นจะทำให้ codon เปลี่ยนชนิดเสมอ (13),(14) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนนี้ทำให้การตอบสนองของ T cell ต่อ epitope ดังกล่าวลดลงหรือไม่ตอบสนองเลย เรียกกระบวนการที่เกิดขึ้นว่า altered peptide ligand antagonism (15) แต่จากการศึกษาครั้งนี้พบว่ากระบวนการดังกล่าวไม่น่าจะเกี่ยวข้องกับยีน STARP เนื่องจากการแทนที่ที่เกิดขึ้นนั้นไม่ได้ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนคุณสมบัติแตกต่างไปจาก

เดิม ดังนั้นแอนติบอดีต่อ STARP จึงน่าจะกระตุ้นบริเวณที่เป็น epitope ของ STARP ได้ดีกว่าใน CSP ส่งผลให้ร่างกายกระตุ้นการตอบสนองต่อเชื้อมาลาเรียได้ดีมากยิ่งขึ้น

อย่างไรก็ตามสำหรับองค์ประกอบของวัคซีนป้องกันมาลาเรียที่มีประสิทธิภาพ นอกจากจะต้องทำลายเชื้อได้หลายระยะแล้ว แอนติเจนที่เป็นองค์ประกอบนั้นไม่ควรมีความหลากหลายสูงมากเกินไปและสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายทั้ง B cell และ T cell จึงจะมีประสิทธิภาพต่อการทำลายหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียได้อย่างสมบูรณ์และจะส่งผลให้ภูมิคุ้มกันดังกล่าวสามารถคงอยู่ได้เป็นระยะเวลาอันยาวนาน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในยีน STARP ที่พบบริเวณที่มีความเกี่ยวข้องกับการเกาะติดกับเซลล์ตับ อีกทั้งยังพบว่า ยีน STARP นั้นมีความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ต่ำ (polymorphism) ประกอบกับมีการศึกษาพบว่า เมื่อใช้โปรตีน CSP และ TRAP ร่วมกันสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านทานต่อการติดเชื้อมาลาเรียได้ดีกว่าการใช้โปรตีนชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงอย่างเดียว (16) ด้วยข้อเสนอดังกล่าวนั้นจึงไม่น่าจะเป็นอุปสรรคของการนำมาเป็นองค์ประกอบของวัคซีนป้องกันโรคมมาลาเรีย หรืออาจจะนำไปใช้ร่วมกับโปรตีนชนิดอื่นๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของวัคซีนดังกล่าวให้ครอบคลุมเชื้อมาลาเรียได้ดีมากยิ่งขึ้น ดังนั้นการพบความหลากหลายของยีน STARP ในการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการพัฒนาองค์ประกอบของวัคซีนจาก STARP ต่อไป



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาโดยใช้จำนวนตัวอย่างเชื้อมากขึ้นอาจทำให้พบความหลากหลายของยีน STARP ได้มากยิ่งขึ้น หรือทำให้ทราบขอบเขตของความหลากหลายได้ดีขึ้นและอาจทำให้การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละกลุ่มตัวอย่างได้ดียิ่งขึ้น อันจะเป็นประโยชน์ในการเข้าใจกลไกทางพันธุกรรมที่ก่อให้เกิดความหลากหลายดังกล่าวต่อไป
2. การศึกษาเพื่อหาความสัมพันธ์ของการตอบสนองของแอนติบอดีต่อ STARP โดยเฉพาะบริเวณ Rp10 กับความสามารถในการป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียในประเทศไทย หรือการใช้โปรตีนสังเคราะห์ที่ประกอบด้วยโปรตีน STARP ร่วมกับโปรตีนชนิดอื่นๆ จะมีส่วนเพิ่มศักยภาพในการพัฒนาวัคซีนป้องกันเชื้อมาลาเรียต่อไปได้หรือไม่



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

1. World health Organization. Twelfth programme report of the UNDP/World Bank/WHO special programme for research and training in tropical diseases (TDR). Bull World Health Organ 1995;12:64-76.
2. Mackinnon MJ, Read AF. Virulence in malaria: an evolutionary viewpoint. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2004;359:965-86.
3. Wernsdorfer WH. The development and spread of drug resistant malaria. Parasitol Today 1991;7:297-303.
4. Miller LH, Howard RJ, Carter R, et al. Research towards malaria vaccines. Science 1986; 234:1349-56.
5. Mulligan HW, Russell PF, Mohan BN. Active immunization of fowls against *Plasmodium gallinaceum* by infections of killed homologous sporozoites. J Malaria Inst India 1941;4:25-34.
6. Nussenzweig R, Vanderberg J, Most H. Protective immunity produced by the injection of X-irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. IV. Dose response, specificity and humoral immunity. Mill Med 1969;134:1176-82.
7. Vanderberg J, Nussenzweig R, Most H. Protective immunity produced by the injection of X-irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. V. In vitro effects of immune serum on sporozoites. Mill Med 1969;134:1176-82.
8. Mccutchan TF, Kissinger JC, Touray MG, et al. Comparison of circumsporozoite proteins from avian and mammalian malaras: biological and phylogenetic implications. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:11889-94.
9. Dame JB, Williams JL, McCutchan TF, et al. Structure of the gene encoding the immunodominant surface antigen on the sporozoite of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Science 1984;225:593-9.
10. Hollingdale MR, Nardin EH, Tharavanij S, Schwartz AL, Nussenzweig RS. Inhibition of entry of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* sporozoites into cultured cells; an in vitro assay of protective antibodies. J Immunol 1984;132:909-13.

11. Nardin EH, Nussenzweig V, Nussenzweig RS, et al. Circumsporozoite proteins of human malaria parasites *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. J Exp Med 1982;156:20-30.
12. Good MF, Maloy WL, Lunde MN, et al. Construction of synthetic immunogen: use of new T-helper epitope on malaria circumsporozoite protein. Science 1987;235:1059-62.
13. Lockyer MJ, Marsh K, Newbold CI. Wild isolates of *Plasmodium falciparum* show extensive polymorphism in T cell epitopes of the circumsporozoite protein. Mol Biochem Parasitol 1989;37:275-80.
14. Jongwutiwes S, Tanabe K, Hughes MK, Kanbara H, Hughes AL. Allelic variation in the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* from Thai field isolates. Am J Trop Med Hyg 1994;51:659-68.
15. Plebanski M, Lee EAM, Hannan CM, et al. Altered peptide ligands narrow the repertoire of cellular immune responses by interfering with T-cell priming. Nat Med 1999;5:565-71.
16. Khusmith S, Charoenvit Y, Kumar S, Sedegah M, Beaudoin RL, Hoffman SL. Protection against malaria by vaccination with sporozoite surface protein 2 plus CS protein. Science 1991;252:715-8.
17. Fidock DA, Bottius E, Brahimi K, et al. Cloning and characterization of a novel *Plasmodium falciparum* sporozoite surface antigen, STARP. Mol Biochem Parasitol 1994;64:219-32.
18. Bottius E, BenMohamed L, Brahimi K, et al. A novel *Plasmodium falciparum* sporozoite and liver stage antigen (SALSA) defines major B, T helper and CTL epitopes. J Immunol 1996;156:2847-2884.
19. Guerin-Marchand C, Druilhe P, Galey B, et al. A liver-stage-specific antigen of *Plasmodium falciparum* characterized by gene cloning. Nature 1987;329:164-167.
20. Fidock DA, Sallenbave-Sales S, Sherwood JA, et al. Conservation of the *Plasmodium falciparum* sporozoite surface protein gene, STARP, in field isolates and distinct species of *Plasmodium*. Mol Biochem Parasitol 1994;27:255-67.

21. Pasquetto V, Fidock DA, Gras H, et al. *Plasmodium falciparum* sporozoite invasion is inhibited by naturally acquired or experimentally induced polyclonal antibodies to the STARP antigen. *Eur J Immunol* 1997;27:2502-13.
22. Lopez R, Garcia J, Puentes A, et al. Identification of specific Hep G2 cell binding regions in *Plasmodium falciparum* sporozoite-threonine-asparagine-rich protein (STARP). *Vaccine* 2003;21:2404-11.
23. Perlaza BL, Arevalo-Herrera M, Brahim K, et al. Immunogenicity of four *Plasmodium falciparum* preerythrocytic antigens in *Aotus lemurinus* monkeys. *Infect Immun* 1998;66:3423-8.
24. BenMohamed L, Thomas A, Druilhe P. Long-term multi-epitopic cytotoxic-T-lymphocyte responses induced in chimpanzees by combinations of *Plasmodium falciparum* liver-stage peptides and lipopeptides. *Infect Immun* 2004;72:4376-84.
25. Lalvani A, Hill AV. Cytotoxic T-lymphocytes against malaria and tuberculosis: from natural immunity to vaccine design. *Clin Sci* 1998;95:531-8.
26. Rosenberg R, Wirtz RA, Lanar DE, et al. Circumsporozoite protein heterogeneity in the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Science* 1989;245:973-6.
27. Knowles R, Das Gupta BM. A study of monkey-malaria and its experimental transmission to man. *Ind Med Gaz* 1932;67:301-320.
28. Coatney GR, Elder HA, Contacos PG, et al. Transmission of the M strain of *Plasmodium cynomolgi* to man. *Am J Trop Med Hyg* 1961;10:673-678.
29. Deane LM, Deane MP, Ferreira Neto J. Studies on transmission of simian malaria and on a natural infection of man with *Plasmodium simium* in Brazil. *Bull WHO* 1966;35:805-808.
30. World Health Organization and UNICEF. World malaria report 2005.
31. กองมาลาเรีย. สถานการณ์ไข้มาลาเรีย. ใน: รุ่งระวี ทิพย์มนตรี, เกษณี กัดม่วง และคณะ, บรรณาธิการ. รายงานประจำปี 2545 กองมาลาเรีย กรมควบคุมโรคติดต่อ. กรุงเทพมหานคร; สำนักงานกิจการโรงพยาบาลองค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก, ไม่ระบุ พ.ศ.:45-58.
32. Thimasarn K, Jatapadma S, Vijaykadga S, Sirichaisinthop J, Wongsrichanalai C. Epidemiology of malaria in Thailand. *J Travel Med* 1995;2:59-65.

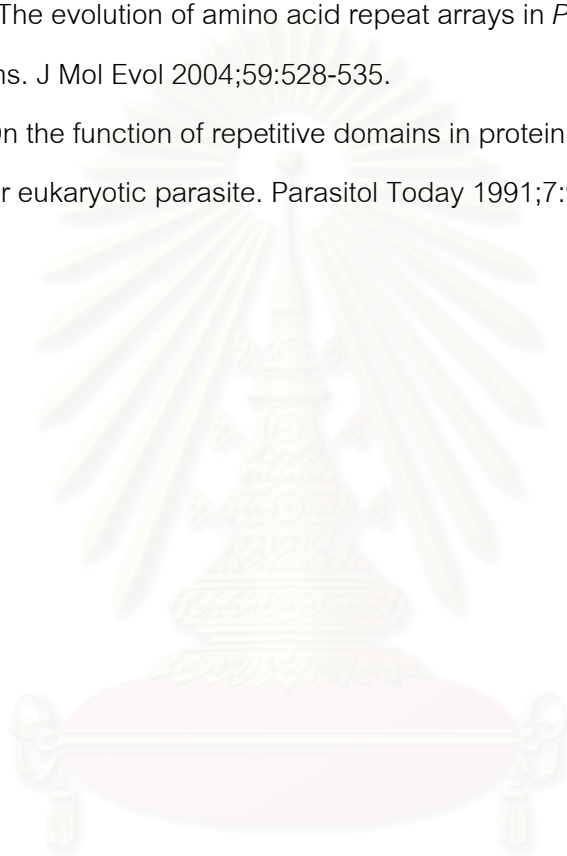
33. Rosenberg R, Rungsiwongse J, The number of sporozoites produced by individual malaria oocysts. *Am J Trop Med Hyg* 1991;45:574-77.
34. Sinden RE, Gilles HM. The malaria parasites. In:Warrell DA, Gilles HM, ed. *Essential malariology*. 4th ed. London: Arnold, 2002:8-34.
35. Kiszewski A, Mellinger A, Spielmen A, Malaney P, Sachs SE, Sachs J. A global index representing the stability of malaria transmission. *Am J Trop Med Hyg* 2004;70:486-498.
36. Rich KA, George IV FW, Law JL, Martin WJ. Cell-adhesive motif in region II of malaria circumsporozoite protein. *Science* 1990;249:1574-77.
37. Cerami C, Frevert U, Sinnis P, et al. The basolateral domain of the hepatocyte plasma membrane bears receptors for the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* sporozoites. *Cell* 1992;70:1021-33.
38. Yoshida N, Nussenzweig RS, Potocnjak P, Nussenzweig V, Aikawa M. Hybridoma produces protective antibodies directed against the sporozoite stage of malaria parasit. *Science* 1980;207:71-73.
39. Nussenzweig V, Nussenzweig RS. Rationale for the development of an engineered sporooite malaria vaccine. *Adv Immunol* 1989;45:283-334.
40. Robson KJ, Hall JR, Jennings MW, et al. A highly conserved amino-acid sequence in thrombospondin properdin and in proteins from sporozoites and blood stages of a human malaria parasite. *Nature* 1988;335:79-82.
41. Cochrane AH, Uni S, Maracic M, di Giovanni L, Aikawa M, Nussenzweig RS. Presence of a circumsporozoites-like protein in micronemes of blood-stages merozoites of malaria parasites. *Bull WHO* 1990;68:181-183.
42. Hollingdale MR, Appiah A, Leland P, et al. Activity of human volunteer sera to candidate *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein vaccines in the inhibition of sporozoite invasion assay of human hepatoma cells and hepatocytes. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990;84:325-329.
43. Bray RS, Garnham PC. The life-cycle of primate malaria parasites. *Br Med Bull*1982;38:117-122.

44. Krotoski WA, Collins WE, Bray RS, et al. Demonstration of hypnozoites in sporozoite-transmitted *Plasmodium vivax* infection. *Am J Trop Med Hyg* 1982;31:1291-93.
45. Krotoski WA, The hypnozoite and malarial relapse. *Prog Clin Parasitol* 1989;1:1-19.
46. Aikawa M, Miller LH, Johnson J, Rabbege J, Erythrocyte entry by malarial parasites. A moving junction between erythrocyte and parasites. *J cell Biol* 1978;77:72-82.
47. Holder AA, Blackman MJ. What is the function of MSP-1 on the malaria merozoite? *Parasitol Today* 1994;10:182-184.
48. Smythe JA, Coppel RL, Brown GV, Ramasamy R, Kemp DJ, Anders RF. Identification of two integral membrane proteins of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Aced Sci USA* 1988;85:5195-99.
49. Pirson PJ, Perkin ME. Characterization with monoclonal antibodies of a surface antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites. *J Immunol* 1985;134:1946-51.
50. Sim BKL, Chitnis CE, wasniowaska K, Hadley TJ, Miller LH. Receptor and ligand domains for invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *Science* 1994;264:1941-44.
51. Chauhuri A, Polyakova J, Zbrzezna V, William K, Gulati S, Pogo AO. Cloning of glycoprotein D cDNA which encodes the major subunit of the Duffy blood group system and the receptor for the *Plasmodium falciparum* malaria parasite. *Proc Natl Aced Sci USA* 1994;90:10793-97.
52. Nagel RL, Roth EF. Malaria and red cell genetic defects. *Blood* 1989;74:1213-1221.
53. Goldberg DE, Slater AF. The pathway of hemoglobin degradation in malaria parasites. *Parasitol Today* 1992 ;8:280-283.
54. Aikawa M, Miller LH, Rabbege J. Caveola-vesicles complexes in the plasmalemma of erythrocytes infected by *Plasmodium vivax* and *P.cynomolgi*. Unique structures related to Schuffner's dots. *Am J Pathol* 1975;79:285-300.
55. Quinn TC, Stricland GT. Malaria: clinical manifestation of malaria. *Clin Trop Med Com Dis* 1986;1:127-170.
56. Spencer HC. Epidemiology of malaria. *Clin Trop Med Com Dis* 1986;1:1-28.
57. Warrell DA, Molyneux ME, Beale PF. Severe and complicated malaria. *Tran Roy Soc Trop Med Hyg* 1990;84:1-65.

58. Phillips RE, Pasvol G, Anemia of *Plasmodium falciparum* malaria. Bailliere's Clin Haematol 1992;5:315-330.
59. Miller LH, Good MF, Milon G. Malaria pathogenesis. Science 1994;264:1878-83.
60. Waters AP, Higgins DG, MacCutchan TF. *Plasmodium falciparum* appears to have arisen as a result of lateral transfer between avian and human hosts. Proc Natl Acad Sci USA 1991;88:3140-44.
61. Escalante AA, Freeland DE, Collins WE, Lal AA. The evolution of primate malaria parasites based on the gene encoding cytochrome b from the linear mitochondrial genome. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:8124-29.
62. Qari SH, Shi YP, Pieniazek NJ, Collins WE, Lal AA. Phylogenetic relationship among the malaria parasites based on small subunit rRNA genes sequence: monophyletic nature of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. Mol Phylogenet Evol 1996;6:157-165.
63. Weber JL. Molecular biology of malaria parasites. Exp Parasitol 1988;66(2):143-170.
64. Walliker D. The genetic basis of diversity in malaria parasites. Adv in Parasitology 1983;22:217-259.
65. Thaitong S, Beale GH. Bangkok: Chulalongkorn university. Malaria parasite 1992.
66. Goman M, Langsley G, Hyde JE, Yankovsky Nk, Zolg JW, Scaife JG. The establishment of genomic DNA libraries for the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* and identification of individual clones by hybridization. Mol Biochem Parasitol 1982;5(6):391-400.
67. Gardner MJ, Hall N, Fung E, et al. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Nature 2002;419:498-511.
68. Saul A, Battistuta D. Codon Usage in *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol 1988;27:35-42.
69. Vernick KD, McCutchan TF. Sequence and structure of a *Plasmodium falciparum* telomere. Mol Biochem parasitol 1988;28:85-94.
70. Corcoran LM, Thompson JK, Walliker D, and Kemp DJ. Homologous recombination within subtelomeric repeat sequences generates chromosome size polymorphisms in *Plasmodium falciparum*. Cell 1988;53(5):807-813.

71. Good MF. Vaccine-induced immunity to malaria parasites and the need for novel strategies. *Trends parasitol* 2005;21:29-34.
72. McColl DJ, Anders RF. Conservation of structural motifs and antigenic diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-3 (MSP-3). *Mol Biochem Parasitol* 1997;90:21-31.
73. Narum DL, Thomas AW. Differential localization of full-length and processed form of PF83/AMA-1 an apical membrane antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Mol Biochem Parasitol* 1994;67:59-68.
74. Aikawa M, Torii M, Sjolander A, Berzins K, Perlmann P, Miller LH. Pf1155/RESA antigen is localized in dense granules of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Exp Parasitol* 1990;71:326-329.
75. Williamson KC, Criscio MD, Kaslow DC. Cloning and expression of the gene for *Plasmodium falciparum* transmission-blocking target antigen, Pfs230. *Mol Biochem Parasitol* 1993;58:355-358.
76. kaslow DC, Quakyi IA, Syin C, et al. A vaccine candidate from the sexual stage of human malaria that contains EGF-like domains. *Nature* 1988;333:74-76.
77. Duffy PE, Kaslow DC. A novel malaria protein, Pfs28, and Pfs25 are genetically linked and synergistic as falciparum malaria transmission-blocking vaccines. *Infect Immun* 1997;65:1109-13.
78. Cochrane AH, Aikawa M, Jeng M, Nussenzweig RS. Antibody-induced ultrastructural changes of malarial sporozoites. *J Immunol* 1976;116:859-867.
79. Potocnjak P, Yoshida N, Nussenzweig RS, Nussenzweig V. Monovalent fragments (Fab) of monoclonal antibodies to a sporozoites surface antigen (Pb44) protect mice against malarial infection. *J Exp Med* 1980;151:1504-13.
80. Stewart MJ, Nawrot RJ, Schulman S, Vanderberg JP. *Plasmodium berghei* sporozoites invasion is blocked in vitro by sporozoite-immobilizing antibodies. *Infect Immun* 1986;51:859-864.
81. Hoffman SL, Oster CN, Plowe CV, et al. Naturally acquired antibodies to sporozoites do not prevent malaria: vaccine development implications. *Science* 1987;237:639-642.
82. von Heijine G, Signal sequences: the limits of variation. *J Mol Biol* 1985;184:99-105.

83. Scherf A, Behr C, Sarthou JL, et al. Immune response in mouse and malaria-exposed humans to peptides derived from Pf11-1, a highly repetitive megadalton protein of *Plasmodium falciparum*. Eur J Immunol 1993;23:1574-81.
84. Rogers WO, Malik A, Mellouk S, et al. Characterization of *Plasmodium falciparum* sporozoite surface protein 2. Proc Natl Acad Sci USA 1992;89:9176-80.
85. Hughes AL, The evolution of amino acid repeat arrays in *Plasmodium* and other organisms. J Mol Evol 2004;59:528-535.
86. Shofield L. On the function of repetitive domains in protein antigens of *Plasmodium* and other eukaryotic parasite. Parasitol Today 1991;7:99-105.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

แสดงรหัสพันธุกรรม (genetics code)

Second Position

	U	C	A	G	
U	UUU UUC Phe UUA Leu UUG	UCU UCC Ser UCA UCG	UAU Tyr UAC UAA* Stop UAG* Stop	UGU Cys UGC UGA* Stop UGG Trp	U C A G
C	CUU CUC Leu CUA CUG	CCU CCC Pro CCA CCG	CAU CAC His CAA Gln CAG	CGU CGC Arg CGA CGG	U C A G
A	AUU AUC Ile AUA AUG ⁺	ACU ACC Thr ACA ACG	AAU AAC Asn AAA Lys AAG	AGU AGC Ser AGA Arg AGG	U C A G
G	GUU GUC Val GUA GUG	GCU GCC Ala GCA GCG	GAU GAC Asp GAA Glu GAG	GGU GGC Gly GGA GGG	U C A G

* chain termination, or "nonsense," codon

⁺ the initiator codon

ภาคผนวก ข

แสดงรหัสและตัวย่อสำหรับกรดอะมิโน

Amino acid	Three-letter abbreviation	One-letter symbol
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Aspartic acid	Asp	D
Cysteine	Cys	C
Glutamine	Gln	Q
Glutamic acid	Glu	E
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Methionine	Met	M
Phenylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Serine	Ser	S
Threonine	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	val	V

ภาคผนวก ค

การเตรียมสารเคมี

การเตรียม 0.5 EDTA (pH 8.0)

EDTA	186.1 g.
double distilled water	800 ml.

นำส่วนผสมทั้ง 2 อย่างนี้มาควนด้วย magnetic stirrer จนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับ pH ด้วย NaOH ให้มีค่า pH = 8 และปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งปลอดเชื้อ*

การเตรียม TBE buffer (10x)

Tris base	108 g.
Boric acid	55 g.
EDTA	7.4 g.

ปรับค่า pH และปริมาตรให้เท่ากับ 8.3 และ 1 ลิตร จากนั้นจึงนำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งปลอดเชื้อเช่นเดียวกัน*

การเตรียม marker

DNA marker	20 μ l.
Dye	80 μ l.
TE buffer	360 μ l.

การเตรียม TE buffer (10x)

1 M Tris	800 ml.
0.5 M EDTA	200 ml.

ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งปลอดเชื้อก่อนที่จะใช้*

การเตรียม 1 M Tris (pH 7.8)

Tris base	121.1 g.
น้ำกลั่น	800 ml.

นำส่วนผสมทั้ง 2 มาละลายให้เป็นเนื้อเดียวด้วย magnetic stirrer จากนั้นปรับ pH ด้วย HCl ให้มีค่า pH เท่ากับ 7.4 และปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1 ลิตร โดยใช้น้ำกลั่น และนำไปนิ่งด้วยหม้อปอดเชื้อก่อนที่จะนำไปใช้*

* ภายใต้อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

การเตรียม gel-loading buffers

bromophenol blue	0.25 g.
xylene cyanol FF	0.25 g.
glycerol in water	30 g.
ละลายในน้ำกลั่น โดยปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1 ลิตร	

การเตรียมสี Giemsa (stock)

สี Giemsa (ผง)	25 g.
Absolute Methanol	1650 ml.
Glycerine	1650 ml.

บดผงสีก่อน โดยค่อยๆเติม glycerine ไปทีละน้อยๆ จากนั้นนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส พร้อมกับเท glycerine ที่เหลือผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติม absolute methanol ลงไปเขย่าให้เข้ากัน และนำเอา stock solution นี้เก็บไว้ในขวดสีน้ำตาลประมาณ 1-3 เดือน ก่อนนำมาใช้จะทำให้การย้อมสีดีกว่าใช้ในขณะเตรียมเสร็จใหม่ๆ

การเตรียม buffer ย้อมสี (stock buffer)

buffer I	$\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	9.2 g.
	น้ำกลั่น	1000 ml.
Buffer II	Na_2HPO_4	9.5 g.
	น้ำกลั่น	1000 ml.

	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
Tm3									AA TTCAACAGAT	AATAGTAATA
SK20									AA TTCAACAGAT	AATAGTAATA
K59									AA TTCAACAGAT	AATAGTAATA
PN_18									AA TTCAACAGAT	AATAGTAATA
Tm_2									AA TTCAACAGAT	AATAGTAATA
S118									AA TTCAACAGAT	AATAGTAATA
Tm25									AA TTCAACAGAT	AATAGTAATA
Tm27									AA TTCAACAGAT	AATAGTAATA
Tm21									AA TTCAACAGAT	AATAGTAATA
MK109									AA TTCAACAGAT	AATAGTAATA
AF4									AA TTCAACAGAT	AATAGTAATA
AF1									AA TTCAACAGAT	AATAGTAATA
Tm_33									AA TTCAACAGAT	AATAGTAATA
S_151									AA TTCAACAGAT	AATAGTAATA
AF_5									AA TTCAACAGAT	AATAGTAATA
A_83									AA TTCAACAGAT	AATAGTAATA
CH7									AA TTCAACAGAT	AATAGTAATA
Tm9									AA TTCAACAGAT	AATAGTAATA
Tm23									AA TTCAACAGAT	AATAGTAATA
Tm11									AA TTCAACAGAT	AATAGTAATA
SK37									AA TTCAACAGAT	AATAGTAATA
TD511									AA TTCAACAGAT	AATAGTAATA
SK1									AA TTCAACAGAT	AATAGTAATA
RB5									AA TTCAACAGAT	AATAGTAATA
MK32									AA TTCAACAGAT	AATAGTAATA
CH13									AA TTCAACAGAT	AATAGTAATA
CH1									AA TTCAACAGAT	AATAGTAATA
A99									AA TTCAACAGAT	AATAGTAATA
A100									AA TTCAACAGAT	AATAGTAATA
T9\96	CAAATATTAA	CAGGAAATAA	CAATACAACC	ACAAATACAT	CCACGACAGA	ACATAATAAT	AATATTAACA	CAAATACAAA	TTCAACAGAT	AATAGTAATA
B_91	CAAATATTAA	CAGGAAATAA	CAATACAACC	ACAAATACAT	CCACGACAGA	ACATAATAAT	AATATTAACA	CAAATACAAA	TTCAACAGAT	AATAGTAATA
AF3									AA TTCAACAGAT	AATAGTAATA
B82									AA TTCAACAGAT	AATAGTAATA
B_111									AA TTCAACAGAT	AATAGTAATA
B_112									AA TTCAACAGAT	AATAGTAATA
B_113									AA TTCAACAGAT	AATAGTAATA
B_114									AA TTCAACAGAT	AATAGTAATA
T137									AA TTCAACAGAT	AATAGTAATA
Tm5									AA TTCAACAGAT	AATAGTAATA
Tm22									AA TTCAACAGAT	AATAGTAATA
Tm24									AA TTCAACAGAT	AATAGTAATA
Tm26									AA TTCAACAGAT	AATAGTAATA
Tm32									AA TTCAACAGAT	AATAGTAATA
Tm45									AA TTCAACAGAT	AATAGTAATA
TD505									AA TTCAACAGAT	AATAGTAATA
Clustal Co									** *****	*****


```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1810      1820      1830      1840
Tm3      GGAAAATTAA TTTTAGCTTT TGCTTTATAT ATGTTAATTA AT---
SK20     GGAAAATTAA TTTTAGCTTT TGCTTTATAT ATGTTAATTA AT---
K59      GGAAAATTAA TTTTAGCTTT TGCTTTATAT ATGTTAATTA AT---
PN_18    GGAAAATTAA TTTTAGCTTT TGCTTTATAT ATGTTAATTA AT---
Tm_2     GGAAAATTAA TTTTAGCTTT TGCTTTATAT ATGTTAATTA AT---
S118    GGAAAATTAA TTTTAGCTTT TGCTTTATAT ATGTTAATTA AT---
Tm25    GGAAAATTAA TTTTAGCTTT TGCTTTATAT ATGTTAATTA AT---
Tm27    GGAAAATTAA TTTTAGCTTT TGCTTTATAT ATGTTAATTA AT---
Tm21    GGAAAATTAA TTTTAGCTTT TGCTTTATAT ATGTTAATTA AT---
MK109   GGAAAATTAA TTTTAGCTTT TGCTTTATAT ATGTTAATTA AT---
AF4     GGAAAATTAA TTTTAGCTTT TGCTTTATAT ATGTTAATTA AT---
AF1     GGAAAATTAA TTTTAGCTTT TGCTTTATAT ATGTTAATTA AT---
Tm_33   GGAAAATTAA TTTTAGCTTT TGCTTTATAT ATGTTAATTA AT---
S_151   GGAAAATTAA TTTTAGCTTT TGCTTTATAT ATGTTAATTA AT---
AF_5    GGAAAATTAA TTTTAGCTTT TGCTTTATAT ATGTTAATTA AT---
A_83    GGAAAATTAA TTTTAGCTTT TGCTTTATAT ATGTTAATTA AT---
CH7     GGAAAATTAA TTTTAGCTTT TGCTTTATAT ATGTTAATTA AT---
Tm9     GGAAAATTAA TTTTAGCTTT TGCTTTATAT ATGTTAATTA AT---
Tm23    GGAAAATTAA TTTTAGCTTT TGCTTTATAT ATGTTAATTA AT---
Tm11    GGAAAATTAA TTTTAGCTTT TGCTTTATAT ATGTTAATTA AT---
SK37    GGAAAATTAA TTTTAGCTTT TGCTTTATAT ATGTTAATTA AT---
TD511   GGAAAATTAA TTTTAGCTTT TGCTTTATAT ATGTTAATTA AT---
SK1     GGAAAATTAA TTTTAGCTTT TGCTTTATAT ATGTTAATTA AT---
RB5     GGAAAATTAA TTTTAGCTTT TGCTTTATAT ATGTTAATTA AT---
MK32    GGAAAATTAA TTTTAGCTTT TGCTTTATAT ATGTTAATTA AT---
CH13    GGAAAATTAA TTTTAGCTTT TGCTTTATAT ATGTTAATTA AT---
CH1     GGAAAATTAA TTTTAGCTTT TGCTTTATAT ATGTTAATTA AT---
A99     GGAAAATTAA TTTTAGCTTT TGCTTTATAT ATGTTAATTA AT---
A100    GGAAAATTAA TTTTAGCTTT TGCTTTATAT ATGTTAATTA AT---
T9\96   GGAAAATTAA TTTTAGCTTT TGCTTTATAT ATGTTAATTA AT---
B_91    GGAAAATTAA TTTTAGCTTT TGCTTTATAT ATGTTAATTA AT---
AF3     GGAAAATTAA TTTTAGCTTT TGCTTTATAT ATGTTAATTA AT---
B82     GGAAAATTAA TTTTAGCTTT TGCTTTATAT ATGTTAATTA AT---
B_111   GGAAAATTAA TTTTAGCTTT TGCTTTATAT ATGTTAATTA AT---
B_112   GGAAAATTAA TTTTAGCTTT TGCTTTATAT ATGTTAATTA AT---
B_113   GGAAAATTAA TTTTAGCTTT TGCTTTATAT ATGTTAATTA AT---
B_114   GGAAAATTAA TTTTAGCTTT TGCTTTATAT ATGTTAATTA AT---
T137    GGAAAATTAA TTTTAGCTTT TGCTTTATAT ATGTTAATTA AT---
Tm5     GGAAAATTAA TTTTAGCTTT TGCTTTATAT ATGTTAATTA AT---
Tm22    GGAAAATTAA TTTTAGCTTT TGCTTTATAT ATGTTAATTA AT---
Tm24    GGAAAATTAA TTTTAGCTTT TGCTTTATAT ATGTTAATTA AT---
Tm26    GGAAAATTAA TTTTAGCTTT TGCTTTATAT ATGTTAATTA AT---
Tm32    GGAAAATTAA TTTTAGCTTT TGCTTTATAT ATGTTAATTA AT---
Tm45    GGAAAATTAA TTTTAGCTTT TGCTTTATAT ATGTTAATTA AT---
TD505   GGAAAATTAA TTTTAGCTTT TGCTTTATAT ATGTTAATTA AT---
Clustal Co *****

```



วิทยาลัยบริการ
 จันท์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายเกรียงไกร การชัยศรี เกิดเมื่อวันที่ 6 พฤษภาคม 2526 จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ในปีการศึกษา 2547 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาปรสิตวิทยาทางการแพทย์ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2548



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย