บทที่ 2

บทสอบสวนเอกสาร

เชื้อมาลาเรีย (malaria parasite)

การจัดจำแนก (classification)

Kingdom Protista

Phylum Protozoa

Class Sporozoa

Order Euccocidiida

Family Plasmodiidae

Genus Plasmodium

มาลาเรียเป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว จัดอยู่ใน Class Sporozoa ใน Genus Plasmodium มียุงก้นปล่องเพศเมียเป็นพาหะ เชื้อมาลาเรียมีอยู่ด้วยกันหลายชนิด

เชื้อมาลาเรียในสัตว์ปีก (aves) ได้แก่ Plasmodium lophurae

Plasmodium gallinaceum

เชื้อมาลาเรียของสัตว์ฟันแทะ (rodent) ได้แก่ Plasmodium berghei

Plasmodium yoelii

เชื้อมาลาเรียในลิง (simian) ได้แก่ Plasmodium knowlesi

Plasmodium cyanomolgi

สำหรับเชื้อมาลาเรียที่ทำให้เกิดโรคในคนมีเพียง 4 ชนิด

ได้แก่ Plasmodium falciparum

Plasmodium vivax

Plasmodium malariae

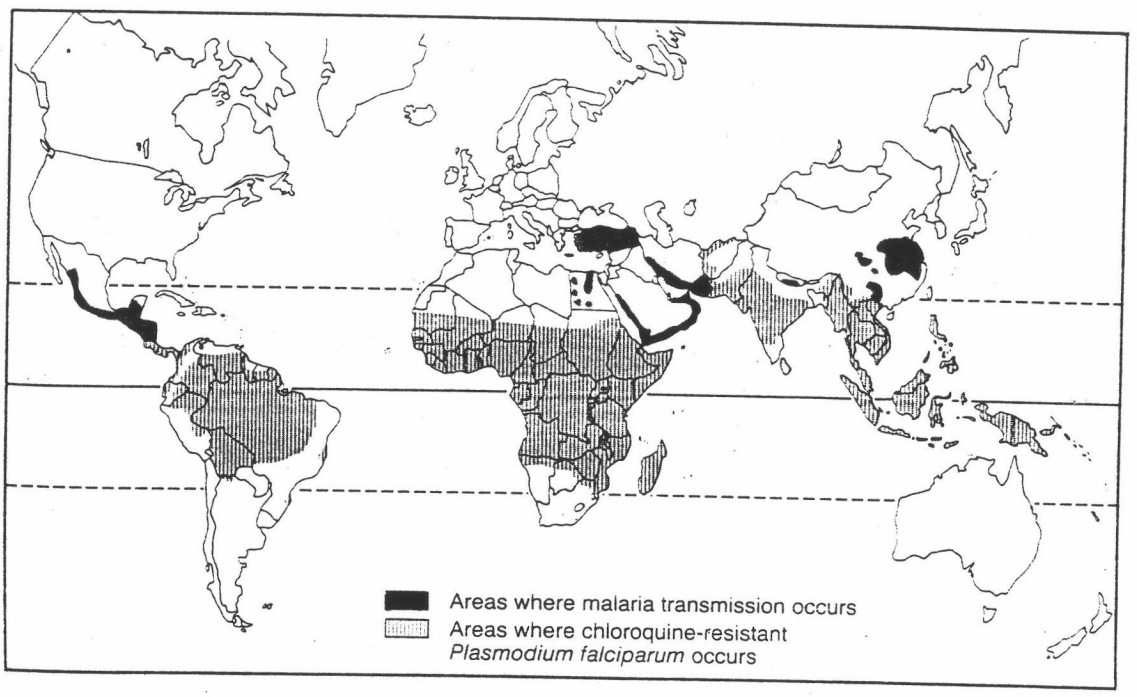
Plasmodium ovale

ในจำนวนนี้ P. falciparum มีความสำคัญทางการแพทย์มากที่สุด เนื่องจากความรุนแรงของโรค และโดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศไทย ความชุก (prevalence) ของโรคมีมากกว่าชนิด(species) อื่น

การกระจายทางภูมิศาสตร์ (geographical distribution)

มาลาเรียมีขอบเขตการแพร่กระจายอย่างกว้างขวางระหว่างเส้นรุ้ง (latitudes) ที่ 64° เหนือถึงเส้นรุ้งที่ 32° ใต้ และครอบคลุมพื้นที่ซึ่งอยู่ต่ำกว่าระดับน้ำทะเลถึง 400 เมตร เช่นบริเวณ Dead sea จนถึงพื้นที่ที่อยู่สูงกว่าระดับน้ำทะเลถึง 2600 เมตรเช่นที่ประเทศเคนยา (รูปที่ 1) จากการสำรวจในปี 1986 พบว่า ประชาชนในเกือบ 100 ประเทศ หรือประมาณ 56 เปอร์เซนต์ของประชากรโลกอาศัยอยู่ในพื้นที่ที่มีการระบาดของมาลาเรีย (Wernsdorfer., 1986)

ตามรายงานขององค์การอนามัยโลก จากประชากรทั่วโลกราว 5,000 ล้านคน ในปี พ.ศ. 2531 ประชากรกว่า 2,000 ล้านคน (41%) อาศัยอยู่ในดินแดนซึ่งมีการแพร่เชื้อมาลาเรีย ในแต่ละปีมีผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมาลาเรียประมาณ 110 ล้านคน และประมาณกันว่าจำนวนผู้ป่วยที่มีเชื้อมาลาเรียในกระแสโลหิตอาจมีถึง 270 ล้านคน (WHO., 1990) อย่างไรก็ตาม อัตราการตายที่แท้จริงของคนที่เป็นโรคมาลาเรียยังไม่เป็นที่ทราบกันแน่นอน จากการศึกษาบ่งชี้ว่า ประมาณร้อยละ 20-30 เป็นการเสียชีวิตของทารกและเด็กในทวีปอัฟริกา อาจจะเนื่องมาจากโรคมาลาเรีย เฉพาะในประเทศไทย ในปีงบประมาณ 2531 ตรวจพบผู้ป่วยประมาณ 350,000 ราย คิดเป็นอัตราป่วย 6.8 ต่อประชากร 1000 คน และเป็นสาเหตุการตายอันดับที่ 6 ของประเทศ จังหวัดที่มีอัตราผู้ป่วยมาลาเรียสูงสุดได้แก่ ตราด รองลงไปคือ กระบี่ ตาก และจันทบุรี คนไทยราว 12 ล้านคนหรือประมาณ 1 ใน 5 ของประชากรทั้งประเทศอาศัยอยู่หรือประกอบอาชีพประจำในท้องที่ป่าเขาและชายแดน ซึ่งโรคมาลาเรียยังเป็นปัญหาสำคัญยิ่งทางสาธารณะสุข ปัจจุบันรัฐบาลต้องใช้งบประมาณหลายร้อยล้านบาทต่อปีในการป้องกันและรักษาโรคมาลาเรีย นับว่าเป็นค่าใช้จ่ายที่สูงมากอย่างหนึ่งของประเทศ

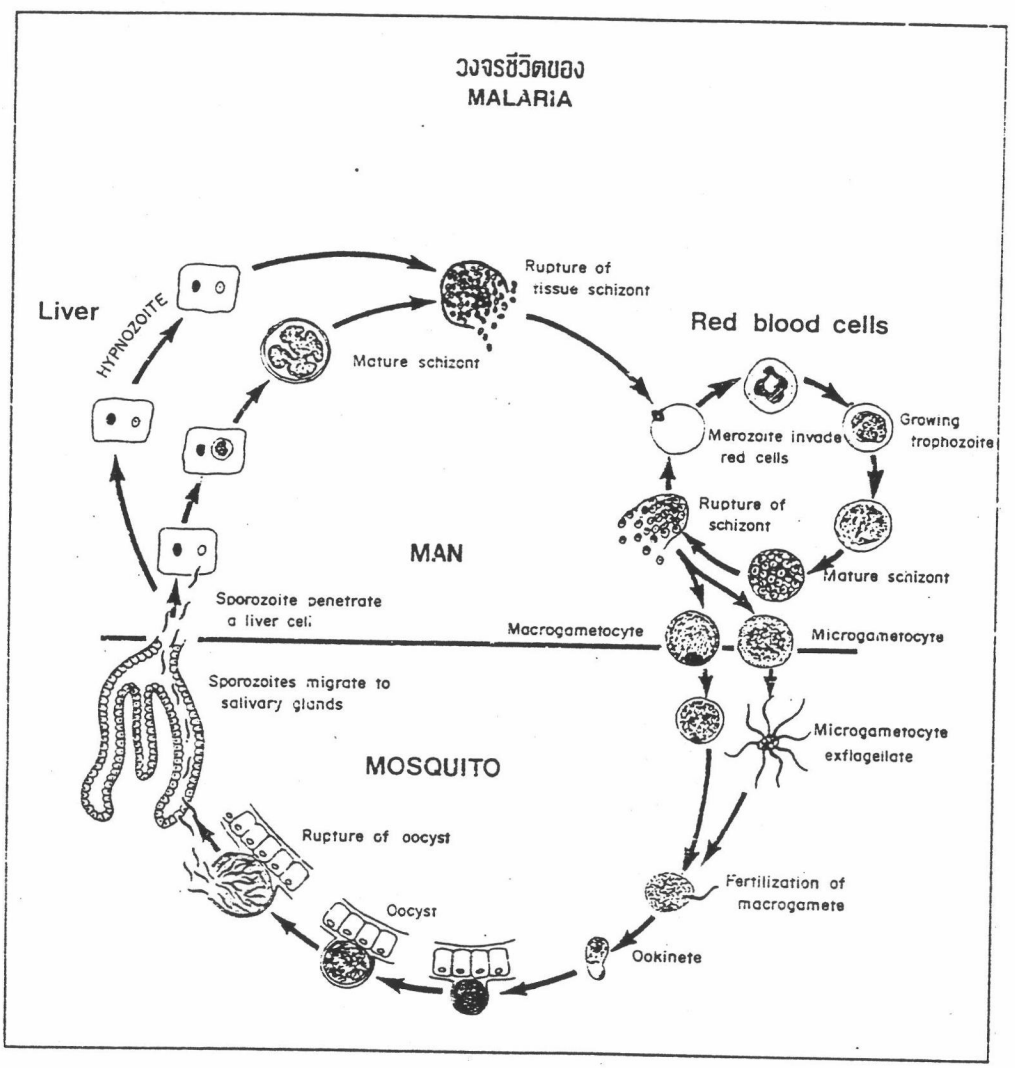


รูปที่ 1 แผนที่แสดงการแพร่กระจายของเชื้อมาลาเรีย

(Markell et al., 1992)

วงจรชีวิต (life cycle)

วงจรชีวิตของเชื้อ Plasmodium แบ่งออกได้เป็น 2 ระยะใหญ่ๆคือ ระยะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual stage) ซึ่งต้องอาศัยโฮสต์ (host) ที่เป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังรวมทั้งคนด้วย และระยะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual stage) ซึ่งเจริญอยู่ในยุงเพศเมียสกุล Anopheles ดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 วงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรีย (ประยงค์ และคณะ 2535)

ระยะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual stage)

วงจรชีวิตเริ่มจากยุงก้นปล่อง (Anopheles) เพศเมียซึ่งเป็นพาหะของโรคมาลาเรียกัดคนหรือสัตว์ และมีเชื้อมาลาเรียในระยะที่จะติดต่อเข้าสู่คนได้เรียกว่า สปอโรซอยท์ (sporozoite) จะถูกปล่อยออกจากต่อมน้ำลายยุงขณะที่กัดเข้าสู่กระแสโลหิต สปอโรซอยท์จะอยู่ในกระแสโลหิตเพียงช่วงสั้นๆ หลังจากนั้นจะไปเจริญเติบโตต่อที่เซลล์ตับ (hepatocyte) ระยะการเจริญของเชื้อมาลาเรียในเซลล์ตับนี้เรียกว่า exoerythrocytic stage จากนั้นเริ่มแบ่งตัวแบบไม่อาศัยเพศ (asexual multiplication) เพื่อสร้างระยะโทรโฟซอยท์ (trophozoite), ไซซอนท์ และเมอร์โรซอยท์ สำหรับเชื้อ P. falciparum จะเจริญในเซลล์ตับประมาณ 10 วัน ในที่สุดเซลล์ตับจะแตกออกและปล่อยเมอร์โรซอยท์หลายหมื่นตัวเข้าสู่กระแสโลหิต เมอร์โรซอยท์เหล่านี้จะไปเจริญเติบโตต่อในเม็ดโลหิตแดงและมีการเจริญเปลี่ยนแปลงเป็นระยะต่างๆ คือ ระยะวงแหวน (ring form) โทรโฟซอยท์ ไซซอนท์ และเมอร์โรซอยท์ ตามลำดับ ทั้งหมดนี้รวมเรียกว่า asexual blood stage การเจริญของเชื้อมาลาเรียชนิดนี้ในเม็ดโลหิตแดงจะใช้เวลาประมาณ 48 ชั่วโมง เมื่อไซซอนท์เจริญเต็มที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกออก เมอร์โรซอยท์จำนวนมากถูกปล่อยออกมาและเข้าไปเจริญในเม็ดเลือดแดงใหม่วนเวียนไปเรื่อยๆ จำนวนเมอร์โรซอยท์ในไซซอนท์จะแตกต่างกันแล้วแต่ชนิดของเชื้อมาลาเรียเช่น ใน P. falciparum มีจำนวน 8-24 เมอร์โรซอยท์ ใน P. vivax มีประมาณ 12-24 เมอร์โรซอยท์ ใน P. malariae และ P. ovale มีจำนวน 6-12 เมอร์โรซอยท์ (Krerie and Baker., 1987) ในขณะที่มีการเจริญเพิ่มจำนวนในเม็ดเลือดแดงนั้น เมอร์โรซอยท์บางตัวจะมีการเปลี่ยนแปลงเป็นระยะมีเพศคือ แกมมีโตไซท์ (gametocyte) โดยแกมมีโตไซท์ของเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิดจะมีลักษณะแตกต่างกันเช่น ใน P. falciparum จะเห็นเป็นลักษณะคล้ายกล้วยหอม แต่มาลาเรียชนิดอื่นจะมีลักษณะกลม ถ้าย้อมเชื้อมาลาเรียด้วยสีจิมซา (Giemsa) จะเห็นแกมมีโตไซท์เพศเมีย (macrogametocyte) มีไซโตพลาสม (cytoplasm) ติดสีฟ้าเข้ม ในขณะที่นิวเคลียส (nuclues) จะเห็นขนาดเล็กติดสีแดงเข้ม ส่วนแกมมีโตไซท์เพศผู้ (microgametocyte) นั้น ไซโตพลาสมจะติดสีฟ้าจางกว่าและนิวเคลียสมีขนาดใหญ่ติดสีแดง การเจริญจากระยะวงแหวนจนถึงระยะแกมมีโตไซท์นั้นใช้เวลาประมาณ 7-14 วัน

ระยะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual stage)

เมื่อยุงก้นปล่องเพศเมียไปกัดคนหรือสัตว์ที่ติดเชื้อ ยุงจะได้รับเชื้อระยะแกมมีโตไซท์เข้าไปสู่กระเพาะอาหาร ทั้งแกมมีโตไซท์เพศเมียและแกมมีโตไซท์เพศผู้จะมีการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (macrogamete) และเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (microgamete) ตามลำดับ โดยแกมมีโตไซท์เพศผู้จะแบ่งตัวออกเป็นเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ 4-8 ตัว มีลักษณะยาวเรียวคล้ายแฟลกเจลลา เรียกกระบวนการนี้ว่า exflagellation เซลล์สืบพันธุ์เพศผู้แต่ละตัวนี้จะปฏิสนธิกับเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียได้ไซโกต(zygote) เจริญเป็นโอโอไคนีท (ookinete) มีลักษณะเป็นรูปรีโอโอไคนีทสามารถไชทะลุกระเพาะอาหารของยุงออกมาทางด้านนอกแล้วเจริญเป็นโอโอซีสท์ (oocyst) ภายในโอโอซีสท์จะมีสปอโรซอยท์อยู่เป็นจำนวนมาก โอโอซีสท์ของฟัลซิพารัมมาลาเรีย 1 ถุงจะมีสปอโรซอยท์มากถึง 1000 ตัว เมื่อโอโอซีสท์เจริญเต็มที่ถุงจะแตกออกและสปอโรซอยท์จะไปอยู่ที่ต่อมน้ำลาย (salivary gland) ของยุง เมื่อยุงกัดคนสปอโรซอยท์จะเข้าสู่คน วงจรชีวิตในยุงจะใช้เวลาประมาณ 10-14 วัน แล้วแต่ชนิดของเชื้อมาลาเรีย

พันธุกรรมของเชื้อมาลาเรีย (genetics of malaria parasite)

การควบคุมและกำจัดเชื้อมาลาเรียในปัจจุบันมีปัญหาหลายประการที่เป็นอุปสรรคและที่เป็นปัญหาสำคัญ 2 ประการที่ควรจะกล่าวถึงก็คือ เชื้อมาลาเรียดื้อต่อยาที่ใช้รักษาและไม่มีวัคซีนป้องกันมาลาเรีย แม้ว่าจะมีการศึกษาค้นคว้าอย่างต่อเนื่องเพื่อจะให้ได้ข้อมูลต่างๆมาเป็นแนวทางสู่การแก้ปัญหาดังกล่าวข้างต้นอย่างจริงจังแล้วก็ตาม จนถึงปัจจุบันนี้เราก็ยังไม่ทราบว่าเชื้อมาลาเรียดื้อยาได้อย่างไร รวมทั้งไม่มีวัคซีนป้องกันมาลาเรีย ส่วนหนึ่งน่าจะเป็นเพราะยังขาดความรู้ทางด้านชีววิทยาและพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรีย

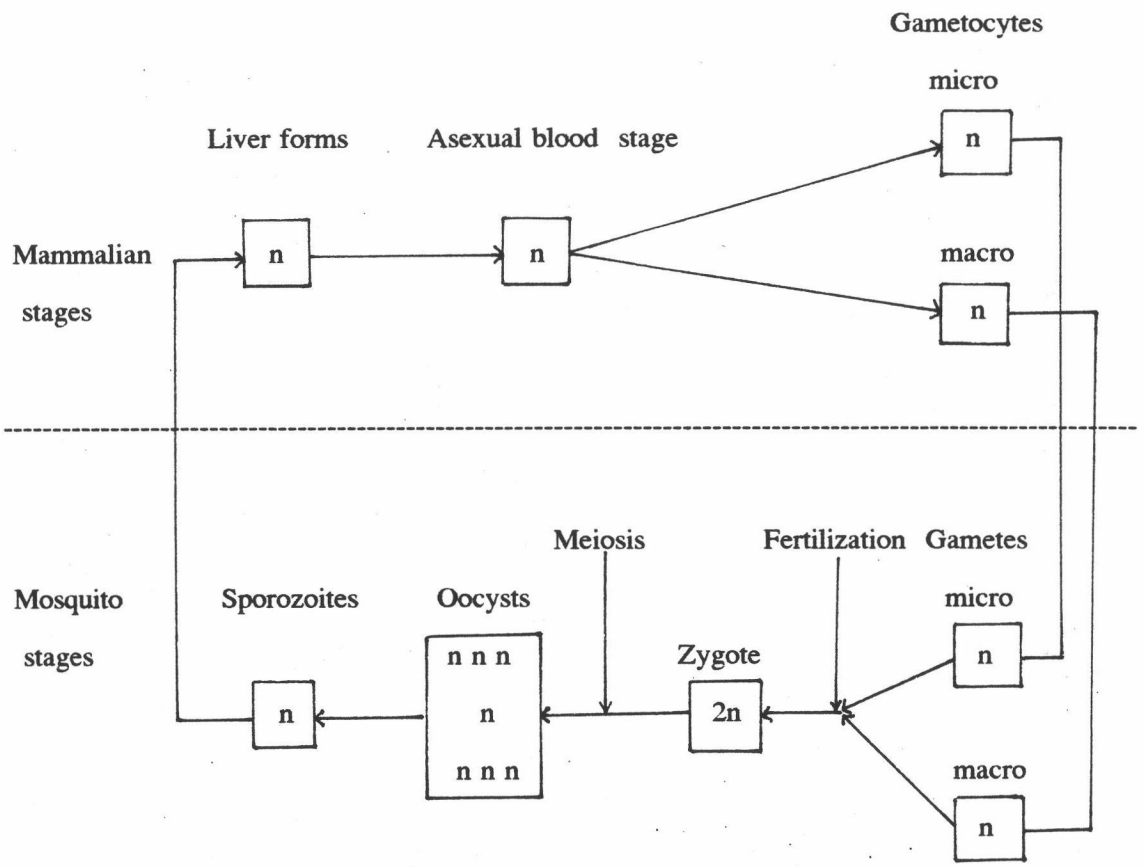
การศึกษาเกี่ยวกับพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียนั้นค่อนข้างยุ่งยาก เนื่องจากเชื้อมาลาเรียมีวงชีวิตที่ซับซ้อนต้องการโฮสต์ 2 ชนิดคือ ทั้งสัตว์มีกระดูกสันหลังและแมลง(ยุง) มีการสืบพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศและการเพิ่มจำนวนชนิดไม่อาศัยเพศ นอกจากนั้นวงชีวิตยังประกอบด้วยระยะต่างๆหลายระยะ แต่ละระยะมีความแตกต่างกันทั้งด้านชีววิทยา ชีวเคมี และสรีรวิทยา อย่างไรก็ตาม ในปี ค.ศ. 1983 Walliker ได้รายงานถึงความสำเร็จในการศึกษาเกี่ยวกับการถ่ายทอดพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรีย โดยทดลองกับเชื้อมาลาเรียของหนู (P. yoelli และ P. chabaudi) ซึ่งนับว่ามีประโยชน์อย่างมาก เพราะทำให้ทราบข้อมูลเกี่ยวกับพันธุศาสตร์ของเชื้อมาลาเรียหลายประการอาทิ การถ่ายทอดพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียเป็นไปตามกฎของ Mendel ระยะใน

เม็ดเลือดแดงมีโครโมโซมเป็นครึ่งหนึ่ง (haploid, n) การแบ่งเซลล์แบบไมโอซีส (meiosis) เกิดขึ้นในระหว่างการแบ่งตัวขั้นต้นของไซโกต การดื้อยาไพริเมธามีนและคลอโรควินเกิดจากการกลายพันธุ์ (gene mutation) การแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรม (genetic recombination) ของสายพันธุ์ที่ต่างกันเกิดขึ้นได้ระหว่างที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อมาลาเรียในยุง (Walliker., 1983)

Walliker และคณะ ได้ทำการศึกษาการผสมข้ามพันธุ์ (genetic cross) ของเชื้อ P. falciparum สายพันธุ์บริสุทธิ์ (clone) สองสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติแตกต่างกัน (ใช้เอนไซม์ ความไวต่อยา แอนติเจน และรูปแบบของโครโมโซมเป็นตัวบ่งชี้ (marker)) จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมของสองสายพันธุ์นี้ เกิดขึ้นระหว่างที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อมาลาเรียในยุง ทำให้ประชากรรุ่นต่อมาที่ได้จากการผสม (progeny) มีพันธุกรรมแบบใหม่ที่ต่างไปจากเดิม โดยสามารถเห็นได้จากรูปแบบโครโมโซม (chromosome patterns) ที่แตกต่างไปจากของสายพันธุ์ตั้งต้น (parent clone) (Walliker et al., 1987)

การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับมาลาเรียก่อนปี ค.ศ. 1976 นั้น มีข้อจำกัดในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับเชื้อมาลาเรียที่ทำให้เกิดโรคในคนคือ ไม่มีสัตว์ทดลองที่เหมาะสมที่จะใช้ทดลองและไม่สามารถเพาะเชื้อเพื่อให้ได้เชื้อปริมาณมากพอที่จะนำไปทำการค้นคว้าวิจัยได้ ความสำเร็จของ Trager และJensen (Trager and Jensen., 1976) ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ P. falciparum แบบต่อเนื่องในห้องปฏิบัติการ นับว่าให้ประโยชน์อย่างมากในการทำวิจัยเกี่ยวกับตัวเชื้อมาลาเรีย เพราะนอกจากทำให้ได้เชื้อปริมาณมากพอที่จะนำไปศึกษาแล้ว ยังสามารถทำการทดลองต่างๆกับระยะไม่มีเพศที่เกิดขึ้นในเม็ดเลือดแดงซึ่งเป็นระยะที่ทำให้เกิดอาการในผู้ป่วยอีกด้วย หลังจากมีวิธีเลี้ยงเชื้อ P. falciparum แล้ว การศึกษาวิเคราะห์หาแอนติเจนเพื่อจะใช้เป็นวัคซีน การศึกษาเกี่ยวกับการดื้อยา การศึกษาทดลองการออกฤทธิ์ของสารที่จะนำมาใช้ในการฆ่าเชื้อมาลาเรีย รวมทั้งการศึกษาในด้านอื่นๆอีกมากมายได้เจริญรุดหน้าอย่างรวดเร็ว แต่การศึกษาเกี่ยวกับโครโมโซมของเชื้อมาลาเรียนั้นเป็นไปอย่างช้ามาก สาเหตุสำคัญประการหนึ่งคือ ระหว่างที่เกิดขบวนการไมโอซีสนั้น โครโมโซมไม่หดตัว (condense) เป็นแท่งให้เห็นชัดเจนพอที่จะให้ศึกษาได้ ความก้าวหน้าในการศึกษาโครโมโซมของเชื้อมาลาเรียเริ่มขึ้นหลังจากที่ Kemp และคณะ (Kemp et al., 1985) ประสบความสำเร็จในการวิเคราะห์จำนวนโครโมโซมของเชื้อ P. falciparum โดยวิธี Pulsed Field Gradient Gel Electrophoresis (PFGE) ซึ่ง Carle และOlson (Carle and Olson., 1984) ได้คิดค้นขึ้นเพื่อใช้ในการวิเคราะห์จำนวนโครโมโซมของยีสต์

เชื้อมาลาเรียเกือบทุกระยะที่พบในวงชีวิตมีจำนวนโครโมโซมครึ่งหนึ่ง (haploid, n) (Walliker., 1983) ซึ่งได้แก่ระยะเมอร์โรซอยท์ แกมมีโตไซท์ แกมีท และสปอโรซอยท์ มีอยู่ระยะเดียวที่มีโครโมโซมเต็มจำนวนคู่ (diploid, 2n) คือระยะไซโกต ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 แสดงจำนวนโครโมโซมที่พบในวงชีวิตของเชื้อมาลาเรีย

n=haploid no. 2n=diploid no. (Thaithong and Beale, 1992)

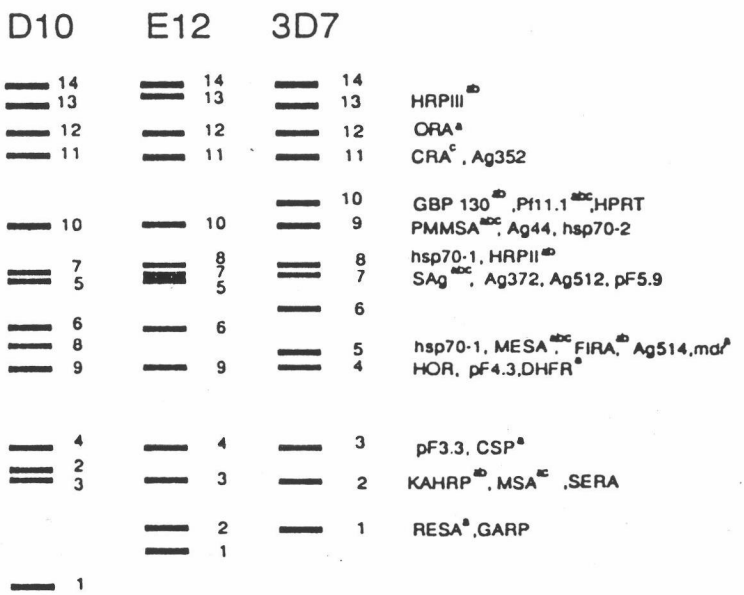
เชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมมีโครโมโซมจำนวน 14 โครโมโซม (Prensier and Slomianny ., 1986 ; Kemp et al ., 1987 ; Langsley et al ., 1987) ขนาดโครโมโซมของเชื้อ P. falciparum อยู่ระหว่างประมาณ 800 - 3500 Kb ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับเชื้อมาลาเรียของหนู (P. berghei , P. vinckei , P. chabaudi) ซึ่งพบว่าอยู่ระหว่าง 730 - 2000 Kb (Shepherd et al., 1989) ที่ปลายทั้ง 2 ข้างของเส้นโครโมโซมแต่ละเส้นจะมี telomere ติดอยู่ ซึ่งลักษณะเช่นนี้พบ

ได้ในเซลล์ eukaryote ทั่วๆไป telomere ประกอบด้วยเบส (base) ที่เรียงตัวซ้ำๆกัน (tandemly repeated sequence) telomere มีหน้าที่ช่วยให้ดีเอ็นเอที่อยู่แถวตอนปลายๆโครโมโซมเกิดการจำลองตัว (replication) อย่างสมบูรณ์และรักษาให้โครโมโซมมีสภาพเป็นเส้นอยู่ได้ (Blackburn., 1984 ; Blackburn and Szostak., 1984)

การศึกษาของนักวิทยาศาสตร์หลายกลุ่มมีผลให้ประเมินได้ว่าโครโมโซมของเชื้อมาลาเรียสามารถเปลี่ยนแปลงขนาดได้บางโครโมโซมอาจเล็กลงบางโครโมโซมอาจมีขนาดใหญ่ขึ้น เมื่อนำมาทำ PFGE แล้วมีผลทำให้รูปแบบของโครโมโซมบนเจลต่างกันไป Kemp และคณะ (Kemp et al., 1985) พบว่าเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยในพื้นที่ที่มีสภาพภูมิศาสตร์แตกต่างกันมีรูปแบบของโครโมโซมต่างกัน Van der Ploeg และคณะ (Van der ploeg et al., 1985) และ Corcoran และคณะ (Corcoran et al., 1986) ยังพบอีกว่าแม้ว่าจะเป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่แยกจากไอโซเลตเดียวกันก็อาจมีความแตกต่างกันในรูปแบบของโครโมโซมได้เช่นกัน รูปที่ 4 แสดงโครโมโซมทั้ง 14 โครโมโซมของ P. falciparum 3 สายพันธุ์บริสุทธิ์ (D10 , E12 และ 3D7) หลังจากทำ PFGE โครโมโซมที่มีขนาดเล็กที่สุดเป็นโครโมโซมที่หนึ่งและโครโมโซมที่มีขนาดใหญ่ที่สุดเป็นโครโมโซมที่ 14 โดยใช้สายพันธุ์ 3D7 เป็นสายพันธุ์มาตราฐาน (Kemp et al., 1987) หลังจากทำไฮบริไดเซชัน (hybridization) กับดีเอ็นเอตัวติดตาม (DNA probe) ซึ่งเป็นยีนที่ได้รับการศึกษาอย่างแพร่หลายจนทราบหน้าที่แล้ว ทำให้สามารถทำแผนที่ยีน (gene mapping) บนโครโมโซมได้ ทำให้ทราบว่ายีนใดอยู่บนโครโมโซมใด การเพิ่มขนาดของโครโมโซม 5 ในเชื้อ P. falciparum ที่ดื้อต่อยาคลอโรควินนั้นพบว่า เกิดจากการเพิ่มจำนวนชุด (copy) ของยีน Pfmdr ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนซึ่งทำหน้าที่ขับยาออกจากเซลล์ ขนาดของโครโมโซม 5 ที่เพิ่มขึ้นในแต่ละสายพันธุ์ที่ดื้อยานั้นขึ้นอยู่กับจำนวนชุดของยีนนี้ (Foote and Cowman., 1989)

จากหลักฐานที่มีในปัจจุบันทำให้พอจะสรุปได้ว่า การเปลี่ยนแปลงขนาดโครโมโซมนั้นมีสาเหตุจาก 1) การขาดหายของโครโมโซมบางส่วนไป (deletion) 2) การแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมระหว่างที่มีกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีสหรือเกิดจากการเพิ่มยีนเป็นชุด (gene duplication) หรือหลายๆชุด (gene amplification)

จะเห็นได้ว่า ปัจจุบันเรามีความรู้และความเข้าใจเกี่ยวกับพันธุศาสตร์ของเชื้อมาลาเรียเพิ่มมากขึ้น ข้อมูลต่างๆที่ได้ล้วนแต่มีความสำคัญเพราะจะเป็นแนวทางนำไปสู่การศึกษาวิธีกำจัดหรือควบคุมเชื้อมาลาเรียในอนาคต



รูปที่ 4 แสดงโครโมโซมจำนวน 14 โครโมโซมของ 3 สายพันธุ์บริสุทธิ์ของเชื้อ P. falciparum (D10,E12 และ 3D7) (Kemp et al., 1987)

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียชนิดพลาสโมเดียมฟัลซิพารัม (genetic diversity in Plasmodium falciparum)

จากการศึกษาวิจัยในระดับพื้นฐานทางชีววิทยาของเชื้อมาลาเรียเพื่อที่จะให้ได้ข้อมูลอันเป็นประโยชน์ในการควบคุมและกำจัดโรคมาลาเรียนั้น ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาประยุกต์เป็นเทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรม สามารถสร้างรีคอมบิแนนต์ดีเอ็นเอ (recombinant DNA) จากการค้นพบเอนไซม์ที่จำเพาะต่อกรดนิวคลีอิกหรือที่เรียกว่า เรสทริกชันเอนโดนิวคลีเอส (restriction endonuclease) ซึ่งสามารถย่อยสายดีเอ็นเอให้ได้ชิ้นส่วนที่มีขนาดต่างๆกัน ทำให้สามารถช่วยในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้และแยกชิ้นส่วนที่มีขนาดต่างๆกันโดยเทคนิคอิเลคโทรโฟรีซีส ต่อมาได้มีการนำเอาเทคนิคดังกล่าวมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียโดยวิธีการโคลนนิง (cloning) และการหาลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ (sequencing) การศึกษาความหลากหลายของยีนอันจะเป็นประโยชน์ในการพัฒนาวัคซีนป้องกันมาลาเรีย ผลจากการศึกษาดังกล่าวพบว่า แอนติเจนยีนเกือบทุกชนิดประกอบด้วยส่วนที่ซ้ำกัน (tandem repeats) ของลำดับนิวคลีโอไทด์และส่วนที่สามารถกระตุ้นให้ร่างกายโฮสต์เกิดการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกัน (host immune response) (Kemp et al., 1987) บริเวณส่วนที่ซ้ำกันนี้พบว่า มีความแตกต่างกันในแต่ละไอโซเลต การศึกษาการผสมข้ามพันธุ์พบว่า การแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมเกิดขึ้นได้ระหว่างกระบวนการไมโอซีส ทำให้เกิดจีโนไทป์ (genotype) ใหม่ๆที่แตกต่างไปจากของเดิม มีผลทำให้เกิดความหลากหลายของแอนติเจนซึ่งเป็นอุปสรรคในการผลิตวัคซีน การค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับการทำวัคซีนป้องกันเชื้อมาลาเรียได้กระทำอย่างต่อเนื่องจนถึงปัจจุบันและได้ข้อสรุปว่าวัคซีนที่ควรจะนำมาใช้ควรเป็นวัคซีนที่เรียกว่า polyvalent vaccine คือเป็นวัคซีนที่ป้องกันต่อการติดต่อโดยระยะสปอโรซอยท์ ระยะในเม็ดเลือดแดง (blood stage) และระยะแกมมีท ปัญหาหนึ่งที่ประสบอยู่คือเชื้อที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงมีแอนติเจนมากมายหลายชนิดที่ดูเหมือนว่าต่างก็จะเป็นแอนติเจนที่ดี แต่แอนติเจนเหล่านี้มีความแตกต่างกันออกไปในแต่ละสายพันธุ์ จนถึงปัจจุบันเรายังไม่ทราบแน่ชัดว่าควรนำแอนติเจนใดมาใช้จึงจะปลอดภัยและได้ประโยชน์มากที่สุด (Walliker., 1986 ; Moreno and Patarroyo., 1989) การเปลี่ยนแปลงแอนติเจนอาจจำเป็นต่อเชื้อมาลาเรียในแง่ที่มันจะหลบหนีหรือหลีกเลี่ยงจากการถูกทำลายด้วยระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ แต่ปรากฏการณ์เช่นนี้ก่อให้เกิดความยุ่งยากในการสร้างวัคซีนป้องกันมาลาเรียอย่างแน่นอน ดังนั้น จึงมีความจำเป็นที่ควรคำนึงถึงข้อนี้ในการศึกษาเกี่ยวกับแอนติเจนของเชื้อมาลาเรีย โดยต้องแน่ใจว่าแอนติเจนที่นำมาศึกษาเพื่อใช้เป็นวัคซีนต้องเป็นแอนติเจนที่ถาวร (conserved antigen) ซึ่งไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงไปตามขั้นตอนการเจริญเติบโตและสามารถถ่ายทอดไปสู่ลูก

หลานได้ วัคซีนป้องกันมาลาเรียที่ได้ผลอาจจะประกอบด้วยส่วนย่อย (subunit) ที่กระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีที่มีผลต่อทุกๆระยะของการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียในคน นอกจากนี้ยังประกอบด้วยส่วนย่อยมากกว่าหนึ่งชนิดจากแต่ละระยะการเจริญของเชื้อ วัคซีนซึ่งประกอบด้วยหลายๆส่วนประกอบย่อยมีเป้าหมายต่อระยะต่างๆของการเจริญเติบโต อาจจะมีศักยภาพที่สูงขึ้นในการป้องกันโรคซึ่งมุ่งรุกรานร่างกายของเราได้ดีกว่าด้วย ดังนั้นวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียจึงแบ่งตามระยะการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ sporozoite vaccine , asexual blood stage vaccine และ transmission blocking vaccine ถึงแม้ว่าปัจจุบันเรายังไม่สามารถผลิตวัคซีนที่มีประสิทธิภาพเป็นที่น่าพอใจได้เนื่องจากอุปสรรคดังกล่าวข้างต้น ในอนาคตจากการค้นคว้าวิจัยอย่างต่อเนื่องรวมถึงการพัฒนาเทคโนโลยีที่ทันสมัยอาจจะทำให้เราสามารถผลิตวัคซีนป้องกันมาลาเรียที่มีประสิทธิภาพได้

ความหลากหลายของแอนติเจนของเชื้อฟัลซิพารัมมาลาเรีย (antigenic diversity in P. falciparum)

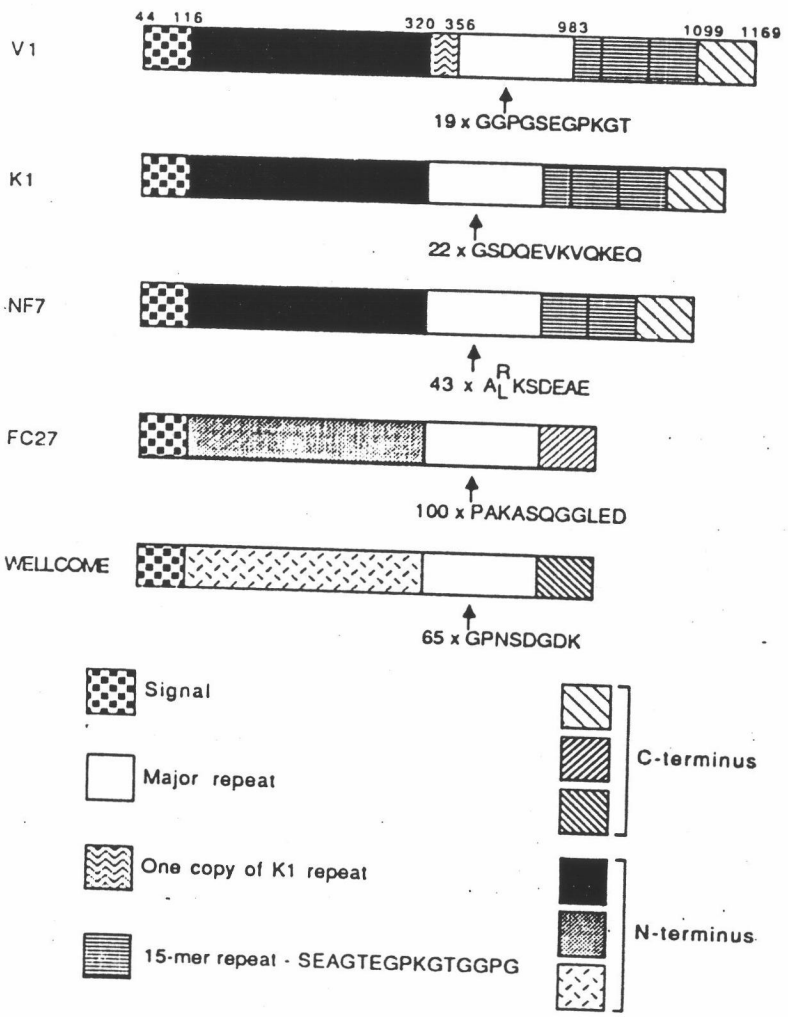
เนื่องจากเชื้อมาลาเรียมีระยะต่างๆในการเจริญเติบโตในคนหลายระยะและแต่ละระยะยังมีรูปร่างลักษณะตลอดจนโปรตีนซึ่งเป็นองค์ประกอบแตกต่างกันไปตามระยะที่มีการเปลี่ยนแปลงทำให้ภูมิต้านทานที่โฮสต์สร้างขึ้นต่อระยะต่างๆมีความจำเพาะ โปรตีนซึ่งเป็นองค์ประกอบในแต่ละระยะของการเจริญของเชื้อมาลาเรียมีมากมายหลายชนิดและมีความแตกต่างกันออกไปในแต่ละสายพันธุ์ ดังนั้นการผลิตวัคซีนป้องกันมาลาเรียที่จะให้ผลดีจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาคุณลักษณะของโปรตีนที่จะนำมาใช้เป็นส่วนประกอบของวัคซีนป้องกันมาลาเรีย ได้มีผู้ทำการศึกษาแอนติเจนของเชื้อมาลาเรียและพบว่ามีมากมายหลายชนิด อาทิเช่น

1. secreted antigens

1.1 S-antigen

S-antigen เป็นโปรตีนที่ถูกสร้างและเก็บอยู่ภายใน parasitophorous vacuole ถูกหลั่งออกมาเมื่อไชซอนท์แตกออก สามารถใช้ S-antigen ในการศึกษาความหลากหลายของเชื้อมาลาเรียไอโซเลตต่างๆได้ รวมทั้งการจำแนกชนิด (serotyping) ของเชื้อ P. falciparum ด้วย (Wilson et al., 1975 ; Anderers et al., 1983) จากรูปที่ 5 แสดงให้เห็นความแตกต่างของยีนที่ควบคุมการสร้าง S-antigen ของเชื้อฟัลซิพารัม จำนวน 5 ไอโซเลต (Brown et al., 1987) ยีนที่ควบคุมการสร้าง S-antigen ประกอบด้วย 1 เอกซอน (exon) บริเวณส่วนกลางประกอบด้วยส่วน

ที่ซ้ำกัน (tandem repeat) S-antigen ในไอโซเลต FC27 พบว่าประกอบด้วยส่วนที่ซ้ำกันของกรดอะมิโน 11 ตัว (PAKASQGGLED) จำนวน 100 ชุด (copy) ในขณะที่ S-antigen ในไอโซเลต K1 ประกอบด้วยส่วนที่ซ้ำกันของกรดอะมิโน 12 ตัว (GSDQEVKVQK EQ) จำนวน 22 ชุด จากการศึกษาพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อมาลาเรียในไอโซเลต FC27 และ NF7 ไม่ทำให้เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross reaction) นอกจากนี้ยังพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ S-antigen สามารถขัดขวางไม่ให้เมอร์โรซอยท์เข้าไปเจริญในเม็ดเลือดแดงใหม่ในหลอดทดลองได้ (Saul et al., 1985)



รูปที่ 5 แสดงโครงสร้างของยีน S-antigen ของเชื้อมาลาเรีย จาก 5 ไอโซเลต (Brown et al., 1987)

1.2 glycophorin-binding protein

glycophorin-binding protein (GBP) เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 105-130 KD โปรตีนดังกล่าวสร้างจากระยะไซซอนท์และถูกปล่อยออกมาในน้ำเลี้ยงเชื้อ (culture supernatant) เมื่อไซซอนท์แตกออก (Perkin, 1984; Bianco et al ., 1987) ยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนชนิดนี้มีเพียง 1 เอกซอนที่ประกอบด้วยส่วนของ signal sequence ด้านปลาย N-terminus ถัดเข้ามาเป็นส่วนของกรดอะมิโนจำนวน 155 ตัว ตามด้วยส่วนของกรดอะมิโน 50 ตัว เรียงตัวกันซ้ำไปมาและปลายด้าน C-terminus ในไอโซเลต FCR3 พบว่าประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 50 ตัว เรียงตัวซ้ำๆกันประมาณ 11 ชุด (Kochan et al., 1986) โปรตีนดังกล่าวพบว่าสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลองได้ (Dubois et al ., 1984)

1.3 serine - rich antigen

serine - rich antigen (SERA) เป็นโปรตีนที่ถูกสร้างและเก็บอยู่ภายใน parasitophorous vacuole (Delplace et al., 1987 ; Coppel et al., 1988) มีน้ำหนักโมเลกุล 126 KD บริเวณ N-terminus ของยีนดังกล่าวประกอบด้วยกรดอะมิโน 8 ตัว (TGGGNAGS) เรียงตัวซ้ำกัน 6 ครั้งและกรดอะมิโน 6 ตัว (AGTTCT/A) เรียงตัวซ้ำกัน 19 ครั้ง (Knapp et al., 1989) Perrin และคณะ แสดงให้เห็นว่าการฉีดโปรตีนดังกล่าวในลิง Saimiri สามารถทำให้เกิดภูมิคุ้มกันในลิงได้ (Perrin et al., 1984)

2. circumsporozoite protien

circumsporozoite (CS) protein เป็นโปรตีนที่เกาะอยู่บนผิวของสปอโรซอยท์ จากการศึกษาในหนูที่ได้รับการฉีดวัคซีนที่ทำจากสปอโรซอยท์ที่ทำให้อ่อนกำลังโดยการฉายแสง (irradiated sporozoite) ของ P. berghei เพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันแล้วติดตามดูความสามารถของหนูในการต้านทานโรคมาลาเรียพบว่า หนูมีภูมิต้านทานสูงขึ้นและถ้าลองฉีดสปอโรซอยท์ที่ปกติเข้าไปปรากฏว่าหนูไม่เป็นมาลาเรีย (Nussenzweig et al., 1967) นอกจากนี้ยังมีการทดลองในอาสาสมัครซึ่งก็พบว่าสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในคนได้เช่นกัน (Clyde., 1990) ปัจจุบันเราทราบว่าภูมิคุ้มกันต่อสปอโรซอยท์มีความจำเพาะต่อสปอโรซอยท์เท่านั้น (stage specific) และจำเพาะต่อชนิดด้วย (species specific) (Yoshida et al., 1980)

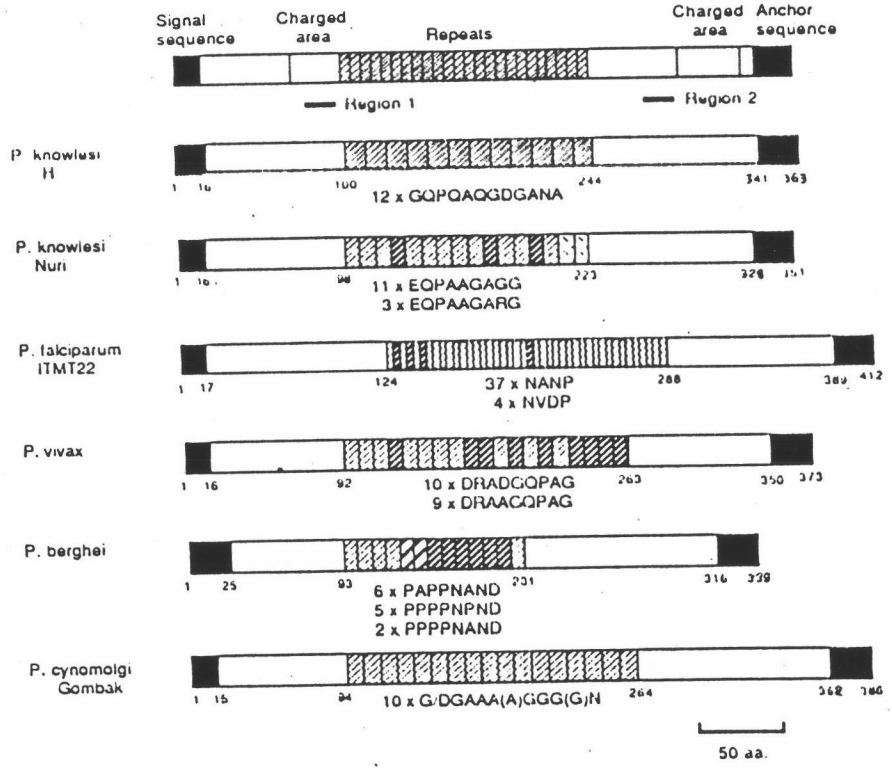
จากการศึกษายีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนที่ผิวของสปอโรซอยท์ของฟัลซิพารัมมาลาเรียพบว่าประกอบด้วยส่วนที่เป็น signal sequence ที่ปลายด้าน N-terminus และส่วนของ hydrophobic sequence ที่ปลายด้าน C-terminus (Ellis et al., 1983 ; Dame et al., 1984 ;

Eichinger et al., 1986) บริเวณส่วนกลางของยีนพบว่ากรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบของโปรตีนดังกล่าวมีลักษณะจำเพาะคือ ประกอบด้วยส่วนของกรดอะมิโน $[(NAAP)_{37}(NVDP)]_4$ เรียงตัวกันซ้ำไปซ้ำมา (รูปที่ 6) และเป็นตำแหน่งที่ตั้งของ B cell epitope หลายตัว (Zavala et al., 1983)

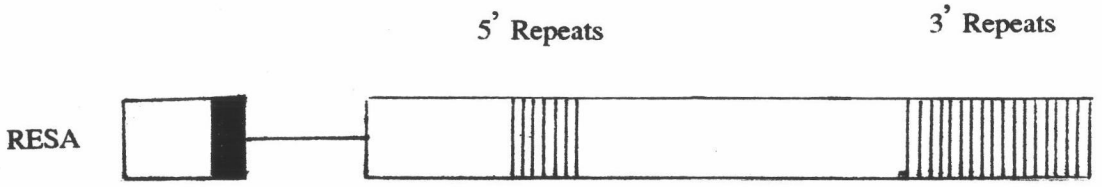
3. ring infected erythrocyte surface antigen

ring infected erythrocyte surface antigen (RESA) หรือ Pf155 (Kemp et al., 1983 ; Miller et al., 1986) เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 155 KD เกาะอยู่บนผิวของเม็ดเลือดแดง โดยเนื่องมาจากเมอร์โรซอยท์ที่เข้าไปเจริญในเม็ดเลือดแดง จากการศึกษาพบว่าแอนติบอดีต่อ RESA/Pf155 มีคุณสมบัติในการขัดขวางการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดง (asexual blood stage) ในหลอดทดลองได้ (Wahlin et al., 1984)

ยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนดังกล่าวประกอบด้วย 2 เอกซอน (รูปที่ 7) เอกซอนที่ 1 สามารถถอดระหัสให้เป็นกรดอะมิโน 65 ตัว ส่วน exon ที่ 2 สามารถถอดระหัสให้เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 125 KD บริเวณด้าน C - terminus พบว่าประกอบด้วยกรดอะมิโน (EENVEHDA , EENV และ EEV) เรียงตัวกันซ้ำไปมา ส่วนบริเวณด้าน N-terminus ประกอบด้วยส่วนที่ซ้ำกันของกรดอะมิโน (DDEHVEEPTVA) ซึ่งพบว่าทั้งสองส่วนนี้สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มได้ (cross reacting antigenic epitope) (Gowman et al., 1984 ; Ander et al., 1986)



รูปที่ 6 แสดงโครงสร้างของยีน circumsporozoite protien ของเชื้อพลาสโมเดียมชนิดต่างๆ (Kemp et al.,1987)



รูปที่ 7 แสดงโครงสร้างของยีน ring infected erythrocyte surface antigen ของเชื้อ P.falciparum (Kemp et al., 1987)

4. merozoite surface antigen

4.1 merozoite surface protein -1 (MSP-1) เป็น asexual blood stage antigen ที่กำลังศึกษากันอยู่ถึงความเป็นไปได้ที่จะนำมาผลิตวัคซีนป้องกันมาลาเรีย merozoite surface protein-1 หรือที่รู้จักกันในชื่ออื่นๆเช่น 195 KD protein (Holder and Freeman., 1982 ; 1984) P190 (Hall et al., 1983) The polymorphic schizont antigen (McBride et al., 1985) และ gp195 (Reese et al., 1985) โปรตีนดังกล่าวถูกสังเคราะห์ขึ้นในระยะไซซอนท์ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 180 - 220 KD (Holder and Freeman., 1984 ; Perkins., 1982) ปรากฏอยู่ที่ผิวของเมอร์โรซอยท์ ระหว่างการเจริญของเมอร์โรซอยท์ MSP-1 มีกระบวนการ proteolytic cleavage ให้เป็นชิ้นส่วน (fragment) ที่มีขนาด 83 KD, 28-30 KD, 38 KD และ 42 KD ทั้ง 83 KD, 28-30 KD และ 38 KD จะถูกสลัด (shed) ออกก่อนที่เมอร์โรซอยท์จะเข้าสู่เม็ดเลือดแดงใหม่ ขณะที่ 42 KD เปปไทด์ ยังคงเกาะอยู่กับระยะวงแหวน

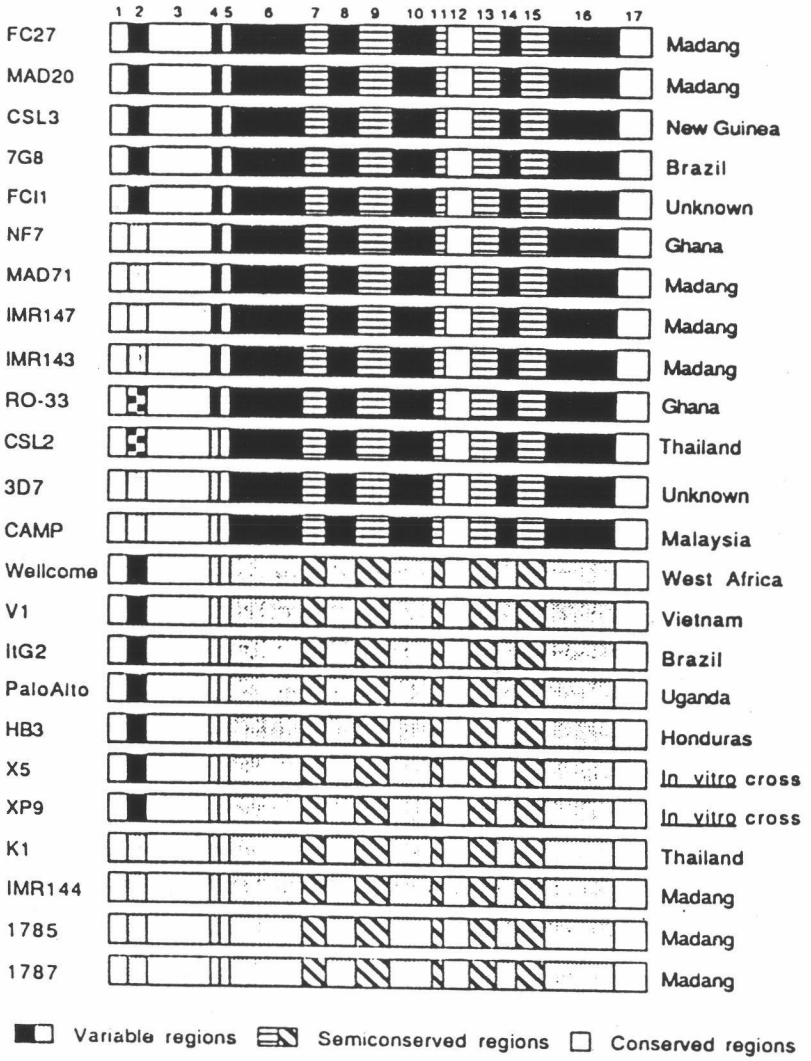
จากการทดลองใช้ MSP-1 บริสุทธิ์ที่สกัดจากเมอร์โรซอยท์ฉีดเข้าลิง Aotus พบว่าโปรตีนดังกล่าวสามารถชักนำให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ P. falciparum ได้สำเร็จ (Siddiqui et al., 1987) นอกจากนี้ยังพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ MSP-1 หลายตัวสามารถขัดขวางไม่ให้เมอร์โรซอยท์เข้าไปเจริญในเม็ดเลือดแดงใหม่และยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียในหลอดทดลอง (Cheung et al., 1986) ดังนั้น MSP-1 จึงเป็น malaria vaccine candidate ที่ดีชนิดหนึ่ง แต่จากการศึกษาคุณสมบัติและลักษณะต่างๆของ MSP-1 ในไอโซเลตต่างๆโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีพบว่า โปรตีนดังกล่าวมีความหลากหลายของแอนติเจน (antigenic diversity) แตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ โดยโปรตีนดังกล่าวประกอบด้วยส่วนที่เป็น variable และ constant epitope (McBride et al., 1982 ; 1985 ; Hall et al., 1984) McBride และคณะ แสดงให้เห็นว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีบางตัวจะทำปฏิกิริยากับทุกสายพันธุ์ของ P. falciparum แต่โมโนโคลนอลแอนติบอดีบางตัวก็มีความจำเพาะต่อชนิด (species specific) ทำให้สามารถจำแนก MSP-1 ออกเป็น 7 ชนิด (serotype) (McBride et al., 1985)

การศึกษายีนที่ควบคุมการสร้าง MSP-1 พบว่า MSP-1 อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 9 และมีเพียง 1 ชุดต่อจีโนม จำนวนกรดอะมิโนที่ถอดระหัสให้เป็นยีน MSP-1 อยู่ระหว่าง 1631-1726 แตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ มีผลทำให้เกิดความแตกต่างของขนาด (molecular size polymorphism) ระหว่าง 180-220 KD นอกจากนี้ยังพบว่า MSP-1 ถูกสร้างจากยีนที่มีลักษณะเป็น dimorphic allele กล่าวคือ nucleotide substitution ที่ตำแหน่งหนึ่งตำแหน่งใดในโมเลกุลมีเพียง 2 ชนิดเท่านั้น ความรู้ดังกล่าวทำให้สามารถแบ่งยีน MSP-1 ออกเป็นบล็อค (block) ต่างๆ โดยอาศัยความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างสายพันธุ์ ออกเป็น 17 บล็อค ซึ่งประกอบ

ด้วย 5 conserved blocks (มี nucleotide sequence homology > 87 %) , 5 semiconserved blocks (มี nucleotide sequence homhlogy ระหว่าง 13-87 %) และ 7 variable blocks (มี nucleotide sequence homology < 13 %) (Tanabe et al., 1987) การวิเคราะห์การเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ทำให้สามารถอธิบายการเกิดความหลากหลายของแอนติเจนของ MSP-1 ได้จากกระบวนการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมระหว่างการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ทำให้มีโอกาสแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมระหว่างกันได้ มีผลทำให้เกิดรูปแบบของยีนที่แตกต่างกัน การเกิด deletion/ insertion ที่ variable blocks ทำให้เกิดความแตกต่างของขนาดของยีน MSP-1 จากรูปที่ 8 แสดงให้เห็นว่าส่วนที่เป็น variable และ semiconserved blocks ของ MSP-1 มี ปรากฏเพียง 2 รูปแบบเท่านั้น (dimorphic)

จากการเปรียบเทียบโครงสร้างพื้นฐานของยีน MSP-1 ในสายพันธุ์ต่างๆทำให้สามารถแบ่ง MSP-1 ออกได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ K1 และ MAD20 ทั้ง K1 และ MAD20 พบว่ามีการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันในทุกๆ variable และ semiconserved blocks การเกิด intragenic recombination ของ 2 อัลลีลต้นแบบ (parental allele) ระหว่างกระบวนการไมโอซีสนี้ มีผลทำให้เกิดรูปแบบของอัลลีลที่แตกต่างกัน จากการศึกษาในบางส่วนของ MSP-1 พบว่า บริเวณบล็อค 2 ซึ่งเป็น variable block ที่อยู่ทางด้าน N - terminus เป็นบริเวณที่มีความแตกต่างกันมาก มีลักษณะหลายรูปแบบซึ่งเป็นส่วนที่แตกต่างจาก variable block อื่นๆที่มีลักษณะเพียง 2 รูปแบบ (dimorphism) กล่าวคือ การเรียงลำดับของกรดอะมิโนมีลักษณะเป็น tripeptide repeats (S-X-X) เมื่อ S คือ serine และ X คือ กรดอะมิโนใดๆ เรียงตัวกันซ้ำไปมาจำนวน 5-19 ซ้ำ แตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์ (Jongwutiwes et al., 1992) จากการศึกษาโดยการใช้เทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (polymerase chain reaction) ในบางส่วนของยีน MSP-1 พบว่าบริเวณบล็อค 2 มีลักษณะแตกต่างกันถึง 3 แบบได้แก่ ชนิด K1 , MAD20 และ RO33 (ตารางที่ 1) (Jongwutiwes et al., 1992 ; Kimura et al., 1990 ; Peterson et al., 1988 ; Scherf et al., 1991 ; Snewin et al., 1991) โดยมีกลุ่มที่พบมากของไอโซเลตจากประเทศซีนีกรัลและบราซิลเป็นชนิด RO33 และ K1 ขณะที่ไอโซเลตจากประเทศไทยเป็นชนิด MAD20 จากรูปที่ 8 แสดงให้เห็นรูปแบบที่ 3 ของ variable block 2 ในไอโซเลต RO33 จากประเทศกานา (Certa et al., 1987) และ CSL2 จากประเทศไทย (Peterson et al., 1988) ซึ่งพบว่าเป็นสายพันธุ์ที่ไม่มีส่วนของกรดอะมิโนที่มีลักษณะเป็น tripeptide repeats

ถึงแม้ว่าหน้าที่ที่แท้จริงของ MSP-1 ยังไม่เป็นที่ทราบกันแน่นอนนักแต่เชื่อกันว่าโปรตีนนี้น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับขั้นตอน recognition , attachment และ invasion เพื่อที่จะเข้าไปเจริญในเม็ดเลือดแดงใหม่ต่อไป



รูปที่ 8 แสดงโครงสร้างยีนของ merozoite surface protein-1 ของเชื้อ P. falciparum จำนวน 24 ไอโซเลตจากประเทศต่างๆ (Peterson et al., 1988)

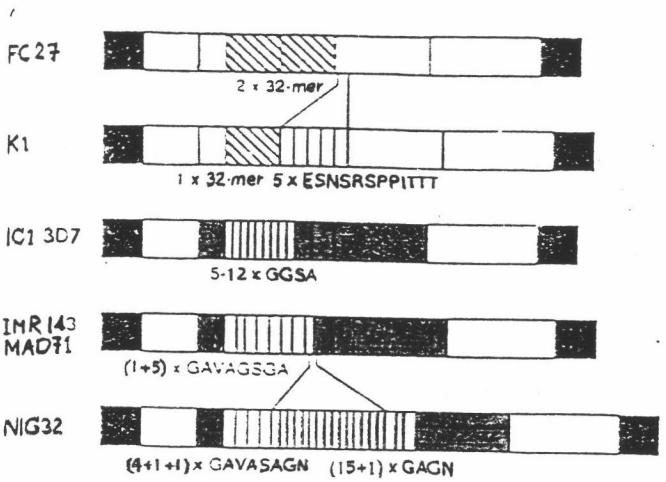
ตารางที่ 1 แสดงความถี่ของการพบอัลลีล MSP-1 ของเชื้อ P . falciparum ในพื้นที่ต่างๆกัน (Tanabe., 1992)

area	number of isolates	allele RO33(%)	K1(%)	MAD20(%)	reference	
Thailand	19	16	21	74	Jongwutiwes	1992
Columbia	31	84	10	48	Snewin	1991
Senegal	16	94	56	13	Scherf	1991
Brazil	30	53	50	17	Kimura	1990
(culture)	23	4	44	52	Peterson	1988

4.2 merozoite surface protein -2 (MSP-2) เป็น integral membrane protein อีกชนิดหนึ่งบนผิวของเมอร์โรซอยท์ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 45-52 KD (Smythe et al., 1988) หรือที่รู้จักกันในชื่ออื่นๆเช่น 45 KD protein , 35-48 KD merozoite surface antigen และ 51 KD antigen เป็นโปรตีนอีกชนิดหนึ่งที่จัดเป็น malaria vaccine candidate เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียในหลอดทดลองได้ (Epping et al., 1988)

MSP-2 แตกต่างจาก MSP-1 คือไม่มีกระบวนการ proteolytic cleavage ระหว่างการเจริญของเมอร์โรซอยท์ แต่จากการศึกษาพบว่ามีความหลากหลายของแอนติเจนในสายพันธุ์ต่างๆ เช่นเดียวกับ MSP-1 (Fenton et al., 1991)

จากการศึกษา MSP-2 ในระดับการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า MSP-2 อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 2 สามารถแบ่งยีนดังกล่าวออกเป็น 5 บล็อค โดยอาศัยความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งประกอบด้วยส่วนที่เป็น conserved blocks ด้าน N และ C terminus (บล็อคที่ 1 และ 5) ถัดเข้ามาเป็นส่วนที่เป็น semiconserved blocks (บล็อคที่ 2 และ 4) บริเวณส่วนกลาง (บล็อคที่ 3) เป็นส่วนของ variable block ซึ่งพบว่าเป็นบริเวณที่ประกอบด้วยการเรียงตัวของกรดอะมิโนซ้ำๆกัน (tandem repeats) ซึ่งมีขนาดและลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ (รูปที่ 9) จากการศึกษายีน MSP-2 บริเวณ variable block พบว่าสามารถแบ่งออกเป็น 2 แฟมิลีได้แก่ IC1/3D7 และ FC27 (Smythe et al., 1989 ; 1990 ; 1991) ซึ่งทั้ง 2 แฟมิลีนี้ตรงกับที่ Fenton และคณะ ได้จำแนกไว้โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีจำแนกออกเป็น serogroup A และ B (Fenton et al., 1991) โดย IC1/3D7 ประกอบด้วยการเรียงตัวของกรดอะมิโนที่ซ้ำๆกัน 4 ตัว จำนวน 5-12 ชุด ส่วน FC27 ประกอบด้วยการเรียงตัวของกรดอะมิโน 32 ตัว จำนวน 2 ชุด (2x32 repeat unit) แต่ในไอโซเลต K1 จากประเทศไทยพบเพียง 1 ชุด (Smythe et al., 1988 ; 1991)



รูปที่ 9 แสดงโครงสร้างยีนของ merozoite surface protein-2 ของเชื้อ P. falciparum จากไอโซเลตต่างๆ

(Smythe et al., 1991)

polymerase chain reaction

การตรวจวินิจฉัยเชื้อก่อโรคในคนสามารถทำได้โดยใช้ตัวติดตามที่มีความจำเพาะ (specific nucleic acid probe) โดยวิธีไฮบริไดเซชันซึ่งมีการพัฒนาวิธีการอย่างต่อเนื่องมาตลอด จนกระทั่งในปี ค.ศ. 1983 Karry Mullis ได้ค้นพบวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองที่ เรียกว่า polymerase chain reaction (PCR) และได้มีการนำเทคนิคนี้มาใช้ครั้งแรกในปี ค.ศ.1985 โดย Saiki และคณะ (Saiki et al., 1985) โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะบริเวณของยีน β -globin ที่สกัดจากเม็ดเลือดขาวของคนไข้โรค sickle cell anemia

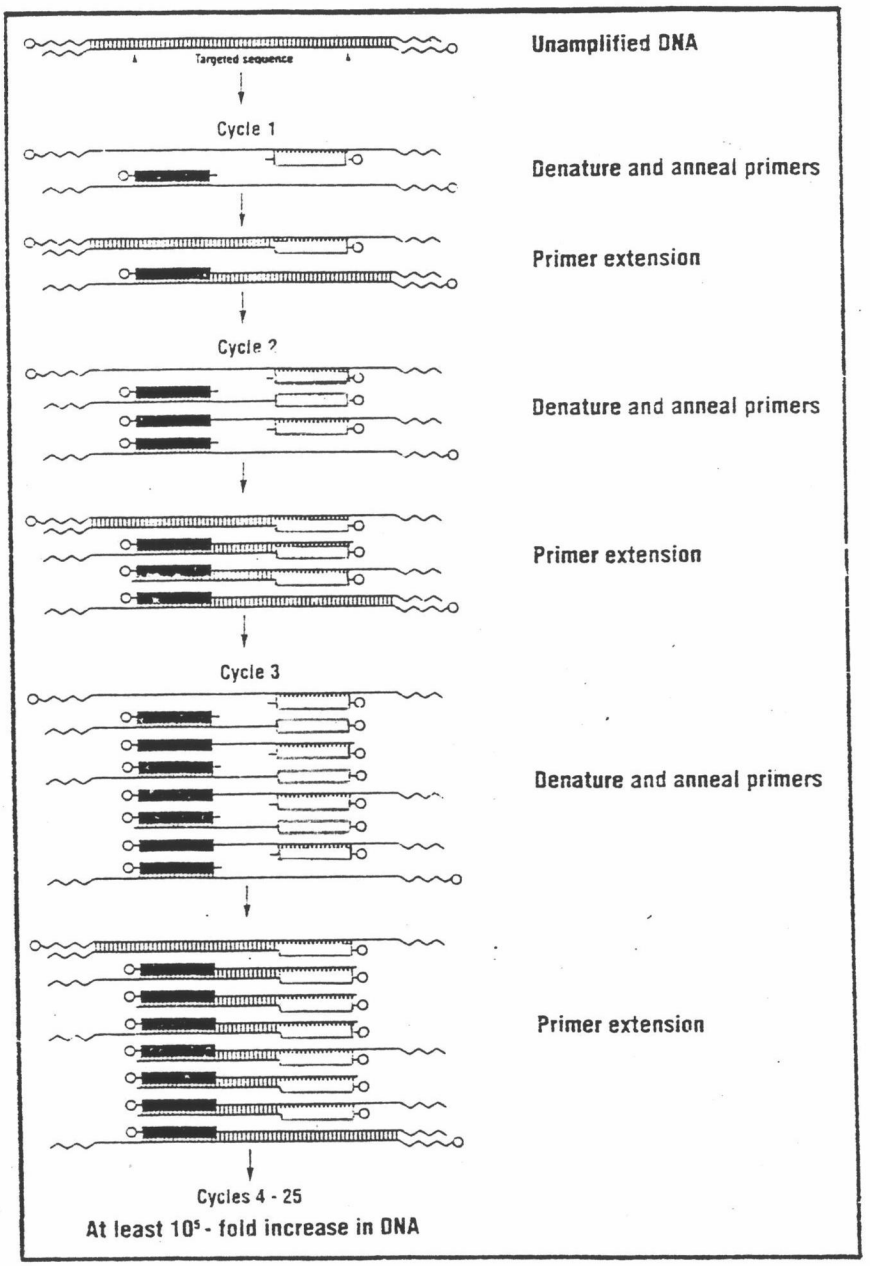
หลักการพื้นฐาน (basic principle) ของ PCR อาศัยหลักการจำลองตัวของดีเอ็นเอ (DNA replication) โดยทำให้เกิดในหลอดทดลอง (*in vitro*) แบบซ้ำกันหลายรอบ (repeated cycles) ในช่วงแรกของเทคนิค PCR ใช้เอนไซม์ Klenow fragment ปฏิกิริยาในแต่ละรอบของ PCR ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ได้แก่

1. denaturation: ทำให้ดีเอ็นเอสายคู่แยกจากกันเป็นสายเดี่ยว เกิดที่อุณหภูมิสูง ประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส

2. primer annealing: ไพรเมอร์ 2 สายเข้าไปจับคู่สม (complementary) บนดีเอ็นเอสาย เดี่ยวที่เป็นแม่พิมพ์ (DNA template) เกิดที่อุณหภูมิประมาณ 40-60 องศาเซลเซียสขึ้นอยู่กับ อุณหภูมิแยกตัว (Tm) ของไพรเมอร์

3. primer extension: เป็นการต่อลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลาย 3'- OH ของไพรเมอร์ โดยใช้เอนไซม์ Klenow fragment ซึ่งต้องการอุณหภูมิพอเหมาะที่ 30 องศาเซลเซียส

เมื่อทำซ้ำจำนวนหลายรอบ ทำให้สามารถเพิ่มขยายดีเอ็นเอจากเดิมได้จำนวนมาก โดยมี จำนวนผลิตผล (PCR product) คำนวณได้เท่ากับ 2^n (n=จำนวนรอบ) ถ้าปฏิกิริยามีประสิทธิภาพ 100% (รูปที่ 10)



รูปที่ 10 หลักการของ polymerase chain reaction (PCR)

(Saiki et al., 1985)

เนื่องจากเอนไซม์ Klenow fragment ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR นั้นไม่ทนความร้อน ในทุกขั้นตอนของ denaturation ที่อุณหภูมิสูงเอนไซม์จะสูญเสียสภาพธรรมชาติ (denature) ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ ดังนั้นในการศึกษาระยะแรกๆต้องเติมเอนไซม์ใหม่ลงไปในขั้นตอน primer extension ในทุกรอบของปฏิกิริยา PCR เป็นผลให้ส่วนผสมของปฏิกิริยามีปริมาตรเพิ่มขึ้นเรื่อยๆทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย เนื่องจากเอนไซม์ Klenow fragment มีราคาแพง ต่อมาในปี ค.ศ. 1988 ได้มีรายงานการปรับปรุงเทคนิคนี้ให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้นโดยใช้การทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ชนิดที่ทนความร้อนสูง (thermostable DNA polymerase) แยกสกัดจาก thermophilic bacteria Thermus aquaticus (*Taq*) ซึ่งได้จากบ่อน้ำพุร้อนใน Yellowstone national park มีคุณสมบัติเร่งปฏิกิริยาการสร้างดีเอ็นเอได้ที่อุณหภูมิสูง (70° C) ทำให้ไม่ต้องเติมเอนไซม์ใหม่ลงไปในทุกๆรอบของปฏิกิริยาและสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น (Saiki et al., 1988) เทคนิคที่ได้พัฒนาขึ้นนี้จึงเป็นที่นิยมใช้ในปัจจุบัน

การตรวจวิเคราะห์ผลิตผล PCR

วิธีการตรวจหาผลิตผล PCR กระทำได้หลายวิธี เทคนิคที่ใช้แบ่งได้เป็น 2 เทคนิคใหญ่ๆคือ

1. วิธีเจลอิเลคโทรโฟรีซีส (gel electrophoresis)

คือการตรวจดูผลิตผล PCR จากการย้อมดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) หลังจากผ่านกระบวนการอิเลคโทรโฟรีซีสแล้ว วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็วที่สุดเหมาะสำหรับการตรวจหาผลิตผล PCR ที่ทราบขนาดแน่นอน หากเป็นชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดยาวกว่า 500 คู่เบส (bp) นิยมใช้ 1 % (w/v) อะกาโรสเจล (agarose gel) แต่หากเป็นดีเอ็นเอที่มีขนาดสั้นกว่า 500 คู่เบส มักใช้ 2 % (w/v) อะกาโรสเจล หรือ 5 % (w/v) อะคริลาไมด์เจล (acrylamide gel)

2. วิธีไฮบริไดเซชัน (nucleic acid hybridization)

คือวิธีการตรวจหาผลิตผล PCR ที่ต้องการในกรณีที่การดูผลจากเจลไม่ชัดเจนหรือต้องการเพิ่มความมั่นใจ วิธีนี้ต้องใช้ตัวติดตาม (probe) ที่มีเบสคู่สมกับผลิตผล PCR และจะจับคู่สมในสภาวะที่เหมาะสม ตัวติดตามอาจเป็นดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอก็ได้ แต่ต้องติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีหรือสารปลอดรังสี

ขั้นตอนการติดตามผลิตผล PCR ด้วยวิธีนี้ประกอบด้วย

1. การติดฉลากดีเอ็นเอ (DNA labelling)

สารที่ใช้ในการติดฉลากดีเอ็นเอมีทั้งสารที่เป็นกัมมันตรังสีและสารปลอดรังสี สารกัมมันตรังสีที่นิยมนำมาใช้เป็นตัวติดฉลากมีหลายชนิดได้แก่ ^{32}P , ^{35}S , ^{125}I และ ^{3}H แต่ที่นิยมกันมากคือ ^{32}P เพราะแตกตัวให้รังสีที่มีพลังงานสูงทำให้มีความไวในการติดตาม โดยสารกัมมันตรังสีจะถูกติดฉลากอยู่ในตำแหน่งที่เหมาะสมในโมเลกุลของนิวคลีโอไทด์ ส่วนการติดฉลากด้วยสารปลอดรังสีก็สามารถกระทำได้สะดวก รวดเร็ว เช่นเดียวกับการติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี แต่มีข้อดีตรงที่สารปลอดรังสีมีความปลอดภัยและเก็บได้นานกว่าสารกัมมันตรังสี สารปลอดรังสีที่นิยมใช้ได้แก่ biotin, fluorescein, horse radish peroxidase, alkaline phosphatase เป็นต้น วิธีที่นิยมติดฉลากด้วยสารปลอดรังสีคือการติดฉลากที่ปลาย 3' ซึ่งจะใช้คุณสมบัติของเอนไซม์ deoxynucleotidyl transferase (TdT)

2. การทำไฮบริไดเซชัน (hybridization)

ไฮบริไดเซชันคือการกำหนดสภาวะให้ตัวติดตามที่ติดฉลากแล้วสามารถเข้าจับกับเบสคู่สมกับดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยทั้งคู่จะถูกทำให้อยู่ในสภาพสายเดี่ยว (single stand) มักนิยมให้ดีเอ็นเอเป้าหมายตรึงอยู่บนเมมเบรน (membrane) ซึ่งมีคุณสมบัติจับดีเอ็นเอสายเดี่ยวได้ดี ส่วนดีเอ็นเอติดตามจะอยู่ในสารละลาย การตรึงดีเอ็นเอเป้าหมายบนเมมเบรนทำได้ทั้งการใช้ความร้อนและใช้แสงอุลตราไวโอเลต (UV) ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของเมมเบรนที่ใช้

ปัจจัยต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการทำไฮบริไดเซชัน

1. ส่วนประกอบของเบสบนตัวติดตาม
2. อุณหภูมิที่ก่อให้เกิดการรวมตัวของดีเอ็นเอสายเดี่ยวกลายเป็นสายคู่
3. ความเข้มข้นของตัวติดตาม
4. ความเข้มข้นและคุณสมบัติทางประจุของเกลือในสารละลายไฮบริไดเซชัน

ปัจจัยต่างๆเหล่านี้จะส่งผลให้อุณหภูมิที่ใช้ในการไฮบริไดเซชันแตกต่างกัน ซึ่งจะขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของตัวติดตามเป็นหลัก การทำไฮบริไดเซชันมักนิยมทำที่อุณหภูมิต่ำกว่า Tm ประมาณ 5-10 องศาเซลเซียสเท่านั้นเพื่อให้การจับคู่ของเบสอยู่ตัวมากขึ้น

3. การตรวจหาตัวติดตาม (detection)

ถ้าเป็นการตรวจหาสารกัมมันตรังสีทำได้โดยการประกบแผ่นเมมเบรนที่หุ้มด้วยพลาสติกใส (saran wrap) กับแผ่นฟิล์ม X-ray เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16-24 ชั่วโมงจึงนำฟิล์มไปล้างและดูผลจุดสีดำที่ปรากฏ ส่วนการตรวจหาสารปลอดรังสีแบ่งเป็นการตรวจหาสีและการตรวจหาแสงขึ้นกับชนิดของสารปลอดรังสีที่ใช้ ถ้าสารปลอดรังสีเป็น fluorescein มักใช้ anti-fluorescein-horse radish peroxidase conjugate เป็นตัวตรวจจับและสามารถให้ผลเป็นแสงสีน้ำเงินที่มีความยาวคลื่น (λ max) 428 นาโนเมตร (nm) ซึ่งจะตรวจพบได้เป็นจุดสีดำบนฟิล์ม X-ray เมื่อให้สารตั้งต้นคือ peroxide และ luminol โดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ horse radish peroxidase