บทที่2

ทบทวนเอกสาร

โรคมาลาเรียมีสาเหตุมาจากโปรโตซัวที่อยู่ในจีนัส *Plasmodium* มีพาหะเป็นยุงก้นปล่อง (*Anopheles spp.*) เพศเมีย เชื้อมาลาเรียที่ทำให้เกิดโรคในคนมี 4 ชนิด คือ

Plasmodium falciparum

Plasmodium vivax

Plasmodium malariae

Plasmodium ovale

โดย *P. falciparum* เป็นชนิดที่รุนแรงที่สุด

วงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรีย (Life cycle)

วงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรียเป็นวงจรชีวิตที่ซับซ้อนต้องการโฮสต์ (host) 2 ชนิด คือสัตว์มีกระดูกสันหลัง และ ยุงก้นปล่อง วงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรียประกอบด้วย ระยะมีเพศ (sexual stage) และระยะไม่มีเพศ (asexual stage) อาศัยในโฮสต์ที่เป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังรวมทั้งคนด้วย (รูปที่ 2-1) เชื้อมาลาเรียที่ทำให้เกิดโรคในคนทั้ง 4 ชนิด จะมีวงจรชีวิตคล้ายคลึงกัน แตกต่างกันในรายละเอียดเพียงเล็กน้อย

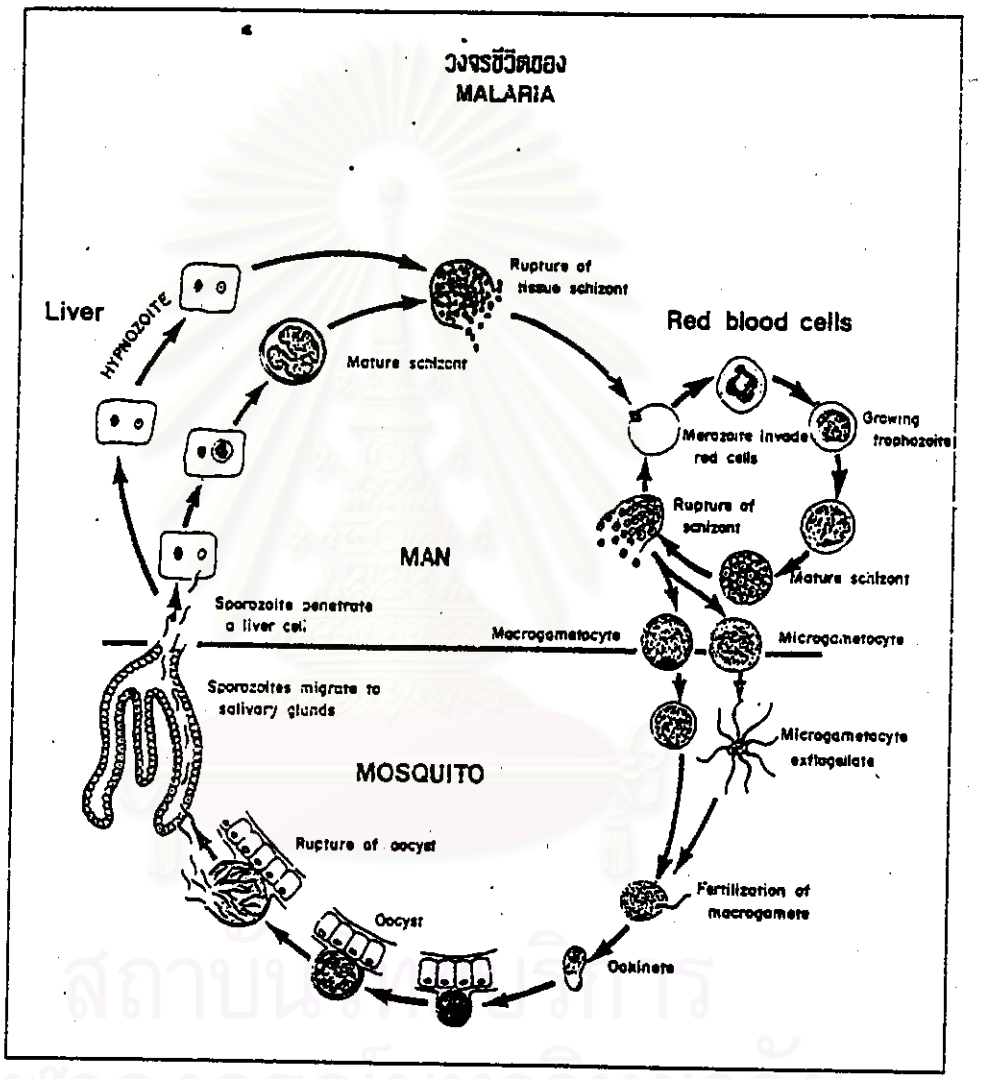
เมื่อยุงเพศเมียกัดโฮสต์ก็จะปล่อย สปอร์โรซอยท์ (sporozoite) เข้าสู่ระบบไหลเวียนโลหิต และภายใน 20- 30 นาที ก็จะเข้าสู่เนื้อเยื่อพาเรนไคมา (parenchyma cell) ของเซลล์ตับ และเริ่มแบ่งตัวแบบไม่มีเพศ (asexual maltiplication) เพื่อสร้างระยะโทรโฟซอยท์ (trophozoite) ไชซอนท์ (schizont) ตามลำดับ เชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมจะอยู่ในระยะไชซอนท์ มากกว่า 5.5 วัน (Knell, A.J, 1991) และต่อจากนั้นในระยะนี้จะพัฒนาไปเป็นระยะเมอร์โรซอยท์ (merozoite) จะเรียกระยะที่เชื้อมาลาเรียอยู่ในเซลล์ตับว่า exo-erythrocytic stage หรือ hepatic stage สำหรับ *P. vivax* และ *P. ovale* เมื่อสปอร์โรซอยท์เข้าสู่ตับนอกจากจะมีการเจริญแบบดังกล่าวแล้ว จะมี

ส่วนหนึ่งหยุดพักการเจริญและแฝงตัวในเซลล์ตับช่วงเวลาหนึ่ง เรียกระยะที่หยุดการเจริญนี้ว่า hypnozoite (Krotoski et al., 1982) ซึ่งเป็นสาเหตุของการไข้กลับ (relapse) เพราะเชื้อมาลาเรียที่อยู่ในระยะพักตัวอาจมีการพัฒนาการเป็นปกติในภายหลัง เมื่อไซซอนท์แตกออกจากเซลล์ตับจะได้เมอร์โรซอยท์ มากกว่า 30,000 ตัว เข้าสู่ระบบเลือด โดยเมอร์โรซอยท์จะเข้าสู่เม็ดเลือดแดงในทันทีแล้วจะเจริญเป็นระยะวงแหวน (ring form) ระยะโทรโฟซอยท์ และเมื่อมีการแบ่งนิวเคลียส เชื้อมาลาเรียจะเข้าสู่ระยะไซซอนท์ ซึ่งภายในจะมีเมอร์โรซอยท์ 8-32 ตัว ขึ้นกับชนิดของเชื้อมาลาเรีย เมื่อไซซอนท์แตกออกเมอร์โรซอยท์ก็จะถูกปล่อยออกมาและพร้อมที่จะเข้าสู่เม็ดเลือดแดงใหม่ต่อไป ช่วงเวลาของวงจรชีวิตจะมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อมาลาเรีย (ตารางที่ 2-1)

เมอร์โรซอยท์บางตัวจะเจริญไปเป็นระยะมีเพศ คือ แกมมีตเพศผู้ (microgametocyte) และ แกมมีตเพศเมีย (macrogametocyte) เมื่อโฮสต์ที่มีเชื้อมาลาเรียระยะมีเพศถูกยุงกัด ยุงจะได้รับระยะมีเพศเข้าไป ระยะมีเพศจะเข้าสู่กระเพาะอาหารส่วนกลาง (midgut) ภายใน 10 นาที แกมมีตเพศผู้ จะเข้าสู่ระยะ exflagellation และจะเข้าปฏิสนธิ (fertilization) กับ แกมมีตเพศเมีย ได้ไซโกต (zygote) ที่เคลื่อนที่ได้ เรียกว่า ookinete ซึ่งจะไปฝังตัวอยู่ที่เซลล์บุผิว (epithelial cell) ของกระเพาะอาหารส่วนกลาง และจะเจริญไปเป็นระยะโอโอซีสต์ (oocyst) ภายในจะมีการแบ่งตัวแบบไมโอซิส (meiosis) ให้ได้สปอร์โรซอยท์ประมาณ 10,000 ตัว (Knell, A.J, 1991) เมื่อโอโอซิสต์แตกออก สปอร์โรซอยท์จะเดินทางไปยังต่อมน้ำลาย (salivary gland) ของยุง เมื่อยุงกัดโฮสต์ สปอร์โรซอยท์ก็จะถูกปล่อยเข้าสู่ร่างกายของโฮสต์พร้อมกับน้ำลาย (Knell, A.J, 1991)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2-1 แสดงวงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรีย (ประยงค์ และคณะ 2535)

ตารางที่ 2-1 แสดงช่วงเวลาของวงจรชีวิตที่แตกต่างกันของเชื้อมาลาเรียที่ทำให้เกิดโรคในคน (Howard, R. J.,1986)

	P. falciparum	*P. vivax*	*P. ovale*	*P. malariae*
clinical features	severe anemia, renal failure, cerebral malaria, pulmonary edema, death	splenic rupture, anemia		RBC infection persists for years, nephrosis
worldwide incidence	common	common	uncommon	uncommon
relapses from liver forms[a]	absent	present	present	absent
incubation period[b]	7-27 days (avg. 12)	10-40 days, occasionally months (avg. 14)	12-26 days (avg. 15)	18-76 days
blood parasitemia	very high (up to 60%)	usually < 1%	usually < 1%	usually < 1%
asexual cycle	48 hr	48 hr	48 hr	72 hr
mortality	high in nonimmunes and common in untreated	uncommon	rarely fatal	rarely fatal
persistence	< 3 yr	< 3 yr	usually < 3 yr	many years

[a]Relapse: recurrent RBC infection derived from latent parasites in liver after a mosquito-induced incubation.

[b]Incubation period: interval from time of mosquito inoculation until appearances of clinical signs (fever).

avg. = average

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ความหลากหลายของจีนของ *Plasmodium falciparum*

Plasmodium falciparum เป็นปรสิตชนิดหนึ่งที่มีความหลากหลายระดับจีนดังต่อไปนี้

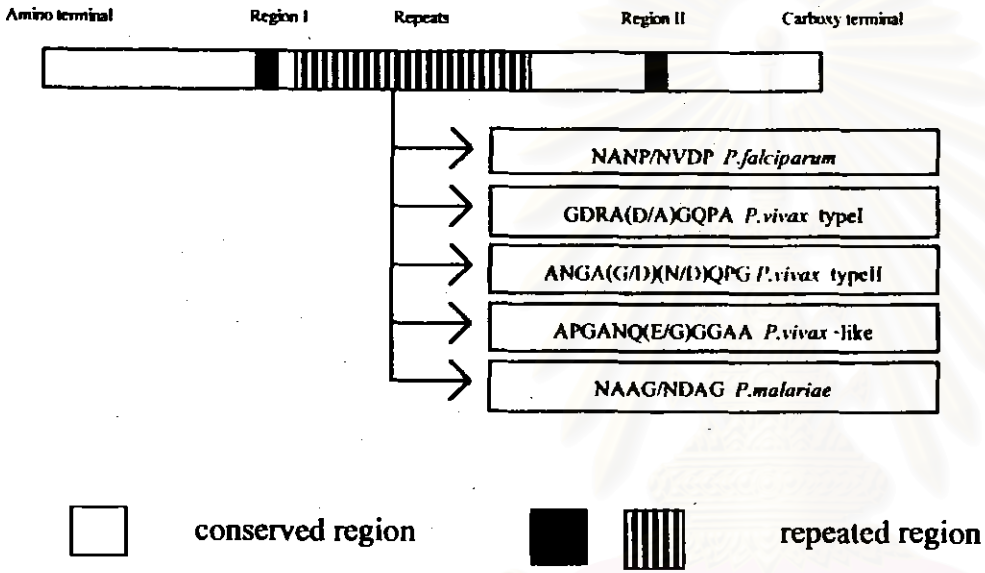
Circumsporozoite protein (CSP)

CSP เป็นโปรตีนตัวแรกที่ถูกนำมาทดลองใช้เป็นแอนติเจนในการผลิตวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย เนื่องจาก Nussenzwieg และคณะ (1967) พบว่าสปอร์โรซอยท์ (*P. berghei*) ที่ทำให้อ่อนกำลังลงด้วยรังสี (irradiated sporozoite) สามารถกระตุ้นให้หนูสร้างภูมิต้านทานต่อการติดเชื้อมาลาเรียได้ นอกจากนี้แอนติบอดีต่อ CSP สามารถยับยั้งการลุกลามของสปอร์โรซอยท์เข้าสู่เซลล์ตับชนิด HepG2-A16 ในหลอดทดลองได้ (Nussenzweig, and Nussenzweig, 1990) จึงเป็นโปรตีนที่ได้รับความสนใจศึกษาเพื่อพัฒนาเป็นวัคซีน โปรตีนชนิดนี้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 40 KD เป็นองค์ประกอบสำคัญของโปรตีนที่ปกคลุมผิวของสปอร์โรซอยท์ โครงสร้างของโปรตีนประกอบด้วย signal sequence ที่ N terminus ส่วน C-terminus มีคุณสมบัติค่อนข้างเป็น hydrophobic บริเวณส่วนกลางของโปรตีน ประกอบด้วยกรดอะมิโน 4 ชนิด เรียงตัวซ้ำไปมา [$(NANP)_{37}$ $(NVDP)_4$] บริเวณนี้อาจเป็นบริเวณที่สามารถกระตุ้นให้มีการผลิตแอนติบอดีได้ (Herrington *et al.*, 1987) แต่อย่างไรก็ตามการกระตุ้น protective immunity ให้มีประสิทธิภาพจะต้องทำให้การกระตุ้นทั้ง B cell และ T cell (humoral and cellular immune response) จึงจะสามารถป้องกันทั้งการติดเชื้อ และสามารถทำลายเชื้อมาลาเรียที่รุกรานได้ ดังนั้นการศึกษาบริเวณที่เป็น T cell epitope ใน CSP พบว่ามี T cell epitope 2 ตำแหน่ง ตั้งอยู่ในบริเวณ C terminal คือ Th2R และ Th3R มีรายงานว่า ทั้ง 2 บริเวณดังกล่าวมีความหลากหลายของรูปแบบอัลลีล (allelic polymorphism) (Doolan *et al.*, 1992; Jongwutiwes *et al.*, 1994) ดังแสดงในตารางที่ 2 และพบว่า ความหลากหลายดังกล่าวมีผลต่อการจดจำในการตอบสนองของ cytotoxic T cell (Udhaykumar *et al.*, 1994)

ตารางที่ 2-2 แสดงผลการศึกษาภาวะหลายรูปแบบในบริเวณ T cell epitope ของจีน Circumsporozoite protein

		T cell epitope region			
Area	Number of isolates	Th1R-N1	Th2R	Th3R	Referance
Thailand	15	-	8 types	7 types	Jongwutiwes *et al.*,1994,
Papua New Guinae, Brazil,Gambia	39,30,50	4 types	11 types	10 types	Qari *et al.*, 1994
Thailand, Malasia, Honduras, Natherland, Papua New Guinae, Gambia, Brazil	41	-	5 types	6 types	Doolan *et al.*, 1992
Papua New Guinae, Brazil	18 isolates/33clones 17isolates/19 clones	4 types	11 types	10 types	Shi *et al.*,1992
Brazil	32	-	11 types	10 types	Yoshida *et al.*, 1990
Brazil	5 isolates/ 50 clones	-	10 types	6 types	Lockyer *et al.*, 1989

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



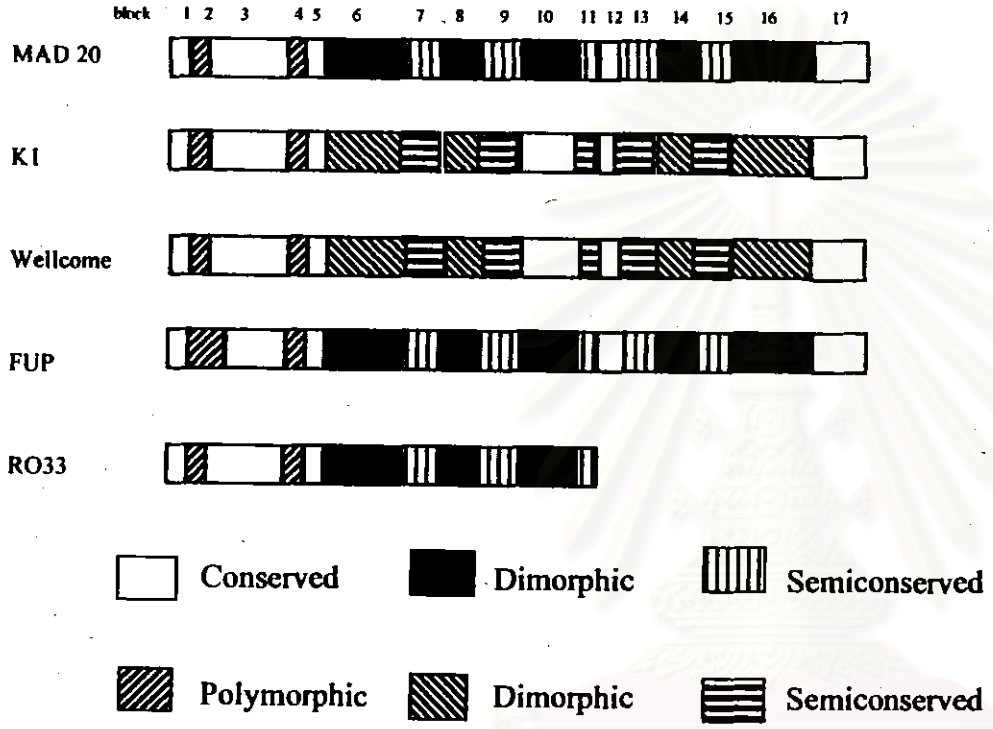
รูปที่ 2-2 แสดงโครงสร้างของจีนที่ควบคุมการสังเคราะห์โปรตีน circumsporozoite (CSP) ของเชื้อมาลาเรียชนิดที่ทำให้เกิดโรคในคน (Qari *et al.*, 1994) และกรดอะมิโนที่เรียงตัวซ้ำกัน ใน repeated region ของเชื้อมาลาเรียบางสายพันธุ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Merozoite surface protein 1 (MSP 1)

Merozoite surface protein 1 หรือรู้จักกันในชื่ออื่นๆ เช่น 195K protein (Holder and Freeman, 1982, 1984), P190 (Hall *et al.*, 1983) , 200Kd Protein (Perrin *et al.*, 1984) the polymorphic schizont antigen (McBride *et al.*, 1985) หรือ gp185 (Reese *et al.*, 1985) โปรตีนชนิดนี้ถูกสังเคราะห์ขึ้นในระยะไซซอนท์ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 180-200 kD ถูกพบบนผิวของเมอร์โรซอยท์ และบนผิวของเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อมาลาเรียระยะวงแหวน (ring form) เจริญอยู่ (Tanabe *et al.*, 1987; Perterson *et al.*, 1988) หน้าที่ของ MSP 1 ยังไม่ทราบแน่ชัดแต่สันนิษฐานว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการ recognition, attachment และ invasion (Cooper, 1993) ในการที่เชื้อมาลาเรียจะเจริญเข้าในเม็ดเลือดแดงใหม่ต่อไป จากการเปรียบเทียบลำดับเบสของจีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนชนิดนี้ในสายพันธุ์ฟัลซิพารัม สามารถแบ่งจีนออกได้เป็นส่วนๆ (block) ทั้งหมด 17 ส่วน โดยใช้ความคล้ายคลึงของลำดับเบสซึ่งประกอบด้วย 5 conserved blocks or regions (nucleotide homology>87%), 5 semiconserved blocks (nucleotide sequence homology 13-87%), 7 variable blocks (nucleotide sequence homology <13%) (Tanabe *et al.*, 1987) จากการศึกษาบริเวณส่วนที่ 2 ที่เป็น variable block อยู่ทางด้าน N terminal เพิ่มเติมพบว่าบริเวณนี้มีลักษณะแตกต่างกัน 3 รูปแบบ คือ K1 MAD20 และ RO33 สำหรับในบริเวณส่วนอื่น (block 1,3-17) มีรูปแบบเพียง 2 รูปแบบ (dimorphic alleles) (Jongwutiwes *et al.*, 1992) แต่อย่างไรก็ตามมีการศึกษาพบว่าส่วนที่ 12-17 ด้าน C terminal มีความหลากหลายในระดับจีน โดยใช้ตัวอย่าง 4 ไอโซเลต คือ RO33 RO71 3D7A และ FCH5 (Tolle *et al.*, 1995)

จากการศึกษาโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ทำปฏิกริยาต่อโปรตีนดังกล่าวในเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมจากหลายประเทศ (Conway *et al.*, 1991) พบว่าแอนติบอดีชนิดหนึ่งๆจะทำปฏิกิริยาเฉพาะกับเมอร์โรซอยท์บางไอโซเลต และสามารถพบความหลากหลายในอัลลีลถึง 36 อัลลีล แสดงว่ากรดอะมิโนในบริเวณที่แอนติบอดีเข้าไปจับมีความแปรปรวนไปตามสายพันธุ์ ดังนั้นในการใช้ MSA1 เป็นองค์ประกอบในการผลิตวัคซีน จึงมีอุปสรรคต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้เกิดการตอบสนองในทุกสายพันธุ์ของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม



รูปที่ 2- 3 แสดงโครงสร้าง และความหลากหลายของจีน MSP1 ในสายพันธุ์ต่าง ของ *P.falciparum* (Tanabe, *et al.*, 1987)

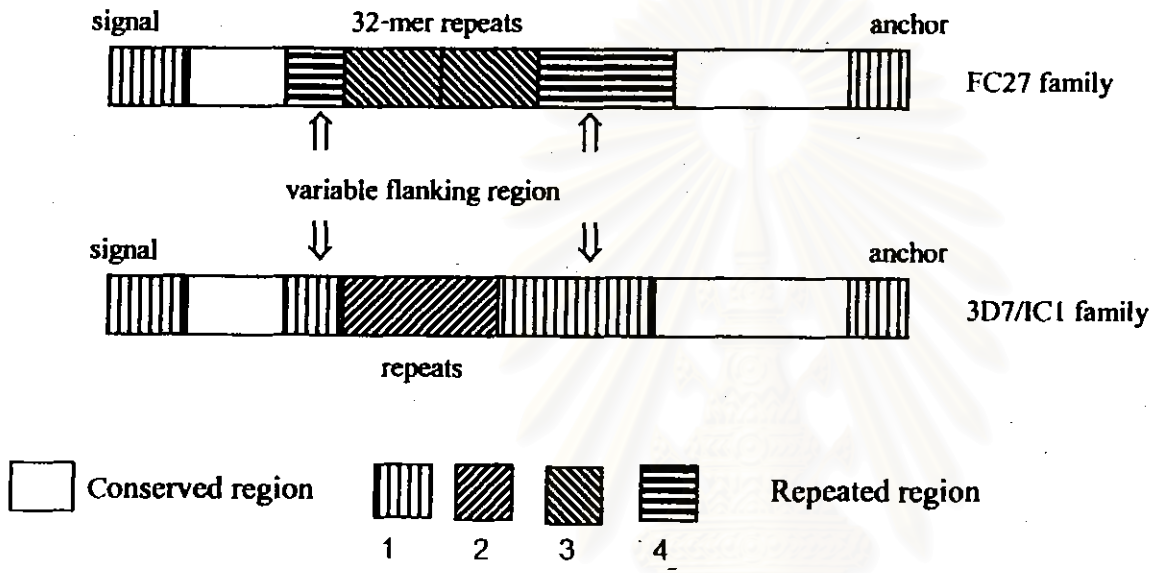
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Merozoite surface protein 2 (MSP 2)

MSP 2 เป็นโปรตีนที่ผิวของเมอร์โรซอยท์ (integral protein) อีกชนิดหนึ่งของ *P. falciparum* ที่จัดเป็น candidates vaccine มีน้ำหนักโมเลกุล 45-52 kDa (Smythe *et al.*, 1988) และที่รู้จักกันในชื่อ MSA2 (Smythe *et al.*, 1988) GYMSSA (Ramasamy, 1987) , QS122 (Epping *et al.*, 1988) , GP3 (Fenton *et al.*, 1989) จีนที่สร้างโปรตีน MSP 2 ประกอบด้วย ส่วนที่เป็น conserved ตั้งอยู่ที่ 5' terminal (43 amino acid) และ 3' terminal (74 amino acid) ซึ่งตรงส่วนกลางจีน (central region) ก็เป็นจะ repititive และ nonrepititve region ที่มีความคล้ายคลึงของจีนน้อย (Prescott *et al.*, 1994) (รูปที่ 2-4)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ MSP 2 สามารถใช้จำแนกกลุ่ม (family) ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ 3D7/CAMP และ FC27 (Fenton *et al.*, 1991) องค์ประกอบของ จีนไอโซเลต FC27 มีกรดอะมิโนที่ซ้ำๆกัน (repeated amino acid) 32 ตัว อยู่ 2 ชุด ส่วนในจีนไอโซเลต 3D7/CAMP มีกรดอะมิโนที่ซ้ำๆกันของ GGAS หลายชุด ด้วยการใช้เทคนิคไฮบริไดเซชั่น (hybridization) พบว่าสามารถจัดกลุ่มจีนในแต่ละไอโซเลตได้ผลในลักษณะเดียวกับการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี แต่ก็พบว่ามีบางไอโซเลตไม่สามารถไฮบริไดซ์กับตัวตรวจจับ (probe) ได้ แสดงว่าไอโซเลตดังกล่าวมีรูปแบบของอัลลีลที่ต่างกันออกไป ต่อมาได้มีการศึกษาถึงลำดับเบสพบว่าที่ central region มีการเรียงตัว ของกรดอะมิโนที่ซ้ำกัน 8 ตัว (octapeptide repeat) ซึ่งต่างไปจากรูปแบบทั้ง 2 ข้างต้น (Bhattacharya *et al.*, 1995)

การศึกษาคุณลักษณะของจีน MSP 2 โดยวิธีต่างๆอาทิ eletrophoresis (Babiker *et al.*, 1990 ; Creasey *et al.*, 1990) immunological protein assay (Conway *et al.*, 1992) dot blot hybridization with allele specific oligonucleotide probes (Smythe *et al.*, 1990) PCR-RFLP(Felger *et al.*, 1993) แสดงให้เห็นว่า อัลลีลจีน MSP 2 มีความหลากหลายอยู่ในระดับหนึ่งและพบในบริเวณส่วนกลางของจีน แต่ก็ยังมีความคล้ายคลึงและสามารถจัดอยู่ในกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งของ FC27 และ IC1/CAMP ซึ่งน่าจะสามารถนำมาใช้เป็นส่วนประกอบของการผลิตวัคซีนได้ในอนาคต



รูปที่ 2-4 แสดงโครงสร้างของจีน MSP 2 (Marshall, *et al.*, 1994)

หมายเหตุ หมายเลข 1, 2, 3, 4 หมายถึง บริเวณที่มีลำดับเบสแตกต่างกัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

S antigen

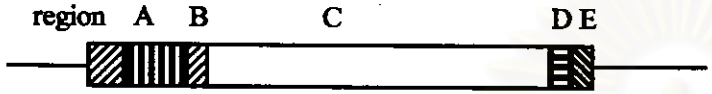
S antigen เป็นโปรตีนที่ปล่อยออกมาจาก parasitophorous vacuole เมื่อไซซอนท์แตกออก มีน้ำหนักโมเลกุล 50-220 kDa จากการศึกษาโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ S antigen พบว่ามีความแตกต่างไปตามสายพันธุ์ คาดว่าสามารถแบ่งได้ถึง 50 แบบ ซึ่งสามารถนำมาใช้ประโยชน์เป็น serotypic marker (Anders *et al.*, 1983; Saint *et al.*, 1987; Mattei *et al.*, 1988) จีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีน S antigen เป็นจีนที่สามารถแบ่งเป็นส่วนๆตามความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้ 5 ส่วน ดังรูปที่ 2-5 (Bickle *et al.*, 1993) และการมีภาวะหลายรูปแบบในโปรตีน S antigen นี้เกิดขึ้นในหลายตำแหน่งภายในจีนเดียวกัน ซึ่งสาเหตุที่แท้จริงของการมีภาวะหลายรูปแบบของ S antigen ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่คาดว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับกลไกการหลบเลี่ยงระบบภูมิคุ้มกันของเจ้าบ้าน (Saint *et al.*, 1987)

Falciparum interspersed repeat antigen (FIRA)

เมื่อเชื้อมาลาเรียเข้าเจริญในเม็ดเลือดแดงจะพบโปรตีน FIRA อยู่ที่เม็ดเลือดแดง ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลขนาดใหญ่ (Stahl *et al.*,1985) ตรวจพบว่ามีแอนติบอดีต่อโปรตีน FIRA ในซีรัมของคนที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ๆมีการระบาดของเชื้อมาลาเรีย สำหรับโปรตีน FIRA พบว่าประกอบด้วย 13 blocks การเรียงลำดับของกรดอะมิโน 6 ตัว (PVTTQE) และการเรียงตัวของกรดอะมิโน 81 ตัว ซึ่งเป็น repeated sequence ที่ยาวที่สุดในแอนติเจนของมาลาเรีย และพบว่าบริเวณดังกล่าวประกอบด้วยส่วนที่สามารถกระตุ้นแอนติบดีในร่างกายของคนที่อาศัยในพื้นที่ๆมีมาลาเรียชุกชุม ในการศึกษาจีน FIRA โดยวิธี RFLP พบว่ามีความแตกต่างกันไปในแต่ละไอโซเลต (Stahl *et al.*, 1987)

Glutamate-rich protein (GLURP)

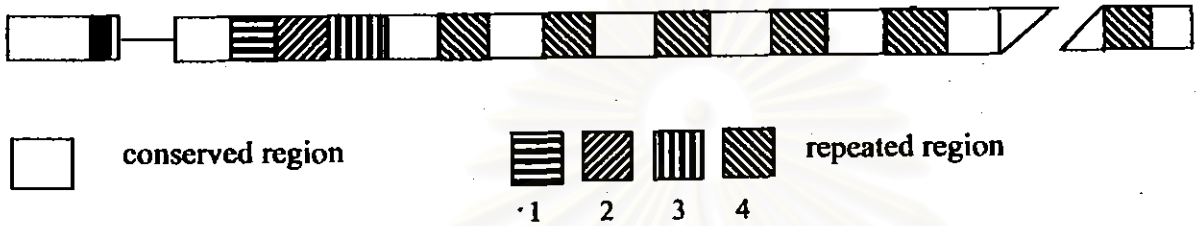
GLURP เป็นโปรตีนที่พบได้ในทุกระยะของวงจรชีวิต (ทั้ง asexual และ sexual stage) มีน้ำหนักโมเลกุล 210 kDa จีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีน GLURP พบว่าประกอบด้วยส่วนที่มีกรดอะมิโนซ้ำๆกัน 2 บริเวณ คือ R1 และ R2 (รูปที่ 2-6) จากการศึกษาบริเวณ R2 พบว่าสามารถกระตุ้น B cell และ T cell ได้ ในไอโซเลตต่างๆจากพื้นที่ต่างๆที่มีการระบาดของโรคมาลาเรีย จีน GLURP มีลำดับเบสที่คล้ายคลึงกันค่อนข้างสูง (Borre *et al.*, 1991)



Serotype	S-Ag Family	Length	Region C repeats	Region B	Region D
3D7	3D7	8	57 x ED(E/K)VSNG(R/G)	10 residues	8 residues
HB3	3D7	11	80 x ETGPGKAGEQG	10 residues	none
Wellcome	Wellcome	8	65 x GPNSDGDK	none	none
KF1917	Wellcome	11	78 x GDQTEGS(S/A)GGK	none	5 residues
NF7	NF7	8	43 x A(R/L)KSDEAE	none	2x 15-mer
K1	NF7	12	22 x GSDQEVKVQKEQ	?	2.5x15-mer
V1	NF7	11	19 x GGPGSEGPKGT	12 residues	2.5x15-mer
KF1916	NF7	6	100 x AGSNE(E/K)	none	1x15-mer+3residues
FC27	FC27	11	100 x PAKASQGGLED	none	none

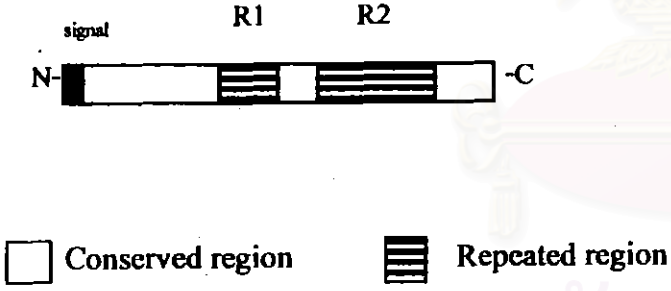
รูปที่ 2-5 แสดงโครงสร้างของจีน S-Ag ในสายพันธุ์ต่างๆ (Bickle, *et al.*, 1993)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2 -7 แสดงโครงสร้างของจีน FIRA (Kemp, *et al.*, 1990)

<u>หมายเหตุ</u> หมายเลข 1, 2, 3, 4 หมายถึง บริเวณที่มีลำดับเบสแตกต่างกัน



รูปที่ 2 -7 แสดงโครงสร้างของจีน GLURP (Borre, *et al.*, 1991)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Ring infected erythrocyte surface antigen (Pf155/RESA)

การศึกษาจีน Pf155/RESA

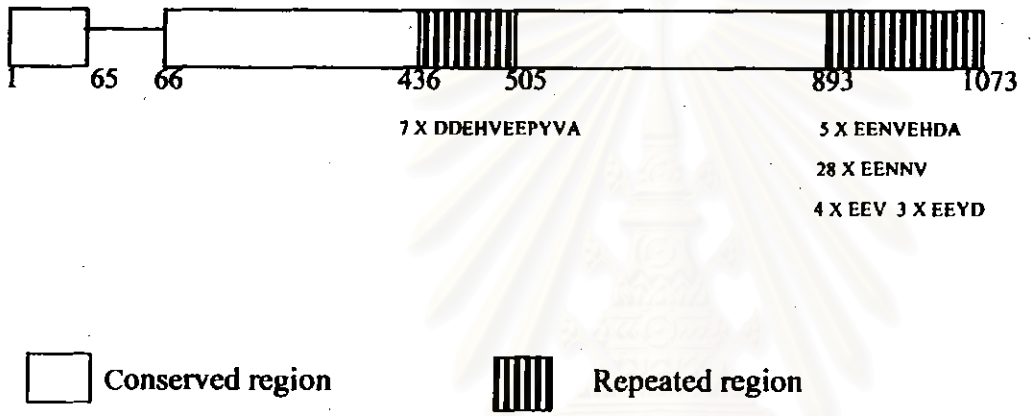
จีน Pf155/RESA อยู่บนโครโมโซมที่ 1 ตรงบริเวณ subtelomeric (Corcoran, *et al.*, 1986) ซึ่งพบจีนดังกล่าวได้ในทุกสายพันธุ์ ยกเว้นเพียง 1 ไอโซเลตคือ FCR3 ที่ถูกเพาะเลี้ยงไว้ในหลอดทดลองเป็นเวลานาน (Cappai *et al.*, 1989) เนื่องจากเกิดการขาดหาย (deletion) บริเวณ subtelomeric บนโครโมโซมที่ 1 อย่างไรก็ตามยังไม่พบว่ามีการขาดหายหรือไม่ปรากฏจีนนี้ในสายพันธุ์จากธรรมชาติเลย นอกจากนี้ในการวิเคราะห์ karyotype ของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม 4 สายพันธุ์ โดยการเพิ่มจำนวนในลิง *Saimiri sciureus* (squirrel monkey) และใช้ตัวติดตาม (probe) เป็นจีนที่ตั้งอยู่บริเวณ subtelomeric ของโครโมโซม (variable subtelomeric antigen gene) จากการสังเกตุพบว่าทุกสายพันธุ์เกิด deletion ใน RESA gene (chromosome 1) การหายไปของจีน Pf155/RESA นั้น อาจเป็นผลมาจากการคัดเลือกสายพันธุ์ของ *P. falciparum* เมื่ออยู่ในเม็ดเลือดแดงของลิง อย่างไรก็ตามตัวติดตามที่เป็น RESA specific gene สามารถ hybridized กับ chromosome 1 ได้กับเชื้อมาลาเรียที่อยู่ในคนไข้ 28 คน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าจีนดังกล่าวยังอาจมีความจำเป็นต่อการเจริญของเชื้อมาลาเรียในคน (Hinterberg *et al.*, 1995)

จีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนดังกล่าวประกอบด้วย 2 exon ที่เชื่อมด้วย short intervening sequence (Favaloro *et al.*, 1986) exonที่ 1 สามารถถอดรหัสให้เป็นกรดอะมิโนได้ 65 ตัว และมีกรดอะมิโนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) 13 ตัว ตั้งแต่ตำแหน่งที่ 52 ถึง 65 (รูปที่ 2-7) exon ที่ 2 เป็น major open reading frame ที่ ถอดรหัสให้กรดอะมิโน 1007 ตัว ประกอบไปด้วยส่วนซ้ำของลำดับกรดอะมิโน (tandem repeat sequence) ที่บริเวณด้าน C-terminal (3' repeat) ประกอบด้วยกรดอะมิโน EENVEHDA, EENV, EEYD, EEV เรียงตัวซ้ำไปซ้ำมา ส่วนบริเวณ N-terminal (5' repeat) ประกอบด้วยส่วนซ้ำของกรดอะมิโน DDEHVEEPTVA พบว่าลำดับกรดอะมิโนทั้ง 2 บริเวณนี้ สามารถกระตุ้นให้ร่างกายสร้างแอนติบอดีและทำให้เกิดปฏิกริยาข้ามกลุ่มได้ (cross reacting antigenic epitopes) (Cowman, *et al.*,1984, Anders, *et al*, 1986) แอนติเจนที่มีศักยภาพนำมาผลิตวัคซีนได้นั้นส่วนหนึ่งจะต้องเป็น protective antigen และแอนติบอดีต่อแอนติเจนนั้นจะต้องทำปฏิกริยากับแอนติเจนตัวอื่นๆได้อีก มีแอนติเจนหลายชนิดที่

สามารถเกิดปฏิกริยาข้ามกลุ่มได้ (cross reaction) ในจำนวนนี้ Pf155/RESA ก็เช่นกัน สามารถเกิดปฏิกริยาข้ามกลุ่มได้กับ แอนติเจนที่ปรากฏในช่วง blood stage เช่น แอนติเจน 332 (Mattei *et al.*, 1989), 11.1 (Koenen *et al.*, 1984), CARP (clustered asparagine-rich protein) (Saul and Battistutta, 1988) และ FIRA (falciparum interspersed repeat antigen) (Stahl, *et al*, 1986) แอนติเจนข้างต้นทุกตัวประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโน ที่มีกรดกลูตามิก (glutamic acid) จำนวนหนึ่งซึ่งจะทำให้เกิดปฏิกริยาต่อกันได้ (Anders, *et al.*,1986) การเกิดปฏิกริยาข้ามกลุ่มของ RESA ยังสามารถเกิดได้กับแอนติเจนในระยะ sexual stage ได้ด้วย กล่าวคือโมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่จำเพาะต่อแอนติเจน 332 และ RESA สามารถเกิดการรวมกลุ่ม (agglutination) ได้กับ gametocytes (Mattei, *et al.*,1989)

Ring infected erythrocyte surface antigen (RESA)หรือ Pf155 (Miller *et al.*,1986) เป็น candidate vaccine ของระยะ asexual blood stage ที่น่าสนใจตัวหนึ่ง มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 155 KD ในระยะต้นๆของการศึกษาโปรตีน Pf155/RESA นั้น มีความเข้าใจที่คลาดเคลื่อนคือ พบว่า Pf155/RESA อยู่ที่ microneme และ rhoptries ในระยะเมอร์โรซอยท์ (Brown *et al.*, 1985; Uni *et al.*, 1987) และปล่อยออกมาในช่วงที่มีการเข้าเม็ดเลือดแดงใหม่ของเมอร์โรซอยท์ จึงมีผู้สันนิษฐานว่าโปรตีนน่าจะทำหน้าที่การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างบางอย่างที่ผิวเซลล์เม็ดเลือดแดงทำให้ ง่ายต่อการที่เมอร์โรซอยท์จะเข้าเจริญในเม็ดเลือดแดง (Taylor *et al.*, 1987) แต่ในปัจุบันพบว่าโปรตีน Pf155/RESA ถูกสังเคราะห์ขึ้นในระยะ mature stage ก่อนที่จะถูกเก็บไว้ใน dense granule และปล่อยออกมา เมื่อมีการเข้าสู่เม็ดเลือดแดงใหม่ของเชื้อมาลาเรียระยะเมอร์โรซอยท์ (reinvasion) โดยที่ dense granule จะรวมตัวกับพลาสมาเมมเบรน (plasma membrane) ของเมอร์โรซอยท์ ในระยะวงแหวน (ring form) โปรตีนนี้จะพบอยู่ที่โครงสร้างผนังเซลล์เม็ดเลือดแดงบริเวณที่เป็น spectrin โดยผ่านทาง parasitophorous vacuole (Coppel *et al.*,1984; Perlmann *et al.*,1984; Aikawa *et al.*, 1990)

แต่อย่างไรก็ตามหน้าที่ของโปรตีนชนิดนี้ยังไม่ทราบแน่ชัด อีกทั้งกลไกในการเคลื่อนย้ายตำแหน่งผ่านจาก parasitophorous vacuole เข้าสู่เม็ดเลือดแดงไปยังผนังของเซลล์ด้านในเม็ดเลือดแดงก็ยังไม่ทราบแน่ชัด



รูปที่ 2-8 แสดงแผนที่ของจีน Pf155/RESA (ไอโซเลต FC27) (Kemp *et al.*, 1990)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การศึกษาความหลากหลายของจีน Pf155/RESA

เนื่องจาก Pf155/RESA เป็นโปรตีนที่มีความเป็นไปได้สูงในการนำไปใช้เป็นองค์ประกอบของวัคซีนต่อโรคมาลาเรีย จึงมีนักวิทยาศาสตร์หลายกลุ่มได้ทำการศึกษาถึงความหลากหลายของ Pf155/RESA อย่างต่อเนื่อง ในปี 1987 มีการศึกษาหาความหลากหลายของแอนติเจนชนิดนี้โดย immunoblotting analysis ใช้โมโนโคลนอล (monoclonal) และโพลีโคลนอล (polyclonal) แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ epitope บริเวณ C-terminal ของจีน Pf155/RESAในเชื้อมาลาเรียจากประเทศไทย ฮอนดูรัส เวียดนาม เคนยา แกมเบีย บราซิล แทนซาเนีย แซร์ และอินเดีย รวม 26 ไอโซเลต 11 สายพันธุ์ ปรากฏว่าขนาดของโปรตีน Pf155/RESA คงที่และไม่มีความแตกต่างของ B cell epitope และสรุปว่าจีน Pf155/RESA น่าจะมีความคล้ายคลึงกันของเบสสูง (Perlmann,H. *et al*., 1987)

การศึกษาความหลากหลายของ โปรตีน Pf155/RESA ในระดับจีนนั้น พบว่ามีการศึกษาหาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในจีน Pf155/RESA ด้วยวิธี Dideoxy chain termination จากเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมจากประเทศฮอนดูรัส บราซิล อูกันดา และประเทศไทย จำนวน 11 ไอโซเลต/สายพันธุ์ (A°slund, *et al*.,1990) พบว่าในแต่ละไอโซเลต/สายพันธุ์ มีลำดับเบสที่คล้ายคลึงกัน แต่มี 3 บริเวณที่พบการเปลี่ยนแปลง คือ 1) บริเวณ exon 1 แต่อย่างไรก็ตามลำดับเบสส่วนใหญ่ยังคงเดิมไม่มีการเปลี่ยนแปลง เช่นเดียวกับรายงานของ Favaloro และคณะ (1986) ซึ่งได้ทำการศึกษาในเชื้อมาลาเรีย 5 ตัวอย่าง ได้แก่ FC27, NF7, IMR143, IMR144 และ MAD71 โดยใช้วิธี restriction fragmant length polymorphism (RFLP) ผลปรากฏว่าเมื่อใช้เอนไซม์ Rsa-I ตัด จีน Pf155/RESA ทำให้เกิดรูปแบบของอัลลีลที่แตกต่างกัน 2 รูปแบบ คือรูปแบบของไอโซเลต FC27 และ NF7 2) ใน exon 2 บริเวณ C-terminal repeat มีความแตกต่างในด้านความยาวของเบสในแต่ละไอโซเลต หรือสายพันธุ์ และ 3) บริเวณ upstream C-terminal repeat มีรูปแบบอัลลีลแตกต่างกัน 2 รูปแบบ คือ ในรูปแบบของไอโซเลต FC27 และ F32 กล่าวคือ ใน 2 ไอโซเลตนี้มีลำดับกรดอะมิโนแตกต่างกัน 6 ตำแหน่ง (A°slund, *et al*.,1990) ซึ่งในการเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโนดังกล่าวนี้ ได้มีการศึกษาและพบในลักษณะเดียวกัน จากเชื้อตัวอย่างของประเทศอินโดนีเซียจำนวน 12 ไอโซเลต คือมีรูปแบบของอัลลีลแตกต่างกัน 2 รูปแบบ (FC27 และ NF7) เช่นกัน (Kun *et al*., 1994) ส่วนในไอโซเลต NF7 มีความคล้ายคลึงของเบสเหมือนกับ F32 ใน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บริเวณดังกล่าว ยกเว้นในตำแหน่งเดียว คือ ตำแหน่งที่ 2857 มีการเกิด silent mutation เปลี่ยนจากเบส A → C (A°slund, *et al.*,1990)

สำหรับการศึกษาในบริเวณ exon 2 โดยวิธี solid phase sequencing ในบริเวณ exon 2 ส่วน 5' terminal จากตัวอย่างเชื้อมาลาเรียในประเทศแกมเบีย จำนวน 6 ไอโซเลต ปรากฏว่าลำดับเบสในแต่ละไอโซเลตมีส่วนที่คล้ายคลึงกันกับของไอโซเลต FC27 จากประเทศปาปัวนิวกินี (Holmberg *et al.*, 1992) เป็นการยืนยันให้เห็นว่าจีน Pf155/RESA มีความหลากหลายน้อยมาก

ต่อมาในปี 1996 Seesod และคณะ ได้ทำการตรวจสอบความหลากหลายของจีน Pf155/RESA พบว่าใน exon 2 อัลลีลบริเวณ upstream ของ C-terminal จากตัวอย่างที่ได้จากผู้ป่วยในท้องที่ที่มีการระบาดของโรคมาลาเรียในประเทศไทย จำนวน 168 ไอโซเลต มีภาวะหลายรูปแบบเพิ่มขึ้นจาก A°slund *et al* และ Kun *et al.* อีก 8 รูปแบบ รวมเป็น 10 รูปแบบ ในจำนวนรูปแบบใหม่ที่เพิ่มขึ้นส่วนใหญ่พบเพียงรูปแบบละ 1 ไอโซเลตเท่านั้น จะเห็นว่ามีรูปแบบของอัลลีลที่หลากหลายมากขึ้นและพบรูปแบบเหมือน F32 มากถึง 67%

ความสำคัญของโปรตีน Pf155/RESA

หน้าที่ของโปรตีน Pf155/RESA ไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดแต่สันนิษฐานว่าโปรตีนจะเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ cytoskeleton เซลล์เม็ดเลือดแดง และทำให้เมอร์โรซอยท์เข้าเม็ดเลือดแดงได้ง่าย อีกทั้งยังอาจป้องกันไม่ให้เมอร์โรซอยท์ตัวอื่นเข้าเจริญในเม็ดเลือดแดงเซลล์เดียวกัน

มีสมมติฐานสองประการเกี่ยวกับหน้าที่ของจีน Pf155/RESA ประการแรก จากการสังเกตพบว่าลำดับกรดอะมิโนบริเวณ 3'repeat มีความความคล้ายคลึงกับบริเวณ 5' terminal ของ band 3 (โปรตีนชนิดหนึ่งที่เป็นองค์ประกอบของเม็ดเลือดแดง) ซึ่ง Anders และคณะ (1988) พบว่าลักษณะดังกล่าวสามารถ ทำลายแรงระหว่างโมเลกุล (interaction) ของเม็ดเลือดแดง กับฮีโมโกลบิน (haemoglobin) อีกทั้งยังยับยั้งการเกิด phosphorylation ของ band 3 อีกด้วยซึ่งเป็นผลให้ lipid bilayer มีความยืดหยุ่นมากขึ้น ซึ่งอาจจะมีความจำเป็นต่อการสร้าง parasitophorous vacuole ขณะที่เมอร์โรซอยท์จะเข้าเม็ดเลือดแดง

ประการที่สอง Pf155/RESA อาจเกี่ยวข้องกับการรักษาเสถียรภาพของเม็ดเลือดแดง ทั้งนี้เนื่องมาจากการศึกษาลำดับของกรดอะมิโนของโปรตีนชนิดนี้ พบว่ามีบริเวณซึ่งอยู่ระหว่างบริเวณที่มีกรดอะมิโนซึ่งมีความเป็นกรดซ้ำๆกัน (Foley *et al.*, 1994) ที่อาจทำหน้าที่เป็น spectrin-

binding domain และการทดลองในหลอดทดลองแสดงให้เห็นว่าสายเปปไทด์บางส่วนของ Pf155/RESA สามารถป้องกันการเสียสภาพของ spectrin ได้ (De Silva *et al,* 1994)

การศึกษาทางด้านภูมิกันในระดับเซลล์และระดับภูมิคุ้มกันน้ำเหลือง (cellular and humoral immunity) ต่อโปรตีน Pf155/RESA

การศึกษาโปรตีน Pf155/RESA ในลิง *Rhesus* (*Macaca mulatta*) ที่ติดเชื้อ *P. coatneyi* พบว่ามีโปรตีน Pf155/RESA ปรากฏอยู่และสามารถกระตุ้นให้เกิดแอนติบอดีได้เช่นในคน และจากการทดสอบโดยวิธี Immunofluorescense และ Western Blot พบว่าซีรั่มในลิงที่ติดเชื้อ *P. coatneyi* สามารถทำปฏิกริยาข้ามกลุ่มกับแอนติเจนจาก *P. falciparum* antigen ได้ดี แต่ไม่ได้มีผลในทางกลับกันทั้งนี้อาจเนื่องมาจากมีความแตกต่างที่ immunogenic epitopes (Udomsangpetch, *et al.*,1993)

จากการทดลองใช้ fusion protein 2 ชนิด (เปปไทด์ส่วน 3' repeated และ 5' repeated ที่เชื่อมอยู่กับ staphylococcal protein A และถูกห่อหุ้มด้วย influenza virus membrane glycoprotein) กระตุ้นกระต่ายและลิง (green monkey) พบว่ามีแอนติบอดีที่ถูกชักนำและปรากฏอยู่เป็นเวลานาน เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับ Freud's Adjuvant อย่างเดียว และพบว่าแอนติบอดีดังกล่าวนั้นสามารถยับยั้งการเข้าสู่เม็ดเลือดแดงใหม่ของระยะเมอร์โรซอยท์ได้ด้วย (Sjolander *et al.*, 1993)

การกระตุ้นแอนติบอดีในกระต่ายด้วยเปปไทด์ (octapeptide ของ 3' repeated: EENVEHDA) พบว่าแอนติบอดีดังกล่าวสามารถยับยั้งการเข้าสู่เม็ดเลือดแดงใหม่ (reinvasion) และพบว่าเปปไทด์ดังกล่าวสามารถเกิดปฏิกริยากับซีรั่มของผู้ป่วยในประเทศโคลัมเบีย ซึ่งเมื่อนำซีรั่มดังกล่าวมาแยกหา IgG และพบว่าแอนติบอดีนั้นสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อในหลอดทดลองได้ (Berzins *et al.*, 1986)

การศึกษาการกระตุ้นสารที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน

มาลาเรียขึ้นสมองเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการตายด้วยโรคมาลาเรีย ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าอาจเกิดจากระบบภูมิคุ้มกันและการทำงานของไซโตคาย (cytokine network) ถูกกระตุ้นให้ตอบสนองมากเกินไป (overstimulation) (Beutler *et al.*, 1987; Kwiatkowski *et al.*, 1990) มีการศึกษาพบว่า มี tumour necrosis factor (TNF) หลั่งจาก macrophages ซึ่งกระตุ้นโดยแอนติเจนของมาลาเรีย และ Pf155/RESA ก็เป็นแอนติเจนหนึ่งที่สามารถกระตุ้นสารดังกล่าวได้ มีการทดลองในหลอดทดลองใช้เปปไทด์สังเคราะห์ บริเวณ C-terminal [$(EENV)_4$; $(EENVEHDA)_4$] และ N-terminal [$(DDEHVEEPTVA)_3$ เพื่อทดสอบกระตุ้นการหลั่ง TNF ด้วยวิธี immunoradiometric assay พบว่ามี TNF หลั่งออกมา หลังจากที่เชื้อระยะไซซอนท์แตก เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เป็นสายพันธุ์ (FCR3) ที่ไม่มีโปรตีน Pf155/RESA (Picot *et al.*, 1993)

ความสัมพันธ์ระหว่างอัลลีล HLA class II กับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันนั้นมีการศึกษาในประเทศมาดากัสกา 50 ตัวอย่าง โดยใช้เปปไทด์ส่วนที่เป็น B cell และ T cell epitope [$(EENV)_4$; $(EENVEHDA)_4$ $(DDEHVEEPTVA)_3$] กระตุ้น เพื่อตรวจสอบปฏิกริยาของ T cell โดยวิธี lymphocyte proliferation และตรวจการหลั่ง interferon-γ และ interleukin-2 สำหรับการตอบสนองของแอนติบอดีทดสอบโดยวิธี ELISA ปรากฏว่าไม่มีความสัมพันธ์กันระหว่าง HLA class II กับการ ตอบสนองระดับเซลล์และระดับน้ำเหลือง (cellular and humoral immune response) (Migot *et al.*, 1995)

ความเป็นไปได้ในการใช้ Pf155/RESA เป็นวัคซีน

มีเหตุผลหลายประการที่ทำให้ Pf155/RESA มีศักยภาพในการเป็นวัคซีนได้ อาทิเช่น (1) โพลีโคลนอล (polyclonal) และ โมโนโคลนอล (monoclonal) แอนติบอดีของ repeat epitope หลายบริเวณของ Pf155RESA สามารถยับยั้งไม่ให้เมอร์โรซอยท์เข้าเม็ดเลือดแดงได้ในหลอดทดลอง (Berzins *et al.*, 1986) (2) เปปไทด์ที่สังเคราะห์ขึ้นของจีน Pf155/RESA ฉีดเข้าไปในลิง *Aotus* สามารถป้องกันการติดเชื้อ *P. falciparum* ได้แบบ partial protection (Collin *et al.*, 1986) (3) สายโพลีเปปไทด์ (polypeptide) ที่ได้จาก *P. chabaudi* ที่มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับ

Pf155/RESA สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันซึ่งป้องกันไม่ให้หนูติดเชื้อ murine malaria ได้ (Wanidworanum *et al.*, 1987) (4) Pf155/RESA ไม่แสดง antigenic heterogeneity ในตัวอย่างที่ต่างกันของ *P. falciparum* (Perlmann *et al.*,1987)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย