หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 1

# บทนำ

มาลาเรียเป็นโรคติดเชื้อชนิดหนึ่งพบมากในประเทศเขตร้อนทั่วโลก จากรายงานขององค์การอนามัยโลกในปี ค.ศ. 1991 ประมาณว่ามีผู้ติดเชื้อมาลาเรียในแต่ละปีประมาณ 270-300 ล้านคน ซึ่งในทวีปอาฟริกาเพียงทวีปเดียวมีเด็กที่เสียชีวิต จากการติดเชื้อมาลาเรียปีละประมาณ 1 ล้านคน ดังนั้นมาลาเรียจึงเป็นโรคที่มีความรุนแรง และเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขของประชากรส่วนใหญ่ของโลกซึ่งอาศัยอยู่ในบริเวณดังกล่าว

เชื้อมาลาเรียเป็นโปรโตซัวชนิดหนึ่งใน Phylum Protozoa Class Sporozoa และ Genus *Plasmodium* ซึ่งมีทั้งหมดประมาณ 120 ชนิด แต่ชนิดที่ทำให้เกิดโรคในคนมีเพียง 4 ชนิดได้แก่ *Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax, Plasmodium malariae* และ *Plasmodium ovale* เชื้อมาลาเรียมีระยะต่างๆ ในการเจริญหลายระยะ และมีวงชีวิตที่ต้องอาศัยการสืบพันธุ์แบบใช้เพศ (sexual reproduction) ในยุงก้นปล่อง และแบบไม่ใช้เพศ (asexual reproduction) ในคนโดยเริ่มที่เซลล์ตับในระยะเริ่มต้นของการเจริญเติบโต และเข้าสู่เม็ดเลือดแดงในที่สุด ซึ่งระยะที่มีการเจริญและเพิ่มจำนวนในเม็ดเลือดแดงจะก่อให้เกิดพยาธิสภาพและการเจ็บป่วยในคน โดยที่ *P. falciparum* ทำให้เกิดความเจ็บป่วยที่รุนแรงที่สุด และพบได้มากที่สุด (Miller et al., 1986)

มาตรการสำคัญในการควบคุมมาลาเรียที่เคยใช้ได้ผลค่อนข้างดีในช่วงสงครามโลกครั้งที่ 2 ได้แก่การพัฒนาผลิตยารักษาโรคที่มีประสิทธิภาพ ตลอดจนการพัฒนาผลิตยาฆ่าแมลงเพื่อกำจัดยุงก้นปล่องที่เป็นพาหะนำโรคนั้นทำให้อุบัติการการติดเชื้อมาลาเรียลดลงอย่างมาก แต่ต่อมาไม่นานกลับพบว่าอุบัติการการติดเชื้อมาลาเรียกลับเพิ่มขึ้นเนื่องจากเชื้อมาลาเรียโดยเฉพาะอย่างยิ่ง *P. falciparum* เกิดการดื้อต่อยาที่เคยใช้รักษาได้ผลหลายชนิด ตลอดจนยุงก้นปล่องดื้อต่อยาฆ่าแมลง ดังนั้นมาตรการอันหนึ่งที่น่าจะมีประโยชน์ในการควบคุมการแพร่กระจายของโรคนี้คือการผลิตวัคซีนเพื่อป้องกันการติดเชื้อมาลาเรีย (Wernsdorfer, 1991)

**ระยะที่มีการเพิ่มจำนวนแบบไม่ใช้เพศในเม็ดเลือดแดง** (erythrocytic stages)

ประกอบด้วยระยะต่าง ๆ หลายระยะแต่มีเพียงระยะเมอร์โรซอยต์ (merozoite) เท่านั้นที่สามารถมีชีวิตอยู่ภายนอกเม็ดเลือดแดงในช่วงเวลาสั้น ๆ ได้ระยะนี้จึงอาจถูกทำลายได้โดยภูมิคุ้มกันของคน ดังนั้นระยะเมอร์โรซอยต์จึงน่าจะเป็นเป้าหมายที่ดีในการเป็นองค์ประกอบของมาลาเรียวัคซีน (malaria subunit vaccine) จากการศึกษาโปรตีนซึ่งเป็นองค์ประกอบในระยะเมอร์โรซอยต์ของ *P. falciparum* พบว่ามีหลายชนิด แต่ชนิดที่มีปริมาณมากที่สุด คือ ไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 180-220 KD เรียกว่า merozoite surface protein 1 (MSP1) (Holder, 1988) แม้ว่าหน้าที่ของ MSP1 ยังไม่ทราบชัดเจนแต่เชื่อว่าน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการลุกลาม (invasion) เข้าสู่เม็ดเลือดแดง เนื่องจาก polyclonal และ monoclonal antibody ต่อ MSP1 สามารถป้องกันการลุกลามของเมอร์โรซอยต์ซึ่งจะเข้าเม็ดเลือดแดงใหม่ได้ นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียในหลอดทดลอง (Cheung et al., 1986 ; Chang et al., 1992) จากการศึกษา MSP1 ในด้าน immunogenicity โดยการทดลองฉีด MSP1 ในรูปของ purified protein, recombinant polypeptides หรือ synthetic peptides เข้าในลิงทดลองพบว่าโปรตีนดังกล่าวสามารถชักนำให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ *P. falciparum* ได้เป็นผลสำเร็จดังนั้น MSP1 น่าจะเป็นองค์ประกอบที่ดีชนิดหนึ่งสำหรับการผลิตวัคซีนป้องกันมาลาเรีย (Cheung et al., 1986 ; Siddiqui et al., 1987 ; Herrera et al., 1990)

เนื่องจาก MSP1 เป็นโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่และยังมีความแตกต่างกันในเชื้อมาลาเรียแต่ละสายพันธุ์ (clone) โดยมีความหลากหลายในคุณลักษณะของแอนติเจนมาก (extensive antigenic diversity) (McBride et al., 1985) ซึ่งอาจเป็นอุปสรรคต่อการนำไปใช้เป็นองค์ประกอบของวัคซีน อย่างไรก็ตามจากการศึกษาจีโนไทป์ (genotype) ของ MSP1 ใน *P. falciparum* สายพันธุ์ต่าง ๆจากผู้ป่วยโดยใช้ Southern blot hybridization กับ MSP1 allele-specific probes และ DNA sequencing พบว่าสายพันธุ์ต่าง ๆ เหล่านี้มีพื้นฐานของยีนอยู่เพียง 2 รูปแบบ (dimorphism) ได้แก่ K1 type และ MAD20 type (Tanabe et al., 1987) ยกเว้น variable block 2 ที่สร้าง tripeptide repeats นั้นมี 3 กลุ่ม คือ K1, MAD20 และ RO33 โดยที่ K1 type และ MAD20 type นั้นยังแตกต่างกันในจำนวนของ tripeptide repeats และ sequence ในแต่ละกลุ่มอีกด้วย (Certa et al., 1987 ; Jongwutiwes et al., 1992) และผลจากการวิเคราะห์ DNA sequence นี้ ทำให้สามารถอธิบายการเกิด antigenic diversity ของ MSP1 ได้จากขบวนการเกิด genetic recombination ระหว่างสายพันธุ์ที่ต่างกัน (Tanabe et al., 1987 ; Walliker et al., 1987 ; Jongwutiwes et al.,1992) ในช่วงที่มีการสืบพันธุ์แบบใช้เพศในยุงก้นปล่อง

ดังนั้นการใช้เทคนิคของ polymerase chain reaction (PCR) เพื่อเพิ่มจำนวน

DNA fragment ในส่วน 5′ ของ ยีน MSP1 ตั้งแต่ block 1 ถึง block 5 แล้วใช้ restriction enzyme ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับ sequence ของแต่ละกลุ่มจะสามารถนำมาใช้ศึกษารูปแบบอัลลีล (allele) ของ block 2 และ block 4 ของ MSP1 ได้อย่างรวดเร็วกว่าการศึกษาโดย Southern blot hybridization หรือ DNA sequencing โดยบริเวณที่น่าจะเกิด genetic recombination จะจำกัดอยู่เฉพาะบริเวณส่วนต้น (5′ portion) ของยีนกล่าวคือ ตั้งแต่ block 1 ถึง 4 เท่านั้น (Peterson et al., 1988 ; Jongwutiwes et al., 1991) นอกจากนี้การใช้เทคนิค PCR เพื่อเพิ่มจำนวน DNA fragment ของบริเวณ block 5 ถึง block 13 และบริเวณ block 12 ถึง block 17 ซึ่ง MAD20 type จะมี ความยาวมากกว่า K1 type อยู่ 105 เบส และ 90 เบส ตามลำดับ (Jongwutiwes et al., 1993) ซึ่งความยาวของ amplified DNA fragment ที่ได้สามารถแยกความแตกต่างได้โดยวิธีอะกาโรสเจล อิเลคโตรฟอรีซีส (agarose gel electrophoresis) และสามารถตรวจสอบยืนยันโดยใช้ restriction enzyme ที่เหมาะสม ซึ่งจะให้ผลรวดเร็วและยังไม่มีผู้ทำการศึกษามาก่อน

เนื่องจาก MSP1 เป็น malaria vaccine candidate ที่ดีชนิดหนึ่ง ดังนั้นการพัฒนาเทคนิค เพื่อตรวจสอบลักษณะของ MSP1 allele อย่างรวดเร็วจะเอื้ออำนวยต่อการศึกษาความหลากหลายของ MSP1 allele ของ *P. falciparum* จากตัวอย่างที่ได้จากผู้ป่วยจำนวนมากได้ ซึ่งข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนามาลาเรียวัคซีนตลอดจนการศึกษาพันธุประชากร (population genetics) ของ *P. falciparum* ในธรรมชาติอีกด้วย (Conway & McBride, 1991)