บทที่ 1

บทนำ

โรคมาลาเรียยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญมากอย่างหนึ่งของประเทศ ทำให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพและชีวิตของประชาชน ซึ่งจะมีผลกระทบต่อความมั่นคงทางเศรษฐกิจและการพัฒนาประเทศ การแพร่กระจายของโรคนี้พบได้ทั่วโลกในประเทศเขตร้อน ถึงแม้ว่าองค์การอนามัยโลกจะมีการรณรงค์สนับสนุนทางด้านการเงินเพื่อลดอัตราการแพร่กระจายและหยุดยั้งการติดต่อของโรค แต่ก็ยังไม่สามารถกำจัดหรือควบคุมให้สิ้นไปได้ ภาวะดื้อยาเป็นสาเหตุหนึ่งซึ่งทำให้โรคมาลาเรียทวีความรุนแรงในบางส่วนของประเทศ ในขณะที่มีการค้นคว้าเกี่ยวกับเคมีบำบัดใหม่ๆ นั้น เป้าหมายหนึ่งที่ทางองค์การอนามัยโลกให้ความสนใจคือการผลิตวัคซีนสำหรับป้องกันโรคมาลาเรีย โดยการใช้แอนติเจนที่มีคุณสมบัติเป็น protective antigen ที่ดีที่สุด แต่เนื่องจากแอนติเจนของเชื้อมาลาเรียมีคุณสมบัติเปลี่ยนแปลงไปตามแต่ละระยะของการเจริญตามวงจรชีวิตของเชื้อ จึงทำให้ภูมิต้านทานที่ร่างกายโฮสต์สร้างขึ้นมีความจำเพาะต่อการเปลี่ยนแปลงในแต่ละระยะของเชื้อด้วยและเป็นปัญหาในการพัฒนาวัคซีนป้องกันมาลาเรีย ปัจจุบันพบว่าแอนติเจนที่ทำให้เกิดภูมิต้านทานต่อมาลาเรียนั้นมีมากมายหลายชนิดและมีความแตกต่างกันออกไปในแต่ละสายพันธุ์ จนถึงปัจจุบันยังไม่เป็นที่แน่ชัดว่าแอนติเจนชนิดใดที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการศึกษาคุณสมบัติของแอนติเจนของเชื้อมาลาเรียที่มีการเจริญในระยะต่างๆอย่างละเอียดเพื่อพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียให้มีประสิทธิภาพมากที่สุด

เชื้อมาลาเรียมีการเจริญพัฒนาหลายระยะในเม็ดเลือดแดงของโฮสต์ ระยะเมอร์โรซอยท์ (merozoite) ของเชื้อมาลาเรียเป็นระยะที่แตกออกจากเม็ดเลือดแดงและอยู่ในพลาสมา (plasma) ในช่วงเวลาอันสั้นก่อนที่จะเข้าสู่เม็ดเลือดแดงใหม่ต่อไปนั้นจึงเป็นระยะที่มีโอกาสถูกกำลายได้โดยระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ ระยะดังกล่าวนี้น่าจะเป็นเป้าหมายสำคัญในการผลิตวัคซีนเพื่อป้องกันโรคมาลาเรีย บนผิวของเมอร์โรซอยท์ประกอบด้วยโปรตีนกลุ่มที่เรียกว่า Precursors to the Major Merozoite Surface Antigen (PMMSA) (Holder and Freeman., 1984) ซึ่งน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับขั้นตอน recognition, attachment และ invasion เพื่อที่จะเจริญในเม็ดเลือดแดงใหม่ต่อไป โปรตีนที่สำคัญ 2 ชนิดที่กำลังศึกษาถึงความเป็นไปได้ที่จะนำมาผลิตวัคซีนได้แก่ merozoite surface protein 1 (MSP-1) หรือที่รู้จักกันในชื่ออื่นๆอีกเช่น MSA-1, PMMSA, p190, gp195

และ Pf195 (Holder et al., 1988) ซึ่งเป็นโปรตีนที่สำคัญและมีปริมาณมากที่สุดบนผิวของเมอร์โรซอยท์ของ Plasmodium falciparum เป็นไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ที่สร้างขึ้นในระยะไชซอนท์ (schizont) มีน้ำหนักโมเลกุล 180-220 KD จากการทดลองใช้ MSP-1 บริสุทธิ์ที่สกัดจากเมอร์โรซอยท์เป็นอิมมิวโนเจน (immunogen) พบว่าโปรตีนดังกล่าวสามารถชักนำให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อเชื้อฟัลซิพารัมในลิงได้เป็นผลสำเร็จ (Siddiqui et al., 1987) นอกจากนี้ยังพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibodies) ต่อโปรตีนดังกล่าวยังสามารถป้องกันการลุกลามของเมอร์โรซอยท์ซึ่งจะเข้าเม็ดเลือดแดงใหม่ได้และยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียในหลอดทดลองได้ (Cheung et al., 1986) ดังนั้น MSP-1 จึงน่าจะเป็น malaria vaccine candidate ที่ดีชนิดหนึ่ง แต่จากการศึกษาคุณสมบัติของ MSP-1 ไอโซเลตต่างๆโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีพบว่า โปรตีนดังกล่าวมีความหลากหลายของแอนติเจน (antigenic diversity) แตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ (McBride et al., 1985) ในระยะต่อมาได้มีการศึกษา MSP-1 ในระดับหน่วยทางพันธุกรรมโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) และเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ พบว่าโปรตีนดังกล่าวถูกสร้างจากยีน (gene) ที่มีลักษณะเป็น dimorphic allele กล่าวคือ nucleotide substitution ที่ตำแหน่งหนึ่งตำแหน่งใดในโมเลกุลมีเพียง 2 ชนิดเท่านั้น ความรู้ดังกล่าวทำให้สามารถแบ่งยีน MSP-1 ออกเป็น 17 บล็อค (blocks) โดยอาศัยความคล้ายคลึงในลำดับนิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วยส่วนที่เป็น conserved blocks, semiconserved blocks และ variable blocks (Tanabe et al., 1987) และพบว่าบริเวณ block 2 เป็นส่วนที่มีการเปลี่ยนแปลง (variable) มาก เป็นบริเวณที่มีลักษณะหลายรูปแบบ (polymorphism) ประกอบด้วยส่วนที่ซ้ำกัน (tandem repeats) ซึ่งมีขนาดและลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันไปตามสายพันธุ์และในบางสายพันธุ์พบว่าไม่มีส่วนที่ซ้ำกันนี้ (Peterson et al., 1988)

โปรตีนอีกชนิดหนึ่งที่ผิวของเมอร์โรซอยท์เป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติคล้าย MSP-1 เรียกว่า merozoite surface protein 2 (MSP-2) เป็น integral membrane protein ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 45-52 KD ปรากฏอยู่บนผิวเมอร์โรซอยท์ หรือที่รู้จักกันในชื่ออื่นๆ เช่น 45 KD protein, 35-48 KD merozoite surface antigen และ 51 KD antigen เป็นโปรตีนอีกชนิดหนึ่งที่จัดเป็น candidate vaccine antigen สำหรับฟัลซิพารัมมาลาเรีย (Smythe et al., 1988 ; Clark et al., 1989) เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียในหลอดทดลองได้ (Epping et al., 1988) จากการศึกษาพบว่าโปรตีนดังกล่าวมีแอนติเจนหลายรูปแบบ (antigenic polymorphism) แตกต่างกันไปตามสายพันธุ์เช่นกัน (Fenton et al., 1991) MSP-2 ประกอบด้วยส่วนของ conserved blocks บริเวณ N และ C terminus บริเวณส่วนที่เป็น non-repetitive ปรากฏเพียง 2 รูปแบบเท่านั้น ได้แก่ FC27 และ IC1

(Smythe et al., 1900; 1991) บริเวณส่วนกลางของยีนประกอบด้วยส่วนซ้ำกัน (repetitive) ซึ่งมีขนาดและลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ นอกจากนี้ยังพบว่าบริเวณที่ซ้ำกันนี้มีส่วนของ epitope ซึ่งสามารถกระตุ้นให้ร่างกายเกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้อีกด้วย (Epping et al., 1988; Smythe et al ., 1988)

ปัจจุบันนี้ได้เป็นที่ยอมรับกันแล้วว่า อุปสรรคที่สำคัญต่อการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียคือ การขาดความรู้พื้นฐานทางชีววิทยาของเชื้อมาลาเรียและความรู้ที่เกี่ยวกับภูมิคุ้มกันวิทยาของเชื้อมาลาเรียในคน มนุษย์สามารถสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อมาลาเรียระยะต่างๆที่อยู่ในร่างกายได้ และกระบวนการต่างๆที่ทำให้เกิดการต่อต้านดังกล่าวนั้นเป็นอย่างไรยังไม่ทราบแน่ชัด และความรู้ดังกล่าวนี้จะต้องมีความสัมพันธ์กับส่วนที่เป็นแอนติเจนบนตัวเชื้อมาลาเรียอย่างแน่นอน เพราะโปรตีนหลายชนิดของเชื้อมาลาเรียที่ทำหน้าที่เป็นแอนติเจนที่กระตุ้นให้ร่างกายมนุษย์สร้างแอนติบอดี เชื้อมาลาเรียไอโซเลตที่แตกต่างกันก็จะมีรูปแบบของแอนติเจนที่แตกต่างกัน แม้แต่สายพันธ์ที่ต่างกันในแต่ละไอโซเลตก็อาจมีรูปแบบของแอนติเจนที่แตกต่างกันได้เช่นกัน

ดังนั้นการศึกษาถึงความหลากหลายของรูปแบบของแอนติเจนยีนจึงเป็นข้อมูลสำคัญที่จะใช้ประกอบการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียที่มีคุณภาพได้ประการหนึ่ง ในการวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายของแอนติเจนยีนสองชนิดคือ MSP-1 และ MSP-2 ในประชากรของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมที่ได้จากผู้ป่วยจากพื้นที่ที่มีมาลาเรียชุกชุมในประเทศไทย โดยใช้เทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA) ในหลอดทดลอง (polymerase chain reaction) ในบางส่วนของยีนดังกล่าว เพื่อต้องการทราบว่าแอนติเจนยีนทั้งสองชนิดนี้มีความหลากหลายมากน้อยเพียงใด เหมือนหรือแตกต่างกับผลงานของผู้อื่นที่ได้ทำการสำรวจไว้แล้วอย่างไร โดยเปรียบเทียบถึงชนิดและความถี่ของอัลลีลของแต่ละแอนติเจนยีน และนอกจากนี้ยังศึกษาถึงขนาดของยีนที่พบในแต่ละอัลลีลอีกด้วย