บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาความสัมพันธ์ของการเจ็บป่วยด้วยโรคมาลาเรีย จากกลุ่มประชากรตัวอย่างของการศึกษาในครั้งนี้ พบอัตราการติดเชื้อ *P. falciparum* ในกลุ่มเพศชายมากกว่าเพศหญิง คิดเป็นร้อยละ 73.6 และ 26.4 ตามลำดับ ส่วนใหญ่มีอายุประมาณ 16-25 ปี ซึ่งเป็นช่วงอายุที่อยู่ในวัยทำงานและเมื่อเปรียบเทียบข้อมูลการกระจายของผู้ป่วยตามกลุ่มอายุและเพศจากรายงานของกองมาลาเรีย กระทรวงสาธารณสุข ประจำปี 2541 พบผู้ป่วยมาลาเรีย 39,402 ราย ในเขตจังหวัดชายแดน พบผู้ป่วยเพศชาย ร้อยละ 67.6 เพศหญิง ร้อยละ 32.3 ไม่ระบุเพศร้อยละ 0.1 โดยผู้ป่วยที่พบร้อยละ 70.4 เป็นผู้ป่วยอยู่ในวัยทำงาน ซึ่งผลการศึกษาในครั้งนี้มีค่าไม่แตกต่างจากการรายงานดังกล่าวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.352$) แสดงว่าความเสี่ยงในการติดเชื้อมาลาเรียมีความสัมพันธ์กับอายุและเพศ นอกจากนี้ยังขึ้นกับสภาพภูมิศาสตร์ เนื่องจากจังหวัดตากมีภูมิประเทศเป็นป่าเขากระจายทั่วไป พื้นที่ดังกล่าวมีความเหมาะสมต่อการแพร่พันธุ์ของยุงพาหนะนำโรค รวมทั้งประชากรในพื้นที่อาจขาดการป้องกันที่มีประสิทธิภาพ ดังนั้นผู้ทำงานนอกอาคารโดยเฉพาะการทำงานในป่าย่อมมีโอกาสเสี่ยงต่อการติดเชื้อมาลาเรียสูงกว่าผู้ที่ทำงานในอาคาร (Somboon et al., 1998) สำหรับกลุ่มประชากรที่นำมาศึกษานี้ส่วนใหญ่เป็นชาวต่างชาติที่อาศัยอยู่ในอำเภอพบพระและอำเภอแม่สอด ประมาณร้อยละ 70 ซึ่งสถานการณ์ของโรคมาลาเรียในชาวต่างชาติที่ตรวจพบระหว่างปี พ.ศ. 2536 – พ.ศ. 2541 จำนวนผู้ติดเชื้อเป็นชาวต่างชาติมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นตามลำดับและผู้ป่วยชาวต่างชาติมากกว่าครึ่งหนึ่งเป็นชาวเมียนมาร์ (กองมาลาเรีย, 2542) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ ดังนั้นกลุ่มประชากรที่นำมาศึกษานี้จึงเป็นกลุ่มประชากรตัวอย่างที่มีความเหมาะสมและเพียงพอ

แม้ว่าการควบคุมโรคมาลาเรียในประเทศไทยในปัจจุบัน ส่งผลให้แนวโน้มของจำนวนผู้ติดเชื้อและเสียชีวิตด้วยโรคมาลาเรียมีแนวโน้มลดลง แต่จำนวนผู้ป่วยในท้องที่โดยเฉพาะชายแดนประเทศไทยและเมียนมาร์ยังมีจำนวนมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งจังหวัดตากพบจำนวนผู้ป่วยมากที่สุด มาตรการที่ทำให้การควบคุมโรคมาลาเรียประสบผลสำเร็จในระดับหนึ่งคือ การจัดให้มีศูนย์มาลาเรียเพื่อปฏิบัติหน้าที่ควบคุมดูแลและให้บริการตรวจรักษา ส่งผลให้สามารถตรวจพบผู้ป่วยที่ติดเชื้อในขั้นต้นและทำให้สามารถควบคุม

การแพร่เชื้อได้ นอกจากนี้จากการให้สุขศึกษา การใช้มุ้งอาบสารเคมีและจัดสภาพแวดล้อมที่ไม่เอื้ออำนวยต่อการแพร่พันธุ์ของยุงพาหะ อย่างไรก็ตามมาตรการดังกล่าวไม่สามารถลดจำนวนผู้ป่วยและการแพร่เชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพสมบูรณ์ ดังนั้นมาตรการที่น่าจะเพิ่มประสิทธิภาพของการควบคุมโรคมาลาเรียอีกวิธีหนึ่งคือการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย ซึ่งวัคซีนที่มีประสิทธิภาพน่าจะมีองค์ประกอบจากหลายระยะของเชื้อมาลาเรีย

PfMSP1 เป็นโปรตีนบนผิวของระยะเมอร์โรซอยต์ที่มีคุณสมบัติที่เหมาะสมสำหรับการนำมาเป็นองค์ประกอบวัคซีน เนื่องจากการเจริญเติบโตของเชื้อสามารถถูกยับยั้งได้โดยใช้ monoclonal antibody ที่มีความจำเพาะต่อ PfMSP1 โดยเฉพาะอย่างยิ่งส่วน C-terminus ซึ่งมีขนาด 19 KDa (Blackman et al., 1990; Chang et al., 1992; Guevara Patino et al., 1997) นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์ระหว่างการตรวจพบแอนติบอดีต่อ 19 KDa กับภาวะการลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมาลาเรีย (Egan et al., 1996) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Locher และคณะ (1996) พบว่า monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อ block 2 ซึ่งอยู่บริเวณ N-terminus ของ PfMSP1 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียในหลอดทดลองได้ในระดับสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและผลการยับยั้งมีความจำเพาะต่อลำดับกรดอะมิโนในบริเวณดังกล่าวของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ การวิเคราะห์พันธุกรรมของประชากรของเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* จากเขตปรากฏโรคต่าง ๆ พบว่า ค่าความแปรปรวนในการกระจายของอัลลีลใน block 2 ระหว่างกลุ่มประชากรของเชื้อมาลาเรีย (interpopulation variance) จากภูมิภาคที่ใกล้เคียงกันเช่น ประชากรของเชื้อมาลาเรียจากประเทศซูดาน ทานซาเนีย แกมเบีย ไนจีเรีย กาบอง และประเทศอัฟริกาใต้ มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่ามีกระบวนการคัดเลือกตามธรรมชาติ (natural selection) ในบริเวณ block 2 หรืออีกนัยหนึ่งแสดงว่า block 2 เป็นเป้าหมายของการตอบสนองของภูมิคุ้มกันจากโฮสต์ ซึ่งการติดตามกลุ่มผู้ป่วยในประเทศแกมเบียพบความสัมพันธ์ระหว่างการพบแอนติบอดีต่ออัลลีลที่จำเพาะของ block 2 กับปริมาณเชื้อมาลาเรียที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (Conway et al., 2000)

แม้ว่า PfMSP1 จะมีความหลากหลายในรูปแบบแอนติเจน แต่โปรตีนชนิดนี้ถูกสร้างด้วยยีนพื้นฐานเพียง 2 รูปแบบ ยกเว้นใน block 2 เป็นบริเวณที่มีความหลากหลายมากประกอบด้วยยีน 3 รูปแบบ ซึ่งความหลากหลายนี้มีส่วนสำคัญต่อความจำเพาะของการตอบสนองของภูมิคุ้มกันของโฮสต์ (Ekala et al., 2002) จากการศึกษาส่วน block 2 ของ PfMSP1 ในกลุ่มประชากรของเชื้อมาลาเรียในเขตปรากฏโรคต่าง ๆ โดยการใช้

oligonucleotide ที่มีความจำเพาะต่ออัลลีลแต่ละกลุ่มเป็นตัวติดตาม (probe) โดยวิธี Southern blot hybridization พบว่ากลุ่มอัลลีล MAD20 และ K1 มีความยาวของแถบดีเอ็นเอแตกต่างกันไป ส่วนกลุ่มอัลลีล R033 พบความยาวของแถบดีเอ็นเอคงที่ (Kimura et al., 1990; Snounou et al., 1999; Maitland et al., 2000) อย่างไรก็ตามวิธีการศึกษาดังกล่าวสามารถตรวจสอบความหลากหลายได้ในระดับหนึ่งเท่านั้น เนื่องจากวิธีการวัดขนาดของแถบดีเอ็นเอไม่สามารถบอกถึงความแตกต่างของความยาวได้อย่างถูกต้อง กล่าวคือ ในบริเวณ tripeptide repeats จะมีจำนวนความยาวที่ต่างกันชุดละ 9 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งถ้าอัลลีลที่มีความยาวของนิวคลีโอไทด์ต่างกันไม่มากหรือภายในอัลลีลมีตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ขาดหาย ทำให้การวัดขนาดเกิดความคลาดเคลื่อนด้วยข้อจำกัดของวิธีการดังกล่าวได้ ดังนั้นการศึกษาความหลากหลายของยีนในบริเวณดังกล่าวจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จึงให้ผลการวิเคราะห์ชัดเจนมากกว่าวิธีอื่น ๆ

จากการศึกษาความหลากหลายใน block 2 ของยีน PfMSP1 จากตัวอย่างผู้ป่วยในประเทศไทยจำนวน 26 อัลลีล (Jongwutiwes et at., 1992) และประเทศทานซาเนียจำนวน 27 อัลลีล (Jiang et al., 2000) พบว่าในแต่ละกลุ่มอัลลีลมีความหลากหลายในลำดับและองค์ประกอบของนิวคลีโอไทด์ นอกจากนี้อัลลีลที่มีจำนวนชุด tripeptide ที่ซ้ำกันยังอาจพบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความแตกต่างกันได้ อย่างไรก็ตามในการศึกษาส่วนมากไม่ได้ศึกษาในกลุ่มประชากรจำนวนมากในพื้นที่ปรากฏโรค ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้ ได้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากกลุ่มผู้ป่วยจำนวน 151 ตัวอย่าง ซึ่งกล่าวได้ว่าเป็นการศึกษาแรกที่ใช้กลุ่มประชากรตัวอย่างมากที่สุดที่เคยมีการรายงานมาก่อน

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน PfMSP1 ในส่วน block 2 ในการศึกษาครั้งนี้พบว่ากลุ่มอัลลีล MAD20 ประกอบด้วย 21 อัลลีลจากทั้งหมดทั่วโลกที่มีการรายงาน 37 อัลลีล โดยมีองค์ประกอบของ tripeptide repeats ตั้งแต่ 5-16 ชุด อัลลีล M-XVIb พบได้มากที่สุด รองลงมาคือ อัลลีล M-IX โดย tripeptide ในชุดสุดท้ายคือ TCAGGTGGT (SGG) จะปรากฏในทุกสายพันธุ์ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานก่อนหน้านี้ (Jongwutiwes et al., 1992) และในชุดก่อนสุดท้ายของทุกอัลลีล ยกเว้นอัลลีล M-XXXI ประกอบด้วย TCAGTTGCT (SVA) ในทุกสายพันธุ์เช่นกัน นอกจากนี้อัลลีล M-I, M-II, M-VIIa, M-XI, M-XVIb, M-XX, M-XXI และ M-XXVIII เป็นอัลลีลใหม่ที่ยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อน สำหรับอัลลีลกลุ่ม K1 พบความหลากหลายทั้งหมดทั่วโลกที่มีการรายงาน 26 อัลลีล จากการศึกษาในครั้งนี้พบ 5 อัลลีล มีจำนวน tripeptide repeats ตั้งแต่ 5-15 ชุด โดยลำดับ

นิวคลีโอไทด์ในชุดแรกและชุดสุดท้าย คือ AGTGCTCAA (SAQ) และ AGTGGTCCA (SGT) ตามลำดับ ปรากฏในทุกสายพันธุ์ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานที่เคยมีการรายงานมาก่อนเช่นกัน (Jongwutiwes et al., 1992) โดยอัลลีล K-XV พบมากที่สุด สำหรับอัลลีลใหม่ที่ไม่เคยมีการรายงานมาก่อนพบ 3 แบบ ได้แก่ K-IX, K-XXIII และ K-XXVI และกลุ่มอัลลีล R033 ไม่พบลักษณะของ tripeptide repeats และมีองค์ประกอบของนิวคลีโอไทด์จำนวนเท่ากันในทุกอัลลีล แต่พบการแทนที่ในบางตำแหน่ง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาอื่น (Certa et al., 1987; Jongwutiwes et al., 1992) จากข้อมูลที่เคยมีการรายงานทั้งหมดพบความหลากหลาย 4 อัลลีล สำหรับการศึกษาครั้งนี้พบ 2 อัลลีล โดยอัลลีล R-II พบมากที่สุด Certa และคณะ (1987) เสนอว่าอัลลีล R033 เป็นอัลลีลบรรพบุรุษ (ancestral allele) ของอัลลีล MAD20 และ K1 แม้ว่าอัลลีล R033 จะไม่พบการซ้ำกันของกรดอะมิโนเป็นชุด แต่เมื่อพิจารณาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อาจเป็นอัลลีลบรรพบุรุษของการเกิดการซ้ำกันเป็นชุด ๆ ขึ้นภายหลัง พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ต้นแบบมีองค์ประกอบของ TCAA (A/N) GT (T/N) G (G/N) T โดย N เป็นนิวคลีโอไทด์ชนิดใดก็ได้ ซึ่งความหลากหลายที่เกิดขึ้นอาจเกิดจากกลไกทางพันธุกรรมส่งผลให้ลำดับนิวคลีโอไทด์พื้นฐานมีการจำลองตัวเอง (duplication) และเพิ่มจำนวนชุด

การกระจายของอัลลีลที่ปรากฏในประเทศไทย พบกลุ่มอัลลีล MAD20 มากที่สุด รองลงมาคือ กลุ่มอัลลีล K1 และกลุ่มอัลลีล R033 ซึ่งมีความแตกต่างกันในแต่ละปี จากการเปรียบเทียบการกระจายของกลุ่มอัลลีลทั้ง 3 ที่เกิดขึ้นในแต่ละปีที่ศึกษาพบว่า การกระจายของกลุ่มอัลลีลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.4431$) ถึงแม้ว่ากลุ่มอัลลีล K1 และ R033 พบอุบัติการการกระจายต่างกัน (ตารางที่ 17) ดังนั้นความหลากหลายในกลุ่มอัลลีลที่เกิดขึ้นมีความคงที่ในช่วงเวลาที่ต่างกัน แสดงว่าความหลากหลายที่พบไม่น่าจะเกิดจากปัจจัยการอพยพย้ายถิ่นของกลุ่มประชากรในระหว่างพื้นที่ภายในจังหวัดตากหรือระหว่างชายแดนของประเทศไทยและประเทศเมียนมาร์ ดังนั้นประชากร *P. falciparum* ในบริเวณดังกล่าวน่าจะมีการแลกเปลี่ยนอัลลีลตลอดเวลาจนพื้นที่ดังกล่าวปรากฏกลุ่มอัลลีลลักษณะไม่ต่างกันมาก ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้พบว่าการกระจายของกลุ่มอัลลีลในจังหวัดตากให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Sakihama และคณะ (1999) เมื่อเปรียบเทียบอุบัติการการกระจายกลุ่มอัลลีล ของ block 2 ในประเทศเวียดนาม

ตารางที่ 17 แสดงการเปรียบเทียบการกระจายของกลุ่มอัลลีล ใน block 2 ในช่วงระยะเวลา 10 ปี ทดสอบทางสถิติด้วยวิธี chi-square

ปี	ระดับความแตกต่าง (P-value)			
	อ.แม่สอด 2531-2532	อ.แม่สอด 2538	อ.แม่สอด 2541	อ. พบพระ 2540-2542
อ.แม่สอด 2531-2532	-	0.440	0.956	0.269
อ.แม่สอด 2538	-	-	0.716	0.393
อ.แม่สอด 2541	-	-	-	0.503
อ. พบพระ 2540-2542	-	-	-	-

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พบว่า ในแต่ละกลุ่มอัลลีลมีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับในประเทศไทย ($P = 0.4860$) กล่าวคือพบกลุ่มอัลลีล MAD20 มากที่สุด ร้อยละ 64 รองลงมาคือกลุ่มอัลลีล K1 และ R033 ร้อยละ 23, 13 ตามลำดับ (Kaneko et al., 1999) นอกจากนี้พบว่าเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ในประเทศบราซิล ทานซาเนีย ซูดาน แกมเบีย เป็นกลุ่มอัลลีล K1 มากที่สุด ประมาณร้อยละ 36-55 รองลงมาคือ กลุ่มอัลลีล R033 และ MAD20 ประมาณร้อยละ 26-45, 15-35 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามการกระจายของกลุ่มอัลลีลดังกล่าวในประเทศเหล่านี้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน ($P = 0.1270$) จากการเปรียบเทียบอุบัติการการกระจายของกลุ่มอัลลีลระหว่างประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (ประเทศไทยและประเทศเวียดนาม) กับประเทศทานซาเนียและประเทศบราซิล พบว่าการกระจายของกลุ่มอัลลีลในประชากรของเชื้อมาลาเรียทั้ง 3 กลุ่ม มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($0.0003 < P < 0.02$) ดังแสดงในตารางที่ 18 ดังนั้นความผันแปรในกระจายของกลุ่มอัลลีลจึงขึ้นอยู่กับปัจจัยทางภูมิศาสตร์ (geographic variation) แม้ว่าจะไม่ทราบกลไกในความแตกต่างดังกล่าว ความหลากหลายที่พบในแต่ละกลุ่มอัลลีลในเขตปรากฏโรคที่แตกต่างกัน อาจมีปัจจัยหลายประการเช่น เชื้อมาลาเรียมีความสามารถเจริญในยุงพาหะต่างชนิดต่างกันได้ (Rosenberg et al., 1990; Camargo et al., 1996; Tadei et al., 2000) กล่าวคือ ยุงพาหะนำเชื้อมาลาเรียในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มักเป็นยุงชนิด *An. dirus* และ *An. minimus* แต่ในประเทศแถบอัฟริกาส่วนใหญ่มักเป็นยุงชนิด *An. gambiae* และ *An. funestus* ดังนั้น อาจเป็นไปได้ที่เชื้อมาลาเรียที่มีอัลลีลที่ต่างกันมีความสามารถในการเจริญอยู่ในยุงพาหะได้ไม่เท่ากันเป็นต้น

อย่างไรก็ตามความหลากหลายของยีน PfMSP1 อาจถูกกำหนดหรือได้รับผลกระทบจากปัจจัยภายนอก โดยเฉพาะการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของโฮสต์จะส่งผลให้อัตราการพบกลุ่มอัลลีลใน block 2 ของ *PfMSP1* มีอุบัติการการกระจายของกลุ่มอัลลีลคงที่ในแต่ละช่วงเวลา ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในช่วง 10 ปี ของประเทศไทย (Jongwutiwes et al., 1992; Sakihama et al., 1999) หรืออัตราการพบกลุ่มอัลลีลในกลุ่มประเทศอัฟริกาได้แก่ ประเทศทานซาเนีย ซูดานและแกมเบีย (Conway et al., 1992; Babiker et al., 1997; Conway et al., 2000, Jiang et al., 2000) มีความคงที่ อย่างไรก็ตามอาจเป็นไปได้ที่ส่วน variable block ไม่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของโฮสต์จากการติดเชื้อในธรรมชาติได้ตามลำพัง แต่อาจมีบทบาทร่วมกับบริเวณอื่นใน MSP1 หรือแอนติเจนอื่น อย่างไรก็ตามในบริเวณดังกล่าวมีความหลากหลายของอัลลีลในกลุ่ม MAD20 และ K1 สูง

ดังนั้นการตอบสนองของภูมิคุ้มกัน แม้จะมีประสิทธิภาพสามารถทำลายเชื้อมาลาเรีย แต่อาจไม่สามารถเลือกทำลายเชื้อที่มีอัลลีลที่ต่างกันได้

อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาในระดับอัลลีล พบว่าการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มากขึ้นจะทำให้มีโอกาสพบกลุ่มอัลลีลที่มีจำนวนน้อย (minor population) เพิ่มมากขึ้นด้วย จากการศึกษาการกระจายของกลุ่มอัลลีลในประเทศไทยในระยะเวลาที่แตกต่างกัน พบว่าอัลลีลที่มีอุบัติการสูง (predominant allele) ในช่วงปีใดปีหนึ่งจะพบอัลลีลนี้มีอุบัติการสูงในช่วงปีอื่นด้วยเช่น อัลลีล M-IX มีอุบัติการสูงในช่วงปี พ.ศ. 2531 - พ.ศ. 2532 และปี พ.ศ. 2540 - พ.ศ. 2542 เช่นเดียวกับอัลลีล M-X และ M-XVIb มีอุบัติการสูงในปี พ.ศ. 2538 และใน ช่วงปี พ.ศ. 2540 - พ.ศ. 2542 นอกจากนี้ยังพบว่า อัลลีล K-XV พบมากในทุกช่วงเวลาดังกล่าวและเมื่อเปรียบเทียบการกระจายของกลุ่มอัลลีลที่พบในประเทศไทยและประเทศทานซาเนีย พบว่ามีอัลลีลที่พบร่วมกันเพียง 3 อัลลีล ได้แก่ อัลลีล M-XVa, K-XX และ R-I แสดงว่ากลุ่มอัลลีลใน block 2 น่าจะมีขอบเขตจำกัดของความหลากหลายในรูปแบบ ทำให้มีโอกาสพบอัลลีลที่เหมือนกันได้ในพื้นที่ที่ต่างกันและจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในครั้งนี้ ไม่พบอัลลีลที่มีการขาดหายไปของลำดับนิวคลีโอไทด์ใน tripeptide repeats ดังเช่นการ รายงานของ Kimura และคณะในปี 1990 ซึ่งการศึกษาดังกล่าวใช้วิธีเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิค PCR แล้วทำการ subclone ใน plasmid เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป ดังนั้นจึงมีโอกาสเกิดความผิดพลาดในขั้นตอนดังกล่าวหรืออาจเกิดจากความคลาดเคลื่อนในการอ่านผลจากแถบดีเอ็นเอบนแผ่นฟิล์ม ในทางตรงข้ามการขาดหายไปของลำดับนิวคลีโอไทด์อาจเกิดขึ้นได้แต่น่าจะพบในธรรมชาติน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างทั้งหมดที่มีการศึกษา อย่างไรก็ตามขอบเขตความหลากหลายในการตรวจพบจำนวนอัลลีลที่ต่างกันในแต่ละกลุ่มมีความสัมพันธ์กับอุบัติการการตรวจพบกลุ่มอัลลีลในแต่ละท้องที่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.0024$) ซึ่งอาจแสดงว่ากลุ่มอัลลีลที่พบมากในธรรมชาติน่าจะมีโอกาสเกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมมากตามไปด้วยเช่น การแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมแบบไม่ใช้เพศ (mitotic recombination) เกิดขึ้นได้มากกว่ากลุ่มอัลลีลที่พบน้อย ถ้ากระบวนการดังกล่าวมีอัตราการเกิดทัดเทียมกัน

องค์ประกอบของกรดอะมิโนในบริเวณ tripeptide repeats ในแต่ละกลุ่มอัลลีลมีความหลากหลายต่างกันไป โดยกลุ่ม MAD20 และ K1 มีองค์ประกอบของ tripeptide repeats ที่ใช้ในในแต่ละชุดจำนวน 7 แบบและ 5 แบบ ตามลำดับ แต่เมื่อพิจารณาในระดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ากลุ่มอัลลีล MAD20 มีความหลากหลายสูงถึง 13 แบบ ในขณะที่กลุ่ม

ตารางที่ 18 แสดงการเปรียบเทียบการกระจายของอัลลีลใน block 2 ของยีน PfMSP1 ในประเทศไทย เวียดนาม บราซิล และทานซาเนีย โดยทดสอบทางสถิติด้วยวิธี chi- square

ประเทศ	ระดับความแตกต่าง (P-value)			
	ไทย	เวียดนาม	บราซิล	ทานซาเนีย
ไทย	-	0.486	0.02*	0.0003*
เวียดนาม	-	-	0.009*	0.0123*
บราซิล	-	-	-	0.1217
ทานซาเนีย	-	-	-	-

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

K1 พบ 5 แบบ ถึงแม้ว่าบางอัลลีลมีลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกัน แต่อาจมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกัน ดังนั้นการศึกษาโดยอาศัยวิธี Southern blot hybridization จึงเป็นการประเมินความหลากหลายของอัลลีลต่ำกว่าจริงและจากการเปรียบเทียบองค์ประกอบของ tripeptide repeats แต่ละชุดของกลุ่มอัลลีล MAD20 และ K1 ที่พบในการศึกษานี้กับการศึกษาอื่น ๆ ทั้งหมด พบว่าภายในแต่ละกลุ่มมีสัดส่วนองค์ประกอบของ tripeptide repeats ไม่แตกต่างกัน ($P = 0.8117$ และ $P = 0.4125$ ตามลำดับ) นอกจากนี้เมื่อพิจารณาโคดอนที่ใช้ในองค์ประกอบในบริเวณดังกล่าวยังพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ($P = 0.9768$ และ $P = 0.7232$ ตามลำดับ) อันเป็นข้อชี้แนะว่าองค์ประกอบของ tripeptide repeats ที่พบในประเทศไทยไม่มีความแตกต่างกับพื้นที่อื่นทั่วโลกอย่างชัดเจน ซึ่งถ้าพิจารณาเกี่ยวกับบรรพบุรุษและอายุของสายวิวัฒนาการของยีน PfMSP1 จากการประเมินอัตราการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ พบว่ากลุ่มอัลลีล MAD20 และ K1 มีการแยกสายวิวัฒนาการเมื่อประมาณ 35 ล้านปีก่อนโดยสมมุติฐานที่ว่าอัตราการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์เกิดขึ้น 2.6×10^{-9} ต่อตำแหน่งต่อปี (Hughes, 1992; Hughes and Verra , 2001) ดังนั้นในช่วงระยะเวลาอันยาวนานดังกล่าวกลไกทางพันธุกรรมที่ทำให้เกิดความหลากหลายในแต่ละกลุ่มอัลลีลโดยกระบวนการทางพันธุกรรมเช่น การแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมแบบไม่สมดุลย์ (unequal crossingover) และการผ่าเหล่า (mutation) จึงมีโอกาสดำเนินไปอย่างมากภายในระยะเวลาอันยาวนาน นอกจากนี้ถ้าบรรพบุรุษของเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* มีต้นกำเนิดอันยาวนานเช่น ในช่วงหลายแสนปีก่อนการแพร่กระจายของโรคมาลาเรียไปตามภูมิภาคต่าง ๆ ของโลกอาจทำให้องค์ประกอบของกรดอะมิโนใน tripeptide repeats ในแต่ละกลุ่มอัลลีลจากทั่วโลกไม่แตกต่างกัน ในทางตรงข้ามการพบองค์ประกอบของ tripeptide repeats มีความคงที่ในบางตำแหน่ง อาจเกิดจากข้อจำกัดในโครงสร้างและหน้าที่ของ MSP1 ร่วมด้วย อย่างไรก็ตามถ้าบรรพบุรุษของเชื้อมาลาเรียเกิดขึ้นไม่นานเช่นในช่วง 20,000 ปี ถึง 40,000 ปี (Rich et al., 1998; Volkman et al., 2001) กลไกทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นน่าจะมีอัตราการเกิดที่เร็วมากกว่า 2.6×10^{-9} ต่อตำแหน่งต่อปี ซึ่งมากกว่าอัตราการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์โดยทั่วไปมาก ดังนั้นแนวคิดเกี่ยวกับทฤษฎีวิวัฒนาการอันยาวนานของเชื้อมาลาเรีย (Hughes, 1992; Hughes and Verra , 2001) น่าจะสนับสนุนการเกิดความหลากหลายใน block 2 ของ PfMSP1 มากกว่า.

แม้ว่าบทบาทและหน้าที่ของ PfMSP1 ยังไม่ทราบชัดเจน แต่เชื่อว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับการลุกลามเข้าสู่เม็ดเลือดแดง เนื่องจาก monoclonal และ polyclonal antibody ต่อ MSP1 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียในหลอดทดลองได้และในสัตว์ทดลองพบว่าโปรตีนชนิดนี้สามารถชักนำให้เกิดภูมิต้านทานต่อการติดเชื้อมาลาเรีย นอกจากนี้การศึกษาการตอบสนองของแอนติบอดีในผู้ป่วยมาลาเรียจำนวนมากพบว่าผู้ป่วยมีภูมิต้านทานต่อการติดเชื้อและมีระดับแอนติบอดีที่ตอบสนองต่อ block 2 ของ PfMSP1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามโดยทั่วไปโปรตีนส่วนที่มีกรดอะมิโนซ้ำ ๆ กัน มักจะสามารถกระตุ้น B cell ได้โดยไม่อาศัย T cell (T cell independent B cell response) (Schofield et al., 1991) จากการทดสอบการตอบสนองของ B cell ต่อบริเวณ tetrapeptide repeats ของ CSP พบว่าบริเวณดังกล่าวสามารถกระตุ้น B cell ได้ดี (immunodominant) แต่ประสิทธิภาพของแอนติบอดีที่สร้างขึ้นอาจมีความสามารถต่ำ เนื่องจากแอนติบอดีที่เกิดขึ้นจะจับกับแอนติเจนได้ไม่ดี (low affinity) และมักไม่เกิดการจดจำแอนติเจนในภายหลัง (poor memory formation) ทำให้การทำลายเชื้อมาลาเรียจึงเป็นไปอย่างไม่ได้ผลเต็มที่ ดังนั้นความหลากหลายในลำดับกรดอะมิโนของบริเวณดังกล่าวอาจส่งผลต่อการกระตุ้นการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันให้สร้างแอนติบอดีที่สามารถยับยั้งการบุกรุกของเชื้อเข้าสู่เม็ดเลือดแดงหรือในทางตรงกันข้ามแอนติบอดีที่ถูกสร้างขึ้นอาจจะไม่มีประสิทธิภาพต่อการทำลายเชื้อ จึงทำให้เชื้อมาลาเรียสามารถหลบเลี่ยงการตอบสนองของโฮสต์ได้ แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาของ Locher และคณะ (1996) ได้ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียในหลอดทดลองพบว่า monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อบริเวณ tripeptide repeats ของ PfMSP1 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อในกลุ่มอัลลีลที่มีลำดับกรดอะมิโนประกอบด้วย SAQSGTSGTSGTSGTSGT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและจากการศึกษาตำแหน่งที่มีคุณสมบัติต่อการกระตุ้นการตอบสนองของแอนติบอดีในผู้ติดเชื้อมาลาเรีย พบว่ากลุ่มอัลลีล MAD20 และ K1 มีบริเวณที่สามารถกระตุ้นการตอบสนองดังกล่าวหลายตำแหน่งและมีความสัมพันธ์กับการลดความรุนแรงของอาการแสดงของโรคได้ (Jouin et al., 2001) อาจเป็นไปได้ที่ความหลากหลายเกิดขึ้นจากกลไกการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนเพื่อให้สามารถหลบหลีกจากการทำลายและการจดจำแอนติเจนของระบบภูมิคุ้มกัน

สำหรับองค์ประกอบของวัคซีนป้องกันมาลาเรียที่มีประสิทธิภาพที่ดี นอกจากจะต้องทำลายเชื้อได้หลายระยะ โดยแอนติเจนที่เป็นองค์ประกอบไม่ควรมีความหลากหลายสูงมากเกินไปและสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายทั้ง B cell และ T cell ที่มีประสิทธิภาพต่อการทำลายหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียได้อย่างสมบูรณ์และภูมิคุ้มกันดังกล่าวสามารถคงอยู่ได้เป็นระยะเวลานาน นอกจากนี้เมื่อผู้ที่ได้รับวัคซีนได้รับเชื้อมาลาเรียตามธรรมชาติ การติดเชื้อดังกล่าวสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกายให้ตอบสนอง (booster) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แม้ว่า block 2 ของ PfMSP1 เป็นเป้าหมายของการตอบสนองของแอนติบอดีที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อในหลอดทดลองและมีความสัมพันธ์กับการป้องกันการเกิดโรคมาลาเรีย จึงน่าจะเป็นองค์ประกอบของวัคซีน แต่จากการศึกษานี้พบว่าบริเวณดังกล่าวมีความหลากหลายสูงมาก โดยเฉพาะกลุ่มอัลลีล MAD20 และ K1 ทั้งนี้แอนติบอดีต่ออัลลีลที่ต่างกันไม่มีปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (Ekala et al., 2002) ดังนั้นจึงน่าจะเป็นอุปสรรคของการนำมาเป็นองค์ประกอบของวัคซีน เนื่องจากแอนติบอดีที่ถูกสร้างขึ้นมาอาจไม่สามารถยับยั้งเชื้อมาลาเรียที่มีกลุ่มอัลลีลใน block 2 ที่ต่างกันไป ดังนั้นด้วยข้อจำกัดดังกล่าว การพัฒนาวัคซีนโดยโปรตีนจากบริเวณนี้จึงไม่น่าจะมีประสิทธิภาพสมบูรณ์ (imperfect vaccine) จากการวิเคราะห์แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ (mathematical modeling) สำหรับวัคซีนที่มีประสิทธิภาพไม่สมบูรณ์ในการทำลายเชื้อ พบว่าวัคซีนที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อจะมีผลต่อการเกิดเชื้อสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงในการก่อโรคที่รุนแรงมากขึ้น ดังนั้นผลกระทบที่ตามมาคือผู้ที่ไม่ได้รับวัคซีนเมื่อได้รับเชื้อที่ผ่านกระบวนการคัดเลือกดังกล่าว จะมีอาการของโรคที่รุนแรงขึ้นทำให้อัตราการตายอาจเพิ่มสูงขึ้น ในทางตรงกันข้ามวัคซีนที่มีประสิทธิภาพไม่สมบูรณ์ แต่สามารถป้องกันการติดเชื้อ (infection-blocking) จะไม่เกิดผลดังกล่าวหรืออาจทำให้เชื้อลดความรุนแรงในการก่อโรคลงได้ (Gandon et al., 2001) ดังนั้นวัคซีนที่ใช้โปรตีนใน block 2 ซึ่งมีเป้าหมายในการยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียเท่านั้น ถ้าวัคซีนมีประสิทธิภาพการป้องกันไม่สมบูรณ์อาจส่งผลต่อการเกิดโรคมาลาเรียที่รุนแรงในกลุ่มประชากรที่ไม่ได้รับวัคซีนมากขึ้นในอนาคต อย่างไรก็ตามการพัฒนาวัคซีนจากส่วน block 2 ในกลุ่มอัลลีล RO33 น่าจะมีศักยภาพสูงสุด เนื่องจากเป็นกลุ่มอัลลีลที่พบความหลากหลายน้อยมากและสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกายได้ดีที่สุด ทำให้เกิดภูมิต้านทานเพื่อป้องกันการเกิดอาการแสดงของโรคที่รุนแรงอย่างมีนัยสำคัญ ($P = 0.00000$) (Branch et al., 2001)

ดังนั้นการพบความหลากหลายของอัลลีลใน block 2 ในการศึกษานี้จึงเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการพัฒนาองค์ประกอบวัคซีนจาก PfMSP1 ต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย