

The Miltenberger Blood Group Antigen Enhances *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Entry

แอนติเจนหมู่เลือดมิลเทนเบอร์เกอร์เพิ่มการเข้าเซลล์เม็ดเลือดแดงของเชื้อพลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม

Chumnumporn Pruksa (ชมนนุพร พฤษยา)* Dr.Phongchai Harnyuthanakorn (ดร.พงษ์ชัย หาญยุทธนากร)**

Dr.Ponlapat Rojnuckarin (ดร.พลภัทร โรจน์นกรินทร์)***

ABSTRACT

The Miltenberger blood group antigen is located on glycoporphins, the receptors for *Plasmodium falciparum* malaria. The purpose of this research was to study the relation between the Miltenberger blood group antigens and the invasion of *Plasmodium falciparum* to red blood cells comparing the invasion rates to erythrocytes from Mi^a+ vs. Mi^a- normal volunteers. Malarial cultures were performed using 46 samples of group O red blood cells. 16 were from Mi^a+ individuals and 30 were Mi^a- negative controls. The means $\pm$ standard deviations of the percentage of infected erythrocytes after 48-hour incubation in 3 separate experiments were: Mi^a+ $7.8 \pm 1.7\%$ vs. Mi^a- $5.2 \pm 0.8\%$, Mi^a+ $9.1 \pm 0.7\%$ vs. Mi^a- $6.1 \pm 1.4\%$, Mi^a+ $7.5 \pm 1.7\%$ vs. Mi^a- $5.9 \pm 0.5\%$ respectively. ($p < 0.001$, Student's t-test) In conclusion, this glycoporphin variant enhances malaria invasion to erythrocytes. The relationship to clinical severity remains to be determined.

บทคัดย่อ

แอนติเจนหมู่เลือดมิลเทนเบอร์เกอร์อยู่บนโปรตีนไกลโคพอรินซึ่งเป็นตัวรับของเชื้อมาลาเรียพลาสโมเดียมฟัลซิพารัม งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแอนติเจนหมู่เลือดมิลเทนเบอร์เกอร์กับความไวต่อการเข้าเซลล์เม็ดเลือดแดงของเชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพารัม โดยเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างเม็ดเลือดแดงจากคนปกติที่มีหมู่เลือดชนิด Mi^a+ และ Mi^a- ผลการวิจัยจากการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียในกลุ่มตัวอย่างที่มีเลือดหมู่โอ 46 ราย แบ่งเป็น Mi^a+ 16 ราย และ Mi^a- 30 ราย พบว่าค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เป็นดังนี้ การทดลองครั้งที่ 1 Mi^a+ $7.8 \pm 1.7\%$ และ Mi^a- $5.2 \pm 0.8\%$, ครั้งที่ 2 Mi^a+ $9.1 \pm 0.7\%$ และ Mi^a- $6.1 \pm 1.4\%$ และครั้งที่ 3 Mi^a+ $7.5 \pm 1.7\%$ และ Mi^a- $5.9 \pm 0.5\%$ ($p < 0.001$) แสดงว่าแอนติเจน Mi^a เพิ่มการเข้าเซลล์เม็ดเลือดแดงของเชื้อมาลาเรีย โดยความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคยังคงต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

Key Words: Miltenberger antigen, *Plasmodium falciparum*

คำสำคัญ: แอนติเจนมิลเทนเบอร์เกอร์ พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม

* Student, Master of Science, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University.

**Associate Professor, Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University.

*** Hematology Unit, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University.

บทนำ

ในร่างกายของมนุษย์เรามีเม็ดเลือดแดงที่สามารถบ่งบอกหมู่เลือดที่มีความแตกต่างกันในแต่ละบุคคลได้อยู่มากมายหลายชนิด หมู่เลือดที่เรารู้จักคุ้นเคยกันเป็นอย่างดีคือ หมู่เลือดเอบีโอ (ABO blood group) ส่วนหมู่เลือดอื่นๆ ถือว่ามีความสำคัญในระดับรองลงมา หมู่เลือดมิลเทนเบอร์เกอร์ (Miltenerberger blood group) ถือว่าเป็นอีกหมู่เลือดหนึ่งที่มีความสำคัญเช่นกัน โดยมีการศึกษาพบว่าหมู่เลือดชนิดนี้ถูกบ่งชี้จากโปรตีนชนิดหนึ่งที่อยู่บนผิวของเซลล์เม็ดเลือดแดงคือ ไกลโกลฟอริน (Glycophorin) ซึ่งเป็นตัวรับ (receptor) ของมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม จึงอาจมีความสัมพันธ์ต่อการที่เซลล์เม็ดเลือดแดงนี้จะติดเชื้อพลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม (*Plasmodium falciparum*) ที่ก่อให้เกิดโรคมาลาเรียชนิดรุนแรงได้

โรคมาลาเรียเป็นโรคที่มีความสำคัญเป็นอันดับต้นๆ เนื่องจากในแต่ละปีจะมีอัตราการเสียชีวิตด้วยโรคมาลาเรียประมาณ 1-3 ล้านคนต่อปีทั่วโลก สาเหตุส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum* ที่อยู่ในเซลล์เม็ดเลือดแดง (Intra-erythrocytic blood stage) ก่อให้เกิดพยาธิสภาพอย่างรุนแรงคือทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงบนผิวของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ (Infected red blood cell) เซลล์จะถูกยึดติดอยู่ในหลอดเลือดของอวัยวะภายใน (Cytoadherence) ไม่หลุดออกมาในกระแสเลือดส่วนปลาย (Peripheral blood circulation) ทำให้เชื้อรอดจากการถูกทำลายโดยม้าม (สมชาย และ จตุรงค์, 2549) ด้วยกลไกนี้ทำให้ *Plasmodium falciparum* สามารถเพิ่มจำนวนในกระแสเลือด (Parasitemia) ได้มากกว่าชนิดอื่นๆ นอกจากนั้นยังทำให้เกิดการอุดตันของหลอดเลือดขนาดเล็กในอวัยวะต่างๆ โดยเฉพาะในสมอง เกิดภาวะมาลาเรียขึ้นสมอง (Cerebral malaria) ซึ่งเป็นภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรงจนทำให้ผู้ป่วยเกิดอาการช็อคและถึงแก่ชีวิตได้ ดังนั้นเชื้อมาลาเรียที่อยู่ในเซลล์เม็ดเลือดแดงนี้จึงเป็นระยะเป้าหมายของการผลิตยาและวัคซีนเพื่อควบคุมและป้องกันโรคมาลาเรียในอนาคต

การค้นพบว่าแอนติเจนในระบบหมู่เลือดต่างๆ นั้นมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคมาลาเรีย ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ.1976 โดย Miller LH และคณะ (Miller, 1976) ซึ่งได้ทำการศึกษาพบว่าหมู่เลือดระบบ Duffy มีความสัมพันธ์ต่อการติดเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium vivax* โดยแอนติเจนของหมู่เลือดนี้ทำหน้าที่เป็นตัวรับ ให้กับเชื้อมาลาเรีย ดังนั้นคนที่ไม่มีแอนติเจนของหมู่เลือดชนิดนี้ก็จะสามารถต่อต้านการเป็นโรคมาลาเรียชนิด *Plasmodium vivax* ได้ การค้นพบนี้ทำให้ทราบว่าแอนติเจนของหมู่เลือดสามารถทำหน้าที่เป็นตัวรับให้กับโปรตีนยึดเกาะ (Ligand) บนผิวเซลล์ของเชื้อปรสิตต่างๆ โดยเฉพาะเชื้อก่อโรคมาลาเรีย ที่มีผู้ทำการศึกษาเพิ่มเติมในปี ค.ศ.1982 โดย Pasvol G และคณะ (Pasvol, 1982) พบว่าในคนที่มีหมู่เลือด En^a- คือคนที่ขาดโปรตีน Glycophorin A บนผิวเซลล์เม็ดเลือดแดงนั้น สามารถต่อต้านการเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงของเชื้อ *Plasmodium falciparum* ได้ และในทำนองเดียวกันก็พบว่าคนที่ขาด Glycophorin B ซึ่งแสดงหมู่เลือดเป็น S-s-U- เชื้อในระยะ Merozoite ก็ไม่สามารถเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงได้เช่นกัน สำหรับคนที่ขาด Glycophorin C จะมีหมู่เลือด Gerbich เป็นลบก็สามารถต่อต้านการเข้าสู่เซลล์ของ Merozoite ได้ (Anstee, 1984) คนที่ขาดทั้ง Glycophorin A และ Glycophorin B คือหมู่เลือด M^kM^k (Hadley, 1987) ก็แสดงลักษณะเดียวกัน ยิ่งไปกว่านั้นมีการศึกษาพบว่าหมู่เลือดต่างๆ เหล่านี้ที่มีการขาด Glycophorin ชนิดต่างๆ จะพบมากในประเทศทางแถบแอฟริกาใต้ ซึ่งเป็นแหล่งระบาดของเชื้อมาลาเรียมากที่สุดในโลก โดยพบว่าในคนแอฟริกันจะมีความชุก (Prevalence) ของหมู่เลือดเหล่านี้สูงกว่าในประเทศแถบอื่นๆ แสดงให้เห็นว่า Glycophorin น่าจะมีบทบาทสำคัญในการทำหน้าที่เป็นตัวรับให้กับเชื้อก่อโรคมาลาเรียได้

Glycophorin (GP) เป็น Sialoglycoprotein ที่พบมากที่สุดอยู่บนผิวของเซลล์เม็ดเลือดแดง สร้างจากยีน *GYP A, GYP B, GYP C, GYP D*, และ *GYP E* gene ซึ่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 2 บริเวณ 2q14-q21 และ

โครโมโซมคู่ที่ 4 บริเวณ 4q28.2-q31.1 โดยมี Sialic acid เป็นจำนวนมากเกาะอยู่ที่ปลายด้านนอกของสายโปรตีน ซึ่ง Sialic acid นี้เองที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับเชื้อปรสิตต่างๆ รวมทั้งเชื้อมาลาเรียด้วย Glycophorin แบ่งออกได้เป็น 5 ชนิด คือ Glycophorin A(α), B(δ), C(β , γ), D(variant of GPC) และ E ชนิดที่พบมากที่สุดบนผิวของเซลล์เม็ดเลือดแดง คือ Glycophorin A มีปริมาณมากถึงหนึ่งล้านโมเลกุลต่อเซลล์ รองลงมาคือ Glycophorin B ประมาณสองแสนห้าหมื่นโมเลกุลต่อเซลล์ คิดเป็นร้อยละ 60 และร้อยละ 15 ของจำนวน Glycophorin ทั้งหมดตามลำดับ ด้วยเหตุนี้เองจึงเชื่อว่า Glycophorin A (GPA) และ Glycophorin B (GPB) เป็นตัวรับที่สำคัญของเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum* โดยทำหน้าที่เป็นตัวรับให้กับโปรตีนที่ยึดเกาะบนผิวเซลล์ของเชื้อในระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดง คือระยะ Merozoite โปรตีนที่ใช้ในการยึดเกาะเรียกว่า Merozoite ligand ซึ่งอยู่บริเวณส่วนปลายของเชื้อ เรียกว่า Apical end ประกอบด้วยส่วนที่สำคัญสองส่วน คือ Microneme และ Rhoptry มีความจำเพาะต่อการเข้าจับกับ Glycophorin ชนิดต่างๆ กันไป

Glycophorin A และ Glycophorin B สามารถแสดงลักษณะเป็นหมู่เลือดระบบ MNSs ได้ (Palacajornsuk, 2006) เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่งต่างๆ กลายเป็นมี (+) หรือไม่มี (-) แอนติเจนนั้น การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนบน *GYP A* และ *GYP B* gene พบว่ามีอยู่หลายตำแหน่งใน *GYP A* gene family ทำให้เกิดแอนติเจนมากมายหลายชนิดในระบบหมู่เลือด MNSs นี้ เกิด Variant phenotypes ต่างๆ มากกว่า 40 ชนิด หมู่เลือดระบบ Miltenberger subsystem ถือว่าเป็น Variant หนึ่งของหมู่เลือดในระบบ MNSs ซึ่งเกิดจาก Recombination ของยีน *GYP A* และ *GYP B* gene ได้เป็น Hybrid molecule ของ Glycophorin A และ Glycophorin B แบ่งเป็น 11 subclasses

Miltenberger subsystem พบได้มากในประชากรแถบเอเชีย เช่น จีน ไต้หวัน ไทย อินเดีย และ

มาเลเซีย เป็นต้น โดยแอนติเจน MiIII (GP.Mur) เป็นชนิดที่พบมากที่สุด แอนติเจนชนิดนี้พบในคนจีนร้อยละ 4.7 (Prathiba, 2002), คนไต้หวันร้อยละ 7.3(Lo, 2002) และคนไทยร้อยละ 9.7 (Chandanyingyong, 1975) นอกจากแอนติเจนใน Miltenberger subsystem แล้วยังมีแอนติเจนชนิดอื่นๆ อีก เช่น Variant ของ MNSs ที่เป็น Isoform ของหมู่เลือด St^a เช่น Dantu, Sat, He เป็นต้น ชนิดที่เป็น Deletion variants เช่น En^a (GYP A-Null), S-s-U- (GYP B-Null) และ M^kM^k (GYP A&GYP B-Null) เป็นต้น ความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic diversity) ทั้งหมดนี้เกิดจากกระบวนการ Gene recombination ด้วยกลไกทางโมเลกุล (Molecular mechanisms) ต่างๆ

GYP A gene มี 7 exons ส่วน *GYP B* gene มี 6 exons ใน *GYP B* gene จะมี Exon 3 เป็น Pseudo exon ที่มีส่วนของ Intron แทรกอยู่ พบว่ายีนทั้งสองนี้มี Sequence homology สูงถึงร้อยละ 97 ตั้งแต่ 5'UTR จนถึง Coding sequence ลักษณะนี้ทำให้ยีนทั้งสองเกิด Unequal homologous recombination และ Gene conversion ได้ง่าย(Reid, 2009) ซึ่งส่วนใหญ่เกิดจาก Gene conversion ทำให้มีลักษณะเป็น Hybrid molecule ที่แตกต่างกันไป เช่น การเกิด Gene conversion บน *GYP B* gene ทำให้ได้ *GYP(B-A-B)* allele ที่มี Phenotype เป็น GP. Mur, GP. Bun, GP. HF และ GP. Hop ซึ่งแต่ละ Phenotype จะพบแอนติเจนชนิดต่างๆ ที่มีความใกล้เคียงกัน โดยในทุก Phenotype จะพบแอนติเจน Mi^a ลักษณะของ Hybrid molecule ที่พบมากในประเทศแถบเอเชีย คือ GYP(B-A-B) hybrid molecule

นอกจากความแปรผันของหมู่เลือดระบบ Miltenberger ที่พบมากในแหล่งระบาดของเชื้อมาลาเรียแล้ว ในด้านพันธุกรรมประชากร (Population genetics) พบว่าประชากรที่อาศัยในเขตที่มีการระบาดของโรคมาลาเรียถูกกระบวนการคัดเลือกตามธรรมชาติ (Natural selection) (Dhangadamajhi, 2010) ทำให้เกิดความต้านทานต่อเชื้อมาลาเรีย

(Malarial resistance) โดยสังเกตได้จากการศึกษาในประชากรแบบ Case-control พบว่า คนที่มีหมู่เลือด O มีโอกาสเกิดโรคมาลาเรียรุนแรงน้อยกว่าหมู่เลือด A และ B (Cserti, 2007), (Rowe, 2007), (Fry, 2008) และอาจเป็นสาเหตุให้พบความชุกของหมู่เลือด O สูงในท้องถิ่นที่มีการระบาดของมาลาเรีย การศึกษาต่อมาพบว่าแอนติเจน P1EMP 1 ของเชื้อไม่ได้จับ A หรือ B antigen โดยตรง แต่จับกับ Sialic acid ซึ่งหมู่เลือด A และ B ทำให้การเรียงตัวของโมเลกุลคาร์โบไฮเดรต Sialic acid จับกับแอนติเจนของเชื้อได้ดีกว่าหมู่เลือด O (Cohen, 2009) นอกจากนั้น ความผิดปกติทางพันธุกรรมของเซลล์เม็ดเลือดแดงก็ส่งผลต่อการป้องกันโรคมาลาเรียได้ เช่น คนที่เป็นพาหะของธาลัสซีเมียทั้งชนิดอัลฟา (α) และเบต้า (β) หรือคนที่มีความผิดปกติของฮีโมโกลบิน (Hemoglobinopathy: Hb E, HbC และ HbS) รวมทั้งคนที่ขาดเอนไซม์ Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD deficiency) พบว่ามีความต้านทานต่อการเกิดโรคมาลาเรียชนิดรุนแรงได้ (พลภัทร, 2549) เป็นเหตุให้โรคทางพันธุกรรมของเซลล์เม็ดเลือดแดง (Red cell disorders) เหล่านี้พบมากในเขตที่มีการระบาดของโรคมาลาเรีย ดังเช่นในประเทศไทย พบคนที่เป็น HbE ได้มากถึงร้อยละ 20 ของประชากร ผลการศึกษาแบบ Case-control พบว่า HbE นั้นมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคมาลาเรียที่รุนแรงน้อยกว่าผู้ป่วยที่มีฮีโมโกลบินปกติ (Hutagalung, 1999)(Chotivanich, 2002) แต่ไม่ได้มีความสามารถในการป้องกันการติดเชื้อ กลไกการดื้อต่อเชื้อมาลาเรียที่ตั้งสมมุติฐานไว้ (Verra, 2009) คือ ทำให้เชื้อที่เข้าสู่เซลล์มีการเจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงไม่ดี จากการศึกษาลดทอดทดลองพบว่า เม็ดเลือดแดงของคนที่เป็นพาหะ HbE จะต้านทานการถูกกลืนของเชื้อมาลาเรีย ทำให้แม้มีการติดเชื้อแต่อยู่ในระดับต่ำและไม่ก่อให้เกิดภาวะมาลาเรียรุนแรง ส่วนภาวะขาดเอนไซม์จี-6-พีดี (G-6-PD deficiency) ทำให้เกิด Oxidative stress ภายในเซลล์ เชื้อจะเจริญเติบโตได้ไม่ดี เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ

ก็จะถูกจับกินด้วย Phagocytic cell อย่างรวดเร็ว เนื่องจากเซลล์เหล่านี้มีความผิดปกติของ Cytoskeleton อยู่แล้ว เมื่อมีเชื้อมาลาเรียจึงถูกจับกินตั้งแต่ระยะแรก ก่อนที่เชื้อจะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากเกินไป โรคที่มีความผิดปกติของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีการศึกษาว่าทำให้เกิดผลต่อการต่อต้านโรคมาลาเรียนี้ คือ HbE, HbC, β -thalassemia และภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD จะทำให้เกิดกลไก Cytoadherence และ/หรือ Rosetting ลดลง จึงไม่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพที่รุนแรง (พลภัทร, 2549)

แม้ในปัจจุบันจะมียารักษามาลาเรียที่ได้ผล แต่ผู้ป่วยมาลาเรียฟัลซิพารัมชนิดรุนแรงราวร้อยละ 1-2 ที่ได้รับยาด้านมาลาเรียแล้วก็ยังมีอัตราการตายสูงถึงร้อยละ 20 (พลภัทร, 2549) จึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาถึงพยาธิกำเนิดอันสลับซับซ้อนของเชื้อ *Plasmodium falciparum* เพื่อหาวิธีการป้องกันภาวะแทรกซ้อนหรือการรักษาเสริมไปกับยาด้านเชื้อมาลาเรียเพื่อลดอัตราการตายของผู้ป่วยต่อไป การศึกษาแอนติเจนของหมู่เลือดในระบบ Miltenberger subsystem ซึ่งเป็น Hybrid molecule ของโปรตีน Glycophorin A และ Glycophorin B ก็อาจถูกใช้เป็นโปรตีนเป้าหมายในคิดค้นวิธีการรักษาโรคมาลาเรียในอนาคตได้

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างคนที่มีความผิดปกติของ Miltenberger subsystem ชนิด Mi^{a+} และ Mi^{a-} ในการที่เชื้อ *Plasmodium falciparum* จะสามารถเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงแล้วก่อให้เกิดโรคมาลาเรียชนิดรุนแรงได้

วิธีการวิจัย

ตัวอย่าง คัดเลือกผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยโดยทำการตรวจตามเกณฑ์การคัดเลือกผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย ก่อนจากการเก็บตัวอย่างเลือดใส่หลอดที่มีสารกันเลือดแข็ง EDTA หลอดละ 3 mL จำนวน 1 หลอดสำหรับใช้ในการตรวจต่างๆ ตามเกณฑ์การคัดเลือกเข้าการศึกษา

ดังนั้นคือ เกณฑ์ในการคัดเลือกผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย เข้าการศึกษา (Inclusion Criteria)

1. แสดงความยินยอมเข้าร่วมในการศึกษาวิจัย
หลังจากทราบรายละเอียดโครงการแล้ว
2. อายุตั้งแต่ 18-70 ปี ทั้งหญิงและชาย
3. เลือดหมู่โอและหมู่ Rh บวก (gr.“O” and Rh+)

เกณฑ์ในการคัดเลือกผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยออกจาก การศึกษา (Exclusion Criteria)

1. ไม่ผ่านการตรวจความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด (CBC; Completed Blood Count) โดยพบว่าผิดปกติ ภาพจากเสมียร์เลือดเมื่อส่องดูจากกล้องจุลทรรศน์พบภาวะ Spherocytosis และ Ovalocytosis
2. มีแอนติบอดีที่ไม่พึงประสงค์ (Unexpected antibody) จากการตรวจ Antibody screening
3. เป็นโรคหรือภาวะของโรคที่มีความผิดปกติของเซลล์เม็ดเลือดแดง (Red-cell disorders) เช่น โรคโลหิตจาง, โรคธาลัสซีเมีย, โรคที่มีความผิดปกติของฮีโมโกลบิน, โรคภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดี เป็นต้น
4. เคยเป็นโรคมะเร็งหรืออยู่ในแหล่งที่มีการระบาดของโรคมะเร็ง รวมทั้งผู้ที่เคยได้รับยาใดๆ ที่มีผลต่อการรักษาและการป้องกันโรคมะเร็งมาก่อน เมื่อผ่านเกณฑ์การคัดเลือกแล้วจึงขอเก็บตัวอย่างเลือดจากหลอดเลือดดำที่แขนของผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยด้วยวิธีมาตรฐาน บรรจุในหลอดเลือดที่มีสารกันเลือดแข็ง ACD หลอดละ 10 mL จำนวน 2 หลอด สำหรับใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย ประชากรเป้าหมายที่ใช้ในการศึกษาเป็นผู้มีสุขภาพดี มีคุณสมบัติที่ระบุไว้ในเกณฑ์การคัดเลือกผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยและลงนามให้ความยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษรแล้ว เกณฑ์ในการคัดออกคือ อาสาสมัครที่เป็นพาหะของธาลัสซีเมีย มีภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดี หรือ มีความผิดปกติของผิวเม็ดเลือดแดง (red cell membrane defect) ขนาดตัวอย่างคำนวณจากโปรแกรม Power and Sample size Calculation (PASS, PS)

การตรวจคัดกรองโรคต่างๆเพื่อคัดเลือกผู้เข้าร่วมวิจัยตามเกณฑ์ที่กำหนด

- การตรวจหมู่เลือด ABO และ Rh, การตรวจหมู่เลือด Miltenberger (Mi^a typing) ตรวจโดยวิธีทาง Serology แบบ Conventional test tube (CTT) โดยหลักการ Hemagglutination โดยใช้เลือดจากสิ่งส่งตรวจที่มีสารกันเลือดแข็ง EDTA
- การตรวจคัดกรองแอนติบอดี (Antibody screening) ตรวจหาแอนติบอดีที่ไม่พึงประสงค์ (Unexpected antibody) อันอาจก่อให้เกิดความไม่เข้ากันของเลือด (Incompatibility) โดยใช้เซลล์ O1, O2 screening cells จากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย
- การตรวจความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด (Completed Blood Count; CBC) โดยใช้เครื่อง Semi-Automated (Horiba ABX, CA) และย้อมสไลด์ดูเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วยสีย้อม Wright stain เพื่อแยกโรค red cell membrane defect ได้แก่ hereditary spherocytosis และ hereditary elliptocytosis
- การตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์จี-6-พีดี โดยวิธี G-6-PD screening test จากการทำ Fluorescence Spot test แล้วดูผลจากการเรืองแสงของ Spot อ่านผลภายใต้แสง UV
- การตรวจโรคหรือพาหะของธาลัสซีเมีย โดยวิธีคัดกรองธาลัสซีเมียด้วยการพิจารณาค่า MCV (Mean Corpuscular Volume) ที่ได้จากการตรวจ CBC ร่วมกับการตรวจหา HbE ด้วย DCIP test
- การสกัด DNA จากเซลล์เม็ดเลือดขาวโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จ DNA IQTM System ซึ่งเรซินจะจับกับสารปนเปื้อนที่อาจขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ในปฏิกิริยา PCR ทำให้ DNA ที่สกัดได้มีคุณภาพดี
- การตรวจ Subclass ของหมู่เลือด Miltenberger (Mi^a antigen genotyping) ด้วยวิธี SSP-PCR(20) เพื่อตรวจประเภทของแอนติเจนในระบบ Miltenberger (Mi^a) โดยทำ genotyping แยก Mi^a+ และ Mi^a- รวมทั้งแยกชนิดของ Subclass ต่างๆ อย่างคร่าวๆ โดยวิธี SSP-

PCR อ้างอิงจากการศึกษาของ P.Palacajornsuk (Palacajornsuk, 2007) ซึ่ง Primer ที่ใช้คือ

Forward primer = 5'-

CCTTTCTCAACTTCTCTTATATGCAGATAA-3'

Reverse primer =

5'GAGCAACTATTTAAACTAAGAACATACC

GG-3'

โดย Primer นี้จะแยก B-A-B Hybrid molecule ได้แก่ MiIII (GP.Mur), MiIV (GP.Hop), MiVI (GP.Bun), MiX (GP.HF) และ MiII (GP.Hut) ซึ่งเป็น A-B-A Hybrid molecule ได้เป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 ชิ้นคือ 151bp และ 148bp

การเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย (Malaria culture) เมื่อทำการแยกชนิดของ Mi^+ antigen ด้วยวิธี SSP-PCR แล้วให้นำเซลล์เม็ดเลือดที่ได้ แยกกันเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นสองกลุ่ม คือ กลุ่มที่เป็น Mi^+ และกลุ่ม Mi^- เริ่มที่ 0.5-1.0% synchronized-parasitemia เท่ากัน เชื้อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงคือเชื้อ *Plasmodium falciparum* strain T9/94RC17 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI-1640 และ HEPES (glutamine/without sodium bicarbonate) ที่ผสม Pooled AB+ serum ใน 96 micro-well plate โดยตัวอย่าง 1 รายเลี้ยงแบบ triplicated 3 well ด้วยวิธี Candle jar technique เพาะเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้ว Harvest เชื้อทั้งสองกลุ่มพร้อมกันใส่สไลด์ well ละ 2 สไลด์ แล้วนำไปย้อมสี Wright stain

- **การทำ Synchronization** คือการทำให้เชื้อที่เพาะเลี้ยงไว้อยู่ในระยะเดียวกันก่อนนำไปทดลองเพาะเลี้ยงกับเซลล์เม็ดเลือดแดงทั้งสองกลุ่ม ด้วยการเติมสารละลาย 5% D-sorbital จากนั้นเติม Complete medium ให้มีค่า 50% Hct

- **การทำ Invasion assay** เพื่อทดสอบหาอัตรา การเข้าเซลล์เม็ดเลือดแดงของเชื้อเปรียบเทียบกันระหว่างเซลล์เม็ดเลือดแดงสองกลุ่ม โดยทำการเลี้ยงเชื้อแบบ triplicated ในแต่ละตัวอย่าง หลังจาก Synchronization โดยเริ่มที่ 0.5-1.0% parasitemia

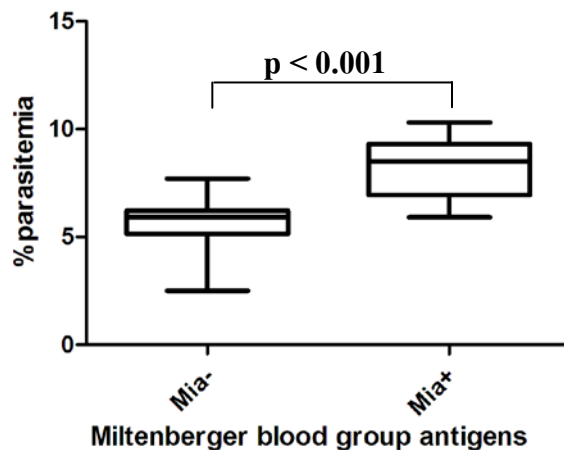
เท่ากัน แล้วเพาะเลี้ยงเชื้อประมาณ 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หรือ 1 วงจรชีวิตของเชื้อ จากนั้นจึงทำการ Harvest เชื้อโดยใส่สไลด์ลงบนสไลด์แก้ว ย้อมด้วยสี Wright stain แล้วนำไปนับจำนวนเชื้อคิดเป็น % parasitemia โดยนับจำนวนเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อพลาสมาเดียม ฟัลซิพารัมในจำนวนเม็ดเลือดแดงรวมทั้งหมด 2000 เซลล์ ดังนี้

$$\%parasitemia = \frac{\text{Infected RBCs} \times 100}{\text{Total RBCs}}$$

การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis) สถิติที่ใช้ในการทดสอบในการเปรียบเทียบระหว่างค่าเฉลี่ย (Mean) ของข้อมูลสองกลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน (Two independent groups) โดยนำข้อมูลที่ได้นำมาคำนวณโดยใช้การทดสอบทางสถิติด้วย Unpaired t-test เมื่อข้อมูลที่ได้มีการกระจายแบบปกติ (Normal distribution) โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 5.01 ในการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการวิจัย

การเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียในกลุ่มตัวอย่างที่มีเลือดหมู่โอทั้งสิ้นรวม 46 ราย แบ่งเป็นกลุ่มที่มีหมู่เลือด Mi^+ 16 ราย และกลุ่มที่มีหมู่เลือด Mi^- 30 ราย ทำทั้งหมด 3 ครั้ง ดังนี้ ครั้งที่ 1 Mi^+ 5 ราย และ Mi^- 10 ราย, ครั้งที่ 2 Mi^+ 6 รายและ Mi^- 10 ราย และครั้งที่ 3 Mi^+ 5 รายและ Mi^- 10 ราย ตามลำดับ พบว่าค่าเฉลี่ยของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เป็นดังนี้ ครั้งที่ 1 หมู่เลือด Mi^+ เท่ากับ $7.8 \pm 1.7\%$ และหมู่เลือด Mi^- เท่ากับ $5.2 \pm 0.8\%$, ครั้งที่ 2 หมู่เลือด Mi^+ เท่ากับ $9.1 \pm 0.7\%$ และหมู่เลือด Mi^- เท่ากับ $6.1 \pm 1.4\%$ และครั้งที่ 3 หมู่เลือด Mi^+ เท่ากับ $7.5 \pm 1.7\%$ และหมู่เลือด Mi^- เท่ากับ $5.9 \pm 0.5\%$ ($p < 0.001$) เมื่อคิดค่าเฉลี่ยโดยรวมทั้งหมด กลุ่มที่มีหมู่เลือด Mi^+ เท่ากับ $5.7 \pm 0.2\%$ และกลุ่มที่มีหมู่เลือด Mi^- เท่ากับ $8.2 \pm 0.4\%$ พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$ by Student's t-test) ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อเป็น %parasitemia ระหว่างกลุ่มที่มีหมู่เลือด Mi^+ และ Mi^- ซึ่งพบว่ามี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$)

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จากผลการวิจัยพบว่า การทดลองเลี้ยงเชื้อ มาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum* strain T9/94RC17 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่เคยมีการระบาดใน จังหวัดตาก กับเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ใช้ในการศึกษาในหลอดทดลอง (In Vitro) นั้น เซลล์เม็ดเลือดแดงของ คนที่มีหมู่เลือด Mi^+ กลับมีความสามารถในการรุกราน (Invasion) เข้าเซลล์ได้ดีกว่าเม็ดเลือดแดงของคนที่มี หมู่เลือด Mi^- เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อนาน 48 ชั่วโมง หรือ 1 วงจรชีวิตของเชื้อ

การพบปริมาณเชื้อที่สูง (High parasitemia) ในระยะที่เชื้อเข้าสู่เม็ดเลือดแดงนี้ อาจเป็นสาเหตุ สำคัญสาเหตุหนึ่งในการเกิดโรคมาลาเรียชนิดรุนแรง ทำให้เกิดความขัดแย้งกันกับสมมติฐานที่คนที่มีหมู่ เลือด Mi^+ น่าจะต่อต้านการติดเชื้อ และ มี ความสามารถในการอยู่รอดได้ในแหล่งระบาดของเชื้อ ได้ จึงเป็นที่น่าสนใจว่ากระบวนการที่เชื้อมาลาเรียเข้าสู่เม็ดเลือดแดงโดยอาศัยตัวรับบนเม็ดเลือดแดงคือ Glycophorin นั้น มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรค มาลาเรียชนิดรุนแรงหรือไม่ อย่างไร และเหตุใดจึง เป็นไปในลักษณะของการติดเชื้อในเซลล์เม็ดเลือดแดง ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งอาจจะต้องทำการศึกษาค้นคว้าทดลองโดยการ

ควบคุมตัวแปรอื่นๆ ที่อาจมีผลต่อการทดลอง หรือ ศึกษาในรูปแบบวิจัยอื่นๆเพิ่มเติมต่อไป

โปรตีน Glycophorin นั้นมีผู้ตั้งสมมติฐานว่า น่าจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการคัดเลือกทางธรรมชาติ จากโรคมมาลาเรีย โดยมีแนวโน้มว่าวิวัฒนาการไปในทาง ที่จะหลบหลีกการเข้าจับของเชื้อมาลาเรีย(Baum, 2002) แต่การศึกษาประชากรในชนเผ่าดั้งเดิมของ ไต้หวันที่มีความชุกของแอนติเจน MiIII สูง (ร้อยละ 20-80) กับความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคมมาลาเรีย ก็ไม่ พบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างกันอย่างชัดเจน (Morisita, 1976) ทำให้ไม่สามารถบ่งชี้ถึงวิวัฒนาการ ในการหลบเลี่ยงการติดเชื้อของแอนติเจน MiIII ได้ (Wang, 2003)

มีการศึกษาพบว่าหมู่เลือด Miltenberger subsystem ที่มี แอนติเจนชนิด MiIII (GP.Mur) ซึ่งเป็น Mi^+ ชนิด หนึ่งสามารถเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน Anion Exchange-1 (AE-1) หรือ Band 3(Goel, 2003),(Hsu, 2009) ได้ ซึ่งเคยมีการศึกษาว่า Band 3 เป็นตัวรับ แอนติเจนของเชื้อ *Plasmodium falciparum*(de Oliveira, 2010) และการแสดงออกของ Band 3 สูงขึ้น นั้น สามารถลดการเกิดภาวะ Acidosis ซึ่งเป็นอาการที่ สำคัญอย่างหนึ่งของโรคมมาลาเรีย(Day, 2000),(Marsh, 1995) ทำให้มีสมมติฐานใหม่เกิดขึ้นมาว่า แท้ที่จริง แอนติเจนของหมู่เลือดนี้อาจไม่ได้มีวิวัฒนาการที่มี ความเกี่ยวข้องในการหลบเลี่ยงจากการติดเชื้อมาลาเรีย (Baum, 2002) แต่อาจจะมีการเปลี่ยนแปลงให้มีความ หลากหลายเพื่อทำหน้าที่ในการช่วยให้เซลล์ที่ติดเชื้อ แล้วสามารถอยู่รอดในร่างกายคน (Host survival) และ ไม่ก่อให้เกิดภาวะมาลาเรียที่รุนแรงจากภาวะ Acidosis ก็เป็นไปได้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณอาสาสมัครที่บริจาคเลือด เพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณศูนย์บริการ โลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทยที่ให้ความอนุเคราะห์ สิ่งตัวอย่างในการวิจัยและให้ความช่วยเหลือในด้าน ต่างๆ ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการมาลาเรียร่วมกับองค์การ

อนามัยโลก คณะวิทยาศาสตร์และวิทยาลัยสาธารณสุข
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ห้องปฏิบัติการโลหิตวิทยา
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย,
ห้องปฏิบัติการฝ่ายธนาคารเลือด โรงพยาบาล
จุฬาลงกรณ์ ที่อนุญาตให้ใช้สถานที่และให้ความ
อนุเคราะห์ทั้งอุปกรณ์และน้ำยาในการทำวิจัย ขอคุณ
กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุขที่ให้โอกาสใน
การร่วมสำรวจข้อมูลทางระบาดวิทยาของเชื้อมาลาเรีย
ขอขอบคุณทุกท่านที่มีส่วนร่วมในงานวิจัย ให้ความ
ช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกไม่ว่าจะเป็นอาจารย์
เพื่อน พี่ น้องและผู้มีพระคุณทุกท่านจนกระทั่ง
การศึกษานี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

พลภัทร วิจารณ์ครินทร์. 2549. การติดเชื้อมาลาเรียที่ไม่ได้เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ : มาลาเรีย. (สมชาย จงวุฒิเวศย์ และ อุษา ทิสยากร, บรรณาธิการ). กรุงเทพมหานคร: ธนาพรส.

สมชาย จงวุฒิเวศย์ และจตุรงค์ พุทธิพรทิพย์. 2549. ชีวิตวิทยาและวงชีวิตของเชื้อมาลาเรีย. กรุงเทพมหานคร: ธนาพรส.

Anstee DJ, Ridgwell K, Tanner MJ, Daniels GL, Parsons SF. 1984. Individuals lacking the Gerbich blood-group antigen have alterations in the human erythrocyte membrane sialoglycoproteins beta and gamma. *Biochem. J.* 221(1): 97-104.

Baum J, Ward RH, Conway DJ. 2002. Natural Selection on the Erythrocyte Surface. *Molecular Biology and Evolution.* 19(3): 223 -229.

Chandanyingyong D, Pejrachandra S. 1975. Studies on the Miltenberger complex frequency in Thailand and family studies. *Vox Sang.* 28(2): 152-155.

Chotivanich K, Udomsangpetch R, Pattanapanyasat K, Chierakul W, Simpson J, Looareesuwan S, et al. 2002. Hemoglobin E: a balanced polymorphism protective against high parasitemias and thus severe *P falciparum* malaria. *Blood.* 100(4): 1172-1176.

Cohen M, Hurtado-Ziola N, Varki A. 2009. ABO blood group glycans modulate sialic acid recognition on erythrocytes. *Blood.* 114(17): 3668-3676.

Cserti CM, Dzik WH. 2007. The ABO blood group system and plasmodium falciparum malaria. *Blood: blood-2007-03-077602.*

Dhangadamajhi G, Kar SK, Ranjit M. 2010. The Survival Strategies of Malaria Parasite in the Red Blood Cell and Host Cell Polymorphisms. *Malaria Research and Treatment.* 2010: 1-10.

Day NP, Phu NH, Mai NT, Chau TT, Loc PP, Chuong LV, et al. 2000. The pathophysiologic and prognostic significance of acidosis in severe adult malaria. *Crit. Care Med.* 28(6): 1833-1840.

de Oliveira S, Saldanha C. 2010. An overview about erythrocyte membrane. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 44(1): 63-74.

Goel VK, Li X, Chen H, Liu S, Chishti AH, Oh SS. 2003. Band 3 is a host receptor binding merozoite surface protein 1 during the *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100(9): 5164-5169.

Lo S, Chang J, Lin SW, Lin D. 2002. Immunological characterization of anti-Mia, a red blood cell alloantibody, in Taiwan. *Vox Sang.* 83(2): 162-164.

- Hadley TJ, Klotz FW, Pasvol G, Haynes JD, McGinniss MH, Okubo Y, et al. 1987. *Falciparum* malaria parasites invade erythrocytes that lack glycophorin A and B (MkMk). Strain differences indicate receptor heterogeneity and two pathways for invasion. *J Clin Invest.* 80(4): 1190-1193.
- Hsu K, Chi N, Gucek M, Van Eyk JE, Cole RN, Lin M, et al. 2009. Miltenberger blood group antigen type III (Mi.III) enhances the expression of band 3. *Blood.* 114(9): 1919-1928.
- Hutagalung R, Wilairatana P, Looareesuwan S, Brittenham GM, Aikawa M, Gordeuk VR. 1999. Influence of hemoglobin E trait on the severity of *Falciparum* malaria. *J. Infect. Dis.* 179(1): 283-286.
- Fry AE, Griffiths MJ, Auburn S, Diakite M, Forton JT, Green A, et al. 2008. Common variation in the ABO glycosyltransferase is associated with susceptibility to severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Hum. Mol. Genet.* 17(4): 567-576.
- Miller LH, Mason SJ, Clyde DF, McGinniss MH. 1976. The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. *N. Engl. J. Med.* 295(6): 302-304.
- Morisita K. 1976. Taiwan ni okeru mararia no yobou no kenkyun [Malaria Epidemiology in Taiwan]. In: Mararia no ekigaku to yobou [Epidemiology and Prevention of Malaria]. Tokyo, Japan: Kikuoku Shobou: p. 51.
- Marsh K, Forster D, Waruiru C, Mwangi I, Winstanley M, Marsh V, et al. 1995. Indicators of life-threatening malaria in African children. *N. Engl. J. Med.* 332(21): 1399-1404.
- Pasvol G, Wainscoat JS, Weatherall DJ. 1982. Erythrocytes deficiency in glycophorin resist invasion by the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature.* 297(5861): 64-66.
- Palacajornsuk P. 2006. Review: molecular basis of MNS blood group variants. *Immunohematology.* 22(4): 171-182.
- Prathiba R, Lopez CG, Usin FM. 2002. The prevalence of GP Mur and anti-"Mia" in a tertiary hospital in Peninsula Malaysia. *Malays J Pathol.* 24(2): 95-98.
- Palacajornsuk P, Nathalang O, Tantimavanich S, Bejrachandra S, Reid ME. 2007. Detection of MNS hybrid molecules in the Thai population using PCR-SSP technique. *Transfus Med.* 17(3): 169-174.
- Reid ME. 2009. MNS blood group system: a review. *Immunohematology.* 25(3): 95-101.
- Rowe JA, Handel IG, Thera MA, Deans A, Lyke KE, Koné A, et al. 2007. Blood group O protects against severe *Plasmodium falciparum* malaria through the mechanism of reduced rosetting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104(44): 17471-17476.
- Wang H, Tang H, Shen CJ, Wu C. 2003. Rapidly evolving genes in human. I. The glycophorins and their possible role in evading malaria parasites. *Mol. Biol. Evol.* 20(11): 1795-1804.

Verra F, Mangano VD, Modiano D. 2009. Genetics of susceptibility to *Plasmodium falciparum*: from classical malaria resistance genes towards genome-wide association studies. *Parasite Immunol.* 31(5): 234-253.