



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การประเมินโปรไฟล์ของภาวะเลือดเป็นกรดในผู้ป่วยมาลาเรียขั้นรุนแรงโดย

ใช้เทคนิคนวัตกรรม

โดย อาจารย์ ดร.ณัฐธิดา ศรีบุญวรกุล ภาควิชาอายุรศาสตร์เขตร้อน

คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

เดือน เมษายน ปี 2561 ที่เสร็จโครงการ

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5980038

ชื่อโครงการ: การประเมินโปรไฟล์ของภาวะเลือดเป็นกรดในผู้ป่วยมาลาเรียขั้นรุนแรงโดยใช้
เทคนิคนวัตกรรม

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน อาจารย์ ดร.ณัฐธิดา ศรีบุญวรกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

อีเมล: natthida.srn@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

บทคัดย่อ:

ภาวะเลือดเป็นกรด (Acidosis) ซึ่งเป็นเครื่องหมายที่ใช้ทำนายโรค (prognostic marker) เป็นปัญหาที่พบโดยทั่วไป และเป็นสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตในผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรง (severe malaria) จากเชื้อ Plasmodium falciparum โดยภาวะ Acidosis มีสาเหตุหลักหนึ่งมาจากกรดแลคติก และต่อมาได้มีการศึกษาทางการแพทย์ ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรงจาก Plasmodium falciparum และทำการคำนวณหาค่าผลต่างระหว่างแอนไอออนชนิดแรง (strong anion gap) ทั้งหมดเทียบกับจากกรดแลคติก พบว่าค่าผลรวม strong anion gap ทั้งหมดมีค่าสูงกว่าที่มาจากกรดแลคติกอย่างเดี๋ยวจึงประมาณสี่เท่า จากผลการศึกษาทำให้พบว่า ยังมีกรดอินทรีย์ที่ไม่สามารถระบุชนิดได้อีกหลายชนิดที่เป็นตัวแปรสำคัญที่ส่งผลต่อค่าผลรวมของ strong anion gap ที่ไม่ขึ้นกับกรดแลคติก และก่อให้เกิดอัตราการเสียชีวิตอย่างมีนัยสำคัญทางการวินิจฉัยสาเหตุการเกิดโรคในผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรงจากเชื้อ Plasmodium falciparum นี้ จากการศึกษาเบื้องต้น (Pilot study) ได้ทำการพัฒนาวิธีการทางเคมีวิเคราะห์และพิสูจน์ความเชื่อมั่น (Validation) โดยใช้เทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (LC-MS) ประเภทไฮโดรฟิลิกอินเทอร์เฟซลิควิดโครมาโทกราฟี (HILIC) ต่อกับแมสสเปกโตรเมตรี (MS) ในโหมดไอออนลบสำหรับการแยกและการตรวจวัดกรดอินทรีย์ขนาดเล็ก 8 ชนิดซึ่งเป็น endogenous compounds และเป็น metabolites ในผู้ป่วยเบื้องต้นเพื่อใช้ในการขยายการศึกษาในขั้นต่อไป กรดทั้ง 8 ชนิด ได้แก่ กรดแอลแลคติก, กรดแอลฟาไฮดรอกซีบีวทิลิก, กรดแอลฟาไคโกลูตาริก, กรดเบต้าไฮดรอกซีบีวทิลิก, กรดฟีไฮดรอกซีฟีนิลแลคติก, กรดมาโลนิค, กรดเมทิลมาโลนิคและ กรดเอทิลมาโลนิค โดยกรดอินทรีย์ทั้งหมดนี้สามารถถูกวิเคราะห์ได้พร้อมๆกันโดยใช้ซิกฮิลิกคอลัมน์ (ZIC HILIC) โดยวิธีการทางเคมีวิเคราะห์ในการศึกษานี้ได้พัฒนาและพิสูจน์ความเชื่อมั่นอ้างอิงตามคู่มือขององค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา และได้เพิ่มการประยุกต์เพิ่มเติมสำหรับการวิเคราะห์สาร endogenous

compounds วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยนี้คือ เพื่อศึกษาสาเหตุการเกิดภาวะเลือดเป็นกรดในผู้ป่วยมาลาเรีย (*Plasmodium falciparum*) ชนิดรุนแรงจากการหาชนิดและปริมาณของกรดอินทรีย์ที่สำคัญที่พบในตัวอย่างพลาสมาและปัสสาวะของผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรง เทียบกับผู้ป่วยมาลาเรียชนิดไม่รุนแรง (Uncomplicated malaria), ภาวะเลือดกรดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย และในอาสาสมัครคนสุขภาพดี โดยใช้เทคนิควัดกรรม (LC-MS และ Chemometrics) จากนั้น ทำการรวบรวมโปรไฟล์ของกรดที่ได้จากการศึกษาทั้งหมด มาประเมินเป็นดัชนีชี้วัดที่สัมพันธ์กับความรุนแรงหรือการพยากรณ์โรคของโรคมาลาเรีย การค้นพบที่ได้จากงานวิจัยนี้จะสามารถนำมาใช้ในการพัฒนาการรักษาผู้ป่วยมาลาเรียที่มีภาวะเลือดเป็นกรด เพื่อลดอัตราการเจ็บป่วยและเสียชีวิตจากโรคนี้ และสามารถนำเทคนิคที่พัฒนาได้ในงานวิจัยนี้ไปประยุกต์ใช้กับผู้ป่วยภาวะเลือดเป็นกรดจากโรคอื่นๆได้

คำหลัก : ภาวะเลือดเป็นกรด, มาลาเรียชนิดรุนแรง, กรดอินทรีย์, ลิควิดโครมาโทกราฟี, แมสสเปกโตรเมตรี

Abstract

Project Code : MRG5980038**Project Title** : Assessment of acidosis profile in patients with severe malaria using innovative technique**Investigator** : Natthida Sriboonvorakul, PhD, Lecturer, Mahidol University**E-mail Address** : natthida.srn@mahidol.ac.th**Project Period** : 2 years**Abstract:**

Acidosis is an important cause of mortality in severe falciparum malaria. Lactic acid is a major contributor to metabolic acidosis, but accounts for only one-quarter of the strong anion gap. Other unidentified organic acids have an independent strong prognostic significance for a fatal outcome. The assessment of acidosis profile in patients with severe malaria and other conditions complicated by acidosis could lead to better understanding the pathophysiology of disease condition. A simultaneous bio-analytical method for qualitative and quantitative assessment of eight small organic acids potentially contributing to acidosis in severe malaria in plasma and urine was developed and validated. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) coupled to negative mass spectroscopy was utilized for separation, detection and quantification. Eight possible small organic acids; L-lactic acid (LA), α -hydroxybutyric acid (aHBA), β -hydroxybutyric acid (bHBA), p-hydroxyphenyllactic acid (pHPLA), malonic acid (MA), methylmalonic acid (MMA), ethylmalonic acid (EMA) and α -ketoglutaric acid (aKGA) were analyzed simultaneously using a ZIC-HILIC column. This method was validated according to U.S. Food and Drug Administration guidelines with additional validation procedures for endogenous substances. Chemometrics was performed for the complementary study. The objectives of this study are to assess acidosis profile in patients with severe falciparum malaria by using innovative technique (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry and Chemometrics) to obtain qualitative and quantitative data of unmeasured organic acids in patients with severe falciparum malaria, uncomplicated falciparum malaria and bacterial infection sepsis (in absence of

malaria) with healthy volunteers, and to combine profile of unmeasured organic acids and clinical characteristics for the assessment of disease state and/or disease prognosis. This could be important clinical tool for better understanding the pathophysiology of acidosis in severe malaria and other conditions complicated by acidosis. Consequently, this could guide to the development of new therapies.

Keywords; Acidosis, Severe malaria, Organic acids, Liquid Chromatography, Mass Spectrometry

เนื้อหางานวิจัยประกอบด้วย

1. บทคัดย่อภาษาไทย และภาษาอังกฤษ

บทคัดย่อ:

ภาวะเลือดเป็นกรด (Acidosis) ซึ่งเป็นเครื่องหมายที่ใช้ทำนายโรค (prognostic marker) เป็นปัญหาที่พบโดยทั่วไป และเป็นสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตในผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรง (severe malaria) จากเชื้อ *Plasmodium falciparum* โดยภาวะ Acidosis มีสาเหตุหลักหนึ่งมาจากกรดแลคติก และต่อมาได้มีการศึกษาทางการแพทย์ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรงจาก *Plasmodium falciparum* และทำการคำนวณหาค่าผลต่างระหว่างแอนไอออนชนิดแรง (strong anion gap) ทั้งหมดเทียบกับจากกรดแลคติก พบว่าค่าผลรวม strong anion gap ทั้งหมดมีค่าสูงกว่าที่มาจากกรดแลคติกอย่างเดียวยิ่งประมาณสี่เท่า จากผลการศึกษาทำให้พบว่า ยังมีกรดอินทรีย์ที่ไม่สามารถระบุชนิดได้อีกหลายชนิดที่เป็นตัวแปรสำคัญที่ส่งผลต่อค่าผลรวมของ strong anion gap ที่ไม่ขึ้นกับกรดแลคติก และก่อให้เกิดอัตราการเสียชีวิตอย่างมีนัยสำคัญทางการวินิจฉัยสาเหตุการเกิดโรคในผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรงจากเชื้อ *Plasmodium falciparum* นี้ จากการศึกษาสำรวจ (Pilot study) ได้ทำการพัฒนาวิธีการทางเคมีวิเคราะห์และพิสูจน์ความเชื่อมั่น (Validation) โดยใช้เทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (LC-MS) ประเภทไฮโดรฟิลิกอินเทอร์เฟซลิควิดโครมาโทกราฟี (HILIC) ต่อกับแมสสเปกโตรเมตรี (MS) ในโหมดไอออนลบสำหรับการแยกและการตรวจวัดกรดอินทรีย์ขนาดเล็ก 8 ชนิดซึ่งเป็น endogenous compounds และเป็น metabolites ในผู้ป่วยเบื้องต้นเพื่อใช้ในการขยายการศึกษาในขั้นต่อไป กรดทั้ง 8 ชนิด ได้แก่ กรดแอลแลคติก, กรดแอลฟาไฮดรอกซีบีวทิลิก, กรดแอลฟาดีไฮโดรกลูตาริก, กรดเบต้าไฮดรอกซีบีวทิลิก, กรดฟีไฮดรอกซีฟีนิลแลคติก, กรดมาโลนิค, กรดเมทิลมาโลนิคและ กรดเอทิลมาโลนิค โดยกรดอินทรีย์ทั้งหมดนี้สามารถถูกวิเคราะห์ได้พร้อมๆกันโดยใช้ซิกฮิลิกคอลัมน์ (ZIC HILIC) โดยวิธีการทางเคมีวิเคราะห์ในการศึกษานี้ได้พัฒนาและพิสูจน์ความเชื่อมั่นอ้างอิงตามคู่มือขององค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา และได้เพิ่มการประยุกต์เพิ่มเติมสำหรับการวิเคราะห์สาร endogenous compounds วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยนี้คือ เพื่อศึกษาสาเหตุการเกิดภาวะเลือดเป็นกรดในผู้ป่วยมาลาเรีย (*Plasmodium falciparum*) ชนิดรุนแรงจากการหาชนิดและปริมาณของกรดอินทรีย์ที่สำคัญที่พบในตัวอย่างพลาสมาและปัสสาวะของผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรง (Severe malaria) เทียบกับ ผู้ป่วยมาลาเรียชนิดไม่รุนแรง (Uncomplicated malaria), ผู้ป่วยติดเชื้อแบคทีเรียและมีภาวะเลือดเป็นกรด (Sepsis) และในอาสาสมัครคนสุขภาพดี (Healthy volunteers) โดยใช้เทคนิคนวัตกรรม (LC-MS และ Chemometrics) จากนั้นทำการรวบรวมโปรไฟล์ของกรดที่ได้จากการศึกษาทั้งหมดมาประเมินเป็นดัชนีชี้วัดที่สัมพันธ์กับความรุนแรง

หรือการพยากรณ์โรคของโรคมาลาเรีย การค้นพบที่ได้จากงานวิจัยนี้จะสามารถนำมาใช้ในการพัฒนาการรักษาผู้ป่วยมาลาเรียที่มีภาวะเลือดเป็นกรด เพื่อลดอัตราการเจ็บป่วยและเสียชีวิตจากโรคนี้ และสามารถนำเทคนิคที่พัฒนาได้ในงานวิจัยนี้ไปประยุกต์ใช้กับผู้ป่วยภาวะเลือดเป็นกรดจากโรคอื่นๆได้

คำหลัก : ภาวะเลือดเป็นกรด, มาลาเรียชนิดรุนแรง, กรดอินทรีย์, ลิควิดโครมาโทกราฟี, แมสสเปกโตรเมตรี

Abstract:

Acidosis is an important cause of mortality in severe falciparum malaria. Lactic acid is a major contributor to metabolic acidosis, but accounts for only one-quarter of the strong anion gap. Other unidentified organic acids have an independent strong prognostic significance for a fatal outcome. The assessment of acidosis profile in patients with severe malaria and other conditions complicated by acidosis could lead to better understanding the pathophysiology of disease condition. A simultaneous bio-analytical method for qualitative and quantitative assessment of eight small organic acids potentially contributing to acidosis in severe malaria in plasma and urine was developed and validated. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) coupled to negative mass spectroscopy was utilized for separation, detection and quantification. Eight possible small organic acids; L-lactic acid (LA), α -hydroxybutyric acid (aHBA), β -hydroxybutyric acid (bHBA), p-hydroxyphenyllactic acid (pHPLA), malonic acid (MA), methylmalonic acid (MMA), ethylmalonic acid (EMA) and α -ketoglutaric acid (aKGA) were analyzed simultaneously using a ZIC-HILIC column. This method was validated according to U.S. Food and Drug Administration guidelines with additional validation procedures for endogenous substances. Chemometrics was performed for the complementary study. The objectives of this study are to assess acidosis profile in patients with severe falciparum malaria by using innovative technique (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry and Chemometrics) to obtain qualitative and quantitative data of unmeasured organic acids in patients with severe falciparum malaria, uncomplicated falciparum malaria and bacterial infection sepsis (in absence of malaria) with healthy volunteers, and to combine profile of unmeasured organic acids and clinical characteristics for the assessment of disease state and/or disease prognosis. This could be important clinical tool for better understanding the pathophysiology of acidosis in severe malaria and other conditions complicated by

acidosis. Consequently, this could guide to the development of new therapies.

Keywords; Acidosis, Severe malaria, Organic acids, Liquid Chromatography,
Mass Spectrometry

2. บทสรุปผู้บริหาร (Executive Summary) ประกอบด้วย:

- ที่มาและความสำคัญของปัญหา-ทบทวนวรรณกรรม

มาลาเรียเป็นโรคติดต่อในมนุษย์ที่มียุงก้นปล่อง (Anopheles) เป็นพาหะ โรคนี้ก่อให้เกิดอัตราการเจ็บป่วยและการเสียชีวิตสูงถึงประมาณ 2,000 คนต่อวัน โดยอัตราการเสียชีวิตจากโรคนี้เกือบทุกกรณีมีสาเหตุจากเชื้อ Plasmodium falciparum โดยมีภาวะเลือดเป็นกรด (Acidosis) ซึ่งเป็นเครื่องหมายที่ใช้ทำนายโรค (prognostic marker) เป็นหนึ่งในสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตในผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรง (severe malaria) จากเชื้อ Plasmodium falciparum นี้ (White, Pukrittayakamee et al. 2013)

ภาวะ Acidosis มีสาเหตุหลักหนึ่งมาจากกรดแลคติก และต่อมาได้มีการศึกษาทางการแพทย์ (Dondorp, Chau et al. 2004) ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรงจาก Plasmodium falciparum (n=268) และทำการคำนวณค่าผลต่างระหว่างแอนไอออนชนิดแรง (strong anion gap) ทั้งหมดเทียบกับจากกรดแลคติก พบว่าค่าผลรวม strong anion gap ทั้งหมดมีค่าสูงกว่าที่มาจากกรดแลคติกอย่างเดียวถึงประมาณสี่เท่า (Dondorp, Chau et al. 2004) จากผลการศึกษานี้ทำให้พบว่า ยังมีกรดอินทรีย์ที่ไม่สามารถระบุชนิดได้อีกหลายชนิดที่เป็นตัวแปรสำคัญที่ส่งผลต่อค่าผลรวมของ strong anion gap ที่ไม่ขึ้นกับกรดแลคติก และก่อให้เกิดอัตราการเสียชีวิตอย่างมีนัยสำคัญทางการวินิจฉัยสาเหตุการเกิดโรคในผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรงจากเชื้อ Plasmodium falciparum นี้

จากการศึกษานำร่อง (Pilot study) (Sriboonvorakul, Leepipatpiboon et al. 2013) ได้ทำการพัฒนาและพิสูจน์ความเชื่อมั่น (Validation) ของวิธีการทางเคมีวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี (LC-MS) ในการคัดเลือกรหัสอินทรีย์เบื้องต้น (Preliminary screening) ในตัวอย่างพลาสมาและปัสสาวะของผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรงจากเชื้อ Plasmodium falciparum เปรียบเทียบกับกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดี (n=30) โดยใช้เทคนิคไฮโดรฟิลิกอินเทอร์เฟซลิควิดโครมาโทกราฟี (HILIC) ต่อกับแมสสเปกโตรเมทรี (MS) ในโหมดไอออนลบสำหรับการแยก การตรวจวัดและหาปริมาณความเข้มข้น ร่วมกับการค้นคว้าและเปรียบเทียบกับ Biochemical pathway ใน parasite metabolism ทำให้ได้ข้อมูลกรดอินทรีย์ขนาดเล็ก 8 ชนิด ที่เป็น endogenous compounds และเป็น metabolites ในผู้ป่วยเบื้องต้น เพื่อใช้ในการขยายการศึกษาในขั้นต่อไป กรดทั้ง 8 ชนิด ได้แก่ กรดแอลแลคติก, กรด

แอลฟาไฮดรอกซีบีวาทิลิก, กรดแอลฟาคีโตกลูตาริก, กรดเบต้าไฮดรอกซีบีวาทิลิก, กรดฟีไฮดรอกซีฟีนิลแลกติก, กรดมาโลนิค, กรดเมทิลมาโลนิคและ กรดเอทิลมาโลนิค โดยกรดอินทรีย์ทั้งหมดนี้สามารถถูกวิเคราะห์ได้พร้อม ๆ กันโดยใช้ซิกฮิลิกคอลัมน์ (ZIC HILIC) (Sriboonvorakul, Leepipatpiboon et al. 2013)

โดยปกติข้อมูลทางเคมีวิเคราะห์ (Analytical data) ที่ได้จากเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี (LC-MS) เป็นข้อมูลที่ซับซ้อนและยากต่อการเข้าใจ ข้อมูลเหล่านี้จึงต้องการเทคนิคเคโมเมทริกซ์ (Chemometrics) เพื่อทำการจัดระเบียบข้อมูลที่ซับซ้อนให้ง่ายต่อการแปลผล ซึ่งเทคนิคเคโมเมทริกซ์ คือเทคนิคที่รวมกันของศาสตร์ระหว่าง คณิตศาสตร์ประยุกต์ สถิติ และคอมพิวเตอร์ (Brereton 2009) ปัจจุบันเทคนิคเคโมเมทริกซ์ นิยมใช้และเป็นที่ยอมรับอย่างแพร่หลายในการวิเคราะห์ศึกษาเมทาบอลอไลท์ (Metabolomics analysis) เพื่อวินิจฉัยหาสาเหตุการเกิดโรค (Madsen, Lundstedt et al. 2010)

เอกสารอ้างอิง:

- Brereton, R. G. (2009). Chemometrics for Pattern Recognition.
- Dondorp, A. M., T. T. H. Chau, N. H. Phu, N. T. H. Mai, P. P. Loc, L. V. Chuong, D. X. Sinh, A. Taylor, T. T. Hien, N. J. White and N. P. J. Day (2004). "Unidentified acids of strong prognostic significance in severe malaria *." Critical Care Medicine 32(8): 1683-1688
- Sriboonvorakul, N., N. Leepipatpiboon, A. M. Dondorp, T. Pouplin, N. J. White, J. Tarning and N. Lindegardh (2013). "Liquid chromatographic-mass spectrometric method for simultaneous determination of small organic acids potentially contributing to acidosis in severe malaria." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 941: 116-122.
- White, N. J., S. Pukrittayakamee, T. T. Hien, M. A. Faiz, O. A. Mokuolu and A. M. Dondorp (2013). "Malaria." The Lancet 383: 723-735.

- วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาโปรไฟล์ของกรดในผู้ป่วยมาลาเรีย (*Plasmodium falciparum*) ชนิดรุนแรงที่มีภาวะเลือดเป็นกรด โดยการตรวจวัดหาชนิดและปริมาณของกรดอินทรีย์ที่สำคัญในผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรง เปรียบเทียบกับผู้ป่วยมาลาเรียชนิดไม่รุนแรง ผู้ป่วยติดเชื้อแบคทีเรียและมีภาวะเลือดเป็นกรด อาสาสมัครสุขภาพดี โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟี (LC-MS และ Chemometrics)
2. รวบรวมและประเมินโปรไฟล์ของกรดที่ได้จากการศึกษาทั้งหมด เพื่อประเมินเป็นดัชนีชี้วัดที่สัมพันธ์กับความรุนแรงหรือการพยากรณ์โรคของโรคมาลาเรีย

3. ทำการศึกษานำร่องเพื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของกรดต่อเวลา
(Preliminary kinetic study)

- วิธีทดลอง

1. ขอบจริยธรรมการวิจัยในคน และเมื่อได้รับอนุมัติจาก Ethical and Scientific Committee จากคณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล เริ่มดำเนินการเก็บรวบรวมข้อมูลพื้นฐานของตัวอย่างทุกกลุ่มและเก็บข้อมูลทางการแพทย์ที่สำคัญของผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรง ชนิดไม่รุนแรง และผู้ป่วยที่มีภาวะเลือดเป็นกรดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย เช่น (อายุ, เพศ, ปริมาณ electrolytes ในร่างกายคน ฯลฯ)
2. ทำการวิเคราะห์กรดอินทรีย์ที่พบใน (pilot study) ทั้ง 8 ชนิด ได้แก่ กรดแอลแลกติก, กรดแอลฟาไฮดรอกซีบิวทริก, กรดแอลฟาคีโตกลูตาริก, กรดเบต้าไฮดรอกซีบิวทริก, กรดฟีไฮดรอกซีฟีนิลแลกติก, กรดมาโลนิค, กรดเมทิลมาโลนิคและ กรดเอทิลมาโลนิค ในเชิงคุณภาพและปริมาณในตัวอย่างพลาสมาและปัสสาวะของผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรง (n=90) ไม่รุนแรง (n=94) ผู้ป่วยติดเชื้อแบคทีเรียและมีภาวะเลือดเป็นกรด (n=19) และอาสาสมัครสุขภาพดี (n=61) โดยใช้เทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี (LC-MS)
3. ทำการพัฒนาวิธีการกลั่นกรองข้อมูล (Data Pre-processing) ที่เหมาะสมกับข้อมูลทางเคมีวิเคราะห์ (Analytical data) ที่ได้จากเทคนิค LC-MS เพื่อให้ข้อมูลที่ได้ง่ายต่อการแปลผลและอยู่ในสเกลเดียวกันสามารถเปรียบเทียบกันได้
4. ทำการพัฒนาวิธีทาง Chemometrics เพื่อหา Trend และ outlier ของข้อมูลเบื้องต้นด้วยเทคนิค Unsupervised pattern recognition โดยพิจารณาข้อมูลทางเคมีวิเคราะห์ที่ได้ร่วมกับการคัดเลือกข้อมูลทางการแพทย์ที่สำคัญ อีกทั้งสามารถนำโปรไฟล์ของข้อมูลทางเคมีวิเคราะห์ และ/หรือข้อมูลทางการแพทย์ที่สำคัญนี้มาใช้ในการแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มผู้ป่วยและคนปกติได้ และขยายไปสู่การแยกกลุ่มผู้ป่วยชนิดรุนแรงที่มีภาวะแทรกซ้อนต่างๆได้
5. ทำการพัฒนาวิธีทาง Chemometrics เพื่อสร้าง Prediction models ของโปรไฟล์กรดอินทรีย์และ/หรือข้อมูลทางการแพทย์ที่สำคัญ ด้วยเทคนิค Supervised pattern recognition และทำการทดสอบความเชื่อมั่น (Validation) ของ prediction models เพื่อใช้ในการวิเคราะห์และแบ่งกลุ่ม unknown samples
6. ศึกษา นำร่องเพื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของกรดที่เวลาต่าง ๆ (Preliminary kinetic study) ในผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรง

- แผนการดำเนินงาน

เดือนที่ 1-6

1. ขออนุมัติโครงการวิจัยในคน และเมื่อได้รับอนุมัติจาก Ethical and Scientific Committee จากคณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล แล้ว
2. ดำเนินการเก็บรวบรวมข้อมูลพื้นฐานของตัวอย่างทุกกลุ่มและเก็บข้อมูลทางการแพทย์ที่สำคัญของผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรง ชนิดไม่รุนแรง และผู้ป่วยติดเชื้อแบคทีเรียที่มีภาวะเลือดเป็นกรด เช่น (อายุ, เพศ, ปริมาณ electrolytes ในร่างกายคน ฯลฯ)
3. เริ่มทำการวิเคราะห์กรดอินทรีย์ ทั้ง 8 ชนิด ได้แก่ กรดแอลแลกติก, กรดแอลฟาไฮดรอกซีบิวทิลิก, กรดแอลฟาคีโตกลูตาริก, กรดเบต้าไฮดรอกซีบิวทิลิก, กรดฟีไฮดรอกซีฟีนิลแลกติก, กรดมาโลนิค, กรดเมทิลมาโลนิคและ กรดเอทิลมาโลนิค ในเชิงคุณภาพและปริมาณในตัวอย่างพลาสมาและปัสสาวะของผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรง ไม่รุนแรง ผู้ป่วยติดเชื้อแบคทีเรียที่มีภาวะเลือดเป็นกรด และอาสาสมัครสุขภาพดี โดยใช้เทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมทรี (LC-MS) ที่พัฒนาและทดสอบความเชื่อมั่นของวิธีการแล้ว

เดือนที่ 7-12

1. ทำการวิเคราะห์กรดอินทรีย์ ทั้ง 8 ชนิด ได้แก่ กรดแอลแลกติก (LA), กรดแอลฟาไฮดรอกซีบิวทิลิก (aHBA), กรดแอลฟาคีโตกลูตาริก (aKGA), กรดเบต้าไฮดรอกซีบิวทิลิก (bHBA), กรดฟีไฮดรอกซีฟีนิลแลกติก (pHPLA), กรดมาโลนิค (MA), กรดเมทิลมาโลนิค (MMA) และ กรดเอทิลมาโลนิค (EMA) ในเชิงคุณภาพและปริมาณในตัวอย่างพลาสมาและปัสสาวะของผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรง ไม่รุนแรง ผู้ป่วยติดเชื้อแบคทีเรียที่มีภาวะเลือดเป็นกรด และอาสาสมัครสุขภาพดี โดยใช้เทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมทรี (LC-MS) ที่พัฒนาและทดสอบความเชื่อมั่นของวิธีการแล้ว
2. ทำการศึกษานำร่องเพื่อวิเคราะห์หาการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของกรดต่อเวลา (Preliminary kinetic study)

เดือนที่ 13-18

1. ทำการพัฒนาวิธีการกรองข้อมูล (Data Pre-processing) ที่เหมาะสมกับข้อมูลทางเคมีวิเคราะห์ (Analytical data) ที่ได้จากเทคนิค LC-MS เพื่อให้ข้อมูลที่ได้ง่ายต่อการแปรผลและอยู่ในสเกลเดียวกันสามารถเปรียบเทียบกันได้
2. ทำการพัฒนาวิธีทาง Chemometrics เพื่อหา Trend และ outlier ของข้อมูลเบื้องต้น ด้วยเทคนิค Unsupervised pattern recognition โดยพิจารณาข้อมูลทางเคมีวิเคราะห์ที่

ได้ร่วมกับการคัดเลือกข้อมูลทางการแพทย์ที่สำคัญ อีกทั้งสามารถนำโปรไฟล์ของข้อมูลทางเคมีวิเคราะห์ และ/หรือข้อมูลทางการแพทย์ที่สำคัญนี้มาใช้ในการแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มผู้ป่วยและคนปกติได้ และขยายไปสู่การแยกกลุ่มผู้ป่วยชนิดรุนแรงที่มีภาวะแทรกซ้อนที่สำคัญต่างๆได้

3. ทำการพัฒนาวิธีทาง Chemometrics เพื่อสร้าง Prediction models ของโปรไฟล์กรดอินทรีย์และ/หรือข้อมูลทางการแพทย์ที่สำคัญ ด้วยเทคนิค Supervised pattern recognition และทำการทดสอบความเชื่อมั่น (Validation) ของ prediction models เพื่อใช้ในการวิเคราะห์และแบ่งกลุ่ม unknown samples

เดือนที่ 19-24

1. ทำการประเมินผลของ pattern ของโปรไฟล์ของข้อมูลกรดและข้อมูลทางการแพทย์ที่สำคัญและใช้แยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มผู้ป่วยมาลาเรียและคนปกติได้ และขยายไปสู่การแยกกลุ่มผู้ป่วยชนิดรุนแรงที่มีภาวะแทรกซ้อนที่สำคัญต่างๆ
2. วิเคราะห์ผลการทดลองที่ได้ เขียน paper เป็น first author และได้รับการตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ Malaria Journal ในชื่อเรื่อง Acidosis and acute kidney injury in severe malaria (Impact Factor 2016 = 2.71)

3. ผลการทดลอง

ผลการทดลองพบว่า ในตัวอย่างปัสสาวะสามารถตรวจวัดปริมาณความเข้มข้นกรดได้ 7 ชนิดได้แก่ กรดแอลแลกติก (LA), กรดแอลฟาไฮดรอกซีบีวทิลิก (aHBA), กรดแอลฟาไคโกลูตาริก (aKGA), กรดเบต้าไฮดรอกซีบีวทิลิก (bHBA), กรดฟีไฮดรอกซีฟีนิลแลกติก (pHPLA), กรดเมทิลมาโลนิค (MMA) และ กรดเอทิลมาโลนิค (EMA) และในตัวอย่างปัสสาวะสามารถตรวจวัดปริมาณความเข้มข้นกรดได้ 4 ชนิดได้แก่ กรดแอลแลกติก (LA), กรดแอลฟาไฮดรอกซีบีวทิลิก (aHBA), กรดเบต้าไฮดรอกซีบีวทิลิก (bHBA), กรดฟีไฮดรอกซีฟีนิลแลกติก (pHPLA)

ตารางที่ 1 (ภาคผนวก) แสดงผลการเปรียบเทียบข้อมูลทางการแพทย์ที่สำคัญและความเข้มข้นกรดที่ตรวจวัดด้วยเทคนิคคลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี ในตัวอย่างปัสสาวะและปัสสาวะของผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรง (Severe Malaria) ชนิดไม่รุนแรง (Uncomplicated Malaria) และผู้ป่วยติดเชื้อแบคทีเรียที่มีภาวะเลือดเป็นกรด (Sepsis) และอาสาสมัครสุขภาพดี (Healthy)

Sriboonvorakul N, Ghose A, Hassan MMU, Hossain MA, Faiz MA, Pukrittayakamee S, Chotivanich K, Sukthana Y, Leopold SJ, Plewes K, et al: Acidosis and acute kidney injury in severe malaria. Malaria Journal 2018, 17:128

ผลการทดลองจากตารางที่ 1 พบว่า ค่าความเข้มข้นของกรดแลแลกติก (LA), กรดแอลฟาไฮดรอกซีบิวทิลิก (aHBA), กรดเบต้าไฮดรอกซีบิวทิลิก (bHBA), กรดฟีไฮดรอกซีฟีนิลแลติก (pHPLA) ในกลุ่มผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรง (Severe Malaria) มีค่าสูงกว่าในกลุ่มผู้ป่วยมาลาเรียชนิดไม่รุนแรง (Uncomplicated Malaria) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในตัวอย่างพลาสมา และค่าความเข้มข้นของกรดแลแลกติก (LA), กรดแอลฟาไฮดรอกซีบิวทิลิก (aHBA), กรดแอลฟาดีโทกลูตาริก (aKGA), กรดเบต้าไฮดรอกซีบิวทิลิก (bHBA), กรดฟีไฮดรอกซีฟีนิลแลติก (pHPLA), กรดเมทิลมาโลนิค (MMA) และ กรดเอทิลมาโลนิค (EMA) ในกลุ่มผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรง (Severe Malaria) มีค่าสูงกว่าในกลุ่มผู้ป่วยมาลาเรียชนิดไม่รุนแรง (Uncomplicated Malaria) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในตัวอย่างปัสสาวะ ในขณะที่เฉพาะกรดแลแลกติก (LA) ในตัวอย่างพลาสมาจากกลุ่มผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรง (Severe Malaria) มีค่าสูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยติดเชื้อแบคทีเรียที่มีภาวะเลือดเป็นกรด (Sepsis) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เพื่อพิจารณากรดทุกชนิดพร้อมกันและสร้างโปรไฟล์ความเข้มข้นของกรดทุกชนิดและประเมินโปรไฟล์ความเข้มข้นของกรดด้วยวิธีทาง Chemometrics ในการศึกษาที่ใช้เทคนิค Principal Component Analysis และได้ผลการทดลอง Principal Component Analysis (PCA) ของโปรไฟล์ความเข้มข้นกรด 4 ชนิด กรดแลแลกติก (LA), กรดแอลฟาไฮดรอกซีบิวทิลิก (aHBA), กรดเบต้าไฮดรอกซีบิวทิลิก (bHBA), กรดฟีไฮดรอกซีฟีนิลแลติก (pHPLA) จากตัวอย่างพลาสมา 4 กลุ่ม ได้แก่ ผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรง (Severe Malaria) ชนิดไม่รุนแรง (Uncomplicated Malaria) ผู้ป่วยติดเชื้อแบคทีเรียที่มีภาวะเลือดเป็นกรด (Sepsis) และอาสาสมัครสุขภาพดี (Healthy) ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 1

รูปที่ 1 (ภาคผนวก) แสดงผล Principal Component Analysis (PCA) ของโปรไฟล์ความเข้มข้นกรด 4 ชนิด กรดแลแลกติก (LA), กรดแอลฟาไฮดรอกซีบิวทิลิก (aHBA), กรดเบต้าไฮดรอกซีบิวทิลิก (bHBA), กรดฟีไฮดรอกซีฟีนิลแลติก (pHPLA) ในตัวอย่างพลาสมาทั้ง 4 กลุ่ม ได้แก่ ผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรง (Severe Malaria) ชนิดไม่รุนแรง (Uncomplicated Malaria) ผู้ป่วยติดเชื้อแบคทีเรียที่มีภาวะเลือดเป็นกรด (Sepsis) และอาสาสมัครสุขภาพดี (Healthy)

ผลการทดลองจากรูปที่ 1 (ภาคผนวก) พบว่าสามารถใช้โปรไฟล์ความเข้มข้นกรดทั้ง 4 ชนิด แยกกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดี (Healthy) ออกจากผู้ป่วยได้ทุกกลุ่ม และค่า Loading factor ของกรด ทั้ง 4 ชนิด ($LA = 0.52$, $aHBA = 0.55$, $bHBA = 0.48$ และ $pHPLA = 0.50$) มีค่าใกล้เคียงกันมากจึงสามารถนำโปรไฟล์ความเข้มข้นของกรดทั้ง 4 ชนิด มาพิจารณา เป็น Potential Contributors ได้

ขณะที่ผลการทดลอง Principal Component Analysis (PCA) ของโปรไฟล์ความเข้มข้นกรด 7 ชนิด กรดแอลแลกติก (LA), กรดแอลฟาไฮดรอกซีบิวทริก (aHBA), กรดแอลฟาคีโตนิก (aKGA), กรดเบต้าไฮดรอกซีบิวทริก (bHBA), กรดฟีไฮดรอกซีฟีนิลแลกติก (pHPLA), กรดเมทิลมาโลนิก (MMA) และ กรดเอทิลมาโลนิก (EMA) จากตัวอย่างปัสสาวะทั้ง 4 กลุ่ม ได้แก่ ผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรง (Severe Malaria) ชนิดไม่รุนแรง (Uncomplicated Malaria) ผู้ป่วยติดเชื้อแบคทีเรียที่มีภาวะเลือดเป็นกรด (Sepsis) และอาสาสมัครสุขภาพดี (Healthy) พบว่าไม่สามารถใช้โปรไฟล์ความเข้มข้นกรด 7 ชนิดนี้ แยกกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดี (Healthy) ออกจากกลุ่มผู้ป่วยได้

จากนั้นทำการศึกษาความสัมพันธ์ของการแสดงออกที่สำคัญ (major manifestation) ในผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรง (Severe Malaria) ที่มีภาวะไตวายเฉียบพลัน (Acute kidney injury) และ ภาวะโคม่า (Coma) ร่วมกับโปรไฟล์ความเข้มข้นของกรดโดยใช้วิธีทางเคโมเมทริกซ์ (Chemometrics) ในการศึกษาครั้งนี้ใช้เทคนิค Principal Component Analysis เป็น (Unsupervised recognition) และ Partial Least Square Discriminant Analysis เป็น (Supervised recognition) ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 2 และรูปที่ 2

ตารางที่ 2 (ภาคผนวก) แสดงผลการเปรียบเทียบความเข้มข้นกรดที่ตรวจวัดได้ในผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรง (Severe Malaria) ที่มีและไม่มีภาวะไตวายเฉียบพลัน (Acute kidney injury) ในตัวอย่างปัสสาวะและปัสสาวะ

ผลการทดลองจากตารางที่ 2 พบว่า ในตัวอย่างปัสสาวะค่าความเข้มข้นของกรดฟีไฮดรอกซีฟีนิลแลกติก (pHPLA) และกรดเบต้าไฮดรอกซีบิวทริก (bHBA) ในกลุ่มผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรง (Severe Malaria) ที่มีภาวะไตวายเฉียบพลัน (Acute kidney injury) มีค่าสูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรง ที่ไม่มีภาวะไตวายเฉียบพลัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และในตัวอย่างปัสสาวะ เฉพาะค่าความเข้มข้นของกรดฟีไฮดรอกซีฟีนิลแลกติก (pHPLA) ในกลุ่มผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรง (Severe Malaria) ที่มีภาวะไตวายเฉียบพลัน (Acute kidney injury) มีค่าสูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรง ที่ไม่มีภาวะไตวายเฉียบพลัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

รูปที่ 2 (ภาคผนวก) แสดงผล Principal Component Analysis (PCA) ของโปรไฟล์ความเข้มข้นกรด 4 ชนิด กรดแอลแลกติก (LA), กรดแอลฟาไฮดรอกซีบิวทริก (aHBA), กรดเบต้าไฮดรอกซีบิวทริก (bHBA), กรดฟีไฮดรอกซีฟีนิลแลกติก (pHPLA) จากตัวอย่างพลาสมา (a) และ โปรไฟล์ความเข้มข้นกรด 7 ชนิด กรดแอลแลกติก (LA), กรดแอลฟาไฮดรอกซีบิวทริก (aHBA), กรดแอลฟาคีโตกลูตาริก (aKGA), กรดเบต้าไฮดรอกซีบิวทริก (bHBA), กรดฟีไฮดรอกซีฟีนิลแลกติก (pHPLA), กรดเมทิลมาโลนิก (MMA) และ กรดเอทิลมาโลนิก (EMA) จากตัวอย่างปัสสาวะ (b) ในผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรง (Severe Malaria) ที่มีและไม่มีภาวะไตวายเฉียบพลัน (Acute kidney injury)

Sriboonvorakul N, Ghose A, Hassan MMU, Hossain MA, Faiz MA, Pukrittayakamee S, Chotivanich K, Sukthana Y, Leopold SJ, Plewes K, et al: Acidosis and acute kidney injury in severe malaria. Malaria Journal 2018, 17:128

จากผลการทดลองรูปที่ 2 พบว่า สามารถใช้โปรไฟล์ความเข้มข้นของกรดแยกกลุ่มผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรง (Severe Malaria) ที่มีและไม่มีภาวะไตวายเฉียบพลัน (Acute kidney injury) ออกจากกันได้ ทั้งในตัวอย่างพลาสมาและปัสสาวะ โดยในตัวอย่างพลาสมา กรดฟีไฮดรอกซีฟีนิลแลกติก (pHPLA) เป็นดัชนีสำคัญที่ทำให้เกิดการแยกกลุ่มได้ ขณะที่ในตัวอย่างปัสสาวะ กรดฟีไฮดรอกซีฟีนิลแลกติก (pHPLA), กรดแอลแลกติก (LA), กรดเบต้าไฮดรอกซีบิวทริก (bHBA) และกรดแอลฟาคีโตกลูตาริก (aKGA) ทั้ง 4 ชนิด เป็นดัชนีสำคัญที่ทำให้เกิดการแยกกลุ่มได้ และค่า Loading factor ของกรดฟีไฮดรอกซีฟีนิลแลกติก ในตัวอย่างพลาสมา (pHPLA = 0.92) และในตัวอย่างปัสสาวะค่า Loading factor ของกรดทั้ง 4 ชนิดคือ (pHPLA = 0.36, LA = 0.11, bHBA = 0.00 และ aKGA = 0.24)

ตารางที่ 3 (ภาคผนวก) แสดงผล Predictive Model จากเทคนิค Partial Least Square Discriminant Analysis (PLSDA) ของโปรไฟล์ความเข้มข้นกรด 4 ชนิด กรดแอลแลกติก (LA), กรดแอลฟาไฮดรอกซีบิวทริก (aHBA), กรดเบต้าไฮดรอกซีบิวทริก (bHBA), กรดฟีไฮดรอกซีฟีนิลแลกติก (pHPLA) จากตัวอย่างพลาสมา (a) และ โปรไฟล์ความเข้มข้นกรด 7 ชนิด กรดแอลแลกติก (LA), กรดแอลฟาไฮดรอกซีบิวทริก (aHBA), กรดแอลฟาคีโตกลูตาริก (aKGA), กรดเบต้าไฮดรอกซีบิวทริก (bHBA), กรดฟีไฮดรอกซีฟีนิลแลกติก (pHPLA), กรดเมทิลมาโลนิก (MMA) และ กรดเอทิลมาโลนิก (EMA) จากตัวอย่างปัสสาวะ (b) ในผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรง (Severe Malaria) ที่มีและไม่มีภาวะไตวายเฉียบพลัน (Acute kidney injury)

จากผลการทดลองตารางที่ 3 พบว่า ค่า Recognition Ability ของกลุ่มผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรง (Severe Malaria) ที่มีภาวะไตวายเฉียบพลัน (Acute kidney injury) ในตัวอย่างพลาสมาจาก Predictive Model (PLSDA) คือ 92.3% และในตัวอย่างปัสสาวะคือ 99.4 % ทั้งสอง PLSDA model ได้ผ่านการ Validation ด้วยเทคนิค Leave-one-out cross validation และให้ผลค่า Recognition Ability เหมือนกัน

ผลการศึกษาในผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรง (Severe Malaria) ที่มีและไม่มีภาวะโคม่า (Coma) นั้น ไม่สามารถใช้โปรไฟล์ความเข้มข้นของกรดแยกกลุ่มผู้ป่วยออกจากได้

ผลการทดลองทำการศึกษานำร่องเพื่อวิเคราะห์กรดอินทรีย์ เพื่อหาการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของกรดต่อเวลา (Preliminary kinetic study) ความเข้มข้นกรด 4 ชนิด กรดแอลแลกติก (LA), กรดแอลฟาไฮดรอกซีบิวทิลิก (aHBA), กรดเบต้าไฮดรอกซีบิวทิลิก (bHBA), กรดฟีไฮดรอกซีฟีนิลแลกติก (pHPLA) ในตัวอย่างพลาสมาจากผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรง (Severe Malaria) ขั้นต้น พบการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นเพียงเล็กน้อยต่อเวลา อาจเนื่องจากจำนวนตัวอย่างน้อยที่เลือกมาศึกษาเบื้องต้น ซึ่งผู้วิจัยมีแผนการจะทำการศึกษาจุลศาสตร์ต่อไปในอนาคต โดยเฉพาะกรดฟีไฮดรอกซีฟีนิลแลกติก (pHPLA) ซึ่งมีความสำคัญและเป็นดัชนีที่สามารถใช้ในการแยกกลุ่มผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรง (Severe Malaria) ที่มีและไม่มีภาวะไตวายเฉียบพลัน (Acute kidney injury) ออกจากกันได้

4. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง และข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

จากผลการทดลองของการศึกษาในโครงการวิจัยนี้ พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรง (Severe Malaria) สามารถตรวจวิเคราะห์หาปริมาณความเข้มข้นได้สูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยมาลาเรียชนิดไม่รุนแรง (Uncomplicated Malaria) และกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากกรดกรดแอลแลกติก (LA) แล้วยังมีกรดแอลฟาไฮดรอกซีบิวทิลิก (aHBA), กรดเบต้าไฮดรอกซีบิวทิลิก (bHBA), กรดฟีไฮดรอกซีฟีนิลแลกติก (pHPLA) สูงขึ้นในตัวอย่างพลาสมา และกรดแอลฟาไฮดรอกซีบิวทิลิก (aHBA), กรดแอลฟาคีโตนกลูตาริก (aKGA), กรดเบต้าไฮดรอกซีบิวทิลิก (bHBA), กรดฟีไฮดรอกซีฟีนิลแลกติก (pHPLA), กรดเมทิลมาโลนิก (MMA) และ กรดเอทิลมาโลนิก (EMA) สูงขึ้นในตัวอย่างปัสสาวะ

ผลการทดลองจากการศึกษาเพิ่มเติมความสัมพันธ์ระหว่างโปรไฟล์ความเข้มข้นของกรดชนิดต่างๆ และความเกี่ยวข้องกับอวัยวะเฉพาะที่ พบว่ามีความสัมพันธ์กับภาวะไตวายเฉียบพลัน (Acute kidney injury) โดยในผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรงที่มีภาวะไตวาย

เฉียบพลัน จะตรวจวัดความเข้มข้นของกรดแลแลกติก (LA) กรดเบต้าไฮดรอกซีบิวทิลิก (bHBA) และกรดฟิไฮดรอกซีฟีนิลแลแลกติก (pHPLA) 3 ชนิดนี้ ได้สูงกว่าผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรงที่ไม่มีภาวะไตวายเฉียบพลัน

ผล Principal Component Analysis (PCA) ของโปรไฟล์ความเข้มข้นกรดในตัวอย่างพลาสมาและปัสสาวะพบว่ากรดฟิไฮดรอกซีฟีนิลแลแลกติก (pHPLA) เป็นดัชนีสำคัญที่ใช้ในการแยกกลุ่มผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรงที่มีและไม่มีภาวะไตวายเฉียบพลัน ออกจากกันได้ ซึ่งผลที่ได้จาก Predictive Model เทคนิค Partial Least Square Discriminant Analysis (PLSDA) ได้ช่วยยืนยันผล PCA ด้วยเช่นกัน

จากผลการทดลองทั้งหมดในการศึกษานี้ สรุปได้ว่า กรดฟิไฮดรอกซีฟีนิลแลแลกติก (pHPLA) นี้ นอกจากจะเป็น biomarker ของภาวะไตวายเฉียบพลัน ยังสามารถก่อให้เกิดความผิดปกติของไต ในผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรง (Severe Malaria) ซึ่งการศึกษาถึงแหล่งกำเนิดของกรดฟิไฮดรอกซีฟีนิลแลแลกติก (pHPLA) ในโรคมาลาเรียชนิดรุนแรงจากเชื้อ *falciparum* และกลไกการทำให้เกิดผิดปกติของไตเนื่องจากกรดนี้ เป็นประเด็นที่น่าสนใจ และทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในอนาคต

5. ภาคผนวก

5.1 ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลทางการแพทย์ที่สำคัญของผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรง (Severe Malaria) ชนิดไม่รุนแรง (Uncomplicated Malaria) และผู้ป่วยติดเชื้อแบคทีเรียที่มีภาวะเลือดเป็นกรด (Sepsis) และอาสาสมัครสุขภาพดี (Healthy) และความเข้มข้นกรดที่ตรวจวัดด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี

5.2 รูปที่ 1 แสดงผล Principal Component Analysis (PCA) ของโปรไฟล์ความเข้มข้นกรด 4 ชนิด กรดแลแลกติก (LA), กรดแอลฟาไฮดรอกซีบิวทิลิก (aHBA), กรดเบต้าไฮดรอกซีบิวทิลิก (bHBA), กรดฟิไฮดรอกซีฟีนิลแลแลกติก (pHPLA) จากตัวอย่างพลาสมา 4 กลุ่ม ได้แก่ ผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรง (Severe Malaria) ชนิดไม่รุนแรง (Uncomplicated Malaria) ผู้ป่วยติดเชื้อแบคทีเรียที่มีภาวะเลือดเป็นกรด (Sepsis) และอาสาสมัครสุขภาพดี (Healthy)

5.3 ตารางที่ 2 แสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นกรดที่ตรวจวัดได้ในผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรง (Severe Malaria) ที่มีและไม่มีภาวะไตวายเฉียบพลัน (Acute kidney injury) ในตัวอย่างพลาสมาและปัสสาวะ

5.4 รูปที่ 2 แสดงผล Principal Component Analysis (PCA) ของโปรไฟล์ความเข้มข้นกรด 4 ชนิด กรดแอลแลกติก (LA), กรดแอลฟาไฮดรอกซีบิวทริก (aHBA), กรดเบต้าไฮดรอกซีบิวทริก (bHBA), กรดฟีไฮดรอกซีฟีนิลแลกติก (pHPLA) จากตัวอย่างพลาสมา (a) และ โปรไฟล์ความเข้มข้นกรด 7 ชนิด กรดแอลแลกติก (LA), กรดแอลฟาไฮดรอกซีบิวทริก (aHBA), กรดแอลฟาคีโกลูตาริก (aKGA), กรดเบต้าไฮดรอกซีบิวทริก (bHBA), กรดฟีไฮดรอกซีฟีนิลแลกติก (pHPLA), กรดเมทิลมาโลนิก (MMA) และ กรดเอทิลมาโลนิก (EMA) จากตัวอย่างปัสสาวะ (b) ในผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรง (Severe Malaria) ที่มีและไม่มีภาวะไตวายเฉียบพลัน (Acute kidney injury)

5.5 ตารางที่ 3 แสดงผล Partial Least Square Discriminant Analysis ของโปรไฟล์ความเข้มข้นกรด 4 ชนิด กรดแอลแลกติก (LA), กรดแอลฟาไฮดรอกซีบิวทริก (aHBA), กรดเบต้าไฮดรอกซีบิวทริก (bHBA), กรดฟีไฮดรอกซีฟีนิลแลกติก (pHPLA) จากตัวอย่างพลาสมา (a) และ โปรไฟล์ความเข้มข้นกรด 7 ชนิด กรดแอลแลกติก (LA), กรดแอลฟาไฮดรอกซีบิวทริก (aHBA), กรดแอลฟาคีโกลูตาริก (aKGA), กรดเบต้าไฮดรอกซีบิวทริก (bHBA), กรดฟีไฮดรอกซีฟีนิลแลกติก (pHPLA), กรดเมทิลมาโลนิก (MMA) และ กรดเอทิลมาโลนิก (EMA) จากตัวอย่างปัสสาวะ (b) ในผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรง (Severe Malaria) ที่มีและไม่มีภาวะไตวายเฉียบพลัน (Acute kidney injury)

5.6 รางวัลชมเชย poster ดีเด่น งานประชุมวิชาการนานาชาติ “44th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques” ณ เมือง ซานฟรานซิสโก ประเทศ สหรัฐอเมริกา

5.6 ผลงานวิจัย หัวเรื่อง “Acidosis and acute kidney injury in severe malaria” ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ Malaria Journal ในปี 2018

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่มที่ เลขที่ และหน้า) หรือผลงานตามที่คาดไว้ในสัญญาโครงการ

ผลงานวิจัยผู้แต่ง **Natthida Sriboonvorakul**, Aniruddha Ghose, M. Mahtab Uddin Hassan, Md. Amir Hossain, M. Abul Faiz, Sasithon Pukrittayakamee,

Kesinee Chotivanich, Yaowalark Sukthana, Stije J. Leopold, Katherine
Plewes, Nicholas P. J. Day, Nicholas J. White, Joel Tarning and
Arjen M. Dondorp*

ชื่อเรื่อง Acidosis and acute kidney injury in severe malaria

ชื่อวารสาร Malaria Journal

ปี เล่มที่ เลขที่ และหน้า (2018) 17:128 หน้า 1-8

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ในเชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)

3. อื่นๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุม วิชาการ หนังสือ การจดสิทธิบัตร)

ส่วนหนึ่งของผลการศึกษาในโครงการวิจัยนี้ ได้นำไปเสนอผลงานในที่ประชุม
วิชาการ ระดับนานาชาติ แบบโปสเตอร์ และได้รับรางวัลชมเชย poster ดีเด่น ในงาน
ประชุมวิชาการนานาชาติ “44th International Symposium on High Performance
Liquid Phase Separations and Related Techniques” ณ เมือง ซานฟรานซิสโก
ประเทศ สหรัฐอเมริกา

ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลทางการแพทย์ที่สำคัญของผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรง (Severe Malaria) ชนิดไม่รุนแรง (Uncomplicated Malaria) และผู้ป่วยติดเชื้อแบคทีเรียที่มีภาวะเลือดเป็นกรด (Sepsis) และอาสาสมัครสุขภาพดี (Healthy) และความเข้มข้นกรดที่ตรวจวัดด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี

Characteristics	Severe malaria N=90	Uncomplicated malaria N=94	Sepsis N=19	Healthy N=61 ^d	P value* ¹
Male, n (%)	63 (70 %)	74 (79 %)	9 (47%)		0.009
Age (yr)	32 (25-45)	29 (21-45)	35 (25-48)		0.205
Glasgow Coma Scale score	10 (8-14)	15 (15-15)	14 (8-15)		< 0.001
GCS score <11, n (%)	59/90 (66 %)	0 (0 %)	6/19 (32 %)		
Parasitaemia (count/ μ l)	41,929 (26,191-67,127)	10,287 (5,959-17,758)			< 0.001
PfHRP2 (ng/ml)	1,740 (1,333-2,272)	240.3 (167.8-344.1)			< 0.001
Total bilirubin (mg/dl)	2.8 (2.3–3.5, 0.2–44.2)	1.1 (0.9–1.4, 0.2–28.3)	0.94 (0.59-1.49)		< 0.001
Creatinine (mg/dl)	1.48 (1.34-1.65)	0.95 (0.89-1.01)	1.68 (1.25-2.26)		< 0.001
Acute kidney injury (creatinine >3 mg/dl)	13/90 (14 %)	0/94 (0 %)	4/19 (21%)		
Plasma concentration (μ mol/L) ^a					
LA	4,587 (4028-5223)	2,246 (2080-2426)	2,849 (2148-3779)	1,111 (1088-1133)	< 0.001
aHBA	118.7 (106-133)	63.07 (56.58-70.3)	107.7 (86.2-134.6)	22.18 (21.19-23.21)	< 0.001
bHBA	139.0 (126.1-153.1)	101.9 (91.28-113.7)	247.9 (160.4-383.2)	71.37 (69.43-73.37)	< 0.001
pHPLA	9.73 (8.51-11.11)	5.85 (5.57-6.15)	8.24 (6.97-9.73)	1.06 (0.99-1.14)	< 0.001
Corrected urine concentrations (μ mol/mmol CrCl) ^b					
LA	9.94 (7.54-13.09)	2.85 (2.32-3.49)	13.82 (4.76-40.1)		< 0.001
aHBA	0.95 (0.73-1.25)	0.63 (0.51-0.78)	1.07 (0.55-2.09)		0.063
bHBA	2.56 (2.17-3.03)	1.88 (1.57-2.26)	4.61 (2.13-9.96)		0.003
pHPLA	1.42 (1.09-1.86)	0.48 (0.34-0.66)	0.83 (0.30-2.29)		< 0.001
MMA	0.14 (0.12-0.17)	0.23 (0.19-0.28)	0.15 (0.11-0.22)		< 0.001
EMA	0.21 (0.17-0.25)	0.34 (0.27-0.43)	0.32 (0.21-0.48)		0.005
aKGA	2.44 (2.09-2.85)	2.16 (1.89-2.47)	4.31 (2.77-6.70)		< 0.001

Characteristics	Severe malaria N=90	Uncomplicated malaria N=94	Sepsis N=19	Healthy N=61 ^d	<i>P</i> value* ¹
Urine concentrations (μ mol/L) ^c					
LA	560.0 (436.3-718.7)	166.8 (140.0-198.7)	370.7 (196.7-698.7)	247.6 (221.1-277.2)	< 0.001
aHBA	56.58 (44.39-72.12)	35.97 (29.98-43.16)	35.44 (23.43-53.59)	90.71 (80.0-102.8)	< 0.001
bHBA	159.4 (142.2-178.7))	127.0 (114.4-140.9)	252.3 (168.7-377.3)	122.1 (115.3-129.2)	0.007
pHPLA	74.98 (60.85-92.40)	26.31 (20.73-33.40)	28.57 (17.75-45.97)	21.76 (16.29-29.08)	< 0.001
MMA	10.19 (8.51-12.20)	13.32 (11.20-15.84)	6.99 (4.53-10.79)	24.25 (20.79-28.28)	< 0.001
EMA	13.22 (10.63-16.45)	19.70 (15.83-24.52)	11.79 (7.51-18.53)	45.34 (36.54-56.26)	< 0.001
aKGA	218.0 (201.5-235.9)	220.8 (201.9-241.4))	250.1 (190.8-327.8)	UD	< 0.001

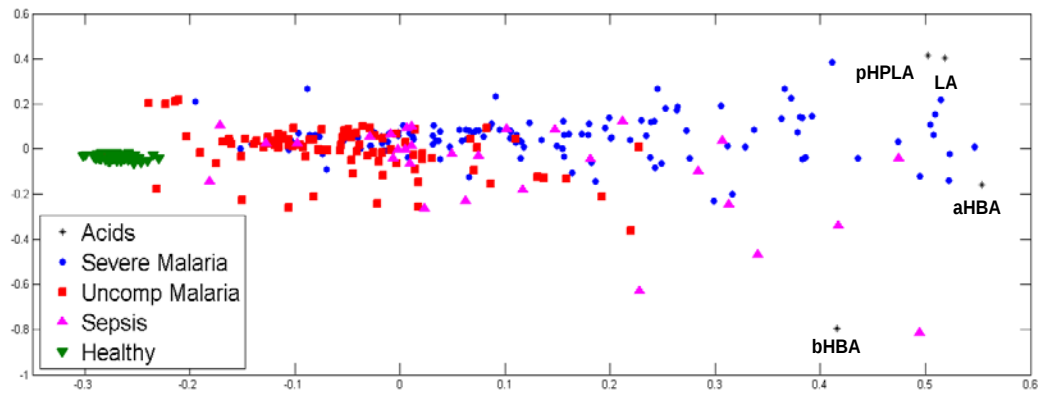
¹*Values are geometric mean (95% CI), except * median (IQR)

^aFor all plasma specimens, EMA, MMA, α-KGA were assayed but undetectable

^bUrine creatinine-adjusted concentrations were corrected as described in the Methods section

^cActual urine concentrations

^dFor healthy participants, clinical parameters and creatinine values were not available



รูปที่ 1 ผล Principal Component Analysis (PCA) ของโปรไฟล์ความเข้มข้นกรด 4 ชนิด กรดแลแลกติก (LA), กรดแอลฟาไฮดรอกซีบิวทริก (aHBA), กรดเบต้าไฮดรอกซีบิวทริก (bHBA), กรดฟีไฮดรอกซีฟีนิลแลแลกติก (pHPLA) จากตัวอย่างพลาสมา 4 กลุ่ม ได้แก่ ผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรง (Severe Malaria) ชนิดไม่รุนแรง (Uncomplicated Malaria) ผู้ป่วยติดเชื้อแบคทีเรียที่มีภาวะเลือดเป็นกรด (Sepsis) และอาสาสมัครสุขภาพดี (Healthy)

ตารางที่ 2 แสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นกรดที่ตรวจวัดได้ในผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรง (Severe Malaria) ที่มีและไม่มีภาวะไตวายเฉียบพลัน (Acute kidney injury) ในตัวอย่างพลาสมาและปัสสาวะ

Characteristics	Severe malaria with AKI (N=13)	Severe malaria without AKI (N=77)	P value*
Plasma concentration (μ mol/L) ^a			
LA	6,406 (4,816-8,520)	4,335 (3,760-4,998)	0.066
α HBA	142 (107-188)	115 (102-131)	0.348
β HBA	178 (133-238)	133 (120-148)	0.043
pHPLA	33.8 (22.5-50.7)	7.88 (7.36-8.45)	< 0.001
Urine creatinine adjusted concentrations (μ mol/mmol CrCl) ^b			
LA	50.7 (30.4-84.5)	7.55 (5.78-9.86)	< 0.001
α HBA	1.33 (0.86-2.06)	0.90 (0.66-1.22)	0.577
β HBA	5.94 (4.52-7.80)	2.22 (1.87-2.64)	< 0.001
pHPLA	8.80 (6.17-12.5)	1.04 (0.82-1.33)	< 0.001
MMA	0.11 (0.07-0.17)	0.15 (0.12-0.18)	0.245
EMA	0.16 (0.09-0.25)	0.22 (0.18-0.27)	0.232
α KGA	7.29 (6.28-8.46)	2.03 (1.76-2.33)	< 0.001

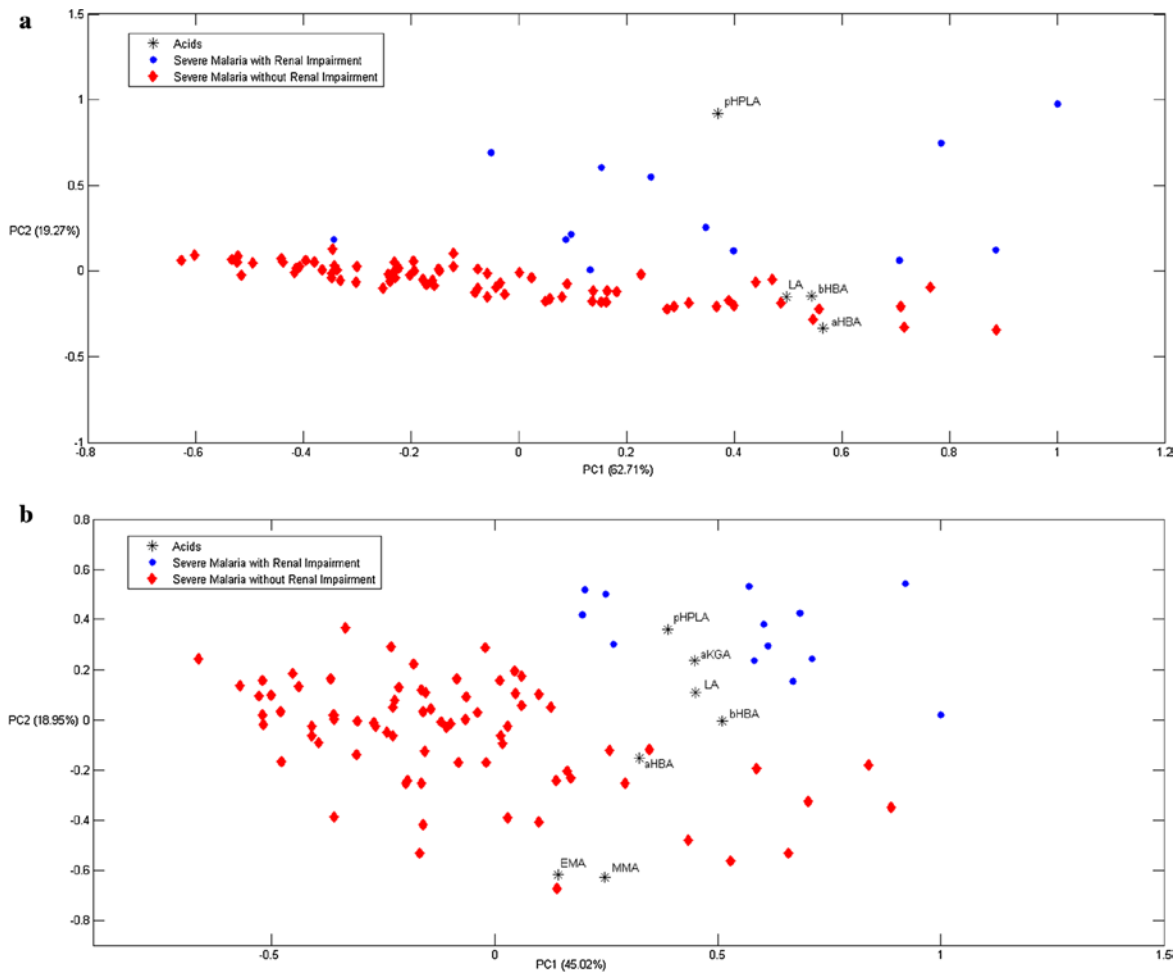
Characteristics	Severe malaria with AKI (N=13)	Severe malaria without AKI (N=77)	P value* ²
Urine concentrations			
(μ mol/L) ^c			
LA	800 (451-1420)	527 (400-696)	0.871
α HBA	21.0 (13.7-32.3)	67.0 (51.8-86.8)	0.019
β HBA	101 (86.0-120)	172 (152-194)	0.012
pHPLA	139 (102-189)	67.6 (53.6-85.2)	0.019
MMA	3.21 (2.59-3.98)	11.2 (9.38-13.4)	0.032
EMA	3.58 (2.42-5.30)	15.4 (12.4-19.1)	0.049
α KGA	242 (213-275)	218 (201-237)	0.197

²*Values are geometric mean (95% CI), except * median (IQR)

^aFor all plasma specimens, EMA, MMA, α -KGA were assayed but undetectable

^bUrine creatinine-adjusted concentrations were corrected as described in the Methods section

^cActual urine concentrations



รูปที่ 2 แสดงผล Principal Component Analysis (PCA) ของโปรไฟล์ความเข้มข้นกรด 4 ชนิด กรดแอลแลกติก (LA), กรดแอลฟาไฮดรอกซีบิวทริก (aHBA), กรดเบต้าไฮดรอกซีบิวทริก (bHBA), กรดฟีไฮดรอกซีฟีนิลแลกติก (pHPLA) จากตัวอย่างพลาสมา (a) และ โปรไฟล์ความเข้มข้นกรด 7 ชนิด กรดแอลแลกติก (LA), กรดแอลฟาไฮดรอกซีบิวทริก (aHBA), กรดแอลฟาคีโตนกลูตาริก (aKGA), กรดเบต้าไฮดรอกซีบิวทริก (bHBA), กรดฟีไฮดรอกซีฟีนิลแลกติก (pHPLA), กรดเมทิลมาโลนิค (MMA) และ กรดเอทิลมาโลนิค (EMA) จากตัวอย่างปัสสาวะ (b) ในผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรง (Severe Malaria) ที่มีและไม่มีภาวะไตวายเฉียบพลัน (Acute kidney injury)

ตารางที่ 3 (a) แสดงผล Partial Least Square Discriminant Analysis ของโปรไฟล์ความเข้มข้นกรด 4 ชนิด กรดแอลแลกติก (LA), กรดแอลฟาไฮดรอกซีบิวทิลิก (aHBA), กรดเบต้าไฮดรอกซีบิวทิลิก (bHBA), กรดพีไฮดรอกซีฟีนิลแลกติก (pHPLA) จากตัวอย่างพลาสมา ในผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรง (Severe Malaria) ที่มี และไม่มีภาวะไตวายเฉียบพลัน (Acute kidney injury)

		Predicted sample groups		
		Severe malaria with AKI	Severe malaria without AKI	Correct classification (%)
Original data set	Severe malaria with AKI	11	2	84.6
	Severe malaria without AKI	0	77	100
	Recognition ability (%)			92.3
Cross-validation	Severe malaria with AKI	11	2	84.6
	Severe malaria without AKI	0	77	100
	Predictive ability (%)			92.3

ตารางที่ 3 (b) แสดงผล Partial Least Square Discriminant Analysis ของโปรไฟล์ความเข้มข้นกรด 7 ชนิด กรดแอลแลกติก (LA), กรดแอลฟาไฮดรอกซีบีวทีลิก (aHBA), กรดแอลฟาคีโตกลูตาริก (aKGA), กรดเบต้าไฮดรอกซีบีวทีลิก (bHBA), กรดฟีไฮดรอกซีฟีนิลแลกติก (pHPLA), กรดเมทิลมาโลนิก (MMA) และ กรดเอทิลมาโลนิก (EMA) จากตัวอย่างปัสสาวะในผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรง (Severe Malaria) ที่มีและไม่มีภาวะ ไตวายเฉียบพลัน (Acute kidney injury)

		Predicted sample groups		Correct classification (%)
		Severe malaria with AKI	Severe malaria without AKI	
Original data set	Severe malaria with AKI	13	0	100
	Severe malaria without AKI	1	76	98.7
	Recognition ability (%)			99.4
Cross-validation	Severe malaria with AKI	13	0	100
	Severe malaria without AKI	1	76	98.7
	Predictive ability (%)			99.4

**HPLC
2016**

44th International Symposium on
High Performance Liquid Phase Separations
and Related Techniques



June 19-24, 2016 • Marriott San Francisco Marquis • San Francisco, CA, USA

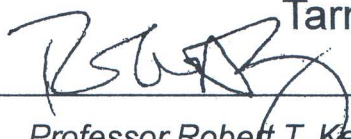
Best Poster Award

Honorable Mention Presented to:

Natthida Sriboonvorakul

Mahidol University, Bangkok, Thailand

Clinical Mass Spectrometry: Introduction to Kinetic Study of Acidosis in Patients with Severe Malaria. Natthida Sriboonvorakul, Sasithon Pukrittayakamee, Kesinee Chotivanich, Yaowalark Sukthana, Nicholas Day, Niklas P. J. Lindegardh, Nicholas J. White, Arjen Dondorp, Joel Tarning, Mahidol University, Bangkok, THAILAND


Professor Robert T. Kennedy
Chair HPLC 2016


Monika Dittmann
Agilent Technologies
HPLC 2016 Poster Committee Chair

RESEARCH

Open Access



Acidosis and acute kidney injury in severe malaria

Natthida Sriboonvorakul¹, Aniruddha Ghose⁵, M. Mahtab Uddin Hassan⁵, Md. Amir Hossain⁵, M. Abul Faiz⁵, Sasithon Pukrittayakamee¹, Kesinee Chotivanich¹, Yaowalark Sukthana², Stije J. Leopold^{3,4}, Katherine Plewes^{3,4}, Nicholas P. J. Day^{3,4}, Nicholas J. White^{3,4}, Joel Tarning^{3,4} and Arjen M. Dondorp^{3,4*}

Abstract

Background: In severe falciparum malaria metabolic acidosis and acute kidney injury (AKI) are independent predictors of a fatal outcome in all age groups. The relationship between plasma acids, urine acids and renal function was investigated in adult patients with acute falciparum malaria.

Methods: Plasma and urinary acids which previously showed increased concentrations in proportion to disease severity in patients with severe falciparum malaria were quantified. Patients with uncomplicated malaria, sepsis and healthy volunteers served as comparator groups. Multiple regression and multivariate analysis were used to assess the relationship between organic acid concentrations and clinical syndromes, in particular AKI.

Results: Patients with severe malaria ($n = 90$), uncomplicated malaria ($n = 94$), non-malaria sepsis ($n = 19$), and healthy volunteers ($n = 61$) were included. Univariate analysis showed that both plasma and creatinine-adjusted urine concentrations of *p*-hydroxyphenyllactic acid (pHPLA) were higher in severe malaria patients with AKI ($p < 0.001$). Multiple regression analysis, including plasma or creatinine-adjusted urinary acids, and PfHRP2 as parasite biomass marker as independent variables, showed that pHPLA was independently associated with plasma creatinine ($\beta = 0.827$) and urine creatinine ($\beta = 0.226$). Principal component analysis, including four plasma acids and seven urinary acids separated a group of patients with AKI, which was mainly driven by pHPLA concentrations.

Conclusions: Both plasma and urine concentrations of pHPLA closely correlate with AKI in patients with severe falciparum malaria. Further studies will need to assess the potential nephrotoxic properties of pHPLA.

Keywords: Severe malaria, Acidosis, Acute kidney injury

Background

Severe malaria caused by *Plasmodium falciparum* remains a major cause of death in the tropics, with an estimated 429,000 deaths in 2015 [1]. The major manifestations of severe malaria, which independently predict fatal outcome in both adults and children, include coma (cerebral malaria), acidosis and renal dysfunction [2–5]. Coma in cerebral malaria is characterized by an absence of localizing neurological signs, and full recovery in most

adults and the majority of children if patients survive. Acidosis in severe malaria is primarily a lactic acidosis, resulting from anaerobic glycolysis as a result of micro-circulatory impairment caused by sequestered parasitized red cells. This is compounded by reduced hepatic lactate clearance [6]. But lactic acid comprises less than half of the acid load, whereas these incompletely characterized additional acids are an independent prognosticator for a fatal outcome [7]. Acute kidney injury (AKI) is common in adult severe malaria, and may be under-recognized in paediatric patients [8, 9]. The pathology of AKI is characterized by acute tubular injury, associated with an accumulation of parasitized red cells and mononuclear cells in the glomerular and peritubular capillaries with a contribution of haem-mediated oxidative damage

*Correspondence: arjen@tropmedres.ac

³ Mahidol-Oxford Tropical Medicine Research Unit, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, 420/6 Rajvithi Road, Bangkok 10400, Thailand

Full list of author information is available at the end of the article

[10–12]. Metabolic acidosis and AKI are interrelated, since renal dysfunction causes accumulation of acids normally excreted or metabolized by the kidney. Indeed, in severe malaria plasma creatinine is an independent predictor of acidosis [6]. The plasma concentration of an acid, or other biomarkers of severity may therefore reflect either increased production, reduced clearance or both. Adjusting the plasma concentration for plasma creatinine only corrects for concomitant renal dysfunction if the acid or biomarker has similar renal clearance dynamics as creatinine, including similar renal filtration, re-absorption and secretion. For many biomarkers these properties have not been assessed.

The current study reports a secondary data analysis on plasma and urine organic acids elevated in adult patients with falciparum malaria and sepsis [13, 14], and relates these to organ failure in severe malaria, in particular AKI.

Methods

Patients and sample collection

Details of the study have been described previously in detail [13, 14]. Written informed consent was obtained from all participants in the study or from their attending relative for incapacitated patients. Consecutive adult patients with slide-proven severe falciparum malaria admitted at Chittagong Medical College Hospital, Chittagong, Bangladesh, were recruited in the study. Pregnant women were excluded from the study. In addition, a sub-set of Bangladeshi patients with other sepsis syndromes with acidosis and with uncomplicated falciparum malaria were included in the study. In addition, a group of healthy controls were recruited from the local population, screened by a physical exam and basic laboratory testing.

Severe malaria was classified by modified World Health Organization (WHO) criteria [15]. AKI was defined by a plasma creatinine > 265 µmol/l, coma as a Glasgow Coma Score (GCS) < 11 and a high parasite biomass by a plasma concentration of *P. falciparum* histidine-rich protein 2 (PfHRP2) > 1000 ng/ml [16].

Non-malaria sepsis was defined by a blood film negative for malaria of all species, clinical suspicion of bacterial infection, based on history, examination and, when available, complete blood count and other investigations, a standard base deficit (SBD) ≥ 3 mEq/l and 2 or more of the following four criteria: (1) heart rate > 90 beats per minute; (2) respiratory rate > 20 breaths per minute; (3) systolic blood pressure < 90 mmHg; and/or, (4) GCS score < 15. Recruitment in this study was prior to the recently adopted updated criteria for sepsis [17].

Healthy volunteers were screened by microscopy for absence of *Plasmodium* parasites. Ethical approval for this observational study was provided by the Chittagong

Medical College Hospital Ethical Review Committee and the Oxford Tropical Research Ethics Committee.

Analytical methods

The analytical method for quantifying organic acids in human plasma and urine have been described previously [13]. Selection of acids was based on their increased plasma and urine concentrations observed in a pilot study and included L-lactic acid (LA), α-hydroxybutyric acid (αHBA), β-hydroxybutyric acid (βHBA) and *p*-hydroxyphenyllactic acid (pHPLA). In addition, methylmalonic (MMA), ethylmalonic (EMA) and α-ketoglutaric acids (αKGA) were quantified only in urine, because concentrations in plasma were lower than the limit of detection [13]. Samples were purified initially by high-throughput strong anion exchange solid-phase extraction in a 96-well plate format. Reconstituted extracts were separated, detected and quantified by hydrophilic interaction liquid chromatography (HILC) coupled to negative mass spectrometry (MS). The LC–MS method was validated according to US Food and Drug Administration guidelines [13]. Measured urine concentrations were corrected for renal function by adjusting for urine and plasma creatinine concentrations, as described previously [18]

$$[A]_{\text{urine-corrected}} = [A]_{\text{urine}} \times \frac{[\text{Creatinine}]_{\text{plasma}}}{[\text{Creatinine}]_{\text{urine}}}.$$

Peripheral blood parasitaemia was assessed by microscopy from peripheral blood slides stained according to Field's method. Plasma PfHRP2 concentration was assessed by a commercial sandwich enzyme-linked immunosorbent assay kit (ELISA) (Cell Labs, Brookvale, Australia), as described previously [19].

Plasma PfHRP2, released by the parasitized red blood cell at schizont rupture, is a surrogate measure of the total body parasite biomass, which includes the sequestered biomass [19].

Statistical methods

Plasma and corrected urine acid concentrations were log-normalized. Acid concentrations were compared initially between disease groups and disease manifestations. The four groups (severe malaria, uncomplicated malaria, non-malaria sepsis, healthy) were compared by analysis of variance (ANOVA). Student's *t* test was used where only two participant groups were compared. Multiple regression models were assessed for plasma and urinary acids, PfHRP2 as independent variables, and plasma or urinary creatinine as dependent variable. For the multiple regression analysis, acid concentrations were log-transformed toward normality before analysis. All variables in univariate analysis were initially included in the model

then backward stepwise selection was performed, removing variables with $\alpha \geq 0.05$ and using optimal value of Akaike's information criterion (AIC) and Bayesian information criterion (BIC) in the model.

Further multivariate statistical analyses relating acid concentrations to disease states included principal component analysis (PCA) and partial least square discrimination analysis (PLSDA). PCA analysis was used to visualize clustering for specific disease profiles, including presence of AKI, coma and parasite biomass. PLSDA analysis was then used to create prediction models to classify unknown samples.

Analyses were performed with STATA/IC 12.0 software (StataCorp, College Station, TX, USA), MATLAB version 7.11 software (MathWorks, Natick, MA, USA) and GraphPad PRISM® version 5.03 (GraphPad Software Inc, CA, USA).

Results

Patient characteristics and univariate analysis

Baseline clinical and laboratory characteristics are summarized in Table 1. The concentrations of plasma and corrected urinary LA, α HBA, β HBA, and pHPLA were higher in patients with severe malaria compared to

Table 1 Baseline clinical and laboratory

Characteristics	Severe malaria N = 90	Uncomplicated malaria N = 94	Sepsis N = 19	Healthy N = 61 ^d	p value
Male, n (%)	63 (70%)	74 (79%)	9 (47%)		0.009
Age (year)*	32 (25–45)	29 (21–45)	35 (25–48)		0.205
Glasgow Coma Scale score*	10 (8–14)	15 (15–15)	14 (8–15)		<0.001
GCS score < 11, n (%)	59/90 (66%)	0 (0%)	6/19 (32%)		
Parasitaemia (count/ μ l)	41,929 (26,191–67,127)	10,287 (5959–17,758)			<0.001
PfHRP2 (ng/ml)	1740 (1333–2272)	240.3 (167.8–344.1)			<0.001
Total bilirubin (mg/dl)	2.8 (2.3–3.5, 0.2–44.2)	1.1 (0.9–1.4, 0.2–28.3)	0.94 (0.59–1.49)		<0.001
Creatinine (mg/dl)	1.48 (1.34–1.65)	0.95 (0.89–1.01)	1.68 (1.25–2.26)		<0.001
Acute kidney injury (creatinine > 3 mg/dl), n (%)	13/90 (14%)	0/94 (0%)	4/19 (21%)		
Plasma concentration (μ mol/l) ^a					
LA	4587 (4028–5223)	2246 (2080–2426)	2849 (2148–3779)	1111 (1088–1133)	<0.001
α HBA	118.7 (106–133)	63.07 (56.58–70.3)	107.7 (86.2–134.6)	22.18 (21.19–23.21)	<0.001
β HBA	139.0 (126.1–153.1)	101.9 (91.28–113.7)	247.9 (160.4–383.2)	71.37 (69.43–73.37)	<0.001
pHPLA	9.73 (8.51–11.11)	5.85 (5.57–6.15)	8.24 (6.97–9.73)	1.06 (0.99–1.14)	<0.001
Corrected urine concentrations (μ mol/mmol CrCl) ^{a, b}					
LA	9.94 (7.54–13.09)	2.85 (2.32–3.49)	13.82 (4.76–40.1)		<0.001
α HBA	0.95 (0.73–1.25)	0.63 (0.51–0.78)	1.07 (0.55–2.09)		0.063
β HBA	2.56 (2.17–3.03)	1.88 (1.57–2.26)	4.61 (2.13–9.96)		0.003
pHPLA	1.42 (1.09–1.86)	0.48 (0.34–0.66)	0.83 (0.30–2.29)		<0.001
MMA	0.14 (0.12–0.17)	0.23 (0.19–0.28)	0.15 (0.11–0.22)		<0.001
EMA	0.21 (0.17–0.25)	0.34 (0.27–0.43)	0.32 (0.21–0.48)		0.005
α KGA	2.44 (2.09–2.85)	2.16 (1.89–2.47)	4.31 (2.77–6.70)		<0.001
Urine concentrations (μ mol/l) ^c					
LA	560.0 (436.3–718.7)	166.8 (140.0–198.7)	370.7 (196.7–698.7)	247.6 (221.1–277.2)	<0.001
α HBA	56.58 (44.39–72.12)	35.97 (29.98–43.16)	35.44 (23.43–53.59)	90.71 (80.0–102.8)	<0.001
β HBA	159.4 (142.2–178.7))	127.0 (114.4–140.9)	252.3 (168.7–377.3)	122.1 (115.3–129.2)	0.007
pHPLA	74.98 (60.85–92.40)	26.31 (20.73–33.40)	28.57 (17.75–45.97)	21.76 (16.29–29.08)	<0.001
MMA	10.19 (8.51–12.20)	13.32 (11.20–15.84)	6.99 (4.53–10.79)	24.25 (20.79–28.28)	<0.001
EMA	13.22 (10.63–16.45)	19.70 (15.83–24.52)	11.79 (7.51–18.53)	45.34 (36.54–56.26)	<0.001
α KGA	218.0 (201.5–235.9)	220.8 (201.9–241.4)	250.1 (190.8–327.8)	UD	<0.001

Values are geometric mean (95% CI), except * median (IQR)

^a For all plasma specimens, EMA, MMA, α -KGA were assayed but undetectable

^b Urine creatinine-adjusted concentrations were corrected as described in the “Methods” section

^c Actual urine concentrations

^d For healthy participants, clinical parameters and creatinine values were not available

uncomplicated malaria. Creatinine-corrected urinary concentrations of LA, α HBA, β HBA, pHPLA, MMA, EMA and α KGA were also higher in patients with severe compared to uncomplicated malaria.

Plasma and urine acid concentrations in patients with severe malaria according to the presence of AKI are summarized in Table 2. In the univariate analysis, plasma concentrations of pHPLA and β HBA were higher in patients with AKI. Of these acids, only pHPLA concentrations were also increased in the urine of patients with AKI. When adjusted for urine creatinine concentrations, the urine concentrations of LA, β HBA, pHPLA, and α KGA were all increased in patients with AKI. In contrast, urine concentrations of α HBA, MMA and EMA were lower in patients with AKI. Univariate analysis of acid profiles according to presence of coma (as GCS<11)

Table 2 Plasma and urine concentrations of organic acids detected in patients with severe malaria with or without acute kidney injury (AKI)

Characteristics	Severe malaria with AKI (N = 13)	Severe malaria without AKI (N = 77)	p value
Plasma concentration ($\mu\text{mol/l}$) ^a			
LA	6406 (4816–8520)	4335 (3760–4998)	0.066
α HBA	142 (107–188)	115 (102–131)	0.348
β HBA	178 (133–238)	133 (120–148)	0.043
pHPLA	33.8 (22.5–50.7)	7.88 (7.36–8.45)	<0.001
Urine creatinine adjusted concentrations ($\mu\text{mol/mmol CrCl}$) ^{a, b}			
LA	50.7 (30.4–84.5)	7.55 (5.78–9.86)	<0.001
α HBA	1.33 (0.86–2.06)	0.90 (0.66–1.22)	0.577
β HBA	5.94 (4.52–7.80)	2.22 (1.87–2.64)	<0.001
pHPLA	8.80 (6.17–12.5)	1.04 (0.82–1.33)	<0.001
MMA	0.11 (0.07–0.17)	0.15 (0.12–0.18)	0.245
EMA	0.16 (0.09–0.25)	0.22 (0.18–0.27)	0.232
α KGA	7.29 (6.28–8.46)	2.03 (1.76–2.33)	<0.001
LA	800 (451–1420)	527 (400–696)	0.871
α HBA	21.0 (13.7–32.3)	67.0 (51.8–86.8)	0.019
β HBA	101 (86.0–120)	172 (152–194)	0.012
pHPLA	139 (102–189)	67.6 (53.6–85.2)	0.019
MMA	3.21 (2.59–3.98)	11.2 (9.38–13.4)	0.032
EMA	3.58 (2.42–5.30)	15.4 (12.4–19.1)	0.049
α KGA	242 (213–275)	218 (201–237)	0.197

For plasma specimens, undetectable concentrations were treated as half the lower limit of detection to allow inclusion in intergroup comparisons. For creatinine-corrected urine concentrations, undetectable values were treated as half the lowest value calculated from a detectable specimen. Values are geometric mean (95% CI)

GCS, Glasgow Coma Scale; geo mean, geometric mean; Hb, haemoglobin; PfHRP2, *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2; UD, undetectable; LA, lactic acid; HPLA, hydroxyphenyllactic acid; α -HBA, α -hydroxybutyric acid; β -HBA, β -hydroxybutyric acid; EMA, ethylmalonic acid; MMA, methylmalonic acid; α -KGA, α -ketoglutaric acid; CrCl, creatinine clearance

^a For all plasma specimens, EMA, MMA, α -KGA were assayed but undetectable

^b Urine creatinine-adjusted concentrations were corrected as described in the “Methods” section

or high parasite biomass (reflected by elevated plasma PfHRP2 concentrations) did not show differences in acid concentrations in patients with or without either syndrome (Additional file 1: Table S1a and Table S1b).

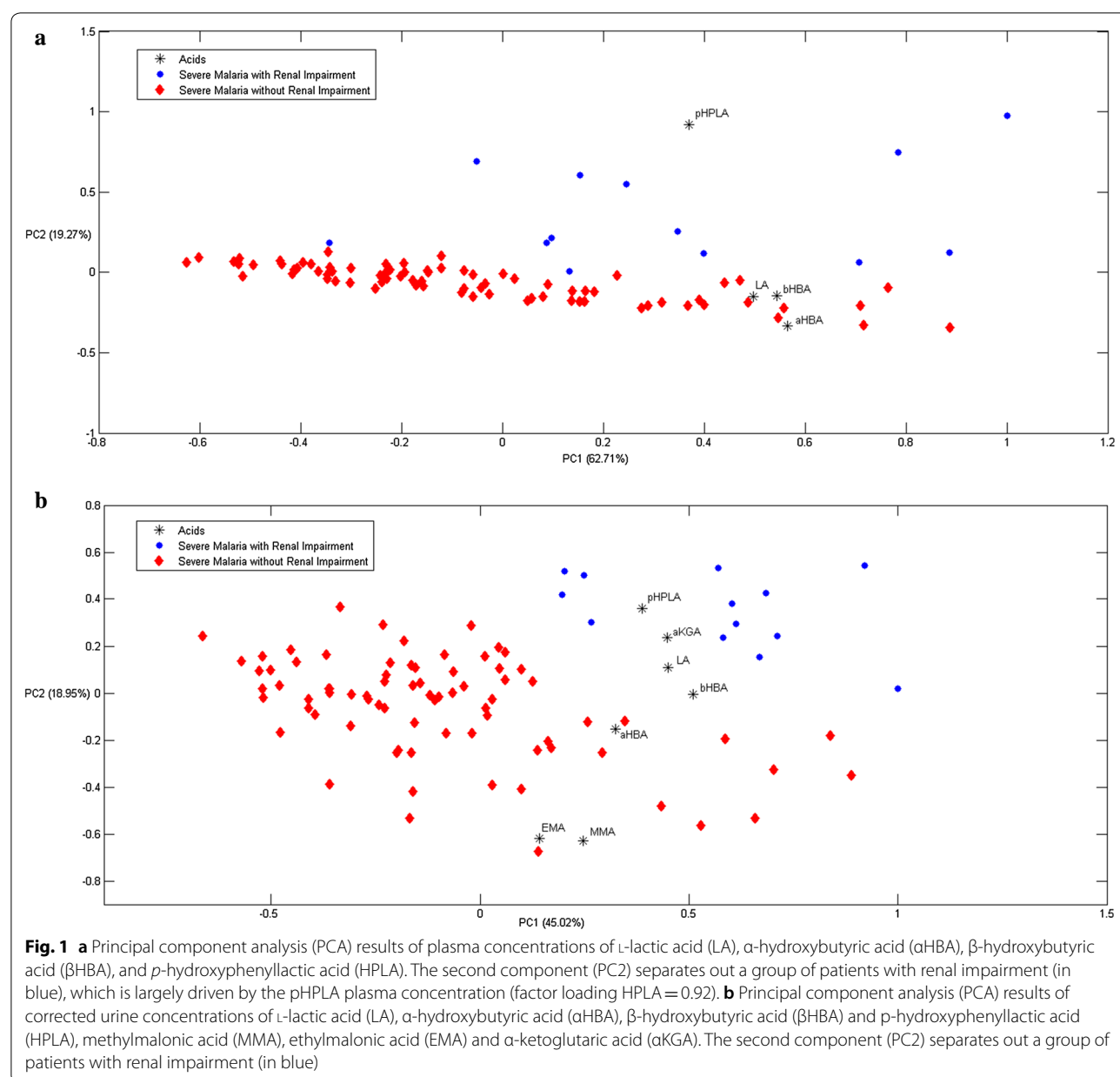
The (log) plasma concentrations of pHPLA correlated with (log) plasma concentrations of PfHRP2, ($r=0.57$, $p<0.001$). The (log) corrected urine concentration of pHPLA also correlated with plasma PfHRP2 ($r=0.38$, $p<0.001$), whereas the unadjusted pHPLA urine concentrations did not ($r=-0.024$, $p=0.835$). The (log) plasma concentrations of pHPLA also correlated with the (log) plasma total bilirubin concentrations ($r=0.46$, $p<0.001$).

Multiple regression and multivariate analysis

In patients with severe malaria, applying linear multiple regression models with (log) plasma creatinine as dependent variable, including plasma acids (LA, α HBA, β HBA, pHPLA) and plasma PfHRP2 as marker for total parasite burden as independent variables, plasma pHPLA and LA were retained in the model (Additional file 1: Table S2). In the model, pHPLA was associated most strongly with plasma creatinine ($\beta=0.827$).

In patients with sepsis, linear regression models with (log) plasma creatinine as dependent variable, including plasma acids (LA, α HBA, β HBA, pHPLA) as independent variables (Additional file 1: Table S3), only the (log) plasma pHPLA concentration was correlated with the (log) plasma creatinine ($r=0.26$, $p=0.007$) and plasma pHPLA was associated most strongly with plasma creatinine, with $\beta=0.849$. Plasma LA, α HBA and β HBA did not show a correlation.

Principal component analysis analysis was performed to assess clustering of acids with certain disease manifestations (presence of AKI, coma and high parasite biomass) (Fig. 1 and Additional file 1: Figures S3–S6). In patients with AKI, clear clustering could be observed. PCA analysis including all four acids assessed in plasma separated a group of patients with AKI along the PC2 axis (Fig. 1a). Related factor loading results for the PC2 component were: LA = -0.15 , α HBA = -0.33 , β HBA = -0.15 , and pHPLA = 0.92 , which shows that the separation was mainly driven by the HPLA plasma concentrations. When plasma creatinine was included in the PCA analysis, a similar separation was apparent (Additional file 1: Figure S1), with factor loading results for the PC2 component of -0.65 for creatinine and -0.51 for pHPLA. PCA analysis including urine concentration of seven acids (corrected for creatinine) also showed separation of patients with AKI along the PC2 axis (Fig. 1b). The related factor loading results for the PC2 component were: LA = 0.11 , α HBA = -0.15 , β HBA = 0.00 , HPLA = 0.36 , MMA = -0.63 , EMA = -0.62 , and α KGA = 0.24 , showing that pHPLA together with LA, β HBA and α KGA were



the main drivers of the separation. When urinary creatinine was included in the PCA analysis, a similar separation was apparent (Additional file 1: Figure S2). PLSDA including plasma and urine acid concentrations, showed a high recognition ability for AKI of 92.3% for plasma acids and 99.4% for urinary acids. The leave-one-out cross validation method (LOOCV) showed similar high recognition ability (Additional file 1: Tables S4a, b).

Discussion

In patients with severe falciparum malaria the concentrations of several small organic acids are increased compared to patients with uncomplicated malaria and

healthy controls. Apart from lactic acid, concentrations of pHPLA, αHBA and βHBA in plasma and pHPLA, αHBA, βHBA, MMA, EMA, and αKGA in urine are all elevated [14]. In this secondary analysis the relationships between these acid concentrations and specific organ involvement, in particular AKI, were assessed in more detail.

Increased concentrations of plasma LA, βHBA and pHPLA were observed in severe malaria patients with AKI compared to patients without AKI. The main source of plasma lactate in severe malaria is from anaerobic glycolysis in the human host caused by blockage of the microcirculation by sequestered parasitized red

blood cells and compounded by reduced hepatic clearance [6, 7, 20]. *Plasmodium falciparum* parasites also produce lactate, but this is thought to be a minor contribution to the total lactate concentration [7]. Plasma lactate and AKI both have strong prognostic significance for death in severe malaria.

Urinary lactate concentrations were also increased in severe malaria patients with AKI. In healthy subjects, creatinine has limited tubular re-absorption and negligible tubular secretion, whereas lactate is fully filtered by the glomerulus [21] and then almost completely re-absorbed in the proximal tubule [21]. Tubular re-absorption of lactate might be disturbed in severe malaria patients with AKI, characterized by acute tubular injury. Increased renal production of lactate is another possible contributor, related to the extensive sequestration of parasitized red blood cells in renal vessels, shown in *post-mortem* autopsy studies of severe malaria-related AKI [11], whereas the medulla of the kidney is already scarcely vascularized.

β HBA is a ketoacid generated from human free fatty acid metabolism, which becomes an energy source during fasting, dysregulated type I diabetes, and other disease states. Patients with severe malaria have usually been fasting for an extended period, and there is a high metabolic demand related to the severe febrile illness. As previously shown, plasma concentrations of β HBA are elevated in severe *falciparum* malaria, provided ketogenesis has not been suppressed by quinine-induced insulin secretion, and correlate well with plasma creatinine concentrations ($r=0.68$, $p=0.001$) [14, 22–24].

Ketogenesis can also occur in the kidney, which might contribute to the increased urine concentrations of β HBA adjusted for plasma and urinary creatinine concentrations.

In the present study, an increase in both plasma and urinary concentrations of pHPLA in patients with severe malaria was shown, strongly correlating with the presence of AKI. This indicates that pHPLA production is increased in these patients, although reduced hepatic clearance could also have contributed. The renal handling of pHPLA has not been well characterized, so it cannot be excluded that the increased urine concentrations are explained by reduced renal tubular re-absorption of glomerular-filtered pHPLA. Local renal production of pHPLA is an alternative explanation. pHPLA is derived from *p*-hydroxyphenylpyruvic (pHPPA) acid and a product in the phenylalanine and tyrosine pathways. Plasma phenylalanine (an indirect precursor of pHPPA) has shown to be increased in adult patients with severe malaria [25]. Both the human host and *P. falciparum* produce pHPLA (Human Metabolome Database (HMDB)

[26]. The human gut flora produces the D-isomer of pHPLA, and is thus another potential source. The LC–MS method used in the current study cannot distinguish between D and L-form isomers. Plasma *Pf*HRP2 and pHPLA concentrations were correlated and might suggest *P. falciparum* as a potential source of pHPLA in patients with severe malaria. However, a positive correlation with *Pf*HRP2 may also reflect increased sequestration in the gut microvasculature, causing increased translocation of gut microbioma and their products.

In the PCA analysis, pHPLA was a strong driver for clustering on the PC2 axis patients with AKI, which was confirmed by PLSDA analysis. pHPLA remained a significant driver separating the patients with AKI, even when creatinine was added as a variable in the PCA analysis. The results suggest that pHPLA is not merely a biomarker for AKI, but also could contribute to renal dysfunction in patients with severe *falciparum* malaria. The pathogenesis of AKI in severe malaria is multifactorial. Free haemoglobin associated oxidative damage to the renal tubules is thought to be an important contributor [10]. In a large autopsy series, microvascular sequestration of parasitized red blood cells in the peritubular capillaries is observed, which could impair the already vulnerable circulation of the renal medulla. Locally parasite-produced pHPLA could be an additional contributor to renal tubular injury. In patients with tyrosinemia, pHPLA accumulates, and renal tubular damage is common in this disease [27]. In addition, pHPLA has been implicated as a cause of tubular damage in Fanconi syndrome, although alternative mechanisms have also been proposed [28]. Assessment of the sources of pHPLA in severe *falciparum* malaria, and its contribution to renal damage will need further investigation, including animal studies, metabolomic studies in *P. falciparum*, and detailed kinetic studies in patients, distinguishing the L- and D-isomers of pHPLA.

Limitations of the study include the focus on a limited number of acids selected by the column used for extraction. Although during the development phase several columns were compared [13], it cannot be excluded that additional contributing small organic acids have been missed. The number of sepsis patients was limited in this study, and the causing microorganisms were not identified, because of the limited local diagnostic capacity. This precludes drawing firm conclusions in this patient group. In addition, 24-h urines were not collected in the study, so that the total quantity of excreted acids could not be estimated accurately. Correcting the urine acid concentration for urine creatinine concentration partly circumvents this problem, but assumes similar renal clearance mechanisms of these compounds.

Conclusions

This secondary analysis of organic acid concentrations in patients with falciparum malaria shows that both plasma and urine concentrations of pHPLA are independently correlated with AKI, suggesting a possible causative contribution of pHPLA to AKI. This hypothesis will now need further testing.

Additional file

Additional file 1: Figure S1. Principal Component Analysis (PCA) results of plasma concentrations of L-lactic acid (LA), α -hydroxybutyric acid (α HBA), β -hydroxybutyric acid (β HBA) and p-hydroxyphenyllactic acid (pHPLA) with plasma creatinine of severe malaria patients with AKI (in blue) and without AKI (in red). **Figure S2.** Principal Component Analysis (PCA) results of corrected urine concentrations of L-lactic acid (LA), α -hydroxybutyric acid (α HBA), β -hydroxybutyric acid (β HBA), p-hydroxyphenyllactic acid (pHPLA), methylmalonic acid (MMA), ethylmalonic acid (EMA) and α -ketoglutaric acid (α KGA) with urinary creatinine of severe malaria patients with AKI (in blue) and without AKI (in red). **Figure S3.** Principal Component Analysis (PCA) results of plasma concentrations of L-lactic acid (LA), α -hydroxybutyric acid (α HBA), β -hydroxybutyric acid (β HBA) and p-hydroxyphenyllactic acid (pHPLA) of severe malaria patients with coma (in blue) and without coma (in red). **Figure S4.** Principal Component Analysis (PCA) results of corrected urine concentrations of L-lactic acid (LA), α -hydroxybutyric acid (α HBA), β -hydroxybutyric acid (β HBA), p-hydroxyphenyllactic acid (pHPLA), methylmalonic acid (MMA), ethylmalonic acid (EMA) and α -ketoglutaric acid (α KGA) of severe malaria patients with coma (in blue) and without coma (in red). **Figure S5.** Principal Component Analysis (PCA) results of plasma concentrations of L-lactic acid (LA), α -hydroxybutyric acid (α HBA), β -hydroxybutyric acid (β HBA) and p-hydroxyphenyllactic acid (pHPLA) of severe malaria patients with high parasite biomass (in blue) and without high parasite biomass (in red). **Figure S6.** Principal Component Analysis (PCA) results of corrected urine concentrations of L-lactic acid (LA), α -hydroxybutyric acid (α HBA), β -hydroxybutyric acid (β HBA), p-hydroxyphenyllactic acid (pHPLA), methylmalonic acid (MMA), ethylmalonic acid (EMA) and α -ketoglutaric acid (α KGA) of severe malaria patients with high parasite biomass (in blue) and without high parasite biomass (in red). **Figure S7.** Principal Component Analysis (PCA) results of uncorrected urine concentrations of L-lactic acid (LA), α -hydroxybutyric acid (α HBA), β -hydroxybutyric acid (β HBA), p-hydroxyphenyllactic acid (pHPLA), methylmalonic acid (MMA), ethylmalonic acid (EMA) and α -ketoglutaric acid (α KGA) of severe malaria patients with AKI (in blue) and without AKI (in red). **Figure S8.** Principal Component Analysis (PCA) results of uncorrected urine concentrations of L-lactic acid (LA), α -hydroxybutyric acid (α HBA), β -hydroxybutyric acid (β HBA), p-hydroxyphenyllactic acid (pHPLA), methylmalonic acid (MMA), ethylmalonic acid (EMA) and α -ketoglutaric acid (α KGA) with urinary creatinine of severe malaria patients with AKI (in blue) and without AKI (in red). **Table S1a.** Plasma and urine concentration range of organic acids detected in patients with severe malaria with coma (+/-). **Table S1b.** Plasma and urine concentration range of organic acids detected in patients with severe malaria with high biomass (+/-). **Table S2.** Summary of linear regression models in patients with severe falciparum malaria (N = 90), with plasma PfHRP2 concentrations and plasma or urinary acid concentrations as independent variables, and plasma or urinary creatinine concentrations as dependent variable. **Table S3.** Summary of linear regression models in patients with sepsis (N = 19), with plasma PfHRP2 concentrations and plasma or urinary acid concentrations as independent variables, and plasma or urinary creatinine concentrations as dependent. **Table S4a.** Partial Least Square Discriminant Analysis classification results of plasma concentration of 4 acids. **Table S4b.** Partial Least Square Discriminant Analysis classification results of corrected urine concentration of 7 acids.

Authors' contributions

NS and AMD drafted the manuscript. NS and JT devised and performed LC-MS analyses. NS, JT and ADM devised and performed chemometrics. NJW, NPJD, JT, and AMD conceived of the study. AMD, AG, SM, MMUH, MAH, MAF, SM, SJL, and KP provided clinical sample, data collection and input on the analysis. AMD, NW, NPJD, JT, SP, KC, and YS supported all work and interpretation data. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹ Department of Clinical Tropical Medicine, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok, Thailand. ² Department of Protozoology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok, Thailand. ³ Mahidol-Oxford Tropical Medicine Research Unit, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, 420/6 Rajvithi Road, Bangkok 10400, Thailand. ⁴ Centre for Tropical Medicine, Nuffield Department of Clinical Medicine, University of Oxford, Oxford, UK. ⁵ Chittagong Medical College Hospital, Chittagong, Bangladesh.

Acknowledgements

Special thanks to The Thailand Research Fund, Office of the Higher Education Commission and Mahidol University (MRG5980038). This study was part of the Wellcome Trust Mahidol University Oxford Tropical Medicine Research Programme supported by the Wellcome Trust. Sincere appreciation is expressed to Assist. Prof. Dr. Kanet Wongravee for Chemometrics advice and Atthanee Jeeyapant for statistical advice.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Availability of data and materials

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

Ethical approval for this observational study was provided by the Chittagong Medical College Hospital Ethical Review Committee and the Oxford Tropical Research Ethics Committee.

Funding

The Thailand Research Fund, Office of the Higher Education Commission and Mahidol University (MRG5980038) and the Wellcome Trust of Great Britain [Grant Number 089275/Z/09/Z].

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 13 December 2017 Accepted: 14 March 2018

Published online: 23 March 2018

References

1. WHO. World malaria report. Geneva: World Health Organization; 2016.
2. White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, Faiz MA, Mokuolu OA, Dondorp AM. Malaria. *Lancet*. 2013;383:723–35.
3. Dondorp AM, Lee SJ, Faiz MA, Mishra S, Price R, Tjitra E, et al. The relationship between age and the manifestations of and mortality associated with severe malaria. *Clin Infect Dis*. 2008;47:151–7.
4. Von Seidlein L, Olaosebikan R, Hendriksen IC, Lee SJ, Adedoyin OT, Agbenyega T, et al. Predicting the clinical outcome of severe falciparum malaria in african children: findings from a large randomized trial. *Clin Infect Dis*. 2012;54:1080–90.
5. Sypniewska P, Duda JF, Locatelli I, Althaus CR, Althaus F, Genton B. Clinical and laboratory predictors of death in African children with features

- of severe malaria: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med*. 2017;15:147.
6. Day NP, Phu NH, Mai NT, Chau TT, Loc PP, Chuong LV, et al. The pathophysiologic and prognostic significance of acidosis in severe adult malaria. *Crit Care Med*. 2000;28:1833–40.
 7. Dondorp AM, Chau TTH, Phu NH, Mai NTH, Loc PP, Chuong LV, et al. Unidentified acids of strong prognostic significance in severe malaria. *Crit Care Med*. 2004;32:1683–8.
 8. Trang TT, Phu NH, Vinh H, Hien TT, Cuong BM, Chau TT, et al. Acute renal failure in patients with severe falciparum malaria. *Clin Infect Dis*. 1992;15:874–80.
 9. Conroy AL, Hawkes M, Elphinstone RE, Morgan C, Hermann L, Barker KR, et al. Acute kidney injury is common in pediatric severe malaria and is associated with increased mortality. *Open Forum Infect Dis*. 2016;3:046.
 10. Plewes K, Kingston HWF, Ghose A, Maude RJ, Herdman MT, Leopold SJ, et al. Cell-free hemoglobin mediated oxidative stress is associated with acute kidney injury and renal replacement therapy in severe falciparum malaria: an observational study. *BMC Infect Dis*. 2017;17:313.
 11. Nguansangiam S, Day NP, Hien TT, Mai NT, Chaisri U, Riganti M, et al. A quantitative ultrastructural study of renal pathology in fatal *Plasmodium falciparum* malaria. *Trop Med Int Health*. 2007;12:1037–50.
 12. Plewes K, Royakkers AA, Hanson J, Hasan MM, Alam S, Ghose A, Maude RJ, et al. Correlation of biomarkers for parasite burden and immune activation with acute kidney injury in severe falciparum malaria. *Malar J*. 2014;13:91.
 13. Sriboonvorakul N, Leepipatpiboon N, Dondorp AM, Pouplin T, White NJ, Tarning J, et al. Liquid chromatographic-mass spectrometric method for simultaneous determination of small organic acids potentially contributing to acidosis in severe malaria. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2013;941:116–22.
 14. Herdman MT, Sriboonvorakul N, Leopold SJ, Douthwaite S, Mohanty S, Hassan MM, et al. The role of previously unmeasured organic acids in the pathogenesis of severe malaria. *Crit Care*. 2015;19:317.
 15. Tran TH, Day NP, Nguyen HP, Nguyen TH, Tran TH, Pham PL, et al. A controlled trial of artemether or quinine in Vietnamese adults with severe falciparum malaria. *N Engl J Med*. 1996;335:76–83.
 16. Hendriksen IC, Mwanga-Amumpaire J, von Seidlein L, Mtoto G, White LJ, Olaosebikan R, et al. Diagnosing severe falciparum malaria in parasitaemic African children: a prospective evaluation of plasma PfHRP2 measurement. *PLoS Med*. 2012;9:1001297.
 17. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016;315:801–10.
 18. Charunwatthana P, Abul Faiz M, Ruangveerayut R, Maude RJ, Rahman MR, Roberts LJ, et al. N-acetylcysteine as adjunctive treatment in severe malaria: a randomized, double-blinded placebo-controlled clinical trial. *Crit Care Med*. 2009;37:516–22.
 19. Dondorp AM, Desakorn V, Pongtavornpinyo W, Sahassananda D, Silamut K, Chotivanich K, et al. Estimation of the total parasite biomass in acute falciparum malaria from plasma PfHRP2. *PLoS Med*. 2005;2:204.
 20. Pukrittayakamee S, Krishna S, Ter Kuile F, Wilaiwan O, Williamson DH, White NJ. Alanine metabolism in acute falciparum malaria. *Trop Med Int Health*. 2002;7:911–8.
 21. Hohmann B, Frohnert PP, Kinne R, Baumann K. Proximal tubular lactate transport in rat kidney: a micropuncture study. *Kidney Int*. 1974;5:261–70.
 22. White NJ, Warrell DA, Chanthavanich P, Looareesuwan S, Warrell MJ, Krishna S, et al. Severe hypoglycemia and hyperinsulinemia in falciparum malaria. *N Engl J Med*. 1983;309:61–6.
 23. White NJ, Miller KD, Marsh K, Berry CD, Turner RC, Williamson DH, et al. Hypoglycaemia in African children with severe malaria. *Lancet*. 1987;1:708–11.
 24. Sasi P, English M, Berkley J, Lowe B, Shebe M, Mwakesi R, et al. Characterisation of metabolic acidosis in Kenyan children admitted to hospital for acute non-surgical conditions. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2006;100:401–9.
 25. Lopansri BK, Anstey NM, Stoddard GJ, Mwaikambo ED, Boutlis CS, Tjitra E, et al. Elevated plasma phenylalanine in severe malaria and implications for pathophysiology of neurological complications. *Infect Immun*. 2006;74:3355–9.
 26. Park YH, Shi YP, Liang B, Mediano CA, Jeon YH, Torres E, et al. High-resolution metabolomics to discover potential parasite-specific biomarkers in a *Plasmodium falciparum* erythrocytic stage culture system. *Malar J*. 2015;14:122.
 27. Sun MS, Hattori S, Kubo S, Awata H, Matsuda I, Endo F. A mouse model of renal tubular injury of tyrosinemia type 1: development of de Toni Fanconi syndrome and apoptosis of renal tubular cells in Fah/Hpd double mutant mice. *J Am Soc Nephrol*. 2000;11:291–300.
 28. Andreoli TE, Fanestil DD, Hoffman JF, Schultz S. Clinical disorders of membrane transport processes. US: Springer; 2012.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

