



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

Nitric Oxide ในซีรัม และน้ำไขสันหลังกับการเกิดพยาธิสภาพมาลาเรียขึ้นสมอง

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์เยาวพา มณีรัตน์ และคณะ

กรกฎาคม 2543



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

Nitric Oxide ในชีรุ่ม และน้ำไขสันหลังกับการเกิดพยาธิสภาพมาลาเรียขึ้นสมอง

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์เยาวพา มณีรัตน์ และคณะ

กรกฎาคม 2543

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

Nitric Oxide ในซีรัม และน้ำไขสันหลังกับการเกิดพยาธิสภาพมาลาเรียขึ้นสมอง

คณะผู้วิจัย

สังกัด

- | | |
|-----------------------------------|---|
| 1. ผศ. ยาวพา มณีรัตน์ | ภาควิชาพยาธิวิทยาเขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน |
| 2. ศ. พลรัตน์ วิไลรัตน์ | ภาควิชาโรงพยาบาลเวชศาสตร์ คณะเวชศาสตร์เขตร้อน |
| 3. รศ. เอี่ยมศรี พงศ์พนรัตน์ | ภาควิชาพยาธิวิทยาเขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน |
| 4. ผศ. พรณเพ็ญ วิริยเวชกุล | ภาควิชาพยาธิวิทยาเขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน |
| 5. ผศ.(พิเศษ) เบญจณี พันธุ์ภูวงศ์ | ภาควิชาพยาธิวิทยาเขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน |
| 6. นางสาวอุไร ไชยศรี | ภาควิชาพยาธิวิทยาเขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน |
| 7. นายวสันต์ ขจรศักดิ์สุขเมธ | ภาควิชาพยาธิวิทยาเขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน |

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

โครงการทุนวิจัยหลังปริญญาเอก

บทคัดย่อ

โครงการวิจัย หมายเลข PDF/61/2540
ชื่อโครงการวิจัย nitric oxide ในซีรัม และน้ำไขสันหลังกับการเกิดพยาธิสภาพ
 มาเลเรียขึ้นสมอง
ผู้ร่วมโครงการวิจัย ผศ.เยาวพา มณีรัตน์* ศ.พลรัตน์ วิไลรัตน์** รศ.เอี่ยมศรี พงศ์
 พันธ์รัตน์* ผศ.พรรณเพ็ญ วิริยเวชกุล* ผศ.(พิเศษ)เบญจณี พันธุ์ภูวงศ์* นางสาวอุไร ไชยศรี
 และ นายวสันต์ ขจรศักดิ์สุขเมธ*
*ภาควิชาพยาธิวิทยาเขตร้อน ** ภาควิชาโรงพยาบาลเวชศาสตร์เขตร้อน คณะเวชศาสตร์
 เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล
e-mail : tmymn@mahidol.ac.th
ระยะเวลาที่ทำการวิจัย 3 ปี

การศึกษานี้เป็นการหาความสัมพันธ์ระหว่างระดับของ nitric oxide (NO) ในซีรัมและน้ำไขสันหลังกับความรุนแรงของโรคมาลาเรียฟาลซิพาร์ม และศึกษาชนิดของเซลล์และตำแหน่งของเซลล์ในเนื้อเยื่อสมองผู้ป่วยมาลาเรียขึ้นสมองที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง NO โดย 1) การวัดเปรียบเทียบระดับ nitrate ในซีรัม และน้ำไขสันหลังของผู้ป่วยมาลาเรียขึ้นสมองที่มีอาการโคม่า อาการไม่รุนแรง และของคนปกติ โดยใช้ nitric oxide colorimetric assay (Boehringer Mannheim) และ 2) ศึกษาการสร้าง NO โดยอ้อมด้วยการตรวจหา enzyme inducible nitric oxide synthase (iNOS) ด้วยวิธี immunohistochemistry ในเนื้อเยื่อสมองของผู้ป่วยที่เสียชีวิตด้วยมาลาเรียขึ้นสมอง 12 ราย เปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อสมองผู้ป่วยมาลาเรียที่มีอาการดีขึ้นจากโคม่า 2 ราย และเนื้อเยื่อสมองปกติ 4 ราย พบว่าระดับ nitrate ในซีรัมและน้ำไขสันหลังของผู้ป่วยที่มีอาการโคม่า และไม่มีอาการรุนแรง เปรียบเทียบกับของคนปกติ ไม่มีความสัมพันธ์กันและไม่มีความแตกต่างกันตลอดจนไม่มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และพบว่า neuron astrocyte oligodendrocyte, microglia และ endothelial cell (EC) ในเนื้อเยื่อสมองของผู้ป่วยมาลาเรียขึ้นสมอง สามารถสร้าง iNOS มากกว่าเนื้อเยื่อสมองผู้ที่เสียชีวิตด้วยสาเหตุอื่นๆ และ จำนวน EC ที่สร้าง iNOS มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของพยาธิสภาพในเนื้อเยื่อสมอง

นอกจากนี้ EC ที่แยกจาก umbilical cord ปกติ สามารถสร้าง iNOS เมื่อถูกกระตุ้นด้วย เชื้อ *Plasmodium falciparum* (Pf) ระยะตัวแก่ ในห้องปฏิบัติการซึ่งผลการศึกษานี้จะเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาผลของ Pf ต่อการสร้าง NO โดย endothelial cells ต่อไป

Keyword : nitric oxide, nitrate, iNOS, *Plasmodium falciparum*

Abstract

Project Code : PDF 61/2540

Project Title : Pathogenic effects of nitric oxide in sera and cerebrospinal fluid on cerebral malaria

Investigator : Yaowapa Maneerat*, Polarat Wilairatana**, Emsri Pongponratn*, Parnpen Viriyavejakul*, Benjanee Punpoowong*, Urai Chaisri*, Vasant Khachansaksumet*

* Department of Tropical Pathology, **Hospital for Tropical Diseases, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University

Project period 3 years

The study was designed 1) to determine correlation between nitric oxide(NO) level in sera and CSF from cerebral malaria (CM) patients and the severity of the disease, 2) to detect NO production and identify nitric oxide producing cells in brain tissues from CM patients. By using nitric oxide calorimetric assay (Boehringer Mannheim), we found no significant difference in nitrate level in sera and CSF of CM patients comparing to those in normal sera and CSF. Contrastly, neuron, astrocytes, oligodendrocyte, microglia and endothelial cell (EC) in CM brain tissues produced more inducible nitric oxide synthase (iNOS) detected by immunohistochemical staining. We also demonstrated iNOS mRNA by RT-PCR in Plasmodium falciparum (Pf) stimulated human umbilical cord endothelial cells (HUVEC) in vitro.

Keyword : nitric oxide, nitrate, iNOS, Plasmodium falciparum

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัย เรื่อง nitric oxide กับ การเกิดพยาธิสภาพมาลาเรียขึ้นสมอง ได้ดำเนินการมาตลอด 3 ปี และ ความร่วมมือของผู้ร่วมวิจัยทุกท่าน โดยทำการวิจัยส่วนใหญ่ๆ ใน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน และคณะวิทยาศาสตร์ ภายใต้การดูแลของ ศาสตราจารย์รัชนี้์ อุดมแสงเพชร ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา ดิฉันขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์รัชนี้์ อุดมแสงเพชร ที่ได้ให้คำแนะนำ กำลังใจและสนับสนุนทุนวิจัยตลอดเวลา 3 ปี ดิฉันขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์พรชัย มาตังคสมบัติ อธิการบดีมหาวิทยาลัยมหิดล ศาสตราจารย์ศรชัย หล่ออารีย์สุวรรณ คณบดีคณะเวชศาสตร์เขตร้อน และ รองศาสตราจารย์เอี่ยมศรี พงศ์พนรัตน์ หัวหน้าภาควิชาพยาธิวิทยาเขตร้อนที่ให้โอกาสและสนับสนุนการทำการวิจัยตลอดมา ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์มาเรียว ริกกันดี พยาธิแพทย์ที่ปรึกษาของคณะเวชศาสตร์เขตร้อนและอาจารย์สุชาติ พุทธิเจริญรัตน์ แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลประสาท ที่ให้คำแนะนำในด้านพยาธิวิทยา

ดิฉันขอขอบคุณแพทย์ พยาบาล เจ้าหน้าที่ในโรงพยาบาลเวชศาสตร์เขตร้อน ทุกท่าน ซึ่งได้ดูแลผู้ป่วยมาลาเรียที่ยินยอมอุทิศเลือด และน้ำไขสันหลัง เนื้อเยื่อสมอง มาใช้ในการศึกษา ตลอดจน ขอขอบพระคุณอาสาสมัครผู้บริจาคเลือดทุกท่าน

ดิฉันขอขอบพระคุณผู้อำนวยการสถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติมหาราชินี ที่อนุเคราะห์น้ำไขสันหลังปกติ

ดิฉันขอขอบพระคุณ Professor Nicholas J White ผู้อำนวยการ The Wellcome Research Unit คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งได้ให้คำแนะนำ ตลอดจนให้โอกาสดิฉันไปทำการวิจัยเพิ่มเติม เพื่อปรับปรุงผลการทดลอง ซึ่งได้เสนอในผลงานที่ได้รับการตีพิมพ์ ภายใต้การดูแลของ Dr. Gareth Turner ณ The John Radcliffe Hospital Oxford University

ดิฉันขอขอบคุณ อ. ดร. สำรี มั่นเขตต์กรณ์ และ นางสาว กาญจนา พฤกษ์เพิ่มพูล นักศึกษาปีที่ 4 (ปีการศึกษา 2542) ที่ให้ความร่วมมือและช่วยวิจัยในส่วนการสร้าง nitric oxide โดย endothelial cell เมื่อถูกกระตุ้นด้วย Plasmodium falciparum ในห้องปฏิบัติการ และขอบคุณ นางสาววิมล ยมนา เลขานุการภาควิชาพยาธิวิทยาเขตร้อน ที่ช่วยพิมพ์เอกสาร และพิสูจน์อักษร

ท้ายที่สุด ดิฉันขอขอบพระคุณ สำนักกองทุนสนับสนุนการวิจัย และมหาวิทยาลัยมหิดลที่ได้สนับสนุนเงินทุนในการวิจัย ซึ่งทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี และดิฉันหวังเป็นอย่างว่าจะได้รับการสนับสนุนจากทุกท่านที่กล่าวมานี้ อีกในโอกาสต่อไป

Executive Summary

ทุนวิจัยหลังปริญญาเอก (PDF-40 ผศ. ดร. เยาวพา มณีรัตน์)

Nitric oxide กับ การเกิดพยาธิสภาพในมาลาเรียขึ้นสมอง

(Pathogenic Effects of Nitric Oxide in Cerebral Malaria)

1. ปัญหาที่ทำการวิจัยและความสำคัญของปัญหา

โรคมาลาเรีย เป็นปัญหาที่สำคัญในประเทศที่กำลังพัฒนา รวมทั้งประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ตามแนวชายแดนของประเทศ สาเหตุที่สำคัญของโรคมาลาเรียที่รุนแรง คือ Plasmodium falciparum (*P. falciparum*) ซึ่งอาจทำให้เกิดมาลาเรียขึ้นสมอง (cerebral malaria) ผู้ป่วยบางรายอาจมีอาการแทรกซ้อนที่รุนแรง คือ ภาวะเลือดจางอย่างรุนแรง (severe anemia) ภาวะไตล้มเหลว (renal failure) ปอดบวมน้ำ (pulmonary edema) ระดับน้ำตาลในเลือดต่ำ (hypoglycemia) ภาวะขาดเลือดทั่วร่างกาย (circulatory collapse) มีเลือดออกหรือระบบการแข็งตัวของเลือดผิดปกติ (bleeding/disseminated intravascular coagulation) อาการชักอย่างรุนแรง (repeated generalized convulsions) ภาวะมีกรดสูงในร่างกาย (acidosis) และปัสสาวะเป็นสีดำนี (malarial hemoglobinuria)

กลไกที่ทำให้เกิดมาลาเรียขึ้นสมอง เป็นกลไกที่มีความซับซ้อน และยังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัด การอุดตันของเส้นเลือดฝอยในสมองด้วย เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ *P. falciparum* ในระยะตัวแก่ (trophozoite หรือ schizont) โดยการจับกับเซลล์บุผนังหลอดเลือด (sequestration) และหรือเกิดจากเม็ดเลือดแดงปกติเกาะติดกับเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ (rosette formation)

การเกิดพยาธิสภาพในผู้ป่วยมาลาเรียขึ้นสมองอาจเป็นผลมาจาก cytokine ที่หลั่งจาก immune cells บางชนิดในร่างกายผู้ป่วยขณะติดเชื้อที่สำคัญ ได้แก่ Tumor necrosis factor – α (TNF- α) interferon – γ (IFN- γ) interleukin – 1β (IL- 1β) และ interleukin-6 (IL-6) ซึ่งมีการตรวจพบทั้งในซีรัม และเนื้อเยื่อสมองของผู้ป่วยที่เสียชีวิตด้วยมาลาเรียขึ้นสมอง

ในช่วง 15 ปีที่ผ่านมา นักวิจัยจำนวนมากได้ให้ความสำคัญกับบทบาทของ nitric oxide (NO) ในการเกิดพยาธิสภาพของโรคต่างๆ รวมทั้งโรคมาลาเรียฟาลซิพาร์ม NO เป็น product ที่สร้างขึ้นโดย enzyme nitric oxide synthase (NOS) โดยมีสารตั้งต้น คือ arginine NOS พบในเซลล์หลายชนิดที่สำคัญได้แก่ activated monocyte macrophage fibroblast astrocyte และ endothelial cell ปัจจุบันนักวิจัยหลายกลุ่มยังไม่สามารถสรุปบทบาทของ NO ในการเกิดความรุนแรงของมาลาเรียฟาลซิพาร์ม และมาลาเรียขึ้นสมองได้ นักวิจัยบางกลุ่มมีหลักฐานแสดงให้เห็นว่า

ระดับ NO หรือ derivatives ใน biological fluid ไม่สัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค แต่นักวิจัยบางกลุ่ม พบว่า ระดับ NO derivative อาจเพิ่มมากขึ้น หรือลดลง ในผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรง

ดังนั้นคณะผู้วิจัยได้ทำการวิจัยตรวจหาปริมาณ nitrate ซึ่งเป็น stable end product ในซีรัมและน้ำไขสันหลังของผู้ป่วยมาลาเรียฟาลซิพาร์ม ที่มีอาการรุนแรงและไม่รุนแรงตลอดและศึกษาการสร้าง NO ด้วยการตรวจปริมาณ NOS ในเซลล์ชนิดต่างๆ ในเนื้อเยื่อสมองผู้ป่วยมาลาเรียขึ้นสมอง เพื่อความเข้าใจบทบาทของ NO ต่อพยาธิสภาพของมาลาเรียขึ้นสมอง มากขึ้น

2. วิธีการวิจัย

ผู้วิจัยได้ทำการศึกษา เป็น 3 ส่วน ดังนี้

ส่วนที่ 1 เป็นการตรวจหา ระดับของ nitric oxide ในผู้ป่วยมาลาเรีย ซึ่งแบ่งความรุนแรงของโรคตามวิธี glasgow coma scoreโดยเปรียบเทียบตัวอย่างจากซีรัมและน้ำไขสันหลังของผู้ป่วยกับคนปกติ โดยใช้ยาสำเร็จรูป nitric oxide colorimetric assay (Boehringer Mannheim) ในการตรวจหา nitrate ซึ่งเป็น end product ของ nitric oxide intermediate ที่ stable

ส่วนที่ 2 เป็นการศึกษาจุลพยาธิสภาพ (histopathology) ในเนื้อเยื่อสมองของผู้ตายด้วยมาลาเรียขึ้นสมอง เปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อสมองผู้ตายด้วยสาเหตุอื่น โดยมุ่งเน้นในการศึกษาชนิดของเซลล์ที่เกี่ยวข้องในบริเวณวิการ (lesion) ซึ่งย้อมด้วยวิธี hematoxylin & eosin และทำการตรวจหาปริมาณของ enzyme inducible nitric oxide synthase (NOS) ในเนื้อเยื่อสมองดังกล่าวด้วยวิธี Immunohistochemistry โดยการย้อมด้วย antibody ต่อ iNOS ในเนื้อเยื่อโดยตรง

ส่วนที่ 3 เป็นการศึกษาในห้องในการใช้ endothelial cell จาก umbilical cord ปกติเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ (in vitro) เพื่อศึกษากลไกการสร้าง NO เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วยเม็ดเลือดแดงติดเชื้อ P.falciparum ในระยะตัวแก่

3. ผลการทดลอง

ส่วนที่ 1 การศึกษาระดับ nitrate ในซีรัมและน้ำไขสันหลัง

ผู้วิจัยได้ทำการตรวจระดับ nitrate ในซีรัมและน้ำไขสันหลัง 35 ราย ของผู้ป่วยมาลาเรียฟาลซิพาร์ม และได้เปรียบเทียบระดับ nitrate ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการโคม่า ผู้ป่วยที่มีอาการโคม่าจนถึงขั้นไม่รุนแรง และคนปกติ สรุปผลได้ดังนี้

1. ระดับ nitrate ในซีรัมและน้ำไขสันหลังของผู้ป่วย ไม่มีความสัมพันธ์กัน
2. ระดับ nitrate ในซีรัม และน้ำไขสันหลัง ไม่มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค และไม่มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในแต่ละกลุ่มของผู้ป่วยและของคนปกติ
3. ระดับ nitrate ในซีรัมและน้ำไขสันหลังไม่สัมพันธ์กับ ค่า parasitemia, parasite clearance time และ recovering time ของผู้ป่วย ตลอดจนไม่สัมพันธ์กับ อุบัติการณ์การหายหรือ เสียชีวิตของผู้ป่วย

ส่วนที่ 2 การศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาและการสร้าง NOS ในเนื้อเยื่อสมองของผู้ป่วย มาลาเรียที่เสียชีวิตด้วยมาลาเรียขึ้นสมอง

ลักษณะทางพยาธิสภาพที่สำคัญในเนื้อเยื่อสมองผู้ป่วยมาลาเรียขึ้นสมองด้วย การย้อม ด้วยวิธี Hematoxylin & eosin ได้แก่ การเสื่อมของเซลล์สมอง (neuron degeneration), การบวม น้ำ (edema) การเกิดความเสื่อมของเยื่อหุ้มเส้นใยประสาท (demyelination) ซึ่งได้ตรวจย้อมพิเศษ เพื่อยืนยันผลโดย วิธี Sevier Montgomery, การเกิดจุดเลือดออก (Ring hemorrhage)

เมื่อทำการย้อมเพื่อตรวจหา iNOS ในเนื้อเยื่อสมองเดียวกันด้วยเทคนิค immunohistochemistry โดยการใช้ Antibody ต่อ iNOS และได้ทำการย้อม double staining เพื่อ แยกชนิดของเซลล์ที่สร้าง iNOS พบว่า neuron astrocyte oligodendrocytes microglia และ EC สามารถสร้าง iNOS ได้ และปริมาณของ iNOS ที่ถูกสร้างขึ้นจะสัมพันธ์กับความรุนแรงของพยาธิ สภาพที่ตรวจพบด้วยการย้อม hematoxylin & eosin นอกจากนี้ปริมาณของ EC ที่สร้าง iNOS จะ สัมพันธ์กับความรุนแรงของพยาธิสภาพอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และผู้วิจัยยังพบว่า macrophage หรือ monocyte ในบริเวณ ring hemorrhage หรือ ใน sequestered vessel มีการ สร้าง iNOS และเซลล์ในบริเวณ demyelination จะมีการสร้าง iNOS อย่างเห็นได้ชัด

ส่วนที่ 3 การศึกษาการสร้าง NO โดย EC เมื่อถูกกระตุ้นด้วย P. falciparum ในห้องปฏิบัติการ

จากการศึกษาในเนื้อเยื่อสมอง ทำให้ผู้วิจัยได้เปลี่ยนแปลงการทดลองในปีที่ 3 โดยเพิ่ม การศึกษาบทบาทของ endothelial cell ในการสร้าง NO เมื่อถูกกระตุ้นด้วย P. falciparum ในห้อง ปฏิบัติการ โดยใช้ HUVEC passage ตั้งแต่ 2 –7 ในการวิจัยพบว่า HUVEC สามารถสร้าง NOS ได้ภายในเวลา 24 ชั่วโมงหลังจากเลี้ยงร่วมกับ เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ P. falciparum ในระยะตัวแก่ (late trophozoite หรือ schizont) ซึ่งตรวจหาโดยการย้อม NOS โดยวิธี immunoperoxidase แต่ อย่างไรก็ตาม การย้อม EC monolayer ที่เลี้ยงบน cover slip มีปัญหาเรื่อง non-specific staining มากทำให้การอ่านผลไม่แน่นอน ผู้วิจัยจึงได้ทำการปรับปรุงการทดลอง โดยการเลี้ยงเซลล์ใน flask 20 cm² หรือ 24 well plate และตรวจหา mRNA ใน HUVEC ด้วยวิธี RT-PCR พบว่าสามารถ

ตรวจพบ mRNA ของ iNOS ตั้งแต่ 30 นาที – 2 ชั่วโมงหลังจากถูกกระตุ้นด้วยเม็ดเลือดแดงติดเชื้อ *P.falciparum* ในระยะตัวแก่ หรือ soluble antigen ที่เตรียมจาก *P. falciparum* อย่างไรก็ตาม การตรวจหา mRNA ของ iNOS ด้วยวิธี RT-PCR เป็นวิธีที่ละเอียดและมีขั้นตอนที่ต้องระมัดระวังเป็นพิเศษ และต้องใช้ทุนวิจัยสูง ผลการศึกษาที่ได้เป็นเพียงข้อมูลเพิ่มเติมที่จะทำการศึกษาในโครงการวิจัยเรื่อง กลไกการสร้าง nitric oxide โดย monocyte และ endothelial cell เมื่อถูกกระตุ้นด้วย *P. falciparum* ซึ่งอยู่ระหว่างการพิจารณาขอทุนพัฒนานักวิจัย

4. บทวิจารณ์

การศึกษาบทบาทของ nitric oxide ต่อพยาธิสภาพและความรุนแรงของโรคมาลาเรียฟาลซิพาร์ม ยังคงมีรายงานอย่างต่อเนื่องแต่ยังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัด โดยเฉพาะการตรวจระดับของ nitric oxide และ derivatives ใน biological fluids ต่างๆ เนื่องจากมีปัจจัยต่างๆ มากมายที่รบกวนปริมาณ ของ nitric oxide และ derivatives ซึ่งอาจได้แก่ อายุผู้ป่วย genetics strain ของเชื้อ สภาวะของอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับ metabolism ของ nitric oxide เช่นไต นอกจากนี้ อาจขึ้นกับ ความไว ของเทคนิคที่ใช้ในการตรวจวัด

การตรวจหา iNOS ใน เนื้อเยื่อสมอง ผู้ป่วยมาลาเรียขึ้นสมองของผู้วิจัยทำให้เราสามารถตั้งสมมุติฐาน ความสัมพันธ์ของการสร้าง nitric oxide กับการเกิดวิการบนเนื้อเยื่อสมองของผู้ป่วย อย่างไรก็ตามการศึกษานเนื้อเยื่อสมองเป็น ภาพที่มองเห็นการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพ ณ. เวลาที่ผู้ป่วยเสียชีวิตเท่านั้นซึ่งไม่สามารถทำให้เข้าใจกลไกการสร้าง NO เมื่อถูกกระตุ้นโดย *P. falciparum* ซึ่งผู้วิจัยมีความเห็นว่าการศึกษการสร้าง NO โดย เซลล์ที่สำคัญ เช่น monocyte หรือ EC เมื่อถูกกระตุ้น ด้วยเชื้อ *P. falciparum* ในห้องปฏิบัติการ น่าจะเป็นแนวทางที่น่าจะทำการศึกษาต่อไปเพื่อตอบคำถามนี้อย่างชัดเจน

5. ผลงานที่ได้

1. วิทยากร เรื่อง ไนตริกออกไซด์ กับการกระตุ้นการก่อพยาธิสภาพและการเกิดโรคของมาลาเรีย (Nitric oxide-induced malaria pathogenesis) ในการสัมมนาเครือข่ายงานวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ เรื่อง มาลาเรียกับซาลัสซีเมีย เมื่อวันที่ 12 มกราคม 2541 ณ. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
2. วิทยากร เรื่อง Inducible Nitric Oxide Synthase Expression in the Brain Tissues of cerebral Malaria ในการประชุมวิชาการ Joint International Tropical Medicine Meeting 1998

and The Fourth Chamlong-Tranakchit Harinasuta Lecture, 20-21 สิงหาคม 2541 ณ คณะ
เวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

3. Maneerat Yaowapa, Veriyavejakul Parmpen, Punpoowong Benjane, Jones Margaret,
Wilairatana Polrat, Pongponratn Emsri, Turner Gareth, Udomsangpetch Rachanee.
Inducible Nitric Oxide Synthase Expression is Increased in the Brain in Fatal Cerebral
Malaria. Histopathology 2000; (in press).
4. Maneerat Yaowapa, Wilairatana Polrat, Veriyavejakul Parmpen, Punpoowong Benjane,
Chaisri Urai, Pongponratn Emsri, Udomsangpetch Rachanee, Looareesuwan Sornchai.
Nitrate in falciparum malaria infection. (in preparation to submit in Southeast Asian
Journal Tropical Medicine & Public Health)

บทนำ

โรคมาลาเรีย เป็นปัญหาที่สำคัญในประเทศที่กำลังพัฒนา รวมทั้งประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ตามแนวชายแดนของประเทศ (1) สาเหตุที่สำคัญของโรคมาลาเรียที่รุนแรง คือ *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) ซึ่งอาจทำให้เกิดมาลาเรียขึ้นสมอง (cerebral malaria) ผู้ป่วยบางรายอาจมีอาการแทรกซ้อนที่รุนแรง คือ ภาวะเลือดจางอย่างรุนแรง (severe anemia) ภาวะไตล้มเหลว (renal failure) ปอดบวมน้ำ (pulmonary edema) ระดับน้ำตาลในเลือดต่ำ (hypoglycemia) ภาวะขาดเลือดทั่วร่างกาย (circulatory collapse) มีเลือดออกหรือระบบการแข็งตัวของเลือดผิดปกติ (bleeding/disseminated intravascular coagulation) อาการชักอย่างรุนแรง (repeated generalized convulsions) ภาวะมีกรดสูงในร่างกาย (acidosis) และปัสสาวะเป็นสีดำนี (malarial hemoglobinuria) (2)

กลไกที่ทำให้เกิดมาลาเรียขึ้นสมอง เป็นกลไกที่มีความซับซ้อน และยังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัด การอุดตันของเส้นเลือดฝอยในสมองด้วย เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ *P. falciparum* ในระยะตัวแก่ (trophozoite หรือ schizont) โดยการจับกับเซลล์บุผนังหลอดเลือด (sequestration) (3) และหรือเกิดจากเม็ดเลือดแดงปกติเกาะติดกับเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ (rosette formation) (4)

การเกิดพยาธิสภาพในผู้ป่วยมาลาเรียขึ้นสมองอาจเป็นผลมาจาก cytokine ที่หลั่งจาก immunecells บางชนิดในร่างกายผู้ป่วยขณะติดเชื้อที่สำคัญ ได้แก่ Tumor necrosis factor- α (TNF- α) interferon - γ (IFN- γ) interleukin - 1β (IL- 1β) และ interleukin-6 (IL-6) ซึ่งมีการตรวจพบทั้งในซีรัม (5-7) และเนื้อเยื่อสมองของผู้ป่วยที่เสียชีวิตด้วยมาลาเรียขึ้นสมอง (8)

ในช่วง 15 ปีที่ผ่านมา นักวิจัยจำนวนมากได้ให้ความสำคัญกับบทบาทของ nitric oxide (NO) ในการเกิดพยาธิสภาพของโรคต่างๆ รวมทั้งโรคมาลาเรียฟาลซิพาร์ม (9) NO เป็น product ที่สร้างขึ้นโดย enzyme nitric oxide synthase (NOS) โดยมีสารตั้งต้น คือ arginine NOS พบในเซลล์หลายชนิดที่สำคัญได้แก่ activated monocyte macrophage fibroblast astrocyte และ endothelial cell (10) ปัจจุบันนักวิจัยหลายกลุ่มยังไม่สามารถสรุปบทบาทของ NO ในการเกิดความรุนแรงของมาลาเรียฟาลซิพาร์ม และมาลาเรียขึ้นสมองได้ นักวิจัยบางกลุ่มมีหลักฐานแสดงให้เห็นว่าระดับ NO หรือ derivatives ใน biological fluid ไม่สัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค (11, 12) แต่นักวิจัยบางกลุ่ม พบว่า ระดับ NO derivative อาจเพิ่มมากขึ้น (13-15) หรือลดลง (16) ในผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรง

ดังนั้นคณะผู้วิจัยได้ทำการวิจัยตรวจหาปริมาณ nitrate ซึ่งเป็น stable end product ในซีรัมและน้ำไขสันหลังของผู้ป่วยมาลาเรียฟาลซิพาร์ม ที่มีอาการรุนแรงและไม่รุนแรงตลอด และศึกษาการสร้าง NO ด้วยการตรวจปริมาณ NOS ในเซลล์ชนิดต่างๆ ในเนื้อเยื่อสมองผู้ป่วยมาลาเรียขึ้นสมอง เพื่อความเข้าใจบทบาทของ NO ต่อพยาธิสภาพของมาลาเรียขึ้นสมองมากขึ้น

วิธีการทดลอง

ผู้วิจัยได้ทำการศึกษา เป็น 3 ส่วน ดังนี้

ส่วนที่ 1 เป็นการตรวจหา ระดับของ nitric oxide ในผู้ป่วยมาลาเรีย ซึ่งแบ่งความรุนแรงของโรคตามวิธี glasgow coma score (17) โดยเปรียบเทียบกับตัวอย่างจากซีรัมและน้ำไขสันหลังของผู้ป่วยกับคนปกติ โดยใช้ยาสำเร็จรูป nitric oxide colorimetric assay (Boehringer Mannheim) ในการตรวจหา nitrate ซึ่งเป็น end product ของ nitric oxide intermediate ที่ stable

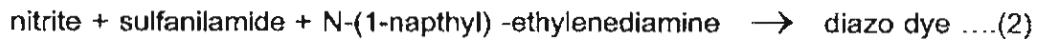
ส่วนที่ 2 เป็นการศึกษาจุลพยาธิสภาพ (histopathology) ในเนื้อเยื่อสมองของผู้ตายด้วยมาลาเรียขึ้นสมอง เปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อสมองผู้ตายด้วยสาเหตุอื่น โดยมุ่งเน้นในการศึกษาชนิดของเซลล์ที่เกี่ยวข้องในบริเวณวิการ (lesion) ซึ่งย้อมด้วยวิธี hematoxylin & eosin และทำการตรวจหาปริมาณของ enzyme inducible nitric oxide synthase (iNOS) ในเนื้อเยื่อสมองดังกล่าวด้วยวิธี Immunohistochemistry โดยการย้อมด้วย antibody ต่อ iNOS (18) ในเนื้อเยื่อโดยตรง

ส่วนที่ 3 เป็นการศึกษาการนำร่องในการใช้ endothelial cell จาก umbilical cord ปกติ หรือจากเนื้อเยื่อสมอง เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*)(19) เพื่อศึกษากลไกการสร้าง NO เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *P. falciparum*

การตรวจวัด Nitrate ด้วย Nitric Oxide Colorimetric Assay

วิธีการทำตามขั้นตอนที่ได้ชี้แจงไว้จากบริษัทผู้ผลิต หลักการคือ nitrate ใน sample จะถูก reduce ให้เป็น nitrite โดย reduced nicotinamide adeninedinucleotide phosphate (NADPH) โดยมี enzyme nitrate reductase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (สมการที่ 1) และ nitrite ที่เกิดขึ้นจะรวมตัวกับ sulfanilamide และ N-(1-naphthyl) - ethylenediamine dihydrochloride และให้ product เป็น diazo dye ซึ่งมีสีม่วงแดง (สมการที่ 2)

nitrate reductase



การวัดผล โดยวัดค่า absorbance ของ diazo dye ใน sample ที่ความยาวคลื่น 550 nm และนำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับ positive และ negative control ที่มีใน kit

การเตรียมชิ้นเนื้อและการย้อมด้วยวิธี Immunoperoxidase

การเตรียมชิ้นเนื้อก่อนการย้อมด้วยเครื่อง microwave อบ brain section ใน hot air oven ที่อุณหภูมิ 50°C นาน 4 ชั่วโมง แล้วจึงผ่านขั้นตอน hydration โดยแช่ section ใน 100%, 100%, 90%, 90%, 70% และ 70% ethanol ตามลำดับนานครั้งละ 5 นาที แล้วแช่ section ไว้ใน tap water แล้วนำ section ใส่ลงใน Coplin jar ซึ่งมี 0.01 M citrate buffer pH 6.0 ที่ผ่านการเดือดใน microwave (800 W) ที่ไฟกลางแล้วนำเข้าอบใน microwave ที่ไฟต่ำ จนกระทั่ง buffer เดือด เป็นเวลานาน 5 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง แล้วตั้ง slide ไว้ใน buffer ที่ยังร้อนอยู่นาน 15 นาที แล้วจึงนำ section แช่ลงใน PBS ล้าง section ด้วย PBS 3 ครั้งๆละ 5 นาที เพื่อเตรียมใช้ในขั้นตอนการย้อม iNOS ด้วยวิธี Immunoperoxidase ต่อไป

การย้อมด้วยวิธี Immunoperoxidase

นำ section ที่ผ่านการเปิดผิวหน้าชิ้นเนื้อ (antigen retrieval) ด้วย microwave มา incubate ใน 3% V/V H₂O₂ ใน PBS นาน 15 นาที แล้วจึงล้าง section ด้วย PBS 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที จึงหยด 0.01% BSA ใน PBS ลงบน section และ incubate ที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที หลังจากนั้น incubate section ด้วย rabbit anti-iNOS (1:100) นาน 45 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และ 4°C ข้ามคืน หลังจากล้าง section ด้วย PBS 3 ครั้งๆละ 5 นาที แล้วจึง incubate section ต่อด้วย goat anti-rabbit IgG ซึ่ง conjugate กับ biotin นาน 30 นาที จากนั้น ล้าง section ด้วย PBS 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที แล้วจึงเติม Streptavidin biotin peroxidase complex บน section และ incubate นาน 30 นาที หลังจากล้าง section ด้วย PBS 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที แล้วจึงตรวจสอบปฏิกิริยา peroxidase ด้วย 3,3 diaminobenzidine mixture ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยานาน ประมาณ 15 – 20 นาที จนกระทั่งเห็น section มีสีน้ำตาล ล้าง section ใน running tap water นานประมาณ 5 นาที ย้อมทับด้วย Meyer's hematoxylin เมื่อ section ผ่านขั้นตอน dehydration ด้วย 95 % ethenol 100% ethenol xylene แล้วจึง mount section ด้วย permount อ่านผลด้วยกล้องจุลทรรศน์

การอ่านผล

1. ตรวจดูตะกอนสีน้ำตาลใน cytoplasm ของเซลล์ต่างๆ ในเนื้อเยื่อสมองของผู้ป่วย มาลาเรียขึ้นสมองเปรียบเทียบกับ เนื้อเยื่อสมองของผู้เสียชีวิตด้วยสาเหตุอื่น โดยแสดงผลเป็น

- = เซลล์ไม่ติดสีน้ำตาล
- + = เซลล์มีตะกอนสีน้ำตาลเล็กน้อยใน cytoplasm
- ++ = เซลล์มีตะกอนสีน้ำตาลปานกลางใน cytoplasm
- +++ = เซลล์มีตะกอนสีน้ำตาล จำนวนมากและติดสีเข้มใน cytoplasm

2. นับจำนวน เซลล์ที่มีตะกอนสีน้ำตาล (positive cell) โดยคิด positive cell เป็น เปอร์เซ็นต์ของเซลล์แต่ละชนิด

การย้อมด้วยวิธี immunohistochemistry แบบ double stain

เพื่อยืนยันการนับแยกชนิดของเซลล์ในเนื้อเยื่อในสมองที่สร้าง iNOS ซึ่งได้แก่ astrocyte oligodendrocyte, endothelial cell และ microglia โดยใช้ mouse anti-glia Fibrillar acidic protein (GFAP) เพื่อย้อม astrocyte; mouse anti – CD68 เพื่อย้อม microglia monocyte และ macrophage; mouse anti – CD31 เพื่อย้อม endothelial cell โดยทำการย้อม section เช่นเดียวกับการย้อม iNOS ด้วยวิธี immunoperoxidase จนถึงขั้นตอนตรวจปฏิกิริยา peroxidase ด้วย DAB หลังจากล้าง DAB ส่วนเกินออกด้วย tap water แล้วแช่ section ใน PBS นาน 5 นาที 3 ครั้ง แล้วจึง incubate section ด้วย 0.01% BSA ใน PBS นาน 15 นาที แล้วจึง incubate section ด้วย anti-GFAP หรือ anti –CD 68 หรือ anti CD31 นาน 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากล้างด้วย PBS 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที จึง incubate section ด้วย goat anti-mouse IgG นาน 30 นาที ล้างด้วย 0.1 M Tris buffer pH 7.5 3 ครั้งๆละ 5 นาที แล้วจึง incubate section ต่อด้วย strepavidin biotin alkaline phosphatase นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงตรวจปฏิกิริยา alkaline phosphatase โดยการเติม HistoMark Red นาน 30 นาที ล้าง reagent ส่วนเกินออกด้วย tap water นาน 5 – 10 นาที ย้อมทับด้วย Meyer's hematoxylin นาน 4 นาที แล้วล้างออกด้วย tap water mount section ด้วย glycerline –jelly

การอ่านผล เซลล์ที่สร้าง iNOS จะมีตะกอนสีน้ำตาลใน cytoplasm และ cell ที่ specific ต่อ maker แต่ละชนิดจะมีตะกอนสีแดงที่ cytoplasm ด้วย

การเพาะเลี้ยง EC ในห้องปฏิบัติการ

แยก EC จาก umbilical vein และเลี้ยง EC อย่างต่อเนื่อง โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ

M 199 +10% fetal calf serum ที่ 37°C , 5% CO₂ จนถึง passage ที่ 2 แล้วจึงเก็บแช่แข็งไว้ใน liquid nitrogen (-180°C) เมื่อจะทำการทดลองจะนำ EC ที่แช่แข็งมาเลี้ยงเพิ่มจำนวนและใช้ประมาณ 10,000 cells เลี้ยงบน cover slip (Thermanox, ICN) ใน 24 well plate นาน 1-2 วัน จนเป็น complete monolayer (endothelial cell ที่ใช้จะเป็น passage ที่ 3 - 6)

การเลี้ยง P. falciparum

แยกเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ P. falciparum ออกจากเลือดผู้ป่วย เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย (RPMI 1640 + 10% inactivated human serum AB+ 32 mM NaHCO₃, 25 mM Hepes, 10mM glucose, pH 7.4) ซึ่งมีเม็ดเลือดแดงปกติ (type O⁺) 1% hematocrit นานประมาณ 48-72 ชั่วโมง แล้วจึงทำการแยกอายุของเชื้อโดยการปั่นแยกเม็ดเลือดด้วย 60% Percoll แยกระยะ trophozoite และ schizont จาก ring form ปรับให้เป็น 100 parasite/ μ l

การกระตุ้น EC ด้วย P. falciparum และตรวจ iNOS ด้วยวิธี immunoperoxidase

นำเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ late stage (โดยปรับเป็น 10% parasitemia) มาเลี้ยงร่วมกับ EC ที่เตรียมไว้ใน chamber slide ที่ 37°C, 5% CO₂ ที่เวลาต่าง ๆ กัน นำ cover slip มาล้างและตรวจหา iNOS ด้วยวิธี immunoperoxidase ตามที่กล่าวมาแล้ว

การกระตุ้น EC ด้วย P. falciparum และตรวจ iNOS mRNA ด้วยวิธี Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

วิธีการวิจัยเช่นเดียวกับการกระตุ้น EC ด้วย P. falciparum และตรวจ iNOS ด้วยวิธี immunoperoxidase แต่ทำการเพาะเลี้ยง EC ใน tissue culture flask ขนาด 25 cm² และเก็บ EC มาทำการสกัด RNA ด้วย Trizole (Gibco) และทำการตรวจหา iNOS mRNA วิธี RT-PCR โดยใช้ Oligo dT primer (Gibco) และ iNOS primers (Clontech)

ผลการทดลอง (โปรดดู manuscript ที่แนบมาด้วย)

ส่วนที่ 1 การศึกษาระดับ nitrate ในซีรัมและน้ำไขสันหลัง

ผู้วิจัยได้ทำการตรวจระดับ nitrate ในซีรัมและน้ำไขสันหลัง 35 ราย ของผู้ป่วยมาลาเรียฟาลซิพารัมและได้เปรียบเทียบระดับ nitrate ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการโคม่า ผู้ป่วยที่มีอาการโคม่าจนถึงขั้นไม่รุนแรง และคนปกติ สรุปผลได้ดังนี้

1. ระดับ nitrate ในซีรัมและน้ำไขสันหลังของผู้ป่วย ไม่มีความสัมพันธ์กัน
2. ระดับ nitrate ในซีรัม และน้ำไขสันหลัง ไม่มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค และไม่มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในแต่ละกลุ่มของผู้ป่วยและของคนปกติ
3. ระดับ nitrate ในซีรัมและน้ำไขสันหลังไม่สัมพันธ์กับ ค่า parasitemia, parasite clearance time และ recovering time ของผู้ป่วย ตลอดจนไม่สัมพันธ์กับ อุบัติการหายหรือ เสียชีวิตของผู้ป่วย

ส่วนที่ 2 การศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาและการสร้าง NOS ในเนื้อเยื่อสมองของผู้ป่วย มาลาเรียที่เสียชีวิตด้วยมาลาเรียขึ้นสมอง

ลักษณะทางพยาธิสภาพที่สำคัญในเนื้อเยื่อสมองผู้ป่วยมาลาเรียขึ้นสมอง ด้วยการย้อม ด้วยวิธี Hematoxylin & eosin ได้แก่ การเสื่อมของเซลล์สมอง (neuron degeneration), การ บวมน้ำ (edema) การเกิดความเสื่อมของเยื่อหุ้มเส้นใยประสาท (demyelination) ซึ่งได้ตรวจ ย้อมพิเศษเพื่อยืนยันผลโดย วิธี Sevier Montgomery, การเกิดจุดเลือดออก (Ring hemorrhage)

เมื่อทำการย้อมเพื่อตรวจหา iNOS ในเนื้อเยื่อสมองเดียวกันด้วยเทคนิค immunohistochemistry โดยการใช้ antibody ต่อ iNOS และได้ทำการย้อม double staining เพื่อ แยกชนิดของเซลล์ที่สร้าง iNOS พบว่า neuron astrocyte oligodendrocytes microglia และ EC สามารถสร้าง iNOS ได้ และปริมาณของ iNOS ที่ถูกสร้างขึ้นจะสัมพันธ์กับความรุนแรง ของพยาธิสภาพที่ตรวจพบด้วยการย้อม hematoxylin and eosin นอกจากนี้ปริมาณของ EC ที่ สร้าง iNOS จะสัมพันธ์กับความรุนแรงของพยาธิสภาพอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และผู้วิจัย ยังพบว่า macrophage หรือ monocyte ในบริเวณ ring hemorrhage หรือ ใน sequestered vessel มีการสร้าง iNOS และเซลล์ในบริเวณ demyelination จะมีการสร้าง iNOS อย่างเห็นได้ ชัด

ส่วนที่ 3 การศึกษาการสร้าง NO โดย EC เมื่อถูกกระตุ้นด้วย P. falciparum ในห้อง ปฏิบัติการ

จากการศึกษาในเนื้อเยื่อสมอง ทำให้ผู้วิจัยได้เปลี่ยนแปลงการทดลองในปีที่ 3 โดยเพิ่ม การศึกษาบทบาทของ endothelial cell ในการสร้าง NO เมื่อถูกกระตุ้นด้วย P. falciparum ใน ห้องปฏิบัติการ โดยใช้ HUVEC passage ตั้งแต่ 2 –7 ในการวิจัยพบว่า HUVEC สามารถ สร้าง iNOS ได้ภายในเวลา 24 ชั่วโมงหลังจากเลี้ยงรวมกับ เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ P. falciparum ในระยะตัวแก่ (late trophozoite หรือ schizont) ซึ่งตรวจหาโดยการย้อม NOS โดยวิธี immunoperoxidase แต่อย่างไรก็ตาม การย้อม EC monolayer ที่เลี้ยงบน cover slip มีปัญหา

เรื่อง non-specific staining มากทำให้การอ่านผลไม่แน่นอน ผู้วิจัยจึงได้ทำการปรับปรุงการทดลอง โดยการเลี้ยงเซลล์ใน flask 20 cm² หรือ 24 well plate และตรวจหา mRNA ใน HUVEC ด้วยวิธี RT-PCR พบว่าสามารถตรวจพบ mRNA ของ iNOS ตั้งแต่ 30 นาที – 2 ชั่วโมงหลังจากถูกกระตุ้นด้วยเม็ดเลือดแดงติดเชื้อ *P. falciparum* ในระยะตัวแก่ หรือ soluble antigen ที่เตรียมจาก *P. falciparum* อย่างไรก็ตาม การตรวจหา mRNA ของ iNOS ด้วยวิธี RT-PCR เป็นวิธีที่ละเอียดและมีขั้นตอนที่ต้องระมัดระวังเป็นพิเศษ และต้องใช้ทุนวิจัยสูง ผลการศึกษาที่ได้เป็นเพียงข้อมูลเพิ่มเติมที่จะทำการศึกษาในโครงการวิจัยเรื่อง กลไกการสร้าง nitric oxide ในมาลาเรียฟาลซิพาร์มโดย เซลล์โมโนไซด์และเซลล์บุผนังหลอดเลือด ซึ่งอยู่ระหว่างการพิจารณาของทุนพัฒนานักวิจัย

บทวิจารณ์ (โปรดดูรายละเอียดใน manuscripts)

การศึกษามหาพิษของ nitric oxide ต่อพยาธิสภาพและความรุนแรงของโรคมาลาเรียฟาลซิพาร์ม ยังคงมีรายงานอย่างต่อเนื่องแต่ยังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัด โดยเฉพาะการตรวจระดับของ nitric oxide และ derivatives ใน biological fluids ต่างๆ เนื่องจากมีปัจจัยต่างๆ มากมายที่รบกวนปริมาณของ nitric oxide และ derivatives ซึ่งอาจได้แก่ อายุผู้ป่วย genetics strain ของเชื้อ สภาวะของอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับ metabolism ของ nitric oxide เช่นไต นอกจากนี้อาจขึ้นกับ ความไวของเทคนิคที่ใช้ในการตรวจวัด

การตรวจหา iNOS ใน เนื้อเยื่อสมอง ผู้ป่วยมาลาเรียขึ้นสมองของผู้วิจัยทำให้เราสามารถ ตั้งสมมุติฐาน ความสัมพันธ์ของการสร้าง nitric oxide กับ การทำให้เกิดอาการในเนื้อเยื่อสมองของผู้ป่วย อย่างไรก็ตาม การศึกษาบนเนื้อเยื่อสมองเป็น ภาพที่มองเห็นการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพ ณ เวลาที่ผู้ป่วยเสียชีวิตเท่านั้นซึ่งไม่สามารถทำให้เข้าใจกลไกการสร้าง NO เมื่อถูกกระตุ้นโดย *P. falciparum* ซึ่งผู้วิจัยมีความเห็นว่าการศึกษการสร้าง NO โดย เซลล์ที่สำคัญ เช่น monocyte หรือ EC เมื่อถูกกระตุ้น ด้วยเชื้อ *P. falciparum* ในห้องปฏิบัติการ น่าจะเป็นแนวทางที่น่าจะทำการศึกษาคืบต่อไปเพื่อตอบคำถามนี้อย่างชัดเจน

เอกสารอ้างอิง

1. กองระบาดวิทยา สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข. 2539, รายงานการเฝ้าระวังโรคประจำสัปดาห์: สถานการณ์ไข้มาลาเรียในประเทศไทย ปีงบประมาณ 2538. หน้า 433-444
2. World Health Organization, Division of Control of Tropical Diseases. Severe and complicated malaria. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1990; 84(s2): 1-65.

3. Pongponratn E, Riganti M, Harinasuta T, Bunnag D. Electron microscopy of the human brain in cerebral malaria. Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth 1985; 16: 219-27.
4. Udomsangpetch R, Wahlin B, Carlson J, Berzins K, Torii M, et al. Plasmodium falciparum-infected erythrocytes form spontaneous erythrocyte rosettes. J Exp Med 1989; 169:1335-40.
5. Kern P, Hemmer CJ, Damme JV, Gruss HJ, Dietrich M. Elevated of tumor necrosis factor alpha and interleukin -6 serum levels as a markers for complicated Plasmodium falciparum malaria. Am J Med 1989; 87:139-43.
6. Kwiatkowski D, Hill AVS, Sambou I, Twumasi P, Castracane J, et al. TNF concentration in fatal cerebral, non fatal cerebral, and uncomplicated Plasmodium falciparum malaria. Lancet 1990; 336:1201-4.
7. Rockett KA, Awburn MM, Aggarwal BB, Cowden WB, Clark IA. In vivo induction of nitrite and nitrate by tumor necrosis factor, lymphotoxin, and interleukin-1: possible roles in malaria. Infect Immun 1992; 60: 3725-30.
8. Udomsangpetch R, Chivapat S, Virayavejakul P, Riganti M, Wilairatana P, et al. Involvement of cytokines in the histopathology of cerebral malaria. Am J Trop Med Hyg 1997; 57:501-6.
9. Clark IA, Rockett KA, Cowden WB. Proposed link between cytokines, nitric oxide and human cerebral malaria. Parasitol Today 1991; 7: 205-7
10. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol Rev 1991; 43:109-41.
11. Taylor AM, Day NP, Sinh DX, et al. Reactive nitrogen intermediates and outcome in severe adult malaria. Trans R Soc Trop Med Hyg 1998; 92:170-5.
12. Dondorp AM, Planche T, de Bel EE, et al. Nitric oxides in plasma , urine, and cerebrospinal fluid in patients with severe falciparum malaria. Am J Trop Med Hyg 1998; 59:497-502.
13. Nussler AK, Eling W, Kremsner PG. Patients with Plasmodium falciparum malaria and Plasmodium vivax malaria show increased nitrite and nitrate plasma levels. J Infect Dis 1994; 169: 1418-9.
14. Weiss G, Thuma P, Biemba G, et al. Cerebrospinal fluid levels of biopterin, nitric oxide metabolites, and immune activation markers and the clinical course of human cerebral malaria. J Infect Dis 1998; 177:1064-8.

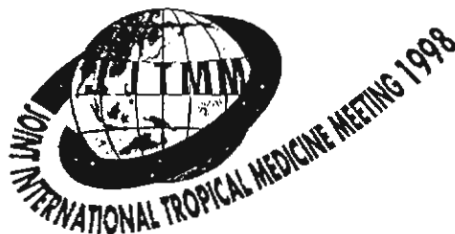
15. Al Yaman FMA, Mokela D, Genton B, et al. Association between serum levels of reactive nitrogen intermediates and coma in children with cerebral malaria in Papua New Guinea. Trans Roy Soc Trop Med Hyg 1996; 90:270-3.
16. Anstey NM, Weinberg JB, Hassanali MY, Mwaikambo ED, Manyenka D, et al. Nitric oxide in Tanzania Children with Malaria: Inverse relation between malaria severity and nitric oxide synthase type 2 expression. J Exp Med 1996; 184: 557-67.
17. Teasdale G, Jennett B. Assessment of coma and impaired consciousness: a practical scale. Lancet 1974;2: 81-4.
18. Neufeld AH, Hernandez MR, Gonzalez M. Nitric oxide synthase in the human glaucomatous optic nerve head. Arch Ophthalmol 1997; 115: 497-503.
19. Jaffee EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. J Clin Invest 1973; 52: 2745-56.

Output ที่ได้

1. วิทยากร เรื่อง ไนตริกออกไซด์ กับการกระตุ้นการก่อพยาธิสภาพและการเกิดโรคของมาลาเรีย (Nitric oxide-induced malaria pathogenesis) ในการสัมมนาเครือข่ายงานวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ เรื่อง มาลาเรียกับธาลัสซีเมีย เมื่อวันที่ 12 มกราคม 2541 ณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
2. วิทยากร เรื่อง Inducible Nitric Oxide Synthase Expression in the Brain Tissues of cerebral Malaria ในการประชุมวิชาการ Joint International Tropical Medicine Meeting 1998 and The Fourth Chamlong-Tranakchit Harinasuta Lecture, 20-21 สิงหาคม 2541 ณ คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล
3. Maneerat Yaowapa, Veriyavejakul Parnpen, Punpoowong Benjanee, Jones Margaret, Wilairatana Polrat, Pongponratn Emsri, Turner Gareth, Udomsangpetch Rachanee. Inducible Nitric Oxide Synthase Expression is Increased in the Brain in Fatal Cerebral Malaria. Histopathology 2000; (in press).

4. Maneerat Yaowapa, Wilairatana Poirat, Veriyavejakul Pampen, Punpoowong Benjane, Chaisri Urai, Pongponratn Emsri, Udomsangpetch Rachanee, Looareesuwan Sornchai. Nitrate in falciparum malaria infection. (in preparation to submit in Southeast Asian Journal Tropical Medicine & Public Health)

ภาคผนวก



JOINT INTERNATIONAL TROPICAL MEDICINE MEETING 1998 AND THE FOURTH CHAMLONG-TRANAKCHIT HARINASUTA LECTURE

Maegraith Conference Room
Faculty of Tropical Medicine
Mahidol University, Bangkok, Thailand
20-21 August 1998

Organized by

Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok, Thailand
SEAMEO TROPMED Network
The Office of the WHO Representative to Thailand

INDUCIBLE NITRIC OXIDE SYNTHASE EXPRESSION IN THE BRAIN TISSUES OF CEREBRAL MALARIA

Yaowapa Maneerat¹, Mario Riganti¹, Parnpen Viriyaveejakul¹, Benjane Punpoowong¹, Polrat Wilairatana², Emsri Pongponratn¹, Rachanee Udomsangpetch³

¹Department of Tropical Pathology,

²The Hospital for Tropical Diseases, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University

³Department of Pathobiology, Faculty of Science, Mahidol University

Cerebral malaria caused by severe *Plasmodium falciparum* infection in human is still an important health problem in developing countries. The etiology of cerebral malaria is unclear. Role of cytokine-induced nitric oxide (NO) in pathogenesis of severe malaria has been controversial due to the dual effects of NO in protective immunity against the malaria parasite or in enhancement of disease pathogenesis. In this study, inducible nitric oxide synthase (iNOS) was detected in the brain tissues of cerebral malaria in neurons, glia cells, and endothelial cells of large and small vessels by immunohistochemical staining. Intensity of the iNOS staining and number of positive cells was associated with the severity of histopathologic changes in the brain tissues. Cerebral tissues from 2 patients, recovered from cerebral malaria but died because of renal failure and pneumonia, 1 dengue haemorrhagic fever patient, and 3 car accident victims showed only weakly or no staining of iNOS. This study indicate proinflammatory cytokines may associate with pathogenesis of cerebral malaria via the induction of NO in the brain. 

INDUCIBLE NITRIC OXIDE SYNTHASE EXPRESSION IS INCREASED IN THE BRAIN IN FATAL CEREBRAL MALARIA

Y Máneerat¹, P Viriyavejakul¹, B Punpoowong¹, M Jones², P Wilairatana³,
E Pongponratn¹, G Turner² & R Udomsangpetch⁴.

¹ *Department of Tropical Pathology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Thailand*

² *Department of Cellular Science and Wellcome Trust Centre for Tropical and Infectious Diseases, The John Radcliffe Hospital, Oxford University, UK*

³ *The Hospital for Tropical Diseases, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Thailand*

⁴ *Department of Pathobiology, Faculty of Science, Mahidol University*

Number of pages: 11

Number of Figures: 1

Number of Tables: 2

Short running head: nitric oxide synthase in cerebral malaria

Key words: inducible nitric oxide synthase, iNOS, cerebral malaria, *P. falciparum*, demyelination

This work received financial support from Mahidol University, the Thailand Research Fund (TRF) and The Wellcome Trust of Great Britain. YM is a TRF-Postdoctoral Fellow and Wellcome Trust Travelling Fellow.

Corresponding author: Rachanee Udomsangpetch

Address: Department of Pathobiology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand
Tel : 662-2461379
Fax : 662-2461379
E-mail: scrud@mahidol.ac.th