



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาการเกิด auto-agglutination ของเม็ดเลือดแดงติดเชื้อ  
พัลซิฟาร์มมาลาเรีย กับความรุนแรงของโรคในระยะติดเชื้ออย่างเฉียบพลัน

โดย ดร. เกศินี โชติวานิช และคณะ

1 พฤษภาคม 2546



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาการเกิด auto-agglutination ของเม็ดเลือดแดงติดเชื้อ  
พัลซิฟาร์มมาลาเรีย กับความรุนแรงของโรคในระยะติดเชื้ออย่างเฉียบพลัน

โดย ดร. เกศินี โชติวานิช และคณะ

1 พฤษภาคม 2546

สัญญาเลขที่ PDF/32/2544

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ      การศึกษาการเกิด auto-agglutination ของเม็ดเลือดแดงติดเชื้อฟิลิฟารัม  
มาลาเรียกับความรุนแรงของโรคในระยะติดเชื้อย่างเฉียบพลัน

คณะผู้วิจัย

สังกัด

1. ดร. เกศินี โชติวานิช

คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

2. ศ. รัชนิย์ อุดมแสงเพชร

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้ เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

## บทคัดย่อ

จากการศึกษาตัวอย่างจากผู้ป่วยติดเชื้อฟัลซิฟาร์มาลาเรีย ระยะเฉียบพลัน จำนวน 182 ตัวอย่าง พบว่า เชื้อฟัลซิฟาร์มาลาเรีย ในประเทศไทย มีคุณสมบัติการเกิด auto-agglutination คิดเป็นร้อยละ 50 การเกิด auto-agglutination นี้สามารถทำให้แยกออกจากกันได้โดย heparin และ EGTA (ethylene-bis(oxy-ethyleneitrillo) tetra-acetic acid) โดยร้อยละ 50 ของเม็ดเลือดแดง ที่ติดเชื้อ จะแยกออกจากกันที่ heparin ความเข้มข้น 50 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ EGTA ความเข้มข้น 0.01 มิลลิโมลาร์ การเกิด auto-agglutination จะพบได้ร้อยละ 43 ของเชื้อที่ทำให้เกิด uncomplicated malaria, ร้อยละ 41 ของเชื้อที่ทำให้เกิด severe malaria และ ร้อยละ 100 ของเชื้อที่ทำให้เกิดมาลาเรียขึ้นสมอง นอกจากนี้ยังพบว่า จำนวนเม็ดเลือดแดงติดเชื้อในกลุ่มก่อน จะสูงสุดในกลุ่มของเชื้อที่ทำให้เกิดมาลาเรียขึ้นสมอง คุณสมบัติการติดเชื่นี้ จะมีความสัมพันธ์ทางบวก กับปริมาณเชื้อ, ยูเรียในเลือดของผู้ป่วย และ มีความสัมพันธ์ทางลบกับไบคาร์บอเนตในเลือด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการวิเคราะห์ทางสถิติ (multivariate) พบว่า ปริมาณเชื้อ ในกระแสเลือด และการเกิดมาลาเรีย ขึ้นสมอง มีความเกี่ยวข้องกับการเกิด auto-agglutination อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

## **Abstract**

The relationship of platelet mediated autoagglutination of *P. falciparum* infected red cells to disease severity was investigated in 182 Thai patients with falciparum malaria. 50% of parasite isolates showed the agglutination phenotype. Autoagglutination was reversed by both heparin ( $EC_{50}$ ; 50 units/ml) and EGTA ( $EC_{50}$ ; 0.01 mM). The proportion of parasites showing the agglutination phenotype in patients with uncomplicated malaria (43%) was similar to that of severe malaria (41%), whereas all 15 (100%) isolates from patients with cerebral malaria showed autoagglutination ( $P=0.001$ ). The median (range) number of infected red cells (IRBC) in agglutinates per 1000 IRBC was significantly higher in cerebral malaria (6; 3-42) when compared with severe (0; 0-52) and uncomplicated malaria (0; 0-24) ( $P=0.01$ ). Agglutination was associated positively with admission parasitaemia ( $P=0.001$ ), and blood urea nitrogen concentration ( $P=0.013$ ), but negatively with plasma  $HCO_3$  ( $P=0.01$ ). In multivariate analyses, high parasitaemia and cerebral malaria were associated significantly and independently with parasite agglutination.

**KEYWORDS :** *P. falciparum*, malaria, erythrocyte, autoagglutination

**หน้าสรุปโครงการ(Executive Summary)**  
**ทุนวิจัยหลังปริญญาเอก**

ชื่อ ดร. เกศินี โชติวานิช

ภาควิชา อายุรศาสตร์เขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

1. ชื่อโครงการ

ภาษาไทย :

การศึกษาการเกิด auto-agglutination ของเม็ดเลือดแดงติดเชื้อฟัลซิพารัมมาลาเรียกับความรุนแรงของโรคในระยะติดเชื้อย่างเฉียบพลัน

ภาษาอังกฤษ :

Study of auto-agglutination phenotype and disease severity in *P. falciparum* infection

2. หัวหน้าโครงการ

ดร. เกศินี โชติวานิช

ภาควิชา อายุรศาสตร์เขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

ที่อยู่ 420/6 ถ.ราชวิถี เขตพญาไท กทม. 10400

โทรศัพท์ 66 2 246-0056 ต่อ 1404, 1427

โทรสาร 66 2 246-7795

3. สาขาวิชาที่ทำการวิจัย พยาธิสรีรวิทยาของโรคมาลาเรีย

## 7. ปัญหาที่ทำการวิจัยและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันประเทศไทยยังคงมีผู้ติดเชื้อมาลาเรียประมาณ 2.2 ต่อประชากร 1000 คนต่อปี (1) โดยเฉพาะอย่างยิ่งจังหวัดตาก, กาญจนบุรี, จันทบุรี และตราด ซึ่งอยู่ใกล้ชายแดนติดต่อกับประเทศพม่าและกัมพูชาในจำนวนผู้ที่ติดเชื่อนั้นจะมีผู้เสียชีวิตส่วนมากเป็นเด็ก และหญิงมีครรภ์ จากการมีภาวะแทรกซ้อนและเกิดมาลาเรียขึ้นสมอง

เชื้อฟัลซิพารัมมาลาเรียเป็นชนิดที่พบได้บ่อยและรุนแรงที่สุด เนื่องจากทำให้เกิดมาลาเรียขึ้นสมอง การดำเนินของโรคในระหว่างที่มีการติดเชื้ออย่างเฉียบพลันจะรุนแรงหรือไม่ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายๆประการ ทั้งทางด้านผู้ป่วยและคุณสมบัติของเชื่อนั้น การติดเชื้อในเด็กและหญิงมีครรภ์จะค่อนข้างรุนแรงเนื่องจาก ระบบภูมิคุ้มกันต่ำ คุณสมบัติบางอย่างของเชื้อเช่น เชื้อทำให้เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อเกาะติดผนังหลอดเลือด (cytoadherence) (2,3,4) หรือ เกาะติดกับเม็ดเลือดแดงที่ไม่ติดเชื้อจนเป็นกลุ่มใหญ่ (rosette formation) (5) นำไปสู่การอุดตันของหลอดเลือด ทำให้อาหารและอากาศไปเลี้ยงส่วนต่างๆของอวัยวะนั้นๆ ไม่เพียงพอ และ เชื้อบางชนิดทำให้เกิดความรุนแรงได้มากกว่าอีกชนิดหนึ่ง เนื่องจากมีอัตราการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน (multiplication rate) ที่เร็วกว่า เป็นต้น (6)

อย่างไรก็ตามคุณสมบัติของเชื่อดังกล่าวมีความแตกต่างกันไปตามแหล่งที่มาของเชื้อ (geographical distribution) คณะผู้วิจัยมีความสนใจที่จะศึกษา คุณสมบัติของเชื้อในการเกาะติดกันเองเป็นกลุ่ม (auto-agglutination) ซึ่งเป็นคุณสมบัติแบบหนึ่งของเชื้อฟัลซิพารัมที่ยังมีการศึกษาอยู่น้อย แต่เป็นคุณสมบัติที่มีความสำคัญ กับการเกิด ความรุนแรงของโรค การศึกษานี้คณะผู้วิจัยจะมุ่งหาข้อมูล การเกิด auto-agglutination ของเม็ดเลือดแดงติดเชื้อทั้งในภาวะที่มีภูมิคุ้มกันและไม่มีภูมิคุ้มกันเชื้อมาลาเรีย เพื่อหาความสัมพันธ์กับการเกิดความรุนแรงของโรคฟัลซิพารัมมาลาเรียในประเทศไทย ซึ่งการศึกษาดังกล่าวยังไม่เคยปรากฏว่ามีผู้ใดทำมาก่อน ผลที่ได้รับจากการศึกษาเกี่ยวกับปัจจัยที่ทำให้เกิดความรุนแรงของโรคนี้จะนำไปสู่การพัฒนาความคิดแนวทางในการป้องกันมิให้การติดเชื้อฟัลซิพารัมมาลาเรียดำเนินไปสู่ขั้นวิกฤตได้

## 8. วัตถุประสงค์

8.1 เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างคุณสมบัติการเกาะติดของเม็ดเลือดแดงติดเชื้อเป็นกลุ่มก้อน(auto-agglutination) กับการเกิดพยาธิสรีรวิทยาของโรคฟัลซิพารัมมาลาเรียแบบไม่มี ภาวะแทรกซ้อน (uncomplicated) และมีภาวะแทรกซ้อน (complicated)

8.2 เพื่อศึกษาผลของ heparin และ EGTA ต่อการเกิด auto-agglutination ของเม็ดเลือดแดงติดเชื้อฟัลซิพารัมมาลาเรีย

## 9. ระเบียบวิธีวิจัย

### 9.1 เตรียมเกร็ดเลือด

โดยได้รับเลือดจากอาสาสมัครที่ไม่เคยติดเชื้อมาลาเรียมาก่อนและมีผลการตรวจทางโลหิตวิทยาอยู่ในเกณฑ์ปกติ จำนวน 3 คน (กรุ๊ปเลือด A, B และ AB ตามลำดับ) คนละ 5 mL

ในหลอดEDTA นำมาปั่นแยกที่ 250 g เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกเก็บพลาสมา ที่มีเกร็ดเลือดปริมาณสูง (Platelet Rich Plasma, PRP) เกร็ดเลือดที่แยกไว้นี้จะเก็บไว้ที่ 4 °C ได้นาน 2 สัปดาห์ เมื่อจะทำการทดลองจะต้องนำ PRP มา dilute ใน RPMI-1640 เพื่อให้ได้ปริมาณเกร็ดเลือด  $1 \times 10^8$ /mL

### 9.2 เตรียมเชื้อฟัลซิพารัมมาลาเรีย

เลือดจากผู้ป่วยที่มีเชื้อมาลาเรียมากกว่า 1% จะถูกนำมาปั่นแยกเอาเม็ดเลือดขาว และพลาสมา ส่วนเม็ดเลือดแดงจะถูกนำมาใช้เลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียที่ 37°C, 5% CO<sub>2</sub> จนกระทั่งเชื้อมาลาเรียเจริญเป็นระยะ trophozoite หรืออายุประมาณ 30-32 ชั่วโมง จึงจะนำมาใช้ในการศึกษา

9.3 บันทึกข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยซึ่งประกอบด้วยอายุ เพศ ปริมาณเชื้อ ค่าทางเคมีคลินิก ค่าทางโลหิตวิทยา ภาวะแทรกซ้อนต่างๆ เช่น ไตวาย มาลาเรียขั้นสมอง เป็นต้น

### 9.4 ตรวจสอบคุณสมบัติ auto-agglutination ของเชื้อ

9.4.1 ใช้ถาด 96 หลุมในการทดลอง โดยใส่เกร็ดเลือดที่เตรียมไว้ (PRP ใน RPMI-1640) จำนวน 45  $\mu$ L ในหลุมที่ 1. ใส่ซีรัมจากผู้ติดเชื้อมาลาเรีย



(hyperimmune serum) (1:10 RPMI-1640) ในหลุมที่2. ใส่ RPMI-1640 เพียงอย่างเดียว ในหลุมที่3.

9.4.2 ใส่เม็ดเลือดแดง (packed red cells) จากจานเพาะเลี้ยงเชื้อลงไปทั้ง 3 หลุม หลุมละ 5  $\mu$ L

9.4.3 จากนั้นใส่สีย้อม acridine orange (AO), (1  $\mu$ g/mL) หลุมละ 10  $\mu$ L ผสมให้ทั่วกันแล้วนำไปเขย่า 30 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 และ 30 นาที ตามลำดับ

9.4.4 เมื่อครบ 15 และ 30 นาที ดูตัวอย่าง หลุมละ 5  $\mu$ L มาหยดบนสไลด์แก้ว เพื่อวิเคราะห์ผลด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงอุลตราไวโอเล็ต

9.5 การตรวจสอบผลของ heparin และ EGTA (ethylene-bis (oxy-ethylenenitrilo) tetra-acetic acid) ต่อ auto-agglutination

ตัวอย่างเชื้อที่แสดงคุณสมบัติ auto-agglutination จำนวน 20 ตัวอย่าง ผสมกับ heparin ที่ มีความเข้มข้นระหว่าง 5000 ถึง 1000 ยูนิต หรือ EGTA ความเข้มข้นระหว่าง 0.01 ถึง 1 mM ผสมให้ทั่วกันแล้วนำไปเขย่า 30 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที ตามลำดับ เมื่อครบ 15 นาที ดูตัวอย่าง หลุมละ 5  $\mu$ L มาหยดบนสไลด์แก้ว เพื่อวิเคราะห์ผลด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงอุลตราไวโอเล็ต

## 9.6 การวิเคราะห์

สีย้อมจะย้อมติดเชื้อมาลาเรียในเม็ดเลือดแดงให้เห็นชัดเจนด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด fluorescence microscopy เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อเกาะติดกันมีจำนวนมากกว่า 3 แต่ไม่น้อยกว่า 20 จะถูกนับเป็น 1 auto-agglutination การนับจะนับจำนวน auto-agglutination และนับเม็ดเลือดแดงติดเชื้อทั้งหมดที่อยู่ในกลุ่ม auto-agglutination และที่ไม่อยู่ในกลุ่ม auto-agglutination โดยนับรวมกันเป็น 1000 เม็ดเลือดแดง ที่ติดเชื้อ ส่วนเม็ดเลือดแดงติดเชื้อที่เกาะติดกับเม็ดเลือดแดงที่ไม่ติดเชื้อ ( $\geq 2$ ) จะถูกนับเป็น rosette โดยนับจำนวน rosette ต่อ 1000 เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อเช่นกัน

#### 9.7 การวิเคราะห์ผล

จะใช้โปรแกรมสถิติชนิด SPSS (version 11.0) ในการวิเคราะห์ผลและ ความสัมพันธ์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

#### 10 จำนวนโครงการที่ผู้สมัครกำลังดำเนินอยู่

ชื่อโครงการ Drug sensitivity assay of *P.vivax*

ระยะเวลาโครงการ 3 ปี ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2543-2546

แหล่งทุนที่ได้รับการสนับสนุน Wellcome Trust of Great Britain

งบประมาณที่ได้รับ 800,000 บาท

สถานะผู้สมัคร ผู้ร่วมโครงการ

เวลาที่ใช้ในการทำวิจัยในโครงการนี้ 15 ชั่วโมงต่อสัปดาห์

## เนื้อหางานวิจัย

### บทนำ

โรคมาลาเรียยังคงเป็นปัญหาทางสาธารณสุขของประเทศไทยอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากอุบัติการณ์ของการเกิดโรคและอัตราการตายของผู้ป่วยที่ติดเชื้อมีแนวโน้มสูงอยู่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณชายแดนฝั่งตะวันตกติดต่อกับประเทศพม่าและชายแดนฝั่งตะวันออกติดประเทศลาวและกัมพูชา เป็นต้น (1) การเกิดโรคมาลาเรียในพื้นที่ดังกล่าวส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของประชาชนและยังมีผลต่อเศรษฐกิจและสังคมในระดับประเทศอีกด้วย

เชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม (*P. falciparum*) เป็นเชื้อมาลาเรียที่ก่อให้เกิดโรคในคนที่รุนแรงที่สุด กล่าวคือ ทำให้เกิด ภาวะมาลาเรียขึ้นสมอง (cerebral malaria) จากการศึกษาวิจัยจากหลายกลุ่มทั้งในและต่างประเทศเชื่อว่า สาเหตุที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมาลาเรียขึ้นสมองคือ การเกิดการอุดตันของหลอดเลือดที่มาเลี้ยงสมอง ทำให้อาหารและออกซิเจนมาเลี้ยงส่วนต่างๆของสมองไม่เพียงพอ (2,3) นอกจากนี้ยังพบว่ามีการอุดตันของหลอดเลือดในอวัยวะสำคัญอื่นๆอีก เช่น หัวใจ, ไต เป็นต้น (4) การอุดตันของหลอดเลือดสามารถอธิบายพยาธิกำเนิดได้ดังต่อไปนี้คือ

- 1) เมื่อเชื้อฟัลซิพารัมอาศัยอยู่ในเม็ดเลือดแดงของคน ทำให้เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมีความยืดหยุ่น(deformability) ลดลง ทำให้เคลื่อนที่ในกระแสโลหิตได้ ไม่ดี (7,8)
- 2) เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมีคุณสมบัติในการเกาะติดผนังหลอดเลือด (endothelial cell) โดยอาศัยกลไก receptor-ligand ทำให้หลอดเลือดตีบตัน (2,3,4)
- 3) เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อสามารถเกาะติดกับเม็ดเลือดแดงที่ไม่ติดเชื้อ (rosette formation) กลายเป็นกลุ่มก้อนใหญ่ที่สามารถอุดตันหลอดเลือดขนาดเล็กได้ (5, 9, 10)
- 4) เม็ดเลือดแดงเกาะติดกันเองเป็นกลุ่มใหญ่ (auto-agglutination) (11,12) ความรุนแรงของโรคในผู้ป่วยซึ่งติดเชื้อมาลาเรียระยะเฉียบพลันขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายๆ ประการได้แก่ ระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วย, ปัจจัยทางพันธุกรรมของผู้ป่วย และ

คุณสมบัติของเชื้อเอง (intrinsic property) เชื้อบางชนิดสามารถเกาะติดผนังหลอดเลือดได้ดี บางชนิดเกิดการเกาะกลุ่มได้ดีกว่าอีกชนิดหนึ่ง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับแหล่งและที่มาของเชื้อ (geographical distribution) มีการศึกษาแล้วว่า การติดเชื้อมาลาเรียจะรุนแรงหรือไม่ ขึ้นอยู่กับ ชนิดของเชื้อที่ได้รับว่าจะมีคุณสมบัติในการแบ่งตัว (multiplication rate) มากหรือน้อย (6) แต่ยังไม่เคยมีการศึกษาความเกี่ยวข้องระหว่างการเกิด auto-agglutination ของเชื้อฟัลซิพารัมในประเทศไทยกับความรุนแรงของโรค การศึกษาสาเหตุและกลไก การเกิดความรุนแรงของโรคจะนำไปสู่การค้นคว้าป้องกันมิให้การ ติดเชื่อดังกล่าว ดำเนินไปจนกระทั่งเกิดภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรงและเป็นอันตรายต่อผู้ป่วย

#### วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 5.1 เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างคุณสมบัติการเกาะติดของเม็ดเลือดแดงติดเชื้อ เป็นกลุ่มก้อน (auto-agglutination) กับ การเกิดพยาธิสรีรวิทยาของโรค ฟัลซิพารัมมาลาเรีย แบบไม่มีภาวะแทรกซ้อน (uncomplicated) และมีภาวะแทรกซ้อน(complicated)
- 5.2 เพื่อศึกษาผลของ heparin และ EGTA ต่อการเกิด auto-agglutination ของเม็ดเลือดแดง ติดเชื้อฟัลซิพารัมมาลาเรีย

#### ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ก่อนหน้านี้ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงติดเชื้อ (auto-agglutination) ในสภาวะที่มีภูมิคุ้มกัน (anti-malarial antibody) และพบว่า auto-agglutination ของเม็ดเลือดแดงติดเชื้อในซีรัมของผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันโรคมาลาเรีย จะไม่เป็นแบบเฉพาะเจาะจง (lack of monospecific antibody) ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อมาลาเรีย ผลิตแอนติเจนที่มีความหลากหลายมาอยู่บนผิวเม็ดเลือดแดง (antigenic diversity) และการตอบสนองในการสร้างภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยก็แตกต่างกัน ด้วยเหตุนี้จึงเป็นการยากที่จะสรุปว่า การเกิด auto-agglutination ในสภาวะที่มีภูมิคุ้มกันต้านเชื้อ มาลาเรีย กับความรุนแรงของโรคเกี่ยวข้องกันหรือไม่

สำหรับการศึกษา auto-agglutination ของเม็ดเลือดแดงติดเชื้อในสภาวะที่ไม่มีภูมิคุ้มกันต้านเชื้อมาลาเรีย ได้เริ่มต้นในปี 2543 นี้โดย David S Roberts ได้ทำการศึกษา เชื้อมาลาเรียฟัลซิพารัม ในผู้ป่วยเด็กในประเทศเคนยา และรายงานผลว่าการเกิด auto-agglutination ของเชื้อฟัลซิพารัมเกี่ยวข้องกับการเกิดมาลาเรียชนิดรุนแรง

(severe malaria) ในเด็ก (11) ในเบื้องต้นเชื่อว่า auto-agglutination นี้เกิดจากการเกาะกันของเม็ดเลือดแดงติดเชื่อโดยมีเกร็ดเลือดเป็นตัวเชื่อม (12) รายละเอียดของ receptor-ligand ยังอยู่ในระหว่างการศึกษา คณะผู้วิจัยมีความสนใจที่จะศึกษา ความสัมพันธ์ระหว่างคุณสมบัติ auto-agglutination ของเม็ดเลือดแดงติดเชื่อในกลุ่มผู้ป่วยติดเชื่อฟัลซิพารัม ในประเทศไทยกับการเกิดความรุนแรงของโรคมาลาเรีย

## ระเบียบวิธีการวิจัย

### 8.1 แบบการวิจัยแบ่งออกเป็น 2 ส่วนดังนี้

ส่วนที่ 1 ผู้วิจัยตรวจหาเกร็ดเลือดจากอาสาสมัครที่ทำให้เกิด auto-agglutination กับเชื้อ C10 (positive-autoagglutination *P. falciparum* clone) เพื่อนำมาใช้ในการทดลอง

ส่วนที่ 2 ผู้วิจัยจะตรวจสอบคุณสมบัติ auto-agglutination ของเชื้อฟัลซิพารัม ในภาวะที่มีปริมาณเกร็ดเลือดที่แน่นอนและไม่มีภูมิคุ้มกัน โดยทำการวิเคราะห์ทางกล้องจุลทรรศน์ fluorescence microscopy

### 8.2 ขั้นตอนการทำวิจัย

#### 8.2.1 เชื้อฟัลซิพารัม

คณะผู้วิจัยได้รับตัวอย่างเลือด จำนวน 3 มิลลิลิตรในหลอดที่มี heparin จากผู้ป่วยที่มารับการรักษา ที่ โรงพยาบาลเวชศาสตร์เขตร้อน และ โรงพยาบาลแม่สอด และพบว่าเชื้อฟัลซิพารัมมาลาเรีย มากกว่า 1% ขึ้นไปใน thin film เชื้อ

#### 8.2.2 เตรียมเกร็ดเลือดเพื่อใช้ในการทดลอง

คณะผู้วิจัยจะได้รับเลือดจากอาสาสมัครผู้ที่ไม่เคยติดเชื่อมาลาเรียชนิดใดๆมาก่อน และผลทางห้องปฏิบัติการโลหิตวิทยาอยู่ในเกณฑ์ปกติ จำนวน 5 มิลลิลิตร ในหลอดที่มี EDTA เลือดจะถูกนำมาปั่นที่ 250 g ,15 นาที, 4 °C แยกเอาพลาสมาที่มีเกร็ดเลือดออกมา (Platelet Rich Plasma; PRP) นำเอา PRP มาตรวจเช็คกับ C10 clone ถ้าให้ผลบวก (เกิด auto-agglutination กับ C10 clone) จะถูกนำมา dilute ใน RPMI-1640 เพื่อให้ได้ปริมาณเกร็ดเลือด  $1 \times 10^6 / \text{mL}$

### 8.4 ขั้นตอนในการทดลอง

#### 8.4.1 เก็บตัวอย่างเลือดที่มีเชื้อมาลาเรียฟัลซิพารัม (มากกว่า 1 %)

8.4.2 บั่นล้างเลือดแยกเอาพลาสมาออกจนเหลือแต่เม็ดเลือดแดง

8.4.3 นำเลือดที่มีเชื้อมาลาเรียลงเลี้ยงในจานเพาะเชื้อ รอจนครบ 24 ชั่วโมง หรือจนเชื้ออยู่ในระยะ trophozoite หรืออายุ 30-32 ชั่วโมงจึงนำมาใช้

8.4.4 เตรียม PRP (ที่ dilute ใน RPMI-1640 จนได้ปริมาณเกร็ดเลือด  $1 \times 10^6$ /ml)

45  $\mu$ L ผสมกับเม็ดเลือดแดง (packed red cell) จากจานเพาะเลี้ยง 5  $\mu$ L และใส่สีย้อม

acridine orange ( $1 \mu$ g/ml) 10  $\mu$ L ผสมให้เข้ากันและนำไปเขย่า 30 รอบต่อนาที

เป็นเวลานาน 15 และ 30 นาที ตามลำดับ เมื่อครบกำหนดเวลา เก็บตัวอย่างไปตรวจ

วิเคราะห์ทางกล้องจุลทรรศน์ fluorescence microscope

9.8 การตรวจสอบผลของ heparin และ EGTA (ethylene-bis (oxy-ethylenenitrilo) tetra-acetic acid) ต่อ auto-agglutination

ตัวอย่างเชื้อที่แสดงคุณสมบัติ auto-agglutination จำนวน 20 ตัวอย่าง ผสมกับ heparin ที่ มีความเข้มข้นระหว่าง 5000 ถึง 1000 ยูนิต หรือ EGTA ความเข้มข้นระหว่าง 0.01 ถึง 1 mM ผสมให้ทั่วกันแล้วนำไปเขย่า 30 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที ตามลำดับ เมื่อครบ 15 นาที ดูตัวอย่าง หลุมละ 5  $\mu$ L มาหยดบนสไลด์แก้ว เพื่อวิเคราะห์ การเกิด auto-agglutination อีกครั้ง ตามที่กล่าวไว้ข้างต้น เปรียบเทียบผลกับ กลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ไม่ได้ใส่ heparin หรือ EGTA) ผลด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงอุลตราไวโอเล็ต

8.5 การรวบรวมและวิเคราะห์ผล

8.5.1 นับจำนวนเม็ดเลือดแดงติดเชื้อที่เกาะติดกันจำนวนมากกว่า 3 แต่น้อยกว่า 20

จะนับเป็น 1 auto-agglutination การนับจะนับจำนวน auto-agglutination

และนับเม็ดเลือดแดงติดเชื้อทั้งหมดที่อยู่ในกลุ่ม auto-agglutination

และที่ไม่อยู่ในกลุ่ม auto-agglutination โดยนับรวมกันเป็น 1000 เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ

8.5.2 นับเม็ดเลือดแดงติดเชื้อที่เกาะติดกับเม็ดเลือดแดงที่ไม่ติดเชื้อ ( $\geq 2$ ) เป็น 1 rosette

โดยนับจำนวน rosette ต่อ 1000 เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อเช่นกัน

8.5.3 รวบรวมข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยรวมถึงการวินิจฉัยโรค และแบ่ง

ออกเป็น 3 กลุ่มคือ การติดเชื้อมาลาเรียแบบไม่รุนแรง (uncomplicated),

รุนแรง (severe) และมาลาเรียขั้นสมอง (cerebral malaria) ตามหลักเกณฑ์

ของ World Health Organization (1997)

8.5.4 เปรียบเทียบจำนวน auto-agglutination ระหว่าง 3 กลุ่ม โดยดูความสัมพันธ์กับข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยการเกิด ภาวะแทรกซ้อนของโรค (complicated malaria)

#### การวิเคราะห์ทางสถิติ

เปรียบเทียบความถี่ของการเกิด auto-agglutination ของเชื้อมาลาเรียจากกลุ่มผู้ป่วย uncomplicated, severe และ cerebral มาลาเรีย โดย Kruskal-Wallis test ตรวจหาความสัมพันธ์ระหว่างคุณสมบัติ autoagglutination และข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยโดยใช้ Spearman Rank Correlation Coefficient. เพื่อดูความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด autoagglutination กับความรุนแรงของโรค จำนวนเม็ดเลือดแดงติดเชื้อในกลุ่มก้อน (autoagglutination) ถูกแบ่งออกเป็น 4 ระดับ ได้แก่ ไม่มีการเกาะกลุ่ม, มีการเกาะกลุ่มน้อยกว่า 10, มีการเกาะกลุ่ม จำนวน 10-20 และมีการเกาะกลุ่มมากกว่า 20 เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ และทดสอบทางสถิติโดย logistic regression โดยใช้โปรแกรม SPSS version 11.0 ในการทดสอบทางสถิติ

#### **ผลงานวิจัย**

##### ตัวอย่างเลือดและกลุ่มผู้ป่วย

ได้รับตัวอย่างเลือดจำนวน 182 ตัวอย่างโดยแบ่งเป็น 60 ตัวอย่างมาจากกลุ่มผู้ป่วย uncomplicated malaria, 119 ตัวอย่างจากกลุ่ม ผู้ป่วย severe malaria และ 15 ตัวอย่างจากกลุ่มผู้ป่วย cerebral malaria ข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยในแต่ละกลุ่ม สรุปดังตารางที่ 1. ไม่มีผู้ป่วยคนใดเสียชีวิต เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเชื้อในกระแสโลหิต, ค่าเครตินีน, บิลิรูบินรวม และระดับ transaminases ในกลุ่มผู้ป่วย severe malaria จะต่ำกว่ากลุ่ม uncomplicated malaria อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ระดับฮีมาโตคริต, ยูเรียในเลือด, SGPT และ บิลิรูบินรวม ในกลุ่มผู้ป่วย severe malaria จะแตกต่างกับกลุ่ม cerebral malaria อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

**ตารางที่ 1 ข้อมูลทางคลินิกและผลทางห้องปฏิบัติการของกลุ่มผู้ป่วยต่างๆ**

| Variable                                                    | Uncomplicated        | Severe                 | Cerebral malaria      |
|-------------------------------------------------------------|----------------------|------------------------|-----------------------|
|                                                             | n = 63               | n= 104                 | n= 15                 |
| Glasgow coma score <sup>g</sup>                             | 15(14-15)            | 15(11-15)              | 7(4-10)               |
| Haematocrit(%) <sup>*</sup>                                 | 38.3 (31.7-44.7)     | 34.7 (28.2-41.1)       | 29.5 (27-36)          |
| Parasitaemia (No./ $\mu$ L) <sup>h</sup>                    | 68770 (67141-116564) | 242156 (220372-350953) | 199192 (96441-468722) |
| Serum creatinine ( $\mu$ mol/L) <sup>*</sup>                | 110 (88-132)         | 139 (107-170)          | 135 (71-198)          |
| Serum BUN (mmol/L) <sup>f</sup>                             | 17.8 (11.5-20)       | 44.5 (15-79)           | 51.8 (45-58)          |
| Plasma glucose (mmol/L) <sup>*</sup>                        | 11.7 (8.7-14.7)      | 7.7 (4.2-11.2)         | 9.6 (5-11.5)          |
| Platelets x10 <sup>9</sup> (/L)                             | 129.7 (26-233)       | 39 (14-121)            | 83 (52-144)           |
| Serum total bilirubin ( $\mu$ mol/L) <sup>g</sup>           | 13 (5-61)            | 32 (17-380)            | 93 (50-690)           |
| Serum bicarbonate (HCO <sub>3</sub> ) <sup>*</sup> (mmol/L) | 19 (16-21)           | 17 (14-19)             | 13 (9-16)             |
| Serum alkaline phosphatase <sup>*</sup>                     | 71 (58-84)           | 95 (62-128)            | 124 (90-320)          |
| Serum AST <sup>g</sup>                                      | 41 (29-52)           | 104 (52-156)           | 152 (127-575)         |
| Serum ALT <sup>g</sup>                                      | 19 (10-28)           | 37 (14-61)             | 172 (122-217)         |

- <sup>\*</sup>mean (95% CI), <sup>g</sup> geometric mean (95% CI), <sup>h</sup> median (range)

AST = aspartate aminotransferase ; ALT= alanine aminotransferase

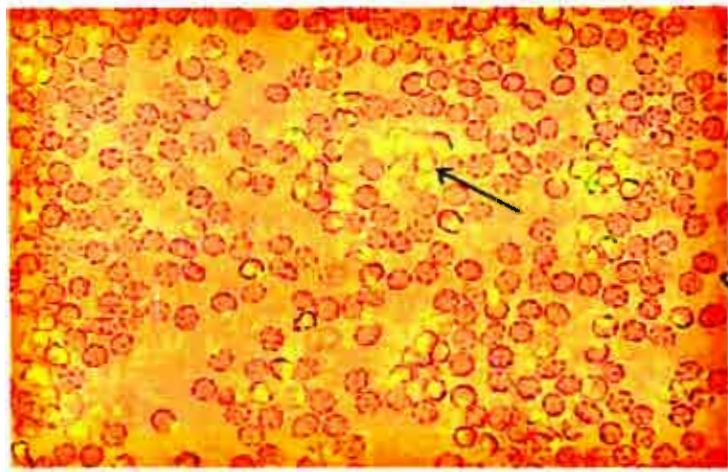


#### การตรวจหาคอนสมบัติ auto-agglutination

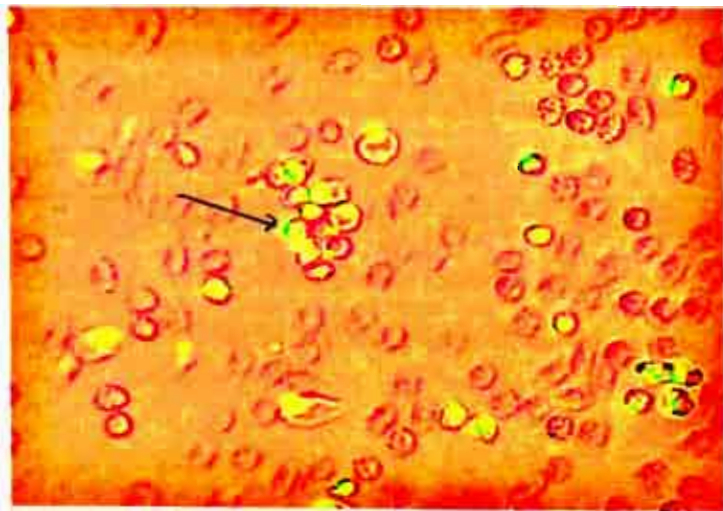
จำนวนเชื้อทั้งหมด 182 ตัวอย่าง พบว่า 93 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 51) เกิดคุณสมบัติ autoagglutination (ดังรูปที่ 1, 2) 169 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 93) เกิด rosette formation (ดังรูปที่3) โดยพบ autoagglutination ร้อยละ43 ของเชื้อที่มาจากกลุ่มผู้ป่วย uncomplicated และร้อยละ 46 จากเชื้อในกลุ่ม severe malaria และ ร้อยละ100 ในกลุ่ม cerebral malaria.

จำนวนเม็ดเลือดแดงติดเชื้อในกลุ่มก้อน agglutination จะสูงสุดในตัวอย่างเลือดจากกลุ่ม cerebral malaria (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 6) รองลงมาคือกลุ่ม severe malaria(ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4) และ น้อยที่สุดในกลุ่ม uncomplicated malaria (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3) ความแตกต่างนี้มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p<0.003$ ). เชื้อที่แสดงคุณสมบัติ autoagglutination มักจะมาจากผู้ป่วยที่มีระดับเชื้อ ในกระแสเลือดสูง, ค่า urea ในเลือดสูง และค่าไบคาร์บอเนตต่ำ โดยการคำนวณทางสถิติ (multivariant) พบว่า ความสัมพันธ์ระหว่าง ระดับของเชื้อในเลือดกับภาวะการเกิด cerebral malaria เกี่ยวข้องกับการเกิด autoagglutination

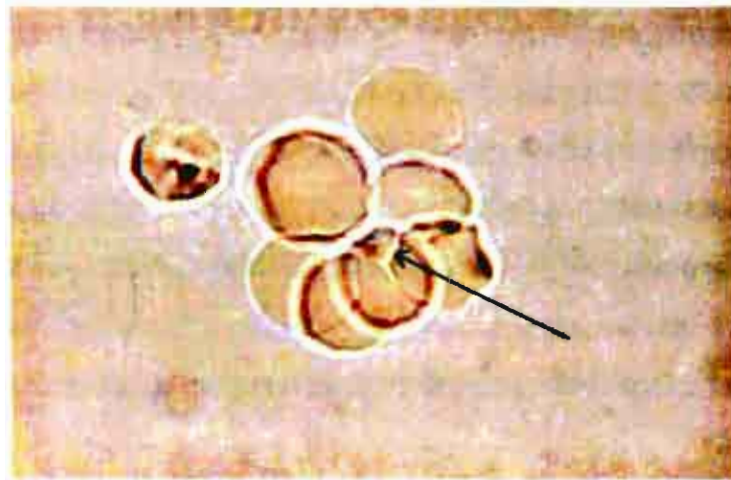
จำนวนเม็ดเลือดแดงติดเชื้อที่เกาะกลุ่มแบบ rosette formation จะสูงสุดในตัวอย่างเลือด จากกลุ่ม cerebral malaria (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 10) จำนวนเม็ดเลือดแดงติดเชื้อที่เกาะ กลุ่ม แบบ rosette formation จะไม่แตกต่างกันในตัวอย่างเลือดจากกลุ่ม severe malaria และ กลุ่ม uncomplicated malaria (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4) นอกจากนี้ยังพบว่า การเกิด rosette formation มีความสัมพันธ์ในทางบวกกับระดับของเชื้อ ค่าไบคาร์บอเนต ระดับยูเรีย ระดับบิลิรูบินในเลือด และมีความสัมพันธ์ในทางลบ กับ ระดับ อัลบูมิน



รูปที่ 1 แสดงเม็ดเลือดแดงติดเชื้อฟัลซิพารัม ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิดไม่รุนแรง  
เกิดการเกาะกลุ่ม หรือ autoagglutination โดยอาศัยเกร็ดเลือดเป็นตัวเชื่อม (→) กำลังขยาย 400 เท่า



รูปที่ 2 แสดงเม็ดเลือดแดงติดเชื้อฟัลซิพารัม ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียขั้นสมอง เกิดการเกาะกลุ่ม  
หรือ autoagglutination โดยอาศัยเกร็ดเลือดเป็นตัวเชื่อม (→) กำลังขยาย 400 เท่า



รูปที่ 3 แสดงเม็ดเลือดแดงติดเชื้อฟิลิปปารัม ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียขึ้นสมอง เกิดการเกาะกลุ่มแบบ rosette formation โดยอาศัยเกร็ดเลือดเป็นตัวเชื่อม (→) กำลังขยาย 1000 เท่า

#### ผลของ heparin และ EGTA กับ การเกิด autoagglutination

จากการศึกษาตัวอย่างที่เชื้อเกิดคุณสมบัติ autoagglutination จำนวน 20 ตัวอย่าง พบว่าการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงติดเชื้อนี้ สามารถแยกออกจากกันได้โดย heparin และ EGTA การแยกตัวจะมากหรือน้อยขึ้นกับความเข้มข้นของ heparin และ EGTA

heparin ปริมาณ 50 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ EGTA ปริมาณ 0.01 mM ทำให้เม็ดเลือดแดงติดเชื้อในกลุ่ม autoagglutination แยกออกจากกัน 50% เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ จะถูกแยกออกจนไม่มีการเกาะกลุ่ม autoagglutination เกิดขึ้น ที่ heparin 1000 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ EGTA 1 nM. (ดังรูปที่ 4,5)

#### **สรุปผลการวิจัย**

การศึกษาการเกาะกลุ่มหรือ autoagglutination ของเม็ดเลือดแดงติดเชื้อฟิลิปปารัม มาลาเรียนี้ ได้เริ่มต้นศึกษาเชื้อมาลาเรียในทวีปแอฟริกา และรายงานว่าคุณสมบัติดังกล่าวพบได้ทั่วไป และมีความสัมพันธ์กับการเกิดความรุนแรงของโรค (11) คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาการเกาะกลุ่มหรือ autoagglutination ของเม็ดเลือดแดงติดเชื้อฟิลิปปารัม มาลาเรียในประเทศไทย พบว่า ร้อยละ 50 ของเชื้อฟิลิปปารัมมาลาเรีย ในประเทศไทย จะเกิด autoagglutination โดยมีเกร็ดเลือดเป็นตัวเชื่อม โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เชื้อทุกตัวที่มาจาก กลุ่มผู้ป่วยมาลาเรียขึ้นสมอง จะเกิด autoagglutination

Autoagglutinationนี้จะเกิดขึ้นเมื่อเชื้อเจริญเติบโตถึงระยะ trophozoite หรืออายุประมาณ 30-32 ชั่วโมง สามารถอธิบายการเกิดได้โดย CD36บนเกร็ดเลือด เชื่อมต่อกับ PfEMP-1 (*P. falciparum* erythrocyte membrane protein-1) บนผิวเม็ดเลือดแดงติดเชื้อ (12) ซึ่งคล้ายกับกลไกการเกิด cytoadherence ของเชื้อมาลาเรีย (13,14,15,16,17,18) เมื่อวิเคราะห์ผล ทางสถิติแล้วพบว่า autoagglutination นี้สัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค โดยเฉพาะมาลาเรียขึ้นสมอง ซึ่งสอดคล้องกับรายงาน ก่อนหน้านี้ (11,12) ทั้งนี้อาจจะอธิบายได้โดย กลุ่มก้อน autoagglutination สามารถอุดตันทางเดิน กระแสเลือดในเส้นเลือดฝอย ทำให้อาหารและอากาศไปเลี้ยง อวัยวะสำคัญต่างๆอย่างเฉียบพลัน

คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาต่อไปถึง คุณสมบัติของกลุ่มก้อน autoagglutination และพบว่ากลุ่มก้อนนี้ สามารถแยกออกจากกันโดยใช้ heparin และ EGTA ซึ่งคุณสมบัตินี้คล้ายกับการเกิด rosette formation (19,20) และบ่งชี้ว่าการเกาะกลุ่มนี้เป็น lectin-like interaction และขึ้นอยู่กับระดับของแคลเซียม ความรู้ที่ได้นี้อาจจะนำไปประยุกต์ใช้ในการดูแลรักษา ผู้ป่วยโรคมาลาเรียได้ แต่อย่างไรก็ตามจะต้องมีการศึกษาในรายละเอียดเกี่ยวกับ ปริมาณการใช้ heparin อย่างปลอดภัยในผู้ป่วยโรคมาลาเรีย

## เอกสารอ้างอิง

1. Timasan K. Malaria situation and control in Thailand. Joint International Tropical Medicine Meeting, 1999.
2. Aikawa M, Iseki M, Barnwell JW, et al. The pathology of human cerebral malaria. Am J Trop Med Hyg 1990; 43: 30-37.
3. Turner G. Cerebral malaria. Brain Pathology. 1997; 7: 569-582.
4. Pongpanaratn E, Riganti M, Punpoowong B and Aikawa M. Microvascular sequestration of parasitized erythrocyte in human falciparum malaria: a pathological study. Am J Trop Med Hyg 1991; 44: 168-175.
5. Udomsangpetch R, Wahlin B, Carlson J, et al. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes form spontaneous erythrocyte rosettes. J Exp Med 1989; 169: 1835-1840.
6. Chotivanich K, Udomsangpetch R, Simpson J, et al. Parasite multiplication potential and the severity of falciparum malaria. J Infect Dis 2000; 181: 1206-1209.