

I. บทคัดย่อ

การติดเชื้อมาลาเรียประเภท *Plasmodium falciparum* เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญ โดยผู้ป่วยอาจเกิดอาการแทรกซ้อนทางคลินิก อาการแทรกซ้อนที่ทำให้มีอัตราการตายสูงคือ cerebral malaria เชื่อกันว่า pathophysiology หนึ่งของ cerebral malaria นั้นเกี่ยวข้องกับการอุดตันของหลอดเลือด capillary และ post capillary venules จากเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อฟัลซิพาร์มในระยะ mature stage ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับปฏิกริยาระหว่าง host receptor หรือ parasite ligand ที่เกี่ยวข้อง อันเป็นวัตถุประสงค์ของโครงการ อาจทำให้เข้าใจถึงกลไกที่จะป้องกันการเกิดปฏิกริยาระหว่าง receptors บนผิวเซลล์บุหลอดเลือดและ ligand บนผิวเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ

กลุ่มผู้วิจัยได้รับ blood samples ของผู้ติดเชื้อ *P. falciparum* จาก ศ.นพ.ศรชัย หล่ออารีย์สุวรรณ รพ. เวชศาสตร์เขตร้อน ม.มหิดล และทำการเลี้ยงเชื้อปรับสภาพเป็นจำนวนทั้งสิ้น 235 isolates จากนั้นทำการทดสอบการเกาะติดของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อเฉพาะ isolate ที่แบ่งตัวได้รวดเร็ว จำนวน 82 isolates กับ C32 melanoma cells, CD36, intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), thrombospondin (TSP), chondroitin sulfate A (CSA), heparan sulfate (HS) และบางสายพันธุ์กับ Chinese hamster ovary cells (CHO) ที่มี E-selectin และ vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) แสดงออก (express) อยู่บนผิวเซลล์ พบว่าเม็ดเลือดแดงติดเชื้อแทบทุก isolates จับกับ CD36 และ TSP เม็ดเลือดแดงติดเชื้อบาง isolates จับกับ ICAM-1 และ chondroitin sulfate A บ้างแต่ในปริมาณที่ไม่ใคร่สูง ไม่พบการเกาะติดของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ *P. falciparum* กับ CHO cells ซึ่งถูก transfect ด้วย E-selectin หรือ VCAM-1 เมื่อเปรียบเทียบกับ untransfected CHO cells ลักษณะการเกาะติดของเม็ดเลือดแดงซึ่งติดเชื้อฟัลซิพาร์ม ส่วนใหญ่ไม่มี pattern ที่แน่นอน และเมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติ เพื่อดูความสัมพันธ์ระหว่างการเกาะติดของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อต่อ receptor และ ชนิดอาการทางคลินิกซึ่งกำหนดโดย World Health Organization เป็น 2 ระดับคือ uncomplicated และพบว่าไม่มี correlation อย่างมีนัยสำคัญแต่อย่างใด สิ่งที่น่าสนใจที่พบคือ เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ isolate SL83 ซึ่งมีการเกาะติดกับ CSA ในระดับปานกลาง และไม่เกาะกับ adhesion molecule ที่สำคัญคือ CD36 นั้นได้มาจากผู้ป่วยชาย ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสังเกตว่า การเกาะติดกับ CSA ซึ่งเคยคิดว่าพบในผู้ป่วยหญิงตั้งครรภ์เท่านั้น อาจพบในเฉพาะผู้ป่วยที่เป็นชายก็ได้ โดยอาจมีการเกาะติดในอวัยวะอื่นที่มีการแสดงออกของ CSA สูงบนผิวเซลล์ เช่น ปอด เป็นต้น

นอกจากลักษณะของการเกาะติดของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ กลุ่มผู้วิจัยได้ทำการตรวจสอบลักษณะของ rosette formation ของเชื้อเพื่อดูถึงความสำคัญของ degree rosetting และขนาดของ rosette กับ clinical severity, blood group, และการเกาะติดกับ CD36 ไม่พบวาระดับของการเกิด

rosette และขนาดของ rosette เกี่ยวข้องกับตัวแปรเหล่านี้เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติ การทดลองนี้ทำใน clinical specimen จำนวน 262 samples ผลการทดลองเดิมนี้นัดกับข้อสรุปที่ว่า rosette formation เกี่ยวข้องอย่างมีนัยสำคัญกับ clinical severity ซึ่งในการทดลองนั้นใช้จำนวน specimens น้อยกว่ามาก

จากการทดลองเกี่ยวกับ cytoadherence และ rosette formation จะเห็นได้ว่าพยาธิสภาพของการเกิด severe malaria หรือ cerebral malaria คงมิได้เกิดจาก sequestration และ vascular obstruction เพียงอย่างเดียว ส่วนกรณีที่มีผู้คิดว่า CD36 เกี่ยวข้องกับการ form rosette ซึ่งการวิจัยทำใน Lab strains นั้นผู้วิจัยไม่พบว่าขนาดและปริมาณ rosette มีความสัมพันธ์ กับปริมาณการเกาะติดกับ CD36 แต่อย่างใด ทั้ง MAbs ที่จำเพาะกับ CD36 ก็ไม่สามารถสลายการเกิด rosette ได้

กลุ่มผู้วิจัยได้ทำการศึกษาคัดเลือก *P. falciparum* สายพันธุ์ที่แสดงการเกาะติดกับ C32 melanoma cell และ CD36 ในระดับต่ำ ($0-100/\text{mm}^2$), ปานกลาง ($100-500/\text{mm}^2$) และสูง ($>500/\text{mm}^2$) จำนวนทั้งสิ้น 24 สายพันธุ์ ทำการเลี้ยงเพิ่มปริมาณสูง เพื่อเตรียมบไลดโครโมโซม และได้ทำการวิเคราะห์ทำแผนที่ (map) ของแขนขาโครโมโซม 9 ใช้เทคนิค pulsed-field gel electrophoresis พบว่าขนาดของโครโมโซมที่เล็กหรือใหญ่ มิได้ทำให้การเกาะติดมีปริมาณมาก หรือน้อย เป็นสัดส่วนกัน หรือตำแหน่งที่เคยมีผู้ predict ว่าเป็นตำแหน่งของ cytoadherence gene เมื่อถูก delete ไปก็ไม่จำเป็นว่าการเกาะติดกับ C32 melanoma จะลดลงอย่างไรก็ตามเนื่องจากกลุ่มผู้วิจัยยังพบว่าในบาง isolate จาก clinical samples ยังมี mix infection ของ *P. falciparum* มากกว่า 1 ชนิดปะปนอยู่จึงทำ limiting dilution เพื่อ clone เชื้อ *P. falciparum* พบว่าได้รับโคลนทั้งสิ้น 4 โคลน เป็นโคลนที่มีโครโมโซม 9 ขนาด intermediate size 2 โคลน และ small size 2 โคลนจากการทำ restriction map ด้วย Sma I พบว่า โคลนที่มีโครโมโซม 9 ขนาดเล็กสามารถเกาะกับ C32 melanoma ได้ถึงประมาณ 1,000 เซล/ต่อ 100 เซลล์เมลานوما และ ชิ้นของโครโมโซม 9 ที่ถูก delete ออกไปมีขนาดใหญ่กว่าของ C10 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่เป็นตัวควบคุม Breakpoint ของโครโมโซม 9 ของ clone SL86B และ SL86D นี้อยู่ในระดับใกล้เคียงกับ breakpoint ของ CSL2 หรือ NF7 ดังนั้นจะเห็นว่า ยีนที่สำคัญในการควบคุมการเกาะติดของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ *P. falciparum* ต่อ CD36 คงจะไม่ได้อยู่ในส่วนที่ถูก delete บนแขนขาของโครโมโซม 9 ทั้งนี้ผลงานวิจัยอีกชิ้นหนึ่ง จากกลุ่มของ David Kemp ก็พบว่าไม่มี var gene อยู่บนแขนขาของ chromosome 9.

II Abstract

The association between cytoadherence of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes and the severity of malaria has been evaluated. In this study, we investigate adherence to C32 melanoma cells, CD36, intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), thrombospondin (TSP), E-selectin, vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), and chondroitin sulfate A (CSA) of 62 *P. falciparum* isolates from patients suffering from acute falciparum malaria. Adherence to purified adhesion molecules varied greatly among different parasite isolates, but none bound to E-selectin and VCAM-1 beyond control levels. Some *P. falciparum* isolates adhered to ICAM-1 and to CSA, a newly identified receptor for adherence. There was no correlation between *in vitro* binding to any one receptor and the patients' conditions. In addition, we investigated the characteristics of adherence to CSA and to C32 melanoma cells. Infected erythrocytes continued to adhere after trypsin digestion and soluble CSA inhibited adherence to C32 melanoma cells in a dose-dependent manner. The results imply a role for CSA in the natural infection of *P. falciparum*.

The ability of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes from 162 Thai patients with uncomplicated malaria, 82 patients with severe malaria and 19 patients with cerebral malaria, to form rosettes *in vitro* was also assessed. Of 263 isolates, 62 were evaluated for their adherence to different target molecules. We found that wide variation occurred in isolates from all groups in the level of rosette formation and adherence to CD36, intracellular adhesion molecule-1, thrombospondin and chondroitin sulfate A. No statistically significant correlation between the magnitude of rosette formation and disease severity ($P > 0.05$). In addition, our results from the use of purified CD36 as an adherence receptor showed no association between the degree rosetting and level of cytoadherence ($P > 0.05$, $r = -0.04$). Our data provide evidence that rosette formation and cytoadherence involve different molecular mechanisms and both phenomena can occur in all manifestation of the disease.

The analysis of chromosome 9 of 24 parasite isolates demonstrated no association between deletion of chromosome 9 and cytoadherence to any receptors, including CD36. This study was confirmed after 4 parasite clones were obtained. Parasite with small form chromosome 9 can adhere to CD36. The results suggested that the essential gene for cytoadherence may not localize in this region at the right end of chromosome 9.