



รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษากลไกการเกาะติดของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ
Plasmodium falciparum กับ Chondroitin Sulfate A

ศาสตราจารย์ ดร. ศันสนีย์ ไชยโรจน์

ธันวาคม พ.ศ. 2543

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษากลไกการเกาะติดของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ
Plasmodium falciparum กับ Chondroitin Sulfate A

รองศาสตราจารย์ ดร. ศันสนีย์ ไชยโรจน์

สังกัด

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ส่วน specimen และการอำนวยความสะดวกในการไป อ. แม่สอด จังหวัดตาก นั้น ได้รับความกรุณาจาก Professor Nick J. White และ Dr. Francois Nosten

บทคัดย่อ

เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ *Plasmodium falciparum* ในระยะ trophozoite และ schizont จะมีการเปลี่ยนแปลง ที่ cell membrane โดยปรสิตจะสร้างโปรตีนหลายประเภทมา deposit ไว้ โปรตีนชนิดหนึ่งเรียกว่า *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein-1 (Pf-EMP-1) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ encode ด้วย ยีนที่ชื่อ var ทำหน้าที่สำคัญเกี่ยวกับการเกาะติด (cytoadherence) กับ adhesion molecule ชนิดต่างๆ ที่อยู่บน host cell โดยเฉพาะอย่างยิ่ง endothelial cells ใน deep vasculature การเกาะติดที่สำคัญประเภทหนึ่งคือ การเกาะติดระหว่างเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อกับ syncytiotrophoblast cell ใน placenta เมื่อศึกษา molecular interaction ของ parasite ligand คือ Pf-EMP-1 พบว่า มี interaction กับ glycosaminoglycan ที่ชื่อว่า chondroitin sulfate A (CSA) โดยเม็ดเลือดแดงติดเชื้อจาก placental specimen จะเกาะติดกับ CSA ในระดับสูงและ correlate กับ placental infection อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้น interaction ของเม็ดเลือดแดงติดเชื้อกับ CSA ใน placenta จึงถูกสรุปว่าเป็นกลไกสำคัญของการเกิดครรภ์เป็นพิษ การแท้ง หรือการตายของเด็กเมื่อหญิงมีครรภ์ติดเชื้อมาลาเรียชนิดนี้

งานวิจัยชิ้นนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปฏิกิริยาระดับโมเลกุลระหว่าง parasite ligand บนผิวเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อกับ CSA โดยอาศัยการใช้สาร glycosaminoglycans อื่นๆ ที่ทราบโครงสร้างเพื่อยับยั้งการเกาะติดของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อกับ CSA หรือ CSA-expressed cell นอกจากนี้ยังทำการศึกษาถึง interaction ของส่วนต่างๆ PfEMP-1 กับ CSA และ glycosaminoglycan ที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับ CSA โดยการผลิต fusion protein ของ recombinant clone ต่างๆ ของยีน var และทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเกาะติดของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ งานวิจัยเริ่มโดยการรวบรวม specimen คือเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อจากหญิงมีครรภ์และตรวจสอบลักษณะการเกาะติดกับ CSA และ CD36 จากนั้นจึงเลือกปรสิตสายพันธุ์ที่เกาะกับ CSA ได้ในระดับสูงมาศึกษา ในขณะเดียวกันกลุ่มผู้วิจัยได้ทำการ establish ปรสิตสายพันธุ์หนึ่งซึ่งจับกับ CSA (SL83) โดยทำการ select จนได้ population ของปรสิตซึ่งสามารถเกาะติดในระดับสูง ด้วยวิธี competitive inhibition assay กลุ่มผู้วิจัยพบว่า CSA, CSD และ CSE ในความเข้มข้นต่ำๆ สามารถยับยั้งการเกาะติดของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อได้ ในขณะที่ polyolpolysulfate, pentosan polysulfate, colominic acid, keratan sulfate, CSB และ CSC ที่ความเข้มข้นสูงจะ inhibit ได้เพียงในระดับต่ำถึงระดับปานกลาง จากผลการทดลองนี้ กลุ่มผู้วิจัยจึงได้ทำการทดสอบการเกาะติดของเชื้อ *Plasmodium falciparum* สายพันธุ์ที่ได้จากหญิงมีครรภ์ พบว่าสามารถเกาะติดกับ CSD และ CSE ได้ในระดับต่างๆ กัน ดังนั้น proteoglycan ในร่างกาย ซึ่งมีส่วนประกอบของ CSD และ CSE ก็อาจทำหน้าที่เป็น receptor ของการเกาะติดของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อได้เช่นกัน

เนื่องจากเคยมี report ว่าเมื่อให้ heparin กับคนไข้ที่ติดเชื้อมาลาเรีย พบว่ามี mature infected red cells ออกมาใน circulation ของผู้ป่วย กลุ่มผู้วิจัยจึงทำการทดสอบโดยใช้ low molecular weight heparins ชนิดต่างๆ เพื่อศึกษาถึงการ reverse การเกาะติดของเม็ดเลือด

แดงติดเชื้อมนเซลล์ที่ express CSA พบว่า low molecular weight heparins สามารถ reverse การเกาะติดได้โดยระดับของการ reverse ซึ่งอยู่กับชนิดของ heparin

กลุ่มผู้วิจัยยังได้ทำการ express recombinant expression protein ของส่วนต่างๆ ของ Pf-EMP-1 เพื่อทำการตรวจหา interactive site ของ Pf-EMP-1 ของ *P. falciparum* สายพันธุ์ที่ เกาะติดกับ CSE และ CSD ซึ่งขณะนี้การทดลองกำลังดำเนินอยู่และจะรายงานผลให้ทราบต่อไป

Abstract

Chondroitin sulfate A (CSA) is an important receptor for *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes in the placenta. To study the molecular interaction between parasitized erythrocytes (PE) to CSA, we performed in vitro cytoadherence inhibition assays of PE infected with wild and laboratory isolates of *P. falciparum* to CSA using various glycosaminoglycans (GAGs). Chondroitin sulfate D (CSD) and chondroitin sulfate E (CSE), which comprise similar repeating disaccharide structure and sulfation at position 4 of N-acetyl-galactosamine, were able to almost completely inhibit adhesion at low concentrations. The effect was dose dependent with the same degree of inhibition to that of soluble CSA. Partial inhibitory activity was observed when chondroitin sulfate C, chondroitin sulfate B and polyolpolysulfate were used. Other GAGs such as keratan sulfate, colominic acid and Suramine were unable to inhibit PE adherence. The results suggest that the 4-sulfate amino sugar moiety as well as the basic disaccharide structure of chondroitin sulfate may influence the degree of this molecular interaction. Interestingly, PE of the tested wild isolates could adhere to immobilized CSD and CSE at different levels while PE of CSA-selected laboratory lines could not. The results indicate the specificity of the interaction of the selected parasite ligands to CSA and that variability in the level of adhesion to CSD and CSE is due to mixed parasite populations with different adhesive motifs. In addition, we evaluated the importance of sulfate as determinants of adhesion by using pentosan polysulfate, an oversulfated molecule with a xylan backbone, as an inhibitor. A reduction of PE adherence of most isolates tested was observed. Hence, only the sulfate content and pattern of this molecule could affect the adhesive interactions. In addition, different low molecular weight heparins also exhibited their capacity to inhibit CSA-mediated cytoadherence of PE, thereby providing the basis for developing future therapeutic strategies.

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

การติดเชื้อมาลาเรียประเภท *Plasmodium falciparum* ในหญิงมีครรภ์ ก่อให้เกิดอาการแทรกซ้อนทางคลินิก โดยเฉพาะหญิงมีครรภ์ครั้งแรก (Primigravidae) จะพบว่ามี ความรุนแรงของอาการแทรกซ้อน รวมทั้งความหนาแน่นของเชื้อในรกเมื่อเปรียบเทียบกับ การตั้งครรภ์ครั้งต่อ ๆ มาได้ มีการค้นพบว่า chondroitin sulfate A เป็น receptor ที่สำคัญในการ เกาะติด (cytoadherence) ของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ แต่ยังไม่ทราบถึง ligand กลไกการเกิด พยาธิสภาพ ตลอดจนภูมิคุ้มกัน ซึ่งอาจเกี่ยวข้องทำให้อาการแทรกซ้อนทางคลินิกมีความรุนแรงน้อยลงในการตั้งครรภ์ครั้งต่อมา ผู้วิจัยได้พบเชื้อที่สามารถผลิต Ligand บนผิวเม็ดเลือดแดงสามารถเกาะติดกับ chondroitin sulfate A ในโครงการวิจัยที่ได้รับทุนพัฒนานักวิจัยครั้ง ก่อน (SL83) จึงสนใจที่จะศึกษาลักษณะทางชีวเคมีของ ligand บนผิวเซลล์ ตรวจสอบความสัมพันธ์ของการเกาะติดกับการแสดงออกทางพันธุกรรมของยีน *var* ซึ่ง encode เป็นโปรตีนที่ชื่อว่า *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein-1 (PfEMP-1) บนผิวเซลล์ของเม็ดเลือดแดง และความสามารถของเชื้อที่จะแสดงออก (express) โปรตีนหรือ ligand มากกว่า 1 ชนิดบนผิวเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยความรู้ที่ได้รับอาจเป็นประโยชน์ในการพัฒนาการ ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง receptor-ligand หรือลดความรุนแรงของอาการแทรกซ้อนของ หญิงมีครรภ์ที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Literature review) และเอกสารอ้างอิง

Sequestration คือการเกาะติดของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมภายในอวัยวะต่าง ๆ ปรากฏการณ์นี้เกี่ยวข้องกับการเกาะระหว่าง receptor-ligand ซึ่งโดยทั่วไปเป็นชีวโมเลกุลประเภทโปรตีน แต่ในระยะ 3 ปีที่ผ่านมาได้มีการค้นพบทางวิทยาศาสตร์ว่า Sequestration อาจเกิดจากการที่เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อเกาะกับ glycosaminoglycan (GAG) ที่เรียกว่า chondroitin sulfate A (1, 2) ซึ่ง express อยู่บนผิว C32 melanoma cell และ Chinese hamster ovary cells (CHO cells) หรือเมื่อ GAG ตัวนี้ถูก immobilized อยู่บน plate ส่วนใน *in vivo* พบ correlation ของการเกาะติดในรก (placenta) ปอด หรือแม้แต่ endothelial cell ในหลอดเลือดสมอง (3, 4, 5) ซึ่งผลของการที่มีการเกาะติดภายในรกนี้อาจเป็นสาเหตุของการเกิดพยาธิสภาพ การตายในหญิงมีครรภ์ที่ติดเชื้อมาลาเรียฟัลซิพารัม การ ที่ทารกมีน้ำหนักต่ำ (Low birth weight) รวมถึง pulmonary oedema และการเกิด cerebral malaria

สำหรับการค้นพบครั้งแรกพบว่า chondroitin sulfate A เป็น receptor ของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม เกิดจากการที่กลุ่มนักวิจัย (รวมถึงผู้เสนอโครงการขณะนั้นทำ Postdoctoral Work ที่ the Walter and Eliza Hall Institute) ได้ทำการคัดเลือกปรีสตี สายพันธุ์ซึ่งเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อสามารถเกาะกับ CHO cells และคัดเลือกปรีสตีที่อยู่ในเม็ด

เลือดแดงที่ถูก trypsinized โปรตีนบนผิวเซลล์และเซลล์นั้นยังสามารถเกาะกับ C32 melanoma cells ทำให้คาดคะเนว่ามี receptor ใหม่อยู่บนผิวเซลล์ที่ยังไม่มีผู้รายงานมาก่อน จากการยับยั้งการเกาะติดด้วย free chondroitin sulfate A, B และ C, free heparan sulfate, dextran sulfate และอื่น ๆ พบว่า free chondroitin sulfate A เท่านั้นที่ยับยั้งและ reverse การเกาะติดได้ (1, 2) และการที่พบว่าเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อปรสิตสายพันธุ์นี้สามารถเกาะได้ดีกับ C32 melanoma cell ได้ เนื่องจากมี โมเลกุลบนผิวเซลล์ C32 melanoma cells ที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาด 250,000 กิโลดาลตัน ซึ่งประกอบด้วย chondroitin sulfate A จำนวน 13 โมเลกุล (6) ส่วน free CD36 และ free intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) ซึ่งเป็น common adhesion molecules ไม่สามารถยับยั้งการเกาะติดของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์นี้ (2)

GAG เป็นชีวโมเลกุลจำพวก heteropolysaccharides ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนที่เป็น N-acetylated และ hexuronic acid โดยมี sulfate เป็นส่วนประกอบ ฟอรั่มเป็น side chain ของ protein backbone เรียกโมเลกุลนี้ว่า proteoglycan ได้เคยมีรายงานว่า proteoglycan บางชนิดใช้ในการรักษาโรค และเกี่ยวข้องกับ heparin ซึ่งใช้เป็น anticoagulant ในโรค thromboembolic diseases heparan sulfate สามารถจับกับโปรตีนหลายชนิดรวมถึงโปรตีนสำคัญในระบบการไหลเวียนเลือด (7) สำหรับโรคมาลาเรีย GAG ตัวแรกที่มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับการจับของ sporozoites บนผิวเซลล์ตับ (hepatocyte) คือ Heparan sulfate (HS) นั้นเอง (8) ดังนั้น ถ้าเราสามารถบอกได้ว่า motif ใดของ chondroitin sulfate A ทำปฏิกิริยากับ ligand บนผิวเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ เราอาจนำความรู้นี้มาสร้างและออกแบบ specific oligosaccharide เพื่อใช้ในการรักษาโรคได้ ดังเช่นเคยทำกับ heparin สำหรับ antithrombin III และ fibroblast growth factor

ความเข้าใจเกี่ยวกับบทบาทของ chondroitin sulfate A ในการเกิด adhesion ยังไม่เป็นที่แน่ชัด chondroitin sulfate สามารถพบได้ในเลือด ซึ่งปกติจะจับกับโปรตีนโดยมีความเข้มข้นประมาณ 1 µg/ml และ 40% ของ chondroitin sulfate ในเลือดประกอบด้วย N-acetylglucosamine ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของ chondroitin sulfate (9) โดยระดับความเข้มข้นดังกล่าวในเลือดต่ำกว่าระดับของ chondroitin sulfate A ที่ยับยั้งการเกาะติดของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรีย (2, 9) ปัจจุบันยังไม่มีผู้ใดทราบถึงระดับของ chondroitin sulfate A ในเลือดของผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม

ส่วนเชื้อมาลาเรียฟัลซิพารัมสายพันธุ์ที่พบในธรรมชาติจาก (จากผู้ป่วย) บางสายพันธุ์สามารถเกาะติดกับ CSA ในระดับใกล้เคียง ICAM-1 ซึ่งการศึกษานี้ทำโดยกลุ่มผู้เสนอโครงการซึ่งได้รับเงินทุนสนับสนุนจาก ส.ก.ว. ในครั้งก่อน พบสายพันธุ์จากคนไข้บางคนที่ไม่ใช่หญิงมีครรภ์ สามารถเกาะกับ chondroitin sulfate A และได้คัดเลือกสายพันธุ์หนึ่งชื่อว่า SL83 ซึ่งเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ SL83 นี้จะจับ chondroitin sulfate A และ Thrombospondin

แต่ไม่จับกับ CD36 (10) สายพันธุ์นี้จึงได้รับการเลี้ยงใน *in vitro* culture และศึกษาต่อไป ส่วนรายงานในคนไข้จาก Papua New Guinea ก็ให้ผลคล้ายคลึงกัน (2) นอกจากรายงานในคนไข้ chondroitin sulfate A ยังเป็น receptor ที่พบบน endothelial cells ของ Saimiri monkey (SBEC) (3, 11) และเม็ดเลือดแดงติดเชื้อสายพันธุ์จากคนไข้จำนวน 3 ใน 5 สายพันธุ์สามารถจับกับ SBEC การเกาะติดนี้ถูกยับยั้งด้วย chondroitin sulfate A ได้อย่างจำเพาะ

การตรวจดูการเกาะติดใน *in vitro* ภายใต้ physiologic flow พบว่าเม็ดเลือดแดงติดเชื้อ *P. falciparum* สามารถจับกับ chondroitin sulfate A ภายใต้ wall shear stresses ที่ 0.05-0.1 Pascal จำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงที่เกาะติดและลักษณะการเกาะเป็นในระดับเดียวกับการเกาะติดของเม็ดเลือดแดงติดเชื้อกับ CD36 และ ICAM-1 (12, 13) และต้องใช้ shear stress ที่ 1.2 Pascal เพื่อจะ detach 50% ของเม็ดเลือดแดงติดเชื้อที่เกาะอยู่ จึงเป็นหลักฐานสำคัญในทาง physiology ว่าการเกาะติดของเม็ดเลือดแดงติดเชื้อกับ chondroitin sulfate A คงทนต่อ Shear Stress ใน blood vessel (14)

สำหรับ ligand ของ chondroitin sulfate A นั้นยังไม่มีผู้พบว่าเป็นโมเลกุลใดเพียงแต่มีข้อมูลจากการศึกษาของผู้วิจัยว่าเป็นโมเลกุลที่มีคุณสมบัติ trypsin-insensitive (1, 2) ในการทดลองนั้นพบว่า T4 ซึ่งเป็นโปรตีนสายพันธุ์ที่ถูกคัดเลือกให้เกาะกับ chondroitin sulfate A มี PfEMP-1 ที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างไปจากโปรตีนแม่แบบที่ชื่อ FAF-EA8 ซึ่งเกาะกับ chondroitin sulfate A ในระดับต่ำ เนื่องจากว่า PfEMP-1 ซึ่ง encode โดยยีน *var* เป็น ligand ที่เกี่ยวข้องกับการเกาะติดกับ CD36, ICAM-1 และ Thrombospondin (15) ดังนั้นหากศึกษา sequence ของ *var* gene (16) ในสายพันธุ์ที่เกาะกับ chondroitin sulfate A ก็อาจพบ conserved domain ใน *var* gene นั้น

ส่วนความสัมพันธ์ของ chondroitin sulfate A กับครรภ์เป็นพิษในมาลาเรีย เริ่มจากการศึกษาของ Fried และ Duffy (4) พบว่าเม็ดเลือดแดงติดเชื้อซึ่งได้จากรกมักจะเกาะกับ chondroitin sulfate A และไม่เกาะกับ receptor อื่นๆ แต่ใน peripheral blood ของหญิงตั้งครรภ์พบว่าเม็ดเลือดแดงติดเชื้อ สามารถเกาะกับ receptor อื่นๆ ได้ด้วย ดังนั้น chondroitin sulfate A เป็นโมเลกุลสำคัญในรก ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย ทั้งนี้ระบบภูมิคุ้มกันในรกอาจสร้างภูมิคุ้มกันสำหรับการติดเชื้อครั้งต่อ ๆ มาจึงทำให้สังเกตเห็นได้ว่าระดับความหนาแน่นของเชื้อใน placenta จะลดลงในการตั้งครรภ์ครั้งต่อมา (เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง primigravidae และ multigravidae) (17)

จะเห็นได้ว่าการวิจัยเกี่ยวกับ chondroitin sulfate A และ ligand ของโมเลกุลนี้อาจนำไปสู่การรักษาโรคหรือลดความรุนแรงของโรคโดยเฉพาะในหญิงมีครรภ์ที่เป็นมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม นอกจากนี้ยังควรศึกษาถึงระบบภูมิคุ้มกันการตอบสนองในหญิงมีครรภ์ที่เป็น primigravidae หรือ multigravidae จึงเป็นหัวข้อการวิจัยที่น่าสนใจต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Chaiyaroj, S.C. *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 10805-8.
2. Rogerson, S.J. *et al.* (1995) *J. Exp. Med.* 182: 15-20.
3. Gay, F. *et al.* *J. Immunol. Meth.* 184: 15-28.
4. Fried, M. And Duffy, P.E. *Science* 272: 1502-4.
5. Maunza, K. *et al.* (1996) *Res. Immunol.* 147: 149-163.
6. Bumol, J.F. *et al.* (1984) *J. Biol. Chem.* 259: 12733-41.
7. Ihrcke, N.S. *et al.* (1993) *Immunol. Today* 14: 500-505.
8. Pancake, S.J. *et al.* (1992) *J. Cell Biol.* 117: 1351-1357.
9. Volpi, N. *et al.* (1995) *Biochem. Biophys. Acta* 1243: 49-58.
10. Chaiyaroj, S.C. *et al.* (1996) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 55: 76-80.
11. Robert, C. *et al.* (1995) *Res. Immunol.* 146: 383-393.
12. Cooke, B.M. and Coppel, R.L. (1995) *Parasitology Today*
13. Cooke, B.M. *et al.* (1994) *Br. J. Hematol.* 87: 162-170.
14. Cooke, B.M. *et al.* *Blood* (in press).
15. Baruch, D. *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 3497-3502.
16. Baruch, D. *et al.* (1995) *Cell.* 82: 77-87.
17. Brabin, B.J. (1985) *Rev. Infect. Dis.* 7: 579-603.

ผลงานวิจัยในรอบปีประกอบด้วย

1. วัตถุประสงค์

- 1.1 เพื่อศึกษาถึงปฏิกิริยาระดับโมเลกุลระหว่าง parasite ligand บนผิวเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมี chondroitin sulfate A
- 1.2 เพื่อศึกษาถึงการแสดงออกของโปรตีน *Plasmodium falciparum* membrane protein-1 ของเชื้อมาลาเรีย และความสัมพันธ์กับระดับการเกาะติดของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ

2. การดำเนินงาน

การดำเนินงานแบ่งเป็น 4 ขั้นตอนใหญ่ๆ คือ

- 2.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Plasmodium falciparum* สายพันธุ์ที่ได้จากหญิงมีครรภ์ และการตรวจหาระดับการเกาะติดกับ CSA

เมื่อได้รับเชื้อมาลาเรียจาก Mr. Alan Brockman และ Dr. Francois Nosten จาก อ. แม่สอด จังหวัดตาก ผู้วิจัยได้ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อจนกระทั่งมีเปอร์เซ็นต์ parasitemia สูงพอที่จะทำการตรวจวัดระดับการเกาะติดของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมี CSA และ CSA-expressed cell โดยในกรณีของ free CSA ได้ทำการ couple กับ phosphatidyl inositol และเคลือบ plastic Petri dish ส่วน CSA-expressed cell นั้น กลุ่มผู้วิจัยได้สั่งซื้อ Lung carcinoma cell (A549) มาจาก American Type Culture Collection และ seed ที่ 2×10^5 cell/ml ก่อนทำการทดลอง 1 คืน

เชื้อมาลาเรียที่นำมาลง culture มีทั้งเชื้อที่ได้มาจาก peripheral blood และ placental blood จำนวนทั้งสิ้นประมาณ 42 samples แต่สามารถทำการเพาะเลี้ยงได้เพียง 20 สายพันธุ์ ในจำนวน 20 สายพันธุ์ บางสายพันธุ์ก็แสดงการเกาะติดในระดับค่อนข้างสูงคือ 500-700 cell ต่อ 100 lung carcinoma (A549) cells บางสายพันธุ์ก็ประมาณ 100-300 เซลล์/100 A549 cells หรือในบางสายพันธุ์ไม่พบการเกาะติดเลย ซึ่งผลการทดลองนี้พบว่าแตกต่างไปจากรายงานซึ่งเคยมีว่า เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อจากคนไข้ที่มีครรภ์ทุกรายจะเกาะติดกับ CSA ในระดับสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งสายพันธุ์ที่มาจาก placental blood อย่างไรก็ตามเชื้อเหล่านี้หากถูกเลี้ยงไว้ใน culture เป็นเวลานานจะทำให้ความสามารถในการเกาะติดลดลง ซึ่งเป็นลักษณะที่พบได้เสมอสำหรับการเกาะติดกับโมเลกุลอื่นๆ เช่น CD 36, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)

- 2.2 การตรวจสอบถึง antigenic variation ของเชื้อที่มีความสามารถในการเกาะติดกับเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ

เชื้อที่ถูกเพาะเลี้ยงส่วนหนึ่งจะถูกแบ่งมาทำปฏิกิริยาที่เรียกว่า agglutination assay คือทดสอบการเกิดการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมีกับ convalescent sera ที่ได้มาจากคนไข้ที่ติดเชื้อมาลาเรีย และ serum ของกระด่ายที่ได้รับการ immunize ด้วย CSA-

selected isolates SL83 พบว่าการเกิด agglutination ของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ ไม่จำเป็นที่จะเกิดเฉพาะกับสายพันธุ์ที่มี paired convalescent sera เท่านั้น แต่อาจเกิดกับเม็ดเลือดแดงจากเชื้อสายพันธุ์อื่นๆ ได้ นอกจากนี้ trypsin treatment ของเม็ดเลือดแดงบางสายพันธุ์ ยังทำให้ agglutination เกิดได้ดีขึ้น เหมือนกับว่า trypsin treatment จะ expose domain ของ Pf-EMP-1 ที่ทำให้เกิด agglutination reaction

2.3 การศึกษาเกี่ยวกับ interaction ของ Pf-EMP-1 ของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อกับ CSA

ผู้วิจัยได้ทำการทดลองโดยทำ *in vitro* competitive inhibitory assay โดยใช้สารยับยั้งที่มีลักษณะเป็น glycosaminoglycan หลายชนิด รายละเอียดของผลการทดลองอยู่ในเอกสารแนบหมายเลข 1 คือ manuscript ที่ส่งไปวารสาร Infection and Immunity

2.4 การแสดงออกของ recombinant โปรตีน Pf-EMP-1 และการ map binding domain

กลุ่มผู้วิจัยกำลังทำการผลิต fusion protein ของ overlapping polypeptide ซึ่งเป็นส่วนของ cDNA ของ var จากสายพันธุ์ CS2 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีการจับกับ CSA เมื่อผลิต fusion protein เป็นที่เรียบร้อยแล้วจะทำการ map binding domain โดยวิธี competitive inhibition assay กับสายพันธุ์ที่จับกับ CSA, CSE และ CSD เพื่อพยายามที่จะ identify ส่วนของโมเลกุลที่ทำหน้าที่จับกับ glycosaminoglycan ทั้ง 3 ชนิดขณะนี้กำลังอยู่ในการดำเนินการ

3. กิจกรรมอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง

3.1 ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

- 3.1.1 S. Biswas, A. Escalante, S. Chaiyaroj, P. Angkasekwinai and A.A. Lal, 2000. Prevalence of point mutations in the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthetase genes of *Plasmodium falciparum* isolates from India and Thailand: a molecular epidemiologic study. **European Journal of Tropical Medicine & International Health (TM & IH)**. Volume 5, October 2000.
- 3.1.2 Chaisavaneeyakorn, S., Kongtaweelert, P., Angkasekwinai, P., Brockman, A., Nosten, F. and Chaiyaroj, S.C. 2001. Novel cytoadherence receptors, chondroitin sulfate D and E, and their inhibitory activities to CSA mediated cytoadherence of *Plasmodium*. **Infect Immun**. In press.
- 3.1.3 Chaisavaneeyakorn, S., Angkasekwinai, P., Watkins, P., Chaiyaroj, S.C. Adhesive characteristics and antigenic variations of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes from Thai pregnant women. **Acta Tropica**. Submitted.

3.2 จำนวนและรายละเอียดที่ได้รับเชิญไปเป็นวิทยากรและเสนอผลงาน

3.2.1 ได้รับเชิญจาก Thai Society of Microcirculation ให้เป็นวิทยากรในการบรรยาย เรื่อง Cytoadherence of *Plasmodium falciparum* – infected Erythrocytes to Endothelial Cells ณ โรงแรมปทุมวันปริ้นเซส วันที่ 16 ตุลาคม 2542

3.2.2 ได้รับเชิญให้เป็นวิทยากรบรรยายในการประชุม Inter-University Seminar on Cooperative Research on Tropical Biotechnology เรื่อง “Inhibition study of cytoadherence of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes to target cells expressed chondroitin sulfate A” ณ คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล วันที่ 16 ตุลาคม 2542

3.2.3 ได้รับเชิญจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติร่วมอภิปรายเรื่องลักษณะงานที่ต้องใช้สัตว์ทดลองในทศวรรษหน้า วันที่ 14 ธันวาคม พ.ศ. 2542 ณ ห้อง Auditorium ชั้น 3 วิทยาลัยนานาชาติ ม. มหิดล (ศาลายา)

3.2.4 ได้รับเชิญให้เสนอผลงานในการประชุม The Toyota Foundation Mini-Symposium on Malaria ณ คณะเวชศาสตร์เขตร้อน ม. มหิดล วันที่ 13-14 มกราคม 2543 เสนอผลงานเรื่อง Analysis of Mefloquine Resistance and pfmdr-1 Amplification of *Plasmodium falciparum* Isolates from Thailand.

3.3 การเชื่อมโยงทางวิชาการกับนักวิชาการอื่น ๆ ทั้งในและต่างประเทศ

- Dr. Altaf A. Lal, Center for Disease Control, Atlanta, U.S.A.
- Dr. Alan F. Cowman จาก The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Science, Melbourne, Australia
- Mr. Alan Brockman, Shoklo Research Lab จังหวัดตาก
- ผศ. ดร. ปรัชญา คงทวีเลิศ คณะแพทยศาสตร์ ม. เชียงใหม่

3.4 การเชื่อมโยงทางวิชาการกับนักวิทยาศาสตร์ภายในสถาบันเดียวกัน

มีการเชื่อมโยงกับ

- ศ. นพ. ศรชัย หล่ออารีย์สุวรรณ และคณะ
- รพ. เวชศาสตร์เขตร้อน ม. มหิดล
- ศ. ดร. สกิตต์ สิริสิงห
- สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ และคณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล

3.5 ปัญหาและอุปสรรค

ปัญหาใหญ่คือเงินที่ได้รับนั้นไม่พอ เนื่องจากการเลี้ยงมาลาเรียและสารเคมีมีราคาแพง งานที่ทำนั้นก็มีความยากขึ้น เนื่องจากเป็นงานที่ต่อเนื่องจากงานที่ทำในสมัยที่เป็นเมธีวิจัยรุ่นที่ 1

3.6 ความเห็นและข้อเสนอแนะ

ทางองค์การอนามัยโลก ซึ่งเป็น granting agency ได้ทำการเฉลี่ย publication ต่อจำนวนเงินสนับสนุน พบว่าใช้เงิน 1,200,000 บาท/paper การ evaluate ก็ควรให้ความสำคัญกับระดับของวารสารที่ลง

**Novel Cytoadherence Receptors, Chondroitin Sulfate D and E, and Their
Inhibitory Activities to Chondroitin Sulfate A-Mediated Cytoadherence
of *Plasmodium falciparum***

Sujittra Chaisavaneeyakorn,¹ Prachya Kongtaweelert,² Pornpimon

Angkasekwinai,¹ Alan Brockman,³ Francois Nosten,^{3, 4, 5}

and Sansanee C. Chaiyaroj^{1*}

*Department of Microbiology, Faculty of Science, Mahidol University,
Bangkok, Thailand,¹ and Department of Biochemistry, Chiangmai University,
Chiangmai, Thailand,² and Shoklo Malaria Research Unit, Mae Sot, Tak,
Thailand,³ and Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok,
Thailand,⁴ and Nuffield Department of Medicine, John Radcliffe Hospital,
Oxford, U.K.⁵*

Running Title: Chondroitin sulfate-mediated cytoadherence

Corresponding Author: Sansanee C. Chaiyaroj
Department of Microbiology
Faculty of Science, Mahidol University
Rama 6 Rd., Bangkok 10400
THAILAND
Tel:-(662) 246 0063 ext. 6600, 6610
Fax: (662) 644 5411
e-mail: scscy@mahidol.ac.th

ABSTRACT

Chondroitin sulfate A (CSA) is an important receptor for *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes in the placenta. To study the molecular interaction between parasitized erythrocytes (PE) to CSA, we performed in vitro cytoadherence inhibition assays of PE infected with wild and laboratory isolates of *P. falciparum* to CSA using various glycosaminoglycans (GAGs). **Chondroitin sulfate D (CSD) and chondroitin sulfate E (CSE), which comprise similar repeating disaccharide structure and sulfation at position 4 of N-acetyl-galactosamine, were able to almost completely inhibit adhesion at low concentrations.** The effect was dose dependent with the same degree of inhibition to that of soluble CSA. **Partial inhibitory activity was observed when chondroitin sulfate C, chondroitin sulfate B and polyolpolysulfate were used.** Other GAGs such as keratan sulfate, colominic acid and Suramine were unable to inhibit PE adherence. The results suggest that the 4-sulfate amino sugar moiety as well as the basic disaccharide structure of chondroitin sulfate may influence the degree of this molecular interaction. Interestingly, PE of the tested wild isolates could adhere to immobilized CSD and CSE at different levels while PE of CSA-selected laboratory lines could not. **The results indicate the specificity of the interaction of the selected parasite ligands to CSA and that variability in the level of adhesion to CSD and CSE is due to mixed parasite populations with different adhesive motifs.** In addition, we evaluated the importance of sulfate as determinants of adhesion by using pentosan polysulfate, an oversulfated molecule with a xylan backbone, as an inhibitor. A reduction of PE adherence of most isolates tested was observed. Hence, only the sulfate content and pattern of this molecule could affect the adhesive interactions. In addition, different low molecular weight heparins also exhibited their capacity to inhibit CSA-mediated cytoadherence of PE, thereby providing the basis for developing future therapeutic strategies.

INTRODUCTION

In areas of malaria endemicity, pregnancy is often complicated by *Plasmodium falciparum* infection. Premature delivery, stillbirths, low birth-weight of newborns as well as increased maternal morbidity and mortality are associated with the accumulation of *P. falciparum* malarial parasites in the intervillous spaces of placenta (4, 10). This process of accumulation appears to be mediated by adhesive interactions between parasite ligands on the surface of parasitized erythrocytes (PE) and host molecules. It has been demonstrated that a high-molecular-weight galactosaminoglycan, chondroitin sulfate A (CSA), present on the syncytiotrophoblasts that line the placenta is a receptor for PE (9). Another study suggested that intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on the syncytiotrophoblast surface can act as a receptor for parasite adhesion in placental sequestration (18). Recently, a new placental receptor, hyaluronic acid (HA), was identified by Beeson *et al.* (2). In that study, some isolates adhered to either CSA or HA while the others demonstrated binding to both receptors. The data also indicate that other unknown receptor(s) may be involved in PE adherence.

It has become apparent that glycosaminoglycan (GAG) oligosaccharide sequences, occurring in free form or as components of proteoglycans, participate in a number of important biological processes (3, 26). In the case of blood stage malaria, CSA was the first GAG to be identified as a cell adhesion molecule for PE in both static and flow-based assays (6, 7, 21, 22). Furthermore, CSA side chains of thrombomodulin, a type I transmembrane glycoprotein expressed by vascular endothelial cells, have also been implicated as a mediator of PE adherence (12, 23, 24). CS chains comprise a repeating disaccharide unit of N-acetyl-galactosamine (GalNAc) and hexuronic acid, both monosaccharides being linked with each other β -glycosidically (β 1-3) (28). Unsulfated

sequences with this structure are named chondroitin. Heterogeneity in sulfation pattern and hexuronic acid compositions differentiates CS into types. CSA contains a GalNAc-4-sulfate linked to glucuronic acid (Glc A). Chondroitin sulfate C (CSC) is distinguished from CSA by a 6-sulfation amino sugar moiety. Chondroitin sulfate B is similar in sulfation to CSA but the uronic acid is predominantly iduronic acid (IdoA). Chondroitin sulfate D (CSD) and chondroitin sulfate E (CSE) contain repeating units of $\text{GlcA}(2\text{SO}_3^-)\beta 1-3\text{GalNAc}(6\text{SO}_3^-)$ and $\text{GlcA}\beta 1-3\text{GalNAc}(4\text{SO}_3^-, 6\text{SO}_3^-)$, respectively (25).

The basis of molecular interaction of parasite molecule(s) on the surface of PE and CSA remains to be defined. In the study done by Beeson *et al.*, disaccharides and oligosaccharides were employed as competitive inhibitors for PE adherence to immobilized ligands (1). The investigators found that inhibition of adherence of a laboratory-selected isolate, CS2, was dependent on the molecular size of CSA. A CSA tetradecasaccharide fraction was the minimum length able to almost completely inhibit CS2 PE adherence and the effect was in a dose dependent manner. Additionally, analysis of sulfation suggested that the differences between CSA and CSC inhibitory activity could be attributed to the differences in sulfate content and sulfation pattern.

In this study, we have investigated specific characteristics of PE and CSA interaction using various GAGs together with certain drugs to inhibit clinical and laboratory *P. falciparum* PE adherence to immobilized CSA and CSA-expressed cells. We also demonstrated specific adherence of PE to chondroitin sulfate D and E as well as heparin interference on CSA-mediated cytoadherence of PE.

MATERIALS AND METHODS

***P. falciparum* isolates and culture.** Clinical *P. falciparum* isolates were established from peripheral blood or delivered infected placentae of pregnant women from Shoklo Malaria Research Unit, Mae Sot, Tak. Parasite clone SL83 was generated from an isolate obtained from Prof. Sornchai Looareesuwan, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok, and maintained as previously described (5). The study received ethical approval from the Ethics Committee of the Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok, Thailand. All cultures were maintained using standard *in vitro* cultivation (29). Parasite line T4 was generated from FAF-EA8 by repeatedly selecting for trypsin-treated PE (6). This parasite line adhered specifically to CSA.

GAGs and a cell line. The following chemicals were used in cytoadherence assays: chondroitin sulfate A (Sigma Chemical, St. Louis, MO) from bovine trachea; chondroitin sulfate B (Sigma) from bovine mucosa; chondroitin sulfate C (Seikagaku Kogyo, Tokyo, Japan) from shark cartilage; chondroitin sulfate D (Seikagaku Kogyo) from shark cartilage; chondroitin sulfate E (Seikagaku Kogyo) from squid cartilage; keratan sulfate (Seikagaku Kogyo); colominic acid (Sigma), a sialic acid polymer, from *Escherichia coli*; pentosan polysulfate (SP54, a gift from Arthroparm Laboratories, Sydney, Australia); polyolpolysulfate (POPS, a gift from Luitpold-Werk, Munich, F.R.G.); Suramine (Germanin, a gift from Bayer AG, Leverkusen, F.R.G.); Fragmin (a low molecular weight heparin, a gift from Dr. Chalotte Bryno, Pharmacia UpJohn, Sweden) heparin (Sigma, H-9399) heparin (Sigma, H-5284), from porcine intestinal mucosa. Chondroitin sulfates and heparan sulfate were linked to dipalmitoyl phosphatidylethanolamine through the reducing terminus, using the method of Sugiura *et al.* (27).

Human lung carcinoma cells (ATCC CCL-185, A549) obtained from the American Type Culture Collection were cultured in Ham F12 (Gibco-BRL, Grand Island, NY) with 10% fetal bovine serum (FBS) (Flow Laboratories, McLean, VA). This cell line was used in the SL83 selection for higher levels of adherence to CSA. Cells were seeded at 1×10^5 cell/ml into petri dishes and incubated for at least 24 h before cytoadherence assays.

Cytoadherence assays. Cytoadherence assays were performed as described (6) with some modifications. Adhesion molecules were preadsorbed to plastic petri dishes (Nalge Nunc International, Naperville, IL) at 37°C for 4 h. We found that preadsorption with 50 µg/ml of chondroitin sulfates supported high levels of adhesion. Subsequently, dishes were blocked with 1% bovine serum albumin in PBS. The immobilized chondroitin sulfates were overlaid with 3% or more trophozoite-infected erythrocytes and adhesion was allowed to occur for 45 min at 37°C with occasional gentle agitation. Non-adherent erythrocytes were removed by RPMI-Hepes washes (pH 6.8). Bound cells were fixed with 2% glutaraldehyde and Giemsa stained. Results were expressed as the number of parasitized erythrocytes bound per 100 cells or per mm². For inhibition assays, GAGs were tested for inhibition of PE adhesion to cell line or to purified receptors by adding GAGs at varying concentration to PE suspension prior to cytoadherence assays.

Selection for cytoadherence to cell line. Cytoadherence of clone SL83 was enhanced by performing cytoadherence assays on lung carcinoma cells (A549). After the unattached cells were removed by gentle washing, the attached cells were flushed with RPMI-Hepes supplemented with 10% human sera and transferred to new plastic petri dishes. Fresh erythrocytes were added to a 4% Hct. Parasites were repeatedly selected on 5 further occasions until they adhered strongly to the target cells as well as to immobilized CSA. This selected line was designated SL83-S6.