



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

กลไกของพยาธิกำเนิดในโรคมาลาเรีย

โดย ศ.ดร. รัชนีย์ อุดมแสงเพชร

30 พฤศจิกายน 2543

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

กลไกของพยาธิกำเนิดในโรคมะเร็ง

ศ.ดร. รัชนีย์ อุดมแสงเพชร
ภาควิชาพยาธิชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

Abstract

Project Code : RSA/09/2540

Project Title : Mechanism of malaria pathogenesis

Investigator : Rachanee Udomsangpetch

E-mail Address : scrud@mahidol.ac.th

Project Period : 1 December 1997 – 1 December 2000

Virulence of malaria parasites has been investigated in various geographical malaria endemic areas. Parasite factors causing severity can be shown with different parameters, i.e. production of toxin, stimulation of cytokine production, induction of vascular endothelium damage, etc.

One of the factors related to disease severity and pathogenesis of malaria infection is the production of *P. falciparum*-toxin which induces high tumor necrosis factor (TNF) production. Nonetheless in this study using similar form of antigens, *P. vivax* could induce a greater TNF production by mononuclear cells than that did by *P. falciparum* at the same level of parasite density. As expected, more mature form of *P. vivax* induced the highest level of TNF release. This finding was correlated clearly with the results of a clinical study in Thailand that pyrogenic density of *P. vivax* was lower than that of *P. falciparum*.

On the other hand, stimulation of mononuclear cells by *P. falciparum*-infected red cell membrane extracts caused activation of the brain tissue-derived endothelial cells resulting in an increased adherence of platelets within a brief period after co-incubation. *P. vivax* did not have the same effect on induction of platelet adherence. Human umbilical vein endothelial cells did not show the same response when co-incubated with either *P. falciparum* or *P. vivax*-stimulated mononuclear cells. These findings may provide a plausible explanation to the mechanism of pathogenesis in cerebral malaria.

Keywords: cerebral malaria, parasite toxin, tumor necrosis factor

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : RSA/09/2540

ชื่อโครงการ : กลไกของพยาธิกำเนิดในโรคมาลาเรีย

ชื่อนักวิจัย : รัชนิย์ อุดมแสงเพชร

E-mail Address : scrud@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 1 ธันวาคม 2541 – 1 ธันวาคม 2543

การศึกษากลไกของพยาธิกำเนิดในโรคมาลาเรียมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคูณสมบัติของแอนติเจนชนิดหนึ่งที่เชื้อมาลาเรียสร้างขึ้นและสะสมไว้ที่ผิวเม็ดเลือดแดงในระหว่างการเจริญเติบโตของเชื้อในเม็ดเลือดแดง แอนติเจนดังกล่าวอาจชักนำการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยมาลาเรียให้มียาต่อต้านเชื้อในระดับสูงเกินควรซึ่งสามารถก่อให้เกิดพยาธิสภาพอย่างรุนแรงขึ้นในผู้ป่วยได้ การศึกษานี้จึงใช้แอนติเจนจากผิวเม็ดเลือดแดงติดเชื้อมาลาเรียดังกล่าวมากระตุ้นเม็ดเลือดขาวชนิด Monocytes ของคนปกติและทำการตรวจหา Cytokine ในการศึกษานี้คือ Tumor necrosis factor (TNF) ซึ่งจะสามารถทำการตรวจวัดระดับภายหลังการกระตุ้นได้อย่างชัดเจนโดยใช้เซลล์ที่มีความไวต่อ TNF ในการศึกษานี้สามารถเปรียบเทียบคุณสมบัติการกระตุ้นเม็ดเลือดขาวระหว่างแอนติเจนของ *Plasmodium falciparum* กับ *Plasmodium vivax* ได้ ทั้งนี้เพื่อต้องการทราบว่าโรคติดเชื้อมาลาเรียชนิดใดมีประสิทธิภาพในการกระตุ้นเม็ดเลือดขาวให้หลั่ง TNF ได้สูงกว่า และหาความสัมพันธ์ของระดับ TNF กับพยาธิสภาพของโรคที่เกิดขึ้น

ผลจากการใช้ตัวอย่างเชื้อ *Plasmodium falciparum* และเชื้อ *Plasmodium vivax* กระตุ้นเม็ดเลือดขาวพบว่าตัวแก่ของเชื้อ *Plasmodium falciparum* และ *Plasmodium vivax* กระตุ้นการหลั่งสาร TNF ได้ดีกว่าเชื้อตัวอ่อน แสดงว่าเชื้อมีการสร้างสารกระตุ้นเกิดขึ้นในระยะตัวแก่หรือระยะสืบพันธุ์เพิ่มขึ้นที่ผิวของเม็ดเลือดแดงติดเชื้อ เมื่อเปรียบเทียบระดับการหลั่งสาร TNF ระหว่างเชื้อทั้งสองที่อายุใกล้เคียงกันและปริมาณเชื้อเท่ากัน พบว่าเชื้อ *Plasmodium vivax* มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นเหนือกว่าเชื้อ *Plasmodium falciparum* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการศึกษาการกระตุ้นด้วยเม็ดเลือดแดงปกติที่ไม่มีเชื้อมาลาเรียไม่พบว่าการกระตุ้นให้หลั่ง TNF ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าความเชื่อที่ว่าเชื้อ *Plasmodium falciparum* ก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคมาลาเรียได้มากกว่าเชื้อ *Plasmodium vivax* โดยอาศัยประสิทธิภาพการหลั่งสาร TNF กระตุ้นให้เกิดไขได้ดีกว่านั้นอาจไม่ถูกต้อง แต่ผลการศึกษาบทบาทของสารหลังจากเม็ดเลือดขาวที่ถูกกระตุ้นต่อเซลล์ผนังหลอดเลือดนั้นพบว่า *Plasmodium falciparum* ทำให้มี Platelets เกาะกับเซลล์ผนังหลอดเลือดได้มากกว่า *Plasmodium vivax* และด้วยเหตุนี้อาจเป็นคุณสมบัติสำคัญของเชื้อ *Plasmodium falciparum* ที่เหนือกว่าในการก่อพยาธิสภาพของโรคมาลาเรีย

บทนำ

โรคมะเร็งที่เกิดจากเชื้อชนิด พลาสมาเซลล์มะเร็ง มักทำให้ผู้ป่วยมีอาการรุนแรง หากไม่ได้รับการรักษาทันเวลา อาจมีความผิดปกติในระบบการทำงานของอวัยวะภายในเกิดขึ้น เช่น การทำงานของระบบประสาทและสมอง การทำงานของไต ตับ และปอด เป็นต้น ผู้ป่วยเหล่านี้ได้เสียชีวิตไป เนื่องจากอวัยวะภายในร่างกายไม่สามารถทำงานได้ และสาเหตุของปัญหาเหล่านี้ เป็นที่สนใจในวงการแพทย์และวิทยาศาสตร์ โดยแบ่งสายงานออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มหนึ่ง จะเป็นที่การอุดตันของหลอดเลือดฝอย เป็นสาเหตุของพยาธิกำเนิด และกลุ่มที่สองจะเน้นเรื่อง การกระตุ้นระบบตอบสนองของร่างกายผู้ป่วยด้วยสารหรือโปรตีน บางชนิดที่เชื้อพลาสมาเซลล์ออกมาในระหว่างแพร่พันธุ์และเป็นสาเหตุของพยาธิกำเนิดในโรคมะเร็ง การที่เชื้อมะเร็งชนิดพลาสมาเซลล์มีคุณสมบัติสามารถเกาะกับผนังหลอดเลือดฝอย ทำให้เกิดการอุดตันของเส้นเลือดที่หล่อเลี้ยงอวัยวะที่สำคัญของร่างกาย ทำให้อวัยวะนั้น ๆ ขาดสารที่จำเป็นในการทำงานของเซลล์ รวมทั้ง การขาดออกซิเจน เห็นได้ชัดว่าน่าจะเป็นสาเหตุสำคัญของพยาธิกำเนิด แต่ด้วยหลักฐานทางการวิจัยขัดแย้งของกลุ่มนักวิจัยหลาย ๆ แห่ง เช่น พบว่าผู้ป่วยด้วยมะเร็งขึ้นสมอง หลังจากการรักษาหายแล้วอาจจะมีหรือไม่มีอาการทุพพลภาพทางสมองอันเนื่องมาจากโรคนี้หลงเหลืออยู่² และจากการศึกษาชิ้นเนื้อสมองของผู้เสียชีวิตด้วยมะเร็งขึ้นสมองนับร้อยรายนั้น พบว่า เพียง 20% ของเนื้อเหล่านี้มีการอุดตันของเส้นเลือดฝอยในสมอง ในขณะที่ผลการศึกษาอีกกลุ่มหนึ่งกลับพบว่า เส้นเลือดฝอยในสมองจากผู้เสียชีวิตด้วยมะเร็งขึ้นสมองนั้นมีอาการอุดตันด้วยเชื้อมะเร็งจำนวนมาก³

ในวงจรชีวิตการแพร่พันธุ์ของเชื้อพลาสมาเซลล์ จะมีการสร้างและปล่อยสาร/โปรตีน ออกสู่กระแสเลือดของผู้ติดเชื้อ ซึ่งสาร/โปรตีนบางชนิดสามารถกระตุ้นให้เซลล์ในระบบตอบสนองของร่างกายมีปฏิกิริยา และทำการหลั่งสารตัวกลาง (mediators) ออกมาได้หลายชนิด mediators บางชนิด เป็น cytokines ที่สามารถชักนำให้เกิดอาการไข้สูง ซึ่งเรียกว่า pyrogenic cytokines⁴ ได้แก่ interleukin (IL)-1, IL-2, IL-6, tumor necrosis factor (TNF) และ interferon (IFN) และไข้ที่เกิดขึ้นนี้จะเป็นตัวกระตุ้นเซลล์ของระบบตอบสนอง ชนิด mononuclear cells ให้หลั่งสารซึ่งเป็นตัวชักนำให้เกิดไข้เพิ่มขึ้น และวงจรของการเกิดไข้จะต่อเนื่องกันไปเช่นนี้แต่ยังไม่มีหลักฐานการศึกษาแสดงว่า pyrogenic cytokines ที่สร้างขึ้นโดยเซลล์ของระบบตอบสนองในกระแสเลือดนี้ สามารถเข้าสู่เนื้อเยื่อสมองได้อย่างไร ผลจากการศึกษาในโครงการวิจัยของ สกว.รุ่นที่ 1 แสดงให้เห็นว่าเนื้อเยื่อสมองของผู้เสียชีวิตด้วยมะเร็งขึ้นสมองนั้นมี pyrogenic cytokine ชนิด IFN-gamma, TNF-alpha และ IL-1⁵ อยู่ โดยมีตำแหน่งการตรวจพบทั้งที่ใกล้กับเส้นเลือด หรือที่ห่างจากเส้นเลือดก็ได้ ผลงานนี้อาจเป็นการชี้ให้เห็นว่ามีแหล่งกำเนิดของ pyrogenic cytokine ได้ 2 ทาง คืออาจเป็น cytokine ที่ถูกสร้างจากเซลล์เม็ดเลือดขาวและเข้าสู่สมองโดยวิธีทางใดทางหนึ่ง หรือ เซลล์สมองเองนั้น ถูกกระตุ้นจากการมีระดับไข้สูงขณะติดเชื้อมะเร็งและเป็นตัวหลั่ง cytokine เหล่านี้ออกมา อาจกล่าวรวมได้ว่า ไม่ว่า cytokine เหล่านี้จะถูกหลั่งออกมาโดยวิธีใดก็ตามการติดเชื้อมะเร็ง การมีไข้สูง การมีระดับ pyrogenic cytokines เพิ่มขึ้น เป็นกลไกสำคัญของการมีพยาธิ

กำเนิดในโรคมะเร็ง

ความพยายามในการศึกษากลไกของพยาธิกำเนิดในโรคมะเร็งชนิดรุนแรง เช่น มะเร็งขั้นสูงนั้น นำไปสู่การศึกษา 2 ส่วน คือ 1) การกระตุ้นของหลอดเลือดฝอยในสมอง ด้วยเชื้อมะเร็งชนิดฟิลิปปาร์ม และ 2) การชักนำให้เกิดการหลั่ง cytokines ในผู้ป่วยโดยเชื้อ มะเร็ง และผลที่เกิดขึ้นกับเนื้อเยื่อสมอง ซึ่งในแบบที่ 2 จะเป็นแนวทางของโครงการวิจัยนี้ ในทางปฏิบัติไม่สามารถจะทำการวิจัยนี้ได้ในผู้ป่วยขณะติดเชื้อมะเร็ง ดังนั้นจึงมีผู้ทำการวิจัยขึ้น ในสัตว์ทดลองจำพวกหนูที่ติดเชื้อ *P. berghei* และพบว่าเมื่อเกิดมะเร็งขั้นสูงในหนูเหล่านี้ จะมีเม็ดเลือดขาวจำนวนมากเกาะกับผนังเส้นเลือด⁶ แต่ลักษณะนี้กลับไม่เคยพบในรายงานการศึกษาเนื้อสมองของคนที่เสียชีวิตด้วยมะเร็งขั้นสูง³ ผลจากการศึกษาในหนูยังพบว่ามีระดับ ของ TNF สูงมาก ซึ่งเป็นเหตุที่กระตุ้นให้เซลล์ผนังหลอดเลือดสร้างโปรตีนบางชนิดเพิ่มมากขึ้น เช่น intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) ที่ทำหน้าที่เป็นตัวเกาะของโปรตีนบนผิวเม็ด เลือดขาว ผลนี้กลับตรงกันข้ามกับการศึกษาในคนที่พบว่า เนื้อเยื่อสมองมี ICAM-1 สูงขึ้นมาก⁷ แต่ไม่มีเม็ดเลือดขาวมาเกาะเหมือนในหนู ระดับ TNF ในเลือดของคนที่เสียชีวิตก็สูงมากเช่นกัน และมีเชื้อฟิลิปปาร์มอยู่จำนวนมากด้วย แต่ในกรณีผู้ป่วยด้วยเชื้อไวแวกซ์ ซึ่งไม่มีคุณสมบัติใน การเกาะกับผนังหลอดเลือด ระดับ TNF ในเลือดก็ยังสูงมาก และยังไม่ทราบถึงสาเหตุที่แตกต่าง กันในการศึกษาทั้ง 3 กลุ่มนี้

ความสนใจในการศึกษาบทบาทของ mediators ต่าง ๆ ต่อพยาธิกำเนิดของโรคมะเร็ง แสดงให้เห็นว่า cytokines และสารอื่น ๆ เช่น oxygen radical และ nitric oxide (NO) เป็นตัว ควบคุมกลไกของพยาธิกำเนิด ที่สำคัญในโรคมะเร็ง การเพิ่มระดับของ cytokine ชนิด TNF จะ สัมพันธ์กับการเกิดไข้สูงในผู้ป่วย ซึ่งมีผู้แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนในการศึกษากลุ่มผู้ป่วยติดเชื้อ มะเร็งชนิดไวแวกซ์ในประเทศศรีลังกา⁸ การเกิดไข้ในผู้ป่วยมะเร็งไม่ได้มีผลในทางลบเสมอ ไป แต่การมีไข้เป็นส่วนหนึ่งของระบบทางสรีรวิทยาที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อมะเร็งได้⁹

การเพิ่มขึ้นของระดับ nitric oxide ในผู้ป่วยมะเร็งเป็นผลที่เกิดขึ้นจากการกระตุ้นน้ำ ย่อย nitric oxide synthase (NOS) ด้วยสาร cytokines ที่ถูกสร้างขึ้นในขณะติดเชื้อ และเชื่อว่า เป็นกลไกหนึ่งที่ทำให้มีพยาธิกำเนิดขึ้นอย่างเฉียบพลันเพราะการกระตุ้น NOS ในเซลล์ด้วย cytokine นั้น เป็นกลไกที่ไม่สามารถถูกควบคุมได้ด้วยระบบทางสรีรวิทยาของเซลล์ ด้วยเหตุนี้ใน ภาวะติดเชื้อมะเร็งจึงอาจมีระดับของ NO สูงขึ้นนับเป็นพันเท่าของระดับปกติ และ NO นี้อาจ ปรากฏอยู่ได้นานมากกว่าในภาวะปกติ ซึ่งทำให้มีผู้เชื่อว่านี่คือสาเหตุของการเกิดอาการ coma ในผู้ป่วยมะเร็งขั้นสูง และเมื่อรักษาหายจากโรคมะเร็งแล้ว จะไม่มีอาการตกค้างเนื่องมา จากเนื้อสมองเสียอีก ซึ่งจะแตกต่างกับสภาวะการมีพยาธิกำเนิดในสมอง อันเนื่องมาจากการกระตุ้นของหลอดเลือดที่จะเป็นสาเหตุให้มีการตายของเนื้อสมองในบริเวณนั้น ๆ อย่างถาวร อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาทั้งหลายยังอยู่ในขั้นติดตามผลและเป็นที่ยกวิพากษ์วิจารณ์กันมาก และต้องหาหลักฐานยืนยันอีกมากเพื่อพิสูจน์สาเหตุและกลไกที่แท้จริงในการเกิดมะเร็งขั้นสูง

พยาธิกำเนิดของโรคมะเร็งอาจเกิดขึ้นจากสาร/โปรตีนที่เป็นผลผลิตจากการเจริญของ

เชื้อในเม็ดเลือดแดง สารโปรตีนเหล่านี้อาจมีความแตกต่างกันในเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิดที่ก่อโรคในคน เชื้อฟัลซิพาร์มีผลผลิตชนิดหนึ่งคือ glycosyl phosphatidyl inositol (GPI)⁹ ซึ่งเป็นสารจำพวก phospholipid ที่เชื่อมแปลงมาจากโปรตีนชนิดหนึ่งของคน สาร GPI นี้มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการ สร้าง TNF และ IL-1¹⁰ และทำให้มีการสร้าง NOS ของเซลล์สูงขึ้น¹¹ นอกจากนี้ยังเป็นตัวควบคุมการเพิ่มโปรตีนบางชนิดของเซลล์ ซึ่งจะมีผลในการเกาะของเชื้อมาลาเรีย¹² แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาเหล่านี้ไม่ได้รวมถึงการควบคุม CD36 ซึ่งเป็นโปรตีนที่สำคัญในการเกาะของเชื้อมาลาเรีย¹³

วิธีการทดลอง

วิธีการเตรียมตัวอย่างเชื้อมาลาเรีย

ทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยมาลาเรียชนิดฟัลซิพาร์มาจากโรงพยาบาลเวชศาสตร์เขตร้อน ตัวอย่างที่คัดเลือกได้มีปริมาณเชื้อระหว่าง 0.3-11 % เป็นจำนวน 56 ตัวอย่าง ตัวอย่างเชื้อจากผู้ป่วยพลาสโมเดียมไวแวกซ์ มีปริมาณเชื้ออยู่ระหว่าง 0.2-1.2 % เป็นจำนวน 34 ตัวอย่าง ตัวอย่างเชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพาร์มี จะถูกนำมาเลี้ยงจนกระทั่งเชื้อเจริญถึงระดับ schizont stage ที่มีอายุ ≥ 40 ชม. ส่วนพลาสโมเดียมไวแวกซ์ ใช้ stage ของเชื้อที่มาในผู้ป่วยโดยไม่มีการเลี้ยง เลือดผู้ป่วยที่ติดเชื้อทั้งหมดจะถูกนำมาเตรียมแอนติเจนโดยวิธี lysis ด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจาก endotoxin (intrauterine transfer water , SIGMA) หรือน้ำกลั่นที่ใช้เตรียมยาสำหรับฉีดเข้าเส้น ทำการล้างด้วยน้ำกลั่นนี้หลายๆครั้งจนกระทั่งไม่มีสีของฮีโมโกลบินอีก หลังจากนั้นจึงล้างด้วย RPMI (endotoxin free) จากบริษัท Sigma เช่นเดียวกัน ในการล้างครั้งสุดท้ายนี้ pellet ของเม็ดเลือดแดง (ghost RBC) จะถูก resuspended กลับมาสู่ปริมาตรเดิมของเม็ดเลือดแดงที่เริ่มใช้ในขณะทำ lysis เม็ดเลือดแดงไม่ติดเชื้อที่ได้จากคนปกติจะถูกนำมาเตรียมแอนติเจนโดยวิธีเดียวกัน ตัวอย่างแอนติเจนที่เก็บได้ทั้งหมดจะถูกแช่แข็งไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

วิธีการตรวจหา TNF alpha

วิธีการตรวจหา TNF โดยใช้ cell line L929 ซึ่งเป็น fibroblast ที่ได้จากหนูและมีความไวต่อการถูกทำลาย (cytolysis) ด้วย TNF alpha ทำดังนี้

วิธีการทดสอบหาปริมาณเซลล์ที่เหมาะสมในการใช้ทดสอบ

L929 ถูกเลี้ยงใน microtiter plate อย่างน้อย 24 ชั่วโมงก่อนใช้งานในปริมาณต่างๆ กัน โดยเริ่มตั้งแต่ 2,500-40,000 cell/well หลังจากนั้นนำมา fix และ ย้อมด้วย 0.5% crystal violet in 25% Methanol เป็นเวลา 10 นาที จึงล้างออกด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง แล้วนำ plate ไปตากไว้ให้แห้งประมาณ 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยเติมน้ำยา 0.1 M Sodium citrate in 50% Ethanol ลงไปแล้วรอ 10 นาที เพื่อละลายสีออกจากเซลล์ จากนั้นจึงนำไปอ่านค่า optical density ด้วย ELISA

READER ที่ wave length 540 nm นำค่าต่างๆ ที่อ่านได้มา plot กราฟได้ดังรูปที่ 1 และได้เลือกปริมาณเซลล์ที่ 10,000 cells/well เพื่อใช้งานต่อไป

วิธีการกระตุ้น Monocytes (MNC) ด้วยมาลาเรียแอนติเจน

วิธีเดียวกับที่แสดงไว้ข้างต้น MNC ที่แยกได้จากเลือดคนปกติจะถูก coculture กับแอนติเจนของพลาสโมเดียมฟัลซิพารัม หรือพลาสโมเดียมไวแวกซ์ หรือ เม็ดเลือดแดงปกติ ในปริมาณต่างๆ กัน นอกจากนี้ LPS ก็ใช้เป็น control ในการ stimulate MNC ซึ่งเตรียมในลักษณะของ 2-fold dilution ภายใต้สภาวะการเลี้ยงเซลล์นานประมาณ 20 ชั่วโมง supernatant ที่เก็บได้จาก coculture ของ MNC และแอนติเจนนี้ จะถูกนำมาใส่ลงใน microtiter plate ที่มี L929 อยู่ ในขณะเดียวกันจะใช้ recombinant TNF alpha ปริมาณต่างๆ กันจาก 50-400 pg เป็น standard สำหรับ cell lysis หลังจากนั้นเลี้ยงไว้ภายใต้สภาวะการเลี้ยงเซลล์ อีก 24 ชั่วโมงจึงทำการย้อมเซลล์เช่นเดียวกับวิธีข้างต้นค่า optical density ที่อ่านได้จะถูกนำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ของ cell lysis ทำการเปรียบเทียบกับ control ของ L929 ที่เลี้ยงไว้โดยไม่มีแอนติเจนใดๆ recombinant TNF alpha ที่ใช้ในการศึกษาแสดงฤทธิ์ฆ่าเซลล์ L929 ได้ โดยแสดงประสิทธิภาพการฆ่าแบบมี dose response fashion ดังแสดงในรูปที่ 2 ในส่วนของ control stimulation ซึ่งใช้ LPS เป็นตัวกระตุ้น MNC นั้นแสดงให้เห็นว่ามีการหลั่ง TNF alpha จากการกระตุ้นและแสดงฤทธิ์การทำลาย L929 ดังรูปที่ 3

วิธีการศึกษาผลของ MNC ที่ถูกกระตุ้นต่อเซลล์ผนังหลอดเลือด

การศึกษานี้จะใช้มาลาเรียแอนติเจนกระตุ้น MNC ซึ่งถูกเลี้ยงร่วมกับเซลล์ผนังหลอดเลือดเลือกในขณะเดียวกัน ในช่วงระยะเวลา 0.5, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง จึงเติมเกล็ดเลือด (Platelet-rich plasma) ลงบนเซลล์ผนังหลอดเลือดเป็นเวลานาน 30 นาที แล้วจึงล้างเอาเกล็ดเลือดที่ไม่เกาะออกให้หมด จากนั้น fix เซลล์ผนังหลอดเลือดด้วย glutaraldehyde และย้อมด้วย Giemsa เพื่อนำไปตรวจนับแยกจำนวนเซลล์ที่มีเกล็ดเลือดเกาะอยู่ ต่อจำนวนเซลล์ผนังหลอดเลือดทั้งหมด 500 เซลล์ เพื่อเปรียบเทียบผลการกระตุ้นด้วยแอนติเจนของพลาสโมเดียมฟัลซิพารัมกับพลาสโมเดียมไวแวกซ์ นอกจากนี้เซลล์ผนังหลอดเลือดที่ใช้จะแยกได้จากเส้นเลือดของเนื้อเยื่อสมองและเส้นเลือดดำของสายสะดือเด็กแรกเกิด (Umbilical vein) ทั้งนี้เพื่อเปรียบเทียบการตอบสนองของเซลล์ผนังหลอดเลือดจากสองแหล่งที่แตกต่างกัน เพื่ออธิบายความสำคัญของกลไกของพยาธิกำเนิดในโรคมาลาเรีย

วิธีการวิเคราะห์ผล

ในการศึกษานี้ใช้เชื้อที่ได้จากผู้ป่วยเข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลและเลี้ยงให้เป็นตัวแก่ได้ในห้องปฏิบัติการ เพื่อนำมากระตุ้น MNC และแสดงค่าการทำลายเซลล์ L929 ในรูปของ

Optical Density (O.D.) แล้วจึงนำไปคำนวณหาปริมาณ TNF ที่เกิดจากเชื้อจำนวน 10^5 ตัว เพื่อการวิเคราะห์ค่าเปรียบเทียบกับทางสถิติ

ส่วนการวิเคราะห์ผลความแตกต่างของเซลล์ผนังหลอดเลือดที่มีเกล็ดเลือดเกาะอยู่เนื่องจากถูกกระตุ้นด้วยมาลาเรียแอนติเจนนั้นจะต้องรอการวิเคราะห์ผลร่วมกับผลจากการศึกษาสรีรวิทยาและการทำงานของเซลล์ผนังหลอดเลือดด้วยซึ่งขณะนี้กำลังอยู่ระหว่างการทดสอบ

ผลการศึกษา

ในการศึกษาพบว่าแอนติเจนของพลาสโมเดียมฟัลซิพารัม ที่อยู่ในผนังของเม็ดเลือดแดงติดเชื้อระยะ schizont กระตุ้นให้ MNC หลัง TNF alpha ได้ในระดับต่ำกว่าการกระตุ้น MNC ด้วยแอนติเจนของพลาสโมเดียมไวแวกซ์ที่อยู่ในผนังของเม็ดเลือดแดงติดเชื้อในระดับของปริมาณเชื้อ (parasite density) ที่ใกล้เคียงกันดังแสดงในรูปที่ 4

การเปรียบเทียบเชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพารัมและพลาสโมเดียมไวแวกซ์ ในคุณสมบัติที่สามารถกระตุ้นให้เม็ดเลือดขาวหลังTNFทำลายเซลล์L929ได้นั้น แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอายุของเชื้อกับการกระตุ้นให้เกิดการทำลายดังในรูปที่ 4 ระยะตัวอ่อน(Ring stage) และระยะตัวแก่ (Schizont) ของเชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพารัม ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า ระยะตัวแก่ของพลาสโมเดียมฟัลซิพารัมกระตุ้นให้เม็ดเลือดขาวสร้างTNFได้สูงกว่าระยะตัวอ่อน ผลการเปรียบเทียบการกระตุ้นด้วยแอนติเจนของเชื้อพลาสโมเดียมไวแวกซ์ในระยะตัวอ่อน (Amoeboid form) รูปที่ 4 และระยะตัวแก่ (Schizont) ให้ผลเช่นเดียวกับที่พบในเชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพารัม คือตัวแก่ของเชื้อพลาสโมเดียมไวแวกซ์ กระตุ้นเม็ดเลือดขาวให้สร้าง TNF ได้สูงกว่าเชื้อระยะตัวอ่อน นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการกระตุ้นเม็ดเลือดขาว ระหว่างเชื้อต่างชนิดกันแต่มีระยะการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน พบว่าเชื้อพลาสโมเดียมไวแวกซ์ในระยะตัวอ่อนกระตุ้นการหลั่งTNFได้สูงกว่าเชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพารัม ($p \leq 0.01$) และระยะตัวแก่ของเชื้อพลาสโมเดียมไวแวกซ์ก็กระตุ้นได้ดีกว่าเชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพารัม ($p \leq 0.01$)

กลไกของพยาธิกำเนิดในหลอดเลือดฝอยของโรคมาลาเรีย

การกระตุ้น MNC เส้นเลือดฝอยด้วยแอนติเจนของพลาสโมเดียมฟัลซิพารัม (รูปที่ 5) ในขณะที่เลี้ยงอยู่ร่วมกับเซลล์ผนังหลอดเลือดสมอง พบว่ามีการกระตุ้นเซลล์ผนังหลอดเลือดให้เริ่มเกาะกับเกล็ดเลือดได้ภายในเวลาตั้งแต่ 0.5 ชั่วโมง (1.5 เท่าของเซลล์ควบคุม) และการเกาะของเกล็ดเลือดจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆในเวลา 2-3 ชั่วโมง (1.7 - 2.3 เท่าของเซลล์ควบคุม)

การกระตุ้น MNC เส้นเลือดฝอยด้วยแอนติเจนของไวแวกซ์ (รูปที่ 5) ในขณะที่เลี้ยงอยู่ร่วมกับเซลล์ผนังหลอดเลือดสมอง พบว่ามีการกระตุ้นเซลล์ผนังหลอดเลือดให้เกาะกับเกล็ดเลือดได้น้อยกว่าการใช้ แอนติเจนของพลาสโมเดียมฟัลซิพารัม การกระตุ้น MNC คือ 1.1 -1.2 เท่าของเซลล์ควบคุม ภายในระยะเวลา 0.5 - 3 ชั่วโมง

ในการศึกษาที่ใช้ เซลล์ผนังหลอดเลือดของสายสะดือ (รูปที่ 6) เพื่อการทดสอบการกระตุ้นและการเกาะของเกล็ดเลือดนั้น พบว่าแอนติเจนของพลาสโมเดียมฟัลซิพารัม กระตุ้นให้เกล็ดเลือดเกาะได้เล็กน้อยหรือไม่แตกต่างจากเซลล์ควบคุมเลย ภายในระยะเวลาตั้งแต่ 0.5 - 2 ชั่วโมง และเมื่อใช้แอนติเจนของพลาสโมเดียมไวแวกซ์กระตุ้นนั้นพบว่าไม่มีการเกาะของเกล็ดเลือดในเซลล์ของผนังหลอดเลือดเลย

วิจารณ์ผล

สรุปผลที่ได้จากการศึกษานี้พบว่าความเชื่อที่ว่าเชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพารัมก่อให้เกิดโรคมalariaเรื้อรังที่มีความรุนแรงได้มากกว่าเชื้อพลาสโมเดียมไวแวกซ์ โดยมีประสิทธิภาพการหลั่งสารกระตุ้นให้เกิดไข้ได้ดีกว่าเชื้อพลาสโมเดียมไวแวกซ์ และการกระตุ้นนี้มีฤทธิ์เหมือนกับสารพิษที่พบในเชื้อแบคทีเรียนั้นอาจไม่ถูกต้องดังผลที่แสดงข้างต้นนี้ ความสามารถในการก่อความรุนแรงของโรคมalariaเรื้อรังที่เกิดจากเชื้อพลาสโมเดียมไวแวกซ์นั้นมีอยู่แน่นอน แต่ขึ้นกับการศึกษาและแปรผลดังเหตุผลต่อไปนี้

1. เชื้อพลาสโมเดียมไวแวกซ์สามารถใช้เม็ดเลือดแดงเพื่อการแพร่พันธุ์ได้เพียง 1 ใน 7 ของเม็ดเลือดแดงทั้งหมดดังรายงานที่ผ่านมาของSimpsonและพวก โดยใช้ mathematical model ซึ่งแตกต่างกับเชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพารัม ตรงที่พลาสโมเดียมฟัลซิพารัมสามารถใช้เม็ดเลือดแดงไม่จำกัดอายุ

2. ในการศึกษาแต่ดั้งเดิมซึ่งใช้อาสาสมัครมาฉีดเชื้อmalarีชนิด พลาสโมเดียมฟัลซิพารัมและ พลาสโมเดียมไวแวกซ์ พบว่าปริมาณเชื้อที่ทำให้เกิดไข้ได้สูงเท่าๆกันนั้นใช้จำนวนเชื้อพลาสโมเดียมไวแวกซ์น้อยกว่าพลาสโมเดียมฟัลซิพารัม คือใช้ 200พลาสโมเดียมไวแวกซ์/μl แต่ใช้ 10,000 พลาสโมเดียมฟัลซิพารัม/μlของเลือด ปัจจุบันการศึกษานี้ได้ถูกสนับสนุนด้วยผลการศึกษาใหม่โดย Luxemburgและพวก ซึ่งศึกษาในหมู่ประชากรที่อาศัยในดินแดนระบาดของmalarี

ความเชื่อที่ว่าเชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพารัมก่อความรุนแรงและสามารถผลิตสารที่มีคุณสมบัติเหมือนกับ endotoxin ของแบคทีเรีย แต่จากหลักฐานที่มีอยู่ความเชื่อนั้นยังห่างไกลความจริงอยู่มาก ดังการเปรียบเทียบให้เห็นว่า จำนวนเชื้อ *E. coli* ที่ทำให้ 20% ของผู้ติดเชื้อตายนั้นมีเพียง 1*E. coli*/mlของเลือด แต่หากเชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพารัมจะทำให้ผู้ป่วยตายจำนวนที่เท่ากับ*E. coli* นั้นต้องการถึง 250,000,000พลาสโมเดียมฟัลซิพารัม/mlของเลือด ถึงแม้เชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพารัมจะแสดงความรุนแรงของโรคในผู้ป่วยได้อย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับเชื้อพลาสโมเดียมไวแวกซ์ก็ตาม แต่จากผลการศึกษาและหลักฐานต่างๆที่กล่าวมานั้นยืนยันว่าเชื้อพลาสโมเดียมไวแวกซ์เป็นเชื้อที่ร้ายแรงและสามารถทำให้เกิดโรคมalariaเรื้อรังรุนแรงได้เช่นกัน

ผลการศึกษาเพื่อหากลไกของพยาธิกำเนิดของโรคมalariaเรื้อรังรุนแรงโดยใช้รูปแบบการศึกษาเซลล์ผนังหลอดเลือดที่ถูกกระตุ้นโดยผ่านขบวนการภูมิตอบสนองของร่างกายนั้น พบว่า

เกล็ดเลือดเกาะกับเซลล์ผนังหลอดเลือดของสมองได้หลังจากเซลล์ผนังหลอดเลือดถูกกระตุ้นด้วยสารหลั่งที่ MNC ปลั่งออกมาภายหลังถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนของพลาสโมเดียมฟัลซิพารัม ผลที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่า เซลล์ผนังหลอดเลือดของสมองที่ถูกกระตุ้นนั้น ได้มีการสร้างโปรตีนซึ่งเป็นตัวรับ (receptors) ของเกล็ดเลือดขึ้นบนผิวเซลล์และทำให้เกล็ดเลือดเข้าเกาะได้จำนวนมาก ผลจากการเข้าเกาะของเกล็ดเลือดบนเซลล์ผนังหลอดเลือดนี้ อาจใช้อธิบายอาการทางคลินิกที่พบในผู้ป่วยมาลาเรียรุนแรงได้คือ การลดต่ำลงของเกล็ดเลือดในกระแสเลือดอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้การเกิดพยาธิสภาพของผนังหลอดเลือดในเนื้อเยื่อผู้ป่วยด้วยมาลาเรียรุนแรงนั้น อาจอธิบายได้จากการที่เกล็ดเลือดปล่อยน้ำย่อยและโปรตีนต่าง ๆ ออกมาขณะถูกกระตุ้นด้วยการเกาะกับเซลล์ผนังหลอดเลือด และในขณะเดียวกันก็สามารถก่อพยาธิสภาพให้กับผนังหลอดเลือดได้ แต่ลักษณะของพยาธิสภาพของผนังหลอดเลือดมีได้หลายแบบ เช่น การสูญเสียสภาพของรอยต่อระหว่างเซลล์ผนังหลอดเลือดทำให้สูญเสีย permeability หรือการทำลายผนังเซลล์เองทำให้เซลล์ถูกทำลายโดยตรง ทั้งนี้จะได้ทำการศึกษาต่อไป

ผลการกระตุ้นเซลล์ผนังหลอดเลือดด้วยแอนติเจนของพลาสโมเดียมไวแวกซ์นั้นมีผลชักนำเพียงเล็กน้อยต่อการเกาะของเกล็ดเลือด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเกิดพยาธิสภาพของผนังหลอดเลือดในขณะติดเชื้อมาลาเรียชนิดไวแวกซ์นั้นมีน้อย ผลการศึกษาที่ได้ในโครงการนี้ยืนยันผลการศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อต่างๆของผู้ติดเชื้อมาลาเรียที่มีรายงานมาก่อนแล้ว

จากการศึกษาในโครงการนี้พบว่าเซลล์ผนังหลอดเลือดที่มาจากแหล่งอื่นคือหลอดเลือดดำของสายสะดือเด็กนั้นไม่มีความเหมาะสมในการนำมาใช้เป็นรูปแบบของการศึกษาทางพยาธิสภาพที่เกิดจากโรคมาลาเรีย ดังที่มีรายงานในอดีตก่อนนี้การใช้เซลล์ผนังหลอดเลือดดำของสายสะดืออาจทำให้ผลการวิเคราะห์ในเรื่องพยาธิกำเนิดของโรคมาลาเรียนั้นไม่ตรงกับความเป็นจริง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก intrinsic properties ที่แตกต่างกันระหว่างเซลล์ของผนังหลอดเลือดทั้งสองชนิด ทำให้เซลล์ทั้งสองมีการตอบสนองต่อการกระตุ้นที่ไม่เหมือนกัน เซลล์ผนังหลอดเลือดของสายสะดือที่ใช้ทำการศึกษาก่อนหน้านี้ด้วยมาลาเรียแอนติเจนโดยทั่วไปในการศึกษาอื่นๆนั้นไม่สามารถมีการตอบสนองได้เช่นเดียวกับเซลล์ผนังหลอดเลือดจากสมองเลย

เอกสารอ้างอิง

1. White NJ, Ho M. The pathophysiology of malaria. *Adv.Parasitol* 1992;31:83-173.
2. Brewster DR, Kwiatkowski D, White NJ. Neurological sequelae of cerebral malaria in children. *Lancet* 1990;336:1039-43.
3. Berendt AR, Turner GDH, Newbold CI. Cerebral malaria : the sequestration hypothesis. *Parasitol Today* 1994;10:412-14.
4. Dinarello CA:Endogenous pyrogens. The role of cytokines in the pathogenesis of fever. In Mackowiak PA ed. *Fever : Basic Mechanisms and Management*. Raven Press, 1991,p23-47.

5. Udomsangpetch R, Chivapat S, Viriyavejakal P, Riganti M, Wilairatana P, Pongpanratn E, Looareesuwan S. Involvement of cytokines in histopathology of cerebral malaria. *Am J Trop Med Hyg* 1997 (in press).
6. Grau G E, Fajardo LF, Piguet PF, Allet B, Lambert PH, Vassalli P. Tumor necrosis factor (Cachectin) as an essential mediator in murine cerebral malaria. *Science* 1987;237:1210-12
7. Turner GDH, Morrison H, Dones M, Davis TME, Looareesuwan S, Buley ID, Gatter KC, Newbold CI, Pukrittayakamee S, Nagachinta B, White NJ, Berendt AR. An immunohistochemical study of the pathology of fatal malaria. *Am J Pathol* 1994;145:1057-69.
8. Kwiatkowski D. Febrile temperatures can synchronize the growth of *Plasmodium falciparum* in vitro. *J Exp Med* 1989;169:357-61.
9. Gerold P, Diechmann-Schuppert A, Schwarz RT. Glycosyl-phosphatidylinositols synthesized by asexual stages of the malarial parasite, *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* 1994;269:2597
10. Schofield L, Hackett F. Signal transduction in host cells by glycosyl phosphatidylinositol toxin of malaria parasites. *J Exp Med* 1993;177:145-52.
11. Tachado SD, Gerold P, McConville MJ, Baldwin T, Quilici D, Schwarz RT, Schofield L. Glycosylphosphatidylinositol toxin of *Plasmodium* induces nitric oxide synthase expression in macrophages and vascular endothelial cells by a protein tyrosine kinase-dependent and protein kinase C-dependent signaling pathway. *J Immunol* 1996;156:1897-1907.
12. Schofield S, Novakovic S, Gerold P, Schwarz RT, McConville MJ, Tachado SD. Glycosylphosphatidylinositol toxin of *Plasmodium falciparum* up-regulates intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and E-selectin expression in vascular endothelial cells and increases leukocyte and parasite cytoadherence via tyrosine kinase-dependent signal transduction. *J Immunol* 1996;156:1886-96.
13. Udomsangpetch R, Taylor BJ, Looareesuwan S, White NJ, Elliott JF, Ho M. Receptor specificity of clinical *Plasmodium falciparum* isolates: Non-adherence to cell bound E selectin and VCAM-1. *Blood* 1996;88:2754-60.

output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว

1. ผลงานที่จะส่งตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

- 1.1 Rachanee Udomsangpetch, Kesinee Chotivanich, Sornchai Looareesuwan, Clive Bates, Nicholas J White. *Plasmodium vivax* induces more TNF release than *Plasmodium falciparum*.

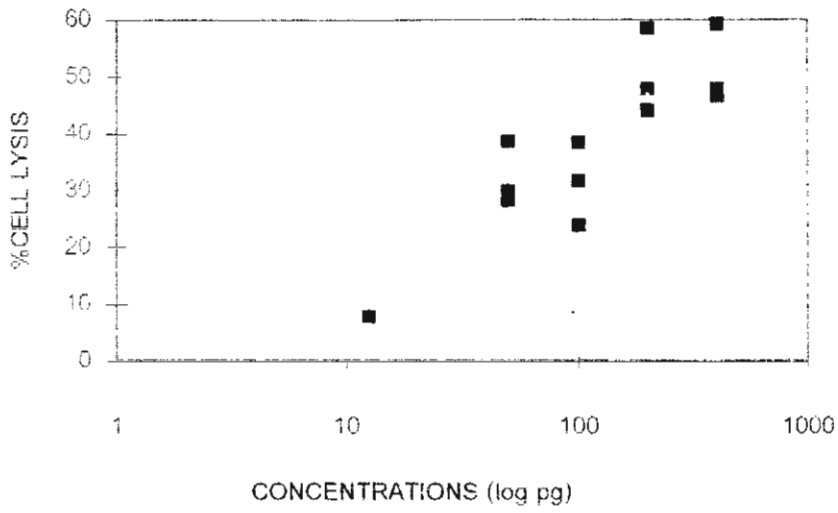
2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์เชิงวิชาการ

ใช้พัฒนาการเรียนการสอนวิชาพยาธิวิทยาพื้นฐานของโรคติดเชื้อมาลาเรีย นอกจากนี้ทางโครงการได้ช่วยสร้างนักวิจัยรุ่นใหม่ในสาขาพยาธิชีววิทยา และสาขาเทคนิคการแพทย์

3. ได้เสนอผลงานวิจัยของโครงการนี้ใน Symposium "Immunological Defense Reactions in the Human Host" ที่ Karolinska Institute, Stockholm, Sweden เมื่อวันที่ 15 ตุลาคม 2542

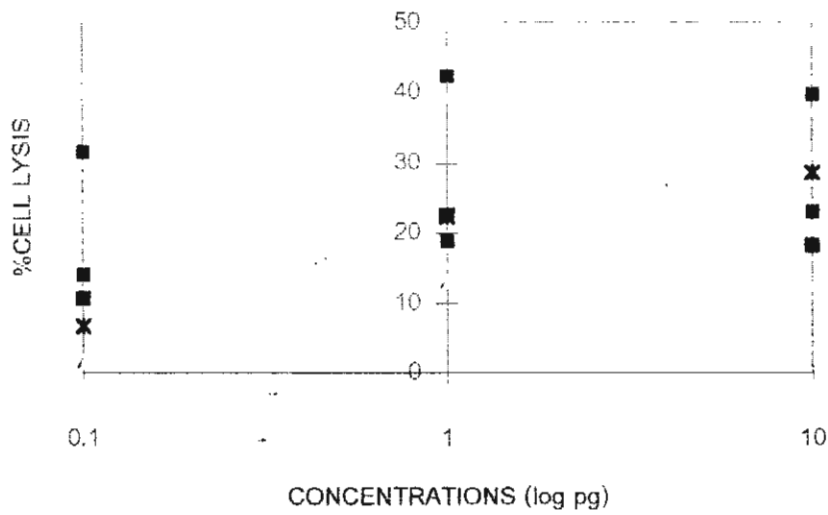
ภาคผนวก

RECOMBINANT TNF-alpha

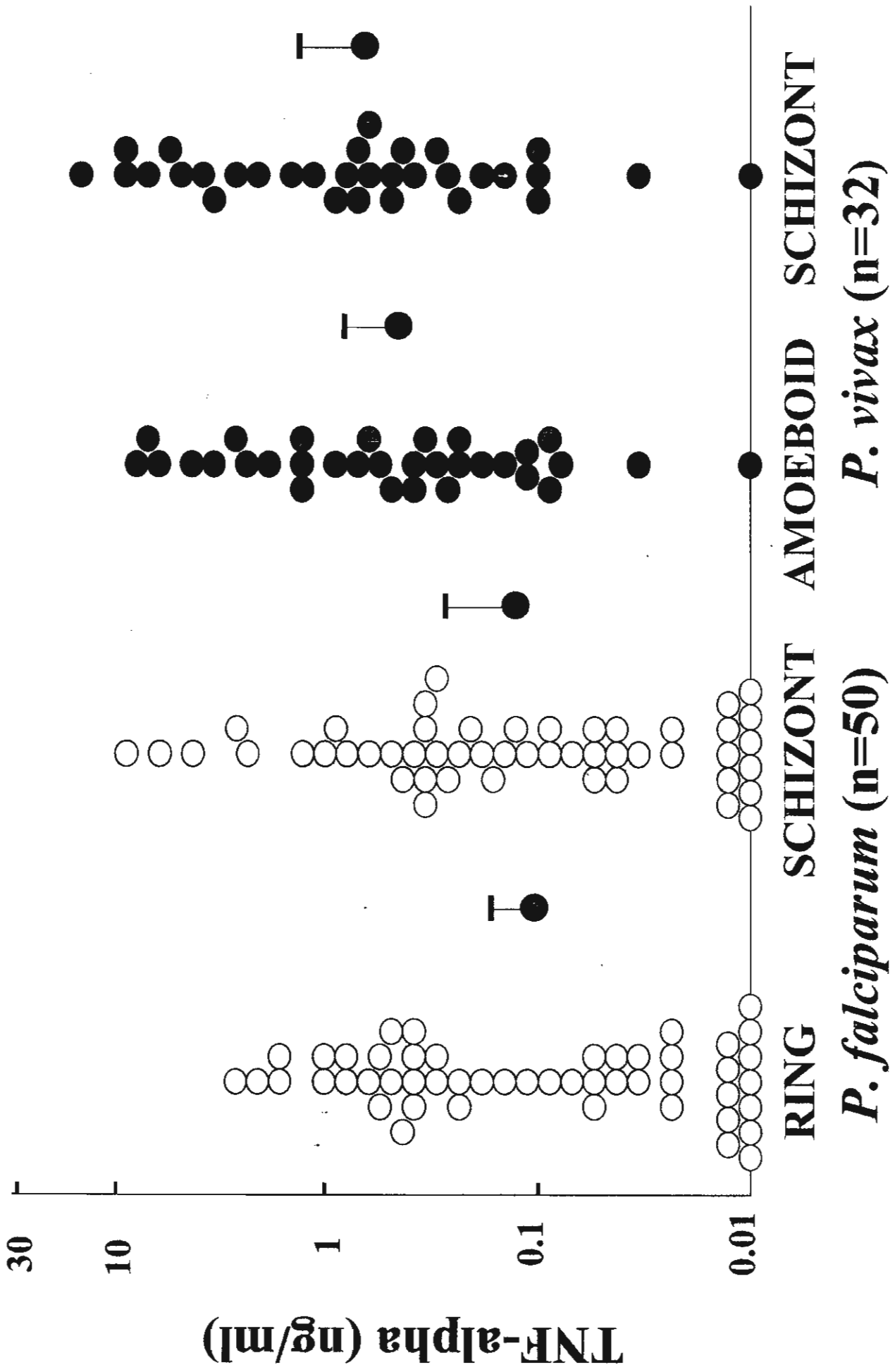


SD 2

LPS STIMULATION

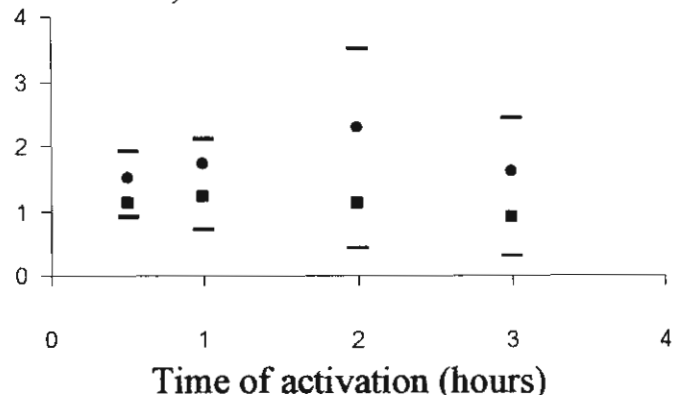


SD 3



$\sqrt[5]{x'}$

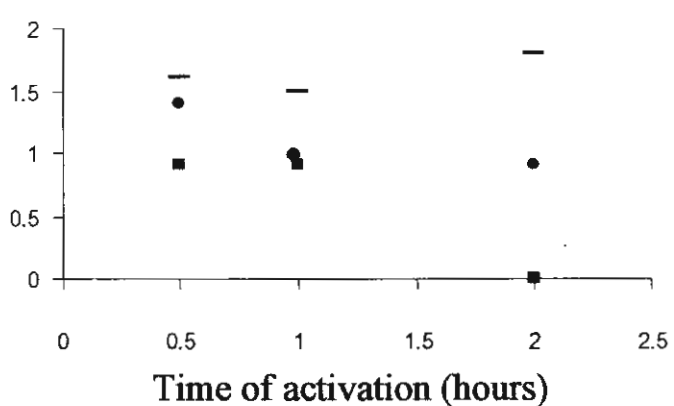
Number of platelet-bound HBEC
(Ratio of control)



Effects of *P. falciparum* ● or *P. vivax* ■ stimulated mononuclear cells

$\sqrt[6]{x'}$

Number of platelet-bound HUVEC
(Ratio of control)



Effects of *P. falciparum* ● or *P. vivax* ■ stimulated mononuclear cells

Plasmodium vivax* induces more TNF release than *Plasmodium falciparum

Rachanee Udomsangpetch¹, Kesinee Chotivanich², Sornchai Looareesuwan²,

Clive Bates³, Nicholas J White^{2,3}

1. Department of Pathobiology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand.
2. Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok, Thailand.
3. Nuffield Department of Clinical Medicine, John Radcliffe Hospital, University of Oxford, Oxford, United Kingdom.

Correspondence: Professor Rachanee Udomsangpetch
Department of Pathobiology
Faculty of Science
Mahidol University, Rama 6 Road
Bangkok 10400, Thailand.

INTRODUCTION

Plasmodium vivax infection has been known to cause benign malaria infection in man. A lack of adherence to endothelial cells resulting in a non-sequestering infected erythrocytes in the host is believed a frail factor of the parasite survival and hence reduced severity. On the other hand, paroxysms are distinct manifestations in patients with *P. vivax* infection. One of the potent mediators from host responses to malaria infection is tumor necrosis factor (TNF) released by stimulated macrophages(1,2). TNF plays dual role in malaria infection. In *P. vivax* infection, TNF together with plasma factors can kill parasite (3). In *P. falciparum* infection, high TNF in plasma (4,5) and in the brain tissue (6,7) is shown to associate with pathogenesis in severe malaria. A membrane-associated parasite antigen, glycosylphosphatidyl inositol (GPI) shown to activate macrophages and endothelial cells (8). Previous study implicates signal transduction in macrophages by the binding of GPI leading to TNF expression with pathogenesis in cerebral malaria (9). The presence of GPI in *P. vivax*-infected red blood cells has not been investigated. The mechanism by which *P. vivax*-derived antigen (GPI) stimulates macrophages has not been verified, however, in this study we reported a significantly greater level of TNF production by *P. vivax*-stimulated mononuclear cells *in vitro* than that by *P. falciparum*.

MATERIALS AND METHODS

Preparations of malaria antigens: Parasite density (number infected red cells/ul) and stages of parasites in all infected blood specimens were determined on admission.

Plasmodium falciparum: Ring stage from blood specimens on admission were washed 3 times with RPMI-1640 (SIGMA, UK), pH7.2, containing 25 mM HEPES, 2mM glutamine, 5mM glucose, buffy coat removed and the parasites were cultured at 3% hematocrit in an endotoxin free RPMI-1640 supplemented with 10% AB serum. The parasite cultures were kept at 37°C in 5% CO₂ air-mixture and maturation of the parasites to schizont stages containing >8 nuclei was confirmed by thin blood smears at 24 to 30 hours after starting the culture. The cultures were then washed 3 times in the serum free RPMI-1640 and the red cells were lysed with an endotoxin free water (SIGMA, UK) using red cell:water = 1:10 (v/v) and centrifuged at 10,000 rpm, 20°C for 4 minutes. Washing of the red cell membrane with water was repeated until the supernatant showed the least hemoglobin and last washing in the RPMI-1640. The red cell membrane was reconstituted with RPMI-1640 to the original red cell volume used at the start of hemolysis and then kept frozen at -20°C until used. Ring stage antigens were prepared from the parasites on admission without culturing, and stored as described above.

Plasmodium vivax: Whole blood from patients infected with *P. vivax* were diluted 1/10 with the 37°C-prewarmed RPMI-1640. Ten milliliters of the diluted blood was plated in a 100mm diameter tissue culture petri dish and kept at 37°C in 5%CO₂-air mixture for one hour to remove the adherent monocytes and neutrophil. After one hour incubation the blood was transferred to a new petri dish, kept under the same conditions as above

and this process was repeated twice. *P. vivax*-infected red cells in the adherent cell-depleted blood was then kept under tissue culture conditions at 37°C in 5%CO₂-air mixture for 30 to 40 hours depending on the stage of parasites on admission. Maturation of *P. vivax* showing fully segmented schizonts was determined by thick blood films prepared during the period of *ex vivo* cultures. The parasite cultures containing schizont stage were centrifuged and the red cells washed 3 times in RPMI-1640. Preparations of the *P. vivax* antigen were performed as those for *P. falciparum* above. *P. vivax* antigen of the younger stages of the parasite was prepared from the admission blood.

Mononuclear cell preparations and stimulation assay: Freshly drawn heparinized blood from a malaria non-immune healthy donor was overlaid on Lymphoprep® and centrifuged at 1,800 rpm, 20°C for 20 minutes. Mononuclear cells in the interface layer were collected, washed, number of cells counted and resuspended in the RPMI-1640 medium containing 5% fetal bovine serum to a final concentration of 3×10^6 cells/ml. Stimulation of the mononuclear cells with malaria antigens was performed in quadruplicate wells of a 96-well microtiter plate using 100 μ l (3×10^5) of the cell suspension per well. Forty microliters of each malaria antigen were added and incubated with the mononuclear cells at 37°C, 5% CO₂-atmosphere for 20 hours and supernatant collected. Uninfected red blood cell antigens prepared by the same protocol as malaria antigens were used to obtain baseline of the mononuclear cell stimulation. Lipopolysaccharides (1, 10, 100 ng/ml) were used as positive control for cell stimulation, and the negative control was mononuclear cells cultured alone in the RPMI-1640 medium.

Cytotoxic assay: A mouse fibroblast cell line L929 susceptible to lysis by TNF- α was used to determine the level of TNF- α released by malaria stimulated mononuclear cells. The L929 cells were pre-grown at 3×10^4 cells/well of microtiter plate and kept under the same culture conditions as above for 16-20 hours before used. Supernatants from the antigen-stimulated mononuclear cell cultures collected at the end of incubation period were transferred into a parallel microtiter plate of the pre-grown L929 cells and incubated overnight under culture conditions. Recombinant TNF- α (5, 50, 500 ng/ml) were added into an extra row of the L929 cells and used as a dose dependent curve showing the levels of TNF-induced cell lysis. Control for the starting number of L929 cells in the study used only RPMI-1640 medium. At the end of incubation period, the L929 cells in microtiter plate were fixed and stained with 5% crystal violet solution in 25% methanol for 20 min then rinsed with distilled water and air-dried. The crystal violet was dissolved in 50% ethanol for 20 minutes at room temperature and the amount of the dye read by spectrophotometer at 540 nm. The values were between malaria antigen stimulation and control cultures were compared and the levels of cell lysis was expressed in percentage.

Statistical analysis: Correlations between clinical parameters of the two malaria groups were tested by Pearson. The amount of TNF produced in the stimulation assays were log-transformed and the comparative differences in levels of TNF production between the two parasite species were tested by Mann Whitney U test. All statistical analyses were performed using SPSS version 7 analysis programme.

RESULTS

Clinical parameters of all malaria patients in both groups were summarized in Table 1. All cases (n=32) of *P. vivax* infection were not severe. Twenty one cases of the *P. falciparum* were from severe infection, only 5 cases were cerebral malaria and 24 were of uncomplicated malaria. Body temperatures during admission of all patients in both infections were not different, although the parasite densities were significantly different, $p<0.01$. Time of illness prior to admission of the *P. vivax* infection group appeared to be longer than that of the *P. falciparum* infection group.

In stimulation of the blood mononuclear cells (BMC), parasite antigens were in either young or mature stages. The level of cell lysis caused by the recombinant TNF was calculated with the known concentrations of TNF and a dose dependent curve was drawn. All values from the cell lysis assay were read against the TNF standard curve. The amount of TNF release caused by stimulation of BMC with *P. vivax* and *P. falciparum* antigens were compared in Table 1, and distribution of all values was shown in Figure 1. Since the levels of parasite density were different between the two groups, the amount of TNF from the stimulation assays was then normalized at the level of 10^5 parasite/ul before comparison. In *P. vivax* infection, TNF released by amoeboid form and schizont antigens was strongly correlated ($r=0.94$, $p=0.01$) showing the mean (95%CI) level of TNF per 10^5 parasites = 1.4 (0.7-2.1) ng/ml and 2.0 (0.9-3.0) ng/ml, respectively. There was no correlation between the release of TNF and other clinical parameters studied in *P. vivax*. In all degree of *P. falciparum* malaria severity, the release of TNF by stimulation with ring stage and schizont were correlated ($r=0.99$, $p=0.01$) showing the mean (95%CI) level of TNF per 10^5 parasites = 0.3 (0.2-0.5) ng/ml and 0.7 (0.2-1.2) ng/ml, respectively. Production of TNF was compared with other clinical

parameters among the 3 severity groups of *P. falciparum* infection. In severe malaria, the production of TNF by either ring or schizont antigens were correlated with duration of illness ($r=0.44$, $p=0.05$). No such correlation was observed in uncomplicated and cerebral malaria. TNF production by ring stage antigen of the uncomplicated malaria appeared to correlate ($r=0.53$, $p=0.05$) with the body temperature on admission.

Comparison between *P. vivax* and the 3 clinically difference groups of *P. falciparum* showed that parasite density in *P. vivax* was much lower than those in all *P. falciparum* ($p=0.001$). Production of TNF by stimulation with either amoeboid form or schizont antigen of *P. vivax* was greater than that in the uncomplicated ($p=0$) and severe ($p=0.002$) falciparum malaria. On contrary, TNF productions by stimulation with antigens from *P. vivax* infection group and the cerebral malaria in *P. falciparum* group were not significantly different.

DISCUSSION

P. vivax infection, unlike *P. falciparum* is known to cause benign malaria. Due to lack of sequestration in the post capillaries and property to adhere to endothelium. Compared with *P. falciparum*, clinical manifestations of *P. vivax* infection in this study were less severe. Severity in *P. vivax* infection has been described in symptomatic cases with paroxysm during which the peak of plasma level of TNF is concomittant with the time of infected erythrocyte rupturing (10). High TNF level is shown in severe *P. falciparum* infection, including cerebral malaria (4,5). The cause of increased TNF production in *P. falciparum*-infected malaria patients is parasite-derived phospholipid (11) released during completion of schizogony (12). Recently, the endotoxin like product has been characterized as a glycosylphosphatidylinositol (GPI) which is a lipid by nature and increasingly deposited in the membrane of infected erythrocytes (9) during maturation to schizonts. The GPI of *P. falciparum* is conserved in different geographical endemic regions (13). A wide range in GPI quantity is found in various *P. falciparum* parasite isolates, however, its stimulating effects on blood mononuclear cells to release TNF *in vitro* is similar, showing no dose dependent manner (13). This can be explained by a toxic effect of the parasite GPI in stimulation of the mononuclear cells, and thus the factor in stimulation is not a matter of quantity. Our results support the notion that GPI function as toxin due to the signalling capacity therefore only a few molecules of GPI is required to mediate biological effects (13). GPI of *P. vivax* has not been investigated and its existence in *P. vivax*-infected erythrocytes is being explored. Our findings that *P. vivax*-derived antigens in the infected erythrocyte membrane lysate stimulated mononuclear cells to produce TNF suggest that endotoxin like antigen of *P. vivax* must be retained in the membrane lysate. More TNF produced by *P. vivax* antigens than that did by the *P. falciparum* antigens indicate that *P. vivax* antigens is more potent in

activation of mononuclear cells than that of the *P. falciparum*. The high stimulating potency found in *P. vivax* might be due to a difference in the GPI structure, leading to a stronger signalling capacity. It has been shown previously (14) that mycoplasma contaminated in parasite materials potently stimulates mononuclear cells to produce TNF but this is not the case in our study. Random sampling mycoplasma test of the specimens showed negative result. Control red blood cell lysates from non-malaria immune donors and all negative medium controls showed no TNF production in these assays. Our findings may explain the clinical features observed in a previous historical malaria infection studied in volunteers (15) and a recent study at the Thai-Myanmar border (16) showing that the pyrogenic density in *P. vivax* infection is much lower than that in *P. falciparum* infection.

REFERENCES

1. Picot S, Peyron F, Vuillez JP, Barbe G, Marsh K, Ambroise-Thomas P, 1990. Tumor necrosis factor production by human macrophages stimulated in vitro by *Plasmodium falciparum*. Infect Immun 58:214-216.
2. Bates CAW, Taverne J, Karunaweera ND, Mendis KN, Kwiatkowsky D, Playfair JHL, 1992. Serological relationship of tumor necrosis factor-inducing exoantigens of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. Infect Immun 60:1241-1243.
3. Wijesekera SK, Carter R, Rathnayaka L, Mendis KN, 1996. A malaria parasite toxin associated with *Plasmodium vivax* paroxysms. Clin Exp Immunol 104:221-227.
4. Kern P, Hemmer CJ, Van Damme J, Gruss HJ, Dietrich M, 1989. Elevated tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 serum levels as markers for complicated *Plasmodium falciparum* malaria. Am J Med 87:139-143.
5. Kwiatkowski D, Hill AVS, Sambou I, Twumasi P, Castracane J, Manogue KR, Cerami A, Brewster DR, Greenwood BM, 1990. TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. Lancet 336:1201-1204.
6. Udomsangpetch R, Chivapat S, Viriyavejakul P, Riganti M, Wilairatana P, Pongponratn E, Looareesuwan S, 1997. Involvement of cytokines in the histopathology of cerebral malaria. Am J Trop Med Hyg 57:501-506.
7. Maneerat Y,
8. Tachado SD, Gerold P, McConville MJ, Baldwin T, Quilici D, Schwarz RT, Schofield L, 1996. Glycosylphosphatidylinositol toxin of *Plasmodium* induces nitric oxide synthase expression in macrophages and vascular endothelial cells by a protein kinase-dependent and protein kinase C-dependent signalling pathway. J Immunol 156:1897-1970.

9. Tachado SD, Gerold P, Schwarz R, Novakovic S, McConville MJ, Schofield L, 1997. Signal transduction in macrophages by glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium*, *Trypanosome*, and *Leishmania*: Activation of protein tyrosine kinase and protein kinase C by inositolglycan and diacylglycerol moieties. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:4022-4027.
10. Karunaweera ND, Carter R, Grau GE, Kwiatkowski D, Del Giudice G, Mendis KN, 1992. Tumor necrosis factor-dependent parasite-killing effects during paroxysms in non-immune *Plasmodium vivax* malaria patients. *Clin Exp Immunol* 88:499-505.
11. Bates CAW, Taverne J, Roman E, Moreno C, Playfair JHL, 1992. Tumor necrosis factor induction by malaria exoantigens depends upon phospholipid. *Immunol* 75:129-135.
12. Kwiatkowski D, Cannon JG, Manogue KR, Cerami A, Dinarello CA, Greenwood BM, 1989. Tumor necrosis factor production in *Falciparum* malaria and its association with schizont rupture. *Clin Exp Immunol* 77:361-366.
13. Berhe S, Schofield L, Schwarz RT, Gerold P, 1999. Conservation of structure among glycosylphosphatidylinositol toxins from different geographic isolates of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 103:273-278.
14. Kwiatkowski D, MYCOPLASMA
15. Kitchen SF, 1949. Symptomatology: General considerations and *falciparum* malaria. In Boyd MF edition. *Malariology*. Vol 2. Philadelphia: WB Saunders, 996-1017.
16. Luxemburg K,

Table 1. Clinical parameters between *P. vivax* and *P. falciparum* infection

Parameters	<i>P. vivax</i>		<i>P. falciparum</i>	
	Mean (95%CI)	Range	Mean (95%CI)	Range
Temperature (°C)	38.0(37.6-38.4)	36.2-40	37.9(37.6-38.2)	36.2-40
Parasite density (No./ μ l)	60967(41,206-80,728) [#]	100,00-240,000	360,243(242,530-477,956)	720-1,880,000
Duration of illness (Days)	4.8(3.6-5.9)	1-15	3.9(3.3-4.4)	1-10
Ring-TNF (ng/ml)*	1.4(0.7-2.1) [#]	0.03-6.7	0.3(0.2-0.5)	0.01-2.2
Schizont-TNF (ng/ml) *	2.0(0.9-3) [#]	0.03-12.5	0.7(0.2-1.2)	0.01-8

*Concentrations of TNF produced by stimulation of the mononuclear cells with ring stage or amoeboid form, and schizont stages of the parasites as indicated. # Statistically significance.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors thank all staff at the Hospital for Tropical Medicine, Bangkok. Technical assistance of Miss Bongkot Sunthornsata is appreciated. This study was supported by the Wellcome Trust of Great Britain and by the Thailand Research Fund.

Figure legend ၂၃၄ နံ ၁၈

Figure 1. Comparison of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) production by stimulation of the blood mononuclear cells with the infected red cell lysate preparations from young and mature stages of *P. falciparum* and *P. vivax* parasites.