

**PATHOGENESIS OF SEVERE FALCIPARUM MALARIA
AT THE BLOOD BRAIN BARRIER *IN VITRO***

LERTYOT TREERATANAPIBOON

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(MEDICAL TECHNOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2005**

**ISBN 974-04-5649-9
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

พยาธิกำเนิดที่ BLOOD BRAIN BARRIER ของโรคมalariaเรื้อรังชนิดรุนแรงที่สภาวะการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ (PATHOGENESIS OF SEVERE FALCIPARUM MALARIA AT THE BLOOD BRAIN BARRIER *IN VITRO*)

เลิศยศ ศรีรัตนไพบูรณ์ 4336821 MTMT/D

ปร.ด. (เทคนิคการแพทย์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : รัชนิย์ อุดมแสงเพชร, Ph.D., รัชฎา เกียรติเฟื่องฟู, ปร.ด., วีระพงศ์ ปรัชชญาสิทธิกุล, Ph.D.

บทคัดย่อ

พยาธิกำเนิดของโรคมalariaเรื้อรังชนิดฟาลซิพารัมขึ้นสมองยังไม่สามารถหาคำอธิบายได้ โดยที่เซลล์ผนังหลอดเลือดเป็นส่วนเชื่อมต่อที่สำคัญระหว่างเม็ดเลือดแดงติดเชื่อในกระแสเลือดกับเซลล์สมองหรือที่เรียกกันว่า blood brain barrier (BBB) ในโรคมalariaเรื้อรังขึ้นสมอง วิทยานิพนธ์นี้ได้ทำการศึกษาผลกระทบของการตอบสนองของร่างกายเนื่องจากการติดเชื้อมalariaเรื้อรังที่มีต่อหน้าที่ของ BBB โดยการวัดคุณสมบัติที่เปลี่ยนแปลงของ BBB ด้วยวิธีทางชีวฟิสิกส์ได้แก่ ECIS และทางชีวเคมีได้แก่ immunocytochemistry การเปลี่ยนแปลงของ tight junction โปรตีนบนรอยต่อระหว่างเซลล์ผนังหลอดเลือด BBB ในหลอดทดลองถูกเตรียมจากเซลล์ผนังหลอดเลือดของสมองหนู ในขณะที่ malaria เรื้อรังแอนติเจนที่เตรียมจากเม็ดเลือดแดงติดเชื่อในระยะตัวแก่ถูกใช้ในการกระตุ้นเม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear จากคนเพื่อให้หลั่ง cytokine TNF- α การศึกษานี้พบว่าการกระตุ้นเม็ดเลือดขาวด้วย malaria เรื้อรังแอนติเจนกระตุ้นการแสดงออกของ E-selectin บนเซลล์ผนังหลอดเลือดและลดความต้านทานระหว่างเซลล์ที่อยู่ตามผนังหลอดเลือดซึ่งมีผลทำให้หน้าที่ของ BBB ในการป้องกันเซลล์สมองลดลงในช่วงเวลา 4 ชั่วโมงของการเลี้ยงเซลล์เหล่านี้ไว้ด้วยกัน นอกจากนี้ยังพบการแตกแยกของ tight junction โปรตีนทั้ง ZO-1 และ claudin-5 ด้วย การทำงานที่ไม่เป็นปกติของ BBB นี้ อาจเกิดขึ้นจากการที่เม็ดเลือดขาวที่ถูกกระตุ้นแล้วสัมผัสกับเซลล์ผนังหลอดเลือดโดยตรง การศึกษานี้ได้เสนอบทบาทสำคัญของการตอบสนองอย่างเฉียบพลันของเม็ดเลือดขาวที่ถูกกระตุ้นด้วย malaria เรื้อรังแอนติเจนในการทำให้ BBB ทำหน้าที่ผิดปกติในโรคมalariaเรื้อรังชนิดรุนแรง การใช้ BBB ที่สร้างขึ้นในหลอดทดลองร่วมกับวิธีการทางชีวฟิสิกส์และชีวเคมีสร้างโอกาสที่สำคัญในการศึกษารายละเอียดของกลไกการเกิดโรคใน malaria เรื้อรังขึ้นสมอง

**PATHOGENESIS OF SEVERE FALCIPARUM MALARIA AT THE BLOOD
BRAIN BARRIER *IN VITRO***

LERTYOT TREERATANAPIBOON 4336821 MTMT/D

Ph.D. (MEDICAL TECHNOLOGY)

THESIS ADVISORS: RACHANEE UDOMSANGPETCH, Ph.D., RACHADA
KIATFUENGFOO, Ph.D., VIRAPONG PRACHAYASITTIKUL, Ph.D.**ABSTRACT**

Cerebral malaria is one of the most severe malaria associated with *Plasmodium falciparum* infection. However the pathogenesis of cerebral malaria is unclear. In cerebral malaria, the cerebral endothelial cell is a key interface between parasitized red blood cells and the brain. In this thesis, the effect of an inflammatory response on the blood brain barrier function during a malarial infection was studied by biophysical and biochemical methods. An *in vitro* blood brain barrier model was prepared from a primary culture of porcine brain capillary endothelial cells. Membrane associated malaria antigens obtained from lysed *P. falciparum* schizont-infected red blood cells stimulated human peripheral blood mononuclear cells to secrete tumor necrosis factor alpha. Blood brain barrier functions of endothelial cells during co-cultivation with malaria-activated peripheral blood mononuclear cells were determined by electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) and tight junction protein expression. The effects of malaria-activated peripheral blood mononuclear cells on blood brain barrier function were demonstrated *in vitro* for the first time. Expression of E-selectin on endothelial cells was also investigated. A significant decrease of electrical resistance between the cell-cell junctions in the blood brain barrier was detected during 4 hours incubation with the malaria-activated peripheral blood mononuclear cells. Immunocytochemical study showed the disruption of tight junction proteins ZO-1 and claudin-5, an indication of dysfunction of the blood brain barrier caused by malaria-activated peripheral blood mononuclear cells. Moreover, the activation of endothelial cells in the blood brain barrier model required direct contact of the peripheral blood mononuclear cells. Results from this study suggest a critical role of the acute response of malaria-activated peripheral blood mononuclear cells on the blood brain barrier dysfunction during the cerebral complication of malaria infection. Severity of cerebral malaria can be modulated by the focal interaction between the sequestering *P. falciparum*-infected red blood cells or remnant of the adherent *P. falciparum*-infected red blood cells along the capillaries in the brain and the leukocytes. A combination of the biochemical and biophysical techniques with the *in vitro* blood brain barrier model provides a great opportunity to elaborate the progressive mechanism of pathogenesis in cerebral malaria.

**KEY WORDS : *P. FALCIPARUM*/ CEREBRAL MALARIA/ BLOOD BRAIN
BARRIER/ IMPEDANCE SPECTROSCOPY**

125 P. ISBN 974-04-5649-9