ERYTHROCYTIC CELLS FOR CULTIVATION AND PATHOLOGICAL STUDY IN *PLASMODIUM VIVAX* INFECTION

TASANEE PANICHAKUL

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(TROPICAL MEDICINE)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2007

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การใช้เม็ดเลือดแดงเลี้ยงเชื้อมาลาเรียและศึกษาพยาธิวิทยาของโรคมาลาเรียชนิดพลาสโมเดียม ไวแว็กซ์ (ERYTHROCYTIC CELLS FOR CULTIVATION AND PATHOLOGICAL STUDY IN *PLASMODIUM VIVAX* INFECTION)

ทัศนีย์ พาณิชย์กุล 4836681 TMTM/D

ปร. ด. (อายุรศาสตร์เขตร้อน)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : เกศินี โชติวานิช (Ph.D. PATHOBIOLOGY),

รัชนีย์ อุดมแสงเพ็ชร (Ph.D. IMMUNOLOGY), เจตสุมน ประจำศรี (Ph.D. BIOLOGY)

บทคัดย่อ

ปัจจุบันเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์พลาสโมเดียมไวแว็กซ์ ยังไม่สามารถ เพาะเลี้ยงได้ อย่างต่อเนื่องในห้องปฏิบัติการ และการศึกษาในอดีตยังทราบว่า เชื้อพลาสโมเดียมไวแว็กซ์ เลือกที่จะเข้าเจริญในเม็ดเลือดแดงระยะ reticulocytes การศึกษาครั้งนี้ จึงได้ทดลองผลิตเม็ดเลือดแดง จากเซลล์ต้นกำเนิด ที่แยกได้จาก cord blood ของคน และใช้เม็ดเลือดแดงที่ผลิตได้นี้ นำมาเลี้ยงเชื้อพลาสโมเดียมไวแว็กซ์ ซึ่ง แยก ได้ จาก ผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรีย เซลล์ต้นกำเนิดที่แยกได้ จะถูกนำมาเลี้ยงใน อาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดโดยเฉพาะที่มีสารช่วยกระตุ้นการเจริญ และกระตุ้นเซลล์ให้เปลี่ยนไปเป็นเม็ดเลือดแดง หลังเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 10 วัน เซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนจะเริ่มปรากฏ และเจริญเป็นเม็ดเลือดแดงตัวแก่ ที่ ไม่มี nucleus ซึ่งจะพบมากเมื่อเลี้ยงเซลล์ได้ 20 วัน เม็ดเลือดแดงที่ผลิตได้ เมื่อถูกทดสอบ พบว่ามีคุณสมบัติลักษณะของเม็ดเลือดแดงปกติ และ ที่ผิวเซลล์แสดง markers CD 71, CD 36, glycophorin A, และ Duffy blood group (Fy6) และยังพบ reticulocytes ในช่วงวันที่ 10 ถึง 16 ของการเลี้ยงเซลล์ เม็ดเลือดแดงที่ผลิตได้นี้ถูกนำมาใช้เลี้ยงเชื้อพลาสโมเดียมไวแว็กซ์ ผลการทดลองพบว่าเชื้อสามารถเข้าเซลล์ และเจริญเติบโตได้ในเซลล์เม็ดเลือดแดงนี้ เมื่อติดตามการเจริญของเชื้อ พบว่าเชื้อดังกล่าว สามารถเจริญอย่างต่อเนื่องได้เป็นเวลา ตั้งแต่ 14 วันและนานถึง 85 วัน ดังนั้นแสดงให้เห็นว่า เม็ดเลือดแดงที่ผลิตจากเซลล์ต้นกำเนิดสามารถผลิตเซลล์ที่เชื้อพลาสโมเดียมไวแว็กซ์ต้องการใช้ในการเจริญเติบโต นอกจากนี้ได้ค้นพบว่า เชื้อพลาสโมเดียมไวแว็กซ์ สามารถเข้าเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนได้ และมีการทำลายเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนและตัวแก่ ซึ่งอาจจะเป็นสาเหตุอย่างหนึ่งของการเกิดโลหิตจางในผู้ป่วยมาลาเรีย น่าสนใจที่จะศึกษาต่อไปในเรื่องกลไกการทำลายเม็ดเลือดแดงโดยเชื้อพลาสโมเดียมไวแว็กซ์

141 หน้า.

ERYTHROCYTIC CELLS FOR CULTIVATION AND PATHOLOGICAL STUDY IN *PLASMODIUM VIVAX* INFECTION

TASANEE PANICHAKUL 4836681 TMTM/D

Ph.D.(TROPICAL MEDICINE)

THESIS ADVISORS: KESINEE CHOTIVANICH (Ph.D. PATHOBIOLOGY),

RACHANEE UDOMSANGPETCH (Ph.D. IMMUNOLOGY),

JETSUMON PRACHUMSRI (Ph.D. BIOLOGY)

ABSTRACT

Plasmodium vivax cannot be maintained in a continuous culture. Evidently, reticulocytes are the main targets for merozoite interaction and subsequent invasion to sustain the blood-stage cycles. In this study, we produced newly differentiated red blood cells (RBC) *in vitro* from freshly isolated human cord-blood stem cells. Hematopoietic stem cells (HSCs) were activated with erythropoietin and derived to become erythroid cells. Differentiation and maturation of erythroid cells were analyzed by determination of erythroid cell surface markers (CD 71, 36, glycophorin A and Duffy blood group Fy6). Duffy^{+} reticulocytes appeared after 10 to 16 erythroid cell cultures. These erythroid cells called growing RBCs (gRBCs), were then used to culture vivax parasites isolated from patients confirmed by parasite detection using blood smear stained with Giemsa. After co-culture of vivax parasites and gRBCs, parasite-infected gRBCs were determined by Giemsa staining and immunofluorescence assay (IFA) using anti-Duffy binding protein antibody and monoclonal antibody 3F9. The results showed that infected gRBCs had reacted with these two antibodies. Schizont and early stages of parasites in culture were illustrated by Giemsa staining. This indicates that vivax merozoites could invade and develop to schizont stage in gRBCs. Eleven of 14 vivax parasite isolates could be continuously cultured by adding fresh gRBCs. These parasite cultures could be maintained for more than 2 weeks and one culture could grow continuously for up to 85 days. Therefore, the production of gRBCs from HSCs is an alternative method for providing Duffy^{+} reticulocytes, which are specific target cells for *in vitro* continuous culture of *P. vivax*. Interestingly, it was discovered that vivax parasites could invade nucleated erythrocytes or erythroblasts. Direct or indirect destruction of these cells by vivax parasites may be an underlying pathogenetic mechanism contributing to anemia in vivax malaria.

KEY WORDS: MALARIA / *PLASMODIUM VIVAX* / HEMATOPOIETIC STEM CELL / ERYTHROCYTIC CELL.

141 P.