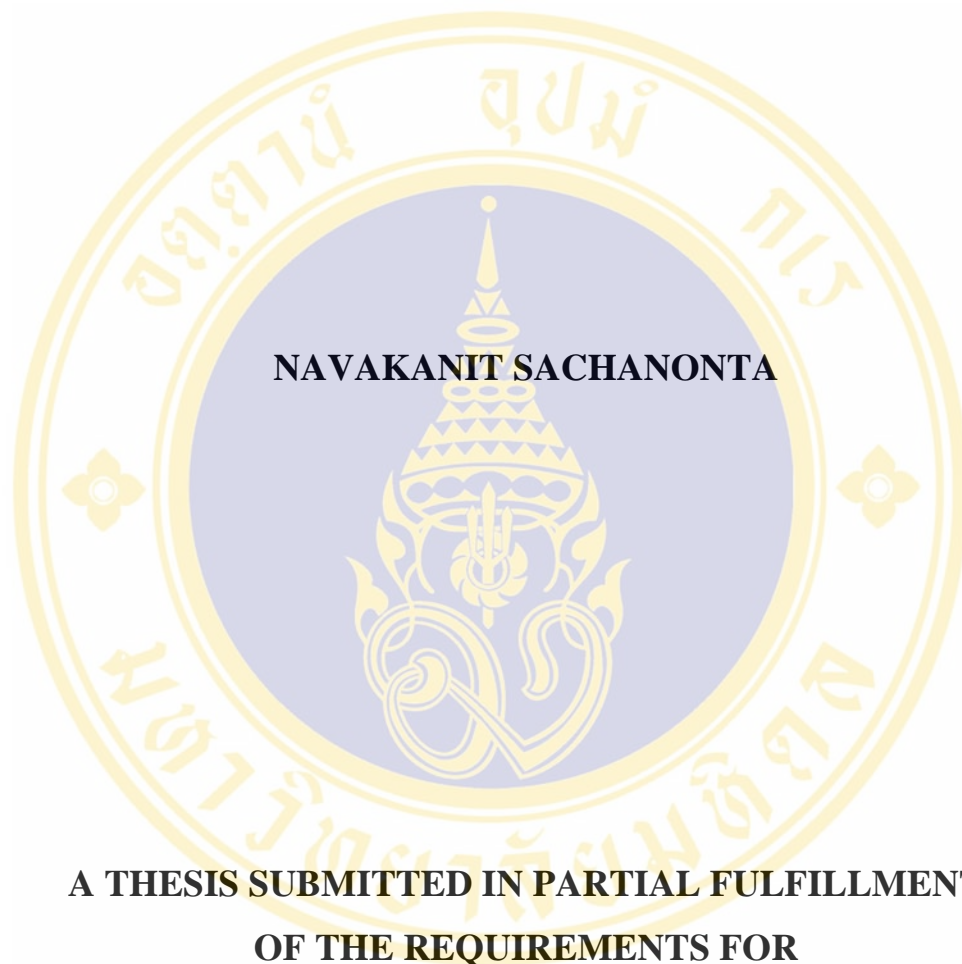


**EFFECTS OF ANTIMALARIAL DRUGS AND  
OTHER STRESS FACTORS ON *PLASMODIUM FALCIPARUM*  
IN VIVO AND IN VITRO**



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

**2008**

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

ผลของยาต้านมาลาเรียและปัจจัยความเครียดอื่นที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อเชื้อมาลาเรียชนิด  
พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม ศึกษาในเชื้อที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการและภายในร่างกาย

(EFFECTS OF ANTIMALARIAL DRUGS AND OTHER STRESS FACTORS ON *PLASMODIUM  
FALCIPARUM* IN VIVO AND IN VITRO)

นวนิษฐ์ สัจจานนท์ 4637690 TMTM/D

ปร.ด. (อายุรศาสตร์เขตร้อน)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: เอี่ยมศรี พงศ์พนรัตน์, Ph.D., อุไร ไชยศรี, Ph.D.,  
เกศินี โชติวานิช, Ph.D., GARETH TURNER, MA, BM BCh, DPhil, FRCPath, DAVID FERGUSON, Ph.D., DSc.

บทคัดย่อ

เชื้อมาลาเรียชนิดพลาสโมเดียมฟัลซิพารัมเป็นเชื้อโปรโตซัวที่ก่อให้เกิดการติดเชื้ออย่างรุนแรงในมนุษย์ มีวงจรชีวิตส่วนหนึ่งอาศัยอยู่ในเม็ดเลือดแดง การศึกษานี้มีความประสงค์จะสร้างความเข้าใจเกี่ยวกับเชื้อนี้ให้มากขึ้นในแง่ของผลของยาต้านมาลาเรียและปัจจัยความเครียดอื่นที่สังเกตเห็นความเปลี่ยนแปลงของเชื้อได้ในระดับ ultrastructure รวมทั้งการก่อให้เกิด vascular endothelial growth factor (VEGF) และ receptor (VEGF-R) ในเม็ดเลือดแดงที่มีการติดเชื้อ นอกจากนั้น ยังเป็นการศึกษาการตอบสนองของเชื้อซึ่งเหนี่ยวนำโดย VEGF ต่อการได้รับออกซิเจนในระดับต่ำ และการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของ blood-brain barrier ซึ่งเหนี่ยวนำโดย VEGF ในเนื้อเยื่อสมองของผู้ป่วยที่เสียชีวิตด้วยโรคมาลาเรีย ผลจากการศึกษาสรุปได้ดังต่อไปนี้ คือ ยาต้านมาลาเรียชนิด artesunate มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อมาลาเรียได้เร็วกว่าและสูงกว่ายาต้านมาลาเรียชนิด quinine และ piperacquine โดยการเปลี่ยนแปลงของเชื้อที่เกี่ยวข้องกับการได้รับยาต้านมาลาเรียคือจำนวนของ free ribosome ใน cytoplasm ของเชื้อที่ลดลง อย่างไรก็ตาม การเปลี่ยนแปลงของเชื้อในแบบอื่นที่พบอาจนำไปสู่ความเข้าใจของกลไกการออกฤทธิ์ของยาที่อาจเป็นไปได้ เช่น artesunate อาจมีกลไกการออกฤทธิ์ที่ membrane ของเชื้อ จากการศึกษาโดยใช้กล้อง real-time พบว่าเชื้อระยะ trophozoite ที่ได้รับยาต้านมาลาเรียจะมีการเคลื่อนไหวของ hemozoin granules ลดลงซึ่งจะสังเกตพบก่อนการเปลี่ยนแปลงรูปร่างที่จะนำไปสู่การตายของเชื้อ การศึกษาในสมองผู้ป่วยที่เสียชีวิตด้วยโรคมาลาเรียพบว่าการเพิ่มขึ้นของ VEGF ในเม็ดเลือดแดงที่มีการติดเชื้อซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาเชื้อที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการโดยใช้กล้อง confocal และพบว่า VEGF-R เพิ่มขึ้นบนผิวของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อเนื่องจากการซึมผ่านแบบ passive จาก host serum สู่มิวของเม็ดเลือดแดงแต่ไม่เข้าสู่ parasitophorous vacuole การเติม VEGF ให้กับเชื้อที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการจะเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อซึ่งจะมีส่วนในการช่วยให้เชื้อที่หยุดการเจริญเติบโตเนื่องจากได้รับยาต้านมาลาเรียให้กลับมีชีวิตรอดได้ จากการศึกษาการรั่วซึมออกจากเส้นเลือดของ VEGF-R และ fibrinogen ในสมองผู้ป่วยที่เสียชีวิตด้วยโรคมาลาเรียพบว่า VEGF-R ชนิด pKDR มีระดับการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญและสอดคล้องกับการรั่วซึมของ fibrinogen จาก blood-brain barrier เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ ยังพบว่า hypoxia inducible nuclear transcription factor DEC-1 มีระดับสูงขึ้นในเซลล์ชนิดต่างๆในสมองผู้ป่วยที่เสียชีวิตด้วยโรคมาลาเรีย หมายความว่ามีการตอบสนองต่อระดับออกซิเจนที่ลดต่ำลงในสมอง จากผลการวิเคราะห์ transcriptome พบว่าเชื้อมาลาเรียชนิดพลาสโมเดียมฟัลซิพารัมมีการตอบสนองต่อความร้อนและระดับออกซิเจนที่ลดต่ำลง ซึ่งแสดงให้เห็นโดยการลดลงของโปรตีนชนิดใหม่จำนวน 3 ชนิดที่ตอบสนองต่อระดับออกซิเจนที่ลดต่ำลงโดยไม่ขึ้นกับการที่เชื้อตอบสนองต่อความร้อน

**EFFECTS OF ANTIMALARIAL DRUGS AND OTHER STRESS FACTORS  
ON *PLASMODIUM FALCIPARUM* IN VIVO AND IN VITRO****NAVAKANIT SACHANONTA 4637690 TMTM/D****Ph.D. (TROPICAL MEDICINE)****THESIS ADVISORS: EMSRI PONGPONRATN, Ph.D., URAI CHAISRI, Ph.D.,  
KESINEE CHOTIVANICH, Ph.D., GARETH TURNER, MA, BM BCh, DPhil,  
FRCPath, DAVID FERGUSON, Ph.D., DSc.****ABSTRACT**

*Plasmodium falciparum*, the protozoan parasite responsible for severe malaria infection, undergoes a complex life cycle including intraerythrocytic development in the human host. This study aimed to provide a better understanding on the effects of antimalarial drugs and stress response on parasite ultrastructure, the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors (VEGF-R) on *P. falciparum*-infected red blood cell (IRBC), the hypoxic stress responses mediated by hypoxic inducible factor and VEGF, and changes in blood-brain barrier function induced by VEGF mediated pathways in post mortem tissues from patients dying of severe malaria. The results from the study showed the following: Artesunate drug treatment had faster and more parasitocidal effects on parasite growth than quinine or piperazine. The only morphological correlate of antimalarial drug exposure was a decrease in the number of free ribosome in the parasite cytoplasm. However, a number of other morphological features were seen which indicate possible mechanisms of drug action, such as the effect of artesunate on parasite membrane integrity. Parasite drug treatment causes a decrease in the movement of hemozoin granules in trophozoite stage parasites, as observed by real-time microscopy. Interestingly, this occurs before recognizable morphological changes of parasite death such as pyknosis. Examination of post mortem brain tissues from human cerebral malaria (CM) cases showed increased expression of VEGF within sequestered IRBC. This was also shown *in vitro* using confocal microscopy on cultured parasites. VEGF-R expression is increased on the surface of cultured IRBC, but is passively adsorbed onto the RBC surface from host serum, and not translocated into the parasitophorous vacuole. Exogenous administration of VEGF to cultured parasites caused increased growth rates and is trophic to parasites, allowing partial rescue from parasitostatic effects of drug treatment. Studies of VEGF-R expression and serum fibrinogen leakage in post mortem tissues showed that activated VEGF-R (pKDR) expression is significantly increased in the brain in CM, and associated with blood brain barrier leakage as evidenced by fibrinogen leakage around cerebral vessels when compared to controls. The hypoxia inducible nuclear transcription factor DEC-1 was also upregulated in a number of different cells in the brain of CM patients, implying that hypoxic responses occur during cerebral malaria. A provisional transcriptome analysis of *P. falciparum* responses to heat shock and hypoxia demonstrated specific reductions in three novel parasite proteins in response to hypoxia, independent of heat shock.

**KEY WORDS : *PLASMODIUM FALCIPARUM* / ANTIMALARIAL DRUGS /  
PATHOPHYSIOLOGY / IMMUNOHISTOCHEMISTRY /  
VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR**

185 pp.