



บทบาทของอะพอพโทซิสกับการเกิด blood-brain barrier breakdown ในมาลาเรียขึ้นสมอง

ขวัญนันท์ นันทวิสัย

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

บทคัดย่อ

โรคมาลาเรียเป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อโปรโตซัวในจีนิส *Plasmodium* และยังคงเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่มีความสำคัญในหลายประเทศทั่วโลก ในบรรดาเชื้อมาลาเรียที่สามารถก่อโรคในคนได้นั้นมีเพียงเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมเท่านั้นที่มีคุณสมบัติในการเกาะติดกับผนังหลอดเลือดของโฮสต์และก่อให้เกิดโรคมาลาเรียชนิดรุนแรงเนื่องจากมีภาวะแทรกซ้อน หนึ่งในภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรงที่สุดของโรคก็คือ มาลาเรียขึ้นสมอง กลไกการเกิดมาลาเรียขึ้นสมองนั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่าเกิดขึ้นอย่างไร แต่เนื่องจาก blood-brain barrier เป็นส่วนสำคัญที่กั้นกลางระหว่างเชื้อมาลาเรียที่อยู่ในภายในหลอดเลือดกับเนื้อสมอง งานวิจัยส่วนใหญ่จึงให้ความสนใจกับ blood-brain barrier จากการศึกษาทางโครงสร้างและหน้าที่ของ blood-brain barrier พบว่ามี blood-brain barrier breakdown เกิดขึ้นในมาลาเรียขึ้นสมอง แต่อย่างไรก็ตามกลไกที่ทำให้เกิด blood-brain barrier breakdown นี้ยังไม่ทราบแน่ชัดว่าเกิดได้อย่างไร แต่เนื่องจากพบว่าการเกาะติดของเม็ดเลือดแดงติดเข้ากับผนังหลอดเลือดซึ่งเกิดจากการจับกันระหว่างโปรตีนของเชื้อมาลาเรียที่อยู่บนผิวเม็ดเลือดแดงกับตัวรับที่อยู่บนผิวเซลล์บุหลอดเลือดนั้น สามารถก่อให้เกิดการส่งสัญญาณต่างๆ ภายในเซลล์ ทำให้เซลล์เกิดความเปลี่ยนแปลงในรูปแบบต่างๆ ซึ่งรวมถึงการเกิดอะพอพโทซิสของเซลล์ด้วย ดังนั้นจึงมีผู้เสนอว่าอะพอพโทซิสอาจจะเป็นกลไกหนึ่งที่ทำให้เกิด blood-brain barrier breakdown ที่พบในมาลาเรียขึ้นสมอง แต่อย่างไรก็ตามกลไกโดยละเอียดที่เชื้อมาลาเรียสามารถชักนำให้เกิดอะพอพโทซิสในเซลล์บุหลอดเลือดยังคงต้องการการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปอีกมาก ซึ่งในที่สุดอาจจะนำไปสู่การพัฒนาที่สามารถนำมาใช้ในการรักษามาลาเรียขึ้นสมองได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

คำสำคัญ: มาลาเรียขึ้นสมอง, พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม, อะพอพโทซิส

ผู้พิมพ์ประสานงาน

ขวัญนันท์ นันทวิสัย

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

สุขุมวิท 23 เขตวัฒนา กรุงเทพฯ 10110

อีเมล: kwannan@swu.ac.th

Role of apoptosis in the blood-brain barrier breakdown during cerebral malaria

Kwannan Nantavisai

Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University

Abstract

Malaria, a disease caused by protozoan parasites of the genus *Plasmodium*, is still a major problem in many parts of the world. Among the human malaria parasites, *Plasmodium falciparum* is the only species which sequesters in microvasculature and causes the most severe form of the disease, cerebral malaria. The mechanism underlying the onset of cerebral malaria is still not fully understood. Many research works have focussed attention on blood-brain barrier which is the key interface between the brain parenchyma and the parasite. Structurally and functionally studies of blood-brain barrier have provided some evidences for blood-brain barrier breakdown in cerebral malaria. However, the precise mechanism leading to the disruption of the blood-brain barrier seen in cerebral malaria is still unknown. It has been shown that sequestration, resulting from the interaction between parasite proteins on the surface of parasitized red blood cells and host endothelial cell adhesion molecules can cause activation of intracellular signalling pathways in endothelial cells including apoptosis which may be one of the mechanisms responsible for the blood-brain barrier breakdown in cerebral malaria. However, the fine mechanisms and signalling pathways implicating in this process remain to be further defined which, in turn, might lead to the new therapeutic intervention for the disease.

Keywords: Cerebral malaria, *Plasmodium falciparum*, Apoptosis

Corresponding author

Kwannan Nantavisai

Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University

Sukhumwit 23, Wattana, Bangkok, 10110

E-mail : kwannan@swu.ac.th

■ บทนำ

มาลาเรียเป็นโรคที่มียุงก้นปล่องเป็นพาหะ เกิดจากการติดเชื้อโปรโตซัวในจี้นิส *Plasmodium* เชื้อโปรโตซัวในจี้นิสที่สามารถก่อโรคในคนได้มีทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* และ *Plasmodium knowlesi* สำหรับ *Plasmodium knowlesi* นั้นเป็นเชื้อที่ก่อโรคในลิงแสม (long-tailed macaques) และลิงกัง (pig-tailed macaque) แต่ปัจจุบันได้ถูกจัดให้เป็นเชื้อมาลาเรียที่ก่อโรคในคน¹ เนื่องจากมีรายงานว่าการติดเชื้อนี้สามารถติดต่อและก่อโรคในคนได้ ซึ่งพบในประเทศมาเลเซีย^{2, 3} ฟิลิปปินส์⁴ สิงคโปร์⁵ รวมทั้งในประเทศไทยด้วย^{6, 7}

โรคมาลาเรียยังคงเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญในหลายประเทศทั่วโลก โดยเฉพาะประเทศที่ตั้งอยู่ในเขตร้อนและเขตกึ่งร้อน ถึงแม้ว่าจะมีความพยายามในการควบคุมและกำจัดมาลาเรียด้วยวิธีต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นการให้ยาฆ่าเชื้อมาลาเรียหรือการกำจัดยุงพาหะ ก็ยังคงพบการติดเชื้อในอัตราที่ค่อนข้างสูง จากรายงานขององค์การอนามัยโลก พบว่าในปี ค.ศ. 2010 มีจำนวนผู้ป่วยด้วยโรคมาลาเรียทั่วโลกมากกว่า 200 ล้านราย และมีผู้เสียชีวิตประมาณ 1 ล้านคนต่อปี⁸ สาเหตุของการเสียชีวิตของผู้ป่วยส่วนใหญ่เกิดจากการป่วยเป็นมาลาเรียชนิดรุนแรงซึ่งมีภาวะแทรกซ้อนจากการติดเชื้อ *Plasmodium falciparum*

เมื่อผู้ป่วยติดเชื้อมาลาเรีย ผู้ป่วยอาจจะมีอาการได้ตั้งแต่ไม่มีอาการของโรคเลย หรือมีอาการคล้ายเป็นไข้หวัด (มักพบในคนที่อาศัยอยู่ในเขตรอบนอกและมีภูมิคุ้มกันต่อโรค) จนถึงมีอาการรุนแรงเนื่องจากเกิดภาวะแทรกซ้อนต่างๆ เช่น ภาวะซีด (anemia) ภาวะเหลือง (jaundice) ไตวาย (renal failure) หรือ มาลาเรียขึ้นสมอง (cerebral malaria)^{9,10} ซึ่งในบรรดาภาวะแทรกซ้อนต่างๆ ของมาลาเรียชนิดรุนแรงนั้น ภาวะมาลาเรียขึ้นสมองนับว่ามีความรุนแรงที่สุดภาวะหนึ่งและเป็นภาวะที่ได้รับความสนใจศึกษามากที่สุด

อาการของมาลาเรียขึ้นสมองจะมีระดับแตกต่างกันไป ตั้งแต่ผู้ป่วยอาจมีความรู้สึกสับสน (confusion) หรือหลับลึก ไม่รู้สึกตัวแต่ยังสามารถตอบสนองต่อสิ่งเร้าที่รุนแรงได้ (stupor) จนถึงผู้ป่วยไม่ตอบสนองต่อสิ่งเร้า (obtundation) และหมดสติ (coma) ผู้ป่วยด้วยมาลาเรียขึ้นสมองนั้นมักมีอัตราการตายที่ค่อนข้างสูงถึงแม้ว่าจะมีการให้ยาต้านมาลาเรียร่วมกับให้การให้การรักษาระดับประคับประคอง (supportive care) และการให้การรักษาระดับภาวะแทรกซ้อนอื่นๆ เช่น ภาวะซีดหรือไตวาย ร่วมไปด้วย⁹

สำหรับกลไกการเกิดมาลาเรียขึ้นสมองนั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่าเกิดขึ้นได้อย่างไร แต่เชื่อว่าคุณสมบัติในการเกาะติดกับผนังหลอดเลือด (sequestration) ของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมนั้นมีความสำคัญในการทำให้เกิดภาวะนี้ โดยช่วงหนึ่งในวงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมนั้น เชื้อมาลาเรียจะมีการบุกรุกเข้าไปเจริญเติบโตภายในเม็ดเลือดแดงของโฮสต์ ซึ่งเชื้อมาลาเรียจะมีการพัฒนาจากระยะวงแหวน (ring) ไปเป็นระยะโทรโฟซอइट (trophozoite) และไซซอนต์ (schizont) ตามลำดับ ในระยะโทรโฟซอइटและไซซอนต์ของเชื้อมาลาเรียชนิดนี้พบว่า บนผิวของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมีปุ่ม (knob) ขนาดเล็กกระจายอยู่ทั่วไป โดยปุ่มเหล่านี้เกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงและการรวมตัวของโปรตีนที่สร้างโดยเชื้อมาลาเรียภายใต้ปุ่มนี้ และบนปุ่มนี้ยังมีโมเลกุลที่เกี่ยวข้องโดยตรงกับการเกาะติดของเม็ดเลือดแดงติดเชื้อมีเซลล์บุหลอดเลือด (endothelial cell) ซึ่งได้แก่ โปรตีน PfEMP-1 (*Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1) ซึ่งโปรตีนชนิดนี้สามารถจับกับตัวรับ (receptor) บนผิวเซลล์ของโฮสต์ได้หลายชนิด เช่น thrombospondin (TSP), CD36, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), E-selectin, vascular cellular adhesion molecule-1 (VCAM-1) และ CD31 เป็นต้น จึงทำให้เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมมีความสามารถในการเข้าเกาะติดกับผนังหลอดเลือดของอวัยวะต่างๆ ของโฮสต์ เช่น สมอง ได้ ซึ่งแตกต่างจากเชื้อมาลาเรียชนิดอื่นๆ ที่มักจะไม่สามารถเกาะติดกับเซลล์ของโฮสต์¹¹

จากลักษณะเด่น (hallmark) ของมาลาเรียขึ้นสมองที่พบจากการตรวจศพของผู้ที่เสียชีวิตจากมาลาเรียขึ้นสมอง ที่มักจะพบเม็ดเลือดแดงติดเชื้อมีเม็ดเลือดขาว (leukocyte) และเกล็ดเลือด (platelet) อุดตันอยู่ภายในหลอดเลือดขนาดเล็กของสมอง¹² และจากที่ได้กล่าวไปข้างต้นแล้วว่า การเกาะติดนี้เกิดจากการจับกันระหว่างโปรตีนของเชื้อมาลาเรียกับตัวรับบนผิวเซลล์บุหลอดเลือดซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของ blood-brain barrier ทำให้นักวิทยาศาสตร์หลายกลุ่มเชื่อว่า การสัมผัสกันอย่างใกล้ชิดระหว่างเม็ดเลือดแดงติดเชื้อมีเซลล์บุหลอดเลือดสมองนี้ เป็นปัจจัยที่ส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อ blood-brain barrier และในที่สุดก็นำไปสู่การเกิดมาลาเรียขึ้นสมอง⁹ นอกจากนี้การติดเชื้อมาลาเรียยังกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันวิทยาของโฮสต์ทำให้เกิดการหลั่งของ cytokine ต่างๆ เช่น tumor necrosis factor (TNF)- α และ Interleukin (L)-1 ซึ่งพบว่ามีปริมาณสูงขึ้นในผู้

ป่วยมาลาเรียขึ้นสมอง^{13,14} cytokine เหล่านี้มีผลทำให้ตัวรับบนผิวเซลล์บุหลอดเลือด เช่น ICAM-1 มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้น^{15,16} ทำให้เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ เม็ดเลือดขาว และเกล็ดเลือดสามารถเกาะติดกับเซลล์บุหลอดเลือดได้มากขึ้น รวมทั้งยังพบว่าสามารถทำให้ permeability ของเซลล์บุหลอดเลือดเพิ่มขึ้น จึงอาจจะเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สนับสนุนให้เกิดความเสียหายแก่ blood-brain barrier¹⁷

■ Blood-brain barrier breakdown ในมาลาเรียขึ้นสมอง

การศึกษาทั้งในสมองของผู้ป่วย ในสัตว์ทดลอง หรือในห้องปฏิบัติการ ต่างสนับสนุนว่ามีการเกิด blood-brain barrier breakdown ในมาลาเรียขึ้นสมอง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในหลอดเลือดที่มีเม็ดเลือดแดงติดเชื้อเกาะติดอยู่ ในการศึกษาของ Brown และคณะ ซึ่งทำการเปรียบเทียบสมองของผู้ป่วยที่เสียชีวิตจากมาลาเรียขึ้นสมองกับสมองของกลุ่มควบคุมซึ่งได้มาจากผู้ที่เสียชีวิตจากสาเหตุอื่นที่ไม่ใช่มาลาเรีย โดยวิธี immunohistochemistry พบว่าในสมองของกลุ่มควบคุมจะพบ endothelial cell junction proteins เช่น ZO-1, occludin และ vinculin อยู่ในปริมาณมาก ในขณะที่พบว่าการสูญหายไปของโปรตีนเหล่านี้ในสมองของผู้ป่วยที่เสียชีวิตจากมาลาเรียขึ้นสมอง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในบริเวณที่เม็ดเลือดแดงติดเชื้อเกาะติดอยู่ นอกจากนี้ยังพบว่าการเกาะติดของเม็ดเลือดแดงติดเชื้อยังทำให้ blood-brain barrier เสียคุณสมบัติในการคัดเลือกรวมทั้งสารที่จะสามารถผ่านเข้าสู่สมองไป ทำให้พลาสมาโปรตีนรั่วไหลเข้าสู่สมองได้ โดยผู้วิจัยพบการดูดซึมโปรตีน fibrinogen โดย astrocyte และยังพบการแสดงออกของ sialoadhesin และ scavenger receptor บนผิวของ perivascular macrophage ในสมองของผู้ป่วยที่เสียชีวิตจากมาลาเรียขึ้นสมอง ซึ่งโมเลกุลทั้งสองชนิดนี้โดยปกติแล้วจะไม่ถูกแสดงออกโดย perivascular macrophage ที่อยู่ภายในสมอง แต่จะถูกแสดงออกต่อเมื่อถูกกระตุ้นจากพลาสมาโปรตีนเท่านั้น ดังนั้นการแสดงออกของโมเลกุลทั้งสองนี้บนผิว perivascular macrophage จึงเป็นหลักฐานที่แสดงให้เห็นถึงการรั่วไหลของพลาสมาโปรตีนเข้าสู่สมอง ซึ่งรูปแบบเหล่านี้ไม่พบในกลุ่มควบคุม^{18,19} การศึกษาในสัตว์ทดลองซึ่งถูกเหนี่ยวนำให้เป็นมาลาเรียขึ้นสมองก็พบว่ามี blood-brain barrier breakdown เกิดขึ้นเช่นเดียวกัน โดยจากการวัดปริมาณการเคลื่อนที่ของสีย้อมชนิด Evans blue และโปรตีนอัลบูมินที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีพบว่า blood-brain barrier ในสมองของหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นมาลาเรียขึ้น

สมองด้วยเชื้อมาลาเรียชนิด *P. berghei* ANKA เกิดความเสียหายโดย blood-brain barrier เสียความสามารถในการคัดเลือกรวมทั้งสารที่จะผ่านเข้าสู่สมอง นอกจากนี้ยังพบว่ามีความเสียหายเกิดขึ้นกับเซลล์บุหลอดเลือดด้วย ซึ่งนักวิจัยคาดว่าน่าจะเป็นสาเหตุของการเกิด blood-brain barrier breakdown ในสัตว์ทดลอง²⁰ ซึ่งลักษณะในการทำงานของเดียวกันกับที่พบจากการศึกษาในสัตว์ทดลองและในผู้ป่วยนี้ ก็ถูกพบในการศึกษาในห้องปฏิบัติการด้วย จากการศึกษาของ Tripathi และคณะ ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงเซลล์บุหลอดเลือดสมองร่วมกับเม็ดเลือดแดงติดเชื้อ²¹ และ Treeratanapiboon และคณะ ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงเซลล์บุหลอดเลือดร่วมกับเม็ดเลือดขาวชนิด peripheral blood mononuclear cell ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยแอนติเจนจากเชื้อมาลาเรีย²² พบว่าทั้งเม็ดเลือดแดงติดเชื้อหรือเม็ดเลือดขาวที่ได้รับการกระตุ้นด้วยแอนติเจนจากเชื้อมาลาเรียต่างก็มีผลทำให้ barrier function ของเซลล์บุหลอดเลือดสมองลดลง นอกจากนี้การพบจุดเลือดออก (petechial haemorrhages) ในสมองของผู้เสียชีวิตจากมาลาเรียขึ้นสมอง รวมถึงการพบจุดเลือดออกภายในจอประสาทตา (retinal haemorrhages) ของผู้ป่วยมาลาเรียขึ้นสมอง ซึ่งเจริญมาจากเนื้อเยื่อในระยะตัวอ่อนชนิดเดียวกันกับสมอง (neuroectoderm) จึงมีลักษณะของเซลล์และ blood-tissue barrier ที่มีความคล้ายคลึงกับสมองมาก^{23,24} ก็เป็นอีกหลักฐานหนึ่งที่สนับสนุนการเกิด blood-brain barrier breakdown ในมาลาเรียขึ้นสมอง ซึ่งจากหลักฐานต่างๆ เหล่านี้ทำให้เชื่อได้ว่าการเกิด blood-brain barrier breakdown นั้นน่าจะมีความสัมพันธ์กับการเกิดมาลาเรียขึ้นสมอง แต่อย่างไรก็ตามกลไกที่เชื้อมาลาเรียทำให้เกิด blood-brain barrier breakdown นั้นยังไม่ทราบแน่ชัดว่าเกิดขึ้นอย่างไร

■ อะพอพโทซิสกับการเกิด Blood-brain barrier breakdown ในมาลาเรียขึ้นสมอง

เป็นที่ทราบกันดีว่าการเกิด cross-linking กันของ adhesion molecules บนเยื่อหุ้มเซลล์บุหลอดเลือดนั้นสามารถกระตุ้นให้เกิดการส่งสัญญาณ (intracellular signalling pathways) ต่างๆ ภายในเซลล์บุหลอดเลือด ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่างๆ แก่เซลล์บุหลอดเลือด ซึ่งการจับกับตัวรับ (receptor) บนผิวเซลล์บุหลอดเลือดของเชื้อมาลาเรียนั้นก็ถูกพบว่าสามารถทำให้เกิดกระบวนการส่งสัญญาณต่างๆ ภายในเซลล์บุหลอดเลือดด้วยเช่นกัน ซึ่งทำให้เกิดการตอบสนองของเซลล์บุหลอดเลือดต่อการเกาะติดของเชื้อมาลาเรียในรูปแบบต่างๆ เช่น การกระตุ้นให้เซลล์บุหลอดเลือดมีการแสดงออก

ของ adhesion molecules เพิ่มมากขึ้นซึ่งทำให้เม็ดเลือดแดงติดเชื่อมสามารถเกาะติดกับเซลล์บุหลอดเลือดได้เพิ่มมากขึ้น รวมถึงสามารถกระตุ้นให้เกิดอะพอพโทซิสของเซลล์บุหลอดเลือดได้ด้วย ดังนั้นจึงมีผู้เสนอว่าการเกิดอะพอพโทซิสของเซลล์บุหลอดเลือดจากการชักนำของเม็ดเลือดแดงติดเชื่อม อาจจะเป็นกระบวนการหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในการเกิด blood-brain barrier breakdown ในมาลาเรียขึ้นสมอง^{25,26}

สำหรับกระบวนการอะพอพโทซิสนั้น เป็นกระบวนการตายของเซลล์ที่เกิดขึ้นตามปกติในการเจริญพัฒนาและรักษาสมดุลของสิ่งมีชีวิตหลายเซลล์ เซลล์ที่เกิดอะพอพโทซิสจะมีการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ทั้งทางด้านสัณฐานวิทยาและทางชีวเคมี เช่น เซลล์มีการหดตัว (cellular shrinkage) นิวเคลียสรวมตัวกันแน่น (nuclear condensation) ดีเอ็นเอถูกย่อยเป็นชิ้นเล็กๆ (DNA breakdown) และเยื่อหุ้มเซลล์มีการบวมพองออกเป็นถุงเล็กๆ (membrane blebbing) จนในที่สุดเมื่อเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีการบวมพองเป็นถุงขนาดเล็กเกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก เซลล์จะแตกออกเป็นชิ้นส่วนเล็กๆ ซึ่งถูกหุ้มไว้ด้วยเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane-surrounding fragment) เรียกว่า apoptotic bodies หรือ microparticles ซึ่งชิ้นส่วนเซลล์เล็กๆ เหล่านี้จะถูกจับกินโดย phagocyte หรือเซลล์ข้างเคียงโดยไม่ก่อให้เกิดความเสียหายแก่เซลล์อื่นโดยรอบ สำหรับวิถีที่ควบคุมการเกิดอะพอพโทซิสนั้นมีอยู่ 2 วิถีหลักๆ คือ extrinsic/death receptor pathway และ intrinsic/mitochondrial pathway²⁷ นอกจากนี้กระบวนการอะพอพโทซิสยังสามารถถูกควบคุมโดยวิถีอื่นๆ ได้ด้วย เช่น endoplasmic reticulum stress pathway²⁸

หลักฐานจากการศึกษาในสมองของผู้ป่วยที่เสียชีวิตจากมาลาเรียขึ้นสมอง สัตว์ทดลอง หรือการเพาะเลี้ยงเซลล์ในหลอดทดลอง ต่างก็แสดงให้เห็นถึงความสามารถของเชื้อมาลาเรียในการเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโทซิสของเซลล์บุหลอดเลือด รวมถึงความเชื่อมโยงของอะพอพโทซิสกับการเกิดมาลาเรียขึ้นสมอง การศึกษาเนื้อเยื่อสมองจากผู้ที่เสียชีวิตด้วยมาลาเรียขึ้นสมองและเนื้อเยื่อสมองของสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นมาลาเรียขึ้นสมองด้วยวิธี immunohistochemistry ต่างก็พบว่ามีการถูกกระตุ้นของ caspase-3 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในวิถีอะพอพโทซิสในสมองของผู้ป่วยมาลาเรียขึ้นสมอง^{29,30} และพบการเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของ Fas ligand และ Soluble Fas ในการตรวจน้ำไขสันหลังและพลาสมาซึ่งได้จากผู้ป่วยซึ่งเสียชีวิตจากมาลาเรียขึ้นสมองด้วย^{31,32} นอกจากนี้ยังพบว่าในพลาสมาของผู้ป่วยมาลาเรียขึ้นสมองมีระดับของ endothelial microparticle สูง

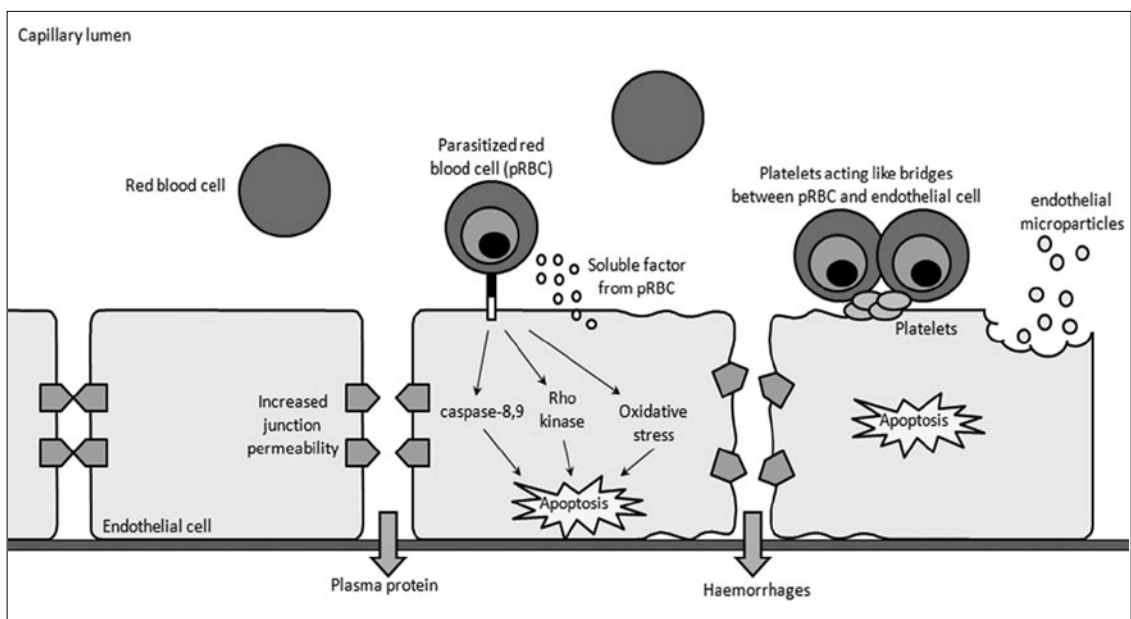
กว่าที่พบในพลาสมาของผู้ป่วยมาลาเรียชนิดที่ไม่มีอาการแทรกซ้อนหรือคนที่สุขภาพแข็งแรงมาก³³

ในการศึกษาของ Pino และคณะ พบว่าการเพาะเลี้ยงเม็ดเลือดแดงติดเชื่อมร่วมกับเซลล์บุหลอดเลือด สามารถทำให้เกิดอะพอพโทซิสของเซลล์บุหลอดเลือดได้ โดยเกิดผ่านทางกรกระตุ้นเอนไซม์ caspase-8 (extrinsic pathway) และ caspase-9 (intrinsic pathway) และยังพบว่ามี การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอะพอพโทซิสในเซลล์บุหลอดเลือดที่ถูกเพาะเลี้ยงร่วมกับเม็ดเลือดแดงติดเชื่อม เช่น Fas, FasL, Bad, Bax, caspase-3 และ Bcl-w อีกด้วย นอกจากนี้ ผลจากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา (morphological modification) การล้อมเซลล์ด้วย Annexin V, การเกิด DNA degradation และ caspase activity ในเซลล์บุหลอดเลือดหลังจากการเข้าเกาะของเม็ดเลือดแดงติดเชื่อม ต่างยืนยันการเกิดอะพอพโทซิสของเซลล์บุหลอดเลือดเมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับเม็ดเลือดแดงติดเชื่อม³⁴ และจากการเก็บตัวอย่างเชื้อมาลาเรียจากผู้ป่วยมาทำการเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์บุหลอดเลือดก็พบความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถของเชื้อมาลาเรียในการชักนำให้เกิดอะพอพโทซิสของเซลล์บุหลอดเลือดกับอาการมาลาเรียขึ้นสมองในผู้ป่วยโดยเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ที่สามารถทำให้เกิดอะพอพโทซิสได้มักจะพบในผู้ป่วยที่มีอาการของมาลาเรียขึ้นสมอง³⁵

อะพอพโทซิสของเซลล์บุหลอดเลือดนอกจากจะถูกชักนำได้จากการเกาะติดของเม็ดเลือดแดงติดเชื่อมกับเซลล์บุหลอดเลือดแล้ว ยังสามารถเกิดได้จากอิทธิพลของ soluble factors จากเชื้อมาลาเรียด้วย โดยพบว่าเมื่อนำอาหารเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย³⁶ หรือซีรัมจากผู้ป่วยมาลาเรีย³⁷ มาเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์บุหลอดเลือด ต่างก็สามารถทำให้เกิดอะพอพโทซิสของเซลล์บุหลอดเลือดได้ นอกจากนี้เกล็ดเลือด (platelet) ซึ่งมักจะพบเกาะติดอยู่ในหลอดเลือดสมองของผู้ป่วยมาลาเรียขึ้นสมองร่วมกับเม็ดเลือดแดงติดเชื่อมก็เป็นอีกองค์ประกอบหนึ่งที่พบว่าส่งเสริมให้เชื้อมาลาเรียสามารถก่อให้เกิดความเสียหายแก่ blood-brain barrier ได้มากขึ้น โดยเกล็ดเลือดนั้นสามารถทำหน้าที่คล้ายกับเป็นสะพานเชื่อมโยงเม็ดเลือดแดงติดเชื่อมเข้ากับเซลล์บุหลอดเลือดได้ ทำให้เม็ดเลือดแดงติดเชื่อมสามารถเกาะติดกับเซลล์บุหลอดเลือดได้มากขึ้น³⁸ เม็ดเลือดแดงติดเชื่อมจึงสามารถชักนำให้เกิดอะพอพโทซิสของเซลล์บุหลอดเลือดได้มากขึ้น³⁹ นอกจากนี้เกล็ดเลือดที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อมาลาเรียก็พบว่าสามารถทำให้เกิดอะพอพโทซิสของเซลล์บุหลอดเลือดได้เช่นเดียวกัน⁴⁰

วิธีการควบคุมอะพอพโทซิสของเซลล์บุหลอดเลือดที่ถูกชักนำโดยเชื้อมาลาเรียนั้น นอกจากจะพบว่าเกิดผ่านวิถีแบบ extrinsic และ intrinsic pathways แล้ว ยังพบว่าเกี่ยวข้องกับวิถีควบคุมอะพอพโทซิสอื่นๆ ด้วย เช่น oxidative stress จากการศึกษาของ Pino และคณะ พบว่าการเติม MnTBAP ซึ่งเป็น superoxide dismutase (SOD1) mimetic สามารถยับยั้งอะพอพโทซิสของเซลล์บุหลอดเลือดที่ถูกชักนำโดยเชื้อมาลาเรียได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอะพอพโทซิสของเซลล์บุหลอดเลือดนี้น่าจะเกิดจากผลของ superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) และ nitric oxide (NO^{\bullet})⁴¹ และการ transfection เซลล์บุหลอดเลือดด้วยเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD1)⁴² หรือการเติม

สารแอนติออกซิแดนซ์ชนิดต่างๆ³⁷ ก็สามารถปกป้องเซลล์บุหลอดเลือดจากการถูกชักนำให้เกิดอะพอพโทซิสโดยเชื้อมาลาเรียได้ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่พบความเกี่ยวข้องของวิถี Rho kinase pathway ในการเกิดอะพอพโทซิสของเซลล์บุหลอดเลือดจากอิทธิพลของเชื้อมาลาเรียอีกด้วย โดยพบว่า Fasudil ซึ่งเป็นยาที่ใช้ในการรักษาโรค cardio- และ neuro-vascular disease และมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของ rho kinase สามารถป้องกันการเกิดอะพอพโทซิสของเซลล์บุหลอดเลือดหลังจากการเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อมาลาเรียทั้งสายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงในห้องทดลองและสายพันธุ์ที่แยกมาจากผู้ป่วยได้^{43, 44}



รูปที่ 1 อะพอพโทซิสของเซลล์บุหลอดเลือดจากการชักนำโดยเชื้อมาลาเรียอาจเป็นสาเหตุของ blood-brain barrier breakdown ในมาลาเรียขึ้นสมอง

การเกาะติดของเชื้อมาลาเรียและ soluble factors จากเชื้อมาลาเรียทำให้ permeability ของเซลล์บุหลอดเลือดเพิ่มขึ้นทำให้เกิดการรั่วไหลของ plasma protein สู่ออก และอาจชักนำให้เกิดอะพอพโทซิสของเซลล์บุหลอดเลือดได้ ซึ่งอาจจะเป็นสาเหตุของการเกิดจุดเลือดออก (haemorrhages) ในผู้ป่วยมาลาเรียขึ้นสมอง การเกาะติดของเชื้อมาลาเรียยังสามารถถูกทำให้เพิ่มขึ้นได้โดยเกล็ดเลือดทำหน้าที่เสมือนสะพานเชื่อมระหว่างเชื้อมาลาเรียกับเซลล์บุหลอดเลือด ทำให้เชื้อมาลาเรียสามารถก่อให้เกิดอะพอพโทซิสของเซลล์บุหลอดเลือดได้มากขึ้น

■ unaru

จากการศึกษาต่างๆ เหล่านี้ แสดงให้เห็นได้ว่าการเกาะติดของเม็ดเลือดแดงติดเชื้อ เกล็ดเลือด และสารน้ำต่างๆ ที่ถูกปล่อยมาจากเชื้อมาลาเรียนั้น อาจจะมีผลทำให้เกิดอะพอพโทซิสของเซลล์บุหลอดเลือดซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของ blood-brain barrier ซึ่งเมื่อเซลล์บุหลอดเลือดถูกทำลายไปก็จะทำให้เกิดความเสียหายแก่ blood-brain barrier และนำไปสู่การเกิดเลือดออกภายในสมองที่มักพบในสมองของผู้ที่เสียชีวิตจากมาลาเรียขึ้นสมอง (รูปที่ 1) แต่อย่างไรก็ตามการที่จะสามารถนำเอากระบวนการอะพอพโทซิสนี้มาใช้ในการอธิบายการเกิดมาลาเรียขึ้นสมอง รวมถึงกลไกโดย

ละเอียดที่เชื้อมาลาเรียสามารถทำให้เกิดอะพอฟโทซิสของ เซลล์บุหลอดเลือดจำเป็นที่จะต้องได้รับการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปอีกมาก ดังที่ได้กล่าวไปในข้างต้นแล้วว่า ผู้ป่วยมาลาเรีย ขึ้นสมองแม้ว่าจะได้รับการรักษาด้วยยาฆ่าเชื้อมาลาเรีย การรักษาแบบประคับประคอง รวมทั้งการรักษาภาวะแทรกซ้อน

ร่วมไปด้วย แต่อัตราการตายของผู้ป่วยก็ยังคงสูง ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับกลไกการเกิดอะพอฟโทซิสที่เหนี่ยวนำโดยเชื้อ มาลาเรี่ยนี้อาจจะเป็นการเพิ่มทางเลือกให้แก่นักวิทยาศาสตร์ ในการพัฒนายาที่สามารถนำมาใช้รักษามาลาเรียขึ้นสมองได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไปในอนาคตก็เป็นได้

เอกสารอ้างอิง

1. White NJ. Plasmodium knowlesi: the fifth human malaria parasite. Clin Infect Dis 2008;46:172-3.
2. Cox-Singh J, Davis TM, Lee KS, et al. Plasmodium knowlesi malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. Clin Infect Dis 2008;46:165-71.
3. Singh B, Kim Sung L, Matusop A, et al. A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings. Lancet 2004;363:1017-24.
4. Luchavez J, Espino F, Curameng P, et al. Human Infections with Plasmodium knowlesi, the Philippines. Emerg Infect Dis 2008;14:811-3.
5. Ng OT, Ooi EE, Lee CC, Lee PJ, et al. Naturally acquired human Plasmodium knowlesi infection, Singapore. Emerg Infect Dis 2008;14:814-6.
6. Jongwutiwes S, Putaporntip C, Iwasaki T, et al. Naturally acquired Plasmodium knowlesi malaria in human, Thailand. Emerg Infect Dis 2004;10:2211-3.
7. Sermwittayawong N, Singh B, Nishibuchi M, et al. Human Plasmodium knowlesi infection in Ranong province, southwestern border of Thailand. Malar J 2012;11:36.
8. WHO. World malaria report 2011. Geneva: World Health Organization; 2011.
9. Medana IM, Turner GD. Human cerebral malaria and the blood-brain barrier. Int J Parasitol 2006;36:555-68.
10. WHO. Guidelines for the treatment of malaria. Geneva: World Health Organization; 2010.
11. Craig A, Scherf A. Molecules on the surface of the Plasmodium falciparum infected erythrocyte and their role in malaria pathogenesis and immune evasion. Mol Biochem Parasitol 2001;115:129-43.
12. Haldar K, Murphy SC, Milner DA, et al. Malaria: mechanisms of erythrocytic infection and pathological correlates of severe disease. Annu Rev Pathol 2007;2:217-49.
13. Grau GE, Taylor TE, Molyneux ME, et al. Tumor necrosis factor and disease severity in children with falciparum malaria. N Eng J Med 1989;320:1586-91.
14. Kwiatkowski D, Hill AV, Sambou I, et al. TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated Plasmodium falciparum malaria. Lancet 1990;336:1201-4.
15. Dobbie MS, Hurst RD, Klein NJ, et al. Upregulation of intercellular adhesion molecule-1 expression on human endothelial cells by tumour necrosis factor-alpha in an in vitro model of the blood-brain barrier. Brain Res 1999;830:330-6.
16. Wong D, Dorovini-Zis K. Upregulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in primary cultures of human brain microvessel endothelial cells by cytokines and lipopolysaccharide. J Neuroimmunol 1992;39:11-21.
17. van der Heyde HC, Nolan J, Combes V, et al. A unified hypothesis for the genesis of cerebral malaria: sequestration, inflammation and hemostasis leading to microcirculatory dysfunction. Trends Parasitol 2006;22:503-8.
18. Brown H, Hien TT, Day N, et al. Evidence of blood-brain barrier dysfunction in human cerebral malaria. Neuropathol Appl Neurobiol 1999;25:331-40.

19. Brown H, Rogerson S, Taylor T, et al. Blood-brain barrier function in cerebral malaria in Malawian children. *Am J Trop Med Hyg* 2001;64:207-13.
20. Thumwood CM, Hunt NH, Clark IA, et al. Breakdown of the blood-brain barrier in murine cerebral malaria. *Parasitology* 1988;96:579-89.
21. Tripathi AK, Sullivan DJ, Stins MF. Plasmodium falciparum-infected erythrocytes decrease the integrity of human blood-brain barrier endothelial cell monolayers. *J Infect Dis* 2007;195:942-50.
22. Treeratanapiboon L, Psathaki K, Wegener J, et al. In vitro study of malaria parasite induced disruption of blood-brain barrier. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;335:810-8.
23. Beare NA, Taylor TE, Harding SP, et al. Malarial retinopathy: a newly established diagnostic sign in severe malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2006;75:790-7.
24. Maude RJ, Dondorp AM, Abu Sayeed A, et al. The eye in cerebral malaria: what can it teach us? *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009;103:661-4.
25. Medana IM, Turner GD. Plasmodium falciparum and the blood-brain barrier—contacts and consequences. *J Infect Dis* 2007;195:921-3.
26. Pino P, Taoufiq Z, Nitchou J, et al. Blood-brain barrier breakdown during cerebral malaria: suicide or murder? *Thromb Haemost* 2005;94:336-40.
27. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007;35:495-516.
28. Jin Z, El-Deiry WS. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther* 2005;4:139-63.
29. Medana IM, Mai NT, Day NP, et al. Cellular stress and injury responses in the brains of adult Vietnamese patients with fatal Plasmodium falciparum malaria. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2001;27:421-33.
30. Lackner P, Burger C, Pfaller K, et al. Apoptosis in experimental cerebral malaria: spatial profile of cleaved caspase-3 and ultrastructural alterations in different disease stages. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2007;3:560-71.
31. Armah HB, Wilson NO, Sarfo BY, et al. Cerebrospinal fluid and serum biomarkers of cerebral malaria mortality in Ghanaian children. *Malar J* 2007;6:147.
32. Jain V, Armah HB, Tongren JE, et al. Plasma IP-10, apoptotic and angiogenic factors associated with fatal cerebral malaria in India. *Malar J* 2008;7:83.
33. Combes V, Taylor TE, Juhan-Vague I, et al. Circulating endothelial microparticles in malawian children with severe falciparum malaria complicated with coma. *JAMA* 2004;291:2542-4.
34. Pino P, Vouldoukis I, Kolb JP, et al. Plasmodium falciparum–infected erythrocyte adhesion induces caspase activation and apoptosis in human endothelial cells. *J Infect Dis* 2003;187:1283-90.
35. Toure FS, Ouwe-Missi-Oukem-Boyer O, Bisvigou U, et al. Apoptosis: a potential triggering mechanism of neurological manifestation in Plasmodium falciparum malaria. *Parasite Immunol* 2008;30:47-51.
36. Wilson NO, Huang MB, Anderson W, et al. Soluble factors from Plasmodium falciparum-infected erythrocytes induce apoptosis in human brain vascular endothelial and neuroglia cells. *Mol Biochem Parasitol* 2008;162:172-6.
37. Hemmer CJ, Lehr HA, Westphal K, et al. Plasmodium falciparum Malaria: reduction of endothelial cell apoptosis in vitro. *Infect Immun* 2005;73:1764-70.
38. Wassmer SC, Lepolard C, Traore B, et al. Platelets reorient Plasmodium falciparum-infected erythrocyte cytoadhesion to activated endothelial cells. *J Infect Dis* 2004;189:180-9.
39. Wassmer SC, Combes V, Candal FJ, et al. Platelets potentiate brain endothelial alterations induced by Plasmodium falciparum. *Infect Immun* 2006;74:645-53.

40. Wassmer SC, de Souza JB, Frere C, et al. TGF-beta1 released from activated platelets can induce TNF-stimulated human brain endothelium apoptosis: a new mechanism for microvascular lesion during cerebral malaria. *J Immunol* 2006;176:1180-4.
41. Pino P, Vouldoukis I, Dugas N, Hassani-Loppion G, et al. Redox-dependent apoptosis in human endothelial cells after adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Ann N Y Acad Sci* 2003;1010:582-6.
42. Taoufiq Z, Pino P, Dugas N, et al. Transient supplementation of superoxide dismutase protects endothelial cells against *Plasmodium falciparum*-induced oxidative stress. *Mol Biochem Parasitol* 2006;150:166-73.
43. Taoufiq Z, Gay F, Balvanyos J, et al. Rho kinase inhibition in severe malaria: thwarting parasite-induced collateral damage to endothelia. *J Infect Dis* 2008;197:1062-73.
44. Zang-Edou ES, Bisvigou U, Taoufiq Z, et al. Inhibition of *Plasmodium falciparum* field isolates-mediated endothelial cell apoptosis by Fasudil: therapeutic implications for severe malaria. *PLoS One* 2010;5:e13221.

