

Thesis Title Expression of Vascular Endothelial Growth Factor During Nurse Cell Formation in *Trichinella spiralis* and *Trichinella pseudospiralis* Infections

Author Mr. Pathamet Khositharattanakool

Degree Doctor of Philosophy (Parasitology)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Pichart Uparanukraw, M.D.

Advisor

Assoc. Prof. Dr. Nimit Morakote

Co-advisor

Assoc. Prof. Dr. Narissara Jariyapan

Co-advisor

Prof. Dr. Nongnuch Vanittanakom

Co-advisor

ABSTRACT

The nematodes in the genus *Trichinella* have a very wide host range infecting several mammals including human, birds and reptiles. The disease caused by *Trichinella* species is distributed in many countries covering nearly every continent. The two most common *Trichinella* species causing human disease are *T. spiralis* and *T. pseudospiralis* belonging to encapsulated and non-encapsulated clades, respectively. Upon its invasion of the skeletal muscle, the larva of *T. spiralis* not only occupies and develops inside the muscle cell but also transforms the normal muscle cell into the nurse cell. One of the remarkable observed changes of the nurse cell is the formation of the vascular network called circulatory rete which is believed to provide nutrients to support the growth of the larva. It has been postulated that

vascular endothelial growth factor (VEGF) is involved in the rete formation leading to the development and maintenance of nurse cell. This study aims to determine the expression of VEGF during nurse cell formation in *T. spiralis* and *T. pseudospiralis* infections employing relative quantification real-time PCR technique and Western blot analysis. Localization of VEGF mRNA transcript in infected nurse cell was also performed using RNA *in situ* hybridization. The results showed that the expression of VEGF in the nurse cell of *T. spiralis* and *T. pseudospiralis* was detected by *in situ* hybridization. Basal expression of VEGF was found in uninfected muscle by real-time PCR technique and Western blot analysis. Nevertheless, both methods were not able to demonstrate the increase of VEGF expression above the basal expression in muscles infected with *T. spiralis* or *T. pseudospiralis*. The unexpected results are probably due to the relatively small number of infected muscle cells which could not produce enough positive signals to show significant increase in VEGF expression. It is likely that VEGF plays a role in the formation of circulatory rete and nurse cell in *T. spiralis* infection. However, there has been no experiment to directly validate this hypothesis. This area of study should be further investigated.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

การแสดงออกของวาสตุลาร์เอ็นโดทีเลียลโกรทแฟกเตอร์
ระหว่างการสร้างเนื้องอกในการติดเชื้อ *Trichinella*
spiralis และ *Trichinella pseudospiralis*

ผู้เขียน

นายปฐมเมศร์ โหมยฐารัตนกุล

ปริญญา

วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ปรดัตวิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ.ดร.นพ. พิชาดิ อุปรานูเคราะห์	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
รศ.ดร. นิมิตร มรกต	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
รศ.ดร. นริศรา จริยะพันธุ์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ศ.ดร. นงนุช วัฒนชัยนาค	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

พยาธิตัวกลม *Trichinella* สามารถพบได้ในโฮสต์ชนิดต่างๆ อย่างกว้างขวาง ได้แก่ สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมรวมถึงมนุษย์ สัตว์ปีก และสัตว์เลื้อยคลาน โรคติดเชื้อพยาธิ *Trichinella* มีการกระจายแพร่หลายในหลายประเทศครอบคลุมเกือบทุกทวีป สปีชีส์ของพยาธิ *Trichinella* ที่ก่อโรคในคนที่พบได้บ่อยคือ *T. spiralis* ซึ่งเป็นชนิดที่มีการสร้างแคปซูลและ *T. pseudospiralis* ซึ่งเป็นชนิดที่ไม่มีการสร้างแคปซูล หลังจากตัวอ่อนของพยาธิ *T. spiralis* ไซเข้าไปในกล้ามเนื้อลายของโฮสต์แล้วนอกจากมันจะเจริญเติบโตอยู่ในเซลล์กล้ามเนื้อแล้ว มันยังทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเซลล์ของกล้ามเนื้อไปเป็นเซลล์ชนิดพิเศษที่เรียกว่าเนื้องอกเนื้องอก ลักษณะเด่นอันหนึ่งของเนื้องอกเนื้องอกคือการสร้างร่างแหของเส้นเลือดที่เรียกว่า circulatory rete ซึ่งเชื่อกันว่าร่างแหของเส้นเลือดนี้ทำหน้าที่นำอาหารมาเพื่อให้ส่งเสริมการเจริญเติบโตของตัวอ่อนของพยาธิ มีการตั้งสมมติฐานว่า VEGF อาจมีส่วนเกี่ยวข้องในการสร้างร่างแหของเส้นเลือดนี้ ซึ่งจะนำไปมีผลต่อการเจริญเติบโตและคงอยู่ของเนื้องอกเนื้องอก งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะวัดการแสดงออกของ VEGF ระหว่างการสร้างเนื้องอกเนื้องอกในการติดเชื้อ *T. spiralis* และ *T. pseudospiralis* โดยวิธี real-time PCR และ Western blot นอกจากนี้ยังต้องการที่จะบอกตำแหน่งการแสดงออกของ VEGF mRNA โดยวิธี RNA *in situ* hybridization ผลการศึกษาพบว่าวิธี *in situ* hybridization สามารถระบุได้ว่ามีการแสดงออกของ VEGF ในเนื้องอกเนื้องอกของพยาธิทั้งสองชนิด วิธีการ real-time PCR และ

Western blot แสดงให้เห็นว่ามีการแสดงออกของ VEGF ในระดับหนึ่งอยู่แล้ว (basal expression) ในกล้ามเนื้อที่ไม่ติดเชื้อ แต่วิธีการทั้งสองตรวจไม่พบว่า VEGF มีการแสดงออกในกล้ามเนื้อที่มีการติดเชื้อ *T. spiralis* หรือ *T. pseudospiralis* เพิ่มขึ้นไปจากระดับที่ตรวจพบในกล้ามเนื้อที่ไม่มีการติดเชื้อ เหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะเซลล์กล้ามเนื้อที่มีการติดเชื้อมีจำนวนค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับจำนวนเซลล์กล้ามเนื้อทั้งหมด จึงทำให้การแสดงของ VEGF ในกล้ามเนื้อโดยรวมไม่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ถึงแม้ว่า VEGF น่าจะมีบทบาทในการสร้าง circulatory rete และเนิร์สเซลล์ของพยาธิ *T. spiralis* แต่ก็ยังไม่มีการทดลองที่พิสูจน์สมมติฐานนี้โดยตรง ดังนั้นจึงควรที่จะมีการศึกษาหน้าที่ของ VEGF ต่อการสร้างเนิร์สเซลล์เพิ่มเติมต่อไป