บทที่ 6

วิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้ได้ทดสอบความสามารถในการอยู่รอดของมาเลเรียที่เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว โดยการหาค่าลาเทนท์พีเรียด และศึกษาระดับปาราสิตในเลือดหนูไมซ์ พบว่าลาเทนท์พีเรียดของหนูที่ได้รับเชื้อที่ผ่านการเก็บโดยใช้กลีเซอรอลสั้นกว่าและเปลี่ยนแปลงน้อยกว่าใช้ไดเม็ททิลซัลฟอกไซด์ ดังจะเห็นข้อแตกต่างได้อย่างชัดเจนระหว่างวิธีที่ 2 และ 3 ซึ่งเตรียมเชื้อมาเลเรียและเก็บโดยวิธีเดียวกัน ทั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการใช้กลีกลีเซอรอลเป็นไครโอโปรเท็คแตนท์ ทำให้เชื้อมาเลเรียอยู่รอดได้ดีกว่าการใช้ไดเม็ททิล-ซัลฟอกไซด์ ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับผลงานของ Collins & Jeffery (1961)และ Gallaher (1974) ที่พบว่าการใช้กลีเซอรอลทำให้มาเลเรียชนิดนี้อยู่รอดได้ดีกว่าได-เม็ททิลซัลฟอกไซด์ นอกจากนี้ Ogunba (1962) ได้ทดลองเปรียบเทียบการเก็บเซลล์ของเอ็มบริโอของไก่ในกลีเซอรอล และไดเม็ททิลซัลฟอกไซด์ พบว่ากลีเซอรอลให้ผลดีกว่า ถึงกระนั้นก็ตาม จากการทดลองใช้ไดเม็ททิลซัลฟอกไซด์ที่เข้มข้นต่างกันตามวิธีที่ 1 และ 2 คือ 12 และ 10 % ตามลำดับนั้น ไดเม็ททิลซัลฟอกไซด์ที่เข้มข้น 12 % ทำให้มีลาลาเทนท์พีเรียดยาวนานและเปลี่ยนแปลงมากกว่า 10 % ซึ่งผลที่ได้นี้สอดคล้องกับ Collins & Jeffery (1963) ที่ได้เคยรายงานว่า ไดเม็ททิลซัลฟอกไซด์ 5 % ทำให้ P. berghei อยู่รอดได้ดีกว่าที่เข้มข้น 10 % ในทำนองเดียวกับ Gallaher (1974) ที่ได้ทำการทดลองกับ P. berghei โดยใช้ไดเม็ททิลซัลฟอกไซด์เข้มข้น 2.5 5 10 และ 15 % แล้วพบว่าไดเม็ททิลซัลฟอกไซด์ 5 % ให้ผลดีที่สุด แต่ Pavanand et al (1974) ได้ทำการเก็บ P. falciparum โดยใช้ไดเม็ททิลซัลฟอกไซด์ 12 % และพบว่าเมื่อนำเชื้อมาเลเรียออกมาทดสอบความสามารถในการอยู่รอดโดยการเพาะเลี้ยงในห้องทดลองเจริญได้ดีเท่ากับเชื้อมาเลเรียกลุ่มควบคุม ซึ่งผลที่ได้นี้แตกต่างกับการทดลองที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเชื้อมาเลเรียที่ใช้ต่างชนิดกัน และวิธีการทดสอบความ

สามารถในการอยู่รอดก็ต่างกัน ในกรณีของการใช้กลีเซอรอลที่เข้มข้นต่างกันในวิธีที่ 3 และ 4 นั้น ลาเทนท์พีเรียดของหนูที่ได้รับเชื้อที่ผ่านการเก็บโดยวิธีที่ 3 สั้นและเปลี่ยนแปลงน้อยกว่าวิธีที่ 4 อย่างเห็นได้ชัด แสดงว่ากลีเซอรอลที่เข้มข้นมากกว่าทำให้เซลล์อยู่รอดได้ดีกว่า ผลของวิธีที่ 3 สอดคล้องกับ Gallaher (1974) ที่พบว่า กลีเซอรอล 20 % ให้ผลดีกว่าการใช้ 5 และ 10 % แต่ผลการทดลองของวิธีที่ 4 นั้นไม่เหมือนกับของ Gallaher ที่พบว่ากลีเซอรอล 15 % ให้ผลใกล้เคียงกับกลีเซอรอล 20 % ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสารร่วมของไครโอโปรเท็คแตนท์และวิธีการเตรียมเชื้อมาเลเรียก่อนทำการเก็บแตกต่างกัน โดย Gallaher เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ลงไปในเลือดที่มีมาเลเรีย โดยไม่มีการปั่นล้าง แต่วิธีที่ 4 เติม 4.2 % ซอร์บิทอลในนอร์มอลซาไลน์ลงไปในเม็ดเลือดที่มีมาเลเรียที่ผ่านการปั่น 1000 รอบ/วินาทีเป็นเวลา 10 นาที และจากรายงานของ Molinari(1961) พบว่า กลีเซอรอลที่เข้มข้นน้อยคือ 5 % สามารถทำให้ P.berghei ที่เก็บไว้ที่ -70 °c อยู่รอดได้ดี ทั้งนี้อาจเป็นเพราะอุณหภูมิที่เก็บและสารร่วมของไครโอโปรเท็คแตนท์ต่างจากการทดลองทั้งสองที่กล่าวแล้วข้างต้น สำหรับสารร่วมของไครโอโปรเท็คแตนท์ในวิธีที่ 1 2 3 และ 4 แตกต่างกัน คือวิธีที่ 1 ใช้น้ำยาไทโรด วิธีที่ 2 และ 3 ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ วิธีที่ 4 ใช้ 4.2 % ซอร์บิทอลในนอร์มอลซาไลน์ การใช้สารร่วมของไครโอโปรเท็คแตนท์ที่ต่างกันนี้ อาจเป็นผลให้ลาเทนท์พีเรียดของทั้ง 4 วิธีแตกต่างกัน ในวิธีที่ 2 และ 3 ซึ่งใช้สารร่วมชนิดเดียวกันจึงทำให้ค่าลาเทนท์พีเรียดใกล้เคียงกันมากที่สุด ดังเช่นจากรายงานของ Jeffery (1962) พบว่าการใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์เป็นสารร่วมกับกลีเซอรอลในการเก็บ P. berghei และ P. gallinaceum ทำให้มาเลเรียทั้งสองชนิดอยู่รอดได้ดีกว่าการใช้นอร์มอลซาไลน์ นอกจากนี้การปั่นล้างเลือดในวิธีที่ 1 และวิธีที่ 4 อาจมีผลกระทบกระเทือนต่อความสามารถในการอยู่รอดของมาเลเรีย จะเห็นว่าวิธีที่ 1 ซึ่งมีการปั่นล้างเลือด 3 ครั้ง มีค่าลาเทนท์พีเรียดมากและเปลี่ยนแปลงมากที่สุด วิธีที่ 4 ที่มีการปั่นล้างเพียง 1 ครั้งนั้น ค่าลาเทนท์พีเรียดสั้นและเปลี่ยนแปลงน้อยกว่าวิธีที่ 1 ส่วนวิธีที่ 2 และ 3 ไม่มีการปั่นล้าง จึงพบว่าค่าลาเทนท์พีเรียดสั้นและเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด ถ้าพิจารณาจากระดับปาราสิตในเลือดหนูที่ได้รับเชื้อที่

ผ่านการเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว พบว่าอัตราการเปลี่ยนแปลงของระดับปาราสิตในเลือดหนูที่ได้รับเชื้อที่ผ่านการเก็บทั้ง 4 วิธี สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของลาเทนท์พีเรียด ยกเว้นในกลุ่มควบคุม คือถ้าลาเทนท์พีเรียดมีค่ามาก อัตราการเพิ่มของระดับปาราสิตเป็นไปอย่างช้า ๆ วิธีที่ 1 เป็นวิธีที่มีอัตราการเพิ่มของปาราสิตช้าที่สุด รองลงมาคือวิธีที่ 4 ส่วนวิธีที่ 2 และ 3 นั้น เมื่อเวลาที่เก็บผ่านไปจะมีอัตราการเพิ่มของระดับปาราสิตไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก และวิธีที่ 3 เป็นวิธีที่เปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด อัตราการเพิ่มและระดับของปาราสิตที่ขึ้นได้สูงที่สุดในกลุ่มควบคุมของทั้ง 4 วิธีใกล้เคียงกัน แสดงว่าความแตกต่างกันของจำนวนเซลล์ของมาเลเรียในสารละลายที่เริ่มเก็บไม่มีผลต่อความแตกต่างกันของอัตราการเพิ่มของระดับปาราสิต ถ้าพิจารณาจากอัตราการเพิ่มของระดับปาราสิตของกลุ่มควบคุมนี้จะเห็นว่าไม่สอดคล้องกับค่าลาเทนท์พีเรียด คือค่าลาเทนท์พีเรียดของวิธีที่ 1 : 2 1 : 4 2 : 3 2 : 4 และ 3 : 4 ต่างกัน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะค่าลาเทนท์พีเรียดนั้นได้จากการนับจำนวนปาราสิตทุก 2 ชั่วโมง ซึ่งเป็นค่าที่ละเอียดกว่าการศึกษาระดับปาราสิตที่ได้จากการนับจำนวนปาราสิตทุกวัน หรืออาจเนื่องจากการหาค่าของความแตกต่างของลาเทนท์พีเรียดโดยการใช้ F test นั้นไม่ใช่วิธีที่ดีที่สุดสำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการทดลองนี้ เพราะการนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีมาเลเรียนั้น ไม่ว่าใน 1 เซลล์จะมีมาเลเรียอยู่มากน้อยเท่าใดก็นับเป็น 1 เท่ากัน และเซลล์เม็ดเลือดแดง 1 เซลล์สามารถมีมาเลเรียได้ตั้งแต่ 1-24 เซลล์ (Garnham, 1966) อย่างไรก็ดี ก็ยังไม่สามารถหาวิธีวิเคราะห์ข้อมูลที่ดีกว่านี้ได้

สำหรับผลของเวลาที่เก็บไว้ต่อความสามารถในการอยู่รอดของมาเลเรียนั้น พบว่าเมื่อเวลาที่เก็บผ่านไปลาเทนท์พีเรียดของทุกวิธีจะมีค่ามากขึ้น แสดงว่าเวลาที่เก็บไว้มีผลกระทบต่อความสามารถในการอยู่รอดของมาเลเรีย ผลที่ได้นี้ต่างจาก Gallaher (1974) ที่พบว่าเชื้อ P. berghei ที่เก็บไว้ไม่ทำให้หนูมีลาเทนท์พีเรียดเปลี่ยนแปลงตลอดเวลาที่เก็บ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในการทดลองนี้ไม่ได้ล้างไครโอโปรเท็คแทนท์ออกก่อนนำมาฉีดเข้าหนูทดลอง ไครโอโปรเท็คแทนท์ที่ละลายอยู่ในเซลล์ของมาเลเรียอาจมีส่วนทำให้

ความสามารถในการทำให้หนูเป็นโรคลดลง นอกจากนี้การหาค่าลาเทนท์พีเรียดของ Gallaher ได้จากมาเลเรียที่เก็บเอาไว้ในไนโตรเจนเหลวเป็นช่วงเวลานานกว่า เช่น 75 วัน (10 สัปดาห์) 88 วัน (12 สัปดาห์) 107 วัน (15 สัปดาห์) ฯลฯ และไม่เป็นช่วงเวลาที่แน่นอน จึงทำให้ไม่พบว่ามีการเปลี่ยนแปลง แต่ในการศึกษาครั้งนี้ได้หาค่าลาเทนท์พีเรียดทุกๆ 2 สัปดาห์ และพบว่าภายใน 12 สัปดาห์แรกลาเทนท์พีเรียดเปลี่ยนแปลงไปตามเวลาที่เก็บไว้ หลังจากนั้นพบว่าลาเทนท์พีเรียดของทุกวิธีไม่เปลี่ยนแปลง จากผลการทดลองนี้จึงอาจกล่าวได้ว่า ถ้าเก็บ P. berghei ไว้นานมากกว่า 24 สัปดาห์ มาเลเรียอาจยังคงมีความสามารถในการอยู่รอดเท่าเดิม

ผลของการทดสอบสมรรถภาพของเอ็นไซม์แลคเตทดีไฮโดรจีเนสภายหลังจากที่ได้เก็บเชื้อมาเลเรียไว้ในไนโตรเจนเหลวด้วยวิธีต่าง ๆ กันทั้ง 4 วิธี ในระยะเวลา 24 สัปดาห์ โดยวิธีสตาร์ชเจลอีเล็คโตรฟอรีซิส พบว่าตลอดเวลา 24 สัปดาห์ ที่ทำการทดลองสมรรถภาพของเอ็นไซม์ซึ่งดูได้จากความเข้มของสีฟอร์มาซานที่เกิดจากการย้อมดูแถบของไอโซไซม์ ระยะทางที่ไอโซไซม์เคลื่อนที่ไปในเจล ตลอดจนจำนวนแถบของไอโซไซม์ยังคงเหมือนเดิม แสดงว่าวิธีการเก็บและเวลาที่เก็บไว้ 6 เดือนไม่มีผลทำให้สมรรถภาพของเอ็นไซม์แลคเตทดีไฮโดรจีเนสเปลี่ยนแปลง นอกจากนี้ลักษณะและจำนวนแถบของไอโซไซม์ยังเหมือนกับรายงานของ Carter & Walliker(1977) อีกด้วย ทำให้ทราบว่า P.berghei ที่ Carter & Walliker ใช้ในการทดลองมีสายพันธุ์ใกล้เคียงกับการทดลองนี้ เพราะการดูแบบแผนของเอ็นไซม์เป็นวิธีจำแนกโปรโตซัวได้ถึงระดับไทพ์ (type) และสเตรน (strain) (Brodie and Ryckman, 1967; Warren and Breland 1969; Takayanaki, et al, 1971) การทดสอบสมรรถภาพของเอ็นไซม์ของเชื้อมาเลเรียที่เก็บเอาไว้ในที่เย็นจัดเป็นช่วงระยะเวลาต่าง ๆ ยังไม่มีผู้ใดทำการทดลองมาก่อน จึงไม่สามารถบอกได้ว่า ถ้าทดสอบสมรรถภาพของเอ็นไซม์แลคเตทดีไฮโดรจีเนสของเชื้อ P. berghei ที่เก็บไว้ด้วยวิธีอื่น ๆ จะได้ผลแตกต่างออกไปหรือไม่