หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

สอบสวนเอกสาร

การเก็บรักษาเนื้อเยื่อและเซลล์ด้วยความเย็นเป็นวิธีที่ใช้กันมานานแล้ว ในปี 1939 Coggeshall ทดลองใช้ความเย็นเก็บรักษาเชื้อมาเลเรียได้เป็นครั้งแรก โดยสามารถเก็บเชื้อมาเลเรียไว้ที่อุณหภูมิ -79° C นานถึง 70-80 วัน ต่อมาได้มีผู้ทดลองเก็บปาราสิตที่เป็นโปรโตซัวอื่น ๆ รวมทั้งมาเลเรียต่าง ๆ ไว้ในที่อุณหภูมิต่ำ ๆ กันมากขึ้น และสามารถเก็บไว้ได้นานวันยิ่งขึ้น Jeffery & Rendtorff(1955) ได้ทดลองเก็บระยะสปอโรซอยต์ของเชื้อมาเลเรียที่พบในคนไว้ที่ -79° C พบว่าสามารถเก็บสปอโรซอยต์ของ Plasmodium vivax ได้นาน 375 วัน P. falciparum นาน 183 วัน P. ovale ได้นาน 70 วัน และเมื่อนำเชื้อเหล่านี้ฉีดกลับเข้าในคนก็ยังสามารถทำให้เกิดโรคได้ Bafort (1968) สามารถเก็บสปอโรซอยต์ของPlasmodium berghei ไว้ที่ -196°C นาน 207 วัน และ Weathersby & McCall (1967) ได้ทดลองเก็บระยะสปอโรซอยต์ของมาเลเรียในนก (Plasmodium gallinaceum) ที่ -196°C ได้นานถึง 2 ปี ถึงกระนั้นก็ตามการเก็บเชื้อมาเลเรียไว้ในที่เย็นจัดก็ยังคงประสบปัญหายุ่งยากโดยเฉพาะอย่างยิ่ง คือปัญหาเกี่ยวกับการแตกตัวของเม็ดเลือดแดง ซึ่งเป็นเหตุให้อัตราการรอดชีวิตของเชื้อมาเลเรียต่ำมาก ในปี 1949 Polge et al พบว่าถ้าเติมน้ำยากลีเซอรอล 20 % ในเซลล์สเปอร์มของเป็ดไก่ก่อนเก็บไว้ที่ -79°C จะทำให้สเปอร์มมีชีวิตรอดเพิ่มขึ้น ต่อมา Smith (1950)พบโดยบังเอิญอีกว่า เซลล์เม็ดเลือดแดงจะไม่แตกตัวถ้าปนกับกลีเซอรอลก่อนเก็บไว้ในที่เย็น จึงอาจถือได้ว่าการค้นพบทั้งสองนี้เป็นจุดเริ่มต้นที่นำไปสู่การใช้สารเพื่อป้องกันเซลล์ เนื้อเยื่อ จากอันตรายที่จะเกิดขึ้นจากความเย็น หรือสารไครโอโปรเท็กแทนท์นั่นเอง ตั้งแต่นั้นมากลีเซอรอลก็ถูกนำมาใช้เป็นไครโอโปรเท็กแทนท์สำหรับการเก็บเซลล์และเนื้อเยื่อต่างๆ ในที่อุณหภูมิต่ำกันอย่างกว้างขวาง เช่นในการเก็บToxoplasma gondii(

Coleman and Cavanaugh, 1956) Plasmodium gallinaceum (Molinari, 1961; Jeffery, 1962) เชื้อ Plasmodium ในสัตว์ปีกแห้ง (Molinari and Tabibzadeh, 1961; Gallaher, 1974) เก็บสเปอร์มของสัตว์ (Lovelock and Bishop, 1959; Entwistle and Martin, 1972) และการเก็บเซลล์เม็ดเลือดของคน เป็นต้น (Tullis et al, 1958; Valeri, 1965; Rowe, Eyster and Kellner, 1968; Runck and Valeri, 1969; Meryman and Hornblower, 1972)

สำหรับความเข้มข้นของไครโอโปรเท็คแตนท์ที่ใช้ในการเก็บเนื้อเยื่อและเซลล์แต่ละชนิดนั้นมีผู้ศึกษากันอย่างกว้างขวาง เช่น Molinari (1961) พบว่าถ้าเก็บเชื้อมาเลเรียในเลือดไก่ไว้ที่อุณหภูมิ -70°C โดยใช้กลีเซอรอลขนาดเข้มข้น 2.5-15 % จะได้ผลดี แต่ถ้าใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอลเกิน 15 % ขึ้นไป กลับทำให้เม็ดเลือดแดงแตก และเชื้อตาย นอกจากนี้กลีเซอรอลความเข้มข้นต่ำ ๆ ก็ยังให้ผลดีในการเก็บ Taxoplasma gondii ที่อุณหภูมิ -15°C -20°C และ -70°C (Eyles, Coleman and Cavanaugh, 1956) Molinari & Tabibzadeh (1961) พบว่าถ้าใช้กลีเซอรอล 10 % ในการเก็บเชื้อ Plasmodium berghei ที่อุณหภูมิ -196°C จะให้ผลดีคือเชื้อที่ผ่านการเก็บในที่เย็นจัดยังสามารถทำให้เกิดโรคในสัตว์ทดลองได้เท่ากับเชื้อที่ไม่เคยถูกเก็บในที่เย็นมาก่อน ทั้งรูปร่างของเชื้อมาเลเรียก็ไม่เปลี่ยนแปลง ต่อมามีผู้นิยมใช้กลีเซอรอลซึ่งมีความเข้มข้นสูง ดังเช่น ในการเก็บเม็ดเลือดแดงไว้ที่อุณหภูมิ -196°C หรือที่ไอของไนโตรเจนเหลว (-170°C) ซึ่ง Rowe, Eyster & Kellner (1968) ใช้กลีเซอรอลสูงถึง 14 % และพบว่าเมื่อทำให้เลือดเหลวตัวอย่างเร็วที่อุณหภูมิ 42-45° แล้ว มีจำนวนเม็ดเลือดที่ไม่แตกตัวถึง 92 % ส่วน Tullis et al (1958) ได้ใช้กลีเซอรอลที่มีความเข้มข้น 25 % เป็นไครโอโปรเท็คแตนท์ในการเก็บเม็ดเลือดแดงไว้ที่ -80°C และ -120°C นอกจากนี้ก็ยังมีรายงานของ Valeri & Runck (1969) และ Meryman & Hornblower (1972) กล่าวถึงการเก็บเซลเม็ดเลือดแดง โดย

การใช้กลีเซอรอลความเข้มข้นสูงและเติมลงไปทีละน้อยเพื่อให้กลีเซอรอลซึมเข้าสู่เซลล์ได้มากขึ้น ซึ่งสามารถช่วยป้องกันการแตกของเม็ดเลือดได้ถึง 98 %

การใช้กลีเซอรอลความเข้มข้นสูงถึง 20 % เป็นไครโอโปรเท็คแตนท์ในการเก็บเชื้อมาเลเรียได้เริ่มในปี 1974 โดย Gallaher ได้ทดลองกับ Plasmodium berghei ไว้ในไนโตรเจนเหลว ต่อมา Phillip & Wilson (1978) ใช้กลีเซอรอล 19 % สำหรับเก็บ P. falciparum ไว้ที่อุณหภูมิ -196° C ครั้นเมื่อนำเชื้อออกมาทำให้เหลวตัวที่ 37° C ล้างกลีเซอรอลออกแล้วทำการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง พบว่าเชื้อมาเลเรียสามารถเจริญเพิ่มจำนวนและเข้าไปอยู่ในเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ใหม่ถึง 35-50 % จึงเห็นได้ว่ากลีเซอรอลทั้งความเข้มข้นต่ำและสูงล้วนเป็นไครโอโปรเท็คแตนท์ที่ให้ผลดี ที่เป็นเช่นนี้ขึ้นอยู่กับเหตุผลหลายประการ เช่น ความแตกต่างกันของชนิดของเซลล์ อุณหภูมิที่ใช้เก็บ และส่วนประกอบอื่นที่เติมลงไปในน้ำยากลีเซอรอล ตลอดจนถึงการล้างกลีเซอรอลออก

ถึงแม้กลีเซอรอลจะเป็นไครโอโปรเท็คแตนท์ที่นิยมกันมากก็ตาม แต่ข้อเสียของกลีเซอรอล เช่น การซึมเข้าเซลล์ช้า ต้องล้างออกจากเซลล์เหล่านี้ทำให้มีการแสวงหาไครโอโปรเท็คแตนท์ตัวใหม่ ในปี 1959 Lovelock & Bishop ได้ทดลองใช้ DMSO ในการเก็บเม็ดเลือดแดงของคนและวัว และสเปอร์มของวัวไว้ที่อุณหภูมิ -79° C พบว่า DMSO สามารถซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ได้เร็วกว่ากลีเซอรอลหลายเท่า ถึงแม้จะเป็นไครโอโปรเท็คแตนท์ที่ไม่ดีเท่ากับกลีเซอรอล อย่างไรก็ตามได้มีผู้หันมาใช้ DMSO มากขึ้น ดังเช่น การเก็บไฟโบรบลาสต์ของตัวอ่อนของไก่ไว้ที่ -79° C โดยใช้ DMSO 10 % (Dougherty, 1962) เก็บ Brugia pahangi ซึ่งเป็นไมโครฟิลาเรีย (microfilaria)ของแมวไว้ที่ -196° C ด้วย DMSO 5 %(Ogunba, 1969) เป็นต้น ส่วนการใช้ DMSO เป็นไครโอโปรเท็คแตนท์สำหรับเก็บเชื้อมาเลเรีย เริ่มโดย Booden & Gieman ในปี 1973 ซึ่งเก็บ Plasmodium falciparum กับ P. knowlesi ไว้ที่ -196° C ด้วย DMSO 5 % แล้วพบว่าเมื่อนำเชื้อนั้นฉีดกลับเข้าโฮสต์จะทำให้พรีพาเทนท์พีเรียดนานขึ้นกว่าเดิมสองเท่า

อย่างไรก็ดี Pavanand et al (1974) ได้ใช้ DMSO ขนาดความเข้มข้น 8 12 และ 15 % ในการเก็บ Plasmodium falciparum ไว้ที่ -196° C เป็นเวลานานถึง 2 ปี แล้วนำออกมาเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง พบว่าเชื้อที่เก็บด้วย DMSO 12 % จะมีอัตราการอยู่รอดมากที่สุด และในปีเดียวกันนั้น Gallaher ได้ทดลองใช้ DMSO 5 % ในการเก็บ P. berghei ไว้ในไนโตรเจนเหลว ซึ่งปรากฏว่าเชื้อมาเลเรียสามารถรอดชีวิตและทำให้สัตว์ทดลองเป็นโรคได้ดีที่สุด

สำหรับเชื้อมาเลเรียที่ใช้ในการทดลองนี้ ได้แก่ Plasmodium berghei berghei ซึ่งเป็นเชื้อมาเลเรียของสัตว์ฟันแทะ มีถิ่นเดิมอยู่ในประเทศคาตังกา(Katanga) ทวีปอัฟริกา Vincke & Lips (1948) เป็นผู้พบเชื้อมาเลเรียชนิดนี้เป็นครั้งแรก โดยพบในหนูคองโกทรีแรท (Congo tree rat) ซึ่งมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า Thamnomys surdaster โดยพบว่าเชื้อมาเลเรียเข้าไปอยู่ในเซลล์เม็ดเลือดแดง เชื้อมาเลเรียชนิดนี้มีวงชีวิตแบบเดียวกับเชื้อมาเลเรียชนิดอื่น ๆ คือมีการเจริญแบบมีเพศในยุงที่เป็นพาหะ และมีการเจริญแบบไม่มีเพศในสัตว์ฟันแทะ Yoeli et al (1965) ได้ประสบความสำเร็จในการเปลี่ยนโฮสต์ตามธรรมชาติมาให้เป็นสัตว์ทดลอง คือ แฮมสเตอร์ และเปลี่ยนยุงที่เป็นพาหะตามธรรมชาติ คือ Anopheles dureni มาเป็น A. stephensi นอกจากนี้ยังพบว่า หนูไมซ์ก็ยังทำหน้าที่เป็นโฮสต์ได้ดี ตั้งแต่นั้นมาก็มีผู้นิยมใช้เชื้อมาเลเรียชนิดนี้ในการทดลองที่เกี่ยวกับโรคมาเลเรีย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย