หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

การเก็บรักษาอวัยวะ เนื้อเยื่อ และเซลล์ของสิ่งที่มีชีวิตไว้ในที่ที่มีความเย็นหรือที่อุณหภูมิต่ำ ๆ เพื่อชลอการเสียหรือเน่าเปื่อยนั้น เป็นที่รู้จักกันมานาน แต่การเก็บรักษาเซลในความเย็นจัด (cryopreservation) เพื่อให้เซลล์ยังคงมีชีวิตอยู่ โดยหยุดการเจริญชั่วระยะเวลาหนึ่งนั้น เพิ่งถูกค้นพบไม่นานนัก โดย Coggeshall (1939) ซึ่งได้ทดลองเก็บเชื้อมาเลเรียจากไพรเมทไว้ในการ์บอนไดออกไซด์แข็งหรือน้ำแข็งแห้งที่อุณหภูมิ -79° C อยู่ชั่วระยะเวลาหนึ่ง และเมื่อนำเชื้อมาฉีดกลับเข้าโฮสต์ ก็พบว่าโฮสต์เกิดอาการติดเชื้อมาเลเรีย นับแต่นั้นมาได้มีผู้นิยมใช้ความเย็นเพื่อการเก็บเซลล์ เนื้อเยื่อและอื่น ๆ มากมาย Tullis et al (1958) ได้พยายามเก็บเซลล์เม็ดเลือดในที่อุณหภูมิต่ำ เพื่อไว้ใช้ในการถ่ายเลือดยามฉุกเฉิน (Valeri, 1965) Lovelock & Bishop (1959) ได้ใช้ความเย็นจัดในการเก็บรักษาสเปอร์ม เพื่อไว้ใช้ในการผสมเทียมทั้งในคน และเพื่อประโยชน์ด้านการปศุสัตว์ (First, 1971; Entwistle and Martin, 1972) นอกจากนี้ยังมีผู้พยายามศึกษาและพัฒนาวิธีการเพื่อจะเก็บรักษาปาราสิตต่าง ๆ รวมทั้งมาเลเรียด้วยความเย็นให้ได้ผลดียิ่งขึ้น ซึ่งบางชนิดก็ประสบผลสำเร็จแล้ว เช่น การเก็บรักษาทริปพาโนโซม ด้วยความเย็นจัด เป็นต้น (Walker and Ashwood-Smith, 1961; Cunningham, Lumsden and Webber, 1963; Herbert, Lumsden and French, 1968) แต่หลายชนิดก็ยังอยู่ระหว่างการพัฒนา รวมทั้งเชื้อไข้มาเลเรีย

การเก็บรักษาเชื้อมาเลเรียไว้เพื่อใช้ในการศึกษาและวิจัยนั้น นิยมใช้กันอยู่ 2 วิธี คือ

1. การเก็บรักษาเชื้อมาเลเรียไว้ในสัตว์ทดลองที่เป็นโฮสต์ โดยการผ่านทอดเป็นทอด ๆ (serial passage) วิธีนี้ทำโดยนำเลือดจากโฮสต์ที่ติดเชื้อมาเลเรียไปฉีดเข้าโฮสต์ตัวใหม่เป็นระยะ ๆ ไปเรื่อย ๆ ซึ่งเป็นวิธีที่เหมาะสำหรับการเก็บในช่วงระยะเวลาสั้น หรือในกรณีที่ได้เชื้อมาเลเรียมาน้อย และที่สำคัญที่สุดคือ จะต้องมีจำนวนโฮสต์อย่างเพียงพอ ส่วนข้อเสียของการเก็บเชื้อมาเลเรียโดยวิธีนี้มีหลายประการ ได้แก่ มีการเปลี่ยนแปลงของเชื้อมาเลเรีย เช่น พบว่า มีความรุนแรง (virulence) เพิ่มขึ้น เชื้อมาเลเรียไม่สามารถสร้างกามีโตไซต์ หรืออาจเกิดการผ่าเหล่าขึ้นได้ และที่สำคัญอีกประการหนึ่งก็คือ ไม่อาจทำการเก็บเชื้อมาเลเรียที่พบในคนโดยวิธีนี้อย่างแน่นอน สิ่งเหล่านี้จึงเป็นปัญหาสำคัญต่อการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับเชื้อมาเลเรียยิ่งนัก

2. การเก็บเชื้อมาเลเรียโดยใช้ความเย็นจัด เป็นวิธีที่นิยมใช้กันในปัจจุบัน ซึ่งแม้ว่าการค้นพบวิธีการเก็บเชื้อมาเลเรียโดยใช้ความเย็นจะถูกค้นพบโดย Coggeshall 1939 ก็ตาม แต่การนำเทคนิคนี้มาใช้ก็ยังประสบกับปัญหายุ่งยากหลายประการ ที่สำคัญประการหนึ่งก็คือ การแตกตัวอย่างมากมายของเม็ดเลือดแดง และเป็นผลให้ปาราสิตไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปเมื่อฉีดกลับเข้าสู่โฮสต์ นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงสภาวะอุณหภูมิอย่างเฉียบพลันที่เกิดขึ้นในขณะนำเชื้อออกจากความเย็นจัด และทำให้เกิดการเหลวตัว (thaw) ก็มีผลโดยตรงต่อปาราสิต ทำให้เชื้อที่ยังคงชีวิตอยู่มีจำนวนน้อย อย่างไรก็ตาม จากการค้นพบโดยบังเอิญของ Polge etal (1949) ซึ่งพบว่าการเติมกลีเซอรอลลงในเชื้อสเปอร์มก่อนเก็บด้วยความเย็นจัด สามารถช่วยเพิ่มจำนวนเชื้อที่ยังคงชีวิตอยู่รอดได้มากขึ้น จึงมีการศึกษาและค้นหาสารที่ใช้ป้องกันอันตรายจากความเย็นจัดที่จะเกิดขึ้นกับเซลล์ ซึ่งเรียกสารที่ช่วยป้องกันอันตรายนี้ว่า ไครโอโปรเท็กแตนท์ (cryoprotectant)

จากการศึกษาถึงสภาพการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่เกิดขึ้นในขณะลดอุณหภูมิ พบว่าถ้าการลดอุณหภูมิเกิดขึ้นอย่างช้า ๆ และผนังเซลล์มีเพอมีอะบิลิตี้ต่อน้ำสูง เซลล์จะปรับสภาพภายในโดยการปล่อยน้ำออกจากเซลล์ (dehydration) ทำให้มีผลึกน้ำแข็งเกิดรอบเซลล์ แต่ถ้าการลดอุณหภูมิเป็นไปอย่างฉับพลัน ประกอบกับเซลล์มีเพอมีอะบิลิตี้ต่อน้ำต่ำ การปรับสภาพภายในจะเกิดขึ้นได้โดยการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ (Mazur,

1970) การเกิดผลึกน้ำแข็งทั้งรอบเซลล์และภายในเซลล์จะเป็นผลให้ความเข้มข้นของอี-เล็กโตรไลท์ ภายในเซลล์เพิ่มขึ้น และการเปลี่ยนแปลงอันนี้เองที่มีผลโดยตรงต่ออัตรา การกงชีวิตอยู่ของเซลล์ เนื่องจากว่าเมื่อความเข้มข้นของอีเล็คโตรไลท์เพิ่มขึ้นจะกระทบกระเทือนต่อโปรตีน และไลโปโปรตีนบางชนิดที่เป็นส่วนประกอบของโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ และเยื่อหุ้มออร์กาเนล โดยเกิดเสียสภาพธรรมชาติ (denature) ขึ้นได้ (Lovelock, 1957) ด้วยเหตุดังกล่าวจึงอาจบอกได้ว่าหน้าที่สำคัญของสารพวกไครโอโปรเท็คแตนท์ก็คือ จะต้องป้องกันหรือลดการเกิดผลึกน้ำแข็งทั้งภายในและรอบนอกเซลล์ และป้องกันการเกิดสภาวะที่มีอีเล็กโตรไลท์เข้มข้นในเซลล์. ดังนั้นสารที่จะเป็นไครโอโปรเท็คแตนท์ได้ควรจะมีคุณสมบัติทั่วไปดังนี้คือ เป็นนิวทรอลโซลูท (neutral solute) ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ โมเลกุลมีขนาดเล็ก น้ำหนักโมเลกุลน้อย ละลายน้ำได้ดี และทะลุผ่านเยื่อหุ้มที่มีชีวิตได้ง่าย (Lovelock and Bishop, 1959) สารที่มีคุณสมบัติดังกล่าวและที่นิยมใช้เป็นไครโอโปรเท็คแตนท์สำหรับการเก็บรักษาเชื้อบาเลเรียมี 2 ตัว ได้แก่ กลีเซอรอล และไดเม็ทธิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulfoxide หรือ LMSO)

กลีเซอรอล หรือ กลีเซอรีน มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_3H_8O_3$ น้ำหนักโมเลกุล 92.09 ลักษณะเป็นของเหลวค่อนข้างหนืดในอุณหภูมิปกติ มีจุดหลอมเหลว 17.8 °C และจุดเดือดที่ความดัน 760 มิลลิเมตรของปรอท 290 °C ละลายน้ำได้ดี สามารถใช้เป็นตัวทำละลายช่วยหล่อลื่น และช่วยเพิ่มรสหวาน กลีเซอรอลมีพิษน้อยโดยมี LD_{50} ในหนูถีบจักร 31.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวโดยการกิน (Stecher, 1968)

ไดเม็ทธิลซัลฟอกไซด์หรือ DMSO มีสูตรโมเลกุล ($CH_3)_2SO$ น้ำหนักโมเลกุล 78.13 มีสภาพเป็นของเหลวที่อุณหภูมิปกติ มีจุดหลอมเหลว 18.45 °C และจุดเดือดที่ความดัน 760 มิลลิเมตรของปรอท 189 °C ละลายน้ำได้ดี สามารถใช้เป็นตัวทำละลายของกาซหลายชนิด เช่น อะเซ็ททีลีน ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ และยังเป็นตัวใช้ล้างสารเคลือบ (varnish) ออกได้ด้วย DMSO เมื่อสัมผัสกับผิวหนังคนจะทำให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังอย่างมาก และมี LD_{50} ในหนูขาว 20 มิลลิกรัม ต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวโดยการกิน (Stecher, 1968)

ถึงแม้กลีเซอรอลและ DMSO จะแตกต่างกัน แต่ก็ถูกนำมาใช้เป็นไครโอโปรเท็กแทนท์เพื่อการเก็บเชื้อมาเลเรียชนิดต่าง ๆ รวมทั้ง Plasmodium berghei ในที่อุณหภูมิต่ำทั้งสองตัว เทคนิคการเก็บและการใช้ไครโอโปรเท็กแทนท์ใช้วิธีเดียวกับการเก็บเม็ดเลือดแดง Lovelock (1953, 1954, 1957) พบว่ากลีเซอรอลสามารถป้องกันการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงได้ โดยกลีเซอรอลสามารถรวมตัวกับน้ำที่อยู่รอบเซลล์และป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง (Tullis et al, 1958) แต่ในปี 1959 Lovelock & Bishop ได้ลองใช้ DMSO แทนกลีเซอรอล พบว่า DMSO สามารถซึมเข้าสู่เม็ดเลือดแดงได้เร็วกว่ากลีเซอรอล และการล้าง DMSO ออกภายหลังก็ยุ่งยากน้อยกว่า นับแต่นั้นมาก็ได้มีการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการเก็บเม็ดเลือดโดยใช้ DMSO และกลีเซอรอลเป็นไครโอโปรเท็กแทนท์ในแบบต่าง ๆ เช่นเปรียบเทียบความเข้มข้นของไครโอโปรเท็กแทนท์ทั้งสอง (Rowe, Eyster and Kellner, 1968) วิธีการลดอุณหภูมิ (Rapatz and Luet, 1968) วิธีการทำให้เหลวตัวโดยดูผลกระทบต่อการแตกตัวของเม็กเลือด (Meryman and Hornblower, 1972) ส่วนด้านการเก็บเชื้อมาเลเรียโดยใส่ไครโอโปรเท็กแทนท์ก็ได้มีผู้ทำการศึกษาวิธีการเก็บเชื้อมาเลเรียชนิดต่าง ๆ โดยเฉพาะเชื้อ P. berghei เนื่องจากว่าเป็นเชื้อที่หาได้ง่าย มีผู้ลองใช้กลีเซอรอล (Molinari, 1960; Jeffery, 1962) และ DMSO (Collins and Jeffery, 1963) ในการเก็บเชื้อ P. berghei ไว้ในที่อุณหภูมิต่ำ ๆ เช่น น้ำแข็งแห้ง อุณหภูมิ -79° C ไนโตรเจนเหลวอุณหภูมิ -196° C แล้วทดสอบความคงชีวิตของเชื้อโดยการนำเชื้อมาเลเรียฉีดกลับในโฮสต์ และติดตามการเพิ่มระดับปาราสิทในเลือดจนกระทั่งโฮสต์ตาย (Collins and Jeffery, 1963) นอกจากนี้มีผู้ศึกษาความเข้มข้นขนาดต่าง ๆ ของกลีเซอรอลหรือ DMSO (Gallaher, 1974) ต่อความคงชีวิตของเชื้อ P.berghei ที่ถูกเก็บไว้ในอุณหภูมิ-196° C Pavanand et al (1974) ได้ดัดแปลงวิธีการเติมและล้าง DMSO ออกจากเชื้อ P. falciparum ก่อนและหลังการเก็บในไนโตรเจนเหลว และพบว่า โดยวิธีการดัดแปลงนั้นทำให้เชื้อมาเลเรียยังคงมีชีวิตอยู่เป็นจำนวนมาก ส่วน Phillip & Wilson (1978) ก็ได้ดัดแปลงวิธีการใช้ DMSO และกลีเซอรอลในการเก็บเชื้อมาเลเรีย

และพบว่า การดัดแปลงนี้จะมีผลดีต่อการรงชีวิตของเชื้อมาเลเรียเช่นกัน อย่างไรก็ตาม อาจจะพอสรุปได้ว่า ไกรโอโปรเท็คแตนท์ที่นิยมใช้สำหรับการเก็บเชื้อมาเลเรียในอุณหภูมิต่ำมี 2 ตัวคือ กลีเซอรอล และ DMSO แต่มีแบบแผนและวิธีการเก็บเชื้อต่างกัน แต่ยังไม่มีใครบอกได้ว่าวิธีใดดีที่สุด ด้วยเหตุผลดังกล่าว จึงทำให้ผู้วิจัยมีความสนใจอยากศึกษาเปรียบเทียบวิธีการเก็บเชื้อมาเลเรียโดยใช้กลีเซอรอลเป็นไกรโอโปรเท็กแตนท์ตามวิธีการของ Phillip & Wilson (1978) กับวิธีของ Rowe, Eyster & Kellner (1968) เทียบกับการใช้ DMSO ด้วยวิธีของ Pavanand et al (1974) กับวิธีของ Phillip & Wilson (1978) โดยใช้เชื้อมาเลเรียชนิดเดียวกันคือ P. berghei เก็บไว้ที่อุณหภูมิเดียวกันคือ -196° C ในไนโตรเจนเหลว และด้วยระยะเวลาการเก็บเท่ากันนาน 6 เดือน ตลอดจนการใช้หลักเกณฑ์เดียวกันในการตัดสินผลซึ่ง ได้แก่

1. ศึกษาความคงชีวิตของเชื้อมาเลเรีย โดยดูจาก
   1.1 ลาเทนท์พีเรียด
   1.2 การเพิ่มระดับปาราสิตในโฮสต์
2. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงด้านชีวเคมีของปาราสิต โดยการศึกษาสมรรถภาพของเอ็นไซม์ แลกเทตดีไฮโดรจีเนส ซึ่งยังไม่มีผู้ใดได้ทำมาก่อน โดยที่เข้าใจกันว่าการเก็บเชื้อมาเลเรียไว้ในที่อุณหภูมิต่ำเช่น -196° C นั้น อาจไม่กระทบกระเทือนขบวนการทางชีวเคมีของเซลล์ เนื่องจากที่อุณหภูมิต่ำ ๆ นั้นเซลล์คงจะหยุดเมตาโบลิซึมหมดทุกอย่างประการหนึ่ง อีกประการหนึ่งสรุปจากการที่เซลล์สามารถคงชีวิตอยู่ได้หลังการเก็บแต่ยังไม่อาจตัดสินปัญหาในเรื่องผลกระทบของความเย็น และไกรโอโปรเท็กแตนท์ที่จะมีต่อสมรรถภาพการทำงานของเอ็นไซม์ และต่อการเคลื่อนที่ของไอโซไซม์ในสตาร์ชเจลอีเล็กโตรฟอรีซิส ซึ่งวิธีการศึกษาไอโซไซม์โดยอีเล็กโตรฟอรีซิสนั้นเป็นวิธีจำแนกเชื้อมาเลเรีย (Carter, 1970; Carter and Walliker, 1977) และปาราสิตอื่น ๆ ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย แต่เชื้อที่ใช้สำหรับการศึกษาเอ็นไซม์อาจจะถูกกระทบกระเทือนได้ ถ้าผ่านการเก็บด้วยอุณหภูมิต่ำ โดยใช้ไกรโอโปรเท็กแตนท์

การศึกษาครั้งนี้ จะช่วยให้ทราบถึงวิธีการเก็บ ความเข้มข้นและชนิดของไกรโอโปรเท็กแตนท์ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเก็บเชื้อมาเลเรีย เพื่อการศึกษาวิจัยด้านอื่น ๆ ต่อไป กับทั้งทราบผลกระทบของความเย็นและไกรโอโปรเท็กแตนท์ต่อเชื้อมาเลเรียในแง่การเปลี่ยนแปลงด้านเอ็นไซม์.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย