

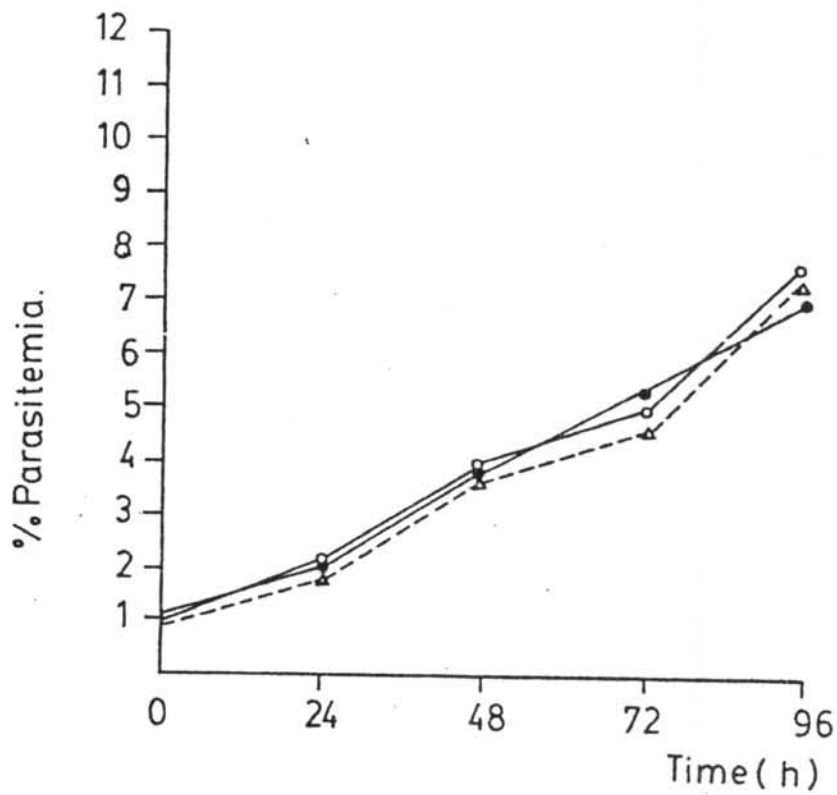
### บทที่ 3

#### ผลการทดลอง

#### 3.1 การเพาะเลี้ยงพลาสมาโมเดียม พาลซีปาร์ม แบบต่อเนื่องในเม็ดเลือดแดงกรุปบี

เนื่องจากตัวอย่างเลือดติดเชื้อพลาสมาโมเดียม พาลซีปาร์ม ที่ใช้ได้รับมาจากแหล่งต่าง ๆ อาจเจริญอยู่ในเม็ดเลือดแดงกรุปใด ๆ ก็ได้ เพื่อขจัดปัญหาความแตกต่างของเซลล์เจ้าบ้านที่เป็นเม็ดเลือดแดงกรุปต่าง ๆ กัน เพื่อความสะดวกในการเพาะเลี้ยงเชื้อพลาสมาโมเดียม พาลซีปาร์ม แบบต่อเนื่อง จึงจำเป็นต้องเปลี่ยนเซลล์เจ้าบ้านของเชื้อพลาสมาโมเดียมให้ เป็นเม็ดเลือดแดงชนิดเดียวกันเสีย การวิจัยต่อไปนี้จะใช้เม็ดเลือดแดงกรุปบีเป็นเซลล์เจ้าบ้าน

ผลการทดลองเมื่อนำเชื้อพลาสมาโมเดียมซึ่งเพาะเลี้ยงอยู่แล้วในเม็ดเลือดแดงและซีรัมกรุปอื่นมาเปลี่ยนเป็นเม็ดเลือดแดง และซีรัมกรุปบีตามวิธี 2.8.1 และ 2.8.2 ติดตามผลการเจริญของพลาสมาโมเดียม พาลซีปาร์มทุก ๆ 24 ชั่วโมง พบว่ารูปแบบการเจริญของเชื้อพลาสมาโมเดียมนี้คล้ายกันทั้ง 2 วิธี และคล้ายกับรูปแบบของการเจริญของพลาสมาโมเดียมในเซลล์เม็ดเลือดแดงเดิมด้วยเช่นกัน จากรูปที่ 5 แสดงให้เห็นการเจริญของพลาสมาโมเดียม พาลซีปาร์ม ไอโซเลท  $K_1$  ซึ่งเดิมอยู่ในเม็ดเลือดแดงกรุปเอบี เมื่อค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นเม็ดเลือดแดงกรุปบีที่อัตราส่วนเม็ดเลือดแดงบีต่อเอบี เป็น 1 ต่อ 1 แต่อาหารเลี้ยงเชื้อสมบูรณ์ยังคงมีซีรัมชนิดเอบีอยู่ จะพบว่าการเจริญของพลาสมาโมเดียม พาลซีปาร์ม ไอโซเลท  $K_1$  จะคงคล้ายกันทั้ง 2 ระบบในทำนองเดียวกันกับวิธีข้อ 2.8.2 ซึ่งพยายามเปลี่ยนเซลล์เจ้าบ้านให้เป็นเม็ดเลือดแดงกรุปบี โดยที่อาหารเลี้ยงเชื้อสมบูรณ์มีซีรัมกรุปบีด้วย รูปแบบของการเจริญก็คล้ายคลึงกัน และเมื่อทำการเปลี่ยนหลาย ๆ ครั้งจนในที่สุดเซลล์เพาะเลี้ยงมีแต่เม็ดเลือดแดงกรุปบีเป็นส่วนใหญ่ รูปแบบของการเจริญก็จะไม่ต่างจากเดิม โดยเทียบระยะเวลาของการเจริญทุก ๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (2 วงชีพ)



รูปที่ 5-

รูปแบบการเจริญของ *P. falciparum* ไอโซเลต K, เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 ที่มีซีรัม และมีเม็ดเลือดแดงกรุป AB และ B

- — ○ การเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีทั้งซีรัม - และเม็ดเลือดแดงกรุป AB.
- △ - - - △ การเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซีรัมชนิด AB และเม็ดเลือดแดงกรุป B ต่อ AB ในอัตราส่วน 1:1.
- — ● การเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีทั้งซีรัม - และเม็ดเลือดแดงกรุป B.

### 3.2 การขึ้นโครโนเชชัน พลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม

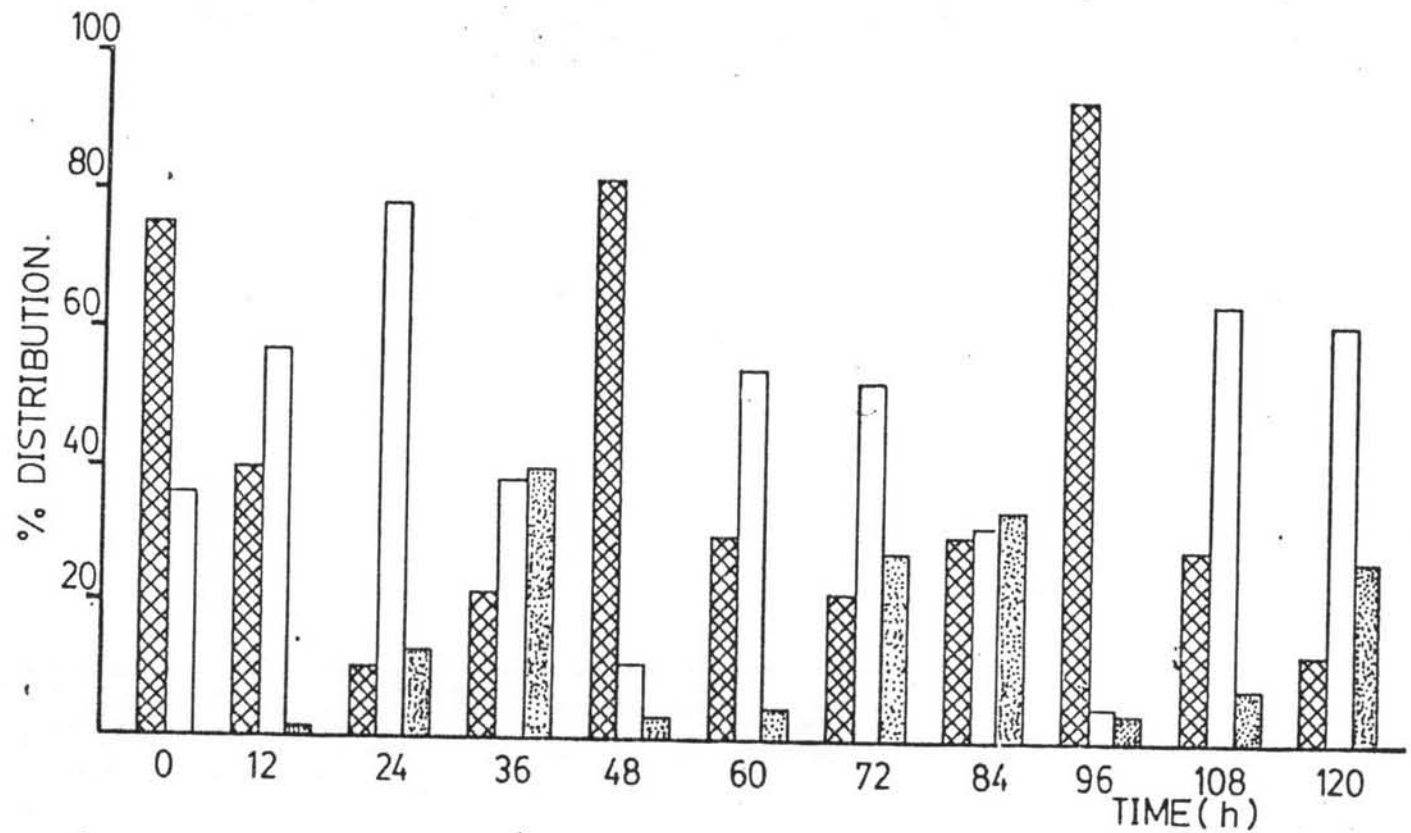
การทดลองบางครั้งจำเป็นต้องควบคุมให้การเพาะเลี้ยงได้รูปแบบการเจริญใกล้เคียงกันมากที่สุด โดยการทำให้ขึ้นโครโนเชชัน

การทดลองดำเนินการตามวิธี 2.9 พบว่าหลังจากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงทำปฏิกิริยากับ 5% D-sorbitol (ติดตามการเจริญโดยเทคนิคฟิล์มบางและย้อมสีเขียวตามวิธี 2.6.3) พบว่าระยะการเจริญส่วนใหญ่เป็นระยะวงแหวน และเมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปประมาณ 12 ชั่วโมง จะได้ระยะโทรโฟยอกที่เพิ่มขึ้น ขณะเดียวกันระยะวงแหวนจะค่อย ๆ ลดลง และเมื่อเลี้ยงไปประมาณ 24 ชั่วโมง (ครึ่งวงชีพ) ระยะการเจริญส่วนใหญ่ในเซลล์เพาะเลี้ยงจะเป็นโทรโฟยอกที่จากนั้นระยะโทรโฟยอกจะค่อย ๆ ลดลง และเปลี่ยนเป็นระยะไซซอนที่ชั่วโมงที่ 36 แล้วกลับเป็นระยะวงแหวนอีกครั้งที่ชั่วโมงที่ 48 ซึ่งครบวงชีพพอดี และเมื่อเพาะเลี้ยงไปได้ถึงชั่วโมงที่ 72 ระยะส่วนใหญ่เป็นโทรโฟยอกที่ชั่วโมงที่ 84 ระยะไซซอนที่จะเพิ่มมากพอ ๆ กับระยะอื่น ชั่วโมงที่ 96 ระยะส่วนใหญ่จะเป็นระยะวงแหวนอีกครั้งหนึ่ง และเมื่อตรวจดูที่ชั่วโมงที่ 120 จะพบระยะส่วนใหญ่เป็นโทรโฟยอก แต่ก็มีเปอร์เซ็นต์ของไซซอนที่ลู่ลงพอ ๆ กับชั่วโมงที่ 72 ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 6

การทำขึ้นโครโนเชชัน 2 ครั้ง ที่ชั่วโมงที่ 34 หลังจากการทำขึ้นโครโนเชชันครั้งแรกแล้ว จะทำให้ได้ระยะการเจริญต่าง ๆ ระยะใดระยะหนึ่งเกือบ 100% กล่าวคือที่ชั่วโมงที่ 0, 48, 96 จะได้ระยะวงแหวน, ชั่วโมงที่ 24, 72, 120 จะได้ระยะโทรโฟยอก และชั่วโมงที่ 36, 84 จะได้ระยะไซซอนที่เป็นส่วนใหญ่

### 3.3 ความไวของพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมต่อไพริเมธาซีน

เมื่อนำพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมไอโซเลท  $K_1$ , CC,  $G_{112}$  ซึ่งทำขึ้นโครโนเชชันแล้วมาทดสอบความไวต่อไพริเมธาซีนตามวิธี 2.10 พบว่าผลกระทบของการเจริญของพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมไอโซเลททั้งสามด้วยไพริเมธาซีน เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของยาระดับต่าง ๆ ่าง ระหว่าง  $10^{-10}$  -  $10^{-4}$  โมลาร์ ( $10^{-10}$ ,  $5 \times 10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $5 \times 10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  โมลาร์) ผลการทดลองเป็นดังนี้

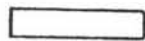


รูปที่ 6.

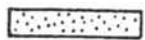
รูปแบบการเจริญของ *P. falciparum* ไอโซแลท K, เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อลมบูรณ์ โดยวิธีของ - Troger และ Jensen, 1976. หลังจากทำปฏิกิริยากับ 5% D-sorbitol



ระยะวงแหวน



ระยะโทรฟิซอัยท์



ระยะไซซอนท์.



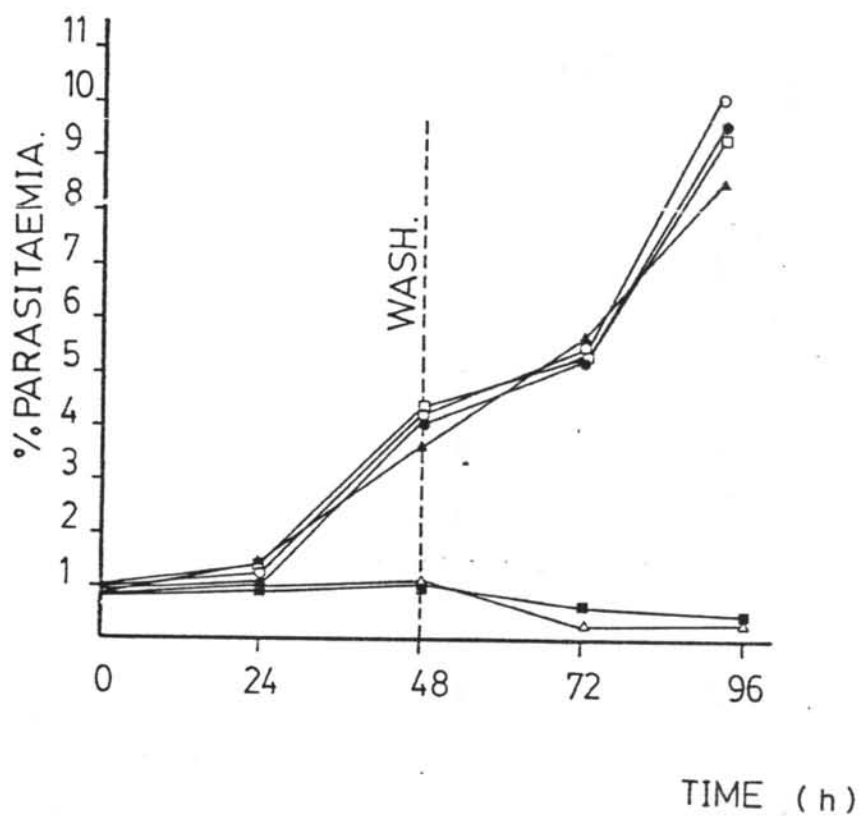
พลาสมาโมเดียม พลาสมาอาร์มไอโซเลท  $K_1$  รูปแบบการเจริญจะคงเป็นไปตามปกติเหมือนในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ไม่มีไฟโรเมธาซีน จนกระทั่งถึงระดับความเข้มข้น  $10^{-5}$  โมลาร์ เป็นความเข้มข้นสูงสุดที่ไอโซเลท  $K_1$  จะทนต่อฤทธิ์ไฟโรเมธาซีนได้ เมื่อใช้ความเข้มข้นสูงกว่านี้ ไฟโรเมธาซีนจะไปหยุดยั้งการเจริญของไอโซเลท  $K_1$  (รูปที่ 7) ซึ่งตรวจสอบได้เมื่อใช้เทคนิคฟิล์มบางและย้อมสีเสียมซา ล่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย  $10 \times 100$  จะพบความผิดปกติของเซลล์พลาสมาโมเดียมด้วย

สำหรับพลาสมาโมเดียม พลาสมาอาร์มไอโซเลท CC จะคงเจริญได้ปกติถึงระดับความเข้มข้นของไฟโรเมธาซีนสูงสุดเพียง  $10^{-8}$  โมลาร์ (รูปที่ 8) ส่วนพลาสมาโมเดียม พลาสมาอาร์มไอโซเลท  $G_{112}$  ทนต่อฤทธิ์ไฟโรเมธาซีนได้น้อยที่สุด คือที่ความเข้มข้น  $10^{-10}$  โมลาร์ จะเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่ไอโซเลท  $G_{112}$  จะทนฤทธิ์ไฟโรเมธาซีนได้ (รูปที่ 9)

### 3.4 ความไวต่อไฟโรเมธาซีนของพลาสมาโมเดียม พลาสมาอาร์มที่ระยะการเจริญต่าง ๆ กัน

เมื่อนำพลาสมาโมเดียม พลาสมาอาร์มไอโซเลท  $K_1$  มาทำซินโครไนเซชัน 2 ครั้ง แล้วเลือกเซลล์ที่ระยะการเจริญต่าง ๆ โดยอาศัยระยะเวลาที่กำหนด (ตามผลการทดลองข้อ 3.2) นำมาทดสอบความไวของพลาสมาโมเดียมต่อไฟโรเมธาซีน ที่ความเข้มข้น  $10^{-4}$  โมลาร์ นาน 24 ชั่วโมง ตามวิธีข้อ 2.10 ล้างยาออกแล้วเพาะเลี้ยงต่อไปโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีไฟโรเมธาซีน ติดตามการเจริญในช่วงเวลาต่าง ๆ กันได้ผลดังนี้

หลังจากการทำซินโครไนเซชัน 2 ครั้ง แล้วทดสอบความไวของพลาสมาโมเดียมที่ได้ต่อไฟโรเมธาซีนทันทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าการเจริญของพลาสมาโมเดียมจะถูกยับยั้งเมื่อครบ 1 วงชีพพอตี (48 ชั่วโมง) ดังรูปที่ 10 แต่ถ้าเลี้ยงเชื้อพลาสมาโมเดียมต่อไปอีก 24 ชั่วโมง หลังจากทำซินโครไนเซชัน 2 ครั้ง แล้วจึงเริ่มทดสอบความไวของเชื้อต่อไฟโรเมธาซีนนาน 24 ชั่วโมง พบว่ารูปแบบของการเจริญตามรูปที่ 11 ซึ่งคล้ายกับรูปที่ 10 ในทางตรงกันข้ามหากทำซินโครไนเซชัน 2 ครั้ง แล้วเพาะเลี้ยงต่อไป 36 ชั่วโมง จึงนำมาทดสอบความไวของเชื้อต่อไฟโรเมธาซีน ดังรูปที่ 12 ซึ่งพบว่าความเข้มข้นของไฟโรเมธาซีน  $10^{-4}$  โมลาร์ จะไม่มีผลกระทบต่อพลาสมาโมเดียม พลาสมาอาร์มไอโซเลท  $K_1$  ในหนึ่งวงชีพถัดไป

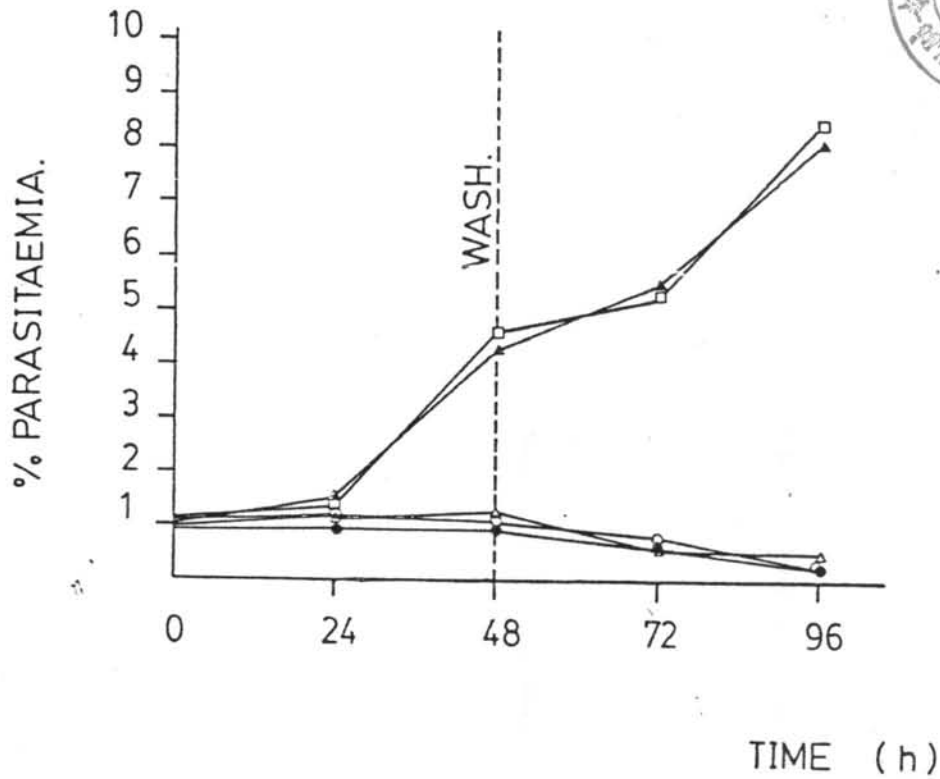


รูปที่ 7.

ผลกระทบของ ไพริเมอามีน ความเข้มข้นต่าง ๆ  
ต่อการเจริญของ *P. falciparum* ไอโซเลท K, เมื่อเพาะเลี้ยง  
ในอาหารเลี้ยงเชื้อลมบูรณ์ ตามวิธีของ Trager และ Jensen, 1976.

ความเข้มข้นของ ไพริเมอามีน :

△—△—△	10 <sup>-4</sup> โมลาร์	▲—▲—▲	10 <sup>-6</sup> โมลาร์
■—■—■	5 × 10 <sup>-5</sup> โมลาร์	□—□—□	10 <sup>-7</sup> โมลาร์
●—●—●	10 <sup>-5</sup> โมลาร์	○—○—○	Control.

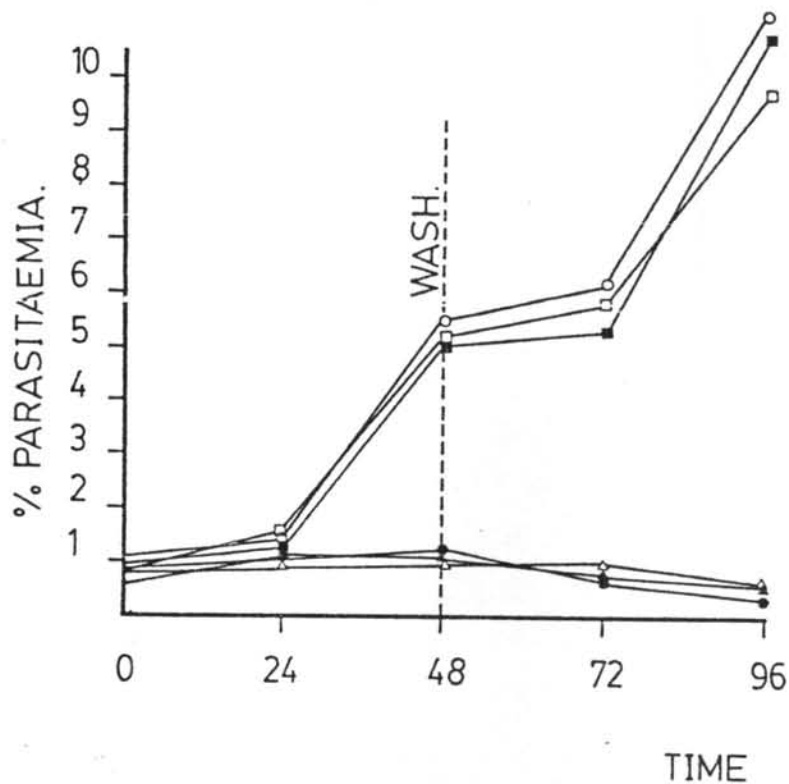


รูปที่ 8.

ผลกระทบของ ไพริเมอามีน ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการ -  
 เจริญของ *P. falciparum* ไฮโซเลท CC เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ -  
 ดมบูรณ์ ตามวิธีของ Trager และ Jensen, 1976.

ความเข้มข้นของ ไพริเมอามีน ๘ :

- 10<sup>5</sup> ไมลาร์    △—△—△    10<sup>7</sup> ไมลาร์
- 10<sup>6</sup> ไมลาร์    ▲—▲—▲    10<sup>8</sup> ไมลาร์
- Control.



รูปที่ ๑.

ผลกระทบของ ไพริเมธามีน ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเจริญของ *P. falciparum* ไอโซเลท G<sub>112</sub>. เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ-ลมบูรณ์ ตามวิธีของ Trager และ Jensen, 1976.

ความเข้มข้นของ ไพริเมธามีน :

- |       |                        |       |                             |
|-------|------------------------|-------|-----------------------------|
| ▲—▲—▲ | 10 <sup>7</sup> ไมลาร์ | ○—○—○ | 10 <sup>10</sup> ไมลาร์     |
| ●—●—● | 10 <sup>8</sup> ไมลาร์ | □—□—□ | 5 × 10 <sup>10</sup> ไมลาร์ |
| △—△—△ | 10 <sup>9</sup> ไมลาร์ | ■—■—■ | Control.                    |



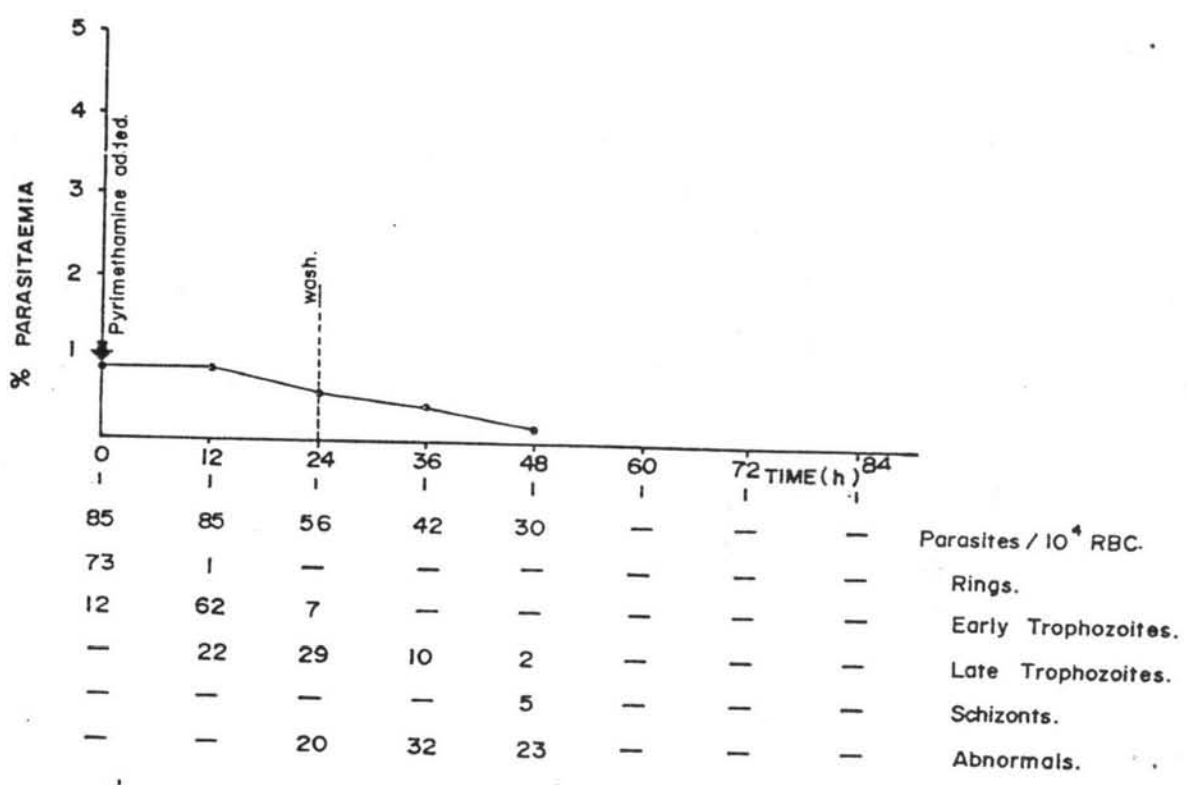
เมื่อตรวจดูระยะต่าง ๆ ของพลาสโมเดียมก่อนที่จะเริ่มทดลองความไวต่อไพริเมธา-  
มิน พบว่าถ้าส่วนใหญ่ของพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม เป็นระยะวงแหวนและโทรโฟซอิต์เมื่อทด-  
สอบกับไพริเมธามินจะทำให้เปอร์เซ็นต์พาราไซต์ในเลือดลดลง (รูปที่ 10, 11) และปรากฏรู-  
ปร่างของเซลล์พลาสโมเดียมผิดปกติ แต่ถ้าเริ่มทดสอบไพริเมธามินเมื่อเซลล์ส่วนใหญ่เป็นระยะไซ-  
ซอนที่ เปอร์เซ็นต์พาราไซต์ในเลือดจะเพิ่มขึ้น (รูปที่ 12) กล่าวคือ ไซซอนที่จะทำลายเม็ดเลือด  
แล้วได้เมโรซอิต์ซึ่งจะไซเข้าสู่เม็ดเลือดแดง เซลล์ใหม่ เจริญเป็นระยะวงแหวนต่อไปได้

นอกจากนี้ยังทดลองความไวของเชื้อต่อไพริเมธามินนาน 12 ชั่วโมง แทน 24 ชั่วโมง  
พบว่าระยะวงแหวนและระยะโทรโฟซอิต์ เมื่อได้สัมผัสไพริเมธามินนาน 12 ชั่วโมง จะทำให้การ  
เจริญของเชื้อพลาสโมเดียมลดลง และรูปร่างของเชื้อพลาสโมเดียมจะผิดปกติด้วย แต่ถ้านำ  
โทรโฟซอิต์ระยะปลาย (late trophozoite) หรือไซซอนที่ส่วนใหญ่มาทดสอบความไวของ  
เชื้อพลาสโมเดียมต่อไพริเมธามินในระยะเวลา 12 ชั่วโมงเช่นกัน จะพบว่ารูปแบบของการเจริญ  
จะคงเป็นไปตามปกติในวงซีฟถัดไป

### 13.5' ความไวของพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม ต่อไพริเมธามินและเมโรเทรเซท

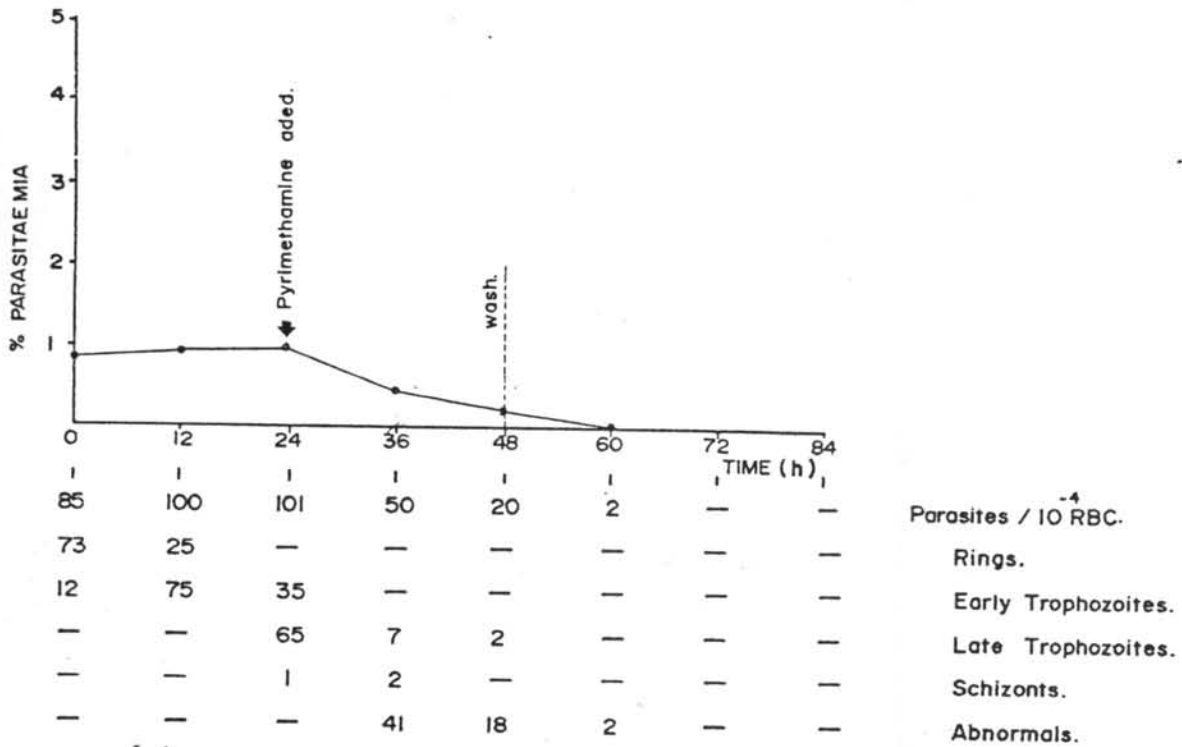
เพื่อจะทดสอบดูว่าระหว่างไอโซเลทที่ไวต่อไพริเมธามินต่างกัน จะมีความไวต่อเมโร-  
เทรเซทในรูปแบบเดียวกันหรือไม่

การทดสอบความไวของยาตามวิธีในหัวข้อ 12.10 พบว่าพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม  
ไอโซเลท K<sub>1</sub> ซึ่งเป็นไอโซเลทที่ต้านไพริเมธามินสูงที่สุดที่ความเข้มข้น 10<sup>-5</sup> โมลาร์ เมื่อนำมา  
ทดสอบความไวต่อเมโรเทรเซทพบว่า จะต้านยาสูงที่สุดที่ความเข้มข้น 10<sup>-9</sup> โมลาร์ (รูปที่ 13  
ก และ 13 ข) ขณะเดียวกันพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมไอโซเลท CC ซึ่งเป็นไอโซเลทที่ต้าน  
ไพริเมธามินสูงที่สุดที่ความเข้มข้น 10<sup>-8</sup> โมลาร์ แต่เมื่อทดสอบความไวต่อเมโรเทรเซท พบ  
ว่าจะต้านยาสูงที่สุดที่ความเข้มข้น 10<sup>-9</sup> โมลาร์ เช่นกัน (รูปที่ 13 ค และ 13 ง) ยิ่งไปกว่า  
นั้นรูปร่างของเชื้อพลาสโมเดียมที่ผิดปกติเมื่อไวต่อยาไพริเมธามินและเมโรเทรเซท เมื่อตรวจ  
ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ในสไลด์ฟิล์มบางที่ย้อมสีเสียมซา จะมีลักษณะคล้ายกันทุกประการ (รูปที่ 14 ก  
และ 14 ข) คือไซโทรพลาสมาจะติดสีจาง มีแวคคูลอล นิวเคลียสจะติดสีม่วงเข้ม และมีรงค-  
วัตถุสีน้ำตาล รวมกันเป็นกลุ่ม



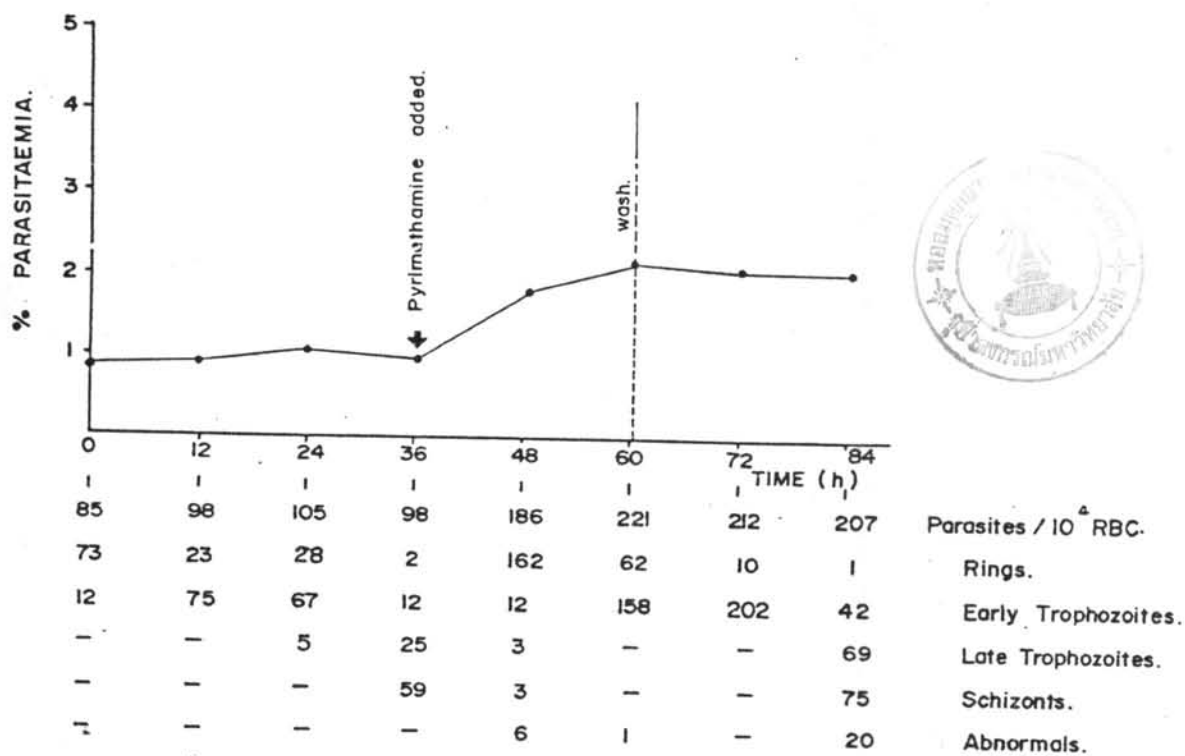
รูปที่ 10.

แสดงรูปแบบและระยะการเจริญของ *P. falciparum* ไอโซเลท K<sub>1</sub> ในช่วงเวลาต่าง ๆ เมื่อทำ ซินโครไนเซชัน 2 ครั้ง แล้วนำมาทดสอบความไวต่อไพริเมตามีน ที่ความเข้มข้น 10<sup>-4</sup> โมลาร์ ตามวิธี 2.10 ทั้งนี้ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเพาะเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อลมบูรณ์ ตามวิธีของ Trager และ Jensen 1976.



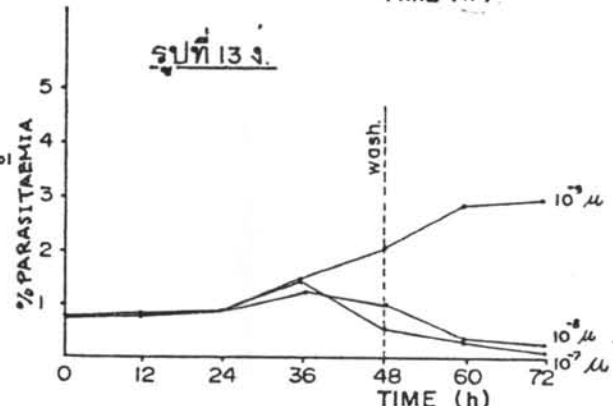
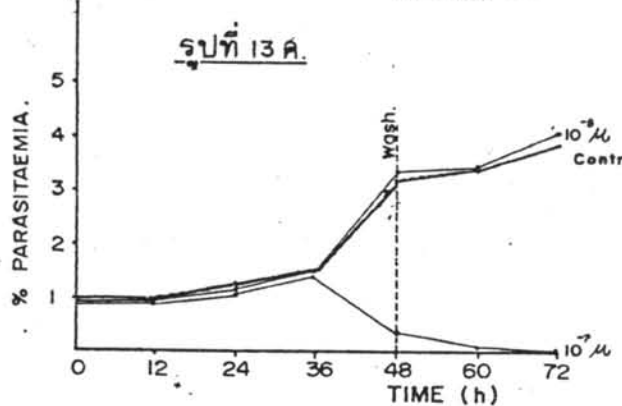
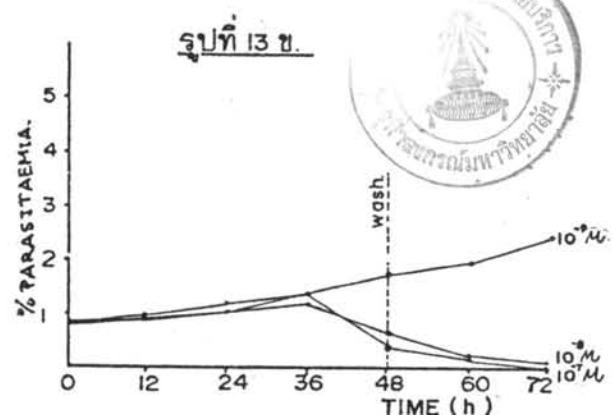
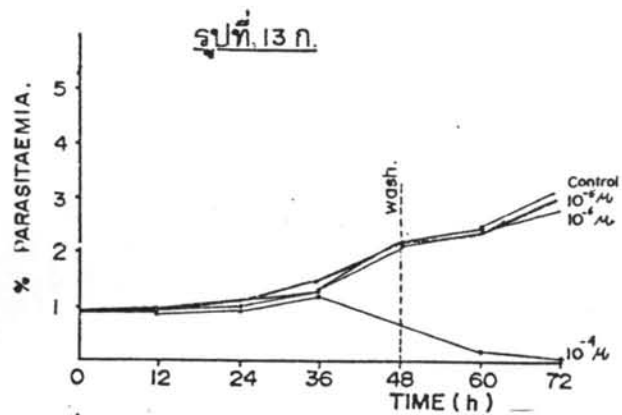
รูปที่ 11.

แสดงรูปแบบและระยะการเจริญของ *P. falciparum* ไซโซเลท K<sub>1</sub> ในช่วงเวลาต่าง ๆ เมื่อทำ ซินโครไนเซชัน 2 ครั้ง แล้วเพาะเลี้ยงต่อไปอีก 24 ชั่วโมง นำมาทดสอบความไวต่อไพริเมธาอิมินที่ความเข้มข้น 10<sup>-4</sup> โมลาร์ ตามวิธี 2.10 เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเพาะเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อลมบูร์น ตามวิธีของ Trager และ Jensen, 1976.



รูปที่ 12.

แสดงรูปแบบและระยะการเจริญของ *P. falciparum* ไซโซเลท K, ในช่วงเวลาต่าง ๆ เมื่อทำ ซินโครไนเซชัน 2 ครั้ง แล้วเพาะเลี้ยงต่อไปอีก 36 ชั่วโมง นำมาทดสอบความไวต่อไพริเมธาไมน ที่ความเข้มข้น  $10^{-6}$  โมลาร์ ตามวิธี 2.10 เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเพาะเลี้ยงต่อในอาหารลมบูรณ์ ตามวิธีของ Troger และ Jensen, 1976.



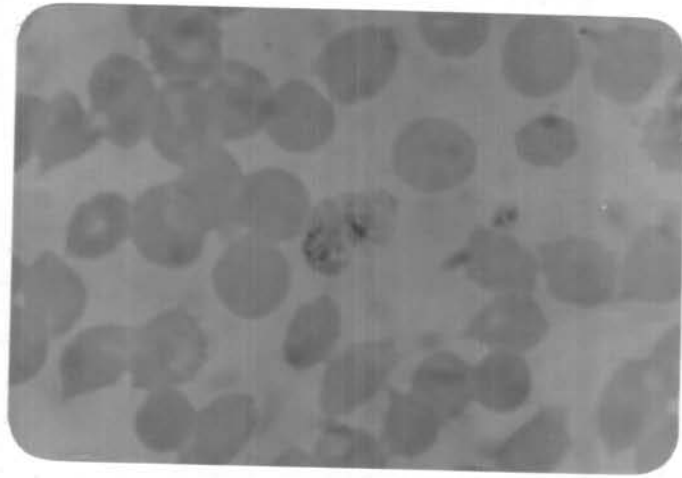
**รูปที่ 13**

รูปแบบการเจริญของ *P. falciparum* เมื่อทดลองกับ ไพริเมธาไมน

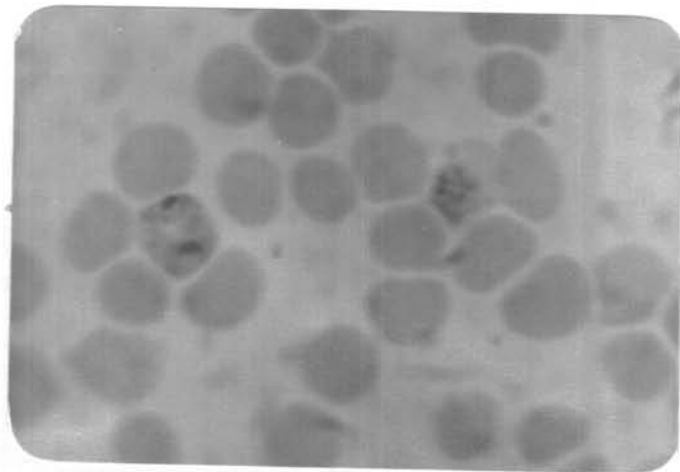
และเมโอเทอร์เซท ที่ความเข้มข้นต่างกัน ตามวิธีข้อ 2.10

รูปที่ 13 ก,ข. ความไวของ *P. falciparum*. ไอโซเลท K, ต่อไพริเมธาไมน และเมโอเทอร์เซท. ตามลำดับ.

รูปที่ 13 ค,ง. ความไวของ *P. falciparum*. ไอโซเลท CC ต่อไพริเมธาไมน และเมโอเทอร์เซท. ตามลำดับ.



รูปที่ 14 ก



รูปที่ 14 ข

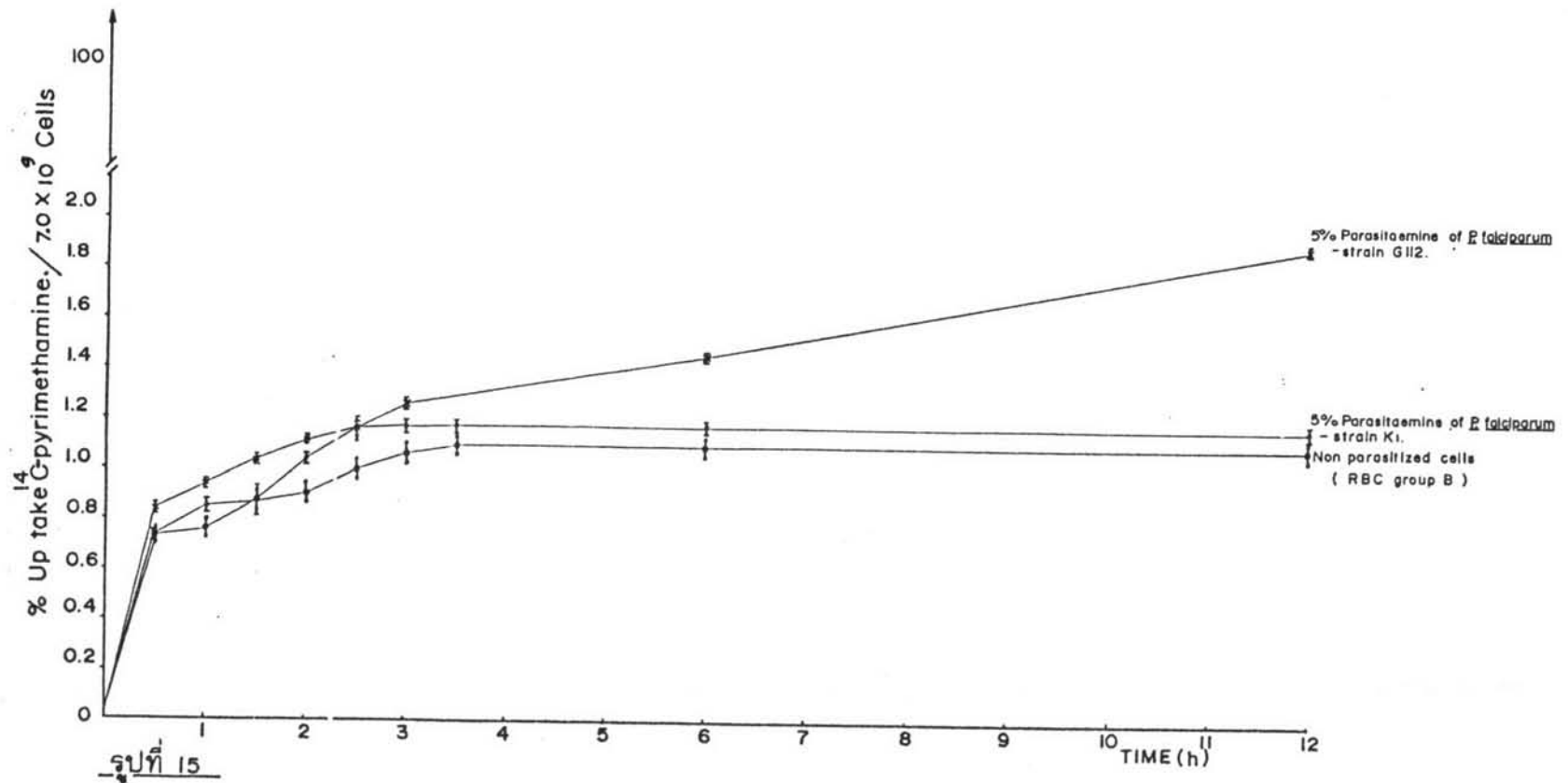
รูปที่ 14 รูปร่างชนิดปกติของพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมไอโซเลต  $K_1$  (ย้อมด้วยสีเสียมซา) เมื่อทดสอบกับไฟริ เมรามีนและเมโรเทร เซทที่ความเข้มข้น  $10^{-4}$  โมลาร์ และ  $10^{-9}$  โมลาร์ตามลำดับ (กำลังขยาย 10 x 100)

3.6 การนำ  $^{14}\text{C}$ -pyrimethamine เข้าสู่เม็ดเลือดแดงซึ่งติดเชื้อและไม่ติดเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง

ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องตามวิธีของ Trager และ Jensen เมื่อทดสอบความไวต่อไพริเมธาไมน์จะมีการนำเข้าสู่เซลล์ต่างกันอย่างไรระหว่างไอโซเลทไวและต้านยา จากการทดลองตามวิธี 2.12 ผลเป็นดังนี้ (รูปที่ 15)

เมื่อเติม  $^{14}\text{C}$ -pyrimethamine ความเข้มข้น  $10^{-4}$  โมลาร์ลงในเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีแต่เม็ดเลือดแดง ซึ่งไม่ติดเชื้อพลาสโมเดียม แล้วเพาะเลี้ยงตามวิธี 2.9 พบว่า  $^{14}\text{C}$ -pyrimethamine จะถูกนำเข้าสู่เม็ดเลือดแดง 0.1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ( $7.0 \times 10^9$  เซลล์) ประมาณ 0.7 เปอร์เซ็นต์ ในครึ่งชั่วโมงแรก และเมื่อเพาะเลี้ยงต่อไประดับของยาจะสูงขึ้นเป็น 1.1% คงที่ไปเรื่อย ๆ เมื่อเปรียบเทียบกับเม็ดเลือดแดงซึ่งติดเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมไอโซเลท  $K_1$  จำนวนพาราไซต์ในเลือดเท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ และเพาะเลี้ยงในสภาวะเดียวกัน พบว่าระดับของ  $^{14}\text{C}$ -pyrimethamine ที่ถูกนำเข้าสู่เม็ดเลือดแดงทั้งหมด 0.1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ( $7.0 \times 10^9$  เซลล์) ในครึ่งชั่วโมงแรกจะใกล้เคียงกัน แต่เพาะเลี้ยงต่อไประดับ  $^{14}\text{C}$ -pyrimethamine จะสูงขึ้นถึงชั่วโมงที่ 3 และคงที่ไปจนถึงชั่วโมงที่ 12 ระดับ  $^{14}\text{C}$ -pyrimethamine ที่ถูกนำเข้าประมาณ 1.2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าระดับ  $^{14}\text{C}$ -pyrimethamine ในเม็ดเลือดแดงที่ไม่ติดเชื้อเล็กน้อย

สำหรับการทดสอบเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมไอโซเลท  $G_{112}$  จำนวนพาราไซต์ในเลือดเท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์เช่นกัน และจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงเท่ากัน ( $7.0 \times 10^9$  เซลล์) พบว่าระดับ  $^{14}\text{C}$ -pyrimethamine ในครึ่งชั่วโมงแรกประมาณ 0.8 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเพาะเลี้ยงไปเรื่อย ๆ ในชั่วโมงที่ 6 จะเป็น 1.25 เปอร์เซ็นต์ และในชั่วโมงที่ 12 เป็น 1.9 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 15

เปรียบเทียบการนำเข้าของ  $^{14}\text{C}$ -Pyrimethamine ความเข้มข้น  $10^{-4}$  โมลาร์ ในเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ 5% Parasitaemia และ  
 ไม่ติดเชื้อ *P. falciparum* ในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ แล้วนำไปนับปริมาณกัมมันตรังสี ที่ถูกนำเข้าเซลล์โดยใช้  
 เครื่องมือ Packard Tri-carb Liquid Scintillation Counter Model BPL ตามวิธี 2.12



### 3.7 การนำ $^{14}\text{C}$ -pyrimethamine เข้าสู่เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อพลาสโมเดียมที่ระยะการเจริญต่าง ๆ

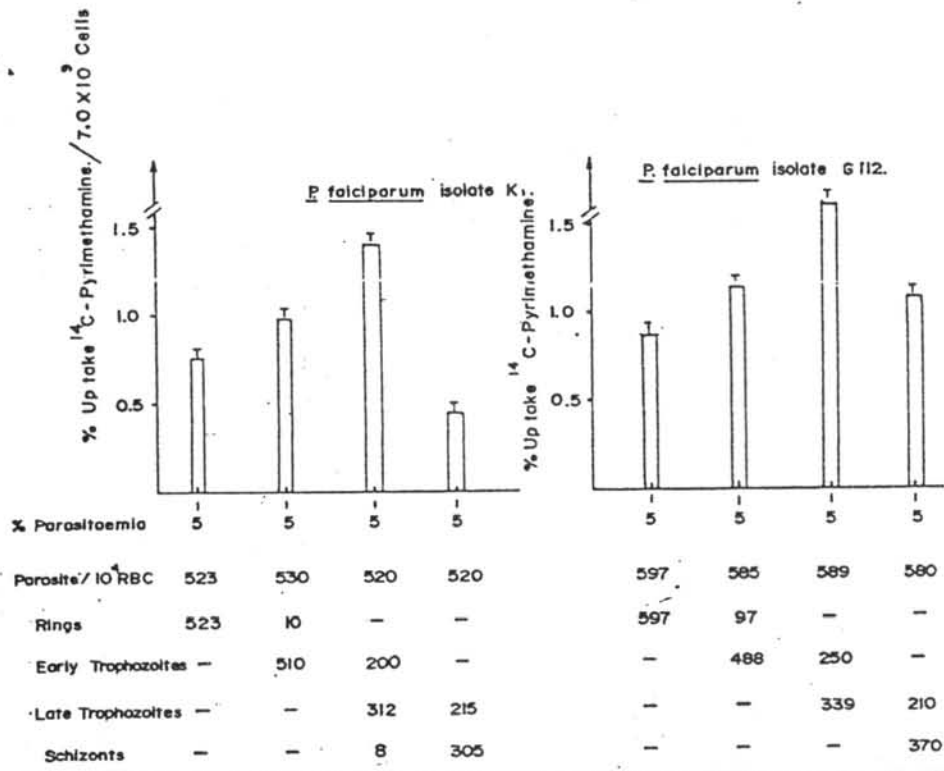
นำเซลล์เพาะเลี้ยงมาทำซินโครไนเซชัน 2 ครั้ง แล้วเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องตามวิธี 2.9 ทดสอบความไวต่อยาของพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม ที่ระยะการเจริญต่าง ๆ โดยมี  $^{14}\text{C}$ -pyrimethamine ความเข้มข้น  $10^{-4}$  โมลาร์ผสมอยู่ด้วย เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่า พลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมไอโซเลท  $K_1$  เป็นระยะวงแหวนส่วนใหญ่ จะมีการนำ  $^{14}\text{C}$ -pyrimethamine เข้าสู่เซลล์ ( $7.0 \times 10^9$  เซลล์) เพียง 10.7 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับโทรโฟพอยท์ระยะต้นจะมีการนำเข้าของ  $^{14}\text{C}$ -pyrimethamine 1.0 เปอร์เซ็นต์ โทรโฟพอยท์ระยะปลาย จะมีการนำเข้าสู่ที่สุดคือ 1.45 เปอร์เซ็นต์ สำหรับระยะไซซอนท์จะมีการนำเข้าต่ำที่สุดเพียง 0.4 - 0.5 เปอร์เซ็นต์ (ดังแสดงในรูปที่ 16)

สำหรับพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมไอโซเลท  $G_{112}$  รูปแบบของการนำ  $^{14}\text{C}$ -pyrimethamine เข้าสู่เซลล์จะคล้ายกับพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมไอโซเลท  $K_1$  แต่ระดับ  $^{14}\text{C}$ -pyrimethamine จะสูงกว่า กล่าวคือระยะที่เป็นวงแหวนส่วนใหญ่ จะมีการนำเข้า 0.8 เปอร์เซ็นต์ โทรโฟพอยท์ระยะต้น, โทรโฟพอยท์ระยะปลาย และระยะไซซอนท์ จะมีการนำเข้า 1.2, 1.6 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

### 3.8 การส่ง $^{14}\text{C}$ -pyrimethamine ออกจากเม็ดเลือดแดงซึ่งติดเชื้อและไม่ติดเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม

นำเซลล์เพาะเลี้ยงมาทำซินโครไนเซชัน 2 ครั้ง แล้วทดสอบความไวต่อยาโดยมี  $^{14}\text{C}$ -pyrimethamine ความเข้มข้น  $10^{-4}$  โมลาร์ผสมอยู่ด้วย เป็นเวลานาน 12 ชั่วโมง แล้วล้างยาออก นำมาเพาะเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อสมบูรณ์ที่ไม่มียา วัดระดับของ  $^{14}\text{C}$ -pyrimethamine ที่คงเหลืออยู่ภายในเซลล์ ในเวลาต่อมาอีก 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 17)

ผลการทดลองพบว่า เซลล์เพาะเลี้ยงที่มีแต่เม็ดเลือดแดงซึ่งไม่ติดเชื้อพลาสโมเดียมระดับยาจะลดลงเรื่อย ๆ ในชั่วโมงที่ 12 และ 24 ขณะที่เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อพลาสโมเดียม



รูปที่ 16

กราฟรูปนี้แสดงถึงความแตกต่างของการนำ  $^{14}\text{C}$  - Pyrimethamine ความเข้มข้น  $10^{-4}$  ไมลาร์ เข้าสู่เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ *P. falciparum* ไอโซเลท K1 และ G112 ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสมบูรณ์ ที่มี  $^{14}\text{C}$  - Pyrimethamine ความเข้มข้น  $10$  ไมลาร์ ตามวิธีของ Trager และ Jensen นาน  $1$  ชั่วโมง แล้วนำไปวัดปริมาณด้วยเครื่องวัดที่ถูกลำเลียงโดยใช้เครื่องมือ Packard Tri - carb Scintillation Counter Model BPL ตามวิธี 2.12

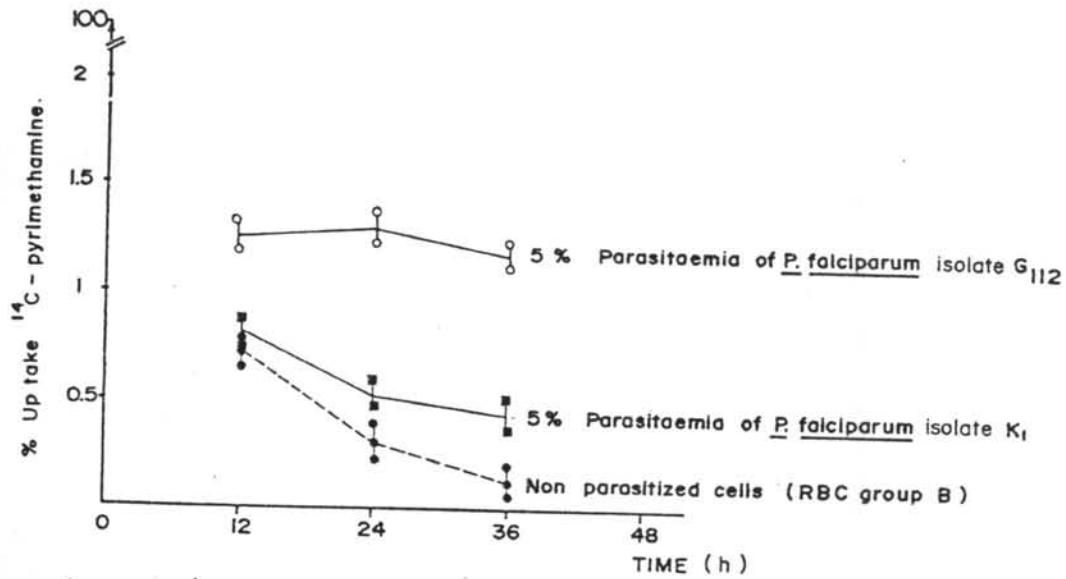
ฟาลซีปาร์มไอโซเลท  $K_1$  (จำนวนพาราไซต์ในเลือดเท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์) หลังจากล้างยาออกระดับ  $^{14}\text{C}$ -pyrimethamine จะคงลดลงเรื่อย ๆ เช่นกัน แต่ระดับยาจะคงสูงกว่าในเม็ดเลือดแดงที่ไม่ติดเชื้อ สำหรับเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซีปาร์มไอโซเลท  $G_{112}$  (จำนวนพาราไซต์ในเลือดเท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์) พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยงต่อ 12 และ 24 ชั่วโมง ระดับยาจะไม่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ

### 3.9 การนำ $^{14}\text{C}$ -pyrimethamine เข้าสู่เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซีปาร์ม หลังจากการทำ Ficoll fractionation

เพื่อให้การศึกษาการนำเข้าของ  $^{14}\text{C}$ -pyrimethamine เห็นเด่นชัดมากขึ้น จึงหาวิธีทำให้เปอร์เซ็นต์พาราไซต์ในเลือดสูงขึ้น โดยใช้สารละลาย 28% ฟิคอล ตามวิธี 2.13 ซึ่งการทดลองนี้สามารถทำได้จำนวนพาราไซต์ในเลือดสูงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ และระยะการเจริญของพลาสโมเดียม ฟาลซีปาร์ม ที่ได้ส่วนใหญ่เป็นโทรโฟพอยระยะปลายกับระยะไซซอนท์ เมื่อนำมาทดสอบการนำเข้าของ  $^{14}\text{C}$ -pyrimethamine ผลการทดลองดังรูปที่ 18 พบว่าในเม็ดเลือดแดงที่ไม่ติดเชื้อ ( $7.0 \times 10^9$  เซล) จะมีการนำเข้าของ  $^{14}\text{C}$ -pyrimethamine ได้และคงที่ แต่เมื่อเทียบกับ  $^{14}\text{C}$ -pyrimethamine ที่ถูกนำเข้าไปเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซีปาร์มไอโซเลท  $K_1$  และ  $G_{112}$  ( $7.0 \times 10^9$  เซล) จะพบว่าการนำเข้าสู่สูงกว่าอย่างมากและเมื่อเปรียบเทียบกันเองระหว่างทั้ง 2 ไอโซเลทพบว่า ในไอโซเลท  $G_{112}$  จะมีการนำ  $^{14}\text{C}$ -pyrimethamine เข้าสู่เซลล์สูงกว่าไอโซเลท  $K_1$  ที่ทุกช่วงเวลาการทดลอง และในนาฬิกาที่ 30 ไอโซเลท  $G_{112}$  สามารถนำ  $^{14}\text{C}$ -pyrimethamine เข้าสู่เซลล์สูงถึง 24 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ไอโซเลท  $K_1$  มีการนำเข้าเพียง 11 เปอร์เซ็นต์

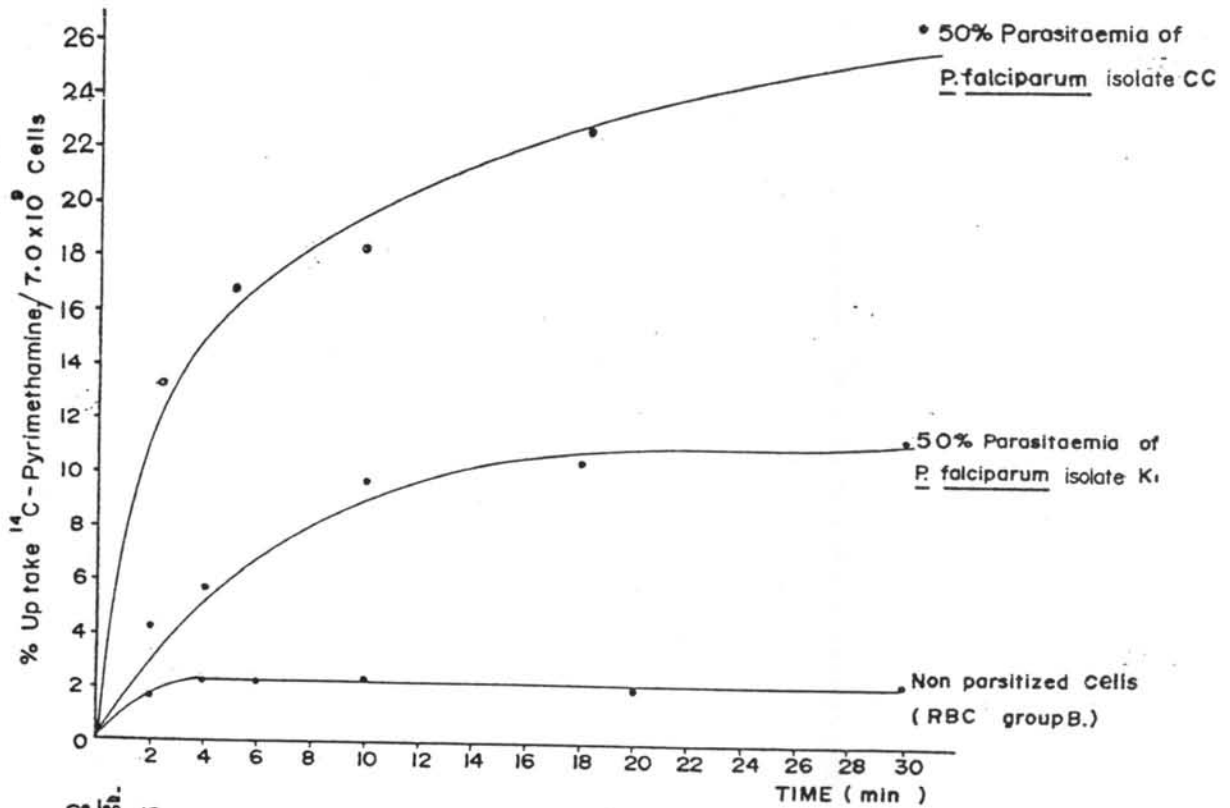
### 3.10 กราฟมาตรฐานของอัลบูมินที่ละลายในสารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ และในสารละลาย 1% ไตรตอนเอกซ์ - 100

จากการเปรียบเทียบเส้นกราฟมาตรฐานของอัลบูมิน (ในรูปที่ 20) แสดงให้เห็นว่ากราฟมาตรฐานของอัลบูมินใน 100 มิลลิโมลาร์ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ จะมีค่าของการดูดแสงได้สูงกว่ากราฟมาตรฐานของอัลบูมิน ในสารละลาย 1% ไตรตอนเอกซ์ - 100 ที่ความ



รูปที่ 17

กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงของระดับ  $^{14}\text{C}$ -Pyrimethamine ในเม็ดเลือดแดง ที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ *P. falciparum* เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อลมบูรณ์ ที่มี  $^{14}\text{C}$ -Pyrimethamine ความเข้มข้น  $10^{-4}$  โมลาร์ แล้วล้าง 3 ครั้งด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดา นำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อลมบูรณ์ แล้วนับปริมาณกัมมันตรังสีที่เหลืออยู่ในเซลล์ หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 12 และ 24 ชั่วโมง.



รูปที่ 18

เปรียบเทียบการนำเข้าของ  $^{14}\text{C}$ -Pyrimethamine ความเข้มข้น  $10^{-5}$  โมลาร์  
 ในเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ *P. falciparum* ตามวิธี 2.13 ในช่วง -  
 ระยะเวลาต่าง ๆ แล้วนำไปนับปริมาณกัมมันตรังสี ที่ถูกนำเข้าสู่เซลล์โดยเครื่องมือ  
 Packard Tri-carb Liquid Scintillation Counter Model BPL ตามวิธี 2.12 .

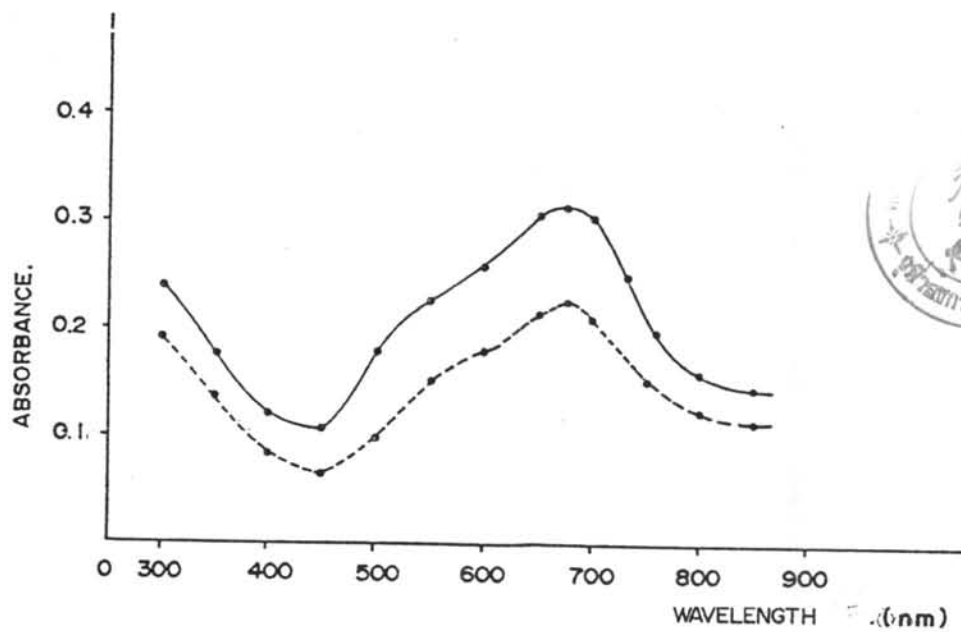
เข้มข้นเดียวกัน แต่อัลบูมินในสารละลายทั้ง 2 ชนิดที่นำมาใช้หาโปรตีนตามวิธีของ Lowry (ข้อ 2.17.4) จะมึรูปแบบของการดูดแสงที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ เหมือนกัน (รูปที่ 19)

### 3.11 คุณสมบัติของไดไฮโดรโฟเลต

ไดไฮโดรโฟเลต ซึ่งเตรียมได้ตามวิธี 2.15.1 และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส และก่อนนำมาใช้ทุกครั้งต้องทดสอบคุณสมบัติของไดไฮโดรโฟเลตเสียก่อน โดยเปรียบเทียบสเปกตรัมของการดูดแสง (absorbtion spectra) ของไดไฮโดรโฟเลต ซึ่งละลายใน 0.1 โมลาร์ โปรแตสเซียม ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 หรือ สารละลาย 0.01 โมลาร์โซเดียมไฮดรอกไซด์ จะดูดแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 282 นาโนเมตร ตามรูปที่ 21

### 3.12 แอกติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสในพลาสมาโมเดียม ฟาลซีปาร์รัม

จากการเพาะเลี้ยงพลาสมาโมเดียม ฟาลซีปาร์รัมให้ได้จำนวนพาราไซต์ในเลือดประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ในระยะต่าง ๆ แล้วนำมาสกัดเอนไซม์ตามวิธี 2.14 จะพบว่าหลังจากทำลายเม็ดเลือดแดงด้วยสารละลาย 0.15% แชนโปนิน และย้อมดูด้วยสีเซียมซา จะคงเหลือแต่เซลล์ของพลาสมาโมเดียม ซึ่งลักษณะเซลล์ (รูปที่ 23) จะเหมือนเซลล์ปกติที่ยังไม่ถูกทำลายด้วยสารละลาย 0.15% แชนโปนิน (รูปที่ 22) และเมื่อสกัดเอาเอนไซม์ออกมาด้วยสารละลาย 1% ไตรตอนเอกซ์ - 100 นำไปวัดเอนไซม์แอกติวิตีตามวิธี 2.15.4 ผลปรากฏว่าพลาสมาโมเดียม ฟาลซีปาร์รัมไอโซเลท  $K_1$  ซึ่งเป็นไอโซเลทที่ต้านยาสูงสุดที่  $10^{-5}$  โมลาร์ จะมีค่าเฉลี่ยของเอนไซม์แอกติวิตีจำเพาะ (specific activity) สูงที่สุด คือ 10.22 ไมโครโมล/นาที่/มิลลิกรัมโปรตีนที่ 37 องศาเซลเซียส (0.07 - 0.43) ขณะที่พลาสมาโมเดียม ฟาลซีปาร์รัมไอโซเลท CC ซึ่งต้านยาสูงสุดที่ความเข้มข้น  $10^{-8}$  โมลาร์จะมีค่าเฉลี่ยของเอนไซม์แอกติวิตีเท่ากับ 0.027 ไมโครโมล/นาที่/มิลลิกรัมโปรตีนที่ 37 องศาเซลเซียส (0.02 - 0.032) และพลาสมาโมเดียม ฟาลซีปาร์รัมไอโซเลท  $G_{112}$  ซึ่งเป็นไอโซเลทที่ไวต่อยาที่สุดคือจะต้านยาสูงสุดที่ความเข้มข้น  $10^{-10}$  โมลาร์เท่านั้น มีเอนไซม์แอกติวิตี 0.008 ไมโครโมล/นาที่/มิลลิกรัมโปรตีนที่ 37 องศาเซลเซียส บางครั้งวัดไม่พบแอกติวิตีของเอนไซม์ในพลาสมาโมเดียม ฟาลซีปาร์รัมไอโซเลท  $G_{112}$  นี้เลย ดังแสดงในตารางที่ 1



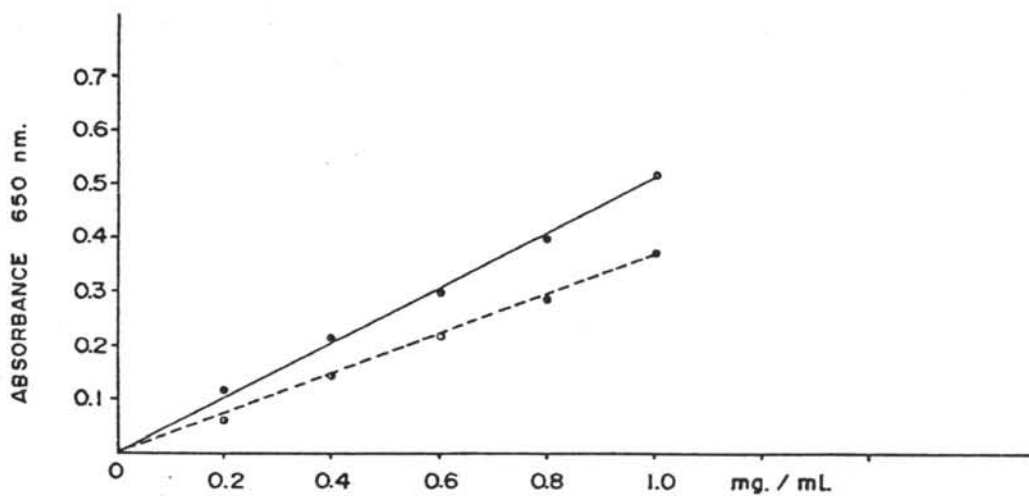
รูปที่ 19

เปรียบเทียบการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ ของอัลบูมิน

ที่ความเข้มข้น 6 มิลลิกรัม ต่อ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร.

—●— ในสารละลาย 100 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl buffer pH 7.5

- - -●- - ในสารละลาย 1% triton x - 100



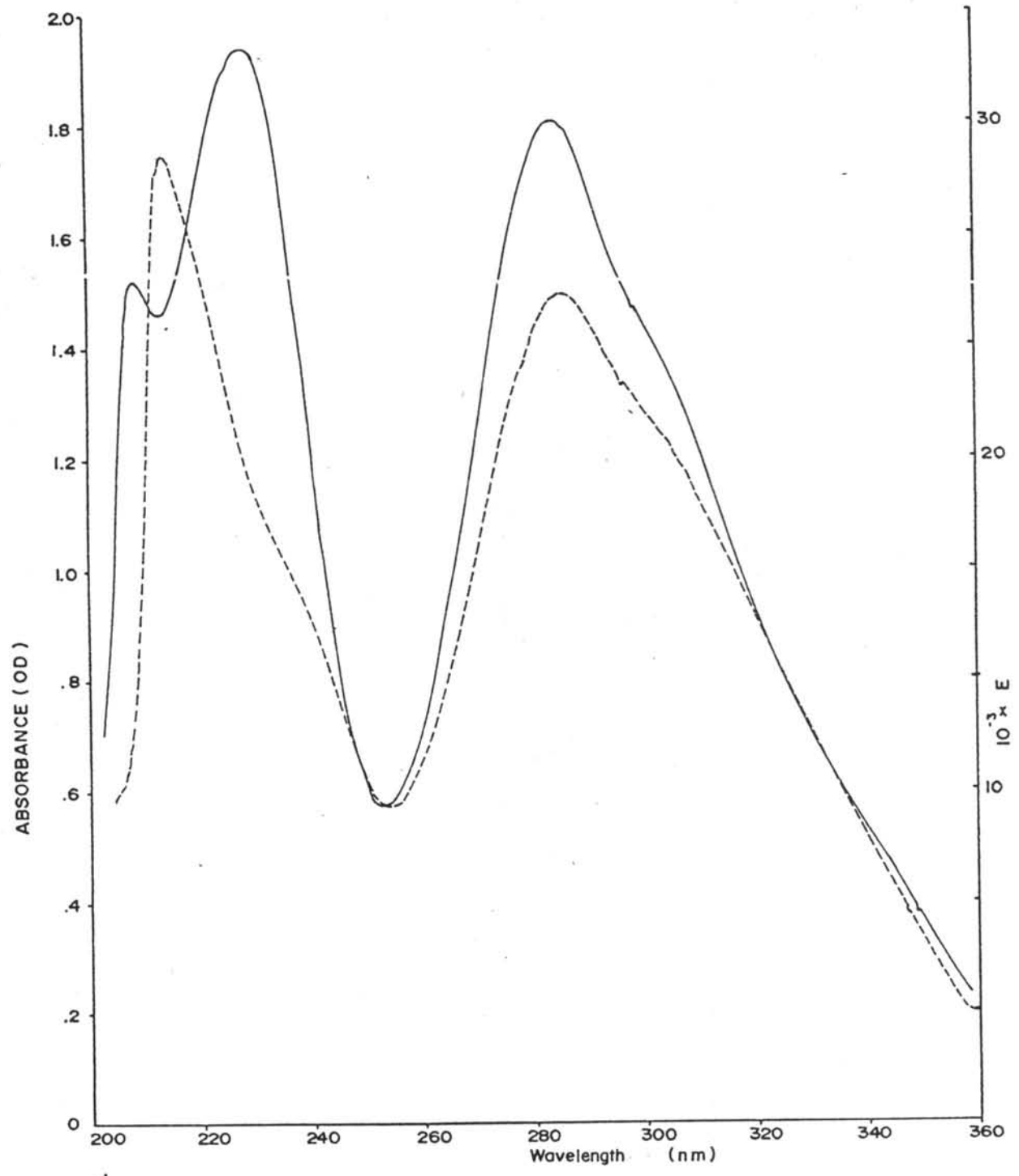
รูปที่ 20

เปรียบเทียบกราฟมาตรฐานของอัลบูมิน โดยวิธีของ Lowry

—●— ในสารละลาย 100 มิลลิโมลาร์ Tris-HCL buffer pH 7.5

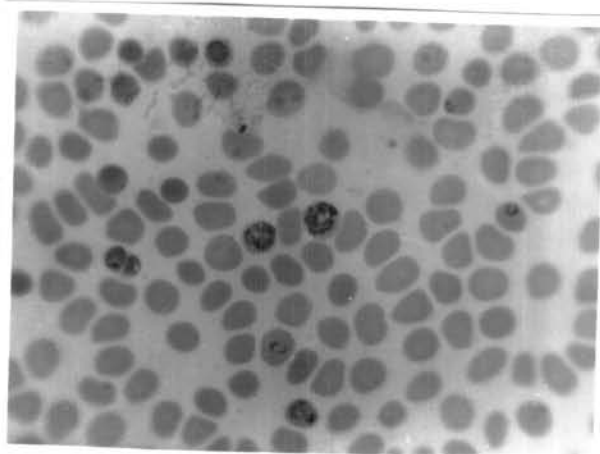
- - -○- - ในสารละลาย 1% triton x-100.



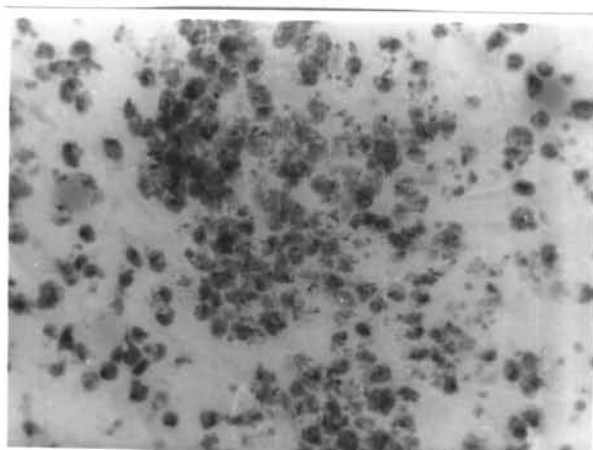


รูปที่ 2.1

Absorbance spectra ของสารละลายไดไฮโดรฟิเลต ในสารละลาย 0.01 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (---) และ 0.1 โมลาร์ โปแตสเซียม-ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.0 (—)



รูปที่ 22 ภาพแสดงระยะต่าง ๆ ของการเจริญของพลาสมอดิเทียม ฟาลซีปารัม ไอโซเลท  $K_1$  เมื่อย้อมด้วยสีเสียมปลา (กำลังขยาย 10 x 100)



รูปที่ 23 ภาพแสดงพลาสมอดิเทียม ฟาลซีปารัม ไอโซเลท  $K_1$  หลังจากทำปฏิกิริยากับสารละลาย 0.15% แคลโปดิม ตามวิธี 2.11 (กำลังขยาย 10 x 100)

ตารางที่ 1.

แอกติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส ใน *P. falciparum*.

ไอโซเลท  $K_1$ , CC และ G<sub>112</sub> ซึ่งมีความไวต่อยา ไพริเมตามีนต่างกัน

ISOLATE OF P. FALCIPARUM.	DEGREE OF PYRIMETHA- -MINE RESISTANCE ( $\mu$ ).	SPECIFIC ACTIVITY ( $\mu$ MOL MIN <sup>-1</sup> /MG.PROT.- 37° C.)
$K_1$	$10^{-5}$	0.22 (0.07-0.43)
CC	$10^{-8}$	0.027 (0.02-0.032)
G 112	$10^{-10}$	0.008 (0.006-0.009)

ASSAY PROTOCOL (incubation volume 1 millilitre)

- Tris-HCL Buffer pH 7.5 100 m $\mu$
- KCL 150 m $\mu$
- 2-Mercaptoethanol 1 m $\mu$
- NADPH 0.10 m $\mu$
- Dihydrofolate 0.05 m $\mu$

3.13 แอกติวิตีของเอนไซม์โตไฮโดรโฟเลต ไรด์กเตล ในระยะการเจริญต่าง ๆ ของพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม

การทดลองได้เลือกระยะต่าง ๆ ของพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมไอโซเลท  $K_1$ , CC และ  $G_{112}$  โดยการทำให้โครโมโซมของเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยสารละลาย 5% D-sorbital ตามวิธีข้อ 2.9 ลักัดเอนไซม์ในแต่ละระยะมาวัดแอกติวิตีตามวิธี 2.14 และ 2.15 ตามลำดับ พบว่า พลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม ทั้ง 3 ไอโซเลท ที่ประกอบด้วยเซลล์ในระยะแรก ๆ เป็นส่วนใหญ่ เช่น ระยะวงแหวน และโทรโฟซอยท์ระยะต้น (early trophozoite) จะมีแอกติวิตีของเอนไซม์ โตไฮโดรโฟเลต ไรด์กเตล ต่ำกว่าระยะที่มีโทรโฟซอยท์ระยะปลาย และไซซอนท์เป็นส่วนใหญ่ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2, 3, 4

3.14 ปริมาณของโปรตีนในแต่ละระยะการเจริญของพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมไอโซเลท  $K_1$

จากผลการทดลองในตารางที่ 2 แสดงให้เห็นว่า ค่าแอกติวิตีจำเพาะของเอนไซม์โตไฮโดรโฟเลต ไรด์กเตล จะแตกต่างกันในแต่ละระยะการเจริญของพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมไอโซเลท  $K_1$  ดังนั้นเพื่อจะพิสูจน์ว่าแอกติวิตีจำเพาะของเอนไซม์เพิ่มขึ้นในระยะที่มีการเจริญเต็มที่จริง มิใช่เพิ่มขึ้นเนื่องจากจำนวนโปรตีนชนิดอื่นที่เปลี่ยนแปลงไป จึงได้ทำการทดลองโดยเลือกระยะการเจริญต่าง ๆ ของพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมไอโซเลท  $K_1$  จากการขึ้นโครโมโซม (ตามวิธีข้อ 2.9) แล้วลักัดแยกเอนไซม์ตามวิธี 2.14 วัดเอนไซม์แอกติวิตีตามวิธี 2.15 พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณโปรตีน แอกติวิตีของเอนไซม์ โตไฮโดรโฟเลต ไรด์กเตลก็เพิ่มขึ้นด้วย และที่ความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากัน ระยะการเจริญซึ่งเป็นระยะวงแหวนเป็นส่วนใหญ่ จะมีแอกติวิตีของเอนไซม์ต่ำกว่าระยะการเจริญเป็นระยะโทรโฟซอยท์และระยะไซซอนท์เป็นส่วนใหญ่ตามลำดับ (รูปที่ 24)

เมื่อเทียบระยะการเจริญของพลาสโมเดียม กับปริมาณของโปรตีน พบว่าถ้าเป็นระยะไซซอนท์และโทรโฟซอยท์ระยะปลาย จะมีปริมาณของโปรตีนมากกว่าระยะวงแหวนและโทรโฟซอยท์ระยะต้น (ดังแสดงในตารางที่ 5) และมีแอกติวิตีจำเพาะสูงชันเช่นกัน

ตารางที่ 2. แอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส ที่ระยะการเจริญต่างๆ ของ *P. falciparum* ไอโซเลต K<sub>1</sub>

% Rings	Parasites / 10 <sup>4</sup> RBC				Specific activity ( $\mu$ mol min./mg. protein 37°C.)
	% Early Trophozoites.	% Late Trophozoites.	% Schizonts.	% Gametocytes	
100	—	—	—	—	0.07
93	7	—	—	—	0.08
17	36	45	2	—	0.13
59	26	4	6	5	0.15
83	8	7	2	—	0.16
24	36	22	11	7	0.176
2	30	56	12	—	0.19
16	20	50	14	—	0.24
15	8	23	54	—	0.30
17	4	26	52	1	0.38
15	14	24	47	—	0.37
21	11	14	54	—	0.43

Assay protocol (incubation volume 1 millilitre.)

Tris-HCL Buffer pH 7.5 100 mM

KCL 150 mM

2- Mercaptoethanol 1 mM

NADPH 0.10 mM

Dihydrofolate 0.05 mM

ตารางที่ 3. \* แอคติวิตีของแอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส ที่ระยะการเจริญต่าง ๆ ของ *P. falciparum* ไอโซเลท CC.

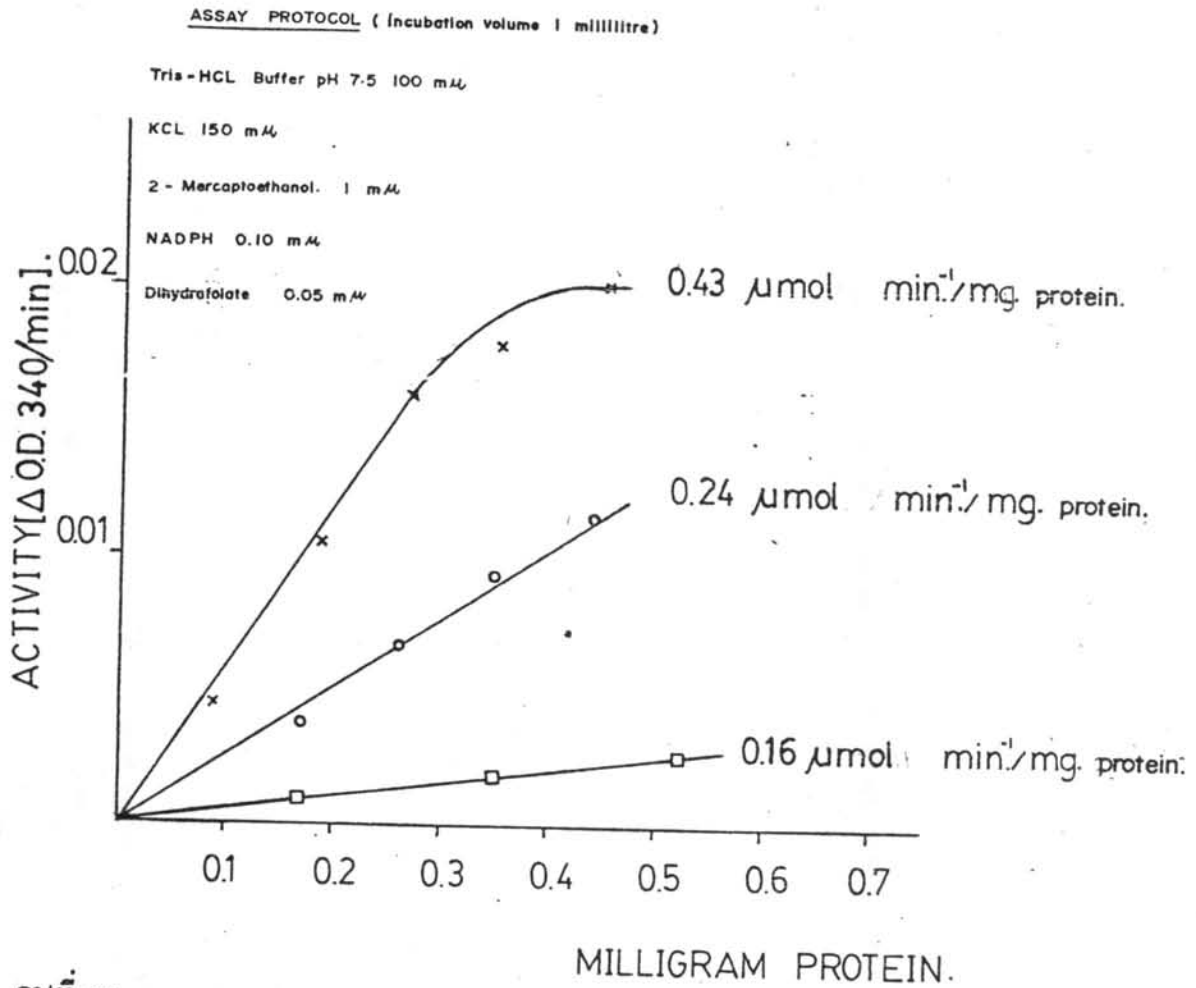
Parasites / $10^4$ RBC					Specific activity ( $\mu\text{mol min}^{-1} / \text{mg}$ protein $37^\circ\text{C}.$ )
% Rings	% Early Trophozoites	% Late Trophozoites	% Schizonts	% Gametocytes.	
32	38	30	—	—	0.020
10	36	61	3	—	0.029
24	17	33	25	1	0.031
10	6	41	41	2	0.032
3	10	29	57	1	0.032

\* Assay Protocol เช่นเดียวกับตารางที่ 2.

ตารางที่ 4 \* แอคติวิตีของแอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส ที่ระยะการเจริญต่าง ๆ  
ของ *P. falciparum* ไส้เซลล์ G<sub>112</sub>

Parasites / 10 <sup>4</sup> RBC					Specific activity ( $\mu$ mol min <sup>-1</sup> / mg protein 37°C)
% Rings	% Early Trophozoites	% Late Trophozoites	% Schizonts.	% Game- tocytes	
30	21	31	17	1	0.0060
28	25	26	21	—	0.0063
20	2	46	32	—	0.0075
2	22	30	44	2	0.0080
5	4	39	51	1	0.0090

\* Assay Protocol เช่นเดียวกับตารางที่ 2.



รูปที่ 24.

แอกติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสต่อความเข้มข้นของโปรตีน  
ในระยะเวลาเจริญต่างๆ ของ *P. falciparum* ไซโซเลท K<sub>1</sub>

□ — □ — □	83 % Rings.
	8 % Early Trophozoites.
	7 % Late Trophozoites.
	2 % Schizonts.
○ — ○ — ○	16 % Rings.
	20 % Early Trophozoites.
	50 % Late Trophozoites.
	14 % Schizonts.
x — x — x	21 % Rings.
	11 % Early Trophozoites.
	14 % Late Trophozoites.
	54 % Schizonts.



ตารางที่ 5.

แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ปริมาณโปรตีนและแอกติวิตี้ของเอนไซม์

ไดไฮโดรโฟเลต จีดีทีแอลที่แตกต่างกันในแต่ละระยะการเจริญของ P. falciparum

ไฮโซเลขท K<sub>1</sub>

Rings.	Total cell of Parasites ( $\times 10^6$ )			Protein concentra- tion. <sup>6</sup> ( $\mu\text{g}/10$ cell para- -sites.)	Sp. Activity ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}/\text{mg} -$ protein. 37 °C.)
	Early Trophozoites	Late Trophozoites.	Schizonts.		
93	7	—	—	0.45	0.08
3	30	66	1	0.63	0.18
17	4	26	53	0.72	0.38

3.15  $K_m$  ต่อสับสเตรทไดไฮโดรโฟเลต ในแต่ละระยะการเจริญของพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม  
ไอโซเลท  $K_1$

แอกติวิตีของ เอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส แตกต่างกันในแต่ละระยะการเจริญของพลาสโมเดียม ซึ่งเป็นที่น่าสนใจว่า เอนไซม์นี้ในแต่ละระยะการเจริญจะมีแอฟฟินิตี (affinity) ต่อสับสเตรทไดไฮโดรโฟเลตแตกต่างกันหรือไม่

การทดลองโดยเพาะเลี้ยงพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมไอโซเลท  $K_1$  ตามวิธี 2.9 แล้วสกัดเอนไซม์ (ตามวิธี 2.14) มาวัดแอกติวิตีโดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสับสเตรทที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ความเข้มข้นของสับสเตรทวัดได้โดยเทียบจาก extinction coefficient 28,000 ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร แล้วนำไปหาค่า  $K_m$  ต่อไดไฮโดรโฟเลต โดยอาศัยการพลอตของ Lineweaver-Burk จะพบว่า  $K_m$  ใกล้เคียงกันทุก ๆ ตัวอย่างของเอนไซม์ที่สกัดจากเชื้อพลาสโมเดียม ไม่ว่าจะ เป็นระยะการเจริญใด ๆ ก็ตาม ในตารางที่ 6 แสดงให้เห็นว่าทุกครั้งที่ทำ การทดลอง ไม่ว่าจะระยะการเจริญของพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม จะเป็นระยะวางแหวน, ระยะโทรโฟซอท์ หรือระยะไซซอนท์เป็นส่วนใหญ่ จะมีค่า  $K_m$  ต่อไดไฮโดรโฟเลต ใกล้เคียงกัน

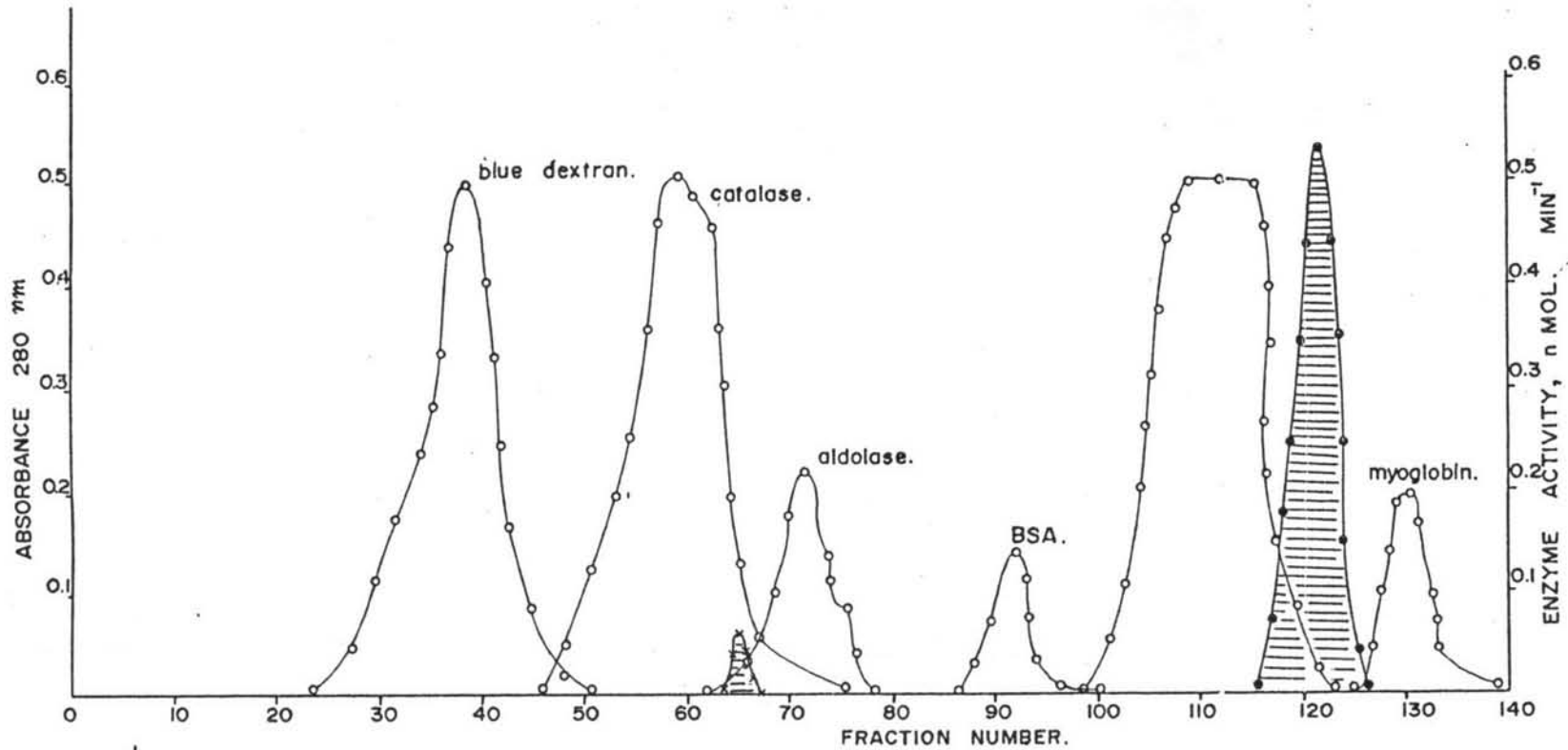
3.16 น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส

หลังจากการเตรียมเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส จากพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมไอโซเลท  $K_1$  (ตามวิธี 2.14) และ จากตับหนู (ตามวิธี 2.16) แล้วนำมาหาน้ำหนักโมเลกุลโดยผ่านสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมได้นี้ลงในคอลัมน์ เซฟาเดกซ์ G - 200 เก็บแฟรคชันที่ได้ไปหาแอกติวิตี (รูปที่ 25) แล้วเทียบกับค่า  $K_{av}$  เอนไซม์มาตรฐานที่ผ่านลงในคอลัมน์นี้เช่นกัน (รูปที่ 26) พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสในพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมไอโซเลท  $K_1$  เท่ากับ 205,000 ดาลตัน ขณะที่น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสในตับหนูเท่ากับ 21,500 เท่านี้

ตารางที่ 6.

แสดงค่า Specific activity และ  $K_m$  ของเอนไซม์โตไฮโดรโฟเลต  
 รีดักเตส ซึ่งแยกจาก *P. falciparum* ไอโซเลท  $K_1$  ที่ระยะ -  
 การเจริญต่าง ๆ เมื่อพลอตตามวิธีของ Lineweaver - Burk.

SET NUMBER	PERCENT OF GROWTH - STAGE.				SPECIFIC ACTIVITY ( $\mu\text{mol min}^{-1}$ /m.g.protein at 37°C.)	$K_m$ . ( $\mu\text{M}$ )
	RING	EARLY TROPHOZOITE	LATE TROPHOZOITE	SCHI- ZONT		
1	100	-	-	-	0.07	7.2
2	83	8	7	2	0.16	7.7
3	16	20	50	14	0.24	7.2
4	17	36	45	2	0.13	7.5
5	21	11	14	54	0.43	8.0
6	15	14	24	47	0.37	7.6



รูปที่ 25

รูปแบบของโปรตีนมาตรฐานและเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส ที่เก็บได้จากคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ G200.

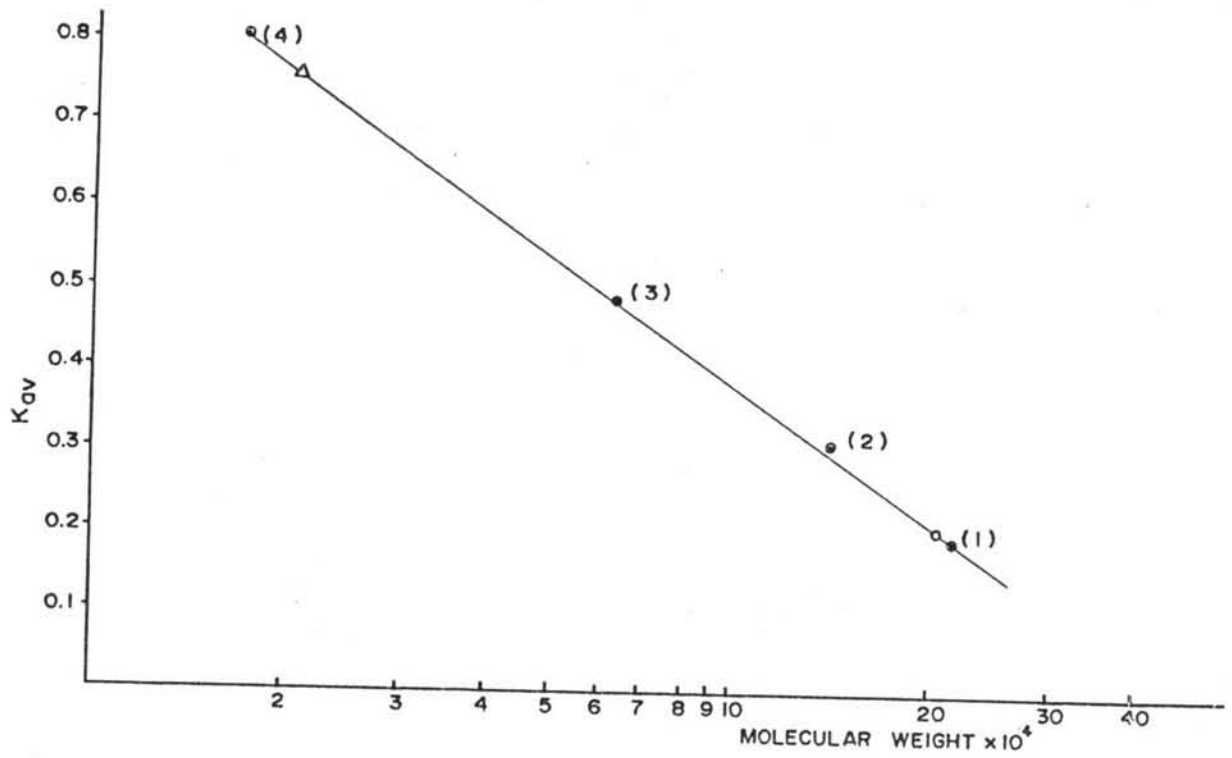
x — x — x

แอกติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส ที่แยกได้จาก *P. falciparum*

ไอโซเลท K<sub>1</sub> เตรียมโดยวิธี 2.14

● — ● — ●

แอกติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส ที่แยกได้จากตับหนู เตรียมโดยวิธี 2.16



รูปที่ 26

แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง  $K_{av}$  ของโปรตีนมาตรฐานและ  $\log$  ของน.น.โมเลกุล (●). 1=Catalase(240,000);

2=aldolase (158,000); 3= bovine serum albumin (67,000); 4= myoglobin (16,900);

ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส จาก P. falciparum ไอโซเลท K<sub>1</sub> (○); ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส จากคัปปู(Δ);

โปรตีนมาตรฐานทุกชนิดที่ใช้มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร ปริมาตร 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร.

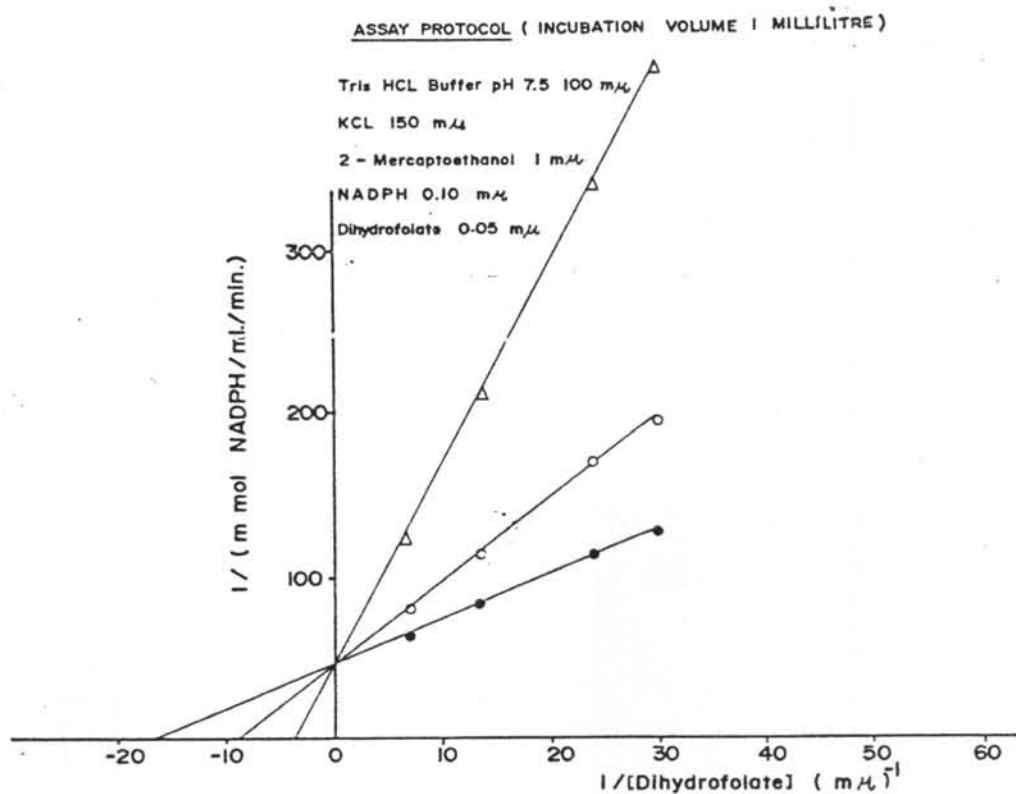
3.17  $K_1$  ต่อไพริเมธาซีนและเมโรเทรเซทของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสไอโซเลท  
 $K_1$  และในตับหนู

จากการเปรียบเทียบการยับยั้งของไพริเมธาซีนและเมโรเทรเซทต่อเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส ในพลาสมาโมเตียม ฟาลซีปาร์มไอโซเลท  $K_1$  และในตับหนู โดยการเตรียมเอนไซม์และวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ตามวิธี 2.15 และใส่ตัวยับยั้งคือ ไพริเมธาซีนและเมโรเทรเซท ที่ความเข้มข้น  $10^{-8}$  โมลาร์ สำหรับพลาสมาโมเตียม ฟาลซีปาร์มไอโซเลท  $K_1$  และความเข้มข้น  $10^{-7}$  โมลาร์ สำหรับตับหนู นำไปหาค่า  $K_1$  โดยอาศัยวิธีพลอตของ Lineweaver - Burk (รูปที่ 27, 28) พบว่า  $K_1$  ต่อไพริเมธาซีนของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสในพลาสมาโมเตียม ฟาลซีปาร์มไอโซเลท  $K_1$  และในตับหนูเท่ากับ 22.5 และ 200 นาโนโมลาร์ ตามลำดับ ขณะที่  $K_1$  ต่อเมโรเทรเซทของเอนไซม์นี้เท่ากับ 4.4 นาโนโมลาร์ และ 76 นาโนโมลาร์

3.18 ค่า 50% Inhibition ของไพริเมธาซีนต่อเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส

เอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสที่เตรียมได้จากพลาสมาโมเตียม ฟาลซีปาร์มไอโซเลท และจากตับหนู นำมาเจือจางให้มีแอกติวิตีเท่ากัน จากนั้นทดสอบแอกติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส ที่ถูกยับยั้งด้วยไพริเมธาซีนความเข้มข้นต่าง ๆ เอนไซม์ ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส ในพลาสมาโมเตียม ฟาลซีปาร์มไอโซเลท  $K_1$  จะมีแอกติวิตีลดลง 50% ที่ความเข้มข้นของไพริเมธาซีนเท่ากับ  $7.5 \times 10^9$  โมลาร์ ขณะที่แอกติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส ในตับหนูลดลง 50% ที่ความเข้มข้นไพริเมธาซีนเท่ากับ  $10^{-7}$  โมลาร์

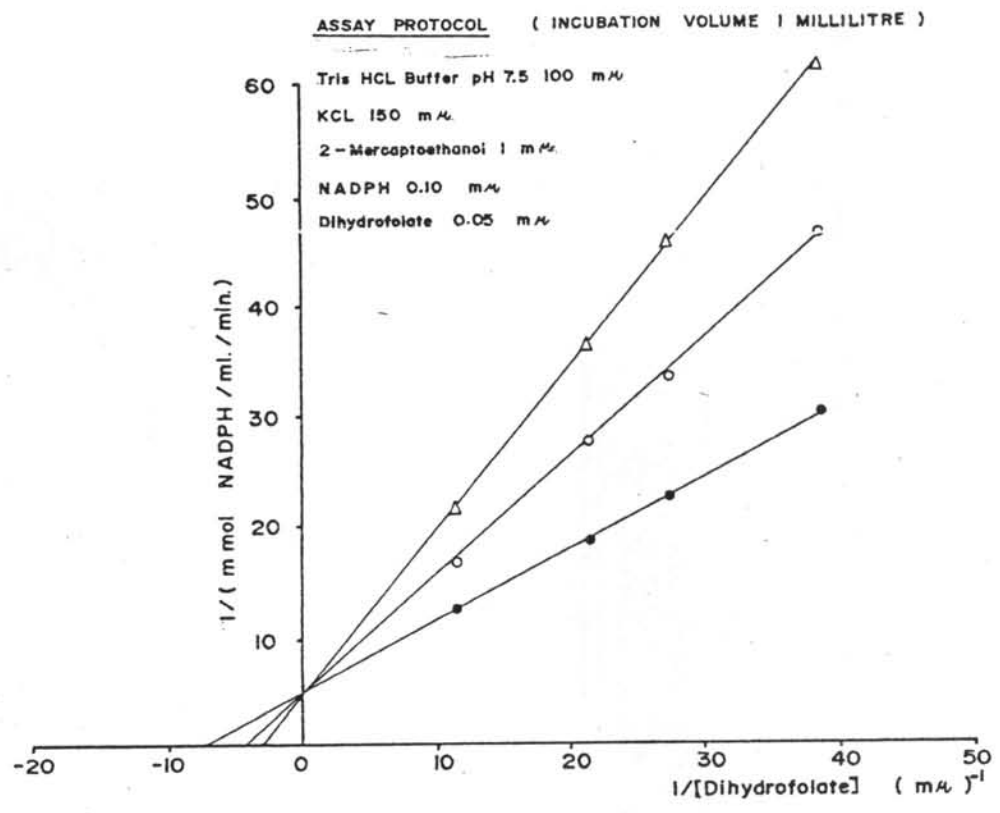
สำหรับในตารางที่ 7 เป็นการสรุปเปรียบเทียบค่า  $K_m$ ,  $K_1$  และคุณสมบัติบางประการระหว่างเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส ในพลาสมาโมเตียม ฟาลซีปาร์มไอโซเลท  $K_1$  และในตับหนู



รูปที่ 27.

กราฟแสดงการหาค่า  $K_i$  ของเฮนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส ใน *P. falciparum* ใช้วิธี Lineweaver-Burk (เตรียมโดยวิธี 2.14) ต่อไพริเมธามีน และ เมโธเทรเซท.

- — ● — ● เมื่อไม่มีไพริเมธามีน และ เมโธเทรเซท.
- — ○ — ○ ไพริเมธามีน  $10^{-8}$  โมลาร์
- △ — △ — △ เมโธเทรเซท  $10^{-8}$  โมลาร์



รูปที่ 28

กราฟแสดงการหาค่า  $K_i$  ของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส

ในต้นหนู (เตรียมโดยวิธี 2.1.6) ต่อไพริเมธามีน และ เมโธเทรเซท

- — ● — ●      เมื่อไม่มี ไพริเมธามีน และ เมโธเทรเซท
- — ○ — ○      ไพริเมธามีน  $10^{-7}$  โมลาร์
- △ — △ — △      เมโธเทรเซท  $10^{-7}$  โมลาร์



ASSAY PROTOCOL (incubation volume 1 millilitre)

Tris HCL Buffer pH 7.5 100 mM

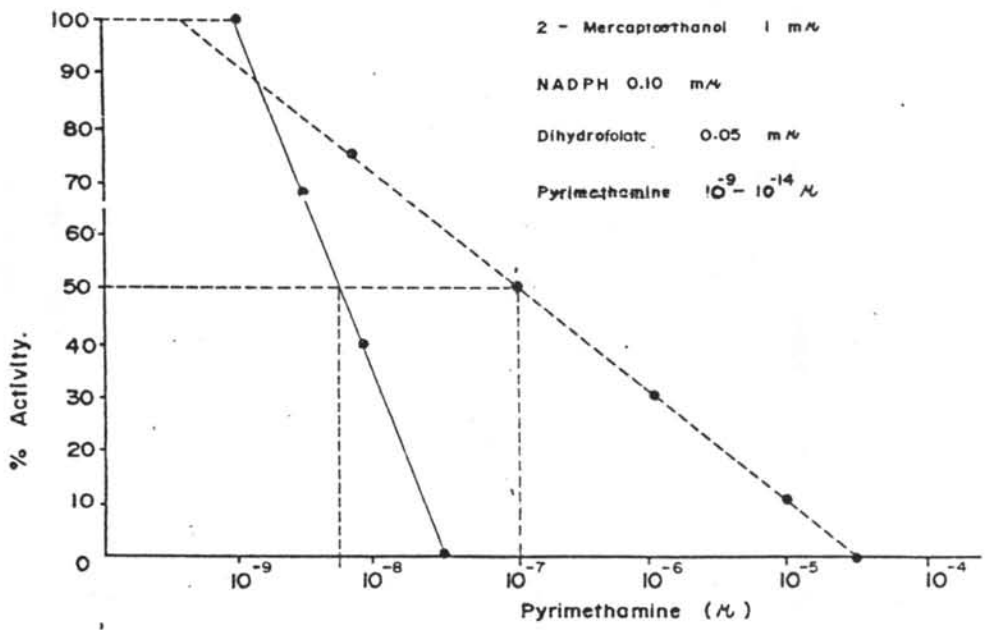
KCL 150 mM

2 - Mercaptoethanol 1 mM

NADPH 0.10 mM

Dihydrofolate 0.05 mM

Pyrimethamine  $10^{-9}$  -  $10^{-14}$   $\mu$



รูปที่ 29

กราฟแสดงการหาค่า 50% Inhibition ของไพริเมธามีน ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส

● — ● % แอคติวิตี ของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส ใน *P. falciparum* ไลโซเลท K<sub>i</sub> (เตรียมได้โดยวิธี 2.14)

● - - - ● % แอคติวิตี ของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส ใน ดับหนู (เตรียมได้โดยวิธี 2.16)

ตารางที่ ๗.

เปรียบเทียบค่าคงที่ทางจลศาสตร์ ( Kinetic Constant ) และคุณสมบัติ

บางประการของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต      รัติกเดลใน P. falciparum

ไอโซเลท K<sub>i</sub> และตับหนู

Enzyme Source	K <sub>m</sub> of DHF ( $\mu M$ )	K <sub>i</sub> of Pyrimethamine ( nM )	K <sub>i</sub> of Methotrexate ( nM )	50% inhibition of Pyrimethamine	Inhibition type of Pyrimethamine & Methotrexate	Molecular Weight ( daltons )
P. falciparum Isolate K <sub>i</sub>	7.6	22.5	4.4	$7.5 \times 10^{-9}$	Competitive	205,000
Rat Liver	16	200	75	$10^{-7}$	Competitive	21,500