บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลองและสรุปผลการวิจัย

การเพาะเลี้ยงพลาสโมเดียม ฟาลซิปารัม ในจานทดลองแบบต่อเนื่องตามวิธีของ Trager และ Jensen (1976) สิ่งที่สำคัญและจำเป็นมากคือเม็ดเลือดแดงและซีรัมที่ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI *1640* ควรเป็นกรุปเดียวกัน เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนที่ผิวเม็ดเลือดแดงและแอนติบอดีในซีรัม สำหรับการวิจัยครั้งนี้ใช้เลือดกรุปบีเพราะเป็นชนิดที่หาจากผู้บริจาคได้ค่อนข้างง่าย แม้เลือดกรุปบีจะมีในคนเปอร์เซนต์ไม่สูงเท่าเลือดกรุปโอ แต่เพื่อขจัดปัญหาที่ว่าเลือดกรุปโอนั้นในซีรัมจะประกอบด้วยแอนตีเอและบี (anti A, B) สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนเอหรือบีได้ทั้งสิ้น หากตัวอย่างเลือดที่ได้รับมาเป็นเม็ดเลือดแดงกรุปใด ยกเว้นกรุปโอ จะต้องเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนแอนติบอดีในทางใดทางหนึ่ง

เมื่อใช้เม็ดเลือดแดงกรุปบีเพาะเลี้ยงพลาสโมเดียม ฟาลซิปารัมแบบต่อเนื่อง โดยเปลี่ยนเม็ดเลือดแดงจากตัวอย่างเลือดเดิมเป็นเม็ดเลือดแดงกรุปบี แต่คงซีรัมของกรุปเดิมไว้แล้วจึงค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นซีรัมกรุปบีกับอีกวิธีหนึ่งทำได้โดยเปลี่ยนเม็ดเลือดแดงและซีรัมเป็นกรุปบีทันที พบว่ารูปแบบของการเจริญจะเหมือนกับการเจริญในเม็ดเลือดแดงกรุปเดิม แสดงว่าวิธีการเปลี่ยนเม็ดเลือดแดงเป็นกรุปบีทั้งสองวิธี สามารถใช้ในการเปลี่ยนสภาวะการเพาะเลี้ยงพลาสโมเดียม ฟาลซิปารัมจากสภาวะเดิมมาเป็นสภาวะที่จะใช้ในการทดลองซึ่งมีเม็ดเลือดแดงและและซีรัมกรุปบีได้

ในแต่ละวงชีพของการเจริญในระยะไร้เพศ (48 ชั่วโมง) ของพลาสโมเดียม ฟาลซิปารัม เมื่อเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องไปนาน ๆ จะพบการเจริญระยะวงแหวน, โทรโฟซอยท์และไซซอนท์ผสมกัน ซึ่งในบางการทดลองจำเป็นต้องใช้พลาสโมเดียม ฟาลซิปารัม ซึ่งมีการเจริญอยู่ในระยะใดระยะหนึ่งเป็นส่วนใหญ่ จึงต้องใช้เทคนิคของซินโครไนเซชันเข้ามาช่วย โดยให้พลาสโมเดียมซึ่งมีระยะการเจริญผสมกันหลายระยะทำปฏิกิริยากับสารละลาย 5% D-sorbitol (ออสโมลาริตี 287 มิลลิออสโมล/กิโลกรัม) สารละลายนี้จะทำลายเม็ดเลือด

แดงที่ติดเชื้อพลาสโมเดียมในระยะโทรโฟซอยท์ระยะปลายและไซซอนท์ ผลทำให้เหลือเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อพลาสโมเดียมระยะวงแหวนเป็นส่วนใหญ่ เมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปพลาสโมเดียม ฟาลซิปารัมจะเปลี่ยนเป็นระยะการเจริญต่าง ๆ โดยมีรูปแบบที่แน่นอนในช่วงเวลาต่าง ๆ ทำให้เราสามารถเลือกระยะการเจริญของพลาสโมเดียมที่ต้องการเพื่อใช้ในการศึกษาและวิจัยได้ ในการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีอิมมูโนวิทยาและสรีรวิทยาของพลาสโมเดียม ฟาลซิปารัม บางครั้งจำเป็นต้องใช้ระยะการเจริญระยะใดระยะหนึ่งโดยเฉพาะ ก็สามารถทำได้โดยการซินโครไนเซชันอีกครั้งหนึ่ง หลังจากครั้งแรก 34 ชั่วโมง วิธีนี้บางครั้งอาจจะได้ระยะการเจริญเริ่มต้นเป็นระยะวงแหวนทั้งหมด แต่อย่างไรก็ตามพลาสโมเดียม ฟาลซิปารัม ไอโซเลทต่าง ๆ ที่นำมาทดลอง ไม่ได้เจริญมาจากโคลน (clone) เดียวกัน อายุการเจริญ (aging) ของพลาสโมเดียมจึงไม่เท่ากันในแต่ละระยะการเจริญ ดังนั้นเมื่อเพาะเลี้ยงไปนานระยะเวลาหนึ่งจะพบว่าระยะการเจริญต่าง ๆ จะกลับมาเกิดร่วมกันอีก ในการศึกษาและวิจัยที่ต้องการระยะการเจริญระยะใดระยะหนึ่งโดยเฉพาะ จึงควรทำหลังจากการซินโครไนเซชันแล้วไม่เกิน 48 ชั่วโมง นอกจากนี้สภาวะการเพาะเลี้ยงอย่างอื่นและชนิดของไอโซเลท อาจมีผลกระทบต่อระยะการเจริญของพลาสโมเดียมได้ด้วย (Lambros และ Vanderberg, 1979)

คุณสมบัติที่สำคัญของพลาสโมเดียม ฟาลซิปารัมที่ใช้ทดสอบความไวของยาข้อหนึ่งคือ จะต้องมีลักษณะที่ดี สังเกตได้จากเมื่อใช้เทคนิคฟิล์มบางและย้อมด้วยสีเจียมซ่า ส่องดูด้วยกล้องจุลทัศน์ จะเห็นนิวเคลียสติดสีม่วงแดง ไซโตพลาสมติดสีน้ำเงินชัดเจนปลอดจากเชื้อแบคทีเรียและรา ซึ่งทำได้โดยเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ต้องเปลี่ยนอาหารทุกวันและเติมเม็ดเลือดแดงใหม่อย่างน้อยทุก ๆ 1 วงชีพ เมื่อทำการทดสอบความไวของยาต่อเชื้อพลาสโมเดียม 3 ไอโซเลท ได้ผลว่าไอโซเลท K_1 จัดเป็นไอโซเลทที่ต้านไพริเมธามีนสูงสุดที่ความเข้มข้น 10^{-5} โมลาร์ ขณะที่ไอโซเลท CC และ G_{112} ต้านไพริเมธามีนสูงสุดที่ความเข้มข้น 10^{-8} และ 10^{-10} โมลาร์ ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานของ Thaithong และ Beale (1980) พลาสโมเดียมทั้ง 3 ไอโซเลท นี้จะใช้เป็นแม่แบบ (model) ของการศึกษาการต้านไพริเมธามีนขั้นต่อไป

จากผลการทดสอบความไวต่อไพริเมธามีนของพลาสโมเดียม ฟาลซิปารัม ทั้ง 3 ไอโซเลท จะพบลักษณะที่ผิดปกติของพลาสโมเดียมที่ไวต่อยาในความเข้มข้นนั้น ๆ เฉพาะระยะการ

เจริญเมื่อเข้าสู่โทรโฟซอยท์ระยะปลายและไซซอนท์ทั้งสิ้น เมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทัศน์กำลังขยาย 10 x 100 สังเกตไม่เห็นความผิดปกติของพลาสโมเดียม ฟาลซิปารัม ในระยะการเจริญที่เป็นระยะวงแหวนหรือโทรโฟซอนท์ระยะต้น (early trophozoite) เลย Pratt (1973) ได้เสนอว่าไพริเมธามีนอาจจะไปออกฤทธิ์ทำลายพลาสโมเดียม ฟาลซิปารัมเฉพาะระยะไซซอนท์และระยะที่อยู่นอกเม็ดเลือดแดงเท่านั้น

เมื่อศึกษาการนำเข้าของไพริเมธามีนในแต่ละระยะการเจริญ เริ่มด้วยการทดลองเพื่อศึกษาผลกระทบของไพริเมธามีนที่ความเข้มข้น 10^{-4} โมลาร์ (lethal dose) ต่อระยะการเจริญของพลาสโมเดียม โดยใช้พลาสโมเดียมซึ่งได้จากการทำซินโครไนเซชัน 2 ครั้ง มาทดสอบความไวต่อไพริเมธามีนที่ระยะเวลา 0, 24, 36 ชั่วโมง ซึ่งระยะการเจริญส่วนใหญ่ตรงกับระยะวงแหวน, โทรโฟซอยท์ และไซซอนท์ตามลำดับ พบว่าพลาสโมเดียมจะถูกยับยั้งการเจริญด้วยไพริเมธามีนที่ความเข้มข้น lethal dose เมื่อระยะการเจริญส่วนใหญ่เป็นระยะวงแหวน และโทรโฟซอยท์ แต่พลาสโมเดียมที่ระยะการเจริญส่วนใหญ่เป็นไซซอนท์จะยังคงเจริญต่อไปได้อย่างปกติ ถึงแม้จะพบว่าบางส่วนของพลาสโมเดียมมีรูปร่างผิดปกติก็อาจเป็นผลเนื่องจากพลาสโมเดียมที่ใช้ มีระยะการเจริญอื่นปะปนอยู่ด้วยเพราะไม่สามารถเตรียมระยะการเจริญให้เป็นไซซอนท์ทั้งหมดได้ แสดงให้เห็นว่าแต่ละระยะการเจริญของพลาสโมเดียม ฟาลซิปารัม อาจมีการนำเข้าของไพริเมธามีนต่างกัน Gutteridge และ Trigg (1970) ได้รายงานว่าการยับยั้งการสังเคราะห์ DNA, RNA และโปรตีนด้วยไพริเมธามีนจะเกิดขึ้นเฉพาะในระยะที่เป็นโทรโฟซอยท์ระยะปลายและไซซอนท์ระยะแรก โดยจะมีการนำเข้าของสารเริ่มต้น (precursor) ของการสังเคราะห์ DNA ส่วนระยะวงแหวนและโทรโฟซอยท์ระยะต้นจะไม่เกิดการยับยั้งนี้เลย

ไพริเมธามีนและเมโธเทรเซทเป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างเป็น analogue กับไดไฮโดรโฟเลตและเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส ที่เร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์เตตระไฮโดรโฟเลต (Hakala และ Suolinna, 1966) เป็นโคเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ดีออกซีไธมิไดเลต ซึ่งเป็นสารเริ่มต้นของการสังเคราะห์ DNA ดังนั้นจึงน่าสนใจว่าพลาสโมเดียม ฟาลซิปารัมไอโซเลทที่ไวและต้านไพริเมธามีน จะมีความไวต่อเมโธเทรเซทใน

รูปแบบเดียวกันหรือไม่ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า พลาสโมเดียมทั้ง 2 ไอโซเลท ซึ่งต้านต่อไพริเมธามีนจะมีความเข้มข้นต่างกันถึง 1,000 เท่า นี้จะต้านต่อเมโธเทรเซทสูงสุดที่ความเข้มข้น 10^{-9} โมลาร์เท่ากัน ถึงแม้จะพบรูปร่างที่ผิดปกติของพลาสโมเดียมซึ่งถูกยับยั้งด้วยไพริเมธามีน และเมโธเทรเซทคล้ายกัน ที่ระยะการเจริญของโทรโฟซอยท์ระยะปลาย และไซซอนท์เช่นเดียวกัน เป็นการแสดงว่าแม้สารประกอบทั้ง 2 ชนิด จะมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส เหมือนกัน แต่กลไกของการยับยั้งการเจริญโดยสารทั้ง 2 ชนิดนี้น่าจะมีธรรมชาติต่างกันอย่างสิ้นเชิง

Aikawa และ Beaudain (1968) ได้ศึกษาด้วยกล้องจุลทัศน์อิเลคตรอน พบว่าไพริเมธามีนจะเข้าไปมีผลต่อพลาสโมเดียม กาลินาเซียม (P.gallinaceum) โดยไปรบกวนในระยะเมตาเฟส (metaphase) ของไซซอนท์ เมื่อมีการแบ่งนิวเคลียส McGregor และ Smith (1952) ได้รายงานว่าเมื่อใช้ไพริเมธามีนทำการรักษาผู้ป่วย ไพริเมธามีนจะไปออกฤทธิ์ต่อพลาสโมเดียมในระยะการแบ่งโครมาติน แต่อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีรายงานการนำเข้าของไพริเมธามีนในแต่ละระยะการเจริญของพลาสโมเดียมโดยตรงเลย ในการวิจัยนี้ได้ศึกษาเปรียบเทียบการนำ ^{14}C-pyrimethamine เข้าสู่เม็ดเลือดแดงซึ่งติดเชื้อและไม่ติดเชื้อพลาสโมเดียมฟาลซิปารัม โดยใช้พลาสโมเดียม ฟาลซิปารัม ไอโซเลท K_1 และ G_{112} ในภาวะการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง เมื่อมีจำนวนพาราไซต์ในเลือด 5 เปอร์เซนต์ โดยใช้ ^{14}C-pyrimethamine ความเข้มข้น 10^{-4} โมลาร์ นาน 12 ชั่วโมง พบว่าไม่มีความแตกต่างของการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ในไอโซเลท K_1 และ G_{112} ใน 3 ชั่วโมงแรก แต่จะเริ่มมองเห็นความแตกต่างกันบ้างในชั่วโมงที่ 6 และหลังจาก 12 ชั่วโมง จะพบการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine เข้าเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อพลาสโมเดียม ไอโซเลท G_{112} สูงกว่าเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อพลาสโมเดียมไอโซเลท K_1 และเม็ดเลือดแดงปกติเล็กน้อยเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะเดียวกัน แม้การทดลองนี้จะใช้ไพริเมธามีนความเข้มข้น 10^{-4} โมลาร์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่จะมีผลยับยั้งการเจริญของพลาสโมเดียม โดยใช้เทคนิคฟิล์มบางและย้อมสีเจียมซ่า จะไม่พบรูปร่างของพลาสโมเดียมที่ผิดปกติแต่อย่างใด (ดูจากกล้องจุลทัศน์กำลังขยาย 10 x 100) อีกทั้งเปอร์เซนต์พาราไซต์ในเลือดคงที่ในช่วงเวลา 12 ชั่วโมง ที่ทำการทดลอง

ผลการทดลองการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ในเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิปารัม (จำนวนพาราไซต์ในเลือดเท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์) ที่ระยะการเจริญต่าง ๆ หลังจากทำซินโครไนเซชัน 2 ครั้ง ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องนาน 1 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิปารัม ไอโซเลท K_1 และ G_{112} ที่มีระยะการเจริญโทรโฟซอยท์ระยะปลาย จะมีการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine สูงกว่าระยะการเจริญอื่นเล็กน้อย อย่างไรก็ตามถึงแม้การนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine จะไม่แตกต่างกันมากนักในแต่ละระยะการเจริญ แต่ผลการทดลองก็แสดงให้เห็นว่า ระยะที่มีการแบ่งนิวเคลียสจะมีการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine สูงกว่าระยะการเจริญอื่น ๆ ถึงแม้จะมีการนำเข้าของไพริเมธามีนที่ทุกระยะการเจริญก็ตาม ยิ่งไปกว่านั้นยังแสดงให้เห็นว่าการนำเข้าของไพริเมธามีนในเม็ดเลือดแดงติดเชื้อพลาสโมเดียม ไอโซเลท K_1 จะมีค่าต่ำกว่าเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อพลาสโมเดียมไอโซเลท G_{112} ถึงแม้ความแตกต่างจะไม่เห็นชัดนัก และการทดลองจะไม่ได้แสดงว่าความแตกต่างนี้เป็นความแตกต่างในช่วงของการนำเข้าของไพริเมธามีนก็ตาม

อย่างไรก็ตามการทดลองนี้มีขีดจำกัดที่ไม่สามารถเลือกระยะไซซอนท์ ที่มีนิวเคลียสตั้งแต่ 2 นิวเคลียสขึ้นไป มาทดลองว่า เมื่อมีนิวเคลียสเพิ่มขึ้น ระดับ ^{14}C-pyrimethamine นำเข้าจะสูงขึ้นหรือไม่ ซึ่งจะเป็นการยืนยันว่าไพริเมธามีนจะมีการนำเข้าสู่พลาสโมเดียมในระยะแบ่งนิวเคลียสได้สูงสุด ภายหลังจากให้พลาสโมเดียมสัมผัสกับไพริเมธามีนที่ความเข้มข้น 10^{-4} โมลาร์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในสภาวะปกติ อีกครั้งหนึ่ง พบว่าพลาสโมเดียมทั้ง 2 ไอโซเลท ยังสามารถเจริญได้ในรูปแบบปกติเมื่อเพาะเลี้ยงต่อไป และไม่พบความผิดปกติของรูปร่าง เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 10 x 100 หลังจากย้อมด้วยสีเจียมซ่า

เพื่อทดลองว่าไพริเมธามีนที่ถูกนำเข้าสู่เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อพลาสโมเดียมนั้น จะมีการส่งออกจากเซลในสภาวะปกติหรือไม่ จึงได้ทดลองโดยให้เชื้อพลาสโมเดียมสัมผัสกับ ^{14}C-pyrimethamine นาน 12 ชั่วโมง จากนั้นล้าง ^{14}C-pyrimethamine ในอาหารเลี้ยงเชื้อสมบูรณ์ออกเพาะเลี้ยงต่อไป พบว่าเมื่อเลือดแดงที่ติดเชื้อไอโซเลท G_{112} นั้น

ระดับ ^{14}C-pyrimethamine จะไม่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ หลังการเพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง ตรงกันข้ามกับเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อไอโซเลท K_1 และเม็ดเลือดแดงที่ไม่ติดเชื้อ ระดับ ^{14}C-pyrimethamine จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเพาะเลี้ยงไปนาน 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ ผลการทดลองดังกล่าวน่าจะสรุปได้ว่า ไพริเมธามีนจะถูกจับให้อยู่ในเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อพลาสโมเดียมไอโซเลท ที่ไวต่อยาแน่นกว่าเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อพลาสโมเดียมไอโซเลทต้านยา และในเม็ดเลือดแดงที่ไม่ติดเชื้อ

การทดลองการนำเข้าของไพริเมธามีน โดยการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง จะวัดสารกัมมันตรังสีได้น้อย เพราะเปอร์เซ็นต์พาราไซต์ในเลือดค่อนข้างต่ำ (5 เปอร์เซ็นต์) หากให้จำนวนพาราไซต์มีเปอร์เซ็นต์สูงกว่านี้ จะพบความผิดปกติของรูปร่างของพลาสโมเดียม และเมื่อสูงขึ้นไปอีก การเจริญของพลาสโมเดียมจะลดลง อีกทั้ง ^{14}C-pyrimethamine ที่ได้มีค่าแอคติวิตี้จำเพาะไม่สูงมากนัก หากจะใช้ ^{14}C-pyrimethamine ปริมาณมากก็จะสิ้นเปลืองมาก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาวิธีที่จะทำให้ได้เปอร์เซ็นต์พาราไซต์ในเลือดสูง โดยการใช้สารละลาย 28% ฟีคอล วิธีนี้สามารถทำให้ได้ตัวอย่างที่มีจำนวนพาราไซต์ในเลือดสูงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ (Eling, 1979) และจะได้เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิปารัม ซึ่งมีระยะการเจริญอยู่ในโทรโฟซอยท์ ระยะปลายเป็นส่วนใหญ่ มีระยะไซซอนท์ร่วมด้วยในอัตราส่วน 3 ต่อ 1 ซึ่งเหมาะที่จะเป็นตัวอย่างทดลอง การนำเข้าของไพริเมธามีน เพราะมีการนำเข้าสูงสุด เมื่อพยายามเพาะเลี้ยงพลาสโมเดียม ให้ได้โทรโฟซอยท์ ระยะปลายและไซซอยท์มากที่สุด แล้วนำมาแยกเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อออกด้วยสารละลาย 28% ฟีคอล จากนั้นนำมาทดลองการนำ ^{14}C-pyrimethamine ความเข้มข้น 10^{-5} โมลาร์เข้าสู่เซล จะพบว่าเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อไอโซเลท G_{112} จะมีการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine สูงกว่าใน ไอโซเลท K_1 ตลอดเวลาการทดลองในช่วง 30 นาที เช่นเดียวกันหลังจากที่พลาสโมเดียมสัมผัสต่อไพริเมธามีนที่ 10^{-5} โมลาร์ นานครึ่งชั่วโมง แล้วนำไปเพาะเลี้ยงต่อในสภาวะปกติจะเห็นได้ว่า ไพริเมธามีนจะไม่มีผลยับยั้งการเจริญของพลาสโมเดียมทั้ง 2 ไอโซเลท คือสามารถเจริญได้ในรูปแบบปกติ

ผลการทดลองการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ในเซลเม็ดเลือดแดง และเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิปารัม ไอโซเลท K_1 และ G_{112} เมื่อใช้จำนวนเซลเท่ากัน

(7.0×10^9 เซล) ทั้งการทดลองในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องตามวิธีของ Trager และ Jensen และในหลอดทดลองหลังจากรวบรวมเซลที่ติดเชื้อโดยใช้สารละลาย 28% ฟีคอล จะแสดงให้เห็นว่า เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิปารัมไอโซเลท G_{112} จะมีการนำเข้าของไพริเมธามีนได้สูงกว่าไอโซเลท K_1 และในเม็ดเลือดแดงซึ่งไม่ติดเชื้อตามลำดับ และการนำเข้านำจะเกิดสูงสุดในระยะเริ่มมีการแบ่งนิวเคลียส

เนื่องจากไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสเป็นเอนไซม์เป้าหมายต่อการยับยั้งของไพริเมธามีน และเมโธเทรเซท ซึ่งน่าจะศึกษาถึงคุณสมบัติ และแอคติวิตีของเอนไซม์ ในพลาสโมเดียม ฟาลซิปารัม การทดลองเมื่อสกัดเอนไซม์จากพลาสโมเดียม โดยใช้สารละลาย 1% ไตรตอน เอกซ์-100 พบว่าสารละลายนี้ จะไปมีผลต่อการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน โดยวิธีของ Lowry ซึ่งใช้ในการหาแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ (หน่วยเป็นไมโครโมลของไดไฮโดรโฟเลตที่ถูกรีดิวส์/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน) แต่เมื่อนำสารละลายอัลบูมิน ซึ่งมี 1% ไตรตอนเอกซ์-100 ใน 100 มิลลิโมลาร์ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 7.5 ไปทำปฏิกิริยากับรีเอเจนท์ ของ Lowry นำสารละลายที่ได้ไปดูดแสงที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ กัน จะมีรูปแบบของการดูดแสงเหมือนกับการดูดแสงของสารละลายอัลบูมิน ใน 100 มิลลิโมลาร์ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 7.5 ซึ่งทำปฏิกิริยากับรีเอเจนท์ของ Lowry โดยพบว่าค่าการดูดแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ดังนั้น ในการหาปริมาณโปรตีนจึงยังคงใช้วิธีของ Lowry ได้ เพราะว่ากราฟมาตราฐานอัลบูมินในสารละลาย 1% ไตรตอนเอกซ์-100 จะแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของอัลบูมินกับการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร เป็นเส้นตรง แต่การดูดแสงของกราฟมาตราฐานอัลบูมินในสารละลาย 1% ไตรตอนเอกซ์-100 จะมีค่าต่ำกว่ากราฟมาตราฐานอัลบูมินอย่างเดียว ดังนั้นการสร้างกราฟมาตราฐานอัลบูมินทุกครั้ง ต้องใช้อัลบูมินในสารละลาย 1% ไตรตอนเอกซ์-100 และ 100 มิลลิโมลาร์ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 7.5 การวัดแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเตสทุกครั้ง จะต้องทดสอบคุณสมบัติของสับสเตรท ไดไฮโดรโฟเลต ซึ่งเก็บไว้ที่ - 70 องศาเซลเซียส สารไดไฮโดรโฟเลตที่แท้จริงมีค่าการดูดแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 282 นาโนเมตรเสมอ และใช้ค่าการดูดแสงสูงสุดนี้เป็นตัวปรับความเข้มข้นของสับสเตรทที่ใช้ในการทดลอง โดยกำหนดให้ molar extinction

coefficient ค่าความยาวคลื่น 282 นาโนเมตร มีค่า 28 ต่อ มิลลิโมลาร์

เมื่อย่อยเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสจากพลาสโมเดียม ฟาลซิปารัม มาวัดแอคติวิตีจำเพาะหลาย ๆ ครั้ง ผลการทดลองพบว่าค่าแอคติวิตีจำเพาะจะแตกต่างกันในแต่ละไอโซเลท และในไอโซเลทเดียวกันค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ที่วัดได้เหล่านี้จะมีความแตกต่างกันในช่วงกว้างมาก ช่วงของแอคติวิตีจำเพาะของพลาสโมเดียม ฟาลซิปารัม ไอโซเลท K_1 (ต้านไพริเมธามีนสูงสุด 10^{-5} โมลาร์) เท่ากับ 0.22 ไมโครโมล/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน ที่ 37 องศา เซลเซียส (0.07-0.43) ไอโซเลท CC (ต้านไพริเมธามีนสูงสุด 10^{-8} โมลาร์) เท่ากับ 0.027 ไมโครโมล/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน ที่ 37 องศา เซลเซียส (0.02-0.032) และไอโซเลท G_{112} (ต้านไพริเมธามีน สูงสุด 10^{-10} โมลาร์) เท่ากับ 0.008 ไมโครโมล/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน ที่ 37 องศา เซลเซียส (0.006-0.009) อย่างไรก็ตามจะเห็นว่าไม่เคยมีช่วงของแอคติวิตีจำเพาะใดของไอโซเลท G_{112} มีค่าสูงกว่าไอโซเลท CC และในช่วงของค่าแอคติวิตีจำเพาะในไอโซเลท CC ก็ไม่เคยพบว่ามีค่าสูงกว่า ไอโซเลท K_1 เลย ผลการทดลองนี้จึงน่าจะสรุปได้ว่า แอคติวิตีจำเพาะของพลาสโมเดียม ฟาลซิปารัม ไอโซเลท ที่ต้านไพริเมธามีนมากกว่าจะมีค่าสูงกว่า ไอโซเลท ที่ต้านไพริเมธามีนต่ำกว่า ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Ferone (1970) ซึ่งศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์นี้ในพลาสโมเดียม เบอจิอายโดยพบว่าไอโซเลท ที่ไวต่อไพริเมธามีน จะมีค่าแอคติวิตีจำเพาะ .0.008-0.039 ไมโครโมล/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน ขณะที่ในไอโซเลทต้าน ไพริเมธามีน มีค่าแอคติวิตีจำเพาะ 0.05-0.39 ไมโครโมล/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน และจากการรายงานของ Schoenfeld และคณะ (1974) ศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์นี้ในพลาสโมเดียมวิงคิอาย ไอโซเลท ซึ่งไวและต้านไพริเมธามีน จะมีค่าแอคติวิตี 0.4 , 0.8 และ 1.74 , 4.9 ไมโครโมล/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ

เมื่อวิเคราะห์ค่าแอคติวิตีจำเพาะของพลาสโมเดียมชนิดต่าง ๆ จะสังเกตเห็นว่าในไอโซเลทเดียวกันค่าแอคติวิตีจำเพาะก็จะแตกต่างกันไปในช่วงกว้าง ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่านอกจากชนิดของไอโซเลทแล้ว ระยะการเจริญในไอโซเลทเดียวกันก็น่าจะมีค่าแอคติวิตีจำเพาะแตกต่างกันด้วย ระยะที่มีการเจริญเต็มที่ คือที่มีระยะไซซอนท์เป็นส่วนใหญ่ จะมีแอคติวิตีจำเพาะสูงกว่าระยะการเจริญพันธุ์ ช่วงต้นคือระยะโทรโฟซอยท์และระยะวงแหวนตามลำดับ

ค่าแอคติวิตี้จำเพาะที่เพิ่มขึ้นไม่ได้เป็นผลเนื่องจากการลดปริมาณการสังเคราะห์โปรตีนชนิดอื่นในระยะการเจริญเต็มที่ เพราะที่ความเข้มข้นโปรตีนเท่ากัน แอคติวิตี้ของเอนไซม์ ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส ในพลาสโมเดียมระยะที่เจริญเต็มที่จะมีค่าสูงกว่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์นี้ ในพลาสโมเดียมระยะการเจริญต้น ๆ เมื่อเทียบความเข้มข้นโปรตีนในพาราไซต์ 10^6 เซล ที่ระยะการเจริญต่าง ๆ จะพบว่าสารละลายที่สกัดจากพลาสโมเดียม ซึ่งมีระยะการเจริญเต็มที่เป็นส่วนใหญ่ จะมีความสามารถในการสังเคราะห์โปรตีนในปริมาณสูงกว่า สารละลายที่สกัดจากพลาสโมเดียมที่มีระยะการเจริญต้น ๆ เป็นส่วนใหญ่ ความเข้มข้นของโปรตีน ที่เพิ่มขึ้นได้นี้ จะไม่เป็นสัดส่วนโดยตรงต่อค่าแอคติวิตี้จำเพาะที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากความแตกต่างของระยะการเจริญเลย แสดงว่าค่าแอคติวิตี้จำเพาะเพิ่มขึ้นในระยะการเจริญที่มีอายุมากขึ้นนั่นเอง

เมื่อเปรียบเทียบแอฟฟินิตี้ต่อไดไฮโดรโฟเลต (K_m) ในแต่ละระยะการเจริญของพลาสโมเดียม ฟาลซิปารัม ไอโซเลท K_1 พบว่าไม่ว่าระยะการเจริญส่วนใหญ่จะเป็นระยะใดก็ตาม ค่า K_m จะไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าทุก ๆ ระยะการเจริญของพลาสโมเดียมจะมีค่าแอฟฟินิตี้ต่อสับสเตรท ไดไฮโดรโฟเลตของเอนไซม์ ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส คงที่ เนื่องจากแอคติวิตีของเอนไซม์ ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส ในพลาสโมเดียม ฟาลซิปารัม ไอโซเลท G_{112} และ CC ต่ำมาก จึงไม่สามารถสกัดมาทดสอบคุณสมบัติอื่น ๆได้

สิ่งที่น่าสนใจศึกษา คือ คุณสมบัติของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลท รีดักเตส ในพลาสโมเดียมและเซลเม็ดเลือดแดง ซึ่งเป็นเจ้าบ้าน มีรายงานว่าไพริเมธามีนที่ความเข้มข้น 5×10^{-9} โมลาร์ สามารถยับยั้งแอคติวิตี้ของไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส ที่สกัดได้จากพลาสโมเดียม เบอจิอายอย่างสมบูรณ์ ในขณะที่ต้องใช้ไพริเมธามีนความเข้มข้น 10^{-6} โมลาร์ จึงสามารถยับยั้งเอนไซม์นี้ที่สกัดจากเม็ดเลือดแดงหนูได้ แสดงว่าเอนไซม์จากแหล่งทั้งสองจะมีความไวต่อไพริเมธามีนต่างกัน 10^2-10^3 เท่า (Ferone และคณะ 1969) ความแตกต่างนี้อาจเกิดเนื่องจากลำดับ binding site ของเอนไซม์ต่อไพริเมธามีนต่างกันก็ได้ (Platzer, 1974)

ในการวิจัยนี้ได้พยายามแยกเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสจากเซลเจ้าบ้านของพลาสโมเดียม ฟาลซิปารัมคือ เซลตับและเม็ดเลือดแดงของคน เพื่อมาศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติควบคู่ไปด้วย แต่เป็นที่น่าเสียดายที่ไม่สามารถสกัดเอนไซม์นี้จากแหล่งทั้งสองชนิดได้เลย

อาจเป็นเพราะตับคนที่นำมาไม่สดพอ แอคติวิตีของเอนไซม์ได้สูญเสียไปหมดเพราะใช้ตับของคนตายจากโรงพยาบาลตำรวจ ซึ่งไม่สามารถบอกได้ว่าได้ตายไปแล้วนานเท่าไร เมื่อได้พยายามสกัดเอนไซม์ ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส จากเม็ดเลือดแดงของคน ตามวิธีของ Ferone และคณะ (1968) กับ Kan และ Siddiqui (1979) โดยใช้เม็ดเลือดแดงซึ่งเตรียมใหม่ทันทีหลังจากได้รับจากผู้บริจาคหรือเม็ดเลือดแดงที่เตรียมขึ้นเพื่อการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง พบว่าไม่ว่าจะใช้เม็ดเลือดแดงปริมาณมากเท่าใด ก็ไม่สามารถวัดแอคติวิตีของเอนไซม์นี้ได้เลย แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ที่เตรียมได้โดยการทำลายเซลเม็ดเลือดแดงด้วยสารละลาย 0.15% แซโปนิน แม้จะมีผนังเซลเม็ดเลือดแดงติดอยู่บ้างก็ตาม (Ferone และคณะ 1976) เมื่อทำลายเซลพลาสโมเดียมด้วยสารละลาย 1% ไตรตอนเอกซ์-100 เอนไซม์แอคติวิตีที่วัดได้ควรจะเป็นเอนไซม์ของพลาสโมเดียมเอง

การวิจัยนี้ได้ศึกษาเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสของตับหนูควบคู่ไปด้วย เพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบแทนเซลเจ้าบ้าน ถึงแม้จะเป็นเซลเจ้าบ้านคนละชนิด แต่คุณสมบัติของเอนไซม์นี้ในตับหนูได้รับการศึกษาอย่างกระจ่างพอสมควร จากการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสในพลาสโมเดียม ฟาลซิปารัม และตับหนู พบว่ามีคุณสมบัติหลายชนิดต่างกัน กล่าวคือในตับหนูแอฟฟินิตี้ต่อไดไฮโดรโฟเลต (K_m = 16 ไมโครโมลาร์) จะต่ำกว่าของพลาสโมเดียม ฟาลซิปารัม ไอโซเลท K_1 (K_m = 7.6 ไมโครโมลาร์) และแอฟฟินิตี้ต่อไพริเมธามีน และไตรเมโทรเซท (K_1) ของเอนไซม์นี้ในตับหนูจะต่ำกว่าในพลาสโมเดียมประมาณ 10 และ 20 เท่าตามลำดับ

น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส ในพลาสโมเดียม มีค่าเท่ากับ 205,000 ดาลตัน ซึ่งใกล้เคียงกับพลาสโมเดียม โนวัลไซ ซึ่งมีค่า 185,000 ดาลตัน (Gutteridge, and Trigg, 1971) และพลาสโมเดียมเบอจิอาย มีค่า 190,000 ดาลตัน (Ferone และคณะ , 1969) และพลาสโมเดียม โลฟูเลย์ วัดได้ 103,000 ดาลตัน (Platzer, 1974) ในขณะที่น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์นี้ในตับหนูเท่ากับ 21,500 ดาลตัน ซึ่งใกล้เคียงกับพวกสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่น (Bertino และคณะ , 1965) และในแบคทีเรีย (Mathews, 1965. และ Hillcoat, 1966)

อย่างไรก็ตามแม้ว่าจะไม่สามารถสกัดเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส จากเซลเจ้าบ้านคือคนได้ แต่เมื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติของ เอนไซม์ ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส ที่แยกจากพลาสโมเดียม ฟาลซิปารัมกับเอนไซม์นี้ในเม็ดเลือดแดงของลิงออตัส (Aotus monkey) ซึ่งเป็นเซลเจ้าบ้านของพลาสโมเดียม ฟาลซิปารัม ได้เช่นกัน (Kan และ Siddiqui, 1979) พบว่า K_m ต่อไดไฮโดรโฟเลต เท่ากับ 5.1 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่ K_m ของพลาสโมเดียม ฟาลซิปารัม ไอโซเลท K_1 เท่ากับ 7.6 ไมโครโมลาร์ และ K_1 ต่อไพริเมธามีนของเม็ดเลือดแดงลิงออตัส เท่ากับ 2500 นาโนโมลาร์ ซึ่งสูงกว่า K_i ของพลาสโมเดียม ฟาลซิปารัม ไอโซเลท K_1 ซึ่งมีค่า K_i เพียง 22.5 นาโนโมลาร์ นั่นคือแอฟฟินิตี้ต่อไพริเมธามีนของ เอนไซม์นี้ในพลาสโมเดียม ฟาลซิปารัม ไอโซเลท K_1 จะสูงกว่าในเม็ดเลือดแดงลิงออตัส ถึง 200 เท่า ซึ่งถ้าคุณสมบัติของ เอนไซม์ในเม็ดเลือดแดงของลิงออตัส และคนคล้ายกันก็แสดงว่า ไพริเมธามีนสามารถใช้รักษาโรคมาลาเรียในคน โดยไม่มีผลกระทบต่อเซลเจ้าบ้าน จนกว่าจะใช้ไพริเมธามีนที่ความเข้มข้นสูงกว่าการยับยั้งการเจริญของพลาสโมเดียมถึง 200 เท่า ในรายงานของ Kan และ Siddiqui (1979) นี้ยังได้แสดงค่า K_i ของพลาสโมเดียม ฟาลซิปารัม ไอโซเลท FUP และ FVO ซึ่งเพาะเลี้ยงในลิงออตัส มีค่า K_i เท่ากับ 1.5 และ 2.1 นาโนโมลาร์ ตามลำดับ

จากการศึกษาความเข้มข้นของไพริเมธามีน ที่จะยับยั้ง เอนไซม์ ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสของ พลาสโมเดียม ฟาลซิปารัม ไอโซเลท K_1 และต้นหนูที่แอคติวิตีเท่ากัน พบว่า ไพริเมธามีนความเข้มข้น 7.5×10^{-9} โมลาร์ ก็จะยับยั้ง แอคติวิตีของ เอนไซม์นี้ในพลาสโมเดียมได้ 50 เปอร์เซนต์ (ID_{50}) สำหรับเอนไซม์นี้ในต้นหนู จะต้องใช้ไพริเมธามีนที่ความเข้มข้นถึง 10^{-8} โมลาร์ จึงจะยับยั้งแอคติวิตีลงได้ 50 เปอร์เซนต์เช่นกัน จะเห็นได้ว่าค่าที่ได้จะต่างกันประมาณ 10 เท่า แต่แอคติวิตี้ของ เอนไซม์นี้ในพลาสโมเดียมจะลดลง 100 เปอร์เซนต์ (ID_{100}) เมื่อถูกยับยั้งด้วยไพริเมธามีน ที่ความเข้มข้น 5×10^{-7} โมลาร์ ซึ่งต่างจากความเข้มข้นของไพริเมธามีนที่ใช้ยับยั้ง เอนไซม์นี้ในต้นหนู จะต้องใช้ความเข้มข้นสูง 5×10^{-4} โมลาร์ ความแตกต่างกันถึง 1000 เท่า

จากการทดลองสรุปได้ว่า สาเหตุการต้านยานั้นควรจะเป็นผลเนื่องจากการนำเข้าของไพริเมธามีนลดลงใน ไอโซเลทต้านยา ในขณะเดียวกันก็มีการเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์ ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส ในไอโซเลทต้านยา ทำให้ไพริเมธามีนมีผลกระทบต่อพลาสโมเดียม ไอโซเฟทต้านยาได้น้อยกว่า ไอโซเลทไวต่อยา และกลไกการยับยั้งการเจริญของพลาสโมเดียมด้วยไพริเมธามีน และเมโธเทรเซท ซึ่งเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส ทั้งคู่จะแตกต่างกันอย่างแน่นอน ซึ่งน่าจะกล่าวได้ว่าเมโธเทรเซทสามารถใช้เป็นสารรักษาไข้มาลาเรียได้ และการที่ไพริเมธามีน ใช้เป็นยารักษาได้นั้น อาจเป็นผลเนื่องจากแอฟฟินิตี้ต่อเอนไซม์ ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส ของพลาสโมเดียม มีค่าสูงกว่าแอฟฟินิตี้ของเอนไซม์นี้ต่อไพริเมธามีนในเซลเจ้าบ้าน ซึ่งควรทดลองโดยพยายามศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์นี้ในเซลเจ้าบ้านอีกทีหนึ่ง

<u>สรุปผลการทดลอง</u>

1. ในการเพาะเลี้ยงพลาสโมเดียม ฟาลซิปารัม แบบต่อเนื่องในจานทดลองการเปลี่ยนกรุปของเม็ดเลือดแดง จะไม่มีผลกระทบต่อการเจริญ

2. พลาสโมเดียม ฟาลซิปารัม ไอโซเลท K_1 จะต้านไพริเมธามีนสูงสุดที่ความเข้มข้น 10^{-5} โมลาร์ ไอโซเลท CC และ G_{112} จะต้านยาสูงสุดที่ความเข้มข้น 10^{-8} และ 10^{-10} โมลาร์ ตามลำดับ

3. ระยะการเจริญของพลาสโมเดียม จะมีความไวต่อไพริเมธามีน ไม่เท่ากัน ระยะวงแหวนกับโทรโฟซอยท์ เมื่อสัมผัสกับยาที่ความเข้มข้น ซึ่งมีผลกระทบต่อการเจริญ (lethal dose) จะถูกยับยั้งการเจริญแต่ระยะไซซอนท์จะยังคงเจริญต่อไปได้

4. การนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine จะสูงสุดในระยะการเจริญของโทรโฟซอยท์ระยะปลาย เมื่อเปรียบเทียบกับระยะการเจริญอื่น

5. พลาสโมเดียม ฟาลซิปารัม ไอโซเลท K_1 และ CC ซึ่งมีความไวต่อไพริเมธามีนต่างกัน จะมีค่าความไวต่อเมโธเทรเซทเท่ากัน

6. แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส ในพลาสโมเดียม ฟาลซิปารัม ซึ่งมีการต้านไพริเมธามีนสูง (ไอโซเลท K_1) จะมีค่าสูงกว่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์นี้ใน

พลาส์โมเดียม ฟาลซิปารัม ไอโซเลทที่ไวต่อ ไพริเมธามีน (ไอโซเลท G_{112})

7. พลาส์โมเดียมระยะที่มีการเจริญเต็มที่ จะมีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส์ สูงกว่าพลาส์โมเดียม ซึ่งมีการเจริญในระยะการเจริญเริ่มต้นและแอคติวิตีของเอนไซม์นี้จะไม่ขึ้นกับปริมาณโปรตีนที่เพิ่มขึ้นในแต่ละระยะการเจริญ

8. ค่า K_1 ของไพริเมธามีนต่อเอนไซม์ ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส์ ในพลาส์โมเดียม ฟาลซิปารัม ไอโซเลท K_1 มีค่า ต่ำกว่า K_i ของตับหนู และ K_i ของเม็ดเลือดแดงลิงออตัส์ (Kan และ Siddiqui, 1979) 11 และ 200 เท่า ตามลำดับ

9. น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส์ ในพลาส์โมเดียม ฟาลซิปารัม ไอโซเลท K_1 มีค่า 205,000 ดาลตัน ซึ่งต่างจากตับหนูและเม็ดเลือดแดงของลิงออตัส์ (Kan และ Siddiqui, 1979) ซึ่งมีค่า 21,500 และ 19,000 ดาลตัน ตามลำดับ

10. ค่า K_m ต่อไดไฮโดรโฟเลต ของเอนไซม์ ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส์ ในพลาส์โมเดียม ฟาลซิปารัม ไอโซเลท K_1 มีค่า 7.6 ไมโครโมลาร์ ซึ่งต่างกับตับหนูและเม็ดเลือดแดงของลิงออตัส์ (Kan และ Siddiqui, 1979) ซึ่งมีค่า 16 และ

ข้อเสนอแนะ

การศึกษากลไกการต้านยาไพริเมธามีนที่เกิดขึ้นในพลาส์โมเดียม ฟาลซิปารัม สิ่งที่สำคัญและจำเป็นที่ต้องทำคือ เปรียบเทียบคุณสมบัติของไอโซเลตที่ต้านยา ซึ่งควรพัฒนามาจากไอโซเลทที่ไวต่อยา เพื่อป้องกันปัญหาเกี่ยวกับความแปรปรวนระหว่างไอโซเลท (strain variation)

Trager และ Phuc Nguyen-Dinth (1978) ได้พัฒนาการต้านยาคลอโรควินในพลาส์โมเดียม ฟาลซิปารัมไอโซเลท FCR-3 โดยการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องตามวิธีของ Trager and Jensen (1977) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยคลอโรควินซึ่งเพิ่มความเข้มข้นของคลอโรควิน 0.01 ไมโครกรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร หลังจากนั้น 1 เดือน (15 วงชีพ) พบว่าพลาส์โมเดียมนี้จะปรับสภาพการต้านยาคลอโรควินให้มีความเข้มข้นสูงถึง 0.1 ไมโครกรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร

ในงานวิจัยนี้ จึงได้พยายามพัฒนาการต้านไพริเมธามีนในพลาสโมเดียม ฟาลซิปารัม ไอโซเลท G_{112} และ CC ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไวต่อไพริเมธามีน แต่ปัญหาที่เกิดคือการพัฒนาการต้านยาโดยการเหนี่ยวนำด้วยไพริเมธามีน และการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องไปเรื่อย ๆ จะเกิดการ contamination ระหว่างการทดลอง ทำให้เป็นปัญหาสำหรับงานในขั้นต่อไป เพื่อตัดปัญหานี้จึงได้เลือกพลาสโมเดียมไอโซเลท ที่ไวและต้านยาที่เกิดขึ้นแล้วมาเป็นแม่แบบการศึกษา โดยความเป็นจริงแล้ว ถ้าสามารถขจัดปัญหาดังกล่าวได้ และมีเวลามากพอ การพัฒนาการต้านยาโดยการเหนี่ยวนำ น่าจะอยู่ในวิสัยที่จะทำได้