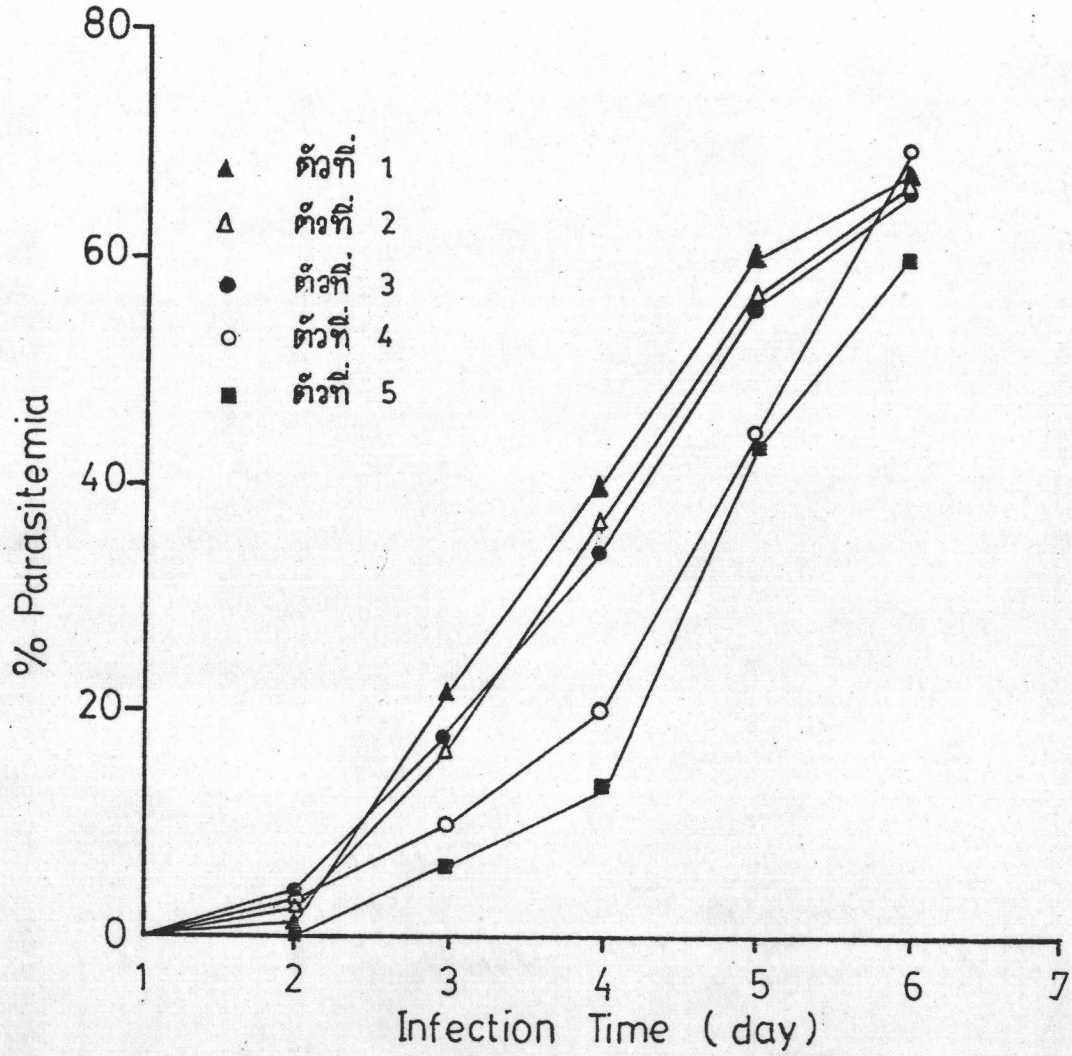
บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการเพาะเลี้ยง*พลาสโมเดียม ชาบอดี*ในหนูไมซ์

จากข้อมูลที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *พลาสโมเดียม ชาบอดี* AS ตามรูปที่ 6 พบว่าเมื่อกำหนดให้วันที่หนูได้รับเชื้อประมาณ 10^8 เซลล์เป็นวันที่ 1 ภายในเวลา 24 ชั่วโมง จำนวนเม็ดเลือดแดงติดเชื้อที่ตรวจพบจะต่ำมากจนบางครั้งไม่สามารถติดตามได้ (หนูตัวที่ 5) หลังจากนั้นจะเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็วจนเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อมีค่า 10-20 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 3 ของการติดเชื้อ และเพิ่มเป็นทวีคูณในวันที่ 4 เมื่อเลี้ยงหนูติดเชื้อครบ 5 วัน เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อโดยเฉลี่ยจะสูงประมาณ 45-60 เปอร์เซ็นต์ ระยะนี้จะเป็นระยะเก็บเกี่ยวเซลล์เพื่อนำไปใช้ทดลองหรือฉีดเข้าไปในหนูตัวใหม่ เพื่อเป็นการเลี้ยงแบบต่อเนื่อง อย่างไรก็ตามถ้าเลี้ยงต่ออีก 1 วัน จำนวนเม็ดเลือดแดงติดเชื้ออาจเพิ่มขึ้นได้อีก แต่อัตราการติดเชื้อเพิ่มจะน้อยกว่าในช่วงต้น ยิ่งไปกว่านั้นหนูมากกว่าครึ่งหนึ่งของหนูติดเชื้อทั้งหมดจะตายเพราะไม่สามารถทนต่อสภาวะการเจ็บป่วยจากเชื้อมาลาเรียต่อไปได้

ผลจากการติดตามระยะการเจริญของเชื้อปรากฏว่า ที่เวลาประมาณ 6.00-10.00น. ของทุก ๆ วัน รวมทั้งวันเก็บเกี่ยวเลือดตัวอย่าง *พลาสโมเดียม ชาบอดี* ส่วนใหญ่อยู่ในระยะโทรโฟซอยต์ตอนปลาย และไซซอนต์ตอนต้น แต่ไม่ปรากฏระยะวงแหวนเลย (รูปที่ 7) อีกทั้งยังพบว่าในระยะแรก ๆ ของการเพาะเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อมีค่าต่ำ เม็ดเลือดแดงติดเชื้อส่วนใหญ่จะถูกบุกรุกด้วยพลาสโมเดียมเพียงเซลล์เดียว (single-infection) (รูปที่ 7 ก.) แต่เมื่อเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อเพิ่มสูงขึ้น อันเป็นผลมาจากการเจริญต่อไปหลายวงชีพ โอกาสที่เม็ดเลือดแดงติดเชื้อจะถูกบุกรุกด้วยพลาสโมเดียมมากกว่า 1 เซลล์ (multi-infection) ก็จะเพิ่มมากขึ้น โดยอาจถูกบุกรุกด้วยพลาสโมเดียม 2 เซลล์ (double-infection), 3 เซลล์ (triple-infection), 4 เซลล์ (tetra-infection) และบางครั้งอาจมีมากที่สุดถึง 5 เซลล์ (penta-infection) (รูปที่ 7 ข.)



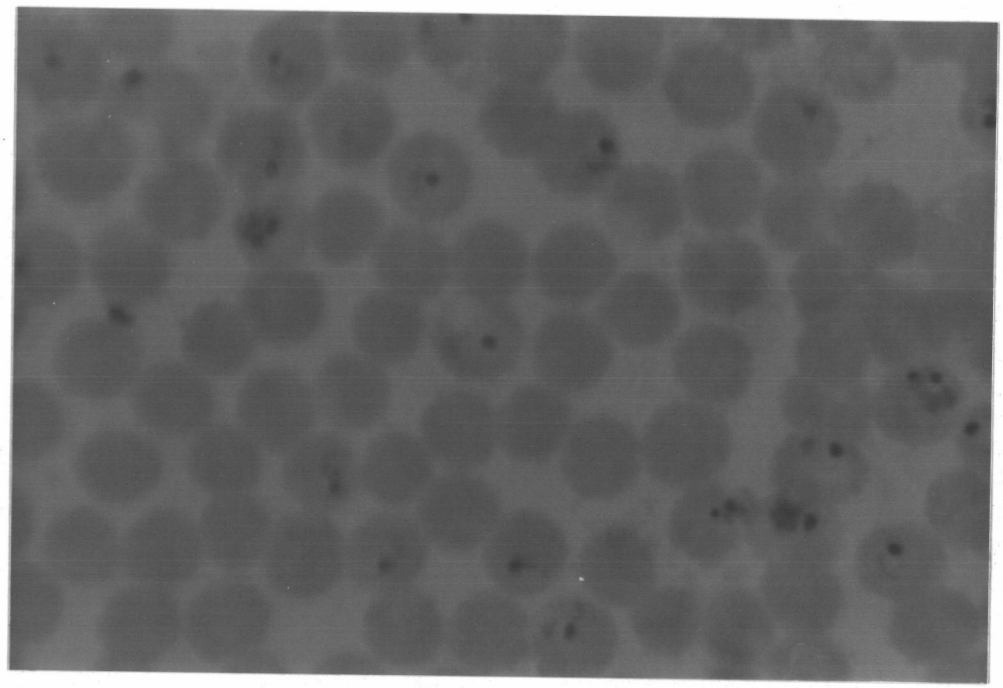
รูปที่ 6. รูปแบบการเจริญเติบโตของ P chabaudi AS ในเม็ดเลือดแดงหนูไมซ์ เมื่อหนูได้รับเชื้อพลาสโมเดียมประมาณ 10^8 เซลล์ แล้วทำการเลี้ยงและติดตามการเจริญตามวิธีทดลองในข้อ 3.3 และ 3.4

รูปที่ 7. ภาพแสดงระยะการเจริญและลักษณะการติดเชื้อของ P.chabaudi AS ในเม็ดเลือดแดงหนูไมซ์ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงตามวิธีทดลองข้อ 3.3 (กล้องจุลทัศน์กำลังขยาย 10 x 100)

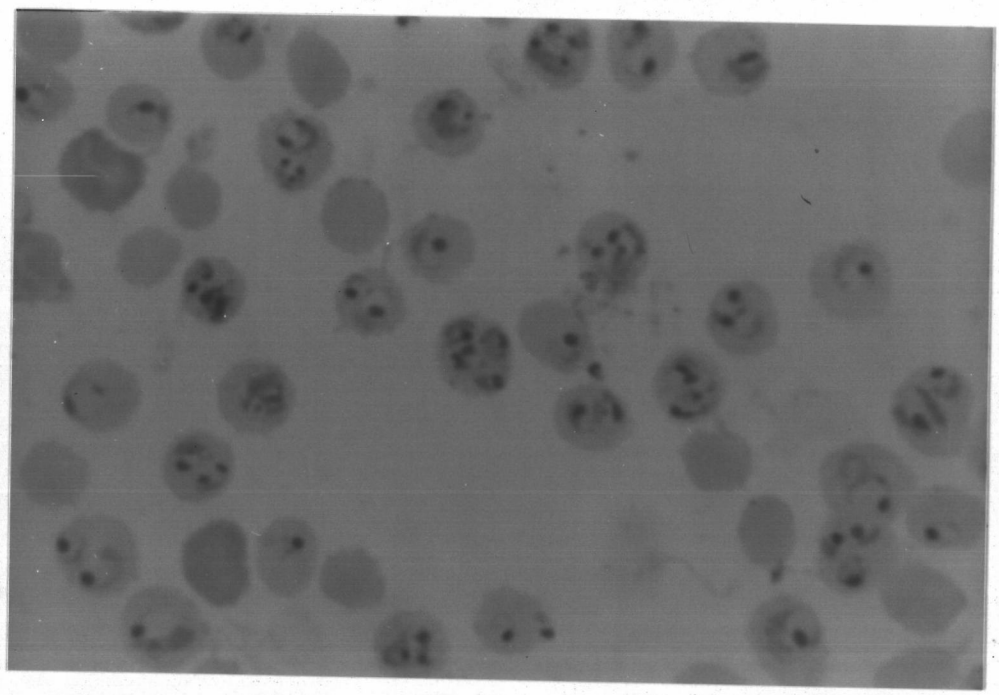
รูปที่ 7 ก. การเจริญของพลาสโมเดียมในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีค่าเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ 12 %

รูปที่ 7 ข. การเจริญของพลาสโมเดียมในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีค่าเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ 60 %

รูปที่ 7 ก.



รูปที่ 7 ข.



4.2 ผลการทดลอบความไวของพลาสโมเดียม ฆ่าบอดี ต่อไพริเมธามีน

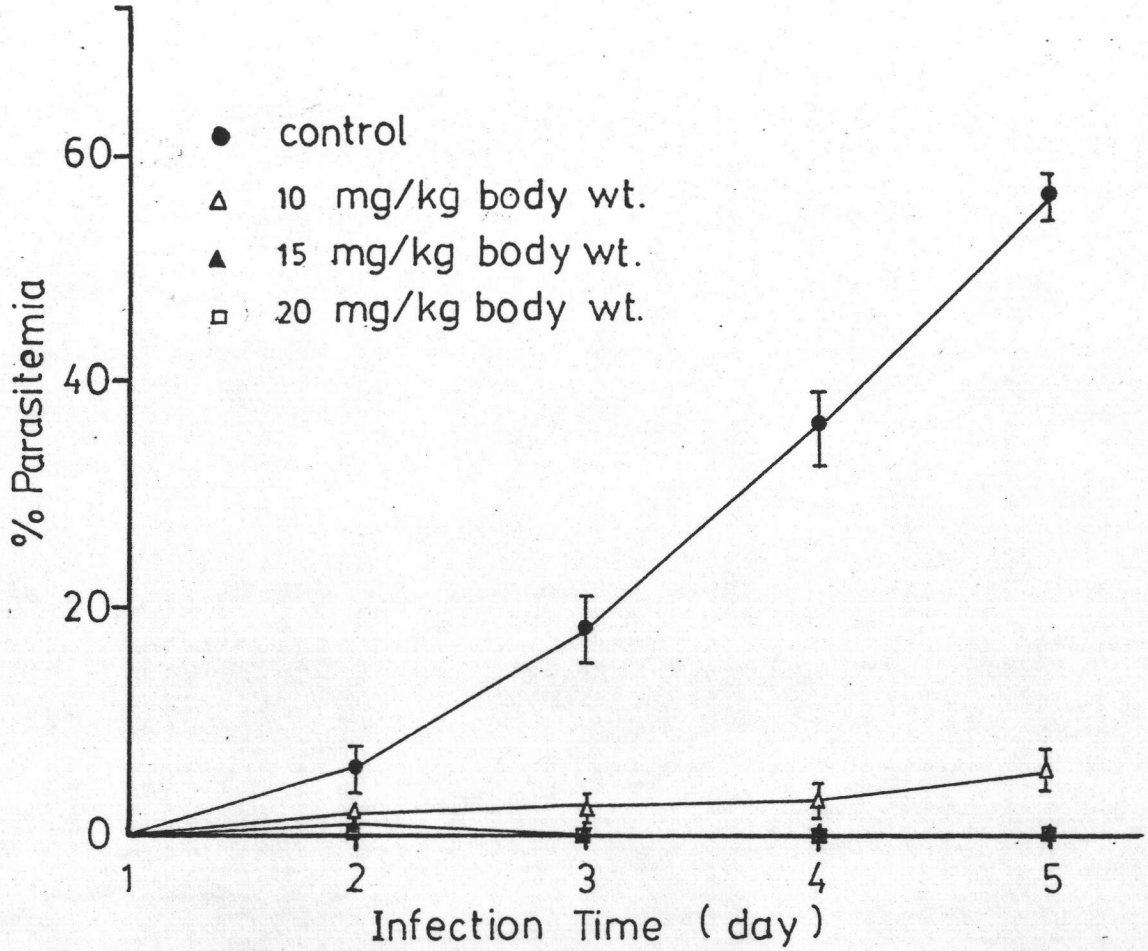
การทดลอบผลกระทบของไพริเมธามีนต่อการเจริญของเชื้อ พลาสโมเดียม ฆ่าบอดี AS พบว่า (รูปที่ 8) การเจริญของเชื้อพลาสโมเดียมในหนูจะถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ ถ้าให้หนูติดเชื้อได้รับไพริเมธามีน 15 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ตามวิธีข้อ 3.5 และเมื่อลดขนาด (dose) ของไพริเมธามีนเหลือเพียง 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว จะทำให้พลาสโมเดียม ฆ่าบอดี AS เจริญได้บ้างบางส่วน

ผลการทดลองตามรูปที่ 9 แสดงให้เห็นว่า หนูติดเชื้อ พลาสโมเดียม ฆ่าบอดี AS (Pr_1) เมื่อได้รับไพริเมธามีน 15 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว รูปแบบการเจริญของพลาสโมเดียมไม่ต่างจากหนูกลุ่มควบคุมซึ่งติดเชื้อชนิดเดียวกัน และไพริเมธามีนขนาดสูงขึ้นถึง 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวจะเริ่มมีผลกระทบเล็กน้อยต่อการเจริญของเชื้อโคลน AS(Pr_1) เมื่อเพิ่มขนาดเป็น 30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวจึงจะสามารถยับยั้งการเจริญของ พลาสโมเดียม ฆ่าบอดี AS(Pr_1) ในหนูติดเชื้อได้อย่างสมบูรณ์

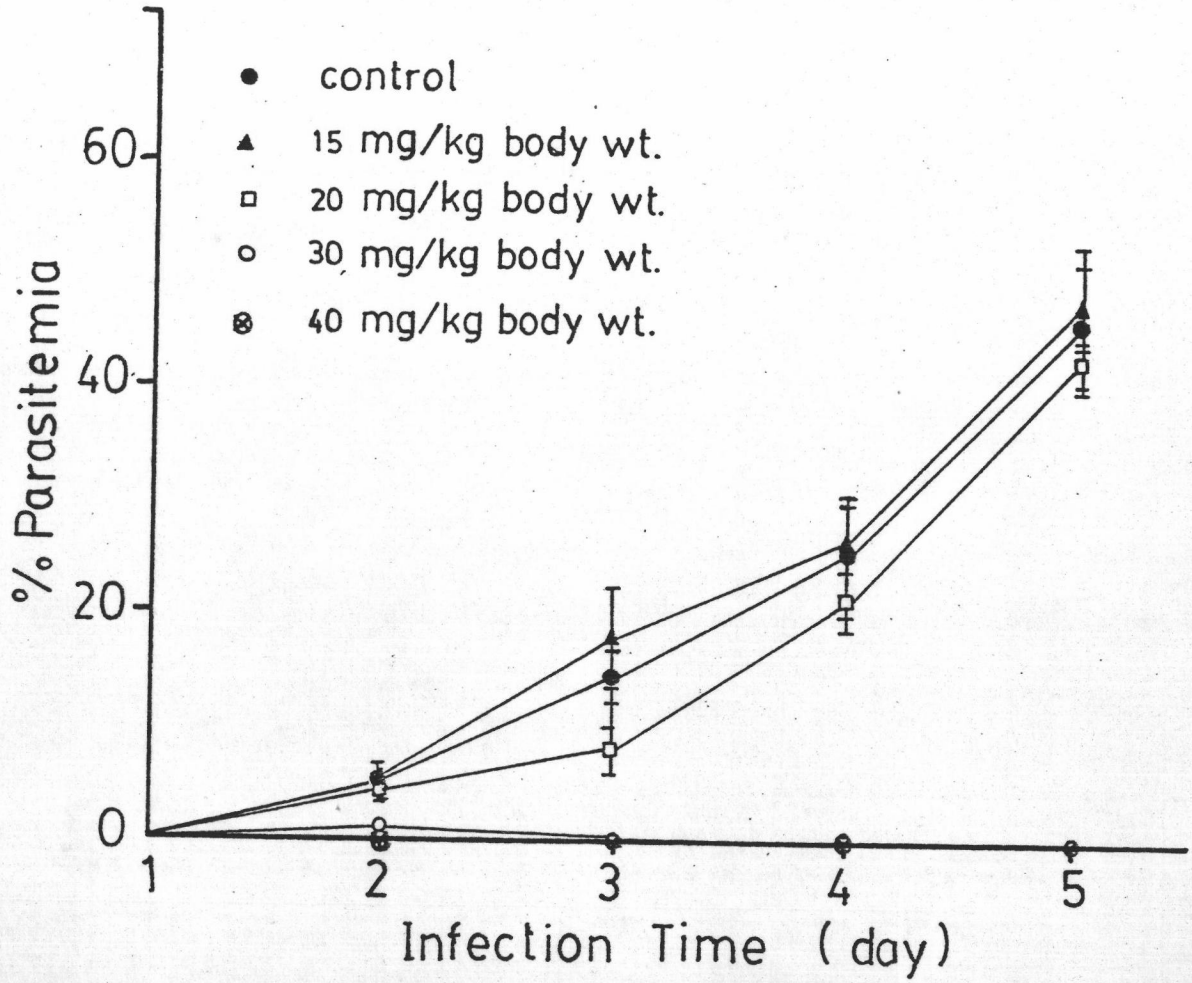
4.3 ผลกระทบของความเข้มข้นของ ^{14}C-pyrimethamine ต่อการนำเข้าสู่เซลล์

เมื่ออินคิวเบตเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติและเลือดติดเชื้อ พลาสโมเดียม ฆ่าบอดี AS จำนวน 7×10^8 เซลล์ (50 เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ) กับ ^{14}C-pyrimethamine ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์เป็นเวลาต่าง ๆ กันตั้งแต่ 1-30 นาที ดังแสดงในรูปที่ 10 ก. พบว่าค่าการนำเข้าในเม็ดเลือดแดงทั้ง 2 ชนิดเพิ่มมากขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับเวลาจนกระทั่งมีค่าสูงสุดที่เวลานาทีที่ 6 หลังจากนั้นค่าจะลดต่ำลงมากคล้ายกับเซลล์ผิดปกติจนไม่สามารถสะสม ^{14}C-pyrimethamine ไว้ได้ เมื่อทำการทดลองในลักษณะเดิมแต่อินคิวเบตเซลล์กับ ^{14}C-pyrimethamine 100 นาโนโมลาร์ (รูปที่ 10 ข.) ปรากฏว่า ^{14}C-pyrimethamine ถูกนำเข้าสู่เม็ดเลือดแดงทั้ง 2 ชนิด อย่างรวดเร็ว โดยในเม็ดเลือดแดงปกติค่าการนำเข้าเริ่มอิ่มตัวในเวลาประมาณ 2 นาที และสำหรับเม็ดเลือดแดงติดเชื้อโคลน AS ต้องใช้เวลาประมาณ 2 นาทีเช่นกัน จึงจะมีการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine อิ่มตัว

เมื่อทดลอบการมีชีวิตของพลาสโมเดียม ฆ่าบอดี AS โดยอินคิวเบตเลือดติดเชื้อกับไพริเมธามีน 100 นาโนโมลาร์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที (ตามสภาวะ-

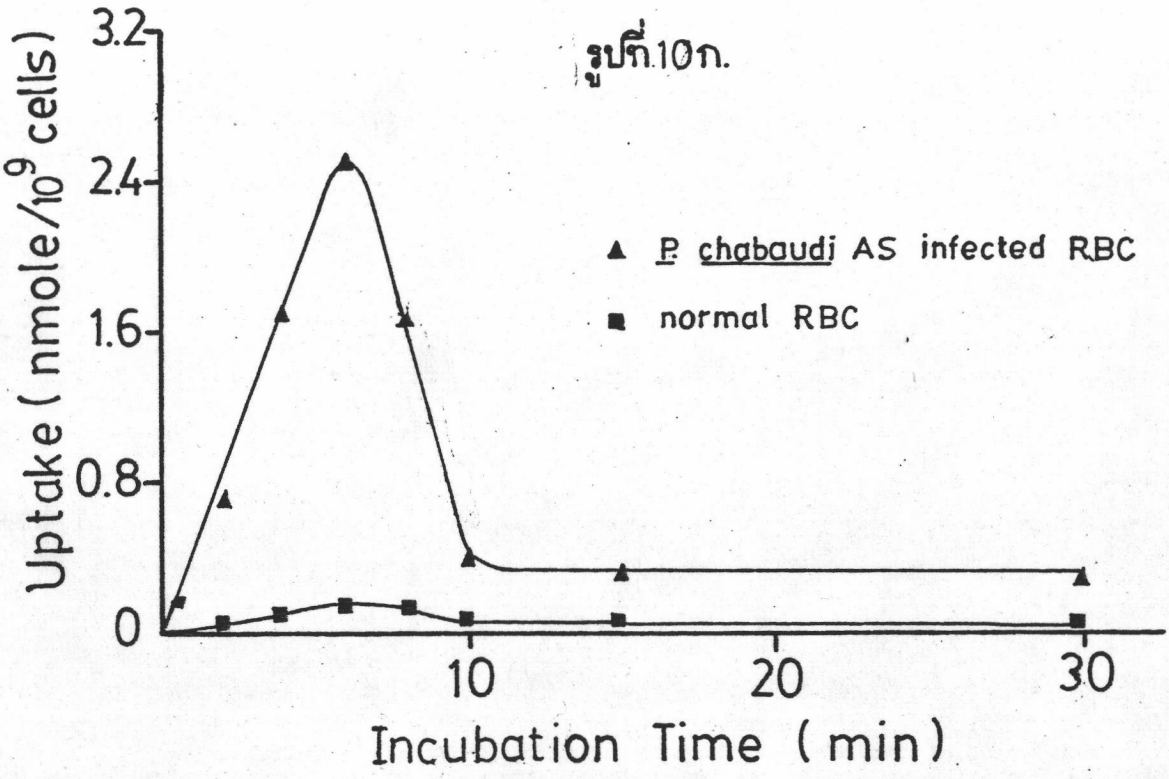


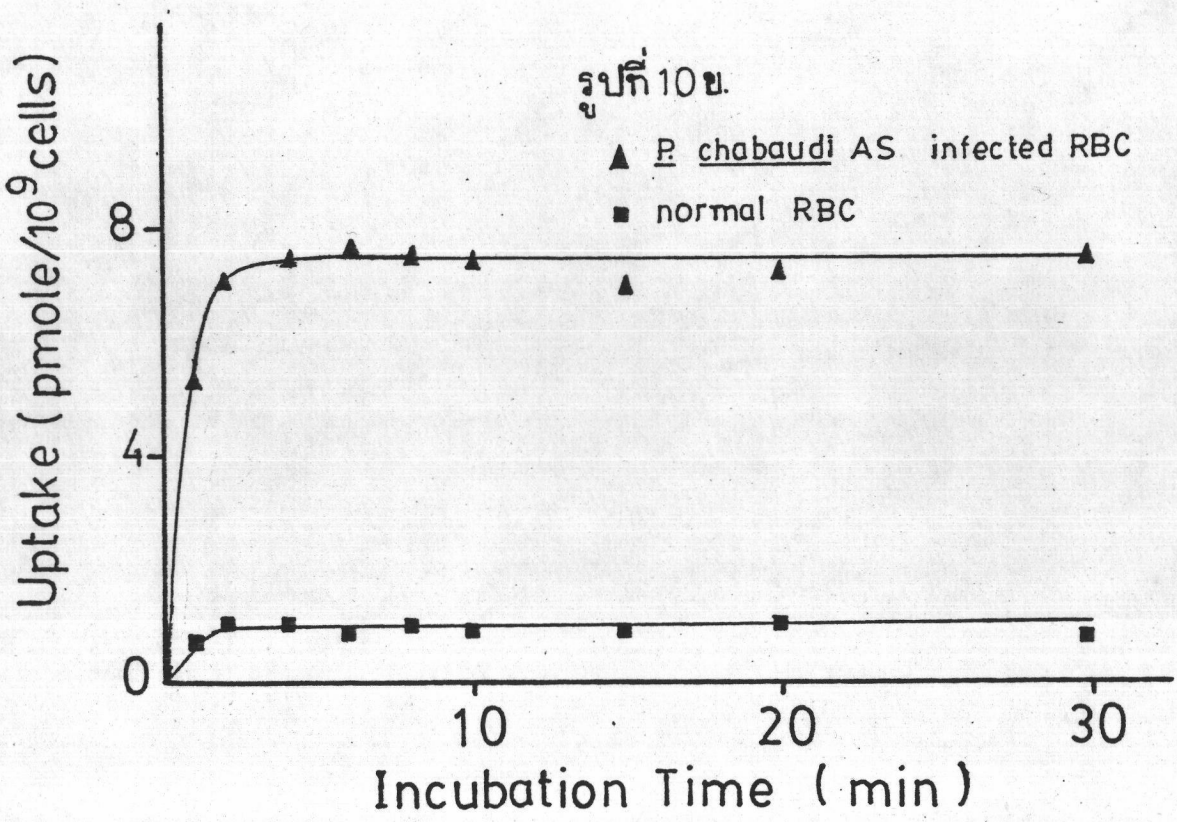
รูปที่ 8. ผลกระทบของไพริเมธามีนต่อการเจริญเติบโตของ P chabaudi AS ในเม็ดเลือดแดงหนูไมซ์ซึ่งได้รับเชื้อพลาสโมเดียมประมาณ 10^8 เซลล์ และเพาะเลี้ยงตามวิธีทดลองข้อ 3.3 โดยฉีดไพริเมธามีนขนาดต่างๆกัน (0 – 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว) ทุกวันติดต่อกัน 4 วัน รายละเอียดตามที่ระบุในวิธีทดลองข้อ 3.5



รูปที่ 9. ผลกระทบของไพริเมธามีนต่อการเจริญเติบโตของ P. chabaudi AS (Pr_1) ในเม็ดเลือดแดงหนูไมซ์ซึ่งได้รับเชื้อพลาสโมเดียมประมาณ 10^8 เซลล์ และเพาะเลี้ยงตามวิธีทดลองข้อ 3.3 โดยฉีดไพริเมธามีนขนาดต่างๆกัน (0-40 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว) ทุกวันติดต่อกัน 4 วัน รายละเอียดตามที่ระบุในวิธีทดลองข้อ 3.5

รูปที่ 10. ผลกระทบของ ^{14}C-pyrimethamine ความเข้มข้นสูง ๆ ต่อการนำเข้าในเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติกับเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ P.chabaudi AS ทำการทดลองตามวิธีทดลองข้อ 3.8.1 โดยอินคิวเบตเลือดปกติหรือเลือดติดเชื้อ (50 % parasitemia) 7 x 10^8 เซลล์กับ ^{14}C-pyrimethamine เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ (รูป ก.) และ 0.1 ไมโครโมลาร์ (รูป ข.) ในฟิทย์มีเดียมเป็นเวลาต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 1-30 นาที นับปริมาณกัมมันตรังสีที่ถูกนำเข้าเซลล์ตามวิธีทดลองข้อ 3.8.2.1


รูปที่ 10ก.
P. chabaudi AS infected RBC
normal RBC
Uptake (nmole/10^9 cells)
3.2
2.4
1.6
0.8
0
10
20
30
Incubation Time (min)


รูปที่ 10ข.
P. chabaudi AS infected RBC
normal RBC
Uptake (pmole/10^9 cells)
8
4
0
10
20
30
Incubation Time (min)

การทดลองนำเข้าข้อ 3.8.1) แล้วฉีดกลับเข้าไปในหนูตามวิธีข้อ 3.3 ติดตามรูปแบบและระยะการเจริญพบว่า รูปแบบและระยะการเจริญของเชื้อพลาสโมเดียม ในหนูจะยังคงเหมือนกับเชื้อที่ไม่ได้อินคิวเบตกับไพริเมธามีนทุกประการ (รูปที่ 11)

จากการทดลองอินคิวเบตเลือดติดเชื้อ พลาสโมเดียม ยาบอดี AS จำนวน 7×10^8 เซลล์ (50 เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ) กับ ^{14}C-pyrimethamine ความเข้มข้นตั้งแต่ 2-100 นาโนโมลาร์นาน 30 นาที ซึ่งแสดงผลในรูปที่ 12 จะเห็นได้ว่าอัตราการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงความเข้มข้นต่ำกว่า 20 นาโนโมลาร์ และจะลดต่ำลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ ^{14}C-pyrimethamine จนถึง 100 นาโนโมลาร์ ดังนั้นการทดลองเพื่อศึกษาจลน์ศาสตร์การนำ ^{14}C-pyrimethamine เข้าสู่เซลล์ในการวิจัยนี้ จึงจะทำการศึกษาที่ช่วงความเข้มข้นระหว่าง 2-30 นาโนโมลาร์เป็นหลัก

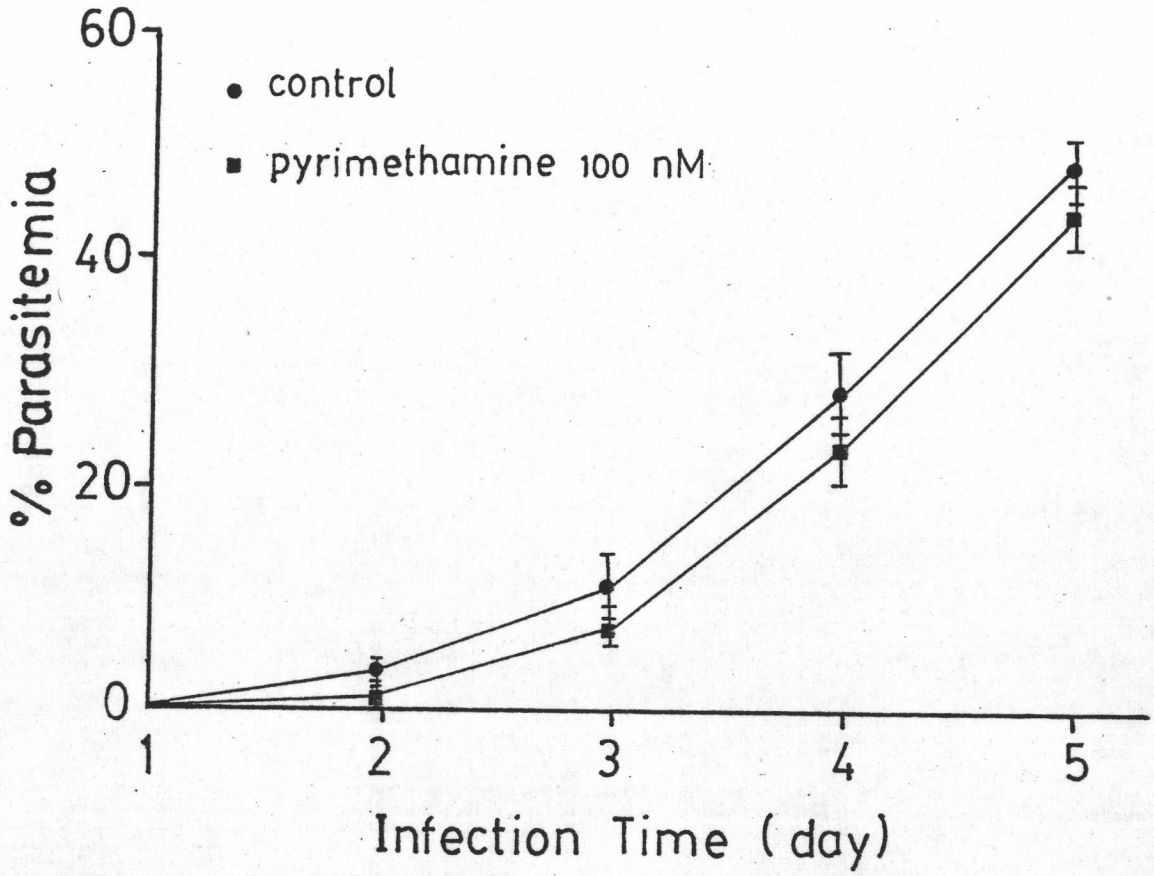
4.4 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine

4.4.1 ผลของการปั่นล้างเซลล์ต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine

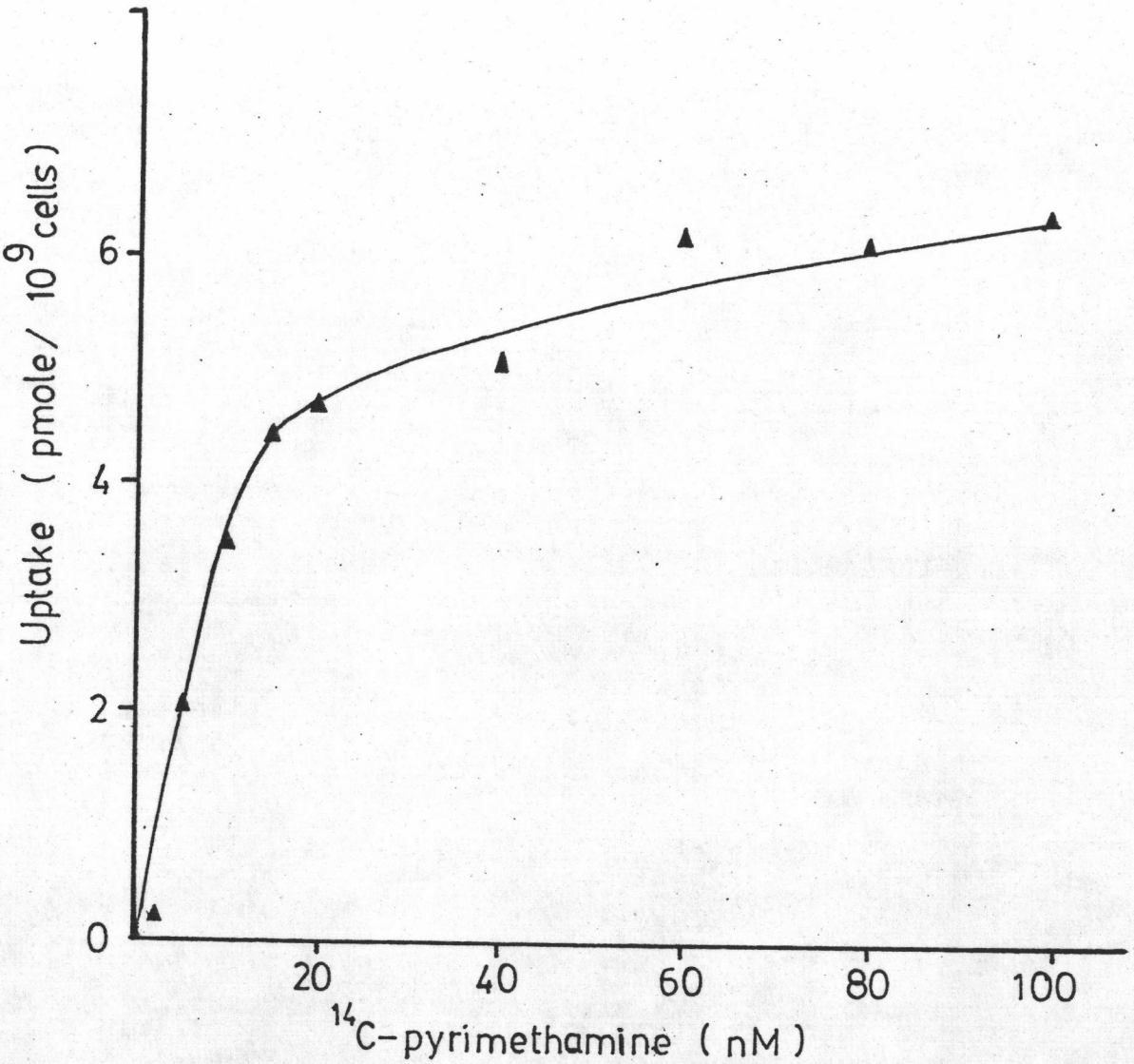
เมื่ออินคิวเบตเลือดติดเชื้อพลาสโมเดียม ยาบอดี AS จำนวน 7×10^8 เซลล์ (50 เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ) กับ ^{14}C-pyrimethamine 30 นาโนโมลาร์เป็นเวลา 30 นาที นำเซลล์ที่ได้มาปั่นล้างด้วย 0.85 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ ครั้งละ 1 มิลลิลิตร วัดระดับของ ^{14}C-pyrimethamine ที่คงเหลืออยู่ในเซลล์โดยการล่วงตามวิธีข้อ 3.8.2.1 ทุกครั้ง จำนวนทั้งสิ้น 5 ครั้ง เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของค่ากัมมันตรังสีที่วัดได้โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของค่าซึ่งวัดได้จากเซลล์ซึ่งอินคิวเบตกับ ^{14}C-pyrimethamine ในสภาวะเดียวกันโดยไม่ผ่านการล้างเซลล์เลย พบว่าระดับของ ^{14}C-pyrimethamine ที่วัดได้จะลดลงมากที่สุดถึง 40 เปอร์เซ็นต์ เมื่อล้างเซลล์เพียง 1 ครั้ง แต่จะต่ำลงอีกประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์เมื่อปั่นล้างครั้งที่สอง หลังจากนั้นระดับ ^{14}C-pyrimethamine ที่วัดได้ในเซลล์จะคงที่ (รูปที่ 13 ก.)

4.4.2 ผลของความหนาแน่นของเซลล์ต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine

จากการศึกษาการนำ ^{14}C-pyrimethamine 30 นาโนโมลาร์เข้าสู่เซลล์โดยใช้เลือดติดเชื้อ พลาสโมเดียม ยาบอดี AS (50 เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ) ด้วยความหนาแน่นของเซลล์คิดเป็นจำนวนเซลล์ทั้งหมดต่อมิลลิลิตรมีเดียมต่าง ๆ กัน (รูปที่ 13 ข.)



รูปที่ 11. รูปแบบการเจริญของ P. chabaudi AS ในเม็ดเลือดแดงหนูไมซ์ เมื่ออินคิวเบตเลือดติดเชื้อ (50 % parasitemia) 7×10^8 เซลล์กับไพริเมธามีน 100 นาโนโมลาร์ในสภาวะ in vitro นาน 30 นาที ทำการทดลองตามวิธีทดลองข้อ 3.8.1 แล้วฉีดกลับเข้าหนูปกติ (ข้อ 3.3) เปรียบเทียบรูปแบบการเจริญเติบโตกับหนูกลุ่มควบคุม ซึ่งฉีดด้วยเลือดติดเชื้อชนิดเดียวกันปริมาณเท่ากัน แต่ไม่ได้อินคิวเบตกับไพริเมธามีน



รูปที่ 12. รูปแบบการนำเข้าของ ^{14}C- pyrimethamine ในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ P. chabaudi AS ทำการทดลองตามวิธีทดลองข้อ 3.8.1 โดยอินคิวเบตเลือดติดเชื้อ (50% parasitemia) 7×10^8 เซลล์กับ ^{14}C-pyrimethamine ความเข้มข้นต่างๆกันตั้งแต่ 2 – 100 นาโนโมลาร์ นับปริมาณกัมมันตรังสีที่ถูกนำเข้าเซลล์ตามวิธีทดลองข้อ 3.8.2.2

ปรากฏว่า เมื่อเซลล์หนาแน่น $1.5 \times 10^8 - 3.0 \times 10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร การนำ ^{14}C-pyrimethamine เข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อจะมีค่าใกล้เคียงกันคือประมาณ 7.6 พิโคโมลต่อ 10^9 เซลล์ แต่ถ้าความหนาแน่นมากยิ่งกว่านี้จะมีผลกระทบต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine โดยค่านำเข้าจะลดลงเหลือเพียง 4.0 พิโคโมลต่อ 10^9 เซลล์ เมื่อใช้เซลล์ 12×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตรมีเดียม

4.4.3 ผลการศึกษาเวลาที่เหมาะสมต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine

ทำการทดลองเปรียบเทียบการนำเข้าที่เวลาต่าง ๆ กันของการอินคิวเบตตั้งแต่ 1-30 นาที เมื่อใช้เลือดติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ (5.5×10^8 เซลล์ ;50 เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ) ในลักษณะเดียวกับข้อ 4.3 โดยใช้ ^{14}C-pyrimethamine 30 นาโนโมลาร์ ผลปรากฏว่า ^{14}C-pyrimethamine จะถูกนำเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงปกติและเม็ดเลือดแดงติดเชื้อโคลน AS ได้อิ่มตัวภายในเวลา 2 นาทีแรก และคงที่ไปตลอด 30 นาที (รูปที่ 13 ค.) ในขณะที่เม็ดเลือดแดงติดเชื้อพลาสโมเดียม ฆาบอดี AS (Pr_1) ระดับกัมมันตรังสีในเซลล์ภายหลังอินคิวเบตกับ ^{14}C-pyrimethamine นาน 2 นาที จะมีค่าใกล้เคียงกับเม็ดเลือดแดงปกติ หลังจากนั้นจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงนาทีที่ 6 จึงมีค่าอิ่มตัว แต่เมื่อเปรียบเทียบปริมาณนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ต่อ 10^9 เซลล์ในเม็ดเลือดแดงติดเชื้อโคลน AS, AS (Pr_1) และเม็ดเลือดแดงปกติ จะให้ความแตกต่างอย่างชัดเจน โดยเม็ดเลือดแดงติดเชื้อโคลน AS จะมีปริมาณนำเข้าที่สภาวะอิ่มตัวสูงกว่าเม็ดเลือดแดงปกติ และเม็ดเลือดแดงติดเชื้อ พลาสโมเดียม ฆาบอดี AS (Pr_1)

4.5 ผลการศึกษาความเชื่อถือได้ของวิธีการสกัด ^{14}C-pyrimethamine ออกจากเซลล์

จากการศึกษาเปรียบเทียบ % recovery ของวิธีการสกัด ^{14}C-pyrimethamine ออกจากเซลล์เม็ดเลือดแดงตามผลการทดลองรูป14 ก. แสดงให้เห็นว่าเมื่อเติม ^{14}C-pyrimethamine ปริมาณ 0.78 - 6.72 พิโคโมลให้แก่เซลล์เม็ดเลือดแดงปกติ จำนวน 5.5×10^8 เซลล์ อินคิวเบตที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที (ซึ่งเป็นสภาวะการทดลองนำเข้า) แล้วสกัดด้วย 95 เปอร์เซ็นต์ เอทธานอลตามวิธีข้อ 3.8.2.2 พบว่าให้ % recovery สูงถึงประมาณ 100 เปอร์เซ็นต์ที่ทุก ๆ ค่ากัมมันตรังสี ซึ่งมากกว่าวิธีการสกัดด้วย 0.5 เปอร์เซ็นต์กรดแลคติคกับ 5 เปอร์เซ็นต์กรดไตรคลอโรอะซีติคตามวิธีข้อ 3.8.2.1 ประมาณเกือบ 2 เท่า

รูปที่ 13. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine

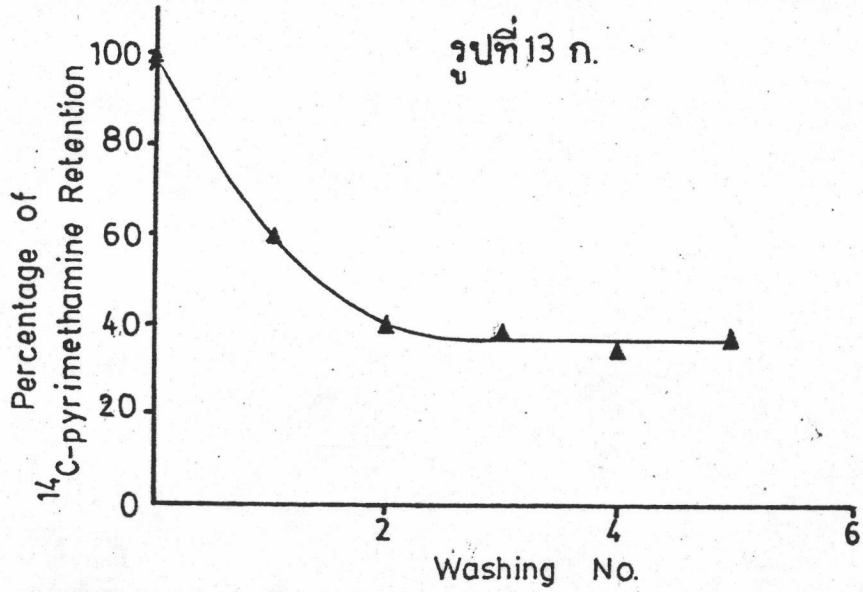
รูปที่ 13 ก. ผลของจำนวนครั้งของการปั่นล้างเซลล์ : ทำการทดลองตามวิธีข้อ 3.8.1 โดยอินคิวเบตเลือดติดเชื้อ P.chabaudi AS (50 % parasitemia) 7 x 10^8 เซลล์กับ ^{14}C-pyrimethamine ความเข้มข้น 30 นาโนโมลาร์ในฟิทช์ มีเดียมเป็นเวลา 30 นาที แล้วปั่นล้างเซลล์ด้วยจำนวนครั้งตั้งแต่ 1-5 ครั้ง

รูปที่ 13 ข. ผลของความหนาแน่นของเซลล์ : ทำการทดลองตามวิธีข้อ 3.8.1 โดยอินคิวเบตเลือดติดเชื้อ P.chabaudi AS (50 % parasitemia) จำนวนตั้งแต่ 3 x 10^8 - 24 x 10^8 เซลล์กับ ^{14}C-pyrimethamine ความเข้มข้น 30 นาโนโมลาร์ในฟิทช์มีเดียมเป็นเวลา 30 นาที

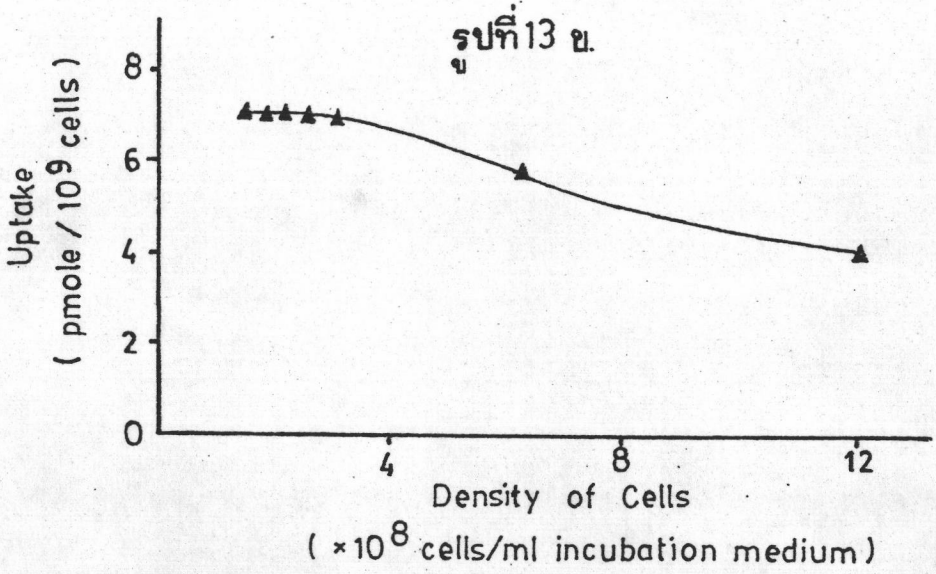
รูปที่ 13 ค. ผลการหาเวลาที่เหมาะสม: ทำการทดลองตามวิธีข้อ 3.8.1 โดยอินคิวเบตเลือดปกติหรือเลือดติดเชื้อ P.chabaudi (50 % parasitemia) 5.5 x 10^8 เซลล์กับ ^{14}C-pyrimethamine ความเข้มข้น 30 นาโนโมลาร์ในฟิทช์มีเดียม เป็นเวลาต่าง ๆ กันตั้งแต่ 1-30 นาที

นับปริมาณกัมมันตรังสีที่ถูกนำเข้าเซลล์ตามวิธีทดลองข้อ 3.8.2.1

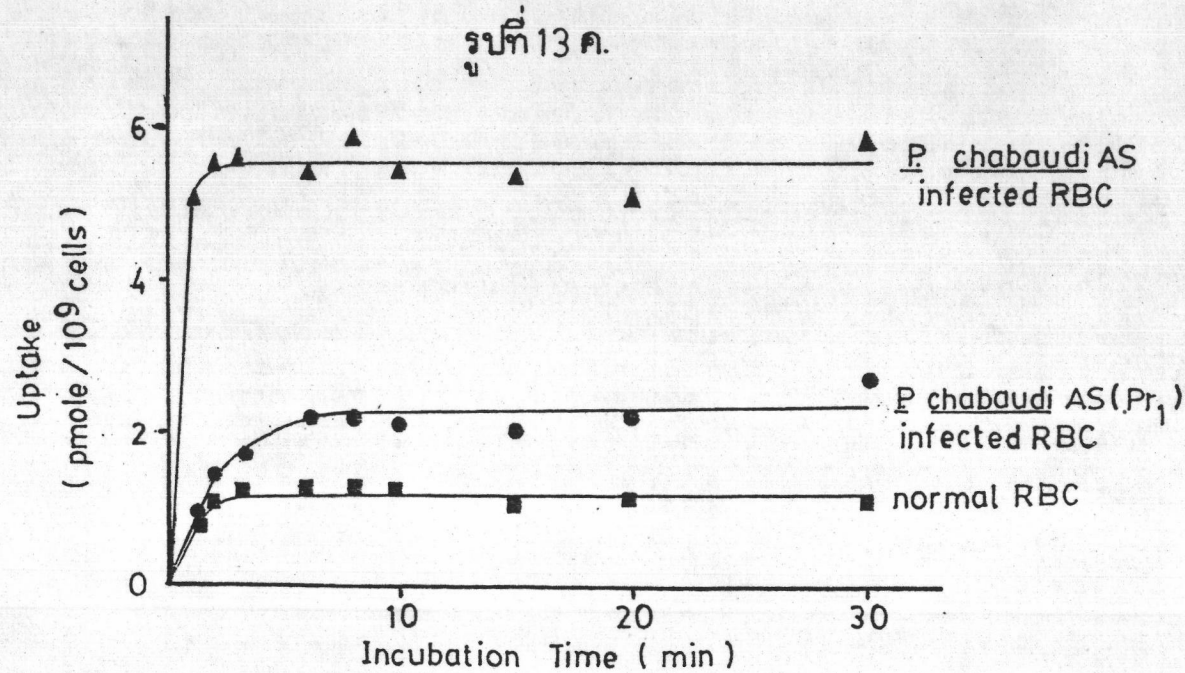
รูปที่ 13 ก.



รูปที่ 13 ข.



รูปที่ 13 ค.



ผลการทดสอบความแม่นยำ (precision) ของวิธีการสกัด ^{14}C-pyrimethamine ออกจากเซลล์เม็ดเลือดแดง จากการเติม ^{14}C-pyrimethamine 0.78 พิโคโมลและ 2.0 พิโคโมล ให้แก่เซลล์เม็ดเลือดแดงปกติ 5.5×10^8 เซลล์ แล้ววัดเปรียบเทียบปริมาณ ^{14}C-pyrimethamine จากการสกัดทั้ง 2 วิธีที่แต่ละค่ากัมมันตรังสีภายในการทดลองเดียวกัน (10 ครั้ง) ผลในตารางที่ 2 และ 3 จะเห็นได้ว่า สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนเมื่อสกัดด้วย 95 เปอร์เซ็นต์เอทธานอลจะมีค่าคงที่ประมาณ 6 เปอร์เซ็นต์ที่ปริมาณกัมมันตรังสีต่างกันอย่างตัน ส่วนการสกัดโดยใช้กรดแลคติคกับกรดไตรคลอโรอะซีติค สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนจะเพิ่มขึ้นจาก 5.3 เปอร์เซ็นต์เป็น 11.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพิ่มปริมาณกัมมันตรังสีให้แก่เซลล์

และเมื่อนำวิธีการสกัดทั้งสองมาศึกษาเปรียบเทียบปริมาณการนำ ^{14}C-pyrimethamine (2-30 นาโนโมลาร์) เข้าสู่เม็ดเลือดแดงปกติ และเม็ดเลือดแดงติดเชื้อ พลาสโมเดียม ฆ้าบอดี AS และ AS (Pr_1) จะเห็นได้ว่า (รูปที่ 14 ข.) ค่าที่วัดได้เมื่อสกัดด้วยกรดแลคติคกับกรดไตรคลอโรอะซีติคจะน้อยกว่าค่าจากการสกัดด้วยเอทธานอลประมาณ 2 เท่าที่ทุก ๆ ความเข้มข้นของ ^{14}C-pyrimethamine

การทดลองในการวิจัยเพื่อศึกษาการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ตั้งแต่นี้ไป จึงใช้เอทธานอลสกัด ^{14}C-pyrimethamine ออกจากเซลล์แทนการใช้กรดแลคติคกับกรดไตรคลอโรอะซีติค

4.6 ผลการศึกษาชนิดของมีเดียมที่เหมาะสมต่อการนำเข้าของ ^{4}C-pyrimethamine

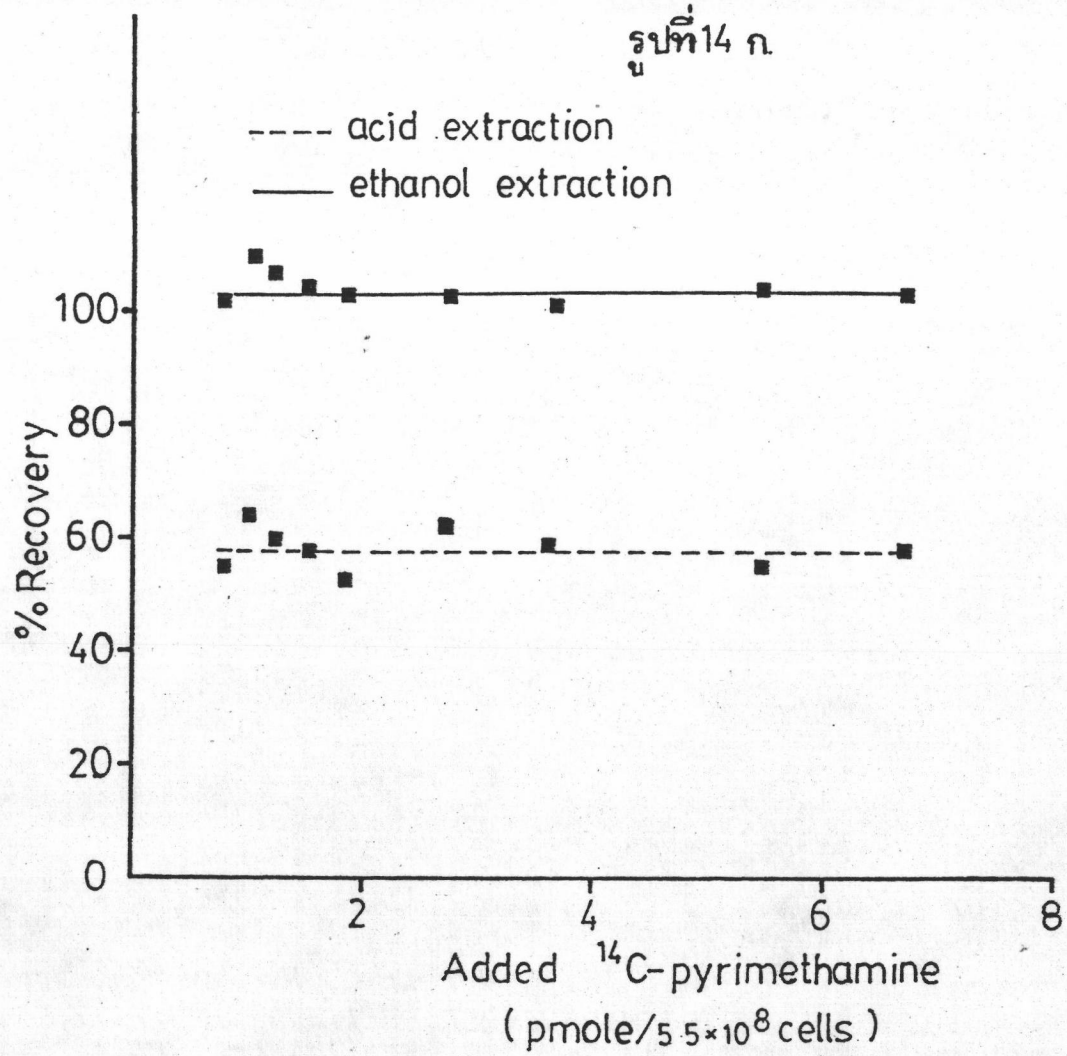
เมื่ออินคิวเบตเลือดติดเชื้อ พลาสโมเดียม ฆ้าบอดี AS จำนวน 5.5×10^8 เซลล์ (50 เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที ในฟิทย์มีเดียม ซึ่งมีไพริเมธามีนความเข้มข้นต่าง ๆ กันตั้งแต่ 2-30 นาโนโมลาร์ (รูปที่ 15) พบว่า pH ของมีเดียมจะลดลงจาก 7.40 เหลือประมาณ 7.30 แต่เมื่อทำการทดลองแบบเดียวกันในฮีพส์บัฟเฟอร์ซาลีน pH 7.4 ซึ่งมีกลูโคสเป็นองค์ประกอบเท่ากับฟิทย์มีเดียมคือ 86 มิลลิโมลาร์ ปรากฏว่า pH ของบัฟเฟอร์ซาลีนหลังการอินคิวเบตเซลล์เกือบไม่มีการเปลี่ยนแปลงเลย (ประมาณ 0.02 หน่วย pH) ที่ทุก ๆ ความเข้มข้นของไพริเมธามีน

รูปที่ 14. เปรียบเทียบวิธีการสกัด ^{14}C-pyrimethamine ออกจากเซลล์ด้วย 95 เปอร์เซ็นต์เอทธานอล (ข้อ 3.8.2.2) และการสกัดด้วย 0.5 เปอร์เซ็นต์กรดแลคติคกับ 5 เปอร์เซ็นต์กรดไตรคลอโรอะซีติค (Ploydanai, 1982) (ข้อ 3.8.2.1)

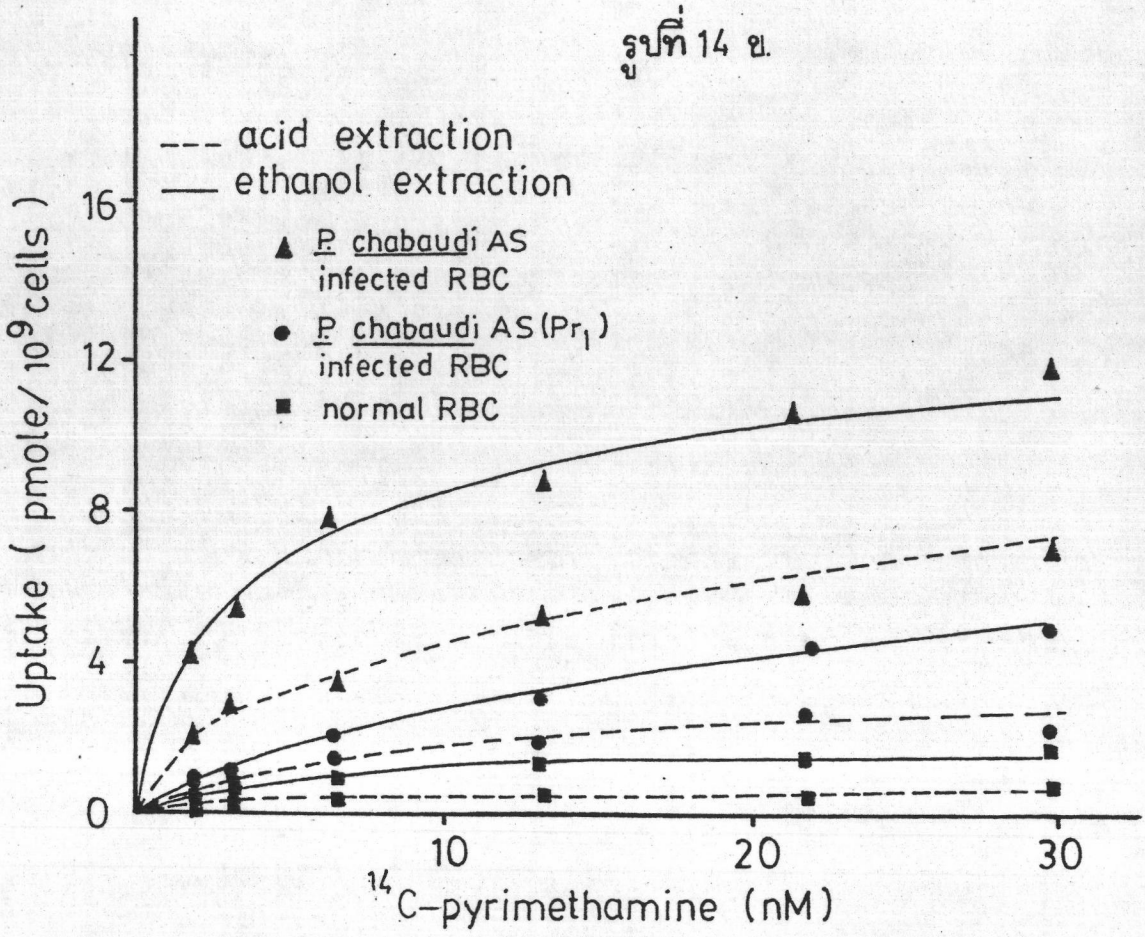
รูปที่ 14 ก. เปรียบเทียบ % recovery ของค่าที่วัดได้จากการสกัด ^{14}C-pyrimethamine ออกจากเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติ

รูปที่ 14 ข. เปรียบเทียบการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ในเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติ และเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ P.chabaudi ทำการทดลองตามวิธีทดลองข้อ 3.8.1

รูปที่ 14 ก.



รูปที่ 14 ข.



ตารางที่ 2. แสดงความแม่นยำ (แบบ within assay) ของการวัดปริมาณ ^{14}C-pyrimethamine ซึ่งสกัดออกจากเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติด้วย 95 เปอร์เซนต์เอทานอล[1]

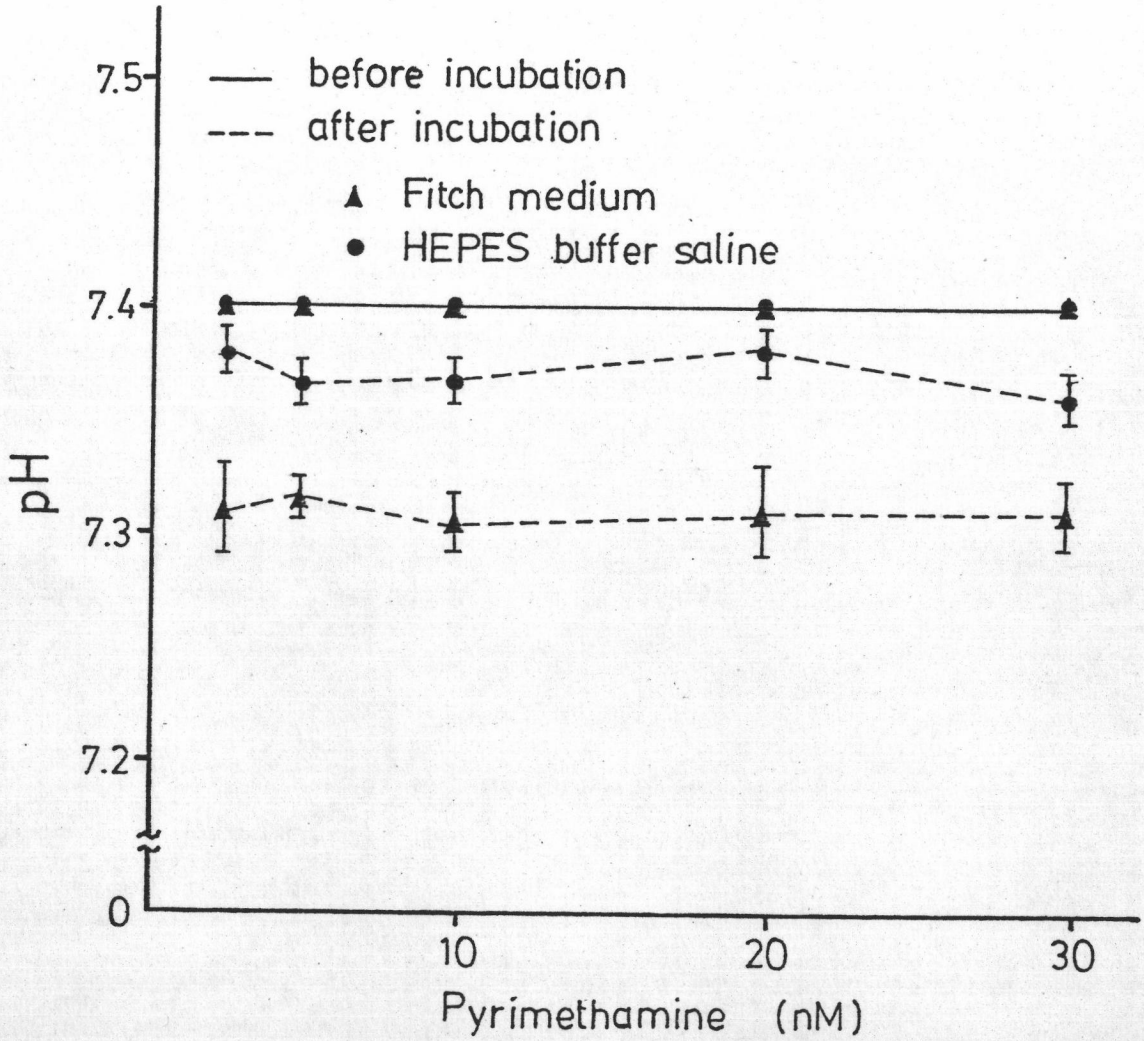
Statistic of[2] Measured ^{14}C-pyrimethamine	Amount of ^{14}C-pyrimethamine Added (pmole / 5.5×10^8 cells)	
	0.78	2.00
$\bar{X}$ (n=10)	0.81	1.98
S.D.	0.05	0.12
% C.V.	6.17	6.06

ตารางที่ 3. แสดงความแม่นยำ (แบบ within assay) ของการวัดปริมาณ ^{14}C-pyrimethamine ซึ่งสกัดออกจากเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติด้วย 0.5 เปอร์เซนต์กรดแลคติคกับ 5 เปอร์เซนต์กรดไตรคลอโรอะซีติค[1]

Statistic of[2] Measured ^{14}C-pyrimethamine	Amount of ^{14}C-pyrimethamine Added (pmole/ 5.5×10^8 cells)	
	0.78	2.00
$\bar{X}$ (n=10)	0.38	0.78
S.D.	0.02	0.09
% C.V.	5.33	11.53

(1) รายละเอียดระบุในวิธีทดลองข้อ 3.8.3.2

(2) pmole/ 5.5×10^8 cells



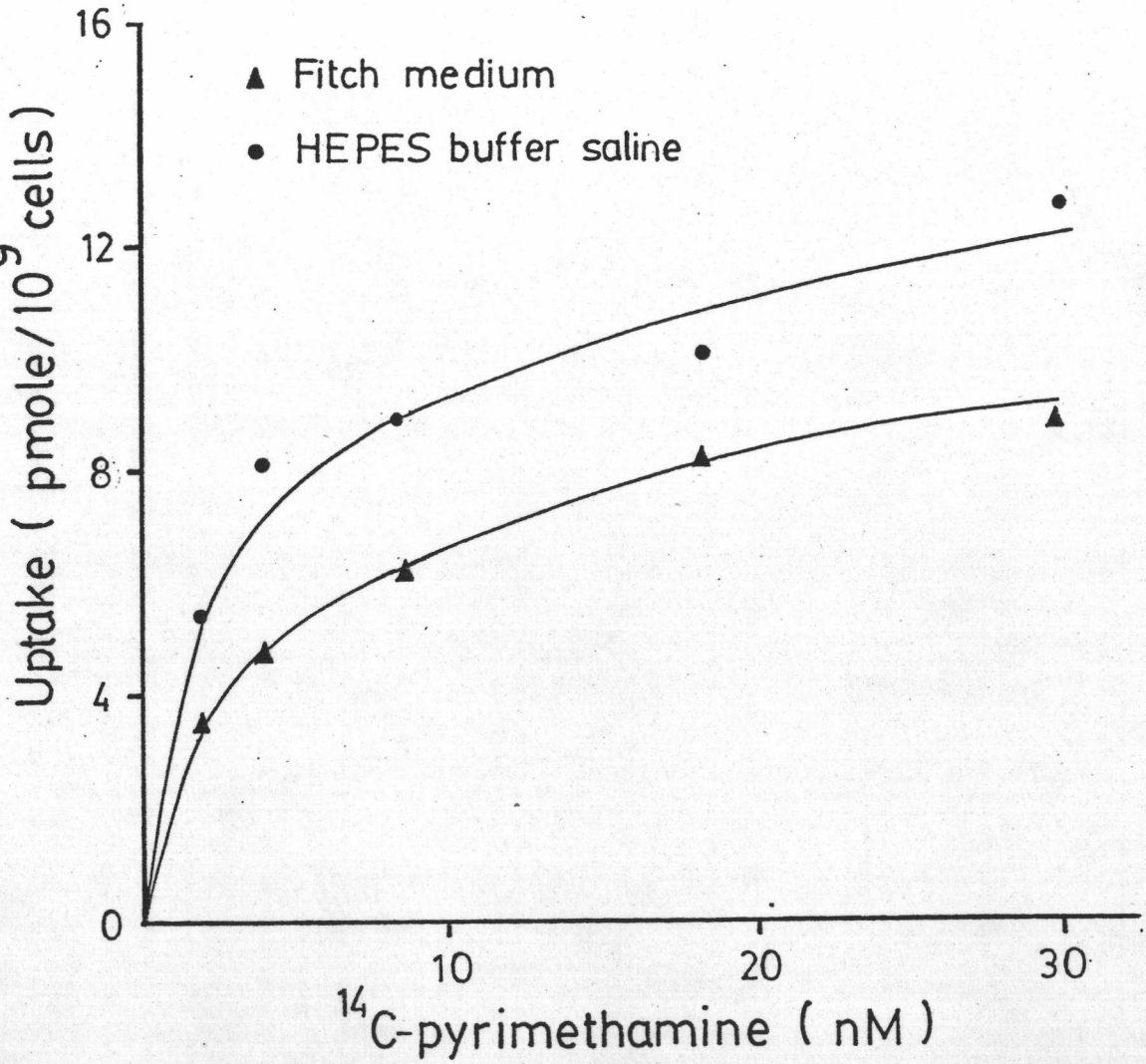
รูปที่ 15. เปรียบเทียบความสามารถในการรักษาระดับ pH ในระหว่างทำการทดลองการนำเข้า ^{14}C-pyrimethamine ของฟิทช์-มีเดียมและ 20 มิลลิโมลาร์ฮีพส์บัฟเฟอร์ซาลีน pH 7.4 (86 มิลลิโมลาร์กลูโคส) เมื่ออินคิวเบตเลือดติดเชื้อ P. chabaudi AS (50 % parasitemia) ก๊บไพริเมธามีนความเข้มข้นต่างๆกันตั้งแต่ 2-30 นาโนโมลาร์ ตามวิธีทดลองข้อ 3.8.1

นอกจากนี้เมื่อได้ทำการทดลองเปรียบเทียบค่าการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine (2-30 นาโนโมลาร์) ในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ พลาส์โมเดียม ฆ่าบอดี AS ระหว่างการใช้ฟิทย์มีเดียมและฮีพส์บัฟเฟอร์ซาลีน pH 7.4 (86 มิลลิโมลาร์กลูโคส) ปรากฏว่าเมื่อใช้ฮีพส์-บัฟเฟอร์ซาลีน pH 7.4 เป็นมีเดียมสำหรับการทดลองนำเข้าจะให้ผลการนำเข้าสูงกว่าการใช้ฟิทย์มีเดียม (รูปที่ 16) ผลการทดลองในรูปที่ 17 แสดงให้เห็นอีกว่า ไม่มีความแตกต่างของปริมาณนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine เมื่อทำการศึกษาในฮีพส์บัฟเฟอร์ซาลีน pH 7.4 เปรียบเทียบกับฮีพส์บัฟเฟอร์ซาลีน pH 7.4 ซึ่งมีแมกนีเซียมซัลเฟต 1.2 มิลลิโมลาร์ (เท่ากับในฟิทย์มีเดียม) และฮีพส์บัฟเฟอร์ซาลีน pH 7.4 ซึ่งใช้โปแตสเซียมคลอไรด์แทนโซเดียม-คลอไรด์

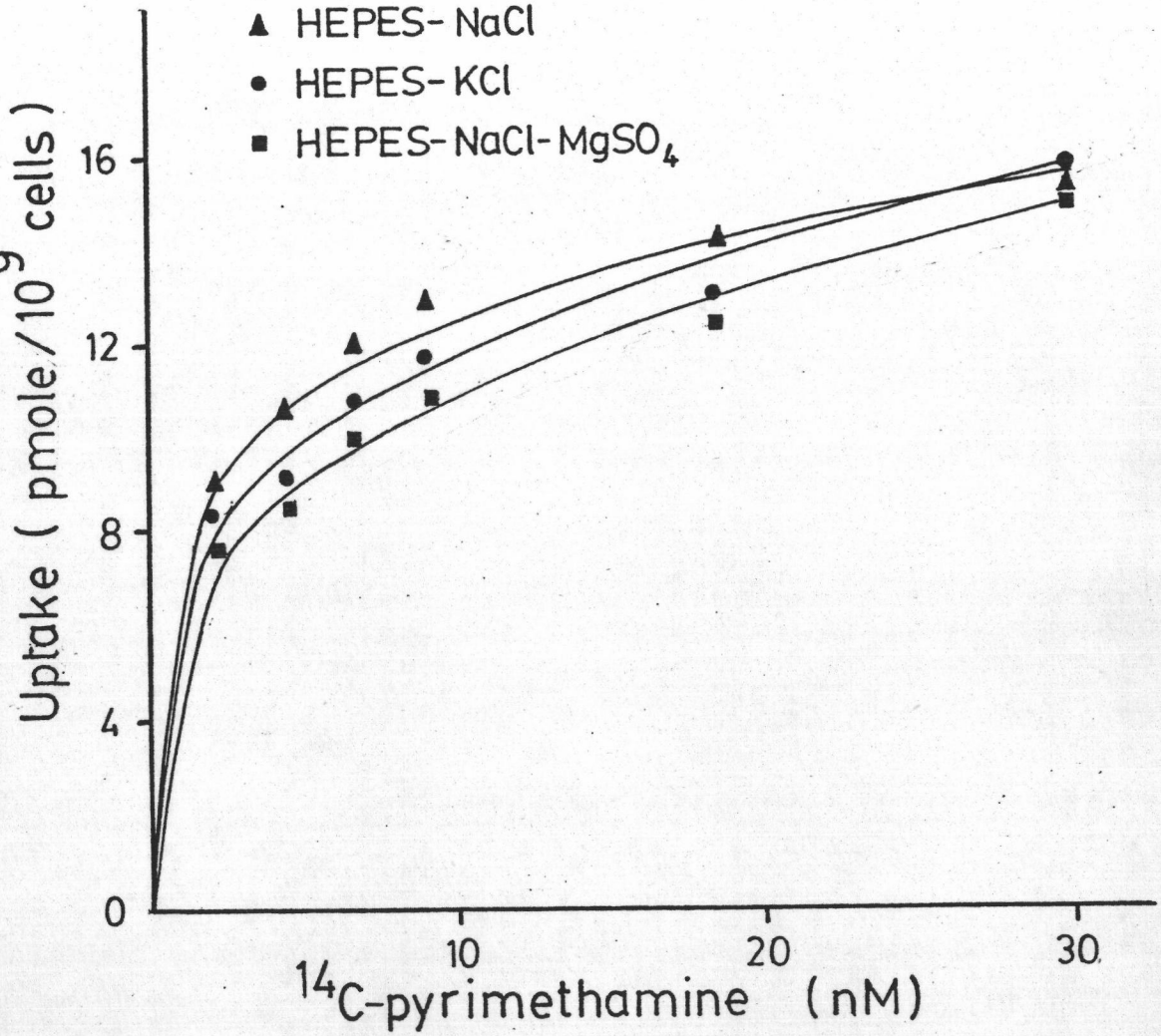
ในการศึกษาทดลองต่อ ๆ ไปของงานวิจัยนี้จึงใช้ฮีพส์บัฟเฟอร์ซาลีน pH 7.4 เป็นมีเดียมสำหรับศึกษากลไกการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine

4.7 ผลกระทบของลักษณะการติดเชื้อต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine

ในการวิจัยได้ติดตามศึกษาและสังเกตลักษณะการติดเชื้อของเม็ดเลือดแดงโดยใช้กล้องจุลทัศน์ (ข้อ 3.4) ควบคู่ไปกับการศึกษาการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ผลในตารางที่ 4 แสดงถึงค่าการเปรียบเทียบปริมาณการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine (ที่ความเข้มข้น 30 นาโนโมลาร์) ในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ พลาส์โมเดียม ฆ่าบอดี AS ภายใต้สภาวะมาตรฐานการทดลองนำเข้าตามวิธีทดลองข้อ 3.8.1 โดยอินคิวเบตเลือดติดเชื้อ 5.5×10^8 เซลล์ กับ ^{14}C-pyrimethamine ในฮีพส์บัฟเฟอร์ซาลีน pH 7.4 (86 มิลลิโมลาร์กลูโคส) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที แล้วสกัดด้วยเอทธานอลตามวิธีข้อ 3.8.2.2 โดยใช้เลือดติดเชื้อซึ่งมีเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อตั้งแต่ 44.5 - 58.2 เปอร์เซ็นต์ แต่มีลักษณะการติดเชื้อแบบ multi-infection แตกต่างกันออกไป จะเห็นได้ว่าการติดเชื้อแบบ multi-infection เฉพาะอย่างยิ่งที่องศาสูงกว่า double-infection จะมีผลต่อปริมาณ ^{14}C-pyrimethamine ที่นำเข้าเซลล์ สังเกตได้จากการนำเข้าของเลือดติดเชื้อที่มีเปอร์เซ็นต์ของเม็ดเลือดแดงติดเชื้อใกล้เคียงกัน เช่นที่ 54.6, 55.5 และ 58.2 เปอร์เซ็นต์ จะให้ค่าการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ในเม็ดเลือดแดงติดเชื้อต่างกันอย่างชัดเจนคือ 14.54, 9.06 และ 12.15 พิโคโมลต่อ 10^9 เซลล์ในเมื่อค่าเปอร์เซ็นต์ double-infection



รูปที่ 16. เปรียบเทียบการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ P. chabaudi AS ในฟิทช์มีเดียมและฮีพส์บัฟเฟอร์ซาลีน (86 มิลลิโมลาร์กลูโคส) : อินคิวเบตเลือดติดเชื้อ (50 % parasitemia) กับ ^{14}C-pyrimethamine ตามวิธีทดลองข้อ 3.8.1 นับปริมาณก้มมันตรังสีที่ถูกนำเข้าเซลล์ตามวิธีทดลองข้อ 3.8.2:2



รูปที่ 17. เปรียบเทียบการนำเข้าของ ^{14}C- pyrimethamine ในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ P chabaudi AS ในฮีพส์บัฟเฟอร์ (86 มิลลิโมลาร์กลูโคส) ซึ่งมีองค์ประกอบต่าง ๆ กัน :

- 145 มิลลิโมลาร์โซเดียมคลอไรด์ (บัฟเฟอร์ซาลีน)
- 140 มิลลิโมลาร์โปแตสเซียมคลอไรด์
- 145 มิลลิโมลาร์โซเดียมคลอไรด์ + 1.2 มิลลิโมลาร์แมกนีเซียมซัลเฟต

ทำการทดลองตามวิธีทดลองข้อ 3.8.1 นับปริมาณก้ม-มันตรังสีที่ถูกนำเข้าเซลล์ตามวิธีทดลองข้อ 3.8.2.2

ตารางที่ 4 แสดงผลกระทบของลักษณะการติดเชื้อ P. chabaudi AS ต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine: ทำการทดลองตามวิธีทดลองข้อ 3.8.1 โดยใช้เลือดติดเชื้อซึ่งมีเปอร์เซนต์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อและลักษณะการติดเชื้อแบบ multi-infection ต่างๆกัน นับปริมาณกัมมันตรังสีที่ถูกนำเข้าเซลล์ตามวิธีทดลองข้อ 3.8.2.2

% Parasitemia	% Multi-infection		Uptake * (pmole/10^9 cells)
	Double-infection	Triple-infection	
44.5 (22.8 T + 21.7 S)	19.0	16.4	8.76
54.6 (24.6 T + 30.0 S)	29.8	32.3	14.54
55.5 (27.3 T + 28.2 S)	25.8	11.8	9.06
58.2 (29.0 T + 29.2 S)	30.5	27.1	12.15

T = trophozoite

S = shizont

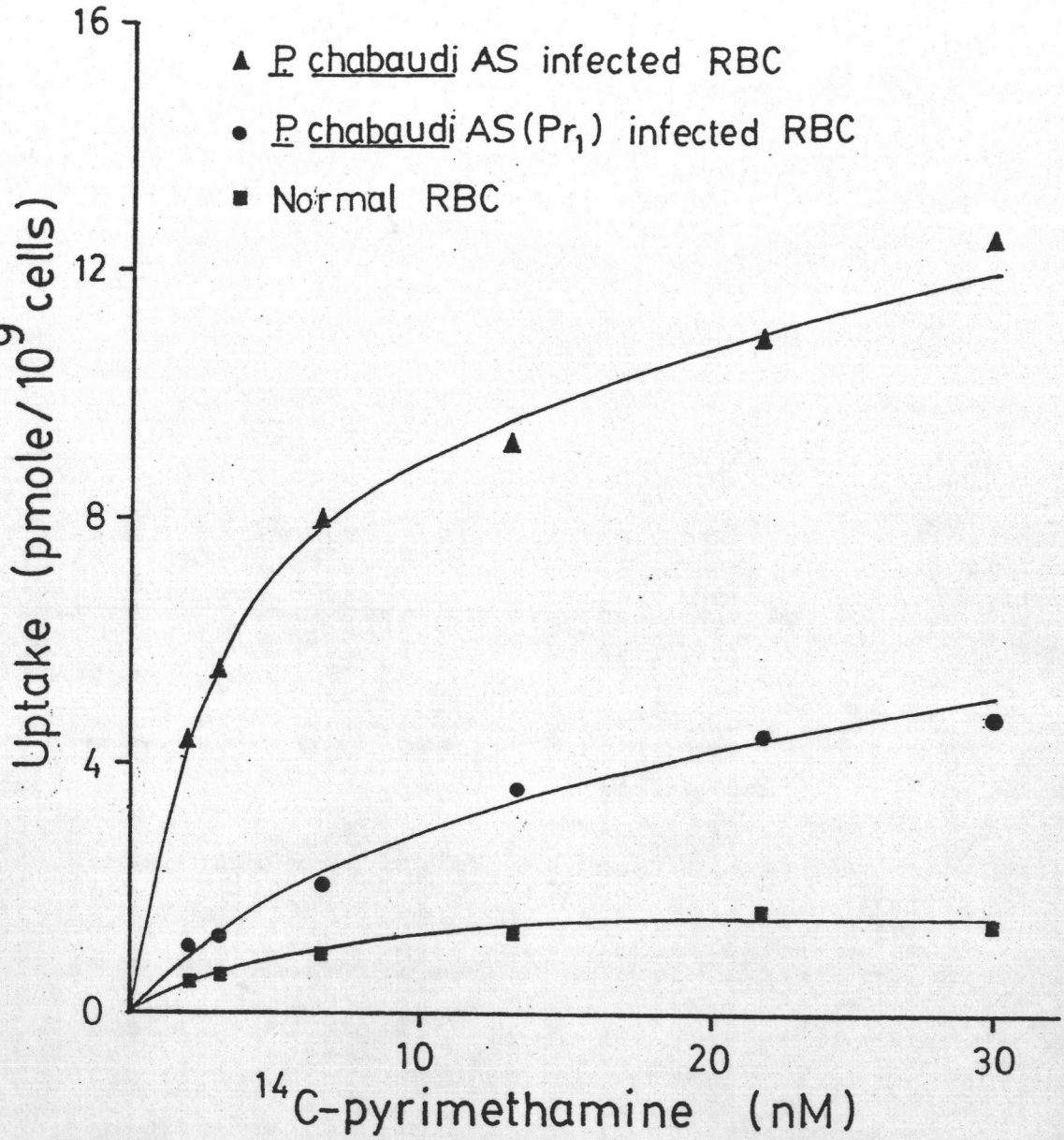
* value at ^{14}C-pyrimethamine 30 nM

ไม่ต่างกันมากนัก แต่ค่าเปอร์เซ็นต์ triple-infection ต่างกันคือ 32.3, 11.8 และ 27.1 ตามลำดับ เช่นเดียวกับค่าการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ในเลือดติดเชื้อที่มีเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ 44.5 เปอร์เซ็นต์ กับ 55.5 เปอร์เซ็นต์ จะมีค่าใกล้เคียงกัน เมื่อค่าเปอร์เซ็นต์ triple-infection ของเม็ดเลือดแดงติดเชื้อเป็น 16.4 และ 11.8 ตามลำดับ

4.8 ผลการเปรียบเทียบปริมาณการนำเข้าของ ^{4}C-pyrimethamine ในเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติและเม็ดเลือดแดงติดเชื้อ พลาสโมเดียม ฆ่าบอดี

จากการศึกษาการนำเข้าของ ^{4}C-pyrimethamine ในเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติและเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ พลาสโมเดียม ฆ่าบอดี ที่สภาวะมาตรฐานการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.7 พบว่า (รูปที่ 18) รูปแบบการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ พลาสโมเดียม ฆ่าบอดี AS (ใช้เลือดที่มีเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ 50 เปอร์เซ็นต์; ติดเชื้อแบบ double-infection 30.5 เปอร์เซ็นต์ และ triple-infection 27.1 เปอร์เซ็นต์) พอจะแบ่งได้เป็น 2 เฟส (phase) คือ เฟสแรกอัตราการนำเข้าจะเพิ่มขึ้นเร็วมากจนมีค่าประมาณ 8 พิโคโมลต่อ 10^{9} เซลล์เมื่อใช้ ^{14}C-pyrimethamine ความเข้มข้น 6.5 นาโนโมลาร์ หลังจากนั้นจะเข้าสู่เฟสที่สอง ซึ่งอัตราการนำเข้าจะลดลง โดยค่านำเข้าที่ ^{14}C-pyrimethamine 30 นาโนโมลาร์ มีค่าเป็น 12.0 พิโคโมลต่อ 10^{9} เซลล์

รูปแบบการนำเข้าในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ พลาสโมเดียม ฆ่าบอดี AS (Pr_1) จะคล้ายคลึงกับเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ พลาสโมเดียม ฆ่าบอดี AS แต่อัตราการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ในเฟสแรกและเฟสที่สองจะไม่แตกต่างกันมากนัก ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เมื่อใช้เลือดติดเชื้อโคลน AS(Pr_1) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ 50 เปอร์เซ็นต์ (ติดเชื้อแบบ double-infection 32.3 เปอร์เซ็นต์ และ triple-infection 29.8 เปอร์เซ็นต์) ปริมาณนำเข้าที่ ^{14}C-pyrimethamine 30 นาโนโมลาร์จะมีค่าเพียง 4.9 พิโคโมลต่อ 10^{9} เซลล์ (น้อยกว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อโคลน AS ประมาณ 2.5 เท่า)



รูปที่ 18. เปรียบเทียบการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ในเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติ และเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ P chabaudi ทำการทดลองตามวิธีทดลองข้อ 3.8.1 นับปริมาณก๊มม๊นตรังสีที่ถูกนำเข้าเซลล์ตามวิธีทดลองข้อ 3.8.2.2

^{14}C-pyrimethamine จะถูกนำเข้าเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติต่ำมาก (1:3 พิโคโมล ต่อ 10^9 เซลล์) และรูปแบบการนำเข้าคล้ายคลึงกับเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ พลาส์โมเดียม ฆ่าบอดี AS (Pr_1) มากกว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ พลาส์โมเดียม ฆ่าบอดี AS แต่ค่านำเข้าจะเริ่มคงที่เมื่อความเข้มข้นของ ^{14}C-pyrimethamine ที่ใช้ประมาณ 10-15 นาโนโมลาร์

4.9 ผลการวิเคราะห์ปริมาณฮีโมโกลบินในเลือดปกติและเลือดติดเชื้อพลาส์โมเดียม ฆ่าบอดี

เมื่อทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงในเลือดปกติ และเลือดติดเชื้อ พลาส์โมเดียม ฆ่าบอดี AS และ AS(Pr_1) แตกตัวด้วยน้ำกลั่นแล้ววัดปริมาณฮีโมโกลบินที่ถูกปล่อยออกจากเซลล์ (ใช้กราฟมาตรฐานภาคผนวกที่ 3) ตามวิธีทดลองข้อ 3.9.2 ตารางที่ 5 แสดงให้เห็นว่าเลือดติดเชื้อ (ทั้ง 2 โคลน) ที่มีเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อและลักษณะการเกิด multi-infection ต่าง ๆ กัน (พิจารณาเฉพาะ double-infection และ triple-infection) จะมีปริมาณฮีโมโกลบินต่อ 10^9 เซลล์ใกล้เคียงกัน ซึ่งค่านี้ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับค่าที่วัดได้ในเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติ คือประมาณ 23.41 $\pm$ 0.3 มิลลิกรัมต่อ 10^9 เซลล์ (สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนเท่ากับ 1.28 เปอร์เซ็นต์)

4.10 ผลกระทบของอุณหภูมิต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine และการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดง ในเลือดปกติและเลือดติดเชื้อ พลาส์โมเดียม ฆ่าบอดี

จากการศึกษาการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 2-50 องศาเซลเซียส พบว่า (รูปที่ 19 ก.) ไม่สามารถสังเกตความแตกต่างของปริมาณการนำ ^{14}C-pyrimethamine เข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงปกติที่อุณหภูมิ 2, 10, 37 และ 50 องศาเซลเซียส (ตลอดช่วงความเข้มข้น 2-30 นาโนโมลาร์) ผลกระทบของอุณหภูมิต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine เมื่อทดลองกับเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ พลาส์โมเดียม ฆ่าบอดี AS แสดงในรูปที่ 19 ค. จะเห็นได้ว่าค่านำเข้าจะมากขึ้น เมื่อทำการทดลองที่อุณหภูมิ 50, 2, 10 และ 37 องศาเซลเซียสตามลำดับ ส่วนเม็ดเลือดแดงติดเชื้อโคลน AS (Pr_1) จะนำเข้า ^{14}C-pyrimethamine มากที่สุดที่อุณหภูมิ 10 กับ 2 องศาเซลเซียส รองลงมาคือ 37 และ 50 องศาเซลเซียสตามลำดับ (รูปที่ 19 จ.)

ตารางที่ 5 แสดงผลการเปรียบเทียบปริมาณฮีโมโกลบินในเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติและเลือดติดเชื้อ P. chabaudi ซึ่งมีเปอร์เซนต์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ และลักษณะการติดเชื้อแบบ multi-infection ต่างๆกัน ทำการทดลองตามวิธีทดลองข้อ 3.9.2

	% Parasitemia	% Multi-infection		Hemoglobin ($mg/10^9$ total cells)
		Double-infection	Triple-infection	
NC	—	—	—	23.70
NC	—	—	—	23.85
SB	56.8	27.6	23.6	23.45
SB	52.3	30.5	13.5	23.10
RB	45.5	25.2	12.5	23.30
RB	53.3	33.5	17.0	23.08

NC = normal red blood cell

SB = P. chabaudi AS infected blood

RB = P. chabaudi AS(Pr_1) infected blood

สำหรับผลของอุณหภูมิต่อการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดง (รูปที่ 19 ข., ง., จ.) พบว่าการแตกของเซลล์ที่แต่ละอุณหภูมิไม่มีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของ ^{14}C-pyrimethamine ที่ใช้ทดลอง (2-30 นาโนโมลาร์) อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียสทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงในเลือดปกติ เลือดติดเชื้อโคลน AS (Pr_1) และ AS แตกตัวโดยเฉลี่ยที่ทุกความเข้มข้นของไพริเมธามีนเท่ากับ 4.72 $\pm$ 0.51, 6.04 $\pm$ 0.94 และ 13.68 $\pm$ 1.27 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ทำให้เลือดปกติและเลือดติดเชื้อโคลน AS(Pr_1) แตกตัวใกล้เคียงกัน คือ 5.74 $\pm$ 1.27 และ 5.22 $\pm$ 0.49 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่าการแตกตัวของเลือดติดเชื้อโคลน AS เล็กน้อย (8.77 $\pm$ 0.68 เปอร์เซ็นต์) เลือดปกติแตกตัวเพียง 2.98 $\pm$ 0.51 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสน้อยกว่าค่าของเลือดติดเชื้อ พลาสโมเดียม ฆาบอดี AS(Pr_1) และ AS ซึ่งเท่ากับ 5.9 $\pm$ 0.59 และ 6.66 $\pm$ 0.75 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสจะทำให้เซลล์แตกตัวมากกว่าที่อุณหภูมิอื่น ๆ คือ เลือดปกติแตก 10.69 $\pm$ 0.89 เปอร์เซ็นต์ เลือดติดเชื้อโคลน AS (Pr_1) แตก 57.91 $\pm$ 8.75 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เลือดติดเชื้อ พลาสโมเดียม ฆาบอดี AS แตกตัวสูงถึง 74.48 $\pm$ 3.04 เปอร์เซ็นต์

4.11 ผลกระทบของ pH ต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine และการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดง ในเลือดปกติและเลือดติดเชื้อ พลาสโมเดียม ฆาบอดี

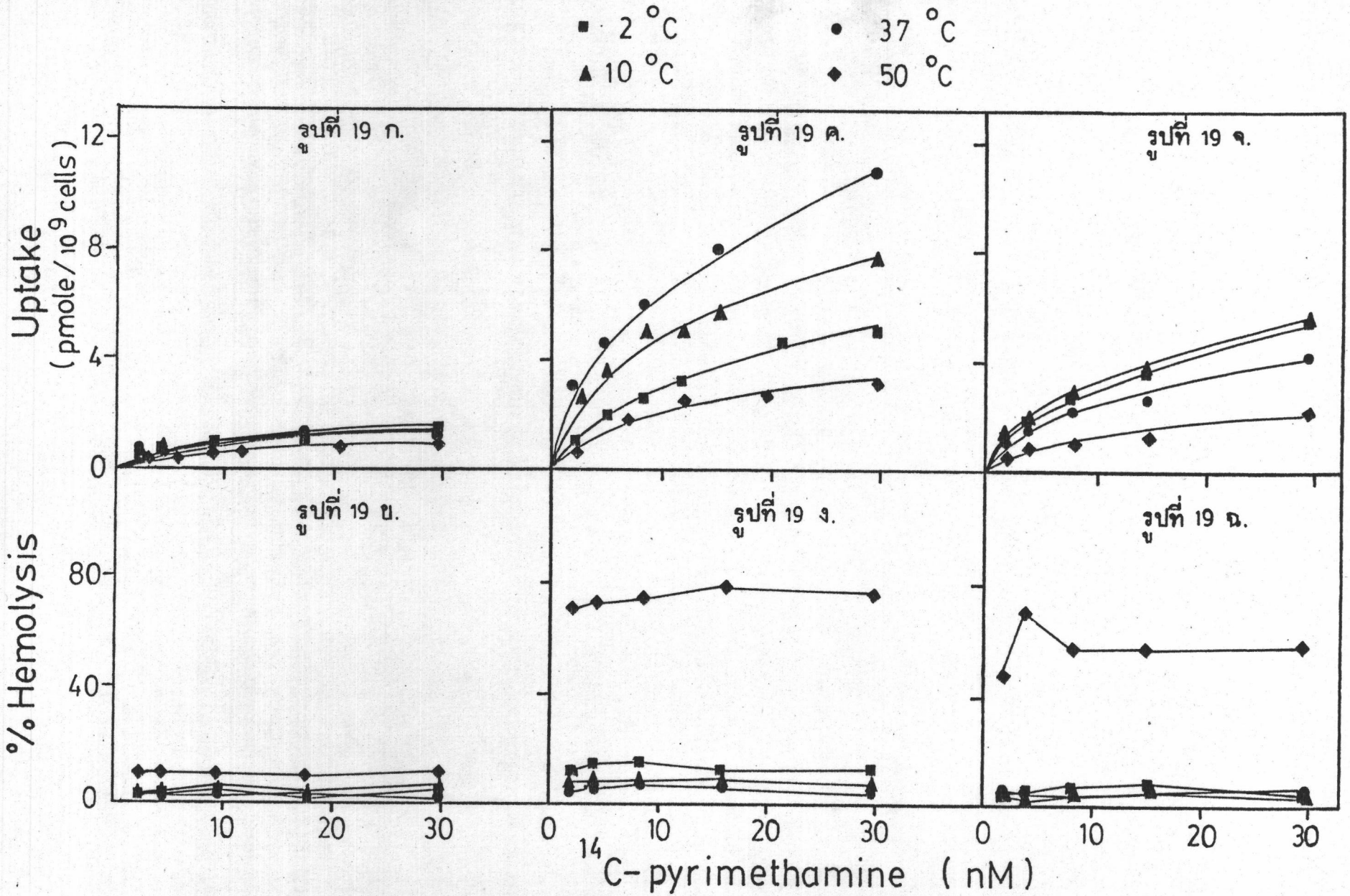
เมื่อทำการทดลองเปรียบเทียบการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ในฮีพส์บัฟเฟอร์ซาลีน pH ต่าง ๆ กันตั้งแต่ 6.6 - 8.1 ผลการทดลองตามรูปที่ 20 ก. แสดงให้เห็นว่าปริมาณการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine จะไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ pH ต่าง ๆ ซึ่งใช้ทดลองกับเม็ดเลือดแดงปกติ สำหรับเม็ดเลือดแดงติดเชื้อ พลาสโมเดียม ฆาบอดี AS (รูปที่ 20 ค.) จะมีค่าการนำเข้าในฮีพส์บัฟเฟอร์ซาลีน pH 8.1 กับ 7.4 มากกว่า pH 7.0 และจะน้อยสุดเมื่อทำการทดลองที่ pH 6.6 ส่วนเม็ดเลือดแดงติดเชื้อโคลน AS (Pr_1) ผลกระทบจาก pH จะแตกต่างจากเม็ดเลือดแดงติดเชื้อโคลน AS เล็กน้อยคือ ^{14}C-pyrimethamine จะนำเข้าสูงสุดที่ pH 7.0 ตามด้วย pH 7.4 กับ 8.1 ซึ่งใกล้เคียงกัน และค่านำเข้าจะยังคงต่ำสุดที่ pH 6.6 เช่นกัน (รูปที่ 20 จ.)

รูปที่ 19. ผลกระทบของอุณหภูมิต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine และการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงในเลือดปกติและเลือดติดเชื้อ P.chabaudi (50 % parasitemia) ทำการทดลองตามวิธีทดลองข้อ 3.8.1 โดยอินคิวเบตเซลล์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กันตั้งแต่ 2-50 °ซ นับปริมาณกัมมันตรังสีที่ถูกนำเข้าเซลล์ตามวิธีทดลองข้อ 3.8.2.2

รูปที่ 19 ก.,ข. เซลล์เม็ดเลือดแดงปกติ

รูปที่ 19 ค.,ง. เซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ P.chabaudi AS

รูปที่ 19 จ.,ฉ. เซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ P.chabaudi AS(Pr_1)


2 °C
10 °C
37 °C
50 °C
รูปที่ 19 ก.
รูปที่ 19 ค.
รูปที่ 19 จ.
รูปที่ 19 ข.
รูปที่ 19 ง.
รูปที่ 19 ฉ.
Uptake
(pmole/ 10^9 cells)
% Hemolysis
^{14}C- pyrimethamine (nM)
0
4
8
12
40
80
10
20
30

จากการศึกษาผลกระทบของ pH ต่อการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงในฮีพส์บัฟเฟอร์ซาลีน pH ต่าง ๆ กัน จะเห็นได้ชัดเจนว่า นอกจาก pH จะมีผลต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine แล้ว ยังมีผลทำให้เม็ดเลือดแดงทั้ง 3 ชนิดแตกตัวโดยเฉลี่ยที่ทุก ๆ ความเข้มข้นของ ^{14}C-pyrimethamine ที่ใช้ดังนี้ (รูปที่ 20 ข., ง., ฉ.) ฮีพส์บัฟเฟอร์ซาลีน pH 6.6 ทำให้เลือดติดเชื้อ พลาส์โมเดียม ฆาบอดี AS (Pr_1) และAS แตกตัวสูงที่สุดถึง 32.11 ± 2.97 และ 37.09 ± 3.47 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในขณะที่เลือดปกติเซลล์แตกเพียง 3.13± 0.56 เปอร์เซ็นต์ ฮีพส์บัฟเฟอร์ซาลีน pH 7.0 ก็ทำให้จำนวนเซลล์ที่แตกแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดระหว่างเลือดปกติ (2.00 ± 0.20 เปอร์เซ็นต์) เลือดติดเชื้อโคลน AS (Pr_1) (14.79± 1.88 เปอร์เซ็นต์) กับ เลือดติดเชื้อโคลน AS (15.09 ± 2.17 เปอร์เซ็นต์) นอกจากนี้ยังปรากฏผลคล้ายคลึงกัน เมื่ออินคิวเบตเซลล์ที่ pH 8.1 คือการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงในเลือดติดเชื้อ พลาส์โมเดียม ฆาบอดี AS (Pr_1) และ AS จะมากกว่าเซลล์ในเลือดปกติ (12.25 ± 0.36, 15.54 ± 1.16 และ 8.20 ± 1.30 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ) ฮีพส์-บัฟเฟอร์ซาลีน pH 7.4 จะทำให้เลือดติดเชื้อแตกตัวน้อยที่สุด คือ 7.03 ± 0.42 เปอร์เซ็นต์ (เลือดติดเชื้อโคลน AS (Pr_1)) และ 7.36 ± 0.88 เปอร์เซ็นต์ (เลือดติดเชื้อโคลน AS) แต่ก็ยังมีค่ามากกว่าการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติที่ pH เดียวกัน ซึ่งเท่ากับ 4.31 ± 1.88 เปอร์เซ็นต์)

4.12 ผลกระทบของกรดโฟลิคต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ พลาส์โมเดียม ฆาบอดี

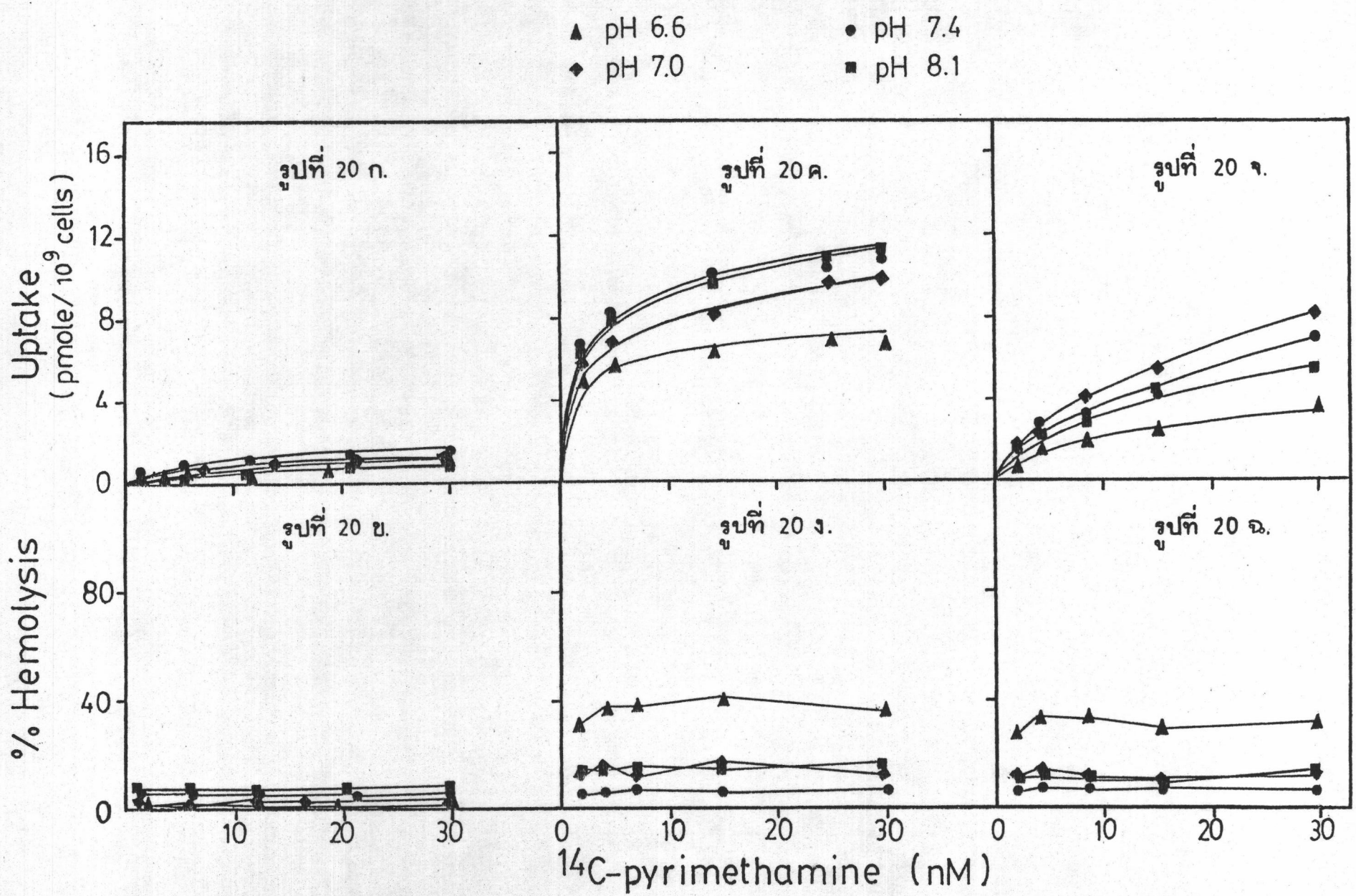
เมื่ออินคิวเบตเลือดติดเชื้อ พลาส์โมเดียม ฆาบอดี AS และ AS (Pr_1) จำนวน 5.5 x 10^8 เซลล์ (50 เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ) กับกรดโฟลิคความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ในฮีพส์บัฟเฟอร์ซาลีน pH 7.4 (86 มิลลิโมลาร์กลูโคส) นาน 30 นาทีก่อนที่จะเติม ^{14}C-pyrimethamine ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน (2-30 นาโนโมลาร์) ลงไป และอินคิวเบตต่ออีก 15 นาที ผลปรากฏว่า ปริมาณ ^{14}C-pyrimethamine ที่ถูกนำเข้าเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อโคลน AS จะเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดที่ทุกความเข้มข้นของ ^{14}C-pyrimethamine เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่ไม่มีผลจากกรดโฟลิค (รูปที่ 21 ก.) ตรงกันข้าม กรดโฟลิคจะไม่มีผลกระทบต่อการนำ ^{14}C-pyrimethamine เข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ พลาส์โมเดียม ฆาบอดี AS (Pr_1) (รูปที่ 21 ข.)

รูปที่ 20. ผลกระทบของ pH ต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine และการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงในเลือดปกติและเลือดติดเชื้อ P.chabaudi (50 % parasitemia) ทำการทดลองตามวิธีทดลองข้อ 3.8.1 โดยอินคิวเบตเซลล์ในฮีพส์-บัฟเฟอร์ซาลีน pH ต่าง ๆ กันตั้งแต่ 6.6 - 8.1 นับปริมาณกัมมันตรังสีที่ถูกนำเข้าเซลล์ตามวิธีทดลองข้อ 3.8.2.2

รูปที่ 20 ก., ข. เซลล์เม็ดเลือดแดงปกติ

รูปที่ 20 ค., ง. เซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ P.chabaudi AS

รูปที่ 20 จ., ฉ. เซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ P.chabaudi AS(Pr_1)


▲ pH 6.6
● pH 7.4
◆ pH 7.0
■ pH 8.1
รูปที่ 20 ก.
รูปที่ 20 ค.
รูปที่ 20 จ.
รูปที่ 20 ข.
รูปที่ 20 ง.
รูปที่ 20 ฉ.
Uptake (pmole/ 10^9 cells)
% Hemolysis
^{14}C-pyrimethamine (nM)
0
4
8
12
16
40
80
10
20
30

รูปที่ 21. ผลกระทบของกรดโฟลิค ต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ P.chabaudi อินคิวเบตเลือดติดเชื้อ (50% parasitemia) กับกรดโฟลิค ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ในฮีพล์บัฟเฟอร์ซาลีน pH 7.4 (86 มิลลิโมลาร์กลูโคส) ที่อุณหภูมิ 37° ซ นาน 30 นาที ก่อนจะทำการทดลองตามวิธีข้อ 3.8.1 ในฮีพล์บัฟเฟอร์ซาลีน pH 7.4 (86 มิลลิโมลาร์กลูโคส) ที่มีกรดโฟลิค 1 ไมโครโมลาร์ เปรียบเทียบผลกับการทดลองที่ไม่มีกรดโฟลิค นับปริมาณกัมมันตรังสีที่ถูกนำเข้าเซลล์ตามวิธีทดลองข้อ 3.8.2.2

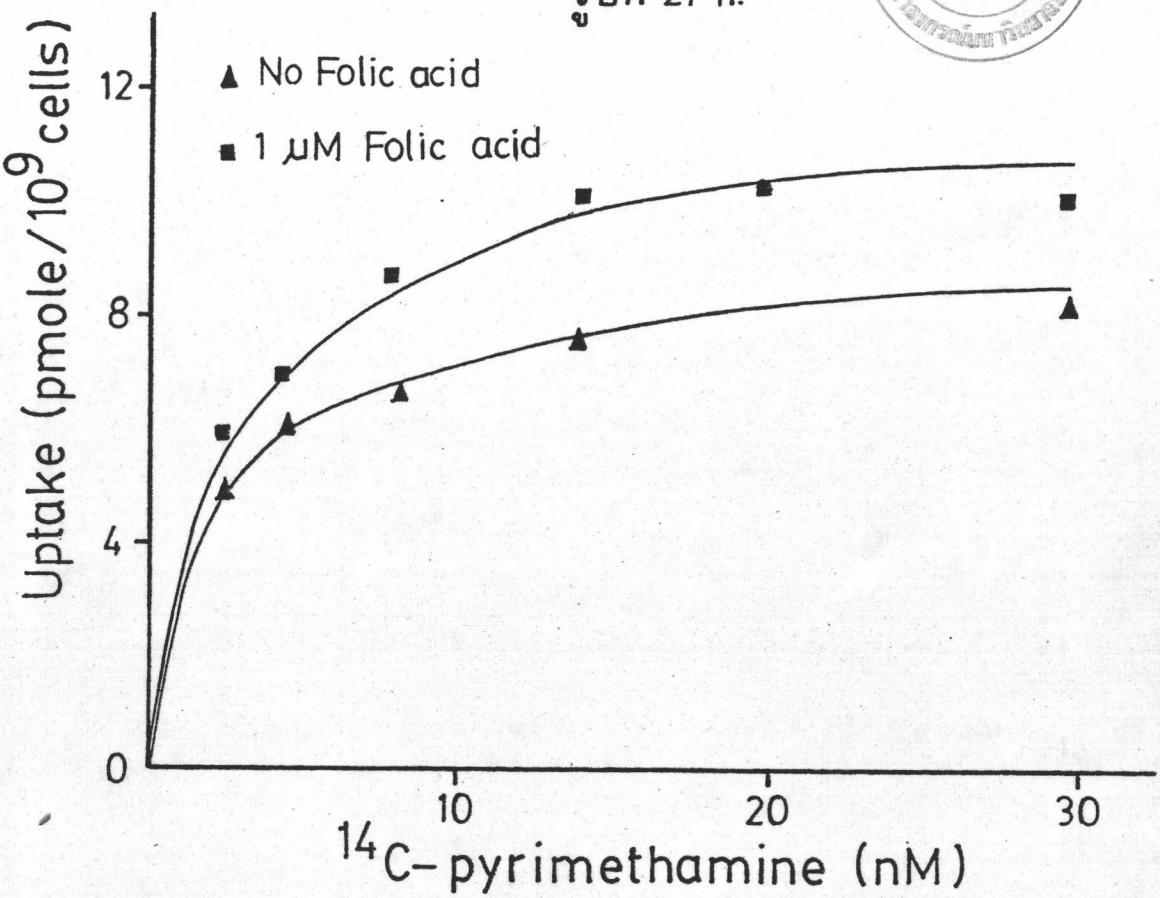
รูปที่ 21 ก. เซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ P.chabaudi AS

รูปที่ 21 ข. เซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ P.chabaudi AS(Pr_1)

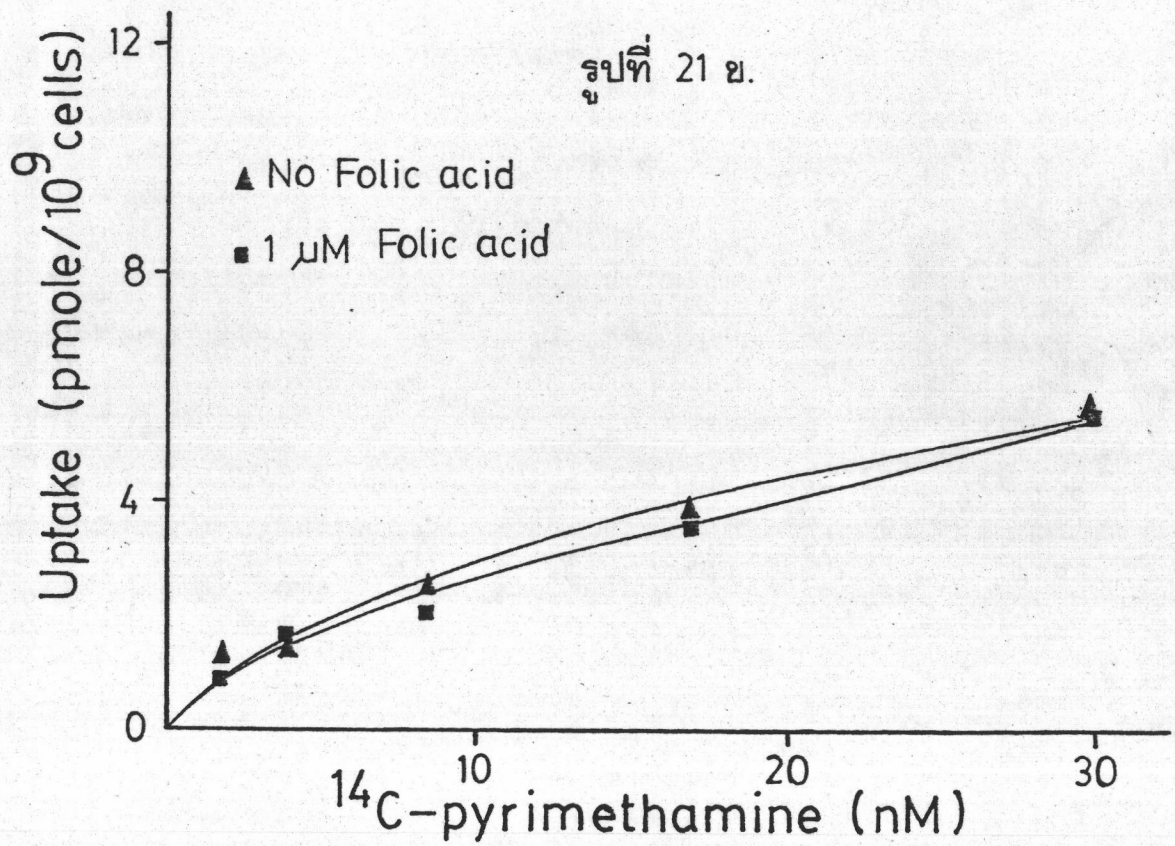
Protocol :

- Infected blood (50 % parasitemia) 5.5 x 10^8 cells
- Incubate in HEPES -NaCl pH 7.4 (86 mM glucose and 1 µM folic acid) 0.8 ml at 37°C 30 min
- Add ^{14}C-pyrimethamine 2-30 nM
- Add HEPES-NaCl pH 7.4 (86 mM glucose and 1 µM folic acid) to make 2 ml.
- Incubate at 37°C 15 min

รูปที่ 21 ก.



รูปที่ 21 ข.



4.13 ผลกระทบของสารที่เป็นแหล่งพลังงานต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine และการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงในเลือดติดเชื้อพลาสโมเดียม ฆ่าบอดี

4.13.1 ผลกระทบของกลูโคสต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine

เมื่ออินคิวเบตเลือดติดเชื้อ พลาสโมเดียม ฆ่าบอดี AS และ AS (Pr_1) (5.5×10^8 เซลล์; 50 เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ) กับ ^{14}C-pyrimethamine ในฮีพส์บัฟเฟอร์ซาลีน pH 7.4 ที่มีกลูโคสความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 10 และ 100 มิลลิโมลาร์ แล้ววัดปริมาณการนำเข้าของสารรังสีเปรียบเทียบกับ เมื่อไม่มีกลูโคส ผลการทดลองตามรูปที่ 22 จะเห็นได้ว่าไม่มีความแตกต่างของปริมาณ ^{14}C-pyrimethamine ที่วัดได้ในเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ

ผลกระทบของกลูโคสต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine จะสังเกตเห็นได้ต่อเมื่อทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงที่ใช้ขาดอาหาร (ตามวิธีทดลองข้อ 3.8.4) เสียก่อนแล้วจึงทำการทดลอง ผลปรากฏว่า ^{14}C-pyrimethamine จะถูกนำเข้าสู่เซลล์ติดเชื้อทั้ง 2 โคลน ได้มากที่สุดในฮีพส์บัฟเฟอร์ซาลีนที่มีกลูโคส 100 มิลลิโมลาร์ (การทดลองทั่ว ๆ ไปใช้ 86 มิลลิโมลาร์) รองลงมาคือ 10 มิลลิโมลาร์ และจะน้อยที่สุดเมื่อไม่มีกลูโคสเป็นแหล่งพลังงานของเซลล์ (รูปที่ 23)

4.13.2 ผลกระทบของไพรูเวตและซัคซิเนตต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine และการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงในเลือดติดเชื้อพลาสโมเดียม ฆ่าบอดี

เมื่อทำการศึกษาการนำ ^{14}C-pyrimethamine เข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ พลาสโมเดียม ฆ่าบอดี AS และ AS (Pr_1) ในฮีพส์บัฟเฟอร์ซาลีน pH 7.4 ซึ่งมีสารต้นตอพลังงานเป็นไพรูเวต, ซัคซิเนต และกลูโคส ด้วยความเข้มข้นเท่ากันคือ 100 มิลลิโมลาร์ พบว่าปริมาณการนำเข้าของเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อโคลน AS เมื่อให้ไพรูเวตและซัคซิเนตกับเซลล์จะน้อยกว่าการมีกลูโคสเป็นแหล่งพลังงานของเซลล์ (รูปที่ 24 ก.) แต่ไม่สามารถสังเกตพบความแตกต่างนี้ได้ในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ พลาสโมเดียม ฆ่าบอดี AS (Pr_1) (รูปที่ 24 ค.)

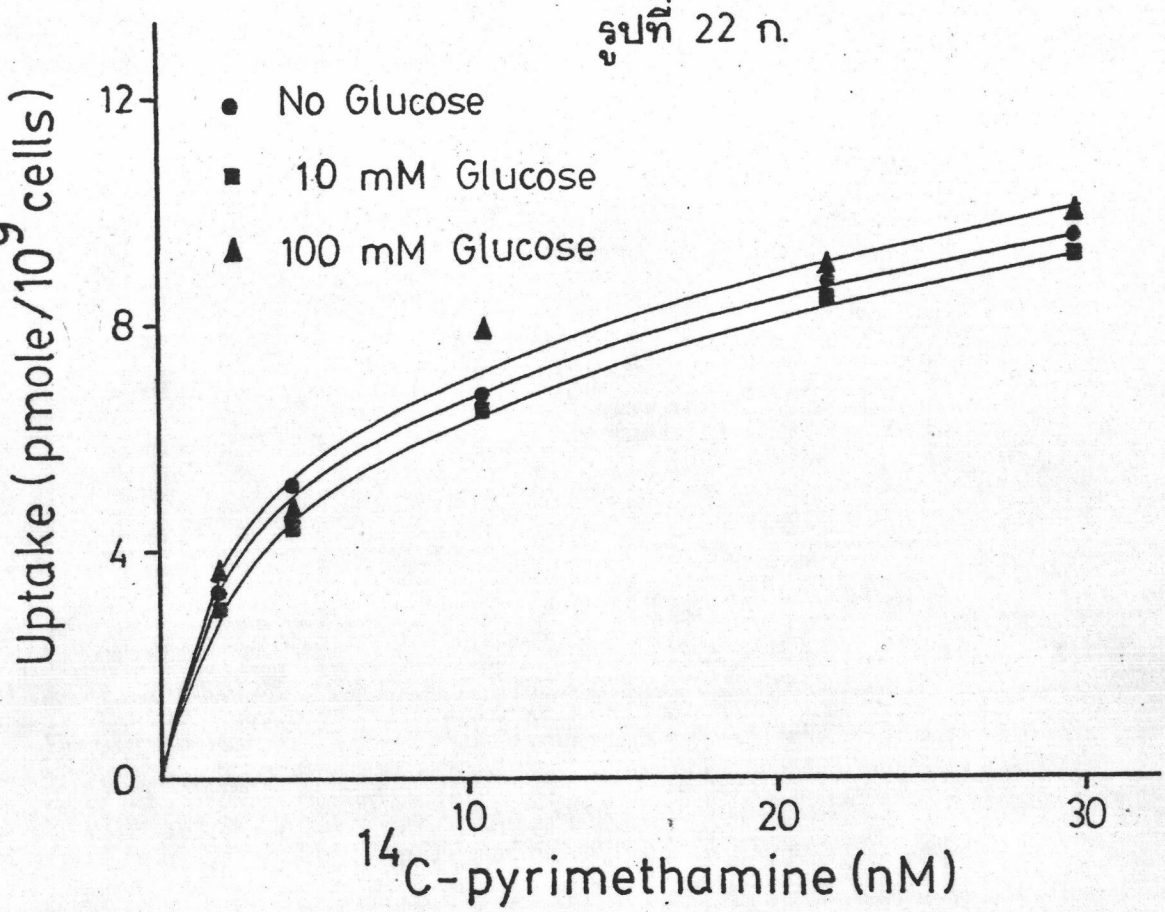
สำหรับผลการศึกษาการแตกตัวของเซลล์พบว่า เซลล์เม็ดเลือดแดงในเลือดติดเชื้อ พลาสโมเดียม ฆ่าบอดี AS จะแตก 6.40 ± 0.5, 8.56 ± 1.18 และ 11.40 ± 0.73 เปอร์เซ็นต์ เมื่อถูกผลกระทบจากกลูโคส ไพรูเวต และ ซัคซิเนต ตามลำดับ (รูปที่ 24 ข.)

รูปที่ 22. ผลกระทบของกลูโคส่ต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ P.chabaudi ทำการทดลองตามวิธีทดลองข้อ 3.8.1 โดยอินคิวเบตเซลล์กับกลูโคส่ความเข้มข้น 10 และ 100 มิลลิโมลาร์ ในฮีพส์บัฟเฟอร์ซาลีน pH 7.4 เปรียบเทียบผลกับการทดลองเมื่อไม่ใช้กลูโคส่ นับปริมาณกัมมันตรังสีที่ถูกนำเข้าเซลล์ตามวิธีทดลองข้อ 3.8.2.2

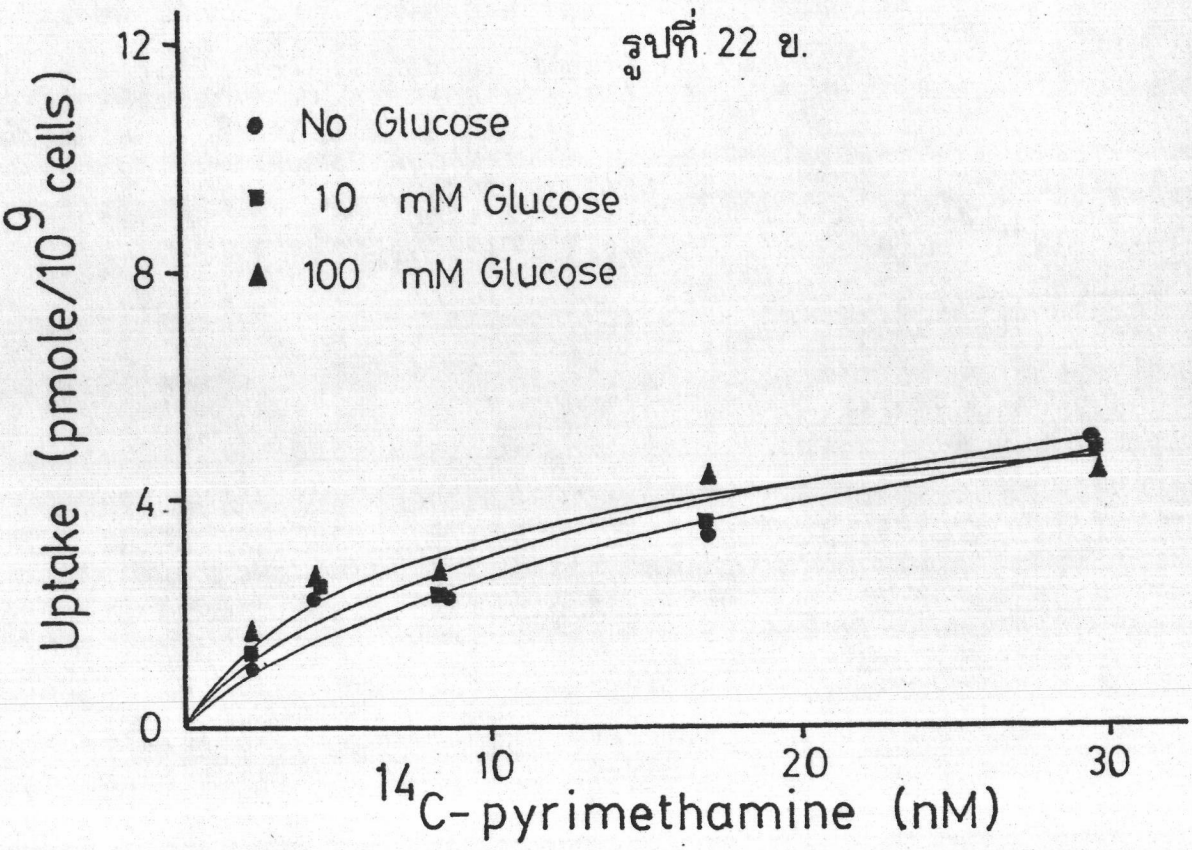
รูปที่ 22 ก. เซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ P.chabaudi AS

รูปที่ 22 ข. เซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ P.chabaudi AS(Pr_1)

รูปที่ 22 ก.



รูปที่ 22 ข.



รูปที่ 23. ผลกระทบของกลูโคส ต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ P.chabaudi ซึ่งทำให้ขาดอาหาร (ข้อ 3.8.4) แล้วทำการทดลองตามวิธีทดลองข้อ 3.8.1 โดยอินคิวเบตเซลล์กับกลูโคส ความเข้มข้น 10 และ 100 มิลลิโมลาร์ ในฮีพล์บัฟเฟอร์ซาลีน pH 7.4 เปรียบเทียบผลกับการทดลองเมื่อไม่ใช้กลูโคส นับปริมาณกัมมันตรังสีที่ถูกนำเข้าเซลล์ตามวิธีทดลองข้อ 3.8.2.2

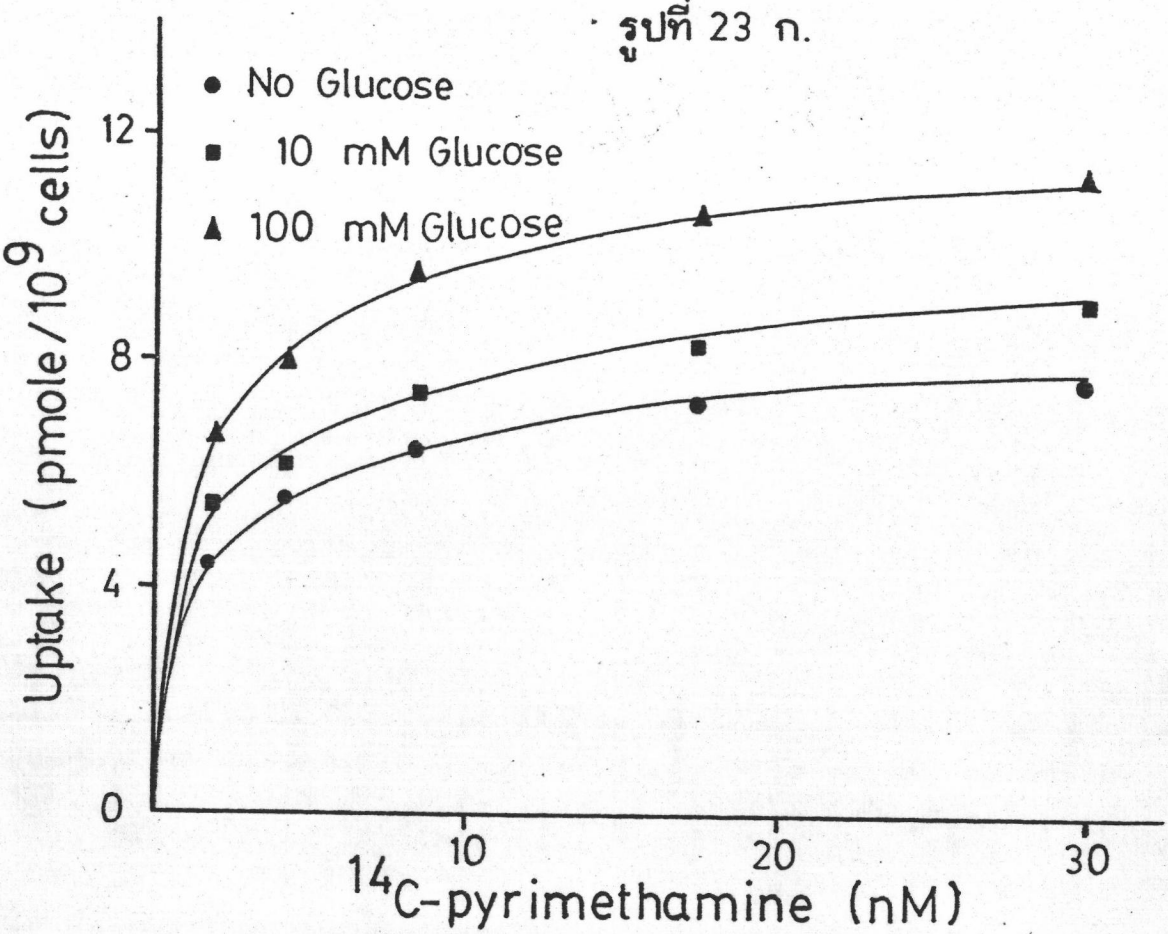
รูปที่ 23 ก. เซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ P.chabaudi AS

รูปที่ 23 ข. เซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ P.chabaudi AS(Pr_1)

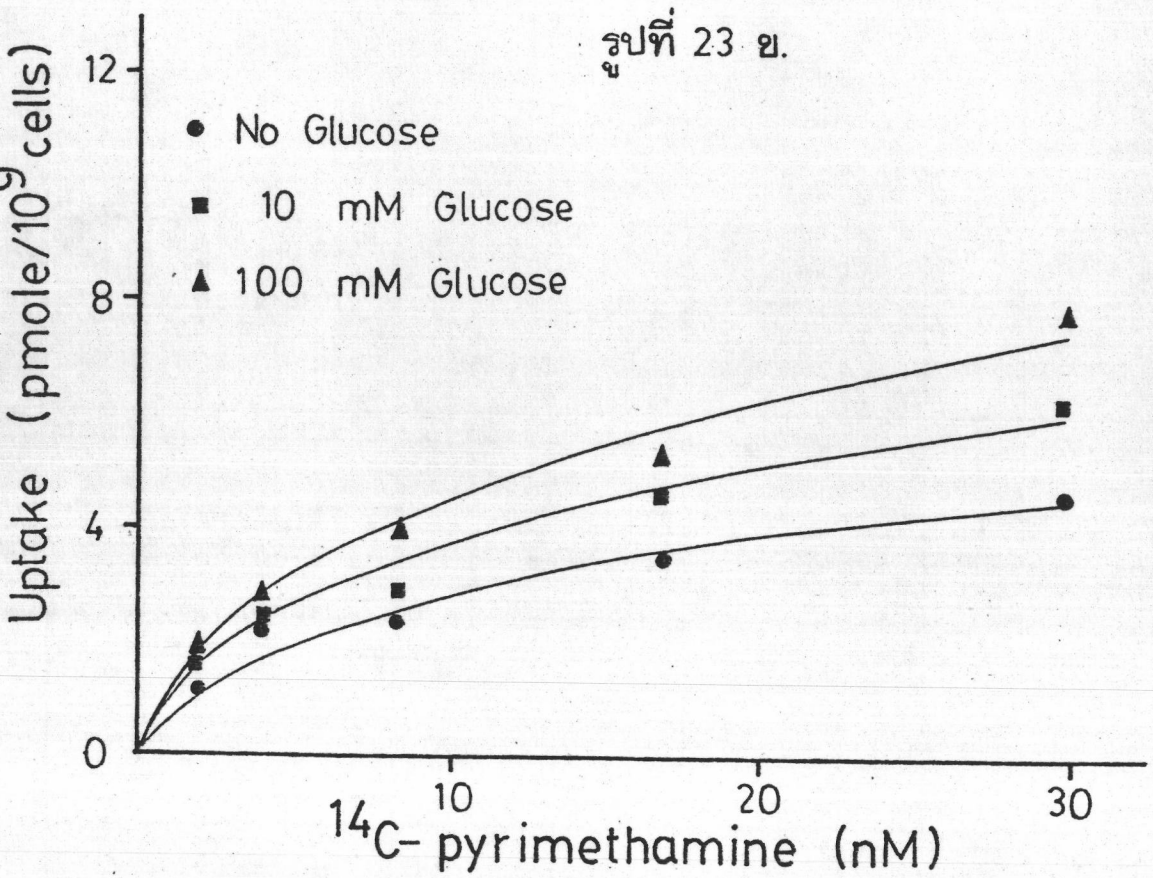
Protocol :

- Infected blood (50 % parasitemia) 5.5×10^8 cells
- Incubate in HEPES-NaCl pH 7.4 0.8 ml at 37°C 30 min
- Add ^{14}C-pyrimethamine 2-30 nM
- Add HEPES-NaCl pH 7.4 (0,20, 200 mM glucose) to make 2 ml
- Incubate at 37°C 15 min

รูปที่ 23 ก.



รูปที่ 23 ข.



ส่วนเลือดติดเชื้อโคลน AS (Pr_1) จำนวนเซลล์ที่แตกเนื่องจากสภาวะดังกล่าวทุกค่าจะมีค่าต่ำกว่าได้แก่ 5.90 $\pm$ 0.59, 6.49 $\pm$ 0.44 และ 8.83 $\pm$ 1.05 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (รูปที่ 24 ง.)

เมื่อทำการทดลองในทำนองเดียวกับการศึกษาผลของกลูโคสต่อการนำเข้า โดยทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ <u>พลาสโมเดียม ฆ้าบอดี</u> ขาดอาหารก่อนที่จะนำมาศึกษาผลของซัคซีเนตและไพรูเวต เปรียบเทียบกับกลูโคสที่ความเข้มข้นเท่า ๆ กัน (100 มิลลิโมลาร์) พบว่า มีความแตกต่างของปริมาณ ^{14}C-pyrimethamine ในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อโคลน AS (Pr_1) คือปริมาณการนำ ^{14}C-pyrimethamine เข้าของเซลล์ที่ได้รับซัคซีเนต และไพรูเวตเป็นแหล่งพลังงานจะมีค่าต่ำกว่า เมื่อใช้กลูโคส (รูปที่ 25 ค.) ส่วนเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อโคลน AS จะยังคงปรากฏผลเช่นเดียวกับการทดลองกับเซลล์ที่ไม่ขาดอาหาร คือ กลูโคสเป็นสารตั้นต่อพลังงานที่เหมาะสมสำหรับการนำ ^{14}C-pyrimethamine เข้าสู่เซลล์มากกว่าไพรูเวตกับซัคซีเนต (รูปที่ 25 ก.)

การแตกตัว ของเซลล์เม็ดเลือดแดงในเลือดติดเชื้อ <u>พลาสโมเดียม ฆ้าบอดี</u> AS และ AS (Pr_1) จากผลกระทบของกลูโคส ไพรูเวตและซัคซีเนต จะมีลักษณะคล้ายกับที่พบในเซลล์ไม่ขาดอาหาร คือ เลือดติดเชื้อโคลน AS เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก 8.19 $\pm$ 1.66, 15.57 $\pm$ 1.37 และ 17.78 $\pm$ 2.06 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในขณะที่เลือดติดเชื้อโคลน AS (Pr_1) เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก 6.61 $\pm$ 0.20, 13.11 $\pm$ 1.80 และ 14.72 $\pm$ 2.48 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (รูปที่ 25 ข. และ ง.)

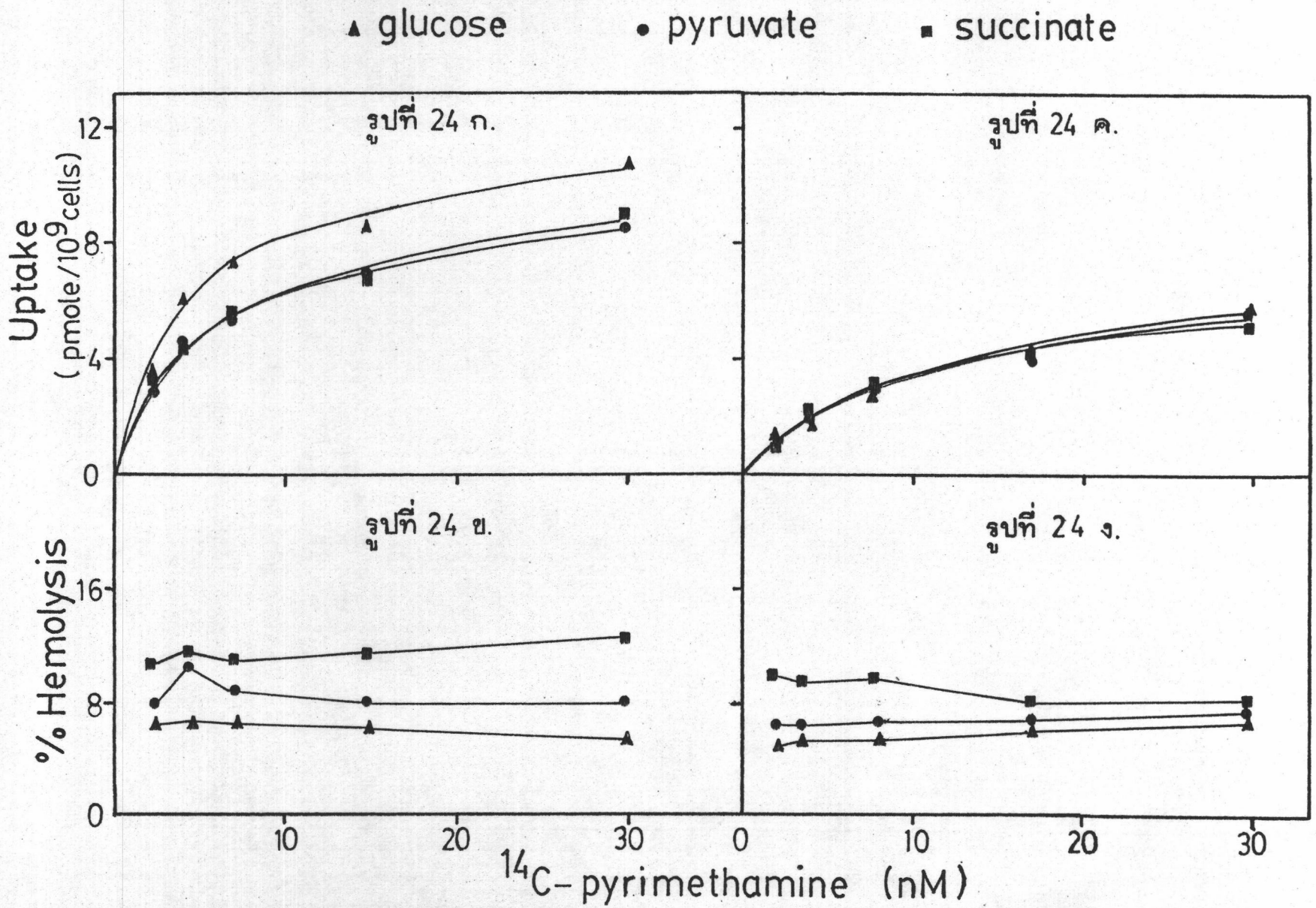
4.14 <u>ผลกระทบของ 2,4-ไดไนโตรฟีนอลต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine และการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดง ในเลือดปกติและเลือดติดเชื้อพลาสโมเดียม ฆ้าบอดี</u>

ในการที่จะทดสอบว่าการนำ ^{14}C-pyrimethamine เข้าสู่เม็ดเลือดแดงต้องอาศัยแหล่งพลังงานจากเซลล์หรือไม่ ทำได้โดยติดตามผลกระทบของไดไนโตรฟีนอล และเพื่อที่จะลังเกตอิทธิพลของไดไนโตรฟีนอลให้เด่นชัดมากขึ้น จึงทำการทดลองกับเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ขาดอาหาร ซึ่งเท่ากับเป็นการลด energy charge ของเซลล์เสียก่อน

รูปที่ 24. ผลกระทบของไพรูเวตและซัคซีเนต ต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine และการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงในเลือดติดเชื้อ P.chabaudi ทำการทดลองตามวิธีทดลองข้อ 3.8.1 โดยอินคิวเบตเซลล์กับไพรูเวตและซัคซีเนต ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ในฮีพล์บัฟเฟอร์ซาลีน pH 7.4 เปรียบเทียบผลกับการทดลองเมื่อใช้กลูโคสความเข้มข้นเท่ากัน (100 มิลลิโมลาร์) นับปริมาณกัมมันตรังสีที่ถูกนำเข้าเซลล์ตามวิธีทดลองข้อ 3.8.2.2

รูปที่ 24 ก.,ข. เซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ P.chabaudi AS

รูปที่ 24 ค.,ง. เซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ P.chabaudi AS (Pr_1)


▲ glucose
● pyruvate
■ succinate
รูปที่ 24 ก.
รูปที่ 24 ค.
รูปที่ 24 ข.
รูปที่ 24 ง.
Uptake (pmole/10^9cells)
% Hemolysis
14C-pyrimethamine (nM)
0
4
8
12
16
10
20
30

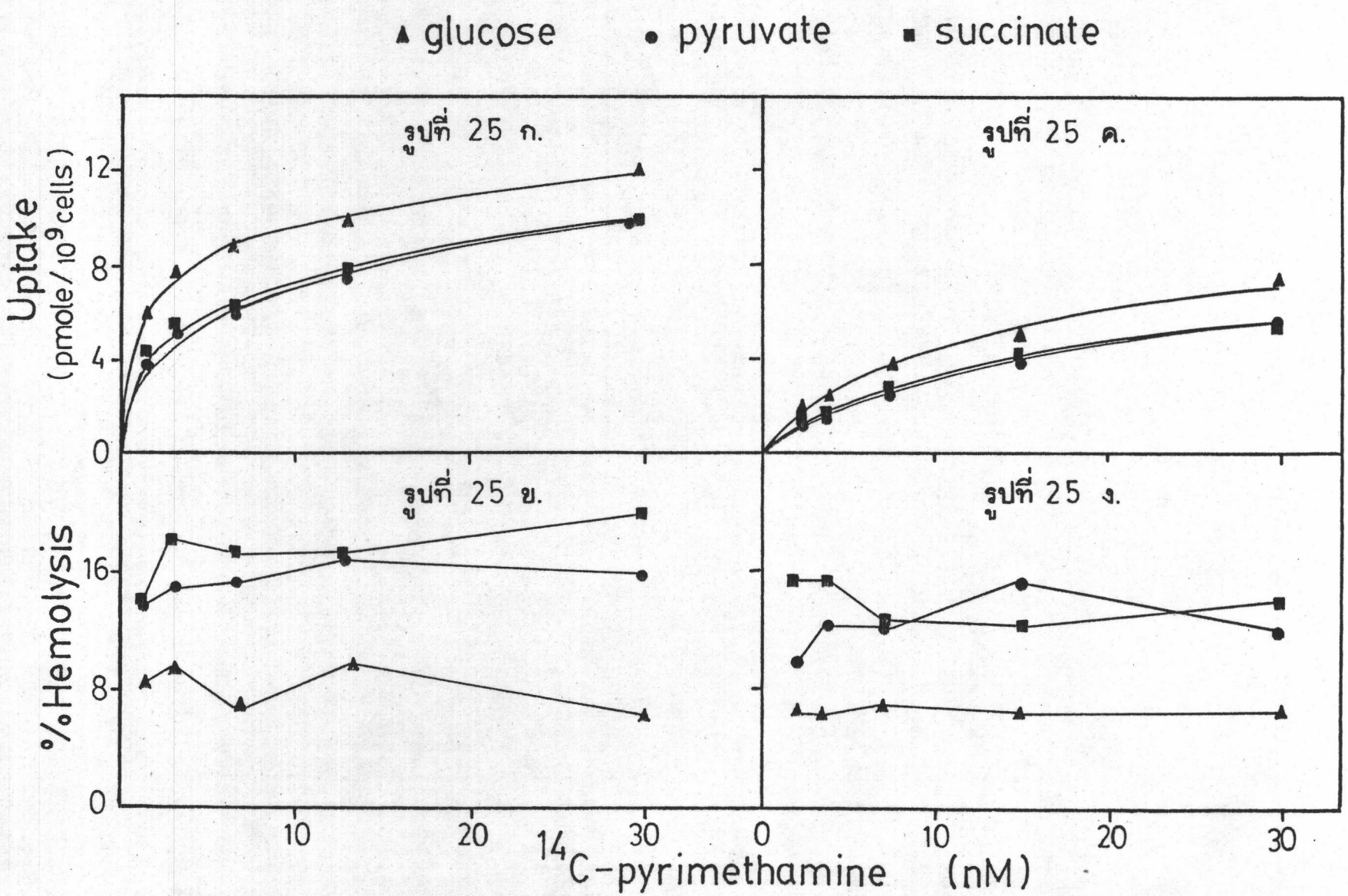
รูปที่ 25. ผลกระทบของไพรูเวตและซัคซีเนต ต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine และการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงในเลือดติดเชื้อ P.chabaudi (50 % parasitemia) ซึ่งทำให้ขาดอาหาร (ข้อ 3.8.4) แล้วทำการทดลองตามวิธีทดลองข้อ 3.8.1 โดยอินคิวเบตเซลล์กับไพรูเวต และซัคซีเนตความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ในฮีพล์บัฟเฟอร์ซาลีน pH 7.4 เปรียบเทียบผลกับการทดลองเมื่อใช้กลูโคสความเข้มข้นเท่ากัน (100 มิลลิโมลาร์) นับปริมาณกัมมันตรังสีที่ถูกนำเข้าเซลล์ตามวิธีทดลองข้อ 3.8.2.2

รูปที่ 25 ก., ข. เซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ P.chabaudi AS

รูปที่ 25 ค., ง. เซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ P.chabaudi AS(Pr_1)

Protocol :

- Infected blood (50 % parasitemia) 5.5×10^8 cells
- Incubate in HEPES-NaCl pH 7.4 0.8 ml at 37°C 30 min
- Add ^{14}C-pyrimethamine 2-30 nM
- Add HEPES-NaCl pH 7.4 (200 mM glucose/pyruvate/succinate) to make 2 ml
- Incubate at 37°C 15 min


▲ glucose
● pyruvate
■ succinate
รูปที่ 25 ก.
รูปที่ 25 ค.
รูปที่ 25 ข.
รูปที่ 25 ง.
Uptake
(pmole/10^9cells)
%Hemolysis
0
4
8
12
16
10
20
30
14C-pyrimethamine (nM)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการทดลองตามรูปที่ 26 ค. เป็นการศึกษาผลกระทบของไดไนโตรฟีนอล 1 มิลลิโมลาร์ ต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ พลาสโมเดียม ฆ่าบอดี AS พบว่า ค่าการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine จะลดต่ำลงเมื่อได้รับผลกระทบจากไดไนโตรฟีนอล เมื่ออินคิวเบตเซลล์ที่ขาดอาหารกับ ^{14}C-pyrimethamine ภายใต้สภาวะที่มีกลูโคส (100 มิลลิโมลาร์) และเมื่อไม่มีกลูโคส ผลการทดลองแสดงให้เห็นชัดเจนว่ากลูโคสสามารถลดอิทธิพลของไดไนโตรฟีนอลได้บ้าง กล่าวคือ ปริมาณนำเข้าจะต่ำสุดในการทดลองที่มีเฉพาะไดไนโตรฟีนอล และค่าจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อถูกเสริมด้วยกลูโคส (100 มิลลิโมลาร์) จนมีค่าใกล้เคียงกับปริมาณ ^{14}C-pyrimethamine ซึ่งถูกนำเข้าเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ เมื่อไม่มีกลูโคสเป็นแหล่งพลังงานของเซลล์ อย่างไรก็ดีการมีกลูโคสเพียงอย่างเดียวจะยังคงทำให้ ^{14}C-pyrimethamine ผ่านเข้าเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อได้สูงสุด

ผลของไดไนโตรฟีนอล 1 มิลลิโมลาร์ต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ พลาสโมเดียม ฆ่าบอดี AS (Pr_1) ตามรูปที่ 26 จ. แสดงว่าการนำ ^{14}C-pyrimethamine เข้าสู่เซลล์จะถูกยับยั้งได้ด้วยไดไนโตรฟีนอลในลักษณะเดียวกับเม็ดเลือดแดงติดเชื้อโคลน AS และฤทธิ์การยับยั้งบางส่วนสามารถจะถูกหักล้างได้ด้วย 100 มิลลิโมลาร์กลูโคส เช่นเดียวกัน

สำหรับอิทธิพลของไดไนโตรฟีนอล ต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ในเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติ ซึ่งแสดงดังรูปที่ 26 ก. พบว่าผลกระทบจะน้อยมากจนแทบจะไม่สามารถสังเกตความแตกต่างของค่าการนำเข้าได้

จากการศึกษาการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของ ^{14}C-pyrimethamine (2-30 นาโนโมลาร์) ภายใต้สภาวะการทดลองผลของไดไนโตรฟีนอลข้างต้น ปรากฏผลในเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติดังนี้ เปอร์เซ็นต์การแตกตัวมีค่า 2.47 ± 0.88 และ 2.67 ± 0.88 ในสภาวะการทดลองที่มีและไม่มีกลูโคส ซึ่งค่าที่ได้ไม่แตกต่างจากค่าที่ถูกผลกระทบของไดไนโตรฟีนอล เมื่อมีและไม่มีกลูโคสซึ่งเท่ากับ 2.94 ± 0.51 และ 3.31 ± 0.75 (รูปที่ 26 ข.) ค่าการแตกตัวของเซลล์จะสูงขึ้นเล็กน้อย ในเลือดติดเชื้อ พลาสโมเดียม ฆ่าบอดี AS (Pr_1) (รูปที่ 26 ฉ.) กล่าวคือการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine เมื่อมีไดไนโตรฟีนอล 1 มิลลิโมลาร์ จะทำให้เซลล์แตก 8.62 ± 0.90 เปอร์เซ็นต์ และจะลดลง

เหลือ 8.25 ± 1.19 เปอร์เซ็นต์ ถ้าเพิ่มกลูโคส์ลงไปด้วย ในสภาวะซึ่งมีเฉพาะกลูโคส์อย่างเดียว เซลล์จะแตกตัว 6.71 ± 0.84 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การแตกตัวในสภาวะการนำเข้าซึ่งไม่มีผลกระทบจากสารใดเลยจะเท่ากับ 7.62 ± 0.23 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเม็ดเลือดแดงติดเชื้อโคลน AS (รูปที่ 26 ง.) จะให้ค่าการแตกตัวของเซลล์สูงที่สุดคือ 7.52 ± 1.09 และ 8.06 ± 0.20 เปอร์เซ็นต์ ในการทดลองเฉพาะเมื่อมีและไม่มีกลูโคส์ซึ่งน้อยกว่าค่าที่วัดได้ในการทดลองที่มีผลจากไดไนโตรฟีนอล ภายใต้สภาวะเดียวกันเล็กน้อย คือ 8.39 ± 1.71 และ 8.68 ± 0.93 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

4.15 ผลของโซเดียมฟลูออไรด์และโซเดียมอาร์ซีเนตต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine และการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงในเลือดปกติและเลือดติดเชื้อพลาส์โมเดียม ฆ่าบอดี

ทำการศึกษากับเซลล์ขาดอาหารในลักษณะเดียวกับที่ศึกษาผลของไดไนโตรฟีนอล โดยแทนด้วยโซเดียมฟลูออไรด์หรือโซเดียมอาร์ซีเนต พบว่า โซเดียมฟลูออไรด์ความเข้มข้นสูงถึง 1 มิลลิโมลาร์ไม่ทำให้ปริมาณการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ลดลงที่ทุกความเข้มข้นของ ^{14}C-pyrimethamine (2-30 นาโนโมลาร์) ไม่ว่าจะมีหรือไม่มีกลูโคส์ (100 มิลลิโมลาร์) ร่วมด้วยก็ตาม และจะปรากฏผลเช่นเดียวกันทั้งในเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติและเม็ดเลือดแดงติดเชื้อ พลาส์โมเดียม ฆ่าบอดี (รูปที่ 27 ก., ค., จ.)

สำหรับผลการศึกษาการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงเฉลี่ยที่ทุกความเข้มข้นของ ^{14}C-pyrimethamine พบว่า เซลล์เม็ดเลือดแดงปกติแตก 2.16 ± 0.44 และ 2.95 ± 0.91 เปอร์เซ็นต์ในการทดลองเฉพาะเมื่อมีและไม่มีกลูโคส์ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับสภาวะแบบเดียวกัน เมื่อมีโซเดียมฟลูออไรด์ (3.05 ± 0.26 และ 3.09 ± 0.69 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ) ตรงกันข้ามการเพิ่มฟลูออไรด์จะทำให้เลือดติดเชื้อ พลาส์โมเดียม ฆ่าบอดี AS แตกตัวเพิ่มขึ้นจาก 7.98 ± 0.20 เปอร์เซ็นต์ เมื่อไม่มีกลูโคส์เป็น 9.02 ± 0.64 เปอร์เซ็นต์ ในทำนองเดียวกันเมื่อมีกลูโคส์กับฟลูออไรด์จะแตก 8.60 ± 0.59 เปอร์เซ็นต์มากกว่า เมื่อมีเฉพาะกลูโคส์อย่างเดียว ซึ่งมีค่าเพียง 7.47 ± 1.09 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเลือดติดเชื้อโคลน AS (Pr_1) เซลล์จะแตก 8.39 ± 1.71 และ 8.68 ± 0.93 เปอร์เซ็นต์ เมื่อถูกผลกระทบจากฟลูออไรด์ภายใต้สภาวะทดลองที่มี และไม่มีกลูโคส์ตามลำดับ มากกว่าสภาวะการทดลองแบบเดียวกัน แต่ไม่มีฟลูออไรด์ (6.93 ± 0.84 และ 7.74 ± 0.23 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ) (รูปที่ 27 ข., ง., ฉ.)

รูปที่ 26. ผลกระทบของ 2,4-ไดไนโตรฟีนอล ต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine และการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงในเลือดปกติและเลือดติดเชื้อ P.chabaudi (50 % parasitemia) ซึ่งทำให้ขาดอาหาร (ข้อ 3.8.4) แล้วทำการทดลองตามวิธีทดลองข้อ 3.8.1 โดยอินคิวเบตเซลล์กับ 2,4-ไดไนโตรฟีนอลความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ในฮีพล์ปัฟเฟอร์ซาลีน pH 7.4 ที่มีและไม่มีกลูโคส 100 มิลลิโมลาร์ เปรียบเทียบผลกับการทดลอง เมื่อไม่มี 2,4-ไดไนโตรฟีนอล นับปริมาณกัมมันตรังสีที่ถูกนำเข้าเซลล์ตามวิธีทดลองข้อ 3.8.2.2

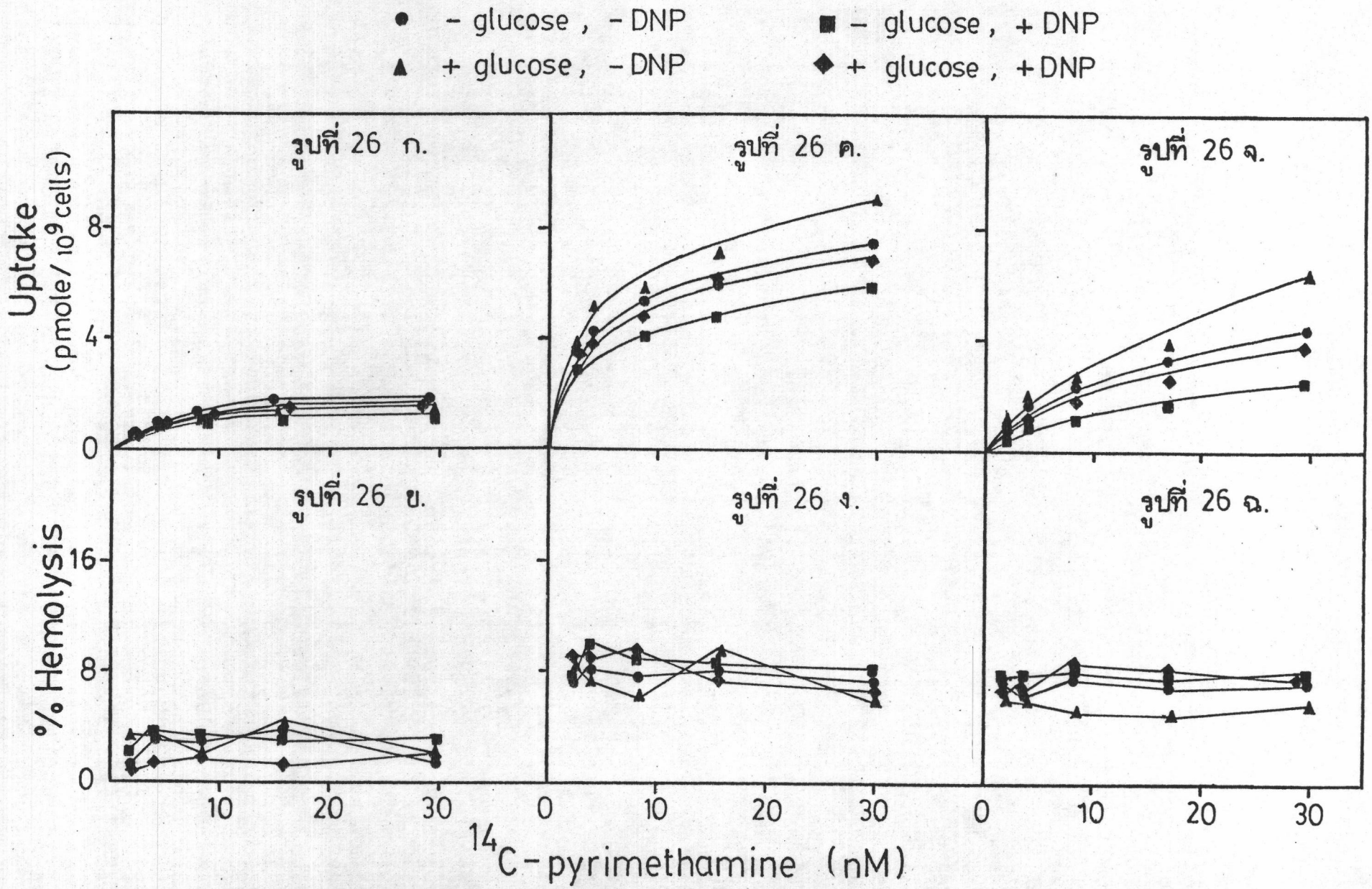
รูปที่ 26 ก., ข. เซลล์เม็ดเลือดแดงปกติ

รูปที่ 26 ค., ง. เซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ P.chabaudi AS

รูปที่ 26 จ., ฉ. เซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ P.chabaudi AS(Pr_1)

Protocol :

- Blood 5.5×10^8 cells
- Incubate in HEPES-NaCl pH 7.4 0.8 ml at 37°C 30 min
- Add ^{14}C-pyrimethamine 2-30 nM
- Add HEPES-NaCl pH 7.4 (with/without 200 mM glucose and with/without 2 mM DNP) to make 2 ml
- Incubate at 37°C 15 min


● - glucose , - DNP
■ - glucose , + DNP
▲ + glucose , - DNP
◆ + glucose , + DNP
รูปที่ 26 ก.
รูปที่ 26 ค.
รูปที่ 26 จ.
รูปที่ 26 ข.
รูปที่ 26 ง.
รูปที่ 26 ฉ.
Uptake (pmole/ 10^9 cells)
% Hemolysis
0
4
8
16
10
20
30
^{14}C-pyrimethamine (nM)

รูปที่ 27. ผลกระทบของโซเดียมฟลูออไรด์ ต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine และการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงในเลือดปกติและเลือดติดเชื้อ P.chabaudi (50 % parasitemia) ซึ่งทำให้ขาดอาหาร (ข้อ 3.8.4) แล้วทำการทดลองตามวิธีทดลองข้อ 3.8.1 โดยอินคิวเบตเซลล์กับโซเดียมฟลูออไรด์ ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ในฮีพล์บัฟเฟอร์ซาลีน pH 7.4 ที่มีและไม่มีกลูโคส 100 มิลลิโมลาร์ เปรียบเทียบผลกับการทดลองเมื่อไม่มีโซเดียมฟลูออไรด์ นับปริมาณกัมมันตรังสีที่ถูกนำเข้าเซลล์ตามวิธีทดลองข้อ 3.8.2.2

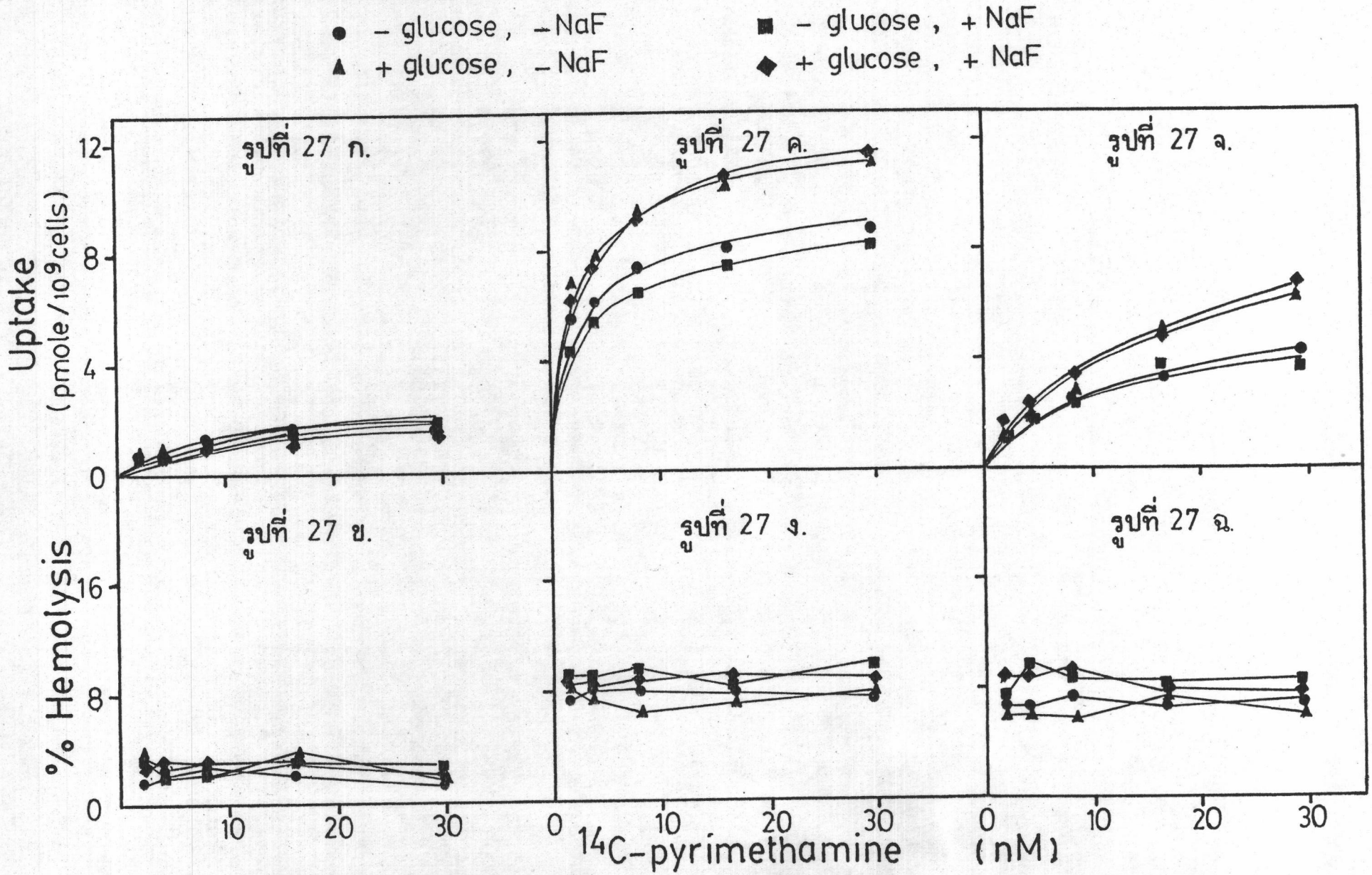
รูปที่ 27 ก., ข. เซลล์เม็ดเลือดแดงปกติ

รูปที่ 27 ค., ง. เซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ P.chabaudi AS

รูปที่ 27 จ., ฉ. เซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ P.chabaudi AS(Pr_1)

Protocal :

- Blood 5.5×10^8 cells
- Incubate in HEPES-NaCl pH 7.4 0.8 ml at 37°C 30 min
- Add ^{14}C-pyrimethamine 2-30 nM
- Add HEPES-NaCl pH 7.4 (with/without 200 mM glucose and with/without 2 mM NaF) to make 2 ml
- Incubate at 37°C 15 min


● – glucose , – NaF
▲ + glucose , – NaF
■ – glucose , + NaF
◆ + glucose , + NaF
รูปที่ 27 ก.
รูปที่ 27 ค.
รูปที่ 27 จ.
รูปที่ 27 ข.
รูปที่ 27 ง.
รูปที่ 27 ฉ.
Uptake (pmole/10⁹cells)
% Hemolysis
12
8
4
0
16
8
0
10
20
30
14C-pyrimethamine (nM)

จากการศึกษาผลของโซเดียมอาร์ซีเนตต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ในเซลล์ยาดอาหาร พบว่าโซเดียมอาร์ซีเนตความเข้มข้นสูงถึง 60 มิลลิโมลาร์ ไม่มีผลลดปริมาณการนำเข้าตลอดช่วง ^{14}C-pyrimethamine 2-30 นาโนโมลาร์ เช่นเดียวกับที่พบในการศึกษาผลกระทบของโซเดียมฟลูออไรด์ (รูปที่ 28 ก., ค., จ.)

เมื่อศึกษาการแตกตัวของเซลล์ควบคู่กับการนำเข้า พบว่าโซเดียมอาร์ซีเนตไม่ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงปกติแตกตัวเพิ่มขึ้น โดยมีค่า 2.72 $\pm$ 0.84 และ 3.16 $\pm$ 0.94 เปอร์-เซนต์ ซึ่งใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากการทดลองเฉพาะที่มีและไม่มีกลูโคส (100 มิลลิโมลาร์) ร่วมด้วยคือ 1.89 $\pm$ 0.57 และ 2.31 $\pm$ 0.76 เปอร์เซนต์ตามลำดับ ตรงกันข้ามโซเดียมอาร์ซีเนตจะมีผลทำให้เลือดติดเชื้อ พลาสโมเดียม ฆ่าบอดี แตกตัวเพิ่มขึ้นดังผลต่อไปนี้ การทดลองนำเข้าในฮีพส์บัฟเฟอร์ซาลีน pH 7.4 ที่ไม่มีสารใดเลย มีเฉพาะกลูโคส มีเฉพาะโซเดียมอาร์ซีเนต และเสริมกลูโคสร่วมกับโซเดียมอาร์ซีเนต เลือดติดเชื้อโคลน AS เซลล์เม็ดเลือดแดงจะแตก 7.86 $\pm$ 0.49, 7.48 $\pm$ 0.39, 9.16 $\pm$ 0.82 และ 9.00 $\pm$ 0.3 เปอร์เซนต์ตามลำดับ ส่วนเลือดติดเชื้อโคลน AS(Pr_1) เซลล์เม็ดเลือดแดงจะแตก 6.84 $\pm$ 0.36, 6.12 $\pm$ 0.17, 7.84 $\pm$ 0.43 และ 7.18 $\pm$ 0.2 เปอร์เซนต์ตามลำดับ (รูปที่ 28 ข., ง., ฉ.)

รูปที่ 28. ผลกระทบของโซเดียมอาร์ซีเนต ต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine และการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงในเลือดปกติและเลือดติดเชื้อ P.chabaudi (50 % parasitemia) ซึ่งทำให้ขาดอาหาร (ข้อ 3.8.4) แล้วทำการทดลองตามวิธีทดลองข้อ 3.8.1 โดยอินคิวเบตเซลล์กับโซเดียมอาร์ซีเนต ความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ ในฮีพส์บัฟเฟอร์ซาลีน pH 7.4 ที่มีและไม่มีกลูโคส 100 มิลลิโมลาร์ เปรียบเทียบผลกับการทดลองเมื่อไม่มีโซเดียมอาร์ซีเนต นับปริมาณกัมมันตรังสีที่ถูกนำเข้าเซลล์ตามวิธีทดลองข้อ 3.8.2.2

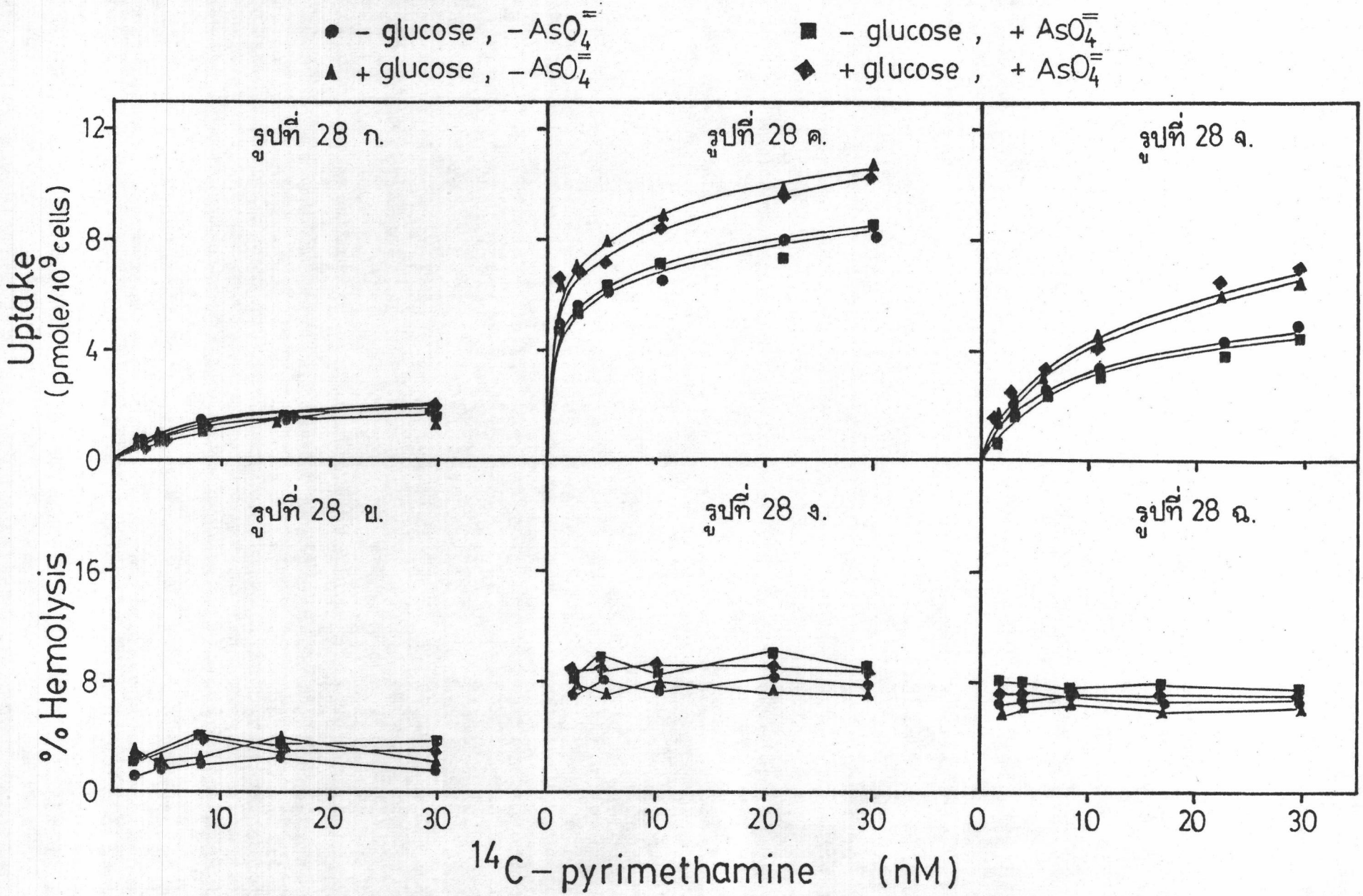
รูปที่ 28 ก., ข. เซลล์เม็ดเลือดแดงปกติ

รูปที่ 28 ค., ง. เซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ P.chabaudi AS

รูปที่ 28 จ., ฉ. เซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ P.chabaudi AS(Pr_1)

Protocol :

- Blood 5.5×10^8 cells
- Incubate in HEPES-NaCl pH 7.4 0.8 ml at 37°C 30 min
- Add ^{14}C-pyrimethamine 2-30 nM
- Add HEPES-NaCl pH 7.4 (with/without 200 mM glucose and with/without 120 mM Na_2HAsO_4) to make 2 ml
- Incubate at 37°C 15 min


● – glucose , – $AsO_4^{=}$
▲ + glucose , – $AsO_4^{=}$
■ – glucose , + $AsO_4^{=}$
◆ + glucose , + $AsO_4^{=}$
รูปที่ 28 ก.
รูปที่ 28 ค.
รูปที่ 28 จ.
รูปที่ 28 ข.
รูปที่ 28 ง.
รูปที่ 28 ฉ.
Uptake (pmole/10^9cells)
% Hemolysis
^{14}C – pyrimethamine (nM)
0
4
8
12
16
10
20
30

4.16 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกเซลล์พลาสโมเดียม ชาบอดี อิสระจากเซลล์-เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ

เมื่อทำการทดลองเตรียมเซลล์พลาสโมเดียมอิสระจากเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ พลาสโมเดียม ชาบอดี โดยทำลายเยื่อเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อด้วยซาโปนิน โดยใช้สารละลาย 0.015 เปอร์เซ็นต์ซาโปนินในอัตราส่วน 1:20 (สารละลายซาโปนิน : ปริมาตรเซลล์) และอินคิวเบตที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (ข้อ 3.10.1) ทำการศึกษาเวลาที่เหมาะสมสำหรับการอินคิวเบตเซลล์เม็ดเลือดแดงกับซาโปนิน เพื่อให้ได้เซลล์พลาสโมเดียมอิสระโดยที่เยื่อเซลล์ไม่ถูกทำลายต่อด้วยซาโปนินหรือถูกทำลายน้อยที่สุด โดยติดตามเปรียบเทียบจากปริมาณโปรตีน และแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส

ผลการทดลองในรูปที่ 29 ซึ่งใช้เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ พลาสโมเดียม ชาบอดี AS เป็นแม่แบบพบว่า หลังจากอินคิวเบตเลือดติดเชื้อ (50 เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ) กับ 0.015 เปอร์เซ็นต์ซาโปนินนาน 2 นาที ปริมาณโปรตีนจะลดลงเหลือเพียง 1.44 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่วัดได้จากเลือดในปริมาตรที่นำมาทดลอง เมื่อเพิ่มเวลาจนถึง 10 นาที ปริมาณโปรตีนจะลดลงเล็กน้อยเหลือประมาณ 1.36 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นจะลดลงอย่างรวดเร็ว ถ้ายังอินคิวเบตเซลล์ในสารละลายซาโปนินต่อไปอีกคือ จะมีค่า 0.80, 0.52 และ 0.30 เปอร์-เซ็นต์ที่เวลา 20, 30 และ 40 นาทีตามลำดับ

จากการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส (ข้อ 3.12.1) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่า เมื่อเตรียมเอนไซม์จากเลือดติดเชื้อ (50 เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ) โดยการทำลายเยื่อเซลล์ทั้งหมดทันทีด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ไตรตอน X-100 จะไม่สามารถวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ แต่จะเริ่มวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ต่อเมื่อทำให้เซลล์เม็ด-เลือดแดงของเลือดติดเชื้อแตกไปบางส่วนแล้วจึงสกัดเอนไซม์จากเซลล์พลาสโมเดียมอิสระ โดยการใช้สารละลายไตรตอน X-100 ซึ่งผลการทดลองปรากฏว่า แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มเวลาของการแยกเซลล์พลาสโมเดียมอิสระด้วยซาโป-นินนานขึ้น และจะมีค่าสูงสุดที่เวลา 20 นาที หลังจากนั้นแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์จะกลับลดต่ำลง ผลการติดตามแอคติวิตีสุทธิของเอนไซม์แสดงให้เห็นว่า มีค่าคงที่ในช่วงประมาณ 2,5 และ 10 นาที หลังจากนั้นปริมาณเอนไซม์จะลดลงอย่างเห็นได้ชัด

การแยกพลาสโมเดียมอิสระเพื่อศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์ในงานวิจัยนี้จึงใช้ตามวิธีทดลองข้อ 3.10.1 นาน 10 นาที ตลอดไป

รูปที่ 29. ผลการแยกเซลล์ P. chabaudi AS อิสระ โดยวิธีทำลายเยื่อเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อด้วย 0.015 เปอร์เซนต์ซาโปนิน ตามวิธีทดลองข้อ 3.10.1 เป็นเวลาต่างๆกัน ตั้งแต่ 2-40 นาที เปรียบเทียบจำนวนเซลล์อิสระจากการวัดปริมาณโปรตีน (ข้อ 3.11.) และแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส (ข้อ 3.12.1) ที่อุณหภูมิ 37°ซ

Percentage of Maximum Specific Activity (■)
Percentage of Maximum Total Protein (▲)
Percentage of Maximum Total Activity (●)
Time of Saponin Lysis (min)
0
20
40
60
80
100
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4
1.6
10
20
30
40
50

4.17 ผลการศึกษาเปรียบเทียบเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส, เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิล-ทรานสเฟอเรสและไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส ในพลาสโมเดียม ฆาบอดี AS และ AS (Pr_1)

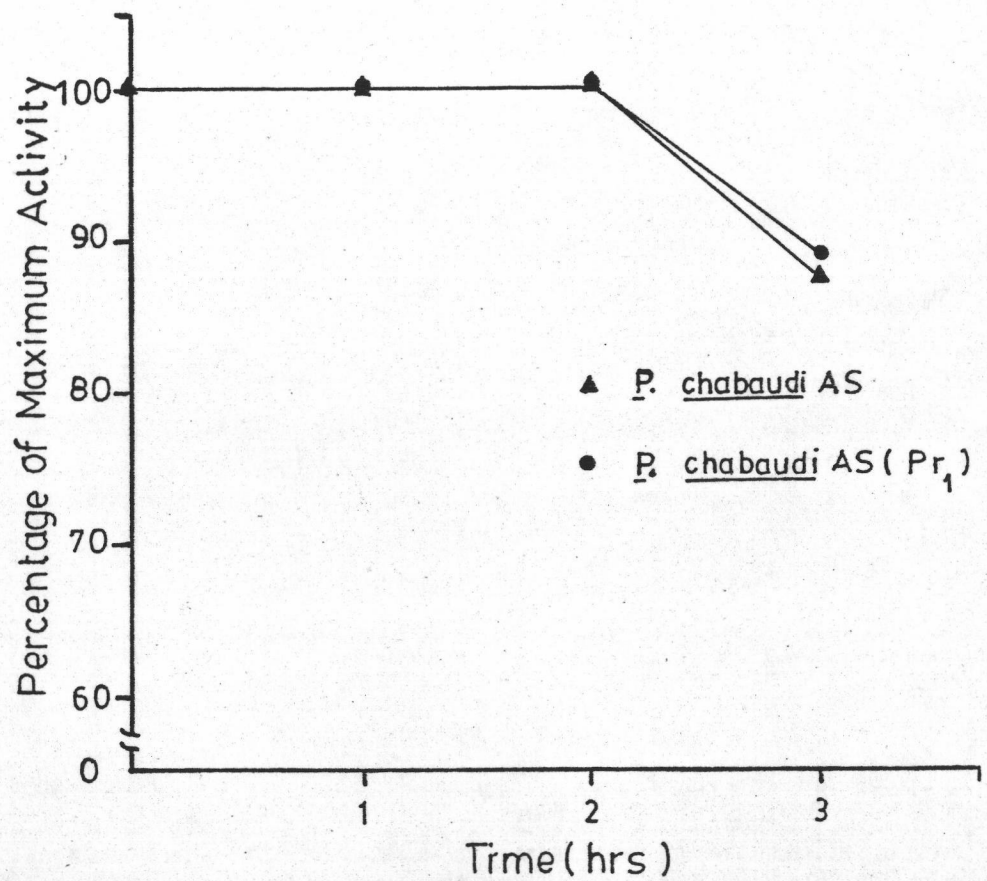
4.17.1 เอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส

4.17.1.1 ผลการศึกษาเปรียบเทียบเสถียรภาพของเอนไซม์ไดไฮโดร-โฟเลต รีดักเตสที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

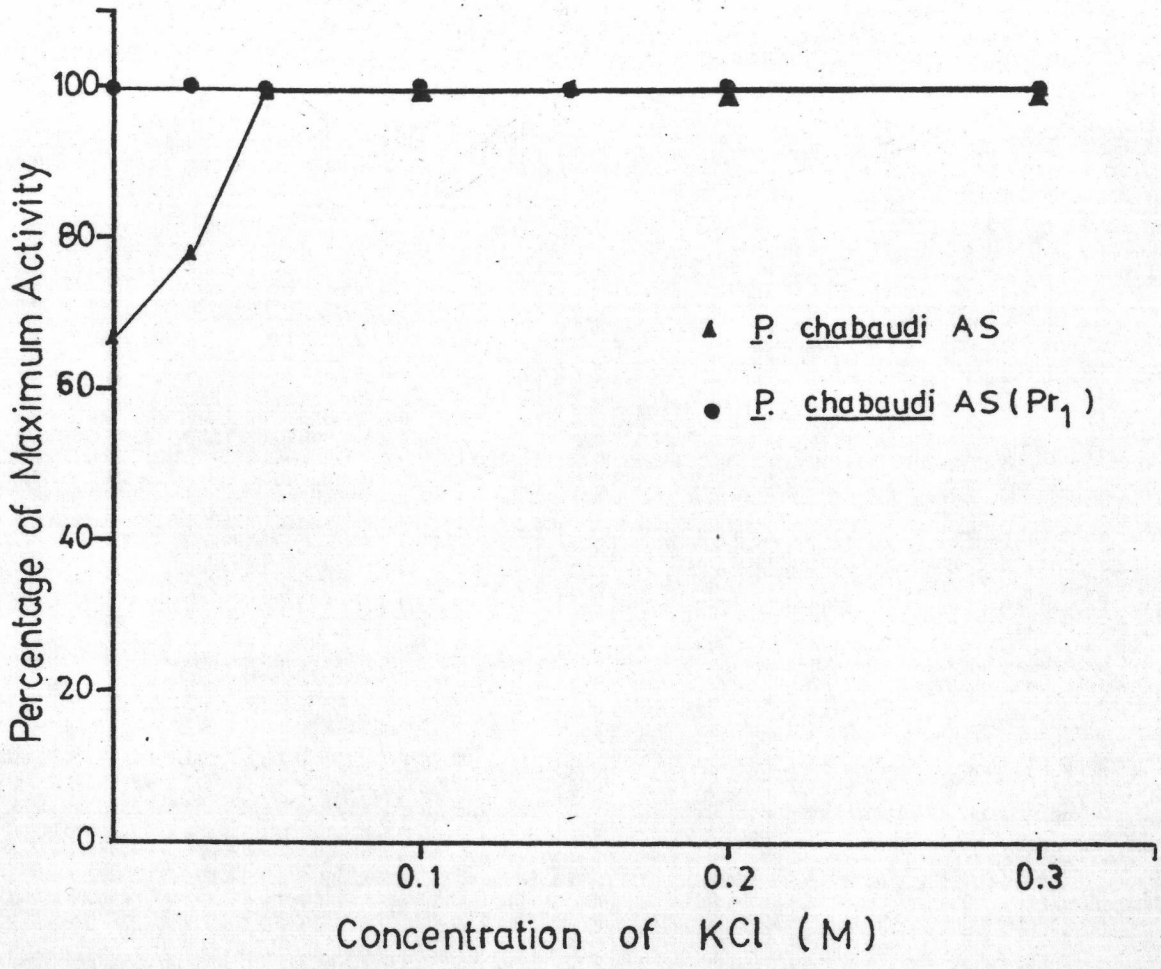
การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสตามวิธีข้อ 3.12.1 ติดตามจากการลดปริมาณของ NADPH ซึ่งในการวัดแต่ละตัวอย่างใช้เวลาประมาณ 5 นาที ถึงแม้ว่าจะเก็บเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและมี 1 มิลลิโมลาร์ 2-เมอร์เคพโตเอท-ธานอลร่วมอยู่ด้วย ก็น่าสนใจที่จะศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์ในระหว่างทำการทดลองเพื่อเพิ่มความเชื่อมั่นของค่าแอคติวิตีที่วัดได้ ผลการทดลองรูปที่ 30 แสดงว่าในระยะเวลา 2 ชั่วโมงแรกของการทดลอง เอนไซม์จากทั้ง พลาสโมเดียม ฆาบอดี AS และ AS (Pr_1) จะยังไม่สูญเสียแอคติวิตี แต่แอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส จะลดลงเหลือประมาณ 87.5 เปอร์เซ็นต์ในเวลา 3 ชั่วโมง

4.17.1.2 ผลการศึกษาเปรียบเทียบผลกระทบของโปแตสเซียมคลอไรด์ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส

จากการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสที่โปแตสเซียม-คลอไรด์ ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน (0-0.3 โมลาร์) พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์จาก พลาสโม-เดียม ฆาบอดี AS(Pr_1) ไม่ต้องการโปแตสเซียมคลอไรด์ ส่วนแอคติวิตีของเอนไซม์เดียวกันในเชื้อโคลน AS จะเพิ่มขึ้น 40 เปอร์เซ็นต์เมื่อถูกกระตุ้นด้วย โปแตสเซียมคลอไรด์ 0.05 โมลาร์ และค่อนข้างจะคงที่ตลอดช่วงความเข้มข้นที่ใช้ทดลอง (รูปที่ 31) ซึ่งในการวิจัยจะเลือกโปแตสเซียมคลอไรด์ 0.15 โมลาร์ สำหรับศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสจากเชื้อทั้ง 2 โคลน



รูปที่ 30. เสถียรภาพของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เมื่อล่ารละลายเอนไซม์มี 2-เมอร์เคพโตเอทธานอล 1 มิลลิโมลาร์ วัดแอคติวิตีตามวิธีทดลองในข้อ 3.12.1 ที่อุณหภูมิ 37 °ซ



รูปที่ 31. ผลกระทบของโปแตสเซียมคลอไรด์ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส วัดแอคติวิตีตามวิธีทดลองข้อ 3.12.1 ที่อุณหภูมิ 37°ซ เมื่อมีโปแตสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่าง ๆ กันตั้งแต่ 0–0.3 โมลาร์

4.17.1.3 ผลการศึกษาเปรียบเทียบผลกระทบของ pH ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส

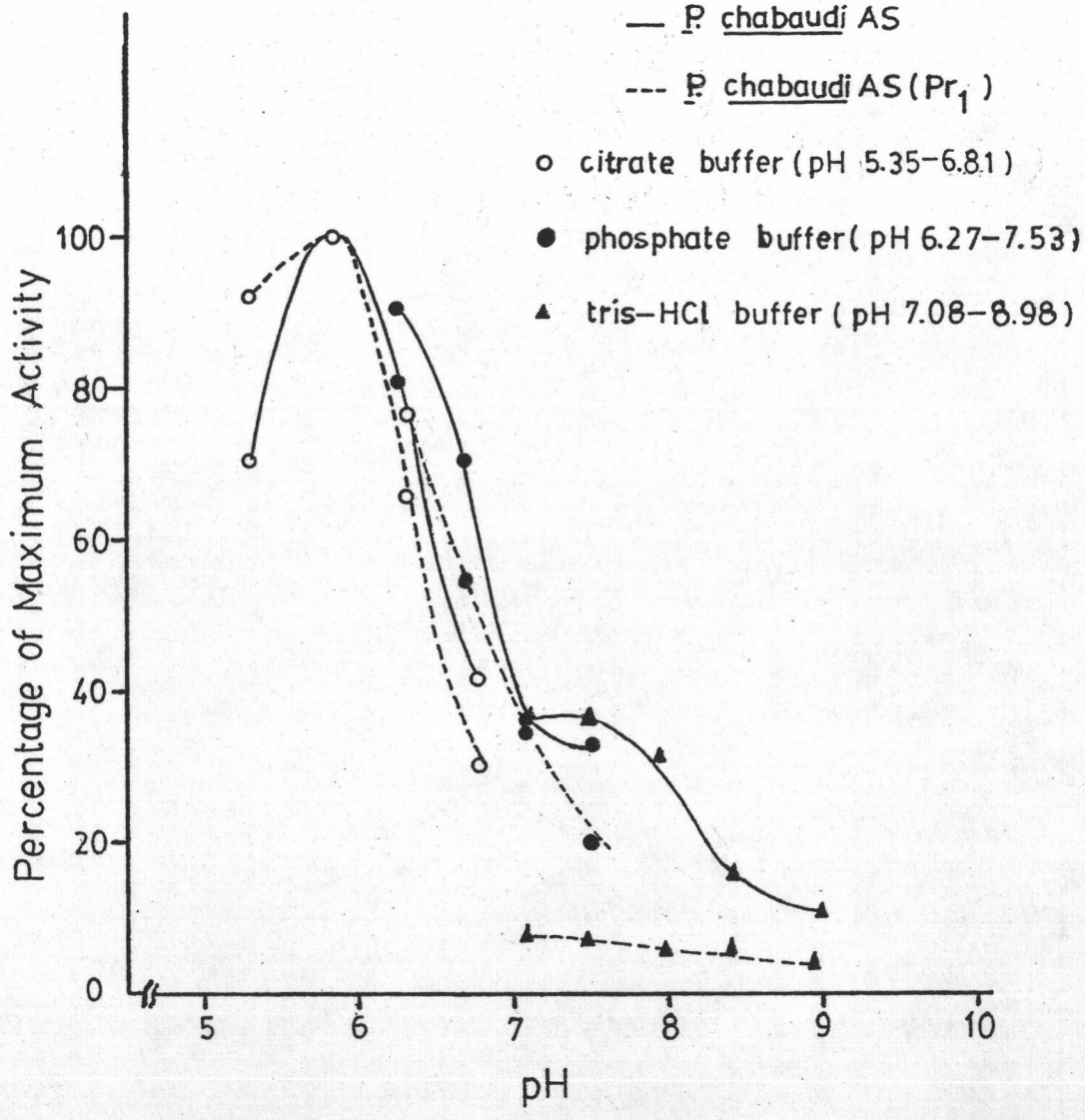
ทำการทดลองเปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ pH ต่าง ๆ ได้แก่ซีเตรตบัฟเฟอร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ปรากฏว่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ซึ่งสกัดจากเชื้อ พลาสโมเดียม ยำบอดี AS และ AS(Pr_1) มีค่าใกล้เคียงกัน คือ ประมาณ pH 5.9 (ซีเตรตบัฟเฟอร์) pH สูงหรือต่ำกว่านี้จะมีผลทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็ว (รูปที่ 32) นอกจากนี้ยังพบอีกว่า ทริส-ไฮโดร-คลอไรด์บัฟเฟอร์จะมีผลกระทบต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสจากเชื้อโคลน AS และ AS (Pr_1) แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด คือ pH ระหว่าง 7-9 จะให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ได้จาก พลาสโมเดียม ยำบอดี AS(Pr_1) ต่ำกว่าพลาสโมเดียม ยำบอดี AS

4.17.1.4 ผลการศึกษาเปรียบเทียบผลกระทบของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส

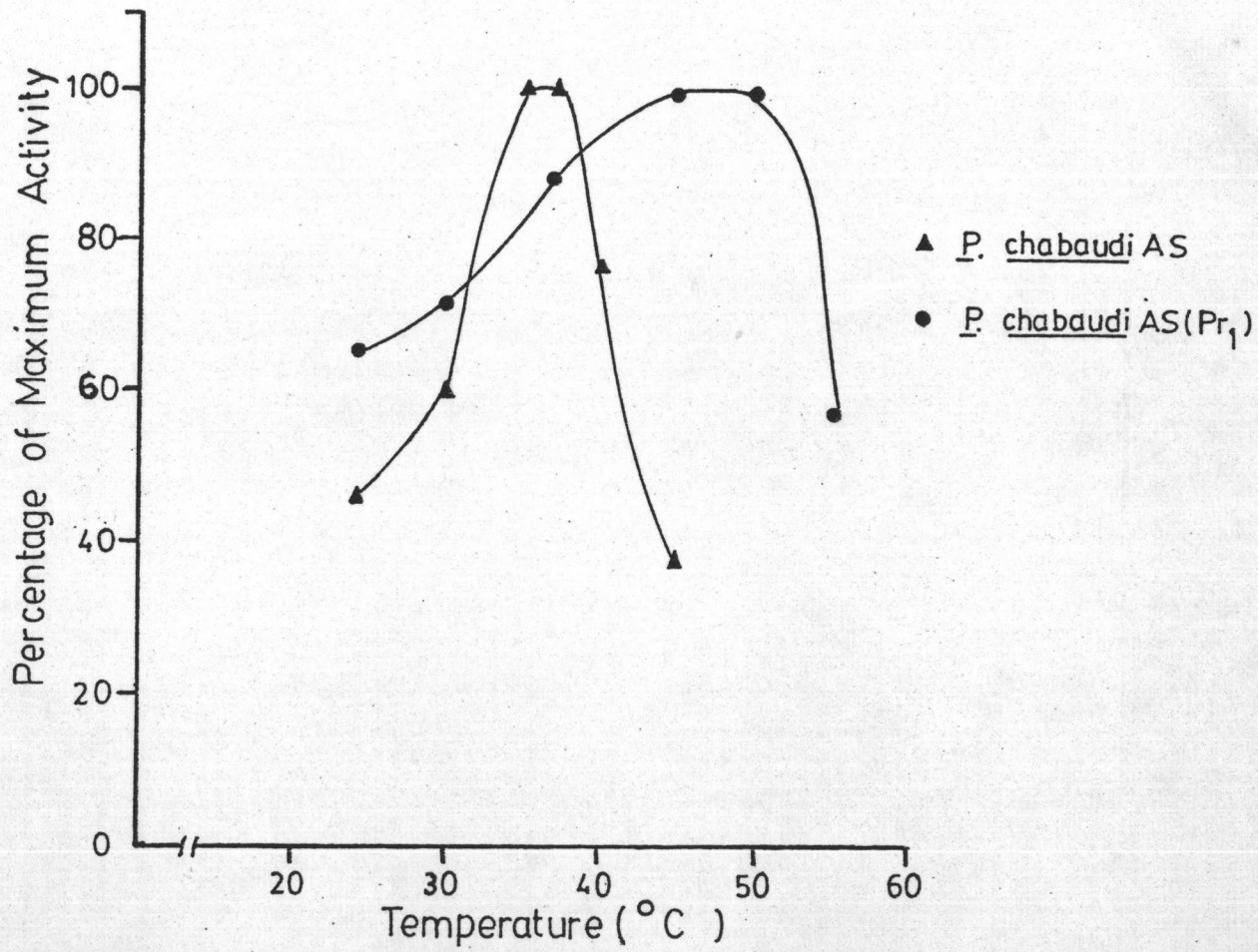
เมื่อทำการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสจากพลาสโม-เดียม ยำบอดี AS และ AS(Pr_1) ที่อุณหภูมิ 24-55 องศาเซลเซียส ผลการทดลอง (รูปที่ 33) พบว่า ให้รูปแบบต่างกันอย่างเห็นได้ชัด อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จากเชื้อโคลน AS จะเป็นช่วงแคบระหว่าง 35-37 องศาเซลเซียส ส่วนเอนไซม์เดียวกันในเชื้อโคลน AS(Pr_1) จะค่อย ๆ เพิ่มแอคติวิตี เมื่ออุณหภูมิเปลี่ยนจาก 24 องศาเซลเซียส และจะมีค่าคงที่ที่อุณหภูมิประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส

4.17.1.5 ผลการศึกษาเปรียบเทียบค่า K_m ของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสต่อไดไฮโดรโฟเลต

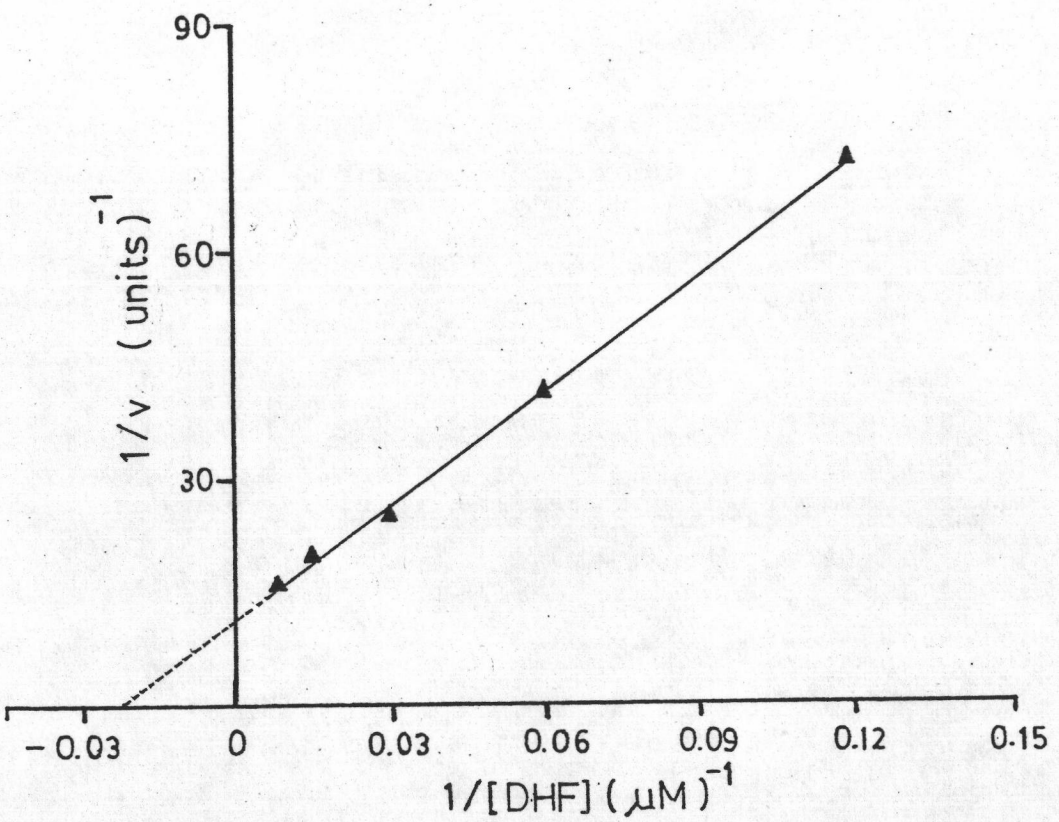
ทำการทดลองเปรียบเทียบระหว่าง พลาสโมเดียม ยำบอดี AS และ AS(Pr_1) โดยวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หาค่า K_m ด้วยวิธี Lineweaver-Burk Plot ปรากฏว่า เอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส จากเชื้อโคลน AS(Pr_1) จะมีค่า K_m ต่อไดไฮโดรโฟเลตเท่ากับ 11.8 $\pm$ 0.7 ไมโครโมลาร์ น้อยกว่าค่าของเอนไซม์เดียวกันที่สกัดจากเชื้อโคลน AS (44.9 $\pm$ 0.6 ไมโครโมลาร์)ประมาณ 4 เท่า (รูปที่ 34,35



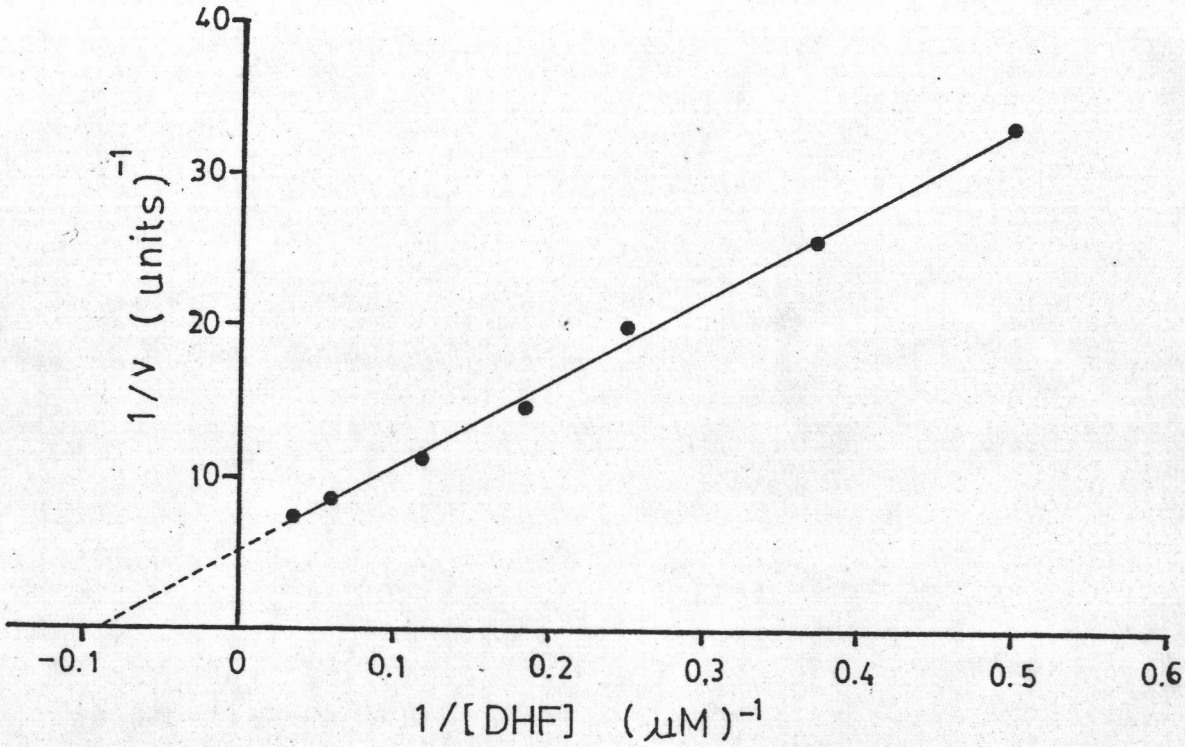
รูปที่ 32. ผลกระทบของ pH ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮ-ไดรโฟเลต รีดักเตส วัดแอคติวิตีตามวิธีทดลองในข้อ 3.12.1 ที่อุณหภูมิ 37°ซ ในสารละลายบัฟเฟอร์ (0.5 โมลาร์) pH ต่างๆ



รูปที่ 33. ผลกระทบของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส วัดแอคติวิตีตามวิธีทดลองในข้อ 3.12.1 ที่อุณหภูมิต่างๆกันตั้งแต่ 24–55 °ซ



รูปที่ 34. Lineweaver-Burk Plot ของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเตส จาก P. chabaudi AS กับสับสเตรตไดไฮโดรโฟเลต วัดแอคติวิตีตามวิธีทดลองในข้อ 3.12.1 ที่อุณหภูมิ 37°ซ โดยใช้สับสเตรตความเข้มข้นต่างๆกัน ตั้งแต่ 0-133 ไมโครโมลาร์



รูปที่35. Lineweaver-Burk Plot ของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส จาก P chabaudi AS(Pr_1) กับสับสเตรตไดไฮโดรโฟเลต วัดแอคติวิตีตามวิธีทดลองในข้อ 3.12.1 ที่อุณหภูมิ 37°ซ โดยใช้สับสเตรตความเข้มข้นต่างๆกันตั้งแต่ 0-28ไมโครโมลาร์

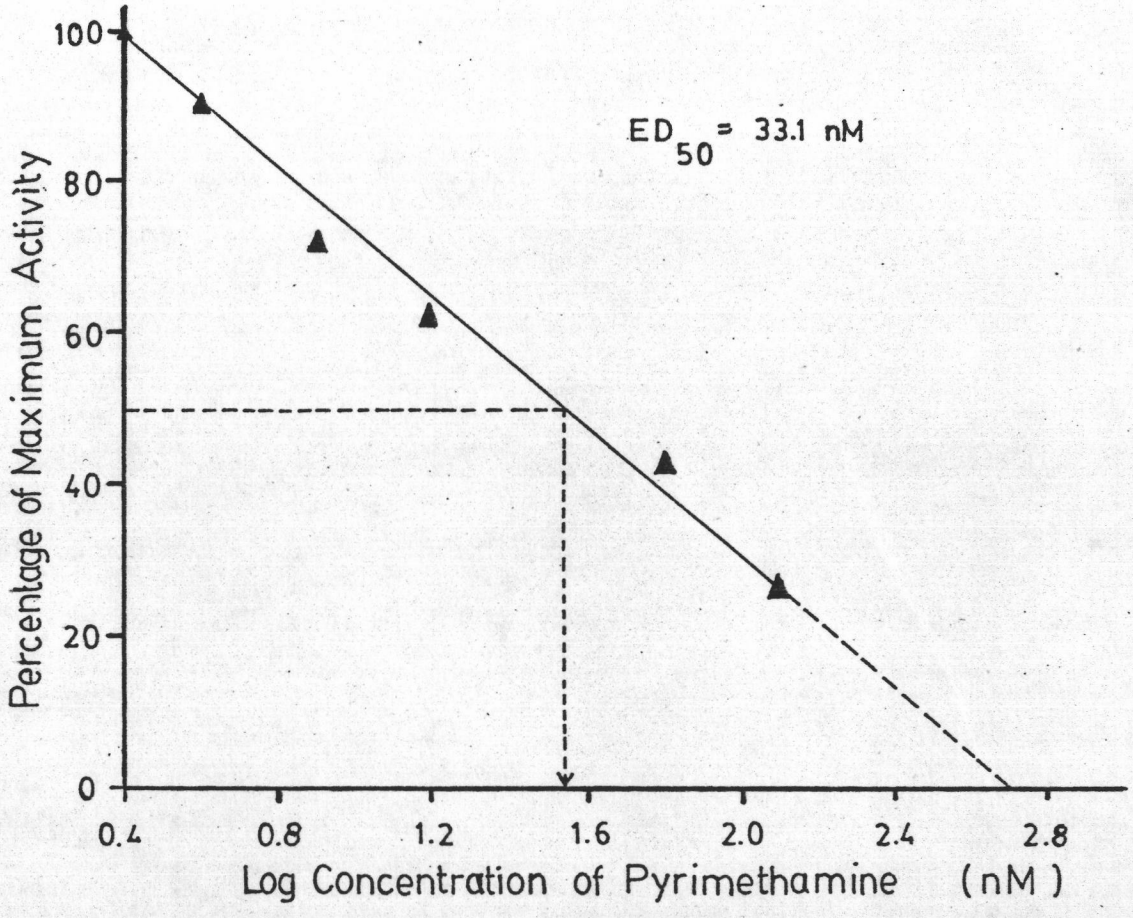
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

และตารางที่ 6)

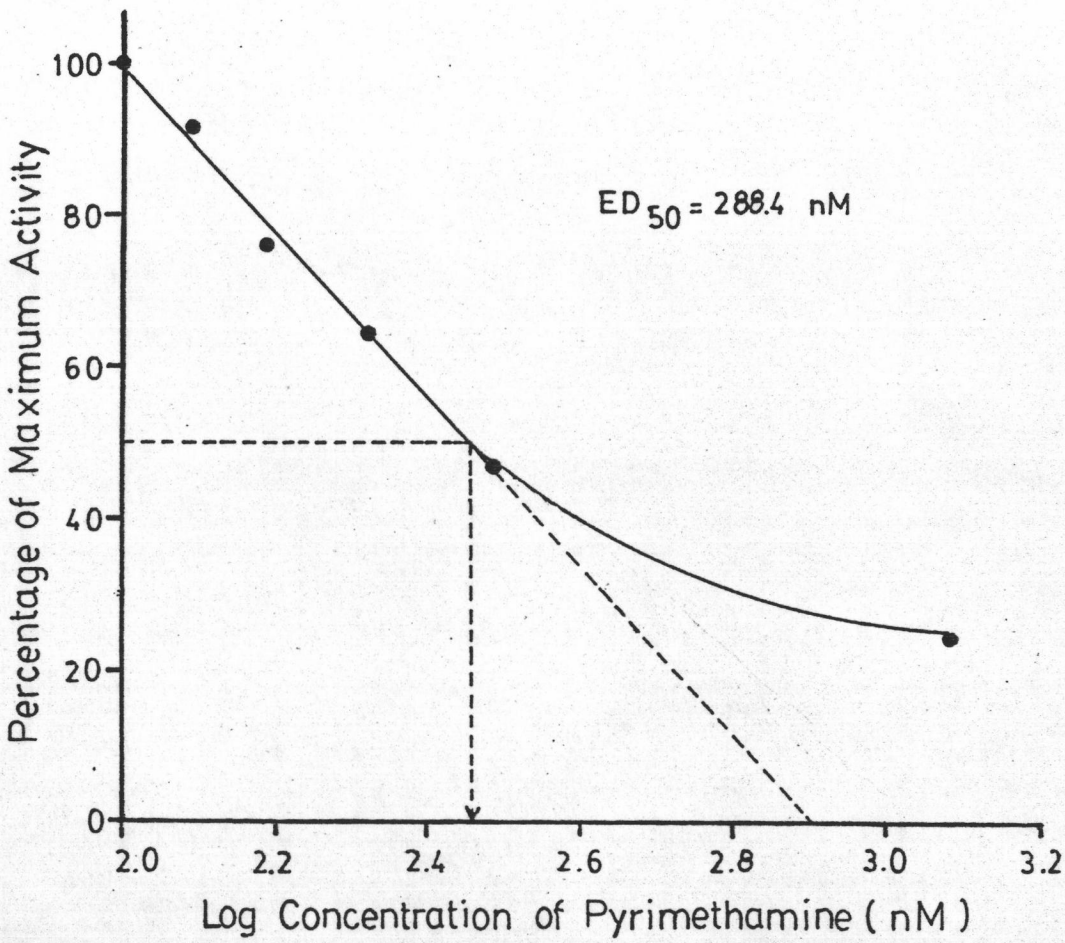
4.17.1.6 ผลการศึกษาเปรียบเทียบผลกระทบของไพริเมธามีนต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส

ได้ทำการทดลองหาค่า ED_{50} ซึ่งหมายถึงความเข้มข้นของไพริเมธามีนที่ทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงจากแอคติวิตีเริ่มต้น 50 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ไพริเมธามีนความเข้มข้นต่าง ๆ ในช่วง 4-125 นาโนโมลาร์ยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส จากพลาสโมเดียม ฆ่าบอดี AS และ 0.12 - 1.25 ไมโครโมลาร์ยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เดียวกันจากเชื้อโคลน AS(Pr_1) (เอนไซม์แอคติวิตี 7 หน่วยเท่ากัน) วัดแอคติวิตี (ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส) ซึ่งเหลือจากการยับยั้งด้วยไพริเมธามีนหาค่า ED_{50} โดยการสร้างความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีของเอนไซม์กับค่าลอการิธึม (log) ของความเข้มข้นของไพริเมธามีน พบว่า ED_{50} ต่อเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสจากเชื้อโคลน AS เท่ากับ 33.1 นาโนโมลาร์ (รูปที่ 36) และเมื่อลากเส้นต่อจุด (extrapolate) มายังแกนนอนของกราฟ(abscissa) ปรากฏว่าเอนไซม์แอคติวิตีจะถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ด้วยไพริเมธามีนความเข้มข้นประมาณ 500 นาโนโมลาร์ ส่วนเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสที่พบในพลาสโมเดียม ฆ่าบอดี AS(Pr_1) จะถูกยับยั้งด้วยไพริเมธามีนด้วยรูปแบบที่ต่างจากเอนไซม์ของเชื้อโคลน AS (รูปที่ 37) โดยแอคติวิตีจะลดลงเป็นสัดส่วนกับการเพิ่มความเข้มข้นของไพริเมธามีนจนเหลือ 45 เปอร์เซ็นต์ที่ไพริเมธามีนความเข้มข้นประมาณ 331 นาโนโมลาร์ ซึ่งจะได้ค่า ED_{50} ต่อเอนไซม์เท่ากับ 288.4 นาโนโมลาร์ (สูงประมาณ 9 เท่าของค่าที่พบในเชื้อโคลน AS) แต่ผลยับยั้งจะลดลงเมื่อใช้ไพริเมธามีนมากกว่า 331 นาโนโมลาร์ จากผลการทดลองถ้าทำการลากต่อเส้นกราฟมายังแกนนอน ปรากฏว่าแอคติวิตีของเอนไซม์จะถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ที่ไพริเมธามีนความเข้มข้นประมาณ 794 นาโนโมลาร์

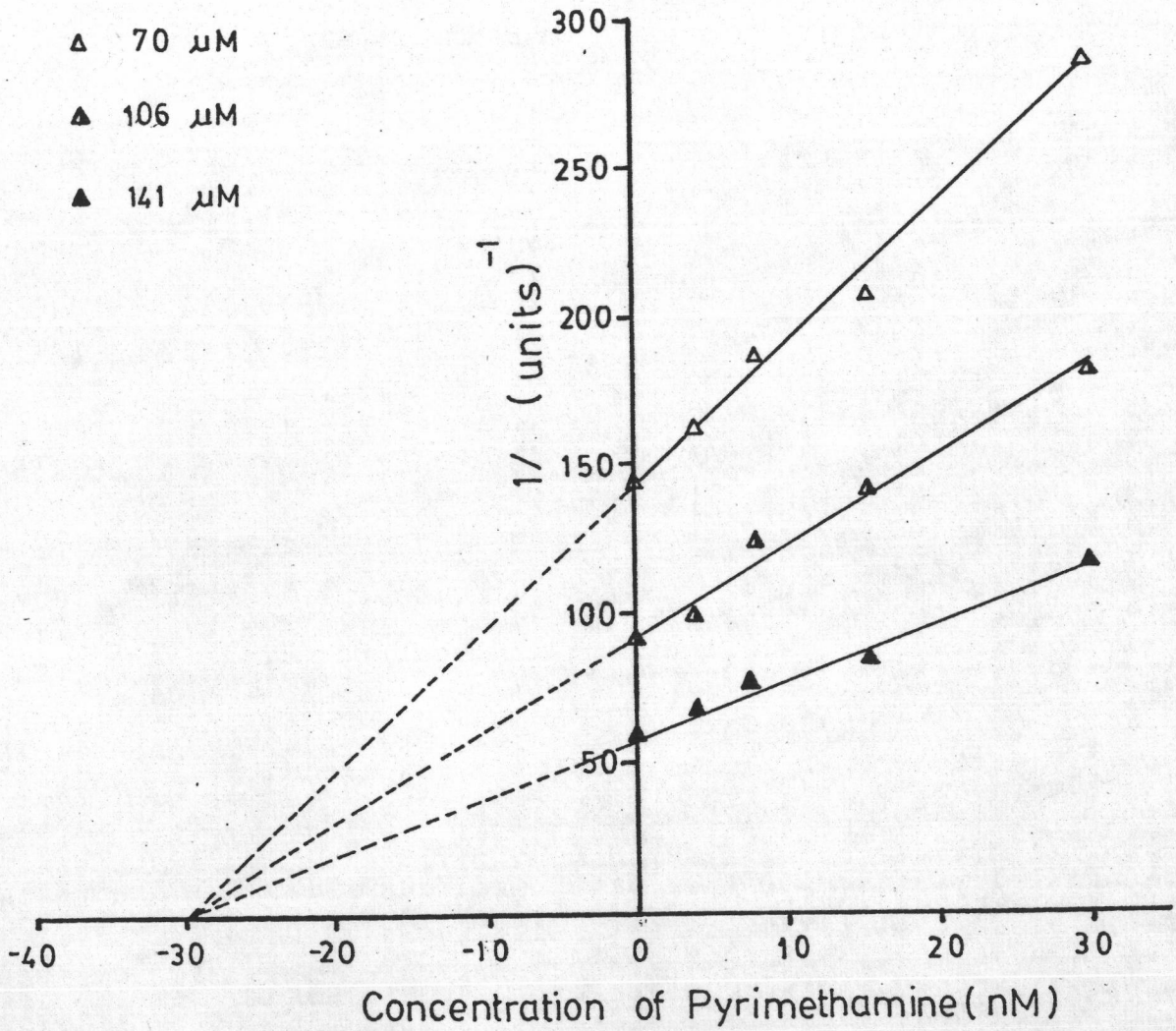
ค่า K_i ต่อไพริเมธามีนของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสหาได้จากการเขียนกราฟสร้างความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไพริเมธามีนกับแอคติวิตีของเอนไซม์ (วัดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส) ตามแบบของ Dixon Plot ที่ไดไฮโดรโฟเลตความเข้มข้นต่าง ๆ 3 ค่า ดังแสดงในรูปที่ 38 และ 39 พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์จาก พลาสโมเดียม ฆ่าบอดี AS จะถูกยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (non-competitive inhibition) โดยไพริเมธามีนด้วยค่า K_i เท่ากับ 30 นาโนโมลาร์ ส่วนเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสในเชื้อโคลน



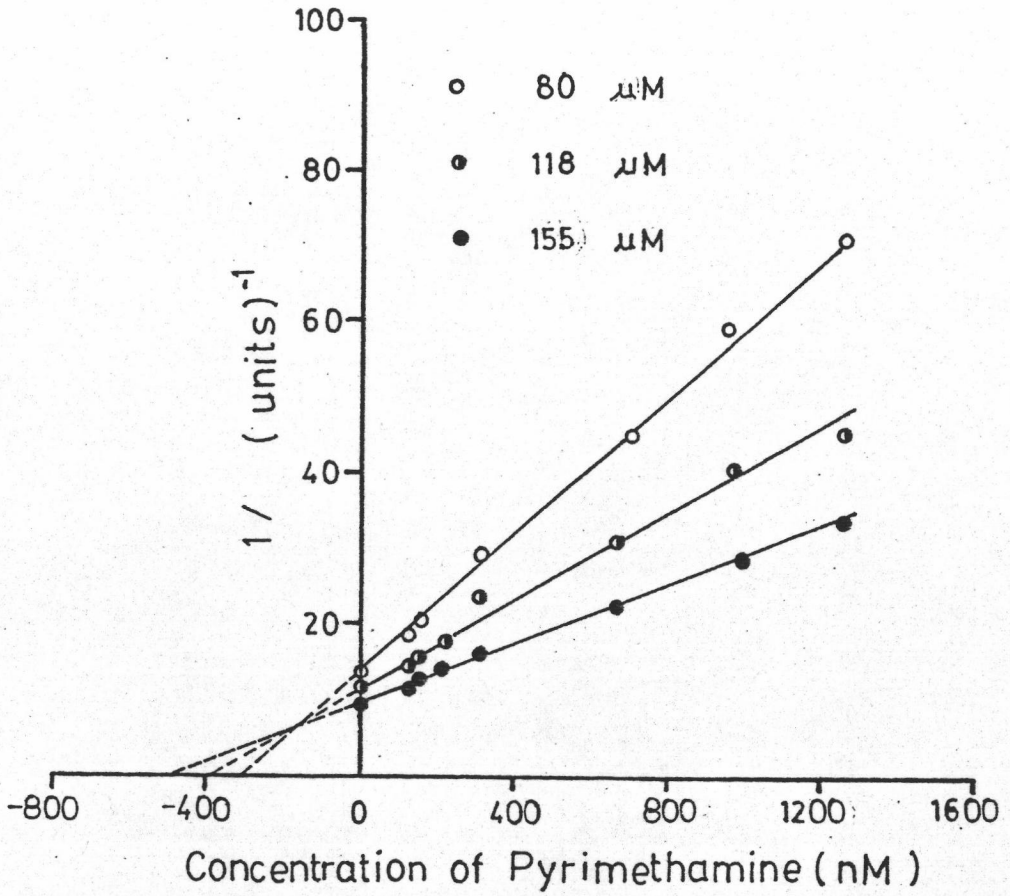
รูปที่ 36. ผลกระทบของไพริเมธามีนต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส จาก P. chabaudi AS วัดแอคติวิตีตามวิธีทดลองในข้อ 3.12.1 ที่อุณหภูมิ 37°ซ เมื่อมีไพริเมธามีนความเข้มข้นต่าง ๆ กันตั้งแต่ 4-125 นาโนโมลาร์ (เอนไซม์ 0.3 มิลลิกรัมโปรตีน , 7 หน่วย)



รูปที่ 37. ผลกระทบของไพริเมธามีนต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส จาก P. chabaudi AS (Pr_1) วัดแอคติวิตีตามวิธีทดลองในข้อ 3.12.1 ที่อุณหภูมิ 37°ซ เมื่อมีไพริเมธามีนความเข้มข้นต่าง ๆ กันตั้งแต่ 125 — 1250 นาโนโมลาร์ (เอนไซม์ 0.15 มิลลิกรัมโปรตีน , 7 หน่วย)



รูปที่ 38. Dixon Plot ของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส จาก P chabaudi AS กับไพริเมธามีน (ความเข้มข้นต่างๆ กันตั้งแต่ 4-30 นาโนโมลาร์) วัดแอคติวิตีตามวิธีทดลองในข้อ 3.12.1 ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เมื่อใช้ไดไฮโดรโฟเลตความเข้มข้น 70, 106 และ 141 ไมโครโมลาร์



รูปที่ 39. Dixon Plot ของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส จาก P chabaudi AS (Pr_1) กับไพริเมธามีน (ความเข้มข้นต่างๆกันตั้งแต่ 120–1250 นาโนโมลาร์) วัดแอคติวิตีตามวิธีทดลองในข้อ 3.12.1 ที่อุณหภูมิ 37°ซ เมื่อใช้ไดไฮโดรโฟเลตความเข้มข้น 80, 118 และ 155 ไมโครโมลาร์

AS(Pr_1) จะมีค่า K_i ต่อไพริเมธามีนเพิ่มขึ้นเป็น 160 นาโนโมลาร์และจลน์ศาสตร์ของการยับยั้งจะเป็นแบบแย่งยัน (competitive inhibition)

4.17.1.7 ผลการศึกษาเปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส

ทำการทดลองวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ (ใช้ปริมาณโปรตีน 0.2-1.0 มิลลิกรัม) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ปรากฏว่า แอคติวิตีจำเพาะของไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสจาก พลาสโมเดียม ฆาบอดี AS(Pr_1) มีค่า 6.5 $\pm$ 0.5 นาโนโมลต่อนาที ต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งไม่แตกต่างมากนักจากค่าที่พบในเชื้อโคลน AS ซึ่งเท่ากับ 8.5 $\pm$ 0.5 นาโนโมลต่อนาที ต่อมิลลิกรัมโปรตีน (ตารางที่ 6)

4.17.1.8 ผลการศึกษาเปรียบเทียบแอคติวิตีสุทธิของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส

ในการวิจัยนี้ได้ทำการทดลองเปรียบเทียบแอคติวิตีสุทธิของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส ที่ลังเคราะห์ขึ้นในเซลล์พลาสโมเดียม ฆาบอดี โดยคำนวณและรายงานเป็นค่าแอคติวิตีสุทธิ (total activity) ต่อ 10^9 เซลล์พลาสโมเดียม

เมื่อวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่สภาวะมาตรฐานการทดลองดังที่ระบุในข้อ 3.12.1 คือใช้เอนไซม์ไม่เกิน 0.3 มิลลิกรัมโปรตีน ซีเตรตบัฟเฟอร์ pH 5.9 และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (เอนไซม์จาก พลาสโมเดียม ฆาบอดี AS) หรือ 45 องศาเซลเซียส (เอนไซม์จากเชื้อโคลน AS(Pr_1)) พบว่า (ตารางที่ 6) แอคติวิตีสุทธิของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส ต่อ 10^9 เซลล์ ของพลาสโมเดียม ฆาบอดี AS(Pr_1) (34.8 $\pm$ 0.6 นาโนโมลต่อนาที) มีค่ามากกว่าที่พบในเชื้อโคลน AS (9.3 $\pm$ 0.2 นาโนโมลต่อนาที) ประมาณ 4 เท่า

4.17.2 เอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทรานสเฟอเรส

4.17.2.1 ผลการศึกษาเปรียบเทียบเวลาที่เหมาะสมสำหรับวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทรานสเฟอเรส

ทำการทดลองวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทรานสเฟอเรสจากพลาสโมเดียม ฆาบอดี AS และ AS(Pr_1) (ตามวิธีข้อ 3.12.2) ที่อุณหภูมิ 50 องศา-

ตารางที่ 6. สรุปผลการศึกษาเปรียบเทียบเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส จาก P. chabaudi AS และ AS(Pr_1)

	P. chabaudi AS	P. chabaudi AS(Pr_1)
KCl activation (up to 0.3M)	0.05–0.3	NO
Optimum pH	~5.9	~5.9
Optimum temperature (°C)	35–37	40–45
K_m for DHF (37°C, pH 5.9)[1]	44.9±0.6	11.8±0.7
Pyrimethamine inhibition (ED_{50}; 37°C, pH 5.9)[2]	33.1	288.4
K_i for pyrimethamine (37°C, pH 5.9)[3]	30	160
Specific activity (37°C, pH 7.4)[4]	8.5±0.5	6.5±0.5
Amount of enzyme (10^9 cells)[5]	9.3±0.2	34.8±0.6

(1) expressed as μM

(2), (3) expressed as nM

(4) expressed as nmole·min^{-1}/mg protein

(5) expressed as nmole·min^{-1} (at optimum conditions)

เซลเซียส์ในทริส์-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.3 โดยใช้เอนไซม์ด้วยปริมาณโปรตีน 0.4 มิลลิกรัม อินคิวเบตเป็นเวลาต่าง ๆ กันจนถึง 90 นาที ปรากฏว่าแอคติวิตีของเอนไซม์เพิ่มเป็นสัดส่วนกับเวลาของการอินคิวเบตที่เพิ่มขึ้นตลอดช่วงเวลาที่ทดลอง (รูปที่ 40)

4.17.2.2 ผลการศึกษาเปรียบเทียบผลกระทบของ pH ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทรานส์เฟอเรส์

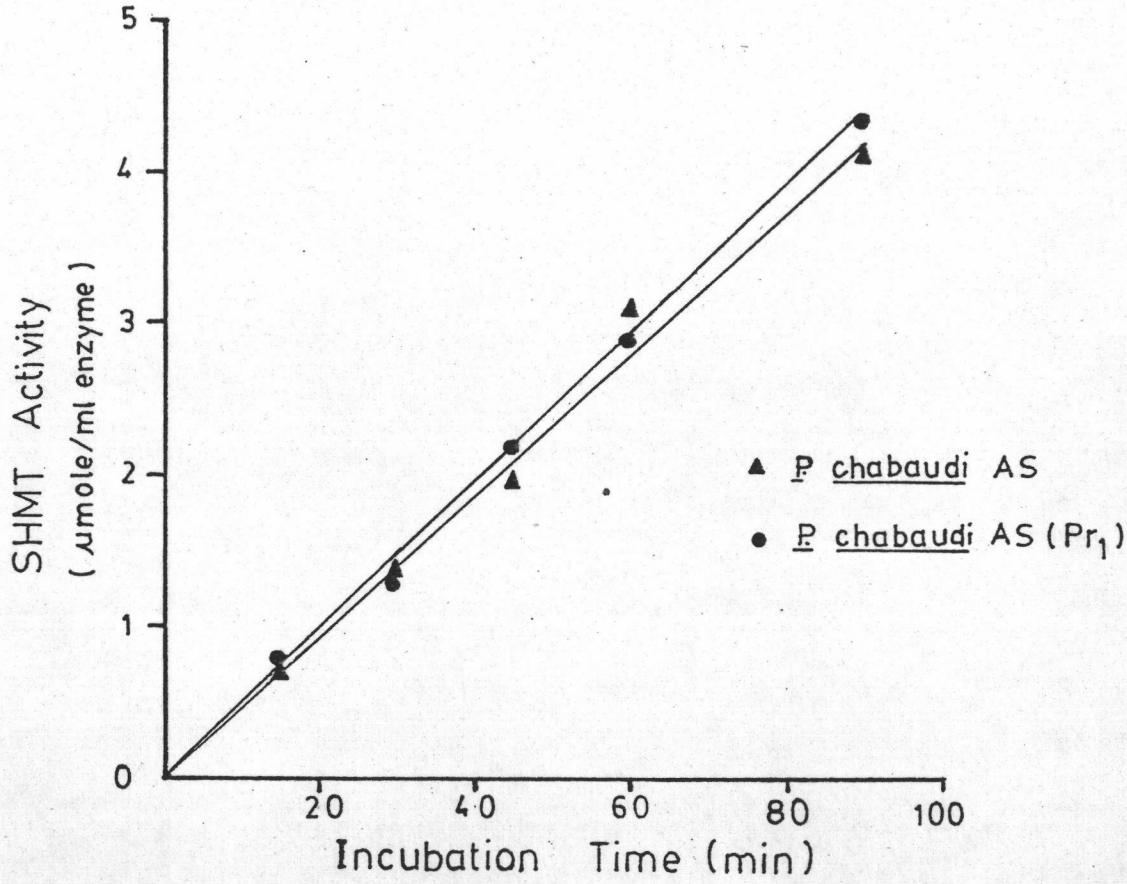
เมื่อศึกษาปฏิกิริยาการเปลี่ยนเตตระไฮโดรโฟเลตเป็นเมทธิลลีนเตตระ-ไฮโดรโฟเลต โดยมีเอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทรานส์เฟอเรส์เป็นตัวเร่ง ในบัฟเฟอร์ pH ต่าง ๆ กัน 2 ชนิด ได้แก่ 0.3 โมลาร์ ฟอส์เฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.77 - 7.43) และ 0.6 โมลาร์ ทริส์-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ (pH 7.18 - 8.71) ปรากฏว่า pH ที่เหมาะสมสำหรับวัดแอคติวิตีของเอนไซม์จาก พลาส์โมเดียม ฆาบอดี AS และ AS(Pr_1) เกือบจะไม่แตกต่างกันโดยจะมีค่าอยู่ในช่วงประมาณ pH 8.0 - 8.8 และชนิดของบัฟเฟอร์ไม่มีผลต่อเอนไซม์แอคติวิตีของเชื้อทั้ง 2 โคลน (รูปที่ 41) (ในการวิจัยจะวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทรานส์เฟอเรส์ในทริส์-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.3)

4.17.2.3 ผลการศึกษาเปรียบเทียบผลกระทบของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของเอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทรานส์เฟอเรส์

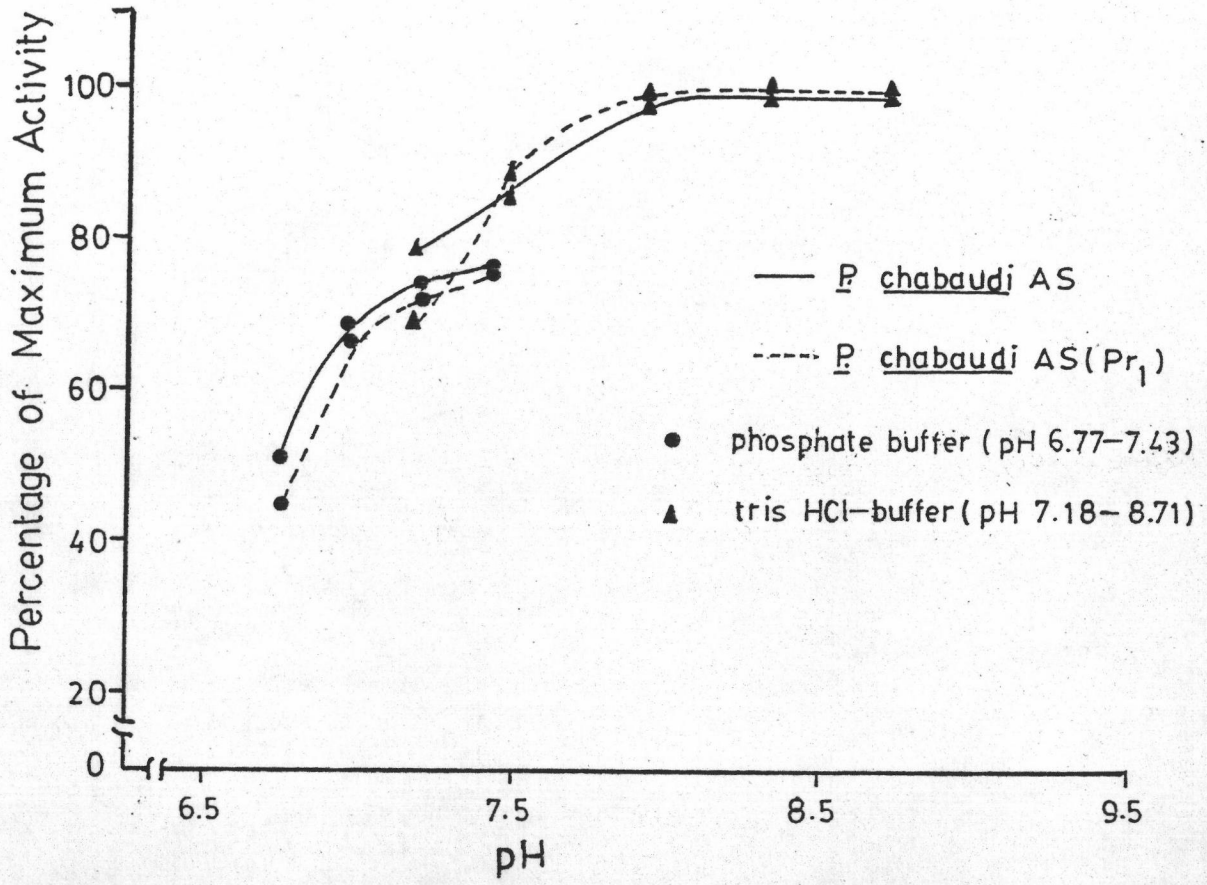
จากการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน (24-60 องศาเซลเซียส์) ดังแสดงในรูปที่ 42 พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสำหรับการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทรานส์เฟอเรส์จาก พลาส์โมเดียม ฆาบอดี AS คือ 50 องศาเซลเซียส์ ส่วนเอนไซม์จากเชื้อโคลน AS(Pr_1) จะอยู่ในช่วงประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส์ อุณหภูมิสูงกว่า 55 องศาเซลเซียส์ จะทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็ว แต่แอคติวิตีของเอนไซม์จะยังคงเหลือประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ถ้าให้เร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส์)

4.17.2.4 ผลการศึกษาเปรียบเทียบค่า K_m ของเอนไซม์เซอรีน ไฮดรอก-ซีเมทธิลทรานส์เฟอเรส์ต่อสับส์เตรต

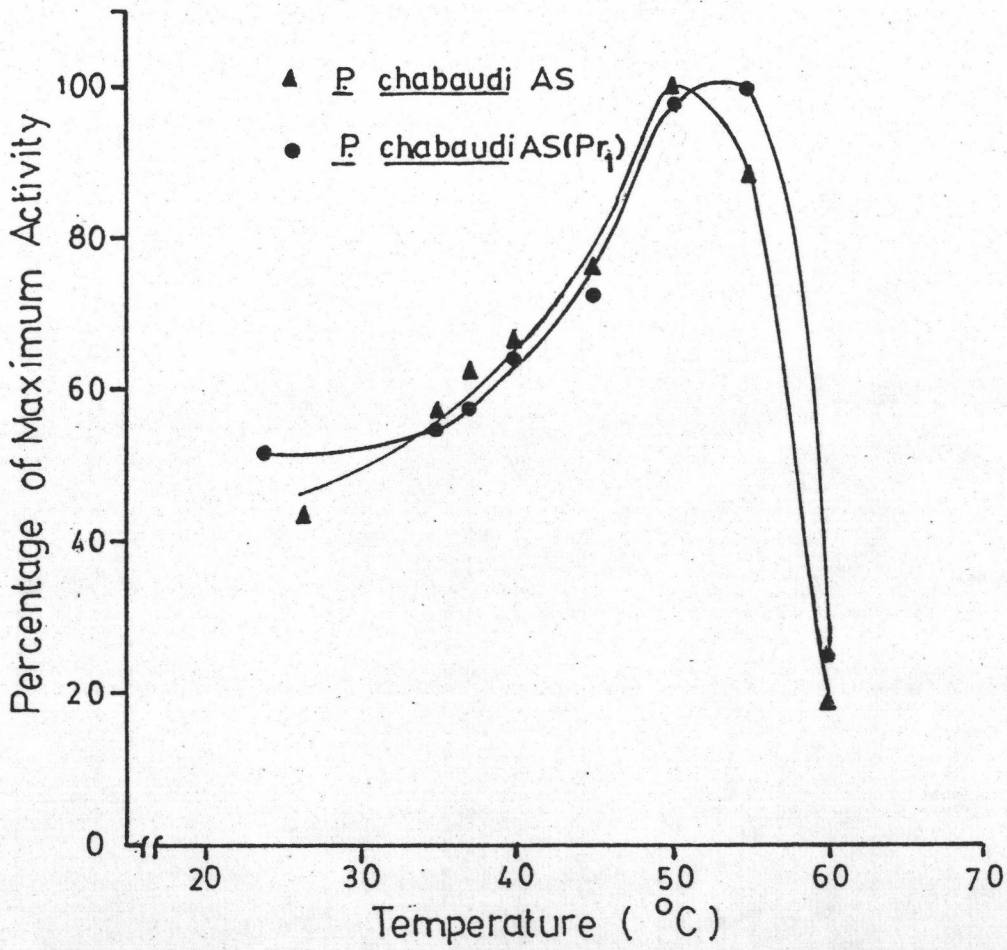
เอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทรานส์เฟอเรส์เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนกรดอะมิโนเซอรีนเป็นกรดอะมิโนไกลซีนโดยมีเตตระไฮโดรโฟเลตเป็นโคสับส์เตรต ได้ทำการทดลอง



รูปที่ 40. ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับแอคติวิตีของเอนไซม์-เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทรานสเฟอเรส วัดแอคติ-วิตีตามวิธีทดลองในข้อ 3.12.2 เมื่ออินคิวเบตเป็นเวลาต่างๆกันตั้งแต่ 0-90 นาที



รูปที่ 41. ผลกระทบของ pH ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์เซอรีนไฮดรอกซีเมทธิลทรานส์เฟอเรส วัดแอคติวิตีตามวิธีทดลองในข้อ 3.12.2 ที่อุณหภูมิ 37 °ซ ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH ต่างๆ



รูปที่ 42. ผลกระทบของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของเอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทรานส์เฟอเรส วัดแอคติวิตีตามวิธีทดลองในข้อ 3.12.2 ที่อุณหภูมิต่างๆกันตั้งแต่ 24-60 °ซ

เพื่อหาค่า K_m ต่อสับสเตรตทั้งสอง ด้วยวิธีของ Lineweaver-Burk Plot

เมื่อวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทรานสเฟอเรส ตามวิธีข้อ 3.12.2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและใช้เตตระไฮโดรโฟเลตความเข้มข้นตั้งแต่ 0-0.22 มิลลิโมลาร์ เปรียบเทียบระหว่างเอนไซม์ในเชื้อทั้ง 2 โคลน ทำให้พบว่า K_m ต่อเตตระไฮโดรโฟเลตของเซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทรานสเฟอเรสจากพลาสโมเดียม ฆาบอดี AS(Pr_1) มีค่าเท่ากับ 0.13 ± 0.03 มิลลิโมลาร์ ซึ่งไม่ต่างกับค่า K_m ของเอนไซม์ที่พบในพลาสโมเดียม ฆาบอดี AS (0.10 ± 0.02 มิลลิโมลาร์) (รูปที่ 43 และตารางที่ 7)

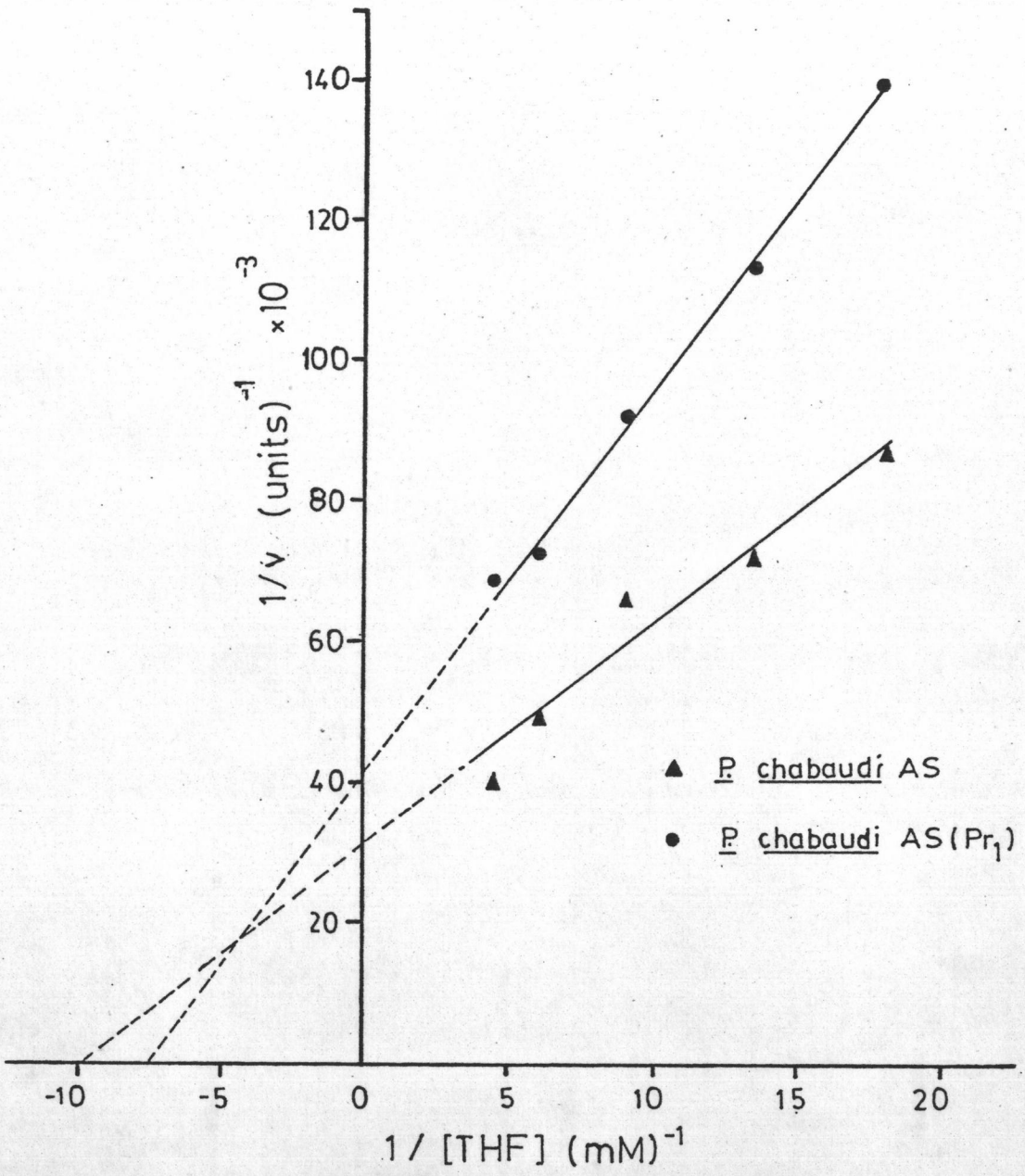
การทดลองหาค่า K_m ของเอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทรานสเฟอเรสต่อกรดอะมิโนเซอรีนทำในลักษณะเดียวกับการหาค่า K_m ต่อเตตระไฮโดรโฟเลตโดยวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ เมื่อใช้กรดอะมิโนเซอรีนความเข้มข้น 0-2.22 มิลลิโมลาร์ ผลการทดลองในรูปที่ 44 และตารางที่ 7 แสดงให้เห็นว่า เอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทรานสเฟอเรสจาก พลาสโมเดียม ฆาบอดี AS(Pr_1) จะมีค่า K_m ต่อกรดอะมิโนเซอรีน (0.45± 0.05 มิลลิโมลาร์) ใกล้เคียงกับค่าของเอนไซม์จากเชื้อโคลน AS (0.55 ± 0.08 มิลลิโมลาร์)

4.17.2.5 ผลการศึกษาเปรียบเทียบผลกระทบของไพริเมธามีนต่อแอคติวิตีของเอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทรานสเฟอเรส

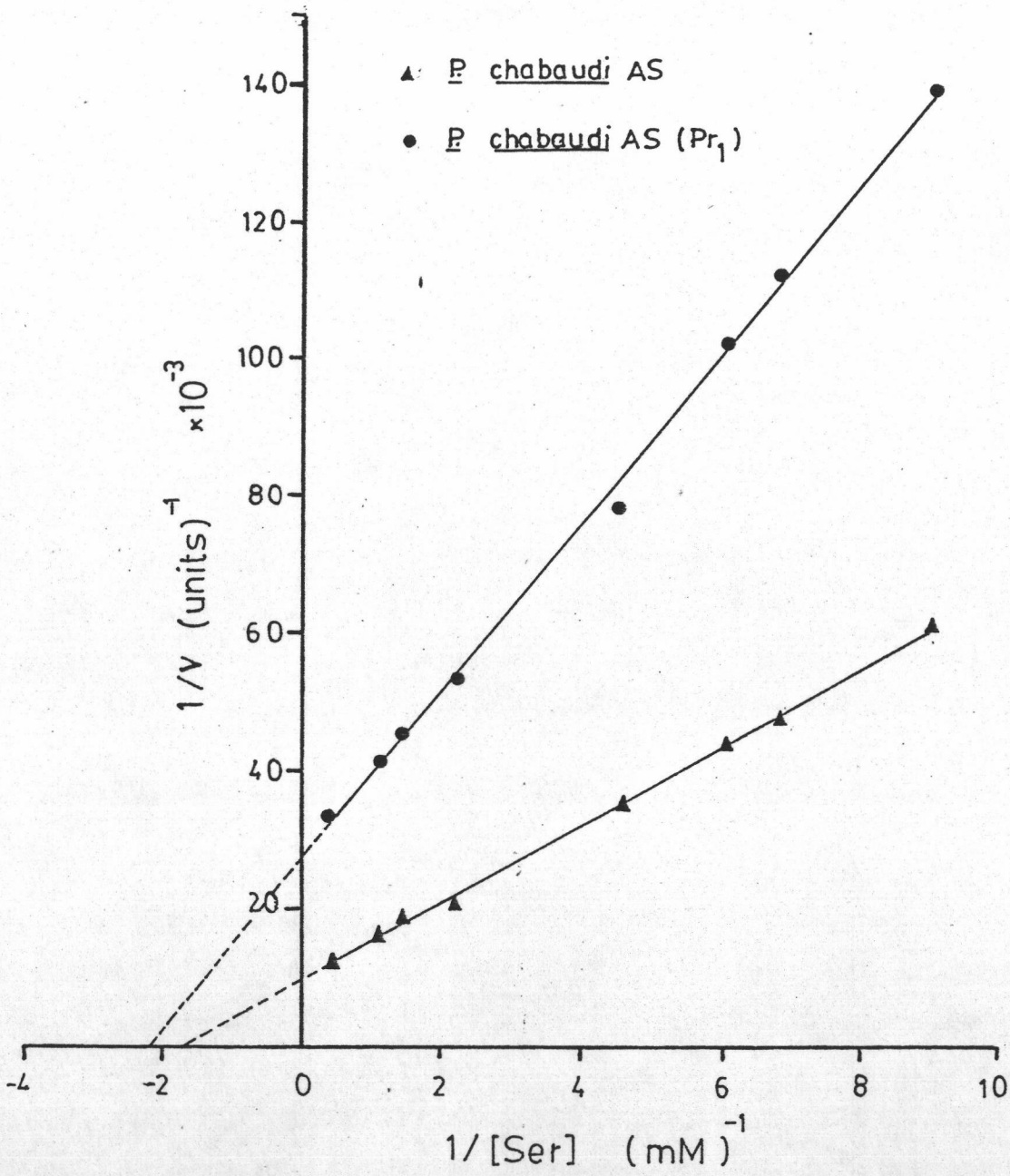
จากการศึกษาผลการยับยั้งของไพริเมธามีน (0-1.11 มิลลิโมลาร์) ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทรานสเฟอเรส (ทำการทดลองที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส) ปรากฏว่าไพริเมธามีน 1.11 มิลลิโมลาร์ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่ละลายได้ในสภาวะการทดลอง (ข้อ 3.12.2) และมีค่าเป็นครึ่งหนึ่งของความเข้มข้นของเตตระไฮโดรโฟเลตจะไม่มีผลกระทบต่อแอคติวิตีของเอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทรานสเฟอเรสจากพลาสโมเดียม ฆาบอดี AS และ AS(Pr_1) (รูปที่ 45)

4.17.2.6 ผลการศึกษาเปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทรานสเฟอเรส

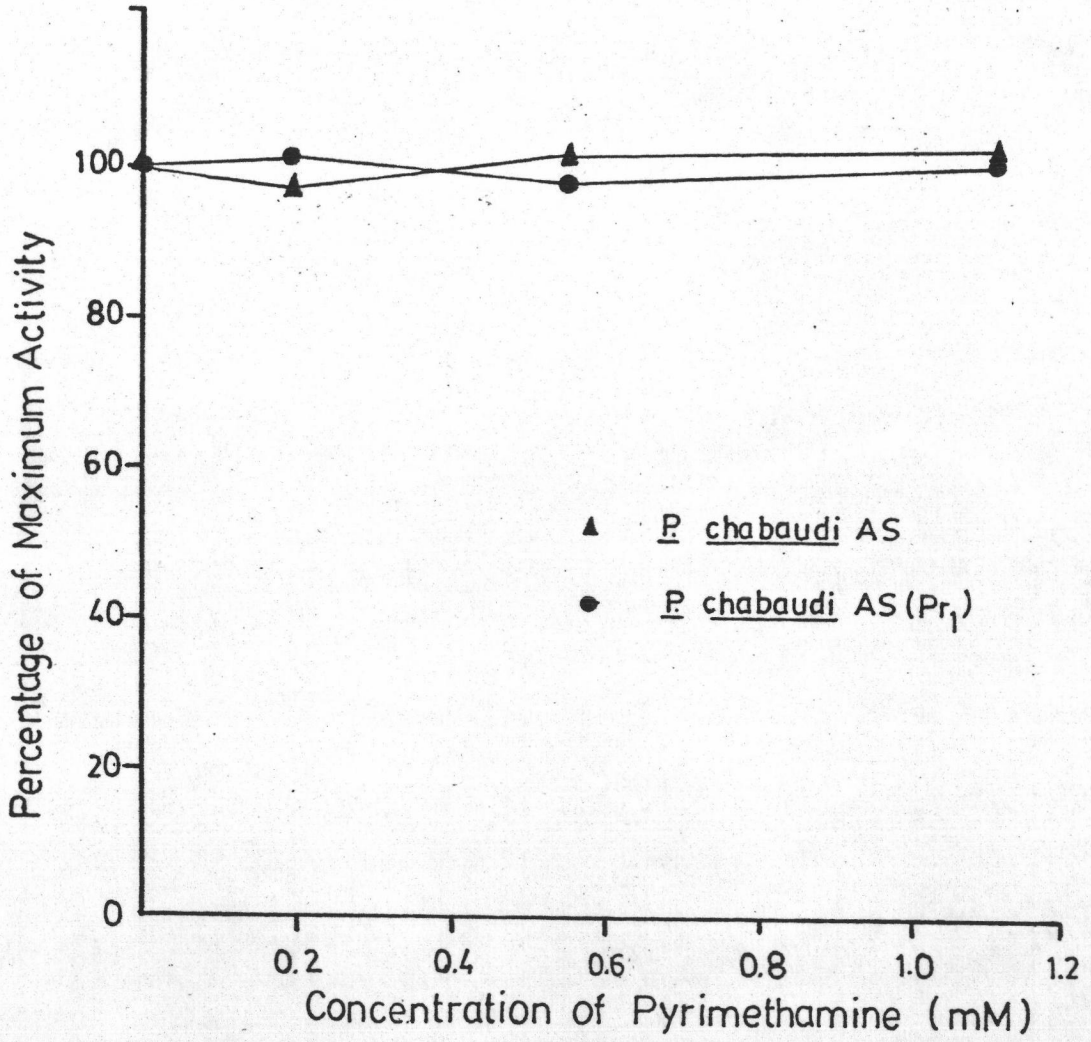
ทำการทดลองวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 7.4 โดยใช้เอนไซม์ปริมาณโปรตีน 0.1-0.4 มิลลิกรัม ผลตามตารางที่ 7 แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทรานสเฟอเรสจะมีค่าแอคติวิตี



รูปที่ 43. Lineweaver-Burk Plot ของเอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิล-ทรานสเฟอเรส กับสับสเตรต เตตระไฮโดรโฟเลต วัดแอคติวิตีตามวิธีทดลองในข้อ 3.12.2 ที่อุณหภูมิ 37°ซ โดยใช้สับสเตรตความเข้มข้นต่างๆกันตั้งแต่ 0-0.22 มิลลิโมลาร์



รูปที่ 44. Lineweaver-Burk Plot ของเอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิล-ทรานส์เฟอเรส กับสับสเตรตกรดอะมิโนเซอรีน วัดแอคติวิตีตามวิธีทดลองในข้อ 3.12.2 ที่อุณหภูมิ 37 °ซ โดยใช้สับส-เตรตความเข้มข้นต่างๆกันตั้งแต่ 0 – 2.22 มิลลิโมลาร์



รูปที่ 45. ผลกระทบของไพริเมธามีนต่อแอคติวิตีของเอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทรานสเฟอเรส วัดแอคติวิตีตามวิธีทดลองในข้อ 3.12.2 ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เมื่อมีไพริเมธามีนความเข้มข้นต่างๆกันตั้งแต่ 0 – 1.11 มิลลิโมลาร์

จำเพาะไม่แตกต่างกันใน พลาส์โมเดียม ฆ่าบอดี AS และ AS(Pr_1) (7.7 $\pm$ 0.9 และ 7.9 $\pm$ 0.6 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ)

4.17.2.7 ผลการศึกษาเปรียบเทียบแอคติวิตีสุทธิของเอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทรานส์เฟอเรส์

จากการวัดแอคติวิตีของเซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทรานส์เฟอเรส์ที่ส์ภาวะมาตรฐานการทดลอง (ข้อ 3.12.2) ได้แก่ใช้เอนไซม์ 0.1 - 0.4 มิลลิกรัมโปรตีน ทริส์-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.3 และอินคิวเบตนาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส์ คำนวณค่าแอคติวิตีสุทธิต่อ 10^9 เซลล์พลาส์โมเดียม ซึ่งชี้ให้เห็นว่าแอคติวิตีสุทธิของเอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทรานส์เฟอเรส์ ในพลาส์โมเดียม ฆ่าบอดี AS(Pr_1) (12.1 $\pm$ 0.7 นาโนโมลต่อนาทีต่อ 10^9 เซลล์) มากกว่าที่พบในเยื่อโคลน AS ประมาณ 1.5 เท่า (8.5 $\pm$ 0.3 นาโนโมลต่อนาทีต่อ 10^9 เซลล์) (ตารางที่ 7)

4.17.3 เอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส์

4.17.3.1 ผลการศึกษาเปรียบเทียบเวลาที่เหมาะส์มสำหรับวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส์

เมื่ออินคิวเบตเอนไซม์ที่ส์กัดได้จากพลาส์โมเดียม ฆ่าบอดี AS และ AS(Pr_1) (0.4 มิลลิกรัมโปรตีน) เพื่อวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส์ (ตามวิธีข้อ 3.12.3) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส์ในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ กัน ผลการทดลองในรูปที่ 46 แส์ดงให้เห็นว่า ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะยังคงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับการเพิ่มของเวลาในช่วงประมาณ 45 นาที และรูปแบบของการเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันมากนัก

4.17.3.2 ผลการศึกษาเปรียบเทียบผลกระทบของแมกนีเซียมคลอไรด์ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส์

แมกนีเซียมไอออนทำหน้าที่เป็นโคแฟคเตอร์ทำงานร่วมกับเอนไซม์ไดไฮโดรพ-เทอโรเอต ซินเตส์ ในการเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน 2-อะมิโน-4-ไฮดรอกซี-6-ไฮดรอกซีเมทธิล-7,8-ไดไฮโดรพเทอริดีน ไพโรฟอส์เฟตไปเป็น 7,8-ไดไฮโดรพเทอโรเอต จากการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ เมื่อมีแมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน (0-0.4 โมลาร์) ดัง

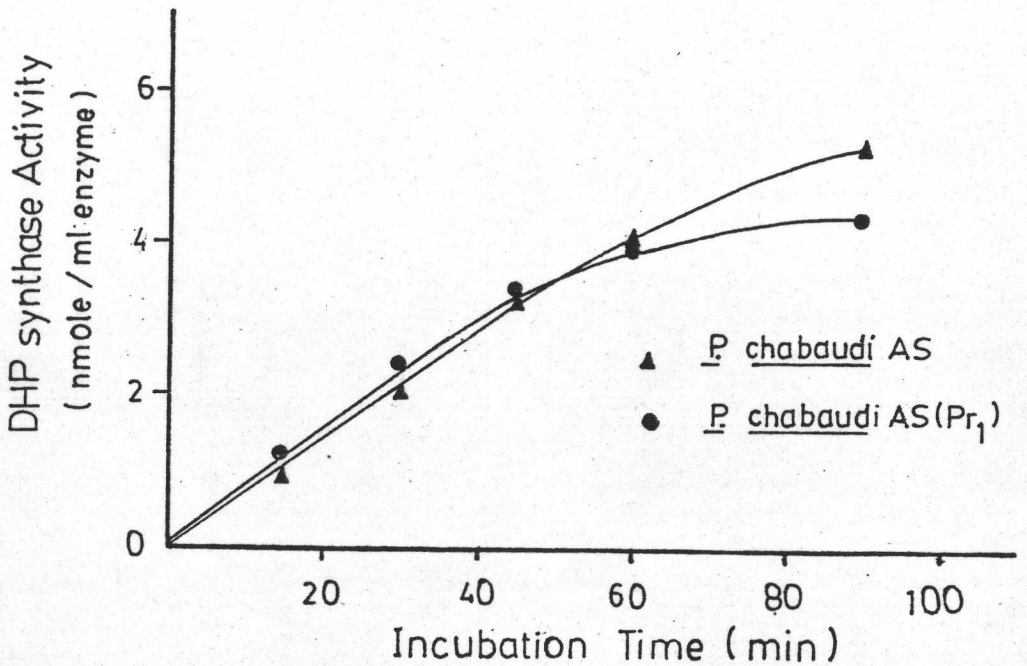
ตารางที่ 7. สรุปผลการศึกษาเปรียบเทียบเอนไซม์เซอรีน ไฮดรอก-ซีเมทธิลทรานส์เฟอเรส จาก P. chabaudi AS และ AS (Pr_1)

	P. chabaudi AS	P. chabaudi AS (Pr_1)
Optimum pH	8.0–8.8	8.0–8.8
Optimum temperature (°C)	50	50–55
K_m for Ser (37 °C, pH 8.3) (1)	0.55±0.08	0.45 ± 0.05
K_m for THF (37 °C, pH 8.3) (2)	0.10± 0.02	0.13 ± 0.03
Pyrimethamine inhibition (up to 1.11 mM)	NO	NO
Specific activity (37 °C, pH 7.4) (3)	7.7 ± 0.9	7.9 ± 0.6
Amount of enzyme (10^9 cells) (4)	8.5±0.3	12.1 ± 0.7

(1), (2) expressed as mM

(3) expressed as nmole·min^{-1} / mg protein

(4) expressed as nmole·min^{-1} (at optimum conditions)



รูปที่ 46. ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเทส วัดแอคติวิตีตามวิธีทดลองในข้อ 3.12.3 เมื่ออินคิวเบตเป็นเวลาต่างๆ กันตั้งแต่ 0–90 นาที

แสดงในรูปที่ 47 จะเห็นได้ว่า เอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส จากพลาสโม-เดียม ฆาบอดี AS และ AS(Pr_1) จะถูกกระตุ้นให้เร่งปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นด้วยแมกนีเซียม-คลอไรด์ 0.2 โมลาร์ แต่ความเข้มข้นมากกว่านี้จะมีผลลดแอคติวิตีของเอนไซม์

4.17.3.3 ผลการศึกษาเปรียบเทียบผลกระทบของ pH ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส

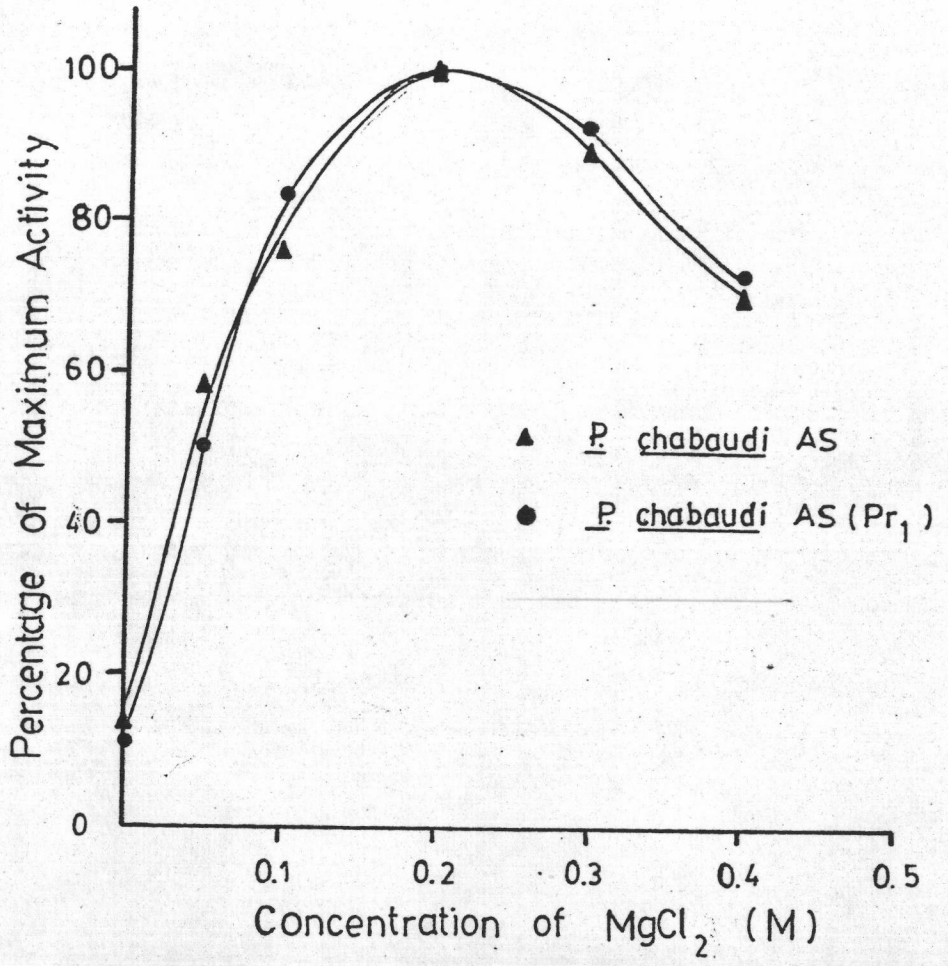
ทำการทดลองเปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส ที่แยกได้จาก พลาสโมเดียม ฆาบอดี AS และ AS(Pr_1) เมื่อใช้บัฟเฟอร์ pH ต่าง ๆ ในช่วงตั้งแต่ 6.48 - 7.96 (ฟอสเฟตบัฟเฟอร์) และ pH 7.48 - 9.31 (ทริส-ไฮโดร-คลอไรด์บัฟเฟอร์) ผลการทดลองตามรูปที่ 48 จะเห็นได้ว่า การเปลี่ยนชนิดของบัฟเฟอร์จะมีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์จากพลาสโมเดียม ทั้ง 2 โคลน คือที่ pH เดียวกัน ทริส-ไฮโดร-คลอไรด์ จะเป็นบัฟเฟอร์ที่ให้แอคติวิตีสูงกว่าฟอสเฟตบัฟเฟอร์บ้างเล็กน้อย แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบ pH ของการเกิดแอคติวิตีที่เหมาะสมของเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส จาก พลาสโมเดียม ฆาบอดี AS และ AS(Pr_1) จะมีค่าใกล้เคียงกันคือในช่วงระหว่าง pH 8.9 - 9.0

4.17.3.4 ผลการศึกษาเปรียบเทียบผลกระทบของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส

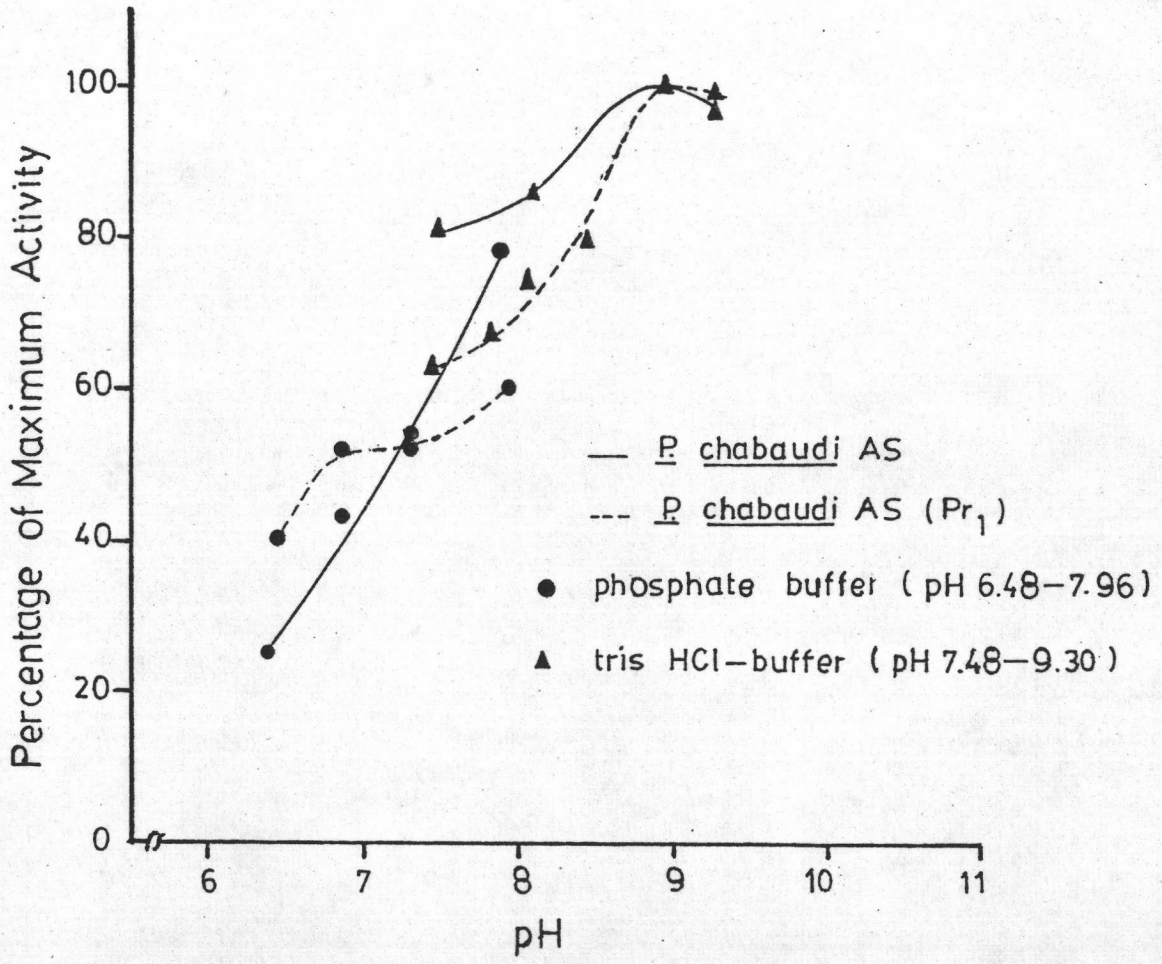
เมื่อทำการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส ใน พลาสโมเดียม ฆาบอดี AS และ AS(Pr_1) ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ตั้งแต่ 24-55 องศาเซลเซียส ปรากฏว่าอุณหภูมิที่เหมาะสำหรับการเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส จาก พลาสโมเดียม ฆาบอดี AS จะอยู่ในช่วง 40-45 องศาเซลเซียส อุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่านี้จะมีผลทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็ว (รูปที่ 49) ส่วนเอนไซม์จากเชื้อโคลน AS (Pr_1) จะเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส

4.17.3.5 ผลการศึกษาเปรียบเทียบค่า K_m ของเอนไซม์ไดไฮโดรพ-เทอโรเอต ซินเตส ต่อสับสเตรต

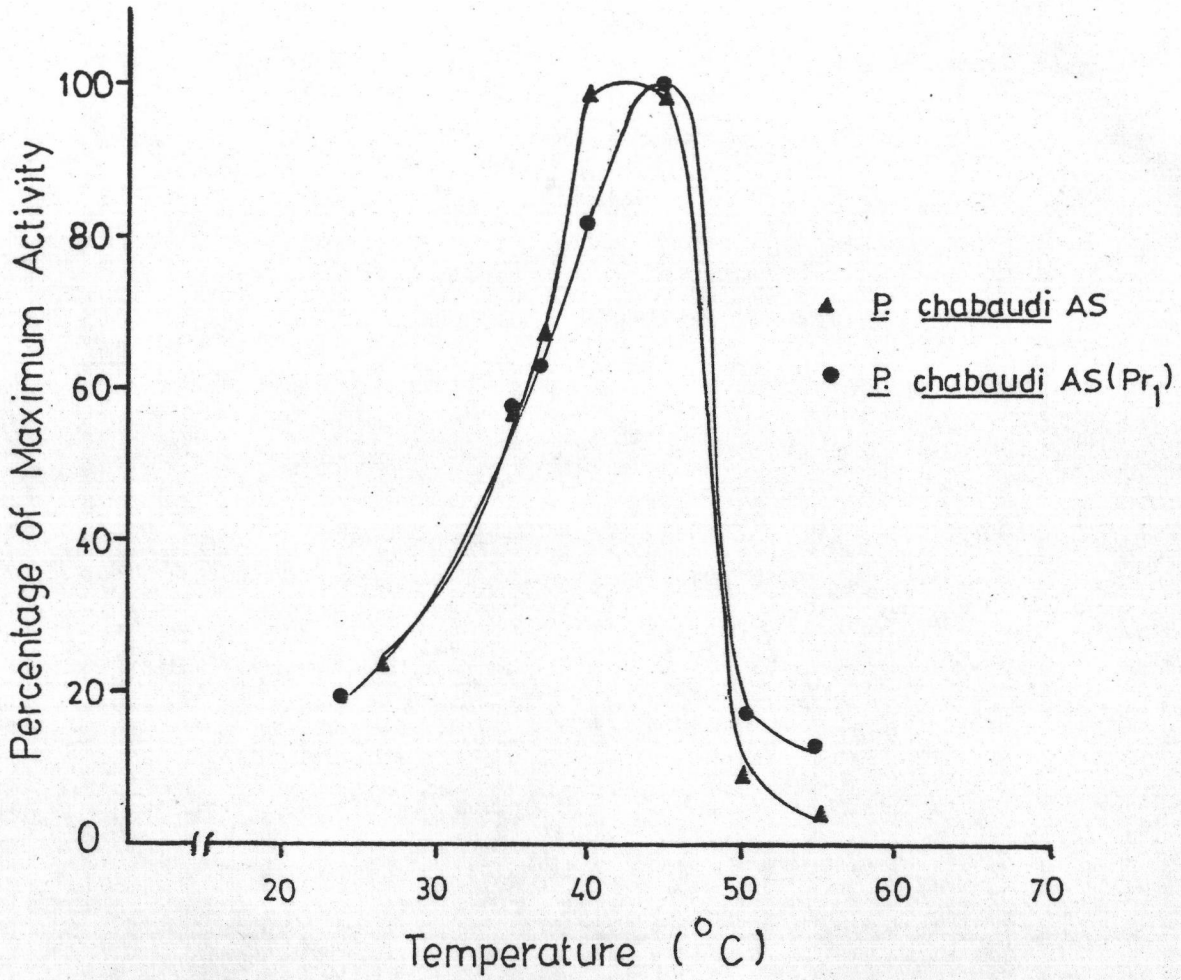
สับสเตรตของเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส ได้แก่ 2-อะมิโน-4-ไฮดรอกซี-6-ไฮดรอกซีเมทธิล-7,8-ไดไฮโดรพเทอริดีนไพโรฟอสเฟต และกรดพาราอะมิโน-



รูปที่ 47. ผลกระทบของแมกนีเซียมคลอไรด์ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส วัดแอคติวิตีตามวิธีทดลองในข้อ 3.12.3 ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เมื่อมีแมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆกันตั้งแต่ 0 0.4 โมลาร์



รูปที่ 48. ผลกระทบของ pH ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรฟเทอโรเอต ซินเตส วัดแอคติวิตีตามวิธีทดลองในข้อ 3.12.3 ที่อุณหภูมิ 37 °ซ ในสารละลายบัฟเฟอร์ (0.5 โมลาร์) pH ต่าง ๆ



รูปที่ 49. ผลกระทบของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส วัดแอคติวิตีตามวิธีทดลองในข้อ 3.12.3 ที่อุณหภูมิต่างๆกันตั้งแต่ 24–55 °ซ

เบนโซอิค ทำการทดลองเปรียบเทียบค่า K_m ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยอาศัยความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีของเอนไซม์กับความเข้มข้นของสับสเตรตที่ใช้ ตามแบบวิธี Lineweaver-Burk Plot (รูปที่ 50 และรูปที่ 51) ปรากฏว่า K_m ของเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส จากพลาสโมเดียม ยำบอดี AS ต่อสับสเตรตข้างต้นตามลำดับคือ 0.19 ± 0.05 มิลลิโมลาร์ และ 2.5 ± 0.01 ไมโครโมลาร์ ซึ่งใกล้เคียงกับค่าของเอนไซม์ที่พบในเชื้อโคลน AS (Pr_1) คือ 0.12 ± 0.04 มิลลิโมลาร์ และ 2.5 ± 0.01 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับเช่นกัน (ตารางที่ 8)

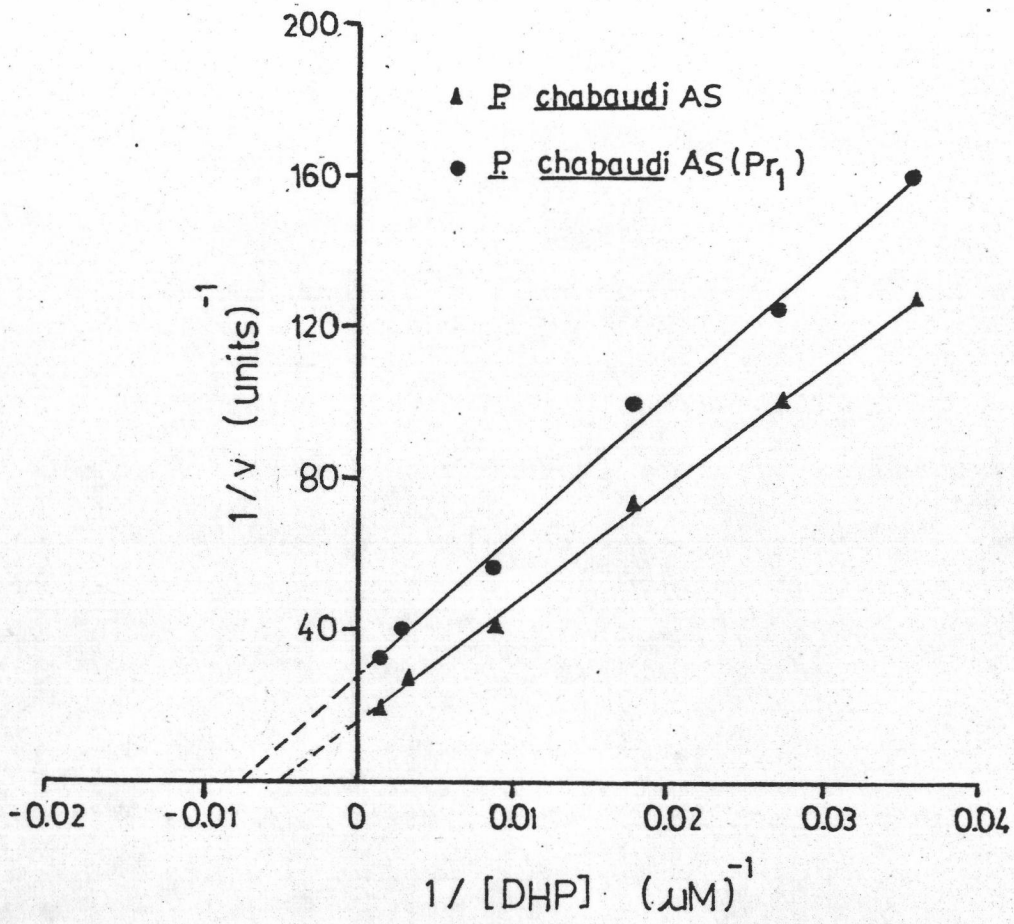
4.17.3.6 ผลการศึกษาเปรียบเทียบผลกระทบของไพริเมธามีนต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส

จากการศึกษาเปรียบเทียบผลกระทบของไพริเมธามีน ต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส จากพลาสโมเดียม ยำบอดี AS และ AS(Pr_1) โดยวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อมีไพริเมธามีนความเข้มข้นตั้งแต่ 0.05 - 0.25 มิลลิโมลาร์ และใช้สับสเตรต 2-อะมิโน-4-ไฮดรอกซี-6-ไฮดรอกซีเมทธิล-7,8-ไดไฮโดรพเทอริดีนไพโรฟอสเฟต 0.7 มิลลิโมลาร์ ซึ่งแสดงผลในรูปที่ 52 จะเห็นได้ว่าไพริเมธามีน ไม่ทำให้แอคติวิตีของไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตสลดลง แม้จะใช้ความเข้มข้นสูงถึง 0.25 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่สามารถละลายในสภาวะการทดลองตามวิธีทดลองข้อ 3.12.3

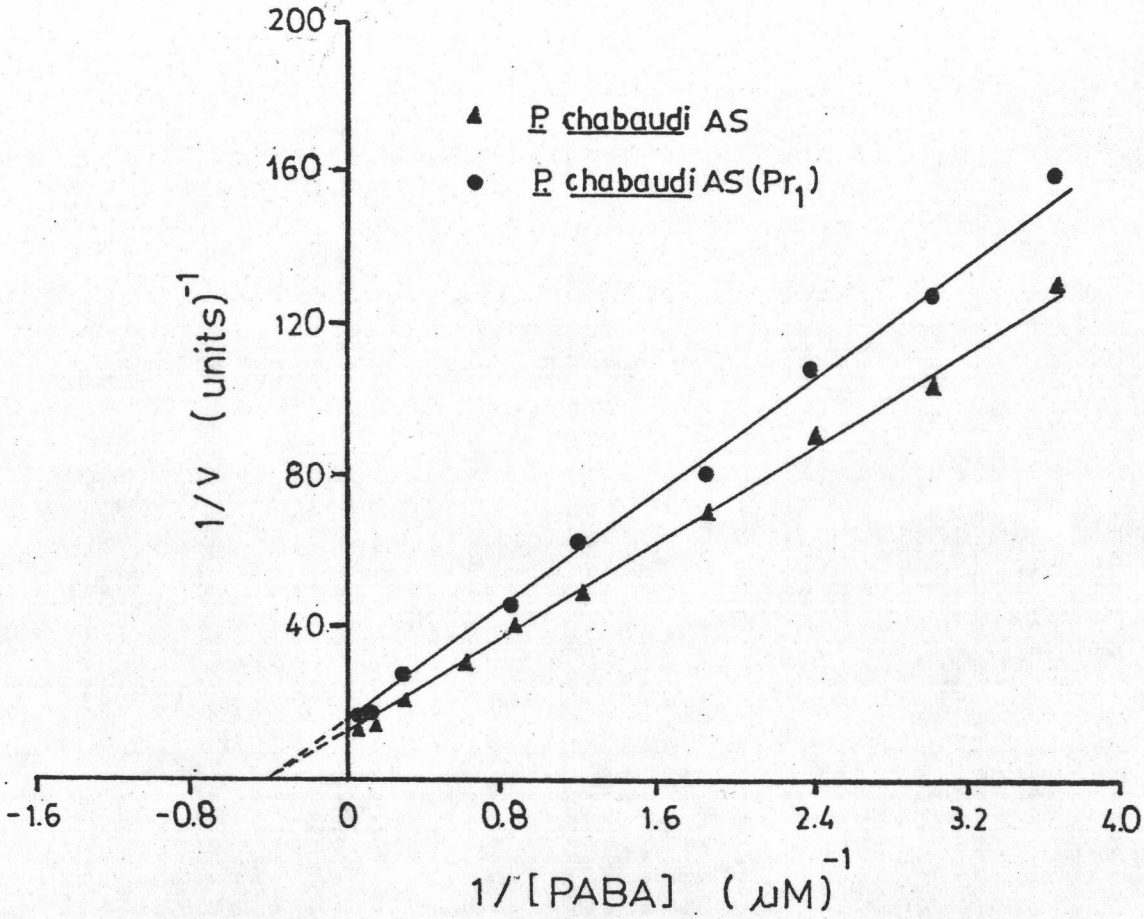
4.17.3.7 ผลการศึกษาเปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส

ทำการทดลองวัดแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์เปรียบเทียบระหว่างพลาสโมเดียม ยำบอดี AS และ AS(Pr_1) โดยวัดแอคติวิตีตามวิธีทดลองข้อ 3.12.3 ในทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 7.4 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (ใช้เอนไซม์ 0.2 - 0.4 มิลลิกรัมโปรตีน) พบว่า แอคติวิตีจำเพาะของไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตสที่สกัดจากเชื้อโคลน AS มีค่าต่ำกว่าเอนไซม์จากเชื้อโคลน AS (Pr_1) คือ 0.009 ± 0.001 และ 0.014 ± 0.001 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ (ตารางที่ 8)

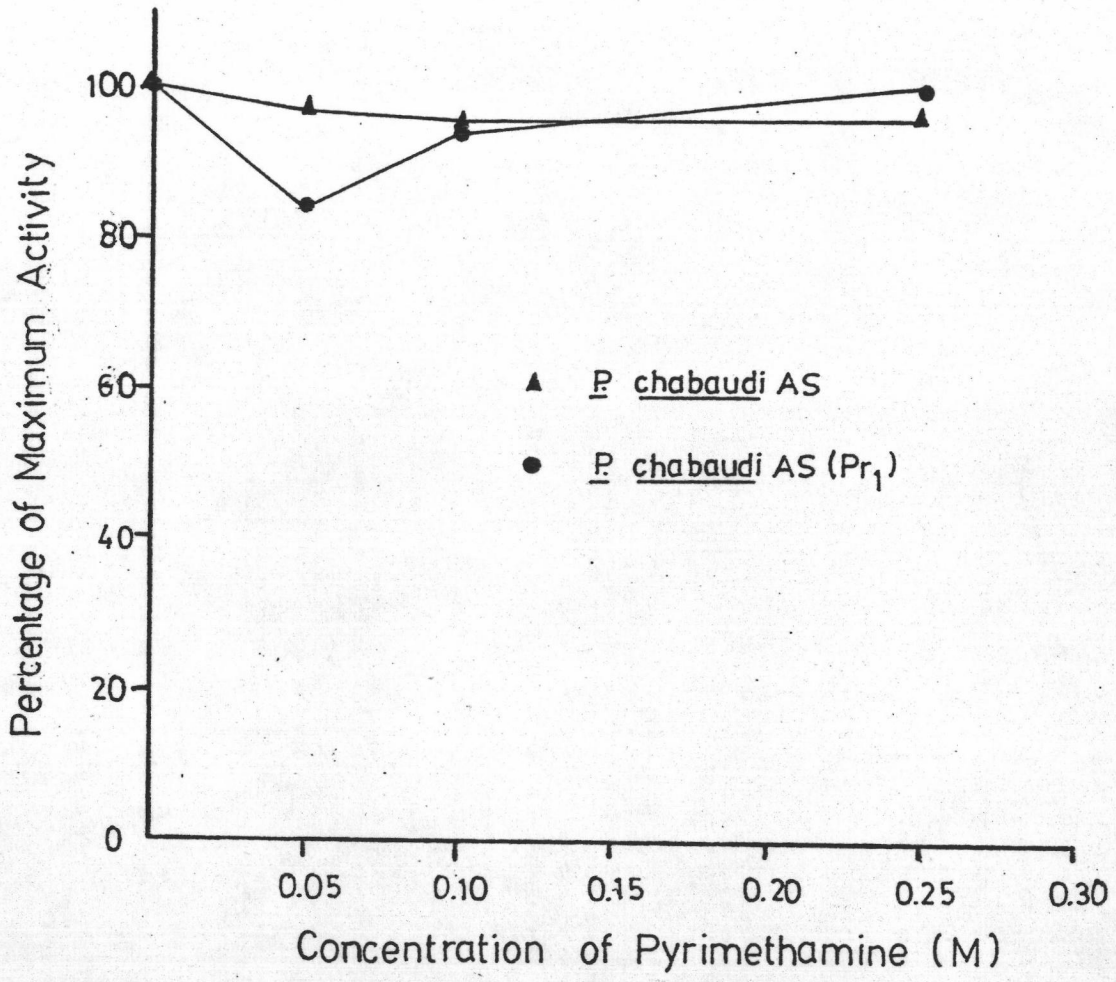
4.17.3.8 ผลการศึกษาเปรียบเทียบแอคติวิตีสุทธิของเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส



รูปที่ 50. Lineweaver– Burk Plot ของเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส กับสับสเตรต 2-อะมิโน-4-ไฮดรอกซี-6-ไฮดรอกซีเมทธิล-7,8-ไดไฮโดรพเทอริดีน ไพโรฟอสเฟต วัดแอคติวิตีตามวิธีทดลองในข้อ 3.12.3 ที่อุณหภูมิ 37 °ซ โดยใช้สับสเตรตความเข้มข้นต่างๆกันตั้ง 0–600 ไมโครโมลาร์



รูปที่ 51. Lineweaver–Burk Plot ของเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอิโรเอต ซินเตส กับสับสเตรตกรดพาราอะมีโนเบนโซอิค วัดแอคติวิตีตามวิธีทดลองในข้อ 3.12.3 ที่อุณหภูมิ 37 °ซ โดยใช้สับสเตรตความเข้มข้นต่างๆกันตั้งแต่ 0–15 ไมโครโมลาร์



รูปที่ 52. ผลกระทบของไพริเมธามีนต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส วัดแอคติวิตีตามวิธีทดลองในข้อ 3.12.3 ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เมื่อมีไพริเมธามีนความเข้มข้นต่าง ๆ กันตั้งแต่ 0–0.25 มิลลิโมลาร์

เมื่อวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส์ที่ส่ภาวะมาตรฐานการทดลองตามวิธีทดลองในข้อ 3.12.3 ได้แก่ ใช้เอนไซม์ 0.2 - 0.4 มิลลิกรัมโปรตีน ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.9 อินคิวเบตที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วคำนวณค่าแอคติวิตีเป็นแอคติวิตีสุทธิต่อ 10^9 เซลล์ ผลการทดลองตามตารางที่ 8 ทำให้เห็นว่าแอคติวิตีสุทธิของเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส์ ใน พลาส์โมเดียม ฆาบอดี AS(Pr_1) (0.014 $\pm$ 0.001 นาโนโมลต่อนาทีต่อ 10^9 เซลล์) จะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยประมาณ 1.3 เท่าของที่พบใน พลาส์โมเดียม ฆาบอดี AS (0.010 $\pm$ 0.001 นาโนโมลต่อนาทีต่อ 10^9 เซลล์)

ตารางที่ 8. สรุปผลการศึกษาเปรียบเทียบเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเทส จาก P chabaudi AS และ AS(Pr_1)

	P chabaudi AS	P chabaudi AS(Pr_1)
Optimum concentration of $MgCl_2$ (1)	0.2	0.2
Optimum pH	~8.9	~9.0
Optimum temperature (°C)	40–45	45
K_m for DHPP (37°C, pH 8.9) (2)	0.19±0.05	0.12±0.04
K_m for PABA (37°C, pH 8.9) (3)	2.5±0.01	2.5±0.01
Pyrimethamine inhibition (up to 0.25 mM)	NO	NO
Specific activity (37°C, pH 7.4) (4)	0.009±0.001	0.014±0.001
Total activity / 10^9 cells (5)	0.010±0.001	0.014±0.001

(1) expressed as M

(2) expressed as mM

(3) expressed as μM

(4) expressed as nmole·min^{-1}/mg

(5) expressed as nmole·min^{-1} (at optimum conditions)