

ผลของปัจจัยทางกายภาพและเคมีต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ
มาลาเรีย *Plasmodium falciparum* ระหว่างการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง

นางสาวกนกวรรณ อรุณฤกษ์ดีวงศ์



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR) are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสัตววิทยา ภาควิชาชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2559

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF PHYSICAL AND CHEMICAL FACTORS ON GROWTH AND DEVELOPMENT
OF *Plasmodium falciparum* DURING *IN VITRO* CULTIVATION

Miss Kanokwan Arunrerkdeewong



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Zoology

Department of Biology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2016

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ผลของปัจจัยทางกายภาพและเคมีต่อการเจริญเติบโต
ของเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* ระหว่าง
การเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง
โดย นางสาวกนกวรรณ อรุณฤกษ์ดีวงศ์
สาขาวิชา สัตววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พงษ์ หาญยุทธนากร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สิทธิพร ภัทรดิลลภรณ์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นพดล กิตนะ)
..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พงษ์ หาญยุทธนากร)
..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สิทธิพร ภัทรดิลลภรณ์)
..... กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร.สุจินดา มาลัยวิจิตรนนท์)
..... กรรมการ
(ดร.เทพนาฏ พุ่มไพบูลย์)
..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.มาลินี ฉัตรมงคล)

กนกวรรณ อรุณฤกษ์ดีวงศ์ : ผลของปัจจัยทางกายภาพและเคมีต่อการเจริญเติบโตของ
เชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* ระหว่างการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง
(EFFECTS OF PHYSICAL AND CHEMICAL FACTORS ON GROWTH AND
DEVELOPMENT OF *Plasmodium falciparum* DURING *IN VITRO* CULTIVATION)
อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร.พงษ์ หาดยุกธนากร, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
ร่วม: ผศ. ดร.สิทธิพร ภัทรดิลลภรณ์, หน้า.

Plasmodium falciparum เป็นเชื้อมาลาเรียที่มีความรุนแรงมากที่สุด แม้ว่าเทคนิคในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. falciparum* ได้ถูกคิดค้นมารวม 40 ปี แต่ความรู้เกี่ยวกับผลกระทบของปัจจัยทางกายภาพและเคมีต่อการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียในหลอดทดลองมีไม่มากนัก การศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิ ความเป็นกรด – ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ การลดปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และสารเคมีต่าง ๆ ต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 ในหลอดทดลอง การประเมินผลใช้วิธีการนับจำนวนและดูรูปร่างของเชื้อมาลาเรียระยะวงแหวนและไม่ใช่วงแหวนในฟิล์มเลือดบางด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อมาลาเรียตอบสนองต่อปัจจัยทางกายภาพและปัจจัยทางเคมีที่ใช้ทดสอบแตกต่างกัน โดยพบว่าเชื้อมาลาเรียสามารถอยู่รอดได้ที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส แต่มีค่า % parasitaemia ต่ำกว่าชุดควบคุม (ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส) โดยสามารถตรวจพบเชื้อมาลาเรียในระยะวงแหวนเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในขณะที่ประชากรส่วนใหญ่ของเชื้อมาลาเรียที่เพาะเลี้ยงในอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสและในบรรยากาศปกติ (สภาวะที่มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ต่ำ) เป็นเชื้อในระยะไม่ใช่วงแหวน เชื้อมาลาเรียยังสามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH 7.3 ได้ดีกว่ากลุ่มควบคุม (pH 7.0) ส่วนผลจากการทดสอบปัจจัยทางเคมีพบว่า เพนซิลลิน ลินโคมายซิน กลูโคส วิตามินซี โซเดียมคลอไรด์ และแคลเซียมคลอไรด์ มีผลต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาการของเชื้อมาลาเรียแตกต่างกันไป ผลของการทดลองครั้งนี้สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาเทคนิคการเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย การคัดเลือกระยะของเชื้อมาลาเรียและการพัฒนายาต้านมาลาเรียในอนาคต

ภาควิชา	ชีววิทยา	ลายมือชื่อนิสิต
สาขาวิชา	สัตววิทยา	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก
ปีการศึกษา	2559	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5671903323 : MAJOR ZOOLOGY

KEYWORDS: PLASMODIUM FALCIPARUM / MALARIA / IN VITRO CULTIVATION / TEMPERATURE / PH / LINCOMYCIN / CARBON DIOXIDE

KANOKWAN ARUNRERKDEEWONG: EFFECTS OF PHYSICAL AND CHEMICAL FACTORS ON GROWTH AND DEVELOPMENT OF *Plasmodium falciparum* DURING *IN VITRO* CULTIVATION. ADVISOR: ASST. PROF. PONGCHAI HARNYUTTANAKORN, Ph.D., CO-ADVISOR: ASST. PROF. SITTIPORN PATTARADILOKRAT, Ph.D., pp.

Plasmodium falciparum is the most virulent species of the malaria disease. Although the methods for *P. falciparum in vitro* cultivation have been established for decades, very little is known about the effects of physical and chemical factors on the growth and development of parasites during *in vitro* culture. This study aimed to determine the effects of temperature, pH, CO₂ deprivation and chemical compositions of medium on the growth and development, *in vitro*, of three *P. falciparum* clones, K1CB1, T9/94RC17 and 3D7. To evaluate these effects, the numbers and the morphology of blood stage parasites were determined by the microscopic analysis of thin blood smears. The results showed that the parasites responded differently to the tested physical and chemical factors. At 34 °C, the parasites could survive, but their parasitaemia were lower than those in control condition (at 37 °C). Ring stages were mainly detected at low temperature incubation (4 °C), while non-ring stages were detected as main population at high temperature incubation (40 °C) and in the CO₂ deprivation experiment. The parasites had higher parasitaemia when cultured in media with pH 7.3 than the control group (pH 7.0). This study also showed that penicillin, lincomycin, glucose, vitamin C, NaCl and CaCl₂ affected the growth and development of malaria parasites at different levels. These results could be applied for improving *P. falciparum* cultivation, synchronization technique and anti-malaria drug screening in the future.

Department: Biology

Field of Study: Zoology

Academic Year: 2016

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ดีด้วยความช่วยเหลือของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พงษ์ชัย หาญยุทธนากร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิทธิพร ภัทรดิลกรัตน์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ ที่ให้ความกรุณาคอยให้คำปรึกษา ให้ความรู้ คำแนะนำที่ดี ๆ เกี่ยวกับการวิจัยในครั้งนี้ ทั้งการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย วิธีการทำงานในห้องปฏิบัติการอย่างถูกต้องและปลอดภัย การค้นคว้าหาข้อมูลงานวิจัยอื่น ๆ รวมทั้งการสอนให้มีความคิดที่สามารถแก้ไขปัญหาได้อย่างถูกต้อง ชี้แนะแนวทางที่ดีในการทำงานอื่น ๆ นอกเหนือจากงานทางด้านทางวิทยาศาสตร์เพื่อเป็นประโยชน์ในการทำงานในอนาคต และยังคงให้กำลังใจตลอดการทำงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคุณสุชาติ เทพนิมิตร ศูนย์มาลาเรีย วิทยาลัยสาธารณสุขจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ช่วยในการจัดเตรียมอุปกรณ์ต่าง ๆ ในการทำงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นพดล กิตนะ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ศาสตราจารย์ ดร. สุจินดา มาลัยวิจิตรนนท์ และดร. เทพนาฏ พุ่มไพบูลย์ รองศาสตราจารย์ ดร. มาลินี ฉัตรมงคล คณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ที่ให้คำแนะนำในการเขียนวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ คุณไตรรัตน์ ยิ่งสุนทรวัฒนา ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องวัดค่าความเป็นกรด - ต่าง รวมทั้งให้คำแนะนำในการใช้เครื่องวัดค่าความเป็นกรด - ต่าง

ขอขอบพระคุณ คุณภูมิินทร์ สิมพลพันธ์ ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำต่าง ๆ ในการทำงานวิจัยภายในห้องปฏิบัติการวิจัยมาลาเรีย ขอขอบคุณ คุณศักรินทร์ แสนสุข คุณวิภาวิ กิติทรัพย์กาญจนา คุณรัตน์สุดา เสนาดี ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ความช่วยเหลือต่าง ๆ ในการทำรูปเล่มวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช และภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับทุนสนับสนุนในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง.....	ฐ
สารบัญภาพ	ด
บทที่ 1 บทนำ.....	20
วัตถุประสงค์.....	23
ขอบเขตการศึกษา	23
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม.....	24
1. สาเหตุของโรคมาลาเรีย.....	24
2. สถานการณ์ของโรคมาลาเรียในปัจจุบัน	25
3. วงชีวิตของเชื้อมาลาเรีย.....	27
3.1 การเจริญของเชื้อมาลาเรียในยุงก้นปล่อง.....	27
3.2 การเจริญของเชื้อมาลาเรียในมนุษย์	29
3.2.1 การเจริญของเชื้อมาลาเรียในเซลล์ตับ	29
3.2.2 การเจริญของเชื้อมาลาเรียในเซลล์เม็ดเลือดแดง	29
4. การเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย	30
5. การทำให้เชื้อมาลาเรียอยู่ในระยะเดียว (synchronization).....	32
6. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อมาลาเรียในระหว่างการเพาะเลี้ยง	33
6.1 ปัจจัยทางกายภาพ.....	33
6.1.1. อุณหภูมิ.....	33

6.1.2. ความเป็นกรด – ต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ	34
6.1.3. การลดแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์	34
6.2 ปัจจัยทางเคมี	35
6.3 ปัจจัยทางชีวภาพ	36
6.3.1 การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ	36
6.3.2 ชนิดของซีรัม	37
6.3.3 อายุของเลือดมนุษย์	38
7. การนำเชื้อมาลาเรียที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการมาใช้ประโยชน์	38
7.1 เชื้อมาลาเรียที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการกับการทดสอบความไวต่อยาและการ พัฒนาต้านมาลาเรีย	38
7.2 เชื้อมาลาเรียที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการกับการผลิตวัคซีน	42
8. ความสำคัญในการพัฒนาเทคนิคในการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย	43
บทที่ 3 วิธีการศึกษา	44
1. เชื้อมาลาเรีย <i>P. falciparum</i> ที่ใช้ในการทดลอง	44
2. การเตรียมอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย	45
3. การเลี้ยงเชื้อมาลาเรียจากเชื้อที่เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว	47
4. การเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียในห้องปฏิบัติการ	47
5. การศึกษารูปร่าง (morphology) ระยะ (stage) และจำนวน (parasitaemia) ของเชื้อ มาลาเรียจากการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง	50
5.1 การเตรียมฟิล์มเลือดบาง	50
5.2 การติดตามการเปลี่ยนแปลงของเชื้อมาลาเรีย	53
6. การเก็บรักษาเชื้อมาลาเรียในไนโตรเจนเหลว	56
7. การเตรียมสาร Cryoprotectant	56

8. การเตรียมเชื้อมาลาเรียแบบระยะเดียวกัน (Synchronization).....	56
9. การติดตามการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียทุก 6 ชั่วโมง.....	58
10. การทดสอบปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย <i>P. falciparum</i>	58
10.1 ปัจจัยทางกายภาพ.....	59
10.1.1 อุณหภูมิ.....	59
10.1.2 ความเป็นกรด – ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ	61
10.1.3 แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์.....	62
10.2 ปัจจัยทางเคมี.....	64
10.2.1 ยาปฏิชีวนะ.....	65
10.2.2 ซีรัมของมนุษย์.....	66
10.2.3 วิตามินซี.....	66
10.2.4 น้ำตาล.....	66
10.2.5 เกลือ.....	67
11. การเตรียมสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต ความเข้มข้น 5%.....	67
12. การเตรียมสารละลายซอร์บิทอล ความเข้มข้น 5%	67
13. การเตรียมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 3.5%.....	68
14. การเตรียมกระจกสไลด์.....	68
15. การเตรียมสีย้อม Giemsa	69
16. การเตรียม Solution A และ Solution B.....	69
17. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารเคมีชนิดต่างๆ.....	69
17.1 ยาปฏิชีวนะ	69
17.1.1 เพนิซิลลิน.....	69

17.1.2 ลินโคมัยซิน	70
17.2 ซีรัมของมนุษย์	70
17.3 วิตามินซี	70
17.4 น้ำตาล	71
17.4.1 กลูโคส	71
17.4.2 ซอร์บิทอล	71
17.5 เกลือ	71
17.5.1 โซเดียมคลอไรด์	71
17.5.2 แคลเซียมคลอไรด์	72
บทที่ 4 ผลการทดลอง	73
รูปแบบการเจริญของเชื้อมาลาเรีย	75
ปัจจัยทางกายภาพ	81
1. อุณหภูมิ	81
1.1 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	81
1.2 อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส	85
1.3 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	89
1.4 การสลับอุณหภูมิระหว่างการเลี้ยงเชื้อ	92
2. ความเป็นกรด – ต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ	93
3. แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์	97
3.1 มีการจุดเทียนในโถดูความขึ้นตลอดการเลี้ยงเชื้อ	97
3.2 มีการจุดเทียนสลับกับการไม่จุดเทียนในโถดูความขึ้น	100
ปัจจัยทางเคมี	101

1. ยาปฏิชีวนะ.....	101
1.1 เพนิซิลลิน.....	101
1.2 ลินโคมายซิน.....	107
2. ซีรัมของมนุษย์.....	113
3. วิตามินซี.....	119
4. น้ำตาล.....	127
4.1 กลูโคส.....	127
4.2 ซอร์บิทอล.....	132
5. เกลือ.....	137
5.1 โซเดียมคลอไรด์.....	137
5.2 แคลเซียมคลอไรด์.....	143
บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลอง.....	150
ปัจจัยทางกายภาพ.....	151
1. อุณหภูมิ.....	151
1.1 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส.....	151
1.3 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส.....	152
1.4 การสลับอุณหภูมิระหว่างการเลี้ยงเชื้อ.....	154
2. ความเป็นกรด – ต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	155
3. แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์.....	156
3.1 ไม่มีการจุดเทียนในโถดูความขึ้นตลอดการเลี้ยงเชื้อ.....	156
3.2 มีการจุดเทียนสลับกับการไม่จุดเทียนในโถดูความขึ้น.....	157
ปัจจัยทางเคมี.....	158

1. ยาปฏิชีวนะ.....	158
1.1 เพนิซิลลิน.....	158
1.2 ลินโคมายซิน	159
2. ซีรัมของมนุษย์	160
3. วิตามินซี.....	161
4. น้ำตาล	162
4.1 กลูโคส	162
4.2 ซอร์บิทอล	162
5. เกลือ	163
5.1 โซเดียมคลอไรด์.....	163
5.2 แคลเซียมคลอไรด์.....	163
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง	164
ปัญหาที่พบในการระหว่างการทำวิจัย	166
ข้อเสนอแนะ	168
รายการอ้างอิง.....	169
ภาคผนวก.....	179
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	184

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1	ค่า % parasitaemia (mean \pm SD) ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 ในกลุ่มควบคุม (อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส) และกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของกลุ่มเชื้อแบบระยะเดียว (syn).....	82
ตารางที่ 2	ค่า % parasitaemia (mean \pm SD) ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 ในกลุ่มควบคุม (อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส) และกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของกลุ่มเชื้อแบบหลายระยะ (asyn)	84
ตารางที่ 3	ค่า % parasitaemia (mean \pm SD) ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 ในกลุ่มควบคุม (อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส) และกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงในอุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของกลุ่มเชื้อแบบระยะเดียว (syn).....	86
ตารางที่ 4	ค่า % parasitaemia (mean \pm SD) ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 ในกลุ่มควบคุม (อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส) และกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงในอุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของกลุ่มเชื้อแบบหลายระยะ (asyn)	88
ตารางที่ 5	ค่า % parasitaemia (mean \pm SD) ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 ในกลุ่มควบคุม (อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส) และกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงในอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของกลุ่มเชื้อแบบระยะเดียว (syn).....	90
ตารางที่ 6	ค่า % parasitaemia (mean \pm SD) ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 ในกลุ่มควบคุม (ในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส) และกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงในอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของกลุ่มเชื้อแบบหลายระยะ (asyn).....	92
ตารางที่ 7	ค่า % parasitaemia (mean \pm SD) ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 ในกลุ่มควบคุมที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด - ต่าง	

- เท่ากับ 7.0 และในกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด – ต่างเท่ากับ 6.9 และ 7.3 ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของกลุ่มเชื้อแบบระยะเดียว (syn)..... 94
- ตารางที่ 8** ค่า % parasitaemia (mean \pm SD) ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 ในกลุ่มควบคุมที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด – ต่างเท่ากับ 7.0 และในกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด – ต่างเท่ากับ 6.9 และ 7.3 ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของกลุ่มเชื้อแบบหลายระยะ (asyn) 96
- ตารางที่ 9** ค่า % parasitaemia (mean \pm SD) ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 ในกลุ่มควบคุม (มีการจุดเทียนในโถดูดความชื้น) และกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงในโถดูดความชื้นโดยไม่มีการจุดเทียน ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของกลุ่มเชื้อแบบระยะเดียว (syn) 98
- ตารางที่ 10** ค่า % parasitaemia (mean \pm SD) ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 ในกลุ่มควบคุม (มีการจุดเทียนในโถดูดความชื้น) และกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงในโถดูดความชื้นโดยไม่มีการจุดเทียน ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของกลุ่มเชื้อแบบหลายระยะ (asyn) 100
- ตารางที่ 11** ค่า % parasitaemia (mean \pm SD) ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1 (a.), T9/94RC17 (b.) และ 3D7 (c.) ในกลุ่มควบคุม (ไม่มีเพนซิลลิน) และกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเพนซิลลินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของกลุ่มเชื้อแบบระยะเดียว (syn)..... 102
- ตารางที่ 12** ค่า % parasitaemia (mean \pm SD) ของเชื้อ K1CB1 (a.), T9/94RC17 (b.) และ 3D7 (c.) ในกลุ่มควบคุม (ไม่มีเพนซิลลิน) และกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเพนซิลลินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของกลุ่มเชื้อแบบหลายระยะ (asyn) 105
- ตารางที่ 13** ค่า % parasitaemia (mean \pm SD) ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1 (a.), T9/94RC17 (b.) และ 3D7 (c.) ในกลุ่มควบคุม (ไม่มีลินโคมายซิน) และกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีลินโคมายซินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของกลุ่มเชื้อแบบระยะเดียว (syn) 108

ตารางที่ 14 ค่า % parasitaemia (mean ± SD) ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1 (a.), T9/94RC17 (b.) และ 3D7 (c.) ในกลุ่มควบคุม (ไม่มีลินโคมายซิน) และกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีลินโคมายซินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของกลุ่มเชื้อแบบหลายระยะ (asyn) 111

ตารางที่ 15 ค่า % parasitaemia (mean ± SD) ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1 (a.), T9/94RC17 (b.) และ 3D7 (c.) ในกลุ่มควบคุม (ซีรัมของมนุษย์ เข้มข้น 10%) และกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซีรัมของมนุษย์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของกลุ่มเชื้อแบบระยะเดียว (syn) 114

ตารางที่ 16 ค่า % parasitaemia (mean ± SD) ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1 (a.), T9/94RC17 (b.) และ 3D7 (c.) ในกลุ่มควบคุม (ซีรัมของมนุษย์ เข้มข้น 10%) และกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซีรัมของมนุษย์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของกลุ่มเชื้อแบบหลายระยะ (asyn) 117

ตารางที่ 17 ค่า % parasitaemia (mean ± SD) ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1 (a.), T9/94RC17 (b.) และ 3D7 (c.) ในกลุ่มควบคุม (ไม่มีวิตามินซี) และกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีวิตามินซีที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของกลุ่มเชื้อแบบระยะเดียว (syn) 120

ตารางที่ 18 ค่า % parasitaemia (mean ± SD) ของเชื้อ K1CB1 (a.), T9/94RC17 (b.) และ 3D7 (c.) ในกลุ่มควบคุม (ไม่มีวิตามินซี) และกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีวิตามินซีที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของกลุ่มเชื้อแบบหลายระยะ (asyn) 124

ตารางที่ 19 ค่า % parasitaemia (mean ± SD) ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1 (a.), T9/94RC17 (b.) และ 3D7 (c.) ในกลุ่มควบคุม (ไม่มีกลูโคส) และกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของกลุ่มเชื้อแบบระยะเดียว (syn) 128

ตารางที่ 20 ค่า % parasitaemia (mean ± SD) ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1 (a.), T9/94RC17 (b.) และ 3D7 (c.) ในกลุ่มควบคุม (ไม่มีกลูโคส) และกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของกลุ่มเชื้อแบบหลายระยะ (asyn) 130

- ตารางที่ 21 ค่า % parasitaemia (mean \pm SD) ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1 (a.), T9/94RC17 (b.) และ 3D7 (c.) ในกลุ่มควบคุม (ไม่มีซอร์บิทอล) และกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงที่มีซอร์บิทอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของกลุ่มเชื้อแบบระยะเดียว (syn) 132
- ตารางที่ 22 ค่า % parasitaemia (mean \pm SD) ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1 (a.), T9/94RC17 (b.) และ 3D7 (c.) ในกลุ่มควบคุม (ไม่มีซอร์บิทอล) และกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงที่มีซอร์บิทอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของกลุ่มเชื้อแบบหลายระยะ (asyn) 135
- ตารางที่ 23 ค่า % parasitaemia (mean \pm SD) ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1 (a.), T9/94RC17 (b.) และ 3D7 (c.) ในกลุ่มควบคุม (ไม่มีไซโตเดียมคลอไรด์) และกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซโตเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของกลุ่มเชื้อแบบระยะเดียว (syn) 138
- ตารางที่ 24 ค่า % parasitaemia (mean \pm SD) ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1 (a.), T9/94RC17 (b.) และ 3D7 (c.) ในกลุ่มควบคุม (ไม่มีไซโตเดียมคลอไรด์) และกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซโตเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของกลุ่มเชื้อแบบหลายระยะ (asyn) 141
- ตารางที่ 25 ค่า % parasitaemia (mean \pm SD) ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1 (a.), T9/94RC17 (b.) และ 3D7 (c.) ในกลุ่มควบคุม (ไม่มีแคลเซียมคลอไรด์) และกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของกลุ่มเชื้อแบบระยะเดียว (syn) 144
- ตารางที่ 26 ค่า % parasitaemia (mean \pm SD) ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1 (a.), T9/94RC17 (b.) และ 3D7 (c.) ในกลุ่มควบคุม (ไม่มีแคลเซียมคลอไรด์) และในกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของกลุ่มเชื้อแบบหลายระยะ (asyn) 147

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1	พื้นที่ที่มีการระบาดของโรคมาลาเรีย ระหว่างปี ค.ศ. 2000 ถึง 2016	26
ภาพที่ 2	วงชีวิตของเชื้อมาลาเรีย <i>P. falciparum</i>	28
ภาพที่ 3	พื้นที่ที่มีการดื้อยา ACT (artemisinin-based combination therapy) ในปี 2016	42
ภาพที่ 4	การใส่ RPMI 1640 ในน้ำกลั่น	45
ภาพที่ 5	อาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากใส่ HEPES buffer ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีสีส้ม	45
ภาพที่ 6	การกรองอาหารเลี้ยงเชื้อ	46
ภาพที่ 7	การแบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากการกรองใส่ขวดแก้วปราศจากเชื้อ	46
ภาพที่ 8	การทิ้งอาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้ออย่างต่อเนื่อง	48
ภาพที่ 9	การเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ complete medium ลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้ออย่างต่อเนื่อง	48
ภาพที่ 10	การจุดเทียนภายในโถดูดความชื้น	49
ภาพที่ 11	การปิดฝาหลังจากจุดเทียนภายในโถดูดความชื้น	49
ภาพที่ 12	การปิดช่องอากาศที่อยู่ส่วนบนของฝา (stop – cock) เมื่อเทียนไขใกล้ดับ	49
ภาพที่ 13	การนำโถดูดความชื้นใส่ในตู้ควบคุมอุณหภูมิคงที่ที่ 37 องศาเซลเซียส	50
ภาพที่ 14	การทำฟิล์มเลือดชนิดบาง	51
ภาพที่ 15	การตรึงฟิล์มเลือดด้วยเมทานอล	52
ภาพที่ 16	การย้อมฟิล์มเลือดด้วยสีย้อม Giemsa	52
ภาพที่ 17	ฟิล์มเลือดที่ผ่านการย้อมด้วยสีย้อม Giemsa	52
ภาพที่ 18	การตรวจดูเชื้อมาลาเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง	52
ภาพที่ 19	ภาพวาดแสดงเชื้อมาลาเรีย <i>P. falciparum</i> ระยะต่าง ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	55

ภาพที่ 20 อาหารเลี้ยงเชื้อ complete medium (ขวดแก้ว) และเลือดที่มีเชื้อมาลาเรียหลังจาก
การปั่นเหวี่ยงเพื่อทำให้เชื้ออยู่ในระยะเดียวกัน (หลอดทดลอง) 57

ภาพที่ 21 การดูดส่วนใสด้านบนออกหลังจากการปั่นเหวี่ยงเพื่อทำให้เชื้ออยู่ในระยะเดียวกัน... 57

ภาพที่ 22 การนำเลือดที่มีเชื้อมาลาเรียหลังจากการทำให้เชื้ออยู่ในระยะเดียวกันมา
เพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่อง 57

ภาพที่ 23 การเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียในการทดสอบอุณหภูมิเดียวกันตลอดการทดลอง ใน
ถาดแบบ 96 หลุม หลุมสีแดง คือ หลุมที่ใส่ตัวอย่างเชื้อมาลาเรีย หลุมสีขาว คือ
หลุมที่ไม่ใส่เชื้อมาลาเรีย..... 60

ภาพที่ 24 การเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียในการทดสอบอุณหภูมิที่มีการเพิ่มและลดอุณหภูมิใน
ระหว่างการทดลอง ในถาดแบบ 96 หลุม หลุมสีแดง คือ หลุมที่ใส่ตัวอย่างเชื้อ
มาลาเรีย หลุมสีขาว คือ หลุมที่ไม่ใส่เชื้อมาลาเรีย 61

ภาพที่ 25 การเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียในการทดสอบความเป็นกรด – ต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ
ในถาดแบบ 96 หลุม หลุมสีแดง คือ หลุมที่ใส่ตัวอย่างเชื้อมาลาเรีย หลุมสีขาว คือ
หลุมที่ไม่ใส่เชื้อมาลาเรีย..... 62

ภาพที่ 26 การเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียในการทดสอบผลของคาร์บอนไดออกไซด์..... 63

ภาพที่ 27 การเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียในการทดสอบผลของคาร์บอนไดออกไซด์ ในกลุ่มที่
เลี้ยงเชื้อในภาชนะที่ไม่มี การจุดเทียนสลักับการเลี้ยงเชื้อภายในภาชนะที่มีการ
จุดเทียน 64

ภาพที่ 28 ตัวอย่างการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียในการทดสอบปัจจัยทางเคมี ในถาดแบบ 96
หลุม หลุมสีแดง คือ หลุมที่ใส่ตัวอย่างเชื้อมาลาเรีย หลุมสีขาว คือ หลุมที่ไม่ใส่เชื้อ
มาลาเรีย 65

ภาพที่ 29 กระຈกสไลด์แช่ในแอลกอฮอล์ 95% 68

ภาพที่ 30 การขีดกระຈกสไลด์ด้วยผ้าสะอาด 68

ภาพที่ 31 กราฟแสดงค่าเฉลี่ย % parasitemia (mean ± SD) ของเชื้อมาลาเรียทั้ง 3 สาย
พันธุ์ ได้แก่ K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อปกติ
เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิคงที่ 37 องศาเซลเซียส ภายในโถที่เติมแก๊ส

คาร์บอนไดออกไซด์ด้วยการจุดเทียน (Trager and Jensen, 1976) โดยใช้เชื้อ
 มาลาเรียแบบระยะเดียว (synchronized parasite) ซึ่งเชื้อมาลาเรียเกือบทั้งหมด
 เป็นเชื้อในระยะวงแหวนที่เวลา 0 ชั่วโมง โดย □ แสดงถึง ค่า % parasitaemia ของ
 เชื้อมาลาเรียทุกระยะ, ■ แสดงถึง ค่า % parasitaemia ของเชื้อมาลาเรียในระยะ
 วงแหวน และ ▣ แสดงถึง ค่า % parasitaemia ของเชื้อมาลาเรียในระยะไม่ใช่วง
 แหวน..... 78

ภาพที่ 32 ภาพแสดง % total parasitaemia (mean ± SD) ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1 (a.),
 T9/94RC17 (b.) และ 3D7 (c.) ในกลุ่มควบคุม โดยเลี้ยงเชื้อมาลาเรียที่อุณหภูมิ
 37 องศาเซลเซียส (ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมจากการทดลองผลของอุณหภูมิ 4 องศา
 เซลเซียส) โดย □ แสดงถึงค่า % parasitaemia ของเชื้อมาลาเรียแบบระยะเดียว
 (synchronized parasite, syn) และ ■ แสดงถึงค่า % parasitaemia ของเชื้อ
 มาลาเรียแบบหลายระยะ (asynchronized parasite, asyn) 79

ภาพที่ 33 ภาพแสดงค่าเฉลี่ย % parasitaemia ระยะวงแหวนและระยะไม่ใช่วงแหวนของเชื้อ
 มาลาเรีย K1CB1 (a. และ d.), T9/94RC17 (b. และ e.) และ 3D7 (c. และ f.) ใน
 กลุ่มเชื้อมาลาเรียแบบระยะเดียว (synchronized parasite, syn) และเชื้อ
 มาลาเรียแบบหลายระยะ (asynchronized parasite, asyn) ที่เลี้ยงในอุณหภูมิ
 37 องศาเซลเซียส (ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมจากการทดลองผลของอุณหภูมิ 4 องศา
 เซลเซียส) โดย □ แสดงถึงค่า % parasitaemia ของระยะวงแหวน และ ■ แสดงถึง
 ค่า % parasitaemia ของระยะที่ไม่ใช่วงแหวน..... 80

บทที่ 1

บทนำ

โรคมาลาเรียเป็นโรคติดต่อในมนุษย์ที่เกิดจากเชื้อโปรโตซัวในสกุลพลาสโมเดียม (*Plasmodium*) เชื้อที่ก่อให้เกิดโรคมาลาเรียในมนุษย์มีทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* และ *P. knowlesi* โดยมีพาหะนำเชื้อมาลาเรีย คือ ยุงก้นปล่องเพศเมีย (WHO, 2015) เชื้อมาลาเรียที่มีความรุนแรงมากที่สุด คือ *P. falciparum* เนื่องจากเป็นเชื้อมาลาเรียที่สามารถก่อให้เกิดอาการมาลาเรียขึ้นสมอง (cerebral malaria) ได้ และเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการตายมากที่สุด (Roberts and John Janovy, 2000) นอกจากนี้ยังเป็นเชื้อมาลาเรียที่สามารถเพาะเลี้ยงได้อย่างต่อเนื่องภายในห้องทดลอง เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ระยะในเซลล์เม็ดเลือดแดงภายในหลอดทดลองได้รับการพัฒนาขึ้นราว 40 ปีที่ผ่านมา โดยใช้อาหารที่มีองค์ประกอบซับซ้อนในการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย (Trager and Jensen, 1976)

ในระยะแรก RPMI 1640 เป็นอาหารที่ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ของมนุษย์ โดยการจำลองสภาวะให้มีความคล้ายคลึงกับของเหลวภายในร่างกายของมนุษย์ องค์ประกอบที่สำคัญในอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 ได้แก่ กรดอะมิโน น้ำตาล วิตามิน และเกลือแร่ (Schuster, 2002) ต่อมาจึงนำ RPMI 1640 มาใช้ในการเลี้ยงเซลล์ชนิดอื่นโดยการเติมส่วนประกอบอื่น ๆ เพิ่มเติม รวมทั้งนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย ซึ่งนอกจาก RPMI 1640 เป็นองค์ประกอบหลักของอาหารเลี้ยงเชื้อมาลาเรียแล้วยังมี HEPES buffer ซีรัมของมนุษย์ และยาปฏิชีวนะ เช่น เจนตามัยซิน เพนิซิลลิน หรือ สเตรปโตมัยซิน โดยส่วนมากมักใช้เจนตามัยซินเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อป้องกันการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ในระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย นอกจากนี้เชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนได้บ่อย ได้แก่ แบคทีเรียและยีสต์ ซึ่งสามารถตรวจพบได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงแล้ว ยังอาจพบการปนเปื้อนของไมโครพลาสมา ซึ่งไม่สามารถตรวจพบได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Rowe et al., 1998)

นอกจากอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ การเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียในห้องปฏิบัติการยังต้องควบคุมอุณหภูมิ และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ โดยควบคุมให้อุณหภูมิอยู่ที่ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิร่างกายปกติของมนุษย์ รวมทั้งควบคุมปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และปริมาณแก๊สออกซิเจนโดยการจุดเทียนภายในภาชนะที่ใส่จานเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย (Jensen and Trager, 1977) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ หรือวิธีเลี้ยงอย่างต่อเนื่องในภาชนะที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อไหลผ่าน ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถควบคุมปริมาณของแก๊สที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้ออย่างต่อเนื่องได้ (Jensen, Trager, and Doherty, 1979)

ในระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้ออย่างต่อเนื่องยังต้องมีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 24 ชั่วโมง รวมทั้งเติมเซลล์เม็ดเลือดแดงใหม่ที่ไม่ใช่เชื้อมาลาเรีย เซลล์เม็ดเลือดแดงนอกจากจะเป็นแหล่งที่อยู่ของเชื้อมาลาเรียแล้ว ยังเป็นแหล่งของสารอาหารที่สำคัญของเชื้อมาลาเรีย นอกเหนือจากองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 (Schuster, 2002)

การเลียนแบบสภาวะในการเลี้ยงเชื้อมาลาเรียให้ใกล้เคียงกับสภาวะในร่างกายของมนุษย์ ทำให้นักวิทยาศาสตร์สามารถนำเชื้อมาลาเรียที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเหล่านี้มาใช้ในการศึกษาชีววิทยาของเชื้อมาลาเรียซึ่งเป็นพื้นฐานความรู้ที่นำไปสู่การพัฒนาเทคนิคต่าง ๆ เพิ่มเติม เช่น การตรวจวัดความไวต่อยาของเชื้อมาลาเรียในหลอดทดลอง การค้นคว้าหาาาชนิดใหม่ การติดตามการดื้อยาของเชื้อมาลาเรีย และการหาองค์ประกอบสำคัญที่อาจนำมาพัฒนาเป็นวัคซีนต่อเชื้อมาลาเรีย (Dondorp et al., 2010; Geary and Jensen, 1983; Pradines et al., 2000; Young and Moore, 1961) อย่างไรก็ตามดังที่ได้กล่าวมาแล้วว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียต้องการสภาวะที่มีความจำเพาะสูง เชื้อมาลาเรียที่เพาะเลี้ยงในห้องทดลองจึงมีความไวต่อสภาพแวดล้อม การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ เช่น การทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Yuan et al., 2014) 40 องศาเซลเซียส (Kwiatkowski, 1989) ทำให้เชื้ออยู่ในระยะเดียวกัน หรือการเพิ่มอุณหภูมิในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 37 – 41 องศาเซลเซียส สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย (Long et al., 2001)

การทดลองในอดีตแสดงให้เห็นว่า การเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อก็มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียเช่นเดียวกัน ปัจจัยทางกายภาพ เช่น การเปลี่ยนแปลงซีรัมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ จากซีรัมของมนุษย์เป็นซีรัมจากสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ เช่น กระต่าย วัว เป็นต้น (Ifediba and Vanderberg, 1980; Sax and Rieckmann, 1980) หรือการใช้ซีรัมสังเคราะห์ที่ผลิตขึ้นมาเพื่อใช้เพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย (Lingnau et al., 1993) หรือการนำพลาสมาของมนุษย์มาใช้แทนซีรัมของมนุษย์ (Hui, Palmer, and Siddiqui, 1984) การเติมสารเคมีที่ทำให้เชื้อเกิดการเปลี่ยนแปลง เช่น ทำให้เชื้ออยู่ในระยะเดียวกัน (Hui, Palmer, and Siddiqui, 1983; Lambros and Vanderberg, 1979) หรือชักนำให้เชื้ออยู่ในระยะ gametocyte (Ono and Nakabayashi, 1990; Ono et al., 1993) หรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย (Geary and Jensen, 1983) ทุกปัจจัยล้วนมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียในหลอดทดลอง

การศึกษาผลกระทบของปัจจัยเหล่านี้มีการศึกษามาอย่างต่อเนื่องร่วม 40 ปี การทดลองใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียของ Trager และ Jensen เป็นพื้นฐานในการศึกษาเพื่อพัฒนาเทคนิคในการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียเพิ่มเติมดังที่ได้กล่าวไปข้างต้น เพื่อให้ได้วิธีที่สะดวก รวดเร็วและประหยัดมากขึ้น ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้ได้ศึกษาถึงปัจจัยทางกายภาพและเคมีโดยปัจจัยที่เลือกมาศึกษาเป็นปัจจัยเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย ไม่ว่าจะเป็นสภาวะต่าง ๆ ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ อุณหภูมิ ความเป็นกรด - ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ และปริมาณของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ถือว่าเป็นปัจจัยทางกายภาพ หรือส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ ปัจจัยทางเคมี ได้แก่ ยาปฏิชีวนะ ซีรัมของมนุษย์ วิตามิน น้ำตาล และเกลือ แม้ว่าการทดลองเคยมีผู้ศึกษา เช่น อุณหภูมิ ยาปฏิชีวนะ ซีรัม วิตามินและน้ำตาลมาก่อนแล้ว แต่การทดลองครั้งนี้เป็นการทดลองที่ใช้เชื้อมาลาเรียคนละสายพันธุ์กับการทดลองในอดีต ดังนั้น การศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงปัจจัยทางกายภาพและปัจจัยทางเคมีบางประการที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ระหว่างการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง ซึ่งองค์ความรู้เหล่านี้เป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่งในการพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงให้ดีขึ้น และอาจนำไปสู่การพัฒนาเทคนิคใหม่เพิ่มเติม หรือสร้างแนวทางใหม่ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียได้

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาผลของปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ อุณหภูมิ ความเป็นกรด – ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ และการลดแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ในหลอดทดลอง

2. ศึกษาผลของปัจจัยทางเคมี ได้แก่ ยาปฏิชีวนะ (เพนิซิลลินและลินโคมายซิน) ซีรัมของมนุษย์ วิตามินซี น้ำตาล (กลูโคสและซอร์บิทอล) และเกลือ (โซเดียมคลอไรด์และแคลเซียมคลอไรด์) ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ในหลอดทดลอง

ขอบเขตการศึกษา

การทดลองเริ่มต้นจากการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียอย่างต่อเนื่อง เชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้มีทั้งสิ้น 3 สายพันธุ์ ได้แก่ K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 เลี้ยงด้วยวิธีเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงภายในภาชนะที่ควบคุมปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 3% ด้วยการจุดเทียนในภาชนะที่ใช้เลี้ยงเชื้อมาลาเรีย และควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยวางภาชนะในตู้ควบคุมอุณหภูมิคงที่ที่ 37 องศาเซลเซียส เมื่อทดลองปัจจัยทางกายภาพและเคมี แบ่งเชื้อออกเป็น 2 กลุ่ม คือ เชื้อมาลาเรียแบบระยะเดียวกัน (synchronized parasite) และเชื้อมาลาเรียแบบหลายระยะ (asynchronized parasite) ปัจจัยทางกายภาพที่นำมาทดสอบ คือ อุณหภูมิ ความเป็นกรด – ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ และการลดแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ส่วนปัจจัยทางเคมี ทดลองที่ความเข้มข้นของสารต่าง ๆ กัน โดยสารเคมีที่นำมาทดสอบ ได้แก่ ยาปฏิชีวนะ (เพนิซิลลินและลินโคมายซิน) ซีรัมของมนุษย์ วิตามินซี น้ำตาล (กลูโคสและซอร์บิทอล) และเกลือ (โซเดียมคลอไรด์และแคลเซียมคลอไรด์)

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

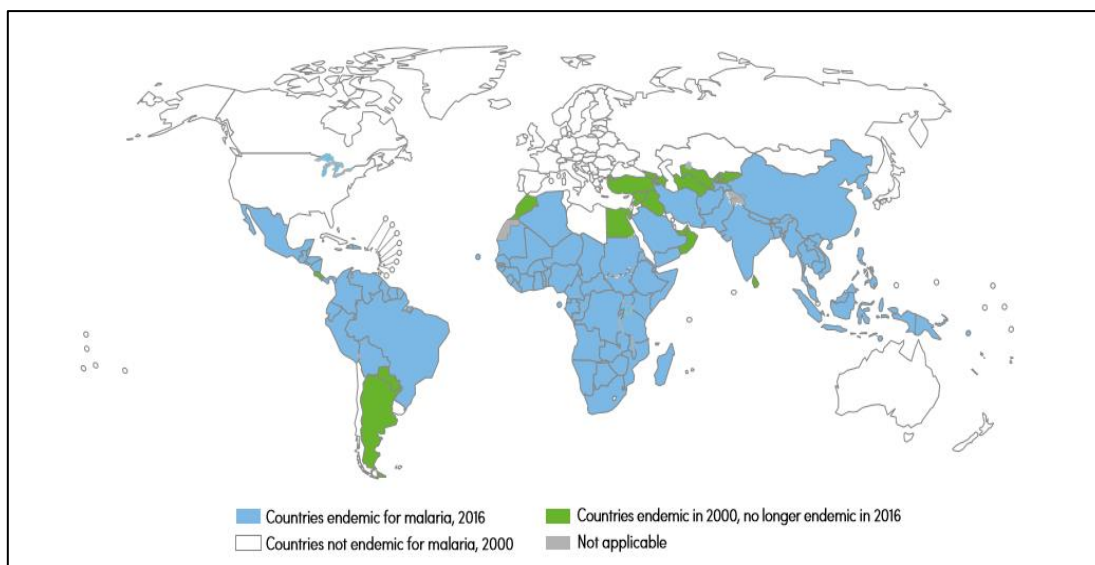
1. สาเหตุของโรคมาลาเรีย

โรคมาลาเรียเป็นโรคติดต่อในมนุษย์ที่สำคัญทางสาธารณสุขโดยเฉพาะอย่างยิ่งในพื้นที่เขตร้อนและเขตกึ่งร้อน โรคมาลาเรียเกิดจากปรสิตเซลล์เดียวในสกุล *Plasmodium* วงศ์ Plasmodiidae อันดับ Haemosporidia ไฟลัม Apicomplexa เชื้อมาลาเรียสามารถแพร่กระจายได้โดยมียุงก้นปล่องเพศเมีย (*Anopheles* spp.) เป็นพาหะนำเชื้อจากผู้ป่วยมาลาเรียไปสู่ผู้อื่น (WHO, 2014) เชื้อที่ก่อให้เกิดโรคมาลาเรียในมนุษย์มีทั้งหมด 5 ชนิด โดยเชื้อมาลาเรีย 4 ชนิดเป็นโรคมาลาเรียที่ติดต่อมาจากคนสู่คนผ่านยุงก้นปล่องที่เป็นพาหะ ได้แก่ *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* และ *P. ovale* ในขณะที่ *P. knowlesi* เป็นเชื้อมาลาเรียในลิงที่ติดต่อมาสู่คน พบได้มากในพื้นที่เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะในพื้นที่เกาะบอร์เนียว (WHO, 2015) เชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* และ *P. vivax* เป็นเชื้อมาลาเรียที่สามารถพบได้บ่อยที่สุด โดยเชื้อ *P. falciparum* เป็นเชื้อมาลาเรียที่แพร่หลายมากที่สุดในทวีปแอฟริกา และเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการตายมากที่สุด เนื่องจากผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อชนิด *P. falciparum* หากไม่ได้รับการรักษา ผู้ป่วยอาจเสียชีวิตได้จากอาการมาลาเรียขึ้นสมอง (cerebral malaria) ส่วนเชื้อมาลาเรีย *P. vivax* เป็นเชื้อมาลาเรียที่สำคัญในหลายประเทศที่อยู่ในพื้นที่เอเชีย อเมริกากลางและแอฟริกาใต้ นอกเขตทะเลทรายซาฮารา (sub-Saharan African) (WHO, 2017a)

2. สถานการณ์ของโรคมาลาเรียในปัจจุบัน

ในช่วงเริ่มต้นของปี ค.ศ. 2016 โรคมาลาเรียได้รับการพิจารณาให้เป็นโรคติดต่อเฉพาะถิ่น (endemic disease) ในพื้นที่ 91 ประเทศและเขตการปกครอง ลดลงจากปี ค.ศ. 2000 ที่มีการระบาดใน 108 ประเทศและเขตการปกครอง (ภาพที่ 1) ถึงแม้ว่าพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคมาลาเรียลดลง แต่ประเทศและเขตการปกครองที่มีการระบาดของโรคมาลาเรียยังคงมีอยู่จำนวนมาก โดย WHO ประมาณว่า ในปี ค.ศ. 2015 น่าจะมีผู้ป่วยที่ติดเชื้อนี้ 212 ล้านราย ในจำนวนนี้เป็นผู้ป่วยในพื้นที่แอฟริกามากที่สุด (90%) รองลงมา คือ เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (7%) และน่าจะมีผู้เสียชีวิตด้วยโรคนี้ประมาณ 429,000 คน ซึ่งส่วนใหญ่อาศัยอยู่ในพื้นที่แอฟริกามากที่สุด (92%) รองลงมา คือ เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (6%) ทั้งนี้การตายประมาณ 99% เป็นสาเหตุมาจากการติดเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* และเกิดขึ้นในพื้นที่แอฟริกาถึง 86% โดยส่วนมากมักเกิดกับเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 5 ปี (70%) ตัวเลขเหล่านี้แสดงให้เห็นว่ายังมีผู้ป่วยและผู้เสียชีวิตจากโรคมาลาเรียเป็นจำนวนมาก แม้ว่าตัวเลขผู้เสียชีวิตได้ลดลงถึง 29% ในช่วงระหว่างปี ค.ศ. 2010 ถึง ค.ศ. 2015 และในพื้นที่แอฟริกาเองมีผู้เสียชีวิตลดลงถึง 47% (WHO, 2016)

ส่วนในประเทศไทย มีการรายงานการติดเชื้อมาลาเรียทั้งหมด 8,022 ราย ในปี ค.ศ. 2016 ในจำนวนนี้มีผู้เสียชีวิตจำนวน 33 ราย ผู้ป่วยส่วนใหญ่ติดเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* (58% ของการติดเชื้อทั้งหมด) หรือเชื้อมาลาเรียชนิด *P. vivax* (42% ของการติดเชื้อทั้งหมด) (WHO, 2017b)



ภาพที่ 1 พื้นที่ที่มีการระบาดของโรคมาลาเรีย ระหว่างปี ค.ศ. 2000 ถึง 2016

(WHO, 2016)

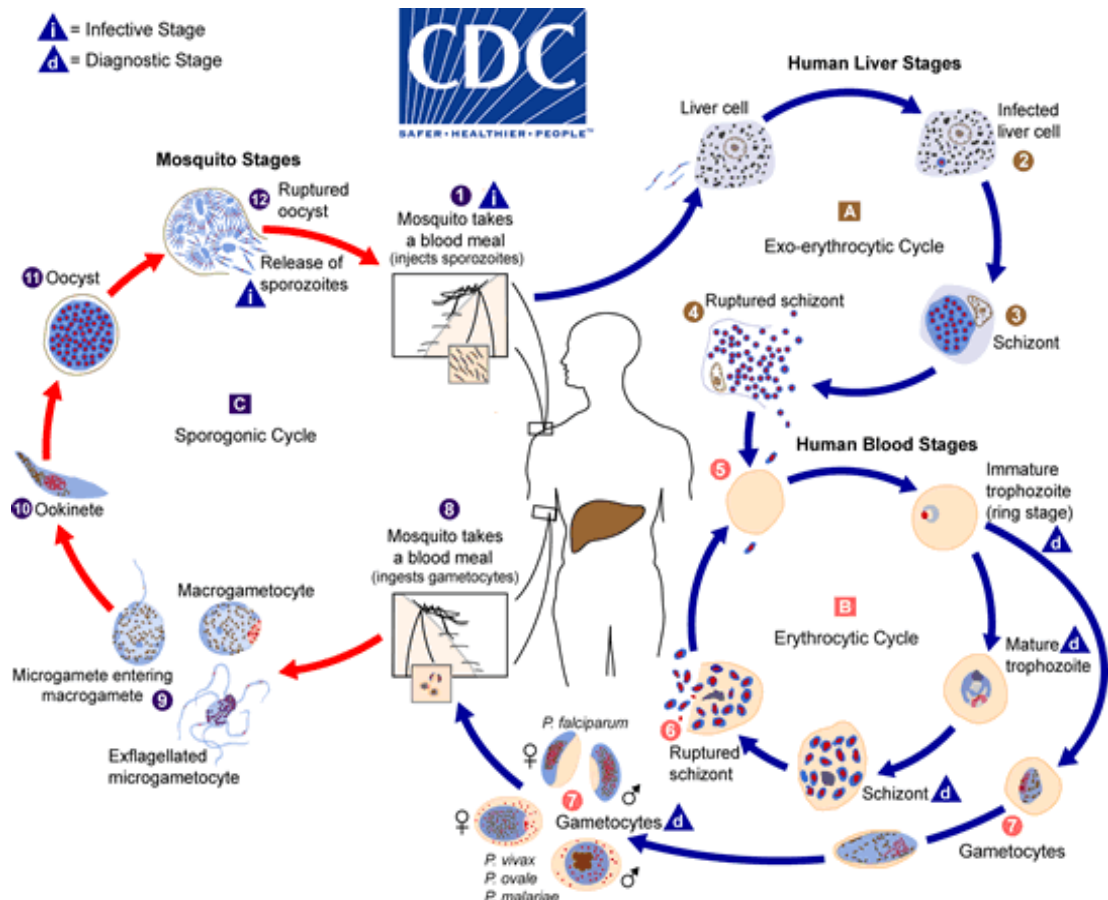
- พื้นที่ที่มีการระบาดในปี ค.ศ. 2016
- พื้นที่ที่มีการระบาดในปี ค.ศ. 2000 และไม่มีการระบาดแล้วในปี ค.ศ. 2016
- พื้นที่ที่ไม่มีการระบาดของโรคมาลาเรียในปี ค.ศ. 2000
- พื้นที่ที่ไม่มีข้อมูล

3. วงชีวิตของเชื้อมาลาเรีย

การเจริญของเชื้อมาลาเรีย สามารถแบ่งออกเป็น 2 ช่วง คือ การเจริญของเชื้อมาลาเรียในยุงก้นปล่อง และการเจริญของเชื้อมาลาเรียในมนุษย์ (ภาพที่ 2)

3.1 การเจริญของเชื้อมาลาเรียในยุงก้นปล่อง

การเจริญของเชื้อมาลาเรียในยุงก้นปล่องเริ่มขึ้นเมื่อยุงก้นปล่องเพศเมียดูดเลือดจากคนที่มีเชื้อมาลาเรียเข้าไปในกระเพาะอาหารของยุง เชื้อมาลาเรียที่ถูกดูดเข้าไปนั้นประกอบไปด้วยเชื้อหลายระยะ แต่มีเพียงเชื้อมาลาเรียในระยะ gametocyte เท่านั้นที่สามารถพัฒนาต่อไปได้ในกระเพาะอาหารของยุง เชื้อมาลาเรียจะเจริญต่อไปเป็น gamete ที่มีเพียง 1 นิวเคลียส ซึ่งอาจพัฒนาเป็นเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (microgamete) หรือ เซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (macrogamete) เซลล์สืบพันธุ์เพศผู้จะสามารถเคลื่อนที่เข้าหาเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียโดยอาศัยแฟลกเจลลา เมื่อเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้เข้าปฏิสนธิกับเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย เซลล์ที่ได้จะพัฒนาไปเป็นไซโกต (zygote) หลังจากนั้นไซโกตจะพัฒนาไปเป็นระยะ ookinete ซึ่งจะเคลื่อนที่ผ่านผนังกระเพาะอาหารของยุงก้นปล่องและไปหยุดอยู่ที่ basement membrane ของเซลล์บุผนังด้านนอกของกระเพาะอาหาร แล้วพัฒนาไปเป็นระยะ oocyst ภายใน oocyst มีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนและมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ให้มีรูปร่างคล้ายไส้เดือน เรียกระยะนี้ว่า sporozoite หลังจากที่ยุงก้นปล่องของ oocyst แตกออก เชื้อมาลาเรียในระยะ sporozoite จะถูกปล่อยออกมาสู่ช่องว่างภายในลำตัว (haemocoel) ของยุงก้นปล่องเป็นจำนวนมาก และมี sporozoite จำนวนมากสามารถพบได้ภายในต่อมน้ำลายของยุงก้นปล่อง (Knell, 1991; Roberts and John Janovy, 2000)



ภาพที่ 2 วงชีวิตของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum*

(CDC, 2016)



3.2 การเจริญของเชื้อมาลาเรียในมนุษย์

ประกอบด้วย การเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศ แบ่งออกเป็น 2 ช่วง คือ

- การเจริญของเชื้อมาลาเรียในเซลล์ตับ (exo-erthrocytic cycle)
- การเจริญของเชื้อมาลาเรียในเซลล์เม็ดเลือดแดง (erythrocytic cycle)

3.2.1 การเจริญของเชื้อมาลาเรียในเซลล์ตับ

เกิดขึ้นเมื่อยุงก้นปล่องเพศเมียที่มีเชื้อมาลาเรียกัดคนจะปล่อยเชื้อมาลาเรียระยะ sporozoite จากต่อมน้ำลายของยุงก้นปล่องเข้าสู่กระแสเลือดของมนุษย์ เชื้อมาลาเรียจะเข้าสู่เซลล์ตับ ในเซลล์ตับเชื้อมาลาเรียจะเข้าสู่ระยะ schizont โดยมีการแบ่งนิวเคลียสหลายครั้งภายในไซโทพลาซึมเดียวกัน ตามด้วยการแบ่งไซโทพลาซึมแยกออกจากกัน และพัฒนาได้เป็นเชื้อมาลาเรียในระยะ merozoite แต่ละ merozoite ที่เกิดขึ้นจะมีนิวเคลียสเพียงอันเดียว เมื่อเซลล์ตับแตกออก เชื้อระยะ merozoite จำนวนมากจะเข้าสู่กระแสเลือดและแทรกตัวเข้าไปอาศัยอยู่ในเซลล์เม็ดเลือดแดงต่อไป ดังนั้นระยะ merozoite จึงเป็นระยะที่เชื้อมาลาเรียเป็นอิสระอยู่นอกเซลล์เพียงชั่วคราวหนึ่งเท่านั้น (สมชาย จงวุฒิวาศย์ และ จตุรงค์ พุทธิพรทิพย์, 2549)

3.2.2 การเจริญของเชื้อมาลาเรียในเซลล์เม็ดเลือดแดง

การเจริญของเชื้อมาลาเรียในเซลล์เม็ดเลือดแดงเริ่มขึ้นเมื่อเชื้อในระยะ merozoite เข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดง โครงสร้างของ merozoite มีรูปร่างเป็นทรงรีคล้ายหยดน้ำมีด้านหนึ่งแบน ส่วนด้านตรงข้ามมีปลายยื่นออกมาเล็กน้อย เรียกว่า apex เป็นด้านที่มี apical organelle ทำหน้าที่สร้างสารคัดหลั่ง ประกอบด้วย rhoptry, microneme และ dense granule ในระหว่างที่ merozoite เข้าเซลล์เม็ดเลือดแดง จะมีการหลั่งโปรตีนจากโครงสร้างเหล่านี้ เพื่อช่วยให้ merozoite เข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดง โดยการสร้าง parasitophorous vacuole ห่อหุ้มเชื้อมาลาเรียไว้ (สมชาย จงวุฒิวาศย์ และ จตุรงค์ พุทธิพรทิพย์, 2549: 39) หลังจาก merozoite เข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงแล้วเชื้อจะมีการเปลี่ยนรูปร่าง มีลักษณะกลมและเพิ่มขนาดขึ้น เรียกเชื้อในระยะนี้ว่า trophozoite ช่วงแรกของระยะ trophozoite เชื้อมาลาเรียจะติดสีย้อมเป็นรูปวงแหวนจึงมักเรียกเชื้อมาลาเรียในช่วงแรกนี้ว่า ระยะวงแหวน (ring) เมื่อเข้าสู่ระยะ schizont เชื้อจะแบ่งนิวเคลียส

หลายครั้งภายในไซโทพลาซึมเดียวกัน ตามด้วยการแบ่งไซโทพลาซึม และพัฒนาเป็นเชื้อในระยะ merozoite เมื่อเยื่อหุ้ม parasitophorous vacuole และเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงแตกออก เชื้อระยะ merozoite จำนวนมากจะถูกปล่อยออกมาจากเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ เชื้อระยะ merozoite เหล่านี้จะอยู่ในกระแสเลือดเป็นช่วงเวลาสั้น ๆ ก่อนแทรกตัวเข้าไปเจริญในเซลล์เม็ดเลือดแดงเซลล์ใหม่ต่อไป การเข้าและออกจากเซลล์เม็ดเลือดแดงนี้จะเกิดขึ้นซ้ำหลายครั้ง จนกระทั่งเชื้อมาลาเรียถูกยับยั้งการเจริญด้วยระบบภูมิคุ้มกันหรือยารักษาโรคมาลาเรีย

หลังจากเชื้อในระยะ merozoite แทรกตัวเข้าไปเจริญในเซลล์เม็ดเลือดแดงเซลล์ใหม่แล้ว merozoite บางตัวอาจพัฒนาไปเป็นระยะวงแหวน (ring) แล้วพัฒนาไปเป็นเซลล์สร้างเซลล์สืบพันธุ์ชนิด microgametocyte (เพศผู้) หรือ macrogametocyte (เพศเมีย) ซึ่งสามารถสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศได้หากยุงก้นปล่องดูดเอา gametocyte เหล่านี้เข้าสู่ตัวยุง (Knell, 1991; Roberts and John Janovy, 2000)

4. การเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย

เนื่องจากเชื้อมาลาเรียมีความจำเพาะต่อสิ่งมีชีวิตเจ้าบ้านค่อนข้างสูง ทำให้การศึกษาทางชีววิทยาของเชื้อมาลาเรียในคนโดยใช้สัตว์ทดลองทำได้อย่างจำกัด การเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียในหลอดทดลองจึงเป็นทางเลือกในการเพิ่มจำนวนเชื้อมาลาเรียเพื่อนำมาใช้ในการทดลอง แต่ในจำนวนเชื้อมาลาเรียทั้งหมดนั้น เชื้อ *P. falciparum* เป็นเชื้อมาลาเรียเพียงชนิดเดียวที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในห้องทดลองอย่างต่อเนื่องและมีการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการหลายแห่งทั่วโลก แต่จำกัดอยู่ในระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศในเซลล์เม็ดเลือดแดงเท่านั้น เนื่องจากในระยะที่เชื้อมาลาเรียเจริญอยู่ในเซลล์ตัวยังไม่มีการเพาะเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายและยังอยู่ในระหว่างการพัฒนาเทคนิคในการเพาะเลี้ยงให้สามารถเพาะเลี้ยงต่อเนื่องได้เป็นระยะเวลานาน

การเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ในห้องทดลองได้เริ่มขึ้นเมื่อปี ค.ศ. 1912 โดย Bass และ Johns สามารถทำให้เชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* และ *P. vivax* เจริญแบ่งตัวในช่วงสั้น ๆ ได้ (Bass and Johns, 1912) นับเป็นระยะแรกของการพัฒนาการเลี้ยงเชื้อมาลาเรียในห้องทดลอง หลังจากนั้นมีการศึกษาเกี่ยวกับการเลี้ยงเชื้อมาลาเรียชนิดต่าง ๆ ในห้องทดลองมา

ตลอด กระทั่งปี ค.ศ. 1976 Trager และ Jensen รายงานว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 ที่ใช้เลี้ยง เม็ดเลือดขาวและ HEPES buffer ที่ผสมซีรัมของมนุษย์ สามารถทำให้เชื้อ *P. falciparum* เจริญ ในเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ในสภาวะที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อไหลผ่านเซลล์เม็ดเลือดแดงในจานเพาะเลี้ยง เชื้อ ภายใต้สภาวะระหว่างคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 7 ออกซิเจนร้อยละ 5 และสามารถเพิ่ม จำนวนเชื้อมาลาเรียได้ด้วยการเติมเลือดที่ไม่มีเชื้อมาลาเรียลงไป (Trager and Jensen, 1976) หลังจากนั้นกลุ่มผู้วิจัยกลุ่มนี้ได้พัฒนาเทคนิคเพิ่มขึ้นจนสามารถเลี้ยงเชื้อ *P. falciparum* ระยะเวลาที่อยู่ในเซลล์เม็ดเลือดแดงได้อย่างต่อเนื่องซึ่งแบ่งได้ 2 วิธี คือ

1. วิธีเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงในภาชนะจุดเทียน (petri-dish in candle jar method) เป็นการเพาะเลี้ยงเชื้อโดยเลี้ยงเชืบบนจานเพาะเลี้ยงภายในภาชนะจุดเทียนโดยใช้โถดูดความชื้น เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 24 ชั่วโมง และเติมเลือดใหม่เมื่อมีเชื้อสูงกว่า 5% การเพาะเลี้ยงเริ่มจากการนำเลือดที่มีเชื้อมาลาเรียและอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ลงในจานเพาะเลี้ยง และนำไปใส่ลงในโถดูดความชื้น วางเทียนไขที่จุดลงในโถดูดความชื้นปิดฝาโดยเปิดช่องอากาศที่อยู่ส่วนบนของฝา (stop-cock) ไว้ รอจนเทียนไขเกือบดับแล้วปิดช่องอากาศทันที หากพบว่ามีความชื้นจะตั้งจุดใหม่จนกระทั่งไม่มีควัน นำโถดูดความชื้นใส่ในตู้ควบคุมอุณหภูมิคงที่ที่ 37 องศาเซลเซียส (Jensen and Trager, 1977)

2. วิธีเลี้ยงอย่างต่อเนื่องในภาชนะที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อไหลผ่าน (continuous flow method) เป็นการเพาะเลี้ยงในระบบที่ออกแบบมาเป็นพิเศษทำให้สามารถปล่อยแก๊ส (คาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 3, ออกซิเจน ร้อยละ 10 และ ไนโตรเจน ร้อยละ 87) และตั้งเวลาในการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบอัตโนมัติได้ โดยเชื้อมาลาเรียจะเพาะเลี้ยงอยู่ในภาชนะที่ออกแบบมาเป็นพิเศษทำให้สามารถเติมเลือดหรืออาหารเพาะเลี้ยงโดยยังคงสภาวะปลอดเชื้อได้นานนับเดือน ในขณะที่เดียวกันก็ยังสามารถนำเลือดที่มีเชื้อมาลาเรียออกมาได้ทุกสัปดาห์เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป (Jensen et al., 1979)

วิธีแรกเป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายจนถึงปัจจุบัน จากการเลี้ยงเชื้อมาลาเรียในห้องปฏิบัติการวิจัยมาลาเรีย ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ด้วย

วิธีเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงในภาชนะจุดเทียนมาอย่างต่อเนื่องพบว่าการเจริญเติบโตของเชื้อ มาลาเรีย *P. falciparum* ในหลอดทดลองขึ้นกับสภาวะแวดล้อมหลายชนิด (สดศรี ไทยทอง, 2549)

5. การทำให้เชื้อมาลาเรียอยู่ในระยะเดียว (synchronization)

ในระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียในหลอดทดลองมักมีเชื้อมาลาเรียหลายระยะปะปน กัน อาจเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิระหว่างการนำเชื้อมาลาเรียออกจากตู้ควบคุม อุณหภูมิมาเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อหรือการที่เชื้อมาลาเรียภายในจานเพาะเลี้ยงมีโอกาสสัมผัสกับ อาหารเลี้ยงเชื้อได้ไม่เท่ากัน โดยเชื้อมาลาเรียที่อยู่บนผิวของเซลล์เม็ดเลือดแดงมีโอกาสสัมผัสกับ อาหารเลี้ยงเชื้อมากกว่าจึงเจริญได้ดีกว่าเชื้อมาลาเรียที่อยู่ด้านล่าง (สดศรี ไทยทอง, 2549: 475) ดังนั้นก่อนการทดสอบยาหรือสารเคมีที่มีผลต่อเชื้อมาลาเรีย นักวิทยาศาสตร์จึงมักทำให้เชื้อเป็น เชื้อมาลาเรียแบบระยะเดียว เพื่อให้ง่ายต่อการวิเคราะห์ผลว่าสารเคมีเหล่านั้นมีผลต่อเชื้อ มาลาเรียในระยะใด

การทำให้เชื้ออยู่ในระยะเดียวกันมีหลายวิธี เช่น การใช้สาร Colchicine (Hui et al., 1983) Aphidicolin (Inselburg and Banyal, 1984) เจลาติน (Jensen, 1978) plasmagel (Heidrich et al., 1982) หรือ plasmion (Lelievre, Berry, and Benoit-Vical, 2005) ในการทำให้ เชื้ออยู่ในระยะเดียวกัน นอกจากนี้ยังสามารถใช้สารละลาย Percoll (Nillni, Londner, and Spira, 1981; Rivadeneira, Wasserman, and Espinal, 1983) หรือใช้วิธี Percoll/ sorbitol ซึ่งเป็นวิธีที่ ใช้สารละลายซอร์บิทอลและ Percoll เข้าด้วยกัน ในการปั่นแยกเชื้อมาลาเรียแต่ละระยะ (Kutner et al., 1985; Radfar et al., 2009; Saliba and Jacobs-Lorena, 2013) หรืออาจจะใช้วิธี magnetic separation เป็นการแยกระยะโดยการ ใช้ LD column และ MACS system เพื่อให้ได้ เชื้อแต่ละระยะ (Ahn et al., 2008; Paul et al., 1981; Saliba and Jacobs-Lorena, 2013)

ถึงแม้ว่าการทำให้เชื้ออยู่ในระยะเดียวกันจะมีการศึกษาว่าสามารถทำได้หลากหลายวิธี แต่วิธีที่เป็นที่นิยมใช้กันมากที่สุดในปัจจุบัน คือ การใช้สารละลายซอร์บิทอล ความเข้มข้น 5% บ่ม กับเชื้อมาลาเรียที่มีหลายระยะ ซอร์บิทอลจะทำลายเชื้อมาลาเรียบางระยะทิ้งไป ระยะที่เหลืออยู่

ส่วนใหญ่ (มากกว่า 95%) เป็นระยะวงแหวน เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อปกติจนถึงเวลา 48 และ 96 ชั่วโมง เชื้อส่วนใหญ่ (มากกว่า 95%) เป็นเชื้อในระยะวงแหวน ขณะที่เชื้อในระยะอื่น ๆ (non-ring) จะพบมากที่สุดที่เวลา 24, 72 และ 120 ชั่วโมง (Lambros and Vanderberg, 1979)

6. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อมาลาเรียในระหว่างการเพาะเลี้ยง

6.1 ปัจจัยทางกายภาพ

6.1.1. อุณหภูมิ

เชื้อมาลาเรียสามารถเติบโตได้ดีในร่างกายของมนุษย์ซึ่งมีอุณหภูมิปกติอยู่ที่ 37 องศาเซลเซียส การเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียในห้องปฏิบัติการจึงมักเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิดังกล่าว (Jensen and Trager, 1977) แต่การติดเชื้อมาลาเรียอาจทำให้เกิดอาการไข้สูงได้ถึง 42 องศาเซลเซียสในบางช่วง (Odongo-Aginya et al., 2005) ดังนั้นจึงมีนักวิทยาศาสตร์บางกลุ่มทำการศึกษาค้นคว้าของอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย โดยพบว่า การเพิ่มหรือลดอุณหภูมิจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียในห้องปฏิบัติการ เช่น ในปี 1989 Kwiatkowski ได้เลี้ยงเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เชื้อมาลาเรียจะตายหมดภายใน 5 วัน แต่หากนำเชื้อมาลาเรียในระยะวงแหวนมาเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส สลับวันเว้นวัน พบว่าการเจริญของเชื้อมาลาเรียจะลดลงเมื่อป้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (Kwiatkowski, 1989) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Long และคณะในปี 2001 แสดงให้เห็นว่าหากนำเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* มาเลี้ยงอย่างต่อเนื่องในอุณหภูมิต่าง ๆ เชื้อจะมีการเจริญลดลงเมื่อถูกเลี้ยงในอุณหภูมิที่สูงกว่า 38.5 องศาเซลเซียส (Long et al., 2001) นอกจากนี้ Kwiatkowski ยังชี้ให้เห็นว่าระยะวงแหวนเป็นระยะที่ทนต่อการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิได้ดีกว่าเชื้อมาลาเรียในระยะอื่น ๆ เช่นเดียวกับ Long ที่แสดงให้เห็นว่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส การเจริญของเชื้อมาลาเรียในระยะ mid และ late trophozoite และ schizont จะถูกยับยั้งมากที่สุดเมื่อเทียบกับระยะวงแหวน

ในขณะที่ Rojas และ Wasserman ทดลองเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อสามารถเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงและพัฒนาข้างลง หากให้เชื้อพัฒนาจนถึงระยะ trophozoite แล้วย้ายเชื้อกลับมาเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถเจริญได้เป็นปกติ แต่ถ้าเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิปกติแล้วจึงย้ายเชื้อไปเลี้ยงที่ 28 องศาเซลเซียส กลับพบว่าเชื้อมีการเจริญที่ครบวงจรชีวิตปกติแต่เจริญช้ากว่าสภาวะปกติประมาณ 12 – 16 ชั่วโมง (Rojas and Wasserman, 1993) ส่วนการศึกษาในปี 2014 Yuan และคณะได้ทดลองนำเชื้อไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 – 24 ชั่วโมง พบว่าพบเชื้อในระยะวงแหวนถึง 70 – 93% (Yuan et al., 2014)

6.1.2. ความเป็นกรด – ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 มีสารที่ใช้ทดสอบความเป็นกรด – ด่าง (pH indicator) คือ phenol red (Schuster, 2002) ที่สามารถบอกถึงความเป็นกรด – ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ โดยมีช่วงค่าความเป็นกรด – ด่างอยู่ที่ 6.8 – 8.2 หากอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าความเป็นกรด – ด่างต่ำกว่า 6.2 อาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าความเป็นกรด – ด่างมากกว่า 8.2 สีของอาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนเป็นสีชมพู โดยค่าความเป็นกรด – ด่างของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อมากที่สุดอยู่ที่ 7.2 – 7.4 (Jensen and Trager, 1977; Trigg, 1985) ซึ่งเคยมีการทดลองเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* สายพันธุ์ FCR-3/FMG ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการปรับค่าความเป็นกรด – ด่างด้วยกรดไฮโดรคลอริกและโซเดียมไฮดรอกไซด์ ให้มีค่าระหว่าง 7.0 – 7.7 พบว่าเชื้อมาลาเรียมีปริมาณสูงเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด – ด่างระหว่าง 7.2 – 7.45 (Jensen, Conley, and Helstowski, 1983)

6.1.3. การลดแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์

การเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียด้วยวิธีเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงในภาชนะจุดเทียน ภายในโถดูดความชื้นมีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ประมาณ 3% แก๊สออกซิเจนประมาณ 17% และแก๊สไนโตรเจนประมาณ 80% (Jensen and Trager, 1977) ถ้าเป็นการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี

เลี้ยงในภาชนะที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อไหลผ่านจะมีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ประมาณ 3% แก๊สออกซิเจนประมาณ 10% และแก๊สไนโตรเจนประมาณ 87% ซึ่งวิธีนี้สามารถควบคุมให้มีแก๊สระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อให้คงที่ได้ (Jensen et al., 1979) ในอดีตมีการทดลองหาปริมาณของแก๊สที่ทำให้เชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* สายพันธุ์ FCR-3/FMG เจริญเติบโตได้มากที่สุด คือสภาวะที่มีแก๊สออกซิเจน 3% และมีปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 1 – 2% (Scheibel, Ashton, and Trager, 1979)

6.2 ปัจจัยทางเคมี

การทดลองหลายงานได้แสดงให้เห็นว่าปัจจัยทางเคมีมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. falciparum* ในหลอดทดลอง เช่น berenil (Ono et al., 1993), ammonium carbonate และ ammonium bicarbonate สามารถชักนำให้เชื้อเกิดระยะ gametocyte ได้ ส่วนการทดสอบด้วย ammonium acetate และ ammonium chloride ไม่มีผลทำให้เชื้อพัฒนาไปเป็นระยะ gametocyte (Ono and Nakabayashi, 1990) หรือการเติม colchicine ลงไปในอาหารเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะทำให้เชื้อมาลาเรียมีจำนวนเพิ่มขึ้นและอยู่ในระยะเดียวกัน (Hui et al., 1983) หรือการนำเชื้อมาลาเรียหลายระยะมาล้างในสารละลายซอร์บิทอล เพื่อให้เหลือแต่เชื้อในระยะวงแหวน (Lambros and Vanderberg, 1979)

นอกจากนี้ยังมีการนำสารเคมีชนิดต่าง ๆ มาทดลองในห้องปฏิบัติการ เช่น วิตามินเอ (Retinol) ควบคู่กับกับยาอาร์เทมิซินิน ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาโรคมาลาเรีย (Thriemer et al., 2005) และการใช้เมทิลีนบลู ให้ผลในการยับยั้งเชื้อมาลาเรียได้เมื่อเทียบกับคลอโรควิน และ ควินิน (Ademowo, Nneji, and Adedapo, 2007)

ในประเทศไทย มีการทดสอบความไวของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* 5 สายพันธุ์ ได้แก่ T9/94RC17, RN106, TP174, K306 และ K355 ต่อสารเคมีที่พบได้ในชีวิตประจำวัน 9 ชนิด ผลการทดลองพบว่าสามารถแบ่งสารเคมีที่ใช้ในการทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ไม่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย ได้แก่ พาราเซตามอล (Paracetamol) นิโคติน (Nicotine) และเอทานอล (Ethanol) กลุ่มที่สามารถลดการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย ได้แก่ แอสไพริน

(Aspirin) วิตามินซีและกลูโคส และกลุ่มที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย ได้แก่ คลอแรมฟินิโคล (Chloramphenicol) เมอโรพินีม (Meropenem) และเพนิซิลลิน (Penicillin) (รุ่งฟ้า ธีญธนกุล, 2550)

สารเคมีที่เป็นยาปฏิชีวนะบางชนิดสามารถนำมาใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อมาลาเรียเพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ได้แก่ เจนตามัยซิน (133 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) หรือเพนิซิลลิน (100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ซึ่งที่ความเข้มข้นเหล่านี้เป็นความเข้มข้นที่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ (Trager and Jensen, 1977) บางการศึกษาเติมยาปฏิชีวนะ 3 ชนิด ในอาหารเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย โดยใส่สเตรปโตมัยซิน (100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ร่วมกับเพนิซิลลิน (100 หน่วยสากลต่อมิลลิลิตร) และเจนตามัยซิน (20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 (Inselburg and Banyal, 1984)

6.3 ปัจจัยทางชีวภาพ

6.3.1 การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ

ในระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียอาจมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ซึ่งมีผลกระทบต่อเชื้อมาลาเรียโดยตรงหรือต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้เชื้อมาลาเรียมีจำนวนลดลง จุลินทรีย์ที่สามารถพบได้บ่อยที่สุด คือ แบคทีเรียและเชื้อรา ซึ่งสามารถตรวจสอบได้จากการทำฟิล์มเลือดบาง หรือสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าหากเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้มีการเพิ่มจำนวนมากพอ โดยจะเห็นลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อมีสีออกแดงคล้ายสีเลือด ซึ่งอาจเกิดจากการสลายของเซลล์เม็ดเลือดแดง สารพิษของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนอยู่ในจานเพาะเลี้ยง สีของอินดิเคเตอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนแปลงไปจากปกติหรือบริเวณผิวของเซลล์เม็ดเลือดแดงมีลักษณะที่แตกต่างจากปกติเมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เช่น มีจุดสีดำ หรือ มีกลุ่มเส้นใยสีขาว มีเมือกเป็นต้น เมื่อเกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ดังกล่าวควรนำเชื้อมาลาเรียเหล่านั้นทิ้งไปทันทีเพื่อป้องกันการปนเปื้อนไปสู่ส่วนอื่น ๆ (สดศรี ไทยทอง, 2549)

6.3.2 ชนิดของซีรัม

โดยปกติการเลี้ยงเชื้อมาลาเรียมักใช้ซีรัมของมนุษย์ในรูปของซีรัมรวม (pooled serum) ที่ได้จากผู้ให้ที่มีเลือดกลุ่มเดียวกันหลาย ๆ คน ซึ่งช่วยให้เชื้อมาลาเรียมีการเจริญเติบโตที่ดีกว่า (สดศรี ไทยทอง, 2549: 466) แต่เนื่องจากซีรัมของมนุษย์หาได้ยาก จึงมีนักวิทยาศาสตร์บางกลุ่มพยายามใช้ซีรัมจากสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ หรือสารอาหารอื่นมาทดแทน

ซีรัมที่มีผู้นำมาทดลองเลี้ยงเชื้อมาลาเรียมาจากสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น วัว, หมู, แพะ, ม้า, แกะ, ลูกวัว หรือกระต่าย โดยพบว่า ซีรัมจากวัวสามารถนำมาเลี้ยงเชื้อได้อย่างต่อเนื่อง (Divo and Jensen, 1982) ส่วนซีรัมจากกระต่ายก็สามารถใช้ทดแทนได้เช่นกันแต่ต้องใช้เวลา 2 – 3 สัปดาห์ ในการปรับตัวของเชื้อมาลาเรียเข้าสู่สภาวะแวดล้อมใหม่ (Sax and Rieckmann, 1980) ในขณะที่ Hui และคณะ สามารถเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่พลาสมาแทนซีรัมของมนุษย์ ผลการศึกษาพบว่าทั้งพลาสมาและซีรัมของมนุษย์ ต่างก็ทำให้เชื้อมาลาเรียมีการเจริญที่ไม่แตกต่างกัน (Hui et al., 1984)

นักวิทยาศาสตร์บางกลุ่มยังได้ทำการทดลองโดยการเติมสารบางชนิดเพื่อช่วยให้เชื้อมาลาเรียเจริญเติบโตได้ในซีรัมของสัตว์ เช่น Ifediba และ Vanderberg ได้ทดลองใส่เปปไทด์และซีรัมจากลูกวัวในอาหารเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* แทนซีรัมของมนุษย์ พบว่า เชื้อมาลาเรียที่เลี้ยงในอาหารที่เติม Neopeptone หรือ Proteose – Peptone No. 3 พร้อมกับซีรัมจากลูกวัว มีอัตราการเจริญไม่ต่างจากเชื้อมาลาเรียที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่ซีรัมจากมนุษย์ (Ifediba and Vanderberg, 1980)

นอกจากนี้ยังมีบทความที่กล่าวถึงการหาสารอื่นมาใช้ทดแทนซีรัมของมนุษย์ เช่น การศึกษาของ Lingnau และคณะ ได้ใช้ A* I* M* V, Basal Medium Supplement (BMS), Ultrosor G และ Nutridoma – SR แทนซีรัมของมนุษย์ โดยเชื้อมาลาเรียสามารถเจริญเติบโตได้เป็นปกติ และอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม Nutridoma – SR ยังสามารถชักนำให้เชื้อเกิดระยะ gametocytes ได้อีกด้วย (Lingnau et al., 1993) ในขณะที่ Flores และคณะ สามารถเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ต่อเนื่องได้ 30 – 50 วัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่ Nutridoma SR และ

AlbuMAXI (N – SR และ AlbM) แทนซีรัมของมนุษย์ (Flores, Berger-Eiszele, and Stewart, 1997)

6.3.3 อายุของเลือดมนุษย์

ในการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียจำเป็นต้องเติมเลือดใหม่เพื่อให้เชื้อมาลาเรียในระยะ merozoite ที่แตกออกจากเซลล์เม็ดเลือดแดงเก่าสามารถเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงเซลล์ใหม่ได้ ซึ่งสามารถใช้เลือดได้ทุกหมู่ แต่ส่วนมากมักจะใช้หมู่เลือดโอเพราะสามารถเข้ากับซีรัมของมนุษย์ที่ได้มาจากเลือดทุกหมู่ (Schuster, 2002) นอกจากนี้ Jensen และ Trager ยังพบว่า เลือดที่มีอายุ 3 – 4 สัปดาห์ ทำให้เชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* เจริญเติบโตได้ดีที่สุด (Jensen and Trager, 1977)

7. การนำเชื้อมาลาเรียที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการมาใช้ประโยชน์

7.1 เชื้อมาลาเรียที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการกับการทดสอบความไวต่อยาและการพัฒนายาต้านมาลาเรีย

แม้ว่ายาที่ใช้ในการรักษาโรคมาลาเรียมีหลายกลุ่ม และยาในแต่ละกลุ่มก็มีกลไกการรักษาที่แตกต่างกันไป เช่น ยาในกลุ่มควิโนลีน (Quinolone) เป็นยารักษาโรคมาลาเรียที่ประสบความสำเร็จในการรักษาและมีประวัติการใช้มาอย่างยาวนาน การออกฤทธิ์ของยาควิโนลีนเชื่อว่าเกิดจากการยับยั้งการสลายฮีโมโกลบินที่เกิดมาจากการย่อยฮีโมโกลบินของเชื้อมาลาเรีย ซึ่งปกติเชื้อมาลาเรียจะมีกระบวนการสลายฮีโมโกลบินที่เป็นพิษต่อเชื้อเกิดเป็น hemazoin หรือ malaria pigment เมื่อใช้ยาในกลุ่มนี้ ทำให้มีฮีโมโกลบินสะสมมากขึ้นจนไปทำลายเชื้อมาลาเรีย ตัวอย่างของยาในกลุ่มนี้ได้แก่ คลอโรควิน (Chloroquine) และ ควินิน (Quinine) (Slater, 1993) ส่วนยาดีออกซีไซคลิน (Doxycycline) เตตราไซคลิน (Tetracycline) คลินดามัยซิน (Clindamycin) ยาอิริโทรมัยซิน (Erythromycin) คลอแรมเฟนิคอล (Chloramphenicol) และไรแฟมพิน (Rifampin) เป็นยาที่ใช้ในการรักษาโรคมาลาเรียโดยยับยั้งการสังเคราะห์ของโปรตีนของเชื้อมาลาเรีย สามารถทำให้เชื้อ *P. falciparum* ที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการนั้นตายได้ (Dahl et al., 2006; Geary and Jensen,

1983) ซึ่งยาเตตราไซคลีนได้ถูกค้นพบว่าสามารถใช้ในการรักษาโรคมาลาเรียที่เกิดจากเชื้อ *P. falciparum* ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1971 (Rieckmann et al., 1971)

ในช่วงระยะเวลา 20 ปีที่ผ่านมา เชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ดื้อต่อยาคลอโรควินและยาต้านมาลาเรียชนิดอื่น ๆ เป็นอย่างมาก (Pradines et al., 2001) โดยพบว่าเชื้อ *P. falciparum* มีการดื้อต่อยาคลอโรควินในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ บริเวณพื้นที่ชายแดนประเทศไทย – กัมพูชา และในอเมริกาใต้ คือ ประเทศบราซิล ตั้งแต่ช่วงปลาย 1950s (Na-Bangchang and Congpuong, 2007) หลังจากนั้นการดื้อยาก็ได้แพร่กระจายไปยังพื้นที่อื่น ๆ (Wernsdorfer and Payne, 1991) ทำให้การดื้อยาของเชื้อมาลาเรียกลายเป็นปัญหาสำคัญในการควบคุมโรคมาลาเรีย (Na-Bangchang and Congpuong, 2007) ดังนั้นการรักษาโรคมาลาเรียในปัจจุบันมักใช้ยามผสม (combination therapy) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาและลดการดื้อยา (ศรัวิศา ครุทสุตวร, พลรัตน์ วิไลรัตน์ และ ศรชัย หล่ออารีย์สุวรรณ, 2549: 345) เช่น เชื้อมาลาเรียที่ดื้อต่อยาคลอโรควินสามารถรักษาได้โดยการใช้ยาคลินดามัยซิน (Clindamycin) เพิ่มเติมเข้าไป (Mordmüller, Graninger, and Kremsner, 1998) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการพัฒนายารักษาโรคมาลาเรียชนิดอื่น ๆ ขึ้นมา ได้แก่

ซัลฟาดอกซินไพริเมตามีน (Sulfadoxine/ Pyrimethamine) ซึ่งเป็นการใช้ยามผสมระหว่างซัลฟาดอกซินและไพริเมตามีน มาใช้ในการรักษาโรคมาลาเรียที่เชื้อมีการดื้อต่อยาคลอโรควิน (Doberstyn et al., 1979; Wernsdorfer and Payne, 1991) ยานิดินี้จะมีผลต่อกระบวนการสร้างโฟเลตซึ่งเป็นสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย (Na-Bangchang and Congpuong, 2007) การดื้อยานิดินี้เกิดขึ้นครั้งแรกในพื้นที่พรมแดนประเทศไทย – กัมพูชา ในช่วงกลาง 1960s (Na-Bangchang and Congpuong, 2007) นอกจากนี้พื้นที่พรมแดนประเทศไทย – กัมพูชาแล้ว ในพื้นที่อเมริกาใต้ก็เกิดการดื้อยานิดินี้เช่นกัน ซึ่งทั้งสองพื้นที่นี้เกิดการดื้อยาขึ้นอย่างรวดเร็ว ส่วนพื้นที่แอฟริกากลางยังคงใช้ยานิดินี้ในการรักษาโรคมาลาเรียได้อยู่ (White, 1992)

ควินิน เป็นยารักษาโรคมาลาเรียในพื้นที่ที่ติดต่อยาฆ่าฟาดอกซิ่นไพริเมทามีนและคลอโรควิน เช่น ในประเทศไทยและเวียดนาม นอกจากนี้ควินินยังเป็นยาที่สามารถใช้รักษาโรคมาลาเรียขั้นรุนแรงได้ (Wernsdorfer and Payne, 1991) การติดต่อยาคควินินเกิดขึ้นในพื้นที่เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ช่วงกลาง 1960s โดยเฉพาะพื้นที่พรมแดนประเทศไทย – กัมพูชา ดังนั้น จึงมีการใช้ยาคควินินผสมกับยาปฏิชีวนะชนิดอื่น ๆ เช่น เตตราไซคลีนหรือด็อกซีไซคลีน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาโรค (Na-Bangchang and Congpuong, 2007) แต่การใช้ควินินคู่กับเตตราไซคลีนไม่สามารถใช้กับผู้ป่วยที่เป็นเด็กและสตรีมีครรภ์ได้ (White, 1992)

เมโฟลควิน (Mefloquine) เป็นยาในกลุ่มควิโนลีนเช่นเดียวกับคลอโรควิน (Chevli and Fitch, 1982) จึงนำมาใช้ในพื้นที่ที่มีเชื้อมาลาเรียที่ติดต่อยาคคลอโรควิน (Saifi et al., 2013) แต่เชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* มีการพัฒนาให้ติดต่อยาชนิดนี้ได้รวดเร็ว ดังนั้นจึงมีการใช้ยามะโฟลควินร่วมกับฆ่าฟาดอกซิ่นและไพริเมทามีน เรียกยาคชนิดนี้ว่า MSP (Nosten et al., 1991) ซึ่งในปี ค.ศ. 1985 ประเทศไทยได้มีการใช้ยา MSP ในการรักษาโรคมาลาเรียที่เกิดจากเชื้อ *P. falciparum* สายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย (Wongsrichanalai et al., 1992)

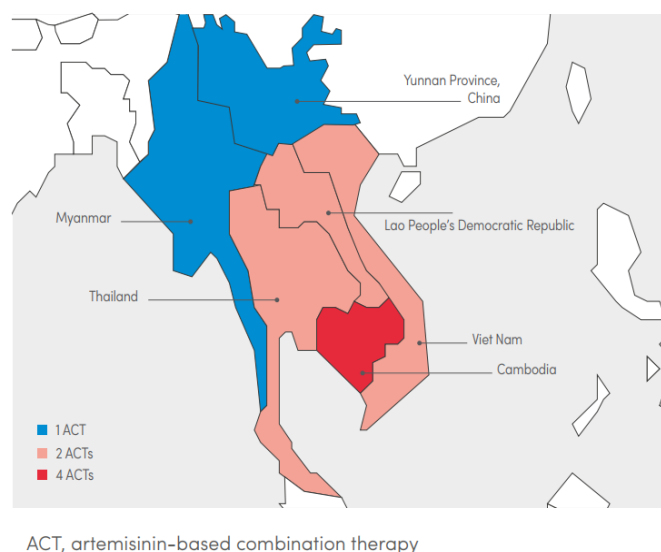
อาร์เทมิซินิน (Artemisinin) เป็นยาที่สกัดมาจากใบของสมุนไพรจากจีนที่เรียกว่า qinghao (*Artemisia annua*) ซึ่งมีการบันทึกในตำรายาแผนโบราณของจีนมากกว่าสองพันปี เพื่อใช้ในการรักษาอาการไข้ คุณสมบัติในการรักษาโรคมาลาเรียของ qinghao พบในประเทศจีนเมื่อปี ค.ศ. 1971 ซึ่งสามารถกำจัดเชื้อมาลาเรียในหนู (*P. berghei*) และเมื่อปี ค.ศ. 1972 ได้ค้นพบสารชนิดหนึ่ง ที่เรียกว่า qinghaosu หรืออาร์เทมิซินิน (Hien and White, 1993; Krishna, Uhlemann, and Haynes, 2004) โดยยาในกลุ่มอาร์เทมิซินิน ได้แก่ ไดไฮโดรอาร์เทมิซินิน (Dihydroartemisinin), Artemether, Arteether และ อาร์เทซูนเนท (Artesunate) (Wiesner et al., 2003) ยากลุ่มนี้สามารถฆ่าเชื้อมาลาเรียทุกระยะในเลือดและใช้ในการรักษาโรคมาลาเรียขั้นรุนแรงในผู้ใหญ่ได้ (Dondorp et al., 2005; Shanks, 2010; Woodrow, Planche, and Krishna, 2006) ในพื้นที่แอฟริกาที่มีการติดต่อยาคคลอโรควินและเอโมโดอาควิน (Amodiaquine) สามารถใช้ยาเอโมโดอาควินควบคู่กับอาร์เทซูนเนทในการรักษาโรคมาลาเรีย (Adjui et al., 2002) หรือในพื้นที่เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ประเทศไทย เป็นพื้นที่ที่มีการติดต่อยาฆ่าฟาดอกซิ่นไพริเมทามีน

คลอโรควิน และเมโฟลควิน ดังนั้นในการรักษาโรคมาลาเรียจึงใช้ยาเมโฟลควินควบคู่กับอาร์เทซูนามีน (Nosten et al., 2000; Wiesner et al., 2003)

จากการรายงานขององค์การอนามัยโลก ในปี ค.ศ. 2016 ระบุว่า เชื้อ *P. falciparum* จากประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ทั้ง 6 ประเทศ ได้แก่ ประเทศไทย พม่า ลาว กัมพูชา เวียดนาม และมณฑลยูนนานในประเทศจีนคือต่อยารักษา Artemisinin การดื้อยาชนิดนี้จะทำให้การรักษาผู้ป่วยมาลาเรียให้หายได้ช้าลง จึงต้องรักษาด้วย Artemisinin-based combination therapy (ACT) เป็นการรักษาโดยใช้ยา Artemisinin เป็นพื้นฐานร่วมกับยารักษาโรคมาลาเรียชนิดอื่น ๆ ซึ่งสามารถรักษาโรคมาลาเรียให้หายได้ แต่อย่างไรก็ดีเชื้อมาลาเรียในบางพื้นที่ดื้อต่อยา ACT เช่น ในประเทศกัมพูชา คือ พื้นที่ที่มีการดื้อของยา ACT สูงที่สุด ไม่สามารถใช้ ACT ในการรักษาได้ (ภาพที่ 3) และในปี ค.ศ. 2008 ในประเทศกัมพูชามีการรายงานถึงการดื้อยาอีกชนิดหนึ่ง คือ ไดไฮโดรอาร์เทมิซินินไพเพอราควิน (Dihydroartemisinin piperaquine) ซึ่งเป็นการผสมระหว่างยา ไดไฮโดรอาร์เทมิซินิน (Dihydroartemisinin) และยาไพเพอราควิน (Piperaquine) เป็นครั้งแรก และการดื้อยานี้ได้แพร่กระจายไปยังประเทศเวียดนามในปี ค.ศ. 2015 (WHO, 2016)

นอกจากนี้ยังมีการใช้ยาผสมอื่น ๆ เช่น การใช้ยาคลินดามัยซินร่วมกับยาไพโรมาควิน (Primaquine) ทำให้สามารถรักษาโรคมาลาเรียได้ดียิ่งขึ้น (Spížek and Režanka, 2004)

นอกจากการศึกษาในเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* แล้วยังมีการศึกษาการใช้ยาในการรักษาการติดเชื้อมาลาเรีย *P. vivax* อีกด้วย โดยพบว่าคลินดามัยซินเพียงชนิดเดียวหรือใช้ในการรักษาร่วมกับควินินสามารถใช้ในการรักษาโรคมาลาเรียที่เกิดจากเชื้อมาลาเรีย *P. vivax* ได้ (Lell and Kremsner, 2002) และถึงแม้ว่าเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* จะมีการดื้อต่อยาคลอโรควิน แต่ยาคลอโรควินยังคงเป็นตัวเลือกในการกำจัดเชื้อมาลาเรีย *P. vivax* ระยะที่อยู่ในเซลล์เม็ดเลือดแดง (Na-Bangchang and Congpuong, 2007)



ภาพที่ 3 พื้นที่ที่มีการดื้อยา ACT (artemisinin-based combination therapy) ในปี 2016 โดย 4 ACTs (สีแดง) คือ พื้นที่ที่มีการดื้อของยา ACT สูงที่สุด ได้แก่ ประเทศกัมพูชา (WHO, 2016)

จะเห็นได้ว่าการเลือกใช้ยารักษามาลาเรียที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพของยาต่อเชื้อ มาลาเรีย การตรวจสอบประสิทธิภาพในการรักษาด้วยยารักษามาลาเรียเป็นส่วนสำคัญของ แผนการการรักษาโรคมาลาเรีย (WHO, 2016) ซึ่งการตรวจสอบประสิทธิภาพของยาด้านมาลาเรีย นอกจากจะใช้วิธีในการติดตามผลของยาที่มีต่อเชื้อมาลาเรียในผู้ป่วยแล้ว การตรวจสอบความไว ต่อยาโดยการใช้เชื้อมาลาเรียที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการก็เป็นวิธีมาตรฐานวิธีหนึ่งในการ ติดตามการดื้อยามาอย่างต่อเนื่อง

7.2 เชื้อมาลาเรียที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการกับการผลิตวัคซีน

เชื้อมาลาเรียเกิดการดื้อต่อยาที่ใช้รักษามาลาเรียหลายชนิด เช่น ยาอาร์เทมิซิनि (Artemisinin) ทำให้โรคมาลาเรียมีการแพร่กระจายสูงขึ้น จึงนำไปสู่การพัฒนาวัคซีนเพื่อป้องกัน โรคมาลาเรีย (Trager and Jensen, 1997) แต่การเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียในแต่ละช่วง ของวงจรชีวิตมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปเป็นระยะต่าง ๆ โปรตีนที่เชื้อมาลาเรียสร้างขึ้นก็มีความ แตกต่างกัน แอนติบอดีที่โปรตีนเหล่านี้กระตุ้นให้เกิดขึ้นจึงมีความจำเพาะสำหรับเชื้อมาลาเรียแต่ ละระยะ (Flores et al., 1997) นักวิทยาศาสตร์จึงศึกษาความจำเพาะของแอนติบอดีที่ผู้ป่วยสร้าง

ขึ้นหรือแอนติบอดีที่ได้จากการฉีดโปรตีนของเชื้อมาลาเรียเข้าไปในสัตว์ทดลอง เพื่อศึกษา ศักยภาพของโปรตีนที่อาจนำมาใช้เป็นวัคซีน โดยการบ่มแอนติบอดีเหล่านี้กับเชื้อมาลาเรียที่ เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเพื่อทดสอบดูว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียหรือไม่ ซึ่ง อาจนำไปสู่การค้นพบโปรตีนที่สามารถพัฒนาไปเป็นวัคซีนได้ในอนาคต (Lin et al., 2016; Moreno et al., 2001)

8. ความสำคัญในการพัฒนาเทคนิคในการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย

ในปัจจุบันการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียสามารถเพาะเลี้ยงได้เพียงเชื้อ *P. falciparum* ระยะ ที่อยู่ในเซลล์เม็ดเลือดแดงเท่านั้น แต่ถือว่าเป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่งในการพัฒนาเทคนิคการ เพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย เนื่องจากเชื้อ *P. falciparum* ระยะในเซลล์เม็ดเลือดแดงนั้นเป็นสาเหตุที่ ทำให้เกิดพยาธิสภาพในผู้ป่วยมาลาเรีย (สดศรี ไทยทอง, 2549) และเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ในระยะนี้เป็นเชื้อมาลาเรียที่มีความรุนแรงมากที่สุดเนื่องจากสามารถทำให้เกิดอาการมาลาเรียขึ้น สมองได้หากไม่ได้รับการรักษา (WHO, 2017a; Wiesner et al., 2003)

การศึกษาทางชีววิทยาของเชื้อมาลาเรียในคนโดยใช้สัตว์ทดลอง เช่น ลิงชิมแปนซีและลิง เอนโดส สามารถทำได้อย่างจำกัดเนื่องจากเชื้อมาลาเรียมีความจำเพาะต่อโฮสต์สูง สัตว์เหล่านี้มี ราคาแพงและหาได้ยาก ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียในห้องปฏิบัติการจึงเป็นทางเลือกในการ เพิ่มจำนวนเชื้อมาลาเรียที่จะนำมาใช้ในการทดลองต่อไปและยังสามารถใช้เป็นวิธีการทดสอบ เบื้องต้นก่อนนำไปทดลองกับสัตว์ทดลองอีกด้วย ทั้งนี้เพื่อสร้างความเข้าใจทางชีววิทยาและ พันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียให้ดีขึ้น สามารถติดตามภาวะดี้อย่างของเชื้อมาลาเรียชนิดต่าง ๆ ศึกษา ค้นคว้าหายารักษาโรคมมาลาเรียชนิดใหม่ รวมทั้งผลิตวัคซีนในการรักษาโรคมมาลาเรีย (สดศรี ไทยทอง, 2549)

บทที่ 3

วิธีการศึกษา

1. เชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อมาลาเรียที่นำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้เป็นสายพันธุ์ของเชื้อมาลาเรียที่ใช้เป็นเชื้อมาลาเรียมาตรฐานซึ่งเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว ณ ห้องปฏิบัติการวิจัยมาลาเรีย ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เชื้อมาลาเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ได้ผ่านการโคลนเพื่อให้ได้เชื้อแต่ละสายพันธุ์ที่มีพันธุกรรมเหมือนกัน ได้แก่

- K1CB1 เชื้อมาลาเรียที่ได้มาจากการโคลนเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* สายพันธุ์ K1 ซึ่งเป็นเชื้อมาลาเรียจากจังหวัดกาญจนบุรี โดยการแยกเอาเชื้อมาลาเรียออกมา 1 เซลล์ด้วยเครื่องมือไมโครมานิปูเลเตอร์ (micromanipulator) มาเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนด้วยการสับพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศให้ได้เชื้อมาลาเรียจำนวนมากที่มีพันธุกรรมเหมือนกัน (Thaithong et al., 2001)

- T9/94RC17 เชื้อมาลาเรียที่ได้มาจากการโคลนเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* สายพันธุ์ T9 จากจังหวัดตาก โดยวิธีการนับเชื้อมาลาเรียแล้วนำมาคำนวณทำให้เจือจาง (dilution method) ได้เป็นสายพันธุ์ T9/94 ซึ่งถูกนำมาโคลนอีกครั้งโดยใช้เครื่องมือไมโครมานิปูเลเตอร์ (micromanipulator) ได้เป็นเชื้อ T9/94RC17 (Thaithong et al., 2001)

- 3D7 เชื้อมาลาเรียที่ได้มาจากการโคลนเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* สายพันธุ์ NF54 ที่แยกได้จากผู้ป่วยในประเทศเนเธอร์แลนด์ ซึ่งคาดว่าน่าจะติดเชื้อมาจากแอฟริกา (Miller et al., 1993)

ทั้งนี้เชื้อมาลาเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ถูกนำมาเพาะเลี้ยงและใช้ในการศึกษาชีววิทยาของเชื้อมาลาเรียอย่างต่อเนื่อง เช่น ด้านพันธุกรรม การสังเคราะห์โปรตีนและความไวต่อยาต้านมาลาเรีย (Cheychoma et al., 2015; Pradines et al., 2001; Siripoon et al., 2015) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อ 3D7 เป็นเชื้อที่ได้รับการศึกษาอย่างกว้างขวางทั่วโลกและมีข้อมูลของจีโนมทั้งหมดอยู่ในฐานข้อมูลระดับนานาชาติ (Gardner et al., 2002) จากการศึกษาเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ที่ผ่านมา

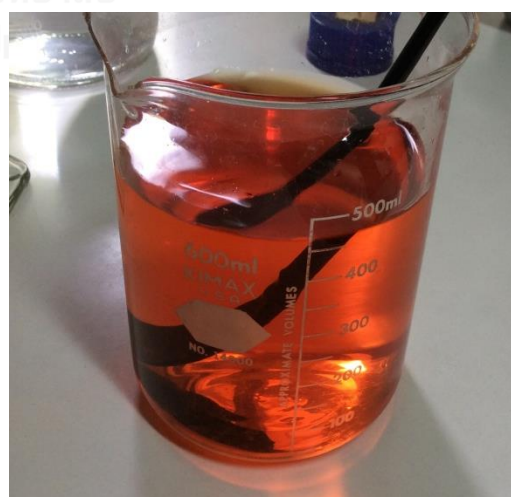
พบว่าเป็นเชื้อที่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมและมีรูปแบบการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน (Rovira-Graells et al., 2016; Siripoon et al., 2015) ทั้งนี้เพื่อแสดงให้เห็นผลของปัจจัยทางกายภาพและเคมีที่มีต่อเชื้อมาลาเรียที่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมและอาจนำผลการทดลองไปใช้กับเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์อื่น ๆ ต่อไป

2. การเตรียมอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 สูตรผงที่มีกลูตามีน และไม่มีโซเดียมไบคาร์บอเนต (RPMI 1640 medium with glutamine/ without sodium bicarbonate Cat. no. 10-601-26 (2F-068A) GIBCO™ Invitrogen Corporation, USA) น้ำหนัก 10.41 กรัม ละลายลงในน้ำกลั่นปริมาตร 300 – 500 มิลลิลิตร (ภาพที่ 4) เติม HEPES buffer (Cat. no. H-3375 SIGMA – ALDRICH, USA) 5.94 กรัม (ภาพที่ 5) และเจนนตามัยซิน (T.P. DRUG Laboratories (1969), Thailand) ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อเพิ่มให้ได้ปริมาตรสุทธิ 960 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอีกครั้ง นำสารละลายทั้งหมดไปกรองผ่านแผ่นกรองมิลลิพอร์ขนาด 0.22 ไมโครเมตร (ภาพที่ 6) และนำไปแบ่งใส่ขวดแก้วที่ปราศจากเชื้อ ขวดละ 100 มิลลิลิตร (ภาพที่ 7) สามารถเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 – 10 องศาเซลเซียสได้เป็นเวลา 1 เดือน



ภาพที่ 4 การใส่ RPMI 1640 ในน้ำกลั่น
ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีสีชมพู



ภาพที่ 5 อาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากใส่ HEPES buffer ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีสีส้ม



ภาพที่ 6 การกรองอาหารเลี้ยงเชื้อ



ภาพที่ 7 การแบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากการกรองใส่ขวดแก้วปราศจากเชื้อ

การเตรียม incomplete medium ทำได้โดยเติมโซเดียมไบคาร์บอเนต ความเข้มข้น 5% ปริมาตร 4.2 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 เพื่อนำมาใช้ในการล้างเลือดที่มีเชื้อ มาลาเรียหลังจากนำออกมาจากไนโตรเจนเหลวและหลังผ่านการทำให้เชื้ออยู่ในระยะเดียวกัน รวมทั้งใช้ในการล้างเลือดใหม่ที่ได้มาจากธนาคารเลือดก่อนนำเลือดไปใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ มาลาเรีย

การเตรียม complete medium ทำได้โดยเติมโซเดียมไบคาร์บอเนต ความเข้มข้น 5% ปริมาตร 4.2 มิลลิลิตร และซีรั่มของมนุษย์ ปริมาตร 10.4 มิลลิลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เพื่อนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย (Jensen and Trager, 1977)

3. การเลี้ยงเชื้อมาลาเรียจากเชื้อที่เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

นำหลอดแช่แข็งจุลินทรีย์ที่เก็บเชื้อมาลาเรียในไนโตรเจนเหลว มาแช่ในน้ำอุ่นที่มีอุณหภูมิ 40 – 44 องศาเซลเซียส จนเลือดละลาย ถ่ายเลือดที่ละลายแล้วใส่ในหลอดทดลอง นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 478 g เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสด้านบนทิ้งไป เติมน้ำละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 3.5% ลงไปเท่ากับปริมาณเลือดที่เหลือ ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปล้างด้วยการใส่ incomplete medium ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 478 g เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสด้านบนทิ้งไป ล้างเลือดซ้ำแบบเดิมอีกครั้ง ก่อนนำเลือดที่เหลือใส่ลงในจานเพาะเลี้ยง นำไปเลี้ยงต่อด้วยวิธีเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงในภาชนะจุดเทียน (สดศรี ไทยทอง, 2549)

4. การเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียในห้องปฏิบัติการ

การทดลองครั้งนี้ใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียแบบต่อเนื่องในห้องปฏิบัติการ (continuous culture) ด้วยวิธีเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงในภาชนะจุดเทียนโดยใช้โถดูดความชื้น เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 24 ชั่วโมง โดยการนำจานเพาะเลี้ยงเชื้อออกมาจากโถดูดความชื้นด้วยความระมัดระวัง เนื่องจากเลือดที่มีเชื้อมาลาเรียจะตกตะกอนอยู่ที่ก้นจาน เติมน้ำเล็กน้อยก่อนดูดอาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่ภายในทิ้งไป (ภาพที่ 8) ทำฟิล์มเลือดบางเพื่อตรวจดูปริมาณและระยะของเชื้อ แล้วเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ complete medium ลงไปปริมาตร 5 มิลลิลิตร (ภาพที่ 9) เขย่าเบา ๆ และเติมเลือดใหม่เมื่อมีเชื้อสูงกว่า 5%



ภาพที่ 8 การทึงอาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่ภายในจานเพาะเลี้ยงเชื้อระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้ออย่างต่อเนื่อง



ภาพที่ 9 การเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ complete medium ลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้ออย่างต่อเนื่อง

การเพาะเลี้ยงเริ่มจากการนำเลือดที่มีเชื้อมาลาเรียทั้งหมดที่มีอยู่ภายในหลอดแช่แข็งจุกเกลียวจากไนโตรเจนเหลวที่เก็บรักษาไว้มาละลายตามขั้นตอนข้างต้น ดูดเชื้อมาลาเรียทั้งหมดประมาณ 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในจานเพาะเลี้ยงขนาดใหญ่ (60 x 15 มิลลิเมตร) พร้อมอาหาร

เลี้ยงเชื้อ complete medium ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมเลือดที่ไม่มีเชื้อมาลาเรีย ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มีค่าฮีมาโตคริต (hematocrit) เท่ากับ 4% แล้วใส่ลงในโถดูดความชื้น วางเทียนไขที่จุดลงในโถดูดความชื้น (ภาพที่ 10) ปิดฝาโดยเปิดช่องอากาศที่อยู่ส่วนบนของฝา (stop – cock) ไว้ (ภาพที่ 11) รอจนเทียนไขเกือบดับแล้วปิดช่องอากาศทันที (ภาพที่ 12) หากพบว่ามีควันเกิดขึ้นจะต้องจุดใหม่จนกระทั่งไม่มีควัน นำโถดูดความชื้นใส่ในตู้ควบคุมอุณหภูมิคงที่ที่ 37 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 13) (สดศรี ไทยทอง, 2549)



ภาพที่ 10 การจุดเทียนภายใน
โถดูดความชื้น



ภาพที่ 11 การปิดฝาหลังจากจุดเทียน
ภายในโถดูดความชื้น



ภาพที่ 12 การปิดช่องอากาศที่อยู่ส่วนบนของฝา (stop – cock) เมื่อเทียนไขใกล้ดับ



ภาพที่ 13 การนำเอดูดความชื้นใส่ในตู้ควบคุมอุณหภูมิห้องที่ 37 องศาเซลเซียส

การตรวจสอบการเจริญและการเติบโตของเชื้อมาลาเรีย ใช้วิธีทำฟิล์มเลือดบาง แล้วย้อมฟิล์มเลือดด้วยสี Giemsa เพื่อตรวจดูลักษณะรูปร่างและนับจำนวนเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

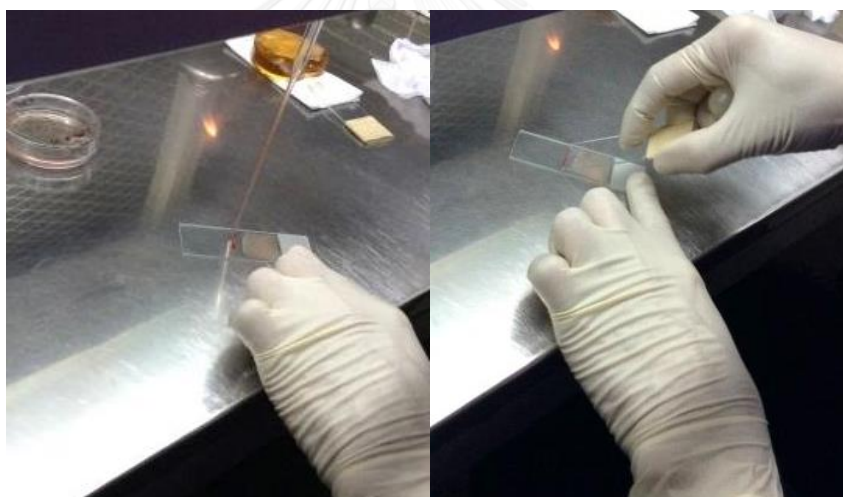
5. การศึกษารูปร่าง (morphology) ระยะ (stage) และจำนวน (parasitaemia) ของเชื้อมาลาเรียจากการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

เป็นวิธีที่ทำให้ทราบการเจริญเติบโต (growth rate) รูปร่าง (morphology) ระยะ (stage) และจำนวน (parasitaemia) ของเชื้อมาลาเรีย

5.1 การเตรียมฟิล์มเลือดบาง

ทำฟิล์มเลือดบางโดยใช้พาสเจอร์ปีเปตหรือไมโครปีเปตดูดเลือดประมาณ 5 – 10 ไมโครลิตร หรือเพียงหยดเล็ก 1 หยดลงบนที่ปลายด้านหนึ่งของกระจกใส นำปลายของกระจกใสสำหรับใ้ที่มีขอบเรียบไปแตะทำมุมเอียงประมาณ 30 – 45 องศา เลื่อนกระจกใส

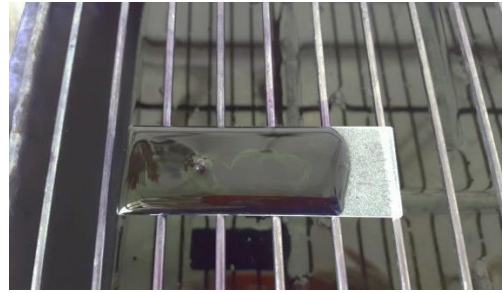
ที่ใช้ไถถอยไปและหยุดเลือด ให้หยุดเลือดกระจายไปทั่วปลายกระจกสไลด์แล้วไถเลือดด้วยความเร็วสม่ำเสมอ (ภาพที่ 14) แรงตึงผิวของเลือดจะดึงแถบเลือดไปตามกระจกสไลด์เกิดเป็นฟิล์มบาง ถ้ามุมระหว่างกระจกสไลด์กว้างเกินไปหรือไถเร็วเกินไปจะทำให้ฟิล์มหนา ในทางตรงกันข้ามถ้ามุมแคบและไถช้าจะทำให้ฟิล์มบางเกินไป นำฟิล์มเลือดไปตรึงด้วยเมทานอล (Avantor Performance Materials, United States) โดยการจุ่มฟิล์มเลือดลงไปในเมทานอลจนท่วมฟิล์มเลือดเพียง 5 – 10 วินาที (ภาพที่ 15) แล้วรอให้ฟิล์มเลือดบางแห้งสนิท ก่อนนำไปย้อมด้วยสีย้อม Giemsa เจือจางที่ผสมระหว่าง Solution A: Solution B: สีย้อม Giemsa = 3: 2: 1 โดยหยุดสีย้อม Giemsa เจือจางลงบนฟิล์มเลือดตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 15 – 20 นาที (ภาพที่ 16) จากนั้นล้างออกด้วยน้ำสะอาด ทิ้งไว้ให้แห้ง (ภาพที่ 17) ก่อนนำมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (ภาพที่ 18) (สมชาย จงวุฒิเวศย์, 2549)



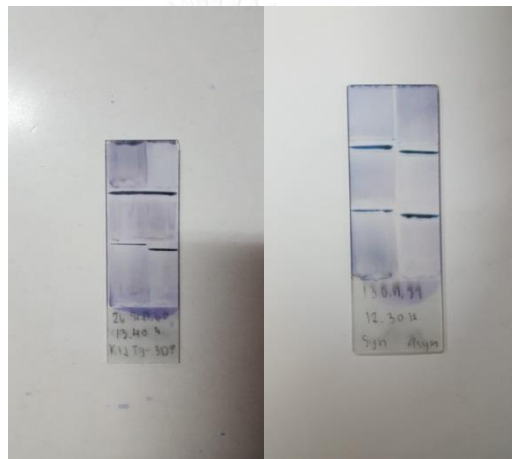
ภาพที่ 14 การทำฟิล์มเลือดชนิดบาง



ภาพที่ 15 การตรึงฟิล์มเลือดด้วยเมทานอล



ภาพที่ 16 การย้อมฟิล์มเลือดด้วยสีย้อม
Giemsa



ภาพที่ 17 ฟิล์มเลือดที่ผ่านการย้อมด้วยสีย้อม Giemsa



ภาพที่ 18 การตรวจดูเชื้อมาลาเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

5.2 การติดตามการเปลี่ยนแปลงของเชื้อมาลาเรีย

การติดตามการเปลี่ยนแปลงของเชื้อมาลาเรียสามารถทำได้โดยทำฟิล์มเลือดแล้วย้อมด้วยสี Giemsa นับจำนวนเชื้อทั้งหมดภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง แต่แผ่นฟิล์มเลือดจะนับเซลล์เม็ดเลือดแดงประมาณ 1,000 เซลล์ เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงจำนวนของเชื้อมาลาเรียในจานเพาะเลี้ยงโดยนำมาคำนวณเป็นค่า % parasitaemia (จำนวนเชื้อมาลาเรียในเซลล์เม็ดเลือดแดง 100 เซลล์) โดยคำนวณจาก

$$\% \text{ parasitaemia} = \frac{\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อมาลาเรีย} \times 100}{\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงทั้งหมด}}$$

เชื้อมาลาเรียถูกนับแยกเป็นระยะวงแหวน (ring) และระยะไม่ใช่วงแหวน (non – ring) คือการรวมโทรโฟซอยต์ (trophozoite) ในระยะกลางและปลาย และไซซอนต์ (schizont) เข้าด้วยกัน ส่วนระยะ gametocyte พบได้น้อยมากในการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียอย่างต่อเนื่องจึงไม่นับรวมเชื้อในระยะนี้

การคำนวณค่า % parasitaemia ของเชื้อระยะวงแหวนสามารถคำนวณได้จาก

$$\% \text{ parasitaemia} = \frac{\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อระยะวงแหวน} \times 100}{\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงทั้งหมด}}$$

การคำนวณค่า % parasitaemia ของเชื้อระยะไม่ใช่วงแหวนสามารถคำนวณได้จาก

$$\% \text{ parasitaemia} = \frac{\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อระยะไม่ใช่วงแหวน} \times 100}{\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงทั้งหมด}}$$

การจำแนกระหว่างระยะวงแหวนและระยะไม่ใช่วงแหวน สามารถตรวจดูได้โดย

- ระยะวงแหวน เป็นช่วงต้นของระยะ trophozoite หลังจากเชื้อมาลาเรียเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดง มีขนาดเล็กเพียง 1 ใน 5 ของเซลล์เม็ดเลือดแดง พบลักษณะเป็นรูปร่างแหวน โดยเห็นจุดโครมาตินสีเข้ม (ภาพที่ 19: 2 – 4) มักพบระยะวงแหวนที่มีโครมาติน 2 อัน (ภาพที่ 19: 5) อยู่

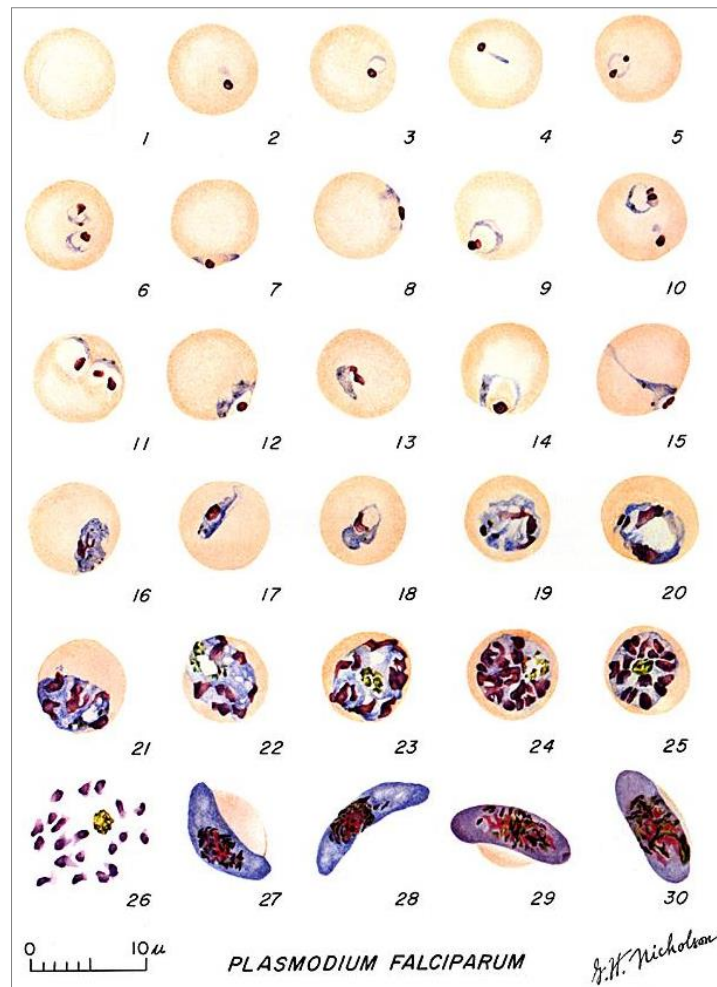
ภายในเซลล์เม็ดเลือดแดงและสามารถพบระยะวงแหวนหลายเซลล์ภายในเซลล์เม็ดเลือดแดงเดียวกันได้ (ภาพที่ 19: 6 และ 10) หรืออาจพบระยะวงแหวนที่อยู่ชิดขอบของเซลล์เม็ดเลือดแดง (ภาพที่ 19: 7 – 9) (Roberts and John Janovy, 2000)

- ระยะไม่ใช่วงแหวน (non-ring) คือ ระยะ trophozoite ในระยะกลาง ระยะปลาย (ภาพที่ 19: 11 – 18) และระยะ schizont (ภาพที่ 19: 19 – 25)

ระยะ trophozoite ในระยะกลางและระยะปลาย คือ ระยะถัดจากระยะวงแหวน สามารถพบไซโตพลาซึมที่มีขนาดใหญ่ขึ้น แต่ภายในเซลล์ยังคงมีเพียง 1 นิวเคลียสเท่านั้น ในขณะที่ระยะ schizont เกิดการแบ่งนิวเคลียสแล้ว จึงพบว่าภายใน schizont มีหลายนิวเคลียส ซึ่งช่วงระหว่างการเปลี่ยนแปลงจากระยะ trophozoite ไปเป็นระยะ schizont สามารถจำแนกภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงได้ยาก ดังนั้นการทดลองนี้จึงนับรวมระหว่างระยะ trophozoite ตอนกลางและปลาย และระยะ schizont เข้าด้วยกันเป็นระยะไม่ใช่วงแหวน ส่วนเชื้อมาลาเรียที่ระยะ merozoite แยกออกจาก schizont แล้ว (ภาพที่ 19: 26) จะไม่นับรวมเข้าในระยนี้ นอกจากนี้เซลล์สร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (ภาพที่ 19: 27 – 28) และเซลล์สร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (ภาพที่ 19: 29 – 30) จะพบในการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียในห้องปฏิบัติการได้น้อย

เชื้อมาลาเรียระยะต่าง ๆ ถูกแยกนับเพื่อดูผลของปัจจัยทางกายภาพและเคมีที่มีผลต่อการพัฒนาของเชื้อมาลาเรียในแต่ละระยะ

ในการทดสอบปัจจัยทางเคมี ต้องหาค่า MIC หรือ Minimum inhibitory concentration เป็นค่าที่แสดงความเข้มข้นต่ำสุดของสารเคมีที่ทำให้ไม่พบเชื้อมาลาเรียเหลืออยู่ที่ความเข้มข้นนั้น ๆ จากการตรวจดูฟิล์มเลือดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เทียบกับกลุ่มควบคุมภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง



ภาพที่ 19 ภาพวาดแสดงเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ระยะเวลาต่าง ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Coatney et al., 1971)

ภาพที่ 19: 1 คือ เซลล์เม็ดเลือดแดงปกติ

ภาพที่ 19: 2 – 18 คือ เซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อมาลาเรียในระยะ trophozoites (ภาพที่ 19: 2 – 10 คือ เชื้อมาลาเรียในระยะวงแหวน)

ภาพที่ 19: 19 – 26 คือ เซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อมาลาเรียในระยะ schizont (ภาพที่ 19: 26 คือ เชื้อมาลาเรียในระยะ merozoite ที่แตกออกจาก schizont)

ภาพที่ 19: 27 – 28 คือ เซลล์สร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย

ภาพที่ 19: 29 – 30 คือ เซลล์สร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้

6. การเก็บรักษาเชื้อมาลาเรียในไนโตรเจนเหลว

การเก็บรักษาเชื้อมาลาเรียในไนโตรเจนเหลว มีเป้าหมายเพื่อป้องกันการสูญเสียเชื้อระหว่างการทดลอง เช่น เกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ภายในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น โดยมีวิธีดังนี้ นำเชื้อมาลาเรียจากการเพาะเลี้ยงเชื้ออย่างต่อเนื่องที่มีค่า % parasitaemia สูงกว่า 5% และมีสัดส่วนของระยะวงแหวนสูง มาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 478 g เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง เติมสารป้องกันการแข็งตัว cryoprotectant ปริมาณเท่ากับเลือดส่วนที่เหลือลงไปผสมให้เข้ากัน ใส่ลงในหลอดแช่แข็งจุลชีววิทยาปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่น เขียนชื่อเชื้อและวันเดือนปีที่เตรียมไว้ข้างหลอด แล้วใส่ลงในถังไนโตรเจนเหลวทันที (สดศรี ไทยทอง, 2549)

7. การเตรียมสาร Cryoprotectant

เริ่มจากการเตรียมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.9% (โซเดียมคลอไรด์ 0.9 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร) และสารละลายซอร์บิทอลในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 4.2% (ซอร์บิทอล น้ำหนัก 4.2 กรัม ละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.9% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร)

จากนั้นนำกลีเซอรอล ปริมาตร 70 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลายซอร์บิทอลในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 4.2% ปริมาตร 180 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำสารละลายทั้งหมดไปกรองผ่านแผ่นกรองมิลลิพอร์ขนาด 0.22 ไมครอนเมตร ใส่ในหลอดทดลองฝาเกลียวที่ฆ่าเชื้อแล้ว หลอดละ 10 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 – 10 องศาเซลเซียส

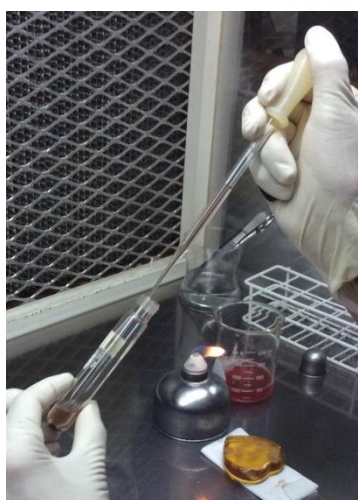
8. การเตรียมเชื้อมาลาเรียแบบระยะเดียวกัน (Synchronization)

นำเชื้อมาลาเรียจากการเพาะเลี้ยงเชื้ออย่างต่อเนื่องที่มีเชื้อในระยะวงแหวนสูงกว่าระยะไม่ไช่วงแหวน มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 478 g เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสด้านบนทิ้งไป เติมสารละลายซอร์บิทอล ความเข้มข้น 5% ปริมาตร 5 เท่าของเลือดที่เหลือลงไปผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้สารละลายซอร์บิทอลไปทำลายเชื้อระยะอื่น ๆ นอกจากเชื้อใน

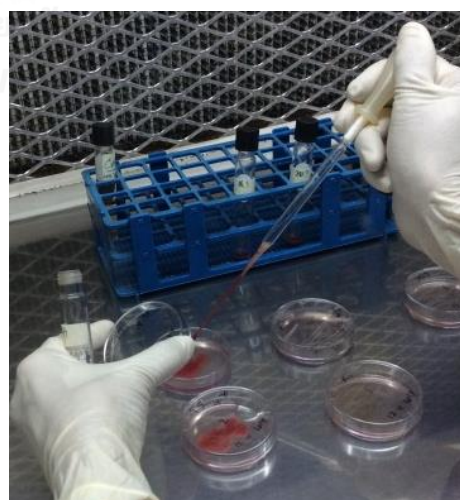
ระยวงแหวน เมื่อครบ 10 นาที นำไปล้างด้วยการเติม incomplete medium ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 478 g เป็นเวลา 5 นาที เลือดที่มีเชื้อมาลาเรียจะ ตกตะกอนอยู่ที่ด้านล่างของหลอด (ภาพที่ 20) ดูดส่วนใสด้านบนทิ้งไป (ภาพที่ 21) ล้างเลือดซ้ำ อีก 2 ครั้ง จากนั้นนำเลือดที่เหลือใส่ในจานเพาะเลี้ยงขนาดใหญ่ (60 x 15 มิลลิเมตร) (ภาพที่ 22) ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเติมเลือดที่ไม่มีเชื้อมาลาเรียลงไป ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วดำเนินขั้นตอนต่อไปเหมือนการเพาะเลี้ยงเชื้ออย่างต่อเนื่อง (Lambros and Vanderberg, 1979)



ภาพที่ 20 อาหารเลี้ยงเชื้อ complete medium (ขวดแก้ว) และเลือดที่มีเชื้อมาลาเรียหลังจากการปั่นเหวี่ยงเพื่อทำให้เชื้ออยู่ในระยะเดียวกัน (หลอดทดลอง)



ภาพที่ 21 การดูดส่วนใสด้านบนออก หลังจากการปั่นเหวี่ยงเพื่อทำให้เชื้ออยู่ในระยะเดียวกัน



ภาพที่ 22 การนำเลือดที่มีเชื้อมาลาเรีย หลังจากการทำให้เชื้ออยู่ในระยะเดียวกันมาเพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่อง

9. การติดตามการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียทุก 6 ชั่วโมง

การติดตามการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียทุก 6 ชั่วโมงเป็นการติดตามการเปลี่ยนแปลงระยะของเชื้อมาลาเรีย เพื่อระบุระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบปัจจัยต่าง ๆ โดยเริ่มจากการนำเชื้อมาลาเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 จากการเพาะเลี้ยงเชื้ออย่างต่อเนื่องมาทำให้เชื้ออยู่ในระยะเดียวกันด้วยสารละลายซอร์บิทอลตามวิธีข้างต้น คำนวณค่า % parasitaemia ที่ได้แล้วเจือจางด้วยเลือดใหม่ที่ไม่มีเชื้อมาลาเรียให้ได้ค่า % parasitaemia เริ่มต้นเท่ากับ 0.2% จากนั้นนำเชื้อไปเลี้ยงด้วยวิธีเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงในภาชนะจุดเทียนเหมือนกับการเพาะเลี้ยงเชื้ออย่างต่อเนื่อง เริ่มต้นนับเวลาที่ 0 ชั่วโมง เมื่อนำเชื้อมาลาเรียเข้ามาในตู้ควบคุมอุณหภูมิคงที่ที่ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบทุก 6 ชั่วโมง (ตั้งแต่ที่เวลา 6 ถึง 96 ชั่วโมง) นำเชื้อมาลาเรียออกมาทำฟิล์มเลือดบาง และเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 24 ชั่วโมง (ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง) โดยไม่มีการเติมเลือดใหม่ที่ไม่มีเชื้อมาลาเรียระหว่างการทดลอง

10. การทดสอบปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum*

แบ่งเชื้อมาลาเรียจากการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียอย่างต่อเนื่องเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มเชื้อมาลาเรียแบบระยะเดียวกัน (synchronized parasite) และกลุ่มเชื้อมาลาเรียแบบหลายระยะ (asynchronized parasite)

กลุ่มเชื้อมาลาเรียแบบระยะเดียวกัน คือ เชื้อมาลาเรียที่ผ่านการทำให้เชื้ออยู่ในระยะเดียวกันด้วยสารละลายซอร์บิทอล 2 ครั้ง เชื้อมาลาเรียเริ่มต้นจะอยู่ในระยะวงแหวนเกือบทั้งหมด เป็นการทดลองเพื่อดูผลของปัจจัยต่าง ๆ ต่อเชื้อแต่ละระยะ ในขณะที่กลุ่มเชื้อมาลาเรียแบบหลายระยะ เป็นการนำเชื้อมาลาเรียมาจากการเพาะเลี้ยงเชื้ออย่างต่อเนื่อง ดังนั้นเชื้อมาลาเรียเริ่มต้นจะมีหลายระยะปะปนกัน เป็นการทดลองเพื่อดูผลของปัจจัยต่าง ๆ ต่อเชื้อมาลาเรียในการเลี้ยงเชื้ออย่างต่อเนื่อง ซึ่งในแต่ละการทดลองจะมีค่า % parasitaemia ของเชื้อในระยะวงแหวนและไม่ใช่วงแหวนแตกต่างกัน นำเชื้อมาลาเรียทั้ง 2 กลุ่มมาคำนวณค่า % parasitaemia ของเชื้อที่มีอยู่แล้วเติมเลือดใหม่ที่ไม่มีเชื้อมาลาเรียเพื่อลดจำนวนของเชื้อมาลาเรียให้มีค่า % parasitaemia เท่ากับ 0.3% จากนั้นใส่เลือดที่มีเชื้อมาลาเรียหลังจากการเจือจางแล้วลงในถาดแบบ 96 หลุม (96

– well plate) หลุมละ 10 ไมโครลิตร และเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ หลุมละ 100 ไมโครลิตร โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มการทดลอง คือ กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง การทดสอบปัจจัยทางกายภาพและปัจจัยทางเคมีจะทำการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ และติดตามการเปลี่ยนแปลงเป็นเวลาอย่างน้อย 72 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อและทำฟิล์มเลือดบางทุก 24 ชั่วโมง (เริ่มต้นการนับเวลาเมื่อนำเชื้อมาลาเรียเข้าสู่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ) เพื่อเปรียบเทียบผลการทดลองของกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง ขณะทำการทดลองจะไม่มี การเติมเลือดใหม่

10.1 ปัจจัยทางกายภาพ

ในการทดสอบปัจจัยทางกายภาพ แต่ละการทดลองจะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียในถาดแบบ 96 หลุม จำนวน 3 ถาด ในแต่ละถาดจะเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ รวมทั้งแบ่งออกเป็นกลุ่มเชื้อมาลาเรียแบบระยะเดียวกัน (synchronized parasite) และกลุ่มเชื้อมาลาเรียแบบหลายระยะ (asynchronized parasite) แต่ละปัจจัยที่ทดสอบ ทำการทดลอง 3 หลุม การทำฟิล์มเลือดบางแต่ละครั้งจะใช้เซลล์เม็ดเลือดแดงจากถาด 1 หลุม (ภาพที่ 23 – 27)

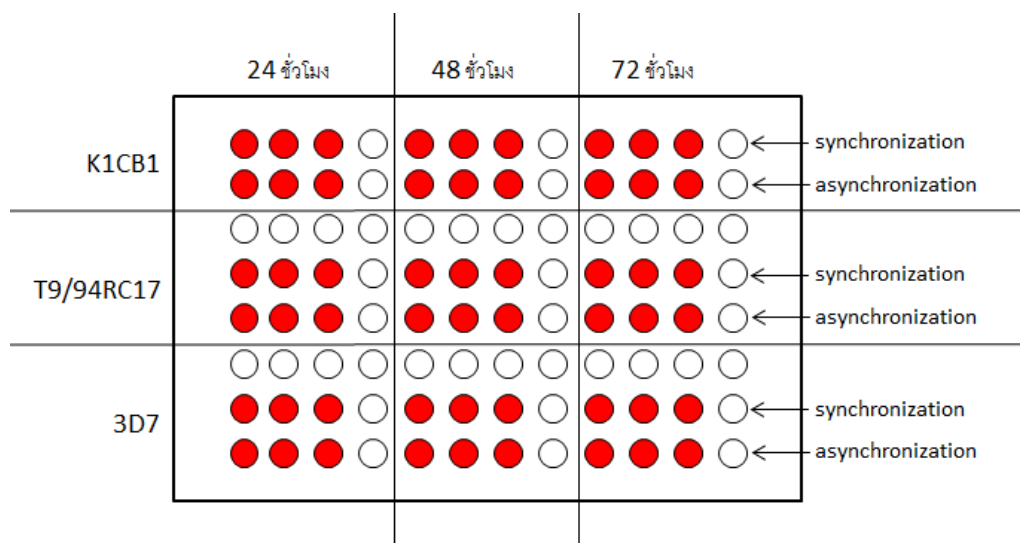
ปัจจัยทางกายภาพที่นำมาทดสอบผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ได้แก่

10.1.1 อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่ใช้ทดสอบแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

1. กลุ่มที่ใช้อุณหภูมิเดียวกันตลอดการทดลอง อุณหภูมิที่ใช้ คือ 4, 34, 37 (กลุ่มควบคุม) และ 40 องศาเซลเซียส

ใช้ถาดแบบ 96 หลุม แต่ละหลุมมีเชื้อมาลาเรียเริ่มต้นเท่ากับ 0.3% ทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองใส่ในโถดูความชื้นแล้วนำโถดูความชื้นนี้ไปใส่ในตู้ควบคุมอุณหภูมิต่าง ๆ หลังจากบ่มเชื้อในตู้ควบคุมอุณหภูมิครบ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง นำเชื้อออกมาเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อพร้อมทำฟิล์มเลือดบาง (ภาพที่ 23)

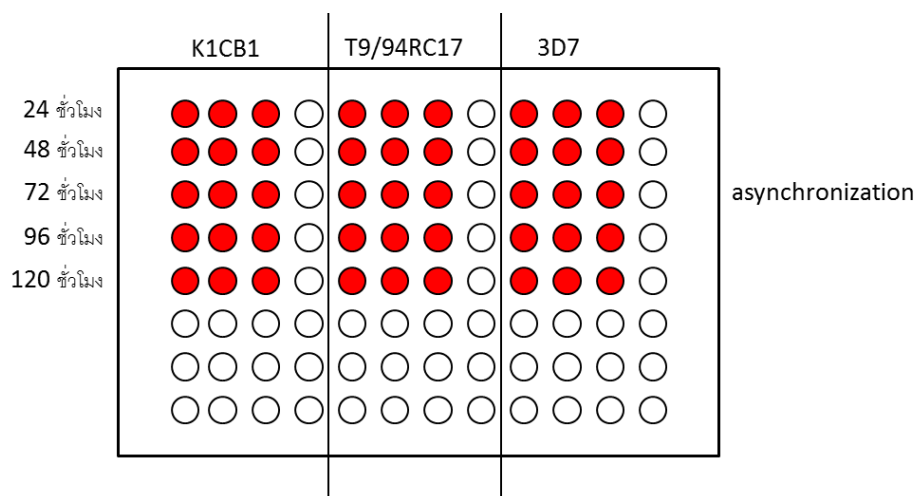


ภาพที่ 23 การเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียในการทดสอบคุณสมบัติเดียวกันตลอดการทดลอง ในถาดแบบ 96 หลุม หลุมสีแดง คือ หลุมที่ใส่ตัวอย่างเชื้อมาลาเรีย หลุมสีขาว คือ หลุมที่ไม่ใส่เชื้อมาลาเรีย

2. การเลี้ยงเชื้อมาลาเรียแบบหลายระยะโดยมีการเพิ่มและลดอุณหภูมิในระหว่างการทดลอง ใช้ถาดแบบ 96 หลุม แต่ละหลุมมีเชื้อมาลาเรียเริ่มต้นเท่ากับ 0.3% ทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง ในกลุ่มควบคุม ใส่ถาดเพาะเลี้ยงเชื้อสำหรับทดลองในอุณหภูมิที่ขึ้นบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ส่วนในกลุ่มทดลองนั้น ได้เลือกอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองมาจากการทดลองของกลุ่มที่ใช้อุณหภูมิเดียวกันตลอดการทดลอง ซึ่งนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิต่าง ๆ ดังนี้

$$\frac{40\text{ }^{\circ}\text{C}}{24\text{ ชั่วโมง}} \rightarrow \frac{4\text{ }^{\circ}\text{C}}{24\text{ ชั่วโมง}} \rightarrow \frac{40\text{ }^{\circ}\text{C}}{24\text{ ชั่วโมง}} \rightarrow \frac{37\text{ }^{\circ}\text{C}}{48\text{ ชั่วโมง}}$$

หลังจากบ่มเชื้อในตู้ควบคุมอุณหภูมิครบ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง นำเชื้อออกมาเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อพร้อมทำฟิล์มเลือดบาง (ภาพที่ 24)



ภาพที่ 24 การเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียในการทดสอบอนุภูมิภาคที่มีการเพิ่มและลดอนุภูมิภาคในระหว่างการทดลอง ในถาดแบบ 96 หลุม หลุมสีแดง คือ หลุมที่ใส่ตัวอย่างเชื้อมาลาเรีย หลุมสีขาว คือ หลุมที่ไม่ใส่เชื้อมาลาเรีย

10.1.2 ความเป็นกรด – ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ค่าความเป็นกรด – ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อมาลาเรียที่นำมาทดสอบ คือ 6.9, 7.0 (กลุ่มควบคุม) และ 7.3 ปรับค่าความเป็นกรด – ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการเพิ่มหรือลดปริมาณของ โซเดียมไบคาร์บอเนตในอาหารเลี้ยงเชื้อ

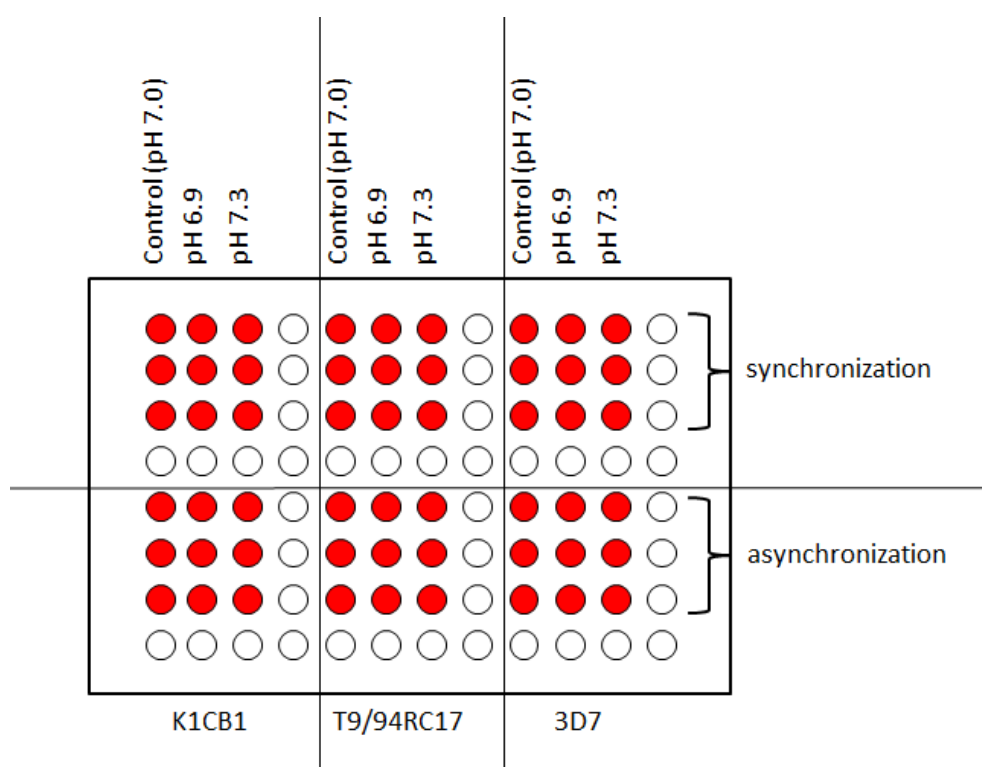
- กลุ่มควบคุม คือ เชื้อมาลาเรียที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซีรัมของมนุษย์ ปริมาตร 10.4 มิลลิลิตร และ โซเดียมไบคาร์บอเนต ความเข้มข้น 5% ปริมาตร 4.2 มิลลิลิตร

- กลุ่มทดลอง โดยการลดค่าความเป็นกรด – ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ (pH 6.9) คือ เชื้อมาลาเรียที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซีรัมของมนุษย์ ปริมาตร 10.4 มิลลิลิตร และโซเดียมไบคาร์บอเนต ความเข้มข้น 5% ปริมาตร 2.4 มิลลิลิตร

- กลุ่มทดลอง โดยการเพิ่มค่าความเป็นกรด – ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ (pH 7.3) คือ เชื้อมาลาเรียที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 ปริมาตร

100 มิลลิลิตร ซีรัมของมนุษย์ ปริมาตร 10.4 มิลลิลิตร และโซเดียมไบคาร์บอเนต ความเข้มข้น 5% ปริมาตร 6.0 มิลลิลิตร

ใช้ถาดแบบ 96 หลุม แต่ละหลุมมีเชื้อมาลาเรียเริ่มต้นเท่ากับ 0.3% ทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส หลังจากบ่มเชื้อในตู้ควบคุมอุณหภูมิครบ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง นำเชื้อออกมาเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อพร้อมทำฟิล์มเลือดบาง (ภาพที่ 25)



ภาพที่ 25 การเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียในการทดสอบความเป็นกรด - ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ในถาดแบบ 96 หลุม หลุมสีแดง คือ หลุมที่ใส่ตัวอย่างเชื้อมาลาเรีย หลุมสีขาว คือ หลุมที่ไม่ใส่เชื้อมาลาเรีย

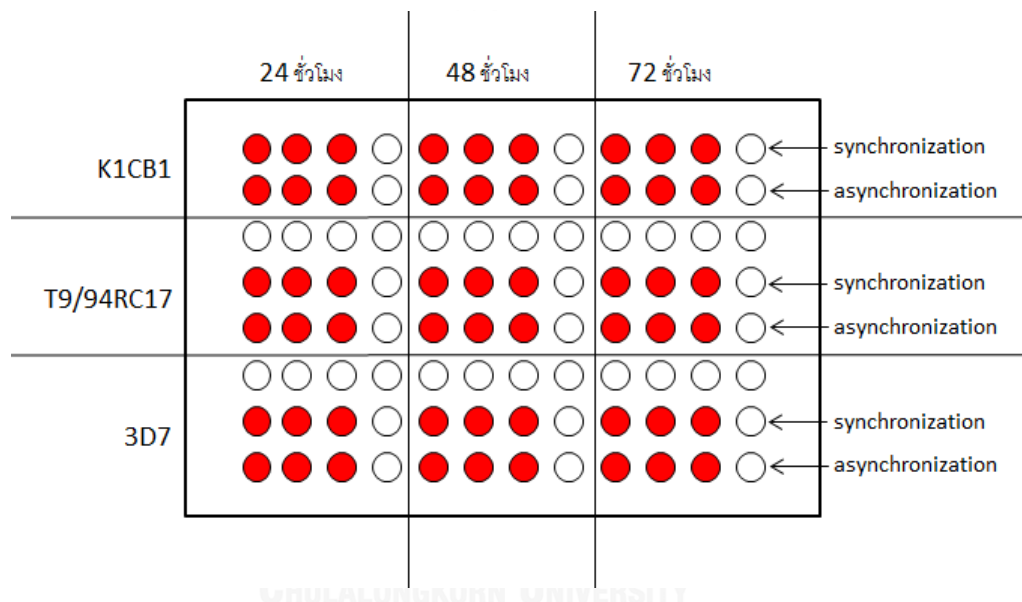
10.1.3 แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์

การทดสอบผลของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

1. กลุ่มที่เลี้ยงในสภาวะเดียวกันตลอดการเลี้ยงเชื้อ แบ่งออกเป็น

- กลุ่มควบคุม: กลุ่มที่เลี้ยงในโถดูดความชื้นที่มีการจืดเทียนอยู่ภายใน
- กลุ่มทดลอง: กลุ่มที่เลี้ยงในโถดูดความชื้นที่ไม่มีการจืดเทียนอยู่ภายใน

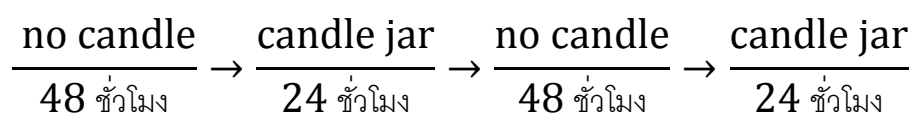
ทั้ง 2 กลุ่มจะเลี้ยงเชื้อแบบเดียวกัน ใช้ภาชนะ 96 หลุม แต่ละหลุมมีเชื้อมาลาเรียเริ่มต้นเท่ากับ 0.3% ใสในโถดูดความชื้น โดยกลุ่มควบคุมมีการจืดเทียนก่อนปิดฝา เช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงเชื้ออย่างต่อเนื่อง ในขณะที่กลุ่มทดลองไม่ต้องจืดเทียนก่อนปิดฝาและนำเข้าตู้ควบคุมอุณหภูมิคงที่ที่ 37 องศาเซลเซียส หลังจากบ่มเชื้อในตู้ควบคุมอุณหภูมิครบ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง นำเชื้อออกมาเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อพร้อมทำฟิล์มเลือดบาง (ภาพที่ 26)



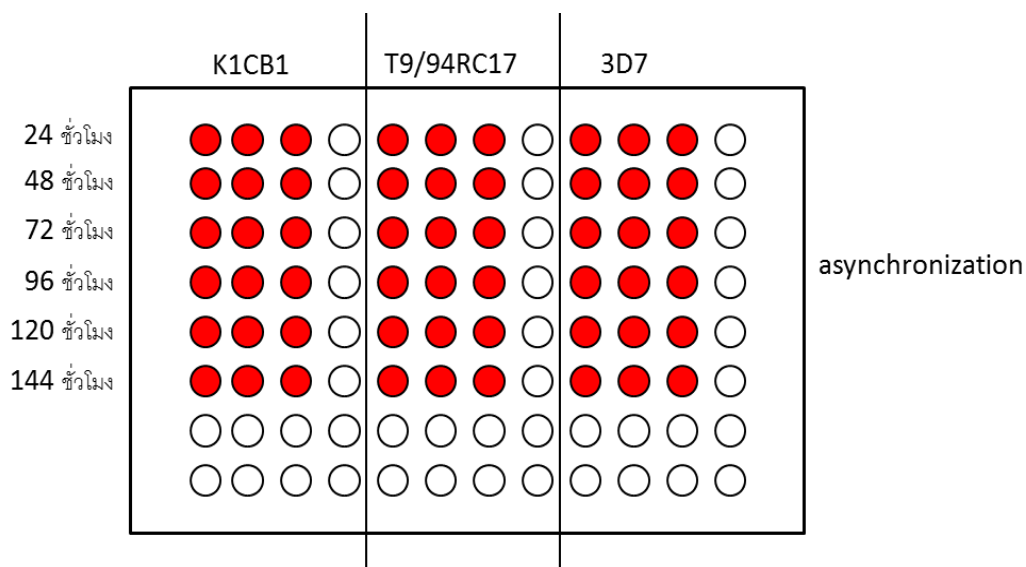
ภาพที่ 26 การเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียในการทดสอบผลของคาร์บอนไดออกไซด์ในภาชนะ 96 หลุม หลุมสีแดง คือ หลุมที่ใส่ตัวอย่างเชื้อมาลาเรีย หลุมสีขาว คือ หลุมที่ไม่ใส่เชื้อมาลาเรีย

2. กลุ่มที่เลี้ยงเชื้อในบรรยากาศปกติสลับกับการเลี้ยงภายในภาชนะที่มีการจืดเทียน

- กลุ่มควบคุม เลี้ยงเชื้อโดยมีการจืดเทียนในโถดูดความชื้น
- กลุ่มทดลอง นำไปเลี้ยงในสภาวะอากาศ ดังนี้



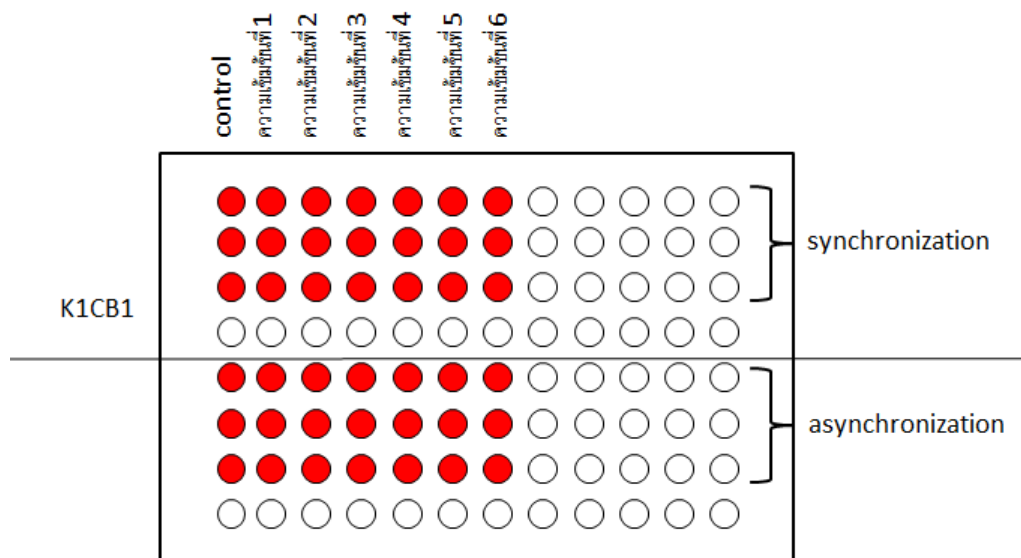
ใช้ถาดแบบ 96 หลุม แต่ละหลุมมีเชื้อมาลาเรียเริ่มต้นเท่ากับ 0.3% ทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส หลังจากบ่มเชื้อในตู้ควบคุมอุณหภูมิครบ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง นำเชื้อออกมาเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อพร้อมทำฟิล์มเลือดบาง (ภาพที่ 27)



ภาพที่ 27 การเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียในการทดสอบผลของคาร์บอนไดออกไซด์ ในกลุ่มที่เลี้ยงเชื้อในภาชนะที่ไม่มีการจุดเทียนสลับกับการเลี้ยงเชื้อภายในภาชนะที่มีการจุดเทียน

10.2 ปัจจัยทางเคมี

ในการทดสอบปัจจัยทางเคมี แต่ละการทดลอง เลี้ยงเชื้อมาลาเรียในถาดแบบ 96 หลุม แต่ละหลุมมีเชื้อมาลาเรียเริ่มต้นเท่ากับ 0.3% ทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส หลังจากบ่มเชื้อในตู้ควบคุมอุณหภูมิครบ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง นำเชื้อออกมาเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อพร้อมทำฟิล์มเลือดบาง (ภาพที่ 28)



ภาพที่ 28 ตัวอย่างการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียในการทดสอบปัจจัยทางเคมี ในถาดแบบ 96 หลุม หลุมสีแดง คือ หลุมที่ใส่ตัวอย่างเชื้อมาลาเรีย หลุมสีขาว คือ หลุมที่ไม่ใส่เชื้อมาลาเรีย

สารเคมีที่นำมาทดสอบว่ามีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ได้แก่ สารเคมีในกลุ่มยาปฏิชีวนะ ซีรัม วิตามิน น้ำตาลและเกลือโดยใช้ความเข้มข้นดังต่อไปนี้

10.2.1 ยาปฏิชีวนะ

- **เพนิซิลลิน:** กลุ่มควบคุม คือ เชื้อมาลาเรียที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อปกติที่ไม่มีเพนิซิลลินและใส่น้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อลงไป ปริมาณเท่ากับเพนิซิลลินที่ใสในกลุ่มทดลอง

ส่วนกลุ่มทดลอง คือ เชื้อมาลาเรียที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเพนิซิลลิน โดยทดลองที่ความเข้มข้น 50, 500, 5000 และ 50000 Units

- **ลินโคมายซิน:** กลุ่มควบคุม คือ เชื้อมาลาเรียที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อปกติที่ไม่มีลินโคมายซินและใส่น้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อลงไป ปริมาณเท่ากับลินโคมายซินที่ใสในกลุ่มทดลอง

ส่วนกลุ่มทดลอง คือ เชื้อมาลาเรียที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีลินโคมายซิน โดยทดลองที่ความเข้มข้น 5×10^{-8} , 5×10^{-7} , 5×10^{-6} , 5×10^{-5} และ 5×10^{-4} ไมคราร์

10.2.2 ซีรัมของมนุษย์

กลุ่มควบคุม คือ เชื้อมาลาเรียที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซีรัมของมนุษย์เข้มข้น 10%

ส่วนกลุ่มทดลอง คือ เชื้อมาลาเรียที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซีรัมของมนุษย์เข้มข้น 4.8%, 7.2% และ 12%

10.2.3 วิตามินซี

กลุ่มควบคุม คือ เชื้อมาลาเรียที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีสารละลายวิตามินซีและใส่น้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อลงไปปริมาณเท่ากับสารละลายวิตามินซีที่ใส่ในกลุ่มทดลอง

ส่วนกลุ่มทดลอง คือ เชื้อมาลาเรียที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารละลายวิตามินซี โดยทดลองที่ความเข้มข้น 1×10^{-5} , 5×10^{-5} , 1×10^{-4} , 5×10^{-4} , 1×10^{-3} และ 5×10^{-3} ไมลาร์

10.2.4 น้ำตาล

- **กลูโคส:** กลุ่มควบคุม คือ เชื้อมาลาเรียที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีสารละลายกลูโคสและใส่น้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อลงไปปริมาณเท่ากับสารละลายกลูโคสที่ใส่ในกลุ่มทดลอง

ส่วนกลุ่มทดลอง คือ เชื้อมาลาเรียที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารละลายกลูโคส โดยทดลองที่ความเข้มข้น 5×10^{-5} , 5×10^{-4} , 5×10^{-3} , 5×10^{-2} และ 5×10^{-1} ไมลาร์

- **ซอร์บิทอล:** กลุ่มควบคุม คือ เชื้อมาลาเรียที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีสารละลายซอร์บิทอลและใส่น้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อลงไปปริมาณเท่ากับสารละลายซอร์บิทอลที่ใส่ในกลุ่มทดลอง

ส่วนกลุ่มทดลอง คือ เชื้อมาลาเรียที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารละลายซอร์บิทอล โดยทดลองที่ความเข้มข้น 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4% และ 0.5%

10.2.5 เกลือ

- **ไซเดียมคลอไรด์:** กลุ่มควบคุม คือ เชื้อมาลาเรียที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีสารละลายไซเดียมคลอไรด์และใส่น้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อลงไปปริมาณเท่ากับสารละลายไซเดียมคลอไรด์ที่ใส่ในกลุ่มทดลอง

ส่วนกลุ่มทดลอง คือ เชื้อมาลาเรียที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารละลายไซเดียมคลอไรด์โดยทดลองที่ความเข้มข้น 0.05%, 0.10%, 0.15% และ 0.20%

- **แคลเซียมคลอไรด์:** กลุ่มควบคุม คือ เชื้อมาลาเรียที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีสารละลายแคลเซียมคลอไรด์และใส่น้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อลงไปปริมาณเท่ากับสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ใส่ในกลุ่มทดลอง

ส่วนกลุ่มทดลอง คือ เชื้อมาลาเรียที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ โดยทดลองที่ความเข้มข้น 0.75%, 0.80%, 0.85%, 0.90%, 0.95% และ 1.00%

11. การเตรียมสารละลายไซเดียมไปคาร์บอเนต ความเข้มข้น 5%

นำไซเดียมไปคาร์บอเนตชนิดผง (MERCK, Germany) 5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำสารละลายทั้งหมดไปกรองผ่านแผ่นกรองมิลลิพอร์ขนาด 0.22 ไมครอนเมตร และนำไปแบ่งใส่ขวดแก้วที่ปราศจากเชื้อ ขวดละ 50 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 – 10 องศาเซลเซียส

12. การเตรียมสารละลายซอร์บิทอล ความเข้มข้น 5%

นำซอร์บิทอลชนิดผง (FLUKA, Switzerland) 5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำมาแบ่งใส่หลอดทดลองฝาเกลียว หลอดละ 10 มิลลิลิตร นำไปนึ่งในหม้อนึ่งอัดไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 – 10 องศาเซลเซียส

13. การเตรียมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 3.5%

นำโซเดียมคลอไรด์ (BDH Laboratory, England) 3.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งในหม้อนึ่งอัดไอน้ำ ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แบ่งใส่หลอดทดลองฝาเกลียว หลอดละ 10 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 – 10 องศาเซลเซียส

14. การเตรียมกระจกสไลด์

กระจกสไลด์ที่ใช้ในการทำฟิล์มเลือด มีขนาดกว้าง 1 นิ้ว ยาว 3 นิ้ว นำไปทำความสะอาดให้ปราศจากคราบไขมันที่ตกค้างบนกระจกสไลด์ โดยแช่ในแอลกอฮอล์ 95% (ปริมาณของแอลกอฮอล์ต้องท่วมมิดกระจกสไลด์) เป็นเวลาอย่างน้อย 1 สัปดาห์ (ภาพที่ 29) นำมาเช็ดให้สะอาดและเก็บใส่กล่องกระจกสไลด์เดิมไว้ในอุณหภูมิห้อง (ภาพที่ 30) ส่วนกระจกสไลด์สำหรับเลือกกระจกสไลด์แผ่นที่มีปลายเรียบมาใช้เป็นกระจกสไลด์สำหรับไทเพื่อที่จะได้ฟิล์มเลือดที่เรียบสามารถตรวจดูเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ง่าย (สมชาย จงวุฒิเวศย์, 2549)



ภาพที่ 29 กระจกสไลด์แช่ในแอลกอฮอล์ 95%



ภาพที่ 30 การเช็ดกระจกสไลด์ด้วยผ้าสะอาด

15. การเตรียมสีย้อม Giemsa

บดผงสีย้อม Giemsa's azur-eosin-methylene blue (MERCK, Germany) น้ำหนัก 6 กรัม กับกลีเซอรอล (MERCK, Germany) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่ละน้อยในโถรงบดสารจนละเอียด บดจนผงสีหมดแล้วจึงล้างสีที่เหลือติดโถรงด้วยกลีเซอรอล ถ่ายสารละลายทั้งหมดลงในขวดสีชา นำไปบ่มในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 50 – 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 8 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ก่อนเติมเมทานอล ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 สัปดาห์ หรือบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 เดือน เมื่อต้องการนำมาใช้ให้แบ่งใส่ขวดเล็กมาใช้

16. การเตรียม Solution A และ Solution B

Solution A (Na_2HPO_4) เตรียมจากผงไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (United Chemicals, USA) น้ำหนัก 9.464 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 1 ลิตร

Solution B (KH_2PO_4) เตรียมจากผงโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (United Chemicals, USA) น้ำหนัก 9.073 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 1 ลิตร

17. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารเคมีชนิดต่าง ๆ

ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารเคมีชนิดต่าง ๆ เริ่มต้นจากการเตรียมสารเคมีที่มีความเข้มข้นมากกว่าความเข้มข้นที่ต้องการเพื่อใช้เป็นสต็อกของแต่ละความเข้มข้น แล้วเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ ซึ่งเตรียมสต็อกและอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ทุกครั้งเมื่อเริ่มต้นการทดลองหรือเมื่อเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการทดลอง

17.1 ยาปฏิชีวนะ

17.1.1 เพนิซิลลิน

เตรียมเพนิซิลลิน (Bio Basic, Canada) ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 5000000 Units เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อให้มีความเข้มข้นต่ำกว่าเดิม 10 เท่า จำนวน 4 ครั้ง จะได้เพนิซิลลินเข้มข้น 500000, 50000, 5000 และ 500 Units ใช้ความเข้มข้น 4 ความเข้มข้นที่เจือจาง

แล้วนี้เป็นสต็อกในการเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเข้มข้นต่ำกว่าเดิมอีก 10 เท่า จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50000, 5000, 500 และ 50 Units

17.1.2 ลินโคมายซิน

เตรียมลินโคมายซิน (T.P. DRUG LABORATORIES, Thailand) ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 5×10^{-3} โมลาร์ เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อให้มีความเข้มข้นต่ำกว่าเดิม 10 เท่า จำนวน 4 ครั้ง ได้ลินโคมายซินเข้มข้น 5×10^{-4} , 5×10^{-5} , 5×10^{-6} , 5×10^{-7} โมลาร์ ใช้ความเข้มข้นเหล่านี้ทั้ง 5 ความเข้มข้นเป็นสต็อกในการเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเข้มข้นต่ำกว่าเดิมอีก 10 เท่า จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5×10^{-4} , 5×10^{-5} , 5×10^{-6} , 5×10^{-7} และ 5×10^{-8} โมลาร์

17.2 ซีรัมของมนุษย์

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบปกติเพียงแต่เปลี่ยนปริมาตรของซีรัมที่ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

- ความเข้มข้น 4.8%: ใส่ซีรัม 5 มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และโซเดียมไบคาร์บอเนต 4.2 มิลลิลิตร
- ความเข้มข้น 7.2%: ใส่ซีรัม 7.5 มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และโซเดียมไบคาร์บอเนต 4.2 มิลลิลิตร
- ความเข้มข้น 10% (กลุ่มควบคุม): ใส่ซีรัม 10.4 มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และโซเดียมไบคาร์บอเนต 4.2 มิลลิลิตร
- ความเข้มข้น 12%: ใส่ซีรัม 12.5 มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อ RPM 1640 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และโซเดียมไบคาร์บอเนต 4.2 มิลลิลิตร

17.3 วิตามินซี

เตรียมวิตามินซี (Bio Basic, Canada) ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 1 โมลาร์ เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อให้ได้วิตามินที่มีความเข้มข้น 5×10^{-1} , 1×10^{-1} , 5×10^{-2} , 1×10^{-2} , 5×10^{-3} และ 1×10^{-3} โมลาร์ ใช้ความเข้มข้นเหล่านี้ทั้ง 6 ความเข้มข้นเป็นสต็อกในการเจือจาง

ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเข้มข้นต่ำกว่าเดิมอีก 100 เท่า ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5×10^{-3} , 1×10^{-3} , 5×10^{-4} , 1×10^{-4} , 5×10^{-5} และ 1×10^{-5} โมลาร์

17.4 น้ำตาล

17.4.1 กลูโคส

เตรียมสารละลายกลูโคส (Ajax Finechem, Australia & New Zealand) ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 5 โมลาร์ แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อให้มีความเข้มข้นต่ำกว่าเดิม 10 เท่า จำนวน 4 ครั้ง จะได้สารละลายกลูโคสเข้มข้น 5×10^{-1} , 5×10^{-2} , 5×10^{-3} , 5×10^{-4} โมลาร์ ใช้ความเข้มข้นเหล่านี้ทั้ง 5 ความเข้มข้นเป็นสต็อกในการเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเข้มข้นต่ำกว่าเดิมอีก 10 เท่า ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5×10^{-1} , 5×10^{-2} , 5×10^{-3} , 5×10^{-4} และ 5×10^{-5} โมลาร์

17.4.2 ซอร์บิทอล

เตรียมสารละลายซอร์บิทอล (FLUKA, Switzerland) ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 5% เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อให้มีความเข้มข้น 4%, 3%, 2% และ 1% ใช้ความเข้มข้นเหล่านี้ทั้ง 5 ความเข้มข้นเป็นสต็อกในการเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเข้มข้นต่ำกว่าเดิมอีก 10 เท่า ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5%, 0.4%, 0.3%, 0.2% และ 0.1%

17.5 เกลือ

17.5.1 โซเดียมคลอไรด์

เตรียมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (BDH Laboratory, England) ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 10% เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 2.0%, 1.5%, 1.0% และ 0.5% ใช้ความเข้มข้นทั้ง 4 ความเข้มข้นเป็นสต็อกในการเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเข้มข้นต่ำกว่าเดิมอีก 10 เท่า ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.20%, 0.15%, 0.10% และ 0.05%

17.5.2 แคลเซียมคลอไรด์

เตรียมสารละลายไฮเดียมคลอไรด์ (BDH Laboratory, England) ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 10% เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อให้มีความเข้มข้น 9.5%, 9.0%, 8.5%, 8.0% และ 7.5% ใช้ความเข้มข้นเหล่านี้ทั้ง 6 ความเข้มข้นเป็นสต็อกในการเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเข้มข้นต่ำกว่าเดิมอีก 10 เท่า จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.00%, 0.95%, 0.90%, 0.85%, 0.80% และ 0.75%



บทที่ 4

ผลการทดลอง

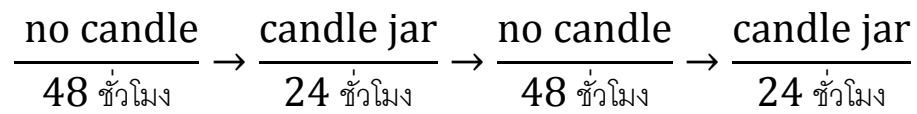
งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการทดสอบปัจจัยทางกายภาพและเคมีที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 โดยนำเชื้อเริ่มต้นที่เก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวมาเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงในหลอดความชื้นที่จุดเทียน (Jensen and Trager, 1977) ก่อนนำมาทดสอบปัจจัยทางกายภาพและเคมี เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ปัจจัยทางกายภาพที่ทดสอบ ได้แก่

- อุณหภูมิ ในการทดลองนี้แบ่งการทดสอบออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่เลี้ยงในสภาวะเดียวตลอดการเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิที่ใช้ คือ 4, 34, 37 (กลุ่มควบคุม) และ 40 องศาเซลเซียส และกลุ่มที่มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิระหว่างการเลี้ยงเชื้อภายใน 120 ชั่วโมง โดยใช้ อุณหภูมิ ดังนี้

$$\frac{40\text{ }^{\circ}\text{C}}{24\text{ ชั่วโมง}} \rightarrow \frac{4\text{ }^{\circ}\text{C}}{24\text{ ชั่วโมง}} \rightarrow \frac{40\text{ }^{\circ}\text{C}}{24\text{ ชั่วโมง}} \rightarrow \frac{37\text{ }^{\circ}\text{C}}{48\text{ ชั่วโมง}}$$

- ความเป็นกรด – ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ทดลองโดยการเพิ่มหรือลดปริมาณของ โซเดียมไบคาร์บอเนตในอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าความเป็นกรด – ด่าง เท่ากับ 6.9, 7.0 (กลุ่มควบคุม) และ 7.3
- แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ในการทดลองนี้แบ่งการทดสอบออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่เลี้ยงในสภาวะเดียวตลอดการเลี้ยงเชื้อ คือ เลี้ยงในหลอดความชื้นที่มีการจุดเทียน (กลุ่มควบคุม คือ การเพาะเลี้ยงเชื้อในหลอดความชื้นที่มีการจุดเทียน) และกลุ่มที่มีการเปลี่ยนแปลงสภาวะภายในภาชนะที่ใช้เลี้ยงเชื้อ โดยเลี้ยงเชื้อในบรรยากาศปกติ (ในหลอดความชื้นที่ไม่มีการจุดเทียน) สลับกับการเลี้ยงภายในหลอดความชื้นที่มีการจุดเทียน ดังนี้



ปัจจัยทางเคมีที่ทดสอบ ได้แก่

- ยาปฏิชีวนะ
 - เพนิซิลลิน ทดลองที่ความเข้มข้น 0 (กลุ่มควบคุม), 50, 500, 5000 และ 50000 Units
 - ลินโคมายซิน ทดลองที่ความเข้มข้น 0 (กลุ่มควบคุม), 5×10^{-8} , 5×10^{-7} , 5×10^{-6} , 5×10^{-5} และ 5×10^{-4} ไมลาร์
- ความเข้มข้นของซีรัมของมนุษย์ ทดลองที่ความเข้มข้น 4.8%, 7.2%, 10% (กลุ่มควบคุม) และ 12%
- วิตามินซี ทดลองที่ความเข้มข้น 0 (กลุ่มควบคุม), 1×10^{-5} , 5×10^{-5} , 1×10^{-4} , 5×10^{-4} , 1×10^{-3} และ 5×10^{-3} ไมลาร์
- น้ำตาล
 - กลูโคส ทดลองที่ความเข้มข้น 0 (กลุ่มควบคุม), 5×10^{-5} , 5×10^{-4} , 5×10^{-3} , 5×10^{-2} และ 5×10^{-1} ไมลาร์
 - ซอร์บิทอล ทดลองที่ความเข้มข้น 0 (กลุ่มควบคุม), 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4% และ 0.5%
- และเกลือ
 - โซเดียมคลอไรด์ ทดลองที่ความเข้มข้น 0 (กลุ่มควบคุม), 0.05%, 0.10%, 0.15% และ 0.20%
 - แคลเซียมคลอไรด์ ทดลองที่ความเข้มข้น 0 (กลุ่มควบคุม), 0.75%, 0.80%, 0.85%, 0.90%, 0.95% และ 1.00%

ผลการทดลองของงานวิจัยในครั้งนี้จะแสดงในรูปของ % parasitaemia ซึ่งคำนวณมาจากการนับเซลล์เม็ดเลือดแดงบนฟิล์มเลือดบางที่ผ่านการย้อมด้วยสี Giemsa ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบไข้วแสง โดยแสดงจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงทั้งหมดที่ติดเชื้อมาลาเรีย (total parasites) จำนวนเชื้อมาลาเรียในระยะวงแหวน (ring stage) และระยะที่ไม่ใช่วงแหวน (non-

ring stage) การแสดงจำนวนเชื้อมาลาเรียในระยะวงแหวนแยกออกจากระยะที่ไม่ใช่วงแหวน เนื่องจากในการทดลองที่ใช้เชื้อมาลาเรียที่อยู่ในระยะเดียวกันเริ่มการทดลองโดยใช้เชื้อในระยะวงแหวน ซึ่งสามารถทำได้โดยใช้สารละลายซอร์บิทอลไปทำลายเชื้อระยะอื่น ๆ เหลือเพียงเชื้อระยะวงแหวนที่ไม่ถูกทำลายไป และเชื้อระยะวงแหวนกับระยะอื่น ได้แก่ mid และ late trophozoite และ schizont สามารถเห็นความแตกต่างได้อย่างชัดเจนเมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นอกจากนี้ในการทดสอบยาหรือสารเคมีควรเริ่มต้นการทดสอบด้วยเชื้อที่อยู่ในระยะเดียวกัน คือ ระยะวงแหวน เพื่อช่วยในการวิเคราะห์ผล เนื่องจากเชื้อในระยะวงแหวนและระยะไม่ใช่วงแหวนมีผลต่อสารเคมีแต่ละชนิดแตกต่างกัน ดังนั้นในการศึกษาคั้งนี้จึงเลือกใช้เชื้อที่อยู่ในระยะวงแหวนและระยะไม่ใช่วงแหวนในการทดสอบ

รูปแบบการเจริญของเชื้อมาลาเรีย

เมื่อติดตามการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ทุก ๆ 6 ชั่วโมงอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่าเชื้อทุกสายพันธุ์ที่ทำให้อยู่ในระยะเดียวกัน (synchronized parasite) มีแนวโน้มในการเจริญไปในทางเดียวกัน คือ เริ่มจากเชื้อในระยะวงแหวน เชื้อส่วนใหญ่จะพัฒนาไปเป็นเชื้อในระยะไม่ใช่วงแหวน (non-ring) ภายใน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นภายในเวลา 42 – 48 ชั่วโมง เชื้อส่วนใหญ่จะพัฒนาไปเป็นเชื้อในระยะวงแหวน และพัฒนาเข้าสู่ระยะไม่ใช่วงแหวนอีกครั้งที่เวลา 60 – 72 ชั่วโมง ในช่วงสุดท้ายเชื้อจะพัฒนากลับไปเป็นเชื้อในระยะวงแหวนที่เวลา 84 ชั่วโมง โดยเชื้อ T9/94RC17 และ 3D7 จะมีค่า % parasitaemia สูงกว่า K1CB1 อย่างเห็นได้ชัด ซึ่งแสดงถึงอัตราการเจริญ (growth rate) ของเชื้อ T9/94RC17 และ 3D7 ที่สูงกว่าเชื้อ K1CB1 (ภาพที่ 31) อย่างไรก็ตามค่า % total parasitaemia สูงสุดของเชื้อมาลาเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ มีค่าไม่คงที่ตลอดงานวิจัย อาจจะขึ้นอยู่กับค่า % parasitaemia เริ่มต้นของเชื้อมาลาเรีย หรืออายุของระยะวงแหวนที่เวลา 0 ชั่วโมง

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อมาลาเรียจะมีวัฏจักรในเซลล์เม็ดเลือดแดงแต่ละรอบประมาณ 42 – 48 ชั่วโมง เช่นเดียวกับที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ (สมชาย จงวุฒิวาศย์ และ จตุรงค์ พุทธิพรทิพย์, 2549) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงกำหนดให้ระยะเวลาในการทดสอบปัจจัยทางกายภาพและเคมีกับเชื้อมาลาเรียเป็นเวลา 72 ชั่วโมง หรือ 1 รอบครึ่งของวัฏจักร เพื่อให้สามารถดูผลของ

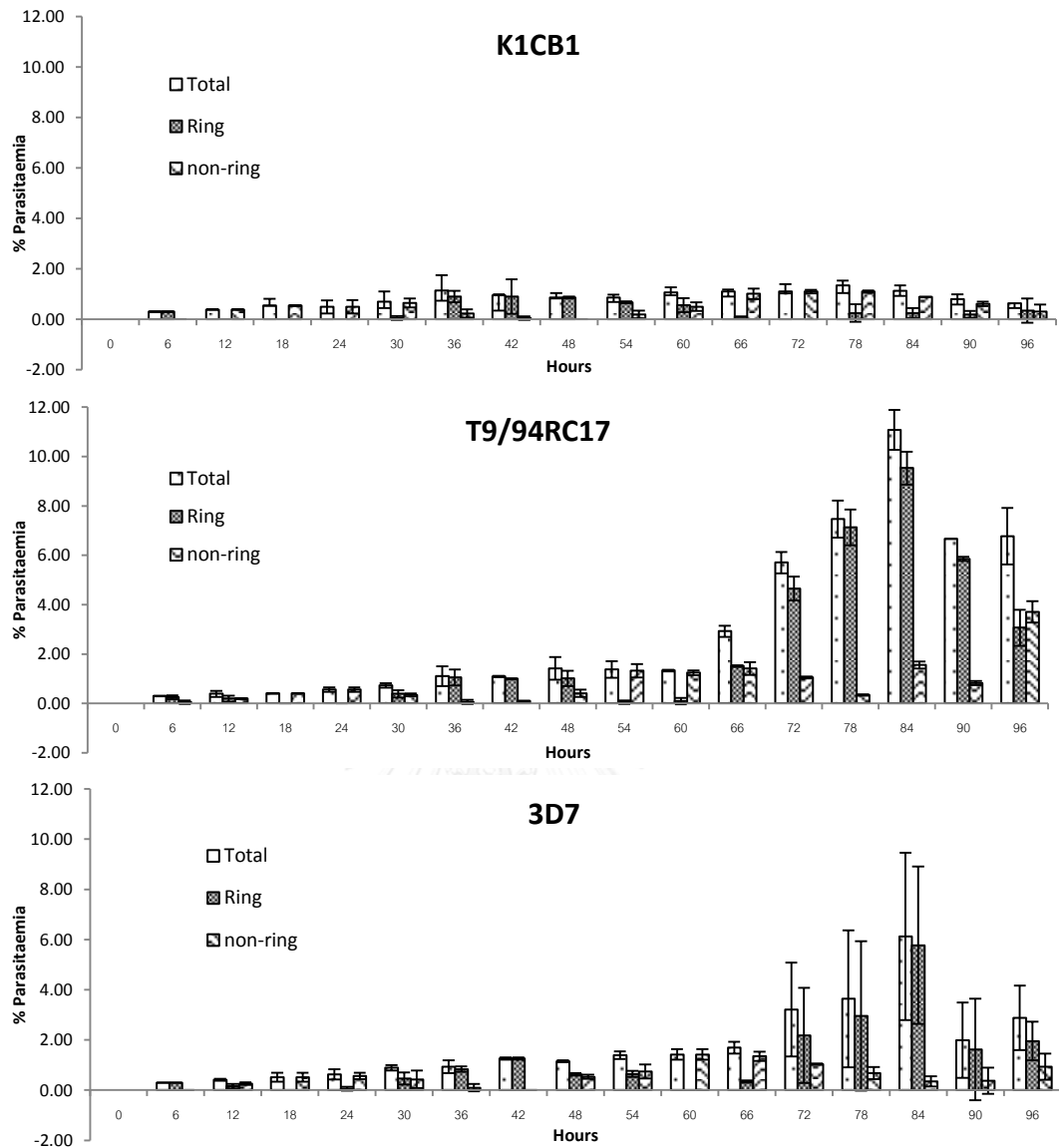
ปัจจัยเหล่านี้ต่อระยะต่าง ๆ ของเชื้อมาลาเรียอย่างชัดเจนโดยใช้เวลาไม่มาก การทดสอบปัจจัยทางกายภาพและเคมีกับเชื้อมาลาเรียเริ่มต้นทั้ง 2 แบบ คือ เชื้อมาลาเรียแบบระยะเดียว และเชื้อมาลาเรียแบบหลายระยะ (asynchronous parasite) ไปพร้อมกัน ซึ่งเชื้อมาลาเรียแบบหลายระยะ เป็นสภาวะของเชื้อมาลาเรียที่สามารถพบได้ในการเพาะเลี้ยงเชื้ออย่างต่อเนื่อง

ก่อนการทดสอบปัจจัยต่าง ๆ ในทุกการทดลอง เชื้อมาลาเรียบางส่วนจากการเพาะเลี้ยงเชื้ออย่างต่อเนื่อง ทั้งเชื้อมาลาเรียแบบระยะเดียวและเชื้อมาลาเรียแบบหลายระยะ จะถูกนำมาเจือจางให้มีค่า % total parasitaemia ประมาณ 0.3% โดยการเติมเลือดที่ไม่มีเชื้อมาลาเรีย หลังจากนั้นจึงแบ่งใส่ลงในหลอดแบบ 96 หลุม เพื่อทำการทดสอบปัจจัยต่าง ๆ ต่อไป และเชื้อมาลาเรียบางส่วนจะถูกนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อปกติ (10% human serum) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเพิ่มแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ภายในโถดูความขึ้นโดยการจุดเทียน เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุม (control) สำหรับการเปรียบเทียบและวิเคราะห์ผล ตลอดทั้ง 72 ชั่วโมงของการทดลองจะไม่มี การเติมเลือดเพิ่มเติม แต่มีการเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อทุก 24 ชั่วโมง หลังจากการนำเชื้อมาลาเรียเข้าปมในตู้ควบคุมอุณหภูมิ (โดยเริ่มต้นนับเวลาเมื่อนำเชื้อมาลาเรียเข้าสู่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ) ในกรณีที่ทดสอบปัจจัยทางกายภาพ สภาวะในการเลี้ยงเชื้อจะถูกเปลี่ยนไปจากสภาวะปกติ ขณะที่การทดสอบปัจจัยทางเคมี ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่เปลี่ยนจะมีสารเคมีที่ใช้ทดสอบเพื่อให้เชื้อมาลาเรียได้รับสารเคมีในความเข้มข้นที่กำหนดไว้ตลอดการทดลอง

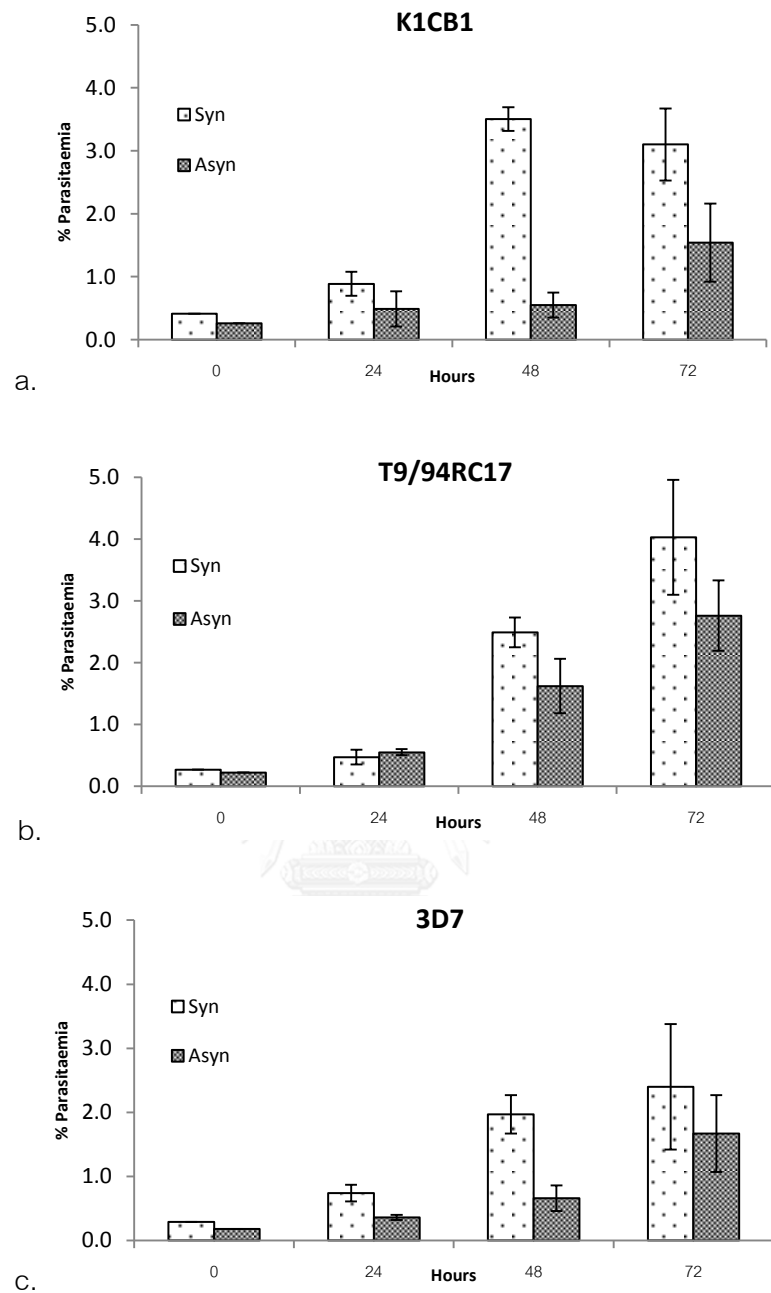
เมื่อเปรียบเทียบค่า % total parasitaemia ของเชื้อมาลาเรียแบบระยะเดียวกัน และเชื้อมาลาเรียแบบหลายระยะ ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่า ค่า % total parasitaemia ของเชื้อมาลาเรียทั้งสองแบบมีการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ตั้งแต่ที่เวลา 0 ชั่วโมงจนถึงที่เวลา 72 ชั่วโมง โดยในช่วงแรก (ที่เวลา 0 – 24 ชั่วโมง) มีค่า % total parasitaemia เพิ่มขึ้นไม่มากนัก หลังจากนั้น (ที่เวลา 24 – 48 ชั่วโมง) ค่า % total parasitaemia จะเพิ่มขึ้นสูงมาก (ภาพที่ 32) เนื่องจากเชื้อมาลาเรียส่วนใหญ่ที่อยู่ในระยะ schizont แตกออกในเวลาใกล้เคียงกัน และปล่อยเชื้อในระยะ merozoite จำนวนมากเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงเซลล์ใหม่ ทำให้มีเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรียเพิ่มมากขึ้น ยกเว้นเชื้อ K1CB1 ที่มีค่าเพิ่มขึ้นจนถึงที่เวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งมีค่า % total parasitaemia สูงที่สุด จากนั้น % total parasitaemia มีค่าลดลงที่เวลา 72 ชั่วโมง ทั้งนี้อาจเป็น

ผลมาจากการมี % total parasitaemia สูงเกินไปที่เวลา 48 ชั่วโมง ทำให้สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากสารอาหารไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียหรือมีการสะสมของของเสียในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 32) เชื้อมาลาเรียที่มี % total parasitaemia เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วแล้วลดลงอย่างทันที แสดงว่า เชื้อเกิดการ overgrowth ทั้งนี้ค่า % total parasitaemia สูงสุดก่อนการตายของเชื้อมาลาเรียในแต่ละสายพันธุ์ และแต่ละการทดลองอาจมีค่าไม่เท่ากัน

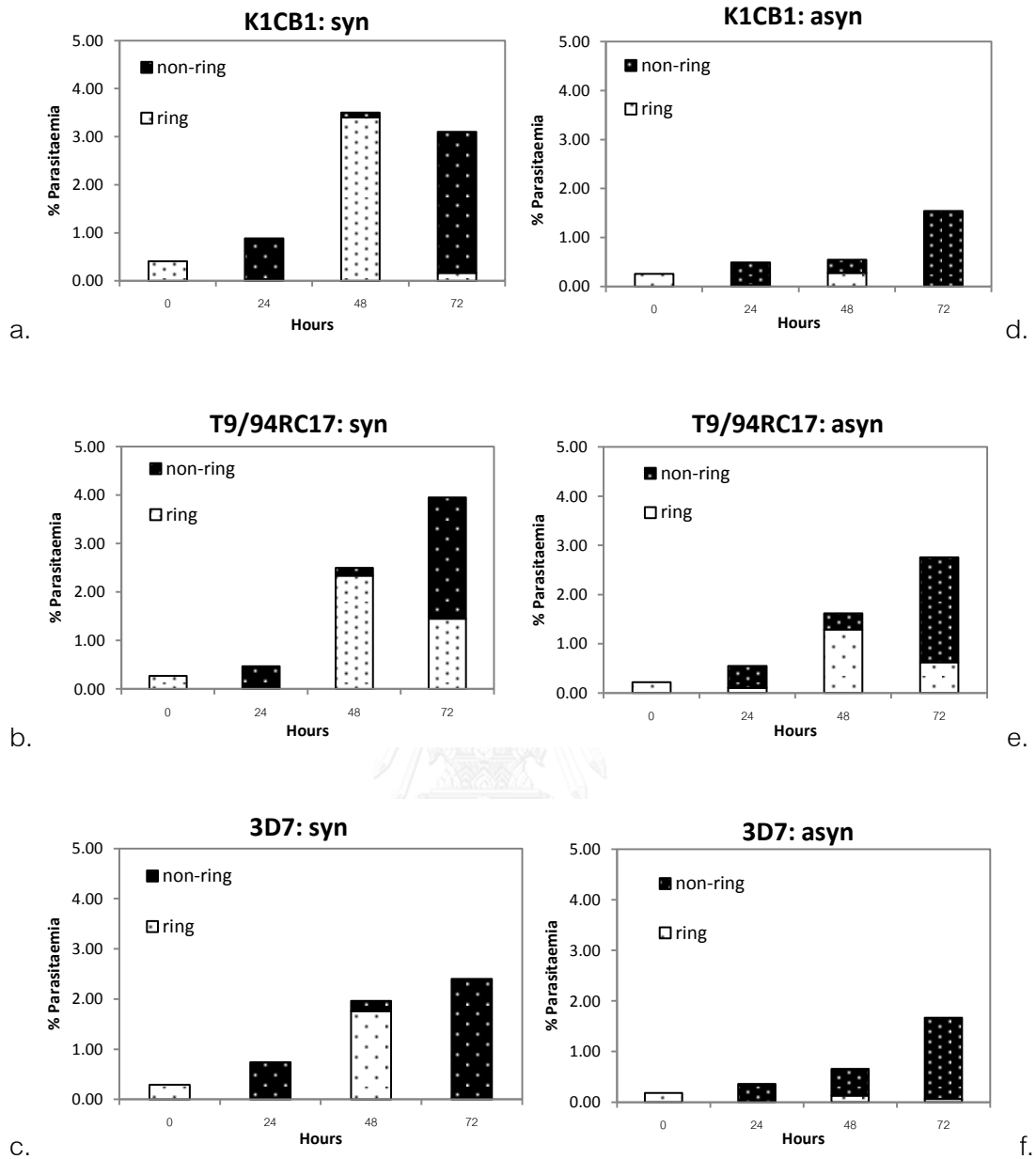
ในกระบวนการคัดเลือกเชื้อมาลาเรียให้เป็นเชื้อมาลาเรียแบบระยะเดียวกันนั้น เชื้อในระยะ schizont ถูกทำลายโดยการเติมสารละลายซอร์บิทอล เชื้อมาลาเรียส่วนใหญ่ในเซลล์เม็ดเลือดแดงที่เหลืออยู่จึงเป็นเชื้อในระยะวงแหวนเกือบทั้งหมด เมื่อนำเชื้อมาลาเรียเหล่านี้มาใช้ในการทดลอง เชื้อมีพัฒนาการไปพร้อมกัน เมื่อตรวจสอบระยะของเชื้อมาลาเรีย K1CB1 และ 3D7 ทุก 24 ชั่วโมง มักพบว่าเชื้อมาลาเรียส่วนใหญ่อยู่ในระยะใดระยะหนึ่งเกือบทั้งหมดตลอดช่วงการทดลอง เช่น ที่เวลา 48 ชั่วโมง เชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ อยู่ในระยะวงแหวน ส่วนที่เวลา 24 และ 72 ชั่วโมง เชื้ออยู่ในระยะไม่ใช่วงแหวน ดังแสดงในภาพที่ 33 ยกเว้นเชื้อ T9/94RC14 ที่พบทั้งระยะวงแหวนและระยะไม่ใช่วงแหวนอยู่ในสัดส่วนใกล้เคียงกันที่เวลา 72 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าเชื้อ T9/94RC14 สูญเสียสภาวะการเป็นเชื้อมาลาเรียระยะเดียวกันอย่างรวดเร็วเมื่อเทียบกับ K1CB1 และ 3D7 แต่ในกรณีของเชื้อมาลาเรียแบบหลายระยะมักพบเชื้อมาลาเรียในระยะไม่ใช่วงแหวนในสัดส่วนที่สูงกว่าระยะวงแหวน ในเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่างมาตรวจสอบ แสดงให้เห็นว่าเชื้อมาลาเรียในแต่ละระยะต่างก็มีพัฒนาการไปพร้อมกัน



ภาพที่ 31 กราฟแสดงค่าเฉลี่ย % parasitemia (mean \pm SD) ของเชื้อมาลาเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อปกติ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ที่ อุณหภูมิคงที่ 37 องศาเซลเซียส ภายในโถที่เติมแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยการจุดเทียน (Trager and Jensen, 1976) โดยใช้เชื้อมาลาเรียแบบระยะเดียว (synchronized parasite) ซึ่งเชื้อ มาลาเรียเกือบทั้งหมดเป็นเชื้อในระยะวงแหวนที่เวลา 0 ชั่วโมง โดย \square แสดงถึง ค่า % parasitaemia ของเชื้อมาลาเรียทุกระยะ, ▨ แสดงถึง ค่า % parasitaemia ของเชื้อมาลาเรียใน ระยะวงแหวน และ ▩ แสดงถึง ค่า % parasitaemia ของเชื้อมาลาเรียในระยะไม่ใช่วงแหวน



ภาพที่ 32 ภาพแสดง % total parasitaemia (mean \pm SD) ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1 (a.), T9/94RC17 (b.) และ 3D7 (c.) ในกลุ่มควบคุม โดยเลี้ยงเชื้อมาลาเรียที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมจากการทดลองผลของอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) โดย \square แสดงถึงค่า % parasitaemia ของเชื้อมาลาเรียแบบระยะเดียว (synchronized parasite, syn) และ \blacksquare แสดงถึงค่า % parasitaemia ของเชื้อมาลาเรียแบบหลายระยะ (asynchronous parasite, asyn)



ภาพที่ 33 ภาพแสดงค่าเฉลี่ย % parasitaemia ระยะวงแหวนและระยะไม่ใช่วงแหวนของเชื้อ มาลาเรีย K1CB1 (a. และ d.), T9/94RC17 (b. และ e.) และ 3D7 (c. และ f.) ในกลุ่มเชื้อ มาลาเรียแบบระยะเดียว (synchronized parasite, syn) และเชื้อมาลาเรียแบบหลายระยะ (asynchronized parasite, asyn) ที่เลี้ยงในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมจากการทดลองผลของอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) โดย □ แสดงถึงค่า % parasitaemia ของระยะวงแหวน และ ■ แสดงถึงค่า % parasitaemia ของระยะที่ไม่ใช่วงแหวน

ปัจจัยทางกายภาพ

1. อุณหภูมิ

1.1 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.1.1 กลุ่มเชื้อแบบระยะเดียว

เมื่อเปรียบเทียบค่า % total parasitaemia ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 ที่เพาะเลี้ยงในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในกลุ่มเชื้อแบบระยะเดียว พบว่าระหว่าง 0 และ 24 ชั่วโมง เชื้อมาลาเรีย 2 สายพันธุ์ มีจำนวนลดลง ยกเว้นเชื้อ K1CB1 ที่มีค่า % total parasitaemia สูงที่สุด เมื่อเวลา 24 ชั่วโมง ต่อมาเชื้อมาลาเรียมีระดับลดลงเหลือ 0.04% เมื่อเวลา 48 ชั่วโมง และหายไปเมื่อเวลา 72 ชั่วโมง ในขณะที่เชื้อ T9/94RC17 และ 3D7 มีค่า % total parasitaemia ลดลง และไม่พบเชื้อเหลืออยู่ที่เวลา 48 ชั่วโมงเป็นต้นไป (ตารางที่ 1)

เมื่อเปรียบเทียบเชื้อแต่ละระยะของเชื้อ T9/94RC17 และ 3D7 ที่เพาะเลี้ยงในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบเชื้อระยะวงแหวนมีจำนวนลดลง ที่เวลา 24 ชั่วโมง และไม่พบเชื้อเหลืออยู่ที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง ส่วนเชื้อ K1CB1 พบว่าเชื้อระยะวงแหวนมีจำนวนลดลงที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง และหายไปเมื่อเวลา 72 ชั่วโมง ส่วนเชื้อในกลุ่มควบคุม ที่เวลา 24 ชั่วโมงอยู่ในระยะไม่ใช้วงแหวนทั้งหมด ที่เวลา 48 ชั่วโมงเชื้อมาลาเรียอยู่ในระยะวงแหวนเป็นส่วนมาก และที่เวลา 72 ชั่วโมงเชื้อโดยส่วนมากอยู่ในระยะไม่ใช้วงแหวน (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ค่า % parasitaemia (mean \pm SD) ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 ในกลุ่มควบคุม (อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส) และกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของกลุ่มเชื้อแบบระยะเดียว (syn)

Synchronization		K1CB1		T9/94RC17		3D7	
		Control	4 °C	Control	4 °C	Control	4 °C
0 hour	Total	0.41 \pm 0.00	0.41 \pm 0.00	0.27 \pm 0.00	0.27 \pm 0.00	0.29 \pm 0.00	0.29 \pm 0.00
	Ring	0.41 \pm 0.00	0.41 \pm 0.00	0.27 \pm 0.00	0.27 \pm 0.00	0.29 \pm 0.00	0.29 \pm 0.00
	Non-ring	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
24 hours	Total	0.89 \pm 0.19	0.46 \pm 0.18	0.47 \pm 0.12	0.24 \pm 0.21	0.74 \pm 0.13	0.23 \pm 0.17
	Ring	0.00	0.36 \pm 0.20	0.00	0.19 \pm 0.15	0.00	0.20 \pm 0.14
	Non-ring	0.89 \pm 0.19	0.10 \pm 0.12	0.47 \pm 0.12	0.06 \pm 0.12	0.74 \pm 0.13	0.03 \pm 0.05
48 hours	Total	3.50 \pm 0.19	0.04 \pm 0.11	2.49 \pm 0.24	0.00	1.97 \pm 0.30	0.00
	Ring	3.40 \pm 0.24	0.04 \pm 0.11	2.34 \pm 0.29	0.00	1.76 \pm 0.28	0.00
	Non-ring	0.10 \pm 0.10	0.00	0.16 \pm 0.05	0.00	0.20 \pm 0.10	0.00
72 hours	Total	3.10 \pm 0.57	0.00	4.03 \pm 0.93	0.00	2.40 \pm 0.98	0.00
	Ring	0.16 \pm 0.28	0.00	1.45 \pm 0.41	0.00	0.03 \pm 0.05	0.00
	Non-ring	2.94 \pm 0.49	0.00	2.58 \pm 0.62	0.00	2.37 \pm 0.93	0.00

1.1.2 กลุ่มเชื้อแบบหลายระยะ

ในกลุ่มเชื้อแบบหลายระยะ เชื้อมาลาเรีย K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 มีจำนวนเพิ่มขึ้นที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยมีค่า % total parasitaemia เท่ากับ 0.44%, 0.23% และ 0.44% ตามลำดับ ถัดมาที่เวลา 48 ชั่วโมง มีจำนวนลดลงเหลือ 0.14%, 0.04% และ 0.24% ตามลำดับ และไม่พบเชื้อที่เวลา 72 ชั่วโมง (ตารางที่ 2)

เมื่อเปรียบเทียบเชื้อแต่ละระยะของเชื้อมาลาเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่เพาะเลี้ยงในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบทั้งเชื้อในระยะวงแหวนและระยะไม่ใช่วงแหวน ที่เวลา 24 ชั่วโมง เชื้อ K1CB1 มีค่า % parasitaemia ของระยะวงแหวนและระยะไม่ใช่วงแหวนมีจำนวนเพิ่มขึ้นที่เวลา 24 ชั่วโมง และลดลงที่เวลา 48 ชั่วโมงเหลือ 0.05% และ 0.09% ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อ 3D7 ระยะวงแหวนลดลงที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง และไม่พบเชื้อที่เวลา 72 ชั่วโมง เชื้อ T9/94RC17 ระยะวงแหวนลดลงที่เวลา 24 ชั่วโมง และหมดไปที่เวลา 48 ชั่วโมง ส่วนระยะไม่ใช่วงแหวนของเชื้อ 3D7 และ T9/94RC17 มีจำนวนเพิ่มขึ้นที่เวลา 24 ชั่วโมง แล้วลดลงเหลือ 0.21% และ 0.04% ตามลำดับที่เวลา 48 ชั่วโมง และหายไปเมื่อเวลา 72 ชั่วโมง (ตารางที่ 2)

การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 โดยไม่พบเชื้อมาลาเรียหลังจากเลี้ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แต่ที่เวลา 24 ชั่วโมง เชื้อมาลาเรียที่พบส่วนใหญ่เป็นเชื้อในระยะวงแหวน

ตารางที่ 2 ค่า % parasitaemia (mean \pm SD) ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 ในกลุ่มควบคุม (อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส) และกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของกลุ่มเชื้อแบบหลายระยะ (asyn)

Asynchronization		K1CB1		T9/94RC17		3D7	
		Control	4 °C	Control	4 °C	Control	4 °C
0 hour	Total	0.26 \pm 0.00	0.26 \pm 0.00	0.22 \pm 0.00	0.22 \pm 0.00	0.18 \pm 0.00	0.18 \pm 0.00
	Ring	0.26 \pm 0.00	0.26 \pm 0.00	0.22 \pm 0.00	0.22 \pm 0.00	0.18 \pm 0.00	0.18 \pm 0.00
	Non-ring	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
24 hours	Total	0.49 \pm 0.28	0.44 \pm 0.16	0.55 \pm 0.05	0.23 \pm 0.11	0.36 \pm 0.04	0.44 \pm 0.22
	Ring	0.03 \pm 0.06	0.34 \pm 0.16	0.10 \pm 0.01	0.09 \pm 0.08	0.00	0.17 \pm 0.16
	Non-ring	0.46 \pm 0.23	0.10 \pm 0.11	0.45 \pm 0.05	0.14 \pm 0.10	0.36 \pm 0.04	0.27 \pm 0.18
48 hours	Total	0.55 \pm 0.20	0.14 \pm 0.09	1.62 \pm 0.44	0.04 \pm 0.07	0.66 \pm 0.20	0.24 \pm 0.16
	Ring	0.28 \pm 0.19	0.05 \pm 0.08	1.29 \pm 0.49	0.00	0.13 \pm 0.06	0.03 \pm 0.07
	Non-ring	0.27 \pm 0.19	0.09 \pm 0.08	0.33 \pm 0.06	0.04 \pm 0.07	0.53 \pm 0.15	0.21 \pm 0.12
72 hours	Total	1.54 \pm 0.62	0.00	2.76 \pm 0.57	0.00	1.67 \pm 0.60	0.00
	Ring	0.00	0.00	0.62 \pm 0.14	0.00	0.06 \pm 0.08	0.00
	Non-ring	1.54 \pm 0.62	0.00	2.14 \pm 0.71	0.00	1.61 \pm 0.52	0.00

1.2 อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส

1.2.1 กลุ่มเชื้อแบบระยะเดียว

เมื่อเปรียบเทียบค่า % total parasitaemia ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 ที่เพาะเลี้ยงในอุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส ในกลุ่มเชื้อแบบระยะเดียว พบว่าระหว่างเวลา 0 – 72 ชั่วโมงที่ได้ตรวจสอบ มีเชื้อมาลาเรียเพิ่มขึ้น และที่เวลา 72 ชั่วโมง มีค่า % total parasitaemia สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อ T9/94RC17 มีค่า % total parasitaemia สูงที่สุด เท่ากับ 4.76% ในขณะที่เชื้อ K1CB1 และ 3D7 มีค่า % total parasitaemia ใกล้เคียงกัน คือ 1.63% และ 1.61% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุม เชื้อมาลาเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ในกลุ่มทดลองมีค่า % total parasitaemia ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (ตารางที่ 3)

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างเชื้อแต่ละระยะของเชื้อในกลุ่มทดลอง พบว่าเชื้อมีแนวโน้มการเจริญใกล้เคียงกัน เมื่อเริ่มต้นเชื้ออยู่ในระยะวงแหวนทั้งหมด เมื่อเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์มีจำนวนเพิ่มขึ้น โดยเป็นเชื้อระยะไม่ไช่วงแหวนเป็นส่วนมาก เมื่อเวลา 48 ชั่วโมง เชื้อ K1CB1 และ 3D7 ส่วนมากอยู่ในระยะวงแหวน และที่เวลา 72 ชั่วโมง เชื้อ K1CB1 และ 3D7 ส่วนมากอยู่ในระยะไม่ไช่วงแหวน ในขณะที่เชื้อ T9/94RC17 ที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง เชื้อระยะวงแหวนและระยะไม่ไช่วงแหวนมีจำนวนใกล้เคียงกัน โดยที่เวลา 48 ชั่วโมง มีค่า % parasitaemia ของเชื้อระยะวงแหวนและระยะไม่ไช่วงแหวนในกลุ่มควบคุม เท่ากับ 1.29% และ 1.76% ตามลำดับ กลุ่มทดลองมีค่าเท่ากับ 1.20% และ 1.05% ตามลำดับ ส่วนที่เวลา 72 ชั่วโมง มีค่า % parasitaemia ของเชื้อระยะวงแหวนระยะไม่ไช่วงแหวนในกลุ่มควบคุมเท่ากับ 2.63% และ 2.40% ตามลำดับ ส่วนกลุ่มทดลองมีค่าเท่ากับ 2.39% และ 2.37% ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ค่า % parasitaemia (mean \pm SD) ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 ในกลุ่มควบคุม (อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส) และกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงในอุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของกลุ่มเชื้อแบบระยะเดียว (syn)

Synchronization		K1CB1		T9/94RC17		3D7	
		Control	34 °C	Control	34 °C	Control	34 °C
0 hour	Total	0.38 \pm 0.00	0.38 \pm 0.00	0.26 \pm 0.00	0.26 \pm 0.00	0.39 \pm 0.00	0.39 \pm 0.00
	Ring	0.38 \pm 0.00	0.38 \pm 0.00	0.26 \pm 0.00	0.26 \pm 0.00	0.39 \pm 0.00	0.39 \pm 0.00
	Non-ring	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
24 hours	Total	0.87 \pm 0.08	0.69 \pm 0.16	0.66 \pm 0.19	0.68 \pm 0.15	0.67 \pm 0.17	0.67 \pm 0.19
	Ring	0.00	0.00	0.22 \pm 0.14	0.08 \pm 0.11	0.00	0.02 \pm 0.04
	Non-ring	0.87 \pm 0.08	0.69 \pm 0.16	0.44 \pm 0.13	0.61 \pm 0.15	0.67 \pm 0.17	0.64 \pm 0.20
48 hours	Total	2.18 \pm 0.49	1.25 \pm 0.54	3.05 \pm 0.37	2.25 \pm 0.90	2.27 \pm 0.11	1.60 \pm 0.48
	Ring	2.12 \pm 0.38	1.04 \pm 0.70	1.29 \pm 0.52	1.20 \pm 0.64	2.17 \pm 0.12	1.21 \pm 0.33
	Non-ring	0.06 \pm 0.11	0.21 \pm 0.24	1.76 \pm 0.16	1.05 \pm 0.41	0.09 \pm 0.00	0.39 \pm 0.49
72 hours	Total	2.17 \pm 0.47	1.63 \pm 0.90	5.02 \pm 1.50	4.76 \pm 1.73	2.99 \pm 1.01	1.61 \pm 0.72
	Ring	0.13 \pm 0.11	0.13 \pm 0.14	2.63 \pm 0.87	2.39 \pm 1.55	0.18 \pm 0.18	0.33 \pm 0.21
	Non-ring	2.04 \pm 0.39	1.50 \pm 0.84	2.40 \pm 0.68	2.37 \pm 0.42	2.81 \pm 1.05	1.28 \pm 0.59

1.2.2 กลุ่มเชื้อแบบหลายระยะ

เมื่อเปรียบเทียบค่า % total parasitaemia ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 ที่เพาะเลี้ยงในอุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส ในกลุ่มเชื้อแบบหลายระยะ พบว่าระหว่างเวลา 0 – 72 ชั่วโมง มีเชื้อมาลาเรียเพิ่มขึ้น และที่เวลา 72 ชั่วโมง มีค่า % total parasitaemia สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อ T9/94RC17 มีค่า % total parasitaemia สูงที่สุด เท่ากับ 6.30% ในขณะที่เชื้อ K1CB1 และ 3D7 มีค่า % total parasitaemia ใกล้เคียงกัน เท่ากับ 1.64% และ 1.43% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบที่เวลา 72 ชั่วโมง ระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุม เชื้อมาลาเรีย 2 สายพันธุ์ ในกลุ่มทดลองมีค่า % total parasitaemia ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ยกเว้นเชื้อ T9/94RC17 ในกลุ่มทดลองมีค่า % total parasitaemia สูงกว่ากลุ่มควบคุม (ตารางที่ 4)

เมื่อเปรียบเทียบเชื้อแต่ละระยะในกลุ่มทดลอง เมื่อเริ่มต้นเชื้อ K1CB1 เป็นเชื้อในระยะวงแหวนทั้งหมด เชื้อ T9/94RC17 และ 3D7 เป็นเชื้อระยะไม่ใช่วงแหวนมากกว่า เมื่อเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์มีจำนวนเพิ่มขึ้นและอยู่ในระยะไม่ใช่วงแหวนเป็นส่วนมาก เมื่อเวลา 48 ชั่วโมง เชื้อ K1CB1 และ 3D7 เชื้อระยะวงแหวนและไม่ใช่วงแหวนมีค่าใกล้เคียงกัน เชื้อ T9/94RC17 เป็นเชื้อในระยะไม่ใช่วงแหวนมากกว่าระยะวงแหวน โดยมีค่า % parasitaemia เท่ากับ 1.05% และ 0.71% ตามลำดับ และที่เวลา 72 ชั่วโมง เชื้อ K1CB1 และ 3D7 ส่วนมากเชื้ออยู่ในระยะไม่ใช่วงแหวน มีค่าเท่ากับ 1.22% และ 1.09% ตามลำดับ ส่วนเชื้อระยะวงแหวนมีค่าเท่ากับ 0.42% และ 0.34% ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อ T9/94RC17 ในระยะวงแหวนมีค่ามากกว่าเชื้อระยะไม่ใช่วงแหวน มีค่าเท่ากับ 4.40% และ 1.90% ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 ที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมินี้มีผลในการลดการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย ซึ่งมีค่า % parasitaemia ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม

ตารางที่ 4 ค่า % parasitaemia (mean \pm SD) ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 ในกลุ่มควบคุม (อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส) และกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงในอุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของกลุ่มเชื้อแบบหลายระยะ (asyn)

Asynchronization		K1CB1		T9/94RC17		3D7	
		Control	34 °C	Control	34 °C	Control	34 °C
0 hour	Total	0.37 \pm 0.00	0.37 \pm 0.00	0.37 \pm 0.00	0.37 \pm 0.00	0.60 \pm 0.00	0.60 \pm 0.00
	Ring	0.37 \pm 0.00	0.37 \pm 0.00	0.09 \pm 0.00	0.09 \pm 0.00	0.20 \pm 0.00	0.20 \pm 0.00
	Non-ring	0.00	0.00	0.28 \pm 0.00	0.28 \pm 0.00	0.40 \pm 0.00	0.40 \pm 0.00
24 hours	Total	0.66 \pm 0.08	0.60 \pm 0.28	0.70 \pm 0.10	0.84 \pm 0.25	0.74 \pm 0.24	0.61 \pm 0.15
	Ring	0.23 \pm 0.13	0.09 \pm 0.15	0.28 \pm 0.17	0.28 \pm 0.26	0.00	0.07 \pm 0.11
	Non-ring	0.44 \pm 0.06	0.51 \pm 0.20	0.41 \pm 0.09	0.55 \pm 0.18	0.74 \pm 0.24	0.54 \pm 0.13
48 hours	Total	1.11 \pm 0.31	1.31 \pm 0.33	2.01 \pm 0.17	1.76 \pm 0.44	1.59 \pm 0.03	1.11 \pm 0.53
	Ring	0.62 \pm 0.06	0.75 \pm 0.21	0.75 \pm 0.10	0.71 \pm 0.20	1.42 \pm 0.16	0.60 \pm 0.42
	Non-ring	0.49 \pm 0.30	0.56 \pm 0.25	1.25 \pm 0.22	1.05 \pm 0.32	0.17 \pm 0.16	0.50 \pm 0.28
72 hours	Total	1.91 \pm 0.51	1.64 \pm 0.50	5.89 \pm 0.69	6.30 \pm 1.83	2.29 \pm 0.34	1.43 \pm 1.16
	Ring	0.82 \pm 0.27	0.42 \pm 0.27	3.72 \pm 0.21	4.40 \pm 1.31	0.51 \pm 0.34	0.34 \pm 0.50
	Non-ring	1.09 \pm 0.23	1.22 \pm 0.46	2.17 \pm 0.48	1.90 \pm 0.56	1.78 \pm 0.64	1.09 \pm 0.72

1.3 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

1.3.1 กลุ่มเชื้อแบบระยะเดียว

เมื่อเปรียบเทียบเชื้อมาลาเรีย K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 ที่เพาะเลี้ยงในอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในกลุ่มเชื้อแบบระยะเดียว พบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง เชื้อมาลาเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ มีจำนวนเพิ่มขึ้นมาเท่ากับ 0.27%, 0.30% และ 0.35% ตามลำดับ และลดลงที่เวลา 48 ชั่วโมง เหลือ 0.12%, 0.20% และ 0.26 ตามลำดับ จนกระทั่งไม่มีเชื้อมาลาเรียเหลือที่เวลา 72 ชั่วโมง (ตารางที่ 5)

เมื่อเปรียบเทียบเชื้อแต่ละระยะของเชื้อมาลาเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่เพาะเลี้ยงในอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สามารถพบเชื้อในระยะวงแหวนได้ที่เวลา 24 ชั่วโมงเท่านั้น โดยมีค่า % parasitaemia ของเชื้อ K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 เท่ากับ 0.06%, 0.02% และ 0.01% ตามลำดับ ซึ่งมีค่าต่ำกว่าตอนเริ่มต้น ส่วนระยะไม่ใช้วงแหวนมีจำนวนเพิ่มขึ้นที่เวลา 24 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 0.22%, 0.28% และ 0.34% ตามลำดับ ต่อมาที่เวลา 48 ชั่วโมง มีจำนวนลดลงเหลือ 0.12%, 0.20% และ 0.26% ตามลำดับ และไม่พบเชื้อมาลาเรียเหลืออยู่ที่เวลา 72 ชั่วโมง (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ค่า % parasitaemia (mean \pm SD) ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 ในกลุ่มควบคุม (อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส) และกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงในอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของกลุ่มเชื้อแบบระยะเดียว (syn)

Synchronization		K1CB1		T9/94RC17		3D7	
		Control	40 °C	Control	40 °C	Control	40 °C
0 hour	Total	0.26 \pm 0.00	0.26 \pm 0.00	0.18 \pm 0.00	0.18 \pm 0.00	0.24 \pm 0.00	0.24 \pm 0.00
	Ring	0.26 \pm 0.00	0.26 \pm 0.00	0.18 \pm 0.00	0.18 \pm 0.00	0.24 \pm 0.00	0.24 \pm 0.00
	Non-ring	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
24 hours	Total	0.48 \pm 0.05	0.27 \pm 0.28	0.36 \pm 0.11	0.30 \pm 0.06	0.45 \pm 0.11	0.35 \pm 0.12
	Ring	0.00	0.06 \pm 0.17	0.06 \pm 0.06	0.02 \pm 0.04	0.00	0.01 \pm 0.03
	Non-ring	0.48 \pm 0.05	0.22 \pm 0.26	0.30 \pm 0.10	0.28 \pm 0.09	0.45 \pm 0.11	0.34 \pm 0.13
48 hours	Total	2.79 \pm 1.03	0.12 \pm 0.19	2.37 \pm 0.42	0.20 \pm 0.18	1.60 \pm 0.67	0.26 \pm 0.08
	Ring	2.72 \pm 0.92	0.00	2.16 \pm 0.59	0.00	1.46 \pm 0.61	0.00
	Non-ring	0.07 \pm 0.12	0.12 \pm 0.19	0.21 \pm 0.19	0.20 \pm 0.18	0.13 \pm 0.06	0.26 \pm 0.08
72 hours	Total	3.08 \pm 0.08	0.00	4.76 \pm 0.33	0.00	1.82 \pm 1.47	0.00
	Ring	0.06 \pm 0.11	0.00	1.89 \pm 0.69	0.00	0.03 \pm 0.06	0.00
	Non-ring	3.02 \pm 0.18	0.00	2.87 \pm 0.37	0.00	1.78 \pm 1.45	0.00

1.3.2 กลุ่มเชื้อแบบหลายระยะ

ในกลุ่มเชื้อแบบหลายระยะ เชื้อมาลาเรีย K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 มีเชื้อเหลืออยู่ที่เวลา 48 ชั่วโมง เท่ากับ 0.39%, 0.22% และ 0.09% และไม่พบเชื้อมาลาเรียเหลือที่เวลา 72 ชั่วโมง โดยเชื้อ K1CB1 มีค่า % total parasitaemia เพิ่มขึ้นที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เชื้อ T9/94RC17 มีค่า % total parasitaemia เพิ่มขึ้นที่เวลา 24 ชั่วโมงและลดลงที่เวลา 48 ชั่วโมง ในขณะที่เชื้อ 3D7 มีค่า % total parasitaemia ที่ลดลงจนหมดไปที่เวลา 72 ชั่วโมง (ตารางที่ 6)

เมื่อเปรียบเทียบเชื้อแต่ละระยะของเชื้อมาลาเรียทั้ง K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 ที่เพาะเลี้ยงในอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เชื้อ K1CB1 ระยะไม่ไช่วงแหวนมีจำนวนเพิ่มขึ้นจนถึงที่เวลา 48 ชั่วโมง เท่ากับ 0.38% ส่วนเชื้อ T9/94RC17 และ 3D7 ในระยะไม่ไช่วงแหวนมีจำนวนเพิ่มขึ้นเมื่อเวลา 24 ชั่วโมง และลดลงเหลือ 0.22% และ 0.09% ที่เวลา 48 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยไม่พบเชื้อมาลาเรียที่เวลา 72 ชั่วโมง ในขณะที่เชื้อระยะวงแหวนของเชื้อ K1CB1 และ T9/94RC17 พบที่เวลา 24 ชั่วโมงเท่านั้น โดยมีค่า % parasitaemia เท่ากับ 0.06% และ 0.03% ตามลำดับ ส่วนเชื้อ 3D7 ไม่พบเชื้อระยะวงแหวนตั้งแต่ที่เวลา 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 6)

การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีผลการต่อการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 โดยเชื้อมาลาเรียที่พบหลังจากการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมินี้เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เชื้อมาลาเรียที่ตรวจพบส่วนใหญ่เป็นเชื้อระยะไม่ไช่วงแหวน

ตารางที่ 6 ค่า % parasitaemia (mean \pm SD) ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 ในกลุ่มควบคุม (ในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส) และกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงในอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของกลุ่มเชื้อแบบหลายระยะ (asyn)

Asynchronization		K1CB1		T9/94RC17		3D7	
		Control	40 °C	Control	40 °C	Control	40 °C
0 hour	Total	0.29 \pm 0.00	0.29 \pm 0.00	0.21 \pm 0.00	0.21 \pm 0.00	0.29 \pm 0.00	0.29 \pm 0.00
	Ring	0.19 \pm 0.00	0.19 \pm 0.00	0.10 \pm 0.00	0.10 \pm 0.00	0.20 \pm 0.00	0.20 \pm 0.00
	Non-ring	0.10 \pm 0.00	0.10 \pm 0.00	0.10 \pm 0.00	0.10 \pm 0.00	0.10 \pm 0.00	0.10 \pm 0.00
24 hours	Total	0.54 \pm 0.16	0.36 \pm 0.16	0.42 \pm 0.07	0.31 \pm 0.07	0.53 \pm 0.20	0.19 \pm 0.29
	Ring	0.10 \pm 0.10	0.06 \pm 0.12	0.13 \pm 0.15	0.03 \pm 0.05	0.16 \pm 0.14	0.00
	Non-ring	0.44 \pm 0.22	0.30 \pm 0.21	0.29 \pm 0.10	0.28 \pm 0.08	0.37 \pm 0.19	0.19 \pm 0.29
48 hours	Total	0.87 \pm 0.23	0.39 \pm 0.10	1.89 \pm 0.37	0.22 \pm 0.18	1.53 \pm 0.45	0.09 \pm 0.14
	Ring	0.47 \pm 0.37	0.01 \pm 0.03	1.41 \pm 0.27	0.00	0.75 \pm 0.53	0.00
	Non-ring	0.40 \pm 0.24	0.38 \pm 0.10	0.48 \pm 0.25	0.22 \pm 0.18	0.78 \pm 0.11	0.09 \pm 0.14
72 hours	Total	1.68 \pm 1.16	0.00	3.75 \pm 0.38	0.00	1.90 \pm 0.99	0.00
	Ring	0.23 \pm 0.21	0.00	0.87 \pm 0.22	0.00	0.37 \pm 0.34	0.00
	Non-ring	0.78 \pm 0.84	0.00	2.88 \pm 0.40	0.00	1.53 \pm 0.72	0.00

1.4 การสลับอุณหภูมิระหว่างการเลี้ยงเชื้อ

เชื้อมาลาเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ถูกเลี้ยงในสถานะที่มีการเปลี่ยนแปลงระหว่างอุณหภูมิ 4, 37 (กลุ่มควบคุม) และ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิคัดเลือกมาจากผลการทดลองของทั้ง 3 อุณหภูมิที่รายงานข้างต้น เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เชื้อมาลาเรียส่วนใหญ่ที่พบเป็นระยะไม่ใช่วงแหวน ส่วนเชื้อในระยะวงแหวนสามารถอยู่รอดได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากการเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 อุณหภูมิ นำเชื้อมาเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส รวมเวลาที่ใช้เลี้ยงทั้งหมด 120 ชั่วโมง พบว่าทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองไม่พบเชื้อเหลืออยู่ที่เวลา 120 ชั่วโมง ทั้งนี้ในกลุ่มควบคุมไม่พบเชื้อมาลาเรียอาจเป็นเพราะเชื้อมาลาเรียเกิดการ overgrowth จนไม่เหลือเชื้อมาลาเรียเหลืออยู่ เพราะระหว่างการทดลองมีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 24 ชั่วโมง แต่ไม่มีการเติมเลือดใหม่เข้าไป

2. ความเป็นกรด – ต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 กลุ่มเชื้อแบบระยะเดียว

เมื่อเปรียบเทียบค่า % total parasitaemia ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด – ต่างเท่ากับ 6.9 และ 7.3 ในกลุ่มเชื้อแบบระยะเดียว มีค่า % total parasitaemia เพิ่มขึ้น จนถึงที่เวลา 72 ชั่วโมง มีค่าสูงสุดและมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม โดยเชื้อมาลาเรียที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด – ต่างเท่ากับ 7.3 มีค่า % total parasitaemia สูงที่สุด เชื้อ K1CB1 มีค่า % total parasitaemia เท่ากับ 3.10% เชื้อ T9/94RC17 และ 3D7 มีค่าเท่ากับ 4.97% และ 4.38% ตามลำดับ (ตารางที่ 7)

เมื่อเปรียบเทียบเชื้อแต่ละระยะของเชื้อมาลาเรีย ที่เวลา 24 ชั่วโมง เชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ ส่วนใหญ่เป็นเชื้อในระยะไม่ไช่วงแหวน ต่อมาที่เวลา 48 ชั่วโมง เชื้อ K1CB1 และ 3D7 ส่วนใหญ่เป็นเชื้อในระยะวงแหวน ส่วนเชื้อ T9/94RC17 เชื้อส่วนใหญ่เป็นเชื้อในระยะไม่ไช่วงแหวน และที่เวลา 72 ชั่วโมง เชื้อส่วนใหญ่เป็นเชื้อในระยะไม่ไช่วงแหวน ยกเว้นเชื้อ T9/94RC17 ในกลุ่มทดลอง เชื้อส่วนใหญ่อยู่ในระยะวงแหวน (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 ค่า % parasitaemia (mean \pm SD) ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 ในกลุ่มควบคุมที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด – ต่างเท่ากับ 7.0 และในกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด – ต่างเท่ากับ 6.9 และ 7.3 ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของกลุ่มเชื้อแบบระยะเดียว (syn)

Synchronization		K1CB1			T9/94RC17			3D7		
		control (pH 7.0)	pH 6.9	pH 7.3	control (pH 7.0)	pH 6.9	pH 7.3	control (pH 7.0)	pH 6.9	pH 7.3
0 hour	Total	0.46 \pm	0.46 \pm	0.46 \pm	0.47 \pm	0.47 \pm	0.47 \pm	0.38 \pm	0.38 \pm	0.38 \pm
		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Ring	0.46 \pm	0.46 \pm	0.46 \pm	0.47 \pm	0.47 \pm	0.47 \pm	0.38 \pm	0.38 \pm	0.38 \pm
		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Non-ring	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
24 hours	Total	0.53 \pm	0.56 \pm	0.43 \pm	0.60 \pm	0.62 \pm	0.65 \pm	0.69 \pm	0.93 \pm	0.93 \pm
		0.04	0.14	0.11	0.10	0.32	0.05	0.11	0.20	0.20
	Ring	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10 \pm	0.17 \pm	0.00	0.10 \pm	0.00
						0.10	0.15		0.13	
	Non-ring	0.53 \pm	0.56 \pm	0.43 \pm	0.60 \pm	0.52 \pm	0.48 \pm	0.69 \pm	0.83 \pm	0.52 \pm
		0.04	0.14	0.11	0.10	0.29	0.13	0.11	0.06	0.08
48 hours	Total	0.83 \pm	1.77 \pm	1.90 \pm	0.65 \pm	1.82 \pm	1.64 \pm	1.16 \pm	2.26 \pm	3.73 \pm
		0.12	0.08	0.56	0.01	0.39	0.53	0.14	0.19	0.26
	Ring	0.54 \pm	1.41 \pm	1.87 \pm	0.15 \pm	0.62 \pm	0.53 \pm	0.67 \pm	1.96 \pm	3.50 \pm
		0.20	0.14	0.56	0.06	0.16	0.29	0.32	0.11	0.21
	Non-ring	0.29 \pm	0.36 \pm	0.03 \pm	0.50 \pm	1.20 \pm	1.11 \pm	0.49 \pm	0.30 \pm	0.22 \pm
		0.11	0.15	0.06	0.04	0.34	0.24	0.22	0.09	0.05
72 hours	Total	1.03 \pm	2.88 \pm	3.10 \pm	0.86 \pm	3.47 \pm	4.97 \pm	1.29 \pm	3.83 \pm	4.38 \pm
		0.11	0.71	0.53	0.02	0.17	0.81	0.06	0.84	1.02
	Ring	0.00	0.35 \pm	0.45 \pm	0.19 \pm	2.00 \pm	4.29 \pm	0.13 \pm	0.13 \pm	0.30 \pm
			0.34	0.37	0.00	0.67	0.91	0.06	0.12	0.16
	Non-ring	1.12 \pm	2.53 \pm	2.65 \pm	1.12 \pm	1.47 \pm	0.67 \pm	1.12 \pm	3.69 \pm	4.07 \pm
		0.11	0.44	0.19	0.01	0.50	0.32	0.13	0.76	0.95

2.2 กลุ่มเชื้อแบบหลายระยะ

เชื้อมาลาเรีย K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด – ด่างเท่ากับ 6.9 และ 7.3 ในกลุ่มเชื้อแบบหลายระยะ มีค่า % total parasitaemia เพิ่มขึ้น จนถึงที่เวลา 72 ชั่วโมง มีค่า % total parasitaemia สูงที่สุด ยกเว้นเชื้อ T9/94RC17 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด – ด่างเท่ากับ 7.3 ที่เวลา 72 ชั่วโมง มีค่า % total parasitaemia ต่ำกว่าที่เวลา 48 ชั่วโมง อาจเป็นเพราะเชื้อเกิดการ overgrowth ทำให้มีจำนวนเชื้อที่ลดลง ซึ่งหากดูแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของเชื้อมาลาเรียแล้ว เชื้อ T9/94RC17 น่าจะมี % parasitaemia สูงที่สุด (ตารางที่ 8)

เมื่อเปรียบเทียบเชื้อแต่ละระยะของเชื้อมาลาเรีย การเจริญเติบโตของเชื้อระยะวงแหวน และระยะไม่ใช่วงแหวน ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองของเชื้อ K1CB1 มีแนวโน้มไปในทางเดียวกัน คือ ที่เวลา 0 และ 48 ชั่วโมง เชื้อโดยส่วนมากเป็นเชื้อระยะวงแหวน ที่เวลา 24 และ 72 ชั่วโมง เชื้อส่วนใหญ่เป็นเชื้อในระยะไม่ใช่วงแหวน ส่วนเชื้อ T9/94RC17 และ 3D7 เห็นระยะได้ไม่ชัดเจนเหมือนเชื้อ K1CB1 โดยเชื้อ T9/94RC17 ที่เวลา 0, 48 และ 72 ชั่วโมง เชื้อส่วนใหญ่เป็นเชื้อระยะไม่ใช่วงแหวน ที่เวลา 24 ชั่วโมง เชื้อโดยส่วนมากเป็นเชื้อในระยะไม่ใช่วงแหวน ยกเว้นกลุ่มควบคุม ที่มีเชื้อระยะไม่ใช่วงแหวนมากกว่า ส่วนเชื้อ 3D7 ในช่วงเวลาที่ได้ตรวจสอบ เชื้อโดยส่วนมากเป็นเชื้อระยะไม่ใช่วงแหวน ยกเว้น เชื้อที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด – ด่างเท่ากับ 7.3 ที่เวลา 48 ชั่วโมง เชื้อโดยส่วนมากอยู่ในระยะวงแหวน และที่เวลา 72 ชั่วโมง เชื้อทั้ง 2 ระยะมีจำนวนใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 8)

การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อมาลาเรีย K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด – ด่างเท่ากับ 7.3 มีค่า % parasitaemia สูงที่สุด

ตารางที่ 8 ค่า % parasitaemia (mean \pm SD) ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 ในกลุ่มควบคุมที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด – ต่างเท่ากับ 7.0 และในกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด – ต่างเท่ากับ 6.9 และ 7.3 ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของกลุ่มเชื้อแบบหลายระยะ (asyn)

		K1CB1			T9/94RC17			3D7		
Asynchronization		control			control			control		
		(pH 7.0)	pH 6.9	pH 7.3	(pH 7.0)	pH 6.9	pH 7.3	(pH 7.0)	pH 6.9	pH 7.3
0 hour	Total	0.30 \pm	0.30 \pm	0.30 \pm	0.54 \pm	0.54 \pm	0.54 \pm	0.28 \pm	0.28 \pm	0.28 \pm
		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Ring	0.20 \pm	0.20 \pm	0.20 \pm	0.11 \pm	0.11 \pm	0.11 \pm	0.09 \pm	0.09 \pm	0.09 \pm
		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Non-ring	0.10 \pm	0.10 \pm	0.10 \pm	0.43 \pm	0.43 \pm	0.43 \pm	0.19 \pm	0.19 \pm	0.19 \pm
		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
24 hours	Total	0.78 \pm	1.03 \pm	1.00 \pm	0.77 \pm	1.56 \pm	1.85 \pm	0.95 \pm	1.22 \pm	0.82 \pm
		0.05	0.05	0.22	0.15	0.39	0.35	0.10	0.30	0.32
	Ring	0.27 \pm	0.34 \pm	0.48 \pm	0.23 \pm	1.00 \pm	1.24 \pm	0.38 \pm	0.58 \pm	0.28 \pm
		0.04	0.15	0.08	0.05	0.27	0.32	0.06	0.31	0.26
	Non-ring	0.51 \pm	0.68 \pm	0.52 \pm	0.54 \pm	0.56 \pm	0.62 \pm	0.57 \pm	0.64 \pm	0.54 \pm
		0.07	0.15	0.18	0.18	0.17	0.03	0.12	0.02	0.06
48 hours	Total	1.11 \pm	2.97 \pm	2.57 \pm	1.12 \pm	3.65 \pm	4.57 \pm	1.02 \pm	2.08 \pm	3.02 \pm
		0.34	0.06	0.16	0.30	0.60	1.25	0.14	0.31	0.56
	Ring	0.68 \pm	1.95 \pm	1.90 \pm	0.26 \pm	1.17 \pm	1.80 \pm	0.17 \pm	0.79 \pm	2.03 \pm
		0.23	0.11	0.24	0.15	0.60	0.49	0.12	0.27	0.41
	Non-ring	0.44 \pm	1.01 \pm	0.67 \pm	0.86 \pm	1.81 \pm	2.77 \pm	0.85 \pm	1.29 \pm	0.98 \pm
		0.12	0.17	0.15	0.20	1.38	0.77	0.18	0.29	0.22
72 hours	Total	1.54 \pm	4.81 \pm	3.53 \pm	1.82 \pm	3.93 \pm	2.13 \pm	1.62 \pm	4.68 \pm	6.07 \pm
		0.60	0.25	0.80	0.63	0.71	0.37	0.14	0.22	1.14
	Ring	0.65 \pm	1.37 \pm	1.17 \pm	0.42 \pm	1.47 \pm	0.08 \pm	0.65 \pm	1.88 \pm	3.04 \pm
		0.48	0.19	0.63	0.30	0.71	0.11	0.15	0.54	0.06
	Non-ring	1.12 \pm	3.44 \pm	2.36 \pm	1.12 \pm	2.46 \pm	2.05 \pm	1.12 \pm	2.84 \pm	3.03 \pm
		0.13	0.38	0.53	0.36	0.80	0.25	0.09	0.44	1.16

3. แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์

3.1 มีการจุดเทียนในโถดูความขึ้นตลอดการเลี้ยงเชื้อ

การทดสอบผลของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ทดสอบด้วยการจุดเทียนในโถดูความขึ้น หากมีการจุดเทียนในโถดูความขึ้น จะเป็นการทดลองในกลุ่มควบคุม ส่วนในกลุ่มทดลองจะไม่มี การจุดเทียนในโถดูความขึ้นตลอดการเลี้ยงเชื้อ

3.1.1 กลุ่มเชื้อแบบระยะเดียว

เชื้อมาลาเรีย K1CB1 และ T9/94RC17 ที่เพาะเลี้ยงในโถดูความขึ้นโดยไม่มีการจุด เทียน มีจำนวนเพิ่มขึ้นที่เวลา 24 ชั่วโมง และลดลงที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง โดยที่เวลา 72 ชั่วโมง เชื้อ K1CB1 และ T9/94RC17 มีค่า % total parasitaemia เท่ากับ 0.24% และ 0.23% ตามลำดับ ส่วนเชื้อ 3D7 มีจำนวนเพิ่มขึ้นถึงที่เวลา 48 ชั่วโมง และลดลงที่เวลา 72 ชั่วโมงเหลือ 0.54% (ตารางที่ 9)

เมื่อเปรียบเทียบเชื้อแต่ละระยะของเชื้อมาลาเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่เพาะเลี้ยงใน โถดูความขึ้นโดยไม่มีการจุดเทียน มีเชื้อในระยะวงแหวนที่ลดลงจากตอนเริ่มต้น ที่เวลา 24 ชั่วโมง เชื้อ K1CB1 มีค่า % parasitaemia เท่ากับ 0.14% เชื้อ T9/94RC17 มีค่า % parasitaemia เท่ากับ 0.09% และเชื้อ 3D7 มีค่า % parasitaemia เท่ากับ 0.13% ต่อมาที่เวลา 48 ชั่วโมง เชื้อมาลาเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ มีจำนวนลดลงเหลือ 0.01% และหายไปเมื่อ 72 ชั่วโมง ส่วนเชื้อในระยะไม่ใช่วงแหวนมีจำนวนเพิ่มขึ้นที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เชื้อ K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 มีค่า % parasitaemia ที่เวลา 48 ชั่วโมง เท่ากับ 0.46%, 0.45% และ 1.37% ตามลำดับ และมีจำนวนลดลงเมื่อเลี้ยงไปถึงที่เวลา 72 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 0.24%, 0.23% และ 0.54% ตามลำดับ (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 ค่า % parasitaemia (mean \pm SD) ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 ในกลุ่มควบคุม (มีการจุดเทียนในโถดูดความชื้น) และกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงในโถดูดความชื้น โดยไม่มีการจุดเทียน ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของกลุ่มเชื้อแบบระยะเดียว (syn)

Synchronization		K1CB1		T9/94RC17		3D7	
		Control	CO ₂	Control	CO ₂	Control	CO ₂
0 hour	Total	0.47 \pm 0.00	0.47 \pm 0.00	0.38 \pm 0.00	0.38 \pm 0.00	1.68 \pm 0.00	1.68 \pm 0.00
	Ring	0.47 \pm 0.00	0.47 \pm 0.00	0.38 \pm 0.00	0.38 \pm 0.00	1.68 \pm 0.00	1.68 \pm 0.00
	Non-ring	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
24 hours	Total	1.14 \pm 0.29	0.50 \pm 0.25	2.17 \pm 0.58	0.57 \pm 0.33	2.34 \pm 0.60	1.10 \pm 0.30
	Ring	0.00	0.14 \pm 0.17	0.87 \pm 0.51	0.09 \pm 0.13	0.07 \pm 0.06	0.13 \pm 0.09
	Non-ring	1.14 \pm 0.29	0.41 \pm 0.21	1.29 \pm 0.10	0.53 \pm 0.33	2.27 \pm 0.65	0.97 \pm 0.25
48 hours	Total	2.94 \pm 0.02	0.47 \pm 0.18	6.28 \pm 0.33	0.46 \pm 0.22	9.81 \pm 0.94	1.38 \pm 0.32
	Ring	2.46 \pm 0.24	0.01 \pm 0.03	1.62 \pm 0.52	0.01 \pm 0.03	8.56 \pm 1.54	0.01 \pm 0.04
	Non-ring	0.47 \pm 0.25	0.46 \pm 0.17	4.56 \pm 0.72	0.45 \pm 0.23	1.25 \pm 0.65	1.37 \pm 0.33
72 hours	Total	2.96 \pm 0.98	0.24 \pm 0.14	15.52 \pm 4.93	0.23 \pm 0.08	13.78 \pm 1.13	0.54 \pm 0.17
	Ring	0.13 \pm 0.06	0.00	12.11 \pm 5.20	0.00	0.67 \pm 0.10	0.00
	Non-ring	2.82 \pm 0.94	0.24 \pm 0.14	3.41 \pm 0.97	0.23 \pm 0.08	13.12 \pm 1.22	0.54 \pm 0.17

3.1.2 กลุ่มเชื้อแบบหลายระยะ

ในกลุ่มเชื้อแบบหลายระยะ เชื้อมาลาเรีย K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 ที่เพาะเลี้ยงใน โถดูดความชื้นโดยไม่มีการจุดเทียน มีจำนวนที่ลดลงในช่วงเวลา 0 – 24 ชั่วโมง เหลือ 0.34%, 0.62% และ 0.64% ตามลำดับ ต่อมาที่เวลา 48 ชั่วโมง มีจำนวนเพิ่มขึ้นมาเป็น 0.41%, 0.81% และ 0.66% ตามลำดับ และลดลงที่เวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งมีค่า % total parasitaemia ต่ำที่สุด เท่ากับ 0.25%, 0.37% และ 0.25% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ที่เวลา 72 ชั่วโมง เชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ มีค่า % total parasitaemia ใกล้เคียงกัน โดยเชื้อ K1CB1 และ 3D7 มีค่าเท่ากับ 0.25% ส่วนเชื้อ T9/94RC17 มีค่าเท่ากับ 0.37% (ตารางที่ 10)

เมื่อเปรียบเทียบเชื้อแต่ละระยะของเชื้อมาลาเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่เพาะเลี้ยงใน โถดูดความชื้นโดยไม่มีการจุดเทียน เชื้อระยะวงแหวนพบในเชื้อ T9/94RC17 และ 3D7 ที่เวลา 24 ชั่วโมงเท่านั้น โดยมีค่า % parasitaemia เท่ากับ 0.03% และ 0.04% ตามลำดับ ซึ่งมีค่าน้อยกว่า ตอนเริ่มต้น และไม่พบเชื้อเหลืออยู่ที่เวลา 48 ชั่วโมงเป็นต้นไป ส่วนเชื้อ K1CB1 พบเพียงเชื้อระยะ ไม่ใช่วงแหวนเท่านั้น โดยเชื้อในระยะไม่ใช่วงแหวนมีจำนวนเพิ่มขึ้นที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยที่เวลา 48 ชั่วโมง เชื้อ K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 มีค่า % parasitaemia เท่ากับ 0.41%, 0.81% และ 0.66% ตามลำดับ และมีจำนวนลดลงเมื่อเลี้ยงไปถึงที่เวลา 72 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 0.25%, 0.37% และ 0.25% ตามลำดับ (ตารางที่ 10)

การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ มาลาเรีย K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 โดยเชื้อมาลาเรียที่เพาะเลี้ยงในโถดูดความชื้นโดยไม่มีการจุดเทียน (มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ต่ำ) ที่เวลา 72 ชั่วโมง พบเชื้อในระยะไม่ใช่วงแหวนเท่านั้น

ตารางที่ 10 ค่า % parasitaemia (mean \pm SD) ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 ในกลุ่มควบคุม (มีการจุดเทียนในโถดูดความชื้น) และกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงในโถดูดความชื้นโดยไม่มีการจุดเทียน ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของกลุ่มเชื้อแบบหลายระยะ (asyn)

Asynchronization		K1CB1		T9/94RC17		3D7	
		Control	CO ₂	Control	CO ₂	Control	CO ₂
0 hour	Total	0.91 \pm 0.00	0.91 \pm 0.00	1.27 \pm 0.00	1.27 \pm 0.00	0.77 \pm 0.00	0.77 \pm 0.00
	Ring	0.54 \pm 0.00	0.54 \pm 0.00	0.42 \pm 0.00	0.42 \pm 0.00	0.66 \pm 0.00	0.66 \pm 0.00
	Non-ring	0.36 \pm 0.00	0.36 \pm 0.00	0.85 \pm 0.00	0.85 \pm 0.00	0.11 \pm 0.00	0.11 \pm 0.00
24 hours	Total	1.14 \pm 0.40	0.34 \pm 0.16	2.40 \pm 0.26	0.62 \pm 0.16	2.11 \pm 0.46	0.64 \pm 0.11
	Ring	0.22 \pm 0.22	0.00	1.30 \pm 0.22	0.03 \pm 0.05	0.58 \pm 0.39	0.04 \pm 0.07
	Non-ring	0.93 \pm 0.38	0.34 \pm 0.16	1.09 \pm 0.16	0.59 \pm 0.15	1.53 \pm 0.35	0.60 \pm 0.14
48 hours	Total	3.37 \pm 0.80	0.41 \pm 0.10	8.79 \pm 0.09	0.81 \pm 0.88	4.53 \pm 0.96	0.66 \pm 0.30
	Ring	1.99 \pm 0.59	0.00	4.25 \pm 0.46	0.00	2.56 \pm 0.83	0.00
	Non-ring	1.38 \pm 0.33	0.41 \pm 0.10	4.54 \pm 0.37	0.81 \pm 0.88	1.98 \pm 0.14	0.66 \pm 0.30
72 hours	Total	6.77 \pm 1.16	0.25 \pm 0.12	19.44 \pm 3.73	0.37 \pm 0.12	7.50 \pm 2.07	0.25 \pm 0.15
	Ring	2.97 \pm 0.85	0.00	6.22 \pm 0.84	0.00	2.78 \pm 0.60	0.00
	Non-ring	3.80 \pm 0.85	0.25 \pm 0.12	13.18 \pm 2.83	0.37 \pm 0.12	4.73 \pm 1.64	0.25 \pm 0.15

3.2 มีการจุดเทียนสลับกับการไม่จุดเทียนในโถดูดความชื้น

เชื้อมาลาเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ถูกเลี้ยงในสภาวะที่มีการเปลี่ยนแปลงระหว่างการจุดเทียนในโถดูดความชื้นและไม่มีการจุดเทียนในโถดูดความชื้น ซึ่งการปรับเปลี่ยนสภาวะนี้คัดลอกมาจากผลการทดลองที่ได้รายงานข้างต้น เชื้อมาลาเรียระยะไม่ไช่วงแหวนสามารถอยู่รอดในสภาวะที่ไม่มีการจุดเทียนในโถดูดความชื้น (สภาวะที่มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ต่ำ) และสลับกลับไปเลี้ยงในสภาวะปกติเพื่อเพิ่มจำนวนของเชื้อ รวมเวลาที่ใช้เลี้ยงทั้งหมด 144 ชั่วโมง พบว่าทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองไม่พบเชื้อเหลืออยู่ที่เวลา 144 ชั่วโมง ทั้งนี้ในกลุ่มควบคุมอาจเป็นเพราะเชื้อมาลาเรียเกิด overgrowth จนไม่เหลือเชื้อมาลาเรียเหลืออยู่ เพราะระหว่างการทดลองมีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 24 ชั่วโมง แต่ไม่มีการเติมเลือดใหม่เข้าไป

ปัจจัยทางเคมี

1. ยาปฏิชีวนะ

1.1 เพนิซิลลิน

การทดลองนี้ทั้งกลุ่มเชื้อแบบระยะเดียวและกลุ่มเชื้อหลายระยะของเชื้อทุกสายพันธุ์ เกิดการ overgrowth ที่เวลา 72 ชั่วโมง สังเกตได้จากที่เวลา 72 ชั่วโมงมีค่า % parasitaemia ต่ำกว่าที่เวลา 48 ชั่วโมง (ตารางที่ 11 และ 12)

1.1.1 กลุ่มเชื้อแบบระยะเดียว

ในกลุ่มเชื้อแบบระยะเดียว เชื้อมาลาเรีย K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเพนิซิลลินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ หากดูผลในเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า เชื้อ T9/94RC17 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเพนิซิลลินที่ความเข้มข้น 50, 500 และ 5000 units มีค่า % total parasitaemia สูงกว่าเชื้อชนิดอื่น โดยมีค่าเท่ากับ 7.87%, 7.94% และ 7.02% เมื่อเปรียบเทียบระหว่างความเข้มข้น พบว่า ที่ความเข้มข้น 50000 units มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย T9/94RC17 ที่มีค่า % total parasitaemia ลดลงอย่างเห็นได้ชัดเจน คือ มีค่าเท่ากับ 3.87% ในขณะที่เชื้อ K1CB1 และ 3D7 มีค่า % total parasitaemia เท่ากับ 3.80% และ 2.64% ตามลำดับซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับความเข้มข้นอื่น ๆ (ตารางที่ 11)

เมื่อเปรียบเทียบเชื้อแต่ละระยะของเชื้อมาลาเรีย ที่เวลา 24 ชั่วโมง เชื้อมาลาเรียที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเพนิซิลลินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เชื้อยังคงมีการเจริญเติบโตเป็นปกติ โดยมีค่า % parasitaemia ของเชื้อระยะวงแหวนและระยะไม่ไช่วงแหวนใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม ส่วนที่เวลา 48 ชั่วโมง เชื้อ K1CB1 และ 3D7 มีค่า % parasitaemia ของเชื้อ ระยะวงแหวนและระยะไม่ไช่วงแหวนใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม แต่เชื้อ T9/94RC17 มีค่า % parasitaemia ของทุกความเข้มข้นใกล้เคียงกัน ยกเว้นที่ความเข้มข้น 50000 Units ของเชื้อในระยะวงแหวนมีจำนวนที่ลดลงเหลือ 2.12% ซึ่งมีค่าต่ำกว่าที่ความเข้มข้นอื่น ๆ ขณะที่เชื้อในระยะไม่ไช่วงแหวนยังคงมีค่าใกล้เคียงกับความเข้มข้นอื่น ๆ (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 ค่า % parasitaemia (mean \pm SD) ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1 (a.), T9/94RC17 (b.) และ 3D7 (c.) ในกลุ่มควบคุม (ไม่มีเพนิซิลลิน) และกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเพนิซิลลินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของกลุ่มเชื้อแบบระยะเดียว (syn)

a.

Synchronization		Penicillin				
		0 Units	50 Units	500 Units	5000 Units	50000 Units
K1CB1						
0 hour	Total	0.41 \pm 0.00	0.41 \pm 0.00	0.41 \pm 0.00	0.41 \pm 0.00	0.41 \pm 0.00
	Ring	0.41 \pm 0.00	0.41 \pm 0.00	0.41 \pm 0.00	0.41 \pm 0.00	0.41 \pm 0.00
	Non-ring	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
24 hours	Total	0.59 \pm 0.11	0.71 \pm 0.17	0.81 \pm 0.06	0.67 \pm 0.04	0.69 \pm 0.08
	Ring	0.07 \pm 0.12	0.03 \pm 0.06	0.04 \pm 0.06	0.00	0.03 \pm 0.05
	Non-ring	0.52 \pm 0.08	0.68 \pm 0.13	0.78 \pm 0.12	0.67 \pm 0.04	0.66 \pm 0.08
48 hours	Total	4.07 \pm 0.76	3.98 \pm 0.89	4.76 \pm 1.37	4.37 \pm 0.77	3.80 \pm 1.06
	Ring	0.39 \pm 0.59	0.31 \pm 0.30	0.41 \pm 0.29	0.52 \pm 0.09	0.54 \pm 0.32
	Non-ring	3.68 \pm 1.35	3.67 \pm 0.62	4.35 \pm 1.34	3.84 \pm 0.88	3.26 \pm 1.36
72 hours	Total	2.92 \pm 0.94	3.31 \pm 0.76	3.35 \pm 0.32	3.47 \pm 1.19	3.01 \pm 0.55
	Ring	2.41 \pm 0.89	2.85 \pm 0.57	2.07 \pm 0.30	3.30 \pm 0.77	2.48 \pm 0.73
	Non-ring	0.51 \pm 0.09	0.46 \pm 0.20	1.28 \pm 0.62	0.50 \pm 0.19	0.53 \pm 0.63

b.

Synchronization		Penicillin				
T9/94RC17		0 Units	50 Units	500 Units	5000 Units	50000 Units
0 hour	Total	0.29 ± 0.00	0.29 ± 0.00	0.29 ± 0.00	0.29 ± 0.00	0.29 ± 0.00
	Ring	0.29 ± 0.00	0.29 ± 0.00	0.29 ± 0.00	0.29 ± 0.00	0.29 ± 0.00
	Non-ring	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
24 hours	Total	0.63 ± 0.06	1.22 ± 0.30	1.37 ± 0.49	1.68 ± 0.08	0.86 ± 0.24
	Ring	0.06 ± 0.11	0.62 ± 0.26	0.84 ± 0.43	1.35 ± 0.05	0.14 ± 0.16
	Non-ring	0.57 ± 0.17	0.60 ± 0.17	0.52 ± 0.13	0.67 ± 0.08	0.72 ± 0.14
48 hours	Total	6.99 ± 2.71	7.87 ± 2.16	7.94 ± 2.30	7.02 ± 1.06	3.87 ± 1.34
	Ring	5.71 ± 3.00	5.50 ± 1.53	5.84 ± 1.36	5.15 ± 0.32	2.12 ± 1.36
	Non-ring	1.28 ± 0.32	2.37 ± 0.64	2.09 ± 1.09	1.86 ± 1.36	1.76 ± 0.34
72 hours	Total	2.88 ± 0.17	2.69 ± 0.41	3.00 ± 0.04	2.66 ± 0.55	1.98 ± 0.31
	Ring	1.15 ± 0.83	0.52 ± 0.45	0.96 ± 0.51	0.61 ± 0.73	0.98 ± 0.55
	Non-ring	1.73 ± 0.72	2.17 ± 0.54	2.05 ± 0.53	2.05 ± 0.63	1.00 ± 0.83

c.

Synchronization		Penicillin				
3D7		0 Units	50 Units	500 Units	5000 Units	50000 Units
0 hour	Total	0.39 ± 0.00	0.39 ± 0.00	0.39 ± 0.00	0.39 ± 0.00	0.39 ± 0.00
	Ring	0.39 ± 0.00	0.39 ± 0.00	0.39 ± 0.00	0.39 ± 0.00	0.39 ± 0.00
	Non-ring	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
24 hours	Total	0.72 ± 0.21	0.57 ± 0.10	0.58 ± 0.07	0.65 ± 0.28	0.57 ± 0.18
	Ring	0.07 ± 0.12	0.03 ± 0.06	0.00	0.00	0.03 ± 0.05
	Non-ring	0.65 ± 0.09	0.54 ± 0.15	0.58 ± 0.07	0.65 ± 0.28	0.53 ± 0.13
48 hours	Total	3.11 ± 1.07	2.86 ± 0.33	2.40 ± 0.52	3.18 ± 0.51	2.64 ± 0.46
	Ring	0.22 ± 0.19	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.10	0.09 ± 0.10	0.07 ± 0.06
	Non-ring	2.23 ± 1.70	2.76 ± 0.32	2.31 ± 0.43	3.09 ± 0.42	2.57 ± 0.42
72 hours	Total	1.84 ± 0.11	2.82 ± 1.24	2.01 ± 0.18	1.48 ± 0.15	2.01 ± 0.42
	Ring	1.74 ± 0.19	2.82 ± 1.24	1.88 ± 0.21	1.32 ± 0.29	1.98 ± 0.44
	Non-ring	0.10 ± 0.10	0.00	0.14 ± 0.06	0.17 ± 0.15	0.04 ± 0.06

1.1.2 กลุ่มเชื้อแบบหลายระยะ

ในกลุ่มเชื้อแบบหลายระยะ เชื้อมาลาเรีย K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเพนิซิลลินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มีจำนวนที่เพิ่มขึ้น จนถึงที่เวลา 48 ชั่วโมง มีค่า % total parasitaemia สูงที่สุด โดยเชื้อ T9/94RC17 ที่ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเพนิซิลลินที่ความเข้มข้น 50, 500 และ 5000 units มีค่า % total parasitaemia เท่ากับ 13.42%, 13.36% และ 11.76% ซึ่งมีค่าสูงกว่าเชื้อชนิดอื่น ส่วนที่ความเข้มข้น 50000 units เชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์มีผลแตกต่างกัน คือ เชื้อ K1CB1 มีค่า % total parasitaemia เท่ากับ 3.90% ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมแต่มีค่าต่ำกว่าความเข้มข้นอื่น ๆ เชื้อ T9/94RC17 มีค่า % total parasitaemia เท่ากับ 5.66% ซึ่งมีค่าต่ำกว่าความเข้มข้นอื่น ๆ และเชื้อ 3D7 มีค่า % total parasitaemia เท่ากับ 6.28% ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับความเข้มข้นอื่น ๆ (ตารางที่ 12)

เมื่อเปรียบเทียบเชื้อแต่ละระยะของเชื้อมาลาเรีย ที่เวลา 24 ชั่วโมง เชื้อมาลาเรียที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเพนิซิลลินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เชื้อยังคงมีการเจริญเติบโตเป็นปกติ โดยมีค่า % parasitaemia ของเชื้อระยะวงแหวนและระยะไมโซวงแหวนใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม ที่เวลา 48 ชั่วโมง เชื้อ K1CB1 มีค่า % parasitaemia ของกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ความเข้มข้น 50000 Units ใกล้เคียงกันและมีค่าต่ำกว่าที่ความเข้มข้นอื่น ๆ โดยระยะวงแหวนมีค่าเท่ากับ 1.65% และ 2.01% ตามลำดับ ส่วนเชื้อระยะไมโซวงแหวนมีค่าเท่ากับ 2.04% และ 1.89% ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อ T9/94RC17 ที่ความเข้มข้น 50000 Units มีค่า % parasitaemia ของเชื้อระยะวงแหวนและระยะไมโซวงแหวนต่ำกว่าที่ความเข้มข้นอื่น ๆ คือ มีค่าเท่ากับ 3.27% และ 2.06% ตามลำดับ ส่วนเชื้อ 3D7 มีค่า % parasitaemia ของทุกความเข้มข้นใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 12)

การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเพนิซิลลินที่ความเข้มข้น 50000 units มีผลในการลดการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย T9/94RC17 โดยมีค่า % parasitaemia ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม

ตารางที่ 12 ค่า % parasitaemia (mean \pm SD) ของเชื้อ K1CB1 (a.), T9/94RC17 (b.) และ 3D7 (c.) ในกลุ่มควบคุม (ไม่มีเพนิซิลลิน) และกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเพนิซิลลินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของกลุ่มเชื้อแบบหลายระยะ (asyn)

a.

Asynchronization		Penicillin				
		0 Units	50 Units	500 Units	5000 Units	50000 Units
K1CB1						
0 hour	Total	0.48 \pm 0.00	0.48 \pm 0.00	0.48 \pm 0.00	0.48 \pm 0.00	0.48 \pm 0.00
	Ring	0.29 \pm 0.00	0.29 \pm 0.00	0.29 \pm 0.00	0.29 \pm 0.00	0.29 \pm 0.00
	Non-ring	0.19 \pm 0.00	0.19 \pm 0.00	0.19 \pm 0.00	0.19 \pm 0.00	0.19 \pm 0.00
24 hours	Total	0.64 \pm 0.08	0.83 \pm 0.13	1.02 \pm 0.33	0.76 \pm 0.13	0.60 \pm 0.12
	Ring	0.12 \pm 0.14	0.37 \pm 0.25	0.35 \pm 0.23	0.19 \pm 0.20	0.03 \pm 0.05
	Non-ring	0.51 \pm 0.06	0.45 \pm 0.15	0.67 \pm 0.12	0.56 \pm 0.07	0.57 \pm 0.07
48 hours	Total	3.69 \pm 1.76	7.14 \pm 1.75	6.36 \pm 2.30	6.61 \pm 2.27	3.90 \pm 1.45
	Ring	1.65 \pm 0.70	3.94 \pm 0.97	3.35 \pm 1.31	3.53 \pm 1.80	2.01 \pm 1.13
	Non-ring	2.04 \pm 1.07	3.20 \pm 1.01	3.02 \pm 1.00	3.08 \pm 0.50	1.89 \pm 0.39
72 hours	Total	2.98 \pm 0.35	3.58 \pm 0.34	4.01 \pm 0.62	3.68 \pm 0.86	1.33 \pm 1.07
	Ring	2.06 \pm 0.31	2.49 \pm 0.27	3.49 \pm 0.20	2.41 \pm 0.35	0.70 \pm 0.58
	Non-ring	0.93 \pm 0.07	1.10 \pm 0.31	0.53 \pm 0.46	1.27 \pm 0.73	0.63 \pm 0.49

b.

Asynchronization		Penicillin				
T9/94RC17		0 Units	50 Units	500 Units	5000 Units	50000 Units
0 hour	Total	0.49 ± 0.00	0.49 ± 0.00	0.49 ± 0.00	0.49 ± 0.00	0.49 ± 0.00
	Ring	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00
	Non-ring	0.39 ± 0.00	0.39 ± 0.00	0.39 ± 0.00	0.39 ± 0.00	0.39 ± 0.00
24 hours	Total	1.66 ± 0.46	2.45 ± 0.73	2.20 ± 0.25	2.04 ± 0.63	1.43 ± 0.85
	Ring	1.17 ± 0.69	1.99 ± 0.71	1.74 ± 0.20	1.45 ± 0.62	0.70 ± 0.71
	Non-ring	0.50 ± 0.25	0.47 ± 0.23	0.46 ± 0.09	0.59 ± 0.10	0.73 ± 0.21
48 hours	Total	9.09 ± 2.38	13.42 ± 1.45	13.36 ± 1.69	11.76 ± 4.69	5.66 ± 2.18
	Ring	4.94 ± 0.34	7.40 ± 1.94	5.78 ± 1.09	6.21 ± 3.20	3.27 ± 1.63
	Non-ring	4.15 ± 2.04	6.02 ± 0.53	6.61 ± 1.84	5.56 ± 1.59	2.06 ± 0.34
72 hours	Total	2.97 ± 0.57	4.78 ± 1.02	4.62 ± 0.98	3.14 ± 1.13	2.02 ± 0.63
	Ring	1.81 ± 0.21	2.51 ± 0.88	2.44 ± 1.20	1.67 ± 0.96	0.81 ± 0.24
	Non-ring	1.16 ± 0.47	2.27 ± 0.20	2.18 ± 0.22	1.47 ± 0.39	1.21 ± 0.63

c.

Asynchronization		Penicillin				
3D7		0 Units	50 Units	500 Units	5000 Units	50000 Units
0 hour	Total	0.38 ± 0.00	0.38 ± 0.00	0.38 ± 0.00	0.38 ± 0.00	0.38 ± 0.00
	Ring	0.19 ± 0.00	0.19 ± 0.00	0.19 ± 0.00	0.19 ± 0.00	0.19 ± 0.00
	Non-ring	0.19 ± 0.00	0.19 ± 0.00	0.19 ± 0.00	0.19 ± 0.00	0.19 ± 0.00
24 hours	Total	1.12 ± 0.18	1.31 ± 0.20	1.67 ± 0.38	1.26 ± 0.17	1.10 ± 0.52
	Ring	0.79 ± 0.13	0.83 ± 0.15	1.11 ± 0.17	0.82 ± 0.11	0.60 ± 0.37
	Non-ring	0.33 ± 0.16	0.47 ± 0.08	0.56 ± 0.27	0.45 ± 0.24	0.50 ± 0.16
48 hours	Total	6.56 ± 1.67	7.18 ± 0.34	6.29 ± 0.66	7.31 ± 0.94	6.28 ± 1.65
	Ring	4.50 ± 0.89	5.20 ± 0.88	4.11 ± 1.13	5.54 ± 1.06	4.61 ± 0.79
	Non-ring	2.06 ± 0.80	1.98 ± 0.83	2.18 ± 1.14	2.12 ± 0.28	1.67 ± 0.86
72 hours	Total	1.89 ± 0.50	2.74 ± 0.62	2.71 ± 0.61	2.03 ± 0.22	2.00 ± 0.71
	Ring	1.10 ± 0.49	1.49 ± 0.46	1.51 ± 0.28	0.85 ± 0.31	0.84 ± 0.20
	Non-ring	0.78 ± 0.12	1.25 ± 0.23	1.20 ± 0.45	1.18 ± 0.24	1.16 ± 0.52

1.2 ลินโคมัยซิน

1.2.1 กลุ่มเชื้อแบคทีเรียเดี่ยว

เชื้อมาลาเรีย K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีลินโคมัยซินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในกลุ่มเชื้อแบคทีเรียเดี่ยว ที่ความเข้มข้น 5×10^{-4} โมลาร์ ไม่พบเชื้อที่เวลา 72 ชั่วโมง (ตารางที่ 13)

เมื่อเปรียบเทียบเชื้อแต่ละระยะของเชื้อมาลาเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีลินโคมัยซินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า ที่ความเข้มข้น 5×10^{-4} โมลาร์ มีค่า % parasitaemia ต่ำที่สุดในทุกครั้งที่ตรวจสอบ โดยไม่พบเชื้อมาลาเรียระยะวงแหวนแต่พบเชื้อระยะไม่ใช้วงแหวนที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยเชื้อ K1CB1 มีค่า % parasitaemia เท่ากับ 0.13% และ 0.17% ตามลำดับ เชื้อ 3D7 มีค่าเท่ากับ 0.20% และ 0.10% ตามลำดับ ส่วนเชื้อ T9/94RC17 พบเชื้อที่เวลา 48 ชั่วโมง เท่านั้น โดยมีค่าเท่ากับ 0.03% และเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ไม่พบเชื้อมาลาเรียทุกระยะที่เวลา 72 ชั่วโมง (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 13 ค่า % parasitaemia (mean \pm SD) ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1 (a.), T9/94RC17 (b.) และ 3D7 (c.) ในกลุ่มควบคุม (ไม่มีลินโคมายซิน) และกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีลินโคมายซินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของกลุ่มเชื้อแบบระยะเดียว (syn)

a.

Synchronization		Lincomycin					
K1CB1		0 M	5×10^{-8} M	5×10^{-7} M	5×10^{-6} M	5×10^{-5} M	5×10^{-4} M
0 hour	Total	0.40 \pm 0.00	0.40 \pm 0.00	0.40 \pm 0.00	0.40 \pm 0.00	0.40 \pm 0.00	0.40 \pm 0.00
	Ring	0.40 \pm 0.00	0.40 \pm 0.00	0.40 \pm 0.00	0.40 \pm 0.00	0.40 \pm 0.00	0.40 \pm 0.00
	Non-ring	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
24 hours	Total	0.85 \pm 0.24	0.84 \pm 0.18	1.00 \pm 0.15	1.20 \pm 0.67	0.78 \pm 0.05	0.13 \pm 0.12
	Ring	0.03 \pm 0.06	0.03 \pm 0.06	0.00	0.03 \pm 0.06	0.00	0.00
	Non-ring	0.82 \pm 0.26	0.81 \pm 0.23	1.00 \pm 0.15	1.18 \pm 0.59	0.78 \pm 0.05	0.13 \pm 0.12
48 hours	Total	2.39 \pm 0.40	1.91 \pm 0.69	2.02 \pm 0.29	1.15 \pm 0.20	1.13 \pm 0.05	0.17 \pm 0.06
	Ring	2.05 \pm 0.74	1.80 \pm 0.58	1.56 \pm 0.32	0.90 \pm 0.19	0.74 \pm 0.22	0.00
	Non-ring	0.34 \pm 0.33	0.12 \pm 0.10	0.46 \pm 0.03	0.24 \pm 0.13	0.39 \pm 0.27	0.17 \pm 0.16
72 hours	Total	2.29 \pm 0.62	2.71 \pm 0.49	1.98 \pm 0.70	1.56 \pm 0.16	0.56 \pm 0.09	0.00
	Ring	0.56 \pm 0.39	0.07 \pm 0.06	0.00	0.00	0.00	0.00
	Non-ring	1.72 \pm 0.94	2.65 \pm 0.52	1.98 \pm 0.70	1.56 \pm 0.16	0.56 \pm 0.09	0.00

b.

Synchronization		Lincomycin					
		T9/94RC17	0 M	5×10^{-8} M	5×10^{-7} M	5×10^{-6} M	5×10^{-5} M
0 hour	Total	0.45 ± 0.00	0.45 ± 0.00	0.45 ± 0.00	0.45 ± 0.00	0.45 ± 0.00	0.45 ± 0.00
	Ring	0.45 ± 0.00	0.45 ± 0.00	0.45 ± 0.00	0.45 ± 0.00	0.45 ± 0.00	0.45 ± 0.00
	Non-ring	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
24 hours	Total	1.30 ± 0.21	1.06 ± 0.34	0.83 ± 0.20	0.81 ± 0.13	0.62 ± 0.15	0.00
	Ring	0.58 ± 0.35	0.54 ± 0.47	0.35 ± 0.17	0.24 ± 0.13	0.03 ± 0.06	0.00
	Non-ring	0.71 ± 0.21	0.52 ± 0.13	0.47 ± 0.11	0.57 ± 0.01	0.58 ± 0.14	0.00
48 hours	Total	1.69 ± 0.62	2.09 ± 0.61	0.72 ± 0.00	0.72 ± 0.56	0.66 ± 0.42	0.03 ± 0.06
	Ring	0.24 ± 0.21	0.03 ± 0.06	0.10 ± 0.00	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.18	0.00
	Non-ring	1.45 ± 0.43	2.06 ± 0.59	0.62 ± 0.00	0.61 ± 0.57	0.56 ± 0.24	0.03 ± 0.06
72 hours	Total	3.72 ± 0.65	1.42 ± 0.06	0.81 ± 0.39	1.19 ± 0.61	0.81 ± 0.19	0.00
	Ring	2.96 ± 0.69	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Non-ring	0.76 ± 0.25	1.42 ± 0.06	0.81 ± 0.39	1.19 ± 0.61	0.81 ± 0.19	0.00

c.

Synchronization		Lincomycin					
		3D7	0 M	5×10^{-8} M	5×10^{-7} M	5×10^{-6} M	5×10^{-5} M
0 hour	Total	0.41 ± 0.00	0.41 ± 0.00	0.41 ± 0.00	0.41 ± 0.00	0.41 ± 0.00	0.41 ± 0.00
	Ring	0.41 ± 0.00	0.41 ± 0.00	0.41 ± 0.00	0.41 ± 0.00	0.41 ± 0.00	0.41 ± 0.00
	Non-ring	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
24 hours	Total	0.80 ± 0.13	0.68 ± 0.09	0.69 ± 0.29	0.82 ± 0.21	0.68 ± 0.12	0.20 ± 0.01
	Ring	0.00	0.00	0.05 ± 0.07	0.00	0.17 ± 0.29	0.00
	Non-ring	0.80 ± 0.13	0.68 ± 0.09	0.64 ± 0.35	0.82 ± 0.21	0.51 ± 0.18	0.20 ± 0.01
48 hours	Total	1.88 ± 0.64	1.73 ± 0.16	2.12 ± 0.48	1.17 ± 0.60	0.62 ± 0.14	0.10 ± 0.10
	Ring	1.20 ± 0.49	1.09 ± 0.11	1.77 ± 0.45	1.08 ± 0.51	0.32 ± 0.10	0.00
	Non-ring	0.68 ± 0.35	0.65 ± 0.05	0.35 ± 0.05	0.09 ± 0.09	0.30 ± 0.15	0.10 ± 0.10
72 hours	Total	1.96 ± 0.46	1.31 ± 0.23	1.66 ± 0.26	1.16 ± 0.46	0.67 ± 0.09	0.00
	Ring	0.00	0.00	0.07 ± 0.06	0.00	0.00	0.00
	Non-ring	1.96 ± 0.46	1.31 ± 0.23	1.59 ± 0.20	1.16 ± 0.46	0.67 ± 0.09	0.00

1.2.2 กลุ่มเชื้อแบบหลายระยะ

เชื้อมาลาเรีย K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีลินโคมัยซินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในกลุ่มเชื้อแบบหลายระยะ มีผลการทดลองคล้ายกับกลุ่มเชื้อแบบระยะเดียว คือ เมื่อเวลา 72 ชั่วโมง ไม่พบเชื้อมาลาเรียเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้น 5×10^{-4} ไมลาร์ (ตารางที่ 14)

เมื่อเปรียบเทียบเชื้อแต่ละระยะของเชื้อมาลาเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีลินโคมัยซินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้ผลการทดลองคล้ายกับกลุ่มเชื้อระยะเดียว โดยพบว่า ที่ความเข้มข้น 5×10^{-4} ไมลาร์ ในทุกครั้งที่ตรวจสอบ โดยไม่พบเชื้อมาลาเรียระยะวงแหวน แต่พบเชื้อระยะไม่ใช่วงแหวนที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยเชื้อ K1CB1 มีค่า % parasitaemia เท่ากับ 0.52% และ 0.13% ตามลำดับ เชื้อ T9/94RC17 มีค่าเท่ากับ 0.23% และ 0.04% ตามลำดับ เชื้อ 3D7 มีค่าเท่ากับ 0.21% และ 0.10% ตามลำดับ และเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ไม่พบเชื้อมาลาเรียทุกระยะที่เวลา 72 ชั่วโมง ในขณะที่ความเข้มข้นอื่น ๆ ของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ มีค่า % parasitaemia ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (ตารางที่ 14)

การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าลินโคมัยซินมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดของลินโคมัยซินที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (MIC) เท่ากับ 5×10^{-4} ไมลาร์

ตารางที่ 14 ค่า % parasitaemia (mean \pm SD) ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1 (a.), T9/94RC17 (b.) และ 3D7 (c.) ในกลุ่มควบคุม (ไม่มีลินโคมายซิน) และกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีลินโคมายซินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของกลุ่มเชื้อแบบหลายระยะ (asyn)

a.

Asynchronization		Lincomycin						
		K1CB1	0 M	5×10^{-8} M	5×10^{-7} M	5×10^{-6} M	5×10^{-5} M	5×10^{-4} M
0 hour	Total	0.32 \pm 0.00	0.32 \pm 0.00	0.32 \pm 0.00	0.32 \pm 0.00	0.32 \pm 0.00	0.32 \pm 0.00	0.32 \pm 0.00
	Ring	0.32 \pm 0.00	0.32 \pm 0.00	0.32 \pm 0.00	0.32 \pm 0.00	0.32 \pm 0.00	0.32 \pm 0.00	0.32 \pm 0.00
	Non-ring	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
24 hours	Total	1.32 \pm 0.02	1.07 \pm 0.31	1.40 \pm 0.43	1.43 \pm 0.20	1.41 \pm 0.38	0.52 \pm 0.13	
	Ring	0.13 \pm 0.15	0.13 \pm 0.07	0.20 \pm 0.20	0.23 \pm 0.05	0.20 \pm 0.18	0.00	
	Non-ring	1.19 \pm 0.14	0.93 \pm 0.31	1.20 \pm 0.27	1.20 \pm 0.24	1.20 \pm 0.20	0.52 \pm 0.13	
48 hours	Total	2.31 \pm 0.81	2.50 \pm 0.40	2.51 \pm 0.68	1.86 \pm 0.33	1.39 \pm 0.63	0.13 \pm 0.07	
	Ring	1.67 \pm 0.51	1.77 \pm 0.25	1.70 \pm 0.40	1.16 \pm 0.33	0.68 \pm 0.61	0.00	
	Non-ring	0.64 \pm 0.31	0.72 \pm 0.30	0.81 \pm 0.32	0.71 \pm 0.01	0.70 \pm 0.09	0.13 \pm 0.07	
72 hours	Total	3.29 \pm 1.26	2.61 \pm 0.63	1.90 \pm 0.46	2.03 \pm 0.54	0.80 \pm 0.05	0.00	
	Ring	0.38 \pm 0.66	0.09 \pm 0.01	0.03 \pm 0.06	0.11 \pm 0.11	0.05 \pm 0.07	0.00	
	Non-ring	2.90 \pm 0.62	2.52 \pm 0.64	1.86 \pm 0.41	1.92 \pm 0.56	0.75 \pm 0.02	0.00	

b.

Asynchronization		Lincomycin					
		T9/94RC17	0 M	5×10^{-8} M	5×10^{-7} M	5×10^{-6} M	5×10^{-5} M
0 hour	Total	0.51 ± 0.00	0.51 ± 0.00	0.51 ± 0.00	0.51 ± 0.00	0.51 ± 0.00	0.51 ± 0.00
	Ring	0.31 ± 0.00	0.31 ± 0.00	0.31 ± 0.00	0.31 ± 0.00	0.31 ± 0.00	0.31 ± 0.00
	Non-ring	0.21 ± 0.00	0.21 ± 0.00	0.21 ± 0.00	0.21 ± 0.00	0.21 ± 0.00	0.21 ± 0.00
24 hours	Total	1.91 ± 0.23	1.28 ± 0.29	1.39 ± 0.11	1.20 ± 0.28	1.14 ± 0.24	0.23 ± 0.06
	Ring	0.72 ± 0.12	0.31 ± 0.30	0.38 ± 0.09	0.58 ± 0.25	0.41 ± 0.18	0.00
	Non-ring	1.18 ± 0.19	0.98 ± 0.09	1.01 ± 0.08	0.62 ± 0.11	0.73 ± 0.30	0.23 ± 0.06
48 hours	Total	3.99 ± 1.02	3.92 ± 0.41	2.80 ± 0.30	1.91 ± 0.42	1.53 ± 0.66	0.04 ± 0.06
	Ring	2.12 ± 0.85	2.58 ± 0.33	1.77 ± 0.16	0.95 ± 0.36	0.42 ± 0.21	0.00
	Non-ring	1.87 ± 0.42	1.34 ± 0.45	1.03 ± 0.22	0.97 ± 0.27	1.11 ± 0.56	0.04 ± 0.06
72 hours	Total	3.67 ± 0.92	2.53 ± 0.70	2.71 ± 0.78	2.21 ± 0.38	2.00 ± 0.03	0.00
	Ring	0.97 ± 1.20	0.00	0.10 ± 0.01	0.03 ± 0.06	0.03 ± 0.06	0.00
	Non-ring	2.69 ± 0.38	2.53 ± 0.70	2.61 ± 0.77	2.18 ± 0.35	1.97 ± 0.07	0.00

c.

Asynchronization		Lincomycin					
		3D7	0 M	5×10^{-8} M	5×10^{-7} M	5×10^{-6} M	5×10^{-5} M
0 hour	Total	0.41 ± 0.00	0.41 ± 0.00	0.41 ± 0.00	0.41 ± 0.00	0.41 ± 0.00	0.41 ± 0.00
	Ring	0.31 ± 0.00	0.31 ± 0.00	0.31 ± 0.00	0.31 ± 0.00	0.31 ± 0.00	0.31 ± 0.00
	Non-ring	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00
24 hours	Total	1.20 ± 0.15	1.15 ± 0.25	1.13 ± 0.24	0.83 ± 0.08	0.72 ± 0.17	0.21 ± 0.10
	Ring	0.34 ± 0.32	0.35 ± 0.12	0.34 ± 0.32	0.14 ± 0.15	0.21 ± 0.18	0.00
	Non-ring	0.86 ± 0.18	0.80 ± 0.14	0.79 ± 0.23	0.70 ± 0.14	0.52 ± 0.02	0.21 ± 0.10
48 hours	Total	1.72 ± 0.33	1.66 ± 0.55	1.76 ± 0.19	0.97 ± 0.25	1.02 ± 0.32	0.10 ± 0.11
	Ring	0.98 ± 0.18	0.70 ± 0.42	1.06 ± 0.01	0.49 ± 0.10	0.42 ± 0.30	0.00
	Non-ring	0.75 ± 0.25	0.96 ± 0.21	0.70 ± 0.20	0.48 ± 0.16	0.60 ± 0.29	0.10 ± 0.11
72 hours	Total	2.03 ± 0.49	1.94 ± 0.10	1.34 ± 0.12	1.12 ± 0.34	0.97 ± 0.56	0.00
	Ring	0.23 ± 0.05	0.03 ± 0.06	0.08 ± 0.13	0.04 ± 0.06	0.03 ± 0.06	0.00
	Non-ring	1.80 ± 0.53	1.91 ± 0.09	1.26 ± 0.15	1.08 ± 0.34	0.93 ± 0.50	0.00

2. ซีรัมของมนุษย์

2.1 กลุ่มเชื้อแบบระยะเดียว

เมื่อเปรียบเทียบค่า % total parasitaemia ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซีรัมของมนุษย์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในกลุ่มเชื้อแบบระยะเดียว พบว่า ช่วงเวลา 0 – 48 ชั่วโมง มีเชื้อมาลาเรียเพิ่มขึ้น และลดลงที่เวลา 72 ชั่วโมง เนื่องจากเชื้อเกิดการ overgrowth (ตารางที่ 15)

หากดูผลที่เวลา 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุม เชื้อ K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซีรัมของมนุษย์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จะเห็นได้ว่าความเข้มข้น 4.8% มีค่า % parasitaemia ต่ำที่สุด แต่ที่ความเข้มข้นอื่น ๆ ไม่สามารถสรุปได้ว่าที่ความเข้มข้นใดทำให้เชื้อมีค่า % parasitaemia สูงที่สุด (ตารางที่ 15)

ตารางที่ 15 ค่า % parasitaemia (mean \pm SD) ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1 (a.), T9/94RC17 (b.) และ 3D7 (c.) ในกลุ่มควบคุม (ซีรัมของมนุษย์ เข้มข้น 10%) และกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซีรัมของมนุษย์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของกลุ่มเชื้อแบบระยะเดียว (syn)

a.

Synchronization		Serum			
		4.8%	7.2%	10.0%	12.0%
K1CB1	Total	0.33 \pm 0.00	0.33 \pm 0.00	0.33 \pm 0.00	0.33 \pm 0.00
	Ring	0.33 \pm 0.00	0.33 \pm 0.00	0.33 \pm 0.00	0.33 \pm 0.00
	Non-ring	0.00	0.00	0.00	0.00
24 hours	Total	0.69 \pm 0.08	0.63 \pm 0.12	0.71 \pm 0.30	0.77 \pm 0.21
	Ring	0.00	0.00	0.18 \pm 0.17	0.00
	Non-ring	0.69 \pm 0.08	0.63 \pm 0.12	0.53 \pm 0.13	0.77 \pm 0.21
48 hours	Total	2.13 \pm 0.31	2.44 \pm 0.44	2.53 \pm 0.50	2.94 \pm 0.29
	Ring	0.44 \pm 0.29	1.69 \pm 0.45	1.49 \pm 0.20	2.50 \pm 0.38
	Non-ring	1.69 \pm 0.15	0.74 \pm 0.22	1.03 \pm 0.61	0.44 \pm 0.23
72 hours	Total	2.78 \pm 0.07	2.99 \pm 0.21	3.21 \pm 1.37	2.23 \pm 0.42
	Ring	0.00	0.27 \pm 0.12	0.03 \pm 0.05	0.03 \pm 0.06
	Non-ring	2.78 \pm 0.07	2.73 \pm 0.15	3.18 \pm 1.32	2.20 \pm 0.41

b.

Synchronization		Serum			
		T9/94RC17	4.8%	7.2%	10.0%
0 hour	Total	0.40 ± 0.00	0.40 ± 0.00	0.40 ± 0.00	0.40 ± 0.00
	Ring	0.40 ± 0.00	0.40 ± 0.00	0.40 ± 0.00	0.40 ± 0.00
	Non-ring	0.00	0.00	0.00	0.00
24 hours	Total	1.69 ± 0.48	1.80 ± 0.34	1.56 ± 0.37	2.26 ± 1.01
	Ring	1.09 ± 0.40	1.40 ± 0.44	1.13 ± 0.30	1.76 ± 1.04
	Non-ring	0.60 ± 0.14	0.40 ± 0.18	0.43 ± 0.14	0.50 ± 0.04
48 hours	Total	3.92 ± 0.58	5.76 ± 0.51	5.32 ± 0.63	4.59 ± 0.28
	Ring	0.66 ± 0.15	0.24 ± 0.03	0.64 ± 0.27	0.34 ± 0.33
	Non-ring	3.26 ± 0.74	5.52 ± 0.53	4.68 ± 0.44	4.24 ± 0.46
72 hours	Total	4.12 ± 1.22	4.46 ± 1.69	3.52 ± 1.79	8.85 ± 7.74
	Ring	0.39 ± 0.18	0.94 ± 1.34	0.89 ± 1.22	6.15 ± 8.28
	Non-ring	3.73 ± 1.08	3.52 ± 0.43	2.63 ± 0.57	2.70 ± 0.59

c.

Synchronization		Serum			
		3D7	4.8%	7.2%	10.0%
0 hour	Total	0.47 ± 0.00	0.47 ± 0.00	0.47 ± 0.00	0.47 ± 0.00
	Ring	0.47 ± 0.00	0.47 ± 0.00	0.47 ± 0.00	0.47 ± 0.00
	Non-ring	0.00	0.00	0.00	0.00
24 hours	Total	0.69 ± 0.12	0.45 ± 0.09	0.78 ± 0.15	0.67 ± 0.11
	Ring	0.00	0.00	0.07 ± 0.06	0.00
	Non-ring	0.69 ± 0.12	0.45 ± 0.09	0.71 ± 0.20	0.67 ± 0.11
48 hours	Total	3.07 ± 0.14	3.71 ± 0.60	3.67 ± 0.63	3.79 ± 0.37
	Ring	0.96 ± 0.18	2.65 ± 0.98	2.55 ± 0.41	2.56 ± 0.10
	Non-ring	2.11 ± 0.26	1.05 ± 0.51	1.12 ± 0.59	1.17 ± 0.32
72 hours	Total	6.08 ± 1.30	4.63 ± 1.50	5.26 ± 1.04	5.48 ± 1.67
	Ring	1.89 ± 0.49	0.41 ± 0.30	0.69 ± 0.42	0.48 ± 0.21
	Non-ring	4.20 ± 0.84	4.22 ± 1.22	4.57 ± 0.98	5.00 ± 1.54

2.2 กลุ่มเชื้อแบบหลายระยะ

เมื่อเปรียบเทียบค่า % total parasitaemia ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1 และ 3D7 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซีรัมของมนุษย์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในกลุ่มเชื้อแบบหลายระยะ เชื้อมีจำนวนเพิ่มขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อไปจนถึงที่เวลา 72 ชั่วโมง ส่วนเชื้อ T9/94RC17 ช่วงเวลา 0 – 48 ชั่วโมง มีเชื้อมาลาเรียเพิ่มขึ้น และลดลงที่เวลา 72 ชั่วโมง เนื่องจากเชื้อเกิดการ overgrowth (ตารางที่ 16)

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมในกลุ่มเชื้อแบบหลายระยะ เชื้อ K1CB1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซีรัมของมนุษย์ที่ความเข้มข้น 10% และ 12% มีค่า % parasitaemia ใกล้เคียงกันและมีค่าสูงกว่าความเข้มข้น 4.8% และ 7.2% โดยที่ความเข้มข้น 4.8% มีค่า % parasitaemia ต่ำที่สุด มีค่าเท่ากับ 4.80% เชื้อ 3D7 ที่ความเข้มข้น 10% มีค่า % parasitaemia สูงที่สุดเท่ากับ 11.22% โดยที่ความเข้มข้น 4.80% มีค่า % parasitaemia ต่ำที่สุด มีค่าเท่ากับ 4.74% ส่วนเชื้อ T9/94RC17 ไม่สามารถรายงานผลที่เวลา 72 ชั่วโมงได้ แต่หากดูที่เวลา 48 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 10% มีค่า % parasitaemia สูงที่สุดและที่ความเข้มข้น 4.80% มีค่า % parasitaemia ต่ำที่สุด ซึ่งมีผลคล้ายกับเชื้อ K1CB1 และ 3D7 (ตารางที่ 16)

การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อมาลาเรีย K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของซีรัมเท่ากับ 4.80%, 7.20%, 10% และ 12% แต่ความเข้มข้นที่เชื้อมีค่า % parasitaemia สูงที่สุด คือ ที่ความเข้มข้น 10%

ตารางที่ 16 ค่า % parasitaemia (mean \pm SD) ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1 (a.), T9/94RC17 (b.) และ 3D7 (c.) ในกลุ่มควบคุม (ซีรัมของมนุษย์ เข้มข้น 10%) และกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซีรัมของมนุษย์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของกลุ่มเชื้อแบบหลายระยะ (asyn)

a.

Asynchronization		Serum			
		4.8%	7.2%	10.0%	12.0%
K1CB1	Total	0.43 \pm 0.00	0.43 \pm 0.00	0.43 \pm 0.00	0.43 \pm 0.00
	Ring	0.22 \pm 0.00	0.22 \pm 0.00	0.22 \pm 0.00	0.22 \pm 0.00
	Non-ring	0.22 \pm 0.00	0.22 \pm 0.00	0.22 \pm 0.00	0.22 \pm 0.00
0 hour	Total	1.21 \pm 0.35	0.96 \pm 0.32	1.36 \pm 0.27	1.25 \pm 0.07
	Ring	0.77 \pm 0.25	0.31 \pm 0.11	0.87 \pm 0.12	0.77 \pm 0.15
	Non-ring	0.44 \pm 0.14	0.65 \pm 0.32	0.48 \pm 0.15	0.48 \pm 0.10
24 hours	Total	2.93 \pm 0.58	2.48 \pm 0.82	3.52 \pm 0.19	2.70 \pm 0.53
	Ring	1.90 \pm 0.37	0.58 \pm 0.45	1.07 \pm 0.37	0.79 \pm 0.23
	Non-ring	1.03 \pm 0.22	1.89 \pm 0.37	2.45 \pm 0.31	1.91 \pm 0.29
48 hours	Total	4.80 \pm 1.73	7.30 \pm 2.09	9.27 \pm 3.15	9.67 \pm 1.19
	Ring	2.02 \pm 0.94	2.60 \pm 1.78	4.73 \pm 2.38	5.65 \pm 1.01
	Non-ring	2.79 \pm 0.91	4.70 \pm 1.20	4.54 \pm 1.17	4.01 \pm 0.19
72 hours	Total	4.80 \pm 1.73	7.30 \pm 2.09	9.27 \pm 3.15	9.67 \pm 1.19
	Ring	2.02 \pm 0.94	2.60 \pm 1.78	4.73 \pm 2.38	5.65 \pm 1.01
	Non-ring	2.79 \pm 0.91	4.70 \pm 1.20	4.54 \pm 1.17	4.01 \pm 0.19

b.

Asynchronization		Serum			
		T9/94RC17	4.8%	7.2%	10.0%
0 hour	Total	0.63 ± 0.00	0.63 ± 0.00	0.63 ± 0.00	0.63 ± 0.00
	Ring	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00
	Non-ring	0.52 ± 0.00	0.52 ± 0.00	0.52 ± 0.00	0.52 ± 0.00
24 hours	Total	1.93 ± 0.27	1.77 ± 0.26	2.69 ± 0.51	2.31 ± 0.37
	Ring	1.28 ± 0.06	1.12 ± 0.29	1.85 ± 0.37	1.60 ± 0.40
	Non-ring	0.65 ± 0.20	0.66 ± 0.06	0.85 ± 0.16	0.71 ± 0.09
48 hours	Total	4.67 ± 0.91	5.50 ± 1.80	6.56 ± 0.17	5.24 ± 0.54
	Ring	0.34 ± 0.32	1.00 ± 0.28	2.95 ± 0.15	1.26 ± 0.25
	Non-ring	4.32 ± 1.21	4.50 ± 1.64	3.61 ± 0.30	3.98 ± 0.54
72 hours	Total	3.03 ± 1.40	5.96 ± 0.90	4.44 ± 1.08	2.52 ± 0.09
	Ring	0.23 ± 0.33	1.21 ± 0.07	0.67 ± 0.60	0.10 ± 0.00
	Non-ring	2.80 ± 1.07	4.75 ± 0.82	3.78 ± 0.91	2.42 ± 0.09

c.

Asynchronization		Serum			
		3D7	4.8%	7.2%	10.0%
0 hour	Total	0.72 ± 0.00	0.72 ± 0.00	0.72 ± 0.00	0.72 ± 0.00
	Ring	0.21 ± 0.00	0.21 ± 0.00	0.21 ± 0.00	0.21 ± 0.00
	Non-ring	0.51 ± 0.00	0.51 ± 0.00	0.51 ± 0.00	0.51 ± 0.00
24 hours	Total	1.58 ± 0.15	1.34 ± 0.46	1.53 ± 0.04	1.29 ± 0.80
	Ring	1.01 ± 0.32	0.76 ± 0.47	0.97 ± 0.16	0.67 ± 0.70
	Non-ring	0.58 ± 0.17	0.58 ± 0.13	0.56 ± 0.18	0.62 ± 0.28
48 hours	Total	3.09 ± 0.45	2.84 ± 0.70	4.72 ± 1.76	3.67 ± 0.30
	Ring	2.16 ± 0.31	1.06 ± 0.19	2.52 ± 0.60	1.41 ± 0.11
	Non-ring	0.93 ± 0.62	1.78 ± 0.63	2.20 ± 1.17	2.26 ± 0.27
72 hours	Total	4.74 ± 1.69	8.06 ± 3.32	11.22 ± 3.11	8.54 ± 2.88
	Ring	0.10 ± 0.17	3.33 ± 1.31	6.43 ± 2.73	3.86 ± 2.04
	Non-ring	4.64 ± 1.53	4.73 ± 2.05	4.79 ± 0.42	4.68 ± 0.91

3. วิตามินซี

อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมวิตามินซีที่ความเข้มข้นสูง ๆ สีของอาหารเลี้ยงเชื้อเกิดการเปลี่ยนแปลงไป โดยมีสีออกเหลืองมากขึ้น (อาหารเลี้ยงเชื้อปกติมักมีสีส้มอ่อน ๆ) เมื่อเลี้ยงเชื้อ K1CB1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของวิตามินซีเท่ากับ 5×10^{-3} โมลาร์ (ความเข้มข้นสูงสุดที่ทดลอง) ไม่สามารถทำฟิล์มเลือดบางได้ เนื่องจากเลือดมีลักษณะเป็นเมือกและมีสีดำ

3.1 กลุ่มเชื้อแบบระยะเดียว

เมื่อเปรียบเทียบค่า % total parasitaemia ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีวิตามินซีที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในกลุ่มเชื้อแบบระยะเดียว พบว่าช่วงเวลา 0 – 48 ชั่วโมง มีเชื้อมาลาเรียเพิ่มขึ้น และลดลงที่เวลา 72 ชั่วโมง ในบางความเข้มข้นเนื่องจากเชื้อเกิดการ overgrowth หากดูผลที่เวลา 48 ชั่วโมงแทน เชื้อมีค่า % total parasitaemia สูงขึ้น เชื้อ T9/94RC17 และ 3D7 มีค่า % total parasitaemia ของทุกความเข้มข้นใกล้เคียงกัน ยกเว้นที่ความเข้มข้น 5×10^{-3} โมลาร์ ของเชื้อ T9/94RC17 มีค่าเท่ากับ 3.18% ซึ่งมีค่าต่ำกว่าที่ความเข้มข้นอื่น ๆ ส่วนเชื้อ K1CB1 ที่ความเข้มข้น 5×10^{-3} โมลาร์ มีค่า % total parasitaemia เพิ่มขึ้นมาเป็น 0.57% ที่เวลา 24 ชั่วโมง ลดลงเหลือ 0.13% ที่เวลา 48 ชั่วโมง และไม่พบเชื้อที่เวลา 72 ชั่วโมง (ตารางที่ 17)

ตารางที่ 17 ค่า % parasitaemia (mean \pm SD) ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1 (a.), T9/94RC17 (b.) และ 3D7 (c.) ในกลุ่มควบคุม (ไม่มีวิตามินซี) และกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีวิตามินซีที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของกลุ่มเชื้อแบบระยะเดียว (syn)

a.

Asynchronization		Vitamin C					
		K1CB1	0 M	1×10^{-5} M	5×10^{-5} M	1×10^{-4} M	5×10^{-4} M
0 hours	Total	0.52 \pm 0.00	0.52 \pm 0.00	0.52 \pm 0.00	0.52 \pm 0.00	0.52 \pm 0.00	0.52 \pm 0.00
	Ring	0.21 \pm 0.00	0.21 \pm 0.00	0.21 \pm 0.00	0.21 \pm 0.00	0.21 \pm 0.00	0.21 \pm 0.00
	Non-ring	0.31 \pm 0.00	0.31 \pm 0.00	0.31 \pm 0.00	0.31 \pm 0.00	0.31 \pm 0.00	0.31 \pm 0.00
24 hours	Total	1.22 \pm 0.67	1.35 \pm 0.42	1.44 \pm 0.30	1.65 \pm 0.18	0.81 \pm 0.18	0.70 \pm 0.02
	Ring	0.63 \pm 0.48	0.85 \pm 0.67	0.98 \pm 0.31	1.12 \pm 0.18	0.50 \pm 0.26	0.27 \pm 0.06
	Non-ring	0.63 \pm 0.22	0.50 \pm 0.27	0.46 \pm 0.04	0.53 \pm 0.13	0.31 \pm 0.11	0.43 \pm 0.06
48 hours	Total	2.01 \pm 0.83	3.19 \pm 0.78	3.50 \pm 1.15	3.33 \pm 1.15	1.31 \pm 0.10	0.18 \pm 0.23
	Ring	0.94 \pm 0.42	1.55 \pm 0.79	2.01 \pm 1.08	1.98 \pm 0.77	0.46 \pm 0.16	0.00
	Non-ring	1.07 \pm 0.41	1.64 \pm 0.22	1.49 \pm 0.07	1.35 \pm 0.41	0.85 \pm 0.14	0.18 \pm 0.23
72 hours	Total	4.42 \pm 2.08	5.29 \pm 0.95	5.24 \pm 0.83	4.98 \pm 0.20	2.71 \pm 1.12	0.00
	Ring	2.90 \pm 1.02	2.95 \pm 0.90	2.80 \pm 1.16	2.81 \pm 0.76	1.69 \pm 0.71	0.00
	Non-ring	1.52 \pm 1.05	2.34 \pm 0.26	2.44 \pm 0.33	2.17 \pm 0.56	0.73 \pm 0.34	0.00

b.

Synchronization		Vitamin C							
		0 M	1×10^{-5} M	5×10^{-5} M	1×10^{-4} M	5×10^{-4} M	1×10^{-3} M	5×10^{-3} M	
0 hour	Total	0.53 ±	0.53 ±	0.53 ±	0.53 ±	0.53 ±	0.53 ±	0.53 ±	
		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	Ring	0.53 ±	0.53 ±	0.53 ±	0.53 ±	0.53 ±	0.53 ±	0.53 ±	
		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	Non-ring	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	24 hours	Total	0.95 ±	1.03 ±	1.25 ±	1.17 ±	1.22 ±	0.87 ±	1.26 ±
			0.35	0.20	0.25	0.18	0.29	0.11	0.13
		Ring	0.00	0.16 ±	0.34 ±	0.13 ±	0.23 ±	0.07 ±	0.05 ±
			0.15	0.31	0.15	0.14	0.13	0.07	
Non-ring		0.95 ±	0.87 ±	0.91 ±	1.04 ±	0.99 ±	0.80 ±	1.21 ±	
		0.35	0.19	0.11	0.15	0.22	0.02	0.06	
48 hours		Total	4.47 ±	5.44 ±	4.75 ±	4.48 ±	5.12 ±	4.70 ±	3.18 ±
			1.54	1.47	1.02	0.02	0.15	0.81	0.33
		Ring	1.44 ±	1.57 ±	1.40 ±	1.63 ±	1.63 ±	1.54 ±	1.78 ±
	0.82		0.43	0.63	0.42	0.35	0.25	0.41	
	Non-ring	3.04 ±	3.87 ±	3.36 ±	2.85 ±	3.49 ±	3.16 ±	1.40 ±	
		0.75	1.04	0.43	0.43	0.49	0.89	0.08	
	72 hours	Total	6.70 ±	6.78 ±	4.35 ±	3.95 ±	5.59 ±	6.93 ±	3.52 ±
			2.31	2.96	1.19	0.89	1.54	2.34	0.76
		Ring	2.91 ±	3.21 ±	0.88 ±	0.64 ±	1.54 ±	2.68 ±	0.80 ±
1.57			2.71	0.85	0.75	0.92	2.05	0.80	
Non-ring		3.80 ±	3.57 ±	3.51 ±	3.31 ±	4.05 ±	4.24 ±	2.72 ±	
		1.07	0.51	0.85	0.70	0.63	0.92	0.05	

C.

Synchronization		Vitamin C						
3D7		0 M	1×10^{-5} M	5×10^{-5} M	1×10^{-4} M	5×10^{-4} M	1×10^{-3} M	5×10^{-3} M
0 hour	Total	0.50 ±	0.50 ±	0.50 ±	0.50 ±	0.50 ±	0.50 ±	0.50 ±
		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Ring	0.50 ±	0.50 ±	0.50 ±	0.50 ±	0.50 ±	0.50 ±	0.50 ±
		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Non-ring	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
24 hours	Total	1.02 ±	1.36 ±	1.51 ±	1.54 ±	1.67 ±	1.21 ±	1.45 ±
		0.39	0.75	0.40	0.24	0.16	0.15	0.16
	Ring	0.00	0.03 ±	0.19 ±	0.23 ±	0.27 ±	0.16 ±	0.13 ±
		0.00	0.06	0.09	0.20	0.29	0.14	0.06
	Non-ring	1.02 ±	1.33 ±	1.33 ±	1.32 ±	1.40 ±	1.04 ±	1.32 ±
		0.39	0.70	0.45	0.33	0.19	0.07	0.21
48 hours	Total	4.21 ±	5.25 ±	5.71 ±	5.51 ±	4.62 ±	4.96 ±	5.77 ±
		0.37	0.34	0.54	0.94	0.66	0.87	1.68
	Ring	2.95 ±	3.54 ±	3.83 ±	4.07 ±	3.23 ±	3.81 ±	3.53 ±
		0.83	0.09	0.75	1.10	0.64	0.93	0.82
	Non-ring	1.26 ±	1.71 ±	1.89 ±	1.44 ±	1.39 ±	1.14 ±	2.24 ±
		0.49	0.26	0.23	0.14	0.05	0.12	2.50
72 hours	Total	6.89 ±	5.58 ±	4.73 ±	8.19 ±	7.75 ±	6.45 ±	4.00 ±
		0.95	1.39	1.61	0.81	2.30	0.51	0.51
	Ring	0.85 ±	0.34 ±	0.13 ±	0.81 ±	0.29 ±	0.42 ±	0.10 ±
		0.64	0.29	0.05	0.44	0.17	0.11	0.10
	Non-ring	6.04 ±	5.24 ±	4.61 ±	7.38 ±	7.47 ±	6.03 ±	3.86 ±
		1.47	1.17	1.60	0.58	2.18	0.42	0.61

3.2 กลุ่มเชื้อแบบหลายระยะ

เมื่อเปรียบเทียบค่า % total parasitaemia ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1 ที่ความเข้มข้น 1×10^{-3} โมลาร์ เชื้อ K1CB1 มีค่า % total parasitaemia เพิ่มขึ้นมาเป็น 0.70% ที่เวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งพบเชื้อทั้ง 2 ระยะ ต่อมาที่เวลา 48 ชั่วโมง เชื้อลดลงเหลือ 0.18% โดยเป็นเชื้อระยะไม่ไขว่แหวน และไม่พบเชื้อทุกระยะที่เวลา 72 ชั่วโมง ส่วนที่ความเข้มข้นอื่น ๆ เชื้อมีค่า % total parasitaemia ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม โดยมีค่า % total parasitaemia ระหว่าง 4.42% – 5.29%

ส่วนเชื้อ T9/94RC17 และ 3D7 ช่วงเวลา 0 – 48 ชั่วโมง มีเชื้อมาลาเรียเพิ่มขึ้น และลดลง ที่เวลา 72 ชั่วโมง ในบางความเข้มข้นเนื่องจากเชื้อเกิดการ overgrowth หากดูผลที่เวลา 48 ชั่วโมงแทน พบว่าที่ความเข้มข้น 5×10^{-3} โมลาร์ เชื้อ ค่า % total parasitaemia ต่ำที่สุด (ตารางที่ 18)

การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าวิตามินซีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย K1CB1 โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดของวิตามินซีที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (MIC) เท่ากับ 1×10^{-3} โมลาร์ ส่วนเชื้อ T9/94RC17 และ 3D7 ที่ความเข้มข้น 5×10^{-3} โมลาร์ สามารถลดการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียได้ โดยเชื้อมีค่า % parasitaemia ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม

ตารางที่ 18 ค่า % parasitaemia (mean \pm SD) ของเชื้อ K1CB1 (a.), T9/94RC17 (b.) และ 3D7 (c.) ในกลุ่มควบคุม (ไม่มีวิตามินซี) และกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีวิตามินซีที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของกลุ่มเชื้อแบบหลายระยะ (asyn)

a.

Asynchronization		Vitamin C					
		K1CB1	0 M	1×10^{-5} M	5×10^{-5} M	1×10^{-4} M	5×10^{-4} M
0 hours	Total	0.52 \pm 0.00	0.52 \pm 0.00	0.52 \pm 0.00	0.52 \pm 0.00	0.52 \pm 0.00	0.52 \pm 0.00
	Ring	0.21 \pm 0.00	0.21 \pm 0.00	0.21 \pm 0.00	0.21 \pm 0.00	0.21 \pm 0.00	0.21 \pm 0.00
	Non-ring	0.31 \pm 0.00	0.31 \pm 0.00	0.31 \pm 0.00	0.31 \pm 0.00	0.31 \pm 0.00	0.31 \pm 0.00
24 hours	Total	1.22 \pm 0.67	1.35 \pm 0.42	1.44 \pm 0.30	1.65 \pm 0.18	0.81 \pm 0.18	0.70 \pm 0.02
	Ring	0.63 \pm 0.48	0.85 \pm 0.67	0.98 \pm 0.31	1.12 \pm 0.18	0.50 \pm 0.26	0.27 \pm 0.06
	Non-ring	0.63 \pm 0.22	0.50 \pm 0.27	0.46 \pm 0.04	0.53 \pm 0.13	0.31 \pm 0.11	0.43 \pm 0.06
48 hours	Total	2.01 \pm 0.83	3.19 \pm 0.78	3.50 \pm 1.15	3.33 \pm 1.15	1.31 \pm 0.10	0.18 \pm 0.23
	Ring	0.94 \pm 0.42	1.55 \pm 0.79	2.01 \pm 1.08	1.98 \pm 0.77	0.46 \pm 0.16	0.00
	Non-ring	1.07 \pm 0.41	1.64 \pm 0.22	1.49 \pm 0.07	1.35 \pm 0.41	0.85 \pm 0.14	0.18 \pm 0.23
72 hours	Total	4.42 \pm 2.08	5.29 \pm 0.95	5.24 \pm 0.83	4.98 \pm 0.20	2.71 \pm 1.12	0.00
	Ring	2.90 \pm 1.02	2.95 \pm 0.90	2.80 \pm 1.16	2.81 \pm 0.76	1.69 \pm 0.71	0.00
	Non-ring	1.52 \pm 1.05	2.34 \pm 0.26	2.44 \pm 0.33	2.17 \pm 0.56	0.73 \pm 0.34	0.00

b.

Asynchronization		Vitamin C						
		0 M	1×10^{-5} M	5×10^{-5} M	1×10^{-4} M	5×10^{-4} M	1×10^{-3} M	5×10^{-3} M
T9/94RC17								
0 hours	Total	0.81 ±	0.81 ±	0.81 ±	0.81 ±	0.81 ±	0.81 ±	0.81 ±
		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Ring	0.10 ±	0.10 ±	0.10 ±	0.10 ±	0.10 ±	0.10 ±	0.10 ±
		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Non-ring	0.71 ±	0.71 ±	0.71 ±	0.71 ±	0.71 ±	0.71 ±	0.71 ±
		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
24 hours	Total	2.70 ±	2.90 ±	3.45 ±	2.80 ±	3.27 ±	2.66 ±	1.84 ±
		0.82	0.56	0.59	0.61	0.42	0.63	0.17
	Ring	1.41 ±	1.62 ±	2.09 ±	1.64 ±	2.30 ±	1.33 ±	0.72 ±
		0.73	0.83	0.25	0.41	0.23	0.49	0.23
	Non-ring	1.29 ±	1.28 ±	0.36 ±	1.16 ±	0.97 ±	1.33 ±	1.13 ±
		0.34	0.27	0.42	0.27	0.20	0.24	0.07
48 hours	Total	8.36 ±	8.85 ±	9.58 ±	8.48 ±	8.28 ±	9.11 ±	6.04 ±
		1.46	1.42	0.46	0.83	0.31	1.57	0.55
	Ring	3.59 ±	2.67 ±	3.40 ±	2.17 ±	2.94 ±	3.11 ±	2.67 ±
		0.05	0.24	0.61	0.25	0.46	1.01	0.49
	Non-ring	4.77 ±	6.17 ±	6.18 ±	6.31 ±	5.34 ±	5.99 ±	3.03 ±
		1.43	1.36	0.15	0.80	0.30	1.12	0.34
72 hours	Total	3.56 ±	2.35 ±	3.12 ±	2.78 ±	3.18 ±	4.64 ±	5.53 ±
		2.13	1.25	0.52	0.40	1.14	1.37	0.37
	Ring	0.75 ±	0.44 ±	0.36 ±	0.26 ±	0.49 ±	1.01 ±	1.29 ±
		0.42	0.21	0.31	0.06	0.19	0.71	0.64
	Non-ring	2.81 ±	1.91 ±	2.72 ±	2.53 ±	2.70 ±	3.63 ±	4.25 ±
		1.76	1.13	0.72	0.35	1.32	0.66	0.28

C.

Asynchronization		Vitamin C							
3D7		0 M	1×10^{-5} M	5×10^{-5} M	1×10^{-4} M	5×10^{-4} M	1×10^{-3} M	5×10^{-3} M	
0 hours	Total	0.67 ± 0.00	0.67 ± 0.00	0.67 ± 0.00	0.67 ± 0.00	0.67 ± 0.00	0.67 ± 0.00	0.67 ± 0.00	
	Ring	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	
		Non-ring	0.58 ± 0.00	0.58 ± 0.00	0.58 ± 0.00	0.58 ± 0.00	0.58 ± 0.00	0.58 ± 0.00	0.58 ± 0.00
	24 hours		Total	2.48 ± 0.22	3.19 ± 0.33	2.98 ± 1.17	3.53 ± 0.50	3.24 ± 0.41	3.15 ± 0.62
		Ring	1.27 ± 0.46	1.73 ± 0.32	1.84 ± 1.39	1.83 ± 0.24	1.52 ± 0.15	1.85 ± 0.99	1.98 ± 0.43
			Non-ring	1.21 ± 0.38	1.46 ± 0.03	1.14 ± 0.32	1.70 ± 0.26	1.72 ± 0.29	1.31 ± 0.62
48 hours		Total		6.23 ± 0.49	5.88 ± 0.79	6.38 ± 1.16	5.70 ± 0.10	6.68 ± 0.58	7.32 ± 0.49
		Ring	2.62 ± ±0.37	2.59 ± 0.48	2.66 ± 0.42	2.36 ± 0.40	2.84 ± 0.62	2.90 ± 0.37	1.29 ± 0.11
			Non-ring	3.61 ± 0.23	3.29 ± 0.34	4.06 ± 0.65	3.34 ± 0.37	3.83 ± 1.18	4.42 ± 0.35
	72 hours	Total		2.20 ± 1.06	2.80 ± 1.40	2.90 ± 1.00	6.65 ± 2.81	5.18 ± 1.98	6.11 ± 1.53
		Ring	0.24 ± 0.22	0.81 ± 0.78	0.70 ± 0.34	1.77 ± 1.99	1.75 ± 1.34	1.53 ± 0.56	1.57 ± 1.13
			Non-ring	1.95 ± 0.87	2.02 ± 0.61	2.20 ± 0.75	4.88 ± 0.91	3.43 ± 0.64	4.58 ± 0.97

4. น้ำตาล

4.1 กลูโคส

4.1.1 กลุ่มเชื้อแบบระยะเดียว

เมื่อเปรียบเทียบค่า % total parasitaemia ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในกลุ่มเชื้อแบบระยะเดียว พบว่าทุกช่วงเวลาที่ได้ตรวจสอบ มีเชื้อมาลาเรียเพิ่มขึ้นจนถึงเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เวลา 72 ชั่วโมง ในกลุ่มทดลองทุกความเข้มข้นมีค่า % total parasitaemia ต่ำกว่าในกลุ่มควบคุม โดยที่ความเข้มข้น 5×10^{-1} โมลาร์ ไม่พบเชื้อทุกสายพันธุ์ตั้งแต่ที่เวลา 24 ชั่วโมง เชื้อแต่ละระยะมีแนวโน้มการเจริญไปทางเดียวกับกลุ่มควบคุม โดยเชื้อ K1CB1 และ 3D7 ที่เวลา 0 และ 48 ชั่วโมง เชื้ออยู่ในระยะวงแหวน และที่เวลา 24 และ 72 ชั่วโมง เชื้อส่วนใหญ่อยู่ในระยะไม่ใช่วงแหวน ส่วนเชื้อ T9/94RC17 ที่เวลา 48 ชั่วโมง เชื้อทั้ง 2 ระยะ มีจำนวนใกล้เคียงกัน และที่เวลา 72 ชั่วโมง เชื้อส่วนใหญ่อยู่ในระยะวงแหวน (ตารางที่ 19)

ตารางที่ 19 ค่า % parasitaemia (mean \pm SD) ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1 (a.), T9/94RC17 (b.) และ 3D7 (c.) ในกลุ่มควบคุม (ไม่มีกลูโคส) และกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของกลุ่มเชื้อแบบระยะเดียว (syn)

a.

Synchronization		Glucose					
		0 M	5×10^{-5} M	5×10^{-4} M	5×10^{-3} M	5×10^{-2} M	5×10^{-1} M
0 hour	Total	0.42 \pm 0.00	0.42 \pm 0.00	0.42 \pm 0.00	0.42 \pm 0.00	0.42 \pm 0.00	0.42 \pm 0.00
	Ring	0.42 \pm 0.00	0.42 \pm 0.00	0.42 \pm 0.00	0.42 \pm 0.00	0.42 \pm 0.00	0.42 \pm 0.00
	Non-ring	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
24 hours	Total	0.57 \pm 0.04	0.30 \pm 0.02	1.02 \pm 0.48	0.48 \pm 0.05	0.50 \pm 0.19	0.00
	Ring	0.06 \pm 0.06	0.00	0.27 \pm 0.20	0.0	0.0	0.00
	Non-ring	0.51 \pm 0.04	0.30 \pm 0.02	0.75 \pm 0.33	0.48 \pm 0.05	0.50 \pm 0.19	0.00
48 hours	Total	1.55 \pm 0.08	1.36 \pm 0.66	1.44 \pm 0.01	0.88 \pm 0.38	1.13 \pm 0.30	0.00
	Ring	1.52 \pm 0.02	1.04 \pm 0.54	1.44 \pm 0.01	0.81 \pm 0.39	1.13 \pm 0.30	0.00
	Non-ring	0.03 \pm 0.06	0.32 \pm 0.16	0.00	0.07 \pm 0.06	0.00	0.00
72 hours	Total	2.08 \pm 0.44	1.46 \pm 0.28	1.35 \pm 0.61	1.69 \pm 0.98	0.95 \pm 0.05	0.00
	Ring	0.23 \pm 0.17	0.25 \pm 0.25	0.38 \pm 0.13	0.50 \pm 0.40	0.07 \pm 0.12	0.00
	Non-ring	1.84 \pm 0.56	1.22 \pm 0.07	0.96 \pm 0.56	1.19 \pm 0.59	0.89 \pm 0.07	0.00

b.

Synchronization		Glucose					
		0 M	5×10^{-5} M	5×10^{-4} M	5×10^{-3} M	5×10^{-2} M	5×10^{-1} M
T9/94RC17							
0 hour	Total	0.29 ± 0.00	0.29 ± 0.00	0.29 ± 0.00	0.29 ± 0.00	0.29 ± 0.00	0.29 ± 0.00
	Ring	0.29 ± 0.00	0.29 ± 0.00	0.29 ± 0.00	0.29 ± 0.00	0.29 ± 0.00	0.29 ± 0.00
	Non-ring	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
24 hours	Total	1.23 ± 0.14	1.31 ± 0.13	1.10 ± 0.09	0.61 ± 0.08	0.90 ± 0.08	0.00
	Ring	0.46 ± 0.20	0.45 ± 0.07	0.60 ± 0.09	0.03 ± 0.06	0.10 ± 0.01	0.00
	Non-ring	1.21 ± 0.81	0.86 ± 0.06	0.50 ± 0.03	0.58 ± 0.11	0.80 ± 0.07	0.00
48 hours	Total	2.04 ± 0.64	2.14 ± 0.31	2.44 ± 0.50	2.57 ± 0.25	2.88 ± 1.18	0.00
	Ring	1.04 ± 0.33	1.08 ± 0.40	1.40 ± 0.49	1.34 ± 0.20	1.92 ± 0.57	0.00
	Non-ring	1.01 ± 0.32	1.06 ± 0.10	1.04 ± 0.11	1.23 ± 0.40	0.96 ± 0.69	0.00
72 hours	Total	4.40 ± 0.17	3.85 ± 0.43	3.81 ± 1.19	4.16 ± 0.67	3.20 ± 0.34	0.00
	Ring	3.15 ± 0.46	2.61 ± 0.75	2.38 ± 1.32	2.35 ± 0.81	1.82 ± 0.33	0.00
	Non-ring	1.25 ± 0.43	1.23 ± 0.32	1.43 ± 0.38	1.81 ± 0.24	1.38 ± 0.16	0.00

c.

Synchronization		Glucose					
		0 M	5×10^{-5} M	5×10^{-4} M	5×10^{-3} M	5×10^{-2} M	5×10^{-1} M
3D7							
0 hour	Total	0.50 ± 0.00	0.50 ± 0.00	0.50 ± 0.00	0.50 ± 0.00	0.50 ± 0.00	0.50 ± 0.00
	Ring	0.50 ± 0.00	0.50 ± 0.00	0.50 ± 0.00	0.50 ± 0.00	0.50 ± 0.00	0.50 ± 0.00
	Non-ring	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
24 hours	Total	0.73 ± 0.07	0.88 ± 0.26	0.66 ± 0.05	1.13 ± 0.58	0.57 ± 0.07	0.00
	Ring	0.00	0.13 ± 0.06	0.07 ± 0.12	0.23 ± 0.32	0.00	0.00
	Non-ring	0.73 ± 0.07	0.74 ± 0.23	0.59 ± 0.17	0.90 ± 0.26	0.57 ± 0.07	0.00
48 hours	Total	2.31 ± 0.13	2.22 ± 0.57	2.20 ± 0.52	2.19 ± 0.20	1.68 ± 0.25	0.00
	Ring	2.14 ± 0.02	1.95 ± 0.57	2.03 ± 0.54	1.86 ± 0.13	1.59 ± 0.24	0.00
	Non-ring	0.17 ± 0.14	0.27 ± 0.07	0.17 ± 0.07	0.33 ± 0.13	0.09 ± 0.09	0.00
72 hours	Total	2.68 ± 0.66	2.28 ± 0.35	2.89 ± 0.53	2.07 ± 0.37	1.82 ± 0.35	0.00
	Ring	0.53 ± 0.22	0.36 ± 0.22	0.62 ± 0.23	0.29 ± 0.24	0.03 ± 0.06	0.00
	Non-ring	2.14 ± 0.46	1.91 ± 0.53	2.27 ± 0.61	1.78 ± 0.24	1.79 ± 0.38	0.00

4.1.2 กลุ่มเชื้อแบบหลายระยะ

เมื่อเปรียบเทียบค่า % total parasitaemia ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 ที่เพาะเลี้ยงอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในกลุ่มเชื้อแบบหลายระยะ พบว่าทุกช่วงเวลาที่ได้ตรวจสอบ มีเชื้อมาลาเรียเพิ่มขึ้นและที่เวลา 72 ชั่วโมง เป็นช่วงที่เชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ มีค่า % total parasitaemia สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ที่ความเข้มข้น 5×10^{-1} โมลาร์ ไม่พบเชื้อตั้งแต่ที่เวลา 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 20)

การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่ากลูโคสมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดของกลูโคสที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (MIC) เท่ากับ 5×10^{-1} โมลาร์

ตารางที่ 20 ค่า % parasitaemia (mean \pm SD) ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1 (a.), T9/94RC17 (b.) และ 3D7 (c.) ในกลุ่มควบคุม (ไม่มีกลูโคส) และกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของกลุ่มเชื้อแบบหลายระยะ (asyn)

a.

		Asynchronization		Glucose				
		K1CB1	0 M	5×10^{-5} M	5×10^{-4} M	5×10^{-3} M	5×10^{-2} M	5×10^{-1} M
0 hour	Total	0.37 \pm 0.00	0.37 \pm 0.00	0.37 \pm 0.00	0.37 \pm 0.00	0.37 \pm 0.00	0.37 \pm 0.00	0.37 \pm 0.00
	Ring	0.28 \pm 0.00	0.28 \pm 0.00	0.28 \pm 0.00	0.28 \pm 0.00	0.28 \pm 0.00	0.28 \pm 0.00	0.28 \pm 0.00
	Non-ring	0.09 \pm 0.00	0.09 \pm 0.00	0.09 \pm 0.00	0.09 \pm 0.00	0.09 \pm 0.00	0.09 \pm 0.00	0.09 \pm 0.00
24 hours	Total	0.91 \pm 0.09	0.83 \pm 0.19	0.48 \pm 0.06	0.95 \pm 0.19	1.04 \pm 0.36	0.00	
	Ring	0.31 \pm 0.10	0.19 \pm 0.19	0.00	0.26 \pm 0.22	0.44 \pm 0.14	0.00	
	Non-ring	0.61 \pm 0.11	0.63 \pm 0.04	0.48 \pm 0.06	0.68 \pm 0.09	0.60 \pm 0.26	0.00	
48 hours	Total	2.03 \pm 0.37	1.87 \pm 0.49	1.90 \pm 0.39	1.97 \pm 0.36	1.60 \pm 0.34	0.00	
	Ring	1.56 \pm 0.33	1.51 \pm 0.60	1.29 \pm 0.43	1.64 \pm 0.31	1.22 \pm 0.31	0.00	
	Non-ring	0.47 \pm 0.25	0.36 \pm 0.15	0.53 \pm 0.10	0.33 \pm 0.08	0.38 \pm 0.02	0.00	
72 hours	Total	2.97 \pm 0.77	2.80 \pm 0.27	3.01 \pm 0.69	2.59 \pm 0.70	1.71 \pm 0.48	0.00	
	Ring	0.79 \pm 0.40	0.90 \pm 0.54	1.02 \pm 0.42	0.92 \pm 0.06	0.40 \pm 0.18	0.00	
	Non-ring	2.17 \pm 0.52	1.90 \pm 0.31	1.99 \pm 0.30	1.67 \pm 0.75	1.31 \pm 0.32	0.00	

b.

Asynchronization		Glucose					
		T9/94RC17	0 M	5×10^{-5} M	5×10^{-4} M	5×10^{-3} M	5×10^{-2} M
0 hour	Total	0.47 ± 0.00	0.47 ± 0.00	0.47 ± 0.00	0.47 ± 0.00	0.47 ± 0.00	0.47 ± 0.00
	Ring	0.28 ± 0.00	0.28 ± 0.00	0.28 ± 0.00	0.28 ± 0.00	0.28 ± 0.00	0.28 ± 0.00
	Non-ring	0.19 ± 0.00	0.19 ± 0.00	0.19 ± 0.00	0.19 ± 0.00	0.19 ± 0.00	0.19 ± 0.00
24 hours	Total	1.24 ± 0.03	1.62 ± 0.73	1.23 ± 0.50	1.17 ± 0.38	1.14 ± 0.11	0.00
	Ring	0.63 ± 0.10	0.98 ± 0.59	0.73 ± 0.41	0.59 ± 0.32	0.62 ± 0.11	0.00
	Non-ring	0.61 ± 0.12	0.64 ± 0.21	0.50 ± 0.10	0.59 ± 0.07	0.52 ± 0.10	0.00
48 hours	Total	1.88 ± 0.14	2.57 ± 0.51	2.00 ± 0.21	2.33 ± 0.32	2.12 ± 0.29	0.00
	Ring	0.62 ± 0.21	1.21 ± 0.53	0.64 ± 0.14	0.94 ± 0.14	1.33 ± 0.13	0.00
	Non-ring	1.26 ± 0.11	1.36 ± 0.21	1.35 ± 0.16	1.39 ± 0.17	0.79 ± 0.30	0.00
72 hours	Total	4.66 ± 0.33	5.21 ± 0.74	4.19 ± 0.13	4.51 ± 0.58	3.48 ± 0.47	0.00
	Ring	2.85 ± 0.40	3.86 ± 1.04	3.05 ± 0.40	2.79 ± 0.64	2.17 ± 0.20	0.00
	Non-ring	1.81 ± 0.08	1.36 ± 0.35	1.14 ± 0.37	1.73 ± 0.18	1.31 ± 0.28	0.00

c.

Asynchronization		Glucose					
		3D7	0 M	5×10^{-5} M	5×10^{-4} M	5×10^{-3} M	5×10^{-2} M
0 hour	Total	0.40 ± 0.00	0.40 ± 0.01	0.40 ± 0.02	0.40 ± 0.03	0.40 ± 0.04	0.40 ± 0.05
	Ring	0.20 ± 0.00	0.20 ± 0.00	0.20 ± 0.00	0.20 ± 0.00	0.20 ± 0.00	0.20 ± 0.00
	Non-ring	0.20 ± 0.00	0.20 ± 0.00	0.20 ± 0.00	0.20 ± 0.00	0.20 ± 0.00	0.20 ± 0.00
24 hours	Total	1.17 ± 0.58	0.93 ± 0.04	1.09 ± 0.03	0.94 ± 0.11	0.72 ± 0.14	0.00
	Ring	0.43 ± 0.16	0.38 ± 0.16	0.57 ± 0.06	0.49 ± 0.06	0.21 ± 0.11	0.00
	Non-ring	0.73 ± 0.43	0.54 ± 0.12	0.53 ± 0.07	0.46 ± 0.09	0.51 ± 0.11	0.00
48 hours	Total	2.93 ± 0.95	2.16 ± 0.57	2.12 ± 0.43	2.53 ± 0.50	1.71 ± 0.23	0.00
	Ring	2.26 ± 0.66	1.61 ± 0.43	1.47 ± 0.43	1.80 ± 0.25	1.35 ± 0.30	0.00
	Non-ring	0.68 ± 0.36	0.56 ± 0.15	0.64 ± 0.10	0.73 ± 0.28	0.35 ± 0.10	0.00
72 hours	Total	3.50 ± 1.30	3.71 ± 0.57	4.08 ± 0.20	3.29 ± 0.55	2.98 ± 0.68	0.00
	Ring	1.66 ± 0.65	1.70 ± 0.14	1.44 ± 0.62	1.16 ± 0.46	1.40 ± 0.33	0.00
	Non-ring	1.85 ± 0.68	2.01 ± 0.68	2.65 ± 0.81	2.14 ± 0.53	1.58 ± 0.42	0.00

4.2 ซอร์บิทอล

4.2.1 กลุ่มเชื้อแบคทีเรียเดี่ยว

เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เชื้อมาลาเรีย K1CB1 และ 3D7 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงที่มีซอร์บิทอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ช่วงเวลา 0 – 72 ชั่วโมง มีเชื้อมาลาเรียเพิ่มขึ้น แต่เมื่อดูค่า % parasitaemia ที่เวลา 48 – 72 ชั่วโมงแล้ว เชื้อน่าจะเกิดการ overgrowth ในบางความเข้มข้น หากดูผลที่เวลา 48 ชั่วโมงแทน เชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ มีค่า % parasitaemia ใกล้เคียงกันในทุกความเข้มข้น (ตารางที่ 21)

ตารางที่ 21 ค่า % parasitaemia (mean \pm SD) ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1 (a.), T9/94RC17 (b.) และ 3D7 (c.) ในกลุ่มควบคุม (ไม่มีซอร์บิทอล) และกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงที่มีซอร์บิทอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของกลุ่มเชื้อแบคทีเรียเดี่ยว (syn)

a.

Synchronization		Sorbitol					
		K1CB1	0.00%	0.10%	0.20%	0.30%	0.40%
0 hour	Total	0.44 \pm 0.00	0.44 \pm 0.00	0.44 \pm 0.00	0.44 \pm 0.00	0.44 \pm 0.00	0.44 \pm 0.00
	Ring	0.44 \pm 0.00	0.44 \pm 0.00	0.44 \pm 0.00	0.44 \pm 0.00	0.44 \pm 0.00	0.44 \pm 0.00
	Non-ring	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
24 hours	Total	0.59 \pm 0.17	0.48 \pm 0.12	0.78 \pm 0.07	0.64 \pm 0.18	0.78 \pm 0.11	0.48 \pm 0.07
	Ring	0.00	0.00	0.11 \pm 0.11	0.07 \pm 0.06	0.03 \pm 0.06	0.00
	Non-ring	0.59 \pm 0.17	0.48 \pm 0.12	0.67 \pm 0.10	0.57 \pm 0.14	0.75 \pm 0.06	0.48 \pm 0.07
48 hours	Total	2.68 \pm 0.18	3.02 \pm 0.17	2.85 \pm 0.52	2.18 \pm 0.20	3.46 \pm 0.35	2.79 \pm 0.10
	Ring	1.65 \pm 0.27	2.10 \pm 0.20	2.06 \pm 0.43	1.66 \pm 0.30	1.79 \pm 0.31	1.88 \pm 0.44
	Non-ring	1.04 \pm 0.45	0.92 \pm 0.03	0.79 \pm 0.12	0.52 \pm 0.10	1.67 \pm 0.43	0.91 \pm 0.54
72 hours	Total	4.38 \pm 0.87	4.07 \pm 0.09	4.32 \pm 0.38	4.24 \pm 0.23	4.30 \pm 0.88	4.18 \pm 0.88
	Ring	0.40 \pm 0.19	0.97 \pm 0.99	0.48 \pm 0.33	0.37 \pm 0.29	0.30 \pm 0.28	0.30 \pm 0.28
	Non-ring	3.98 \pm 0.93	3.10 \pm 1.07	3.84 \pm 0.11	3.88 \pm 0.12	4.00 \pm 1.05	3.88 \pm 0.61

b.

Synchronization		Sorbitol					
T9/94RC17		0.00%	0.10%	0.20%	0.30%	0.40%	0.50%
0 hour	Total	0.72 ± 0.00	0.72 ± 0.00	0.72 ± 0.00	0.72 ± 0.00	0.72 ± 0.00	0.72 ± 0.00
	Ring	0.72 ± 0.00	0.72 ± 0.00	0.72 ± 0.00	0.72 ± 0.00	0.72 ± 0.00	0.72 ± 0.00
	Non-ring	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
24 hours	Total	1.19 ± 0.13	1.22 ± 0.45	1.10 ± 0.22	1.04 ± 0.08	0.97 ± 0.28	0.71 ± 0.28
	Ring	0.64 ± 0.23	0.64 ± 0.20	0.43 ± 0.19	0.44 ± 0.21	0.19 ± 0.10	0.21 ± 0.15
	Non-ring	0.55 ± 0.13	0.58 ± 0.25	0.67 ± 0.06	0.60 ± 0.27	0.77 ± 0.27	0.51 ± 0.13
48 hours	Total	3.42 ± 0.57	2.65 ± 0.46	2.19 ± 0.26	4.47 ± 0.40	2.60 ± 1.08	3.00 ± 0.21
	Ring	0.33 ± 0.24	0.00	0.06 ± 0.06	3.41 ± 0.23	0.00	0.36 ± 0.17
	Non-ring	3.10 ± 0.34	2.65 ± 0.46	2.12 ± 0.25	1.10 ± 0.55	2.60 ± 1.08	2.65 ± 0.09
72 hours	Total	4.65 ± 2.73	3.18 ± 0.74	10.09 ± 2.90	5.41 ± 2.16	6.59 ± 2.70	7.68 ± 1.86
	Ring	1.95 ± 1.97	0.34 ± 0.59	9.65 ± 2.79	4.32 ± 2.31	3.96 ± 1.89	4.42 ± 1.60
	Non-ring	2.70 ± 0.89	2.84 ± 0.25	0.44 ± 0.35	1.09 ± 0.23	2.63 ± 0.84	3.27 ± 0.27

c.

Synchronization		Sorbitol					
3D7		0.00%	0.10%	0.20%	0.30%	0.40%	0.50%
0 hour	Total	1.15 ± 0.00	1.15 ± 0.00	1.15 ± 0.00	1.15 ± 0.00	1.15 ± 0.00	1.15 ± 0.00
	Ring	1.15 ± 0.00	1.15 ± 0.00	1.15 ± 0.00	1.15 ± 0.00	1.15 ± 0.00	1.15 ± 0.00
	Non-ring	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
24 hours	Total	1.01 ± 0.02	1.11 ± 0.08	0.89 ± 0.03	0.63 ± 0.10	0.63 ± 0.32	0.68 ± 0.22
	Ring	0.00	0.10 ± 0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
	Non-ring	1.01 ± 0.02	1.02 ± 0.08	0.89 ± 0.03	0.63 ± 0.10	0.63 ± 0.32	0.68 ± 0.22
48 hours	Total	2.73 ± 0.25	3.60 ± 0.78	3.72 ± 0.47	3.91 ± 0.28	4.22 ± 0.08	3.21 ± 0.57
	Ring	0.38 ± 0.23	2.18 ± 0.96	2.37 ± 0.21	2.60 ± 0.81	3.21 ± 0.61	2.16 ± 0.10
	Non-ring	2.35 ± 0.43	1.42 ± 0.19	1.35 ± 0.36	1.31 ± 0.94	1.01 ± 0.61	1.05 ± 0.51
72 hours	Total	5.87 ± 0.14	6.98 ± 2.04	5.26 ± 0.40	5.80 ± 0.80	5.12 ± 1.40	5.20 ± 0.67
	Ring	0.19 ± 0.16	0.32 ± 0.21	0.26 ± 0.04	0.10 ± 0.11	0.29 ± 0.18	0.30 ± 0.21
	Non-ring	5.68 ± 0.20	6.66 ± 2.11	5.01 ± 0.40	5.69 ± 0.88	4.83 ± 1.52	4.96 ± 1.07

4.2.2 กลุ่มเชื้อแบบหลายระยะ

เมื่อเปรียบเทียบค่า % total parasitaemia ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซอร์บิทอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในกลุ่มเชื้อแบบหลายระยะ พบว่าช่วงเวลา 0 – 48 ชั่วโมง มีเชื้อมาลาเรียเพิ่มขึ้น และลดลงที่เวลา 72 ชั่วโมงในบางความเข้มข้นเนื่องจากเชื้อเกิดการ overgrowth หากดูผลที่เวลา 48 ชั่วโมงแทน เชื้อ K1CB1 ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองทุกความเข้มข้น มีค่า %parasitaemia ใกล้เคียงกัน ในขณะที่เชื้อ T9/94RC17 และ 3D7 เชื้อในกลุ่มควบคุม มีค่า %parasitaemia สูงกว่าความเข้มข้นอื่น ๆ โดยมีค่าเท่ากับ 6.30% และ 6.01% ตามลำดับ (ตารางที่ 22)

การทดลองนี้ไม่สามารถสรุปผลได้ชัดเจนว่าซอร์บิทอลมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียได้หรือไม่ เนื่องจากเชื้อเกิดการ overgrowth และไม่สามารถเห็นแนวโน้มการเจริญของเชื้อมาลาเรียในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองได้ชัดเจน

ตารางที่ 22 ค่า % parasitaemia (mean \pm SD) ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1 (a.), T9/94RC17 (b.) และ 3D7 (c.) ในกลุ่มควบคุม (ไม่มีซอร์บิทอล) และกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงที่มีซอร์บิทอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของกลุ่มเชื้อแบบหลายระยะ (asyn)

a.

Asynchronization		Sorbitol					
		0.00%	0.10%	0.20%	0.30%	0.40%	0.50%
K1CB1							
0 hour	Total	1.12 \pm 0.00	1.12 \pm 0.00	1.12 \pm 0.00	1.12 \pm 0.00	1.12 \pm 0.00	1.12 \pm 0.00
	Ring	0.34 \pm 0.00	0.34 \pm 0.00	0.34 \pm 0.00	0.34 \pm 0.00	0.34 \pm 0.00	0.34 \pm 0.00
	Non-ring	0.78 \pm 0.00	0.78 \pm 0.00	0.78 \pm 0.00	0.78 \pm 0.00	0.78 \pm 0.00	0.78 \pm 0.00
24 hours	Total	2.18 \pm 0.23	2.21 \pm 0.22	2.27 \pm 0.25	2.06 \pm 1.21	2.08 \pm 0.39	1.94 \pm 0.22
	Ring	1.60 \pm 0.28	1.58 \pm 0.33	1.68 \pm 0.40	1.33 \pm 1.25	1.55 \pm 0.41	1.23 \pm 0.33
	Non-ring	0.58 \pm 0.06	0.63 \pm 0.18	0.59 \pm 0.22	0.73 \pm 0.09	0.53 \pm 0.19	0.70 \pm 0.27
48 hours	Total	4.39 \pm 0.57	4.67 \pm 0.27	4.01 \pm 0.48	4.51 \pm 0.43	3.99 \pm 0.27	4.22 \pm 0.95
	Ring	1.39 \pm 0.40	1.47 \pm 0.16	1.19 \pm 0.25	1.58 \pm 0.71	0.79 \pm 0.05	1.05 \pm 0.43
	Non-ring	2.99 \pm 0.19	3.20 \pm 0.32	2.82 \pm 0.26	2.93 \pm 0.43	3.20 \pm 0.24	3.16 \pm 0.52
72 hours	Total	2.40 \pm 0.50	3.68 \pm 1.27	5.11 \pm 1.06	5.53 \pm 2.54	2.35 \pm 0.74	2.20 \pm 0.78
	Ring	0.21 \pm 0.30	1.27 \pm 1.26	2.51 \pm 0.53	2.46 \pm 2.04	0.87 \pm 0.90	0.42 \pm 0.01
	Non-ring	2.19 \pm 0.21	2.41 \pm 0.44	2.62 \pm 0.53	3.08 \pm 1.49	1.49 \pm 0.16	1.78 \pm 0.78

b.

Asynchronization		Sorbitol					
		T9/94RC17	0.00%	0.10%	0.20%	0.30%	0.40%
0 hour	Total	0.67 ± 0.00	0.67 ± 0.00	0.67 ± 0.00	0.67 ± 0.00	0.67 ± 0.00	0.67 ± 0.00
	Ring	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Non-ring	0.67 ± 0.00	0.67 ± 0.00	0.67 ± 0.00	0.67 ± 0.00	0.67 ± 0.00	0.67 ± 0.00
24 hours	Total	4.95 ± 2.62	4.38 ± 0.65	4.11 ± 1.23	4.04 ± 1.13	3.42 ± 0.72	3.61 ± 0.58
	Ring	3.41 ± 1.24	2.80 ± 0.95	2.92 ± 1.26	2.96 ± 1.00	2.52 ± 0.91	2.80 ± 0.28
	Non-ring	1.54 ± 1.39	1.57 ± 0.34	1.19 ± 0.68	1.07 ± 0.29	0.91 ± 0.44	0.82 ± 0.30
48 hours	Total	6.30 ± 0.47	5.32 ± 0.10	4.71 ± 0.89	5.00 ± 1.09	4.54 ± 0.47	5.78 ± 1.32
	Ring	0.33 ± 0.39	0.00	0.00	0.95 ± 0.58	0.00	0.50 ± 0.17
	Non-ring	5.97 ± 0.66	5.32 ± 0.10	4.71 ± 0.89	4.05 ± 0.82	4.54 ± 0.47	5.28 ± 1.32
72 hours	Total	4.12 ± 2.69	5.85 ± 1.11	3.24 ± 0.76	2.70 ± 0.26	2.99 ± 1.13	3.52 ± 1.60
	Ring	1.11 ± 1.68	4.67 ± 1.01	0.95 ± 1.32	0.11 ± 0.11	0.28 ± 0.08	1.02 ± 1.11
	Non-ring	3.01 ± 1.02	1.17 ± 0.10	2.29 ± 0.61	2.60 ± 0.34	2.71 ± 1.05	2.49 ± 0.65

c.

Asynchronization		Sorbitol					
		3D7	0.00%	0.10%	0.20%	0.30%	0.40%
0 hour	Total	1.02 ± 0.00	1.02 ± 0.00	1.02 ± 0.00	1.02 ± 0.00	1.02 ± 0.00	1.02 ± 0.00
	Ring	0.20 ± 0.00	0.20 ± 0.00	0.20 ± 0.00	0.20 ± 0.00	0.20 ± 0.00	0.20 ± 0.00
	Non-ring	0.81 ± 0.00	0.81 ± 0.00	0.81 ± 0.00	0.81 ± 0.00	0.81 ± 0.00	0.81 ± 0.00
24 hours	Total	2.27 ± 0.65	2.06 ± 0.14	1.70 ± 0.66	1.57 ± 0.51	2.00 ± 0.31	2.08 ± 0.39
	Ring	1.44 ± 0.51	1.43 ± 0.25	0.99 ± 0.61	0.99 ± 0.64	1.47 ± 0.33	1.13 ± 0.40
	Non-ring	0.83 ± 0.14	0.63 ± 0.11	0.71 ± 0.35	0.57 ± 0.21	0.53 ± 0.27	0.95 ± 0.38
48 hours	Total	6.01 ± 0.13	2.76 ± 0.58	5.14 ± 0.83	4.10 ± 0.36	4.13 ± 0.32	4.62 ± 1.27
	Ring	0.57 ± 0.36	0.40 ± 0.15	1.20 ± 0.07	1.41 ± 0.14	0.85 ± 0.42	1.21 ± 0.64
	Non-ring	5.44 ± 0.32	2.37 ± 0.43	3.93 ± 0.81	2.69 ± 0.36	3.28 ± 0.37	3.41 ± 0.69
72 hours	Total	3.95 ± 1.68	5.27 ± 4.82	2.93 ± 0.90	2.61 ± 0.19	7.99 ± 2.41	2.89 ± 1.03
	Ring	1.33 ± 1.68	1.96 ± 3.22	0.47 ± 0.46	0.38 ± 0.34	3.63 ± 2.58	0.44 ± 0.43
	Non-ring	2.62 ± 0.29	3.32 ± 1.69	2.46 ± 0.55	2.23 ± 0.49	4.36 ± 0.66	2.45 ± 0.81

5. เกลื้อ

5.1 โซเดียมคลอไรด์

5.1.1 กลุ่มเชื้อแบบระยะเดียว

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุม ที่เวลา 72 ชั่วโมง เชื้อ K1CB1 ในกลุ่มทดลองมีค่า % parasitaemia ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม แต่เชื้อ T9/94RC17 และ 3D7 มีค่า % parasitaemia ต่ำลงเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.20% โดยมีค่า % parasitaemia เท่ากับ 2.02% และ 2.94% ตามลำดับ (ตารางที่ 23)

เมื่อดูเชื้อแต่ละระยะ เชื้อ K1CB1 และ 3D7 ที่เวลา 0 และ 48 ชั่วโมง เชื้ออยู่ในระยะวงแหวน ที่เวลา 24 และ 72 ชั่วโมง โดยส่วนมากเชื้ออยู่ในระยะไม่ใช่วงแหวน ในขณะที่เชื้อ T9/94RC17 ที่เวลา 0 ชั่วโมง เชื้ออยู่ในระยะวงแหวน เมื่อเวลา 24 และ 72 ชั่วโมง เชื้อทั้ง 2 ระยะมีค่า % parasitaemia ใกล้เคียงกัน ส่วนที่เวลา 48 ชั่วโมง โดยส่วนมากเชื้ออยู่ในระยะไม่ใช่วงแหวน โดยเชื้อ T9/94RC17 มีค่า % parasitaemia ของเชื้อระยะวงแหวนและระยะไม่ใช่วงแหวนต่ำลงเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.20% โดยมีค่าเท่ากับ 0.46% และ 1.56% ตามลำดับ ส่วนเชื้อ 3D7 มีค่า % parasitaemia ของระยะไม่ใช่วงแหวนต่ำลงเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.20% โดยมีค่า % parasitaemia เท่ากับ 2.82% (ตารางที่ 23)

ตารางที่ 23 ค่า % parasitaemia (mean \pm SD) ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1 (a.), T9/94RC17 (b.) และ 3D7 (c.) ในกลุ่มควบคุม (ไม่มีไซโตเดียมคอลลอยด์) และกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซโตเดียมคอลลอยด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของกลุ่มเชื้อแบบระยะเดียว (syn)

a.

Synchronization		NaCl				
		0.00%	0.05%	0.10%	0.15%	0.20%
0 hour	Total	0.41 \pm 0.00	0.41 \pm 0.00	0.41 \pm 0.00	0.41 \pm 0.00	0.41 \pm 0.00
	Ring	0.41 \pm 0.00	0.41 \pm 0.00	0.41 \pm 0.00	0.41 \pm 0.00	0.41 \pm 0.00
	Non-ring	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
24 hours	Total	0.58 \pm 0.05	0.63 \pm 0.08	0.67 \pm 0.05	0.50 \pm 0.15	0.59 \pm 0.14
	Ring	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Non-ring	0.58 \pm 0.05	0.63 \pm 0.08	0.67 \pm 0.05	0.50 \pm 0.15	0.59 \pm 0.14
48 hours	Total	2.06 \pm 0.43	2.40 \pm 0.69	1.72 \pm 0.52	2.19 \pm 0.43	1.76 \pm 0.90
	Ring	2.06 \pm 0.43	2.24 \pm 0.50	1.59 \pm 0.53	2.12 \pm 0.49	1.55 \pm 0.98
	Non-ring	0.00	0.15 \pm 0.19	0.13 \pm 0.15	0.07 \pm 0.06	0.21 \pm 0.11
72 hours	Total	2.29 \pm 1.06	2.48 \pm 0.55	2.90 \pm 0.41	2.83 \pm 0.21	2.15 \pm 0.57
	Ring	0.03 \pm 0.06	0.03 \pm 0.06	0.00	0.03 \pm 0.05	0.03 \pm 0.06
	Non-ring	2.26 \pm 1.11	2.45 \pm 0.57	2.90 \pm 0.41	2.80 \pm 0.26	2.12 \pm 0.57

b.

Synchronization		NaCl				
		T9/94RC17	0.00%	0.05%	0.10%	0.15%
0 hour	Total	0.42 ± 0.00	0.42 ± 0.00	0.42 ± 0.00	0.42 ± 0.00	0.42 ± 0.00
	Ring	0.42 ± 0.00	0.42 ± 0.00	0.42 ± 0.00	0.42 ± 0.00	0.42 ± 0.00
	Non-ring	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
24 hours	Total	0.83 ± 0.07	0.94 ± 0.33	0.96 ± 0.13	0.61 ± 0.03	0.54 ± 0.07
	Ring	0.36 ± 0.24	0.47 ± 0.32	0.33 ± 0.16	0.10 ± 0.11	0.03 ± 0.06
	Non-ring	0.48 ± 0.24	0.47 ± 0.22	0.63 ± 0.03	0.50 ± 0.09	0.50 ± 0.11
48 hours	Total	2.77 ± 0.69	2.96 ± 0.41	2.78 ± 0.37	3.00 ± 0.40	1.52 ± 0.24
	Ring	0.55 ± 0.31	0.67 ± 0.34	0.50 ± 0.13	1.22 ± 0.19	0.74 ± 0.15
	Non-ring	2.23 ± 0.43	2.29 ± 0.62	2.28 ± 0.41	1.77 ± 0.51	0.71 ± 0.26
72 hours	Total	4.06 ± 0.22	5.27 ± 1.04	4.40 ± 0.85	4.23 ± 0.54	2.02 ± 0.92
	Ring	1.51 ± 0.82	2.65 ± 1.52	2.34 ± 0.65	2.61 ± 0.62	0.46 ± 0.45
	Non-ring	2.56 ± 0.64	2.61 ± 0.61	2.05 ± 0.46	1.62 ± 0.49	1.56 ± 0.58

c.

Synchronization		NaCl				
		3D7	0.00%	0.05%	0.10%	0.15%
0 hour	Total	0.47 ± 0.00	0.47 ± 0.00	0.47 ± 0.00	0.47 ± 0.00	0.47 ± 0.00
	Ring	0.47 ± 0.00	0.47 ± 0.00	0.47 ± 0.00	0.47 ± 0.00	0.47 ± 0.00
	Non-ring	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
24 hours	Total	0.83 ± 0.20	0.70 ± 0.11	0.63 ± 0.16	0.67 ± 0.16	0.76 ± 0.19
	Ring	0.00	0.03 ± 0.06	0.03 ± 0.06	0.07 ± 0.06	0.00
	Non-ring	0.83 ± 0.20	0.67 ± 0.06	0.59 ± 0.11	0.61 ± 0.18	0.76 ± 0.19
48 hours	Total	3.82 ± 0.85	3.35 ± 0.68	3.06 ± 1.00	3.31 ± 0.96	2.39 ± 0.40
	Ring	3.23 ± 0.33	2.95 ± 0.64	2.63 ± 0.63	3.19 ± 0.85	2.19 ± 0.40
	Non-ring	0.59 ± 0.53	0.40 ± 0.24	0.43 ± 0.37	0.12 ± 0.21	0.21 ± 0.01
72 hours	Total	4.78 ± 0.66	5.02 ± 0.50	4.64 ± 0.45	3.54 ± 0.70	2.94 ± 1.04
	Ring	0.33 ± 0.30	0.67 ± 0.22	0.50 ± 0.03	0.07 ± 0.12	0.12 ± 0.14
	Non-ring	3.12 ± 2.07	4.35 ± 0.58	4.15 ± 0.42	3.47 ± 0.67	2.82 ± 1.15

5.1.2 กลุ่มเชื้อแบบหลายระยะ

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุม ที่เวลา 72 ชั่วโมง เชื้อ K1CB1 และ 3D7 มีค่า % parasitaemia ต่ำลงเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซโตียมคลอไรด์เข้มข้น 0.20% โดยมีค่า % parasitaemia เท่ากับ 4.51% และ 3.12% ตามลำดับ แต่เมื่อดูเชื้อ T9/94RC17 ที่เวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเชื้อเกิดการ overgrowth ถึงแม้ว่าเชื้อจะเกิดการ overgrowth แต่เมื่อดูผลที่เวลา 48 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองเช่นเดียวกับกลุ่มเชื้อแบบระยะเดียว คือ เชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ ในกลุ่มทดลองมีค่า % parasitaemia ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม ยกเว้นที่ความเข้มข้น 0.20% มีค่า % parasitaemia ต่ำที่สุด (ตารางที่ 24)

การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าไซโตียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 0.20% มีผลในการลดการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 โดยเชื้อมีค่า % parasitaemia ต่ำกว่าความเข้มข้นอื่น ๆ



ตารางที่ 24 ค่า % parasitaemia (mean \pm SD) ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1 (a.), T9/94RC17 (b.) และ 3D7 (c.) ในกลุ่มควบคุม (ไม่มีไซเดียมคลอไรด์) และกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของกลุ่มเชื้อแบบหลายระยะ (asyn)

a.

		Asynchronization		NaCl			
		K1CB1		0.00%	0.05%	0.10%	0.15%
0 hour	Total	0.70 \pm 0.00	0.70 \pm 0.00	0.70 \pm 0.00	0.70 \pm 0.00	0.70 \pm 0.00	0.70 \pm 0.00
	Ring	0.23 \pm 0.00	0.23 \pm 0.00	0.23 \pm 0.00	0.23 \pm 0.00	0.23 \pm 0.00	0.23 \pm 0.00
	Non-ring	0.47 \pm 0.00	0.47 \pm 0.00	0.47 \pm 0.00	0.47 \pm 0.00	0.47 \pm 0.00	0.47 \pm 0.00
24 hours	Total	1.46 \pm 0.16	1.64 \pm 0.14	1.47 \pm 0.29	1.88 \pm 0.22	1.17 \pm 0.51	
	Ring	1.03 \pm 0.20	1.12 \pm 0.07	0.96 \pm 0.10	1.40 \pm 0.08	0.73 \pm 0.41	
	Non-ring	0.44 \pm 0.21	0.53 \pm 0.11	0.51 \pm 0.20	0.48 \pm 0.15	0.44 \pm 0.13	
48 hours	Total	2.31 \pm 0.54	2.47 \pm 0.45	2.80 \pm 0.40	2.16 \pm 0.39	2.07 \pm 0.20	
	Ring	1.26 \pm 0.34	1.21 \pm 0.40	1.47 \pm 0.56	1.42 \pm 0.17	0.79 \pm 0.24	
	Non-ring	1.04 \pm 0.32	1.26 \pm 0.36	1.32 \pm 0.28	0.74 \pm 0.33	1.28 \pm 0.32	
72 hours	Total	5.09 \pm 0.43	4.73 \pm 1.23	5.03 \pm 0.71	5.66 \pm 0.88	4.51 \pm 0.79	
	Ring	2.73 \pm 0.29	2.72 \pm 0.73	3.10 \pm 0.25	3.32 \pm 0.70	2.81 \pm 0.63	
	Non-ring	2.35 \pm 0.66	2.01 \pm 0.51	1.93 \pm 0.50	2.34 \pm 0.24	1.70 \pm 0.24	

b.

Asynchronization		NaCl				
T9/94RC17		0.00%	0.05%	0.10%	0.15%	0.20%
0 hour	Total	0.32 ± 0.00	0.32 ± 0.00	0.32 ± 0.00	0.32 ± 0.00	0.32 ± 0.00
	Ring	0.21 ± 0.00	0.21 ± 0.00	0.21 ± 0.00	0.21 ± 0.00	0.21 ± 0.00
	Non-ring	0.11 ± 0.00	0.11 ± 0.00	0.11 ± 0.00	0.11 ± 0.00	0.11 ± 0.00
24 hours	Total	1.45 ± 0.20	1.71 ± 0.33	1.36 ± 0.19	1.08 ± 0.40	1.13 ± 0.36
	Ring	0.82 ± 0.18	0.94 ± 0.14	0.78 ± 0.23	0.44 ± 0.26	0.45 ± 0.05
	Non-ring	0.63 ± 0.15	0.77 ± 0.24	0.57 ± 0.05	0.64 ± 0.15	0.68 ± 0.33
48 hours	Total	5.36 ± 0.67	5.06 ± 0.45	4.89 ± 0.37	4.44 ± 0.20	3.45 ± 1.77
	Ring	2.32 ± 0.18	1.84 ± 0.44	2.29 ± 0.30	1.84 ± 0.20	1.65 ± 0.78
	Non-ring	2.86 ± 0.69	3.22 ± 0.13	2.60 ± 0.34	2.60 ± 0.21	1.79 ± 1.06
72 hours	Total	2.27 ± 0.89	2.13 ± 0.51	2.82 ± 0.55	4.72 ± 1.32	3.96 ± 0.81
	Ring	0.26 ± 0.46	0.00	0.09 ± 0.16	1.08 ± 0.61	0.91 ± 0.38
	Non-ring	2.00 ± 0.47	2.13 ± 0.51	2.73 ± 0.57	3.65 ± 0.94	3.05 ± 0.56

c.

Asynchronization		NaCl				
3D7		0.00%	0.05%	0.10%	0.15%	0.20%
0 hour	Total	0.50 ± 0.00	0.50 ± 0.00	0.50 ± 0.00	0.50 ± 0.00	0.50 ± 0.00
	Ring	0.30 ± 0.00	0.30 ± 0.00	0.30 ± 0.00	0.30 ± 0.00	0.30 ± 0.00
	Non-ring	0.20 ± 0.00	0.20 ± 0.00	0.20 ± 0.00	0.20 ± 0.00	0.20 ± 0.00
24 hours	Total	0.82 ± 0.37	0.83 ± 0.16	0.75 ± 0.12	0.96 ± 0.22	0.66 ± 0.28
	Ring	0.32 ± 0.39	0.34 ± 0.06	0.20 ± 0.09	0.34 ± 0.15	0.20 ± 0.10
	Non-ring	0.50 ± 0.03	0.49 ± 0.11	0.55 ± 0.21	0.62 ± 0.11	0.46 ± 0.19
48 hours	Total	2.95 ± 0.14	3.04 ± 0.55	2.92 ± 0.17	2.69 ± 0.38	2.18 ± 0.40
	Ring	2.48 ± 0.22	2.41 ± 0.41	2.39 ± 0.03	2.15 ± 0.56	1.76 ± 0.40
	Non-ring	0.47 ± 0.23	0.63 ± 0.23	0.53 ± 0.16	0.54 ± 0.19	0.41 ± 0.18
72 hours	Total	5.37 ± 0.23	5.14 ± 0.67	4.97 ± 0.50	4.06 ± 0.56	3.12 ± 0.58
	Ring	1.52 ± 0.27	2.07 ± 1.15	1.49 ± 0.50	1.12 ± 0.62	0.66 ± 0.70
	Non-ring	3.85 ± 0.30	3.07 ± 0.55	3.48 ± 0.35	2.94 ± 0.08	2.46 ± 0.16

5.2 แคลเซียมคลอไรด์

5.2.1 กลุ่มเชื้อแบบระยะเดียว

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุม พบว่า เชื้อ K1CB1 และ T9/94RC17 ในทุกความเข้มข้นสามารถพบเชื้อได้ที่เวลา 24 ชั่วโมงเท่านั้น ส่วนเชื้อ 3D7 พบเชื้อมาลาเรียได้ในความเข้มข้น 0.70 – 0.85% โดยเชื้อมาลาเรียที่พบนั้นส่วนใหญ่ คือ เชื้อมาลาเรียในระยะไม่ใช่วงแหวน (ตารางที่ 25)

5.2.2 กลุ่มเชื้อแบบหลายระยะ

ในกลุ่มเชื้อแบบหลายระยะ เชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้ผลการทดลองคล้ายกับกลุ่มเชื้อแบบระยะเดียว คือ ในทุกความเข้มข้น สามารถพบเชื้อ K1CB1 และ T9/94RC17 ที่เวลา 24 ชั่วโมงเท่านั้น ส่วนเชื้อ 3D7 พบเชื้อมาลาเรียได้ในความเข้มข้น 0.70 – 0.85% โดยเชื้อมาลาเรียที่พบนั้นส่วนมาก คือ เชื้อมาลาเรียในระยะไม่ใช่วงแหวน (ตารางที่ 26)

การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าแคลเซียมคลอไรด์มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 ภายใน 48 ชั่วโมง

ตารางที่ 26 ค่า % parasitaemia (mean \pm SD) ของเชื้อมาลาเรีย K1CB1 (a.), T9/94RC17 (b.) และ 3D7 (c.) ในกลุ่มควบคุม (ไม่มีแคลเซียมคลอไรด์) และในกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของกลุ่มเชื้อแบบหลายระยะ (asyn)

a.

Asynchronization		CaCl ₂						
K1CB1		0.00%	0.75%	0.80%	0.85%	0.90%	0.95%	1.00%
0 hour	Total	0.49 \pm	0.49 \pm	0.49 \pm	0.49 \pm	0.49 \pm	0.49 \pm	0.49 \pm
		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Ring	0.10 \pm	0.10 \pm	0.10 \pm	0.10 \pm	0.10 \pm	0.10 \pm	0.10 \pm
		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Non-ring	0.39 \pm	0.39 \pm	0.39 \pm	0.39 \pm	0.39 \pm	0.39 \pm	0.39 \pm
		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
24 hours	Total	1.26 \pm	0.50 \pm	0.70 \pm	0.46 \pm	0.51 \pm	0.30 \pm	0.43 \pm
		0.12	0.06	0.18	0.18	0.19	0.18	0.11
	Ring	0.81 \pm	0.04 \pm	0.11 \pm	0.00	0.00	0.00	0.00
		0.07	0.06	0.11				
	Non-ring	0.45 \pm	0.46 \pm	0.60 \pm	0.46 \pm	0.51 \pm	0.30 \pm	0.43 \pm
		0.12	0.06	0.25	0.18	0.19	0.18	0.11
48 hours	Total	3.52 \pm	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		0.40						
	Ring	2.22 \pm	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		0.41						
	Non-ring	1.31 \pm	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		0.59						
72 hours	Total	9.42 \pm	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		0.95						
	Ring	4.51 \pm	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		0.47						
	Non-ring	4.91 \pm	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		0.48						

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

เชื้อมาลาเรีย 3 สายพันธุ์ ได้แก่ K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 เป็นเชื้อมาลาเรียมาตรฐานที่เก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวภายในห้องปฏิบัติการวิจัยมาลาเรีย ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Thaithong et al., 2001) ถูกนำมาเพาะเลี้ยงเชื้ออย่างต่อเนื่องเพื่อเป็นเชื้อเริ่มต้นในการทดสอบปัจจัยทางกายภาพและเคมี ก่อนการทดสอบทั้ง 2 ปัจจัย ได้ติดตามการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียทุก 6 ชั่วโมง เพื่อกำหนดระยะเวลาในการทดสอบปัจจัยทั้ง 2 ปัจจัย เป็น 72 ชั่วโมง เนื่องจากเชื้อมาลาเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ มีวงชีวิตในเซลล์เม็ดเลือดแดง ประมาณ 42 – 48 ชั่วโมง ดังนั้นการทดสอบปัจจัยต่าง ๆ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ช่วยให้เห็นผลของปัจจัยต่าง ๆ ต่อเชื้อมาลาเรียในระยะต่าง ๆ ได้ชัดเจนขึ้น

การทดสอบปัจจัยทางกายภาพและเคมีได้กำหนดให้มีเชื้อมาลาเรียเริ่มต้น เท่ากับ 0.3% parasitaemia ซึ่งเป็นค่าที่เหมาะสม (Cheychoma et al., 2015) สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียได้ถึงที่เวลา 72 ชั่วโมง หากมีค่า % parasitaemia ที่สูงเกินไป ส่งผลให้เชื้อเกิดการ overgrowth เนื่องจากเชื้อมาลาเรียมีปริมาณมาก สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ เช่น สารอาหารไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย หรือเกิดการสะสมของของเสียภายในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย เป็นต้น ทำให้ผลการทดลองที่ได้ในเวลา 72 ชั่วโมง เชื้อมาลาเรียมีค่า % parasitaemia ลดลง

ปัจจัยทางกายภาพ

1. อุณหภูมิ

1.1 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ในอดีตเคยมีการทดลองเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ผลการทดลองที่ได้พบว่าเชื้ออยู่ในระยะเดียวกัน (Yuan et al., 2014) ดังนั้นจึงเลือกอุณหภูมินี้มาใช้ในการทดลองกับเชื้อมาลาเรียคนละสายพันธุ์ ในการทดลองครั้งนี้ใช้เชื้อมาลาเรีย K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 มาเพาะเลี้ยงในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสทั้งในกลุ่มเชื้อระยะเดียวและกลุ่มเชื้อหลายระยะ ทั้ง 2 กลุ่ม ได้ผลการทดลองที่คล้ายกัน คือ พบเชื้อระยะวงแหวนที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยมีค่า % parasitaemia ลดลงจากตอนเริ่มต้น แสดงว่าเชื้อในระยะวงแหวนที่พบเวลา 24 ชั่วโมง อาจเป็นเชื้อจากตอนเริ่มต้นที่มีพัฒนาการช้าลง เชื้อจึงยังอยู่ในระยะวงแหวน (เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เวลา 24 ชั่วโมง เชื้อมาลาเรียพัฒนาไปเป็นระยะไม่ใช่วงแหวนทั้งหมด) ที่เวลา 48 ชั่วโมง พบเชื้อมาลาเรียได้ในปริมาณน้อยมากหรือไม่พบเลย และไม่สามารถตรวจพบได้ที่เวลา 72 ชั่วโมง ดังนั้นระยะวงแหวนไม่สามารถพัฒนาต่อเป็นระยะไม่ใช่วงแหวนและตายไปหรือพัฒนาไปเป็นระยะไม่ใช่วงแหวนแต่ไม่สามารถทนอุณหภูมิต่ำ แสดงว่าที่อุณหภูมินี้ มีผลต่อการพัฒนาของเชื้อมาลาเรียในระยะวงแหวนมาเป็นระยะไม่ใช่วงแหวน ผลการทดลองนี้ได้ผลตรงกับการศึกษาในอดีตของ Yuan และคณะ ที่สามารถทำให้เชื้อมาลาเรีย (strains: 3D7, HB3, DD2, 7G8 และ isolates: WB299, WB548, WB183, WB682) อยู่ในระยะเดียวกันได้โดยการบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 – 24 ชั่วโมง เชื้อมาลาเรียที่เหลืออยู่ส่วนมากเป็นเชื้อในระยะวงแหวน เนื่องจากเชื้อในระยะวงแหวนเป็นเชื้อที่สามารถอยู่รอดได้ในอุณหภูมิต่ำและเป็นระยะที่ใช้ในการเก็บรักษาเชื้อในไนโตรเจนเหลว โดยเชื้อในระยะวงแหวนเหล่านี้ยังคงเจริญต่อไปได้หากนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

1.2 อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส

การเลือกใช้อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียสในการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย มีสาเหตุมาจากการเลี้ยงเชื้ออย่างต่อเนื่องที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีทดสอบโดยการเพิ่มอุณหภูมิในการเลี้ยงโดยเพิ่มไปเป็น 40 องศาเซลเซียส จึงลดอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อโดยให้มีช่วงอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเท่ากัน คือ เลี้ยงเชื้อในอุณหภูมิ 37 ± 3 องศาเซลเซียส การเพาะเลี้ยงมาลาเรียในอุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส ทั้งในกลุ่มเชื้อระยะเดียวและกลุ่มเชื้อหลายระยะ เชื้อมาลาเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ มีจำนวนลดลงเมื่อเลี้ยงในอุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยพบว่า ที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส ตลอดทั้ง 72 ชั่วโมง เชื้อมีปริมาณต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส) และเชื้อทุกสายพันธุ์มีค่า % parasitaemia สูงที่สุดที่เวลา 72 ชั่วโมง เช่นเดียวกับเชื้อที่เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แสดงว่าที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส สามารถลดการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียในระยะเวลา 72 ชั่วโมง เนื่องจากที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ เชื้อมาลาเรียจึงมีจำนวนลดลง

1.3 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ในกลุ่มเชื้อระยะเดียวและกลุ่มเชื้อหลายระยะที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เชื้อเมื่อเริ่มต้นโดยส่วนมากเป็นเชื้อในระยะวงแหวน ซึ่งสามารถตรวจพบระยะวงแหวนที่เวลา 24 ชั่วโมงเท่านั้น โดยมีจำนวนต่ำกว่าเมื่อเริ่มต้น (มีค่า % parasitaemia น้อยกว่า 0.10%) และตรวจพบระยะไม่ใช่วงแหวนที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ซึ่งเชื้อระยะไม่ใช่วงแหวนที่เวลา 24 ชั่วโมง เป็นเชื้อที่พัฒนามาจากเชื้อระยะวงแหวนเมื่อตอนเริ่มต้น ส่วนเชื้อในระยะไม่ใช่วงแหวนที่เวลา 48 ชั่วโมง เป็นเชื้อที่พัฒนามาจากเชื้อระยะวงแหวนเมื่อเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนที่เวลา 72 ชั่วโมง ไม่พบที่ระยะไม่ใช่วงแหวนเนื่องจากที่เวลา 48 ชั่วโมง ไม่พบเชื้อระยะวงแหวน จึงไม่มีเชื้อระยะวงแหวนที่จะพัฒนามาเป็นระยะไม่ใช่วงแหวนได้ และไม่พบเชื้อระยะวงแหวนเช่นกัน แสดงว่าระยะไม่ใช่วงแหวนไม่สามารถพัฒนาต่อเป็นระยะวงแหวนและตายไป ดังนั้นที่อุณหภูมินี้ มีผลในการยับยั้งการพัฒนาของเชื้อมาลาเรียในระยะไม่ใช่วงแหวนมาเป็นระยะวงแหวน ทำให้เมื่อเริ่มต้นเชื้อที่อยู่ในระยะวงแหวนสามารถพัฒนามาเป็นระยะไม่ใช่วงแหวนที่เวลา 24 ชั่วโมงได้ แต่เชื้อระยะไม่ใช่วงแหวนไม่สามารถพัฒนามาเป็นระยะวงแหวน ดังนั้นที่

เวลา 24 ชั่วโมง เชื้อที่พบส่วนมากจึงเป็นเชื้อในระยะไม่ใช่วงแหวน ซึ่งสามารถเห็นได้ชัดเจนในการทดลองของกลุ่มเชื้อหลายระยะที่ถึงแม่เมื่อตอนเริ่มต้นที่เวลา 0 ชั่วโมง มีเชื้อระยะไม่ใช่วงแหวนปะปนกับระยะวงแหวน แต่ที่เวลา 24 ชั่วโมง ก็ยังคงมีเชื้อในระยะวงแหวนน้อยมากหรือไม่มีเลย ซึ่งถ้าเชื้อระยะไม่ใช่วงแหวนสามารถพัฒนาไปเป็นระยะวงแหวนได้ ที่เวลา 24 ชั่วโมง น่าจะมีเชื้อในระยะวงแหวนมากกว่านี้ เนื่องจากเชื้อระยะไม่ใช่วงแหวน (ระยะ schizont) แยกออกและพัฒนาไปเป็นเชื้อระยะวงแหวน ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Kwiatkowski ที่เคยทดลองเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* (isolated: Gam 83 – 1 และ Gam 85 – 372) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง การพัฒนาของเชื้อจากรยะวงแหวนไปเป็นระยะ schizont สามารถพัฒนาได้เช่นเดียวกับเชื้อที่เลี้ยงในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อเลี้ยงเชื้อต่อไปให้เชื้อระยะ schizont พัฒนาไปเป็นระยะวงแหวน พบว่าเชื้อระยะ schizont พัฒนามาเป็นระยะวงแหวนได้ลดลง ดังนั้น ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีผลต่อการพัฒนาการของเชื้อมาลาเรียในระหว่างการเพาะเลี้ยงได้ และเมื่อเลี้ยงเชื้อแบบหลายระยะในอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำให้เชื้ออยู่ในระยะเดียวกันโดยเป็นเชื้อมาลาเรียส่วนใหญ่จะอยู่ในระยะไม่ใช่วงแหวน (Kwiatkowski, 1989) และการศึกษาของ Long และคณะที่ได้รายงานไว้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ทุกระยะ โดยการเจริญของเชื้อมาลาเรียในระยะ mid และ late trophozoite และ schizont จะถูกยับยั้งการเจริญเติบโตมากที่สุดเมื่อเทียบกับระยะวงแหวน ทำให้เชื้อไม่สามารถพัฒนามาเป็นระยะวงแหวนได้ (Long et al., 2001)

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองของการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบว่าทั้ง 2 อุณหภูมิสามารถทำให้เชื้ออยู่ในระยะเดียวกันได้ แต่เชื้อที่พบเป็นระยะที่แตกต่างกัน โดยเชื้อที่ถูกเลี้ยงในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เชื้อที่พบเป็นเชื้อระยะวงแหวนที่สามารถอยู่รอดได้ตั้งแต่เริ่มต้นเลี้ยงเชื้อแต่ไม่สามารถพัฒนาต่อเป็นระยะไม่ใช่วงแหวนและตายไปหรือพัฒนาไปเป็นระยะไม่ใช่วงแหวนแต่ไม่สามารถทนอุณหภูมิต่ำ ซึ่งระยะวงแหวนเป็นระยะที่ใช้ในการเก็บรักษาเชื้อไว้ในไนโตรเจน เชื้อระยะวงแหวนจึงทนต่ออุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสได้ ในขณะที่เชื้อที่ถูกเลี้ยงในอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เชื้อที่พบเป็นเชื้อระยะไม่ใช่วงแหวนที่พัฒนามาจากเชื้อระยะวงแหวน ดังนั้น ที่อุณหภูมิ

40 องศาเซลเซียส เชื้อในระยะวงแหวนสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ แต่เมื่อเชื้อพัฒนามาเป็นระยะไม่ใช่วงแหวน เชื้อไม่สามารถพัฒนาไปเป็นระยะวงแหวนได้ ดังนั้นจึงพบเชื้อระยะไม่ใช่วงแหวนเท่านั้น

1.4 การสลับอุณหภูมิระหว่างการเลี้ยงเชื้อ

อุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเชื้อมาลาเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ 4, 37 (กลุ่มควบคุม) และ 40 องศาเซลเซียส เริ่มต้นเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เชื้อมาลาเรียระยะไม่ใช่วงแหวนสามารถอยู่รอดได้ ดังนั้น หลังจากการเลี้ยงที่อุณหภูมินี้จะพบแต่เชื้อในระยะไม่ใช่วงแหวนแล้วนำเชื้อไปเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เชื้อในระยะไม่ใช่วงแหวนพัฒนามาเป็นระยะวงแหวน ซึ่งเชื้อในระยะวงแหวนสามารถอยู่รอดได้ แล้วนำไปเชื่อนี้ไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสอีกครั้งเพื่อให้เชื้อในระยะวงแหวนพัฒนามาเป็นระยะไม่ใช่วงแหวน หลังจากการเลี้ยงทั้ง 2 อุณหภูมิ นำเชื้อมาเลี้ยงในสภาวะปกติที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อเพิ่มจำนวนของเชื้อมาลาเรียเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ดังนั้น หากเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้เป็นปกติ ที่เวลาสุดท้ายจะพบเป็นเชื้อระยะไม่ใช่วงแหวนเกือบทั้งหมด แต่ผลการทดลองพบว่าทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองไม่พบเชื้อเหลืออยู่ที่เวลาสุดท้าย สาเหตุที่ไม่พบเชื้อมาลาเรียเหลือในกลุ่มควบคุมอาจเป็นเพราะเมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะปกติไปเรื่อย ๆ เชื้อมีปริมาณที่เพิ่มสูงขึ้นจนกระทั่งเชื้อเกิดการ overgrowth ที่เวลาสุดท้าย ในขณะที่กลุ่มทดลองที่ไม่พบเชื้อมาลาเรีย สาเหตุที่เป็นไปได้ คือ เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้เช่นเดียวกับกลุ่มควบคุมจนเกิดการ overgrowth หรือเชื้ออาจจะไม่สามารถทนกับสภาวะที่ผิดปกติได้จนเชื้อตายหมด ซึ่งในอดีตเคยมีการทดลองสลับอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ โดย Kwiatkowski ได้เลี้ยงเชื้อมาลาเรีย (isolated: Gam 83 – 1 และ Gam 85 – 372) ที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส สลับวันเว้นวัน พบว่า วันที่เลี้ยงในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะมีปริมาณเชื้อสูงกว่าวันที่เลี้ยงในอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังทำให้เชื้อที่พบอยู่ในระยะเดียวกัน โดยวันที่เลี้ยงเชื้อในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เชื้อที่พบโดยส่วนมากอยู่ในระยะวงแหวน ส่วนวันที่เลี้ยงในอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เชื้อที่พบโดยส่วนมากอยู่ในระยะ trophozoite (Kwiatkowski, 1989) ส่วนการศึกษาของ Rojas และ Wasserman ทดลองเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อจะเจริญและบุกรุกเข้าสู่เซลล์เม็ด

เลือดแดงเซลล์ใหม่ได้ฆ่าลง เมื่อเชื้อเจริญไปถึงระยะ trophozoite ตอนต้น ย้ายเชื้อมาเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส จะพบว่า การเจริญของเชื้อจะสามารถเจริญได้เป็นปกติ แต่ถ้าเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิปกติแล้วจึงย้ายไปเลี้ยงที่ 28 องศาเซลเซียส กลับพบว่า เชื้อมีการเจริญที่ครบวงจรชีวิตแต่จะช้ากว่า วงชีวิตปกติประมาณ 12-16 ชั่วโมง (Rojas and Wasserman, 1993) แสดงว่า ที่การเลี้ยงเชื้อที่ อุณหภูมิต่าง ๆ ทั้ง 4, 28 และ 40 องศาเซลเซียส ล้วนมีผลในการลดการเจริญเติบโตของเชื้อ มาลาเรีย แต่หากเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิเหล่านี้สลับกับการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ เชื้อสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้เป็นปกติ และอาจ สามารถทำให้เชื้ออยู่ในระยะเดียวกันได้ด้วย

2. ความเป็นกรด – ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในอาหารเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย มีการเติม HEPES buffer ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 เพื่อใช้เป็นบัฟเฟอร์ในการป้องกันการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด – ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้ออย่างต่อเนื่องในงานวิจัยนี้มีค่าความเป็นกรด – ด่าง เท่ากับ 7.0 ดังนั้นจึงปรับค่าความเป็นกรด – ด่างให้เพิ่มขึ้นและลดลง โดยการเพิ่มและลด สารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนตในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งต้องการปรับให้มีค่าความเป็นกรด – ด่างมี ค่า 7.0 ± 0.2 แต่ค่าความเป็นกรด – ด่างที่ได้จริงแตกต่างไปจากการ เนื่องจาก การวัดค่า ความเป็นกรด – ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถนำไปวัดได้หลังจากการเพาะเลี้ยงเสร็จสิ้นแล้ว เพราะอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ต้องปลอดเชื้อและต้องทำการทดลองภายในตู้กรงอากาศเท่านั้น

อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด – ด่างเท่ากับ 6.9 และ 7.3 สามารถเลี้ยงเชื้อ มาลาเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ให้เจริญเติบโตได้เป็นปกติโดยมีค่า % parasitaemia สูงกว่ากลุ่มควบคุม และเชื้อมีค่า % parasitaemia สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด - ด่าง เท่ากับ 7.3 แต่ไม่ได้มีผลจำเพาะต่อระยะของเชื้อมาลาเรีย ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาต่าง ๆ ใน อดีต ได้แก่ การศึกษาของ Schuster ที่รายงานว่า อาหารที่มีความเป็นด่างอ่อน ๆ (pH 7.2 – 7.45) เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อมาลาเรียในสกุล *Plasmodium* (Schuster, 2002) เช่นเดียวกับ

การศึกษาของ Jensen และ Trager ที่มีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด – ต่างเท่ากับ 7.4 (Jensen and Trager, 1977) ส่วนการทดลองของ Jensen และคณะ ได้ทดลองเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย (FCR-3/FMG) ในช่วง pH 7.0 – 7.7 เป็นเวลา 2 วัน เชื้อที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH 7.1 – 7.5 มีค่า % parasitaemia อยู่ระหว่าง 20 – 30% โดยค่า pH ที่มีค่า % parasitaemia สูงที่สุด คือ ค่า pH ประมาณ 7.4 (Jensen et al., 1983) และมีการรายงานว่า การรักษาค่าความเป็นต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีค่าอยู่ระหว่าง 7.3 และ 7.5 จะทำให้ประสบความสำเร็จในการเชื้อมาลาเรียอย่างต่อเนื่อง (Trigg, 1985) เนื่องจากค่าความเป็นกรด – ต่างในเลือดของมนุษย์ มีค่าประมาณ 7.4 (Kellum, 2000) อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเป็นต่างอ่อน ๆ ที่มีค่าใกล้เคียงกับเลือดของมนุษย์ ทำให้เชื้อมีการเจริญเติบโตได้ดีเหมือนเชื้อมาลาเรียที่อยู่ในร่างกายของมนุษย์

3. แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์

3.1 ไม่มีการจุดเทียนในโถดูดความชื้นลดการเลี้ยงเชื้อ

การเก็บตัวอย่างเชื้อมาลาเรียจากผู้ป่วยมาทำการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ จะมีช่วงเวลาเดินทางจากสถานที่ที่เก็บตัวอย่างมาจนถึงห้องปฏิบัติการ โดยช่วงเวลาในการเดินทางเป็นช่วงที่มีบรรยากาศปกติ คือ มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 0.03% และมีแก๊สออกซิเจน 21% ซึ่งมีความต่างจากการเพาะเลี้ยงเชื้อโดยวิธีเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงในภาชนะจุดเทียน (Jensen and Trager, 1977) ที่มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 3% และแก๊สออกซิเจน 17% (Trager and Jensen, 1977) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Scheibel และคณะ เลี้ยงเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* (strain FCR3/FMG) ในสภาวะที่มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และมีแก๊สออกซิเจนในปริมาณที่ต่างกันไปพบว่า เชื้อมีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในสภาวะที่มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 1 – 2% และมีแก๊สออกซิเจน 3% โดยมีค่า % parasitaemia สูงถึง 12% ที่เวลา 96 ชั่วโมง (Scheibel et al., 1979)

การทดลองนี้จึงต้องการทดสอบว่า หากเชื้อต้องอยู่ภายใต้สภาวะที่เป็นบรรยากาศปกติ (มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 0.03%) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เชื้อสามารถอยู่รอดได้หรือไม่ การทดลองสามารถทำได้โดยเลี้ยงเชื้อมาลาเรียในภาชนะที่มีการจุดเทียนเป็นกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง คือ ไม่มีการจุดเทียนภายในภาชนะ โดยติดตามการเจริญเติบโตของเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งกลุ่มเชื้อระยะเดียวและกลุ่มเชื้อหลายระยะที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีการจุดเทียน (มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 0.03%) พบเชื้อมาลาเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ในระยะวงแหวนจำนวนน้อย (มีค่า % parasitaemia น้อยกว่า 0.15%) ที่เวลา 24 ชั่วโมงเท่านั้น ส่วนระยะไม่ใช้วงแหวนสามารถอยู่รอดได้ถึงที่เวลา 72 ชั่วโมง แสดงว่าเชื้อในระยะไม่ใช้วงแหวนที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เป็นเชื้อที่พัฒนามาจากเชื้อระยะวงแหวนเมื่อตอนเริ่มต้นและที่เวลา 24 ชั่วโมงตามลำดับ เชื้อในระยะไม่ใช้วงแหวนที่เวลา 72 ชั่วโมง อาจเป็นเชื้อที่เวลา 48 ชั่วโมงที่มีพัฒนาการช้า ส่วนระยะไม่ใช้วงแหวนไม่สามารถพัฒนาต่อเป็นระยะวงแหวนได้ จึงมีค่า % parasitaemia ของเชื้อระยะวงแหวนลดลงและหมดไปที่เวลา 72 ชั่วโมง ดังนั้นการเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่ไม่มีการจุดเทียนมีผลในการยับยั้งการพัฒนาของเชื้อมาลาเรียในระยะไม่ใช้วงแหวนมาเป็นระยะวงแหวน ทำให้เมื่อเริ่มต้นเชื้อที่อยู่ในระยะวงแหวนสามารถพัฒนาเป็นระยะไม่ใช้วงแหวนที่เวลา 24 ชั่วโมงได้ แต่เชื้อระยะไม่ใช้วงแหวนไม่สามารถพัฒนาเป็นระยะวงแหวน ดังนั้นที่เวลา 24 ชั่วโมง เชื้อที่พบส่วนมากจึงเป็นเชื้อในระยะไม่ใช้วงแหวน ซึ่งสามารถเห็นได้ชัดเจนในการทดลองของกลุ่มเชื้อหลายระยะที่ถึงแม้เมื่อตอนเริ่มต้นที่เวลา 0 ชั่วโมง มีเชื้อระยะไม่ใช้วงแหวนปะปนกับระยะวงแหวน แต่ที่เวลา 24 ชั่วโมง ก็ยังคงมีเชื้อในระยะวงแหวนน้อยมากหรือไม่มีเลย ซึ่งถ้าเชื้อระยะไม่ใช้วงแหวนสามารถพัฒนาไปเป็นระยะวงแหวนได้ ที่เวลา 24 ชั่วโมง น่าจะมีเชื้อในระยะวงแหวนมากกว่านี้ เนื่องจากเชื้อระยะไม่ใช้วงแหวน (ระยะ schizont) แตกออกและพัฒนาไปเป็นเชื้อระยะวงแหวน

3.2 มีการจุดเทียนสลับกับการไม่จุดเทียนในโถดูดความชื้น

เชื้อมาลาเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ถูกเลี้ยงในสภาวะที่มีการเปลี่ยนแปลงอากาศภายในโถดูดความชื้นระหว่างกลุ่มที่มีการจุดเทียนภายใน (กลุ่มควบคุม) และไม่มีการจุดเทียนภายใน (กลุ่มทดลอง) โดยการจุดเทียนภายในโถดูดความชื้น คือ การเลี้ยงเชื้อแบบปกติที่ใช้ในการ

เพาะเลี้ยงเชื้ออย่างเนือง ในขณะที่การไม่จุดเทียนภายในโถดูดความชื้นเป็นการเลี้ยงเชื้อโดยใช้บรรยากาศปกติที่มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 0.03% และมีแก๊สออกซิเจน 21% จากการทดลองเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีการจุดเทียนในโถดูดความชื้นตลอดการเลี้ยงเชื้อตามที่มีการรายงานผลข้างต้น พบว่า การเลี้ยงเชื้อในบรรยากาศปกติที่ไม่มีการจุดเทียนภายใน 48 ชั่วโมง ทำให้เชื้อที่พบส่วนมากเป็นเชื้อระยะไม่ไช่วงแหวน แล้วนำเชื้อมาเลี้ยงต่อในสภาวะปกติที่มีการจุดเทียนภายใน 24 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มจำนวนของเชื้อมาลาเรีย ดังนั้นเชื้อที่พบควรเป็นเชื้อระยะวงแหวน เมื่อสลับการเลี้ยงแบบจุดเทียนและไม่จุดเทียนครบ 2 รอบ ผลที่คาดว่าจะได้รับ คือ เชื้อระยะวงแหวน แต่ผลการทดลองกลับพบว่าทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง ไม่พบเชื้อเหลืออยู่ อาจเป็นเพราะเมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะปกติไปเรื่อย ๆ เชื้อมีปริมาณที่เพิ่มสูงขึ้นจนกระทั่งเชื้อเกิดการ overgrowth ไม่พบเชื้อมาลาเรียเหลืออยู่ที่เวลาสุดท้าย

ปัจจัยทางเคมี

1. ยาปฏิชีวนะ

1.1 เพนิซิลลิน

เพนิซิลลิน เป็นยาปฏิชีวนะที่สกัดมาจาก *Penicillium notatum* ที่ค้นพบโดย อเล็กซานเดอร์ เฟลมมิง ในปี ค.ศ. 1928 (Fleming, 1999) ออกฤทธิ์โดยการขัดขวางการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย (Silver and Bostian, 1993) การทดลองนำเพนิซิลลินมาใช้ในการรักษาโรคมาลาเรีย โดยการใช้เพนิซิลลินเพียงชนิดเดียว พบว่าไม่มีผลในการรักษาโรคมาลาเรีย (Coatney and Greenberg, 1952) นอกจากนี้ยังพบว่ายาเพนิซิลลินไม่มีผลในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรีย *P. vivax* (Hindle et al., 1945)

ส่วนการทดลองในห้องปฏิบัติการ เชื้อมาลาเรียที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเพนิซิลลิน ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ทั้งในกลุ่มเชื้อระยะเดียวและกลุ่มเชื้อหลายระยะ พบว่า ที่ความเข้มข้น 50000 units มีผลในการลดการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย T9/94RC17 โดยมีค่า % total parasitaemia ต่ำกว่าที่ความเข้มข้นอื่น ๆ การทดลองในครั้งนี้ได้ผลที่ต่างจากการทดลองที่เคยมี

การศึกษามาในปี ค.ศ. 1983 การศึกษาครั้งนั้น พบว่า เมื่อทดลองในห้องปฏิบัติการ เพนซิลลิน ที่ความเข้มข้น 113.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* (strain FCR_{3TC}) (Geary and Jensen, 1983) ซึ่งอาจเป็นเพราะเชื้อมาลาเรียที่ใช้ทดสอบเป็นเชื้อมาลาเรียคนสายพันธุ์ทำให้เชื้อมาลาเรียมีผลต่อเพนซิลลินแตกต่างกัน ส่วนการทดลองของรุ่งฟ้า ธีญธนกุล รายงานว่า เพนซิลลินที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรีย T9/94RC17, TP174 และ K306 ได้ โดยความเข้มข้นต่ำสุดของเพนซิลลินที่ทำให้ไม่พบเชื้อมาลาเรีย T9/94RC17 เหลืออยู่ (MIC) เท่ากับ 7,000 Units ในขณะที่ความเข้มข้นต่ำสุดของเพนซิลลินที่ทำให้ไม่พบเชื้อมาลาเรีย TP174 เหลืออยู่ (MIC) เท่ากับ 10000 Units และ ความเข้มข้นต่ำสุดของเพนซิลลินที่ทำให้ไม่พบเชื้อมาลาเรีย K306 เหลืออยู่ (MIC) เท่ากับ 30000 Units (รุ่งฟ้า ธีญธนกุล, 2550) ซึ่งการทดลองในครั้งนี้และการทดลองของรุ่งฟ้า ธีญธนกุล มีการใช้เชื้อสายพันธุ์เดียวกันในการทดสอบ คือ T9/94RC17 แต่ผลการทดลองที่ได้แตกต่างกัน โดยการทดลองของรุ่งฟ้า ธีญธนกุล พบว่า เชื้อมาลาเรีย T9/94RC17 มีค่า MIC เท่ากับ 7,000 Units ในขณะที่การทดลองครั้งนี้ไม่สามารถบอกค่า MIC ได้ สามารถบอกได้เพียงว่าเพนซิลลินสามารถลดการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียได้ เพราะเชื้อมีค่า % parasitaemia ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม

1.2 ลินโคมายซิน

ลินโคมายซิน เป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่มเดียวกับคลินดามัยซิน โดยอยู่ในกลุ่มลินโคซาไมด์ (Lincosamide) ที่ผลิตจากแบคทีเรียกลุ่ม *Streptomyces lincolnensis* สามารถนำมาใช้เป็นยาต่อต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ยากลุ่มนี้ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรียโดยยับยั้งเอนไซม์ peptidyl transferase บนไรโบโซมขนาด 50S (Spížek and Rezanka, 2004; Spížek and Rezanka, 2004) ซึ่งคลินดามัยซินและลินโคมายซินสามารถนำมาใช้กับผู้ป่วยที่แพ้ยาเพนซิลลินและสามารถนำมาใช้ในการรักษาโรคมมาลาเรียที่เกิดจากเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ได้แม้แต่สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาคลอโรควิน ซัลโฟนาไมด์และไพริเมทามีน (Spížek and Rezanka, 2004) แต่ ลินโคมายซินจะมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อมาลาเรียได้น้อยกว่ายาชนิดอื่นในกลุ่มเดียวกัน เช่น

คลินดามัยซิน มีฤทธิ์ในการต่อต้านได้ดีกว่าและอาจจะใช้คู่กับควินินเพื่อให้ได้ผลที่ดียิ่งขึ้น (Warhurst, 1986)

ลินโคมายซินเป็นยาปฏิชีวนะที่มีผลต่อเชื้อมาลาเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ทั้งในกลุ่มเชื้อระยะเดียวและกลุ่มเชื้อหลายระยะ โดยค่าความเข้มข้นต่ำสุดของลินโคมายซินที่ทำให้ไม่พบเชื้อมาลาเรียเหลืออยู่ (MIC) คือ 5×10^{-4} ไมโครโมลาร์ ในอดีตเคยมีการทดลองผลของยาลินโคมายซินต่อเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ที่ดื้อต่อยาคลอโรควิน (สายพันธุ์ W2) พบว่าที่ 48 ชั่วโมง มีค่าความเข้มข้นสูงสุดที่ยับยั้งเชื้อมาลาเรียให้มีปริมาณลดลงเหลือ 50% (IC_{50}) ของยาลินโคมายซิน คือ ที่ความเข้มข้นมากกว่า 800 ไมโครโมลาร์ (Pradines et al., 2001) ซึ่งเมื่อดูผลการทดลองครั้งนี้และการทดลองในอดีต สามารถเทียบได้ว่าเชื้อมาลาเรีย W2, K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 มีความไวต่อยา ลินโคมายซิน

2. ซีรัมของมนุษย์

ซีรัมของมนุษย์เป็นส่วนประกอบที่สำคัญในการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียที่ช่วยในการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย หากไม่มีการเติมซีรัมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อจะถูกรเรียกว่า incomplete medium ซึ่งไม่สามารถใช้ในการเลี้ยงเชื้อมาลาเรียให้เจริญเติบโตได้ แต่สามารถใช้ในการล้างเลือด ทั้งเลือดใหม่ที่ไม่ใช่เชื้อมาลาเรียและเลือดที่มีเชื้อมาลาเรียหลังจากการทำให้เชื้ออยู่ในระยะเดียวกันหรือหลังจากการนำเชื้อออกมาจากการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียมีซีรัมของมนุษย์ความเข้มข้น 10% เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของซีรัมของมนุษย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเข้มข้น 4.8%, 7.2% และ 12.0% ทำให้เชื้อมาลาเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ทั้งในกลุ่มเชื้อระยะเดียวและกลุ่มเชื้อหลายระยะ เจริญเติบโตได้ปกติในทุกความเข้มข้นที่ได้ทดลอง แต่มีค่า % parasitaemia ที่แตกต่างกัน โดยที่ความเข้มข้น 4.8% มีค่า % parasitaemia ต่ำที่สุด และที่ความเข้มข้น 10.0% หรือกลุ่มควบคุม มีค่า % parasitaemia สูงที่สุด เมื่อดูผลการทดลองในอดีตที่เคยศึกษา พบว่าซีรัมของมนุษย์ที่ความเข้มข้น 5% สามารถทำให้เชื้อเจริญเติบโตเป็นปกติได้ แต่เมื่อเลี้ยงเชื้อมาลาเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของซีรัมของมนุษย์เท่ากับ 2.5% เชื้อมาลาเรียสามารถเจริญเติบโต

ได้ แต่มีจำนวนที่น้อยลง (Divo and Jensen, 1982) ส่วนการศึกษาของ Schuster ได้รายงานว่าการเติมซีรัมของมนุษย์ที่ความเข้มข้น 10 – 15% ทำให้เชื้อมาลาเรียมีการเจริญที่ดีที่สุด (Schuster, 2002) ซึ่งการศึกษาของทั้ง 2 งาน ได้สอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ ที่ความเข้มข้นของซีรัมของมนุษย์ 4.80% เชื้อมาลาเรียสามารถเจริญเติบโตได้เป็นปกติ เช่นเดียวกับการทดลองของ Divo และ Jensen ในขณะที่เชื้อมาลาเรียที่ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของซีรัมของมนุษย์ 10 และ 12% ทำให้เชื้อเจริญเติบโตได้ดีกว่าที่ความเข้มข้นอื่น ๆ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Schuster ดังนั้นความเข้มข้นของซีรัมของมนุษย์ที่ดีที่สุดในการทดลองนี้ คือ ความเข้มข้น 10% ที่ทำให้เชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์มีค่า % parasitaemia สูงที่สุด

3. วิตามินซี

การใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีวิตามินซีมาเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ทั้งในกลุ่มเชื้อระยะเดี่ยวและกลุ่มเชื้อหลายระยะ พบว่า วิตามินซีมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย K1CB1 โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดของวิตามินซีที่ทำให้ไม่พบเชื้อมาลาเรียเหลืออยู่ (MIC) เท่ากับ 1×10^{-3} ไมลาร์ ในขณะที่เชื้อ T9/94RC17 และ 3D7 ที่เวลา 72 ชั่วโมง ไม่สามารถหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของวิตามินซีที่ทำให้ไม่พบเชื้อมาลาเรียเหลืออยู่ (MIC) ได้ แต่ที่ความเข้มข้น 5×10^{-3} ไมลาร์ เชื้อมาลาเรียมีค่า % parasitaemia ลดลง แสดงว่าวิตามินซีมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียทั้ง 3 สายพันธุ์โดยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ K1CB1 ได้ และสามารถลดการเจริญเติบโตของเชื้อ T9/94RC17 และ 3D7 เมื่อดูการทดลองของรุ่งฟ้า ธัญธนกุล พบว่า วิตามินซีสามารถลดการเจริญของเชื้อได้ โดยความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดลองครั้งนั้นเท่ากับ 1×10^{-4} ไมลาร์ (รุ่งฟ้า ธัญธนกุล, 2550) ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ต่ำกว่าการทดลองในครั้งนี้ แต่เมื่อดูผลที่ความเข้มข้น 1×10^{-4} ไมลาร์ ในการทดลองครั้งนี้พบว่าที่ความเข้มข้น 1×10^{-4} ไมลาร์ เชื้อมาลาเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ยังคงมีการเจริญเติบโตเป็นปกติ นอกจากนี้ยังมีการทดลองที่เติมวิตามินซีลงในอาหารเลี้ยงเชื้อมาลาเรียชนิดอื่น คือ *P. vivax* ไม่มีผลในการยับยั้งเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย *P. vivax* แต่ช่วยทำให้สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย *P. vivax* ในหลอดทดลองได้ยาวนานขึ้น เมื่อมีการปรับปริมาณของซีรัมและเปลี่ยนชนิดของเลือดที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย (Udomsangpetch et al., 2008)

4. น้ำตาล

4.1 กลูโคส

ในอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย มีน้ำตาลกลูโคสเป็นส่วนประกอบอยู่ โดยมีความเข้มข้น 2000 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือเท่ากับ 1.11×10^{-1} โมลาร์ เมื่อเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า เชื้อมาลาเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ในกลุ่มเชื้อระยะเดียวและกลุ่มเชื้อหลายระยะ ไม่พบเชื้อมาลาเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกลูโคส ความเข้มข้นเท่ากับ 5×10^{-1} โมลาร์ การทดลองครั้งนี้ได้ผลสอดคล้องกับการทดลองที่เคยมีการศึกษาของรุ่งฟ้า ธีญธนุกุล ที่แสดงให้เห็นว่าที่ความเข้มข้น 1×10^{-1} โมลาร์ ไม่พบเชื้อมาลาเรียเหลืออยู่ และที่ความเข้มข้นของกลูโคส 1 โมลาร์ ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก ดังนั้นรุ่งฟ้า ธีญธนุกุล จึงได้รายงานว่าการลดการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียเมื่อพิจารณาจากผลการทดลอง (รุ่งฟ้า ธีญธนุกุล, 2550) ระดับความเข้มข้นของกลูโคสปกติในเลือดของมนุษย์นั้นมีความอยู่ระหว่าง 70 ถึง 100 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร หรือระหว่าง 3.9 ถึง 5.6 มิลลิโมลาร์ต่อลิตร (3.9×10^{-3} ถึง 5.5×10^{-3} โมลาร์) (Wisse, 2015) ดังนั้นความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อปกติ มีค่าสูงกว่าความเข้มข้นของกลูโคสปกติในเลือดของมนุษย์ แสดงว่าการใช้กลูโคสอาจไม่สามารถนำมาใช้ในการยับยั้งเชื้อมาลาเรียในผู้ป่วยที่เป็นโรคมาลาเรียได้ แต่ในผู้ป่วยที่เป็นเบาหวานอาจมีความเข้มข้นของน้ำตาลในเลือดสูงกว่านี้ซึ่งอาจมีผลต่อการเจริญของเชื้อมาลาเรียได้

4.2 ซอร์บิทอล

เชื้อมาลาเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซอร์บิทอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ทั้งในกลุ่มเชื้อระยะเดียวและกลุ่มเชื้อหลายระยะ ไม่สามารถสรุปผลได้ชัดเจนว่าซอร์บิทอลมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียได้หรือไม่ เนื่องจากเชื้อเกิดการ overgrowth และไม่สามารถเห็นแนวโน้มการเจริญของเชื้อมาลาเรียในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองได้ชัดเจน ปัจจุบันนิยมใช้สารละลายซอร์บิทอลในการทำให้เชื้ออยู่ในระยะเดียวกันก่อนทดสอบปัจจัยต่าง ๆ โดยการเติมสารละลายซอร์บิทอล ความเข้มข้น 5% เติมนลงในเลือดที่มีเชื้อมาลาเรีย ทั้งไว้ 10 นาที

ซอร์บิทอลจะไปทำลายเชื้อมาลาเรียในระยะ schizont ทำให้เชื้อระยะไมโซวงแหวนถูกทำลายไป ดังนั้น สารละลายซอร์บิทอลที่ความเข้มข้นต่างกัน รวมทั้งระยะเวลาในการใช้ต่างกันทำให้ได้ผลการทดลองที่แตกต่างกัน

5. เกลือ

5.1 โซเดียมคลอไรด์

เชื้อมาลาเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ทั้งในกลุ่มเชื้อระยะเดี่ยวและกลุ่มเชื้อหลายระยะ มีเพียงเชื้อมาลาเรีย K1CB1 เท่านั้นที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ในขณะที่เชื้อ T9/94RC17 และ 3D7 มีการเจริญที่ลดลงเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.20% ซึ่งเมื่อดูค่าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 แล้วพบว่ามีความประมาณ 5.3% นอกจากนี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 ยังมีเกลือชนิดอื่น ๆ อีก เช่น โซเดียมไบคาร์บอเนต โพแทสเซียมคลอไรด์ เป็นต้น ซึ่งปริมาณของเกลือทั้งหมดโดยรวมแล้วมีประมาณ 8.65% (Schuster, 2002) ซึ่งเมื่อรวมปริมาณของโซเดียมคลอไรด์ที่เติมลงไปทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมาลาเรียมีค่าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูงสุดประมาณ 8.85% มีค่าใกล้เคียงกับความเข้มข้นของเลือดในร่างกายมนุษย์

5.2 แคลเซียมคลอไรด์

อาหารเลี้ยงเชื้อผสมแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มีสีเปลี่ยนแปลงไปจากอาหารเลี้ยงเชื้อปกติอย่างเห็นได้ชัด โดยเปลี่ยนเป็นสีเหลืองขุ่น อาจเป็นผลมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเป็นกรดมากขึ้น สีของอาหารเลี้ยงเชื้อจึงเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ส่วนตะกอนที่ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเกิดความขุ่น ไม่สามารถบอกได้ว่ามีสาเหตุมาจากสิ่งใด เนื่องจากในอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 นั้นมีส่วนประกอบหลายชนิด แต่อาจเป็นผลมาจากแคลเซียมที่เติมเข้าไป

เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ในกลุ่มเชื้อระยะเดี่ยวและกลุ่มเชื้อหลายระยะ ลักษณะภายนอกของเลือดมีลักษณะเป็นปกติ แต่เชื้อมาลาเรียสามารถอยู่รอดได้แค่ที่เวลา 24 ชั่วโมงเท่านั้น และมีเพียงเชื้อในระยะไมโซวงแหวนเท่านั้นที่สามารถอยู่รอดได้ โดยมีปริมาณน้อยมาก

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

การเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ K1CB1, T9/94RC17 และ 3D7 ระยะในเซลล์เม็ดเลือดแดง มีระยะเวลาประมาณ 42 – 48 ชั่วโมงต่อ 1 รอบวงชีวิตของเชื้อมาลาเรีย ดังนั้นจึงใช้เวลาอย่างน้อย 72 ชั่วโมงหรือ 1 รอบครึ่งของวงชีวิตเชื้อมาลาเรียในการทดสอบปัจจัยทางกายภาพและเคมี โดยใช้เชื้อมาลาเรียทั้งระยะเดียวกันและหลายระยะมาทดสอบ จากการทดสอบปัจจัยทางกายภาพและเคมีต่อเชื้อมาลาเรีย โดยใช้ระยะเวลาในการติดตามการเจริญเติบโตทุก 24 ชั่วโมง พบว่า

ปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อมาลาเรีย คือ อุณหภูมิที่ 4, 34 และ 40 องศาเซลเซียส ปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ และ ค่าความเป็นกรด – ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนปัจจัยทางเคมีที่แสดงผลต่อการเจริญของเชื้อมาลาเรีย ได้แก่ เพนนิซิลิน ลินโคมายซิน กลูโคส วิตามินซี ความเข้มข้นของซีรัม โซเดียมคลอไรด์ และแคลเซียมคลอไรด์ โดยปัจจัยแต่ละชนิดมีผลต่อการเจริญของเชื้อมาลาเรียแตกต่างกัน และเชื้อมาลาเรียแต่ละสายพันธุ์ก็ตอบสนองต่อปัจจัยเหล่านี้ต่างกัน

การทดสอบที่อุณหภูมิ 4, 34 และ 40 องศาเซลเซียส พบว่าการเจริญของเชื้อมาลาเรียทั้ง 3 สายพันธุ์มีค่าลดลงเมื่อเทียบกับการเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส การเลี้ยงเชื้อมาลาเรียที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตรวจพบเชื้อในระยะวงแหวนเป็นส่วนใหญ่ภายหลังการบ่ม 24 ชั่วโมง ในขณะที่การเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสและการเลี้ยงเชื้อในอากาศปกติที่มีปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ต่ำ ส่งผลให้เชื้อที่เหลืออยู่ส่วนใหญ่เป็นเชื้อในระยะไม่ใช่วงแหวน

ปัจจัยทางกายภาพชนิดเดียวที่มีผลทำให้การเจริญของเชื้อมาลาเรียดีขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด – ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อจาก 7.0 เป็น 7.3 ทำให้ได้ค่า % parasitaemia สูงขึ้น

ปัจจัยทางเคมีที่มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ ลินโคมัยซิน (MIC เท่ากับ 5×10^{-4} โมลาร์) กลูโคส (MIC เท่ากับ 5×10^{-1} โมลาร์) และแคลเซียมคลอไรด์ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ได้ตั้งแต่วันที่เวลา 48 ชั่วโมง ส่วนวิตามินซีนอกจากจะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ K1CB1 แล้ว (MIC เท่ากับ 1×10^{-3} โมลาร์) ยังสามารถลดการเจริญของเชื้อ T9/94RC17 และ 3D7 (ที่ความเข้มข้น 5×10^{-3} โมลาร์) ได้อีกด้วย

ส่วนไซเตียมคลอไรด์สามารถลดการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียเมื่อเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ความเข้มข้น 0.20% เช่นเดียวกับเพนิซิลลิน ซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ T9/94RC17 เท่านั้น (ที่ความเข้มข้น 50000 units) ในขณะที่การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของซีรัมในอาหารเลี้ยงเชื้อจากค่าปกติ (10%) มีผลให้การเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียลดลง

ปัจจัยที่ไม่สามารถรายงานผลได้ ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงสภาวะในการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย ทั้งอุณหภูมิและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ เนื่องจากไม่พบเชื้อมาลาเรียในเวลาสุดท้ายของการทดลอง และการทดสอบผลของซอร์บิทอล ไม่สามารถสรุปได้ว่ามีผลอย่างไรต่อการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียเนื่องจากเชื้อเกิดการ overgrowth และไม่เห็นแนวโน้มของการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย

การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าปัจจัยทางกายภาพและเคมีที่ได้ทดสอบในครั้งนี้มีผลต่อเชื้อมาลาเรียแตกต่างกัน และอาจนำไปใช้ในการพัฒนาเทคนิคเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย หรือแนวทางใหม่ในการทำให้เชื้อมาลาเรียอยู่ในระยะเดียวกัน นอกจากนี้การตอบสนองที่แตกต่างกันของเชื้อมาลาเรียแต่ละสายพันธุ์ชี้ให้เห็นว่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* น่าจะมีส่วนสำคัญต่อการตอบสนองต่อปัจจัยเหล่านี้ และการค้นหาความแตกต่างทางพันธุกรรมเหล่านี้อาจนำไปสู่แนวทางในการพัฒนาวิธีการรักษาหรือค้นคว้าหาเป้าหมายของยาชนิดใหม่ที่สามารถยับยั้งหรือฆ่าเชื้อมาลาเรียต่อไปได้ในอนาคต

ปัญหาที่พบในการระหว่างการทำวิจัย

1. การทำให้เชื้อมาลาเรียทั้ง 3 สายพันธุ์อยู่ในระยะเดียวกัน เนื่องจากในช่วงแรกของการทำวิจัย เกิดปัญหาที่ไม่สามารถทำให้เชื้อมาลาเรียทั้ง 3 สายพันธุ์อยู่ในระยะเดียวกันที่เวลา 48 ชั่วโมงหลังจากการทำให้เชื้ออยู่ในระยะเดียวกัน ซึ่งระยะของเชื้อที่ได้เป็นระยะวงแหวน แต่มีเชื้อ T9/94RC17 มักจะพัฒนาไปเป็นระยะ trophozoite แล้ว จึงต้องทำให้เชื้ออยู่ในระยะเดียวกันใหม่
2. เชื้อเกิดการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย เป็นปัญหาในช่วงแรกที่ได้เริ่มต้นเลี้ยงเชื้อมาลาเรียอย่างต่อเนื่อง ซึ่งเกิดการปนเปื้อนในเชื้อมาลาเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ จึงต้องนำเชื้อมาลาเรียชุดใหม่จากไนโตรเจนเหลวที่เก็บรักษาไว้มาเลี้ยงใหม่
3. ไม่สามารถปรับตู้ควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ที่ 31 องศาเซลเซียสได้ตลอด 72 ชั่วโมง จึงไม่สามารถทำการทดลองที่อุณหภูมินี้ได้ตามที่ได้เขียนในโครงร่างวิทยานิพนธ์
4. ปัญหาของการทำฟิล์มเลือดบาง ซึ่งอาจเป็นผลมาจากสีย้อม Giemsa ด้วย ที่ทำให้เชื้อวงแหวนติดสีจางจนมองไม่เห็น เกิดความผิดพลาดในการนับเชื้อมาลาเรียเพื่อคำนวณค่า % parasitaemia เริ่มต้นก่อนการทดลอง จึงต้องทำการทดลองซ้ำใหม่หลังจากการเตรียมสีย้อม Giemsa ใหม่ หลังจากการเปลี่ยนสีย้อมใหม่ เชื้อมาลาเรียในเซลล์เม็ดเลือดติดสีอย่างชัดเจน ทำให้สามารถนับเชื้อเพื่อคำนวณ ค่า % parasitaemia ได้
5. ในโครงร่างวิทยานิพนธ์ เลือกใช้ยาคลอแรมฟินิโคลและเมอโรฟิเนียม เป็นตัวแทนของสารเคมีในกลุ่มยาปฏิชีวนะ แต่เกิดปัญหาในการละลายสาร เนื่องจากคลอแรมฟินิโคลต้องการความเข้มข้น 1×10^{-3} , 5×10^{-3} , 1×10^{-2} , 1.5×10^{-2} , 2.0×10^{-2} , 2.5×10^{-2} และ 3×10^{-2} โมลาร์ เมื่อใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย ไม่สามารถให้ความเข้มข้นที่ต้องการได้ เมื่อเปลี่ยนตัวทำละลายเป็น DMSO สามารถละลายได้ดี แต่เมื่อนำสารละลายของคลอแรมฟินิโคลใน DMSO มาเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่ามีตะกอนเกิดขึ้น จึงเปลี่ยนตัวทำละลายเป็นเอทานอลแต่ต้องใช้เอทานอลในปริมาณมาก ซึ่งเอทานอลอาจจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียด้วย ดังนั้นจึงเปลี่ยนเป็นยาปฏิชีวนะชนิดอื่นแทน ส่วนเมอโรฟิเนียม ต้องการที่ความเข้มข้น 5×10^{-2} , 1×10^{-1} , 1.5×10^{-1} , 2×10^{-1} , 2.5×10^{-1} โมลาร์ โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลายแต่ต้องใช้ยาในปริมาณมากซึ่ง

ยามีราคาสูง ดังนั้นจึงเปลี่ยนเป็นเพนิซิลลินและลินโคมัยซินมาใช้ในการทดลองแทน โดยยาปฏิชีวนะทั้ง 2 ชนิดนี้สามารถใช้น้ำเป็นตัวทำละลายได้

6. ในการทดสอบปัจจัยหลายครั้ง ผู้วิจัยไม่สามารถทำให้เชื้อมีค่า % parasitaemia เริ่มต้นประมาณ 0.3% ได้ เนื่องจากผู้วิจัยไม่ได้ตรวจนับ % parasitaemia เริ่มต้นหลังจากการใส่เลือดที่ไม่มีเชื้อลงไปก่อนทำการทดลอง และได้ทำการทดลองจนเสร็จสมบูรณ์ก่อนนับค่า % parasitaemia แล้วจึงรู้ว่าค่า % parasitaemia สูงเกินไป ทำให้เชื้อเกิดการ overgrowth และไม่สามารถทำการทดลองใหม่ได้เนื่องจากไม่มีเวลาในการนับจำนวนของเชื้อ ปัจจัยที่เชื้อมาลาเรียเกิดการ overgrowth คือ เพนิซิลลิน ซีรัมของมนุษย์ วิตามินซีและซอร์บิทอล



ข้อเสนอแนะ

1. การทดสอบที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง เชื้อมาลาเรียเกิดการคัดเลือกเชื้อที่เหลือเป็นระยะวงแหวน ส่วนการทดสอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส รวมทั้งการทดสอบแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์โดยการทำไม่จุดเทียนในโถดูความขึ้นที่ใช้เลี้ยงเชื้อมาลาเรีย เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เกิดการคัดเลือกเชื้อระยะไม่ใช่วงแหวนที่สามารถอยู่รอดได้ จากผลการทดลองนี้ สามารถพัฒนามาใช้เป็นวิธีการทำให้เชื้ออยู่ในระยะเดียวกันได้ แต่อาจจะต้องมีการทดลองเพิ่มเติม

2. การใส่ซีรัมในอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงแค่ 4.8% ยังสามารถทำให้เชื้อมาลาเรียเจริญเติบโตได้ น่าจะนำวิธีนี้มาทดลองเลี้ยงเชื้อมาลาเรียทั้ง 3 สายพันธุ์นี้ หรือสายพันธุ์อื่น ๆ อย่างต่อเนื่อง ดูผลว่าเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้เป็นปกติหรือไม่ เพื่อเป็นการประหยัดค่าใช้จ่ายในการทดลอง

3. สารเคมีที่สามารถลดหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียทั้ง 3 สายพันธุ์นี้ได้ เช่น ลินโคมายซิน (MIC เท่ากับ 5×10^{-4} ไมลาร์) วิตามินซี (MIC เท่ากับ 1×10^{-3} ไมลาร์) อาจสามารถนำไปพัฒนาเป็นยารักษาโรคมาลาเรียต่อไปได้เนื่องจากเป็นสารเคมีที่สามารถหาได้และปลอดภัยพอในการนำไปใช้

4. ผลการทดลองทั้งหมดสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการปรับปรุงการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียให้ดีขึ้นหรือเป็นแนวทางในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น รวมถึงการคัดเลือกระยะของเชื้อมาลาเรียเพื่องานวิจัยต่อไปในอนาคต

5. ค่า % parasitaemia เริ่มต้นในการทดสอบปัจจัยควรมีค่าต่ำกว่า 0.3% เนื่องจากในการทดลองครั้งนี้มีการทดลองบางปัจจัยที่เชื้อมีค่ามากกว่าหรือประมาณ 0.3% เมื่อเลี้ยงไปจนถึงเวลา 72 ชั่วโมง ปัจจัยที่ทดสอบไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย เชื้อจึงเกิดการ overgrowth ทำให้ไม่สรุปผลการทดลองได้

6. เลือดที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย ควรมีอายุไม่เกิน 2 เดือน

รายการอ้างอิง

- รุ่งฟ้า ธัญธนกุล. 2550. การเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม (*Plasmodium falciparum*) และการทดสอบความไวต่อสารเคมีบางชนิด. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ วิทยาศาสตร์บัณฑิต. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ศรีวิศา ครุฑสูตร, พลรัตน์ วิไลรัตน์ และ ศรชัย หล่ออารีย์สุวรรณ. 2549. การรักษาโรคมาลาเรียในผู้ใหญ่. ใน สมชาย จงวุฒิเวศย์ และ อุษา ทิสยากร (บรรณาธิการ), มาลาเรีย, หน้า 345. กรุงเทพมหานคร: ธนาเพรส.
- สดศรี ไทยทอง. 2549. การเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียเพื่อนำวิจัย. ใน สมชาย จงวุฒิเวศย์ และ อุษา ทิสยากร (บรรณาธิการ), มาลาเรีย, หน้า 463-482. กรุงเทพมหานคร: ธนาเพรส.
- สมชาย จงวุฒิเวศย์ และ จตุรงค์ พุทธิพรพิพย์. 2549. ชีววิทยาและวงชีวิตของเชื้อมาลาเรีย. ใน สมชาย จงวุฒิเวศย์ และ อุษา ทิสยากร (บรรณาธิการ), มาลาเรีย, หน้า 39. กรุงเทพมหานคร: ธนาเพรส.
- สมชาย จงวุฒิเวศย์. 2549. การวินิจฉัยโรคมาลาเรียทางห้องปฏิบัติการ. ใน สมชาย จงวุฒิเวศย์ และ อุษา ทิสยากร (บรรณาธิการ), มาลาเรีย, หน้า 282-287. กรุงเทพมหานคร: ธนาเพรส.
- Ademowo, O.G., Nneji, C.M., and Adedapo, A.D.A. 2007. *In vitro* antimalarial activity of methylene blue against field isolates of *Plasmodium falciparum* from children in Southwest Nigeria. Indian Journal of Medical Research 126: 45-49.
- Adjuik, M., et al. 2002. Amodiaquine-artesunate versus amodiaquine for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in African children: A randomised, multicentre trial. Lancet 359: 1365-1372.
- Ahn, S.-Y., et al. 2008. Magnetic separation: A highly effective method for synchronization of cultured erythrocytic *Plasmodium falciparum*. Parasitology Research 102: 1195-1200.

- Bass, C.C., and Johns, F.M. 1912. The cultivation of malarial plasmodia (*Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*) *in vitro*. Journal of Experimental Medicine 16: 567-579.
- CDC. 2016. Biology of Malaria. [Online]. Available from: <https://www.cdc.gov/Malaria/about/biology/index.html> [March 1, 2016]
- Chevli, R., and Fitch, C.D. 1982. The antimalarial drug mefloquine binds to membrane phospholipids. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 21: 581-586.
- Cheychoma, J., Kanchanakhan, N., Vijaykadga, S., Gaywee, J., and Harnyuttanakorn, P. 2015. Cytochrome b mutation and atovaquone susceptibility in *Plasmodium falciparum* isolates from the Thai-Cambodian border during 1990–2010. ScienceAsia 41: 340-344.
- Coatney, G.R., Collins, W.E., Warren, M., and Contacos, P.G. 1971. The Primate Malaria. [Online]. Available from: https://www.cdc.gov/dpdx/resources/pdf/benchAids/malaria/Malaria_Comparison_p3-6.pdf
- Coatney, G.R., and Greenberg, J. 1952. The use of antibiotics in the treatment of malaria. Annals of the New York Academy of Sciences 55: 1075-1081.
- Dahl, E.L., Shock, J.L., Shenai, B.R., Gut, J., DeRisi, J.L., and Rosenthal, P.J. 2006. Tetracyclines specifically target the apicoplast of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 50: 3124-3131.
- Divo, A.A., and Jensen, J.B. 1982. Studies on serum requirements for the cultivation of *Plasmodium falciparum*: 1. Animal sera. Bulletin of the World Health Organization 60: 565-569.
- Doberstyn, E.B., Phintuyothin, P., Noeypatimanondh, S., and Teerakiartkamjorn, C. 1979. Single-dose therapy of falciparum malaria with mefloquine or pyrimethamine—sulfadoxine. Bulletin of the World Health Organization 57: 275-279.

- Dondorp, A., Nosten, F., Stepniewska, K., Day, N., and White, N. 2005. Artesunate versus quinine for treatment of severe falciparum malaria: A randomised trial. Lancet 366: 717-725.
- Dondorp, A.M., et al. 2010. Artesunate versus quinine in the treatment of severe falciparum malaria in African children (AQUAMAT): An open-label, randomised trial. Lancet 376: 1647-1657.
- Fleming, A. 1999. The discovery and development of penicillin 1928-1945. [Online]. Available from: <https://www.acs.org/content/acs/en/education/whatischemistry/landmarks/flemingpenicillin.html>
- Flores, M.V.C., Berger-Eiszele, S.M., and Stewart, T.S. 1997. Long-term cultivation of *Plasmodium falciparum* in media with commercial non-serum supplements. Parasitology Research 83: 734-736.
- Gardner, M.J., et al. 2002. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Nature 419: 498-511.
- Geary, T.G., and Jensen, J.B. 1983. Effects of antibiotics on *Plasmodium falciparum* *in vitro*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 32: 221-225.
- Heidrich, H.-G., Mrema, J.E., Vander Jagt, D.L., Reyes, P., and Rieckmann, K.H. 1982. Isolation of intracellular parasites (*Plasmodium falciparum*) from culture using free-flow electrophoresis: separation of the free parasites according to stages. Journal of Parasitology 68: 443-450.
- Hien, T.T., and White, N.J. 1993. Qinghaosu. Lancet 341: 603-608.
- Hindle, J.A., Rose, A.S., Trevett, L.D., and Prout, C. 1945. The effect of penicillin on inoculation malaria: A negative report. New England Journal of Medicine 232: 133-136.
- Hui, G.S.N., Palmer, K.L., and Siddiqui, W.A. 1983. Synchronization of *Plasmodium falciparum* in continuous *in vitro* culture: Use of colchicine. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 32: 1451-1453.

- Hui, G.S.N., Palmer, K.L., and Siddiqui, W.A. 1984. Use of human plasma for continuous *in vitro* cultivation of *Plasmodium falciparum*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 78: 625-626.
- Ifediba, T., and Vanderberg, J.P. 1980. Peptones and calf serum as a replacement for human serum in the cultivation of *Plasmodium falciparum*. Journal of Parasitology 66: 236-239.
- Inselburg, J., and Banyal, H.S. 1984. *Plasmodium falciparum*: Synchronization of asexual development with aphidicolin, a DNA synthesis inhibitor. Experimental Parasitology 57: 48-54.
- Jensen, J.B. 1978. Concentration from continuous culture of erythrocytes infected with trophozoites and schizonts of *Plasmodium falciparum*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 27: 1274-1276.
- Jensen, J.B., and Trager, W. 1977. *Plasmodium falciparum* in culture: Use of outdated erythrocytes and description of the candle jar method. Journal of Parasitology 63: 883-886.
- Jensen, J.B., Trager, W., and Doherty, J. 1979. *Plasmodium falciparum*: Continuous cultivation in a semiautomated apparatus. Experimental Parasitology 48: 36-41.
- Jensen, M.D., Conley, M., and Helstowski, L.D. 1983. Culture of *Plasmodium falciparum*: The role of pH, glucose, and lactate. Journal of Parasitology 69: 1060-1067.
- Kellum, J.A. 2000. Determinants of blood pH in health and disease. Critical Care 4: 6-14.
- Knell, A.J. 1991. Malaria. New York: Wellcome Tropical Institute.
- Krishna, S., Uhlemann, A.-C., and Haynes, R.K. 2004. Artemisinins: Mechanisms of action and potential for resistance. Drug Resistance Updates 7: 233-244.
- Kutner, S., Breuer, W.V., Ginsburg, H., Aley, S.B., and Cabantchik, Z.I. 1985. Characterization of permeation pathways in the plasma membrane of human erythrocytes infected with early stages of *Plasmodium falciparum*: Association with parasite development. Journal of Cellular Physiology 125: 521-527.
- Kwiatkowski, D. 1989. Febrile temperatures can synchronize the growth of *Plasmodium falciparum in vitro*. Journal of Experimental Medicine 169: 357-361.

- Lambros, C., and Vanderberg, J.P. 1979. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. Journal of Parasitology 65: 418-420.
- Lelievre, J., Berry, A., and Benoit-Vical, F. 2005. An alternative method for *Plasmodium* culture synchronization. Experimental Parasitology 109: 195-197.
- Lell, B., and Kremsner, P.G. 2002. Clindamycin as an antimalarial drug: Review of clinical trials. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 46: 2315-2320.
- Lin, C.S., et al. 2016. Multiple *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 complexes mediate merozoite binding to human erythrocytes. Journal of Biological Chemistry 291: 7703-7715.
- Lingnau, A., Margos, G., Maier, W.A., and Seitz, H.M. 1993. Serum-free cultivation of *Plasmodium falciparum* gametocytes *in vitro*. Parasitology Research 79: 378-384.
- Long, H.Y., Lell, B., Dietz, K., and Kremsner, P.G. 2001. *Plasmodium falciparum*: *In vitro* growth inhibition by febrile temperatures. Parasitology Research 87: 553-555.
- Miller, L.H., Roberts, T., Shahabuddin, M., and McCutchan, T.F. 1993. Analysis of sequence diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP-1). Molecular and Biochemical Parasitology 59: 1-14.
- Mordmüller, B., Graninger, W., and Kremsner, P.G. 1998. Malaria therapy in the era of chloroquine resistance. Wiener Klinische Wochenschrift 110: 321-325.
- Moreno, R., et al. 2001. Rhoptry-associated protein 1-binding monoclonal antibody raised against a heterologous peptide sequence inhibits *Plasmodium falciparum* growth *in vitro*. Infection and Immunity 69: 2558-2568.
- Na-Bangchang, K., and Congpuong, K. 2007. Current malaria status and distribution of drug resistance in East and Southeast Asia with special focus to Thailand. Tohoku Journal of Experimental Medicine 211: 99-113.
- Nillni, E.A., Londner, M.V., and Spira, D.T. 1981. A simple method for separation of uninfected erythrocytes from those infected with *Plasmodium berghei* and for isolation of artificially released parasites. Parasitology Research 64: 279-284.

- Nosten, F., et al. 1991. Mefloquine-resistant falciparum malaria on the Thai-Burmese border. Lancet 337: 1140-1143.
- Nosten, F., et al. 2000. Effects of artesunate-mefloquine combination on incidence of *Plasmodium falciparum* malaria and mefloquine resistance in western Thailand: a prospective study. Lancet 356: 297-302.
- Odongo-Aginya, E., Ssegwanyi, G., Kategere, P., and Vuzi, P.C. 2005. Relationship between malaria infection intensity and rainfall pattern in Entebbe peninsula, Uganda. African Health Sciences 5: 238-245.
- Ono, T., and Nakabayashi, T. 1990. Gametocytogenesis induction by ammonium compounds in cultured *Plasmodium falciparum*. International Journal for Parasitology 20: 615-618.
- Ono, T., Ohnishi, Y., Nagamune, K., and Kano, M. 1993. Gametocytogenesis induction by berenil in cultured *Plasmodium falciparum*. Experimental Parasitology 77: 74-78.
- Paul, F., Roath, S., Melville, D., Warhurst, D.C., and Osisanya, J.O.S. 1981. Separation of malaria-infected erythrocytes from whole blood: Use of a selective high-gradient magnetic separation technique. Lancet 318: 70-71.
- Pradines, B., et al. 2001. *In vitro* activities of antibiotics against *Plasmodium falciparum* are inhibited by iron. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 45: 1746-1750.
- Pradines, B., et al. 2000. Antibiotics for prophylaxis of *Plasmodium falciparum* infections: *In vitro* activity of doxycycline against senegalese isolates. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 62: 82-85.
- Radfar, A., et al. 2009. Synchronous culture of *Plasmodium falciparum* at high parasitemia levels. Nature Protocols 4: 1899-1915.
- Rieckmann, K.H., et al. 1971. Effects of tetracycline against chloroquine-resistant and chloroquine-sensitive *Plasmodium falciparum*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 20: 811-815.

- Rivadeneira, E.M., Wasserman, M., and Espinal, C.T. 1983. Separation and concentration of schizonts of *Plasmodium falciparum* by Percoll gradients. Journal of Protozoology 30: 367-370.
- Roberts, L.S., and John Janovy, J. 2000. Foundations of parasitology 6th eds. Singapore: McGraw-Hill Higher Education.
- Rojas, M.O., and Wasserman, M. 1993. Effect of low temperature on the *in vitro* growth of *Plasmodium falciparum*. Journal of Eukaryotic Microbiology 40: 149-152.
- Rojas, M.O.O., and Wasserman, M. 1993. Effect of low temperature on the *in vitro* growth of *Plasmodium falciparum*. Journal of Eukaryotic Microbiology 40: 149-152.
- Rovira-Graells, N., Aguilera-Simón, S., Tintó-Font, E., and Cortés, A. 2016. New assays to characterise growth-related phenotypes of *Plasmodium falciparum* reveal variation in density-dependent growth inhibition between parasite lines. Plos One 11: e0165358.
- Rowe, J.A., Scragg, I.G., Kwiatkowski, D., Ferguson, D.J.P., Carucci, D.J., and Newbold, C.I. 1998. Implications of mycoplasma contamination in *Plasmodium falciparum* cultures and methods for its detection and eradication. Molecular and Biochemical Parasitology 92: 177-180.
- Saifi, M.A., Beg, T., Harrath, A.H., Altayalan, F.S.H., and Quraishy, S.A. 2013. Antimalarial drugs: Mode of action and status of resistance. African Journal of Pharmacy and Pharmacology 7: 148-156.
- Saliba, K.S., and Jacobs-Lorena, M. 2013. Production of *Plasmodium falciparum* gametocytes *in vitro*. Malaria: Methods and Protocols 923: 17-25.
- Sax, L.J., and Rieckmann, K.H. 1980. Use of rabbit serum in the cultivation of *Plasmodium falciparum*. Journal of Parasitology 66: 621-624.
- Scheibel, L.W., Ashton, S.H., and Trager, W. 1979. *Plasmodium falciparum*: Microaerophilic requirements in human red blood cells. Experimental Parasitology 47: 410-418.

- Schuster, F.L. 2002. Cultivation of *Plasmodium* spp. Clinical Microbiology Reviews 15: 355-364.
- Shanks, G.D. 2010. For severe malaria, artesunate is the answer. Lancet 376: 1621-1622.
- Silver, L.L., and Bostian, K.A. 1993. Discovery and development of new antibiotics: The problem of antibiotic resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 37: 377-383.
- Siripoon, N., Harnyuttanakorn, P., Pattaradilokrat, S., and Pumpaibool, T. 2015. Growth and drug susceptibility of artificially mixed-clones of *Plasmodium falciparum* during *in vitro* cultivation. Journal of Health Research 29: 189-196.
- Slater, A.F.G. 1993. Chloroquine: Mechanism of drug action and resistance in *Plasmodium falciparum*. Pharmacology & Therapeutics 57: 203-235.
- Spížek, J., and Rezanka, T. 2004. Lincomycin, clindamycin and their applications. Applied Microbiology and Biotechnology 64: 455-464.
- Spížek, J., and Rezanka, T. 2004. Lincomycin, cultivation of producing strains and biosynthesis. Applied Microbiology and Biotechnology 63: 510-519.
- Thaithong, S., et al. 2001. *Plasmodium falciparum*: Gene mutations and amplification of dihydrofolate reductase genes in parasites grown *in vitro* in presence of pyrimethamine. Experimental Parasitology 98: 59-70.
- Thriemer, K., Wernsdorfer, G., Rojanawatsirivet, C., Kollaritsch, H., Sirichainsinthop, J., and Wernsdorfer, W.H. 2005. *In vitro* activity of artemisinin alone and in combination with retinol against *Plasmodium falciparum*. Wiener Klinische Wochenschrift 117: 45-48.
- Trager, W., and Jensen, J.B. 1976. Human malaria parasites in continuous culture. Science 193: 673-675.
- Trager, W., and Jensen, J.B. 1977. Cultivation of erythrocytic stages. Bulletin of the World Health Organization 55: 363-365.
- Trager, W., and Jensen, J.B. 1997. Continuous culture of *Plasmodium falciparum*: Its impact on malaria research. International Journal for Parasitology 27: 989-1006.

- Trigg, P.I. 1985. Recent advances in malaria parasite cultivation and their application to studies on host-parasite relationships: A review. Bulletin of the World Health Organization 63: 387-398.
- Udomsangpetch, R., Kaneko, O., Chotivanich, K., and Sattabongkot, J. 2008. Cultivation of *Plasmodium vivax*. Trends in Parasitology 24: 85-88.
- Warhurst, D. 1986. Antimalarial drugs: mode of action and resistance. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 18: 51-59.
- Wernsdorfer, W.H., and Payne, D. 1991. The dynamics of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. Pharmacology & Therapeutics 50: 95-121.
- White, N.J. 1992. Antimalarial drug resistance: The pace quickens. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 30: 571-585.
- WHO. 2014. Malaria and Some Polymaviruses (SV40, BK, JC, and Merkel Cell viruses). Geneva: World Health Organization.
- WHO. 2015. Guidelines for the treatment of malaria. 3rd eds. Geneva: World Health Organization.
- WHO. 2016. World Malaria Report 2016. Geneva: World Health Organization.
- WHO. 2017a. Malaria. [Online]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/> [April 2017]
- WHO. 2017b. Thailand. [Online]. Available from: http://www.who.int/malaria/publications/country-profiles/profile_tha_en.pdf?ua=1
- Wiesner, J., Ortmann, R., Jomaa, H., and Schlitzer, M. 2003. New antimalarial drugs. Angewandte Chemie International Edition 42: 5274-5293.
- Wisse, B. 2015. Blood sugar test - blood. [Online]. Available from: <https://medlineplus.gov/ency/article/003482.htm> [2016]
- Wongsrichanalai, C., et al. 1992. Emergence of multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* in Thailand: *In vitro* tracking. American journal of tropical medicine and hygiene 47: 112-116.
- Woodrow, C.J., Planche, T., and Krishna, S. 2006. Artesunate versus quinine for severe falciparum malaria. Lancet 367: 110-111.

Young, M.D., and Moore, D.V. 1961. Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*.

American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 10: 317-320.

Yuan, L., et al. 2014. Refrigeration provides a simple means to synchronize *in vitro*

cultures of *Plasmodium falciparum*. Experimental Parasitology 140: 18-23.





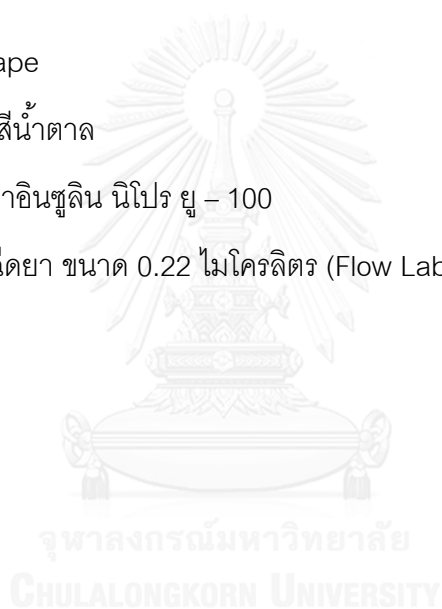
วัสดุอุปกรณ์

1. ตู้กรองอากาศ (Horizontal laminar air flow, EN 12469 standard (Microtech)
2. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (SHEL LAB Digital Laboratory Incubator, RI28 – 2)
3. ตู้อบฆ่าเชื้อด้วยความร้อนสูง
4. หม้อนึ่งอัตโนมัติ (Automatic Autoclave LS – 2D)
5. อ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ
6. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Kokusan, H – 103N Series)
7. เครื่องปั่นแยกสารแบบควบคุมอุณหภูมิ (Sorvall, RT6000B)
8. เครื่องขังสาร
9. เครื่องปั่นสุญญากาศและสายยาง (Rocker 300)
10. กล้องจุลทรรศน์ (Olympus CHA PHASE Microscope)
11. เครื่องนับเม็ดเลือด
12. ชุดเครื่องกรองมิลลิพอร์ ประกอบด้วย
 - ขวดแก้วทรงกรวยมีแขนด้านข้างขนาด 1 ลิตร (Millipore)
 - เครื่องกรองมิลลิพอร์ (Millipore)
 - แผ่นกรอง (Millipore filter Cat.no.GSWP/ 047/ so (100/PK) 0.22 μ / white/ Plain 47 mm Sterilized)
13. โถดูดความชื้นแก้ว (ขนาด 210 MM)
14. โกร่งบดสาร
15. เครื่องดูดจ่ายสารละลาย (BIOHIT MidiPlus)
16. ไมโครปิเปตต์ (ขนาด 10, 100, 10 – 100 และ 200 – 1000 ไมโครลิตร)
17. ปิเปตต์แบบใช้ดวง (ขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร)
18. ปิเปตต์แบบปริมาตร (ขนาด 100 มิลลิลิตร)
19. ไมโครปิเปตต์ทีป (ขนาด 0.5 – 10, 1 – 200 และ 200 – 1000 ไมโครลิตร)
20. พาสเจอร์ปิเปตต์

21. หลอดแช่แข็งจุกเกลียว (Cryotube – vials size 1ml Cat.no.3 66656 NUNCLON® 50/ bag 500/ case)
22. กล่องใส่หลอดแช่แข็งจุกเกลียว
23. ตะแกรงใส่หลอดทดลอง
24. กล่องใส่ไมโครปิเปตต์ทิป
25. ขวดดูแรน (ขนาด 500 และ 1000 มิลลิลิตร)
26. ปีกเกอร์ (ขนาด 100, 250 และ 600 มิลลิลิตร)
27. หลอดทดลองฝาเกลียว (ขนาด 10 มิลลิลิตร)
28. ขวดแก้วที่ปราศจากเชื้อ (ขนาด 100 มิลลิลิตร)
29. กระบอกตวง (ขนาด 10, 25, 50 และ 1000 มิลลิลิตร)
30. กระจกสไลด์ (Cat.no. 7105 clear glass ground edges 72 pcs. (25.4 x 76.2mm = 1" x 3") 1 – 1.2mm Thick)
31. ซ้อนดักสาร
32. จานเพาะเลี้ยงขนาดใหญ่ (Large culture dish size 60 x 15 mm Cat. no.1 50288 NUNCLON® 10/ bag 400/ case)
33. ถาดแบบ 96 หลุม (TC micro – well 96F Cat. no. 167008 NUNCLON® 1/ bag 50/ case)
34. หลอดเซ็นทรัลฟิวซ์พลาสติกชนิดขุนขนาด 50 มิลลิลิตร (Bioline)
35. ลูกยางดูดปิเปตต์
36. พาราฟิล์ม
37. ตะเกียงแอลกอฮอล์
38. สำลีก้อน
39. สำลีม้วน
40. กระจุกใส่สำลีชุบแอลกอฮอล์ 70%
41. กระดาษฟอยล์

42. เทียนไข
43. ไม้ขีดไฟ
44. ถุงมือสำหรับการตรวจวินิจฉัยทางการแพทย์
45. กระบอกฉีดน้ำ
46. เทปกระดาษกาวย่น
47. ปากกาเคมี
48. กระดาษทิชชู
49. กระดาษเช็ดเลนส์
50. Immersion oil (MERCK, Germany)
51. Vacuum grease (Ajax Finechem, Australia & New Zealand)
52. เลือด (ธนาคารเลือด โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์)
53. ซีรัม (ธนาคารเลือด โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์)
54. อาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 สูตรผงที่มีกลูตามีนและไม่มีโซเดียมไบคาร์บอเนต (RPMI 1640 medium with glutamine/ without sodium bicarbonate (2F – 068A) GIBCO™ Invitrogen Corporation, USA)
55. HEPES buffer (SIGMA – ALDRICH, USA)
56. เจนตามัยซิน (T.P. DRUG Laboratories, Thailand)
57. โซเดียมไบคาร์บอเนต (MERCK, Germany)
58. กลีเซอรอล (MERCK, Germany)
59. เมทานอล (Avantor Performance Materials, United States)
60. เอทานอล (Liquor Distillery Organization Excise Department, Thailand)
61. ดินโคมัยซิน (T.P. DRUG LABORATORIES (1969), Thailand)
62. เบนซิลลิน (Bio Basic, Canada)
63. วิตามินซี (Bio Basic, Canada)
64. กลูโคส (Ajax Finechem, Australia & New Zealand)
65. ซอร์บิทอล (FLUKA, Switzerland)

66. โซเดียมคลอไรด์ (BDH Laboratory, England)
67. แคลเซียมคลอไรด์ (BHD Laboratory, England)
68. สีย้อม Giemsa's azur – eosin – methylene blue (MERCK, Germany)
69. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (United Chemicals, USA)
70. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (United Chemicals, USA)
71. 7x® cleaning solution (MP Biomedicals, France)
72. น้ำกลั่นผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ
73. น้ำกรอง
74. Autoclave tape
75. ซองกระดาษสีน้ำตาล
76. กระบอกล้างยาอินซูลิน นิโปร ยู – 100
77. ตัวกรองเซมิซิดยา ขนาด 0.22 ไมครอน (Flow Laboratory, West Germany)



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว กนกวรรณ อรุณฤกษ์ดีวงศ์ เกิดเมื่อวันที่ 25 พฤศจิกายน พ.ศ. 2534 ที่กรุงเทพมหานคร จบการศึกษาระดับมัธยมศึกษาที่โรงเรียนเบญจมราชาลัย ในพระบรมราชูปถัมภ์ ปีการศึกษา 2551 และจบการศึกษาระดับปริญญาตรีที่ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2555 และเข้าศึกษาต่อระดับปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาสัตววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2556 งานวิจัยที่ได้ศึกษา คือ งานทางด้านการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย โดยได้ทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการวิจัยมาลาเรีย ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยได้รับทุนอุดหนุนวิจัย คือ ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช และได้ตีพิมพ์งานวิจัย หัวข้อ Effect of temperatures on the parasitaemia of Plasmodium falciparum in vitro ลงใน Journal of Health Research (vol. 31 Supplement 1, year 2017)