บทที่ 5

บทสรุปและวิจารณ์

เมื่อสปอโรซอยต์ของ พลาสโมเดียม ชาบอดี เข้าสู่สัตว์เจ้าเรือนคือ หนูไมซ์ จะฟักตัวและเพิ่มจำนวนแบบไม่มีเพศในเซลล์พาเรนไคมาของตับ หลังจากนั้นจะปล่อยเมอโรซอยต์เข้าสู่เม็ดเลือดแดง (เฉพาะเซลล์ "erythrocyte") เริ่มต้นวัฏจักรของการเจริญจากระยะวงแหวนจนครบ 1 วงชีพ ใช้เวลา 24 ชั่วโมง ทำให้ได้ชิโซซอยต์ ซึ่งส่วนหนึ่งอาจบุกรุกเข้าสู่เม็ดเลือดแดงเซลล์ใหม่ อีกส่วนหนึ่งเปลี่ยนแปลงเป็นแกมีโตไซต์เพื่อความพร้อมในการเจริญแบบมีเพศ และบางส่วนอาจเวียนกลับเข้าสู่เซลล์พาเรนไคมาอีก ในการวิจัยได้ทดลองเพาะเลี้ยงและติดตามการเจริญของเชื้อ พลาสโมเดียม ชาบอดี AS ในหนูไมซ์ซึ่งเลี้ยงด้วยอาหารปกติและให้กินน้ำซึ่งมี 0.01 เปอร์เซ็นต์กรดพาราอะมิโนเบนโซอิค ปรากฏว่า (รูปที่ 6) ภายหลังการติดเชื้อ 24 ชั่วโมงจะตรวจพบเชื้อพลาสโมเดียมในเม็ดเลือดแดงต่ำมากหรือบางครั้งอาจไม่สามารถตรวจพบเชื้อพลาสโมเดียมในกระแสเลือดเลยถึงแม้จะฉีดพาราไซต์ให้ถึง 10^8 เซลล์ก็ตาม เชื่อว่าอาจเป็นช่วงเวลาที่พลาสโมเดียมฟักตัวในเซลล์พาเรนไคมา หลังจากนั้นจึงเริ่มเข้าสู่กระแสเลือดและเพิ่มจำนวนเป็นลัดส่วนกับเวลาจนกระทั่งวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อ เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อจะขึ้นได้สูงถึง 45-60 เปอร์เซ็นต์ และถ้าเลี้ยงหนูถึงวันที่ 6 แล้ว หนูบางส่วน (บางครั้งถึงครึ่งหนึ่งของหนูทั้งหมด) จะตายเนื่องจากไม่สามารถทนสภาวะการเจ็บป่วยได้ ดังนั้น เพื่อป้องกันการสูญเสียเลือดตัวอย่างจึงฆ่าหนูเพื่อเก็บเกี่ยวเลือดติดเชื้อนำไปทำการทดลองเมื่อเลี้ยงเชื้อครบ 5 วัน ผลการทดลองที่รายงานนี้ต่างกับที่ Kreier (1977) รายงานว่าเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อในหนูไมซ์ซึ่งทำให้ติดเชื้อ พลาสโมเดียม ชาบอดี จะมีค่าสูงถึง 60-100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเลี้ยงเชื้อประมาณ 6-8 วัน และเมื่อพ้นระยะนี้แล้วหนูติดเชื้อบางตัวที่สามารถทนสภาวะการเจ็บป่วยจะกลับมีชีวิตรอดต่อไปได้ เมื่อทำการทดลองเช่นเดียวกันพบว่า นอกจากหนูส่วนใหญ่จะตายแล้ว จำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อที่แยกได้จากหนูที่มีชีวิตรอดจะลดน้อยลง ถึงแม้บางครั้งได้เซลล์ที่มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อสูงเพิ่มถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ยิ่งไปกว่านั้นยังพบว่าการสูญเสียเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อใน

ขั้นตอนการผ่านคอลัมน์ของเซลลูโลส์ CF-11 เพื่อกำจัดเม็ดเลือดขาวจะเพิ่มมากขึ้น เมื่อเลือดติดเชื้อมีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อสูง

ความรุนแรงในการทำให้เกิดโรคของพลาส์โมเดียมแก่สัตว์เจ้าเรือนขึ้นกับปัจจัยหลายชนิด ได้แก่ คุณสมบัติทางสรีรวิทยาของสัตว์ทดลองและของพลาส์โมเดียม (ชนิดหรือสายพันธุ์) Peters (1968) ทดลองเปรียบเทียบความรุนแรงของ พลาส์โมเดียม เบอเจอาย สายพันธุ์ที่ไวต่อคลอโรควินต่างกัน โดยติดตามจากอัตราการเจริญของเชื้อ พบว่า อัตราการเจริญจะลดลงเมื่อเชื้อต้านยา ผลจากการทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อ พลาส์โมเดียม ฆ่าบอดี AS(Pr_1) ซึ่งไวต่อไพริเมธามีนน้อยกว่าเชื้อโคลน AS (ตามผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อไพริเมธามีนในรูปที่ 8 และ 9) พบว่าอัตราการเจริญของ พลาส์โมเดียม ฆ่าบอดี AS(Pr_1) ซึ่งดูได้จากการเพิ่มของเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อไม่ต่างจากอัตราการเจริญของเชื้อโคลน AS

นอกจากปัจจัยดังกล่าวข้างต้นแล้ว สภาวะการเลี้ยงดูสัตว์ทดลองหลังการติดเชื้อก็มีผลต่อความรุนแรงของโรค ตัวอย่างเช่น สารอาหารซึ่งสารที่พบว่าจำเป็นสำหรับการเจริญของพลาส์โมเดียมในเซลล์เจ้าเรือน คือ กรดพาราอะมิโนเบนโซอิค โดยแม้ว่าสัตว์เจ้าเรือนจะติดเชื้อพลาส์โมเดียมจำนวนน้อย แต่ถ้าได้รับกรดพาราอะมิโนเบนโซอิคมาก ก็จะทำให้โรคมีอาการรุนแรงขึ้นได้ (Peters, 1968) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ พลาส์โมเดียม ฆ่าบอดี ในหนูไมซ์ ลังเกตพบว่า ในช่วงเวลาที่อากาศร้อนจำนวนเม็ดเลือดแดงติดเชื้อจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเป็นเหตุให้หนูติดเชื้อตายก่อนวันเก็บเกี่ยวเลือดเพื่อทำการทดลอง เพื่อแก้ปัญหานี้จำเป็นต้องลดปริมาณเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อที่ฉีดให้กับหนูจากปริมาณปกติตัวละ 10^8 เซลล์ เหลือเพียง $5x10^7$ เซลล์จึงจะได้รูปแบบการเจริญของเชื้อในลักษณะเดิม จากการติดตามลังเกตการตำรงชีพของหนูไมซ์ที่ช่วงอากาศร้อน หนูจะมีนิสัยการกินน้ำเพิ่มมากขึ้นกว่าปกติ ซึ่งในกรณีของหนูติดเชื้อก็เท่ากับว่าหนูได้รับกรดพาราอะมิโนเบนโซอิค เพิ่มมากขึ้นนั่นเอง

การเจริญของ พลาส์โมเดียม ฆ่าบอดี มีลักษณะพิเศษต่างจากเชื้อพลาส์โมเดียมชนิดอื่น คือ จะมีการเปลี่ยนระยะการเจริญจากระยะวงแหวนเข้าสู่ระยะโทรโฟซอยต์พร้อมกันเพื่อเจริญเข้าสู่ระยะไซซอนต์อันเป็นระยะที่มีการเจริญเต็มที่ (matured stage) ซึ่งการเจริญพร้อมกันลักษณะนี้เรียกว่าเป็น synchronous shizogony ในการวิจัยนี้ได้ทดลองติดตามการเจริญของพลาส์โมเดียม ฆ่าบอดี AS และ AS(Pr_1) พบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อตามวิธีของ

Newbold และคณะ (1982) โดยการฉีดเชื้อเข้าช่องท้องหนูที่เวลาประมาณ 6.00-10.00 น. และเลี้ยงหนูติดเชื้อในห้องมืด โดยมีระบบการปิดเปิดไฟอัตโนมัติให้เปิดไฟที่ช่วงเวลา 17.30-8.30 น.ทุกวัน พบว่าที่ช่วงเวลาประมาณ 6.00-10.00 น. ของทุก ๆ วัน ซึ่งเป็นเวลาที่เก็บเกี่ยวเลือดตัวอย่าง การเจริญของพลาส์โมเดียม ทั้งหมดจะอยู่ในระยะโทรโฟซอยต์ตอนปลายปนกับระยะไซซอนต์ตอนต้นอันเป็นระยะที่ต้องการ (รูปที่ 7)

ผลการทดสอบความไวต่อไพริเมธามีนของ พลาส์โมเดียม ฆาบอดี AS (รูปที่ 8) และ AS(Pr_1) (รูปที่ 9) แสดงให้เห็นว่าการฉีดไพริเมธามีนขนาด 15 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวติดต่อกัน 4 วัน เข้าทางผนังช่องท้องของหนูติดเชื้อโคลน AS จะสามารถกำจัดเชื้อโคลน AS ได้อย่างสมบูรณ์ คือ ไม่สามารถตรวจพบการเจริญของพลาส์โมเดียมในกระแสเลือดเมื่อติดตามโดยการย้อมสีเจียมซ่า และหนูจะไม่กลับเป็นโรคขึ้นมาอีกหลังจากเลี้ยงต่อไปโดยไม่ให้ยา แม้ว่าในช่วงแรกของการให้ยาจะปรากฏเชื้อในกระแสเลือดบ้าง แต่จะมีลักษณะการย้อมติดสีเจียมซ่าและรูปร่างผิดปกติ (abnormal morphology) ซึ่งเชื่อว่าเป็นเชื้อที่ตายและพร้อมที่จะสลายตัวแล้ว การทดลองในพลาส์โมเดียม ฆาบอดี AS(Pr_1) ปรากฏผลคล้ายกัน แต่ทว่าหนูติดเชื้อต้องได้รับไพริเมธามีนสูงถึง 30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวเชื้อจึงจะถูกขจัดได้อย่างสมบูรณ์ แสดงให้เห็นได้ว่า พลาส์โมเดียม ฆาบอดี AS เป็นโคลนที่ไวต่อไพริเมธามีนมากกว่า พลาส์โมเดียม ฆาบอดี AS(Pr_1) ถึงประมาณ 2 เท่า มีรายงานว่าการเจริญของ พลาส์โมเดียม ฆาบอดี ที่ไม่มีคุณสมบัติต้านไพริเมธามีนเลยจะถูกยับยั้งได้ด้วยไพริเมธามีน เพียง 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว (ติดต่อกัน 4 วัน) เท่านั้น (Beale และคณะ, 1978) ดังนั้นจึงควรที่จะตั้งข้อสังเกตไว้ว่าทั้งพลาส์โมเดียม ฆาบอดี AS และ AS(Pr_1) ต่างก็เป็นโคลนซึ่งต้านยาทั้งคู่ หากแต่ว่าค่าองศาของการต้านยา (degree of resistance) ในเชื้อโคลน AS(Pr_1) มีค่าสูงกว่าโคลน AS ประมาณ 2 เท่า

จากรายงานเกี่ยวกับความเสถียรของคุณสมบัติการต้านไพริเมธามีนของพลาส์โมเดียมที่พัฒนาขึ้น แสดงให้เห็นว่า การเพาะเลี้ยงเชื้อพลาส์โมเดียมต้านไพริเมธามีนอย่างต่อเนื่องในหนูไมซ์ โดยไม่มีการเสริมไพริเมธามีนช่วงระยะเวลาหนึ่ง จะทำให้พลาส์โมเดียมสูญเสียคุณสมบัติการต้านไพริเมธามีนไปได้ อาทิเช่น พลาส์โมเดียม เบอจิอาย จะสูญเสียคุณสมบัติการต้านไพริเมธามีนเมื่อเพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่องเพียง 15 ครั้ง (Yoeli และคณะ, 1969)

ในขณะที่การต้านไพริเมธามีนของพลาส์โมเดียม โยลิอาย จะยังคงอยู่ได้เมื่อเพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่องมากกว่า 55 ครั้ง (Morgan, 1974) Schoenfeld และคณะ (1974) ส่ร้างส่ายพันธุ์ของพลาส์โมเดียม เบอจิอาย ซึ่งคุณส่มบัติการต้านไพริเมธามีนจะไม่สู่ญเสียแม้จะทำการเพาะเลี้ยงมากกว่า 40 ครั้ง ผลการทดส่อบปรากฏว่าคุณส่มบัติการต้านไพริเมธามีนของพลาส์โมเดียม ช่าบอดี AS(Pr_1) รวมทั้งเชื้อโคลน AS เอง จะไม่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิมตลอดการวิจัย ซึ่งมีการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องไม่ต่ำกว่า 200 ครั้ง นับเป็นการเพาะเลี้ยงเชื้อช่นิดต้านยาอย่างต่อเนื่องได้นานที่สุ่ดโดยที่ยังไม่มีรายงานมาก่อนเลย จึงเชื่อว่าพลาส์โมเดียม ช่าบอดี AS และ AS(Pr_1) ที่ทำการทดลองนี้ควรจะเป็นส่ายพันธุ์ที่มีคุณส่มบัติการต้านไพริเมธามีนอย่างถาวร

การวิจัยเพื่อศึกษากลไกของกระบวนการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine นั้น มีวัตถุประส่งค์หลักที่จะเปรียบเทียบปริมาณและคุณลักษณะ (characteristic) การนำ ^{14}C-pyrimethamine เข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงปกติและเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ พลาส์โมเดียม ช่าบอดี AS และ AS(Pr_1) จึงจำเป็นต้องใช้ส่ภาวะการทดลองซึ่งเซลล์ยังมีชีวิตอยู่ (viable) ในช่วงความเข้มข้นของไพริเมธามีนที่จะใช้ทดล่อง ผลจากการศึกษาโดยใช้พลาส์โมเดียม ช่าบอดี AS เป็นแม่แบบ พบว่า ^{14}C-pyrimethamine ความเข้มข้นไม่เกิน 100 นาโนโมลาร์ จะไม่ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อโคลน AS ผิดปกติ สังเกตได้จากลักษณะของกราฟการส่ะส่ม ^{14}C-pyrimethamine (รูปที่ 10 ข.) ซึ่งส่นับส่นุนโดยการทดส่อบการมีชีวิตของ พลาส์โมเดียม ช่าบอดี AS ที่ถูกผลกระทบจากไพริเมธามีน in vitro (รูปที่ 11) ที่ว่า รูปแบบการเจริญของพลาส์โมเดียมในหนูจะไม่เปลี่ยนแปลงมากนักหลังจากอินคิวเบตเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ กับไพริเมธามีนความเข้มข้น 100 นาโนโมลาร์นานถึง 30 นาที อย่างไรก็ตามอัตราการเจริญของเชื้อจะช้าลงเล็กน้อย อาจเป็นเพราะความรุนแรงของเชื้อพลาส์โมเดียม ช่าบอดี AS ลดลงบ้างบางส่่วนในระยะแรก เนื่องจากผลกระทบของไพริเมธามีนต่อแอคติวิตีในการแบ่งเซลล์ของพลาส์โมเดียม ในการทดลองทำนองเดียวกันนี้ถ้าใช้ความเข้มข้นของ ^{14}C-pyrimethamine สูงถึง 10 ไมโครโมลาร์ (รูปที่ 10 ก.) จะเห็นได้ว่าลักษณะของกราฟการส่ะส่ม ^{14}C-pyrimethamine จะแตกต่างจากเมื่อใช้ ^{14}C-pyrimethamine ความเข้มข้น 100 นาโนโมลาร์มาก ทั้งนี้คาดว่าไพริเมธามีนความเข้มข้นสูง ๆ อาจมีผลต่อความอยู่รอดของเซลล์นั่นเอง

เนื่องจากการศึกษากระบวนการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ พลาสโมเดียม ฆาบอดี หรือแม้แต่เซลล์เม็ดเลือดแดงปกติของหนูเองยังไม่มีผู้ใดเคยกระทำมาก่อนเลย การพัฒนาวิธีการวัดการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine จึงจำเป็นต้องเริ่มต้นด้วยการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการนำเข้า เพื่อความเชื่อถือได้ของผลการทดลองที่จะใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาเปรียบเทียบคุณลักษณะ และจลน์ศาสตร์ของการนำเข้าต่อไป เริ่มตั้งแต่ช่วงความเข้มข้นของ ^{14}C-pyrimethamine ที่ใช้ซึ่งจะให้ข้อมูลที่สามารถแสดงให้เห็นถึงจลน์ศาสตร์ของการนำเข้า และจากผลการศึกษาในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ พลาสโมเดียม ฆาบอดี AS ก็พบว่า ช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมดังกล่าวไม่ควรเกิน 30 นาโนโมลาร์ (รูปที่ 12) สำหรับเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติแม้จะไม่สามารถทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ได้ แต่เมื่อเปรียบเทียบลักษณะของกราฟการสะสม ^{14}C-pyrimethamine ของเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติซึ่งทำการทดลองควบคู่กับเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อโคลน AS (รูปที่ 10 ก. และ 10 ข.) ทำให้คาดว่าที่สภาวะเดียวกันนี้ไม่น่าที่จะมีความผิดปกติของเซลล์เกิดขึ้น เช่นเดียวกับในกรณีของเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อโคลน AS(Pr_1) ซึ่งผลกระทบของไพริเมธามีนต่อเซลล์มีค่าต่ำกว่า พลาสโมเดียม ฆาบอดี AS ถึงประมาณ 2.5 เท่า (รูปที่ 18)

Sirawaraporn (1980) รายงานว่าที่เยื่อเซลล์เม็ดเลือดแดงหนูไม่ปกติ และเม็ดเลือดแดงหนูไม่ติดเชื้อ พลาสโมเดียม เบอจิอาย จะมีโปรตีนตัวรับ (receptor protein) ซึ่งจะจับกับคลอโรควินได้ดีเลวขึ้นกับกำลังแรงอิออน (ionic strength) ของมีเดียมที่ใช้ ผลการทดลองรูปที่ 13 ก. แสดงให้เห็นว่า ปริมาณ ^{14}C-pyrimethamine ที่วัดได้ในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ พลาสโมเดียม ฆาบอดี AS จะลดลงเมื่อปั่นล้างเซลล์ด้วย 0.85 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์จนมีค่าคงที่หลังการปั่นล้างเซลล์ 3 ครั้ง ^{14}C-pyrimethamine ซึ่งสูญเสียในระหว่างขั้นตอนการปั่นล้างเซลล์อาจเป็นส่วนที่จับแบบหลวม ๆ อย่างไม่มีความจำเพาะกับโปรตีนที่ผิวเซลล์ ในขณะที่ปริมาณ ^{14}C-pyrimethamine ที่วัดได้หลังการปั่นล้างจนมีค่าคงที่นั้น น่าจะเป็นส่วนที่สะสมอยู่ในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ ทั้งนี้อาจเป็นโมเลกุลของ ^{14}C-pyrimethamine ซึ่งจับอยู่กับโปรตีนบางชนิดและที่มิได้จับกับโปรตีนใดเลย (non-binding molecule) สำหรับผลการศึกษาผลกระทบของความหนาแน่นของเซลล์เม็ดเลือดแดงต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อพลาสโมเดียม ฆาบอดี AS (รูปที่ 13 ข) แสดงให้เห็นว่าถ้าเซลล์เม็ดเลือดแดง (50 เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ) ที่ใช้ทดลองหนาแน่น

มากกว่า 3×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตรมีเดียมจะทำให้ปริมาณนำเข้าลดลง ซึ่งผลการทดลองนี้อาจแสดงให้เห็นถึงอิทธิพลของการเบียดบังของผิวเซลล์ต่อการนำเข้า

ข้อมูลจากการทดลองเพื่อหาเวลาที่เหมาะสมสำหรับการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine (รูปที่ 13 ค.) พบว่าเมื่ออินคิวเบตเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติและเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ พลาสโมเดียม ฆ่าบอดี AS กับ ^{14}C-pyrimethamine ความเข้มข้น 30 นาโนโมลาร์ ^{14}C-pyrimethamine จะเข้าสู่เซลล์เร็วมาก โดยจะอิ่มตัวภายในเวลา 2 นาที ในขณะที่เซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อโคลน AS(Pr_1) จะต้องใช้เวลานานถึง 6 นาที จึงเริ่มเข้าสู่สภาวะอิ่มตัว เมื่อเปรียบเทียบผลกับการทดลองแบบเดียวกันในเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติและเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อพลาสโมเดียม ฆ่าบอดี AS แต่ใช้ความเข้มข้นของ ^{14}C-pyrimethamine สูงถึง 100 นาโนโมลาร์ (รูปที่ 10 ข.) แสดงให้เห็นว่า เวลาที่ทำให้การนำเข้าอิ่มตัวไม่มีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของยา ผลการทดลองจึงบ่งชี้ให้เห็นว่าอัตราการนำ ^{14}C-pyrimethamine เข้าสู่เซลล์จะช้าลงเมื่อเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อพลาสโมเดียม ฆ่าบอดี AS(Pr_1) ซึ่งต้านไพริเมธามีนสูงกว่า ยิ่งกว่านั้นจะเห็นอีกด้วยว่าปริมาณการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ พลาสโมเดียม ฆ่าบอดี AS จะมีค่าสูงที่สุด รองลงมาคือเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ พลาสโมเดียม ฆ่าบอดี AS(Pr_1) และเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติจะมีปริมาณการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ต่ำที่สุด

ในการวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการวัดปริมาณ ^{14}C-pyrimethamine ที่ถูกนำเข้าเซลล์เม็ดเลือดแดงขึ้นใหม่ โดยดัดแปลงจากวิธีของ Ploydanai (1982) ซึ่งสกัดไพริเมธามีนออกจากเซลล์ โดยอาศัยคุณสมบัติการละลายของไพริเมธามีนในกรดแลคติค วิธีการสกัดแบบใหม่นี้จะใช้เอทธานอลเป็นตัวสกัดไพริเมธามีนแทน เมื่อทำการทดสอบเปรียบเทียบความเชื่อถือได้ของวิธีการวัดปริมาณ ^{14}C-pyrimethamine ในเซลล์เม็ดเลือดแดง ระหว่างวิธีการที่พัฒนาขึ้นใหม่กับวิธีเดิม (รูปที่ 14 ก., ตารางที่ 2 และ 3) พบว่า วิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่โดยใช้เอทธานอลสกัด ^{14}C-pyrimethamine นี้จะมี % recovery ของการสกัดสูงถึงประมาณ 100 เปอร์เซ็นต์ในขณะที่ % recovery เมื่อสกัดด้วยกรดแลคติคมีค่าเพียงประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ส่วนการเปรียบเทียบความแม่นยำ (precision) ของวิธีการสกัด ^{14}C-pyrimethamine พบว่าการใช้เอทธานอลสกัด ^{14}C-pyrimethamine ออกจากเซลล์จะให้ค่าความแปรปรวนเป็นที่น่าพอใจ คือ เมื่อใช้เซลล์เม็ดเลือดแดงปกติแล้วทำการทดลองวัดการนำเข้าของ

^{14}C-pyrimethamine ภายในการทดลองเดียวกันที่ปริมาณการนำเข้าต่างกัน 2 ค่า คือ 0.78 และ 2.0 พิโคโมลต่อ 5.5 x 10^8 เซลล์ ค่าความแปรปรวนจะใกล้เคียงกันคือ 6.17 และ 6.06 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งมีแนวโน้มว่าค่าความแปรปรวนจะลดลงเมื่อปริมาณการนำเข้าเพิ่มขึ้น ในขณะที่ค่าความแปรปรวนของปริมาณนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ที่วัดได้เมื่อล่กัดด้วยกรดแลคติคจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มการนำเข้า คือ 5.33 และ 11.53 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แล่ดงให้เห็นถึงความได้เปรียบของวิธีการล่กัดด้วยเอทธานอล ในการทดลองเพื่อศึกษาการนำเข้าต่อแต่นี้ไปจึงจะใช้วิธีการที่พัฒนาขึ้นใหม่นี้ตลอดการวิจัย เนื่องจากการทดล่อบความเชื่อถือได้ของวิธีการวัดปริมาณ ^{14}C-pyrimethamine ที่ถูกนำเข้าเซลล์ได้ทำการทดล่อบกับเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติแต่เพียงอย่างเดียว จึงได้ศึกษาถึงความเป็นไปได้ของวิธีการที่พัฒนาขึ้นมาใหม่นี้เมื่อใช้กับเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ ผลการทดลองรูปที่ 14 ข. แล่ดงให้เห็นว่า วิธีการที่พัฒนาขึ้นใหม่คือ ล่กัดไพริเมธามีนด้วยเอทธานอลน่าจะเป็นวิธีที่เหมาะล่มสำหรับการวัดปริมาณ ^{14}C-pyrimethamine ที่ถูกนำเข้าเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ พลาล่โมเดียม ฆ่าบอดี ด้วยเช่นกัน

Fitch (1974) ศึกษาความแตกต่างของการล่ะล่มคลอโรควินในเซลล์เม็ดเลือดแดงหนูไมซ์ติดเชื้อ พลาล่โมเดียม เบอจิอาย ชนิดต้านและไม่ต้านคลอโรควิน โดยใช้ฟิทซ์มีเดียม (Fitch, 1969) ในการวิจัยนี้จึงเริ่มต้นด้วยการใช้ฟิทซ์มีเดียม (pH 7.4) เป็นมีเดียมสำหรับการศึกษาการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ พลาล่โมเดียม ฆ่าบอดี พบว่าเมื่อให้มีการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียล่โดยมีกลูโคล่ 86 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งพลังงานนาน 15 นาที pH ของมีเดียมจะลดลงจาก pH 7.4 ไป 0.1 ถึง 0.2 หน่วย (รูปที่ 15) ดังนั้นจึงได้ทดลองเปลี่ยนมาใช้ฮีพล์บัฟเฟอร์ซาลีน pH 7.4 (Henderson และ Zevely, 1979) โดยมีกลูโคล่ 86 มิลลิโมลาร์เป็นแหล่งพลังงานเช่นกัน พบว่า ฮีพล์บัฟเฟอร์ซาลีน มีความล่ามารถในการรักษา pH ได้ดีกว่าฟิทซ์มีเดียม คือ pH หลังอินคิวเบตกับเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ พลาล่โมเดียม ฆ่าบอดี AS ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียล่นาน 15 นาทีจะมีค่าประมาณ 7.38$\pm$ 0.01 การที่ pH ของมีเดียมลดลงนั้นเชื่อว่า เป็นผลเนื่องจากเมตาบอลิล่มของกลูโคล่ โดยผ่านขบวนการไกลโคไลซิล่และได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ โดยมีกรดแลคติคเป็นผลิตภัณฑ์ล่วนใหญ่ นอกจากนั้น

อาจมีกรดอะซีติคและกรดซัคซินิครวมอยู่ด้วยบ้าง (Bovarnick และคณะ, 1946 ; Bowman และคณะ , 1960 ; Neame และคณะ , 1975) การสังเคราะห์กรดอินทรีย์เหล่านี้จะขึ้นกับชนิดของพลาสโมเดียม และองศาของการติดเชื้อ (degree of parasitization) อีกด้วย นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติจะมีความสามารถในการใช้กลูโคสได้ช้ากว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อพลาสโมเดียมถึง 75 เท่า (Sherman และ Tanigoshi, 1974 ; Homewood, 1977 - 1978)

เมื่อศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการนำ ^{14}C-pyrimethamine เข้าสู่เซลล์โดยใช้ฟีทซ์มีเดียมและฮีพส์บัฟเฟอร์ซาลีน ผลการทดลองตามรูปที่ 16 จะเห็นได้อย่างชัดเจนว่า ^{14}C-pyrimethamine จะถูกนำเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ <u>พลาสโมเดียม ชาบอดี</u> AS เมื่ออินคิวเบตในฮีพส์บัฟเฟอร์ซาลีนได้มากกว่าเมื่อใช้ฟีทซ์มีเดียมอย่างมีนัยสำคัญ ผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานของ Henderson และ Zevely (1979) ซึ่งศึกษาการขนส่งเมทโธทรีเซตผ่านเยื่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนูไมซ์, L 1210 เปรียบเทียบระหว่างการใช้ฮีพส์บัฟเฟอร์ซาลีน และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน นอกจากนี้ยังได้รายงานด้วยว่าฟอสเฟตอิออนและแมกนีเซียมอิออนมีผลกระทบทำให้มีการขนส่งเมทโธทรีเซตเข้าสู่เซลล์ได้น้อยลง ฟีทซ์มีเดียมเองนอกจากจะประกอบด้วยฟอสเฟตอิออนและแมกนีเซียมซัลเฟตแล้ว ยังมีองค์ประกอบอื่น ๆ ที่แตกต่างไปจากฮีพส์บัฟเฟอร์ซาลีน คือ มีโปแตสเซียมคลอไรด์ด้วย จึงได้ทำการทดสอบผลกระทบของโปแตสเซียมคลอไรด์และแมกนีเซียมซัลเฟตต่อการนำ ^{14}C-pyrimethamine เข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดง ซึ่งผลการทดลองตามรูปที่ 17 แสดงให้เห็นว่า การใช้โปแตสเซียมคลอไรด์แทนโซเดียมคลอไรด์และการมี 1.2 มิลลิโมลาร์แมกนีเซียมซัลเฟตเกือบจะไม่มีผลกระทบต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ซึ่งคล้ายคลึงกับรายงานของ Goldman (1971) ที่ว่า carrier-mediated transport ของการนำเมทโธทรีเซตเข้าเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวหนูไมซ์, L1210 ไม่อาศัยพลังงานจากการขับเคลื่อนโซเดียมและโปแตสเซียมผ่านเยื่อเซลล์ ($Na^+ - K^+$ pump)

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ระหว่างเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติ เซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ<u>พลาสโมเดียม ชาบอดี</u> AS และ AS(Pr_1) โดยใช้เลือดติดเชื้อที่มีเปอร์เซนต์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อและเปอร์เซนต์การติดเชื้อแบบ mutti-infection ต่าง ๆ ใกล้เคียงกันมากที่สุด พบว่า ปริมาณการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine

ในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ พลาสโมเดียม ฆ่าบอดี AS จะมากกว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อโคลน AS(Pr_1) และเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติตามลำดับที่ทุกค่าความเข้มข้นของ ^{14}C-pyrimethamine ที่ใช้อินคิวเบตกับเซลล์ (2-30 นาโนโมลาร์) โดยจะมีค่าการนำเข้าสูงสุดประมาณ 12.0, 4.9 และ 1.3 พิโคโมลต่อ 10^9 เซลล์ ที่ ^{14}C-pyrimethamine เข้มข้น 30 นาโนโมลาร์ (รูปที่ 18) ค่าการนำเข้าสูงสุดสมบูรณ์นี้ในแต่ละการทดลองอาจเปลี่ยนแปลงไปได้บ้าง ซึ่งความแปรปรวนในระหว่างการทดลอง (between assay) จะมีความสัมพันธ์กับลักษณะการติดเชื้อแบบ multi-infection ของเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ (ตารางที่ 4) ถึงแม้ว่าจะได้พยายามควบคุมให้ระยะการเจริญของพลาสโมเดียม ฆ่าบอดี ในเลือดติดเชื้อที่ใช้ในการทดลองส่วนใหญ่เป็นโทรโฟซอยต์ปนกับไซซอนต์ด้วยสัดส่วนที่ใกล้เคียงกันตลอดการวิจัย คือ ประมาณ 1 ต่อ 1 และทุกครั้งของการทดลองได้เตรียมตัวอย่างเลือดติดเชื้อให้มีเปอร์เซนต์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อใกล้เคียงกัน คือ ประมาณ 50 เปอร์เซนต์ ก็ยังไม่อาจแก้ไขความแปรปรวนของปริมาณการนำเข้านี้ได้ อย่างไรก็ตามลำดับความแตกต่างของการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ในเม็ดเลือดแดงติดเชื้อและเม็ดเลือดแดงปกติจะคงเดิม

Fischer (1962) รายงานว่าเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนูไมซ์, L5178 Y จะสะสมเมทโธทรีเซต (ซึ่งเป็นสารแอนติโฟเลต (antifolate) และออกฤทธิ์ที่เอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส เช่นเดียวกับไพริเมธามีน) ไว้ในเซลล์ได้น้อยลงเมื่อมีคุณสมบัติต้านเมทโธทรีเซต Kessel และคณะ (1968) พบว่า เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวจะสะสมเมทโธทรีเซตได้มากกว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ Fitch (1969) ศึกษาเปรียบเทียบการสะสมของคลอโรควินในเม็ดเลือดแดงติดเชื้อพลาสโมเดียม เบอจิอาย รายงานว่า การใช้คลอโรควินช่วงความเข้มข้นเป็นนาโนโมลาร์ (ไม่เกิน 100 นาโนโมลาร์) จะแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของการสะสมคลอโรควิน โดยปริมาณคลอโรควินในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อพลาสโมเดียม เบอจิอาย สายพันธุ์ที่ไวต่อยา จะมีค่ามากกว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อพลาสโมเดียม เบอจิอาย สายพันธุ์ที่ต้านยา และเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติตามลำดับ โดยที่เซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อนั้นพบว่า คลอโรควินส่วนใหญ่ (ประมาณ 65 เปอร์เซนต์) ที่ถูกนำเข้าเซลล์จะถูกสะสมไว้ในเซลล์พลาสโมเดียม ส่วนที่เหลือ (ประมาณ 35 เปอร์เซนต์) กระจายอยู่ตามส่วนของเยื่อเซลล์และไลเซต (lysate) ของเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ (Sirawaraporn, 1980)

กระบวนการเคลื่อนที่ของสารผ่านเยื่อเซลล์ โดยทั่วไปมักขึ้นกับโครงสร้างของสารนั้น คือ สารที่โครงสร้างเป็นโมเลกุลแบบไม่โพลาร์ (non-polar molecule) จะผ่านเยื่อเซลล์ด้วยขบวนการ simple diffusion ซึ่งคุณลักษณะหรือนัยหนึ่งจลน์ศาสตร์ของการนำเข้าจะไม่มีสภาวะอิ่มตัว (non-saturable process) คือ อัตราการนำเข้าจะแปรตามความเข้มข้นของสารที่ใช้ ส่วนสารที่โครงสร้างเป็นโมเลกุลแบบโพลาร์หรือกึ่งโพลาร์ (polar or partially polar molecule) จะผ่านเยื่อเซลล์โดยอาศัยขบวนการ carrier-mediated transport ซึ่งหมายความรวมถึง facilitated (passive) diffusion และ active transport คุณลักษณะของการนำสารเข้าเซลล์ด้วยขบวนการนี้จะมีสภาวะอิ่มตัว (saturable process)

มีรายงานว่าสารโฟเลตส่วนใหญ่จะเข้าสู่เซลล์ด้วยขบวนการ carrier-mediated transport เช่น เซลล์แบคทีเรีย (Mandebaum-Gravit และ Grossowicz, 1973 ; Henderson และ Huennekens, 1974 ; Shane และ Stokstad, 1975-1976) เซลล์เม็ดเลือดแดงเรติคิวโลไซต์ของกระต่าย (Bobzien และ Goldman, 1972) เป็นต้น ยกเว้นที่เยื่อเซลล์ลำไส้เล็กของหนู ซึ่งสารโฟเลตจะเข้าเซลล์แบบ simple diffusion (Strum และคณะ , 1971) สำหรับสารแอนติโฟเลต ตัวอย่างเช่น เมทโธทรีเซต ก็มีรายงานยืนยันว่าผ่านเยื่อเซลล์ด้วยขบวนการเช่นเดียวกับโฟเลต McCormick และคณะ (1979) รายงานว่าสามารถแยกโปรตีนที่จับกับเมทโธทรีเซตอย่างมีความจำเพาะได้ถึง 3 ชนิดจากเยื่อเซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลืองของหนูไมซ์, L1210 เมื่อพิจารณาข้อมูลจากการศึกษา การนำ ^{14}C-pyrimethamine เข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงปกติและเม็ดเลือดแดงติดเชื้อพลาสโมเดียม ฆ่าบอดี ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ pH 7.4 ตามผลการทดลองรูปที่ 18 พบว่าคุณลักษณะการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ในเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติเป็นแบบที่มีสภาวะอิ่มตัว แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ที่ไพริเมธามีนจะผ่านเยื่อเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติด้วยขบวนการ carrier-mediated transport ซึ่งเมื่อหาค่าคงที่ทางจลน์ศาสตร์ของการนำเข้า (K_m) โดยสร้างความสัมพันธ์ Lineweaver-Burk Plot ระหว่างส่วนกลับความเข้มข้นของ ^{14}C-pyrimethamine และส่วนกลับของอัตราการนำเข้า (ภาคผนวกที่ 1) จะได้ค่า K_m ของการนำเข้าเท่ากับ 7.9 ± 0.1 นาโนโมลาร์ อันอาจเป็นข้อมูลที่บ่งชี้ถึงความสามารถในการจับกันระหว่างไพริเมธามีนกับโปรตีนตัวรับที่เยื่อเซลล์เม็ดเลือดแดงได้อีกด้วย

ส่วนเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อพลาสโมเดียม ฆ่าบอดี AS และ AS(Pr_1) นั้นปรากฏว่าคุณลักษณะการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine เป็นแบบกึ่งอิ่มตัวกึ่งแปรตามความเข้มข้นของ ^{14}C-pyrimethamine ชี้ให้เห็นว่าไพริเมธามีนอาจจะผ่านเยื่อเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อพลาสโมเดียม ฆ่าบอดี ด้วยขบวนการ carrier-mediated transport ควบคู่กับ simple diffusion ซึ่งเมื่อสร้างความสัมพันธ์ Lineweaver-Burk Plot จะได้ค่า K_m ของการนำ ^{14}C-pyrimethamine เข้าเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ พลาสโมเดียม ฆ่าบอดี AS เท่ากับ 3.9 $\pm$0.7 นาโนโมลาร์ และค่า K_m ของการนำเข้าจะเพิ่มขึ้นเป็น 6.3 $\pm$ 0.9 นาโนโมลาร์ในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ พลาสโมเดียม ฆ่าบอดี ที่ต้านไพริเมธามีนสูงขึ้นคือโคลน AS(Pr_1) หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งว่าความสามารถในการที่ไพริเมธามีนจับกับโปรตีนตัวรับในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ พลาสโมเดียม ฆ่าบอดี AS จะดีกว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อโคลน AS(Pr_1) ประมาณ 2 เท่า และการจับกันของไพริเมธามีนต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ พลาสโมเดียม ฆ่าบอดี จะดีกว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติ

นอกจากข้อมูลดังกล่าวแล้วในการวิจัยยังได้ศึกษาปัจจัยกระทบอื่น ๆ อีกหลายปัจจัย ซึ่งผลที่ได้จะเป็นข้อมูลสนับสนุนความเป็นไปได้ของขบวนการนำไพริเมธามีนเข้าเซลล์ที่แท้จริง ยิ่งไปกว่านั้นในขณะทำการวิจัยเพื่อศึกษาการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ได้สังเกตพบว่าระหว่างที่ทำการทดลองเซลล์เม็ดเลือดแดงจะแตกตัวบ้างบางส่วนเมื่อซัสเปนเซลล์ใน 0.85 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ เพื่อปั่นล้างเซลล์หลังจากอินคิวเบตเซลล์ที่บางสภาวะการทดลองแล้วโดยเฉพาะอย่างยิ่งการทดลองจะเห็นการแตกตัวชัดเจนในการปั่นล้างครั้งที่หนึ่ง เชื่อว่าการแตกของเซลล์นี้อาจทำให้เกิดการสูญเสีย ^{14}C-pyrimethamine บางส่วนที่ถูกนำเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงแล้ว อย่างไรก็ตามในบางสภาวะของการทดลองพบว่า จะมีการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงเกิดขึ้นมากผิดปกติด้วยเช่นกัน ระหว่างขั้นตอนการอินคิวเบตกับ ^{14}C-pyrimethamine ซึ่งการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงนี้ จะเป็นผลลดจำนวนเซลล์ (available cells) ที่อินคิวเบตกับ ^{14}C-pyrimethamine ลงไปจากค่าที่เป็นจริง ดังนั้นในการศึกษาวิจัยถึงปัจจัยกระทบต่อการนำ ^{14}C-pyrimethamine เข้าเซลล์จึงต้องศึกษาติดตามการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ใช้ทั้งชนิดติดเชื้อและไม่ติดเชื้อด้วย จำนวนเซลล์ที่แตกตัวคำนวณได้จากการเปรียบเทียบปริมาณฮีโมโกลบินที่วัดได้กับปริมาณฮีโมโกลบินจากการ

แตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ทราบจำนวนโดยใช้วิธีเบนซิดีน ซึ่งเป็นการทำปฏิกิริยาระหว่างเบนซิดีนกับเหล็กอิออนอันเป็นองค์ประกอบภายในโครงสร้างของฮีโมโกลบิน

โดยปกติฮีโมโกลบินจะมีเหล็กอิออนในปริมาณคงที่ค่าหนึ่ง (ขึ้นกับชนิดของสัตว์) จนกระทั่งหมดอายุการทำงาน (life span) ของเม็ดเลือดแดง มีรายงานว่าเมื่อมีการติดเชื้อพลาสโมเดียมเหล็กอิออนจะถูกใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์รงควัตถุชนิดหนึ่ง (ฮีโม-โซอิน ; hemozoin) ขึ้นในเซลล์ พลาสโมเดียมเอง จึงเชื่อว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อพลาสโมเดียมอาจจะยอมให้เหล็กอิออนผ่านเข้าเยื่อเซลล์และมีการสะสมเพิ่มขึ้นดังเช่นที่ปรากฏกับสารโมเลกุลเล็กชนิดอื่น ๆ (Sherman และคณะ , 1967 ; Yuthavong, 1983) ผลการวัดปริมาณฮีโมโกลบิน (หรือนัยหนึ่งเหล็กอิออน) ของเม็ดเลือดแดง (ตารางที่ 5) ปรากฏว่า ไม่มีความแตกต่างของปริมาณฮีโมโกลบินในเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติ และเซลล์เม็ดเลือดแดงในเลือดติดเชื้อพลาสโมเดียม ฆ่าบอดี ทั้ง 2 โคลน ซึ่งมีเปอร์เซนต์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ ตลอดจนการติดเชื้อแบบ mutti-infection ต่าง ๆ กัน คือจะมีค่าฮีโมโกลบินที่วัดได้ประมาณ 23.41 $\pm$ 0.3 มิลลิกรัม ต่อ 10^{9}* เซลล์ (ค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน 1.28 เปอร์เซนต์)

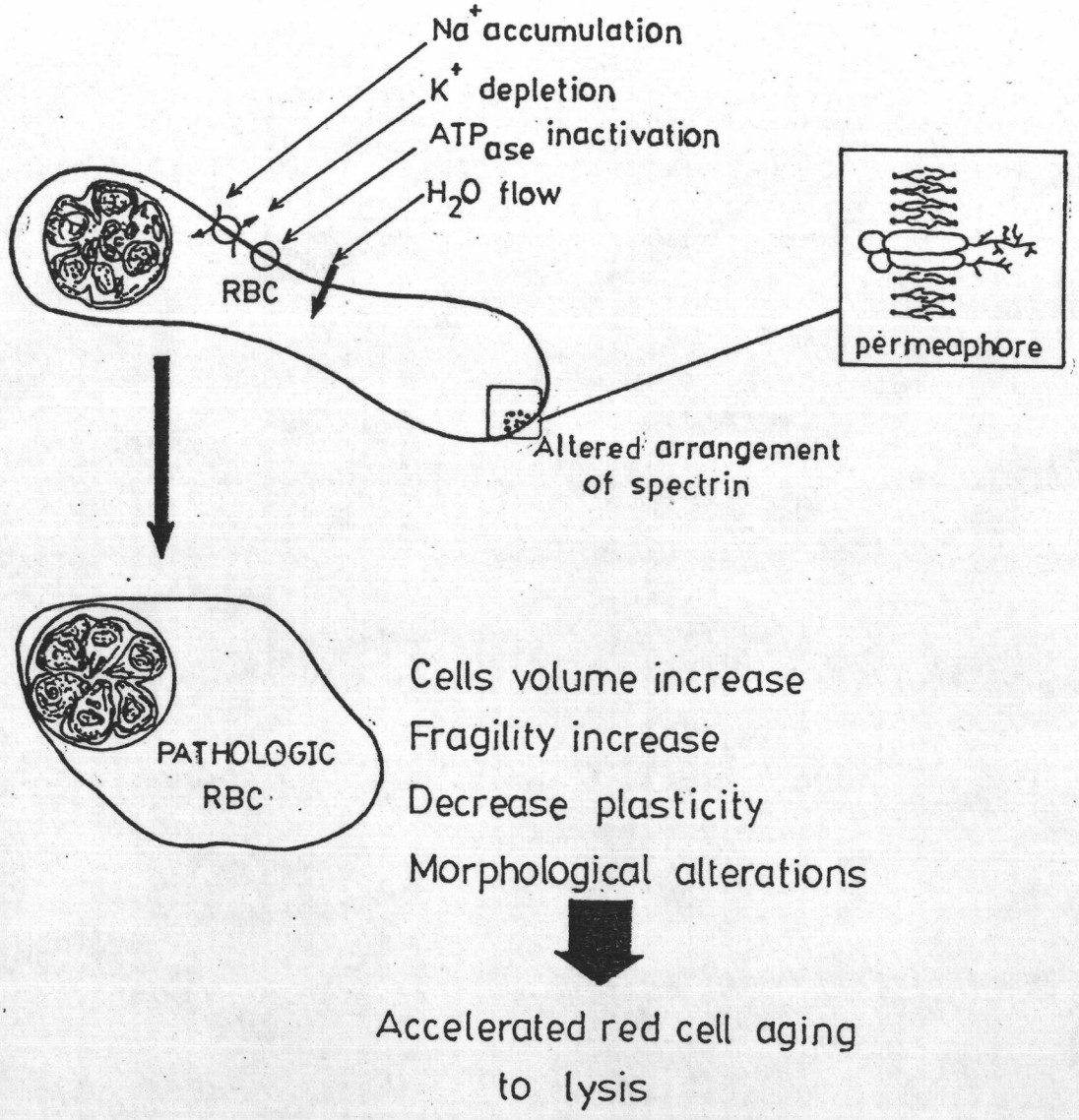
นอกจากการศึกษาปริมาณเหล็กในเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติ และเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อพลาสโมเดียมแล้ว คุณสมบัติที่น่าสนใจอีกประการหนึ่ง คือ การเปลี่ยนแปลงความเปราะ (fragility) ของเยื่อเซลล์เม็ดเลือดแดง Herman (1969) กับ Seed และ Kreier (1972) ได้รายงานว่า เลือดเป็ดเมื่อติดเชื้อ พลาสโมเดียม โลฟูเร และ พลาสโมเดียม กัลลิเนเซียม จะมีผลให้เยื่อเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อเปราะมากกว่าเม็ดเลือดแดงของเป็ดปกติ จากผลการทดลองในภาคผนวกที่ 2 แสดงให้เห็นผลซึ่งสอดคล้องกันว่า เมื่อเลือดหนูไมซ์ติดเชื้อพลาสโมเดียม ฆ่าบอดี จะทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงเปราะ สามารถทำให้แตกได้ง่ายขึ้น และเลือดติดเชื้อพลาสโมเดียมโคลน AS จะมีความเปราะของเยื่อเซลล์เม็ดเลือดแดงสูงกว่าเลือดติดเชื้อพลาสโมเดียมโคลน AS(Pr_1) เล็กน้อย ยิ่งไปกว่านั้นผลการทดลองยังแสดงให้เห็นชัดเจนว่าการมีไพริเมธามีน 30 นาโนโมลาร์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดของ ^{14}C-pyri-methamine ที่ใช้ในมีเดียมของการศึกษาการนำเข้าจะไม่มีผลไปเพิ่มหรือลดความเปราะของ

---

*ค่าที่รายงานอาจไม่ใช่ค่าสัมบูรณ์ (absolute) ของปริมาณฮีโมโกลบินในเซลล์เม็ดเลือดแดงหนูไมซ์ เนื่องจากฮีโมโกลบินมาตรฐานที่ใช้ในการทดลองนี้ เตรียมได้จากเม็ดเลือดแดงของม้า

ของเยื่อเซลล์เม็ดเลือดแดงในเลือดปกติ หรือเลือดติดเชื้อโคลนใดโคลนหนึ่งเลย Seed และ Kreier (1980) ตั้งสมมติฐานการเปลี่ยนแปลงของเยื่อเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ ซึ่งจะส่งผลให้เซลล์แตกตัวได้ง่ายขึ้น (รูปที่ 53) โดยอาศัยข้อมูลจากภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทัศน์อิเลคตรอน (Seed และ Kreier, 1972) เป็นการยืนยันว่าเม็ดเลือดแดงปกติ เมื่อถูกบุกรุกด้วยเชื้อพลาสโมเดียม กัลลิเนเซียม จะมีความผิดปกติที่เยื่อเซลล์

ในการศึกษาผลกระทบของปัจจัยต่าง ๆ ต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine เพื่อนำไปสู่ความเข้าใจถึงลักษณะและกลไกการนำไพริเมธามีนเข้าเซลล์ได้ผลการทดลองที่น่าสนใจหลายประการ คือ เมื่อศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิต่อการนำ ^{14}C-pyrimethamine เข้าเซลล์เม็ดเลือดแดง (รูปที่ 19) พบว่า อุณหภูมิจะมีผลกระทบต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ พลาสโมเดียม ฆาบอดี โดยอุณหภูมิที่ทำให้ปริมาณการนำเข้ามีค่าสูงสุดในเม็ดเลือดแดงติดเชื้อโคลน AS คือ 37 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตาม ^{14}C-pyrimethamine จะเข้าสู่เซลล์ได้มากพอสมควรที่ 2 องศาเซลเซียส (ประมาณ 45 เปอร์เซ็นต์ของค่าการนำเข้าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส) ส่วนเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อพลาสโมเดียมโคลน AS(Pr_1) นั้น การนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine จะมีค่าสูงสุดที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ซึ่งปริมาณการนำเข้าสูงกว่าที่อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียสเพียงเล็กน้อย ปริมาณ ^{14}C-pyrimethamine ที่วัดได้ในเซลล์ทั้งชนิดติดเชื้อและไม่ติดเชื้อจะมีค่าต่ำสุดเมื่อทำการทดลองที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส สำหรับการนำ ^{14}C-pyrimethamine เข้าของเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติจะมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างเห็นชัดมากนัก เนื่องจากค่าที่วัดได้ต่ำมาก ถึงกระนั้นก็ตามค่าที่วัดได้ ณ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ก็ยังแสดงความแตกต่างที่พอสังเกตได้ อันอาจเป็นผลจากการแตกตัวของเซลล์ซึ่งมากกว่าที่อุณหภูมิอื่น ๆ ประมาณ 2-5 เท่า เมื่อติดตามการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงที่สภาวะอุณหภูมิต่างๆ กันข้างต้น ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าผลกระทบของอุณหภูมิ 2, 10 และ 37 องศาเซลเซียสจะทำให้เซลล์ในเลือดติดเชื้อ พลาสโมเดียม ฆาบอดี AS(Pr_1) แตกใกล้เคียงกับเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติ ยกเว้นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งจะมีค่าสูงกว่าเกือบ 6 เท่า จึงน่าจะเป็นไปได้ว่าที่สภาวะการทดลองการนำเข้าจะมีผลต่อการแตกตัวของเลือดติดเชื้อมากกว่าเลือดปกติ เมื่อเปรียบเทียบกับการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงในเลือดติดเชื้อ พลาสโมเดียม ฆาบอดี AS พบว่าเซลล์จะแตกตัวมากกว่าเลือดติดเชื้อโคลน AS(Pr_1) ที่ทุกอุณหภูมิที่ทำการ



รูปที่ 53. สมมติฐานผลการเปลี่ยนแปลงบางประการที่เยื่อเซลล์ต่อคุณสมบัติทางสรีรวิทยาของเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อพลาสโมเดียม (Seed และ Kreier, 1980)

ทดลอง (รูปที่ 19 ข., ง., ฉ.,) ในการศึกษานี้เมื่อทำการวิเคราะห์ผลกระทบของอุณหภูมิต่อการเข้าสู่เซลล์ของ ^{14}C-pyrimethamine และการแตกตัวของเซลล์ควบคู่กันไป ข้อมูลจากรูปที่ 19 แสดงให้เห็นว่าหากไม่นับที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสซึ่งจะมีการแตกตัวของเซลล์ในระหว่างที่อินคิวเบตเซลล์กับ ^{14}C-pyrimethamine สูงมากแล้ว แม้อุณหภูมิอื่นจะมีผลกระทบทำให้เซลล์แตกตัวแตกต่างกันบ้างก็เพียงเล็กน้อย ดังนั้นปริมาณ ^{14}C-pyrimethamine ที่สะสมอยู่ในเซลล์ซึ่งวัดได้แตกต่างกันดังกล่าวข้างต้น จึงควรจะเชื่อถือได้ว่าเป็นผลอันเนื่องจากวิถีการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ในเซลล์ติดเชื้อพลาสโมเดียมแต่ละโคลนเอง

Kessel และ Hall (1967) รายงานว่า 5-ฟลูออโรยูราซิล (5-fluorouracil), 6-เมอร์แคพโตพิวรีน (6-mercaptopurine) และไธโอยูเรีย (thiorea) ซึ่งเชื่อว่าผ่านเยื่อเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนแบบ simple diffusion จะยังคงผ่านเซลล์ได้ค่อนข้างมากแม้จะลดอุณหภูมิของการนำเข้าลงจนเหลือต่ำกว่าองศาเซลเซียส และการเข้าสู่เซลล์ของสารเหล่านี้จะเพิ่มขึ้นได้บ้างแต่ไม่มากนักเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น โดยจะมีค่าสูงสุดที่อุณหภูมิไม่เกิน 20 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับน้ำตาลไรโบสกับเมทโธทรีเซต ซึ่งจะเข้าสู่เซลล์ด้วยขบวนการ facilitated diffusion และไซโคลลิวซีน (cycloleucine) ซึ่งเข้าเซลล์โดยขบวนการ active transport การนำสารทั้งสองชนิดเข้าเซลล์เม็ดเลือดขาวจะมีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิคล้ายกับผลกระทบของอุณหภูมิต่ออัตราการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ทุกประการ ลักษณะที่เด่นสำหรับขบวนการ carrier-mediated transport คือ ที่อุณหภูมิต่ำ ๆ อัตราการนำเข้าจะต่ำมาก จากผลการทดลองที่แสดงถึงผลกระทบของอุณหภูมิต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อดังกล่าวข้างต้นอาจจะทำให้อนุมานได้ว่ามีความแตกต่างของวิถีการนำไพริเมธามีนเข้าสู่เซลล์ คือ ไพริเมธามีนจะเข้าเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ <u>พลาสโมเดียม ฆาบอดี</u> AS ด้วยขบวนการ carrier-mediated transport ควบคู่กับ simple diffusion และวิถีการนำเข้าแบบหลังจะเห็นเด่นชัดมากขึ้นเมื่อเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อพลาสโมเดียมที่ต้านยาสูงขึ้นคือ <u>พลาสโมเดียม ฆาบอดี</u> AS (Pr_1)

จากการศึกษาผลกระทบของ pH ของมีเดียมต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine (pH ที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยของค่าที่วัดได้ก่อนและหลังการอินคิวเบตเซลล์) (รูปที่ 20) ปรากฏว่าปริมาณการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ในเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติจะไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อใช้มีเดียม pH ต่าง ๆ แต่จะสังเกตความแตกต่างได้ชัดเจนในเซลล์เม็ด

เลือดแดงติดเชื้อพลาส์โมเดียม ฆ่าบอดี คือ pH 7.4 - 8.1 จะเป็น pH ที่ทำให้ ^{14}C-pyrimethamine เข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อโคลน AS ได้สูงสุด และจะเปลี่ยนมาเป็นที่ pH 7.0 เมื่อเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ พลาส์โมเดียม ฆ่าบอดี AS(Pr_1) การที่ปริมาณการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อลดต่ำลงมากในมีเดียม pH 6.6 พบว่า เกิดควบคู่กับการแตกตัวสูงผิดปกติ ของเซลล์ อย่างไรก็ตามเมื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบปริมาณ ^{14}C-pyrimethamine ที่เข้าสู่เซลล์กับการแตกตัวของเซลล์เพื่อยืนยันความเชื่อถือได้ของความแตกต่างของการนำเข้าในทำนองเดียวกับที่ศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิ ทำให้เชื่อว่า การเปลี่ยนแปลงอัตราการนำเข้าที่ pH ต่าง ๆ กันเป็นผลจากอิทธิพลของ pH ต่อวิถีการนำ ^{14}C-pyrimethamine เข้าเซลล์เอง แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ที่โปรตีน เฉพาะอย่างยิ่งโปรตีนที่เยื่อเซลล์จะมีบทบาทในการนำไพริเมธามีนเข้าเซลล์ ซึ่งผลการทดลองยังแสดงให้เห็นอีกด้วยว่า วิถีการนำเข้าของไพริเมธามีนในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อทั้งสองโคลน น่าจะแตกต่างกัน Fitch และคณะ (1972) รายงานว่า pH จะมีผลกระทบต่อการนำเข้าของคลอโรควินด้วยรูปแบบที่เปลี่ยนไปจากเดิมเมื่อ พลาส์โมเดียม เบอจิอาย สร้างความต้านทานต่อคลอโรควินสูงขึ้น นอกจากนี้ ผลการติดตามการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงยังให้ข้อสังเกตอีกเช่นกันว่า เซลล์ในเลือดติดเชื้อ พลาส์โมเดียม ฆ่าบอดี AS จะแตกตัวที่สภาวะการทดลอง pH ต่าง ๆ มากกว่าเลือดติดเชื้อโคลน AS(Pr_1) บ้างเล็กน้อย โดยที่เลือดติดเชื้อทั้ง 2 โคลนจะแตกตัวสูงกว่าเลือดปกติอย่างเห็นได้ชัด

Trager (1959) ตั้งสมมติฐานซึ่งเป็นที่ยอมรับกันมานานแล้วว่า การสังเคราะห์โคเอนไซม์โฟเลตในพลาส์โมเดียม จะไม่ใช้สารโฟเลตเป็นต้นตอจากภายนอกเซลล์ แต่จะสังเคราะห์โคเอนไซม์โฟเลตขึ้นได้เองโดยใช้กรดพาราอะมิโนเบโซอิค เป็นสารเริ่มต้น เช่นเดียวกับที่พบในแบคทีเรีย อย่างไรก็ตามจากการศึกษา in vitro พบว่าโฟเลตสามารถผ่านเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ พลาส์โมเดียม โลฟูเร,พลาส์โมเดียม โนลิซาย (McCormick และคณะ, 1971) และ พลาส์โมเดียม ฟาลซิพารัม (Brokelman และคณะ, 1983) ได้โดยตรง ผลการทดลองตามรูปที่ 21 ก. เป็นการศึกษาผลกระทบของโฟเลตต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ พลาส์โมเดียม ฆ่าบอดี AS โดยอินคิวเบตเซลล์กับ

โฟเลต (1 ไมโครโมลาร์นาน 30 นาที) ก่อนที่จะอินคิวเบตกับ ^{14}C-pyrimethamine พบว่า อัตราการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine จะเพิ่มขึ้นมากกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ Bobzien และ Goldman (1971) รายงานว่า การนำเข้าของเมทโธทรีเซตในเซลล์เม็ดเลือดแดงกระต่ายเป็น carrier-mediated transport ซึ่งจะถูกยับยั้งแบบแย่งชันได้ด้วยโฟเลต ตรงกันข้าม Goldman (1971) แสดงให้เห็นว่า carrier-mediated transport ของเมทโธทรีเซตในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวหนูไมซ์ L 1210 จะเกิดได้ดีขึ้นเมื่อมีโฟเลตอยู่ภายในเซลล์ โดยตั้งสมมติฐานว่า เมทโธทรีเซตและโฟเลตจะผ่านเข้าออกเยื่อเซลล์ด้วยวิถีซึ่งใช้โปรตีนตัวพา (carrier protein) ร่วมกัน และโฟเลตที่มีอยู่ด้วยจะช่วยให้การกลับทิศทาง (reorientation) ของโปรตีนตัวพาเดียวกันนั้น เกิดได้เร็วขึ้น

จากการศึกษาเปรียบเทียบผลกระทบของโฟเลตต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine เมื่อใช้เซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ <u>พลาสโมเดียม ฆาบอดี</u> AS(Pr_1) ปรากฏผลต่างกันคือ โฟเลตความเข้มข้นเท่ากับที่ทดลองแล้วมีผลกับเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อโคลน AS (1 ไมโครโมลาร์) จะไม่มีผลกระทบต่ออัตราการนำเข้าแต่อย่างใด (รูปที่ 21 ข.) ผลการทดลองจึงมีส่วนช่วยสนับสนุนความเป็นไปได้ที่วิถีการนำไพริเมธามีนเข้าเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ <u>พลาสโมเดียม ฆาบอดี</u> AS จะแตกต่างจากเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อโคลน AS(Pr_1)

การศึกษาผลกระทบของความเข้มข้นของกลูโคสต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine (ตามรูปที่ 22 และ 23) แสดงให้เห็นว่า การนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ <u>พลาสโมเดียม ฆาบอดี</u> น่าจะเกี่ยวข้องกับการใช้พลังงานของเซลล์ โดยผลจะเห็นชัดเจนขึ้นเมื่ออินคิวเบตเซลล์ในอีพล์ปัฟเฟอร์ซาลีนอย่างเดียวที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสล่วงหน้า นาน 30 นาทีก่อน แล้วจึงนำมาใช้ศึกษาการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ซึ่งในช่วงเวลาดังกล่าว กลูโคสหรือแหล่งพลังงานอื่น ๆ ที่มีอยู่บ้างในเซลล์จะถูกเมตาบอไลต์ไปบ้างบางส่วน จึงเรียกเซลล์หลังผ่านขั้นตอนนี้ว่าเซลล์ขาดอาหาร (glucose-depleted cells) (Horne และ Wagner, 1979) ดังนั้นเมื่อมีการเสริมกลูโคสในมีเดียมของการนำเข้าเพิ่มขึ้นเป็น 10 และ 100 มิลลิโมลาร์ การนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine จึงจะเพิ่มขึ้นด้วยโดยเฉพาะที่กลูโคสความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ซึ่งผลกระทบของกลูโคสจะทำให้การนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อทั้งสองโคลนเพิ่มขึ้นในสัดส่วนใกล้เคียงกัน Goldman (1971-1977)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตั้งสมมติฐานการนำเข้าของเมทโธทรีเซตในเซลล์มะเร็งหนูไมซ์, L 1210 ว่า การมีสารประกอบฟันธะฟอสเฟตอันเป็นสารประกอบพลังงานสูง (high-energy compound) ได้แก่ อะดีนีนไตรฟอสเฟต (ATP) และกลูโคส-6-ฟอสเฟต (G-6-P) เป็นต้นสะสมอยู่ในเซลล์ จะเป็นแหล่งพลังงานที่ช่วยในการนำเมทโธทรีเซตเข้าเซลล์ ทำให้การศึกษาเกี่ยวกับบทบาทของพลังงานต่อการนำเข้าเห็นไม่เด่นชัด เมื่อใช้สภาวะการทดลองที่มีผลต่อการสร้างพลังงานของเซลล์ เช่น ผลของสารยับยั้งการสร้างพลังงาน หรือผลของการใช้สารอื่นแทนกลูโคส Fitch และคณะ (1974) รายงานว่าการสะสมคลอโรควินในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ พลาสโมเดียม เบอจิอาย จะมีค่ามากสุดเมื่อใช้กลูโคส 10 มิลลิโมลาร์ และการเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสจะมีผลต่อการสะสมคลอโรควินในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ พลาสโมเดียม เบอจิอาย ชนิดต้านคลอโรควินน้อยกว่าเชื้อที่ไม่ต้านคลอโรควิน

ข้อมูลของการศึกษาและวิจัยที่สนับสนุนการนำเข้าของไพริเมธามีนว่ามีการใช้พลังงานเกี่ยวข้องในขบวนการด้วย ได้จากการศึกษาผลกระทบของแหล่งพลังงานต่างชนิดกัน ได้แก่ กลูโคส ไพรูเวต และ ซัคซิเนต ต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ในเซลล์ติดเชื้อทั้งสองโคลน โดยใช้สารความเข้มข้นเท่ากัน คือ 100 มิลลิโมลาร์ ผลการทดลองพบว่าในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ พลาสโมเดียม ฆาบอดี AS จะเห็นผลยับยั้งเฉพาะทั้งในเซลล์ที่ขาดอาหารและไม่ขาดอาหารว่ากลูโคสจะเป็นแหล่งพลังงานสำหรับการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ได้ดีกว่าไพรูเวตกับซัคซิเนตประมาณ 20 เปอร์เซนต์ (รูปที่ 25 ก. และ 24 ก.) ในขณะที่ผลกระทบของไพรูเวตและซัคซิเนตต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ในลักษณะเดียวกันนี้ในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ พลาสโมเดียม ฆาบอดี AS(Pr_1) จะปรากฏเฉพาะเมื่อทำให้เซลล์อยู่ในสภาวะขาดอาหารแล้วเท่านั้น (รูปที่ 25 ค.) ในสภาวะปกติจะไม่สามารถสังเกตเห็นความแตกต่างของการใช้แหล่งพลังงานระหว่างไพรูเวต หรือซัคซิเนตกับกลูโคสเลย Fitch และคณะ (1974) ทำการทดลองโดยใช้เซลล์ไม่ขาดอาหาร พบว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ พลาสโมเดียม เบอจิอาย ที่ต้านคลอโรควิน จะใช้ไพรูเวตเป็นแหล่งพลังงานสำหรับการนำเข้าได้เพียงบางส่วน (ประมาณ 30 เปอร์เซนต์) การศึกษาการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงควบคู่กับการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ในสภาวะเดียวกัน พบว่า ซัคซิเนตสามารถจะทำให้เซลล์แตกมากกว่าไพรูเวตและกลูโคสตามลำดับ ทั้งในเลือดติดเชื้อโคลน AS และAS(Pr_1) ไม่ว่าเซลล์จะอยู่ในสภาพขาดอาหารหรือไม่ก็ตาม โดยการแตกตัวของ

เซลล์ในเลือดติดเชื้อโคลน AS ยังคงมีค่ามากกว่าเลือดติดเชื้อ AS(Pr_1) และเป็นที่น่าสังเกตว่าเซลล์ที่ผ่านขั้นตอนการทำให้ขาดอาหารจะแตกตัวเพิ่มขึ้นเมื่อถูกผลกระทบจากสภาวะการทดลอง (รูปที่ 24 ข., ง. และ รูปที่ 25 ข., ง.) อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์ผลกระทบของการแตกตัวของเซลล์ควบคู่กับการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine เพื่อยืนยันความเชื่อถือได้ของผลการทดลองการนำเข้า ข้อมูลที่แสดงในรูปที่ 24 และ 25 ชี้บ่งว่า สัดส่วนการแตกตัวของเซลล์เมื่ออินคิวเบตในมีเดียมของการนำเข้าที่มีซัคซิเนตหรือไพรูเวต ต่อค่าการแตกตัวในมีเดียมที่มีกลูโคสจะไม่ต่างกันมากนัก โดยสัดส่วนดังกล่าวใกล้เคียงกับสัดส่วนการลดลงของค่าการนำเข้า ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine เมื่อใช้ซัคซิเนตและไพรูเวตเป็นแหล่งพลังงาน ที่พบว่ามีค่าต่ำลงกว่าเมื่อใช้กลูโคสนั้น จะเป็นผลเนื่องจากความแตกต่างอันเป็นผลจากการที่เซลล์มีการแตกตัวสูงกว่า นั่นคือเซลล์ติดเชื้ออาจจะใช้ซัคซิเนตหรือไพรูเวตเป็นแหล่งพลังงานได้ดีพอ ๆ กับกลูโคสก็เป็นได้ นอกจากนี้ในทุกการทดลองของงานวิจัยหัวข้อนี้ยังได้ทำการวัด pH ของมีเดียมที่มีไพรูเวตหรือซัคซิเนตแทนกลูโคสเทียบกับมีเดียมที่มีกลูโคส พบว่าค่าที่ได้ไม่แตกต่างจากเมื่อมีกลูโคสในมีเดียม คือ มีค่าประมาณ pH7.4 แสดงให้เห็นว่าการแตกตัวของเซลล์นั้นมิได้เป็นผลเนื่องจากความเป็นกรดของซัคซิเนตหรือไพรูเวตเอง

เมื่อศึกษาผลกระทบของสารยับยั้งการสร้างพลังงานของเซลล์ต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ได้แก่ 2,4-ไดไนโตรฟีนอล (ยับยั้งการสร้างพลังงานจาก coupling reaction ในออกซิเดทีฟฟอสฟอริเลชัน) โซเดียมฟลูออไรด์ (ยับยั้งขบวนการไกลโคไลซิส) และโซเดียมอาร์ซิเนต (ยับยั้งการสะสมพลังงานในรูปของสารประกอบพันธะฟอสเฟต โดยอาร์ซิเนตอิออนยับยั้งแบบแข่งขันกับฟอสเฟตอิออน) โดยทำการทดลอบกับเซลล์ที่ขาดอาหารพบว่าการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ <u>พลาสโมเดียม ฆาบอดี</u> AS และ AS(Pr_1) ที่ขาดอาหารจะลดลงเมื่อได้รับผลกระทบจาก 2,4-ไดไนโตรฟีนอลความเข้มข้นเพียง 1 มิลลิโมลาร์ และผลยับยั้งนี้จะหักล้างได้ด้วยกลูโคสความเข้มข้นสูงถึง 100 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 26 ค., จ.) ตรงกันข้ามโซเดียมฟลูออไรด์ความเข้มข้นเท่ากัน (1 มิลลิโมลาร์) จะไม่มีผลกระทบแต่อย่างใดต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อพลาสโมเดียม (รูปที่ 27 ค., จ.) แสดงให้เห็นว่าพลังงานที่มีบทบาทต่อการนำเข้าในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อน่าจะได้มาจากออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชัน ไม่ใช่จากไกลโคไลซิสหรือแม้แต่จากการขับเคลื่อนโซเดียม-โปแตสเซียมผ่านเยื่อเซลล์ (บทวิจารณ์เกี่ยวกับผลของโซเดียม-

คลอไรด์และโปแตสเซียมคลอไรด์ต่อการนำเข้า) อย่างไรก็ตามโซเดียมอาร์ซีเนต ซึ่งเป็นสาร ยับยั้งการสร้างสารประกอบฟันธะฟอสเฟตในทุกขบวนการกลับไม่มีผลกระทบต่อการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine แม้จะใช้ความเข้มข้นสูงถึง 60 มิลลิโมลาร์ก็ตาม (รูปที่ 28 ค.,จ.) Horne และคณะ (1978) รายงานว่า ความสามารถของโซเดียมอาร์ซีเนตต่อการยับยั้งการนำเข้าของ 5-เมทธิลเตตระไฮโดรโฟเลตในเซลล์ตับจะต่ำกว่า 2,4-ไดไนโตรฟีนอลประมาณ 6 เท่า เมื่อศึกษาการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ในเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติ ไม่ปรากฏว่าถูกผลกระทบจากสารยับยั้งชนิดใดชนิดหนึ่งอย่างตันเลย (รูปที่ 26 ก., 27 ก. และ 28 ก.) สำหรับผลการวัดจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงที่แตกตัวระหว่างทำการทดลอง พบว่าเซลล์ในเลือดติดเชื้อ พลาสโมเดียม ฆาบอดี AS แตกตัวมากกว่าเลือดติดเชื้อโคลน AS(Pr_1) เล็กน้อย และเลือดติดเชื้อจะแตกตัวมากกว่าเลือดปกติอย่างเห็นได้ชัด เมื่อวิเคราะห์ค่าการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงควบคู่กับการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine เพื่อยืนยันความเชื่อถือได้ของผลการทดลองที่พบว่า 2,4-ไดไนโตรฟีนอลมีผลยับยั้งการสร้างพลังงานจากแหล่งพลังงานภายนอกเซลล์คือ กลูโคส ทำให้ปริมาณการนำเข้าลดลงในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ ปรากฏว่า แม้การมีสารยับยั้งอยู่ในมีเดียมของการนำเข้าจะทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่จากผลกระทบของโซเดียมฟลูออไรด์ซึ่งจะทำให้เซลล์แตกตัวมากกว่าผลของ 2,4-ไดไนโตรฟีนอลโดยที่ไม่พบว่า เป็นผลลดปริมาณการนำเข้าแต่อย่างใด จึงเชื่อว่าการที่ 2,4-ไดไนโตรฟีนอลมีผลทำให้ค่าการนำเข้าต่ำลง น่าจะเนื่องมาจากผลกระทบต่อขบวนการสร้างพลังงานของเซลล์เองเป็นสำคัญ

การศึกษาเกี่ยวกับบทบาทของพลังงานต่อการนำเข้าของไพริเมธามีนไม่ว่าจะเป็นการศึกษาผลกระทบของสารที่เป็นแหล่งพลังงาน หรือ ผลกระทบของสารยับยั้งการสร้างพลังงานของเซลล์ ผลการทดลองบางส่วนแสดงให้เห็นชัดเจนว่า พลังงานน่าจะมีบทบาทต่อการนำเข้าของไพริเมธามีน แต่ยังไม่อาจบอกได้ว่าเกี่ยวข้องโดยตรงต่อวิถีการนำไพริเมธามีนเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ พลาสโมเดียม ฆาบอดี หรือเพียงช่วยในการสะสมไพริเมธามีนไว้ในเซลล์ Seed และ Kreier (1972) รายงานว่า เอนไซม์อะดีนีนไตรฟอสฟาเตส (ATP_{ase}) ที่เยื่อเซลล์เม็ดเลือดแดงซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ ATP จาก coupling reaction ของขบวนการออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชันจะสูญเสียแอคติวิตีอย่างสมบูรณ์ เมื่อเซลล์เม็ดเลือดแดงเป็ดติดเชื้อ พลาสโมเดียม กัลลิเนเซียม

ผลการศึกษาการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงควบคู่กับการทดลองการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine แสดงให้เห็นว่า เซลล์ในเลือดติดเชื้อพลาสโมเดียม ฆาบอดี AS จะแตกตัวที่สภาวะการทดลองต่าง ๆ ได้ง่ายกว่าเลือดติดเชื้อโคลน AS(Pr_1) และเซลล์ในเลือดติดเชื้อทั้ง 2 โคลนจะแตกตัวมากกว่าเซลล์ในเลือดปกติ ยิ่งไปกว่านั้นยังพบอีกว่าความเข้มข้นของ ^{14}C-pyrimethamine ที่ใช้ในการทดลอง (2-30 นาโนโมลาร์) จะไม่มีส่วนร่วมในการทำให้เซลล์แตกตัวเพิ่มขึ้นหรือน้อยลง ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาเบื้องต้นที่แสดงเปรียบเทียบถึงความเปราะของเซลล์ต่อแรงดันออสโมติคในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ กัน (ภาคผนวกที่ 2)

รายงานการศึกษาที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งสำหรับความเป็นไปได้ของวิถีการนำไพริเมธามีนเข้าเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติและเม็ดเลือดแดงติดเชื้อ คือ ที่เยื่อเซลล์เม็ดเลือดแดงมีโครงสร้างเชิงซ้อนของโปรตีนสเปคตริน (spectrin) เรียกว่าเพอร์มิเอฟอร์ (permeaphore) (Pinta da Silva และ Nicolson, 1974) ซึ่งเป็นผลทำให้เกิดรูขึ้นที่เยื่อเซลล์ ซึ่งเชื่อว่าเกี่ยวข้องกับขบวนการ simple diffusion ของน้ำและสารโมเลกุลโพลาร์ขนาดเล็ก (Nicolson, 1976) Seed และ Kreier (1980) รายงานว่าเมื่อเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อพลาสโมเดียม จะมีการเปลี่ยนแปลงจำนวน โครงสร้าง และการเรียงตัวของสเปคตริน (รูปที่ 53) ซึ่งเป็นไปได้ว่าอาจจะเป็นผลให้โครงสร้างเพอร์มิเอฟอร์แตกต่างไปจากเดิม อันอาจเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงกลไกหรือคุณสมบัติของวิถีนำเข้าของไพริเมธามีนเมื่อเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ พลาสโมเดียม ฆาบอดี AS หรือเมื่อติดเชื้อที่ต้านไพริเมธามีนสูงขึ้น คือ พลาสโมเดียม ฆาบอดี AS(Pr_1) ก็เป็นได้

การศึกษาวิจัยผลกระทบของการต้านไพริเมธามีนต่อการนำเข้าของไพริเมธามีน พอจะสรุปเป็นหัวข้อได้ดังนี้

1. สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อ พลาสโมเดียม ฆาบอดี AS และ AS(Pr_1) ที่มีความไวต่อไพริเมธามีน 15 และ 30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวในหนูไมซ์ ได้เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในเม็ดเลือดแดงของหนูสูงถึง 45-60 เปอร์เซ็นต์ (เม็ดเลือดแดงติดเชื้อเริ่มต้น 10^8 เซลล์) ในเวลา 5 วัน ณ สภาวะการให้แสงสว่างสลับกับความมืด 12 ชั่วโมง เซลล์ที่เก็บเกี่ยวได้หลังจากการเพาะเลี้ยงครบ 5 วงชีพส่วนใหญ่จะเป็นระยะการเจริญโทรโฟซอยต์ตอนปลายปนกับไซซอนต์ตอนต้น

2. ได้พัฒนาวิธีการและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการนำ ^{14}C-pyrimethamine เข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงปกติ และติดเชื้อพลาสโมเดียมขึ้นใหม่ พบว่า วิธีการที่เหมาะสมคือ อินคิวเบต ^{14}C-pyrimethamine (2-30 นาโนโมลาร์) กับเม็ดเลือดแดงในสารละลายฮีพส์บัฟเฟอร์ซาลีน pH 7.4 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที เมื่อใช้ความหนาแน่นของเซลล์ไม่เกิน 3 x 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตรมีเดียม ซึ่งในสภาวะดังกล่าวจะไม่มีผลทำให้เซลล์ผิดปกติ คือ ยังสามารถเจริญในเซลล์เจ้าเรือนได้อย่างปกติ

3. ได้ดัดแปลงวิธีการวัดปริมาณ ^{14}C-pyrimethamine ในเซลล์ติดเชื้อพลาสโมเดียม จากวิธีที่ใช้อยู่เดิม คือ สกัดด้วยกรดแลคติคกับกรดไตรคลอโรอะซีติค มาใช้สกัดด้วยเอทธานอล พบว่า วิธีซึ่งพัฒนาขึ้นให้ผลดีมีค่า % recovery ของการสกัดเกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ และมีความแม่นยำสูง (สัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของค่าที่วัดได้ ประมาณ 6 เปอร์เซ็นต์) เมื่อใช้วิธีดังกล่าวจะสามารถวัดปริมาณ ^{14}C-pyrimethamine ที่ถูกนำเข้าเซลล์ได้สูงกว่าวิธีการใช้กรดแลคติคประมาณ 2 เท่าตัว

4. เซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ <u>พลาสโมเดียม ฆาบอดี</u> AS จะนำ ^{14}C-pyrimethamine เข้าเซลล์ได้เร็วและสูงกว่า เซลล์ติดเชื้อพลาสโมเดียม AS(Pr_1) ค่าเฉลี่ยของการนำ ^{14}C-pyrimethamine เข้าเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติสูงสุดที่ความเข้มข้นของ ^{14}C-pyrimethamine 30 นาโนโมลาร์ จะมีค่าต่ำกว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อโคลน AS (Pr_1) และ AS 3.5 และ 9 เท่าตามลำดับ ค่าการนำเข้าสัมบูรณ์ของเซลล์ติดเชื้อจะแปรเปลี่ยนไปขึ้นกับลักษณะการติดเชื้อแบบ multi-infection ของเซลล์ตัวอย่างที่ใช้ทดลองแต่ละครั้ง

5. คุณลักษณะการนำ ^{14}C-pyrimethamine เข้าเซลล์เมื่อใช้ความเข้มข้นต่าง ๆ กันระหว่าง 2-30 นาโนโมลาร์:

5.1 เซลล์เม็ดเลือดแดงปกติจะเป็นแบบอิ่มตัว (K_m 7.9 $\pm$ 0.1 นาโนโมลาร์) ความแตกต่างของคุณลักษณะและปริมาณนำเข้าเมื่อศึกษาปัจจัยกระทบต่าง ๆ เช่นอุณหภูมิ pH สารยับยั้งการสร้างพลังงาน ฯลฯ จะไม่สามารถเห็นได้ชัดมากนักเนื่องจากการนำเข้ามีค่าต่ำมาก

5.2 เซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ <u>พลาสโมเดียม ฆาบอดี</u> AS จะเป็นแบบกึ่งอิ่มตัวกึ่งแปรตามความเข้มข้นของ ^{14}C-pyrimethamine (K_m 3.9 $\pm$ 0.7 นาโนโมลาร์)

ปริมาณการนำ ^{14}C-pyrimethamine เข้าเซลล์จะเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิจาก 2-37 องศา เซลเซียส และขึ้นกับ pH โดยมีค่า pH ของการนำเข้าสูงสุดระหว่าง 7.4 - 8.1 นอกจากนี้กรดโฟลิคความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์จะช่วยเสริมให้มีการนำ ^{14}C-pyrimethamine เข้าเซลล์ได้สูงขึ้น

5.3 เซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ <u>พลาสโมเดียม ฆ้าบอดี</u> AS(Pr_1) จะเป็นแบบกึ่งอิ่มตัวกึ่งแปรตามความเข้มข้นของ ^{14}C-pyrimethamine (K_m 6.3 $\pm$ 0.9 นาโนโมลาร์) การนำเข้าจะเกิดได้ดีที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ซึ่งไม่ต่างกับที่อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียสมากนัก โดยค่าการนำเข้าที่ 37 องศาเซลเซียสจะมีค่าต่ำกว่าเล็กน้อย ค่า pH ที่มีการนำเข้าได้สูงสุดคือ pH 7.0 นอกจากนี้กรดโฟลิคความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์จะไม่มีผลกระทบต่อการนำ ^{14}C-pyrimethamine เข้าเซลล์เลย

6. การศึกษาปัจจัยกระทบต่อการสร้างพลังงานของเซลล์ให้ผลว่า เซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อทั้งสองโคลนสามารถใช้กลูโคสเป็นแหล่งของพลังงานได้ดีกว่าไพรูเวตและซัคซีเนต และผลการทดลอง เมื่อใช้สารยับยั้งการสร้างพลังงาน ได้แก่ 2,4-ไดไนโตรฟีนอล ฟลูออไรด์ และอาร์ซีเนต แสดงแนวโน้มว่า การนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine ในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อพลาสโมเดียมใช้พลังงานจากขบวนการออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชัน มากกว่าไกลโคไลซีส

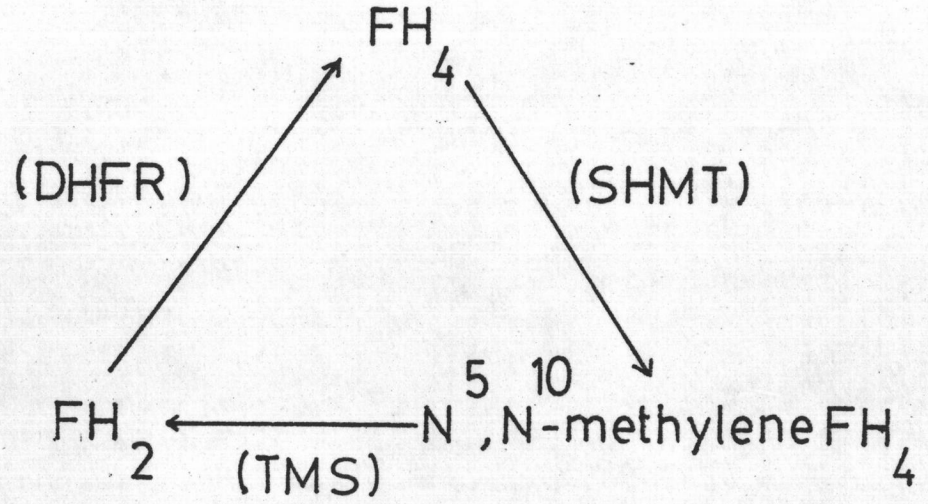
7. เซลล์เม็ดเลือดแดงในเลือดติดเชื้อ <u>พลาสโมเดียม ฆ้าบอดี</u> AS แตกตัวได้ง่ายกว่าเลือดติดเชื้อโคลน AS(Pr_1) และเซลล์เม็ดเลือดแดงในเลือดติดเชื้อแตกตัวมากกว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติ เมื่อติดตามการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงควบคู่กับการศึกษาการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine แสดงให้เห็นว่า การแตกตัวของเซลล์ไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของ ^{14}C-pyrimethamine ในช่วงที่ใช้ทดลองคือ 2-30 นาโนโมลาร์ แต่บางสภาวะการทดลอง เช่น สภาวะการทำให้เซลล์ขาดอาหาร และเฉพาะอย่างยิ่ง ผลของอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสหรือ pH เป็นกรด จะทำให้เซลล์แตกตัวมากผิดปกติ เมื่อวิเคราะห์การแตกตัวของเซลล์สัมพันธ์กับค่าการนำเข้า พบว่า โดยเฉลี่ยแล้ว การแตกตัวของเซลล์ไม่น่าจะเป็นเหตุสำคัญที่ทำให้ค่าการนำเข้าลดลง

จากข้อมูลทั้งหมดข้างต้นจึงคาดว่า วิถีการนำไพริเมธามีนเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงปกติน่าจะแตกต่างจากเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ <u>พลาสโมเดียม ฆ้าบอดี</u> ดังนี้ การนำไพริเมธามีนเข้าเซลล์จะเปลี่ยนจากการอาศัยขบวนการ carrier-mediated transport เพียงอย่างเดียว

มาเป็นอาศัยขบวนการ carrier-mediated transport ปนกับ simple diffusion โดยที่คุณลักษณะของการนำเข้าแบบ simple diffusion จะเห็นเด่นชัดขึ้น เมื่อเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อพลาสโมเดียม ย่าบอดี ซึ่งต้านไพริเมธามีนสูงขึ้นคือ โคลน AS(Pr_1) ส่วนการที่ผลการทดลองบางส่วนบ่งชี้ว่าพลังงานมีบทบาทต่อการนำเข้าของไพริเมธามีนในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อนั้น ยังมิอาจสรุปได้ว่า พลังงานถูกใช้ใน carrier-mediated transport โดยตรง หรือใช้ในการสะสมไพริเมธามีนไว้ในเซลล์

ความสามารถในการพัฒนาให้เกิดการต้านสารแอนติเมตาบอไลต์จำพวกแอนติโฟเลต เช่น เมทโธทรีเซต หรืออะมิธอพเทอริน (amithopterin) และอะมินอพเทอริน (aminopterin) ฯลฯ ได้รับความสนใจติดตามศึกษาและวิจัยกันอย่างกว้างขวางทั้งในเซลล์แบคทีเรียและเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์มะเร็ง ด้วยความคาดหวังว่าความเข้าใจถึงกลไกของการต้านยาของเซลล์เหล่านี้จะนำไปสู่การเพิ่มประสิทธิภาพของการใช้สารแอนติโฟเลตในการรักษาโรคมะเร็ง ลักษณะของกลไกการต้านยาแอนติโฟเลตที่พบโดยทั่วไปทั้งในเซลล์แบคทีเรียและเซลล์มะเร็ง คือ การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติบางประการที่เยื่อเซลล์ ซึ่งมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกระบวนการนำเข้าเซลล์ของเมทโธทรีเซตเป็นเหตุให้ ถูกนำเข้าสู่เซลล์ได้ลดน้อยลง (Braganea และคณะ, 1967 ; Divekar และคณะ,1967) นอกจากนี้ยังพบการเปลี่ยนแปลงของระดับตลอดจนคุณสมบัติทางจลน์ศาสตร์ของเอนไซม์เป้าหมาย (target enzyme) คือ ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส โดยพบว่าปริมาณไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสจะเพิ่มขึ้นในเซลล์ซึ่งมีความสามารถต้านอะมิธอพเทอรินหรืออะมินอพเทอริน บางครั้งเป็นร้อยเท่าของเซลล์ปกติ (Fischer, 1962 ; Hakala และคณะ 1961 ; Misra และคณะ , 1961) จากผลการทดลองข้างต้นที่แสดงให้เห็นชัดเจนว่าในเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อพลาสโมเดียม ย่าบอดี AS ซึ่งเป็นโคลนต้านไพริเมธามีน (in vivo) ต่ำกว่าเชื้อพลาสโมเดียม ย่าบอดี AS(Pr_1) 2 เท่าตัว (รูปที่ 8 และ 9) จะมีการนำเข้าของ ^{14}C-pyrimethamine in vitro สูงกว่าประมาณ 2.5 เท่า นอกจากนี้กระบวนการนำไพริเมธามีนเข้าเซลล์ก็แตกต่างไปจากกันอย่างเห็นได้ชัด ดังนั้นจึงเชื่อว่าน่าจะมีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของเอนไซม์บางตัวในขบวนการเมตาบอลิสมของโคเอนไซม์โฟเลต โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส ซึ่งเชื่อว่าเป็นเอนไซม์เป้าหมายการออกฤทธิ์ของไพริเมธามีนในเชื้อพลาสโมเดียม (ยังผลให้ไพริเมธามีนสามารถใช้เป็นสารยับยั้งการเจริญของพลาสโมเดียมได้) นอกจากนี้

Platzer (1972) ได้เสนอสมมติฐานของการสังเคราะห์ไธมิดิลเลต ซึ่งเป็นสารตั้นตอของการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิคขึ้นในพลาสโมเดียม โลฟูเร ว่าน่าจะมีความสัมพันธ์กันเป็นวัฏจักรของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องอย่างน้อย 3 ชนิด คือ ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส, เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทรานสเฟอเรส และไธมิดิลเลต ซินเตส (ตามรูปที่ 54)



DHFR = dihydrofolate reductase

SHMT = serine hydroxymethyltransferase

TMS = thymidylate synthase

รูปที่ 54 สมมติฐานวัฏจักรการสังเคราะห์ไธมิดิลเลตในพลาสโมเดียม (Platzer, 1972)

Ferone และ Roland (1980) ได้รายงานว่าเอนไซม์ไธมิดิลเลต ซินเตส และไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส น่าจะเป็นเอนไซม์ที่รวมกันอยู่ในรูปขององค์ประกอบโปรตีน (enzyme complex) ที่มีความสัมพันธ์ในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ทั้งคู่ และการต้านไพริเมธามีนจะมีผลกระทบต่อเอนไซม์ไธมิดิลเลต ซินเตส เช่นกันกับไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส ด้วย ดังนั้นจึงเป็นที่น่าศึกษาต่อไปอีกด้วยว่าหากมีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของเอนไซม์ทั้งสองชนิดที่เกี่ยวข้องในวัฏจักรการสังเคราะห์ไธมิดิลเลตนี้แล้ว น่าจะมีผลกระทบไม่โดยตรงก็ทางอ้อมต่อเอนไซม์อีกหนึ่งชนิดในวัฏจักรเดียวกัน คือ เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทรานสเฟอเรส

นอกจากนี้ Rollo (1955) ได้เสนอสมมติฐานว่าไพริเมธามีนและอนุพันธ์ของยาประเภทซัลฟา (sulfa drugs) หลายชนิด จะออกฤทธิ์เสริมกัน (synergism) ในการยับยั้งการเจริญของพลาสโมเดียม และการต้านไพริเมธามีนของ พลาสโมเดียม ฆาบอดี จะมีผลควบคู่กับการเปลี่ยนแปลงความไวของพลาสโมเดียมต่อยาซัลฟาได้ด้วย (Jacobs, 1964 ; Morgan, 1974 ; Macleod, 1978) แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ที่จะมีการทำงานเกี่ยวข้องกันของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสกับเอนไซม์เป้าหมายของยาซัลฟาคือ ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตสในการควบคุม (regulation) เมตาบอลิสมของโคเอนไซม์โฟเลต ในการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะครอบคลุมไปถึงการศึกษาผลกระทบของการต้านไพริเมธามีนต่อเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตสควบคู่ไปด้วย

ขั้นแรกของการศึกษาผลกระทบของการต้านไพริเมธามีนต่อเอนไซม์ในงานวิจัยนี้ คือ ศึกษาเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงปริมาณเอนไซม์ซึ่งถูกสังเคราะห์ขึ้นในเซลล์พลาสโมเดียม ฆาบอดี AS และ AS(Pr_1) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาวิธีแยกเอาเฉพาะเซลล์ของพลาสโมเดียมออกจากเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อให้ได้เสียก่อน วิธีที่นิยมใช้กันสำหรับการแยกพลาสโมเดียมอิสระ (erythrocyte-free parasite) ทั่ว ๆ ไป คือ ทำลายเยื่อเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อด้วยสารละลายซาโปนิน (saponin) และแยกเอาเฉพาะเซลล์พลาสโมเดียมอิสระออกมาใช้ต่อไป (Ferone และคณะ , 1969 ; Kramer และ Matusik, 1971 ; Platzer และ Compuzano, 1976 ; Walter และ Konigk, 1980) เนื่องจากไม่มีรายงานยืนยันถึงสภาวะที่เหมาะสมของการแยกเซลล์พลาสโมเดียม ฆาบอดี อิสระจากเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อมาก่อน การวิจัยจึงจำเป็นต้องเริ่มด้วยการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมเซลล์พลาสโมเดียมอิสระโดยดัดแปลงจากวิธีของ Kramer และ Matusik (1971) ด้วยการใช้สารละลาย 0.015 เปอร์เซ็นต์ซาโปนิน การทดลองได้ติดตามศึกษาสภาวะการแยกเซลล์พลาสโมเดียม จากเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ พลาสโมเดียม ฆาบอดี AS ในระหว่างการทำปฏิกิริยากับซาโปนิน โดยติดตามวัดปริมาณของโปรตีนและแอคติวิตีสุทธิ (total protein and activity) ของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสซึ่งทำได้ง่ายและรวดเร็ว ผลการทดลองปรากฏว่าเมื่อใช้เซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อโคลน AS 1 เป็นแม่แบบ อินคิวเบตกับสารละลาย 0.015 เปอร์เซ็นต์ซาโปนินนาน 2 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณโปรตีนทั้งหมดของเซลล์จะลดลงประมาณเกือบ 99 เปอร์เซ็นต์ หลังจากอินคิวเบตต่อไปถึง

10 นาที ปรากฏว่าปริมาณโปรตีนที่วัดได้จะลดลงไปอีกบางเล็กน้อยเท่านั้น ในขณะที่ค่าแอคติวิตีสุทธิจะยังคงที่จนถึงนาทีที่สิบ ซึ่งมีผลให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงขึ้นเล็กน้อย หลังจากนั้นค่าโปรตีนและแอคติวิตีสุทธิจะลดลงอย่างรวดเร็ว จากผลการทดลองนี้จึงอนุมานได้ว่า การทำลายเยื่อเซลล์ด้วยซาโปนินนั้นน่าจะเกิดเป็น 2 ช่วง คือ ช่วงแรกเมื่ออินคิวเบตเซลล์เม็ดเลือดแดงกับ สารละลาย 0.015 เปอร์เซ็นต์ซาโปนินนานไม่เกิน 10 นาที จะเป็นระยะการทำลายเยื่อเซลล์เม็ดเลือดแดงเป็นส่วนใหญ่ โดยที่เซลล์พลาสโมเดียมจะยังคงอยู่ในสภาพปกติดี (intact cell) แต่หลังจาก 10 นาที ไปแล้ว ซาโปนินจะเริ่มออกฤทธิ์ต่อเยื่อเซลล์ของพลาสโมเดียม ทำให้เซลล์แตก ซึ่งการสูญเสียทั้งโปรตีนและแอคติวิตีของเอนไซม์ในพลาสโมเดียมจะเกิดขึ้นในช่วงที่สองนี้เอง ผลการทดลองในรูปที่ 29 ยังแสดงให้เห็นอีกว่า เมื่อเยื่อเซลล์ของพลาสโมเดียมเริ่มจะถูกทำลายด้วยซาโปนินที่ใช้นั้น (อินคิวเบตนานมากกว่า 10 นาทีเล็กน้อย) อาจจะยังมีโปรตีนจากเซลล์เม็ดเลือดแดงปะปนอยู่บ้าง เฉพาะอย่างยิ่งฮีโมโกลบิน สังเกตได้จากค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์มีค่าต่ำแต่เมื่อเพิ่มเวลาให้ซาโปนินทำปฏิกิริยานานขึ้นถึง 20 นาที ค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส จึงจะเริ่มมีค่าสูงสุด อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มเวลาการกำจัดฮีโมโกลบินที่ปะปนออกโดยอินคิวเบตเซลล์กับซาโปนินนานมากกว่า 20 นาที (คือ 30 และ 40 นาที ตามลำดับ) กลับพบว่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์มีค่าลดลง เป็นการสนับสนุนถึงผลกระทบของซาโปนินต่อเยื่อเซลล์พลาสโมเดียมอิสระ ทำให้มีการสูญเสียโปรตีนและแอคติวิตีของเอนไซม์ไปพร้อมกับเซลล์พลาสโมเดียมอิสระส่วนที่เยื่อเซลล์ถูกทำลายด้วยซาโปนิน โดยค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ที่ลดลงอาจเป็นเพราะสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้จากการทำปฏิกิริยาของ 1 เปอร์เซ็นต์ไตรตอน X-100 นั้นมีโปรตีนจากเศษเยื่อเซลล์ (cell debris) ของพลาสโมเดียมดังกล่าวปะปนอยู่บ้างบางส่วน ในการทดลองศึกษาเปรียบเทียบเอนไซม์แต่ละชนิดในการวิจัยนี้จึงใช้วิธีกำจัดส่วนของเซลล์เม็ดเลือดแดงเพื่อให้ได้เซลล์พลาสโมเดียมอิสระโดยใช้สารละลาย 0.015 เปอร์เซ็นต์ซาโปนิน 10 นาที ซึ่งถึงแม้จะไม่ใช่สภาวะที่ให้เอนไซม์ที่ปราศจากโปรตีนของเซลล์เม็ดเลือดแดงอย่างสมบูรณ์ แต่ก็จะเป็นสภาวะที่ไม่มีการสูญเสียเซลล์พลาสโมเดียมเลย ดังนั้นจึงสามารถนับจำนวนเซลล์พลาสโมเดียมได้โดยอาศัยค่าที่ได้จากการติดตามลักษณะของการติดเชื้อของพลาสโมเดียมแบบต่าง ๆ (multi-infection) และจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อตามวิธีข้อ 3.7 แม้ในการวิจัยจะมิได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการเตรียมเซลล์พลาสโมเดียมอิสระ จากเลือด

ติดเชื้อพลาสโมเดียม ฆาบอดี AS(Pr_1) แต่จากผลการศึกษาเบื้องต้นที่แสดงว่า เยื่อเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อโคลน AS(Pr_1) จะทนทานต่อการถูกทำลายมากกว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อโคลน AS ดังนั้นการอินคิวเบตเลือดติดเชื้อพลาสโมเดียม ฆาบอดี AS(Pr_1) กับสารละลาย 0.015 เปอร์เซ็นต์ ซาโปนินที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที จึงน่าจะเป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเซลล์พลาสโมเดียมอิสระ ของพลาสโมเดียม ฆาบอดี AS (Pr_1) โดยที่เซลล์ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงเช่นกัน

ในการวิจัยนี้จะมีข้อสังเกตที่สำคัญมากประการหนึ่งคือการศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติต่าง ๆ ของเอนไซม์ทั้ง 3ชนิด ได้แก่ ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส , เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิล-ทรานสเฟอเรส และไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส นั้นจะเป็นการเปรียบเทียบคุณสมบัติในสภาวะของเอนไซม์ที่แยกออกมาจากพลาสโมเดียมโดยไม่ทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเลย (crude enzyme) โดยตั้งจุดมุ่งหวังว่าสภาวะที่ใช้ศึกษานี้น่าจะเป็นสภาวะของเอนไซม์ที่คงอยู่ในสภาพเช่นนี้ ภายในเซลล์ของพลาสโมเดียมจริง ๆ หรือใกล้เคียง และในสภาพธรรมชาตินั้นการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้จะถูกผลกระทบของปัจจัยต่าง ๆ ต่อคุณสมบัติของเอนไซม์แต่ละชนิดเท่าที่เป็นจริง ซึ่งผลการทดลองอาจให้คุณสมบัติบางประการของเอนไซม์แตกต่างจากค่าที่ได้รับ หากมีการทำให้เอนไซม์เหล่านี้บริสุทธิ์มากขึ้น และมีผลกระทบจากปฏิกิริยาข้างเคียงลดน้อยลง แต่อย่างไรก็ตามค่าที่ได้นี้จะเป็นค่าที่เหมาะสมสำหรับการเปรียบเทียบความแตกต่างของคุณสมบัติของเอนไซม์ที่แยกได้จากโคลนของพลาสโมเดียมที่มีความสามารถในการต้านยาต่างกัน เพื่อประโยชน์ในการเข้าใจถึงสภาวะการควบคุมของเอนไซม์ในขบวนการเมตา-บอลิสมของโคเอนไซม์โฟเลตของพลาสโมเดียม ฆาบอดี ในสภาพใกล้เคียงกับสภาวะ in vivo ให้มากที่สุด นอกจากนี้การศึกษาเอนไซม์ในสภาวะที่ไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์นี้จะไม่ก่อให้เกิดการสูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์ การศึกษาเปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์ทั้งหมดที่สังเคราะห์ขึ้นภายในเซลล์พลาสโมเดียมจึงน่าจะทำให้ได้ค่าซึ่งไม่แตกต่างจากค่าแท้จริงของ in vivo มากนักเช่นกัน

ผลการทดสอบความเสถียร (stability) ของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส แสดงให้เห็นว่า (รูปที่ 30) เอนไซม์จากพลาสโมเดียม ฆาบอดี AS และ AS(Pr_1) จะไม่สูญเสียแอคติวิตีภายในเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อเก็บรักษาสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยมี 2-เมอร์เคพโตเอทธานอลเป็นสารรักษาสภาพรีดิวซ์ของหมู่ซัลฟ์ไฮดริล

(sulfhydryl group) ที่ตำแหน่งเร่งปฏิกิริยา (active site) ของเอนไซม์ ดังนั้น การเตรียมการทดลองแต่ละครั้งจะทำการศึกษาให้เสร็จภายในเวลาไม่เกิน 2-3 ชั่วโมง พร้อมทั้งตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ควบคุมเป็นระยะ ๆ

จากรายงานการศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด พบว่า แอคติวิตีของเอนไซม์จะถูกกระตุ้นด้วยเกลือคลอไรด์ของโลหะอัลคาไลน์อิออน หรืออิออนของโลหะอัลคาไลน์เอง ที่สำคัญคือโปแตสเซียมอิออน (Bertino, 1962 ; Kaufman, 1963 ; Bertino และคณะ , 1965 ; Greenberg และคณะ , 1976) เชื่อว่าอิออนเหล่านี้จะมีผลทำให้สับสเตรตจับกับเอนไซม์ได้ดีขึ้น ตรงกันข้ามเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเตสจากสิ่งมีชีวิตบางชนิดไม่พบว่าต้องการโปแตสเซียมอิออนเป็นโคแฟคเตอร์เพื่อช่วยเร่งปฏิกิริยาแต่อย่างใด (Nixon และ Blakeley, 1968)

ผลการวิจัยเมื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบผลกระทบของโปแตสเซียมคลอไรด์ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส ที่แยกจากพลาสโมเดียม ย่าบอดี AS และ AS(Pr_1) พบว่า (รูปที่ 31) เอนไซม์จากเชื้อโคลน AS(Pr_1) จะเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนไดไฮโดรโฟเลตเป็นเตตระไฮโดรโฟเลตได้สูงสุดโดยไม่ต้องการโปแตสเซียมคลอไรด์ ในขณะที่แอคติวิตีของเอนไซม์เดียวกันในเชื้อโคลน ASจำเป็นต้องใช้โปแตสเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ขึ้นไปจึงจะมีแอคติวิตีสูงสุด ผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับ ที่รายงานโดย Ferone (1969) Ferone และ O'Shea (1970) ว่า เอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสที่พบในพลาสโมเดียม เบอจิอาย ซึ่งไม่มีคุณสมบัติการต้านไพริเมธามีนเลย จะเร่งปฏิกิริยาได้เต็มที่ต่อเมื่อมีโปแตสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นสูงถึง 0.15 โมลาร์ อาจเป็นไปได้ว่าการลดความต้องการของโปแตสเซียมคลอไรด์ในการเร่งปฏิกิริยาของไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส ในโคลนซึ่งต้านไพริเมธามีนสูงอาจเป็นคุณสมบัติประการหนึ่งของการพัฒนาการต้านไพริเมธามีนของพลาสโมเดียม ย่าบอดี และยังเป็นการแสดงให้เห็นต่อไปว่า น่าจะมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสามมิติ (conformation) ของโมเลกุลของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสเอง เมื่อพลาสโมเดียมต้านไพริเมธามีนสูงขึ้น ซึ่งเป็นผลให้ตำแหน่งเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงเพื่อหลีกเลี่ยงผลกระทบของไพริเมธามีนต่อเอนไซม์

ผลการศึกษาผลกระทบของชนิดบัฟเฟอร์ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส ตามรูปที่ 32 แสดงผลซึ่งสรุปได้ว่า ซิเตรตบัฟเฟอร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และทริส บัฟเฟอร์ (ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์เท่ากัน) ที่ค่า pH เท่ากัน จะมีผลไม่ต่างกันต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ที่แยกได้จาก พลาสโมเดียม ฆาบอดี AS ตรงกันข้ามแอคติวิตีของเอนไซม์ที่พบในเชื้อโคลน AS(Pr_1) จะถูกยับยั้งโดยทริสบัฟเฟอร์อย่างชัดเจน จึงน่าจะเป็นการยืนยันอีกข้อหนึ่งว่าเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส ของเชื้อโคลน AS(Pr_1) มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสามมิติของ เอนไซม์จากเชื้อโคลน AS อย่างไรก็ตามเมื่อศึกษาเปรียบเทียบผลกระทบของ pH ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสจากเชื้อทั้ง 2 โคลน พบว่ารูปแบบของการเร่งปฏิกิริยาที่ pH ต่าง ๆ คล้ายคลึงกัน ตลอดจนถึง pH ที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาก็มีค่าใกล้เคียงกันคือประมาณ 5.9 ผลการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสที่เห็นเด่นชัดอีกข้อหนึ่งคือ เอนไซม์ที่พบในเชื้อโคลน AS(Pr_1) จะเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่อุณหภูมิสูงกว่าเอนไซม์เดียวกันของเชื้อโคลน AS ถึงประมาณ 10 องศาเซลเซียส คือ โคลน AS มีค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาอยู่ในช่วงระหว่าง 35-37 องศาเซลเซียส ในขณะที่โคลน AS(Pr_1) มีค่าอยู่ระหว่าง 45-50 องศาเซลเซียส และรูปแบบของกราฟ (รูปที่ 33) ก็แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์จากเชื้อ AS(Pr_1) มีแนวโน้มที่จะทนทานต่อการเกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิสูงได้มากกว่าเอนไซม์ที่แยกจากเชื้อโคลน AS

เมื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบความสามารถของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสจากพลาสโมเดียม ฆาบอดี AS และ AS(Pr_1) ในการจับกับสับสเตรตไดไฮโดรโฟเลตที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (pH ประมาณ 5.9) โดยดูจากค่า K_m ที่ได้จากการสร้างความสัมพันธ์ตามวิธี Lineweaver-Burk Plot พบว่า ค่า K_m ต่อไดไฮโดรโฟเลตของเอนไซม์ซึ่งสกัดจากเชื้อโคลน AS(Pr_1)จะต่ำกว่าค่าที่วัดได้เมื่อศึกษากับเอนไซม์เดียวกันในเชื้อโคลน AS ประมาณ 4 เท่า ผลการทดลองนี้ต่างกับงานของ Ferone (1969) ; Ferone และ O'Shea (1970) กับ Diggens และคณะ (1970) ซึ่งรายงานว่า พลาสโมเดียม เบอจิอาย และพลาสโมเดียม วิงกิอาย ที่ต้านไพริเมธามีนสูงประมาณ 100-600 เท่า จะมีค่า K_m ของไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสต่อไดไฮโดรโฟเลต เพิ่มขึ้นเป็น 10-20 เท่าของค่าที่วัดได้จากเอนไซม์ของเชื้อที่ไม่ต้านไพริเมธามีน อย่างไรก็ตามการหาค่า K_m ของเอนไซม์ที่ศึกษาในงานวิจัยนี้กระทำโดยการใช้เอนไซม์ที่ไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเลย จึงอาจเป็นไปได้ว่า การมี

เอนไซม์ปะปนอยู่หลายตัวทำให้เกิดปฏิกิริยาข้างเคียง ซึ่งส่งผลให้ค่าจลน์ศาสตร์ของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไปจากที่เป็นจริงได้บ้าง

ผลการทดลองที่น่าสนใจอย่างยิ่งอีกข้อหนึ่งในการศึกษาคุณสมบัติการต้านไพริเมธามีนของพลาสโมเดียม คือ การศึกษาผลกระทบโดยตรงของไพริเมธามีนต่อปฏิกิริยาที่ถูกเร่งโดยเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส ซึ่งเชื่อว่าเป็นเป้าหมายการออกฤทธิ์ของไพริเมธามีน เมื่อศึกษาเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นของไพริเมธามีนที่ทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงจากแอคติวิตีเริ่มต้น 50 เปอร์เซ็นต์ (ED_{50}) พบว่า เมื่อใช้เอนไซม์ แอคติวิตีเริ่มต้นเท่ากัน (7 หน่วย) ED_{50} ของไพริเมธามีนต่อเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส จากพลาสโมเดียม ฆ่าบอดี AS มีค่าต่ำกว่าค่าของเอนไซม์จากเชื้อโคลน AS(Pr_1) ประมาณ 9 เท่า แสดงให้เห็นว่าไพริเมธามีนจะมีผลกระทบต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส น้อยลงในเชื้อโคลน AS(Pr_1) นอกจากนี้ผลการทดลอง (รูปที่ 36 และ 37) ยังพบอีกว่า แอคติวิตีของเอนไซม์จากเชื้อโคลน AS จะลดลงเป็นสัดส่วนกับการเพิ่มความเข้มข้นของไพริเมธามีน แสดงว่าปฏิกิริยาการจับกันระหว่างไพริเมธามีนกับโมเลกุลของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส จะเป็น "stoichiometric equivalent" ตลอดช่วงความเข้มข้นของไพริเมธามีนที่ใช้ จาก 4-125 นาโนโมลาร์ เมื่อศึกษาความสามารถในการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส ที่แยกได้จากพลาสโมเดียม ฆ่าบอดี AS(Pr_1) จะต้องใช้ไพริเมธามีนสูงถึง 125 นาโนโมลาร์ จึงจะเริ่มมีผลต่อการยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่มีแอคติวิตีเท่ากันกับของเชื้อโคลน AS และเมื่อเพิ่มปริมาณไพริเมธามีนสูงขึ้นในช่วงต้น ซึ่งความเข้มข้นไม่เกิน 300 นาโนโมลาร์ การลดลงของแอคติวิตีของเอนไซม์จะเป็น stoichiometric equivalent กับไพริเมธามีนที่ใช้หลังจากนั้นเมื่อเพิ่มไพริเมธามีนจนความเข้มข้นสูงมากกว่า 331 นาโนโมลาร์ จะเห็นชัดเจนว่าการลดลงของแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสจาก พลาสโมเดียม ฆ่าบอดี AS(Pr_1)จะ non-stoichiometric equivalent กับไพริเมธามีน ค่า ED_{100} ของไพริเมธามีนที่ประมาณได้ จึงไม่น่าจะเป็นค่าที่ถูกต้องมากนัก แต่ก็พอจะเปรียบเทียบได้กับค่าของเอนไซม์ที่แยกได้จากเชื้อ พลาสโมเดียม ฆ่าบอดี AS การศึกษาผลกระทบของไพริเมธามีนต่อเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสในเชื้อ พลาสโมเดียม ฆ่าบอดี นี้สอดคล้องกับรายงานที่พบในพลาสโมเดียม เบอจิอาย และ พลาสโมเดียม วิงกิอาย (Ferone, 1969 ; Ferone และ O'shea, 1970 ; Diggens และคณะ , 1970) เมื่อพิจารณาลักษณะการยับยั้งของไพริเม-

ธามีนต่อเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส จาก พลาสโมเดียม ฆาบอดี AS(Pr_1) ซึ่งปรากฏว่าที่ไพริเมธามีนความเข้มข้นต่ำ ๆ การยับยั้งจะ stoichiometric equivalent กับไพริเมธามีนนั้น คาดว่า ตำแหน่งที่ไพริเมธามีนจับกับเอนไซม์คงเป็นตำแหน่งเดียวกับที่เอนไซม์จับกับไดไฮโดรโฟเลต แต่เมื่อความเข้มข้นของไพริเมธามีนสูงขึ้น ผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ว่า ไพริเมธามีนอาจจะจับกับตำแหน่งอื่นบนโมเลกุลของเอนไซม์ไดไฮโดร-โฟเลต รีดักเตสด้วย แต่ความสามารถในการจับกันต่ำกว่าตำแหน่งข้างต้น ซึ่งจะเท่ากับเป็นการลดผลกระทบของไพริเมธามีนต่อปริมาณเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสที่จะเร่งปฏิกิริยาได้ตามปกติ (available enzyme) หรืออาจเป็นไปได้ว่า ไพริเมธามีนที่ความเข้มข้นสูงนี้บางส่วนอาจไปจับกับมหโมเลกุลอื่น ๆ ที่มีอยู่ใน crude enzyme ทำให้เหลือปริมาณไพริเมธามีนที่จะไปยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสได้น้อยลง Fischer (1962) รายงานว่า ความเข้มข้นของเมทโธทรีเซต (ซึ่งเป็นสารแอนติโฟเลต) ที่สะสมในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนูไมซ์, L 5178 Y จะมีค่าสูงกว่าความเข้มข้นที่เป็น stoichiometric equivalent ของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส ที่พบในเซลล์ เป็นการแสดงว่าอาจมีสารมหโมเลกุลอื่น ๆ นอกจากไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสที่สามารถจับกับเมทโธทรีเซตได้ เช่นเดียวกัน

เมื่อศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการจับกันระหว่างไพริเมธามีนกับเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส โดยคำนวณหาค่าพารามิเตอร์ที่บอกถึงความสามารถในการจับกันระหว่างไพริเมธามีนกับเอนไซม์ในรูปของค่าคงที่ทางจลน์ศาสตร์ คือ ค่าคงที่ของการยับยั้ง (inhibition constant, K_i) โดยใช้ข้อมูลที่ได้จากการศึกษา ณ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (pH 5.9) และสร้างความสัมพันธ์เพื่อหาค่า K_i ตามแบบ Dixon Plot (รูปที่ 38 และ 39) พบว่าผลการทดลองให้ค่า K_i สอดคล้องกับค่า ED_{50} คือ K_i ของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสจากเชื้อ พลาสโมเดียม ฆาบอดี AS จะมีค่าต่ำกว่าที่วัดได้ของเอนไซม์จากเชื้อโคลน AS(Pr_1)(ประมาณ 5 เท่า) โดยจลน์ศาสตร์การยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส ด้วยไพริเมธามีนจะเปลี่ยนจากแบบไม่แข่งขัน (non-competitive) ของเอนไซม์จากเชื้อโคลน AS มาเป็นแบบแข่งขัน (competitive) ในเชื้อโคลน AS(Pr_1) ตามลำดับ ดังนั้นความแตกต่างของจลน์ศาสตร์การยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส ตลอดจนความแตกต่างของค่า ED_{50} ของเอนไซม์จากเชื้อโคลน AS และ AS(Pr_1)

รวมทั้งการเพิ่มขึ้นของค่า K_i หรืออีกนัยหนึ่งความสามารถในการจับกับไพริเมธามีนจะมีค่าต่ำลงเมื่อพลาสโมเดียมต้านไพริเมธามีนได้สูงขึ้น จึงเป็นการยืนยันถึงการปรับหรือเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสซึ่งคาดว่าเป็นเป้าหมายของไพริเมธามีน ในรูปแบบที่จะต่อต้านผลกระทบของยาเพื่อการอยู่รอดของเซลล์พลาสโมเดียม และแสดงออกโดยลักษณะของการต้านไพริเมธามีนนั่นเอง

Bertino และ David (1972) ได้รายงานว่าลักษณะการจับกันของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส ที่แยกจากเซลล์มะเร็งของหนูไมซ์, L 1210 กับเมทโธทรีเซต เป็นแบบ stoichiometric equivalent เช่นกัน และสามารถใช้ค่า stoichiometric equivalent ของเมทโธทรีเซต นี้วัดปริมาณเอนไซม์โดยติดตามการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสในเซลล์มะเร็งได้ด้วย Ferone และ O'Shea (1970) กับ Diggens และคณะ (1970) รายงานว่าค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสในพลาสโมเดียม เบอจิอาย และ พลาสโมเดียม วิงกิอาย ชนิดต้านไพริเมธามีนจะมีค่าสูงกว่าเอนไซม์ของเชื้อชนิดไม่ต้านไพริเมธามีนประมาณ 3-9 เท่า โดยที่ไม่มีรายงานเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่สังเคราะห์ขึ้นในเซลล์พลาสโมเดียมเลย ผลการทดลองดังกล่าวยังไม่สามารถจะชี้บ่งได้ว่า ค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นในเชื้อต้านไพริเมธามีนนั้น เป็นผลเนื่องจากการลดปริมาณการสังเคราะห์โปรตีนหรือการเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์ ในการวิจัยนี้ได้ทำการทดลองเปรียบเทียบแอคติวิตีสุทธิของเอนไซม์ที่สังเคราะห์ในเซลล์พลาสโมเดียม ฆาบอดี AS และ AS(Pr_1) ที่ทราบจำนวน (10^9 เซลล์) โดยวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส ภายใต้สภาวะการทดลองที่ทำให้ได้ค่าแอคติวิตีสูงสุด (maximum activity) ซึ่ง ณ สภาวะนี้จะไม่สามารถติดตามพบแอคติวิตีของเอนไซม์ใน crude enzyme ของเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติ ผลการทดลอง (ตารางที่ 6) ปรากฏว่าแอคติวิตีสุทธิของเอนไซม์ในเชื้อโคลน AS(Pr_1) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 34.8 $\pm$ 0.6 นาโนโมลของไดไฮโดรโฟเลตที่ถูกเปลี่ยนต่อนาทีต่อ 10^9 เซลล์ จะมากกว่าที่วัดได้ในเชื้อโคลน AS ซึ่งมีค่าเพียง 9.3 $\pm$ 0.2 นาโนโมลของไดไฮโดรโฟเลตที่ถูกเปลี่ยนต่อนาทีต่อ 10^9 เซลล์ อยู่ประมาณเกือบ 4 เท่า ค่าแอคติวิตีสุทธิของเอนไซม์ที่ต่างกันนี้อาจแสดงถึงความเป็นไปได้ที่จะมีความแตกต่างของแอคติวิตี หรือปริมาณเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสที่สังเคราะห์ขึ้นในเชื้อทั้งสองโคลน โดยที่อาจเป็นผลเนื่องจากสาเหตุหลายประการ เช่น เอนไซม์ในเชื้อ AS (Pr_1) อาจมีค่า turn over สูงกว่าเอนไซม์จากเชื้อ AS หรือครึ่งชีวิต (half-life) ของเอนไซม์อาจแตกต่างกันก็เป็นได้ เมื่อเปรียบเทียบค่าแอคติวิตีจำเพาะ

ของเอนไซม์ที่แยกจากเซลล์พลาสโมเดียมอิสระของเชื้อโคลน AS และ AS(Pr_1) ซึ่งเตรียมได้จากการทำปฏิกิริยาของเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อกับ 0.015 เปอร์เซ็นต์ ซาโปนินนาน 10 นาที พบว่าแอคติวิตีจำเพาะของไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสจากเชื้อทั้งสองโคลนจะไม่แตกต่างกันมากนัก (ตารางที่ 6) อย่างไรก็ตามค่าแอคติวิตีจำเพาะที่วัดได้จะไม่ใช่ค่าที่ถูกต้องเพราะไม่สามารถเตรียมเซลล์พลาสโมเดียมอิสระโดยปราศจากการปะปนของโปรตีนอื่นในเซลล์เม็ดเลือดแดงอย่างสิ้นเชิงได้ ผลการทดลองเปรียบเทียบเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสที่แยกได้จากเชื้อ<u>พลาสโมเดียม ฆาบอดี</u> AS และ AS(Pr_1) ได้รับการสรุปไว้ในตารางที่ 6 นับเป็นการยืนยันว่าเมื่อ <u>พลาสโมเดียม ฆาบอดี</u> มีการต้านยาเพิ่มขึ้นนั้น นอกจากมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะโครงสร้างของเยื่อเซลล์ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงกระบวนการนำไพริเมธามีนเข้าสู่เซลล์แล้ว ยังมีการเปลี่ยนคุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส จลน์ศาสตร์ของการยับยั้งโดยไพริเมธามีน รวมไปถึงการเปลี่ยนแปลงแอคติวิตีสุทธิของเอนไซม์ อีกทั้งยังเป็นไปได้ว่าใน <u>พลาสโมเดียม ฆาบอดี</u> ที่ต้านยาจะมีการเหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์โปรตีนใหม่ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาเช่นเดียวกับเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส ซึ่งจะพิสูจน์ได้ต่อเมื่อทำการศึกษาโดยใช้เอนไซม์ที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์

การศึกษาผลกระทบของการต้านไพริเมธามีนต่อเอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิล-ทรานสเฟอเรส กระทำในลักษณะคล้ายคลึงกับที่ศึกษาผลกระทบของการต้านไพริเมธามีนต่อเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส โดยไม่ทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์เช่นกัน เมื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการระหว่างเอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทรานสเฟอเรส ซึ่งสกัดจาก<u>พลาสโมเดียม ฆาบอดี</u> AS และ AS(Pr_1) พบว่า รูปแบบของผลกระทบของ pH ต่อความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จากเชื้อทั้ง 2 โคลน เมื่อใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์และทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ค่า pH ต่าง ๆ จาก 6.7 - 8.8 ไม่แตกต่างกัน โดยเอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทรานสเฟอเรสที่แยกได้จาก<u>พลาสโมเดียม ฆาบอดี</u> ทั้ง 2 โคลนจะเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ช่วง pHระหว่าง 8.0 - 8.8 และไม่พบว่ามีความแตกต่างของชนิดบัฟเฟอร์ต่อการทำงานของเอนไซม์ (รูปที่ 41) เช่นเดียวกับผลที่ได้จากการศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบของผลกระทบของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของเอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทรานสเฟอเรสซึ่งพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไม่ต่างกันคือ 50 องศาเซลเซียส

เพียงแต่เอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทรานส์เฟอเรส์ที่พบในเชื้อโคลน AS(Pr_1) จะเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ช่วงของอุณหภูมิกว้างกว่าโคลน AS เล็กน้อย (ประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส)

เมื่อศึกษาผลกระทบของความเข้มข้นของสับส์เตรตต่อความเร็วของปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่แยกได้จาก พลาส์โมเดียม ฆ่าบอดี AS และ AS(Pr_1) แล้วคำนวณค่าคงที่ทางจลน์-ค่าส์ตร์เปรียบเทียบกัน ปรากฏว่า ค่า K_m ของเอนไซม์ต่อสับส์เตรตกรดอะมิโนเซอรีน และเตตระไฮโดรโฟเลตที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส์ (pH ประมาณ 8.3) จะไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างเอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทรานส์เฟอเรส์จากเชื้อ พลาส์โมเดียม ฆ่าบอดี AS(Pr_1)กับโคลน AS คือ เอนไซม์จากเชื้อโคลน AS(Pr_1) จะให้ค่า K_m ต่อกรดอะมิโนเซอรีนเท่ากับ 0.45 $\pm$ 0.05 มิลลิโมลาร์ และ K_m ต่อเตตระไฮโดรโฟเลตเท่ากับ 0.13 $\pm$ 0.03 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่เอนไซม์เดียวกันในพลาส์โมเดียม ฆ่าบอดี AS ได้ค่า K_m ต่อกรดอะมิโนเซอรีนเท่ากับ 0.55 $\pm$ 0.08 มิลลิโมลาร์ และ K_m ต่อเตตระ-ไฮโดรโฟเลต เท่ากับ 0.10 $\pm$ 0.02 มิลลิโมลาร์

จากผลการศึกษาเปรียบเทียบคุณส์มบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิล-ทรานส์เฟอเรส์ แส์ดงให้เห็นว่า การต้านไพริเมธามีนใน พลาส์โมเดียม ฆ่าบอดี AS(Pr_1) ไม่น่าจะมีผลกระทบต่อโครงส์ร้างส์ามมิติของเอนไซม์ในส์่วนที่จะมีบทบาทต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยตรง อย่างไรก็ตามเมื่อศึกษาเปรียบเทียบแอคติวิตีสุ์ทธิของเอนไซม์ที่สังเคราะห์ขึ้นในเซลล์พลาส์โมเดียม 10^9 เซลล์ ในทำนองเดียวกับเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส์ จะเห็นได้ว่าแอคติวิตีสุ์ทธิของเอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทรานส์เฟอเรส์ซึ่งวัดได้ในเซลล์พลาส์โมเดียม ฆ่าบอดี AS(Pr_1) (12.1 $\pm$ 0.7 นาโนโมลของเตตระไฮโดรโฟเลตที่ถูกเปลี่ยนต่อนาทีต่อ 10^9 เซลล์) จะมีค่ามากกว่าในเชื้อโคลน AS (8.5 $\pm$ 0.3 นาโนโมลของเตตระไฮโดรโฟเลตที่ถูกเปลี่ยนต่อนาทีต่อ 10^9 เซลล์) ประมาณ 1.5 เท่า Platzer (1972) รายงานว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติของเป็ดจะมีเอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทรานส์เฟอเรส์ ในปริมาณใกล้เคียงกับที่พบในเซลล์ พลาส์โมเดียม โฟเร (เชื้อมาลาเรียของเป็ด) ในการวิจัยพบว่าวิธีการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทรานส์เฟอเรส์ที่ใช้ไม่สามารถวัดแอค-ติวิตีของเอนไซม์ใน Crude enzyme จากเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติได้ สำหรับการศึกษา

เปรียบเทียบค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างเอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิล-ทรานสเฟอเรสจาก*พลาสโมเดียม ฆาบอดี* AS และ AS(Pr_1) (ตารางที่ 7) นอกจากนี้ยังได้ทำการทดสอบผลกระทบของไพริเมธามีนต่อเอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทราน-สเฟอเรส ซึ่งผลปรากฏว่า ไพริเมธามีนที่ความเข้มข้นสูงสุดที่สามารถทำได้ในสภาวะการทดลองคือ 1.11 มิลลิโมลาร์ (ครึ่งหนึ่งของความเข้มข้นของสับสเตรตเตตระไฮโดรโฟเลตที่ใช้ หรือประมาณ 40 เท่าของค่า K_i ของไพริเมธามีนต่อเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสของเชื้อโคลน AS) ไม่มีผลยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทราน-สเฟอเรสแต่อย่างใด (รูปที่ 45) นับเป็นการยืนยันที่ค่อนข้างเด่นชัดอีกครั้งหนึ่งว่า การต้านไพริเมธามีนใน*พลาสโมเดียม ฆาบอดี* AS(Pr_1) ไม่มีผลเหนี่ยวนำให้มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสามมิติที่ตำแหน่งเร่งปฏิกิริยาหรือกล่าวอีกนัยหนึ่งว่า เอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทราน-สเฟอเรสไม่น่าจะเป็นเป้าหมายในการออกฤทธิ์ของไพริเมธามีนต่อเชื้อ *พลาสโมเดียม ฆาบอดี*

อย่างไรก็ตามจากผลการวิจัยที่พบว่ามีเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส และเซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทรานสเฟอเรส ประกอบกับที่มีผู้รายงานว่าพบเอนไซม์ไธมิดิลเลตซินเตสใน*พลาสโมเดียม ฆาบอดี* (Walter และคณะ , 1970) จะเป็นการสนับสนุนสมมติฐานวัฏจักรการสังเคราะห์ไธมิดิลเลตในพลาสโมเดียมของ Platzer (1972) (รูปที่ 54) อีกโสตหนึ่งด้วย

จากการศึกษาผลกระทบของการต้านไพริเมธามีนต่อเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอตซินเตส โดยศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของเอนไซม์ ปรากฏว่า แอค-ติวิตีของเอนไซม์จาก*พลาสโมเดียม ฆาบอดี* AS และ AS(Pr_1) จะถูกกระตุ้นด้วยแมกนีเซียมอิออน (เมื่อใช้แมกนีเซียมคลอไรด์) ในรูปแบบที่คล้ายคลึงกันมาก (รูปที่ 47) ซึ่งความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่แยกได้จาก*พลาสโมเดียม ฆาบอดี* ทั้ง 2 โคลน จะมีค่าเท่ากันคือ 0.2 โมลาร์ ส่วนการศึกษาผลกระทบของ pH ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส พบว่า แม้เอนไซม์จากเชื้อโคลน ASและ AS(Pr_1) จะเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ค่า pH ใกล้เคียงกัน คือ ประมาณ pH 8.9 - 9.0 แต่การเปลี่ยนชนิดของบัฟเฟอร์จากฟอสเฟตบัฟเฟอร์ไปเป็น ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์จะมีผลกระทบเล็กน้อยต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ (รูปที่ 48)

การศึกษาเปรียบเทียบผลกระทบของอุณหภูมิต่อเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส แสดงให้เห็นว่า อุณหภูมิจะมีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส ที่แยกได้จากพลาสโมเดียม ชาบอดี AS (Pr_1)ด้วยรูปแบบเดียวกับที่มีผลต่อเอนไซม์เดียวกันในเชื้อโคลน AS (รูปที่ 49) อย่างไรก็ตามอุณหภูมิซึ่งเหมาะสมสำหรับการเร่งปฏิกิริยาจะต่างกันเล็กน้อย (45 องศาเซลเซียส และ 40-45 องศาเซลเซียสตามลำดับ) ส่วนการศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการจับกันระหว่างเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส กับสับสเตรต โดยใช้ค่าคงที่ทางจลน์ศาสตร์คือ K_m ต่อกรดพาราอะมิโนเบนโซอิค และ 2-อะมิโน-4-ไฮดรอกซี-6-ไฮดรอกซีเมทธิล-7,8-ไดไฮโดรพเทอริดีน ไพโรฟอสเฟต (DHPP) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (pH ประมาณ 8.9) แสดงให้เห็นว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างค่าของเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตสจากพลาสโมเดียม ชาบอดี AS (K_m ต่อกรดพาราอะมิโนเบนโซอิคเท่ากับ 2.5 $\pm$ 0.01 ไมโครโมลาร์ และ K_m ต่อ DHPP เท่ากับ 0.19 $\pm$ 0.05 มิลลิโมลาร์) และเอนไซม์จากเชื้อโคลน AS(Pr_1) (K_m ต่อกรดพาราอะมิโนเบนโซอิคเท่ากับ 2.5 $\pm$ 0.01 ไมโครโมลาร์ และ K_m ต่อ DHPP เท่ากับ 0.12 $\pm$ 0.04 มิลลิโมลาร์)

ผลการศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติบางประการระหว่างเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส จาก พลาสโมเดียม ชาบอดี AS และ AS(Pr_1) ข้างต้น แสดงให้เห็นว่า การต้านไพริเมธามีนของเชื้อโคลน AS(Pr_1) ไม่น่าจะมีผลกระทบ โดยตรงต่อโครงสร้างสามมิติที่ตำแหน่งเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ อย่างไรก็ดี Walter และ Konick (1980) ทำการศึกษาเอนไซม์ที่แยกได้จากพลาสโมเดียม ชาบอดี และรายงานค่า K_m ต่อสับสเตรตดังนี้ K_m ต่อ DHPP เท่ากับ 0.11 มิลลิโมลาร์ และ K_m ต่อกรดพาราอะมิโนเบนโซอิคเท่ากับ 1.5 ไมโครโมลาร์ ซึ่งใกล้เคียงกับผลการวิจัยครั้งนี้มาก ความแตกต่างเล็กน้อยที่สังเกตได้อาจเป็นผลเนื่องจากสภาวะการทดลองที่ใช้วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ และที่สำคัญคือสายพันธุ์ของพลาสโมเดียม ชาบอดี ซึ่งเป็นแหล่งของเอนไซม์

จากข้อมูลของค่าแอคติวิตีสุทธิของเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตสที่ได้จากพลาสโมเดียม 10^9 เซลล์ แสดงให้เห็นว่า การต้านไพริเมธามีนของพลาสโมเดียม ชาบอดี AS(Pr_1) จะมีผลต่อแอคติวิตีสุทธิของเอนไซม์ที่มีอยู่ในเซลล์บ้างเช่นกัน คือ เอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตสจากเชื้อโคลน AS(Pr_1) จะมีค่าแอคติวิตีสุทธิเท่ากับ 0.014 $\pm$ 0.001

นาโนโมลของ DHPP ที่ถูกเปลี่ยนต่อนาทีต่อ 10^9 เซลล์ ซึ่งมากกว่าค่าของเอนไซม์ที่วัดได้จากเชื้อโคลน AS เล็กน้อยประมาณ 1.4 เท่า (แอคติวิตีสุทธิของเอนไซม์เท่ากับ 0.010 ± 0.001 นาโนโมลของDHPP ที่ถูกเปลี่ยนต่อนาทีต่อ 10^9 เซลล์) ซึ่งการเพิ่มขึ้นเล็กน้อยนี้อาจเนื่องจากมีการสังเคราะห์เอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส ขึ้นใช้เพิ่มขึ้นเมื่อพลาสโมเดียมต้านไพริเมธามีน หรือเนื่องจากเซลล์ลดการทำลายเอนไซม์ก็เป็นได้ นอกจากนี้ยังพบว่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 จะเพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่าจากผลกระทบของการต้านไพริเมธามีนในพลาสโมเดียม ชาบอดี AS(Pr_1) เมื่อเทียบกับค่าของเอนไซม์เดียวกันในเชื้อโคลน AS (ตารางที่ 8) และเนื่องจาก DHPP เป็นสารตั้นตอของการสังเคราะห์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซึ่งจะถูกสังเคราะห์ต่อเป็นไดไฮโดรโฟเลต โดยต่างก็เป็นสารที่มีโครงสร้างคล้ายโฟเลต จึงได้ทำการทดลอบผลกระทบของไพริเมธามีนต่อเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส ผลปรากฏว่า ไพริเมธามีนความเข้มข้นสูงถึง 0.25 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่ทำได้ที่สภาวะการทดลอง (น้อยกว่าความเข้มข้นของ DHPP ที่ใช้ประมาณ 2.5 เท่า หรือประมาณ 8 เท่าของค่า K_i ของไพริเมธามีนต่อเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสของเชื้อโคลน AS จะไม่มีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส (รูปที่ 52) แสดงว่าในการรักษาโรคมาลาเรียซึ่งมีการใช้ยา ซึ่งมีองค์ประกอบทั้งอนุพันธ์ซัลฟาและไพริเมธามีนรวมกัน เช่น แฟนสิดาร์ (ไพริเมธามีน 25 มิลลิกรัม กับซัลฟาดอกซิน 500 มิลลิกรัม) และมีรายงานว่าตัวยาทั้งสองชนิดจะออกฤทธิ์เสริมกันนั้น (Rollo, 1955) สำหรับพลาสโมเดียม ชาบอดี แล้วไพริเมธามีนจะไม่มีผลเสริมฤทธิ์ยาซัลฟาด้วยวิธีการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส ซึ่งเป็นเป้าหมายการออกฤทธิ์ของยาซัลฟาโดยตรง

ผลการศึกษาเกี่ยวกับผลกระทบของการต้านไพริเมธามีนต่อเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส เอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทรานสเฟอเรส และไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส ให้ข้อสรุปดังนี้

1. เวลาที่เหมาะสมสำหรับการแยกเซลล์พลาสโมเดียม อิสระออกจากเซลล์เม็ดเลือดแดงติดเชื้อด้วยสารละลาย 0.015 เปอร์เซ็นต์ซาโปนิน เมื่อทำการแยกที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คือ อินคิวเบตเซลล์กับซาโปนินนาน 10 นาที

2. จากการศึกษาผลกระทบของการต้านไพริเมธามีนต่อเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส โดยใช้เอนไซม์ที่ไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์เลย ซึ่งเชื่อว่าเป็นสภาวะที่ใกล้เคียงกับ in vivo มากที่สุดพบว่า การต้านไพริเมธามีนของ พลาสโมเดียม ฆ้าบอดี AS(Pr_1) จะมีผลเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสทำให้แตกต่างจากเอนไซม์ในเชื้อโคลน AS ซึ่งองค์การต้านยาต่ำกว่า 2 เท่าหลายประการได้แก่

2.1 เอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสที่แยกจากเชื้อโคลน AS จะเร่งปฏิกิริยาได้ดีเมื่อมีโปแตสเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ ตรงกันข้ามกับโคลน AS(Pr_1) ซึ่งเอนไซม์ยังคงเร่งปฏิกิริยาได้เต็มที่แม้ไม่มีโปแตสเซียมคลอไรด์เลย

2.2 pH ที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส ในเชื้อพลาสโมเดียม ฆ้าบอดี ทั้งสองโคลนจะไม่ต่างกันอย่างเห็นชัด แต่แอคติวิตีของเอนไซม์ที่แยกได้จากโคลน AS(Pr_1) จะถูกยับยั้งได้ด้วยทริสบัฟเฟอร์

2.3 ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส ที่พบในเชื้อโคลน AS(Pr_1) จะเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่อุณหภูมิสูงกว่าเอนไซม์เดียวกันของเชื้อโคลน AS ประมาณ 10 องศาเซลเซียส

2.4 การต้านไพริเมธามีนของเชื้อโคลน AS(Pr_1)ทำให้ความสามารถในการจับกันของเอนไซม์กับสับสเตรตไดไฮโดรโฟเลต (K_m) ดีขึ้นประมาณ 4 เท่า เมื่อเทียบกับเอนไซม์จากโคลน AS

2.5 ผลกระทบของไพริเมธามีนต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส(ED_{50})ในเชื้อโคลนAS(Pr_1)น้อยกว่าโคลน AS ประมาณ 9 เท่า โดยที่ปฏิกิริยาการจับกันระหว่างไพริเมธามีนกับเอนไซม์จะเป็นแบบ non-stoichiometric equivalent และ stoichiometric equivalent ตามลำดับ

2.6 จลน์ศาสตร์ของการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสด้วยไพริเมธามีนเป็นแบบแข่งขัน (competitive inhibition) ในเชื้อโคลน AS(Pr_1) ตรงกันข้ามกับโคลน AS ซึ่งไพริเมธามีนยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์แบบไม่แข่งขัน (non-competitive) โดยค่าคงที่ของการยับยั้งในเชื้อโคลน AS(Pr_1) จะมากกว่าประมาณ 5.5 เท่า

2.7 การต้านไพริเมธามีนมีผลกระทบต่อแอคติวิตีสูทธิของเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตสที่สังเคราะห์ขึ้นในเชื้อ พลาสโมเดียม ฆ้าบอดี AS(Pr_1) ทำให้วัดแอคติวิตีสูทธิต่อ 10^9 เซลล์ได้สูงกว่าเอนไซม์ของพลาสโมเดียม ฆ้าบอดี AS ประมาณ 4 เท่า

3. การศึกษาผลกระทบของการต้านไพริเมธามีนต่อเอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซี-เมทธิลทรานส์เฟอเรส โดยใช้เอนไซม์ที่ไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์เช่นกัน แสดงให้เห็นว่า ในสภาวะการทดลองที่คาดว่าใกล้เคียงกับ in vivo นี้ การต้านไพริเมธามีนจะไม่มีผลกระทบอย่างมีนัยสำคัญต่อคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการที่ทำการศึกษาได้แก่ pH และอุณหภูมิที่ให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุด ตลอดจนความสามารถของเอนไซม์ในการจับกับสับสเตรต กรดอะมิโนเซอรีน และเตตระไฮโดรโฟเลต แต่จะมีผลกระทบต่อแอคติวิตีสุทธิของเอนไซม์เซอรีนไฮดรอกซีเมทธิลทรานส์เฟอเรส ซึ่งสังเคราะห์ขึ้นในเซลล์ พลาสโมเดียม ฆาบอดี AS(Pr_1) ทำให้วัดแอคติวิตีสุทธิต่อ 10^9 เซลล์ ได้เพิ่มมากกว่าโคลน AS เล็กน้อย

4. การศึกษาผลกระทบของการต้านไพริเมธามีนต่อเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส โดยใช้เอนไซม์ซึ่งไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ พบว่า การต้านไพริเมธามีนของพลาสโม-เดียม ฆาบอดี AS(Pr_1) จะไม่มีผลกระทบอย่างมีนัยสำคัญต่อคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการที่ทำการศึกษา ได้แก่ pH อุณหภูมิ และความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ที่ทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์มีค่าสูงสุด รวมถึงความสามารถของเอนไซม์ในการจับกับสับสเตรต กรดพารา-อะมิโนเบนโซอิค และ 2-อะมิโน-4-ไฮดรอกซี-6-ไฮดรอกซีเมทธิล-7,8-ไดไฮโดรพเทอริดีน ไพโรฟอสเฟต แต่จะเห็นได้ว่ามีผลกระทบเล็กน้อยต่อแอคติวิตีสุทธิของเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตสที่สังเคราะห์ขึ้นในเซลล์พลาสโมเดียม ฆาบอดี AS(Pr_1) เช่นเดียวกับผลของการต้านไพริเมธามีนต่อแอคติวิตีสุทธิของไอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทรานส์เฟอเรส

5. ไพริเมธามีนไม่มีผลยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทราน-ส์เฟอเรส และไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส ที่แยกได้จากพลาสโมเดียม ฆาบอดี AS และ AS(Pr_1) เมื่อใช้ความเข้มข้น 1.11 และ 0.25 มิลลิโมลาร์ตามลำดับชนิดของเอนไซม์

ผลการศึกษาเปรียบเทียบผลกระทบของการต้านไพริเมธามีนต่อเอนไซม์สามตัวในโฟเลต-เมตาบอลิสม ได้แก่ ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส, เซอรีน ไฮดรอกซีเมทธิลทรานส์เฟอเรส และไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเตส ดังกล่าวข้างต้น นับเป็นการยืนยันสมมติฐานการออกฤทธิ์ของไพริเมธามีนในการยับยั้งการเจริญของพลาสโมเดียมว่า ไพริเมธามีนมีผลกระทบโดยตรงต่อเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลต รีดักเตส