

ผลของพลาสมาผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรีย และผลของยาด้านมาลาเรีย
ต่อความอยู่รอดของเซลล์รกของมนุษย์ชนิด trophoblast
Effect of Plasma from Malaria Patients and Antimalarial Drugs
on Human Placental Trophoblast Survival

สีบตระกูล วิเศษสมบัติ
Sueptrakool Wisessombat

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
Master of Science Thesis in Microbiology
Prince of Songkla University

2548


๑

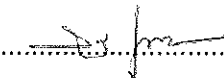
เลขที่:	RM868.5	ส๖3	2548	ด. 2
Bib Key:	261354			
	11 สค ๖๖			


(1)

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของพลาสมาผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรีย และผลของยาต้าน
มาลาเรีย ต่อความอยู่รอดของเซลล์รกของมนุษย์ชนิด trophoblast
ผู้เขียน นายสืบตระกูล วิเศษสมบัติ
สาขาวิชา จุลชีววิทยา


คณะกรรมการที่ปรึกษา

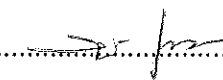

.....ประธานกรรมการ
(ดร.อธิป นิลแก้ว)



.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทธิณี ภูวนาถ)



.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นงเยาว์ สว่างเจริญ)

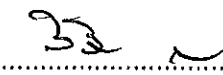
คณะกรรมการสอบ

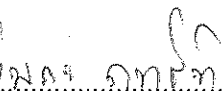

.....ประธานกรรมการ
(ดร.อธิป นิลแก้ว)


.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทธิณี ภูวนาถ)



.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นงเยาว์ สว่างเจริญ)


.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จรรยา นครินทร์)


.....กรรมการ
(นพ.วิวิทย์ ศมसानต์)


.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นพ.วิบูลย์ ฤทธิพิศ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา


.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุรพล อารีย์กุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	ผลของพลาสมาผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรีย และผลของยาต้านมาลาเรีย ต่อความอยู่รอดของเซลล์รกของมนุษย์ชนิด trophoblast
ผู้เขียน	นายสีบตระกูล วิเศษสมบัติ
สาขาวิชา	จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา	2547

บทคัดย่อ

โรคมาลาเรียในสตรีมีครรภ์เป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุข ส่งผลร้ายต่อทั้งมารดาและทารก เช่น ภาวะรกติดเชื้อมาลาเรีย และภาวะมาลาเรียแต่กำเนิด โดยการเกิดพยาธิวิทยาเหล่านี้มีผลโดยตรงกับพัฒนาการของรกด้วยทั้งสิ้น ในโครงการวิจัยนี้ผู้วิจัยทำการศึกษาค้นคว้าผลของพลาสมาจากผู้ป่วยมาลาเรียจากเชื้อ *Plasmodium vivax* และ *Plasmodium falciparum* ต่อความอยู่รอด การดำเนินของวงจรเซลล์ และการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ ในเซลล์รกของมนุษย์ชนิด trophoblast (JAR) ในระดับ *in vitro* รวมทั้งผลของยาต้านมาลาเรียต่อความอยู่รอดของเซลล์รกด้วย จากการศึกษาผลของพลาสมาจากผู้ป่วยมาลาเรียที่ความเข้มข้น 0-5% ต่อความอยู่รอดของเซลล์ JAR ด้วยวิธี MTT พบว่าเซลล์ JAR ที่ได้รับพลาสมาจากผู้ป่วยมาลาเรีย มีการเพิ่มจำนวนเซลล์มากกว่ากลุ่มที่ได้รับพลาสมาจากกลุ่มควบคุมที่ทุกระดับความเข้มข้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เซลล์ JAR กลุ่มที่ได้รับพลาสมาจากผู้ป่วยมาลาเรียชนิด *P. falciparum* มีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นเฉลี่ย 650% มากกว่าพลาสมาจากผู้ป่วยมาลาเรียชนิด *P. vivax* ซึ่งมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นเฉลี่ย 450% ในขณะที่กลุ่มควบคุมที่ได้รับพลาสมาจากผู้ป่วยมาลาเรียที่ไม่เป็นโรคมาลาเรีย มีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นเฉลี่ย 200% และจากการศึกษาผลของพลาสมาจากผู้ป่วยมาลาเรียต่อเปอร์เซ็นต์เซลล์ JAR ในแต่ละระยะของวงจรเซลล์ด้วยเทคนิค flow cytometry พบว่าพลาสมาจากผู้ป่วยมาลาเรียทั้ง 2 ชนิด ต่างเร่งการดำเนินของวงจรเซลล์ของเซลล์ JAR ให้เร็วขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับพลาสมาจากผู้ป่วยมาลาเรียที่ไม่พบพลาสมาจากผู้ป่วยมาลาเรียเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ JAR เพิ่มขึ้นแต่อย่างใด

เมื่อศึกษาผลของยาต้านมาลาเรียที่ความเข้มข้น 0-50 $\mu\text{g/mL}$ ต่อความอยู่รอดของเซลล์ JAR พบว่ายาด้านมาลาเรียทั้ง 4 ชนิดคือ chloroquine, quinine, artemisinin, และ pyrimethamine ต่างมีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ JAR แบบ dose-dependent fashion มีค่า IC_{50} เท่ากับ 6.56, 6.04, 6.67 และ 2.92 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ และพบระดับเอนไซม์ LDH ใน

น้ำเลี้ยงเซลล์ซึ่งเป็นดัชนีชี้วัดการตายของเซลล์เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) นอกจากนี้การศึกษามูลของยาด้านมาลาเรียต่อวงจรเซลล์ของเซลล์ JAR พบว่ายาด้านมาลาเรียทั้ง 4 ชนิด หยุด/ชะลอการดำเนินของวงจรเซลล์ โดยหยุด/ชะลอวงจรเซลล์ของเซลล์ JAR ไว้ในระยะ S และเมื่อทำการศึกษามูลของยาต่อการตายของเซลล์ JAR ด้วยเทคนิค DNA laddering assay และ TUNEL พบว่ายาดังกล่าวทุกตัวกระตุ้นการแตกหักของ DNA ของเซลล์ JAR ซึ่งแสดงถึงการตายของเซลล์แบบ apoptosis

จากผลการศึกษาในครั้งนี้ มีประโยชน์เพื่อการศึกษาในอนาคตเพื่ออธิบายกลไกการเกิดพยาธิสภาพของโรคในภาวะที่รกติดเชื้อมาลาเรีย ตลอดจนสามารถอธิบายผลของยาด้านมาลาเรียต่อเซลล์รก

Thesis Title	Effect of Plasma from Malaria Patients and Antimalarial Drugs on Human Placental Trophoblast Survival
Author	Mr.Sueptrakool Wisessombat
Major Program	Microbiology
Academic Year	2004

Abstract

Malaria in pregnancy poses serious risks for the mother and the fetus with often adverse outcomes such as placental malaria and congenital malaria. However, direct effects of plasma from malaria patients on placenta have not been studied. In this project, MTT proliferation assays were used to investigate the effect of plasma from malaria patients (*P. vivax* and *P. falciparum*) on trophoblast (JAR) cell line proliferation. Plasma treatments (0-5%) resulted in induction of cell proliferation by 650%, 450% and 200% for *P. falciparum*, *P. vivax* and control plasma, respectively. In related study, plasma promoted cell cycle progression of JAR cells, analyzed by using flow cytometry technique. In addition, plasma treatments did not result in induction of apoptotic cell death as study by DNA laddering assay and TUNEL technique.

Furthermore, cytotoxic effects of antimalarial drugs on JAR cells were determined. Drug treatments (0-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) resulted in inhibition of cell proliferation in a dose-dependent fashion with 50% growth inhibition (IC_{50}) at 6.56, 6.04, 6.67 and 2.92 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for chloroquine, quinine, artemisinin and pyrimethamine, respectively. In addition, this inhibition of cell proliferation was accompanied with increased LDH release, an indicator of cytotoxicity, in treated group compared to the control ($p < 0.05$). Analysis on cell cycle progression showed that these drug treatments resulted in cell cycle arrest in S phase. In addition, all drug treatments induced apoptosis in JAR cells analyzed by using DNA laddering assay and TUNEL techniques. Findings in this study are beneficial to a future study of pathogenesis of placenta malaria and could be beneficial to an effective administration of these drugs during pregnancy.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้โดยได้รับความช่วยเหลือ จากบุคคลหลายฝ่าย บุคคลเหล่านี้ล้วนเป็นกัลยาณมิตรที่ควรค่าแก่การกล่าวถึงด้วยความรู้สึกขอบคุณ และยกย่องไว้ ณ ที่นี้ ผู้ศึกษาวิจัยขอกราบขอบพระคุณ ดร.อธิป นิลแก้ว ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำปรึกษาในระหว่างที่ดำเนินการวิจัย ตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องในการเขียนวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความสะดวกในทุกๆ ด้าน ทำให้การวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ตามวัตถุประสงค์ที่วางไว้

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทธิณี ภูวนาท กรรมการที่ปรึกษาร่วมที่กรุณาให้คำปรึกษาในงานวิจัย ชี้แนะแนวทางในการวิจัย ตลอดจนแสดงข้อคิดเห็นต่างๆ อันมีประโยชน์ ต่อการปรับปรุงวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น นพ.วิวิทย์ ศมसानต์ และ ผศ.ดร.จรรยา นครินทร์ กรรมการผู้แทนจากคณะวิทยาศาสตร์ ตลอดจน รศ.นพ.วิบูลย์ ฤทธิพิศ กรรมการผู้แทนจากบัณฑิตวิทยาลัย เป็นอย่างยิ่งที่ได้ให้โอกาส คำแนะนำปรึกษา ตลอดจนแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่ได้อนุเคราะห์อุปกรณ์ ตลอดจนเครื่องมือในการทำวิจัย ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย ที่สนับสนุนทุนในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ รวมทั้งเพื่อนๆ ครอบครัวที่ให้ทั้งกำลังใจและกำลังใจทรัพย์เสมอมา

สีปตระกูล วิเศษสมบัติ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(6)
สารบัญ	(7)
รายการรูป	(8)
ตัวย่อและสัญลักษณ์	(10)
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	26
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	27
วัสดุ	27
อุปกรณ์	30
วิธีการ	31
3. ผลการทดลอง	38
4. วิเคราะห์ผลการทดลอง	75
5. สรุปผลการทดลอง	82
เอกสารอ้างอิง	83
ภาคผนวก	98
ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่จากวิทยานิพนธ์	103
ประวัติผู้เขียน	104

รายการรูป

รูปที่	หน้า
1. วงชีวิตของเชื้อมาลาเรีย	4
2. วงชีวิตของมาลาเรียและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน	12
3. การตรวจหาเชื้อมาลาเรียในฟิล์มเลือด	14
4. การออกฤทธิ์ของยาต้านมาลาเรียแต่ละชนิดต่อวงชีวิตของปรสิต	15
5. โครงสร้างทางเคมีของ chloroquine diphosphate salt	16
6. โครงสร้างทางเคมีของ quinine hemisulfate salt	17
7. โครงสร้างทางเคมีของ artemisinin	18
8. โครงสร้างทางเคมีของ pyrimethamine	19
9. การนับจำนวนเซลล์ด้วย hemacytometer	28
10. หลักการของ MTT	31
11. ปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นของเอนไซม์ LDH	33
12. วงจรเซลล์	34
13. Histogram ที่นำเสนอดด้วย Flow cytometer	35
14. หลักการของวิธี TUNEL	37
15. ผลของพลาสมาต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์	39
16. ผลของพลาสมาต่อการดำเนินของวงจรเซลล์ ที่เวลา 4 ชั่วโมง	41
17. ผลของพลาสมาต่อการดำเนินของวงจรเซลล์ ที่เวลา 8 ชั่วโมง	42
18. ผลของพลาสมาต่อการดำเนินของวงจรเซลล์ ที่เวลา 12 ชั่วโมง	43
19. ผลของพลาสมาต่อการดำเนินของวงจรเซลล์ ที่เวลา 16 ชั่วโมง	45
20. ผลของพลาสมาต่อการดำเนินของวงจรเซลล์ ที่เวลา 20 ชั่วโมง	46
21. ผลของพลาสมาต่อการดำเนินของวงจรเซลล์ ที่เวลา 24 ชั่วโมง	47
22. ผลของพลาสมาจากอาสาสมัครที่ไม่เป็นโรคมาลาเรียต่อการ ชักนำการตายของเซลล์	49
23. ผลของพลาสมาจากผู้ป่วยมาลาเรียจากเชื้อ <i>P. vivax</i> ต่อการ ชักนำการตายของเซลล์	50

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
24. ผลของพลาสมาจากผู้ป่วยมาลาเรียจากเชื้อ <i>P. falciparum</i> ต่อการชักนำการตายของเซลล์	51
25. ผลของพลาสมาต่อการชักนำการตายเซลล์	52
26. ผลของยาต้านมาลาเรียต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์	54
27. ผลของยาต้านมาลาเรียต่อการลดลงของเซลล์	55
28. ผลของยาต้านมาลาเรียต่อความเป็นพิษของเซลล์	57
29. ผลของยาต้านมาลาเรียต่อการตายของเซลล์	58
30. ผลของยาต้านมาลาเรียต่อการดำเนินของวงจรเซลล์ ที่เวลา 6 ชั่วโมง	61
31. ผลของยาต้านมาลาเรียต่อการดำเนินของวงจรเซลล์ ที่เวลา 12 ชั่วโมง	62
32. ผลของยาต้านมาลาเรียต่อการดำเนินของวงจรเซลล์ ที่เวลา 20 ชั่วโมง	64
33. ผลของยาต้านมาลาเรียต่อการดำเนินของวงจรเซลล์ ที่เวลา 32 ชั่วโมง	66
34. ผลของยาต้านมาลาเรีย pyrimethamine ต่อการดำเนินของวงจรเซลล์	67
35. ผลของยาต้านมาลาเรีย chloroquine ต่อการชักนำการตายของเซลล์	69
36. ผลของยาต้านมาลาเรีย quinine ต่อการชักนำการตายของเซลล์	70
37. ผลของยาต้านมาลาเรีย artemisinin ต่อการชักนำการตายของเซลล์	71
38. ผลของยาต้านมาลาเรีย pyrimethamine ต่อการชักนำการตายของเซลล์	72
39. ผลของยาต้านมาลาเรียต่อการชักนำการตายเซลล์	74

ตัวย่อและสัญลักษณ์

ELISA	=	enzyme-linked immunosorbent assay
g	=	gram
M	=	molar
mL	=	milliliter
μ L	=	microliter
mg	=	milligram
μ g	=	microgram
pg	=	picogram
OD	=	optical density
PBS	=	Phosphate buffer saline
pH	=	log hydrogen ion concentration
TUNEL	=	TdT-mediated dUTP nick end labeling
EDTA	=	ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate
%	=	percent
FBS	=	fetal bovine serum
MTT	=	3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide
LDH	=	lactate dehydrogenase
LSD	=	least-significant different
$^{\circ}$ C	=	degree celsius
IC ₅₀	=	inhibition concentration 50%
IL	=	interleukin
TNF	=	tumor necrosis factor
IFN	=	interferon

ตัวย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

GM-CSF	=	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
M-CSF	=	macrophage colony-stimulating factor
EGF	=	epidermal growth factor
TGF	=	transforming growth factor
MHC	=	major histocompatibility complex
Ag	=	antigen
Ab	=	antibody
CTL	=	cytotoxic T lymphocyte
NK	=	natural killer cell
ADCI	=	antibody-dependent cellular inhibition
Th1	=	type 1 helper T-cell
Th2	=	type 2 helper T-cell
CMI	=	cell mediated immunity
APCs	=	antigen-presenting cells
DNA	=	deoxyribonucleic acid
RNA	=	ribonucleic acid
mRNA	=	messenger ribonucleic acid
IUGR	=	intrauterine growth retardation
CSA	=	chondroitin sulphate A
HA	=	hyaluronic acid
LDH	=	lactate dehydrogenase

1. บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

โรคมาลาเรียจัดเป็น 1 ใน 6 ของโรคที่มีความสำคัญต่อประชากรที่อาศัยอยู่ในแถบเขตร้อนและกึ่งเขตร้อนรวมมากกว่า 103 ประเทศ พบการแพร่กระจายของโรคเป็นบริเวณกว้าง ประชากรโลกโดยประมาณมากกว่า 2,000 ล้านคนอาศัยอยู่ในแหล่งระบาดและเสี่ยงต่อการติดเชื้อ มีรายงานผู้ป่วยที่แสดงอาการของโรคจากทั่วโลกปีละประมาณ 300-500 ล้านคนและมีผู้เสียชีวิตประมาณปีละ 1-2 ล้านคน โดยเฉพาะเด็กอายุต่ำกว่า 5 ปี (Okoko et al., 2003)

โรคมาลาเรียในประเทศไทยส่วนใหญ่พบอยู่ตามจังหวัดชายแดน ซึ่งมีสภาพภูมิประเทศเป็นป่าเขา จังหวัดที่พบผู้ป่วยจำนวนมาก ได้แก่ ตาก กาญจนบุรี แม่ฮ่องสอน ยะลา ระนอง มีอัตราเป็นโรค 1,200-7,500 คนต่อประชากรแสนคน ชนิดของเชื้อที่พบมากที่สุด คือ *Plasmodium falciparum* ซึ่งพบประมาณ 50-60% (วิฑูรย์ และ พีรพรรณ, 2540) โรคมาลาเรียเป็นปัญหาที่สำคัญด้านสาธารณสุข และทำความสูญเสียต่อเศรษฐกิจของประเทศเป็นอันมาก ตลอดจนการที่จะกำจัดให้หมดสิ้นจากประเทศไทยทำได้ยาก เนื่องจากสาเหตุหลายประการคือ ลักษณะทางภูมิศาสตร์ที่เอื้ออำนวยต่อการแพร่พันธุ์ของยุงก้นปล่องซึ่งเป็นพาหะของโรค มีกลุ่มประชากรที่มีพฤติกรรมเสี่ยงต่อการติด และแพร่กระจายเชื้อ เช่น ประชาชนที่อาศัยบริเวณแนวชายแดน ที่ประกอบอาชีพทำสวนยางพารา สวนปาล์ม กลุ่มแรงงานต่างชาติ ตลอดจนกลุ่มเจ้าหน้าที่ของรัฐ เช่น ทหาร เจ้าหน้าที่ป่าไม้ นอกจากนี้ในปัจจุบันยังพบปัญหาเชื้อมาลาเรียดื้อยาที่ใช้รักษามากขึ้นในหลายพื้นที่ของประเทศไทย

ปัญหาที่สำคัญอีกประการหนึ่งคือ การติดเชื้อ *P. falciparum* ในสตรีมีครรภ์ซึ่งส่งผลร้ายต่อมารดาและทารก เกิดภาวะซีดรุนแรงในมารดา ภาวะคลอดก่อนกำหนด (Matteelli et al., 1997) ภาวะน้ำหนักรกเกิดต่ำในทารก เป็นต้น (Brabin, 1991) การเกิดพยาธิวิทยาเหล่านี้มีความเกี่ยวข้องโดยตรงกับพัฒนาการของรกด้วยทั้งสิ้น เนื่องจากรกมีหน้าที่ควบคุมสรีรวิทยาของการตั้งครรภ์ ผลิตฮอร์โมน แลกเปลี่ยนน้ำ อาหาร แก๊ส และของเสีย ระหว่างแม่และลูก ควบคุม metabolism ของตัวอ่อน ตลอดจนมีบทบาทในการควบคุมการสนองทางภูมิคุ้มกันวิทยา ป้องกันการปฏิเสธตัวอ่อนจากระบบภูมิคุ้มกันของมารดา ดังนั้นการศึกษาเรื่องผลของการติดเชื้อมาลาเรียต่อความอยู่รอดของเซลล์รกนั้น มีความสำคัญในแง่การอธิบายกลไกของการเกิดโรคได้ นอกจากนี้กลไกในระดับโมเลกุลนั้นยังเป็นประโยชน์ต่อการคิดค้นวิธีการรักษา หรือป้องกันได้ในอนาคต ใน

โครงการวิจัยนี้ผู้ดำเนินการจะศึกษาผลของพลาสมาจากผู้ป่วยมาลาเรีย ต่อเซลล์รกชนิด choriocarcinoma ในระดับ *in vitro* ในแง่การอยู่รอด วงจรเซลล์ และการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ รวมทั้งผลของยาต้านมาลาเรียต่อความอยู่รอดของเซลล์รกด้วย

ตรวจเอกสาร

1 โรคมาลาเรีย

โรคมาลาเรียมีสาเหตุจากการติดเชื้อปรสิตในกระแสเลือด (blood parasite) ปัจจุบันมีรายงานการพบเชื้อมาลาเรียมากกว่า 120 species แต่มีเพียง 4 species เท่านั้นที่ทำให้เกิดโรคในคน ซึ่งได้แก่ *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* และ *P. ovale* โดยมีพาหะนำโรคคือ ยุงก้นปล่อง (anopheles) เพศเมีย ระหว่างปี 1999-2004 มีผู้ติดเชื้อมาลาเรียประมาณ 350-500 ล้านราย และเสียชีวิต 1.1-1.3 ล้านคน พบว่า 90% ของผู้เสียชีวิตที่อาศัยอยู่ในทวีปแอฟริกา มีสาเหตุจากการติดเชื้อปรสิตชนิด *P. falciparum* โดยเฉพาะเด็กอายุต่ำกว่า 5 ปี และสตรีมีครรภ์ ในขณะที่ส่วนอื่นๆ ของโลก พบมาลาเรียแพร่กระจายในพื้นที่เขตร้อน และกึ่งเขตร้อน มีผู้ป่วยประมาณ 5 ล้านราย และ 3 ล้านรายพบมากในประเทศอินเดีย และปากีสถาน มักเกิดจากการติดเชื้อปรสิตชนิด *P. falciparum* และ *P. vivax* (WHO, 2005) ปัจจุบันด้วยความร่วมมือของ world health organization (WHO), world bank, united nations development program (UNDP) และ united nations children's fund (UNICEF) ได้จัดตั้ง the roll back malaria program ขึ้น โดยมีเป้าหมายในการดำเนินการคือ เพื่อป้องกันการแพร่กระจายของยุงพาหะนำโรค ป้องกันสตรีมีครรภ์จากโรคมาลาเรีย ตลอดจนคิดค้นพัฒนายาต้านมาลาเรียชนิดใหม่ๆ (Suh *et al.*, 2004) แสดงให้เห็นว่ามาลาเรียยังคงเป็นโรคที่มีความสำคัญในปัจจุบัน

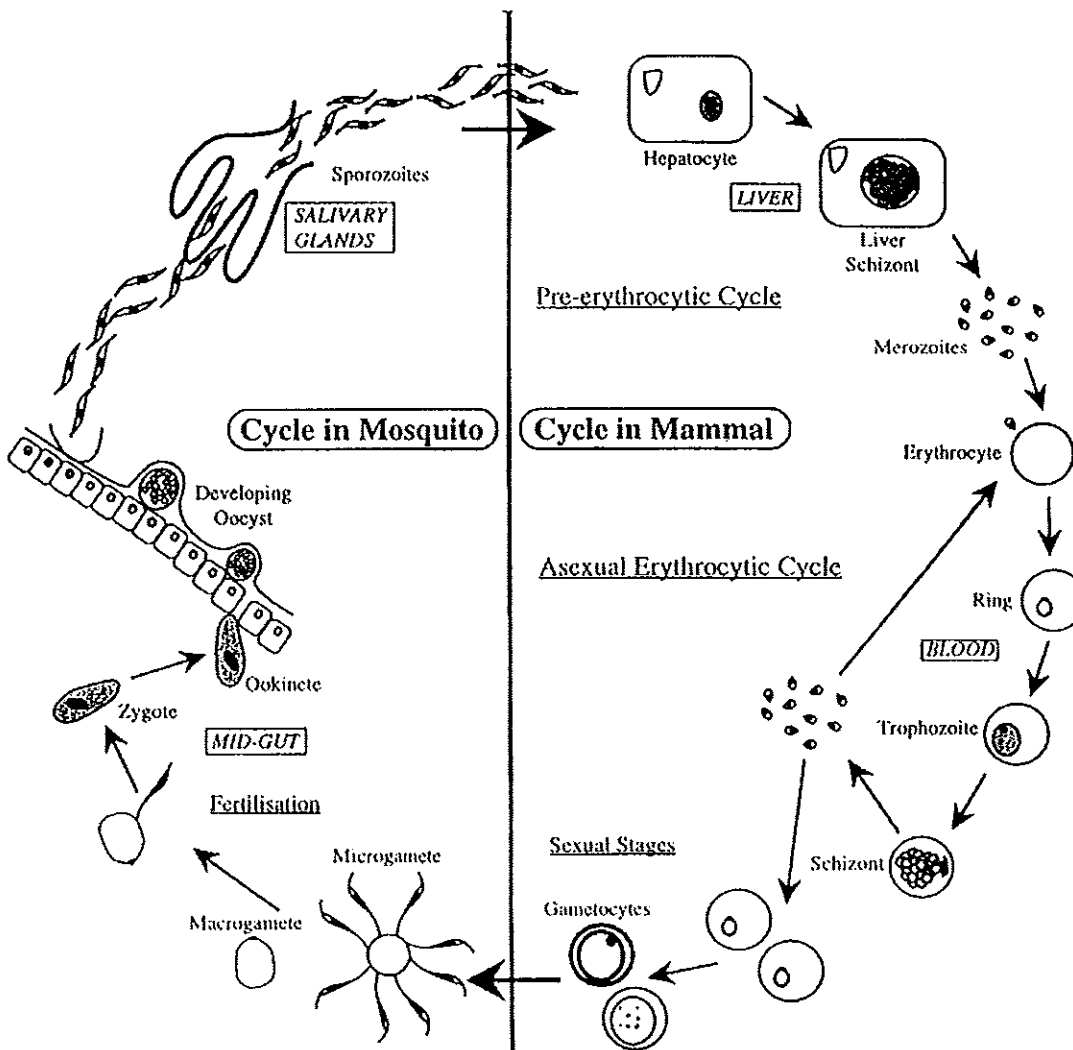
1.1 วงชีวิตของเชื้อสาเหตุ

วงชีวิตของ *Plasmodium* ต้องการเจ้าบ้าน 2 ชนิด คือ คนและยุงก้นปล่องเพศเมีย กระบวนการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction) เกิดขึ้นในเซลล์เม็ดเลือดแดง (erythrocytic cycle) และเซลล์ตับของคน (exo-erythrocytic cycle) ส่วนกระบวนการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual reproduction) เกิดขึ้นในกระเพาะอาหารของยุง (sporogonic cycle) ดังรูปที่ 1 คนได้รับเชื้อมาลาเรียจากการที่ยุงก้นปล่องเพศเมียที่มีปรสิตระยะ sporozoite ในต่อมน้ำลายกัดกินเลือด โดยการกัดหนึ่งครั้งนั้น พบว่า sporozoite ประมาณ 15-200 ตัว จะถูกปล่อยเข้าสู่กระแสโลหิตทันที และภายในเวลา 15-30 นาที sporozoite จะหายไปจากกระแสโลหิต

เนื่องจาก sporozoite จำนวนหนึ่งถูกกำจัดโดย macrophage แต่อีกจำนวนหนึ่งเข้าไปในเซลล์ตับได้โดยอาศัย macrophage ของตับพาไป หรือสามารถเคลื่อนที่เข้าสู่เซลล์ตับได้โดยตรงด้วยการใช้โปรตีน circumsporozoite (CS) บนผิวของปรสิต ซึ่งจับอย่างจำเพาะกับ heparin sulfate proteoglycans (HSPGs) ของเซลล์ตับ (Mota and Rodriguez, 2002) เมื่อเข้าสู่ภายในเซลล์ตับแล้ว sporozoite จะมีการเจริญเติบโตและพัฒนาไปเป็น trophozoite ภายในถุงหุ้มปรสิต ซึ่งพัฒนามาจากเยื่อหุ้มเซลล์ตับ (Mota *et al.*, 2004) จากนั้นจะเจริญเข้าสู่ระยะ schizont และเกิดกระบวนการแบ่งตัวแบบไม่อาศัยเพศ ผ่านพัฒนาการต่อมาได้เซลล์รุ่นใหม่เรียกว่า merozoite มีรูปร่างกลมรี merozoite ของ *P. falciparum* เป็น merozoite ที่มีขนาดเล็กที่สุดในบรรดาเชื้อปรสิตทั้ง 4 ชนิดซึ่งเมื่อการแบ่งเซลล์เสร็จสมบูรณ์จะได้ merozoite ประมาณ 2,000-40,000 ตัว โดยใช้ระยะเวลาในการเจริญและแบ่งเซลล์ประมาณ 6-15 วัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของปรสิต (Phillips, 2001) หลังจากนั้นถุงหุ้มปรสิตจะสลายตัวไป และ merozoite จะออกมาจากเซลล์ตับที่เกิดการแตกสลายเพื่อเข้าสู่กระแสโลหิตต่อไป การเจริญเติบโตในเซลล์ตับของ *P. falciparum* ไม่มีระยะที่หลบซ่อนในเซลล์ตับ (hypnozoite) ซึ่งไม่เหมือนกับ *P. vivax* และ *P. ovale* เนื่องจาก sporozoite ที่เข้าไปในเซลล์ตับทุกเซลล์เจริญเป็น schizont ทั้งหมด เพราะฉะนั้นคนที่ติดเชื้อปรสิตชนิดนี้จึงไม่มีอาการไข้กลับซ้ำ (relapse) แต่อาจมีเชื้อกลับมาใหม่ (recrudescence) ได้ภายใน 6 เดือน ถึง 1 ปี เนื่องจากจะมีเชื้อปริมาณต่ำๆคงอยู่ในกระแสโลหิต ซึ่งอาจเกิดจากเชื้อที่คงอยู่สามารถเปลี่ยนแปลงแอนติเจนและหลบหนีจากแอนติบอดีได้ หรือเกิดจากการที่เชื้อดื้อยา (Omonuwa and Omonuwa, 2002)

merozoite สามารถบุกรุกเข้าสู่เม็ดเลือดแดงด้วยกระบวนการจับกันระหว่างโปรตีนของปรสิต merozoite surface proteins (MSPs) กับตัวรับจำเพาะบนผิวเซลล์เม็ดเลือดแดง (Gaur *et al.*, 2004) ซึ่งเกิดขึ้นและเสร็จสิ้นภายในเวลาอันรวดเร็ว หลังจากนั้น merozoite จะมีการเปลี่ยนเป็นรูปร่างกลม ตรงกลางเซลล์มี vacuole ขนาดใหญ่ ซึ่งจะดัน nucleus และ cytoplasm ไปอยู่บริเวณขอบเซลล์ ทำให้เซลล์มีรูปร่างคล้ายวงแหวน จึงเรียกระยะนี้ว่าระยะวงแหวน (ring form) จากนั้นปรสิตจะเติบโตเป็นระยะ trophozoite ปรสิตจะแบ่งตัวแบบไม่อาศัยเพศ ผ่านพัฒนาต่อไปจนได้เซลล์รุ่นใหม่เรียกว่า merozoite ระยะ merozoite นี้มีรูปร่างกลมรี กระบวนการเจริญเติบโตและแบ่งตัวของปรสิตในเม็ดเลือดแดงใช้ระยะเวลาประมาณ 36-72 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับชนิดของปรสิต หลังจากนั้น merozoite จะถูกปล่อยออกนอกเซลล์เม็ดเลือดแดงโดยการทำให้เซลล์แตก merozoite ที่ถูกปล่อยออกมาในกระแสโลหิตจะบุกรุกเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงใหม่ทันที และเจริญเป็นวัฏจักรต่อไป (Miller *et al.*, 2002) ระยะเวลาตั้งแต่ยุ่งักัดจนตรวจพบเชื้อ *P.*

falciparum ในเม็ดเลือดแดงใช้เวลาประมาณ 7-11 วัน อัตราการติดเชื้อ *P. falciparum* ในเม็ดเลือดแดงสูงกว่าเชื้อมาลาเรียชนิดอื่นๆ โดยจะขึ้นสูงสุดประมาณในวันที่ 9 หลังจากพบเชื้อ และอาจสูงถึง 25-50% เนื่องจาก merozoite ของ *P. falciparum* สามารถเข้าไปเจริญได้ในเม็ดเลือดแดงทุกอายุ ประกอบกับจำนวน merozoite ที่ได้จากการแบ่งตัวแต่ละรอบมีจำนวนมากกว่่าเชื้อชนิดอื่นๆ (Chotivanich *et al.*, 2000) ทำให้ผู้ป่วยมาลาเรียชนิด *P. falciparum* มักมีอาการของโรคแทรกซ้อน และรุนแรงกว่าผู้ป่วยมาลาเรียชนิดอื่นๆ



รูปที่ 1 วงชีวิตของเชื้อมาลาเรีย (Phillips, 2001)

การเจริญเติบโตและแบ่งตัวของปรสิตในเม็ดเลือดแดงต้องการสารอาหารต่างๆที่จำเป็น เช่น กลูโคส กรดอะมิโน กรดไขมัน เป็นต้น พบว่า schizont สามารถย่อยสลายไซโตพลาซึม และ ฮีโมโกลบินในไซโตพลาซึมของเม็ดเลือดแดงเพื่อนำกรดอะมิโนไปใช้ แต่เนื่องจากปรสิตไม่สามารถย่อยฮีโม (heme) ซึ่งเป็นพิษต่อปรสิตได้ ปรสิตจึงต้องกำจัดออกในรูปของกากอาหารหรือเมดิสี ซึ่งพบว่าเป็น polymer ที่เรียกว่า hemozoin (Sullivan, 2002) ดังนั้นระยะที่ปรสิตเจริญเติบโตจะพบ เมดิสีในถุงอาหาร ที่เรียกว่า malarial pigment ซึ่งมีสีน้ำตาลวาวเนื่องจากมีเหล็กเป็นองค์ประกอบ ซึ่งช่วยในการวินิจฉัยโรคได้

เมื่อปรสิตเจริญและแบ่งเซลล์แบบไม่อาศัยเพศประมาณ 2-3 รอบแล้ว merozoite ที่เข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงแล้วส่วนหนึ่งจะพัฒนาไปเป็นระยะมีเพศเรียกว่า gametocyte ซึ่งมีทั้ง gametocyte เพศผู้ (microgametocyte) และ gametocytes เพศเมีย (macrogametocyte) ปัจจัยที่มีผลให้เกิดการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของปรสิตนั้น คาดว่าเกิดจากทั้งการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน การเพิ่มขึ้นของ hormone เช่น steroid และ corticosteroid ภาวะโลหิตจาง ตลอดจนผลของยาด้านมาลาเรียบางชนิด เช่น chloroquine และ sulfadoxine-pyrimethamine โดยทั่วไปจะเริ่มพบ gametocyte ได้ในกระแสโลหิตหลังจากผู้ป่วยมีอาการไข้แล้ว 7-15 วัน ระยะเวลาตั้งแต่ merozoite เข้าสู่เม็ดเลือดแดงจนกระทั่งเจริญเต็มที่ได่ gametocyte ตัวแก่ซึ่งเป็นระยะติดต่อยุง จะใช้เวลาประมาณ 10-14 วัน gametocyte สามารถอยู่ในกระแสโลหิตอีกชั่วระยะเวลาหนึ่ง เพื่อรอเวลาให้ยุงมากัดกินเลือดคน และรับ gametocyte เข้าไปเพื่อเจริญเติบโตต่อไป หรือสลายตัวไปถ้าไม่ได้เข้าสู่ยุง (Talman *et al.*, 2004)

เมื่อยุงกัดปล่องเพศเมียมากัดและดูดกินเลือดจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรีย ยุงจะได้รับเชื้อปรสิตทุกระยะเข้าไป รวมทั้งระยะติดต่อก็คือ gametocyte เพศเมีย และ gametocyte เพศผู้ ปรสิตระยะอื่นๆ ยกเว้นระยะ gametocyte จะถูกทำลายโดยน้ำย่อยในกระเพาะอาหารของยุง ส่วนระยะ gametocyte จะเจริญเติบโตต่อไปในกระเพาะยุง โดยหลังจากถูกย่อยออกจากเม็ดเลือดแดงแล้ว gametocyte เพศผู้จะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ 4-8 เซลล์ ในขณะที่เดียวกัน gametocyte เพศเมื่อก็จะพัฒนาไปเป็นเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย โดยเปลี่ยนรูปร่างจากเดิมที่คล้ายกล้วยหอมไปเป็นรูปร่างกลม กระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์นี้จะเกิดขึ้นภายใน 10-20 นาที หลังจากยุงได้รับเลือด หลังจากนั้นเกิดกระบวนการปฏิสนธิ โดยการผสมกันระหว่างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้กับเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย ได้เป็น zygote ซึ่งต่อมาจะพัฒนาเป็น ookinete ภายใน 12-18 ชั่วโมง มีรูปร่างยาวรี สามารถเคลื่อนที่ได้จะไชผ่านเซลล์บุผนังกระเพาะอาหารยุง ทำให้กระเพาะอาหารยุงโป่งออกหุ้มตัวไว้เกิดเป็นระยะ oocyst เป็นถุงรูปร่างกลม ขนาดเมื่อโตเต็มที่ 6-20

ไมโครเมตร ภายในเกิดกระบวนการแบ่งตัวได้ sporozoite รูปร่างคล้ายเส้นด้าย มีจำนวนประมาณ 1,000-100,000 ตัวต่อหนึ่ง oocyst โดยในระยะนี้ภายหลังยุงได้รับ gametocyte 4-15 วัน หลังจากนั้น oocyst จะแตกและปล่อย sporozoite ออกมา โดย sporozoite จำนวนหนึ่งจะเคลื่อนที่ไปด้านหัวของยุงและไซเข้าไปในต่อมน้ำลายของยุงเพื่อรอเวลาให้ยุงเข้าไปกัดกินเลือดคนต่อไป sporozoite ที่ออกจาก oocyst ใหม่จะติดต่อกันได้ไม่ดีเนื่องจากต้องใช้เวลาในการพัฒนาไปเป็นระยะติดต่ออีก 1-3 วัน ในต่อมน้ำลายของยุง sporozoite สามารถมีชีวิตอยู่ได้ในต่อมน้ำลายยุงจนสิ้นอายุขัยของยุง (Beier, 1998)

1.2 อาการ และพยาธิวิทยา

อาการของผู้ป่วยขึ้นอยู่กับชนิดของปรสิต ตลอดจนระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วย ประชากรที่อาศัยอยู่ในแหล่งที่มีการระบาดของโรคมาลาเรียสูง มักมีภูมิคุ้มกันทั้งด้านเซลล์ และสารน้ำต่อโรคมาลาเรียก่อนแล้ว ดังนั้นจึงมีอาการไม่รุนแรงเมื่อเป็นโรคมาลาเรีย โดยพบว่า 80% มีปรสิตในกระแสเลือดแต่ไม่แสดงอาการของโรค (Suh *et al.*, 2004) พื้นที่ที่มีการระบาดของโรคต่ำผู้ป่วยจะไม่แสดงอาการจนกระทั่งปรสิตออกจากเซลล์ตับเข้าสู่เม็ดเลือดแดง และเจริญเติบโตแบ่งตัวในเม็ดเลือดแดงแล้วอย่างน้อยหนึ่งรอบ โดยระยะเวลาฟักตัวซึ่งเป็นช่วงระยะเวลาตั้งแต่ถูกยุงพาหะกัดจนแสดงอาการของโรคจะขึ้นอยู่กับชนิดของปรสิต โดยระยะฟักตัวของ *P. falciparum* จะสั้นที่สุดคือประมาณ 7-10 วัน อาการของโรคโดยทั่วไปคือ ผู้ป่วยจะแสดงอาการคล้ายกับเป็นไข้หวัด เช่น มีไข้ต่ำ ปวดศีรษะ ปวดตามตัว และกล้ามเนื้อ อาจมีอาการคลื่นไส้ และเบื่ออาหารร่วมด้วย อาการดังกล่าวอาจเป็นอยู่ 2-3 วัน หรือนานกว่านั้นก็ได้ขึ้นอยู่กับภาวะภูมิคุ้มกันของผู้ป่วย อาการที่เด่นชัดของโรคมาลาเรียคือมีไข้จับสั่น (paroxysms) ซึ่งประกอบด้วยระยะต่างๆ 3 ระยะ (วิฑูรย์ และ พิรพวรรณ 2540) ตามลำดับดังนี้คือ

ระยะหนาวสั่น ผู้ป่วยจะมีอาการหนาวสั่น อาการจะกินเวลาประมาณ 15-60 นาที แล้วหายไป ระยะนี้จะตรงกับการแตกของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ

ระยะร้อน ผู้ป่วยจะมีไข้สูงถึง 39-41°C หน้าแดง ในเด็กอาจชักได้ ระยะนี้เป็นอยู่นาน 2-6 ชั่วโมง

ระยะเหงื่อออก ผู้ป่วยจะมีเหงื่อออกทั่วตัว อาการไข้เริ่มลดลง และหายไปในที่สุด อาการเหล่านี้จะเริ่มอีกครั้งเมื่อมีการแตกของเม็ดเลือดแดงชุดใหม่

ผู้ป่วยมาลาเรียชนิด *P. falciparum* มักจะมีอาการรุนแรง (severe malaria) ตลอดจนพบภาวะแทรกซ้อนต่างๆ เช่น respiratory distress, pulmonary edema, abnormal bleeding,

jaundice, hemoglobinuria, renal failure และ severe anemia มาลาเรียชนิดรุนแรงนี้มักพบเมื่อมีปรสิตในกระแสเลือดมากกว่า 5% ซึ่งหากขาดการรักษาที่เหมาะสม ผู้ป่วยมีโอกาสเสียชีวิตถึง 20% ภาวะมาลาเรียขึ้นสมอง (cerebral malaria) เป็นภาวะแทรกซ้อนที่อันตรายที่สุด มีอัตราการเสียชีวิต 15-25% (Suh *et al.*, 2004)

ปรสิตชนิด *P. falciparum* มีความรุนแรงและทำให้เกิดอันตรายมากที่สุด เนื่องจากปัจจัยต่างๆ ดังต่อไปนี้ ภาวะมีปรสิตในกระแสโลหิตสูง (hyperparasitemia) พบเชื้อ *P. falciparum* ชนิดไร้เพศในกระแสโลหิตมากกว่า 5% ของเม็ดเลือดแดง เนื่องจากระยะ merozoite ของ *P. falciparum* มีโปรตีนที่จำเป็นต่อการจับกับตัวรับจำเพาะบนผิวของเม็ดเลือดแดงหลายชนิด จึงสามารถบุกรุกเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ทุกระยะ ในขณะที่ *P. vivax* บุกกรุกได้เฉพาะเม็ดเลือดแดงตัวอ่อน (reticulocyte) เท่านั้น เม็ดเลือดแดงที่มีปรสิตจะแตกง่ายทำให้ผู้ป่วยที่ติดเชื้อมักพบภาวะซีดอย่างรุนแรง (severe anemia) ระดับ hemoglobin น้อยกว่า 50 g/L หรือ hematocrit น้อยกว่า 15% ร่วมกับอาการเหลือง (jaundice) มีค่าบิลิรูบินในเลือดสูง ภาวะช็อก ผู้ป่วยมักมีความดันโลหิตต่ำกว่าปกติ และภาวะ hypovolemia เนื่องจากการขยายตัวของหลอดเลือด hemoglobinuria และ blackwater fever มีปัสสาวะมีสีเข้ม เนื่องจากเม็ดเลือดแดงแตกในหลอดเลือดอย่างรุนแรง มี hemoglobin ออกมาในปัสสาวะ (Stoute *et al.*, 2003)

จากการศึกษาในหลอดทดลอง (*in vitro*) แสดงให้เห็นว่าเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรียมีสมบัติเกาะติด (cytoadherence) กับเซลล์ endothelial ของผนังหลอดเลือดขนาดเล็กได้ (Heddini, 2002) พบว่าโมเลกุลที่มีบทบาทสำคัญในการเกาะติดนี้คือ Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) เป็นโปรตีนซึ่งพบแทรกอยู่ที่ผิวของเม็ดเลือดแดงในระยะ schizont และ merozoite สามารถเกาะติดกับตัวรับบนผิวของเซลล์บุผนังหลอดเลือดหลายชนิด ได้แก่ thrombospondin (TSP), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), CD36 และ CD31 (Mackintosh *et al.*, 2004) ดังนั้นจึงพบปรสิตระยะวงแหวนและ gametocytes เท่านั้นในกระแสโลหิตของผู้ที่ติดเชื้อมาลาเรีย การเกาะติดกับผนังหลอดเลือดภายในอวัยวะต่างๆ ทำให้เกิดพยาธิสภาพที่สำคัญของ *P. falciparum* โดยพบมากที่สุดที่สมอง การเกาะติดดังกล่าวทำให้เกิดภาวะขาดขวางการไหลเวียนของโลหิต ประกอบกับเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อปรสิตเปลี่ยนรูปร่างเมื่อไหลในหลอดเลือดแคบๆ ได้น้อยลง จึงทำให้อวัยวะปลายทางได้รับเลือดน้อยลง เกิดภาวะขาด oxygen (hypoxia) ซึ่งถ้าเกิดขึ้นกับอวัยวะใดก็จะทำให้เกิดพยาธิสภาพกับอวัยวะนั้นๆ เช่น เกิดที่สมองทำให้ผู้ป่วยมีอาการไม่รู้สึกรู้ตัว ชัก เกิดที่ไต ทำให้ปัสสาวะน้อย อาการไตล้มเหลวเฉียบพลัน เกิดขึ้นที่ปอดทำให้เกิดภาวะปอด

บวมน้ำ เป็นต้น นอกจากสมบัติการเกาะติดกับผนังหลอดเลือดดังกล่าวแล้ว เม็ดเลือดแดงที่มีประสิทธิภาพยังสามารถเกาะติดกับเม็ดเลือดแดงปกติโดยรอบ (rosetting) กับเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาก่อนเอง (autoagglutination) (Miller *et al.*, 2002) ตลอดจนกับเกร็ดเลือด (clumping) (Pain *et al.*, 2001) ได้ นอกจากนี้ยังพบการเกาะกลุ่มระหว่างเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาก่อนกับเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน เช่น dendritic cells ส่งผลให้เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาก่อนไม่ถูกทำลายตามปกติที่ม้าม ตลอดจนสามารถหลบหลีกจากระบบภูมิคุ้มกันได้อีกด้วย (Urban *et al.*, 2001)

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อมาก่อนมีบทบาทในการเกิดพยาธิสภาพของโรคมาลาเรียเช่นกัน ระดับ pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IFN- γ , IL-1 และ IL-6) เพิ่มขึ้นมีบทบาทในการกำจัดปรสิตในระยะแรกของการติดเชื้อ (Day *et al.*, 1999) พบว่า TNF- α ในกระแสโลหิตสัมพันธ์กับภาวะช็อค (Ekvall, 2003) โดยลดการสร้างเซลล์เม็ดเลือดแดงในไขกระดูก (Wickramasinghe and Abdalla, 2000) นอกจากนี้ TNF- α และ IFN- γ ยังมีบทบาทเพิ่มการแสดงโมเลกุลตัวรับของเซลล์ endothelial ของหลอดเลือดในสมอง (Chen *et al.*, 2000) และชักนำ lymphocyte และ macrophage มายังบริเวณดังกล่าวชักนำให้เกิดปฏิกิริยาการอักเสบ อันเป็นกลไกในการเกิดพยาธิสภาพของภาวะมาลาเรียขึ้นสมองอีกด้วย (Newton *et al.*, 2000) นอกจากนี้การติดเชื้อมาลาเรียทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเม็ดเลือดขาว เกร็ดเลือด ตลอดจนกระบวนการแข็งตัวของเลือด ทั้งด้านจำนวน และการทำหน้าที่ ภาวะเกร็ดเลือดต่ำ อันเกิดจากการเกาะกลุ่มกับเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาก่อน (Pain *et al.*, 2001) ตลอดจนภาวะเลือดออกผิดปกติ อันเนื่องมาจากความผิดปกติของการแข็งตัวของเลือด ทำให้มีเลือดออกได้ทั่วตัว บางรายอาจเกิดการแข็งตัวของเลือดอุดตันภายในหลอดเลือดทั่วร่างกาย มักพบในผู้ป่วยอาการรุนแรง ตลอดจนผู้ป่วยที่เสียชีวิต (Holst *et al.*, 1999)

ผู้ป่วยมาลาเรียชนิด *P. vivax* และ *P. ovale* มักจะไม่เสียชีวิต นอกจากในผู้ป่วยที่มีร่างกายอ่อนแอ เช่น เด็กและผู้สูงอายุ เนื่องจากอัตราการบุกรุกเม็ดเลือดแดงต่ำ ตลอดจนไม่พบการหลบซ่อนของปรสิตตามอวัยวะต่างๆ ในขณะที่เชื้อมาลาเรียชนิด *P. malariae* ถึงแม้มีอัตราการเสียชีวิตต่ำ แต่พบว่าปรสิตสามารถคงอยู่ในกระแสเลือดได้นานกว่า 40 ปี (Oh *et al.*, 2001)

1.3 ภูมิคุ้มกันวิทยา

เนื่องจากปรสิตมีวงชีวิตที่ซับซ้อนในร่างกายจึงมีกระบวนการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อปรสิตแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับระยะของปรสิตนั่นเอง (รูปที่ 2) ปรสิตระยะ sporozoite ในกระแสโลหิตนั้นถูกกำจัดได้ด้วย antibody การศึกษาทั้งในหลอดทดลอง (*in vitro*)

และในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) แสดงให้เห็นว่า antibody สามารถยับยั้งกระบวนการบุกรุก ตลอดจน การพัฒนาของปรสิตในเซลล์ตับ (hepatocytes) ได้ แต่เนื่องจาก sporozoite บุกรุกเข้าสู่เซลล์ตับ ในเวลาภายใน 2-30 นาทีเท่านั้น ดังนั้นจึงจำเป็นจะต้องมี antibody ในกระแสโลหิตในระดับที่สูง เพียงพอในระยะเวลาสั้นๆ ซึ่งพบเฉพาะในประชากรที่อาศัยในพื้นที่ที่มีการแพร่ระบาดของโรคสูง เท่านั้น (Good and Doolan, 1999) เมื่อเข้าสู่เซลล์ตับ sporozoite จะถูกจับกินโดย monocytes หรือ macrophages ในตัวด้วยกระบวนการ antibody-dependent และ antibody-independent phagocytosis ในขณะเดียวกันก็หลั่งสารที่มีความเป็นพิษต่อปรสิต เช่น perforin และ granzyme ตลอดจน pro-inflammatory cytokines เช่น IL-1, TNF- α และ GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) ชักนำให้เกิดปฏิกิริยาการอักเสบ ซึ่งจำเป็นต่อ กระบวนการทำลายปรสิตในระยะแรก (Fritsche *et al.*, 2001) ปรสิตส่วนที่หลุดรอดไปได้ก็จะเข้าสู่เซลล์ตับถูกนำเสนอ antigen ร่วมกับ MHC class I ของเซลล์ตับ ซึ่งสามารถจดจำและทำลาย ด้วย CTLs (cytotoxic T lymphocytes) หรือ กระตุ้นให้ natural killer cell (NK cells) และ T cells ผลิต IFN- γ ซึ่งมีฤทธิ์ฆ่าปรสิตได้โดยตรง ตลอดจนส่งเสริมกระบวนการ phagocytosis (Tsuji and Zavala, 2003)

ปรสิตในระยะ merozoite ก่อนที่จะเข้าสู่เม็ดเลือดแดง ถูกจดจำได้ด้วย antibody เช่นกัน ยับยั้งการบุกรุกเซลล์เม็ดเลือดแดงของปรสิต ตลอดจนมีบทบาทในกระบวนการทำลาย ปรสิตด้วย antibody-dependent phagocytosis ได้ นอกจากนี้เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อปรสิตใน กระแสโลหิตเมื่อถูกจับกินโดย macrophages ก็จะนำเสนอ antigen ของปรสิตผ่าน MHC class II ให้กับ CD4 T cells เพื่อให้มีการสร้าง specific antibody ด้วย โดย antibody ดังกล่าวสามารถ ยับยั้งการเกาะติดของปรสิต ตลอดจนมีความจำเป็นในกระบวนการ antibody-dependent cellular inhibition (ADCI) (Plebanski and Hill, 2000) พบว่าส่วนประกอบของเม็ดเลือดแดงที่ ถูกทำลายด้วยปรสิต โดยเฉพาะ malaria pigment นั้น ชักนำการสร้าง IL-12 และ IL-18 ของ macrophage (Pichyangkul *et al.*, 1994) ตลอดจน TNF- α และ IFN- γ โดย T cell ได้ พบว่า pro-inflammatory cytokines มีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่อการติดเชื้อปรสิตในระยะแรก (Rhee *et al.*, 2001) ในการควบคุมการเพิ่มจำนวนของปรสิตในกระแสเลือด ตลอดจนกระตุ้นการ ทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันอื่นๆ (Artavanis-Tsakonas and Riley, 2002) จากการศึกษา ในหลอดทดลอง และในสัตว์ทดลองแสดงให้เห็นว่า IFN- γ ป้องกันเซลล์ตับจากการติดเชื้อปรสิตได้ แต่หากขาด IFN- γ ในระยะแรกของการติดเชื้อกลับส่งผลต่อการเกิดพยาธิสภาพได้ (Su and Stevenson, 2000) การศึกษาในผู้ป่วยมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ที่ไม่มีอาการแทรกซ้อน

พบว่าระดับของ IFN- γ ในกระแสโลหิตเพิ่มขึ้นในระยะแรกของการติดเชื้อ และลดลงในวันที่ 3 (Torre *et al.*, 2002) TNF- α มีสมบัติ pyrogen มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิร่างกาย ตลอดจนอาการไข้จับสั่น (paroxysm) ในการทดลอง *in vitro* คาดว่าอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นนั้นมีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโต และการเพิ่มจำนวนของปรสิตชนิด *P. falciparum* ตลอดจนมีบทบาทสำคัญในการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ โดยกระตุ้น type 1 helper T-cell (Th1) ซึ่งจะส่งเสริมการกำจัดเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อโดย macrophages และ NK cells (Hensmann and Kwiatkowski, 2001) แต่ในขณะเดียวกันก็พบว่าในผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรงมักพบ TNF- α และ IFN- γ ในกระแสโลหิตสูง ถึงแม้ว่าการตอบสนองดังกล่าวสามารถกำจัดปรสิตได้ แต่ในขณะเดียวกันก็พบว่ามีบทบาทต่อพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นด้วย โดยพบว่าในผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิดรุนแรงมีระดับของ TNF- α และ IFN- γ สูงในกระแสโลหิต พบว่า TNF- α และ IFN- γ มีบทบาทต่อการแสดงออกของ vascular endothelium receptor โดยเฉพาะการเพิ่มขึ้นของตัวรับชนิด ICAM-1 ใน cerebral microvessels ในผู้ป่วยที่มีภาวะมาลาเรียขึ้นสมอง เป็นต้น (Louis *et al.*, 2002) รวมทั้ง IL-12 และ IL-18 เพิ่มการทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดง และยับยั้งกระบวนการสร้างเซลล์เม็ดเลือดแดงในไขกระดูก (Malaguarnera and Musumeci, 2002)

เชื่อว่ากระบวนการรักษาและควบคุมภาวะสมดุลของ pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IFN- γ , IL-12 และ IL-18) มีความสำคัญในการป้องกันการเกิดพยาธิสภาพอันมีสาเหตุจากการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (immunopathology) โดยปรกติพบว่ามีการสร้าง anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10 และ TGF- β) ท้นที่ที่มีการสร้าง pro-inflammatory cytokine (Omer *et al.*, 2000) คอยกกดมิให้มีการตอบสนองด้านเซลล์มากเกินไป และกระตุ้น type 2 helper T-cell (Th2) ส่งเสริมให้มีการสร้าง antibody (Jason *et al.*, 2001) IL-4 ลดการสร้าง IFN- γ ส่งผลยับยั้งการทำงานของ Th1 ในขณะเดียวกันก็ส่งเสริม Th2 ในขณะที่ IL-10 ส่งเสริมการเจริญเติบโต ตลอดจนการทำหน้าที่ของ B cell ยับยั้งการหลั่ง IFN- γ , IL-6, TNF- α และ GM-CSF ของ T cell ลดการนำเสนอ MHC class II ของ macrophage ทำให้สมบัตินำเสนอ antigen ของปรสิตลดลง โดยเฉพาะ transforming growth factor-beta (TGF- β) ซึ่งมีบทบาทสำคัญมากในกระบวนการนี้ โดยควบคุมสมดุลของ pro-inflammatory cytokine และ anti-inflammatory cytokine ให้เหมาะสม พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 1-5 pg/mL TGF- β มีบทบาท pro-inflammatory cytokine ชักนำ macrophage, neutrophil และ T cell มายังบริเวณที่เกิดการอักเสบ ส่งเสริมการแสดง endothelial cell adhesion molecule ตลอดจนการสร้าง pro-inflammatory cytokine อื่นๆ ในขณะทีระดับความเข้มข้น 20-50 pg/mL พบว่า TGF- β แสดง

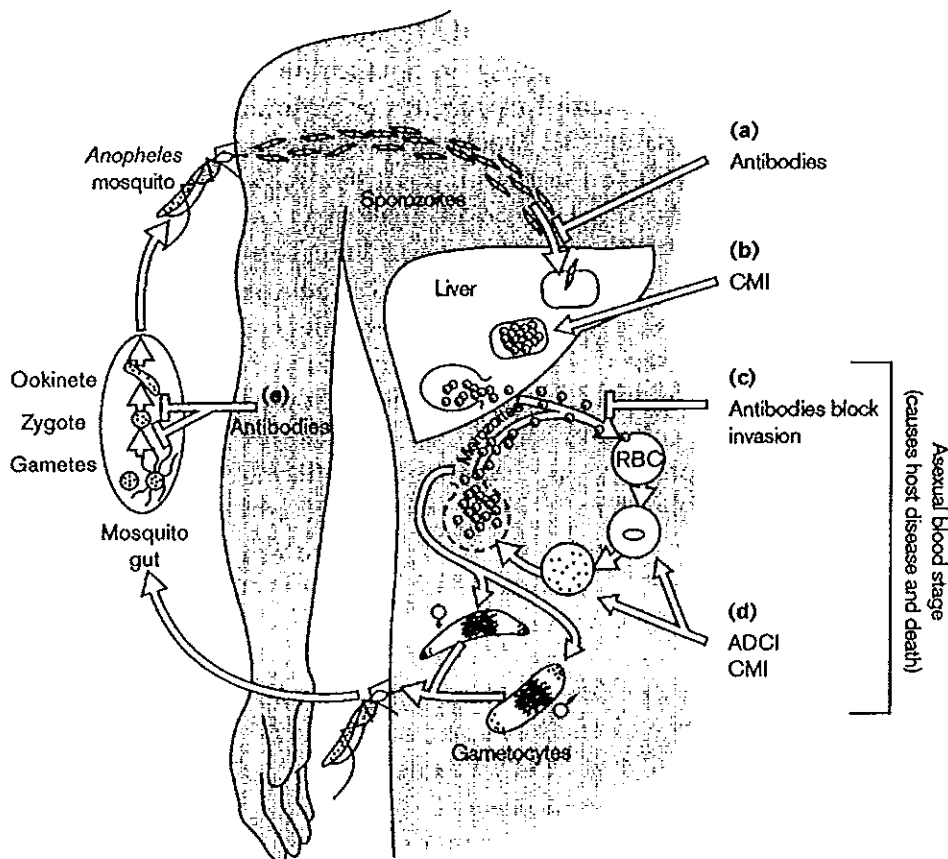
สมบัติ anti-inflammatory cytokine ยับยั้งการหลั่ง TNF- α และ IFN- γ จาก macrophage และ NK cell รวมทั้งส่งเสริมการหลั่ง IL-10 และการทำงานของ B cell (Wahl, 1994; Maeda and Shiraishi, 1996)

ถึงกระนั้นก็ตามพบว่าปรสิตชนิด *P. falciparum* สามารถหลบหลีกจากระบบภูมิคุ้มกัน (immune evasion) ดังกล่าวได้ด้วยกระบวนการต่างๆ (Hisaeda *et al.*, 2005) เช่น สมบัติความหลากหลายของ antigen (antigenic polymorphism) ด้วย MSP-1 ของปรสิตระยะ merozoite และ PfEMP1 ของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื่อปรสิตทำให้ยากแก่การจดจำโดยระบบภูมิคุ้มกัน (Qari *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1995) การกดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (immune suppression) พบว่า PfEMP1 ของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื่อปรสิตสามารถจับกับเซลล์ที่ทำหน้าที่นำเสนอ antigen (antigen-presenting cells, APCs) ของปรสิตต่อ T cell เช่น dendritic cell และ macrophage ด้วย CD36 ตลอดจนยับยั้งการเติบโตของ dendritic cell (Urban *et al.*, 1999) ซึ่งส่งผลทำลายสมบัติการตรวจจับ antigen ของปรสิตโดย T cell และส่งเสริมการหลั่ง (anti-inflammatory cytokine) เช่น IL-10 และ TGF- β ในระยะแรกของการติดเชื่อส่งผลลดปฏิกิริยาการอักเสบซึ่งจำเป็นในการกำจัดปรสิต (Ocana-Morgner *et al.*, 2003) นอกจากนี้ตัว *P. falciparum* เอง ยังสามารถสร้าง prostaglandin ซึ่งมีสมบัตียับยั้งการทำงานของ APCs และ T cell ได้โดยตรง (Luder *et al.*, 2001) อันเป็นสาเหตุของการเกิดพยาธิสภาพ ตลอดจนอาการแทรกซ้อน

1.4 การวินิจฉัย

การวินิจฉัยการติดเชื่อมาลาเรียอาจเริ่มจากการสังเกตอาการทางคลินิก (clinical diagnosis) และซักประวัติผู้ป่วย เช่น เคยเดินทางไปในแหล่งที่มีการระบาดหรือไม่ เป็นต้น อาการทางคลินิกที่พบได้บ่อยในผู้ป่วยมาลาเรีย คือ ความผิดปกติของระบบโลหิต เช่น ภาวะเกร็ดเลือดต่ำ (thrombocytopenia) โลหิตจาง (anemia) เม็ดเลือดขาวต่ำ (leucopenia) พบว่าการวินิจฉัยโรคมาลาเรียโดยอาศัยอาการทางคลินิกเพียงอย่างเดียวไม่เพียงพอ เนื่องจากอาการที่พบ เช่น มีไข้ ปวดศีรษะ เหงื่อออก เบื่ออาหาร คลื่นไส้ อาเจียน ไม่ได้บ่งชี้จำเพาะว่าเป็นโรคมาลาเรีย ซึ่งจำเป็นต้องวินิจฉัยแยกจากโรคอื่นๆ เช่น ไข้เลือดออก ไข้หวัด หรือโรคติดเชื้อในกระแสโลหิต (Chandramohan *et al.*, 2002)

การตรวจหาปรสิตที่เป็นสาเหตุของโรคมาลาเรีย (parasitological diagnosis) การตรวจหาเชื้อมาลาเรียในฟิล์มเลือด เป็นวิธีการมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรีย

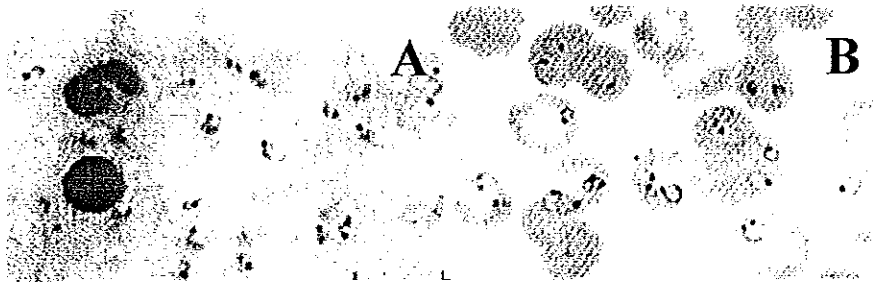


รูปที่ 2 วงชีวิตของมาลาเรียสัมพันธ์กับกระบวนการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (a) antibody ยับยั้งการบุกรุกเซลล์ตับของปรสิตระยะ sporozoite, (b) merozoite ในเซลล์ตับถูกตรวจจับและทำลายด้วยระบบภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ (cell mediated immunity, CMI), (c) เมื่อ merozoite ทำลายเซลล์ตับออกสู่ กระแสโลหิต antibody สามารถยับยั้งการบุกรุกเซลล์เม็ดเลือดแดงตลอดจน การเกาะติดอวัยวะต่างๆ เช่น รกได้, (d) ปรสิตระยะเจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงถูกตรวจจับ และทำลายด้วย antibody-dependent cellular inhibition, ADCI และ CMI, (e) ปรสิตระยะ sporozoite จากถุงกั้นปล่องเพศเมีย ถูกจดจำ ได้ด้วย antibody ในผู้ป่วยที่เคยได้รับปรสิตมาแล้ว (Good and Doolan, 1999)

สามารถพิสูจน์แยกชนิดของเชื้อมาลาเรียได้ มีความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ในการตรวจพบเชื้อปรสิตสูง สามารถทำได้ทั้งการตรวจจากแผ่นฟิล์มเลือดชนิดหนา (thick blood film) และชนิดบาง (thin blood film) ซึ่งย้อมด้วยสีกิมีซ่า (giemsa) หรือสีไวท์ (wright) ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสงกำลังขยาย 1,000 เท่า (รูปที่ 3) ในขณะที่การวินิจฉัยโรค

มาลาเรียด้วยอาการทางคลินิกมีความจำเพาะเพียงร้อยละ 20-60 เท่านั้น เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีนี้ การตรวจฟิล์มเลือดชนิดหนาที่มีประโยชน์มากในกรณีที่ผู้ป่วยมีการติดเชื้อปริมาณต่ำ วิธีนี้มีความไวในการตรวจพบเชื้อเมื่อเม็ดเลือดแดงมีการติดเชื้อในอัตรา 5-20 เซลล์ ในเลือด 1 μ L (Hanscheid, 1999) ข้อด้อยของวิธีการนี้คือ การแยกชนิดของปรสิตทำได้ยาก ดังนั้นจึงต้องใช้ควบคู่ไปกับการทำแผ่นฟิล์มชนิดบาง การวินิจฉัยโดยแผ่นฟิล์มชนิดบางมีความจำเป็นแม้ว่าจะมีความไวในการตรวจหาเชื้อต่ำกว่าการทำฟิล์มชนิดหนาก็ตาม เนื่องจากใช้แยกชนิดของปรสิตได้ซึ่งมีความจำเป็นในการให้ยารักษา เนื่องจากเชื้อแต่ละชนิดให้ยารักษาแตกต่างกัน และการตรวจฟิล์มเลือดชนิดบางยังสามารถบอกอัตราการติดเชื้อในเม็ดเลือดแดงได้ ซึ่งช่วยในการพยากรณ์อาการของโรค ติดตาม และประเมินการรักษาของแพทย์ได้อีกด้วย (Lyke *et al.*, 2003) นอกจากนี้อาจใช้สารเรืองแสงที่มีสมบัติย้อม DNA หรือ RNA ได้ เช่น acridine orange ย้อมฟิล์มเลือดเพื่อตรวจหาปรสิตได้เช่นเดียวกัน เนื่องจากเม็ดเลือดแดงแก่ปกติจะไม่มี DNA หรือ RNA ในขณะที่เม็ดเลือดแดงที่มีปรสิตมี DNA หรือ RNA ของปรสิต วิธีนี้มีความไวในการตรวจพบปรสิตมากกว่าฟิล์มเลือดชนิดบางที่ย้อมด้วยสี giemsa แต่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์เฉพาะคือ กล้องจุลทรรศน์ชนิด fluorescent (Gay *et al.*, 1996) อาศัยสมบัติการวาวแสงของ malaria pigment โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิด dark field สามารถตรวจหาปรสิตจำนวนน้อยๆ ได้ การใช้ฟิล์มเลือดชนิดหนาหรือชนิดบางอาจไม่เหมาะสมเนื่องจากต้องใช้ผู้ที่มีความชำนาญ อาจเกิดความผิดพลาดได้เมื่อมีเชื้อปรสิตในปริมาณต่ำ และใช้เวลานาน อาจทำให้รักษาผู้ป่วยไม่ทันที่ ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาวิธีการใหม่ๆ ขึ้นเพื่อช่วยเหลือในการตรวจหาเชื้อปรสิต

การตรวจวินิจฉัยโดยใช้ DNA หรือ RNA probes เป็นการตรวจหา DNA ของเชื้อปรสิต วิธีการนี้สามารถตรวจหาปรสิตปริมาณต่ำสุดใกล้เคียงกับวิธีตรวจจากแผ่นฟิล์มเลือดชนิดหนา แต่จะมีความจำเพาะ 90-100% และมีความไว 80-85% การตรวจหา DNA ของปรสิตโดยวิธีเพิ่มขยาย DNA หรือ polymerase chain reaction (PCR) ทำให้มีความไวเพิ่มขึ้น มักใช้ 18s rRNA หรือ circumsporozoite gene เป็นเป้าหมายของ probe สามารถตรวจพบปรสิตที่มีจำนวนน้อยกว่า 5 ตัว ในเลือดประมาณ 1 μ L วิธี nested PCR และ reverse transcription-PCR สามารถจำแนก ชนิดของปรสิต ตลอดจนการติดเชื้อผสมของ *P. falciparum* และ *P. vivax* ได้ (Moody, 2002) แต่เนื่องจากเป็นวิธีที่ใช้เวลานาน ประกอบกับอุปกรณ์ที่ใช้มีราคาแพงจึงไม่เหมาะสมในงานตรวจวินิจฉัยโดยทั่วไป จึงมักใช้ในกรณีที่ต้องการยืนยันผลการตรวจเท่านั้น



รูปที่ 3 การตรวจหาเชื้อมาลาเรียในฟิล์มเลือด (A) แผ่นฟิล์มเลือดชนิดหนา (thick blood film) และ (B) ชนิดบาง (thin blood) ตามลำดับ (ประยงค์ และคณะ 2544)

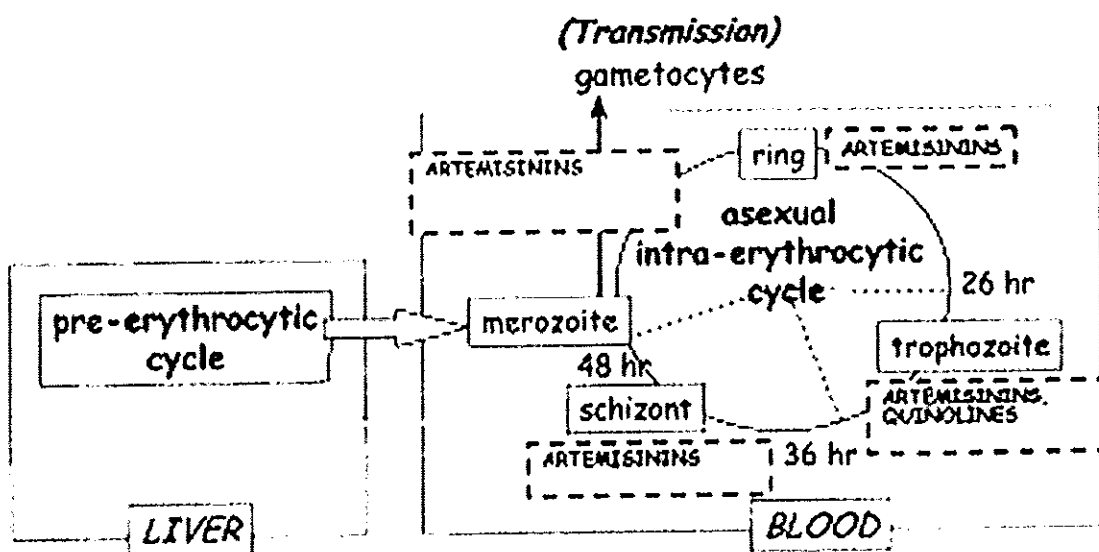
ปัจจุบันมีวิธีการตรวจหาเชื้อมาลาเรียที่รวดเร็ว (rapid diagnostic tests, RDTs) โดยการใช้แผ่นจุ่มวิเคราะห์ (dipstick) ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว และไม่ต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ วิธีนี้เป็นการตรวจหาแอนติเจน หรือเอนไซม์ของเชื้อมาลาเรียที่มีคุณสมบัติแตกต่างจากโปรตีนของคน อาศัยหลักการจับกันของ monoclonal antibody บนแผ่น nitrocellulose membrane ที่จำเพาะต่อแอนติเจน หรือเอนไซม์ของปรสิตจากตัวอย่างเลือดของผู้ป่วย เช่น การตรวจหา histidine-rich protein 2 (HRP-2) ซึ่งพบในระยะ trophozoites และตัวอ่อนระยะมีเพศของปรสิตชนิด *P. falciparum* การวิเคราะห์เอนไซม์ Lactate dehydrogenase (pLDH) ซึ่งพบในกระบวนการ metabolism ของปรสิตทั้งชนิดมีเพศ และไร้เพศ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีตรวจหาปรสิตด้วยฟิล์มเลือดชนิดหนา และเทคนิค PCR พบว่าวิธีนี้มีความไวในการตรวจหาเชื้อ *P. falciparum* 35-97% ความจำเพาะ 77-100% ความไวในการตรวจหาเชื้อ *P. vivax* หรือเชื้อมาลาเรียที่ไม่ใช่ *P. falciparum* 2-97% ความจำเพาะ 97-100% (Murray et al., 2003) แต่มีที่ประสิทธิภาพต่ำในการตรวจหาเชื้อมาลาเรียชนิด *P. malariae* และ *P. ovale* (Playford and Walker, 2002) พบว่า HRP-2 สามารถตรวจหา *P. falciparum* ซึ่งซ่อนอยู่ที่รกได้ ในขณะที่ผลการตรวจหาเชื้อมาลาเรียในฟิล์มเลือดให้ผลลบ (Leke et al., 1999) ข้อด้อยของวิธีนี้คือ ตรวจหาปรสิตในเลือดได้เมื่อมีอัตราเม็ดเลือดแดงติดเชื้อประมาณ 0.02% ขึ้นไป และเกิด cross-reaction กับ rheumatoid factor ได้ นอกจากนี้ HRP-2 อาจมีผลบวกปลอม (false positive) ได้เนื่องจากแอนติเจนจะยังคงอยู่ในกระแสโลหิตได้นานประมาณ 2 สัปดาห์ หลังจากเชื้อหมดไปจากกระแสโลหิตแล้ว (Mayxay et al., 2001) ในขณะที่ pLDH จะตรวจพบเฉพาะช่วงที่เชื้อมีชีวิตเท่านั้น (Hanscheid, 1999) ในขณะที่การตรวจหา antibody ต่อปรสิตไม่เป็นที่นิยม เนื่องจาก antibody คงอยู่ในกระแสเลือดได้นานเป็นเดือน จึงไม่สามารถแยกผู้ป่วยเก่าออกจากผู้ป่วยใหม่ได้

นอกจากนี้การนำอุปกรณ์ทันสมัยมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรีย เช่นใช้ Flow cytometer (FCM) ตรวจหาปรสิต และ laser desorption mass spectrometer (LDMS) ตรวจหา malaria pigment ทำให้การตรวจวินิจฉัยสะดวก และรวดเร็วมากขึ้น (Wongchotigul *et al.*, 2004; Scholl *et al.*, 2004)

1.4 การรักษา

การรักษาผู้ป่วยมาลาเรียมีหลักสำคัญคือการให้ยาฆ่าเชื้อมาลาเรียระยะไร้เพศซึ่งเป็นระยะที่พบในเม็ดเลือดแดง อันเป็นระยะที่ทำให้เกิดอาการป่วยไข้ ตลอดจนบำบัดความผิดปกติของอวัยวะต่างๆ ให้กลับทำงานได้เป็นปกติ โดยการรักษาอาการและภาวะแทรกซ้อน และการฆ่าเชื้อมาลาเรียระยะมีเพศเพื่อป้องกันการแพร่กระจายโรค วงชีวิตของเชื้อมาลาเรียประกอบไปด้วยระยะต่างๆ เชื้อต่างระยะกันจะมีความไวต่อยาต้านมาลาเรียต่างกัน หรืออาจกล่าวได้ว่ายาต้านมาลาเรียแต่ละชนิดออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อบางระยะเท่านั้น ดังรูปที่ 4

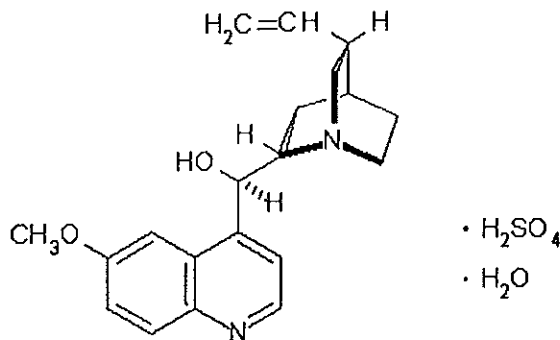
chloroquine (7-chloro-4-(4-diethylamino-1-methylbutylamino) quinoline) เป็นอนุพันธ์ของ quinine ใช้กันอย่างแพร่หลายภายหลังสงครามโลกครั้งที่ 2 มีความเป็นพิษน้อยกว่ายา quinine มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อมาลาเรียได้ทุกชนิด chloroquine ถูกเปลี่ยนแปลงโดยตับ ให้เมตาโบไลต์ที่สำคัญคือ desethylchloroquine ซึ่งมีฤทธิ์ต้านมาลาเรียระยะในเลือด มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ heme polymerases และสามารถจับกับ heme (ferriprotophyrin IX) ซึ่งเป็นผลผลิตจากกระบวนการย่อยสลาย hemoglobin (Sullivan, 2002) เกิด heme-chloroquine complex ทำให้



รูปที่ 4 การออกฤทธิ์ของยาต้านมาลาเรียแต่ละชนิดต่อวงชีวิตของปรสิต (Olliaro, 2001)

ปรสิตไม่สามารถเปลี่ยน heme ให้เป็น hemozoin ได้ จึงเกิดเป็นพิษขึ้นกับปรสิต นอกจากนี้ chloroquine ยังสามารถยับยั้งเอนไซม์ของปรสิตอีกหลายชนิด เช่น proteases ซึ่งจำเป็นต่อการย่อยสลาย hemoglobin ของปรสิตอีกด้วย (Ginsburg *et al.*, 1999)

chloroquine ดูดซึมได้ดีในระบบทางเดินอาหาร ความเข้มข้นสูงสุดในพลาสมาหลังจากได้รับยา 2 ถึง 12 ชั่วโมง ค่าครึ่งชีวิตประมาณ 10 วัน ในพื้นที่ที่ปรสิตไวต่อ chloroquine ให้ chloroquine 25 mg/ น้ำหนักตัว (kg) เป็นเวลา 3 วัน โดยแบ่งให้ในวันที่ 1 และ 2 ครั้งเดียว ขนาด 10 mg ต่อ น้ำหนักตัว (kg) และ 5 mg ต่อ น้ำหนักตัว (kg) ในวันที่ 3 พบว่าการได้รับ chloroquine มากกว่า 2 g หรือได้รับยา 2 ถึง 3 ครั้งใน 1 วัน อาจเป็นอันตรายถึงชีวิตได้ (Bosman *et al.*, 2000) chloroquine สามารถใช้ในการรักษาผู้ป่วยมาลาเรียในขณะตั้งครรภ์ได้ แต่พบว่ามีปริมาณยาสูงๆส่งผลให้แท้งได้ (Newman *et al.*, 2003) ถึงกระนั้นก็ตามจากการศึกษาบริเวณชายแดนไทย-พม่า ระหว่างปี 1995 ถึง 2000 โดยการรักษาผู้ป่วยมาลาเรียทั้งชนิด *P. vivax* และ



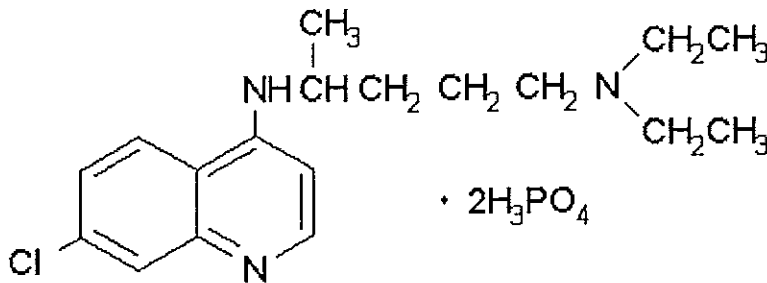
รูปที่ 5 โครงสร้างทางเคมีของ chloroquine diphosphate salt (Anonymous a, 2004)

P. falciparum ในขณะตั้งครรภ์ในไตรมาสแรกด้วยยา chloroquine และ quinine ตามลำดับ พบว่าการเกิด spontaneous abortion ในสตรีมีครรภ์ที่เป็นมาลาเรีย และได้รับ chloroquine (18.3%) หรือ quinine (22.9%) ไม่แตกต่างจากกลุ่มสตรีมีครรภ์ที่ไม่เป็นมาลาเรีย (17.8%) ตลอดจนไม่มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของภาวะความผิดปกติแรกคลอด ตายคลอด หรือน้ำหนักแรกเกิดต่ำแต่อย่างใด (McGready *et al.*, 1999)

quinine เป็น alkaloid ซึ่งได้จากเปลือกของต้น cinchona ใช้รักษามาลาเรีย มากกว่า 300 ปี มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อปรสิตทุกชนิดในระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงตลอดจนระยะสืบพันธุ์ของปรสิตชนิด *P. vivax*, *P. ovale* และ *P. malariae* ยกเว้น *P. falciparum* ในหลายๆประเทศ รวมทั้ง

ประเทศไทย ที่เชื้อมาลาเรียคือยา chloroquine สามารถใช้ quinine ในการรักษาผู้ป่วยมาลาเรีย ในขณะที่ตั้งครรภ์ได้ กระนั้นก็ตามพบว่า การได้รับปริมาณยามากเกินไปก่อให้เกิดภาวะ teratogenic และอันตรายต่อระบบประสาทของทารก นอกจากนั้นยังกระตุ้นให้มีการหลั่ง insulin เพิ่มขึ้น ส่งผลให้เกิดภาวะ hypoglycemia ในมารดา (Newman *et al.*, 2003)

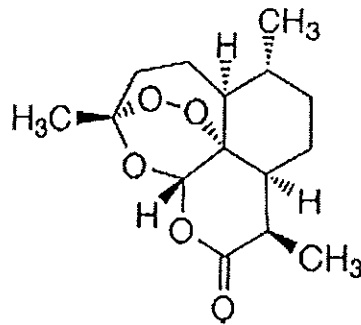
quinine ดูดซึมได้ดีในระบบทางเดินอาหาร ความเข้มข้นสูงสุดในพลาสมา หลังจากได้รับยา 1 ถึง 3 ชั่วโมง ค่าครึ่งชีวิต 10 ถึง 12 ชั่วโมง ในพื้นที่ที่ปรสิตไวต่อ quinine ให้ quinine ขนาด 8 mg ต่อน้ำหนักตัว (kg) วันละ 3 ครั้ง เป็นเวลา 7 วัน พบว่าการได้รับ quinine ครั้งเดียว มากกว่า 3 g อาจทำให้เสียชีวิตได้ (Bosman *et al.*, 2000)



รูปที่ 6 โครงสร้างทางเคมีของ quinine hemisulfate salt (Anonymous b, 2004)

artemisinin ตลอดจนอนุพันธ์ เช่น dihydroartemisinin, artemether และ artesunate เป็นสารธรรมชาติจากพืชสมุนไพร Qing Hao (*Artemisia annua*) จากประเทศจีน เป็นยาต้านมาลาเรียที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อปรสิตในกระแสเลือดได้อย่างรวดเร็วมาก และมีความปลอดภัยสูง สามารถใช้ในการรักษาผู้ป่วยมาลาเรียชนิดรุนแรง รวมทั้งผู้ป่วยมาลาเรียในบริเวณที่เชื้อปรสิตคือต่อยา chloroquine และยาต้านมาลาเรียอื่นๆ ได้ artemisinin เมื่อผ่านกระบวนการ metabolism ที่ตับแล้วจะได้เป็น dihydroartemisinin สามารถจับได้ดีกับ porphyrin ring (ferrous II[ferroprotoporphyrin IX]) ในโมเลกุลของ heme และ hemozoin ของเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วย (Meshnick, 2002) เกิดการกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยา hydroperoxide ทำให้ endoperoxide bridge ที่อยู่ภายในโมเลกุลของ artemisinin เปิดออกได้เป็น reactive oxygen species (ROS) ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการรบกวนกระบวนการ hemozoin synthesis, hemozoin degradation, hemoglobin digestion ของปรสิต ตลอดจนเกิดการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ และทำลายปรสิตในที่สุด (Olliaro *et al.*, 2001)

artemisinin ดูดซึมได้ดีในระบบทางเดินอาหาร ความเข้มข้นสูงสุดในพลาสมาหลังได้รับยา 1 ถึง 2 ชั่วโมง ค่าครึ่งชีวิต 2 ถึง 5 ชั่วโมง ขนาดที่ใช้ในการรักษา



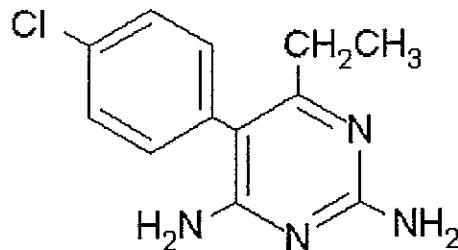
รูปที่ 7 โครงสร้างทางเคมีของ artemisinin (Anonymous c, 2004)

คือ 20 mg ต่อน้ำหนักตัว (kg) ในวันแรก และ 10 mg ต่อน้ำหนักตัว (kg) เป็นเวลา 6 วัน (Bosman *et al.*, 2000) จากการศึกษาในสตรีมีครรภ์ ที่ติดมาลาเรียชนิด *P. falciparum* บริเวณชายแดนไทย-พม่า เปรียบเทียบผลของยาด้านมาลาเรีย 3 ชนิด คือ quinine, mefloquine และ artemisinin พบว่า artemisinin มีประสิทธิภาพ ตลอดจนความปลอดภัยในการใช้รักษามาลาเรียในสตรีมีครรภ์มากกว่ายาด้านมาลาเรียชนิดอื่น (McGready and Nosten, 1998) เช่นเดียวกับการศึกษาในพื้นที่อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก ซึ่งเป็นพื้นที่ที่พบการดื้อยาหลายชนิดของเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* (multidrug-resistant *Plasmodium falciparum*) พบว่า artesunate และ artemether ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ artemisinin มีประสิทธิภาพดีในการรักษาตรีมีครรภ์ที่ติดมาลาเรีย ตลอดจนไม่มีผลข้างเคียงทั้งต่อมารดา และทารกในครรภ์แต่อย่างใด (McGready *et al.*, 2001)

pyrimethamine เป็นสารสังเคราะห์ ออกฤทธิ์ฆ่าปรสิตระยะไร้เพศที่อยู่ในเม็ดเลือดแดง มีฤทธิ์เป็น dihydrofolate reductase inhibitors (DHFR) เนื่องจากมีโครงสร้างคล้ายกับ dihydrofolate จึงแย่งจับกับ active site ของ dihydrofolate reductase (DHF) ทำให้ DHF ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยา reduction ในกระบวนการสร้าง tetra-hydrofolate ซึ่งเป็น cofactor ที่สำคัญในกระบวนการ nucleic acid metabolism ของปรสิต (Olliaro, 2001)

การใช้ยาผสมของ sulfadoxine-pyrimethamine จะช่วยเสริมฤทธิ์ เพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดปรสิต ลดการดื้อยาได้ pyrimethamine ดูดซึมได้ดีในระบบทางเดินอาหาร ค่าครึ่งชีวิต

ประมาณ 95 ชั่วโมง ขนาดที่ใช้ในการรักษาคือ 1,500 mg สำหรับ sulfadoxine และ 75 mg สำหรับ pyrimethamine และให้ยาเพียงครั้งเดียว (Bosman *et al.*, 2000)



รูปที่ 8 โครงสร้างทางเคมีของ pyrimethamine (Anonymous d, 2004)

sulfadoxine-pyrimethamine ใช้รักษาผู้ป่วยมาลาเรียในขณะตั้งครรภ์โดยเฉพาะในไตรมาสแรก ได้ (Ridley, 2002) แต่พบว่าการใช้ยาต้านมาลาเรียในกลุ่ม antifolate ในไตรมาสที่ 2 และ 3 มีผลต่อความผิดปกติของทารก ในขณะที่การใช้ pyrimethamine ชนิดเดียว มิได้มีผลข้างเคียงต่อการตั้งครรภ์แต่อย่างใด (Newman *et al.*, 2003)

2 ชีววิทยาของเซลล์รก

รอกหมายถึง ก้อนเนื้อเยื่อที่ประกอบด้วยการไหลเวียนของเลือด มีบทบาทสำคัญในการตั้งครรภ์ เนื่องจากการเติบโตของตัวอ่อนจะเกิดขึ้นพร้อมๆกับพัฒนาการของรก ไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิจะเดินทางผ่านท่อนำไข่มายังอยู่ในโพรงมดลูก ใช้เวลาประมาณ 4 วัน มีการแบ่งตัว (cleavage) จนได้เป็นกลุ่มเซลล์ 16-32 เซลล์ที่เรียกว่า morula เรียกแต่ละเซลล์ว่า blastomere เมื่อ morula แบ่งเซลล์ได้ blastomere 32 ถึง 46 เซลล์ และมีการรัดรูปใหม่ (compaction) โดยเซลล์ข้างเคียงเกาะกันแน่นขึ้นด้วย adhesion molecules เช่น E-cadherin และ gap junction ได้ เป็น blastomere โดยชั้นนอกซึ่งเป็นเซลล์รูปร่างแบนเรียกว่า trophoctodermal และกลุ่มเซลล์รูปร่างกลมชั้นในเรียกว่า inner cell mass โดยมีช่องว่างภายใน (blastocoele) เกิดขึ้น เรียกทั้งหมดนี้ว่า blastocyst ซึ่ง trophoctodermal cells จะพัฒนาเป็นเซลล์ trophoblast และเยื่อหุ้ม (zona pellucida) ชั้นนอก ในขณะที่ inner cell mass จะพัฒนาเป็นตัวอ่อน (embryo) ในที่สุด (Gerami-Naini *et al.*, 2004) วันที่ 6-7 ภายหลังปฏิสนธิ เนื่องจากความต้องการสารอาหารเพื่อการเติบโตตลอดจนพัฒนาการของตัวอ่อน ทำให้ blastocyst ต้องมีกระบวนการฝังตัว (implantation) บนเยื่อบุผนังมดลูกชั้น endometrium ที่ผ่านกระบวนการเตรียมพร้อมให้เหมาะสมสำหรับการฝังตัว (decidua) กระบวนการฝังตัวเริ่มต้นเมื่อ blastocyst หลุดออก (hatching) ออกจากเยื่อหุ้ม (zona

pellucida) การฝังตัวเกิดขึ้น blastocyst จะหันเอาขั้วด้านที่มี inner cell mass เข้าสัมผัส (adhesion) เยื่อบุโพรงมดลูก ภายหลังการเข้าสัมผัสระหว่าง blastocyst กับ decidua เซลล์ trophoblast มีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน (proliferation) อย่างรวดเร็วได้เป็นเซลล์ที่มีนิวเคลียสเดี่ยวขอบเขตชัดเจนเรียกว่า cytotrophoblast หลังจากนั้นกระบวนการบุกรุก (invasion) ในเนื้อเยื่อ decidua จะเริ่มขึ้น โดย cytotrophoblast จะมีการเปลี่ยนแปลง (differentiation) ด้วกระบวนการหลอมรวมเซลล์ (syncytialization) ได้เป็นเซลล์ที่มีหลายนิวเคลียส ขอบเขตไม่ชัดเจน หุ้มอยู่ชั้นนอกชั้น cytotrophoblast เรียกว่าเซลล์ syncytiotrophoblast ซึ่งจึงมีบทบาทในการแลกเปลี่ยนสารอาหาร แก๊ส ของเสีย ระหว่างแม่และตัวอ่อน ตลอดจนทำหน้าที่ผลิตฮอร์โมน และปรับเปลี่ยนการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันให้เหมาะสม (Bentin-Ley *et al.*, 2000) ในกระบวนการ syncytialization นี้ พบว่ามีการผลิตฮอร์โมนที่สำคัญคือ human chorionic gonadotropins (hCG) ซึ่งเชื่อว่ามีฤทธิ์กดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของแม่ต่อทารก จากการศึกษาในหลอดทดลองพบว่า hCG, epidermal growth factor (EGF), GM-CSF, glucocorticoid และ estradiol มีฤทธิ์กระตุ้นกระบวนการ syncytialization ของ cytotrophoblast นอกจากนี้ยังเชื่อว่ากระบวนการ syncytialization ของเซลล์ cytotrophoblast เกิดจากกระบวนการตายของเซลล์แบบ apoptosis (Black *et al.*, 2004; Adler *et al.*, 1995; Jerzak and Bischof, 2002) ประมาณวันที่ 9-10 หลังปฏิสนธิ blastocyst จะฝังตัวมิดรอบด้าน แต่ trophoblast จะไม่บุกรุกถึงชั้นกล้ามเนื้อ ภายหลังการบุกรุกโดย syncytiotrophoblast วันที่ 13-14 ภายหลังปฏิสนธิชั้นของเซลล์ cytotrophoblast มีการแบ่งเซลล์ ตลอดจนการบุกรุกเพิ่มขึ้นได้เซลล์ที่มีรูปร่างเป็นแท่งยื่นตาม (migrate) ชั้นของเซลล์ syncytiotrophoblast เข้าไป เกิดเป็น primary villi ซึ่งมีรูปร่างคล้ายนิ้วมือ ทำให้มีการบุกรุกเข้าสู่ deciduas ลึกยิ่งขึ้น (Chakraborty *et al.*, 2002) เหตุผลของการบุกรุกลึกยิ่งขึ้น ก็คือต้องการเข้าถึงระบบไหลเวียนโลหิตของมารดานั่นเองโดย เฉพาะหลอดเลือดแดง (spiral arteries) ภายในมดลูกของมารดา ส่งผลเพิ่มพื้นที่สัมผัสกับระบบไหลเวียนของมารดามาก และทั่วถึงยิ่งขึ้น (Kingdom *et al.*, 2000)

บริเวณของ decidua ที่ถูกบุกรุกจะเกิดช่องว่างขึ้นเป็นแอ่ง เรียกว่า intervillous space มีเลือดของมารดาอาบอยู่โดยรอบ และเรียกแอ่งขนาดใหญ่ที่เกิดจากการรวมกันของแอ่งเล็กๆว่า lacuna เนื่องจากการเจริญตลอดจนพัฒนาการของเซลล์ trophoblast จะเกิดขึ้นพร้อมๆกับการเติบโตและพัฒนาของตัวอ่อน ดังนั้นเมื่อมีการสร้างระบบไหลเวียนเลือดของตัวอ่อนจะต้องมีการสร้างหลอดเลือดขึ้นบุช่องว่างเซลล์ cytotrophoblast ที่บุกรุก decidua โดยเนื้อเยื่อชั้น mesoderm ของตัวอ่อนเจริญเข้าไปสวมช่องว่างนั้น เกิดเป็น secondary villi ภายหลังจากนั้น

mesoderm ซึ่งเป็นแกนกลางจะพัฒนาต่อไปเป็นหลอดเลือดในที่สุด หลังจากนั้นระบบหลอดเลือดฝอยจะถูกพัฒนาขึ้นทำให้การไหลเวียนโลหิตของตัวอ่อนและมารดาเชื่อมต่อกันโดยสมบูรณ์ ประมาณวันที่ 17-18 หลังปฏิสนธิ เลือดแม่และเลือดลูกจึงไหลเวียนมาแลกเปลี่ยนสารกันได้ ส่วนของ trophoblast ที่ยึดติดกับ decidua โดยไม่สลายเป็น lacuna เรียกว่า anchoring villi สำหรับ villi ที่แตกแขนงลอยอยู่ใน lacuna หรือ intervillous space นั้น เรียกว่า free villi ดังนั้นกล่าวได้ว่า เลือดแม่กับเลือดลูกมิได้ปนกัน แต่ไหลเวียนมาใกล้กันแล้วแลกเปลี่ยนอาหารโดยผ่านสิ่งขวางกัน หรือที่เรียกว่า placental barrier ซึ่งประกอบด้วยชั้น endothelium ของเส้นเลือดใน villi, cytotrophoblast และ syncytiotrophoblast (Gude *et al.*, 2004)

ถึงแม้ว่าเลือดของแม่และลูกมีระบบที่อิสระต่อกัน แต่มีหลักฐานว่าเลือดลูกเข้าไปสู่เลือดแม่ได้ สารละลายต่างๆ และ antibodies จากแม่สามารถผ่านไปยังลูกได้ ยอมให้เซลล์เม็ดเลือดแดงปริมาณน้อยๆ ผ่านได้ แต่ไม่ยอมให้เซลล์เม็ดเลือดขาวผ่านจากแม่ไปสู่ลูกได้ การแลกเปลี่ยนสารระหว่างแม่กับลูกที่รกสามารถแบ่งได้เป็น 4 แบบ คือ rapid diffusion เช่น น้ำ, แก๊ส และ electrolytes, active transport เช่น amino acid, sugar, vitamins, slow diffusion ได้แก่สารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น estrogen, progesterone ซึ่งเป็นสารที่มีความจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโต และช่วยบำรุงรักษาการตั้งครรภ์ให้เป็นปกติ, pinocytosis ได้แก่สารที่มีความสำคัญทางด้านภูมิคุ้มกัน เช่น เม็ดเลือดแดง และ plasma protein เป็นต้น (Glazier and Jansson, 2004)

รกทำหน้าที่เสมือนเป็นต่อมไร้ท่อ เพื่อผลิตฮอร์โมน โดยสร้างฮอร์โมนได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม steroids ที่สำคัญ ได้แก่ progesterone และ estrogen และกลุ่ม glycoprotein ที่สำคัญ ได้แก่ hCG และ progesterone (Lacroix *et al.*, 2002) รกสร้าง progesterone โดย syncytiotrophoblast ใน 10 สัปดาห์แรกของการตั้งครรภ์ การดำรงภาวะตั้งครรภ์ขึ้นอยู่กับความสามารถในการสร้าง progesterone ในระหว่าง 7-12 สัปดาห์ ตลอดจนมีบทบาทสำคัญต่อการฝังตัวของ blastocyst ยับยั้งการหดตัวของมดลูก เชื่อว่า progesterone เป็นตัวสำคัญในการกีดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของแม่ต่อ fetal antigens ในขณะที่ estrogen สร้างโดย syncytiotrophoblast จะเริ่มสร้างตั้งแต่ 6-10 สัปดาห์แรกของการตั้งครรภ์ ทำหน้าที่เป็น growth hormone สำหรับอวัยวะในระบบสืบพันธุ์ของมารดา ฮอร์โมน hCG เป็น glycoprotein hormone สร้างมาจาก syncytiotrophoblast มีระดับสูงสุดในเลือดขณะ 8-10 สัปดาห์ของการตั้งครรภ์ ทำหน้าที่เป็น immunosuppressive ป้องกันมิให้ระบบภูมิคุ้มกันของมารดาปฏิเสธทารก ตลอดจนยับยั้งปฏิกิริยาของ lymphocyte ที่มีต่อรก ดังนั้นจึงเชื่อว่าการตั้งครรภ์ที่ประสบความสำเร็จนั้น

ขึ้นอยู่กับฮอร์โมนที่ลำคุดังกล่าวทั้งในแง่ของการควบคุมพัฒนาการของรก สมดุลของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน นอกจากนี้รกรังยังเป็นด่านป้องกันมิให้สิ่งแปลกปลอม ไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรีย ไวรัส ตลอดจนปรสิต ผ่านเข้าสู่ทารกได้ (Rogerson and Beeson, 1999)

นอกจากรกจะมีหน้าที่ผลิต hormone ที่ควบคุมสรีรวิทยาของการตั้งครรภ์ และทำหน้าที่เปรียบเหมือนปอด ไต ลำไส้ และตับของทารกแล้ว บทบาทของรกในการควบคุมตอบสนองทางภูมิคุ้มกันวิทยายังเหมาะสมก็จำเป็นต่อความสำเร็จของการตั้งครรภ์เช่นกัน พบว่าในขณะตั้งครรภ์ ภูมิคุ้มกันของแม่จะต่างจากคนปรกติ อาจเนื่องมาจากผลของ hormone ที่เกี่ยวข้องกับ การตั้งครรภ์ helper T cells ลดลงเมื่อเทียบกับ suppressor T cells และชนิดของ immunoglobulin ที่ผลิต ก็มีส่วนทำให้สภาพสมดุลเปลี่ยนแปลงไป ทั้งนี้เพื่อให้ fetal graft อยู่รอดได้ ระหว่างการตั้งครรภ์จะมีการขยายตัวของต่อมน้ำเหลืองที่ไปยังมดลูก อาจเนื่องมาจากปฏิกิริยาการตอบสนองต่อ antigen ของลูกหรือต่อโปรตีนใน steroid hormone ที่ถูกผลิตมากขึ้นระหว่างการตั้งครรภ์ ระหว่างการตั้งครรภ์ CMI ต่อ placental antigen จะเกิดขึ้นในเดือนที่สี่และคงอยู่อีกหลายเดือน แต่ถูก hormone หลายชนิดที่ผลิตจากรกกดไว้ เช่น progesterone เป็นต้น (Das *et al.*, 2002) trophoblast จะไม่ถูกฆ่าด้วย NK cell ที่ถูกกระตุ้นด้วย IFN- γ แต่จะถูกฆ่าด้วย NK ที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-2 นอกจากนี้ยังพบว่า GM-CSF และ TGF- β เป็นตัวยับยั้ง cytotoxic cell ที่ถูกกระตุ้นโดย cytokine ใน maternal decidua ขณะที่ TNF- α และ IL-2 กระตุ้น NK cells ในขณะที่รกกัทำหน้าที่เป็น specific immunoabsorbent barrier โดย HLA antibody จากแม่ที่จะทำอันตรายต่อ fetal graft จะถูกย่อยด้วย trophoblast cells ในขณะที่ lymphocyte T cells ของแม่ก็จะ tolerance ต่อ antigen ของลูก (Thellin and Heinen, 2003)

กลุ่มของ inflammatory cytokines (IL-1, IL-6, and TNF- α) มีบทบาทสำคัญต่อพัฒนาการของรกในระยะแรกของการตั้งครรภ์ (Simon *et al.*, 1998) เช่น IL-1 จาก decidua ควบคุม placental proliferation และ IL-6 จาก decidua เป็น growth factor สำหรับ placental cells นอกจากนี้ IL-3, GM-CSF และ macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) ยังทำหน้าที่เป็น hematopoiesis growth factor ด้วย รวมทั้ง immunosuppressive cytokines (TGF- β และ IL-10) นอกจากนี้พบว่าสมดุลระหว่าง inflammatory cytokines และ anti-inflammatory cytokines ก็มีความสำคัญต่อการตั้งครรภ์ โดยพบว่าการตั้งครรภ์ปกติระบบภูมิคุ้มกันของมารดาจะมี anti-inflammatory cytokines ตลอดจน Th2 เด่น (Chaouat *et al.*, 2002)

3 Choriocarcinoma

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้เซลล์รกที่ใช้คือเซลล์มะเร็ง choriocarcinoma ซึ่งเป็นเซลล์รกที่มีการแบ่งเซลล์มากผิดปกติ เกิดการบุกรุกและทำลายเนื้อเยื่อโดยรอบ นอกจากนี้ยังพบการแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นๆ โดยตำแหน่งที่พบบ่อยคือ ปอด (80%) ช่องคลอด (30%) และสมอง (10%) สาเหตุของการเกิดเซลล์มะเร็งนั้น คาดว่าเกิดจากการผิดปกติของการปฏิสนธิ เช่น จากอสุจิ 1 ตัว ปฏิสนธิกับไข่ 1 ใบ ซึ่งมีโครโมโซมเพศหลุดหายไป ทำให้ได้ตัวอ่อนที่มีโครโมโซมเพศจากอสุจิเท่านั้น หรืออาจเกิดจากอสุจิ 2 ตัว เข้าไปปฏิสนธิกับไข่ 1 ใบ ทำให้มีจำนวนโครโมโซมมากเกินไป โดยเซลล์ตัวอ่อนจากทั้ง 2 กรณี จะไม่สมบูรณ์ เจริญเติบโตอย่างไร้ระเบียบ เกิดเป็นถุงน้ำ มีลักษณะเหมือนเม็ดสาครุ (mole) หรือไข่ปลา จำนวนมากอยู่ในถุงน้ำคร่ำ ที่เรียกว่าการตั้งครรภ์ไข่ปลาอุก (Cheung, 2003) โดยเซลล์มะเร็งชนิด choriocarcinoma นั้น มักพบได้ภายหลังการตั้งครรภ์ไข่ปลาอุก (50%) การแท้ง (25%) การตั้งครรภ์ปกติ (22.5%) ตลอดจนการตั้งครรภ์นอกมดลูก (2.5%) ปัจจุบันการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค ultrasound และตรวจวัดระดับ hCG ซึ่งเป็น tumor marker ที่สำคัญ ทำให้โอกาสตรวจพบตลอดจนรักษาผู้ป่วยทำได้อย่างรวดเร็ว และมีประสิทธิภาพ (Ngan, 2003)

4 มาลาเรียขณะตั้งครรภ์

สตรีมีครรภ์ประมาณ 24 ล้านคน อาศัยอยู่ในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคมาลาเรีย มีโอกาสติดเชื้อปรสิตโดยเฉพาะ *P. falciparum* ซึ่งมักมีโรคแทรกซ้อนและรุนแรง (Okoko, 2003) โดยในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคต่ำ ภาวะมาลาเรียระหว่างตั้งครรภ์เสี่ยงต่อภาวะติดเชื้ออย่างรุนแรง และภาวะแทรกซ้อนต่างๆ เช่น แท้ง ตายคลอด ตลอดจนการเสียชีวิตของมารดาและทารกมากกว่าเมื่อเทียบกับสตรีปกติ พื้นที่ที่มีการระบาดของโรคมาลาเรียสูง พบว่าการติดเชื้ออย่างรุนแรงพบได้ไม่บ่อยนัก และมักเป็นการติดเชื้อที่ไม่แสดงอาการ ในขณะที่ภาวะรกติดเชื้อมาลาเรีย (placental malaria) อันเป็นภาวะที่พบเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรีย ร่วมกับ pigment deposition ในเนื้อรกชั้นนอก (syncytiotrophoblast) พบได้บ่อย (Leopardi et al., 1996)

เนื่องจากสตรีมีครรภ์มีความไวต่อการติดเชื้อมาลาเรียสูงกว่าสตรีที่ไม่ตั้งครรภ์ โดยเฉพาะการตั้งครรภ์ครั้งแรกจะมีการตายและความผิดปกติจากการติดเชื้อมาลาเรียในอัตราสูง ในมารดาอาการทางคลินิกที่พบได้บ่อยคือมีเชื้อมาลาเรียแพร่กระจายในเลือดมากทำให้มี อาการซีดรุนแรง ภาวะ hypoglycemia พบบ่อยในสตรีมีครรภ์ที่ติดเชื้อมาลาเรียระหว่างตั้งครรภ์มากกว่าในสตรีปกติที่ติดเชื้อ ร่วมกับอาการแทรกซ้อนอื่นๆคือ ภาวะปอดบวม น้ำ ไตวาย ดีซ่าน และช็อก เป็นต้น (Dorman and Shulman, 2000) พบว่าระหว่างตั้งครรภ์โดยเฉพาะในการตั้งครรภ์ครั้งแรก

แรกนั้น ระบบการไหลเวียนโลหิตบริเวณมดลูก และรกนั้น ไม่เคยสัมผัสกับปรสิตมาก่อน ประกอบกับผลของการปรับเปลี่ยนระบบภูมิคุ้มกันให้เหมาะสมต่อการเติบโต ตลอดจนการพัฒนาของทารก โดยการสร้าง hormones ตลอดจนโปรตีนบางชนิด เช่น cortisol และ estrogen (Smith, 1996) ซึ่งมีสมบัติลดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ อันมีบทบาทสำคัญในการป้องกันการติดเชื้อภายในเซลล์ ซึ่งรวมทั้งปรสิตที่ก่อให้เกิดโรคมาลาเรียด้วย จึงเป็นสาเหตุให้สตรีมีครรภ์มีความไวต่อการติดเชื้อเหล่านี้เพิ่มขึ้น ในขณะที่การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันด้านสารน้ำนั้น พบว่าสตรีมีครรภ์ที่ผ่านการตั้งครรภ์หลายครั้ง ซึ่งอาศัยในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรค จะมีระดับของ antibody ที่จำเพาะต่อ antigen ของปรสิต เพียงพอต่อการป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียในขณะที่ตั้งครรภ์ได้ (Duffy and Fried 2003; Staalsoe *et al.*, 2001) ดังนั้นสตรีมีครรภ์ที่อาศัยในพื้นที่ที่มีการแพร่ระบาดของโรคต่ำ จึงมีความเสี่ยงสูงโดยเฉพาะในการตั้งครรภ์ครั้งแรกส่งผลให้หญิงตั้งครรภ์ที่ติดเชื้อมาลาเรียจะมีโอกาสเสียชีวิตสูงกว่าหญิงที่ไม่ตั้งครรภ์

ผลของการติดเชื้อมาลาเรียระหว่างตั้งครรภ์ต่อทารกนั้นจะต่างกันขึ้นอยู่กับพื้นที่การระบาดของโรค ในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคต่ำ ภาวะมาลาเรียขณะตั้งครรภ์เป็นสาเหตุของการเสียชีวิตของทารกถึง 14% ตลอดจนแท้ง ตายคลอด ทำให้อัตราการตายตลอดจนอัตราความผิดปกติของทารกสูงขึ้น (Steketee *et al.*, 1996; Nosten *et al.*, 1991) พื้นที่ที่มีการระบาดของโรคมาลาเรียสูง ภาวะรกติดเชื้อมาลาเรียมีผลต่อภาวะโลหิตจางและน้ำหนักแรกเกิดน้อยในทารก (Lone *et al.*, 2004; Nosten *et al.*, 2004) การติดเชื้อมาลาเรียระหว่างตั้งครรภ์ในช่วงไตรมาสแรก มักส่งผลให้เกิดภาวะ intrauterine growth retardation (IUGR) ในขณะที่การติดเชื้อในไตรมาสสุดท้าย มักส่งผลให้เกิดภาวะคลอดก่อนกำหนด (Dorman and Shulman, 2000)

ปัจจุบันเชื่อว่าสมบัติของการเกาะติดของปรสิตกับเซลล์รก และเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันบางชนิด สามารถอธิบายกลไกการเกิดพยาธิสภาพดังกล่าวได้ สตรีมีครรภ์ที่ติดเชื้อมาลาเรีย มีปรสิตในกระแสโลหิตต่ำ ในขณะที่ภาวะรกติดเชื้อมาลาเรียพบได้บ่อย Fried และ Duffy (1998) กล่าวว่ารกเป็นบริเวณพิเศษต่อเชื้อมาลาเรีย เนื่องจากภาวะภูมิคุ้มกันที่เปลี่ยนไปข้างต้นแล้ว ยังพบการเกาะติดระหว่างเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรีย โดยใช้โปรตีนที่ผิวเม็ดเลือดแดง PfEMP1 กับตัวรับโปรตีนจำเพาะ chondroitin sulphate A (CSA) (Beeson and Brown, 2004) และ hyaluronic acid (HA) (Beeson *et al.*, 2000) ที่พบบนเนื้อรกเท่านั้น พบการเกาะติดดังกล่าวได้ทั่วทั้งเนื้อรก ทำให้ปรสิตสามารถหลบซ่อนจากระบบภูมิคุ้มกันได้ คาดว่าการเกาะติดดังกล่าวนี้เองทำให้ผู้ป่วยที่มีภาวะรกติดเชื้อมาลาเรียมักพบปรสิตในกระแสเลือดต่ำกว่าผู้ป่วยมาลาเรียปกติ โดยจะพบเม็ดเลือดที่ติดเชื้อมาลาเรียระยะ trophozoite และ schizont ในเนื้อรกสูงกว่าในกระแส

เลือด (Beeson *et al.*, 2002) นอกจากนี้ยังพบภาวะจำนวนเม็ดเลือดขาวในรกสูง โดยส่วนใหญ่เป็น macrophage ที่มี malarial pigment ตลอดจนเกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อรก เช่น การเพิ่มจำนวนของเซลล์ cytotrophoblast ทำให้เกิดการหนาตัวของรก syncytiotrophoblastic necrosis และสูญเสีย syncytial microvilli ในที่สุด (Brabin *et al.*, 2004) ภาวะรกติดเชื่อมมาลาเรียทำให้การทำหน้าที่ของรกผิดปกติ ทำลายระบบการแลกเปลี่ยนสารระหว่างมารดา และทารก ลดการส่งผ่านสารที่จำเป็นผ่านรก รวมทั้งการผลิตฮอร์โมนหลายชนิดที่จำเป็นในการตั้งครรภ์ พบว่าการเปลี่ยนแปลงระดับของฮอร์โมนดังกล่าวมีผลต่อพัฒนาการของตัวอ่อน หน้าที่ และ พัฒนาการของรก พบว่าระดับของ estradiol จะต่ำในสตรีมีครรภ์ที่ติดเชื่อมมาลาเรีย ทำให้กระตุ้นให้เกิดภาวะ IUGR ได้ (Roberts *et al.*, 1996)

กลุ่มของ pro-inflammatory cytokines มีบทบาทสำคัญต่อพัฒนาการของรกในระยะแรกของการตั้งครรภ์ โดยเฉพาะในไตรมาสแรก มีบทบาทในการเกาะติด (attachment) และการฝังตัว (implantation) ของ blastocyes บริเวณมดลูก (Chaouat *et al.*, 2002; Saito, 2001) IL-1 ควบคุมการเจริญของรก IL-6 เป็น growth factor สำหรับเซลล์รกนอกจากนี้ anti-inflammatory cytokines เช่น TGF- β และ IL-10 ทำหน้าที่เป็น immunosuppressive cytokines (Simon *et al.*, 1998) ควบคุมการสร้างฮอร์โมน เช่น progesterone และ hCG ตลอดจนพัฒนาการของ cytotrophoblast โดยเฉพาะในช่วงไตรมาสแรก (Das *et al.*, 2002) พบว่าสมดุลระหว่าง pro-inflammatory cytokines และ anti-inflammatory cytokines มีความสำคัญต่อการตั้งครรภ์ โดยพบว่าการตั้งปฏิกิริยาภูมิคุ้มกันของมารดาจะมี anti-inflammatory cytokines เด่น (Smith, 1996) พบว่าระหว่างที่มีการติดเชื่อมมาลาเรียจะมีการหลั่ง pro-inflammatory cytokines เพิ่มขึ้น มีความสัมพันธ์กับความผิดปกติของทารกแรกคลอด พบว่าระดับความเข้มข้นของ IFN- γ , TNF- α , IL-2 สูงๆ มีผลต่อการสูญเสียทารกระหว่างตั้งครรภ์ของหนู (Chaouat *et al.*, 2002) ตลอดจนภาวะ spontaneous abortion ในมนุษย์ (Hill *et al.*, 1995) ทั้ง IFN- γ และ TNF- α มีความเป็นพิษต่อตัวอ่อน (embryotoxic) ทำให้เกิด necrosis เพิ่ม uterine contraction ส่งผลให้เกิดภาวะ foetal expulsion ในขณะที่ IFN- γ ส่งเสริมกิจกรรมของ NK cell ซึ่งสัมพันธ์กับภาวะแท้งและภาวะคลอดก่อนกำหนด (Kwak *et al.*, 1995) พบว่าระดับของ pro-inflammatory cytokines ที่เพิ่มสูงขึ้นในรกของมนุษย์ มีความสัมพันธ์กับภาวะ IUGR (Moormann *et al.*, 1999) และมักพบระดับ TNF- α และ IFN- γ สูงในสตรีที่ตั้งครรภ์เป็นครั้งแรก ซึ่งให้กำเนิดทารกที่มีน้ำหนักแรกเกิดต่ำภาวะโลหิตจางทั้งในมารดา และทารก (Fried *et al.*, 1998) ดังนั้นทารกที่เกิดจากมารดาที่ติดเชื่อมมาลาเรียระหว่างตั้งครรภ์ มักคลอดก่อนกำหนด มีน้ำหนักตัวน้อยเมื่อแรกคลอด มีการเจริญเติบโต

ไม่เต็มที่มีอาการซีดแรกคลอด ตายครรภ์ และแท้ง ในรายที่ซีดรุนแรงอาจเสียชีวิตได้ (Steketee *et al.*, 1996)

วัตถุประสงค์

- 1 ศึกษาผลของพลาสมาผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียต่อความอยู่รอดของเซลล์รก
- 2 ศึกษาผลของยาต้านมาลาเรียต่อความอยู่รอดของเซลล์รก

2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

เซลล์รก

เซลล์ JAR เป็นเซลล์มะเร็งรกชนิด choriocarcinoma จากรกของทารกเพศชายเชื้อสายคอเคเชียน มีโครโมโซมมากกว่า 68 คู่ แต่พบโครโมโซม X ปรกติเพียงโครโมโซมเดียวเท่านั้น มีหมายเลข ATCC คือ HTB-144 ค้นพบและตั้งชื่อโดย R.A. Pattillo ลักษณะเหมือนเซลล์ epithelium ชนิดยึดติดพื้นผิวภาชนะ สามารถผลิตฮอร์โมนเอสโตรเจน โปรเจสเตอโรน hCG และ แลคโตรเจน เซลล์ JAR นี้ได้ชื่อมาจากบริษัท ATCC, Manassas, Virginia, USA

การเลี้ยงเซลล์

อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์ JAR คือ RPMI-1640 (Life Technologies, Gaithersburg, MD) ที่เติม แอล-กลูตามีน 2 mM โซเดียมไบคาร์บอเนต 2.0 g/l กลูโคส 2.5g/l HEPES 10 mM และ 1.0 mM โซเดียมไพรูเวต 10% FBS (Biochrom AG, Berlin) และยาปฏิชีวนะ (penicillin G [100 U/mL], streptomycin sulfate [100 µg/mL], amphotericin B [0.25 µg/mL]) (Life Technologies, Gaithersburg, MD)

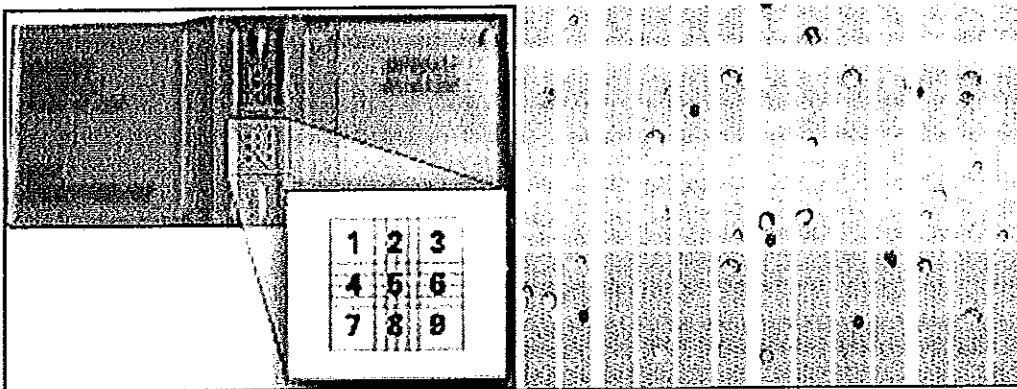
เมื่อปริมาณเซลล์ในขวดเพาะเลี้ยงมีความหนาแน่น 70 ถึง 80% ต้องแยกเซลล์ออกจากขวดเพาะเลี้ยง เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป การนำเซลล์ออกจากขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยเอนไซม์ Trypsin (Trypsinization) ทำได้โดยนำอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกจากขวดเพาะเลี้ยงเซลล์โดยใช้ปิเปตดูดออก แล้วล้างด้วย PBS (Biochrom AG, Berlin) ปริมาณ 3 ถึง 5 mL โดยใช้ปิเปตค่อย ๆ ใส่น้ำเกลือให้ไหลลงข้างภาชนะอย่างช้า ๆ ป้องกันการหลุดของเซลล์ เอียงภาชนะช้า ๆ เพื่อล้างของเสียต่างๆ ออกจากเซลล์ แล้วเททิ้งทำอย่างนี้ 1 ถึง 2 ครั้ง เติม trypsin-EDTA (0.25% trypsin, 1mM EDTA.Na) (Life Technologies, Gaithersburg, MD) 1 mL เอียงภาชนะช้า ๆ ให้เอนไซม์กระจายทั่วพื้นผิวเติม แล้วนำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 10 นาที เติม FBS 1 mL เพื่อหยุดปฏิกิริยาของ trypsin แล้วล้างขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ ด้วย PBS 3 ถึง 5 mL เพื่อช่วยให้เซลล์ทั้งหมดหลุดจากผิวขวดเลี้ยงเซลล์ ใช้ปิเปตดูดอาหารที่มีเซลล์อยู่ให้หลุดปราศจากเชื้อที่มีฝาปิด (15 mL Conical centrifuge tube [Nunc™, Roskilde, Denmark]) นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที แยกสารละลายส่วนใสทิ้ง เติมอาหารเลี้ยง

เซลล์ RPMI-1640 1 mL แล้วดูดขึ้นลงหลายๆ ครั้ง เพื่อให้เป็นสารละลายที่มีเซลล์เดี่ยวๆ แล้วนับ และคำนวณจำนวนเซลล์ทั้งหมด

การนับจำนวนเซลล์

การนำเซลล์ไปใช้ในการทดลองนั้นจะใช้เฉพาะเซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้น โดยนำเซลล์มาเจือจางในสี 0.4% Trypan blue (Sigma, St. Louis, MO) ผสมให้เข้ากัน แล้วนำ 10 μ L หยดลงบน hemacytometer นับจำนวนเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100 เท่า โดยนับเซลล์ทั้งหมดใน 9 ช่องของ hemacytometer เฉพาะเซลล์ที่ไม่ติดสี ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีชีวิต ดังรูปที่ 9 แล้วนำไปคำนวณหาปริมาณเซลล์ทั้งหมด โดยปริมาณเซลล์ทั้งหมดได้มาจากการคำนวณโดยสูตร

ปริมาณเซลล์ทั้งหมด = (ปริมาณเซลล์เฉลี่ยที่นับได้ \times dilution factor $\times 10^4$) เซลล์/mL



รูปที่ 9 การนับจำนวนเซลล์ด้วย hemacytometer แสดงให้เห็นเซลล์ที่มีชีวิต (ไม่ติดสี) และเซลล์ตาย (ติดสีน้ำเงิน) ของ 0.4% trypan blue ด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100 เท่า

พลาสมา

พลาสมาแยกจากเลือดผู้ป่วยที่ใช้ heparin เป็นสารกันเลือดแข็ง ผ่านการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที นำตัวอย่างพลาสมา ชนิดละ 6 ตัวอย่างมารวมกันเป็นพลาสมารวม (pool plasma) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80°C เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป พลาสมาจากผู้ป่วยมาลาเรียชนิด *P. vivax* และ *P. falciparum* ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา โดยเป็นผู้ป่วยมาลาเรียในพื้นที่เขตอำเภอธารโต และอำเภอบันนังสตา จังหวัดยะลา พลาสมาชนิด *P. vivax* นั้น ได้จากผู้ป่วยมาลาเรียเพศชาย และหญิง

อย่าง ละ 3 ราย ในขณะที่พลาสมาชนิด *P. falciparum* ได้จากผู้ป่วยที่เป็นเพศชาย 5 ราย และเพศหญิง 1 ราย พลาสมาที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุมได้จากคนปกติที่อาศัยอยู่ในพื้นที่อำเภอ หาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ซึ่งเป็นพื้นที่ที่ไม่มีภาวะระบาดของโรคมาลาเรีย เป็นเพศชายและหญิง อย่างละ 3 ราย

สารเคมี

- Sodiumbicarbonate (BDH, England)
- L-glucose (Sigma, USA)
- Sodiumpyruvate (BDH, England)
- Sodium chloride (BDH, England)
- Sodium azide (RDH, Germany)
- Sodium acetate (RDH, Germany)
- TrisCl (Merck, Germany)
- EDTA (Fluka, Germany)
- SDS (Sigma, USA)
- Trisbase (Merck, Germany)
- Glacial acetic (Merck, Germany)

ยาต้านมาลาเรีย

- Chloroquine diphosphate salt, $C_{18}H_{26}ClN_3 \bullet 2H_3PO_4$ (Sigma, St. Louis, MO) เตรียมในสารละลาย PBS แล้วกรองด้วย Filter ขนาด 0.22 μ M
- Quinine hemisulfate salt, $C_{40}H_{48}N_4O_4 \bullet H_2O_4S$ (Sigma, St. Louis, MO) เตรียมในสารละลาย DMSO แล้วกรองด้วย Filter ขนาด 0.22 μ M
- Artemisinin 98%, $C_{15}H_{22}O_5$ (Sigma, St. Louis, MO) เตรียมในสารละลาย DMSO แล้วกรองด้วย Filter ขนาด 0.22 μ M
- Pyrimethamine, $C_{12}H_{13}ClN_4$ (MP biomedical, Aurora, OH) เตรียมใน สารละลาย DMSO แล้วกรองด้วย Filter ขนาด 0.22 μ M

อุปกรณ์

เครื่องแก้วและพลาสติก

- หลอดทดลอง (Nunc, Denmark)
- ขวด Duran (Schott, Germany)
- ขวดชมพู่ (Pyrex, USA)
- บีกเกอร์ (Pyrex, USA)
- ไมโครไตเตอร์เพลต (Corning, USA)
- Pipette tip (Corning, USA)
- กระดาษกรอง Whatman No 1
- สไลด์แก้ว
- ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ (Corning, USA)

เครื่องมือ

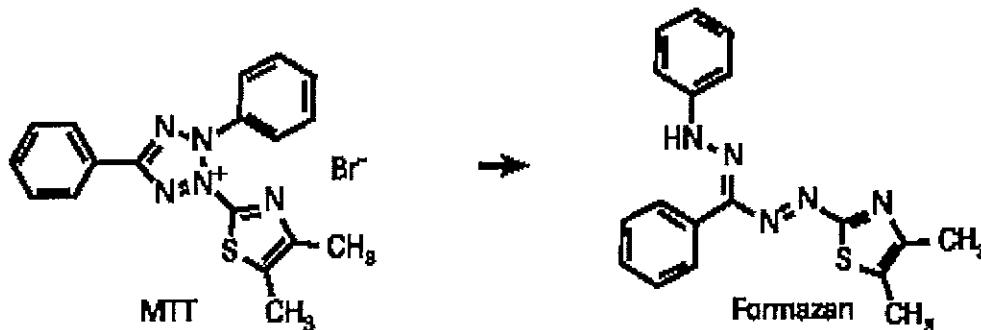
- Biosafety cabinet class II (24 9BP, Actec, UK)
- Water bath (TW8, TW12, TW20)
- Vortex (Genie2, Scientific Industries)
- Incubator (Ultima, Revco, USA)
- Inverted microscope (Diavert, Leitz)
- Centrifuge (MSE-Harrier 18/80, Sanyo)
- Light microscope (CH20BIMF200, Olympus)
- Automatic pipette (ACURA825, Socorex)
- Micro centrifuge (Minispin plus, Eppendorf)
- Electrophoresis set including power supply (PAC300, Biorad)
- ELIZA reader (model Elx808, Bio-Tek Instruments Inc, USA)
- pH meter (Scientific Industries Inc, USA)
- Flow cytometer (FACSC Calibur, Becton Dickinson)
- Confocal laser scanning microscope (IX70, Olympus)
- Fluorescence microscope (BX50, Olympus)
- Microscope digital camera system (DP50, Olympus)

- Multichannel pipette
- Hemacytometer (BOECO, Germany)

วิธีการ

1 ศึกษาผลของพลาสมาผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรีย และยาต้านมาลาเรียต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์โดย MTT

MTT (Serva, Heidelberg) เป็นวิธีการที่ใช้เพื่อศึกษาปริมาณวิเคราะห์ความอยู่รอดของเซลล์ จากการชักนำด้วยสารต่างๆ เซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้นจึงจะสามารถเปลี่ยน tetrazolium salt (MTT) ซึ่งมีสีเหลืองเป็น formazan salt ที่ไม่ละลายน้ำ ด้วย succinate-tetrazolium reductase system ซึ่งพบในปฏิกิริยาห่วงโซ่การหายใจใน mitochondria ของเซลล์ เป็นตะกอนสี formazan salt สามารถละลายได้ใน solubilized เกิดเป็นสารละลายสีม่วง ดังรูปที่ 10 ที่สามารถตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorption) ได้ด้วย spectrophotometer ค่าการดูดกลืนที่ได้จะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต



รูปที่ 10 การเปลี่ยนสารประกอบ MTT เป็น formazan salt ซึ่งพบได้ในเซลล์ที่มีชีวิต

(Anonymous e, 2004)

เลี้ยงเซลล์ JAR (10,000 เซลล์/หลุม) ใน 96-well tissue culture plate ชนิดกันแบน บ่มเลี้ยงเซลล์ที่ 37°C คาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 68 ชั่วโมง ในอาหารที่มีเพียง 0.5% FBS สำหรับกลุ่มควบคุม และมีความเข้มข้นของพลาสมา หรือยาต้านมาลาเรียต่างๆ กัน สำหรับกลุ่มทดสอบ แล้ววัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตโดยเติม 20 μ L ของ สารละลาย 3-[4,5-dimethylthiazol-2-

yl]-2,5-diphenyl tetrazoliumbromide (MTT) ความเข้มข้น 5 mg/mL ในแต่ละหลุม ป่มเลี้ยงเซลล์ต่ออีก 4 ชั่วโมง จึงดูดสารละลายทั้งหมดทิ้ง เติม 200 μ L ของสารละลาย acid isopropanal (90% isopropanal alcohol, 0.004 N HCL) เพื่อละลายตะกอน และป่มเซลล์ต่ออีก 1 ชั่วโมง จะได้สารละลายสีม่วง หลังจากนั้นวัดค่า optical density (OD) ของสารละลายด้วย ELISA reader ที่ความยาวคลื่น 595 nm ค่า absorption value ของสารละลายมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณเซลล์ ทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง แล้ววิเคราะห์ด้วย One Way ANOVA (Dunnnett's method) พร้อมทั้งคำนวณหาเซลล์ที่เพิ่มขึ้น (Cell increase, %) หรือลดลง (Cell decrease, %) อันเป็นผลจากพลาสมา หรือยาต้านมาลาเรียต่อเซลล์ JAR ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่เพิ่มขึ้น หรือลดลง} = \frac{[\text{OD ของกลุ่มทดสอบ} - \text{OD เฉลี่ยของกลุ่มควบคุม}]}{\text{ค่า OD เฉลี่ยของกลุ่มควบคุม}} \times 100$$

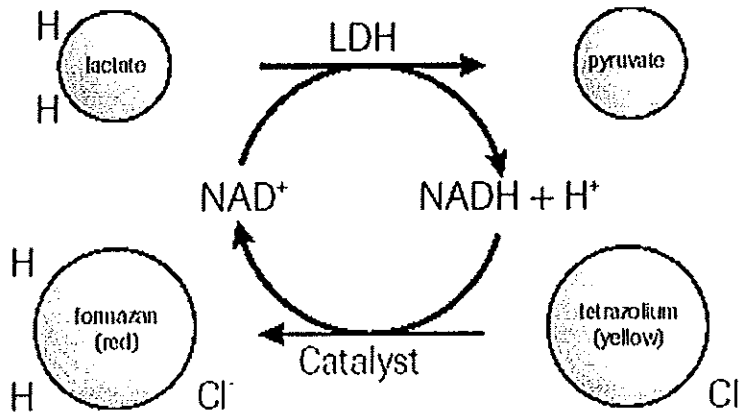
2 ศึกษาผลของยาต้านมาลาเรียต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ (cell cytotoxicity) โดยการตรวจวัดระดับ LDH (lactate dehydrogenase) ในน้ำเลี้ยงเซลล์

LDH เป็นเอนไซม์ที่พบได้ในเซลล์ทุกเซลล์เมื่อมีการทำลาย cell membrane หรือ มีการตายของเซลล์เกิดขึ้น ตรวจวัดด้วย LDH-kit (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) โดย LDH ที่ปล่อยออกมาจะไป reduces โมเลกุลของ NAD^+ เป็น $\text{NADH} + \text{H}^+$ โดยใช้ 2H^+ จากการ oxidation โมเลกุลของ lactate ไปเป็น pyruvate หลังจากนั้นเอนไซม์ catalyst จะส่ง 2H^+ จาก $\text{NADH} + \text{H}^+$ ให้กับ tetrazolium salt (INT, 2-[4-iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazolium chloride) ซึ่งมีสีเหลือง เปลี่ยนเป็น formazan salt ซึ่งมีสีแดง ดังรูปที่ 11 ดังนั้นหากมีการทำลาย cell membrane หรือ มีการตายของเซลล์เพิ่มขึ้น พบว่าระดับของ LDH ในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่สูงขึ้นมีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเกิด formazan salt การละลายน้ำของ formazan salt ทำให้สามารถตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorption) ของสารละลายด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 490 nm

เลี้ยงเซลล์ JAR เช่นเดียวกับในการศึกษาที่ 1 แล้วแยกเฉพาะส่วนน้ำเลี้ยงเซลล์ออกมา โดยนำ culture plates ไป centrifuge ที่ 1,500 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที นำ 100 μ L ของน้ำเลี้ยงเซลล์ไป ป่มกับ 100 μ L ของ reaction mixture ในที่มีด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เติม 50 μ L ของ 1 N HCl เพื่อหยุดปฏิกิริยา หลังจากนั้นวัดค่า optical density (OD) ของสารละลายด้วย ELISA reader ที่ 490 nm ทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง แล้ววิเคราะห์ด้วย

One Way ANOVA (Dunnett's method) พร้อมทั้งคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์เซลล์ตาย (Cell death, %) อันเป็นผลจากยาต้านมาลาเรียต่อเซลล์ JAR ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์เซลล์ตาย} = \frac{[\text{OD ของกลุ่มทดสอบ} - \text{OD เฉลี่ยของกลุ่มควบคุม}] \times 100}{\text{ค่า OD เฉลี่ยของกลุ่มควบคุม}}$$



รูปที่ 11 ปฏิกริยาเคมีที่เกิดขึ้นของเอนไซม์ LDH (Anonymous f, 2004)

3 ศึกษาผลของพลาสมาผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรีย และยาต้านมาลาเรียต่อวงจรเซลล์ (cell cycle study)

วงจรเซลล์ (cell cycle) หมายถึงช่วงระยะเวลาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ ในขณะที่เซลล์มีการแบ่งตัว ซึ่งประกอบด้วย 2 ระยะได้แก่ ระยะเตรียมพร้อมสำหรับการแบ่งตัว (G₀, G₁, S และ G₂) และระยะแบ่งตัว (M) ดังรูปที่ 12

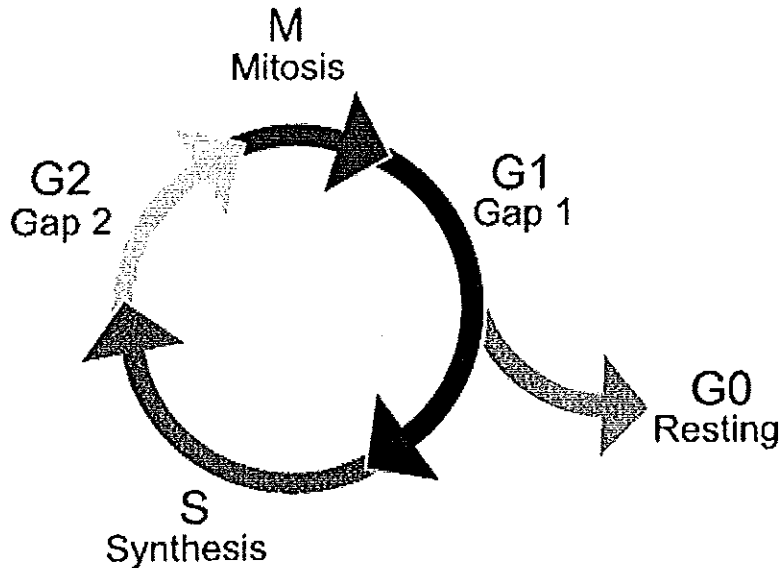
ระยะ G₀ หรือระยะพัก เซลล์จะอยู่ในระยะนี้ช่วงเวลาหนึ่ง ก่อนกลับเข้าสู่วงจรเซลล์ปกติต่อไป

ระยะ G₁ เป็นระยะก่อนการสร้าง DNA เซลล์มีการเติบโตเต็มที่ ระยะนี้มีการสังเคราะห์สารที่จำเป็นสำหรับการใช้สร้าง DNA ในระยะต่อไป

ระยะ S เป็นระยะสร้าง DNA (DNA synthesis) โดยเซลล์มีการเจริญเติบโต และมีการสังเคราะห์ DNA เพิ่มขึ้นอีก 1 ชุด เป็นระยะที่ใช้เวลานานที่สุด

ระยะ G₂ เป็นระยะหลังสร้าง DNA เซลล์มีการเจริญเติบโต และเตรียมพร้อมสำหรับการแบ่ง DNA และ cytoplasm ต่อไป

ระยะ M หรือ mitosis เป็นระยะที่มีการแบ่งเซลล์ เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ร่างกาย ประกอบด้วย การแบ่ง nucleus และ cytoplasm ซึ่งประกอบด้วย 4 ระยะย่อยคือ prophase, metaphase, anaphase และ telophase



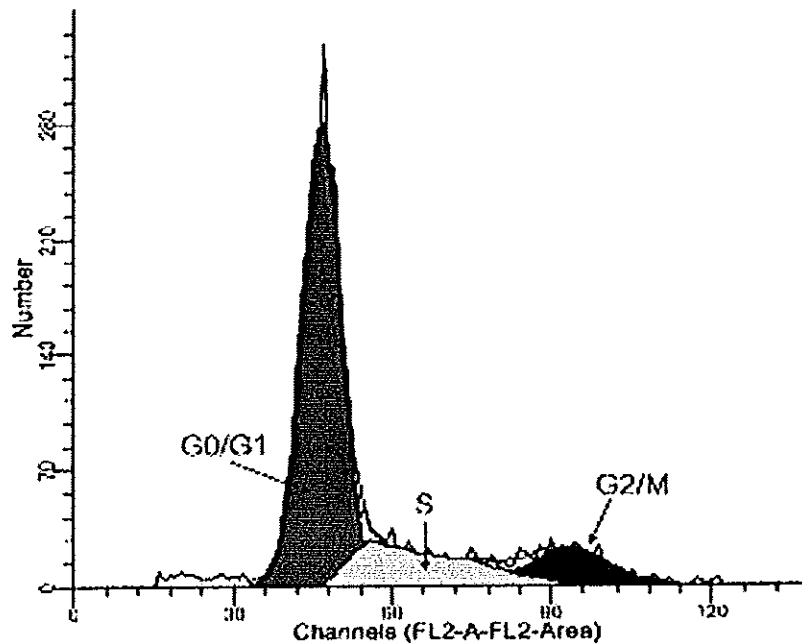
รูปที่ 12 วงจรเซลล์

การศึกษาผลของพลาสมาและยาต้านมาลาเรียต่อวงจรของเซลล์ JAR โดย ทำการศึกษาเปรียบเทียบจำนวนประชากรเซลล์ในแต่ละระยะของวงจรเซลล์ (G0/G1, S, G2/M) กับกลุ่มควบคุม ด้วยการศึกษ ปริมาณของ DNA (DNA content) ภายในเซลล์ที่ย้อมด้วย propidium iodide ณ เวลาต่างๆกัน ด้วย Flow cytometry นำเสนอข้อมูลในรูปแบบ histogram ด้วยโปรแกรม WinMDI version 2.8 และวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์เซลล์ในแต่ละระยะของวงจรเซลล์ ด้วยโปรแกรม Cylchred version 1.0.0.1, UWCM ดังรูปที่ 13

เลี้ยงเซลล์ JAR ใน 6-well tissue culture plate ด้วย 3 mL ของ RPMI-1640 ที่มี 10% FBS จนเซลล์มีความหนาแน่น 70-80% แล้ว ทำให้เซลล์ทั้งหมดเริ่มต้นอยู่ในวงจรเซลล์ระยะเดียวกัน (synchronization) ด้วยวิธีการอดพลาสมา (serum starvation) และใช้สารละลาย 0.5 mM hydroxy urea (Sigma, St. Louis, MO) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะทำให้เซลล์ส่วนใหญ่อยู่ในระยะ S

หลังจากนั้นเปลี่ยนน้ำเลี้ยงเซลล์ใหม่ด้วย RPMI-1640 ที่มีเพียง 3% FBS สำหรับกลุ่มควบคุม หรือ 3% FBS และยาต้านมาลาเรีย หรือพลาสมาสำหรับกลุ่มทดสอบ ทำให้เซลล์ตาย และมีสมบัติติดสีดีขึ้น ด้วย 70% alcohol ที่เย็นจัด เป็นเวลา 30 นาที แล้วย้อม DNA ด้วย

propidium iodide (Sigma, St. Louis, MO) ที่เวลาต่างๆกัน แล้วนับจำนวนเซลล์ (10,000 เซลล์) ด้วย flow cytometer วิเคราะห์ปริมาณเซลล์ในระยะเวลาต่างๆด้วยโปรแกรม WinMDI และ Cycled แล้ววิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วย One Way ANOVA



รูปที่ 13 Histogram ที่นำเสนอด้วย Flow cytometer ประชากรเซลล์ในระยะ G0/G1 มี DNA 1 ชุด (n) ระยะ G2/M เซลล์มีปริมาณ DNA เป็น 2 เท่า (2n) ในขณะที่ประชากรเซลล์ในระยะ S มีปริมาณ DNA ระหว่าง n หรือ 2n

4 ศึกษาผลของพลาสมาผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรีย และยาต้านมาลาเรียต่อการการตายของเซลล์แบบ apoptosis

4.1 ศึกษาการแตกหักของ DNA ด้วยเทคนิค gel-electrophoresis

การแตกหักของ DNA เป็นลักษณะสำคัญของการเกิด apoptosis สามารถสังเกตเห็นได้โดยการสกัด DNA แล้วนำไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบน agarose gel ที่ย้อมด้วย ethidium bromide จะสามารถมองเห็นแถบชิ้นส่วนของ DNA ได้ภายใต้แสง UV

เลี้ยงเซลล์ JAR ใน 6-well tissue culture plate ด้วย 3 mL ของ RPMI-1640 ที่มี 10% FBS จนเซลล์มีความหนาแน่น 70-80% แล้วเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ด้วย RPMI-1640 ที่มี

เพียง 0.5% FBS สำหรับกลุ่มควบคุม และพลาสมาหรือยาต้านมาลาเรียที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ สำหรับกลุ่มทดสอบ แล้วสกัด DNA จากเซลล์ JAR ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ล้างเซลล์ด้วย PBS เย็นจัด แล้วเติม 500 μ L ของ Digestion buffer บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายทั้งหมดใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 mL แล้วเติม 10 μ L ของ Rnase (250U/mL, Serva, Heidelberg) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 10 นาที เติม 12.5 μ L ของ proteinase K (4 mg/mL, USb, Cleveland, OH, USA) บ่มที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมสารละลาย phenol-chloroform-isoamyl alcohol ในปริมาณที่เท่ากับสารละลายทั้งหมดในหลอด microcentrifuge ผสมให้เข้ากันด้วย vortex แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 g ด้วยเครื่อง microcentrifuge เป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายในชั้นน้ำซึ่งอยู่ส่วนบนทั้งหมด ซึ่งเป็นชั้นที่มี DNA ใส่ในหลอด microcentrifuge ใหม่ แล้วเติม 100 μ L ของ 3M sodium acetate pH 5.2 ผสมให้เข้ากันด้วย vortex เป็นเวลา 10 วินาที เติม 1 mL ของ 100% isopropanol ที่เย็นจัด แล้วจึงนำไปเก็บในน้ำแข็ง เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ความเร็วรอบสูงๆ เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำสารละลายทั้งหมดทิ้งไป เหลือเฉพาะส่วนที่เป็นตะกอน (pellet) เติม 1 mL ของ 70% ethanol แล้วพลิกหลอด microcentrifuge ไปมาหลายๆ ครั้ง นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบสูงๆ อีกครั้ง นำชั้นสารละลายทั้งหมดทิ้งไป เหลือเฉพาะตะกอนที่แห้ง แล้วละลายตะกอนด้วย TE buffer pH 8.0 หลังจากนั้นจึงนำไปวัดความเข้มข้นของ DNA ต่อไป

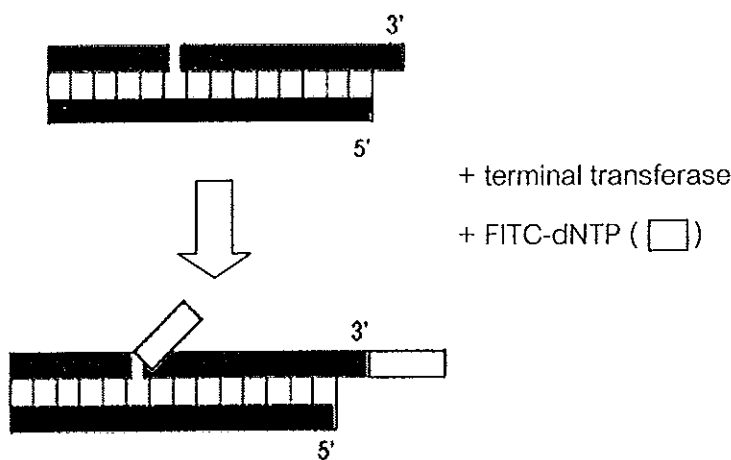
นำ 2 μ g ของ DNA ที่สกัดได้ไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้า 85 mV บน 2% agarose gel (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) ด้วย 1X TAE buffer เป็นเวลา 130 นาที โดยใช้ DNA ของ เซลล์ JAR ที่ได้รับ actinomycin D (1 mg/mL) เป็นกลุ่มควบคุมบวก พร้อมกับ DNA markers (100 bp) หลังจากนั้นย้อมแผ่น Gel (Staining) ด้วย ethidium bromide (10 mg/mL) เป็นเวลา 10 นาที ล้างแผ่น Gel (De-staining) ด้วย 1X TAE buffer เป็นเวลา 2 ชั่วโมง สามารถมองเห็นแถบที่ขึ้นส่วนของ DNA ได้ภายใต้แสง UV

4.2 *in situ* cell death detection, fluorescein

ยืนยันการเกิดการแตกหักของ DNA ด้วย apoptosis detection kit (R&D systems, Minnrapolis, MN) โดยเทคนิค TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) ซึ่งใช้เอนไซม์ terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) labeled nucleotide ที่จะไปจับกับส่วนของ

fragmented DNA ในนิวเคลียสของเซลล์ ดังรูปที่ 14 สามารถตรวจวัดการเรืองแสงได้ด้วย fluorescence microscopy และ confocal microscope

เลี้ยงเซลล์ JAR ใน 6-well tissue culture plate ที่มีแผ่นสไลด์แก้วที่ผ่านการเคลือบ collagen R (Serva, Heidelberg) ด้วย 3 mL ของ RPMI-1640 ที่มี 10% FBS จนเซลล์มีความหนาแน่น 70-80% แล้วเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ด้วย RPMI-1640 ที่มี 0.5% FBS เป็นกลุ่มควบคุม และพลาสมาหรือยาต้านมาลาเรีย สำหรับกลุ่มทดสอบ เลี้ยงเซลล์ต่อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วล้างแผ่นสไลด์แก้วด้วย PBS เย็น ทำการ fix แผ่นสไลด์แก้วด้วย สารละลาย 3.7% paraformaldehyde ที่เตรียมใหม่ๆ เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วย PBS อีกครั้งหนึ่ง นำไปบ่มเลี้ยงเซลล์ ในสารละลาย permeabilisation (cytonin) เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างแผ่นสไลด์แก้วด้วย washing buffer แล้วบ่มเซลล์ กับ TdT reaction mixture เป็นเวลา 60 นาที ที่ 37°C แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย specific buffer บ่มเซลล์ กับ streptavidin-FITC เป็นเวลา 10 นาที ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วย PBS อีกครั้งหนึ่ง ตรวจวัดการเรืองแสงได้ด้วย confocal และ fluorescence microscope



รูปที่ 14 หลักการของวิธี TUNEL

5 การทดสอบทางสถิติ

การทดสอบทางสถิติที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นการศึกษาเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มทดสอบ กับกลุ่มควบคุม คำนวณโดยใช้โปรแกรม Statistical Packages for the Social Science release 10.00 (SPSS, Chicago, USA) ซึ่งวิเคราะห์ด้วย การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (analysis of variance; One-Way ANOVA)

3. ผลการทดลอง

1 ผลของพลาสมาจากผู้ป่วยมาลาเรียต่อเซลล์รกชนิด trophoblast (JAR)

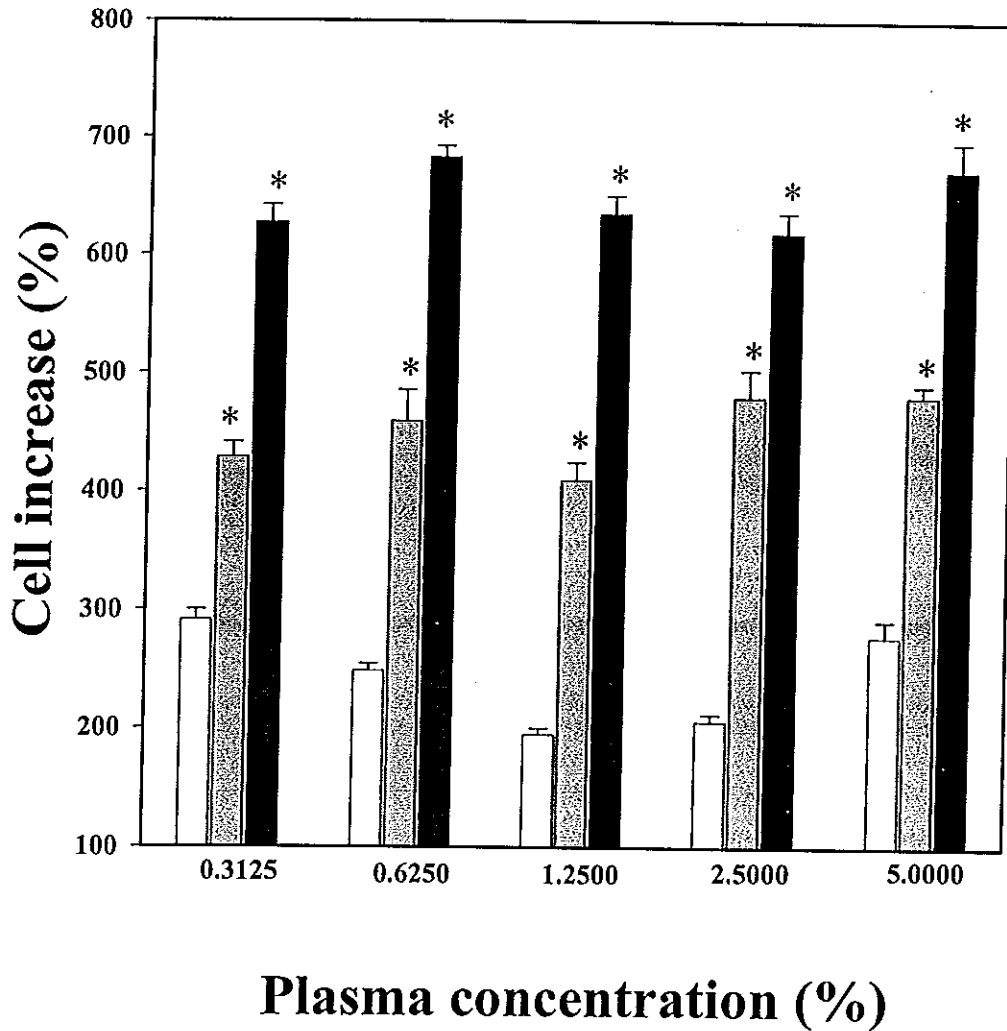
1.1 ผลของพลาสมาจากผู้ป่วยมาลาเรียต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์โดยใช้

MTT

จากการศึกษาโดยใช้พลาสมาจากผู้ป่วยมาลาเรียจากเชื้อ *P. vivax* หรือ *P. falciparum* ที่ระดับความเข้มข้น 0-5% ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ JAR เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับพลาสมาจากอาสาสมัครที่ไม่เป็นโรคมาลาเรีย พบว่าเซลล์ JAR ที่ได้รับพลาสมา รวมทั้งสามชนิดที่ระดับความเข้มข้น 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5 และ 5% มีการเพิ่มจำนวนมากกว่าเซลล์ที่ไม่ได้รับพลาสมา โดยความเข้มข้นของพลาสมาในแต่ละกลุ่ม (0.3125-5%) ส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ในระดับที่เท่ากัน และเมื่อทำการเปรียบเทียบระดับการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่ได้รับพลาสมาที่แตกต่างกัน พบว่าเซลล์ JAR ที่ได้รับพลาสมาจากผู้ป่วยมาลาเรีย มีการเพิ่มจำนวนเซลล์มากกว่ากลุ่มที่ได้รับพลาสมาของกลุ่มควบคุมที่ทุกระดับความเข้มข้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เซลล์ JAR กลุ่มที่ได้รับพลาสมาจากผู้ป่วยมาลาเรียชนิด *P. falciparum* มีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นเฉลี่ย 650% มากกว่าพลาสมาชนิด *P. vivax* ซึ่งมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นเฉลี่ย 450% ในขณะที่กลุ่มควบคุมที่ได้รับพลาสมาจากอาสาสมัครที่ไม่เป็นโรคมาลาเรีย มีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นเฉลี่ย 200% ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 15

1.2 ผลของพลาสมาจากผู้ป่วยมาลาเรียต่อวงจรเซลล์

จากการศึกษาในข้อ 1.1 แสดงให้เห็นว่าพลาสมาจากผู้ป่วยมาลาเรียจากเชื้อ *P. vivax* หรือ *P. falciparum* ต่างชักนำการเพิ่มจำนวนเซลล์ JAR ได้มากกว่าพลาสมาจากกลุ่มควบคุม จึงคาดว่าพลาสมาจากผู้ป่วยอาจจะส่งผลต่อการดำเนินของวงจรเซลล์ JAR และสามารถทดสอบสมมติฐานนี้ได้โดยเลี้ยงเซลล์ JAR ด้วย 10% FBS จนเซลล์มีความหนาแน่น 70-80% แล้วเลี้ยงเซลล์ JAR ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัม แต่มีเฉพาะ hydroxyl urea เท่านั้น เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ JAR ทั้งหมดอยู่ในวงจรเซลล์ระยะเดียวกัน (synchronization) หลังจากนั้นเลี้ยงเซลล์ JAR ด้วย อาหาร RPMI-1640 ที่มี 3% ของพลาสมาจากผู้ป่วยมาลาเรีย หรือพลาสมาของกลุ่มควบคุม ศึกษาจำนวนเซลล์ในแต่ละระยะของวงจรเซลล์ทุกๆ 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยการย้อม DNA ของเซลล์ด้วย popridium iodine แล้วนับจำนวนเซลล์ด้วยเครื่อง Flow cytometer จากการศึกษพบว่าที่เวลา 0 ชั่วโมง ภายหลังจาก synchronized มีเซลล์ JAR อยู่ในระยะ






รูปที่ 15 ผลของพลาสมาต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ JAR: ศึกษาโดยการเลี้ยงเซลล์ JAR 10^5 เซลล์ต่อหลุมในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นของพลาสมา 0 ถึง 5% เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้ววัดปริมาณเซลล์โดยวิธี MTT (■ = control plasma, □ = *P. vivax* plasma, ▨ = *P. falciparum* plasma) และคำนวณปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้น (%) เปรียบเทียบกับพลาสมากลุ่มควบคุม *, $p < 0.05$ แทนการทดสอบทางสถิติที่มีค่าแตกต่างกันมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มพลาสมาจากผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม โดยวิธี OneWay ANOVA (Dunnett's method)

G0/G1 จำนวน 20.95% ระยะ S 68.24% และระยะ G2/M 10.81%

ที่เวลา 4 ชั่วโมง ภายหลังจากที่เซลล์ได้รับพลาสมารวมทั้ง 3 ชนิด พบว่าสามารถกระตุ้นให้วงจรเซลล์ของเซลล์ JAR ดำเนินออกจากระยะ S ได้ โดยเปอร์เซ็นต์เซลล์ JAR ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีพลาสมาจากผู้ป่วยมาลาเรียจากเชื้อ *P. vivax* กระตุ้นให้วงจรเซลล์ของเซลล์ JAR ดำเนินออกจากระยะ S ได้มากกว่า (58.50%) เมื่อเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์เซลล์ในระยะ S กับพลาสมาจากผู้ป่วยจากเชื้อ *P. falciparum* (53.16%) และพลาสมาจากอาสาสมัครที่ไม่เป็นโรคมาลาเรีย (52.66%) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เช่นเดียวกับเปอร์เซ็นต์เซลล์ในระยะ G0/G1 ของเซลล์ JAR ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีพลาสมาจากผู้ป่วยจากเชื้อ *P. vivax* ก็มีเปอร์เซ็นต์น้อยกว่า (17.88%) เมื่อเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์เซลล์ในระยะ G0/G1 ของเซลล์ JAR ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีพลาสมาจากผู้ป่วยจากเชื้อ *P. falciparum* (24.08%) และพลาสมาจากอาสาสมัครที่ไม่เป็นโรคมาลาเรีย (23.39%) ในขณะที่เปอร์เซ็นต์เซลล์ JAR ในระยะ G2/M ของพลาสมาทั้ง 3 ชนิด ไม่แตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 16 นอกจากนี้พบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างเปอร์เซ็นต์เซลล์ในระยะ G2/M ในแต่ละกลุ่มทดลอง

ที่เวลา 8 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ JAR ที่เพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีพลาสมาจากผู้ป่วยจากเชื้อ *P. vivax* มีเปอร์เซ็นต์เซลล์ในระยะ G0/G1 (40.94%) มากกว่าเซลล์ JAR ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีพลาสมาจากผู้ป่วยจากเชื้อ *P. falciparum* (34.01%) และพลาสมาจากอาสาสมัครที่ไม่เป็นโรคมาลาเรีย (31.74%) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เปอร์เซ็นต์เซลล์ JAR ในระยะ S ของเซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีพลาสมาจากผู้ป่วยจากเชื้อ *P. vivax* (38.88%) น้อยกว่าเซลล์ JAR ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีพลาสมาจากผู้ป่วยจากเชื้อ *P. falciparum* (49.88%) และพลาสมาจากอาสาสมัครที่ไม่เป็นโรคมาลาเรีย (51.48%) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในขณะที่เปอร์เซ็นต์เซลล์ JAR ในระยะ G2/M ของเซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีพลาสมาจากผู้ป่วยจากเชื้อ *P. vivax* (20.43%) มากกว่าเซลล์ JAR ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีพลาสมาจากผู้ป่วยจากเชื้อ *P. falciparum* (16.11%) และพลาสมาจากอาสาสมัครที่ไม่เป็นโรคมาลาเรีย (16.79%) ดังแสดงในรูปที่ 17

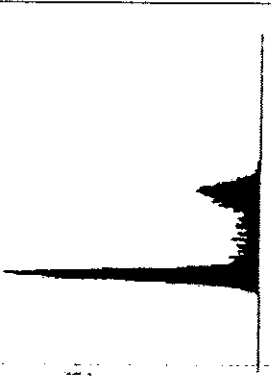
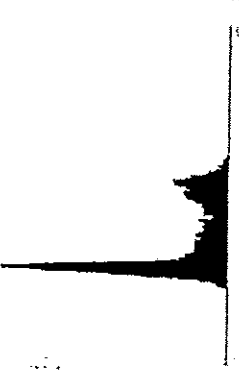
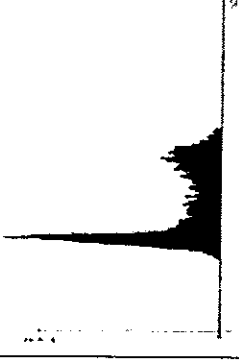
ที่เวลา 12 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ JAR ที่เพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีพลาสมาจากผู้ป่วยจากเชื้อ *P. falciparum* มีเปอร์เซ็นต์เซลล์ในระยะ G0/G1 (39.25%) น้อยที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ JAR ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีพลาสมาชนิดอื่น ในขณะที่เปอร์เซ็นต์เซลล์ JAR ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีพลาสมาจากผู้ป่วยจากเชื้อ *P. vivax* (47.88%) น้อยกว่าเปอร์เซ็นต์เซลล์เพาะเลี้ยงที่มีพลาสมาจากอาสาสมัครที่ไม่เป็นโรคมาลาเรีย (53.39%) อย่างมีนัยสำคัญ

เวลา	3% Control plasma	3% <i>P. vivax</i> plasma	3% <i>P. falciparum</i> plasma
4 ชั่วโมง	<p>G0/G1=23.39±1.55 S=52.66±2.36 G2/M=23.96±0.82</p> 	<p>G0/G1=17.88±0.73* S=58.50±1.52* G2/M=23.62±2.07</p> 	<p>G0/G1=24.08±0.92 S=53.16±0.32 G2/M=24.64±1.27</p> 

รูปที่ 16 ผลของพลาสมาต่อการดำเนินของวงจรเซลล์: ศึกษาโดยการเลี้ยงเซลล์ JAR ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นของพลาสมา 3% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้ววัดจำนวนเซลล์ในแต่ละระยะของวงจรเซลล์ด้วย Flow cytometer และคำนวณเปอร์เซ็นต์เซลล์ (Mean%±SEM) ในแต่ละระยะของวงจร เซลล์เปรียบเทียบกับระหว่างพลาสมาทั้ง 3 ชนิด: *p<0.05 แทนการทดสอบทางสถิติที่มีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ระหว่างพลาสมาจากผู้เลี้ยงทั้งจากเชื้อ *P. vivax* หรือ *P. falciparum* และกลุ่มควบคุม โดยวิธี OneWay ANOVA (LSD's method)

เวลา	3% Control plasma	3% <i>P. vivax</i> plasma	3% <i>P. falciparum</i> plasma
8 ชั่วโมง	<p>G0/G1=31.74±1.49 S=51.48±0.27 G2/M=16.79±1.23</p>	<p>G0/G1=40.94±0.07* S=38.88±0.12* G2/M=20.43±0.07*</p>	<p>G0/G1=34.01±3.02 S=49.88±1.96 G2/M=16.11±1.07</p>

รูปที่ 17 ผลของพลาสมาต่อการดำเนินของวงจรเซลล์: ศึกษาโดยการเลี้ยงเซลล์ JAR ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นของพลาสมา 3% เป็นเวลา 8 ชั่วโมง แล้ววัดจำนวนเซลล์ในแต่ละระยะของวงจรเซลล์ด้วย Flow cytometer และคำนวณเปอร์เซ็นต์เซลล์ (Mean±SEM) ในแต่ละระยะของวงจร เซลล์เปรียบเทียบกับระหว่างพลาสมาทั้ง 3 ชนิด: *p<0.05 แทนการทดสอบทางสถิติที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ระหว่างพลาสมาจากผู้ป่วยทั้งจากเชื้อ *P. vivax* หรือ *P. falciparum* และกลุ่มควบคุม โดยวิธี OneWay ANOVA (LSD's method)

เวลา	3% Control plasma	3% <i>P. vivax</i> plasma	3% <i>P. falciparum</i> plasma
12 ชั่วโมง	<p>G0/G1=53.39±0.83 S=22.61±1.17 G2/M=24.00±1.35</p> 	<p>G0/G1=47.88±0.77* S=34.82±1.04* G2/M=17.31±1.81*</p> 	<p>G0/G1=39.25±0.80** S=37.87±1.37* G2/M=22.87±1.11</p> 

รูปที่ 18 ผลของพลาสมาต่อการดำเนินของวงจรเซลล์: ศึกษาโดยการเลี้ยงเซลล์ JAR ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นของพลาสมา 3% เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้ววัดจำนวนเซลล์ในแต่ละระยะของวงจรเซลล์ด้วย Flow cytometer และคำนวณเปอร์เซ็นต์เซลล์ (Mean%±SEM) ในแต่ละระยะของวงจร เซลล์เปรียบเทียบกับระหว่างพลาสมาทั้ง 3 ชนิด: *p<0.05 แทนการทดสอบทางสถิติที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ระหว่างพลาสมาจากผู้ป่วยทั้งจากเชื้อ *P. vivax* หรือ *P. falciparum* และกลุ่มควบคุม โดยวิธี OneWay ANOVA (LSD's method)

($p < 0.05$) เปอร์เซ็นต์เซลล์ JAR ในระยะ S ของเซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีพลาสมาจากผู้ป่วยจากเชื้อ *P. vivax* (34.82%) และ *P. falciparum* (37.87%) ต่างก็มากกว่าเปอร์เซ็นต์เซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีพลาสมาจากอาสาสมัครที่ไม่เป็นโรคมาลาเรีย (22.61%) ในขณะที่เปอร์เซ็นต์เซลล์ JAR ในระยะ G2/M ของเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีพลาสมาจากผู้ป่วยจากเชื้อ *P. vivax* (17.31%) น้อยกว่าเซลล์ JAR ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีพลาสมาจากผู้ป่วยจากเชื้อ *P. falciparum* (22.87%) และพลาสมาจากอาสาสมัครที่ไม่เป็นโรคมาลาเรีย (24.00%) ดังแสดงในรูปที่ 18

ที่เวลา 16 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ JAR ที่เพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีพลาสมาจากผู้ป่วยจากเชื้อ *P. falciparum* มีเปอร์เซ็นต์เซลล์ในระยะ G0/G1 (49.38%) มากกว่าเซลล์ JAR ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีพลาสมาจากผู้ป่วยจากเชื้อ *P. vivax* (36.48%) และพลาสมาจากอาสาสมัครที่ไม่เป็นโรคมาลาเรีย (36.36%) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เปอร์เซ็นต์เซลล์ JAR ในระยะ S ของเซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีพลาสมาจากผู้ป่วยจากเชื้อ *P. falciparum* (41.56%) น้อยกว่าเซลล์ JAR ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีพลาสมาจากผู้ป่วยจากเชื้อ *P. vivax* (48.14%) และพลาสมาจากอาสาสมัครที่ไม่เป็นโรคมาลาเรีย (49.38%) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในขณะที่เปอร์เซ็นต์เซลล์ JAR ในระยะ G2/M ของเซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีพลาสมาจากผู้ป่วยจากเชื้อ *P. falciparum* (9.06%) น้อยกว่าเซลล์ JAR ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีพลาสมาจากผู้ป่วยจากเชื้อ *P. vivax* (15.38%) และพลาสมาจากอาสาสมัครที่ไม่เป็นโรคมาลาเรีย (14.17%) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 19




ที่เวลา 20 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ JAR ที่เพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีพลาสมาจากผู้ป่วยจากเชื้อ *P. vivax* (29.96%) หรือ *P. falciparum* (30.80%) ต่างมีเปอร์เซ็นต์เซลล์ในระยะ G0/G1 น้อยกว่าเซลล์ JAR ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีพลาสมาจากอาสาสมัครที่ไม่เป็นโรคมาลาเรีย (40.75%) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เช่นเดียวกับเปอร์เซ็นต์เซลล์ JAR ในระยะ S ของเซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีพลาสมาจากผู้ป่วยจากเชื้อ *P. vivax* (46.36%) หรือ *P. falciparum* (46.79%) มากกว่าเซลล์ JAR ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีพลาสมาจากอาสาสมัครที่ไม่เป็นโรคมาลาเรีย (36.88%) ในขณะที่เปอร์เซ็นต์เซลล์ JAR ในระยะ G2/M ของเซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีพลาสมาทั้ง 3 ชนิดไม่แตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 20

และที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ JAR ที่เพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีพลาสมาจากผู้ป่วยจากเชื้อ *P. falciparum* มีเปอร์เซ็นต์เซลล์ในระยะ G0/G1 (26.94%) น้อยกว่าเซลล์ JAR ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีพลาสมาจากผู้ป่วยจากเชื้อ *P. vivax* (33.56%) และพลาสมาจากอาสาสมัครที่ไม่เป็นโรคมาลาเรีย (30.25%) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เปอร์เซ็นต์เซลล์ JAR




เวลา	3% Control plasma	3% <i>P. vivax</i> plasma	3% <i>P. falciparum</i> plasma
16 ชั่วโมง	<p>G0/G1=36.36±0.99 S=49.38±0.68 G2/M=14.17±1.77</p>	<p>G0/G1=36.48±2.11 S=48.14±3.54 G2/M=15.38±1.55</p>	<p>G0/G1=49.38±2.12* S=41.56±2.17* G2/M=9.06±1.22*</p>

รูปที่ 19 ผลของพลาสมาต่อการดำเนินของวงจรเซลล์: ศึกษาโดยการเลี้ยงเซลล์ JAR ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นของพลาสมา 3% เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้ววัดจำนวนเซลล์ในแต่ละระยะของวงจรเซลล์ด้วย Flow cytometer และคำนวณเปอร์เซ็นต์เซลล์ (Mean%±SEM) ในแต่ละระยะของวงจร เซลล์เปรียบเทียบกับระหว่างพลาสมาทั้ง 3 ชนิด: *p<0.05

แผนการทดสอบทางสถิติที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ระหว่างพลาสมาจากผู้ป่วยทั้งจากเชื้อ *P. vivax* หรือ *P. falciparum* และกลุ่มควบคุม โดยวิธี OneWay ANOVA (LSD's method)

เวลา	3% Control plasma	3% <i>P. vivax</i> plasma	3% <i>P. falciparum</i> plasma
20 ชั่วโมง	<p>G0/G1=40.75±0.25 S=36.88±0.03 G2/M=22.38±0.23</p> 	<p>G0/G1=29.96±0.33* S=46.36±1.93* G2/M=23.68±1.60</p> 	<p>G0/G1=30.80±0.06* S=46.79±0.99* G2/M=22.42±0.94</p> 

รูปที่ 20 ผลของพลาสมาต่อการดำเนินของวงจรเซลล์: ศึกษาโดยการเลี้ยงเซลล์ JAR ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นของพลาสมา 3% เป็นเวลา 20 ชั่วโมง แล้ววัดจำนวนเซลล์ในแต่ละระยะของวงจรเซลล์ด้วย Flow cytometer และคำนวณเปอร์เซ็นต์เซลล์ (Mean%±SEM) ในแต่ละระยะของวงจร เซลล์เปรียบเทียบกับระหว่างพลาสมาทั้ง 3 ชนิด: *p<0.05 แทนการทดสอบทางสถิติที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ระหว่างพลาสมาจากผู้เลี้ยงทั้งจากเชื้อ *P. vivax* หรือ *P. falciparum* และกลุ่มควบคุม โดยวิธี OneWay ANOVA (LSD's method)

เวลา	3% Control plasma	3% <i>P. vivax</i> plasma	3% <i>P. falciparum</i> plasma
24 ชั่วโมง	G0/G1=30.25±1.16 S=47.28±3.12 G2/M=22.48±2.10 	G0/G1=33.56±0.35 S=47.12±2.68 G2/M=19.34±3.02 	G0/G1=26.94±1.40* S=56.00±2.04* G2/M=17.06±2.67 

รูปที่ 21 ผลของพลาสมาต่อการดำเนินของวงจรเซลล์: ศึกษาโดยการเลี้ยงเซลล์ JAR ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นของพลาสมา 3% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้ววัดจำนวนเซลล์ในแต่ละระยะของวงจรเซลล์ด้วย Flow cytometer และคำนวณเปอร์เซ็นต์เซลล์ (Mean%±SEM) ในแต่ละระยะของวงจร เซลล์เปรียบเทียบกับระหว่างพลาสมาทั้ง 3 ชนิด: *p<0.05 แทนการทดสอบทางสถิติที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ระหว่างพลาสมาจากผู้ให้ทั้งจากเชื้อ *P. vivax* หรือ *P. falciparum* และกลุ่มควบคุม โดยวิธี OneWay ANOVA (LSD's method)

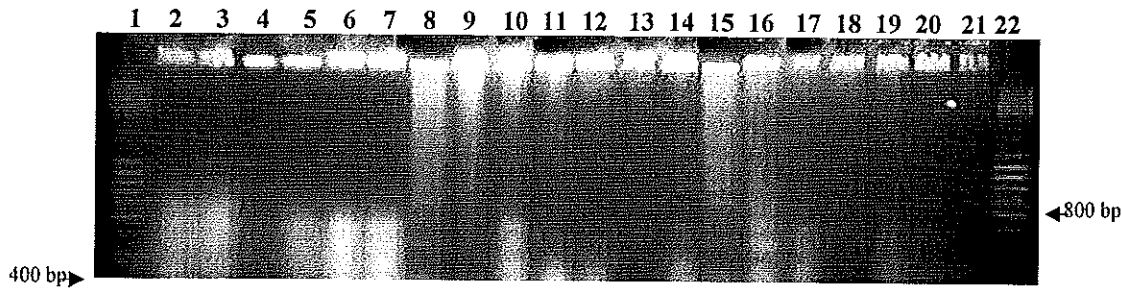
ในระยะ S ของเซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีพลาสมาจากผู้ป่วยจากเชื้อ *P. falciparum* (56.00%) มากกว่าเซลล์ JAR ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีพลาสมาจากผู้ป่วยจากเชื้อ *P. vivax* (47.12%) และพลาสมาจากอาสาสมัครที่ไม่เป็นโรคมาลาเรีย (47.28%) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในขณะที่เปอร์เซ็นต์เซลล์ JAR ในระยะ G2/M ของเซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีพลาสมาทั้ง 3 ชนิดไม่แตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 21

ดังนั้นเมื่อพิจารณาจากผลการทดลองดังกล่าวร่วมกับผลการศึกษาในข้อ 1.1 แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าพลาสมาจากผู้ป่วยมาลาเรียทั้งจากเชื้อ *P. vivax* หรือ *P. falciparum* ต่างเร่งการดำเนินวงจรเซลล์ของเซลล์ JAR ให้เร็วขึ้น ซึ่งเป็นสาเหตุของการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ JAR ในการทดลองที่ 1.1 โดยสามารถสังเกตเห็นผลของพลาสมารวมชนิด *P. vivax* ต่อการเปลี่ยนแปลงวงจรเซลล์ได้ที่เวลา 4 ชั่วโมง ในขณะที่พลาสมารวมชนิด *P. falciparum* สังเกตผลที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงของวงจรเซลล์ได้ที่เวลา 12 ชั่วโมง ภายหลังจากเริ่มทำการทดลอง

1.3 ผลของพลาสมาจากผู้ป่วยมาลาเรียต่อการชักนำการตายของเซลล์

จากผลการศึกษาในข้อ 1.1 และ 1.2 แสดงให้เห็นว่าพลาสมาจากผู้ป่วยมาลาเรียชักนำการเพิ่มจำนวน โดยเร่งการดำเนินของวงจรเซลล์ของเซลล์ JAR ในการศึกษาต่อไปนี้จึงเป็นการทดสอบผลของพลาสมาจากผู้ป่วยมาลาเรียต่อการชักนำการตายของเซลล์ ทำได้โดยเลี้ยงเซลล์ JAR ด้วยอาหาร RPMI-1640 ที่มีพลาสมารวมที่ระดับความเข้มข้น 0 ถึง 5% เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง และสกัด DNA จากเซลล์ แล้วตรวจสอบการแตกหักของ DNA โดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าโดย 2% agarose gel ซึ่งจากการศึกษาพบว่าพลาสมาทั้ง 3 ชนิดที่ทุกระดับความเข้มข้นไม่ก่อให้เกิดการแตกหักของ DNA ในทุกช่วงเวลา แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าที่เวลา 72 ชั่วโมง ในกลุ่มของเซลล์ JAR ที่ไม่ได้รับพลาสมา (lane 16) พบการแตกหักของ DNA ได้ ซึ่งคาดว่าเป็นผลจากการอดซึ่มจึงส่งผลให้เซลล์ตาย ดังแสดงในรูปที่ 22-24 อย่างไรก็ตามการกระตุ้นการตายของเซลล์ในสถานะที่ไม่มีพลาสมา (lane 16) นั้นจะลดลงเมื่อมีการเติมพลาสมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ (lane 21)

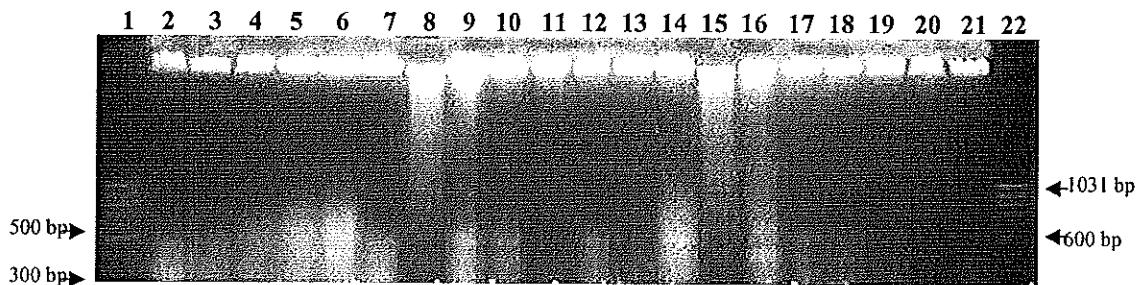
ในการยืนยันการแตกหักของ DNA ด้วยเทคนิค TUNEL โดยการเลี้ยงเซลล์ JAR ด้วยอาหาร RPMI-1640 ที่มีพลาสมารวม 5% เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และย้อมด้วยชุดน้ำยาแล้วดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด confocal กำลังขยาย 200 เท่า โดยเซลล์ที่มีการตายนั้น จะเกิดการแตกหักของ DNA ซึ่งย้อมติดสีเขียวของ FITC ในนิวเคลียสพบว่าเมื่อเลี้ยงเซลล์ที่มีพลาสมาทั้ง 3 ชนิด



รูปที่ 22 ผลของพลาสมาจากอาสาสมัครที่ไม่เป็นโรคมมาลาเรียต่อการชักนำการตายของเซลล์

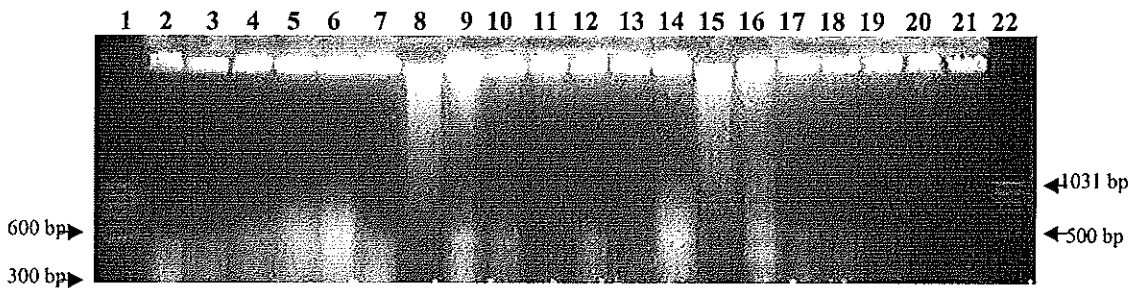
JAR: ศึกษาโดยการเลี้ยงเซลล์ JAR ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นของพลาสมา 0 ถึง 5% เป็นเวลา 24 (lane 2-7), 48 (lane 9-14) และ 72 (lane 16-21) ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วตรวจสอบการแตกหักของ DNA ด้วยวิธี Gel-electrophoresis

- | | |
|------------------------------------|------------------------------------|
| 1=DNA marker (100 bp) | 12=control plasma 1.25% 48 hours |
| 2=control plasma 0% 24 hours | 13=control plasma 2.50% 48 hours |
| 3=control plasma 0.3125% 24 hours | 14=control plasma 5.00% 48 hours |
| 4=control plasma 0.625% 24 hours | 15=Positive control |
| 5=control plasma 1.25% 24 hours | 16=control plasma 0% 72 hours |
| 6=control plasma 2.50% 24 hours | 17=control plasma 0.3125% 72 hours |
| 7=control plasma 5.00% 24 hours | 18=control plasma 0.625% 72 hours |
| 8=Positive control | 19=control plasma 1.25% 72 hours |
| 9=control plasma 0% 48 hours | 20=control plasma 2.50% 72 hours |
| 10=control plasma 0.3125% 48 hours | 21=control plasma 5.00% 72 hours |
| 11=control plasma 0.625% 48 hours | 22=DNA marker (100 bp) |



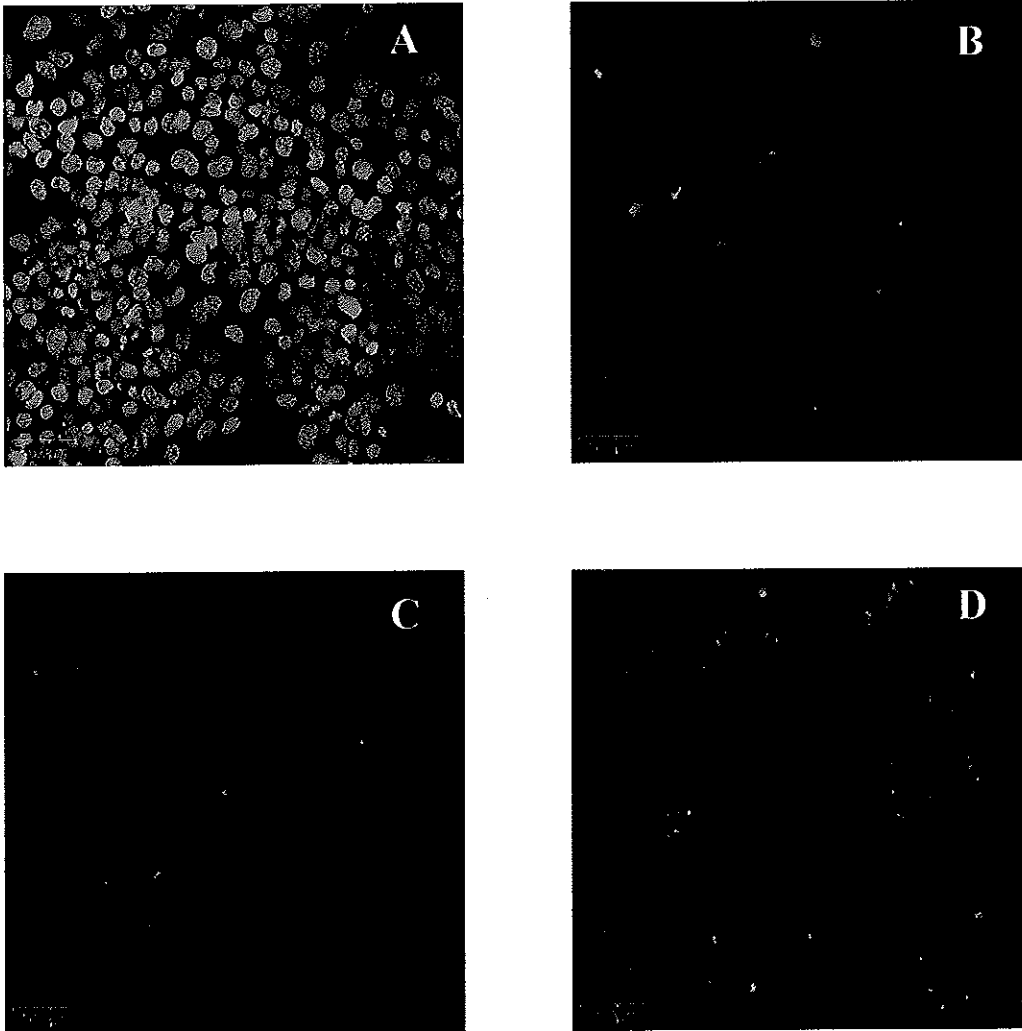
รูปที่ 23 ผลของพลาสมาจากผู้ป่วยมาลาเรียจากเชื้อ *P. vivax* ต่อการชักนำการตายของเซลล์ JAR: ศึกษาโดยการเลี้ยงเซลล์ JAR ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นของพลาสมา 0 ถึง 5% เป็นเวลา 24 (lane 2-7), 48 (lane 9-14) และ 72 (lane 16-21) ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วตรวจสอบการแตกหักของ DNA ด้วยวิธี Gel-electrophoresis

- | | |
|--|--|
| 1=DNA marker (100 bp) | 12= <i>Pv.</i> plasma 1.25% 48 hours |
| 2= <i>Pv.</i> plasma 0% 24 hours | 13= <i>Pv.</i> plasma 2.50% 48 hours |
| 3= <i>Pv.</i> plasma 0.3125% 24 hours | 14= <i>Pv.</i> plasma 5.00% 48 hours |
| 4= <i>Pv.</i> plasma 0.625% 24 hours | 15=Positive control |
| 5= <i>Pv.</i> plasma 1.25% 24 hours | 16= <i>Pv.</i> plasma 0% 72 hours |
| 6= <i>Pv.</i> plasma 2.50% 24 hours | 17= <i>Pv.</i> plasma 0.3125% 72 hours |
| 7= <i>Pv.</i> plasma 5.00% 24 hours | 18= <i>Pv.</i> plasma 0.625% 72 hours |
| 8=Positive control | 19= <i>Pv.</i> plasma 1.25% 72 hours |
| 9= <i>Pv.</i> plasma 0% 48 hours | 20= <i>Pv.</i> plasma 2.50% 72 hours |
| 10= <i>Pv.</i> plasma 0.3125% 48 hours | 21= <i>Pv.</i> plasma 5.00% 72 hours |
| 11= <i>Pv.</i> plasma 0.625% 48 hours | 22=DNA marker (100 bp) |



รูปที่ 24 ผลของพลาสมาจากผู้ป่วยมาลาเรียจากเชื้อ *P. falciparum* ต่อการชักนำการตายของเซลล์ JAR: ศึกษาโดยการเลี้ยงเซลล์ JAR ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นของพลาสมา 0 ถึง 5% เป็นเวลา 24 (lane 2-7), 48 (lane 9-14) และ 72 (lane 16-21) ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วตรวจสอบการแตกหักของ DNA ด้วยวิธี Gel-electrophoresis

- | | |
|--|--|
| 1=DNA marker (100 bp) | 12= <i>Pf.</i> plasma 1.25% 48 hours |
| 2= <i>Pf.</i> plasma 0% 24 hours | 13= <i>Pf.</i> plasma 2.50% 48 hours |
| 3= <i>Pf.</i> plasma 0.3125% 24 hours | 14= <i>Pf.</i> plasma 5.00% 48 hours |
| 4= <i>Pf.</i> plasma 0.625% 24 hours | 15=Positive control |
| 5= <i>Pf.</i> plasma 1.25% 24 hours | 16= <i>Pf.</i> plasma 0% 72 hours |
| 6= <i>Pf.</i> plasma 2.50% 24 hours | 17= <i>Pf.</i> plasma 0.3125% 72 hours |
| 7= <i>Pf.</i> plasma 5.00% 24 hours | 18= <i>Pf.</i> plasma 0.625% 72 hours |
| 8=Positive control | 19= <i>Pf.</i> plasma 1.25% 72 hours |
| 9= <i>Pf.</i> plasma 0% 48 hours | 20= <i>Pf.</i> plasma 2.50% 72 hours |
| 10= <i>Pf.</i> plasma 0.3125% 48 hours | 21= <i>Pf.</i> plasma 5.00% 72 hours |
| 11= <i>Pf.</i> plasma 0.625% 48 hours | 22=DNA marker (100 bp) |



รูปที่ 25 ผลของพลาสมาต่อการชักนำการตายเซลล์ JAR: ศึกษาโดยเลี้ยงเซลล์ JAR ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นของพลาสมา 5% เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบการแตกหักของ DNA ของเซลล์ JAR โดยเทคนิค TUNEL ด้วยกล้องจุลทรรศน์ confocal กำลังขยาย 200 เท่า เซลล์ที่มีการตายแบบ apoptosis นั้น จะย้อมติดสีเขียวของ FITC ในนิวเคลียส (A=positive control, B=5% control plasma, C=5% *P. vivax* plasma และ D=5% *P. falciparum* plasma)

ปริมาณเซลล์มีการแตกหักของ DNA ไม่แตกต่างกันซึ่งเซลล์ที่ย้อมติดสีของ FITC ที่ปรากฏนั้น น่าจะเกิดมาจากเซลล์ที่กำลังตายและไม่ได้เป็นผลมาจากพลาสมา ดังแสดงในรูปที่ 25

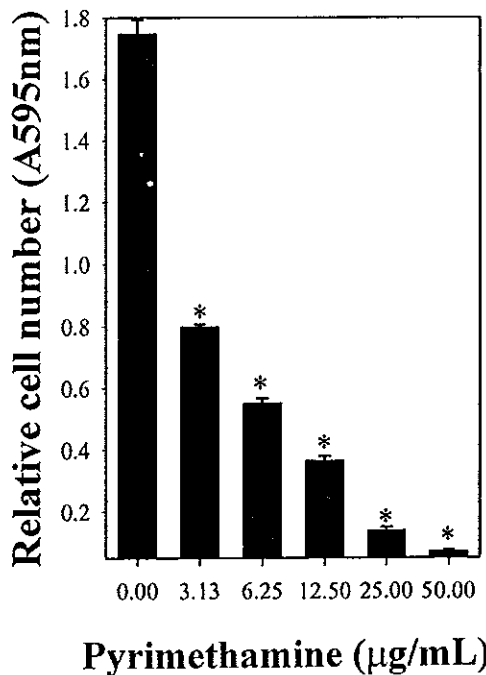
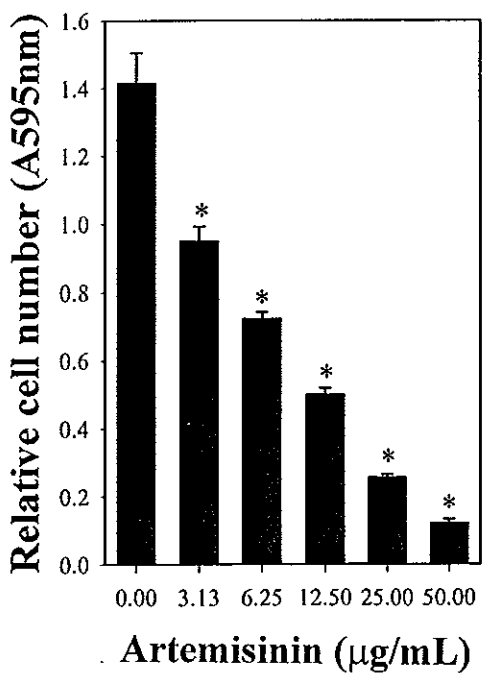
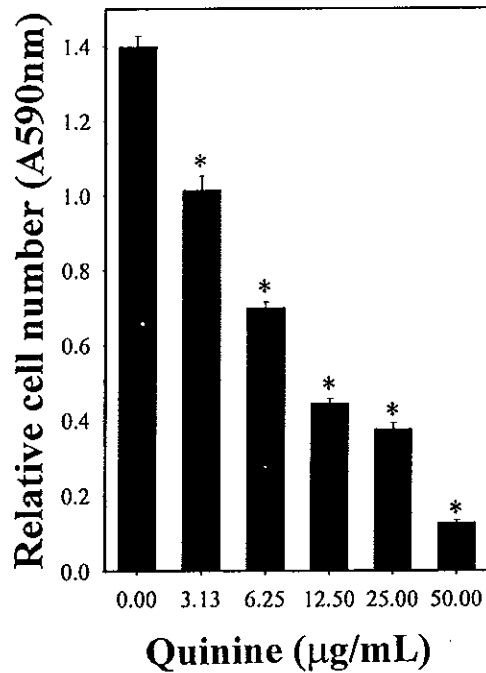
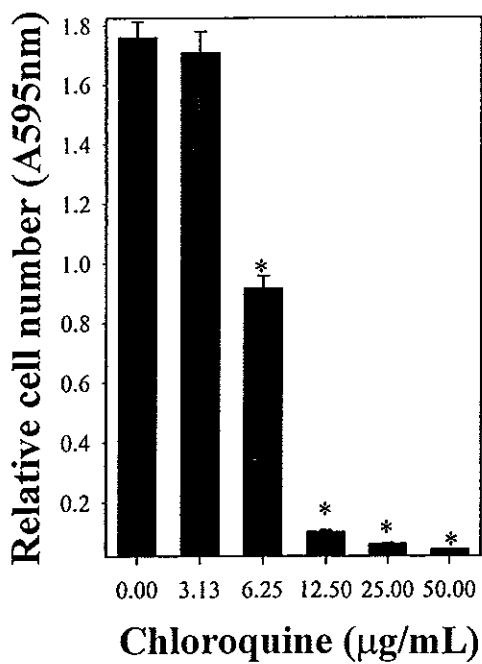
2 ผลของยาต้านมาลาเรียต่อเซลล์รกชนิด trophoblast (JAR)

2.1 ผลของยาต้านมาลาเรียต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์โดย MTT

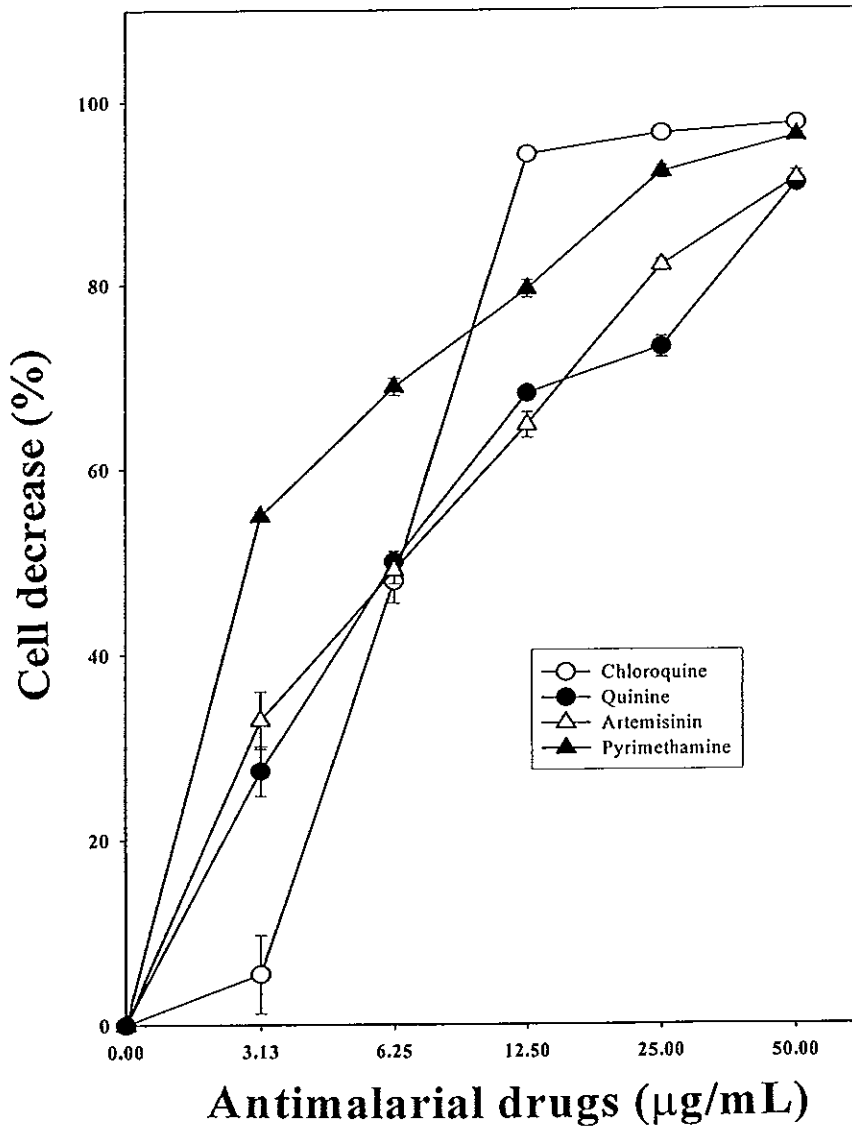
จากการศึกษาผลของยาต้านมาลาเรียทั้ง 4 ชนิด คือ chloroquine, quinine, artemisinin และ pyrimethamine ที่ระดับความเข้มข้น 0 ถึง 50 $\mu\text{g/mL}$ ต่อความอยู่รอดของเซลล์ JAR ในด้านการเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วยวิธี MTT พบว่า chloroquine ที่ระดับความเข้มข้น 6.25, 12.50, 25.00 และ 50.00 $\mu\text{g/mL}$ ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ JAR เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มีเฉพาะ 0.5% FBS อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 6.56 $\mu\text{g/mL}$ เช่นเดียวกับ quinine, artemisinin และ pyrimethamine ที่ระดับความเข้มข้น 3.125, 6.25, 12.50, 25.00 และ 50.00 $\mu\text{g/mL}$ ต่างสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ JAR ได้เช่นกัน และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 6.04, 6.67 และ 2.92 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 26 ในขณะที่ DMSO (ตัวทำละลายของยาบางตัว) ไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ JAR แต่อย่างใด

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบผลของยาต้านมาลาเรียแต่ละชนิดต่อจำนวนของเซลล์ JAR ที่ลดลง (%) ดังรูปที่ 27 พบว่า chloroquine ที่ระดับความเข้มข้น 6.25, 12.50, 25.00 และ 50 $\mu\text{g/mL}$ ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ JAR มีจำนวนเซลล์ลดลงเท่ากับ 47.92, 94.20, 96.42 และ 97.50% ตามลำดับ quinine ที่ระดับความเข้มข้น 3.125, 6.25, 12.50, 25.00 และ 50 $\mu\text{g/mL}$ มีจำนวนเซลล์ลดลง 27.45, 52.11, 68.12, 73.12 และ 90.92% ตามลำดับ เช่นเดียวกับ artemisinin ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันมีจำนวนเซลล์ลดลง 32.93, 49.05, 64.73, 81.98 และ 91.45% ตามลำดับ ในขณะที่ pyrimethamine ที่ระดับความเข้มข้น 3.125, 6.25, 12.50, 25.00 และ 50 $\mu\text{g/mL}$ มีจำนวนเซลล์ลดลงเท่ากับ 54.32, 68.52, 79.22, 92.10 และ 95.99% ตามลำดับ

การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ายาต้านมาลาเรียทั้ง 4 ชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ JAR แบบ dose-dependent fashion โดย chloroquine, quinine และ artemisinin มีค่า IC_{50} ใกล้เคียงกัน (6.56, 6.04 และ 6.67 $\mu\text{g/mL}$) ในขณะที่ pyrimethamine แสดงให้เห็นว่าเป็นยาต้านมาลาเรียที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ JAR สูงสุด โดยพบว่าเซลล์ JAR ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มียา pyrimethamine ที่ระดับความเข้มข้นน้อยที่สุดคือ 3.125 $\mu\text{g/mL}$ สามารถลดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้สูงถึง 54.32% ประกอบกับมีค่า IC_{50} น้อยที่สุด



รูปที่ 26 ผลของยาต้านมาลาเรียต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ JAR: ศึกษาโดยการเลี้ยงเซลล์ JAR 10^5 เซลล์ต่อหลุมในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นของยาต้านมาลาเรีย 0 ถึง 50 µg/mL เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้ววัดจำนวนเซลล์สัมพันธ์ (Mean±S.E.M) โดยวิธี MTT และเปรียบเทียบจำนวนเซลล์สัมพันธ์ (Mean±S.E.M) กับกลุ่มควบคุม: *, $p < 0.05$ แทนการทดสอบทางสถิติที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มยาต้านมาลาเรียและกลุ่มควบคุม โดยวิธี OneWay ANOVA (Dunnell's method)



รูปที่ 27 ผลของยาต้านมาลาเรียต่อการลดลงของเซลล์ JAR: ศึกษาโดยการเลี้ยงเซลล์ JAR 10^5 เซลล์ต่อหลุมในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นของยาต้านมาลาเรีย 0 ถึง 50 µg/mL เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้ววัดปริมาณของเซลล์โดยวิธี MTT และคำนวณจำนวนเซลล์ที่ลดลง (% , Mean \pm SEM)

2.2 ความเป็นพิษของยาต้านมาลาเรียต่อเซลล์ (cell cytotoxicity) โดยการตรวจวัดระดับ LDH ในน้ำเลี้ยงเซลล์

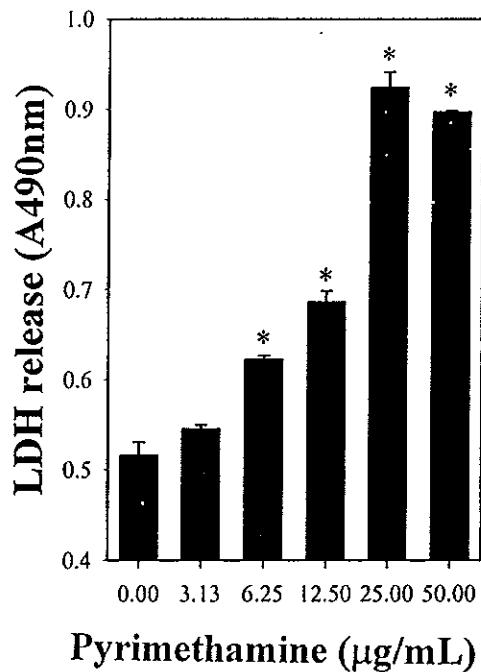
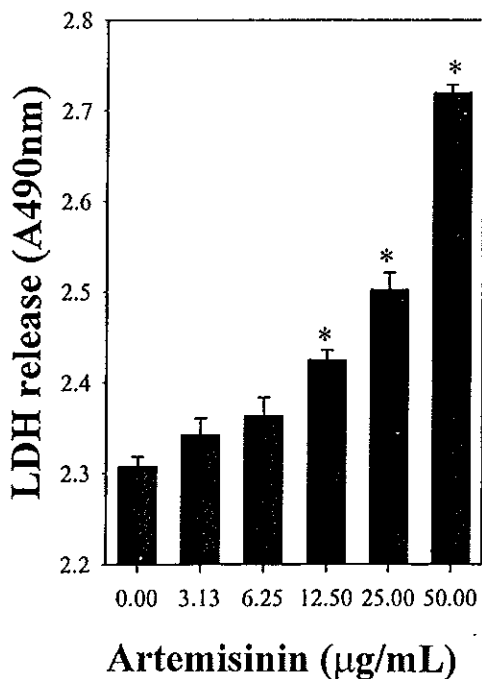
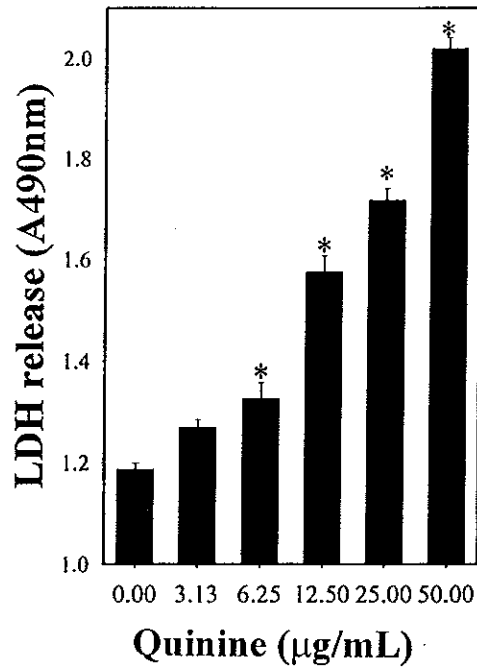
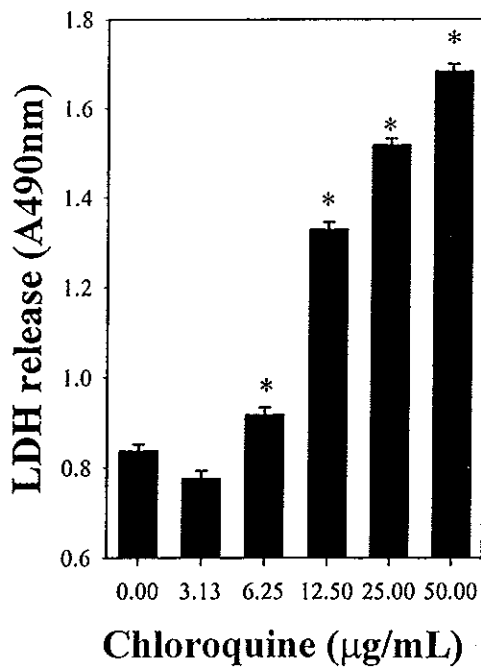
จากการศึกษาในข้อ 2.1 แสดงให้เห็นว่ายาด้านมาลาเรียทั้ง 4 ชนิด มีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ JAR แต่ไม่สามารถอธิบายกลไกการออกฤทธิ์ของยาต้านมาลาเรียดังกล่าวต่อการลดจำนวนของเซลล์ได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยการศึกษาความเป็นพิษของยาต้านมาลาเรียต่อเซลล์ โดยการตรวจวัดระดับ LDH ในน้ำเลี้ยงเซลล์ พบว่า chloroquine, quinine และ pyrimethamine ที่ระดับความเข้มข้น 6.25, 12.50, 25.00 และ 50.00 $\mu\text{g/mL}$ มีระดับ LDH ในน้ำเลี้ยงเซลล์เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะ 0.5% FBS อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในขณะที่ artemisinin ที่ระดับความเข้มข้น 12.50, 25.00 และ 50.00 $\mu\text{g/mL}$ มีระดับของ LDH เพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 28

เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของ LDH เป็นดัชนีชี้วัดระดับการตายของเซลล์ ดังนั้นเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบ ผลของยาต้านมาลาเรียแต่ละชนิดต่อระดับการตายของเซลล์ JAR (%) ดังรูปที่ 29 พบว่า chloroquine ที่ระดับความเข้มข้น 6.25, 12.50, 25.00 และ 50 $\mu\text{g/mL}$ ชักนำไปเกิดเซลล์ตาย 9.69, 58.85, 81.58 และ 101.32% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับยา ตามลำดับ

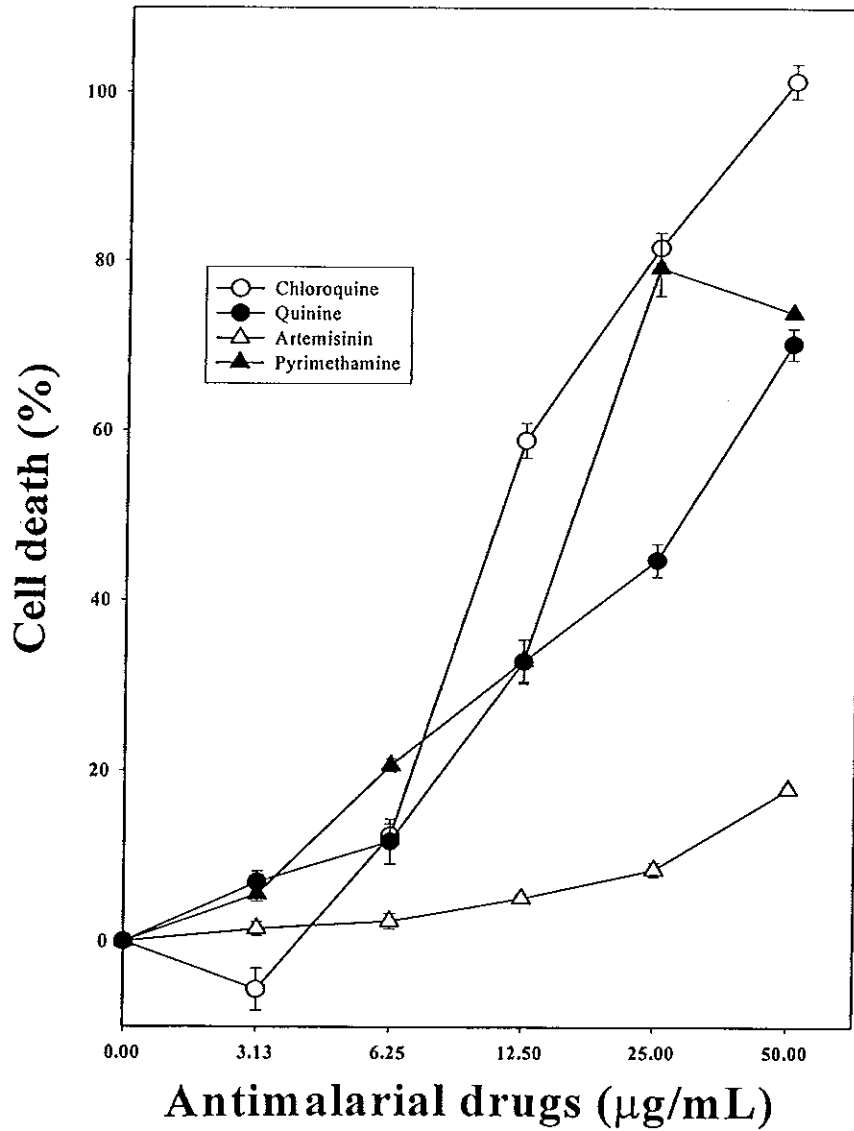
สำหรับยา quinine ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน ชักนำไปเกิดเซลล์ตาย 11.79, 32.86, 44.74 และ 70.18% ตามลำดับ เช่นเดียวกับ pyrimethamine ที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวก็ชักนำไปเกิดเซลล์ตาย 20.74, 32.95, 79.07 และ 73.84% ตามลำดับ แต่เป็นที่น่าสังเกตว่า artemisinin ที่ระดับความเข้มข้น 12.50, 25.00 และ 50 $\mu\text{g/mL}$ ถึงแม้จะมีระดับของ LDH เพิ่มขึ้นเช่นกัน แต่พบว่าชักนำไปเกิดเซลล์ตาย 5.12, 8.45 และ 17.90% เท่านั้น

2.3 ผลของยาต้านมาลาเรียต่อการดำเนินของวงจรเซลล์

จากการศึกษาในข้อ 2.1 และ 2.2 แสดงให้เห็นว่ายาด้านมาลาเรียมีฤทธิ์ฆ่าเซลล์ JAR อันส่งผลต่อการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าเซลล์ JAR ที่เพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี artemisinin ที่ระดับความเข้มข้น 3.125, 6.25, 12.50, 25 และ 50 $\mu\text{g/mL}$ ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ โดยมีจำนวนของเซลล์ลดลง 32.93, 49.05, 64.73, 81.98 และ 91.45% ตามลำดับ แต่ในการศึกษาข้อ 2.2 พบว่า artemisinin ที่ระดับความเข้มข้น 12.25, 25 และ 50 $\mu\text{g/mL}$ นั้น กลับชักนำไปเกิดการตายของเซลล์เพียง 5.12, 8.45 และ 17.9% เท่านั้น จึงกล่าวได้ว่าอาจจะมีกลไกในการออกฤทธิ์ของยาต้านมาลาเรียต่อเซลล์ JAR อื่นๆ อีกนอกจากฆ่าเซลล์เท่านั้น จึงคาดว่ายาต้านมาลาเรียอาจจะส่งผลต่อการดำเนินของวงจรเซลล์ ดังนั้นในการศึกษาส่วนนี้จะกล่าวถึงผลของยาต้านมาลาเรียต่อวงจรเซลล์



รูปที่ 28 ผลของยาด้านมาลาเรียต่อความเป็นพิษของเซลล์ JAR: ศึกษาโดยการเลี้ยงเซลล์ JAR 10^5 เซลล์ต่อหลอดในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นของยาด้านมาลาเรีย 0 ถึง 50 µg/mL เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้ววัดระดับ LDH ในน้ำเลี้ยงเซลล์ด้วย LDH-kit และเปรียบเทียบระดับ LDH (Mean±S.E.M) กับกลุ่มควบคุม*, $p < 0.05$ แทนการทดสอบทางสถิติที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ระหว่างกลุ่มยาด้านมาลาเรียและกลุ่มควบคุม โดยวิธี OneWay ANOVA (Dunnett's method)



รูปที่ 29 ผลของยาต้านมาลาเรียต่อความเป็นพิษของเซลล์ JAR: ศึกษาโดยการเลี้ยงเซลล์ JAR 10^5 เซลล์ต่อหลุมในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นของยาต้านมาลาเรีย 0 ถึง 50 $\mu\text{g/mL}$ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้ววัดระดับ LDH ในน้ำเลี้ยงเซลล์ด้วย LDH-kit และคำนวณจำนวนเซลล์ตาย (% Mean \pm SEM)

โดยเลี้ยงเซลล์ JAR ด้วย 10% FBS จนเซลล์มีความหนาแน่น 70 ถึง 80% แล้ว synchronize เซลล์เพื่อยับยั้งวงจรเซลล์ในเซลล์ส่วนใหญ่อยู่ในระยะเดียวกัน หลังจากนั้นกระตุ้นวงจรเซลล์โดยการเลี้ยงเซลล์ JAR ด้วย อาหาร RPMI-1640 ที่มี 3% FBS ที่มี หรือไม่มียาต้านมาลาเรียแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ แล้วศึกษาเปอร์เซ็นต์เซลล์ในแต่ละระยะของวงจรเซลล์ที่เวลา 6, 12, 20 และ 32 ชั่วโมง โดยการย้อม DNA ของเซลล์ด้วย popridium iodine แล้วนับเปอร์เซ็นต์เซลล์ด้วยเครื่อง Flow cytometer จากการศึกษาพบว่าที่เวลา 0 ชั่วโมง ภายหลังจาก synchronize มีเปอร์เซ็นต์เซลล์ JAR อยู่ในระยะ G0/G1 จำนวน 23.96% ระยะ S 61.29% และระยะ G2/M 14.75% ตามลำดับ

ที่เวลา 6 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์เซลล์ JAR ในระยะ S ของทุกกลุ่มการทดลอง พบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีเฉพาะ 3% FBS สามารถกระตุ้นให้เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ JAR ดำเนินออกจากรยะ S ได้มากที่สุด อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยคงเหลือเปอร์เซ็นต์เซลล์ JAR ในระยะ S น้อยที่สุด (41.51%) เมื่อเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์เซลล์ในระยะ S ของเซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี 3% FBS ร่วมกับยาต้านมาลาเรีย chloroquine (47.27%) quinine (49.46%) หรือ artemisinin (49.90%) ตามลำดับ ในขณะที่เซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี 3% FBS ร่วมกับ pyrimethamine คงเหลือเปอร์เซ็นต์เซลล์ JAR ในระยะ S มากที่สุด (69.55%) เมื่อเปรียบเทียบกับทุกกลุ่มการทดลอง อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

เปอร์เซ็นต์เซลล์ในระยะ G0/G1 ของเซลล์ JAR ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี 3% FBS ร่วมกับ artemisinin มีเปอร์เซ็นต์เซลล์มากที่สุด (30.66%) เมื่อเปรียบเทียบกับทุกกลุ่มการทดลอง อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในขณะที่เปอร์เซ็นต์เซลล์ในระยะ G0/G1 ของเซลล์ JAR ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีเฉพาะ 3% FBS (27.87%) หรือ 3% FBS ร่วมกับ chloroquine (26.76%) ต่างมีเปอร์เซ็นต์เซลล์ JAR มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี 3% FBS ร่วมกับ quinine (21.95%) หรือ 3% FBS ร่วมกับ pyrimethamine (20.26%)

เปอร์เซ็นต์เซลล์ JAR ในระยะ G2/M ของเซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีเฉพาะ 3% FBS (30.63%) หรือ 3% FBS ร่วมกับ quinine (28.60%) ต่างมีเปอร์เซ็นต์เซลล์มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับทุกกลุ่มการทดลอง อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในขณะที่เปอร์เซ็นต์เซลล์ JAR ในระยะ G2/M ของเซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี 3% FBS ร่วมกับ chloroquine (25.98%) มีเปอร์เซ็นต์เซลล์มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์เซลล์ JAR ในระยะ G2/M ของเซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี 3% FBS ร่วมกับ artemisinin (19.45%) โดยเซลล์

เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี 3% FBS ร่วมกับ pyrimethamine มีเปอร์เซ็นต์เซลล์ในระยะดังกล่าวน้อยที่สุด (10.18%) เมื่อเปรียบเทียบกับทุกกลุ่มการทดลอง อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 30

ที่เวลา 12 ชั่วโมง พบว่าเปอร์เซ็นต์เซลล์ JAR ในระยะ G0/G1 ของแต่ละกลุ่มการทดลองแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ดังนี้ 3% FBS ร่วมกับ artemisinin (62.21%), 3% FBS ร่วมกับ quinine (56.40%), 3% FBS (49.64%), 3% FBS ร่วมกับ chloroquine (40.66%) และ 3% FBS ร่วมกับ pyrimethamine (17.48%) ตามลำดับ

เปอร์เซ็นต์เซลล์ JAR ในระยะ S ของเซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี 3% FBS ร่วมกับ pyrimethamine มีเปอร์เซ็นต์เซลล์มากที่สุด (76.75%) เมื่อเปรียบเทียบกับทุกกลุ่มการทดลอง อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในขณะที่เปอร์เซ็นต์เซลล์ในระยะ S ของเซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีเฉพาะ 3% FBS (45.23%) หรือ 3% FBS ร่วมกับ chloroquine (44.70%) ต่างมีเปอร์เซ็นต์เซลล์มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี 3% ร่วมกับ quinine (36.90%) โดยเซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี 3% FBS ร่วมกับ artemisinin มีจำนวนเซลล์ JAR ในระยะ S น้อยที่สุด (24.35%) เมื่อเปรียบเทียบกับทุกกลุ่มการทดลอง อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

เปอร์เซ็นต์เซลล์ JAR ในระยะ G2/M ของเซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี 3% FBS ร่วมกับ chloroquine (14.63%) หรือ 3% FBS ร่วมกับ artemisinin (13.44%) ต่างมีเปอร์เซ็นต์เซลล์มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์เซลล์ JAR ในระยะ G2/M ของเซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีเฉพาะ 3% FBS (5.13%) หรือ 3% FBS ร่วมกับ quinine (6.72%) หรือ 3% FBS ร่วมกับ pyrimethamine (5.76%) ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 31

ที่เวลา 20 ชั่วโมง พบว่าเปอร์เซ็นต์เซลล์ JAR ในระยะ G0/G1 ของเซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีเฉพาะ 3% FBS (46.24%) หรือ 3% FBS ร่วมกับ artemisinin (42.89%) ต่างมีเปอร์เซ็นต์เซลล์มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์เซลล์ JAR ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี 3% FBS ร่วมกับ chloroquine (29.89%) หรือ 3% FBS ร่วมกับ quinine (27.52%) ในขณะที่เซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี 3% FBS ร่วมกับ pyrimethamine มีเปอร์เซ็นต์เซลล์ในระยะดังกล่าวน้อยที่สุด (22.60%) เมื่อเปรียบเทียบกับทุกกลุ่มการทดลองอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

เปอร์เซ็นต์เซลล์ JAR ในระยะ S ของเซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี 3% FBS ร่วมกับ pyrimethamine มีเปอร์เซ็นต์เซลล์มากที่สุด (68.66%) เมื่อเปรียบเทียบกับทุกกลุ่มการทดลอง

เวลา	3%FBS	3%FBS + Chloroquine	3%FBS + Quinine	3%FBS + Artemisinin	3%FBS + Pyrimethamine
6 ชั่วโมง	G0/G1=27.87±1.88 S=41.51±1.64 G2/M=30.63±0.25	G0/G1=26.76±0.54 S=47.27±2.44* G2/M=25.98±1.90	G0/G1=21.95±2.04* S=49.46±0.40* G2/M=28.60±1.64	G0/G1=30.66±0.45** S=49.90±0.91* G2/M=19.45±1.35*	G0/G1=20.26±1.12* S=69.55±1.07** G2/M=10.18±0.16*

รูปที่ 30 ผลของยาต้านมาลาเรียต่อการดำเนินของวงจรเซลล์: ศึกษาโดยการเลี้ยงเซลล์ JAR ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นของ

ยาต้านมาลาเรีย 10 µg/mL เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้ววัดจำนวนเซลล์ในแต่ละระยะของวงจรเซลล์ด้วย Flow cytometer และ

คำนวณจำนวนเซลล์ (Mean%±SEM) ใน แต่ละระยะของวงจรเซลล์เปรียบเทียบระหว่างทุกกลุ่มการทดลอง: *, ** p<0.05

แทนการทดสอบทางสถิติที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ระหว่างยาด้านมาลาเรียทั้ง 4 ชนิด และกลุ่มควบคุม โดย

วิธี OneWay ANOVA (LSD's method)

เวลา	3%FBS	3%FBS +	3%FBS +	3%FBS +	3%FBS +
		Chloroquine	Quinine	Artemisinin	Pyrimethamine
12 ชั่วโมง	G0/G1=49.64±0.18 S=45.23±1.60 G2/M=5.13±1.78	G0/G1=40.66±0.43* S=44.70±0.13 G2/M=14.63±0.32*	G0/G1=56.40±0.09** S=36.90±0.86* G2/M=6.72±0.95	G0/G1=62.21±0.22*** S=24.35±1.38** G2/M=13.44±1.16*	G0/G1=17.48±1.16**** S=76.75±1.69*** G2/M=5.76±2.73

รูปที่ 31 ผลของยาด้านมาลาเรียต่อการดำเนินของวงจรเซลล์: ศึกษาโดยการเลี้ยงเซลล์ JAR ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นของยาด้านมาลาเรีย 10 µg/mL เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้ววัดจำนวนเซลล์ในแต่ละระยะของวงจรเซลล์ด้วย Flow cytometer และคำนวณจำนวนเซลล์ (Mean%±SEM) ใน แต่ละระยะของวงจรเซลล์เปรียบเทียบกับระหว่างทุกกลุ่มการทดลอง: *, **, ***, **** p<0.05 แทนการทดสอบทางสถิติที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ระหว่างยาด้านมาลาเรียทั้ง 4 ชนิด และกลุ่มควบคุม โดยวิธี OneWay ANOVA (LSD's method)

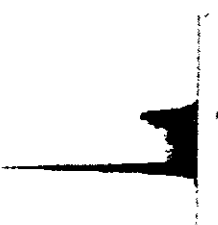
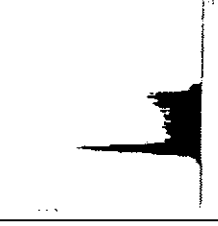
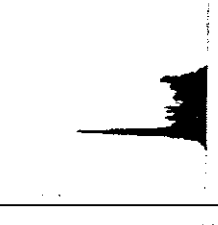


อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในขณะที่เปอร์เซ็นต์เซลล์ในระยะ S ของเซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี 3% FBS ร่วมด้วย quinine (57.80%) มีเปอร์เซ็นต์เซลล์มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์เซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี 3% FBS ร่วมด้วย chloroquine (42.62%) โดยเซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีเฉพาะ 3% FBS (35.45%) หรือ 3% FBS ร่วมด้วย artemisinin (35.16%) ต่างมีเปอร์เซ็นต์เซลล์ JAR ในระยะ S น้อยที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับทุกกลุ่มการทดลองอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์เซลล์ JAR ในระยะ G2/M พบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี 3% FBS ร่วมด้วย chloroquine มีเปอร์เซ็นต์เซลล์มากที่สุด (27.49%) เมื่อเปรียบเทียบกับทุกกลุ่มการทดลอง อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในขณะที่เซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีเฉพาะ 3% FBS (18.31%) หรือ 3% FBS ร่วมด้วย artemisinin (21.96%) ต่างมีเปอร์เซ็นต์เซลล์ในระยะ S มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี 3% FBS ร่วมด้วย quinine (14.69%) โดยเซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี 3% FBS ร่วมด้วย pyrimethamine มีเปอร์เซ็นต์เซลล์ JAR ในระยะ G2/M น้อยที่สุด (8.74%) เมื่อเปรียบเทียบกับทุกกลุ่มการทดลองอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 32

ที่เวลา 32 ชั่วโมง พบว่าเปอร์เซ็นต์เซลล์ JAR ในระยะ G0/G1 ของเซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีเฉพาะ 3% FBS มีเปอร์เซ็นต์เซลล์มากที่สุด (69.66%) เมื่อเปรียบเทียบกับทุกกลุ่มการทดลอง อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในขณะที่เซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี 3% FBS ร่วมด้วย chloroquine (65.89%) หรือ 3% FBS ร่วมด้วย quinine (64.94%) หรือ 3% FBS ร่วมด้วย artemisinin (64.50%) ต่างก็มีจำนวนเซลล์ในระยะ G0/G1 มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์เซลล์ JAR ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี 3% FBS ร่วมด้วย pyrimethamine (18.10%)

เปอร์เซ็นต์เซลล์ JAR ในระยะ S ของเซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี 3% FBS ร่วมด้วย pyrimethamine (60.49%) มีเปอร์เซ็นต์เซลล์มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับทุกกลุ่มการทดลองอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในขณะที่ เปอร์เซ็นต์เซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี 3% FBS ร่วมด้วย (27.40%) ต่างมีจำนวนเซลล์ในระยะ S มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีเฉพาะ 3% FBS (15.72%) หรือ 3% FBS ร่วมด้วย artemisinin (18.72%)

เช่นเดียวกับเซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี 3% FBS ร่วมด้วย pyrimethamine มีเปอร์เซ็นต์เซลล์ JAR ในระยะ G2/M มากที่สุด (21.40%) เมื่อเปรียบเทียบกับทุกกลุ่มการทดลองอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในขณะที่จำนวนเซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีเฉพาะ 3% FBS

เวลา	3%FBS	3%FBS + Chloroquine	3%FBS + Quinine	3%FBS + Artemisinin	3%FBS + Pyrimethamine
20 ชั่วโมง	G0/G1=46.24±0.27 S=35.45±0.54 G2/M=18.31±0.28 	G0/G1=29.89±0.44* S=42.62±0.16* G2/M=27.49±0.28* 	G0/G1=27.52±2.57* S=57.80±2.12** G2/M=14.69±0.46** 	G0/G1=42.89±1.30 S=35.16±3.11 G2/M=21.96±1.81 	G0/G1=22.60±1.53** S=68.66±0.90*** G2/M=8.74±1.08*** 

รูปที่ 32 ผลของยาด้านมาลาเรียต่อการดำเนินของวงจรเซลล์: ศึกษาโดยการเรียงเซลล์ JAR ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นของยาด้านมาลาเรีย 10 µg/mL เป็นเวลา 20 ชั่วโมง แล้ววัดจำนวนเซลล์ในแต่ละระยะของวงจรเซลล์ด้วย Flow cytometer และคำนวณจำนวนเซลล์ (Mean%±SEM) ใน แต่ละระยะของวงจรเซลล์เปรียบเทียบระหว่างทุกกลุ่มการทดลอง: *, **, ***, p<0.05 แทนการทดสอบทางสถิติที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ระหว่างยาด้านมาลาเรียทั้ง 4 ชนิด และกลุ่มควบคุม โดยวิธี OneWay ANOVA (LSD's method)

(14.62%) หรือ 3% FBS ร่วมด้วย artemisinin (17.25%) ต่างมีจำนวนเซลล์ในระยะ G2/M มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี 3% FBS ร่วมด้วย chloroquine (7.07%) หรือ 3% FBS ร่วมด้วย quinine (7.65%) ดังแสดงในรูปที่ 33

จากการศึกษาพบว่าเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ภายหลัง synchronize นั้น ถูกหยุด/ชะลออยู่ในระยะ S (61.29%) แต่หลังจากนั้นเซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีเฉพาะ 3% FBS แสดงให้เห็นว่าเซลล์ JAR จะกลับเข้าสู่วงจรเซลล์ปรกติอีกครั้ง โดยพบว่าในหนึ่งวงจรเซลล์ของเซลล์ JAR นั้น ใช้เวลาประมาณ 12 ถึง 16 ชั่วโมง ในขณะที่เซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี 3% FBS ร่วมด้วยยาต้านมาลาเรียทั้ง 4 ชนิด ที่ความเข้มข้น $10 \mu\text{g/mL}$ ชะลอการดำเนินของวงจรเซลล์ โดยหยุด/ชะลอวงจรเซลล์อยู่ในระยะ S ของวงจรเซลล์ แต่พบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี 3% FBS ร่วมด้วย chloroquine หรือ quinine และ artemisinin เซลล์ JAR สามารถกลับเข้าสู่วงจรเซลล์ปรกติได้ ในขณะที่เซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี 3% FBS ร่วมด้วย pyrimethamine หยุดวงจรเซลล์ JAR ไว้ในระยะ S ได้มากกว่า 60% ตลอดระยะเวลา 32 ชั่วโมง ที่ใช้ในการศึกษา ถึงกระนั้นก็ตามจากการศึกษาเพิ่มเติมโดย synchronize เซลล์ JAR ด้วยวิธีการอดซีรั่ม ร่วมกับ pyrimethamine $10 \mu\text{g/mL}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มี 3% FBS ต่อไป และวัดเปอร์เซ็นต์เซลล์ในทุกๆ ระยะของวงจรเซลล์ทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์เซลล์ JAR ในแต่ละระยะของวงจรเซลล์ที่เวลา 0 ชั่วโมง พบว่าที่เวลา 0 ชั่วโมง เปอร์เซ็นต์เซลล์ JAR ในแต่ละระยะของวงจรเซลล์คือ G0/G1 26.66%, S 58.33% และ G2/M 15.01% ตามลำดับ ในขณะที่เซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี 3% FBS เป็นเวลา 6 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์เซลล์ในระยะ S เพิ่มขึ้น (80.48%) และเปอร์เซ็นต์เซลล์ในระยะ G0/G1 ลดลง (1.73%) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่เวลา 0 ชั่วโมง ในขณะที่เปอร์เซ็นต์เซลล์ในระยะ G2/M ไม่แตกต่างกัน ที่เวลา 12 ชั่วโมง เซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี 3% FBS ในระยะ G0/G1 มีเปอร์เซ็นต์เซลล์น้อยกว่า ในขณะที่ระยะ G2/M มีเปอร์เซ็นต์เซลล์เพิ่มขึ้น อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนเซลล์ที่เวลา 0 ชั่วโมง ในขณะที่ระยะ S ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 34

ชี้ให้เห็นว่าถึงแม้ pyrimethamine จะมีฤทธิ์หยุด/ชะลอวงจรเซลล์ไว้ในระยะ S ของวงจรเซลล์สูงกว่ายาต้านมาลาเรียชนิดอื่นก็ตาม แต่ก็สามารถกลับเข้าสู่วงจรเซลล์ปรกติได้

ดังนั้นจากการศึกษาในครั้งนี้ ประกอบกับเมื่อพิจารณาจากผลการทดลองดังกล่าว ร่วมกับผลการศึกษาในข้อ 2.1 และ 2.2 แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าการชะลอการดำเนินวงจร

เวลา	3%FBS	3%FBS +	3%FBS +	3%FBS +	3%FBS +
		Chloroquine	Quinine	Artemisinin	Pyrimethamine
32 ชั่วโมง	G0/G1=69.66±1.94 S=15.72±0.04 G2/M=14.62±1.90	G0/G1=65.89±0.42* S=27.03±0.93* G2/M=7.07±0.73*	G0/G1=64.94±2.11* S=27.40±0.76* G2/M=7.65±1.46*	G0/G1=64.50±0.09* S=18.27±1.05 G2/M=17.25±1.13	G0/G1=18.10±2.60** S=60.49±2.03** G2/M=21.40±4.12**

รูปที่ 33 ผลของยาด้านมาลาเรียต่อการดำเนินของวงจรเซลล์: ศึกษาโดยการเลี้ยงเซลล์ JAR ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นของยาด้านมาลาเรีย 10 µg/mL เป็นเวลา 32 ชั่วโมง แล้ววัดจำนวนเซลล์ในแต่ละระยะของวงจรเซลล์ด้วย Flow cytometer และคำนวณจำนวนเซลล์ (Mean%±SEM) ใน แต่ละระยะของวงจรเซลล์เปรียบเทียบกับทุกกลุ่มการทดลอง: **, p<0.05 แทนการทดสอบทางสถิติที่มีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ระหว่างยาด้านมาลาเรียทั้ง 4 ชนิด และกลุ่มควบคุม โดยวิธี OneWay ANOVA (LSD's method)

	0 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง	12 ชั่วโมง	18 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง
3% FBS	G0/G1=26.66±0.30 S=58.33±4.35 G2/M=15.01±4.57	G0/G1=1.73±0.94* S=80.48±3.01* G2/M=17.79±3.68	G0/G1=18.35±1.21* S=52.05±2.33 G2/M=29.60±1.43*	G0/G1=26.97±2.06 S=58.32±5.42 G2/M=14.70±3.52	G0/G1=24.71±0.16 S=51.87±0.36 G2/M=23.42±0.23

รูปที่ 34 ผลของยาด้านมาลาเรีย pyrimethamine ต่อการดำเนินของวงจรเซลล์: ศึกษาโดยการเลี้ยงเซลล์ JAR ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นของยาด้านมาลาเรีย pyrimethamine 10 µg/mL เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 3% FBS เลี้ยงเซลล์ต่อไปเป็นเวลา 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง วัดจำนวนเซลล์ในแต่ละระยะของวงจรเซลล์ด้วย Flow cytometer และคำนวณจำนวนเซลล์ (Mean%±SEM) ในแต่ละระยะของวงจรเซลล์เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม: *, p<0.05 แทนการทดสอบทางสถิติที่มีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ระหว่างเวลาและกลุ่มควบคุม โดยวิธี OneWay ANOVA (Dunnett's method)

เซลล์ของเซลล์ ด้วยการหยุด/ชะลอวงจรเซลล์ไว้ในระยะ S เป็นกลไกการออกฤทธิ์ของยาต้านมาลาเรียทั้ง 4 ชนิดต่อเซลล์ JAR ด้วย

2.4 ผลของยาต้านมาลาเรียต่อการชักนำการตายของเซลล์

จากการศึกษาในข้อ 2.2 แสดงให้เห็นว่ายาด้านมาลาเรียทั้ง 4 ชนิด มีฤทธิ์ฆ่าเซลล์อย่างไรก็ตามเพื่อที่จะอธิบายชนิดของกระบวนการตายของเซลล์ ในการศึกษาส่วนต่อไปนี้จะเป็นการศึกษาการแตกหักของ DNA ที่เป็นลักษณะเด่นของการตายของเซลล์ โดยเฉพาะเลี้ยงเซลล์ JAR ใน RPMI-1640 ที่มีเฉพาะ 0.5% FBS สำหรับกลุ่มควบคุม หรือ 0.5% FBS ร่วมกับยาต้านมาลาเรียทั้ง 4 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้นของยา 0 ถึง 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ สำหรับกลุ่มทดสอบแล้วทำการสกัด DNA และแยกด้วยกระแสไฟฟ้า

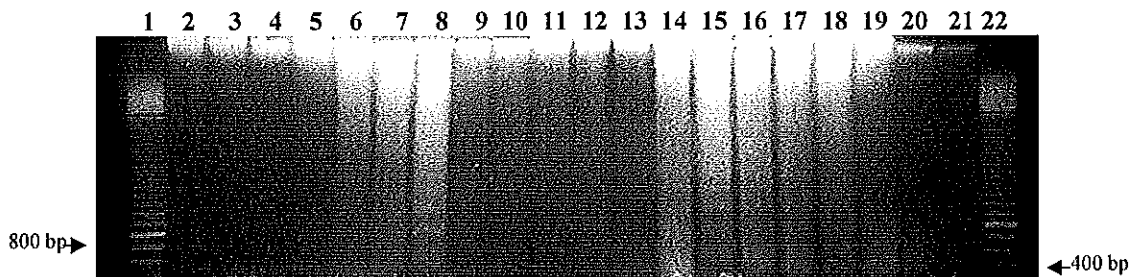
ในกลุ่มทดสอบจากการศึกษาพบว่าเซลล์ JAR ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 0.5% FBS ร่วมด้วย chloroquine ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (lane 6 และ 7) พบการแตกหักของ DNA ซึ่งมีลักษณะเป็นขั้นบันได (ladder) ได้ เช่นเดียวกับที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ เวลา 48 ชั่วโมง (lane 14) ในขณะที่เวลา 72 ชั่วโมง พบการแตกหักของ DNA ได้ที่ความเข้มข้น 3.125, 6.25 และ 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (lane 17, 18 และ 19) ดังรูปที่ 35

เซลล์ JAR ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 0.5% FBS ร่วมด้วย quinine ที่เวลา 24 ชั่วโมง ไม่พบการแตกหักของ DNA แต่อย่างใด ในขณะที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง พบการแตกหักของ DNA ได้ที่ความเข้มข้น 3.125, 6.25, 12.5, 25 และ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (lane 10-14 และ 17-21) ดังรูปที่ 36

เซลล์ JAR ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 0.5% FBS ร่วมด้วย artemisinin พบการแตกหักของ DNA ได้ ที่ความเข้มข้น 3.125, 6.25, 12.5, 25 และ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ เวลา 48 ชั่วโมง (lane 10-14) เท่านั้น ในขณะที่เวลา 24 และ 72 ชั่วโมง ไม่พบการแตกหักของ DNA แต่อย่างใด ดังรูปที่ 37

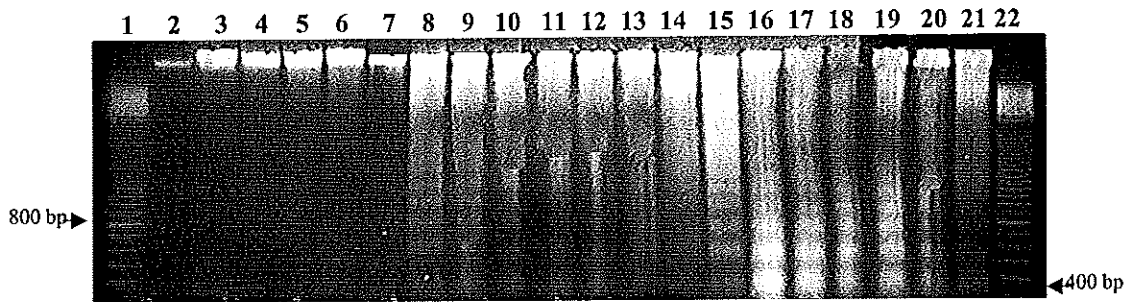
ที่เวลา 24 ชั่วโมง เซลล์ JAR ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 0.5% FBS ร่วมด้วย pyrimethamine ไม่พบการแตกหักของ DNA ที่ทุกระดับความเข้มข้นของยาแต่อย่างใด ในขณะที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 3.125, 6.25, 12.5, 25 และ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (lane 10-14 และ 17-20) สังเกตเห็นการแตกหักของ DNA ได้ ดังรูปที่ 38

แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าเซลล์ JAR ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้รับเฉพาะ 0.5% FBS ในกลุ่มควบคุมที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง พบการแตกหักของ DNA ได้เช่นกัน ดังแสดงในรูป



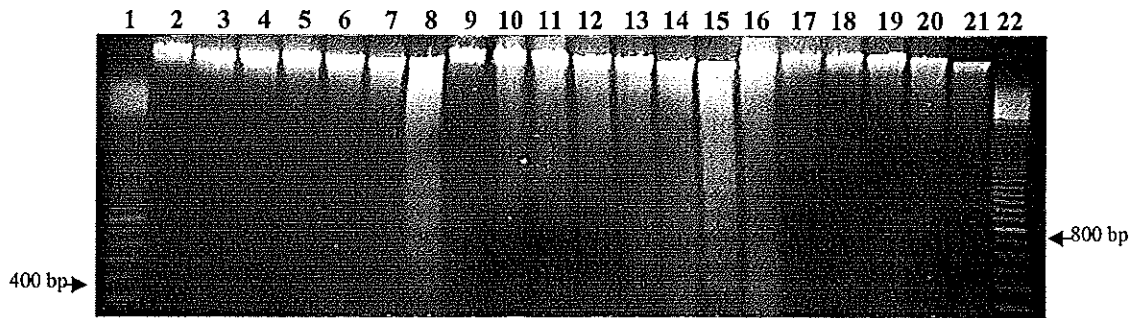
รูปที่ 35 ผลของยาต้านมาลาเรีย chloroquine ต่อการชักนำการตายของเซลล์ JAR: ศึกษาโดยการเลี้ยงเซลล์ JAR ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นของ chloroquine 0 ถึง 50 µg/mL เป็นเวลา 24 (lane 2-7), 48 (lane 9-14) และ 72 (lane 16-21) ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วตรวจสอบการแตกหักของ DNA ด้วยวิธี Gel-electrophoresis

- | | |
|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 1=DNA marker (100 bp) | 12=chloroquine 12.50 µg/mL 48 hours |
| 2=chloroquine 0 µg/mL 24 hours | 13=chloroquine 25.00 µg/mL 48 hours |
| 3=chloroquine 3.125 µg/mL 24 hours | 14=chloroquine 50.00 µg/mL 48 hours |
| 4=chloroquine 6.25 µg/mL 24 hours | 15=Positive control |
| 5=chloroquine 12.50 µg/mL 24 hours | 16=chloroquine 0 µg/mL 72 hours |
| 6=chloroquine 25.00 µg/mL 24 hours | 17=chloroquine 3.125 µg/mL 72 hours |
| 7=chloroquine 50.00 µg/mL 24 hours | 18=chloroquine 6.25 µg/mL 72 hours |
| 8=Positive control | 19=chloroquine 12.50 µg/mL 72 hours |
| 9=chloroquine 0 µg/mL 48 hours | 20=chloroquine 25.00 µg/mL 72 hours |
| 10=chloroquine 3.125 µg/mL 48 hours | 21=chloroquine 50.00 µg/mL 72 hours |
| 11=chloroquine 6.25 µg/mL 48 hours | 22=DNA marker (100 bp) |



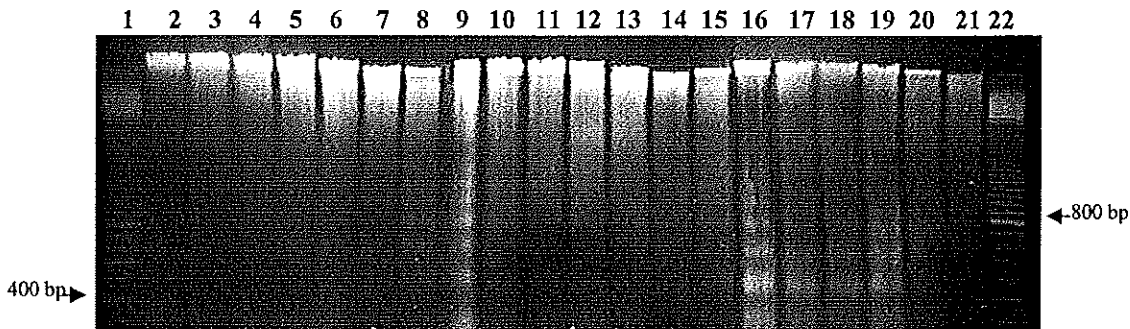
รูปที่ 36 ผลของยาต้านมาลาเรีย quinine ต่อการชักนำการตายของเซลล์ JAR: ศึกษาโดยการเลี้ยงเซลล์ JAR ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นของ quinine 0 ถึง 50 $\mu\text{g/mL}$ เป็นเวลา 24 (lane 2-7), 48 (lane 9-14) และ 72 (lane 16-21) ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วตรวจสอบการแตกหักของ DNA ด้วยวิธี Gel-electrophoresis

- | | |
|--|--|
| 1=DNA marker (100 bp) | 12=quinine 12.50 $\mu\text{g/mL}$ 48 hours |
| 2=quinine 0 $\mu\text{g/mL}$ 24 hours | 13=quinine 25.00 $\mu\text{g/mL}$ 48 hours |
| 3=quinine 3.125 $\mu\text{g/mL}$ 24 hours | 14=quinine 50.00 $\mu\text{g/mL}$ 48 hours |
| 4=quinine 6.25 $\mu\text{g/mL}$ 24 hours | 15=Positive control |
| 5=quinine 12.50 $\mu\text{g/mL}$ 24 hours | 16=quinine 0 $\mu\text{g/mL}$ 72 hours |
| 6=quinine 25.00 $\mu\text{g/mL}$ 24 hours | 17=quinine 3.125 $\mu\text{g/mL}$ 72 hours |
| 7=quinine 50.00 $\mu\text{g/mL}$ 24 hours | 18=quinine 6.25 $\mu\text{g/mL}$ 72 hours |
| 8=Positive control | 19=quinine 12.50 $\mu\text{g/mL}$ 72 hours |
| 9=quinine 0 $\mu\text{g/mL}$ 48 hours | 20=quinine 25.00 $\mu\text{g/mL}$ 72 hours |
| 10=quinine 3.125 $\mu\text{g/mL}$ 48 hours | 21=quinine 50.00 $\mu\text{g/mL}$ 72 hours |
| 11=quinine 6.25 $\mu\text{g/mL}$ 48 hours | 22=DNA marker (100 bp) |



รูปที่ 37 ผลของยาต้านมาลาเรีย artemisinin ต่อการชักนำการตายของเซลล์ JAR: ศึกษาโดยการเลี้ยงเซลล์ JAR ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นของ artemisinin 0 ถึง 50 µg/mL เป็นเวลา 24 (lane 2-7), 48 (lane 9-14) และ 72 (lane 16-21) ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วตรวจสอบการแตกหักของ DNA ด้วยวิธี Gel-electrophoresis

- | | |
|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 1=DNA marker (100 bp) | 12=artemisinin 12.50 µg/mL 48 hours |
| 2=artemisinin 0 µg/mL 24 hours | 13=artemisinin 25.00 µg/mL 48 hours |
| 3=artemisinin 3.125 µg/mL 24 hours | 14=artemisinin 50.00 µg/mL 48 hours |
| 4=artemisinin 6.25 µg/mL 24 hours | 15=Positive control |
| 5=artemisinin 12.50 µg/mL 24 hours | 16=artemisinin 0 µg/mL 72 hours |
| 6=artemisinin 25.00 µg/mL 24 hours | 17=artemisinin 3.125 µg/mL 72 hours |
| 7=artemisinin 50.00 µg/mL 24 hours | 18=artemisinin 6.25 µg/mL 72 hours |
| 8=Positive control | 19=artemisinin 12.50 µg/mL 72 hours |
| 9=artemisinin 0 µg/mL 48 hours | 20=artemisinin 25.00 µg/mL 72 hours |
| 10=artemisinin 3.125 µg/mL 48 hours | 21=artemisinin 50.00 µg/mL 72 hours |
| 11=artemisinin 6.25 µg/mL 48 hours | 22=DNA marker (100 bp) |



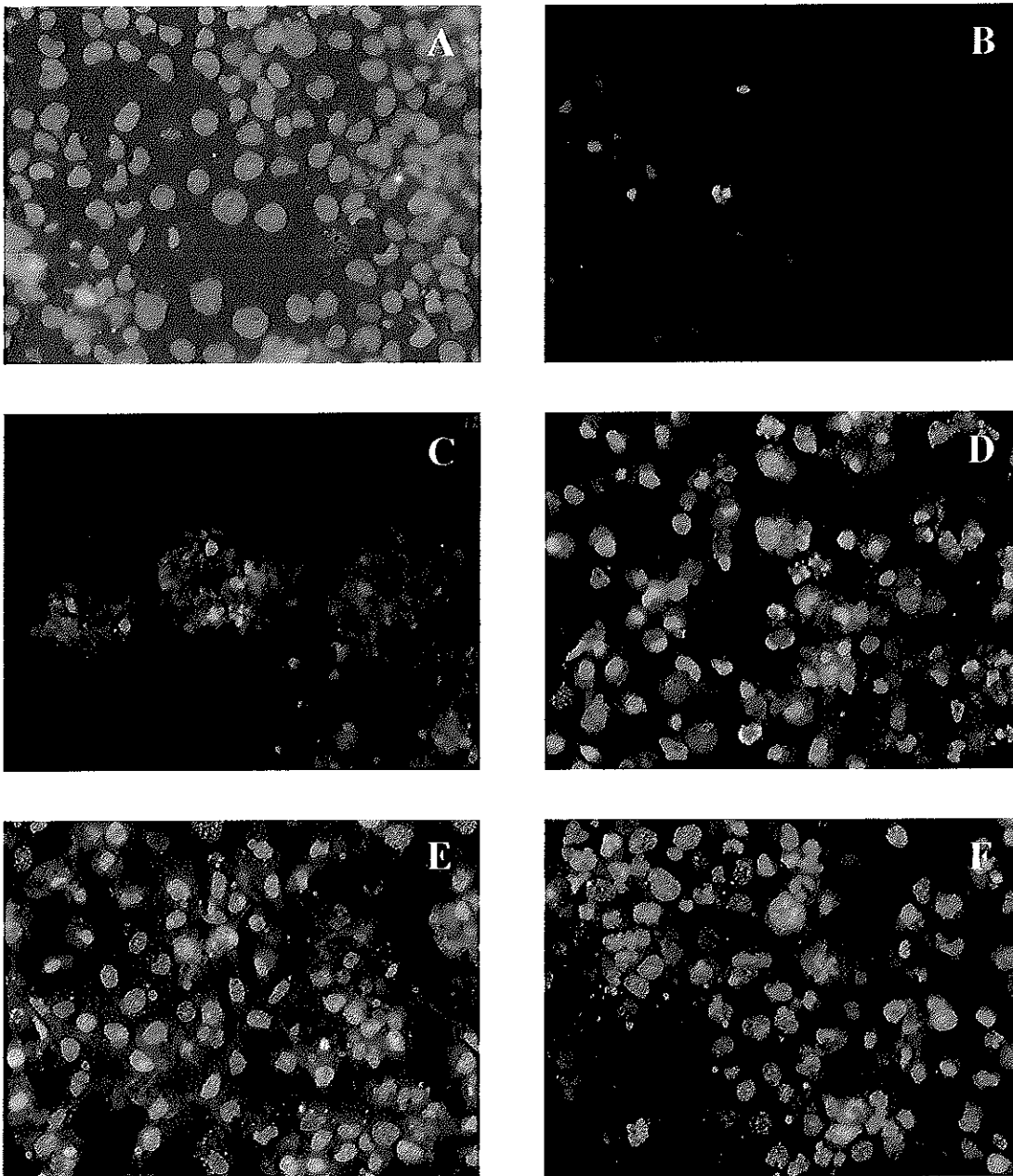
รูปที่ 38 ผลของยาต้านมาลาเรีย pyrimethamine ต่อการชักนำการตายของเซลล์ JAR: ศึกษาโดยการเลี้ยงเซลล์ JAR ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นของ pyrimethamine 0 ถึง 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ เป็นเวลา 24 (lane 2-7), 48 (lane 9-14) และ 72 (lane 16-21) ชั่วโมงตามลำดับ แล้วตรวจสอบการแตกหักของ DNA ด้วยวิธี Gel-electrophoresis

- | | |
|---|---|
| 1=DNA marker (100 bp) | 12=pyrimethamine 12.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 48 hours |
| 2=pyrimethamine 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 24 hours | 13=pyrimethamine 25.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 48 hours |
| 3=pyrimethamine 3.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 24 hours | 14=pyrimethamine 50.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 48 hours |
| 4=pyrimethamine 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 24 hours | 15=Positive control |
| 5=pyrimethamine 12.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 24 hours | 16=pyrimethamine 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 72 hours |
| 6=pyrimethamine 25.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 24 hours | 17=pyrimethamine 3.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 72 hours |
| 7=pyrimethamine 50.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 24 hours | 18=pyrimethamine 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 72 hours |
| 8=Positive control | 19=pyrimethamine 12.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 72 hours |
| 9=pyrimethamine 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 48 hours | 20=pyrimethamine 25.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 72 hours |
| 10=pyrimethamine 3.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 48 hours | 21=pyrimethamine 50.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 72 hours |
| 11=pyrimethamine 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 48 hours | 22=DNA marker (100 bp) |

ที่ 35-38 (lane 9 และ 16) ซึ่งน่าจะเกิดมาจากเซลล์ที่กำลังตาย

จากการศึกษาโดยเทคนิค TUNEL โดยการเลี้ยงเซลล์ JAR ใน RPMI-1640 ที่มีเฉพาะ 0.5% FBS ในกลุ่มควบคุม หรือ 0.5% FBS และยาต้านมาลาเรียที่ความเข้มข้นสูงสุด 50 µg/mL ในกลุ่มทดสอบ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าเซลล์เพาะเลี้ยงที่มี 0.5% FBS และยาต้านมาลาเรียมีปริมาณเซลล์ที่มีการแตกหักของ DNA มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 39

เมื่อพิจารณารูปร่างลักษณะของเซลล์ที่มีการแตกหักของ DNA พบว่ากลุ่มควบคุมบวก ซึ่งเป็นเซลล์ JAR ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีเฉพาะ 0.5% FBS เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วปมเซลล์กับเอนไซม์ DNase นั้น พบว่าบริเวณที่ติดสี FITC ซึ่งแสดงถึง DNA ที่แตกหักนั้นจะพบอยู่ภายในขอบเขตของนิวเคลียสของเซลล์เท่านั้น ในขณะที่กลุ่มทดสอบซึ่งเพาะเลี้ยงเซลล์ JAR ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้รับยาต้านมาลาเรีย สามารถพบบริเวณที่ติดสี FITC ได้ทั้งภายในและนอกขอบเขตของเซลล์ เรียกลักษณะการแตกหักของ DNA ที่พบภายในเนื้อเยื่อหุ้มเซลล์นี้ว่า apoptotic bodies อันแสดงถึงขั้นตอนสุดท้ายของการตายของเซลล์แบบ apoptosis



รูปที่ 39 ผลของยาต้านมาลาเรียต่อการชักนำการตายเซลล์ JAR: ศึกษาโดยเลี้ยงเซลล์ JAR ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นของยาต้านมาลาเรีย 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบการแตกหักของ DNA ของเซลล์ JAR โดยเทคนิค TUNEL ด้วยกล้องจุลทรรศน์ fluorescence กำลังขยาย 200 เท่า เซลล์ที่มีการตายแบบ apoptosis นั้น จะย้อมติดสีเขียวของ FITC ในนิวเคลียส (A=positive control, B= 0.5% FBS, C=chloroquine, D=quinine, E=artemisinin และ F=pyrimethamine)

4. วิจารณ์ผลการทดลอง

1 ผลของพลาสมาจากผู้ป่วยมาลาเรียต่อเซลล์รกชนิด trophoblast (JAR)

พยาธิสภาพที่เกิดขึ้นกับทารกจากภาวะมาลาเรียขณะตั้งครรภ์มักเป็นผลสืบเนื่องมาจากความผิดปกติในการทำหน้าที่ของรก ทั้งจากปรสิตที่เกาะอยู่บริเวณรกเอง โดยขัดขวางการแลกเปลี่ยนสารระหว่างรกกับระบบโลหิตของมารดา ตลอดจนผลที่เกิดตามมาจากปฏิกิริยาการตอบสนองของทางภูมิคุ้มกัน การสร้าง pro-inflammatory cytokines ซึ่งส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ ให้มีการสร้าง MHC class I, II มากขึ้น กระตุ้นการทำงานของ lymphocyte, macrophage, NK cell, neutrophil ตลอดจนการสะสมของ complement (C1q, C4, C3, C9) (Smith, 1996; Fievet *et al.*, 2001) เหล่านี้นำไปสู่ปฏิกิริยาการอักเสบ ทำให้เซลล์รกถูกทำลาย พบว่าการเพิ่มขึ้นของ TNF- α และ IFN- γ สัมพันธ์กับภาวะน้ำหนักรกเกิดต่ำ แท้ง ในทารก และโลหิตจางในมารดา (Okoko *et al.*, 2003)

จากการศึกษาผลของพลาสมาจากผู้ป่วยมาลาเรีย ทั้งชนิด *P. vivax* และ *P. falciparum* ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ JAR เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับพลาสมาจากอาสาสมัครที่ไม่เป็นโรคมมาลาเรีย แสดงให้เห็นว่าพลาสมาจากผู้ป่วยมาลาเรียที่ระดับความเข้มข้น 0 ถึง 5% กระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ JAR มากกว่า 2 ถึง 3 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ JAR ที่มีพลาสมาจากกลุ่มควบคุม โดยพลาสมาจากผู้ป่วย *P. falciparum* มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ JAR มากกว่าพลาสมาชนิด *P. vivax* จากผลการทดลองดังกล่าวคาดว่าเนื่องจากพลาสมาจากผู้ป่วยมาลาเรียมี cytokines ตลอดจน growth factor อื่นๆ ที่จำเป็นต่อการเติบโตของเซลล์รกสูงกว่าพลาสมาจากคนปกติ

งานวิจัยโดยคณะอื่นๆ พบว่าผู้ป่วยมาลาเรียชนิด *P. falciparum* และ *P. vivax* มีระดับของ pro-inflammatory cytokines ได้แก่ TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-12 และ anti-inflammatory cytokines IL-10 ในกระแสเลือดเพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับการติดเชื้อมาลาเรียในขณะตั้งครรภ์ พบ cytokines ดังกล่าวเพิ่มขึ้นในกระแสเลือด รก ตลอดจน cord blood เช่นกัน (Fried *et al.*, 1998; Bouyou-Akotet *et al.*, 2004) พบว่า cytokines ตลอดจน growth factor ที่พบในระหว่างเกิดปฏิกิริยาการอักเสบ มีผลต่อการเติบโต ตลอดจนพัฒนาการของเซลล์รก จากการศึกษาเปรียบเทียบผลของ pro-inflammatory cytokines (IFN- γ , TNF- α , IL-6) และ anti-inflammatory cytokines (IL-10) ต่อความอยู่รอดของเซลล์รก พบว่าเซลล์รกที่ได้รับ IFN- γ และ

ของเซลล์รก เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับ FBS พร้อมทั้งส่งเสริมกิจกรรมของโปรตีนที่ยับยั้งการเกิด apoptosis อีกด้วย (Aschkenazi *et al.*, 2002)

นอกจากนี้ยังพบว่า growth factor ตลอดจนโปรตีนที่พบในปฏิริยาการอักเสบหลายชนิด เช่น EGF, TGF- α (transforming growth factor-alpha) IGF-I (insulin-like growth factor-I), และ platelet derived growth factor (PDGF) ต่างส่งเสริมการเพิ่มจำนวนเซลล์ (Li and Zhuang, 1997; Aoki *et al.*, 1991) และพัฒนาการของเซลล์มะเร็งรกชนิด trophoblast ได้ (Aplin *et al.*, 2000; Shams and Ahmed, 1994)

จากผลการศึกษาค้นคว้าของพลาสมาจากผู้ป่วยมาลาเรียต่อการดำเนินวงจรเซลล์ของเซลล์ JAR เปรียบเทียบกับพลาสมาจากอาสาสมัครที่ไม่เป็นโรคมาลาเรีย แสดงให้เห็นว่าพลาสมาจากผู้ป่วยมาลาเรียทั้งจากเชื้อ *P. vivax* หรือ *P. falciparum* ต่างเร่งการดำเนินวงจรเซลล์ของเซลล์ JAR ให้เร็วขึ้น ในงานวิจัยอื่นๆ พบว่า PDGF กระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ fibroblast (Balb) ในระบบเซลล์เพาะเลี้ยง โดยพบปริมาณ mRNA ของ cyclin D1 เพิ่มขึ้น 20-30 เท่า ในเวลา 6 ชั่วโมง ภายหลังจากได้รับ PDGF (Winston and Pledger, 1993) และเพิ่มการสังเคราะห์ DNA ของเซลล์ trophoblast ในระบบเซลล์เพาะเลี้ยงได้ (Holmgren *et al.*, 1992) เช่นเดียวกับ EGF ซึ่งกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก (LNCaP) ก็พบปริมาณ mRNA ของ cyclin D1 เพิ่มขึ้น 4 เท่า ภายในเวลา 12 ชั่วโมง โดยพบระดับสูงสุดที่เวลา 4 ชั่วโมง (Perry *et al.*, 1998) เช่นเดียวกับในเซลล์มะเร็งตับอ่อน พบว่า EGF กระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ มะเร็งตับอ่อน และพบปริมาณ mRNA ของ cyclin D1 เพิ่มขึ้นในเวลา 2 ชั่วโมง (Poch *et al.*, 2001) ผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าพลาสมาจากผู้ป่วยมาลาเรียชนิด *P. vivax* และ *P. falciparum* ต่างเร่งการดำเนินของวงจรเซลล์ JAR โดยสังเกตเห็นผลของพลาสมาจากผู้ป่วยมาลาเรียชนิด *P. vivax* และ *P. falciparum* ต่อการเปลี่ยนแปลงการดำเนินของวงจรเซลล์ได้ที่เวลา 4 ชั่วโมง และ 12 ตามลำดับ จึงคาดว่าน่าจะเกิดจากผลของ growth factor ดังกล่าวต่อการทำงานของโปรตีน cyclin D1 ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการดำเนินของวงจรเซลล์ (Jones and Kazlauskas, 2001)

ในสตรีมีครรภ์ที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* มีการเกาะติดของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมีตัวรับจำเพาะ เช่น CSA และ HA บนเซลล์รก ชักนำให้มีการสร้าง TNF- α , IFN- γ และ IL-10 เพิ่มขึ้น (Fievet *et al.*, 2001) ตลอดจน chemotactic cytokine (MCP-1, MIP-1) (Suguitan *et al.*, 2003) ชักนำให้มี inflammatory cells เข้าสู่รกเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะ monocyte และ macrophage (Rogerson, 2003) ซึ่งพบว่า TNF- α และ IFN- γ กระตุ้นให้เกิดการตายแบบ apoptosis ของทั้งเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของมารดาตลอดจนเซลล์รกเพิ่มขึ้น พบว่าเซลล์

trophoblast ของรกที่ติดมาลาเรียมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้น เกิดการหนาตัวขึ้นของชั้นเซลล์ trophoblast นำไปสู่การตายแบบ apoptosis และหลุดลอกของเซลล์รกชั้น trophoblast ในที่สุด (Brabin *et al.*, 2004) เช่นเดียวกับการศึกษาในระบบเซลล์เพาะเลี้ยง พบว่าสามารถชักนำให้เกิด apoptosis ได้ด้วย TNF- α และ IFN- γ (Yui *et al.*, 1994) ในขณะที่การศึกษาในเซลล์รกปกติ พบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด trophoblast ที่แยกได้จากรกในไตรมาสแรก TNF- α ชักนำให้เกิดกระบวนการ apoptosis ได้ (Knofler *et al.*, 2000) ซึ่งผู้ดำเนินการศึกษาวิจัยมีความสนใจในปรากฏการณ์ดังกล่าว

จากการศึกษาผลของพลาสมาจากผู้ป่วยมาลาเรียต่อการชักนำการตายของเซลล์ JAR เปรียบเทียบกับพลาสมาจากอาสาสมัครที่ไม่เป็นโรคมาลาเรีย พบว่าพลาสมาจากผู้ป่วยมาลาเรียมิได้ชักนำให้เกิดการตายของเซลล์เพิ่มขึ้นแต่อย่างใด แสดงว่าอาจมีปัจจัยอื่นๆ ที่ลดการตายของเซลล์ หรือระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบไม่นานพอที่จะเกิดการกระตุ้นการตายของเซลล์ได้ และพลาสมาที่ได้รับมาเพื่อการศึกษานี้ไม่ได้เป็นตัวอย่างพลาสมาจากผู้ป่วยตั้งครรภ์

อย่างไรก็ตามจากการศึกษาในระบบเซลล์เพาะเลี้ยงของเซลล์ trophoblast พบว่า EGF, basic fibroblast growth factor (bFGF), IGF-1, PDGF สามารถยับยั้งสมบัติของ IFN- γ และ TNF- α ในการชักนำการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ trophoblast ได้ (Garcia-Lloret *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 2002) ดังนั้นผู้วิจัยคาดว่าในพลาสมาตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาคั้งนี้นั้น อาจมีปริมาณของ growth factor ดังกล่าวเป็นปริมาณสูงซึ่งอาจส่งผลต่อความอยู่รอดของเซลล์ JAR โดยส่งเสริมการเพิ่มจำนวนเซลล์ มากกว่าจะชักนำให้เกิดการตายของเซลล์

การศึกษาโดยนักวิจัยกลุ่มอื่นๆ ก่อนหน้านี้พบว่า สมดุลของการเพิ่มจำนวน และการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ trophoblast นั้น มีบทบาทในการทำหน้าที่ของรก ดังนั้นพัฒนาการเซลล์ trophoblast ที่ไม่สมดุลจะนำไปสู่การตั้งครรภ์ที่ผิดปกติได้ พบว่ากระบวนการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนของ trophoblast จำเป็นต่อการเติบโตในระยะแรกของรก หลังจากนั้นจะเกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เพื่อการทำหน้าที่เฉพาะของเซลล์ อันประกอบด้วยกระบวนการหลอมรวมเซลล์ (syncytiation) และกระบวนการบุกรุก (invasion) หลอดเลือดของมารดา พบว่าการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนที่เพิ่มขึ้นของเซลล์ trophoblast มีความสัมพันธ์กับภาวะ pre-eclampsia (Allaire *et al.*, 2000; Leung *et al.*, 2001) การเกิดกระบวนการบุกรุกมากเกินไปเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งรกชนิด choriocarcinoma (Bischof and Finger, 2005) ในขณะที่การขาดกระบวนการหลอมรวมของเซลล์ trophoblast เกี่ยวข้องกับภาวะ down's syndrome ของทารก (Frendo *et al.*, 2000) เป็นต้น

เช่นเดียวกับการศึกษาผลของพลาสมาจากผู้ป่วยมาลาเรียมาลาเรียต่อเซลล์รกชนิด trophoblast พบว่าพลาสมาจากผู้ป่วยมาลาเรียทั้งชนิด *P. falciparum* และ *P. vivax* ต่างกระตุ้นการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน โดยเร่งการดำเนินของวงจรเซลล์ อันคาดว่าจะส่งผลทำลายสมดุลการพัฒนารก ซึ่งอาจเป็นกลไกในการเกิดพยาธิสภาพของรกในสตรีมีครรภ์ที่ติดเชื้อมาลาเรีย

2 ผลของยาต้านมาลาเรียต่อเซลล์รกชนิด trophoblast (JAR)

จากการศึกษาผลของยาต้านมาลาเรียต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์โดยวิธี MTT พบว่ายาต้านมาลาเรียทั้ง 4 ชนิด คือ chloroquine, quinine, artemisinin และ pyrimethamine ที่ระดับความเข้มข้น 0 ถึง 50 µg/mL มีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ JAR แบบ dose-dependent fashion และมีค่า inhibitory concentration 50% (IC₅₀) หรือระดับความเข้มข้นของยาที่ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ครึ่งหนึ่ง เท่ากับ 6.56, 6.04, 6.67 และ 2.92 µg/mL ตามลำดับ

สอดคล้องกับการศึกษาความเป็นพิษของยาต้านมาลาเรียต่อเซลล์ JAR โดยจากการตรวจวัดระดับ LDH ในน้ำเลี้ยงเซลล์ พบว่าการเพิ่มขึ้นของระดับ LDH ในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้รับยาต้านมาลาเรียที่ระดับความเข้มข้น 0 ถึง 50 µg/mL มีความสัมพันธ์โดยตรงกับระดับการตายของเซลล์ แสดงให้เห็นว่าเกิดความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้องค์ประกอบภายในเซลล์หลั่งออกนอกเซลล์ เป็นที่น่าสังเกตว่าลักษณะดังกล่าวจะพบได้ในการตายของเซลล์ชนิด necrosis เท่านั้น แต่จากการศึกษาพบว่าระยะสุดท้ายของการตายของเซลล์ชนิด apoptosis ในระบบเซลล์เพาะเลี้ยง สามารถเกิดความเสียหายของเยื่อหุ้มของเซลล์ได้เช่นกัน เนื่องจากขาดเซลล์ phagocyte ซึ่งทำหน้าที่จับกินเซลล์ที่ตาย ซึ่งเรียกปรากฏการณ์ดังกล่าวว่า secondary necrosis

การรักษาภาวะมาลาเรียระหว่างตั้งครรภ์ ในกรณีติดเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ปัจจุบัน quinine เป็นยาต้านมาลาเรียชนิดแรกๆ ที่ควรเลือกใช้ในการรักษา (McGready *et al.*, 2004) แต่จากการศึกษาในครั้งนี้ ระดับความเข้มข้นของยา quinine ที่เป็นพิษต่อเซลล์รก (IC₅₀) ใกล้เคียงกับระดับยาในพลาสมาที่ต้องการใช้ในการกำจัดปรสิต โดยค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งปรสิต (Minimally inhibitory concentration, MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าปรสิต (Minimally parasiticidal concentration, MPC) เท่ากับ 0.7 และ 3.4 µg/mL ตามลำดับ (Pukrittayakamee *et al.*, 2003) นอกจากนี้ยังพบว่าระดับความเข้มข้นของ quinine ในพลาสมา 5 µg/mL ทำให้เกิดกลุ่มอาการเป็นพิษที่เรียกว่า cinchonism โดยเฉพาะในสตรีมีครรภ์ quinine มีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่ง insulin ทำให้เกิดภาวะ hypoglycemia (Berman, 2004) ตลอดจนมีเป็นพิษต่อตัวอ่อน (Dorman and Shulman, 2000)

เมื่อพิจารณาระดับความเข้มข้นของ chloroquine, artemisinin และ pyrimethamine ที่เป็นพิษต่อเซลล์ JAR พบว่ามีค่า IC_{50} สูงกว่าความเข้มข้นของยาต้านมาลาเรียที่ใช้กำจัดปรสิตมาก โดยในระดับ *in vivo* พบว่าความเข้มข้นของ chloroquine 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ มีผลลดภาวะรกติดเชื้อมาลาเรียได้ (Testa *et al.*, 1998) ระดับของ pyrimethamine ในเลือดสูงกว่า 0.175 $\mu\text{g}/\text{mL}$ จึงจะมีประสิทธิภาพในการรักษา (Aubouy *et al.*, 2003) แต่เนื่องจากปัจจุบันพบว่าพื้นที่บางส่วนของประเทศไทย ตลอดจนภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบปัญหาการดื้อยา chloroquine และ quinine รวมทั้งยาต้านมาลาเรียชนิดอื่นๆ ดังนั้นองค์การอนามัยโลกจึงแนะนำให้ใช้ artemisinin ในการรักษาผู้ป่วยมาลาเรียขณะตั้งครรรภ์ได้ เนื่องจากเป็นยาต้านมาลาเรียที่มีประสิทธิภาพสูงสามารถกำจัดปรสิตได้มากกว่า 90% ภายในเวลา 24 ชั่วโมง พบระดับยาสูงสุดในพลาสมา $0.18 \pm 0.10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ณ เวลา 1.13 ± 0.58 ชั่วโมง ภายหลังได้รับยา (Halpaap *et al.*, 1998) อย่างไรก็ตามยังต้องมีการศึกษาถึงความเป็นพิษในระดับ *in vivo* และผลที่ตามมาจากการใช้ยาต่อพัฒนาการของทารก

เนื่องจากวิธี MTT ที่ใช้ในการศึกษาผลของยาต้านมาลาเรียต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ เป็นการตรวจสอบความสามารถของเซลล์ ในการเปลี่ยนสารประกอบ tetrazolium salt (MTT) เป็น formazan salt ด้วย succinate-tetrazolium reductase system ซึ่งพบในปฏิกิริยาลูกโซ่การหายใจของ mitochondria ในเซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้น ดังนั้นจากผลการทดลองดังกล่าวจึงแสดงให้เห็นว่ากระบวนการทำลายหรือขัดขวางการทำงานของ mitochondria เป็นกลไกในการออกฤทธิ์ฆ่าเซลล์ของยาต้านมาลาเรียต่อเซลล์ JAR นอกจากนี้เมื่อศึกษาผลของยาต้านมาลาเรียทั้ง 4 ชนิดต่อการชักนำการตายของเซลล์ด้วยเทคนิค gel-electrophoresis และ TUNEL พบว่าเป็นการตายแบบ apoptosis เนื่องจากพบการแตกหักของ DNA จึงกล่าวได้ว่า mitochondria และ DNA ของเซลล์ เป็นเป้าหมายในการออกฤทธิ์ของยาต้านมาลาเรียต่อเซลล์รก โดยกลไกในการกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์นั้นจากการศึกษาในครั้งนี้ไม่สามารถอธิบายได้อย่างชัดเจน แต่ทั้งนี้คาดว่าเกิดจากการรบกวนการทำหน้าที่ของ mitochondria และ DNA ของเซลล์

ในงานวิจัยโดยกลุ่มอื่นพบว่า chloroquine ยับยั้งกระบวนการ DNA replication โดยการจับกับ GC-rich DNA ได้ดี และระดับความเข้มข้นของ chloroquine ที่เป็นพิษต่อแบคทีเรีย มีผลยับยั้ง DNA และ RNA polymerase (Sullivan, 2002) นอกจากนี้ระดับความเข้มข้นที่เป็นพิษในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะสูงกว่าระดับที่เป็นพิษต่อปรสิต (plasmodium) ทั้งนี้คาดว่าเนื่องจากปรสิตเป็น AT-rich DNA (Foley and Tilley, 1998) พบว่า hydroxychloroquine ชักนำให้เกิดภาวะ lysosomal membrane permeabilisation (LMP) ส่งผลกระตุ้นการทำงานของ

caspase การแสดง phosphatidylserine ที่เยื่อหุ้มเซลล์ chromatin condensation และ การทำลาย DNA ในที่สุด ในขณะที่เดียวกันก็ชักนำให้ mitochondria สูญเสียสมบัติเป็นเยื่อเลือกผ่าน โดยการสร้างรูขึ้นบริเวณเยื่อหุ้ม mitochondria และปล่อย cytochrome c ออกมาซึ่งส่งผลให้เกิด การตายแบบ apoptosis ในที่สุด (Boya *et al.*, 2003) ในขณะที่ quinine สามารถจับกับ lipo- protein ใน serum เพื่อเข้าสู่เซลล์ พบว่า quinine ชักนำให้เกิดรูบนเยื่อหุ้ม mitochondria เช่นกัน (Catisti and Vercesi, 1999) นอกจากนี้อนุพันธ์อื่นๆของ quinine เช่น primaquine ส่งผลให้เกิด ภาวะบวม และหนาตัวขึ้นของ mitochondria ในขณะที่ atovaquone ยับยั้งลูกโซ่การหายใจของ เซลล์ (Foley and Tilley, 1998)

สำหรับกลไกการฆ่าเซลล์โดย artemisinin พบว่าเกิดเมื่อ endoperoxide bridge ของ artemisinin เปิดออก ส่งผลให้เกิดอนุมูลอิสระ ROS (reactive oxygen species) และ free radical (Efferth and Oesch, 2004) ซึ่งชักนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ในเซลล์มะเร็งได้ (Chen *et al.*, 2003) การเพิ่มขึ้นของ ROS และ free radical ทำลาย DNA โดยตรง ตลอดจนมีผล ให้การทำงานของยีนที่ควบคุมการตายของเซลล์ของ mitochondria เปลี่ยนไป ชักนำให้เกิดการ ตายของเซลล์แบบ apoptosis ในที่สุด (Zhang *et al.*, 2001) นอกจากนี้ artemisinin สามารถจับ กับโปรตีนได้หลายชนิด เช่น catalase, cytochrome c ซึ่งมีความสำคัญในการทำงานของ mitochondria ทำให้เกิดปฏิกิริยา alkylation ของโปรตีน (Yang *et al.*, 1994)

ส่วน pyrimethamine ที่เป็น lipophilic folate antagonist ผ่านเข้าสู่เซลล์ของสัตว์เลี้ยง ลูกด้วยนม ด้วยกระบวนการแพร่ผ่าน (diffusion or facilitated diffusion) พบการสะสมของ pyrimethamine บริเวณ mitochondria ส่งผลทำลายโครงสร้างเยื่อหุ้มชั้นในของ mitochondria ยับยั้งลูกโซ่การหายใจของเซลล์ ตลอดจนชักนำให้การแสดงออกของยีนที่ควบคุมการตายของ เซลล์ของ mitochondria เปลี่ยนไป (Sprecher *et al.*, 1995)

การศึกษาผลของยาต้านมาลาเรียต่อการดำเนินของวงจรเซลล์ JAR แบบ mitosis พบว่า ยาต้านมาลาเรียทั้ง 4 ชนิด มีสัมพันธ์กับภาวะ premature mitosis ของเซลล์รก โดยหยุด/ชะลอ วงจรเซลล์ไว้ในระยะ S ทำให้การดำเนินของวงจรเซลล์ช้าลง เชื่อว่าการหยุด/ชะลอวงจรเซลล์ไว้ใน ระยะ S ของเซลล์นั้น เกี่ยวข้องกับกระบวนการซ่อมแซม DNA ที่เสียหายของเซลล์ (Gottifredi and Prives, 2005) เช่นเดียวกับงานวิจัยผลของ luteolin ต่อเซลล์มะเร็งปอด (CH27) พบว่า luteolin ชักนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ CH27 และหยุด/ชะลอการดำเนินของวงจรเซลล์ไว้ใน ระยะ S ได้เช่นเดียวกัน นอกจากนั้นพบว่าในขณะที่เซลล์ CH27 หยุด/ชะลอการดำเนินของวงจร

ไว้ในระยะ S นั้น จะพบปริมาณ mRNA ของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการซ่อมแซม DNA เพิ่มขึ้นด้วย (Leung *et al.*, 2005)

5. สรุปผลการทดลอง

1. จากการศึกษาผลของพลาสมาจากผู้ป่วยมาลาเรียต่อเซลล์รกชนิด trophoblast ในระดับ *in vitro* พบว่าพลาสมาจากผู้ป่วยมาลาเรียทั้งชนิด *P. vivax* และ *P. falciparum* มีผลกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ด้วยการเร่งการดำเนินของวงจรของเซลล์รกให้เร็วขึ้น
2. จากการศึกษาผลของยาด้านมาลาเรียทั้ง 4 ชนิด คือ chloroquine, quinine, artemisinin และ pyrimethamine ต่อเซลล์รกชนิด trophoblast ในระดับ *in vitro* แสดงให้เห็นว่ายาด้านมาลาเรียมีความเป็นพิษต่อเซลล์รก โดยมีฤทธิ์ฆ่าเซลล์ด้วยกระบวนการ apoptosis ตลอดจนหยุด/ชะลอวงจรเซลล์ ซึ่งส่งผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์รกในที่สุด

เอกสารอ้างอิง

- ประยงค์ ระดมยศ, อัญชลี ตั้งตรงจิตร, พลรัตน์ วิไลรัตน์, ศรัชัย หล่ออารีย์สุวรรณ และ แทน จงศุภชัยสิทธิ์. 2544. Atlas of medical parasitology. พิมพ์ครั้งที่ 5. กรุงเทพฯ: ภาพพิมพ์.
- วิฑูรย์ ไวยนันท์ และ พีรพรรณ ตันอารีย์. 2540. ปรสตีวิทยาทางการแพทย์. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- Adler, R.R., Ng, AK. and Rote, N.S. 1995. Monoclonal antiphosphatidylserine antibody inhibits intercellular fusion of the choriocarcinoma line, JAR. Biol Reprod. 53(4): 905-910.
- Allaire, A.D., Ballenger K.A., Wells S.R., McMahon M.J. and Lessey, B.A. 2000. Placental apoptosis in preeclampsia. Obstet Gynecol. 96(2): 271-276.
- Anonymous a. Chloroquine diphosphate salt. (Online) Available: <http://www.sigmaaldrich.com/structureimages/s/66/c6628.gif>. Accessed [September 30, 2004]
- Anonymous b. Quinine hemisulfate salt. (Online) Available: <http://www.sigmaaldrich.com/structureimages/s/12/q1250.gif>. Accessed [September 30, 2004]
- Anonymous c. Artemisinin. (Online) Available: <http://www.sigmaaldrich.com/structureimages/a/36/361593.gif>. Accessed [September 30, 2004]
- Anonymous d. Pyrimethamine. (Online) Available: <http://www.sigmaaldrich.com/structureimages/s/77/p7771.gif> Accessed [September 30, 2004]
- Anonymous e. MTT. (Online) Available: <http://www.roche-applied-science.com/pack-insert/1465007a.pdf> Accessed [September 30, 2004]
- Anonymous f. LDH. (Online) Available: <http://www.roche-applied-science.com/pack-insert/1644793a.pdf> Accessed [September 30, 2004]
- Aoki, Y., Adachi, S., Yoshiya, N., Honma, S., Kanazawa, K. and Tanaka, K. 1991. Effects of various growth factors on the proliferation and the differentiation of trophoblastic cells in vitro. Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi. 43(11): 1527-1532.

- Aplin, J.D., Lacey, H., Haigh, T., Jones, C.J., Chen, C.P. and Westwood, M. 2000. Growth factor-extracellular matrix synergy in the control of trophoblast invasion. *Biochem Soc Trans.* 28(2): 199-202.
- Artavanis-Tsakonas, K. and Riley, E.M. 2002. Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN- γ from human NK cells by live *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Immunol.* 169(6): 2956–2963.
- Aschkenazi, S., Straszewski, S., Verwer, K.M.A., Foellmer, H., Rutherford, T. and Mor, G. 2002. Differential regulation and function of the Fas/Fas ligand system in human trophoblast cells. *Biol Reprod.* 66(6): 1853–1861.
- Aubouy, A., Bakary, M., Keundjian, A., Mbomat, B., Makita, JR., Migot-Nabias, F., Cot, M., LeBras, J. and Deloron, P. 2003. Combination of drug level measurement and parasite genotyping data for improved assessment of amodiaquine and sulfadoxine-pyrimethamine efficacies in treating *Plasmodium falciparum* malaria in Gabonese children. *Antimicrob Agents Chemother.* 47(1): 231-237.
- Beeson, J.G., Amin, N., Kanjala, M. and Rogerson, S.J. 2002. Selective accumulation of mature asexual stages of *Plasmodium falciparum* - infected erythrocytes in the placenta. *Infect Immun.* 70(10): 5412–5415.
- Beeson, J.G. and Brown, G.V. 2004. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes demonstrate dual specificity for adhesion to hyaluronic acid and chondroitin sulfate A and have distinct adhesive properties. *J Infect Dis.* 189(2): 169-179.
- Beeson, J.G., Rogerson, S.J., Cooke, B.M., Reeder, J.C., Chai, W., Lawson, A.M., Molyneux, M.E. and Brown, G.V. 2000. Adhesion of *Plasmodium falciparum* - infected erythrocytes to hyaluronic acid in placental malaria. *Nat Med.* 6(1): 86-90.
- Beier, J.C. 1998. Malaria parasite development in mosquitoes. *Annu. Rev. Entomol.* 43: 519-543.
- Bentin-Ley, U., Horn, T., Sjögren, A., Sørensen, S., Larsen, J.F. and Hamberger, L. 2000. Ultrastructure of human blastocyst–endometrial interactions *in vitro*. *J Reprod Fertil.* 120(2): 337–350.

- Berman, J. 2004. Toxicity of commonly-used antimalarial drugs. *J Tmaid.* 2(3-4): 171–184.
- Bischof, P. and Finger, I.I. 2005. The human cytotrophoblastic cell, a mononuclear chameleon. *Int J Biochem cell B.* 37(1): 1–16.
- Black, S., Kadyrov, M., Kaufmann, P., Ugele, B., Emans, N. and Huppertz, B. 2004. Syncytial fusion of human trophoblast depends on caspase 8. *Cell Death Differ.* 11(1): 90–98.
- Bosman, A., Delacollette, C., Olumese, P., Ridley, R.G., Rietveld, A., Shretta, R. and Teklehaimanot, A. 2000. The use of antimalarial drugs. Geneva, Switzerland, Nov: 50-54.
- Bouyou-Akotet, M.K., Kombila, M., Kremsner, P.G., Mavoungou, E. 2004. Cytokine profiles in peripheral, placental and cord blood in pregnant women from an area endemic for *Plasmodium falciparum*. *Eur Cytokine Netw.* 15(2): 120-125.
- Boya, P., Gonzalez-Polo, R.A., Poncet, D., Andreau, K., Vieira, H.L., Roumier, T., Perfettini, J.L. and Kroemer, G. 2003. Mitochondrial membrane permeabilization is a critical step of lysosome-initiated apoptosis induced by hydroxychloroquine. *Oncogene.* 22(25): 3927-3936.
- Brabin, B. 1991. An assessment of low birthweight risk in primiparae as an indicator of malaria control in pregnancy. *Int J Epidemiol.* 20(1): 276-283.
- Brabin, B.J., Romagosa, C., Abdelgalil, S., Menendez, C., Verhoeff, F.H., McGready, R., Fletcher, K.A., Owens, S., Dalessandro, U., Nosten, F., Fischer, P.R. and Ordi, J. 2004. The sick placenta the role of malaria. *Placenta.* 25(5): 359–378.
- Catisti, R. and Vercesi, A.E. 1999. Permeability transition pore closure promoted by quinine. *J Bioenerg Biomembr.* 31(2): 153-157.
- Chakraborty, C., Gleeson, L.M., McKinnon, T. and Lala, P.K. 2002. Regulation of human trophoblast migration and invasiveness. *Can J Physiol Pharmacol.* 80(2): 116-124.
- Chandramohan, D., Jaffar, S. and Greenwood, B. 2002. Use of clinical algorithms for diagnosing malaria. *Trop Med Int Health.* 7(1): 45-52.

- Chaouat, G., Zourbas, S., Ostojic, S., Lappree-Delage, G., Dubanchet, S., Ledee, N. and Martal, J. 2002. A brief review of recent data on some cytokine expressions at the materno-foetal interface which might challenge the classical Th1/Th2 dichotomy. *J Reprod Immunol.* 53(1-2): 241–256.
- Chen, H.H., Zhou, H.J. and Fang, X. 2003. Inhibition of human cancer cell line growth and human umbilical vein endothelial cell angiogenesis by artemisinin derivatives in vitro. *Pharmacol Res.* 48(3): 231-236.
- Chen, Q., Schlichtherle, M. and Wahlgren, M. 2000. Molecular aspects of severe malaria. *Clin Microbiol Rev.* 13(3): 439–450.
- Cheung, A.N.Y. 2003. Pathology of gestational trophoblastic diseases. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 17(6): 849–868.
- Chotivanich, K., Udomsangpetch, R., Simpson, J.A., Newton, P., Pukrittayakamee, S., Looareesuwan, S. and White, N.J. 2000. Parasite multiplication potential and the severity of falciparum malaria. *J Infect Dis.* 181(3): 1206-1209.
- Das, C., Kumar, V.S., Gupta, S. and Kumar, S. 2002. Network of cytokines, integrins and hormones in human trophoblast cells. *J Reprod Immunol.* 53(1-2): 257–268.
- Day, N.P.J., Hien, T.T., Schollaardt, T., Loc, P.P., Chuong, L.V., Chau, T.T.H., Mai, N.T.H., Phu, N.H., Sinh, D.X., White, N.J. and Ho, M. 1999. The prognostic and pathophysiologic role of pro- and anti-inflammatory cytokines in severe malaria. *J Infect Dis.* 180(4): 1288–1297.
- Dorman, E. and Shulman, C. 2000. Malaria in pregnancy. *Curr Obstet Gynaecol.* 10: 183-189.
- Duffy, P.E. and Fried, M. 2003. Antibodies that inhibit *Plasmodium falciparum* adhesion to chondroitin sulfate A are associated with increased birth weight and the gestational age of newborns. *Infect Immun.* 71(11): 6620–6623.
- Efferth, T. and Oesch, F. 2004. Oxidative stress response of tumor cells: microarray-based comparison between artemisinins and anthracyclines. *Biochem Pharmacol.* 68(1): 3–10.
- Ekvall, H. 2003. Malaria and anemia. *Curr Opin Hematol.* 10(2): 108-114.

- Fievet, N., Moussa, M., Tami, G., Maubert, B., Cot, M., Deloron, P. and Chauvat, G. 2001. *Plasmodium falciparum* induces a Th1/Th2 disequilibrium, favoring the Th1-Type pathway, in the human placenta. *J Infect Dis.* 183(10): 1530–1534.
- Foley, M. and Tilley, L. 1998. Quinoline Antimalarials: Mechanisms of action and resistance and prospects for new agents. *Pharmacol Ther.* 79(1): 55–87.
- Frendo, J.L., Vidaud, M., Guibourdenche, J., Luton, D., Muller, F., Bellet, D., Giovagrandi, Y., Tarrade, A., Porquet, D., Blot, P. and Evain-Brion, D. 2000. Defect of villous cytotrophoblast differentiation into syncytiotrophoblast in Down's syndrome. *J Clin Endocr Metab.* 85(10): 3700-3707.
- Fried, M. and Duffy, P.E. 1998. Maternal malaria and parasite adhesion. *J Mol Med.* 76(3-4): 162–171.
- Fried, M., Muga, R.O., Misore, A.O. and Duffy, P.E. 1998. Malaria elicits type 1 cytokines in the human placenta: IFN- γ and TNF- α associated with pregnancy outcomes. *J Immunol.* 160(5): 2523–2530.
- Fritsche, G., Larcher, C., Schennach, H. and Weiss, G. 2001. Regulatory interactions between iron and nitric oxide metabolism for immune defense against *Plasmodium falciparum* infection. *J Infect Dis.* 183(9): 1388–1394.
- Garcia-Lloret, M.I., Yui J., Winkler-Lowen B., Guilbert, L.J. 1996. Epidermal growth factor inhibits cytokine-induced apoptosis of primary human trophoblasts. *J Cell Physiol.* 167(2): 324-332.
- Gaur, D., Mayer, D.C.G. and Miller, L.H. 2004. Parasite ligand-host receptor interactions during invasion of erythrocytes by plasmodium merozoites. *Int J Parasitol.* 34(13-14): 1413-1429.
- Gay, F., Traore, B., Zanoni, J., Danis, M. and Fribourg-Blanc, A. 1996. Direct acridine orange fluorescence examination of blood slides compared to current techniques for malaria diagnosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 90(5): 516- 518.
- Gerami-Naijai, B., Dovzhenko, O.V., Durning, M., Wegner, F.H., Thomson, J.A. and Golos, T.G. 2004. Trophoblast differentiation in embryoid bodies derived from human embryonic stem cells. *Endocrinology.* 145(4): 1517–1524.

- Ginsburg, H., Ward, S.A. and Bray, P.G. 1999. An integrated model of chloroquine action. *Parasitol Today*. 15(9): 357-360.
- Glazier, J.D. and Jansson, T. 2004. Placental transport in early pregnancy—a workshop report. *Placenta*. 25: 57-59.
- Good, M.F. and Doolan, D.L. 1999. Immune effector mechanisms in malaria. *Curr Opin Immunol* 11(4): 412–419.
- Gottifredi, V. and Prives, C. 2005. The S phase checkpoint: When the crowd meets at the fork. *Semin Cell Dev Biol*. 16(3): 355–368.
- Gude, N.M., Roberts, C.T., Kalionis, B. and King, R.G. 2004. Growth and function of the normal human placenta. *Thromb Res*. 114(5-6): 397-407.
- Halpaap, B., Ndjave, M., Paris, M., Benakis, A and Kremsner, P.G. 1998. Plasma levels of artesunate and dihydroartemisinin in children with *Plasmodium falciparum* malaria in Gabon after administration of 50-milligram artesunate suppositories. *Am J Trop Med Hyg*. 58(3): 365-368.
- Hanscheid, T. 1999. Diagnosis of malaria: a review of alternatives to conventional microscopy. *Clin Lab Haematol*. 21(4): 235-245.
- Hedini, A. 2002. Malaria pathogenesis: a jigsaw with an increasing number of pieces. *Int J Parasitol*. 32(13): 1587–1598.
- Hensmann, M. and Kwiatkowski, D. 2001. Cellular basis of early cytokine response to *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun*. 69(4): 2364–2371.
- Hill, J.A., Polgar, K. and Anderson, D.J. 1995. T-helper 1-type immunity to trophoblast in women with recurrent spontaneous abortion. *JAMA*. 273(24): 1933-1936.
- Hisaeda, H., Yasutomo, K. and Himeno, K. 2005. Malaria: immune evasion by parasites. *Int J Biochem Cell B*. 37: 700–706.
- Holmgren, L., Claesson-Welsh, L., Heldin, C.H. and Ohlsson, R. 1992. The expression of PDGF alpha- and beta-receptors in subpopulations of PDGF-producing cells implicates autocrine stimulatory loops in the control of proliferation in cytotrophoblasts that have invaded the maternal endometrium. *Growth Factors*. 6(3): 219-31.

- Holst, F.G.E., Hemmer, C.J., Foth, C., Seitz, R., Egbring, R. and Dietrich, M. 1999. Low levels of fibrin-stabilizing factor (FACTOR XIII) in human: *Plasmodium falciparum* malaria correlation with clinical severity. *Am J Trop Med Hyg.* 60(1): 99–104.
- Jason, J., Archibald, L.K., Nwanyanwu, O.C., Bell, M., Buchanan, I., Larned, J., Kazembe, P.N., Dobbie, H., Parekh, B., Byrd, M.G., Eick, A., Han, A. and Jarvis, W.R. 2001. Cytokines and malaria parasitemia. *Clin Immunol.* 100(2): 208–218.
- Jerzak, M. and Bischof, P. 2002. Apoptosis in the first trimester human placenta: the role in maintaining immune privilege at the maternal–foetal interface and in the trophoblast remodeling. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 100(2): 138–142.
- Jones, S.M. and Kazlauskas, A. 2001. Growth factor-dependent signaling and cell cycle progression. *Febs Lett.* 490(3): 110–116.
- Kingdom, J., Huppertz, B., Seaward, G. and Kaufmann, P. 2000. Development of the placental villous tree and its consequences for fetal growth. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 92(1): 35–43.
- Knofler, M., Mosl, B., Bauer, S., Griesinger, G. and Husslein, P. 2000. TNF- α /TNFR1 in primary and immortalized first trimester cytotrophoblasts. *Placenta.* 21(5-6): 525–535.
- Kwak, J.Y., Beaman, K.D., Gilman-Sachs, A., Ruiz, J.E., Schewitz, D. and Beer, A.E. 1995. Up-regulated expression of CD56+, CD56+/CD16+, and CD19+ cells in peripheral blood lymphocytes in pregnant women with recurrent pregnancy losses. *Am J Reprod Immunol.* 34(2): 93–99.
- Lacroix, M.C., Guibourdenche, J., Frendo, J.L., Muller, F. and Evain-Brion, D. 2002. Human placental growth hormone--a review. *Placenta.* 23: 87–94.
- Leke, R.G., Djokam, R.R., Mbu, R., Leke, R.J., Fogako, J., Megnekou, R., Metenou, S., Sama, G., Zhou, Y., Cadigan, T., Parra, M. and Taylor, D.W. 1999. Detection of the *Plasmodium falciparum* antigen histidine-rich protein 2 in blood of

pregnant women: implications for diagnosing placental malaria. *J Clin Microbiol.* 37(9): 2992–2996.

Leopardi, O., Naughten, W., Salvia, L., Colecchia, M., Matteelli, A., Zucchi, A., Shein, A., Muchi, J.A., Carosi, G. and Ghione, M. 1996. Malaric placentas. A quantitative study and clinico-pathological correlations. *Pathol Res Pract.* 192(9): 899-900.

Leung, D.N., Smith, S.C., To, K.F., Sahota, D.S. and Baker, P.N. 2001. Increased placental apoptosis in pregnancies complicated by preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 184(6): 1249-1250.

Leung, H.W.C., Wu, C.H., Lin, C.H. and Lee, H.Z. 2005. Luteolin induced DNA damage leading to human lung squamous carcinoma CH27 cell apoptosis. *Eur J Pharmacol.* 508(1-3): 77– 83

Li, R. and Zhuang, L. 1997. The effects of growth factors on human normal placental cytotrophoblast cell proliferation. *Hum Reprod.* 12(4): 830–834.

Lone, F.W., Qureshi, R.N. and Emanuel, F. 2004. Maternal anaemia and its impact on perinatal outcome. *Trop Med Int Health.* 9(4): 486–490.

Louis, H.M., Dror I. B., Kevin M. and Ogobara K. D. 2002. The pathogenic basis of malaria. *Nature.* 415: 673-679.

Luder, C.G.K., Gross, U. and Lopes, M.F. 2001. Intracellular protozoan parasites and apoptosis: diverse strategies to modulate parasite–host interactions. *Trends Parasitol.* 17(10): 480-486.

Lyke, K.E., Diallo, D.A., Dicko, A., Kone, A., Coulibaly, D., Guindo, A., Cissoko, Y., Sangare, L., Coulibaly, S., Dakouo, B., Taylor, T.E., Doumbo, O.K. and Plowe, C.V. 2003. Association of intraleukocytic *Plasmodium falciparum* malaria pigment with disease severity, clinical manifestations, and prognosis in severe malaria. *Am J Trop Med Hyg* 69(3): 253–259.

Mackintosh, C.L., Beeson, J.G. and Marsh, K. 2004. Clinical features and pathogenesis of severe malaria. *Trends Parasitol.* 20(12): 597-603.

- Maeda, H. and Shiraishi, A. 1996. TGF-beta contributes to the shift toward Th2-type responses through direct and IL-10-mediated pathways in tumor-bearing mice. *J Immunol.* 156(1): 73-78.
- Malaguarnera, L, and Musumeci, S. 2002. The immune response to *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet Infect Dis.* 2(8): 472-478.
- Matteelli, A., Caligaris, S., Castelli, F. and Carosi, G. 1997. The placenta and malaria. *Ann Trop Med Parasitol.* 91(7): 803-810.
- Mayxay, M., Pukrittayakamee, S., Chotivanich, K., Looareesuwan, S. and White, N.J. 2001. Persistence of *Plasmodium falciparum* HRP-2 in successfully treated acute falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 95(2): 179-182.
- McGready, R., Ashley, E.A. and Nosten, F. 2004. Malaria and the pregnant traveller. *J Travel Med.* 2(3-4): 127-142.
- McGready, R., Cho, T., Keo, N.K., Thwai, K.L., Villegas, L., Looareesuwan, S., White, N.J. and Nosten, F. 2001. Artemisinin antimalarials in pregnancy: a prospective treatment study of 539 episodes of multidrug-resistant *Plasmodium falciparum*. *Clin Infect Dis.* 33(12): 2009-2016.
- McGready, R. and Nosten, F. 1999. The Thai-Burmese border : drug studies of *Plasmodium falciparum* in pregnancy. *Ann Trop Med Parasitol.* 93: 19-23.
- McGready, R., Thwai, K.L., Cho, T., Looareesuwan, S., White, N.J. and Nosten, F. 2002. The effects of quinine and chloroquine antimalarial treatments in the first trimester of pregnancy. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 96(2): 180-184.
- Meshnick, S.R. 2002. Artemisinin mechanisms of action, resistance and toxicity. *Int J Parasitol.* 32(13): 1655-1660.
- Miller, L.H., Baruch, D.I., Marsh, K. and Doumbo, O.K. 2002. The pathogenic basis of malaria. *Nature.* 415(6872): 673-679.
- Moody, A. 2002. Rapid Diagnostic Tests for Malaria Parasites. *Clin Microbiol Rev.* 15(1): 66-78.
- Moormann, A.M., Sullivan, A.D., Rochford, R.A., Chensue, S.W., Bock, P.J., Nyirenda, T. and Meshnick, S.R. 1999. Malaria and pregnancy: placental cytokine

- expression and its relationship to intrauterine growth retardation. *J Infect Dis.* 180(6): 1987–1993.
- Mota, M.M., Giordano, S. and Rodriguez, A. 2004. Targeting plasmodium host cells: survival within hepatocytes. *Trends Mol Med.* 10(10): 487-492.
- Mota, M.M. and Rodriguez, A. 2002. Invasion of mammalian host cells by plasmodium sporozoites. *Bioessays.* 24(2): 149-156.
- Murray, C.K., Bell, D., Gasser, R.A. and Wongsrichanalai, C. 2003. Rapid diagnostic testing for malaria. *Trop Med Int Health.* 8(10): 876–883.
- Newman, R.D., Parise, M.E., Slutsker, L., Nahlen, B. and Steketee, R.W. 2003. Safety, efficacy and determinants of effectiveness of antimalarial drugs during pregnancy: implications for prevention programmes in *Plasmodium falciparum*-endemic sub-Saharan Africa. *Trop Med Int Health.* 8(6): 488–506.
- Newton, C.R.J.C., Hien, T.T., White, N. 2000. Cerebral malaria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 69(4): 433–441.
- Ngan, H.Y.S. 2003. Gestational trophoblastic disease. *Curr Obstet Gynaecol.* 13: 95-101.
- Nosten, F., Kuile, F.T., Maelankirri, L., Decludt, B. and White, N.J. 1991. Malaria during pregnancy in an area of unstable endemicity. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 85(4): 424-429.
- Nosten, F., McGready, R., Simpson, J.A., Thwai, K.L., Balkan, S., Cho, T., HkiriJARoen, L., Looareesuwan, S. and White, N.J. 1999. Effects of *Plasmodium vivax* malaria in pregnancy. *Lancet.* 354(9178): 546–549.
- Nosten, F., Rogerson, S.J., Beeson, J.G., McGready, R., Mutabingwa, T.K. and Brabin, B. 2004. Malaria in pregnancy and the endemicity spectrum what can we learn?. *Trends Parasitol.* 20(9): 425-432.
- Ocana-Morgner, C., Mota, M.M. and Rodriguez, A. 2003. Malaria blood stage suppression of liver stage immunity by dendritic cells. *J Exp Med.* 197(2): 143–151.

- Oh, M.D., Shin, H., Shin, D., Kim, U., Lee, S., Kim, N., Chol, M.H., Chai, J.Y. and Choe, K. 2001. Clinical features of vivax malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 65(2): 143–146.
- Okoko, B.J., Enwere, G. and Ota, M.O.C. 2003. The epidemiology and consequences of maternal malaria a review of immunological basis. *Acta Trop.* 87(2): 193-205.
- Olliaro, P. 2001. Mode of action and mechanisms of resistance for antimalarial drugs. *Pharmacol Ther.* 89(2): 207-219.
- Olliaro, P.L., Haynes, R.K., Meunier, B. and Yuthavong, Y. 2001. Possible modes of action of the artemisinin type compounds. *Trends Parasitol.* 17(3): 122-126.
- Omer, F.M., Kurtzhals, J.A. and Riley, E.M. 2000. Maintaining the immunological balance in parasitic infections: a role for TGF-beta. *Parasitol Today.* 16(1): 18-23.
- Omonuwa, S. and Omonuwa, S. 2002. Malaria recurrence caused by *Plasmodium falciparum*. *J Am Board Fam Pract.* 15(2): 159-160.
- Pain, A., Ferguson, D.J.P., Kai, O., Urban, B.C., Lowe, B., Marsh, K. and Roberts, D.J. 2001. Platelet-mediated clumping of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes is a common adhesive phenotype and is associated with severe malaria. *PNAS.* 98(4): 1805–1810.
- Perry J.E., Grossmann M.E. and Tindall D.J. 1998. Epidermal growth factor induces cyclin D1 in a human prostate cancer cell line. *Prostate.* 35(2): 117-124.
- Phillips, R.S. 2001. Current status of malaria and potential for control. *Clin Microbiol Rev* 14(1): 208–226.
- Pichyangkul, S., Saengkrai, P., Webster, H.K. 1994. *Plasmodium falciparum* pigment induces monocytes to release high levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta. *Am J Trop Med Hyg.* 51(4): 430-435.
- Playford, E.G. and Walker, J. 2002. Evaluation of the ICT malaria P.f/P.v and the optiMal rapid diagnostic tests for malaria in febrile returned travellers. *J Clin Microbiol.* 40(11): 4166–4171.
- Plebanski, M. and Hill, A.V.S. 2000. The immunology of malaria infection. *Curr Opin Immunol* 12(4): 437–441.

- Poch, B., Gansauge, F., Schwarz, A., Seufferlein, T., Schnelldorfer, T., Ramadani, M., Beger, H.G. and Gansauge, S. 2001. Epidermal growth factor induces cyclin D1 in human pancreatic carcinoma: evidence for a cyclin D1-dependent cell cycle progression. *Pancreas*. 23(3): 280-287.
- Pukrittayakamee, S., Wanwimolruk, S., Stepniowska, K., Jantra, A., Huyakorn, S., Looareesuwan, S. and White, N.J. 2003. Quinine pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships in uncomplicated falciparum malaria. *Antimicrob Agents Chemother*: 47(11): 3458-3463.
- Qari, S.H., Shi, Y.P., Goldman, I.F., Nahlen, B.L., Tibayrenc, M. and Lal, A.A. 1998. Predicted and observed alleles of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP-1), a potential malaria vaccine antigen. *Mol Biochem Parasitol*. 92(2): 241-252.
- Rhee, M.S.M., Akanmori, B.D., Waterfall, M. and Riley, E.M. 2001. Changes in cytokine production associated with acquired immunity to *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Exp Immunol*. 126(3): 503-510.
- Ridley, R.G. 2002. Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. *Nature*. 415(6872): 686-693.
- Roberts, C.W., Satoskar, A. and Alexander, J. 1996. Sex steroids, pregnancy-associated hormones and immunity to parasitic infection. *Parasitol Today*. 12(10): 382-388.
- Rogerson, S.J. 2003. Sequestration: causes and consequences. *Redox Rep*. 8(5): 295-299.
- Rogerson, S.J. and Beeson, J.G. 1999. The placenta in malaria: mechanisms of infection, disease and foetal morbidity. *Ann Trop Med Parasitol*. 93: 35-42.
- Saito, S. 2001. Cytokine cross-talk between mother and the embryo/placenta. *J Reprod Immunol*. 52(1-2): 15-33.
- Scholl, P.F., Kongkasuriyachai, D., Demirev, P.A., Feldman, A.B., Lin, J.S., Sullivan, D.J. and Kumar, N. 2004. Rapid detection of malaria infection in vivo by laser desorption mass spectrometry. *Am J Trop Med Hyg*. 71(5): 546-551.

- Shams, M. and Ahmed, A. 1994. Localization of mRNA for basic fibroblast growth factor in human placenta. *Growth Factors*. 11(2): 105-111.
- Simon, C., Moreno, C., Remohy, J. and Pellicer, A. 1998. Cytokines and embryo implantation. *J Reprod Immunol*. 39(1-2): 117-131.
- Smith, N.C. 1996. An immunological hypothesis to explain the enhanced susceptibility to malaria during pregnancy. *Parasitol today*. 12(1): 4-6.
- Smith, J.D., Chitnis, C.E., Craig, A.G., Roberts, D.J., Hudson-Taylor, D.E., Peterson, D.S., Pinches, R., Newbold, C.I. and Miller, L.H. 1995. Switches in expression of *Plasmodium falciparum* var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. *Cell*. 82(1): 101-110.
- Smith, S., Francisa, R., Guilbert, L. and Baker, P.N. 2002. Growth factor rescue of cytokine mediated trophoblast apoptosis. *Placenta*. 23(4): 322-330.
- Sprecher, H., Barr, H.M., Slotky, J.I., Tzukerman, M., Eytan, G.D. and Assaraf, Y.G. 1995. Alteration of mitochondrial gene expression and disruption of respiratory function by the lipophilic antifolate pyrimethamine in mammalian cells. *J Biol Chem*. 270(35): 20668-20676.
- Staalsoe, T., Megnekou, R., Fievet, N., Ricke, C.H., Zornig, H.D., Leke, R., Taylor, D.W., Deloron, P. and Hviid, L. 2001. Acquisition and decay of antibodies to pregnancy-associated variant antigens on the surface of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes that protect against placental parasitemia. *J Infect Dis*. 184(5): 618-626.
- Steketee, R.W., Wirima, J.J., Hightower, A.W., Slutsker, L., Heymann, D.L. and Breman, J.G. 1996. The effect of malaria and malaria prevention in pregnancy on offspring birthweight, prematurity, and intrauterine growth retardation in rural Malawi. *Am J Trop Med Hyg*. 55: 33-41.
- Stoute, J.A., Odindo, A.O., Owuor, B.O., Mibei, E.K., Opollo, M.O. and Waitumbi, J.N. 2003. Loss of red blood cell-complement regulatory proteins and increased levels of circulating immune complexes are associated with severe malarial anemia. *J Infect Dis*. 187(3): 522-528.

- Su, Z. and Stevenson, M.M. 2000. Central role of endogenous gamma interferon in protective immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection. *Infect Immun.* 68(8): 4399–4406.
- Suguitan, A.L., Leke, R.G.F., Fouda, G., Zhou, A., Thuita, L., Metenou, S., Fogako, J., Megnekou, R. and Taylor, D.W. 2003. Changes in the levels of chemokines and cytokines in the placentas of women with *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis.* 188(7): 1074-1082.
- Suh, K.N., Kain, K.C. and Keystone, J.S. 2004. Malaria. *CMAJ.* 170 (11): 1693-1702.
- Sullivan, D.J. 2002. Theories on malarial pigment formation and quinoline Action. *Int J Parasitol.* 32(13): 1645–1653.
- Talman, A.M., Domarle, O., Mckenzie, F.E., Ariey, F. and Robert, V. 2004. Gametocytogenesis: the puberty of *plasmodium falciparum*. *Malaria J.* 3(1): 24.
- Testa, J., Traore, L.K., Nabalma, S., Sondo, B. and Guissou, I.P. 1998. Chloroquine resistance of *Plasmodium falciparum*. study of a surveillance method based on placental apposition and determination of blood chloroquine in pregnant women. *Sante.* 8(4): 293-296.
- Thellin, O. and Heinen, E. 2003. Pregnancy and the immune system between tolerance and rejection. *Toxicology.* 185(3): 179-184.
- Torre, D., Speranza, F., Giola, M., Matteelli, A., Tambini, R. and Biondi, G. 2002. Role of Th1 and Th2 cytokines in immune response to uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Diagn Lab Immun.* 9(2): 348–351.
- Tsuji, M. and Zavala, F. 2003. T cells as mediators of protective immunity against liver stages of plasmodium. *Trends Parasitol.* 19(2): 88-93.
- Urban, B.C., Ferguson, D.J., Pain, A., Willcox, N., Plebanski, M., Austyn, J.M. and Roberts, D.J. 1999. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells. *Nature.* 400(6739): 73-77.
- Urban, B.C., Willcox, N. and Roberts, D.J. 2001. A role for CD36 in the regulation of dendritic cell function. *PNAS.* 98(15): 8750–8755.

- Wahl, S.M. 1994. Transforming Growth Factor/3: The good, the bad, and the ugly. *J Exp Med.* 9(180): 1587-1590.
- Wickramasinghe, .S.N. and Abdalla, S.H. 2000. Blood and bone marrow changes in malaria. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol.* 13(2): 277-299.
- Winston, J.T. and Pledger, W.J. 1993. Growth factor regulation of cyclin D1 mRNA expression through protein synthesis-dependent and -independent mechanisms. *Mol Biol Cell.* 4(11): 1133-1144.
- Wongchotigul, V., Suwanna, N., Krudsood, S., Chindanond, D., Kano, S., Hanaoka, N., Akai, Y., Maekawa, Y., Nakayama, S., Kojima, S. and Looareesuwan, S. 2004. The use of flow cytometry as a diagnostic test for malaria parasites. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 35(3): 552-559.
- World Health Organization. 2005. Malaria control today. Geneva, Switzerland, March: 1-75.
- Yang, Y.Z., Little, B. and Meshnick, S.R. 1994. Alkylation of proteins by artemisinin. Effects of heme, pH, and drug structure. *Biochem Pharmacol.* 48(3): 569-573.
- Yui, J., Garcia-Lloret, M., Wegmann, T.G. and Guilbert, L.J. 1994. Cytotoxicity of tumour necrosis factor-alpha and gamma-interferon against primary human placental trophoblasts. *Placenta.* 15(8): 819-835.
- Zhang, C., Gong, Y., Ma, H., An, C. and Chen, D. 2001. Reactive oxygen species involved in trichosanthin-induced apoptosis of human choriocarcinoma cells. *Biochem. J.* 355(3): 653-661.

ภาคผนวก

ประวัติของผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรีย

เพศ	อายุ (ปี)	ชนิดของเชื้อ	parasitemia (thick smear)	หมายเหตุ
ชาย	32	<i>P. vivax</i>	1000	มีอาการไข้ 2 วัน
ชาย	18	<i>P. vivax</i>	150	มีอาการไข้ 5 วัน, ทานยาลดไข้
ชาย	15	<i>P. vivax</i>	100	มีอาการไข้ 3 วัน
หญิง	17	<i>P. vivax</i>	500	มีอาการไข้ 2 วัน
หญิง	18	<i>P. vivax</i>	300	มีอาการไข้ 3 วัน
หญิง	29	<i>P. vivax</i>	200	มีอาการไข้ 4 วัน
ชาย	9	<i>P. falciparum</i>	50	มีอาการไข้ 2 วัน
ชาย	33	<i>P. falciparum</i>	30	มีอาการไข้ 1 อาทิตย์, ทานยาลดไข้
ชาย	12	<i>P. falciparum</i>	30	มีอาการไข้ 1 วัน
ชาย	74	<i>P. falciparum</i>	20	มีอาการไข้ 4 วัน
ชาย	27	<i>P. falciparum</i>	10	มีอาการไข้ 5 วัน
หญิง	4	<i>P. falciparum</i>	70	มีอาการไข้ 1 วัน, ทานยาลดไข้

การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ และน้ำยาต่างๆ

1. RPMI-1640 (1 L)

RPMI-1640 powder 10.4 g (Biochrom AG, Berlin)

sodiumbicarbonate 2.0 g

L-glucose 2.5 g

10 mM HEPES 2.383 g

1 mM sodiumpyruvate 10 mL

Double distilled water (1 L)

ปรับ pH ให้ได้ 7.1 กรองด้วย 0.22 µm milipore เก็บที่ 4°C

2. PBS buffer (1 L)

PBS powder 9.55 g (Biochrom KG, Berlin)

Double distilled water 1 L

ปรับ pH ให้ได้ 7.1 กรองด้วย 0.22 μ M milipore เก็บที่ 4°C

3. 0.4% Trypan blue (10 mL)

Trypan blue powder 0.04 g (Sigma, St. Louis, MO)

NaCl 0.081 g

$\text{HK}_2\text{O}_4\text{P}$ 0.006 g

Distilled water 10 mL

กรองด้วย 0.22 μ M milipore

4. 1X Trypsin

100X Trypsin (Biochrom AG, Berlin) เจือจาง 10 เท่าใน sterile double distilled water เก็บที่ 4°C

5. MTT solution (5 mg/mL)

MTT powder (Serva, Heidelberg) in PBS

กรองด้วย 0.22 μ M milipore

6. Propidium iodide (0.5 mg/mL)

Propidium iodide powder (Sigma, St. Louis, MO) in PBS

Sodium azide 0.1% (W/V)

กรองด้วย 0.22 μ M milipore

7. Rnase, Dnase free (500 U/mL)

Rnase (Serva, Heidelberg) in distilled water

8. Proteinase K (4 mg/mL)

Proteinase K (USB, Cleveland, OH, USA) in distilled water

9. Hydroxyurea (0.41 mM)

Hydroxyurea (Sigma, St. Louis, MO) in PBS

กรองด้วย 0.22 μ M millipore

10. Digestion buffer (50 mL)

2.5 M NaCl 2 mL

1 M TrisCl 0.5 mL

0.25 M EDTA 5 mL

10% SDS 2.5 mL

ปรับปริมาตรด้วย Distilled water

11. TAE buffer (50X , 500 mL)

Trisbase 121 g

Glacial acetic 28.55 mL

0.25 M EDTA 100 mL

ปรับปริมาตรด้วย Distilled water

12. Ethidium bromide (10 mg/mL)

Ethidium bromide in distilled water กรองแล้วเก็บในที่มืด

13. Agarose (2%)

Agarose (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)

in 1X TAE buffer

เวลา	ระยะของ วงจรเซลล์	3% Control plasma	3% <i>P. vivax</i> plasma	3% <i>P. falciparum</i> plasma
4 ชั่วโมง	G0/G1	23.39±1.55	17.88±0.73*	24.08±0.92
	S	52.66±2.36	58.50±1.52*	53.16±0.32
	G2/M	23.96±0.82	23.62±2.07	24.64±1.27
8 ชั่วโมง	G0/G1	31.74±1.49	40.94±0.07*	34.01±3.02
	S	51.48±0.27	38.88±0.12*	49.88±1.96
	G2/M	16.79±1.23	20.43±0.07*	16.11±1.07
12 ชั่วโมง	G0/G1	53.39±0.83	47.88±0.77*	39.25±0.80**
	S	22.61±1.17	34.82±1.04*	37.87±1.37*
	G2/M	24.00±1.35	17.31±1.81*	22.87±1.11
16 ชั่วโมง	G0/G1	36.36±0.99	36.48±2.11	49.38±2.12*
	S	49.38±0.68	48.14±3.54	41.56±2.17*
	G2/M	14.17±1.77	15.38±1.55	9.06±1.22*
20 ชั่วโมง	G0/G1	40.75±0.25	29.96±0.33*	30.80±0.06*
	S	36.88±0.03	46.36±1.93*	46.79±0.99*
	G2/M	22.38±0.23	23.68±1.60	22.42±0.94
24 ชั่วโมง	G0/G1	30.25±1.16	33.56±0.35	26.94±1.40*
	S	47.28±3.12	47.12±2.68	56.00±2.04*
	G2/M	22.48±2.10	19.34±3.02	17.06±2.67

ตารางที่ 1 ผลของพลาสมาต่อการดำเนินของวงจรเซลล์ (Mean%±SEM) ในแต่ละระยะของวงจรเซลล์ *, ** p<0.05 แทนการทดสอบทางสถิติที่มีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างพลาสมาผู้ป่วยจากเชื้อ *P. vivax* หรือ *P. falciparum* กับกลุ่มควบคุมโดยวิธี OneWay ANOVA (LSD's method)

ระยะเวลา วางจรรยาบรรณ	3%FBS	3%FBS + Chloroquine	3%FBS + Quinine	3%FBS + Artemisinin	3%FBS + Pyrimethamine
6 ชั่วโมง	G0/G1	27.87±1.88	26.76±0.54	21.95±2.04*	30.66±0.45**
	S	41.51±1.64	47.27±2.44*	49.46±0.40*	49.90±0.91*
	G2/M	30.63±0.25	25.98±1.90	28.60±1.64	19.45±1.35*
12 ชั่วโมง	G0/G1	49.64±0.18	40.66±0.43*	56.40±0.09**	62.21±0.22***
	S	45.23±1.60	44.70±0.13	36.90±0.86*	24.35±1.38**
	G2/M	5.13±1.78	14.63±0.32*	6.72±0.95	13.44±1.16*
20 ชั่วโมง	G0/G1	46.24±0.27	29.89±0.44*	27.52±2.57*	42.89±1.30
	S	35.45±0.54	42.62±0.16*	57.80±2.12**	35.16±3.11
	G2/M	18.31±0.28	27.49±0.28*	14.69±0.46**	21.96±1.81
32 ชั่วโมง	G0/G1	69.66±1.94	65.89±0.42*	64.94±2.11*	64.50±0.09*
	S	15.72±0.04	27.03±0.93*	27.40±0.76*	18.27±1.05
	G2/M	14.62±1.90	7.07±0.73*	7.65±1.46*	17.25±1.13

ตารางที่ 2 ผลของยาด้านมาลาเรียต่อการดำเนินของวงจรเซลล์ (Mean±SEM) ในแต่ละระยะของวงจรเซลล์*, **, *** p<0.05

แทนการทดสอบทางสถิติที่มีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ระหว่างยาด้านมาลาเรียแต่ละชนิดกับกลุ่มควบคุม โดยวิธี

OneWay ANOVA (LSD's method)

ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่จากวิทยานิพนธ์

การเผยแพร่ในบทความวิชาการ

Nilkaeo, A., Bhuvanath, S. and Wisessombat, S. (2004). Effects of antimalarial drugs on cytotrophoblast survival. *Am. J. Reprod. Immunol.* 52(1, supplement): 44.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นายสีบตระกูล วิเศษสมบัติ	
วัน เดือน ปีเกิด	30 กันยายน 2521	
วุฒิการศึกษา		
วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)	มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์	2544