จำนวน 2 เล่ม
- 8 มิ.ย. 2560

รายงานการวิจัย

การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในเซลล์ของเชื้อพลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม ที่ทดสอบด้วยยาอะโตวาโคนและโปรกัวนิล

Intracellular structure changes of Plasmodium falciparum treated with atovaquone/proguanil

ชื่อผู้วิจัย

จิตรวี เชยชม

พงชัย หาญยุทธนากร

สิทธิพร ภัทรดิลกรัตน์

นภาพร ศิริพูล

รายงานวิจัยฉบับนี้ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณกองทุนวิจัย

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

พ.ศ. 2559

ชื่องานวิจัย การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในเซลล์ของเชื้อพลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม ที่ทดสอบด้วยยาอะโตวาโคนและโปรกัวนิล

ผู้วิจัย จิตรวี เชยชมและคณะ

คณะ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

ปี 2561

บทคัดย่อ

ยามาลาโรนเป็นยาผสมระหว่างยาสองชนิดได้แก่ โปรกัวนิลและอะโตวาโคน ซึ่งเป็นยาชนิดใหม่ที่มีการนำมาใช้รักษาโรคมาลาเรียในจังหวัดตราดและ จันทบุรี เพื่อยืดอายุในการใช้ยาผสมอาร์ทีมิซินินในการรักษามาลาเรีย วัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้ คือ ศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในเซลล์ของเชื้อพลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม ที่ทดสอบด้วยโปรกัวนิลและอะโตวาโคนของเชื้อมาลาเรีย 3 สายพันธุ์ได้แก่ สายพันธุ์T9/94RC17 สายพันธุ์ K1CB1 และ สายพันธุ์ 3D7 ภายหลังทดสอบกับยา โปรกัวนิลและอะโตวาโคนพบว่าลักษณะเชื้อ พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม ทั้ง 3 สายพันธุ์ มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างที่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมเมื่อทำการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงโดยพบว่าลักษณะของเชื้อ พลาสโมเดียม เมื่อทดสอบกับยา โปรกัวนิลและอะโตวาโคน เชื้อจะมีความผิดปกติ โดยความผิดปกติดังกล่าวเกิดขึ้นแตกต่างกัน ตามความเข้มข้นของยา โปรกัวนิลและอะโตวาโคน และเมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในเซลล์ อันได้แก่ ลักษณะออร์แกเนลล์ต่างๆ มีรูปร่างที่ผิดปกติไปเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ไม่ได้ทดสอบกับยา) คือเซลล์ที่มีการตาย มีลักษณะหดลง แต่สำหรับเซลล์ที่ไม่ตาย (แต่มีความผิดปกติเกิดขึ้นเกี่ยวกับโครงสร้างภายในของเชื้อพลาสโมเดียม) ยังพบการเปลี่ยนแปลงที่ยังไม่ชัดเจน ซึ่งอาจเกิดจากปริมาณความเข้มข้นของยา โปรกัวนิลและอะโตวาโคน

เลขทะเบียน 112282
วันที่ 15 เม.ย. 2562
เลขเรียกหนังสือ 616.936
ก 251

Research Title	Intracellular structure changes of Plasmodium falciparum treated with atovaquone/proguanil
Researcher	Miss Jitravee Cheychom and et.al.
Faculty	Sciences and Technology
Year	2018

Abstract

Malarone, a combination of atovaquone and proguanil, had been introduced for malaria treatment in Trat and Chantaburi Province to prolong the life span of the artemisinin-based combination therapies (ACTs). The purpose of this study is Intracellular structure changes of *Plasmodium falciparum* (T9/94RC17, K1CB1 and 3D7) treated with atovaquone/proguanil. The result found that structures of *Plasmodium falciparum* are different from the control group, when study by light microscope. It is abnormal by concentration level of Atovaquone and Proguanil. The electron microscope found with structural changes within the cells, including the characteristics of the various organelles has abnormal shape when compared with the control group (not tested with drug) is a cell that is dead. But for the cells are looks not to die (but wrong about the internal structure of Plasmodium infections) also found the changes unclear which may be caused by the concentration of the Atovaquone and Proguanil.

SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้ ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก กองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 และยังได้รับการสนับสนุนสถานที่ทำวิจัย ณ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทางผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้สถานที่และเครื่องมือ อุปกรณ์ในการทำการทดลองจนงานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี รวมทั้งเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการและน้องๆ ทุกคนในห้องปฏิบัติการ สำหรับมิตรภาพและความช่วยเหลือต่างๆ ที่มอบให้

สุดท้ายนี้ ความดีและประโยชน์ใด ๆ ที่เกิดจากการทำวิจัยนี้ ผู้วิจัยขอมอบให้แก่บิดามารดาและคณาจารย์ทุก ๆ ท่าน ที่ได้ประสิทธิ์ประศาสน์วิชาความรู้และให้ความช่วยเหลือด้วยดีมาโดยตลอดจนสำเร็จการวิจัย รวมทั้งผู้ให้ความช่วยเหลืออีกหลายท่านที่ไม่ได้เอ่ยนามหากมีข้อผิดพลาดประการใด ผู้วิจัยขอน้อมรับไว้เพียงผู้เดียว และหวังว่าวิจัยฉบับนี้จะมีประโยชน์ต่อบุคคลที่สนใจและหน่วยงานที่เกี่ยวข้องเพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการวางแผนด้านนโยบายและมาตรการต่าง ๆ ต่อไป

คณะผู้วิจัย

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

7 มกราคม 2560

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎี	3
มาลาเรีย	3
สถานการณ์มาลาเรียในประเทศไทย	4
สถานการณ์การดื้อยาในประเทศไทย	4
วงจรชีวิตของเชื้อพลาสโมเดียม	5
อาการของโรคมาลาเรีย	9
การรักษา	11
การวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการ	11
กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน	13
บทที่ 3 การทดลอง	
เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	15
วิธีการทดลอง	16
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผล	18
ผลการทดลอง	18
วิจารณ์	26
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	27
เอกสารอ้างอิง	28
ประวัติผู้วิจัย	32

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 สถานการณ์มาลาเรียในประเทศไทย 4

ภาพที่ 2 วงจรชีวิตของเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคมาลาเรีย 5

ภาพที่ 3 การเลี้ยงเชื้อและเพิ่มจำนวน พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม 18

ภาพที่ 4 การเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี candle – jar method 18

ภาพที่ 5 การทดสอบยาด้วยวิธี 96 micro well plate 19

ภาพที่ 6 ลักษณะการเตรียมสไลด์และการย้อมสีจิมซา 20

ภาพที่ 7 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อพลาสโมเดียมสายพันธุ์ T9/94RC17 21

ภาพที่ 8 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อพลาสโมเดียมสายพันธุ์ K1CB1 22

ภาพที่ 9 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อพลาสโมเดียมสายพันธุ์ 3D7 22

ภาพที่ 10 ลักษณะการปั่นเหวี่ยงตัวอย่างเชื้อพลาสโมเดียมเพื่อเก็บตัวอย่าง 23

ภาพที่ 11 ลักษณะตัวอย่างเม็ดเลือดแดงและเชื้อพลาสโมเดียมที่ตกตะกอน 23

ภาพที่ 12 ลักษณะการเก็บตัวอย่างเพื่อนำไปเตรียมตัวอย่างสำหรับการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน 24

ภาพที่ 13 ลักษณะตัวอย่างเชื้อพลาสโมเดียม ที่ใช้สำหรับการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน 24

ภาพที่ 14 ลักษณะภายในเซลล์ของเชื้อ พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม เมื่อทดสอบด้วยยาโปรกัวนิลและอะโตวาโคน 25

SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

มาลาเรียเป็นโรคติดเชื้อที่สำคัญชนิดหนึ่งของโลก มีสาเหตุมาจากโปรโตซัวในสกุลพลาสโมเดียม (Plasmodium) โรคมาลาเรียในมนุษย์มีสาเหตุมาจากโปรโตซัว 4 ชนิด ได้แก่ พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม (*Plasmodium falciparum*) พลาสโมเดียม ไวแวกซ์ (*Plasmodium vivax*) พลาสโมเดียม โอวัลเล่ (*Plasmodium ovalae*) และ พลาสโมเดียม มาลาริอี (*Plasmodium malariae*) นอกจากนี้ยังมีเชื้อมาลาเรียในลิง เช่น พลาสโมเดียม โนว์ลซาย (*Plasmodium knowlesi*) ที่สามารถระบาดมาสู่มนุษย์[1] ได้เช่นกัน จากรายงานขององค์การอนามัยโลกพบว่า มีประเทศที่ยังมีการติดเชื้อประมาณ 107 ประเทศ โดยมีผู้ป่วยปีละ 300 – 500 ล้านคน[2] สำหรับในประเทศไทย โรคมาลาเรียยังคงเป็นปัญหาสำคัญของประเทศไทยโดยเฉพาะตามพื้นที่บริเวณแนวชายแดนไทย – กัมพูชา ทำให้ประชากรตามแนวชายแดนในพื้นที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อโรคมาลาเรียอยู่ตลอดเวลา เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีการระบาดของโรคมาลาเรียสูง โดยเฉพาะโรคมาลาเรียที่มีสาเหตุมาจากโปรโตซัวชนิด พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม ซึ่งมีการระบาดมากในประเทศไทย นอกจากนี้ยังพบว่าความรุนแรงของโรคและการดื้อยาของเชื้อพลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม ได้เพิ่มมากขึ้นอีกด้วย[6-11] เนื่องจากมีหลักฐานว่าเชื้อมาลาเรียชนิด พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัมในบริเวณดังกล่าวเริ่มดื้อต่อยา อาร์ทีซูเนท-เมโฟลควิน[3-5] ซึ่งเป็นกลุ่มยาที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดสำหรับการรักษาโรคมาลาเรียชนิดดื้อยาหลายชนิด (multi-drug resistant) โดยยาที่ใช้ในปัจจุบันมีประสิทธิภาพในการรักษาการติดเชื้อมาลาเรียต่ำลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข จึงมีความจำเป็นต้องจัดหายาต้านมาลาเรียชนิดอื่น เช่น ยามาลาโรน (malarone) เป็นยาผสมระหว่างยาสองชนิดได้แก่ โปรกัวนิลและอะโตวาโคน มาใช้สลับกับการใช้ยาอาร์ทีซูเนท และยาเมโฟลควิน เพื่อชะลอปัญหาการดื้อยาของเชื้อ พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัมที่จะเกิดขึ้นในพื้นที่ชายแดนไทย – กัมพูชา

ปัจจุบันข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับลักษณะโครงสร้างและองค์ประกอบภายในเซลล์ (Organelle) ต่างๆ ของเชื้อ พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัมที่ทดสอบด้วยยาอะโตวาโคนและโปรกัวนิลในประเทศไทยยังมีน้อยมาก ซึ่งการศึกษาลักษณะโครงสร้างของเชื้อพลาสโมเดียมนิยมใช้กล้องจุลทรรศ์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope; TEM) โดยมีการเตรียมตัวอย่างขึ้นโดยวิธีพิเศษเพื่อให้ลำอนุภาคอิเล็คตรอนผ่านทะลุได้ เหมาะสำหรับศึกษารายละเอียดขององค์ประกอบภายในของตัวอย่าง เช่น องค์ประกอบภายในเซลล์ ลักษณะของเยื่อหุ้มเซลล์ ผนังเซลล์ ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยมีความสำคัญ สามารถบ่งชี้การเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบภายในเซลล์ เมื่อเชื้อ พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม ถูกทดสอบด้วย

ยาอะโตวาโคนและโปรกัวนิล ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการนำเอาเชื้อพลาสโมเดียม ฟัลซิปารัม (*Plasmodium falciparum*) ที่เป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์ (clone) 3 สายพันธุ์ (T9/94RC17, K1CB1 และ 3D7) มาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ทำการเพิ่มจำนวน และทดสอบด้วยยาอะโตวาโคนและโปรกัวนิล หลังจากนั้นส่องกล้องจุลทรรศ์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน เพื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างและองค์ประกอบภายในเซลล์ (Organelle) ของเชื้อมาลาเรียที่เป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์ทั้ง 3 สายพันธุ์

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างและองค์ประกอบภายในเซลล์ (Organelle) ของเชื้อพลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม ที่เป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์ (clone) 3 สายพันธุ์ (T9/94RC17, K1CB1 และ 3D7) ก่อนและหลังทดสอบกับยา โปรกัวนิลและอะโตวาโคน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การวิจัยนี้ไม่ได้ก่อให้เกิดประโยชน์กับผู้ป่วยโดยตรง แต่ข้อมูลที่ได้จากการวิจัย เช่น ลักษณะโครงสร้างและองค์ประกอบภายในเซลล์ (Organelle) มีความสำคัญ เพราะเป็นข้อมูลที่สามารถบ่งชี้ลักษณะของ เชื้อพลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม ที่เป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์ (clone) ทั้ง 3 สายพันธุ์ (T9/94RC17, K1CB1 และ 3D7) และเป็นประโยชน์โดยตรงต่อการใช้เป็นข้อมูลเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ต่างๆ ที่มีการศึกษาประสิทธิภาพและผลของยาที่ใช้ในการรักษามาลาเรียในอนาคต

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

บทที่ 2

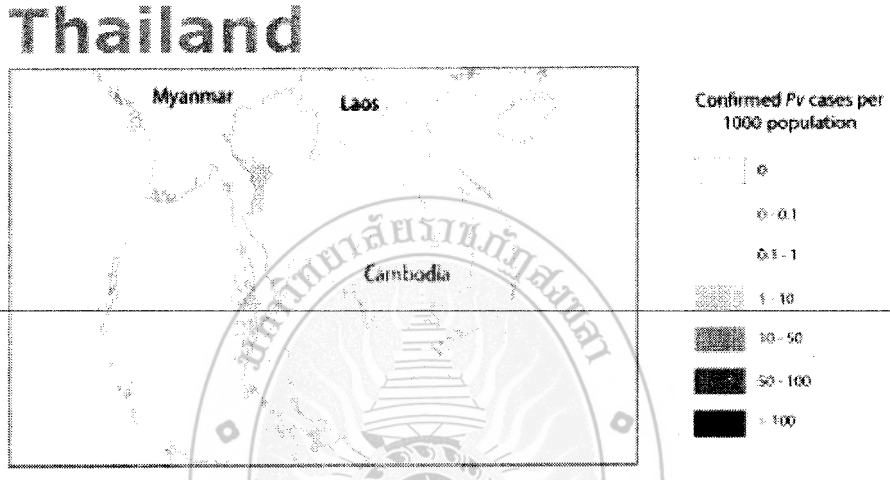
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มาลาเรีย

โรคมาลาเรียยังคงเป็นปัญหาสำคัญของประเทศไทยในปัจจุบัน ถึงแม้ว่าได้มีการควบคุมและป้องกัน ทำให้จำนวนผู้ป่วยโรคมาลาเรียในปัจจุบันลดลง ทำให้ดูเหมือนว่าโรคมาลาเรียไม่ใช่ปัญหาใหญ่ของประเทศอีกต่อไป แต่โดยความจริงแล้ว โรคมาลาเรียยังคงเป็นปัญหาที่สำคัญ เพราะความรุนแรงของโรคและการดื้อยาของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม (*Plasmodium falciparum*) มิได้ลดลง กลับทวีความรุนแรงขึ้น[6-11] ดังนั้นปัญหาการดื้อยายังคงเป็นปัญหาสำคัญต่อการควบคุมโรคมาลาเรีย และปัจจุบันได้พบหลักฐานว่าเชื้อมาลาเรียเริ่มดื้อต่อยา อาร์ทีซูเนท-เมโฟลควิน[7] ซึ่งเป็นกลุ่มยาที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด สำหรับการรักษาโรคมาลาเรียชนิดดื้อยาหลายชนิด (muti-drug resistant) ในบริเวณชายแดนไทย – กัมพูชา ซึ่งเป็นศูนย์กลางการระบาดของเชื้อมาลาเรียดื้อยา โดยประสิทธิภาพของยาสามารถรักษามาลาเรียให้หายได้เพียง 78.6%[7] โดยทั่วไปเชื้อพลาสโมเดียมตามธรรมชาติที่เก็บตัวอย่างได้จากผู้ป่วยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อค่อนข้างสูง ความหลากหลายทางพันธุกรรมและลักษณะฟีโนไทป์ต่างๆ ที่พบในเชื้อมาลาเรียตามธรรมชาติ ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียเกิดขึ้นได้จาก 2 กระบวนการ ได้แก่ (1) การแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรม (genetic recombination) ซึ่งเกิดขึ้นภายหลังจากการปฏิสนธิและการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสภายในกระเพาะอาหารของยุงและ (2) การกลายพันธุ์หรือมิวเทชั่น (mutation) ซึ่งอาจเกิดขึ้นระหว่างการจาลองดีเอ็นเอเมื่อเชื้อมาลาเรียมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ที่พบภายในเซลล์ตับ เซลล์เม็ดเลือดแดงหรือโอโอซิสต์ การแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมเป็นปัจจัยหลักที่ก่อให้เกิดความหลากหลายของเชื้อมาลาเรียตามธรรมชาติ ซึ่งพบได้บ่อยในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคมาลาเรียสูง เช่น ประเทศต่างๆ ตอนกลางทวีปแอฟริกาและในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้[12] ความหลากหลายทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นจะแสดงออกมาเป็นฟีโนไทป์ต่างๆ ของเชื้อมาลาเรีย เช่น การดื้อต่อยารักษาโรคมาลาเรีย (drug resistant phenotype) เป็นต้น ดังนั้นในการทดลองในห้องปฏิบัติการจึงจำเป็นต้องทำการโคลน (clone) เชื้อพลาสโมเดียม ให้เป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์ ซึ่งเชื้อที่ทำการโคลนเรียบร้อยแล้ว จะมีความไวต่อยาในหลอดทดลองและ พันธุกรรมที่คงที่ เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมในการทดลองต่างๆ

สถานการณ์มาลาเรียในประเทศไทย

มาลาเรียเป็นโรคติดต่อที่สำคัญชนิดหนึ่งในประเทศไทย โดยพบว่ามีการระบาดและการติดเชื้อบริเวณตามแนวชายแดนระหว่างประเทศไทย และประเทศเพื่อนบ้าน อันได้แก่ ไทย-กัมพูชา ไทย-พม่า ไทย-ลาว และไทย-มาเลเซีย[13] (ภาพที่ 1) โดยพบจำนวนการติดเชื้อมาลาเรีย (ยืนยันผลจากห้องปฏิบัติการ) 33,408 ครั้ง ชนิดของเชื้อพลาสโมเดียม ที่พบส่วนใหญ่เป็นชนิดฟัลซิพารัม และ ไวแวกซ์[14]



ภาพที่ 1 สถานการณ์มาลาเรียในประเทศไทย[13]

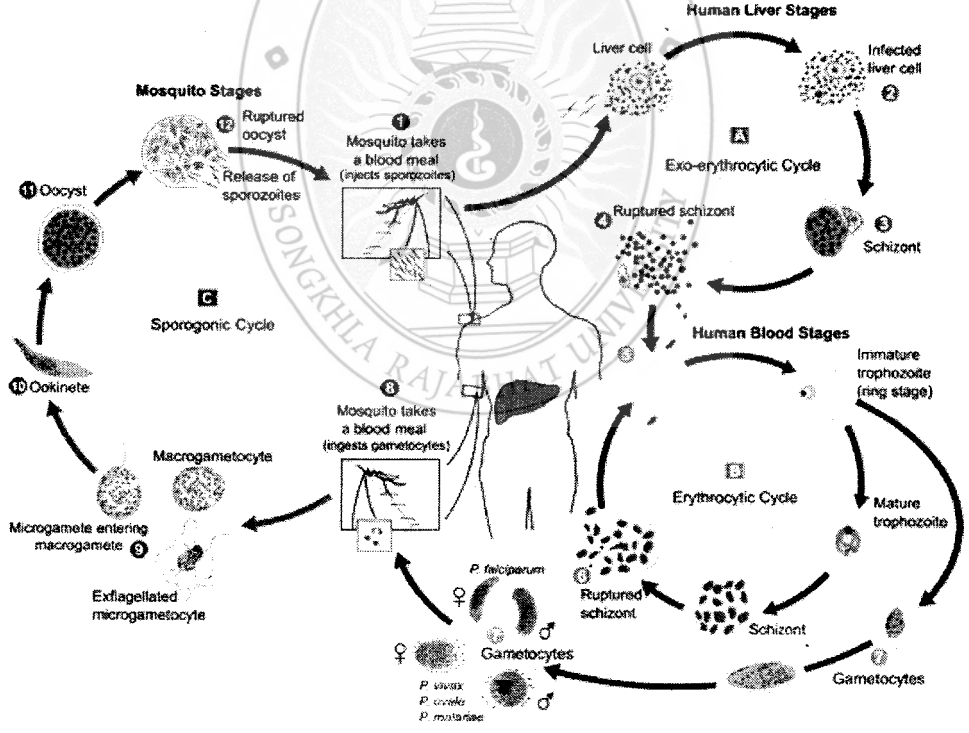
สถานการณ์การดื้อยาในประเทศไทย

การดื้อยาสำหรับรักษาโรคมาลาเรียในประเทศไทยเริ่มพบการดื้อยา chloroquine เป็นชนิดแรกในปี 1962[15] หลังจากนั้นจึงมีการใช้ยาในการรักษาร่วมกัน ระหว่าง pyrimethamine และ sulfadoxine (SP) ซึ่งถูกนำมาใช้ในประเทศไทยในปี 1973[16] ประสิทธิภาพการรักษาของยา pyrimethamine และ sulfadoxine สามารถฆ่าเชื้อ Plasmodium ได้หมด แต่พบอัตราการกำจัดเชื้อ Plasmodium เริ่มลดลงในบางพื้นที่ จนในที่สุดก็พบว่าผลการรักษาด้วยยา pyrimethamine และ sulfadoxine ไม่ได้ผลในบางพื้นที่ และพบว่าเชื้อ Plasmodium มีการดื้อต่อยา pyrimethamine และ sulfadoxine[16-17] จากสาเหตุดังกล่าว ในปี 1985 จึงมีการนำยา mefloquine sulfadoxine และ pyrimethamine (MSP) มาใช้ร่วมกัน ในปี 2002 หลังจากใช้ยา MSP ในการรักษามาลาเรีย พบว่าประสิทธิผลของการใช้ยา mefloquine ชนิดเดียวต่ำลงมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ จึงมีการนำยาหลังจากนั้นในปี 2003 เชื้อ พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัมมีการดื้อต่อยา mefloquine ในพื้นที่บางส่วน

ของเขตชายแดน โดยเฉพาะบริเวณจังหวัดตาก ระนอง และกาญจนบุรี ซึ่งเป็นชายแดนระหว่างประเทศไทย และประเทศพม่า รวมถึงจังหวัดตราดและจันทบุรี ซึ่งเป็นชายแดนระหว่างประเทศไทยและกัมพูชา[18] กระทรวงสาธารณสุขจึงมีการปรับเปลี่ยนยาที่ใช้ในการรักษาโรคมาลาเรียเป็นการใช้ยารักษาร่วมกัน 2 ชนิด ได้แก่ mefloquine และ artesunate แทนการใช้ยาตัวเดิม และในปี 2009 พบว่าประสิทธิภาพของยา mefloquine และ artesunate ในการรักษาโรคมาลาเรียเริ่มลดลงเหลือน้อยกว่า 79 เปอร์เซ็นต์ในจังหวัดตราด[19-21] และพบการลดลงของประสิทธิภาพยา mefloquine และ artesunate มากขึ้นในบริเวณชายแดนในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ[19] ดังนั้นเพื่อให้ประสิทธิภาพของยาไม่ลดลงไปมากกว่าเดิม จึงได้มีการนำยา malarone มาใช้ในบริเวณดังกล่าว ซึ่งยา malarone เป็นส่วนผสมของยา 2 ชนิด อันได้แก่ ยา โปรกัวนิลและอะโตวาโคน โดยจะทำไปใช้สำหรับป้องกันและรักษาเชื้อ พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม ที่มีการดื้อต่อยา

วงจรชีวิตของเชื้อพลาสโมเดียม[22-25]

วงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรียทั้งห้าชนิดเหมือนกัน โดยประกอบด้วย (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 วงจรชีวิตของเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคมาลาเรีย

ที่มา The Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2560[26]

ระยะไม่ใช้เพศ (asexual phase) หรือ schizogony ซึ่งเกิดขึ้นในคน

ในส่วนที่เกิดขึ้นในคนนั้นยังแบ่งเป็น 2 ระยะ

1. ระยะที่เกิดขึ้นในเซลล์ตับ (liver parenchymal cells) เรียกว่า exoerythrocytic schizogony หรือ tissue schizogony

2. ระยะที่เกิดขึ้นในเม็ดเลือดแดง เรียกว่า erythrocytic schizogony หรือ blood schizogony Asexual phase (Schizogony) ในคน

(1) Exoerythrocytic schizogony

เมื่อยุงก้นปล่องที่มีเชื้อมาลาเรียระยะติดต่อที่เรียกว่า sporozoites กัดดูดเลือดคน sporozoites จะเข้าสู่คนโดยปะปนมากับน้ำลายของยุงเข้าสู่กระแสเลือด และหลังจากนั้นประมาณครึ่งชั่วโมง มันจะเข้าไปอยู่ในเซลล์ตับและมีการเจริญเติบโต แบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้นมากมาย เรียกระยะนี้ว่า schizont ต่อมาประมาณ 8-15 วัน schizont จะแก่และมี merozoites อยู่มากมาย schizont ที่แตกจะปล่อย merozoites เข้าสู่กระแสเลือดเจริญเติบโตต่อไปในเม็ดเลือดแดงใน พลาสโมเดียม ไวแวกซ์ และ พลาสโมเดียม โอวัลเล่ sporozoites บางตัวจะเจริญอย่างช้า ๆ เรียกว่า hypnozoites ใช้เวลานานหลายเดือนกว่าจะได้ merozoites เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดอาการไข้กลับ (relapses)

(2) Erythrocytic schizogony

เมื่อ merozoites เข้าไปในเม็ดเลือดแดงจะเจริญเติบโตและแบ่งตัวต่อไป สามารถเห็นได้จากการย้อมสี เช่น Giemsa และ Wright เป็นต้น

การเจริญของเชื้อในเม็ดเลือดแดง

1.ระยะ trophozoite เป็นระยะที่กำลังเจริญเติบโต มีนิวเคลียสเดียว มี 2 ระยะ

1.1 early trophozoite เป็นระยะที่ merozoite เพิ่งเข้าไปได้ใหม่ ๆ เห็นเป็นรูปร่างคล้ายวงแหวนมี chromatin (nucleus) ติดสีแดงเป็นจุด ไซโตพลาสมติดสีฟ้าหรือน้ำเงิน จึงมักเรียกระยะนี้ว่า "ring form"

1.2 growing trophozoite เป็นระยะที่ต่อจาก ring form โดยไซโตพลาสมและนิวเคลียสจะขยายใหญ่ขึ้น มีรูปร่างแตกต่างกันแล้วแต่ชนิด คือ พลาสโมเดียม ไวแวกซ์ มีไซโตพลาสมยืดขยายออกไปมาก คล้ายตัวอมีบา จึงมักเรียกว่า amoeboid form ส่วน พลาสโมเดียม โอวัลเล่ ไซโตพลาสมมีการยืดขยายตัวออกไปไม่มากเท่า พลาสโมเดียม ไวแวกซ์ สำหรับ พลาสโมเดียม มาลาเรียอี มีไซโตพลาสมได้ 3 แบบคือ ไซโตพลาสมยืดขยายไม่มากคล้ายของ พลาสโมเดียม โอวัลเล่ มีรูปร่าง

ไม่แน่นอน ไซโตพลาสมเป็นแถบยาว มักเรียกว่า band form ไซโตพลาสมเป็นวงโค้ง มักเรียกว่า compact form และ *พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม*มีการขยายของไซโตพลาสมแบบค่อนข้างกลม

ในระยะ growing trophozoite นี้ เม็ดเลือดแดงที่เชื้ออาศัยอยู่จะเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงโดยมีจุด (stippling) สีชมพูขึ้นโดยทั่วไปมีชื่อเรียกดังนี้

ใน พลาสโมเดียม ไวแวกซ์และ พลาสโมเดียม โอวัลเล่เรียกว่า Schuffner's dots

ใน พลาสโมเดียม มาเรียอี เรียกว่า Ziemann's dots

ใน พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม เรียกว่า Maurer's dots

ในฟิล์มเลือดย้อมสีนั้น Schuffner's dots จะเห็นได้ง่ายและเด่นชัดกว่าอย่างอื่น Ziemann's dots มักจะมองไม่เห็นจากการย้อมสีตามปกติ ส่วน Maurer's dots มักเริ่มเห็นในระยะ growing trophozoite นอกจากนี้ในไซโตพลาสมของเชื้อมาลาเรียจะเริ่มมีเม็ดสีน้ำตาลหรือดำ ซึ่งเกิดจากการที่เชื้อมาลาเรียกินฮีโมโกลบินแล้วเปลี่ยนเป็น hemozoin เรียกเม็ดสีเหล่านี้ว่า malarial pigment

2. ระยะ schizont เป็นระยะที่เชื้อมีการแบ่งนิวเคลียสแล้ว เริ่มจากมี 2 ก้อนขึ้นไป นิวเคลียสจะแบ่งตัวไปเรื่อยๆ แต่ยังไม่มีการแบ่งไซโตพลาสม เรียกระยะนี้ว่า immature schizont ต่อเมื่อมีการแบ่งนิวเคลียสครบแล้ว ไซโตพลาสมจึงแยกไปรวมกับนิวเคลียสแต่ละอันกลายเป็น merozoites อยู่ในเม็ดเลือดแดง เรียกระยะนี้ว่า mature schizont จำนวน merozoites มีมากน้อยแตกต่างกันแล้วแต่ชนิด

<u>จำนวน merozoites</u>	
พลาสโมเดียม ไวแวกซ์	12-24 (ส่วนใหญ่ 16)
พลาสโมเดียม โอวัลเล่	4-12 (ส่วนใหญ่ 8)
พลาสโมเดียม มาเรียอี	6-12 (ส่วนใหญ่ 8)
พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม	12-30

ผนังเม็ดเลือดแดงที่มี mature schizont แก่เต็มที่จะแตกและปล่อย merozoites ออกมาเข้าสู่เม็ดเลือดแดงใหม่เป็นการเริ่มวงจร erythrocytic schizogony ซ้ำอีก ระยะเวลาตั้งแต่ merozoites เข้าไปในเม็ดเลือดแดงแล้วเจริญจนได้ merozoites ใหม่ ใช้เวลาประมาณ 48 ชั่วโมง ใน พลาสโมเดียม ไวแวกซ์ พลาสโมเดียม โอวัลเล่ และ พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม ส่วน พลาสโมเดียม มาเรียอีใช้เวลาประมาณ 72 ชั่วโมง ซึ่งระยะเวลาดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับการเกิดอาการไข้มาลาเรีย merozoites ที่เกิดจาก erythrocytic schizogony บางตัว หลังจากที่เข้าสู่เม็ดเลือดแดงแล้ว แทนที่จะเจริญต่อไปแบบ schizogony กลับเจริญไปเป็นแบบ gametocytogony ได้เซลล์เพศ หรือ gametocyte ซึ่งมี 2

ประเภทคือเซลล์เพศผู้ (male gametocyte or microgametocyte) และเซลล์เพศเมีย (female gametocyte or macrogametocyte) เซลล์เพศจะปรากฏให้เห็นหลังจากที่คนไข้มีอาการแล้ว ประมาณ 4 วัน ใน พลาสโมเดียม ไวแวกซ์และ 8 วัน ใน พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม ลักษณะรูปร่างของเซลล์เพศ พลาสโมเดียม ไวแวกซ์, พลาสโมเดียม โอวัลเล่และ พลาสโมเดียม มาเรียอีจะกลมส่วนของ พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัมเมื่อแก่เต็มที่จะมีรูปร่างคล้ายกล้วยหอมหรือพระจันทร์เสี้ยว

ระยะใช้เพศ (sexual phase) หรือ sporogony ซึ่งเกิดขึ้นในยุงก้นปล่อง (Anopheles)

เมื่อยุงกัดดูดเลือดคนที่มี gametocytes เข้าไปในกระเพาะ (midgut) ภายใน 5-30 นาที microgametocytes จะมีการแบ่งนิวเคลียสและไซโตพลาสซึม โดยวิธีที่เรียกว่า exflagellation ได้เซลล์คล้ายสเปิร์ม ประมาณ 6-8 ตัว แต่ละตัวเรียกว่า microgamete ส่วน macrogametocytes จะกลายเป็น macrogamete โดยมีรูปร่างไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก และไม่มีการแบ่งตัว หลังจากผสมพันธุ์กันแล้วได้เซลล์ zygote ต่อจากนั้น 12-24 ชั่วโมง จะกลายเป็น ookinete ซึ่งเคลื่อนไหวได้ช้า ๆ และไชผ่านเซลล์หรือช่องว่างระหว่างเซลล์บุผนังกระเพาะยุง เข้าไปอยู่ระหว่างผนังด้านนอกและด้านในของกระเพาะ เจริญต่อไปเป็นถุงที่เรียกว่า oocyst ซึ่งจะเริ่มเห็นได้ในวันที่ 3 และจะค่อยๆ โตขึ้น จนในที่สุดเกิดมีเซลล์รูปกระสวยเรียกว่า sporozoites อยู่ภายในหลายพันตัว oocyst เมื่อแก่เต็มที่ถุงจะแตกและปล่อย sporozoites เข้าสู่ haemocoel ในที่สุดจะเข้าไปอยู่ในต่อมน้ำลายของยุง พร้อมที่จะถ่ายทอดสู่คนต่อไป ระยะเวลาที่ยุงเริ่มรับ gametocytes จนกระทั่งมี sporozoites อยู่ในต่อมน้ำลาย กินเวลาประมาณ 2 สัปดาห์ ที่ 25°C แต่ถ้าอุณหภูมิเย็นลง วงจรชีวิต sporogony จะยืดยาวออกไป ถ้าต่ำกว่า 20°C จะไม่เกิด sporogony ใน *พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม*และถ้าต่ำกว่า 16°C จะไม่เกิด sporogony ในมาลาเรียทุกชนิด

Course of infection

ระยะเวลาตั้งแต่คนได้รับเชื้อมาลาเรียระยะ sporozoites จากยุงก้นปล่อง ไปจนถึงการเริ่มมีเชื้อปรากฏในกระแสเลือด เรียกว่า prepatent period ซึ่งจะสั้นกว่าระยะ incubation period หรือระยะเวลาที่ได้รับเชื้อจนเริ่มมีอาการ ช่วงระยะเวลาทั้งสองของเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิดเป็นดังนี้ prepatent period (days) incubation period (days) พลาสโมเดียม ไวแวกซ์ 11-13 (12-17) หรืออาจจะเป็นพลาสโมเดียม โอวัลเล่ 10-14 (16-18) หรือมากกว่าพลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม 9-16 (9-14) พลาสโมเดียม มาลาเรียอี 15-16 (18-40) หรือมากกว่า นอกจากการติดเชื้อมาลาเรียโดยถูก

ยุงก้นปล่องกัดแล้ว คนยังสามารถติดเชื้อมาลาเรียได้จากเชื้อระยะที่อยู่ในเม็ดเลือด เช่น การเติมเลือด ในกรณีเช่นนี้ค่าทั้งสองจะสั้นลงขึ้นอยู่กับปริมาณเชื้อที่ได้รับ เชื้อมาลาเรียที่อยู่ในเลือดจะมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้นเรื่อย ๆ ส่วนใหญ่แล้ว พลาสโมเดียม ไวแวกซ์, พลาสโมเดียม มาลาเรียอี และ พลาสโมเดียม โอวัลเล่ มักก่อให้เกิดอาการที่ไม่รุนแรงนัก ส่วน พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม ประมาณ 50% ของผู้ป่วยจะเสียชีวิตถ้าไม่ได้รับการรักษา เนื่องจากเชื้อทำให้เกิดพยาธิสภาพรุนแรงมาก

อาการของโรคมาลาเรีย

คนที่เป็นไข้มาลาเรียระยะเริ่มแรกอาจมีอาการคล้ายกับคนเป็นไข้หวัด เช่น ปวดหัว คลื่นไส้ อย่างไรก็ตามการเป็นไข้มาลาเรียแตกต่างจากไข้ทั่ว ๆ ไป โดยมีรูปแบบเฉพาะที่เรียกว่า malaria paroxysm มี 3 ระยะตามลำดับคือ

1. ระยะหนาวสั่น (the cold stage) ผู้ป่วยจะรู้สึกหนาวสั่น อาจถึงกับฟันกระทบกัน อาจมีปวดศีรษะ คลื่นไส้อาเจียน ระยะนี้กินเวลาประมาณ 5-60 นาที

2. ระยะมีไข้ (the hot stage) ผู้ป่วยเริ่มรู้สึกร้อน ทิ้งผ้าห่ม หน้าตาแดง ผิวหนังแห้ง ชีพจรเร็วและแรง หายใจเร็ว ปวดศีรษะรุนแรงขึ้น คอแห้ง คลื่นไส้ บางทีอาเจียน อุณหภูมิสูงถึง 105 *F ระยะนี้กินเวลาประมาณ 2-6 ชั่วโมง

3. ระยะเหงื่อออก (the sweating stage) ไข้ลดลง มีเหงื่อออกจนเปียกชุ่ม ผู้ป่วยรู้สึกสบายขึ้นและอ่อนเพลียมาก ระยะนี้กินเวลาประมาณ 2-4 ชั่วโมง

หลังพ้นระยะเหงื่อออกแล้ว ผู้ป่วยจะกลับหายเป็นปกติเหมือนไม่มีอะไรเกิดขึ้น สามารถทำงานได้ตามเดิม ซึ่งระยะที่ไม่มีไข้นี้เป็นระยะที่เชื้อในเม็ดเลือดแดงกำลังเจริญเติบโตในระยะ trophozoite ไปจนถึงระยะก่อนที่ mature schizont จะแตก และเมื่อมีการแตกของเม็ดเลือด ผู้ป่วยจะเริ่มมีอาการในระยะหนาวสั่นใหม่ เป็นวงจรอยู่อย่างนี้เรื่อยๆ พลาสโมเดียม ไวแวกซ์ และ พลาสโมเดียม โอวัลเล่ มักทำให้เกิดไข้ทุกๆ 2 วัน พลาสโมเดียม มาลาเรียอี เกิดทุกๆ 3 วัน ส่วน พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม อาจเกิดทุกวันหรือทุก 2 วัน อย่างไรก็ตามในระยะแรกๆ ของการติดเชื้อ เวลาที่เกิดมีไข้มักไม่แน่นอน เนื่องจากมีเชื้อที่ออกมาจากตับเข้าสู่กระแสเลือดอยู่เรื่อย ๆ ต่อมาเมื่อมีการสร้างภูมิคุ้มกันขึ้น อาการของไข้มาลาเรียจะค่อยๆ ลดลง และหายไปเองได้ ผู้ป่วยที่เป็นโรคนี้เรื้อรัง มักมีภาวะโลหิตจาง ม้ามโตหรือบางทีตับโตด้วย เชื้อมาลาเรียอาจทำให้เกิดอาการรุนแรงถึงเสียชีวิตได้ ซึ่งส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อ พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อชนิดนี้ ในระยะ growing

trophozoite ไปจนถึงระยะ mature schizont และ young gametocyte ทำให้ผนังเม็ดเลือดแดงที่มันอาศัยอยู่ มีการเปลี่ยนแปลงเป็นปุ่มเล็ก ๆ ซึ่งปุ่มนี้สามารถยึดติดกับผนังหลอดเลือดเล็กๆ จนเกิดการอุดตัน ทำให้เนื้อเยื่อหรืออวัยวะนั้นขาดออกซิเจน อีกประการหนึ่ง การจับกลุ่มของเชื้อที่ติดตามผนังหลอดเลือดนั้น เมื่อมีการทำลายเชื้อด้วยระบบภูมิคุ้มกัน ทำให้มีการทำลายผนังหลอดเลือดด้วย จึงเกิดมีเลือดออกตามอวัยวะต่างๆ

อาการของไข้มาลาเรียชนิดรุนแรงอาจแบ่งได้เป็น

1. อาการทางระบบประสาท ที่สำคัญคือ มาลาเรียขึ้นสมอง (cerebral malaria) ซึ่งจะมีอาการปวดศีรษะอย่างรุนแรง คลื่นไส้อาเจียนและอาจมีอาการเพ้อคลั่ง ชัก หรือหมดสติและอาจเสียชีวิต

2. มาลาเรียทางเดินอาหาร บางทีเรียกว่า Algid malaria ซึ่งมีอาการตัวเย็น ท้องเดิน เป็นตะคริว หรืออาจมีอาการช็อคด้วย

3. มาลาเรียของอวัยวะอื่นๆ เช่น ปอดอักเสบ กล้ามเนื้อหัวใจอักเสบและไตอักเสบ เป็นต้น

ไข้กลับ (Relapse)

หมายถึงการกลับเป็นไข้มาลาเรียขึ้นมาอีก หลังจากได้หายไปโดยไม่มีอาการแล้ว ทั้งๆ ที่ไม่ได้รับเชื้อเข้าสู่ร่างกายใหม่เลย แบ่งได้เป็น 2 ประเภทคือ

1. Recrudescence หรือ short term relapse เป็นไข้กลับที่เกิดจากเชื้อมาลาเรียที่ยังคงมีอยู่ในกระแสเลือด แต่มีจำนวนน้อยมากจนตรวจไม่พบในฟิล์มเลือด และไม่มีอาการ ทั้งนี้เนื่องมาจากการสร้างภูมิคุ้มกันของร่างกายทำให้เชื้อมีปริมาณลดลง ต่อมาเมื่อภูมิต้านทานลดลงเชื้อก็กลับเจริญขึ้นในระยะเวลาสั้นไม่กี่สัปดาห์ หรือเกิดจากได้รับยารักษาแต่ไม่สามารถรักษาให้หายขาด เนื่องจากเชื้อดื้อยาหรือได้รับยาไม่ครบ

2. Recurrent หรือ True relapse หรือ long term relapse เป็นไข้กลับที่เกิดจากเชื้อที่ยังคงมีอยู่ในตับ หรือ hypnozoite โดยใช้เวลานานเป็นเดือน ๆ กว่าจะมีไข้อีก

ไข้กลับแบบแรกนั้น สามารถเกิดได้กับเชื้อมาลาเรียทั้ง 4 ชนิด ส่วนไข้กลับแบบหลังจะเกิดขึ้นเฉพาะกับ พลาสโมเดียม ไวแวกซ์และ พลาสโมเดียม โอวัลเล่

ไข้น้ำดำ (black water fever)

เป็นอาการของคนที่ได้รับเชื้อ พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม ซ้ำหลายๆ ครั้งและได้รับการรักษาด้วยควินินไม่พอเพียง ต่อมาเมื่อได้รับการรักษาด้วยควินินอีกครั้ง ทำให้เกิดอาการแตกทำลายของเม็ดเลือดแดง ซึ่งเป็นปฏิกิริยาภูมิแพ้ (autoimmune reaction) ทำให้ปัสสาวะมีสีดำ ปัจจุบันอาการของโรคนี้ไม่พบบ่อยนัก

การรักษา (chemotherapy)

การใช้ยาต่อต้านมาลาเรีย (antimalarial drugs) มีวัตถุประสงค์คือ

1. ใช้ป้องกัน (prophylactic use) เช่น ก่อนเข้าไปอยู่ในท้องที่ที่มีมาลาเรียชุกชุม โดยนำยาที่ใช้รักษามาลาเรียมากินอย่างต่อเนื่องแต่ปริมาณจะต่ำกว่าที่ใช้รักษาให้หายขาด เช่น Mefloquine, Chloroquine, Pyrimethamine, Proguanil และ Doxycycline โดยยาจะออกฤทธิ์อย่างช้าๆ ทำลายระยะ tissue schizont ที่อยู่ในตับ หรือที่ออกมาในกระแสเลือด ขึ้นอยู่กับชนิดของยา อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันหลายประเทศรวมทั้งประเทศไทยเกิดปัญหาเชื้อ พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัมดื้อต่อยาหลายชนิดทำให้ไม่ได้ผลเท่าที่ควร และไม่แนะนำให้ใช้

2. ใช้รักษา (therapeutic use) เพื่อทำลายเชื้อระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดง ยาที่ใช้เรียกว่า blood schizontocides ชนิดของยาที่ใช้ขึ้นอยู่กับชนิดของมาลาเรียและประเทศ สำหรับประเทศไทยปัจจุบันยาที่ใช้รักษา พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัมโดยทั่วไป คือ Mefloquine ในรายที่เป็นมาลาเรียขึ้นสมองมักใช้ Quinine (ทางสายเลือด) ควบคู่ไปกับ tetracycline นอกจากนี้ยังเริ่มใช้ Artesunate และ Artemether สำหรับยาที่ใช้รักษา พลาสโมเดียม ไวแวกซ์ พลาสโมเดียม โอวัลเล่และ พลาสโมเดียม มาเรียอี คือ Chloroquine สำหรับการทำลายเชื้อระยะที่อยู่ในตับ ป้องกันการเกิดไข้กลับ ของ พลาสโมเดียม ไวแวกซ์และ พลาสโมเดียม โอวัลเล่ ยาที่ใช้ เรียกว่า tissue schizontocides ได้แก่ Primaquine

3. ใช้ป้องกันการแพร่เชื้อ (prevent transmission) ยาจะไปทำลายเชื้อระยะ gametocyte ของพลาสโมเดียม ฟัลซิพารัมในกระแสเลือด ได้แก่ Primaquine

การวิจัยโรคทางห้องปฏิบัติการ

วิธีดั้งเดิมและยังเป็นที่นิยมใช้กันโดยทั่วไปอยู่ในขณะนี้คือ การตรวจหาเชื้อจากฟิล์มเลือดย้อมสีทั้งจากฟิล์มหนาและฟิล์มบาง ย้อมด้วยสีจิมซา นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาวิธีการใหม่ๆ มาช่วย

ในการวินิจฉัยโดยเฉพาะในการศึกษาวิจัยด้านวิทยาการระบาด เช่น การตรวจทาง serology การตรวจค้นหา DNA (DNA probe) และการใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป เป็นต้น

ลักษณะของเชื้อมาลาเรียในฟิล์มบาง

พลาสโมเดียม ไวแวกซ์

- เม็ดเลือดแดงที่มีเชื้ออยู่ส่วนมากมีขนาดใหญ่กว่าเม็ดเลือดแดงปกติ
- มี Schuffner dots ทุกระยะ ยกเว้นในระยะ ring form
- มักพบระยะ amoeboid form แทบทุกราย
- ในระยะ mature schizont มี merozoites 12-24 ตัว

พลาสโมเดียม โอวัลเล่

ลักษณะโดยทั่วไปคล้ายกับ พลาสโมเดียม ไวแวกซ์แต่ต่างกันที่

- ในระยะ mature schizont มี merozoites 6-12 (8) ตัว
- ระยะ amoeboid form ไม่มีการยืดของไซโตพลาสมมากนัก
- ผนังเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อมักแตกเป็นแฉกๆ
- รูปร่างของเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้ออยู่ส่วนใหญ่จะรี

พลาสโมเดียม มาลาเรียอี

- เม็ดเลือดแดงที่มีเชื้ออยู่มักมีขนาดเล็กหรือเท่ากับปกติ
- ไม่เห็น stippling บนผนังเม็ดเลือดแดง
- ไซโตพลาสมไม่เป็นแบบ amoeboid form อาจพบ compact หรือ band form
- ในระยะ mature schizont มี merozoites 6-12(8) ตัว

พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม

- เม็ดเลือดแดงที่มีเชื้ออยู่มักมีขนาดปกติ

- ในผู้ป่วยส่วนใหญ่จะพบเฉพาะระยะ ring form และ/หรือ gametocyte ที่มีรูปร่างคล้ายกล้วยหอม ยกเว้นในรายที่มีเชื้อจำนวนมาก ๆ หรือในบางสภาวะ เช่น มาลาเรียขึ้นสมอง อาจพบระยะ growing trophozoite, และ young gametocyte ร่วมด้วย

ลักษณะของเชื้อมาลาเรียในฟิล์มหนา

ใช้หลักการเดียวกับการตรวจฟิล์มบาง แต่จะดูลำบากขึ้นเนื่องจากไม่เห็นขอบเขตเม็ดเลือดแดง ขนาดของเชื้อจะดูเล็กกว่าในฟิล์มบางและรูปร่างของเชื้ออาจผิดเพี้ยนไปบ้าง ต้องใช้ประสบการณ์ในการวินิจฉัยอย่างมาก

ข้อสังเกตในการดูลักษณะของเชื้อมาลาเรียในฟิล์ม

1. การใช้ฟิล์มหนาไม่สามารถแยกเชื้อชนิด พลาสโมเดียม ไวแวกซ์กับ พลาสโมเดียม โอวัลเล่ได้เด็ดขาด แต่โดยทั่วไปในทางปฏิบัติเนื่องจากใช้ฟิล์มหนากันมากและอุบัติการณ์ของพลาสโมเดียม โอวัลเล่ในประเทศไทยมีน้อยกว่า พลาสโมเดียม ไวแวกซ์ มาก จึงมักรายงานเป็นพลาสโมเดียม ไวแวกซ์เสมอ อีกประการหนึ่งการรักษาก็ใช้แบบเดียวกัน

2. ระยะต่าง ๆ และจำนวนของเชื้อมาลาเรีย ในผู้ป่วยแต่ละรายมักมีไม่เหมือนกันและไม่จำเป็นต้องพบทุกระยะของเชื้อ

3. คนอาจติดเชื้อมาลาเรียได้มากกว่าหนึ่งชนิด (mix infection) ที่พบบ่อยคือ พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัมกับ พลาสโมเดียม ไวแวกซ์การตรวจจึงควรคำนึงถึงข้อนี้ด้วย

4. ในระยะ ring form บางครั้งอาจเห็นตัวเชื้อติดอยู่ที่ผิวของเม็ดเลือดแดง (Accole form) หรือมี chromatin 2 อัน (double chromatin) หรือมีตัวเชื้อหลายตัวอยู่ในเม็ดเลือดแดง (double or multiple infection) โดยเฉพาะใน พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม

5. ความผิดพลาดจากการย้อมสี เช่น สีจางหรือเข้มเกินไป หรือฟิล์มเลือดไม่ดี มักทำให้การวินิจฉัยมีปัญหาได้บ่อยๆ

6. ก่อนที่จะรายงานว่าไม่พบเชื้อ ต้องใช้เวลาตรวจอย่างน้อย 5 นาที สำหรับฟิล์มหนา และ 15 นาที สำหรับฟิล์มบาง

7. คนไข้ที่ได้รับยารักษามาลาเรียมาบ้างแล้ว อาจทำให้รูปร่างของเชื้อมาลาเรียผิดปกติ

8. ถ้ามีความสงสัยในการวินิจฉัยให้เจาะเลือดซ้ำทุก 6 ชม. และปรึกษาผู้รู้

กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอน

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน เป็นกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้ลำอนุภาคอิเล็กตรอนพลังงานสูงในการตรวจสอบวัตถุแทนแสงธรรมดา เนื่องจากความยาวคลื่นของลำอนุภาคอิเล็กตรอนนั้นสั้นกว่าความยาวคลื่นแสงถึง 100,000 เท่า ทำให้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนสามารถให้ประสิทธิภาพ

ของกำลังขยาย และการแจกแจงรายละเอียดได้เหนือกว่ากล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง โดยสามารถแยกรายละเอียดของวัตถุที่เล็กขนาด 10 อังสตรอม หรือ 0.1 นาโนเมตร (กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงจะแจกแจงรายละเอียดได้ประมาณ 0.2 ไมโครเมตร) จึงทำให้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนมีกำลังขยายสูงมากถึง 500,000 เท่า และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนมี 2 ชนิด ได้แก่ transmission electron microscope (TEM) และ scanning electron microscope (SEM) ซึ่งจากงานวิจัยเกี่ยวกับการศึกษาโครงสร้าง สัณฐานวิทยา และองค์ประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ของเชื้อ พลาสโมเดียมที่ผ่านมา เช่น การศึกษา haem iron ของ พลาสโมเดียม[27] การศึกษา crystalloid และ microtubule ในเชื้อ พลาสโมเดียม เบอกีอาย[28] การศึกษา Mitosis ของเชื้อ พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม[29] และการศึกษาลักษณะของ liposomes ของเชื้อ พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม[30] นิยมใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน transmission electron microscope (TEM) ในการศึกษา เนื่องจากกล้องอิเล็กตรอนชนิดนี้เป็นกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่ใช้ศึกษาตัวอย่างชนิดบาง ซึ่งเตรียมขึ้นโดยวิธีพิเศษเพื่อให้ลำอนุภาคอิเล็กตรอนผ่านทะลุได้ การสร้างภาพจากกล้องประเภทนี้จะทำได้โดยการตรวจวัดอิเล็กตรอนที่ทะลุผ่านตัวอย่าง จึงเหมาะสำหรับศึกษารายละเอียดขององค์ประกอบภายในของเชื้อ plasmodium เช่น องค์ประกอบภายในเซลล์ ลักษณะของเยื่อหุ้มเซลล์ ผนังเซลล์ เป็นต้น ซึ่งจะให้รายละเอียดสูงกว่ากล้องจุลทรรศน์ชนิดอื่นๆ เนื่องจากมีกำลังขยายและประสิทธิภาพในการแจกแจงรายละเอียดสูงมาก (กำลังขยายสูงสุด 0.1นาโนเมตร)[31]

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

บทที่ 3

การทดลอง

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้

สารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI – 1640
2. ไนโตรเจนเหลว
3. ซีรัม
4. โซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$)
5. น้ำกลั่น (Sterile ddH_2O)
6. Hepes (sigma)
7. Sodium chloride
8. สีจิมซา (Giemsa)
9. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)
10. โพแทสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)
11. D-Sorbital
12. ยา atovaquone (sigma)
13. ยา proguanil hydrochloride (sigma)
14. ยา Gentamycin
15. เมทิลแอลกอฮอล์ (Absolute methyl alcohol)
16. โซเดียมคลอไร (NaCl)
17. เม็ดเลือดแดง (50% haematocrit)

อุปกรณ์

1. พาสเจอร์ปิเปต
2. หลอดเซนติฟิวล์ (centrifuge tube)
3. เครื่องเซนติฟิวล์

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

4. สไลด์ (Slide)
5. กล้องจุลทรรศน์ (light microscope)
6. เทียนไข
7. ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
8. โถดูดความชื้น (desiccator)
9. 96 micro well plate
10. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope)

วิธีการทดลอง

ตัวอย่างเชื้อมาลาเรีย

ใช้ตัวอย่างเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ ฟัลซิพารัมที่เป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์ (clone) 3 สายพันธุ์ (T9/94RC17, K1CB1 และ 3D7) ตัวอย่างเชื้อพลาสโมเดียม ถูกเก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลว จากห้องปฏิบัติการวิจัยมาลาเรีย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตัวอย่างเชื้อจากถังไนโตรเจนเหลว[31]

นำหลอดเก็บตัวอย่างเชื้อ พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม ออกมาจากถังไนโตรเจนเหลว บ่มในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 40-44 องศาเซลเซียล จนกระทั่งสารละลายในหลอดเก็บเชื้อละลาย ใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดสารละลายใส่ในหลอดเซนติฟิวล์ (centrifuge tube) ปั่นด้วยความเร็ว 1500 rpm เป็นเวลา 10 – 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดสารละลายชั้นบนทิ้ง และเติม sterile hypertonic saline (3.5% NaCl) ลงไปในหลอด ผสมสารละลายเบาๆ จนกระทั่งเซลล์เม็ดเลือดแดงละลาย ปั่นด้วยความเร็ว 1500 rpm เป็นเวลา 10 – 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดสารละลายชั้นบนทิ้ง ทำการล้างเซลล์ 2 – 3 ครั้ง ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 ซึ่งผสมซีรัม 10% จนกระทั่งไม่เกิดการแตกตัวของเม็ดเลือดแดง (haemolysis) หลังจากขั้นตอนนี้ทำสไลด์ชนิดหนา (thick blood films) ย้อมด้วยสีจิมซา และส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อเช็คลักษณะลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ Plasmodium เติมเม็ดเลือดแดง (50% haematocrit) 50 µl และ อาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 1.5 ml ซึ่งผสมซีรัม 15% นำไปเลี้ยงในห้องปฏิบัติการต่อไป

การเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย[31-32]

นำเชื้อมาลาเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ (T9/94RC17, K1CB1 และ 3D7) มาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ โดยวิธี candle – jar method นำเลือดมาปั่นที่ความเร็ว 1500 rpm เป็นเวลา 5 นาที ใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดอาหารเลี้ยงเชื้อด้านบนทิ้งไป เติมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซีรัม 10 % นำไปใส่ในเดสสิเคเตอร์ ปิดฝา เปิดช่องระบายอากาศไว้ แล้วจุดเทียนเพื่อให้บรรยากาศภายในมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ปริมาณ 5 -8 % นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียล ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุกๆ 24 ชั่วโมง และทำสไลด์เพื่อตรวจดูรูปร่างและนับจำนวนของเชื้อ โดยย้อมด้วยสารละลายสีจิมซา แล้วนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

การทดสอบยา Atovaquone และ Proguanil ในหลอดทดลอง[33-35]

เชื้อมาลาเรียในระยะ ring form มีจำนวนเชื้ออย่างน้อยตั้งแต่ 1% ทำการเจือจางเชื้อให้อยู่ในช่วง 0.3 – 0.5 % ด้วย uninfected red blood cell เติมยาที่เจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซีรัม (completed medium) ลงในหลุมของจานหลุมทดสอบยา 96 micro well plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร และเพิ่มหลุมที่ไม่มียา (มีเฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเซรั่มเท่านั้น) เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุม โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งในการทดลอง 1 ครั้ง เปลี่ยนยาทุก ๆ 24 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง โดยทดสอบกับยาอะโตวาโคน และยาโปรกัวนิล

การเตรียมตัวอย่างและนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศ์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope, TEM)

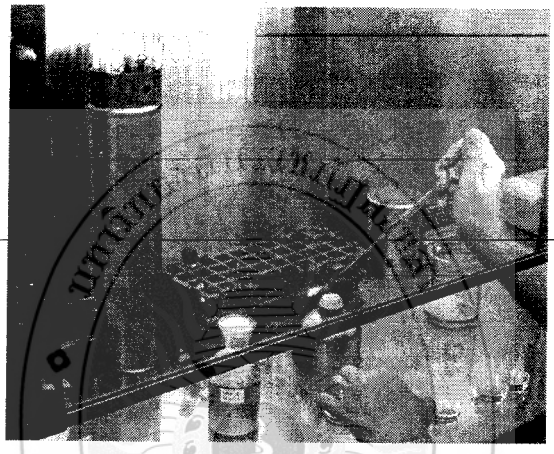
เลี้ยงเชื้อมาลาเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ (T9/94RC17, K1CB1 และ 3D7) และเพิ่มจำนวนเชื้อมาลาเรียจนได้ในช่วง 5 -10% นำเชื้อมาปั่นความเร็ว 1500 rpm เป็นเวลา 5 นาที ใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดอาหารเลี้ยงเชื้อด้านบนทิ้งไป และเติมน้ำยาเก็บรักษาเชื้อ หลังจากนั้นส่งต่อไปเตรียมตัวอย่างและวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านที่ศูนย์เครื่องมือกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

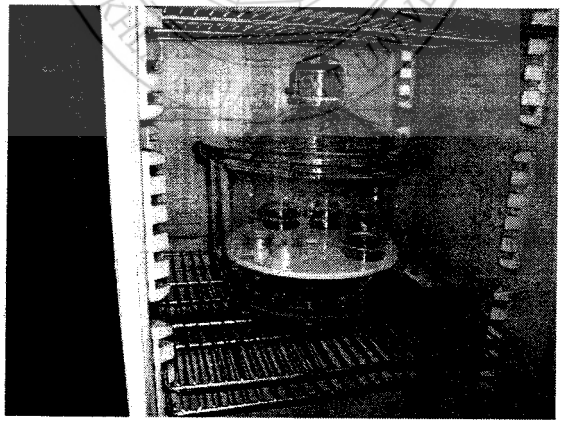
ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

การเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียในห้องปฏิบัติการ

เพาะเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ฟัลซิพารัม ที่เป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์ (clone) 3 สายพันธุ์ (T9/94RC17, K1CB1 และ 3D7) ตัวอย่างเชื้อ พลาสโมเดียมถูกเก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลว จากห้องปฏิบัติการวิจัยมาลาเรีย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และเพิ่มจำนวนจนได้จำนวนที่เหมาะสม สำหรับการทดลองต่อไป



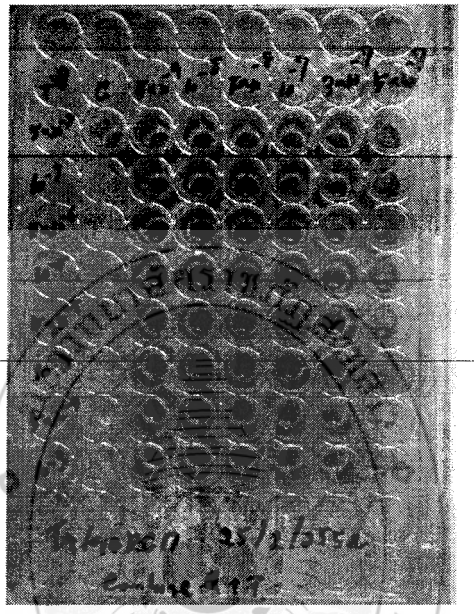
ภาพที่ 3 การเลี้ยงเชื้อและเพิ่มจำนวน พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม ในห้องปฏิบัติการ



ภาพที่ 4 การเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี candle – jar method

การทดสอบยา อะโตวาโคนและโปรกัวนิล ในหลอดทดลอง

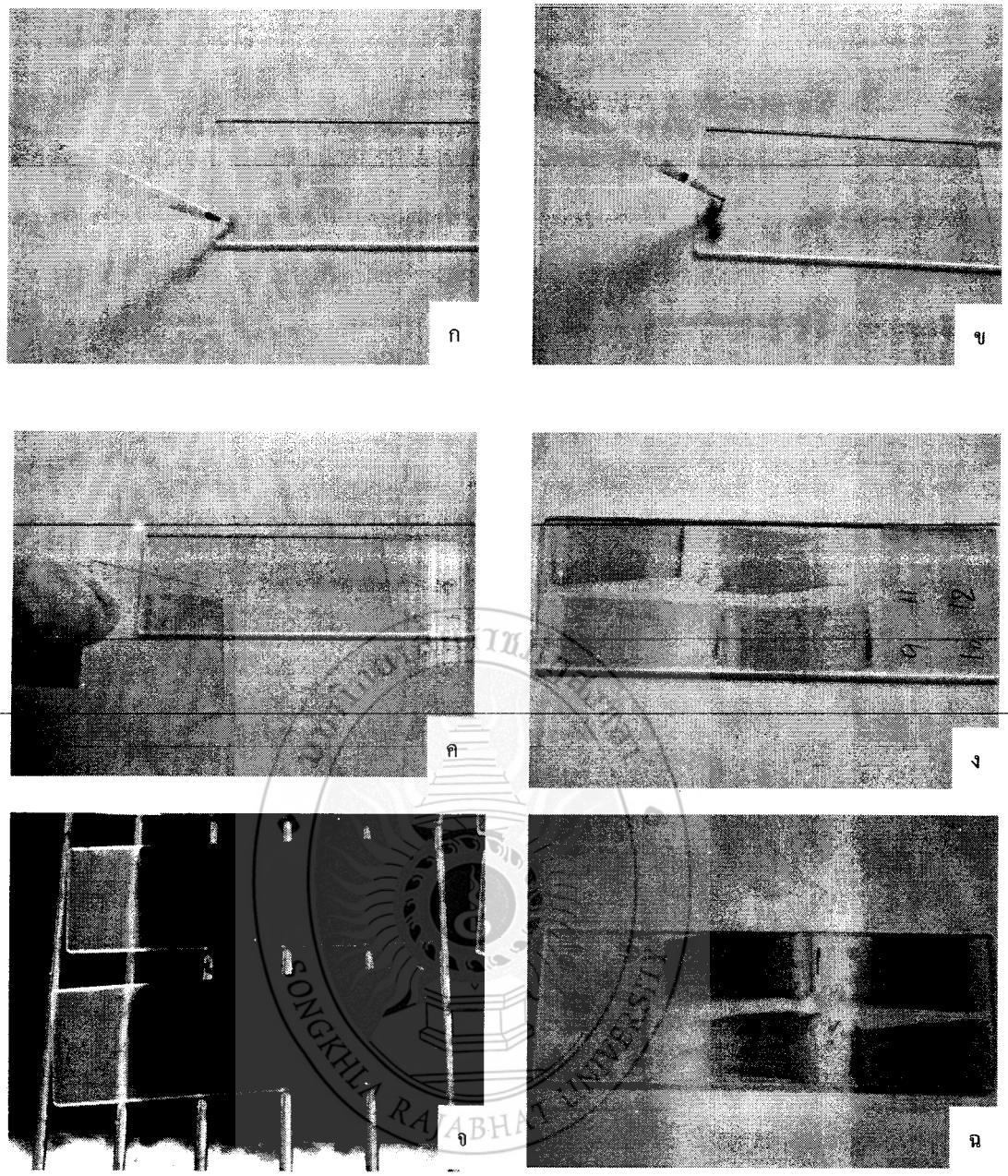
เชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ทั้ง 3 สายพันธุ์ได้แก่ T9/94RC17, K1CB1 และ 3D7 ในระยะ ring form (จำนวน 1 %) นำมาทดสอบยา อะโตวาโคนและโปรกัวนิล ในหลุมทดสอบยา 96 micro well plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร และเพิ่มหลุมที่ไม่มียา (มีเฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเซรั่มเท่านั้น) เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุม โดยทำการเปลี่ยนยาทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงทำการเก็บตัวอย่างของเชื้อที่อยู่ใน 96 micro well plate (ดังแสดงในภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 การทดสอบยาด้วยวิธี 96 micro well plate

หลังจากนั้นจึงนำเชื้อที่ระดับความเข้มข้นของยาในระดับต่างๆ มาทำสไลด์ทดลองและทำการย้อมสีจิมซาเพื่อตรวจสอบลักษณะของเชื้อเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 6) เมื่อตรวจดูลักษณะของเชื้อ พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม ทั้ง 3 สายพันธุ์เสร็จเรียบร้อยแล้ว จึงทำการเก็บตัวอย่างเพื่อนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ต่อไป

SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY



ภาพที่ 6 ลักษณะการเตรียมสไลด์และการย้อมสีจิมซา

ก - ข ขั้นตอนการนำตัวอย่างหยดบนสไลด์

ค ขั้นตอนการสไลด์ตัวอย่างเลือด

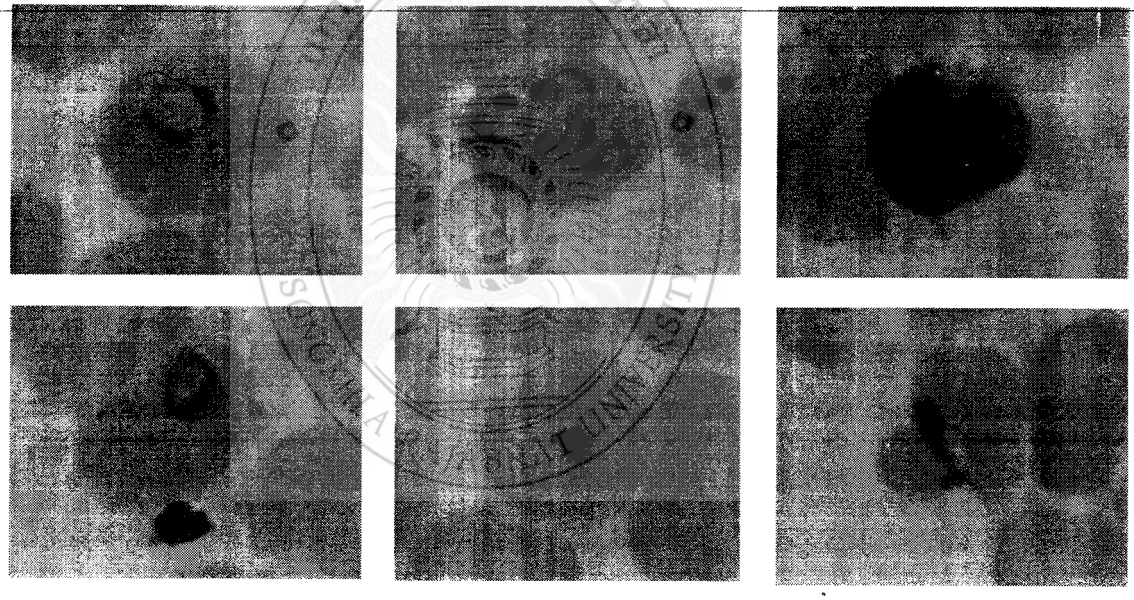
ง สไลด์ที่นำไปย้อมด้วย เมทิลแอลกอฮอล์

จ ขั้นตอนการย้อมด้วยสีจิมซา

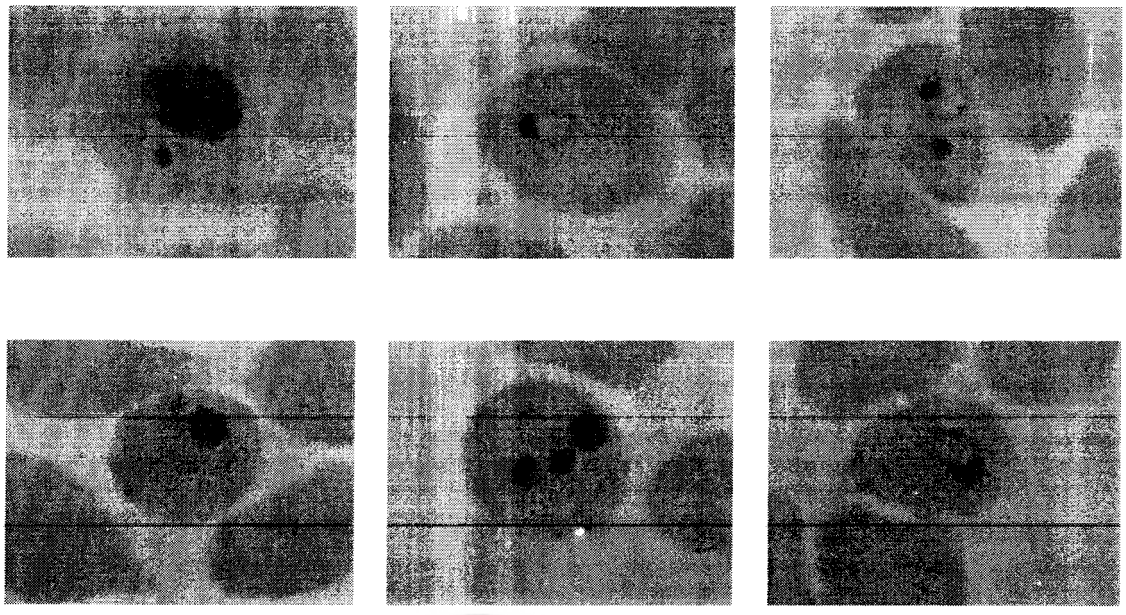
ฉ สไลด์ที่เสร็จสมบูรณ์

การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

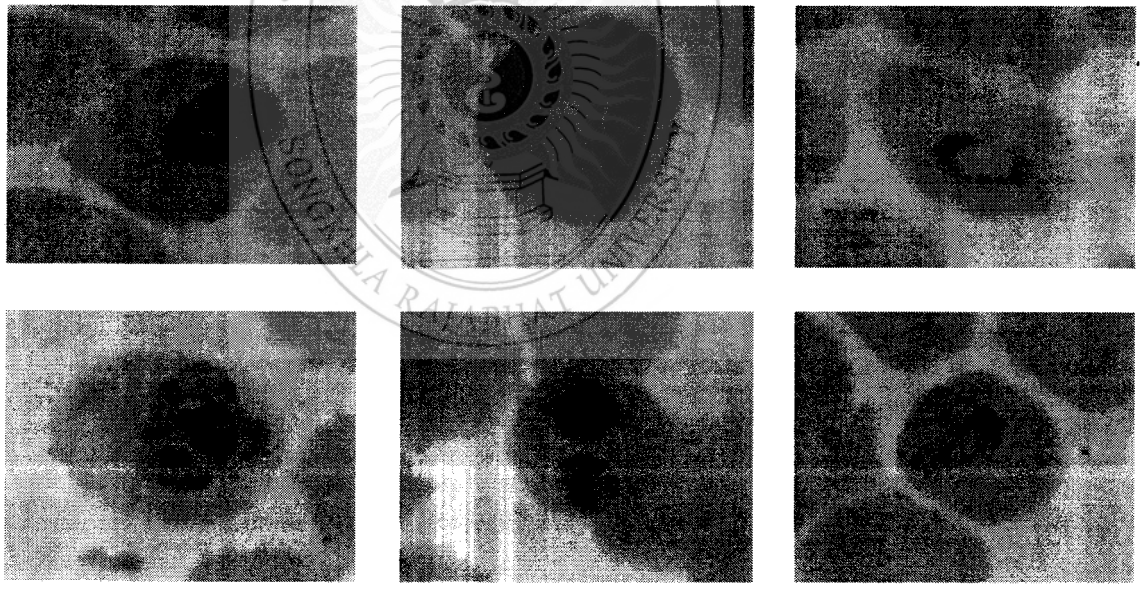
เชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ทั้ง 3 สายพันธุ์ได้แก่ T9/94RC17, K1CB1 และ 3D7 ภายหลังทดสอบกับยา อะโตวาโคนและโปรกัวนิล พบว่าลักษณะเชื้อ พลาสโมเดียม ทั้ง 3 สายพันธุ์ มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างที่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (ดังแสดงในภาพที่ 7-9) โดยพบว่าลักษณะของเชื้อ พลาสโมเดียม เมื่อทดสอบกับยา อะโตวาโคนและโปรกัวนิล เชื้อจะมีความผิดปกติ โดยความผิดปกติดังกล่าวจะค่อยๆ เปลี่ยนแปลงจากน้อย ไปสู่การเปลี่ยนแปลงในระดับมาก โดยพบว่าเชื้อจะเริ่มเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์ช้าลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้เมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของยาทั้งสองชนิด พบว่าการแบ่งเซลล์ของเชื้อพลาสโมเดียม เริ่มมีความผิดปกติให้เห็น โดยพบว่าออร์แกเนลล์ต่างๆ ภายในเซลล์เริ่มมีขนาดเล็กลง และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของยา อะโตวาโคนและโปรกัวนิล มากขึ้น พบว่าเชื้อ พลาสโมเดียม ทั้ง 3 สายพันธุ์ตายทั้งหมด ดังจะเห็นว่าเซลล์มีการห่อตัว มีขนาดเล็ก จนเป็นก้อนกลม



ภาพที่ 7 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อพลาสโมเดียม สายพันธุ์ T9/94RC17 ภายหลังทดสอบด้วยยา อะโตวาโคนและโปรกัวนิล



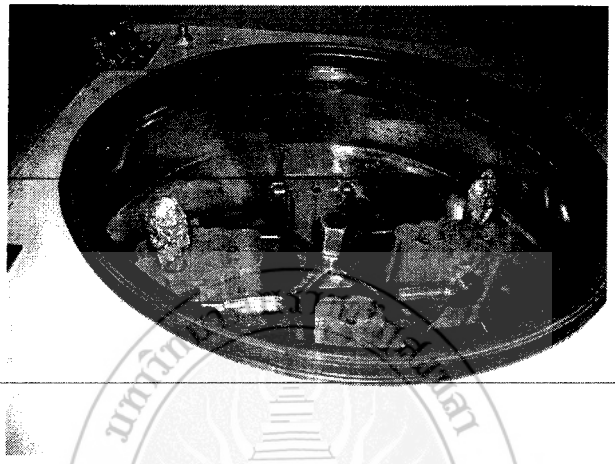
ภาพที่ 8 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อพลาสโมเดียม สายพันธุ์ K1CB1 ภายหลังทดสอบด้วยยา อะโตวาโคนและโปรกัวนิล



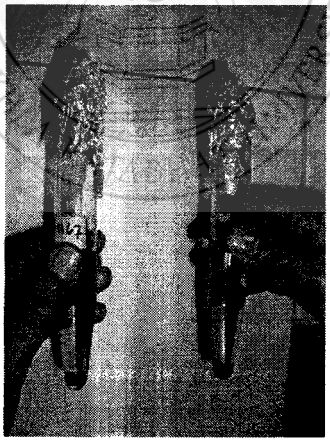
ภาพที่ 9 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ พลาสโมเดียม สายพันธุ์ 3D7 ภายหลังทดสอบด้วยยา อะโตวาโคนและโปรกัวนิล

การเก็บตัวอย่างเชื้อ พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม

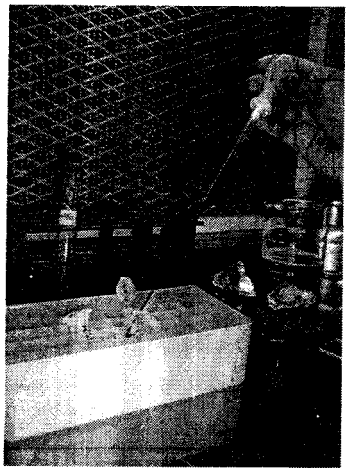
ตัวอย่างเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ทั้ง 3 สายพันธุ์ได้แก่ T9/94RC17, K1CB1 และ 3D7 ภายหลังทดสอบกับยา อะโตวาโคนและโปรกัวนิล จะทำการเก็บตัวอย่างเชื้อโดยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1500 rpm โดยเก็บตัวอย่างเลือดและเชื้อพลาสโมเดียม ที่ตกตะกอนแล้วเติมน้ำยาเก็บรักษาเชื้อ (ภาพที่ 10 - 12)



ภาพที่ 10 ลักษณะการปั่นเหวี่ยงตัวอย่างเชื้อ พลาสโมเดียม เพื่อเก็บตัวอย่าง



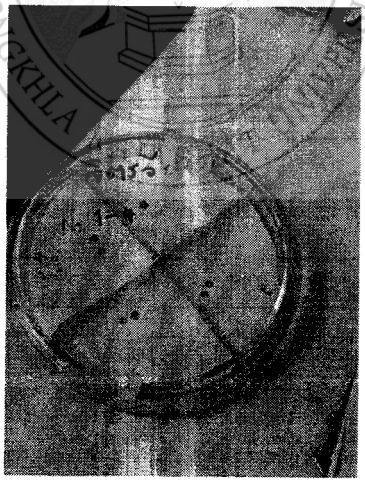
ภาพที่ 11 ลักษณะตัวอย่างเม็ดเลือดแดงและเชื้อพลาสโมเดียมที่ตกตะกอน



ภาพที่ 12 ลักษณะการเก็บตัวอย่างเพื่อนำไปเตรียมตัวอย่างสำหรับการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องผ่าน

การเตรียมตัวอย่าง พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม สำหรับส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

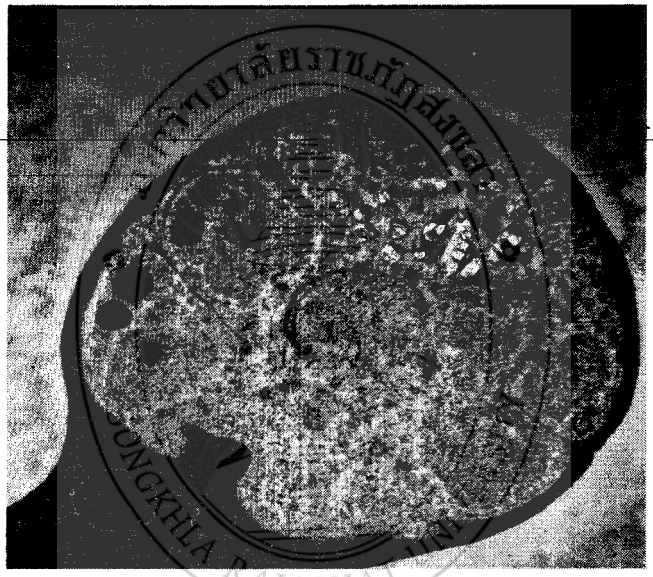
ตัวอย่างเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ทั้ง 3 สายพันธุ์ได้แก่ T9/94RC17, K1CB1 และ 3D7 ถูกนำส่งไปที่ศูนย์เครื่องมือกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเพื่อเตรียมตัวอย่างสำหรับการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (ภาพที่ 13)



ภาพที่ 13 ลักษณะตัวอย่างเชื้อพลาสโมเดียม ที่ใช้สำหรับการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในเซลล์ของเชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพารัมที่ทดสอบด้วยยาอะโตวาโคนและโปรกัวนิล

เชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ทั้ง 3 สายพันธุ์ได้แก่ T9/94RC17, K1CB1 และ 3D7 ภายหลังทดสอบกับยา อะโตวาโคนและโปรกัวนิล พบว่าในกรณีที่ความเข้มข้นของยาทั้งสองชนิดมีความเข้มข้นสูง ลักษณะเชื้อพลาสโมเดียม ทั้ง 3 สายพันธุ์ มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างที่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม โดยพบว่าเซลล์ของเชื้อจะมีการหดตัวอย่างชัดเจน ซึ่งในกรณีนี้ไม่สามารถสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงของออล์แกเนลภายในเซลล์ได้ ส่วนลักษณะของเซลล์กรณีความเข้มข้นของยาทั้งสองชนิดมีความเข้มข้นระดับต่ำ พบว่าการเปลี่ยนแปลงของออล์แกเนลภายในเซลล์ไม่มีความแตกต่างกัน (ดังแสดงในภาพที่ 14)



ภาพที่ 14 ลักษณะภายในเซลล์ของเชื้อ พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม เมื่อทดสอบด้วยยา อะโตวาโคนและโปรกัวนิล

ก
616.936
ก 27

วิจารณ์

การศึกษาลักษณะโครงสร้างโดยการส่องกับกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบว่าเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ทั้ง 3 สายพันธุ์ได้แก่ T9/94RC17, K1CB1 และ 3D7 ภายหลังทดสอบกับยา อะโตวาโคนและโปรกัวนิลพบว่าลักษณะเชื้อ *Plasmodium falciparum* ทั้ง 3 สายพันธุ์ มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างที่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมโดยพบว่าลักษณะของเชื้อพลาสโมเดียม เมื่อทดสอบกับยา อะโตวาโคนและโปรกัวนิล เชื้อจะมีความผิดปกติ โดยความผิดปกติดังกล่าวจะค่อยๆ เปลี่ยนแปลงจากน้อย ไปสู่การเปลี่ยนแปลงในระดับมาก โดยพบว่าเชื้อจะเริ่มเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์ช้าลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้เมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของยาทั้งสองชนิด พบว่าการแบ่งเซลล์ของเชื้อพลาสโมเดียม เริ่มมีความผิดปกติให้เห็น โดยพบว่าออร์แกเนลล์ต่างๆ ภายในเซลล์เริ่มมีขนาดเล็กลง และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของยาอะโตวาโคนและโปรกัวนิลขึ้น พบว่าเชื้อพลาสโมเดียม ทั้ง 3 สายพันธุ์ตายทั้งหมด ดังจะเห็นว่าเซลล์มีการห่อตัว มีขนาดเล็ก จนเป็นก้อนกลม ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองต่างๆ[36-38] ที่พบว่าระดับของยา อะโตวาโคนและโปรกัวนิลที่เหมาะสมสามารถกำจัดเชื้อพลาสโมเดียม ดังจะเห็นว่าเซลล์มีการตายเกิดขึ้น แต่เมื่อนำตัวอย่างเชื้อพลาสโมเดียม ที่ทดสอบด้วยยาอะโตวาโคนและโปรกัวนิล ไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในเซลล์ อันได้แก่ ลักษณะออร์แกเนลล์ต่างๆ มีรูปร่างที่ผิดปกติไปเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ไม่ได้ทดสอบกับยา) คือเซลล์ที่มีการตาย มีลักษณะหดลง แต่สำหรับเซลล์ที่ไม่ตาย (แต่มีความผิดปกติเกิดขึ้นเกี่ยวกับโครงสร้างภายในของเชื้อ พลาสโมเดียม) ยังพบการเปลี่ยนแปลงที่ยังไม่ชัดเจน ซึ่งอาจเกิดจากปริมาณความเข้มข้นของยา อะโตวาโคนและโปรกัวนิล ที่มีความเข้มข้นมากเกินไป จนทำให้เซลล์พลาสโมเดียม เซลล์มีการหดตัวและตายไป ส่วนปริมาณความเข้มข้นที่น้อยเกินไป ก็ก่อให้เกิดความเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ของเชื้อที่ยังไม่ชัดเจน

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

1. เชื้อ พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม เมื่อทดสอบด้วยยา อะโตวาโคนและโปรกัวนิลการเปลี่ยนแปลงลักษณะเซลล์ของเชื้อ พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบแสงธรรมดาจะเห็นความผิดปกติของเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยพบว่าเชื้อจะเริ่มมีความผิดปกติมากขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งเซลล์ตาย แต่ไม่สามารถพบความการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในเซลล์ของเชื้อ พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม ได้เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา

2. การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในเซลล์ของเชื้อ พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม ทั้ง 3 สายพันธุ์มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในเซลล์ อันได้แก่ ลักษณะออร์แกเนลล์ต่างๆ มีรูปร่างที่ผิดปกติไปเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ไม่ได้ทดสอบกับยา) แต่ลักษณะการเปลี่ยนแปลงยังไม่ชัดเจน

ข้อเสนอแนะ

1.ทดลองเพิ่มเติม (ทำซ้ำการทดลอง) เพิ่มศึกษาการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ให้ละเอียดขึ้น

2.ในขั้นตอนการทดสอบกับตัวยา ควรเพิ่มจำนวนความเข้มข้นของเชื้อ พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม มากกว่า 1 % เพื่อทำให้ได้ปริมาณตัวอย่างเชื้อ พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม ที่มากขึ้น ซึ่งสามารถหาตัวอย่างเชื้อ พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม ได้ง่ายเมื่อนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

3. เพิ่มความเข้มข้นของยา อะโตวาโคนและโปรกัวนิลมากขึ้น เพื่อให้เห็นความแตกต่างของการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างชัดเจนขึ้น

4. แบ่งระดับของยา อะโตวาโคนและโปรกัวนิลให้มีความละเอียดมากขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. Collins W.E. 2012. *Plasmodium knowlesi*: a malaria parasite of monkeys and humans. Annual Review of Entomology, 57, 107-121.

2. Alonso P.L. and Tanner M. 2013. Public health challenges and prospects for malaria control and elimination. Nature Medicine, 19, 150-155.

3. Dondorp A.M., Nosten F., Yi P., Das D. Phyo A.P., Tarning J., Lwin K.M., Ariey F., Hanpithakpong W., Lee S.J., Ringwald P., Silamut K., Imwong M., Chotivanich K., Lim P., Herdman T., An S.S., Yeung S., Singhasivanon P., Day N.P., Lindegardh N., Socheat D. and White N.J. 2009. Artemisinin resistance in Plasmodium falciparum malaria. New England Journal of Medicine, 361, 455-467.

4. Na-Bangchang K. and Karbwang J. 2013. Emerging artemisinin resistance in the border areas of Thailand. Expert Review of Clinical Pharmacololgy, 6, 307-322.

5. Phyo A.P., Nkhoma S., Stepniewska K., Ashley E.A., Nair S., McGready R., ler Moo C., Al-Saai S., Dondorp A.M., Lwin K.M., Singhasivanon P., Day N.P., White N.J., Anderson T.J. and Nosten F. 2012. Emergence of artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: a longitudinal study. Lancet, 379, 1960-1966.

6. Lopes D, Rungsihirunrat K, Nogueira F, Seugorn A, Pedro Gil J, Rosario E. and Cravo P. 2008. Molecular characterization of drug-resistance Plasmodium falciparum from Thailand. Malaria Journal, 1:12-23

7. Vijaykadga S, Rojanawatsirivej C, Cholpol S. et al., 2006. In vivo sensitivity monitoring of mefloquine monotherapy and artesunate-mefloquine combinations for the treatment of the uncomplicated falciparum malaria in Thailand in 2003. Tropical Medicine and International Health. 11, 211-219.

8. Thimasarn K, Sirichaisinthop J, Chanyakhun P. et al., 1997. A comparative study of artsunate and artmether in combination with mefloquine in multidrug resistance falciparum malaria in eastern Thailand. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health 28, 465-471.

9. Wongsrichanalai C, Sirichaisinthop J., Karwacki J J. Drug resistant malaria on the thai-myanmar and thai-cambodian borders. 2001. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 32:43-49.

10. Bubbag D., Kanda T., Karbwang J. et al., Artemether-mefloquine combination in multidrug resistance falciparum malaria. 1995. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 89, 213-215.

11. Yeung S, Pongtavornpinyo W, Hastings IM. et al., 2004. Antimalarial drug resistance, artemisinin-based combination therapy, and the contribution of modeling to elucidating policy choices. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 71, 179-186.

12. Conway D.J. 2007. Molecular epidemiology of malaria. Clinical Microbiology Reviews, 20, 188–204.

13. Chareonviriyaphap T, Bangs M. J. and Ratanatham S. 2000. STATUS OF MALARIA IN THAILAND. The Southeast Asian Journal Tropical Medicine Public Health. 31(2). 225-237.

14. Organization, W.H. World Marasia Report. 2013. Geneva: World Health Organization.

15. Harinasuta T. 1962. Chloroquine resistance in Plasmodium falciparum in Thailand. UNesco First Regional Symposium in Scientific Knowledge of Tropical Parasites. Singapore. 148p.

16. Na-Bangchang K.A. 2007. Current malaria status and distribution of drug resistance in East and Southeast Asia with special focus to Thailand. The Tohoku Journal of Experimental Medicine. 211. 99-113.

17. White N.J.1992. antimalria drug resistance: the pace quickens. Journal of Antimicrobial Chemotherapy.571-585.

18. Socheat D. 2003. Mekong malaria II Update of malaria, multi-drug resistance and economic development in the Mekong region of Southeast Asia. The Southeast Asian Journal Tropical Medicine Public Health. 34. 1-102.

19. Fry M. and Pudney M. 1992. Site of action if the antimalarial hydroxynaphthoquinone, 2 – [tran-4-(4-chlorophenyl) cyclohexyl]-3-hydroxy-1, 4-naphthoquine. Biochemical Pharmacology. 43: 1545-1553.

20. Hurwitz ES., Johnson D., Campbell CC. 1981. Resistance of Plasmodium falciparum malaria to sulfadoxine-pyrimethamine (Fansider) in a refugee camp in Thailand. Lancet. 1: 1068 – 70.

21. Looareesuwan S., Viravan C., Webster H., et al., 1996. Clinical studies of atovaquone, alone or in combination with other antimalaria drug, for treatment of acute uncomplicated malaria in Thailand. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 54: 62-66.

22. Beaver PC, Jung Rc and Cupp EW. Clinical Parasitology, 9th ed., Lea & Febiger, Philadelphia, USA. 1984. 825 pp.

23. Beck JW and Davies JE. Medical Parasitology, 3rd ed., The C.V. Mosby Company, Toronto, USA. 1981. 355 pp.

24. Brown HW and Neva FA. Basic Clinical Parasitology, 5th ed. Appleton-Century-Crofts/Norwalk, Connecticut, USA. 1983. 339 pp.

25. Bruce-Chwatt LJ. Essential Malariology. William Heinemann. Medical Books Ltd., London, UK. 1980. 354 pp.

26. The Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2016. U.S. Department of Health & Human Services. USA.

27. Egan J. T, Combrinck M. J, Egan J. et al., 2002. Fate of haem iron in the malaria parasite Plasmodium falciparum. Biochemical Journal. 365:343-347.

28. Saeed S, Tremp Z. A, Dessens T. J. 2015. Biogenesis of the crystalloid organelle in Plasmodium involves microtubule-dependent vesicle transport and assembly. International Journal for Parasitology. 45:537-547.

29. Gerald N, Mahajan B and Kumar S. 2011. Mitosis in the human malaria parasite Plasmodium falciparum. Eukaryotic Cell. 10:474-482.

30. Urban P, Estelrich J, Adeva A, et al., 2011. Study of the efficacy of antimalarial drugs delivered inside targeted immunoliposomal nanovectors. Nanoscale Research Letters. 6:620.

31. R. E. Sinden, Elizabeth U. Canning Barbara Spain. 1976. Gametogenesis and Fertilization in Plasmodium yoelii nigeriensis: A Transmission Electron Microscope Study. The royal society. 193:1110.

32. Thaithong S, Seugorn A. and Beale G.H. 1994. Culturing Plasmodium falciparum from finger prick sample of infected blood. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 88:490.

33. Trager W. and Jensen J.B. 1976. Human malaria parasite in continuous culture. Science. 193: 673-675.

34. Seugorn A, Siripoon N, Kanchanakarn N. et al., 2007. Drug susceptibility of Plasmodium falciparum collected from different areas of Thailand during 2000 – 2001. Journal of Health Research. 21(2).

35. Thaithong S, Beale G.H. and Chutmongkonkul M. 1983. Susceptibility of Plasmodium falciparum to five drugs: an in vitro studies if isolates mainly from Thailand. Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 77: 228-231.

36. McKeage K1 and Scott L. 2003. Atovaquone/proguanil: a review of its use for the prophylaxis of Plasmodium falciparum malaria. Drugs. 63 : 597-623.

37. Jennifer L. Gulera*, John White IIIa, Margaret A. Phillipsb and Pradipsinh K. Rathoda. 2015. Atovaquone Tolerance in Plasmodium falciparum Parasites Selected for High-Level Resistance to a Dihydroorotate Dehydrogenase Inhibitor. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 59 : 686-689.

38. Mark D. Lacy Jason D. Maguire Mazie J. Barcus and et al. 2002. Atovaquone/Proguanil Therapy for Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax Malaria in Indonesians Who Lack Clinical Immunity. Clinical Infectious Diseases. 35: 92-95.

ประวัติผู้วิจัย

ประวัติคณะผู้วิจัย (1)

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) อ.ดร.จิตรวี เชยชม

   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Dr. JITRAVEE CHEYCHOM

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3820700016578
3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์
   1) หน่วยงาน : โปรแกรมวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
   2) หมายเลขโทรศัพท์ : 0894664534
   3) e-mail : jitraveecheychom@hotmail.com
4. ประวัติการศึกษา วท.ด. วิทยาศาสตร์สาธารณสุข จุฬาลงกรณ์วิทยาลัย
5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ Molecular Biology, Parasitology, การเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียในห้องปฏิบัติการ (*Plasmodium falciparum*)
6. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย
   1) การควบคุมทางชีวภาพของ Rhizoctonia solani ที่ก่อให้เกิดโรคในพืชตระกูลถั่วโดยการใช้ (Rhizobium spp. Biological control of Rhizoctonia solani pathogenic of legumes using Rhizobium spp.) (ผู้ร่วมวิจัย)
   2) ความรู้ การปฏิบัติ และการแก้ไขปัญหาเกี่ยวกับการดูแลเด็กของผู้ดูแลเด็กในศูนย์พัฒนาเด็กเล็กจังหวัดสงขลาและสตูล" (Knowledge, Conduct, and Problem Solving Related to Child Care by Care Taker Attendants in Child Care Centers around Songkhla and Satun Provinces) (ผู้ร่วมวิจัย)
   3) Jitravee Cheychom, Naowarat Kanchanakhan, Saowanit Vijaykadga, Jariyanart Gaywee, Pongchai Harnyuttanakorn. 2015. Cytochrome b mutation and atovaquone susceptibility in Plasmodium falciparum

isolates from the Thai-Cambodian border during 1990–2010. ScienceAsia 41: 340-344. (ผู้วิจัยหลัก)

4) Jitravee Cheychom, Naowarat Kanchanakhan, Saowanit Vijaykadga, Pongchai Harnyuttanakorn. 2013. Antifolate Resistance Mutation and Proguanil Susceptibility among Plasmodium Falciparum Isolates in Thai-Cambodia Border. J Health Res.27 no.5 October. (ผู้วิจัยหลัก)

ประวัติคณะผู้วิจัย (2)

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พงชัย หาญยุทธนากร

   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Assistant Professor Dr.Pongchai Harnyuttanakorn
2. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

   1) หน่วยงาน : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
   2) หมายเลขโทรศัพท์ : 02-2185369
   3) e-mail : Pongchai.H@chula.ac.th
3. ประวัติการศึกษา

   Ph.D. (Molecular Biology) University of Edinburgh ประเทศอังกฤษ
4. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ Molecular Biology, Parasitology
5. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย

   1) Harnyuttanakorn, P., McBride, J.S., Donachie, S., Heidrich, H.-G. and Ridley, R.G. (1992) Inhibitory monoclonal antibodies recognise epitopes adjacent to a proteolytic cleavage site on the RAP-1 protein of *Plasmodium falciparum*. Molecular and Biochemical Parasitology. 55:177-186. (ผู้วิจัยหลัก)
   2) Siripurkpong, P., Chindadoungratana, C., Harnyuttanakorn, P., Kotchabhakdi, N., Wichyanuwat, P. and Casalotti, S.O. (1997)

Dexamethasone, but not stress, induce measurable changes of mitochondrial benzodiazepine receptor mRNA level in rat. European Journal of Pharmacology. 331: 227-235. (ผู้ร่วมวิจัย)

3) Kumarnsit, E., Harnyuttanakorn, P., Meksuriyen, D., Govitrapong, P., Baldwin, B.A., Kotchabhakdi, N. and Casalotti, S.O. (1999) Pseudoephedrine, a Sympathomimetic Agent, Induces Fos-like Immunoreactivity in Rat Nucleus Accumbens and Striatum. Neuropharmacology. 38: 1381-1387. (ผู้ร่วมวิจัย)

4) Nudmamud, S., Siripurkpong, P., Chindaduangratana, C., Harnyuttanakorn, P., Lotrakul, P., Laarbboonsarp, W., Srikiatkhachorn, A., Kotchabhakdi, N. and Casalotti, S.O. (2000) Stress, anxiety and peripheral benzodiazepine receptor mRNA levels in human lymphoxytes. Life Sciences. 67, 2221-2231. (ผู้ร่วมวิจัย)

5) Vilaivan, T., Khongdeesameor, C., Harnyuttanakorn, P., Westwell, M.S. and Lowe, G. (2000) Synthesis and Properties of Chiral Peptide Nucleic acids with a *N*-Aminoethyl-D-proline Backbone. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 10, 2541-2545. (ผู้ร่วมวิจัย)

6) Thaithong, S., Ranford-Cartwright, L.C., Siripoon, N., Harnyuttanakorn, P., Seesod-Kanchanakhan, N.S., Seugorn, A., Rungsihirunrat, K., Cravo, P.V.L. and Beale, G.H. (2001) *Plasmodium falciparum*: gene mutations and amplification of DHFR genes in parasites grown *in vitro* in presence of pyrimethamine. Exp. Parasitol. 98, 59-70. (ผู้ร่วมวิจัย)

7) Rungsihirunrat, K., Harnyuttanakorn, P., Siripoon, N., Seugorn, A., Pumpaiboon, T. and Thaithong, S. (2003) Sequence variations of the *Plasmodium vivax* dihydrofolate reductase gene from Thai isolates. J. Trop. Med. Parasitol. 26, 1-8. (ผู้ร่วมวิจัย)

8) Pumpaiboon, T., Seesod-Kanchanakhan, N., Siripoon, N., Seugorn, A. and Harnyuttanakorn, P. (2004) *Plasmodium falciparum*: *Eco* RI site polymorphism in the genome of a parasite clone grown *in vitro* in presence of pyrimethamine. J. Health. Res. 18(1), 31-15. (ผู้ร่วมวิจัย)

9) Kanchanakhan, N.S., Pumpaiboon, T., Siripoon, N., Seugorn, A. and Harnyuttanakorn, P. (2007) Sequence analysis of the gene encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DOXP) reductoisomerase in multidrug resistant isolates of *Plasodium falciparum* collected from patients along Thai-Myanmar border areas. J. Health Res. 21(2), 113 - 118. (ผู้ร่วมวิจัย)

10) Seugorn, A., Siripoon, N., Kanchanakarn, N., Rungsihirunrat, K., Pumpaibool, T., Vichaikatka, S., Thaithong, S. and Harnyuttanakorn, P. (2007) Drug susceptibility of *Plasmodium falciparum* collected from different areas of Thailand during 2000 – 2001. J. Health Res. 21(2), 119 – 124. (ผู้ร่วมวิจัย)

11) Saiwichai, T., Harnyuttanakorn, P. and Nithiuthai, S. (2007) A Simple Method for Isolation of *Plasmodium gallinaceum* from Infected Chicken Red Blood Cells. J. Trop. Med. Parasitol. 30, 24 – 28. (ผู้ร่วมวิจัย)

12) Saiwichai, T., Harnyuttanakorn, P., Sukhumavasi, W., Buddhirakkul, P., Bhumiratana, A., Rojanapremsuk, J. and Nithiuthai, S. (2007) Diagnosis of *Plasmodium gallinaceum* in Infected Mosquitoes by Multiplex PCR. J. Trop. Med. Parasitol. 30, 76-80. (ผู้ร่วมวิจัย)

13) Aowphol, A., Voris, H.K., Feldheim, K.A., Harnyuttanakorn, P. and Thirakhupt, K. (2008) Genetic Homogeneity Among Colonies of the White-Nest Swiftlet (*Aerodramus fuciphagus*) in Thailand. Zool. Sci. 25, 372 – 380. (ผู้ร่วมวิจัย)

14) Suwandittakul, N, Chaijaroenkul, W, Harnyuttanakorn, P, Mungthin, M, Na Bangchang, K. 2009. Drug resistance and in vitro susceptibility of Plasmodium falciparum in Thailand during 1998-2003. Korean J Parasitol. 47(2):139-144.

15) Songprakhon, P, Saiwichai, T, Harnyuttanakorn, P, Nithiuthai, S. 2009. Plasmodium gallinaceum: Specifically Recognized Antigens by Infected Sera. J Trop Med and Parasitol 32(1):17-22.

16) Saiwichai, T, Maneepak, M, Songprakhon, P, Harnyuttanakorn, P, Nithiuthai, S. (2009) Nested PCR Detecting Plasmodium gallinaceum in Chicken Fresh Blood. J Trop Med and Parasitol. 32(2):75-81.

17) Pumpaibool, T, Arnathau, C, Durand, P, Kanchanakhan, N, Siripoon, N, Suegorn, A, Sitthi-Amorn, C, Renaud, F,Harnyuttanakorn, P. (2009) Genetic diversity and population structure of Plasmodium falciparum in Thailand, a low transmission country. Malar J. 8:155.

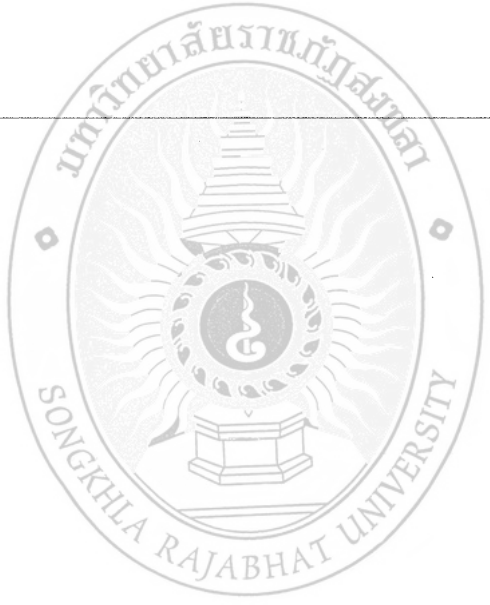
18) Mungthin, M, Suwandittakul, N, Chaijaroenkul, W, Rungsrihirunrat, K, Harnyuttanakorn, P, Seugorn, A, Na Bangchang, K. 2010. The patterns of mutation and amplification of Plasmodium falciparum pfcrt and pfmdr1 genes in Thailand during the year 1988 to 2003. Parasitol Res. 107(3):539-45

19) Saiwichai, T, Sangalangkarn, V, Kawahara, K, Oyama, Y, Chaichalotornkul, S, Narkpinit,

20) S, Harnyuttanakorn, P, Singhasivanon, P, Maruyama, I, Tancharoen, S. (2010) Green tea extract supplement inhibition of HMGB1 release in rats exposed to cigarette smoke. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 41(1):250-8.

21) Kumnuan R, Pattaradilokrat S, Chumpolbanchorn K, Pimnon S, Narkpinit S, Harnyuttanakorn P, Saiwichai T. In vivotransmission

blocking activities of artesunate on the avian malaria parasite Plasmodium gallinaceum. Vet Parasitol. (in press)



ประวัติคณะผู้วิจัย (3)

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) อาจารย์ ดร.สิทธิพร ภัทรดิลกรัตน์

   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Dr.Sittiporn Pattaradilokrat

2. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

   1) หน่วยงาน : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

   2) หมายเลขโทรศัพท์ : 02-2185361

   3) e-mail : sittiporn.p@chula.ac.th

3. ประวัติการศึกษา

   Ph.D. (Molecular Biology) University of Edinburgh ประเทศอังกฤษ

   Post-doctoral training National Institutes of Health, Bethesda, USA

4. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ Molecular Biology, Molecular Ecology

5. Cellular Physiology, Advance in Cell Biology, Medical Entomology

6. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย

   1) สิทธิพร ภัทรดิลกรัตน์. โรคมาลาเรียในหนูไมซ์: โมเดลสู่การค้นพบยาต้านมาลาเรียใหม่ในมนุษย์. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. ฉบับที่ 3 ปีที่ 41 (กรกฎาคม-กันยายน 2556). 41(3): 532-541.

   2) สิทธิพร ภัทรดิลกรัตน์. โรคมาลาเรียในสัตว์ปีก: วิธีการป้องกันการระบาดของเชื้อมาลาเรียโรคในไก่และการประยุกต์ใช้สำหรับควบคุมโรคมาลาเรียในมนุษย์. วารสารวิจัย มข. ฉบับที่ 1 ปีที่ 19 (มกราคม-กุมภาพันธ์ 2557) หน้า 150-160

   3) สิทธิพร ภัทรดิลกรัตน์. พันธุศาสตร์ของเชื้อมาลาเรีย: จากงานวิจัยพื้นฐาน สู่การพัฒนายาต้านมาลาเรีย. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. ฉบับที่ 1 ปีที่ 20 (มกราคม-มิถุนายน 2558). (รอการตีพิมพ์)

4) Pattaradilokrat, S, Cheesman, SJ, Carter R. 2008. Congenicity and genetic polymorphism in cloned lines derived from a single isolate of a rodent malaria parasite. Mol Biochem Parasitol 157(2): 244-247.

5) Pattaradilokrat, S, Culleton, R, Cheesman, SJ, Carter R. 2009. Gene encoding erythrocyte binding ligand linked to blood stage multiplication rate phenotype in Plasmodium yoelii yoelii. Proc Natl Acad Sci U S A. 106(17):7161-6, 2009.

6) Cheesman, SJ, O' Mahony, E, Pattaradilokrat, S, Degnan, K, Knott, S, Carter R. 2010 A single parasite gene determines strain-specific protective immunity against malaria: the role of the Merozoite Surface Protein I. Int J Parasitol. 40(8):951-61.

7) Pattaradilokrat, S, Li, J, Su, XZ. 2011 Protocol for Production of a Genetic Cross of the Rodent

8) Malaria Parasites. JOVE. 47.

9) Li J*, Pattaradilokrat S*, Zhu F*, Jiang H, Liu S, Hong L, Fu Y, Koo L, Xu W, Pan W, Carlton JM, Kaneko O, Carter R, Wootton JC, Su XZ. 2011. Linkage maps from multiple genetic crosses and loci linked to growth-related virulent phenotype inPlasmodium yoelii. Proc Natl Acad Sci U S A. 108:E374-82.

10) Yuan J, Cheng KC, Johnson RL, Huang R, Pattaradilokrat S, Liu A, Guha R, Fidock DA, Inglese J, Wellems TE, Austin CP, Su XZ. 2011. Chemical genomic profiling for antimalarial therapies, response signatures, and molecular targets. Science. 333:724-9

11) Qi Y, Zhu F, Li J, Fu Y, Pattaradilokrat S, Hong L, Liu S, Huang F, Xu W, Su XZ. 2013. Optimized protocols for improving the likelihood of cloning recombinant progeny from Plasmodium yoelii genetic crosses. Exp Parasitol. 133:44-50.

12)Eastman RT*, Pattaradilokrat S*, Raj DK, Dixit S, Deng B, Miura K, Yuan J, Tanaka TQ, Johnson RL, Jiang H, Huang R, Williamson KC, Lambert LE, Long C, Austin CP, Wu Y, Su XZ. 2013. A class of tricyclic compounds blocking malaria parasite oocyst development and transmission. Antimicrob Agents Chemother. 57:425-35.

13)Kumnuan R*, Pattaradilokrat S*, Chumpolbanchorn K, Pimnon S, Narkpinit S, Harnyuttanakorn P, Saiwichai T. 2013. In vivo transmission blocking activities of artesunate on the avian malaria parasite Plasmodium gallinaceum. Vet Parasitol. 197(3–4): 447–454.

14)Simpalipan P, Pattaradilokrat S, Siripoon N, Seugorn A, Kaewthamasorn M, Butcher RD, Harnyuttanakorn P. 2014. Diversity and population structure of Plasmodium falciparum in Thailand based on the spatial and temporal haplotype patterns of the C-terminal 19-kDa domain of merozoite surface protein-1. Malaria Journal. 13(1):54.

15)Wu J, Tian L, Yu X, Pattaradilokrat S, Li J, Wang M, Yu W, Qi Y, Zeituni AE, Nair SC, Crampton SP, Orandle MS, Bolland SM, Qi CF, Long CA, Myers TG, Coligan JE, Wang R, Su XZ. 2014. Strain-specific innate immune signalling pathways determine malaria parasitemia dynamics and host mortality. Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America. 111(4):E511-E520.

16)Pattaradilokrat S, Li J, Wu J, Qi Y, Eastman RT, Zilversmit M, Nair SC, Huaman MC, Quinones M, Jiang H, Li N, Zhu J, Zhao K, Kaneko O, Long CA, Su XZ. 2014. Plasmodium genetic loci linked to host cytokine and chemokine responses. Genes & Immunity. 15(3):145-152.

17)Nair SC*, Pattaradilokrat S*, Zilversmit MM*, Dommer J, Nagarajan V, Stephens MT, Xiao W, Tan JC, Su XZ. 2014. Genome-wide

polymorphisms and development of a microarray platform to detect genetic variations inPlasmodium yoelii. Molecular and Biochemical Parasitology. 194(1-2):9-15. [*shared the first authorship]

ประวัติคณะผู้วิจัย (4)

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวนภาพร ศิริพูล

   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Ms. Napaporn Siripoon

2. ตำแหน่งปัจจุบัน : นักวิจัย

3. หน่วยงาน : คณะวิทยาลัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. หมายเลขโทรศัพท์: 02-218-5269

5. e-mail : napaporn.s@chula.ac.th

6. ประวัติการศึกษา : วิทยาศาตร์มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์สาธารณสุข)

7.สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ Molecular Biology, Plasmodium parasits

8.ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย

   1) ความหลากหลายทางพันธุกรรมและการเปลี่ยนแปลงของยีน merozoite surface protein-2 gene (msp-2), merozoite surface protein-4 gene(msp-4) และ merozoite surface protein-5 gene (msp-5) จากเชื้อมาลาเรีย(Plasmodium falciparum) ในภาคต่างๆ ของประเทศไทย

ความหลากหลายทางพันธุกรรมและการเปลี่ยนแปลงของยีน merozoite surface protein-2 gene (msp-2), merozoite surface protein-4 gene(msp-4) และ merozoite surface protein-5 gene (msp-5) จากเชื้อมาลาเรีย(Plasmodium falciparum) ในภาคต่างๆของประเทศไทย