

บทบาทของโปรตีนชนิด CD108, CD147 และ CD235a ต่อ
การพัฒนาของเซลล์เม็ดเลือดแดงและการรุกรานของ
เชื้อ *Plasmodium falciparum* ในเซลล์เชื้อสาย
มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 ของมนุษย์



กัมปนาท พรหมโลก

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บัณฑิตวิทยาลัย

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

พฤษภาคม 2562

บทบาทของโปรตีนชนิด CD108, CD147 และ CD235a ต่อการพัฒนาของเซลล์
เม็ดเลือดแดงและการรุกรานของเชื้อ *Plasmodium falciparum* ในเซลล์เชื้อสาย
มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 ของมนุษย์



วิทยานิพนธ์นี้เสนอต่อมหาวิทยาลัยเชียงใหม่เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยา
ลิขสิทธิ์ © โดย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
All rights reserved

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

พฤษภาคม 2562


บทบาทของโปรตีนชนิด CD108, CD147 และ CD235a ต่อการพัฒนาของเซลล์
เม็ดเลือดแดงและการรุกรานของเชื้อ *Plasmodium falciparum* ในเซลล์เชื้อสาย
มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 ของมนุษย์

กัมปนาท พรหมโลก

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยา


คณะกรรมการสอบ


คณะกรรมการที่ปรึกษา


..... ประธานกรรมการ
(รศ.ดร.ธีรกุล อภรณ์สุวรรณ)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ผศ.ดร.ภัทรพล ลิชนัทธุม)


..... กรรมการ
(ผศ.ดร.ภัทรพล ลิชนัทธุม)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ดร.จิรประภา วิชาษา)


..... กรรมการ
(ดร.จิรประภา วิชาษา)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(อ.ดร.สุภารัตน์ ลิชนัทธุม)


..... กรรมการ
(อ.ดร.สุภารัตน์ ลิชนัทธุม)

10 พฤษภาคม 2562

© ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่

คำอุทิศ

ผู้เขียนขออุทิศให้ บิดา มารดา ครูอาจารย์ และผู้สนใจในองค์ความรู้



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.ภัทรพล ลิชนิชอุดม และ ดร.จิรประภา วิชาษา ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการวางแผนงานวิจัย ตลอดจนการให้คำปรึกษาและตรวจสอบข้อบกพร่องต่าง ๆ จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ อ.ดร.สุภารัตน์ ลิชนิชอุดม ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในฐานะอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ทั้งในส่วนของการให้คำแนะนำในการดำเนินงานวิจัย รวมไปถึงการแก้ไขและตรวจสอบความถูกต้องของวิทยานิพนธ์ให้เกิดความถูกต้องและสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.ธีรกุล อภรณ์สุวรรณ ที่ได้กรุณาได้รับเป็นกรรมการสอบ และให้คำแนะนำในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ ร.ต.อ.เกริกพล พรหมโลก และคุณแม่ นางโชติกา พรหมโลก และครอบครัว ที่คอยสนับสนุนและให้กำลังใจ รวมถึงให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน

ขอขอบพระคุณการสนับสนุนทุนการศึกษาจาก โครงการพัฒนาและส่งเสริมผู้มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (พสวท.) ที่ได้เอื้อเฟื้อค่าใช้จ่ายต่าง ๆ ระหว่างที่ทำการศึกษา

ขอขอบคุณ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่อำนวยความสะดวกในด้านสถานที่ สารเคมี และอุปกรณ์เครื่องมือในการทำงานวิจัยในครั้งนี้

สุดท้ายขอขอบคุณ สมาชิกห้องปฏิบัติการ SCB 2903 ที่ได้ให้คำแนะนำ ความช่วยเหลือ และให้กำลังใจตลอดช่วงเวลาในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

กัมปนาท พรหมโลก

หัวข้อวิทยานิพนธ์ บทบาทของโปรตีนชนิด CD108, CD147 และ CD235a ต่อการพัฒนาของ เซลล์เม็ดเลือดแดงและการรุกรานของเชื้อ *Plasmodium falciparum* ใน เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 ของมนุษย์

ผู้เขียน นายกัมปนาท พรหมโลก

ปริญญา วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (ชีววิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษา ผศ.ดร. กัทรพล ลิธนะชอุดม อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
ดร. จิรประภา วิชาษา อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
อ.ดร. สุภารัตน์ ลิธนะชอุดม อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

เชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม (*Plasmodium falciparum*) เป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรค มาลาเรียคิดเป็นร้อยละ 85 ของผู้ป่วยทั่วโลก โดยในทุก ๆ ปี จะสามารถพบผู้ป่วยรายใหม่ได้ตลอด โปรตีนชนิด CD108 CD147 และ CD235a ถูกรายงานว่ามีส่วนเกี่ยวข้องในกระบวนการรุกรานของ เชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดง และการรายงานว่าเป็นปัจจัย จำเป็นและสำคัญที่สุดยังคงเป็นที่ถกเถียงกันอยู่ จึงทำให้การพัฒนาวัคซีนที่มีประสิทธิภาพในการ รักษาโรคมมาลาเรียยังไม่ตรงจุด ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาหาชนิดของโปรตีนที่น่าจะเป็น ปัจจัยจำเป็นและสำคัญสำหรับเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมที่ต้องอาศัยในการรุกรานเข้าสู่เซลล์ โดย ทดลองใช้เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดจำนวน 4 ชนิด (Raji Jurkat U937 และ K562) จากผลการ ทดลองพบว่าเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 มีจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน ชนิด CD235a มากที่สุด (ร้อยละ 92.28 ± 5.71 และมีค่า Mean Fluorescent Intensity (MFI) เท่ากับ 3.23 ± 0.71) และเชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Jurkat มีจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน ชนิด CD108 มากที่สุด (ร้อยละ 58.72 ± 11.89 และมีค่า MFI เท่ากับ 0.81 ± 0.31) ในเซลล์เชื้อสายมะเร็ง เม็ดเลือดที่ใช้ในการทดลอง นอกจากนี้ในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดทั้งหมด 4 ชนิดสามารถพบการ แสดงออกของโปรตีนชนิด CD147 ได้ในทุก ๆ เซลล์ (ร้อยละ 99.75 ± 0.16 ถึง 99.91 ± 0.07 และมีค่า MFI เท่ากับ 14.97 ± 0.11 ถึง 22.63 ± 9.60) ในการทดสอบความสามารถในการรุกรานของเชื้อ พลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมสามารถ

รุกรานเข้าสู่เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 ได้มากที่สุด (ร้อยละ 1.69 ที่ 24 ชั่วโมง) รองลงมาคือในเชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Raji (ร้อยละ 0.31 ที่ 24 ชั่วโมง) และ Jurkat (ร้อยละ 0.26 ที่ 24 ชั่วโมง) ตามลำดับ และไม่พบเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพาร์มเลยในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 (ร้อยละ 0.00) อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพาร์มยังไม่สามารถพัฒนาเจริญเติบโตได้ในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลอง ซึ่งจากผลการทดสอบความสามารถในการรุกรานของเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพาร์มข้างต้น ทำให้ตั้งสมมุติฐานได้ว่าการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a น่าจะเป็นปัจจัยจำเป็นและสำคัญสำหรับเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพาร์มที่ต้องอาศัยในการรุกรานเข้าสู่เซลล์ เพื่อพิสูจน์สมมุติฐาน ดังนั้นจึงได้มีการทดลองกระตุ้นเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ให้มีการสร้างฮีโมโกลบินและมีการแสดงออกของโปรตีนชนิดที่สนใจ ได้แก่ โปรตีนชนิด CD235a มากกว่าปกติ โดยอาศัยการกระตุ้นด้วยสารละลายฮีโมคความเข้มข้น $20\mu\text{M}$ จากผลการทดลองพบว่ามีจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a บนผิวของเซลล์ร้อยละ 14.28 ± 2.51 (เพิ่มขึ้น 2.80 เท่าของเซลล์ปกติ ที่เป็นชุดควบคุมการทดลอง) และมีค่า MFI เท่ากับ 1.28 ± 1.80 อย่างไรก็ตามมีการรายงานว่าฮีโมคมีความเป็นพิษต่อเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพาร์มและทำให้เชื้ออ่อนแอ จึงทำให้มีการทดลองถ่ายโอนพลาสมาสำหรับกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a โดยกลุ่มเซลล์ที่ได้รับพลาสมาสำหรับกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a มีจำนวนที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a ร้อยละ 17.84 ± 4.79 (เพิ่มขึ้น 2.36 เท่าของเซลล์ที่ถูกถ่ายโอนพลาสมาที่ไม่มีฮีโมค ที่เป็นชุดควบคุมการทดลอง) และมีค่า MFI เท่ากับ 11.10 ± 2.47 (เพิ่มขึ้น 4.42 เท่าของเซลล์จากชุดควบคุมการทดลอง) หลังจากทดสอบความสามารถในการรุกรานของเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพาร์มในแต่ละกลุ่มสามารถพบเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพาร์มอยู่ในเซลล์ได้เฉพาะในกลุ่มเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a โดยอาศัยการถ่ายโอนพลาสมา ดังนั้นจากผลการทดลองทั้งหมดทำให้เชื่อได้ว่าโปรตีนชนิด CD235a น่าจะเป็นโปรตีนที่จำเป็นและสำคัญที่สุดสำหรับเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพาร์มที่ต้องอาศัยในการรุกรานเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงหรือเซลล์อื่นที่ไม่ใช่เซลล์เม็ดเลือดแดง ซึ่งองค์ความรู้ดังกล่าวอาจนำไปใช้ในการพัฒนา ยาหรือวัคซีนต้านเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพาร์มให้ตรงจุด โดยอ้างอิงโปรตีนชนิด CD235a เป็นเป้าหมายหลักเพื่อยับยั้งไม่ให้เชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพาร์มรุกรานเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงและเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนในผู้ป่วยได้

Thesis Title	Roles of CD108, CD147 and CD235a Proteins on Erythroid Development and <i>Plasmodium falciparum</i> Invasion in Human Leukemia Cell Line U937	
Author	Mr. Kumpanat Pomlok	
Degree	Master of Science (Biology)	
Advisory Committee	Asst.Prof.Dr. Pathrapol Lithanatudom	Advisor
	Dr. Jiraprapa Wipasa	Co-advisor
	Lect.Dr. Suparat Lithanatudom	Co-advisor

ABSTRACT

Plasmodium falciparum is a major causative pathogen of the infectious disease known as malaria which is accounting for 85 percent of worldwide malaria patients. CD108, CD147, and CD235a proteins have been reported as particular receptors for *P. falciparum* invasion, however, the different importance of each receptor required for *P. falciparum* invasion are matters of subject debates impeding the development of effective vaccine candidates. To determine the expression level of those receptors in other hematopoietic cell lines for using as a model to assess the importance of each receptor involved in *P. falciparum* invasion, four leukemic cell lines (Raji, Jurkat, U937 and K562) were employed in the experiments. As a result, we detected the highest percent of cell with CD235a protein expression in U937 (92.28 ± 5.71) with 3.23 ± 0.71 MFI (Mean Fluorescent Intensity) while the highest percent of cell with CD108 protein expression was observed in Jurkat (58.72 ± 11.89 , MFI= 0.81 ± 0.31). However, CD147 protein ubiquitously expressed in every leukemic cell line (99.75 ± 0.16 to $99.91 \pm 0.07\%$, MFI= 14.97 ± 0.11 to 22.63 ± 9.60) used in this study. Then, four leukemic cell lines were used for the capability test of *P. Falciparum* invasion. Results showed the highest percent of parasitemia in U937 (1.69 percent at 24-hour post co-culture) treatment, followed by Raji (0.31% at 24-hour post co-culture), Jurkat (0.26% at 24-hour post infection) and no detectable parasitemia in K562 (0.00%). Moreover, *P. falciparum* in cytoplasm of cell line seemed unhealthy and underwent abnormal development in every single cell line observed. Accordingly, we hypothesized whether CD235a protein expression might be the most crucial

receptor for *P. falciparum* invasion. This was proven by hemin treatment in K562 to induce the hemoglobin synthesis resulting in the increase of CD235a protein expression. Moreover, a number of 20 μ M hemin treated K562 with CD235a protein expression was 14.28 \pm 2.51% (increased 2.80 folds from normal K562) and MFI=1.28 \pm 1.80. However, hemin has been reported as a causative chemical agent toxic to *P. falciparum*, thus K562 overexpressing CD235a protein was conducted on cell surface by transfection. The results showed a number of CD235a-overexpressed K562 with CD235a protein expression was 17.84 \pm 4.79% (increased 2.36 folds from empty plasmid-transfected K562) with 11.10 \pm 2.47 MFI (increased 4.42 folds from empty plasmid-transfected K562). After invasion experiment, *P. falciparum* was found in cytoplasm of only CD235a overexpressed K562 cell line. According to the above results, we presumed that CD235a protein might be the most crucial protein for *P. falciparum* during invasion in both of RBCs and other cell types. Our hypothesis might be used as a basic knowledge for developing effective vaccine candidates against the emergence of *P. falciparum* resistance.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ง
บทคัดย่อภาษาไทย	จ
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ช
สารบัญตาราง	ฐ
สารบัญภาพ	ฑ
บทที่ 1 บทนำและวัตถุประสงค์	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา	3
บทที่ 2 ทบทวนเอกสาร	5
2.1 มลาเรีย	5
2.2 เชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม	6
2.3 การรักษาผู้ป่วยโรคมาลาเรียที่มีสาเหตุมาจากเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม	9
2.3.1 การรักษาผู้ป่วยโรคมาลาเรียโดยอาศัยการใช้ยาต้านเชื้อ	9
2.3.2 การควบคุมการแพร่ระบาดของโรคมาลาเรียโดยอาศัยการใช้วัคซีน	10
2.4 การดื้อยาของเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม	11
2.5 โพรตีนที่เกี่ยวข้องในการรุกรานของเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดง	12
2.5.1 โพรตีนชนิด CD108	12
2.5.2 โพรตีนชนิด CD147	13
2.5.3 โพรตีนชนิด CD235a	15
2.6 เซลล์เม็ดเลือดแดง	16

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.7 เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือด	17
2.7.1 เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Raji	18
2.7.2 เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Jurkat	19
2.7.3 เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937	19
2.7.4 เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562	20
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการวิจัย	22
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี	22
3.2 วิธีการวิจัย	26
บทที่ 4 ผลการวิจัย	46
4.1 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนบนผิวของเซลล์โดยการย้อมเซลล์ด้วยแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง	46
4.2 การเตรียมเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพาร์มในระยะไซซอนต์	53
4.3 การทดสอบความสามารถในการรุกรานของเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพาร์มเข้าสู่เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ	54
4.4 การกระตุ้นเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ให้มีการสร้างฮีโมโกลบินและเพิ่มระดับการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a บนผิวของเซลล์ด้วยไซโตซิน บิวทิเรตและฮีมิน	62
4.5 การเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน CD235a และ CD71 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR) และวิเคราะห์ผลการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน CD235a และ CD71 โดยวิธี 1.5% agarose gel electrophoresis	67
4.6 การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนในพลาสมิดชนิด pBluescriptIISK+	68
4.7 การสร้างพลาสมิดลูกผสมสำหรับการแสดงออกของยีนในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม	69

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.8 การถ่ายโอนพลาสมิดสำหรับการแสดงออกของยีนที่สนใจในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วย น้ำนมเข้าสู่เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ด้วยวิธีการ electroporation (Delgado-Canedo <i>et al.</i> , 2006) และการตรวจสอบระดับการแสดงออกของโปรตีน ชนิด CD235a	70
4.9 การทดสอบความสามารถในการรุกรานของเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพาร์มเข้าสู่ เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารเคมีและถูก กระตุ้นการแสดงออกของยีนที่สนใจ	75
บทที่ 5 อภิปรายผลการวิจัย	82
5.1 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนบนผิวของเซลล์โดยการย้อมเซลล์ด้วย แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง	82
5.2 การทดสอบความสามารถในการรุกรานของเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพาร์มเข้าสู่ เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ	85
5.3 การกระตุ้นเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ให้มีการสร้างฮีโมโกลบิน และเพิ่มระดับการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a บนผิวของเซลล์ด้วย ไซโตไคน์ บิวทิเรตและฮีมิน	88
5.4 การทดลองพัฒนาวิธีการตรวจหาฮีโมโกลบินเชิงกึ่งปริมาณ	90
5.5 การกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีนที่สนใจบนผิวของเซลล์เชื้อสาย มะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562	91
5.6 การทดสอบความสามารถในการรุกรานของเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพาร์มเข้าสู่ เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 กลุ่มต่าง ๆ	93
5.7 การพัฒนาต่อยอดงานวิจัยเพื่อนำไปใช้ได้จริงจากองค์ความรู้ที่ได้	96
บทที่ 6 สรุปผลการวิจัย	97

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
เอกสารอ้างอิง	99
ภาคผนวก	114
ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมี	115
ภาคผนวก ข ข้อมูลการตรวจพบความสามารถในการรุกรานของเชื้อพลาสติกโมเดียม พลาซีพาร์มในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ	119
ประวัติผู้เขียน	130

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 3.1 ข้อมูลไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย	36
ตารางที่ 4.1 จำนวนร้อยละของเซลล์ที่มีเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ที่ 24 45 และ 96 ชั่วโมงหลังเริ่มการทดลอง (สำรวจจากเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ จำนวน 2,500 เซลล์ และเซลล์เม็ดเลือดแดงจำนวน 1,000 เซลล์)	56
ตารางที่ 4.2 จำนวนของเซลล์ที่มีเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมหรือสิ่งทีคาดว่าน่าจะเป็นเชื้ออยู่ภายในไซโทพลาซึมมากกว่า 2 ตัวต่อ 1 เซลล์ ในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ (สำรวจจากเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ จำนวน 2,500 เซลล์/ชนิด)	62
ตารางที่ 4.3 จำนวนร้อยละของเซลล์ที่มีเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 กลุ่มต่าง ๆ ที่ 24 ชั่วโมงหลังเริ่มการทดลอง (สำรวจจากเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 กลุ่มต่าง ๆ จำนวน 100 เซลล์/กลุ่ม และเซลล์เม็ดเลือดแดงจำนวน 1,000 เซลล์)	81

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 2.1 ระยะเวลาต่าง ๆ ของเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม	8
ภาพที่ 2.2 วัฏจักรชีวิตของเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม	9
ภาพที่ 2.3 โครงสร้างของโปรตีนชนิด CD108	13
ภาพที่ 2.4 โครงสร้างของโปรตีนชนิด CD147	14
ภาพที่ 2.5 โครงสร้าง 3 มิติของโปรตีนชนิด CD235a	16
ภาพที่ 2.6 กระบวนการพัฒนาของเซลล์เพื่อสร้างเซลล์เม็ดเลือดแดง	17
ภาพที่ 2.7 รูปร่างลักษณะเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Raji ที่กำลังขยาย 40X	18
ภาพที่ 2.8 รูปร่างลักษณะเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Jurkat ที่กำลังขยาย 40X	19
ภาพที่ 2.9 รูปร่างลักษณะเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 ที่กำลังขยาย 40X	20
ภาพที่ 2.10 รูปร่างลักษณะเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่กำลังขยาย 40X	21
ภาพที่ 3.1 โครงสร้างพลาสมิดชนิด pBluescriptIISK+	39
ภาพที่ 3.2 โครงสร้างพลาสมิดชนิด pEGFP-C3	42
ภาพที่ 4.1 ตัวอย่างผลการตรวจสอบจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนบนผิวของเซลล์ชนิด CD3 CD4 CD8 CD14 CD19 CD20 และ CD45 ในเซลล์ PBMC และเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์แยกชนิดและหาปริมาณเซลล์แบบอัตโนมัติ	49
ภาพที่ 4.2 ค่าร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนบนผิวของเซลล์ชนิด CD3 CD4 CD8 CD14 CD19 CD20 และ CD45 ในเซลล์ PBMC และเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ	50
ภาพที่ 4.3 ค่า Mean Fluorescent Intensity (MFI) ของเซลล์ PBMC และเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ที่มีการแสดงออกของโปรตีนบนผิวของเซลล์ชนิด CD3 CD4 CD8 CD14 CD19 CD20 และ CD45	50

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

ภาพที่ 4.4 ตัวอย่างผลการตรวจสอบจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนบนผิวของเซลล์ชนิด CD108 CD147 และ CD235a ในเซลล์ PBMC และเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์แยกชนิดและหาปริมาณเซลล์แบบอัตโนมัติ	51
ภาพที่ 4.5 ค่าร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนบนผิวของเซลล์ชนิด CD108 CD147 และ CD235a ในเซลล์ PBMC และเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ	52
ภาพที่ 4.6 ค่า Mean Fluorescent Intensity (MFI) ของเซลล์ PBMC และเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ที่มีการแสดงออกของโปรตีนบนผิวของเซลล์ชนิด CD108 CD147 และ CD235a	52
ภาพที่ 4.7 เซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อพลาสติกโมเดียม ฟาลซิพารัมที่เตรียมได้จากสารละลาย 60% Percoll	53
ภาพที่ 4.8 รูปร่างลักษณะของเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อมาลาเรียชนิด CMC	55
ภาพที่ 4.9 รูปร่างลักษณะของเชื้อพลาสติกโมเดียม ฟาลซิพารัม (ลูกศรสีแดง) ในเซลล์เม็ดเลือดแดง	57
ภาพที่ 4.10 รูปร่างลักษณะของเชื้อพลาสติกโมเดียม ฟาลซิพารัม (ลูกศรสีแดง) ในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Raji	58
ภาพที่ 4.11 รูปร่างลักษณะของเชื้อพลาสติกโมเดียม ฟาลซิพารัม (ลูกศรสีแดง) ในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Jurkat	59
ภาพที่ 4.12 รูปร่างลักษณะของเชื้อพลาสติกโมเดียม ฟาลซิพารัม (ลูกศรสีแดง) ในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937	60
ภาพที่ 4. 13 รูปร่างลักษณะของเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562	61

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

- ภาพที่ 4.14 ตะกอนของเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 หลังกระตุ้นให้สร้าง
อีโมโกลบินด้วยสารละลายโซเดียม บิวทิเรตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 5 วัน
โดย Ctrl คือ เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 และ 1mM 3mM และ 5mM
คือ เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่กระตุ้นด้วยสารละลาย
โซเดียม บิวทิเรตที่ความเข้มข้น 1mM 3mM และ 5mM ตามลำดับ 63
- ภาพที่ 4.15 จำนวนแท่งของจำนวนเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่เปลี่ยนแปลง
หลังจากถูกเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีโซเดียม บิวทิเรตและฮีมินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ
ในวันที่ 0 3 และ 5 64
- ภาพที่ 4.16 ตะกอนของเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 หลังถูกกระตุ้นให้สร้าง
อีโมโกลบินด้วยฮีมิน โดย RBC คือ เซลล์เม็ดเลือดแดง Ctrl คือ เซลล์เชื้อสาย
มะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 และ H10 และ H20 คือ เซลล์เชื้อสายมะเร็ง
เม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่กระตุ้นด้วยฮีมินที่ความเข้มข้น 10 μ M
และ 20 μ M ตามลำดับ 65
- ภาพที่ 4.17 เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ย้อมสีด้วยสารละลาย 0.2% benzidine
โดย Ctrl คือ เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 และ H20 คือ เซลล์เชื้อสาย
มะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่กระตุ้นด้วยสารละลายฮีมินความเข้มข้น 20 μ M 65
- ภาพที่ 4.18 ตัวอย่างเส้นโค้งมาตรฐานที่สร้างได้จากการพล็อตค่าที่วัดได้จากเซลล์เม็ดเลือด
เจ็องที่ 4 ความเข้มข้น 66
- ภาพที่ 4.19 ตัวอย่างการสร้างเส้นโค้งมาตรฐานและการคำนวณค่าที่วัดได้จากตัวอย่างเซลล์
เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 และกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยสารละลายฮีมิน
ในสมการที่สร้างได้ 67
- ภาพที่ 4.20 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน CD71 (เลนที่ 1) และ CD235a (เลนที่ 2) ที่ใช้ในงานวิจัย 68

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพที่ 4.21 ขนาดของพลาสมิดสำหรับการแสดงออกของยีนในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมชนิด pEGFP-C3 (เลนที่ 1) และพลาสมิดลูกผสมที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน CD235a (เลนที่ 2 และ 3)	70
ภาพที่ 4.22 ผลการตรวจสอบความสำเร็จในการถ่ายโอนพลาสมิดชนิด pEGFP-C3 พลาสมิดชนิด pEGFP-C3 ที่เชื่อมต่อกับยีน CD235a และพลาสมิดชนิด pEGFP-C3 ที่เชื่อมต่อกับยีน CD71 เข้าสู่เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562	72
ภาพที่ 4.23 ค่าร้อยละของจำนวนเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ประสบความสำเร็จในการถ่ายโอนพลาสมิด	73
ภาพที่ 4.24 ระดับการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a โดย Ctrl คือ เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 pEGFP-C3 คือ เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ได้รับพลาสมิดชนิด pEGFP-C3 CD235a คือ เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ได้รับพลาสมิดชนิด pEGFP-C3 ที่เชื่อมต่อกับยีน CD235a CD71 คือ เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ได้รับพลาสมิดชนิด pEGFP-C3 ที่เชื่อมต่อกับยีน CD71 และ H2O คือ เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารละลายอีมินความเข้มข้น 20 μ M	74
ภาพที่ 4.25 ค่าร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนบนผิวของเซลล์ชนิด CD235a ในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 กลุ่มต่าง ๆ	75
ภาพที่ 4.26 ค่า Mean Fluorescent Intensity (MFI) ของเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 กลุ่มต่าง ๆ ที่มีการแสดงออกของโปรตีนบนผิวของเซลล์ชนิด CD235a	75
ภาพที่ 4.27 รูปร่างลักษณะของเชื้อพลาสมาเดียม ฟาลซิพารัม (ลูกศรสีแดง) ในเซลล์เม็ดเลือดแดง	77
ภาพที่ 4.28 รูปร่างลักษณะของเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562	78
ภาพที่ 4.29 รูปร่างลักษณะของเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดชนิด pEGFP-C3	78

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพที่ 4.30 รูปร่างลักษณะของเชื้อพลาสติกโมเดียม ฟาลซิพาร์ม (ลูกศรีสีแดง) ในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสติกลูกผสมที่เชื่อมต่อกับยีน CD235a	79
ภาพที่ 4.31 รูปร่างลักษณะของเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสติกลูกผสมที่เชื่อมต่อกับยีน CD71	80
ภาพที่ 4.32 รูปร่างลักษณะของเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่เลี้ยงร่วมกับสารละลายอีมินความเข้มข้น 20 μ M	80

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทที่ 1

บทนำและวัตถุประสงค์

1.1 ที่มาและความสำคัญ

มาลาเรียเป็นโรคติดเชื้อที่เป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญชนิดหนึ่งของโลก องค์การอนามัยโลก ได้รายงานการแพร่ระบาดและการเสียชีวิตของผู้ป่วยโรคนี้ทั่วโลกอยู่ตลอดในทุก ๆ ปี โดยตั้งแต่ในปี ค.ศ.2002 ได้มีการประมาณการว่ามีผู้ที่ป่วยเป็นโรคนี้ถึง 300-500 ล้านราย และเสียชีวิตมากกว่า 2.7 ล้านคนในแต่ละปี และจากข้อมูลล่าสุดในปี ค.ศ.2017 ระบุว่า มีผู้ที่ป่วยเป็นโรคนี้ประมาณ 203-262 ล้านราย และเสียชีวิตประมาณ 4.35 แสนคน ซึ่งจากข้อมูลแสดงให้เห็นถึงจำนวนผู้เสียชีวิตจากโรคมาลาเรียที่ลดลงเป็นอย่างมาก (ในช่วงปี ค.ศ.2010-2017 จำนวนผู้เสียชีวิตลดลงถึงร้อยละ 28) และจำนวนผู้ที่ป่วยเป็นโรคมาลาเรียก็ลดลงเช่นเดียวกัน (ในช่วงปี ค.ศ.2010-2017 มีจำนวนผู้ที่ป่วยเป็นโรคมาลาเรียลดลงร้อยละ 18) (Gardner, 2002; Narain, 2008; WHO, 2018) อย่างไรก็ตามจากอดีตจนถึงปัจจุบันนี้ ยังไม่มียาหรือวัคซีนชนิดใดที่สามารถใช้ในการต้านทานและควบคุมเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคมาลาเรียที่ได้ผลแน่นอน จึงทำให้ยังสามารถพบผู้ป่วยโรคนี้ได้เรื่อย ๆ ในทุก ๆ ปี การระบาดของโรคมาลาเรียพบได้มากในประเทศเขตร้อน โดยเฉพาะในประชากรในแถบแอฟริกาและเอเชีย ซึ่งมีผู้อยู่อาศัยประมาณ 40-50 % ของประชากรโลก (Snow *et al.*, 2005) โรคมาลาเรียมีสาเหตุหลักมาจากการติดเชื้อปรสิตในจีสพลาสโมเดียม (*Plasmodium* spp.) ซึ่งที่พบว่าก่อโรคได้ในมนุษย์ ประกอบไปด้วยเชื้อ *Plasmodium falciparum* *P. vivax* *P. ovale* *P. malariae* และ *P. knowlesi* โดยเชื้อจะถูกส่งผ่านเข้าสู่มนุษย์โดยการกัดของยุงก้นปล่อง (*Anopheles*) (Qidwai, 2014; Winzeler, 2008) มีการศึกษาและรายงานว่าในแถบภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งรวมถึงประเทศไทยนั้น เชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม (*P. falciparum*) เป็นเชื้อที่มีการระบาดและก่อให้เกิดอัตราการเสียชีวิตสูงสุด โดยเฉพาะในเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 5 ปี โดยผู้ป่วยจะมีอาการ มีไข้สูงหนาวสั่นและเกิดภาวะช็อค มีปัญหาเกี่ยวกับระบบประสาท ซึ่งบางรายอาจถึงขั้นเสียชีวิตได้ อีกทั้งเชื้อชนิดนี้ยังดื้อต่อยาต้านเชื้อมาลาเรียที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน (Gardner, 2002; Haldar *et al.*, 2018; Mita and Tanabe, 2012; Verdrager, 1986)

จนถึงปัจจุบันนี้มีการศึกษามากมายที่มุ่งหาวิธีที่จะช่วยป้องกันและควบคุมการระบาดของโรคมาลาเรีย ซึ่งแบ่งเป็นการศึกษาในส่วนของพาหะของโรค คือ ยุงก้นปล่อง และการศึกษาตัวเชื้อพลาสโมเดียม ทั้งในแง่ชีววิทยาและกระบวนการก่อโรค ตลอดจนการค้นหายาวัคซีนเพื่อป้องกันเชื้อมาลาเรียและการคิดค้นยาต้านเชื้อมาลาเรียใหม่ ๆ อย่างไรก็ตาม มีการพบว่าการรักษาด้วยยาหลายชนิดไม่สามารถรักษาโรคนี้ได้ ในผู้ป่วยบางราย ซึ่งอาจเป็นผลเนื่องมาจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของยาในร่างกายของผู้ป่วยและที่สำคัญคือการดื้อต่อยาของเชื้อพลาสโมเดียม (Baird, 2005; Haldar *et al.*, 2018; Mita and Tanabe, 2012) และจนถึงปัจจุบันก็ยังไม่มียาวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียที่ใช้ได้ผล

การเพาะเลี้ยงเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม ในปัจจุบันนี้ ทำได้โดยการนำเชื้อมาเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองให้แบ่งเพิ่มจำนวนในเซลล์เม็ดเลือดแดงมนุษย์ ซึ่งเป็นเซลล์เป้าหมาย วิธีนี้สามารถนำมาใช้เป็นแบบจำลองในการศึกษากระบวนการการติดเชื้อที่เกิดขึ้นในร่างกายมนุษย์ และการศึกษาทางด้านอณูชีววิทยาของเซลล์ ซึ่งมีประโยชน์ในการคิดค้นวัคซีนและยาต้านเชื้อตลอดจนการศึกษาการดื้อยา (Ahn *et al.*, 2008; Biswas *et al.*, 1988; Lambros and Vanderberg, 1979) มีงานวิจัยที่ค้นพบว่ามิโปรตีนบางชนิดบนผิวของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการการรุกรานเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงของเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม ได้แก่ โปรตีนชนิด CD108 CD147 และ CD235a (Bartholdson *et al.*, 2013; Magowan *et al.*, 1988; Pasvol *et al.*, 1982) นอกจากนี้เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดง K562 ที่เป็นเซลล์เพาะเลี้ยง (cell line) กลุ่มเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือด (leukemic cell) เคยถูกรายงานว่าสามารถกระตุ้นให้มีการสร้างและสะสมฮีโมโกลบินภายในเซลล์ และมีการเพิ่มระดับการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a บนผิวของเซลล์ได้ด้วยสารเคมี ได้แก่ โซเดียม บิวทิเรต (Sodium butyrate) และฮีมิน (Hemin) ซึ่งเป็นโปรตีนที่แสดงลักษณะของเม็ดเลือดแดง (Baliga *et al.*, 1993; Cioe *et al.*, 1981; Dean *et al.*, 1981; Hiep *et al.*, 2012; Witt *et al.*, 2000) องค์ความรู้เหล่านี้ นำไปสู่ที่มาของวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ ซึ่งเป็นการศึกษาการนำเซลล์เพาะเลี้ยง กลุ่มเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ มาตรวจสอบระดับการแสดงออกของโปรตีนที่พบบนผิวเซลล์เม็ดเลือดแดงและมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการการรุกรานเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงของเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม จากนั้นนำเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแต่ละชนิดมาทดสอบความสามารถในการรุกรานของเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม เพื่อศึกษาหาชนิดของโปรตีนที่คาดว่าจะมีความสำคัญและจำเป็นสำหรับเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม ที่ต้องอาศัยเพื่อรุกรานเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงหรือเซลล์อื่นที่ไม่ใช่เซลล์เม็ดเลือดแดง และทดลองกระตุ้นเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดง K562 ที่เคยถูกรายงานว่ามียาลักษณะที่คล้ายคลึงกับเซลล์ระยะต้นที่กำลังจะพัฒนาไปเป็นเซลล์เม็ดเลือดแดง (Andresson *et al.*, 1979; Ohshima, 2016; Zon, 2001) ซึ่งเป็นเซลล์เพาะเลี้ยง กลุ่มเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดที่มี

ความใกล้ชิดกับความเป็นเซลล์เม็ดเลือดแดงมากที่สุดที่มีในห้องปฏิบัติการ ให้มีการสร้างฮีโมโกลบินด้วยสารเคมีดังกล่าวข้างต้น นอกจากนี้ เพื่อยืนยันความสำคัญของโปรตีนที่คาดว่าจะสำคัญต่อการรุกรานของเชื้อมาลาเรีย ผู้วิจัยได้ทดลองสร้างพลาสมิดลูกผสม (recombinant plasmid) สำหรับกระบวนการแสดงของโปรตีนชนิดที่สนใจ โดยเลือกชนิดของโปรตีนจากผลการทดลองที่แสดงว่าโปรตีนชนิดนี้น่าจะเกี่ยวข้องในกระบวนการการรุกรานของเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมมากที่สุด และถ่ายโอนพลาสมิดดังกล่าวเข้าสู่เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดง K562 ก่อนที่จะนำเซลล์มะเร็งเชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดง K562 แต่ละกลุ่มมาทดสอบความสามารถในการรุกรานของเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมอีกครั้ง เพื่อยืนยันชนิดของโปรตีนที่คาดว่าจะมีความสำคัญและจำเป็นที่สุดสำหรับเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมที่ต้องอาศัยเพื่อรุกรานเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงหรือเซลล์อื่นที่ไม่ใช่เซลล์เม็ดเลือดแดง

ซึ่งองค์ความรู้ที่ได้จะทำใหทราบชนิดที่แน่นอนของโปรตีนที่มีความสำคัญและจำเป็นมากที่สุดสำหรับเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมที่ต้องอาศัยเพื่อรุกรานเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงหรือเซลล์อื่นที่ไม่ใช่เซลล์เม็ดเลือดแดง เพื่อเป็นแนวทางพื้นฐานในการสร้างและพัฒนาายด้านเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมให้ตรงจุด โดยอ้างอิงจากชนิดของโปรตีนที่สำคัญและจำเป็นมากที่สุดสำหรับเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมที่ต้องใช้ในกระบวนการการรุกรานเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงหรือเซลล์อื่นที่ไม่ใช่เซลล์เม็ดเลือดแดงเป็นเป้าหมายหลัก เพื่อยืนยันให้เชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมสามารถรุกรานเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงและเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนในผู้ป่วยได้

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 เพื่อตรวจสอบระดับการแสดงออกของโปรตีนที่สนใจที่เกี่ยวข้องในกระบวนการการรุกรานเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงของเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม ได้แก่ โปรตีนชนิด CD108 CD147 และ CD235a บนผิวเซลล์ ในเซลล์เพาะเลี้ยง กลุ่มเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือด และทดสอบความสามารถในการรุกรานของเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมในกลุ่มเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดดังกล่าว เพื่อตั้งสมมุติฐานว่าโปรตีนชนิดใดบนผิวของเซลล์ที่คาดว่าจะมีความสำคัญและจำเป็นสำหรับเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมที่ต้องอาศัยเพื่อเข้ารุกรานเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงหรือเซลล์อื่นที่ไม่ใช่เซลล์เม็ดเลือดแดง

1.2.2 เพื่อทดลองกระตุ้นการสร้างและสะสมฮีโมโกลบินภายในเซลล์ และการเพิ่มการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a ในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดง K562 ที่เป็นเซลล์เพาะเลี้ยง

กลุ่มเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดที่มีความใกล้ชิดกับความเป็นเซลล์เม็ดเลือดแดงมากที่สุดที่มีในห้องปฏิบัติการด้วยสารเคมี

1.2.3 เพื่อทดลองกระตุ้นการแสดงของโปรตีนที่สนใจที่คาดว่ามีความสำคัญและจำเป็นมากที่สุดสำหรับเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมที่ต้องอาศัยเพื่อเข้ารุกรานเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงหรือเซลล์อื่นที่ไม่ใช่เซลล์เม็ดเลือดแดงจากผลการทดลองก่อนหน้านี้ ในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดง K562 โดยอาศัยการถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมสำหรับการกระตุ้นการแสดงของโปรตีนที่สนใจในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดง K562 และทดสอบความสามารถในการรุกรานของเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมในกลุ่มเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดง K562 แต่ละกลุ่ม ทั้งกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยสารเคมีและกลุ่มที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทที่ 2

บททวนเอกสาร

2.1 มาลาเรีย

มาลาเรียเป็นโรคติดเชื้อที่เก่าแก่ชนิดหนึ่งของโลก มีรายงานการปรากฏของโรคนี้ในหลายหลากหลายสถานที่และหลายช่วงเวลาในอดีต ได้แก่ ในเอกสารของชาวจีนเมื่อ 2,700 ปีก่อน ค.ศ. ในแผ่นจารึกสมัยยุคเมโสโปเตเมีย (Mesopotamia) เมื่อ 2,000 ปีก่อน ค.ศ. ในกระดาษปาปิรัส (papyrus) ของชาวอียิปต์เมื่อ 1,570 ปีก่อน ค.ศ. และในเอกสารของชาวฮินดูเมื่อ 600 ปีก่อน ค.ศ. ซึ่งในตอนนั้นมีการรายงานว่าผู้ป่วยจะมีอาการไข้หนาวสั่น สุขภาพอ่อนแอ และม้ามโต โดยมักพบผู้ที่ป่วยเป็นโรคนี้ในกลุ่มคนที่พักอาศัยบริเวณหนองบึง ต่อมาจึงมีการเข้าใจผิดว่าโรคดังกล่าวมีสาเหตุเกิดมาจากมลพิษบริเวณหนองน้ำ จึงเรียกโรคดังกล่าวนี้ว่า “มาลาเรีย” ที่เป็นภาษาอิตาลี แปลว่า อากาศที่ไม่ดี (spoiled air) จนกระทั่งในปี ค.ศ.1676 Antoni van Leeuwenhoek ได้รายงานการค้นพบแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคดังกล่าว (ในอดีตจุลชีพทั้งหมดถูกเรียกเหมารวมว่าแบคทีเรีย) จึงทำให้ทราบว่าเป็นโรคมาลาเรียเป็นโรคติดเชื้อตั้งแต่ตอนนั้น หลังจากนั้นก็ได้มีความพยายามในการศึกษาแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคมาลาเรียโดย Louis Pasteur และ Robert Koch ในช่วงปี ค.ศ.1878-1879 และต่อมาในปี ค.ศ.1880 Charles Louis Alphonse Laveran ได้รายงานการค้นพบเชื้อปรสิตที่เป็นสาเหตุของโรคมาลาเรีย ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตกลุ่มโปรโตซัว (protozoa) จากรายงานของ Ronald Ross ในปี ค.ศ.1897 เป็นรายงานแรกที่ระบุว่าเชื้อปรสิตที่เป็นสาเหตุของโรคมาลาเรียในสัตว์ปีก (*Plasmodium relictum*) จำเป็นต้องอาศัยยุงเป็นพาหะ และหลังจากนั้นในช่วงปี ค.ศ.1898 และ 1900 จึงเริ่มมีการรายงานเกี่ยวกับโรคมาลาเรียในมนุษย์ (Cox, 2010; Lane, 2015)

ปัจจุบันมาลาเรียเป็นโรคติดเชื้อที่เป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญชนิดหนึ่งของโลก องค์การอนามัยโลกได้รายงานการแพร่ระบาดและการเสียชีวิตของผู้ป่วยโรคนี้ทั่วโลกอยู่ตลอดในทุก ๆ ปี โดยในปี ค.ศ.2002 ได้มีการประมาณการว่ามีจำนวนผู้ที่ป่วยเป็นโรคนี้ถึงประมาณ 300-660 ล้านราย และในปี ค.ศ.2017 มีการรายงานว่าจำนวนผู้ที่ป่วยเป็นโรคนี้ประมาณ 203-262 ล้านราย (Snow *et*

al., 2005; WHO, 2018; Winzeler, 2008) การระบาดของโรคมาลาเรียพบได้มากในประเทศเขตร้อน โดยเฉพาะในประชากรในแถบแอฟริกาและเอเชีย ซึ่งมีผู้อยู่อาศัยประมาณร้อยละ 40-50 ของประชากรทั่วโลก (Snow *et al.*, 2005) โรคมาลาเรียมีสาเหตุหลักมาจากการติดเชื้อปรสิตในจีโนม พลาสโมเดียม (*Plasmodium* spp.) ซึ่งเชื้อปรสิตที่พบวก่อโรคได้ในมนุษย์ ประกอบไปด้วย *Plasmodium falciparum* *P. vivax* *P. ovale* *P. malariae* และ *P. knowlesi* โดยเชื้อจะถูกส่งผ่านเข้าสู่มนุษย์โดยการกัดของยุงก้นปล่อง (*Anopheles*) (Qidwai, 2014; Winzeler, 2008) ในประเทศไทย เชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม (*P. falciparum*) เป็นเชื้อที่มีความรุนแรงมากที่สุดและก่อให้เกิดการเสียชีวิตในผู้ป่วยโรคมาลาเรียได้ (Parker *et al.*, 2015) โดยเฉพาะในเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 5 ปี โดยผู้ป่วยจะมีอาการ มีไข้สูงหนาวสั่นและเกิดภาวะช็อค มีปัญหาเกี่ยวกับระบบประสาท ซึ่งบางรายอาจถึงขั้นเสียชีวิตได้ อีกทั้งเชืชนิดนี้ยังพบว่าสามารถติดต่อยาด้านเชื้อมาลาเรียที่ถูกใช้อย่างแพร่หลายมาตั้งแต่ในอดีตจนถึงปัจจุบัน เช่น คลอโรควิน (chloroquine) เมโฟลควิน (mefloquine) ควินิน (quinine) และลูมิแฟนทริน (lumefantrine) เป็นต้น (Gardner, 2002; Haldar *et al.*, 2018; Mita and Tanabe, 2012; Verdrager, 1986)

2.2 เชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม

เชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมมีแหล่งกำเนิดมาจากทวีปแอฟริกา โดยเป็นสาเหตุของการเกิดโรคมาลาเรียร้อยละ 99.7 ของผู้ป่วยในแถบทวีปแอฟริกา ร้อยละ 62.8 ของผู้ป่วยในแถบทวีปเอเชีย ตะวันออกเฉียงใต้ ร้อยละ 69.0 ของผู้ป่วยในบริเวณเมดิเตอร์เรเนียนตะวันออก และร้อยละ 71.9 ของผู้ป่วยในบริเวณแปซิฟิกตะวันตก (WHO, 2019) เชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมสามารถแพร่ระบาดได้ โดยอาศัยยุงก้นปล่องเป็นพาหะ สำหรับระยะการเจริญเติบโตของเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมสามารถแบ่งได้เป็น 3 ระยะหลักตามรูปร่างลักษณะของเชื้อในวัฏจักร erythrocytic cycle หรือ blood stage โดยเริ่มต้นจากเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมในระยะริง (ring) ที่ตัวเชื้อจะมีรูปร่างลักษณะคล้ายวงแหวนที่มีหัวเพชร หลังจากนั้นเชื้อจะพัฒนาตัวเองด้วยการสร้างและขยายขอบเขตของไซโทพลาซึมของเชื้อ เข้าสู่ระยะโทรโฟซอइट (trophozoite) และต่อจากนั้น เมื่อเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมพัฒนาตัวเองให้แก่ขึ้น จะเข้าสู่ระยะไซซอนต์ (schizont) ที่ไซโทพลาซึมของเชื้อจะมีสีเข้มขึ้น แล้วมีลักษณะจุด ๆ ภายในตัวไซโทพลาซึมของเชื้อ โดยจุดดังกล่าวที่สังเกตได้คือ เชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมระยะเมอโรซอइट (merozoite) เมื่อเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมในระยะไซซอนต์แก่เต็มที่ ตัวเชื้อจะแตกและปลดปล่อยเมอโรซอइटออกมาจำนวนมาก ประมาณ 12-24 เมอโรซอइटต่อ 1 ไซซอนต์ และเมอโรซอइटดังกล่าวจะเคลื่อนที่เพื่อไปรุกรานเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย

ต่อไป อย่างไรก็ตามในบางกรณีที่สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมสำหรับตัวเชื้อ เชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมก็สามารถพัฒนาตัวเองเข้าสู่ระยะแกมีโทไซต์ (gametocyte) ได้ ดังแสดงในภาพที่ 2.1

ในมนุษย์ที่ได้รับเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมเข้าสู่ร่างกาย เริ่มต้นจากการที่มนุษย์ถูกยุงก้นปล่องที่เป็นพาหะกัดและปล่อยเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมในระยะสปอโรซอइट (sporozoite) ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนภายในตัวยุงแบบอาศัยเพศในวัฏจักรที่เรียกว่า sporogonic cycle เข้าสู่กระแสเลือด จากนั้นสปอโรซอइटจะเคลื่อนที่ไปตามระบบหมุนเวียนโลหิตเพื่อเดินทางไปบริเวณตับและรุกรานเข้าสู่เซลล์ตับ เพื่อเพิ่มจำนวนและพัฒนาตัวเอง โดยเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมจะต้องมีการพัฒนาตัวเองที่บริเวณเซลล์ตับของมนุษย์ก่อน ซึ่งเป็นวัฏจักรที่เรียกว่า exo-erythrocytic cycle หรือ liver stage แล้วจึงสร้างและปล่อยเมอโรซอइटออกมา เพื่อรุกรานเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงต่อไป เข้าสู่วัฏจักร erythrocytic cycle หรือ blood stage ที่เป็นระยะที่เชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศในเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมจะมีการพัฒนาตัวเองในเซลล์เม็ดเลือดแดงและปลดปล่อยเมอโรซอइटจำนวนมากออกมา และเมอโรซอइटที่ได้จะไปรุกรานเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงเซลล์ใหม่ต่อไปวนเวียนเป็นวัฏจักร ก่อนที่เชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมจะมีการพัฒนาตัวเองเข้าสู่ระยะแกมีโทไซต์ เพื่อกลับไปเพิ่มจำนวนภายในตัวยุงแบบอาศัยเพศ เมื่อมียุงก้นปล่องมากัดและรับเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมระยะแกมีโทไซต์จากผู้ป่วย ดังภาพที่ 2.2 (Bousema *et al.*, 2014; Cox, 2010; Kalanon and McFadden, 2010) นอกจากนี้มีการรายงานว่าเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมอาจจำเป็นต้องอาศัยตัวจับ (receptor) บนผิวของเซลล์เม็ดเลือดแดงในการรุกรานเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดง โดยโปรตีนชนิด CD108 CD147 และ CD235a ถูกรายงานว่ามีแนวโน้มจะเป็นตัวจับที่สำคัญ (Bartholdson *et al.*, 2013; Crosnier *et al.*, 2011; Pasvol *et al.*, 1982)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

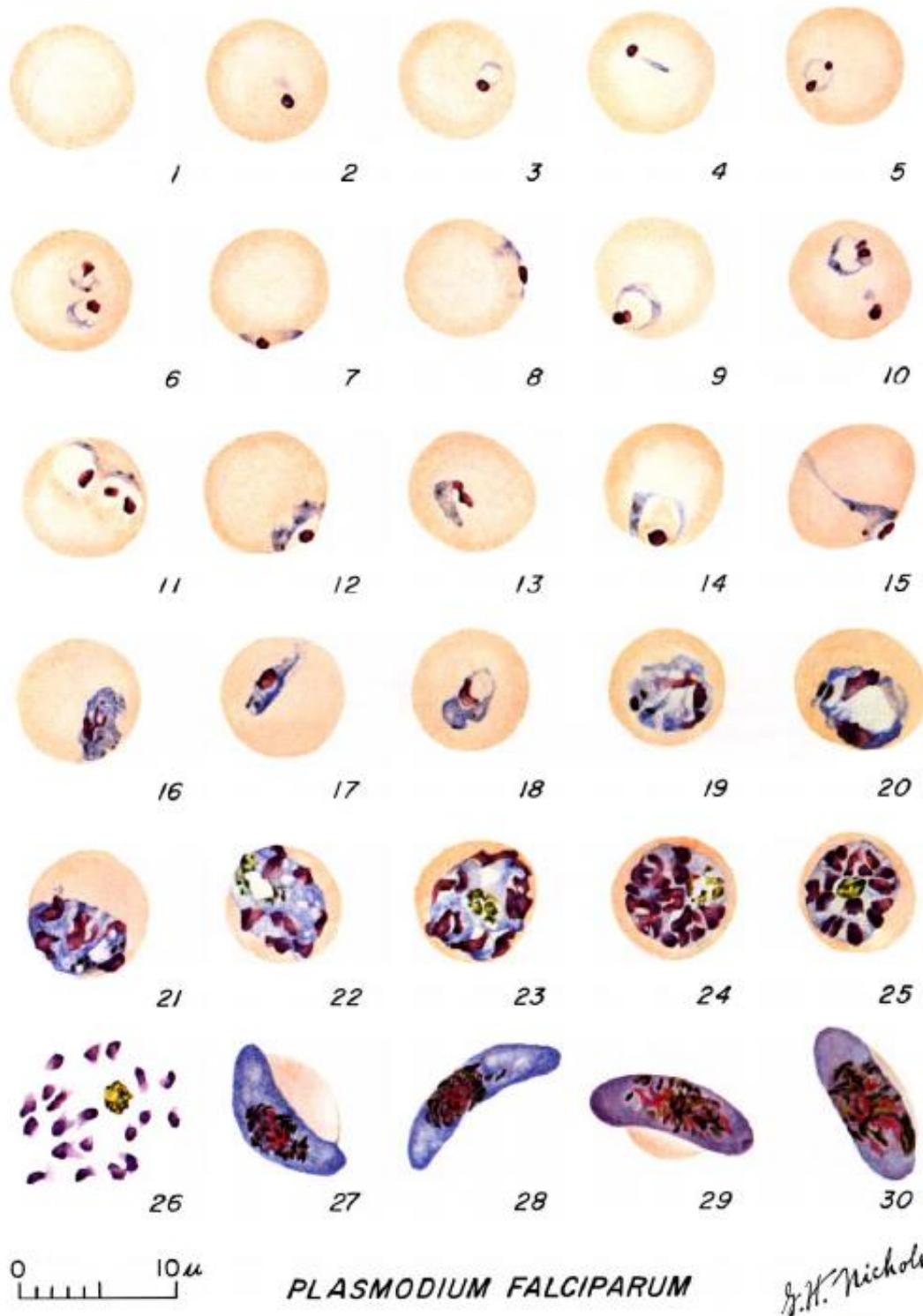
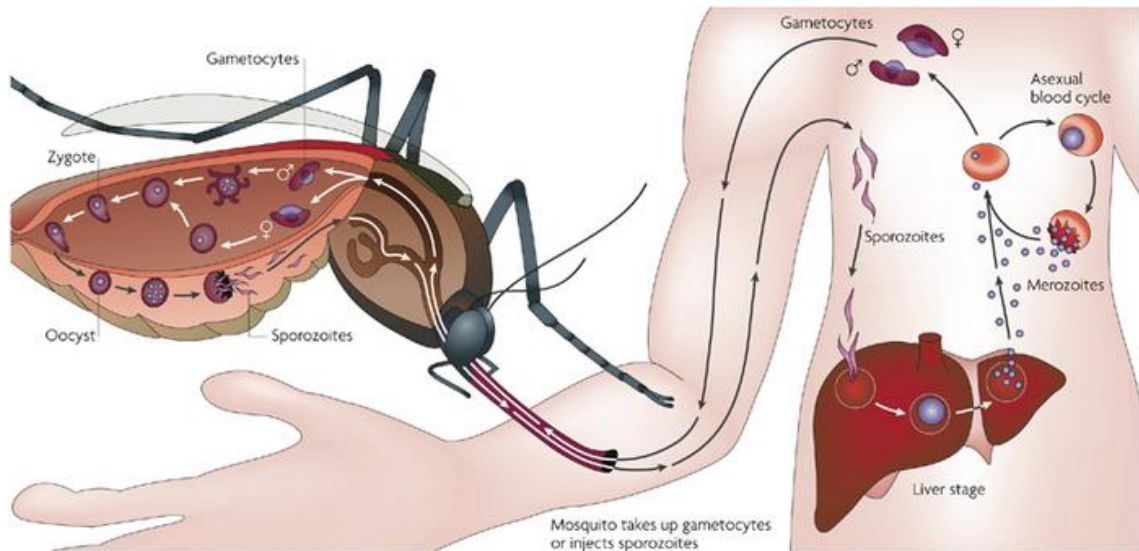


Fig. 1: Normal red cell
 Figs. 2-18: Trophozoites (among these, Figs. 2-10 correspond to ring-stage trophozoites)

Figs. 19-26: Schizonts (Fig. 26 is a ruptured schizont)
 Figs. 27, 28: Mature macrogametocytes (female)
 Figs. 29, 30: Mature microgametocytes (male).

ภาพที่ 2.1 ระยะต่าง ๆ ของเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม (Coatney *et al.*, 1971)



ภาพที่ 2.2 วัฏจักรชีวิตของเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม (Su *et al.*, 2007)

2.3 การรักษาผู้ป่วยโรคมาลาเรียที่มีสาเหตุมาจากเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม

ในปัจจุบันมีแนวทางในการรักษาผู้ป่วยโรคมาลาเรียที่ได้รับเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมและการควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม ประกอบด้วยการใช้ยาต้านเชื้อปรสิตดังกล่าวโดยตรง และการให้วัคซีนในเด็ก เพื่อให้เด็กมีภูมิคุ้มกันต่อโรคมาลาเรียที่มีสาเหตุเกิดจากเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม

2.3.1 การรักษาผู้ป่วยโรคมาลาเรียโดยอาศัยการใช้ยาต้านเชื้อ

ในปัจจุบันมียาต้านเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมที่ถูกใช้กันอย่างแพร่หลายทั่วโลกมากมาย โดยยาชนิดหลัก ๆ ที่ถูกใช้ในปัจจุบันจะเป็นยาในกลุ่มยาอาร์เทมิซินิน (artemisinin) ที่เป็นกลุ่มอนุพันธ์ยาที่แยกสกัดได้จากใบของต้นพืช *Artemisia annua* ซึ่งมีการรายงานว่ามีประสิทธิภาพในการต่อต้านเชื้อปรสิตนี้สพลาสโมเดียม โดยเฉพาะเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมที่เป็นสาเหตุของโรคมาลาเรีย อนุพันธ์ยาอาร์เทมิซินินถูกค้นพบโดยนักวิทยาศาสตร์ชาวจีนชื่อ Tu Youyou โดยใช้กระบวนการสกัดที่อุณหภูมิต่ำและยาที่สกัดได้มีชื่อเรียกว่า Qinghaosu (Su and Miller, 2015) ปัจจุบันองค์การอนามัยโลกได้มีการแนะนำให้ใช้กลุ่มยาอาร์เทมิซินินเป็นยาทางเลือกชนิดแรก ๆ ในการบำบัดรักษาผู้ป่วยจากการติดเชื้อมาลาเรียที่มีสาเหตุจากเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมที่มีอาการไม่ซับซ้อนหรือรุนแรง โดยตัวกลุ่มยาดังกล่าวสามารถลดจำนวนเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมได้อย่างรวดเร็วภายใน 3 วันแรกของการรักษา อย่างไรก็ตาม

ผู้ป่วยยังคงต้องได้รับกลุ่มยาอย่างต่อเนื่องร่วมกับใช้ยาต้านเชื้อมาลาเรียชนิดอื่น ๆ ด้วย (artemisinin-based combination therapies; ACTs) เช่น คลอโรควิน (เป็นยาในกลุ่ม 4-aminoquinoline) เมโฟลควิน (เป็นยาในกลุ่ม amino alcohol) และลูมิเฟนทรีน (เป็นยาในกลุ่ม amino alcohol) จนกระทั่งอาการของผู้ป่วยดีขึ้น อย่างไรก็ตามในปี ค.ศ.2015 มีรายงานเรื่องการดื้อยาอาร์เทมิซินินของเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพาร์มใน 5 ประเทศของกลุ่มแม่น้ำโขง ได้แก่ กัมพูชา ลาว พม่า ไทย และเวียดนาม และมีความเสี่ยงที่การดื้อยานี้ จะกระจายไปยังภูมิภาคอื่น ๆ ด้วย ทั้งนี้เป็นผลมาจากปัจจัยหลายประการ เช่น การใช้ยาอย่างไม่เป็นไปตามหลักมาตรฐานของการรักษา และการกลายพันธุ์ (mutation) ของเชื้อ จนนำไปสู่การดื้อยา เป็นต้น (Haldar *et al.*, 2018; Imwong *et al.*, 2017; Basu and Sahi, 2017; Qidwai, 2014; Su and Miller, 2015)

2.3.2 การควบคุมการแพร่ระบาดของโรคมาลาเรียโดยอาศัยการใช้วัคซีน

ตั้งแต่ในช่วงปี ค.ศ.1960 นักวิทยาศาสตร์ได้เริ่มมีแนวคิดในการพัฒนาสร้างวัคซีนเพื่อใช้ในการควบคุมการแพร่ระบาดของโรคมาลาเรีย โดยเริ่มจากการศึกษาการสร้างภูมิคุ้มกันในหนูที่ได้รับเชื้อปรสิตที่เป็นสาเหตุของโรคมาลาเรียในระยะสปอโรซอยต์ และวิเคราะห์กลไกของระบบภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นในโมเดลหนู จนกระทั่งในปี ค.ศ.1975 ได้มีรายงานของ Clyde ที่ระบุว่าได้ทำการศึกษาการสร้างภูมิคุ้มกันในมนุษย์ที่ได้รับเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพาร์มและเชื้อพลาสโมเดียม ไวแวกซ์ (*P. vivax*) โดยพบว่าความสามารถในการป้องกันและต้านทานเชื้อในอาสาสมัครจะเพิ่มขึ้น เมื่ออาสาสมัครถูกกัดโดยยุงก้นปล่องที่มีเชื้อปรสิตที่เป็นสาเหตุของโรคมาลาเรียจำนวนหลาย ๆ ครั้ง นอกจากนี้ยังมีการระบุหาชนิดของโปรตีนบนผิวของเซลล์ของเชื้อพลาสโมเดียมในระยะสปอโรซอยต์ (circumsporozoite protein; CS) จนนำไปสู่การโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนชนิดดังกล่าวได้สำเร็จ เพื่อนำมาใช้ออกแบบวัคซีนที่จำเพาะต่อเชื้อพลาสโมเดียมในระยะสปอโรซอยต์ (Clyde, 1975) หลังจากนั้นจึงมีการออกแบบวัคซีนที่จำเพาะต่อเชื้อพลาสโมเดียมในระยะอื่น ๆ ออกมา (Coelho *et al.*, 2017) วัคซีน SPf66 เป็นวัคซีนต่อต้านโรคมาลาเรียที่มีสาเหตุมาจากเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพาร์มชนิดแรกที่ถูกคิดค้นและถูกนำมาทดลองใช้ในช่วงปี ค.ศ.1993-1995 โดยวัคซีนดังกล่าวถูกรายงานว่าสามารถถูกใช้ได้ผลกับผู้ป่วยโรคมาลาเรียที่เป็นเด็กร้อยละ 31 ในประเทศโคลัมเบีย แต่กลับไม่ได้ผลเลยกับผู้ป่วยโรคมาลาเรียที่เป็นเด็กในประเทศอื่น ๆ บางประเทศ เช่น ไทย แคมเบีย และแทนซาเนีย เป็น

ต้น ทั้งนี้มีการอธิบายสาเหตุว่าอาจเกิดจากความแตกต่างกันทางพันธุกรรมของประชากรในแต่ละประเทศ หรือเชื่อมาลาเรียในแต่ละประเทศอาจมีโครงสร้างทางชีววิทยาที่แตกต่างกัน (Alonso *et al.*, 1994; D'Alessandro *et al.*, 1995; Nosten *et al.*, 1996) ในช่วงเวลาเดียวกันต่อจากนั้นวัคซีน RTS,S ก็ได้ถูกคิดค้น พัฒนาและถูกนำมาทดลองใช้เรื่อย ๆ จนถึงปัจจุบัน โดยวัคซีน RTS,S ก็ยังคงไม่สามารถถูกใช้ได้ผลที่แน่นอนกับผู้ป่วยที่เป็นเด็กทุกคน โดยมีการรายงานว่าวัคซีน RTS,S สามารถถูกใช้ได้ผลกับผู้ป่วยโรคมาลาเรียที่เป็นเด็กอยู่ในช่วงร้อยละ 30-50 ขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่อาสาสมัครได้รับวัคซีนและอายุของอาสาสมัคร (Rohingya, 2016) ปัจจุบันจึงมีการใช้วัคซีน RTS,S ที่ถูกพัฒนาขึ้นมาใหม่ล่าสุด คือ วัคซีน RTS,S/AS01 ที่สามารถถูกใช้ได้ผลกับผู้ป่วยโรคมาลาเรียที่เป็นเด็กร้อยละ 62 หากมีการให้วัคซีนกับอาสาสมัครจำนวน 3 ครั้ง ในเดือนที่ 0 1 และ 2 และค่าร้อยละของผู้ป่วยโรคมาลาเรียที่เป็นเด็กที่วัคซีน RTS,S/AS01 สามารถถูกใช้แล้วได้ผลจะเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 86 หากอาสาสมัครมีการได้รับวัคซีนครั้งที่ 4 ในเดือนที่ 6 อย่างไรก็ตามการใช้วัคซีน RTS,S/AS01 ในผู้ป่วยโรคมาลาเรียที่ยังเป็นทารกยังคงไม่ได้ผลที่ดีเท่าที่ควร (เพียงร้อยละ 23-30) ซึ่งการพัฒนาวัคซีน RTS,S/AS01 จึงต้องมีการดำเนินต่อไป (Draper, 2018; Hill, 2011; Mahmoudi and Keshavarzb, 2017)

2.4 การดื้อยาของเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม

ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน มีการค้นพบยาต้านเชื้อปรสิตที่เป็นสาเหตุของโรคมาลาเรียในมนุษย์มากมายหลายชนิด ที่ส่วนใหญ่มุ่งเน้นในการรักษาโรคมาลาเรียที่มีสาเหตุมาจากเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม เช่น ควินิน (quinine) (เป็นยาในกลุ่ม arylamino alcohol) คลอโรควิน (เป็นยาในกลุ่ม 4-aminoquinoline) เอโมไดอาควิน (amodiaquine) (เป็นยาในกลุ่ม 4-aminoquinoline) ไพเพอราควิน (piperaquine) (เป็นยาในกลุ่ม 4-aminoquinoline) เมโฟลควิน (เป็นยาในกลุ่ม amino alcohol) ลูมิแฟนทรีน (เป็นยาในกลุ่ม amino alcohols) และซัลฟาดอกซิน/ไพริเมตามีน (sulfadoxine/pyrimethamine) (เป็นยาในกลุ่ม antifolate) เป็นต้น ซึ่งยาดังกล่าวข้างต้นเคยถูกรายงานว่าสามารถใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคมาลาเรียได้ผลดีมาแล้วในอดีตช่วงปี ค.ศ.1930-2010 แต่ในเวลาต่อมากลับมีการรายงานการพบการดื้อยาของเชื้อปรสิตที่เป็นสาเหตุของโรคมาลาเรียออกมาเรื่อย ๆ จึงทำให้ในปัจจุบันกลุ่มยาดังกล่าวข้างต้นเพียงชนิดใดชนิดหนึ่งไม่สามารถถูกนำมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคมาลาเรียได้ผลอีกต่อไป ในปี ค.ศ.2015 มีการคิดค้นยาอาร์เทมิซินินที่เป็นยาชนิดล่าสุดที่ถูกรายงานว่าสามารถใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคมาลาเรียที่ได้ผลดีที่สุด ณ ขณะนี้ อย่างไรก็ตามยังพบว่าผู้ป่วยโรคมาลาเรียในบางประเทศในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ที่ยาอาร์เทมิซินินไม่สามารถใช้ในการรักษาได้ผล จนในปัจจุบัน

องค์การอนามัยโลกได้มีการแนะนำให้ใช้ยาอาร์เทมิซินินร่วมกับการใช้ยาต้านเชื้อมาลาเรียชนิดอื่น ๆ ที่เคยใช้ได้ผลในอดีตข้างต้นด้วย (Artemisinin-based combination therapies; ACTs) เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพในการรักษาโรคมมาลาเรียที่ดีที่สุด นอกจากนี้ยังมีการรายงานความเป็นไปได้ว่าการเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *PfKelch13* (K13) ซึ่งเป็นเครื่องหมายของการดื้อยาอาร์เทมิซินิน (artemisinin resistance marker) จะทำให้เชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมดื้อต่อยาอาร์เทมิซินินได้ ซึ่งนำไปสู่ความจำเป็นที่ต้องคิดค้นหาวัคซีนใหม่ ๆ เพื่อมาใช้ในการรักษาโรคมมาลาเรียต่อไปในอนาคต (Boussaroque *et al.*, 2016; Cui *et al.*, 2015; Fairhurst and Dondorp, 2016; Kim and Schneider, 2013; Su and Miller, 2015; WHO, 2017) สำหรับการดื้อของเชื้อปรสิตที่เป็นสาเหตุของโรคมมาลาเรียในมนุษย์ มีการอธิบายว่าเกิดจากวิวัฒนาการของเชื้อปรสิตที่เกิดขึ้นระหว่างการถูกให้ยาต้านเชื้อมาลาเรียในการรักษาผู้ป่วย โดยมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นในระดับพันธุกรรม (genetic variation leads to evolutionary change) เพื่อพยายามปรับตัวให้รอดจากการถูกให้ยาต้านเชื้อมาลาเรีย เป็นไปตามหลักทฤษฎีการคัดเลือกตามธรรมชาติ (natural selection) ของ Charles Darwin และหลักการ modern evolutionary synthesis ที่อธิบายแสดงถึงความสัมพันธ์กันระหว่างการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้น เช่น การกลายพันธุ์ การเปลี่ยนแปลงความถี่ของแอลลีลอย่างรวดเร็วเป็นแบบสุ่ม (random genetic drift) เป็นต้น กับการเกิดวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตของ Julian Huxley (Escalante *et al.*, 2009; Gilmour, 1944; Kim and Schneider, 2013) ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ในปัจจุบันยังไม่มียาต้านเชื้อมาลาเรียชนิดใดที่สามารถถูกใช้รักษาผู้ป่วยโรคมมาลาเรียให้ได้ผลแน่นอน

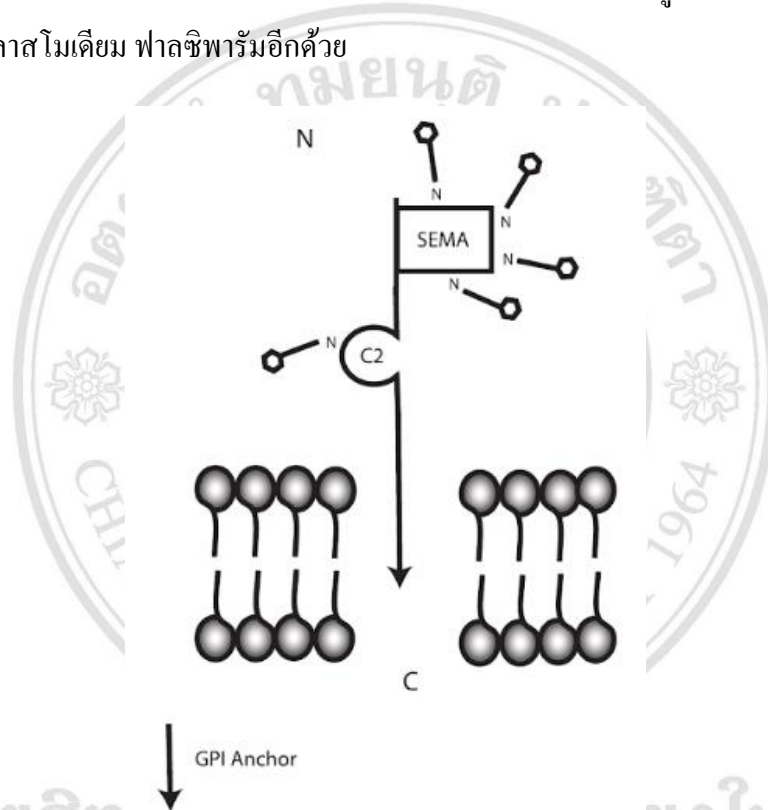
2.5 โปรตีนที่เกี่ยวข้องในการรุกรานของเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดง

มีการรายงานว่าโปรตีนชนิด CD108 CD147 และ CD235a เป็นตัวจับบนผิวของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่เกี่ยวข้องในกระบวนการการรุกรานเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงของเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม (Bartholdson *et al.*, 2013; Crosnier *et al.*, 2011; Pasvol *et al.*, 1982)

2.5.1 โปรตีนชนิด CD108

โปรตีนชนิด CD108 มีขนาดประมาณ 76-80kDa มีชื่อเรียกอื่น ๆ ได้แก่ GPI-gp80 John Milton Hagen (JMH) Sema L และ Sema K1 ถูกสร้างจากยีน SEMA7A โปรตีนชนิด CD108 ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 602 ตัว ที่เป็น glycosylphosphatidylinositol (GPI) เกาะอยู่กับไกลโคโปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์และกลุ่มโปรตีนใน semaphorin family ในกลุ่ม immunoglobulin (Ig) superfamily โดยโปรตีนชนิด CD108 จะยื่นส่วนโดเมน Ig C2 ที่มีส่วน RGD (Arg-Gly-Asp) ที่เป็นลำดับโปรตีนเกี่ยวข้องกับ cell attachment ออก

นอกเซลล์ (ภาพที่ 2.3) สำหรับหน้าที่ของโปรตีนชนิด CD108 ยังไม่เป็นที่แน่ชัด แต่ทราบว่ายึดเกาะในกระบวนการการเกิดการอักเสบ และช่วยเป็นที่ยึดจับของแอนติเจน JMH บนผิวของเซลล์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการกำหนดหมู่เลือดหมู่ JMH นอกจากนี้โปรตีนชนิด CD108 ถูกรายงานว่าสามารถตรวจพบได้บนเซลล์ประสาท เซลล์ลิมโฟไซต์ เซลล์โมโนไซต์ เซลล์แมคโครเฟจ และเซลล์กล้ามเนื้อ (Johnson, 2014; Zola *et al.*, 2007) จากรายงานของ Bartholdson *et al.* ในปี 2013 ยังระบุว่าโปรตีนชนิด CD108 บนผิวของเซลล์เม็ดเลือดแดงเป็นตัวจับสำหรับโปรตีน MTRAP ที่อยู่บนผิวของเซลล์ของเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมอีกด้วย

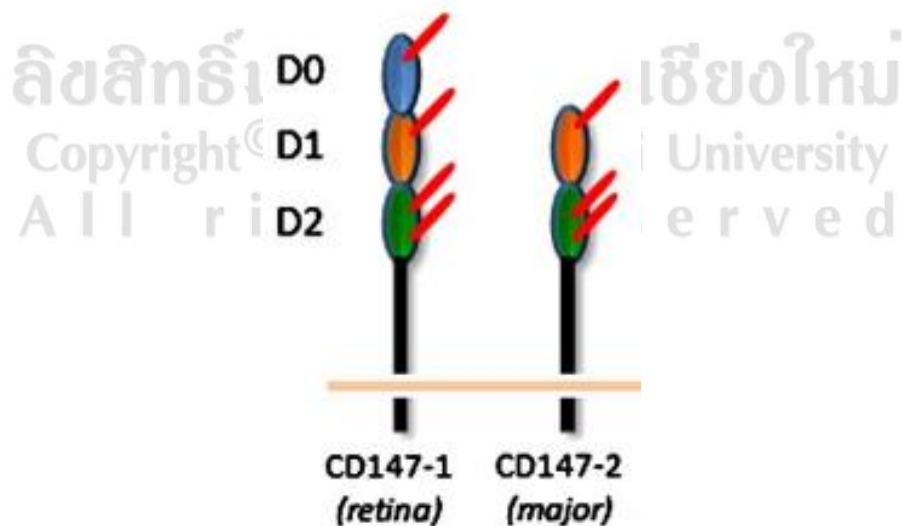


ภาพที่ 2.3 โครงสร้างของโปรตีนชนิด CD108 (Zola *et al.*, 2007)

2.5.2 โปรตีนชนิด CD147

โปรตีนชนิด CD147 มีชื่อเรียกอื่น ๆ ได้แก่ basigin และ EMMPRIN โปรตีนชนิด CD147 เป็นไกลโคโปรตีนที่แทรกผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ อยู่ในกลุ่ม Ig superfamily ซึ่งพบได้ 2 รูปแบบหลัก คือ basigin หรือ basigin-2 หรือ CD147 หรือ CD147-2 ที่ประกอบไปด้วย 2 โดเมน และ basigin-1 หรือ CD147-1 ที่มี 3 โดเมน (ภาพที่ 2.4) โปรตีนชนิด CD147 เคยถูกรายงานว่าเป็นตัวจับสำหรับ cyclophilins S100A9 และไกลโคโปรตีนของเกล็ดเลือด 6 (platelet glycoprotein VI) ในขณะที่โปรตีนชนิด CD147-1 เป็นตัวจับ

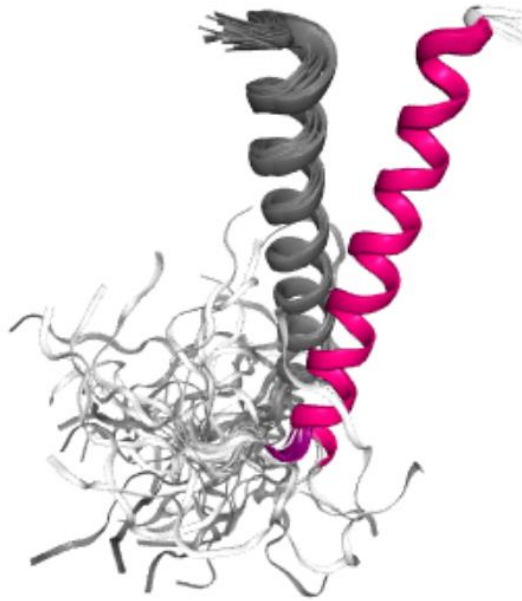
สำหรับ rod-derived cone viability factor ในเซลล์เรตินาในตา นอกจากนี้โปรตีนชนิด CD147 ยังจับกับ monocarboxylate transporters (MCTs) และเกี่ยวข้องกับ การเปลี่ยนแปลงที่ผิวของเซลล์ (cell surface translocation) มีการรายงานว่โปรตีนชนิด CD147 จับกับโปรตีนชนิดต่าง ๆ เช่น GLUT1 CD44 และ CD98 เป็นต้น ในระบบภูมิคุ้มกัน เลคิตินที่เป็นโปรตีนในระบบภูมิคุ้มกันสามารถจดจำโปรตีนชนิด CD147 บนผิวของเซลล์ได้จากส่วนของคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบในโครงสร้างของโปรตีนชนิด CD147 เช่น galectin-3 และ E-selectin เป็นต้น จะเห็นได้ว่าโปรตีนชนิด CD147 มีส่วนเกี่ยวข้องกับโปรตีนหลายชนิดมากมาย ด้วยเหตุนี้จึงทำให้พบโปรตีนชนิด CD147 เกี่ยวข้องในการทำงานที่หลากหลายในเซลล์ เช่น การควบคุมการผ่านเข้าออกของสาร การเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวกลุ่ม inflammatory leukocytes การสร้าง matrix metalloproteinases (MMPs) การสร้างเซลล์สเปิร์ม และการกำหนดหมู่เลือดหมู่ Ok จาก การที่เป็นที่ยึดเกาะของแอนติเจน Ok^a ในเซลล์เม็ดเลือดแดง ยิ่งไปกว่านั้นโปรตีนชนิด CD147 ยังมีบทบาทสำคัญในการพัฒนาของระบบประสาท เซลล์เม็ดเลือดขาว ฟัตัส (fetus) และ extracellular matrix (ECM) โปรตีนชนิด CD147 ถูกรายงานว่เกี่ยวข้องกับ การเกิดโรคหัวใจ โรคอัลไซเมอร์ โรคหลอดเลือดในสมอง และโรคมะเร็ง โดยใน เซลล์มะเร็งและเนื้องอกพบว่ามีระดับการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD147 ที่สูงกว่า เซลล์ปกติ (Daniels, 2013; Iacono et al., 2007; Muramatsu, 2016) นอกจากนี้โปรตีน CD147 ยังถูกระบุว่เป็นตัวจับบนผิวของเซลล์เม็ดเลือดแดงสำหรับโปรตีน RH5 ที่อยู่ บนผิวของเซลล์ของเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม (Crosnier et al., 2011)



ภาพที่ 2.4 โครงสร้างของโปรตีนชนิด CD147 (ดัดแปลงจาก Grass and Toole, 2015)

2.5.3 โปรตีนชนิด CD235a

โปรตีนชนิด CD235a หรือ GYPA หรือ glycophorin A ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 151 ตัว เป็นโปรตีนประเภท sialoglycoprotein ที่พบได้บนผิวของเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยจะยื่นสายกรดอะมิโนฝั่งปลาย N (N-terminal) ออกนอกเซลล์ (ภาพที่ 2.5) โปรตีนชนิด CD235a ถูกสร้างจากยีน GYPA บนโครโมโซมแท่งที่ 4 ตำแหน่ง 4q31.21 ซึ่งมีรายงานว่าทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการกำหนดหมู่เลือดหมู่ MNS โดยการเป็นที่ยึดเกาะของแอนติเจน MNS โดยปกติหมู่เลือด MNS จะไม่มีผลให้เกิดอาการทางคลินิก แต่ในกรณีการเกิด autoantibodies ในตำแหน่งของโครงสร้างโปรตีน ได้แก่ ตำแหน่ง En^a Pr Vw Or M N S และ U ในผู้ป่วย autoimmune haemolytic anaemia (AIHA) จะทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงเกิดการแตกตัวได้ในพีตัสและทารกแรกคลอด (Reid, 2009) นอกจากนี้โปรตีนชนิด CD235a ยังเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของโปรตีน SL4CA1 หรือ band3 ที่เชื่อมเซลล์ในเซลล์เม็ดเลือดแดง (Bruce *et al.*, 2004; Young and Tanner, 2003; Young *et al.*, 2000) จากการศึกษาของ Pasvol *et al.* (1982) ระบุว่าโปรตีนชนิด CD235a อาจเป็นตัวจับสำคัญสำหรับการรุกรานของเชื้อพลาสมาเดียม ฟาลซิพารัม โดยเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ถูกกำจัดโปรตีนชนิด CD235a ออกจากผิวของเซลล์ด้วยทริปซิน จะสามารถลดและป้องกันการรุกรานของเชื้อพลาสมาเดียม ฟาลซิพารัมได้ นอกจากนี้ยังมีการรายงานที่ระบุว่าโปรตีนชนิด CD235a เป็นตัวจับบนผิวของเซลล์เม็ดเลือดแดงสำหรับโปรตีน erythrocyte-binding antigen 175 (EBA-175) ที่อยู่บนผิวของเซลล์ของเชื้อพลาสมาเดียม ฟาลซิพารัมและยังเป็นตัวจับสำหรับไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Influenza virus) และไวรัสตับอักเสบเอ (Hepatitis A virus; HAV) ด้วย (Sanchez *et al.*, 2004; Sim *et al.*, 1994)

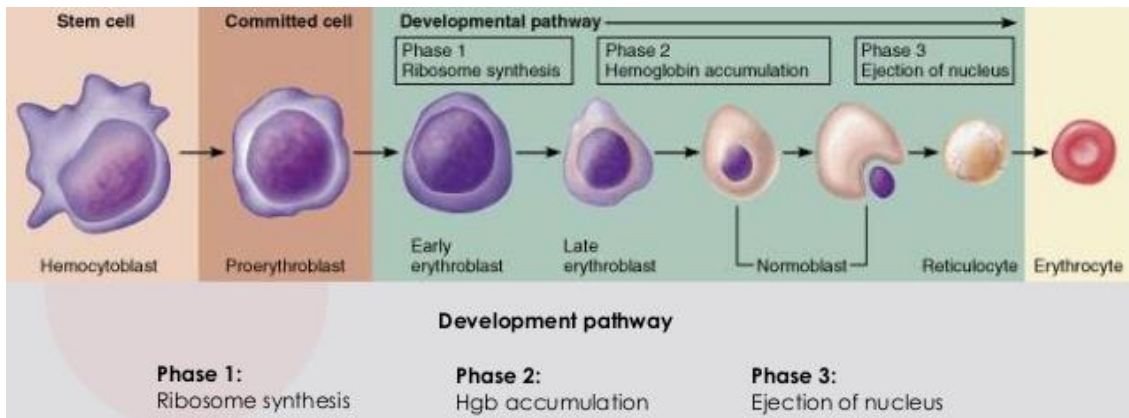


ภาพที่ 2.5 โครงสร้าง 3 มิติของโปรตีนชนิด CD235a (PCSB PDB, 2019)

2.6 เซลล์เม็ดเลือดแดง

เซลล์เม็ดเลือดแดงมีความเกี่ยวข้องกับเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพารัม โดยพบว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงทำหน้าที่เป็นเซลล์เจ้าบ้าน (host) สำหรับเชื้อทั้งในสิ่งมีชีวิต (*in vivo*) และในหลอดทดลอง (*in vitro*) (Schuster, 2002) เซลล์เม็ดเลือดแดงเป็นเซลล์ชนิดหนึ่งที่สำคัญในร่างกายมนุษย์ ทำหน้าที่ในการลำเลียงออกซิเจนไปยังส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย ในมนุษย์พบว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงถูกสร้างได้จากตับและไขกระดูก (Finne and Halvorsen, 1972) โดยในการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดไปเป็นเซลล์เม็ดเลือดแดง เซลล์ในแต่ละระยะจะมีการแสดงออกของยีนต่าง ๆ ที่แตกต่างกันออกไป (Watt *et al.*, 1987) ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุลที่ถูกศึกษาและนิยมใช้ในการบ่งบอก ว่าเซลล์มีการพัฒนาไปเป็นเซลล์เม็ดเลือดแดงมี 2 ชนิด คือยีน CD71 ที่พบว่ามีการแสดงออกมากตั้งแต่ช่วงที่เซลล์อยู่ในระยะโปรอีรีโทบลาส (proerythroblast) ที่เป็นเซลล์ระยะต้นของเซลล์ที่กำลังพัฒนาไปเป็นเซลล์เม็ดเลือดแดง ซึ่งการแสดงออกของยีน CD71 จะค่อย ๆ ลดลงและหมดไปในเซลล์เม็ดเลือดแดง และยีน CD235a ที่พบว่ามีการแสดงออกตั้งแต่ในเซลล์ระยะโปรอีรีโทบลาสเช่นกัน แต่การแสดงออกดังกล่าวจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและคงที่ในเซลล์เม็ดเลือดแดง และยังพบว่าปริมาณฮีโมโกลบินที่ถูกสร้างและสะสมภายในเซลล์มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับการแสดงออกของยีน CD235a ดังภาพที่ 2.6 (Attar, 2014; Chen *et al.*, 2009; Van Lochem *et al.*, 2004; Marsee *et al.*, 2010; Pan and Johnstone, 1983) นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกของยีน CD108 ที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับความปลอดภัย

ของเซลล์เม็ดเลือดแดง และขึ้น CD147 ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโมเลกุลฮีคเาะ ในกระบวนการพัฒนาของเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วย (Daniels, 2013)



	MEP	Proerythroblast	Basophilic Erythroblast	Polychromatophilic Erythroblast	Erythrocyte
CD71	-	+++	+++	+++	-
CD235a	-	+ / ++	+++	+++	+++
Hemoglobin	-	-	- / +	+	+++

MEP means megakaryocyte-erythrocyte progenitor cell; +++ means strong expression; ++ means moderate expression; + means weak expression; +/- means very weak expression; - means no expression; NA means Data Not Available.

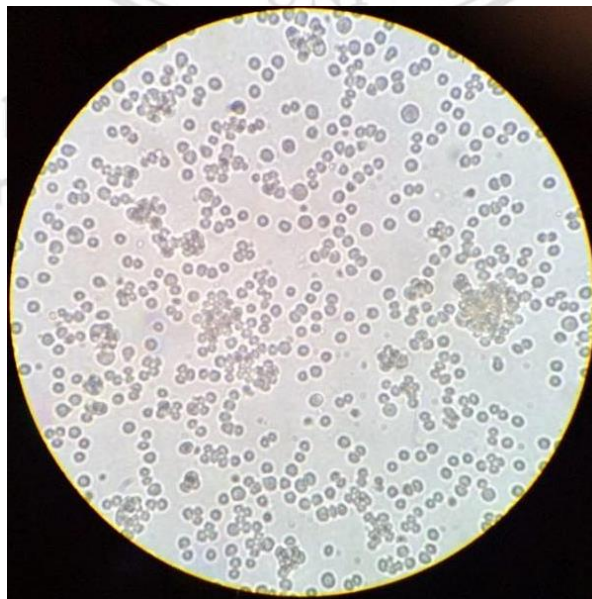
ภาพที่ 2.6 กระบวนการพัฒนาของเซลล์เพื่อสร้างเซลล์เม็ดเลือดแดง (Attar, 2014; Reece *et al.*, 2006)

2.7 เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือด

เนื่องจากปกติเซลล์เม็ดเลือดแดงทำหน้าที่เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพารัม ทั้งในสิ่งมีชีวิตและในหลอดทดลอง โดยมีการรายงานที่เซลล์เม็ดเลือดแดงมีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD108 CD147 และ CD235a ที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการรุกรานของเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพารัม (Bartholdson *et al.*, 2013; Pasvol *et al.*, 1982) ดังนั้นเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการและยังไม่เคยมีรายงานการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD108 CD147 และ CD235a ซึ่งน่าจะมีการแสดงออกของโปรตีนทั้ง 3 ชนิดแตกต่างกับเซลล์เม็ดเลือดแดงอย่างสิ้นเชิง จึงเป็นตัวลึกลับที่น่าสนใจที่จะถูกทดลองใช้ในการทดลอง เพื่อศึกษาหาชนิดของโปรตีนบนผิวของเซลล์ที่คาดว่าจะมีความสำคัญและจำเป็นสำหรับเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพารัมที่ต้องอาศัยเพื่อเข้ารุกรานเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงหรือเซลล์อื่นที่ไม่ใช่เซลล์เม็ดเลือดแดง และเป็นแนวทางให้การสร้างและพัฒนายาให้มีผลต่อโปรตีนเป้าหมาย เพื่อใช้ในการรักษาผู้ป่วยมาลาเรียต่อไป

2.7.1 เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Raji

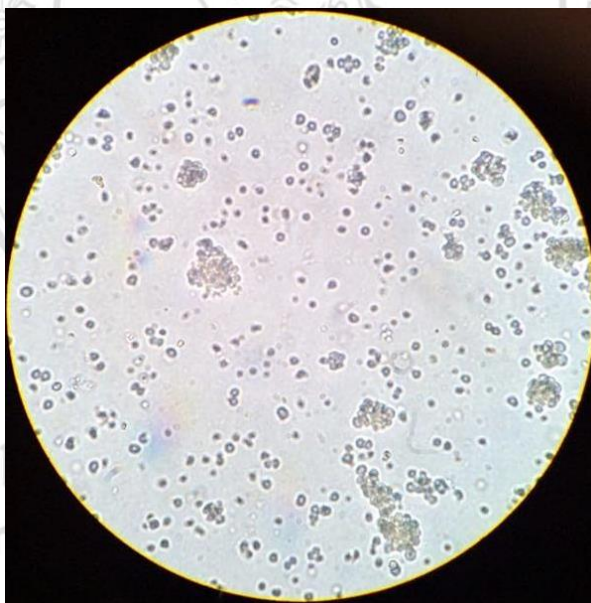
เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Raji เป็นเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดที่ได้มาจากมนุษย์เพศชาย ผิวดำ อายุ 11 ปี ในปี ค.ศ.1963 เป็นผู้ป่วยโรค Burkitt's lymphoma ซึ่งเป็นโรคในกลุ่ม Non-Hodgkin's lymphoma มีจุดกำเนิดจากกลุ่มบีเซลล์ลิมโฟไซท์ (B lymphocyte) ที่ผิดปกติ ในปัจจุบันคาดว่าโรคนี้อาจมีสาเหตุมาจาก Epstein-Barr virus (EBV) โดยโรคดังกล่าวมักพบในผู้ป่วยเด็ก เกิดในขากรรไกรบนมากกว่าขากรรไกรล่าง สำหรับอาการทางคลินิก พบผู้ป่วยมีการบวมของใบหน้า อาจมีอาการปวดหรือชา และมีฟันโยกเนื่องจากการกระดูกโดยรอบถูกทำลาย ลักษณะภาพรังสี จะพบเงาดำขอบเขตไม่ชัดเจน การรักษาโดยเคมีบำบัด ผู้ป่วยมักมีโอกาสกลับมาเป็นใหม่ภายหลังการรักษา เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Raji มีลักษณะเป็นเซลล์ลอย รูปร่างกลม (ภาพที่ 2.7) มีจำนวนชุดโครโมโซมก่อนข้างเสถียร ($2n=46$) โดยพบจำนวนเซลล์ที่มีชุดโครโมโซมมากกว่า 2 ชุด (polyploidy) เพียงร้อยละ 6 (ATCC, 2019; Theofilopoulos *et al.*, 1976) มีรายงานว่าโรค Burkitt's lymphoma เป็นโรคชนิดแรกที่พบการเกิดการสับเปลี่ยนของโครโมโซม (chromosomal translocation) ภายในเซลล์ ซึ่งส่งผลกระทบต่อการทำงานของยีนส่งเสริมมะเร็ง (c-MYC) (Molyneux *et al.*, 2012) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าพบโปรตีนผิวของเซลล์ ได้แก่ โปรตีนชนิด CD5 CD10 CD19 CD20 CD21 CD22 และ CD45 เป็นต้น ซึ่งคล้ายคลึงกับในบีเซลล์ (B cell) (Abbasi-Kenarsari *et al.*, 2015; Kneissl *et al.*, 2013; Trikha *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2004)



ภาพที่ 2.7 รูปร่างลักษณะเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Raji ที่กำลังขยาย 40X

2.7.2 เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Jurkat

เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Jurkat เป็นเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดที่ได้มาจากมนุษย์เพศชาย อายุ 14 ปี ในปี 1997 เป็นผู้ป่วยโรค T-cell leukemia เป็นเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Jurkat มีลักษณะเป็นเซลล์ลอย รูปร่างกลม มักจับตัวอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม ดังภาพที่ 2.8 โดยพบว่ามีเซลล์จำนวนร้อยละ 5.3 ที่มีชุดโครโมโซมมากกว่า 2 ชุด และเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Jurkat ส่วนใหญ่มีคาริโอไทป์ 46,XY,-2,-18,del(2)(p21p23),del(18)(p11.2) (ATCC, 2019) มีรายงานว่าในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Jurkat สามารถถูกตรวจพบโปรตีนชนิด CD3 CD4 CD8 CD34 และ CD38 เป็นต้น และยังมี การแสดงลักษณะที่คล้ายคลึงกับทีเซลล์ (T cell) ตัวเต็มวัย นอกจากนี้ยังพบยีนที่จำเพาะในทีเซลล์ ได้แก่ ยีน *Notch* และ *E2A* อีกด้วย (Inoue *et al.*, 2014)

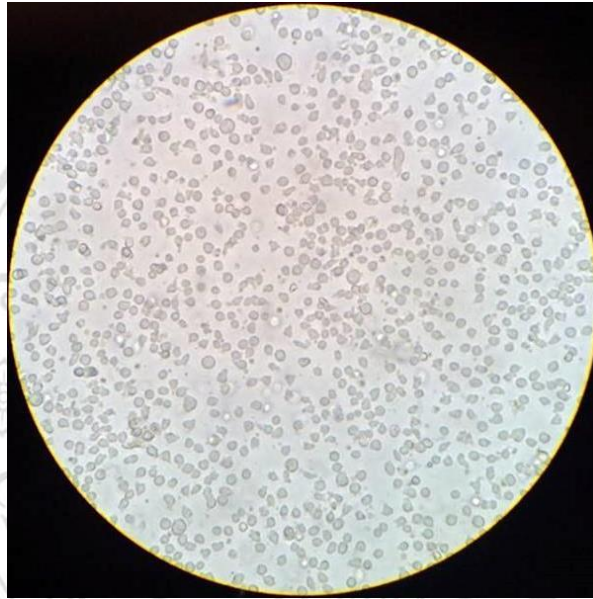


ภาพที่ 2.8 รูปร่างลักษณะเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Jurkat ที่กำลังขยาย 40X

2.7.3 เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937

เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 เป็นเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (histiocytic lymphoma cell line) ชนิด acute myelogenous leukemia (AML) ที่ได้มาจากมนุษย์เพศชาย ผิวขาว อายุ 37 ปี ในปี ค.ศ.1974 เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 เป็น

เซลล์ลอย มีลักษณะรูปร่างกลม ดังภาพที่ 2.9 มีรายงานว่าในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 มีลักษณะที่คล้ายกับเซลล์โปรโมโนไซต์ (promonocyte) ซึ่งสามารถถูกเหนี่ยวนำให้มีการพัฒนาไปเป็นเซลล์โมโนไซต์ (monocyte) ได้ นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD4 แต่ไม่พบ CD14 ที่เป็นโปรตีนเครื่องหมายของเซลล์โมโนไซต์ (ATCC, 2019; Chimal-Ramírez et al., 2016; Moriuchi *et al.*, 1997; Zamani *et al.*, 2013)

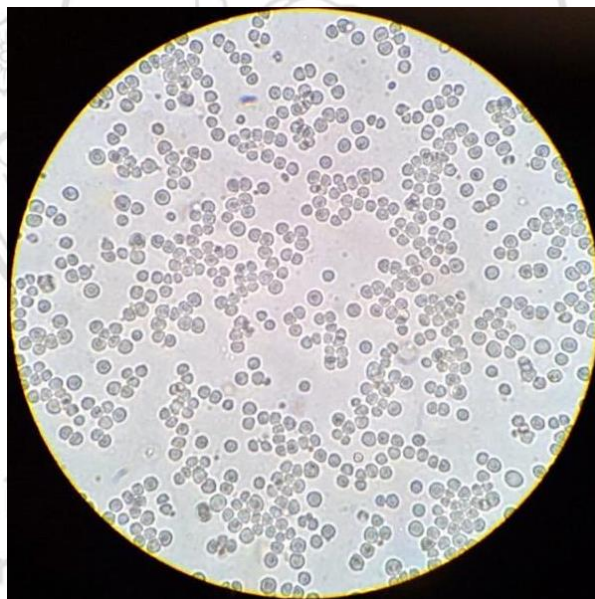


ภาพที่ 2.9 รูปร่างลักษณะเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 ที่กำลังขยาย 40X

2.7.4 เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562

เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 เป็นเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดแดง (erythromyeloblastoid leukemic cell) ชนิด chronic myelogenous leukemia (CML) ที่ได้มาจากมนุษย์เพศหญิง อายุ 53 ปี เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 เป็นเซลล์ลอยและมีลักษณะรูปร่างกลม (ภาพที่ 2.10) เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ถูกรายงานว่า มีลักษณะที่คล้ายคลึงกับเซลล์ระยะต้นที่กำลังจะพัฒนาไปเป็นเซลล์เม็ดเลือดแดง (Andresson *et al.*, 1978; Ohshima, 1994; Zon, 2001) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่รายงานว่าในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 พบการแสดงออกของโปรตีน CD7 CD34 CD45 CD71 CD105 และ HLA-DR เป็นต้น (ATCC, 2019; Inoue *et al.*, 2014; Pourcher *et al.*, 2011) และมีลักษณะที่คล้ายกับเซลล์ระยะต้นที่กำลังจะพัฒนาไปเป็นเซลล์เม็ดเลือดแดง (Andresson *et al.*, 1978; Ohshima, 1994; Zon, 2001)

เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ยังสามารถถูกกระตุ้นให้เกิดการพัฒนาไปทางสายเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ด้วยสารเคมี เช่น ฮีมิน (hemin) และ โซเดียม บิวทิเรต (sodium butyrate) เป็นต้น โดยฮีมินจะส่งผลให้เกิดการเติมหมู่เมทิล (methylation) ให้กับกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของเซลล์เม็ดเลือดแดง (erythroid-specific genes) (Li *et al.*, 2013) ซึ่งพบว่าการสร้างและสะสมฮีโมโกลบินภายในเซลล์เฉื่อยจะอยู่ในช่วง 14-34 พิโคกรัม/เซลล์ และมีระดับการแสดงออกของยีน CD235a ที่เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม การกระตุ้นเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ด้วยฮีมิน จะไม่สามารถทำให้เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 มีการพัฒนาไปเป็นเซลล์เม็ดเลือดแดงสมบูรณ์ได้ (Baliga *et al.*, 1993; Dean *et al.*, 1981) สำหรับการกระตุ้นการพัฒนาของเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ด้วยโซเดียม บิวทิเรต มีบางรายงานระบุว่า โซเดียม บิวทิเรตไม่สามารถกระตุ้นการพัฒนาของเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 บางชนิด ที่เรียกว่า “butyrate-resistant K562r cells” ได้ (Witt *et al.*, 2000)



ภาพที่ 2.10 รูปร่างลักษณะเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่กำลังขยาย 40X

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์ทั่วไป

1. กระจกสไลด์ (glass slide)
2. ขวดสำหรับเลี้ยงเซลล์ (cell culture flask) ขนาด 25 และ 75 ตารางเซนติเมตร (cm²)
3. เข็มเจาะเลือดและหลอดบรรจุเลือดแบบสุญญากาศ
4. คิวเวทสำหรับทำ electroporation (electroporation cuvette) ขนาด 0.4 เซนติเมตร (cm)
5. เครื่องควบคุมการดูดจ่ายสารละลาย (pipette controller)
6. จาน 96 หลุม (96-well plate)
7. จานสำหรับเลี้ยงเซลล์ (cell culture dish) ขนาด 9 และ 78.5 ตารางเซนติเมตร (cm²)
8. จานอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย
9. หัวดูดจ่ายสารละลาย (serological pipette)
10. หัวดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ (autopipette)
11. ถังมือยางพารา
12. ติปสำหรับหัวดูดจ่ายสารละลาย (pipette tip) ขนาด 0.2 20 200 และ 1,000 ไมโครลิตร (μl)
13. แผ่นกรองสารละลายขนาด 0.22 ไมโครเมตร (μm)
14. ไม้จิ้มฟัน
15. หลอดทดลองขนาด 0.2 0.6 1.5 15 และ 50 มิลลิลิตร (ml)
16. หลอดทดลองสำหรับใช้วิเคราะห์ Fluorescent Activated Cell Sorting (FACS tube)

3.1.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. กล้องจุลทรรศน์ (microscope) (OLYMPUS, Japan)
2. กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (inverted microscope) (OLYMPUS, Japan)
3. กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับพร้อมชุดฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent inverted microscope) (Nikon, Japan)
4. เครื่องชั่งสารไฟฟ้าทศนิยมสี่ตำแหน่ง (analytical balance) (Mettler Toledo, U.S.A.)
5. เครื่องตรวจวิเคราะห์แยกชนิดและหาปริมาณเซลล์แบบอัตโนมัติ (flow cytometer) (Beckman Coulter, U.S.A.)
6. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) (Beckman Coulter, U.S.A.)
7. เครื่องผลิตคั่นชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ด้วยกระแสไฟฟ้า (electroporator) (Bio-Rad, U.S.A.)
8. เครื่องแยกขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยไฟฟ้า (gel electrophoresis) (Bio-Rad, U.S.A.)
7. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) (Thermo Scientific, U.S.A.)
8. เครื่องวิเคราะห์เจล (gel documentation) (Bio-Rad, U.S.A.)
9. เครื่องอบนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) (TOMY, Japan)
10. ถังไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen tank) (Worthington, India)
11. ตู้บ่มภายใต้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂ incubator) (Nuair, U.S.A.)
12. ตู้ปลอดเชื้อ (class II biological safety cabinet) (Nuair, U.S.A.)
13. ตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ 4, -20 และ -80 องศาเซลเซียส (°C) (Sharp, Japan และ Sanyo, Japan)
14. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) (Mettler, Germany)

3.1.3 สารเคมีและเอนไซม์

1. ชุดเชื่อมต่อก่อนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (ligation reagents) (Vivantis, Malaysia)
2. เอนไซม์ตัดจำเพาะ ได้แก่ *Bam*HI, *Eco*RV และ *Hind*III (Vivantis, Malaysia)
3. Absolute methanol (RCI Labscan, Thailand)
4. Acetic acid (Merck Millipore, U.S.A.)
5. Agar (RCI Labscan, Thailand)
6. Agarose (Vivantis, Malaysia)
7. Ampicillin (Sigma Aldrich, U.S.A.)
8. Benzidine (Sigma Aldrich, U.S.A.)

9. Boric acid (Merck Millipore, U.S.A)
10. DNA ladder (Vivantis, Malaysia)
11. EndoFree[®] Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Germany)
12. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Merck Millipore, U.S.A)
13. Fetal Bovine Serum (FBS) (Corning, U.S.A.)
14. Ficoll (Merck Millipore, U.S.A.)
15. Gentamycin (Vescopharma, Thailand)
16. GF-1 ambiclean kit (Vivantis, Malaysia)
17. GF-1 plasmid DNA extraction kit (Vivantis, Malaysia)
18. Glucose (Sigma Aldrich, U.S.A.)
19. Glycerine (Sigma Aldrich, U.S.A.)
20. Hemin (Sigma Aldrich, U.S.A.)
21. HEPES (C₈H₁₈N₂O₄S₂) (OmniPur, U.S.A.)
22. Hydrochloric acid (HCl) (Merck Millipore, U.S.A)
23. Hydrogen peroxide (H₂O₂) (Merck Millipore, U.S.A)
24. Hypoxanthine (Sigma Aldrich, U.S.A.)
25. Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (Sigma Aldrich, U.S.A.)
26. Kanamycin (Sigma Aldrich, U.S.A.)
27. L-glutamine (Corning, U.S.A.)
28. Monosodium phosphate (NaH₂PO₄) (Merck Millipore, U.S.A)
29. Paraformaldehyde (Sigma Aldrich, U.S.A.)
30. Penicillin-Streptomycin (Gibco, U.S.A.)
31. Percoll (GE Healthcare, U.K.)
32. Roswell Park Memorial Institute (RPMI) -1640 media (Gibco, U.S.A.)
33. Sorbitol (OmniPur, U.S.A.)
34. Sodium azide (NaN₃) (Sigma Aldrich, U.S.A.)
35. Sodium butyrate (Sigma Aldrich, U.S.A.)
36. Sodium carbonate (NaHCO₃) (Merck Millipore, U.S.A.)
37. Sodium chloride (NaCl) (Merck Millipore, U.S.A.)
38. Sodium hydroxide (NaOH) (RCI Labscan, Thailand)
39. Sodium phosphate (Na₂HPO₄) (Merck Millipore, U.S.A)

40. SYBR[®] Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Malaysia)
41. Triton X-100 (Sigma Aldrich, U.S.A.)
42. Tris (Vivantis, U.S.A.)
43. Tryptone (RCI Labscan, Thailand)
44. Wright-Giemsa stain set (M&P IMPEX, Thailand)
45. X-GAL (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galacto-pyranoside) (Sigma Aldrich, U.S.A.)
46. Yeast extracts (RCI Labscan, Thailand)

3.1.4 แอนติบอดี (antibodies)

1. APC mouse anti-human CD8 antibody (CALTAG, U.K.)
2. APC mouse anti-human CD147 antibody (Immuno Tools, U.S.A.)
3. FITC/PE mouse anti-human CD3/CD4 antibody (BD, U.S.A.)
4. FITC/PE mouse anti-human CD45/CD14 antibody (BD, U.S.A.)
5. KO mouse anti-human CD19 antibody (Beckman Coulter, U.S.A.)
6. PE mouse anti-human CD20 antibody (BD, U.S.A.)
7. PE mouse anti-human CD108 antibody (BD, U.S.A.)
8. PE/Cy7 mouse anti-human CD235a antibody (Biolegend, U.S.A.)

3.1.5 พลาสมิด (plasmids)

1. pBluescriptIIISK+ (Addgene, U.S.A.)
2. pEGFP-C3 (Addgene, U.S.A.)

3.1.6 เซลล์ที่เรื้อยและเซลล์เชื้อสายมะเร็ง (cancer cell lines)

1. เซลล์ที่เรื้อย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α
2. เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Raji
3. เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Jurkat
4. เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937
5. เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562

3.2 วิธีการวิจัย

3.2.1 เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลองและการเพาะเลี้ยงเซลล์

เซลล์เชื้อสายมะเร็งที่ใช้ในการทดลองประกอบไปด้วยกลุ่มเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดในมนุษย์ ได้แก่ เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Raji (human Burkitt's lymphoma cell line) เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Jurkat (human acute T cell leukemic cell line) เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 (human histiocytic lymphoma cell line) และเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 (human erythromyeloblastoid leukemic cell line) โดยทุกเซลล์ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ ชนิด Roswell Park Memorial Institute (RPMI) -1640 ร่วมกับ 10% Fetal Bovine Serum (FBS) ในตู้บ่มภายใต้ความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 95 ที่อุณหภูมิ 37°C

อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนทุก ๆ 2-3 วัน เพื่อควบคุมจำนวนเซลล์ให้มีจำนวนที่เหมาะสม โดยเซลล์แขวนลอยจะถูกดูดเข้าไปให้เซลล์กระจายแยกออกเป็นเซลล์เดี่ยว ก่อนจะถูกย้ายใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 650xg เป็นเวลา 7 นาที จากนั้นเทส่วนของเหลวทิ้ง เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 4 มิลลิลิตร จากนั้นดูดเข้าไปให้เซลล์กระจายแยกออกเป็นเซลล์เดี่ยว ดูดสารละลายเซลล์แขวนลอยออกตามอัตราส่วน (split ratio) ที่เหมาะสม 1:2 1:4 หรือ 1:8 และดูดสารละลายเซลล์แขวนลอยใส่ลงในขวดสำหรับเลี้ยงเซลล์ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อุ่น แล้วจึงเก็บขวดสำหรับเลี้ยงเซลล์ที่มีเซลล์เข้าไปเลี้ยงในตู้บ่มภายใต้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

3.2.2 การเตรียมเซลล์ Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC)

เจาะเลือดอาสาสมัครที่มีสุขภาพแข็งแรง หลังจากที่ได้รับการยินยอมอย่างเป็นทางการเป็นลายลักษณ์อักษร ใส่ลงในหลอดสุญญากาศที่ภายในบรรจุสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด แล้วปั่นเหวี่ยงหลอดบรรจุเลือดที่ 2,000xg เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้สามารถดูดส่วนชั้นสีขาวที่เรียกว่า Buffy coat ซึ่งประกอบด้วยพลาสมาและเซลล์เม็ดเลือดขาว แยกใส่หลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์เชื้อสายมะเร็งชนิด RPMI-1640 ที่ไม่มี FBS ให้ได้ปริมาตรรวม 30 มิลลิลิตร และเติม Ficoll ปริมาตร 12.5

มิลลิลิตร ไร่ข้างใต้ (underlay) ปั่นเหวี่ยงที่ 1,200xg เป็นเวลา 25 นาที โดยปิดระบบเบรก (break off) แล้วดูดเก็บชั้นสีขาวตรงส่วนกลางของหลอดทดลอง ย้ายใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตรใหม่ ปั่นล้างเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์เชื้อสายมะเร็งชนิด RPMI-1640 ที่ไม่มี FBS ที่ความเร็ว 650xg เป็นเวลา 7 นาที และเทส่วนของเหลวทิ้ง เดิมสารละลาย ACK lysis ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 2 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 650xg เป็นเวลา 7 นาที เพื่อเทสารละลายทิ้ง จากนั้นปั่นล้างเซลล์อีก 2 ครั้งด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์เชื้อสายมะเร็งชนิด RPMI-1640 ที่ไม่มี FBS และตรวจสอบหาปริมาณเซลล์ก่อนแยกใส่หลอดเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว

3.2.3 การตรวจสอบหาปริมาณเซลล์

ก่อนทำการทดลอง เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดและเซลล์ PBMC จะถูกตรวจสอบหาความหนาแน่นของเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) โดยเซลล์แขวนลอยจะถูกดูดเข้าไปให้เซลล์กระจายแยกออกเป็นเซลล์เดี่ยว ก่อนจะถูกถ่ายโอนใส่หลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 650xg เป็นเวลา 7 นาที จากนั้นส่วนของเหลวทิ้ง เดิมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมสารละลายเซลล์แขวนลอย 10 ไมโครลิตรมาช่วยย้อมสี trypan blue แล้วตรวจนับจำนวนเซลล์ในสไลด์สำหรับนับเซลล์ (hemocytometer slide) โดยเซลล์ที่มีชีวิตจะใสไม่ติดสีของ trypan blue แต่เซลล์ที่ไม่มีชีวิตจะติดสีน้ำเงินของ trypan blue ซึ่งจำนวนเซลล์ที่นับได้จะถูกคำนวณตามสมการ

$$\text{ความหนาแน่นของเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่นับได้}}{\text{ปริมาตรของบริเวณที่นับ}}$$

$$\text{ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ที่นับได้} = \left(\frac{\text{จำนวนเซลล์ที่นับได้ทั้งหมด}}{\text{จำนวนตารางสี่เหลี่ยมที่ใช้นับ}} \right) \times \text{ค่าการเจือจาง}$$

ปริมาตรของตารางที่ใช้นับ = กว้าง (1 มิลลิลิตร) x ยาว (1 มิลลิลิตร) x สูง (0.1 มิลลิลิตร)

ค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์จะถูกคำนวณตามสมการ

$$\text{ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์} = \left(\frac{\text{เซลล์ที่มีชีวิต}}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด}} \right) \times 100$$

3.2.4 การเตรียมเซลล์เม็ดเลือดแดงและเซรุ่มเอบีจากมนุษย์ (Human AB serum) สำหรับเลี้ยงเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม

เซลล์เม็ดเลือดแดงที่ใช้เป็นเซลล์เม็ดเลือดแดงจากอาสาสมัครที่ร่างกายแข็งแรงและมีหมู่เลือดโอ (O) โดยทำการเจาะเก็บเลือดอาสาสมัครใส่ลงในหลอดสุญญากาศที่ภายในมีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด ตั้งหลอดบรรจุเลือดทิ้งไว้อย่างน้อย 30 นาที จากนั้นดูดย้ายเลือดใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร เติมอาหารเลี้ยงเชื้อมาลาเรียชนิด MCM (Malaria Culture Media) ให้ได้ปริมาตรรวม 30 มิลลิลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงหลอดบรรจุเลือดที่ 2,000xg เป็นเวลา 10 นาที ใช้เครื่องควบคุมการดูดย้ายสารละลายดูดส่วนของเหลวทิ้ง และเติมอาหารเลี้ยงเชื้อมาลาเรียชนิด MCM ให้ได้ปริมาตรรวม 30 มิลลิลิตร เพื่อปั่นล้างเซลล์เม็ดเลือดแดงซ้ำอีก 2 ครั้ง จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อมาลาเรียชนิด CCM (Complete Malaria Culture Media) ให้เท่ากับปริมาตรของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ได้ จะได้เซลล์เม็ดเลือดแดงความเข้มข้น 50% hematocrit (HCT)

เซรุ่มเอบีจากมนุษย์ที่ใช้เป็นเซรุ่มที่ได้จากอาสาสมัครที่ร่างกายแข็งแรงและมีเลือดหมู่เอบี (AB) โดยทำการเจาะเก็บเลือดอาสาสมัครใส่ลงในหลอดสุญญากาศที่ภายในมีสารกระตุ้นการแข็งตัวของเลือด ตั้งหลอดบรรจุเลือดทิ้งไว้อย่างน้อย 30 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงหลอดบรรจุเลือดที่ 2,000xg เป็นเวลา 10 นาที ใช้เครื่องควบคุมการดูดย้ายสารละลายดูดเก็บส่วนของเหลวทิ้งหมดใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้น heat-inactivate human AB serum ที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 30 นาที ก่อนเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้

3.2.5 เชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมและการเพาะเลี้ยงเชื้อ

เชื้อมาลาเรียที่ใช้ในการทดลอง เป็นเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม สายพันธุ์ 3D7 ที่ถูกเลี้ยงด้วยเซลล์เม็ดเลือดแดงความเข้มข้น 1% HCT ในอาหารเลี้ยงเชื้อมาลาเรียชนิด CCM ปริมาตร 10 มิลลิลิตรในจานสำหรับเลี้ยงเซลล์ ขนาด 78.5 ตารางเซนติเมตร ในตู้บ่มภายใต้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 95 และอุณหภูมิ 37°C โดยอาหารเลี้ยงเชื้อมาลาเรียจะถูกเปลี่ยนทุก ๆ 24 ชั่วโมง โดยการดูดเป่าให้เซลล์เม็ดเลือดแดงกระจายแยกออกจากกัน ก่อนจะดูดย้ายใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000xg เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นใช้

เครื่องควบคุมการดูถ่ายสารละลายคู่ส่วนของเหลวทิ้ง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ มาลาเรียใหม่ปริมาตร 10 มิลลิลิตรใส่กลับคืน และจำนวนเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม จะถูกตรวจสอบทุก ๆ 48 ชั่วโมง เพื่อติดตามร้อยละของจำนวน (% parasitemia) และ ระยะการเจริญเติบโตของเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม

3.2.6 การติดตามร้อยละของจำนวนและระยะการเจริญเติบโตของเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม

ในการติดตามร้อยละของจำนวนและระยะการเจริญเติบโตของเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมที่ใช้ในการทดลอง สามารถทำได้ด้วยการทำ blood smear แบบ thin film บนกระจกสไลด์ จากนั้นคงสภาพเซลล์เม็ดเลือดแดงและเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม (fixation) โดยการจุ่มกระจกสไลด์ลงใน absolute methanol นาน 10 วินาทีและวางผึ่งลม ให้แห้งสนิท ผสมสีย้อม Giemsa โดยผสมสี Giemsa กับบัพเฟอร์ Giemsa ในอัตราส่วน 1:10 แล้วหยดลงบนกระจกสไลด์ให้ทั่วแผ่น ตั้งทิ้งไว้ 8 นาที ล้างกระจกสไลด์ด้วยน้ำ ไหลช้า ๆ และวางผึ่งลมให้แห้งสนิท ก่อนนำไปส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100X โดยนับจำนวนเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมในขอบเขตที่มีเซลล์เม็ดเลือดแดง ประมาณ 200 เซลล์ต่อ 1 พื้นที่การนับเชื้อ นับจำนวนเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม จำนวน 5 พื้นที่การนับเชื้อแบบติดต่อกัน เพื่อลดอคติ (bias) ในการเลือกพื้นที่การนับเชื้อ และลดความคลาดเคลื่อนของจำนวนเชื้อที่นับได้ จดบันทึกวันและเวลาที่ทำการนับเชื้อ จำนวนเชื้อในแต่ละระยะ และจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมดในพื้นที่การนับเชื้อ ซึ่ง จำนวนร้อยละเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมที่นับได้ทั้งหมดจะถูกคำนวณตามสมการ

$$\text{ร้อยละของจำนวนเชื้อมาลาเรีย (\% parasitemia)} = \frac{\text{จำนวนเชื้อมาลาเรียที่นับได้ทั้งหมด}}{\text{จำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมดในพื้นที่การนับเชื้อ}} \times 100$$

3.2.7 การตรวจสอบระดับการแสดงออกของโปรตีนจำเพาะบนผิวเซลล์โดยการย้อมเซลล์ด้วย แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง

ในการทดลองนี้ได้ตรวจสอบระดับการแสดงออกของโปรตีนจำเพาะบนผิวเซลล์ด้วย เครื่องตรวจวิเคราะห์แยกชนิดและหาปริมาณเซลล์แบบอัตโนมัติ (flow cytometer) โดย เริ่มจากการตรวจสอบหาปริมาณเซลล์ที่ใช้ในการทดลอง ดูดแบ่งเซลล์จำนวน 1×10^5 เซลล์ใส่ลงในหลอดทดลองสำหรับใช้วิเคราะห์ FACS ปั่นล้างด้วยบัพเฟอร์ Fluorescent

Activated Cell Sorting (FACS buffer) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่ความเร็ว 1,800xg เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C แล้วเทของเหลวทิ้ง เติมน้ำสารละลายสำหรับบล็อกตัวจับเอฟซี (Fc blocking solution) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นเติมแอนติบอดีที่จำเพาะต่อชนิดของโปรตีนที่สนใจ เพื่อตรวจสอบระดับการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวที่บริเวณผิวเซลล์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ต่ออีก 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ในที่มืด แล้วปั่นล้างเซลล์ที่ความเร็ว 1,800xg เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ด้วยบัฟเฟอร์ FACS ปริมาตร 2 มิลลิลิตร อีก 2 ครั้ง และละลายตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย 1% paraformaldehyde ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ก่อนนำไปตรวจสอบระดับการแสดงออกของโปรตีนที่ผิวของเซลล์ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์แยกชนิดและหาปริมาณเซลล์แบบอัตโนมัติ

3.2.8 การทดสอบความสามารถในการรุกรานของเชื้อพลาสมาเดียม ฟาลซิพารัมเข้าสู่เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ

เตรียมเชื้อพลาสมาเดียม ฟาลซิพารัมในระยะไซซอนต์ โดยการดูดเชื้อพลาสมาเดียม ฟาลซิพารัมที่ใช้ในการทดลองใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000xg เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นใช้เครื่องควบคุมการดูดจ่ายสารละลายดูดส่วนของเหลวทิ้ง แล้วปั่นล้างอีก 2 ครั้งด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อมาลาเรียชนิด MCM ปริมาตร 40 มิลลิลิตร จากนั้นละลายตะกอนเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อมาลาเรียชนิด MCM ปริมาตรเท่ากับ 4 เท่าของปริมาณเซลล์เม็ดเลือดแดง (ให้ได้ความเข้มข้น 20% HCT) แล้วค่อย ๆ หยดเซลล์เม็ดเลือดแดงความเข้มข้น 20% HCT ที่เตรียมได้ ปริมาตร 2 มิลลิลิตรไว้ข้างบน (overlay) เหนือสารละลาย 60% Percoll ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000rpm เป็นเวลา 10 นาที โดยปิดระบบเบรก ดูดเก็บเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อพลาสมาเดียม ฟาลซิพารัมในระยะไซซอนต์ ในส่วนชั้นกลางของหลอดทดลอง (สีแดงเข้ม/น้ำตาล) ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตรหลอดใหม่ แล้วปั่นล้างเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ได้ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อมาลาเรียชนิด MCM ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ที่ความเร็ว 2,000xg เป็นเวลา 10 นาที และดูดส่วนของเหลวทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อมาลาเรียชนิด CCMC ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วตรวจสอบจำนวนร้อยละและการเจริญเติบโตของเชื้อพลาสมาเดียม ฟาลซิพารัม

เลี้ยงเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อมาลาเรียชนิด CMC M อย่างน้อย 1 อาทิตย์ เพื่อให้เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ มีการปรับตัว จากนั้น นำเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ จำนวน 1.5×10^5 เซลล์และเซลล์เม็ดเลือดแดง ความเข้มข้น 1% HCT มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อมาลาเรียชนิด CMC M ปริมาตร 3 มิลลิลิตรในจานสำหรับเลี้ยงเซลล์ ขนาด 9 ตารางเซนติเมตร และหัดเติมเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อพลาสมาเดียม ฟาลซิพารัมในระยะไซซอนต์ที่เตรียมไว้ก่อนหน้านี้ แบ่งใส่ลงไปเลี้ยงร่วมกัน ติดตามผลความสามารถในการรุกรานเข้าสู่เซลล์ ร้อยละของจำนวน ระยะการเจริญเติบโตของเชื้อพลาสมาเดียม ฟาลซิพารัม และรูปร่างของเซลล์ และเชื้อ หลังเวลาผ่านไป 24 45 และ 96 ชั่วโมง ด้วยการทำ blood smear แบบ thin film บนกระจกสไลด์

3.2.9 การแช่แข็งเชื้อพลาสมาเดียม ฟาลซิพารัม

การเพาะเลี้ยงเชื้อพลาสมาเดียม ฟาลซิพารัมอย่างต่อเนื่องโดยไม่มีการทดลอง จะทำให้ สิ้นเปลืองวัสดุอุปกรณ์โดยเปล่าประโยชน์ ดังนั้นจึงมีการแช่แข็งเชื้อเพื่อเก็บไว้จนกว่า จะต้องการใช้งานในการทดลองอื่นต่อไป การแช่แข็งเชื้อทำได้โดยการดูดเชื้อ พลาสมาเดียม ฟาลซิพารัมที่ใช้ในการทดลองใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000xg เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นใช้เครื่องควบคุมการดูดจ่าย สารละลายดูดส่วนของเหลวทิ้ง ปั่นล้างเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ได้ด้วย pre-cool sterile 1X PBS (Phosphate Buffered Saline) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร 1 ครั้ง จากนั้นวัดปริมาตร ของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ได้ แล้วค่อย ๆ หัดเติมสารละลายสำหรับแช่แข็งเซลล์ เม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อมาลาเรีย (freezing solution) ปริมาตร 1 ใน 5 ของปริมาตร 2 เท่า ของปริมาตรของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่วัดได้ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที และ ค่อย ๆ หัดเติมสารละลายแช่แข็งเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อพลาสมาเดียม ฟาลซิพารัม ปริมาตร 4 ใน 5 ของปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่วัดได้ที่เหลือ ดูดแบ่งใส่หลอดสำหรับแช่แข็งเซลล์ปริมาตร 500 ไมโครลิตรต่อหลอด นำไปแช่แข็งที่ อุณหภูมิ -80°C นานข้ามคืน แล้วจึงย้ายหลอดที่บรรจุเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มี เชื้อพลาสมาเดียม ฟาลซิพารัมเก็บลงในถังไนโตรเจนเหลวจนกว่าจะใช้งาน

3.2.10 การละลายเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพาร์ม

เมื่อต้องการใช้เชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพาร์มในการทดลองอื่นต่อไป ต้องทำการละลายเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีเชื้ออยู่ภายในเซลล์ โดยการนำหลอดที่บรรจุเชื้อที่เก็บในถังไนโตรเจนเหลวมาแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 37°C แล้วควักวัดปริมาตรของของเหลวทั้งหมดใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร ค่อย ๆ เติมน้ำละลาย 12% NaCl ปริมาตร 1 ใน 5 ของปริมาตรของของเหลวที่วัดได้ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 นาที แล้วค่อย ๆ เติมน้ำละลาย 1.6% NaCl ปริมาตร 10 เท่าของปริมาตรของของเหลวที่วัดได้ ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 2,000xg เป็นเวลา 10 นาที และดูดส่วนของเหลวทิ้ง จากนั้นค่อย ๆ เติมน้ำละลาย 0.9% NaCl ปริมาตร 10 เท่าของปริมาตรของของเหลวที่วัดได้ครั้งแรก และปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 2,000xg เป็นเวลา 10 นาที ก่อนที่จะดูดส่วนของเหลวทิ้ง เติมน้ำเลี้ยงเชื้อมาลาเรียชนิด CMCm ปริมาตร 9.8 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองดังกล่าวเพื่อละลายตะกอนเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพาร์มอยู่ แล้วดูดทั้งหมดย้ายไปเลี้ยงในงานสำหรับเลี้ยงเซลล์ ขนาด 78.5 ตารางเซนติเมตร พร้อมกับเติมเซลล์เม็ดเลือดแดงความเข้มข้น 50% HCT ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เพื่อให้มีเซลล์เม็ดเลือดแดงความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1% HCT นำไปเลี้ยงในตู้บ่มภายใต้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 95 ที่อุณหภูมิ 37°C

3.2.11 การกระตุ้นเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ให้มีการสร้างฮีโมโกลบินและเพิ่มระดับการแสดงออกของโปรตีนที่สนใจบนผิวของเซลล์ด้วยสารเคมี เพื่อทดลองทดสอบความสามารถในการรุกรานของเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพาร์ม

เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 เคยถูกรายงานว่ามียีนที่คล้ายคลึงกับเซลล์ระยะต้นที่กำลังจะพัฒนาไปเป็นเซลล์เม็ดเลือดแดงและสามารถถูกกระตุ้นให้มีการสร้างฮีโมโกลบินได้ด้วยสารเคมี ในการทดลองนี้ได้ทดลองเลี้ยงเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ในอาหารเลี้ยงเซลล์เชื้อสายมะเร็งชนิด RPMI-1640 ที่มี 10% FBS ร่วมกับการเติมสารละลายโซเดียม บิวทิเรตหรือสารละลายฮีมินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ สารละลายโซเดียม บิวทิเรตที่ความเข้มข้น 1mM 3mM และ 5mM และสารละลายฮีมินที่ความเข้มข้น 10µM และ 20µM และติดตามการเปลี่ยนแปลงของเซลล์

ได้แก่ จำนวนและความสามารถในการมีชีวิตของเซลล์ และการสร้างและสะสม ฮีโมโกลบินภายในเซลล์

3.2.12 การตรวจหาฮีโมโกลบิน

ในการทดลองนี้ได้ตรวจหาการสร้างและสะสมของฮีโมโกลบินภายในเซลล์อ้างอิงจากรายงานของ Wanda *et al.* (1981) โดยหลังจากเลี้ยงเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ร่วมกับสารเคมีที่สามารถกระตุ้นให้เซลล์มีการสร้างฮีโมโกลบินได้ อย่างน้อย 14 วัน เพื่อให้เซลล์มีการสร้างและสะสมฮีโมโกลบินภายในเซลล์อย่างเต็มที่ก่อนเริ่มการทดลอง จากนั้นเริ่มจากการทดลองตรวจหาฮีโมโกลบินเชิงคุณภาพ (qualitative) ซึ่งอาศัยกล้องจุลทรรศน์ในการทดสอบ โดยดูดแบ่งเซลล์จำนวน 1×10^5 เซลล์ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตรและปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว $650 \times g$ เป็นเวลา 7 นาที ก่อนที่จะดูดส่วนของเหลวทิ้ง จากนั้นละลายตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย 0.05M Tris/0.4M glycerine/2% Triton X-100 (pH = 7.5) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย 0.2% benzidine ปริมาตร 5 ไมโครลิตรกับสารละลาย 30% H_2O_2 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาทีและตรวจนับจำนวนเซลล์ในสไลด์สำหรับนับเซลล์ โดยเซลล์ที่ไม่มีฮีโมโกลบินจะใสไม่มีสี แต่เซลล์ที่ฮีโมโกลบินอยู่ภายในเซลล์จะมีติดสีน้ำเงินจากการเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยน benzidine ที่เป็นสารตั้งต้นให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่เป็นสีน้ำเงิน ซึ่งจำนวนเซลล์ที่นับได้สามารถนำมาคิดคำนวณหาค่าร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการสร้างและสะสมของฮีโมโกลบินภายในเซลล์ได้ดังสมการ

$$\text{ร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการสร้างฮีโมโกลบิน} = \left(\frac{\text{เซลล์ที่ติดสีน้ำเงิน}}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด}} \right) \times 100$$

นอกจากนี้ผู้ทดลองยังพยายามพัฒนาวิธีการตรวจหาฮีโมโกลบินดังกล่าวให้ได้ผลที่ละเอียดมากขึ้น โดยสามารถประมาณค่าปริมาณฮีโมโกลบินออกมาเป็นค่าตัวเลขได้อย่างคร่าว ๆ ซึ่งเป็นวิธีเชิงกึ่งปริมาณ (semi-quantitative) ดัดแปลงจากวิธีของ Wanda *et al.* (1981) โดยเริ่มจากการเตรียมเซลล์เม็ดเลือดแดงจากอาสาสมัครด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.2.4 จากนั้นตรวจสอบหาความหนาแน่นของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่เตรียมได้และส่งตรวจเซลล์เม็ดเลือดแดงดังกล่าวเพื่อหาค่าปริมาณฮีโมโกลบินด้วย

เครื่องตรวจความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด (complete blood count, CBC) สำหรับใช้คำนวณในการสร้างเส้นโค้งมาตรฐาน (standard curve) โดยปกติในมนุษย์ผู้ใหญ่จะมีฮีโมโกลบินประมาณ 1.52 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ดังนั้นในการทดลองจึงได้เลือกใช้เซลล์เม็ดเลือดที่ถูกเจือจางความเข้มข้นที่ 10 ความเข้มข้น ได้แก่ 1/4,000 1/8,000 1/16,000 1/32,000 1/50,000 1/64,000 1/70,000 1/80,000 1/90,000 และ 1/100,000 ซึ่งเป็นค่าปริมาณฮีโมโกลบินที่เจือจางที่เครื่องตรวจความสมบูรณ์ของเม็ดเลือดไม่สามารถตรวจวัดค่าได้ โดยเตรียมเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีความเข้มข้นมากกว่าความเข้มข้นที่เลือกใช้ 10 เท่า (เนื่องจากในขั้นตอนการทดลอง เซลล์เม็ดเลือดแดงจะถูกเจือจางลงอีก 10 เท่า) ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 900xg นาน 2 นาที ดูดส่วนของเหลวทิ้ง และปั่นล้างด้วย 1X PBS ปริมาตร 500 ไมโครลิตรจำนวน 2 รอบ เติมสารละลาย 0.05M Tris/0.4M glycerine/2% Triton X-100 (pH = 7.5) ปริมาตร 40 ไมโครลิตรและตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500xg เป็นเวลา 2 นาที แล้วดูเฉพาะส่วนของเหลวที่ได้จากเซลล์เม็ดเลือดแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 20 ไมโครลิตร หยดใส่ลงในจาน 96 หลุม ที่ในแต่ละหลุมมีสารละลาย 0.05M Tris/0.4M glycerine ปริมาตร 120 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย 0.2% benzidine ที่ผสมสารละลาย 30% H₂O₂ แล้ว ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และชะลอปฏิกิริยาดังกล่าวที่เกิดขึ้นด้วย H₂SO₄ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ก่อนที่จะวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 414 นาโนเมตร ทุก ๆ 3 นาที เพื่อสร้างและหาเส้นโค้งมาตรฐานและสมการที่มีค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจ (Coefficient of Determination, R²) นำเชื้อถื้อที่สุด ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) สำหรับการทดลองตรวจวัดหาปริมาณฮีโมโกลบินเฉลี่ยในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่เลี้ยงร่วมกับสารเคมีที่สามารถกระตุ้นให้เซลล์มีการสร้างฮีโมโกลบิน จะใช้เซลล์จำนวน 2x10⁴ เซลล์ทำตามวิธีการข้างต้นเช่นเดียวกับเซลล์เม็ดเลือดแดง และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ตรวจวัดได้มาคำนวณแทนค่าในสมการที่ได้จากเส้นโค้งมาตรฐาน เพื่อคำนวณหาค่าปริมาณฮีโมโกลบินเฉลี่ยต่อเซลล์

3.2.13 การเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนที่สนใจที่คาดว่ามีความสำคัญและจำเป็นสำหรับเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพาร์มที่ต้องอาศัยเพื่อเข้ารุกรานเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงหรือเซลล์อื่นที่ไม่ใช่เซลล์เม็ดเลือดแดงด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction: PCR) สำหรับใช้ในการกระตุ้นการแสดงของโปรตีนที่สนใจ

ในการทดลองนี้ได้รับการอนุเคราะห์จาก ดร. อรพรรณ ศรีพิชัย สำหรับตัวอย่างซีดีเอ็นเอ (cDNA) ที่ได้จากการเปลี่ยนมาจากอาร์เอ็นเอ (RNA) ที่ได้จากเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดแดงในระยะอีรีโทโรบลาสต์ อายุ 10-14 วันจากคนปกติ ด้วยวิธี reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) จากนั้นนำตัวอย่างซีดีเอ็นเอที่ได้มาใช้เป็นแม่พิมพ์สำหรับการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนบนผิวของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่สนใจที่ถูกรายงานว่าเกี่ยวข้องกับกระบวนการการเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงของเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพาร์ม ได้แก่ ยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนชนิด CD108 CD147 และ CD235a และมียีนสำหรับใช้เป็นกลุ่มควบคุม ได้แก่ ยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนชนิด CD71 ซึ่งเป็นยีนที่ไม่เกี่ยวข้องกับกระบวนการการรุกรานของเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพาร์ม โดยไพรเมอร์ (primer) ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน CD108 CD147 CD235a และ CD71 แสดงดังตารางที่ 3.1 และการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR) โดยมีสารเคมีดังนี้

cDNA (0.02-0.2ng/ml)	2.00	ไมโครลิตร
10X buffer	2.50	ไมโครลิตร
dNTPs (10mM)	0.50	ไมโครลิตร
forward primer (10 μ M)	1.50	ไมโครลิตร
reverse primer (10 μ M)	1.50	ไมโครลิตร
<i>Pfu</i> polymerase (5pmol/ μ l)	0.50	ไมโครลิตร
distilled water	16.50	ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	25.00	ไมโครลิตร

และมีขั้นตอนการดำเนินปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังนี้

initial denaturation	ที่อุณหภูมิ	95 °C	นาน 2 นาที	
denaturation	ที่อุณหภูมิ	94 °C	นาน 20 วินาที	← 35 รอบ
annealing	ที่อุณหภูมิ	60 °C	นาน 30 วินาที	
extension	ที่อุณหภูมิ	72 °C	นาน 1 นาที	
final extension	ที่อุณหภูมิ	72 °C	นาน 10 นาที	

ตารางที่ 3.1 ข้อมูลไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย

ยีน	ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'→3')	Accession No.
CD108	CD108F	ATGAGAGGCTACGCCCCCTTCAGC	Var3 :NM_001146030.1
	CD108R	CTAGTGGACCAGCAAGCCAAGAGTG	
CD147	CD147F	ATGGCGGCTGCGCTGTTCGTG	Var2 :NM_198589.2
	CD147R	CAGGAAGAGTTCCTCTGGCGGACG	
CD235a	GYPAF	ATGTATGGAAAAATAATCTTTGTATTAC	Var1 : NM_002099.7
	GYPAR	TCATTGATCACTTGTCTCTGGATT	Var2 : NM_001308187.1
			Var3 : NM_001308190.1
CD71	CD71F	ATGATGGATCAAGCTAGATCAGC	
	CD71R	TTAAAACTCATTGTCAATGTCCC	

*หมายเหตุ Var คือ ชนิดที่/แบบที่ (variance)

3.2.14 การวิเคราะห์ผลการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนที่สนใจด้วยวิธี 1.5% agarose gel electrophoresis

เตรียม 1.5% agarose gel โดยการชั่ง agarose 1.5 กรัม ละลายในบัฟเฟอร์ 0.5X TBE ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นหยอดตัวอย่างลงในช่องเจล โดยผสมตัวอย่างผลผลิตพีซีอาร์กับ 6X loading dye ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1X และโหลดดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA ladder) เพื่อเปรียบเทียบขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ในช่องแรกของเจล จากนั้นต่ออ่างสำหรับทำ agarose gel electrophoresis เข้ากับเครื่องจ่ายไฟ และตั้งค่าโดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 110 โวลต์ (V) เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาให้นำเจลไปย้อมด้วย

สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ และนำไปตรวจสอบผลแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่องวิเคราะห์เจล และบันทึกภาพ

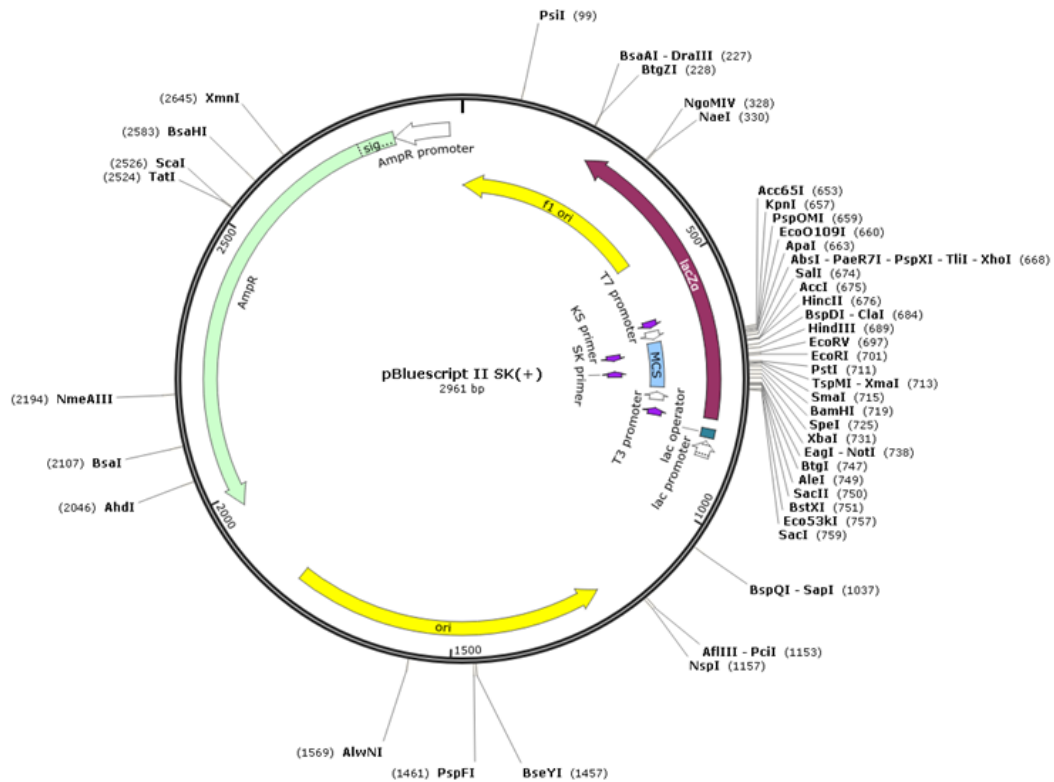
3.2.15 การสกัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนที่สนใจที่ โดยวิธี Gel Extraction ด้วยชุดสกัด GF-1 ambiclean kit (Vivantis, Malaysia)

ผลผลิตพีซีอาร์ที่ให้ผลถูกต้องในขั้นตอน 3.2.14 จะถูกนำมาสกัดให้มีความบริสุทธิ์ โดยนำผลผลิตพีซีอาร์มาแยกด้วยวิธี 1.5% agarose gel electrophoresis ซึ่งแผ่น agarose gel จะถูกนำมาข้อมด้วยสารด้วยสีย้อมดีเอ็นเอชนิด SYBR[®] Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Malaysia) และนำมาส่องภายใต้แสงยูวี (UV) ทำการตัด agarose gel ในบริเวณส่วนที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายออกมาใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ DB ปริมาตร 200 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตรซึ่งบรรจุชิ้นส่วนเจลที่ได้ตัดไว้ก่อนหน้านี้ และนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 55°C โดยทำการกลับหลอดไปมาทุก 2-3 นาที เป็นระยะเวลา 15 นาที หรือจนกว่า ชิ้นส่วนเจลจะละลายหมด เติสารละลายทั้งหมดที่ได้ลงในหลอด Column ที่วางบนหลอด Collection แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000xg นาน 1 นาที แล้วเทส่วนที่ผ่านตัวกรองทิ้ง แล้วเติมบัฟเฟอร์ Wash ปริมาตร 650 ไมโครลิตรลงในหลอด Column ที่วางบนหลอด Collection แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000xg นาน 1 นาที เทส่วนที่ผ่านตัวกรองทิ้ง และนำหลอด Column ที่วางบนหลอด Collection ไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000xg เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้หลอด Column แห้ง จากนั้นย้ายหลอด Column ที่แห้งแล้ว มาวางบนหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ แล้วหยดบัฟเฟอร์ Elution ปริมาตร 35-50 ไมโครลิตรลงบนส่วนเมมเบรนของหลอด Column ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000xg นาน 1 นาที และเก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อเตรียมนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิดต่อไป

3.2.16 การเตรียมพลาสมิดชนิด pBluescriptIISK+ โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด EcoRV

เริ่มต้นจากการเชื้อโคลนเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่มีพลาสมิดชนิด pBluescriptIISK+ (ภาพที่ 3.1) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย LB agar ที่มียาปฏิชีวนะชนิด Ampicillin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร (LB amp agar) นำมา

เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย LB broth ที่มีสารปฏิชีวนะ Ampicillin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร (LB amp broth) ปริมาตร 3 มิลลิตร บ่มที่ 37°C นานข้ามคืน เพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด GF-1 plasmid DNA extraction (Vivantis, Malaysia) โดยนำเชื้อแบคทีเรียที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย LB amp broth มาใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิตร นำหลอดไปปั่นเพื่อตกตะกอนเชื้อแบคทีเรียด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000xg เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง จากนั้นนำหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิตร ที่มีตกตะกอนเชื้อแบคทีเรียมาละลายด้วยสารละลาย S1 ที่มีเอนไซม์ RNase ปริมาตร 250 ไมโครลิตร โดยการดูดด้วยหัวดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติขึ้นลง แล้วเติมสารละลาย S2 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ทำการผสมสารละลายเบา ๆ จากนั้นเติมสารละลาย NB ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ทำการผสมสารละลายเบา ๆ นำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 16,000xg เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสปริมาตรประมาณ 650 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอด Column สำหรับสกัดพลาสมิด นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000xg เป็นเวลา 1 นาที ก่อนที่จะเทของเหลวที่ผ่านหลอด Column ทิ้ง และดูดบัฟเฟอร์ Wash ปริมาตร 650 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอด Column และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000xg เป็นเวลา 1 นาที เพื่อล้างหลอด Column จากนั้นเทของเหลวที่ผ่านหลอด Column ทิ้งและปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000xg อีก 1 นาที เพื่อนำสารละลายส่วนเกินออกและทำให้หลอด Column แห้ง ก่อนที่จะนำหลอด Column วางลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิตร หลอดใหม่ จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ Elution ปริมาตร 40-100 ไมโครลิตรใส่ลงในบริเวณเมมเบรนของหลอด Column และนำปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000xg เป็นเวลา 1 นาที เก็บส่วนของเหลวที่ได้ซึ่งก็คือสารละลายพลาสมิดที่สกัดได้



ภาพที่ 3.1 โครงสร้างพลาสมิดชนิด pBluescriptIISK+
(ปรับปรุงจาก: Transomic technologies, 2019)

จากนั้นทำการวัดปริมาณพลาสมิดชนิด pBluescriptIISK+ ที่สกัดได้ด้วยเทคนิค 1.0% agarose gel electrophoresis และตัดพลาสมิดดังกล่าวด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *EcoRV* ซึ่งจะได้สายดีเอ็นเอปลายทู่ (blunt end) โดยในปฏิกิริยาจะประกอบด้วยสารเคมีต่าง ๆ ดังนี้

- 10X buffer 1.25 ไมโครลิตร
- พลาสมิดชนิด pBluescriptIISK+ ความเข้มข้นประมาณ 200-300 นาโนกรัม
- เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *EcoRV* 1.00 ไมโครลิตร
- distilled water ปรับปริมาตรสุทธิให้ได้เท่ากับ 15.00 ไมโครลิตร

ผสมสารเคมีต่าง ๆ ให้เข้ากัน และบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 1 ชั่วโมงและบ่มที่อุณหภูมิ 80 °C นาน 20 นาที จากนั้นสกัดเอาชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการโดยดำเนินการตามขั้นตอนการสกัดชิ้นส่วนยีนบริสุทธิ์โดยวิธี Gel Extraction ด้วยชุดสกัด GF-1 ambiclean kit (Vivantis, Malaysia)

3.2.17 การเชื่อมต่อนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนที่สนใจ (ligation) และการถ่ายโอนดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α (transformation)

เตรียมความเข้มข้นของสารเคมีที่ใช้ในการเชื่อมต่อนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนที่สนใจที่คาดว่าจะมีความสำคัญและจำเป็นมากที่สุดสำหรับเชื้อพลาสมิเดียม ฟาลซิฟาร์มที่ต้องอาศัยเพื่อเข้าสู่กรานเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงหรือเซลล์อื่นที่ไม่ใช่เซลล์เม็ดเลือดแดงกับพลาสมิดชนิด pBluescriptIISK+ ดังนี้

- 10X buffer	1.00	ไมโครลิตร
- ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเจลข้อ 3.2.15 (10ng/ μ l)	1.00	ไมโครลิตร
- พลาสมิดชนิด pBluescriptIISK+ (20ng/ μ l)	1.00	ไมโครลิตร
- T4 DNA ligase (3units/ μ l)	0.50	ไมโครลิตร
- distilled water	6.50	ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	10.00	ไมโครลิตร

ผสมสารเคมีต่าง ๆ ให้เข้ากัน และบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 16 °C นาน 16 ชั่วโมง

จากนั้นทำการถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ด้วยวิธีการ heat shock โดยการนำอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย LB agar มาบ่มที่ 37 °C แล้วเติม 200mM IPTG ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และ 20mM X-GAL ปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยการเกลี่ยบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นผสมสารละลายดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับพลาสมิดแล้ว ปริมาตร 10 ไมโครลิตรกับเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วบ่มในน้ำแข็งนาน 30 นาที และนำไป heat shock ที่ 42 °C นาน 45 วินาที ก่อนนำกลับมาบ่มในน้ำแข็งนาน 5 นาที สุดท้ายเติมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย LB broth ปริมาตร 950 ไมโครลิตรและนำไปบ่มที่ 37 °C แกว่งด้วยความเร็วรอบ 210 รอบ/นาที นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลานำเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่ได้มาเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย LB agar และบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 16-18 ชั่วโมง

เมื่อครบกำหนดเวลาแล้ว ทำการคัดเลือกโคโลนีที่ถูกต้อง โดยคัดเลือกโคโลนีที่มีสีขาวด้วยการเขี่ยเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* โคโลนีเดี่ยวมาเพาะเลี้ยงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย LB agar ที่มียาปฏิชีวนะชนิด Ampicillin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/

ไมโครลิตร เพื่อเก็บไว้สำหรับงานอื่น ๆ ต่อไป และเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย LB broth ที่มียาปฏิชีวนะชนิด Ampicillin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร สำหรับนำมาสกัดดีเอ็นเอ จากนั้นสกัดพลาสมิดลูกผสม (recombinant plasmid) ด้วยชุดสกัด GF-1 plasmid DNA extraction kit (Vivantis, Malaysia) แล้วนำพลาสมิดลูกผสมที่ได้ไปวัดความเข้มข้นด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 260nm และวิเคราะห์ความถูกต้องของโดยใช้การเชื่อมต่อระหว่างชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนที่สนใจกับพลาสมิดโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และส่งตรวจหานิวคลีโอไทด์

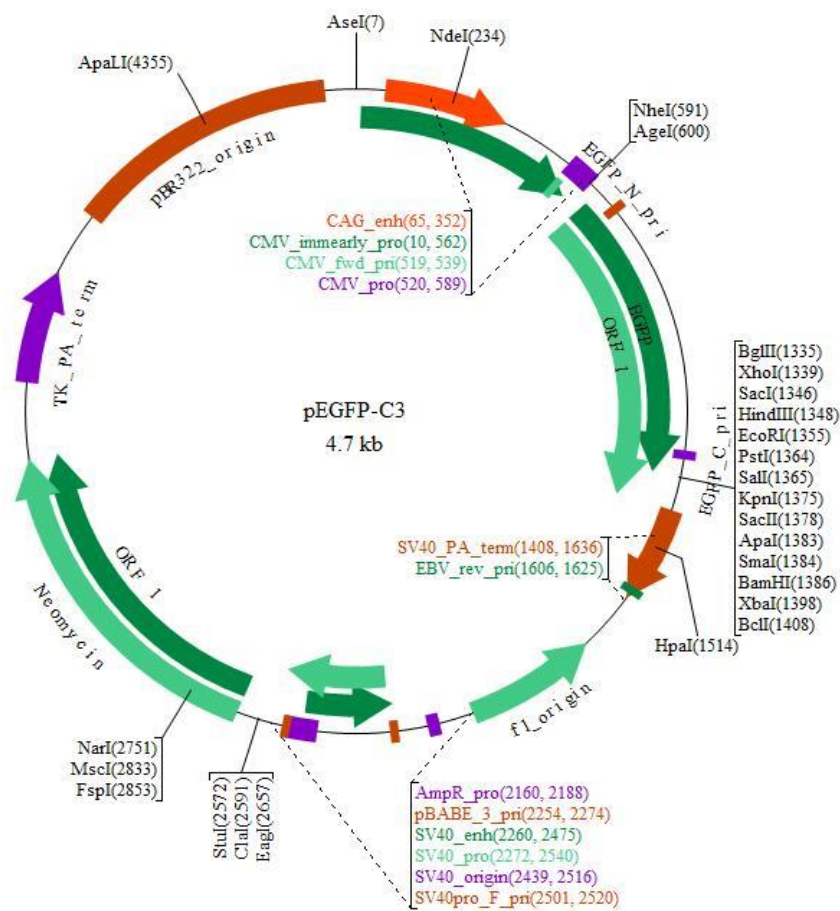
3.2.18 การเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนที่สนใจ และการถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α เพื่อเตรียมพลาสมิดสำหรับการแสดงออกของยีนในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม

ในการทดลองนี้จะใช้พลาสมิดชนิด pEGFP-C3 (ภาพที่ 3.2) สำหรับการกระตุ้นการแสดงออกของยีนในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม ซึ่งต้องทำการการสกัดและเตรียมพลาสมิดชนิด pEGFP-C3 โดยวิธี Gel Extraction ด้วยชุดสกัด GF-1 ambiclean kit (Vivantis, Malaysia) ตามข้อ 3.2.15 และใช้ยาปฏิชีวนะชนิด Kanamycin ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายในอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย LB broth (LB kan broth) เท่ากับ 30 มิลลิกรัม/ไมโครลิตร พลาสมิดที่สกัดได้จะนำมาด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมในการเชื่อมต่อกับแต่ละยีนที่สนใจ จากนั้นสกัดพลาสมิดที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยวิธี Gel Extraction ด้วยชุดสกัด GF-1 ambiclean kit (Vivantis, Malaysia) เช่นเดิม

สำหรับการเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนที่สนใจที่คาดว่าจะมีความสำคัญและจำเป็นมากที่สุดสำหรับเชื้อพลาสมิดโมเดียม ฟาลซิพาร์มที่ต้องอาศัยเพื่อเข้ารุกรานเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงหรือเซลล์อื่นที่ไม่ใช่เซลล์เม็ดเลือดแดงจากพลาสมิดชนิด pBluescriptIIISK+ โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะประกอบด้วย

- 10X universal buffer 1.25 ไมโครลิตร
- ส่วนชิ้นยีนใน pBluescriptIISK+ ความเข้มข้นประมาณ 400 นาโนกรัม
- เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *HindIII* 1.00 ไมโครลิตร
- เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *BamHI* 1.00 ไมโครลิตร
- distilled water ปรับปริมาตรสุทธิให้ได้เท่ากับ 15.00 ไมโครลิตร

ผสมสารเคมีต่าง ๆ ให้เข้ากัน และบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมกับเอนไซม์ตัดจำเพาะและหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เลือกใช้ จากนั้นสกัดเอาชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนที่สนใจที่มีขนาดที่ต้องการ



ภาพที่ 3.2 โครงสร้างพลาสมิดชนิด pEGFP-C3

(ปรับปรุงจาก: Biovisualtech, 2019)

สำหรับการเตรียมความเข้มข้นของสารเคมีที่ใช้ในการเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนที่สนใจกับพลาสมิดสำหรับการแสดงออกของยีน ประกอบด้วยสารเคมีต่าง ๆ ดังนี้

อาหารเลี้ยงเซลล์เชื้อสายมะเร็งชนิด RPMI-1640 ที่ไม่มี FBS และปรับความหนาแน่นของเซลล์ให้เท่ากับ 10×10^6 เซลล์/มิลลิลิตร จากนั้นดูด 300 ไมโครลิตรของสารละลายเซลล์ใส่ลงในควมวาทสำหรับทำ electroporation ขนาด 0.4 เซนติเมตร พร้อมกับพลาสติกคลุมผสมสำหรับการแสดงออกของยีนที่สนใจให้มีความเข้มข้นของพลาสติกสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครกรัม/ปฏิกิริยา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที จากนั้นให้กระแสไฟฟ้า 875 โวลต์/เซนติเมตร (V/cm) 500 ไมโครฟารัด (uF) และค่าความต้านทานไฟฟ้าทานไม่จำกัด (infinite resistance) นาน 4 มิลลิวินาที (msec) แล้วปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ $13,000 \times g$ นาน 30 วินาที ตั้งตะกอนเซลล์ทิ้งไว้ นาน 20 นาที ก่อนที่จะดูดส่วนของของเหลวออก แล้วกระจายเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์เชื้อสายมะเร็งชนิด RPMI-1640 ที่มี 10% FBS และนำเซลล์ไปเลี้ยงที่ 37°C ภายใต้ความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 95 เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง ก่อนนำไปทดสอบความสามารถในการรุกรานของเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพารัมต่อไป

3.2.20 การตรวจสอบระดับการแสดงออกของโปรตีนที่สนใจและการทดสอบความสามารถในการรุกรานของเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพารัมเข้าสู่เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิด K562 ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารเคมีและกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่สนใจ

ในการทดลองนี้ได้ตรวจสอบความสำเร็จในการถ่ายโอนพลาสมาเข้าสู่เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับพร้อมชุดฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent inverted microscope) และตรวจวัดระดับการแสดงออกของโปรตีนที่สนใจที่คาดว่าจะมีความสำคัญและจำเป็นมากที่สุดสำหรับเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพารัมที่ต้องอาศัยเพื่อเข้ารุกรานเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงหรือเซลล์อื่นที่ไม่ใช่เซลล์เม็ดเลือดแดงบนผิวของเซลล์ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์แยกชนิดและหาปริมาณเซลล์แบบอัตโนมัติ ในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ถูกกระตุ้นให้มีการสร้างอีโมโกลบินและเพิ่มระดับการแสดงออกของโปรตีนที่สนใจด้วยสารเคมี และเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดง K562 ที่ถูกกระตุ้นให้มีการเพิ่มระดับการแสดงออกของโปรตีนที่สนใจที่คาดว่าจะมีความสำคัญและจำเป็นมากที่สุดสำหรับเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพารัมที่ต้อง

อาศัยเพื่อเข้ารุกรานเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงหรือเซลล์อื่นที่ไม่ใช่เซลล์เม็ดเลือดแดงด้วยวิธีการเช่นเดียวกับในข้อ 3.2.7

จากนั้นเตรียมเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมในระยะไซซอนต์ด้วยวิธีการเช่นเดียวกับในข้อ 3.2.8 และหยดเติมเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมในระยะไซซอนต์ที่เตรียมได้แบ่งใส่ลงไปเลี้ยงร่วมกับเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ถูกกระตุ้นให้มีการสร้างฮีโมโกลบินและเพิ่มระดับการแสดงออกของโปรตีนที่สนใจด้วยสารเคมี และเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ถูกกระตุ้นให้มีการเพิ่มระดับการแสดงออกของโปรตีนที่สนใจที่คาดว่าจะมีความสำคัญและจำเป็นมากที่สุดสำหรับเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมที่ต้องอาศัยเพื่อเข้ารุกรานเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงหรือเซลล์อื่นที่ไม่ใช่เซลล์เม็ดเลือดแดง ติดตามผลความสามารถในการรุกรานเข้าสู่เซลล์ร้อยละของจำนวนและระยะการเจริญเติบโตของเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม และรูปร่างของเซลล์และเชื้อ หลังเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ด้วยการทำ blood smear แบบ thin film บนกระจกสไลด์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทที่ 4

ผลการวิจัย

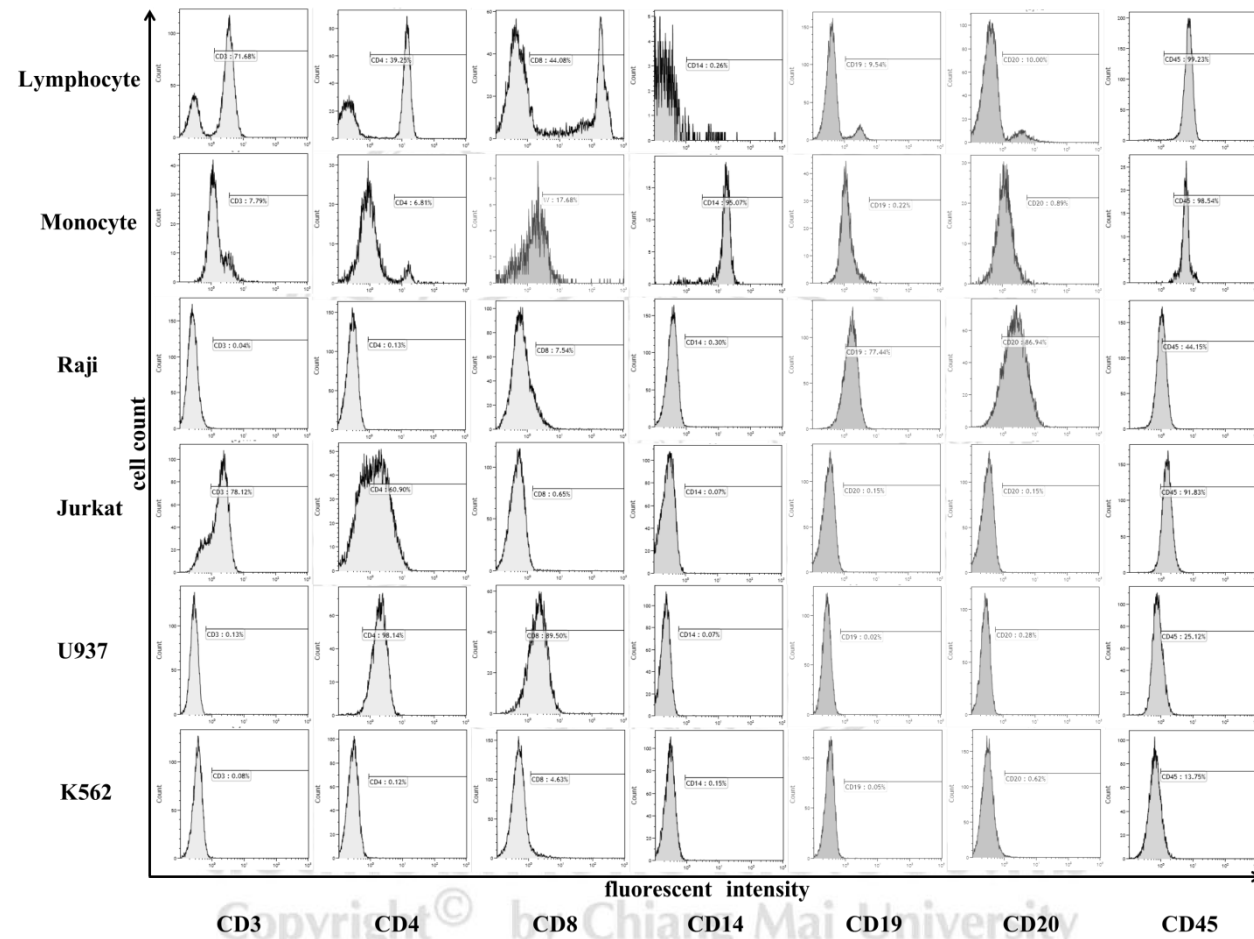
4.1 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนบนผิวของเซลล์โดยการย้อมเซลล์ด้วยแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง

ในการทดลองได้เลือกใช้กลุ่มเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดของมนุษย์จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Raji Jurkat U937 และเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 นอกจากนี้ยังมีเซลล์ PBMC ที่ได้จากอาสาสมัคร เพื่อใช้เป็นเซลล์สำหรับชุดควบคุมการทดลองของเซลล์ในกลุ่มเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซท์ (lymphocyte) (Raji และ Jurkat) และ โมโนไซท์ (monocyte) (U937) และเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวเต็มวัยจากอาสาสมัคร เพื่อใช้เป็นชุดควบคุมการทดลองของเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 โดยทำการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนบนผิวของเซลล์ชนิด CD3 CD4 CD8 CD14 CD19 CD20 และ CD45 อย่างน้อย 3 ชั่วโมง เพื่อจำแนกชนิดของเซลล์ตามชนิดของโปรตีนที่อยู่บนผิวของเซลล์ จากผลการทดลองดังภาพที่ 4.1-4.3 จะเห็นว่าเซลล์ PBMC กลุ่มลิมโฟไซท์ ซึ่งประกอบไปด้วยทีเซลล์ (T cell) และ บีเซลล์ (B cell) มีจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD3 CD4 CD8 CD19 CD20 และ CD45 ร้อยละ 64.60 ± 5.29 40.28 ± 4.81 41.85 ± 6.83 10.10 ± 0.87 9.81 ± 0.16 และ 99.69 ± 0.26 ตามลำดับ โดยมีค่า Mean Fluorescent Intensity (MFI) ของกลุ่มเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนที่สนใจ ที่บอกให้ทราบถึงระดับการแสดงออกของโปรตีนแต่ละชนิดบนผิวของเซลล์เท่ากับ 4.27 ± 0.54 18.51 ± 2.96 120.13 ± 17.94 2.33 ± 0.49 4.90 ± 1.38 และ 5.90 ± 0.70 ตามลำดับ เซลล์ PBMC กลุ่มโมโนไซท์มีจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD14 และ CD45 ร้อยละ 90.13 ± 11.84 และ 99.99 ± 3.86 และมีค่า MFI เท่ากับ 19.28 ± 2.15 และ 5.59 ± 0.92 ตามลำดับ เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Raji มีจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD19 CD20 และ CD45 ร้อยละ 72.05 ± 7.83 78.01 ± 11.04 และ 31.45 ± 14.98 และมีค่า MFI เท่ากับ 1.69 ± 0.61 2.56 ± 0.35 และ 0.80 ± 0.26 ตามลำดับ เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Jurkat มีจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD3 CD4 และ CD45 ร้อยละ 71.74 ± 5.55

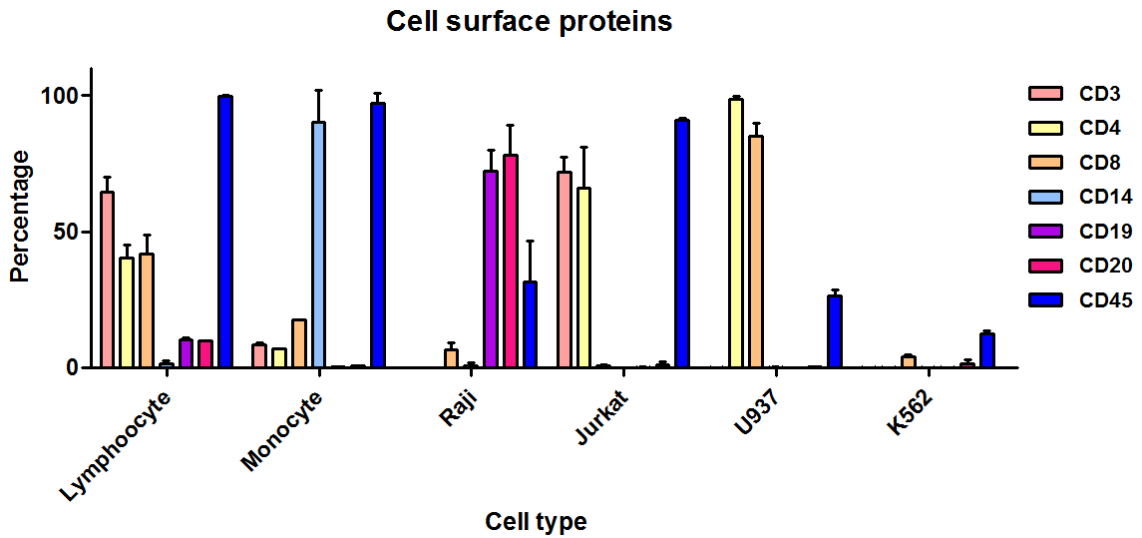
65.86±15.16 และ 91.03±0.69 และมีค่า MFI เท่ากับ 2.71±1.07 2.06±0.63 และ 1.53±0.28 ตามลำดับ เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 มีจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD4 CD8 และ CD45 ร้อยละ 98.80±0.96 84.92±4.74 และ 26.37±2.30 และมีค่า MFI เท่ากับ 4.44±3.09 3.34±1.25 และ 0.38±0.15 ตามลำดับ และเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 มีจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD8 และ CD45 ร้อยละ 3.93±0.99 และ 12.29±1.35 และมีค่า MFI เท่ากับ 0.45±0.19 และ 0.35±0.05 ตามลำดับ ซึ่งค่าร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิดต่าง ๆ และค่า MFI ของกลุ่มเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนที่สนใจที่ได้จากเซลล์แต่ละชนิดจากผลการทดลอง แสดงให้เห็นว่าเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Raji และ Jurkat มีการแสดงออกของโปรตีนชนิดที่พบได้บนผิวของเซลล์ PBMC กลุ่มลิมโฟไซท์ (CD3 CD4 CD8 และ CD45 พบได้บนผิวของทีเซลล์ และ CD19 CD20 และ CD45 พบได้บนผิวของบีเซลล์) นอกจากนี้เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 ไม่พบการแสดงออกของโปรตีนชนิดที่พบได้บนผิวเซลล์ PBMC กลุ่มโมโนไซท์ (CD14 และ CD45) แต่พบการแสดงออกของโปรตีนชนิดที่พบได้บนผิวเซลล์กลุ่มโปรโมโนไซท์ (promonocyte) (CD4 และ CD45) และเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ไม่พบการแสดงออกของโปรตีนชนิดที่พบได้บนผิวของเซลล์ PBMC ทั้งกลุ่มลิมโฟไซท์และโมโนไซท์ที่เป็นกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาว ดังนั้นกลุ่มเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดทั้ง 4 ชนิดที่ใช้ในการทดลอง จึงน่าจะเป็นเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดที่ถูกต้องแล้ว โดยเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Raji เป็นเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาว กลุ่มบีเซลล์ลิมโฟไซท์ เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Jurkat เป็นเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาว กลุ่มทีเซลล์ลิมโฟไซท์ เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 เป็นเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาว กลุ่มโปรโมโนไซท์ และเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 น่าจะเป็นเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดง

ต่อจากนั้นจึงทดลองทำการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD108 CD147 และ CD235a ที่ถูกรายงานว่ามีส่วนเกี่ยวข้องในกระบวนการการรุกรานเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงของเชื้อพลาสมาเดียม ฟาลซิพารัม อย่างน้อย 3 ซ้ำ โดยเซลล์เม็ดเลือดแดงมีจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD108 CD147 และ CD235a ร้อยละ 68.30±12.67 62.04±27.46 และ 99.93±0.02 และมีค่า MFI เท่ากับ 1.42±0.33 1.69±0.43 และ 19.64±3.90 ตามลำดับ เซลล์ PBMC กลุ่มลิมโฟไซท์ ซึ่งประกอบไปด้วยทีเซลล์และบีเซลล์มีจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD108 CD147 และ CD235a ร้อยละ 6.88±2.73 75.06±8.22 และ 45.26 ±25.46 และมีค่า MFI เท่ากับ 2.10±0.57 4.11±0.91 และ

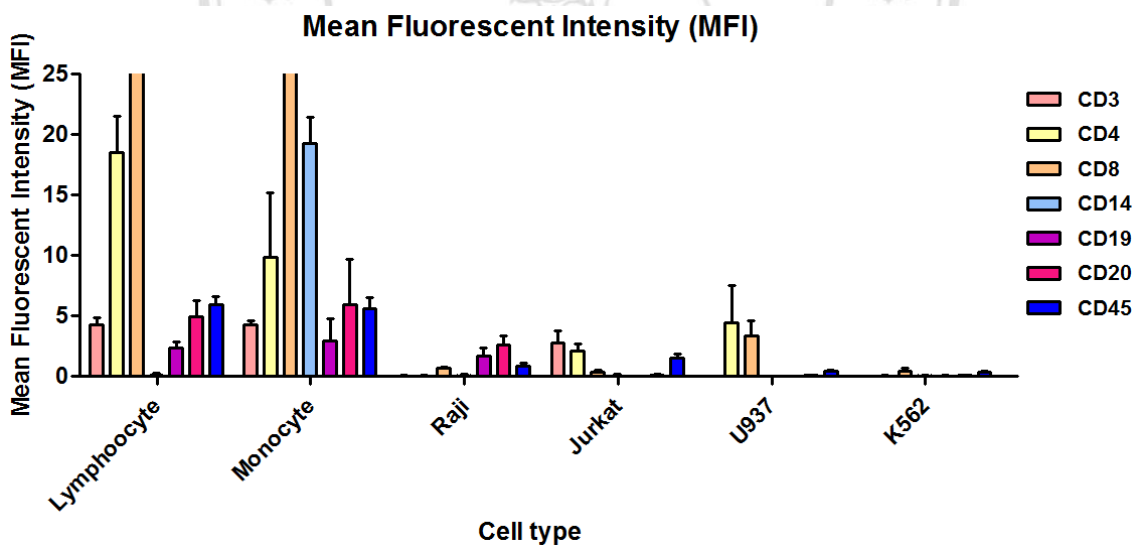
4.69±0.98 ตามลำดับ และเซลล์ PBMC กลุ่มโมโนไซต์มีจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD108 CD147 และ CD235a ร้อยละ 12.43±5.49 99.83±0.06 และ 98.25±0.97 และมีค่า MFI เท่ากับ 2.01±1.80 60.50±12.33 และ 17.85±2.40 ตามลำดับ นอกจากนี้จากผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่ากลุ่มเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดที่ใช้ในการทดลองทั้ง 4 ชนิด พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD147 บนผิวของเซลล์ในทุก ๆ เซลล์ (จำนวนเซลล์ร้อยละ 99.75±0.16 ถึง 99.91±0.07) และมีระดับการแสดงออกอยู่ในระดับที่สูง โดยสามารถวัดค่า MFI ได้อยู่ในช่วง 14.97±0.11 ถึง 22.63±9.60 สำหรับเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Jurkat พบว่ามีจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD108 สูงถึงร้อยละ 58.72±11.89 (มากกว่าในเซลล์ PBMC กลุ่มลิมโฟไซต์ที่เป็นชุดควบคุมการทดลองอย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.05$) และมีค่า MFI เท่ากับ 0.81±0.31 (ไม่แตกต่างกับเซลล์ PBMC กลุ่มลิมโฟไซต์อย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.05$) ในขณะที่เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดอื่น ๆ มีจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD108 อยู่ในช่วงร้อยละ 5.31±1.62 ถึง 7.38±0.85 และมีค่า MFI อยู่ในช่วง 0.13±0.12 ถึง 0.16±0.15 เพียงเท่านั้น เป็นที่น่าสนใจว่าเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 ซึ่งเป็นกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโปรโมโนไซต์ มีค่าร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a สูงที่สุดถึงร้อยละ 92.28±5.71 (ไม่แตกต่างกับเซลล์ PBMC กลุ่มโมโนไซต์ที่เป็นชุดควบคุมการทดลองอย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.05$) และมีค่า MFI เท่ากับ 3.23±0.71 (น้อยกว่าในเซลล์ PBMC กลุ่มโมโนไซต์อย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.05$) ซึ่งถือว่ามีค่าร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a ใกล้เคียงกับในเซลล์ PBMC กลุ่มโมโนไซต์มาก (ที่มีค่าร้อยละ 98.25±0.97) และมีระดับการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a ที่มากกว่าเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดอื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษา เฉลี่ยเท่ากับ 3.20 เท่า เมื่อเปรียบเทียบค่า MFI กับค่าที่ได้จากเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแต่ละชนิด (ที่อยู่ในช่วงร้อยละ 0.75±0.16 ถึง 1.50±0.55) และเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 มีค่าร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a น้อยที่สุดคือร้อยละ 5.10±0.41 และมีค่า MFI เท่ากับ 0.80±0.64 (น้อยกว่าในเซลล์เม็ดเลือดแดงที่เป็นชุดควบคุมการทดลองอย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.05$) ดังภาพที่ 4.4-4.6



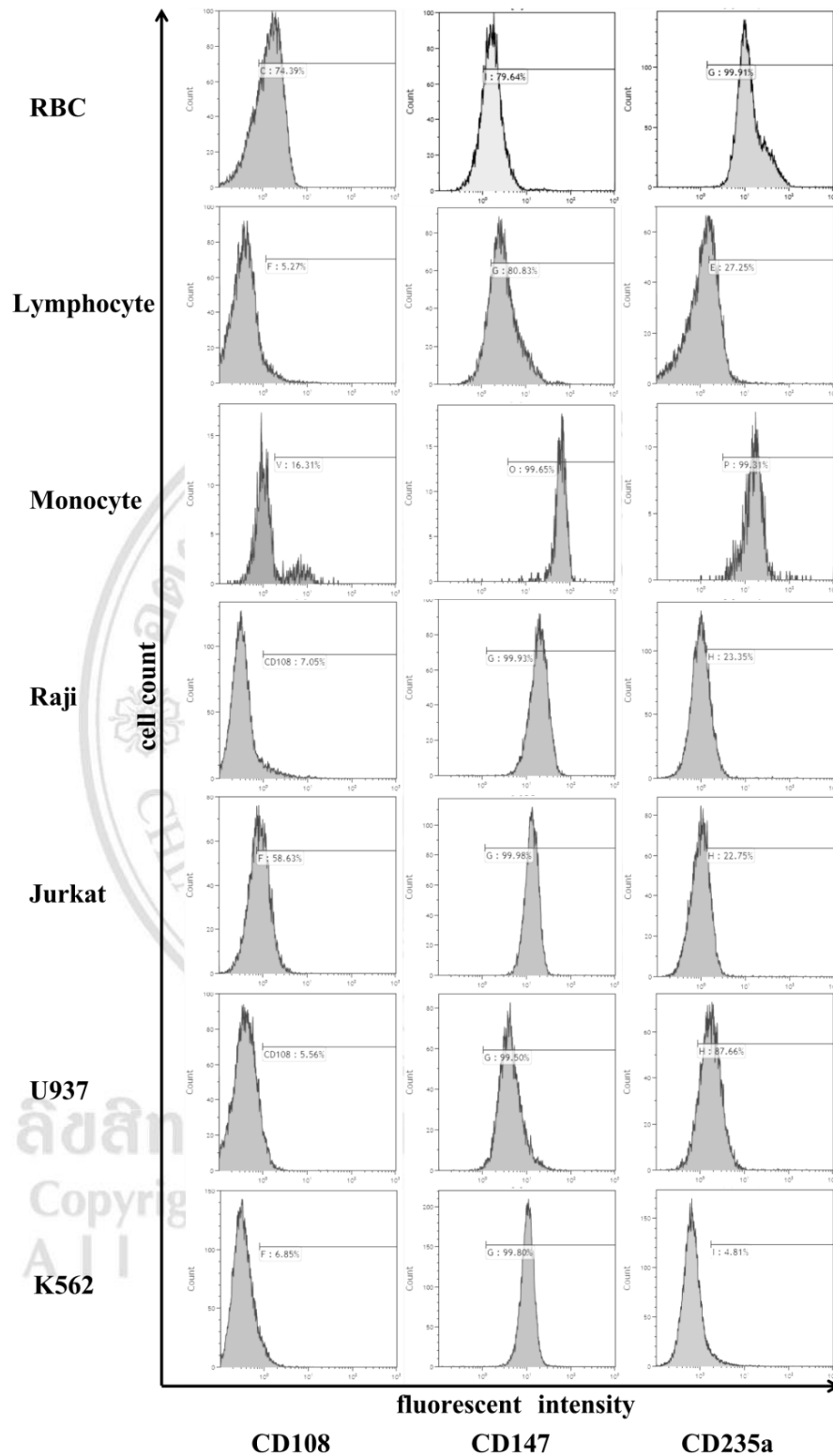
ภาพที่ 4.1 ตัวอย่างผลการตรวจสอบจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนบนผิวของเซลล์ชนิด CD3 CD4 CD8 CD14 CD19 CD20 และ CD45 ในเซลล์ PBMC และเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์แยกชนิดและหาปริมาณเซลล์แบบอัตโนมัติ



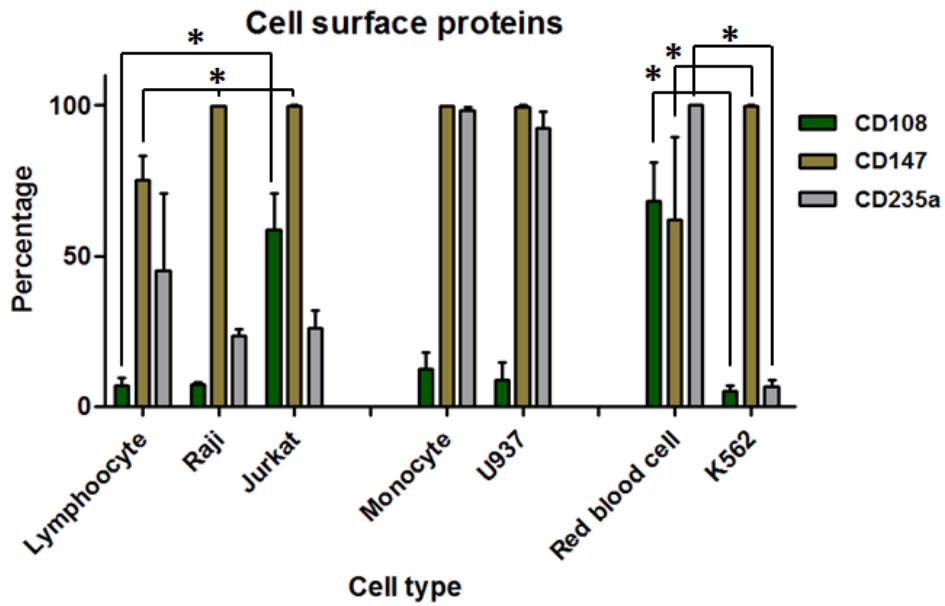
ภาพที่ 4.2 ค่าร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนบนผิวของเซลล์ชนิด CD3 CD4 CD8 CD14 CD19 CD20 และ CD45 ในเซลล์ PBMC และเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ



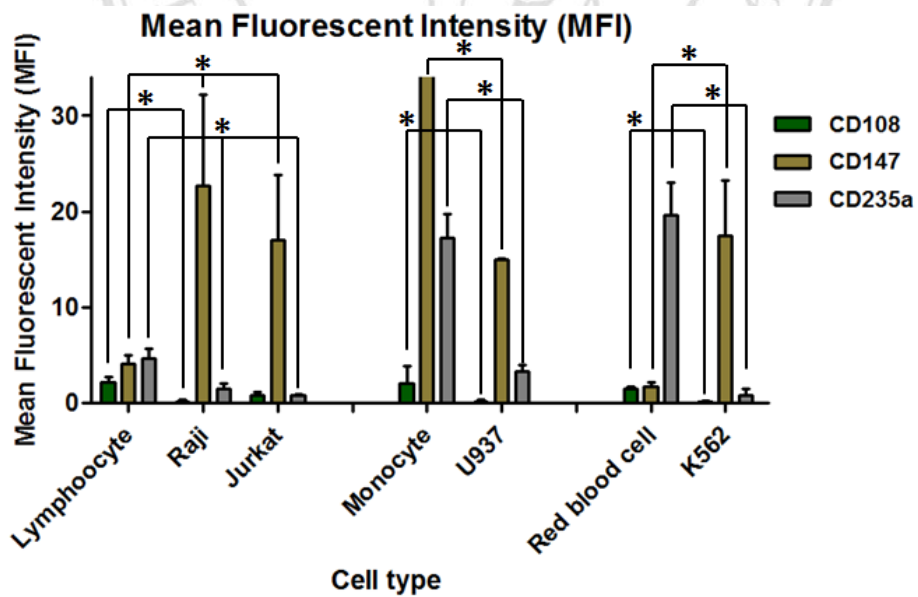
ภาพที่ 4.3 ค่า Mean Fluorescent Intensity (MFI) ของเซลล์ PBMC และเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ที่มีการแสดงออกของโปรตีนบนผิวของเซลล์ชนิด CD3 CD4 CD8 CD14 CD19 CD20 และ CD45



ภาพที่ 4.4 ตัวอย่างผลการตรวจสอบจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนบนผิวของเซลล์ชนิด CD108 CD147 และ CD235a ในเซลล์ PBMC และเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ด้วย เครื่องตรวจวิเคราะห์แยกชนิดและหาปริมาณเซลล์แบบอัตโนมัติ



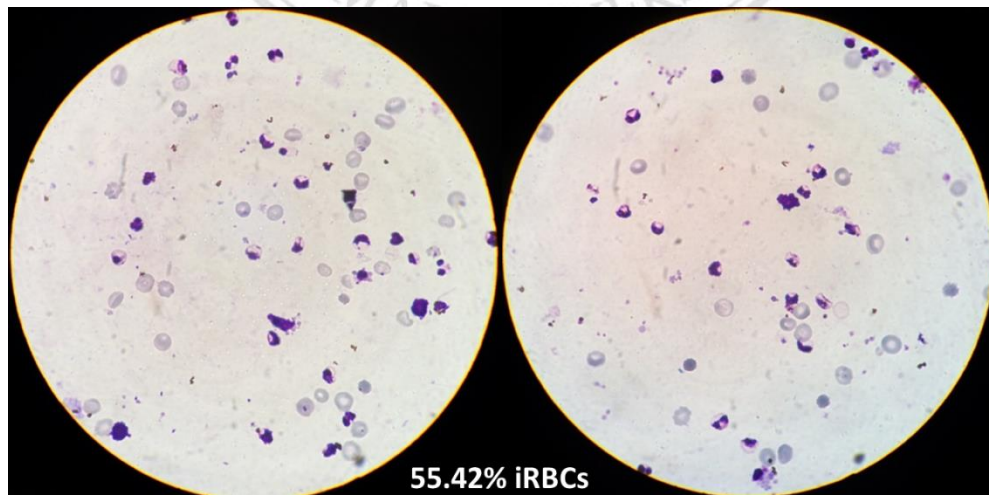
ภาพที่ 4.5 ค่าร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของ โปรตีนบนผิวของเซลล์ชนิด CD108 CD147 และ CD235a ในเซลล์ PBMC และเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ (* แสดงถึงความแตกต่างกับชุดควบคุมการทดลองอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$; Student's *t* test)



ภาพที่ 4.6 ค่า Mean Fluorescent Intensity (MFI) ของเซลล์ PBMC และเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ที่มีการแสดงออกของ โปรตีนบนผิวของเซลล์ชนิด CD108 CD147 และ CD235a (* แสดงถึงความแตกต่างกับชุดควบคุมการทดลองอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$; Student's *t* test)

4.2 การเตรียมเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมในระยะไซซอนต์

หลังจากที่ได้ผลการทดลองจากการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนชนิดต่าง ๆ บนผิวของเซลล์ โดยการย้อมเซลล์ด้วยแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง และตรวจสอบด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์แยกชนิดและหาปริมาณเซลล์แบบอัตโนมัติ ทำให้สามารถทราบค่าร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิดต่าง ๆ บนผิวของเซลล์ รวมทั้งระดับการแสดงออกของโปรตีนชนิดต่าง ๆ ในเซลล์แต่ละชนิด จากนั้นจึงต้องการทดสอบความสามารถในการรุกรานของเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมเข้าสู่เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ เพื่อค้นหาแนวโน้มในเบื้องต้นว่าโปรตีนชนิดใดที่น่าจะสำคัญและเกี่ยวเนื่องกับความสามารถในการรุกรานของเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมมากที่สุด ทำให้จำเป็นต้องมีการเตรียมเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมในระยะไซซอนต์ โดยการปั่นเหวี่ยงสารละลายที่มีเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อผ่านสารละลาย 60% Percoll จากการทดลองสามารถเตรียมสารละลายที่มีเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และเมื่อตรวจสอบจำนวนร้อยละและระยะการเจริญเติบโตของเชื้อ พบว่ามีจำนวนร้อยละของเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมเท่ากับ 55.42 จากจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงทั้งหมด 9.9×10^6 เซลล์ นอกจากนี้เชื้อที่พบ อยู่ในช่วงระยะการเจริญเติบโตระหว่างระยะโทรโฟซอइटที่แก่ (late trophozoite) จนถึงระยะไซซอนต์ดังภาพที่ 4.7 จากนั้นคัดสารละลายที่มีเซลล์เม็ดเลือดแดงที่เตรียมได้แบ่งออกเป็น 5 ส่วนในปริมาตรเท่า ๆ กัน สำหรับใช้ในการทดลองต่อไป



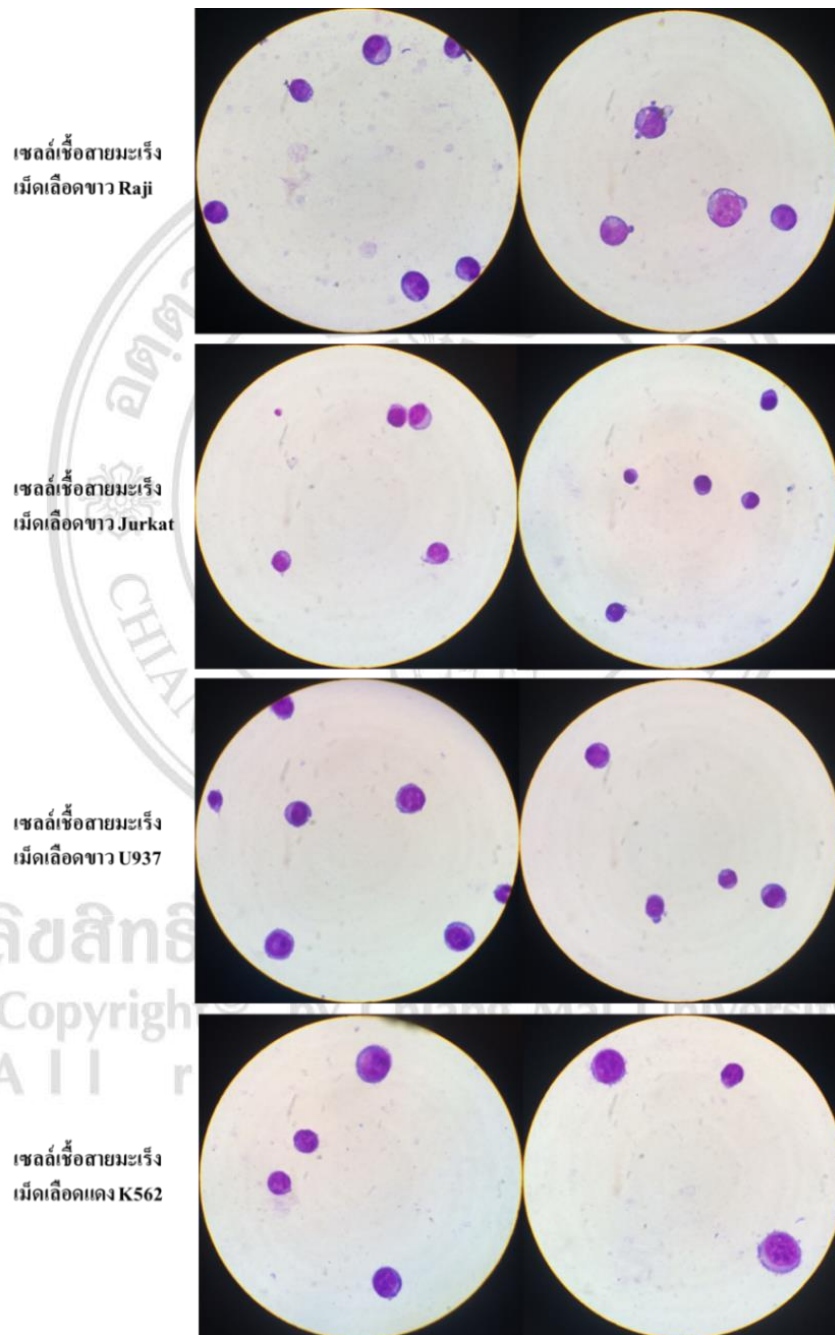
ภาพที่ 4.7 เซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมที่เตรียมได้

จากสารละลาย 60% Percoll

4.3 การทดสอบความสามารถในการรุกรานของเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมเข้าสู่เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ

เมื่อเตรียมเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมในระยะไซซอนต์ได้แล้ว ก่อนทำการทดสอบความสามารถในการรุกรานของเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมเข้าสู่เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ จำเป็นต้องเลี้ยงเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อมาลาเรียชนิด CMCM ก่อนเป็นเวลาอย่างน้อย 1 อาทิตย์ เพื่อให้เซลล์ได้มีการปรับตัวต่ออาหาร จากนั้นตรวจสอบความปกติของเซลล์ด้วยการการทำ blood smear แบบ thick film บนกระจกสไลด์ ซึ่งพบว่าหลังเลี้ยงเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อมาลาเรียชนิด CMCM ก่อนเป็นเวลา 1 อาทิตย์ เซลล์มีรูปร่างลักษณะปกติ ไม่มีความแตกต่างกับเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดกลุ่มที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์เชื้อสายมะเร็งชนิด RPMI-1640 คือ เซลล์มีลักษณะกลม มีขนาดของเซลล์ปกติ (ไม่บวม/ไม่เหี่ยว) มีขอบเขตของนิวเคลียสและไซโทพลาซึมแบ่งแยกกับชัดเจน และส่วนของไซโทพลาซึมไม่ติดสีเข้มที่เป็นสัญญาณว่าเซลล์เกิดความเครียด ดังภาพที่ 4.8 จากการทดสอบความสามารถในการรุกรานของเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมเข้าสู่เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ด้วยการนำเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมในระยะไซซอนต์ที่เตรียมได้มาเลี้ยงร่วมกับเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ และติดตามผลความสามารถในการรุกรานเข้าสู่เซลล์และการเจริญเติบโตของเชื้อ หลังเวลาผ่านไป 24 45 และ 96 ชั่วโมง พบว่าเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมสามารถรุกรานเข้าสู่เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ได้ โดยพบร้อยละของจำนวนเชื้อที่แตกต่างกันในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแต่ละชนิด ค่าร้อยละของจำนวนเชื้อที่มากที่สุดพบได้ในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 ทั้ง 3 ช่วงเวลา หลังเวลาผ่านไป 24 45 และ 96 ชั่วโมง คือ 1.69 1.07 และ 1.18 ตามลำดับ ส่วนในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดอีก 2 ชนิด ได้แก่ เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Raji และ Jurkat พบว่าร้อยละของจำนวนเชื้อที่พบในเซลล์จะมีค่าลดลงตามระยะเวลาที่ผ่านไปตลอด 96 ชั่วโมง และส่วนในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ไม่พบเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมเลยที่ 24 และ 45 ชั่วโมงแรก ทำให้ไม่มีการทดลองต่อที่ 96 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 4.1 นอกจากนี้ยังพบว่ารูปร่างลักษณะและระยะการเจริญเติบโตของเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมด มีความผิดปกติไปจากชุดควบคุมการทดลองที่เป็นเซลล์เม็ดเลือดแดง (1%HCT) ด้วย โดยพบเชื้อที่อยู่ในระยะเริ่มต้น (early ring) แต่มีลักษณะบวม และยังมีสิ่งทีคาดว่าน่าจะเป็นเชื้อที่มีลักษณะเป็นเส้นและเป็นจุดกลมสีเข้ม ซึ่งไม่ใช่ระยะการเจริญเติบโตของเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมที่พบได้ตามปกติ (ภาพที่ 4.9-4.13) ยิ่งไปกว่านั้นจาก

การผลททดลองจะสังเกตเห็นได้ว่า พบจำนวนของเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดที่มีเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมหรือสิ่งทีคาดว่าน่าจะเป็นเชื้ออยู่ภายในเซลล์บริเวณไซโทพลาซึมมากกว่า 2 ตัวต่อ 1 เซลล์ ซึ่งพบได้เฉพาะในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 ทั้ง 3 ช่วงเวลา (หลังเวลาผ่านไป 24 45 และ 96 ชั่วโมง) ดังแสดงในตารางที่ 4.2



ภาพที่ 4.8 รูปร่างลักษณะของเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อมาลาเรียชนิด CCM

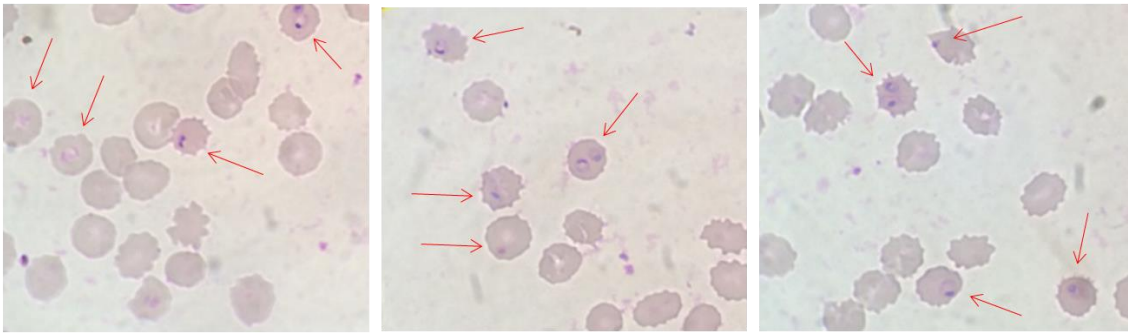
ตารางที่ 4.1 จำนวนร้อยละของเซลล์ที่มีเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพาร์มในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ที่ 24 45 และ 96 ชั่วโมงหลังเริ่มการทดลอง (สำรวจจากเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ จำนวน 2,500 เซลล์ และเซลล์เม็ดเลือดแดงจำนวน 1,000 เซลล์)

ชนิดของเซลล์	จำนวนของเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพาร์ม หลังเริ่มการทดลอง (ร้อยละ)		
	24 ชั่วโมง	45 ชั่วโมง	96 ชั่วโมง
เซลล์เม็ดเลือดแดง (1%HCT)	10.25	9.67	22.45
เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Raji	0.31	0.19	0.09
เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Jurkat	0.26	0.17	0.09
เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937	1.69	1.07	1.18
เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562	0.00	0.00	N/A

*หมายเหตุ N/A คือ ไม่มีข้อมูล (Not Available)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

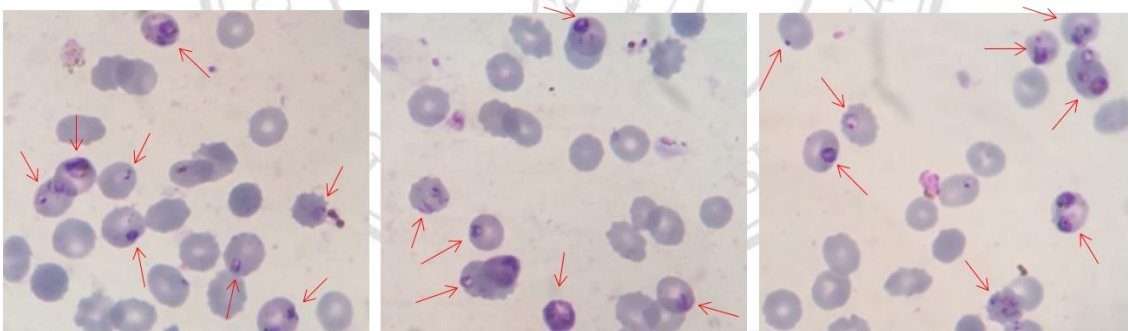
เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง



เมื่อเวลาผ่านไป 45 ชั่วโมง



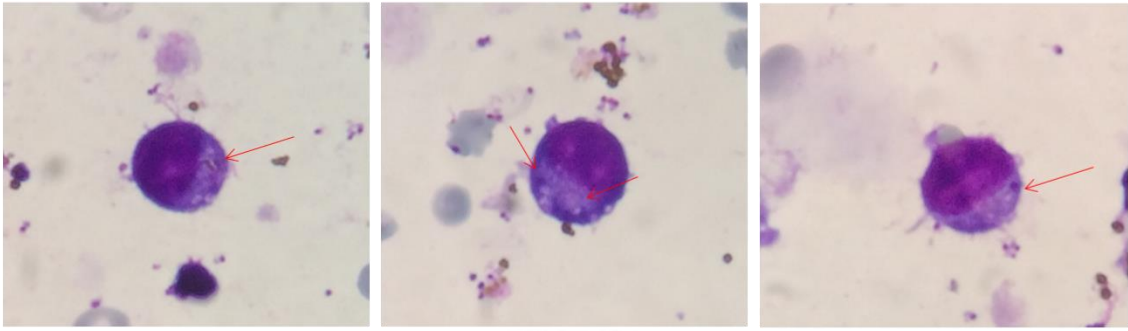
เมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง



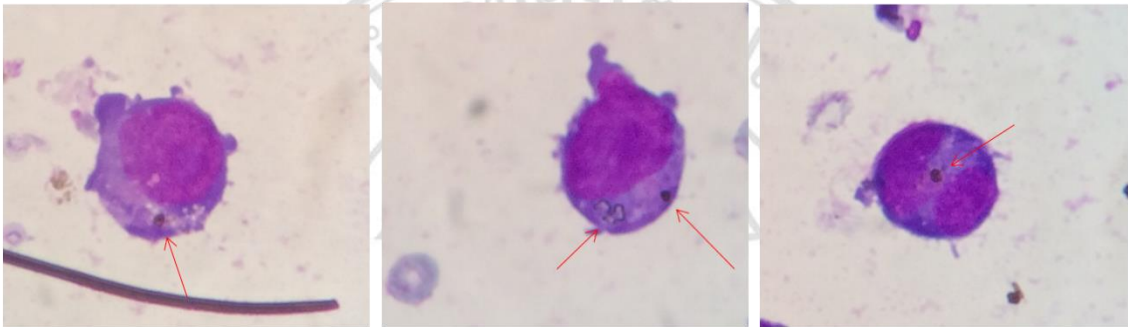
ภาพที่ 4.9 รูปร่างลักษณะของเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม (ลูกครีสีแดง) ในเซลล์เม็ดเลือดแดง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

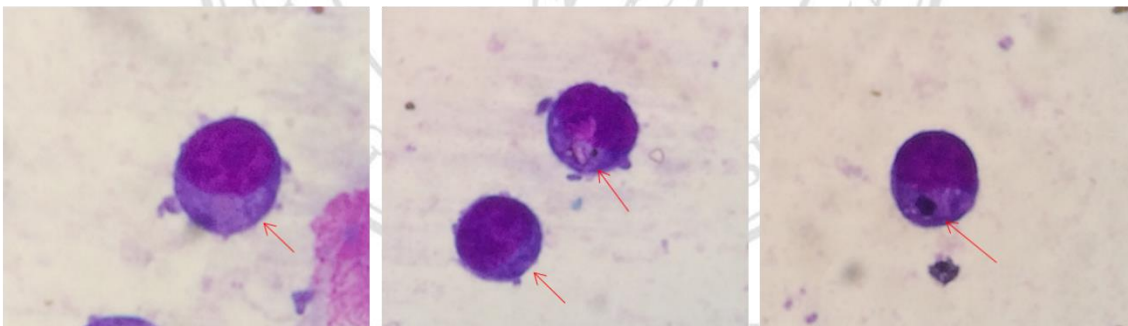
เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง



เมื่อเวลาผ่านไป 45 ชั่วโมง

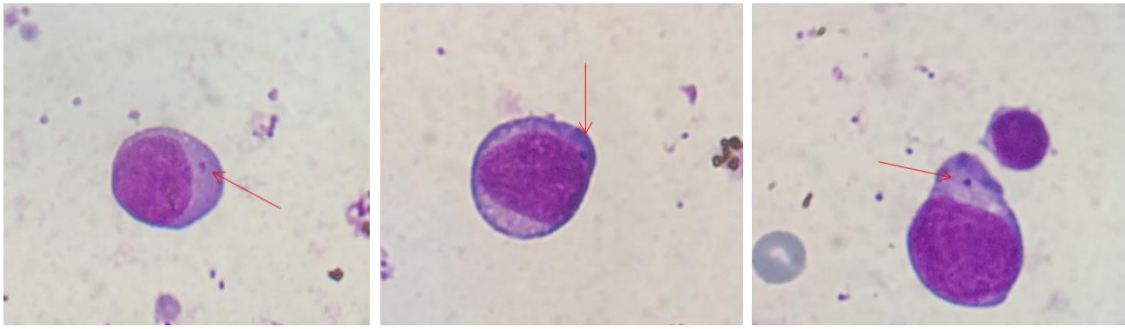


เมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง

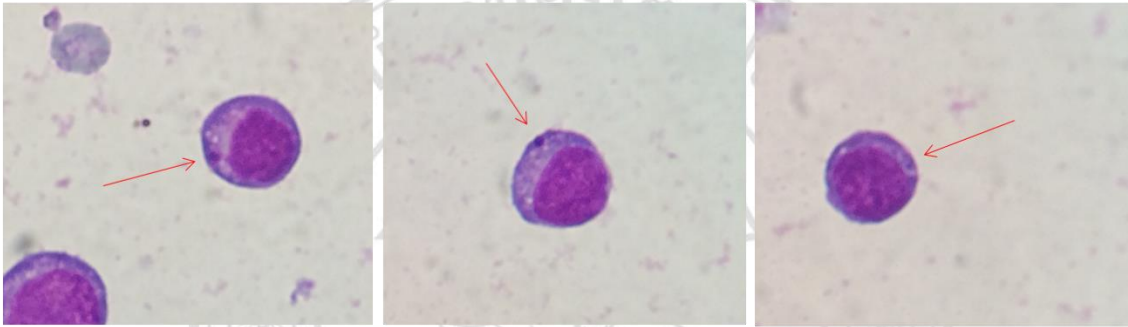


ภาพที่ 4.10 รูปร่างลักษณะของเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพารัม (ลูกศรีสีแดง) ในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Raji

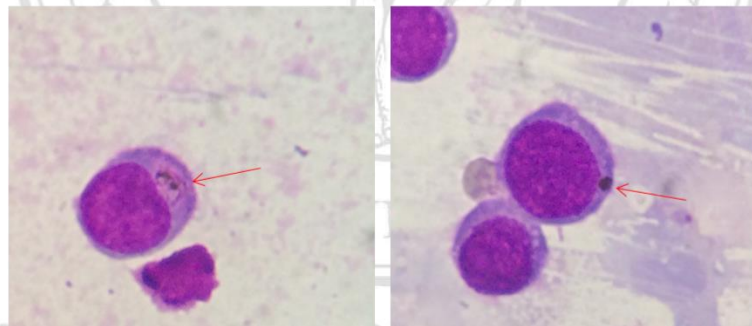
เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง



เมื่อเวลาผ่านไป 45 ชั่วโมง

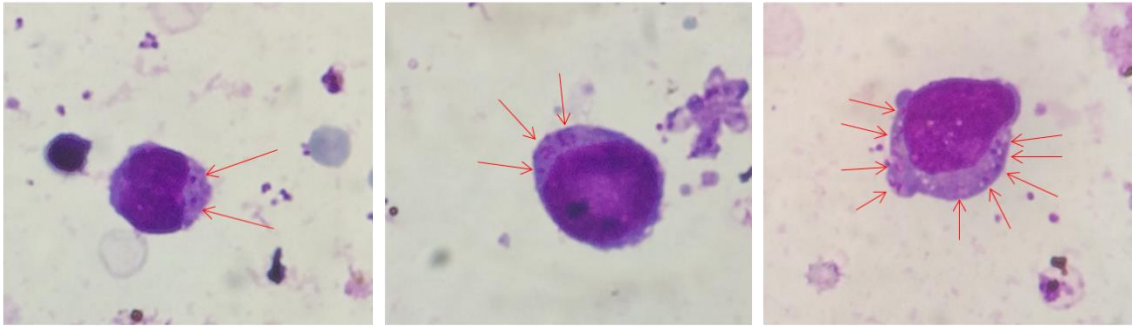


เมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง

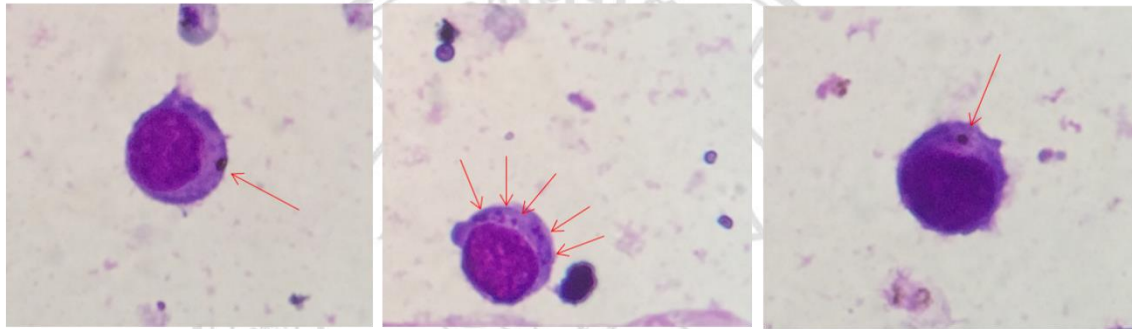


ภาพที่ 4.11 รูปร่างลักษณะของเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพารัม (ลูกศรีแดง) ในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Jurkat

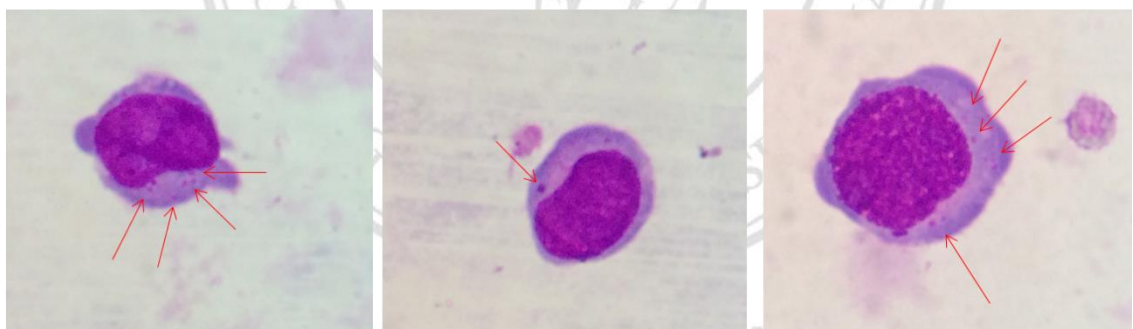
เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง



เมื่อเวลาผ่านไป 45 ชั่วโมง

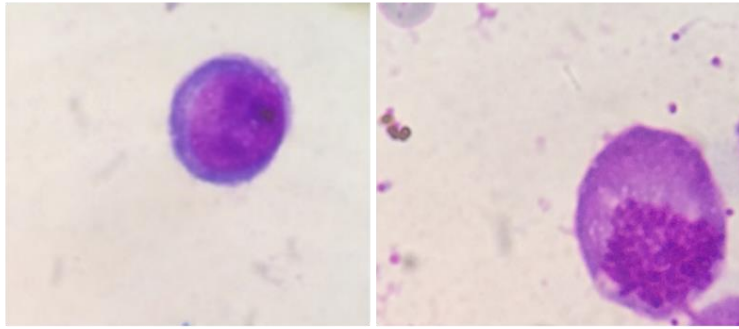


เมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง

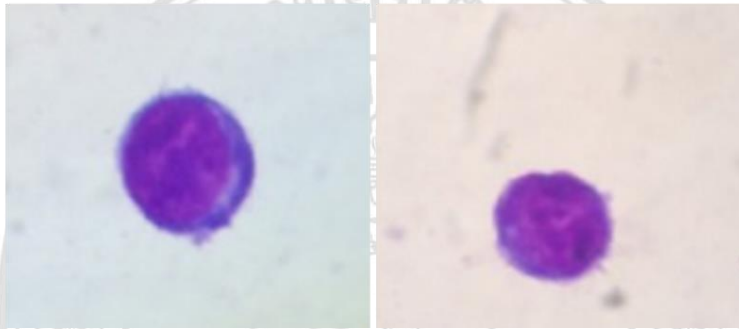


ภาพที่ 4.12 รูปร่างลักษณะของเชื้อพลาสโมเดียม โมเดียม ฟาลซิพารัม (ลูกศรีสีแดง) ใน เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937

เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง



เมื่อเวลาผ่านไป 45 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.13 รูปร่างลักษณะของเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4.2 จำนวนของเซลล์ที่มีเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟลาซิพาร์มหรือสิ่งทีคาดว่าจะน่าจะเป็นเชื้ออยู่ภายในไซโทพลาซึมมากกว่า 2 ตัวต่อ 1 เซลล์ ในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ (สำรวจจากเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ จำนวน 2,500 เซลล์/ชนิด)

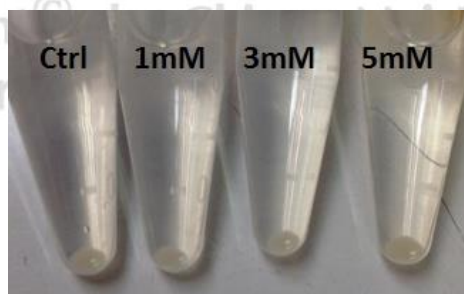
ชนิดของเซลล์เชื้อสาย มะเร็งเม็ดเลือด	จำนวนของเซลล์ที่มีเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟลาซิพาร์มและสิ่งทีคาดว่าจะน่าจะเป็นเชื้ออยู่ภายในไซโทพลาซึมที่ช่วงเวลาต่าง ๆ หลังเริ่มการทดลอง					
	24 ชั่วโมง		45 ชั่วโมง		96 ชั่วโมง	
	1-2 ตัว	>2 ตัว	1-2 ตัว	>2 ตัว	1-2 ตัว	>2 ตัว
เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Raji	8	0	5	0	3	0
เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Jurkat	6	0	3	0	2	0
เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937	26	12	11	1	23	2
เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562	0	0	0	0	N/A	N/A

*หมายเหตุ N/A คือ ไม่มีข้อมูล (Not Available) และข้อมูลที่ได้นับจากเซลล์จำนวน 2,500 เซลล์/กลุ่ม

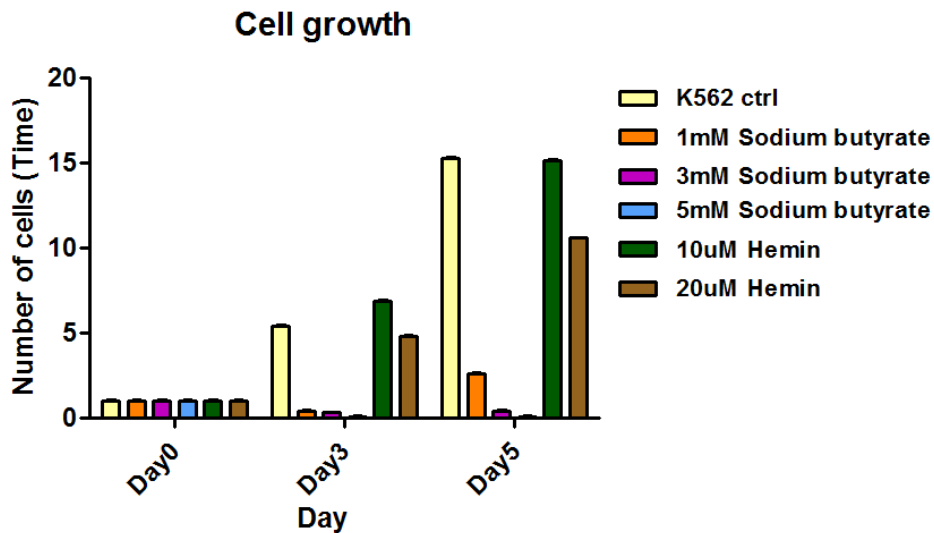
4.4 การกระตุ้นเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ให้มีการสร้างอีโมโกลบินและเพิ่มระดับการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a บนผิวของเซลล์ด้วยไซเคียม บิวทิเรตและอีมิน

จากผลการทดสอบความสามารถในการรุกรานของเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟลาซิพาร์มเข้าสู่เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ทำให้เห็นว่าเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟลาซิพาร์มสามารถเข้าสู่เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ จากการหาค่าจำนวนร้อยละของเซลล์ที่มีเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟลาซิพาร์มอยู่ภายในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นหรือลดลงตามค่าร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a ที่ได้จากการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนบนผิวของเซลล์โดยการย้อมเซลล์ด้วยแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง และตรวจสอบด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์แยกชนิดและหาปริมาณเซลล์แบบอัตโนมัติ โดยในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 ที่มีค่าร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a มากที่สุด

(ร้อยละ 92.28±5.71) มีค่าจำนวนร้อยละของเซลล์ที่มีเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพารัมอยู่ภายในเซลล์มากที่สุด (ร้อยละ 1.07 ถึง 1.69 ตลอดช่วงระยะเวลา 96 ชั่วโมง) และในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่มีค่าร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a น้อยที่สุด (ร้อยละ 5.10±0.41) ไม่พบเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพารัมอยู่ภายในเซลล์เลย (ร้อยละ 0.00) นอกจากนี้เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 เคยถูกรายงานว่ามีลักษณะที่คล้ายคลึงกับเซลล์ระยะต้นที่กำลังจะพัฒนาไปเป็นเซลล์เม็ดเลือดแดง และสามารถถูกกระตุ้นให้มีการสร้างฮีโมโกลบินและเพิ่มระดับการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a บนผิวของเซลล์ได้ด้วยสารเคมี ได้แก่ โซเดียม บิวทิเรต และฮีมิน ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปจึงต้องการทดลองกระตุ้นเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ให้มีการสร้างฮีโมโกลบินและเพิ่มระดับการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a บนผิวของเซลล์ด้วยสารเคมี สำหรับใช้ในการทดสอบความสามารถในการรุกรานของเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพารัมเข้าสู่เซลล์ เพื่อพิสูจน์ข้อสันนิษฐานที่ว่าโปรตีนชนิด CD235a น่าจะสำคัญและเกี่ยวข้องกับความสามารถในการรุกรานของเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพารัมมากที่สุด โดยการทดลองเริ่มต้นจากการทดลองพยายามกระตุ้นเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ให้สร้างฮีโมโกลบินและเพิ่มระดับการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a บนผิวของเซลล์ โดยการเติมสารละลายโซเดียม บิวทิเรตในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเซลล์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 1mM 3mM และ 5mM และเลี้ยงในระยะเวลายาว จากการทดลองพบว่าโซเดียม บิวทิเรตไม่สามารถกระตุ้นให้เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 สร้างฮีโมโกลบินได้ หลังเลี้ยงเซลล์ในอาหารร่วมกับสารละลายโซเดียม บิวทิเรตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 5 วัน โดยจะสังเกตเห็นว่าตะกอนของเซลล์ไม่มีการเปลี่ยนแปลงใด ๆ ที่เป็นสัญญาณว่าเซลล์มีการสร้างฮีโมโกลบินได้ เช่น การที่ตะกอนเซลล์มีสีแดงเพิ่มขึ้นจากการสร้างและสะสมฮีโมโกลบินภายในเซลล์ เป็นต้น แสดงดังภาพที่ 4.14 นอกจากนี้โซเดียม บิวทิเรตยังมีผลต่อความสามารถในการมีชีวิตและการเจริญของเซลล์อีกด้วย (ภาพที่ 4.15)



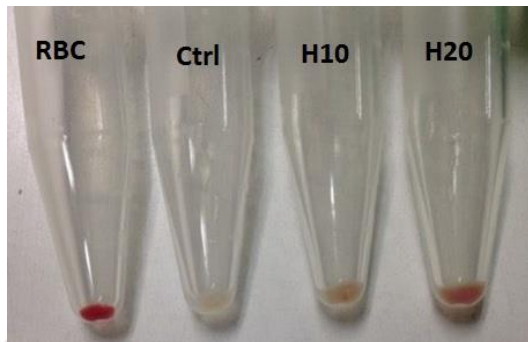
ภาพที่ 4.14 ตะกอนของเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 หลังกระตุ้นให้สร้างฮีโมโกลบินด้วยสารละลายโซเดียม บิวทิเรตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 5 วัน โดย Ctrl คือ เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 และ 1mM 3mM และ 5mM คือ เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่กระตุ้นด้วยสารละลายโซเดียม บิวทิเรตที่ความเข้มข้น 1mM 3mM และ 5mM ตามลำดับ



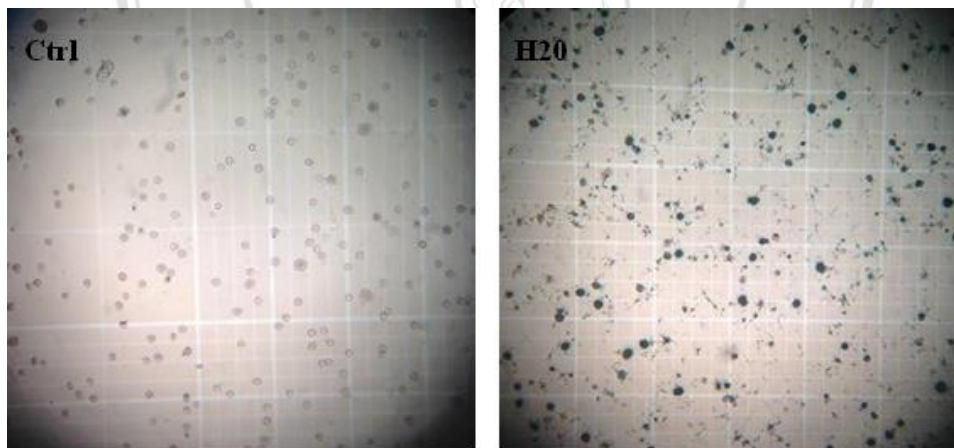
ภาพที่ 4.15 จำนวนเท่าของจำนวนเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่เปลี่ยนแปลงหลังจากถูกเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีโซเดียม บิวทิเรตและฮีมินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในวันที่ 0 3 และ 5

เนื่องจากโซเดียม บิวทิเรตไม่สามารถกระตุ้นเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่เป็นสัญญาณบ่งบอกว่าการสร้างฮีโมโกลบินได้ นอกจากนี้โซเดียม บิวทิเรตยังทำให้อัตราการแบ่งเซลล์ลดลงอย่างมากและทำให้เซลล์ตาย จากภาพที่ 4.15 ดังนั้นขั้นตอนการทดลองการกระตุ้นเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ให้สร้างฮีโมโกลบินด้วยสารละลายโซเดียม บิวทิเรตจึงต้องถูกตัดออก ต่อมาจึงได้ทำการทดลองกระตุ้นเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ให้สร้างฮีโมโกลบินและเพิ่มระดับการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a โดยการเติมสารละลายฮีมินที่ความเข้มข้น 10 μ M และ 20 μ M ในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเซลล์ ซึ่งในเบื้องต้นสามารถสังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เป็นสัญญาณบ่งบอกว่าเซลล์มีการสร้างฮีโมโกลบินได้ดังภาพที่ 4.16 จากผลการทดลองจะเห็นว่าสารละลายฮีมินทั้งที่ความเข้มข้น 10 μ M และ 20 μ M สามารถกระตุ้นให้เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 สร้างฮีโมโกลบินได้ สังเกตได้จากสีของตะกอนเซลล์ที่มีสีแดงเพิ่มขึ้นจากปกติ โดยที่เซลล์ยังสามารถมีชีวิตและแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ (ภาพที่ 4.15) นอกจากนี้ยังสามารถตรวจสอบผลเชิงคุณภาพและคำนวณหาค่าร้อยละของเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่สร้างและสะสมฮีโมโกลบินภายในเซลล์ได้ จากการย้อมสีด้วยสารละลาย 0.2% benzidine แล้วส่องดูผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ อ้างอิงจากรายงานของ Wanda *et al.* (1981) ซึ่งเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่สร้างและสะสมฮีโมโกลบินภายในเซลล์จะปรากฏเป็นสีน้ำเงิน จากผลการทดลองทำให้เลือกใช้เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารละลายฮีมินที่ความเข้มข้น 20 μ M เนื่องจากตะกอนเซลล์มีสีแดงเข้มมากกว่าเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารละลายฮีมินที่ความเข้มข้น 10 μ M และคาดว่าน่าจะมี

ปริมาณฮีโมโกลบินภายในเซลล์มากกว่า พบว่ามีจำนวนเซลล์ที่สามารถถูกกระตุ้นให้มีการสร้างและสะสมฮีโมโกลบินภายในเซลล์ได้ร้อยละ 75.16 ± 2.59 ดังภาพที่ 4.17



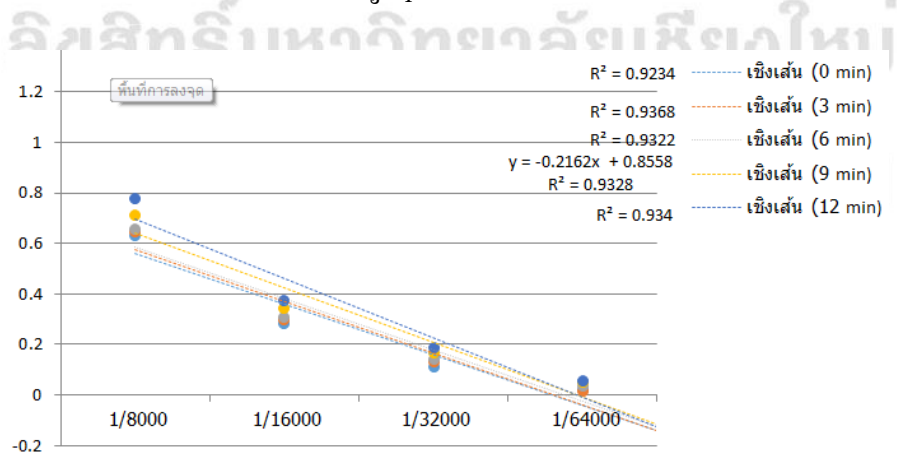
ภาพที่ 4.16 ตะกอนของเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 หลังถูกกระตุ้นให้สร้างฮีโมโกลบินด้วยฮีมิน โดย RBC คือ เซลล์เม็ดเลือดแดง Ctrl คือ เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 และ H10 และ H20 คือ เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่กระตุ้นด้วยฮีมินที่ความเข้มข้น $10 \mu\text{M}$ และ $20 \mu\text{M}$ ตามลำดับ



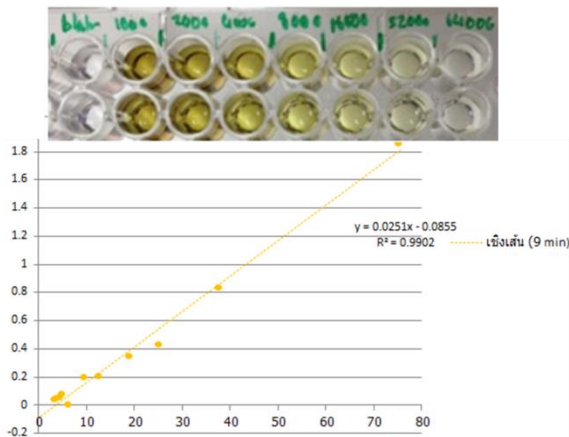
ภาพที่ 4.17 เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ย้อมสีด้วยสารละลาย 0.2% benzidine โดย Ctrl คือ เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 และ H20 คือ เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่กระตุ้นด้วยสารละลายฮีมินความเข้มข้น $20 \mu\text{M}$

หลังจากนั้นผู้ทดลองได้พยายามพัฒนาวิธีการตรวจหาฮีโมโกลบินดังกล่าว (Wanda *et al.*, 1981) ให้เป็นวิธีเชิงกึ่งปริมาณ ซึ่งจะได้ผลที่ละเอียดมากขึ้น สามารถประมาณค่าปริมาณฮีโมโกลบินออกมาเป็นค่าตัวเลขได้อย่างคร่าว ๆ ซึ่งเริ่มจากการเตรียมเซลล์เม็ดเลือดแดงจากอาสาสมัคร จากนั้นตรวจสอบหาความหนาแน่นของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่เตรียมได้และส่งตรวจเซลล์เม็ดเลือดแดง

ดังกล่าวเพื่อหาค่าปริมาณฮีโมโกลบินด้วยเครื่องตรวจความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด แล้วทำการเจือจาง เซลล์เม็ดเลือดที่เตรียมได้ 10 ความเข้มข้น ให้มีการเจือจางความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 1/4,000 1/8,000 1/16,000 1/32,000 1/50,000 1/64,000 1/70,000 1/80,000 1/90,000 และ 1/100,000 เท่าของ ฮีโมโกลบินปริมาณ 1.52 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งเป็นค่าเฉลี่ยปริมาณฮีโมโกลบินในเลือดมนุษย์ผู้ใหญ่ ปกติ จากนั้นทดลองทำตามวิธีการวัดปริมาณฮีโมโกลบินตามที่ได้ดัดแปลงมาจากวิธีการตรวจสอบผลเชิงคุณภาพและวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 414 นาโนเมตร ทุก ๆ 3 นาที พร้อมทั้งสร้างเส้นโค้งมาตรฐาน จากผลการทดลองที่ทำมากกว่า 3 ซ้ำ พบว่าที่เวลานาทีที่ 9 หลังจากทำตามวิธีการวัด ปริมาณฮีโมโกลบินตามที่ได้ดัดแปลงมาจากวิธีการตรวจสอบผลเชิงคุณภาพ และทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 414 นาโนเมตร สามารถสร้างเส้นโค้งมาตรฐานที่มีค่าสัมประสิทธิ์แสดง การตัดสิ้นใจ (R^2) ที่สูงและได้รูปแบบผลการทดลองที่ค่อนข้างคงที่จากการทดลองทำซ้ำหลาย ๆ ครั้ง จากการทดลองพล็อตค่าที่วัดได้จากเซลล์เม็ดเลือดแดงเจือจางที่ 4 ความเข้มข้นในเบื้องต้น ได้ผลดัง แสดงในภาพที่ 4.18 และเมื่อแปลงค่าการเจือจางของปริมาณฮีโมโกลบินทั้ง 10 ความเข้มข้น ให้เป็น ค่าปริมาณฮีโมโกลบิน และนำมาพล็อตหาเส้นโค้งมาตรฐาน ก่อนที่จะนำค่าที่วัดได้จากเซลล์เชื้อสาย มะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารละลายฮีมินที่ความเข้มข้น $20\mu\text{M}$ มาคำนวณใน สมการที่สร้างได้ พบว่าค่าที่คำนวณฮีโมโกลบินที่คำนวณได้ในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดง ชนิด K562 ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารละลายฮีมินที่ความเข้มข้น $20\mu\text{M}$ มีค่า 1.23 ± 0.45 พิโคกรัม/เซลล์ (เพิ่มขึ้น 3.24 เท่าจากเซลล์ปกติ) ในขณะที่ค่าปริมาณฮีโมโกลบินที่ประมาณได้จากเซลล์เชื้อสาย มะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ได้ค่าประมาณ 0.38 ± 0.05 พิโคกรัม/เซลล์ ซึ่งค่าที่คำนวณได้จากเซลล์ ทั้ง 2 กลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ (ภาพที่ 4.19)



ภาพที่ 4.18 ตัวอย่างเส้นโค้งมาตรฐานที่สร้างได้จากการพล็อตค่าที่วัดได้จากเซลล์เม็ดเลือดเจือจางที่ 4 ความเข้มข้น



K562 control (2×10^4 cells),

วัด OD₄₂₅ ได้ $Y_0 = 0.086$ ดังนั้น

$$X_0 = (0.086 + 0.0855) / 0.0251 = 6.83 \text{ ng} / 2 \times 10^4 \text{ cells} = \mathbf{0.34 \text{ pg/cell}}$$

H2O (2×10^4 cells),

วัด OD₄₂₅ ได้ $Y_1 = 0.768$

$$X_1 = (0.768 + 0.0855) / 0.0251 = 34.00 \text{ ng} / 2 \times 10^4 \text{ cells} = \mathbf{1.70 \text{ pg/cell}}$$

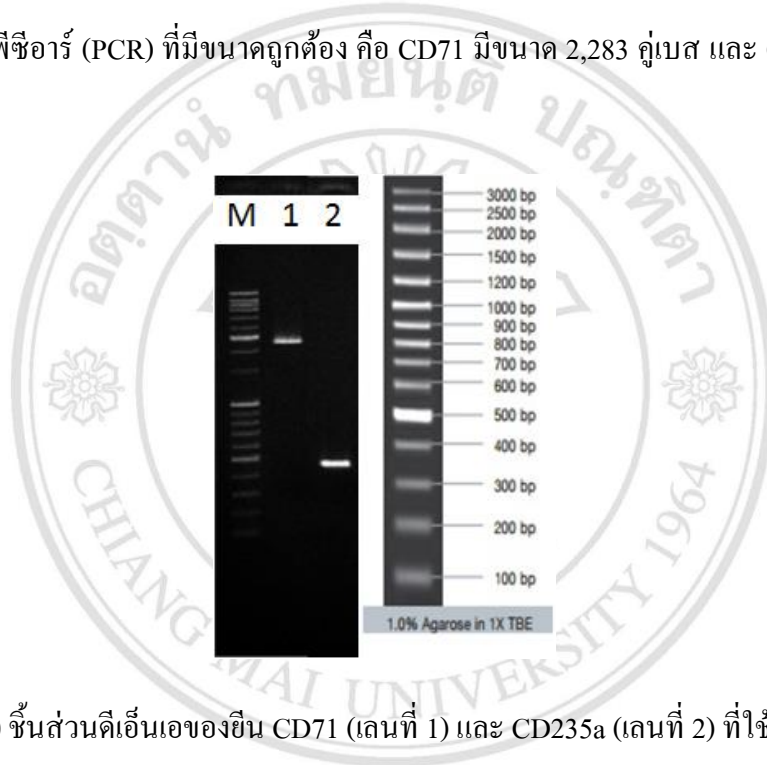
ภาพที่ 4.19 ตัวอย่างการสร้างเส้นโค้งมาตรฐานและการคำนวณค่าที่วัดได้จากตัวอย่างเซลล์เชื้อสาย มะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 และกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยสารละลายอีมีนในสมการที่สร้างได้

4.5 การเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน CD235a และ CD71 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR) และวิเคราะห์ผลการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน CD235a และ CD71 โดยวิธี 1.5% agarose gel electrophoresis

จากผลการทดสอบความสามารถในการรุกรานของเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพารัมเข้าสู่เซลล์เชื้อสาย มะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ที่แสดงให้เห็นว่าค่าจำนวนร้อยละของเซลล์ที่มีเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพารัมอยู่ในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นหรือลดลงตามค่าร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a ทำให้สันนิษฐานได้ว่าโปรตีนชนิด CD235a น่าจะสำคัญและเกี่ยวเนื่องกับความสามารถในการรุกรานของเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพารัม มากที่สุด และจากการทดลองกระตุ้นเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ด้วยอีมีนให้สร้าง ซีโมโกลบินได้และคาดว่ามีการเพิ่มระดับการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a บนผิวของเซลล์ (ซึ่งจะตรวจสอบในขั้นตอนต่อไป) เพื่อนำไปทดสอบความสามารถในการรุกรานของเชื้อ พลาสมาโมเดียม ฟาลซิพารัมเข้าสู่เซลล์ อย่างไรก็ตามเคยมีการรายงานว่าอีมีนทำให้เชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพารัมอ่อนแอและส่งผลให้เชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพารัมรุกรานเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงได้ ลดลง (Gaudreault *et al.*, 2015) ดังนั้นผู้ทดลองจึงต้องการทดลองกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน ชนิด CD235a บนผิวของเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 โดยอาศัยการถ่ายโอน พลาสมาเม็ดลูกผสม ควบคู่กับชุดควบคุมการทดลองที่เป็นเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ ถูกกระตุ้นระดับการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD71 บนผิวของเซลล์ ซึ่งเป็นโปรตีนที่ไม่เกี่ยวข้อง กับการรุกรานเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงของเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพารัม เพื่อตัดปัจจัยที่ทำให้เชื้อ

อ่อนแอออก ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อความสามารถในการรุกรานของเชื้อ ก่อนนำไปทดสอบความสามารถในการรุกรานของเชื้อพลาสติก โมเดียม ฟาลซิพาร์มเข้าสู่เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 กลุ่มต่าง ๆ

ดังนั้นในงานวิจัยส่วนนี้จึงเริ่มจากการออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนบนผิวของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่สนใจทั้งหมด 2 ยีน ได้แก่ ยีน CD71 และ CD235a โดยผลของการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนทั้ง 2 ยีน แสดงในภาพที่ 4.20 ซึ่งให้ผลผลิตจากการทำพีซีอาร์ (PCR) ที่มีขนาดถูกต้อง คือ CD71 มีขนาด 2,283 คู่เบส และ CD235a มีขนาด 453 คู่เบส



ภาพที่ 4.20 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน CD71 (เลนที่ 1) และ CD235a (เลนที่ 2) ที่ใช้ในงานวิจัย

4.6 การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนในพลาสติกชนิด pBluescriptIISK+

เมื่อได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน CD235a และ CD71 ที่ถูกเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR) แล้ว ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของแต่ละยีนจะถูกนำมาใส่หลอดให้บริสุทธิ์เพื่อสร้างพลาสติกลูกผสม โดยดำเนินการเชื่อมต่อดีเอ็นเอของยีนกับพลาสติกชนิด pBluescriptIISK+ และถ่ายโอนนำเข้าสู่เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α จากนั้นคัดเลือกโคโลนีที่คาดว่าจะถูกต้อง โดยอาศัยความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ Ampicillin ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร และวิธี blue-white colony screening ซึ่งแบคทีเรียที่มีโคโลนีสีขาวที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย LB amp agar จะเป็นเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่มีพลาสติกลูกผสมอยู่ และจะถูกนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย LB amp broth เพื่อเพิ่มจำนวน ก่อนนำมาสกัดเอาพลาสติกลูกผสม และนำมาตัด

ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อวิเคราะห์ความถูกต้องของพลาสมิดลูกผสมที่ได้ โดยตัวอย่างพลาสมิดลูกผสมที่ให้ผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ถูกต้อง จะถูกนำไปใช้เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดังกล่าว โดยตัวอย่างการให้ผลการทดลองของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้องของพลาสมิดลูกผสมที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน CD235a จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *NdeI* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้

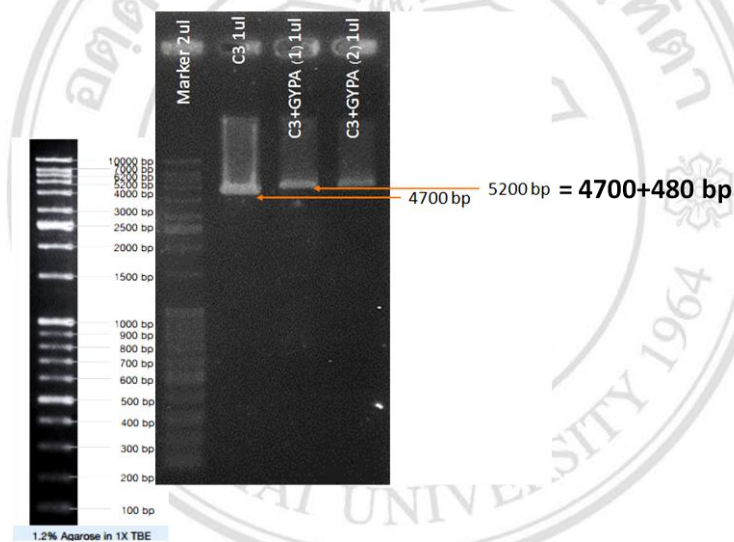
1	ATGTATGGAA	AAATAATCTT	TGTATTACTA	TTGTCAGCAA	TTGTGAGCAT
51	ATCAGCATCA	AGTACCCTG	GTGTGGCAAT	GCACACTTCA	ACCTCTTCTT
101	CAGTCACAAA	GAGTTACATC	TCATCACAGA	CAAATGATAC	GCACAAACGG
151	GACACATATG	CAGCCACTCC	TAGAGCTCAT	GAAGTTTCAG	AAATTTCTGT
201	TAGAACTGTT	TACCCCTCCAG	AAGAGGAAAC	CGGAGAAAGG	GTACAACCTG
251	CCCATCATTT	CTC T GAACCA	GAGATAACAC	TCATTATTTT	TGGGGTGATG
301	GCTGGTGTTA	TTGGAACGAT	CCTCTTAATT	TCTTACGGTA	TTCGCCGACT
351	GATAAAGAAA	AGCCCATCTG	ATGTAAACC	TCTCCCCTCA	CCTGACACAG
401	ACGTGCCTTT	AAGTTCTGTT	GAAATAGAAA	ATCCAGAGAC	AAGTGATCAA
451	TGA				

เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน CD235a ที่ได้กับฐานข้อมูล GenBank (Accession No. L31860.1) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 264 (ตัวอักษรสีแดง คาดแถบสีเหลือง) มีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์จากอะดีนีน (adenine; A) ไปเป็นไทมีน (thymine; T) อย่างไรก็ตามเมื่อเกิดการแปลรหัส (translation) ออกมาเป็นโปรตีน พบว่าลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนตำแหน่งที่ 88 ยังคงเป็นกรดอะมิโนชนิดซีรีน (serine) เหมือนเดิม ไม่มีการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโนแต่อย่างใด ดังนั้นแสดงว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน CD235a ในพลาสมิดลูกผสมที่ได้ มีการเกิดไซเลนท์มิวเทชัน (silent mutation) ที่ไม่มีผลกระทบต่อลำดับกรดอะมิโนของโครงสร้างโปรตีนชนิด CD235a จึงสามารถนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน CD235a ที่ได้ดังกล่าวไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไปได้

4.7 การสร้างพลาสมิดลูกผสมสำหรับการแสดงออกของยีนในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

สำหรับพลาสมิดชนิด pBluescriptII SK+ ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนที่ให้ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้องจะถูกนำมาเลี้ยงเพิ่มจำนวน โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่มีพลาสมิดลูกผสมดังกล่าวในอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย LB amp broth จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียมาสกัดเอาพลาสมิดลูกผสม และตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ทำให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนที่มีส่วนปลายเหนียว (sticky end) ก่อนนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิดสำหรับการแสดงออกของยีนในเซลล์

สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมชนิด pEGFP-C3 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชุดเดียวกันกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนและมีส่วนปลายเหนียวที่สมมาตรกันในบริเวณลำดับคลีโอไทด์มีลักษณะเป็นพาลินโดรม (palindrome sequence) แล้วถ่ายโอนเข้าสู่เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α โดยโคโลนีที่มีความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัม/ไมโครลิตรนั้น จะเป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีพลาสมิดลูกผสมอยู่ จากนั้นนำโคโลนีเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่ได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย LB kan broth เพื่อเพิ่มจำนวนและสกัดเอาพลาสมิดลูกผสม แล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อตรวจสอบความถูกต้อง โดยตัวอย่างผลของการตัดพลาสมิดลูกผสมที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน CD235a ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Bam*HI แสดงดังภาพที่ 4.21 โดยจะเห็นว่าพลาสมิดลูกผสมจะมีขนาดใหญ่กว่าพลาสมิดปกติตามขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนที่แทรกอยู่



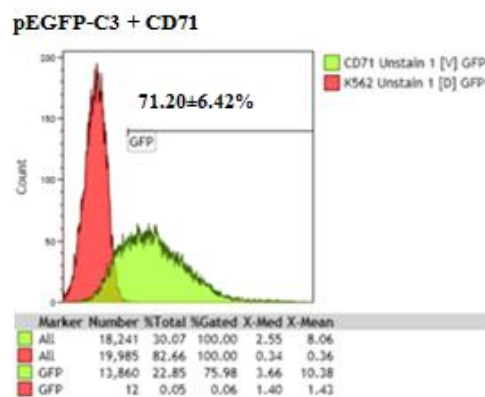
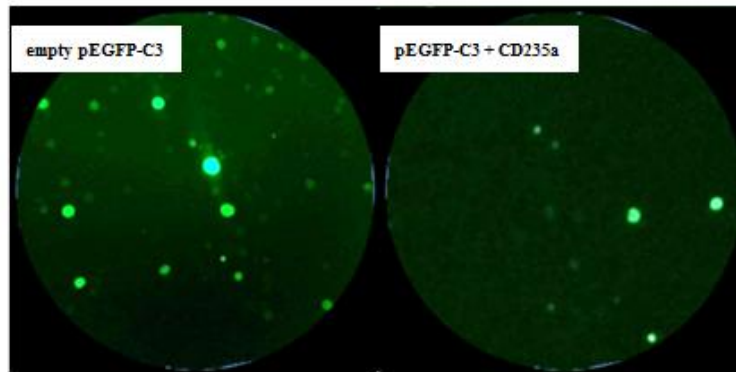
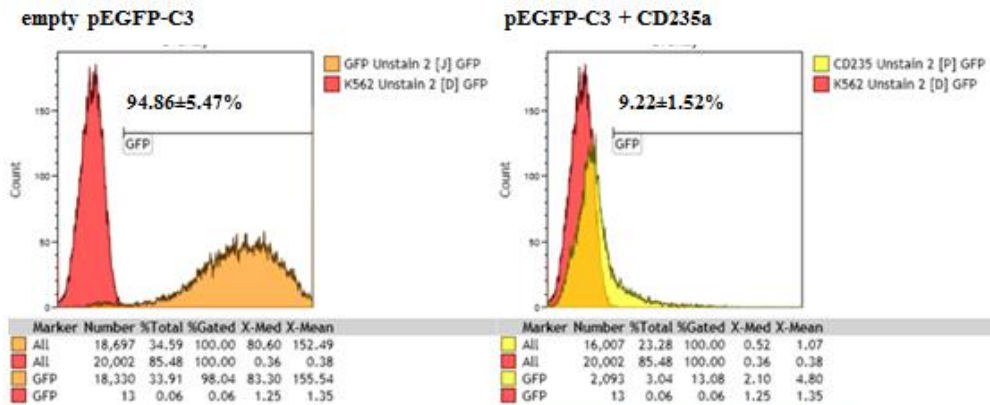
ภาพที่ 4.21 ขนาดของพลาสมิดสำหรับการแสดงออกของยีนในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมชนิด pEGFP-C3 (เลนที่ 1) และพลาสมิดลูกผสมที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน CD235a (เลนที่ 2 และ 3)

4.8 การถ่ายโอนพลาสมิดสำหรับการแสดงออกของยีนที่สนใจในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมเข้าสู่เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ด้วยวิธีการ electroporation (Delgado-Canedo *et al.*, 2006) และการตรวจสอบระดับการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a

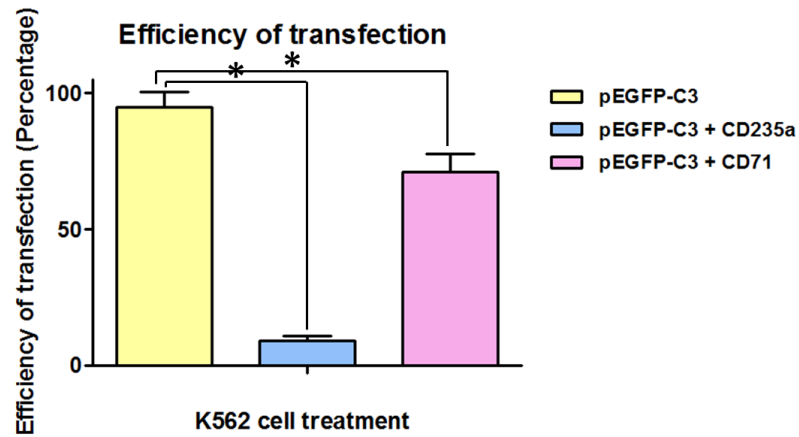
เมื่อได้พลาสมิดลูกผสมสำหรับการแสดงออกของยีนที่สนใจ (ยีน CD235a และ CD71) ในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมชนิด pEGFP-C3 แล้ว จากนั้นทำการถ่ายโอนพลาสมิดสำหรับการแสดงออกของยีนในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมชนิด pEGFP-C3 ที่เชื่อมต่อกับยีน CD235a และพลาสมิดสำหรับการ

แสดงออกของยีนในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมชนิด pEGFP-C3 ที่เชื่อมต่อกับยีน CD71 เข้าสู่เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ด้วยวิธี electroporation และเลี้ยงเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ดังกล่าวในอาหารเลี้ยงเซลล์เชื้อสายมะเร็งชนิด RPMI-1640 ที่มี 10% FBS และไม่มียาปฏิชีวนะเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ได้พักฟื้นและมีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a หรือ CD71 บนผิวของเซลล์ จากนั้นตรวจสอบความสำเร็จในการถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 และการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a โดยอาศัยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับพร้อมชุดฟลูออเรสเซนซ์ และเครื่องตรวจวิเคราะห์แยกชนิดและหาปริมาณเซลล์แบบอัตโนมัติ ซึ่งจากผลการตรวจสอบความสำเร็จในการถ่ายโอนพลาสมิดชนิด pEGFP-C3 ที่เชื่อมต่อกับยีนชนิดต่าง ๆ พบว่ามีจำนวนของเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ประสบความสำเร็จในการถ่ายโอนพลาสมิดชนิด pEGFP-C3 ร้อยละ 94.86 ± 5.47 ที่ใช้เป็นชุดควบคุมการทดลองของเซลล์ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดชนิด pEGFP-C3 ที่เชื่อมต่อกับยีน CD235a ประสบความสำเร็จจำนวนร้อยละ 9.22 ± 1.52 (แตกต่างกันกับชุดควบคุมการทดลองอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$) และเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดชนิด pEGFP-C3 ที่เชื่อมต่อกับยีน CD71 ประสบความสำเร็จจำนวนร้อยละ 71.20 ± 6.42 (แตกต่างกันกับชุดควบคุมการทดลองอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 4.22-4.23 เมื่อตรวจสอบค่าร้อยละของจำนวนเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a พบว่าเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ปกติ ที่ใช้เป็นชุดควบคุมการทดลองของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารละลายฮีมินความเข้มข้น $20 \mu\text{M}$ มีจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a ร้อยละ 5.10 ± 0.41 และมีค่า MFI เท่ากับ 0.80 ± 0.64 เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ได้รับพลาสมิดชนิด pEGFP-C3 ที่เป็นชุดควบคุมการทดลองของเซลล์ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด มีจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a ร้อยละ 7.57 ± 0.20 และมีค่า MFI เท่ากับ 2.51 ± 0.74 เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ได้รับพลาสมิดชนิด pEGFP-C3 ที่เชื่อมต่อกับยีน CD235a มีจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a ร้อยละ 17.84 ± 4.79 (เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ เท่ากับ 2.36 เท่าของเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดชนิด pEGFP-C3 ที่เป็นชุดควบคุมการทดลอง) และมีค่า MFI เท่ากับ 11.10 ± 2.47 (เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ เท่ากับ 4.42 เท่าของชุดควบคุมการทดลอง) และเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ได้รับพลาสมิดชนิด pEGFP-C3 ที่เชื่อมต่อกับยีน CD71 มีจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a ร้อยละ 3.91 ± 0.50

และมีค่า MFI เท่ากับ 1.62 ± 0.62 ซึ่งไม่แตกต่างกับชุดควบคุมการทดลอง นอกจากนี้เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารละลายอีมินความเข้มข้น $20 \mu\text{M}$ มีจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a ร้อยละ 14.28 ± 2.51 (เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ เท่ากับ 2.80 เท่าของเซลล์ปกติ ที่เป็นชุดควบคุมการทดลอง) และมีค่า MFI เท่ากับ 1.28 ± 1.80 ดังภาพที่ 4.24-4.26



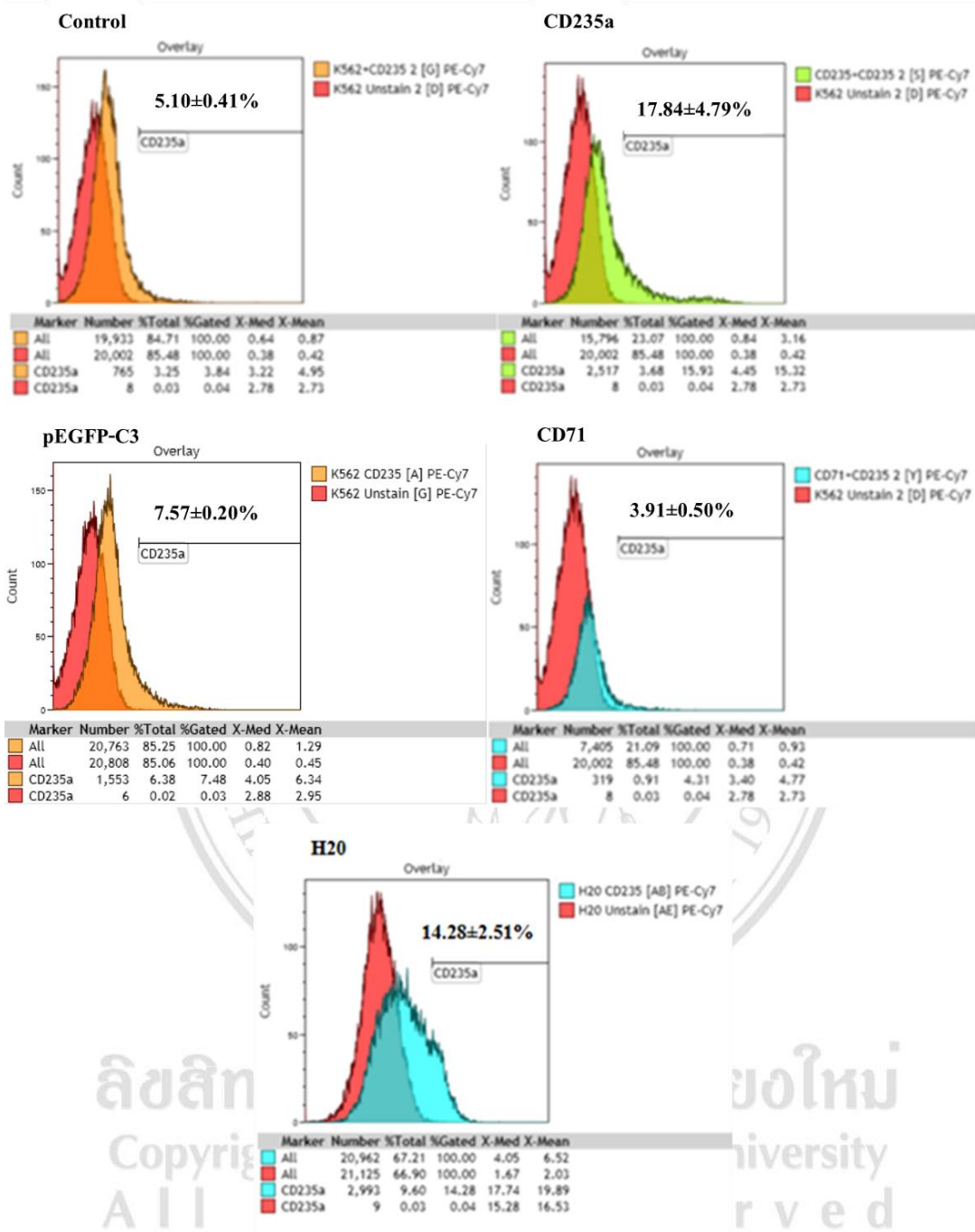
ภาพที่ 4.22 ผลการตรวจสอบความสำเร็จในการถ่ายโอนพลาสมิดชนิด pEGFP-C3 พลาสมิดชนิด pEGFP-C3 ที่เชื่อมต่อกับยีน CD235a และพลาสมิดชนิด pEGFP-C3 ที่เชื่อมต่อกับยีน CD71 เข้าสู่เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562



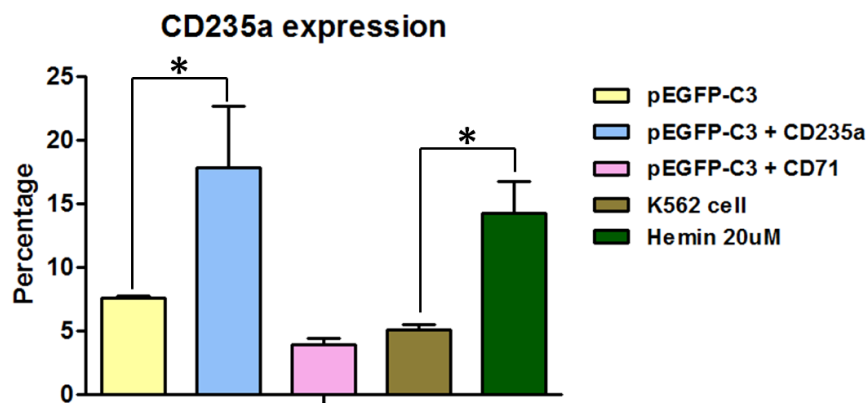
ภาพที่ 4.23 ค่าร้อยละของจำนวนเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ประสบความสำเร็จในการถ่ายโอนพลาสมิด

(* แสดงถึงความแตกต่างกับชุดควบคุมการทดลองอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$; Student's *t* test)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 Copyright© by Chiang Mai University
 All rights reserved



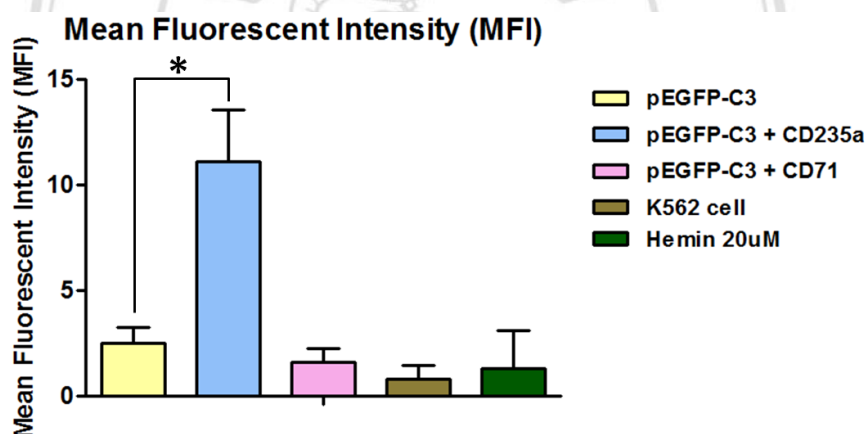
ภาพที่ 4.24 ระดับการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a โดย Ctrl คือ เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 pEGFP-C3 คือ เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ได้รับพลาสมิดชนิด pEGFP-C3 CD235a คือ เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ได้รับพลาสมิดชนิด pEGFP-C3 ที่เชื่อมต่อกับยีน CD235a CD71 คือ เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ได้รับพลาสมิดชนิด pEGFP-C3 ที่เชื่อมต่อกับยีน CD71 และ H2O คือ เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารละลายอีมินความเข้มข้น 20µM



K562 cell treatment

ภาพที่ 4.25 ค่าร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนบนผิวของเซลล์ชนิด CD235a ในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 กลุ่มต่าง ๆ

(* แสดงถึงความแตกต่างกับชุดควบคุมการทดลองอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$; Student's *t* test)



K562 cell treatment

ภาพที่ 4.26 ค่า Mean Fluorescent Intensity (MFI) ของเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 กลุ่มต่าง ๆ ที่มีการแสดงออกของโปรตีนบนผิวของเซลล์ชนิด CD235a

(* แสดงถึงความแตกต่างกับชุดควบคุมการทดลองอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$; Student's *t* test)

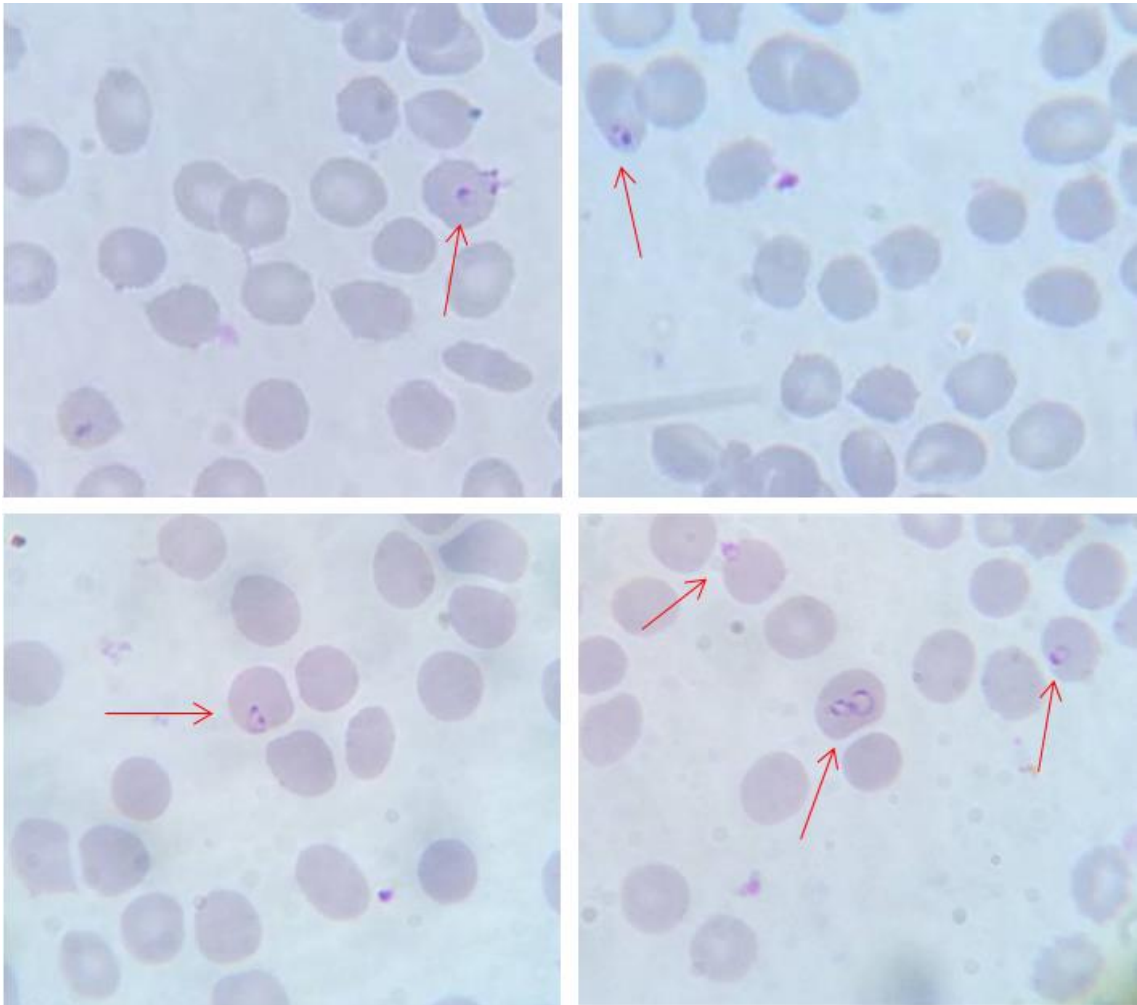
4.9 การทดสอบความสามารถในการรุกรานของเชื้อพลาสมาเดียม ฟาลซิพารัมเข้าสู่เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารเคมีและถูกกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่สนใจ

หลังจากเลี้ยงเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ถูกถ่ายโอนพลาสมาติดลูกผสมในอาหารเลี้ยงเซลล์เชื้อสายมะเร็งชนิด RPMI-1640 ที่มี 10% FBS และไม่มียาปฏิชีวนะเป็นเวลา 48 ชั่วโมงเพื่อให้เซลล์ได้พักฟื้นและมีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a จากนั้นเตรียมเชื้อพลาสมาเดียม

ฟาลซิพาร์มในระยะไซซอนต์ และนำเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพาร์มในระยะไซซอนต์ที่เตรียมได้มาเลี้ยงร่วมกับเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 กลุ่มต่าง ๆ ประกอบด้วย เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ปกติ เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดชนิด pEGFP-C3 เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมที่เชื่อมต่อกับยีน CD235a (pEGFP-C3 + CD235a) เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมที่เชื่อมต่อกับยีน CD71 (pEGFP-C3 + CD71) เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่เลี้ยงร่วมกับสารละลายฮีมินความเข้มข้น 20 μ M และเซลล์เม็ดเลือดแดง (1%HCT) ที่เป็นชุดควบคุมการทดลองในอาหารเลี้ยงเชื้อมาลาเรียชนิด CMMC ด้วยเหตุนี้จึงทำให้เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ยังไม่ได้มีการปรับตัวต่ออาหาร ส่งผลให้เกิดความเครียดกับเซลล์ โดยจะสังเกตพบว่าเซลล์มีรูปร่างกลมปกติ แต่ขอบเขตของนิวเคลียสและไซโทพลาซึมแบ่งแยกกับไม่ชัดเจน โดยส่วนของไซโทพลาซึมติดสีเข้ม เป็นสัญญาณว่าเซลล์เกิดความเครียด นอกจากนี้สำหรับในกลุ่มเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่เลี้ยงร่วมกับสารละลายฮีมินความเข้มข้น 20 μ M ยังจะพบว่าลักษณะของผิวเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงไป โดยที่ผิวของเซลล์มีลักษณะขรุขระไม่เรียบ และการติดสีในส่วน of ไซโทพลาซึมมีสีจางกว่าในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 กลุ่มอื่น ๆ

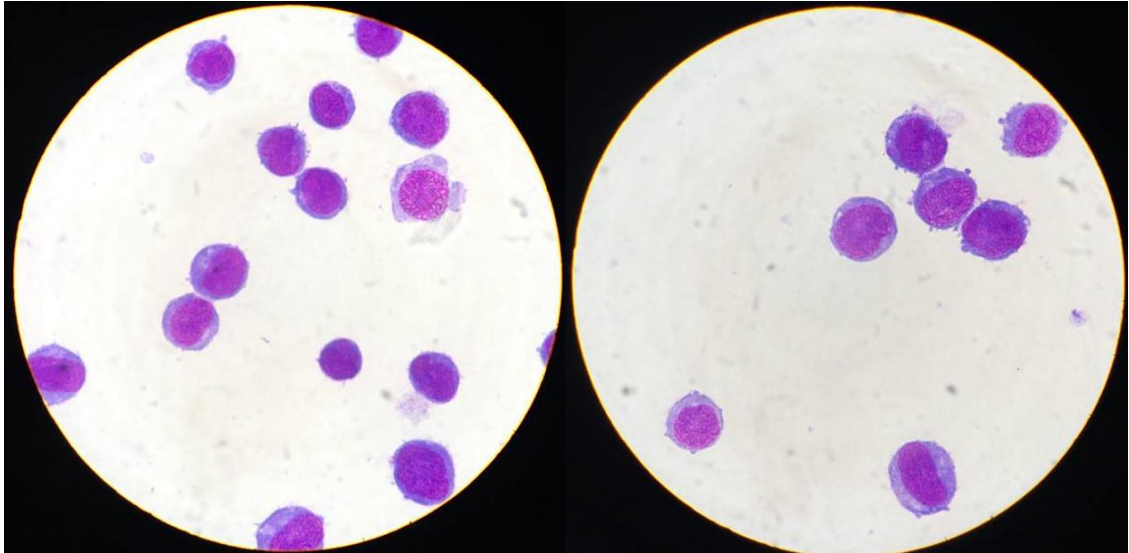
จากการทดสอบความสามารถในการรุกรานของเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพาร์มเข้าสู่เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 กลุ่มต่าง ๆ โดยการนำเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพาร์มในระยะไซซอนต์ที่เตรียมได้มาเลี้ยงร่วมกับเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 กลุ่มต่าง ๆ และติดตามผลความสามารถในการรุกรานเข้าสู่เซลล์และการเจริญเติบโตของเชื้อ หลังเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง พบว่าเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพาร์มสามารถรุกรานเข้าสู่เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมที่เชื่อมต่อกับยีน CD235a ได้ร้อยละ 0.40 โดยพบเชื้อที่อยู่ในระยะจริง แต่มีลักษณะบวม และยังมีสิ่งทีคาดว่าน่าจะเป็นเชื้อที่มีลักษณะเป็นเส้นและเป็นจุดกลมสีเข้มเปรียบเทียบกับเซลล์เม็ดเลือดแดง (1%HCT) ที่เป็นชุดควบคุมการทดลอง พบเชื้อร้อยละ 0.55 ในระยะจริง ในขณะที่ไม่พบเชื้อหรือสิ่งทีคาดว่าน่าจะเป็นเชื้อในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 กลุ่มอื่น ๆ เลย ดังแสดงในภาพที่ 4.27-4.32 และตารางที่ 4.3 อย่างไรก็ตามจากการพบเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพาร์มเพียงร้อยละ 0.55 ในเซลล์เม็ดเลือดแดง (1%HCT) ที่เป็นชุดควบคุมการทดลอง เนื่องจากช่วงเวลาในการเตรียมเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพาร์มในระยะไซซอนต์ในการทดลองครั้งนี้ไม่สัมพันธ์กับเวลาทำการทดลอง ทำให้มีเชื้อในระยะไซซอนต์จำนวนมากแตก และปลดปล่อย

เมื่อโรซอียดออกมาก่อนเวลาที่เหมาะสม จึงทำให้การทดลองครั้งนี้สามารถเตรียมเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมในระยะไซซอนต์ได้ปริมาณเพียง 150 ไมโครลิตร โดยไม่ทราบจำนวนที่แท้จริงของเซลล์เม็ดเลือดแดงทั้งหมดและค่าร้อยละของเชื้อที่เตรียมได้ อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองในครั้งนี้ น่าจะเป็นหลักฐานที่ยืนยันได้ว่าโปรตีนชนิด CD235a ที่น่าจะสำคัญและเกี่ยวเนื่องกับความสามารถในการรุกรานของเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมมากที่สุด

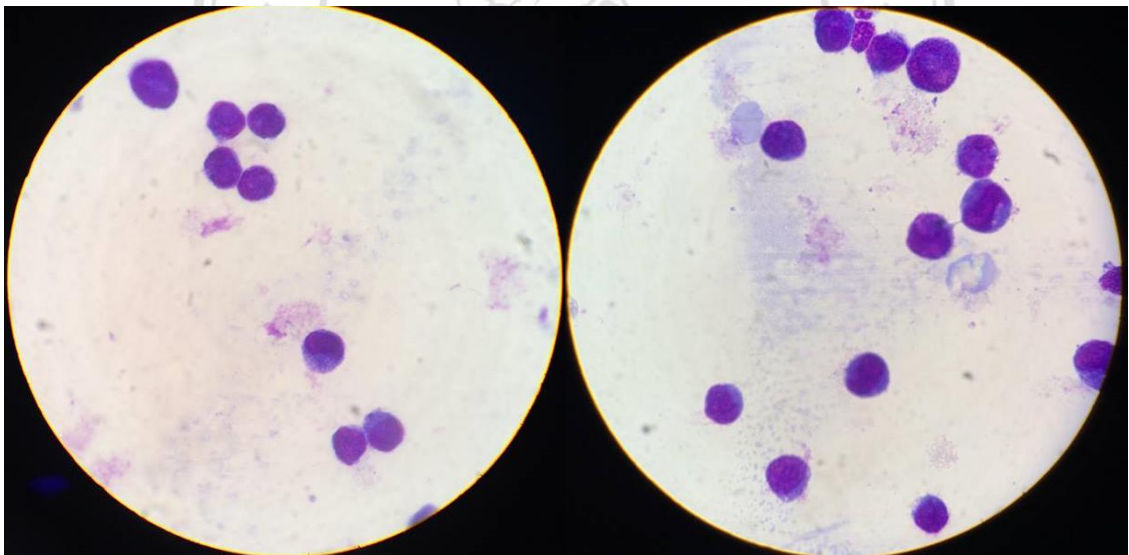


All rights reserved

ภาพที่ 4.27 รูปร่างลักษณะของเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม (ลูกศรสีแดง) ในเซลล์เม็ดเลือดแดง

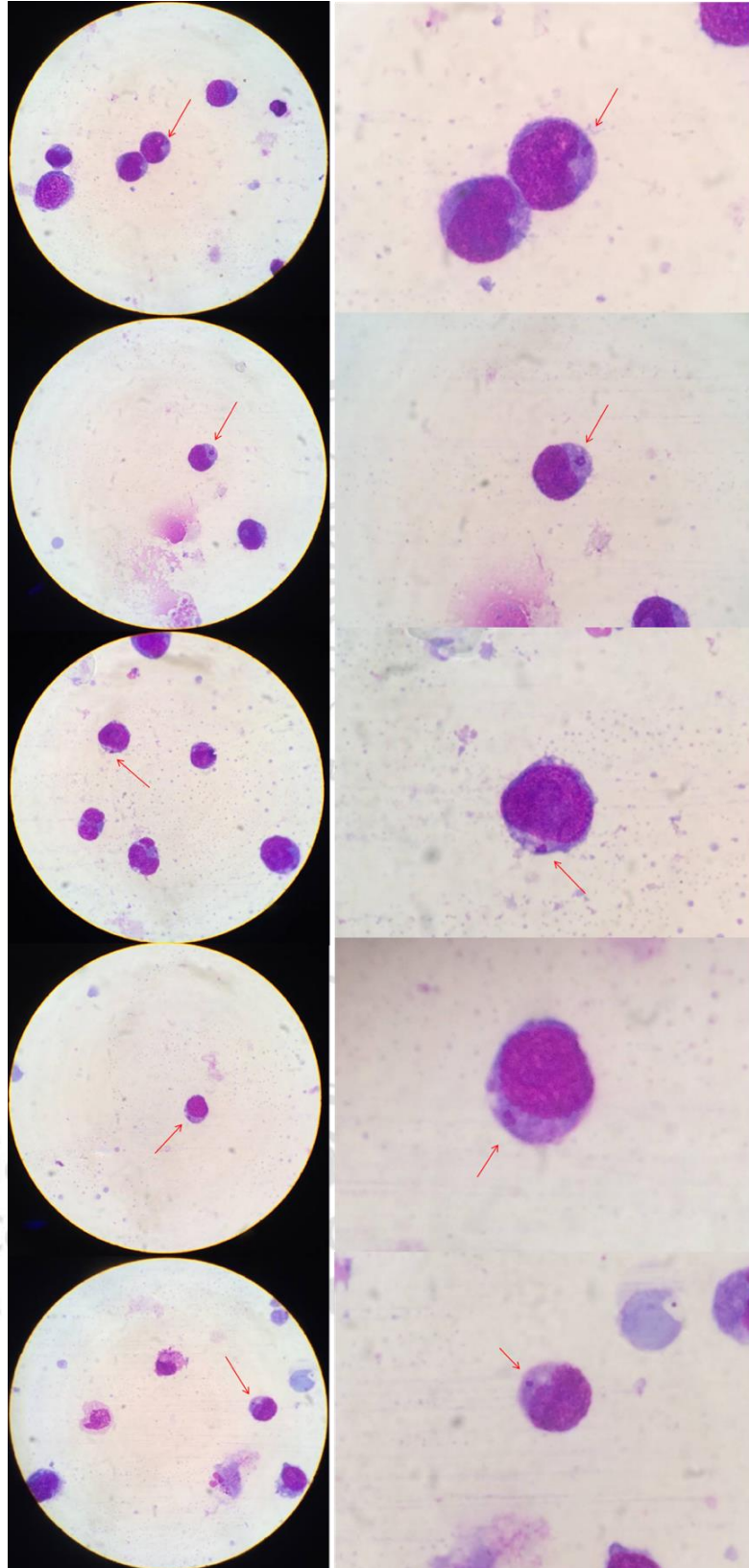


ภาพที่ 4.28 รูปร่างลักษณะของเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562

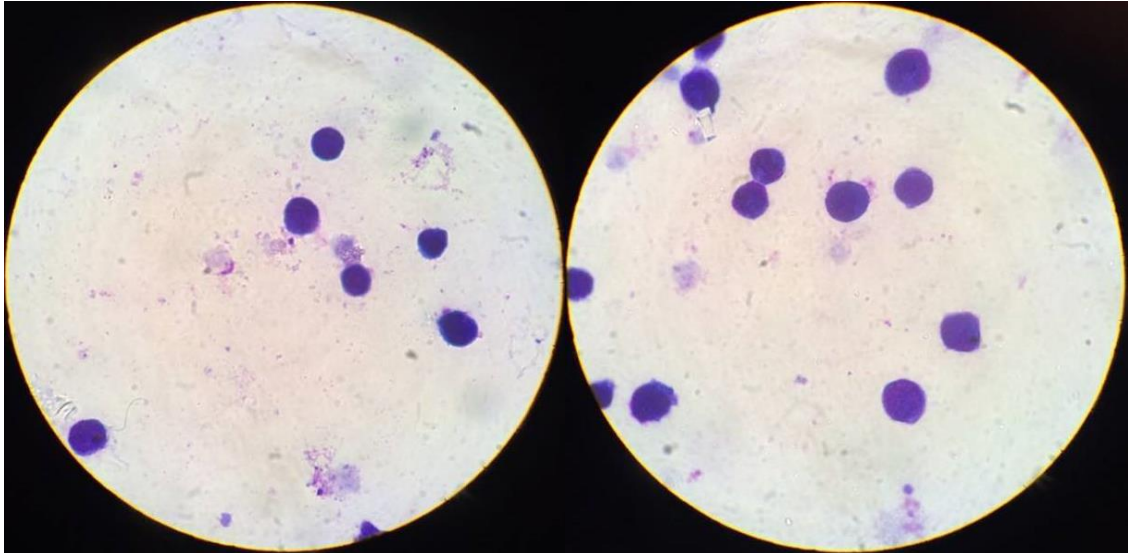


ภาพที่ 4.29 รูปร่างลักษณะของเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562

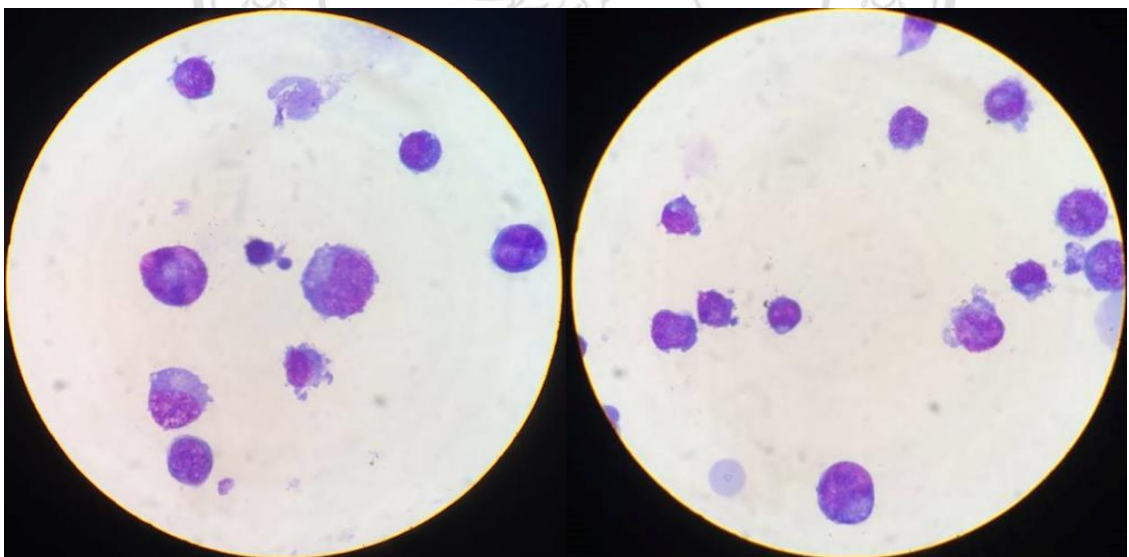
ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดชนิด pEGFP-C3



ภาพที่ 4.30 รูปร่างลักษณะของเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม (ลูกครีสีแดง) ในเซลล์เชื้อสายมะเร็ง
เม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมที่เชื่อมต่อกับยีน CD235a



ภาพที่ 4.31 รูปร่างลักษณะของเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562
ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมที่เชื่อมต่อกับยีน CD71



ภาพที่ 4.32 รูปร่างลักษณะของเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562
ที่เลี้ยงร่วมกับสารละลายฮีมินความเข้มข้น 20 μ M

ตารางที่ 4.3 จำนวนร้อยละของเซลล์ที่มีเชื้อพลาสมิเดียม ฟาลซิพารัมในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 กลุ่มต่าง ๆ ที่ 24 ชั่วโมงหลังเริ่มการทดลอง (สำรวจจากเซลล์มะเร็งเชื้อสายเม็ดเลือดแดงชนิด K562 กลุ่มต่าง ๆ จำนวน 100 เซลล์/กลุ่ม และเซลล์เม็ดเลือดแดงจำนวน 1,000 เซลล์)

ชนิดของเซลล์	จำนวนของเชื้อพลาสมิเดียม ฟาลซิพารัม ที่ 24 ชั่วโมงหลังเริ่มการทดลอง (ร้อยละ)
เซลล์เม็ดเลือดแดง (1%HCT)	0.55
เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562	0.00
เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ได้รับการ ถ่ายโอนพลาสมิดชนิด pEGFP-C3	0.00
เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ได้รับการ ถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมที่เชื่อมต่อกับยีน CD235a	0.40
เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ได้รับการ ถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมที่เชื่อมต่อกับยีน CD71	0.00
เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่เลี้ยง ร่วมกับสารละลายอีมีนความเข้มข้น 20 μ M	0.00

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทที่ 5

อภิปรายผลการวิจัย

5.1 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนบนผิวของเซลล์โดยการย้อมเซลล์ด้วยแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง

จากผลการทดลองการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนบนผิวของเซลล์ชนิดต่าง ๆ โดยการย้อมเซลล์ด้วยแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง และตรวจสอบด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์แยกชนิดและหาปริมาณเซลล์แบบอัตโนมัติ พบว่าเซลล์ PBMC ทั้งกลุ่มลิมโฟไซต์และโมโนไซต์ และเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดทั้ง 4 ชนิดที่ถูกใช้ในการศึกษา มีการแสดงออกของโปรตีนบนผิวของเซลล์ชนิดต่าง ๆ แตกต่างกันไปตามชนิดของเซลล์ โดยสำหรับเซลล์ PBMC กลุ่มลิมโฟไซต์ สามารถตรวจพบจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD3 CD4 CD8 และ CD45 จำนวนมากประมาณช่วงร้อยละ 40.28±4.81 ถึง 64.60±5.29 (สำหรับโปรตีนชนิด CD3 CD4 และ CD8) และ 99.69±0.26 (สำหรับโปรตีนชนิด CD45) และโปรตีนชนิด CD19 และ CD20 ที่มีจำนวนเซลล์ที่แสดงออกประมาณร้อยละ 9.81±0.16 ถึง 10.10±0.87 สอดคล้องกับหลายงานวิจัยที่ระบุว่าสามารถใช้การมีโปรตีนชนิด CD3 CD4 CD8 และ CD45 ในการจำแนกหรือแยกเซลล์ลิมโฟไซต์ กลุ่มที่เซลล์ออกจากเซลล์อื่น ๆ ได้ (Ekberg-Janson *et al.*, 1999; Gelman and Wilkening, 2000) ส่วนโปรตีนชนิด CD19 และ CD20 สามารถใช้ในการระบุเซลล์ลิมโฟไซต์กลุ่มบีเซลล์ได้ (Ginaldi *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2012) นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่าในมนุษย์ผู้ใหญ่ปกติ จะพบอัตราส่วนของเซลล์ลิมโฟไซต์ กลุ่มทีเซลล์ต่อบีเซลล์ได้เท่ากับ 4-5 : 1 (Dragos and Luca, 2012; Horny *et al.*, 1993) ซึ่งค่าอัตราส่วนดังกล่าวสอดคล้องกับอัตราส่วนของร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิดที่พบได้บนผิวของทีเซลล์ลิมโฟไซต์ต่อบีเซลล์ลิมโฟไซต์ (40.28±4.81 ถึง 64.60±5.29 : 10) ที่ได้จากการทดลอง สำหรับเซลล์ PBMC กลุ่มโมโนไซต์ สามารถตรวจพบการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD14 และ CD45 ได้เกือบทั้งหมดทุกเซลล์ (ร้อยละ 90.13±11.84 และ 99.99±3.86 ตามลำดับ) ซึ่งจากรายงานของ Landmann *et al.* (1991) และ Mandl *et al.* (2014) รายงานว่ามีแสดงออกของโปรตีนชนิด CD14 อย่างมากในเซลล์โมโนไซต์และแมคโครเฟจ (macrophage) นอกจากนี้ยังมีการแสดงออกอย่าง

มากของโปรตีนชนิด CD11b CD13 CD36 CD38 และ CD64 ในเซลล์โมโนไซต์อีกด้วย (Landmann *et al.*, 1991) สำหรับเซลล์เชื้อมะเร็งเม็ดเลือดทั้ง 4 ชนิดที่ใช้ในการทดลอง เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Raji ที่เป็นเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดกลุ่มบีเซลล์สามารถตรวจพบจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD19 และ CD20 จำนวนมาก (ร้อยละ 72.05 ± 7.83 และ 78.01 ± 11.04 ตามลำดับ) เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Jurkat ที่เป็นเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดกลุ่มทีเซลล์ตรวจพบจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD3 CD4 และ CD45 จำนวนมาก (ร้อยละ 71.74 ± 5.55 65.86 ± 15.13 และ 91.03 ± 0.69 ตามลำดับ) เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 ที่เป็นเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดกลุ่มเซลล์โปรโมโนไซต์ ตรวจพบจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD4 และ CD8 ที่สูง (ร้อยละ 98.80 ± 0.96 และ 84.92 ± 4.74 ตามลำดับ) แต่ไม่พบการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD14 สอดคล้องกับผลการทดลองของ Moriuchi *et al.* (1997) และ Zamani *et al.* (2013) ที่ระบุว่าพบการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD4 แต่ไม่พบ CD14 หากไม่ถูกกระตุ้นให้มีการพัฒนาไปเป็นเซลล์โมโนไซต์ในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 อย่างไรก็ตามโปรตีนชนิด CD8 ยังคงไม่มีการรายงานที่สามารถตรวจพบได้ในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 แต่จากการตรวจพบโปรตีนชนิด CD8 ในการทดลองนี้ อาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (variation) ตามอายุของเซลล์ที่แก่ขึ้น และปัจจัยภายนอกอื่น ๆ เช่น วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ และองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเซลล์และสารเคมีที่ใช้สัมผัสกับเซลล์โดยตรง เป็นต้น และเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่เป็นเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดแดง ไม่สามารถตรวจพบการแสดงออกของโปรตีนชนิดใดเลยที่บ่งบอกความเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาว (ทีเซลล์ลิมโฟไซต์ บีเซลล์ลิมโฟไซต์ และเซลล์โมโนไซต์) ในขณะที่พบจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD45 เพียงเล็กน้อยสอดคล้องกับรายงานของ Shin *et al.* (2011) ดังนั้นเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ที่ถูกนำมาใช้ในการทดลองน่าจะเป็นเซลล์ชนิดที่ถูกต้องแล้ว สอดคล้องกับผลการสังเคราะห์เพื่อยืนยันความถูกต้องของชนิดของเซลล์ (authentication) (ข้อมูลไม่ถูกแสดง)

จากนั้นตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD108 CD147 และ CD235a ที่ถูกรายงานว่ามีส่วนเกี่ยวข้องในกระบวนการการรุกรานเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงของเชื้อพลาสมาเดียม ฟาลซิพารัม จากผลการทดลองที่ศึกษาทั้งในเซลล์ PBMC ทั้งกลุ่มลิมโฟไซต์ และ โมโนไซต์ และเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดทั้ง 4 ชนิดที่นำไปใช้ในการศึกษาค้นคว้า พบว่าเซลล์ลิมโฟไซต์ตรวจพบค่าร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD147 เท่ากับ 75.06 ± 8.22 ในขณะที่เซลล์โมโนไซต์มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD147 ทั้งหมดในทุก ๆ เซลล์ (ร้อยละ 99.83 ± 0.06) ซึ่งค่าร้อยละที่ได้

แตกต่างกัน อาจเป็นผลมาจากในขั้นตอนการเตรียมเซลล์ PBMC ด้วย Ficoll ที่วิธีดังกล่าวไม่สามารถเตรียมเซลล์ลิมโฟไซต์และโมโนไซต์ที่บริสุทธิ์ (pure) ได้ ดังนั้นเซลล์ลิมโฟไซต์ที่เตรียมได้จึงอาจมีเซลล์กลุ่มอื่น ๆ เช่น เซลล์เกล็ดเลือด และเศษเซลล์ เป็นต้น ประปนมาด้วย อันเนื่องมาจากข้อจำกัดของวิธีการเตรียมเซลล์ PBMC ที่ไม่สามารถเตรียมเซลล์ PBMC ที่บริสุทธิ์ได้ (Casale and Kaliner, 1982) ส่งผลทำให้ค่าระดับการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD147 ที่ได้ มีค่าน้อยกว่าที่ควรจะเป็น จากรายงานของ Pennings *et al.* ในปี ค.ศ.2010 ระบุว่าเซลล์เกล็ดเลือดสามารถตรวจพบจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD147 ได้เพียงร้อยละ 20.45±1.63 เท่านั้น ด้วยเหตุนี้จึงอาจทำให้ค่าร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD147 มีค่าที่น้อยกว่าที่ควรจะเป็นในเซลล์ลิมโฟไซต์ที่ได้ในการทดลองครั้งนี้ นอกจากนี้เป็นที่น่าสนใจว่าในเซลล์โมโนไซต์พบจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a เกือบทั้งหมดทุกเซลล์ (ร้อยละ 98.25±0.97) ซึ่งยังไม่เคยมีการรายงานที่ใดมาก่อน เนื่องจากโดยปกติโปรตีนชนิด CD235a มักถูกรายงานว่าเป็นโปรตีนเครื่องหมาย (protein marker) ของเซลล์เม็ดเลือดแดง ในขณะที่เซลล์ลิมโฟไซต์ก็พบจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a ร้อยละ 45.26±25.46 ซึ่งผลที่ได้ อาจเกิดจากการปนเปื้อนเซลล์กลุ่มอื่น ๆ ในเซลล์ลิมโฟไซต์ที่เตรียมได้อีกเช่นเดิม สำหรับกลุ่มเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลอง พบว่าในทุก ๆ เซลล์พบการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD147 ทั้งหมด (ร้อยละ 99.75±0.16 ถึง 99.91±0.07) สอดคล้องกับผลการรายงานของ Kasinrerak *et al.* (1999) และ Michel *et al.* (2002) นอกจากนี้ในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 ที่เป็นเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดกลุ่มเซลล์โปรโมโนไซต์พบจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a ในจำนวนที่สูงมากถึงร้อยละ 92.28±5.71 ซึ่งผลการทดลองที่ได้ใกล้เคียงกับผลการทดลองที่ได้จากเซลล์ PBMC กลุ่มโมโนไซต์มาก (ไม่แตกต่างกับเซลล์ PBMC กลุ่มโมโนไซต์ ที่เป็นชุดควบคุมการทดลอง) และมีค่า MFI เท่ากับ 3.23±0.71 (น้อยกว่าในเซลล์ PBMC กลุ่มโมโนไซต์ที่มีค่า MFI เท่ากับ 17.85±2.40 อย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.05$) ในขณะที่เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Raji และ Jurkat ตรวจพบจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235 ร้อยละ 23.32±2.44 และ 25.88±5.89 และมีค่า MFI เท่ากับ 0.15±0.15 และ 0.81±0.31 ตามลำดับ (ไม่แตกต่างกับเซลล์ PBMC กลุ่มลิมโฟไซต์ ที่เป็นชุดควบคุมการทดลอง) และเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ตรวจพบจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235 เพียงร้อยละ 5.10±0.41 ซึ่งมีค่าน้อยที่สุดจากเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดทั้งหมด 4 ชนิดที่ใช้ในการทดลอง และมีค่า MFI เท่ากับ 0.80±0.64 และจากการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD108 พบว่าเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Jurkat มีค่าร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกสูงที่สุดถึงร้อยละ 58.72±11.89 และมีค่า MFI เท่ากับ 0.81±0.31 (ไม่แตกต่างกับชุดควบคุมการทดลอง) ในขณะที่เซลล์ PBMC และเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดอื่น ๆ มีจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด

CD108 ประมาณร้อยละ 5.31±1.62 ถึง 7.38±0.85 เท่านั้น และมีค่า MFI อยู่ในช่วงเท่ากับ 0.12±0.12 ถึง 0.15±0.15 (น้อยกว่ากับชุดควบคุมการทดลองของแต่ละเซลล์อย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.05$) อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่เคยมีรายงานใดที่รายงานเกี่ยวกับระดับการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD108 และ CD235 ในเซลล์ PBMC และเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลองนี้ ดังนั้นผลการทดลองที่ได้จึงอาจเป็นแนวทางสำหรับงานวิจัยอื่น ๆ ต่อไปในอนาคต

5.2 การทดสอบความสามารถในการรุกรานของเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมเข้าสู่เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ

หลังจากที่ได้ผลการทดลองจากการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนชนิดต่าง ๆ บนผิวของเซลล์ โดยการย้อมเซลล์ด้วยแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง และตรวจสอบด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์แยกชนิดและหาปริมาณเซลล์แบบอัตโนมัติ ทำให้สามารถทราบค่าร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิดต่าง ๆ บนผิวของเซลล์ รวมทั้งระดับการแสดงออกของโปรตีนชนิดต่าง ๆ ในเซลล์แต่ละชนิด จากนั้นจึงทดลองทดสอบความสามารถในการรุกรานของเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมเข้าสู่เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ เพื่อดูแนวโน้มในเบื้องต้นว่าโปรตีนชนิดใดที่น่าจะสำคัญและเกี่ยวเนื่องกับความสามารถในการรุกรานของเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมมากที่สุด โดยเริ่มต้นจากเตรียมเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมจากการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลาย 60% Percoll พบว่าได้เซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมอยู่ในช่วงระยะการเจริญเติบโตระหว่างระยะ โทรโฟซอइटที่แก่จนถึงระยะ ไชซอนต์ เนื่องจากเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมอยู่ในช่วงระยะริงและโทรโฟซอइटเริ่มต้น (early trophozoite) จะมีความหนาแน่นของเซลล์มากกว่า 1.075 กรัม/มิลลิลิตร ในขณะที่เซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมที่อยู่ในช่วงระยะโทรโฟซอइटที่แก่และไชซอนต์จะมีความหนาแน่นของเซลล์น้อยกว่า 1.062 กรัม/มิลลิลิตร ด้วยเหตุนี้จึงทำให้สามารถแยกเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมที่อยู่ในช่วงระยะโทรโฟซอइटที่แก่จนถึงไชซอนต์ออกจากกระเพาะอื่นได้ด้วยสารละลาย 60% Percoll ซึ่งมีความหนาแน่นเท่ากับ 1.076 กรัม/มิลลิลิตร (Harms *et al.*, 2000; Rivadeneira *et al.*, 1983)

ในขั้นตอนต่อมา ก่อนการทดลองเลี้ยงเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ร่วมกับเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ จะถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อมาลาเรียชนิด CMCМ ก่อนเป็นเวลา 1 อาทิตย์ จากเดิมที่เลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI-1640 ที่มี 10% FBS เพื่อให้เซลล์ได้มีเวลาในการปรับตัวต่ออาหารใหม่ ซึ่งหลังจากนำเซลล์มาตรวจสอบความผิดปกติด้วยการการทำ blood smear แบบ thin film บนกระจกสไลด์ พบว่าเซลล์มี

รูปร่างลักษณะปกติ คือ เซลล์มีลักษณะกลม มีขนาดของเซลล์ปกติ (ไม่บวม/ไม่เหี่ยว) มีขอบเขตของนิวเคลียสและไซโทพลาซึมแบ่งแยกกันชัดเจน และส่วนของไซโทพลาซึมไม่ติดสีเข้ม ที่เป็นสัญญาณว่าเซลล์เกิดความเครียดและมีการสร้างเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ขึ้นมาภายในเซลล์มากกว่าปกติ จากนั้นจึงนำเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ที่ได้ มาทดลองเลี้ยงร่วมกับเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพารัม เพื่อทดสอบความสามารถในการรุกรานเข้าสู่เซลล์ของเชื้อต่อไป

จากการทดลองเลี้ยงเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ร่วมกับเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพารัมที่อยู่ในระยะโทรโพออยด์ที่แก่และไซซอนต์ที่เตรียมได้ โดยในชุดควบคุมการทดลองที่เป็นเซลล์เม็ดเลือดแดง (1%HCT) ตรวจพบจำนวนของเซลล์ที่มีเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพารัมระยะริงเริ่มต้น ร้อยละ 10.25 ที่ 24 ชั่วโมง ระยะโทรโพออยด์ที่แก่ ร้อยละ 9.67 ที่ 45 ชั่วโมง และระยะริงที่แก่ (late ring) ร้อยละ 22.45 ที่ 96 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพารัมสามารถเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนได้ตามปกติ สำหรับในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Raji และ Jurkat พบว่ามีจำนวนของเซลล์ที่มีเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพารัมรวมทั้งสิ่งที่คาดว่าจะจะเป็นเชื้ออยู่ในภายในเซลล์ ร้อยละ 0.31 และ 0.26 ตามลำดับ ที่ 24 ชั่วโมง และค่าร้อยละดังกล่าวมีค่าลดลงเรื่อย ๆ เมื่อเวลาผ่านไปตลอด 96 ชั่วโมง โดยเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพารัมที่พบอยู่ภายในเซลล์จะอยู่ในระยะริงเริ่มต้นที่มีลักษณะบวม และพบสิ่งที่มีลักษณะเป็นเส้นและเป็นจุดกลมสีเข้ม ในขณะที่เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ไม่พบเชื้ออยู่ในภายในเซลล์เลย (ร้อยละ 0.00) ทั้งที่ 24 และ 45 ชั่วโมง จึงทำให้ไม่มีการทดลองต่อในช่วงเวลาที่ 96 ชั่วโมง และในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 กลับพบว่ามีค่าร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพารัมและสิ่งที่คาดว่าจะจะเป็นเชื้ออยู่ในภายในเซลล์เป็นจำนวนค่อนข้างคงที่ อยู่ในช่วงร้อยละ 1.07-1.69 ภายในช่วงระยะเวลา 96 ชั่วโมง ซึ่งน่าจะเกิดจากการที่มีเซลล์เม็ดเลือดแดงปะปนมาในขั้นตอนการเตรียมเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพารัมในระยะไซซอนต์ ทำให้เมื่อทำการเลี้ยงเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ร่วมกับเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพารัมที่มีเซลล์เม็ดเลือดแดงปะปนอยู่ด้วย เชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพารัมจึงอาจรุกรานเข้าสู่ได้ทั้งในเซลล์เม็ดเลือดแดงและเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 โดยเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพารัมที่รุกรานเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงก็จะสามารถพัฒนาเจริญเติบโต และปลดปล่อยเมอโรซอइटออกมารุกรานเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงหรือเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 ได้ต่อ ในขณะที่เชื้อที่รุกรานเข้าสู่เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 จะพบลักษณะเชื้อที่มีลักษณะบวมอยู่ในระยะริงเริ่มต้น และพบสิ่งที่มีลักษณะเป็นเส้นและเป็นจุดกลมสีเข้ม ซึ่งคาดว่าเป็นเชื้อที่ไม่สามารถเจริญเติบโตและพัฒนาตัวเองได้ในเซลล์อื่นที่ไม่ใช่เซลล์เม็ดเลือดแดง

จะสังเกตได้ว่าค่าร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพารัมและสิ่งทีคาดว่าจะเป็นเชื้อที่พบอยู่ภายในเซลล์ จะมีความสัมพันธ์กับค่าร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a ในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแต่ละชนิด โดยค่าร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีเชื้อและสิ่งทีคาดว่าจะเป็นเชื้ออยู่ภายในเซลล์จะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นหรือลดลงตามค่าร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a ในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ จากผลการทดลอง สรุปได้ว่าพบเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพารัมและสิ่งทีคาดว่าจะเป็นเชื้อที่พบอยู่ภายในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 ได้มากที่สุด (อยู่ในช่วงร้อยละ 1.07-1.69 ในช่วงระยะเวลา 96 ชั่วโมง) รองลงมาคือในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Raji และ Jurkat (ร้อยละ 0.31 และ 0.26 ตามลำดับ ที่ 24 ชั่วโมง และค่าร้อยละลดลงเรื่อย ๆ เมื่อเวลาผ่านไป) และไม่พบเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพารัมเลยในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 (ร้อยละ 0.00 ที่ 24 และ 45 ชั่วโมง) นอกจากนี้เมื่อตรวจสอบรูปร่างลักษณะของเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพารัมและสิ่งทีคาดว่าจะเป็นเชื้อที่พบอยู่ภายในเซลล์ จะเห็นว่ามิตั้งเชื้อที่อยู่ในระยะเริ่มแรก แต่มีลักษณะบวม และยังมีส่วนที่มีลักษณะเป็นเส้นและเป็นจุดกลมสีเข้ม ซึ่งไม่ใช่ระยะการเจริญเติบโตของเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพารัมที่พบได้ตามปกติ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงทำให้เชื่อได้ว่า การแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a น่าจะเป็นปัจจัยจำเป็นและสำคัญสำหรับเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพารัมที่ต้องอาศัยในการรุกรานเข้าสู่เซลล์ ไม่ว่าจะเป็นเซลล์เม็ดเลือดแดงหรือเซลล์อื่นที่ไม่ใช่เซลล์เม็ดเลือดแดง โดยโปรตีนชนิด CD147 อาจมีหรือไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับโปรตีนชนิด CD235a ก็ได้ เนื่องจากมีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD147 บนผิวของเซลล์ในทุก ๆ เซลล์ที่นำมาทำการทดลอง จึงทำให้ยังไม่สามารถสรุปได้ ส่วนโปรตีนชนิด CD108 คาดว่าน่าจะไม่มีผลต่อการรุกรานของเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพารัมเข้าสู่เซลล์ เนื่องจากหากเปรียบเทียบค่าร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพารัมและสิ่งทีคาดว่าจะเป็นเชื้อที่พบอยู่ภายในเซลล์ ในระหว่างเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Raji และ Jurkat จะพบว่าค่าร้อยละที่ได้แทบไม่มีความแตกต่างกัน ซึ่งในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดทั้ง 2 ชนิดนี้ มีค่าร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD147 (ช่วงร้อยละ 99.75 ± 0.16 ถึง 99.91 ± 0.07) และ CD235a (ช่วงร้อยละ 23.32 ± 2.44 ถึง 25.88 ± 5.89) ในระดับที่ใกล้เคียงกัน แต่แตกต่างกันที่ค่าร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD108 ที่เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Jurkat (ร้อยละ 58.72 ± 11.89) มีค่ามากกว่าเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Raji (ร้อยละ 7.38 ± 0.85) ถึงประมาณ 8 เท่า และนอกจากนี้เชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพารัมยังไม่สามารถพัฒนาและเจริญเติบโตได้ในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดทั้ง 3 ชนิดที่ใช้ในการทดลองและพบเชื้ออยู่ภายในเซลล์ได้

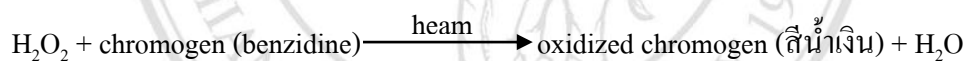
เพื่อทดสอบว่าโปรตีนชนิด CD235a น่าจะเป็นโปรตีนที่จำเป็นและสำคัญที่สุดสำหรับเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพารัมที่ต้องอาศัยในการรุกรานเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงหรือเซลล์อื่นที่ไม่ใช่เซลล์เม็ดเลือดแดง เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 เคยถูกรายงานว่ามีลักษณะที่คล้ายคลึงกับเซลล์ระยะต้นที่กำลังจะพัฒนาไปเป็นเซลล์เม็ดเลือดแดง และสามารถถูกกระตุ้นให้มีการสร้างฮีโมโกลบินและเพิ่มระดับการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a บนผิวของเซลล์ได้ด้วยสารเคมี จึงถูกเลือกนำมาใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป โดยมีการทดลองกระตุ้นให้เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 มีการสร้างฮีโมโกลบินและเพิ่มระดับการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a บนผิวเซลล์ด้วยสารเคมี ได้แก่ โซเดียม บิวทิเรตและ ฮีมิน สำหรับการทดสอบความสามารถในการรุกรานของเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพารัมเข้าสู่เซลล์ เพื่อพิสูจน์ข้อสันนิษฐานที่ว่าโปรตีนชนิด CD235a น่าจะสำคัญและเกี่ยวเนื่องกับความสามารถในการรุกรานของเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพารัมมากที่สุด

5.3 การกระตุ้นเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ให้มีการสร้างฮีโมโกลบินและเพิ่มระดับการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a บนผิวของเซลล์ด้วยโซเดียม บิวทิเรตและฮีมิน

จากการทดลองกระตุ้นเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ให้สร้างฮีโมโกลบินได้โดยการเติมสารละลายโซเดียม บิวทิเรตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 1mM 3mM และ 5mM ในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเซลล์ พบว่าสารละลายโซเดียม บิวทิเรตไม่สามารถกระตุ้นให้เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 สร้างฮีโมโกลบินได้ นอกจากนี้สารละลายโซเดียม บิวทิเรตยังมีผลต่อความสามารถในการมีชีวิตและการแบ่งเซลล์ของเซลล์ในทุกความเข้มข้นที่เลือกใช้ในการทดลองอีกด้วย ซึ่งขัดแย้งกับงานวิจัยของ Cioe *et al.* (1981) และ Hiep *et al.* (2012) ที่รายงานว่าสารละลายโซเดียม บิวทิเรตที่ความเข้มข้น 1.4mM และ 1mM ตามลำดับ สามารถกระตุ้นเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ให้สร้างฮีโมโกลบินได้ นอกจากนี้ Hiep *et al.* (2012) ยังรายงานอีกว่าเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่อยู่ในสภาวะการขาดกลูตามีน (glutamine) ร่วมด้วย จะถูกส่งเสริมให้มีการสร้างและสะสมฮีโมโกลบินภายในเซลล์ได้ดียิ่งขึ้นอีกด้วย อย่างไรก็ตามในปี ค.ศ.2000 ได้มีการรายงานของ Witt *et al.* ที่ได้กล่าวถึงเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ชนิดที่ไม่สามารถถูกกระตุ้นให้สร้างฮีโมโกลบินได้ด้วยสารละลายโซเดียม บิวทิเรต ซึ่งถูกเรียกว่า “butyrate-resistant K562r cells” สอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้ในงานวิจัยครั้งนี้ ดังนั้นเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ถูกใช้ในงานวิจัยครั้งนี้จึงอาจเป็นเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ชนิดที่สารละลายโซเดียม บิวทิเรตไม่สามารถกระตุ้นให้สร้างฮีโมโกลบินได้ ดังนั้น

การทดลองกระตุ้นเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ให้สร้างฮีโมโกลบินด้วยโซเดียมบิวทิเรตจึงถูกตัดออก

ในขั้นตอนต่อมาจากการนำเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 มาทดลองกระตุ้นให้สร้างฮีโมโกลบินด้วยสารละลายฮีมินในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเซลล์ พบว่าสารละลายฮีมินสามารถกระตุ้นให้เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 สร้างและสะสมฮีโมโกลบินในภายเซลล์ได้ สอดคล้องกับรายงานของ Baliga *et al.* (1993) และ Witt *et al.* (2000) ที่รายงานว่าสารละลายฮีมินที่ความเข้มข้น 25 μ M และ 50 μ M ตามลำดับ สามารถกระตุ้นเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ให้สร้างฮีโมโกลบินได้ นอกจากนี้ในปี 1981 ยังมีรายงานของ Dean *et al.* ที่ระบุว่าสารละลายฮีมินที่ความเข้มข้น 20 μ M สามารถกระตุ้นเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ให้สร้างฮีโมโกลบินได้ โดยไม่มีผลต่อความสามารถในการมีชีวิตและการเจริญของเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ได้ต่อเนื่องยาวนานมากกว่า 6 เดือน โดยจากการตรวจสอบร้อยละของเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่สร้างฮีโมโกลบินด้วยการย้อมสีด้วยสารละลาย 0.2% benzidine แล้วตรวจสอบคุณภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยจะเห็นเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่สร้างและสะสมฮีโมโกลบินภายในเซลล์ติดสีน้ำเงิน เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาดังสมการ (Anand *et al.*, 1994)



จากผลการทดลองพบว่าเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารละลายฮีมินที่ความเข้มข้น 20 μ M พบจำนวนเซลล์ที่ติดสีน้ำเงินร้อยละ 75.16 \pm 2.59 (ภาพที่ 4.13) โดยผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการวิจัยของ Baliga *et al.* (1993) ที่ระบุว่าเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารละลายฮีมินที่ความเข้มข้น 25 μ M จะพบค่าร้อยละของจำนวนเซลล์ที่ติดสีน้ำเงินจากการย้อมสีด้วยสารละลาย 0.2% benzidine ได้ตั้งแต่ร้อยละ 70 ขึ้นไป

5.4 การทดลองพัฒนาวิธีการตรวจหาฮีโมโกลบินเชิงกึ่งปริมาณ

จากรายงานในปี ค.ศ.1981 ของ Wanda *et al.* ที่ได้ทำการตรวจสอบการสร้างฮีโมโกลบินในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ด้วยการทำให้เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 แยกแล้วย้อมด้วยสารละลาย 0.2% benzidine ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นจึงตรวจสอบค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 425 นาโนเมตร อย่างไรก็ตามการตั้งของเหลวที่สกัดได้จากเซลล์ (cell lysate) ที่ย้อมด้วยสารละลาย 0.2% benzidine ทิ้งไว้ 30 นาที จะทำให้สีของปฏิกิริยาเปลี่ยนไปจากสีน้ำเงินกลายเป็นสีน้ำตาล ซึ่งผลจากปฏิกิริยาที่เปลี่ยนแปลงไปนี้อาจเป็นผลบวกที่ผิดพลาด (false positive) เนื่องจากสีของปฏิกิริยาที่ถูกต้องควรจะเป็นสีน้ำเงินหรือสีน้ำเงินอมเขียว (Anand *et al.*, 1994) ในปัจจุบันยังไม่มีกระบวนการหรือเทคนิคใดที่สามารถนำมาใช้ตรวจสอบประมาณหาค่าปริมาณฮีโมโกลบินได้ในระดับความเข้มข้นที่น้อยกว่า 0.9 mg/dl (Sigma-Aldrich, 2019) ด้วยเหตุนี้ผู้ทดลองจึงได้พยายามดำเนินการศึกษาและปรับปรุงวิธีการวิเคราะห์ดังกล่าวให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นด้วยการชะลอปฏิกิริยาดังกล่าวด้วยกรดซัลฟิวริก ที่อาศัยหลักการที่คล้ายคลึงกับในขั้นตอนการหยุดปฏิกิริยาในการทำเทคนิค enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) โดยสีของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในสถานะที่เป็นกรด จะเปลี่ยนจากเดิมที่เป็นสีน้ำเงินกลายเป็นสีเหลือง (Furukawa and Brindle, 1973) และสามารถตรวจสอบค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 414 นาโนเมตร เมื่อนำตัวอย่างเซลล์เม็ดเลือดแดงที่เจาะมาจากอาสาสมัครมาวิเคราะห์ด้วยเครื่องตรวจความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด เพื่อคำนวณและสร้างเส้นโค้งมาตรฐาน แล้วนำสมการที่ได้มาประยุกต์ใช้กับการวัดปริมาณฮีโมโกลบินในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารละลายฮีมินที่ความเข้มข้น 20 μ M ในเบื้องต้นสามารถประมาณค่าปริมาณฮีโมโกลบินเฉลี่ยที่พบได้เท่ากับ 1.23 \pm 0.45 พิโคกรัม/เซลล์ (เพิ่มขึ้น 3.24 เท่าจากเซลล์ปกติ) โดยจากการรายงานของ Dean *et al.* (1981) Erard *et al.* (1981) และ Wu *et al.* (1984) ระบุว่าเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารละลายฮีมินที่ความเข้มข้น 20 μ M จะตรวจพบปริมาณฮีโมโกลบินเฉลี่ยได้ 14-26-34 และ 20 พิโคกรัม/เซลล์ ตามลำดับ ส่วนค่าปริมาณฮีโมโกลบินที่พบในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ปกติจะพบอยู่ประมาณ 0.5 พิโคกรัม/เซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้จากการทดลองครั้งนี้คือ 0.38 \pm 0.05 พิโคกรัม/เซลล์ ดังนั้นจากผลการทดลองในครั้งนี้ จึงอาจจำเป็นต้องมีการดำเนินการศึกษาและปรับปรุงวิธีการวิเคราะห์เพิ่มเติมต่อไป เพื่อให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นและเป็นการยืนยันความถูกต้องของข้อมูลที่ได้

5.5 การกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีนที่สนใจบนผิวเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562

จากรายงานของ Gaudreault *et al.* (2015) มีการรายงานว่าฮีมินเป็นสาเหตุทำให้เชื้อพลาสมิดเทียมพลาซมิพารัมอ่อนแอ และส่งผลให้เชื้อรุกรานเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงได้ลดลง ดังนั้นผู้ทดลองจึงต้องการทดลองกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a บนผิวของเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 โดยอาศัยการถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสม ควบคู่กับชุดควบคุมการทดลองที่เป็นเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ถูกกระตุ้นระดับการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD71 บนผิวของเซลล์ ซึ่งเป็นโปรตีนที่ไม่เกี่ยวข้องกับกรรุกรานเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงของเชื้อพลาสมิดเทียมพลาซมิพารัม ก่อนนำไปทดสอบความสามารถในการรุกรานของเชื้อพลาสมิดเทียมพลาซมิพารัมเข้าสู่เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 เพื่อตัดปัจจัยที่ทำให้เชื้ออ่อนแอออก ซึ่งอาจส่งผลต่อความสามารถในการรุกรานของเชื้อเพื่อเข้าสู่เซลล์

จากผลการทดลองถ่ายโอนพลาสมิดสำหรับการแสดงออกของยีนในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมชนิด pEGFP-C3 ทั้งพลาสมิดที่ไม่มียีนแทรกอยู่ (empty plasmid) และพลาสมิดลูกผสมที่เชื่อมต่อกับยีน CD235a หรือ CD71 เข้าสู่เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ด้วยวิธี electroporation (Delgado-Cañedo *et al.*, 2006) พบว่ากลุ่มเซลล์ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดชนิด pEGFP-C3 ที่ไม่มียีนแทรกอยู่ ที่ใช้เป็นชุดควบคุมการทดลองของเซลล์ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด มีจำนวนเซลล์ที่ประสบความสำเร็จในการถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่เซลล์สูงถึงร้อยละ 94.86 ± 5.47 และกลุ่มเซลล์ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดชนิด pEGFP-C3 ที่เชื่อมต่อกับยีน CD71 มีจำนวนเซลล์ที่ประสบความสำเร็จในการถ่ายโอนพลาสมิดร้อยละ 71.20 ± 6.42 ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในปี ค.ศ.2006 ของ Delgado-Cañedo *et al.* ที่ทำการถ่ายโอนพลาสมิดชนิด pEGFP-N1 เข้าสู่เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ด้วยวิธี electroporation โดยมีจำนวนเซลล์ที่ประสบความสำเร็จในการถ่ายโอนพลาสมิดร้อยละ 82.41 ± 3.03 โดยปัจจัยหลักที่ทำให้การถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ด้วยวิธี electroporation ประสบความสำเร็จ จะขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ อายุของเซลล์ที่น้อย (early passage) จำนวนเซลล์ ขนาดรูปร่างและความเข้มข้นของพลาสมิด ขนาดของคิวเวทท์สำหรับทำ electroporation ที่ใช้ ค่าความต่างศักย์ (voltage) ค่าความจุไฟฟ้า (capacity) ค่าความต้านทาน (resistance) และค่าเวลาคงที่ (time constant) (Delgado-Cañedo *et al.*, 2006; Horny *et al.*, 1993; Yildirim *et al.*, 2016) แต่อย่างไรก็ตามในกลุ่มเซลล์ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดชนิด pEGFP-C3 ที่เชื่อมต่อกับยีน CD235a มีจำนวนเซลล์ที่ประสบความสำเร็จในการถ่ายโอนเพียงร้อยละ 9.22 ± 1.52 เท่านั้น ซึ่งความแตกต่างของผลการประสบความสำเร็จในการถ่ายโอนพลาสมิดที่เกิดขึ้น อาจเกิดจากความแตกต่างของขนาดของ

ยีนที่เชื่อมต่อกับพลาสมิด และโปรตีนที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมา โดยโปรตีนชนิด CD71 และ CD235a จะมีขนาดประมาณ 84kDa และ 16kDa ตามลำดับ เปรียบเทียบกับโปรตีน GFP ที่มีขนาดประมาณ 27kDa จึงอาจทำให้โปรตีน GFP เกิดการขัดขวาง/บดบัง (interference) ซึ่งกันและกันกับโปรตีนชนิด CD235a ที่มีขนาดเล็กกว่า หรืออาจเกิดโปรตีนเชื่อมต่อ (fusion protein) ที่ผิดปกติจากการเกิดการม้วนพับตัวของโปรตีนที่ผิดปกติ (protein misfolding) ทำให้โปรตีน GFP และโปรตีนชนิด CD235a ทำงานผิดปกติหรือทำงานไม่ได้ (dysfunction) ด้วยเหตุนี้จึงทำให้การตรวจสอบค่าร้อยละของจำนวนเซลล์ที่ประสบความสำเร็จในการถ่ายโอนพลาสมิดถูกผสมและการแสดงออกของยีน จากการตรวจวัดการแสดงออกของโปรตีน GFP และโปรตีนชนิด CD235a ได้ค่าร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน GFP และโปรตีนชนิด CD235a ที่น้อยกว่าที่ควรจะเป็น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดชนิด pEGFP-C3 ที่ไม่มียีนแทรกอยู่ และกลุ่มเซลล์ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดชนิด pEGFP-C3 ที่เชื่อมต่อกับยีน CD71 โดยผลจากการทดลองที่ได้ดังกล่าวนี้ อาจสอดคล้องกับงานวิจัยในปี ค.ศ.2003 ของ Wang and Chong ที่ได้รายงานกรณีที่พบในเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* เกี่ยวข้องกับการเกิดโปรตีนถูกผสม (recombinant protein) ระหว่างโปรตีน GFP กับโปรตีนที่สนใจและต้องการกระตุ้นให้มีแสดงออกที่มากกว่าปกติ ซึ่งทำให้เกิดการม้วนพับตัวของโปรตีนที่ผิดปกติ และส่งผลทำให้การตรวจวัดการแสดงออกของโปรตีน GFP มีค่าลดลงหรือหายไป เช่นเดียวกัน

เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a บนผิวของเซลล์ พบว่าในชุดควบคุมการทดลองของเซลล์ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด ซึ่งคือเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ประสบความสำเร็จในการถ่ายโอนพลาสมิดชนิด pEGFP-C3 มีจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a ร้อยละ 7.57 ± 0.20 (ค่า MFI เท่ากับ 2.51 ± 0.74) เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ได้รับพลาสมิดชนิด pEGFP-C3 ที่เชื่อมต่อกับยีน CD235a มีจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a ร้อยละ 17.84 ± 4.79 (เพิ่มขึ้น 2.36 เท่าของชุดควบคุมการทดลอง) และมีค่า MFI เท่ากับ 11.10 ± 2.47 (เพิ่มขึ้น 4.42 เท่าของชุดควบคุมการทดลอง) ซึ่งจะเห็นได้ว่าค่าจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a ที่เพิ่มขึ้นจากเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ปกติ (ร้อยละ 5.10 ± 0.41) จะมีค่าเพิ่มขึ้นสอดคล้องกับค่าจำนวนเซลล์ที่ประสบความสำเร็จในการถ่ายโอนพลาสมิดชนิด pEGFP-C3 ที่เชื่อมต่อกับยีน CD235a (ร้อยละ 9.22 ± 1.52) ดังนั้นค่าจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a ที่เพิ่มขึ้นนั้น จึงน่าจะเป็นผลมาจากการที่เซลล์ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดชนิด pEGFP-C3 ที่เชื่อมต่อกับยีน CD235a แล้วมี

การสร้างและแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a บนผิวของเซลล์ และเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ได้รับพลาสมิดชนิด pEGFP-C3 ที่เชื่อมต่อกับยีน CD71 มีจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a ร้อยละ 3.91 ± 0.50 และมีค่า MFI เท่ากับ 1.62 ± 0.62 ซึ่งไม่แตกต่างกับชุดควบคุมการทดลอง สำหรับในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่เป็นชุดควบคุมการทดลองของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารละลายฮีมินความเข้มข้น $20 \mu\text{M}$ มีจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a ร้อยละ 5.10 ± 0.41 (ค่า MFI เท่ากับ 0.80 ± 0.64) และเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารละลายฮีมินความเข้มข้น $20 \mu\text{M}$ มีจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a ร้อยละ 14.28 ± 2.51 (เพิ่มขึ้น 2.80 เท่าของชุดควบคุมการทดลอง) และมีค่า MFI เท่ากับ 1.28 ± 1.80 ดังนั้นจากผลการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a ในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 กลุ่มต่าง ๆ สรุปได้ว่าจากการถ่ายโอนพลาสมิดชนิด pEGFP-C3 ที่เชื่อมต่อกับยีน CD235a ทำให้มีจำนวนเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a เพิ่มขึ้นจากปกติ 2.36 เท่า และมีระดับการออกของโปรตีนชนิด CD235a เพิ่มขึ้นจากปกติ 4.42 เท่า และการกระตุ้นเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ด้วยสารละลายฮีมินความเข้มข้น $20 \mu\text{M}$ นอกจากสามารถกระตุ้นให้เซลล์สร้างฮีโมโกลบินได้แล้ว ยังทำให้มีจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a เพิ่มขึ้นจากปกติ 2.80 เท่า แต่ไม่มีการเพิ่มขึ้นของระดับการออกของโปรตีนชนิด CD235a ในขณะที่เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ได้รับพลาสมิดชนิด pEGFP-C3 ที่เชื่อมต่อกับยีน CD71 ไม่มีการเปลี่ยนแปลงใด ๆ ของการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a บนผิวของเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมการทดลอง ต่อจากนั้นจึงทดลองนำเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 แต่ละกลุ่มไปเลี้ยงร่วมกับเชื้อพลาสมาเดียม ฟาลซิพาร์ม เพื่อทดสอบความสามารถในการรุกรานของเชื้อเข้าสู่เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 กลุ่มต่าง ๆ

5.6 การทดสอบความสามารถในการรุกรานของเชื้อพลาสมาเดียม ฟาลซิพาร์มเข้าสู่เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 กลุ่มต่าง ๆ

เมื่อได้เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 กลุ่มต่าง ๆ ที่ทราบค่าร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a และระดับการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a แล้ว จึงนำมาทดสอบความสามารถในการรุกรานเข้าสู่เซลล์ของเชื้อพลาสมาเดียม ฟาลซิพาร์ม โดยเริ่มจากการทดลองนำเอาเชื้อพลาสมาเดียม ฟาลซิพาร์มในระยะไซซอนต์ที่ได้จากการปั่นแยกด้วยสารละลาย

60% Percoll ปริมาตร 25 ไมโครลิตร มาเลี้ยงร่วมกับเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ถูกกระตุ้นให้สร้างฮีโมโกลบินด้วยสารละลายฮีมินความเข้มข้น $20\mu\text{M}$ และเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ถูกถ่ายโอนพลาสมิดกลุ่มต่าง ๆ จำนวน 1.5×10^7 เซลล์ เป็นเวลานาน 18-24 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อพลาสมาเดียม ฟาลซิพารัม ในระยะไซซอนต์ได้แตกและปล่อยเมอโรซอยต์ออกมา (Crutcher and Hoffman, 1996) เพื่อรุกรานเข้าสู่เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ได้โดยตรง จากนั้นจึงนำเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิดต่าง ๆ ที่ได้มาทดลองเลี้ยงร่วมกับเชื้อพลาสมาเดียม ฟาลซิพารัม

โดยจากผลการทดลองพบว่าหลังจากนำเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 กลุ่มต่าง ๆ มาตรวจสอบความผิดปกติด้วยการการทำ blood smear แบบ thin film บนกระจกสไลด์ พบว่าเซลล์จากทุกกลุ่ม ยกเว้นกลุ่มเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ถูกกระตุ้นให้สร้างฮีโมโกลบินและเพิ่มการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a บนผิวของเซลล์ด้วยสารละลายฮีมินความเข้มข้น $20\mu\text{M}$ มีรูปร่างลักษณะที่ปกติ คือ เซลล์มีลักษณะกลม มีขนาดของเซลล์ปกติ (ไม่บวม/ไม่เหี่ยว) แต่มีขอบเขตของนิวเคลียสและไซโทพลาซึมที่แบ่งแยกออกจากกันไม่ชัดเจน เนื่องจากส่วนของไซโทพลาซึมติดสีเข้ม ที่เป็นสัญญาณว่าเซลล์เกิดความเครียดและมีการสร้างเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ขึ้นมาภายในเซลล์มากกว่าปกติ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ จากอาหารเลี้ยงเซลล์ ชนิด RPMI-1640 ที่มี 10% FBS เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อมาลาเรียชนิด CMCm อย่างฉับพลัน จึงทำให้เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ยังไม่มีเวลาในการปรับตัวเข้ากับอาหารใหม่ เซลล์จึงอาจเกิดความเครียดขึ้นได้ สำหรับรูปร่างลักษณะของเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารละลายฮีมินความเข้มข้น $20\mu\text{M}$ พบว่าผิวของเซลล์มีลักษณะที่ขรุขระ ไม่เรียบ และส่วนของไซโทพลาซึมมีการติดสีที่จางกว่าในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 กลุ่มอื่น ๆ ซึ่งอาจเป็นผลจากฮีมินที่ทำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงบริเวณผิวของเซลล์จากการกระตุ้นให้เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 มีการพัฒนาเข้าสู่ความเป็นเซลล์เม็ดเลือดแดงมากขึ้น ส่งผลทำให้เห็นผิวของเซลล์มีลักษณะที่ขรุขระ ไม่เรียบ และการที่สีของส่วนของไซโทพลาซึมมีสีที่จางกว่าในเซลล์กลุ่มอื่น ๆ อาจเกิดจากการมีฮีโมโกลบินที่สะสมภายในเซลล์ บริเวณส่วนของไซโทพลาซึม ส่งผลทำให้ความสามารถในการติดสีของสี Giemsa บริเวณส่วนของไซโทพลาซึมลดลง ผนวกกับการที่สีของฮีโมโกลบินมีสีแดง จึงอาจทำให้เห็นว่าส่วนของไซโทพลาซึมของเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารละลายฮีมินความเข้มข้น $20\mu\text{M}$ มีสีจางกว่า หรือไม่ติดสีเข้มเท่ากับสีของบริเวณไซโทพลาซึมในเซลล์กลุ่มอื่น ๆ ก็เป็นไปได้

นอกจากนี้จากการตรวจความสามารถในการรุกรานของเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพาร์ม พบว่าเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพาร์ม ไม่สามารถรุกรานเข้าสู่เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดชนิด pEGFP-C3 ไม่มียื่นแทรกอยู่ เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมที่มียีน CD71 และเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารละลายอีมินความเข้มข้น 20 μ M ได้ (ร้อยละ 0.00) ซึ่งผลการทดลองที่ได้เป็นไปตามที่คาด สอดคล้องกับผลการทดลองของ Gaudreault *et al.* (2015) ที่รายงานว่าอีมินทำให้เชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพาร์มอ่อนแอและส่งผลให้เชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพาร์มรุกรานเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงได้ลดลง แต่ในกลุ่มเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมที่มียีน CD235a พบว่ามีเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพาร์มรวมทั้งสิ่งที่คาดว่าน่าจะเป็นเชื้ออยู่ภายในเซลล์ร้อยละ 0.40 (ภาพที่ 4.27-4.31 และตารางที่ 4.3) และเมื่อดูผลจากชุดควบคุมการทดลอง (เม็ดเลือดแดง; 1% HCT) ตรวจพบว่ามีเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพาร์มในระยะจริงเพียงร้อยละ 0.55 ซึ่งถือว่ามียีนน้อย เนื่องจากในการทดลองครั้งนี้จำนวนเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพาร์มในระยะไซซอนต์ที่ใช้อาจมีจำนวนที่น้อยเกินไป จากปัญหาในขั้นตอนการเตรียมเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพาร์มในระยะไซซอนต์ที่รอบวัฏจักรของเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพาร์มในระยะไซซอนต์ไม่สัมพันธ์กับช่วงเวลาที่ทำการทดลอง ทำให้ในช่วงระหว่างการเตรียมเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพาร์มในระยะไซซอนต์เพื่อนำมาทำการทดลอง เกิดการแตกตัวของเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพาร์มในระยะไซซอนต์ก่อน ทำให้เตรียมเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพาร์มในระยะไซซอนต์ได้ปริมาณที่น้อยกว่าที่คาดหมายไว้ อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองในชุดควบคุมการทดลอง (เม็ดเลือดแดง; 1% HCT) สามารถแสดงให้เห็นได้ว่าเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพาร์มที่ใช้ในการทดลองสามารถรุกรานเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงได้ตามปกติ และจากผลการทดลองที่พบเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพาร์มและสิ่งที่คาดว่าน่าจะเป็นเชื้ออยู่ภายในเซลล์ เฉพาะในกลุ่มเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมที่มียีน CD235a ในครั้งนี้ น่าจะสามารถทำให้เชื่อได้ว่าโปรตีนชนิด CD235a น่าจะเป็นโปรตีนที่จำเป็นและสำคัญที่สุดสำหรับเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพาร์มที่เกี่ยวข้องและต้องอาศัยในการรุกรานเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงหรือเซลล์อื่นที่ไม่ใช่เซลล์เม็ดเลือดแดง โดยโปรตีนชนิด CD147 อาจมีหรือไม่มีส่วนเกี่ยวข้องร่วมกับโปรตีนชนิด CD235a ก็ได้ เนื่องจากมีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD147 บนผิวของเซลล์ทุก ๆ เซลล์ที่นำมาทำการทดลอง

5.7 การพัฒนาต่อยอดงานวิจัยเพื่อนำไปใช้ได้จริงจากองค์ความรู้ที่ได้

จากผลการทดลองทั้งหมดของงานวิจัยนี้ ทำให้เชื่อได้ว่าโปรตีนชนิด CD235a น่าจะเป็นโปรตีนที่จำเป็นและสำคัญที่สุดสำหรับเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพาร์มที่ต้องอาศัยในการรุกรานเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงหรือเซลล์อื่นที่ไม่ใช่เซลล์เม็ดเลือดแดง ดังนั้นจึงอาจใช้องค์ความรู้ดังกล่าวเป็นแนวทางพื้นฐานในการสร้างและพัฒนาต่อต้านเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพาร์มให้ตรงจุด โดยอ้างอิงโปรตีนชนิด CD235a เป็นเป้าหมายหลัก เพื่อยับยั้งไม่ให้เชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพาร์มสามารถรุกรานเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงและเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนในผู้ป่วยได้ นอกจากนี้ยังอาจมีการศึกษาว่าโปรตีนชนิด CD147 มีส่วนเกี่ยวข้องร่วมกับโปรตีนชนิด CD235a ในกระบวนการการรุกรานเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงหรือเซลล์อื่นที่ไม่ใช่เซลล์เม็ดเลือดแดงด้วยหรือไม่ เพื่อแสดงให้เห็นชัดเจนว่ามีโปรตีนชนิดใดบ้างที่จำเป็นและสำคัญเกี่ยวข้องในการรุกรานเข้าสู่เซลล์ของเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพาร์ม



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนบนผิวของเซลล์ชนิดต่าง ๆ โดยการย้อมเซลล์ด้วยแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง พบว่าสามารถตรวจพบการแสดงออกของโปรตีนชนิดต่าง ๆ ที่จำเพาะในแต่ละชนิดของเซลล์ได้อย่างถูกต้องในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดทั้ง 4 ชนิดที่ใช้ในการศึกษา (Raji Jurkat U937 และ K562) แสดงให้เห็นว่าเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ที่ถูกนำมาใช้ในการทดลองน่าจะเป็นเซลล์ชนิดที่ถูกต้องแล้ว จากนั้นเมื่อตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD108 CD147 และ CD235a ที่ถูกรายงานว่ามีส่วนเกี่ยวข้องในกระบวนการการรุกรานเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงของเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพารัม พบว่าเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดทั้ง 4 ชนิดที่ใช้ในการทดลองมีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD147 ทั้งหมดในทุก ๆ เซลล์ ส่วนการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD108 พบว่าเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Jurkat มีจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD108 มากที่สุด และเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 พบว่ามีจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a มากที่สุด ในขณะที่เซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 มีจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a น้อยที่สุด

เมื่อทดลองนำเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดทั้ง 4 ชนิดมาเลี้ยงร่วมกับเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพารัมในระยะไซซอนต์ เพื่อทดสอบความสามารถในการรุกรานของเชื้อ พบว่าในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 สามารถตรวจพบร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพารัมหรือสิ่งที่คาดว่าจะเป็นเชื้ออยู่ภายในเซลล์ได้มากที่สุด รองลงมาคือในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Raji และเชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Jurkat และไม่พบเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพารัมหรือสิ่งที่คาดว่าจะเป็นเชื้ออยู่ภายในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 เลย ซึ่งจากผลทดลองแสดงให้เห็นว่าโปรตีนชนิด CD235a น่าจะสำคัญและเกี่ยวเนื่องกับความสามารถในการรุกรานของเชื้อพลาสมาโมเดียม ฟาลซิพารัม ต่อมาจึงได้ทดลองกระตุ้นเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ให้มีการสร้างฮีโมโกลบินและเพิ่มการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a บนผิวของเซลล์ด้วยสารละลายฮีมิน นอกจากนี้ยังได้ทดลองถ่ายโอนพลาสมาดีบุกผสม เพื่อกระตุ้นการ

แสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a ในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 แล้วทดสอบความสามารถในการรุกรานของเชื้อ พบว่ามีเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมหรือสิ่งทีคาดว่าน่าจะเป็นเชื้อที่อยู่ในเซลล์เฉพาะในกลุ่มเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด CD235a ด้วยการถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมเท่านั้น ส่วนในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562 ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารละลายอีมีน ไม่พบเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมหรือสิ่งทีคาดว่าน่าจะเป็นเชื้อเลย เนื่องจากอีมีนถูกรายงานว่าเป็นสาเหตุทำให้เชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมอ่อนแอและรุกรานเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงได้ลดลง ดังนั้นจากผลการทดลองทั้งหมดอาจทำให้เชื่อได้ว่าโปรตีนชนิด CD235a น่าเป็นโปรตีนที่จำเป็นและสำคัญสำหรับเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมที่ต้องอาศัยในระหว่างการรุกรานเข้าสู่เซลล์ โดยอาจมีหรือไม่มีโปรตีนชนิด CD147 เข้ามามีส่วนเกี่ยวข้องร่วมกับโปรตีนชนิด CD235a ก็ได้



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เอกสารอ้างอิง

- [Abbasi-Kenarsari *et al.*, 2015] Abbasi-Kenarsari H, *et al.* (2015) Cloning and expression of CD19, a human B-cell marker in NIH-3T3 cell line. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology* 7(1):39-44.
- [Ahn *et al.*, 2008] Ahn SY, *et al.* (2008) Magnetic separation: a highly effective method for synchronization of cultured erythrocytic *Plasmodium falciparum*. *Parasitology Research* 102(6):1195-1200.
- [Alonso *et al.*, 1994] Alonso PL, *et al.* (1994) Randomised trial of efficacy of SPf66 vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria in children in southern Tanzania. *Lancet* 344(8931):1175-1181.
- [Anand *et al.*, 1994] Anand U, Agarwal R, & Anand CV (1994) The benzidine reaction: test for occult blood. *Biochemical Education* 22(4):212.
- [Andersson *et al.*, 1979] Andersson LC, Nilsson K, & Gahmberg CG (1979) K562--a human erythroleukemic cell line. *International Journal of Cancer* 23(2):143-147.
- [ATCC, 2019] ATCC. Jurkat, Clone E6-1 (ATCC® TIB-152™). ATCC. <https://www.atcc.org/en/Products/All/TIB-152.aspx#characteristics>. Accessed on February 19, 2019.
- [ATCC, 2019] ATCC. K-562 (ATCC® CCL-243™). ATCC. <https://www.atcc.org/products/all/CCL-243.aspx#characteristics>. Accessed on February 19, 2019.
- [ATCC, 2019] ATCC. Raji (ATCC® CCL-86™). ATCC. <https://www.atcc.org/products/all/CCL-86.aspx#generalinformation>. Accessed on February 19, 2019.

- [ATCC, 2019] ATCC. U-937 (ATCC® CRL-1593.2™). ATCC. <https://www.atcc.org/products/all/CRL-1593.2.aspx>. Accessed on February 19, 2019.
- [Attar, 2014] Attar A (2014) Changes in the cell surface markers during normal hematopoiesis: a guide to cell isolation. *Global Journal of Hematology and Blood Transfusion* 1(1):20-28.
- [Baird, 2005] Baird JK (2005) Effectiveness of antimalarial drugs. *The New England Journal of Medicine* 352(15):1565-1577.
- [Baliga *et al.*, 1993] Baliga BS, Mankad M, Shah AK, & Mankad VN (1993) Mechanism of differentiation of human erythroleukaemic cell line K562 by hemin. *Cell Proliferation* 26(6):519-529.
- [Bartholdson *et al.*, 2013] Bartholdson SJ, Crosnier C, Bustamante LY, Rayner JC, & Wright GJ (2013) Identifying novel *Plasmodium falciparum* erythrocyte invasion receptors using systematic extracellular protein interaction screens. *Cellular Microbiology* 15(8):1304-1312.
- [Basu and Sahi, 2017] Basu S & Sahi PK (2017) Malaria: An Update. *Indian Journal of Pediatrics* 84(7):521-528.
- [Biovisualtech, 2019] Biovisualtech. pEGFP-C3. Biovisualtech. <http://www.biovisualtech.com/bvplasmid/pEGFP-C3.jpg>. Accessed on February 19, 2019.
- [Biswas *et al.*, 1988] Biswas S, Saxena QB, Roy A, & Sharma VP (1988) Isolation of different erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum* and synchronization in culture. *Indian Journal of Malariology* 25(1):7-10.
- [Bousema *et al.*, 2014] Bousema T, Okell, L., Felger, I., and Drakeley, C. (2014) The life cycle of *Plasmodium falciparum*. *Nature Reviews Microbiology* 12:833-840.

- [Boussaroqu *et al.*, 2016] Boussaroque A, *et al.* (2016) Emergence of Mutations in the K13 Propeller Gene of *Plasmodium falciparum* Isolates from Dakar, Senegal, in 2013-2014. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 60(1):624-627.
- [Bruce *et al.*, 2004] Bruce LJ, *et al.* (2004) Altered structure and anion transport properties of band 3 (AE1, SLC4A1) in human red cells lacking glycophorin A. *The Journal of Biological Chemistry* 279(4):2414-2420.
- [Casale and Kalinar, 1982] Casale TB & Kalinar M (1982) A rapid method for isolation of human mononuclear cells free of significant platelet contamination. *Journal of Immunological methods* 55(1982):347-353.
- [Chen *et al.*, 2009] Chen K, *et al.* (2009) Resolving the distinct stages in erythroid differentiation based on dynamic changes in membrane protein expression during erythropoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(41):17413-17418.
- [Chimal-Ramirez *et al.*, 2016] Chimal-Ramirez GK, Espinoza-Sanchez NA, Chavez-Sanchez L, Arriaga-Pizano L, & Fuentes-Panana EM (2016) Monocyte differentiation towards protumor activity does not correlate with M1 or M2 phenotypes. *Journal of Immunology Research* 2016:6031486.
- [Cioe *et al.*, 1981] Cioe L, *et al.* (1981) Differential expression of the globin genes in human leukemia K562(S) cells induced to differentiate by hemin or butyric acid. *Cancer Research* 41(1):237-243.
- [Clyde, 1975] Clyde DF (1975) Immunization of man against falciparum and vivax malaria by use of attenuated sporozoites. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 24(3):397-401.

- [Coatney, 1971] Coatney GR (1971) *The Primate Malariae* (National Institute of Allergy & Infectious Diseases, Atlanta, USA).
- [Coelho *et al.*, 2017] Coelho CH, Doritchamou JYA, Zaidi I, & Duffy PE (2017) Advances in malaria vaccine development: report from the 2017 malaria vaccine symposium. *NPJ Vaccines* 2:34.
- [Cox, 2010] Cox FE (2010) History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasites & Vectors* 3(1):5.
- [Crosnier *et al.*, 2011] Crosnier C, *et al.* (2011) Basigin is a receptor essential for erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. *Nature* 480(7378):534-537.
- [Crutcher and Hoffman, 1996] Crutcher JM & Hoffman SL (1996) *Malaria* (University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston) 4th Ed.
- [Cui *et al.*, 2015] Cui L, Mharakurwa S, Ndiaye D, Rathod PK, & Rosenthal PJ (2015) Antimalarial drug resistance: literature review and activities and findings of the ICEMR network. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 93(3 Suppl):57-68.
- [D'Alessandro *et al.*, 1995] D'Alessandro U, *et al.* (1995) Efficacy trial of malaria vaccine SPf66 in Gambian infants. *Lancet* 346(8973):462-467.
- [Daniels, 2013] Daniels G (2013) Human Blood Groups: Introduction. *Human Blood Groups*, 3rd Ed.
- [Dean *et al.*, 1981] Dean A, Erard F, Schneider AP, & Schechter AN (1981) Induction of hemoglobin accumulation in human K562 cells by hemin is reversible. *Science* 212(4493):459-461.

- [Delgado-Canedo *et al.*, 2006] Delgado-Canedo A, Santos DG, Chies JA, Kvitko K, & Nardi NB (2006) Optimization of an electroporation protocol using the K562 cell line as a model: role of cell cycle phase and cytoplasmic DNAses. *Cytotechnology* 51(3):141-148.
- [Dragos and Luca, 2012] Dragos C & Luca MD (2012) *Lymphocyte maturation* (PathologyOutlines.com, Inc.).
- [Draper *et al.*, 2018] Draper SJ, *et al.* (2018) Malaria vaccines: recent advances and new horizons. *Cell Host & Microbe* 24(1):43-56.
- [Ekberg-Jansson *et al.*, 1999] Ekberg-Jansson A, Arva E, Nilsson O, Lofdahl CG, & Andersson B (1999) A comparison of the expression of lymphocyte activation markers in blood, bronchial biopsies and bronchoalveolar lavage: evidence for an enrichment of activated T lymphocytes in the bronchoalveolar space. *Respiratory Medicine* 93(8):563-570.
- [Erard *et al.*, 1981] Erard F, Dean A, & Schechter AN (1981) Inhibitors of cell division reversibly modify hemoglobin concentration in human erythroleukemia K562 cells. *Blood* 58(6):1236-1239.
- [Escalante *et al.*, 2009] Escalante AA, Smith DL, & Kim Y (2009) The dynamics of mutations associated with anti-malarial drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Trends in Parasitology* 25(12):557-563.
- [Fairhurst and Dondorp, 2016] Fairhurst RM & Dondorp AM (2016) Artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Microbiology Spectrum* 4(3).
- [Finne and Halvorsen, 1972] Finne PH & Halvorsen S (1972) Regulation of erythropoiesis in the fetus and newborn. *Archives of Disease in Childhood* 47(255):683-687.
- [Furukawa and Brindley, 1973] Furukawa T & Brindley WG (1973) Adsorption and Oxidation of Benzidine and Aniline by Montmorillonite and Hectorite pp 279-288.

- [Gardner *et al.*, 2002] Gardner MJ, *et al.* (2002) Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* 419(6906):498-511.
- [Gaudreault *et al.*, 2015] Gaudreault V, Wirbel J, Jardim A, Rohrbach P, & Scorza T (2015) Red blood cells preconditioned with hemin are less permissive to *Plasmodium* invasion in vivo and in vitro. *PLoS One* 10(10):e0140805.
- [Gelman and Wilkening, 2000] Gelman R & Wilkening C (2000) Analyses of quality assessment studies using CD45 for gating lymphocytes for CD3(+)/4(+)% . *Cytometry* 42(1):1-4.
- [Gilmour, 1944] Gilmour J (1944) Evolution: The Modern Synthesis. By Julian Huxley, M.A., D.Sc., F.R.S. (London: George Allen and Unwin Ltd.1942. Pp. 645. Price 25s.). *Philosophy* 19(73):166-170.
- [Ginaldi *et al.*, 1998] Ginaldi L, *et al.* (1998) Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias. *Journal of Clinical Pathology* 51(5):364-369.
- [Grass and Toole, 2015] Grass GD & Toole BP (2015) How, with whom and when: an overview of CD147-mediated regulatory networks influencing matrix metalloproteinase activity. *Bioscience Reports* 36(1):e00283.
- [Haldar *et al.*, 2018] Haldar K, Bhattacharjee S, & Safeukui I (2018) Drug resistance in *Plasmodium*. *Nature Reviews Microbiology* 16(3):156-170.
- [Harms *et al.*, 2000] Harms CA, Keller JM, & Kennedy-Stoskopf S (2000) Use of a two-step Percoll gradient for separation of loggerhead sea turtle peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Wildlife Diseases* 36(3):535-540.

- [Hiep *et al.*, 2012] Hiep CN, Kinohira S, Furuyama K, & Taketani S (2012) Depletion of glutamine enhances sodium butyrate-induced erythroid differentiation of K562 cells. *The Journal of Biological Chemistry* 152(6):509-519.
- [Hill, 2011] Hill AV (2011) Vaccines against malaria. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 366(1579):2806-2814.
- [Horny *et al.*, 1993] Horny HP, *et al.* (1993) Investigation of bone marrow lymphocyte subsets in normal, reactive, and neoplastic states using paraffin-embedded biopsy specimens. *American Journal of Clinical Pathology* 99(2):142-149.
- [Iacono *et al.*, 2007] Iacono KT, Brown AL, Greene MI, & Saouaf SJ (2007) CD147 immunoglobulin superfamily receptor function and role in pathology. *Experimental and Molecular Pathology* 83(3):283-295.
- [Imwong *et al.*, 2017] Imwong M, *et al.* (2017) The spread of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in the Greater Mekong subregion: a molecular epidemiology observational study. *The Lancet Infectious Diseases* 17(5):491-497.
- [Inoue *et al.*, 2014] Inoue T, Swain A, Nakanishi Y, & Sugiyama D (2014) Multicolor analysis of cell surface marker of human leukemia cell lines using flow cytometry. *Anticancer Research* 34(8):4539-4550.
- [Johnson, 2014] Johnson ST (2014) JMH blood group system: a review. *Immunohematology* 30(1):18-23.
- [Kalanon and McFadden, 2010] Kalanon M & McFadden GI (2010) Malaria, *Plasmodium falciparum* and its apicoplast. *Biochemical Society Transactions* 38(3):775-782.

- [Kasinrerkerk *et al.*, 1999] Kasinrerkerk W, Tokrasinwit N, & Phunpae P (1999) CD147 monoclonal antibodies induce homotypic cell aggregation of monocytic cell line U937 via LFA-1/ICAM-1 pathway. *Immunology* 96(2):184-192.
- [Kim and Schneider, 2013] Kim Y & Schneider KA (2013) Evolution of drug resistance in malaria parasite populations. *Nature Education Knowledge* 4(8):6.
- [Kneissl *et al.*, 2013] Kneissl S, *et al.* (2013) CD19 and CD20 targeted vectors induce minimal activation of resting B lymphocytes. *PLoS One* 8(11):e79047.
- [Lambros and Vanderberg, 1979] Lambros C & Vanderberg JP (1979) Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *Journal of Parasitology* 65(3):418-420.
- [Landmann *et al.*, 1991] Landmann R, Ludwig C, Obrist R, & Obrecht JP (1991) Effect of cytokines and lipopolysaccharide on CD14 antigen expression in human monocytes and macrophages. *Journal of Cellular Biochemistry* 47(4):317-329.
- [Lane, 2015] Lane N (2015) The unseen world: reflections on Leeuwenhoek (1677) 'Concerning little animals'. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 370(1666).
- [Li *et al.*, 2013] Li Y, *et al.* (2013) Changes in DNA methylation of erythroid-specific genes in K562 cells exposed to phenol and hydroquinone. *Toxicology* 312:108-114.
- [Magowan *et al.*, 1988] Magowan C, Wollish W, Anderson L, & Leech J (1988) Cytoadherence by *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes is correlated with the expression of a family of variable proteins on infected erythrocytes. *The Journal of Experimental Medicine* 168(4):1307-1320.

- [Mahmoudi and Keshavarz, 2017] Mahmoudi S & Keshavarz H (2017) Efficacy of phase 3 trial of RTS, S/AS01 malaria vaccine: The need for an alternative development plan. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 13(9):2098-2101.
- [Mandl *et al.*, 2014] Mandl M, Schmitz S, Weber C, & Hristov M (2014) Characterization of the CD14⁺⁺CD16⁺ monocyte population in human bone marrow. *PLoS One* 9(11):e112140.
- [Marsee *et al.*, 2010] Marsee DK, Pinkus GS, & Yu H (2010) CD71 (transferrin receptor): an effective marker for erythroid precursors in bone marrow biopsy specimens. *American Journal of Clinical Pathology* 134(3):429-435.
- [Michel *et al.*, 2002] Michel RB, Ochakovskaya R, & Mattes MJ (2002) Antibody localization to B-cell lymphoma xenografts in immunodeficient mice: importance of using residualizing radiolabels. *Clinical Cancer Research* 8(8):2632-2639.
- [Mita and Tanabe, 2012] Mita T & Tanabe K (2012) Evolution of *Plasmodium falciparum* drug resistance: implications for the development and containment of artemisinin resistance. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 65(6):465-475.
- [Molyneux *et al.*, 2012] Molyneux EM, *et al.* (2012) Burkitt's lymphoma. *Lancet* 379(9822):1234-1244.
- [Moriuchi *et al.*, 1997] Moriuchi H, Moriuchi M, Arthos J, Hoxie J, & Fauci AS (1997) Promonocytic U937 subclones expressing CD4 and CXCR4 are resistant to infection with and cell-to-cell fusion by T-cell-tropic human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology* 71(12):9664-9671.

- [Muramatsu, 2016] Muramatsu T (2016) Basigin (CD147), a multifunctional transmembrane glycoprotein with various binding partners. *The Journal of Biochemistry*. 159(5):481-490.
- [Narain *et al.*, 2008] Narain JP (2008) Malaria in the South-East Asia region: myth & the reality. *The Indian Journal of Medical Research* 128(1):1-3.
- [Nosten *et al.*, 1996] Nosten F, *et al.* (1996) Randomised double-blind placebo-controlled trial of SPf66 malaria vaccine in children in northwestern Thailand. Shoklo SPf66 malaria vaccine trial group. *Lancet* 348(9029):701-707.
- [Ohshima, 2016] Ohshima H (2016) *Encyclopedia of Biocolloid and Biointerface Science* (John Wiley & Sons, Inc.).
- [Pan and Johnstone, 1983] Pan BT & Johnstone RM (1983) Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell* 33(3):967-978.
- [Parker *et al.*, 2015] Parker DM, *et al.* (2015) Malaria ecology along the Thailand-Myanmar border. *Malaria Journal* 14:388.
- [Pasvol *et al.*, 1982] Pasvol G, *et al.* (1982) Glycophorin as a possible receptor for *Plasmodium falciparum*. *Lancet* 2(8305):947-950.
- [PCSB PDB, 2019] PCSB PDB. Glycophorin-A - P02724 (GLPA_HUMAN). PCSB PDB. https://www.rcsb.org/pdb/protein/P02724?evtc=Suggest&evta=ProteinFeature%20View&evtl=autosearch_SearchBar_querySuggest . Accessed on February 19, 2019.
- [Pennings *et al.*, 2010] Pennings GJ, Yong AS, & Kritharides L (2010) Expression of EMMPRIN (CD147) on circulating platelets in vivo. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 8(3):472-481.
- [Pourcher *et al.*, 2011] Pourcher G, *et al.* (2011) Human fetal liver: an in vitro model of erythropoiesis. *Stem Cells International* 2011.

- [Qidwai *et al.*, 2014] Qidwai T, *et al.* (2014) Antimalarial drug targets and drugs targeting dolichol metabolic pathway of *Plasmodium falciparum*. *Current Drug Targets* 15(4):374-409.
- [Reece *et al.*, 2006] Reece JB, *et al.* (2006) *Campbell Biology* (Pearson).
- [Reid, 2009] Reid ME (2009) MNS blood group system: a review. *Immunohematology* 25(3):95-101.
- [Rivadeneira *et al.*, 1983] Rivadeneira EM, Wasserman M, & Espinal CT (1983) Separation and concentration of schizonts of *Plasmodium falciparum* by Percoll gradients. *The Journal of Protozoology* 30(2):367-370.
- [Rohingya, 2016] Rohingya B (2016) The challenges of introducing a malaria vaccine. *Bull. World Health Organ.* 94(9):640-641.
- [Sanchez *et al.*, 2004] Sanchez G, *et al.* (2004) Capsid region involved in hepatitis A virus binding to glycophorin A of the erythrocyte membrane. *Journal of Virology* 78(18):9807-9813.
- [Schuster, 2002] Schuster FL (2002) Cultivation of *Plasmodium* spp. *Clinical Microbiology Reviews* 15(3):355-364.
- [Shin *et al.*, 2011] Shin HM, *et al.* (2011) Characterization of monoclonal antibodies against human leukocyte common antigen (CD45). *Immune Network* 11(2):114-122.
- [Sigma-Aldrich, 2019] Sigma-Aldrich. Hemoglobin Assay Kit. Sigma-Aldrich. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/mak115?lang=en®ion=TH>. Accessed on February 19, 2019.
- [Sim *et al.*, 1994] Sim BK, Chitnis CE, Wasniowska K, Hadley TJ, & Miller LH (1994) Receptor and ligand domains for invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *Science* 264(5167):1941-1944.

- [Snow *et al.*, 2005] Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, & Hay SI (2005) The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 434(7030):214-217.
- [Su *et al.*, 2007] Su X, Hayton K, & Wellems TE (2007) Genetic linkage and association analyses for trait mapping in *Plasmodium falciparum*. *Nature Reviews Genetics* 8(7):497-506.
- [Su *et al.*, 2015] Su XZ & Miller LH (2015) The discovery of artemisinin and the Nobel Prize in Physiology or Medicine. *Science China Life Sciences* 58(11):1175-1179.
- [Theofilopoulos *et al.*, 1976] Theofilopoulos AN, Wilson CB, & Dixon FJ (1976) The Raji cell radioimmune assay for detecting immune complexes in human sera. *The Journal of Clinical Investigation* 57(1):169-182.
- [Transomic technologies, 2019] Transomic technologies. pBluescriptIIISK+. Transomic technologies. <http://www.transomic.com>. Accessed on February 19, 2019.
- [Tripathi *et al.*, 2010] Tripathi R, *et al.* (2010) B-cell lymphoma line (Raji) viability and surface marker expression minimally affected by 20- and 25-gauge vitrectomy systems analyzed by flow cytometry. *Retina* 30(9):1505-1510.
- [Van Lochem *et al.*, 2004] Van Lochem EG, *et al.* (2004) Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry Part B Clinical Cytometry* 60(1):1-13.
- [Verdrager, 1986] Verdrager J (1986) Epidemiology of the emergence and spread of drug-resistant falciparum malaria in South-East Asia and Australasia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 89(6):277-289.

- [Wanda *et al.*, 1981] Wanda PE, Lee LT, & Howe C (1981) A spectrophotometric method for measuring hemoglobin in erythroleukemic cells (K562). *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 29(12):1442-1444.
- [Wang and Chong, 2003] Wang H & Chong S (2003) Visualization of coupled protein folding and binding in bacteria and purification of the heterodimeric complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(2):478-483.
- [Wang *et al.*, 2012] Wang K, Wei G, & Liu D (2012) CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. *Experimental Hematology & Oncology* 1(1):36.
- [Watt *et al.*, 1987] Watt SM, Gilmore DJ, Davis JM, Clark MR, & Waldmann H (1987) Cell-surface markers on haemopoietic precursors. Reagents for the isolation and analysis of progenitor cell subpopulations. *Molecular and Cellular Probes* 1(4):297-326.
- [WHO, 2017] WHO. Artemisinin and artemisinin-based combination therapy resistance. WHO. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255213/WHO-HTM-GMP-2017.9-eng.pdf;jsessionid=C8FF404415A45C727096D9274E27F3D9?sequence=1>. Accessed on December 25, 2017.
- [WHO, 2018] WHO. Malaria. WHO. <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/malaria>. Accessed on November 19, 2018.
- [WHO, 2019] WHO. Malaria. WHO. <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/malaria>. Accessed on May 9, 2019.
- [Winzeler, 2008] Winzeler EA (2008) Malaria research in the post-genomic era. *Nature* 455(7214):751-756.

- [Witt *et al.*, 2000] Witt O, Sand K, & Pekrun A (2000) Butyrate-induced erythroid differentiation of human K562 leukemia cells involves inhibition of ERK and activation of p38 MAP kinase pathways. *Blood* 95(7):2391-2396.
- [Wu *et al.*, 2004] Wu L, Martin TD, Carrington M, & KewalRamani VN (2004) Raji B cells, misidentified as THP-1 cells, stimulate DC-SIGN-mediated HIV transmission. *Virology* 318(1):17-23.
- [Wu *et al.*, 1984] Wu Y, Dean A, Egan W, & Schechter AN (1984) Control of oxygen affinity of hemoglobin in K562 cells induced by hemin. *Blood* 63(6):1447-1452.
- [Yildirim *et al.*, 2016] Yildirim S, Thompson MG, Jacobs AC, Zurawski DV, & Kirkup BC (2016) Evaluation of parameters for high efficiency transformation of acinetobacter baumannii. *Scientific Reports* 6:22110.
- [Young *et al.*, 2000] Young MT, Beckmann R, Teye AM, & Tanner MJ (2000) Red-cell glycophorin A-band 3 interactions associated with the movement of band 3 to the cell surface. *Biochemical Journal* 350 Pt 1:53-60.
- [Young and Tanner, 2003] Young MT & Tanner MJ (2003) Distinct regions of human glycophorin A enhance human red cell anion exchanger (band 3; AE1) transport function and surface trafficking. *The Journal of Biological Chemistry* 278(35):32954-32961.
- [Zamani *et al.*, 2013] Zamani F, Zare Shahneh F, Aghebati-Maleki L, & Baradaran B (2013) Induction of CD14 expression and differentiation to monocytes or mature macrophages in promyelocytic cell lines: new approach. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* 3(2):329-332.

[Zola *et al.*, 2007]

Zola H, Swart B, Nicholson I, & Voss E (2007) *Leukocyte and Stromal Cell Molecules: The CD Markers* (John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA).

[Zon, 2001]

Zon LI (2001) *Hematopoiesis: A Developmental Approach* (Oxford University Press, Oxford, UK).



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเซลล์เชื้อสายมะเร็ง ชนิด Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) (pH = 7.2)
ปริมาตร 1 ลิตร

RPMI-1640 media powder	10.40	กรัม
HEPES	5.94	กรัม
NaHCO ₃	2.10	กรัม
Fetal Bovine Serum (FBS)	100.00	มิลลิลิตร
100X Penicillin/Streptomycin	10.00	มิลลิลิตร
100X L-glutamine	10.00	มิลลิลิตร

2. อาหารเลี้ยงเชื้อมาลาเรียชนิด Malaria Culture Media (MCM) (pH = 7.4) ปริมาตร 1 ลิตร

RPMI-1640 media powder	10.40	กรัม
HEPES	5.94	กรัม
NaHCO ₃	2.10	กรัม
glucose	2.00	กรัม
hypoxanthine	0.05	กรัม
Gentamycin (80 มิลลิกรัม/2 มิลลิลิตร)	2.00	มิลลิลิตร

3. อาหารเลี้ยงเชื้อมาลาเรียชนิด Complete Malaria Culture Media (CMCM) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

อาหารเลี้ยงเชื้อมาลาเรียชนิด MCM	180.00	มิลลิลิตร
human AB serum	20.00	มิลลิลิตร

4. สารละลาย 10X Phosphate Buffered Saline (10X PBS) (pH = 7.2) ปริมาตร 1 ลิตร

NaCl	76.00	กรัม
Na ₂ HPO ₄	9.90	กรัม
NaH ₂ PO ₄	4.10	กรัม

5. สารละลาย 1X Phosphate Buffered Saline (1X PBS) (pH = 7.2) ปริมาตร 1 ลิตร

NaCl	7.60	กรัม
Na ₂ HPO ₄	0.99	กรัม
NaH ₂ PO ₄	0.41	กรัม

6. สารเคมีสำหรับการเครื่องตรวจวิเคราะห์แยกชนิดและหาปริมาณเซลล์แบบอัตโนมัติ

6.1 บัฟเฟอร์ Fluorescent Activated Cell Sorting (FACS buffer)

1X PBS	980.00	มิลลิลิตร
FBS	20.00	มิลลิลิตร
NaN ₃	500.00	มิลลิกรัม

6.2 สารละลายสำหรับบล็อกตัวจับเอฟซี (Fc blocking solution)

FACS buffer	200.00	มิลลิลิตร
FBS	50.00	มิลลิลิตร

6.3 สารละลาย 1% paraformaldehyde

1X PBS	500.00	มิลลิลิตร
paraformaldehyde	5.00	กรัม

7. สารละลาย 60% Percoll ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

Percoll	6.00	มิลลิลิตร
อาหารเลี้ยงเชื้อมาลาเรียชนิด MCM	3.40	มิลลิลิตร
10X PBS	0.60	มิลลิลิตร

8. สารละลายสำหรับแช่แข็งเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อมาลาเรีย ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

sorbitol	0.60	กรัม
NaCl	0.13	กรัม
กรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร เก็บที่ -20°C		

9. สารละลายสำหรับละลายเชื้อมาลาเรีย

9.1 สารละลาย 12% NaCl

NaCl	6.00	กรัม
distilled water	50.00	มิลลิลิตร
กรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร เก็บที่ 4°C		

9.2 สารละลาย 1.6% NaCl

NaCl	0.80	กรัม
distilled water	50.00	มิลลิลิตร
กรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร เก็บที่ 4°C		

9.3 สารละลาย 0.9% NaCl

NaCl	0.45	กรัม
distilled water	50.00	มิลลิลิตร
กรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร เก็บที่ 4°C		

10. สารละลาย 50mM sodium butyrate ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

sodium butyrate	0.28	มิลลิกรัม
distilled water	50.00	มิลลิลิตร
กรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร เก็บที่ -20°C		

11. สารละลาย 1mM hemin ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

hemin	32.60	กรัม
1M Tris	2.50	มิลลิลิตร
0.5M NaOH	2.00	มิลลิลิตร
กรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร เก็บที่ -20°C		

12. สารละลายสำหรับตรวจหาฮีโมโกลบินด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง

12.1 สารละลาย 0.2% benzidine ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

benzidine	0.02	กรัม
0.5M acetate	2.50	มิลลิลิตร
0.5M NaOH	2.00	มิลลิลิตร

แบ่งเก็บใส่หลอดละ 1 มิลลิลิตร เก็บที่ -20°C

12.2 สารละลาย 0.05M Tris/0.4M glycerine (pH = 7.5) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

Tris	0.61	กรัม
glycerine	3.00	กรัม

ปรับค่า pH ด้วย HCl

12.3 สารละลาย 0.05M Tris/0.4M glycerine/2% Triton X-100 (pH = 7.5)

ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

0.05M Tris/0.4M glycerine	1.60	มิลลิลิตร
Triton X-100	0.40	มิลลิลิตร

13. สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย LB broth และ LB agar ปริมาตร 1 ลิตร

trytone	10.00	กรัม
NaCl	10.00	กรัม
yeast extract	5.00	กรัม
agar (สำหรับ LB agar)	15.00	กรัม

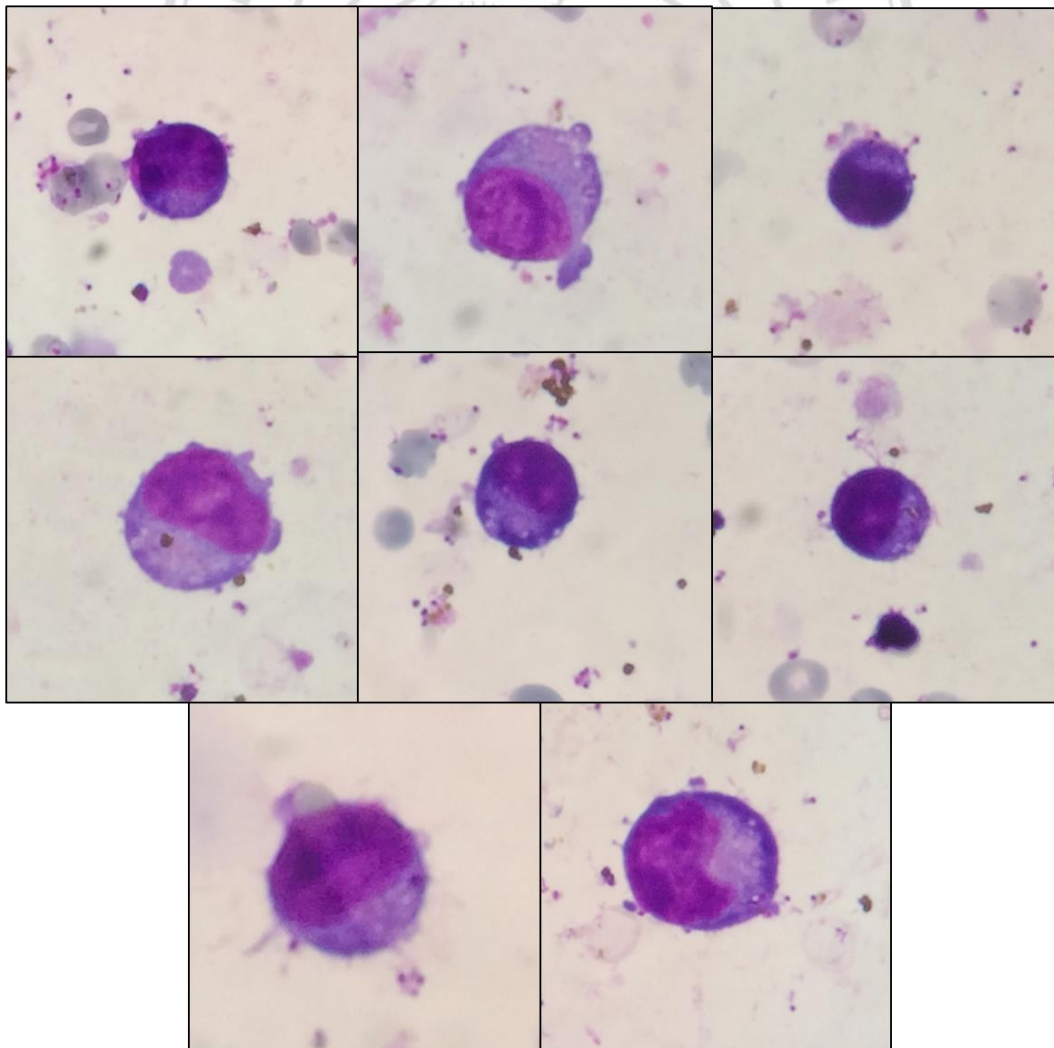
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ข

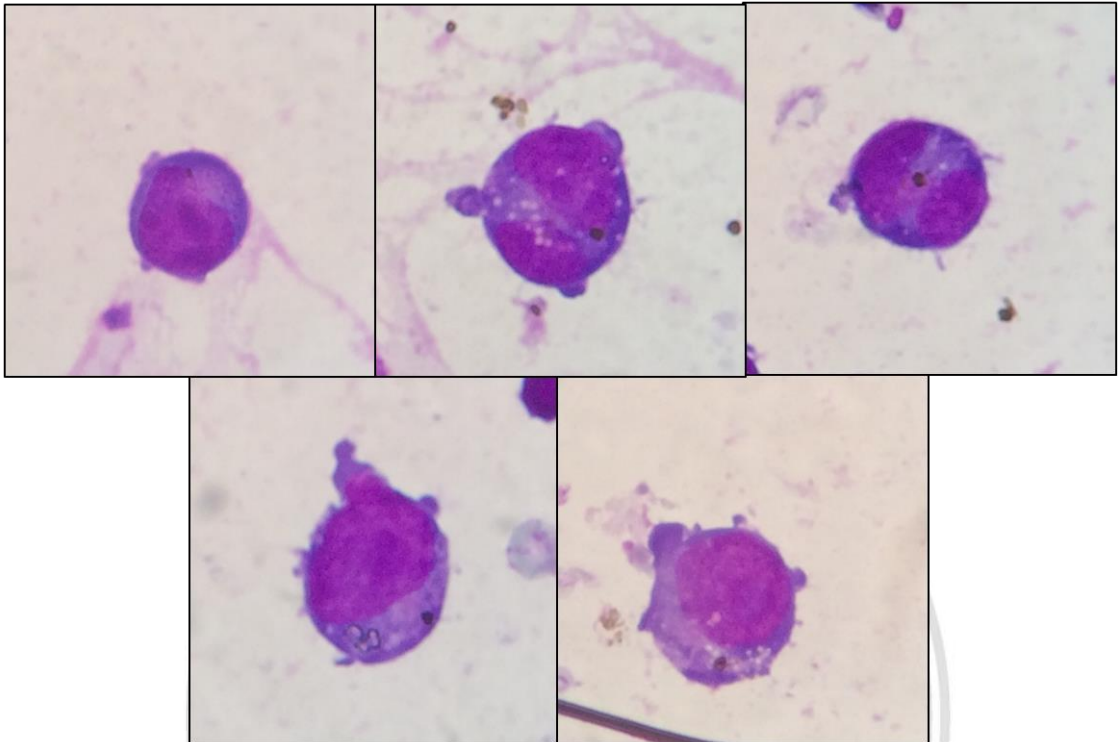
ข้อมูลการตรวจพบความสามารถในการรุกรานของ เชื้อพลาสมาเดียม ฟาลซิพารัมในเซลล์เชื้อสายมะเร็งเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ

1. ผลการตรวจพบเชื้อพลาสมาเดียม ฟาลซิพารัมและสิ่งทีคาดว่าน่าจะเป็นตัวเชื้อในเซลล์เชื้อสาย
มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Raji

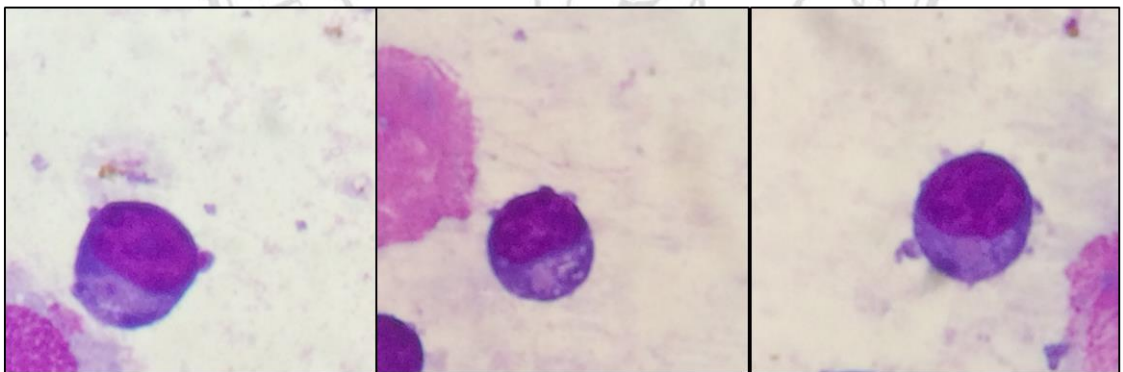
เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง



เมื่อเวลาผ่านไป 45 ชั่วโมง



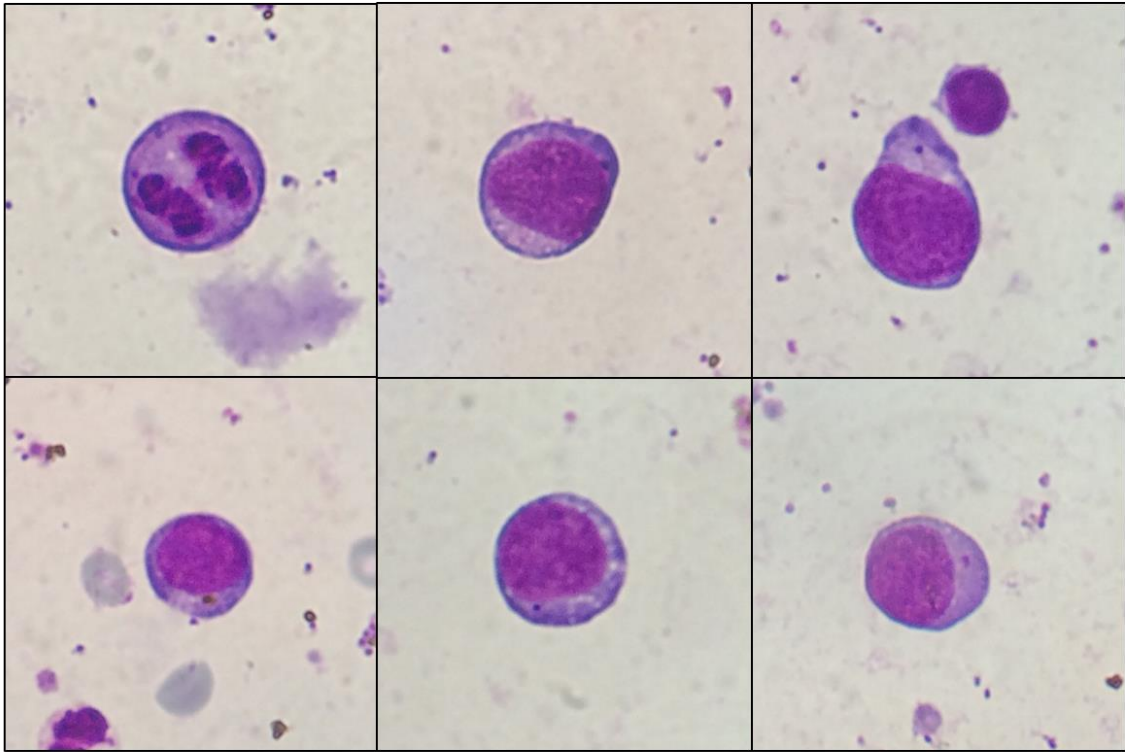
เมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง



Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2. ผลการตรวจพบเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมและสิ่งทีคาดว่าน่าจะเป็นตัวเชื้อในเซลล์เชื้อสาย
มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Jurkat

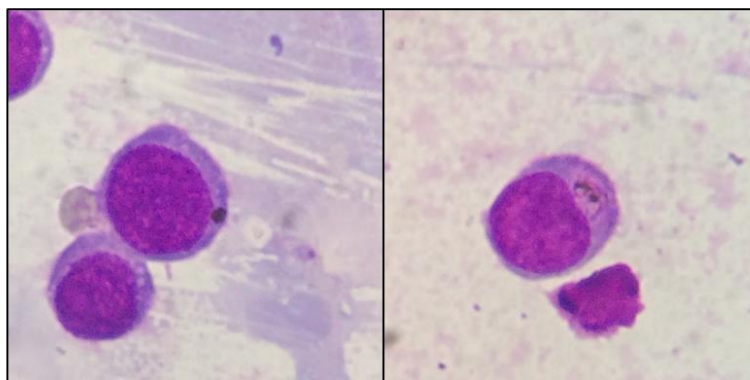
เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง



เมื่อเวลาผ่านไป 45 ชั่วโมง



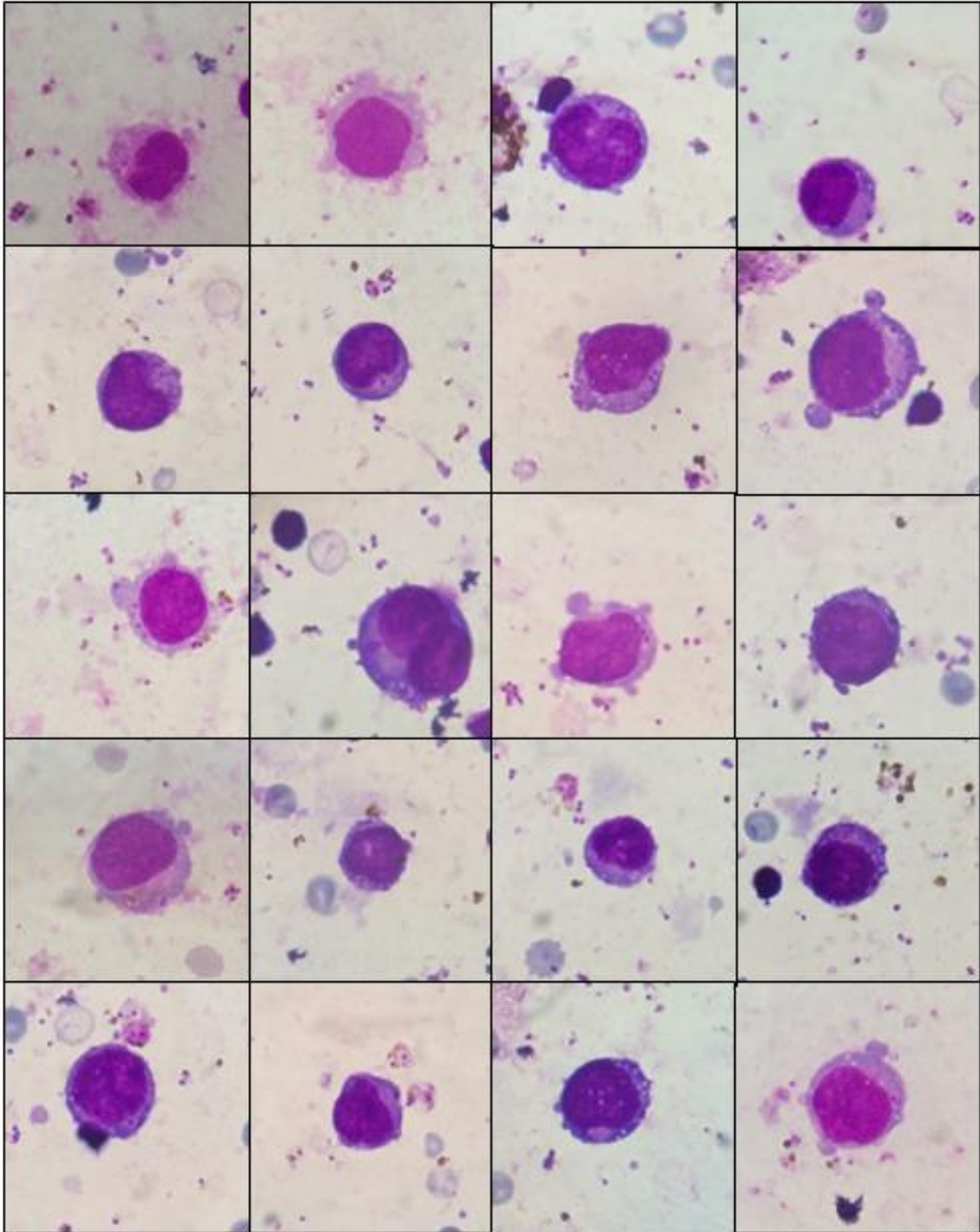
เมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง

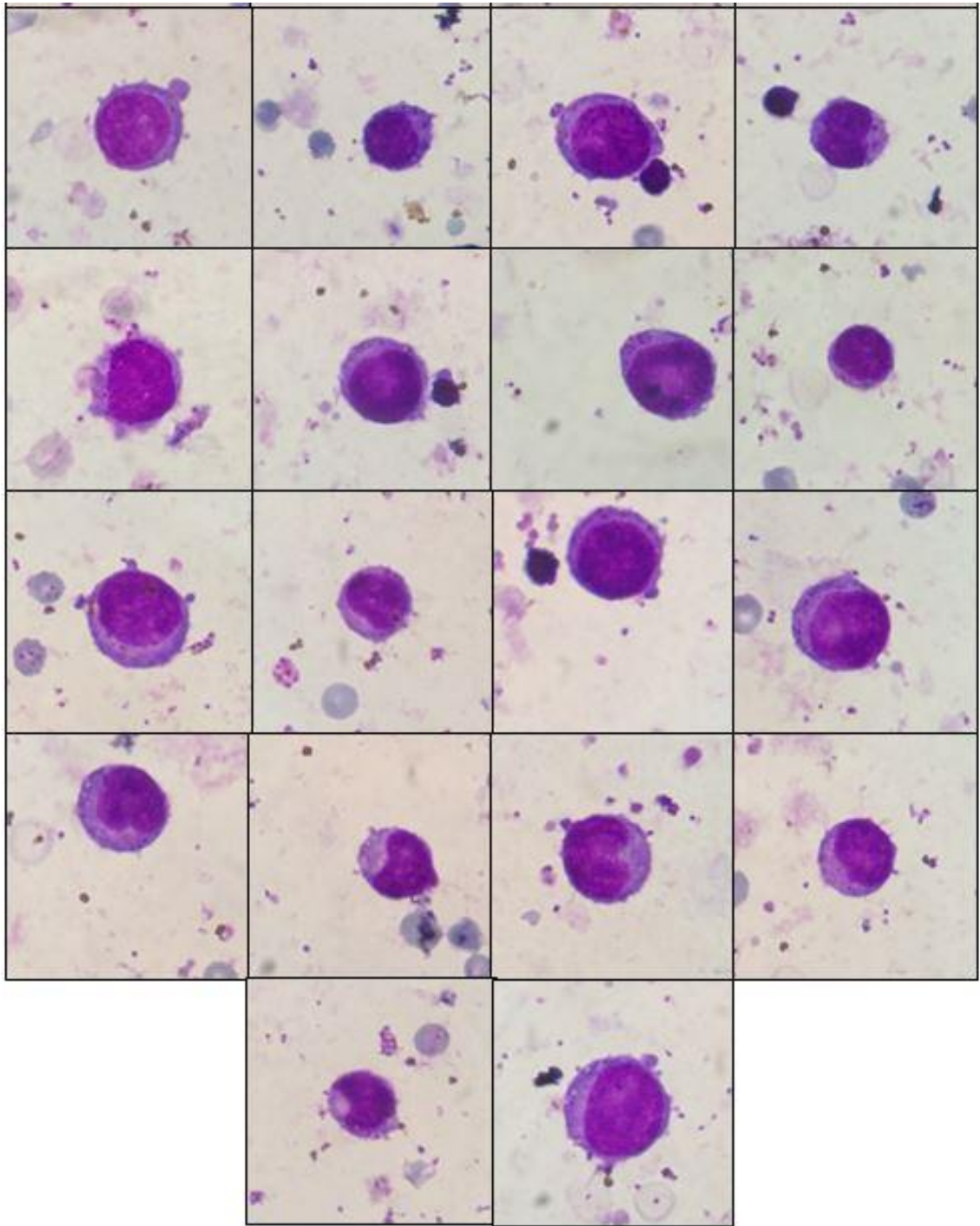


ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

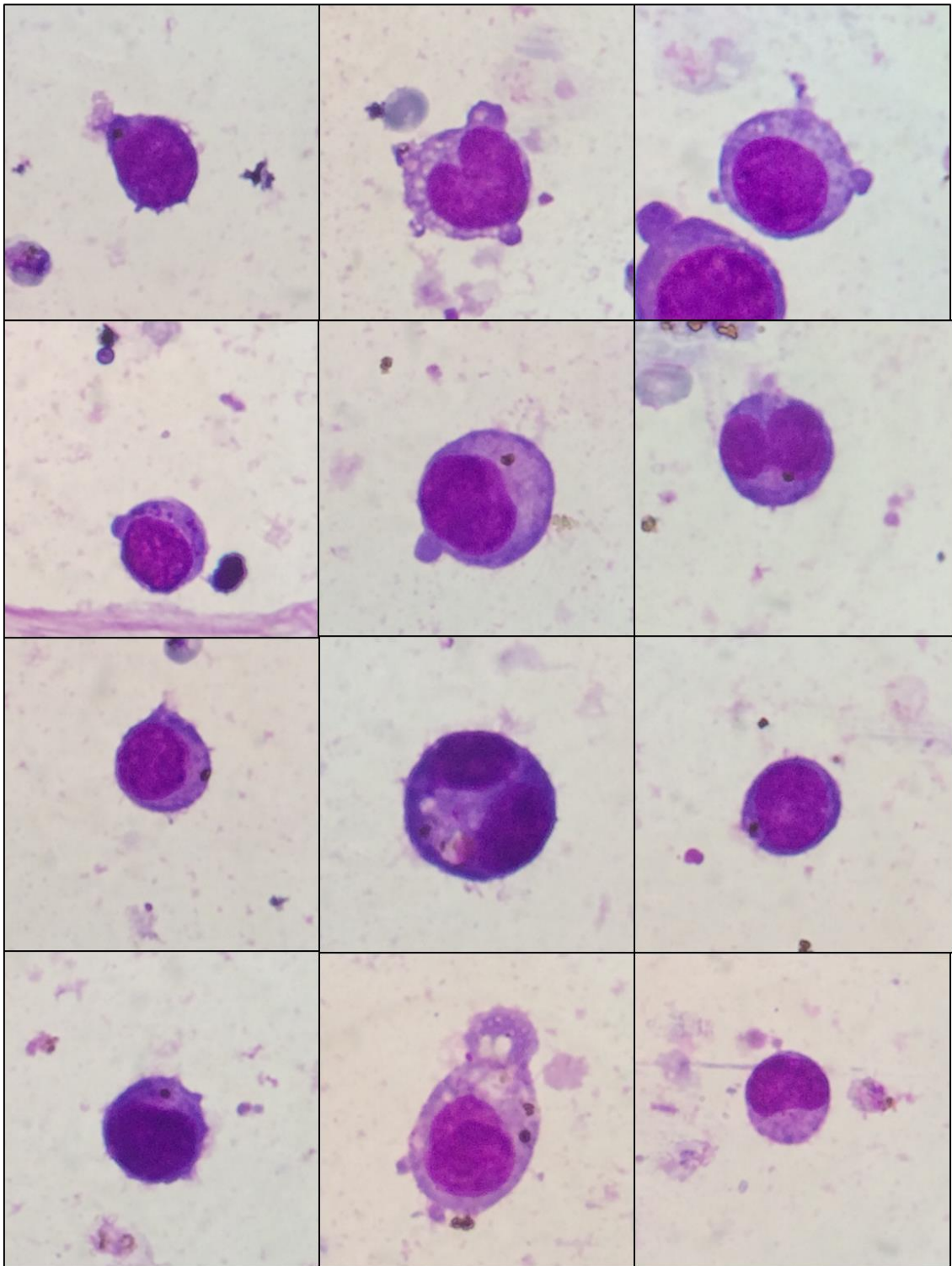
3. ผลการตรวจพบเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมและสิ่งทีคาดว่าน่าจะเป็นตัวเชื้อในเซลล์เชื้อสาย
มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937

เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง

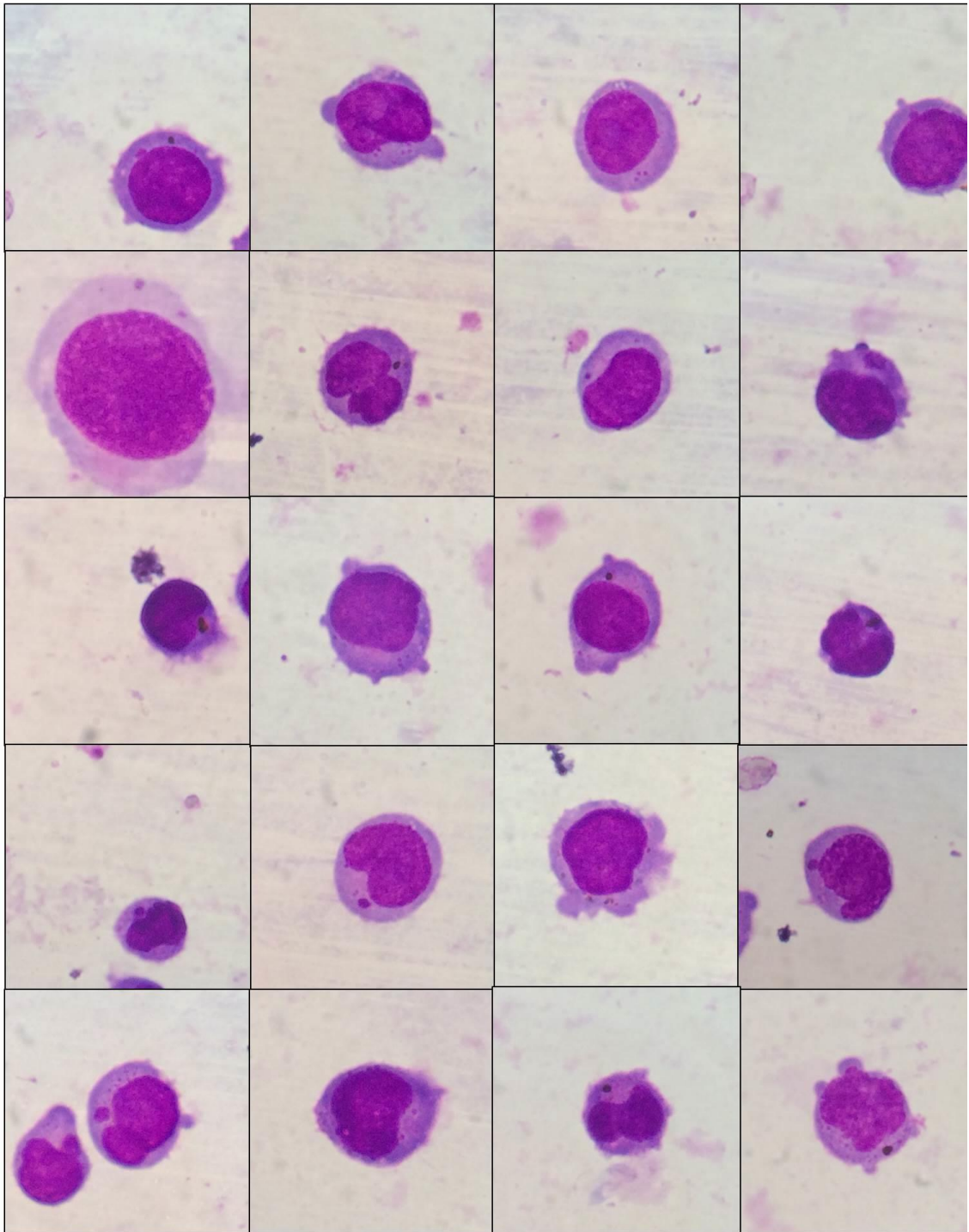


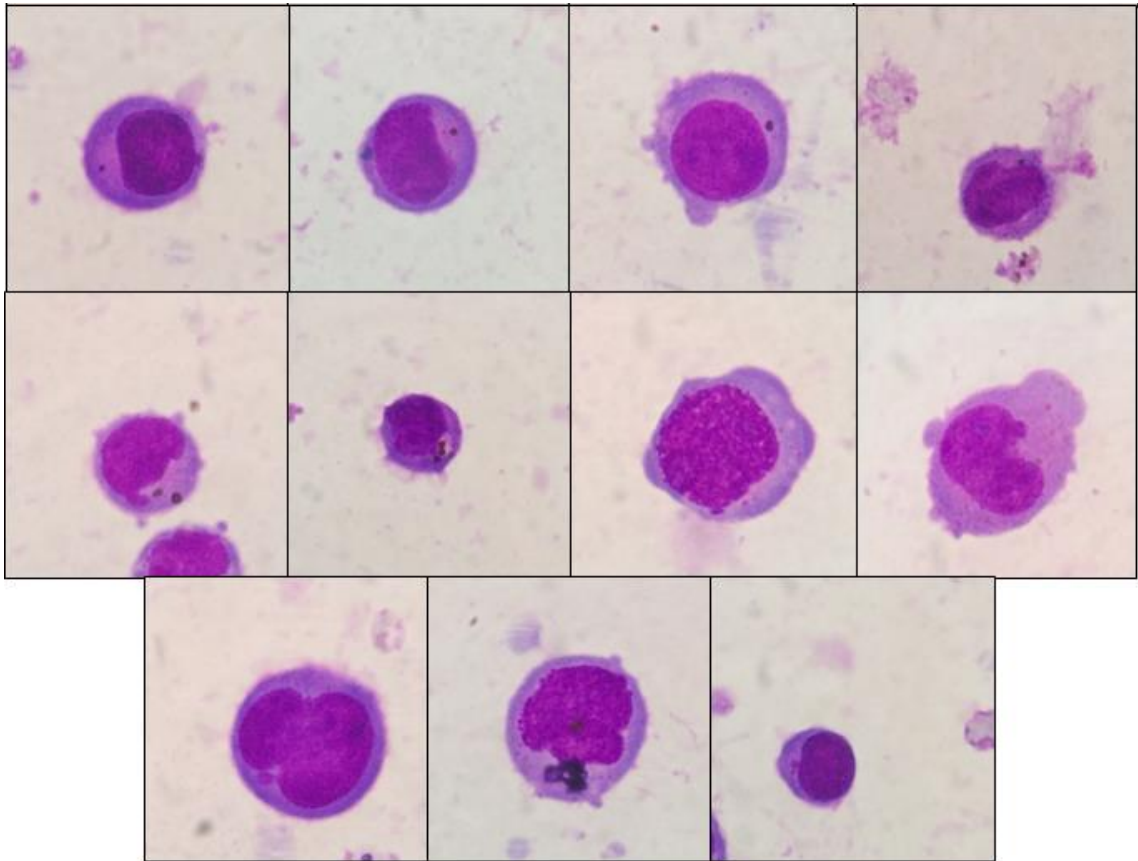


เมื่อเวลาผ่านไป 45 ชั่วโมง



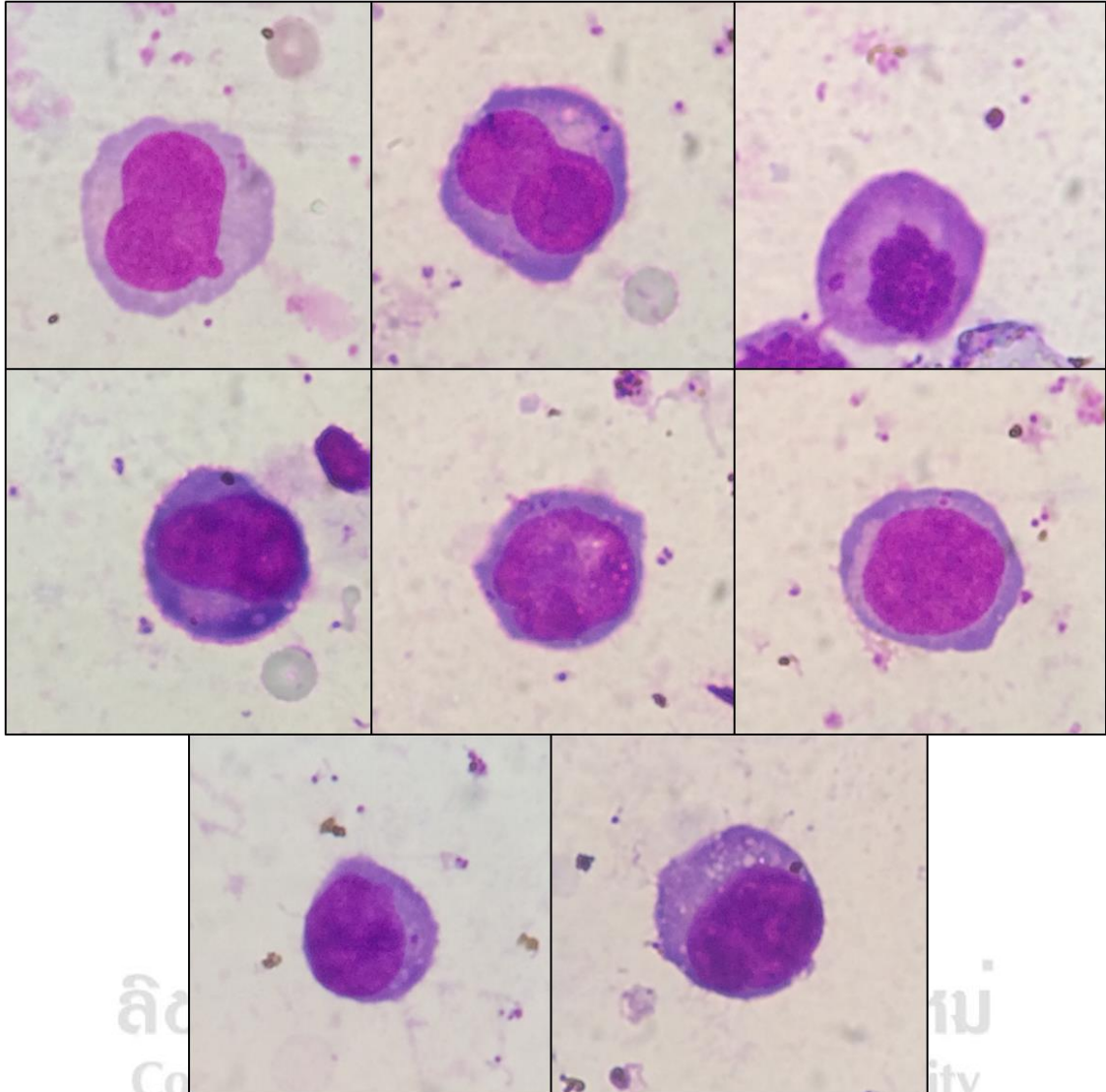
เมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง





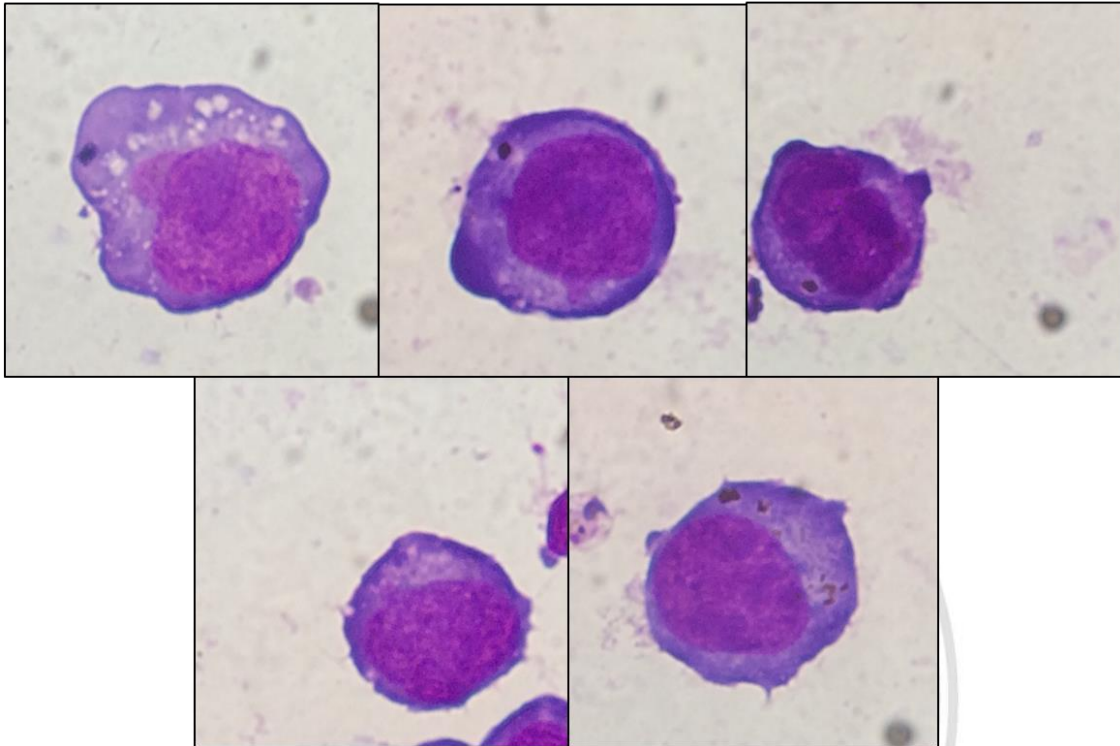
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. ผลการตรวจพบเชื้อพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัมและสิ่งทีคาดว่าน่าจะเป็นตัวเชื้อในเซลล์เชื้อสาย
มะเร็งเม็ดเลือดแดงชนิด K562
เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง

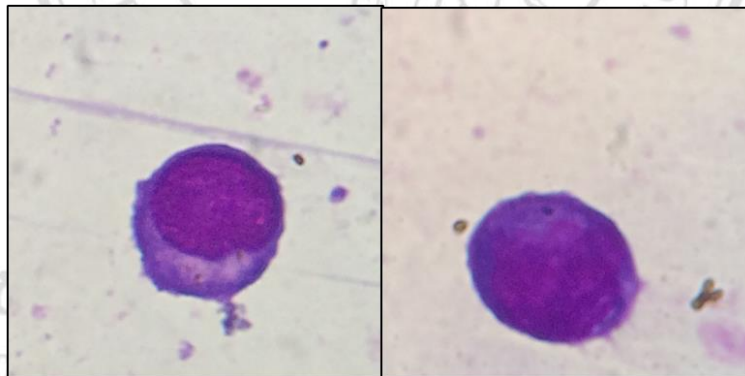


ลิขสิทธิ์
Copyright
All rights reserved

เมื่อเวลาผ่านไป 45 ชั่วโมง



เมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง



ลิขสิทธิ์
Copyright © 2014
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นายกัมปนาท พรหม โลก
วัน เดือน ปีเกิด	5 เมษายน 2537
สถานที่เกิด	จังหวัดเชียงใหม่
ประวัติการศึกษา	ปีการศึกษา 2554 สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษา โรงเรียนยุพราชวิทยาลัย จังหวัดเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2558 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ทุนการศึกษา	ปีการศึกษา 2552-2561 โครงการพัฒนาและส่งเสริมผู้มีความสามารถพิเศษ ทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (พสวท.)



รับมหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved