

2. การศึกษาผลของ Ribavirin ร่วมกับ Dithiouracil (DTU) ต่อการเจริญเติบโตและการรอดชีวิตของ Protocorm-like bodies (PLBs)

2.1 Mokara Chark Kuan

การเพาะเลี้ยง PLBs ในอาหารเหลวสูตร WS ที่ดัดแปลงโดยใช้ Ribavirin เข้มข้น 0.075 มิลลิโมลาร์ นาน 3 สัปดาห์ หรือ Ribavirin เข้มข้น 0.125 มิลลิโมลาร์ นาน 1 สัปดาห์ แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ที่มี DTU เข้มข้น 0.15, 0.20, หรือ 0.25 มิลลิโมลาร์ พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม Ribavirin ทั้งสองความเข้มข้น ครบ 1 สัปดาห์ PLBs ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม Ribavirin เข้มข้น 0.075 มิลลิโมลาร์ ยังคงมีสีเขียวสดใส ขณะที่ PLBs ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม Ribavirin เข้มข้น 0.125 มิลลิโมลาร์ มีสีเขียวอ่อนลงเล็กน้อย (ภาพที่ 6)

เมื่อเปลี่ยนอาหารครั้งที่ 2 คือ หลังจากที่เพาะเลี้ยง PLBs ในอาหารที่เติม Ribavirin เข้มข้น 0.075 มิลลิโมลาร์ นาน 2 สัปดาห์ PLBs เริ่มมีสีเขียวอ่อนถึงสีเขียวอ่อนอมเหลือง ส่วน PLBs ที่เพาะเลี้ยงในอาหารซึ่งเติม Ribavirin เข้มข้น 0.125 มิลลิโมลาร์ ครบ 1 สัปดาห์ แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม DTU ทุกความเข้มข้น นาน 10 วัน (PLBs ได้รับสารกำจัดวัชกรรม 17 วัน) มีสีเขียวอ่อนอมเหลือง ขณะที่ PLBs ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรปกติยังคงมีสีเขียวสดใส และเมื่อเปลี่ยนอาหารครั้งที่ 3 คือ ย้าย PLBs จากอาหารที่มี Ribavirin เข้มข้น 0.125 มิลลิโมลาร์ ไปเพาะเลี้ยงในอาหารซึ่งเติม DTU ทุกความเข้มข้น นาน 20 วัน (PLBs ได้รับสารกำจัดวัชกรรม 27 วัน) พบว่า PLBs มีสีเขียวอ่อนอมเหลือง บางก้อนมีสีเขียวอมเหลืองคล้ำ สำหรับ PLBs ที่เพาะเลี้ยงในอาหารซึ่งเติม Ribavirin เข้มข้น 0.075 มิลลิโมลาร์ ครบ 3 สัปดาห์ มีสีเขียวอ่อนอมเหลืองถึงสีเขียวคล้ำ และมีบางก้อนมีสีเขียวซีดมาก ส่วน PLBs ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรปกติ นาน 21 วัน ยังคงมีสีเขียวอ่อนสดใสและขนาดใหญ่ขึ้น แต่มีบางส่วนที่มีสีซีดและสีคล้ำปนอยู่

หลังจากย้าย PLBs ซึ่งเคยเพาะเลี้ยงในอาหารอาหารที่มี Ribavirin เข้มข้น 0.075 มิลลิโมลาร์ นาน 3 สัปดาห์ ไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่เติม DTU เข้มข้น 0.15 มิลลิโมลาร์ ครบ 10 วัน (PLBs ได้รับสารกำจัดวัชกรรม 31 วัน) พบว่า PLBs มีสีเขียวอมเหลืองซีด บางส่วนมีสีเขียวอมเหลืองคล้ำ และบางส่วนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ส่วน PLBs ซึ่งย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม DTU เข้มข้น 0.20 มิลลิโมลาร์ และ 0.25 มิลลิโมลาร์ มีสีเขียวอ่อนอมเหลือง บางก้อนมีสีเหลืองจนถึงสีน้ำตาล สำหรับ PLBs ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรปกติ นาน 31 วัน ส่วนใหญ่ยังคงมีสีเขียวสดใส

และบางก้อนเริ่มมีสีเขียวซีดเล็กน้อย แต่เริ่มมีการสร้าง PLBs ใหม่รุ่นที่ 1 (C_1 -PLBs) ส่วน PLBs ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม Ribavirin เข้มข้น 0.125 มิลลิโมลาร์ ครบ 1 สัปดาห์ แล้วย้ายมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่เติม DTU เข้มข้น 0.15 มิลลิโมลาร์ ครบ 30 วัน (PLBs ได้รับสารกำจัดไวรัสรวม 37 วัน) มีสีเขียวอ่อนอมเหลืองและมีบางส่วนของก้อน PLBs มีสีน้ำตาล บางก้อนมีสีเขียวเหลืองอมน้ำตาล โดยยังไม่มีการสร้าง C_1 -PLBs ส่วน PLBs ที่ย้ายจากอาหารซึ่งเติม Ribavirin เข้มข้น 0.125 มิลลิโมลาร์ ไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม DTU เข้มข้น 0.20 มิลลิโมลาร์ มีสีเขียวถึงสีเขียวอ่อนอมเหลือง และบางส่วนของก้อน PLBs มีสีน้ำตาลซีดจนถึงสีดำปนอยู่ในก้อนเดียวกัน สำหรับ PLBs ที่ย้ายจากอาหารซึ่งเติม Ribavirin เข้มข้น 0.125 มิลลิโมลาร์ ไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม DTU เข้มข้น 0.25 มิลลิโมลาร์ มีสีเขียวอ่อนอมเหลืองซีดและบางก้อนที่มีสีน้ำตาลแทรกอยู่ในก้อนเดียวกัน บางก้อนเริ่มมีสีน้ำตาล โดยไม่มีการสร้าง C_1 -PLBs (ภาพที่ 6)

หลังจากย้าย PLBs ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม Ribavirin เข้มข้น 0.075 มิลลิโมลาร์ ครบ 3 สัปดาห์ ไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่เติม DTU เข้มข้น 0.15 มิลลิโมลาร์ นาน 20 วัน (PLBs ได้รับสารกำจัดไวรัสรวม 41 วัน) PLBs มีสีเขียวอ่อนอมเหลือง บางก้อนมีส่วนสีน้ำตาลปนอยู่ ส่วน PLBs ที่ย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารซึ่งเติม DTU เข้มข้น 0.20 มิลลิโมลาร์ มีสีเขียวอ่อนอมเหลืองจนถึงน้ำตาล บางก้อนมีบางส่วนของสีน้ำตาลปนอยู่ และบางก้อนมีสีน้ำตาลทั้งก้อน สำหรับ PLBs ที่ย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารซึ่งเติม DTU เข้มข้น 0.25 มิลลิโมลาร์ ส่วนใหญ่มีสีเขียวอ่อนอมเหลือง และมีบางส่วนของสีน้ำตาลปนอยู่ บางก้อนมีสีน้ำตาล ขณะที่ PLBs ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรปกติ นาน 41 วัน ส่วนใหญ่ยังคงมีสีเขียวสดและมี C_1 -PLBs เพิ่มมากขึ้น มีบางก้อนมีสีเขียวซีด ส่วน PLBs ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม Ribavirin เข้มข้น 0.125 มิลลิโมลาร์ ครบ 1 สัปดาห์ แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่เติม DTU เข้มข้น 0.15 มิลลิโมลาร์ นาน 40 วัน (PLBs ได้รับสารกำจัดไวรัสรวม 47 วัน) มีสีเขียวอ่อนอมเหลืองและมีบางส่วนของสีน้ำตาล บางก้อนมีสีเขียวอมน้ำตาลอ่อนและน้ำตาล ส่วน PLBs ที่ย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม DTU เข้มข้น 0.20 มิลลิโมลาร์ มีสีเขียวอ่อนอมเหลืองซีดและมีบางส่วนของสีน้ำตาล บางก้อนมีสีน้ำตาลทั้งก้อน สำหรับ PLBs ที่ย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม DTU เข้มข้น 0.25 มิลลิโมลาร์ มีสีเขียวอมเหลืองถึงเหลืองซีด และบางส่วนของสีน้ำตาล มีบางก้อนมีสีน้ำตาลทั้งก้อน

หลังจากที่เพาะเลี้ยง PLBs ในอาหารซึ่งเติม Ribavirin เข้มข้น 0.075 มิลลิโมลาร์ ครบ 3 สัปดาห์ แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่เติม DTU เข้มข้น 0.15 มิลลิโมลาร์ นาน 30 วัน (PLBs ได้รับสารกำจัดไวรัสรวม 51 วัน) PLBs มีสีเขียวอมเหลืองมีบางส่วนของสีน้ำตาลปนอยู่โดยก้อนที่มี

สีน้ำตาลมีการเพิ่มจำนวนขึ้น ส่วน PLBs ที่ย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารซึ่งเติม DTU เข้มข้น 0.20 มิลลิโมลาร์ มีสีเขียวอมเหลืองมีบางส่วนมีสีน้ำตาลมากขึ้นและมีก้อนที่มีสีน้ำตาลมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น สำหรับ PLBs ที่ย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารซึ่งเติม DTU เข้มข้น 0.25 มิลลิโมลาร์ ส่วนใหญ่มีสีเขียวอ่อนอมเหลืองซีด บางก้อนมีสีเขียวอมเหลืองและมีส่วนที่มีสีน้ำตาลปนอยู่ ขณะที่ PLBs ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรปกติ 51 วัน ยังคงมีสีเขียวสดใส มีขนาดใหญ่ขึ้นและแตกออกเป็นก้อนย่อยและมีการสร้าง PLBs ใหม่เพิ่มมากขึ้น บางก้อนมีสีเขียวซีด ส่วน PLBs ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม Ribavirin เข้มข้น 0.125 มิลลิโมลาร์ ครบ 1 สัปดาห์ แล้วย้ายมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่เติม DTU นาน 50 วัน (PLBs ได้รับสารกำจัดไวรัสรวม 57 วัน) พบว่า PLBs ที่ย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารซึ่งเติม DTU เข้มข้น 0.15 มิลลิโมลาร์ มีสีเขียวอ่อนซีดอมเหลืองและมีปนส่วนมีสีน้ำตาล ซึ่ง PLBs ที่มีสีน้ำตาลยังไม่เพิ่มจำนวนแต่มีสีเข้มขึ้น ขณะที่ PLBs ซึ่งย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม DTU เข้มข้น 0.20 มิลลิโมลาร์ มีสีเขียวอ่อนอมเหลืองซีดและมีบางส่วนมีสีน้ำตาลปนอยู่มากขึ้น บางก้อนมีสีน้ำตาล สำหรับ PLBs ซึ่งย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารซึ่งเติม DTU เข้มข้น 0.25 มิลลิโมลาร์ ส่วนใหญ่มีสีเขียวซีดอมเหลืองและมีบางส่วนมีสีน้ำตาลปนอยู่มากขึ้น บางก้อนมีสีน้ำตาลทั้งก้อน (ภาพที่ 6)

หลังจากเพาะเลี้ยง PLBs ในอาหารซึ่งเติม Ribavirin เข้มข้น 0.075 มิลลิโมลาร์ ครบ 3 สัปดาห์ แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่เติม DTU เข้มข้น 0.15 มิลลิโมลาร์ นาน 40 วัน (PLBs ได้รับสารกำจัดไวรัสรวม 61 วัน) PLBs มีสีเขียวอ่อนซีดอมเหลืองมากขึ้นและมีบางส่วนมีสีน้ำตาลปนอยู่มากขึ้น และมี PLBs สีน้ำตาลทั้งก้อนเพิ่มมากขึ้น ส่วน PLBs ที่ย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารซึ่งเติม DTU เข้มข้น 0.20 มิลลิโมลาร์ มีสีเขียวอ่อนซีดอมเหลืองมากขึ้นและมีบางส่วนมีสีน้ำตาลปนอยู่มากขึ้น และมี PLBs สีน้ำตาลทั้งก้อนเพิ่มมากขึ้น สำหรับ PLBs ที่ย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารซึ่งเติม DTU เข้มข้น 0.25 มิลลิโมลาร์ มีสีเหลืองซีดและมีส่วนสีน้ำตาลเพิ่มขึ้น รวมทั้งมี PLBs ที่มีสีน้ำตาลทั้งก้อนเพิ่มมากขึ้น ขณะที่ PLBs ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรปกติ 61 วัน ยังคงมีสีเขียวสดใส มีขนาดใหญ่ขึ้นและแตกออกเป็นก้อนย่อยและมีการสร้าง C₁-PLBs เพิ่มจนครบทุกก้อน ส่วน PLBs ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม Ribavirin เข้มข้น 0.125 มิลลิโมลาร์ ครบ 1 สัปดาห์ แล้วย้ายมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่เติม DTU เข้มข้น 0.15 มิลลิโมลาร์ นาน 60 วัน (PLBs ได้รับสารกำจัดไวรัสรวม 67 วัน) มีสีเขียวอ่อนอมเหลืองซีดและมีส่วนที่มีสีน้ำตาลปนอยู่มากขึ้น PLBs ที่มีสีน้ำตาลไม่เพิ่มจำนวนแต่มีสีเข้มขึ้น ขณะที่ PLBs ซึ่งย้ายจากอาหารที่มี Ribavirin เข้มข้น 0.125 มิลลิโมลาร์ ไปเพาะเลี้ยงในอาหารซึ่งเติม DTU เข้มข้น 0.20 มิลลิโมลาร์ มีสีเขียวซีดอมเหลืองมากขึ้นและมีส่วนสีน้ำตาลเพิ่มขึ้น รวมทั้งมี PLBs ที่มีสีน้ำตาลทั้งก้อนเพิ่มมากขึ้น สำหรับ PLBs ที่ย้ายจาก

อาหารซึ่งมี Ribavirin เข้มข้น 0.125 มิลลิโมลาร์ ไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่เดิม DTU เข้มข้น 0.25 มิลลิโมลาร์ มีสีเขียวซีดอมเหลืองมากขึ้นและ PLBs บางก้อนปนส่วนสีน้ำตาล โดยมี PLBs ที่มีสีน้ำตาลทั้งก้อนเพิ่มมากขึ้น

หลังจากเพาะเลี้ยง PLBs ในอาหารที่เดิม Ribavirin เข้มข้น 0.075 มิลลิโมลาร์ ครบ 3 สัปดาห์ แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่เดิม DTU เข้มข้น 0.15 มิลลิโมลาร์ นาน 50 วัน (PLBs ได้รับสารกำจัดไวรัสรวม 71 วัน) มีจำนวน PLBs ที่มีสีเหลืองและสีน้ำตาลทั้งก้อนเพิ่มมากขึ้น ส่วน PLBs ที่ย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารซึ่งเดิม DTU เข้มข้น 0.20 มิลลิโมลาร์ มีสีเหลืองซีด และมี PLBs ที่มีสีน้ำตาลทั้งก้อนเพิ่มมากขึ้น สำหรับ PLBs ที่ย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารซึ่งเดิม DTU เข้มข้น 0.25 มิลลิโมลาร์ นั้น มีสีเหลืองซีดอมเขียวอ่อน และมี PLBs ที่มีสีน้ำตาลทั้งก้อนเพิ่มมากขึ้น ขณะที่ PLBs ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรปกติ 71 วัน ยังคงมีสีเขียวสดใส ขนาดใหญ่ขึ้นและแตกออกเป็นก้อนย่อยและมีการสร้าง C_1 -PLBs เพิ่มจนครบทุกก้อน ส่วน PLBs ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารที่เดิม Ribavirin เข้มข้น 0.125 มิลลิโมลาร์ ครบ 1 สัปดาห์ แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่เดิม DTU เข้มข้น 0.15 มิลลิโมลาร์ นาน 70 วัน (PLBs ได้รับสารกำจัดไวรัสรวม 77 วัน) ส่วนใหญ่มีสีน้ำตาล บางก้อนยังคงมีสีเหลืองอมเขียว และมี PLBs ที่มีสีน้ำตาลเพิ่มมากขึ้น ส่วน PLBs ซึ่งย้ายจากอาหารที่มี Ribavirin เข้มข้น 0.125 มิลลิโมลาร์ ไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่เดิม DTU เข้มข้น 0.20 มิลลิโมลาร์ ส่วนใหญ่มีสีน้ำตาล บางก้อนยังคงมีสีเหลืองอมเขียว โดยมี PLBs ที่มีสีน้ำตาลทั้งก้อนเพิ่มมากขึ้น สำหรับ PLBs ที่ย้ายจากอาหารที่มี Ribavirin เข้มข้น 0.125 มิลลิโมลาร์ ไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่เดิม DTU เข้มข้น 0.25 มิลลิโมลาร์ ส่วนใหญ่มีสีน้ำตาล โดยมี PLBs บางก้อนที่ยังคงมีสีเหลืองอมเขียว และมี PLBs ที่มีสีน้ำตาลเพิ่มมากขึ้น (ภาพที่ 6)

เมื่อวิเคราะห์ผลของ Ribavirin ร่วมกับ DTU ต่อการเจริญเติบโตด้านน้ำหนักสดเฉลี่ยของ PLBs พบว่า โดยหลังจากเพาะเลี้ยง PLBs ในอาหารที่มี Ribavirin เข้มข้น 0.075 มิลลิโมลาร์ นาน 21 วัน แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารซึ่งมี DTU ทุกความเข้มข้นอีก 50 วัน มีน้ำหนักสดเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ ตั้งแต่เริ่มเพาะเลี้ยงจนถึงสิ้นสุดการทดลอง คือ 71 วัน โดย PLBs ที่ได้รับ Ribavirin เข้มข้น 0.075 มิลลิโมลาร์ แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี DTU เข้มข้น 0.15, 0.20 หรือ 0.25 มิลลิโมลาร์ มีการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักสดเฉลี่ยในแต่ละสัปดาห์ ราว 1.01-1.2, 1.2 และ 1.1 เท่า ตามลำดับ และเพิ่มขึ้นเป็น 3-3.7 เท่า เมื่อสิ้นสุดการทดลอง สำหรับ PLBs ที่ได้รับ Ribavirin เข้มข้น 0.125 มิลลิโมลาร์ แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารซึ่งเดิม DTU ทุกความเข้มข้น ก็มีน้ำหนักสดเฉลี่ยไม่แตกต่างกันตลอดการทดลองเช่นกัน โดย PLBs ที่ได้รับ Ribavirin เข้มข้น 0.125 มิลลิโมลาร์

แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี DTU เข้มข้น 0.15, 0.20 หรือ 0.25 มิลลิโมลาร์ มีน้ำหนักสดเฉลี่ยเพิ่มขึ้นในแต่ละสัปดาห์ อัตราการ 1.24-1.4, 1.2-1.5 และ 1.27-1.42 เท่า และเมื่อสิ้นสุดการทดลอง PLBs มีน้ำหนักสด เพิ่มขึ้นเป็น 2.9, 2.99 และ 3.16 เท่า ตามลำดับ ทั้งนี้พบว่า PLBs ที่ได้รับ Ribavirin เข้มข้น 0.125 มิลลิโมลาร์ และ DTU เข้มข้น 0.25 มิลลิโมลาร์ มีน้ำหนักสดเฉลี่ยสูงที่สุด (ตารางที่ 5)

เห็นได้ว่า PLBs ทั้งที่ได้รับ Ribavirin เข้มข้น 0.075 หรือ 0.125 มิลลิโมลาร์ ก่อนย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี DTU เข้มข้น 0.15, 0.20 หรือ 0.25 มิลลิโมลาร์ มีน้ำหนักสดเฉลี่ยเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ ในลักษณะของเส้นโค้ง โดยจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรกและมีอัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักสดค่อนข้างคงที่ในช่วงหลังของการทดลอง (ภาพที่ 7)

PLBs ที่เพาะเลี้ยงในอาหารซึ่งมี Ribavirin เข้มข้น 0.125 มิลลิโมลาร์ นาน 1 สัปดาห์แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารซึ่งเติม DTU ทุกความเข้มข้น มีอัตราการรอดชีวิตไม่แตกต่างกันทางสถิติตลอดการทดลอง ทั้งนี้ PLBs มีอัตราการรอดชีวิตลดลงหลังจากทำการเพาะเลี้ยงนาน 37 วัน (ตารางที่ 6) ซึ่งเห็นได้ว่า หลังจากเพาะเลี้ยง PLBs ในอาหารที่มี Ribavirin เข้มข้น 0.125 มิลลิโมลาร์ แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารซึ่งเติม DTU ทุกความเข้มข้น นานเกิน 27 วัน PLBs มีอัตราการรอดชีวิตลดลงอย่างชัดเจน และเมื่อเพาะเลี้ยงเวลานานขึ้น ทำให้ PLBs ยังมีอัตราการรอดชีวิตใกล้เคียงกันและลดลงเรื่อย ๆ จนสิ้นสุดการทดลองคือครบ 77 วัน (ภาพที่ 8)