

24 JAN 2003



**IN VITRO CULTIVATION OF GAMETOCYTE-PRODUCING
STRAINS OF *PLASMODIUM FALCIPARUM* AND THE
ASSESSMENT OF THEIR SENSITIVITY TO
GAMETOCYTOCIDAL COMPOUNDS**

SUTHEERA ARJCHAROEN

๒

**With compliments
of**

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (MICROBIOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2002**

ISBN 974-04-2403-1

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
S966u
2002
c.2

Copyright by Mahidol University

4136993 SCMI/M : MAJOR : MICROBIOLOGY ; M.Sc. (MICROBIOLOGY)

KEY WORDS : *PLASMODIUM FALCIPARUM* / GAMETOCYTE / *IN VITRO* CULTIVATION / GAMETOCYTOCIDAL ACTIVITY

SUTHEERA ARJCHAROEN : *IN VITRO* CULTIVATION OF GAMETOCYTE-PRODUCING STRAINS OF *PLASMODIUM FALCIPARUM* AND THE ASSESSMENT OF THEIR SENSITIVITY TO GAMETOCYTOCIDAL COMPOUNDS. THESIS ADVISOR; PEERAPAN TAN-ARIYA Ph.D., PORNTIP PETMITR Ph.D., SUREEMAS BUATES Ph.D., SUPATRA THONGRUNGKIAT M.Sc. 157p. ISBN 974-04-2403-1

Plasmodium falciparum gametocyte-producing strains, i.e. AQ749 and AQ750, from the western border region of Thailand, were successfully established from the total eighteen fresh isolates collected from the patients. The AQ749 strain was sensitive to chloroquine and pyrimethamine but resistant to mefloquine. The AQ750 strain was resistant to chloroquine, pyrimethamine and mefloquine. The induction and maintenance of the gametocytes in the *in vitro* culture were achieved by using hypoxanthine and PIGPA treated erythrocytes. Only the AQ750 strain could be continuously maintained as a gametocyte-producing strain, whereas the AQ749 strain lost its ability to produce gametocyte after 14 months in the culture. Gametocyte stage V of strain AQ750 from the *in vitro* culture could not undergo complete exflagellation. Therefore, the female mosquitoes which had been fed with gametocytes stage V did not get the infection, due to no development of gamete, zygote, oocyst and sporozoite in the stomach. The cultured gametocytes of AQ750 strain were used for assessment of their drug sensitivity to antimalarial drugs and medicinal plant extracts. Artesunate and dihydroartemisinin exhibited higher gametocytocidal activity than primaquine and tafenoquine (IC_{50} of artesunate: dihydroartemisinin: primaquine: tafenoquine = 0.00163 vs 0.009 vs 0.358 vs 3.875 μ M). Among seven medicinal plant extracts used in this study, crude extracts of *S. venosa* (IC_{50} = 0.00149 μ g/ml) showed the highest gametocytocidal activity compared with the others (IC_{50} > 2.17 μ g/ml).

This study has provided one multidrug resistant gametocyte-producing strain to be used for screening of new gametocytocidal agents, studying the mode of action or mechanism of drug resistance of gametocytocidal drugs, and ongoing research involving the gametocyte *in vitro*.

4136993 SCMI/M : สาขาวิชา : จุลชีววิทยา วท.ม. (จุลชีววิทยา)

สุธีรา อาจเจริญ : การเพาะเลี้ยงเชื้อพลาสโมเดียมสายพันธุ์ที่สร้างระยะมีเพศและศึกษาความไวของเชื้อต่อสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งระยะมีเพศ (*IN VITRO CULTIVATION OF GAMETOCYTE-PRODUCING STRAINS OF PLASMODIUM FALCIPARUM AND THE ASSESSMENT OF THEIR SENSITIVITY TO GAMETOCYTOCIDAL COMPOUNDS*) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : พีรพรรณ ตันอารีย์, Ph.D., พรทิพย์ เพ็ชรมิตร, Ph.D., สุรียมาศ บัวเทศ, Ph.D., สุพัตรา ทองรุ่งเกียรติ, M.Sc. 157 หน้า. ISBN 974-04-2403-1

จากการศึกษาครั้งนี้ประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพารัมสายพันธุ์ที่สามารถสร้างระยะแกมมีโตไซต์จำนวนสองสายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ AQ749 และ AQ750 โดยใช้เทคนิคการเติมสาร hypoxanthine และการใช้เม็ดเลือดแดงที่ผ่านการผสมกับสารละลาย PIGPA เฉพาะสายพันธุ์ AQ750 เท่านั้นที่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องและยังคงสามารถสร้างระยะแกมมีโตไซต์ได้จนถึงปัจจุบัน ส่วนสายพันธุ์ AQ749 สูญเสียความสามารถในการสร้างระยะแกมมีโตไซต์หลังจากเพาะเลี้ยงไป 14 เดือน เมื่อนำแกมมีโตไซต์ระยะที่ 5 ของสายพันธุ์ AQ750 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงซึ่งเป็นระยะที่จะติดต่อไปสู่ยุงได้มาตรวจหากระบวนการ exflagellation ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าไม่มีแกมมีตเกิดขึ้น ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับการที่ไม่พบระยะแกมมีต, ไซโกต, โอโอซิสต์ และสปอโรซอยต์ ในกระเพาะยุงก้นปล่องเพศเมียที่ได้ทดลองให้กินระยะนี้เข้าไป และในการศึกษาครั้งนี้ยังได้ทำการเพาะเลี้ยงแกมมีโตไซต์ของสายพันธุ์ AQ750 ให้มีแต่ระยะที่ 2 และ 3 แล้วนำไปทดสอบความไวต่อยาพบว่า ยาอาร์ทิซูนเนตและยาไดไฮโดรอาร์ทิมิซินินสามารถออกฤทธิ์ทำลายระยะแกมมีโตไซต์ได้ดีกว่ายาไพโรมาควินและยาทาเฟโนควิน (IC_{50} ของอาร์ทิซูนเนต: ไดไฮโดรอาร์ทิมิซินิน: ไพโรมาควิน: ทาเฟโนควิน = 0.00163 vs 0.009 vs 0.358 vs 3.875 μ M) และจากการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อระยะแกมมีโตไซต์ของสารสกัดจากพืชสมุนไพรพบว่า สารสกัดหยาบที่ได้จากรากของบอระเพ็ดพุงช้าง (IC_{50} = 0.00149 μ g/ml) มีฤทธิ์ต้านเชื้อระยะแกมมีโตไซต์ได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดที่ได้จากสมุนไพรตัวอื่นอีก 6 ชนิดที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ (IC_{50} > 2.17 μ g/ml)

ผลจากการศึกษาในครั้งนี้ทำให้ได้เชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพารัมสายพันธุ์คือต่อยาหลายชนิดที่สามารถสร้างระยะแกมมีโตไซต์ได้อย่างต่อเนื่องในห้องปฏิบัติการ จำนวนหนึ่งสายพันธุ์คือ AQ750 ซึ่งสามารถนำไปใช้เพื่อการศึกษาหายาฆ่าระยะแกมมีโตไซต์ตัวใหม่ ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ หรือกลไกการคือต่อยาที่ออกฤทธิ์ฆ่าระยะแกมมีโตไซต์ และนอกจากนี้ยังสามารถนำไปใช้กับงานวิจัยที่ต้องศึกษาเกี่ยวกับแกมมีโตไซต์ในหลอดทดลอง