

บทนำ

โรคมาลาเรียเป็นโรคติดต่อที่มียุงก้นปล่อง (*Anopheles* spp.) เป็นพาหะ มีสาเหตุมาจาก โปรโตซัวในสกุล *Plasmodium* เชื้อมาลาเรียที่ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์มีด้วยกันอยู่ 4 ชนิด ได้แก่ *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* และ *P. malariae* นอกจากนี้ มีรายงานว่าเชื้อมาลาเรีย *P. knowlesi* ที่มีการระบาดในลิงสามารถก่อให้เกิดโรคมาลาเรียในมนุษย์ได้เช่นกัน โรคมาลาเรียเป็นโรคระบาดเขตร้อนที่มีความสำคัญอันดับต้น ๆ เนื่องจากมีผู้ป่วยด้วยโรคมาลาเรียมากกว่า 300 ล้านคนและเสียชีวิตมากกว่า 1 ล้านคนต่อปี (Murry et al., 2012) ปัญหาในการควบคุมโรคมาลาเรียมีหลายสาเหตุ ส่วนหนึ่งเกิดจากการขาดแคลนวัคซีนที่มีประสิทธิภาพ การระบาดของเชื้อมาลาเรียดื้อยาและการใช้ยาปลอมในพื้นที่ระบาดของโรคมาลาเรีย ทำให้ปัญหาการระบาดของโรคมาลาเรียมีแนวโน้มสูงขึ้นและทวีความรุนแรงเพิ่มขึ้น ดังนั้นงานวิจัยเพื่อการพัฒนาวัคซีนโรคมาลาเรียใหม่ที่มีประสิทธิภาพ ราคาถูกและปลอดภัยจึงเป็นสิ่งสำคัญเพื่อการรักษาและป้องกันโรคมาลาเรียอย่างได้ผล

การทดสอบความปลอดภัยและการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารต้านมาลาเรียในสัตว์ทดลอง เป็นวิธีหนึ่งที่จะช่วยให้นักวิจัยและแพทย์ทราบข้อมูลเบื้องต้นก่อนที่จะนำสารเคมีมาทดสอบรักษาโรคมาลาเรียในมนุษย์ ในปัจจุบันมีเชื้อมาลาเรียที่พบในสัตว์มีกระดูกสันหลังต่าง ๆ มากกว่า 170 ชนิด (Garnham, 1966) ในจำนวนนี้มีเชื้อมาลาเรีย 4 ชนิด ได้แก่ *P. berghei*, *P. chabaudi*, *P. vinckei* และ *P. yoelii* ที่ได้รับการพัฒนาให้เจริญเติบโตได้ดีในหนูไมซ์ (*Mus musculus*) และยุงก้นปล่อง (*Anopheles stephensi*) ในห้องปฏิบัติการ (Landau and Boulard, 1978) เนื่องจากหนูไมซ์เป็นสัตว์ที่เลี้ยงง่าย

และเชื้อมาลาเรียในหนูไมซ์เหล่านี้ไม่สามารถติดต่อมาสู่มนุษย์ โรคมาลาเรียในหนูไมซ์จึงมีความปลอดภัยและมีประโยชน์ในงานวิจัยหลายด้าน ได้แก่ การศึกษาชีววิทยาพื้นฐานของเชื้อมาลาเรีย การศึกษาบทบาทของระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ให้อาศัย (host immune responses) ปฏิสัมพันธ์ของเชื้อมาลาเรียกับสัตว์ให้อาศัย (host-parasite interaction) การศึกษาอาการและการรักษาโรคมาลาเรียชนิดรุนแรง (severe malaria) และการตายซึ่งมีสาเหตุจากโรคมาลาเรีย ตลอดจนใช้เป็นโมเดลเพื่อทดสอบความปลอดภัยและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารเคมีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียในระยะต่าง ๆ (chemotherapy) การศึกษาในหัวข้อเหล่านี้จะทำได้ยากเมื่อใช้เชื้อมาลาเรียในมนุษย์เนื่องจากจำเป็นต้องใช้เซลล์ของมนุษย์ในเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียเพื่อการทดลอง บทความวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเผยแพร่ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับวงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรียในหนูไมซ์ ประโยชน์และวิธีการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อมาลาเรียในหนูไมซ์ในระยะต่าง ๆ ข้อมูลเหล่านี้จะเป็นประโยชน์แก่นักวิจัยในการนำไปประยุกต์ใช้ทดสอบและคัดเลือกสารเคมีที่มีความปลอดภัยและมีประสิทธิภาพสูงก่อนนำไปทดสอบรักษาผู้ป่วยโรคมาลาเรียในอนาคต

วงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรียในหนูไมซ์ สัตว์ทดลอง

เชื้อมาลาเรียในสัตว์ฟันแทะตามธรรมชาติจะพบในหนูที่อาศัยอยู่บนต้นไม้ (*Thomomys rutilans* และ *Grammomys surdaster*) มีถิ่นกำเนิดในหลายประเทศในเขตแอฟริกาตอนกลางและได้รับการปรับให้เจริญในหนูไมซ์ วงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรียในหนูไมซ์แบ่งออกเป็น 2 ระยะ ได้แก่ วงจรชีวิตในหนูไมซ์ (M.

musculus) และวงจรชีวิตในยุงก้นปล่อง (*A. stephensi*) (รูปที่ 1) ในการศึกษาในห้องปฏิบัติการ เชื้อมาลาเรียสามารถแพร่เข้าสู่หนูไม่ซีโดยมียุงก้นปล่อง เพศเมียเป็นพาหะ

การเจริญของเชื้อมาลาเรียในหนูไม่ซีเริ่มต้นระหว่างที่ยุงดูดเลือด โดยสปอโรซอยต์ (sporozoite) จะ เคลื่อนที่จากต่อมน้ำลายของยุงก้นปล่องเข้าสู่ชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันใต้ผิวหนัง ขณะที่เชื้อมาลาเรียส่วนใหญ่จะตายระหว่างเคลื่อนที่เข้าสู่หลอดเลือดฝอยหรือถูกทำลายโดยเซลล์เม็ดเลือดขาว เชื้อมาลาเรียอีกส่วนจะสามารถเคลื่อนที่ผ่านผนังหลอดเลือดฝอยเข้าสู่กระแสเลือดและเคลื่อนที่ต่อไปยังตับและเจริญภายในเซลล์ตับ (hepatocyte) นอกจากนี้เชื้อมาลาเรียบางส่วนสามารถเจริญในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) ภายในชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Gueirard et al., 2010; Rankin et al., 2010) สปอโรซอยต์ในเซลล์ตับและเซลล์ไฟโบรบลาสต์จะเปลี่ยนแปลงรูปร่างและแบ่งตัวแบบไม่อาศัยเพศแบบเมอโรโกนี (merogony) ซึ่งหมายถึงการแบ่งเซลล์เพื่อสร้างเชื้อมาลาเรียใหม่ในระยาะเมอโรซอยต์ (merozoites) การเจริญของเชื้อมาลาเรียในตับหรือในชั้นเนื้อเยื่อใต้ผิวหนัง (pre-erythrocytic stage development) จะใช้เวลาเฉลี่ยประมาณ 48-50 ชม. เมื่อเมอโรซอยต์เจริญเต็มที่ จะทำให้เซลล์เจ้าบ้านแตก ปล่อยให้เมอโรซอยต์กลับเข้าสู่กระแสเลือด และเชื้อมาลาเรียจะเข้าสู่วงจรการเจริญในระยาะเม็ดเลือดแดง (erythrocytic stage development) (Sinden, 1978) ในขั้นต่อไป

วงจรการเจริญของเชื้อมาลาเรียในระยาะเม็ดเลือดแดง (erythrocytic stage development) จัดว่าเป็นระยะที่มีความสำคัญเนื่องจากก่อให้เกิดพยาธิสภาพของโรคมาลาเรีย สามารถแบ่งออกเป็น 4 ระยะย่อย ได้แก่ ระยาะวงแหวน (ring form) โทรโฟซอยต์

(trophozoite) ไชซอนท์ (schizont) และเมอโรซอยต์ (merozoites) ตามลำดับ การเจริญของเชื้อมาลาเรียในเซลล์เม็ดเลือดแดงเริ่มต้นเมื่อเมอโรซอยต์สัมผัสกับเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงและเคลื่อนที่เข้าสู่ภายในเซลล์เม็ดเลือด เยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงส่วนหนึ่งจะหุ้มเมอโรซอยต์เป็นถุงเรียกว่า parasitophorous vacuole ซึ่งจะมีหน้าที่เป็นทางผ่านเข้าออกของสารอาหาร และเมื่อสังเกตได้กล้องจุลทรรศน์เชื้อมาลาเรียจะมีรูปร่างคล้ายกับวงแหวนจึงเรียกเชื้อมาลาเรียในระยาะนี้ว่า ระยาะวงแหวน ต่อไปเชื้อมาลาเรียจะกลายเป็นโทรโฟซอยต์ ซึ่งเป็นระยะที่มีการนำสารอาหารเข้าสู่เซลล์ไปสร้างพลังงานและสารชีวโมเลกุลเพื่อใช้ในกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไม่อาศัยเพศแบบเมอโรโกนี เมื่อสังเกตได้กล้องจุลทรรศน์เชื้อมาลาเรียจะมีไซโทพลาสซึมขนาดใหญ่เมื่อเทียบกับขนาดของเซลล์ และหลังจากที่เชื้อมาลาเรียแบ่งเซลล์แบบไม่อาศัยเพศอย่างสมบูรณ์ เชื้อมาลาเรียจะพัฒนาเป็นไชซอนท์ ซึ่งจะพบนิวเคลียสเป็นจำนวนตั้งแต่ 16-32 นิวเคลียสภายในหนึ่งเซลล์ นิวเคลียสเหล่านี้จะมีเยื่อหุ้มเซลล์มาล้อมรอบอีกชั้นหนึ่ง และพัฒนากลายเป็นเชื้อมาลาเรียใหม่หรือเมอโรซอยต์ ต่อไปเมอโรซอยต์เหล่านี้จะทำให้เม็ดเลือดแดงแตกและถูกปล่อยออกจากมาสู่กระแสเลือดและจะเริ่มวงจรการเจริญของเชื้อมาลาเรียในระยาะเม็ดเลือดแดงในเซลล์เม็ดเลือดแดงถัดไป การเจริญของเชื้อมาลาเรียในระยาะเม็ดเลือดแดงจะใช้เวลาเฉลี่ยประมาณ 22-24 ชม.

เชื้อมาลาเรียในหนูไม่ซีมีความหลากหลายทางพันธุกรรม รูปแบบการเจริญในระยาะเม็ดเลือดแดง ความรุนแรงของโรค และการตอบสนองต่อยาต้านมาลาเรียชนิดต่าง ๆ (Pattaradilokrat et al., 2009; Li et al., 2011) (ตารางที่ 1) เชื้อมาลาเรียชนิด *P. yoelii yoelii* สายพันธุ์ 17XNL และ *P. chabuai* สาย

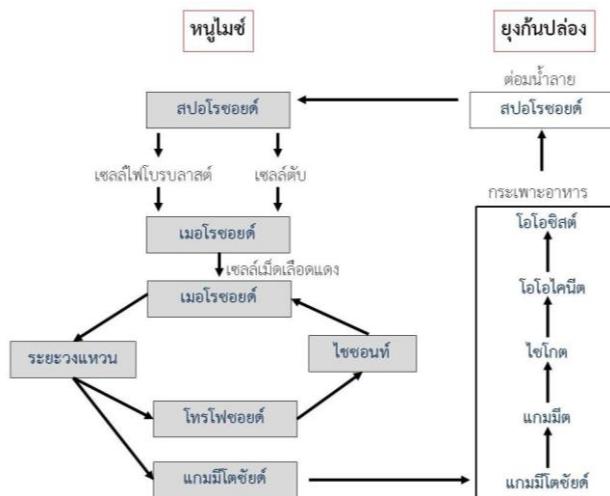
พันธุ์ AS เป็นเชื้อมาลาเรียชนิดไม่รุนแรงและสามารถถูกกำจัดได้โดยระบบภูมิคุ้มกันของหนูโมซัง จึงมีประโยชน์อย่างมากในงานวิจัยเกี่ยวกับกลไกสร้างภูมิคุ้มกันและการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย (Stevenson and Riley, 2004) ในขณะที่เชื้อมาลาเรียบางสายพันธุ์ก่อโรคมาลาเรียในหนูชนิดรุนแรงทำให้หนูโมซังตายอย่างรวดเร็ว เช่น *P. yoelii yoelii* สายพันธุ์ YM และ *P. yoelii nigeriensis* สายพันธุ์ N67 จึงเป็นสายพันธุ์เชื้อมาลาเรียที่นิยมใช้ทดสอบประสิทธิภาพของยาต้านมาลาเรียและวัคซีน (Pattaradilokrat et al., 2009; Li et al., 2011, Eastman et al., 2013)

นอกจากนี้เชื้อมาลาเรียยังสามารถที่จะพัฒนาเป็นเซลล์สร้างเซลล์สืบพันธุ์หรือแกมมาโตซัยต์ (gametocyte) ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 2 เพศคือ เซลล์สร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (male gametocyte) และเซลล์สร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (female gametocyte) ซึ่งจะพัฒนาต่อไปกลายเป็นเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (male gamete) และเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (female gamete) ภายในกระเพาะอาหารของยุง (Sinden, 1978) ตามลำดับ เมื่อเซลล์สืบพันธุ์ทั้งสอง

ชนิดปฏิสนธิจะสร้างไซโกต (zygote) และพัฒนาต่อไปเป็นโอโอไคนิต (ookinete) ซึ่งจะเคลื่อนที่ผ่านผนังกระเพาะอาหารของยุงและเจริญเป็นโอโอซิสต์ (oocyst) ภายใน โอโอซิสต์เชื้อมาลาเรียจะแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (meiosis) เพื่อลดจำนวนโครโมโซมให้เหลือเพียงชุดเดียว (haploid) (Sinden and Hartley, 1985) และจะมีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสเพศแบบสปอโรโกนี (sporogony) เพื่อสร้างสปอโรซอยต์หลังจากที่ยุงได้รับเลือดที่มีเชื้อมาลาเรียประมาณ 9-12 วัน สปอโรซอยต์ในโอโอซิสต์จะพัฒนาสมบูรณ์เต็มที่และเคลื่อนออกจาก โอโอซิสต์ไปยังอวัยวะต่าง ๆ ทั้งนี้สปอโรซอยต์ที่เคลื่อนที่เข้าสู่ต่อมน้ำลายของยุงจะสามารถแพร่พันธุ์ไปสู่หนูโมซังต่อไป เชื้อมาลาเรียในหนูโมซังหลายชนิดมีความแตกต่างกันในการสร้างแกมมาโตซัยต์และการถ่ายสู่ยุงพาหะ โดย *P. yoelii nigeriensis* สายพันธุ์ N67 จัดเป็นเชื้อมาลาเรียที่สามารถสร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้ปริมาณมาก (Qi et al., 2013) จึงมักถูกเลือกเป็นตัวอย่างเพื่อใช้เตรียมระยะเชื้อมาลาเรียในยุงเพื่อทดสอบสารต้านมาลาเรียในระยะแกมมาโตซัยต์และไนตบ (Ramkaran and Peters, 1969)

ตารางที่ 1 ชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อมาลาเรียในหนูโมซังที่นิยมนำมาใช้ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารต้านมาลาเรีย

ชนิด <i>Plasmodium</i>	สายพันธุ์	ความรุนแรงของโรค	การตายของหนูโมซัง	การติดต่อต้านมาลาเรีย	เอกสารอ้างอิง
<i>P. berghei</i>	ANKA	รุนแรง	ภายใน 14 วัน	ไม่มี	Jennings et al., 1998
	NK65	ไม่รุนแรง	ไม่มีการตาย	ไม่มี	Peters and Robinson, 1999
<i>P. y. yoelii</i>	17XNL	ไม่รุนแรง	ไม่มีการตาย	มี chloroquine	Pattaradilokrat et al., 2008
	17XL/YM	รุนแรง	ภายใน 7 วัน	มี chloroquine	Pattaradilokrat et al., 2009
	ART [QMS]	ไม่รุนแรง	ไม่มีการตาย	มี artemisinin	Peters and Robinson, 1999
<i>P. y. nigeriensis</i>	N67	รุนแรง	ภายใน 21 วัน	มี chloroquine	Li et al., 2011
	N67C	รุนแรง	ภายใน 7 วัน	มี chloroquine	Li et al., 2011
	NSM	รุนแรง	ภายใน 21 วัน	มี mefloquine	Li et al., 2011
<i>P. chabaudi</i>	AS	ไม่รุนแรง	ไม่มีการตาย	ไม่มี	Cheesman et al., 2010
	AS (3CQ)	ไม่รุนแรง	ไม่มีการตาย	มี chloroquine	Yuan et al., 2011



รูปที่ 1 ภาพแสดงวงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรียในหนู ระยะการเจริญของเชื้อมาลาเรียในหนูไม่ซ์แสดงในกรอบพื้นหลังสีเทา และระยะการเจริญของเชื้อมาลาเรียในยุงก้นปล่องแสดงในกรอบพื้นหลังสีขาว ดัดแปลงจาก (ที่มา: Pattaradilokrat et al., 2011)

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารต้านมาลาเรียในหนูไม่ซ์

เชื้อมาลาเรียในหนูไม่ซ์เป็นที่นิยมในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารต้านมาลาเรียมากกว่าเชื้อมาลาเรียในสัตว์ทดลองชนิดอื่น ๆ เนื่องจากวงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรียในหนูไม่ซ์มีระยะสั้น สามารถเพิ่มจำนวนได้มากและรวดเร็วในหนูไม่ซ์ (*M. musculus*) และยุงก้นปล่อง (*A. stephensi*) ซึ่งเป็นสัตว์ขนาดเล็ก ดูแลรักษาง่าย นอกจากนี้เชื้อมาลาเรียในหนูไม่ซ์ (*P. berghei*, *P. chabaudi*, *P. vincheki* และ *P. yoelii*) มีความจำเพาะกับสัตว์ฟันแทะเช่น หนูไม่ซ์และหนูแรท (*Rattus norvegicus* และ *Rattus rattus*) (Landau and Boulard, 1978) และไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในคน ดังนั้นจึงมีความปลอดภัยต่อผู้ใช้และสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น ๆ และต่อสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ข้อมูลทางพันธุศาสตร์และจีโนมของเชื้อมาลาเรียในหนูไม่ซ์ เช่น *P. yoelii yoelii* สายพันธุ์ 17XNL และเชื้อมาลาเรียในมนุษย์เช่น *P. falciparum* สายพันธุ์ 3D7 ระบุว่า เชื้อทั้งสองชนิดมีจำนวนโครโมโซม 14 แท่ง

เท่ากันและมียีนที่มีลำดับเบสความคล้ายคลึงกัน (orthologs) มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ของยีนทั้งหมดในจีโนม (Carlton et al., 2004) ดังนั้นการศึกษาหน้าที่การทำงานของยีนต่าง ๆ ตลอดจนโครงสร้างและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารต้านมาลาเรียในหนูไม่ซ์อาจจะช่วยให้นักวิจัยสามารถทำนายผลลัพธ์ที่อาจจะเกิดก่อนที่จะทำการศึกษากับเชื้อมาลาเรียในมนุษย์ได้

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารต้านมาลาเรียแบ่งได้เป็น 3 ประเภทตามระยะเป้าหมายของเชื้อมาลาเรียที่ต้องการศึกษา (Peters, 1987) ในกลุ่มแรกเป็นการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในระยะเม็ดเลือดแดง ซึ่งมีเป้าหมายในการลดพยาธิสภาพและอัตราการตายจากโรคมมาลาเรีย (treatment) ในกลุ่มที่สองเป็นการหาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในระยะแกมมาโตซอइट ซึ่งมีเป้าหมายในการยับยั้งการระบาด (transmission) ของเชื้อมาลาเรียจากมนุษย์หรือสัตว์ทดลองไปสู่พาหะ และในกลุ่มสุดท้ายเป็นการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในระยะเซลล์ตับ ซึ่งมีวัตถุประสงค์ในการป้องกันการเกิดโรคมมาลาเรีย (prophylaxis) หลักการในการทดสอบ

ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารต้านมาลาเรียในระยะต่าง ๆ มีรายละเอียดดังนี้

การทดสอบความปลอดภัยและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารต้านมาลาเรียในระยะเม็ดเลือดแดง

การทดสอบความปลอดภัยของสารต้านมาลาเรียในหนูโมซ (toxicity test) หมายถึง การวัดขนาดของสารทดสอบสูงสุดที่ไม่มีความเป็นพิษ (maximum tolerated dose) ซึ่งวัดได้จากสัดส่วนของหนูโมซที่ได้รับสารทดสอบและแสดงอาการผิดปกติหรือตาย ขั้นตอนแรกเริ่มจากการเตรียมสารทดสอบในตัวทำละลาย (solvent) ที่เหมาะสม เช่น น้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ หรือ dimethyl sulfoxide (DMSO) สำหรับสารทดสอบที่ไม่มีขี้้ว) ที่ระดับขนาดต่าง ๆ กัน โดยจะอยู่ระหว่าง 100-640 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวหนูโมซ (Peters and Robinson, 1999) และขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลายของสารทดสอบ จากนั้นให้สารที่ต้องการทดสอบแก่หนูโมซกลุ่มละ 5 ตัว โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง การฉีดเข้ากระแสเลือด การฉีดเข้าหน้าท้อง หรือทางปากเป็นจำนวนติดต่อกัน 4 ครั้งวันละหนึ่งครั้ง สังเกตการเปลี่ยนแปลงทางพฤติกรรมและอัตราการตายในหนูโมซเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ขนาดของสารทดสอบสูงสุดที่ไม่เป็นอันตรายต่อสัตว์ทดลอง จะเป็นค่าขนาดสูงสุดของสารที่จะนำไปใช้ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของยาต้านมาลาเรียในขั้นตอนต่อไป (Peters and Robinson, 1999)

ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารต้านมาลาเรียในระยะเม็ดเลือดแดงสามารถทำได้ใน 2 ระดับ (Peter, 1987) ได้แก่ การทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (Rane's test) และการวัด

ค่าประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียในระยะเม็ดเลือดแดง (4-day test) การทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียจากคลังสารเคมี ในการทดสอบจะทำการฉีดเชื้อมาลาเรียชนิดรุนแรง เช่น *P. yoelii yoelii* สายพันธุ์ YM แล้ว แบ่งหนูโมซที่ติดเชื้อออกเป็นกลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว จากนั้นในวันที่ 3 หลังจากที่ได้รับเชื้อมาลาเรีย (day 3 post infection) หนูโมซจะได้รับเชื้อมาลาเรีย (day 3 post infection) หนูโมซจะได้รับสารเคมีทดสอบเพียงหนึ่งครั้งที่ขนาดของสารทดสอบสูงสุดที่ไม่เป็นพิษโดยการฉีดหรือการกิน และทำการสังเกตอาการและความรุนแรงของโรคมมาลาเรียในหนูต่อไปเป็นเวลาอีก 7 วัน หากสารทดสอบไม่สามารถยับยั้งการตายของหนูโมซจากเชื้อมาลาเรียถึงร้อยละ 50 จะถือว่าสารทดสอบดังกล่าวไม่มีฤทธิ์ทางชีวภาพหรือไม่ผ่านการทดสอบ ส่วนสารทดสอบที่สามารถป้องกันการตายของหนูจากเชื้อมาลาเรียจะถือว่าสารทดสอบนั้นมีฤทธิ์ทางชีวภาพ และจะนำไปทดสอบต่อไป (Osdene et al., 1967) ส่วนการวัดค่าประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียในระยะเม็ดเลือดแดงมีวัตถุประสงค์เพื่อวัดขนาดของสารทดสอบที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียในหนูได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (effective dose 50, ED₅₀) และ 90 เปอร์เซ็นต์ (effective dose 90, ED₉₀) ตามลำดับ (Peter, 1987) ซึ่งค่าดังกล่าวสามารถนำไปใช้เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารทดสอบประเภทต่าง ๆ ได้ ในการทดสอบเริ่มด้วยการเตรียมหนูโมซที่ได้รับเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์รุนแรงดังที่กล่าวมา จากนั้นเตรียมสารเคมีที่ต้องการทดสอบในช่วงขนาดระหว่าง 0.01-30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อน้ำหนักตัว หรือขนาดของยาสูงสุดในระดับปลอดภัย โดยหนูโมซจะได้รับสารเคมีทดสอบโดยการกินหรือฉีดวันละหนึ่งครั้งเป็นเวลา 4 วันต่อเนื่อง และในวันที่ 5 หลังจากที่ได้รับ

ได้รับเชื้อ จะวัดและคำนวณค่าสัดส่วนจำนวนเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรียต่อเม็ดเลือดแดงทั้งหมด 100 เซลล์หรือค่า parasitaemia จากหนูโมซในกล่มที่ได้รับสารทดสอบที่ขนาดต่าง ๆ กันและนำมาเปรียบเทียบกับปริมาณเชื้อมาลาเรียในกระแสเลือดจากหนูที่ไม่ได้รับยาซึ่งจะใช้ในการคำนวณหาขนาดสารทดสอบที่น้อยที่สุดที่ยังคงฤทธิ์ทางชีวภาพ (minimum effective dose) และค่าเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรีย (percent growth inhibition) และข้อมูลที่ได้จะใช้คำนวณ ED₅₀ และ ED₉₀ ได้ต่อไป (Peter, 1987) เทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่ได้รับการยอมรับและใช้อย่างแพร่หลายในการหากรูปร่างที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ และสามารถประยุกต์ในการทดสอบหากรูปร่างสารเคมีที่มีฤทธิ์ต่อเชื้อมาลาเรียคือยา เช่น ในการทดลองของ Yuan และคณะ (2011) ค้นพบสาร NNC55-0396 และ mibefradil ซึ่งปัจจุบันเป็นยารักษาโรคความดันโลหิตสูง มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อมาลาเรีย *P. chabaudi* สายพันธุ์ AS(3CQ) และ *P. falciparum* จากผู้ป่วยซึ่งต้องต่อยา chloroquine ได้ (Yuan et al., 2011)

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารต้านมาลาเรียในระยะแกมมีโตซัยต์

เนื่องจากในปัจจุบันมียารักษาโรคมาลาเรียที่ออกฤทธิ์กับแกมมีโตซัยต์อยู่เพียงชนิดเดียวได้แก่ primaquine (Warrell et al., 2002) ดังนั้นการค้นหาสารเคมีหรือยาชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการทำลายแกมมีโตซัยต์ และระยะต่าง ๆ ในยุงจึงเป็นประโยชน์อย่างมากในการควบคุมการระบาดของโรคมาลาเรีย และเป็นหัวข้อวิจัยที่ได้รับความสนใจอย่างมากในด้านมาลาเรีย ข้อได้เปรียบของการใช้เชื้อมาลาเรียในหนูในการทดสอบคือ เชื้อมาลาเรียในหนูโมซเช่น *P. yoelii nigeriensis* สายพันธุ์ N67 สามารถสร้างแกมมีโตซัยต์

ได้เร็วภายใน 3-4 วัน (Qi et al., 2013) ในขณะที่เชื้อมาลาเรียในมนุษย์ เช่น *P. falciparum* จะใช้ระยะเวลามากกว่า 8-12 วัน (Baker, 2010) ดังนั้นการใช้เชื้อมาลาเรียในหนูโมซจะดำเนินการทดสอบได้รวดเร็วกว่า วิธีการทดสอบสารต้านมาลาเรียในระยะแกมมีโตซัยต์ได้มีการพัฒนาโดยใช้เชื้อมาลาเรียในหนูชนิด *P. yoelii nigeriensis* สายพันธุ์ N67 เป็นครั้งแรกในปี ค.ศ.1969 โดย Ramkaran และ Peters ในการทดสอบเริ่มต้นด้วยการเตรียมหนูโมซที่มีเชื้อมาลาเรียและมีระดับ parasitaemia ประมาณ 10-20 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นแบ่งหนูโมซออกเป็นกลุ่มเพื่อรับสารเคมีชนิดต่าง ๆ ในระดับปริมาณต่าง ๆ กันและมีหนูโมซอีกกลุ่มเป็นกลุ่มทดลองควบคุมที่ไม่ได้รับสารเคมี หลังจากที่ได้รับยาเป็นเวลาหนึ่งชั่วโมง จึงนำหนูไปสลบและให้ยุงก้นปล่องกัด จากนั้นนำยุงไปเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิและความชื้นเป็นเวลา 7-10 วัน เมื่อครบกำหนดนำยุงทั้งหมดไปศึกษาและนับจำนวนเชื้อมาลาเรียในระยะโอโอซิสต์ในกระเพาะของยุง (Ramkaran and Peters, 1969) ในการวัดผลการทดลองสามารถเปรียบเทียบยุงติดเชื้อมาลาเรียที่ได้รับเลือดจากหนูโมซในกล่มที่ได้รับและไม่ได้รับสารทดสอบ และสามารถคำนวณค่าการยับยั้งซึ่งนำไปใช้เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารต่าง ๆ ได้ ตัวอย่างในการทดลองของ Eastman et al. (2013) มีการค้นพบสาร Ketotifen และ Cyproheptadine ซึ่งปัจจุบันเป็นยาประเภทแก้แพ้มีความสามารถในการยับยั้งการแพร่ของเชื้อมาลาเรียไปสู่ยุงพาหะนำโรคในเชื้อมาลาเรียในหนู *P. yoelii nigeriensis* สายพันธุ์ N67 ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับขนาด 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และสามารถยับยั้งเชื้อมาลาเรียในคน *P. falciparum* ซึ่งมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับยา primaquine ที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน ซึ่งนักวิจัยและแพทย์จะสามารถนำความรู้ไปใช้ทดสอบและรักษา

ผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียร่วมกับยาที่ใช้รักษาอาการป่วยของโรคมาลาเรียซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการควบคุมการระบาดของโรคมาลาเรีย

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารต้านมาลาเรียในระยะเซลล์ต้น

การทดสอบสารต้านมาลาเรียในระยะเซลล์ต้นเป็นวิธีของ Peters et al. (1975) มีวัตถุประสงค์ในการหาสารหรือกลุ่มสารเคมีที่มีฤทธิ์ในการขัดขวางไม่ให้สไปโรซอยต์สามารถเข้าไปภายในเซลล์ตับ หรือยับยั้งไม่ให้เชื้อมาลาเรียเจริญเป็นระยะเมอโรซอยต์ได้สมบูรณ์ในเซลล์ตับ ยาในกลุ่มนี้เป็กลุ่มยาที่ป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียที่เป็นประโยชน์อย่างมากสำหรับบุคคลที่อยู่ในพื้นที่ปลอดมาลาเรีย แต่ต้องเดินทางไปในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคเช่น ทหาร หรือนักท่องเที่ยว ปัจจุบันมียา primaquine, malarone (atovaquone/proguanil), chloroquine และ mefloquine เพียงชนิดเท่านั้นที่ได้รับอนุญาตให้ใช้ได้ในการป้องกันโรค (prophylactic drugs) (Warrell et al., 2002) และยาในกลุ่มนี้มีเพียง primaquine และ proguanil สองชนิดเท่านั้นที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของสไปโรซอยต์ในเซลล์ตับ (Warrell et al., 2002) อย่างไรก็ตาม ยาเหล่านี้ยังไม่สามารถป้องกันการเกิดโรคมาลาเรียได้ 100 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากปัญหาโรคมาลาเรียดื้อยา (Wongsrichanalai et al., 2002) ดังนั้นการหาวิธีใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต้านมาลาเรียในระยะเซลล์ต้นจึงเป็นสิ่งจำเป็น

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารเคมีในกลุ่มนี้ เป็นการทดสอบที่ทำได้ยากและมีความซับซ้อนมากที่สุด เนื่องจากจำเป็นต้องเตรียมการหลายขั้นตอนตั้งแต่ การเตรียมแอมมีโดซัยต์ในหนูไมซ์และถ่ายสู่ยุงกันปล่อย จากนั้นเป็นการตรวจสอบการติดเชื้อมาลาเรียในกระเพาะอาหารและต่อมน้ำลายของยุง

ภายหลังที่ยุงได้รับเชื้อเป็นเวลา 7 และ 14 วันตามลำดับ เพื่อให้มั่นใจว่ามีการสร้างสไปโรซอยต์ในยุงและขั้นตอนสุดท้ายจะเป็นการแยกต่อมน้ำลายยุง ซึ่งต้องอาศัยการแยกเอาส่วนอก (thorax) ของยุงมาบดด้วยเครื่องบด (homogenizer) และนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) แล้วแยกสไปโรซอยต์ออกจากซากยุงก่อนนำมาฉีดให้กับหนูไมซ์ ในการทดลองหนูไมซ์ที่ได้รับสไปโรซอยต์จะถูกแบ่งออกเป็นกลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว เพื่อมารับการทดสอบด้วยสารเคมีต่าง ๆ หนึ่งครั้งภายในเวลา 1 ชม.หลังจากที่หนูไมซ์ได้รับเชื้อ และทำการเปรียบเทียบจำนวนและอัตราส่วนของหนูไมซ์ที่ติดเชื้อมาลาเรียกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารเคมีใด ๆ ในสัปดาห์ต่อมา ผลการศึกษาจะสามารถใช้จำแนกสารเคมีที่ฤทธิ์ทางชีวภาพออกเป็นกลุ่ม ตามประสิทธิภาพในการป้องกันโรค (Peters et al., 1975) โดยกลุ่มที่มีประสิทธิภาพสูงสุดจะเป็นสารที่มีฤทธิ์ป้องกันหนูไมซ์ทุกตัวให้ปราศจากเชื้อมาลาเรียในกระแสเลือดเมื่อเทียบกับกลุ่มทดลองควบคุม ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาจะช่วยให้ผู้ทำการทดลองสามารถคัดเลือกสารเคมีในกลุ่มที่มีประสิทธิภาพสูงไปทดสอบต่อไป เพื่อหาขนาดน้อยที่สุดที่สารยังคงฤทธิ์ทางชีวภาพ (minimum effective dose) โดยทำการทดลองแบบเดิมแต่ใช้สารเคมีที่มีขนาดต่ำลง ซึ่งจะช่วยให้สามารถคำนวณหาขนาดน้อยที่สุดที่สารเคมียังคงประสิทธิภาพในการป้องกันเชื้อมาลาเรียได้ ตัวอย่างของ สารต้านมาลาเรียที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียในระยะต้นซึ่งมีการพัฒนาไปเป็นยารักษาโรคมาลาเรียในปัจจุบัน ได้แก่ primaquine และ tafenoquine (Peters et al., 1975; Ploemen et al., 2009) เป็นต้น

บทสรุป

ในปัจจุบันการค้นคว้าหาวิธีต้านมาลาเรียชนิดใหม่เป็นสิ่งจำเป็นมากในภาวะที่มีการระบาดของ

เชื้อมาลาเรียคือยา งานวิจัยทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารต้านมาลาเรียโดยใช้หนูไม่ซ้จะช่วยให้นักวิจัยสามารถประเมินความปลอดภัยของสารเคมีเบื้องต้นและประเมินประสิทธิภาพและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารเคมีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียก่อนที่จะนำสารเคมีไปทดสอบต่อไปในมนุษย์ ทั้งนี้เชื้อมาลาเรียในหนูไม่ซ้ เช่น *P. chabaudi* และ *P. yoelii* มีความหลากหลายในทางจีโนมและฟีโนไทป์และเป็นเชื้อมาลาเรียที่ดูแลได้ง่ายในห้องปฏิบัติการทั้งในหนูไม่ซ้ (*M. musculus*) และยุงก้นปล่อง (*A. stephensi*) จึงสามารถใช้เป็นเครื่องมือในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารต้านเชื้อมาลาเรียได้ทุกระยะ

เอกสารอ้างอิง

- Baker, D.A. (2010) Malaria gametocytogenesis. *Mol Biochem Parasitol.* 172(2): 57-65.
- Carlton, J., Silva, J. and Hall, N. (2004). The genome of model malaria parasites, and comparative genomics. *In Malaria Parasite: Genomes and Molecular Biology.* Norfolk: Caister Academic Press. pp. 33-64.
- Cheesman, S., O'Mahony, E., Pattaradilokrat, S., Degnan, K., Knott, S. and Carter, R. (2010). A single parasite gene determines strain-specific protective immunity against malaria: the role of the merozoite surface protein I. *Int J Parasitol.* 40(8): 951-961.
- Eastman, R.T., Pattaradilokrat, S., Raj, D.K., Dixit, S., Deng, B., Miura, K., Yuan, J., Tanaka, T.Q., Johnson, R.L., Jiang, H., Huang, R., Williamson, K., Lambert, L.E., Long, C., Austin, C.P., Wu, Y. and Su, X. z. (2013). A class of tricyclic compounds blocking malaria oocyst development and transmission. *Antimicrob Agents Chemother.* 57(1): 425-435.
- Garnham, P.C.C. (1966). Malaria parasites and other haemosporidia. Oxford: Blackwell Scientific Publishing. pp. 1-1114.
- Gueirard, P., Tavares, J., Thiberge, S., Bernex, F., Ishino, T., Milon, G., Franke-Fayard, B., Janse, C.J., Ménard, R. and Amino, R. (2010). Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(43): 18640-18645.
- Jennings, G.J., Toebe, C.S., van Belkum, A. and Wiser, M.F. (1998). The complete sequence of *Plasmodium berghei* merozoite surface protein-1 and its inter and intra-species variability. *Mol Biochem Parasitol.* 93(1): 43-55.
- Landau, I. and Boulard, Y. (1978). Life cycles and morphology. *In Rodent Malaria.* London: Academic Press. pp. 53-84.
- Li, J., Pattaradilokrat, S., Zhu, F., Jiang, H., Liu, S., Hong, L., Fu, Y., Koo, L., Xu, W., Pan, W., Carlton, J. M., Kaneko, O., Carter, R., Wootton, J.C. and Su, X.Z. (2011). Linkage maps from multiple genetic crosses and loci linked to growth-related virulent phenotype in *Plasmodium yoelii*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 108(31): E374-E382.
- Murray, C.J., Rosenfeld, L.C., Lim, S.S., Andrews, K.G., Foreman, K.J., Haring, D., Fullman, N., Naghavi, M., Lozano, R. and Lopez, A.D. (2012). Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet.* 379(9814): 413-431.
- Osdene, T.S., Russell, P.B. and Rane, L. (1967). 2,4,7-Triamino-6-ortho-substituted arylpteridines: a new series of potent antimalarial agents. *J Med Chem.* 10: 431-434.
- Pattaradilokrats, S., Cheesman, S.J. and Carter, R. (2008). Congenicity and genetic

- polymorphism in cloned lines derived from a single isolate of a rodent malaria parasite. *Mol Biochem Parasitol.* 157(2): 244-247.
- Pattaradilokrats, S., Culleton, R., Cheesman, S.J. and Carter, R. (2009). Gene encoding erythrocyte binding ligand linked to blood stage multiplication rate phenotype in *Plasmodium yoelii yoelii*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(17): 7161-7166.
- Pattaradilokrat, S., Jian, L. and Su, X.z. (2011). Protocol for production of a genetic cross of the rodent malaria parasites. *J Vis Exp.* 47.
- Peters, W., Davies, E. E. and Robinson, B.L. (1975). The chemotherapy of rodent malaria, XVIII. Causal prophylaxis, part 2. Practical experience with *Plasmodium yoelii nigeriensis* in drug screening. *Ann Trop Med Parasitol* 69(3):311-328.
- Peters, W. (1987). Chemotherapy and drug resistance in malaria. volume 1. Florida: Academic Press. pp. 1-542.
- Peters, W. and Robinson, B.L. (1999). Malaria. In: Handbook of animal models of infection: experimental models in antimicrobial chemotherapy. San Diego: Academic Press. pp. 757-773.
- Ploemen, I.H., Prudêncio, M., Douradinha, B.G., Ramesar, J., Fonager, J., van Gemert, G.J., Luty, A.J., Hermesen, C.C., Sauerwein, R.W., Baptista, F.G., Mota, M.M., Waters, A.P., Que, I., Lowik, C.W., Khan, S.M., Janse, C.J. and Franke-Fayard, B.M. (2009). Visualisation and quantitative analysis of the rodent malaria liver stage by real time imaging. *PLoS One.* 4(11): e7881.
- Qi, Y., Zhu, F., Li, J., Fu, Y., Pattaradilokrat, S., Hong, L., Liu, S., Huang, F., Xu, W. and Su, X.Z. (2013). Optimized protocols for improving the likelihood of cloning recombinant progeny from *Plasmodium yoelii* genetic crosses. *Exp Parasitol.* 133(1): 44-50.
- Ramkaran, A. E. and Peters, W. (1969). Infectivity of chloroquine-resistant *Plasmodium berghei* to *Anopheles stephensi* enhanced by chloroquine. *Nature.* 223(5206): 635-636.
- Rankin, K.E., Graewe, S., Heussler, V.T. and Stanway, R.R. (2010). Imaging liver-stage malaria parasites. *Cell Microbiol.* 12(5): 569-579.
- Sinden, R.E. (1978). Cell Biology. In *Rodent Malaria*. London: Academic Press. pp. 85-168.
- Sinden, R.E. and Hartley, R.H. (1985). Identification of the meiotic division of malarial parasites. *J Protozool.* 32(4): 742-744.
- Stevenson, M.M. and Riley, E.M. (2004). Innate immunity to malaria. *Nat Rev Immunol.* 4(3): 169-180.
- Warrell, D.A., Watkins, W.M. and Winstanley, P.A. (2002). Treatment and prevention of malaria. In *Bruce-Chwatt's Essential Malariology*. London: Arnold Publisher. pp. 268-312.
- Wongsrichanalai, C., Pickard, A.L., Wernsdorfer, W.H. and Meshnick, S.R. (2002). Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet Infect Dis.* 2(4): 209-218.
- Yuan, J., Cheng, K. C., Johnson, R.L., Huang, R., Pattaradilokrat, P., Liu, A., Guha, R., Fidock, D., Inglese, J., Wellems, T. E., Austin, C.P. and Su, X.z. (2011). Chemical genomic profiling for antimalarial therapies, response signatures and molecular targets. *Science.* 333(6043): 724-729.

