

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ



หนูถีบจักร

หนูถีบจักรที่ใช้ในการทดลองเป็น Swiss albino mice เพศเมีย ซึ่งได้จากหน่วยงานสัตว์ทดลอง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล หนูถีบจักรแต่ละตัวมีน้ำหนักประมาณ 25-30 กรัม มีอายุประมาณ 10-12 สัปดาห์ หนูทุกตัวจะถูกนำมาเลี้ยงไว้ในกรงที่มีอาหารสำเร็จรูปและน้ำตลอดเวลา

หนูเหล่านี้จะถูกแบ่งเป็นกลุ่ม ๆ ละ 10 ตัว เพื่อใช้ในการทดลอง

เชื้อมาเลเรีย

เชื้อมาเลเรียที่ใช้ในการทดลองเป็นเชื้อ Plasmodium berghei berghei ซึ่งเลี้ยงไว้ในหนูถีบจักรในห้องทดลอง ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล มีการ passage เชื้อทุกสัปดาห์ โดยฉีดเชื้อประมาณ 1×10^7 parasitised cells เข้าช่องท้อง (intraperitoneal route) Swiss albino mice ตัวใหม่ที่ยังไม่เคยได้รับเชื้อเลย

การเตรียมเลือดที่มีเชื้อมาเลเรียเพื่อนำมาใช้ในการทดลอง

นำหนูที่ได้รับเชื้อ P. berghei แล้วประมาณ 4-5 วัน มาตรวจเลือดด้วยวิธี thin blood smear เมื่อพบว่า มี parasitemia ไม่ต่ำกว่า 40% จึงนำหนูไปวางยาสลบด้วย ether แล้วทำการผ่าตัดบริเวณระหว่างขาหน้าและลำตัว ผ่านตะดูผิวหนัง กล้ามเนื้อ และ brachial artery เลือดที่ออกมาจาก artery ที่ถูกตัดจะรวมกันอยู่ในบริเวณรักแร้ ใช้ pipette ถูคเลือดทั้งหมดลงเก็บไว้ในหลอด

ทดลองซึ่งมี 1% sodium citrate ในปริมาณเท่ากับเลือดที่ใส่ลงไป หลอดทดลองที่มีเลือดและ sodium citrate จะถูกเขย่าในอ่างน้ำแข็งตลอดเวลาจนถึงกำหนดเวลาที่ฉีดเข้าช่องท้องหนูสืบจักรตัวใหม่ที่ยังไม่เคยได้รับเชื้อเลย

ยาที่ใช้ทดลอง

1. Chloroquine diphosphate

เป็นยา chloroquine ที่ผลิตโดยองค์การเภสัชกรรม เม็ดยาสีขาว ยา 1 เม็ดมี chloroquine base ประมาณ 150 mg base

2. Fansidar

เป็นยาที่ผลิตโดยบริษัท Hoffmann La-Roche, Basle มีตัวยาประกอบ 2 ตัว คือ pyrimethamine และ sulfadoxine ยา 1 เม็ดประกอบด้วย pyrimethamine 25 mg และ sulfadoxine 500 mg.

3. Quinine sulphate

เป็นยา Quinine ชนิดเม็ดผลิตโดยองค์การเภสัชกรรม ยา 1 เม็ดมี Quinine 300 mg base

Thin blood smear และสีย้อม

Thin blood smear ที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นการตรวจการเจริญเติบโตของเชื้อไขจับสันในหนู โดยเตรียมจากหยดเลือด 1 หยดจากปลายหางหนูบน slide แล้ว smear บน slide ปล่อยให้เลือดแห้งในอุณหภูมิของห้อง แล้วนำไป fix smear ใน absolute methanol ประมาณ 2 นาที เมื่อ methanol แห้งแล้วนำไปย้อมสี Giemsa 3% ใน buffered phosphate ที่มี pH 7.2 เป็นเวลา 45 นาที (Department of the Army Technical Manual 1961, Emmel, V.M. and Cowdry, E.V. 1964) หลังจากนั้นนำมา ล้างด้วยน้ำประปาจะได้สีที่ย้อมเป็นสีม่วงชมพู ทิ้งไว้ให้แห้งก่อนนำมาตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์

การประมาณจำนวน เม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อ P. berghei ที่นำมาฉีดเข้าหนู

เชื้อที่ฉีดเข้าหนูลับจักรประมาณได้จาก infected red blood cell ที่ปรากฏอยู่บน thin blood smear และจำนวนเม็ดเลือดแดงนับโดยใช้ haemocytometer

การนับจำนวน parasitised red blood cell จาก thin blood smear เป็นการนับผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ถ้าตรวจพบเชื้อไข้จับสั้น น้อยมากในหนึ่ง field ของ microscope จะนับ parasitised red blood cells และ parasitised reticulocytes จากจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมด 10,000 เม็ด ถ้าตรวจพบเชื้อไข้จับสั้นมากในหนึ่ง field ของ microscope จะนับ parasitised red blood cells และ parasitised reticulocytes จากจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมด 1,000 เม็ด

การนับจำนวนเม็ดเลือดแดงโดยใช้ haemocytometer โดยวิธี Neubour bright line haemocytometer (Viranuvatti et al., 1970) โดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายประมาณ 100 เท่า สุ่มนับเฉพาะช่องตรงกลางและมุมทั้งสี่ นับเม็ดเลือดแดงในช่องทั้ง 5 แล้วนำมาเฉลี่ยและคำนวณหาเม็ดเลือดแดงต่อปริมาตร

น้ำยาที่ใช้ dilute เม็ดเลือดแดงโดยวิธีนี้คือ Gower's solution ซึ่งมี ส่วนผสมดังนี้

| | |
|---------------------|----------|
| Sodium sulfate | 12.5 gm. |
| Glacial acetic acid | 3.3 ml. |
| Distilled water | 100 ml. |

ในการทดลองนี้ เชื้อ P. berghei ที่ฉีดเข้าช่องท้องของหนูลับจักรมี inoculum size คือ จำนวน parasitised red blood cell 1×10^7 ใน ปริมาตรที่ฉีดเข้าหนูลับจักร 0.05 ml.

การให้ยาแก่สัตว์ทดลอง

การให้ยาแก่หนูถีบจักรจะให้ในวันต่อจากที่หนูได้รับการฉีดเชื้อ P. berghei เข้าทางช่องท้อง โดยนำยาแต่ละชนิดมาบดให้ละเอียด แล้วละลายด้วยน้ำกลั่น หลังจากนั้นนำมาให้แก่หนูถีบจักรทางปาก (oral route) โดยปริมาณของยาที่ให้แก่หนูแต่ละตัวจะคำนวณจากความเข้มข้นของยาที่ต้องการให้แก่สัตว์ทดลองและน้ำหนักของหนูแต่ละตัวในการทดลองนั้น

ข้อกำหนดในการทดลอง

1. day 0 คือวันที่ฉีดเชื้อ P. berghei ให้แก่หนูถีบจักรเข้าทางช่องท้อง
2. day 1 คือวันรุ่งขึ้นหลังจากวันที่หนูได้รับเชื้อ P. berghei และเป็นวันที่หนูแต่ละตัวได้เริ่มรับยาตามความเข้มข้นที่ต้องการทดลอง
day 2, day 3, ... เป็นวันที่นับจาก day 1 เป็นต้นไป
3. ในการทดลองนี้จะทำ thin blood smear ของหนูทุกตัวที่ใช้ในการทดลอง และทำทุกวันตั้งแต่ day 1 เป็นต้นไป
4. การนับจำนวน parasitised red blood cell เพื่อสรุปผลการทดลองนั้น นับจาก thin blood smear โดยนับผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า โดยนับ parasitised red blood cell และ parasitised reticulocyte จากจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมด 100 เม็ด และกำหนดเป็น percent parasitemia
5. Prepatent period นับจากวันที่หนูได้รับเชื้อ P. berghei จนถึงวันที่เริ่มมี progressive parasitemia
6. Survival time นับจากวันที่หนูได้รับเชื้อ P. berghei จนถึงวันที่หนูตาย
7. การให้ยาแก่หนูแต่ละตัวโดยคำนวณจากน้ำหนักตัวของหนูนั้น ในการทดลองนี้กำหนดให้ความเข้มข้นของยาเป็น mg base/kg. หรือ mg base / 50 kg ซึ่ง kg คือน้ำหนักของหนู 1 กิโลกรัม และ 50 kg คือน้ำหนักของหนู 50 กิโลกรัม

วิธีการ

1. Induce ให้เชื้อ P. berghei ต้อยยา
 - 1.1 แบ่งหนูเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว สัตว์ เชื้อ chloroquine sensitive P. berghei แก่หนูทั้ง 5 กลุ่ม
 - 1.2 ให้อา chloroquine แก่หนูกลุ่มที่ 2-5 หลังจากที่ได้รับเชื้อ 1 วัน เริ่มจาก day 1
 - กลุ่มที่ 1 เป็น control group หนูได้รับน้ำกลั่นแทนยา
 - กลุ่มที่ 2 หนูแต่ละตัวได้รับยา chloroquine 5 mg base/kg. ทุกวัน 4 ครั้ง เริ่มจาก day 1
 - กลุ่มที่ 3 ให้อาหนูแต่ละตัวได้รับยา chloroquine 5 mg base/kg. วันเว้นวัน 4 ครั้ง เริ่มจาก day 1
 - กลุ่มที่ 4 หนูแต่ละตัวได้รับยา chloroquine 10 mg base/kg. ทุกวัน 2 ครั้ง เริ่มจาก day 1
 - กลุ่มที่ 5 หนูแต่ละตัวได้รับยา chloroquine 10 mg base/kg. วันเว้นวัน 2 ครั้ง เริ่มจาก day 1
 - 1.3 เปรียบเทียบ percent parasitemia จาก thin blood smear ของหนูทั้ง 5 กลุ่ม
 2. ทำการทดลองเหมือนการทดลองที่ 1 เพื่อเปรียบเทียบผลที่ได้
 3. นำเชื้อ chloroquine resistant P. berghei จากการทดลองที่ 1 และ 2 มา passage ให้หนูตัวใหม่ โดยแบ่งตามกลุ่ม 2-5 กำหนดเป็น CR1-4 ตามลำดับ มีหนูกลุ่มละ 10 ตัว และผสมยา chloroquine ใส่ในน้ำที่หนูดื่ม กำหนดให้หนูแต่ละตัวได้รับยาประมาณ 1 mg base/ตัว/วัน เพื่อเปรียบเทียบว่าเชื้อ chloroquine-resistant P. berghei ในกลุ่มใดจะต้อยยาได้ในระดับความเข้มข้นสูงกว่ากัน เพื่อจะเป็น เชื้อที่นำไปทดลองกับยาอื่น

4. นำเชื้อจากการทดลองที่ 3 คือเชื้อในกลุ่มที่ 2-5 ซึ่งกำหนดเป็น CR1-4 ตามลำดับมา passage ให้หนูตัวใหม่จนได้ 5 generations ซึ่งช่วงแต่ละ generation หนูจะได้รับยา chloroquine ใส่ในน้ำดื่ม โดยหนูได้รับยา 1 mg base/ตัว/วัน เพื่อให้เชื้อตั้งตัวมีความคงตัว จึงนำไปทดลองต่อ

5. ให้อา chloroquine 35 mg base/kg แก่หนูสืบจักรตามการทดลองดังนี้

5.1 แบ่งหนูออกเป็น 9 กลุ่ม ๆ ละ 10 ตัว

5.2 สีดเชื้อ chloroquine sensitive P. berghei ให้หนูกลุ่มที่ 1, chloroquine resistant strain P. berghei CR1 ให้แก่หนูกลุ่มที่ 2 และ 3, CR2 ให้แก่หนูกลุ่มที่ 4 และ 5, CR3 ให้หนูกลุ่มที่ 6 และ 7, CR4 ให้หนูกลุ่มที่ 8 และ 9

5.3 ให้อา chloroquine 35 mg base/kg แก่หนูกลุ่มที่ 1, 2, 4, 6 และ 8 ในวันต่อมา

5.4 เปรียบเทียบ percent parasitemia จาก thin blood smear

6. ให้อา single dose treatment chloroquine แก่หนูที่ติดเชื้อ sensitive strain P. berghei และหนูที่ติดเชื้อ chloroquine resistant P. berghei เพื่อเปรียบเทียบว่าต้องใช้เวลาความเข้มข้นเท่าใดจึงจะฆ่าเชื้อได้

7. ทดลองให้อา Fansidar โดยกำหนด mg base p yrimethamine เป็นหลักในการให้อา

7.1 แบ่งหนูออกเป็น 10 กลุ่ม ๆ ละ 10 ตัว

7.2 สีดเชื้อ chloroquine sensitive P. berghei แก่หนูกลุ่มที่ 1-5 และสิดเชื้อ chloroquin resistant P. berghei ให้แก่หนูกลุ่มที่ 6-10

7.3 ให้อา Single dose treatment Fansidar แก่หนูดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 2 และ 7 ได้รับยา 25 mg base/50 kg

กลุ่มที่ 3 และ 8 ได้รับยา 50 mg base/50 kg

กลุ่มที่ 4 และ 9 ได้รับยา 75 mg base/50 kg

กลุ่มที่ 5 และ 10 ได้รับยา 100 mg base/50 kg

7.4 หา percent parasitaemia ของหนูทั้ง 10 กลุ่ม

8. เนื่องจากการใช้ยา Fansidar ในการทดลองที่ 7 นั้นยาไม่สามารถฆ่าเชื้อ chloroquine resistant P. berghei ได้ จึงใช้ยา Fansidar ด้วยความเข้มข้นที่สูงขึ้นโดย

8.1 แบ่งหนูออกเป็น 2 กลุ่ม ๆ ละ 10 ตัว

8.2 ฉีดเชื้อ chloroquine resistant P. berghei ให้แก่หนูทั้ง 2 กลุ่ม

8.3 ให้อา Fansidar แก่หนูทั้ง 2 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 ให้ Fansidar 125 mg base/50 kg

กลุ่มที่ 2 ให้ Fansidar 150 mg base/50 kg

หา percent parasitaemia ของหนูทั้ง 2 กลุ่ม และศึกษาดูว่า การใช้ยา Fansidar ในความเข้มข้นสูง ๆ นี้จะเป็นอันตรายต่อหนูหรือไม่

9. ทดลองเหมือนการทดลองที่ 8 เพื่อจะได้ผลที่แน่นอนยิ่งขึ้น

10. ทดลองการใช้ยา single dose treatment quinine

10.1 แบ่งหนูออกเป็น 8 กลุ่ม ๆ ละ 10 ตัว

10.2 ฉีดเชื้อ chloroquine sensitive P. berghei แก่หนูกลุ่มที่ 1-4 และฉีดเชื้อ chloroquine resistant P. berghei แก่หนูกลุ่มที่ 5-8

10.3 ให้อา quinine แก่หนูดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 2 และ 6 ให้ quinine 1800 mg base/50 kg

กลุ่มที่ 3 และ 7 ให้ quinine 1900 mg base/50 kg

กลุ่มที่ 4 และ 8 ให้ quinine 2000 mg base/50 kg

10.4 ผลของยา quinine ในหนูทั้ง 3 กลุ่ม

11. ให้อา quinine แก่หนูที่ติดเชื้อ chloroquine resistant P. berghei

11.1 แบ่งหนูเป็น 3 กลุ่ม ๆ ละ 10 ตัว

11.2 ติดเชื้อ chloroquine resistant P. berghei แก่หนูทั้ง 3 กลุ่ม

11.3 ให้อา quinine แก่หนูดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1 ให้อา quinine 2000 mg base/50 kg ทุกวันติดต่อกัน 4 วัน

กลุ่มที่ 2 ให้อา quinine 2200 mg base/50 kg ทุกวันติดต่อกัน 4 วัน

กลุ่มที่ 3 ให้อา quinine 2400 mg base/50 kg ทุกวันติดต่อกัน 4 วัน

11.4 ดูผลว่ายา quinine จะฆ่าเชื้อ chloroquine resistant P. berghei ได้หรือไม่ และการให้อา quinine ในความเข้มข้นสูงจะมี side effect หรือไม่