

การทดสอบศักยภาพการฆ่าเชื้อมาลาเรียในสัตว์ทดลอง

จุฑามาศ สัตยวิวัฒน์

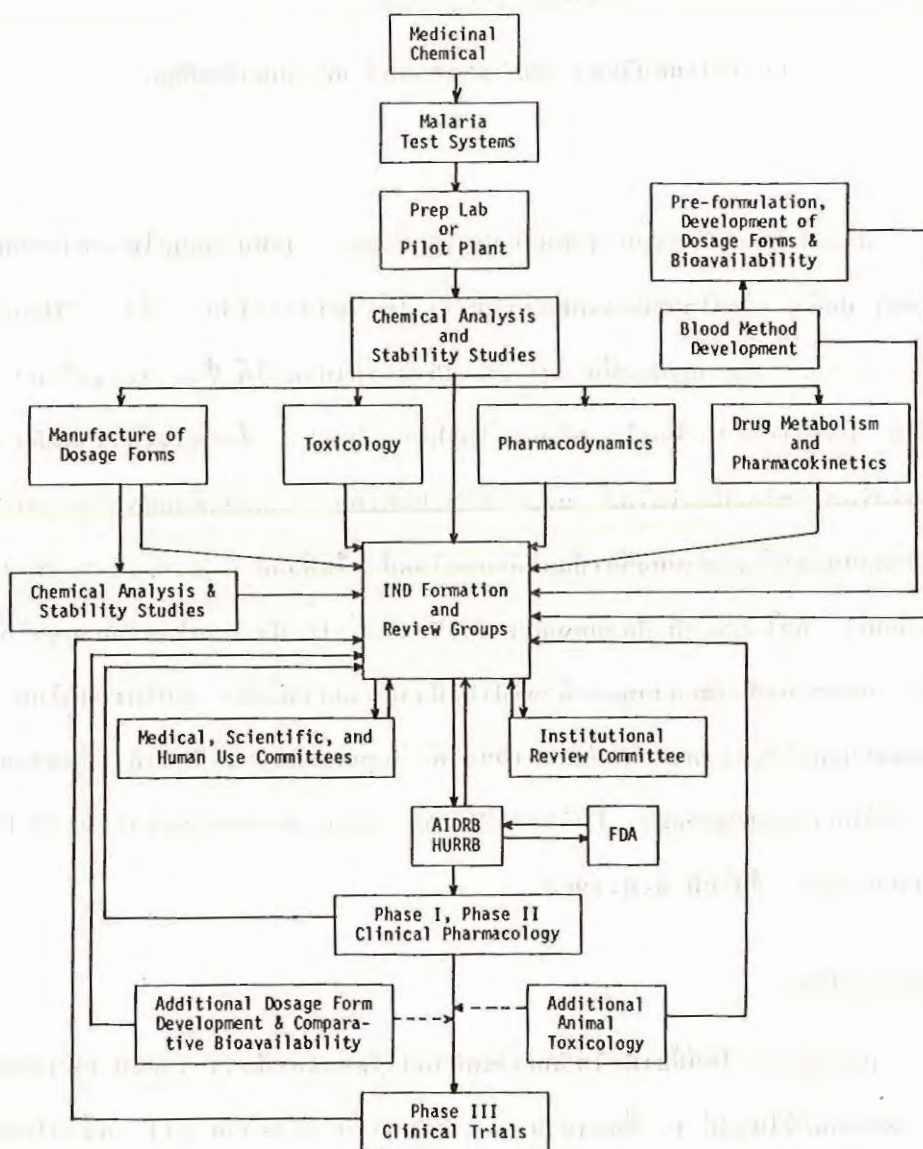
ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

หากย้อนมองอดีตของการรักษามาลาเรียด้วยยา จะพบว่าสมุนไพร เข้ามามีบทบาทสำคัญนับเป็นพันๆ ปีแล้ว สมุนไพรชนิดแรกที่ชาวจีนนำมาใช้รักษามาลาเรีย ชื่อ "Qinghao" (*Artemisia annua*) และอีกชนิดหนึ่งเป็นไม้พื้นเมืองของอเมริกาใต้ ซึ่งชาวเปรูเรียกว่า Jesuit's หรือ Cardinal's bark หรือ Cinchona bark ซึ่งมีสารเคมีสำคัญคือ quinine, quinidine, cinchonidine และ cinchonine จากการค้นพบยารักษามาลาเรียใหม่ๆ และสารฆ่าแมลงเพื่อทำลายยุงซึ่งเป็นพาหะของโรคนี้ ในช่วงปี ค.ศ. 1930-1960 (ดูตารางที่ 1 ประกอบ) ทำให้บุคคลที่เกี่ยวข้องกับมาลาเรียเชื่อว่าโรคนี้จะหมดไปหรือควบคุมได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ความเชื่อดังกล่าวถูกลบล้างไปเมื่อมีรายงานการดื้อยา chloroquine จากประเทศในแถบอเมริกาใต้และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รัฐบาลสหรัฐอเมริกาเล็งเห็นความสำคัญของปัญหา จึงให้การสนับสนุนจัดตั้ง United States Army Antimalarial Drug Development Programme ขึ้นในปี ค.ศ. 1963

กระบวนการพัฒนายาใหม่

การพัฒนายาใหม่ขึ้นเพื่อใช้รักษาโรคมาลาเรียจะต้องมีการวางแผน อย่างรอบคอบเป็นขั้นตอน ดังแสดงไว้ในรูปที่ 1 ซึ่งหาอ่านรายละเอียดเพิ่มเติมได้จาก (1) กล่าวโดยย่อคือเริ่มตั้งแต่การหาสารเคมีมาทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อมาลาเรียในหลอดทดลอง และในสัตว์ทดลอง หากพบว่าศักยภาพก็จะเป็นการสังเคราะห์เป็นจำนวนมาก เพื่อศึกษาในด้านเคมี ศึกษาความคงตัวของสารทั้งในสภาพสารบริสุทธิ์และเมื่อ เป็นยาในรูปแบบต่างๆ การศึกษาทางเภสัชฤทธิ์

วิทยา (pharmacodynamics) เกล็ดขจลนศาสตร (pharmacokinetics) และพิษวิทยา (toxicology) อย่างละเอียด การหาวิธีทำรูปแบบยาให้เหมาะสม ข้อมูลต่างๆที่จำเป็นเหล่านี้เรียกว่า "Notice of Claimed Investigational Exemption for a New Drug" (IND)



รูปที่ 1. Antimalarial drug development process. AIDRB-HURRB, Army Investigational Drug Review Board-Human Use Research Review Board; FDA, Food and Drug Administration. From (1).

ตารางที่ 1. ประวัติการค้นพบยารักษามาลาเรียและสารฆ่าแมลง

ค.ศ.340	Qinghao was first recorded as an antimalaria in Handbook of Prescriptions for Emergency Treatment by Ge Hong in China.
ค.ศ.1633	The first written record of the use of cinchona in a religious book by Augustinian monk named Calancha, of Lima, Peru.
ค.ศ.1820	Quinine and cinchonine were isolated from cinchona bark.
ค.ศ.1930	Development of mepacrine (Atabrine).
ค.ศ.1934	Development of chloroquine.
ค.ศ.1935-1939	Pyrethrin spraying.
ค.ศ.1936-1939	Discovery of insecticide action of DDT.
ค.ศ.1944	Discovery of proguanil.
ค.ศ.1942-1946	Development of synthetic insecticides (dieldrin) with residual action.
ค.ศ.1952	Development of pyrimethamine, primaquine.
ค.ศ.1961-1965	Reports from South America and Southeast Asia of <i>P.falciparum</i> resistant to chloroquine.
ค.ศ.1960-1966	Rediscovery of use of sulphonamides and sulphones as antimalarials.
ค.ศ.1963-	Antimalarial Drug Development Programme of US Army.
ค.ศ.1971	Artemisinin was isolated from <i>Artemisia annua</i> .
ค.ศ.1980 ⁺	Mefloquine.

ข้อมูล IND ใช้เพื่อพิจารณาว่าสารเคมีที่ทดสอบเหมาะสมที่จะนำไปศึกษาทดลองในมนุษย์ต่อไปหรือไม่ ในโครงการนี้จะมีคณะกรรมการพิจารณา เรียกว่า Army Investigational Drug Review Board-Human Use Research Review Board (AIDRB-HURRB) ซึ่งจะมีการพิจารณาร่วมกับ Food and Drug Administration (FDA) การทดลองในมนุษย์แบ่งเป็นระยะต่างๆ และจะมีการประเมินผลเป็นระยะๆ ว่าสมควรให้ทำการวิจัยต่อไปหรือไม่

แนวทางในการพัฒนายาเพื่อใช้รักษาโรคมาลาเรีย

เมื่อมีการตั้งเป้าหมายว่าจะทำการพัฒนายาขึ้นมาเพื่อรักษาโรคมาลาเรีย ปัญหาพื้นฐานคือจะนำสารเคมีใดมาทดสอบ และมีหลักการทั่วไปอย่างไร จากรายงานต่างๆ พอสรุปได้เป็น 2 แนวทาง คือ การดัดแปลงสูตรทางเคมีของสารกลุ่มต่างๆ หลายๆ กลุ่ม ที่น่าจะมีประสิทธิภาพต่อเชื้อมาลาเรียแล้วนำไปทดสอบ หรือนำสมุนไพรมากมายหลายชนิดมาศึกษา ส่วนอีกรูปแบบหนึ่งเป็นการศึกษาอย่างเฉพาะเจาะจง คือ เลือกเฉพาะสารเคมีบางอย่าง โดยอาศัยหลักที่ว่าสารเคมีที่ใช้จะรบกวนหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อปรสิต โดยไปขัดขวางขบวนการต่างๆ ทางชีวเคมีของมัน หรือเลือกทดสอบเฉพาะสมุนไพรบางชนิดที่แพทย์แผนโบราณพบว่า มีสรรพคุณในการรักษา มาลาเรีย

- การสังเคราะห์สารเคมีชนิดใหม่ๆ : เช่นโครงการของ US Army Antimalarial Drug Development Programme ได้สังเคราะห์อนุพันธ์ของสารเคมีกลุ่มต่าง ๆ ตัวอย่างเช่น 8-aminoquinolines, quinolinecarbinols, phenanthrenecarbinols, pyridinecarbinols เป็นต้น จากการทดสอบสารเคมีระหว่างปี ค.ศ.1964-1980 จำนวน 275,000 ชนิด พบว่ามีประสิทธิภาพเบื้องต้นในการฆ่าปรสิต 9,000 ชนิด แต่มีเพียง 30 ชนิด เท่านั้นที่ได้รับการคัดเลือกกว่าสมควรมานำมาศึกษาต่อไปในมนุษย์ (1)

- การทดสอบสารเคมีโดยอาศัยหลักเบื้องต้นทางวิทยาศาสตร์พื้นฐาน : ตัวอย่างเช่น การศึกษาทางชีวเคมีทำให้ทราบว่าในการเจริญเติบโตของเชื้อ Plasmodium ต้องอาศัย phospholipid Vial และคณะจึงใช้สารชื่อ D-2-amino-1-butanol เพื่อรบกวนการสังเคราะห์ phospholipid พบว่ามีประสิทธิภาพในการขัดขวางการเจริญเติบโตของเชื้อมาลา

เรื่องซึ่งเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง (2)

- การทดสอบยาที่มีจำหน่ายในท้องตลาดที่ใช้รักษาโรคอื่นๆ : เมื่อความรู้ทางชีวเคมีของปรสิตเพิ่มขึ้น ทำให้นักวิจัยเริ่มมองเห็นแนวทางที่น่าจะนำยาที่มีอยู่แล้วบางชนิดมาทดสอบฤทธิ์ต้านมาลาเรีย เช่น Pfaller และคณะพบว่ายาฆ่าเชื้อรา ketoconazole และ miconazole มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อปรสิตในหลอดทดลองได้ (3) หรือ Divo และคณะได้ศึกษายาปฏิชีวนะหลายตัว เช่น clindamycin, pirlimycin, tetracyclines, chloramphenicol, thiamphenicol และ erythromycin เป็นต้น พบว่ามีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *P.falciparum* ในหลอดทดลอง (4) Satayavivad และคณะพบว่า calcium blockers ซึ่งใช้รักษาภาวะเกี่ยวกับความผิดปกติของหลอดเลือดและหัวใจ มีฤทธิ์ต้านมาลาเรียในหลอดทดลอง (5) เป็นต้น

- สมุนไพร : การศึกษาเกี่ยวกับสมุนไพรที่ใช้รักษามาลาเรียในประเทศไทย มีมาแต่สมัยสงครามโลกครั้งที่ 2 โดย อวย เกตุสิงห์ ได้ทำการทดสอบสมุนไพรจำนวน 30 ชนิดที่มีการอ้างสรรพคุณว่าสามารถรักษามาลาเรียในคนได้ (6) ซึ่งผลการรักษาสรุปไว้ในตารางที่ 2 สำหรับในต่างประเทศ การทดสอบประสิทธิภาพของสมุนไพรที่ใช้รักษามาลาเรียโดย Spencer และคณะนับว่าเป็นโครงการใหญ่อันหนึ่ง โดยนำสมุนไพร 600 ชนิด จาก 126 วงศ์ มาทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ *P.gallinaceum* ในไก่, *P.cathemerium* และ *P.lophurae* ในเป็ด พบว่า สมุนไพรที่มีประสิทธิภาพส่วนใหญ่จะอยู่ในวงศ์ Amaryllidaceae และ Simaroubaceae (7)

Pavanand และคณะได้รายงานผลการทดลองสารสกัดจาก *Brucea javanica* (L.) Merr. (Simaroubaceae) พบว่า bruceine A,B,C เป็นสารสำคัญที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *P.falciparum* สารที่ได้มีความแรงพอๆ กับ mefloquine (8) O'Neill และคณะได้รายงานผลการทดสอบสารสกัดอย่างหยาบๆ ของ *Artemisia annua*, *A.vulgaris* ซึ่งอยู่ในวงศ์ Compositae และ *Brucea javanica*, *Ailanthus altissima* และ *Simaba cedron* ซึ่งอยู่ในวงศ์ Simaroubaceae ผลการทดสอบพิจารณาจากการขัดขวางการนำ (G-³H)-

ตารางที่ 2. ผลการรักษาแผลเรื้อรังด้วยสมุนไพร. จาก (6)

ก.	ข.	ค.	ง.	จ.	ฉ.	ช.	ซ.
1. ป.กะทงราช	6-30	20	8(40.0%)	8	3(33.3%)	11	5(45.5%)
2. หัวเต่าเกียด	3-40	53	29(54.7%)	21	0(0.1%)	32	21(75.7%)
3. ป.สะเคาป่า	6-18	14	8(57.0%)	1	0(0.0%)	13	8(61.5%)
4. ป.กะทอน	6-18	11	5(45.5%)	2	1(50.0%)	9	4(44.4%)
5. ป.กรรพิการ	6-40	16	10(62.4%)	6	2(33.0%)	10	8(80.0%)
6. หัวคั่ว	6-18	26	12(46.2%)	11	5(45.5%)	15	7(46.6%)
7. คันทรงทอง	6-15	13	6(46.1%)	6	2(33.3%)	7	4(57.1%)
8. ป.พญา	3-30	13	7(53.7%)	6	3(50.0%)	6	4(66.6%)
9. ป.พญามือเหล็ก	6-30	24	8(33.3%)	11	1(0.0%)	13	7(53.8%)
10. รากกระออบ	6-18	12	3(25.0%)	5	1(20.0%)	7	2(28.6%)
11. เถาชิงช้าสาม	9-18	9	3(33.3%)	4	0(0.0%)	5	3(60.0%)
12. ล.เข้าน้อย	6-30	21	13(61.9%)	13	8(61.5%)	8	5(62.0%)
13. ป.สันเป็ดคั้น	6-18	9	3(33.3%)	6	2(33.3%)	3	1(33.3%)
14. ป.ขี้เหล็ก	6-30	11	4(36.3%)	5	2(40.0%)	6	3(50.0%)
15. เถาขมิ้น	3-30	23	10(43.5%)	15	7(46.6%)	8	3(37.5%)
16. ป.โมกหลวง	18-30	13	4(30.8%)	5	2(40.0%)	8	2(25.0%)
17. กล้วยเครือ (เถา)	6-40	17	5(29.4%)	7	3(42.8%)	10	2(20.0%)
18. หัวแห้วหมู	6-30	12	5(41.6%)	6	3(50.0%)	6	2(33.3%)
19. หนุ่ยไค้ใบ	30-40	18	6(33.3%)	8	0(0.0%)	10	6(60.0%)
20. ใบขมิ้นเครือ	18-40	12	4(33.3%)	6	2(33.3%)	6	2(33.3%)
21. ล.ปลิงภาษา	30-40	14	8(57.1%)	6	4(66.6%)	8	4(50.0%)
22. เถาแดงหนู	15	11	3(27.3%)	0	3(27.3%)	3	0(0.0%)
23. เปลือกเหคา	15-30	38	25(65.7%)	18	13(72.1%)	20	12(60.0%)
24. หัวขมิ้นเครือ	15-18	18	5(41.6%)	6	3(50.0%)	6	2(33.3%)
25. รากเจตมูลเพลิงแดง	15	13	4(23.0%)	8	2(25.0%)	5	1(20.0%)
26. หัวกระเทียม	15	10	4(40.0%)	8	4(50.0%)	2	0(0.0%)
27. ป.ระดู	15	10	6(60.0%)	8	5(62.5%)	2	1(50.0%)
28. ป.กอมขม	3-24	61	21(34.4%)	26	5(19.2%)	35	16(45.4%)
29. บ.กาสามปีก	6-30	18	5(14.3%)	7	1(14.3%)	11	4(36.7%)
30. บ.สะเคาป่า	3-10	9	2(22.2%)	7	2(28.6%)	2	0(0.0%)

ก = ชื่อยา

ข = ขนาดที่ใช้ต่อวัน (กรัม)

ง = จำนวนผู้ป่วยที่หายทั้งหมด

ฉ = จำนวนผู้ป่วยที่หาย

ช = จำนวนผู้ป่วยที่หาย

ซ = จำนวนผู้ป่วยที่หาย

ป = เปลือก

ล = ลูก

ค = จำนวนผู้ป่วยที่ใช้ทดลองทั้งหมด

จ = จำนวนผู้ป่วยที่มีเชื้อไวรัส

ฉ = จำนวนผู้ป่วยที่มีเชื้อไวรัส

ช = จำนวนผู้ป่วยที่มีเชื้อไวรัส

ซ = ใบ

hypoxanthine เข้าไปในตัวเชื้อ *P.falciparum* ซึ่งเลี้ยงในหลอดทดลอง พบว่ามีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย (๙)

Chan และคณะ (๑๐) รายงานผลการต้านมาลาเรียของสารสกัดอย่างหยาบ ๆ และสารเคมีบริสุทธิ์ต่างๆ ที่ได้จากรากปลาไหลเผือก *Eurycoma longifolia* Jack Simaroubaceae ซึ่งสมุนไพรชนิดนี้ก็ได้มีการศึกษามาแล้วในประเทศไทยโดย Pavanand และคณะ ตั้งแต่ปี ๑๙๘๓

รายงานดังกล่าวมาข้างต้น เป็นการทดสอบฤทธิ์ต้านมาลาเรียในหลอดทดลอง ยังไม่ได้ทำการทดสอบในสัตว์ทดลอง Fandeur และคณะ (๑๑) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านมาลาเรีย ของ sergeolide ซึ่งเป็นสารพวก quassinoid ได้จาก *Picrolemma pseudocoffea* , Simaroubaceae พบว่าสารนี้มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ *P. falciparum* ในหลอดทดลอง และ *P.berghei* ในหนูถีบจักรในขนาดยาที่ค่อนข้างต่ำ แต่มีความเป็นพิษมาก ทำให้ผู้วิจัยสรุปว่า sergolide ไม่เหมาะที่จะนำไปใช้ในการรักษามาลาเรียในคน

นอกจากพืชในวงศ์ Simaroubaceae แล้ว Abatan และ Makinde (๑๒) ได้รายงานผลการวิจัยเบื้องต้นของสารสกัดอย่างหยาบๆ จาก *Azadirachta indica* (Meliaceae) และ *Pisum sativum* (Leguminosae) ในสัตว์ทดลอง ยุงมูธ มูธวงศ์ และคณะได้ศึกษาสารสกัดบริสุทธิ์ nimbolide และสารสกัดอย่างหยาบๆ จากสะเดาไทย พบว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรียในหลอดทดลอง (๑๓)

Qinghao (*Artemisia annua* L.) Compositae

หากไม่นับ quinine ซึ่งได้จากเปลือกต้นชิงโค่นแล้ว qinghaosu ซึ่งสกัดจาก *Artemisia annua* นับว่ามีบทบาทสำคัญมากในปัจจุบัน เพราะเริ่มมีการใช้ในคนแล้วในประเทศจีน ถ้าหากติดตามการพัฒนายาชนิดนี้จากสมุนไพรจะได้แง่คิดหลายประการด้วยกัน ที่สำคัญคือ การวางรูปแบบการพัฒนาที่ชัดเจน โดยตั้งเป็นคณะทำงานซึ่งมีชื่อว่า "China Cooperative Research Group on Qinghaosu and its derivatives as antimalarials " ซึ่งจะต้องกล่าวหลายครั้ง จึงขอใช้เรียกย่อๆ ว่า CCRGQA เริ่มต้นในปี ค.ศ. ๑๙๗๑ คณะวิจัย

ซึ่งประกอบด้วยนักวิชาการจาก Institute of Chinese Materia Medica, Academy of Traditional Chinese Medicine, Institute of Organic Chemistry, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Science รายงานว่าสารสำคัญซึ่งมีฤทธิ์ต้านมาลาเรียใน Qinghao คือ qinghaosu (QHS) หรือ artemisinin (14) ในการศึกษาทางเคมีและการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ qinghaosu ได้ดำเนินการโดยหน่วยงานอีก 4 แห่งคือ Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Science ; Institute of Chinese Materia Medica, Academy of Traditional Chinese Medicine ; Guilin Pharmaceutical Works ; Institute of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica, Shandong Province (15)

การทดสอบประสิทธิภาพและกลไกการออกฤทธิ์ของ QHS และอนุพันธ์ในสัตว์ทดลอง ได้ดำเนินการโดยหน่วยวิจัย 8 แห่งด้วยกัน (16) การศึกษาการเปลี่ยนแปลงสภาพยาและเภสัชจลนศาสตร์ของ QHS และอนุพันธ์ การวิจัยถึงความเป็นพิษ และการศึกษาทางคลินิก มีหน่วยงานที่ทำการค้นคว้าวิจัยร่วมกันในแต่ละเรื่องจำนวน 7, 9 และ 12 แห่งตามลำดับ (17-19) การศึกษาฤทธิ์และความเป็นพิษของ artesunate ในสัตว์ทดลองทำโดย Yang และคณะ (20) นอกจากงานวิจัยดังกล่าวแล้ว Li และคณะได้รายงานผลการวิจัยที่น่าพอใจของ QHS ในการรักษา cerebral malaria (21) Qian และคณะ (22) ได้ศึกษาฤทธิ์ด้านเชื้อไวรัสและผลต่อภูมิคุ้มกันของ QHS Ye และคณะ (23) ศึกษาผลของ QHS และ chloroquine ต่อโครงสร้างของเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อ *P.falciparum* เจริญเติบโตอยู่ Jiang และคณะ (24) ได้รายงานผลการทดลองยาด้านมาลาเรียโดยเปรียบเทียบ QHS และ mefloquine หลังจากตีผลงานวิจัยเกี่ยวกับ qinghaosu ซึ่งเริ่มอย่างจริงจังเป็นระบบในปี ค.ศ. 1971 เป็นต้นมาได้เริ่มมีการเผยแพร่ผลงานในปี 1979 นักวิจัยในประเทศต่างๆ ก็ให้ความสนใจกับสมุนไพรชนิดนี้ของจีนเป็นอย่างมาก เช่นมีการศึกษาวิธีสังเคราะห์ QHS โดย Schmid และ Hofheinz (25) Li และคณะ (26) ได้ศึกษาฤทธิ์ของ QHS และอนุพันธ์บางชนิดในหลอดทดลอง มีนักวิจัยหลายคนศึกษาเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ของ QHS และอนุพันธ์ (27-29) นอกจากนั้นได้มีการทดลองปลูก *Artemisia annua* ในสหรัฐอเมริกาและเยอรมันเพื่อหาปริมาณของ ar-

temisinin (30,31) บทความที่เกี่ยวกับ qinghaosu (artemisinin) หรือเดิมเรียกว่า artemisinin ที่ครอบคลุมเนื้อหาไว้อย่างละเอียดมีอยู่ใน (32)

กล่าวโดยสรุป QHS และอนุพันธ์จัดเป็นยาที่ได้จากสมุนไพรที่มีประสิทธิภาพสูง ออกฤทธิ์ได้เร็วแต่ฤทธิ์คงอยู่ได้ไม่นาน เชื่อกันว่ามีอาการข้างเคียงน้อย ข้อเสีย คือ เชื้อกลับกำเริบใหม่ได้ (recrudescence) แต่ก็มีประโยชน์มากใน cerebral malaria เพราะลดปริมาณ *P.falciparum* ได้เร็ว ปัจจุบันการสังเคราะห์ทำได้ยาก มีผู้พยายามหาวิธีที่จะเพาะปลูกเพื่อให้ได้ QHS ปริมาณสูงๆ เพื่อนำไปศึกษาวิจัยหาสรรพคุณในแง่ต่างๆ ต่อไป

วิธีทดสอบประสิทธิภาพยารักษามาลาเรียในสัตว์

ในระยะแรกๆ ก่อนที่จะมีการค้นพบวิธีการเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย *P.falciparum* ในน้ำยาเลี้ยงเชื้อที่มีเม็ดเลือดแดงอยู่ด้วย โดยวิธีของ Trager และ Jensen (33) การทดสอบประสิทธิภาพยาด้านมาลาเรียมักทำในสัตว์ทดลอง ซึ่งอาจใช้ ไก่ เป็ด นก สัตว์ฟันแทะ และลิง ต่อมาภายหลังมักนิยมทดสอบในน้ำยาเลี้ยงเชื้อ (in vitro testing models) ก่อนแล้วจึงนำมาทดสอบในสัตว์ทดลองเพราะประหยัดค่าใช้จ่าย สะดวก รวดเร็ว ใช้ตัวอย่างสารเคมีน้อย แต่ก็มีจุดอ่อนในแง่ที่ว่าสารเคมีที่ให้ผลดีในการทดลองวิธีนี้ไม่จำเป็นต้องมีผลเช่นเดียวกันในสัตว์ทดลองเสมอไป

สัตว์ทดลองที่ใช้ในห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่เป็นสัตว์ฟันแทะ เพราะการดูแลสะดวก และประหยัดค่าใช้จ่ายมากกว่า สำหรับวิธีการทดสอบมีแบบต่างๆ กันแล้วแต่จุดประสงค์ของนักวิจัย (ดูตารางที่ 3 ประกอบ) ในการทดสอบหาฤทธิ์เป็น blood schizonticides วิธีการทดสอบที่นิยมใช้กันคือ Rane's test และ four-day test

- Rane's test : วิธีนี้จะฉีดเชื้อ *P.berghei* เข้าทางช่องท้องของหนูถีบจักร หลังจากนั้น 72 ชม.ฉีดยาที่ต้องการทดลองโดยให้เข้าใต้ผิวหนัง การประเมินประสิทธิภาพของยาทำโดยเปรียบเทียบระยะเวลาที่หนูถีบจักรที่ได้รับเชื้อมาลาเรียมีชีวิตรอด (survival time) ระหว่างกลุ่มที่ได้รับยาที่ทดลองและกลุ่มที่ไม่ได้รับยา (34) วิธีนี้เป็นที่นิยมใช้กันมาก แต่นักวิจัยบางคนก็ได้ดัดแปลงต่างไปจากเดิมบ้างเล็กน้อย

ตารางที่ 3. รูปแบบต่างๆ ของการทดสอบยาต้านมาลาเรียในสัตว์ฟันแทะ

1. Blood schizonticides

1.1 Single-dose regimens

- Rane's test (34)
- Fink and Kretschmar's test (35)

1.2 Multiple-dose regimens

- Early test procedures (36-39)
- Four-day test (40)
- Drug-diet methods (41)
- Six-day test (41,42)

2. Tissue schizonticides

2.1 Most's test (43,44)

2.2 Berberian's test (45)

2.3 Vincke's test (46)

2.4 Gregory and Peters' test (47,48)

2.5 Hill's test (49)

2.6 Fink's test (50,51)

2.7 King's test (52)

2.8 Rane and Kinnamon's test (53,54)

3. Residual blood schizonticides

3.1 Schneider's test (55,56)

3.2 Thompson's test (57,59)

3.3 Sustained release implant test (57,60)

4. Residual tissue schizonticides (61)

Rane's test มีขั้นตอนโดยย่อดังนี้ (62)

1. หนูถีบจักรเพศผู้หรือเมียที่ใช้ขนาด 18-20 กรัม
2. หนูแต่ละตัวจะได้รับเชื้อ *P.berghei* ประมาณ 6×10^5 parasitized erythrocytes ซึ่งได้จากหนูซึ่งติดเชื้อนี้มาแล้ว 4 วัน
3. หลังจากหนูได้รับเชื้อ *P.berghei* 3 วัน จะมี parasitemia 5-15 % หนูจะได้รับยา 1 ครั้ง โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง
4. ยาที่จะทดสอบจะละลายในน้ำมันถั่วลิสง
5. สัตว์ทดลองถูกเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 24°C อุณหภูมิที่ทำการทดลอง 29°C
6. หนูที่ได้รับเชื้อแต่ไม่ได้รับยาซึ่งตายก่อนวันที่ 6 เรียกว่า "toxic death"
7. ส่วนใหญ่การทดสอบมักไม่ทราบขนาดยามาก่อน มักจะเริ่มโดยใช้ขนาดสูงๆ เช่น 640 หรือ 320 หรือ 160 มก./กก. แล้วแต่ประมาณสารที่มี หากการทดสอบครั้งแรกใช้ 640, 160, 40 มก./กก. แล้วการทดสอบได้ผล ก็ทำซ้ำอีกโดยใช้ขนาดยา 1280, 640, 320, 160, 80, 40 มก./กก. แต่ละขนาดยาใช้สัตว์ 5 ตัว ยามาตรฐานที่ใช้ในการทดลอง คือ pyrimethamine
8. ในการให้ยาโดยวิธีกรอกปาก ใช้ 0.5% hydroxyethylcellulose และ 0.1% Tween 80 เป็นตัวแขวนตะกอน
9. MED = minimum effective dose เป็นขนาดยาที่ทำให้ระยะเวลาที่หนูมีชีวิตรอด (survival time) ของหนูกลุ่มที่ติดเชื้อและได้รับยาเพิ่มเป็น 2 เท่าของกลุ่มที่ติดเชื้อแต่ไม่ได้รับยา หนูที่ติดเชื้อและได้รับยาซึ่งอยู่รอดเกิน 60 วัน ถือว่ายานั้นรักษาโรคได้หายขาด ในทางปฏิบัตินักวิจัยมักจะให้ความสนใจกับยา ที่เพิ่มระยะเวลาที่หนูอยู่รอดได้ถึง 14 วันหรือนานกว่า ถ้าหากค่า LD_{50} ของยามากกว่า MED 3 เท่า ยานี้ก็น่าจะได้รับการศึกษาวิจัยต่อไปอย่างละเอียด

Abatan และ Makinde (12) ได้ศึกษาฤทธิ์การต้านมาลาเรีย ของสารสกัดจากใบสะเดาอินเดีย (*Azadirachta indica*) และ *Pisum sativum* โดยใช้สารสกัด

อย่างหยาบๆ ซึ่งให้เมธานอลเป็นตัวทำละลาย วิธีทดสอบใช้ขนาดสารสกัด 125, 250, 500 มก./กก. กรอกปากหนูถีบจักรที่ได้รับเชื้อ (1×10^7 *P.berghei*-infected erythrocytes) มาแล้ว 72 ชม. กลุ่มเปรียบเทียบได้รับน้ำกลั่นไม่เกินตัวละ 0.5 มล. และอีกกลุ่มที่ได้รับยามาตราฐานคือ chloroquine ผลการทดลองพบว่า สารสกัดจากสมุนไพรทั้งสองชนิด ไม่สามารถเพิ่มระยะเวลาที่หนูมีชีวิตรอดได้อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งต่างจากยามาตราฐานคือ chloroquine ซึ่งมีฤทธิ์ที่เห็นได้อย่างเด่นชัด กล่าวคือระยะเวลาที่อยู่รอดของหนูติดเชื้อที่ไม่ได้รับยา มีค่าประมาณ 3.8 วันโดยเฉลี่ย แต่เมื่อได้รับ chloroquine 10 มก./กก. จะยืดเวลาไปได้มากกว่า 30 วัน

- Four-day test (40) : วิธีนี้นิยมใช้กันมากกว่า six-day test เพราะทำเสร็จได้ภายใน 1 สัปดาห์ คือเริ่มจากวันจันทร์ถึงวันศุกร์ โดยวันที่ฉีดเชื้อมาลาเรีย ถือเป็น D_0 เริ่มให้ยา แล้วให้ต่อไปอีกในวันต่อๆ ไป (D_1, D_2, D_3) พอถึง D_4 ก็เจาะเลือดมาตรวจหาปริมาณปรสิต (% parasitemia) ปริมาณปรสิตที่ใช้ 10^7 infected erythrocytes/0.2 ml. การให้เชื้อทางหลอดเลือดดำจะได้ผลสม่ำเสมอกว่าให้ทางช่องท้อง

ขนาดยาที่ให้ คือ 3, 10, 30 มก./กก. ละลายในน้ำกลั่นถ้าละลายได้ ถ้าไม่ละลายใช้แขวนตะกอนด้วย 0.5% carboxymethylcellulose และ 0.2% Tween 80 การให้ยาอาจให้ทางใต้ผิวหนังก่อนถ้าหากมีสารน้อย ถ้าได้ผลคืออาจลองให้ทางปาก การให้ยาให้วันละครั้ง การหา ED_{50} หาได้จากกราฟระหว่าง erythrocyte infection rate (EIR) กับขนาดยาที่ใช้ probit-log scale การหาค่า ED_{50}, ED_{90} หาจากกราฟส่วนที่เป็นเส้นตรง ED_{50} เป็นขนาดยาคิดเป็น มก./กก./วัน

Abatan และ Makinde (12) ได้ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดอย่างหยาบๆ จาก *Azadirachta indica* และ *Pisum sativum* เมื่อใช้ Rane's test พบว่าไม่ได้ผล แต่เมื่อใช้ four-day test พบว่า *P.sativum* ไม่ลด % parasitemia อย่างมีนัยสำคัญ แต่ *A.indica* ที่ขนาดยา 500 และ 125 มก./กก. ให้โดยการกรอกปาก จะลด % parasitemia ได้อย่างมีนัยสำคัญ แม้ว่าจะไม่มากนัก

ในการทดสอบหาฤทธิ์ฆ่าเชื้อมาลาเรียโดย Rane's test มักนิยมใช้เป็นวิธีทดสอบเบื้องต้น เพราะสะดวก ประหยัด ไม่ต้องใช้เวลานานในการทดสอบ เพราะพิจารณาเฉพาะระยะเวลาที่หนูมีชีวิตรอด เมื่อได้ผลจึงนำมาทดสอบด้วย four-day test เพื่อหาปริมาณเชื้อในเลือดอีกครึ่งหนึ่ง ข้อจำกัดของวิธีทดสอบนี้คือ สารเคมีบางชนิดที่มีประสิทธิภาพอาจไม่ได้ผล เช่น proguanil นอกจากนั้นสารที่มีสูตรโครงสร้างทางเคมีคล้าย proguanil ที่มีฤทธิ์แรงกว่า quinine 4 เท่าในการฆ่า *P.gallinaceum* จะไม่พบว่ามีประสิทธิภาพ ใน Rane's test อย่างไรก็ตาม Rane's test ก็ยังนับว่ามีประโยชน์มาก และเป็นที่นิยมใช้กันอยู่

การทดสอบประสิทธิภาพของยาในการฆ่าเชื้อมาลาเรียในสัตว์ฟันแทะ โดยเฉพาะในหนูถีบจักร เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมาก ข้อควรระวังในการใช้ *P.berghei* test system มีดังนี้

1. สายพันธุ์ (strain) หนูถีบจักรจะไวต่อเชื้อ *P.berghei* ไม่เท่ากัน NMRI mice จะติดเชื้อช้ากว่า Swiss mice มาก การจะเลือกใช้หนูถีบจักรสายพันธุ์ใด ขึ้นอยู่กับปริมาณของสัตว์ที่มีอยู่ว่าเป็นชนิดใดมากและหาได้ง่าย ควรเลือกใช้ตามความเหมาะสม แต่พึงระลึกว่าการติดเชื้อของหนูแต่ละสายพันธุ์จะมีความไวต่างกัน

2. อายุและเพศ หนูถีบจักรเพศผู้ ขนาด 18-20 กรัม มักเป็นที่นิยมใช้มากกว่าเพศเมีย เพราะเกรงว่าอาจจะมียอทธิพลของการเปลี่ยนแปลงฮอร์โมนของสัตว์ในระหว่างการตกไข่เข้ามาเกี่ยวข้อง หนูถีบจักรที่มีอายุมากๆ มักจะติดเชื้อ *P.berghei* ได้ง่าย

3. ภาวะการติดเชื้ออื่นๆ จะต้องพยายามให้สัตว์ที่ใช้ในการทดลอง มีสุขภาพดี ไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส หรือ พยาธิ

4. อาหารสัตว์ ในกรณีที่สัตว์กลุ่มเปรียบเทียบไม่ได้รับยามีจำนวนปรสิطن้อย ให้คำนึงถึงความเป็นไปได้ของการมี PABA หรือ folic acid จำนวนน้อยกว่าปกติ ซึ่งอาจจำเป็นต้องให้เพิ่ม เช่น ให้ 0.01% PABA หรือ 0.1% folic acid ในน้ำดื่ม แล้วทำการทดลองดูว่าระหว่างสัตว์ที่ได้รับ PABA หรือ folic acid เพิ่มเดิมนั้นอัตราการติดเชื้อ ต่าง

จากกลุ่มที่ไม่ได้รับอย่างไร หากต่างกันอย่างมีนัยสำคัญอาจจำเป็นต้อง เปลี่ยนชนิด ของอาหารสัตว์

5. สภาพแวดล้อม อุณหภูมิที่ทำการทดลอง ความเครียดของสัตว์ อาจมีผลต่อ การทดลอง ดังนั้นควรให้สัตว์ที่ให้อยู่ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมโดยสม่ำเสมอ

6. สายพันธุ์ของปรสิติ สายพันธุ์ที่มีการถ่ายทอดในสัตว์ทดลอง มาเป็นเวลานาน จะให้ผลที่ค่อนข้างสม่ำเสมอต่อยาฆ่าเชื้อมาลาเรีย ในกรณีที่เป็นสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา ผลของยาฆ่า เชื้อมาลาเรียจะมีความแตกต่างกันได้ง่าย การเก็บเชื้อไว้ในไนโตรเจนเหลว จะทำให้เชื้ออยู่ได นาน โดยที่ความไวต่อยาจะไม่เปลี่ยนแปลง ทำให้สะดวกในการเก็บเชื้อไว้ทดสอบในโอกาสต่อไป

7. เทคนิคที่ใช้ในการทดลอง ห้องปฏิบัติการแต่ละแห่ง มักจะกำหนดมาตรฐาน เกี่ยวกับปริมาณของเชื้อที่จะให้ เวลาที่จะนำเชื้อมาใช้ ระยะเวลาในการเตรียมเชื้อ วิธีการให้ ยา ระยะเวลาที่ให้ยาครั้งแรก ความถี่ของการให้ยา ระยะเวลาที่จะหยุดการทดสอบ วิธีการ ตรวจจำนวนปรสิติ ซึ่งเทคนิคเหล่านี้ อาจแตกต่างกันไปในแต่ละห้องปฏิบัติการ

การศึกษาทางพิษวิทยา

- การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลัน (acute toxicity) : การศึกษาทางพิษ วิทยาในขั้นแรก ทำได้โดยทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันโดยหาค่า LD_{50} หรือ median le-
thal dose คือ ขนาดยาที่ทำให้สัตว์ทดลองตายไปครึ่งหนึ่ง หรือ 50 % การบอกค่า LD_{50} จะ ต้องบ่งระยะเวลาที่ทำการทดลอง วิธีให้ยา เช่น ให้ทางปาก ทางหลอดเลือด หรือทางช่อง ท้อง และชนิดของสัตว์ทดลอง โดยมากมักจะทำในสัตว์ทดลองหลายชนิด แต่ในทางปฏิบัติมักใช้ หนูถีบจักรและหนูขาวก่อน การหาค่า LD_{50} อาจใช้ probit analysis หรือ linear regression analysis ก็ได้ หลังจากนั้นอาจทำการทดลองในสุนัขหากด้วยนั้นน่าสนใจ เช่น ศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันในขนาดยาสูงมากๆ เพื่อหาขนาดยาสูงสุดที่สุนัขจะทนได้ ในการศึกษา ความเป็นพิษเฉียบพลันอาจจำเป็นต้องสังเกตจนถึง 14 วัน

- การศึกษาความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลัน (subacute toxicity): การศึกษา ในระยะนี้มีความจำเป็น เพื่อ เป็นข้อมูลในการพยากรณ์อาการพิษหรืออาการข้างเคียงในคน จุดประ-
สงค์หลักของการทดลองคือ เพื่อดูว่าสารที่ทดลองทำให้เกิดการ เปลี่ยนพฤติกรรมหรือการทำงาน หรือการเปลี่ยนแปลงรูปร่างลักษณะของอวัยวะหรือ เนื้อเยื่อ ในการทดลองระยะนี้สัตว์จะได้รับยา

ระยะเวลาหนึ่ง เช่น 28 วันติดต่อกัน โดยให้ขนาดปานกลางอย่างเดียว หรือถ้าต้องการศึกษาโดยละเอียดก็ให้ยา 3 ขนาดคือ ขนาดต่ำ ขนาดปานกลางและขนาดสูง ทั้งนี้เพื่อศึกษาถึง ความเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นว่ามีความสัมพันธ์กับขนาดและระยะเวลาที่ให้ยาอย่างไร

ตารางที่ 4. แสดงถึงการศึกษาทางพิษวิทยาของ US Army Antimalarial Drug Development Programme ค่า LD₅₀ ที่แสดง เป็นของสารที่มีพิษมากที่สุดในแต่ละกลุ่มของสารที่ใช้ทดลอง ในการศึกษาระยะนี้จะดูผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ lymphoid tissues, bone marrow, thymus, ระบบเลือด การเปลี่ยนแปลงทาง histopathology ของ ตับ ไต กล้ามเนื้อลาย ระบบทางเดินอาหาร เมื่อใช้สารในขนาดสูงๆ ซึ่งมักจะพบว่าการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นต่อระบบต่างๆ เหล่านี้

- การศึกษาความเป็นพิษเรื้อรัง (chronic toxicity) : การศึกษาขั้นนี้จะทำต่อเมื่อสารเคมีที่ศึกษามีศักยภาพค่อนข้างสูงมาก น่าจะนำไปใช้ได้ทางคลินิก เมื่อถึงระยะนี้มักจะรวบรวมข้อมูลต่างๆ เกี่ยวกับเภสัชจลนศาสตร์ในสัตว์ทดลองแล้ว ในการศึกษาระยะนี้จะมีการทดสอบ carcinogenic effect และ reproductive/teratogenic effects ระยะเวลาการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังขึ้นอยู่กับการนำไปใช้ เช่น ถ้าใช้เป็น single dose therapy ระยะเวลาศึกษาอาจเป็น 3-6 เดือน ถ้าเป็น prophylactic agent อาจต้องใช้เวลาราว 2 ปี หรือนานกว่า รายละเอียดของการศึกษาในระยะนี้จะคล้าย subacute toxicity แต่ขนาดยาต้องปรับให้เหมาะสม โดยอาศัยข้อมูลต่างๆ ที่ได้จากการทดสอบ subacute toxicity ข้อมูลทางเภสัชจลนศาสตร์และขนาดยาที่คาดว่าจะใช้

การทดสอบความเป็นพิษในสัตว์ที่กล่าวมา เป็นหลัก เกณฑ์ทั่วไป เพื่อขอให้ทราบแนวทางว่าสารที่ทดสอบมีความเป็นพิษมากน้อยเพียงใด แล้วได้หมายความว่า จะตรวจสอบความเป็นพิษได้ทุกอย่าง เป็นที่ทราบกันดีว่ายารักษาเชื้อมาลาเรียมักจะมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ค่อนข้างกว้างขวาง ดังนั้นสารเคมีหรือยาที่น่าจะมีประโยชน์ควรมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อมาลาเรียได้ดี โดยที่ขนาดยาที่ใช้มีฤทธิ์อื่นๆ น้อยมาก ในแง่ของความเป็นพิษของยาฆ่าเชื้อมาลาเรียที่มักจะทดสอบคือ photosensitisation และ mutagenic activity สำหรับความเป็นพิษอย่างแรก ใช้วิธีฉายผิวหนังของหนูถีบจักรด้วยรังสีอุลตราไวโอเลตเป็นเวลา 72 ชม. แล้วดูว่ามีผื่นแดงหรือไม่ เมื่อได้รับยา

ตารางที่ 4. Predominant toxicological observations for the major classes of antimalarial compounds evaluated in the US Army Drug Development Programme. From (1).

Class	Compounds tested	Oral LD ₅₀ male rats ^a (mg/kg)	Clinical pathology/target organs from subacute toxicity studies ^b	
			Rat	Dog
Folate metabolism inhibitors	4	926	↓ Weight gain ↓ WBC Lymphoid tissue GI tract	↓ Weight gain ↓ WBC, ↓ reticulocytes ↑ BUN Lymphoid tissue Bone marrow GI tract, kidney
Pyridine-carbinols	2	518	↓ Weight gain ↑ WBC, ↑ SGOT, ↑ SGPT ↑ alk. phos., ↑ BUN Lymphoid tissue GI tract Skel. muscle	↓ Weight gain Emesis, ↑ SGPT Lymphoid tissue Bone marrow
Quinoline-carbinols	3	745	↓ Weight gain ↓ WBC, ↑ SGOT ↑ SGPT, ↑ BUN GI tract, kidney Liver	↓ Weight gain Emesis, ↑ SGOT ↑ SGPT, ↑ alk. phos. ↓ Reticulocytes Lymphoid tissue Bone marrow GI tract, liver Kidney
Phenanthrene-carbinols	3	≥ 1000	Alopecia, ↑ WBC ↓ Weight gain ↓ Reticulocytes ↑ SGOT, ↑ SGPT Lymphoid tissue Bone marrow Skel. muscle	Emesis, ↑ WBC ↓ Weight gain ↓ Reticulocytes ↑ SGPT, ↑ BUN Lymphoid tissue Bone marrow GI tract, kidney
8-Amino-quinolines	3	177	Rough hair coat ↓ Weight gain ↑ Reticulocytes ↑ WBC, ↑ Hct ↓ Platelets ↑ SGOT, ↑ SGPT Heart, Skel. muscle Liver, kidney	Cyanosis, ↑ SGOT ↓ Weight gain ↑ MetHb ↑ Reticulocytes ↓ Platelets ↑ Haptoglobins Heart, liver Lymphoid tissue

^a LD₅₀ value given is for the most toxic compound in each class

^b Observations are those that were present in a majority of compounds in each class
↓, decrease; ↑, increase; WBC, total leucocyte count; BUN, blood urea nitrogen; GI tract, Gastrointestinal tract; SGOT, serum glutamic oxaloacetic transaminase; SGPT, serum glutamic pyruvic transaminase; alk. phos., alkaline phosphatase; Hct, haematocrit; metHb, methamoglobin

ส่วน mutagenic activity ใช้ Ames' test นอกจากการทดสอบดังกล่าวมาแล้ว อาจมีวิธีอื่นๆ ที่เฉพาะเจาะจงซึ่งอาจต้องนำมาใช้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาและสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารที่ทดสอบนั้นๆ

การศึกษาทางเภสัชวิทยา

การศึกษาทางเภสัชวิทยาของสารเคมีหรือยารักษามาลาเรียจะทำได้เป็น 2 ลักษณะ คือ การศึกษาทางเภสัชจลนศาสตร์ และทางเภสัชฤทธิ์วิทยา การศึกษาอย่างแรกเกี่ยวข้องกับ การหาปริมาณของสารที่ถูกดูดซึม เมื่อให้โดยการกรอกปาก การวัดระดับสารในเลือด เมื่อให้ยาโดยวิธีต่างๆ เช่น ทางปาก ทางหลอดเลือด หรือทางช่องท้อง เพื่อเป็นข้อมูลในการคำนวณหาขนาดและช่วงระยะเวลาการให้ยาที่เหมาะสม นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเกี่ยวกับ การกระจายของยาในร่างกาย การที่ยาจับกับโปรตีนในเลือด การเปลี่ยนแปลงและการขับถ่ายยา การสะสมของยาในร่างกาย เป็นต้น

ส่วนการศึกษาทางเภสัชฤทธิ์วิทยานั้น ในกรณีที่เป็นสารเคมีชนิดใหม่ สิ่งที่จะช่วยได้มากคือ Hippocratic observation ซึ่งสามารถทำได้พร้อมๆ กับการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลัน คือนอกจากจะหาจำนวนของสัตว์ที่ตายแล้ว ยังศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของระบบต่างๆ ด้วย เช่น ระบบประสาทส่วนกลาง ระบบประสาทอัตโนมัติ การทำงานของกล้ามเนื้อ ฯลฯ ข้อมูลเหล่านี้เป็นแนวทางในการเลือกวิธีการทดสอบที่เฉพาะเจาะจงมากขึ้น เช่น ถ้าสัตว์ท้องเดิน ก็ควรติดตามว่ามีการเปลี่ยนแปลงของระบบประสาทอัตโนมัติหรือไม่ หรือถ้าสัตว์หิบลหรือซึม ควรคำนึงถึงฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลาง เป็นต้น สำหรับนักวิจัยที่มีประสบการณ์สูง ข้อมูลจาก Hippocratic observation จะช่วยให้สามารถวางแผนงานวิจัยเพื่อศึกษาฤทธิ์อื่นๆ ต่อไปได้อย่างมีประสิทธิภาพ

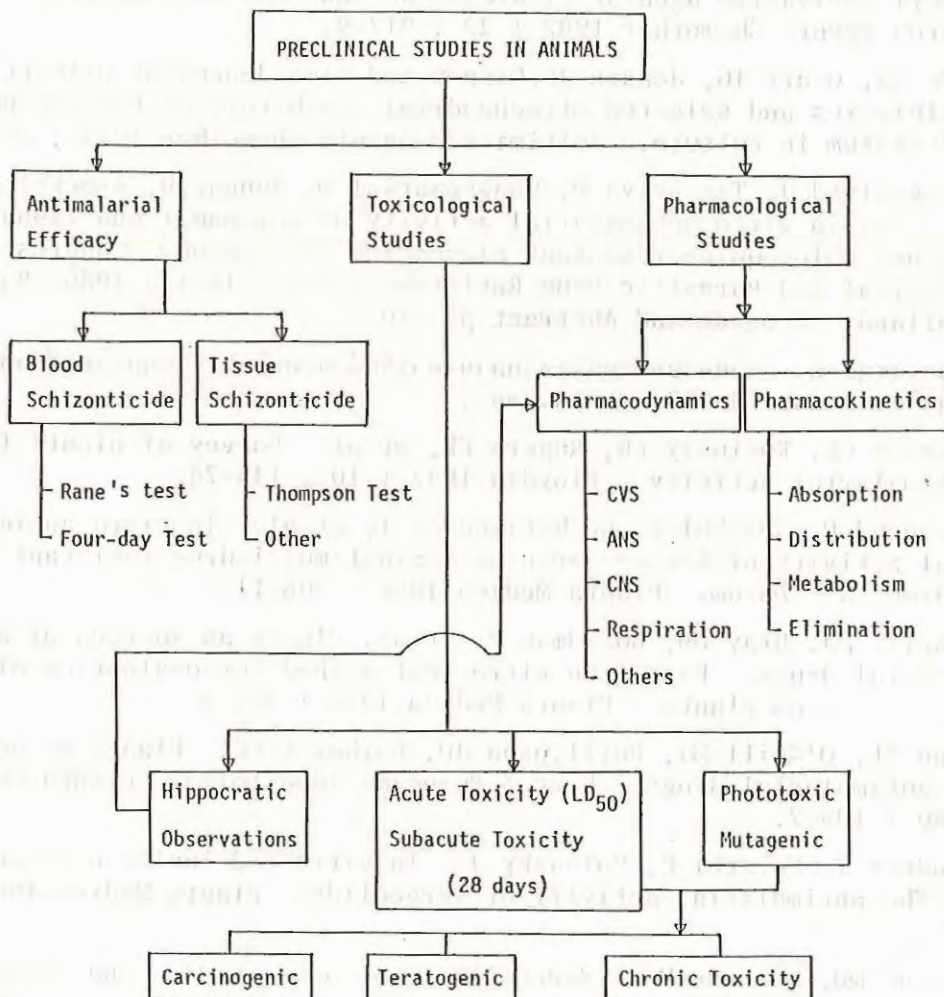
ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของยาฆ่าเชื้อมาลาเรียที่นักวิจัยให้ความสนใจ คือ ฤทธิ์ต่อระบบไหลเวียนเลือดและระบบหายใจ การวิจัยยาฆ่าเชื้อมาลาเรียที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่ๆ จะต้องศึกษาว่ายามีผลต่อระบบดังกล่าวต่างกันอย่างไร เมื่อให้โดยวิธีใดครั้งละมากๆ ในระยะเวลาสั้นๆ เปรียบเทียบกับการให้อย่างช้าๆ ข้อมูลต่างๆ เหล่านี้จะมีประโยชน์มากในทางคลินิก

การประเมินผลการทดลอง

ในการค้นคว้าหายาฆ่าเชื้อมาลาเรียชนิดใหม่ๆ นั้น มีสิ่งที่จะต้องศึกษารวบรวมเบื้องต้นคือ ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อมาลาเรียทั้งในน้ำยาเลี้ยงเชื้อ (in vitro) และในสัตว์ทดลอง (in vivo) จากนั้นก็ทำการศึกษาทางพิษวิทยาและเภสัชวิทยาในแง่ต่างๆ การพัฒนายาที่ใช้รักษาโรคอื่นๆ ที่มีจำหน่ายในท้องตลาดเพื่อนำมาใช้ในโรคมมาเลเรียมีข้อได้เปรียบคือมีข้อมูลเกี่ยวกับความเป็นพิษและเภสัชวิทยาอยู่พร้อมแล้ว แต่การพัฒนายาวิธีนี้จะไม่สามารถทำได้ หากขาดความรู้พื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ชีวภาพในหลายๆ สาขาซึ่งเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ของยา ความรู้ทางชีวเคมีของปรสิต เม็ดเลือดและอื่นๆ อย่างไรก็ตาม เมื่อพบว่ายาดังกล่าวมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อมาลาเรียในน้ำยาเลี้ยงเชื้อ ก็ไม่ได้หมายความว่ายาจะให้ได้ผลดีในการฆ่าเชื้อในสัตว์เพราะขนาดยาที่ได้ผลอาจสูงเกินไป ทำให้เกิดอาการข้างเคียงมาก ไม่ปลอดภัยในการใช้ Wongsa-watkul (63) พบว่ามียาในท้องตลาดหลายชนิดที่มีผลต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด เช่น verapamil, flunarizine, lidocaine, chlorpromazine และ mexiletine เป็นต้น มีฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรียในหลอดทดลอง แต่บางตัวไม่เหมาะที่จะศึกษาต่อไปอย่างละเอียด เพราะเป็นยาที่มีความปลอดภัยในการใช้ต่ำ เช่น lidocaine และ mexiletine โดยเฉพาะเมื่อให้โดยวิธีฉีด ยาที่ควรได้รับความสนใจเนื่องจากมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่ดี ได้แก่ verapamil, flunarizine และ chlorpromazine จึงนำไปศึกษาในสัตว์ทดลอง ปรากฏว่ามีผลในการฆ่าเชื้อมาลาเรียซึ่งเป็นเพียงการทดสอบเบื้องต้น การศึกษาขั้นต่อไปเป็นการหาขนาดยา ที่ทำให้ % parasitemia ลดลงอย่างมีประสิทธิภาพ พร้อมกับการวัดระดับยาในเลือด เพื่อนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีอยู่แล้วว่าระดับดังกล่าวอยู่ในขั้นปลอดภัยหรือไม่ จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่ายาบางชนิดเมื่อให้ด้วยขนาดหนึ่งสัตว์กลับตายเร็วขึ้น และในขนาดยาสูงๆ สัตว์ตายเร็วกว่าเมื่อให้ขนาดต่ำ เนื่องจากขนาดของยาอาจสูงเกินไปจนเกิดอันตรายต่อสัตว์ทดลอง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาในรายละเอียดต่อไป

สำหรับการพัฒนายาจากสมุนไพร เพื่อนำมาใช้เป็นยาด้านมาลาเรียมีข้อดีคือ อาจได้ยากลุ่มใหม่ๆ ซึ่งกลไกการออกฤทธิ์ต่างจากยาที่มีอยู่แล้ว ซึ่งจะก่อให้เกิดความรู้ ความเข้าใจ ในพยาธิสรีรวิทยาของโรคได้ดีขึ้น ในกรณีที่มีการเลือกสมุนไพรที่นำมาศึกษามีข้อมูลการใช้จากแพทย์

แผนโบราณมาช้านานแล้วว่าได้ผลดี ก็จะทำให้อัตราเสี่ยงต่อความล้มเหลวของงานวิจัยมีไม่สูงเกินไป ถึงกระนั้นก็ยังมีความยากลำบากและจะต้องมีการศึกษาวิจัยอย่างละเอียด (ดูรูปที่ ๒) การหาศักยภาพของสมุนไพรที่จะนำมาใช้รักษามาลาเรีย จะต้องทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้ง การเพิ่มปริมาณของปรสิตทั้งในน้ำยาเลี้ยงเชื้อและในสัตว์ แล้วนำมาพิจารณาเกี่ยวกับการศึกษาความเป็นพิษในระยะต่างๆ ขึ้นแรกคือ ถ้าค่า LD_{50} ใกล้เคียงกับ EC_{50} ในสัตว์ทดลอง ก็ไม่ควรศึกษาต่อไป เพราะสมุนไพรชนิดนั้นมีความเป็นพิษเกินกว่าที่จะนำมาใช้ในคนได้ กล่าวโดยสรุป การประเมินศักยภาพของสมุนไพรต้องประกอบด้วยข้อมูลอย่างน้อย ๓ เรื่องคือ เกี่ยวกับประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อมาลาเรีย ความเป็นพิษ และเภสัชวิทยาในแง่ต่างๆ ข้อมูลเหล่านี้จะต้องนำมา



รูปที่ ๒. แผนภูมิกการศึกษาวิจัยในสัตว์

วิเคราะห์ว่าสมควรจะทำการศึกษาริ้วยต่อไปคนหรือไม่ หลักเบื้องต้นคือ มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อได้ และมีความเป็นพิษน้อยมากในขนาดที่ใช้

เอกสารอ้างอิง

1. Heiffer MH, Davidson DE, Jr, Korte DW, Jr. Preclinical testing. In: Peters W, Richards WHG, eds. Handbook of experimental pharmacology. vol 68/I. Berlin : Springer-Verlag, 1984 : 352-73.
2. Vial HJ, Thuet M, Ancelin ML, Philippot JR, Chavis C. Phospholipid metabolism as a new target for malaria chemotherapy mechanism of action of D-2-amino-1-butanol. Biochem Pharmacol 1984 ; 33 : 2761-70.
3. Pfaller MA, Segal JJ, Krogstad DJ. Activity of ketoconazole and its deacyl derivative against *P.falciparum* and *Candida* isolates. Antimicrob Agents Chemother 1982 ; 22 : 917-9.
4. Divo AA, Geary TG, Jensen JB. Oxygen- and time-dependent effects of antibiotics and selected mitochondrial inhibitors on *Plasmodium falciparum* in culture. Antimicrob Agents Chemother 1985 ; 27:21-7.
5. Satayavivad J, Tan-ariya P, Wongsawatkul O, Bunnag D, Brockelman CR. The in vitro antimalarial activity of verapamil and flunarizine against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. Congress on Bacterial and Parasitic Drug Resistance. Dec. 10-13, 1986, Bangkok, Thailand. Program and Abstract p. 170.
6. อวย เกตุสิงห์. รายงานการทดลองรักษามาลาเรียด้วยสมุนไพร. สมุดรวมเรื่องวิชาการแสดงในงานฉลองหกลสิบปีศิริราช พ.ศ.2493.
7. Spencer CF, Koniuszy FR, Rogers EF, et al. Survey of plants for antimalarial activity. Lloydia 1947 ; 10 : 145-74.
8. Pavanand D, Nutakul W, Dechatiwongse T, et al. In vitro antimalarial activity of *Brucea javanica* against multi-drug resistant *Plasmodium falciparum*. Planta Medica 1986 : 108-11.
9. O'Neill MJ, Bray DM, Boardman P, et al. Plants as sources of antimalarial drugs. Part 1 in vitro test method for evaluation of crude extracts from plants. Planta Medica 1985 : 394-8.
10. Chan KL, O'Neill MJ, Phillipson JD, Warhurst DC. Plants as sources of antimalarial drugs. Part 3 *Eurycoma longifolia*. Planta Medica 1986 : 105-7.
11. Fandeur T, Moretti C, Polonsky J. In vitro and invivo assesement of the antimalarial activity of sergeolide. Planta Medica 1985 : 20-3.
12. Abatan MO, Makinde MJ. Screening *Azadirachta indica* and *Pisum sativum* for possible antimalarial activities. J Ethnopharmacol 1986 ; 17 : 85-93.

13. Rochanakij S. Mechanism of action of qinghaosu (artemisinin) and related compounds. Bangkok : Mahidol University, 1984. MSc. Thesis.
14. China cooperative research group on qinghaosu and its derivatives as antimalarials. Chemical studies on qinghaosu (artemisinin). J Trad Chin Med 1982 ; 2 : 3-8.
15. China cooperative research group on qinghaosu and its derivatives as antimalarials. The chemistry and synthesis of qinghaosu derivatives. J Trad Chin Med 1982 ; 2 : 9-16.
16. China cooperative research group on qinghaosu and its derivatives as antimalarials. Antimalarial efficacy and mode of action of qinghaosu and its derivatives in experimental models. J Trad Chin Med 1982 ; 2 : 17-24.
17. China cooperative research group on qinghaosu and its derivatives as antimalarials. Metabolism and pharmacokinetics of qinghaosu and its derivatives. J Trad Chin Med 1982 ; 2 : 25-30.
18. China cooperative research group on qinghaosu and its derivatives as antimalarials. Studies on the toxicity of qinghaosu and its derivatives. J Trad Chin Med 1982 ; 2 : 31-8.
19. China cooperative research group on qinghaosu and its derivatives as antimalarials. Clinical studies on the treatment of malaria with qinghaosu and its derivatives. J Trad Chin Med 1982 ; 2 : 45-50.
20. Yany Q, Shi W, Li R, Gan J. The antimalarial and toxic effect of artesunate on animal models. J Trad Chin Med 1982 ; 2 : 99-103.
21. Li G, Guo X, Jin R, et al. Clinical studies on treatment of cerebral malaria with qinghaosu and its derivatives. J Trad Chin Med 1982 ; 2 : 125-30.
22. Qian R, Li Z, Yu J, Ma D. The immunologic and antiviral effect of qinghaosu. J Trad Chin Med 1982 ; 2 : 271-6.
23. Ye Z, Li Z, Li G, et al. Effects of qinghaosu and chloroquine on the ultrastructure of the erythrocytic stage of *P.falciparum* in continuous cultivation in vitro. J Trad Chin Med 1983 ; 3:95-102.
24. Jiang JB, Li GO, Guo XB, Kong YC, Arnold K. Antimalarial activity of mefloquine and qinghaosu. Lancet 1982 ; 2 : 285-7.
25. Schmid G, Hofheinz W. Total synthesis of qinghaosu. J Am Chem Soc 1983 ; 105 : 624-5.
26. Li ZL, Gu HM, Warhurst DC, Peters W. Effect of qinghaosu and related compounds on incorporation of (G^3H) hypoxanthine by *Plasmodium falciparum* in vitro. Trans R Soc Trop Med Hyg 1983 ; 77 : 522-3.
27. Gu HM, Warhurst DC, Peters W. Rapid action of qinghaosu and rela-

- ted drugs on incorporation of (^3H) isoleucine by *Plasmodium falciparum* in vitro. Biochem Pharmacol 1983 ; 32 : 2463-6.
28. Gu HM, Warhurst DC, Peters W. Uptake of ^3H -dihydroartemisinin by erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum* in vitro. Trans R Trop Med Hyg 1984 ; 78 : 265-70.
 29. Rochanakij S, Thebtaranonth Y, Yenjai C, Yuthavong T. Nimbolide, a constituent of *Azadirachta indica*, inhibits *Plasmodium falciparum* in culture. Mahidol U. Annual Research Abstract 1984 ; 11 : 340.
 30. Klayman DL, Lin AJ, Acton N, et al. Isolation of artemisinin (qinghaosu) from *Artemisia annua* growing in the United States. J Nat Product 1984 ; 47 : 715-7.
 31. Liersch R, Soicke H, Stehr C, Tullner H-U. Formation of artemisinin in *Artemisia annua* during one vegetation period. Planta Medica 1986 : 387-90.
 32. Klayman DL. Qinghaosu (Artemisinin) : an antimalarial drug from China. Science 1985 ; 228 : 1049-55.
 33. Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. Science 1976 ; 193 : 673-5.
 34. Osdone TS, Russell PB, Rane L. 2,4,7-triamino-6-ortho-substituted arylpteridines. A new series of potent antimalarial agents. J Med Chem 1967 ; 10 : 431-4.
 35. Fink E, Kretschmer W. Chemotherapeutische Wirkung von Standard-Malariamitteln in einem vereinfachten Prüfverfahren in der *Plasmodium vinckei* - Infektion der NMRI-Maus. Z Tropenmed Parasitol 1970 ; 21 : 167-81.
 36. Goodwin L. Response of *Plasmodium berghei* to antimalarial drugs. Nature 1949 ; 164 : 1133.
 37. Schneider J, Decourt PH, Montezin G. Sur l'utilisation d'un nouveau plasmodium (*Pl.berghei*) pour l'étude et la recherche de médicaments antipaludiques. Bull Soc Pathol Exot 1949 ; 42 ; 449-52.
 38. Peters W. Competitive relationship between *Eperythrozoon coccoides* and *Plasmodium berghei* in the mouse. Exp Parasitol 1965 ; 16 : 158-66.
 39. Warhurst D, Folwell R. Measurement of the growth rate of the erythrocytic stages of *Plasmodium berghei* and comparisons of the potency of inocula after various treatments. Ann Trop Med Parasitol 1968 ; 62 : 349-60.
 40. Peters W. Chemotherapy and drug resistance in malaria. New York : Academic Press, 1970 : 64-136.
 41. Thompson PE, Bayles A, Olszewski B. PAM 1392 [2,4-diamino-6 (3,4-dichlorobenzylamino)-quinazoline] as a chemotherapeutic agent:

- Plasmodium berghei*, *P.cynomolgi*, *P.knowlesi*, and *Trypanosoma cruzi*. Exp Parasitol 1969 ; 25 : 32-49.
42. Peters W. Drug resistance in *Plasmodium berghei* I. chloroquine resistance. Exp Parasitol 1965 ; 17 : 80-9.
 43. Most H, Herman R, Schoenfeld C. Chemotherapy of sporozoite and blood induced *Plasmodium berghei* infections with selected antimalarial agents. Am J Trop Med Hyg 1967 ; 16 : 572-5.
 44. Most H, Montuori W. Rodent systems (*Plasmodium berghei*-*Anopheles stephensi*) for screening compounds for potential causal prophylaxis. Am J Trop Med Hyg 1975 ; 24 : 179-82.
 45. Berberian DA, Slighter RG, Freele HW. Causal prophylactic effect of menoctone (a new hydroxynaphthoquinone) against sporozoite-induced *Plasmodium berghei* infection in mice. J Parasitol 1968 ; 54 : 1181-9.
 46. Vincke H. The effects of pyrimethamine and sulphormethoxine on the preerythrocytic and sporogonous cycle of *Plasmodium berghei*. Ann Soc Belge Med Trop 1970 ; 50 : 339-58.
 47. Gregory KG, Peters W. The chemotherapy of rodent malaria, IX. causal prophylaxis, part I : a method for demonstrating drug action on exoerythrocytic stages. Ann Trop Med Parasitol 1970 ; 64 : 15-24.
 48. Peters W, Davies EE, Robin BL. The chemotherapy of rodent malaria, XXIII. causal prophylaxis, part II : practical experience with *Plasmodium yoelii nigeriensis* in drug screening. Ann Trop Med Parasitol 1975 ; 69 : 311-28.
 49. Hill J. The activity of antibiotics and logn-acting compounds against the tissue stages of *Plasmodium berghei*. Ann Trop Med Parasitol 1975 ; 69 : 421-7.
 50. Fink E. Kausal prophylaktische Wirkung von Standard-Malariamitteln bei der Nagetiermalaria (*Plasmodium berghei yoelii*). Z Tropenmed Parasitol 1972 ; 23 : 35-47.
 51. Fink E. Assessment of causal prophylactic activity in *Plasmodium berghei yoelii* and its value for the development of new antimalarial drugs. Bull WHO 1974 ; 50 : 213-22.
 52. King ME, Shefner AM, Schneider MD. Utilization of a sporozoite induced rodent malaria system for assessment of drug activity. Proc Helminthol Soc Wash 1972 ; 39 : 288-91.
 53. Rane DS, Kinnamon KE. The development of a "high volume tissue schizonticidal drug screen" based upon mortality of mice inoculated with sporozoites of *Plasmodium berghei*. Am J Trop Med Hyg 1979 ; 28 : 137-47.
 54. Davidson D, Ager A, Brown J, Chapple F, Whitmire R, Rossan R. Recent development of tissue schizonticidal antimalarial drugs.

Bull WHO 1981 ; 59 : 463-79.

55. Schneider J, Bouvry M, Quéllec J. *Plasmodium berghei* et chimiothérapie. Ann Soc Belge Med Trop 1965 ; 45 : 435-49.
56. Benazet F. Activité d'un nouvel antimalarique, le 16.126 R.P. sur le paludisme expérimental des animaux de laboratoire. Bull Soc Pathol Exot 1967 ; 60 : 221-8.
57. Thompson PE, Olszewski BJ, Elslager EF, Worth DF. Laboratory studies on 4,6-diamino-1-(p-chlorophenyl)-1,2-dihydro-2,2-dimethyl-5-triazine pamoate CI-501 as a repository antimalarial drugs. Am J Trop Med Hyg 1963 ; 12 : 481-93.
58. Thompson PE, Olszewski BJ, Waitz J. Laboratory studies on the repository antimalarial activity of 4,4'-diacetylaminodiphenylsulfone, alone and mixed with cycloguanil pamoate (CI-501). Am J Trop Med Hyg 1965 ; 14 : 343-53.
59. Thompson PE, Bayles A, Olszewski BJ. Antimalarial activity of 2,4-diamino-6 [(3,4-dichlorobenzyl) nitroso-amino] quinazoline (CI-679 base) and CI-679 acetate. Am J Trop Med Hyg 1970 ; 19 : 12-26.
60. Judge B, Howells R, Graham N, McNeill M. Sustained-release implants in the chemotherapy of experimental rodent malaria, II. the effects of sulphadiazine, pyrimethamine, and cycloguanil in biodegradable polymer matrices. Ann Trop Med Parasitol 1981 ; 75 : 511-9.
61. Schofield P, Howells RE, Peters W. A technique for the selection of long-acting antimalarial compounds using a rodent malaria model. Ann Trop Med Parasitol 1981 ; 75 : 521-31.
62. Ager AL, Jr. Rodent malaria models. In : Peters W, Richards WHG, eds. Handbook of experimental pharmacology. vol 68/I. Berlin : Springer-Verlag, 1984 : 225-80.
63. Wongsawatkul O. The detection of antimalarial activity of drugs presently used for cardiovascular disorders. Bangkok : Mahidol University, 1986. MSc. Thesis.