ผลของสารเบอเบอรีนต่อเชื้อ *Trypanosoma evansi* ในหนูทดลอง

นางสาวศิริลักษณ์ เจนช่างกล

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์ ภาควิชาพยาธิวิทยา
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2548
ISBN 974-17-4082-4
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THE EFFECT OF BERBERINE ON *Trypanosoma evansi* INFECTION IN MICE

Miss Siriluk Jenchangkol

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Veterinary Pathobiology
Department of Veterinary Pathology
Faculty of Veterinary Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2005

ISBN 974-17-4028-4

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของสารเบอเบอรีนต่อเชื้อ *Trypanosoma evansi* ในหนูทดลอง
โดย	นางสาวศิริลักษณ์ เจนช่างกล
สาขาวิชา	พยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ สพ.ญ. ดร. นารีรัตน์ วิเศษกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สพ.ญ. ดร. มีนา สาริกะภูติ
	รองศาสตราจารย์ ดร. มธุรส พงษ์ลิขิตมงคล

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยอนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ น.สพ.ดร. ณรงค์ศักดิ์ ชัยบุตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร. อัจฉริยา ไศละสูต)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(อาจารย์ สพ.ญ.ดร. นารีรัตน์ วิเศษกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร. มีนา สาริกะภูติ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. มธุรส พงษ์ลิขิตมงคล)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.โกสุม จันทร์ศิริ)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศิริลักษณ์ เจนช่างกล: ผลของสารเบอเบอรีนต่อเชื้อ *Trypanosoma evansi* ในหนูทดลอง (THE EFFECT OF BERBERINE ON *Trypanosoma evansi* INFECTION IN MICE) อ. ที่ปรึกษา: อ. สพ.ญ. ดร. นารีรัตน์ วิเศษกุล, อ. ที่ปรึกษาร่วม: ผศ. สพ.ญ. ดร. มีนา สาริกะภูติ, รศ. ดร. มธุรส พงษ์ลิขิตมงคล, 62 หน้า. ISBN: 974-17-4082-4

เบอเบอรีน เป็นสารสกัดอัคคาลอยด์ที่สามารถพบได้ในพืชสมุนไพร และมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อชนิดต่าง ๆ ได้หลายชนิด การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดสอบสารเบอเบอรีนต่อเชื้อ *T. evansi* NpI 8/2 และ VPh03 ซึ่งเป็นเชื้อโปรโตซัวที่เป็นปรสิตในกระแสเลือดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยแบ่งการศึกษาออกเป็น 3 วิธี คือ การศึกษาในหนูทดลอง การศึกษาในหลอดทดลอง(ศึกษาเพิ่มเติม) และการทดสอบการเปลี่ยนแปลงของ telomerase activity ของเชื้อหลังได้รับสารเบอเบอรีน ผลการศึกษาในหนูทดลอง พบว่า เมื่อทำการฉีดสารเข้าทางช่องท้องหนูขนาด 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ที่ระดับเชื้อ $10^{7.5}$ ตัวต่อเลือด 1 มิลลิลิตร สารเบอเบอรีนไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้ง 2 isolates และเมื่อทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยฉีดสารเบอเบอรีนขนาด 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม 2 ครั้งที่ระดับเชื้อ $10^{7.5}$ และ$10^{8.4}$ ตัวต่อเลือด 1 มิลลิลิตร และที่ระดับเชื้อต่ำ ๆ คือ $10^{5.4}$ ตัวต่อเลือด 1 มิลลิลิตร พบว่า สารเบอเบอรีนไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้เช่นกัน ผลการศึกษาสารผสม Berenil® ขนาด 0.58 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม กับสารเบอเบอรีนขนาด 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า สารผสมเบอเบอรีนไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อหรือไม่มีฤทธิ์เสริมการทำงานของ Berenil®ได้ และสารเบอเบอรีนมีค่าความเป็นพิษเฉียบพลันเบื้องต้น ในเวลา 24 ชั่วโมง เท่ากับ 25.29 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในทางตรงกันข้าม เมื่อทำการศึกษาในหลอดทดลอง โดยนำสารเบอเบอรีนมาเจือจางแบบ 2-fold dilution ตั้งแต่ระดับ 90.9-2.8 ไมโครโมลาร์ แล้วทดสอบกับเชื้อทั้ง 2 isolates พบว่า สารเบอเบอรีนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *T. evansi* NpI 8/2 และ VPh03 ได้ โดยมีค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) เท่ากับ 45.2 ไมโครโมลาร์ ที่เวลา 24 ชั่วโมง และ 22.6 ไมโครโมลาร์ ที่เวลา 72 ชั่วโมง ตามลำดับ ในขณะที่สารละลาย 0.5% DMSO ที่ใช้เป็นตัวทำละลายสารเบอเบอรีน ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *T. evansi* สำหรับผลการศึกษาการทดสอบการเปลี่ยนแปลงของ telomerase activity ของเชื้อ *T. evansi* NpI 8/2 ในหลอดทดลอง พบว่า สารเบอเบอรีนที่ระดับความเข้มข้น 2.8-90.9 ไมโครโมลาร์ ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ telomerase avtivity ของเชื้อ เมื่อทำการทดสอบกับสารละลายโปรตีนของเชื้อปริมาณ 5 ไมโครกรัม ในขณะที่ในกลุ่มของสารละลายโปรตีนปริมาณ10 และ 20 ไมโครกรัม สารเบอเบอรีนมีฤทธิ์เพิ่ม telomerase activity ของเชื้อ อย่างไรก็ตาม สารเบอเบอรีนอาจจะมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อที่เป้าหมายอื่น เนื่องจากสารเบอเบอรีนไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง telomerase activity ของเชื้อ ซึ่งควรทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

ภาควิชา พยาธิวิทยา
สาขาวิชา พยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์
ปีการศึกษา 2548

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4575568131: MAJOR Pathobiology

KEY WORDS: *Trypanosoma evansi* / BERBERINE/ TELOMERASE ACTIVITY

SIRILUK JENCHANGKOL: THE EFFECT OF BERBERINE IN *Trypanosoma evansi* IN MICE. THESIS ADVISOR: NAREERAT VISESHAKUL, Ph. D., THESIS COADVISORS: ASST. MEENA SARIKAPUTI, Ph. D., ASSOC. PROF. MATHUROSE PONGLIKITMONGKOL, Ph. D. 62 pp. ISBN: 974-17-4082-4

Effects of berberine, the natural herbal extract, on haemoflagellated protozoa, *Trypanosoma evansi* have been studied by three different approaches. In the first approach, the outbred mice were infected with 2 different isolates of *T. evansi*, NpI 8/2 and VPh03 followed by the intra-peritoneal injection of 10 or 20 mg/kg of berberine. There were no effects of berberine on both isolates to neither parasitemia of as high as $10^{8.4}$ nor as low as $10^{5.4}$ trypanosomes/ml mice blood. Berberine was used in combination with Berenil®. A dose of 20 mg/kg of berberine was injected with 0.58 mg/kg of Berenil®. There was no inhibitory effect of the combination to the trypanosomes infected mice. The toxicity of berberine was also tested. In spite of the high concentration of berberine at 25.29 mg/kg at the first 24 hours of injection, the preliminary study of berberine toxicity had shown no impact on mice. The second approach was to study the effect of berberine on the *in vitro* culture of trypanosomes. When berberine was applied to the cultures at different concentrations, from 2.8 μM to 90.9 μM, the herbal extract can eliminate *T. evansi* NpI 8/2 at the MIC of 45.2 μM at 24 hrs and VPh03 at the MIC of 22.6 μM at 72 hrs. There were no inhibition of parasite growth, while the berberine's solvent 0.5% DMSO was used as a negative control. In the third approach, we examined berberine on the telomerase activity of the parasite. The application of berberine, from 2.8 μM to 90.9 μM, cannot decrease the level of telomerase activity when the crude extract of 5 μg protein were used. In contrast, we found that telomerase activity was increasing when 10 and 20 μg of protein crude extract was applied. The result suggested that the telomerase of *T. evansi* is not a target of berberine. However, the inhibitory effect of berberine on *T. evansi* growth requires the additional investigation.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department Veterinary Pathology
Field of Study Veterinary Pathobiology
Academic year 2005

Student's signature.....
Advisor's signature.....
Co-advisor's signature.....
Co-advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลือและให้คำแนะนำจาก อ.สพ.ญ.ดร. นารีรัตน์ วิเศษกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ. ดร. มธุรส พงษ์ลิขิตมงคล และ ผศ.สพ.ญ. ดร. มีนา สาริกภูติ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม รวมทั้ง รศ. ดร.โกสุม จันทร์ศิริ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิที่กรุณาร่วมเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณ ทุนสนับสนุนวิทยานิพนธ์และกลุ่มวิทยานิพนธ์ ปีการศึกษา 2547 และทุนอุดหนุนการทำวิทยานิพนธ์สำหรับอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ประจำปีงบประมาณ 2547 คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนทุนในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ หน่วยปรสิตวิทยา นักวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ทุกท่าน ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ ในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ หน่วยไวรัสวิทยา หน่วยชีวเคมี และหน่วยชันสูตรโรคสัตว์ ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือ และห้องปฏิบัติการ ในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือ และให้ความช่วยเหลือต่าง ๆ

ขอขอบคุณ เพื่อน ๆ ,พี่ ๆ และน้อง ๆ นิสิตปริญญาโททุกท่าน ที่กรุณาให้คำแนะนำ ช่วยเหลือและเป็นกำลังใจตลอดการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ สัตว์ทดลองทุก ๆ ชีวิต ที่กรุณาสละชีวิต เพื่อเป็นประโยชน์ในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบคุณผู้มีพระคุณทุกท่านที่มิได้กล่าวนามในที่นี้ ที่ให้คำแนะนำ และให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ

กิตติกรรมประกาศ.....ฉ

สารบัญ.....ช

สารบัตาราง.....ฌ

สารบัญภาพ.....ญ

บทที่

1 บทนำ.....1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....2

1.3 สมมติฐานของการวิจัย.....2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย.....2

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....3

2.1 เชื้อ *Trypanosoma evansi*.....3

2.2 อาการทางคลินิก.....5

2.3 การระบาด.....6

2.4 การตรวจวินิจฉัย.....6

2.5 การรักษา.....7

2.6 เบอเบอรีน.....8

2.7 Telomerase.....11

3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....15

3.1 หนูทดลอง.....15

3.2 เชื้อ *Trypanosoma evansi*.....16

3.3 สารเบอเบอรีน.....16

3.4 การทดลอง.....16

หน้า

บทที่

3.4.1 การตรวจวินิจฉัยเชื้อ *T. evansi* ด้วยวิธี PCR..... 16
3.4.2 การเพิ่มจำนวนเชื้อ *T. evansi* ในหนูทดลอง..... 18
3.4.3 การทดสอบประสิทธิภาพความไวในการตรวจหาเชื้อ *T. evansi* ด้วยวิธี PCR..... 18
3.4.4 การทดสอบประสิทธิภาพของสารเบอเบอรีนต่อเชื้อ *T. evansi* ในหนูทดลอง..... 18
3.4.5 การทดสอบประสิทธิภาพของสารผสม Berenil® และเบอเบอรีนต่อเชื้อ *T. evansi* ในหนูทดลอง (ศึกษาเพิ่มเติม)..... 19
3.4.6 การหาค่าความเป็นพิษเฉียบพลันของสารเบอเบอรีนในหนูทดลอง (ศึกษาเพิ่มเติม)..... 20
3.4.7 การทดสอบประสิทธิภาพของสารเบอเบอรีนต่อเชื้อ *T. evansi* ในหลอดทดลอง (ศึกษาเพิ่มเติม)..... 20
3.4.8 การตรวจสอบหาการเปลี่ยนแปลงของ Telomerase activity ของเชื้อ *T. evansi* หลังได้รับสารเบอเบอรีนในหลอดทดลอง..... 22
4 ผลการทดลอง..... 25
4.1 การตรวจวินิจฉัยเชื้อ *T. evansi* isolate NPI 8/2 และ VPh03 ด้วยวิธี PCR..... 25
4.2 การทดสอบประสิทธิภาพความไวในการตรวจหาเชื้อ *T. evansi* ด้วยวิธี PCR..... 26
4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของสารเบอเบอรีนต่อเชื้อ *T. evansi* ในหนูทดลอง..... 28
4.4 การทดสอบประสิทธิภาพของสารผสม Berenil® และเบอเบอรีนต่อเชื้อ *T. evansi* ในหนูทดลอง..... 32
4.5 การศึกษาค่าความเป็นพิษเฉียบพลันเบื้องต้นของสารเบอเบอรีนในหนูทดลอง..... 34
4.6 การทดสอบประสิทธิภาพของสารเบอเบอรีนต่อเชื้อ *T. evansi* ในหลอดทดลอง... 35
4.7 การตรวจสอบหาการเปลี่ยนแปลงของ telomerase activity ของเชื้อ *T. evansi* หลังได้รับสารเบอเบอรีนในหลอดทดลอง..... 39
5 อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ..... 42
รายการอ้างอิง..... 49
ภาคผนวก..... 55
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 62

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

3.1 กลุ่มหนูทดลองในการทดสอบประสิทธิภาพของสารเบอเบอรีน.....19

3.2 กลุ่มหนูทดลองในการทดสอบประสิทธิภาพของสารผสม Berenil® และเบอเบอรีน.....20

4.1 ค่าการดูดกลืนแสง (A_{450nm}-A_{690nm}) ของเชื้อ *T. evansi* NpI 8/2 หลังจากทดสอบกับสารเบอเบอรีนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน.....41

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 รูปร่างลักษณะของเชื้อ Trypanosomes..... 4

2.2 สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารเบอเบอรีน..... 8

2.3 โครงสร้างของ telomerase..... 12

2.4 กลไกการทำงานของ telomerase..... 13

4.1 ความจำเพาะของวิธี PCR ต่อเชื้อ *T. evansi* และการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *T. evansi* isolates NpI 8/2 และ VPh03 ด้วยวิธี PCR..... 25

4.2 ความไวในการตรวจหาเชื้อ *T. evansi* NpI 8/2 ด้วยวิธี PCR..... 27

4.3 ผลของสารเบอเบอรีนต่อการเจริญของเชื้อ *T. evansi* ในหนูทดลอง..... 29

4.4 ผลของสารเบอเบอรีนต่อการเจริญของเชื้อ *T. evansi* NpI 8/2 ในหนูทดลอง เมื่อฉีดที่ระดับ $10^{5.4}$ ตัวต่อมิลลิลิตร..... 31

4.5 ผลของสารเบอเบอรีนต่อการเจริญของเชื้อ *T. evansi* NpI 8/2 ในหนูทดลอง เมื่อฉีดที่ระดับ $10^{7.5}$ และ $10^{8.4}$ ตัวต่อมิลลิลิตร..... 31

4.6 ผลของสารผสม Berenil ® กับเบอเบอรีนต่อการเจริญของเชื้อ *T. evansi* NpI 8/2 ในหนูทดลอง..... 33

4.7 ค่าความเป็นพิษเฉียบพลันเบื้องต้นของสารเบอเบอรีนในหนูทดลอง (n=5) หลังได้รับสาร 24 ชั่วโมง..... 34

4.8 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาต่อเนื้อเยื่อตับหนูทดลองหลังได้รับสารเบอเบอรีน..... 36

4.9 ผลของสารเบอเบอรีนต่อการเจริญของเชื้อ *T. evansi* ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กันในหลอดทดลอง..... 38

4.10 ผลของสารละลาย DMSO ต่อการเจริญของเชื้อ *T. evansi* VPh03 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กันในหลอดทดลอง..... 39

4.11 Relative Telomerase Activities (RTA) ของเชื้อ *T. evansi* NpI 8/2 หลังจากทดสอบกับสารเบอเบอรีนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน..... 42

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

Trypanosoma evansi เป็นเชื้อโปรโตซัวที่เป็นปรสิตในกระแสเลือดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด โดยเชื้อชนิดนี้ก่อให้เกิดโรค trypanosomiasis หรือโรค surra ซึ่งเป็นโรคที่สร้างความสูญเสียทางเศรษฐกิจมากโรคหนึ่งในวงการสัตว์เลี้ยงและปศุสัตว์เกือบทั่วโลก โดยเฉพาะในทวีปอเมริกาใต้ แอฟริกา และเอเชีย ซึ่งตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้นที่เหมาะแก่การแพร่ระบาดของเชื้อ (Luckins, 1988) สำหรับในประเทศไทยโรคนี้ถูกจัดอยู่ในพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2499 โดยมีรายงานการระบาดของเชื้อในทั่วทุกภาคของประเทศไทย (Tuntasuvan and Luckins, 1998) ในด้านการรักษามีการใช้ยาหลายชนิดในการควบคุมการระบาดและการแพร่กระจายของเชื้อ เช่น Diminazene aceturate (Berenil®), Isometamidium chloride (Samorin®, Trypamidium®), Suramin (Nagonol®, Germanin®) และ Quinapyramine sulphate (Trypacide®) เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามพบว่ายาบางชนิดไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะกำจัดเชื้อในกระแสเลือดของสัตว์ได้ทั้งหมด มีการเพิ่มขนาดของตัวยาในสัตว์บางชนิด และเกิดการดื้อยาของเชื้อขึ้น เช่น ยา Diminazene aceturate, Isometamidium chloride และ Suramin เป็นต้น (Hunter, 1964; Gill, 1971; Zhang et al., 1991; Rayah et al., 1999) นอกจากนี้พิษของยาบางชนิดยังส่งผลข้างเคียงต่อสัตว์และยาบางชนิดยังมีราคาแพงอีกด้วย ด้วยเหตุนี้สารเบอเบอรีนจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการนำมาศึกษาและพัฒนาเป็นยาเพื่อทดแทนเคมีภัณฑ์ต่าง ๆ ในการรักษาโรคได้

เบอเบอรีน (berberine) เป็นสารสกัดอัลคาลอยด์ที่สามารถพบได้ในพืชสมุนไพรหลายชนิด รวมทั้งขมิ้นเครือ *Arcangelisia flava* ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรที่พบได้ในประเทศไทย โดยได้มีรายงานการทดสอบประสิทธิภาพของสารเบอเบอรีนต่อเชื้อ *T. brucei rhodesiense* ในหลอดทดลอง (*in vitro*) พบว่าสารเบอเบอรีนคลอไรด์จากบริษัท Sigma สามารถกำจัดเชื้อ *T. brucei rhodesiense* ได้ โดยมีค่า MIC (minimal inhibitory concentration) เท่ากับ 4.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า IC_{50} (concentration of extract that inhibited growth of trypanosome by 50%) เท่ากับ 0.4 ± 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Freiburghaus et al., 1996) โดย Merschiohann และคณะ (2001) พบว่าสารเบอเบอรีนนี้มีฤทธิ์ทำลาย DNA ของเชื้อ *T. brucei*

และ *T. congolense* ส่งผลให้ยับยั้งกระบวนการสร้างโปรตีนบางชนิดที่ยังไม่ทราบแน่ชัด จึงทำให้เชื้อไม่สามารถเจริญได้ อย่างไรก็ตาม ได้มีรายงานการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดเบอเบอรีนจากขมิ้นเครือ *A. flava* ต่อเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* พบว่า สารเบอเบอรีนสามารถยับยั้ง telomerase activity ของเชื้อได้ (Sriwilaijareon et al., 2002) ด้วยเหตุผลดังกล่าว สารเบอเบอรีนจึงเป็นสารที่น่าสนใจที่จะนำมาศึกษาและพัฒนาเป็นยาในการกำจัดเชื้อ *T. evansi* ได้ และคาดว่า telomerase activity ของเชื้อ *T. evansi* อาจจะเป็นเป้าหมายของสารเบอเบอรีนในการทำลายเชื้อได้ โดยจากรายงานที่ผ่านมาพบว่า ความแตกต่างของเชื้อในแต่ละ isolate จะมีค่า MIC ของยาที่แตกต่างกัน (Zhang et al., 1993 และ Rayah, 1999) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการศึกษาเชื้อ *T. evansi* 2 isolates ด้วยกัน คือ *T. evansi* NpI 8/2 ซึ่งเป็นเชื้อที่เก็บได้จากการติดเชื้อในสุกร และผ่านการโคลนเชื้อที่ประเทศเบลเยียม และ *T. evansi* VPh03 เป็นเชื้อที่เก็บได้จากการติดเชื้อในม้า โดยเชื้อทั้ง 2 isolates นี้มีประวัติความรุนแรงของเชื้อในสัตว์ และจากการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำสารสกัดเบอเบอรีนที่มีในพืชสมุนไพรไทยมาศึกษาและประยุกต์ใช้ต่อไปในอนาคตได้ นับเป็นการนำทรัพยากรธรรมชาติที่มีอยู่ในประเทศมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุดได้อีกทางหนึ่ง

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารเบอเบอรีนต่อเชื้อ *T. evansi* ในหนูทดลอง
2. เพื่อทดสอบผลของสารเบอเบอรีนต่อ telomerase activity ของเชื้อ *T. evansi* ในหลอดทดลอง

1.3 สมมติฐานของการวิจัย

1. สารเบอเบอรีนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *T. evansi* ในหนูทดลองได้หรือไม่
2. เชื้อ *T. evansi* มี telomerase activity เปลี่ยนแปลงไปหลังจากทดสอบกับสารเบอเบอรีนในหลอดทดลองหรือไม่

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ทราบถึงระดับที่เหมาะสมของสารเบอเบอรีนในการยับยั้งเชื้อ *T. evansi*
2. ทราบว่า telomerase activity เป็นเป้าหมายของสารเบอเบอรีนในการยับยั้งเชื้อ *T. evansi* หรือไม่
3. สามารถเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำสารสกัดเบอเบอรีนจากพืชสมุนไพรไทยมาศึกษาและประยุกต์ใช้ในการยับยั้งเชื้อ *T. evansi* ต่อไปในอนาคตและเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะทดแทนเคมีภัณฑ์ที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศได้

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

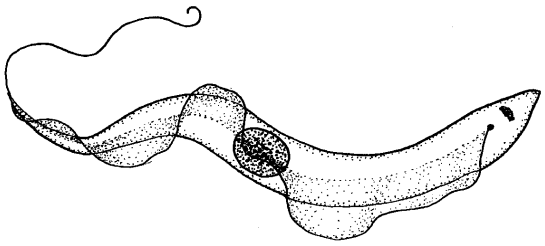
2.1 เชื้อ *Trypanosoma evansi*

T. evansi เป็นเชื้อโปรโตซัว ซึ่งมีวิวัฒนาการมาจากเชื้อ *T. brucei* ถูกค้นพบครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1880 โดย Griffith Evans ในกระแสเลือดของม้าและอูฐ ในประเทศอินเดีย เชื้อชนิดนี้ถูกจัดจำแนกตามหลักอนุกรมวิธานได้ดังนี้

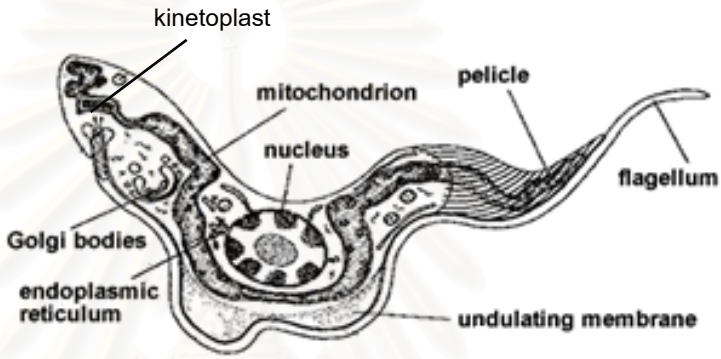
Phylum Protozoa
Subphylum Sarcomastigophora
Superclass Mastigophora
Class Zoomastigophorea
Order Kinetoplastida
Suborder Trypanosomatina
Family Trypanosomatidae
Genus *Trypanosoma*
Trypanosoma evansi
(Hoare, 1972)

เชื้อ *T. evansi* มีรูปร่างแบบ trypomastigote form กล่าวคือ มีรูปร่างลักษณะเรียวยาวคล้ายใบไม้ (slender form) ขนาดความยาวเฉลี่ยประมาณ 24 ไมครอน กว้าง 1.5-2.0 ไมครอน แต่บางครั้งสามารถพบเชื้อที่มีลักษณะสั้นทู่ได้ (stumpy form) โดยบริเวณตอนกลางของลำตัวพบนิวเคลียสขนาดใหญ่ ส่วนทางด้านท้ายพบ kinetoplast ประกอบไปด้วยส่วนสำคัญ คือ mini-circle DNA แต่ไม่พบ maxi-circle DNA ที่พบใน *T. brucei* บริเวณใกล้ ๆ kinetoplast นี้จะพบ flagellum ลักษณะคล้ายแส้โผล่ออกมานอกลำตัว โดยมี undulating membrane ยึดติดกับลำตัว ดังรูปที่ 2.1

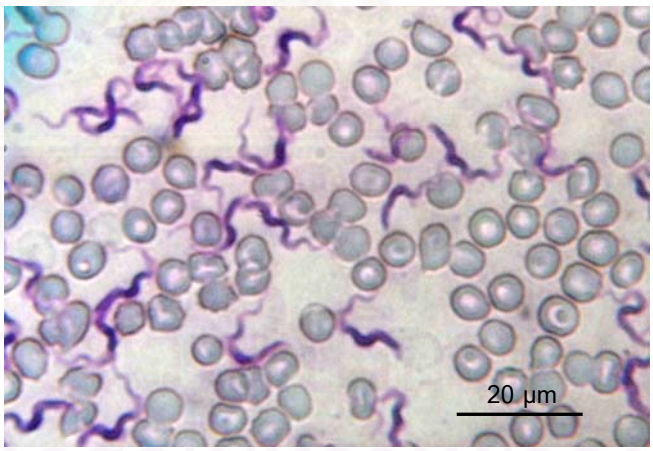
(ก)



(ข)



(ค)



รูปที่ 2.1 รูปร่างลักษณะของเชื้อ Trypanosomes
(ก) ลักษณะโครงสร้างภายนอก
(ข) ลักษณะโครงสร้างภายใน
(ค) *T. evansi* NpI 8/2 จากเลือดหนูทดลอง เมื่อย้อมด้วยสียิมซ่า

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เชื้อ *T. evansi* จะอาศัยอยู่ในกระแสเลือด น้ำไขสันหลัง และน้ำเหลืองของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด โดยเฉพาะในปศุสัตว์ เชื้อชนิดนี้จะอาศัยพลังงานจากกลูโคสซึ่งได้จากไกลโคเจนที่สะสมอยู่ในตับ และกล้ามเนื้อของโฮสต์

การแพร่ระบาดของเชื้อเกิดขึ้นจากการกัดของแมลงปศุสัตว์ต่าง ๆ ซึ่งเป็น mechanical vector คือ ไม่มีการเพิ่มจำนวนและการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเชื้อภายในตัวแมลง เช่น ตัวเหลือบ *Chrysops, Hematopota*, *Tabanus*, แมลงวันคอก *Stomoxys*, และ ริ้นควาย *Lyperosia* เป็นต้น รวมทั้งค้างคาวชนิดที่ดูดเลือด นอกจากนี้ในสัตว์จำพวกที่กินเนื้ออาจได้รับเชื้อโดยการกินเลือดสัตว์ที่เป็นโรคหรือได้รับเชื้อทางบาดแผลที่ผิวหนัง หรือเยื่อชุ่มได้ โดยเมื่อสัตว์ได้รับเชื้อแล้ว เชื้อจะมีการเพิ่มจำนวนแบบ binary fission ในกระแสเลือดของโฮสต์ ทำให้เกิดโรค trypanosomiasis หรือโรค surra

2.2 อาการทางคลินิก

สำหรับอาการของโรคนั้นแตกต่างกันไปแล้วแต่ชนิดของสัตว์ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความรุนแรงของเชื้อ สภาวะความสมบูรณ์ของตัวสัตว์ และปริมาณเชื้อที่ได้รับ แต่โดยทั่วไปแล้วสัตว์จะมีอาการเป็นไข้ โลหิตจาง บวมน้ำ ผอมแห้ง โดยสัตว์ที่แสดงอาการรุนแรงนั้น ได้แก่ อูฐ ม้า และลา เป็นต้น (Hoare, 1972) สำหรับในสุกรจะแสดงอาการที่เด่นชัด คือ มีรอยผื่นแดงตามตัว โดยเฉพาะบริเวณท้อง เต้านม และใบหู ในสุกรแม่พันธุ์อาจแท้งลูกได้ (เอ็นดู และคณะ, 2527) ในม้าจะแสดงอาการค่อนข้างเฉียบพลัน คือ ป่วย ยืนซึม คอตก กินอาหารได้น้อย มีไข้ขึ้น ๆ ลง ๆ บวมน้ำ mucous membrane ในช่องปากซีดและเหลือง โลหิตจาง และตายลงในที่สุด (เทพ และคณะ, 2518) ส่วนในโคและกระบือที่ตั้งท้องอาจคลอดก่อนกำหนด รกค้าง หรือแท้งลูกได้ ในโครีดนมจะให้น้ำนมลดลงอย่างฉับพลัน โดยไม่แสดงอาการผิดปกติอื่น ๆ แต่เมื่อวัดอุณหภูมิจะพบว่ามีไข้สูง ส่วนในโคท้องว่างจะไม่แสดงอาการเป็นสัดให้เห็นเลย (อัมพวัน และคณะ, 2530) สำหรับในแมวนั้นได้มีการทดลองฉีดเชื้อเข้าทางผิวหนัง และให้ทางการกิน พบว่าแมวจะแสดงอาการเบื่ออาหาร เป็นไข้ ผอมแห้ง เยื่อตาอักเสบ ขนหลุดล่วงง่าย บวมน้ำใต้ผิวหนังบริเวณหน้าและขา ชักเกร็งและตายในที่สุด (บุญขวัญ และคณะ, 2533)

2.3 การระบาด

โรค trypanosomiasis ที่เกิดจากเชื้อ *T. evansi* นี้มีการแพร่ระบาดไปเกือบทั่วโลก โดยเฉพาะในเขตร้อนชื้นแถบทวีปอเมริกาใต้ แอฟริกา และเอเชีย โดยได้มีรายงานการระบาดครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ.1880 ในประเทศอินเดีย สำหรับในประเทศไทยนั้นได้มีรายงานการระบาด เป็นครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ.1949 (2459) ในล่อ ซึ่งนำเข้ามาจากประเทศแอลจีเรีย โดยล่อเหล่านี้ได้เดินทางไปกับเจ้าหน้าที่สำรวจแผนที่ชายแดนระหว่าง จ. กาญจนบุรี กับชายแดนพม่าทางด่านพระเจดีย์สามองค์ หลังจากนั้นได้นำกลับมาเลี้ยงต่อใน จ.ราชบุรี แล้วพบว่าได้ล้มตายลงเกือบทั้งหมด (หลวงสนั่นรักษ์สัตว์, 2492) ต่อมาได้มีผู้รายงานการพบเชื้อในปศุสัตว์ เช่น โค กระบือ และสุกร และในสัตว์อื่น ๆ อีกหลายชนิดในทั่วทุกภาคของประเทศไทย โดยในช่วงฤดูฝนนั้นจะพบการระบาดของโรคเป็นจำนวนมาก (เทพ และคณะ, 2518; เอ็นดู และคณะ, 2527; อัมพวัน และคณะ, 2530; อำนวยพร และคณะ, 2532; นุชา และคณะ, 2534; ชิต และคณะ, 2537)

2.4 การตรวจวินิจฉัย

สำหรับการตรวจวินิจฉัยสัตว์ที่ติดเชื้อ *T. evansi* โดยทั่วไปแล้วนิยมใช้วิธีการทำ fresh smear จากเลือดหรือน้ำไขสันหลัง, การทำ thin blood film smear แล้วย้อมด้วยสียิมซ่าหรือสีชนิดอื่น ๆ, การทำ thick blood film ซึ่งจะมีความไวมากกว่าวิธี thin blood film smear เพราะใช้เลือดมากกว่าหรือวิธี haematocrit centrifuge technique แต่วิธีเหล่านี้มีข้อเสีย คือไม่สามารถตรวจพบเชื้อได้ในกรณีที่มีเชื้อในกระแสเลือดในปริมาณน้อย ส่วนการตรวจหาเชื้อทางอ้อมนั้นทำได้โดยการฉีดเลือดที่สงสัยว่าจะมีเชื้อเข้าทางช่องท้องหนูทดลอง 0.5 มิลลิลิตร แล้วทำการตรวจเลือดจากปลายหางหนู หรือการวินิจฉัยด้วย serological method ซึ่งมีหลายวิธีด้วยกัน เช่น direct agglutination test, indirect fluorescent antibody test, complement fixation test และ ELISA เป็นต้น ซึ่งวิธีเหล่านี้มีข้อเสีย คือ ไม่สามารถบ่งบอกได้ว่า antibody ที่ตรวจพบนั้นเกิดจากการติดเชื้อขณะนั้นหรือเป็น residual antibody จากการติดเชื้อหรือฉีดวัคซีนครั้งก่อน ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาการตรวจวินิจฉัยเชื้อทางด้าน molecular diagnosis มากขึ้น ซึ่งมีความไวและความจำเพาะต่อเชื้อสูง เช่น การใช้เทคนิค DNA probe (นารีรัตน์ และคณะ, 2531), PCR (Ijaz et al., 1998; Sukhumsirichart et al., 2000) และ PCR-ELISA (Chansiri et al., 2002) เป็นต้น

2.5 การรักษา

ในปัจจุบันนี้ยังไม่มีวัคซีนที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อ *T. evansi* ได้ ดังนั้นการให้ยารักษาและป้องกันโรค จึงเป็นวิธีการที่เหมาะสมที่สุดในการควบคุมโรคในสัตว์เลี้ยง โดยได้มีรายงานการใช้ยาหลายชนิด ดังนี้

1. Diminazene aceturate (Berenil®) ขนาดยาที่ใช้ตามปกติ คือ 3.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ฉีดเข้าทางกล้ามเนื้อ ยาชนิดนี้จะออกฤทธิ์โดยการจับกับ minicircle kinetoplast DNA ของเชื้อ ทำให้หยุดกระบวนการสร้าง DNA เชื้อจึงไม่สามารถเจริญได้ (Newton and Le Page, 1967; Coates et al., 2002) สำหรับการใช้ยาชนิดนี้ในสุกรนั้นได้มีรายงานการใช้ยาในขนาดปกติพบว่า มีประสิทธิภาพเพียงพอในการกำจัดเชื้อ *T. evansi* ได้ดี (ชิต และคณะ, 2537) แต่อย่างไรก็ตาม การใช้ยาชนิดนี้ในกระบือนั้นต้องใช้ในขนาดที่มากกว่าปกติ คือ 8-15 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จึงจะสามารถกำจัดเชื้อได้ (Sharma et al.,1983; สาธิต และคณะ, 2527) สำหรับในอูฐ แม้จะใช้ยาในขนาดปกติก็อาจทำให้เกิดพิษต่อสัตว์ได้ ส่วนในม้าและล่อนั้นพบว่า บางตัวมีอาการแพ้ยา และยาชนิดนี้ไม่สามารถทำลายเชื้อให้หมดไปจากกระแสเลือดได้ทั้งหมด (Tuntasuvan et al., 2003) โดย Brun and Lun (1994) รายงานว่า เนื่องจากยาชนิดนี้เป็นยาในกลุ่ม hydrophilic drug ตัวยาจึงไม่สามารถแทรกผ่าน blood brain barrier ของสัตว์เข้าไปได้ ดังนั้นในบางกรณีเชื้อที่เข้าไปอยู่ภายในเส้นเลือดของสมอง และระบบประสาท จะไม่ถูกทำลาย จึงสามารถพบเชื้อกลับสู่กระแสเลือดของสัตว์ได้ใหม่อีก เมื่อตัวยาหมดฤทธิ์ไป

2. Isometamidium chloride (Samorin®, Trypamidium®) ขนาดยาที่ใช้ตามปกติคือ 0.5-1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ฉีดเข้าทางกล้ามเนื้อ ยาชนิดนี้จะออกฤทธิ์ทำลาย topoisomerase II ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่อยู่ภายใน kinetoplast ยาชนิดนี้มีรายงานการรักษาและป้องกันโรคได้ดีในโค และกระบือ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าเมื่อฉีดเข้าทางกล้ามเนื้ออาจเกิดอาการบวมบริเวณที่ฉีดขึ้นได้ (อำนวยพร และคณะ, 2532)

3. Suramin (Naganol®, Germanin®) ขนาดยาที่ใช้ตามปกติคือ 7-10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ฉีดเข้าทางเส้นเลือดดำ ยาชนิดนี้อาจมีผลข้างเคียงในม้า คือ บางตัวมีอาการบวมตามขา ลำคอ ลูกอัณฑะ และผื่นเม็ดทั่วตัว โดยอาการเหล่านี้จะหายไปภายใน 5-7 วัน (สนั่นรักษ์สัตว์, 2492) สำหรับในประเทศ Sudan นั้นได้มีการเพิกถอดการใช้ยาชนิดนี้ในอูฐ เนื่องจากเกิดปัญหาการดื้อต่อยาชนิดนี้เป็นอย่างมาก และได้เปลี่ยนมาใช้ยา quinapyramine sulphate แทน (Rayah, 1999)

4. Quinapyramine sulphate (Trypacide®) ขนาดยาที่ใช้ตามปกติ คือ 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ฉีดเข้าทางใต้ผิวหนัง สำหรับการใช้ยาชนิดนี้ในลูกกระบือนั้น อาจเกิดอาการแพ้แสง

ตื่นเต้น เหงื่อออก และอาจทำให้เกิดฝีในตำแหน่งที่ฉีดได้ สำหรับในม้าอาจมีผลข้างเคียงของยา คือ มีอาการทางประสาท เดินวนหรือหมุน แต่อาการเหล่านี้จะหายไปหลังจากฉีดยาแล้วประมาณ 1 ชั่วโมง (เทพ และคณะ, 2518)

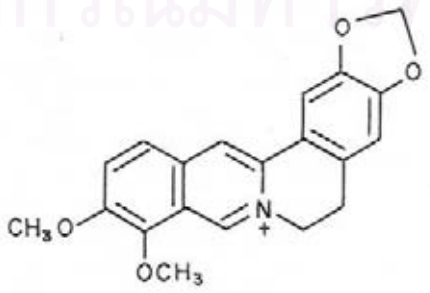
อย่างไรก็ตาม การให้ยารักษาโรคนั้นก็มีขอบเขตจำกัดในการใช้เช่นกัน เนื่องจากการใช้ยาชนิดเดิม ๆ หลายๆ ครั้ง หรือให้ปริมาณยาไม่ถูกต้องตามน้ำหนักสัตว์ที่แท้จริง อาจเกิดปัญหาการดื้อยาของเชื้อขึ้น และในปัจจุบันยังไม่มีการผลิตยาชนิดใหม่ขึ้นมา เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าวจึงควรใช้ยาที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อสลับกันไป หรือควบคู่กันไป ยาบางชนิดนั้นอาจเป็นพิษต่อสัตว์ หรือมีเนื้อตายตรงบริเวณที่มีการฉีดยาได้ ด้วยเหตุนี้จึงควรมีการพัฒนายาชนิดใหม่ขึ้นมาทดแทนยาชนิดเดิม เพื่อรองรับกับปัญหาดังกล่าว ดังนั้น สารเบอเบอรีนจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการนำมาศึกษา เพื่อพัฒนาเป็นยาในการกำจัดเชื้อ *T.evansi* ได้ ซึ่งสารชนิดนี้เป็นสารที่สามารถพบได้ใน *A. flava* หรือขมิ้นเครือ ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านที่พบได้ในประเทศไทย

2.6 เบอเบอรีน

2.6.1 ลักษณะทั่วไปของสารเบอเบอรีน

เบอเบอรีน (berberine) เป็นสาร benzodioxoloquinolizine alkaloid มีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 2.2 สามารถพบได้ในพืชสมุนไพรหลายชนิด เช่น *Berberis vulgaris* (barberry), *Hydrastis canadensis* (golden seal), *Berberis aquifolium* (oregon grape), *Coptis sinensis* (goldenthread), *Berberis aristata* (tree turmeric) และ *Arcangelisia flava* (tree turmeric) โดย *A. flava* นี้เป็นพืชสมุนไพรที่สามารถพบได้ในประเทศไทย สารเบอเบอรีนจากพืชชนิดนี้จะพบได้ในส่วนของลำต้นและราก โดยสารจะมีสีเหลืองเข้มคล้ายขมิ้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.2 สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารเบอเบอรีน (Creasey, 1979)

A. flava หรือ ขมิ้นเครือ มีชื่อสามัญว่า tree turmeric จัดอยู่ในวงศ์ Menispermaceae ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพืชชนิดนี้ คือ เป็นไม้เลื้อยเนื้อแข็งขนาดใหญ่ เนื้อไม้มีสีเหลือง เวลาตัดลำต้นจะมีน้ำสีเหลืองใส (yellow sap) ไหลออกมา มีรสขม ใบเป็นใบเดี่ยว เรียงตัวแบบสลับ แผ่นใบเป็นรูปไข่ปลายแหลมสีเขียวเกลี้ยงไม่มีขน มีขนาดความกว้างxยาว ประมาณ 5.5-19x10-25 เซนติเมตร ฐานใบมนหรือเว้าเล็กน้อย ก้านใบออกจากฐานใบ มีความยาวประมาณ 4-20 เซนติเมตร เส้นใบเรียงตัวแบบนิ้วมือมีเส้นใบหลัก 5 เส้น แตกจากฐานใบ ดอกออกเป็นช่อ โดยดอกย่อยไม่สมบูรณ์เพศจะแยกเป็นดอกตัวผู้ และดอกตัวเมีย ผลเป็นผลเดี่ยวชนิด drupe พบมากในป่าธรรมชาติที่อุดมสมบูรณ์บริเวณภาคใต้และภาคตะวันออกของประเทศไทย (Forman,1991)

2.6.2 รายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เบอเบอรีนเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางยาค่อนข้างกว้าง สำหรับในประเทศจีนนั้นได้มีรายงานการนำสารเบอเบอรีนมาใช้เป็นยาทางการแพทย์แผนโบราณเป็นเวลากว่า 3,000 ปีมาแล้ว และนอกจากนี้พบว่าสารชนิดนี้ยังสามารถนำมาใช้เป็นตัวยาในการต้านเชื้อชนิดต่าง ๆ ได้หลายชนิด เช่น แบคทีเรีย, เชื้อรา, โปรโตซัว, ไวรัส และพยาธิ (Timothy et al., 1997) และได้มีรายงานการวิจัยในด้านต่าง ๆ อีกมากมาย ดังนี้

<u>ประสิทธิภาพของสารเบอเบอรีนในการต้านเซลล์มะเร็ง</u>

Aris และคณะ (2001) รายงานว่าสารเบอเบอรีนที่สกัดจาก *Berberis aristata* สามารถยับยั้งกระบวนการเกิดมะเร็งในหนู mice และหนู rats ได้ เมื่อกระตุ้นด้วยสารชักนำที่ทำให้เกิดมะเร็ง คือ 20-methylcholanthrene และ N-nitrosodiethylamine

Cordero และคณะ (2004) ศึกษา cytotoxic activity ของสารประกอบ 5 ชนิด คือ khellin, berberine, lupeol, scopolin และ rapanone โดยได้ทำการทดสอบใน human tumor cell lines 4 ชนิด ด้วยวิธี microtitration colorimetric method of MTT reduction พบว่า สารเบอเบอรีนที่สกัดจากเปลือกของ *Zanthosylum monophyllum* มีประสิทธิภาพในการต้านเซลล์มะเร็งมากที่สุด โดยมีค่า LC_{50} ต่ำกว่า 50 ไมโครโมลาร์

<u>ประสิทธิภาพของสารเบอเบอรีนในการต้านเชื้อจุลินทรีย์</u>

Sun และคณะ (1988) ศึกษาสารเบอเบอรีนซัลเฟตจากบริษัท Sigma พบว่าสารชนิดนี้สามารถต้านการยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus pyogenes* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกกับ epithelial cell, fibronectin และ hexadecane ของโฮสต์ได้

Freile และคณะ (2003) ได้นำสารสกัดจากใบ, เปลือกและราก และสารเบอเบอรีนซึ่งเป็นสารสกัดบริสุทธิ์ของพืช *Berbeis heteophylla* มาทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์ ในหลอดทดลอง พบว่า

สารสกัดเบอเบอรีนที่ความเข้มข้น 50,100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Candida albicans* และแบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus aureus* ได้

Kim และคณะ (2004) รายงานว่า สารเบอเบอรีนคลอไรด์ ซึ่งสกัดได้จากรากของ *Coptis chinensis* สามารถยับยั้งเอนไซม์ sortase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนบริเวณผนังเซลล์ของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ได้ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 8.7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารเบอเบอรีนคลอไรด์นี้ยังสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ โดยมีค่า MIC ระหว่าง 50-400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

<u>ประสิทธิภาพของสารเบอเบอรีนในการต้านเชื้อโปรโตซัว</u>

Freiburghaus และคณะ (1996) ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพร 24 ชนิด และสารประกอบธรรมชาติ 2 ชนิด ต่อเชื้อ *T. brucei rhodesiense* ในหลอดทดลอง พบว่า สารเบอเบอรีนจากบริษัท Sigma ซึ่งเป็นสารประกอบธรรมชาติ มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อชนิดนี้ได้ โดยมีค่า MIC เท่ากับ 4.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.4 ± 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และได้ศึกษาค่าความเป็นพิษ (cytotoxicity) ของสารเบอเบอรีนต่อเซลล์ Wistar-38 พบว่ามีค่า MTC (Maximum tolerated concentration) เท่ากับ 19 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Merschiohann และคณะ (2001) ศึกษาผลของสารอัลคาลอยด์ 34 ชนิด ต่อเชื้อ *T. brucei brucei* และ *T. congolense* ในหลอดทดลอง พบว่า สารเบอเบอรีนที่สกัดจากพืชสมุนไพรมีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้ได้ดี โดยมีค่า ED_{50} (50% Effective dose) เท่ากับ 0.53 ไมโครโมลาร์ และ 83 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ และมีค่า MIC เท่ากับ 30 ไมโครโมลาร์ และ 175 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ส่วนค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ HL-60 มีค่า ED_{50} เท่ากับ 27 ไมโครโมลาร์ และค่า MIC เท่ากับ 145 ไมโครโมลาร์ โดยพบว่าสารเบอเบอรีนนี้จะเข้าไปขัดระหว่างสาย DNA ของเชื้อส่งผลให้ยับยั้งกระบวนการสร้างโปรตีนทำให้เชื้อไม่สามารถเจริญได้

Sriwilaijareon และคณะ (2002) ได้รายงานการทดสอบสารสกัดเบอเบอรีนจากขมิ้นเครือ *A. flava* ต่อเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* ในหลอดทดลอง พบว่า สารเบอเบอรีนสามารถยับยั้ง telomerase activity ที่พบในเชื้อระยะ trophozoite และ schizoite ได้ ในช่วงความเข้มข้น 30-300 ไมโครโมลาร์ และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 24 ไมโครโมลาร์ โดย telomerase activity นี้น่าจะใช้เป็นเป้าหมายของสารเบอเบอรีนเพื่อใช้ในการพัฒนายาตัวใหม่ในอนาคตต่อไป

<u>ประสิทธิภาพของสารเบอเบอรีนในด้านอื่น ๆ</u>

Creasey (1979) ศึกษาผลทางชีวเคมีของสารเบอเบอรีนคลอไรด์ จากบริษัท Sigma พบว่า สารเบอเบอรีนเป็นสารอัลคาลอยด์ที่สามารถยับยั้งกระบวนการสร้าง DNA, RNA, โปรตีน

และไขมัน ใน sarcoma S 180 cells ได้ และพบว่าสารชนิดนี้สามารถจับกับ polyadenylic acid ได้ดี

Yesilada และ Kupeli (2002) ทำการศึกษาสารสกัดเบอเบอรีนจากรากของ *Berberis crataegina* พบว่า สารชนิดนี้มีประสิทธิภาพในการลดการอักเสบ การปวด และลดไข้ในหนู mice และหนู rats ได้ และได้ทำการศึกษาค่าความเป็นพิษเฉียบพลันของสารเบอเบอรีนในหนู mice โดยทางการกินในช่วงเวลา 24 ชั่วโมงหลังจากป้อนยา พบว่า สารเบอเบอรีนที่ระดับความเข้มข้น 418 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีผลทำให้หนูตายได้

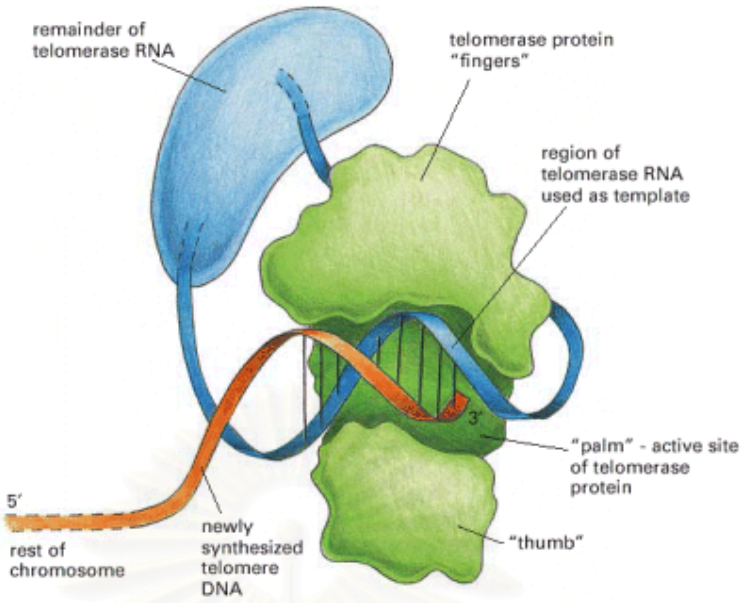
นอกจากนี้สารเบอเบอรีนยังสามารถต้านการเกิดโรคเบาหวานได้ โดย Leng และคณะ (2004) ให้สารเบอเบอรีนที่ระดับความเข้มข้น 187.5 และ 562.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมในหนู rats ทางการกิน พบว่าสามารถลดระดับกลูโคสและไขมันในกระแสเลือดหนูทดลองได้และยังสามารถกระตุ้นการหลั่งของสารอินซูลินเมื่อทำการศึกษาในเซลล์ HIT-T15

2.7 Telomerase

การขาดหายไปของเบสบริเวณด้านปลาย 5’ ของสาย lagging strand เป็นปัญหาหนึ่งในกระบวนการ replication (end replication problem) ส่งผลให้ปลายสายโครโมโซมที่เรียกว่า telomere นี้สั้นลงทุกครั้งที่มีการแบ่งเซลล์ ดังนั้นจึงต้องอาศัยเอนไซม์ telomerase ซึ่งมีกระบวนการพิเศษ เพื่อให้สามารถเพิ่มจำนวนเบสด้านนี้ได้

Telomerase เป็น ribonucleoprotein enzyme ซึ่งทำหน้าที่เป็น reverse transcriptase ประกอบไปด้วยส่วนของ RNA template และ protein catalytic component เพื่อสังเคราะห์ telomere DNA ขึ้นมา ดังรูปที่ 2.3

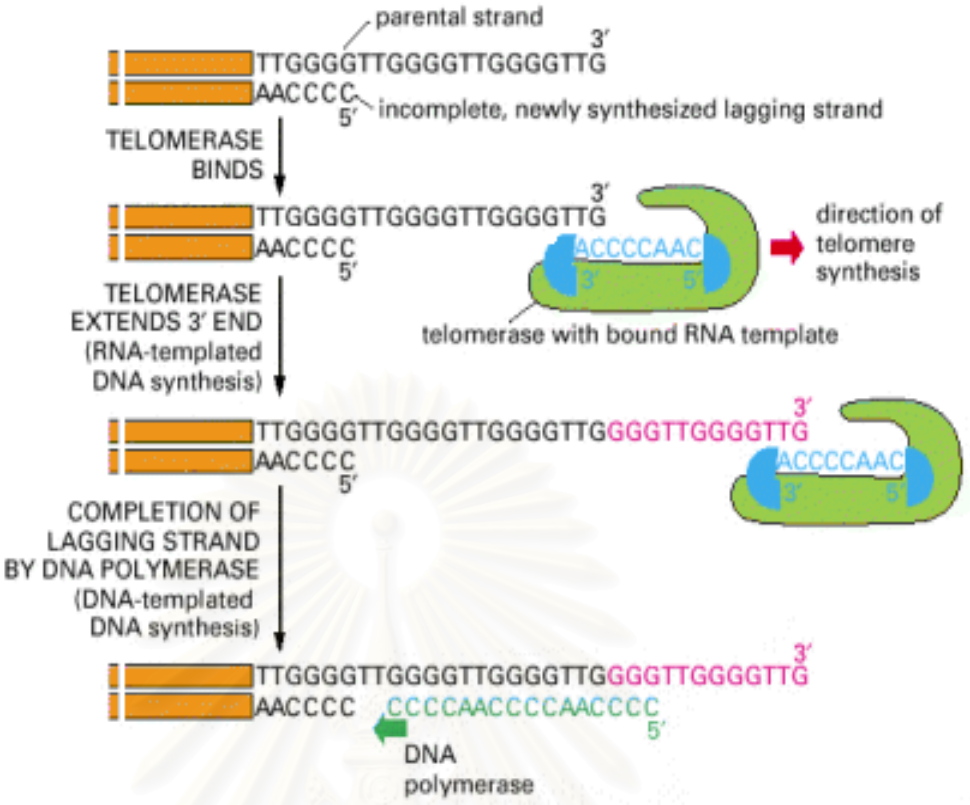
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของ telomerase (Alberts et al., 2002)

Telomere DNA พบได้บริเวณส่วนปลายของโครโมโซมพวกยูคาริโอต (eukaryotes) ซึ่งมีลักษณะโครงสร้างพิเศษ คือ มี G-rich telomere DNA sequence ซึ่งจะ complementary กับ telomerase โดย telomere DNA นี้จะมีโครงสร้างของลำดับเบสซ้ำกัน 6 ตัว (tandamly repeated sequence) เช่น ในมนุษย์มีโครงสร้างของลำดับเบสเป็น 5' TTAGGG 3', ในเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* มีโครงสร้างเป็น 5' TTGGGA 3' และใน trypanosome มีโครงสร้างเป็น 5' TTGGGG 3' สำหรับกลไกการทำงานของ telomerase นี้ค้นพบโดย Carol Greider และ Elizabeth Blackburn ในปี ค.ศ.1985 จากโปรโตซัวสกุล *Tetrahymena* ซึ่งมีโครงสร้างของลำดับเบสแบบ 5' TTGGGG 3'

Telomere และ telomerase มีหน้าที่ป้องกันการเสื่อมสลายบริเวณส่วนปลายของโครโมโซม (protective cap) จากเอนไซม์ต่าง ๆ ที่เข้ามาทำลาย DNA (nuclease digestion) หรือจากกระบวนการ replication ในขั้นตอนการแบ่งเซลล์ โดยจะเติม telomeric repeat ที่บริเวณปลายของโครโมโซมทำให้โครโมโซมไม่หดสั้นลงในขณะที่มีการแบ่งเซลล์ ดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 กลไกการทำงานของ telomerase (Alberts et al., 2002)

สำหรับในสภาวะปกติของเซลล์นั้น telomerase activity จะอยู่ในระดับต่ำ และเมื่อเซลล์มีอายุมากขึ้น telomerase activity ก็จะลดต่ำลงเรื่อย ๆ ดังนั้นส่วนของ telomere จะหดสั้นลงเป็นสาเหตุให้เซลล์แก่และตายในที่สุด (senescence) ในทางตรงกันข้าม telomerase activity จะตรวจพบได้สูงเมื่อเซลล์มีการแบ่งตัว เช่น เซลล์สเปริม หรือ เซลล์มะเร็ง ส่งผลให้ส่วนปลายของ telomeres ยาวขึ้น และกลายเป็นเซลล์มะเร็งในที่สุด (Blackburn, 1991)

Cano และคณะ (1999) ได้รายงานการพบ telomerase activity ของโปรโตซัวที่เป็นปรสิต 3 ชนิด คือ *T. brucei, Lishmania major* และ *L. tarentolae* และกล่าวว่า telomerase activity นี้สามารถนำไปใช้เป็นเป้าหมายในการผลิตยาชนิดใหม่ได้

สำหรับวิธีการตรวจหา telomerase activity นั้นสามารถตรวจได้ด้วยวิธี Telomere Repeat Amplification Protocol (TRAP) ซึ่งอาศัยหลักการพื้นฐานจาก PCR โดยใช้ primer ที่มีความจำเพาะและใช้สารกัมมันตภาพรังสีตรวจสอบหาผลิตภัณฑ์หรือส่วนของ telomere ซึ่งได้จากการทำงานของ telomerase (Krupp et al., 1997; Sriwilaijareon, 2002) แต่ในปัจจุบันนี้ได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจสอบโดยใช้สารที่เป็น nonradioactive แทนสารกัมมันตภาพรังสี เนื่องจากสาร

ชนิดนี้เป็นอันตรายต่อมนุษย์ (Rubiano and Wasserman, 2003) และได้มีการพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบซึ่งมีความแม่นยำ สะดวก และปลอดภัยต่อการใช้งาน

จากข้อมูลและงานวิจัยดังกล่าวข้างต้น พบว่าสารเบอเบอรีนเป็นสารอีกชนิดหนึ่งซึ่งมีความน่าสนใจในการนำมาศึกษาค้นคว้าและพัฒนาเป็นตัวยาในการกำจัดเชื้อ *T. evansi* ได้ โดยในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดสอบสารเบอเบอรีนต่อเชื้อ *T. evansi* NpI 8/2 และ VPh03 ในหนูทดลอง ซึ่งเป็นเชื้อที่มีประวัติความรุนแรงในสัตว์ และเก็บรักษาอยู่ที่หน่วยปรสิตวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และทำการศึกษา telomerase activity ของเชื้อ *T. evansi* หลังได้รับสารเบอเบอรีนในหลอดทดลอง โดยใช้ชุดตรวจสอบ *TeloTAGGG*Telomerase PCR ELISA^{plus}

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารเบอเบอรีนต่อเชื้อ *T. evansi* 3 วิธี คือ การทดสอบในหนูทดลอง การทดสอบในหลอดทดลอง (ศึกษาเพิ่มเติม) และการทดสอบการเปลี่ยนแปลงของ telomerase activity ของเชื้อ โดยแบ่งแผนการวิจัยออกเป็นขั้นตอน ดังนี้

3.1 หนูทดลอง

3.2 เชื้อ *T. evansi*

3.3 สารเบอเบอรีน

3.4 การทดลอง

3.4.1 การตรวจวินิจฉัยเชื้อ *T. evansi* ด้วยวิธี PCR

3.4.2 การเพิ่มจำนวนเชื้อ *T. evansi* ในหนูทดลอง

3.4.3 การทดสอบประสิทธิภาพความไวในการตรวจหาเชื้อ *T. evansi* ด้วยวิธี PCR

3.4.4 การทดสอบประสิทธิภาพของสารเบอเบอรีนต่อเชื้อ *T. evansi* ในหนูทดลอง

3.4.5 การทดสอบประสิทธิภาพของสารผสม Berenil® กับเบอเบอรีนต่อเชื้อ *T. evansi* ในหนูทดลอง (ศึกษาเพิ่มเติม)

3.4.6 การหาค่าความเป็นพิษเฉียบพลันของสารเบอเบอรีนในหนูทดลอง (ศึกษาเพิ่มเติม)

3.4.7 การทดสอบประสิทธิภาพของสารเบอเบอรีนต่อเชื้อ *T. evansi* ในหลอดทดลอง (ศึกษาเพิ่มเติม)

3.4.8 การตรวจสอบหาการเปลี่ยนแปลงของ Telomerase activity ของเชื้อ *T. evansi* หลังได้รับสารเบอเบอรีนในหลอดทดลอง

3.1 หนูทดลอง

ทำการศึกษาในหนู ICR mice *Mus musculus* เพศเมีย อายุ 5 สัปดาห์ น้ำหนักประมาณ 25-30 กรัม จำนวน 150 ตัว โดยเลี้ยงในกรง ๆ ละ 5 ตัว มีอาหารและน้ำดื่มอย่างเพียงพอตลอดเวลา ณ ห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองชั้น 5 อาคาร 60 ปี คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 เชื้อ *T. evansi*

เชื้อที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มี 2 isolates คือ

3.2.1 *T. evansi* NpI 8/2 เป็นเชื้อที่เก็บได้จากการติดเชื้อในสุกร จ. นครปฐม เมื่อปี พ.ศ. 2528 (1985) จากนั้นนำไปแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ที่มหาวิทยาลัย Vriej เมือง Brussels ประเทศเบลเยี่ยม ในปี พ.ศ. 2529 (1986)

3.2.2 *T. evansi* VPh03 เป็นเชื้อที่เก็บได้จากการติดเชื้อในม้า ในหน่วยม้าทรงประจำพระองค์ฯ จ. กรุงเทพมหานคร ในปี พ.ศ. 2546 (2003)

โดยเชื้อทั้ง 2 isolates นี้ได้ทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส หน่วยปรสิตวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 สารเบอเบอรีนและสารอื่น ๆ

สารเบอเบอรีน ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นสารเบอเบอรีนคลอไรด์ ซึ่งสั่งซื้อจากบริษัท Sigma ประเทศสวิตเซอร์แลนด์ มีสูตรโครงสร้างเป็น $C_2OH_{18}ClNO_4$ น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 371.82 และมีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 204 องศาเซลเซียส โดยใช้สารละลาย Dimethysulfoxide (DMSO) เป็นตัวทำละลายสารเบอเบอรีน และใช้ Berenil® (Diminazene aceturate) จากบริษัท Intervet ประเทศเยอรมันนี เป็นสารในกลุ่มควบคุม โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย

3.4 การทดลอง

3.4.1 การตรวจวินิจฉัยเชื้อ *T. evansi* ด้วยวิธี PCR

3.4.1.1 นำเชื้อ *T. evansi* NpI 8/2 และ VPh03 ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาละลาย หลังจากเชื้อละลายแล้วนำมาสกัด DNA ด้วยวิธี Phenol-chloroform extraction (Cethyl-Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB)) ซึ่งดัดแปลงมาจาก Zhao et al. (2001) ดังนี้

3.4.1.1.1 นำเชื้อมา 200 ไมโครลิตร เติม lysis buffer จำนวน 60 ไมโครลิตร และ protenase K จำนวน 3 ไมโครลิตร ปั่นให้เข้ากัน แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

3.4.1.1.2 จากนั้น เติม CTAB จำนวน 350 ไมโครลิตร นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.4.1.1.3 ดูดสารละลายส่วนใสใส่หลอดใหม่ และเติม phenol:chloroform:isoamylalcohol จำนวน 400 ไมโครลิตร ปั่นที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ เติม 4 M NaCl จำนวน 40 ไมโครลิตร

และ 95% ethyl alcohol แช่เย็น จำนวน 1,000 ไมโครลิตร incubate ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ค้างคืน

3.4.1.1.4 หลังจากนั้นนำมาปั่นที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที เทสารละลายส่วนใสด้านบนทิ้ง และเติม 70% ethyl alcohol แช่เย็น จำนวน 1,000 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที

3.4.1.1.5 เทสารละลายส่วนใสด้านบนทิ้ง และเติม 70% ethyl alcohol แช่เย็น จำนวน 1,000 ไมโครลิตร อีกครั้ง นำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที

3.4.1.1.6 เทสารละลายส่วนใสด้านบนทิ้ง จากนั้นตากตะกอน DNA ให้แห้ง แล้วเติมน้ำกลั่น จำนวน 200 ไมโครลิตร

3.4.1.2 นำ DNA ที่ได้มาเพิ่มจำนวนด้วยเครื่อง Gene Amp® system 2700 โดยใช้ Tr3 และ Tr4 เป็น specific primers (Sukhumsirichart et al., 2000) ซึ่งมีลำดับเบส ดังนี้

Tr3 5' GCGCGGATTCTTTGCAGACGA 3'

Tr4 5' TGCAGACACTGGAATGTTACT 3'

โดย 1 ปฏิกิริยา มีปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย สารละลาย DNA , 10X buffer 1.5 mM, dNTP 0.2 mM, $MgCl_2$ 1.5 mM, Tr3 0.1 µM, Tr4 0.1 µM, *Taq* DNA polymerase (Invitrogen®) 2.5 unit และน้ำกลั่น ที่สภาวะอุณหภูมิดังนี้

Initial PCR activation	94	องศาเซลเซียส	5	นาที	
Denaturation	94	องศาเซลเซียส	30	นาที	35 รอบ
Annealing	50	องศาเซลเซียส	45	นาที	
Extension	72	องศาเซลเซียส	45	นาที	
Final extension	72	องศาเซลเซียส	10	นาที	

3.4.1.3 นำ PCR product ที่ได้มา run ด้วย electrophoresis โดยใช้ 2% agarose gel

3.4.1.4 ตรวจสอบ PCR product ด้วย UV transilluminator โดยแถบ DNA จะมีขนาด 257 bp

3.4.1.5 ถ่ายรูป PCR product ที่ได้

3.4.2 การเพิ่มจำนวนเชื้อ *T. evansi* ในหนูทดลอง

3.4.2.1 นำเชื้อแต่ละ isolate ฉีดเข้าทางช่องท้องหนูทดลองตัวละ 0.2 มิลลิลิตร

3.4.2.2 ตรวจหาเชื้อจากปลายหางหนูด้วยวิธี rapid matching method (Herbert and Lumsden, 1976)

3.4.2.3 เมื่อเชื้อขึ้นถึงระดับ 10^9 ตัวต่อเลือด 1 มิลลิลิตร ทำการสลบหนูด้วย ether และเก็บเชื้อจากเลือดที่เจาะจากหัวใจ

3.4.2.4 นำเลือดที่ได้ผสมกับ 20% Glycerol Phosphate Saline Glucose (PSG) ด้วยอัตราส่วน 1:1 และเก็บเชื้อที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.4.3 การทดสอบประสิทธิภาพความไวในการตรวจหาเชื้อ *T. evansi* ด้วยวิธี PCR

เนื่องจากการตรวจสอบหาเชื้อ *T. evansi* ด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง (rapid matching method) ไม่สามารถตรวจสอบหาเชื้อที่มีระดับต่ำกว่า $10^{5.4}$ ตัวต่อเลือด 1 มิลลิลิตรได้ ดังนั้นจึงนำวิธี PCR ซึ่งมีความไวมากกว่ามาใช้ในการตรวจสอบหาเชื้อ โดยมีการทดสอบความไวของวิธีนี้ ดังนี้

3.4.3.1 นำเชื้อที่เพิ่มจำนวนได้จากข้อ 3.4.2.3 มาสกัด DNA ด้วยวิธี Phenol chloroform extraction ตามข้อ 3.4.1.1

3.4.3.2 นำ DNA ที่ได้มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นเป็นลำดับ ดังนี้ 10^5,10^4,10^3,10^2,10 และ 1 ตัวต่อมิลลิลิตร

3.4.3.3 นำ DNA ที่เจือจางได้ มาตรวจสอบความไวด้วยวิธี PCR ตามข้อ 3.4.1.2-3.4.1.5

3.4.4 การทดสอบประสิทธิภาพของสารเบอเบอรีนต่อเชื้อ *T. evansi* ในหนูทดลอง

3.4.4.1 นำเชื้อ *T. evansi* NpI 8/2 และ VPh03 ที่เพิ่มจำนวนได้ตามข้อ 3.4.2 มาฉีดเข้าทางช่องท้องหนูทดลองจำนวน 12 ตัว ๆ ละ 10^2 ตัว โดยใช้ PBS เป็นสารละลายเจือจาง

3.4.4.2 ทำการตรวจหาเชื้อจากปลายหางหนูทุกวันด้วยวิธี rapid matching method

3.4.4.3 เมื่อเชื้อเพิ่มจำนวนขึ้นถึงระดับ $10^{7.5}$ ตัวต่อเลือด 1 มิลลิลิตร แล้ว แบ่งหนูทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม ๆ ละ 3 ตัว ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 กลุ่มหนูทดลองในการทดสอบประสิทธิภาพของสารเบอเบอรีน

กลุ่มที่	จำนวนหนู (ตัว)	*T. evansi* (ตัว)	สาร	จำนวน (ml)
1	3	10^2	PBS	0.2
2	3	10^2	3.5 mg/kg Berenil®	0.2
3	3	10^2	10 mg/kg berberine	0.2
4	3	10^2	20 mg/kg berberine	0.2

3.4.4.4 ฉีดสารต่าง ๆ ตามตารางที่ 3.1 เข้าทางช่องท้องหนูทดลอง โดยใช้ 10%DMSO เป็นตัวทำละลายสารเบอเบอรีน

3.4.4.5 ทำการตรวจหาเชื้อจากปลายหางหนูทุกวันด้วยวิธี rapid matching method เป็นเวลา 21 วัน ในกรณีที่ตรวจไม่พบเชื้อด้วยวิธีนี้ จะทำการตรวจหาเชื้อด้วยวิธี PCR โดยเก็บเลือดจากปลายหางหนูจำนวน 50 ไมโครลิตร มาสกัด DNA ตามข้อ 3.4.1

3.4.4.6 บันทึกระดับเชื้อที่ตรวจพบ แล้วนำมาวิเคราะห์หาค่า CD100 (Curative dose in 100% of infected mice *in vivo*) โดยทำการศึกษาเชื้อทั้ง 2 isolates

3.4.5 การทดสอบประสิทธิภาพของสารผสม Berenil® กับเบอเบอรีนต่อเชื้อ *T. evansi* ในหนูทดลอง (ศึกษาเพิ่มเติม)

3.4.5.1 นำเชื้อ T. evansi NpI8/2 ที่เพิ่มจำนวนได้ตามข้อ 3.4.2 มาฉีดเข้าทางช่องท้องหนูทดลอง จำนวน 15 ตัว ๆ ละ 10^2 ตัว โดยใช้ PBS เป็นสารละลายเจือจาง

3.4.5.2 ทำการตรวจหาเชื้อจากปลายหางหนูทุกวันด้วยวิธี rapid matching method

3.4.5.3 เมื่อเชื้อเพิ่มจำนวนขึ้นถึงระดับ $10^{5.4}$ ตัวต่อเลือด 1 มิลลิลิตร แล้ว แบ่งหนูทดลองออกเป็น 5 กลุ่ม ๆ ละ 3 ตัว ดังตารางที่ 3.2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.2 กลุ่มหนูทดลองในการทดสอบประสิทธิภาพของสารผสม Berenil® และเบอเบอรีน

กลุ่มที่	จำนวนหนู (ตัว)	*T. evansi* (ตัว)	สาร	จำนวน (ml)
1	3	10^2	PBS	0.2
2	3	10^2	3.5 mg/kg Berenil®	0.2
3	3	10^2	0.58 mg/kg Berenil®	0.2
4	3	10^2	20 mg/kg berberine	0.2
5	3	10^2	0.58 mg/kg Berenil®+20 mg/kg berberine	0.2

3.4.5.4 ฉีดสารต่าง ๆ ตามตารางที่ 3.2 เข้าทางช่องท้องหนูทดลอง โดยใช้ 10%DMSO เป็นตัวทำละลายสารเบอเบอรีน และน้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย Berenil®

3.4.5.5 ทำการตรวจหาเชื้อจากปลายหางหนูทุกวันด้วยวิธี rapid matching method เป็นเวลา 21 วัน

3.4.5.6 บันทึกระดับเชื้อที่ตรวจพบ แล้วนำมาวิเคราะห์หาค่า CD100 (Curative dose in 100% of infected mice *in vivo*)

3.4.6 การหาค่าความเป็นพิษเฉียบพลันเบื้องต้นของสารเบอเบอรีนในหนูทดลอง (ศึกษาเพิ่มเติม)

3.4.6.1 แบ่งหนูทดลองออกเป็น 6 กลุ่ม ๆ ละ 5 ตัว ตามขนาดของสารเบอเบอรีน ดังนี้ คือ 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

3.4.6.2 ฉีดสารเบอเบอรีนแต่ละขนาดเข้าทางช่องท้องหนูทดลองทั้ง 6 กลุ่ม

3.4.6.3 หลังจาก 24 ชั่วโมง บันทึกจำนวนหนูที่ตายในแต่ละกลุ่มและนำไปคำนวณหาค่าความเป็นพิษเฉียบพลันเบื้องต้นของสารเบอเบอรีนในหนูทดลอง

3.4.7 การทดสอบประสิทธิภาพของสารเบอเบอรีนต่อเชื้อ *T. evansi* ในหลอดทดลอง (ศึกษาเพิ่มเติม)

3.4.7.1 นำเลือดหนูทดลองที่มีเชื้อ *T. evansi* isolate NpI 8/2 และ VPh03 ที่เพิ่มจำนวนได้ตามข้อ 3.4.2.3 มาทำการแยกเชื้อด้วยวิธี anion-exchange chromatography โดยดัดแปลงจาก Lanham and Godfrey (1970) ดังนี้

3.4.7.1.1 ชั่ง DE52 Diethylaminoethyl (DEAE) cellulose จำนวน 1.2 กรัม ใส่ในสารละลาย PSG จำนวน 10 มิลลิลิตร ปรับ pH 8.0 จากนั้นปล่อยทิ้งให้ตกตะกอนลงมาแล้วเทสารละลายส่วนใสด้านบนทิ้ง

3.4.7.1.2 ใส่สารละลาย PSG จำนวน 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วใส่ลงใน syringe ขนาด 5 มิลลิลิตร โดยด้านปลายอุดด้วยสำลี sterile อย่างหลวม ๆ

3.4.7.1.3 ปล่อยให้ DE52 DEAE cellulose ตกตะกอนลงมา จากนั้นค่อย ๆ เติมเลือดที่ผสมกับสารละลาย PSG แล้ว เป็นอัตราส่วน 1:1 จำนวน 400 ไมโครลิตร

3.4.7.1.4 ปล่อยให้เชื้อไหลลงมากับสารละลาย PSG โดยเม็ดเลือดจะถูกจับไว้กับ DE52 DEAE cellulose จากนั้นค่อย ๆ เติมสารละลาย PSG เมื่อ DE52 DEAE cellulose ใกล้แห้ง

3.4.7.2 นับจำนวนเชื้อด้วย Improved Neubauer chamber แล้วนำมาเลี้ยงด้วย Minimum essential medium with Earle's salts และ supplements ต่าง ๆ ตามวิธีของ Baltz et al. (1968) ดังนี้

3.4.7.2.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ *T. evansi* ซึ่งประกอบไปด้วย Minimum essential medium with Earle's salts, MEM non-essential amino acid , Na-pyruvate 0.2 มิลลิโมลาร์, 2-mercaptoethanol 0.2 มิลลิโมลาร์, hypoxanthine 10 มิลลิโมลาร์ และ thymidine 1.6 มิลลิโมลาร์, 15% heat-inactivated horse serum และ gentamycin 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.4.7.2.2 เลี้ยงเชื้อใน 24 multiwell plates โดยใส่อาหารเลี้ยงเชื้อหลุมละ 1.5 มิลลิลิตร ต่อเชื้อ 10^4 ตัว จากนั้นนำไปเลี้ยงใน 5% CO_2 incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

3.4.7.3 นำเชื้อ *T. evansi* isolate NpI 8/2 และ VPh03 มาทดสอบกับสารเบอเบอรีนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน โดยที่แต่ละความเข้มข้นของสารเบอเบอรีน ทำการทดสอบ 2 ครั้ง ๆ ละ 2 ซ้ำ ดังนี้

3.4.7.3.1 นำสารเบอเบอรีนความเข้มข้น $1.82x10^4$ โมลาร์ จำนวน 10 ไมโครลิตร ใส่ใน 24 multiwell plates ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่หลุมละ 490 ไมโครลิตร จากนั้นทำ 2 fold-dilution ให้ได้ความเข้มข้น 0, 2.8, 5.6,11.3, 22.6, 45.2 และ 90.9 ไมโครโมลาร์

3.4.7.3.2 นำเชื้อที่เลี้ยงไว้ในข้อ 3.4.7.2.2 มาทดสอบกับสารเบอเบอรีนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน จำนวน 500 ไมโครลิตร (ปริมาตรรวมของอาหารเลี้ยงเชื้อและเชื้อที่ทดสอบกับสารเบอเบอรีนเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อหลุม)

3.4.6.3.2 เติมอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 500 ไมโครลิตร ใน 24 multiwell plates ที่มีเชื้อเหลืออยู่ 500 ไมโครลิตร เพื่อเป็นกลุ่มควบคุม

3.4.7.3.3 จากนั้นนำเชื้อไปเลี้ยงใน 5% CO_2 incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3.4.7.3.4 นับจำนวนเชื้อ ณ เวลา 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง โดยทำการดูดอาหารเลี้ยงเชื้อใส่หลอดขนาด1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เชื้อตกตะกอนลงมา แล้วนับด้วย Improved Neubauer chamber

3.4.7.3.5 บันทึกจำนวนเชื้อที่เหลืออยู่เพื่อนำไปหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

3.4.8 การตรวจสอบหาการเปลี่ยนแปลงของ telomerase activity ของเชื้อ *T. evansi* หลังได้รับสารเบอเบอรีนในหลอดทดลอง

3.4.8.1 นำเชื้อ *T. evansi* isolate NpI 8/2 ที่เพิ่มจำนวนได้ตามข้อ 3.4.2.3 มาทำการแยกเชื้อด้วยวิธี anion-exchange chromatography

3.4.8.2 นำเชื้อที่ได้มาสกัดโปรตีนและตรวจสอบหาการเปลี่ยนแปลงของ telomerase activity ของเชื้อด้วยชุดทดสอบ *TeloTAGGG*Telomerase PCR ELISA^{plus} ดังนี้

3.4.8.2.1 ปั่นเชื้อที่แยกได้ด้วยความเร็ว 3,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นดูดสารละลายส่วนใสด้านบนออก แล้วล้างตะกอนด้วย PBS จำนวน 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นด้วยความเร็ว 3,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนออก แล้วล้างตะกอนด้วย PBS อีก 1 รอบ

3.4.8.2.2 เติม lysis reagent (จากชุดทดสอบ) จำนวน 200 ไมโครลิตร จากนั้นนำไป incubate บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที

3.4.8.2.2 ดูดสารละลายโปรตีนด้านบนจำนวน 175 ไมโครลิตร ออกมาใส่หลอดใหม่ แล้วนำมาวัดปริมาณโปรตีนด้วย Bio-Rad protein assay ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร โดยใช้ Bovine Serum Albumin (BSA) เป็นสารละลายมาตรฐาน

3.4.8.2.3 นำสารละลายโปรตีนปริมาณ 5, 10 และ 20 ไมโครกรัม มาทำปฏิกิริยากับสารเบอเบอรีนที่ระดับความเข้มข้น 0, 2.8, 5.6,11.3, 22.6, 45.2 และ 90.9 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

3.4.8.2.3 นำสารละลายโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับสารเบอเบอรีน ณ ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน มาเพิ่มจำนวนในส่วนของ telomere ด้วยวิธี PCR โดย 1 ปฏิกิริยา มี

ปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย reaction mixture 25 ไมโครลิตร, internal standard 5 ไมโครลิตร, สารละลายโปรตีน 3 ไมโครลิตร (positive control 1 ไมโครลิตร, negative control 3 ไมโครลิตร) และน้ำกลั่น โดยใช้สารละลายโปรตีนที่ถูกทำลายด้วยความร้อน ณ อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีเป็น negative control ที่สภาวะอุณหภูมิ ดังนี้

Primer elongation	25	องศาเซลเซียส	20	นาที	
Telomerase inactivation	94	องศาเซลเซียส	5	นาที	
Denaturation	94	องศาเซลเซียส	30	วินาที	30 รอบ
Annealing	50	องศาเซลเซียส	30	วินาที	
Extension	72	องศาเซลเซียส	90	วินาที	
Final extension	72	องศาเซลเซียส	10	นาที	

3.4.8.2.4 ทำการ denature PCR product ที่ได้โดยแบ่ง PCR product ออกเป็น 2 หลอด หลอดละ 2.5 ไมโครลิตร ใส่ denaturation reagent จำนวน 10 ไมโครลิตร incubate ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น hybridization ด้วย hybridization buffer T จำนวน 100 ไมโครลิตรในหลอดแรก และ hybridization buffer IS จำนวน 100 ไมโครลิตร ในหลอดที่ 2 ผสมสารให้เข้ากันแล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส , 300 rpm เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

3.4.8.2.5 ดูดสารละลาย hybridization mixture (T,IS) จำนวน 100 ไมโครลิตรใส่ในหลุม ELISA plate ที่เคลือบด้วย streptavidin ปิดปากหลุมด้วย self-adhesive cover foil จากนั้นนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.4.8.2.6 เทสารละลาย hybridization ออก แล้วล้างด้วย washing buffer จำนวน 250 ไมโครลิตร 3 รอบ

3.4.8.2.7 เติม anti-DIG-HRP-working solution จำนวน100 ไมโครลิตร ปิดปากหลุมด้วย self-adhesive cover foil แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส, 300 rpm เป็นเวลา 30 นาที

3.4.8.2.8 เทสารละลายออก แล้วล้างด้วย washing buffer จำนวน 250 ไมโครลิตร 5 รอบ

3.4.8.2.9 เติม TMB substrate solution จำนวน 100 ไมโครลิตร ปิดปากหลุมด้วย self-adhesive cover foil แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส, 300 rpm เป็นเวลา 15 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.8.2.10 หยุดปฏิกิริยาด้วย stop reagent จำนวน 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (A) ด้วยเครื่อง ELISA reader ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร และ 690 นาโนเมตร

3.4.8.2.11 นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ (A_{450nm}-A_{690nm}) มาคำนวณหาค่า Relative Telomerase Activities (RTA) ดังนี้

$$RTA = \frac{(A_{S,T} - A_{S,T,N}) / A_{S,IS}}{(A_{P,T} - A_{P,T,N}) / A_{P,IS}} \times 100$$

$A_{S,T}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

$A_{S,T,N}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของ negative control

$A_{S,IS}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่มี internal standard

$A_{P,T}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของ positive control

$A_{P,T,N}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของ lysis buffer

$A_{P,IS}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของ positive control ที่มี internal standard

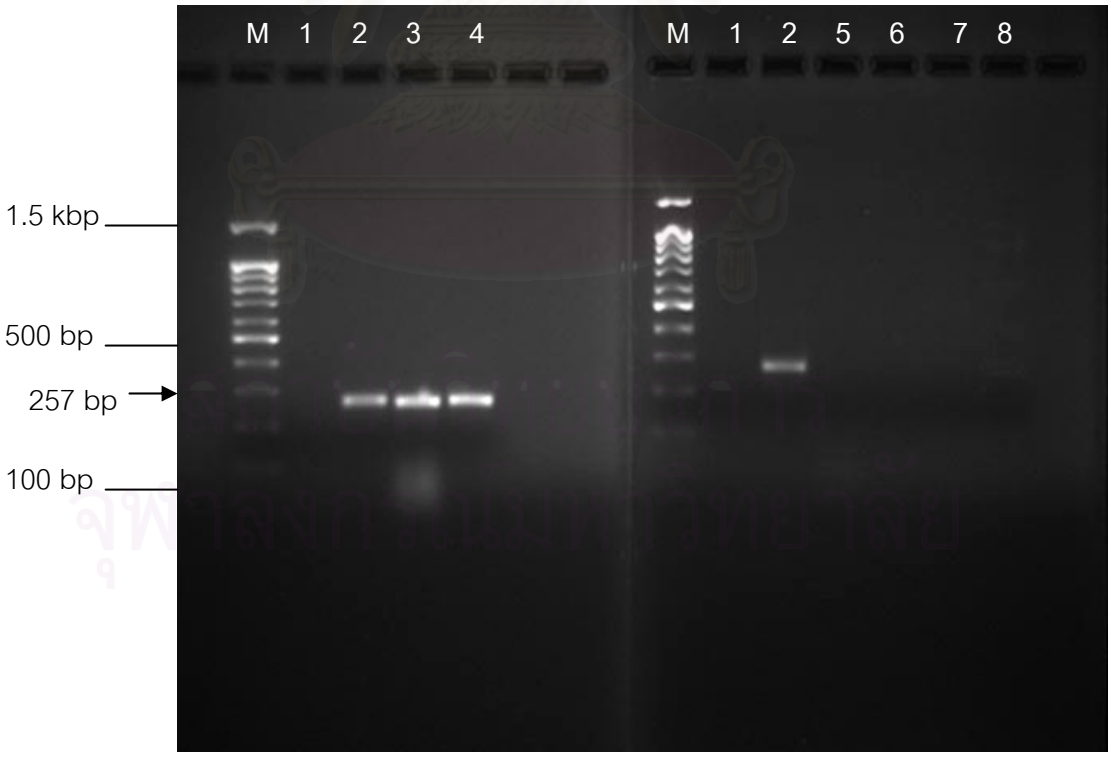
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การตรวจวินิจฉัยเชื้อ *T. evansi* isolate NpI 8/2 และ VPh03 ด้วยวิธี PCR

จากการนำเชื้อ *T. evansi* isolate NpI 8/2 และ VPh03 มาสกัด DNA ด้วยวิธี Phenol-chloroform extraction (CTAB) และเพิ่มปริมาณ DNA เพื่อทำการตรวจวินิจฉัยเชื้อด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ Tr3-Tr4 และทำการศึกษาเปรียบเทียบกับ DNA ของหนู mice, *Babesia* spp., *Ehlichia* spp., *Hepatozoon* spp., *Anaplasma* spp. และ *Theileria* spp. เพื่อทดสอบความจำเพาะของวิธี PCR ต่อเชื้อ *T. evansi* ผลการศึกษาพบว่าวิธี PCR นี้มีความจำเพาะต่อเชื้อ *T. evansi* โดยพบผลิตภัณฑ์ขนาด 257 bp และไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR กับเชื้อชนิดอื่น ๆ ที่ทำการทดสอบ และพบว่าเชื้อทั้ง 2 isolates นี้เป็นเชื้อ *T. evansi* โดยพบผลิตภัณฑ์ขนาดเดียวกับ positive control ดังรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 ความจำเพาะของวิธี PCR ต่อเชื้อ *T. evansi* และการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *T. evansi* NpI 8/2 และ VPh03 ด้วยวิธี PCR

Lane M = 1.5 kbp DNA ladder marker

Lane 1 = negative control (H_2O)

Lane 2 = positive control (*T.evansi*)

Lane 3 = *T. evansi* NpI 8/2

Lane 4 = *T. evansi* VPh03

Lane 5 = DNA หนู mice

Lane 6 = *Babesia* spp.

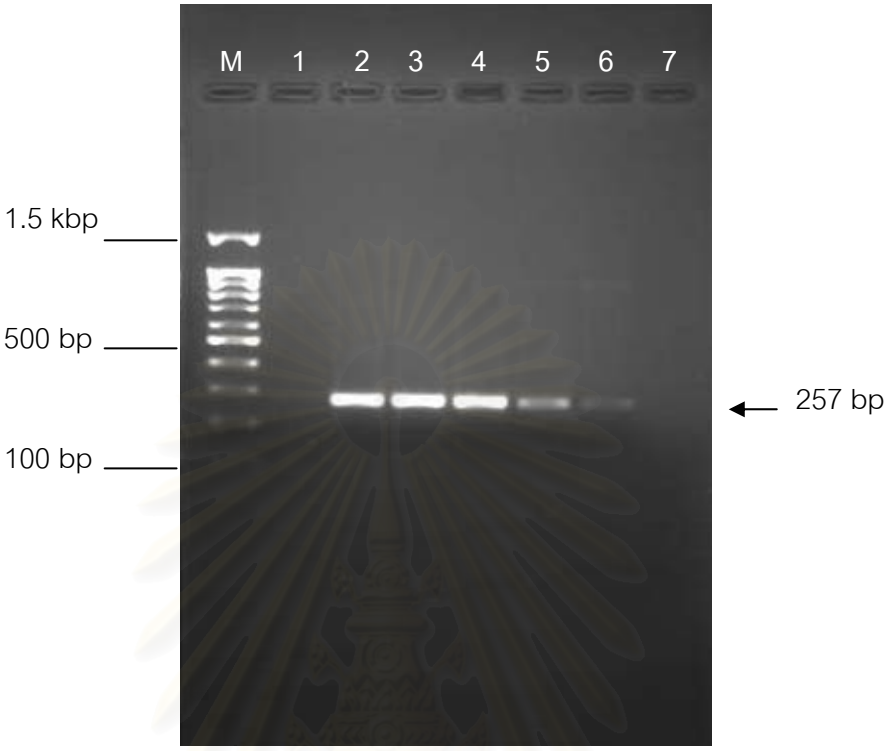
Lane 7 = *Ehlichia* spp. และ *Hepatozoon* spp.

Lane 8 = *Anaplasma* spp. และ *Theileria* spp.

4.2 การทดสอบประสิทธิภาพความไวในการตรวจหาเชื้อ *T. evansi* ด้วยวิธี PCR

จากการทดสอบประสิทธิภาพความไวในการตรวจหาเชื้อ *T. evansi* NpI 8/2 ด้วยวิธี PCR โดยการเจือจางเชื้อตั้งแต่ระดับ 10^5,10^4,10^3,10^2,10 และ 1 ตัวต่อเลือด 1 มิลลิลิตร พบว่า การตรวจหาเชื้อด้วยวิธี PCR โดยไพรเมอร์ Tr3-Tr4 นี้มีประสิทธิภาพความไวในการตรวจพบเชื้อน้อยที่สุดที่ระดับเชื้อตั้งแต่ 10 ตัวต่อเลือด 1 มิลลิลิตร ขึ้นไป โดยมีผลิตภัณฑ์ขนาด 257 bp ดังรูปที่ 4.2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.2 ความไวในการตรวจหาเชื้อ *T. evansi* NpI 8/2 ด้วยวิธี PCR

Lane M = 1.5 kbp DNA ladder marker

Lane 1 = negative control (H_2O)

Lane 2 = *T. evansi* NpI 8/2 จำนวน 10^5 ตัว/ml

Lane 3 = *T. evansi* NpI 8/2 จำนวน 10^4 ตัว/ml

Lane 4 = *T. evansi* NpI 8/2 จำนวน 10^3 ตัว/ml

Lane 5 = *T. evansi* NpI 8/2 จำนวน 10^2 ตัว/ml

Lane 6 = *T. evansi* NpI 8/2 จำนวน 10 ตัว/ml

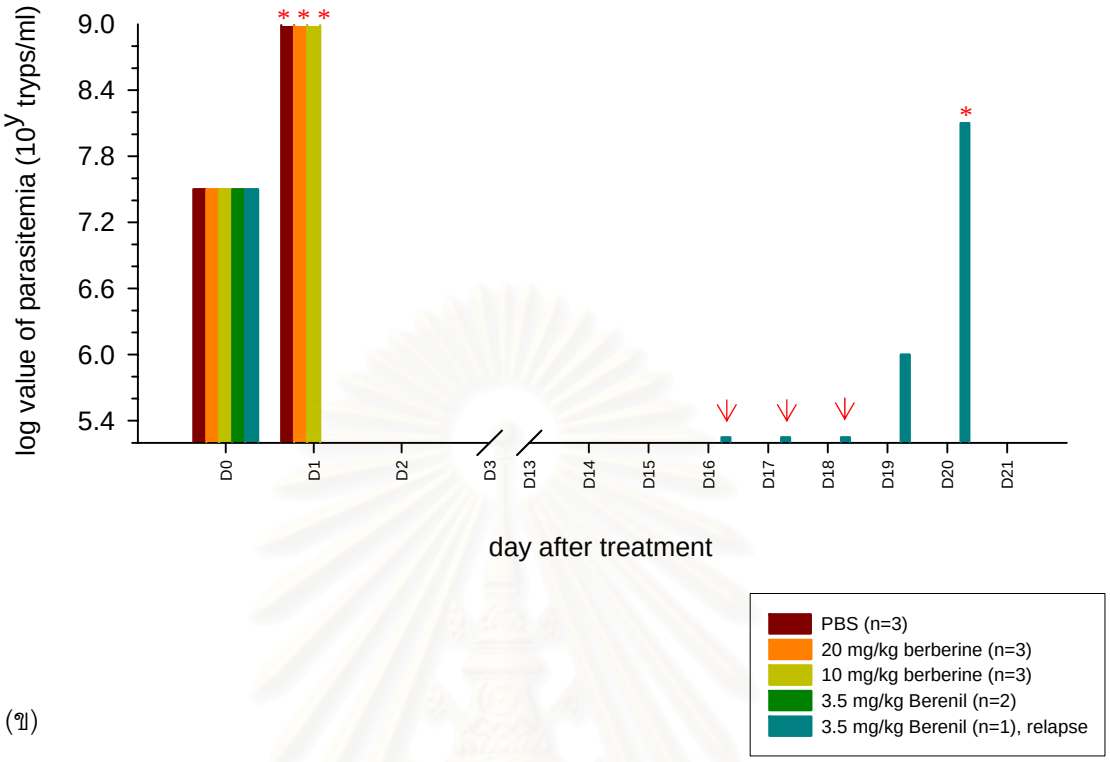
Lane 7 = *T. evansi* NpI 8/2 จำนวน 1 ตัว/ml

4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของสารเบอเบอรีนต่อเชื้อ *T. evansi* ในหนูทดลอง

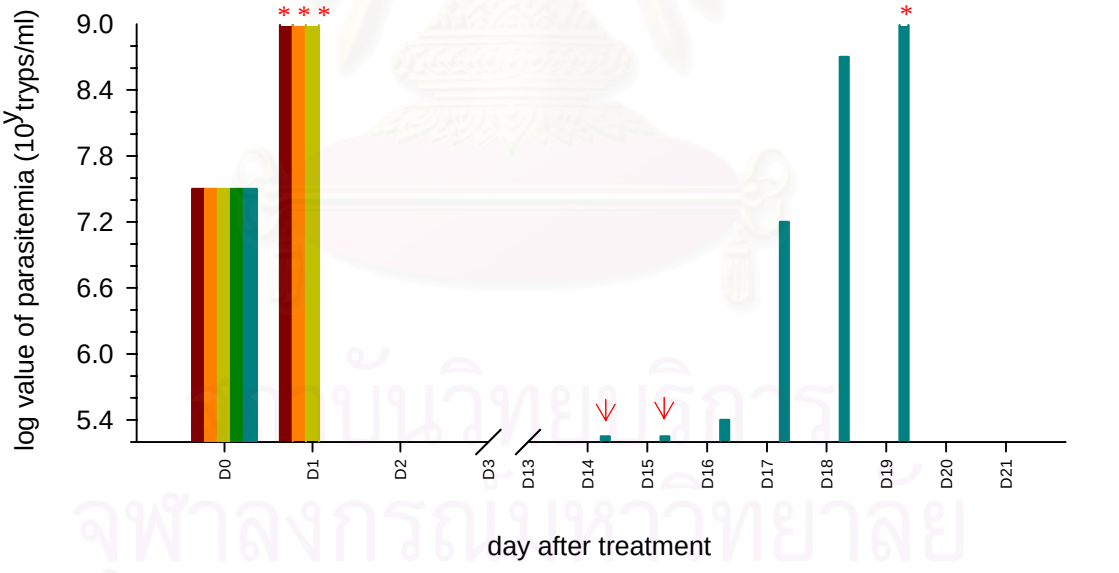
ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารเบอเบอรีนต่อเชื้อ *T.evansi* isolate NpI 8/2 และ VPh03 ในหนูทดลอง พบว่าเมื่อทำการฉีดเชื้อ *T.evansi* NpI 8/2 จำนวน 10^2 ตัว เข้าทางช่องท้องหนูทดลอง แล้วทำการฉีดสารเบอเบอรีนขนาด 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ที่ระดับเชื้อ $10^{7.5}$ ต่อเลือด 1 มิลลิลิตร พบว่า เมื่อทำการตรวจหาเชื้อด้วยวิธี rapid matching method หลังจากวันที่ทำการฉีดสารเบอเบอรีนในวันแรก ระดับเชื้อในกระแสเลือดของหนูทดลองทั้ง 3 ตัว ยังคงเพิ่มขึ้นเท่ากับกลุ่มควบคุมที่ทำการฉีด PBS จนกระทั่งถึงระดับเชื้อ 10^9 ตัวต่อเลือด 1 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นระดับเชื้อสูงสุดในกระแสเลือดของหนูทดลองที่สามารถทำให้หนูทดลองตายได้ ดังรูปที่ 4.3 (ก) เมื่อทำการเพิ่มขนาดของสารเบอเบอรีนเป็น 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า ระดับเชื้อในกระแสเลือดของหนูทดลองยังคงเพิ่มขึ้นเท่ากับกลุ่มควบคุมที่ทำการฉีด PBS และในกลุ่มที่ทำการฉีดสารเบอเบอรีนขนาด 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เช่นกัน ในขณะที่ในกลุ่มควบคุมที่ทำการฉีด Berenil® ขนาด 3.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อทำการตรวจหาเชื้อด้วยวิธี rapid matching method ในวันแรกหลังจากฉีด Berenil® พบว่า หนูทดลองทั้ง 2 ตัว ตรวจไม่พบเชื้อในกระแสเลือด จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง ในขณะที่หนูทดลองตัวที่ 3 กลับพบเชื้อ ในวันที่ 19 หลังจากฉีด Berenil® จำนวน 10^6 ตัวต่อเลือด 1 มิลลิลิตร และเชื้อเพิ่มปริมาณขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงระดับ $10^{8.7}$ ตัวต่อเลือด 1 มิลลิลิตร ในวันที่ 20 หลังจากฉีด Berenil® และเมื่อทำการตรวจหาเชื้อด้วยวิธี PCR พบว่า ในหนูทดลอง 2 ตัวแรก ตรวจไม่พบเชื้อตลอดทั้ง 21 วัน ในขณะที่หนูทดลองตัวที่ 3 สามารถตรวจพบเชื้อได้ตั้งแต่วันที่ 16 หลังจากฉีด Berenil® ดังรูปที่ 4.3 (ก)

สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของสารเบอเบอรีนต่อเชื้อ *T. evansi* VPh03 ในหนูทดลอง พบว่า หลังจากฉีดสารเบอเบอรีนขนาด 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ที่ระดับเชื้อ $10^{7.5}$ ตัวต่อเลือด 1 มิลลิลิตร ให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับเชื้อ *T. evansi* NpI8/2 ดังรูปที่ 4.3 (ข) ในขณะที่กลุ่มควบคุมที่ทำการฉีด Berenil® ขนาด 3.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อทำการตรวจหาเชื้อด้วยวิธี rapid matching method พบว่า หนูทดลอง 2 ตัวแรก ตรวจไม่พบเชื้อจนกระทั่งถึงวันที่สิ้นสุดการทดลอง ในขณะที่หนูทดลองตัวที่ 3 กลับพบเชื้อ ในวันที่ 16 หลังจากฉีด Berenil® จำนวน $10^{5.4}$ ตัวต่อเลือด 1 มิลลิลิตร และเชื้อเพิ่มปริมาณขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงระดับ 10^9 ตัวต่อเลือด 1 มิลลิลิตร ในวันที่ 19 หลังจากฉีด Berenil® และเมื่อทำการตรวจหาเชื้อด้วยวิธี PCR พบว่า ในหนูทดลอง 2 ตัวแรก ตรวจไม่พบเชื้อตลอดทั้ง 21 วัน ในขณะที่หนูทดลองตัวที่ 3 สามารถตรวจพบเชื้อได้ตั้งแต่วันที่ 14 หลังจากฉีด Berenil®

(ก)



(ข)



รูปที่ 4.3 ผลของสารเบอเบอรีนต่อการเจริญของเชื้อ *T. evansi* ในหนูทดลอง (ก) *T. evansi* Npl 8/2 และ (ข) *T. evansi* VPh03

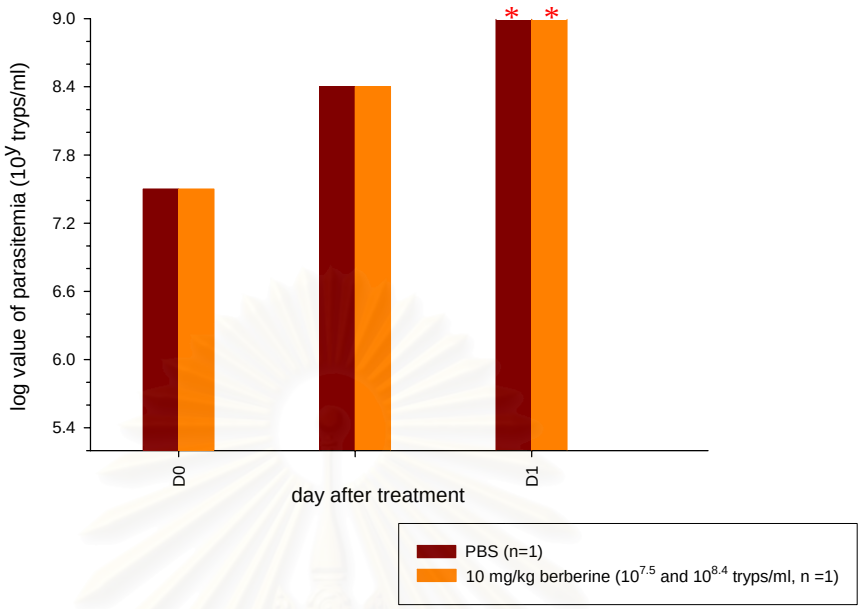
(* หนูทดลองตาย, ⇓ ตรวจพบเชื้อด้วยวิธี PCR)

จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า สารเบอเบอรีนขนาด 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อฉีดเข้าทางช่องท้องหนูทดลอง ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *T. evansi* isolate NpI 8/2 และ VPh03 และ Berenil® ขนาด 3.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *T. evansi* isolate NpI 8/2 และ VPh03 ให้หมดไปจากกระแสเลือดของหนูทดลองทั้งหมด

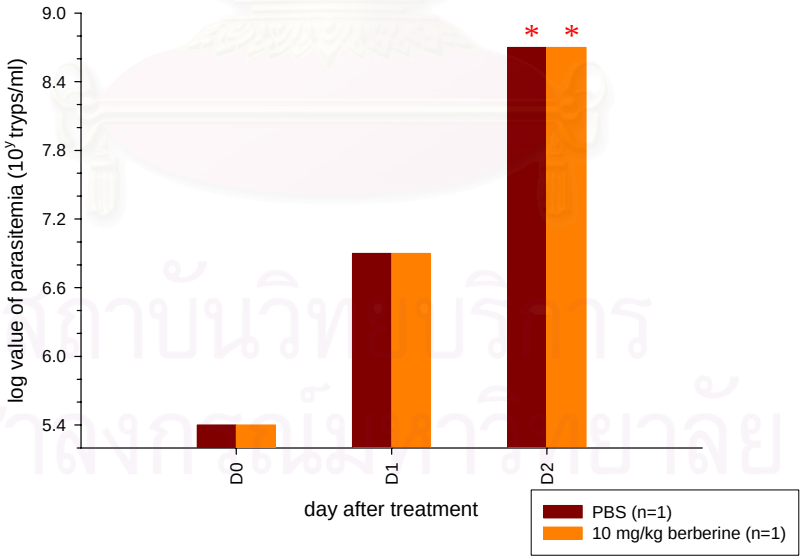
นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาเพิ่มเติม เพื่อหาขนาดของสารเบอเบอรีนที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *T. evansi* NpI 8/2 ในหนูทดลอง ซึ่งในแต่ละกลุ่มการทดลองนั้นใช้หนูทดลองเพียง 1 ตัว โดยได้ทำการเพิ่มจำนวนครั้งในการฉีดสารเบอเบอรีนขึ้น คือ ทำการฉีดสารเบอเบอรีนขนาด 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ที่ระดับเชื้อ $10^{7.5}$ ตัวต่อเลือด 1 มิลลิลิตร และที่ระดับ $10^{8.4}$ ตัวต่อเลือด 1 มิลลิลิตร (double doses) พบว่า เชื้อยังคงเพิ่มปริมาณขึ้นเท่ากับกลุ่มควบคุมที่ทำการฉีด PBS ดังรูปที่ 4.4 และนอกจากนี้ได้ทำการทดลองโดยการฉีดสารเบอเบอรีนขนาด 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ที่ระดับเชื้อต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธี rapid matching method คือ ที่ระดับ $10^{5.4}$ ต่อเลือด 1 มิลลิลิตร พบว่า ในกลุ่มที่ทดลองฉีดสารเบอเบอรีนขนาด 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เชื้อยังคงเพิ่มปริมาณขึ้นเท่ากับกลุ่มควบคุมที่ทำการฉีด PBS เช่นเดิม ดังรูปที่ 4.5

ดังนั้นจากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า สารเบอเบอรีนไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *T. evansi* NpI 8/2 ในหนูทดลองได้ เมื่อทำการฉีดสารเบอเบอรีนขนาด 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ที่ระดับเชื้อต่ำๆ และเพิ่มจำนวนครั้งในการฉีดสารเบอเบอรีน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.4 ผลของสารเบอเบอรีนต่อการเจริญของเชื้อ *T. evansi* NpI8/2 ในหนูทดลอง เมื่อฉีดที่ระดับ $10^{7.5}$ และ $10^{8.4}$ ตัวต่อมิลลิลิตร (* หนูตาย)

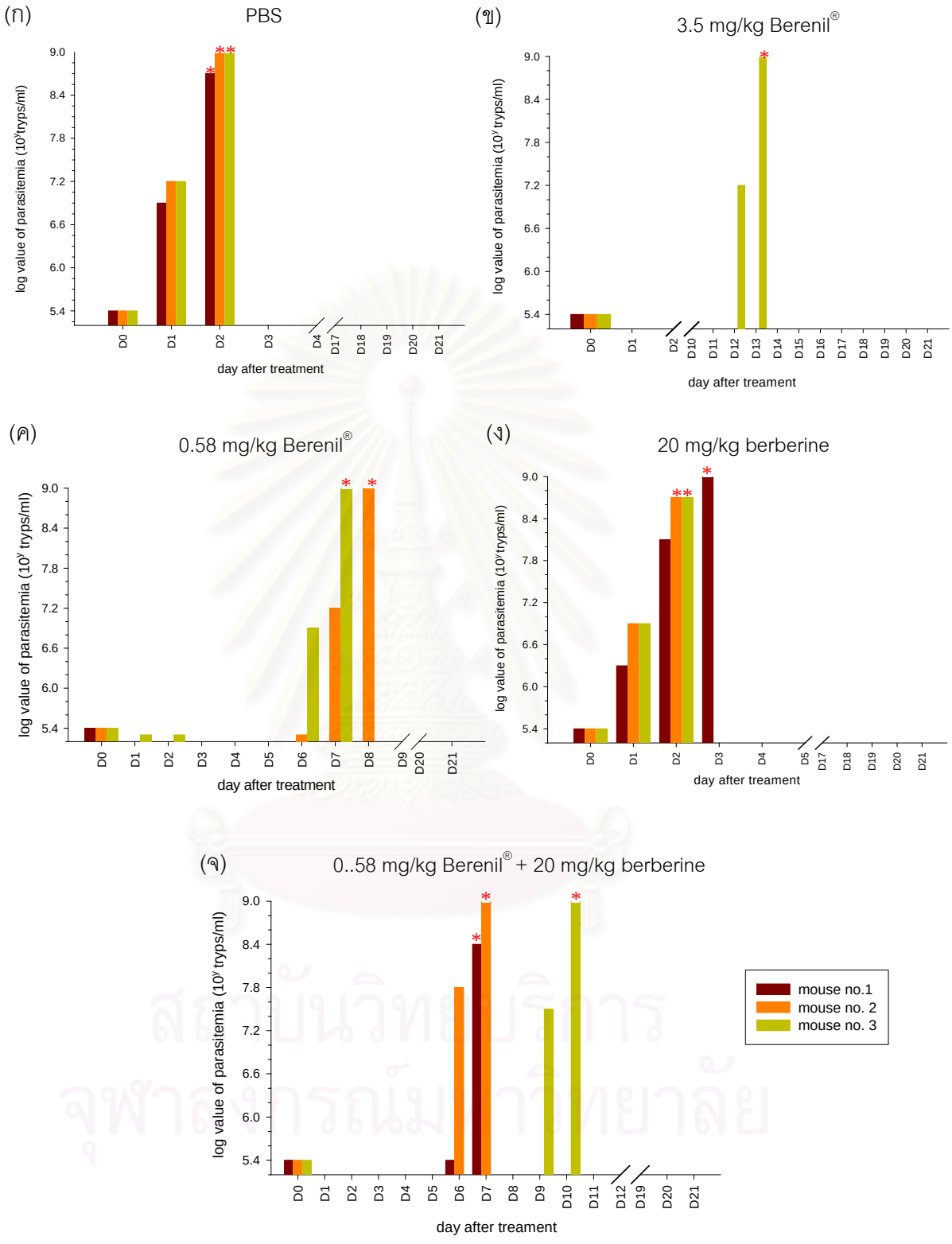


รูปที่ 4.5 ผลของสารเบอเบอรีนต่อการเจริญของเชื้อ *T. evansi* NpI8/2 ในหนูทดลอง เมื่อฉีดที่ระดับ $10^{5.4}$ ตัวต่อมิลลิลิตร (*หนูตาย)

4.4 การทดสอบประสิทธิภาพของสารผสม Berenil® กับเบอเบอรีนต่อเชื้อ *T. evansi* ในหนูทดลอง (ศึกษาเพิ่มเติม)

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารผสม Berenil® กับเบอเบอรีนต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *T. evansi* NpI 8/2 ในหนูทดลอง เมื่อทำการฉีดสารต่าง ๆ เข้าทางช่องท้องหนู ที่ระดับเชื้อ $10^{5.4}$ ตัวต่อเลือด 1 มิลลิลิตร พบว่า ในกลุ่มที่ทำการฉีด Berenil® ขนาด 3.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งเป็นขนาดยามาตรฐานที่ใช้ในการรักษาสัตว์ที่ติดเชื้อโดยทั่วไป ตรวจไม่พบเชื้อในกระแสเลือดตั้งแต่วันแรกหลังจากได้รับยาจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง (เมื่อทำการตรวจหาเชื้อด้วยวิธี rapid matching method) ในขณะที่ตรวจพบเชื้อกลับขึ้นมาในกระแสเลือดหนูทดลองตัวที่ 3 ในวันที่ 12 ที่ระดับเชื้อ $10^{7.2}$ ตัวต่อเลือด 1 มิลลิลิตร ดังรูปที่ 4.6 (ข) เมื่อทำการลดขนาดของ Berenil® ลง 6 เท่าจากขนาดมาตรฐาน คือ 0.58 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า ขนาดยาดังกล่าว สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ โดยในหนูทดลองตัวที่ 1 ตรวจไม่พบเชื้อในกระแสเลือดจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง ในขณะที่หนูทดลองตัวที่ 2 กลับพบเชื้อเพิ่มขึ้นมาในกระแสเลือดในวันที่ 6 ส่วนในหนูทดลองตัวที่ 3 ระดับเชื้อลดลงจนกระทั่งตรวจไม่พบเชื้อในวันที่ 3 แต่กลับพบเชื้อขึ้นมาใหม่อีกในวันที่ 6 หลังจากได้รับยา ดังรูปที่ 4.6 (ค)

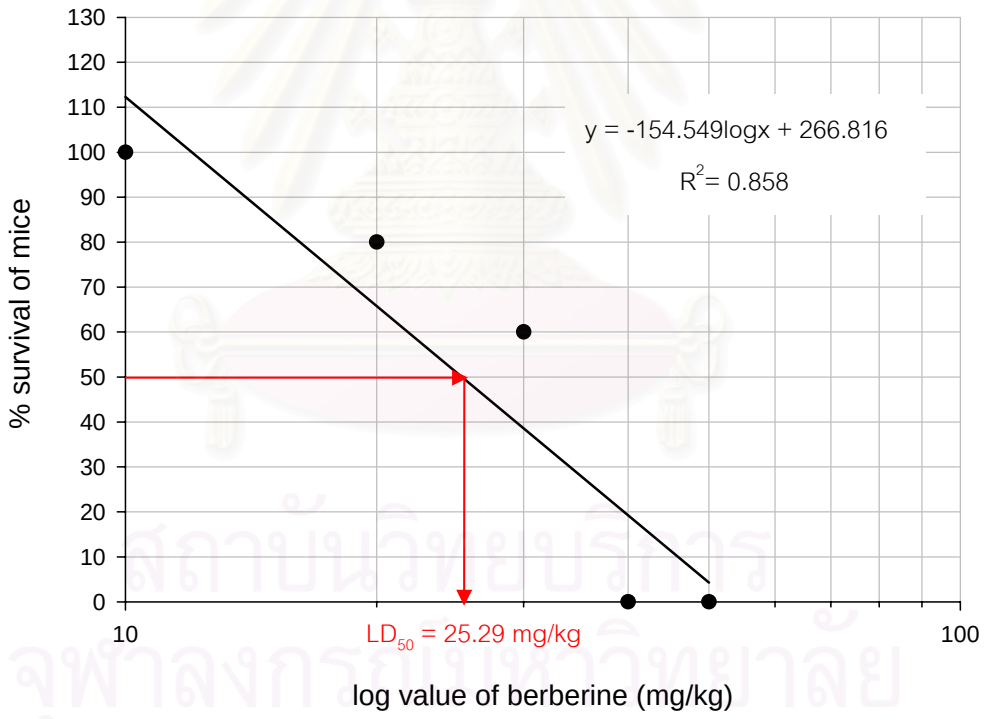
สำหรับในกลุ่มที่ทำการฉีดสารเบอเบอรีนขนาด 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ระดับเชื้อยังคงเพิ่มขึ้นปกติเท่ากับกลุ่มควบคุมที่ทำการฉีด PBS ดังรูปที่ 4.6 (ง), (ก) และเมื่อทำการฉีดสารผสม Berenil® ขนาด 0.58 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมกับเบอเบอรีนขนาด 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า สารผสมดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้เป็นเวลา 5-8 วัน โดยในหนูทดลองตัวที่ 1 และ 2 ตรวจไม่พบเชื้อในกระแสเลือดตั้งแต่วันแรกหลังจากได้รับยา จนกระทั่งในวันที่ 6 เริ่มตรวจพบเชื้อที่ระดับ $10^{5.4}$ และ $10^{7.8}$ ตัวต่อเลือด 1 มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนในหนูทดลองตัวที่ 3 ตรวจพบเชื้อขึ้นมาใหม่อีกในวันที่ 9 หลังจากได้รับยา ดังรูปที่ 4.6 (จ) อย่างไรก็ตาม การลดลงของระดับเชื้อนั้นไม่ได้เป็นผลเนื่องมาจากประสิทธิภาพของสารเบอเบอรีน แต่เป็นผลอันเนื่องมาจากประสิทธิภาพของ Berenil® (เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ Berenil® ขนาด 0.58 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ดังนั้นสารเบอเบอรีนจึงไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อหรือมีฤทธิ์เสริมการทำงานของ Berenil® ได้



รูปที่ 4.6 ผลของสารผสม Berenil ® กับเบอเบอรีนต่อการเจริญของเชื้อ *T. evansi* NpI 8/2 ในหนูทดลอง (ก) PBS, (ข) 3.5 mg/kg Berenil®, (ค) 0.58 mg/kg Berenil®,(ง) 20 mg/kg berberine และ (จ) 0.58 mg/kg Berenil® + 20 mg/kg berberine (* หนูตาย)

4.5 การศึกษาค่าความเป็นพิษเฉียบพลันเบื้องต้นของสารเบอเบอรีนในหนูทดลอง (ศึกษาเพิ่มเติม)

จากการทดลองฉีดสารเบอเบอรีนเข้าทางช่องท้องหนู ขนาด 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เพื่อหาค่าความเป็นพิษเฉียบพลันเบื้องต้นของสารเบอเบอรีนภายในเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า สารเบอเบอรีนขนาด 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีอัตราการรอดชีวิตของหนูทดลองเท่ากับ 100% ส่วนสารเบอเบอรีนขนาด 20 และ 30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีอัตราการรอดชีวิตของหนูทดลอง เท่ากับ 80% และ 60% ตามลำดับ ในขณะที่สารเบอเบอรีนขนาด 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีอัตราการรอดชีวิตของหนูทดลองเท่ากับ 0% จากการทดลองครั้งนี้ เมื่อนำข้อมูลมาคำนวณหาค่าความเป็นพิษเฉียบพลันเบื้องต้นของสารเบอเบอรีนที่ทำให้หนูทดลองตายลงจำนวนครึ่งหนึ่ง (LD_{50}) ในเวลา 24 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 25.29 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ดังรูปที่ 4.7

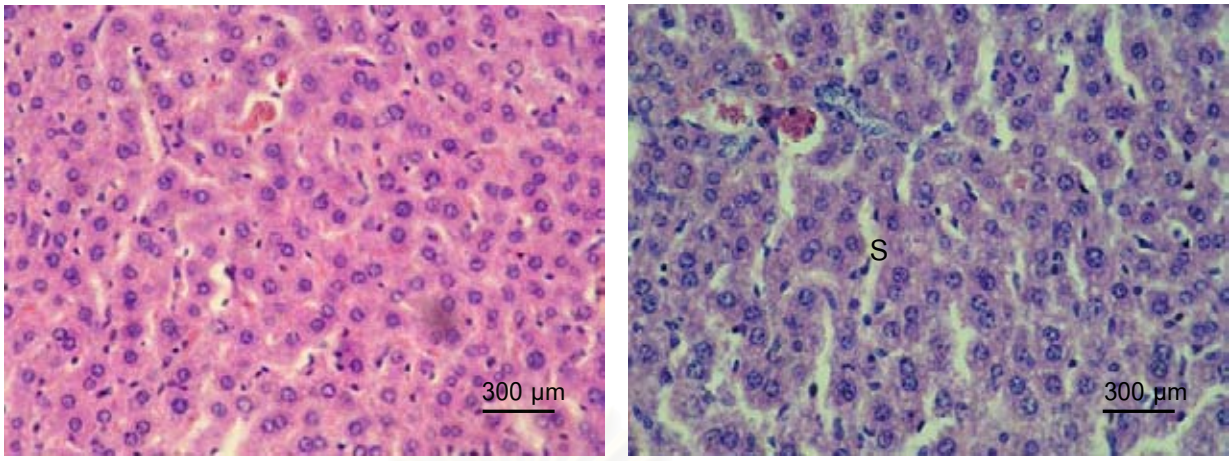


รูปที่ 4.7 ค่าความเป็นพิษเฉียบพลันเบื้องต้นของสารเบอเบอรีนในหนูทดลอง (n = 5) หลังได้รับสาร 24 ชั่วโมง

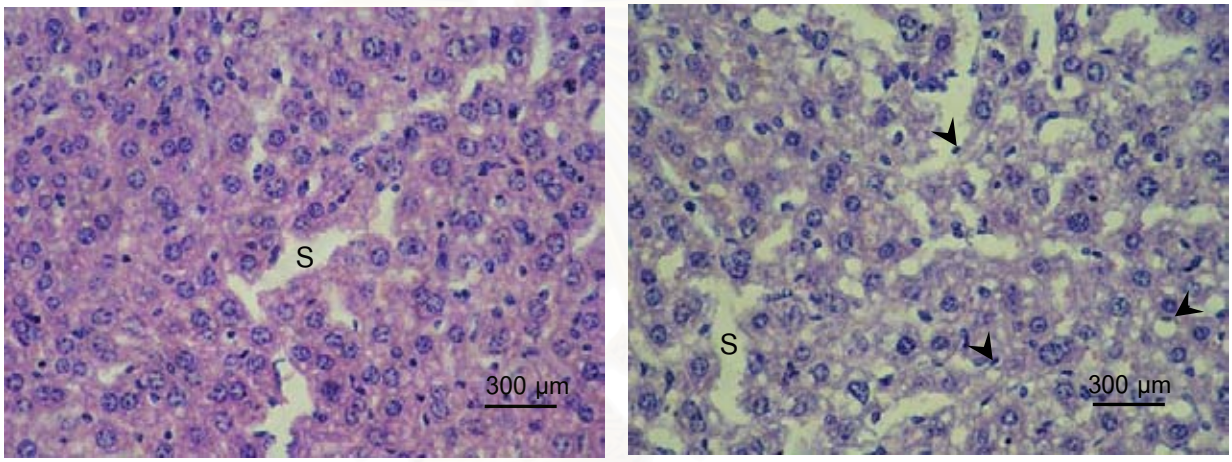
นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อตับหนูทดลองเบื้องต้นเพิ่มเติม โดยการฉีดสารเบอเบอรีนเข้าทางช่องท้องหนูทดลองหลังจากพบเชื้อ *T. evansi* NpI 8/2 จำนวน $10^{7.5}$ ตัวต่อเลือด 1 มิลลิลิตร ขนาด 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และขนาด 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม 2 ครั้ง ที่ระดับเชื้อ $10^{7.5}$ และ $10^{8.4}$ ตัวต่อเลือด 1 มิลลิลิตร ตามลำดับ หลังจากเชื้อขึ้นถึงระดับ 10^{9} ตัวต่อเลือด 1 มิลลิลิตร จึงทำการสลบหนู และเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อเยื่อตับมาศึกษาลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาหลังได้รับสารเบอเบอรีน โดยการย้อมด้วยสี Heamatoxylene and eosin และในแต่ละกลุ่มการทดลอง ทำการสุ่มตัวอย่างมาศึกษาเพียง 1 ตัวอย่าง

จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า ในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารเบอเบอรีน แต่ได้รับเชื้อ *T. evansi* NpI 8/2 จำนวน 10^{9} ตัวต่อเลือด 1 มิลลิลิตร พบเนื้อเยื่อตับมีลักษณะปกติ คือ เซลล์ตับ (hepatocyte) มีรูปร่างหลายเหลี่ยม เรียงตัวเป็นแนว ภายในมีนิวเคลียส และเห็นขอบเขตของเยื่อหุ้มเซลล์ตับชัดเจน พบช่องว่างของหลอดเลือด หรือ sinusoid แทรกอยู่ระหว่างเซลล์ตับ ดังรูปที่ 4.8 (ก) ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับสารเบอเบอรีนขนาด 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าเซลล์มีลักษณะปกติ แต่บางบริเวณพบเซลล์มีการเสียหายบางส่วน คือ เกิดการขยายตัวของ sinusoid ดังรูปที่ 4.8 (ข) และบางบริเวณพบการบวมของเซลล์ตับ (cloudy swelling) ดังรูปที่ 4.8 (ค) นอกจากนี้ในกลุ่มที่ได้รับสารเบอเบอรีนขนาด 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ติดต่อกัน 2 ครั้ง ณ ระดับเชื้อ $10^{7.5}$ และ $10^{8.4}$ ตัวต่อเลือด 1 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลาห่างกัน 12 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ตับเสียหายเพิ่มมากขึ้น โดยพบการบวมของเซลล์ตับ sinusoid ขยายตัวผิดปกติ เซลล์มีการหดตัวของนิวเคลียส และติดสีเข้มทึบเป็นจำนวนมาก (pyknotic nucleus) ดังรูปที่ 4.8 (ง)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



(ก) (ข)



(ค) (ง)

รูปที่ 4.8 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อตับหนูทดลองหลังได้รับสารเบอเบอรีน และเชื้อ *T. evansi* NpI 8/2 จำนวน 10^9 ตัว/ml

(ก) เนื้อเยื่อตับหนูทดลองที่ไม่ได้รับสารเบอเบอรีน แต่ได้รับเชื้อ *T. evansi* NpI 8/2 พบว่า เซลล์มีลักษณะปกติ

(ข) เนื้อเยื่อตับหนูทดลองหลังได้รับสารเบอเบอรีนขนาด 20 mg/kg และเชื้อ *T. evansi* NpI 8/2 พบว่า มีการขยายตัวของ sinusoid (S)

(ค) เนื้อเยื่อตับหนูทดลองหลังได้รับสารเบอเบอรีนขนาด 20 mg/kg และเชื้อ *T. evansi* NpI 8/2 พบว่า มีการขยายตัวของ sinusoid (S) และมีการบวมของเซลล์

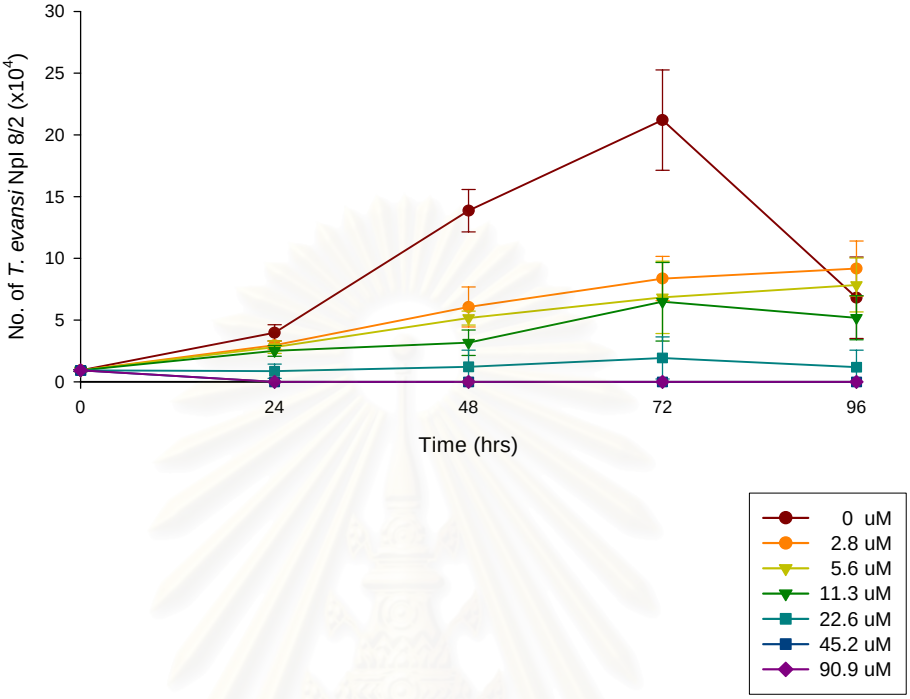
(ง) เนื้อเยื่อตับหนูทดลองหลังได้รับสารเบอเบอรีนขนาด 10 mg/kg 2 ครั้ง ห่างกัน 12 ชั่วโมง และเชื้อ *T. evansi* NpI 8/2 พบว่า เซลล์เกิดการบวม มีการขยายของ sinusoid (S) และมีการหดตัวนิวเคลียส (ลูกศร)

4.6 การทดสอบประสิทธิภาพของสารเบอเบอรีนต่อเชื้อ *T. evansi* ในหลอดทดลอง (ศึกษาเพิ่มเติม)

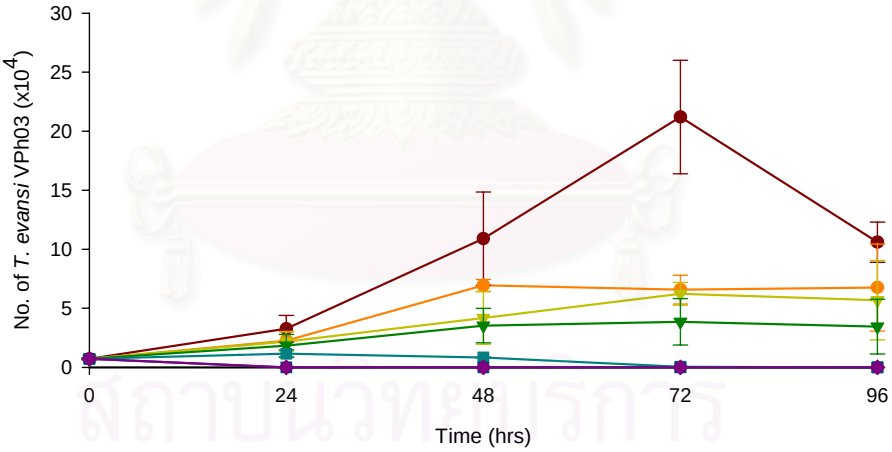
จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารเบอเบอรีนต่อเชื้อ *T. evansi* isolate NpI 8/2 และ VPh03 ในหลอดทดลอง ที่ระดับความเข้มข้น 0, 2.8, 5.6,11.3, 22.6, 45.2 และ 90.9 ไมโครโมลาร์ ณ เวลา 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง พบว่า หลังจากทดสอบเชื้อ *T. evansi* NpI 8/2 กับสารเบอเบอรีนที่ระดับเริ่มต้นจำนวน $(0.92 \pm 0.08) \times 10^4$ ตัว ระดับเชื้อลดจำนวนลงตั้งแต่ 24 ชั่วโมงแรกหลังการทดลอง ในทุก ๆ กลุ่มความเข้มข้นของสารเบอเบอรีน โดยจำนวนเชื้อแปรผกผันตามความเข้มข้นของสารเบอเบอรีนที่เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ทดสอบกับสารเบอเบอรีน และระดับเชื้อยังคงลดจำนวนลงเรื่อย ๆ จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 96 พบว่า ในกลุ่มควบคุมพบเชื้อจำนวน $(6.81 \pm 3.30) \times 10^4$ ตัว ในขณะที่กลุ่มที่ทดสอบกับสารเบอเบอรีนที่ระดับความเข้มข้น 2.8, 5.6,11.3 และ 22.6 ไมโครโมลาร์ พบเชื้อจำนวน $(9.13 \pm 2.23) \times 10^4$, $(7.84 \pm 2.18) \times 10^4$, $(5.19 \pm 1.79) \times 10^4$ และ $(1.19 \pm 1.37) \times 10^4$ ตัว ตามลำดับ โดยในกลุ่มที่ทดสอบกับสารเบอเบอรีนที่ระดับความเข้มข้น 45.2 และ 90.9 ไมโครโมลาร์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *T. evansi* NpI 8/2 ได้ทั้งหมดตั้งแต่ 24 ชั่วโมงแรกหลังจากทดสอบกับสารเบอเบอรีน ดังนั้นสารเบอเบอรีนที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *T. evansi* NpI 8/2 ในหลอดทดลองได้ มีค่า MIC เท่ากับ 45.2 ไมโครโมลาร์ ที่เวลา 24 ชั่วโมง ดังรูปที่ 4.9 (ก)

สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของสารเบอเบอรีนต่อเชื้อ *T. evansi* VPh03 ในหลอดทดลอง พบว่า สารเบอเบอรีนสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *T. evansi* VPh03 ในหลอดทดลองได้เช่นกัน โดยระดับเชื้อเริ่มต้นที่ทำการทดสอบกับสารเบอเบอรีนมีจำนวน $(0.72 \pm 0.08) \times 10^4$ ตัว ใน 24 ชั่วโมงแรกหลังการทดลอง พบว่าในทุก ๆ กลุ่มความเข้มข้นของสารเบอเบอรีนมีระดับเชื้อลดลงแปรผกผันตามความเข้มข้นของสารเบอเบอรีนที่เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และเมื่อสิ้นสุดการทดลองในชั่วโมงที่ 96 กลุ่มควบคุมพบเชื้อจำนวน $(10.6 \pm 1.70) \times 10^4$ ตัว กลุ่มที่ทดสอบกับสารเบอเบอรีนที่ระดับความเข้มข้น 2.8, 5.6 และ 11.3 ไมโครโมลาร์ พบเชื้อจำนวน $(6.76 \pm 3.69) \times 10^4$, $(5.68 \pm 3.37) \times 10^4$ และ $(3.45 \pm 2.32) \times 10^4$ ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มที่ทำการทดสอบกับสารเบอเบอรีนที่ความเข้มข้น 22.6 ไมโครโมลาร์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้งหมดได้ในชั่วโมงที่ 72 และในกลุ่มที่ทดสอบกับสารเบอเบอรีนที่ระดับความเข้มข้น 45.2 และ 90.9 ไมโครโมลาร์ สามารถยับยั้งเชื้อ *T. evansi* NpI 8/2 ได้ทั้งหมดใน 24 ชั่วโมงแรกหลังการทดลอง ดังนั้นสารเบอเบอรีนที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *T. evansi* VPh03 ในหลอดทดลองได้ มีค่า MIC เท่ากับ 22.6 ไมโครโมลาร์ ที่เวลา 72 ชั่วโมง ดังรูปที่ 4.9 (ข)

(ก)



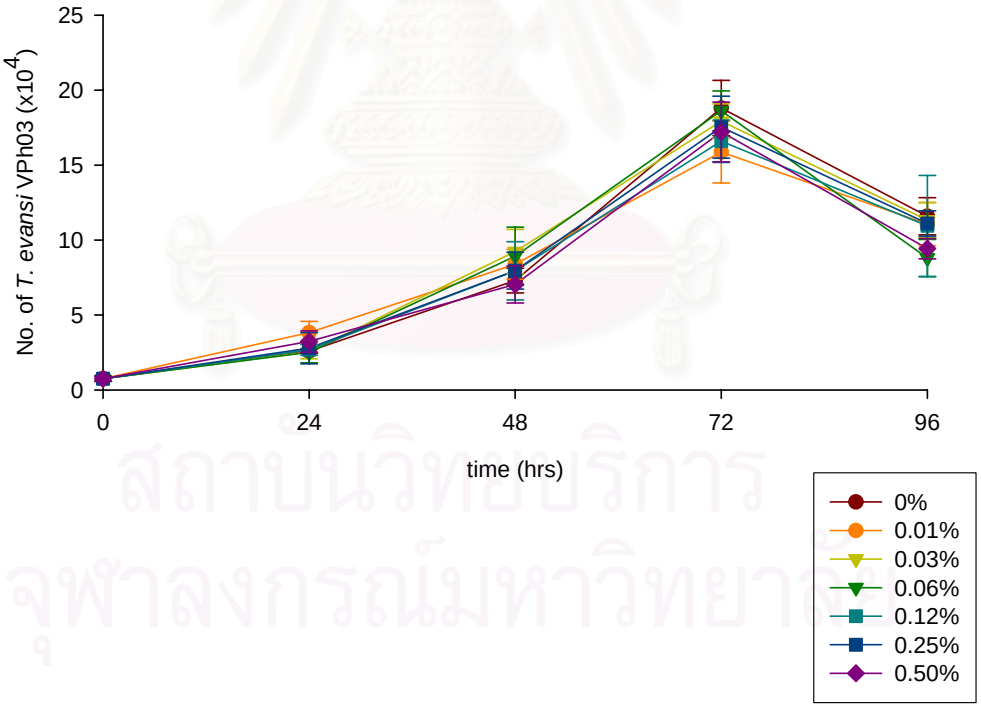
(ข)



รูปที่ 4.9 ผลของสารเบอเบอรีนต่อการเจริญของเชื้อ *T. evansi* ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ในหลอดทดลอง (ก) *T. evansi* NpI 8/2 และ (ข) *T. evansi* VPh03

ดังนั้น จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า สารเบอเบอรีนสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *T. evansi* isolate NpI8/2 และ VPh03 ในหลอดทดลองได้ โดยมีค่า MIC เท่ากับ 45.2 ไมโครโมลาร์ ณ เวลา 24 ชั่วโมง และ 22.6 ไมโครโมลาร์ ณ เวลา 72 ชั่วโมง ตามลำดับ สำหรับผลการศึกษาประสิทธิภาพของ Berenil ® ต่อการเจริญเชื้อ *T. evansi* ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมบวกนั้น ในการศึกษาครั้งนี้ ไม่สามารถหาค่า MIC ได้

นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาผลของสารละลาย DMS0 ต่อการเจริญของเชื้อ *T. evansi* VPh03 ในหลอดทดลอง ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กันตามความเข้มข้นที่ใช้ในการละลายสารเบอเบอรีน ดังนี้ สารเบอเบอรีนที่ระดับความเข้มข้น 0, 2.8, 5.6,11.3, 22.6, 45.2 และ 90.9 ไมโครโมลาร์ ใช้สารละลาย DMSO เท่ากับ 0%, 0.01%, 0.03%, 0.06%, 0.13%, 0.25% และ 0.50% ตามลำดับ จากผลการศึกษา พบว่า จำนวนเชื้อระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารละลาย DMSO ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ(P>0.05, one-way ANOVA) ดังนั้น สารละลาย DMSO จึงไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *T. evansi* VPh03 ดังรูปที่ 4.10



รูปที่ 4.10 ผลของสารละลาย DMSO ต่อการเจริญของเชื้อ *T. evansi* VPh03 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กันในหลอดทดลอง

4.7 การตรวจสอบหาการเปลี่ยนแปลงของ telomerase activity **ของเชื้อ** *T. evansi* **หลังได้รับสารเบอเบอรีนในหลอดทดลอง**

จากการตรวจสอบหาการเปลี่ยนแปลงของ telomerase activity ของเชื้อ *T. evansi* Npl 8/2 จากสารละลายโปรตีนที่สกัดได้ ด้วยชุดทดสอบ *TeloTAGGG*Telomerase PCR ELISA^{plus} ภายหลังได้รับสารเบอเบอรีนที่ระดับความเข้มข้น 0, 2.8, 5.6,11.3, 22.6, 45.2 และ 90.9 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที ผลการศึกษาพบว่า สารละลายโปรตีนของเชื้อที่ทำการทดสอบปริมาณ 5, 10 และ 20 ไมโครกรัม มีค่าการดูดกลืนแสง (A_{450nm}-A_{690nm}) ที่ระดับเริ่มต้น (0 ไมโครโมลาร์) เท่ากับ 0.208, 0.230 และ 0.210 ตามลำดับ และหลังจากทดสอบกับสารเบอเบอรีนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงในกลุ่มของสารละลายโปรตีนปริมาณ 5 ไมโครกรัม มีค่าในระดับคงที่เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ทดสอบกับสารเบอเบอรีน และในกลุ่มของสารละลายโปรตีนปริมาณ 10 และ 20 ไมโครกรัม มีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ดังตารางที่ 4.1

เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสง(A_{450nm}-A_{690nm}) มาคำนวณหาค่า Relative Telomerase Activities (RTA) พบว่า ค่า RTA ที่ทำการทดสอบกับสารเบอเบอรีนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ในกลุ่มของสารละลายโปรตีนปริมาณ 5 ไมโครกรัม มีแนวโน้มคงที่ ในขณะที่ในกลุ่มของสารละลายโปรตีนปริมาณ 10 และ 20 ไมโครกรัม มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ดังรูปที่ 4.11

ดังนั้น จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า สารเบอเบอรีนที่ระดับความเข้มข้น 2.8, 5.6,11.3, 22.6, 45.2 และ 90.9 ไมโครโมลาร์ สามารถเปลี่ยนแปลง telomerase activity ของเชื้อ *T. evansi* Npl 8/2 ในหลอดทดลองได้ ซึ่งจะวิเคราะห์ผลต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.1 ค่าการดูดกลืนแสง (A_{450nm}-A_{690nm}) ของเชื้อ *T. evansi* NpI 8/2 หลังจากทดสอบกับสารเบอเบอรีนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

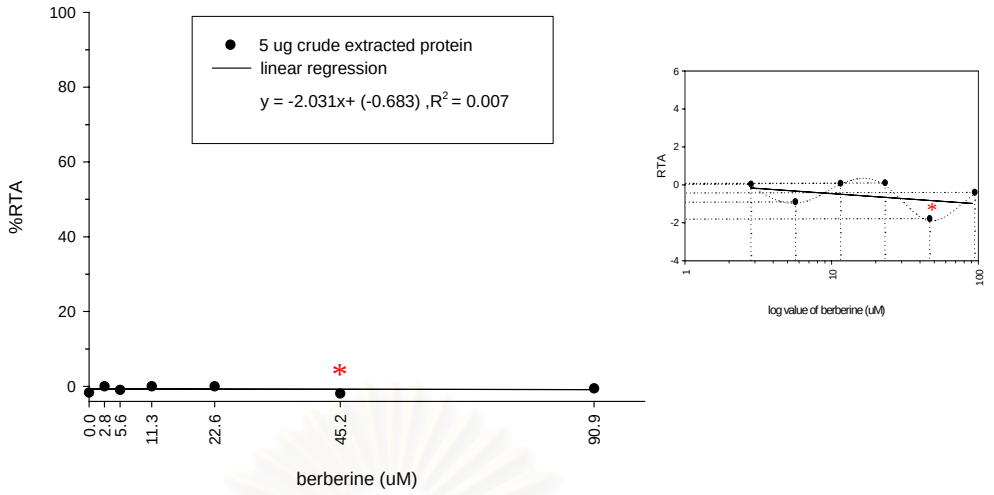
โปรตีน (µg)	ค่าการดูดกลืนแสง (A_{450nm}-A_{690nm})																	
	เบอเบอรีน (µM)		0		2.8		5.6		11.3		22.6		45.2		90.9		Hybridization	
buffer	T	IS	T	IS	T	IS	T	IS	T	IS	T	IS	T	IS	T	IS		
5			0.208	0.283	0.223	0.308	0.215	0.271	0.223	0.291	0.223	0.279	0.220	0.005*	0.219	0.224		
10			0.230	0.294	0.245	0.316	0.232	0.321	0.234	0.320	0.245	0.306	0.246	0.286	0.241	0.266		
20			0.210	0.303	0.231	0.309	0.233	0.306	0.225	0.275	0.255	0.283	0.267	0.275	0.270	0.284		

Hybridization buffer	T	IS
positive control	2.145	0.621
negative control (5 µg heat- inactivated protein)	0.223	-
lysis buffer (negative control of positive control)	0.206	-

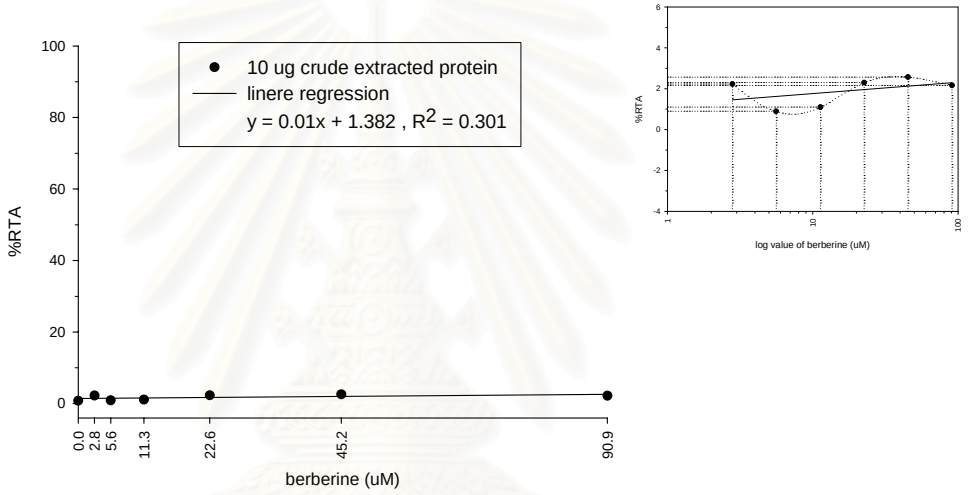
* ข้อมูลผิดผลาดเนื่องจากการทดลอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

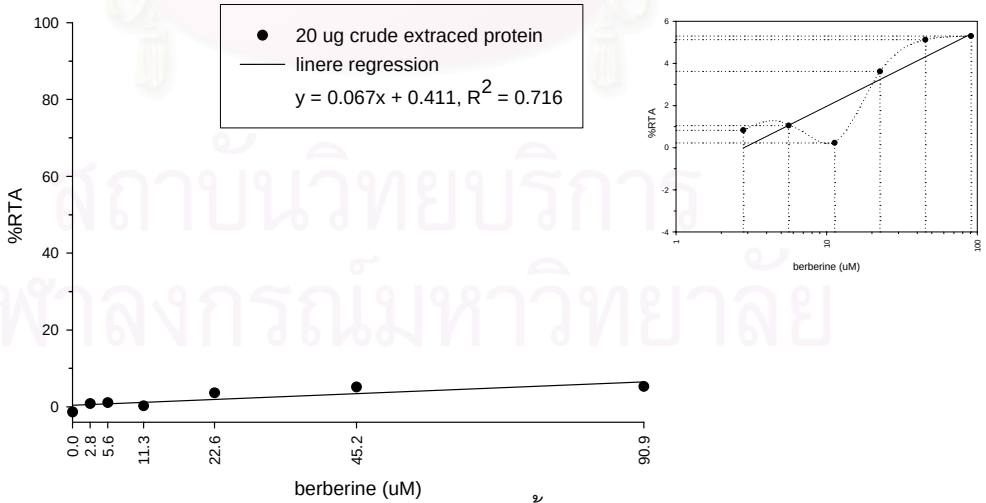
(ก)



(ข)



ค)



รูปที่ 4.11 Relative Telomerase Activities (RTA) ของเชื้อ *T. evansi* NpI 8/2 หลังจากทดสอบกับสารเบอเบอรีนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน (ก) 5 µg crude extracted protein, (ข) 10 µg crude extracted protein และ (ค) 20 µg crude extracted protein

(* ข้อมูลผิดพลาดเนื่องจากการทดลอง)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผล

ในการทดสอบความจำเพาะของเชื้อ *T. evansi* ด้วยวิธี PCR พบผลิตภัณฑ์ขนาด 257 bp และมีความจำเพาะต่อเชื้อ *T. evansi* ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Sukhumsirichart และคณะ (2000) ทั้งนี้เนื่องมาจากไพรเมอร์ที่นำมาทดสอบเป็นไพรเมอร์ชนิดเดียวกัน คือ Tr3-Tr4 และพบว่าในการทดสอบประสิทธิภาพความไวในการตรวจหาเชื้อ *T. evansi* มีค่าความไวเท่ากับ 10 ตัวต่อเลือด 1 มิลลิลิตร ในขณะที่การศึกษาของ Sukhumsirichart และคณะ (2000) พบว่า มีค่าความไวในการตรวจพบเชื้อเท่ากับ 1 พิโคกรัม หรือเท่ากับ trypanosomes 10 ตัว เช่นเดียวกัน (Chansiri et al., 2002) โดยในการศึกษาครั้งนี้ได้นำวิธี PCR มาใช้ในการตรวจสอบหาเชื้อ *T. evansi* ในหนูทดลอง ในกรณีที่ไม่สามารถตรวจหาเชื้อได้ด้วยวิธี Rapid matching method หรือการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ เนื่องจากการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์มีข้อจำกัด คือไม่สามารถตรวจหาเชื้อที่มีระดับต่ำกว่า$10^{5.4}$ ตัวต่อเลือด 1 มิลลิลิตรได้ (Herbert and Lumsden, 1976) จากผลการศึกษาพบว่า การตรวจหาเชื้อด้วยวิธี PCR มีความไวในการตรวจหาเชื้อได้เร็วกว่าการตรวจหาเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ถึง 3 วัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Ijaz และคณะ (1998)

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารเบอเบอรีนต่อเชื้อ *T. evansi* ในหนูทดลอง พบว่าหนูทดลองบางตัวในกลุ่มควบคุมที่ทำการฉีด Berenil® ขนาด 3.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งเป็นระดับยามาตรฐานที่ใช้ในการรักษาสัตว์โดยทั่วไป ไม่สามารถกำจัดเชื้อให้หมดไปจากกระแสเลือดได้ โดยสามารถตรวจพบเชื้อกลับมาในกระแสเลือดอีกในวันที่ 16 (*T. evansi* NpI 8/2) และในวันที่ 14 (*T. evansi* VPh03) หลังจากฉีด Berenil® เมื่อทำการตรวจด้วยวิธี PCR ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Elamin และคณะ (1982) กล่าวว่า Berenil® ขนาด 3.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อในหนู mice ได้ทั้งหมด ในขณะที่ Berenil® ขนาด 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้งหมดได้และไม่เป็นพิษกับหนูทดลอง ทั้งนี้เนื่องจาก Berenil® เป็นยาในในกลุ่ม hydrophilic drug ซึ่งไม่สามารถแทรกผ่าน blood brain barrier ของหนูทดลองหรือสัตว์ชนิดอื่น ๆ เข้าไปได้ โดย blood brain barrier นี้เป็นโครงสร้างที่ทำหน้าที่ป้องกันการแพร่กระจายของสารพิษเข้าสู่สมองและระบบประสาท มีลักษณะการเรียงตัวของ endothelial cells ในหลอดเลือดกันอย่างหนาแน่น ดังนั้นในกรณีนี้เชื้ออาจเข้าไปอยู่ภายในเส้น

เลือดของสมองและระบบประสาทของหนูทดลอง ซึ่งยาไม่สามารถเข้าไปทำลายได้ เมื่อตัวยาหมดฤทธิ์ไป เชื้อจึงกลับเข้าสู่กระแสเลือดและเพิ่มจำนวนได้ใหม่อีก (Brun and Lun, 1994)

สำหรับผลการทดสอบสารเบอเบอรีนต่อเชื้อ *T. evansi* NpI 8/2 และ VPh03 ในหนูทดลอง พบว่า สารเบอเบอรีนขนาด 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *T. evansi* ทั้ง 2 isolates และเมื่อทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยทดลองฉีดสารเบอเบอรีน ขนาด 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม 2 ครั้ง และที่ระดับเชื้อต่ำสุดที่สามารถตรวจเจอด้วยวิธี Rapid matching method พบว่า สารเบอเบอรีนไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้เช่นกัน ในขณะที่การศึกษาของ Ghosh และคณะ(1985) ได้นำสารเบอเบอรีนคลอไรด์ (Sigma®) มาทดสอบกับเชื้อ *Leishmania donovani* ในหนู golden hamsters โดยการฉีดเข้าทางช่องท้องหนูขนาด 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน ติดต่อกันเป็นเวลา 4 วัน พบว่า สารเบอเบอรีนสามารถลดปริมาณเชื้อในตับหนูได้ 48.5%-61.6 ซึ่งเชื้อ *Leishmania* นี้จัดเป็นเชื้อโปรโตซัวที่อยู่ในแฟมิลี่เดียวกับ trypanosomes จากผลการศึกษาครั้งนี้ ให้ผลการศึกษาที่ขัดแย้งกับรายงานดังที่กล่าวมาข้างต้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างกันทางด้านชนิดของเชื้อที่ทดสอบ, ชนิดสัตว์ทดลอง และปริมาณของเบอเบอรีนที่ใช้ทดสอบ

จากผลการทดสอบสารเบอเบอรีนในหนูทดลอง พบว่า สารเบอเบอรีนไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *T. evansi* NpI 8/2 และ VPh03 ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยการทดสอบประสิทธิภาพของสารผสม Berenil® กับเบอเบอรีน ซึ่ง Berenil® เป็นยาที่มีประสิทธิภาพในการรักษาสัตว์ที่ติดเชื้อ *T. evansi* แต่อาจมีผลข้างเคียงในสัตว์บางชนิด ดังนั้นจึงได้ทำการลดขนาดของตัวยาลง 6 เท่า และเพิ่มสารเบอเบอรีนขนาด 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เข้าไปแทน จากการศึกษา พบว่าสารเบอเบอรีนไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *T. evansi* NpI8/2 หรือเสริมการทำงานของ Berenil® ได้ ในขณะที่การศึกษาของ Han and Lee (2005) ได้ทำการทดสอบสารเบอเบอรีน (Sigma®) ต่อเชื้อยีสต์ *Candida albicans* ในรูปแบบที่เป็นการผสมสารเบอเบอรีนกับยา amphotericin B ซึ่งเป็นยาที่ใช้ในการยับยั้งเชื้ออยู่ในปัจจุบัน ในหนู mice ขนาด 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยฉีดเข้าทางช่องท้อง พบว่า สารเบอเบอรีนที่ผสมกับ amphotericin B สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์ *C. albicans* ได้ และมีการออกฤทธิ์แบบ synergy อีกด้วย

สำหรับการหาค่าความเป็นพิษเฉียบพลันเบื้องต้นของสารเบอเบอรีนคลอไรด์ (LD_{50}) เพื่อประเมินความเป็นพิษเบื้องต้นเมื่อฉีดเข้าทางช่องท้องหนูทดลองภายในเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีค่าเท่ากับ 25.29 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการศึกษาของ Schmeller และคณะ (1997) โดยพบว่า มีค่าเท่ากับ 23 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับค่า LD_{50} ของสารเบอเบอรีนซัลเฟต

ในหนูทดลอง มีค่าเท่ากับ 25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในขณะที่ค่า LD_{50} ของสารเบอเบอรีนซัลเฟตในสุนัขเมื่อฉีดเข้าทางเส้นเลือดมีค่าเท่ากับ 45 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Sabri and Bhide, 1979)

จากผลการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อตับหนูทดลองหลังได้รับสารเบอเบอรีนขนาด 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า สารเบอเบอรีนมีความเป็นพิษต่อเซลล์ตับเล็กน้อย และเมื่อให้สารเบอเบอรีนขนาด 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม 2 ครั้ง ห่างกันเป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบความเป็นพิษต่อเซลล์ตับเพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตามข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้เป็นเพียงรอยโรคเบื้องต้นจากการศึกษาความเป็นพิษของสารเบอเบอรีนต่อเนื้อเยื่อตับหนูทดลองเท่านั้น เนื่องจากในปัจจุบันยังไม่มีเกณฑ์มาตรฐานในการกำหนดหรือให้คะแนนรอยโรคของสารเบอเบอรีนต่อเนื้อเยื่อตับหนูทดลองที่ชัดเจน และจากการศึกษาครั้งนี้ยังขาดข้อมูลในกลุ่มของหนูทดลองที่ทำการฉีดเฉพาะสารละลาย DMSO ซึ่งเป็นสารที่ใช้ทำละลายสารเบอเบอรีน และในแต่ละกลุ่มการทดลองทำการสุ่มตัวอย่างจากหนูเพียง 1 ตัว เท่านั้น ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

เมื่อทำการศึกษาเพิ่มเติมในหลอดทดลองพบว่า สารเบอเบอรีนสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้ง 2 isolates ได้ โดยมีค่า MIC ของเชื้อ *T. evansi* NpI 8/2 และ VPh03 เท่ากับ 45.2 ไมโครโมลาร์ ที่เวลา 24 ชั่วโมง และ 22.6 ไมโครโมลาร์ ที่เวลา 72 ชั่วโมง ตามลำดับ และการลดลงของเชื้อในครั้งนี้ไม่ได้เป็นผลเนื่องมาจากสารละลาย DMSO ที่ใช้เป็นตัวทำละลายสารเบอเบอรีน โดยจากการศึกษาของ Merschiohann และคณะ (2001) พบว่า ค่า MIC ของสารเบอเบอรีนต่อเชื้อ *T. brucei brucei* และ *T. congolense* มีค่าเท่ากับ 30 และ 175 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ นอกจากนี้ Freiburghaus และคณะ (1996) พบว่า ค่า MIC ของสารเบอเบอรีนต่อเชื้อ *T. brucei rhodesiense* มีค่าเท่ากับ 4.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า เชื้อทั้ง 2 isolates มีค่า MIC แตกต่างกัน 2 เท่า ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเชื้อทั้ง 2 isolates อาจมีความแตกต่างทางด้านพันธุกรรมของยีนที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งตัว (Witola et. al, 2005) ส่งผลให้เชื้อมีความสามารถในการแบ่งตัว และการตอบสนองต่อสารเบอเบอรีนที่ไม่เท่ากัน โดยจากรายงานการทดสอบประสิทธิภาพของยาชนิดต่าง ๆ ต่อเชื้อ *T. evansi* ในหลาย ๆ isolates ก็พบว่า มีค่า MIC ที่แตกต่างกันเช่นกัน (Brun and Lun, 1994; Rayah et al., 1999)

จากผลการศึกษาในหลอดทดลอง แสดงให้เห็นว่า สารเบอเบอรีนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *T. evansi* ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อในหนูทดลอง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของสภาพแวดล้อมภายในหลอดทดลองและภายในตัวสัตว์เอง โดยจากการศึกษาในหลอดทดลองนั้น เชื้อ *T. evansi* สามารถพบสารเบอเบอรีนได้โดยตรงในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยไม่ถูกเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสาร ซึ่งอาจเป็นโครงสร้างที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ ในขณะที่เมื่อนำมาทดสอบในตัวสัตว์โดยการฉีดเข้าทางช่องท้องหนูทดลอง สารเบอเบอรีนจะผ่านกระบวนการต่าง ๆ ในร่างกายของสัตว์ตั้งแต่กระบวนการดูดซึมสารไปยังกระแส

เลือด, การแพร่กระจายไปยังอวัยวะเป้าหมาย, การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสาร และการกำจัดออกจากร่างกาย โดยสารเบอเบอรีนที่เข้าสู่ตัวสัตว์นี้ จัดเป็นสารพิษซึ่งร่างกายจะมีกระบวนการในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารให้อยู่ในรูปที่สามารถละลายน้ำได้ หรือสามารถจับตัวกับสารบางชนิดที่ตับสร้างขึ้น เพื่อกำจัดออกจากร่างกายในรูปแบบต่าง ๆ เช่น ปัสสาวะ, อุจจาระ, เหงื่อ หรือทางลมหายใจ เป็นต้น (Lin, 1998) การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารนี้อาจจะถูกเปลี่ยนแปลงไปในรูปที่มีฤทธิ์เพิ่มขึ้นหรือในรูปที่ไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ ทั้งนี้สารเบอเบอรีนอาจจะถูกเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไปในรูปที่ไม่สามารถออกฤทธิ์ในการกำจัดเชื้อ *T. evansi* ก็เป็นได้ โดยมีข้อมูลการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของสารเบอเบอรีนในหนู rat พบว่า เมื่อฉีดเบอเบอรีนเข้าสู่เส้นเลือด femoral vein สารเบอเบอรีนจะถูกเปลี่ยนแปลงโครงสร้างในตับ 2 ระยะ คือ ในระยะแรกจะถูกเปลี่ยนแปลงโครงสร้างด้วยปฏิกิริยา demethylation ซึ่งกระตุ้นด้วยเอนไซม์ cytochrome P-450 dependent monooxygenase (P-450 enzymes) จากนั้นจะถูกเปลี่ยนแปลงโครงสร้างในระยะที่ 2 โดยการรวมตัวกับ glucuronic acid ซึ่งกระตุ้นด้วยเอนไซม์ UDP-glucuronyl transferases โดยปฏิกิริยา glucuronidation และถูกส่งออกมาทางน้ำดี (Tsai and Tsai, 2004) จากข้อมูลนี้เป็นที่ยืนยันแน่ชัดว่าสารเบอเบอรีนที่เข้าสู่ร่างกายหนู จะถูกเปลี่ยนแปลงโครงสร้างในตับและปล่อยออกมาทางน้ำดี ซึ่งสารเบอเบอรีนที่ถูกเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไปนี้อาจจะไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *T. evansi* ก็เป็นได้

จากการศึกษาของ Janbaz และ Gilani (2000) กล่าวว่า สารเบอเบอรีนสามารถป้องกันอันตรายจากสารพิษ acetaminophen และ CCl_4 ต่อเซลล์ตับของหนู rat ได้ โดยสารเบอเบอรีนมีฤทธิ์ขัดขวางการทำงานเอนไซม์ P-450 ที่จะเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ acetaminophen และ CCl_4 ให้มีฤทธิ์เป็นพิษมากยิ่งขึ้นได้ โดยหลักการเดียวกันนี้อาจนำมาประยุกต์เพื่อนำมาศึกษาและค้นหาสารหรือซับสเตรทที่ไปจับกับเอนไซม์ P-450 แทนสารเบอเบอรีน เพื่อให้สารเบอเบอรีนไม่ถูกเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไป ซึ่งอาจจะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *T. evansi* ในหนูทดลองก็ได้

สำหรับการตรวจสอบหาการเปลี่ยนแปลงของ telomerase activity ของเชื้อ *T. evansi* NpI 8/2 หลังได้รับสารเบอเบอรีนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน พบว่า ค่า RTA ที่คำนวณได้มีค่าค่อนข้างต่ำ ทั้งนี้เนื่องมาจากผู้ทดลองได้ใช้ positive control ที่เป็น high template จึงได้ค่าการดูดกลืนแสงค่อนข้างสูง ดังนั้นเมื่อนำมาคำนวณหาค่า RTA โดยใช้เป็นตัวหารของตัวอย่าง จึงได้ค่า RTA ค่อนข้างต่ำ จากชุดตรวจสอบกล่าวว่า positive control ที่เป็น high template มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 2.0-4.0 และ low template เท่ากับ 0.2-0.4 ซึ่งค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างอยู่ในช่วงของ low template จึงควรใช้เป็น positive control ซึ่งจะได้ค่า RTA ที่ถูกต้องมากกว่า จากผลการทดสอบพบว่า สารเบอเบอรีนมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ telomerase activity ของเชื้อ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ทดสอบกับสารเบอเบอรีน แต่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง

telomerase activity ในขณะที่การศึกษาของ Sriwilaijareon และคณะ (2002) พบว่า สารเบอเบอรีนที่สกัดจากขมิ้นเครือ *A. flava* ที่ระดับความเข้มข้น 30-300 ไมโครโมลาร์ มีฤทธิ์ยับยั้ง telomerase activity ของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ได้ ($2x10^3$infected redblood cells = 0.14 µg ring, 0.30 µg trophozoite และ 0.46 µg schizont)

อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานที่ระบุแน่ชัดว่าสารเบอเบอรีนมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานตรงบริเวณส่วนใดของเอนไซม์ โดยเชื้อ *P. falciparum* ซึ่งเป็นเชื้อต่างชนิดกันกับ *T. evansi* อาจจะมีความแตกต่างกันของ small subunit proteins ของเอนไซม์ จึงทำให้สารเบอเบอรีนไม่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ telomerase เหมือนกับเชื้อ *P. falciparum* (Keith et al., 2002) หรืออาจเนื่องมาจากความแตกต่างกันของปริมาณ telomerase และปริมาณความเข้มข้นของสารเบอเบอรีนที่ใช้ทดสอบ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ใช้ปริมาณ telomerase ที่มากกว่า และใช้ความเข้มข้นของสารเบอเบอรีนน้อยกว่าถึง 3 เท่า จึงอาจทำให้ได้ผลการศึกษาที่แตกต่างกัน

สำหรับสาเหตุที่ไม่พบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ telomerase อีกประการหนึ่งก็คือ เมื่อคำนวณเปรียบเทียบสัดส่วนปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ของเชื้อที่ใช้ทดสอบ telomerase activity กับจำนวนเชื้อที่ใช้ในหลอดทดลอง (Cano et al., 1999) พบว่า ปริมาณโปรตีนที่ใช้ในการทดสอบ telomerase activity มีปริมาณเชื้อมากกว่าที่ใช้ในหลอดทดลองถึง 500-2,000 จึงอาจเป็นสาเหตุให้สารเบอเบอรีนไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ telomerase ของเชื้อซึ่งมีปริมาณมากเกินไปได้ ในขณะที่พบการยับยั้งการเจริญของเชื้อในหลอดทดลอง เนื่องจากมีปริมาณเชื้อที่น้อยกว่านั่นเอง

เนื่องจากผลการศึกษาพบว่า สารเบอเบอรีนไม่มีผลยับยั้ง telomerase activity ของเชื้อ *T. evansi* ทั้งนี้สารเบอเบอรีน อาจจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่เป้าหมายอื่นที่ไม่ใช่ telomerase activity ก็เป็นได้ ซึ่งมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับบทบาทการทำงานของสารเบอเบอรีนต่อเป้าหมายอื่น พบว่า สารเบอเบอรีนสามารถเข้าไปขัดระหว่างสาย DNA ตรงบริเวณส่วนของ minor groove ที่มี AT-rich ส่งผลให้เชื้อไม่สามารถสังเคราะห์ DNA, RNA และโปรตีนชนิดต่าง ๆ ได้ (Amin et al., 1968 ; Creasey, 1979 ; Schmeller et al., 1997 ; Choi et al., 2001 ; Mazzini et al., 2003) และสารเบอเบอรีนยังสามารถยับยั้งการเข้ารวมตัวกันของเบส [^{14}C]adenine, [^{14}C]uracil และ [^{3}H]thymidine เป็นกรดอะมิโน, การรวมตัวกันของ [^{14}C]leucine เป็นโปรตีนของเชื้อ *L. donovani* และยับยั้งการเข้าออกของออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ในกระบวนการหายใจของเซลล์อีกด้วย (Ghosh et al., 1985) นอกจากนี้ยังพบว่าสารเบอเบอรีน สามารถยับยั้งการทำงานของ ion channels ของเซลล์ตับในหนู rat ได้ โดยสารเบอเบอรีนจะยับยั้งการเข้าออกของ K^+ และ Ca^{2+} ซึ่งเป็นกลไกที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารพิษที่จะทำ

อันตรายต่อเซลล์ตับได้ (Wang et al., 2004) ดังนั้น สารเบอเบอรีน จึงอาจมีเป้าหมายอื่นดังรายงานที่กล่าวมาข้างต้นในการทำลายเชื้อ *T. evansi* ก็เป็นได้

จากการศึกษาครั้งนี้ สรุปได้ว่า สารเบอเบอรีนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *T. evansi* NpI8/2 และ VPh03 ได้ในหลอดทดลอง แต่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ telomerase activity ของเชื้อ ดังนั้นสมมติฐานของศึกษาต่อไปคือ สารเบอเบอรีน อาจมีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อที่เป้าหมายอื่นนอกเหนือจาก telomerase activity จึงควรมีการศึกษาประสิทธิภาพของสารเบอเบอรีนเพิ่มเติม เพื่อพัฒนาเป็นตัวยาในการรักษาสัตว์ที่ติดเชื้อ *T. evansi* ต่อไป

5.2 สรุปผลการวิจัย

5.2.1 สารเบอเบอรีนไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *T. evansi* NpI 8/2 และ VPh03 ในหนูทดลอง เมื่อฉีดเข้าทางช่องท้องหนูขนาด 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ที่ระดับเชื้อ $10^{7.5}$ ตัวต่อเลือด 1 มิลลิลิตร และเมื่อทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยทดลองฉีดสารเบอเบอรีน ขนาด 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม 2 ครั้ง ที่ระดับเชื้อ $10^{7.5}$ และ$10^{8.4}$ ตัวต่อเลือด 1 มิลลิลิตร และที่ระดับเชื้อต่ำ ๆ คือ $10^{5.4}$ ตัวต่อเลือด 1 มิลลิลิตร พบว่า สารเบอเบอรีนไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้เช่นกัน

5.2.2 เมื่อฉีดสารผสม Berenil® ขนาด 0.58 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมกับสารเบอเบอรีนขนาด 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เข้าทางช่องท้องหนูทดลอง พบว่าสารผสมระหว่าง Berenil® และเบอเบอรีนไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *T. evansi* NpI 8/2 หรือสารเบอเบอรีนไม่มีฤทธิ์เสริมการทำงานของ Berenil® ได้

5.2.3 สารเบอเบอรีนมีค่าความเป็นพิษเฉียบพลันเบื้องต้น ในเวลา 24 ชั่วโมง เท่ากับ 25.29 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

5.2.4 เมื่อทำการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อตับหนูทดลองเบื้องต้นเพิ่มเติม พบว่าสารเบอเบอรีนขนาด 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีผลทำให้เนื้อเยื่อตับเสียหายบางส่วน คือ เกิดการขยายตัวของ sinusoid และบางบริเวณพบการบวมของเซลล์ตับ (cloudy swelling) ในขณะที่สารเบอเบอรีนขนาด 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม 2 ครั้ง พบว่า เนื้อเยื่อตับเสียหายเพิ่มมากขึ้น โดยเกิดการบวมของเซลล์ตับ sinusoid ขยายตัวผิดปกติ เซลล์มีการหดตัวของนิวเคลียส และติดสีเข้มทึบเป็นจำนวนมาก (pyknotic nucleus)

5.2.5 สารเบอเบอรีนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *T. evansi* NpI 8/2 และ VPh03 ในหลอดทดลองอย่างเด่นชัด เมื่อทำการทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 2.8, 5.6,11.3, 22.6, 45.2 และ 90.9 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง โดยพบว่าสารเบอเบอรีนมีค่า MIC ต่อเชื้อ *T.*

evansi NpI 8/2 และ VPh03 เท่ากับ 45.2 ไมโครโมลาร์ ที่เวลา 24 ชั่วโมง และ 22.6 ไมโครโมลาร์ ที่เวลา 72 ชั่วโมง ตามลำดับ และสารละลาย DMSO ที่ใช้เป็นตัวทำละลายสารเบอเบอรีน ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *T. evansi*

5.2.6 สารเบอเบอรีนที่ระดับความเข้มข้น 2.8, 5.6,11.3, 22.6, 45.2 และ 90.9 ไมโครโมลาร์ สามารถเปลี่ยนแปลง telomerase activity ของเชื้อ *T. evansi* NpI 8/2 ในหลอดทดลองได้ เมื่อทำการทดสอบกับสารละลายโปรตีนของเชื้อปริมาณ 5, 10 และ 20 ไมโครกรัม

5.3 ข้อเสนอแนะ

5.3.1 ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ telomerase activity ของเชื้อหลังได้รับสารเบอเบอรีน ควรทำการศึกษาซ้ำอย่างน้อย 2-3 ครั้ง เพื่อลดความผิดพลาดของข้อมูล และเพื่อให้ได้ข้อมูลที่มีความชัดเจนยิ่งขึ้น และควรทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยลดปริมาณโปรตีนของเชื้อที่ใช้ทดสอบลง และเพิ่มความเข้มข้นของสารเบอเบอรีนให้มากขึ้น

5.3.2 ควรทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาเป้าหมายอื่นของสารเบอเบอรีนในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *T. evansi*

5.3.3 ควรทำการศึกษาหาสารเคมีที่เป็นอนุพันธ์ของเบอเบอรีนที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกัน และมีความเป็นพิษน้อยกว่า ซึ่งอาจจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อในสัตว์ทดลองได้

5.3.4 ในอนาคตหากมีการนำสารเบอเบอรีน มาประยุกต์ใช้เป็นยาเพื่อป้องกันและรักษาโรคในสัตว์ ต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาค่าความเป็นพิษของสารเบอเบอรีนให้ละเอียด และชัดเจนยิ่งขึ้น โดยอาจทำการศึกษาเพิ่มเติมในระดับหลอดทดลองกับเซลล์สัตว์ หรืออาจศึกษาภายในตัวสัตว์เอง โดยการหาค่าที่เป็นปัจจัยที่บ่งชี้ถึงความเป็นพิษต่อตัวสัตว์เมื่อได้รับสารพิษ เช่น ค่าการทำงานของเอนไซม์ในตับ ปริมาณโปรตีนในพลาสม่า ค่าทางโลหิตวิทยา การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยา หรือแม้กระทั่งการเฝ้าดูอาการทางคลินิก เป็นต้น เพื่อนำข้อมูลเหล่านี้มารวบรวม และวิเคราะห์หาค่าที่ปลอดภัย และลดอัตราเสี่ยงจากสารเคมีได้อย่างมีประสิทธิภาพ

5.3.5 การศึกษานี้สามารถนำไปใช้เป็นแบบแผนในการศึกษาประสิทธิภาพของยาต่อเชื้อชนิดอื่น ๆ ได้

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ชิต ศิริวรรณ์, ทาริกา ประมูลสินทรัพย์ และประทีป เขมะโยธิน. 2537. ผลของยาไดมินาซีนอะเซททูเรท และไอโซเมตามิเดียมคลอไรด์ในการควบคุมการระบาดของเชื้อทริปาโนโซมา อีแวนไซ ในสุกรแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ. วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์. 8(2): 101-110.

เทพ บุญญวงศ์, พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป และมานพ ม่วงใหญ่. 2518. โรคเซอร์ร่าในม้า. เวชสารสัตวแพทย์. 5(1): 666-667.

นารีรัตน์ วิเศษกุล, เพียงจันทร์ ราชกุลชัย และสกล พันธุ์ยิ้ม. 2531. การตรวจหาเชื้อและแยกความแตกต่างของเชื้อ *Trypanosoma evansi* ด้วย DNAตรวจสอบ. บทคัดย่อเรื่องวิจัยการประชุมทางวิชาการสัตวแพทย์ ครั้งที่ 15. สัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย.

นุชา สิมะสาธิตกุล, พัชรินทร์ จีนกล่ำ, อัมพวัน ตฤษณารมย์, กิตติศักดิ์ มะรินทร์ และ ธม อินยา. 2534. ปัญหาสุขภาพโคนมลูกผสมเนื่องจาก *Trypanosoma evansi* . รายงานผลงานวิจัยโคนมประจำปี 2534: 105-115.

บุญขวัญ วงอยู่น้อย, บุญมี สัญญสุจจารี, สุวิทย์ กัมทรทิพย์ และสุวรรณี นิธิอุทัย. 2533. การศึกษาโรคเซอราในแมว. เวชชสารสัตวแพทย์. 20(2): 349-363.

สนั่นรักษ์สัตว์ พอ.หลวง. 2492. โรค Surra ในเมืองไทย. สัตวแพทยสาร. 1(3): 22-28.

สาทิส ผลภาค, มาณวิกา ผลภาค, สุชาติ ศราธพันธุ์, ศิริพรรณ ขุนภาษี และพานิช ทาโบราณ. 2527. การติดเชื้อ *Trypanosoma evansi* ในกระบือภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย. ประมวลประชุมวิชาการสัตวแพย์ ครั้งที่ 11. 219-221.

อัมพวัน ตฤษณารมย์, สุกิจ มากมี และชาญ เพชรอักษร. 2530. การระบาดของทริพพาโนโซมา อีแวนซาย ในโคนมที่ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์เชียงใหม่. ประมวลเรื่องการประชุมทางวิชาการด้านการปศุสัตว์ ครั้งที่ 6: 1-12.

อำนวยพร เกษมสันต์, มาณวิกา ผลภาค, สมใจ ศรีหาคิม, สาทิส ผลภาค และ Leidl, K. 2532. การระบาดและการควบคุมเชื้อทริปปาโนโซม่า อีแวนซาย ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย. สัตวแพทยสาร. 40: 84-92.

เอ็นดู ธีรประเสริฐ และคณะ. 2527. รายงานการพบเชื้อ *Trypanosoma evansi* ในสุกรพันธุ์. การประชุมวิชาการของสัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 11: 53-64.

ภาษาอังกฤษ

Alberts, B., et al. 2002. Molecular biology of the cell. USA: Garland science. 263-264.

Amin, A. H., Subbaiah, T. V. and Abbasi, K.M. 1969. Berberine sulfate: antimicrobial activity, bioassay, and mode of action. Canadian Journal of Microbiology. 15: 1067-1076.

Anis, K. V., Rajeshkumar, N. V. and Kuttan, R. 2001. Inhibition of chemical carcinogenesis by berberine in rat and mice. Journal of Pharmacology. 53(5): 763-768.

Baltz, T., Baltz, D., Girould, Ch. and Crockett, J. 1985. Cultivation in a semi-defined medium of animal infective forms of *Trypanosoma brucei*, *T. equiperdum*, *T.* evansi, *T. rhodesiense* and *T. gambiense*. The EMBO Journal. 4(5): 1273-1277.

Blackburn, E. H. 1991. Structure and function of telomeres. Nature. 350: 569-573.

Brun, R. and Lun, Z.-R. 1994. Drug sensitivity of Chinese *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma equiperdum* isolates. Veterinary Parasitology. 52: 37-46.

Cano, M.I.N., Dungan, J. M., Agabian, N, and Blackburn, E. H. 1999. Telomerase in kinetoplastid parasitic protozoa. Proceedings of the National Acedemy of Science. 96: 3616-3612.

Chansiri, K., Khuchareontaworn, S. and Sarataphan, N. 2002. PCR-ELISA for diagnosis of *Trypanosoma evansi* in animal and vector. Molecular and cellular probs. 16: 173-177.

Choi, D., Kim, S. and Jung, M. Y. 2001. Inhibitory activity of berberine on DNA strand cleavage induced by hydrogen peroxide and cytochrome c. Bioscience Biotechnology and Biochemistry. 65(2): 452-455.

Coates, L., Ikpeazu, E. V., Chen, Y. and Valenzuela, M. 2002. Inhibition of DNA replication by Berenil in plasmids containing poly(dA) poly(dT) sequences. Plasmid. 47: 120-128.

Cooper, G. M. 2000. The cell: a molecular approach, 2nd ed. U.S.A.: Sinauer Associates. 689.

Cordero, C. P., Gomez-Gonzalez, S., Leon-Acosta, C. J., Morantes-Medina, S. J. and Aristizabal, F. A. 2004. Cytotoxic activity of five compounds isolated from Colombian plants. Fitoterapia. 75: 225-227

Creasey, W. A. 1979. Biochemical effects of berberine. Biochemical Pharmacology. 28: 1081-1084.

Elamin, E. A., Homeida, A. M., Adum, S. E. I. and Mahmoud, M. M. 1982. The efficacy of berenil (diminazene aceturate) against *Trypanosoma evansi* infection in mice. Journal of Veterinary Pharmacology Therapy. 5: 259-265.

Forman, L. L. 1991. Menispermaceae In: Flora of Thailand. vol. 5 (part 3). The Forest Herbarium Royal Forest Department. Bangkok: 300-365.

Freiburghaus, F., et al. 1996. Evaluation of African medicinal plants for their *in vitro* trypanocidal activity. Journal of Ethnopharmacology. 55: 1-11.

Freile, M. L., et al. 2003. Antimicrobial activity of aqueous extracts and of berberine isolated from *Berberis heterophylla*. Fitoterapia. 74: 702-705.

Ghosh, A. K., Bhattacharyya, F. K. and Ghosh, D. K. 1985. *Leishmania donovani*: Amastigote inhibition and mode of action of berberine. Experimental Parasitology. 60: 404-413.

Gill, B. S. 1971. Drug-resistance in *Trypanosoma evansi*. Tropical Animal Health and Production. 3:195-198.

Han, Y. and Lee, J. 2005. Berberine synergy with amphotericin B against disseminated candidiasis in mice. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 28(3): 541-544.

Herbert, W. J. and Lumsden, W. N. R. 1976. *Trypanosoma brucei*: A rapid matching method for estimating the host's parasitemia. Experimental Parasitology. 40: 427-431.

Hoare, C. A. 1972. The Trypanosome of Mammals. Oxford: Blackwell Scientific Publications.

Hunter, S. H. 1964. Biochemistry and physiology of protozoa. vol. 3. New York: Academic Press Inc: 506-509.

Ijaz, M. K., et al. 1998. Comparative studies on the sensitivity of polymerase chain reaction and microscopic examination for the detection of *Trypanosoma evansi*

in experimentally infected mice. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Disease. 21: 215-223.

Janbaz, K. H. and Gilani, A. H. 2000. Studies on preventive and curative effects of berberine on chemical-induced hepatotoxicity in rodents. Fitoterapia. 71: 25-33.

Keith, W. N., Bilsland, A., Evans, T. R. J. and Glasspool, R. M. 2002. Telomerase-directed molecular therapeutics. Expert Reviews in Molecular Medicine [Online]. Available from: http://www.expertreviews.org/[2003, Sep 8]

Kim, S. H., Shin, D. S., Oh, M. N., Chung, S. C., Lee, J. S. and Oh, K. B. 2004. Inhibition of the bacterial surface protein anchoring transpeptidase sortase by isoquinoline alkaloids. Bioscience Biotechnology and Biochemistry. 68(2): 421-424.

Krupp, G., et al. 1997. Molecular basis of artifacts in the detection of telomerase activity and a modified primer for a more robust 'TRAP' assay. Nucleic Acids Research. 25 (4): 919-921.

Lanham, S. M. and Godfrey, D. G. 1970. Isolation of salivalian trypanosomes form man and other mammals using DEAE-cellulose. Experimental Parasitology. 28: 521-534.

Leng, S.H., Lu, F. and Xu, L.J. 2004. Therapeutic effects of berberine in impaired glucose tolerance rats and its influence on insulin secretion. 2004. Acta Pharmacologica Sinica. 25 (4): 496-502.

Lin, J. H. 1998. Applications and limitations of interspecies scaling and in vitro extrapolation in pharmacokinetics. Drug Metabolism and Disposition. 26(12): 1202-1212.

Luckins, A. G. 1988. *Trypanosoma evansi* in Asia. Parasitology Today. 4(5): 137-142.

Mazzini, S., Bellucci, M. C. and Mondelli, R. 2003. Mode of binding of the cytotoxic alkaloid berberine with the double helix oligonucleotide $D(AAGAATTCTT)_2$. Bioorganic and Medicinal Chemistry. 11: 505-514.

Merschjohann, K., Sporer, F., Steverding, D. and Wink, M. 2001. *In vitro* effect of alkaloids on bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* and *T. congolense*. Plata Medica. 67: 623-627.

Newton, B. A. and Le Page, R. W. F. 1967. Preferential inhibition of extranuclear deoxyribonucleic acid synthesis by the trypanocide Berenil. Biochemistry Journal. 105.

Queiroz, A. O., Cabello, P. H. and Jansen, A. M. 2000. Biological and biochemical characterization of isolates of *Trypanosoma evansi* from Pantanal of Matogrosso-Brazil. Veterinary parasitology. 92: 107-118.

Rayah, I. E. El., Kaminsky, R., Schmid, C. and Malik, K. H. El. 1999. Drug resistance in Sudanese *Trypanosoma evansi*. Veterinary Parasitology. 80: 281-287.

Sabir, M. and Bhide, N. K. 1971. Study of some pharmacological actions of berberine. Indian Journal of Physiology and Pharmacology. 15: 111-132.

Schmeller, T., Latz-Bruning, B. and Wink, M. 1997. Biochemical activities of berberine, palmatine and sanguinarine mediating chemical defence against microorganisms and herbivores. Phytochemistry. 44(2): 257-266.

Sharma, M.C., Pathak, N. N., Nhi, D.L., Hung, N. N. and Vuc, N. V. 1983. Incidence of trypanosomiasis in murrah buffaloes in Vietnam with special reference to hematology, chemotherapy and control. T. V. M. A. 34: 331-342.

Sriwilaijareon, N., Petmitr, Mutirangura, A., Ponglikitmongkol, M. and Wilairat, P. 2002. Stage specificity of *Plasmodium falciparum* telomerase and its inhibition by berberine. Parasitology International. 51: 99-103.

Sukhumsirichart, W., Khuchareontaworn, S., Sarataphan, N., Viseshakul, N. and Chansiri, K. 2000. Application of PCR-based assay for diagnosis of *Trypanosoma evansi* in different animals and vector. The Journal of Tropical Medicine and Parasitology. 23: 1-6.

Sun, D., Courtney, S. H. and Beachey, H. E. 1988. Berberine sulfate blocks adherence of *Streptococcous pyogenes* to epithelial cells, fibronectin and hecadecane. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 32(9): 1370-1374.

Timothy, C., Birdsall, N. D. and Gregory, S. Kelly, N. D. 1997. Berberine: Therapeutic potential of an alkaloid found in several medicinal plants. Alt. Med. Rev. 2(2): 94-103.

Tsai, P. and Tsai, T. 2004. Hepatobiliary excretion of berberine. Drug Metabolism and Disposition. 32(4): 405-412.

Tuntasuvan, D. and Luckins, A. G. 1988. Status of surra in Thailand. The Journal of Tropical Medicine and Parasitology. 21(2): 1-8.

Tuntasuvan, D., et al. 2003. Chemotherapy of surra in horses and mules with diminazene aceturate. Veterinary Parasitology. 110: 227-233.

Wang, F., et al. 2004. Inhibitory effects of berberine on ion channels of rat hepatocytes. World Journal of Gastroenterology. 10(19): 2842-2845.

Witola, W. H., Sarataphan, N., Inoue, N., Ohashi, K. and Onuma, M. 2005. Genetic variability in ESAG6 genes among *Trypanosoma evansi* isolates and in comparison to other Trypanozoon members. Acta Tropica. 93: 63-73.

Yesilasa, E. and Kupeli, E. 2002. *Berberis cretaegina* DC. root exhibits potent anti-inflammatory, analgesic and febrifuge effects in mice and rats. Journal of Ethnopharmacology. 79: 237-248.

Zhang, Z. Q., Giroud, C. and Baltz, T. 1993. *Trypanosoma evansi* : *In vivo* and *in vitro* determination of trypanocide resistance profiles. Experimental Parasitology. 77: 387-394.

Zhao, X., Duszynski, W. D. and Loker, S. E. 2001. A simple method of DNA extraction for Eimeria species. Journal of Microbiological Methods. 44: 131-137.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียมสารเคมี

Cetyl-Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB)

2% w/v CTAB	2.0	กรัม
1.4 M NaCl	8.2	กรัม
0.2% β-mercaptoethanol	0.2	มิลลิลิตร
20 mM EDTA	0.74	กรัม
100 mMTris base	1.214	กรัม
เติม sterile water จนครบ	100	มิลลิลิตร

Loading dye

0.25% w/v bromophenol blue	0.125	กรัม
30% v/v glycerol	15	มิลลิลิตร
0.25% w/v xylene cyanol FF	0.125	กรัม
เติม sterile water จนครบ	50	มิลลิลิตร

Lysis Buffer pH 8.9

660 mM EDTA	24.6	กรัม
1.3% N-laurorylsarosine	1.3	กรัม
เติม sterile water จนครบ	100	มิลลิลิตร

Phenol:Chloroform:Isoamyl alcohol (25:24:1)

Phenol	100	มิลลิลิตร
Chloroform	96	มิลลิลิตร
Isoamyl alcohol	4	มิลลิลิตร

Phosphase Buffer Saline (PBS)

2 mM $NaH_2PO_4.2H_2O$	0.28	กรัม
50 mM Na_2HPO_4	7.10	กรัม
36 mM NaCl	2.10	กรัม
เติม sterile water จนครบ	1,000	มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PSG pH 8.0 for anion-exchange chromatography

Stock PBS	45	มิลลิลิตร
10% glucose	10	มิลลิลิตร
เติม sterile water จนครบ	100	มิลลิลิตร

Stock PBS pH 8.0 for anion-exchange chromatography

95 mM $NaH_2PO_4.2H_2O$	0.78	กรัม
5 mM Na_2HPO_4	13.48	กรัม
73 mM NaCl	4.25	กรัม
เติม sterile water จนครบ	1,000	มิลลิลิตร

2% Agarose gel

agarose gel powder	0.2	กรัม
1X TAE	30	มิลลิลิตร

20% Glycerol PSG

PBS	36.25	มิลลิลิตร
20% Glucose	3.75	มิลลิลิตร
Glycerol	10	มิลลิลิตร

50X Tris –acetate EDTA (TAE)

Tris base	242	กรัม
Glacial acetic acid	57.1	มิลลิลิตร
5 M EDTA, pH 8.0	100	มิลลิลิตร
เติม sterile water จนครบ	1,000	มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อสารเคมี

Agarose gel powder	USB, USA
Berberine chloride	Sigma, Switzerland
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma, USA
Bradford protein assay dye reagent	Bio-rad, USA
Bromophenol blue	USB, USA
Chloroform	J.T. Baker, USA
Cetyl-trimethyl ammonium bromide (CTAB)	Sigma, USA
DE52 DEAE cellulose	Whatman, England
Diminazene aceturate	Berenil, Germany
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Bio basic, USA
dNTP	Eppendorf, Germany
EDTA	Plusone, Sweden
Ethidium bromide	Bio-rad, USA
Ether	AnalaR, England
Glucose	Sigma, USA
Glycerol	ICN biomedical, USA
Heparin	Leo, Denmark
Heat-inactivated horse serum	Gibco, USA
Isoamyl alcohol	Sigma, USA
Phenol	Amresco, USA
Protenase K	USB, USA
MEM	Gibco, USA
MEM Na-pyruvate	Gibco, USA
MEM non-essential amino acid	Biowest, USA
N-laurolsarcosine	Amresco, USA
Sodium chloride (NaCl)	Sigma, USA
Sodium phosphase anhydrous (Na_2HPO_4)	Sigma, USA
Sodiumhydrogenphosphase ($NaH_2PO_4.2H_2O$)	Sigma, USA
Sodium hypoxanthin-thymidine	Gibco, USA

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Tag DNA polymerase	Invitrogen, Brazil
*TeloTAGGG*Telomerase PCR ELISA^{plus}	Roche, Germany
Tris base	USB, USA
Tr3-Tr4 primer	Proligo, Singapore
1.5 Kbp DNA ladder	Sibco, USA
2-mercaptoethanol	Gibco, USA

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เครื่องมือ

เครื่องชั่งสาร, BP2100	Satorius
เครื่องชั่งสาร, BP 210S	Satorius
Centrifuge, Spectrafuge 16M	Labnet
Gel electrophoresis apparatus, Mini-sub cell GT	Bio-Rad
Improved Neubauer chamber	Boeco
Inverted microscope, LH 50A	Olympus
Laminar Flow, HS-124	ISSCO
Light microscope, CH-2	Olympus
Microcentrifuge, CN 180	Nuvefuge
Micropipette 0.1-10, 20-50, 50-200, 200-1,000 ul	Gibthai
Microtiterplate reader, primary EIA V. 2.1-0	Multiskan EX
Microwave, R-4A52	Sharp
pH meter, 420A	Orion
Rotary shaker, 685	Nahita
Spectrophotometer, 20	Genesys
Thermal cycler, 2700	Gene Amp
UV Transilluminator, 3-3102	Foto Dyne Incoperated
Vortex, G-560E	Genie, Scientific industries
Water bath, GFL-1086	GFL
5% CO_2 incubator, 3111	Thermo Forma
24 multiplate wells	Costar
-20°C freezer, UE650	Vestfrost Tropicalized
-80°C freezer	Forma Scientific

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางภาคผนวกที่ 1 ผลของสารผสม Berenil® กับ berberine ต่อเชื้อ *T. evansi* NpI 8/2 ในหนูทดลองเมื่อตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์

DAI	Parasitemia (10^x tryp/ml)														
	PBS			3.5 mg/kg Berenil®			0.58 mg/kg Berenil®			20 mg/kg berberine			0.58 mg/kg Berenil® + 20 mg/kg berberine		
	No. of mice			No. of mice			No. of mice			No. of mice			No. of mice		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4
1	6.9	7.2	7.2	-	-	-	-	-	< 5.4	6.3	6.9	6.9	-	-	-
2	8.7	9.0	9.0	-	-	-	-	-	< 5.4	8.1	8.7	8.7	-	-	-
3				-	-	-	-	-	-	9.0			-	-	-
4				-	-	-	-	-	-				-	-	-
5				-	-	-	-	-	-				-	-	-
6				-	-	-	-	< 5.4	6.9				5.4	7.8	-
7				-	-	-	-	7.2	9.0				8.4	9.0	-
8				-	-	-	-	9.0							-
9				-	-	-	-								-
10				-	-	-	-								7.5
11				-	-	-	-								9.0
12				-	-	7.2	-								
13				-	-	9.0	-								
14				-	-		-								
15				-	-		-								
16				-	-		-								
17				-	-		-								
18				-	-		-								
19				-	-		-								
20				-	-		-								
21				-	-		-								

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวศิริลักษณ์ เจนช่างกล เกิดวันที่ 27 ธันวาคม พ.ศ. 2522 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2544 และได้เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาพยาธิวิทยา สาขาวิชาพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์ หน่วยปรสิตวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ. 2545

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย