

การศึกษาฤทธิ์ของยาอะซัยโคลเวีย (acyclovir) และ สารสกัดจากพญายอในการต้านเชื้อ Koi
Herpesvirus (KHV) ในเซลล์เพาะเลี้ยง



นางสาวรุณิดา เหวระกุล

ศูนย์วิทยทรัพยากร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

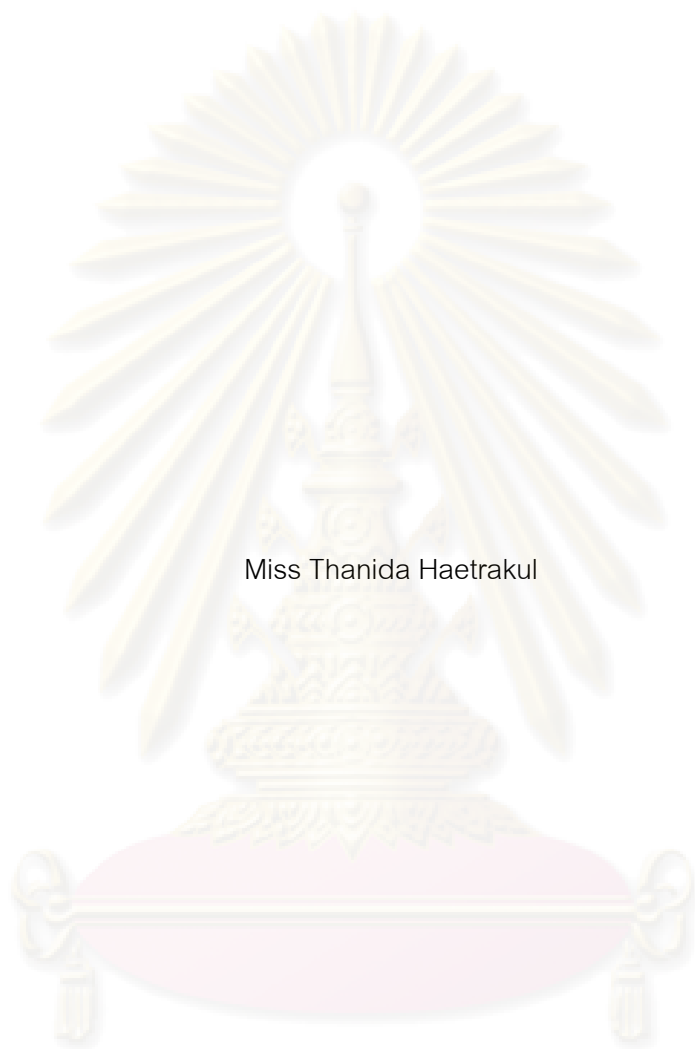
สาขาวิชาอายุรศาสตร์สัตวแพทย์ ภาควิชาอายุรศาสตร์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

In vitro antiviral activity of Acyclovir and *Clinacanthus nutans* (Burm. f.) Lindau. extract
against Koi Herpesvirus (KHV)



Miss Thanida Haetrakul

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Veterinary Medicine

Department of Veterinary Medicine

Faculty of Veterinary Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การศึกษาฤทธิ์ของยาอะซัยโคลเวีย (acyclovir) และ สารสกัดจากพญายอในการต้านเชื้อ Koi Herpesvirus (KHV) ในเซลล์เพาะเลี้ยง

โดย

นางสาวรุณิดา เหนระภูล

สาขาวิชา

อายุรศาสตร์สัตวแพทย์

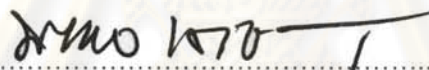
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.นันทริกา ชันช้อย


อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม


รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ร้อยโทหญิง สัตวแพทย์หญิง
เนาวรัตน์ สุธัฒนาพงษ์

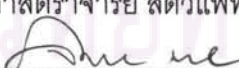
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบัณฑิต


..... คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.มงคล เตชะกำพ)

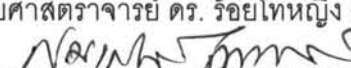
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง รัตนาภรณ์ พรหมมาสา)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.นันทริกา ชันช้อย)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ร้อยโทหญิง สัตวแพทย์หญิง เนาวรัตน์ สุธัฒนาพงษ์)


..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร.สมเกียรติ กาญจนาคาร)

รุณิดา เหนระกุล : การศึกษาฤทธิ์ของยาอะซัยโคลเวีย (acyclovir) และ สารสกัดจาก
 พญาขอในการต้านเชื้อ Koi Herpesvirus (KHV) ในเซลล์เพาะเลี้ยง (IN VITRO
 ANTIVIRAL ACTIVITY OF ACYCLOVIR AND *CLINACANTHUS NUTANS*
 (BURM.F.) LINDAU. EXTRACT AGAINST KOI HERPESVIRUS (KHV)) อ.ที่ปรึกษา
 วิทยานิพนธ์หลัก : รศ.สพ.ญ.ดร.นันทริกา ชันชื้อ, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : รศ.น.สพ.
 ดร.จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์, ผศ. ดร. ร.ท.หญิง สพ.ญ. เนาวรัตน์ สุธัฒนาถพงษ์, 72 หน้า.

การวิจัยครั้งนี้ทำการศึกษาผลของยาอะซัยโคลเวียและสารสกัดพญาขอในการต้านเชื้อ
 ไวรัสเคอเซวีซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดความเสียหายในการเลี้ยงปลาไนและปลาแพนซีคาร์พทั่วโลก
 โดยทำการศึกษาประสิทธิภาพในการต้านเชื้อไวรัสทั้งก่อนและหลังจากที่มีการติดเชื้อเข้าสู่เซลล์
 เพาะเลี้ยงเคอเฟเซลล์ พบว่า สารสกัดพญาขอสามารถยับยั้งเชื้อไวรัสได้ด้วยความเข้มข้น 0.475
 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ทั้งก่อนที่มีการติดเชื้อเข้าสู่เซลล์ 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง และหลังจากเชื้อติดเข้า
 สูเซลล์แล้ว ในขณะที่ยาอะซัยโคลเวียที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ไม่มี
 ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อไวรัสเคอเซวีภายในเซลล์ การทดสอบความเป็นพิษพบว่ายาอะซัย
 โคลเวียที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีความเป็นพิษต่อเซลล์เคอเฟซี
 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายไป 50% ของเซลล์ทั้งหมด
 คือ 11.60 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สารสกัดพญาขอที่ความเข้มข้น 4.75 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
 ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์โดยทำให้เซลล์ตายทั้งหมด ส่วนที่ความเข้มข้น 0.95, 0.475,
 0.095 และ 0.0095 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบว่าไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยความเข้มข้นที่ทำให้
 เซลล์ตายไป 50% ของเซลล์ทั้งหมดคือที่ความเข้มข้น 1.9 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นอกจากนี้
 ทำการศึกษาพยาธิสภาพของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่ามีความ
 สอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้ โดยไวรัสที่พบภายในเซลล์ที่ใช้สารสกัดพญาขอจะมีความผิดปกติ
 เกิดการเสื่อมสภาพ ทำให้ไม่สามารถเจริญเป็นไวรัสที่มีคุณสมบัติในการติดเชื้อได้ จากผล
 การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดพญาขอมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อไวรัสเคอเซวีใน
 เซลล์เพาะเลี้ยงจากปลาคาร์พ โดยอาจนำไปประยุกต์ใช้และพัฒนาต่อไปเพื่อการรักษาโรคไวรัส
 เคอเซวีได้ในอนาคต

ภาควิชา.....อายุรศาสตร์.....
 สาขาวิชา.....อายุรศาสตร์สัตวแพทย์.....
 ปีการศึกษา.....2552.....

ลายมือชื่อนิสิต.....
 ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
 ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....
 ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

4975557631 : MAJOR VETERINARY MEDICINE

KEYWORDS : KOI HERPESVIRUS / ANTIVIRAL ACTIVITY / ACYCLOVIR /
CLINACANTHUS NUTANS (BURM.F) LINDAU

THANIDA HAETRAKUL: IN VITRO ANTIVIRAL ACTIVITY OF ACYCLOVIR
AND *CLINACANTHUS NUTANS* (BURM. F.) LINDAU. EXTRACT AGAINST
KOI HERPESVIRUS (KHV). THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. NANTARIKA
CHANSUE, D.V.M., Ph.D., THESIS CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. JIRASAK
TANGTRONGPIROS, D.V.M., Ph.D., ASSIST. PROF. NAOWARAT
SUTHAMNATPONG, D.V.M., Ph.D., 72pp.

Acyclovir and *Clinacanthus nutans* extract were tested for antiviral activities against Koi Herpesvirus (KHV) which has caused global epizootic in common carp and koi. Acyclovir and *C. nutans* extract were tested for pre and post infection antiviral activities. The mean ED50 of plant extract post-infection was 0.475 mg/ml and pre-infection at 1 hr, 2hr, 3hr and 4hr were 0.475 mg/ml. While acyclovir at the maximum concentration 10 µg/ml was not have antiviral activity in pre and post infection tests. The cytotoxicity results indicated that acyclovir at the concentration of 25, 50 and 100 ug/ml and *C. nutans* plant extract at 4.75 mg/ml damaged Koi fin cell line and had the cytotoxic effect to the cells. 1or non-toxic concentration of acyclovir was at 11.60 ug/ml and *C. nutans* plant extract at 1.9 mg/ml. The cellular pathological study under Transmission electron microscope indicated that the intracellular virion exposed to *C. nutans* extract was degenerated. Therefore, the incomplete development of these virions effected the infectivity of the virus. The results showed that *C. nutans* extract showed antiviral activity against Koi herpesvirus in Koi fin cell line which may be applied as therapeutic agents in common carp and koi in the future.

Department : Veterinary Medicine.....

Field of Study : Veterinary Medicine.....

Academic Year : 2009.....

Student's Signature Thanida Haetrakul

Advisor's Signature Nantarka Chansue

Co-Advisor's Signature J.D

Co-Advisor's Signature Naowarat Suthannatpong

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความอนุเคราะห์ และความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ รศ.สพ.ญ.นันทริกา ชันช้อย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก รศ.น.สพ.ดร.จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์ และ ผศ.ร.ท.สพ.ญ.ดร.เนาวรัตน์ สุธีมนาทพงษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ซึ่งให้คำแนะนำปรึกษา และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่ง ตลอดจนการให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ Dr. Peiyu Alison Lee และนักวิทยาศาสตร์ ประจำห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา ณ Graduate Institute of Medical Biotechnology, Central Taiwan University of Science and Technology ประเทศไต้หวัน ที่ช่วยให้คำแนะนำและข้อเสนอแนะในการทำกรวิจัย และให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในการทำงานวิจัยและให้เซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการทำงานทดลองในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา ที่คอยเป็นแรงผลักดันช่วยเหลือ ให้ความสนับสนุน ทั้งกำลังกาย และกำลังใจตลอดมา รวมทั้งญาติพี่น้อง และเพื่อน พี่ และน้องทุกคนที่คอยเป็นกำลังใจและให้ความช่วยเหลือ จนทำให้ข้าพเจ้าทำงานได้สำเร็จลุล่วงมาได้ด้วยดี

ขอขอบคุณอาจารย์และเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล ที่ให้ความช่วยเหลือในการเตรียมตัวอย่างและให้ความสะดวกในการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 สมมติฐานในการวิจัย.....	3
1.4 ขอบเขตและข้อจำกัดของงานวิจัย.....	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ประวัติและความสำคัญของโรคติดเชื้อเคเอชวี.....	4
2.2 ยาอะซัยโคลเวีย.....	8
2.3 พญายอ.....	10
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	13
3.1 การเตรียมยาและสมุนไพรร.....	13
3.2 การเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยงเชื้อไวรัส.....	13
3.3 การแยกและเก็บเชื้อไวรัส.....	14
3.4 การทดสอบประสิทธิภาพของไวรัส.....	14
3.5 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์.....	15
3.6 การทดสอบประสิทธิภาพในการต้านเชื้อไวรัส.....	16
3.7 การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน.....	18
3.8 การแปลผลและการวิเคราะห์ผล.....	18
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	19
4.1 การทดสอบประสิทธิภาพและคำนวณความเข้มข้นของไวรัส.....	19
4.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เคเอฟซี.....	22

4.3 การทดสอบประสิทธิภาพในการต้านเชื้อไวรัสของยาอะซัยโคลเวียและสารสกัด พญาอ.....	27
4.4 การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน.....	32
บทที่ 5 อภิปรายผลการวิจัย บทสรุป และข้อเสนอแนะ.....	46
5.1 อภิปรายผลการวิจัย.....	46
5.2 บทสรุป และข้อเสนอแนะ.....	56
รายการอ้างอิง.....	58
ภาคผนวก.....	67
ก. ประกาศกรมประมง ปี พ.ศ.2546.....	68
ข. ประกาศกรมประมง ปี พ.ศ.2547.....	69
ค. แสดงสูตรอาหารสำหรับเลี้ยงเคเอฟเซลล์และสำหรับใช้ในการทดลอง.....	70
ง. แสดงใบรับรองคุณภาพของสารสกัดพญาอ.....	71
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	72

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

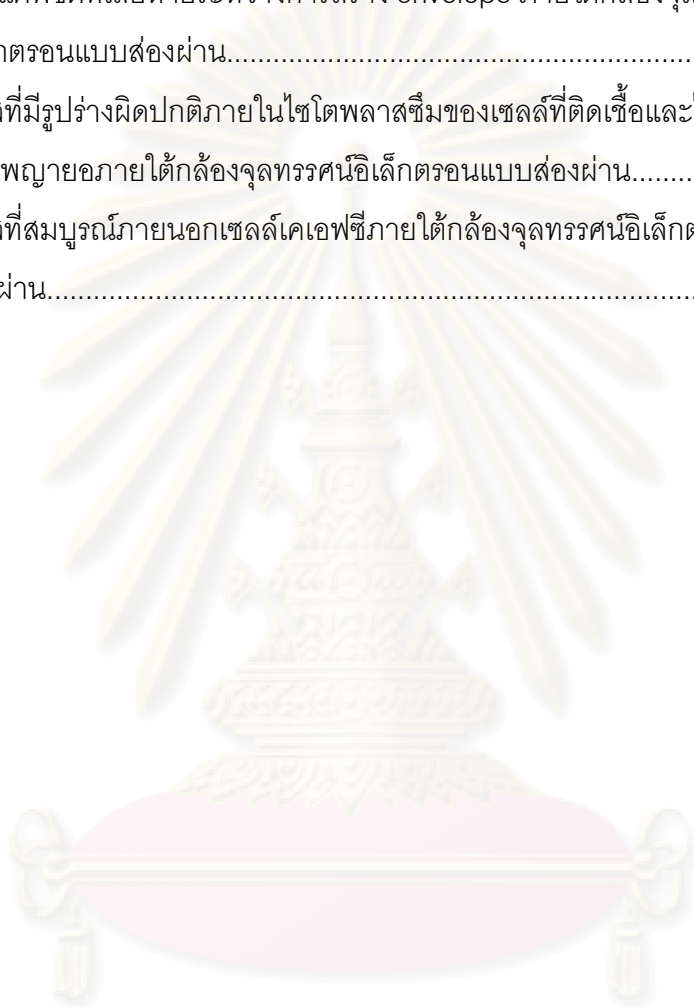
ตารางที่		หน้า
4.1	ตารางแสดงวิธีการคำนวณปริมาณของไวรัสโดยวิธีของ Reed and Muench	20
4.2	ตารางแสดงร้อยละของเซลล์มีชีวิตในการทดสอบความเป็นพิษของยาอะซัยโคลเวียต่อเคเอฟเซลล์.....	23
4.3	ตารางแสดงการเปรียบเทียบหาร้อยละของเซลล์มีชีวิตในกลุ่มทดลองกับเซลล์มีชีวิตในกลุ่มควบคุม (% survival) และ ร้อยละอัตราการตายของเซลล์ (% mortality) ในการทดสอบความเป็นพิษของยาอะซัยโคลเวีย ต่อเซลล์เคเอฟซี.....	24
4.4	ตารางแสดงร้อยละของเซลล์มีชีวิตในการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดพญาฮอต่อเคเอฟเซลล์.....	25
4.5	ตารางแสดงการเปรียบเทียบหาร้อยละของเซลล์มีชีวิตในกลุ่มทดลองกับเซลล์มีชีวิตในกลุ่มควบคุม (% survival) และ ร้อยละอัตราการตายของเซลล์ (% mortality) ในการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดพญาฮอ ต่อเซลล์เคเอฟซี	26
4.6	ตารางแสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณไวรัสเมื่อใช้สารสกัดพญาฮอในความเข้มข้นต่างๆที่ 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง.....	29

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	ขบวนการเพิ่มจำนวนไวรัสเฮอริปส์ภายในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม.....	8
3.1	เซลล์เพาะเลี้ยงเคเอฟซีปกติ.....	14
3.2	Counting chamber และกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ.....	16
4.1	การเสื่อมของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเคเอชวีในวันที่ 10 และ 14 ของการทดลอง.....	21
4.2	เซลล์มีชีวิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ.....	23
4.3	แสดงร้อยละของเซลล์ที่ตายในความเข้มข้นต่างๆของยาอะซัยโคลเวีย.....	24
4.4	อัตราการตายของเซลล์ที่ได้รับสารสกัดพญาอ.....	26
4.5	แสดงค่าปริมาณของไวรัสเคเอชวีที่ได้จากการทดลองใช้ยาอะซัยโคลเวียความเข้มข้นต่างๆ เพื่อดำเนินเชื้อไวรัสหลังติดเข้าสู่เซลล์.....	27
4.6	แสดงค่าปริมาณความเข้มข้นของไวรัสเคเอชวีที่ได้จากการทดลองใช้สารสกัดพญาอความเข้มข้นต่างๆ เพื่อดำเนินเชื้อไวรัสหลังติดเข้าสู่เซลล์.....	28
4.7	แสดงปริมาณความเข้มข้นของไวรัสเมื่อได้รับสารสกัดพญาอความเข้มข้นต่างๆ เพื่อดำเนินเชื้อไวรัสก่อนการติดเชื้อเข้าสู่เซลล์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง.....	29
4.8	แสดงปริมาณความเข้มข้นของไวรัสเมื่อได้รับสารสกัดพญาอความเข้มข้นต่างๆ เพื่อดำเนินเชื้อไวรัสก่อนการติดเชื้อเข้าสู่เซลล์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง.....	30
4.9	แสดงปริมาณความเข้มข้นของไวรัสเมื่อได้รับสารสกัดพญาอความเข้มข้นต่างๆ เพื่อดำเนินเชื้อไวรัสก่อนการติดเชื้อเข้าสู่เซลล์เป็นเวลา 3 ชั่วโมง.....	30
4.10	แสดงปริมาณความเข้มข้นของไวรัสเมื่อได้รับสารสกัดพญาอความเข้มข้นต่างๆ เพื่อดำเนินเชื้อไวรัสก่อนการติดเชื้อเข้าสู่เซลล์เป็นเวลา 4 ชั่วโมง.....	31
4.11	แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณเชื้อเมื่อใช้สารสกัดพญาอความเข้มข้นต่างๆ เพื่อดำเนินเชื้อไวรัสก่อนการติดเชื้อเข้าสู่เซลล์ ที่เวลา 1-4 ชั่วโมง.....	31
4.12	เซลล์เคเอฟซีแสดงลักษณะของเซลล์ปกติ เห็นนิวเคลียสเป็นพู และมีนิวคลีโอลัสสีเข้มอยู่ภายในนิวเคลียสภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน	32
4.13	ไมโตคอนเดรียและเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมชนิดหยาบภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน.....	33
4.14	เยื่อหุ้มนิวเคลียสและเยื่อหุ้มเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope).....	33
4.15	ความผิดปกติภายในเซลล์ส่วนนิวเคลียสเมื่อได้รับยาอะซัยโคลเวียภายใต้กล้อง	

	จุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน.....	34
4.16	ความผิดปกติของเซลล์ในไซโตพลาสซึมเมื่อได้รับยาอะซัยโคลเวียภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน.....	34
4.17	เยื่อหุ้มนิวเคลียสและเยื่อหุ้มเซลล์ที่เกิดความเสียหายเมื่อได้รับยาอะซัยโคลเวียภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน.....	35
4.18	ความผิดปกติภายในเซลล์เมื่อได้รับสารสกัดพญายอภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน.....	36
4.19	เยื่อหุ้มนิวเคลียสและเยื่อหุ้มเซลล์เมื่อได้รับสารสกัดพญายอภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน.....	36
4.20	ไมโทคอนเดรียที่เกิดการเสื่อมและนิวคลีโอลัสที่ผิดปกติเมื่อได้รับสารสกัดพญายอภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน.....	37
4.21	เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเคเอชวีภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน.....	38
4.22	ความผิดปกติของนิวคลีโอลัสและเยื่อหุ้มนิวเคลียสของเซลล์ที่ติดเชื้อเคเอชวีภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน.....	38
4.23	ความผิดปกติของไมโทคอนเดรียภายในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเคเอชวีภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน.....	39
4.24	Premature enveloped virion และ capsid virion ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน.....	39
4.25	Premature enveloped virion และ capsid virion ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน.....	40
4.26	ลักษณะของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเคเอชวีและได้รับยาอะซัยโคลเวียภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน.....	41
4.27	ความเสียหายของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเคเอชวีและได้รับยาอะซัยโคลเวียภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน.....	41
4.28	เยื่อหุ้มนิวเคลียสที่เสียหายและ capsid virion ที่พบในไซโตพลาสซึมของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน.....	41
4.29	การเปลี่ยนแปลงของเชื้อไวรัสที่พบภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน.....	42
4.30	ความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเคเอชวีและได้รับยาอะซัยโคลเวียภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน.....	42
4.31	เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเคเอชวีและได้รับสารสกัดพญายอภายใต้กล้องจุลทรรศน์	

	อิเล็กทรอนิกส์แบบสองผ่าน.....	43
4.32	เซลล์ที่ติดเชื้อเคเอชวีและได้รับสารสกัดพญาอที่มีนิวคลีโอไซด์ติดปกติและเยื่อหุ้มนิวเคลียสเสียหายภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กทรอนิกส์แบบสองผ่าน.....	44
4.33	ไวรัสที่พบบริเวณเยื่อหุ้มนิวเคลียสของเซลล์ที่ติดเชื้อและได้รับสารสกัดพญาอและแคปซิดที่เสียหายระหว่างการสร้าง envelope ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กทรอนิกส์แบบสองผ่าน.....	44
4.34	ไวรัสที่มีรูปร่างผิดปกติภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ที่ติดเชื้อและได้รับสารสกัดพญาอภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กทรอนิกส์แบบสองผ่าน.....	45
4.35	ไวรัสที่สมบูรณ์ภายนอกเซลล์เคเอชวีภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กทรอนิกส์แบบสองผ่าน.....	45



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรค Koi herpesvirus (เคเอชวี) เป็นโรคระบาดในปลาตระกูลคาร์พ (*Cyprinus* sp.) ที่ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยง ทั้งที่เป็นปลาสวยงามและปลาเพื่อการบริโภค พบอุบัติการณ์ของโรคเกิดขึ้นครั้งแรกในปี 1998 ที่ประเทศอิสราเอล (Hedrick *et al*, 2000) จากนั้นพบการระบาดที่ประเทศสหรัฐอเมริกา ประเทศในทวีปยุโรปและทวีปเอเชียรวมทั้งในประเทศไทย (นันทริกา ชันชื้อ และจิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์, 2548; Pikulkaew *et al.*, 2005) ซึ่งมีการนำเข้าปลาคาร์พมาจากประเทศญี่ปุ่นเป็นหลัก การระบาดของโรคเคเอชวีนี้ส่งผลให้ปลาแสดงอาการป่วยและตายเป็นจำนวนมากก่อให้เกิดความสูญเสียอย่างมหาศาล จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าการเกิดโรคในปลาแฟนซีคาร์พทั้งในกลุ่มผู้เลี้ยงตามบ้าน และในฟาร์มเพาะเลี้ยงทั่วประเทศของประเทศไทย (นันทริกา ชันชื้อ และคณะ, 2550) และจากข้อมูลใบประวัติสัตว์ป่วยที่เข้ามารับรักษา ณ ศูนย์วิจัยโรคสัตว์น้ำ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พบว่ามีการตรวจพบเชื้อเคเอชวีครั้งแรกในปี พ.ศ. 2548 จากการเก็บตัวอย่างของปลาแฟนซีคาร์พที่แสดงอาการป่วย มาตรวจด้วยวิธีเนสต์พีซีอาร์ (nested PCR; IQ2000TM KHV Detection System, Farming IntelliGene Tech.Corp.[®]) โดยตั้งแต่ปี 2548 จนถึงปัจจุบันพบมีตัวอย่างปลาคาร์พที่ตรวจพบว่าติดเชื้อเคเอชวีทั้งที่ป่วยและตาย มากถึง 75% จากจำนวนตัวอย่างปลาคาร์พที่ทำการตรวจทั้งหมด โดยเฉพาะในช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนกุมภาพันธ์ที่อากาศค่อนข้างเย็นพบว่าปลาจะมีอัตราการป่วยและตายเพิ่มสูงขึ้นและมีกระบวนการเกิดของโรคขึ้นอย่างรวดเร็ว ปลาที่ได้รับเชื้อเคเอชวีจะอ่อนแอ มักพบการเกิดเนื้อตายที่เหงือก ร่วมกับอาการแสดงจากการติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อน การรักษาโดยส่วนใหญ่จะทำการรักษาตามอาการแสดงของปลา โดยยังไม่มีการทดลองนำยาต้านไวรัสมาใช้ในการรักษา ในขณะที่การรักษาโรคติดเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพล็กซ์ชนิดที่ 1 และ 2 (Herpes simplex virus type 1; HSV-1 และ Herpes simplex virus type 2; HSV-2) ในมนุษย์ มีรายงานการใช้ยาและสมุนไพรหลายชนิดในการรักษา มีการศึกษาและพัฒนาประสิทธิภาพของยาและสมุนไพรต่อเชื้อไวรัส ทั้งการทดลองในเซลล์เพาะเลี้ยง ในสัตว์ทดลอง และนำมาใช้ในการรักษาสัตว์ป่วย โดยยาต้านไวรัสที่นิยมใช้ คือ อะซัยโคลเวีย (acyclovir) มีกลไกการออกฤทธิ์โดยตรงกับเอนไซม์ไทมิดีนไคเนส (thymidine kinase; TK) ของเชื้อไวรัสในตระกูลเฮอร์ปีส์ ทำให้เชื้อไม่สามารถที่จะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนต่อไปได้ (Snoeck, 2000) ปัจจุบันมีงานวิจัยเกี่ยวกับสมุนไพรเพิ่มมากขึ้นและเริ่มมีการนำสารสกัดสมุนไพรเหล่านี้ มาใช้แทนยาแผนปัจจุบัน เนื่องจากมีความเป็นพิษและผลข้างเคียงน้อยกว่า อีกทั้งหาได้ง่ายและมีราคาถูก

สมุนไพรที่มีรายงานการนำมาใช้ได้แก่ พญาขอ (*Clinacanthus nutans*) (ชินฤดี ไชยวสุ และคณะ, 2535; นิษฐกานต์ ภัทรกานต์ และสุภาพร เบญจสุพัฒน์นันท์, 2544; ศรัณยา ธาราแสง และคณะ, 2549; สมชาย แสงกิจพร และคณะ, 2536; Chotikieat *et al.*, 1989; Sangkitporn *et al.*, 1995; Suwanna *et al.*, 1992; Thawaranantha *et al.*, 1992; Yoosook *et al.*, 1999, Yoosook *et al.*, 2000) ว่านหางจระเข้ (*Aloe vera* L. Burm. f.) (นันทวัน บุญยะประภัศร, 2547) ชะเอม (*Derris reticulata* Craib.) (สุมิตา วิเศษสุทธิชัย และคณะ, 2548) สนมแฝง (*Chamaecyparis obtusa*) (Kuo *et al.*, 2006) และหญ้าไต้ไบ (*Phyllanthus urinaria* L.) (Yang *et al.*, 2007) เป็นต้น โดยที่พญาขอซึ่งเป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านที่มีการนำมาใช้ในการรักษาโรคผิวหนัง สามารถหาได้ง่ายในประเทศไทย มีราคาถูก และมีผลผลิตตลอดปี อีกทั้งยังจัดเป็นสมุนไพรเดี่ยวในบัญชียาหลักแห่งชาติปี 2542 (คณะกรรมการแห่งชาติด้านยา, 2543) ที่มีรายงานทางวิทยาศาสตร์ถึงประสิทธิภาพของสารสกัดพญาขอต่อเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพล็กซ์ชนิดที่ 1 และ 2 ซึ่งพบว่าสารสกัดแอลกอฮอล์จากใบ มีประสิทธิภาพในการต้านไวรัสได้ดี และมีการนำมาใช้ในการรักษาโรคเฮอร์ปีส์ซิมเพล็กซ์ชนิดที่ 1 และ 2 หรือที่เรียกว่าโรคเริมและใช้รักษาโรคงูสวัดในคน (Yoosook *et al.*, 1999; Yoosook *et al.*, 2000)

ดังนั้นการนำยาหรือสารที่มีฤทธิ์ต้านไวรัสมาใช้กับโรคไวรัสเคเอชวี น่าจะมีประโยชน์และช่วยลดอัตราการตายของปลาได้ โดยเฉพาะในกลุ่มผู้เลี้ยงปลาแฟนซีคาร์พ ซึ่งเป็นปลาที่มีผู้ให้ความสนใจมากในประเทศไทย เพราะเป็นสัตว์ที่มีคุณค่าทางจิตใจต่อผู้เลี้ยง อีกทั้งยังมีคุณค่าทางเศรษฐกิจจากการส่งออกปลาไปสู่ตลาดโลกอีกด้วย การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับผลของยาและสารสกัดจากสมุนไพรต่อเชื้อเคเอชวีในเซลล์เพาะเลี้ยง เพื่อประโยชน์ในการเป็นข้อมูลเบื้องต้นและเป็นแนวทางในการนำสารต้านไวรัสมาปรับใช้ในการรักษาโรคนี้ในปลาตระกูลคาร์พต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อทำการศึกษาผลของยาอะซัยโคลเวียกับผลของสารสกัดพญาขอต่อเชื้อไวรัสเคเอชวีในเคเอฟเซลล์ (Koi Fin Cell; KFC)
2. เพื่อทำการหาระดับความเข้มข้นของยาอะซัยโคลเวีย และสารสกัดพญาขอที่ให้ผลดีที่สุดในการต้านเชื้อไวรัสเคเอชวี โดยไม่ทำให้เกิดผลเสียต่อเคเอฟเซลล์
3. เพื่อศึกษาผลกระทบของยาอะซัยโคลเวีย และสารสกัดพญาขอต่อเคเอฟเซลล์ผลต่อเคเอฟเซลล์ที่ได้รับเชื้อไวรัสเคเอชวี และผลต่อเชื้อเคเอชวี โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope; TEM)

4. เพื่อศึกษาลักษณะของเชื้อเคเอชวีในความเข้มข้นที่ทำให้เคเอฟเซลล์เกิดการเสื่อม (cytopathic effect; CPE) อย่างสมบูรณ์ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน

1.3 สมมติฐานในการวิจัย

ยาอะซัยโคลเวีย และ สารสกัดพวยอ มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ในปลาแคร์พ (เคเอชวี) ได้โดยไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเคเอฟเซลล์ โดยมีการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัสทั้งก่อนและหลังจากที่มีการติดเข้าสู่เซลล์

1.4 ขอบเขตและข้อจำกัดของงานวิจัย

ทำการศึกษามูลการต้านเชื้อไวรัสเคเอชวีของยาอะซัยโคลเวียและสารสกัดพวยอ ในเคเอฟเซลล์เพื่อหาความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์และมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ อีกทั้งทำการศึกษากลไกการยับยั้งไวรัสภายในเซลล์ของยาอะซัยโคลเวียและสารสกัดพวยอภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงโอกาสและแนวทางในการรักษาโรคเคเอชวี โดยการใช้อะซัยโคลเวียหรือสารสกัดพวยอที่ออกฤทธิ์ต่อเชื้อไวรัสได้โดยตรง เพื่อที่จะลดความสูญเสีย และ เพิ่มโอกาสในการรอดชีวิตของปลาที่ติดเชื้อ
2. ทราบกลไกการทำลายเชื้อไวรัสเคเอชวีว่าเกิดการทำลายก่อนเข้าเซลล์หรือยับยั้งการแบ่งตัวภายหลังติดเข้าสู่เซลล์แล้ว เพื่อเป็นหลักในการฆ่าเชื้อไวรัสที่อยู่ในน้ำหรือในสิ่งแวดล้อม เพื่อลดโอกาสในการติดเชื้อและการแพร่กระจายเชื้อลง
3. ได้ข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนารูปแบบของยาเพื่อใช้ในการรักษาปลา ขนาดยาที่เหมาะสม และการออกแบบการทดลองในตัวปลาโดยตรง
4. ทราบข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการศึกษาเกี่ยวกับสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสอื่นๆต่อไป

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ประวัติและความสำคัญของโรคติดเชื้อเคเอชวี

เคเอชวีเป็นโรคไวรัสอุบัติใหม่ ที่ก่อให้เกิดอัตราการตายสูงมากในปลาตระกูลคาร์พ โดยเฉพาะปลาแฟนซีคาร์พ (*Cyprinus carpio koi*) และ ปลาไน (*Cyprinus carpio* L.) ทั้งในประเทศอิสราเอล สหรัฐอเมริกา ประเทศในทวีปเอเชียและยุโรป โดยสามารถแยกเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคได้ครั้งแรกในปี 1999 (Hedrick *et al.*, 2000) และได้ให้ชื่อว่า Koi herpesvirus (KHV) จากลักษณะของนิวคลีโอแคพซิด (nucleocapsid) และการติดสีเนกกาทีฟของเชื้อไวรัส (virion) เมื่อมีการศึกษาต่อมาถึงลำดับยีนของเชื้อเปรียบเทียบกับเชื้อไวรัสเฮอริปีส์ในสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นต่ำชนิดอื่นพบว่า เคเอชวีมีความใกล้เคียงกับเชื้อ Cyprinid Herpesvirus 1 (CyHV-1) และ Cyprinid Herpesvirus 2 (CyHV-2) และมีการให้ชื่อเชื้อตัวนี้ใหม่ว่า Cyprinid Herpesvirus 3 (CyHV-3) (Waltzek *et al.*, 2005) ในขณะที่นักวิจัยบางกลุ่มได้ให้ชื่อได้แก่ในการจัดให้เชื้ออยู่ในกลุ่มของไวรัสเฮอริปีส์ เนื่องจากมีขนาดของจีโนมที่ใหญ่กว่า คือประมาณ 295 kb ในขณะที่เชื้ออื่นที่พบในตระกูลเฮอริปีส์จะมีขนาดของจีโนมอยู่ที่ประมาณ 125 ถึง 240 kb (Pikarsky *et al.*, 2004; Hutoran *et al.*, 2005; Ilouze *et al.*, 2006) และให้ชื่อว่า Carp interstitial Nephritis and Gill necrosis Virus (CNGV) ตามลักษณะของอาการที่พบแทน เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับจีโนมของเชื้อเคเอชวีด้วยวิธีทาง Phylogenetic จึงมีการจัดเชื้อเคเอชวีเข้าในแฟมิลีใหม่ที่ชื่อว่า *Alloherpesviridae* ซึ่งรวมถึงเฮอริปีส์ไวรัสในปลาและในสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำด้วย (McGeoch *et al.*, 2006) โรคเคเอชวีจัดอยู่ในบัญชีโรคขององค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (Office International des Epizooties: OIE) (OIE, 2006) ซึ่งเป็นองค์กรอ้างอิงด้านมาตรฐานสุขภาพสัตว์ขององค์การการค้าโลก (WTO) การระบาดของโรคเคเอชวีในประเทศไทยเริ่มมีการตรวจพบตั้งแต่วันที่ พ.ศ. 2546 โดยมีการตรวจพบครั้งแรกในปลาคาร์พของไทยที่ส่งออกไปยังประเทศเยอรมนี ทำให้กรมประมงเริ่มทำการสำรวจโรคตามฟาร์มต่างๆในประเทศ และทำลายปลาทั้งหมดเมื่อตรวจพบการติดเชื้อ และห้ามทำการนำเข้าเป็นระยะเวลาประมาณ 1 ปี โดยกรมประมงได้ออกกฎกระทรวงฯ ระเบียบการนำเข้าปลาตระกูลคาร์พจากประเทศญี่ปุ่นไว้เป็นการชั่วคราว เมื่อวันที่ 18 พฤศจิกายน พ.ศ.2546 (ภาคผนวก ก) และได้มีประกาศเห็นควรให้มีการออกหนังสืออนุญาตให้นำปลาตระกูลคาร์พเข้ามาในราชอาณาจักรได้ แต่ต้องดำเนินการภายใต้ระบบการกักกันโรคที่เป็นไปตามมาตรฐาน ตามประกาศของกรมประมง ในวันที่ 30 กันยายน พ.ศ. 2547 (ภาคผนวก ข) การระบาดของโรคนี้ส่งผลให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีการระบาดที่รวดเร็วและสามารถติดต่อได้ง่ายโดยการติดต่อผ่านทางน้ำหรือตะกอนในบ่อเลี้ยงที่มีการ

ปนเปื้อนของเชื้อไวรัส พบว่าเชื้อสามารถมีชีวิตอยู่ในน้ำอย่างอิสระได้นานอย่างน้อย 4 ชั่วโมง โดยที่ยังคงความสามารถในการติดเชื้ออยู่ (Perelberg *et al.*, 2003) มีหลายรายงานที่ให้สมมติฐานว่าเชื้อเคเอชวีติดเข้าสู่ร่างกายปลาผ่านทางเหงือก (Dishon *et al.*, 2005; Gilad *et al.*, 2004; llouze *et al.*, 2006; Miyazaki *et al.*, 2008; Pikarsky *et al.*, 2004) เนื่องจากประการแรก เชื้อโรคหลายชนิดในปลาจะติดเข้าสู่ตัวปลาทางเหงือกเป็นหลัก (Roberts and Ellis, 2001) ประการที่สอง ปลาที่มีการติดเชื้อเคเอชวีจะพบรอยโรคชัดเจนที่บริเวณเหงือกซึ่งเป็นสาเหตุในการเรียกชื่อของเชื้อในช่วงแรกว่า Carp interstitial nephritis and gill necrosis virus (Hedrick *et al.*, 2000; Miyazaki *et al.*, 2008; Perelberg *et al.*, 2003; Pikarsky *et al.*, 2004; Ronen *et al.*, 2003) และประการที่สามคือ สามารถที่จะตรวจพบจีโนมของไวรัสที่เหงือกด้วยวิธีพีซีอาร์ในช่วงต้นของการติดเชื้อ (Gilad *et al.*, 2004; Pikarsky *et al.*, 2004) โดยการศึกษาในช่วงหลังพบว่า การติดเชื้อเข้าสู่ตัวปลาจะติดผ่านเข้าทางผิวหนังเป็นหลักไม่ใช่ทางเหงือกอย่างที่เคยมีรายงานมาโดยการศึกษาด้วยเทคนิคการถ่ายภาพ bioluminescence (Costes *et al.*, 2009)

ปลาที่ติดเชื้อเคเอชวีมีอัตราการตายสูง 80-100% ภายในระยะเวลา 1-2 สัปดาห์หลังจากที่ได้รับเชื้อ (Hedrick *et al.*, 2000) พบว่าอุณหภูมิเป็นปัจจัยของสิ่งแวดล้อมที่สำคัญในการเอื้ออำนวยต่อการติดเชื้อ ความรุนแรง และการระบาดของโรค โดยจะพบการระบาดของโรคที่รุนแรงในช่วงอุณหภูมิ 18 ถึง 26 องศาเซลเซียส (Gilad *et al.*, 2003) และจะมีการแบ่งตัวในเซลล์จากครีบบปลาคาร์พ (Koi Fin Cell; KFC) หรือเคเอฟเซลล์ ได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 20 ถึง 25 องศาเซลเซียส โดยไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อที่อุณหภูมิต่ำกว่า 4 และสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส (Gilad *et al.*, 2003) โดยเมื่อทำการบ่มเชื้อเคเอชวีในเซลล์เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 30 วัน พบว่าเซลล์ที่มีการติดเชื้อ เกิดช่องว่างภายในและเกิดการเสื่อมขึ้นนั้น สามารถกลับมา มีสภาพของเซลล์ที่เป็นปกติได้เมื่อทำการเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้น และจะมีพยาธิสภาพเกิดขึ้นมาอีกครั้งเมื่อนำเซลล์กลับมาเลี้ยงในอุณหภูมิที่เหมาะสมแก่การเจริญเติบโตของเชื้อไวรัส แสดงให้เห็นว่าเชื้อสามารถยังคงอยู่ในเซลล์ได้โดยไม่แสดงให้เห็นความผิดปกติเมื่อทำการเลี้ยงเซลล์ในอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมแก่การเจริญเติบโตของเชื้อ จึงมีความเป็นไปได้ที่เชื้อจะสามารถคงอยู่ในตัวปลาได้นานโดยไม่แสดงอาการ แต่จะสามารถแพร่เชื้อต่อไปได้เมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อเคเอชวี (Dishon *et al.*, 2007) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Ronen *et al.* (2003) และ Gilad *et al.* (2003) ที่พบว่าเมื่อทำการเปลี่ยนอุณหภูมิน้ำให้อยู่ในช่วงที่ต่ำหรือสูงกว่าอุณหภูมิที่ก่อให้เกิดโรค ปลาจะแสดงอาการลดลงหรือไม่แสดงอาการป่วยเลย แต่ปลาที่ได้รับเชื้อจะสามารถเป็นพาหะอยู่ได้นานหลายปีและสามารถแพร่เชื้อทำให้ปลาตัวอื่นติดโรคได้ แม้ว่าจะเป็นปลาในตระกูลเดียวกันที่มีรายงานว่าไม่แสดงอาการป่วยเมื่อได้รับเชื้อเคเอชวี (Hedrick *et al.*, 2006) โดยมีรายงานว่าสามารถตรวจพบเชื้อเคเอชวีด้วยวิธีพีซีอาร์ ในปลาทองที่สัมผัสหรืออยู่

ร่วมกับปลาคาร์พในช่วงที่มีการแสดงอาการของโรค แต่ปลาทองจะไม่มีอาการแสดงอาการป่วยใดๆ และสามารถตรวจพบดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสได้นานหลังจากที่ปลาทองได้รับการสัมผัสกับเชื้อแล้ว แต่ไม่ได้ทำการศึกษาดังกล่าวถึงความสามารถในการแพร่เชื้อให้กับปลาตัวอื่น ดังนั้นปลาทองจึงมีโอกาสที่จะเป็นพาหะนำโรคของเชื้อไวรัสเคเอชวีได้ (Sadler *et al.*, 2008) ไวรัสเคเอชวีสามารถก่อโรครุนแรงได้ในปลาทุกอายุ แต่ในปลาวัยอ่อนจะมีความไวต่อเชื้อสูงกว่า (Perelberg *et al.*, 2003) อาการที่พบ ได้แก่ ซึม เบื่ออาหาร มีการว่ายน้ำที่ผิดปกติ กล้ามเนื้ออ่อนแอ แข็งแรง สุบอากาศ และอาจแสดงรอยโรคที่บริเวณผิวหนังและเกล็ด จากการติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อน (Gilad *et al.*, 2002; Hedrick *et al.*, 2000) และส่วนใหญ่มักจะเสียชีวิตหลังจากมีการติดเชื้อ 7-10 วัน (Hedrick *et al.*, 2000) โดยจะพบรอยโรครุนแรงที่เหงือก พบการบวมอักเสบ การเกิดเนื้อตายและการถูกทำลายของเซลล์ที่เหงือก มีการอักเสบและขยายใหญ่ของไต ม้าม และตับ (Pikarsky *et al.*, 2004; Hedrick *et al.*, 2000) เมื่อทำการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา พบอินคลูชันบอดีในนิวเคลียสของเซลล์เหงือกและอวัยวะภายในอื่นๆ ได้แก่ ตับ ไต และลำไส้ (Pikarsky *et al.*, 2004; Pikulkaew *et al.*, 2005) และพบการเกิดช่องว่าง (foamy) ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ที่มีการติดเชื้อ โดยพบลักษณะเช่นเดียวกันนี้กับการเสื่อมของเซลล์ (Cytopathic Effect ; CPE) ในเซลล์เพาะเลี้ยงเชื้อไวรัส (Pikarsky *et al.*, 2004) การเสื่อมของเซลล์ที่พบจะมีลักษณะจำเพาะโดยจะเกิดการเชื่อมกันของเซลล์ (syncytium formation) และเกิดช่องว่างภายในเซลล์ (cytoplasmic vacuolation) อย่างชัดเจน โดยเซลล์จะเกิดการเสื่อมอย่างสมบูรณ์หลังจากทำการเพาะเชื้อประมาณ 7-10 วัน (Hedrick *et al.*, 2000) ส่วนการตรวจดีเอ็นเอของเชื้อเคเอชวีในตัวอย่างเนื้อเยื่อของปลาคาร์พที่ติดเชื้อด้วยวิธี dot-blot DNA hybridization พบดีเอ็นเอของไวรัสจากเนื้อเยื่อที่ได้จากเหงือกทางเดินอาหาร ตับและไต แต่ไม่พบในเนื้อเยื่อสมอง (Gray *et al.*, 2002) ลักษณะของเชื้อที่พบเมื่อทำการศึกษากายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่า เชื้อไวรัสมีแคปซิดภายใน (inner capsid) และมีรูปร่าง icosahedron แบบสมมาตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 100-110 นาโนเมตร (Hedrick *et al.*, 2000) ในจีโนมของเคเอชวีประกอบด้วยส่วนของยีนไทมิดีนคัยเนส (Gray *et al.*, 2002) (GenBank accession numbers AY208988-91 AJ535112 และ AF411803) ขนาดประมาณ 16 - 45 bp จากการศึกษาลำดับเบสในสายพันธุกรรมของจีโนมอย่างสมบูรณ์ โดยการเปรียบเทียบสายพันธุกรรมของเชื้อเคเอชวี 3 สายพันธุ์จากประเทศญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา และอิสราเอล พบว่าสายจีโนมมีขนาด 295 kbp และมียีน 15 ตัวที่เหมือนกับไวรัสเฮอริปีสที่พบในปลาตุ๊ก (Ictalurid herpesvirus1) ซึ่งเป็นข้อมูลสนับสนุนในการจัดเคเอชวีเข้าอยู่ในไวรัสตระกูลเฮอริปีสวิรีดี (*Herpesviridae*) ที่พบในปลาและสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ โดยเคเอชวีมีขนาดจีโนมที่ใหญ่ที่สุดในไวรัสตระกูลเดียวกันที่มีรายงานในปัจจุบัน (Aoki *et al.*, 2007) และจากการศึกษาถึงกลไกการเข้าสู่เซลล์และการเจริญของเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยงภายใต้กล้องจุลทรรศน์

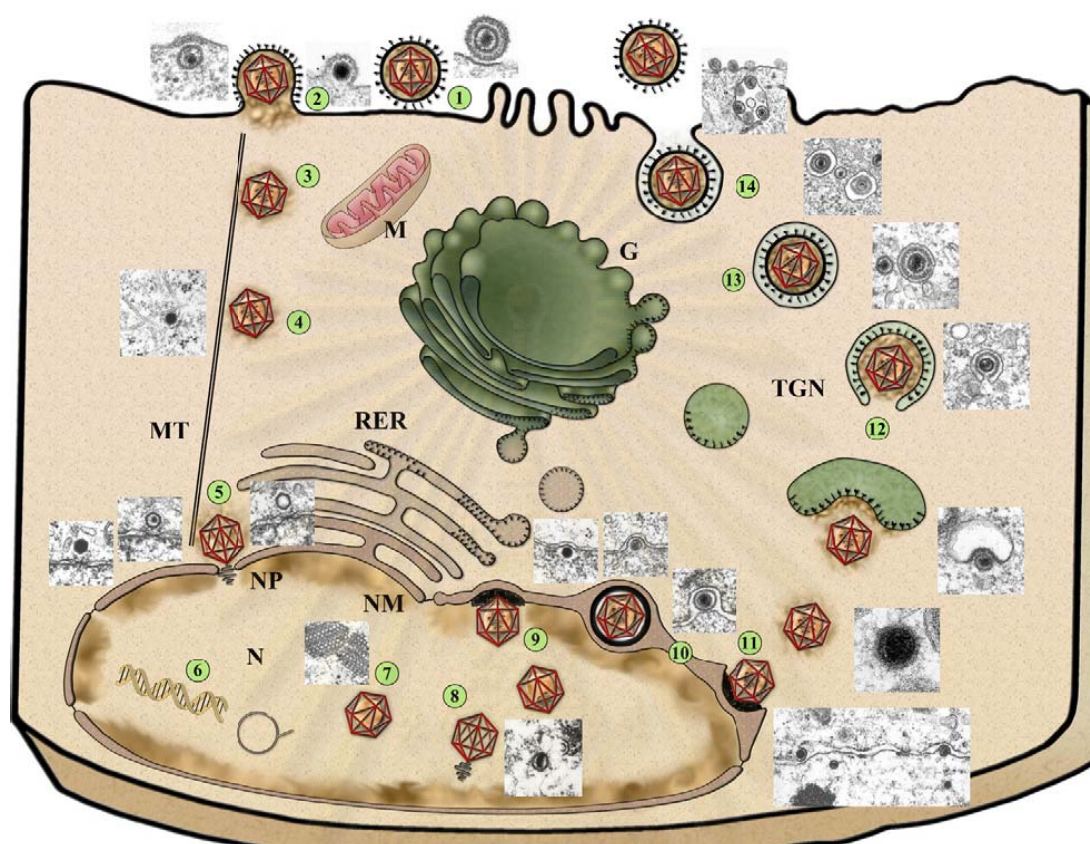
อิเล็กทรอนิกส์ พบว่าเคอเซวีมีกลไกในการทำลายเซลล์เช่นเดียวกันกับเชื้อเฮอริปีส์ที่พบในคนและในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่น จึงเป็นผลการศึกษาที่ช่วยสนับสนุนการเป็นสมาชิกของไวรัสตัวนี้ในตระกูลเฮอริปีส์ได้ (Miwa *et al.*, 2007)

ในปัจจุบันมีวิธีการตรวจเชื้อเคอเซวีอยู่หลายวิธี ได้แก่ การเพาะแยกเชื้อไวรัส (viral isolation) ในเซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อดูการเสื่อมของเซลล์ การนำเชื้อไวรัสมาจำแนกชนิดด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Hedrick *et al.*, 2000; Miwa *et al.*, 2007) การใช้เทคนิค DNA Hybridization (Gray *et al.*, 2002) การทดสอบด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) (Gilad *et al.*, 2002) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) (Gunimaladevi *et al.*, 2004) การจำลองยีนโอมิตินคัยเนสของเชื้อไวรัสเคอเซวี ในการตรวจหาสารพันธุกรรม(DNA) ของไวรัส ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Bercovier *et al.*, 2005) และ การใช้ Quenching Probe (Q probe) เพื่อใช้สำหรับ quantitative PCR (Kamimura *et al.*, 2007) โดยวิธีการตรวจที่นิยมใช้และให้ผลการตรวจที่ยอมรับเป็นมาตรฐาน (gold standard) คือ การตรวจหาดีเอ็นเอของไวรัสด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (OIE, 2006)

การเพิ่มจำนวนของ Alphaherpesvirus และ Pseudorabies Virus (PrV) ภายในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Mettenleiter *et al.*, 2009)

จากรูปที่ 2.1 แสดงแผนภาพขั้นตอนการเพิ่มจำนวนของไวรัสควบคู่ไปกับภาพถ่ายอิเล็กตรอน โดยเริ่มจากไวรัสจะเกาะติดกับเยื่อหุ้มเซลล์ (1) จากนั้นจะผ่านเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ (2) โดยแคพซิด (capsid) จะถูกลำเลียงเข้าไปยังนิวเคลียส (N)(3) ผ่านทางไมโครทิวบูล (microtubule; MT)(4) ไปยังรูเปิดของเยื่อหุ้มนิวเคลียส (nuclear pore; NP) (5) ซึ่งไวรัสจะปล่อยข้อมูลทางพันธุกรรม (genome) เข้าสู่ นิวเคลียสของเซลล์ จากนั้นจะเกิดกระบวนการถอดรหัสพันธุกรรม (transcription) ของไวรัส และเกิดการสร้างสายพันธุกรรมใหม่ (genome replication) ขึ้น (6) ข้อมูลทางพันธุกรรมใหม่ที่สร้างขึ้นจะเกิดการคลี่ออกเป็นสายยาวในขั้นตอนของการเกิด encapsidation (8) เกิดเป็นแคพซิดใหม่ที่ถูกสร้างขึ้น (7) จากนั้นจะออกจากนิวเคลียสโดยการ budding ที่เยื่อหุ้มนิวเคลียสชั้นใน (inner nuclear membrane) (9) เกิดการสร้างเปลือก (envelope) ชั้นแรกที่บริเวณเยื่อหุ้มนิวเคลียสชั้นในกับชั้นนอก (perinuclear space) (10) เกิดเชื่อมกันของไวรัส (virion) กับเยื่อหุ้มนิวเคลียสชั้นนอก (11) ปล่อยแคพซิดเข้าสู่ไซโตพลาสซึม การเจริญขั้นตอนสุดท้ายจะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ภายในไซโตพลาสซึมโดยการสร้างเปลือกชั้นที่สองโดยการ budding เข้าสู่ vesicle ของ Trans-Golgi network (TGN) (12) ที่ภายในบรรจุไกลโคโปรตีนของไวรัสไว้ (black spikes) กลายเป็น enveloped virion ภายใน cellular vesicle จากนั้น

จะถูกขนส่งมาที่บริเวณผิวเซลล์ (13) เกิดการเชื่อมกันกับเยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane) ปลปล่อยไวรัสที่สมบูรณ์ (mature, enveloped virion) ออกจากเซลล์ (14)



รูปที่ 2.1 แสดงขบวนการเพิ่มจำนวนของไวรัสเฮอร์ปีส์ภายในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม
RER : เอนโดพลาสมิกเรติคูลัมชนิดหยาบ M : ไมโทคอนเดรีย G : Golgi apparatus (คัดลอก
จาก Mettenleiter *et al.*, 2009)

2. อะซัยโคลเวีย (Acyclovir)

อะซัยโคลเวียเป็นสารสังเคราะห์ซึ่งมีโครงสร้างคล้าย purine nucleoside พบว่ามีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อไวรัส โดยเฉพาะไวรัสในกลุ่มเฮอร์ปีส์ ได้แก่ ไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพล็กซ์ชนิดที่ 1 และ 2, Varicella Zoster Virus (VZV), Epstein Barr Virus (EBV) และ Cytomegalovirus (CMV) ในเซลล์เพาะเลี้ยง แต่จะมีการออกฤทธิ์ต่อเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพล็กซ์ชนิดที่ 1 และ ไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพล็กซ์ ชนิดที่ 2 (Rang *et al.*, 1999) ทั้งในรูปแบบของยากิน ยาป้ายตา ยาทาเฉพาะที่ และ ยาที่ให้เข้าทางหลอดเลือด (คณะกรรมการแห่งชาติด้านยา, 2542)

กลไกการออกฤทธิ์

อะซัยโคลเวียจะไปทำการยับยั้งการแบ่งตัวของเชื้อไวรัส โดยหลังจากที่ได้รับยาเข้าไปอะซัยโคลเวียจะถูกเปลี่ยนเป็น acyclovir monophosphate (acyclo-GMP) โดยเอนไซม์เอนิเมอไดนคัยเนสของเชื้อไวรัส จากนั้นจะถูก phosphorylate เปลี่ยนไปเป็น acyclovir diphosphate (acyclo-GDP) โดยเอนไซม์ guanylate kinase ของเซลล์โฮสต์ acyclo-GDP จะถูกเปลี่ยนไปเป็น acyclovir triphosphate (acyclo-GTP) โดยเอนไซม์อื่นๆในเซลล์ของโฮสต์ acyclo-GTP จะไปแย่งที่ deoxyguanosine triphosphate ซึ่งเป็นสารตั้งต้นสำคัญในการสร้าง DNA ของไวรัส นอกจากนี้ acyclo-GTP ยังรบกวนการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase) ของเชื้อไวรัส ส่งผลทำให้การสร้างสายดีเอ็นเอของไวรัสสิ้นสุดลง ไวรัสไม่สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนต่อไปได้ (อ้างถึงโดย Snoeck, 2000)

ข้อมูลทางคลินิก

จากการทดลองใช้ทางคลินิก พบว่าการให้ยาเข้าทางหลอดเลือดและทางการกินในผู้ป่วยที่มีปัญหาภูมิคุ้มกันบกพร่อง สามารถเร่งการขับเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ออกจากร่างกายได้ (Snoeck, 2000) Laskin *et al.* (1982) ได้ทำการศึกษาถึงความเป็นพิษในการใช้ยา พบว่า การให้ยาอะซัยโคลเวียในการรักษาโรคติดเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ในมนุษย์นั้น จะเกิดความเป็นพิษเมื่อมีความเข้มข้นของยาในเลือดสูงถึง 67.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แต่จะไม่เกิดพิษถ้าให้การรักษาในขนาดยาปกติ และจากคุณสมบัติในความจำเพาะต่อการต้านเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ ทำให้มีการนำมาใช้เป็นยาพื้นฐาน เพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบกับควบคุม (positive control) สำหรับการทดสอบฤทธิ์ในการต้านไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพล็กซ์ของสารสกัดสมุนไพรที่มีการศึกษาต่อมา (Yoosook *et al.*, 1999; สุมิตา วิเศษสุทธิชัย และคณะ 2548; Kuo *et al.*, 2006) การให้ยาอะซัยโคลเวียในสัตว์นั้นมีการนำมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ในแมวและในนกทั้งในรูปแบบของยากินและยาใช้ภายนอก โดยขนาดที่ใช้ในการรักษาในแมว คือ ให้กินในปริมาณ 200 มิลลิกรัมต่อตัว วันละ 4 ครั้ง ในนกให้กินวันละ 80 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วันละ 1 ครั้ง (อ้างถึงโดย วรา พานิชเกรียงไกร และคณะ, 2548) และมีการนำมาใช้รักษาโรคติดเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ในสัตว์เลื้อยคลาน โดยให้กินวันละ 80 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วันละ 1 ครั้ง หรือ 30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วันละ 3 ครั้ง (Klingenberg, 1996)

3. พญาอ

พญาอ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Clinacanthus nutans* (Burm. f.) Lindau เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ *Acanthaceae* มีชื่อเรียกต่างกันไปตามท้องถิ่น ได้แก่ เสดดพังพอนตัวเมีย พญาปล้องดำ (ภาคกลาง) พญาปล้องทอง ผักมันไก่ ผักลิ้นเหยียด (เชียงใหม่) พญาปล้องดำ (ลำปาง) ลิ้นมังกรโพะไซ้จาง (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน) (ศิริพร เหลืองกอบกิจ, 2542) พญาอเป็นไม้พุ่มเลื้อยสูง 1-3 เมตร ลำต้นและกิ่งก้านสีเขียว ใบเป็นใบเดี่ยวออกตรงข้ามกัน รูปรีแคบ ขอบขนาน ใบกว้าง 0.5-1.5 ซม. ยาว 2.5-13 ซม. ปลายและโคนใบแหลม ริมใบเรียบ ดอกเป็นช่อ ออกเป็นกระจุกที่ปลายกิ่ง มี 5 ดอกย่อยขึ้นไป กลีบดอกสีแดงส้ม โคนกลีบสีเขียวติดกันเป็นหลอด ปลายแยกเป็น 2 ส่วน ผลเป็นผลแห้ง แตกได้ พบได้ทั่วไปตามป่าของประเทศไทยขึ้นได้งามในดินที่สมบูรณ์ แสงแดดปานกลาง และมีปลูกกันตามบ้านอย่างแพร่หลาย เนื่องจากปลูกได้ง่าย ทนต่อสภาพแวดล้อม และมีดอกที่มีสีสวยงาม (เต็ม สมิตินันท์, 2544) นอกจากนี้ยังมีประโยชน์ในทางสมุนไพรอีกด้วย โดยสรรพคุณตามตำราไทย คือ สามารถใช้ใบในการรักษาโรคผิวหนัง จำพวกเริมและงูสวัด ใช้แก้พิษและแมลงสัตว์กัดต่อย (ดร.ณ เพ็ชรพลาย และคณะ, 2544) มีวิธีการนำมาใช้โดยนำใบพญาอสด 10-15 ใบ มาล้างให้สะอาด ต้มให้ละเอียด ตักลงใส่ภาชนะสะอาด เติมห่อผ้าขาวหรือแอลกอฮอล์พอท่วม ตั้งทิ้งไว้ 1 สัปดาห์ โดยคนยาทุกวัน กรองน้ำยา นำมาทาบริเวณที่ปวดบวม หรือหากเป็นมาก ใช้กากพอกบริเวณที่เป็นโรคได้

การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

พฤษเคมี

ใบ : ประกอบด้วย lupeol, Beta-sitosterol, stigmasterol (Dampawan, 1976)

ราก : ประกอบด้วย betulin, lupeol, Beta-sitosterol, stigmasterol (Lin, 1983)

ลำต้น : ประกอบด้วย lupeol (Dampawan *et al.*, 1977)

ก. ฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส (anti-viral activity)

จากการทดลองใช้สารสกัดน้ำจากใบของพญาอในความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง พบว่าสารสกัดสามารถทำลายเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพล็กซ์ชนิดที่ 1 ได้โดยตรงก่อนที่ไวรัสเข้าสู่เซลล์ (ชุตินันท์ กันตสุข, 2534) ในขณะที่มีบางรายงานพบว่าสารสกัดน้ำไม่มีฤทธิ์ในการทำลายไวรัสหรือมีฤทธิ์ต่ำ (นิษฐกานต์ ภัทรกานต์ และสุภาพร เบญจสุพัฒน์นันท์, 2544; Yoosook *et al.*, 1999) ส่วนสารสกัดเฮกเซน บิวทานอล และเอทิลอะซิเตทจากใบพญาอ พบว่ามีฤทธิ์ต้านไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพล็กซ์ชนิดที่ 1 ในเซลล์เพาะเลี้ยงได้ และเมื่อนำไปพัฒนาเป็นตำรับเจลโดยใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ ที่ความเข้มข้น 4% พบว่าสามารถต้านไวรัสได้ดี และไม่เป็นพิษต่อ

เซลล์ (นิษฐกานต์ ภัทรกานต์ และสุภาพร เบญจสุพัฒน์นันทน์, 2544) การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดใบพญาขอต่อเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพล็กซ์ชนิดที่ 2 เปรียบเทียบกับยามาตรฐาน (อะซัยโคลเวีย) โดยวิธี plaque reduction assay พบว่า สารสกัดจากใบพญาขอสามารถฆ่าเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพล็กซ์ชนิดที่ 2 ในเซลล์เพาะเลี้ยงได้ดี โดยออกฤทธิ์ทำลายไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพล็กซ์ชนิดที่ 2 ภายนอกเซลล์ได้โดยตรง ทำให้ไวรัสตายไม่สามารถเข้าไปเจริญเติบโตในเซลล์ได้ แต่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสที่เข้าสู่เซลล์แล้ว (ชื่นฤดี ไชยวสุและคณะ, 2535; Suwanna *et al.*, 1992) และเมื่อนำสารสกัดของใบพญาขอในแอลกอฮอล์ 95% ไปใช้เป็นตัวยาลำค้ำในตำรับน้ำยาบ้วนปาก จากการทดสอบพบว่าสามารถยับยั้งเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพล็กซ์ชนิดที่ 2 ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 1:2000 ในเซลล์เพาะเลี้ยง ด้วยวิธี plaque reduction assay (ศรัณยา ธาราแสวงและคณะ, 2549) สารสกัดใบพญาขอสามารถฆ่าเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคอีสุกอีใสและงูสวัด (Varicella zoster virus) ทั้งภายในและภายนอกเซลล์ คือสามารถยับยั้งด้วยการทำลายไวรัสโดยตรง และโดยการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส (ทองวิจิัยและพัฒนาศมนไพโร, 2533; Thawaranantha, 1992) จากการศึกษาตัวออกฤทธิ์ของสารสกัดพญาขอที่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพล็กซ์ชนิดที่ 1 และ 2 ได้ พบว่าเป็น สารไกลโคลิเซอไรด์ปิด (glycoglycerolipids) ที่สกัดแยกได้จากสารสกัดเมทานอลจากใบ และ สารโมโนไกลโคซิลไดกลีเซอไรด์ (monoglycosyl diglycerides) โดยมีสาร 1,2-O-dilinolenoyl-3-O-b-d-glucopyranosyl-sn-glycerol เป็นสารออกฤทธิ์สูงสุด (Janwitayanuchit *et al.*, 2003)

ข้อมูลทางคลินิก

จากการศึกษาในผู้ป่วยโรคเริมบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์ ที่ติดเชื้อครั้งแรกและติดเชื้อซ้ำ พบว่าการรักษาโดยทาแผลของผู้ป่วยด้วยครีมพญาขอ (5%) เปรียบเทียบกับยามาตรฐานอะซัยโคลเวียและยาหลอก พบว่า แผลของผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยาจากสารสกัดใบพญาขอและอะซัยโคลเวียจะตกสะเก็ดภายในวันที่ 3 และหายภายในวันที่ 7 แสดงว่าครีมพญาขอและครีมอะซัยโคลเวีย มีประสิทธิภาพในการรักษาผู้ป่วยโรคเริมบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์ได้ แต่ครีมพญาขอไม่ทำให้เกิดอาการแสบระคายเคือง ในขณะที่ครีมอะซัยโคลเวียทำให้เกิดอาการแสบและมีราคาสูงกว่า (ชื่นฤดี ไชยวสุและคณะ, 2535; สมชาย แสงกิจพรและคณะ, 2536; ทองวิจิัยและพัฒนาศมนไพโร, 2533) ในผู้ป่วยโรคงูสวัด เมื่อรักษาโดยทาแผลด้วยครีมพญาขอ (5%) วันละ 5 ครั้งทุกวัน พบว่าแผลจะตกสะเก็ดภายใน 1-3 วัน และหายภายใน 7-10 วัน ในขณะที่ผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยาหลอกแผลจะตกสะเก็ดภายใน 4-7 วัน และหายภายใน 10-14 วัน นอกจากนี้ผู้ป่วยกลุ่มที่รักษาด้วยครีมพญาขอ จะมีระดับความเจ็บปวดลดลงเร็วกว่ากลุ่มที่รักษาด้วยยาหลอก และไม่พบอาการข้างเคียงใด ๆ จากการใช้สารสกัดพญาขอ (Sangkitporn *et al.*, 1995)

ข. ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti – inflammatory activity)

จากรายงานการศึกษาในหนูทดลองพบว่าสารสกัดบิวทานอลจากใบพญาายอ มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ และมีการซึมผ่านของสารเข้าสู่ผนังหลอดเลือดเพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนกับขนาดของสารสกัดที่ให้ โดยเมื่อให้สารสกัดดังกล่าวขนาด 270 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว สามารถลดอาการบวมของข้อเท้าหนูขาวได้ เทียบเท่ากับแอสไพรินขนาด 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว (Tanasomwang, 1986; Kittisiripornkul *et al.*, 1987; Satayavivad *et al.*, 1996) โดยมีสารออกฤทธิ์ต้านการอักเสบที่สำคัญ คือ ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) (Chuakul, 1986) เมื่อป้อนสารสกัดดังกล่าวแก่หนูทดลอง พบว่า มีฤทธิ์คล้ายสเตียรอยด์สามารถลดอาการอักเสบได้ แต่เมื่อทำการทดสอบในกลุ่มที่มีการอักเสบแบบเรื้อรังโดยทาสารสกัดดังกล่าวที่ผิวหนังของหนูขาว พบว่าไม่สามารถลดอาการอักเสบได้ (Satayavivad *et al.*, 1996) และพบว่าสารสกัดเอทานอลจากใบพญาายอยังมีผลต่อการทำงานของไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบบางตัวอีกด้วย (Thamaree *et al.*, 1998; Thamaree *et al.*, 2001)

ข้อมูลทางคลินิก

การใช้ยาเตรียมจากใบพญาายอในรูปของกลีเซอร์รินและทิงเจอร์ ในการรักษาผู้ป่วยโรคเรื้อรัง และแผลอักเสบในปาก ที่โรงพยาบาลเจ้าพระยาอภัยภูเบศร พบว่า สามารถรักษาแผลและลดการอักเสบได้ (Chotikieat *et al.*, 1989)

ค. ฤทธิ์แก้ปวด (analgesic activity)

เมื่อให้หนูถีบจักรกินสารสกัดเอินบิวทานอลจากใบพญาายอในขนาดต่างๆ พบว่าสามารถลดการบิดตัวของหนู (anti-writhing) ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดอาการด้วยกรดอะซีติก โดยพบว่าจะมีความแรงลดลงเมื่อให้สารสกัดนี้โดยการฉีดเข้าช่องท้อง และไม่แสดงฤทธิ์ในการระงับปวด (Satayavivad *et al.*, 1996)

ศูนย์วิทยุทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย

การวิจัยแบ่งออกเป็น 7 ส่วน ดังนี้

1. การเตรียมยาและสมุนไพรมะเร็ง
2. การเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยงเชื้อไวรัส
3. การแยกและเก็บเชื้อไวรัส
4. การทดสอบประสิทธิภาพของไวรัส (Virus assay)
5. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cellular cytotoxicity assay)
6. การทดสอบประสิทธิภาพในการต้านเชื้อไวรัส (Virus titer reduction assay)
7. การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

1. ยาและสมุนไพรมะเร็ง

1.1 อะซัยโคลเวีย :

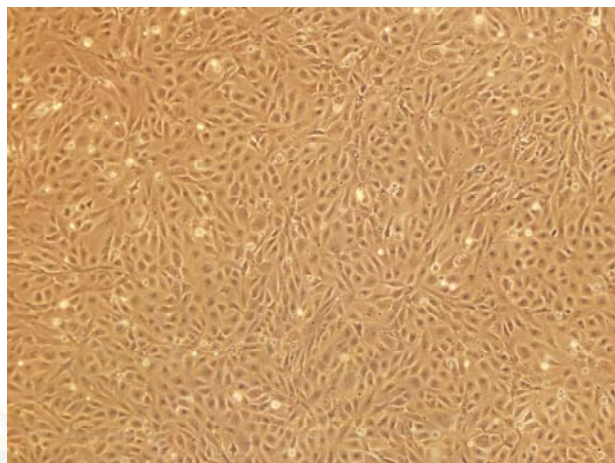
เตรียมยาอะซัยโคลเวียตั้งต้น (stock solution) ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน 100%DMSO (dimethyl sulfoxide) จากยาอะซัยโคลเวียชนิดผงปลอดเชื้อ 250 มิลลิกรัม (Sigma®, USA)

1.2 สารสกัดพญายอ :

ใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ 95% พญายอ ที่ผ่านการเตรียมตามวิธีของมูลนิธิโรงพยาบาลเจ้าพระยาอภัยภูเบศร ผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM-L-15-10% ในอัตราส่วน 1:100 จะได้ความเข้มข้น 9.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2. เซลล์เพาะเลี้ยง (cell line)

ใช้เคเอฟเซลล์ (KFC) (Hutoran *et al.*, 2005) (รูปที่ 3.1) โดยนำมาเลี้ยงในขวดสำหรับเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 (T-75) ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM-L-15-10% ทำการเลี้ยงเซลล์ไป 3 passages จนได้เซลล์ชั้นเดียวที่แข็งแรงสมบูรณ์และเพียงพอต่องานวิจัย จึงเริ่มนำไปทำการทดลองต่อไป



รูปที่ 3.1 แสดงภาพเคเอฟเซลล์ปกติ

3. การแยกและเก็บเชื้อไวรัส

ใช้เชื้อไวรัส KHV-T passage 13 ซึ่งเป็นเชื้อไวรัสเข้มข้นที่แยกได้จากปลาแฟนซีคาร์พที่ป่วยตาย ซึ่งได้ทำการตรวจยืนยันแล้วว่าการติดเชื้อไวรัสเคเอชวีด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่แบบซ้อน (nested PCR; IQ2000™ KHV Detection System, Farming IntelliGene Tech.Corp.®) ณ ศูนย์วิจัยโรคสัตว์น้ำ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยนำไวรัสเข้มข้นที่เก็บไว้มาทดสอบความมีชีวิตและคำนวณปริมาณซ้ำอีกครั้งโดยการดูการเสื่อมของเซลล์ แล้วนำมาหาปริมาณของไวรัสที่ทำให้เซลล์เสื่อมหรือตายไป 50% (Tissue Culture Infected Dose at 50%; TCID₅₀) ตามวิธีของ Reed and Muench (1938)

4. การทดสอบประสิทธิภาพของไวรัส (virus assay)

4.1 เตรียมเคเอฟเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15-4% ลงในถาด 96 หลุม (96-well plate) รอให้เซลล์เกาะประมาณ 95% ป่มที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

4.2 นำไวรัสเข้มข้นมาทำการเจือจางกับอาหาร L-15-2% ให้เป็น 10 เท่าไปเรื่อยๆ (10-fold serial dilution) ซึ่งจะได้ปริมาณไวรัสเจือจางที่ 10^0 ถึง 10^{-7} ส่วนแฉวที่เหลือใช้เป็นกลุ่มควบคุม (negative control)

4.3 ทำการดูดเอาอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมในถาด 96 หลุมออก แล้วเติมไวรัสเจือจางที่ 10^0 ถึง 10^{-7} ใส่ลงไป ในหลุม ในปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร โดยทำซ้ำลงมาทั้งหมดตามระดับไวรัสที่เจือจางระดับละ 7 แฉว ส่วนในหลุมที่เป็นกลุ่มควบคุมเติมอาหาร L-15-2% ในปริมาตร 50 ไมโครลิตร เช่นกัน

4.4 นำไปป่มที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ทำการดูดไวรัสออก แล้วเติมอาหาร L-15-2% 100 ไมโครลิตร ในทุกๆหลุม

4.5 นำไปป่มต่อที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส สังเกตการเสื่อมของเซลล์ทุกวัน จนกว่าจะคงที่ โดยทั่วไปจะใช้เวลาประมาณ 7-14 วัน

4.6 ทำการคำนวณหาปริมาณของไวรัสที่ทำให้เซลล์เสื่อมหรือตายไป 50% ตามวิธีของ Reed and Muench (1938)

5. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cellular cytotoxicity assay)

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดพญาอและยาอะซัยโคลเวียต่อเคเอฟเซลล์โดยแบ่งการทดลองเป็น

5.1 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดพญาอ

- เตรียมเซลล์ลงในถาด 24 หลุม (24-well plate) นำไปป่มที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมงจนเซลล์แผ่กระจายเต็มที่
- ทำการเจือจางสารสกัดพญาอด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 4% ที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 4.75, 0.95, 0.475, 0.095 และ 0.0095 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ
- เติมสารสกัดพญาอในแต่ละความเข้มข้นลงในหลุม ให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 500 ไมโครลิตร ทำซ้ำทั้งหมด 3 แถว โดยแถวควบคุมจะเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15-4% เพียงอย่างเดียวปริมาตร 500 ไมโครลิตร
- นำไปป่มที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง
- ตรวจสอบการมีชีวิตของเซลล์โดยย้อมเซลล์ด้วย 1% Trypan blue แล้วทำการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต เพื่อนำไปคำนวณอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ (% cell viability) ด้วย counting chamber (รูปที่ 3.2 ก) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (inverted microscope) (รูปที่ 3.2 ข) แล้วคำนวณหาร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ (% viability)
- ความเป็นพิษของสารสกัดพญาอต่อเคเอฟเซลล์จะดูจากสัดส่วนของเซลล์ที่มีชีวิต เปรียบเทียบกับเซลล์ในคอลัมน์ควบคุม โดยความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์ หรือ เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไป 50% ของเซลล์ทั้งหมด คือ 50% Cytotoxic Concentration (CC₅₀)

5.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของยาอะซัยโคลเวีย

- ทำการทดลองตามขั้นตอนเช่นเดียวกับข้อ 5.1 โดยเตรียมยาอะซัยโคลเวียที่ความเข้มข้น ตั้งแต่ 100, 50, 25, 10, 5, 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์
- การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของ DMSO ที่ใช้ในการละลายยา โดยเตรียม DMSO ที่ความเข้มข้น 0.1% และ 0.01% ในอาหารเลี้ยงเซลล์ แล้วเติมลงในเซลล์ให้มีปริมาตรสุดท้ายในหลุมเป็น 500 ไมโครลิตร ทำซ้ำทั้งหมด 3 แถว เช่นเดียวกัน



รูปที่ 3.2 ก) แสดงภาพของ counting chamber และ ข) แสดงภาพกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ

6. การทดสอบประสิทธิภาพในการต้านเชื้อไวรัส (Virus titer reduction assay)

การทดสอบประสิทธิภาพของยาอะซัยโคลเวียและสารสกัดพญาขอในการต้านไวรัส โดยทำการทดสอบทั้งหมด 3 ครั้ง ตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

- เตรียมเซลล์ใน ถาด 96 หลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 24 องศา นาน 24 ชั่วโมงรอให้เซลล์กระจายเต็มที่
- เตรียมไวรัสเคเอชวี (KHSV-T) ที่ Multiplicity of Infection (MOI) 0.01
- เตรียมยาอะซัยโคลเวียและสารสกัดพญาขอที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยเริ่มจากความเข้มข้นที่มากที่สุดของสารแต่ละตัวที่ทดสอบแล้วพบว่าไม่เกิดพิษต่อเซลล์ เจือจางลง 2-10 เท่า (2-10 fold dilution) ด้วย L-15-4%
- แบ่งการทดสอบการออกฤทธิ์ของยาและสมุนไพรต่อเชื้อเคเอชวีออกเป็น 2 ส่วน คือ

6.1 ทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดพญาอต่อเชื้อไวรัสก่อนเข้าสู่เซลล์ (pre-infection antiviral activity)

นำไวรัส KHV-T P13 เข้มข้น มาใส่ลงในสารสกัดพญาอความเข้มข้น 4.75, 0.95, 0.475, 0.095 และ 0.0095 mg/ml ที่เตรียมไว้ จากนั้นตั้งพักไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง แล้วนำมาทำการเจือจางลง 10 เท่า ตามปริมาณของเชื้อไวรัสทั้งหมด 4 ระดับ

ทำการดูดเอาอาหารเลี้ยงเซลล์ในถาด 96 หลุมออก แล้วเติมสารสกัดพญาอกับไวรัสที่เตรียมไว้ตามระดับการเจือจางต่างๆ ใส่ลงในหลุม ระดับการเจือจางละ 8 หลุม แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน อ่านและบันทึกผลในวันที่ 7 10 และ 14 แล้วนำผลที่ได้มาทำการคำนวณหาจุดเจือจางสิ้นสุด (end point dilution) ด้วยวิธีของ Reed and Muench (1938)

กลุ่มควบคุมที่ 1 คือ หลุมในแถวที่ทำการเติมเชื้อไวรัสเคเอชวีทีทำการเจือจาง 10 เท่า ตั้งแต่ 10^0 - 10^{-4} ลงในเซลล์ โดยไม่มีการใส่สารสกัดพญาอ

กลุ่มควบคุมที่ 2 คือ หลุมในแถวที่เติมอาหาร L-15-2% ลงในเซลล์ โดยที่ไม่มีไวรัสและไม่มีสารสกัดพญาอ

6.2 ทำการทดสอบประสิทธิภาพของยาอะซัยโคลเวียและสารสกัดพญาอในการยับยั้งการแบ่งตัวของเชื้อไวรัสหลังจากมีการติดเชื้อเข้าสู่เซลล์ (post-infection antiviral activity)

ทำการเพาะเชื้อไวรัส KHV-T P13 ลงในเซลล์เพาะเลี้ยง หลุมละ 50 ไมโครลิตร ตามความเจือจางตั้งแต่ 10^0 - 10^{-4} นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงดูดเอาไวรัสออก และเติมยาอะซัยโคลเวียในความเข้มข้น 10, 5, 1, 0.1 และ 0.01 $\mu\text{g/ml}$ (กลุ่มทดลองที่ 1) และเติมสารสกัดพญาอที่เตรียมไว้ในความเข้มข้น 0.95, 0.475, 0.095 และ 0.0095 mg/ml (กลุ่มทดลองที่ 2) ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร ความเจือจางละ 8 หลุม แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน อ่านและบันทึกผลในวันที่ 7, 10 และ 14 แล้วนำผลที่ได้มาทำการคำนวณหา end point dilution ด้วยวิธีของ Reed and Muench (1938)

กลุ่มควบคุมที่ 1 คือ หลุมในแถวที่ทำการเติมเชื้อไวรัสเคเอชวีทีทำการเจือจาง 10 เท่า ตั้งแต่ 10^0 - 10^{-4} ลงในเซลล์ โดยไม่มีการใส่ยาอะซัยโคลเวียหรือสารสกัดพญาอ

กลุ่มควบคุมที่ 2 คือ หลุมในแถวที่เติมอาหาร L-15-4% ลงในเซลล์ โดยที่ไม่มีไวรัสและไม่มีการใส่ยาหรือสารสกัดสมุนไพร

ทำการคำนวณหาความเข้มข้นของยาอะซัยโคลเวียและสารสกัดพญาอที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัสได้ 50% (50% effective concentration; EC_{50}) ด้วยวิธีคำนวณ end point dilution ของ Reed and Muench (1938)

7. การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

- 7.1 ทำการศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเคอเฟเซลล์ที่ได้รับยาอะซัยโคลเวียและสารสกัดพญาอในความเข้มข้นที่เกิดพิษต่อเซลล์ เปรียบเทียบกับเซลล์ปกติในกลุ่มควบคุม
- 7.2 ทำการศึกษาลักษณะของเชื้อไวรัสเคเอชวีในเคอเฟเซลล์ที่ได้รับยาอะซัยโคลเวียและสารสกัดพญาอในความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสและไม่เป็นพิษต่อเซลล์ เปรียบเทียบกับเชื้อไวรัสในเซลล์ที่ไม่ได้รับยาอะซัยโคลเวียและสารสกัดพญาอ
- 7.3 ทำการศึกษาลักษณะของเชื้อไวรัสเคเอชวีภายในเคอเฟเซลล์ ในความเข้มข้นของไวรัสที่ทำให้เกิดการเสื่อมของเซลล์อย่างสมบูรณ์

วิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Miwa *et al.*, 2007)

ทำการย่อยเซลล์จากหลุมที่ต้องการศึกษาด้วยเอนไซม์ทริปซิน (trypsin) จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยอัตราเร็ว 800 g นาน 5 นาที แล้วทำการตรึงด้วย 4% paraformaldehyde และ 5% glutaraldehyde ใน 0.1 m phosphate buffer นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์มาแช่ใน 1% aqueous osmium tetroxide นาน 1 ชั่วโมง แล้วถ่ายลงในสารละลายเอทานอลความเข้มข้นต่างๆตามลำดับ จากนั้นฝังลงในก้อนเรซิน นำไปตัดเป็นแผ่นบางๆแล้วย้อมด้วย uranyl acetate และ lead citrate จะได้ตัวอย่างที่พร้อมนำมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านเพื่อสังเกตความเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น

8. การแปลผลและการวิเคราะห์ผล

- 8.1 ทำการวิเคราะห์ผลความเป็นพิษของยาอะซัยโคลเวียและสารสกัดพญาอต่อเคอเฟเซลล์โดยการหาค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์มีชีวิตจากการทดลอง 3 ครั้งด้วยวิธี one way ANOVA โดยใช้โปรแกรม SPSS เปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม
- 8.2 ทำการคำนวณค่าอัตราการตายของเซลล์ (%mortality) นำมาสร้างกราฟ XY (Scatter) แล้วทำการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของยาอะซัยโคลเวียและสารสกัดพญาอที่ทำให้เซลล์ตายไปร้อยละ 50 (50% Cytotoxicity concentration)
- 8.3 ทำการคำนวณหา end point dilution ของเชื้อไวรัสจากการทดลองในการศึกษาผลการต้านเชื้อของยาอะซัยโคลเวียและสารสกัดพญาอ ด้วยวิธีของ Reed and Muench (1938) โดยความเข้มข้นของยาอะซัยโคลเวียหรือสารสกัดพญาอที่สามารถลดปริมาณเชื้อไวรัสลงได้มากกว่า 1 log₁₀ ขึ้นไป เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม จะถือว่าเป็นความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสได้ 90% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

บทที่ 4

ผลการทดลอง

ผลการทดลองนี้แบ่งออกเป็น 4 ส่วน คือ

- 4.1 การทดสอบประสิทธิภาพและคำนวณปริมาณของไวรัส
- 4.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเคเอฟเซลล์
- 4.3 การทดสอบประสิทธิภาพในการต้านเชื้อไวรัสของยาอะซัยโคลเวียและสารสกัดพญาอ
- 4.4 การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

4.1 การทดสอบประสิทธิภาพและคำนวณปริมาณของไวรัส

หลังจากทำการเพิ่มปริมาณของเชื้อ KHV-T P13 ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ลงในเคเอฟเซลล์แล้ว ทำการหาความเข้มข้นของไวรัสพบว่าเชื้อ KHV-T P13 มีปริมาณ 1.52×10^4 TCID₅₀/ml โดยทำการอ่านผลในวันที่ 14 ของการทดลอง เมื่อเซลล์เกิดการเสื่อม (Cytopathic Effect; CPE) อย่างชัดเจน และเกิดขึ้น >95% ของเซลล์ทั้งหมดแล้ว โดยเริ่มสังเกตเห็นความเปลี่ยนแปลงของเซลล์ได้ในวันที่ 6 หลังทำการเพาะเชื้อลงในเซลล์ (inoculation) การเปลี่ยนแปลงที่เริ่มสังเกตเห็นได้ คือ เซลล์จะหดตัวและมีช่องว่างเกิดขึ้นภายในไซโตพลาสซึม (cytoplasmic vacuolation) และจะเห็นได้ชัดเจนประมาณวันที่ 10 หลังการเพาะเชื้อ (รูปที่ 4.1ก) โดยจะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ประมาณวันที่ 14 พบลักษณะการเชื่อมกันของเซลล์ (cell fusion) เกิดการเสื่อมแบบ syncytium formation (รูปที่ 4.1ข) และเมื่อทำการสังเกตต่อไปจะพบว่าเซลล์จะเสื่อมตาย และหลุดออกจากกันหลุมลอยขึ้นมาเป็นลักษณะกลม ทำการอ่านผลตามจำนวนหลุมที่แสดงให้เห็นการเสื่อมในแต่ละความเข้มข้น แล้วนำมาคำนวณหาปริมาณของไวรัสที่สามารถฆ่าเซลล์ได้ 50% (50% Tissue Culture Infected Dose หรือ TCID₅₀) ตามวิธีของ Reed and Muench (1938) (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 แสดงวิธีการคำนวณปริมาณของไวรัสโดยวิธีของ Reed and Muench (1938)

Dilution of virus	Observed results				Accumulated results			
	CPE	No CPE	Ratio	%	CPE	No CPE	Ratio	%
10^{-1}	8	0	8/8	100	19	0	19/19	100
10^{-2}	6	2	6/8	75	11	2	11/13	84.62
10^{-3}	4	4	4/8	50	5	6	5/11	45.45
10^{-4}	1	7	1/8	12.5	1	13	1/14	7.14
10^{-5}	0	8	0/8	0	0	21	0/21	0
10^{-6}	0	8	0/8	0	0	29	0/29	0

$$\text{Proportionate distance} = (84.62 - 50) / (84.62 - 45.45)$$

$$= 34.62 / 39.17$$

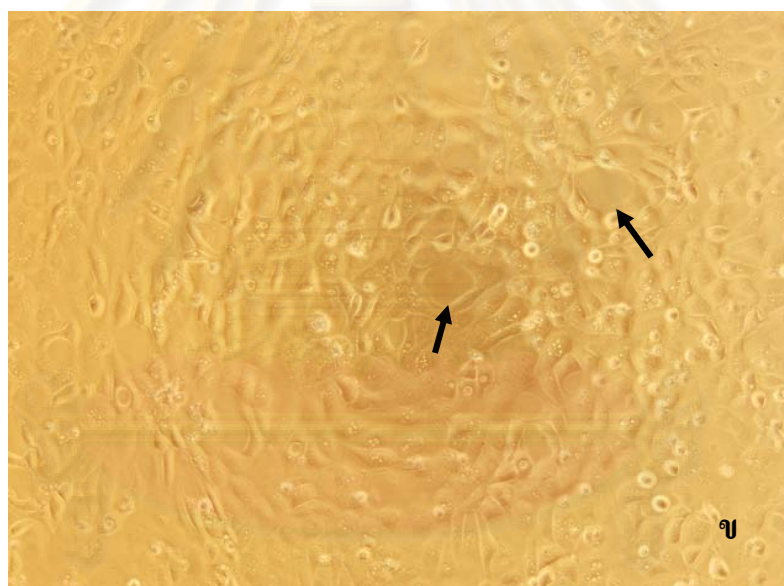
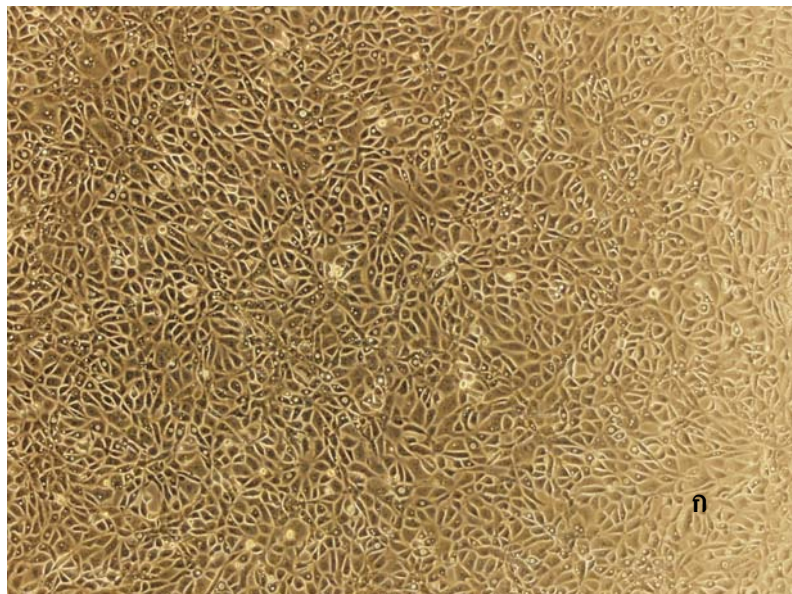
$$= 0.88$$

$$\text{Log of 50\% end point} = (-2) - (0.88)(1)$$

$$= -2.88$$

$$\text{ไวรัสมีปริมาณ} = 10^{2.88} = 7.6 \times 10^2 \text{ TCID}_{50}/0.05\text{ml}$$

$$= 1.52 \times 10^4 \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$$



รูปที่ 4.1 แสดงการเชื่อมของเซลล์ (CPE) หลังจากได้รับเชื้อไวรัส KHV-T P13 ในวันที่ 10 (รูป ที่ 4.1 ก) และ วันที่ 14 (รูปที่ 4.1 ข) ของการทดลอง พบลักษณะการเกิด syncytium formation (ลูกศรชี้)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

4.2.1 ผลของยาอะซัยโคลเวียต่อเคเอฟเซลล์

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยใช้ยาอะซัยโคลเวียที่ความเข้มข้น 100, 50, 25, 10, 5 และ 1 µg/ml และ ทดสอบความเป็นพิษของ DMSO ที่ใช้เป็นตัวละลายยา ในความเข้มข้น 0.1 และ 0.01% หลังจากทำการบ่มที่ 24 องศาเซลเซียสนาน 3 วัน นำเซลล์มาสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ ที่กำลังขยาย 40x พบว่า ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml มีเซลล์ตายเห็นเป็นเซลล์กลมลอยอยู่บนผิวเซลล์ปกติมากกว่าหลุมควบคุม และเมื่อทำการย้อมเซลล์เพื่อนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable) ด้วย counting chamber (รูปที่ 4.2 ก) โดยใช้สี 1% trypan blue ซึ่งจะย้อมติดเซลล์ที่ตายแล้วเห็นเป็นสีน้ำเงิน ในขณะที่เซลล์ที่มีชีวิตจะเห็นเป็นสีใส (รูปที่ 4.2 ข) ทำการคำนวณร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ (% viability) ดังนี้

$$\% \text{ viability} = \frac{\text{จำนวนเซลล์มีชีวิต}}{\text{จำนวนเซลล์มีชีวิต} + \text{จำนวนเซลล์ตาย}} \times 100$$

พบว่า DMSO ที่ 0.1 และ 0.01% ไม่เป็นพิษต่อเคเอฟเซลล์ ในขณะที่กลุ่มทดลองที่ความเข้มข้น 100, 50, 25 และ 10 µg/ml มีร้อยละของเซลล์มีชีวิต (% viability) ที่น้อยกว่าและมีความแตกต่างกับร้อยละของเซลล์มีชีวิตในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$ เมื่อใช้วิธีการคำนวณทางสถิติ Analysis of Variance (ANOVA) ด้วยโปรแกรม SPSS (ตารางที่ 4.2)

คำนวณหาความเข้มข้นที่ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ โดยทำการเปรียบเทียบหาร้อยละของเซลล์มีชีวิตในกลุ่มทดลองกับเซลล์มีชีวิตในกลุ่มควบคุม (% survival) และ ร้อยละอัตราการตายของเซลล์ (% mortality) (ตารางที่ 4.3) โดยนำค่าที่ได้มาทำการสร้างกราฟ XY (Scatter) ระหว่างร้อยละอัตราการตายของเซลล์ กับ ความเข้มข้นของยาอะซัยโคลเวีย พบว่ายาอะซัยโคลเวียในความเข้มข้นที่ทำให้เคเอฟเซลล์ตายไปเป็นจำนวน 50% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (50% cytotoxicity concentration) คือที่ความเข้มข้น 11.60 µg/ml (รูปที่ 4.3)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.2 ก) แสดง counting chamber ที่ใช้ในการนับเซลล์ ข) เซลล์มีชีวิตจะเห็นเป็นสีใส ไม่ติดสี trypan blue ส่วนเซลล์ที่ตายจะติดสีน้ำเงิน (ลูกศรชี้)

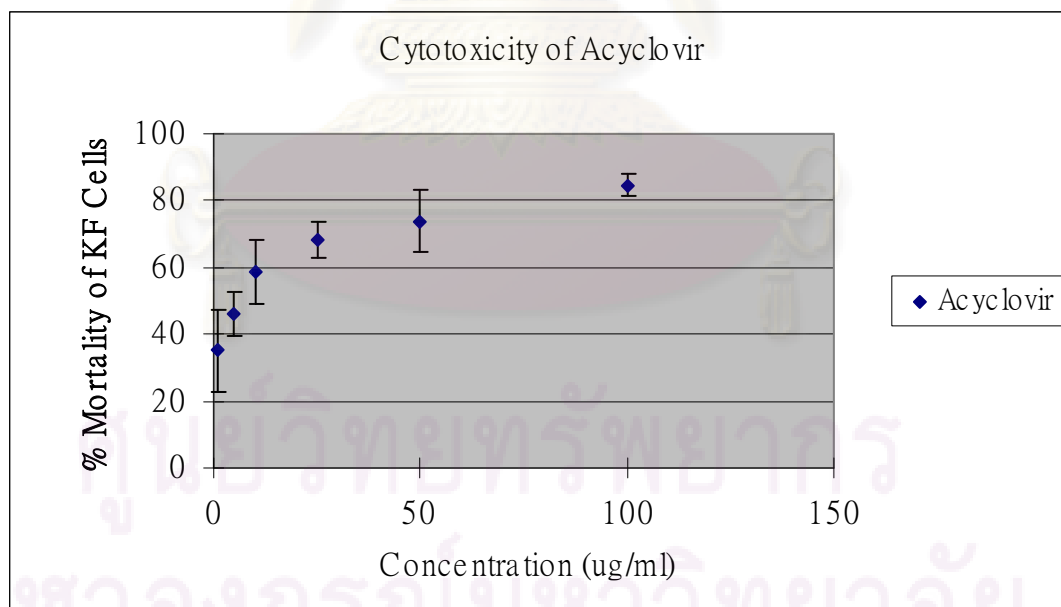
ตารางที่ 4.2 แสดงร้อยละของเซลล์มีชีวิตในการทดสอบความเป็นพิษของยาอะซัยโคลเวียต่อเคเอฟเซลล์

Conc. of acyclovir ($\mu\text{g/ml}$)	% Viability			
	Rep.1 (n=6)	Rep.2 (n=6)	Rep.3 (n=6)	Mean \pm SD
Control	96.18 \pm 1.02	97.46 \pm 0.57	97.15 \pm 1.44	96.93 \pm 1.24*
100	79.56 \pm 9.17	83.90 \pm 2.41	83.53 \pm 5.89	82.33 \pm 6.93*
50	88.03 \pm 4.46	88.38 \pm 2.27	91 \pm 2.94	89.14 \pm 3.70*
25	90.18 \pm 1.87	90.96 \pm 4.04	92.38 \pm 1.53	91.17 \pm 2.95*
10	94.30 \pm 1.54	94.35 \pm 2.14	93.6 \pm 2.17	94.08 \pm 2.05*
5	95.91 \pm 1.08	97.41 \pm 1.20	94.9 \pm 1.00	96.07 \pm 1.55
1	97.90 \pm 0.61	97.08 \pm 1.13	95.74 \pm 1.52	96.91 \pm 1.49
DMSO 0.1%	95.10 \pm 1.86	96.45 \pm 1.11	96.1 \pm 1.89	95.88 \pm 1.80
DMSO 0.01%	94.38 \pm 1.23	96.72 \pm 0.99	95.57 \pm 1.05	95.56 \pm 1.49

* แสดงค่าเฉลี่ยของเซลล์มีชีวิตที่มีความแตกต่างกันกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม (control) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$

ตารางที่ 4.3 แสดงการเปรียบเทียบหาร้อยละของเซลล์มีชีวิตในกลุ่มทดลองกับเซลล์มีชีวิตในกลุ่มควบคุม (% survival) และ ร้อยละอัตราการตายของเซลล์ (% mortality) ในการทดสอบความเป็นพิษของยาอะซัยโคลเวีย ต่อเซลล์เคเอฟซี

Conc. of acyclovir (µg/ml)	% Survival				% Mortality
	Rep.1 (n=6)	Rep.2 (n=6)	Rep.3 (n=6)	Mean ± SD	Mean ± SD
100	13.85 ± 3.84	12.46 ± 3.40	19.97 ± 2.20	15.41 ± 3.27	84.59 ± 3.27
50	18.66 ± 4.36	18.30 ± 2.63	39.25 ± 5.84	26.14 ± 9.30	73.86 ± 9.30
25	25.23 ± 7.97	26.67 ± 7.55	38.80 ± 6.36	31.70 ± 5.56	68.34 ± 5.56
10	32.54 ± 4.21	35.93 ± 3.22	54.31 ± 8.96	41.20 ± 9.43	58.80 ± 9.43
5	57.92 ± 9.36	38.45 ± 9.40	59.06 ± 6.91	53.85 ± 6.57	46.14 ± 6.57
1	61.32 ± 6.75	49.93 ± 5.38	81.39 ± 12.89	64.90 ± 12.27	35.10 ± 12.27
Control	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	0 ± 0



รูปที่ 4.3 แสดงร้อยละของเซลล์ที่ตายในความเข้มข้นต่างๆของยาอะซัยโคลเวีย

4.2.2 ผลของสารสกัดพญาอต่อเคเอฟเซลล์

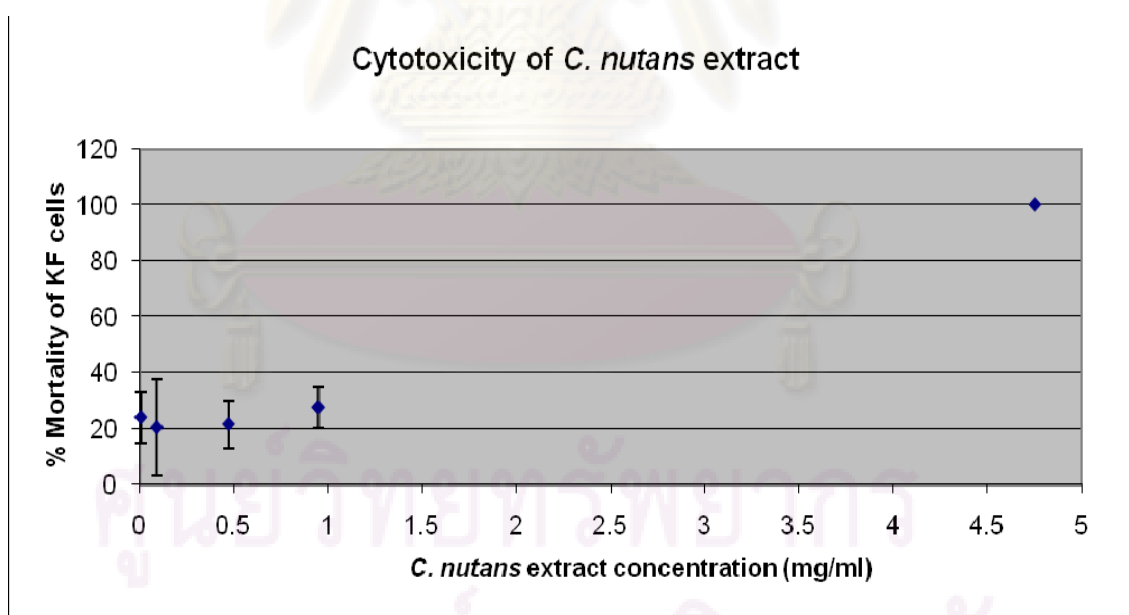
การทดลองความเป็นพิษต่อเซลล์โดยใช้สารสกัดพญาอที่ความเข้มข้น 4.75, 0.95, 0.475, 0.095, 0.0095 mg/ml หลังจากทำการบ่มที่ 24 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน นำเซลล์มาสังเกต ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ ที่กำลังขยาย 40x พบว่า ที่ความเข้มข้น 4.75 mg/ml เซลล์ทั้งหมดตายไม่เหลือเซลล์ปกติเกาะที่บริเวณก้นหลุมเลย โดยเมื่อทำการย้อมเซลล์เพื่อนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในกลุ่มทดลองที่ความเข้มข้น 0.95, 0.475, 0.095 และ 0.0095 mg/ml พบว่า ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตในกลุ่มทดลองทุกความเข้มข้นไม่มีความแตกต่างกับปริมาณเซลล์ในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) เมื่อใช้วิธีการคำนวณทางสถิติ Analysis of Variance (ANOVA) ด้วยโปรแกรม SPSS (ตารางที่ 4.4) แสดงว่าสารสกัดพญาอในความเข้มข้น 0.95, 0.475, 0.095 และ 0.0095 mg/ml ไม่ทำให้เกิดพิษต่อเคเอฟเซลล์ และเมื่อคำนวณหาความเข้มข้นที่ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ โดยทำการเปรียบเทียบหาร้อยละอัตราส่วนของเซลล์ที่มีชีวิตในกลุ่มทดลองกับเซลล์ที่มีชีวิตในกลุ่มควบคุม (% cell survival) และ ร้อยละอัตราการตายของเซลล์ (% mortality) (ตารางที่ 4.5) โดยนำค่าที่ได้มาทำการสร้างกราฟ XY (Scatter) ระหว่างร้อยละอัตราการตายของเซลล์ (%mortality) กับ ความเข้มข้นของสารสกัดพญาอ พบว่าสารสกัดพญาอในความเข้มข้นที่ทำให้เคเอฟเซลล์ตายไปเป็นจำนวน 50% ของเซลล์ทั้งหมด (50% cytotoxicity concentration) คือที่ความเข้มข้น 1.9 mg/ml (รูปที่ 4.4) ในขณะที่การทดสอบความเป็นพิษของสารที่ใช้ละลายสารสกัดพญาอ คือ แอลกอฮอล์พบว่าไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเคเอฟเซลล์ที่ใช้ในการทดลอง (preliminary study)

ตารางที่ 4.4 แสดงร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตในการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดพญาอต่อเคเอฟเซลล์

Conc. of C. <i>nutans</i> (mg/ml)	% Viability			
	Rep.1 (n=6)	Rep.2 (n=6)	Rep.3 (n=6)	Mean \pm SD
Control	96.11 \pm 1.10	95.94 \pm 0.88	98.27 \pm 0.40	96.77 \pm 1.39
0.95	94.78 \pm 1.40	97.35 \pm 1.23	98.05 \pm 0.79	96.72 \pm 1.88
0.475	94.15 \pm 1.64	97.19 \pm 1.00	97.16 \pm 1.34	96.17 \pm 2.02
0.095	98.23 \pm 0.79	96.24 \pm 1.45	97.56 \pm 0.59	97.34 \pm 1.34
0.0095	96.99 \pm 1.08	96.25 \pm 1.17	98.06 \pm 0.62	97.10 \pm 1.26

ตารางที่ 4.5 แสดงการเปรียบเทียบหาร้อยละของเซลล์มีชีวิตในกลุ่มทดลองกับเซลล์มีชีวิตในกลุ่มควบคุม (% survival) และ ร้อยละอัตราการตายของเซลล์ (% mortality) ในการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดพญายอ ต่อเซลล์เคเอฟซี

Conc. of <i>C. nutans</i> (mg/ml)	% Survival				% Mortality
	Rep.1 (n=6)	Rep.2 (n=6)	Rep.3 (n=6)	Mean \pm SD	Mean \pm SD
4.75	0	0	0	0	100 \pm 0
0.95	74.31 \pm 19.87	80.87 \pm 21.35	62.78 \pm 6.60	72.65 \pm 7.48	27.35 \pm 7.48
0.475	67.82 \pm 33.24	79.33 \pm 19.94	88.64 \pm 7.66	78.60 \pm 8.51	21.40 \pm 8.51
0.095	60.15 \pm 5.67	101.99 \pm 26.50	77.17 \pm 13.52	79.77 \pm 17.18	20.23 \pm 17.18
0.0095	64.58 \pm 10.63	87.27 \pm 14.92	76.73 \pm 9.73	76.19 \pm 9.27	23.81 \pm 9.27
Control	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	0

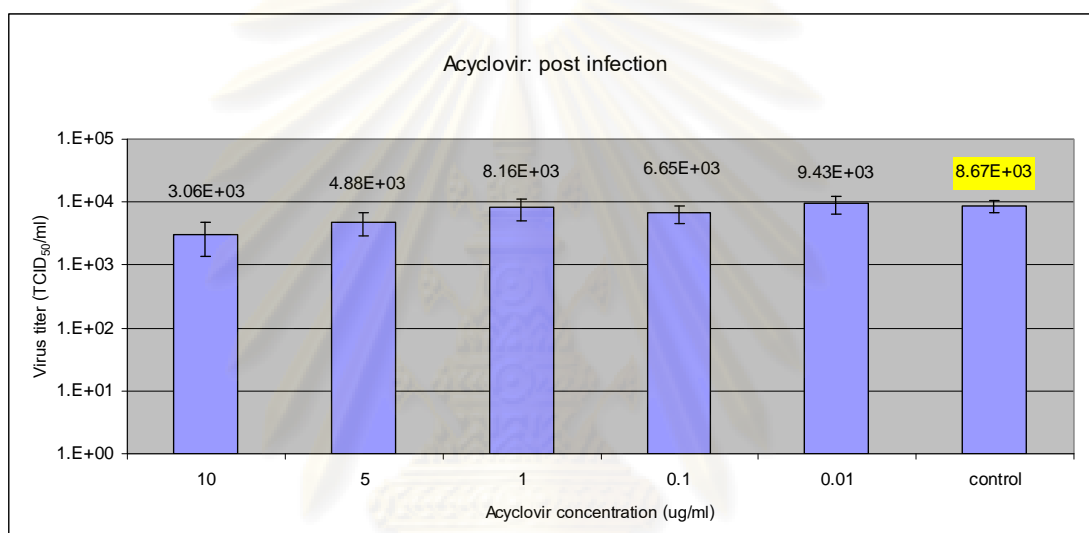


รูปที่ 4.4 แสดงอัตราส่วนร้อยละของเซลล์ที่ตายในความเข้มข้นต่างๆของสารสกัดพญายอ

4.3 การทดสอบประสิทธิภาพในการต้านเชื้อไวรัส (Virus titer reduction assay)

4.3.1 ผลของยาอะซัยโคลเวียตต่อเชื้อไวรัสเคเอชวี

ทำการทดสอบประสิทธิภาพในการต้านเชื้อไวรัสหลังจากเชื้อเข้าสู่เซลล์ (post infection antiviral activity) จากการทดลองทั้ง 3 ครั้งพบว่าเชื้อเคเอชวีในกลุ่มควบคุมมีปริมาณ $8.67 \times 10^3 \pm 2.01 \times 10^3$ TCID₅₀/ml และเมื่อทำการสร้างกราฟเซมิล็อกฐานสิบ (semi log₁₀) ปริมาณของไวรัสกับความเข้มข้นของยาอะซัยโคลเวีย พบว่ายาอะซัยโคลเวียที่ใช้ในการทดลองทุกความเข้มข้นไม่สามารถที่จะลดปริมาณของเชื้อลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 4.5)

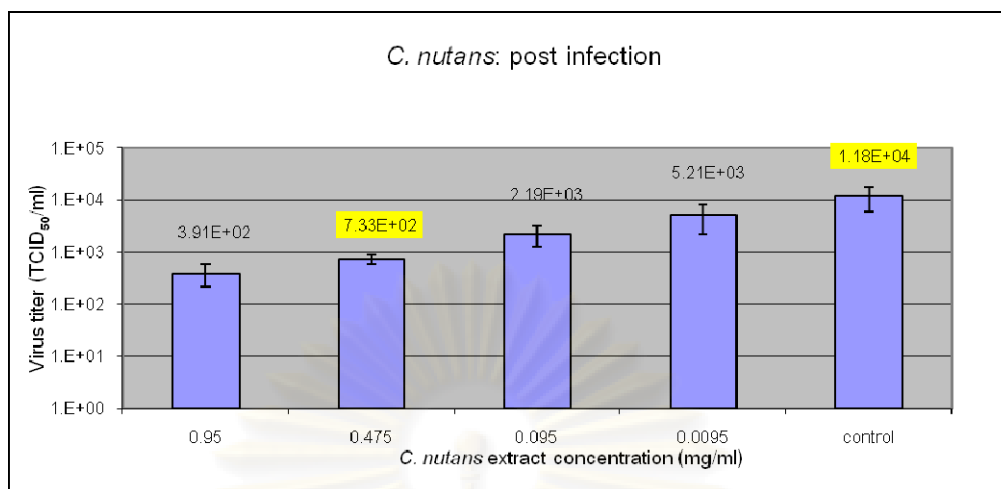


รูปที่ 4.5 แสดงปริมาณของไวรัสเคเอชวีที่ได้จากการทดลองใช้ยาอะซัยโคลเวียความเข้มข้นต่างๆ เพื่อต้านเชื้อไวรัสหลังติดเข้าสู่เซลล์

4.3.2 ผลของสารสกัดพญาอต่อเชื้อไวรัสเคเอชวี

4.3.2.1 ทำการทดสอบประสิทธิภาพในการต้านเชื้อไวรัสหลังจากเชื้อเข้าสู่เซลล์ (Post infection antiviral activity)

จากการทดลองทั้ง 3 ครั้งพบว่าเชื้อเคเอชวีในกลุ่มควบคุมมีปริมาณ $1.18 \times 10^4 \pm 5.9 \times 10^3$ TCID₅₀/ml เมื่อทำการสร้างกราฟเซมิล็อกฐานสิบ (semi log₁₀) ปริมาณของไวรัสกับความเข้มข้นของสารสกัดพญาอพบว่า ความเข้มข้นของสารสกัดพญาอที่สามารถยับยั้งปริมาณของเชื้อได้ (effective end-point concentration) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (>1 log₁₀) คือที่ความเข้มข้น 0.475 mg/ml ขึ้นไป โดยสามารถลดปริมาณเชื้อลงเหลือ $7.33 \times 10^2 \pm 1.43 \times 10^2$ TCID₅₀/ml (รูปที่ 4.6)



รูปที่ 4.6 แสดงปริมาณของไวรัสเคเอชวีที่ได้จากการทดลองใช้สารสกัดพญายอความเข้มข้นต่างๆ เพื่อต้านเชื้อไวรัสหลังติดเข้าสู่เซลล์

4.3.2.2 ทำการทดสอบประสิทธิภาพในการต้านเชื้อไวรัสก่อนเชื้อเข้าสู่เซลล์ (Pre-infection antiviral activity)

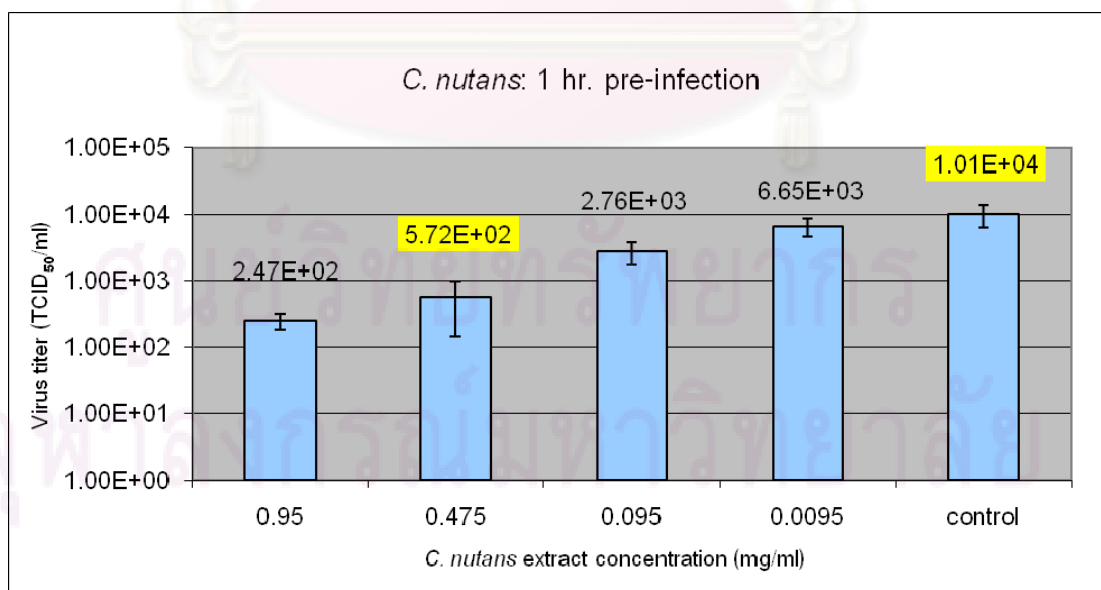
ทำการทดสอบโดยใช้สารสกัดพญายอความเข้มข้นต่างๆ ลงในเชื้อเคเอชวีแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ จากการทดลอง 3 ครั้ง พบว่าเชื้อไวรัสในกลุ่มควบคุมมีปริมาณ $1.01 \times 10^4 \pm 3.73 \times 10^3$ TCID₅₀/ml โดยความเข้มข้นของสารสกัดพญายอที่สามารถลดปริมาณของเชื้อไวรัสได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.475 mg/ml ขึ้นไป ทั้งที่ 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง โดยปริมาณเฉลี่ยของไวรัสที่ได้รับสารสกัดพญายอในความเข้มข้นต่างๆ แสดงดังในตารางที่ 4.6 ปริมาณของเชื้อที่ใช้สารสกัดพญายอในความเข้มข้น 0.475 mg/ml คือ $5.72 \times 10^2 \pm 4.31 \times 10^2$, $8.94 \times 10^2 \pm 2.23 \times 10^2$, $8.14 \times 10^2 \pm 2.57 \times 10^2$ และ $9.49 \times 10^2 \pm 7.69 \times 10^2$ ที่เวลา 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมงตามลำดับ ซึ่งมีค่าต่ำกว่าปริมาณเชื้อในกลุ่มควบคุมมากกว่า 1 log₁₀ ขึ้นไป (รูปที่ 4.7, 4.8, 4.9 และ 4.10)

จากการสร้างแผนภาพแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของไวรัสกับความเข้มข้นของสารสกัดพญายอในชั่วโมงต่างๆ (รูปที่ 4.11) พบว่า ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 0.475 mg/ml และ 0.95 mg/ml มีแนวโน้มของปริมาณเชื้อลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 จนถึงชั่วโมงที่ 4

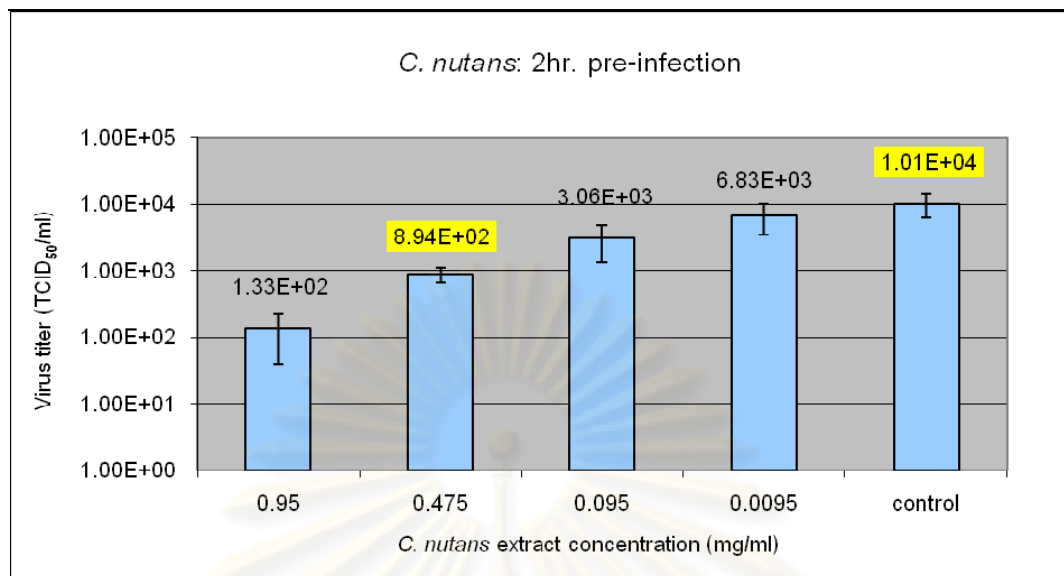
ตารางที่ 4.6 แสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณไวรัสเมื่อใช้สารสกัดพญายอในความเข้มข้นต่างๆที่ 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง

Incubation time	<i>C. nutans</i> extract concentrations (mg/ml)				
	0.95*	0.475*	0.095	0.0095	Control
1 hour	2.47E+02 ± 6.58E+01	5.72E+02 ± 4.31E+02	2.76E+03 ± 1.07E+03	6.65E+03 ± 2.09E+03	1.01E+04 ± 3.73E+03
2 hour	1.33E+02 ± 9.42E+01	8.94E+02 ± 2.23E+02	3.06E+03 ± 1.72E+03	6.83E+03 ± 3.41E+03	1.01E+04 ± 3.73E+03
3 hour	1.33E+02 ± 9.42E+01	8.14E+02 ± 2.57E+02	5.21E+03 ± 3.07E+03	9.37E+03 ± 3.60E+03	1.01E+04 ± 3.73E+03
4 hour	3.51E+02 ± 1.99E+02	9.49E+02 ± 7.69E+02	2.76E+03 ± 1.07E+03	6.17E+03 ± 2.27E+03	1.01E+04 ± 3.73E+03

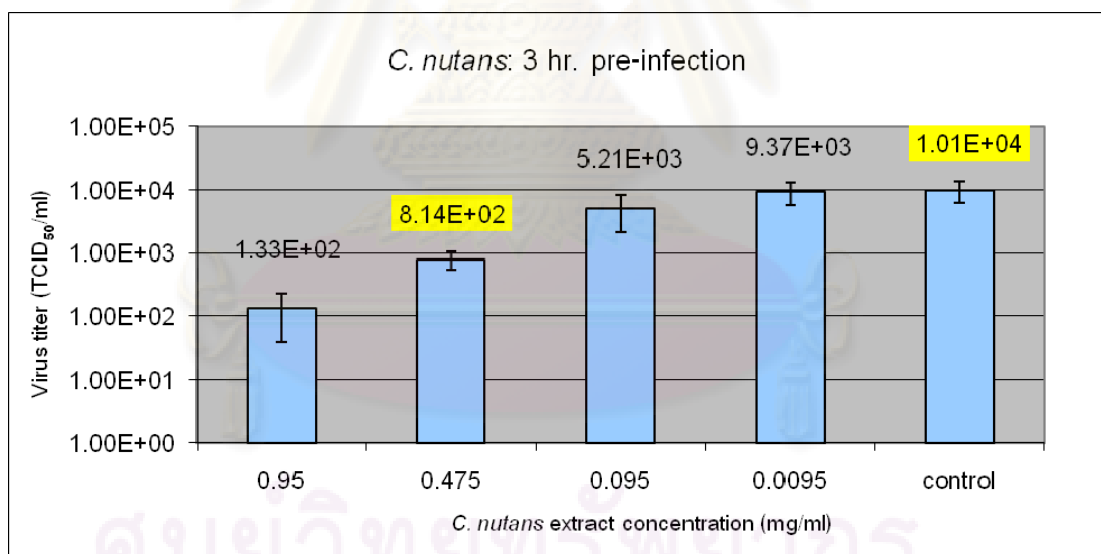
*แสดงค่าความเข้มข้นของสารสกัดพญายอที่มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณเชื้อไวรัสลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



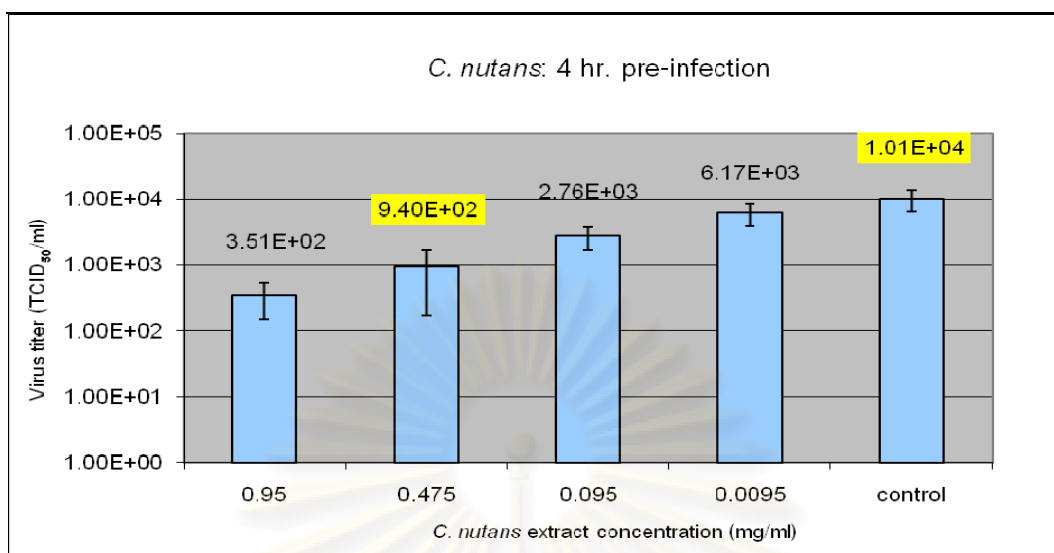
รูปที่ 4.7 แสดงปริมาณของไวรัสเมื่อได้รับสารสกัดพญายอความเข้มข้นต่างๆ เพื่อด้านเชื้อไวรัสก่อนการติดเชื้อเข้าสู่เซลล์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง



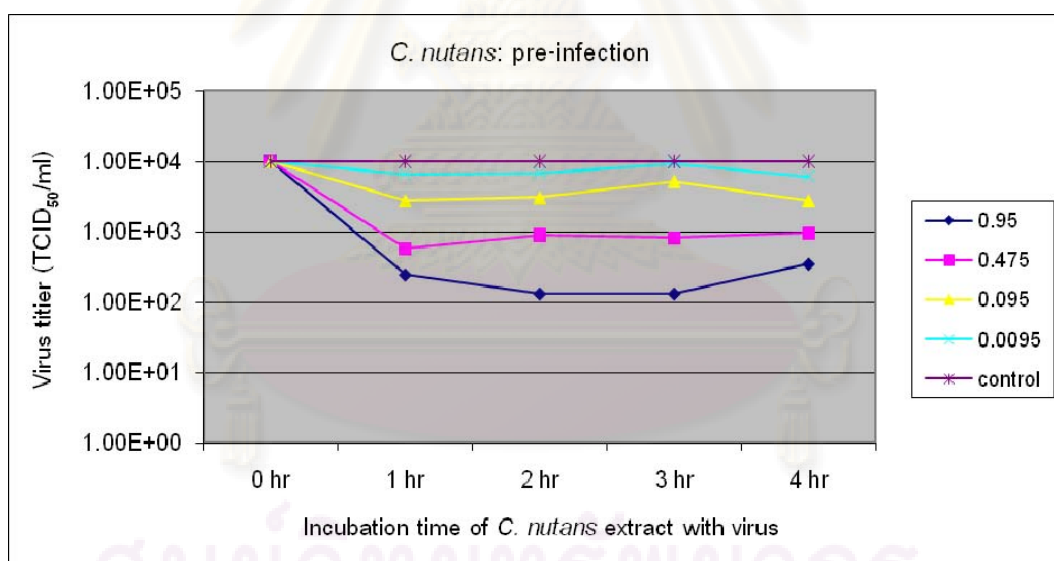
รูปที่ 4.8 แสดงปริมาณของไวรัสเมื่อได้รับสารสกัดพญายอความเข้มข้นต่างๆ เพื่อด้านเชื้อไวรัสก่อนการติดเชื้อเข้าสู่เซลล์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง



รูปที่ 4.9 แสดงปริมาณของไวรัสเมื่อได้รับสารสกัดพญายอความเข้มข้นต่างๆ เพื่อด้านเชื้อไวรัสก่อนการติดเชื้อเข้าสู่เซลล์เป็นเวลา 3 ชั่วโมง



รูปที่ 4.10 แสดงปริมาณของไวรัสเมื่อได้รับสารสกัดพญายอความเข้มข้นต่างๆ เพื่อต้านเชื้อไวรัสก่อนการติดเชื้อเข้าสู่เซลล์เป็นเวลา 4 ชั่วโมง



รูปที่ 4.11 แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณเชื้อเมื่อใช้สารสกัดพญายอความเข้มข้นต่างๆ เพื่อต้านเชื้อไวรัสก่อนการติดเชื้อเข้าสู่เซลล์ ที่เวลา 1-4 ชั่วโมง

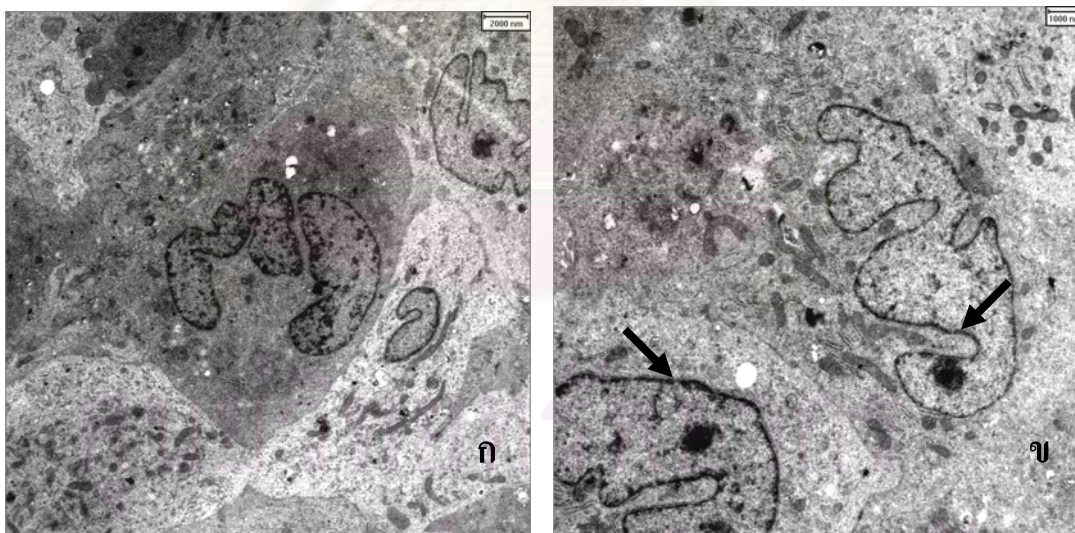
4.4 การศึกษาดัวยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

ทำการศึกษาลักษณะของเคอเฟเซลล์และการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่านด้วยกำลังขยายตั้งแต่ 1000 เท่าขึ้นไป พบลักษณะของเซลล์และการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น ดังนี้

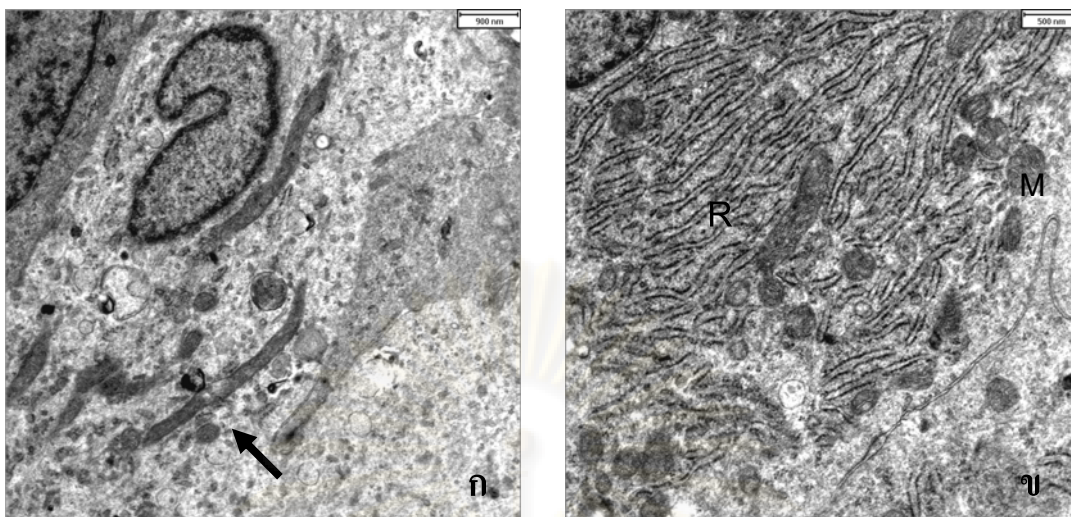
4.4.1 การศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเคอเฟเซลล์ที่ได้รับยาอะซัยโคลเวียและสารสกัดพญาอินความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ เปรียบเทียบกับเซลล์ปกติในกลุ่มควบคุม

ลักษณะของเซลล์ปกติ

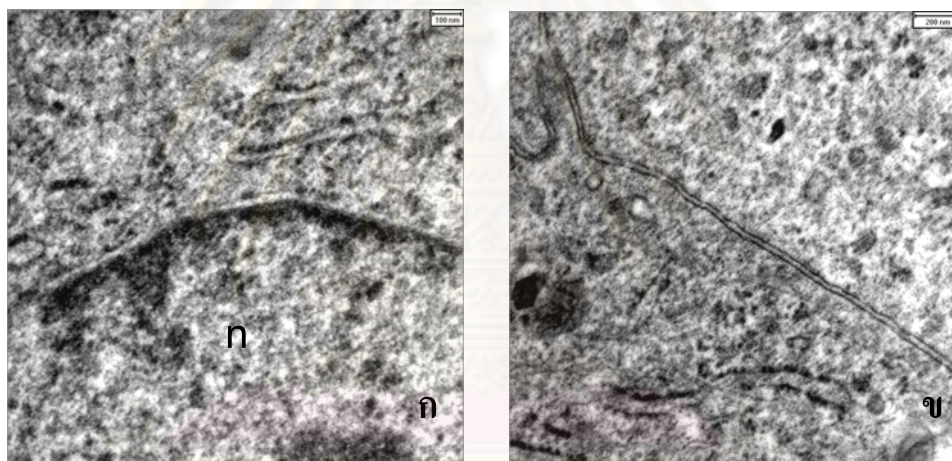
เคอเฟเซลล์มีขนาด 12,000-15,000 นาโนเมตร มีนิวเคลียสเป็นพู (lobulated nucleus) และมี nucleolus สีเข้มอยู่ภายในนิวเคลียส (รูปที่ 4.12 ก และ ข) เยื่อหุ้มนิวเคลียส (nuclear membrane) มีสองชั้น (bilayer) (รูปที่ 4.14 ก) ภายในไซโตพลาสซึมพบเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมชนิดหยาบ (Rough Endoplasmic Reticulum: RER) มีลักษณะเป็นแผ่นขดไปมาหลายชั้น โดยมีไมโทคอนเดรีย (mitochondria) แทรกอยู่เห็นเป็นหน้าตัดกลม (cross section) หรือ หน้าตัดยาว (long section) คล้ายท่อ (tubular) (รูปที่ 4.13) เยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) มีสองชั้น (รูปที่ 4.14 ข)



รูปที่ 4.12 แสดงลักษณะของเซลล์ปกติ เห็นนิวเคลียสเป็นพู และมีนิวคลีโอลัส (ลูกศรชี้) สีเข้มอยู่ภายในนิวเคลียส; ก) scale bar = 2000 nm. และ ข) scale bar = 1000 nm.



รูปที่ 4.13 ก) แสดงหน้าตัดของไมโทคอนเดรียที่ยาว มีลักษณะเป็นท่อ (tubular) (ลูกศรชี้) ข) แสดงให้เห็น RER (R) และ ไมโทคอนเดรีย (M) ในไซโตพลาสซึม; scale bar = 900 nm.

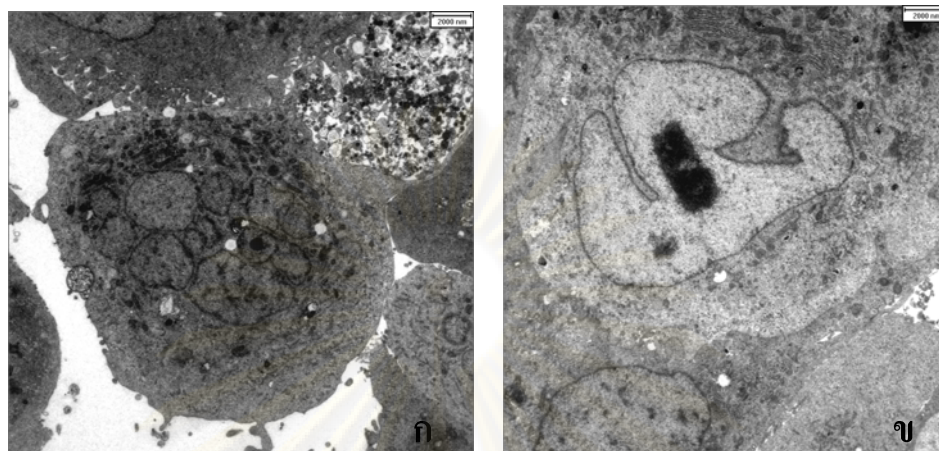


รูปที่ 4.14 ก) แสดงเยื่อหุ้มนิวเคลียส (nuclear membrane); scale bar = 100 nm. ข) แสดงลักษณะของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane); n = nucleus; scale bar = 200 nm.

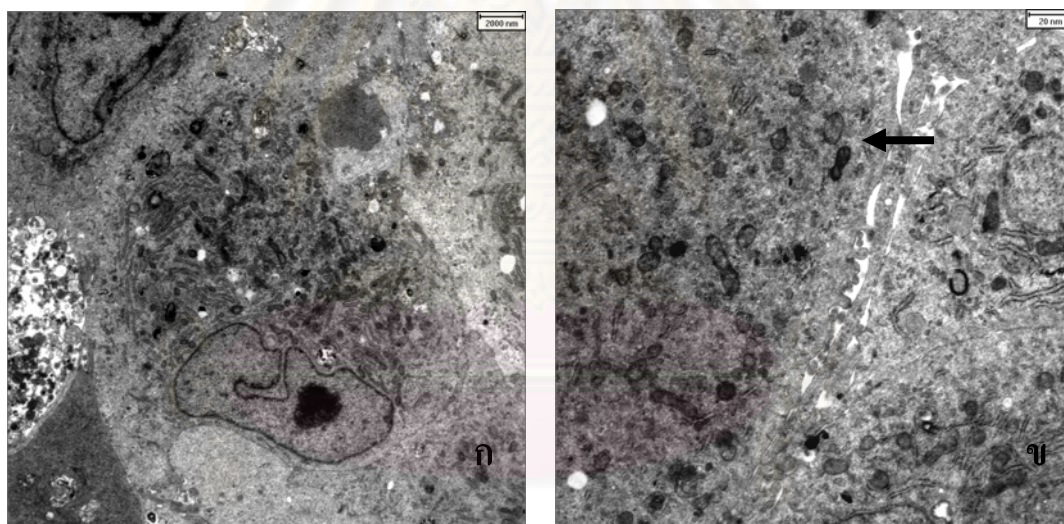
เซลล์ที่ได้รับยาอะซัยโคลเวียในความเข้มข้นที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์

ทำการเลือกตัวอย่างของเซลล์ที่ได้รับยาอะซัยโคลเวียในความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาสังเกตความเป็นพิษต่อเซลล์ที่เกิดขึ้น พบว่า เมื่อทำการดูที่กำลังขยาย 1000 เท่า สังเกตพบเซลล์ที่เสียรูปร่าง เซลล์ที่มีความผิดปกติของนิวเคลียสซึ่งถูกทำลายและแตกออกจากกัน (รูปที่ 4.15 ก) นิวคลีโอลัสมีขนาดใหญ่และมีสีเข้มขึ้น (dense) (รูปที่ 4.15 ข) โดยเมื่อทำการดูที่กำลังขยายเพิ่มขึ้นพบว่าไมโทคอนเดรียมีความเด่นชัด (prominent) มากขึ้น บางเซลล์พบไมโทคอนเดรียมีสีเข้มและผนังหนาขึ้น (รูปที่ 4.16 ข) และพบลักษณะของช่องว่าง (vacuole) แทรกอยู่ภายในไซโต

พลาสม์ซีมของเซลล์ (รูปที่ 4.16 ก) เยื่อหุ้มนิวเคลียสและเยื่อหุ้มเซลล์เซลล์บางส่วนเกิดการฉีกขาด (รูปที่ 4.17 ก และ ข)

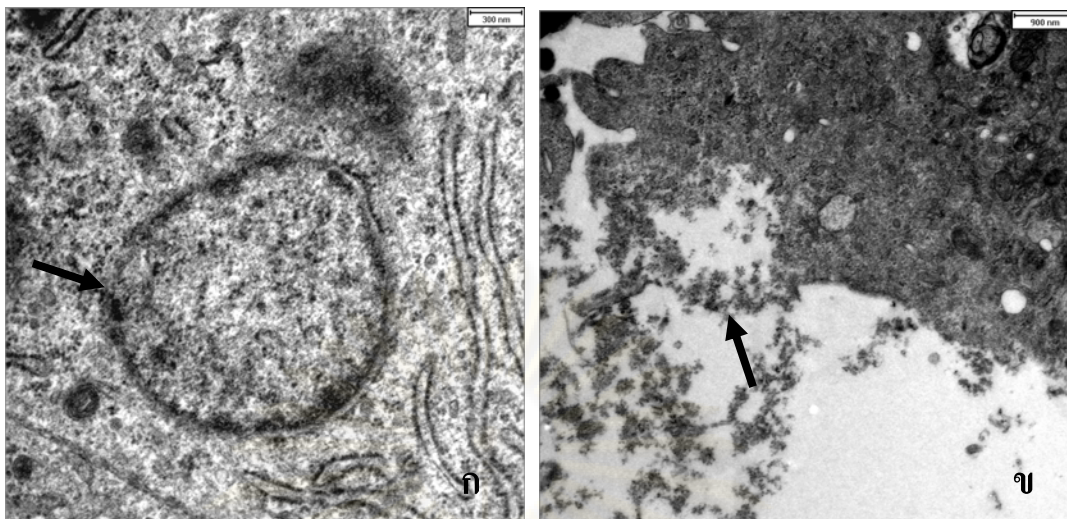


รูปที่ 4.15 ก) แสดงลักษณะของเซลล์ที่มีความผิดปกติในส่วนของนิวเคลียส และ ข) เซลล์ที่มีนิวเคลียสโอลด์ขนาดใหญ่และสีเข้ม; scale bar = 2000 nm.



รูปที่ 4.16 ก) แสดงภาพเซลล์ที่ผิดปกติ มีช่องว่างภายในไซโตพลาสซึม; scale bar = 2,000 nm. และ ข) ภาพของไมโทคอนเดรียที่มีสีเข้มและผนังหนา (ลูกศรชี้); scale bar = 20 nm.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

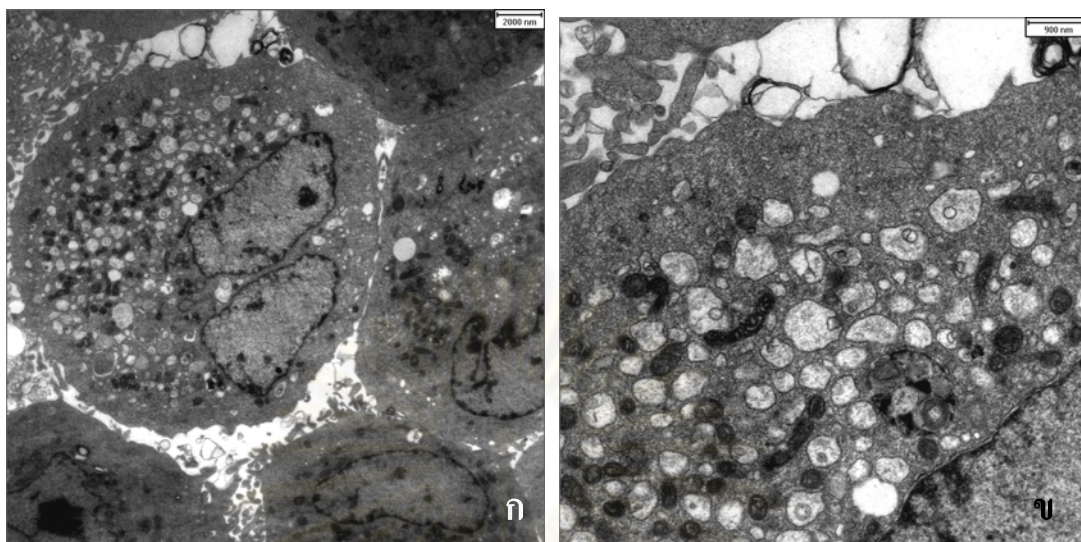


รูปที่ 4.17 ก) แสดงความเสียหายของเยื่อหุ้มนิวเคลียสบางส่วน (ลูกศรชี้); scale bar = 300 nm. และ ข) แสดงความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้มีส่วนประกอบของไซโตพลาสซึม (ลูกศรชี้) ไหลออกมาภายนอกเซลล์; scale bar = 900 nm.

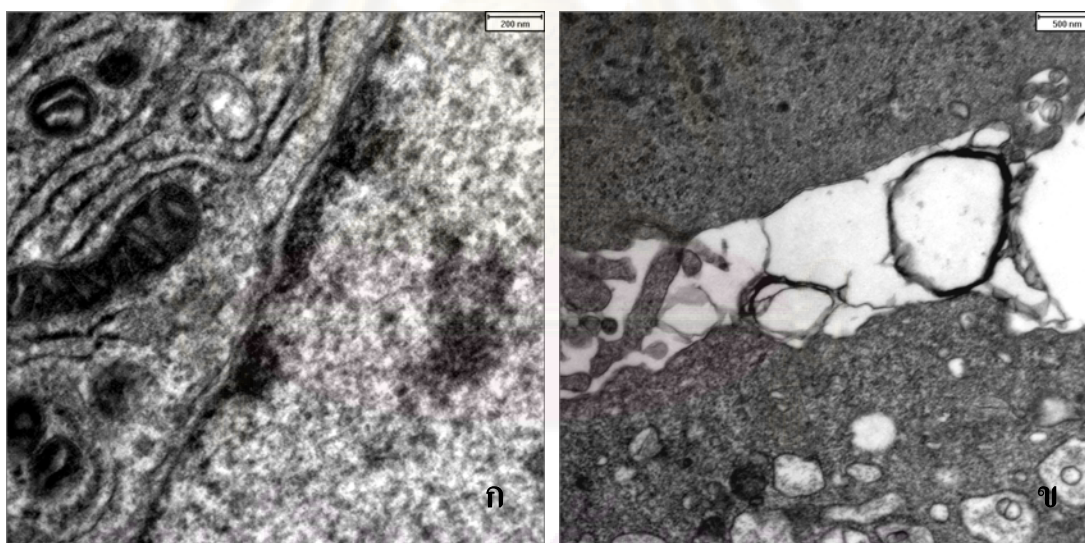
เซลล์ที่ได้รับสารสกัดพญาอินความเข้มข้นที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์

ทำการเลือกตัวอย่างของเซลล์ที่ได้รับสารสกัดพญาอินความเข้มข้น 4.75 mg/ml มาสังเกตความเป็นพิษต่อเซลล์ที่เกิดขึ้น พบว่า เมื่อทำการดูที่กำลังขยาย 1000 เท่า พบลักษณะของออร์แกเนลล์ที่ผิดปกติ และมีช่องว่างอยู่ภายในไซโตพลาสซึมเป็นจำนวนมาก (รูปที่ 4.18 ก) ส่วนนิวเคลียสและนิวคลีโอลัสผิดปกติ เมื่อทำการดูที่กำลังขยายสูงขึ้นพบว่าช่องว่างที่เห็นส่วนหนึ่งคือ การขยายออกของเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมชนิดหยาบ (dilated RER) และพบว่าไมโทคอนเดรียส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นกระจุก (condense) และติดสีอิเล็กตรอนเข้ม (electron dense) (รูปที่ 4.18 ข) เริ่มมีการเสื่อมเกิดขึ้น โดย ไมโทคอนเดรียที่เกิดการเสื่อมจะเห็นภายในมีลักษณะเป็นช่องว่าง (รูปที่ 4.20 ข) ส่วนของนิวเคลียสและเยื่อหุ้มผิดปกติ (รูปที่ 4.19 ก, 4.20 ก) ในขณะที่เยื่อหุ้มเซลล์ดูแคบลงและมีความเสียหายเกิดขึ้นเล็กน้อย (รูปที่ 4.19 ข)

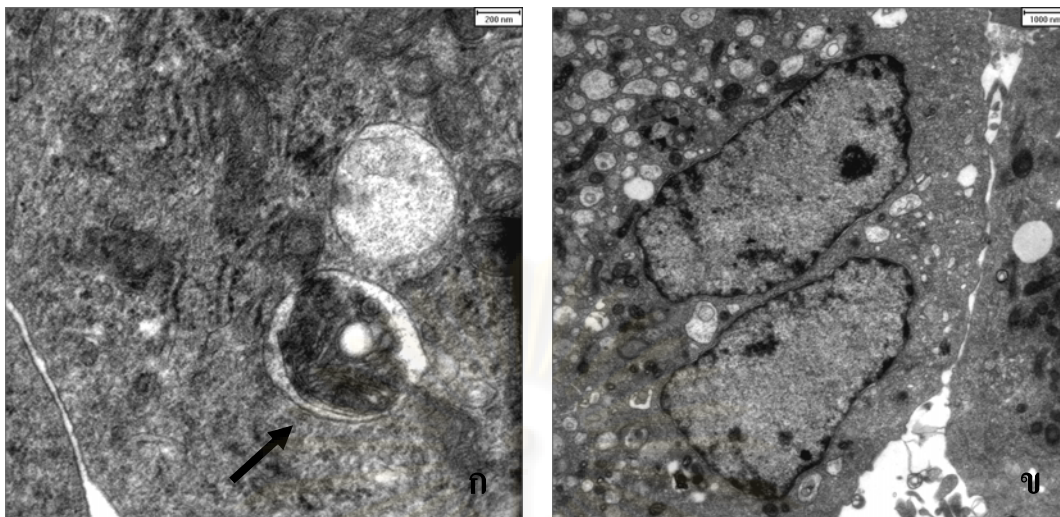
ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.18 ก) แสดงภาพของเซลล์ที่มีความผิดปกติของออร์แกเนลล์ในไซโตพลาสซึม โดยจะเห็นช่องว่างมากมายภายในไซโตพลาสซึม; scale bar = 2000 nm. ข) เมื่อดูที่กำลังขยายสูงจะพบลักษณะของ RER ที่ขยายตัวออก และไมโทคอนเดรียที่มีความเข้มของอิเล็กตรอนเพิ่มมากขึ้น; scale bar = 900 nm.



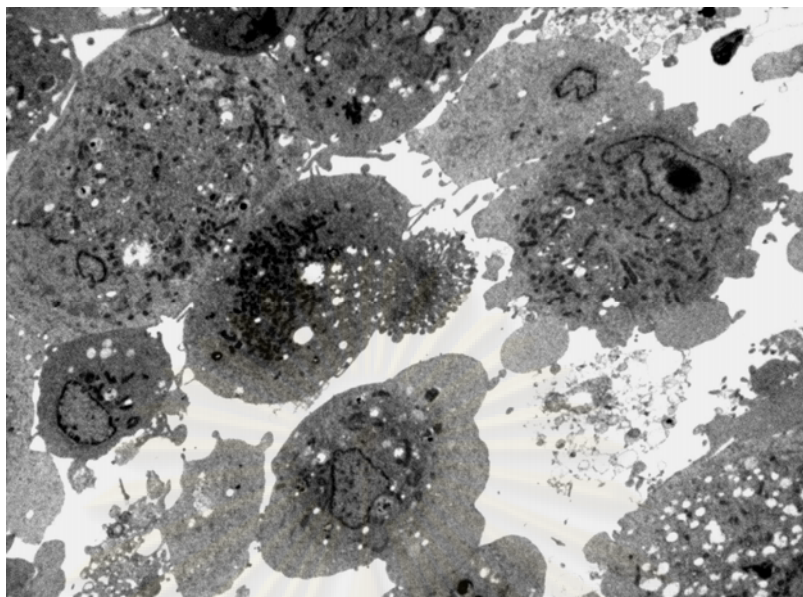
รูปที่ 4.19 ก) แสดงเยื่อหุ้มนิวเคลียสที่มีสองชั้น (bilayer) สมบูรณ์; scale bar = 200 nm. ข) แสดงเยื่อหุ้มเซลล์ที่ถูกทำลายและไม่เห็นลักษณะของเยื่อหุ้มสองชั้นแบบปกติ; scale bar = 500 nm.



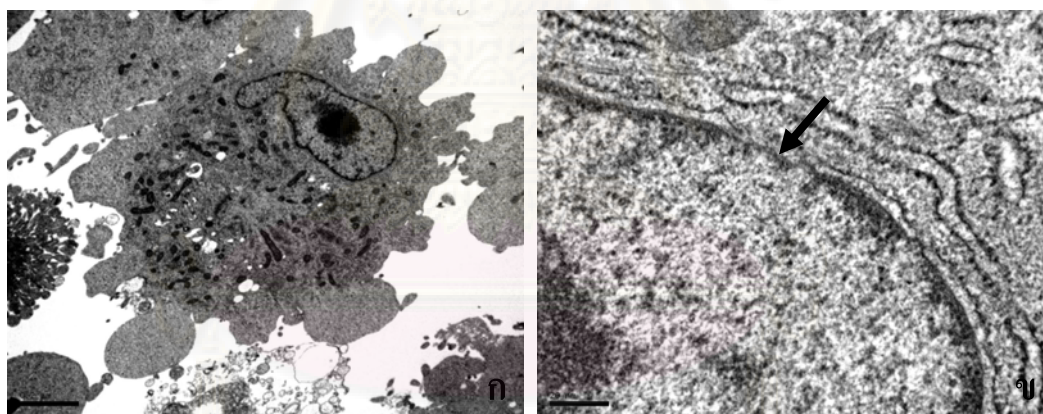
รูปที่ 4.20 ก) แสดงภาพหน้าตัดของไมโทคอนเดรียที่เริ่มมีการเสื่อม (ลูกศรชี้) และ ที่เกิดการเสื่อมแล้วเหลือเป็นเพียงช่องว่างในไซโตพลาสซึม; scale bar = 200 nm. ข) แสดงให้เห็นลักษณะของนิวเคลียสและนิวคลีโอลัสที่ปกติในขณะที่เกิดความผิดปกติในไซโตพลาสซึม; scale bar = 1000 nm.

4.4.2 การศึกษาลักษณะของเชื้อไวรัสเคเอชวีภายในเซลล์ ในความเข้มข้นของไวรัสที่ทำให้เกิดการเสื่อมของเซลล์อย่างสมบูรณ์

ทำการเก็บตัวอย่างเซลล์ที่ได้รับเชื้อไวรัสเคเอชวีในปริมาณ 1.52×10^4 TCID₅₀/ml ในวันที่ 14 ของการทดลองซึ่งพบลักษณะการเสื่อม (CPE) อย่างสมบูรณ์ มาทำการตรวจดูสภาพการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านที่กำลังขยายต่ำ พบว่าเซลล์โดยส่วนใหญ่เกิดความผิดปกติ (รูปที่ 4.21) โดยบางเซลล์พบลักษณะการถูกทำลายของนิวเคลียส นิวคลีโอลัสขยายใหญ่และติดสีเข้ม เยื่อหุ้มนิวเคลียสเสียหายบางส่วน (รูปที่ 4.22 ข) มีความผิดปกติของออร์แกเนลล์และพบช่องว่างในไซโตพลาสซึม (รูปที่ 4.22 ก) เยื่อหุ้มเซลล์เสียหายทำให้รูปร่างของเซลล์เปลี่ยนไป (รูปที่ 4.23 ข) เมื่อดูที่กำลังขยายสูงพบลักษณะของไมโทคอนเดรียที่เกิดการเสื่อมมีลักษณะของเส้นใยไมอีลิน (myelin figure) รวมตัวกันมากขึ้น (รูปที่ 4.23 ก) เกิดการบวมของเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมชนิดหยาบ (dilated RER) และพบไวรัสซึ่งส่วนใหญ่มีรูปร่างกลมอยู่ในไซโตพลาสซึม พบแคพซิดมีลักษณะเป็นวงกลมชั้นเดียวมีสารด้านในติดสีจาง หรือ เป็นวงสองชั้น มีแกนตรงกลางติดสีอิเล็กตรอนอ่อนหรือเข้ม และพบลักษณะของวงกลมที่ภายในว่างเปล่าเป็นส่วนน้อย แคพซิดมีขนาดประมาณ 100-120 nm. (รูปที่ 4.24 และ 4.25) นอกจากนี้ยังพบแคพซิดที่อยู่ภายในถุงหุ้ม (vesicle) อีกด้วย

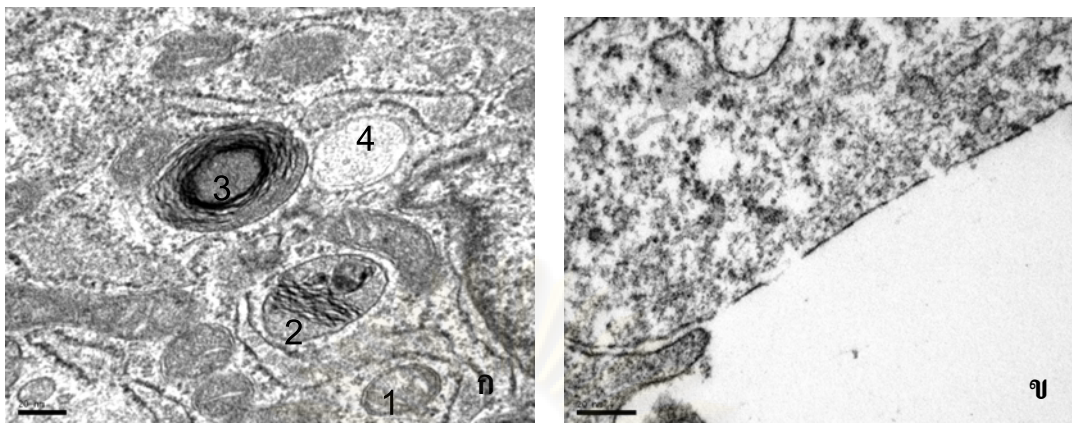


รูปที่ 4.21 แสดงเซลล์ที่ได้รับเชื้อเคอเซวี โดยลักษณะของเซลล์ที่พบจะมีการถูกทำลาย บางเซลล์นิวเคลียสหายไป บางเซลล์พบว่าเยื่อหุ้มเซลล์แตก; scale bar = 5000 nm.

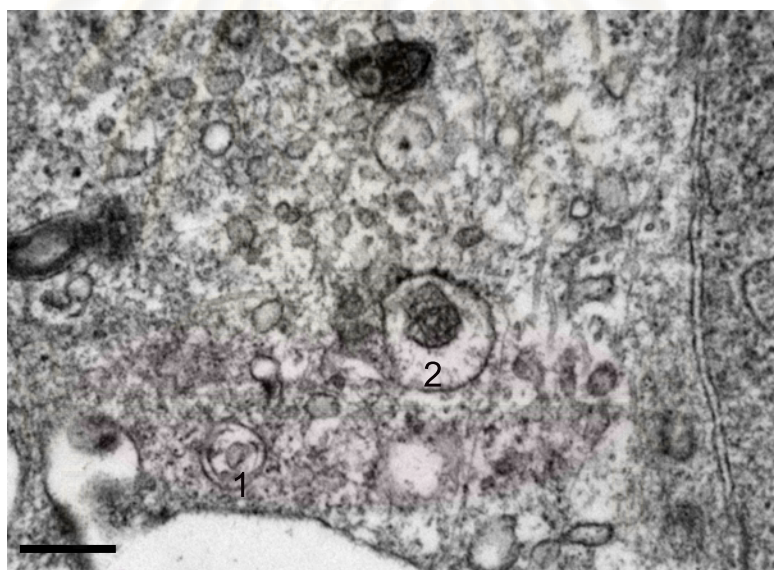


รูปที่ 4.22 ก) แสดงความผิดปกติของเซลล์ พบนิวคลีโอลัสสีเข้มขนาดใหญ่ เซลล์แตกไม่เป็นรูปร่าง มีช่องว่าง (vacuole) ในไซโตพลาสซึม; scale bar = 2000 nm. ข) แสดงความผิดปกติของเยื่อหุ้มนิวเคลียส โดยมีบางส่วนเกิดการขาดหายไป (ลูกศรชี้); scale bar = 300 nm.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

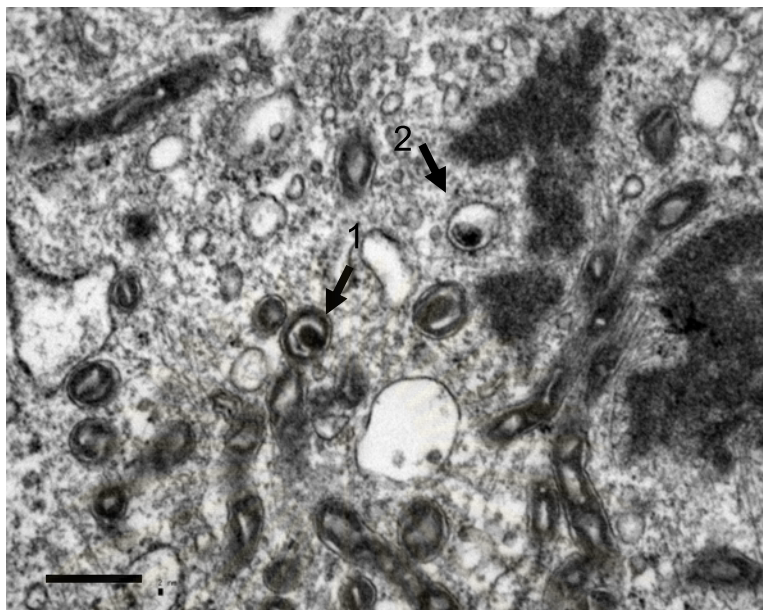


รูปที่ 4.23 ก) แสดงไมโทคอนเดรียที่ปกติ (1) ไมโทคอนเดรียที่มี myelin figure รวมตัวกันขึ้นภายใน (2, 3) และ ไมโทคอนเดรียที่เสื่อมสลายไปกลายเป็นช่องว่าง (4); scale bar = 200 nm.
 ข) แสดงลักษณะของเยื่อหุ้มเซลล์ที่ขาดหายไปและไม่เป็น bilayer; scale bar = 200 nm.



รูปที่ 4.24 แสดงแคพซิดชนิดที่มีเปลือกหุ้มสองชั้นและมีแกนติดสีอิเล็กตรอนจางอยู่ภายใน (1) และแคพซิดในถุงหุ้ม (2) ภายในไซโตพลาสซึม; scale bar = 200 nm.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

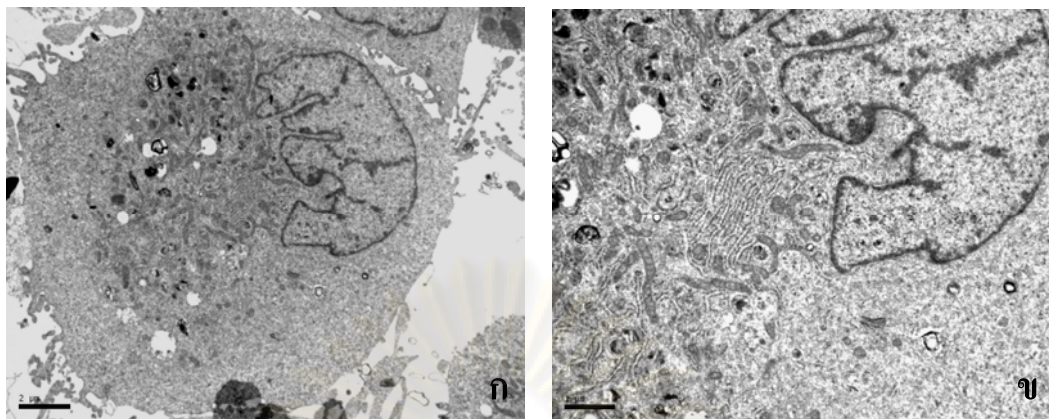


รูปที่ 4.25 แสดงแคปซิดของไวรัสที่พบในไซโตพลาสซึม โดยพบแคปซิดชนิดที่มีการสร้าง envelope มีแกนกลางติดสีเข้ม(1) และชนิดที่ยังไม่สร้าง envelope (2); scale bar = 200 nm.

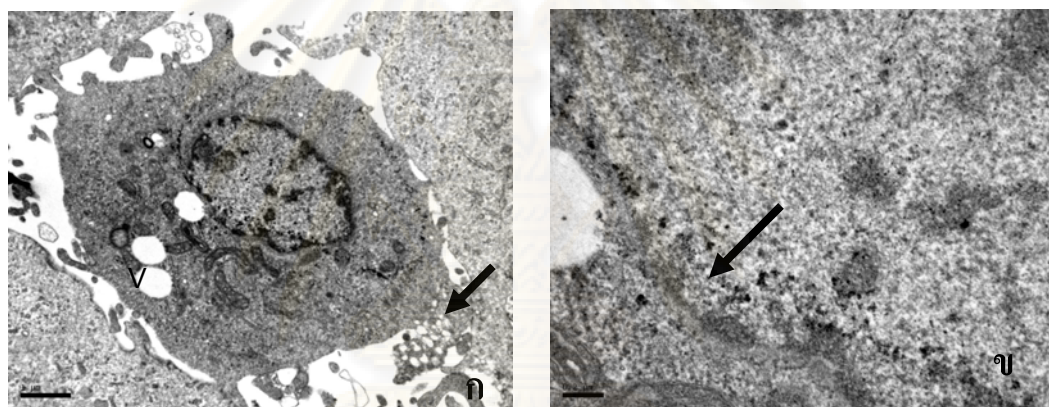
4.4.3 การศึกษาลักษณะของเชื้อไวรัสในเซลล์ที่ได้รับยาอะซัยโคลเวียและสารสกัดพญา ยอในความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสและไม่เป็นพิษต่อเซลล์ เปรียบเทียบกับเชื้อ ไวรัสในเซลล์ที่ไม่ได้รับยาอะซัยโคลเวียและสารสกัดพญา

เซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้รับยาอะซัยโคลเวีย

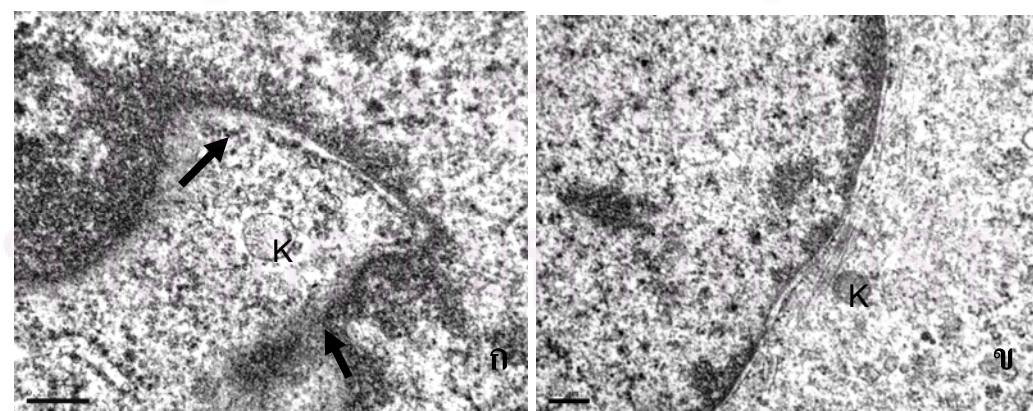
พบลักษณะของเซลล์ที่มีรูปร่างปกติและเซลล์ที่มีรูปร่างผิดปกติ เยื่อหุ้มนิวเคลียสและเยื่อหุ้มเซลล์ บางส่วนถูกทำลาย (รูปที่ 4.27 ก และ ข) ในบางเซลล์พบเยื่อหุ้มนิวเคลียสเกิดความเสียหาย ทั้งหมด ไม่เห็นการเรียงตัวเป็นชั้นชัดเจนเหมือนในเซลล์ปกติ (รูปที่ 4.27 ข) เอนโดพลาสมิกเรติคูลัมชนิดหยาบและไม่โตคอนเดรียค่อนข้างปกติ (รูปที่ 4.26) พบช่องว่างภายในไซโตพลาสซึม เยื่อหุ้มเซลล์บางส่วนเสียหาย และมีส่วนของไซโตพลาสซึมไหลออกมาภายนอก (รูปที่ 4.30) ในเซลล์ที่เกิดความผิดปกติจะพบแคปซิดภายในไซโตพลาสซึม มีลักษณะกลม ทั้งชนิดที่แคปซิดเป็นวงชั้นเดียว ภายในติดสีอิเล็กตรอนจาง (รูปที่ 4.28) ชนิดที่มีสองชั้นข้างในแกนติดสีเข้ม ระยะเวลาที่กำลัง budding เข้าสู่ถุงหุ้ม (cytoplasmic vesicle) และระยะที่กำลังสร้างเปลือกหุ้ม (envelope) (รูปที่ 4.29) ในถุงที่อยู่ภายในไซโตพลาสซึม



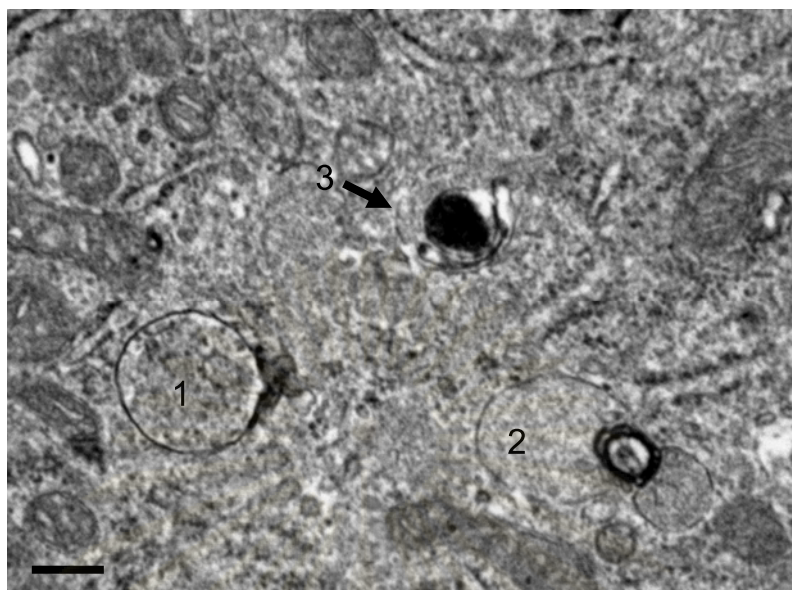
รูปที่ 4.26 ก) แสดงลักษณะของเซลล์ที่พบในการทดสอบผลของยาอะซัยโคลเวียร์ต่อเชื้อไวรัสเคเคซีวี; scale bar = 2000 nm. ข) แสดงลักษณะและการเรียงตัวของไมโทคอนเดรียและเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมชนิดหยาบที่ปกติภายในไซโตพลาสซึม; scale bar = 1000 nm.



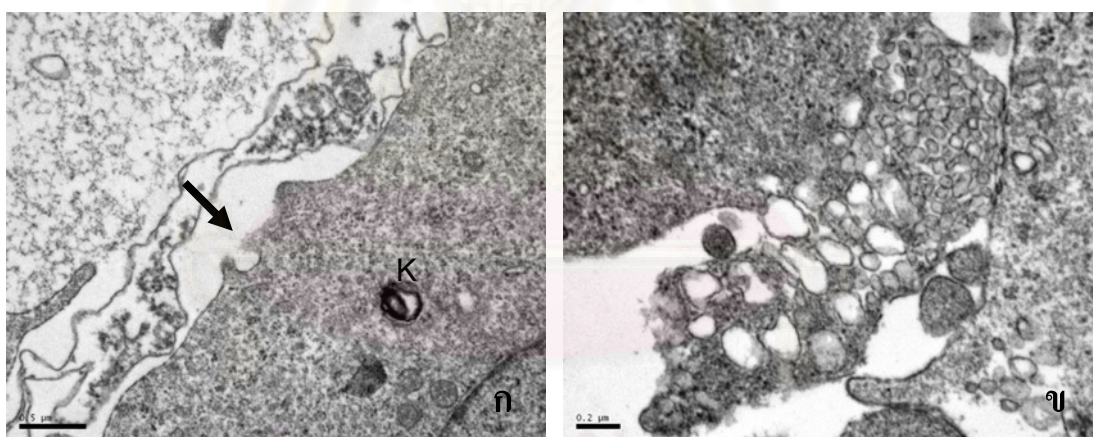
รูปที่ 4.27 ก) แสดงเซลล์ที่ได้รับความเสียหาย พบช่องว่าง(V) เกิดขึ้นภายในไซโตพลาสซึม เยื่อหุ้มเซลล์บางส่วนแตก(ลูกศรชี้); scale bar = 2000 nm. ข) แสดงเยื่อหุ้มนิวเคลียสที่ถูกทำลายเกือบหมด (ลูกศรชี้); scale bar = 100 nm.



รูปที่ 4.28 แสดงเยื่อหุ้มนิวเคลียสที่เสียหาย (ลูกศรชี้) และ แคพซิดของไวรัสภายในไซโตพลาสซึม (K); scale bar = 100 nm.



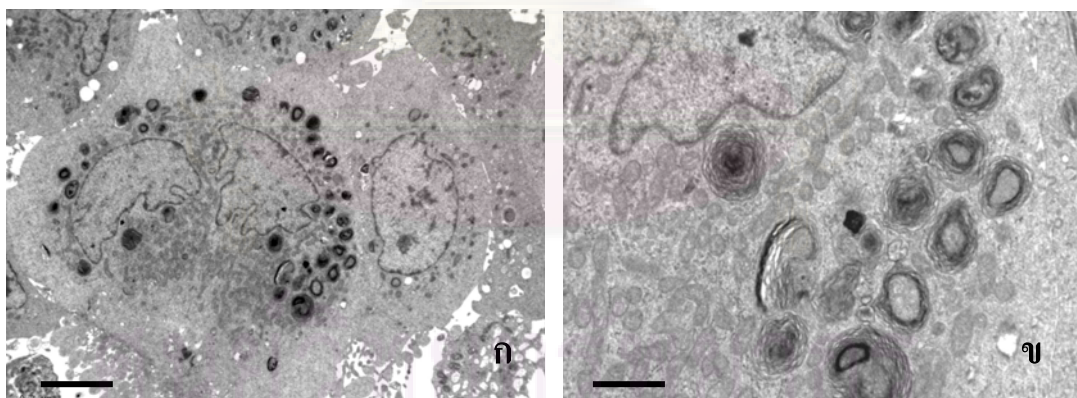
รูปที่ 4.29 แสดงให้เห็น cytoplasmic vesicle (1) แคพซิดที่กำลัง budding เข้าสู่ vesicle (2) และ แคพซิดที่กำลังอยู่ในขั้นตอนการสร้างเปลือกหุ้ม (3); scale bar = 200 nm.



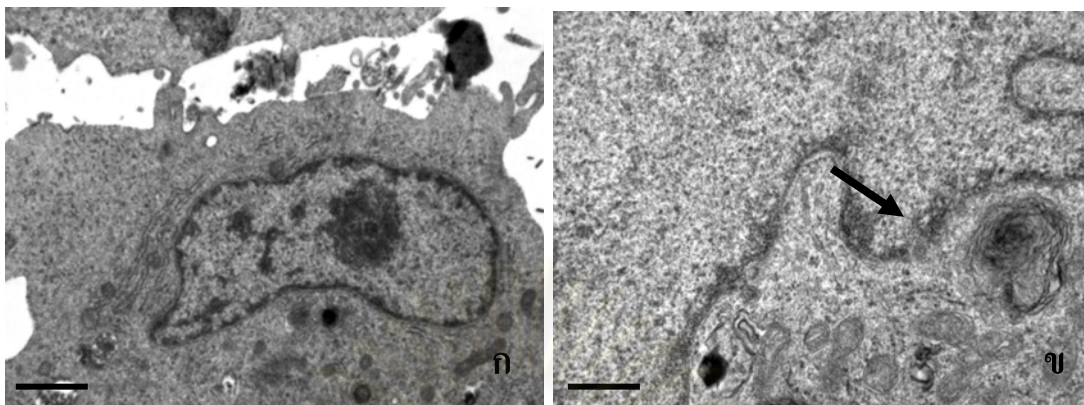
รูปที่ 4.30 ก) แสดงความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์ที่เกิดการฉีกขาด (ลูกศรชี้) และไม่เป็น bilayer พบ enveloped virus ที่ติดสีเข้มภายในไซโตพลาสซึม (K); scale bar = 500 nm. ข) ส่วนของเซลล์ที่เกิดความเสียหายทำให้มีส่วนของไซโตพลาสซึมไหลออกมานอกเซลล์; scale bar = 200 nm.

เซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้รับสารสกัดพญาอ

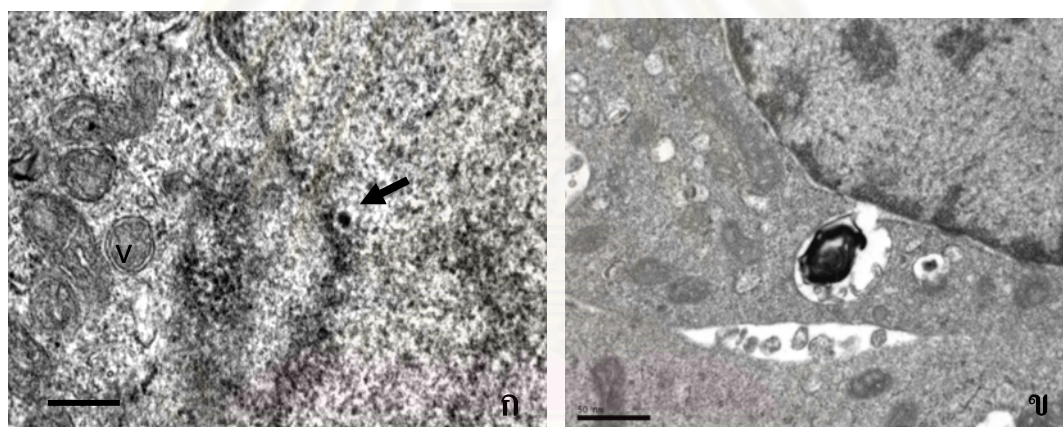
พบเซลล์ที่มีความผิดปกติทั้งในส่วนของนิวเคลียสและไซโตพลาสซึม เมื่อทำการดูที่กำลังขยายต่ำพบบางเซลล์มีนิวคลีโอลัสที่ขยายใหญ่กว่าปกติ (รูปที่ 4.32 ก) เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย (รูปที่ 4.32 ข) เซลล์ส่วนมากมีลักษณะการสร้างเส้นใยไมอีลิน (myelin figure) เกิดขึ้นภายในไซโตพลาสซึม (รูปที่ 4.31 ก) ซึ่งเมื่อทำการดูที่กำลังขยายสูงขึ้นพบว่าเส้นใยไมอีลินที่เกิดขึ้นนั้นเป็นวง ภายในมีสารเนื้อเดียวติดสีเหมือนกับสีภายในไซโตพลาสซึม (รูปที่ 4.31 ข) ในขณะที่เอนโดพลาสมิกเรติคูลัมมีการเรียงตัวภายในไซโตพลาสซึมอย่างปกติ (รูปที่ 4.32 ก) พบแคพซิดภายในนิวเคลียส เป็นวงชั้นเดียวและมีแกนกลางติดสีอิเล็กตรอนเข้มอยู่บริเวณเยื่อหุ้มนิวเคลียส (รูปที่ 4.33 ก) พบแคพซิดที่เสียสภาพในขณะที่มีการสร้างเปลือกหุ้มชั้นแรกระหว่าง perinuclear space (รูปที่ 4.33 ข) พบลักษณะของแคพซิดที่สร้างเปลือกหุ้มไม่สมบูรณ์ โดยพบว่าระหว่างชั้นของ envelope มีการโป่งพองและมีรูปร่างไม่เรียบ รอบแกนภายในเป็นช่องว่างไม่ติดสีอิเล็กตรอน และพบ enveloped capsid ที่มีเส้นใยไมอีลินเกิดขึ้นภายใน และติดสีอิเล็กตรอนเข้ม (รูปที่ 4.34) มีขนาดประมาณ 200 nm. พบไวรัสที่โตเต็มที่ (mature virion) มีเปลือกหุ้มสองชั้น และมีสารเคลือบผิวด้านนอกเซลล์ โดยสังเกตพบบริเวณด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์ที่แตกและเกิดความเสียหาย (รูปที่ 4.35)



รูปที่ 4.31 ก) แสดงภาพของเซลล์ที่พบลักษณะของ myelin figure เกิดขึ้นภายในไซโตพลาสซึมมากผิดปกติ; scale bar = 200 nm. ข) ภาพขยายของ myelin figure ที่พบ และ ไมโตคอนเดรียที่ปกติ; scale bar = 500 nm.

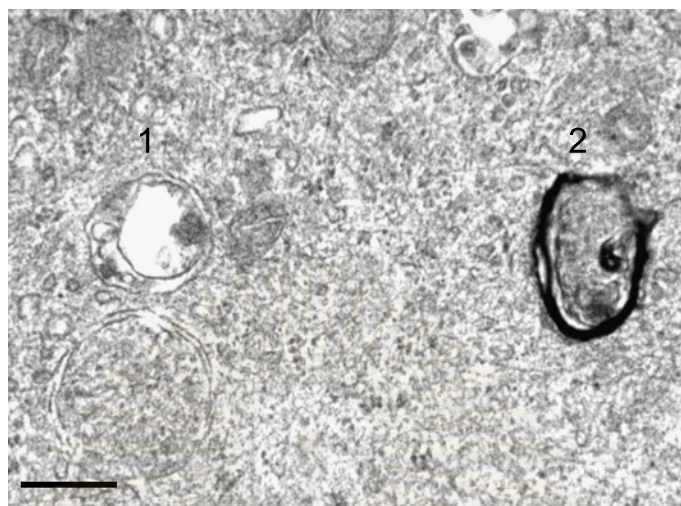


รูปที่ 4.32 ก) แสดงภาพของเซลล์ที่มีการเรียงตัวของเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมชนิดหยาบที่ปกติ แต่พบลักษณะของนิวเคลียสที่มีนิวคลีโอลัสขยายใหญ่ผิดปกติ; scale bar = 2000 nm. ข) แสดงภาพของเยื่อหุ้มนิวเคลียสที่ถูกทำลายไปบางส่วน (ลูกศรชี้); scale bar = 200 nm.

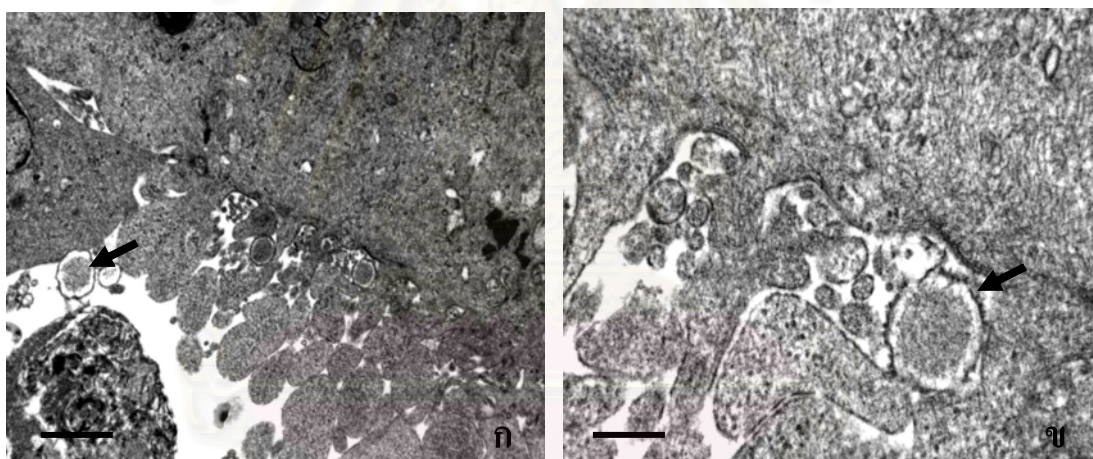


รูปที่ 4.33 ก) แสดงแคพซิดที่ติดอยู่กับเยื่อหุ้มนิวเคลียส (ลูกศรชี้) และ enveloped capsid ในไซโตพลาสซึม (V); scale bar = 500 nm. ข) แสดงภาพของแคพซิดที่เสียดสีระหว่างการสร้าง envelope ชั้นแรกระหว่าง perinuclear space; scale bar = 300 nm.

ศูนย์วิทยาศาสตร์การ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.34 แสดงลักษณะของ enveloped capsid ที่มีความผิดปกติ (1) และ enveloped capsid ที่ติดสปีเล็กตรอนเข้ม และมีเส้นใยไมอิดินภายใน (2); scale bar = 200 nm.



รูปที่ 4.35 แสดงภาพของไวรัสที่สมบูรณ์ (mature virion) (ลูกศรชี้) ที่อยู่ภายนอกเซลล์ และพบความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์; ก) scale bar = 300 nm. และ ข) scale bar = 200 nm.

ศูนย์วิทยาศาสตร์สุขภาพ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

อภิปรายผลการวิจัย บทสรุป และข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผลการวิจัย

ส่วนที่ 1

จากผลการทดลองพบว่าเชื้อ KHV-T P13 ที่ทำการแยกได้จากปลาแพนซีคาร์พที่ป่วยในประเทศไทย ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง (CPE) ในเคอเพเซลล์ คือ เริ่มพบลักษณะการเปลี่ยนแปลงภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ มีการเกิดช่องว่าง (vacuole) เล็กๆ ขึ้น และมีการเชื่อมกันของเซลล์ (cell fusion) โดยจะเริ่มสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงได้ประมาณวันที่ 5-7 หลังจากทำการบ่มเชื้อกับเซลล์ (inoculation) ที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นจะพบการเสื่อมของเซลล์ที่สมบูรณ์และเริ่มมีเซลล์เสื่อมตาย (lysis) ประมาณวันที่ 10-14 ของการทดลอง และเกิดการเปลี่ยนแปลงทั่วทุกเซลล์ประมาณวันที่ 14 ของการทดลอง เช่นเดียวกับในรายงานของ Hedrick *et al.* (2005) ที่ทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสในเซลล์ KF-1 พบว่าไวรัสจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์โดยเริ่มสังเกตเห็นความผิดปกติได้ภายใน 5 วันหลังการเพาะเชื้อ และจะเกิดการเสื่อมรวมทั้งเริ่มมีเซลล์ตายวันที่ 5-7 โดยขบวนการเกิดความเสียหายของเซลล์จะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ทุกเซลล์หลังจากวันที่ 14 ของการทดลอง โดยระยะเวลาที่พบการเสื่อมของเซลล์จะแตกต่างกันไปตามชนิดของเซลล์ที่ใช้และอุณหภูมิที่ทำการศึกษา โดย Dishon *et al.* (2007) ทำการศึกษาในเซลล์สมองปลาไน (Common Carp Brain; CCB) ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส พบว่าเกิดการเสื่อมของเซลล์อย่างสมบูรณ์ในวันที่ 9 หลังการทดลอง และเมื่อทำการเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นจาก 22 เป็น 30 องศาเซลเซียสพบว่าเซลล์กลับมาอยู่ในสภาพที่ปกติได้อีกครั้ง และยังคงสภาพปกติอยู่ได้นานถึง 30 วัน ก่อนที่จะก่อให้เกิดการเสื่อมของเซลล์ได้อีกเมื่อนำเซลล์กลับมาบ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส แสดงให้เห็นว่าไวรัสจะอยู่ในเซลล์ได้อย่างน้อย 30 วันโดยไม่ก่อให้เกิดความผิดปกติเมื่ออยู่ในช่วงอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต จึงมีความเป็นไปได้ที่เชื้อจะสามารถคงอยู่ในตัวปลาได้นานโดยไม่แสดงอาการ แต่จะสามารถแพร่เชื้อต่อไปได้เมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อเคเอชวี โดยจะเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 18-26 องศาเซลเซียส (Gilad *et al.*, 2003) และนอกจากนี้เชื้อจะสามารถอยู่ในตัวปลาได้เป็นระยะเวลานานแล้ว ยังสามารถที่จะคงอยู่ในสิ่งแวดล้อม คือในน้ำได้อย่างน้อยนาน 4 ชั่วโมง (Perelberg *et al.*, 2003) และในตะกอนที่สะสมอยู่ที่ก้นบ่อได้อีกด้วย (Dishon *et al.*, 2005)

ส่วนที่ 2 การทดสอบความเป็นพิษของยาและสารสกัดต่อเคเอฟเซลล์

เมื่อทำการทดสอบความเป็นพิษของยาอะซัยโคลเวียต่อเคเอฟเซลล์ พบว่า ความเข้มข้นของยาที่ทำให้เคเอฟเซลล์ตายไปเป็นจำนวน 50% ของเซลล์ทั้งหมด (50% Cytotoxic Concentration; CC_{50}) คือ ที่ความเข้มข้น 11.60 $\mu\text{g/ml}$ ในขณะที่การทดสอบความเป็นพิษของยาอะซัยโคลเวียในการต้านเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพล็กซ์ 1 (Herpes Simplex Virus 1; HSV1) ต่อเซลล์ 3T3 ในมนุษย์ พบว่าที่ความเข้มข้นสูงสุดของยาที่ใช้ทดสอบคือ 100 $\mu\text{g/ml}$ ก็ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ (Sutton and Boyd, 1993) เช่นเดียวกับการทดสอบในเซลล์ T-lymphoblastoid (CEM) พบว่าความเข้มข้นของยาที่สูงสุดที่ใช้คือ 22.5 mg/ml ไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ที่ใช้ในการทดลองเช่นกัน (Hammer *et al.*, 1982) ส่วนการทดสอบประสิทธิภาพในการต้านเชื้อของยาอะซัยโคลเวียต่อเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ในแมว (Feline herpesvirus) พบว่าความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้คือ 50 $\mu\text{g/ml}$ ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ Crandell-Reese Feline Kidney (Hussein *et al.*, 2007) ในขณะที่ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดพญาอต่อเคเอฟเซลล์ พบว่าสารสกัดพญาอที่ความเข้มข้น 4.75 mg/ml ส่งผลให้เซลล์ตายหมดภายใน 24 ชั่วโมงหลังการทดลอง ในขณะที่ความเข้มข้นอื่นๆสามารถที่จะทำการนับจำนวนเซลล์มีชีวิตที่เหลือได้ในวันที่ 3 หลังการทดลอง ซึ่งพบว่าสารสกัดพญาอที่ความเข้มข้น 0.95, 0.475, 0.095 และ 0.0095 mg/ml ตามลำดับ ไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ ในขณะที่การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดพญาอต่อ Vero cell ก่อนที่จะนำไปทำการศึกษาด้านการต้านเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพล็กซ์ 2 พบว่ามีค่า $CC_{50} = 6.67 \text{ mg/ml}$ (Yoosook *et al.*, 1999) การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดได้จากใบของพญาอต่อ Vero cell ก่อนที่จะนำไปทำการทดสอบประสิทธิภาพในการต้านเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพล็กซ์ 1 พบว่ามีค่าความเข้มข้นที่มากที่สุดที่ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ คือ 6.21 mg/ml (Sakdarat *et al.*, 2009)

แสดงให้เห็นว่าความเป็นพิษของยาหรือสารต่อเซลล์เพาะเลี้ยงจะแตกต่างกันไปตามชนิดของเซลล์ที่ใช้ โดยเคเอฟเซลล์มีความไวต่อยาอะซัยโคลเวีย และสารสกัดพญาอมากกว่าการศึกษาในรายงานที่ผ่านมา (Hammer *et al.*, 1982; Hussein *et al.*, 2007; Yoosook *et al.*, 1999; Sakdarat *et al.*, 2009; Sutton and Boyd, 1993) โดยดูจากค่า CC_{50} ที่ต่ำกว่า และเมื่อทำการเปรียบเทียบความเป็นพิษของยาอะซัยโคลเวียกับสารสกัดพญาอต่อเคเอฟเซลล์ จะเห็นว่าอะซัยโคลเวียมีความเป็นพิษสูงกว่าสารสกัดพญาอ อาจเกิดจากการที่ยาอะซัยโคลเวียเกิดการทำลายเซลล์ได้อย่างถาวร ส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์ในที่สุด

ส่วนที่ 3 การทดสอบประสิทธิภาพในการต้านเชื้อไวรัสของยาอะซัยโคลเวียและสารสกัด พญาขอ

ทำการทดสอบผลในการต้านเชื้อไวรัสเคเอชวีของยาอะซัยโคลเวียและสารสกัดพญาขอ โดยทำการทดสอบผลของสารสกัดพญาขอก่อนการติดเชื้อเข้าสู่เซลล์และหลังจากการติดเชื้อเข้าสู่เซลล์ เนื่องจากมีรายงานว่าสารสกัดพญาขอมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ในมนุษย์ โดยสามารถฆ่าเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคอีสุกอีใสและงูสวัด (VZV) ทั้งภายในและภายนอกเซลล์ คือสามารถยับยั้งโดยการทำลายเชื้อไวรัสโดยตรง และโดยการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสภายในเซลล์หลังจากที่มีการติดเชื้อแล้ว (กองวิจัยและพัฒนาสมุนไพร, 2533; Thawaranantha, 1992) ส่วนยาอะซัยโคลเวียทำการทดสอบประสิทธิภาพหลังจากที่เชื้อติดเข้าสู่เซลล์ เนื่องจากอะซัยโคลเวียมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อไวรัส โดยจะออกฤทธิ์ได้ต้องอาศัยเอนไซม์ดีเอ็นเอของเชื้อไวรัส และเอนไซม์ในเซลล์ของโฮสต์ อะซัยโคลเวียจะมีความสามารถในการจับกับเอนไซม์ดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสอย่างเฉพาะเจาะจง เกิดการ phosphorylation กลายเป็น acyclovir monophosphate (acyclo-GMP) ซึ่งจะไม่พบขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงเช่นนี้ในเซลล์ที่ไม่มีการติดเชื้อไวรัส จากนั้น acyclo-GMP จะเปลี่ยนรูปไปเป็น acyclovir triphosphate (acyclo-GTP) โดยเอนไซม์ที่อยู่ในเซลล์โฮสต์ จากการทดลองของ Elion, G.B. (1982) พบว่า acyclo-GTP จะคงอยู่ในเซลล์ที่มีการติดเชื้อเฮอร์ปีส์ไวรัสได้นานหลายชั่วโมงหลังจากที่มีการดูดเอาออกจากเซลล์ (vero cell) โดยพบปริมาณของ acyclo-GTP ในเซลล์ที่มีการติดเชื้อมากกว่าเซลล์ที่ไม่มีการติดเชื้อไวรัส 40 - 1000 เท่า acyclo-GTP จะไปยับยั้งการสังเคราะห์ DNA polymerase ของเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์มากกว่าของเซลล์ โดยเชื้อจะสังเคราะห์ DNA polymerase โดยใช้ acyclo-GTP เป็นสารตั้งต้นในการรับเอา acyclo-GMP เข้าสู่ DNA primer template ได้ดีกว่าเอนไซม์ที่อยู่ในเซลล์ ซึ่งการจับกันของ acyclo-GMP กับ DNA polymerase ของเชื้อไวรัสจะทำให้การสร้างสายพันธุกรรมยุติลง ไวรัสไม่สามารถเพิ่มจำนวนต่อไปได้อีก จากการศึกษาในครั้งนี้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของยาอะซัยโคลเวียที่ความเข้มข้น 10, 5, 1, 0.1 และ 0.01 $\mu\text{g/ml}$ พบว่ายาอะซัยโคลเวียทุกความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองไม่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อไวรัสเคเอชวี ซึ่งพบการรายงานเช่นเดียวกันนี้ในการใช้ต้านเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ในแมว โดยใช้ยาอะซัยโคลเวียที่ความเข้มข้น 50, 10, 1, 0.2, 0.01 และ 0.001 $\mu\text{g/ml}$ ในเซลล์ Crandell-Reese Feline kidney พบว่าไม่สามารถที่จะยับยั้งเชื้อ Feline herpesvirus ได้ ซึ่งอาจเกิดจากขั้นตอนการเกิด phosphorylation ของอะซัยโคลเวียกับเอนไซม์ดีเอ็นเอของเชื้อมีความบกพร่อง (Hussein *et al.*, 2007) ในขณะที่การศึกษาอื่นที่ผ่านมาที่พบว่าอะซัยโคลเวียมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการติดเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ในมนุษย์และมีการใช้กันอย่างกว้างขวาง ทั้งในการรักษาโรคเริ่มที่เกิดจากเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพล็กซ์ ชนิดที่ 1 และ ไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพล็กซ์ ชนิดที่ 2 (Rang *et al.*, 1999) ที่เกิดขึ้นในคน ทั้งในรูปแบบของยากิน ยาป้าย

ตา ยาทาเฉพาะที่ และ ยาที่ให้เข้าทางหลอดเลือด (คณะกรรมการแห่งชาติด้านยา, 2542) โดยการทดสอบเปรียบเทียบระหว่างเพนซัยโคลเวีย (pencyclovir) และ อะซัยโคลเวียต่อเชื้อเฮอริปัสซิมเพล็กซ์ 1 ใน murine cells พบว่าอะซัยโคลเวีย มีประสิทธิภาพสูงกว่าเพนซัยโคลเวีย ถึง 4 เท่า โดยมีค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ 50% (50% Effective concentration; EC₅₀) อยู่ที่ 0.02 ± 0.07 และ 0.08 ± 0.13 $\mu\text{g/ml}$ (Sutton and Boyd, 1993) ส่วนการศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อเฮอริปัสซิมเพล็กซ์ชนิดที่ 1 ในเซลล์ T-lymphoblastoid (CEM) ตั้งแต่ 0.225 ถึง 22.5 mg/ml พบว่าที่ 22.5 mg/ml มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อได้ดีที่สุด โดยมีค่าดัชนีในการรักษามากถึง 8000 เท่า และจะมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อได้ดียิ่งขึ้นเมื่อใช้ควบคู่กับ alpha interferon ที่ความเข้มข้น 10,000 U/ml. (Hammer *et al.*, 1982) แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ในการต้านเชื้อเฮอริปัสไวรัสของยาอะซัยโคลเวียจะมีประสิทธิภาพมากหรือน้อยขึ้นกับชนิดของเซลล์ที่ใช้ในการทดลอง โดย Brandi *et al.* (2001) พบว่าการทดสอบประสิทธิภาพโดยใช้ macrophage ให้ผลในการต้านเชื้อไวรัสที่ดีกว่าการใช้เซลล์ไฟโบรบลาสต์อย่างชัดเจน ซึ่งน่าจะเกิดจากอัตราการเกิด phosphorylation ของยาภายในเซลล์ที่แตกต่างกัน ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าเคเอฟเซลล์มีอัตราการเกิดขบวนการ phosphorylation ของยาอะซัยโคลเวียภายในเซลล์ต่ำทำให้ผลการทดลองแสดงออกมาว่ายาอะซัยโคลเวียไม่มีผลในการต้านเชื้อเคเอชวีในเคเอฟเซลล์ อีกสาเหตุหนึ่งที่น่าจะเป็นไปได้คือ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเชื้อเฮอริปัสที่พบในปลา จะประกอบด้วยเอนไซม์ 3 ชนิด ที่สำคัญต่อกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของเชื้อ ได้แก่ ribonucleotide reductase, Thymidylate monophosphate kinase (TmPK) และ โธมิดีนคัยเนส แต่จากการศึกษาของ Ilouze *et al.* (2006) พบว่าเชื้อเฮอริปัสที่พบในปลาในที่แสดงอาการป่วยไม่มีการแสดงออกของยีน CyHV-3 TK จึงเป็นเหตุผลหนึ่งที่ทำให้ยาอะซัยโคลเวียไม่สามารถที่จะยับยั้งเชื้อเคเอชวีได้ เช่นเดียวกับการทดลองใช้ยาอะซัยโคลเวียหรือแกงซัยโคลเวีย (gancyclovir) ในการรักษาปลาที่แสดงอาการติดเชื้อไวรัสเฮอริปัส พบว่าไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อได้เช่นกัน (Lee *et al.*, 1999)

การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดพญายอต่อเชื้อเคเอชวี ก่อนที่จะมีการติดเชื้อเข้าสู่เซลล์ โดยการใส่สารสกัดกับเชื้อก่อนเพาะลงเซลล์ที่ 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้มากกว่า $1 \log_{10}$ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมคือ ที่ความเข้มข้น 0.475 mg/ml ทั้งที่ 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง และการทดสอบประสิทธิภาพหลังการติดเชื้อพบว่าค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สารยับยั้งเชื้อได้มากกว่า $1 \log_{10}$ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม คือ ที่ความเข้มข้น 0.475 mg/ml เดียวกัน แสดงให้เห็นว่าสารสกัดมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อเคเอชวีได้โดยตรงและสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัสภายในเซลล์ได้ โดยการศึกษาถึงส่วนประกอบของใบพญายอพบว่ามีสารออกฤทธิ์สำคัญ 3 ชนิด ที่สามารถออกฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสเฮอริปัสซิมเพล็กซ์ชนิดที่ 1 ก่อนที่จะมีการติดเชื้อเข้าสู่เซลล์ได้ ซึ่งเป็นสารประกอบจำพวกคลอโร

ฟิลเอ และ คลอโรฟิลบี (Sakdarat *et al.*, 2009) โดยพบว่าสารประกอบทั้งสามชนิดจะไปทำให้เกิดความผิดปกติของ envelope หรือ glycoprotein ภายนอกซึ่งมีความสำคัญต่อขบวนการติดเชื้อเข้าสู่เซลล์ โดยถูกทำให้หมดฤทธิ์ได้โดยตรงเมื่อมีการบ่มเชื้อไวรัสร่วมกับสารประกอบดังกล่าว สอดคล้องกับการศึกษาผลในการต้านเชื้อไวรัสของ peppermint oil ที่พบว่าจะขัดขวางขบวนการเข้าสู่เซลล์ของเชื้อไวรัสเฮอริปีสซิมเพล็กซ์ชนิดที่ 1 และ 2 ในเซลล์ RC-37 (Schuhmacher *et al.*, 2004) Liu *et al.* (2004) ทำการศึกษาถึงผลของ Ganoderma Lucidum Proteoglycan (GLPG) ที่สกัดได้จาก ไมซีเลีย (mycelia) ของเห็ดหลินจือ (*Ganoderma lucidum*) พบว่ามีผลในการยับยั้งเชื้อไวรัสเฮอริปีสซิมเพล็กซ์ชนิดที่ 1 ทั้งก่อนการติดเชื้อเข้าสู่เซลล์ และหลังการติดเชื้อเข้าไปในเซลล์แล้ว โดย GLPG จะไปขัดขวางขบวนการแบ่งตัวของไวรัสและรบกวนขั้นตอนการเข้าสู่เซลล์ในช่วงแรกของการติดเชื้อ (Liu *et al.*, 2004) ดังนั้นสารสกัดพญายออาจส่งผลขัดขวางขบวนการแบ่งตัวของเชื้อไวรัส เคเอชวีในเคเอฟเซลล์เช่นเดียวกัน โดยอาจเกิดจากการรวมกันของสารสกัดกับ glycoprotein ของไวรัสที่มีความสำคัญในการซึมผ่านเข้าสู่เซลล์โฮสต์ (Sakdarat *et al.*, 2009) ทำให้เชื้อเสียสภาพไปไม่สามารถติดเชื้อเข้าสู่เซลล์ได้ ในขณะที่กลไกของอะซัยโคลเวีย จะไปรบกวนการสร้าง viral DNA polymerase ภายในเซลล์ที่มีการติดเชื้อ แสดงให้เห็นว่ากลไกในการยับยั้งเชื้อไวรัสของสารประกอบในสารสกัดพญายอ มีความแตกต่างกับยาอะซัยโคลเวีย ซึ่งเป็นยาที่มีความแพร่หลายในการใช้รักษาการติดเชื้อไวรัสเฮอริปีสที่พบในมนุษย์ โดยมีความเป็นไปได้ที่ ยาอะซัยโคลเวียจะไม่สามารถต้านเชื้อไวรัสเคเอชวีได้ เนื่องจากยาอะซัยโคลเวียไม่สามารถออกฤทธิ์เพราะยีนโธมิดีนคัยเนสของเชื้อมีความแตกต่างจากโธมิดีนคัยเนสของเชื้อไวรัสเฮอริปีสในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Ilouze *et al.*, 2006) หรือเนื่องจากเคเอฟเซลล์ที่ใช้ทดสอบมีความไวต่อความเป็นพิษของยาอะซัยโคลเวียสูงเกิน ความเข้มข้นของยาที่จะสามารถต้านเชื้อไวรัสเคเอชวีได้

ส่วนที่ 4 การศึกษาความเป็นพิษของยาอะซัยโคลเวียและสารสกัดพญายอต่อเคเอฟเซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope)

เมื่อทำการเปรียบเทียบลักษณะของเคเอฟเซลล์ที่ปกติกับเซลล์ที่ได้รับยาอะซัยโคลเวียและสารสกัดพญายอในความเข้มข้นที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ พบว่าเซลล์ที่ได้รับยาอะซัยโคลเวียจะเกิดความเสียหายในส่วนของนิวเคลียสเป็นส่วนใหญ่ พบลักษณะของนิวเคลียสที่ถูกทำลาย นิวคลีโอลัสที่ขยายขนาดใหญ่และมีความเข้มข้นมากขึ้น เยื่อหุ้มนิวเคลียสเกิดการฉีกขาด ส่งผลให้เซลล์แตกหรือถูกทำลายในที่สุด ในขณะที่เซลล์ที่ได้รับสารสกัดพญายอพบความผิดปกติชัดเจนภายในไซโตพลาสซึม มากกว่าภายในนิวเคลียส เมื่อดูที่กำลังขยายต่ำพบช่องว่าง (vacuole) ภายใน

ไซโตพลาสซึมของเซลล์ปริมาณมาก ซึ่งเป็นความผิดปกติของเซลล์ที่เกิดความเสื่อมขึ้น (cell degeneration) พยาธิสภาพที่บ่งบอกถึงความเสื่อมของเซลล์ ได้แก่ cellular swelling or cloudy swelling, hydropic, vacuolar, fatty, หรือ hyaline degeneration (Clarke, 1990) เมื่อศึกษาที่กำลังขยายสูงพบการรวมของ RER และการหดตัวและเกิดการเสื่อมของไมโทคอนเดรีย โดยพยาธิสภาพที่พบจะมีความแตกต่างกันตามความรุนแรงของความเสียหายของเซลล์ โดยมากการเสื่อมของเซลล์อาจจะสามารถฟื้นสภาพกลับมาเป็นเซลล์ที่ปกติได้ แต่การเกิดความเสื่อมที่รุนแรงมักจะนำไปสู่การตายของเซลล์ (cell death) ในที่สุด (Clarke, 1990) การเกิดช่องว่างภายในไซโตพลาสซึมเกิดได้จากหลายปัจจัย ทั้งการติดเชื้อไวรัส สารพิษจากเชื้อแบคทีเรีย ยาและสารพิษต่างๆ (Henics and Wheatley, 1999) เช่น การศึกษาถึงพิษของธาตุเหล็กที่ปนเปื้อนมากับสมุนไพรมันชัน พบว่าทำให้เกิดการเสื่อมของเซลล์ตับ เกิดการหดตัวของนิวเคลียส เซลล์บวม มีช่องว่าง (vacuole) ภายในไซโตพลาสซึมและเยื่อหุ้มนิวเคลียส (Promchan, 2005) การศึกษาถึงลักษณะการเสื่อมตายของเซลล์ที่พบภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน เปรียบเทียบกันในเซลล์ชนิดต่างๆที่ได้รับสารที่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ พบว่าสามารถจำแนกขบวนการเกิดความเสื่อมตายออกได้เป็น 3 ชนิด ได้แก่ ชนิดแรก เริ่มจากการหดตัวของนิวเคลียส ไซโตพลาสซึมติดสีเข้มขึ้นและเกิดการแยกเป็นชั้น จากนั้นจะถูกเก็บกินจากเซลล์รอบข้าง ชนิดที่สอง เริ่มจากการสะสมกันของไลโซโซม (lysosomal bodies) มากขึ้น ตามมาด้วยการเปลี่ยนแปลงของนิวเคลียส เกิดการแตก เซลล์ตายแล้วจะถูกเก็บกินโดยเซลล์ข้างเคียง ชนิดที่สามพบการเสื่อมของเซลล์ที่แตกต่างจากสองชนิดแรก โดยจะไม่พบการสะสมของไลโซโซมและไม่พบการถูกกลืนทำลายจากเซลล์รอบข้าง (Kacew, 1990)

แสดงให้เห็นว่าอะซัยโคลเวียและสารสกัดพญาอในความเข้มข้นที่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ จะทำให้เกิดการเสื่อมและตายของเซลล์ที่แตกต่างกัน โดยอะซัยโคลเวียจะส่งผลให้เกิดความเสียหายในส่วนของนิวเคลียสเป็นหลักซึ่งทำให้เกิดความเสื่อมของเซลล์อย่างถาวร ส่งผลให้เซลล์ตายในที่สุด ในขณะที่สารสกัดพญาอจะทำให้เกิดความเสียหายภายในไซโตพลาสซึมซึ่งเซลล์ที่ได้รับความเสียหายน้อยอาจซ่อมแซมตัวเองกลับมาได้เป็นปกติอีกครั้ง สอดคล้องกับผลการทดสอบความเป็นพิษของยาอะซัยโคลเวียและสารสกัดพญาอต่อเคเอฟเซลล์ ที่พบว่าอะซัยโคลเวียมีความเป็นพิษต่อเคเอฟเซลล์มากกว่าสารสกัดพญาอ

ส่วนที่ 5 การศึกษาผลของยาอะซัยโคลเวียและสารสกัดพญาขอต่อเชื้อไวรัสเคเอชวี ภายใต้อุปกรณ์จุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope)

จากการเก็บตัวอย่างเซลล์ในวันที่ 14 ของการทดลองมาทำการตรวจดูสภาพการเปลี่ยนแปลงภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านที่กำลังขยายต่ำ (1,000–2,000 เท่า) พบว่าเซลล์โดยส่วนใหญ่เกิดความผิดปกติ โดยบางเซลล์จะเห็นลักษณะการถูกทำลายของนิวเคลียส นิวคลีโอลัสขยายใหญ่และติดสีเข้ม มีความผิดปกติของออร์แกเนลล์และพบช่องว่างในไซโตพลาสซึม เยื่อหุ้มเซลล์แตกทำให้รูปร่างของเซลล์เปลี่ยนไป โดยเซลล์ที่เกิดความผิดปกติของนิวเคลียสและนิวคลีโอลัสเป็นเซลล์ที่จะพบว่ามี การติดเชื้อไวรัส โดยจะไม่พบไวรัสในเซลล์ที่นิวเคลียสยังดูปกติ (Miwa *et al.*, 2007) เมื่อดูที่กำลังขยายสูงพบลักษณะของไมโทคอนเดรียที่มีลักษณะของเส้นใยไมอีลิน (myelin figure) รวมตัวกันมากขึ้น เกิดการรวมของเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมชนิดหยาบ (RER) และพบไวรัสของไวรัส ความผิดปกติของไมโทคอนเดรีย และ RER เกิดจากผลของเชื้อไวรัสที่ส่งผลให้เกิดความเสื่อมของเซลล์ (Henics and Wheatley, 1999) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเกิด margination ของนิวเคลียร์โครมาตินเป็นลักษณะที่บ่งบอกว่าเซลล์มีการติดเชื้อเคเอชวี ซึ่งเป็นลักษณะที่พบทางจุลพยาธิวิทยาของปลาที่ติดเชื้อ โดยเซลล์จะมี margination ของนิวเคลียร์โครมาตินเช่นกัน (Hedrick *et al.*, 2000) ลักษณะการเกิด margination ของนิวเคลียร์โครมาตินนี้ยังพบได้ในนิวเคลียสของเซลล์ปลาทองที่ติดเชื้อ Cyprinid herpesvirus-2 (CyHV-2) อีกด้วย (Hedrick *et al.*, 2006) ไวรัสที่พบจากการศึกษาในครั้งนี้ส่วนใหญ่มีรูปร่างกลม หรือ hexagonal อยู่ภายในไซโตพลาสซึม ทั้งชนิดที่มีแคพซิด (capsid) และชนิดที่มี envelope (enveloped capsid) โดยมีแกนกลาง (core) ติดสีเข้มเป็นส่วนใหญ่ พบไวรัสที่อยู่ในระยะการเจริญเติบโตต่างๆ ส่วนใหญ่ในบริเวณไซโตพลาสซึม พบในนิวเคลียสได้บ้างแต่เป็นส่วนน้อย ไวรัสระยะที่เป็นแคพซิดพบมีหลายลักษณะทั้งแบบที่มีผนังชั้นเดียวภายในมีแกนติดสีเข้ม ชนิดที่มีผนังชั้นเดียวภายในประกอบด้วยสารติดสีอิเล็กตรอนจาง และแคพซิดที่ภายในว่างเปล่า แคพซิดที่พบมีขนาดประมาณ 100-120 นาโนเมตร พบแคพซิดที่กำลังสร้างเปลือกหุ้ม (envelope) และแคพซิดที่มีเปลือกหุ้มแล้ว (enveloped capsid) แต่ยังไม่เต็มที่อยู่ภายในไซโตพลาสซึม และพบไวรัสที่โตเต็มที่พร้อมที่จะก่อโรคอยู่ภายนอกเซลล์มีลักษณะเป็นวงสองชั้นมีผิวด้านนอกขรุขระขนาดประมาณ 180-200 นาโนเมตร จากการศึกษาของ Miwa *et al.* (2007) ถึงลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านของเชื้อเคเอชวีในเซลล์ NGF-2 พบแคพซิดส่วนมากอยู่ภายในนิวเคลียสของเซลล์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 110 นาโนเมตร รูปร่างกลม หรือ เป็นหกเหลี่ยม (hexagonal) รูปร่างภายในแคพซิดมีหลายลักษณะ โดยสามารถจำแนกได้เป็น 3 แบบใหญ่ๆ คือ ชนิดแรกพบลักษณะของทรงกลมอยู่ภายในแคพซิด เห็นเป็นวงสองชั้นซ้อนกัน วงชั้นในส่วนใหญ่ประกอบด้วย heterogeneous parts

หรือ particles เป็นชนิดที่พบมากที่สุด ชนิดที่สองมีลักษณะของแกนกลางติดสปีเล็กตรอนเข้มข้น (electron densed core) โดยมีรูปร่างแตกต่างกันไป ชนิดที่สาม แสดงลักษณะภายในว่างเปล่า อาจพบความหนาแน่นของอีเล็กตรอนบางๆ ส่วนแคพซิดอื่นๆอาจพบส่วนประกอบที่แตกต่างกันไป เช่น พบลักษณะของเยื่อหนาๆ (thick fibrous material) อยู่ภายในลักษณะแคพซิดที่พบว่ามีรูปร่างที่แตกต่างกันหลายแบบน่าจะเป็นการพัฒนาของไวรัสในระยะต่างๆ หรือ การพัฒนาการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของแคพซิดในไวรัสเคเอชวี (Miwa *et al.*, 2007) โดยพบลักษณะแคพซิดหลายๆแบบที่คล้ายคลึงกันนี้ในการติดเชื้อ Pseudorabies Virus (PRV) (Granzow *et al.*, 1997) และในเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่นๆ เช่นกัน (Nii, 1992) สามารถจำแนกชนิดแคพซิดของเชื้อไวรัสในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมออกได้เป็น 3 ชนิด คือ A, B และ C ด้วยวิธีการทางชีววิทยาเคมี ในเซลล์ที่มีการติดเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ เช่น เฮอร์ปีส์ซิมเพล็กซ์ ไวรัส (Gibson and Roizman, 1972) ไฮโดเมกกะโลไวรัส (Gibson, 1981; Yu *et al.*, 2005) และ Equine herpesvirus type 1 (Perdue *et al.*, 1975) โดยขั้นตอนการพัฒนาของเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะเริ่มการสร้างแคพซิดภายในนิวเคลียสของเซลล์โฮสต์ จากนั้นจะแบ่งตัวเข้าสู่พื้นที่ระหว่างผนังนิวเคลียสชั้นนอกและชั้นใน (perinuclear space) เกิดการสร้าง envelope ชั้นต้น (primary envelope) จากนั้นนิวเคลียสชั้นในแล้วจะเคลื่อนตัวเข้าสู่ ไฮโดพลาสซึม (Mettenleiter, 2002) จากการศึกษาค้นคว้าพบแคพซิดภายในนิวเคลียสของเซลล์เป็นจำนวนน้อยมาก ส่วนใหญ่จะพบในส่วนของไฮโดพลาสซึม โดยความแตกต่างจากการศึกษาอื่นที่พบอาจเกิดจากการใช้เซลล์เพาะเลี้ยงในการทดลองที่ต่างกัน พบรายงานการศึกษาเชื้อไวรัสเคเอชวีในเซลล์หลายๆชนิด คือ Common Carp Brain cell line (CCB) ซึ่งเตรียมจากสมองของปลาไน (Dishon *et al.*, 2007) เซลล์ NGF-2 และ NGF-3 จาก เซลล์เยื่อบุ (epithelium) ของปลาแพนซีคาร์พ (Miwa *et al.*, 2007) และ เซลล์ KF-1 ที่พัฒนาจากเนื้อเยื่อชั้นใต้ผิวหนัง (epidermis) จากครีบของปลาแพนซีคาร์พ (Hedrick *et al.*, 2000) พบว่าเซลล์ KF-1 เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงที่พบไวรัสภายในเซลล์น้อยกว่าเซลล์ชนิดอื่น เมื่อทำการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อีเล็กตรอน (Miwa *et al.*, 2007) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่เคเอฟเซลล์อาจจะมีความเหมาะสมน้อยในการศึกษาเชื้อไวรัสเคเอชวีภายใต้กล้องจุลทรรศน์อีเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

ในการศึกษานี้พบแคพซิดที่กำลังเคลื่อนผ่านเยื่อหุ้มนิวเคลียสออกสู่ไฮโดพลาสซึมน้อยมาก พบเพียงแคพซิดเป็นวงกลมชั้นเดียวภายในมีแกนติดสปีเข็มบริเวณเยื่อหุ้มนิวเคลียส เช่นเดียวกับในการศึกษาของ Miwa *et al.* (2007) โดยการ Budding ของแคพซิดบริเวณเยื่อหุ้มนิวเคลียสชั้นใน และ enveloped capsid ในบริเวณเยื่อหุ้มนิวเคลียสชั้นในกับชั้นนอก (perinuclear space) จะมีโอกาสพบได้น้อยเนื่องจากเป็นกระบวนการที่มีการเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว

(Granzow *et al.*, 1997) โดยมีการศึกษาถึงขั้นตอนการเปลี่ยนรูปร่างและเคลื่อนที่ออกจากนิวเคลียสในการติดเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์บางชนิดในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Gibson, 1996) พบว่าจุดที่เกิดการ budding ของไวรัสนั้นจะมีการสร้างกลุ่มของสารที่ติดสีอิเล็กตรอนเข้ม (electron dense material) ขึ้นภายในบริเวณของเยื่อหุ้มนิวเคลียสชั้นในซึ่งจะเป็นส่วนที่ติดอยู่ได้ primary virion (Granzow *et al.*, 2001) การที่ไม่พบลักษณะดังกล่าวจากการศึกษาในครั้งนี้ อาจเกิดจากขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง หรือ จากลักษณะจำเพาะของเชื้อเคอเซวีที่จะไม่พบขั้นตอนนี้ในขบวนการเจริญของไวรัสภายในเซลล์ (Miwa *et al.*, 2007)

จากการศึกษาในครั้งนี้ พบระยะการเจริญของไวรัสมากที่สุดภายในไซโตพลาสซึม แคพซิดที่พบส่วนใหญ่จะเห็นเป็นวงสองชั้น มีจุดศูนย์กลางเป็นแกนติดสีอิเล็กตรอนจาง คล้ายกับแคพซิดชนิดที่ 1 ในการทดลองของ Miwa *et al.* (2007) และน่าจะเปรียบได้กับแคพซิดชนิดบี (B-type) ในการติดเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม วงกลมชั้นในที่พบน่าจะประกอบด้วยแผ่นหรือแกนของโปรตีนบรรจุอยู่ภายใน (Gibson, 1996) ชนิดของแคพซิดที่พบรองลงมาคือ ชนิดที่มีแกนภายในติดสีอิเล็กตรอนเข้ม หรือเทียบได้กับแคพซิดชนิดที่ 2 ในการศึกษาเชื้อเฮอร์ปีส์ของ Miwa *et al.* (2007) และเทียบได้กับชนิดซี (C-type) ของเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งคาดว่า จะมีดีเอ็นเอบรรจุอยู่ภายใน (Gibson, 1996) และพบแคพซิดที่ภายในมีลักษณะว่างเปล่า เทียบได้กับแคพซิดชนิดที่ 3 ในการทดลองของ Miwa *et al.* (2007) และแคพซิดชนิดเอ (A-type) ของเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Gibson, 1996; Granzow *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 2005) โดยแคพซิดชนิด A น่าจะเป็นผลผลิตที่ไม่สมบูรณ์และมีความบกพร่อง (Shao *et al.*, 1993; Yu *et al.*, 2005) จากลักษณะแคพซิดที่พบในการติดเชื้อเคอเซวีซึ่งมีความคล้ายคลึงกับลักษณะที่พบในเฮอร์ปีส์ไวรัสในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม อาจบ่งชี้ว่าไวรัสมีขบวนการสร้างด้วยกลไกที่คล้ายกัน ในเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แคพซิดที่พัฒนาเต็มที่เคลื่อนเข้าสู่ไซโตพลาสซึม โดยการรวมตัวกันของชั้นไขมันที่เป็นเปลือกของไวรัส (primary envelope) กับเยื่อหุ้มนิวเคลียสชั้นนอก แล้วปล่อยแคพซิดเปลือกเข้าสู่ไซโตพลาสซึม แคพซิดจะเกิดการสร้างเปลือกหุ้มที่สอง (secondary envelope) อย่างสมบูรณ์ โดยการแบ่งตัวเข้าสู่ cytoplasmic vesicle จากนั้น vesicle จะมาเชื่อมกับเยื่อหุ้มเซลล์ โดยไวรัสที่โตเต็มที่พร้อมที่จะก่อโรคต่อได้ ก็จะถูกปล่อยออกนอกเซลล์ (Mettenleiter, 2002) จากการศึกษาเชื้อไวรัสเคอเซวีในครั้งนี้พบการเคลื่อนของแคพซิดเข้าสู่บริเวณไซโตพลาสซึม โดยการ budding ของ แคพซิดเข้าสู่ perinuclear space หรือ เข้าสู่ cytoplasmic vesicle แต่พบได้น้อยเช่นเดียวกับการศึกษาของ Miwa *et al.* (2007) ที่สังเกตพบแคพซิดที่กำลังจะทะลุผ่านเยื่อหุ้มนิวเคลียสชั้นในออกมาและพบ enveloped capsid ภายในพื้นที่ระหว่างเยื่อหุ้มนิวเคลียสชั้นในกับชั้นนอก ได้น้อยกว่าการศึกษาในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Granzow

et al., 2001) อาจเนื่องจากชั้นตอนนี้มีกระบวนการเกิดที่รวดเร็วเช่นเดียวกับการเคลื่อนออกจากนิวเคลียส (Miwa *et al.*, 2007) การ budding ของแคพซิดภายในนิวเคลียสออกสู่ perinuclear space นั้นเป็นลักษณะจำเพาะหนึ่งในการติดเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ สมมติฐานหนึ่ง กล่าวว่า วิจารณ์ที่เคลื่อนผ่านจากบริเวณเยื่อหุ้มนิวเคลียสออกสู่ไซโตพลาสซึมจะไม่มี การเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (Darlington and Moss, 1968; Johnson and Spear, 1982; Campadelli-Fiume *et al.*, 1991) แต่จากการศึกษาในภายหลังพบว่าสมมติฐานนี้ไม่ถูกต้อง โดยการศึกษาที่เป็นที่ยอมรับพบว่า จะมีการเชื่อมกันของ primary envelope กับเยื่อหุ้มนิวเคลียสชั้นนอกของเซลล์ก่อน แล้วจึงปล่อยแคพซิดเคลื่อนเข้าสู่ไซโตพลาสซึม เกิดการสร้าง envelope ใหม่อีกครั้ง โดยการ budding เข้าสู่ cytoplasmic vesicle และเกิดขบวนการสร้างสารเคลือบผิวด้านนอก ก่อนที่จะกลายเป็นไวรัสที่โตเต็มที่พร้อมที่จะติดเชื้อเซลล์อื่นๆต่อไป (Mettenleiter, 2002) จากการศึกษาผลของสารสกัดพลาสมาในการต้านเชื้อไวรัสเคเอชวีพบว่า แคพซิดที่กำลัง budding เข้าสู่ perinuclear space มีลักษณะรูปร่างที่ผิดปกติ และติดสีเข้ม อีกทั้งพบ enveloped capsid ที่เกิดการโป่งพองของ envelope และ envelope capsid ที่มีการสร้างเส้นใยโมอิลินภายใน แสดงถึงความเสื่อม ทำให้ไม่สามารถเจริญเป็นไวรัสต่อไปได้อย่างสมบูรณ์ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดพลาสมาส่งผลทำให้เกิดความผิดปกติในกลไกการพัฒนาของเชื้อหลังจากติดเชื้อเข้าสู่เซลล์แล้ว โดยรบกวนขบวนการเจริญของไวรัสภายในเซลล์ได้ในหลายขั้นตอนของการพัฒนา แสดงให้เห็นว่าสารสกัดไม่เพียงแต่จะสามารถทำลายเชื้อได้โดยตรงแล้ว (Sakdarat *et al.*, 2009) แต่สามารถที่จะทำให้เชื้อที่กำลังเจริญเติบโตภายในเซลล์เกิดการเสียหายไม่สามารถที่จะพัฒนาเป็นเชื้อไวรัสที่สมบูรณ์ต่อไปได้ แต่อย่างไรก็ดีจากการทดลองสามารถพบไวรัสที่สมบูรณ์ (mature virion) อยู่ภายนอกเซลล์และบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ที่เสียหาย มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 170-200 นาโนเมตร มีเปลือกหุ้มสองชั้นและด้านนอกขรุขระ แคพซิดภายในจะมีสารติดสีอิเล็กตรอนบรรจุอยู่เต็ม ในขณะที่แคพซิดที่กำลังเจริญ (enveloped capsid) จะมีช่องว่างรอบแกนกลาง นอกจากนี้ผิวชั้นนอกของแคพซิดที่มีการเจริญในไซโตพลาสซึมและไวรัสที่โตเต็มที่ จะหนาและมีแกนกลางที่ติดสีอิเล็กตรอนเข้มมากกว่าแคพซิดที่อยู่ในพื้นที่ระหว่างเยื่อหุ้มนิวเคลียส (Miwa *et al.*, 2007)

5.2 บทสรุป และข้อเสนอแนะ

จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ยาอะซัยโคลเวียในความเข้มข้นที่มากที่สุดที่ไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ คือ 10 $\mu\text{g/ml}$ ไม่มีประสิทธิภาพในการนำมาใช้ในการต้านเชื้อไวรัสเคเอชวีในเซลล์ปลาคาร์พ ในขณะที่สารสกัดพญายอในความเข้มข้น 0.475 mg/ml มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อไวรัสทั้งก่อนและหลังจากที่มีการติดเชื้อเข้าสู่เซลล์ ซึ่งอาจเกิดจากยาอะซัยโคลเวียที่ใช้ในการทดลองมีความเข้มข้นที่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ต่ำกว่าความเข้มข้นที่ยาจะมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อไวรัส ส่งผลให้ไม่สามารถออกฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสเคเอชวีในเคเอฟเซลล์ได้ หรือเกิดเนื่องจากกลไกการจับกันของยาอะซัยโคลเวียกับโอมิตดินคัยเนสของไวรัสอาจมีความแตกต่างกันกับกลไกในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Hussein *et al.*, 2007; Ilouze *et al.*, 2006) อีกทั้งมีความเป็นไปได้ที่อัตราการเกิด phosphorylation ภายในเซลล์เคเอฟซีต่ำกว่าเซลล์ที่มีรายงานการทดสอบฤทธิ์ของยาอะซัยโคลเวียในการต้านเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ในมนุษย์ (Brandi *et al.*, 2001; Sutton and Boyd, 1993; Hammer *et al.*, 1982) ยาจึงไม่สามารถออกฤทธิ์ในการต้านเชื้อไวรัสเคเอชวีในเคเอฟเซลล์ได้ ในขณะที่สารสกัดพญายอมีประสิทธิภาพและมีคุณสมบัติในการต้านเชื้อไวรัสเคเอชวีในเคเอฟเซลล์ โดยจากการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าสารสกัดพญายอจะออกฤทธิ์ทำลายเชื้อไวรัสโดยตรงและรบกวนขบวนการแบ่งตัวของไวรัส ทำให้ไวรัสมีรูปร่างผิดปกติไปจนไม่สามารถเกิดการแบ่งตัวภายในเซลล์ และไม่มีประสิทธิภาพในการติดเชื้อเข้าสู่เซลล์ต่อไปได้ แต่เนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารสกัดพญายอที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ คือ ที่ 4.75 mg/ml กับความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อไวรัส คือ 0.475 mg/ml นั้นมีความแตกต่างกันน้อย แสดงให้เห็นว่าสารสกัดมีความปลอดภัยในการใช้ (safety margin) ค่อนข้างต่ำ ควรที่จะต้องมีการศึกษาต่อไปโดยทำการทดลองในเซลล์เพาะเลี้ยงหลายชนิดมากขึ้น เพื่อศึกษาแนวโน้มของค่าความปลอดภัยในการใช้รักษา (therapeutic index) เพื่อที่จะได้มีความปลอดภัยอย่างสูงสุดเมื่อนำไปทดลองใช้ในตัวปลา นอกจากนี้ควรมีการทดลองในปลาเพื่อศึกษาถึงผลของยาในสัตว์ทดลอง และเพื่อที่จะหาขนาดของยาที่มีประสิทธิภาพในการรักษาจริง รวมทั้งนำไปพัฒนาให้อยู่ในรูปแบบที่เหมาะสมกับการใช้งานในทางสัตวน้ำ โดยนอกจากสารสกัดพญายอจะเป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อไวรัสเคเอชวีในปลาแล้ว ยังมีความเป็นไปได้ในการนำมาใช้เพื่อทำลายหรือลดปริมาณเชื้อไวรัสในสภาพแวดล้อม เนื่องจากสารสกัดพญายอสามารถที่จะลดปริมาณของเชื้อลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หลังจากเชื้อได้สัมผัสกับยาเป็นเวลานานตั้งแต่ 1 – 4 ชั่วโมง ก่อนการติดเชื้อเข้าสู่เซลล์ เป็นการช่วยลดปริมาณเชื้อในน้ำหรือในตะกอนดินต่างๆ ลดโอกาสในการติดเชื้อหรือการก่อให้เกิดโรคในปลาลง ช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตพร้อมไปกับการทำการรักษาการติดเชื้อแทรกซ้อนอื่นๆ ร่วมกับการเพิ่มภูมิคุ้มกันของ

สิ่งแวดล้อม นอกจากนี้การที่สารสกัดพญายอมีฤทธิ์ลดการอักเสบและสามารถลดความเจ็บปวดได้ (Chuakul, 1986; Thamaree *et al.*, 1998; Thamaree *et al.*, 2001) จะเป็นประโยชน์ในการเสริมประสิทธิภาพในการรักษาปลาคาร์พที่มีการติดเชื้อและแสดงอาการซึ่งส่วนใหญ่มักพบการติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อน ทำให้ปลาอ่อนแอและเสียชีวิตอย่างรวดเร็วขึ้น ดังนั้นการใช้สารสกัดพญายอมีประโยชน์ในการนำมาใช้รักษาหรือบรรเทาการติดเชื้อเคเอชวีในปลาคาร์พได้โดยพัฒนารูปแบบการใช้ให้เหมาะสมต่อไปในอนาคต



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- กองวิจัยและพัฒนาสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. 2533. คู่มือสมุนไพรเพื่อการสาธารณสุขมูลฐาน. กรุงเทพมหานคร: Text and Journal Corporation.
- คณะกรรมการแห่งชาติด้านยา. 2542. บัญชียาสำหรับโรงพยาบาลและสถานบริการสาธารณสุข. บัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2542, หน้า 12 และ 39. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด.
- คณะกรรมการแห่งชาติด้านยา. 2543. บัญชียาจากสมุนไพร. บัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2542. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด.
- ชินฤดี ไชยวสุ ทวีผล เดชาติวงศ์ ณ อยุธยา เครือวัลย์ พลจันทร์ ปราณี ขวลิตธำรง และสุทธิโชค จงตระกูลศิริ. 2535. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดใบเสลดพังพอนและใบพญาสัตตอเชื้อ Herpes simplex virus type-2 ในหลอดทดลอง. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 34(4): 153-158.
- ชุตินันท์ กันตสุข. 2534. การทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาฤทธิ์ยับยั้งไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพล็กซ์ของสารสกัดสมุนไพรไทยบางชนิด. วิทยานิพนธ์คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ดร.ณ เพ็ชรพลาย จารีย์ บันสิทธิ์ ณัฐธร จันทร์สุวานิชย์ ประถม ทองศิริรักษ์ และชาติรี ชาญประเสริฐ. 2544. สมุนไพรพื้นบ้าน(ฉบับรวบรวม). สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 85.
- เต็ม สมิตินันท์. 2544. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย. ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้ สำนักวิชาการป่าไม้: กรมป่าไม้.
- นันทริกา ชันช้อย และ จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์. 2548. การสำรวจโรคเคเอชวีของปลาแคร์พในเขตกรุงเทพฯ และปริมณฑล ระหว่างเดือนมีนาคมถึงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2548. สัตวแพทยสาร. 56 (3): 13-21.
- นันทริกา ชันช้อย จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์ และ มณฑกานต์ วงศ์ภากร. 2550. โครงการสำรวจและพัฒนาวิธีการชันสูตรโรคเคเอชวี ในปลาแคร์พในประเทศไทย. รายงานการศึกษาระดับสมบูรณณ์. สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- นันทวัน บุญยะประภัสร์. 2547. ว่านหางจระเข้กับเริ่มและงูสวัด. จุลสารข้อมูลสมุนไพร. 22(1): 18-21.

- นิษฐกานต์ ภัทรกานต์ และ สุภาพร เบญจสุพัฒน์นันท์. 2544. การพัฒนาตำรับเจลเสลดฟังพอนตัวเมียเพื่อใช้ภายนอก. โครงการพิเศษ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
- วรา พานิชเกรียงไกร ศิรินทร หยิบโชคอนันต์ และ ปิยะรัตน์ จันทร์ศิริพรชัย. 2548. การใช้ยา A to Z สำหรับสัตว์แพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ศิรินทรสาร.
- ศรัณยา ธาราแสง โชติกา บุญหลง สุทธิโชค จงตระกูลศิริ ปัทมาวดี เสตะกัณณะ และ ฤกษ์ตรา จันทรสุนาณิชย์. 2549. การพัฒนาตำรับน้ำยาบ้วนปากพญาขอ. วารสารอาหารและยา. 13(1): 27-34.
- ศิริพร เหลืองกอบกิจ. 2542. พญาปล้องทอง. จุลสารสมุนไพรร. 16(3):3-9.
- สมชาย แสงกิจพร เครือวัลย์ พลจันทร์ ปราณี ธวัชสุภา มาลี บรรจบ และ ปราณี ชวลิตดำรง. 2536. การรักษาผู้ป่วยโรคเรื้อรังที่อวัยวะสืบพันธุ์ชนิดเป็นซ้ำด้วยยา จากสารสกัดของใบพญาขอ. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 18(5): 226-231.
- สุมิตา วิเศษสุทธิชัย สุภาพร เตชะมหามณีรัตน์ วราภรณ์ จรรยาประเสริฐ และ นพมาศ สุนทรเจริญนนท์. 2548. การพัฒนาเจลสารสกัดชะเอมเหนื่อเป็นยาต้านโรคม. วารสารสมุนไพรร. 12(2): 11-22.

ภาษาอังกฤษ

- Aoki, T., Hirono, I., Kurokawa, K., Fukuda, H., Nahary, R., Eldar, A., Davison, A.J., Waltzek, T.B., Bercovier, H. and Hedrick, R.P. 2007. Genome sequences of three Koi herpesvirus isolates representing the expanding distribution of an emerging disease threatening koi and Common Carp worldwide. *J. Virol.* 81(10): 5058-5065.
- Bercovier, H., Fishman, Y., Nahary, R., Sinai, S., Zlotkin, A., Eyngor, M., Golad, O., Eldar A. and Hedrick, R.P. 2005. Cloning of the Koi herpesvirus (KHV) gene encoding thymidine kinase and its use for a highly sensitive PCR based diagnosis. *Microbiology.* 5: 13.
- Brandi, G., Schiavano, G.F., Balestra, E., Tavazzi, B., Perno, C., and Magnani, M. 2001. The potency of acyclovir can be markedly different in different cell types. *Life Sci.* 69: 1285-1290.
- Campadelli-Fiume, G., Farabegoli, F., Di Gaeta, S. and Roizman, B. 1991. Origin of unenveloped capsids in the cytoplasm of cells infected with Herpes simplex virus 1. *J. Virol* 65: 1589-1595.

- Chotikieat, U. 1989. Clinical trials on the treatment of Herpes simplex, Herpes zoster and aphthous ulcer with *Clinacanthus nutans* (Burm. f.). Workshop "Pharmacist and Development of Medicinal Plants". Faculty of Pharmacy, Prince of Songkla University. May 23-25.
- Chuakul, W. 1986. Chemical study of the anti-inflammatory agents from the leaves of Phaya Plong Thong, *Clinacanthus nutans* (Burm. f.) Lindau. M.Sc. Thesis, Faculty of Pharmacy, Mahidol University.
- Clarke, P.G.H. 1990. Development cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat. Embryol.* 181: 195-213.
- Costes, B., Stalin Raj, V., Michel, B., Fournier, G., Thirion, M., Gillet, L., Mast, J., Liefbrig, F., Bremont, M. and Vanderplasschen, A. 2009. The major portal of entry of Koi herpesvirus in *Cyprinus carpio* is the skin. *J. Virol.* 83(7): 2819-2830.
- Dampawan, P. 1976. Studies of the chemical constituents of the *Clinacanthus nutans* (Acanthaceae) and *Zingiber Cassumunar* Roxb. M.S. Thesis, Faculty of Pharmacy, Mahidol University.
- Dampawan, P., Huntrakul, C., and Reutrakul, V. 1977. Constituents of *Clinacanthus nutans* and the crystal structure of LUP-20 (29)-ene-3-one. *J. Sci. Soc. Thailand.* 3: 14-26.
- Darlington, R.W. and Moss, L.H. 1968. Herpesvirus envelopment. *J. Virol.* 2: 48-55.
- Dishon, A., Perelberg, A., Bishara-Shieban, J., Ilouze, M., Davidovich, M., Werker, S. and Kotler, M. 2005. Detection of carp interstitial nephritis and gill necrosis virus in fish droppings. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 7285-7291.
- Dishon, A., Davidovich, M., Ilouze, M. and Kotler, M. 2007. Persistence of Cyprinid herpesvirus 3 in infected cultured carp cells. *J. Virol.* 81(9): 4828 - 4836.
- Elion, G.B. 1982. Mechanism of action and selectivity of acyclovir. *Am. J. Med.* 73(1A): 7-13.
- Gibson, W. 1981. Structural and nonstructural proteins of strain Colburn cytomegalovirus. *Virology.* 111: 516-537.
- Gibson, W. 1996. Structure and assembly of the virion. *Intervirology.* 39: 389-400.

- Gibson, W. and Roizman, B. 1972. Proteins specified by Herpes simplex virus VIII. Characterization and composition of multiple capsid forms of subtype 1 and 2. *J. Virol.* 10: 1044-1052.
- Gilad, O., Yun, S., Andree, K.B., Adkison, M.A., Zlorkin, A., Bercovier, H., Eldar, A. and Hedrick, R.P. 2002. Initial characteristics of Koi herpesvirus and development of a polymerase chain reaction assay to detect the virus in koi, *Cyprinus carpio* koi. *Dis. Aquat. Org.* 48: 101–108.
- Gilad, O., Yun, S., Adkison, M.A., Way, K., Willis, N.H., Bercovier, H. and Hedrick, R.P. 2003. Molecular comparison of isolates of an emerging fish pathogen, Koi herpesvirus, and the effect of water temperature on mortality of experimentally infected koi. *J. Gen. Viro.* 84: 2661-2668.
- Gilad, O., Yun, S., Zagmutt-Vergara, F. J., Leutenegger, C. M., Bercovier, H. and Hedrick, R. P. 2004. Concentrations of a Koi herpesvirus (KHV) in tissues of experimentally infected *Cyprinus carpio* koi as assessed by real-time TaqMan PCR. *Dis. Aquat. Organ.* 60:179–187.
- Granzow, H., Weiland, F., Jons, A., Klupp, B.G., Karger, A. and Mettenleiter, T.C. 1997. Ultrastructural analysis of the replication cycle of Pseudorabies virus in cell culture: a reassessment. *J. Virol.* 71: 2072-2082.
- Granzow, H., Klupp, B.G., Fuchs, W., Veits, J., Osterrieder, N. and Metteleiter, T.C. 2001. Egress of Alphaherpesviruses: comparative ultrastructural study. *J. Virol.* 85: 3675-3684.
- Gray, W.L., Mullis, L., LaPatra, S.E., Groff, J.M. and Goodwin, A. 2002. Detection of Koi herpesvirus DNA in tissues of infected fish. *J. Fish Dis.* 25: 171–178.
- Gunimaladevi, I., Kono, T., Venugopal, M.N. and Sakai, M. 2004. Detection of Koi herpesvirus in common carp, *Cyprinus carpio* L., by loop-mediated isothermal amplification. *J. Fish Dis.* 27: 583–589.
- Hammer, S.M., Kaplan, J.C., Lowe, B.R. and Hirsch, M.S. 1982. Alpha interferon and acyclovir treatment of Herpes simplex virus in lymphoid cell cultures. *Antimicrob. Agents Chemother.* 21(4): 634-640.

- Hedrick, R.P., Gilad, O., Yun, S., Spangenberg, J.V., Marty, G.D., Nordhausen, R.W. and Kebus, M.J. 2000. Associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of common carp. *J. Aquat. Anim. Health.* 12: 44-57.
- Hedrick, R.P., Gilad, O., Yun, S., Mchowell, T.S., Waltzek, T.B., Kelley, G.O. and Adkinson, M.A. 2005. Initial isolation and characterization of a herpes-like virus (KHV) from koi and common carp. *Bull. Fish Res. Agen.* 2: 1-7.
- Hedrick, R.P., Waltzek, T.B. and McDowell, T.S. 2006. Susceptibility of koi carp, common carp, goldfish and goldfish x common carp hybrids to Cyprinid herpesvirus-2 and herpesvirus-3. *J. Aquat. Anim. Health.* 18: 26-34.
- Henics, T. And Wheatley, D.N. 1999. Cytoplasmic vacuolation, adaptation and cell death: A view on new perspectives and features. *Biol. Cell.* 91: 485-498.
- Hussein, I.T.M., Menashy, R.V. and Field, H.J. 2007. Pencyclovir is a potent inhibitor of Feline herpesvirus-1 with susceptibility determined at the level of virus-encoded thymidine kinase. *Antiviral Res.* 78(3): 268-274.
- Hutoran, M., Ronen, A., Perelberg, A., Ilouze, M., Dishon, A., Bejerano, I., Chen, N. and Kotler, M. 2005. Description of an as yet unclassified DNA virus from diseased *Cyprinus carpio* species. *J. Virol.* 79: 1983-1991.
- Ilouze, M., Dishon, A. and Kotler, M. 2006. Characterization of a novel virus causing a lethal disease in carp and koi. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70: 147-156.
- Janwitayanuchit, W., Suwanborirux, K., Patarapanich, C., Pummangura, S., Lipipun, V. and Vilaivan, T. 2003. Synthesis and anti-Herpes simplex viral activity of monoglycosyldiglycerides. *Phytochemistry.* 64:1253-64.
- Johnson, D.C. and Spear, P.G. 1982. Monensin inhibits the processing of Herpes simplex virus glycoproteins, their transport to the cell surface and the egress of virions from infected cells. *J. Virol.* 43: 1102-1112.
- Kacew, S. 1990. Drug toxicity and metabolism in pediatrics. Florida, United state: CRC press, Inc.
- Kamimura, S., Hagi, T., Kurata, S., Takatsu, K., Sogo, H., Hoshino, T. and Nakamura, K. 2007. Evaluation of quenching probe (QProbe) PCR assay for quantification of the Koi herpesvirus (KHV). *Microbes Environ.* 22(3): 223-231.

- Kittisiripornkul, S, Bunyaphrathatsara, N, Tanasomwong, W. and Satayavivad, J. 1987. The anti-inflammatory action and toxicological studies of *Clinacanthus nutans*. M.S. thesis, Faculty of Science, Mahidol University. 135 pp.
- Klingenberg, R.J. 1996. Therapeutics. In: Mader DR(ed), Reptile Medicine and Surgery, p. 299-321. Philadelphia: WB Saunders.
- Kuo, Y.C., Kuo, Y.H., Lin, Y.L. and Tsai, W.J. 2006. Yatein from *Chamaecyparis obtusa* suppresses Herpes simplex virus type 1 replication in Hela cells by interruption the immediate-early gene expression. *Antiviral Res.* 70: 112–120.
- Laskin, O.L., Longstreth, J.A., Saral, R., Miranda, P., Keeney, R. and Lietman, P.S. 1982. Pharmacokinetics and tolerance of acyclovir, a new anti-Herpes virus agent in humans. *Antimicrob. Agents Chemother.* 21(3): 393-398.
- Lee, N.S., Kobayashi, J. and Miyazaki, T. 1999. Gill filament necrosis in farmed Japanese eels, *Anguilla japonica* (Temminck & Schlegel), infected with *Herpesvirus anguillae*. *J. Fish Dis.* 22: 457– 463.
- Lin, J., Li, H. and Yu, J. 1983. Studies on the chemical constituents of Nui Xu Hua (*Clinacanthus nutans*). *Zhong Cao Yao.* 14: 337-338.
- Liu, J., Yang, F., Ye, L. B., Yang, X. J., Timani, K. A. and Zheng, Y. 2004. Possible mode of action of antiherpetic activities of a proteoglycan isolated from the mycelia of *Ganoderma lucidum* *In vitro*. *J. Ethnopharmacol.* 95: 265-272.
- McGeoch, D. J., Rixon, F.J. and Davison, A.J. 2006. Topics in Herpesvirus genomics and evolution. *Virus Res.* 117: 90–104.
- Mettenleiter, T.C. 2002. Herpesvirus assembly and egress. *J. Virol.* 76: 1537–1547.
- Mettenleiter, T.C., Klupp, B.G. and Granzow, H. 2009. Review Herpesvirus assembly: an update. *Virus Res.* 143: 222-234.
- Miwa, S., Ito, T. and Sano, M. 2007. Morphogenesis of Koi herpesvirus observed by electron microscopy. *J. Fish Dis.* 30: 715-722.
- Miyazaki, T., Kuzuya, Y., Yasumoto, S., Yasuda, M. and Kobayashi, T. 2008. Histopathological and ultrastructural features of Koi herpesvirus (KHV) infected carp *Cyprinus carpio*, and the morphology and morphogenesis of KHV. *Dis. Aquat. Organ.* 80:1–11.

- Nii, S. 1992. Electron microscopic study on the development of Herpesviruses. *J. Electron Microsc.* 41: 414-423.
- OIE, 2006. Koi herpesvirus disease. *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals* 2006. Fifth edition. France: World Organization for Animal Health.
- Perdue, M.L., Cohen, J.C., Kemp, M.C. and Randall, C.C. 1975. Characterization of three species of nucleocapsids of Equine herpesvirus type-1 (EHV-1). *Virology*. 64: 187-204.
- Perelberg, A., Smirnov, M., Hutoran, M., Diamant, M., Bejerano, Y., and Kotler, M. 2003. Epidemiological description of a new viral disease afflicting cultured *Cyprinus carpio* in Israel. *Isr. J. Aquacult.* 55(1): 5-12.
- Pikarsky, E., Ronen, A., Abramowitz, J., Levavi-Sivan, B., Hutoran, M., Shapira, Y., Steinitz, M., Perelberg, A., Soffer, D. and Kotler, M. 2004. Pathogenesis of acute viral disease induced in fish by carp interstitial nephritis and gill necrosis virus. *J. Virol.* 78: 9544–9551.
- Pikulkaew, S., Banlunara, W., Meeyam, T., and Khattiya, R. 2005. The detection of Koi herpesvirus (KHV) in *Cyprinus carpio* koi in Chiang Mai, Thailand. *Proceeding of the 1st scientific Meeting of the Asian Zoo & Wildlife in Asia; 2005 Oct 28-30.* Bangkok, Thailand. College of Veterinary Medicine, Kasetsart University.
- Promchan, K. 2005. The study of iron contents in Curcuma products and its adverse effects in rats. M.Sc. Thesis, Faculty of Graduate studies, Mahidol University.
- Rang, H.P., Dale, M.M. and Ritter, J.M. 1999. Antiviral drug. In H.P. Rang, M.M. Dale, J.M. Ritter (Eds.), *Pharmacology*. Churchill Livingstone: New York. 708–717.
- Reed, L.J. and Muench, H. 1938. A Simple method of estimating fifty percent end points. *Am. J. Hyg.* 27: 493-497.
- Roberts, R. J., and Ellis, A. E. 2001. The anatomy and physiology of teleosts. In R. J. Roberts (ed.), *Fish pathology* 3rd ed., p. 12–54. London, United Kingdom: W. B. Saunders.
- Ronen, A., Perelberg, A., Abramovitz, J., Hutoran, M., Tinman, S., Bejerano, I., Steinitz, M. and Kotler, M. 2003. Efficient vaccine against the virus causing a lethal disease in cultured *Cyprinus carpio*. *Vaccine*. 21(32): 4625-4743.

- Sadler, J., Marecaux, E. and Goodwin, A.E. 2008. Detection of Koi herpesvirus (CyHV-3) in goldfish, *Carassius auratus* (L.), exposed to infected koi. *J. Fish Dis.* 31: 71–72.
- Sakdarat, S., Shuyprom, A., Pientong, C., Ekalaksananan, T. and Thongchai, S. 2009. Bioactive constituents from the leaves of *Clinacanthus nutans* Lindau. *Bioorg. Med. Chem.* 17: 1857-1860.
- Sangkitporn, S., Polchanandara, K., Balachandra, K., Dechatiwongse na Ayudhaya, T., Bunchob, M. and Jayavas, C. 1995. Treatment of Herpes zoster patients with *Clinacanthus nutans* (bi phaya yaw) extract. *J. Med. Assoc. Thai.* 78: 624-627.
- Satayavivad, J., Bunyapraphatsara, N., Kittisiripornkul, S. and Tanasomwong, W. 1996. Analgesic and anti-inflammatory activities of extract of *Clinacanthus nutans* (Burm. f.) Lindau. *Thai J. Phytophar. Sci.* 3: 7-17.
- Schuhmacher, A., Reichling, J. and Schnitzler, P. 2004. Virucidal effect of peppermint oil on the enveloped viruses Herpes simplex virus type 1 and type 2. *Phytomedicine.* 10: 504-510.
- Shao, L., Rapp, L.M. and Weller, S.K. 1993. Herpes simplex virus 1 alkaline nuclease is required for efficient egress of capsids from the nucleus. *Virology.* 196: 146-162.
- Snoeck, R. 2000. Antiviral therapy of Herpes simplex. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 16: 157-159.
- Sutton, D. and Boyd, M.R. 1993. Comparative activity of penciclovir and acyclovir in mice infected intraperitoneally with Herpes simplex virus type 1 SC16. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37(4): 642-645.
- Suwanna, V., Kanchana, D., and Risara, J. 1992. Antiviral drug activity of *Clinacanthus nutans* (Burm. f.) Lindau to human Herpes type 2 in vero cells. Mahidol University annual research abstracts, January 1-December 31. 20-21.
- Tanasomwang, W. 1986. The screening of anti-inflammatory action of *Clinacanthus nutans* (Burm. f.): A critical evaluation of Carrageenan induced hind paw edema model. M.Sc. Thesis, Faculty of Science, Mahidol University.
- Thamaree, S., Rugruntham, K., Ruangrunsi, N., Thaworn, N. and Kemsri, W. 1998. The inhibitory effects of extracts of some herbal medicines on the

- production of proinflammatory cytokines by *In vitro* stimulated human blood cells. Thai J. Pharma. Sci. 22(3): 47.
- Thamaree, S., Rugrungham, K., Ruangrunsi, N., Thaworn, N. and Kemsri, W. 2001. The inhibitory effects of andrographolide and extracts of some herbal medicines on the production of proinflammatory cytokines by LPS-stimulated human blood cells. Chula. Med. J. 45(8): 661-670.
- Thawaranantha, D., Balachandra, K., Jongtrakulsiri, S., Chavalitturong, P., Bhumiswasdi, J., and Jayavasud, C. 1992. *In vitro* antiviral activity of *Clinacanthus nutans* on Varicella-zoster virus. Siriraj Hosp. Gaz. 44: 285-291.
- Waltzek, T.B., Kelley, G.O., Stone, D.M., Way, K., Hanson, L., Fukuda, H., Hirono, I., Aoki, T., Davison, A.J. and Hedrick, R.P. 2005. Koi herpesvirus represents a third Cyprinid herpesvirus (CyHV-3) in the family *Herpesviridae*. J. Gen. Virol. 86: 1659-1667.
- Yang, C.M., Cheng, H.Y., Lin, T.C, Chiang, L.C. and Lin, C.C. 2007. The *In vitro* activity of geraniin and 1, 3, 4, 6-tetra-O-galloyl- β -D-glucose isolated from *Phyllanthus urinaria* against Herpes simplex virus type 1 and type 2 infection. J. Ethnopharmacol. 110: 555-558.
- Yoosook, C., Panpisutchai, Y., Chaichana, S., Santisuk, T. and Reutrakul, V. 1999. Evaluation of anti-HSV-2 activities of *Barleria lupulina* and *Clinacanthus nutans*. J. Ethnopharmacol. 67: 179-187.
- Yoosook, C., Bunyaphatsara, N., Boonyakiat, Y. and Kantasuk, C. 2000. Anti-Herpes simplex virus activities of crude water extracts of Thai medicinal plants. Phytomedicine. 6(6): 411-419.
- Yu, X., Trang, P., Shah, S., Atanasov, I., Kim, Y., Bai, Y., Zhou, Z.H. and Liu, F. 2005. Dissecting human Cytomegalovirus gene function and capsid maturation by ribozyme targeting and electron cryomicroscopy. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America. 102: 7103-7108.



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก. ประกาศกรมประมง เรื่องการอนุญาตให้นำเข้าปลาตระกูลคาร์พ ปี พ.ศ.2546



ประกาศกรมประมง

เรื่อง การอนุญาตให้นำเข้าปลาตระกูลคาร์พ (Carp fish)

ตามที่ได้มีรายงานข่าวการแพร่ระบาดของโรค Herpesvirus ในปลาตระกูลคาร์พ ที่ประเทศญี่ปุ่น พบว่าการระบาดมีความรุนแรง และขยายพื้นที่ไปเป็นบริเวณกว้าง ตั้งแต่กลางเดือนตุลาคม 2546 เป็นต้นมา สร้างความเสียหายให้ป่อเลี้ยงปลาตระกูลคาร์พ (Carp fish) อย่างหนัก ซึ่งอาจแพร่กระจายไปยังประเทศใกล้เคียง และยังไม่สามารถควบคุมการระบาดของโรคได้

เพื่อป้องกันมิให้เกิดการแพร่ระบาดของโรสดังกล่าวจากการนำเข้า กรมประมงจึงของดการออกหนังสืออนุญาตให้นำเข้าปลาตระกูลคาร์พ (Carp fish) ไว้เป็นการชั่วคราวจนกว่าจะมีคำสั่งเปลี่ยนแปลง

สำหรับผู้ที่ได้รับอนุญาตให้นำเข้าปลาดังกล่าวแล้ว ก่อนประกาศกรมประมงฉบับนี้จะมีผลบังคับใช้ ขอให้กักกันพื้นที่ปลาที่นำเข้าไว้เป็นเวลา 15 วัน และสุ่มตัวอย่างปลาตระกูลคาร์พ (Carp fish) ที่นำเข้ามาตรวจที่สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำจืด สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด หากมีข้อสงสัยสอบถามรายละเอียดเพิ่มเติมได้ที่หมายเลขโทรศัพท์ 0 2579 4122 หรือ 0 2579 6803 หรือ 0 2561 4689 ในวันและเวลาราชการโดยด่วน

จึงประกาศมาเพื่อทราบโดยทั่วกัน

ประกาศ ณ วันที่ 18 พฤศจิกายน พ.ศ. 2546

สิทธิ บุญยรัตผลิน
(นายสิทธิ บุญยรัตผลิน)
อธิบดีกรมประมง

ภาคผนวก ข. ประกาศกรมประมง เรื่องการอนุญาตให้นำปลาตระกูลคาร์พเข้ามาในราชอาณาจักร
ภายใต้ระบบการกักกันโรค ปี พ.ศ. 2547



ประกาศกรมประมง

เรื่อง การอนุญาตให้นำปลาตระกูลคาร์พเข้ามาในราชอาณาจักร

ภายใต้ระบบการกักกันโรค

ตามที่ได้มีประกาศกรมประมง เรื่อง การงดอนุญาตให้นำเข้าปลาตระกูลคาร์พ (Carp fish) ลงวันที่ 18 พฤศจิกายน พ.ศ. 2546 ให้งดการออกหนังสืออนุญาตให้นำเข้าปลาตระกูลคาร์พ (Carp fish) ไว้เป็นการชั่วคราว เนื่องจากมีการแพร่ระบาดของโรคบางชนิดนั้น

เนื่องจากประเทศที่เคยมีการเกิดโรคเคเอชวี (KHV disease หรือ Koi herpesvirus disease) ในปลาคาร์พ ได้พัฒนาระบบการควบคุมและการตรวจรับรองการปลอดโรคดังกล่าวแล้ว เห็นควรให้มีการออกหนังสืออนุญาตให้นำปลาตระกูลคาร์พเข้ามาในราชอาณาจักรได้ แต่ต้องดำเนินการภายใต้ระบบการกักกันโรค เพื่อความปลอดภัยและป้องกันมิให้มีการนำโรคเข้ามาระบาดของในประเทศไทย กรมประมงจึงออกประกาศดังนี้

ข้อ 1 ให้ยกเลิกประกาศกรมประมง เรื่อง การงดอนุญาตให้นำเข้าปลาตระกูลคาร์พ (Carp fish) ลงวันที่ 18 พฤศจิกายน พ.ศ. 2546

ข้อ 2 กรมประมงจะพิจารณาออกหนังสืออนุญาตให้นำปลาตระกูลคาร์พ (Carp fish) เข้ามาในราชอาณาจักรเพื่อการเพาะเลี้ยงได้ภายใต้ระบบการกักกันโรค โดยผู้ประสงค์จะขอหนังสืออนุญาตดังกล่าวต้องปฏิบัติตามเงื่อนไขที่กำหนดไว้ท้ายประกาศนี้


จึงประกาศมาเพื่อทราบโดยทั่วกัน

ประกาศ ณ วันที่ 30 กันยายน พ.ศ. 2547

ภาคผนวก ค. แสดงสูตรอาหารสำหรับเลี้ยงเคเอฟเซลล์และสำหรับใช้ในการทดลอง

1. สูตรอาหารสำหรับเลี้ยงเคเอฟเซลล์ DMEM-L-15-10% ประกอบด้วย
60% DMEM (Duobecco's modified Eagle medium; Gibco® 12100-046)
30% Leibovitz (L-15) (Gibco® 41300-039)
10% FBS (Fetal Bovine Serum)
1% HEPES (pH 7.3)
1% 10000U/ml Penicillin-10000ug/ml Streptomycin (Gibco® 15140-122, 100-fold stock)
2 mM Glutamine (Gibco®25030-149, 200 mM glutamine)
2. สูตรอาหารสำหรับเลี้ยงเคเอฟเซลล์เพื่อใช้ในการทดลอง L-15-4% ประกอบด้วย
93% Leibovitz (L-15) (Gibco® 41300-039)
4% FBS (Fetal Bovine Serum)
2% 1MHEPES (pH 7.3)
1% 10000U/ml Penicillin-10000ug/ml Streptomycin (Gibco® 15140-122, 100-fold stock)
3. สูตรอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อไวรัสเคเอชวีเพื่อใช้ในการทดลอง L-15-2% ประกอบด้วย
95% Leibovitz (L-15) (Gibco® 41300-039)
2% FBS (Fetal Bovine Serum)
2% HEPES (pH 7.3)
1% 10000U/ml Penicillin-10000ug/ml Streptomycin (Gibco® 15140-122, 100-fold stock)

ภาคผนวก ง. แสดงใบรับรองคุณภาพของสารสกัดพญายอ หรือ เสลดพังพอน จากมูลนิธิ
โรงพยาบาลเจ้าพระยาอภัยภูเบศร




CERTIFICATE OF ANALYSIS
Chaopraya Abhaibhubejhr Hospital Foundation
32/7 Moo 12. A. Mueng, Prachinburi 25000, THAILAND. Tel (66)037 – 211088 Ext 2172 Fax. (66) 037 – 212716

Date of issue : 24-02-52	Product Name : สารสกัดเสลดพังพอน 95 %
Lot. No. : SSP A451	Analysis No. : 03-0017/52
Analysis Date : 19-02-52	

Test	Specification	Results Analysis
1. ลักษณะทางกายภาพ	ของเหลว หนืด	ของเหลว หนืด
2. สี	สีน้ำตาลปนแดง	สีน้ำตาลปนแดง
3. กลิ่น	กลิ่นเฉพาะ	กลิ่นเฉพาะ
4. ค่า pH	5.00 – 7.00	6.276
5. Alcohol content (%v/v)	75 - 96	76.95
6. ค่า Density	0.70 - 0.95	0.8676
7. การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์		
Aerobic Bacteria (CFU / g)	< 10 ³ CFU / g	< 1
Enterobacteria อื่นๆ (CFU / g)	< 10 ³ CFU / g	< 1
Yeast and Mold (CFU / g)	ต้องไม่พบ	ไม่พบ
<i>Escherichia coli</i>	ต้องไม่พบ	ไม่พบ
<i>Staphylococcus aureus</i>	ต้องไม่พบ	ไม่พบ
<i>Salmonella</i> spp.	ต้องไม่พบ	ไม่พบ
<i>Clostridium</i> spp.	ต้องไม่พบ	ไม่พบ
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ต้องไม่พบ	ไม่พบ

Approved Rejected

Analyst *กัญจวิ* Date24-02-52.....


 Manager

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวสุนิดา เหดระกุล เกิดเมื่อวันศุกร์ที่ 19 กันยายน พ.ศ. 2523 จบการศึกษาระดับประถมศึกษาจากโรงเรียนเซนต์โยเซฟคอนเวนต์ พ.ศ. 2535 จบการศึกษาระดับมัธยมต้นจากโรงเรียนสาธิต ศรีนครินทรวิโรฒ ปทุมวัน พ.ศ. 2538 จบการศึกษาระดับมัธยมปลายจากโรงเรียนเตรียมอุดมศึกษา พญาไท พ.ศ. 2541 จบการศึกษาในระดับปริญญาตรีจากคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ. 2548 หลังจากจบการศึกษาได้เข้าทำงานเป็นสัตวแพทย์ประจำ ณ ศูนย์วิจัยโรคสัตว์น้ำ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และเพื่อเป็นการเพิ่มพูนความรู้ทางด้านสัตว์น้ำ จึงได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิชาอายุรศาสตร์สัตวแพทย์เมื่อปี พ.ศ. 2549

ผลงานวิชาการระหว่างการศึกษา

- Chansue, N., Assawawongkasem, N., Haetrakul, T. and Mathura, Y. 2007. Morphological and Ultrastructural intraerythrocytic parasite of *Haemohormidium*-like in the sand tiger shark (*Carcharias Taurus*). (Oral presentation and full paper). In Proceeding of SEASTAR 2000 and Asia Biologging Science (The 8th SEASTAR 2000 Workshop). December 15-17, 2007. Royal Phuket City Hotel, Phuket, Thailand. *In Press*.
- Chansue, N., Haetrakul, T., Nawawipapan, T., Assawawongkasem, N. and Jongfuangparinya, F. 2007. Comparative Studies of Sea Turtle Prosthesis Efficiency Comparing Flapped and Non-Flapped Models. In Proceeding Ann. Con. Vet. Sci. Chula. April 26-27, 2006. TJVM. 37(1): 104
- Haetrakul, T., Munanansup, S., Assawawongkasem, N. and Chansue, N. 2007. A case report: Stomach foreign object in Whaleshark (*Rhincodon typus*) stranded in Thailand. (Oral presentation and full paper). In Proceeding of SEASTAR 2000 and Asia Biologging Science (The 8th SEASTAR 2000 Workshop). December 15-17, 2007. Royal Phuket City Hotel, Phuket, Thailand. *In Press*.