การศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรไทยต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสก่อโรค porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS)

โสภิตา ช่วยชู

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2556

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ชื่อเรื่อง

การศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรไทยต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสก่อโรค porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS)

โดย

โสภิตา ช่วยชู

พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการที่ปรึกษา .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วศิน เจริญตัณธนกุล)

วันที่ 20 เดือน มี.ค. พ.ศ. 2556

กรรมการที่ปรึกษา .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มงคล ถิรบุญยานนท์)

วันที่ 25 เดือน มีนาคม พ.ศ. 2556

กรรมการที่ปรึกษา .....

(ดร.ชุลีรัตน์ บรรจงลิขิตกุล)

วันที่ 13 เดือน มี.ค. พ.ศ. 2556

ประธานกรรมการประจำหลักสูตร .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มงคล ถิรบุญยานนท์)

วันที่ 25 เดือน มีนาคม พ.ศ. 2556

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จาตุพงศ์ วาฤทธิ์)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 29 เดือน มี.ค. พ.ศ. 2556

ชื่อเรื่อง การศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรไทยต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสก่อโรค porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS)

ชื่อผู้เขียน นางสาวโสภิตา ช่วยชู

ชื่อปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ประธานกรรมการที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วศิน เจริญตัณธนกุล

บทคัดย่อ

โรค PRRS สร้างความสูญเสียทางเศรษฐกิจต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกร โดยก่อให้เกิดความล้มเหลวทางระบบสืบพันธุ์และระบบทางเดินหายใจของสุกร ส่งผลให้การผลิตสุกรไม่มีประสิทธิภาพ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชสมุนไพร 3 ชนิด คือ พลูคาว (*Houttuynia cordata* Thunb) พญายอ (*Clinacanthus nutans* (Burm.f) Lindan) และทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus* (Linn.) kurz) ต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสก่อโรค PRRS

ผลจากการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ MARC-145 โดยความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดน้ำและสารสกัดเอทานอล 50%, 70% และ 95% เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสในระยะก่อน-หลังติดเข้าสู่เซลล์ (pre-post infection) ในเวลา 1 ชั่วโมง พบว่า สารสกัดเอทานอล 50% มีความสามารถในการยับยั้งการแบ่งตัวของ porcine reproductive and respiratory virus (PRRSV) ได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดที่ใช้ตัวทำละลายอื่นๆ โดยสารสกัดพญายอสามารถยับยั้งการเกิด plaque คิดเป็นร้อยละ 100 ในระยะ post-infection ปริมาณไตเตอร์ของไวรัส ลดลงจาก 10^8 $TCID_{50}$/ml เป็น $10^{0.75 \pm 0.17}$ $TCID_{50}$/ml รองลงมาคือ สารสกัดพลูคาว ปริมาณไตเตอร์ของไวรัส ลดลงจาก 10^7 $TCID_{50}$/ml เป็น $10^{2.33 \pm 0.07}$ $TCID_{50}$/ml ขณะที่สารสกัดทองพันชั่งสามารถลดปริมาณไตเตอร์ของไวรัสในระยะ pre และ post-infection ได้ใกล้เคียงกัน จาก 10^8 $TCID_{50}$/ml เป็น $10^{2.41 \pm 0.16}$ $TCID_{50}$/ml และ $10^{2.5 \pm 0.18}$ $TCID_{50}$/ml ตามลำดับ อีกทั้งการวิเคราะห์หาสารพฤกษเคมีเบื้องต้นด้วยวิธี Thin layer chromatography ยังพบว่าสารสกัดเอทานอล 50% ของพลูคาวมีสารรูตินที่เป็นองค์ประกอบของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ซึ่งอาจจะช่วยส่งเสริมการออกฤทธิ์ยับยั้ง PRRSV ได้นอกเหนือจากสารอื่นๆ

การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดสมุนไพร พลูคาว พญายอ และทองพันชั่งมีความสามารถในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ PRRSV ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งองค์ความรู้ดังกล่าวอาจนำไปประยุกต์ใช้ร่วมกับการรักษาโรค PRRS ต่อไปในอนาคต

Title	Screening for Anti-Viral Effects of Thai Herbs In Inhibition of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Replication
Author	Miss Sopitha Chuaychu
Degree of	Master of Science in Biotechnology
Advisory Committee Chairperson	Assistant Professor Dr. Wasin Charerntantanakul

ABSTRACT

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) contributes to economic loss in swine industry as they cause reproductive failure and respiratory tract in pigs resulting to swine production inefficiency. The objective of this research was to investigate the anti-viral potentials of three types of medicinal plants: *Houttuynia cordata* Thunb., *Clinacanthus nutans* (Burm.f) Lindan. and *Rhinacanthus nasutus* (Linn.) kurz. Crude extract of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) was replicated in MARC-145 cells and the solvent was later extracted with hot distilled water and macerated in ethanol at 50%, 70% and 95% and then extracted by percolation to determine the highest non-toxic concentration of each extract. Results of anti-virus activity in pre- and post-infection at 1 hr. showed that in comparison with crude extract obtained from other solvents, *C. nutans* extracted with 50% ethanol demonstrated highest effectivity in anti-virus activity of plaque in post-infection (100%) and suggested a potential inhibition reduction of virus titer from 10^{8} $TCID_{50}$/ml to $10^{0.75 \pm 0.17}$ $TCID_{50}$/ml, and followed by, *H. cordata* extracted with 50% ethanol which showed reduced viral titer from 10^{7} $TCID_{50}$/ml to $10^{2.33 \pm 0.07}$ $TCID_{50}$/ml. Meanwhile, *R. nasutus* extracted with 50% ethanol showed inhibition of PRRS virus in both pre- and post-infection with reduced virus titer from 10^{8} $TCID_{50}$/ml to $10^{2.41 \pm 0.16}$ $TCID_{50}$/ml and $10^{2.5 \pm 0.18}$ $TCID_{50}$/ml, respectively. In addition, phytochemical analysis of chemical constituents in herbal extraction by Thin Layer Chromatography showed the presence of rutin, a component in 50% ethanol extraction of *H. cordata,* and a substance considered to inhibit promotion of other substances.

This study of anti-virus activity suggested that herbal extraction of *H. cordata*, *R. nasutus* and *C. nutans* had the potential of inhibiting PRRSV replication and this novel knowledge may bc applied in conjunction with the treatment of PRRS syndrome in the future.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วศิน เจริญตัณธนกุล ประธานกรรมการที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มงคล ถิรบุญยานนท และ ดร.ชุลีรัตน์ บรรจงลิขิตกุล กรรมการที่ปรึกษา ที่ได้กรุณาสนับสนุนเครื่องมืออุปกรณ์ในการทำวิจัยครั้งนี้ ตลอดจนให้คำแนะนำและคำปรึกษาทางด้านวิชาการ การปฏิบัติงาน และตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณ คุณธัญวรัตน์ กาจสงคราม และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการฝ่ายเภสัชและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) รวมถึงเพื่อนๆ พี่ๆน้องๆ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการปฏิบัติงาน

ที่สำคัญเหนือสิ่งอื่นใด ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ร้อยตำรวจตรีสุนาถ ช่วยชู และ นางอารมย์ ช่วยชู บิดามารดาผู้ให้กำเนิดที่คอยอบรมสั่งสอนและเป็นกำลังใจให้เสมอมา จนสำเร็จการศึกษา

โสภิตา ช่วยชู

มกราคม 2556

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
ABSTRACT	(4)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบัญ	(6)
สารบัญตางราง	(8)
สารบัญภาพ	(9)
สารบัญภาพผนวก	(10)
สารบัญอักษรย่อ	(11)
บทที่ 1 บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	4
Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)	4
การติดเข้าสู่เซลล์	5
ลักษณะทางพันธุกรรม (Genetics)	5
การติดต่อ (Transmission)	7
อาการทางคลินิกและรอยโรค	8
การวินิจฉัยโรค	9
แนวทางในการการควบคุมโรค	9
พืชสมุนไพร (Medicinal Plants)	10
สมุนไพรพลูคาว (*Houttuynia cordata* Thunb.)	16
สมุนไพรพญายอ (*Clinacanthus nutans* (Burm.f.) Lindau)	18
สมุนไพรทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus* (Linn.) Kurz)	20

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการวิจัย 23
วัสดุอุปกรณ์ในการดำเนินการวิจัย 23
การสกัดและการเตรียมสารออกฤทธิ์จากพืชสมุนไพร 26
การเพาะเลี้ยง Monkey kidney cell (MARC -145) 26
การเพิ่มจำนวนไวรัส 27
การทดสอบความเป็นพิษ (Cytotoxicity assay) 28
การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งก่อน-หลังไวรัสติดเข้าสู่เซลล์ 28
การตรวจหาปริมาณไวรัสวิธี Plaque titration assay 29
การวิเคราะห์หาสารพฤกษเคมีเบื้องต้นด้วยวิธี Thin layer chromatography 30
สถานที่ทำการทดลอง 32
บทที่ 4 ผลและอภิปรายผลการวิจัย 33
ผลผลิตสุทธิของสารสกัดสมุนไพร 33
การตรวจสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ MARC-145 34
การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบโดยวิธี Cytopathic effect assay 40
การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบโดยวิธี Plaque forming assay 43
ผลการวิเคราะห์หารสารพฤกษเคมีเบื้องต้น ด้วยวิธี Thin layer chromatography 48
วิจารณ์ผลการวิจัย 50
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ 52
สรุปผลการวิจัย 52
ข้อเสนอแนะ 53
บรรณานุกรม 54
ภาคผนวก 62
ภาคผนวก ก อาหารและสารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ 63
ภาคผนวก ข เซลล์เพาะเลี้ยงและการนับจำนวนเซลล์ 67
ประวัติผู้เขียน 74

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ PRRSV กับจุลชีพอื่นๆ	8
2	อุณหภูมิที่ใช้อบสมุนให้แห้ง	11
3	ผลผลิตสุทธิของสารสกัดพลูคาว	33
4	ความเป็นพิษของสารสกัดพลูคาว	34
5	ความเป็นพิษของสารสกัดพญายอ	36
6	ความเป็นพิษของสารสกัดทองพันชั่ง	38
7	ปริมาณไตเตอร์ของเชื้อ PRRSV ก่อน-หลังบ่มด้วยสารสกัดพลูคาว	41
8	ปริมาณไตเตอร์ของเชื้อ PRRSV ก่อน-หลังบ่มด้วยสารสกัดพญายอ	42
9	ปริมาณไตเตอร์ของเชื้อ PRRSV ก่อน-หลังบ่มด้วยสารสกัดทองพันชั่ง	43
10	ปริมาณไวรัสเริ่มต้น	44
11	ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ PRRSV จากสารสกัดเอทานอล 50% ของพลูคาว	44
12	ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ PRRSV จากสารสกัดเอทานอล 50% ของพญายอ	46
13	ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ PRRSV จากสารสกัดเอทานอล 50% ของทองพันชั่ง	47
14	ค่า Rf ที่คำนวณได้จากสารผลิตภัณฑ์เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน	49

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
1	โครงสร้างจีโนมของเชื้อ PRRSV	5
2	การติดเชื้อ PRRSV เข้าสู่เซลล์ macrophage	6
3	แม่สุกรแท้งในระยะท้ายของการตั้งครรภ์	9
4	การสังเคราะห์สารประกอบทุติยภูมิ	15
5	สมุนไพรพลูคาว (*Houttuynia cordata* Thunb.)	16
6	สมุนไพรพญายอ (*Clinacanthus nutans (Burm.f.)* Lindau)	18
7	สมุนไพรทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus* (Linn.) Kurz)	21
8	ความเป็นพิษของสารสกัดพลูคาว	35
9	ความเป็นพิษของสารสกัดพญายอ	37
10	ความเป็นพิษของสารสกัดทองพันชั่ง	39
12	ลักษณะของเซลล์ MARC-145 ระหว่างเซลล์ปกติและเซลล์ที่เกิด CPE	40
13	ปริมาณ plaque ในระยะ pre-infection ที่ทดสอบด้วยสารสกัดพลูคาว	45
14	ปริมาณ plaque ในระยะ post-infection ที่ทดสอบlสารสกัดพลูคาว	45
15	ปริมาณ plaque ในระยะ pre-infection ที่ทดสอบด้วยสารสกัดrพญายอ	46
16	ปริมาณ plaqc ในระยะ post-infection ที่ทดสอบด้วยสารสกัดพญายอ	46
17	ปริมาณ plaque ในระยะ pre-infection ที่ทดสอบด้วยสารสกัดทองพันชั่ง	47
18	ปริมาณ plaque ในระยะ post-infection ที่ทดสอบด้วยสารสกัดทองพันชั่ง	48
19	โครมาโทรกราฟีจากสารสกัดเอทานอล 50% ของพลูคาว	48

สารบัญภาพผนวก

ภาพผนวก		หน้า
1	monkey kidney cell line	68
2	ตารางนับเซลล์ในเครื่องนับจำนวนเซลล์	69

สารบัญอักษรย่อ

%	=	เปอร์เซ็นต์
α	=	แอลฟ่า
cm	=	เซนติเมตร
cm^2	=	ตารางเซนติเมตร
EDTA	=	Ethylenediamine tetra-acetic acid
g	=	กรัม
IC_{50}	=	50% Inhibition concentration
Kb	=	กิโลเบส
kDa	=	กิโลดาลตัน
M	=	เมตร
Mg	=	มิลลิกรัม
Ml	=	มิลลิลิตร
Nm	=	นาโนเมตร
PFU	=	Plaque per unit
Rf	=	Rate of flow
µg	=	ไมโครกรัม
µl	=	ไมโครลิตร
µm	=	ไมโครเมตร

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรค Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) ระบาดครั้งแรกที่ประเทศสหรัฐอเมริกาในช่วงประมาณ ปี ค.ศ. 1980 (Breedam et al., 2010) ก่อให้เกิดความเสียหายต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรเป็นอย่างมากเนื่องจากสุกรเป็นสัตว์สัตว์เศรษฐกิจที่สร้างรายได้ให้กับเกษตรผู้เลี้ยงสุกรที่มีอยู่เป็นจำนวนมากในประเทศไทย

สาเหตุเกิดจากเชื้อ Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) ก่อให้เกิดปัญหาทางระบบสืบพันธุ์และระบบทางเดินหายใจของสุกร ส่งผลให้การผลิตสุกรไม่มีประสิทธิภาพ เนื่องจากทำให้น้ำเชื้อของสุกรพ่อพันธุ์มีคุณภาพต่ำ สุกรแม่พันธุ์จะมีอาการแท้งในทุกระยะของการตั้งครรภ์ ลูกสุกรอ่อนแอ และมีอัตราการตายแรกคลอดสูง (Meng et al., 1995) ในระบบทางเดินหายใจ ทำให้แมคโครฟาจ (macrophage) สูญเสียหน้าที่ในการทำงานส่งผลให้สุกรเกิดสภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องและมีความไวต่อการติดเชื้อแทรกซ้อนชนิดอื่นๆ (Meier et al., 2003)

ปัจจุบันโรค PRRS ยังคงเป็นปัญหาในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรอยู่อย่างต่อเนื่อง รวมถึงในประเทศไทยยังคงพบรอยโรคปรากฏอยู่ แต่ก็ยังไม่มีวิธีการแก้ไขปัญหาที่เหมาะสมที่สุดนอกจากคำแนะนำในการจัดการฟาร์ม การปรับปรุงระบบความปลอดภัยทางชีวภาพ และการเฝ้าระวังโรคจากการนำเข้าสุกรทดแทน (รุ่งโรจน์, 2548) ในทางปฏิบัติพบว่าการจัดการค่อนข้างยุ่งยากจึงมีแนวทางแก้ปัญหาโดยการทดลองใช้ วัคซีนชนิดเชื้อเป็น และวัคซีนชนิดเชื้อตาย ในการกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันและใช้ป้องกันโรคกันอย่างแพร่หลาย แต่อย่างไรก็ตามการใช้วัคซีนยังคงมีข้อจำกัดในแง่ของประสิทธิผลและความคุ้มค่าในการใช้งาน ถึงแม้ว่าวัคซีนชนิดเชื้อเป็นจะมีประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้สูงกว่าวัคซีนชนิดเชื้อตาย (Cheon and Chae., 2004) แต่ความรุนแรงของตัวไวรัสวัคซีน (reversion) สามารถผ่านสู่รกทำให้เกิดการถ่ายทอดผ่านชั่วรุ่นไปยังลูกสุกร ปะปนในน้ำเชื้อ มีส่วนทำให้ไวรัสในสิ่งแวดล้อมเกิดการกลายพันธุ์ (Mengeling et al., 1996) วัคซีนเชื้อตายสามารถลดอาการทางคลินิกและระยะเวลาขับเชื้อ แต่ไม่มีสามารถลดความรุนแรงของโรคจากการติดเชื้อซ้ำได้จากทั้งไวรัสสายพันธุ์เดียวกันหรือไวรัสต่างสายพันธุ์ (Nelson et al., 1994)

งานวิจัยนี้จึงเลือกศึกษาสมุนไพร 3 ชนิด คือ พลูคาว (*Houttuynia cordata* Thunb) พญายอ (*Clinacanthus nutans* (Burrn.f) Lindan) และทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus* (Linn.) kurz) ที่มีหลักฐานทางพฤกษศาสตร์สนับสนุนว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อไวรัส อาทิเช่น ฤทธิ์ในการยับยั้งการแบ่งตัวของ Influenza virus (สาเหตุของโรคไข้หวัดใหญ่) Herpes simplex virus type 1 และ 2 (HSV-1; สาเหตุของโรคเริมบริเวณผิวหนังและริมฝีปาก, HSV-2; สาเหตุของโรคเริมบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์) และ Varicella zoster virus (VZV; สาเหตุของโรคอีสุกอีใส) อีกทั้งยังศึกษาความสามารถของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoid) คือ สารรูติน (rutin) และสารเควอซิติน (quercetin) ที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส (Savov et al., 2006) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งนี้เพื่อประโยชน์และเป็นทางเลือกใหม่ให้แก่เกษตรกรผู้เลี้ยงสุกรและยังเป็นองค์ความรู้เพื่อเพิ่มศักยภาพในการผลิตยาต้านไวรัสจากพืชสมุนไพรเหล่านี้ได้ในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของพืชสมุนไพรไทย 3 ชนิด ได้แก่ พลูคาว พญายอ และทองพันชั่ง ต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งการแบ่งตัวของ PRRSV

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. องค์ความรู้ใหม่

องค์ความรู้ใหม่ในเรื่องของสมุนไพรไทยต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของ PRRSV ซึ่งจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับงานวิจัยและงานคลินิกในแง่ของหรือรักษาหรือการป้องกันความรุนแรงของโรค PRRS ในสุกร

2. ภาคเกษตรกรรมและอุตสาหกรรม

งานวิจัยจะอาจส่งผลต่อเกษตรกรผู้เลี้ยงสุกรและอุตสาหกรรมการผลิตสุกร ในการลดต้นทุนค่าใช้จ่ายด้านเวชภัณฑ์เพื่อการรักษาโรคติดเชื้อแทรกซ้อน และเพิ่มผลผลิตมีคุณภาพออกสู่ตลาด

3. เป็นแนวทางในการส่งเสริมการใช้สมุนไพรเพื่อการรักษาโรคในสัตว์และศึกษาปัจจัยที่อาจที่ส่งผลกระทบต่อการนำไปใช้เพื่อพัฒนาคุณภาพของพืชสมุนไพรให้ได้เกิดประโยชน์สูงสุด

บทที่ 2

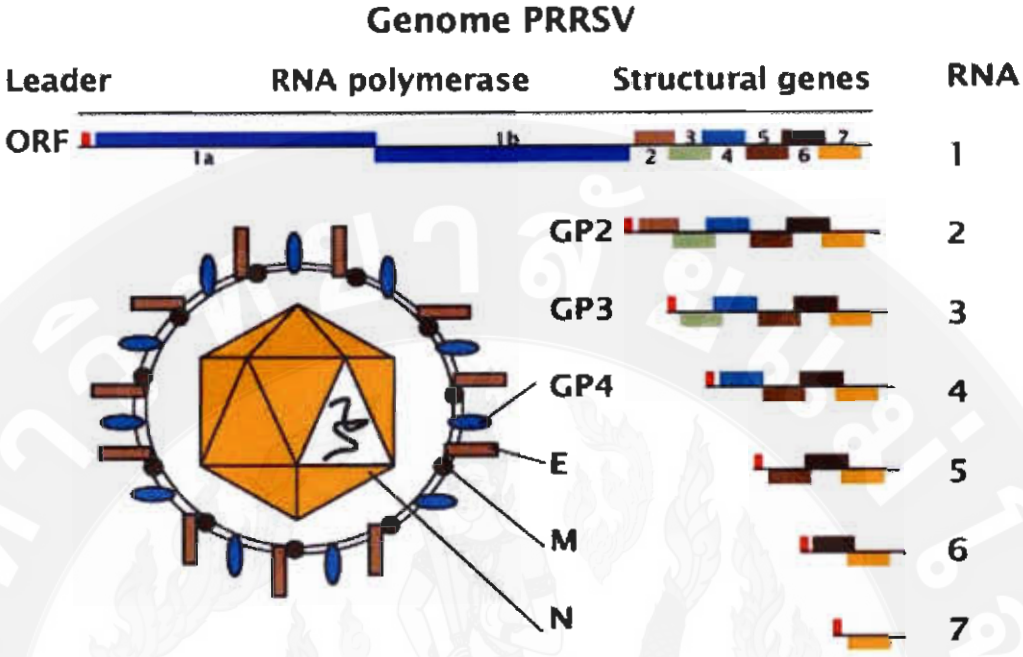
ตรวจเอกสาร

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)

PRRSV อยู่ใน จีนัส (genus) Arterivirusแฟมิลิ (family) Arteriviridaeออร์เดอร์ (order) Nidovirales พันธุกรรมของไวรัสเป็น ribonucleic acid (RNA) ชนิด positive single strandedRNA ขนาดประมาณ15 kbมีเปลือกหุ้ม (envelope) และเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 48-83 nmพบว่ามี 2 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ American stains (VR-2332) และ European stains (Lelystad virus; LV) (Feng et al., 2008)

องค์ประกอบของจีโนม (genome) ประกอบด้วย 8 open reading frames (ORF) ซึ่งมี 1a, 1b, 2, 3, 4, 5, 6, และ 7 (ภาพ 1) ORF 1a และ ORF1b มีขนาดประมาณร้อยละ 75 ของ genomeทั้งหมดจะถอดรหัสได้เป็น non-structural protein ทำหน้าที่เป็นRNA dependent RNA polymerase ในกระบวนการ replication (Barfoed et al., 2004)ส่วน ORF 2-7 ให้ส่วนโปรตีนโครงสร้าง 2 ชนิดคือ โปรตีนโครงสร้างหลักและโปรตีนโครงสร้างรอง โดยโปรตีนโครงสร้างหลักประกอบด้วย

ORF5 ถอดรหัสให้ส่วน glycoprotein 5 (GP5) หรือ E proteinมีขนาด 25 kDa ทำหน้าที่เป็นตัวจับกับแอนติบอดี (antibody) ให้เกิดกระบวนการนิวเทริลไลซ์ (neutralize) (Matanin et al., 2008) โครงสร้างของลำดับ nucleotideส่วนนี้จะมีความหลากหลายมากที่สุด (Fang and Snijder., 2010) ORF6 ให้ส่วนnon-glycosylated membrane protein (Mprotein) มีขนาด 18-19 kDa และ ORF7 ให้ส่วน nucleocapsid (N) protein มีขนาด 14-15 kDa ซึ่งเป็นส่วนที่ลำดับ nucleotide มีความอนุรักษ์สูงที่สุด (Nelsen et al., 1999) ส่วนโปรตีนโครงสร้างรองถอดรหัสมาจาก ORF2, ORF3 และ ORF4 ได้แก่ glycoprotein 2 (GP2) มีขนาด 29-50kDa, glycoprotein 3 (GP3) มีขนาด 45-50 kDa และglycoprotein 4 (GP4) มีขนาด 31-35 kDa ตามลำดับการศึกษาลำดับ nucleotide ของพบว่า nucleotide ของไวรัสทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่า บริเวณ ORF2, ORF3 และ ORF4 มีความคล้ายกันร้อย 63, 58 และ 68 ตามลำดับและลำดับของกรดอะมิโนของไวรัสต่างสายพันธุ์มีความคล้ายกัน ร้อยละ 55-80 (Nelsen et al., 1999)



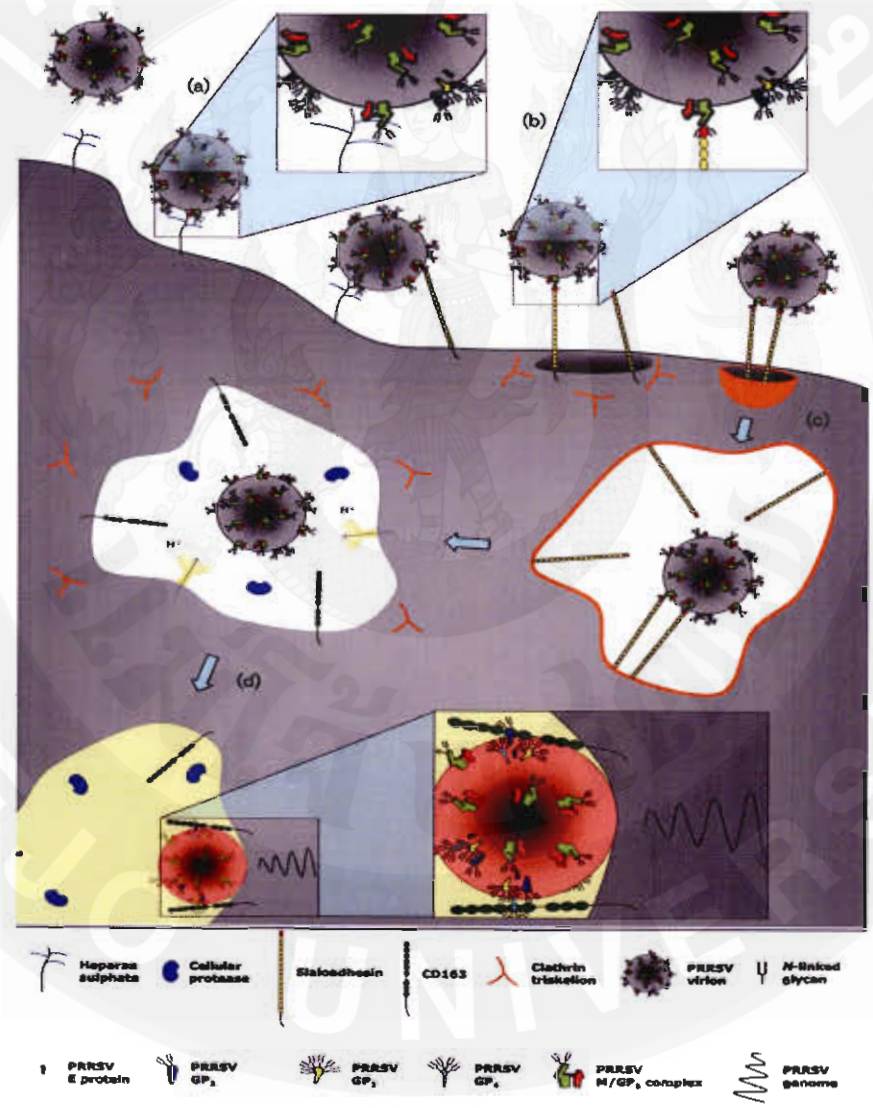
ภาพ 1 โครงสร้างจีโนมของเชื้อPRRSV

ที่มา: http://www.porcilis-prrs.com/microbiology-prrsv-structure.asp.(2011)

การติดเข้าสู่เซลล์ (viral entry)

เซลล์เป้าหมายหลักของเชื้อ PRRSV คือ เซลล์macrophage บริเวณปอดซึ่งประกอบด้วยเซลล์ macrophage ในถุงลม (pulmonalyalveolar macrophages; PAMs) และเซลล์ macrophage ในหลอดเลือดปอด (pulmonary intravascular macrophages; PIMs) โดยทั้ง PAMs และ PIMs ทำหน้าที่เก็บกินสิ่งแปลกปลอมที่ผ่านเข้ามาทางการหายใจและทางเส้นเลือดสู่ปอดเมื่อ macrophage ถูกทำลายเป็นจำนวนมากส่งผลต่อการแสดงออกทางคลินิกของระบบทางเดินหายใจ อีกทั้งยังง่ายต่อการติดเชื้อแทรกซ้อน (Thanawongnuwech et al., 2004) PRRSVติดเข้าสู่เซลล์โดยอาศัยตัวรับ (receptors) 2 ชนิด บนผิวของเซลล์ PAMs จะมี heparansulphate เป็น attachment factor ที่มีอยู่เป็นจำนวนมากทำหน้าที่ในการยึดเกาะและ sialloadherin เป็น specific receptor ที่มีบทบาทสำคัญในการปล่อยจีโนมเข้าสู่เซลล์ PAM (Welch and Calvert., 2010) ไวรัสติดเข้าสู่เซลล์ครั้งแรกจากการยึดเกาะบริเวณ heparansulphate บนผิวเซลล์ PAMจากนั้น sialloadherin จับกันอย่างจำเพาะกับ GP5/M complex บนผิวของ PRRSV เมื่อจับกันได้อย่างสมบูรณ์ clathrin-mediated จะทำหน้าที่

เป็นสารสื่อให้ไวรัสเข้าสู่เซลล์ด้วยกระบวนการ endocytosis pathway หลังจากปล่อยจีโนมไวรัสจาก endosome เข้าสู่ cytoplasm ของเซลล์ PAM ไวรัสจะเริ่มการถอดรหัสเพื่อเพิ่มจำนวนอนุภาคใหม่ จากนั้น CD163 receptor ของ PRRSVจะเข้าจับกับ GP2 และ GP4 เพื่อทำหน้าที่เป็นสำคัญในการเพิ่มจำนวน (Patton et al., 2009) นอกจากนี้ยังพบว่ามีE protein ช่วยลดค่า pH ใน endosome เป็นสิ่งสำคัญสำหรับการปล่อยจีโนม (ภาพ 2) (Breedam et al., 2010)



ภาพ 2 การติดเชื้อ PRRSV เข้าสู่เซลล์ macrophage

ที่มา : Breedam et al. (2010)

Patton et al. (2009) รายงานว่า CD163 เป็น receptor ต่อการเพิ่มจำนวนของ PRRSVจากการศึกษาความสัมพันธ์ในการแสดงออกของ CD163 ของเซลล์ macrophage ที่ได้จาก CD14 positive blood monocytes โดยการสร้างเซลล์ LLC-PK cell line จาก DC163 cDNA ให้มีการแสดงออกของ CD163 พบว่าเมื่อลดการแสดงออกของ CD163 สามารถทำให้เชื้อ PRRSVติดเข้าสู่เซลล์ได้น้อยลง

เมื่อเชื้อ PRRSV ติดเข้าสู่เซลล์จะเพิ่มจำนวนครั้งแรกที่เยื่อบุโพรงจมูกซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 3-6 ชั่วโมง และไวรัสจะเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วในเวลาประมาณ 9-12 ชั่วโมงต่อหนึ่งรอบของการเพิ่มจำนวน และแพร่กระจายไปตามกระแสเลือดมายังปอดและอวัยวะเป้าหมายต่างๆ (Halbur et al., 1996)

การติดต่อ (Transmission)

เชื้อ PRRSVสามารถติดต่อจากการสัมผัสกันโดยตรงเป็นหลัก และเชื้อสามารถติดต่อได้ง่ายผ่านสารคัดหลั่งต่างๆ เช่น น้ำมูก น้ำลาย อุจจาระ กอปรกับสุกรมีช่องทางที่ไวต่อการติดเชื้อหลายช่องทาง เช่น ช่องทางปาก โพรงจมูก กล้ามเนื้อ ช่องท้องและช่องคลอด (Nelson et al., 1994) จากการศึกษาการแพร่กระจายของเชื้อ PRRSV เกิดขึ้นได้ในรูปแบบอื่นๆ เช่น การแพร่ผ่านทางอากาศ การแพร่ผ่านทางเข็มฉีดยา รถบรรทุก เสื้อผ้า อุปกรณ์เครื่องใช้ภายในฟาร์ม หรือแม้แต่สัตว์พาหะเช่น ยุง แมลงวันบ้าน (houseflies หรือ Muscadomestica) (Pirtle and Beran., 1996)

Dee et al. (2002) รายงานว่า PRRSV สามารถติดต่อจากการปนเปื้อนกับวัสดุอุปกรณ์ในสภาพอากาศหนาวเย็นที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส อีกทั้งยังมีความสามารถในการก่อโรคได้สูงและมีความไวรับต่อโรค (susceptibility) ซึ่งไวรัสประมาณ 10-40 อนุภาคก่อให้เกิดการติดเชื้อได้ (Yoon et al., 1999)นอกจากนี้การติดต่อกันระหว่างฟาร์มก็สามารถเกิดขึ้นได้ จากการศึกษาเขตที่มีการเลี้ยงสุกรหนาแน่นร้อยละ 45 ของฟาร์มที่มีระยะห่างกันน้อยกว่า500 m สามารถติดเชื้อได้ง่าย อย่างไรก็ตามการติดต่อกันภายในฝูงของแต่ละฟาร์มจะช้าหรือเร็วนั้นขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยโดยเฉพาะอย่างยิ่งลักษณะการจัดการฟาร์ม การลดอัตราการสัมผัสโดยตรงจะช่วยแก้ไขปัญหาการติดเชื้อได้เนื่องจากสุกรที่เคยได้รับเชื้อในครั้งแรกจะมีภูมิต้านทานที่สูงกว่าสุกรที่ไม่เคยได้รับเชื้อมาก่อนหรือสุกรที่มีการติดเชื้อแฝงซึ่งเป็นพาหะของโรคได้ (Le et al., 1997)

อาการทางคลินิกและรอยโรค

อาการทางคลินิกของโรค PRRS แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์และระบบทางเดินหายใจของสุกร อาการทางระบบสืบพันธุ์ที่เกิดขึ้นในสุกรพ่อพันธุ์หลังจากได้รับเชื้อ PRRSV จะส่งผลให้น้ำเชื้อมีคุณภาพต่ำ ส่วนในสุกรแม่พันธุ์จะส่งผลให้เกิดการแท้งลูกในทุกระยะของการตั้งท้อง ความรุนแรงของโรคจะเพิ่มขึ้นหากเกิดการติดเชื้อในระยะท้ายของการตั้งท้องซึ่งจะทำให้ลูกสุกรอ่อนแอเป็นมัมมี่ และลูกสุกรมีอัตราการตายแรกคลอดสูง (ภาพ 3) (Mengeling et al., 1996)สำหรับอาการทางด้านระบบทางเดินหายใจเกิดขึ้นในทุกช่วงอายุ ส่งผลให้สุกรหายใจติดขัด รุนแรง และมีอาการไอในกรณีที่มีการติดเชื้อแทรกซ้อน สุกรที่ได้รับเชื้อ PRRSVจะแสดงอาการป่วยหลังจากได้รับเชื้อประมาณ 48 ชั่วโมงอาการทางคลินิกที่มักพบ ได้แก่ มีไข้ เบื่ออาหาร อาจพบอาการบวมน้ำใต้ผิวหนังและขาหลัง เกิดภาวะคลั่งเลือดโดยเฉพาะที่ใบหูอวัยวะเพศมีสีม่วงคล้ำ และมักจะพบรอยโรคบริเวณปอดร่วมกับรอยโรคในอวัยวะอื่นๆ เช่น เยื่อหุ้มปอดอักเสบ (pleuritis) เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ(pericarditis) เยื่อบุช่องท้องอักเสบ (peritonitis) เยื่อหุ้มสมองอักเสบ (meningitis) และข้ออักเสบ (arthritis) (Thanawongnuwech et al., 2004)

ตาราง 1 ความสัมพันธ์ระหว่างไวรัส PRRS กับจุลชีพอื่นๆ

ชนิดจุลชีพ	ผลจากภาวะแทรกซ้อน
Mycoplasma hyopnemoniae	มีผลให้ความรุนแรงของโรค PRRSเพิ่มขึ้น
Salmonellecholerasuis	มีผลเสริมฤทธิ์กัน
Streptococcus suis	พบอุบัติการณ์และความรุนแรงของเชื้อ S. suis มากขึ้น โดยเฉพาะลูกสุกรที่ติดเชื้อผ่านชั่วรุ่นและขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของPRRSV
Swine influenza virus	มีผลเสริมฤทธิ์กัน
Porcine respiratory coronavirus virus	มีผลเสริมฤทธิ์กัน

ที่มา : รุ่งโรจน์ (2548)

ภาพ 3 แม่สุกรแท้งในระยะท้ายของการตั้งท้อง (1) ลูกสุกรที่คลอดก่อนกำหนดมีอาการอ่อนแอ ส่งผลให้ตายก่อนหย่านม (2) ซากมัมมี่สุกร (3) ลักษณะคลอกที่ได้รับเชื้อ PRRSV

ที่มา : Dee (2008)

การวินิจฉัย

ปัจจุบันการวินิจฉัยเพื่อตรวจสอบหาเชื้อPRRSVมีการประยุกต์ใช้ความรู้ทางทางซีรั่มวิทยาและอณูชีววิทยา โดยการตรวจหาการลดลงของภูมิคุ้มกันจากตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสและจากการตรวจหาไวรัสโดยตรง (virus isolation) คือ การนำเอาตัวอย่าง เช่น ซีรั่ม หรือเนื้อเยื่อของสัตว์ที่ป่วย มาเพาะเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยง หรือการตรวจหาเชื้อไวรัสจากเนื้อเยื่อที่ติดสีย้อมโดยอาศัยวิธี Immunofluorescent antibody test (IFA) และ Immunoperoxidase monolayer assay (IPMA)(Yoon et al., 1995, Drew et al., 1995)การตรวจหาเชื้อไวรัสจากสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) และ Real time PCR (RT-PCR) เป็นวิธีที่มีความจำเพาะและมีประสิทธิภาพสูง แต่มีค่าใช้จ่ายสูง (Rossow, 1998, Xiao et al., 2008) นอกจากนี้การตรวจหา PRRSV ด้วยวิธี in situ hybrization (ISH) โดยใช้ specific probe เข้าไปจับ (hybridize) กับตำแหน่งที่จำเพาะบน RNA ในตัวอย่างที่ติดเชื้อแต่ต้องอาศัยความชำนาญของผู้ปฏิบัติงาน และมีค่าใช้จ่ายที่

ค่อนข้างสูงเช่นกัน (Mengeling and Lager, 2000) สำหรับการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส ได้แก่Serum neutralization (SN) และ Enzyme-Linked Immunosorbent assay (ELISA) ซึ่งสามารถตรวจหาเชื้อไวรัสได้ใน 7-10 วันหลังมีการสัมผัสเชื้อ วิธีนี้เป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว (Horter et al., 2002, Cho et al., 1997)

แนวทางในการควบคุมโรค

ปัจจุบันพบว่าประเทศไทยมีการใช้วัคซีนโรค PRRSทั้งชนิดเชื้อเป็นและชนิดเชื้อตาย ในการกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน และใช้ป้องกันอาการทางคลินิก ทั้งอาการของระบบทางเดินหายใจและอาการของระบบสืบพันธุ์วัคซีนชนิดเชื้อเป็นประกอบด้วยไวรัสวัคซีนสามารถแฝงตัวอยู่ในร่างกายสุกรที่ได้รับวัคซีน และสามารถขับออกจากตัวสุกร ติดต่อไปยังสุกรที่ปลอดเชื้อได้ นอกจากนี้ยังมีความสามารถผ่านสู่รกทำให้เกิดการถ่ายทอดผ่านชั่วรุ่นไปยังลูกสุกรได้ อีกทั้งยังแฝงตัวอยู่ในร่างกายของพ่อสุกรปะปนอยู่ในน้ำเชื้อ (Mengeling et al., 2003)

Labarque et al. (2002) รายงานว่าสุกรที่ได้รับเชื้อไวรัส PRRS สายพันธุ์ยุโรป หลังจากผ่านการทำวัคซีนชนิดเชื้อเป็นสายพันธุ์ยุโรป มีจำนวนน้อยกว่าสุกรที่ผ่านการทำวัคซีนเชื้อเป็นสายพันธุ์อเมริกา และยังส่งผลให้สุกรมีความไวต่อการติดเชื้อแทรกซ้อนจากแบคทีเรีย (Halbur et al., 2000) แต่อย่างไรก็ตามรายงานด้านวิทยาภูมิคุ้มกันพบว่าวัคซีนชนิดเชื้อเป็นมีประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้สูงกว่าวัคซีนชนิดเชื้อตาย (Cheon and Chae., 2004)

Nielsen et al. (1997) ศึกษาการใช้งานวัคซีนชนิดเชื้อตายในสุกรพ่อพันธุ์ พบว่าไม่สามารถลดความรุนแรงของโรคได้ จากการเปรียบเทียบระยะเวลาและปริมาณไวรัสในกระแสเลือดและการปนเปื้อนเชื้อ PRRSVในน้ำเชื้อ แม้ว่าไวรัสที่สุกรได้รับจะมีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมกับไวรัสวัคซีนชนิดเชื้อตายก็ตาม ยิ่งไปกว่านี้แล้ววัคซีนชนิดเชื้อตายยังไม่สามารถลดการขับเชื้อ PRRSV ในสุกร แต่ยังคงพบแนวโน้มในการเพิ่มปริมาณแอนติบอดีชนิดneutralizingในสุกรที่ได้รับวัคซีนดังกล่าว เห็นได้ว่าไม่ว่าจะเป็นวัคซีนชนิดเชื้อเป็นหรือวัคซีนชนิดเชื้อตาย หรือจากการติดเชื้อตามธรรมชาติ ก็ไม่สามารถให้ความคุ้มโรคข้ามสายพันธุ์ได้

พืชสมุนไพร(Medicinal Plants)

พืชสมุนไพรตามพระราชบัญญัติยาปี พ.ศ. 2510 หมายถึงยาที่ได้จากพืชสัตว์และแร่ธาตุโดยยังมิได้มีการแปรสภาพ (รัตนา, 2547) ปัจจุบันประเทศไทยมีการใช้สมุนไพรมากกว่า 5,000 ชนิดจากพืชสมุนไพรจำนวนมากที่มีรายงานถึงสรรพคุณในการบรรเทาอาการและบำบัดรักษาโรค

สารพฤกษเคมี (phytochemical compounds) ที่พืชสร้างขึ้นในธรรมชาตินอกจากจะมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืชแล้วยังมีคุณสมบัติทางยา (evaluation of crude drugs) ที่หลากหลายแตกต่างกันตามชนิดและปริมาณของ รวมถึงปัจจัยทางกายภาพที่ควบคุมคุณภาพของสารพฤกษเคมีได้แก่ ส่วนที่ใช้เป็นยาอายุที่เหมาะสมของพืชที่เก็บเกี่ยวช่วงเวลาของวันและฤดูกาลที่เหมาะสม และการแปรสภาพในขั้นต้น เช่น อุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการทำแห้ง (ตาราง 2) เพราะสามารถยับยั้งเอนไซม์ที่มีอยู่ในต้นพืชได้ และทำให้สารพฤกษเคมีในพืชเช่น ไกลโคไซด์ (glycoside) และอัลคาลอยด์ (alkaloids) ไม่สลายตัว (Elizabeth et al.,1996)

ตาราง 2 อุณหภูมิที่ใช้อบสมุนให้แห้ง

ชนิดของสมุนไพร	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)
ดอก ใบ ทั้งต้น	20-30
ราก กิ่งราก ผิว	30-65
ผล	70-90
สมุนไพรที่มีน้ำมันหอมระเหย(essential oil)	25-30
สมุนไพรที่มีglycosideและalkaloids	50-60

ที่มา: Elizabeth et al. (1996)

สารประกอบทางเคมีในพืชสมุนไพรแบ่งได้ออกเป็นกลุ่มใหญ่ๆ ได้ 7 กลุ่ม (รัตนา, 2547)

1. Primary metabolite พบในพืชทุกชนิด เป็นสารที่มีอยู่ในพืชชั้นสูงทั่วไป เป็นผลผลิตที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสงเช่น คาร์โบไฮเดรต ไขมัน โปรตีน

1.1 คาร์โบไฮเดรต เป็นสารประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน คาร์โบไฮเดรตที่พืชสร้างขึ้นจากการสังเคราะห์แสงและเก็บสะสมไว้ ที่นำมาใช้ในทางเภสัชกรรม เช่น สารช่วยการแตกตัวของเม็ดยา และน้ำผึ้ง ประกอบด้วยกลูโคสและ ฟลุคโตส มีฤทธิ์เป็นยาระบายอ่อนๆ

1.2 ไขมัน เป็นเอสเตอร์ (ester) ที่เกิดจากกรดไขมันที่มีโมเลกุลยาว จับกับแอลกอฮอล์ นำมาใช้ประโยชน์เป็นอาหารหรือทางเภสัชกรรม เช่น น้ำมันถั่วเหลืองใช้เป็นตัวทำละลายสำหรับยาฉีดและใช้เตรียมอิมัลชัน (emollient)

2. Secondary metabolite เป็นสารประกอบที่พบได้ต่างกันในพืชแต่ละชนิด เกิดจากกระบวนการสังเคราะห์ชีวภาพ (biosynthesis) (ภาพ 4) ที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เช่น essential oil,alkaloid, แอนทราควิโนน (anthraquinone) และแทนนิน (tannin) เป็นต้น ส่วนใหญ่สารพวก secondary metabolite มักมีสรรพคุณทางยา แต่สารพวก primary metabolite บางตัวสามารถออกฤทธิ์ในการรักษาโรคได้เช่นกัน และสารประกอบที่มีฤทธิ์ทางยาในพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งอาจมิใช่สารประกอบเพียงชนิดเดียว ได้แก่

2.1 essential oil ที่พบได้ในส่วนต่างๆของพืช เช่น ดอก ใบ ผล กลีบเลี้ยง เป็นต้น มีลักษณะเป็นน้ำมันที่มีกลิ่นและรสเฉพาะตัว ระเหยได้ง่ายที่อุณหภูมิห้อง ไม่มีสี แต่เมื่อทิ้งไว้นานๆอาจถูกออกซิไดซ์ (oxidized) ทำให้สีเข้มขึ้น

2.2 เรซินและบาลซัม (resins and balsams) เรซินเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสารเคมีหลายชนิดรวมกัน นำมาใช้ประโยชน์ทางเภสัชกรรม ได้แก่ ชันสน ได้จากสน(Pinus spp.) หลายชนิด ดอกแห้งของต้นกัญชาตัวเมีย บาลซัมเป็นสารผสมเรซินที่นำมาใช้ ได้แก่ กำยาน (benzion) ได้จากเปลือกต้นของพืชตระกูลStyraxbenzion

2.3 alkaloid เป็นสารประกอบกลุ่มใหญ่ คุณสมบัติทั่วไปคือรสขม มีฤทธิ์เป็นด่าง ไม่ละลายน้ำแต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ พบได้ในเปลือกต้นซิงโคนา (Cinchona

succirubraPav.) ลำต้นของแพงพวยฝรั่ง (Catharanthusroseus(Linn.)G.Don.) มอร์ฟีน (morphine) ยางฝิ่น (PapaversomniferumL.) ยอดและใบชา (Camellia sinensis)เป็นต้น

2.4 glycosideเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีโครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วย อะไกลโคน (aglycone) หรือจีนิน (genin) จับกับน้ำตาลหรืออนุพันธ์ของน้ำตาลหรือไกลโคน (glycone) นำมาใช้ประโยชน์เป็นยารักษาโรคอย่างกว้างขวางและบางชนิดมีฤทธิ์เป็นสารพิษ โดยทั่ว ๆ ไป glycosideจะละลายได้ในตัวทำละลายมีขั้ว ขึ้นกับจำนวนและชนิดน้ำตาลของโครงสร้าง glycosideเมื่อทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) จะเกิดการสลายพันธะที่เชื่อมต่อระหว่าง aglycone กับ glycone ปกติ aglyconeของ glycoside มีโครงสร้างที่แตกต่างกันหลายแบบและนิยมใช้เป็นหลักในการจำแนกประเภทได้แก่

2.4.1 คาร์ดิแอคไกลโคไซด์ (cardiac glycosides) มีโครงสร้างเป็นวงแหวน cyclopentanophenanthrenes อยู่ในโมเลกุล มีฤทธิ์ต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด เช่น oleandrin จากใบยี่โถ (NeriumincidumMill)

2.4.2 ซาโปนินไกลโคไซด์ (saponinglycosides) มีอะไกลโคไซด์ (aglycosides) เป็นสเตียรอยด์ (steroids) หรือไตรเทอร์พีนอยด์ (triterpennoid) เช่น กลีเซอไรซีน (glycyrrhizin) ที่ได้จากชะเอมเทศ (GlycyrrhizsglabraLinn. G.) มีฤทธิ์ลดการอักเสบและต้านไวรัส (Lalita., 1994)

2.4.3 แอนทราควิโนนไกลโคไซด์ (anthraquinoneglycoside) มี aglycosideเป็นอนุพันธ์ของแอนทราซีน (anthracene) เช่น เซนโนไซด์-บี (sennoside-B) จากใบและฝักของมะขามแขก (Cassia angustifoliaVahl.)

2.4.4 ไซยาโนเจนิคไกลโคไซด์ (cyanogenic glycoside) เมื่อถูกไฮโดรไลซิส ด้วยกรดเจือจาง หรือเอนไซม์ที่มีอยู่ในพืชให้กรดไฮโดรไซยานิค (hydrocyanic) หรือไซยาไนด์ (cyanide) ซึ่งเป็นพิษ

2.4.5 ไอโซธัยโอไซยาเนตกไกลโคไซด์ (isothiocyanateglycoside) เป็นสารประกอบglycoside ที่ถูก hydrolysisด้วยเอนไซม์ธัยโอกลูโคซิเดส (thioglucosidase) มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและรา เช่น พีเทอริโกสเปอมิน (peterygospermin) จากมะรุม (Moringaoleifera Lam.)

2.4.6 ฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ (flavonoid glycoside) มีaglycoside เป็นสารประกอบจำพวก flavonoid เชื่อมเกาะอยู่กับไกลโคนส่วนมากเป็นสารประกอบโพลีฟีนอลิค (polyphenolic compound)

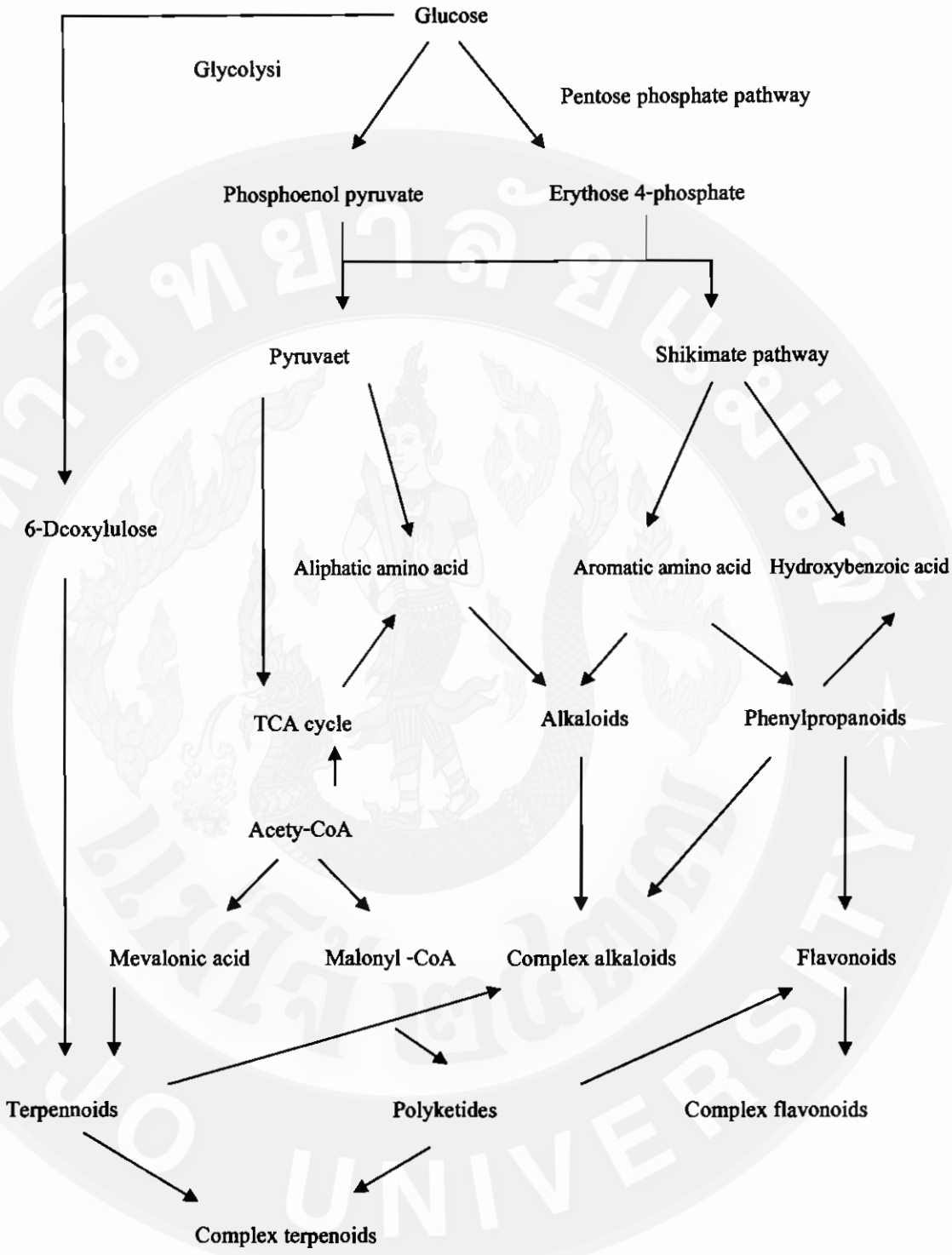
2.4.7 คูมารินไกลโคไซด์ (coumarin glycoside) สารประกอบที่มีโมเลกุลโครงสร้างเบนโซแอลฟาไพโรน (benzo-α-pyrone) เป็นองค์ประกอบ มีลักษณะเฉพาะตัวคือเป็นสารประกอบที่ให้กลิ่นหอม

2.4.8 อิริดอยด์ไกลโคไซด์ (iridoid glycoside) สารประกอบที่มีส่วนโครงสร้างcyclopentane เช่น ออคิวบิน (aucubin) จากต้นผักกาดน้ำ (Plantago major Linn.) มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

2.4.9 glycosideชนิดอื่น ๆ เช่น แซนโธนไกลโคไซด์ (xanthone glycosides)

2.5 แทนนิน (tannin) เป็นสารพวกโพลีฟีนอล (polyphenol) มีโมเลกุลใหญ่และโครงสร้างซับซ้อนพบได้ในพืชหลายชนิด มีรสฝาด จึงใช้เป็นยาฝาดสมาน ยาแก้ท้องเสีย มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ใช้ในการอุตสาหกรรมฟอกหนัง สมุนไพรที่มี tanninเช่น เปลือกทับทิม (punicagranatum) ใบฝรั่ง (PsidiumguajavaLinn) เป็นต้น

2.6 เทอร์พีนอยด์ (tenpenoids) เป็นสารที่ประกอบด้วยหน่วยที่เรียกว่าหน่วยisoprenenits สารประกอบนี้พบกระจายอยู่ทั่วไปในพืชชั้นสูง นอกจากนี้ยังพบในเชื้อรา จุลินทรีย์สิ่งมีชีวิตในทะเล และสารที่เป็นองค์ประกอบที่เกิดจากภาวะเครียด (stress compounds) หรือสารที่สร้างขึ้นเป็นพิเศษเมื่อพืชได้รับอันตราย เช่น Phytoalexins ปัจจุบันมีความสำคัญมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา และยังพบในใบแปะก๊วย (Ginkgo biloba) ใบเปล้าน้อย (Croton stellatopilosus Ohba.) และรากของชะเอม (Glycyrrhizaglabra)



ภาพ 4 การสังเคราะห์สารประกอบทุติยภูมิ(secondary metabolite)

ที่มา: ประยุกต์มาจาก Bhat, S. V., Nagasampagi, B. A. and Sivakumar, M (2005)

ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับสมุนไพร

1. พลูคาว

เป็นพันธุ์ไม้ล้มลุก พบได้ทั่วไปในทวีปเอเชีย ตั้งแต่แถบเทือกเขาหิมาลัยไปจนถึงเวียดนาม จีน รวมทั้งไทย และญี่ปุ่น สำหรับประเทศไทยพลูคาวจะเป็นพันธุ์ไม้ทางภาคเหนือ ขึ้นตามบริเวณที่ชื้นแฉะริมน้ำ

ชื่อวิทยาศาสตร์ HouttuyniacordataThunb.

Family SAURURACEAE

ชื่ออื่นๆ ผักคาวตอง ผักคาวปลา ผักคาวทอง พลูคาว

ภาพ 5 สมุนไพรพลูคาว

ที่มา: http:// www.herblpg.com /thai/node/62 (2007)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

พลูคาวเป็นไม้ขนาดเล็ก ต้นสูงประมาณ 6-12 นิ้ว ทอดไปตามพื้นดินใบแตกกิ่งก้านแผ่อยู่เหนือดินเล็กน้อย ลักษณะคล้ายพลูแต่หนากว่าเล็กน้อย โคนใบเว้าลึกยาว 2-3 นิ้ว ใบมีกลิ่นคาวเหมือนปลาช่อน ดอกช่อขนาดเล็กไม่มีก้าน ดอกออกเป็นช่อดรงส่วนยอดของต้น ดอกสีขาวประกอบด้วยดอกเล็กๆจำนวนมากติดกันแน่น ผลมีลักษณะเมล็ดกลมรี ดรงปลายผลแยกออกเป็น 3 แฉกออกรวมตัวกันแน่นยาวเป็นรูปทรงกระบอกขยายพันธุ์โดยวิธีแยกต้นและปักชำ

สรรพคุณในตำหรับยาไทย

สรรพคุณในตำหรับยาไทย

ต้น : ใช้รักษาโรคติดเชื้อและทางเดินหายใจ ฝีหนองในปอด ปอดบวม ปอดอักเสบ ไข้มาลาเรีย แก้บิด ขับปัสสาวะ ลดอาการบวมน้ำ นิ่ว ขับระดูขาวริดสีดวงทวาร แก้โรคผิวหนัง ผื่นคัน ฝีฝักบัว แผลเปื่อย ติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ แก้ไอ หลอดลมอักเสบ

ราก : ขับปัสสาวะ

ใบ : แก้บิด หัด โรคผิวหนัง ริดสีดวงทวาร หนอง

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่เกี่ยวข้อง

ในปี ค.ศ. 1995 รายงานของ Hayashi et al. ศึกษาพบว่าน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากสารสกัดน้ำมีองค์ประกอบของสาร n-decyl-aldehyde, n-dodecyl aldehyde และ methyl-n-nonyl ketone สามารถยับยั้งการเจริญเติบโดของไวรัสที่มีเปลือกหุ้ม 3 ชนิด คือ HSV-1, Influenza virus และ Human immunodeficiency virus ได้อย่างมีประสิทธิภาพแล้วยังพบว่าคุณสมบัติของสารสำคัญในกลุ่มฟลาโวนอยด์ได้แก่ สาร rutin, hyperoside, afzelin, quercetin, quercitrin, houttuynoside A และhouttuynamide A (Chou et al., 2009; Xuet al., 2006)มีความสามารถในการยับยั้งHSV-2 (Chiang et al., 2003) และยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ Influenza Avirus ได้โดยตรงต่ออนุภาคไวรัสก่อนติดเข้าสู่เซลล์ จากกลไกการออกฤทธิ์ของสารquercetin 3-rhamnoside (Q3R)(Choiet al., 2009b) รายงานของ Choiet al. (2009a)ได้ศึกษาฤทธิ์ของสาร quercetin 7-rhamnoside (Q7R) ต่อฤทธิ์ยับยั้ง Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV; สาเหตุของโรคท้องร่วงในสุกร) ในหลอดทดลอง พบว่าสาร Q7R ที่สกัดได้จากตัวทำละลายเมทานอลจากพลูคาวสามารถยับยั้ง PEDV ในกระบวนการขั้นต้นของการเพิ่มจำนวนซึ่งมีประสิทธิภาพดีกว่ายาต้านไวรัส ribavirin,INFα,coumarin และ tanninโดยมีค่าการยับยั้ง IC_{50}เท่ากับ0.014 ± 0.005 μg/ml

Lau et al. (2008) ได้ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดพลูคาวต่อประสิทธิภาพในการยับยั้ง Severe acute respiratory syndrome corona virus (SARS-CoV; สาเหตุของโรคซาร์สหรือโรคระบบทางเดินหายใจร้ายแรงพบว่าสารสกัดเมทานอลของพลูคาวสามารถขัดขวางกลไกการทำงานของเอนไซม์ SARS-CoV 3C-like protease (3CLpro) และเอนไซม์ RNA-dependent RNA polymerase ซึ่งมีความสำคัญในขั้นตอนการติดเข้าสู่เซลล์และกระบวนการvirus life cycle

นอกจากนี้ รายงานของ Lin et al. (2009) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากสมุนไพรจำนวน 22 ชนิดต่อประสิทธิภาพในการยับยั้ง Enterovirus 71 (EV71; สาเหตุของโรคมือเท้าปาก) พบว่าสารสกัดจากพลูคาวสามารถยับยั้งการเกิดพยาธิสภาพในเซลล์เพาะเลี้ยง vero cell โดยมีค่าการยับยั้ง IC_{50} เท่ากับ 125.92 ± 27.84 µg/ml และส่งให้เกิดการอะพอพโทซิส (apoptosis) หลังการติดเชื้อ

2. พญายอ

เป็นพืชไม้พุ่มกึ่งเลื้อยนิยมปลูกเป็นไม้ประดับพบได้ทั่วไปตามป่าในประเทศไทย ถูกนำมาใช้เป็นยาพื้นบ้านตั้งแต่สมัยอดีตจนถึงปัจจุบัน

ชื่อวิทยาศาสตร์ Clinacanthusnutans (Burm.f.) Lindau

Family ACANTHACEAE

ชื่ออื่นๆ เสลดพังพอนตัวเมียผักมันไก่ผักลิ้นเขียดพญาปล้องดำ

ภาพ 6 พญายอ

ที่มา: http:// xn-n3cga6af7 bxa8aed4a.blogspot. com (2012)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ลำต้นกลมผิวเรียบเป็นปล้อง ก้านสีเขียว สูง 1-3 m ใบเดี่ยวรูปรีแคบขนาดกว้าง 0.5-1.5cmยาวประมาณ2.5-13 cm ปลายและโคนแหลมริมใบเรียบ ออกตอกเป็นช่อ ที่ปลายกิ่ง มี 5 ดอกย่อยขึ้นไป กลีบดอกสีแดงส้ม โคนกลีบสีเขียวดิดกันเป็นหลอดปลายแยกเป็น 2 ส่วนพญายอเจริญเติบโตได้ในดินที่สมบรูณ์ แสงแดดปานกลางขยายพันธุ์โดยการปักชำ

สรรพคุณในตำหรับยาไทย

ทั้งต้น : คั้นเอาน้ำดื่ม แก้พิษงู แก้บิด ถอนพิษไข้

ใบ :ใช้รักษาอาการอักเสบเฉพาะที่ ถอนพิษแมลงกัดต่อย แก้เม็ดผดผื่นคัน

ราก : ทาแก้พิษ ตะขาบ แมงป่อง

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่เกี่ยวข้อง

พญายอเป็นพืชที่มีสรรพคุณทางยาสูงเนื่องจากมีองค์ประกอบของไกลโคไซด์ (Teshima et al., 1998) และสารสำคัญอีกหลายชนิด อาทิ stigmasterol, lupeol, β-sitosterol, belutin, C-glycosyl flavones, vitexin, isovitexin, shaftoside, isomollupentin-7-o-β-glucopyranoside, orientin, isoorientin, five sulfur-cotainig glycoside, cerebrosidesและ monoacylmonogalatosyglycerol (Pittaya et al., 2004) นอกจากจะมีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและต้านการอักเสบ (Satayavivad et al., 1996) พญายอถูกนำใช้เป็นยาแผนโบราณสำหรับบำบัดและรักษาอาการแผลอักเสบในปาก (ชื่นฤดี และคณะ, 2553) โรคเริมและโรคงูสวัดจากรายงานของ Thawaranantha et al. (1992) พบว่าสารสกัดจากใบพญายอสามารถยับยั้งเชื้อ VZV สาเหตุของโรคงูสวัด ได้โดยตรงก่อนเข้าสู่เซลล์ สอดคล้องกับรายงานทางคลินิกวิทยาพบว่าหลังจากผู้ป่วยได้รับยาจากสารสกัดใบพญายอทาวันละ 5 ครั้ง เป็นเวลา 7-14 วัน แผลจะตกสะเก็ดภายใน 3 วัน และหายภายใน 7-10 วัน และระดับความเจ็บปวดลดลงเร็วกว่ากลุ่มยาหลอก (Somchai, 1995)

Jayavasu (1998) รานงานว่าสารสกัดเอทานอลจากใบของพญายอสามารถยับยั้ง HSV-2 ได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อเปรียบเทียบกับยาต้านไวรัส acyclovir จากรายงานทางคลินิกวิทยาพบว่าผู้ป่วยที่มีอาการของโรคเริมที่อวัยวะสืบพันธุ์ จำนวน 163 ราย ที่ได้รับยาต่างๆ กัน 3

กลุ่มคือ ยาที่สกัดจากใบพญายอ ยาต้านไวรัส acyclovir และกลุ่มยาหลอก หลังจากผู้ป่วยได้รับยาทาวันละ 4 ครั้ง เป็นเวลา 6 วันพบว่าผู้ป่วยที่ใช้ยาจากสารสกัดใบพญาและ acyclovir แผลตกสะเก็ดภายใน 3 วัน และแผลหายภายใน 7 วัน แต่พบว่าผู้ป่วยที่ใช้ยาที่สกัดจากใบพญายอไม่มีผลข้างเคียงและไม่ก่อให้เกิดอาการระคายเคือง

Santi et al. (2009) รายงานการศึกษาฤทธิ์ต้าน HSV-1 จากอนุพันธ์ของสารคลอโรฟิลล์เอ (chlorophyll a)และ คลอโรฟิลล์บี(chlorophyll b) คือสาร132-hydroxy-(132-R)-phaeophytin a, 132-hydroxy (132-S)-phaeophytin a และ 132-hydroxy-(132-R)-phaeophytin bที่สกัดได้จากสารสกัดน้ำของใบพญายอมีความสามารถในการทำลายHSV-1 จากกลไกการทำลายโครงสร้างไกลโคโปรตีน และเปลือกหุ้มไวรัสและแทรกแซงที่กระบวนการ adsorption หรือ penetration โดยจับกับ anti-receptor ของไวรัสทำให้ไม่สามารถจับกับตัวรับบริเวณผิวเซลล์ของเซลล์เจ้าบ้าน (Janwitayanuchit et al., 2003) นอกจากนี้พบว่าอนุพันธ์ของสาร monoglycosyl diglycerides ที่สกัดได้จากส่วนใบ มีฤทธิ์ยับยั้ง HSV-2 จากกลไกการยับยั้งกลไกการยับยั้งที่เกิดขึ้นในกระบวนการสร้างสารพันธุกรรมและโปรตีน ทำให้ส่งผลกระทบต่อการเพิ่มจำนวนไวรัส (Yoosook et al., 1999) การศึกษาในภายหลังพบว่า สารอนุพันธุ์ดังกล่าวคือสาร 1,2-O-dilinolenoyl-3-O-b-d-glucopyranosyl-sn-glycerol ซึ่งเป็นสารในกลุ่มไกลโคกลีซีโรลิปิด (glycoglycerolipids) (Santi et al., 2009)

3.ทองพันชั่ง

เป็นพืชล้มลุกนิยมปลูกเป็นไม้ประดับและใช้เป็นยาพื้นบ้านนอกจากจะใช้เป็นยาภายนอกแล้วยังสามารถนำมาใช้เป็นยารับประทานเพื่อรักษาโรคมะเร็งและวัณโรคในระยะเริ่มแรกได้อีกด้วย ในประเทศไต้หวันใช้ทองพันชั่งเป็นยาพื้นบ้านสำหรับการรักษาโรคเบาหวาน ความดันโลหิตสูง และโรคตับอักเสบ (Wu et al., 1995)

ชื่อวิทยาศาสตร์	Rhinacanthusnasutus (Linn.) Kurz
Family	ACANTHACEAE
ชื่ออื่นๆ	ทองคันชั่งหญ้ามันไก่ทองพันดุลย์

ภาพ 7 ทองพันชั่ง

ที่มา : http://www.oknation.net/blog/nonglek(2009)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ลำต้นลักษณะเป็นพุ่มสูงประมาณ 5 ฟุต กิ่งแก่ค่อนข้างกลมเป็นไม้เนื้อแข็ง เปลือกเกลี้ยงสีขี้เถ้า ใบเดี่ยวขึ้นตรงข้ามกันมีลักษณะเป็นวงรี โคนและปลายใบแหลมเรียวขอบใบเรียบ ออกดอกเป็นช่อสั้นๆ สีขาว กลีบดอกแคบและยาว มี 5กลีบแบ่งเป็นกลีบบนและกลีบล่าง ขอบข้างๆ ม้วนกลับมาข้างหลัง ปลายกลีบแยกเป็น 2 แฉก กลีบล่างกว้างมี 3 แฉก ผลเป็นฝักกลมยาวมีขนาดประมาณ 1cm. ขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดหรือการปักชำ

สรรพคุณในตำหรับยาไทย

ทั้งต้น : รักษาโรคผิวหนัง แก้น้ำเหลืองเสีย แก้กลากเกลื้อน ผื่นคัน รักษามะเร็ง คุดทะราด ขับพยาธิแก้ไส้เลื่อน

ต้น : บำรุงร่างกาย รักษาโรคผมร่วง

ใบ : รักษาโรคผิวหนัง รักษาโรคมะเร็ง รักษาโรคความดันสูง แก้พิษงู

ราก: แก้กลากเกลื้อน รักษาโรคมะเร็ง รักษาโรคผิวหนัง ดับพิษไข้ แก้พยาธิวงแหวนตามผิวหนัง

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่เกี่ยวข้อง

สารที่ถูกพบมากที่สุดในสมุนไพรทองพันชั่ง คือสารในกลุ่มของสารที่มีชื่อว่า ไรนาแคนทิน (rhinacanthin) ได้แก่ rhinacanthin-C, rhinacanthin-D และ rhinacanthin-N (Sendl et al., 1996) มีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Sattar et al., 2004) สามารถยับยั้งเชื้อ HSV-1 และ Cytomegalovirus (สาเหตุของโรคตุ่มในคนและหมู) โดยมีค่าการยับยั้ง ED_{50} เท่ากับ 0.02 และ 0.22 μg/ml ตามลำดับแต่ยังคงไม่ทราบกลไกการออกฤทธิ์ที่แน่ชัด นอกจากนี้แล้วยังพบว่ามีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ที่เป็นองค์ประกอบอีก อาทิ oxymethylanthraquione, quione และ rutin (quercetin-3-rutinoside) และnaphthoquinone (Wu et at., 1998)

รายงานการศึกษาของ Kernan et al. (1997) ยังพบว่า สาร rhinacanthin E และF ที่สกัดได้จากส่วนเหนือดินของต้นทองพันชั่ง มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อไวรัส HSV-1 และ Influenza Avirus ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Akanitapichat et al., 2002)

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. ไวรัส PRRS จากคณะสัตวแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. เซลล์ MARC-145 จากคณะสัตวแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
3. สมุนไพรที่ใช้ในการทดสอบ
   - 3.1 พลูคาว (*Houttuyniacordata* Thunb.)
   - 3.2 พญายอ (*Clinacanthusnutans* (Burm.f.) Lindau)
   - 3.3 ทองพันชั่ง (*Rhinacanthusnasutus* (Linn.) Kurz)
4. อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ (ภาคผนวก ก)
   - 4.1 Maintenance medium (MEM^{++}) (Gibco)
5. สารเคมี
   - 5.1สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์
     - 5.1.1 Fetal Bovine Serum (FBS) (PAA, Germany)
     - 5.1.2 Antibiotic-Antimicotic,100X (PAA, Germany)
     - 5.1.3 0.1% Trypsin-EDTA (PAA, Germany)
     - 5.1.4 Phosphate Buffered Saline (PBS) (ภาคผนวก ก)
   - 5.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบสารสกัดสมุนไพร
     - 5.2.1 Dimethylsulphoxide (DMSO) (Sigma)
     - 5.2.2 Hexane AR grade (Lab scan)
     - 5.2.3 Ethyl acetate, AR grade (Lab scan)
     - 5.2.4 Methanol AR grade (Lab scan)
     - 5.2.5 Acitic acid, AR grade (Lab scan)
     - 5.2.6 Dichoromathane (Lab scan)
     - 5.2.7 Rutin hydrate 95% HPLC (Sigma Aldrich)

5.2.8 Quercetin hydrate 98% HPLC (Sigma Aldrich)

5.2.9 Acetone/ Methanol (60/40) (ภาคผนวก ก)

5.2.10 Sorenson Buffer pH 4.2 (ภาคผนวก ก)

5.2.11 Ethanol 50%, 70, 95% (ภาคผนวก ก)

5.2.12 ผงวุ้นอะกาโรส (ภาคผนวก ก)

5.2.13 sterile water

5.3 สีย้อมเซลล์

5.3.1 0.25% Coomassie Brilliant Blue G-250 (Panreac)

5.3.2 0.5% Crystal violet ใน 20% ethanol

6.เครื่องมือ

6.1 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) (Tomy Japan)

6.2 เครื่องนับจำนวนเซลล์ (Haemacytometer) (Clay-Adams U.S.A)

6.3 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Binder Gmbh)

6.4เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (Microplate reader) (Bio-RAD)

6.5 ตู้บ่มเซลล์ (CO_2incubator) (Forma Scientific Infrared)

6.6 ตู้เย็น (Sanyo)

6.7 ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ-20องศาเซลเซียส (Sanyo)

6.8 ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ-80องศาเซลเซียส (Sanyo)

6.9 เครื่องชั่งอย่างละเอียด (Sartorius)

6.10 เครื่องดูดสารอัตโนมัติ (Autopipette) (High tech lab solution)

6.11 เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (Rotary evaporator)(BCCHI)

6.12 กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (Invert microscope) (Olympus)

6.13 กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ (Compound microscope) (Olympus)

6.14 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centifuge) (Hettich Lab Technology)

6.15 ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar flow cabinet) (Microtech)

6.16 เครื่องชั่งอย่างละเอียด (Metler Toledo รุ่น PG 802-S)

6.17 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) (JulaboLabortechink)

6.18 เครื่องไมโครเวฟ (Microwave) (LG)

6.19เครื่องพ่นฝอย (Freeze dry)

7. วัสดุและอุปกรณ์อื่นๆ

7.1 Syringe ขนาด 10 ml

7.2 จานเพาะเลี้ยงเซลล์ ขนาด 24 หลุม

7.3 จานเพาะเลี้ยงเซลล์ ขนาด 96 หลุม

7.4 ขวดเลี้ยงเซลล์ (T25 flask) ขนาด 25 cm^2

7.5 Nylon syringe filter ขนาด 0.22 และ 0.45 µm

7.6 บีกเกอร์ ขนาด 250 ml

7.7 ปิเปต ขนาด 20 และ 200 µl

7.8 ปิเปต ขนาด 1 และ 5 ml

7.9 ขวด Duran ขนาด 100 และ 250 ml

7.10 ขวด Duran ขนาด 500 และ 1,000 ml

7.11ขวด Universal ขนาด 30 ml

7.12ขวดMedical flat ขนาด 100 ml

7.13 กระบอกตวง ขนาด 100 และ 500 ml

7.14 ขวดรูปชมพู่ ขนาด 100, 125 และ 500 ml

7.15 Pipet tip ขนาด 20, 200 µl และ 1, 5 ml

7.16 ขวด Vial

7.17 แผ่น TLC Silica gel $_{60}F_{245}$

7.18 Capillary tube

7.19 TLC tank

7.20 หลอด Microcentrifuge tubes

7.21 กระดาษกรอง (Whatman No.1)

วิธีการวิจัย

1. วิธีสกัดและการเตรียมสารออกฤทธิ์จากพืชสมุนไพร

1.1 นำพืชสมุนไพรพลูคาวพญายอและทองพันชั่งล้างทำความสะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ตากแดด แล้วอบแห้งที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน และนำมาบดก่อนนำไปสกัด

1.2 แบ่งการสกัดออกเป็น 2 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำกลั่น (water extract) โดยต้มสมุนไพรในน้ำเดือด 1 ชั่วโมง กรองสารละลายสารสกัดด้วยผ้าขาวบาง และกระดาษกรอง (whatman No. 1) จากนั้นนำไประเหยแห้งภายใต้ระบบสุญญากาศ (rotary evaporator) ให้สารละลายสารสกัดมีความเข้มข้นที่เหมาะสมและนำไปทำแห้งด้วยวิธีการพ่นฝอย (spray dryer) ในขั้นตอนจะทำให้ได้สารสกัดหยาบ

กลุ่มที่ 2 สกัดแบบชง (percolation) ใช้ตัวทำละลายเอทานอล50%, 70% และ 95% โดยแช่สมุนไพรที่บดละเอียดในตัวทำละลายชนิดต่างๆ นาน 1 ชั่วโมง เพื่อให้สมุนไพรพองตัวเต็มที่ก่อนหมักทิ้งไว้ในถังหมัก (percolator) นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดระยะเวลา จึงเริ่มไขเอาสารสกัดออกจากถังหมักและเติมตัวทำละลายจนกว่าสารละลายที่สกัดที่จะมีลักษณะสีใสและเมื่อการสกัดเสร็จสมบูรณ์ จึงบีบแยกกากออกให้มากที่สุดนำสารละลายสารสกัดทั้งหมดกรองผ่านกระดาษกรองและนำไประเหยแห้งภายใต้ระบบสุญญากาศเพื่อระเหยเอาตัวทำละลายออกจนหมดในขั้นตอนจะทำให้ได้สารสกัดหยาบ

1.3 ทำละลายกลับด้วยสารสกัดน้ำด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM^{++}และสารสกัดเอทานอลด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM^{++}และ 1%DMSO

1.4 ปรับความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดพืชสมุนไพรทั้ง2 กลุ่มให้มีความเข้มข้นเริ่มต้น100 mg/ml และกรองสารสกัดพืชสมุนไพรผ่านตัวกรอง 0.22 μm เก็บเป็น stock solution ไว้ที่อุณหภูมิ-20 องศาเซลเซียส

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์ MARC-145

2.1 นำเซลล์ MARC-145 ($5x10^5$ cell/ml) ที่เจริญเต็มพื้นผิว flask มา sub culture โดยเทอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM^{++} ออกจาก flask แล้วล้างด้วย PBS (1X) ปริมาตร 5 ml

2.2 เท PBS (1X) ทิ้ง และเติม 0.1 % Trypsin-EDTA 100 µl ทิ้งไว้สักครู่ให้เซลล์หลุดร่อนและค่อยๆ เคาะให้เซลล์หลุดออกออกจากผิว flask

2.3 เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM^{++}ปริมาตร 10 mlลงใน flaskจากนั้นปิเปดแบ่งใส่ flask ใหม่ปริมาตร 5 ml

2.4 เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM^{++} เพิ่มอีก flask ละ5mlและเอียง flask ไปมาเพื่อให้เซลล์กระจายทั่ว flask แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส ในตู้บ่มที่มีความชื้นและ 5% CO_2 เป็นเวลา 2-3 วัน สังเกตการเจริญเติบโต จากการส่องกล้องจุลทรรศน์หัวกลับเมื่อเซลล์เจริญเป็นชั้น monolayer นำไป subculture รอบใหม่ เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ ตามวิธีข้างต้น

3. การเพิ่มจำนวนไวรัส

3.1 เทอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM^{++}ออกจาก flask ที่มีเซลล์เจริญอยู่เป็นชั้น monolayer

3.2 เติมไวรัส PRRS ปริมาตร 100 µlปล่อยให้เกาะติดกับเซลล์ โดยบ่มที่อุณหภูมิ37องศาเซลเซียสในตู้บ่มที่มีความชื้นและ5% CO_2เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นปิเปตไวรัสออกจาก flask

3.3 เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM^{++} ปริมาตร 2-3 ml แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในตู้บ่มที่มีความชื้นและ 5% CO_2 เป็นเวลา 2-3 วัน และสังเกตการเกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ

3.4 นำ flask ที่มีไวรัส PRRS ไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.5 ก่อนนำไวรัสมาใช้งานให้ละลายที่อุณหภูมิห้องสลับกับแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (freeze-thaw) ทำเช่นนี้ 2 ครั้ง เพื่อปลดปล่อยไวรัสออกจากเซลล์

3.6 ปิเปตสารละลายทั้งหมดใส่ในหลอดทดลองที่ปลอดเชื้อขนาด 10 ml จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 1000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที

3.7 ปิเปตส่วนใส แบ่งใส่หลอด microccntrifuge tube ที่ปราศจากเชื้อ เก็บไว้เป็น stock ไวรัสที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

4. การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดพืชสมุนไพรต่อเซลล์ MARC-145 (Cytotoxicityassay)

4.1 เจือจางสารละลายสารสกัดพืชสมุนไพรให้ได้ความเข้มข้น100 mg/ml นำมาเจือจางแบบ 2 เท่า (2-folddilution) ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมได้สารสกัดที่มีความเข้มข้น 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56,0.78, 0.39, 019, 0.097, 0.048, 0.024 และ 0.012 mg/ml

4.2 บ่มเซลล์MARC-145 ($5x10^5$cell/ml)ปริมาตร 100 µl ร่วมกับสารสกัดพืชสมุนไพรที่ต่างเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 100 µl ในจานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในตู้บ่มที่มีความชื้นและ 5% CO_2เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

4.3 ดูดสารละลายออกจากหลุม จากนั้นหยดสี 0.5% crystal violet ปริมาตร 100 µl ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที เทสีย้อมทิ้งและปิเปต PBS (1X) ปริมาตร หลุมละ 200 µl จำนวน 2 ครั้ง เพื่อล้างสีย้อมภายในหลุมออกจากนั้นรอจนกว่าจะแห้งสนิท

4.4 ปิเปตสารละลาย Sorenson' citrate buffer ปริมาตรหลุมละ 100 µl ทิ้งไว้ 15 นาที จากนั้นวิเคราะห์อัตราการตายของเซลล์ด้วยเครื่องmicroplate reader จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm ($OD_{595\ nm}$) (Maria et al., 2005)

5. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งก่อนติดเข้าสู่เซลล์ (pre-infection)และการเพิ่มจำนวนของไวรัส PRRS หลังติดเข้าสู่เซลล์ของไวรัส PRRS (post-infection) ด้วยวิธี Cytopathic effect assay

5.1 ปิเปตเซลล์ MARC-145 ($5x10^5$cell/ml) ปริมาตร 10 ml ลงใน flask บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในตู้บ่มที่มีความชื้นและ 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5.1.1 flask ที่ 1 นำสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปริมาตร 5 ml บ่มร่วมกับไวรัส PRRS ปริมาตร1 mlที่อุณหภูมิ37องศาเซลเซียสในตู้บ่มที่มีความชื้นและ 5% CO_2 เป็นเวลา 1ชั่วโมงจากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์เพิ่มปริมาตร 4 ml (ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งก่อนติดเข้าสู่เซลล์)

5.1.2 flask ที่ 2 เทอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง และเติมไวรัส PRRS ปริมาตร 1 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในตู้บ่มที่มีความชื้นและ 5% CO_2 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารสกัดที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่เป็นพิษกับเซลล์ ปริมาตร 5 ml พร้อมกับอาหารเลี้ยงเซลล์เพิ่มปริมาตร4 ml (ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวน)

5.2 บ่มที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียสในตู้บ่มที่มีความชื้นและ 5% CO_2 เป็นเวลา 4 วัน จึงทำการเก็บไวรัส โดยแช่แข็งเซลล์ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส หุ้มฝา flask ให้มิดชิดเพื่อป้องกันการปนเปื้อน

5.3 นำเซลล์ออกมา freeze-thaw ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 1000 รอบต่อนาทีนาน 10 นาที

5.4 ดูดส่วนใสทำการเจือจางตามลำดับแบบ 10 เท่า (10-fold dilution) กับอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM^{++}(10^{-1}-10^{-8}dilution)

5.5 เตรียมเซลล์ MARC-145 ($5x10^5$cell/ml) ในถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุมปริมาตรหลุมละ 100 µl บ่มร่วมกับไวรัสที่ความเจือจางต่างๆ ปริมาตรหลุมละ 100 µl ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มที่มีความชื้นและ 5% CO_2 เป็นเวลา 4 วัน

5.6 สังเกตการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเซลล์เพาะเลี้ยงภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับเพื่อวิเคราะห์หาไตเตอร์ของไวรัส

5.7 คำนวณหาความเข้มข้นของไวรัสโดยวิธีของ Reed and Muench (John and Venetia, 2007) ซึ่งมีหน่วยเป็น TCID (Tissue culture infective dose)$_{50}$/ml (ภาคผนวก ข)

6. การตรวจหาปริมาณไวรัส ด้วยวิธี Plaque titration assay

6.1 ปีเปตเซลล์ MARC-145 ($5x10^5$ cell/ml) ปริมาตรหลุมละ 500 µl ลงในจานเพาะเลี้ยงชนิด 24 หลุมบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในตู้บ่มที่มีความชื้นและ 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจากนั้นดูดอาหารออกจากจานเพาะเลี้ยงเซลล์

6.2 นำไวรัสมาทำการเจือจางแบบ 10 เท่าปีเปตแต่ละความเจือจางลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุม ปริมาตรหลุมละ 450 µl บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในตู้บ่มที่มีความชื้นและ 5% CO_2 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

6.3 ดูดไวรัสออกจากจานเพาะเลี้ยง จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ปริมาตรหลุมละ 500 µl และ 0.6% agarose gel (37 องศาเซลเซียส) ปริมาตรหลุมละ 500 µl บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในตู้บ่มที่มีความชื้นและ 5% CO_2 เป็นเวลา 4 วัน

6.4 ดูดอาหารและ agarose gel ในแต่ละหลุมทิ้ง แล้วล้างด้วย PBS ปริมาตร 2 ml จำนวน 2 ครั้งจากนั้นเติมสารละลาย 60/40 acetone methanol ปริมาตรหลุมละ 500 µl เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ปีเปตเอาสารละลายออก และทิ้งไว้จนแห้งสนิท

6.5 ย้อมสีเซลล์ด้วย 0.25% CoomassieBrilliant Blue R250 ที่ละลายอยู่ใน acetic acid และ 50% methanol (1:9; v:v) ปริมาตรหลุมละ 200 µl ทิ้งไว้ 10 นาที ดูดสีย้อมทิ้งและล้างสารละลายออกด้วย PBS (1X) ปริมาตรหลุมละ 200 µl จำนวน 2 ครั้ง (Kim et al,. 2008)

6.6 ตรวจดูการติดสีย้อมและนับปริมาณplaque ของไวรัสที่เกิดขึ้น (เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสจะไม่ติดสีย้อม) จากนั้นคำนวณหาปริมาณไวรัส (ภาคผนวก ข)

สูตรคำนวณหาปริมาณไวรัส (Virus Titer)

$$(\text{plaques}) / (d \times v) = \text{PFU} / \text{ml}$$

เมื่อ

plaques = ค่าเฉลี่ยของจุดที่พบเห็นด้วยตาเปล่า

d = ลำดับความเจือจาง

v = ปริมาตรในแต่ละความเจือจาง

7. การเตรียมสารสกัดสมุนไพรสำหรับการวิเคราะห์หาสารพฤกษเคมีเบื้องต้นด้วยวิธี Thin layer chromatography (TLC)

7.1 การสกัดแบบเป็นขั้นตอน (partition) (ภาคผนวก ข) โดยใช้ตัวทำละลาย hexane, dichloromethane, ethatyl acetate, n-butanol และน้ำ ตามลำดับ (Elizabeth et al., 1996) จากนั้นนำส่วนที่สกัดแยกได้ทำระเหยแห้งภายใต้ระบบสุญญากาศ

7.2 นำสารสกัดมาทำเจือจางในอัตราส่วน1 mg/ml

7.2.1 ละลายส่วน hexane ด้วย dichloromethane

7.2.2 ละลายส่วน dichloromethaneethatyl acetaten-butanol ด้วย methanol

7.3.3 ละลายส่วนน้ำด้วยน้ำ

7.3 เตรียมสารละลายเคลื่อนที่ (developingsolvent)

7.3.1 dichloromethane: ethatyl acetate: formic acid ในอัตราส่วน 10:6:1สำหรับวิเคราะห์หาสาร quercetin

7.3.2 ethatyl acetate: formic: acetic: H_2O ในอัตราส่วน 100:11:11:26สำหรับวิเคราะห์หาสารrutin

7.4 การจุดสารสกัดหยาบ (crude extract) ลงบนแผ่น TLC หยดสารสกัดหยาบลงบนแผ่น TLC ให้ห่างกันประมาณ 1cm เป็นแถวยาวติดกัน รอให้สารละลายแห้งแล้วจุดสารซ้ำลงไปอีกครั้ง นำแผ่น TLC (10x10 cm) ใส่ลงไปใน tank เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนที่ถึง solvent front จึงนำออกจาก tank ทิ้งไว้ในตู้ดูดควันประมาณครึ่งชั่วโมง เพื่อให้สารตัวทำลายเคลื่อนที่ระเหยไปจนหมด

7.5 ตรวจดูโครมาโทรกราฟีแสดงแถบต่างๆ และส่องภายใต้รังสียูวี ที่ความยาวคลื่น 254 และ 356 nm

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการวิจัยเพื่อส่งเสริมภูมิต้านทานในมนุษย์และสัตว์ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่
63 หมู่ 4 ตำบลหนองหาร อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ 50290

ระยะเวลาทำการทดลอง

21 เมษายน 2553 ถึง 25 กรกฎาคม 2555

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. ผลผลิตสุทธิของสารสกัดสมุนไพรในตัวทำละลายต่างๆ

การศึกษาชนิดของตัวทำละลายน้ำและเอทานอลในการสกัด เพื่อหาค่าผลผลิตสุทธิของสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดของสมุนไพรแต่ละชนิดจากการทดลองนำพืชสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด คือ พลูคาว พญายอ และทองพันชั่ง โดยได้แบ่งการสกัดออกเป็น 2 กลุ่มคือ วิธีการสกัดแบบชงโดยใช้ตัวทำละลายเอทานอลวิธีนี้เป็นวิธีที่ทำง่าย สะดวก ไม่ใช้ความร้อนแต่อาศัยวิธีการแช่ให้พืชสมุนไพรเปื่อยยุ่ยจนตัวทำละลายสามารถแทรกเข้าเนื้อเยื่อและเพิ่มความสามารถในการละลายและชะเอาสารที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดออกมาได้ในปริมาณมากขึ้นทำให้การสกัดเป็นไปอย่างสมบูรณ์ เมื่อทำการระเหยแห้งภายใต้ระบบสุญญากาศ พบว่าสารสกัดมีลักษณะกึ่งแข็งข้นค่อนข้างหนืด สีน้ำตาลเข้ม สำหรับวิธีที่สองอาศัยความร้อนในการสกัดโดยการต้มสมุนไพรในน้ำเดือดและทำแห้งด้วยการพ่นฝอย ทำให้ได้สารสกัดน้ำที่มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีน้ำตาลจากการศึกษาเปรียบเทียบค่าผลผลิตสุทธิของสารสกัดทั้งสองกลุ่ม พบว่าผลผลิตสุทธิของสารสกัดพลูคาว พญายอ และทองพันชั่ง ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 50% มีปริมาณสูงที่สุด คิดเป็นร้อยละ15.22, 21.95 และ 14.42 w/v ตามลำดับ (ตาราง 3)

ตาราง 3 ผลผลิตสุทธิของสารสกัด

สมุนไพร	ผลผลิตสุทธิของสารสกัด(ร้อยละ)			
	สารสกัดน้ำ	เอทานอล50%	เอทานอล70%	เอทานอล95%
พลูคาว	0.70	15.22	11.46	4.76
พญายอ	8.75	21.95	19.39	5.80
ทองพันชั่ง	3.53	14.42	9.28	4.32

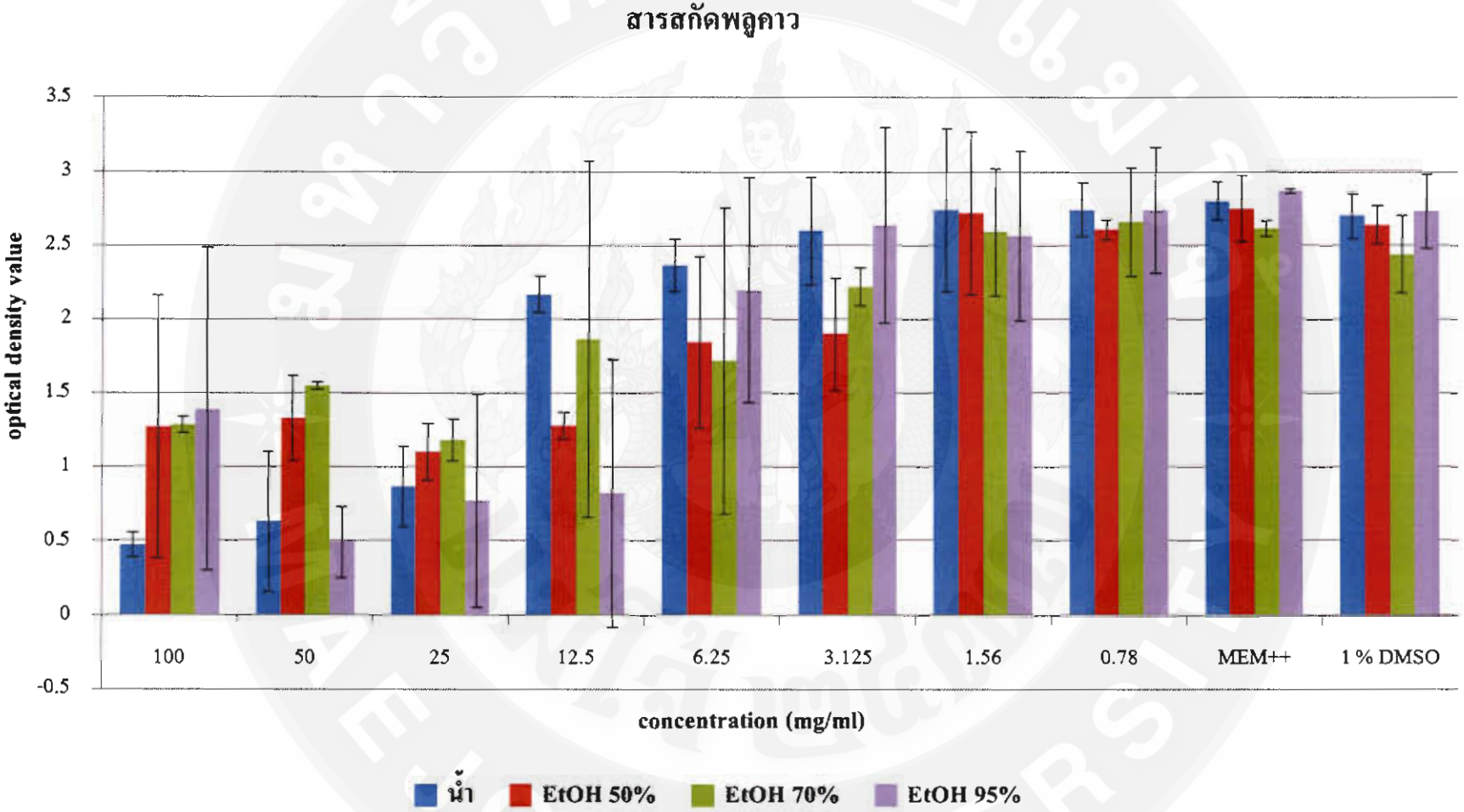
2. การตรวจสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์MARC-145

จากการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ MARC-145 พบว่าความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดที่ใช้ตัวทำละลายน้ำและเอทานอล 50%, 70% และ 95% ของพลูคาวที่ความเข้มข้น เท่ากับ 1.56, 1.56, 1.56 และ 0.78mg/ml ตามลำดับ (ตาราง 4; ภาพ 9) พญายอที่ความเข้มข้น เท่ากับ 25, 12.5, 25และ 6.25 mg/ml ตามลำดับ (ตาราง 5; ภาพ 10)และทองพันชั่งที่ความเข้มข้น เท่ากับ 0.09, 0.02, 0.02และ 0.02mg/ml ตามลำดับ (ตาราง 6; ภาพ 11) โดยจะนำสารสกัดที่ความเข้มข้นดังกล่าวมาทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรต่อเชื้อ PRRSV ต่อไป

ตาราง 4 ความเป็นพิษของสารสกัดพลูคาว

ความเข้มข้น (mg/ml)	สารสกัดน้ำ	เอทานอล50%	เอทานอล70%	เอทานอล95%
	Mean	Mean	Mean	Mean
100	0.469	1.269	1.282	1.389
50	0.629	1.327	1.549	0.489
25	0.866	1.103	1.182	0.773
12.5	2.166	1.275	1.863	0.823
6.25	2.364	1.843	1.714	2.197
3.125	2.594	1.897	2.217	2.637
1.56	2.737*	2.713*	2.587*	2.561
0.78	2.741	2.606	2.657	2.739*
MEM^{++}	2.797	2.747	2.613	2.859
1%DMSO	2.697	2.636	2.437	2.729

หมายเหตุ *ไม่เป็นพิษต่อเซลล์สูงสุด

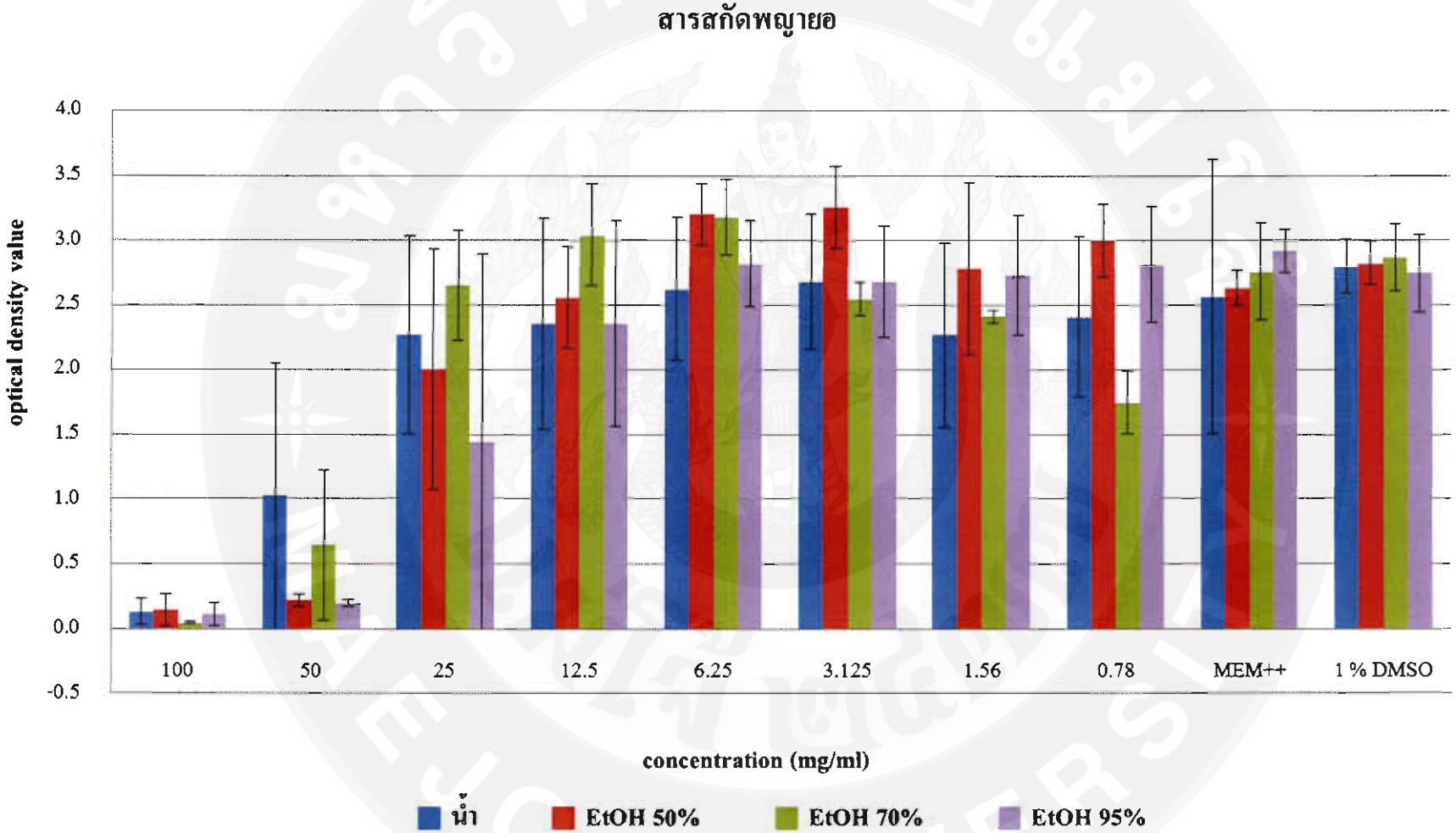


ภาพ 8 ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดพลูคาว

ตาราง 5 ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดพญายอ

ความเข้มข้น (mg/ml)	สารสกัดน้ำ	เอทานอล 50%	เอทานอล 70%	เอทานอล 95%
	Mean	Mean	Mean	Mean
100	0.131	0.140	0.047	0.110
50	1.022	0.221	0.644	0.197
25	2.269*	2.003	2.654*	1.444
12.5	2.353	2.557*	3.045	2.359
6.25	2.627	3.206	3.184	2.824*
3.125	2.684	3.258	2.546	2.682
1.562	2.268	2.783	2.409	2.730
0.781	2.407	3.002	1.746	2.815
MEM^{++}	2.565	2.635	2.760	2.921
1%DMSO	2.800	2.827	2.872	2.744

หมายเหตุ *ไม่เป็นพิษต่อเซลล์สูงสุด

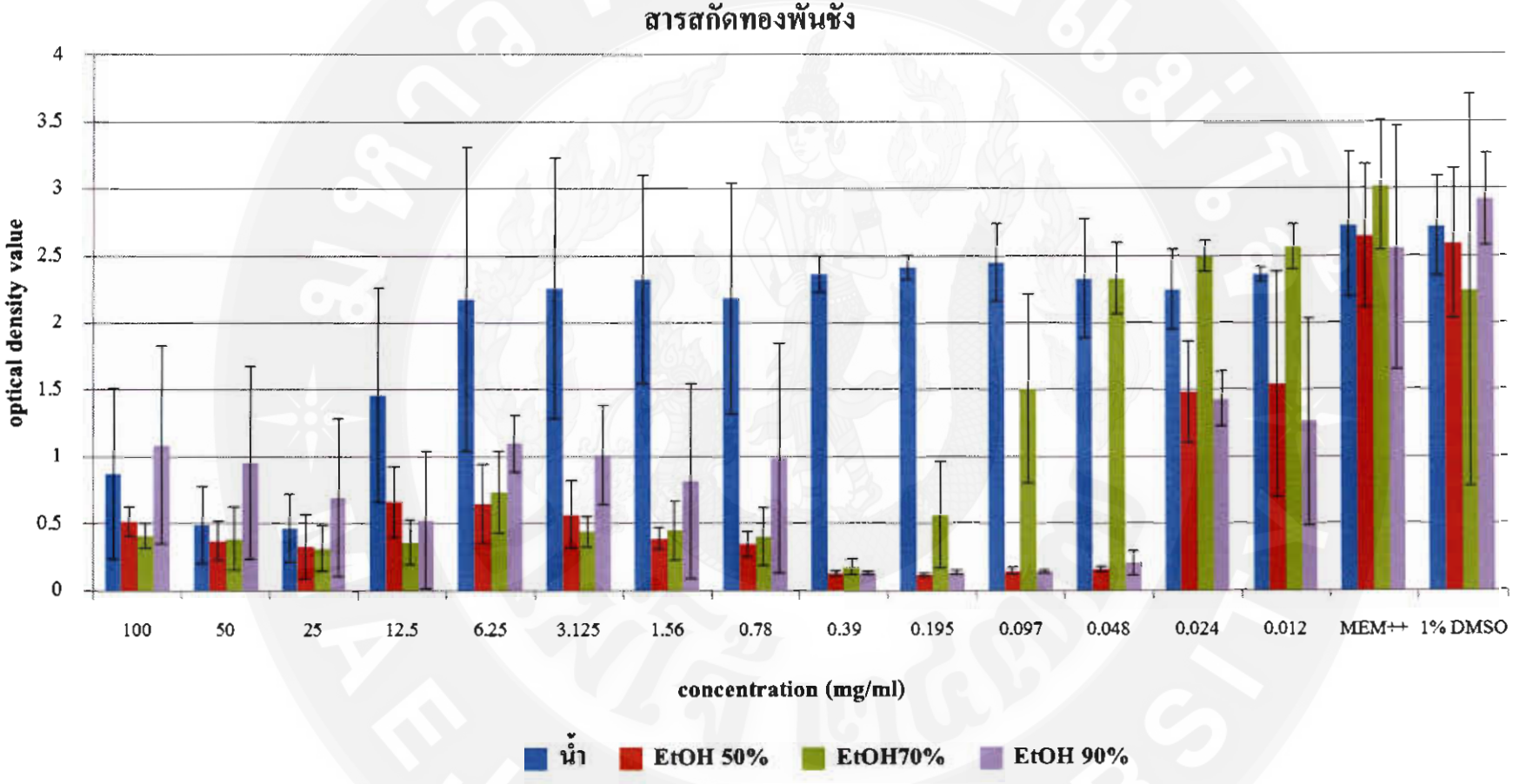


ภาพ 9 ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดพญายอ

ตาราง 6 ความเป็นพิษของสารสกัดทองพันชั่ง

ความเข้มข้น (mg/ml)	สารสกัดน้ำ	เอทานอล50%	เอทานอล70%	เอทานอล95%
	Mean	Mean	Mean	Mean
100	0.870	0.513	0.409	1.085
50	0.490	0.370	0.386	0.953
25	0.466	0.331	0.314	0.695
12.5	1.456	0.664	0.360	0.526
6.25	2.176	0.647	0.736	1.097
3.125	2.254	0.565	0.438	1.008
1.562	2.320	0.385	0.446	0.814
0.781	2.181	0.343	0.400	0.987
0.39	2.362	0.124	0.176	0.130
0.19	2.416	0.116	0.562	0.134
0.09	2.453*	0.142	1.507	0.139
0.04	2.329	0.158	2.329	0.201
0.02	2.245	1.483*	2.496*	1.430*
MEM^{++}	2.731	2.648	3.024	1.259
1%DMSO	2.720	2.836	2.239	2.561

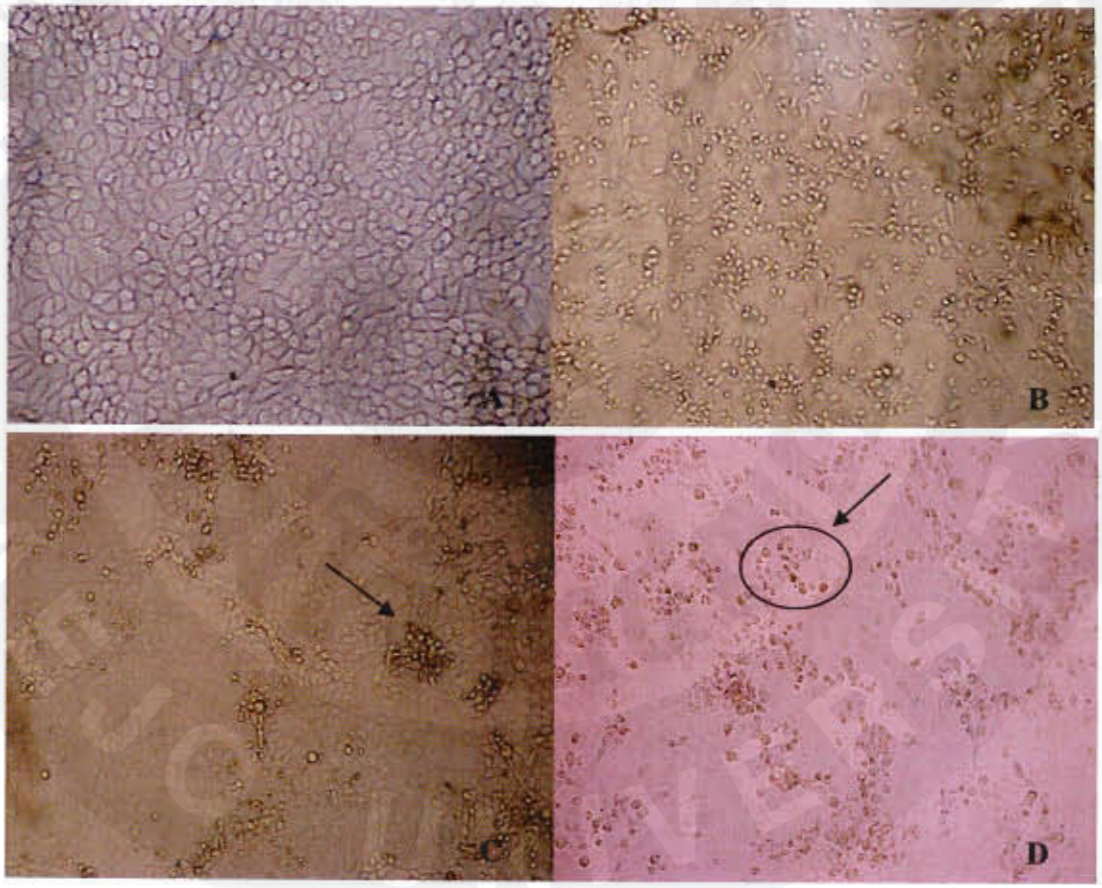
หมายเหตุ *ไม่เป็นพิษต่อเซลล์สูงสุด



ภาพ 10 ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดทองพันชั่ง

3. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรต่อฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ PRRSVก่อน-หลังติดเข้าสู่เซลล์ MARC-145 โดยวิธี Cytopathic effect assay

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการติดเข้าสู่เซลล์ของเชื้อ PRRSV ในระยะเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ที่ติดเชื้อ PRRSV มีลักษณะเปลี่ยนไปจากเดิม ทำให้เซลล์เหี่ยว (shrink cell) กลมวาว (spherical cells) บางบริเวณมีการรวมตัวกันเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ (syncytial cells) และหลุดออกจากผิวภาชนะเพาะเลี้ยงดังภาพที่ปรากฏ (ภาพ 12) และผลการวิเคราะห์หาปริมาณไตเตอร์ของไวรัสแสดงผลการยับยั้งดังนี้



ภาพ 12 ลักษณะของเซลล์ MARC-145 ปกติ (A) กับลักษณะการเกิด CPE คือเซลล์เหี่ยว (B) การรวมตัวกันเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ (C) และเซลล์กลมวาว (D) เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ ที่กำลังขยาย 100 เท่า

3.1 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการติดเข้าสู่เซลล์ MARC-145 จากสารสกัดพลูคาว

เชื้อ PRRSV ที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัดน้ำสารสกัดเอทานอล 50%, 70% และ 95% พบว่าในระยะก่อนดิดเข้าสู่เซลล์ของสารสกัดทั้ง 4 กลุ่มทดลองนั้นสามารถลดปริมาณไตเตอร์ของไวรัสได้ในปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับกลุ่มไวรัสควบคุม โดยที่สารสกัดเอทานอล 95% ลดปริมาณไตเตอร์ของไวรัสได้สูงสุดเท่ากับ $10^{5.6 \pm 0.11}$ $TCID_{50}$/ml รองลงมาคือ สารสกัดน้ำและสารสกัดเอทานอล 50% ลดปริมาณไดเตอร์ของไวรัสได้เท่ากับ $10^{5.75 \pm 0.07}TCID_{50}$/ml และ $10^{5.75 \pm 0.31}$ $TCID_{50}$/ml ตามลำดับ ในขณะที่การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งในระยะหลังติดเข้าสู่เซลล์ พบว่าสารสกัดเอทานอล 50% สามารถลดปริมาณไตเตอร์ของไวรัสได้สูงสุดเท่ากับ $10^{2.33 \pm 0.07}TCID_{50}$/ml รองลงมาคือสารสกัดเอทานอล 70% ลดปริมาณไดเตอร์ของไวรัสได้เท่ากับ $10^{3.75 \pm 0.17}TCID_{50}$/ml (ตาราง 7) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สารสกัดเอทานอล 50% ของพลูคาวมีประสิทธิภาพในการยับยั้งกระบวนการเพิ่มจำนวนของไวรัสหลังติดเข้าสู่เซลล์ได้ดีกว่าในระยะก่อนติดเข้าสู่เซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มไวรัสควบคุม

ตาราง 7 ปริมาณไตเตอร์ของเชื้อ PRRSV ก่อน-หลังบ่มด้วยสารสกัดพลูคาว นาน 1 ชั่วโมง

สารสกัดพลูคาว	ความเข้มข้น (mg/ml)	ปริมาณ Log ไวรัส($TCID_{50}$/ml)		
		เริ่มต้น	Pre-infection	Post-infection
สารสกัดน้ำ	1.56	10^{6}	$10^{5.75 \pm 0.07}$	$10^{5.91 \pm 0.10}$
เอทานอล50%	1.56	10^{7}	$10^{5.75 \pm 0.31}$	$10^{2.33 \pm 0.07}$
เอทานอล70%	1.56	10^{7}	$10^{6.66 \pm 0.14}$	$10^{3.75 \pm 0.17}$
เอทานอล95%	0.78	10^{6}	$10^{5.6 \pm 0.11}$	$10^{5.75 \pm 0.07}$
Control group	-	$I0^{7}$	$10^{7.00 \pm 0.00}$	$10^{7.00 \pm 0.00}$

หมายเหตุ ผลการทดลองได้จากค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ

3.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการติดเข้าสู่เซลล์ MARC-145 จากสารสกัดพญายอ

การทดลองพบว่าสารสกัดเอทานอล 50% สามารถยับยั้งเชื้อ PRRSV ได้ดีที่สุดทั้งในระยะก่อนและหลังไวรัสติดเข้าสู่เซลล์เมื่อเทียบกับสารสกัดที่ใช้ตัวทำละลายอื่นๆ โดยในระยะก่อนติดเข้าสู่เซลล์นั้นสารสกัดสามารถลดปริมาณไตเตอร์ของไวรัสได้เท่ากับ $10^{2.41 \pm 0.14}TCID_{50}/ml$ รองลงมาคือสารสกัดน้ำลดปริมาณไตเตอร์ของไวรัสได้เท่ากับ $10^{4.08 \pm 0.05}TCID_{50}/ml$ และการทดสอบฤทธิ์ในระยะหลังไวรัสติดเข้าสู่เซลล์ พบว่าสารสกัดเอทานอล 50% ลดปริมาณไตเตอร์ของไวรัสได้เท่ากับ $10^{0.75 \pm 0.17}TCID_{50}/ml$ รองลงมาคือสารสกัดเอทานอล 70% ลดปริมาณไตเตอร์ของไวรัสได้เท่ากับ $10^{3.75 \pm 0.17}TCID_{50}/ml$ (ตาราง 8) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดเอทานอล 50% สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสหลังติดเข้าสู่เซลล์ได้ดีกว่าระยะก่อนติดเข้าสู่เซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มไวรัสควบคุม

ตาราง 8 ปริมาณไตเตอร์ของเชื้อ PRRSVก่อน-หลังบ่มด้วยสารสกัดพญายอนาน 1 ชั่วโมง

สารสกัดพญายอ	ความเข้มข้น (mg/ml)	ปริมาณ Log ไวรัส($TCID_{50}$/ml)		
		เริ่มต้นPre-infection	Post-infection	
สารสกัดน้ำ	25	10^{8}	$10^{4.08 \pm 0.05}$	$10^{4 \pm 0.00}$
เอทานอล 50%	12.5	10^{8}	$10^{2.41 \pm 0.14}$	$10^{0.75 \pm 0.17}$
เอทานอล 70%	25	10^{6}	$10^{4.33 \pm 0.07}$	$10^{4.41 \pm 0.05}$
เอทานอล 95%	6.25	10^{7}	$10^{5.66 \pm 0.11}$	$10^{5.75 \pm 0.07}$
Control group	-	10^{8}	$10^{8.00 \pm 0.00}$	$10^{8.00 \pm 0.00}$

หมายเหตุ ผลการทดลองได้จากค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ

3.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการติดเข้าสู่เซลล์ MARC-145 จากสารสกัดทองพันชั่ง

พบว่าสารสกัดเอทานอล 50% สามารถลดปริมาณไตเตอร์ของไวรัสได้สูงสุดเมื่อเทียบกับสารสกัดที่ใช้ตัวทำละลายอื่นๆ โดยที่สารสกัดดังกล่าวสามารถลดปริมาณไตเตอร์ของไวรัสได้ใกล้เคียงกัน ในระยะก่อนติดเข้าสู่เซลล์ลดปริมาณไตเตอร์ของไวรัสได้เท่ากับ $10^{2.41 \pm 0.16}$ $TCID_{50}$/ml และในระยะหลังไวรัสติดเข้าสู่เซลล์ลดปริมาณไดเดอร์ของไวรัสได้เท่ากับ $10^{2.5 \pm 0.18}TCID_{50}$/ml รองลงมาคือสารสกัดน้ำสามารถลดไตเตอร์ของไวรัสได้เท่ากับ $10^{4.83 \pm 0.25}TCID_{50}$/ml (ตาราง 9)

ตาราง 9 ปริมาณไตเดอร์ของเชื้อ PRRSV ก่อน-หลังบ่มด้วยสารสกัดทองพันชั่ง นาน 1 ชั่วโมง

สารสกัดทองพันชั่ง	ความเข้มข้น (mg/ml)	ปริมาณ Log ไวรัส($TCID_{50}$/ml)		
		เริ่มต้นPre-infection	Post-infection	
สารสกัดน้ำ	3.12	10^8	$10^{5.33 \pm 0.2}$	$10^{4.83 \pm 0.25}$
เอทานอล 50%	0.02	10^8	$10^{2.41 \pm 0.16}$	$10^{2.5 \pm 0.18}$
เอทานอล 70%	0.19	10^7	$10^{6.16 \pm 0.07}$	$10^{5.08 \pm 0.21}$
เอทานอล 95%	0.02	10^7	$10^{5.83 \pm 0.11}$	$10^{5.08 \pm 0.24}$
Control group	-	10^7	$10^{7.00 \pm 0.00}$	$10^{7.00 \pm 0.00}$

หมายเหตุ ผลการทดลองได้จากค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ

4. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบต่อการยับยั้งเชื้อPRRSV โดยวิธี Plaque forming assay

เมื่อนำเชื้อ PRRSV มาทดสอบด้วยสารกัดเอทานอล 50% ของพลูคาว พญายอ และทองพันชั่ง ที่ความเข้มข้นสูงสุดไม่เป็นพิษต่อเซลล์ พบว่า ปริมาณ plaque ที่เกิดขึ้นมีปริมาณลดลงตามระดับความเจือจางไวรัส และผลการตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งจากปริมาณ plaque เปรียบเทียบกับกลุ่มไวรัสควบคุม

ตาราง 10 ปริมาณไวรัสควบคุม

ความเจือจาง (10-fold dilution)	ปริมาณไวรัส (PFU/ml)
10^{-2}	$8x10^{3}$
10^{-3}	$6.25x10^{4}$
10^{-4}	$6.25x10^{5}$

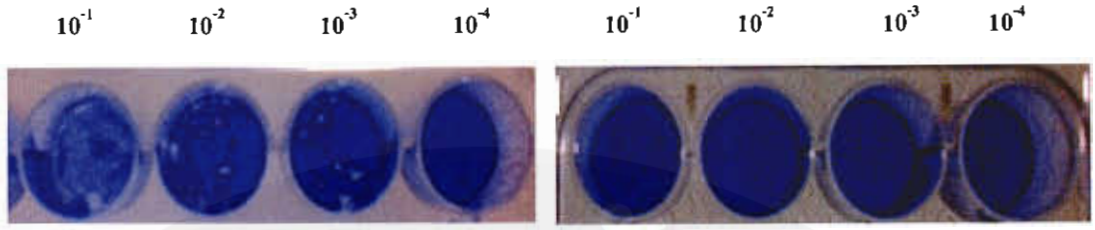
4.1 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ PRRSVจากสารสกัดเอทานอล 50% ของพลูคาว

สารสกัดเอทานอล 50% ของพลูคาวที่ความเข้มข้น 1.56 mg/ml สามารถยับยั้งไวรัสในระยะก่อนดิดเข้าสู่เซลล์ได้สูงสุดร้อยละ 100 ที่ความเจือจางของไวรัส 10^{-4}และพบว่าที่ความเจือจางของไวรัส 10^{-3} มีปริมาณเท่ากับ 3.5 x 10^{4} PFU/ml มีค่าการยับยั้งไวรัส ร้อยละ 44 (ตาราง 11, ภาพ 13) ขณะที่ในระยะหลังไวรัสหลังเข้าสู่เซลล์ มีปริมาณไวรัสเท่ากับ $1.75x10^{4}$ PFU/ml มีค่าการยับยั้งไวรัส ร้อยละ72 เมื่อเทียบกับไวรัสควบคุม (ภาพ 14)

ตาราง 11 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อPRRSV จากสารสกัดเอทานอล 50% ของพลูคาว

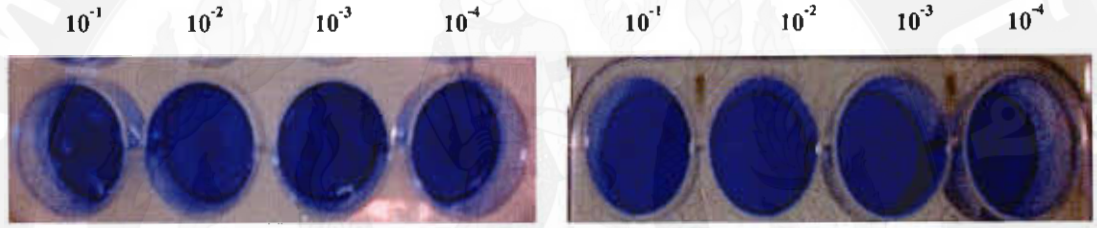
ความเจือจาง (10-fold dilution)	Pre-infection		Post-infection	
	จำนวน Plaque	% การยับยั้ง[a]	จำนวน Plaque	% การยับยั้ง[a]
10^{-2}	24	25	9	64
10^{-3}	14	44	7	72
10^{-4}	0	100	3	88.8

หมายเหตุ: [a]= ค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ครั้ง



(ก) (ข)

ภาพ 13 ปริมาณ plaque ในระยะก่อนติดเข้าสู่เซลล์ MARC-145 เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดเอทานอล 50% ของพลูคาว (ก) เปรียบเทียบกับไวรัสกลุ่มควบคุม (ข)



(ก) (ข)

ภาพ 14ปริมาณ plaque ในระยะหลังไวรัสติดเข้าสู่เซลล์ MARC-145เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดเอทานอล50% ของพลูคาว (ก) เปรียบเทียบกับไวรัสกลุ่มควบคุม (ข)

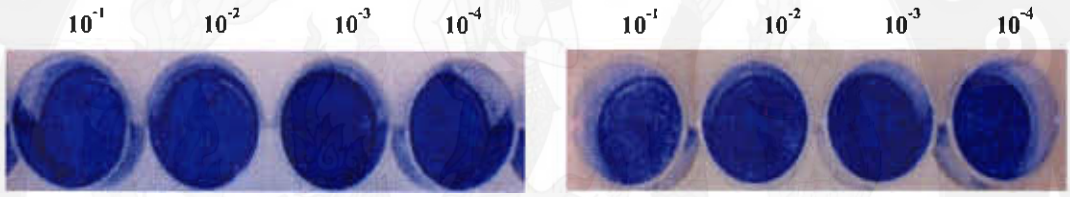
4.2 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ PRRSVจากสารสกัดเอทานอล 50% ของพญายอ

สารสกัดเอทานอล 50% ของพญายอที่ความเข้มข้น 12.5 mg/ml สามารถลดปริมาณไวรัสได้สูงสุดในระยะหลังไวรัสติดเข้าสู่เซลล์พบว่ามีค่าการยับยั้งไวรัสร้อยละ 100 โดยไม่ปรากฏจำนวน plaque ขึ้นในจานเพาะเลี้ยงไวรัส (ภาพ 15) ขณะที่ในระยะก่อนติดเข้าสู่เซลล์พบว่าจำนวน plaque ลดลงตามลำดับความเจือจาง 10^{-1}, 10^{-2}และ 10^{-3}มีปริมาณไวรัส เท่ากับ 75 PFU/ml, $1x10^{3}$PFU/ml และ $1x10^{4}$ PFU/ml ตามลำดับมีค่าการยับยั้งไวรัสร้อยละ 97, 84, 84 ตามลำดับ (ตาราง 12, ภาพ 15)

ตาราง 12 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อPRRSV จากสารสกัดเอทานอล50% ของพญายอ

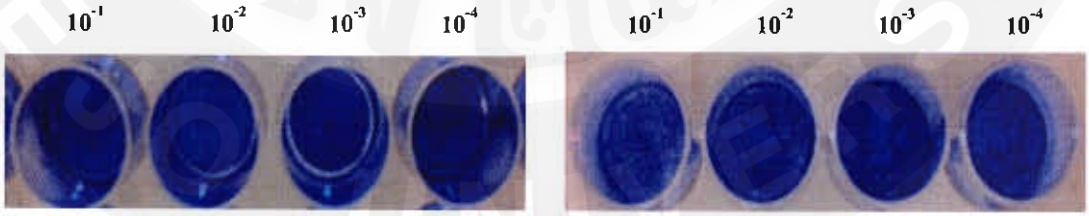
ความเจือจาง	Pre-infection		Post-infection	
(10-fold dilution)	จำนวน Plaque	% การยับยั้ง[a]	จำนวน Plaque	%การยับยั้ง[a]
10^{-2}	4	87.5	0	100
10^{-3}	4	84	0	100
10^{-4}	0	100	0	100

หมายเหตุ: [a]= ค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ครั้ง



(ก) (ข)

ภาพ 15 ปริมาณ plaque ในระยะก่อนไวรัสติดเข้าสู่เซลล์ MARC-145 เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดเอทานอล 50% ของพญายอ (ก) เปรียบเทียบกับไวรัสกลุ่มควบคุม (ข)



(ก) (ข)

ภาพ 16 ปริมาณ plaque ในระยะหลังไวรัสติดเข้าสู่เซลล์ MARC-145 เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดเอทานอล 50% ของพญายอ (ก) เปรียบเทียบกับไวรัสกลุ่มควบคุม (ข)

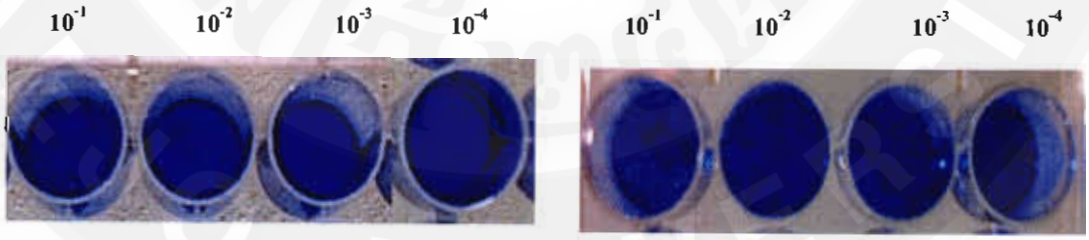
4.3 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ PRRSVจากสารสกัดเอทานอล 50% ของทองพันชั่ง

สารสกัดเอทานอล 50% ของทองพันชั่งที่ความเข้มข้น 0.02 mg/ml สามารถยับยั้งไวรัสในระยะก่อนและหลังติดเข้าสู่เซลล์ได้พบว่าที่ระดับความเจือจางไวรัส 10^{-2} มีปริมาณไวรัสเท่ากับ$1.75x10^{3}$ PFU/ml และ $2.25x10^{3}$ PFU/ml มีค่าการยับยั้งร้อยละ 78.1 และ 71.8 ตามลำดับ และที่ระดับความเจือจางของไวรัส 10^{-3} สารสกัดทองพันชั่งสามารถยับยั้งไวรัสได้ร้อยละ 100 (ตาราง 13)

ตาราง 13 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ PRRSV จากสารสกัดเอทานอล50% ของทองพันชั่ง

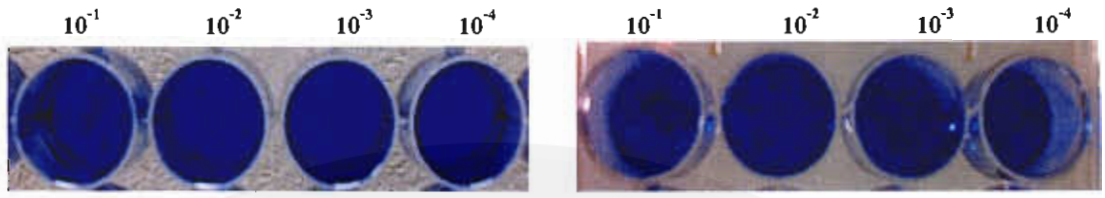
ความเจือจาง	Pre-infection		Post-infection	
(10-fold dilution)	จำนวน Plaque	% การยับยั้ง[a]	จำนวน Plaque	% การยับยั้ง[a]
10^{-2}	7	78.1	9	71.8
10^{-3}	0	100	0	100
10^{-4}	0	100	0	100

หมายเหตุ: [a]= ค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ครั้ง



(ก) (ข)

ภาพ 17 ปริมาณ plaque ในระยะก่อนไวรัสติดเข้าสู่เซลล์ MARC-145 เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดเอทานอล50% ของทองพันชั่ง (ก) เปรียบเทียบกับไวรัสกลุ่มควบคุม(ข)



(ก) (ข)

ภาพ 18 ปริมาณ plaque ในระยะหลังไวรัสติดเข้าสู่เซลล์ MARC-145 เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดเอทานอล 50% ของทองพันชั่ง (ก) เปรียบเทียบกับไวรัสกลุ่มควบคุม (ข)

5. ผลการวิเคราะห์หาสารพฤกษเคมีเบื้องต้นด้วยวิธี Thin layer chromatography

สารสกัดเอทานอล 50% ของพลูคาว พญายอ และทองพันชั่ง เมื่อนำมาทดสอบหาสารที่เป็นองค์ประกอบในพืชสมุนไพรและมีฤทธิ์ต้านไวรัสจากการนำสารสกัดที่ได้จากวิธีการสกัดเป็นขั้นตอน (ภาคผนวก จ) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานสาร rutin และ quercetin และคำนวณหาค่าการเคลื่อนที่ (Rf) ของสารสกัดดังตารางที่แสดง (ตาราง 14) พบว่าสารสกัดพลูคาวที่สกัดได้จากตัวทำละลาย n-butanol มีค่า Rf เท่ากับ 0.56 และแถบการเคลื่อนที่ของสารสกัดเท่ากับสารมาตรฐาน rutin เมื่อส่องภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 nm (ภาพ 19)

มองเห็นที่ความยาวคลื่น 254 nm **มองเห็นที่ความยาวคลื่น 365 nm**

ภาพ 19 โครมาโทรกราฟฟีจากสารสกัดเอทานอล50% ของพลูคาว เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน rutinหมายเหตุ*A = hexane, B = dichloromethane, C = ethatyl acetate, D = n-butanol, E =water และF = สารมาตรฐาน rutin

ตาราง 14 ค่า Rf ที่คำนวณได้จากสารผลิตภัณฑ์เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน

สารละลาย	สมุนไพร		
	พลูคาว	พญายอ	ทองพันชั่ง
สารมาตรฐาน rutin	0.56	0.84	0.90
- Hexane	-	-	-
-Dichloromethane	0.76	-	-
- Ethatylacetate		-	-
- n-Butanol	0.56*	-	-
- water	-	-	-
สารมาตรฐาน quercetin	0.92	0.8	0.7
- Hexane	-	-	-
-Dichloromethane	0.73	-	-
- Ethatylacetate	0.41	-	-
- n-Butanol	0.78	-	-
- water	0.76	-	-

หมายเหตุ - = ไม่มีปรากฏว่ามีแถบของสาร

* = ค่า Rfเท่ากับสารมาตรฐาน

วิจารณ์ผลการวิจัย

ในปัจจุบันโรค PRRS ยังคงเป็นโรคที่สร้างความเสียหายให้แก่อุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรทั่วโลกอย่างต่อเนื่อง เพราะโรคมีความรุนแรงและแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็ว สาเหตุของโรคเกิดจากเชื้อ PRRSVสามารถแพร่กระจายผ่านทางอากาศ สารคัดหลั่งและการสัมผัสกันโดยตรง ส่งผลให้สุกรมีปัญหาในระบบทางเดินหายใจและในระบบสืบพันธุ์ ก่อให้เกิดความสูญเสียทั้งในสุกรพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์

ในด้านของระบบทางเดินหายใจ มักพบการติดเชื้อแทรกซ้อนจากจุลชีพอื่นๆเช่น *Mycoplasma hyopnemoniae*, *Salmonellecholerasuis, Streptococcus suis*, Swine influenza virus และ Porcine respiratory coronavirus เป็นต้น (รุ่งโรจน์, 2548) เนื่องจากเซลล์เป้าหมายของ PRRSV คือเซลล์ macrophage บริเวณปอด ซึ่งประกอบด้วยเซลล์ macrophage ในถุงลม (pulmonalyalveolar macrophages; PAMs) และเซลล์ macrophage ในหลอดเลือดปอด (pulmonary intravascular macrophages; PIMs) ทำให้สุกรติดเชื้อที่ปอดและภาวะภูมิคุ้มกันต่ำ ง่ายต่อการติดเชื้อแทรกซ้อน (Thanawongnuwech et al., 2004) ปัญหาในระบบสืบพันธุ์ส่งผลให้สุกรพ่อพันธุ์มีคุณภาพน้ำเชื้อต่ำ เกิดความผิดปกติของตัวอสุจิ สุกรซึมและเบื่ออาหาร สุกรแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อ PRRSV ในช่วงการตั้งครรภ์ จะแท้งในทุกระยะของการตั้งครรภ์ แต่ความรุนแรงจะเพิ่มสูงขึ้นในระยะท้ายของการตั้งครรภ์ หรือคลอดก่อนกำหนด ลูกที่คลอดอ่อนแอ เกิดการตายก่อนการหย่านม มีอัตราการเกิดมัมมี่และการตายแรกคลอดสูง ถึงแม้จะมีระบบการจัดการฟาร์มที่ดีแต่ก็ยังไม่สามารถควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อPRRSVได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ปัจจุบันมีการใช้วัคซีนทั้งชนิดเชื้อเป็นและชนิดเชื้อตายในการป้องกันและควบคุมโรค แต่ก็ยังมีข้อจำกัดในแง่ของประสิทธิผลและความคุ้มค่าในการใช้งานวัคซีนจากปัจจัยที่เป็นข้อจำกัดดังกล่าวจึงเริ่มมีการประยุกต์ใช้สารต้านไวรัสจากพืชสมุนไพรที่เคยได้รับรายงานผลการวิจัยและพบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งไวรัส ซึ่งมีอยู่ในพืชสมุนไพรหลายชนิด (Jassim and Naji., 2003) เช่น สาร saponin ที่ได้จากชะเอมเทศ (Lalita, 1994) สาร coumarin มักพบในพืชที่ให้กลิ่นหอม และสารtannin ในใบฝรั่งเป็นสารพวก polyphenolic มีฤทธิ์ยับยั้งเอมไซม์ RNA polymerase ของ Influenza virusได้ อีกทั้งยังสามารถนำมาใช้รักษาโรคท้องร่วงในลูกสุกร (ยุทธนา, 2553)

จุดประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของพืชสมุนไพรไทย 3 ชนิด คือ พลูคาว พญายอ ทองพันชั่ง ต่อการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสก่อโรค PRRS ในเซลล์เพาะเลี้ยง MARC-145 เพื่อใช้ในการใช้ป้องกันและรักษาโรค เป็นทางเลือกใหม่ให้แก่เกษตรกร

ผู้เลี้ยงสุกรเนื่องจากสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด เคยได้รับรายงานฤทธิ์ยับยั้งไวรัสในคนและสัตว์ และยังมีรายงานการทดลองประยุกต์ใช้ในปศุสัตว์ที่พบว่าอาหารที่มีส่วนผสมของผงพลูคาวบดแห้ง ในอัตราส่วน 1kg/g ที่ใช้เลี้ยงสุกรเป็นเวลา 10 วัน ส่งผลให้สุกรมีอัตราการเจริญเติบโตดี การทำงานของระบบการย่อยอาหารดีขึ้นปริมาณซาก การเพิ่มน้ำหนักตัวต่อวัน (ADG) ปริมาณการกินอาหารต่อตัวต่อวัน (ADFI) ปริมาณเม็ดเลือดขาวและปริมาณพื้นที่ของเนื้อสันนอกของสุกร ของสุกรกลุ่มที่ใช้สมุนไพรดีกว่าสุกรกลุ่มควบคุม (Yan et al., 2011) นอกจากนี้การให้อาหารกุ้งที่มีส่วนผสมของใบพญายอ จะทำให้กุ้งมีอัตราการรอดชีวิตเพิ่มขึ้นร้อยละ 57.4 สำหรับทองพันชั่งถึงแม้จะยังไม่พบรายงานการประยุกต์ใช้ในเชิงอาหาร ก็พบว่ามีสารพฤษเคมีที่สามารถยับยั้ง cytomegalovirus สาเหตุเหตุของโรคตุ่มคนและหมู (Sendl et al., 2004)

จากผลการวิจัยพบว่าสารสกัดเอทานอล 50% ของพลูคาว พญายอและทองพันชั่งสามารถยับยั้งไวรัสในระยะก่อน และหลังไวรัสติดเข้าสู่เซลล์ MARC-145 ได้ดีกว่าสารสกัดน้ำ สารสกัดเอทานอล 70% และ 95% ซึ่งเกิดจากอำนาจในการละลายสารของสารสกัดเอทานอล 50% เนื่องจากเป็นส่วนผสมของน้ำซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วและเอทานอลเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วละลายอยู่ในอัตราส่วนที่เท่าๆ กัน ทำให้สามารถละลายเอาสารที่มีขั้วและไม่มีขั้วได้ (นันทวัน, 2536) ซึ่งสารสกัดเอทานอล 50% ของพญายอสามารถลดปริมาณไตเตอร์ของ PRRSV หลังไวรัสติดเข้าสู่เซลล์ MARC-145 ได้สูงที่สุด รองลงมา คือสารสกัดเอทานอล 50% ของพลูคาว และสารสกัดเอทานอล 50% ของทองพันชั่ง

แสดงให้เห็นว่า สารสกัดพลูคาว พญายอและทองพันชั่งสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ PRRSV ในเซลล์ MARC-145 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ถึงอย่างไรก็ตามปัจจัยที่มีผลต่อการประสิทธิภาพในการยับยั้ง ก็ต้องคำนึงถึงความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เนื่องจากไวรัสต้องอาศัยเซลล์เจ้าบ้านในการเพิ่มจำนวน และจากผลการวิจัยในครั้งจะเป็นแนวทางในการนำสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด มาประยุกต์ใช้ในปศุสัตว์ในแง่ของการนำมาใช้เพื่อรักษาโรคได้

นอกจากนี้การทดสอบหาสารพฤกษเคมีเบื้องต้นพบว่ามีสาร rutin ที่มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้งไวรัส (Savov et al., 2006) เป็นองค์ประกอบอยู่ในสารสกัดเอทานอล 50% ของพลูคาว ถึงแม้ว่ายังไม่สามารถอธิบายถึงกลไกการออกฤทธิ์ที่แน่ชัดได้ แต่ข้อมูลพื้นฐานที่ค้นพบจะสามารถนำไปใช้ในการศึกษาหาสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

จากการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้ง PRRSV ของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรพลูคาว พญายอและทองพันชั่งความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ MARC-145 cell พบว่า สารสกัดเอทานอล 50% ของพลูคาว พญายอ และทองพันชั่ง เท่ากับ 1.56, 12.5 และ 0.02 mg/ml ตามลำดับและการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งในระยะก่อนและหลังไวรัสติดเข้าสู่เซลล์ พบว่าสารสกัดเอทานอล 50% ของพญายอสามารถยับยั้งได้ทั้งในระยะก่อนติดเข้าสู่หลังไวรัสติดเข้าสู่เซลล์ โดยสามารถลดปริมาณไตเตอร์ได้เท่ากับ $10^{2.41}$TCID$_{50}$/mlและ $10^{0.75}$ TCID$_{50}$/ml ตามลำดับ ขณะที่สารสกัดเอทานอล 50% ของพลูคาวสามารถลดปริมาณไตเตอร์ไวรัสได้ดีที่สุดในระยะหลังไวรัสติดเข้าสู่เซลล์เท่ากับ $10^{2.33}$ TCID$_{50}$/ml และสารสกัดเอทานอล 50% ของทองพันชั่ง สามารถลดปริมาณไตเตอร์ของไวรัสได้เท่ากับ $10^{2.41}$ TCID$_{50}$/ml ในระยะ ก่อนติดเข้าสู่เซลล์และ $10^{2.5}$TCID$_{50}$/ml ในระยะหลังติดเข้าสู่เซลล์และจากการวิเคราะห์หาปริมาณไวรัสโดยวิธี plaque forming assay ทำให้ทราบได้ว่า สารสกัดเอทานอล 50% ของพญายอ มีประสิทธิภาพยับยั้งหลังไวรัสติดเข้าสู่เซลล์ได้ถึง 100% นอกจากนี้การวิเคราะห์หาสารพฤกษเคมีเบื้องต้นในสารสกัดสมุนไพร ด้วยวิธี Thin layer chromatography ยังพบว่า สารสกัดเอทานอล 50% ของพลูคาว มีสารรูตินเป็นองค์ประกอบสำคัญ

ผลการวิจัยในครั้งนี้ทำให้ทราบได้ว่าสารสกัดเอทานอล 50% ของพลูคาว พญายอ และทองพันชั่ง มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสก่อโรค PRRS ในเซลล์ MARC-145 อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้เป็นเพียงการศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ PRRSV และการศึกษาหาสารออกฤทธิ์ในเบื้องต้นเพื่อนำไปสู่การหาสารบริสุทธิ์ ร่วมกับการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในระยะต่างๆ ของการติดเชื้อ และการออกฤทธิ์ทางเภสัชจลนศาสตร์เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาเป็นสารต้านไวรัส และเพื่อการประยุกต์ใช้ในปศุสัตว์ต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1. จากการทดลองจะสังเกตได้ว่าระดับความเข้มข้นสูงสุดที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดนั้น แตกต่างกัน เนื่องจากความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ทดสอบซึ่งต้องคำนึงความเป็นพิษต่อเซลล์เพราะไวรัสต้องอาศัยเซลล์เจ้าบ้านในการดำรงชีพ ด้วยสาเหตุนี้จึงทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งได้อย่างจำกัดโดยที่สารสกัดพญายอใช้ความเข้มข้นสูงที่สุดและสารสกัดทองพันชั่งมีความเข้มข้นต่ำที่สุด อาจเป็นไปได้ว่าฤทธิ์ในการยับยั้งไวรัสจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัด

2. ผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งทั้งในระยะก่อนติดเข้าสู่เซลล์และการเพิ่มจำนวนของไวรัสหลังเข้าสู่เซลล์ พบว่า สารสกัดทั้ง 3 ชนิด มีประสิทธิภาพในการยับยั้งPRRSV ได้ แต่ไม่สามารถอธิบายถึงกลไกการออกฤทธิ์ได้ ดังนั้น จึงควรที่จะทำการทดสอบโดยการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม เพื่ออธิบายถึงกลไกการออกฤทธิ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่น การวิเคราะห์หาโครงสร้างโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของไวรัสด้วยวิธี RT-PCR

3. ผลจากแยกสารสกัดหยาบแล้ว นำมาสกัดแยกต่อโดยใช้ TLCควรมีการนำสารสกัดที่ได้จาก TLC มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไวรัส อีกครั้งหนึ่ง เพื่อหาค่า Rf ว่าสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อไวรัสนั้นเป็นสารตัวเดียวกันกับที่ได้จาก TLC โดยตรงหรือไม่ เพื่อจะเป็นประโยชน์ในการวิเคราะห์หาสารบริสุทธิ์ และนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

บรรณานุกรม

ชื่นฤดี ไชยวสุ ทวีผล เดชาติวงศ์ ณ อยุธยา เครือวัลย์ พลจันทร ปราณี ชวลิตธำรง และสุทธิโชคจง ตระกูลศิริ. 2535. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบเสลดพังพอนและใบพญายอต่อเชื้อ herpes simplex virus type-2 ในหลอดทดลอง. **ว.กรมวิทยพ.** 34(4): 153-158.

ทองพันชั่ง. 2009. **ทองพันชั่ง สมุนไพรแก้มะเร็ง.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มาhttp://www.oknation.net/blog/nonglek/2009/11/17/entry-1 (17 พฤศจิกายน 2009).

นันทวันบุณยะประภัศร. 2536. **การชีวสังเคราะห์เบื้องต้นของสารสำคัญในพืช.** กรุงเทพฯ: ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 101น.

พญายอ. 2012. **สถานีอนามัย สถานีของคนรักสุขภาพ.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http:// xn-n3cga6af7 bxa8aed4a.blogspot.com/2012/06/blog-post_3458.html(12 มิถุนายน 2012).

พลูคาว. 2007. **ลำปางรักษ์สมุนไพร.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มาhttp:// www.herblpg.com /thai /node/62 (23 พฤศจิกายน 2007).

รัตนา อินทรานุปกรณ์. 2547. **การตรวจสอบและการสกัด แยกสารสำคัญจากพืชสมุนไพร.** กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 215 น.

รุ่งโรจน์ ธนาวงศ์นุเวช. 2548. **พยาธิวินิจฉัยโรคพีอาร์อาร์เอส.** กรุงเทพฯ:ห้างหุ้นส่วนสามัญนิติบุคคล ปอยท์กราฟิค. 189 น.

ยุทธนา ศิริวัธนนุกูล สุธา วัฒนสิทธิ์ และ อรุณพร อิฐรัตน์. 2553. ผลของฟ้าทะลายโจรไทยหรือจีนและใบฝรั่งไทยหรือจีนต่อการรักษาโรคท้องร่วงจากเชื้ออี.โคไลในลูกสุกรระยะดูดนม. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยมหาสารคาม.** 29(4): 389-403.

Akanitapichat, P., M. Kurokawa, S.Tewtrakul and M. Hattori. 2002. Inhibitory activities of Thai medicinal plants against herpes simplex type 1, poliovirus type 1, and measles virus.**J.Trad.Med.**19: 174-180.

Barfoed, A. M., M. Blixenkrone-Moller, M. H. Jensen,A. Botner and S. Kamstrup. 2004. DNA vaccination of pigs with open reading frame 1-7 of PRRS virus. **Vaccine.** 22(27-28): 3628-3641.

Breedam, W.V., P.L. Delpuutte, H.V. Gorp, G. Misinzo, N. Vanderheijden, X. Duan and H.J. Nauwynck. 2010. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus entry into the porcine macrophage.**J. Gen. Virol.** 91: 1659-1667.

Bhat, S.V., B.A. NagasampagiandM. Sivakumar.2005. **Chemisstry of natural products**.New Delhi: Narosa Publishing House. 840 p.

Cheon, D. SandC.Chae. 2004. Comparison of the pathogenicity of two strains (wild type and vaccine-like) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in experimentally infected sows. **J.Comp.Pathol.** 130(2-3):105-11.

Chiang, L.C., J.S. Chang, C.C. Chen, L.T. Ng and C.C. Lin.2003. Anti-Herpes simplex virus activity of *Bidenspilosa* and *Houttuyniacordata*. **Am. J. Chin.Med.** 31(3): 355-362.

Cho, H.J., S.C. Entz, R. MagerandH.S. Joo. 1997. Performance of ELISA antigents prepared from 8 isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus with homologous and heterologous antisera. **Can. J. Vet.** 61: 299-304.

Choi, H.J., J.H. Kim, C.H. Lee, Y.J.Ahn, J.H. Song, S.H.Baek and D.H.K. won. 2009a. Antiviral activity of quercetin 7-rhamnoside against porcine epidemic diarrhea virus. **Antiviral Res.** 81(1): 77-81.

Choi, H.J., J.H. Song, K.S. Park andD.H. Kwon. 2009b. Inhibitory effects of quercetin 3-rhamnoside on influenza A virus replication. **European J. of Pharm.Sciences.** 37(3-4): 329-333.

Chou, S.C.,C.R. Su,Y.C. Kuand T.S. Wu.2009. The Constituents and Their Bioactivities of *Houttuyniacordata*.**Chem. Pharm. Bull.** 57(11): 1227-1230.

Dee, S.A. 2008. Etiology and clinical manifestation. [Online]. Available http:// www.pig333. prrs/etiology-and-clinical-manifestation_77/. (12November 2008).

Dee, S., J.Deen, K. Rossow, C. Wiese, S. Otake, H.S. Joo and C. Pijoan.2002. Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus throughout sequence of events during cold weather.**Can. J.Vet.Res.** 66(4):232-9.

Drew, T.W., J.J. Meulenbreg, J.J. Sands and D.J. Paton. 1995. Production characterization and reactivity of monoclonal antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **J. Gen. Virol.**76(6): 1361-1369.

Elizabeth, M., W. David, T.Okpako and F.J. Evas. 1996. **Selection, Preparation and Pharmacological Evaluation of Plant Material.** England: Johnwilley& So Ltd. 228p.

Fang, Y and E. J. Snijder. 2010. The PRRSV replicase: Exploring the multifunctionality of an intriguing set of nonstructural proteins. **Virus Res.** 154(1-2): 61-76.

Feng, Y., T. Zhao, T. Nguyen, K. Inui, Y. Ma, T.H. Nguyen, V.C. Nguyen, D. Liu, Q.A. Bui, L.T. To, C. Wang, K.Tian and G.F. Gao. 2008. Porcine respiratory and reproductive syndrome virus variants, Vietnam and China. **Emerging Infectious Disease J.** 14-11.

Genomes PRRSV. 2011. [online]. Available http://www.porcilis-prrs.com/microbiology-prrsv-structure.asp.(22 November 2011).

Halbur, P., C. Thanawongnuwech, R. Brown, G. Kinyon, J. Roth, J.E. Thacker and B. Thacker.2000. Efficacy of antimicrobial treatment and vaccination regimens for control of porcine reproductive and repiratory syndrome virus and Streptococcus suiscoiofection of nursery pig. **J. Chin. Microbiol.** 38(3): 1156-1160.

Halbur, P.G., P.S. Paul, X.J. Meng, M.A. Lum, J.J. Andrews and J.A. Rathje. 1996. Comparative phthogcnicity of nine US Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus (PRRSV) isolate in a five-week-old cesarean-derived, colostrums-deprivcd pig moled. **J. Vet. Diagn. Invest.** 8(1):11-20.

Hayashi, K., M. Kamiya. and T. Hayashi. 1995. Virucidal effects of the steam distillate from *Houttuyniacordata* and its components on HV-1, influenza virus, and HIV. **Planta Med.** 61: 237–241.

Horter, D.C., R.M. Pogranichiny, C.C. Chang, R.B. Evans, K.J. Yoon and J.J. Zimmerman. 2002. Characterization of the carrier state in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection.**Vet.Microbiol.** 86(3): 213-228.

Janwitayanuchit, W., K. Suwanborirux, C. Patarapanich, S. Pummangura, V. Lipipunand T.Vilaivan.2003. Synthesis and anti-herpes simplex viral activity of monoglycosyldiglycerides. **Phytochemistry.** 64(7): 1253-1264.

Jassim, S.A.A. and M.A. Naji. 2003. Novel antiviral agents: a medieinal plant perspective. **J. of Applied Microbiology**. 95(3): 412-427.

Jayavasu, C. 1998.**Clinocal trial in the treatment of genital herpes patients with*Clinacanthusnutans* extract.** in the 9th Ministy of Publie Health Symposium (57). Bangkok: E.T.O. Press.

John, C and S. Venetia. 2007. **Virology: principles and application**. England: John Wiley & Sons Ltd. 358 p.

Kernan, M.R., A. Sendl,J.L. Chen,S.D. Jolad, P. Blanc,J.T. Murphy, C.A. Stoddart, W. Nanakorn, M.J. Balickand E.J. Rozhon. 1997. Two new lignans with activity against influenza virus from the medicinal plant *Rhinacanthusnasutus*. **J. of Natural Products.** 60: 635–637.

Kim, W-II., J J. Kim, S H. Cha and K J. Yoon. 2008. Different biological characteristics between wild-type PRRS viruses and vaccine viruses and identification of the corresponding genetic determinants. **J. Clin. Microbial.**10: 1128.

Labarque, G., K.V.Reeth, S.V.Gucht, H. Nauwynck and M. Penseart. 2002. Porcine reproductive respiratory syndrome virus infection predisposes pig for respiratory signs upon exposure to bacterial lipopolysaccharide. **Vet. Microbiol.** 88(1): 1-12.

Lalita, B. 1994. In vitro studies on the effect of glycyrrhizin from Indian *glycyrrhlzaglabra*linn on some rna and dna virus. **Indian J. of Pharm.** 26: 194-199.

Lau, K.M., K.M. Lee, C.M. Koon, C.S.F. Cheung, C.P. Lau, H.M. Ho, M.Y.H. Lee, S.W.N. Au, C.H.K. Cheng, C.B.S. Lau, S.K.W. Tsui, D.C.C. Wan, M.M.Y. Waye, K.B. Wong, C.K. Wong, C.W.K. Lam, P.C. Leung andK.P. Fung. 2008. Immunomodulatory and anti-SARS activities of *Houttuyniacordata*. **J. of Ethnopharm.** 118(1): 79-85.

Le, P., P. Blanquefort, E. Morvan and E. Albina.1997. Result of a control programmer for the porcine reproductive and respiratory syndrome in the Frcnch "Pays de lo loire". **Vet. Microblol.** 68:65-80.

Lin, T.Y., Y.C. Liu, J.R. Jheng, H.P. Tsai, J.T. Jan, W.R. Wong andJ.T. Horng. 2009. Anti-enterovirus 71 activity screening of Chinese herbs with anti-infection and inflammationactivities. **Am. J.Chin.Med.** 37(1): 143-158.

Mengeling, W.L.,A.C. Vorwald, K.M. Lager and S.L. Brockmeier.1996. Comparison among strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus for their ability to cause reproductive failure.**Am. J.Vet.Res.** 57(6):834-9.

Maria, J.B.F.,L. Caroline,R.M. Helena, G. Edlayne and C.S. Isabela. 2005. Cytotoxicity of subfractions and compounds from *Polymniasonchifolia*.**Brazilian J. of Microbiol.** 36: 338-341.

Matanin, B.M., Y. Huang, X.J.Meng and C. Zhang. 2008. Purification of the major envelop protein GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) from native virions.**J. of Virol.Methods.** 147(1): 127-135.

Meier, W.A.,J. Galeota, F.A. Osorio, R.J.Husmann,W.M. Schnitzleinand F.A.Zuckermann. 2003. Gradual development of the interferon-gamma response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection or vaccination. **Virol.** 309(1):18-31.

Meng, X.J., P.S. Pual, P.G. Halbur and M.A. Lum. 1995. Phylogenetic analyses of the putative M (ORF 6) and N (ORF 7) genes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): implication for the existence of two genotype of PRRSV in the U.S.A. and Europe. **Arch.Virol.** 140(4): 745-755.

Nelsen, C.J., P.M Michael, S. Faberg and Kay. 1999. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison divergent evolution on two continents. **J. of Virol.** 73(1): 270-280.

Nelson, E.A., J. Christopher-Hennings and D.A. Benfield.1994. Serum immune responses to the proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. **J.Vet.Diagn. Invest.** 6:410-415.

Nielsen, T.L.,J. Nielsen,P. Have,P. Baekbo, R.Hoff-Jorgensen, A. Botner. 1997. Examination of virus shedding in semen from vaccinated and from previously infected boars after experimental challenge with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **J. Vet. Microbiol.** 54(2): 101-12.

Pirtle, E.C. and G.W. Beran. 1996. Stability of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the presence of fomites commonly found on farms. **J.Am. Vet. Met.** 208(3): 390-2.

Pittaya, T., P.O. Yupa, P. Photchanaand T. Walter Charles.2004. Cerebrosides and a Monoacy–monogalactosylglycerol from *Clinacanthusnutans*. **Chem. Pharm.Bull.** 52(1):27-32.

Patton, J. B., R. R. Rowland, D. Yoo and K.O. Chang. 2009. Modulation of CD163 receptor expression and replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in porcine macrophages. **Virus Res.**140(12): 161-171.

Rossow, K.D. 1998. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome.**Vet. Pathol.** 35, 1-20.

Santi S., A. Shuyprom, C. Pientong, T. EkalaksananandS. Thongchai. 2009. Bioactive constituentsfrom the leaves of *Clinacanthusnutans*Lindau. **Bioorganic & Medicinal Chemistry.** 17(5): 1857-1860.

Satayavivad, J., N. Bunyapraphatsara, S. KitisiripornkulandW. Tanasomwang. 1996. analgericand anti-inflamatory activities of extracts of*Clinacanthusnutans* (Burm. f.) Lindau.**Thai J.Phytopharm.** 3(1): 7-17.

Sattar, A.M., A.N. Abdullah., H.A. Khan and M.A. Noor. 2004. Evaluation of anti-bacterial activity of a local plant*Rhinacanthusnasutus* (L.). **J. of Biological Sci.** 4(4): 498-500.

Savov, V.M., A.S. Galabov, L.P. Tantcheva, M.M. Mileva, E.L. Pavlova, E.S. Stoeva and A.A. Braykova. 2006. Effects of rutin and quercetin on monooxygenase activitics in experimental influenza virus infection. **Experimental and Toxicologic Pathology.** 58(1): 59-64.

Sendl, A., L.J. Chen, D.S. Jolad and M. Kernan. 1996. Two new napthoquinones with antiviral activity from *Rhinacanthusnasutus*. **J. Natural Product.** 59(11-808).

Somchai, S. 1995. Treatment of Herpes Zoster with *Clinacanthusnutans*(Bi Phapa Yaw)Extract. **Retrieved from Ministry of Public Health**, Nationburi 11000 Thailand.

Teshima, K.I., T. Kaneko,K. Ohtani,R. Kasai, S. Lhieochaiphant, C. Picheansoonthon and K. Yamasaki.1998. Sulfur-containing glucosides from *Clinacanthusnutans*. **Phyto-chemistry.** 48(5): 831-835.

Thanawongnuwech, R., A. Amonsina, A.Tatsanakit. andS.Damrongwatanapokin. 2004. Genetics and geographical variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Thailand. **Vet. Microbiol.** 101(2004): 9–21.

Thawaranantha, D., K. Balachandra, S. Jongtrakulsiri, P.Chavalittumrong, J. Bhumiswasdi and C.Jayavasu. 1992. In vitro antiviral activity of *Clinacanthusnutans* on varicella-zoster virus.**Siriraj.Hosp. Gaz.**44(4): 285-291.

Welch, S.K.W and J. G. Calvert. 2010. A brief review of CD163 and its role in PRRSV infection.**Virus Res.**154 (1-2): 98-103.

Wu, T.S., C.C. Yang, P.L. Wu and L.K. Liu. 1995. A quinol and steroids from the leaves and stems of *Rhinacanthusnasutus*. **Phytochemistry.** 40(4): 1247-1249.

Wu, T.S., H.C. Hsu, P.L. W.u, C.H. Teng and Y.C. Wu. 1998. Rhinacanthin-Q, a naphthoquinonefrom*Rhinacanthusnasutus*and its biological activity. **Phytochemistry.** 49(7):2001.

Xu, X., H. Ye, W. Wang, L. Yu and G. Chen. 2006. Determination of flavonoids in *Houttuyniacordata*Thunb. andSaururuschinensis (Lour.) Bail.by capillary electrophoresis with electrochemical detection.**Talanta.** 68(3): 759-764.

Xiao, X.L., H. Wu, Y.G. Yu, B.Z. Cheng, X.Q. Yang, G. Chen, D.M. Liu and X.F. Li. 2008. Rapid detection of a highly virulent Chinese-type isolate of Porcine Rcproductive and Respiratory Syndrome virus by real-time reverse transcriptase PCR. **J. of Virol.Methods.** 149(1): 49-55.

Yan, L., Q.W. Meng and I. H. Kim. 2011. The effects of dietary *Houttuyniacordata* and*Taraxacumofficinale* extract powder on growth performance, nutrient digestibility, blood characteristics and meat quality in finishing pigs. **Livestock Science.** 141(2): 188-193.

Yoon, K. J., J.J. Zimmerman, M.J. McGinley, J. Landgraf,M.L. Frey, H.T. Hill and K.B. Platt. 1995. Failure to consider the antigenic diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus isolate may lead to misdiagnosis. **J.Vet.Diagn.Invest.** 7: 386-387.

Yoon, K.J., J.J. Zimmerman, C.C. Chang, S. Cancel-Tirado, K.M. Harmon and M.J. McGinley.1999. Effect of challenge dose and route on porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in young swine. **Vet. Res.** 30(6): 629-638.

Yoosook, C., Y. Panpisutchai, S. Chaichana, T. SantisukandV.Reutrakul. 1999. Evaluation of anti-HSV-2 activities of *Barlerialupulina* and *Clinacanthusnutans*. **J. of Ethnopharma.** 67(2): 179-187.

ภาคผนวกก

อาหารและสารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์

อาหารและสารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์สูตร Minimum Essential Medium(MEM $^{++}$)

- dH2O (ที่อุณหภูมิห้อง)	938	ml
- MEM	1	page
- NaHCO3	2.2	g
- FBS	50	ml
- Antibiotic-Antimycotic	10	ml

ปรับ pH ให้ได้ pH 7.2 ด้วย either 1 N NaOHหรือ 1 N HCl

เตรียมด้วยวิธีไร้เชื้อ โดยผสมส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกันกรองลงขวดปลอดเชื้อผ่านตัวกรองขนาด 0.2 µm

2. Growth medium (ในขวดปริมาตร 100 ml)

- MEM	89	ml
- FBS	10	ml
- Antibiotic-Antimicrotic	1	ml

ปรับ pH ให้ได้ pH 7.2 ด้วย either 1 N NaOHหรือ 1 N HCl

เตรียมด้วยวิธีไร้เชื้อ โดยผสมส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน กรองลงขวดปลอดเชื้อผ่านตัวกรองขนาด 0.2 µm

3. การเตรียมอาหารสำหรับเก็บเซลล์

- MEM^{++}	50	ml
- FBS	40	ml
- DMSO	10	ml

เตรียมด้วยวิธีไร้เชื้อ โดยผสมส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน กรองลงขวดปลอดเชื้อผ่านตัวกรองขนาด 0.2 µm

วิธีการเตรียม

3.1 เทอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจาก flask เดิมทิ้ง จากนั้นล้างเซลล์ด้วย calcium และ magnesium-free PBS ปริมาตร 2 ml

3.2 เทสารละลายทิ้ง เติม FBS ปริมาตร 40 ml และ trypsin-EDTA ปริมาตร 100 µl ตั้งพักไว้ จากนั้นเคาะ flask ให้เซลล์หลุดร่อน

3.2 เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM^{++}ปริมาตร 5 ml นำสารละลายใส่ในหลอด centrifuge ขนาด 15 ml จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 100 xg เป็นเวลา 15 นาที

3.3 เทเอาส่วนใส่ทิ้ง และ ผสมส่วนเซลล์ที่ตกตะกอนด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ให้เข้ากันโดยการปิเปตสาร ขึ้น-ลง

3.4 แบ่งใส่หลอด vials ขนาด 1.8 ml เก็บที่อุณหภูมิ – 80 องศาเซลเซียส

4. สารละลาย Phosphate buffer saline (PBS)ประกอบด้วย

-Sodium chloride (NaCl)	8	g
- Potassium chloride(KCl)	0.2	g
- Sodium phosphate ($NaHPO_4$)	1.25	g
- Potassium Dihydrogen Phosphate (KH_2PO_4)	0.2	g

นำแต่ละส่วนค่อยๆละลายในน้ำบริสุทธิ์ 975 มิลลิลิตร จากนั้นทำการปรับค่าpH ให้ได้ 7.4 แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอ อุณหภูมิ121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา20 นาที และเก็บสารละลาย PBS ที่อุณหภูมิ4 องศาเซลเซียส

5. การเตรียมทริปซิน (Trypsin0.25%)

	(w/w)	
-Trypsin	0.25	g
-ละลายในสารละลาย PBS	100	ml

ปรับค่าpH ให้ได้ 7.4 -7.6

กรองลงขวดปลอดเชื้อผ่านตัวกรองขนาด 0.2 μm แบ่งตัวอย่างปริมาตร 0.5 ml ใส่ลงในหลอดบรรจุ tryptose phosphate soy broth 3 ml และ thioglycolate broth 3 ml เพื่อตรวจสอบความปลอดเชื้อ โดยบ่มที่ 37องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

-แบ่งทริปซินใส่หลอดฝาเกลียวที่ปลอดเชื้อ หลอดละ 2 ml แช่ในตู้ -80 องศาเซลเซียส

6. การเตรียม crystal violet (0.5%) (w/v)

- เตรียมสารละลาย citric acid 0.1 M	95	ml
- ชั่ง crystal violet	0.5	g
- ละลายในสารละลาย citric acid 0.1 M	95	ml
- เก็บในขวดสีน้ำตาล โดยแบ่งเก็บขวดละ	25	ml

7. การเตรียม 0.25% Coomassie brilliant blue R250

- Coomassie Brilliant Blue R250	0.25	g
- Absolute acetic acid	10	ml
- 50% methanol	90	ml

8. การเตรียม 50% เอทานอล (ปริมาตร 1 L)

- 95% เอทานอล	526	ml
- น้ำกลั่น	474	ml

9.การเตรียม 70% เอทานอล

- 95% เอทานอล	736	ml
- น้ำกลั่น	264	ml

10. การเตรียม 0.6% agarose gel

- dH_2O	50	ml
- ผง agarose	0.3	g

ปรับค่า pH ให้ได้ 7.4 จากนั้นฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเมื่อต้องการใช้การ ให้อุ่นในไมโครเวฟจนเดือด ควบคุมอุณหภูมิ ที่ 37 องศาเซลเซียส

11. สารละลาย Sorenson's buffer

- Sodium citrate	5.88	g
- Ethanol	100	ml
- dH_2O	100	ml

- ปรับค่า pH ให้ได้ 4.2

12. สารละลาย 1 NNaOH (100ml)

- Sodium hydroxide	4	g
- dH_2O	100	ml

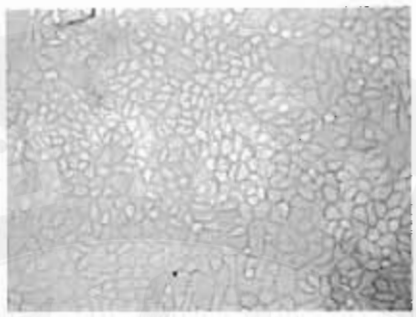
13. สารละลาย 1 HClจาก37% HCl (100 ml)

- HCl	9.86	g
- dH_2O	90.14	ml

ภาคผนวก ข

เซลล์เพาะเลี้ยงและการนับจำนวนเซลล์

เซลล์เพาะเลี้ยง MARC 145



ภาพผนวก 1 monkey kidney cell line

เซลล์ MARC-145 เป็นเซลล์ที่ได้จาก monkey kidney cell line สำหรับใช้ในการเพาะเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส เนื่องจากไวรัสต้องอาศัยอยู่ในเซลล์สิ่งมีชีวิตและเพื่อเพิ่มจำนวนไวรัส จัดอยู่กลุ่ม Continuous cell line คือ เซลล์ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมผิดไปจากเซลล์ปกติมีจำนวนโครโมโซมมาเท่ากัน (aneuploid) ซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์โดยธรรมชาติของเซลล์เองหรือเกิดการใช้สารเคมีหรือรังสีกระตุ้น หรือเกิดจากการเอาเซลล์มะเร็งบางชนิดมาเพาะเลี้ยง เช่น HeLa cell

ข้อดี

- สามารถแบ่งตัวได้อย่างไม่มีที่สิ้นสุด (infinite number of replication) ทำให้เพาะเลี้ยงง่าย

ข้อเสีย

- Continuous cell line แต่ละชนิดจะสามารถใช้เพาะเลี้ยงไวรัสได้บางชนิดเท่านั้น ไม่สามารถเพาะเลี้ยงไวรัสได้ทุกชนิด ดังนั้นจึงไม่เหมาะสมสำหรับการแยกไวรัสชนิดใหม่ แต่เหมาะสำหรับการศึกษาการแบ่งตัวของไวรัสที่จำเพาะต่อ cell line ชนิดนั้นๆ

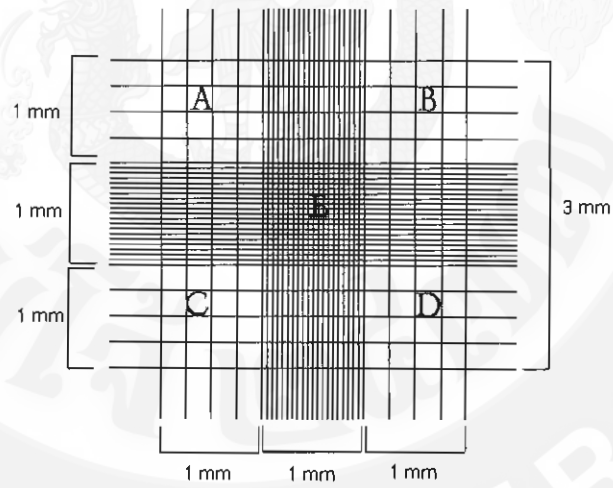
- มีความผิดปกติทางโครโมโซม จึงไม่มีความเหมาะสมต่อการผลิตวัคซีน

การนับจำนวนเซลล์และสูตรคำนวณ

1. นำเซลล์มา 20 µl ผสมกับ 0.2% trypan blue ใน PBS 20 µl ผสมกันในหลอด microcentrifugetubeจากนั้นใช้ micropipette ดูดส่วนผสมที่ได้ออกมาประมาณ 10 µl

2. เติมลงในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจกบางกับ hemocytometer

3. นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ นับเซลล์ภายในช่อง A (ภาพผนวก 2) ซึ่งจำนวนเซลล์ที่นับได้จะเป็นจำนวนที่ได้จะเป็นจำนวนเซลล์ที่มีอยู่ในปริมาตร 0.1 ml (แต่ละช่วงมีพื้น 1x1 mm^2 และมีค่าความลึก 0.1 mm) นับทั้ง 4 ช่องนำจำนวนที่นับได้ไปคำนวณหาจำนวนเซลล์ทั้งหมด (total cell) ในปริมาตร 1 mm^3 และหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ (% viability) โดยใช้สูตรคำนวณเซลล์ทั้งหมด (total cell count) ในปริมาตร 1 mm^3หาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ (% viability) โดยใช้สูตร



ภาพผนวก 2 ตารางนับเซลล์ใน hemocytometer

สูตรการหาจำนวนเซลล์ทั้งหมด (total cell count)

$$T = (X \times d) \times 10^4 / n$$

T = total cell count (cell/ml)

X = จำนวนเซลล์ทั้งหมดที่นับได้ใน 4 ช่อง A, B, C, D (เซลล์ที่มีชีวิต และเซลล์ที่ไม่มีชีวิต)

d = ปริมาณสีกับเซลล์

n = จำนวนซ้ำที่นับ (4 ช่อง A)

สูตรการหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ (% viability)

$$\% v = 100X / X + Y$$

% = % การรอดชีวิตของเซลล์

X = ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (ไม่ติดสี)

Y = ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่ตายแล้ว (ติดสี)

การคำนวณหาค่าความเข้มข้นของไวรัสโดยวิธี Reed and Muench

$TCID_{50}$/ml เป็นค่า 50% ของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส ซึ่งก็คือความเจือจางของไวรัสที่ให้ค่าความเข้มข้นของไวรัส จากวิธีการสังเกตการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเซลล์หรือ ซีพีอี (Cytopathic effect, CPE) เมื่อบ่มเลี้ยงเซลล์ก่อนและหลัง ไวรัสติดเข้าสู่เซลล์

สูตรคำนวณความเข้มข้นของไวรัสโดยวิธี Reed and Muench (John and Venetia., 2007)

การคำนวณหาค่า $TCID_{50}$/ml ซึ่งอยู่ระหว่างค่า 2 ค่า ทำได้โดยการหาค่า Proportionate distance (PD) โดยกำหนดให้

$$PD = (A-50) / (A-B)$$

A = % สะสม ค่าแรกที่มากกว่า 50%

B = % สะสมค่าแรกที่น้อยกว่า 50%

C = ความเจือจางของไวรัสที่ให้ค่า A

D = ลำดับการเจือจางไวรัส (Ditution factor)

เมื่อได้ค่า PD แล้วนำมาคำนวณต่อตามสูตร Log of 50% end point

$$\text{Log 50\% end point} = (\log C) - (PD \times \text{Log } D)$$

สูตรคำนวณหาปริมาณไวรัส (Virus Titer)

$$(\text{Plaques}) / (D \times V) = \text{PFU / ml}$$

Plaques = ค่าเฉลี่ยของจุดที่พบเห็นด้วยตา

D = dilution factor

V = volume of dilution virus added to the well

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ	โสภิตา ช่วยชู	
วัน เดือน ปีเกิด	13 ตุลาคม 2529	
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2548	สำเร็จการศึกษา ชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย จากโรงเรียนพิมานพิทยาสรรค์ จังหวัดสตูล
	พ.ศ. 2552	สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่
ประสบการณ์	-เสนอผลงานวิชาการในการประชุมวิชาการและนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ “แม่โจ้-แพร่ ครั้งที่ 2” ปี พ.ศ. 2554 - เสนอผลงานในการประชุมวิชาการ ประจำปี พ.ศ. 2554 มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่	