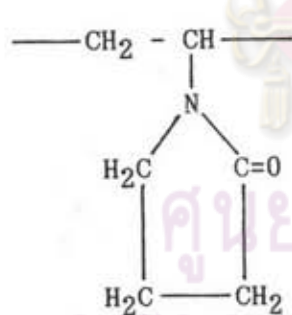


บทที่ 5

วิเคราะห์และอภิปรายผลการวิจัย

ผลการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิ และเวลาที่มีผลต่อไตเตอร์ของ HSV-1 และ HSV-2 ในตารางที่ 5-6 และภาพที่ 14-15 ได้แสดงถึงอิทธิพลของอุณหภูมิและเวลาที่มีผลต่อไตเตอร์ของไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพลกซ์ทั้ง 2 ทัยป์ เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้น ค่าไตเตอร์ของไวรัสจะลดลงซึ่งผลการวิจัยนี้สอดคล้องกับรายงานของ Thorne และ Clarke (1983) ที่ได้ทำการทดสอบการยับยั้งฤทธิ์ของ HSV ด้วย trypan blue Thorne ได้ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิที่มีต่อไตเตอร์ของไวรัส โดยหาค่าไตเตอร์เมื่อบ่มไวรัสไว้ที่อุณหภูมิ 4° ซ. 20° ซ. และ 37° ซ. เป็นเวลา 60 นาที พบว่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้น ค่าไตเตอร์ของไวรัสจะลดลง เนื่องจากไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพลกซ์เป็นไวรัสชนิดที่ไม่คงตัวต่อความร้อนและอุณหภูมิสูง ๆ (heat-labile virus) (Meguenni และคณะ, 1989) ที่อุณหภูมิสูง แคปซิดจะถูกทำลายและโปรตีนจำพวกเอนไซม์จะเปลี่ยนแปลงสภาพ ทำให้ไวรัสสูญเสียความสามารถในการติดเชื้อไปด้วย (Davis และคณะ, 1990) ไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพลกซ์ไม่คงตัวที่อุณหภูมิห้อง แต่ที่อุณหภูมิ 4° ซ. ไวรัสจะมีชีวิตอยู่ได้นานเป็นวัน แต่ถ้าต้องการเก็บไวรัสไว้ศึกษาควรเก็บที่อุณหภูมิ -70° ซ. ในตู้แช่แข็งพิเศษ หรือที่อุณหภูมิ -195° ซ. ในไนโตรเจนเหลว ไวรัสจะมีความทนทานที่สุด (พิไลพันธ์ พุทธิชนะ, 2534) นอกจากนั้นเวลายังมีอิทธิพลต่อไตเตอร์ของไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพลกซ์ด้วย เมื่อเวลาเพิ่มขึ้น ค่าไตเตอร์ของไวรัสจะลดลง โดยปกติเมื่อไวรัสอยู่ภายนอกเซลล์ ไวรัสจะค่อย ๆ ถูกทำลายความสามารถในการติดเชื้อในสิ่งแวดล้อม (พิไลพันธ์ พุทธิชนะ, 2534) ดังนั้นเพื่อหลีกเลี่ยงการสูญเสียความสามารถในการติดเชื้อของไวรัส ผู้วิจัยควรใช้เวลาสั้นตอนที่ไวรัสอยู่ภายนอกเซลล์ให้น้อยที่สุด (Meguenni และคณะ, 1989) ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบเพื่อหาฤทธิ์ยับยั้งไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพลกซ์ของสารสกัดสมุนไพรโดยให้มีผลกระทบบต่อไตเตอร์ของไวรัสทั้ง 2 ทัยป์น้อยที่สุด คือ อุณหภูมิต่ำ 0° ซ. - 4° ซ. อาจแช่หลอดทดลองที่มีไวรัสนี้ในน้ำแข็งตลอดการทดลอง และใช้เวลาในการทำการทดลองให้น้อยที่สุด ไม่ควรเกิน 1-2 ชั่วโมง

นอกจากการควบคุมสภาวะต่าง ๆ ๑ ให้เหมาะสมกับการทดลองแล้ว ยังต้องทดสอบความเป็นพิษต่อ Vero cells ของสารเคมีที่เกี่ยวข้องด้วย สำหรับ polyvinyl pyrrolidone (PVP) เป็นสารที่นำเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนแบบหลวม ๆ กับสารสกัดแอลกอฮอล์ของสมุนไพรในอัตราส่วน สารสกัด : PVP = 1:4 PVP เป็นสารที่มีความหนืด ดังนั้นนอกจากจะทดสอบความเป็นพิษของ PVP แล้วยังต้องทดสอบผลของความหนืดของ PVP ที่มีต่อการจัดเรียงตัวเป็น monolayer ของ Vero cells ด้วย โดยเติม PVP ลงไปพร้อมกับ Vero cells ถ้าความหนืดมีผลในการขัดขวางการจัดเรียงตัวของเซลล์ เซลล์อาจจะไม่เรียงตัวเป็น monolayer ตามปกติ และเมื่อทำการเลี้ยงเซลล์ให้เป็น monolayer ก่อนแล้วจึงเติม PVP ลงไป เพื่อทดสอบผลของ PVP ที่มีต่อ monolayer ที่จัดเรียงตัวแล้ว พบว่า Vero cells ทั้ง 2 การทดลองมีการจัดเรียงตัวของเซลล์เป็น monolayer และยังคงเจริญเติบโตตามปกติโดยไม่พบการเปลี่ยนแปลงของลักษณะเซลล์ จากผลการทดลองอาจสรุปได้ว่า PVP ในความเข้มข้น < 8,000 ไมโครกรัม/มล. ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ดังนั้นเมื่อทำการทดสอบสารสกัดแอลกอฮอล์ของสมุนไพรที่ความเข้มข้น < 2,000 ไมโครกรัม/มล. (เป็นน้ำหนักของสารสกัดสมุนไพรที่หนักน้ำหนักของ PVP ออกแล้ว) PVP จะไม่มีอิทธิพลในการเกิดความเป็นพิษต่อ Vero cells PVP เป็นสารโพลีเมอร์สังเคราะห์ แบบ nonionic มีสูตรเคมีคือ



เป็นผงสีขาว ไม่มีกลิ่น อดูดความชื้นได้ น้ำหนักโมเลกุล 10,000 ถึง 360,000 ละลายได้ในน้ำ แอลกอฮอล์ และคลอโรฟอร์ม ไม่ละลายในอะซิโตนและอีเทอร์ (BASF, 1985) มีประโยชน์ทั้งในวงการแพทย์ เครื่องสำอาง และอุตสาหกรรมยา โดยใช้เป็น plasma expander ที่ความเข้มข้น 4% ใน isotonic NaCl (Osol และ Hoover, 1975) ใช้เป็น dispersing agent ในยาเม็ด สารช่วยทานเกรนูลโดยเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนแล้วค่อย ๆ ปลดปล่อยตัวยา (นวลจิรา อนุสรนิตินสาร, 2527) PVP เป็นสารที่ปลอดภัยไม่เป็นพิษต่อเซลล์และร่างกาย (Martindale, 1977) ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อ Vero cells ของอะซัยคลอเวียร์ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมของการวิจัยพบว่า

อะซัยคลอเวียร์ที่ความเข้มข้น ≤ 0.625 ไมโครกรัม/มล. ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ บริษัท Wellcome (1983) ได้รายงานความเป็นพิษต่อเซลล์ของอะซัยคลอเวียร์ โดยทำการศึกษาในหลอดทดลอง (*in vitro*) พบว่าอะซัยคลอเวียร์มีค่า CD_{50} ต่อ Vero cells เท่ากับ 300 ไมโครโมล อะซัยคลอเวียร์มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ เนื่องจากเอนไซม์ DNA polymerase ของไวรัส ยอมรับอะซัยคลอเวียร์มาใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการแบ่งตัวของไวรัส ในขณะที่เอนไซม์ DNA polymerase ของเซลล์ปกติไม่ยอมรับอะซัยคลอเวียร์ ดังนั้นอะซัยคลอเวียร์จึงสามารถยับยั้งกระบวนการแบ่งตัวของไวรัสได้ โดยมีผลกระทบต่อเซลล์ปกติ น้อยมาก จากการทดลองในหลอดทดลอง ความเข้มข้นของอะซัยคลอเวียร์ที่สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของ Vero cells ปกติ จะมากกว่าความเข้มข้นของอะซัยคลอเวียร์ที่ช่วยยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพลกซ์ ถึง 3,000 เท่า (Wellcome, 1983)

ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดสมุนไพร ทั้งชนิดที่สกัดด้วยน้ำ และ แอลกอฮอล์ เมื่อใช้เกณฑ์ในการพิจารณาวิธีเดียวกับ Abou-Karam และคณะ (1990) คือ สมุนไพรที่มีค่าความเข้มข้นที่ทำให้ Vero cells ตายลงครึ่งหนึ่ง (CD_{50}) มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 1,418 ไมโครกรัม/มล. สมุนไพรชนิดนั้นไม่เป็นพิษต่อเซลล์ แต่ถ้ามีค่า CD_{50} น้อยกว่าหรือเท่ากับ 22 ไมโครกรัม/มล. สมุนไพรชนิดนั้นเป็นพิษต่อเซลล์มาก ดังนั้นสารสกัดใบว่านมหากาฬ ใบเสลดพังพอนทั้งชนิดสกัดด้วยน้ำและแอลกอฮอล์ และ สารสกัดใบชุมเห็ดเทศ ใบพญาขอ ชนิดสกัดด้วยน้ำไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ส่วนสารสกัดใบน้อยหน่าทั้งชนิดน้ำและแอลกอฮอล์ และ สารสกัดเหง้าขมิ้นชันด้วยแอลกอฮอล์มีความเป็นพิษต่อเซลล์มาก ทำให้ Vero cells ตายและหลุดออก ในความเข้มข้นต่ำสุด คือ 15.625 ไมโครกรัม/มล. เมื่อทำให้สารสกัดสมุนไพรเจือจางลงมากจนได้ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ และที่ความเข้มข้นนั้นก็จะไม่พบฤทธิ์ในการต้าน HSV ด้วย เรายังไม่อาจสรุปได้ว่าใบน้อยหน่าและขมิ้นชัน มีหรือไม่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อเริ่มตามที่ชาวบ้านหรือแพทย์แผนโบราณกล่าวอ้างสรรพคุณ ทั้งนี้จะต้องใช้วิธีอื่นที่เหมาะสมในการทดสอบฤทธิ์ในการต้าน HSV เช่น การเปลี่ยนจาก Vero cells เป็นเซลล์ชนิดที่ทนต่อความเป็นพิษของใบน้อยหน่า และขมิ้นชันได้ หรือเปลี่ยนจากวิธี plaque reduction assay เป็น

วิธีทดสอบอื่นๆ น้อยหน้าและขม้นชั้นมีความเป็นพิษต่อเซลล์มาก ทั้งนี้เนื่องมาจากน้อยหน้าและขม้นชั้น มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ โดยสารสกัดดิบและสกัดน้อยหน้าด้วยแอลกอฮอล์:น้ำ (1:1) มีพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด CA-9KB ในขนาด $CD_{50} = 20$ ไมโครกรัม/มล. (Anon, 1976) ส่วนสารสกัดแห้งขม้นชั้นด้วยน้ำมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด CA-Ehrlich-Ascites (Wang, 1982) สารสกัดด้วยอีเทอร์ยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด Hepatoma HTC (Matthe, 1980) สารสกัดด้วยเมทานอลยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด Leuk-SN 36 (Chang, 1980) และ สารสกัดด้วย 50% แอลกอฮอล์สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งชนิด CA-9KB ได้ (Dhar, 1968) ส่วนสารสกัดสมุนไพรชนิดอื่น ๆ ก็มีความเป็นพิษต่อ Vero cells ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันเนื่องจากสมุนไพรที่คัดเลือกมาทำการทดสอบเกือบทุกตัวมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ เช่น น้ำเต้า (Jiratchriyakul และคณะ, 1989) ชุมเห็ดเทศ มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด Sarcoma 37 (Belkin, 1952) และสารสกัดบับกด้วยแอลกอฮอล์:น้ำ (1:1) มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด CA-9KB (Lin, 1972) สารสกัดสมุนไพรที่ไม่ได้นำมาทำการทดลอง เนื่องจากไม่ละลายในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ได้แก่ สารสกัดแห้งขม้นชั้นด้วยน้ำและสารสกัดก้าน และใบมะม่วงด้วยแอลกอฮอล์ ซึ่งอาจจะมีหรือไม่มีฤทธิ์ในการต้าน HSV ก็ได้ ดังนั้นถ้าจะทำการวิจัยเพื่อทดสอบฤทธิ์ในการต้าน HSV ครั้งต่อไป อาจต้องตัดแปลงตั้งแต่ขั้นตอนของกระบวนการสกัด เพื่อให้ได้สารสกัดที่สามารถละลายได้ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์เช่นใช้ propylene glycol ช่วยในการละลายแทน PVP เป็นต้น ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพร ได้จากการทำการทดลองซ้ำหลาย ๆ ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย

สมุนไพรอาจทำลาย HSV โดยตรง ทำให้สูญเสียความสามารถในการติดเชื้อในเซลล์ นอกจากนี้สมุนไพรบางชนิดยังอาจออกฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ HSV ในเซลล์ด้วย ทำให้ไม่สามารถเกิด plaque ในเซลล์ที่ใช้ทดสอบได้ การทดสอบความสามารถในการต้านไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพลกซ์ของสารสกัดสมุนไพรและอะซัยคลอเวียร์ แบ่งออกเป็น 2 วิธี คือ วิธีที่หนึ่ง เติมสารสกัดสมุนไพร หรือ ACV ลงไปพร้อมกับไวรัส เพื่อดูความสามารถรวมในการต้าน HSV ภายนอกเซลล์ และภายในเซลล์ วิธีนี้สารสกัดสมุนไพร

หรือ ACV ที่ละลายในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ถูกบ่มไปพร้อมกับไวรัสและเซลล์ สมุนไพร อาจออกฤทธิ์ต้านไวรัสภายนอกเซลล์ โดยขัดขวางการเข้าสู่เซลล์ หรือทำให้ไวรัสหมดสภาพไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ได้ นอกจากนี้สมุนไพร หรือ ACV อาจออกฤทธิ์ต้านไวรัส ภายในเซลล์หลังจากที่ไวรัสเข้าสู่เซลล์แล้ว ดังนั้น overlay medium จะต้องมีส่วนประกอบ หรือ ACV ในความเข้มข้นเดิมอยู่ด้วย เพื่อรักษาความเข้มข้นของสมุนไพร หรือ ACV ที่คงที่ตลอดการทดลอง วิธีที่สองเติมสารสกัดสมุนไพร หรือ ACV ลงไปหลังจากไวรัสเข้าสู่เซลล์แล้ว เพื่อดูความสามารถในการต้านการเพิ่มจำนวนของ HSV ภายในเซลล์ โดย สารสกัดสมุนไพร หรือ ACV มีเฉพาะใน overlay medium เท่านั้น

การทดสอบความสามารถในการต้าน HSV ของ ACV ในการทดลองที่ 3.6 มีวัตถุประสงค์เพื่อคำนวณหาค่า 50% inhibitory dose (ID₅₀) ของ ACV แล้วนำมาใช้ในการกำหนดช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการทดลองที่ 3.7 ซึ่งเป็นการทดสอบความสามารถในการต้าน HSV ของสารสกัดสมุนไพร โดยทำการทดสอบ ACV ควบคู่ไปด้วยทุกครั้ง เพื่อเป็นตัวควบคุมและเปรียบเทียบฤทธิ์ในการต้าน HSV

ค่า ID₅₀ ของ ACV วิธีที่หนึ่ง (เติม ACV ลงไปพร้อมกับไวรัส) ต่อ HSV-1 เท่ากับ 0.0508 ± 0.0203 ไมโครกรัม/มล. และต่อ HSV-2 เท่ากับ 0.0349 ± 0.0180 ไมโครกรัม/มล.

ค่า ID₅₀ ของ ACV วิธีที่สอง (เติมภายหลังจากไวรัสเข้าสู่เซลล์แล้ว) ต่อ HSV-1 เท่ากับ 0.1341 ± 0.0448 ไมโครกรัม/มล. และต่อ HSV-2 เท่ากับ 0.1499 ± 0.0492 ไมโครกรัม/มล.

กำหนดค่าความเข้มข้นสุดท้ายของ ACV สำหรับการทดลองที่ 3.7 ทั้งวิธีที่หนึ่ง และวิธีที่สอง คือ 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0312, 0.0156 และ 0.0078 ไมโครกรัม/มล. ตามลำดับ โดยเจือจางลงครึ่งละ 2 เท่า

กลไกการออกฤทธิ์ของ ACV ในการยับยั้ง HSV เกิดภายในเซลล์ภายหลังจากที่ไวรัสเข้าสู่เซลล์แล้ว ACV จะไปทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ของไวรัสแทน deoxyguanosine ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสร้าง viral DNA ทำให้ไวรัสไม่สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนต่อไปได้ ส่วนเอนไซม์ของเซลล์ที่ไม่ติดเชื้อ หรือเซลล์ปกติ จะทำปฏิกิริยาจำเพาะกับ

deoxyguanosine เท่านั้น โดยไม่ยอมรับ ACV เป็นสารตั้งต้นในการสร้าง cellular DNA ดังนั้น ACV จึงไม่มีผลต่อการแบ่งตัวของเซลล์ปกติ หรือไม่เป็นพิษต่อการเจริญตามปกติของเซลล์ ค่า ID_{50} ของ ACV ที่ยับยั้งการเจริญของ HSV-1 และ HSV-2 มีขนาด 0.1-1 ไมโครโมล (บริษัท (Wellcome, 1983)

จากผลการทดสอบความสามารถในการต้าน HSV ตามตารางที่ 12 สารสกัดด้วยน้ำของใบน้ำเต้า แสดงฤทธิ์ในการต้าน HSV ทั้ง 2 ทัยป์เมื่อทดสอบด้วยวิธีที่หนึ่ง แต่ไม่พบฤทธิ์ต้าน HSV เมื่อทดสอบด้วยวิธีที่สอง แสดงว่า สารสกัดด้วยน้ำของใบน้ำเต้า ออกฤทธิ์ต้านไวรัสก่อนที่ไวรัสเข้าสู่เซลล์ แต่ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งไวรัสภายในเซลล์ ใบน้ำเต้าอาจทำปฏิกิริยากับไวรัสภายนอก เซลล์คล้ายกับสารระงับเชื้อ (antiseptic) ทำไปสมุนไพรที่มีประสิทธิภาพในการต้าน HSV จนสามารถนำไปใช้ในการรักษาโรคเริ่มได้ควรออกฤทธิ์ยับยั้ง ไวรัสภายในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส สำหรับสารสกัดของใบเสลดพังพอนและใบว่านมหากาฬด้วยน้ำและแอลกอฮอล์ไม่พบฤทธิ์ในการยับยั้ง HSV ทั้ง 2 ทัยป์ทั้งภายนอกและภายในเซลล์ที่ความเข้มข้นของสมุนไพรเท่ากับ 500 ไมโครกรัม/มล. สารสกัดใบชุมเห็ดเทศด้วยน้ำไม่พบฤทธิ์ในการยับยั้ง HSV ทั้ง 2 ทัยป์ แต่สารสกัดใบชุมเห็ดเทศด้วยแอลกอฮอล์มีฤทธิ์ในการต้าน HSV-2 เฉพาะภายนอกเซลล์ สารสกัดด้วยน้ำของแก่นแกล่ทั้ง 2 แหล่งมีฤทธิ์ในการต้าน HSV ทั้ง 2 ทัยป์ โดยอาจจะออกฤทธิ์ก่อนและหลังไวรัสเข้าสู่เซลล์แล้ว ส่วนสารสกัดด้วยแอลกอฮอล์ของแก่นแกล่ไม่พบฤทธิ์ต้าน HSV ทั้ง 2 ทัยป์ ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม/มล.

สารสกัดด้วยน้ำของใบบัวบกมีฤทธิ์ในการต้าน HSV ทั้ง 2 ทัยป์ โดยอาจจะออกฤทธิ์ทั้งภายในและภายนอกเซลล์ ส่วนสารสกัดด้วยแอลกอฮอล์ของใบบัวบกมีฤทธิ์ในการต้าน HSV-2 เฉพาะภายนอกเซลล์ สารสกัดด้วยน้ำของก้านและใบมะม่วงเขียวเสวยพบฤทธิ์ในการต้าน HSV ทั้ง 2 ทัยป์ โดยออกฤทธิ์ยับยั้งไวรัสก่อนและหลังไวรัสเข้าสู่เซลล์แล้ว ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Anon (1989) ที่ศึกษาฤทธิ์ต้านไวรัสเฮอริบีสซิมเพลกซ์ของมะม่วง พบว่า มะม่วงมีสารสำคัญ 2 ชนิด คือ mangiferin และ isomangiferin มีฤทธิ์ต้าน HSV ได้ดี โดยออกฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสภายในเซลล์

สำหรับสารสกัดใบพญาอด้วยน้ำ ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ $CD_{50} = 2,837$ ไมโครกรัม/มล. และ ID_{50} เมื่อเติมสารสกัดพร้อมกับไวรัส = 160.43 ไมโครกรัม/มล. และ 162.46 ไมโครกรัม/มล. สำหรับ HSV-1 และ HSV-2 ตามลำดับ แต่เมื่อสารสกัดใบพญาอด้วยน้ำไม่ค่อยเป็นพิษต่อเซลล์ จึงขยายความเข้มข้นที่เข้าทดสอบให้กว้างออกไปเพื่อหาฤทธิ์ยับยั้ง HSV ภายในเซลล์เมื่อใช้สารสกัดที่มีความเข้มข้นสูง ๆ พบว่าสารสกัดใบพญาอไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง HSV ภายในเซลล์ แพทย์หญิงชิ่งถิติ ไชยสุ และคณะ (2533) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดใบเสลดพังพอน และใบพญาอ ต่อ HSV-2 ในหลอดทดลองด้วยวิธี plaque reduction assay พบว่าใบเสลดพังพอน ไม่มีฤทธิ์ในการทำลายไวรัสซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัย ส่วนสารสกัดใบพญาอด้วยน้ำ มีฤทธิ์ในการทำลายไวรัส HSV-2 ที่ความเข้มข้นสูงถึง 4% (จากการสอบถามผู้วิจัยโดยตรง) จากผลการวิจัย สารสกัดใบพญาออาจจะออกฤทธิ์ยับยั้ง HSV ภายนอกเซลล์ มากกว่าที่จะออกฤทธิ์ภายในเซลล์ เนื่องจากค่า ID_{50} ของวิธีที่หนึ่ง มีค่าอยู่ในระดับ 160 ไมโครกรัม/มล. ในขณะที่ค่า ID_{50} ของวิธีที่สอง มีค่ามากกว่า 2,000 ไมโครกรัม/มล.

บุญเกิด คงยิ่งยศ และคณะ (2533) ได้ศึกษาฤทธิ์การต้านไวรัสเฮอร์ปีส์ ซิมเพลกซ์ทัยป์-1 โดยนำสารสกัดด้วยน้ำของสมุนไพร 22 ชนิด พบว่า เสลดพังพอน พญาอ บัวบก ไม่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพลกซ์ทัยป์-1 เมื่อเปรียบเทียบกับผลงานวิจัยแล้ว เสลดพังพอนไม่พบฤทธิ์ในการต้าน HSV ส่วนพญาอมีฤทธิ์ในการต้าน HSV ที่อยู่ภายนอกเซลล์ และบัวบกมีฤทธิ์ในการต้าน HSV โดยอาจออกฤทธิ์ทั้งภายในและภายนอกเซลล์อย่างชัดเจน สาเหตุที่ผลการวิจัยไม่ตรงกันอาจเนื่องมาจากวิธีการวิจัยต่างกัน บุญเกิด และคณะ ไม่ได้นำเสนอผลงานวิจัยอย่างละเอียดตามบทความของงานวิจัย บ่งว่าได้ศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรต่อการเจริญของไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพลกซ์ทัยป์-1 โดยนำสารสกัดด้วยน้ำของสมุนไพรที่ระดับความเข้มข้นซึ่งไม่เป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Vero cells ผสมกับไวรัสปริมาณ 100 TCID_{50} (tissue culture infectious dose-50) อบที่อุณหภูมิ 37°C . นาน 40 นาที นำไวรัสในส่วนผสมไปเพาะเลี้ยงใน Vero cells ซึ่งเจริญอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ปกติ

และอาหารเพาะเลี้ยง เซลล์ที่มีสารสกัดสมุนไพรผสมอยู่ สังเกตลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่เกิดขึ้น และจากการตรวจวัดปริมาณไวรัสด้วยวิธี plaque assay เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เปรียบเทียบผลระหว่างปริมาณไวรัสที่ถูกผลิตออกมาจากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ปกติในระยะเวลาต่าง ๆ กัน กับปริมาณไวรัสที่ถูกผลิตออกมาจากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดของสมุนไพรในระยะเวลาต่าง ๆ กัน ทำให้ทราบว่าสมุนไพรชนิดใดมีสารที่สามารถทำลายไวรัสได้โดยตรง และอาจยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสภายในเซลล์ จากวิธีการทดลองที่หน้าข้อความ เข้มข้นของสมุนไพรน้อยเกินไป และ/หรือ ปริมาณไวรัสที่ใช้มากเกินไป อาจทำให้ไม่พบฤทธิ์ในการต้าน HSV ได้

เมื่อสารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้าน HSV-1 และ HSV-2 โดยออกฤทธิ์ยับยั้ง HSV ภายในเซลล์ (วิธีที่สอง) มาทดสอบความจำเพาะของสารสกัดสมุนไพรว่านอกจากจะสามารถยับยั้งไวรัส HSV ได้แล้ว ยังมีความสามารถยับยั้งไวรัสกลุ่มอื่น ๆ ได้หรือไม่ โดยใช้นิวคลีโอไวรัสทัยป์-2 ซึ่งมีลักษณะ และคุณสมบัติทางกายภาพและชีวภาพต่างจาก HSV เป็นไวรัสทดสอบ พบว่าสารสกัดด้วยน้ำของใบบัวบก แก่นแกล้งทั้ง 2 แห่ง ก้านและใบมะม่วง และใบพญาบาท ไม่แสดงฤทธิ์ต่อนิวคลีโอไวรัสทัยป์-2 เมื่อใช้วิธีทดสอบการยับยั้งไวรัสภายในเซลล์ (วิธีที่สอง) โดยมีอะซัยคลอเวียร์ซึ่งไม่มีฤทธิ์ในการต้านนิวคลีโอไวรัสทัยป์-2 เช่นกันเป็นตัวควบคุม

หลักเกณฑ์ในการตัดสินใจว่าสมุนไพรมีศักยภาพในการต้านไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพลกซ์ ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเริม คือ

1. สมุนไพรสามารถออกฤทธิ์ได้ภายในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส เพื่อจะนำไปพัฒนาเป็นยารักษาโรคเริมให้กับคนที่ติดเชื้อเริมแล้ว สมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้าน HSV เพียงภายนอกเซลล์จะมีคุณสมบัติคล้ายกับสารระงับเชื้อทั่วไป อาจแนะนำให้ชาวบ้านใช้ตำพอกแผลเริมเพื่อลดจำนวนของไวรัสที่อาจแพร่กระจายไปยังผู้อื่น แต่ไม่มีผลต่อไวรัสที่เข้าสู่เซลล์แล้ว เนื่องจากไวรัสสามารถผ่านจากเซลล์ที่ติดเชื้อเซลล์แรกไปยังเซลล์ข้างเคียงได้โดยไม่จำเป็นต้องออกมานอกเซลล์ก่อน ดังนั้นเราจะพิจารณาเฉพาะสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้ง HSV ภายในเซลล์

2. สมุนไพรเป็นพืชที่หาได้ง่าย หรือปลูกกันแพร่หลาย
3. สมุนไพรออกฤทธิ์ต้านไวรัส เมื่อใช้ในปริมาณค่อนข้างต่ำ และในขนาดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์
4. สมุนไพรสามารถใช้ต้านไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพลกซ์ได้ทั้งทัยป์-1 และทัยป์-2 สมุนไพรที่นำมาทดสอบ เข้าหลักเกณฑ์ดังกล่าวมี 3 ชนิด ได้แก่ แก่นแก่แล้งซึ่งจากแหล่งที่ซื้อจากหมอฉันทน์ และจากปราจีนบุรี ใบบัวบก ก้านมะม่วงและใบมะม่วง แก่นแก่แล้งที่สกัดด้วยน้ำทั้งสองแหล่งให้ผลดีในการยับยั้ง HSV ทั้งทัยป์-1 และทัยป์-2 โดยออกฤทธิ์ต้านไวรัสได้ภายในเซลล์ที่ติดเชื้อในปริมาณความเข้มข้นที่ต่ำ (ID₅₀ มีค่าน้อย) แต่ขนาดที่ออกฤทธิ์ต่อ HSV ใช้ใกล้เคียงกับค่าความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์มาก ทำให้แก่นแก่แล้งอาจมี margin of safety แคบ กล่าวคือ ระดับความเข้มข้นที่ใช้ในการรักษา (therapeutic level) มีค่าใกล้เคียงกับระดับความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ (toxic level) นอกจากนี้แก่นแก่แล้งมีพืชที่ปลูกกันแพร่หลายหรือพบได้ทั่วไป แก่นแก่แล้งจึงเหมาะสมสำหรับนำมาวิจัยแยกหาสารสำคัญที่มีผลต่อ HSV โดยตรง เพื่อพัฒนาเป็นยารักษาโรคเริ่ม แทนการนำแก่นแก่แล้งสดมาใช้เพื่อหลีกเลี่ยงสารที่เป็นพิษต่อเซลล์ในสารสกัดแก่นแก่แล้งนั้น และเมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในการต้าน HSV ของแก่นแก่แล้งกับอะซัยคลอเวียร์ พบว่าในปริมาณไวรัสเท่ากันต้องใช้แก่นแก่แล้งในขนาดมากกว่า ACV 159 และ 850 เท่าสำหรับ HSV-1 และ HSV-2 ตามลำดับ แก่นแก่แล้งที่ซื้อจากร้านหมอฉันทน์และแก่นแก่แล้งที่เก็บจากจังหวัดปราจีนบุรีให้ค่า CD₅₀ และ ID₅₀ ใกล้เคียงกัน ใบมะม่วงเขียวเสวยที่สกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ในการยับยั้ง HSV-1 และ HSV-2 ได้ดีกว่าก้านมะม่วง โดยมีค่า ID₅₀ ต่อ HSV-1 และ HSV-2 ต่ำกว่า แต่ความเป็นพิษต่อเซลล์ของใบมะม่วงก็มีมากกว่าก้านมะม่วงด้วย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารสำคัญที่มีอยู่ในใบและก้านมะม่วงอาจมีชนิดและปริมาณต่าง ๆ กัน (ดูสารสำคัญในบทที่ 2) ใบและก้านมะม่วงสามารถออกฤทธิ์ในการต้าน HSV ภายในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส โดยออกฤทธิ์ได้ดีทั้ง HSV-1 และ HSV-2 ในปริมาณความเข้มข้นที่ต่ำค่อนข้างต่ำ และไม่เป็นพิษต่อเซลล์ นอกจากนี้มะม่วงยังเป็นพืชที่หาได้ง่าย นิยมปลูกกันแพร่หลายเพื่อรับประทานเป็นผลไม้ มะม่วงจึงเป็นพืชสมุนไพร ที่ควรแนะนำให้กับประชาชนทั่วไป ในการนำมารักษาโรคเริ่ม

ด้วยตนเอง เพราะเป็นสมุนไพรพื้นบ้านที่หาง่าย ราคาถูก และมีฤทธิ์ต้านเชื้อเริ่มได้ผลดี แต่ใบและก้านมะม่วง ไม่นิยมนำมารับประทาน จึงอาจนำใบวิจัยแยกหาสารสำคัญที่มีผลต่อ HSV โดยตรงเพื่อพัฒนาเป็นยารักษาโรคเริม และเมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในการต้าน HSV ของก้านและใบมะม่วง กับอะซัยคลอเวียร์ พบว่าอะซัยคลอเวียร์มีฤทธิ์ต้าน HSV-1 และ HSV-2 ได้ดีกว่าก้านและใบมะม่วง ฤทธิ์ต้าน HSV-1 และ HSV-2 สำหรับก้านมะม่วง ต้องใช้มากกว่า ACV 1,230 และ 1,332 เท่าตามลำดับ และสำหรับใบมะม่วงต้องใช้มากกว่า ACV 295 และ 228 เท่าตามลำดับ

ใบบับกที่สกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ในการต้าน HSV ภายในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส โดยออกฤทธิ์ได้ดีทั้ง HSV-1 และ HSV-2 ในปริมาณความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ใบบับกเป็นพืชที่ใช้เป็นอาหารจึงมีความปลอดภัยสูง เหมาะสมที่สุดในการแนะนำใบบับกที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อเริม ให้กับประชาชนทั่วไปในการนำมารักษาตนเองได้ เพราะเป็นสมุนไพรพื้นบ้านที่หาง่าย ได้ผลดี ใช้เป็นอาหารและราคาถูกตรงตามนโยบายของรัฐบาล ในอันที่จะส่งเสริมให้มีการพัฒนาเพื่อการพึ่งตนเองในด้านยาหรือสาธารณสุขมูลฐาน เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในการต้าน HSV ของใบบับก กับอะซัยคลอเวียร์ พบว่าในการต้าน HSV-1 และ HSV-2 ต้องใช้มากกว่า ACV 2,543 และ 1,140 เท่าตามลำดับ

ถ้าเป็นสารสกัดที่ทำการแยกสกัดแล้ว อาจจะใช้ปริมาณความเข้มข้นในการต้านไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพลกซ์น้อยกว่าความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพร

Abou-Karam และ Shier (1990) ได้ทำการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการยับยั้งไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพลกซ์ไทม์-1 ในสมุนไพร 61 ชนิด โดย Abou-Karam ได้รายงานถึง phytoalexin ซึ่งเป็นสารที่ต้นไม้อสร้างขึ้นเพื่อป้องกันไวรัสของพืช (Bailey และ Mansfield, 1982) ว่าอาจมีบทบาทในการต้านไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพลกซ์ได้ แต่ทั้งนี้ยังไม่มีการพิสูจน์โครงสร้างและกลไกการออกฤทธิ์ที่แน่นอน เสริมศิริ วิจิฉัยกุล (2534) ได้รายงานถึงสารต้านไวรัสบางชนิดจากพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการต้านโปลิโอไวรัส และไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพลกซ์ตามประเภทของสารได้ดังนี้

1. alkaloid

สาร	lycörine
ฤทธิ์ต่อไวรัสชนิด	poliovirus
แหล่งธรรมชาติ	พลับพลึง (วงศ์ Amaryllidaceae)

2. polyphenolic

สาร	tannic acid
ฤทธิ์ต่อไวรัสชนิด	HSV และ poliovirus
แหล่งธรรมชาติ	พบในพืชทั่ว ๆ ไปโดยเฉพาะ เปลือกต้นและ เปลือกผล

3. flavonoid

สาร	3-methylquercetin
	3,3'-dimethylquercetin
	3,7-dimethylquercetin
	3,7,3'-trimethylquercetin
ฤทธิ์ต่อไวรัสชนิด	poliovirus
แหล่งธรรมชาติ	<u>Euphorbia grantii</u> (วงศ์ Euphorbiaceae)

4. lignan

สาร	podophyllotoxin
ฤทธิ์ต่อไวรัสชนิด	HSV
แหล่งธรรมชาติ	<u>Podophyllum peltatum</u> (วงศ์ Berberidaceae)

5. phenylpropanoid

สาร	rosmarinic acid
ฤทธิ์ต่อไวรัสชนิด	HSV

6. triterpenoid

สาร	glycerrhizic acid
ฤทธิ์ต่อไวรัสชนิด	HSV
แหล่งธรรมชาติ	ชะเอมเทศ (วงศ์ Leguminosae)

มะม่วงมีสารสำคัญ mangiferin และ isomangiferin ที่มีฤทธิ์ในการต้าน HSV (Anon, 1989) นอกจากนี้มะม่วงยังประกอบด้วยสารจำพวก triterpenoid (Anjaneyulu และคณะ, 1982) โดยเฉพาะ methyl chinomin และ quercetin ที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Zhongyi และคณะ, 1982) อาจมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพลกซ์ได้ บำบวมมีสารสำคัญเป็น triterpene และ triterpene glycoside(นันทวัน บุณยะประภัศร, 2530)ที่อาจมีฤทธิ์ในการต้านไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพลกซ์เช่นกัน ทั้งนี้ต้องนำสมุนไพรไทยเหล่านี้ไปทำการวิจัยแยกหาสารสำคัญต่อไปเพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาการรักษาโรคเริ่มในอนาคต



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย