

การคัดกรองสารยับยั้งไวรัสเดงกี สายพันธุ์ 2 *in vitro* และ *in silico*

นางสาวกาญจนา บำรุงศรี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2559

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SCREENING FOR ANTI-DENGUE VIRUS SEROTYPE-2 COMPOUNDS *in vitro* AND *in silico*

Miss Kanjana Bumrungsri



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Microbiology and Microbial Technology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2016

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดกรองสารยับยั้งไวรัสเดงกี สายพันธุ์ 2 <i>in vitro</i> และ <i>in silico</i>
โดย	นางสาวกาญจนา บำรุงศรี
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจีโนมิกส์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.วันชัย อัครลาภสกุล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ)
.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.วันชัย อัครลาภสกุล)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ชูลี ยมภักดี)

.....กรรมการ
(ดร.ชมพูนิกข์ กาญจนพังคะ)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร.ชุติมา เทพฤทธิ์)

กาญจนา บำรุงศรี : การคัดกรองสารยับยั้งไวรัสเดงกี สายพันธุ์ 2 *in vitro* และ *in silico* (SCREENING FOR ANTI-DENGUE VIRUS SEROTYPE-2 COMPOUNDS *in vitro* AND *in silico*) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร.วันชัย อัครลาภสกุล, 103 หน้า.

โรคไข้เลือดออกเป็นโรคที่แพร่ระบาดในมนุษย์จากยุง (*Aedes* spp.) ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกี แม้ว่ามีงานวิจัยที่พบสารที่พัฒนาไปใช้ในการรักษาโรค อย่างไรก็ตามยังไม่มีสารชนิดใดที่สามารถใช้ทางคลินิกได้ แม้ว่าปัจจุบันมีวัคซีนเดงกี แต่ไม่สามารถที่จะใช้ในการป้องกันการติดเชื้อครั้งที่ 2 ได้ เพื่อที่จะแก้ปัญหาดังกล่าว งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อหาสารที่สามารถยับยั้งไวรัสเดงกีจากพืชสมุนไพร ได้แก่ ต้นระย่มน้อย (*Rauwolfia serpentina*) ต้นบอระเพ็ดพุงช้าง (*Stephania suberosa*) และต้นว่านขมิ้นดอก (*Curcuma comosa* Roxb.) ที่มีคุณสมบัติทางชีวภาพที่หลากหลาย อาทิฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ และฤทธิ์การต้านไวรัส โดยนำสารบริสุทธิ์จากพืชสมุนไพรทั้งสามชนิด มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งไวรัสเดงกีด้วยการบำบัดร่วมแล้วนำมาติดเชื้อเซลล์ไลน์ HepG2 พบว่าสารจากต้นว่านขมิ้นดอกให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งไวรัสเดงกีที่ดีที่สุด จากนั้นนำสารบริสุทธิ์ AS-WA018 AS-WA019 และ AS-WA020 จากต้นว่านขมิ้นดอกที่ความเข้มข้น 75 ไมโครโมลาร์ มาทดสอบการยับยั้ง 4 วิธี คือ การฆ่าไวรัส (Virucidal test) การบำบัดร่วม (Co-treatment) การบำบัดก่อนติดเชื้อ (Pre-exposure treatment) และ การบำบัดหลังติดเชื้อ (Post-exposure treatment) ผลการทดลองพบว่า สาร AS-WA018 สามารถยับยั้งไวรัสได้ทุกการทดสอบ แต่การทดสอบด้วยวิธีการบำบัดหลังติดเชื้อ จะให้ผลดีเมื่อใส่สารทันทีหลังติดเชื้อ สำหรับสาร AS-WA019 ให้ผลการยับยั้งเฉพาะการทดสอบด้วยวิธีการบำบัดก่อนและหลังติดเชื้อเท่านั้น จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสาร AS-WA019 มีฤทธิ์ป้องกันการเพิ่มจำนวน และป้องกันการปลดปล่อยของไวรัสลูกหลานออกนอกเซลล์ ในขณะที่สาร AS-WA020 พบผลการยับยั้งไวรัสในการทดสอบด้วยวิธีการฆ่าไวรัส การบำบัดร่วม และการบำบัดหลังติดเชื้อ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสาร AS-WA020 น่าจะมีฤทธิ์ยับยั้งการติดเชื้อ การเพิ่มจำนวน และการปลดปล่อยไวรัสออกนอกเซลล์ สำหรับการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ด้วยวิธีทางคอมพิวเตอร์ ช่วยให้เข้าใจในการยึดจับของสาร AS-WA018 AS-WA019 และ AS-WA020 ต่อบริเวณยึดจับของ n-octyl- β -D-glucoside (β -OG) ในโปรตีนสิ่งหุ้มของไวรัสเดงกี เมื่อรวมผลทางคอมพิวเตอร์กับผลการทดลองพบว่าสาร AS-WA018 และ AS-WA020 สามารถยึดจับบริเวณ β -OG ในโปรตีนสิ่งหุ้มของไวรัสเดงกีได้ดีกว่าสาร AS-WA019 ซึ่งหมายความว่า สาร AS-WA018 และ AS-WA020 มีสมบัติของการฆ่าไวรัสและการยับยั้งการติดเชื้อของไวรัสในวิธีการบำบัดร่วม ผลการวิจัยนี้จึงเป็นแนวทางในการศึกษาเชิงลึกของสารบริสุทธิ์ทั้งสามที่มีประสิทธิภาพ เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาสารธรรมชาติจากพืชสมุนไพรเพื่อเป็นยาต้านไวรัสเดงกี

ภาควิชา จุลชีววิทยา ปลายมือชื่อนิสิต

สาขาวิชา จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ ปลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ปีการศึกษา 2559

5671913623 : MAJOR MICROBIOLOGY AND MICROBIAL TECHNOLOGY

KEYWORDS: DENGUE VIRUS / INHIBITORS / BIOACTIVE COMPOUNDS / ANTIVIRUS

KANJANA BUMRUNGSRI: SCREENING FOR ANTI-DENGUE VIRUS SEROTYPE-2 COMPOUNDS *in vitro* AND *in silico*. ADVISOR: ASSOC. PROF. WANCHAI ASSAVALAPSAKUL, Ph.D., 103 pp.

Dengue fever is originated from the transmission of dengue virus-infected *Aedes* spp. to human. Although there has been a repertoire of the research on pharmaceutical drugs to treating the disease, those compounds could not be used in terms of clinical practice. The dengue vaccine is available to date, however, it cannot confer lasting protection against secondary heterotypic infection. To overcome the problem, this study aimed at discovering new compounds having deleterious effects on the dengue virus from medicinal plants. Inspired by the diverse biological activities elicited by *Rauwolfia serpentina*, *Stephania suberosa* and *Curcuma comosa* Roxb. including anti-inflammation, anti-microbe and anti-virus, the purified compounds from those plants were firstly screened for their activities by co-treating with dengue virus followed by the HepG2 host cell infection. After the screening, the result revealed that the co-treatment of the virus with the compounds from *C. comosa* gave rise to the highest inhibitory effect. In this case, 75 μ M of the three compounds from *C. comosa*, namely AS-WA018, AS-WA019 and AS-WA020 were subsequently used for testing in these four separated experimental phases: virucidal test, co-treatment, pre-exposure treatment and post-exposure treatment. Interestingly, AS-WA018 showed the inhibitory effect on every experimental phase, but as to the post-exposure treatment experiment, the effect occurred only when AS-WA018 was added immediately after the infection. However, the inhibitory effects exerted by AS-WA019 was shown in only pre-exposure treatment and post-exposure treatment, which suggested that AS-WA019 could stall viral replication and prevent the virus from releasing its progeny out of the host cell. As to AS-WA020, it displayed inhibition of the virus *per se* on co-treatment and post-exposure treatment experiment. This reflected that AS-WA020 could prevent the viral infection, replication and release step. In terms of mechanistic detail, the computational technique was used to help illustrate the binding of AS-WA018, AS-WA019 and AS-WA020 to the n-octyl- β -D-glucoside (β -OG) binding site of the DENV-2 envelope protein. Congruent with the experimental result, AS-WA018 and AS-WA020 could bind to the binding site of β -OG more tightly than AS-WA019 did, it means that AS-WA018 and AS-WA020 could exhibit the virucidal property and inhibit the viral infection in the co-treatment experiment. To this end, the research paves the way for in-depth mechanistic studies of those three potential candidates, particularly in terms of further development of those medicinal natural products as the anti-DENV drugs.

Department: Microbiology

Student's Signature

Field of Study: Microbiology and Microbial
Technology

Advisor's Signature

Academic Year: 2016

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.วันชัย อัสวลาภสกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้สอนเทคนิคการวางแผนแลป เทคนิคในการทำแลป และการทำงานต่าง ๆ รวมถึงให้กำลังใจ ข้อเสนอแนะ ตรวจสอบและช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้นจนผ่านลุล่วงไปด้วยดี

ขอกราบขอบคุณ ศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ สุขสำราญ อาจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง และคุณนิลุบล สอนแก้ว นักศึกษาภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง ที่ให้สารบริสุทธิ์เพื่อใช้ในการทดลองในครั้งนี้ และขอกราบขอบคุณ อาจารย์ ดร.ณัฐพล อภิรติกุล อาจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้ข้อมูลและคำปรึกษาเกี่ยวกับสารบริสุทธิ์

ขอกราบขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. ชูลี ยมภักดี อาจารย์ ดร. ชมพูนิกข์ กาญจนพิงคะ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และอาจารย์ ดร. ชุติมา เทพฤทธิ์ ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ภายนอก และที่กรุณาให้ข้อคิดเห็น ข้อเสนอแนะต่าง ๆ เพื่อให้วิทยานิพนธ์มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ นายสุวัฒน์ บำรุงศรี บิดา และนางพวงรัตน์ บำรุงศรี มารดาของข้าพเจ้า ผู้สนับสนุนการศึกษาและค่าใช้จ่าย รวมถึงกำลังใจและความรักที่ให้เสมอมา ทำให้ข้าพเจ้าได้สำเร็จการศึกษาตามที่ตั้งใจไว้

ขอขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ในห้องวิจัย 2014 ทุกคน ที่ช่วยให้กำลังใจและคำปรึกษาแนะนำ วิธีแก้ปัญหาในการทำวิจัยต่าง ๆ เสมอมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูปภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 วัตถุประสงค์การทดลอง.....	2
บทที่ 2 ปรีทัศน์วรรณกรรม	3
2.1 ความเป็นมาและสภาพปัญหา	3
2.2 สาเหตุของโรคไข้เลือดออก.....	6
2.3 อาการของโรคไข้เลือดออก.....	8
2.4 แนวทางการรักษาโรคไข้เลือดออก	8
2.5 การติดต่อของโรคไข้เลือดออก	9
2.6 พยาธิกำเนิดของโรคไข้เลือดออก.....	9
2.7 วัคซีนโรคไข้เลือดออก	11
2.8 สารสกัดจากธรรมชาติ.....	14
2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	16
บทที่ 3 อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย	17
3.1 อุปกรณ์.....	17
3.2 เคมีภัณฑ์.....	18
3.3 วิธีการทดลอง.....	20

บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	37
4.1 ทดสอบความเป็นพิษของสารบริสุทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งตับมนุษย์ด้วยวิธี MTT assay	37
4.3 Molecular Docking.....	43
4.4 การจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล.....	44
4.5 ทดสอบความเป็นพิษของสารต่อเซลล์มะเร็งตับมนุษย์ด้วยวิธี MTT assay.....	52
4.6 การฆ่าไวรัส (Virucidal test).....	54
4.7 การบำบัดร่วม (Co-treatment).....	55
4.8 การบำบัดก่อนติดเชื้อ (Pre-exposure treatment).....	56
4.9 การบำบัดหลังติดเชื้อ (Post-exposure treatment).....	58
บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลอง	60
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง.....	66
รายการอ้างอิง	67
ภาคผนวก.....	75
ภาคผนวก ก สูตรอาหารและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	76
ภาคผนวก ข ผลการทดลองแต่ละการทดลอง.....	81
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	103

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 แสดงรหัสสาร โครงสร้าง สูตรทางเคมี น้ำหนักโมเลกุลและชื่อทางเคมีของสารบริสุทธิ์
 ละชนิดที่ใช้ในการทดลอง..... 21

ตารางที่ 2 แสดงค่าความเข้มข้นสูงสุดของสารบริสุทธิ์ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งระดับมนุษย์เมื่อ
 เลี้ยงสารและเซลล์มะเร็งระดับมนุษย์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 37

ตารางที่ 3 แสดงค่าพลังงานยึดจับ (กิโลแคลอรีต่อโมล) จากการคำนวณทาง Molecular
 Docking ด้วยโปรแกรม CDOCKER ใน Accelrys Discovery Studio 2.5 ของสาร AS-WA018
 AS-WA019 และ AS-WA020 โดยมีสาร β -OG เป็นสารควบคุม 44

ตารางที่ 4 แสดงค่าพลังงานยึดจับอิสระคำนวณด้วยวิธี MM/PBSA และ MM/GBSA 46

ตารางที่ 5 แสดงเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์มะเร็งหลังเลี้ยงกับสาร AS-WA018 ที่
 ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารแต่ละชนิด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมี DMEM + 0.5% DMSO เป็น
 ชุดควบคุม ($p < 0.05$) ทำ 3 การทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ..... 81

ตารางที่ 6 แสดงเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์มะเร็งหลังเลี้ยงกับสาร AS-WA019 ที่
 ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารแต่ละชนิด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมี DMEM + 0.5% DMSO เป็น
 ชุดควบคุม ($p < 0.05$) ทำ 3 การทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ..... 83

ตารางที่ 7 แสดงเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์มะเร็งหลังเลี้ยงกับสาร AS-WA020 ที่
 ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารแต่ละชนิด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมี DMEM + 0.5% DMSO เป็น
 ชุด ($p < 0.05$) ทำ 3 การทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ 85

ตารางที่ 8 แสดงจำนวนไวรัสลูกหลานเมื่อผสมสาร AS-WA018 AS-WA019 และ AS-WA020 ที่
 ความเข้มข้น 75 ไมโครโมลาร์ กับไวรัสเดงกีซีโรไทป์-2 ที่ MOI 10 พร้อมกันเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
 โดยตรง โดยมี DMEM + 0.5% DMSO เป็นชุดควบคุม ($p < 0.05$) ด้วยวิธีการฆ่าไวรัส
 Virucidal test) ทำ 3 การทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ 87

ตารางที่ 9 แสดงจำนวนไวรัสลูกหลานที่เกิดจากการผสมสาร AS-WA018 AS-WA019 และ AS-
 WA020 ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครโมลาร์ กับไวรัสเดงกีซีโรไทป์-2 ที่ MOI 10 พร้อมกันเป็นเวลา
 2 ชั่วโมงขณะติดเชื้อ โดยมี DMEM + 0.5% DMSO เป็นชุดควบคุม ($p < 0.05$) ด้วยวิธีการ
 บำบัดร่วม (Co-treatment) ทำ 3 การทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ..... 89

ตารางที่ 10 แสดงจำนวนไวรัสลูกหลานที่เกิดจากการนำเซลล์มะเร็งระดับมนุษย์ซึ่งจะถูกเลี้ยงกับสารWA018 ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 0 2 6 12 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นติดเชื้อไวรัสแดงกีซีโรไทป์-2 ที่ MOI 10 โดยใช้การใส่สารและล้างออกทันที (0 ชั่วโมง) เป็นชุดควบคุม ($p < 0.05$) ด้วยวิธีการบำบัดก่อนติดเชื้อ (Pre-exposure treatment) ทำ 3 การทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ.....	91
ตารางที่ 11 แสดงจำนวนไวรัสลูกหลานที่เกิดจากการนำเซลล์มะเร็งระดับมนุษย์ซึ่งจะถูกเลี้ยงกับสาร	93
ตารางที่ 12 แสดงจำนวนไวรัสลูกหลานที่เกิดจากการนำเซลล์มะเร็งระดับมนุษย์ซึ่งจะถูกเลี้ยงกับสาร AS-WA020 ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 0 2 6 12 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นติดเชื้อไวรัสแดงกีซีโรไทป์-2 ที่ MOI 10 โดยใช้การใส่สารและล้างออกทันที (0 ชั่วโมง) เป็นชุดควบคุม ($p < 0.05$) ด้วยวิธีการบำบัดก่อนติดเชื้อ (Pre-exposure treatment) ทำ 3 การทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ.....	95
ตารางที่ 13 แสดงจำนวนไวรัสลูกหลานในเซลล์มะเร็งระดับมนุษย์เมื่อใส่สาร AS-WA018 ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครโมลาร์ ที่เวลา 0 2 4 และ 6 ชั่วโมง หลังการติดเชื้อไวรัสแดงกีซีโรไทป์-2 ที่ MOI 10 โดยมี DMEM + 0.5% DMSO เป็นชุดควบคุม ($p < 0.05$) ด้วยวิธีการบำบัดหลังติดเชื้อ (Post-exposure treatment) ทำ 3 การทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ	97
ตารางที่ 14 แสดงจำนวนไวรัสลูกหลานในเซลล์มะเร็งระดับมนุษย์เมื่อใส่สาร AS-WA019 ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครโมลาร์ ที่เวลา 0 2 4 และ 6 ชั่วโมง หลังการติดเชื้อไวรัสแดงกีซีโรไทป์-2 ที่ MOI 10 โดยมี DMEM + 0.5% DMSO เป็นชุดควบคุม ($p < 0.05$) ด้วยวิธีการบำบัดหลังติดเชื้อ (Post-exposure treatment) ทำ 3 การทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ	99
ตารางที่ 15 แสดงจำนวนไวรัสลูกหลานในเซลล์มะเร็งระดับมนุษย์เมื่อใส่สาร AS-WA020 ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครโมลาร์ ที่เวลา 0 2 4 และ 6 ชั่วโมง หลังการติดเชื้อไวรัสแดงกีซีโรไทป์-2 ที่ MOI 10 โดยมี DMEM + 0.5% DMSO เป็นชุดควบคุม ($p < 0.05$) ด้วยวิธีการบำบัดหลังติดเชื้อ (Post-exposure treatment) ทำ 3 การทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ	101

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 1 แสดงพื้นที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อไวรัสเดงกี ปี ค.ศ. 2013 ^[8]	3
รูปที่ 2 แสดงจำนวนผู้ป่วยและผู้เสียชีวิตจากโรคไข้เลือดออก ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1990 – 2016 จาก Pan American Sanitary Bureau/Regional Office for the Americas (PAHO), Regional Office for South East Asia (SEARO) และ Regional Office for the Western Pacific (WPRO) ^[9] จำนวนผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกเดงกี จำนวนผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกเดงกีต่อ 100,000 คน จำนวนผู้เสียชีวิตจากโรคไข้เลือดออก	4
รูปที่ 3 แสดงค่าใช้จ่ายในการรักษาผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้	5
รูปที่ 4 แสดงจำนวนผู้ป่วยและผู้เสียชีวิตจากโรคไข้เลือดออกในประเทศไทย ตั้งแต่ปีพ.ศ. 2555 – 2560 ^[11]	5
รูปที่ 5 แสดงวงจรการเพิ่มจำนวนของไวรัสเดงกี ^[12]	7
รูปที่ 6 แสดงกลไกการเกิด Antibody-Dependent Enhanced (ADE) Immunity ^[16]	10
รูปที่ 7 แสดงองค์ประกอบ Hemocytometer chamber ^[67, 68]	26
รูปที่ 8 แสดงเปอร์เซ็นต์อัตราการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งตับมนุษย์หลังเลี้ยงกับสารบริสุทธิ์ AS-WA009 AS-WA010 AS-WA012 AS-WA013 และ AS-WA015 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมี DMEM + 0.5% DMSO เป็นชุดควบคุม ($p < 0.05$)	38
รูปที่ 9 แสดงเปอร์เซ็นต์อัตราการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งตับมนุษย์หลังเลี้ยงกับสารบริสุทธิ์ AS-WA016 AS-WA017 AS-WA018 AS-WA019 และ AS-WA020 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมี DMEM + 0.5% DMSO เป็นชุดควบคุม ($p < 0.05$)	39
รูปที่ 10 แสดงจำนวนไวรัสลูกหลานที่เกิดจากการผสมสารบริสุทธิ์ AS-WA009 AS-WA010 AS-WA012 AS-WA013 และ AS-WA015 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กับไวรัสเดงกีซีโรไทป์-2 ที่ MOI 10 พร้อมกันเป็นเวลา 2 ชั่วโมงขณะติดเชื้อ โดยมี DMEM + 0.5% DMSO เป็นชุดควบคุม ($p < 0.05$) ด้วยวิธีการบำบัดร่วม (Co-treatment).....	41
รูปที่ 11 แสดงจำนวนไวรัสลูกหลานที่เกิดจากการผสมสารบริสุทธิ์ AS-WA016 AS-WA017 AS-WA018 AS-WA019 และ AS-WA020 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กับไวรัสเดงกีซีโรไทป์-2 ที่ MOI 10 พร้อมกันเป็นเวลา 2 ชั่วโมงขณะติดเชื้อ โดยมี DMEM + 0.5% DMSO เป็นชุดควบคุม ($p < 0.05$) ด้วยวิธีการบำบัดร่วม (Co-treatment).....	42

รูปที่ 12 แสดงค่า Root-mean square deviation (RMSD) ของสาร AS-WA018 AS-WA019 และ AS-WA020 ที่จับบริเวณ binding site ของ β -OG ในโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัสแดงกีซีโรไทป์-2 (1OKE)..... 45

รูปที่ 13 แสดงค่าพลังงาน Decomposition Free Energy ที่มีค่าน้อยกว่า 0.5 กิโลแคลอรีต่อโมล โดยวิธีการคำนวณ MM/PBSA ของกรดอะมิโนแต่ละตัวในโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัสแดงกีซีโรไทป์-2 ต่อสารบริสุทธิ์ AS-WA018 AS-WA019 และ AS-WA020..... 47

รูปที่ 14 แสดงค่าพลังงาน Decomposition Free Energy ที่มีค่าน้อยกว่า 0.5 กิโลแคลอรีต่อโมล โดยวิธีการคำนวณ MM/GBSA ของกรดอะมิโนแต่ละตัวในโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัสแดงกีซีโรไทป์-2 ต่อสารบริสุทธิ์ AS-WA018 AS-WA019 และ AS-WA020..... 48

รูปที่ 15 แสดงค่าพลังงาน Energy Contribution (กิโลแคลอรีต่อโมล) ของกรดอะมิโนในโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัสแดงกีซีโรไทป์-2 ที่สำคัญในการจับกับสาร AS-WA018 AS-WA019 และ AS-WA020 ที่บริเวณ binding site ของ β -OG ในโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัสแดงกีซีโรไทป์-2..... 50

รูปที่ 16 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความถี่ในการเกิดพันธะไฮโดรเจนของกรดอะมิโนในโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัสแดงกีซีโรไทป์-2 ต่อสาร AS-WA018 AS-WA019 และ AS-WA020..... 51

รูปที่ 17 แสดงเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์มะเร็งระดับมนุษย์หลังเลี้ยงกับสาร AS-WA018 AS-WA019 และ AS-WA020 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ($p < 0.05$)..... 53

รูปที่ 18 แสดงเปอร์เซ็นต์การฆ่าไวรัสแดงกีซีโร (Virucidal test) เมื่อผสมสาร AS-WA018 AS-WA019 และ AS-WA020 ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครโมลาร์ กับไวรัสแดงกีซีโรไทป์-2 ที่ MOI 10 พร้อมกันเป็นเวลา 1 ชั่วโมงโดยตรง โดยมี DMEM + 0.5% DMSO เป็นชุดควบคุม ($p < 0.05$) ด้วยวิธีการฆ่าไวรัส (Virucidal test)..... 54

รูปที่ 19 แสดงเปอร์เซ็นต์ลดการสร้างไวรัสลูกหลานในเซลล์มะเร็งระดับมนุษย์ เมื่อผสมสาร AS-WA018 AS-WA019 และ AS-WA020 ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครโมลาร์ กับไวรัสแดงกีซีโรไทป์-2 ที่ MOI 10 พร้อมกันเป็นเวลา 2 ชั่วโมงขณะติดเชื้อ โดยมี DMEM + 0.5% DMSO เป็นชุดควบคุม ($p < 0.05$) ด้วยวิธีการบำบัดร่วม (Co-treatment)..... 55

รูปที่ 20 แสดงเปอร์เซ็นต์ลดการสร้างไวรัสลูกหลานในเซลล์มะเร็งเมื่อใส่สาร AS-WA018 AS-WA019 และ AS-WA020 ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 12 6 และ 2 ก่อนการติดเชื้อไวรัสแดงกีซีโรไทป์-2 ที่ MOI 10 โดยใช้การใส่สารและล้างออกทันที 0 ชั่วโมง) เป็นชุดควบคุม ($p < 0.05$) ด้วยวิธีการบำบัดก่อนติดเชื้อ (Pre-exposure treatment)..... 57

รูปที่ 21 แสดงเปอร์เซ็นต์ลดการสร้างไวรัสสฤกหลานในเซลล์มะเร็งตับมนุษย์เมื่อใส่สาร AS-WA018 AS-WA019 และ AS-WA020 ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครโมลาร์ ที่เวลา 0 2 4 และ 6 ชั่วโมง การติดเชื้อไวรัสเดงกีซีโรไทป์-2 ที่ MOI 10 โดยมี DMEM + 0.5% DMSO เป็นชุดควบคุม ($p < 0.05$) ด้วยวิธีการบำบัดหลังติดเชื้อ (Post-exposure treatment)..... 59

รูปที่ 22 แสดงเปอร์เซ็นต์อัตราการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งตับมนุษย์หลังเลี้ยงกับสาร AS-WA018 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ($p < 0.05$) ทำ 3 การทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ โดย 1) 2) และ 3) คือการทดลองที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ 82

รูปที่ 23 แสดงเปอร์เซ็นต์อัตราการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งตับมนุษย์หลังเลี้ยงกับสาร AS-WA019 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ($p < 0.05$) ทำ 3 การทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ โดย 1) 2) และ 3) คือการทดลองที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ 84

รูปที่ 24 แสดงเปอร์เซ็นต์อัตราการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งตับมนุษย์หลังเลี้ยงกับสาร AS-WA020 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ($p < 0.05$) ทำ 3 การทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ โดย 1) 2) และ 3) คือการทดลองที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ..... 86

รูปที่ 25 แสดงจำนวนไวรัสสฤกหลานที่เกิดจากการผสมสารบริสุทธิ์ AS-WA018 AS-WA019 และ AS-WA020 ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครโมลาร์ กับไวรัสเดงกีซีโรไทป์-2 จำนวน 1×10^6 PFU มิลลิลิตร พร้อมกันเป็นเวลา 1 ชั่วโมงโดยตรง โดยมี DMEM + 0.5% DMSO เป็นชุดควบคุม ($p < 0.05$) ด้วยวิธีการฆ่าไวรัส (Virucidal test) ทำ 3 การทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ โดย 1) 2) และ 3) คือการทดลองที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ 88

รูปที่ 26 แสดงจำนวนไวรัสสฤกหลานที่เกิดจากการผสมสารบริสุทธิ์ AS-WA018 AS-WA019 และ AS-WA020 ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครโมลาร์ กับไวรัสเดงกีซีโรไทป์-2 ที่ MOI 10 พร้อมกันเป็น 2 ชั่วโมงขณะติดเชื้อ โดยมี DMEM + 0.5% DMSO เป็นชุดควบคุม ($p < 0.05$) ด้วยวิธีการบำบัดร่วม (Co-treatment) ทำ 3 การทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ โดย 1) 2) และ 3) คือการทดลองที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ 90

รูปที่ 27 แสดงจำนวนไวรัสสฤกหลานที่เกิดจากการนำเซลล์มะเร็งตับมนุษย์ซึ่งจะถูกเลี้ยงกับสาร AS-WA018 ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 12 6 และ 2 ชั่วโมงก่อนการติดเชื้อไวรัสเดงกีซีโรไทป์-2 ที่ MOI 10 โดยใส่สารและล้างออกทันที (0 ชั่วโมง) เป็นชุดควบคุม ($p < 0.05$) ด้วยวิธีการบำบัดก่อนติดเชื้อ (Pre-exposure treatment) ทำ 3 การทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ โดย 1) 2) และ 3) คือการทดลองที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ 92

รูปที่ 28 แสดงจำนวนไวรัสลูกหลานที่เกิดจากการนำเซลล์มะเร็งระดับมนุษย์ซึ่งจะถูกเลี้ยงกับสาร AS-WA019 ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 12 6 และ 2 ชั่วโมงก่อนการติดเชื้อไวรัสแดงกีซีโรไทป์-2 ที่ MOI 10 โดยใช้การใส่สารและล้างออกทันที (0 ชั่วโมง) เป็นชุดควบคุม ($p < 0.05$) ด้วยวิธีการบำบัดก่อนติดเชื้อ (Pre-exposure treatment) ทำ 3 การทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ โดย 1) 2) และ 3) คือการทดลองที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ..... 94

รูปที่ 29 แสดงจำนวนไวรัสลูกหลานที่เกิดจากการนำเซลล์มะเร็งระดับมนุษย์ซึ่งจะถูกเลี้ยงกับสาร WA020 ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 12 6 และ 2 ชั่วโมงก่อนการติดเชื้อไวรัสแดงกีซีโรไทป์-2 ที่ MOI 10 โดยใช้การใส่สารและล้างออกทันที (0 ชั่วโมง) เป็นชุดควบคุม ($p < 0.05$) ด้วยวิธีการบำบัดก่อนติดเชื้อ (Pre-exposure treatment) ทำ 3 การทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ โดย 1) 2) และ 3) คือการทดลองที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ..... 96

รูปที่ 30 แสดงจำนวนไวรัสลูกหลานที่เกิดจากการนำเซลล์เป้าหมายซึ่งจะถูกทำให้ติดเชื้อไวรัสแดงกีซีโรไทป์-2 จากนั้นจะถูกเลี้ยงกับสาร AS-WA018 ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครโมลาร์ ที่เวลา 0 2 4 และ 6 ชั่วโมง หลังการติดเชื้อไวรัสแดงกีซีโรไทป์-2 ที่ MOI 10 โดยมี DMEM + 0.5% DMSO เป็นชุดควบคุม ($p < 0.05$) ด้วยวิธีการบำบัดหลังติดเชื้อ (Post-exposure treatment) ทำ 3 การทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ โดย 1) 2) และ 3) คือการทดลองที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ..... 98

รูปที่ 31 แสดงจำนวนไวรัสลูกหลานที่เกิดจากการนำเซลล์เป้าหมายซึ่งจะถูกทำให้ติดเชื้อไวรัสแดงกีซีโรไทป์-2 จากนั้นจะถูกเลี้ยงกับสาร AS-WA019 ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครโมลาร์ ที่เวลา 0 2 4 และ 6 ชั่วโมง หลังการติดเชื้อไวรัสแดงกีซีโรไทป์-2 ที่ MOI 10 โดยมี DMEM + 0.5% DMSO เป็นชุดควบคุม ($p < 0.05$) ด้วยวิธีการบำบัดหลังติดเชื้อ (Post-exposure treatment) ทำการทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ โดย 1) 2) และ 3) คือการทดลองที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ.... 100

รูปที่ 32 แสดงจำนวนไวรัสลูกหลานที่เกิดจากการนำเซลล์เป้าหมายซึ่งจะถูกทำให้ติดเชื้อไวรัสแดงกีซีโรไทป์-2 จากนั้นจะถูกเลี้ยงกับสาร AS-WA020 ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครโมลาร์ ที่เวลา 0 2 4 และ 6 ชั่วโมง หลังการติดเชื้อไวรัสแดงกีซีโรไทป์-2 ที่ MOI 10 โดยมี DMEM + 0.5% DMSO เป็นชุดควบคุม ($p < 0.05$) ด้วยวิธีการบำบัดหลังติดเชื้อ (Post-exposure treatment) ทำ 3 การทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ โดย 1) 2) และ 3) คือการทดลองที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ..... 102

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

β -OG	n-octyl- β -D-glucoside
ADE	Antibody dependent enhancement
CHIKV	Chikungunya virus
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
FBS	Fetal bovine serum
Kcal	kilocalories
MEM	Minimum essential medium
MM/GBSA	Molecular Mechanics/Generalized Born Surface Area
MM/PBSA	Molecular Mechanics/Poisson-Boltzmann Surface Area
MOI	Multiplicity of infection
PBS	Phosphate buffer saline
PGV-0	Pentagamavunon-0 (อนุพันธ์ของ curcumin)
PS	Penicillin Streptomycin
ZIKV	Zika virus

บทที่ 1

บทนำ

โรคไข้เลือดออก เป็นโรคที่มีการแพร่ระบาดอย่างรวดเร็วในช่วง 50 ปีที่ผ่านมา มีประชากรที่อาศัยในพื้นที่เสี่ยงกว่า 2,500 ล้านคน และมีผู้ติดเชื้อมากถึง 50-100 ล้านคนต่อปี สาเหตุของโรคไข้เลือดออกเกิดจากไวรัสเดงกีซึ่งมีุงกลายเป็นพาหะ ทำให้เกิดการแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็วและควบคุมได้ยาก โดยพบการแพร่ระบาดในเขตภูมิอากาศร้อนชื้น (Tropical) และกึ่งร้อนชื้น (Subtropical) [1, 2]

แม้ปัจจุบันจะค้นพบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มปริมาณไวรัสเดงกี แต่ก็ยังไม่มีสารหรือยาชนิดใดที่สามารถนำไปใช้ในการรักษาโรคไข้เลือดออกทางคลินิกได้ การป้องกันไม่ให้โรคไข้เลือดออกจึงทำได้เพียงป้องกันตัวจากการถูกยุงกัดเท่านั้น ในส่วนของวัคซีน มีการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคไข้เลือดออก โดยมีชื่อทางการค้าว่า Dengvaxia[®] โดยพบว่าสามารถป้องกันการติดเชื้อไวรัสเดงกีที่เป็นสาเหตุของโรคไข้เลือดออกได้ 65.6% โดยพบว่าการฉีดวัคซีนจะให้ประสิทธิภาพที่ดีเมื่อฉีดให้กับบุคคลที่เคยติดเชื้อไวรัสเดงกีมาก่อน อย่างไรก็ตาม วัคซีนสามารถใช้ได้ในผู้ป่วยที่อยู่ในช่วง 9-45 ปีเท่านั้น [3] สำหรับเด็กเล็กและบุคคลที่ไม่เคยติดเชื้อไวรัสเดงกีมาก่อน โดยมีความเสี่ยงสูงในการรับวัคซีน เนื่องจากการรับวัคซีนนี้อาจเป็นสาเหตุของความรุนแรงของโรคโดยการติดเชื้อไวรัสเดงกีซ้ำ ที่ก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคด้วยกระบวนการ Antibody dependent enhancement (ADE) [4] นอกจากนี้วัคซีนยังคงอยู่ในขั้นศึกษาผลข้างเคียงที่อาจจะเกิดได้ เช่น อาการปวดศีรษะ มีไข้ อ่อนเพลีย ปวดบริเวณที่ได้รับการฉีดต่อไป รวมถึงงานวิจัยของ Pandey และ Medlock, 2014 กล่าวว่าวัคซีนที่มีประสิทธิภาพที่ไม่สูงพอ อาจทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนของไวรัสในผู้ป่วยมากกว่าช่วงก่อนการใช้วัคซีนอีกด้วย และต้องใช้เวลามากถึง 15 ปีในการลดจำนวนของผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกได้อย่างแท้จริง [5] รวมถึงการค้นพบไวรัสเดงกีซีโรไทป์-5 [6, 7] ยังไม่มีการศึกษาว่าให้ผลครอบคลุมด้วยหรือไม่ ดังนั้นการศึกษาเพื่อหายาด้านไวรัสจึงมีความจำเป็นในปัจจุบัน

สารสกัดจากธรรมชาติ โดยเฉพาะพืชสมุนไพร พบว่ามีความปลอดภัยสูงและมีสารชีวภาพที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย จึงเป็นทางเลือกที่ดีในการใช้ศึกษาหาสารที่สามารถยับยั้งการติดเชื้อและยับยั้งการจำลองตัวของไวรัสเดงกี โดยในประเทศไทยและอินเดีย พืชสมุนไพรที่ใช้ทางการแพทย์ที่พบแพร่หลายและมีความสามารถทางชีวภาพที่โดดเด่น คือ ต้นระย่อมน้อย (*Rauwolfia*

serpentina) ต้นบอระเพ็ดพุงช้าง (*Stephania suberosa*) และว่านขี้มดลูก (*Curcuma comosa* Roxb.)

ในงานวิจัยนี้ สนใจสารบริสุทธิ์จากพืชทั้งสามชนิดข้างต้น เพื่อศึกษาหาประสิทธิภาพและกลไกที่น่าจะเกี่ยวข้องกับการยับยั้งไวรัสเดงกี โดยใช้วิธีการทดลองทางคอมพิวเตอร์ และทางห้องปฏิบัติการในเซลล์มะเร็งตับมนุษย์ต่อไป

1.1 วัตถุประสงค์การทดลอง

เพื่อหาความเข้มข้นสูงสุดของสารบริสุทธิ์ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับมนุษย์ (HepG2) และคัดเลือกกลุ่มสารบริสุทธิ์ที่มีประสิทธิภาพยับยั้งการจำลองตัวของไวรัสเดงกี พร้อมทั้งศึกษาช่วงการออกฤทธิ์ยับยั้งของสารบริสุทธิ์ในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนของไวรัสในระดับห้องปฏิบัติการ และศึกษาหาความน่าจะเป็นของประสิทธิภาพและรูปแบบการจับของสารบริสุทธิ์กับโปรตีนสิ่งหุ้มของไวรัสเดงกีซีโรไทป์-2 โดยใช้วิธีการทดลองทางคอมพิวเตอร์

บทที่ 2

ปริทัศน์วรรณกรรม

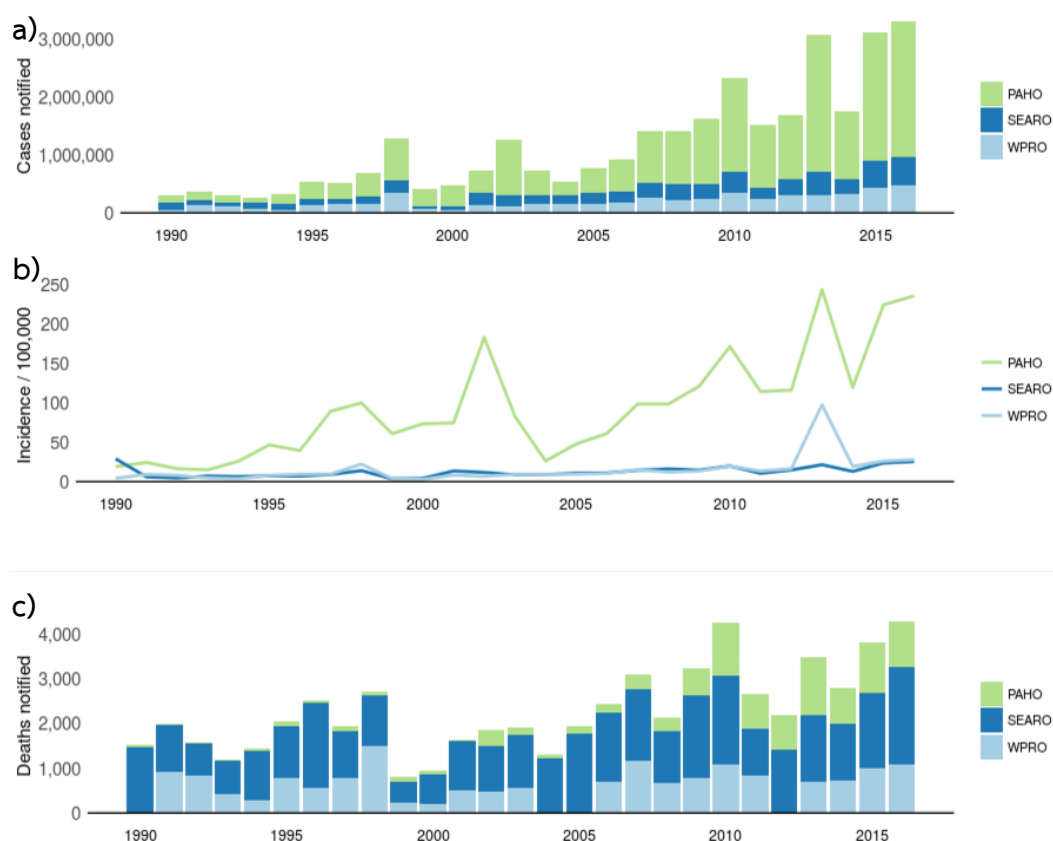
2.1 ความเป็นมาและสภาพปัญหา

โรคไข้เลือดออกเป็นโรคที่มีการแพร่ระบาดอย่างรวดเร็วในเขตภูมิอากาศร้อนชื้น (Tropical) และกึ่งร้อนชื้น (Subtropical) โดยมียุงลาย (*Aedes spp.*) เป็นพาหะ องค์การอนามัยโลก หรือ World Health Organization (WHO) รายงานว่าในช่วง 50 ปีที่ผ่านมา มีการเพิ่มจำนวนพื้นที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อไวรัสเดงกีมากถึง 30 เท่า (รูปที่ 1) มีประชากรอาศัยในพื้นที่เสี่ยงกว่า 2,500 ล้านคน โดยมีจำนวนผู้ติดเชื้อกว่า 50-100 ล้านคนต่อปี [1, 2]



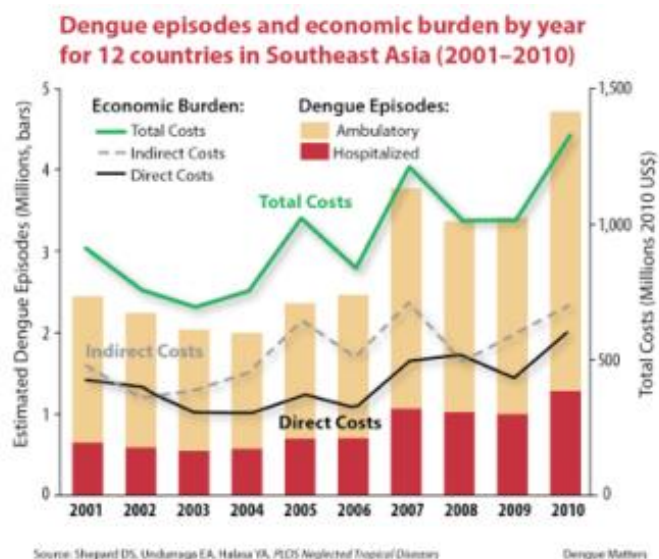
รูปที่ 1 แสดงพื้นที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อไวรัสเดงกี ปี ค.ศ. 2013^[8]

จากรูปที่ 2 แสดงให้เห็นถึงแนวโน้มของจำนวนผู้ป่วยและผู้เสียชีวิตที่เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1990 จนถึงปี ค.ศ. 2016 และยังมีรายงานพบอีกว่า ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งรวมถึงประเทศไทยนั้น มีแนวโน้มค่าใช้จ่ายในการรักษาโรคไข้เลือดออกมากขึ้นเรื่อย ๆ อีกด้วย (รูปที่ 3)



รูปที่ 2 แสดงจำนวนผู้ป่วยและผู้เสียชีวิตจากโรคไข้เลือดออก ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1990 – 2016 จาก Pan American Sanitary Bureau/Regional Office for the Americas (PAHO), Regional Office for South East Asia (SEARO) และ Regional Office for the Western Pacific (WPRO) ^[9]

- จำนวนผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกเดงกี
- จำนวนผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกเดงกีต่อ 100,000 คน
- จำนวนผู้เสียชีวิตจากโรคไข้เลือดออก



รูปที่ 3 แสดงค่าใช้จ่ายในการรักษาผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ตั้งแต่ปี ค.ศ. 2001 – 2010^[10]

ในขณะที่รายงานจำนวนผู้ป่วยในประเทศไทยมีแนวโน้มที่ไม่คงที่ อย่างไรก็ตาม พบว่าอัตราป่วยตายของโรคไข้เลือดออกยังมีมากขึ้น (รูปที่ 4) ปัจจุบันยังไม่มียาที่มีประสิทธิภาพในการรักษาโรคไข้เลือดออก และแม้จะค้นพบวัคซีนไข้เลือดออกแล้ว แต่ก็ยังพบว่าประสิทธิภาพของวัคซีนยังไม่ดีมากนัก และไม่ครอบคลุมทุกช่วงอายุของผู้รับวัคซีน ดังนั้นการหาแนวทางเพื่อรักษาและป้องกันโรคไข้เลือดออกจึงมีความสำคัญในปัจจุบัน

	2560	2559	2558	2557	2556	2555
ป่วย (ราย)	12,670	18,337	21,232	9,698	47,189	14,952
ตาย (ราย)	23	16	11	5	44	8
อัตราป่วยต่อแสน	19.37	28.03	32.60	14.93	73.65	23.27
อัตราป่วยตาย(%)	0.18	0.09	0.05	0.05	0.09	0.05

ณ ช่วงเวลาเดียวกัน ปี 2560 มีรายงานผู้ป่วยน้อยกว่าปี 2559 ร้อยละ 30.90 (0.69 เท่า) เพิ่มขึ้นจากสัปดาห์ที่ผ่านมา 873 ราย

รูปที่ 4 แสดงจำนวนผู้ป่วยและผู้เสียชีวิตจากโรคไข้เลือดออกในประเทศไทย ตั้งแต่ปีพ.ศ. 2555 – 2560^[11]

2.2 สาเหตุของโรคไข้เลือดออก

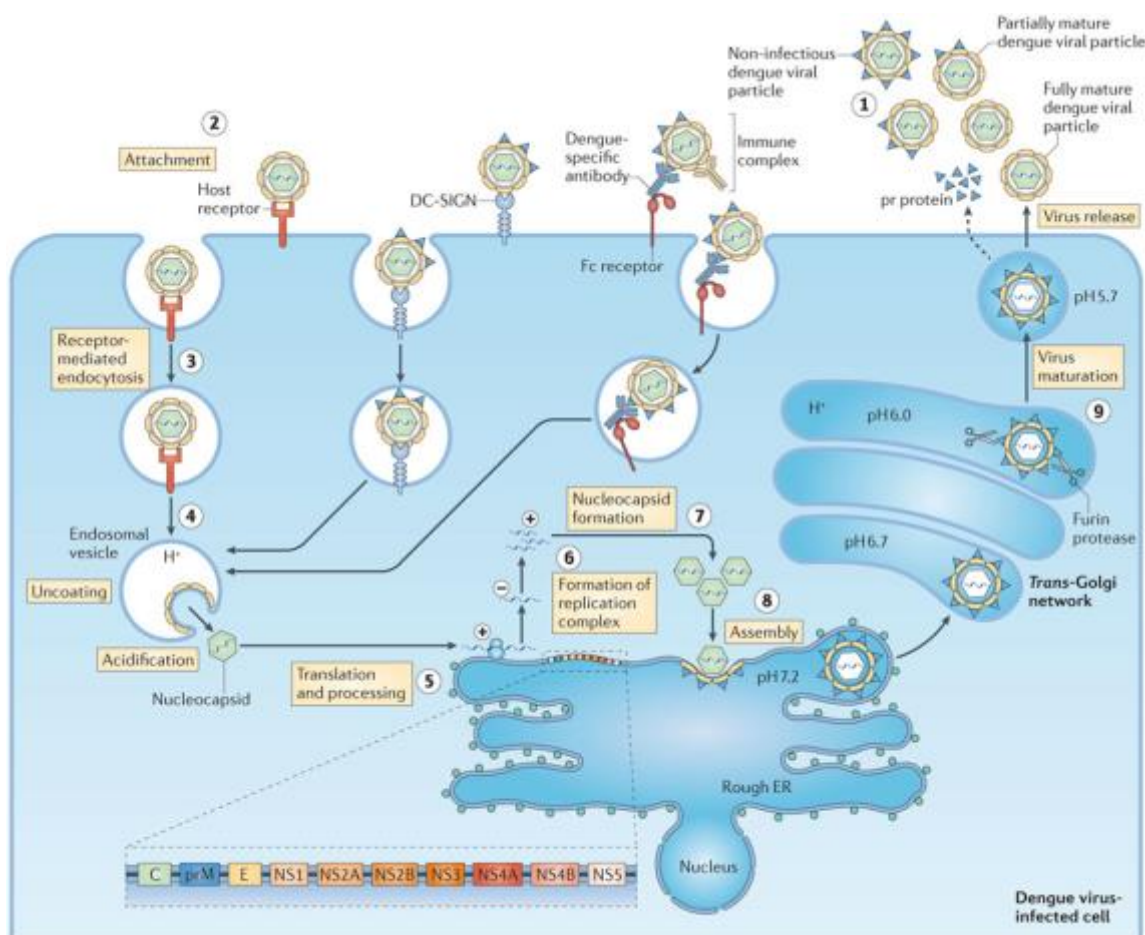
โรคไข้เลือดออกเกิดจากไวรัสเดงกี ซึ่งเป็นไวรัสที่อยู่ในสกุล *Flavivirus* วงศ์ *Flaviviridae* มีขนาดอนุภาคประมาณ 50 นาโนเมตร เป็นไวรัสที่มีเปลือกหุ้มทรงกลม (Spherical envelopes particles) ภายในบรรจุสารพันธุกรรมอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวแบบสายตรงชนิดบวก (Linear, positive single-stranded RNA) ความยาวประมาณ 10.7 กิโลเบส ปัจจุบันไวรัสเดงกีมีทั้งหมด 5 ซีโรไทป์ (ไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 1-5) [6, 7]

การเรียงตัวของยีนในจีโนมของไวรัสเดงกี แบ่งเป็น 2 ส่วนใหญ่ คือ

- 1.) โปรตีนโครงสร้าง (Structural proteins) ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ
 - โปรตีนห่อหุ้ม (Capsid protein; C) โปรตีนเยื่อหุ้ม (Membrane protein; M) และโปรตีนสิ่งหุ้ม (Envelope protein; E)
- 2.) โปรตีนที่ไม่ใช่โครงสร้าง (Non-structural protein) ประกอบด้วย
 - โปรตีน NS1 NS2A NS2B NS3 NS4A NS4B และ NS5

วงจรการเพิ่มจำนวนของไวรัสเดงกี ดังแสดงในรูปที่ 5 เริ่มต้นจาก ไวรัสเดงกีจับกับตัวรับ (Receptor) ที่จำเพาะบนเซลล์เป้าหมาย (2) เช่น heparan sulfate dendritic cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin (DC-SIGN หรือ CD209) heat shock protein 70 กิโลดาลตัน (HSP70) HSP90 mannose receptor CD14 T cell immunoglobulin and mucin domains (TIMs หรือ HAVCRs) TAM receptor protein tyrosine kinases และ laminin เป็นต้น แล้วเข้าสู่เซลล์ด้วยวิธีการนำสารเข้าสู่เซลล์โดยอาศัยตัวรับ (Receptor-mediated endocytosis) เกิดเป็นโครงสร้างเอนโดโซม (Endosome) (3) ภายในเซลล์ เมื่อภายในเอนโดโซมมีสถานะเป็นกรดจะทำให้โครงสร้างโปรตีนสิ่งหุ้มเปลี่ยนแปลงไปจนอาร์เอ็นเอจีโนมของไวรัสหลุดออกจากเอนโดโซม (Uncoat) (4) หลังจากนั้นอาร์เอ็นเอสายบวกของไวรัสที่หลุดออกมาจะเกิดการแปลรหัส (Translation) เป็นโปรตีนสำคัญต่าง ๆ (5) ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนของไวรัส และสร้างอาร์เอ็นเอสายลบขึ้น (6) เพื่อเป็นต้นแบบในการเพิ่มจำนวนอาร์เอ็นเอสายบวกต่อไปที่บริเวณเยื่อหุ้มเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (Endoplasmic reticulum derived membrane; ER) โดยโปรตีนและสายอาร์เอ็นเอที่สร้างได้นั้นจะเกิดการรวมตัว (Assembly) (7-8) ที่บริเวณเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมเกิดเป็นไวรัสที่ไม่สมบูรณ์ (Immature virus) และเคลื่อนที่เข้าสู่ trans-Golgi network (TGN) และเมื่อมี

สภาวะเป็นกรด จะมีเอนไซม์ฟูริน (furin protease) มาตัด Pre-membrane (prM) ให้กลายเป็นไวรัสตัวเต็มวัย (Mature form) (9) ที่บริเวณกอลจิ (Golgi) จากนั้นไวรัสก็จะหลุดออกจากเซลล์และติดเชื้อในเซลล์อื่นต่อไป [12]



Nature Reviews | Immunology

รูปที่ 5 แสดงวงจรการเพิ่มจำนวนของไวรัสเดงกี^[12]

2.3 อาการของโรคไข้เลือดออก

แบ่งความรุนแรงของโรคได้ 2 ชนิด คือ

2.3.1 Asymptomatic ผู้ติดเชื้อจะไม่แสดงอาการใด ๆ แม้ติดเชื้อไวรัสเดงกีก็ตาม โดยพบประมาณ 90% ของผู้ติดเชื้อทั้งหมด

2.3.2 Symptomatic ผู้ติดเชื้อจะแสดงอาการของโรคไข้เลือดออก โดยแบ่งความรุนแรงออกเป็น 3 ระดับ คือ

1. Undifferentiated fever (UF) ผู้ติดเชื้อจะมีอาการไข้สูง ปวดเมื่อยตามร่างกาย คล้ายโรคหวัดทั่วไป จะแสดงอาการประมาณ 2-3 วัน และจะหายได้เอง
2. Dengue fever (DF) ผู้ติดเชื้อจะมีอาการไข้สูงสลับไข้ต่ำ ปวดศีรษะ กระบอกตา และกล้ามเนื้อตามส่วนต่างๆของร่างกาย บางครั้งอาจรุนแรงถึงขั้นปวดลึกถึงกระดูก และข้อ (จึงเรียกโรคไข้เลือดออกอีกชื่อว่า Break bone fever) ผู้ติดเชื้อบางรายอาจแสดงอาการผื่นแบบ maculopapular ซึ่งมักพบในผู้ใหญ่มากกว่าเด็ก
3. Dengue hemorrhagic fever (DHF) ผู้ติดเชื้อในกลุ่มนี้จะแสดงอาการของโรครุนแรงชัดเจน คือ มีไข้สูงลอย ตับโต ปวดท้อง อาเจียน กระสับกระส่าย ตัวและมือเท้าเย็น เหงื่อออก ปัสสาวะออกน้อย ชีพจรเต้นเบาแต่เร็ว ความดันต่ำ มีอาการเลือดออก เลือดกำเดาไหล อาเจียนเป็นเลือด อูจจาระเป็นเลือด เกิดการรั่วของพลาสมาในบริเวณช่องปอดและช่องท้อง ระดับฮีมาโตคริตเพิ่มสูงขึ้น หากมีการรั่วไหลของพลาสมามากอาจทำให้ผู้ป่วยเกิดอาการช็อคจนเป็นอันตรายถึงชีวิตได้ (Dengue shock syndrome; DSS) หากไม่ได้รับการรักษาอย่างทันที่หวังที่อาจก่อให้เกิดอันตรายถึงชีวิต [13-15]

2.4 แนวทางการรักษาโรคไข้เลือดออก

เนื่องจากปัจจุบันยังไม่มียาด้านไวรัสเดงกี การรักษาจึงเป็นการรักษาตามอาการเพื่อระดับประคองไม่ให้อาการของโรครุนแรงยิ่งขึ้นเท่านั้น โดยในระยะแรกผู้ป่วยอาจมีอาการไม่ชัดเจนสามารถรักษาได้โดยการนอนพักผ่อนและดื่มน้ำให้เพียงพอ เช็ดตัวเพื่อลดอาการไข้สูง หลีกเลี่ยงการ

ใช้ยาโดยไม่จำเป็น และเฝ้าสังเกตอาการอย่างใกล้ชิดต่อไป หากผู้ป่วยมีอาการรุนแรงมากขึ้น ควรรีบเข้าพบแพทย์อย่างทันที [13, 14]

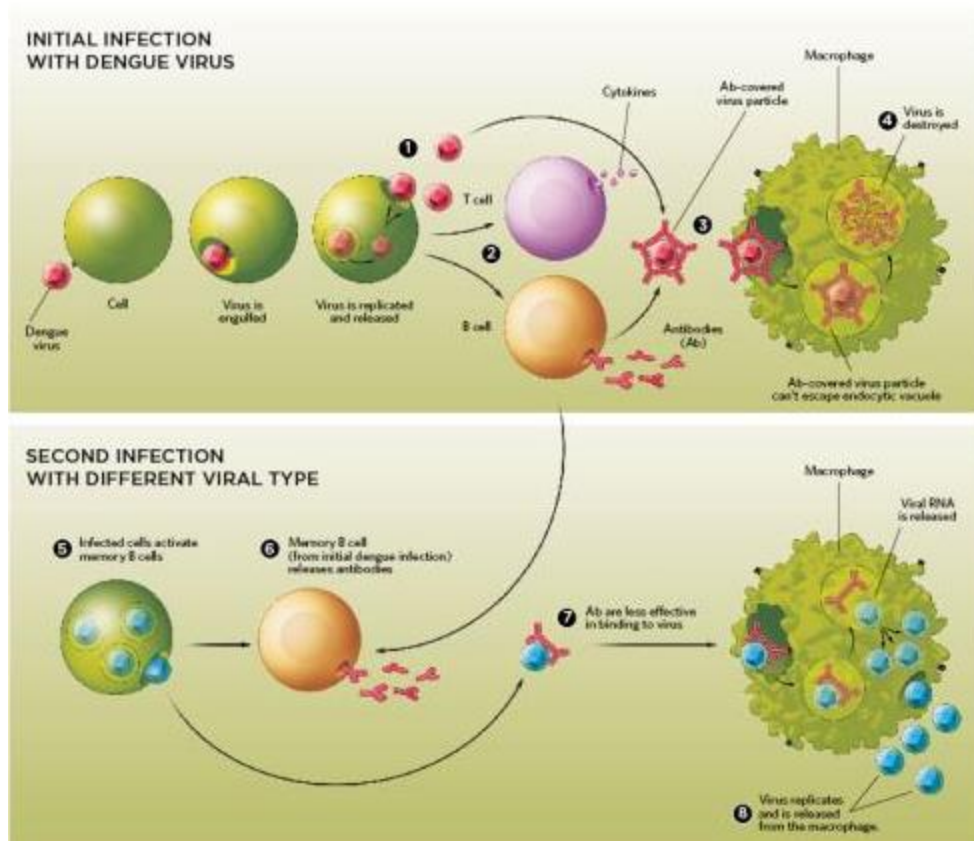
2.5 การติดต่อของโรคไข้เลือดออก

โรคไข้เลือดออกที่เกิดจากไวรัสเดงกีนั้น ติดต่อโดยอาศัยยุงลาย (*Aedes spp.*) เป็นพาหะ พบมากในเขตภูมิอากาศร้อนชื้น (Tropical) และกึ่งร้อนชื้น (Subtropical) เนื่องจากเป็นสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของยุง โดยยุงที่มีบทบาทสำคัญในการแพร่เชื้อ คือ ยุงลายตัวเมีย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) มีอิทธิพลในการแพร่เชื้อไวรัสเดงกีมากที่สุด เนื่องจากยุงชอบกินเลือดมนุษย์เป็นอาหาร เมื่อยุงลายตัวเมื่อกัดผู้ป่วยที่ติดเชื้อ ไวรัสจะเข้าสู่ตัวยุง และเพิ่มจำนวนภายใน 8-12 วัน หลังจากนั้นไวรัสจะมากพอจนสามารถแพร่เข้าสู่มนุษย์ได้ขณะยุงกินเลือดมนุษย์เป็นอาหาร จากการศึกษาพบว่าสภาวะแวดล้อมภายนอกส่งผลอย่างมากต่อเวลาการเพิ่มจำนวนของไวรัส ซึ่งรวมถึงสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ (Environment) ปัจจัยเกี่ยวกับภูมิอากาศ (Climate factors) ปฏิสัมพันธ์ของเชื้อและเซลล์เป้าหมาย (Host-pathogen interaction) และปัจจัยด้านภูมิคุ้มกัน (Immunological factors) ดังนั้นจึงไม่สามารถระบุได้ชัดเจนเกี่ยวกับการแพร่ระบาดของโรคไข้เลือดออกได้

2.6 พยาธิกำเนิดของโรคไข้เลือดออก

โรคไข้เลือดออกเป็นโรคที่มีการก่อโรคแตกต่างจากโรคการติดเชื้อไวรัสอื่น ๆ กล่าวคือการติดเชื้อครั้งแรกจะก่อให้เกิดอาการเหมือนการติดเชื้อไวรัสทั่ว ๆ ไป ที่ก่อให้เกิดไข้หรืออาจไม่แสดงอาการ แต่การติดเชื้อไวรัสเดงกีซ้ำครั้งต่อไปด้วยไวรัสเดงกีคนละซีโรไทป์ (Serotype) จะทำให้ความรุนแรงของโรคเพิ่มมากขึ้น เป็นโรคไข้เลือดออกชนิดรุนแรง (Dengue hemorrhagic fever และ Dengue shock syndrome) โดยผ่านกลไก Antibody dependent enhancement (ADE) กล่าวคือ ในการติดเชื้อครั้งแรกนั้นจะมีการกระตุ้นทีเซลล์ (T-cell) ให้เกิดการสร้าง pro-inflammatory cytokines และกระตุ้นบีเซลล์ (B-cell) ให้เกิดการสร้างแอนติบอดี (Antibody) ต่อเชื้อไวรัสเดงกี จากนั้นแอนติบอดีจะถูกผลิตออกไปจับเชื้อไวรัสและถูกชกนำมาทำลายที่เซลล์แมคโครฟาจ (Macrophage) และโมโนไซต์ (Monocytes) โดยที่ไวรัสไม่สามารถหลบหนีจากเซลล์ได้ จึงทำลายเชื้อไวรัสออกไป

กรณีที่เกิดการติดเชื้อซ้ำด้วยไวรัสซีโรไทป์อื่น บีเซลล์เมมเมอรี (Memory B-cells) จะถูกกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดีต่อซีโรไทป์ที่ติดเชื้อครั้งแรกอีกครั้ง เนื่องจากโครงสร้างของไวรัสมีลักษณะคล้ายคลึงกันมาก ส่งผลให้แอนติบอดีที่ถูกสร้างออกมาไม่สามารถจับกับเชื้อไวรัสได้อย่างจำเพาะพอที่จะถูกนำไปทำลายด้วยเซลล์แมคโครฟาจและโมโนไซต์ แต่กลับนำไวรัสเด็งกีซีโรไทป์ใหม่เข้าสู่เซลล์แมคโครฟาจและโมโนไซต์ และเกิดการจำลองตัวเองของไวรัสในเซลล์ดังกล่าว ส่งผลให้มีการเพิ่มจำนวนไวรัสแทน [4, 16, 17] (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 แสดงกลไกการเกิด Antibody-Dependent Enhanced (ADE) Immunity^[16]

อย่างไรก็ตาม การติดเชื้ออาจไม่ได้ก่อให้เกิดโรคไข้เลือดออกชนิดรุนแรงทุกครั้ง ทั้งนี้เนื่องจากปัจจัยที่สำคัญ 2 ประการ คือ

2.6.1 ปัจจัยจากเชื้อไวรัส

- จำนวนของไวรัส; ปริมาณไวรัสมาก ยิ่งส่งผลให้มีการติดเชื้อไวรัสมากขึ้น ก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคมามากขึ้น [18]
- ซีโรไทป์ของไวรัส; มีการศึกษาพบว่าสายพันธุ์ที่มีการแพร่ระบาดในภูมิภาคเอเซียนั้น ก่อความรุนแรงมากกว่าสายพันธุ์ทางอเมริกา [19]

2.6.2 ปัจจัยจากผู้รับเชื้อ

เพศ อายุ เชื้อชาติ พันธุกรรม ภาวะโภชนาการ ต่างมีผลต่อความรุนแรงของโรค พบว่าเด็ก ผู้หญิง และผู้ที่มีสภาวะโภชนาการที่ดี มีโอกาสเกิดความรุนแรงของโรคมามากกว่า รวมทั้งคนผิวดำที่มีโอกาสเกิดความรุนแรงมากกว่าคนผิวดำ [20] และความรุนแรงของโรคจะสูงกว่าในผู้มียีน Human leukocyte antigen (HLA) เมื่อเทียบกับผู้ที่ไม่มียีน HLA เนื่องจากไวรัสเดงกีมีอีพิโทป (Epitope) ที่จำเพาะต่อยีน HLA จึงสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันทำให้โรคเกิดความรุนแรงเพิ่มขึ้น [21]

2.7 วัคซีนโรคไข้เลือดออก

วัคซีน Dengvaxia[®] เป็นวัคซีนโรคไข้เลือดออก ซึ่งมีลักษณะเป็นเชื้อเป็นชนิดผงต้องนำมาละลายก่อนใช้ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.4% ที่ปราศจากเชื้อสำหรับยาที่ใช้ได้ครั้งเดียว (Single-dose) และละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9% ที่ปราศจากเชื้อสำหรับยาที่ใช้ได้หลายครั้ง (Multi-dose; 5 dose) การฉีดจะฉีดวัคซีนที่ผ่านการละลายปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรบริเวณใต้ผิวหนัง [22] จากการศึกษาพบว่าวัคซีนสามารถให้ผลครอบคลุมไวรัสเดงกีทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยมีการศึกษาผลของวัคซีนในมนุษย์ทั้งหมด 3 ครั้ง โดยครั้งแรกทำการศึกษาค้นคว้าผลของวัคซีนไข้เลือดออกในเฟส 2b ในช่วงเดือน กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2552 ถึงเดือน กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2553 ที่จังหวัดราชบุรี ในกลุ่มเด็กไทยที่มีร่างกายแข็งแรงในช่วงอายุ 4-11 ปี จำนวน 4,002 คน การฉีดวัคซีนจะฉีดทั้งหมด 3 เข็ม ห่างกันทุก 6 เดือน โดยพบว่าประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยรวมเมื่อฉีดครบ 3 เข็ม มีค่าเท่ากับ 30.2% ซึ่งถือว่าต่ำมาก โดยสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันสำหรับไวรัสเดงกีซีโรไทป์-1 -3 และ -4 ได้เท่ากับ 55.6% 75.3% และ 100% ตามลำดับ สำหรับไวรัสเดงกีซีโรไทป์-2 นั้น สามารถกระตุ้น

ภูมิคุ้มกันได้เพียง 9.2% ซึ่งเป็นซีโรไทป์ที่พบบ่อยในประเทศไทย จึงมีความเสี่ยงที่การรับวัคซีนจะก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคมากขึ้นในประเทศไทย [23]

การศึกษารอบที่ 2 ศึกษาผลของวัคซีนไข้เลือดออกเฟส 3 ครั้งที่ 1 ในช่วงเดือนมิถุนายน ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2554 โดยทดสอบในประเทศ 5 ประเทศแถบเอเชีย คือ ไทย อินโดนีเซีย มาเลเซีย ฟิลิปปินส์ และเวียดนาม ในเด็กอายุ 2-14 ปี จำนวน 10,275 คน พบว่าวัคซีนมีประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยรวมที่ 56.5% และมีประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันสูงขึ้นในเด็กที่มีอายุมากขึ้น โดยค่าประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของวัคซีนในเด็กอายุ 12-14 ปี มีค่า 74% เด็กอายุ 6-11 ปี มีค่า 60% และในกลุ่มเด็กอายุ 2-5 ปี มีค่าเพียง 34% ซึ่งถือว่าน้อยเกินไป ประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของวัคซีนเมื่อพิจารณาในแต่ละซีโรไทป์พบว่า วัคซีนให้ผลดีสำหรับไวรัสแดงกึ่งซีโรไทป์-3 และ -4 ที่ 75% ให้ผลปานกลางสำหรับไวรัสแดงกึ่งซีโรไทป์-1 ที่ 50% และให้ผลน้อยสำหรับไวรัสแดงกึ่งซีโรไทป์-2 ที่ 35% แต่ผลของวัคซีนกลับให้ผลดีในการลดจำนวนผู้ป่วยหนัก (DHF) ถึง 88.5% และลดผู้ป่วยนอนโรงพยาบาลได้ 67.2% ผลการศึกษาสรุปว่า วัคซีนไข้เลือดออกจะช่วยกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันสำหรับผู้ที่มีภูมิต้านทานแล้วได้ดีกว่าผู้ที่ไม่เคยมีภูมิต้านทาน และแม้จะพบผลของวัคซีนต่อไวรัสแดงกึ่งซีโรไทป์-2 ที่เพิ่มขึ้น แต่ก็ถือว่ายังน้อยและเสี่ยงต่อการก่อความรุนแรง รวมถึงข้อสังเกตที่ว่า การศึกษาผลของไวรัสแดงกึ่งซีโรไทป์-2 ในเฟส 3 ครั้งที่ 1 มีน้อยกว่าในเฟส 2b จึงอาจเป็นผลทำให้ประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของวัคซีนโดยรวมมีค่าเพิ่มขึ้นได้ [3]

การศึกษารอบที่ 3 ศึกษาผลของวัคซีนไข้เลือดออกเฟสที่ 3 ครั้งที่ 2 ในช่วงเดือน มิถุนายน พ.ศ. 2554 ถึงเดือน มีนาคม พ.ศ. 2555 โดยทดสอบใน 5 ประเทศแถบละตินอเมริกา คือ บราซิล โคลัมเบีย ฮอนดูรัส เม็กซิโก และเปอร์โตริโก ในเด็กอายุ 9-16 ปี จำนวน 20,869 คน พบว่าวัคซีนมีประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยรวมที่ 60.8% โดยมีประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของวัคซีนต่อไวรัสแดงกึ่งซีโรไทป์-4 -3 และ -1 ที่ 77.7% 74% และ 50.3% ตามลำดับ โดยให้ผลน้อยที่สุดในไวรัสแดงกึ่งซีโรไทป์-2 ที่ 42.3% แต่สามารถลดจำนวนผู้ป่วยหนัก (DHF) ได้ถึง 90% และลดผู้ป่วยนอนโรงพยาบาลได้ 80.3% โดยประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของวัคซีนจะดีขึ้นเมื่อฉีดให้กับผู้ที่เคยมีภูมิต้านทานมาก่อนซึ่งสอดคล้องกับการทดลองในเฟส 3 ครั้งที่ 1 อีกทั้งยังพบว่าการฉีดวัคซีนเพียงเข็มเดียวให้ผลเท่ากับการฉีดวัคซีนครบ 3 เข็มอีกด้วย แต่อาจเกิดเนื่องจากผู้รับวัคซีนในกลุ่มทดสอบเคยมีการติดเชื้อไวรัสแดงกึ่งซีโรไทป์มาก่อนถึง 79% [24]

สรุปผลการศึกษาทั้งหมดพบว่าประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของวัคซีนไข้เลือดออก ยังอยู่ในเกณฑ์ปานกลางคือ 56.5% และ 60.8% (เฟส 3 ครั้งที่ 1/เฟส 3 ครั้งที่ 2) แต่ให้ผลดีในการลดจำนวนผู้ป่วยหนักที่ 88.5% และ 90% (เฟส 3 ครั้งที่ 1/เฟส 3 ครั้งที่ 2) และผู้ป่วยนอนโรงพยาบาลที่ 67.2% และ 80.3% (เฟส 3 ครั้งที่ 1/เฟส 3 ครั้งที่ 2) แต่อย่างไรก็ตามการให้วัคซีนจะให้ผลดีในผู้ที่เคยติดเชื้อไวรัสเดงกีมาก่อน และให้ผลดีในเด็กโตมากกว่าเด็กเล็ก จึงไม่เหมาะในผู้ป่วยที่มีอายุน้อยกว่า 9 ปี และประชากรในพื้นที่ที่ไม่มีการแพร่ระบาด รวมถึงการฉีดวัคซีนเพื่อป้องกันโรคในการเดินทาง

โดยวัคซีนชนิดนี้ในประเทศไทยได้ประกาศแล้วว่าสามารถใช้ได้ในผู้ที่มีอายุ 9-45 ปี แต่อย่างไรก็ตามการฉีดวัคซีนยังมีข้อจำกัดหลาย ๆ ประการ เช่น ราคาวัคซีนที่ค่อนข้างสูง และการศึกษายังแนะนำให้ใช้ในผู้ที่มีช่วงอายุ 9-45 ปีเท่านั้น โดยการให้วัคซีนแก่เด็กที่อายุต่ำกว่า 9 ปีนั้นให้ผลไม่ดีนักในการศึกษาที่ผ่านมา และต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเนื่องจากมีโอกาสที่เด็กยังไม่เคยติดเชื้อมาก่อนค่อนข้างสูง การฉีดวัคซีนจึงอาจก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคได้ จึงไม่แนะนำให้ใช้กับผู้ที่มีอายุน้อยกว่า 9 ปี สำหรับผู้ที่มีอายุในช่วง 18-45 ปีนั้น แม้จะไม่มีผลการศึกษาจากการรับวัคซีนโดยตรง แต่มีการศึกษาทางด้านภูมิคุ้มกัน (Immunogenicity) ในทางคลินิก ตามทฤษฎีจึงกล่าวได้ว่าผู้ที่มีอายุระหว่าง 18-45 ปี น่าจะเป็นกลุ่มที่ได้รับวัคซีนได้ ในขณะที่ผู้ใหญ่อายุมากกว่า 45 ปี ยังไม่มีการศึกษาทำให้มีข้อมูลไม่เพียงพอ จึงยังไม่แนะนำให้รับวัคซีน เนื่องจากยังไม่รู้ถึงประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและความปลอดภัยจากการรับวัคซีน [22, 25]

มีงานวิจัยผลการคำนวณทางคณิตศาสตร์เกี่ยวกับปัจจัยด้านการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสเดงกีโดย Pandey และ Medlock (2015) พบว่าการฉีดวัคซีนที่มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันไม่สูงพอ อาจทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนของผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกสูงขึ้นมากเมื่อเทียบกับช่วงก่อนได้รับวัคซีน โดยต้องใช้เวลามากถึง 15 ปี จึงจะสามารถลดจำนวนของผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกลงอย่างแท้จริง [5] รวมถึงการค้นพบไวรัสเดงกีซีโรไทป์-5 ชนิดใหม่ [6, 7] ซึ่งยังไม่มีการศึกษาว่าให้ผลครอบคลุมด้วยหรือไม่ ดังนั้นการศึกษาเพื่อหายาด้านไวรัสเดงกีหรือยารักษาโรคไข้เลือดออก ยังมีความจำเป็นในปัจจุบัน

2.8 สารสกัดจากธรรมชาติ

ปัจจุบัน มีจำนวนประชากรเพิ่มสูงขึ้น ก่อให้เกิดความต้องการการรักษาโรคที่สูงขึ้นตามไปด้วย ในขณะที่ยาที่มีในปัจจุบันเริ่มมีฤทธิ์ในการรักษาน้อยลง เนื่องจากการกลายพันธุ์ของจุลินทรีย์ทำให้เชื้อก่อโรคเกิดการดื้อต่อยารักษาโรคและมีผลข้างเคียงเป็นมากขึ้น การใช้พืชสมุนไพรธรรมชาติ จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่ดีและปลอดภัย ตัวอย่างเช่นในประเทศอินเดียมีการนำพืชสมุนไพรหลายชนิดมาใช้ในการรักษาโรคต่าง ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งพืชสมุนไพรต่าง ๆ นั้นมีสารเคมีเป็นองค์ประกอบหลายชนิด อาทิ อัลคาลอยด์ (Alkaloids) กลูโคไซด์ (Glycosides) น้ำมันหอมระเหย (Volatile oils) กรดไขมัน (Fatty acids) เรซิน (Resins) กัม (Gums) และ แทนนิน (Tannin) ซึ่งสามารถใช้ในการรักษาโรคได้หลากหลาย [26, 27]

งานวิจัยก่อนหน้ามีการค้นพบสารยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสเดงกีมากมาย อาทิ อนุพันธ์ 2,4-diaminoquinazoline [28], adenosine analog [29], doxorubicin [30], อนุพันธ์ของ 8-hydroxyquinoline ที่มี aminobenzothiazole [31], amodiaquine (antimalarial drug) [32] แต่อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีสารชนิดใดที่สามารถนำมาใช้ในการทดสอบทางคลินิกได้ (Clinical trial)

ต้นระย่อน้อย (*Rauwolfia serpentina*) เป็นพืชที่มีความสำคัญทางการแพทย์อีกชนิดหนึ่ง ปัจจุบันพบสารชีวภาพที่สกัดได้จากต้นระย่อน้อยหลายชนิด เช่น Alkaloids Reserpine Ajmalicine Serpentine Ajmaline Rescinnamine Deserpidine Yohimbine Phenols Tannins Flavonoids Saponins เป็นต้น ต้นระย่อน้อยจึงมีฤทธิ์ทางชีวภาพมากมาย อาทิ ช่วยลดความดันโลหิตสูง รักษาอาการนอนไม่หลับ กระตุ้นการทำงานของระบบหลอดเลือดหัวใจ รักษาโรคทางระบบประสาท รักษาโรคหัวใจขาดเลือด โรคระบบทางเดินอาหาร ท้องเสีย โรคบิด ช่วยกระตุ้นการทำงานของกล้ามเนื้อเรียบ และป้องกันการเกิดโรคหลอดเลือดในสมอง (Strokes) เป็นต้น [33-36]

ต้นบอระเพ็ดพุงช้าง (*Stephania suberosa*) พบว่ามีสารชีวภาพหลายชนิดเป็นส่วนประกอบ เช่น Cepharanthine Norcepharanthine Stephasubine Tephabine Stephnubine Discretine Coresimine เป็นต้น จึงพบฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิดเช่นกัน ทั้งความสามารถในการยับยั้ง *Streptococcus pyogenes* *Streptococcus mutans* *Streptococcus mitis* การต้านการดื้อยาหลายชนิดของเซลล์มะเร็ง (Multidrug resistance-reversing effect) ฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง การกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์แบบ Apoptosis (Apoptosis-

inducing) ฤทธิ์ต้านการอักเสบ การยับยั้งเชื้อ HIV-1 ฤทธิ์ต้านอาการภูมิแพ้ (Anti-allergic) และการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Immunomodulatory effect) เป็นต้น [37-41]

พืชอีกชนิดที่มีความสำคัญโดยนำมาใช้ทางการแพทย์ของไทยและอินเดียอย่างแพร่หลาย คือ ว่านชั้กมดลูก (*Curcuma comosa* Roxb.) ซึ่งมีคุณสมบัติทางการแพทย์มากมาย อาทิ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ รักษาภาวะเลือดออกหลังวัยหมดระดู มดลูกอักเสบ เพิ่มการเรียนรู้และการจำในหนู [42] ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ [43] การสูญเสียมวลกระดูกในหนู [44] ซึ่งสารสกัดส่วนใหญ่ที่ได้จากต้นว่านชั้กมดลูกจะมีโครงสร้างหลักเป็น Diarylheptanoids [45] ซึ่ง Curcumin เป็นสารที่มีโครงสร้างหลักเป็น Diarylheptanoids คล้ายกันที่พบในต้นว่านชั้กมดลูก และมีการศึกษาพบว่า Curcumin มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลาย อาทิ ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง [46, 47] การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ [48] ช่วยลดการเกิดอัลไซเมอร์ (Anti-Alzheimer activities) [49] ยับยั้งการเกิดโรคเบาหวาน (Anti-diabetic) [50] ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Anti-oxidant) การยับยั้งการอักเสบ (Anti-inflammatory) [51] การยับยั้งเชื้อรา (Anti-fungal) [52, 53] เป็นต้น อีกทั้งยังมีงานวิจัยพบว่า Curcumin สามารถยับยั้งไวรัสได้หลายชนิด ได้แก่ ยับยั้งการติดเชื้อ Influenza virus [54, 55] ยับยั้งการจับกับเซลล์เป้าหมายของ Zika virus และ Chikungunya virus [56] ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ Enterovirus [57] ยับยั้ง Phosphatidylinositol 3 kinase/Akt/Nuclear Factor-kB Pathway ใน Cocksackievirus B3 [58] down-regulation PGC-1 α ยับยั้ง Hepatitis B virus [59] กดการแสดงออกของ Akt-SREBP-1 pathway ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ Hepatitis C virus [60] ยับยั้งการแสดงออกของยีน p300/CBP histone acetyltransferase ใน Herpes simplex virus [61] ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ Human immunodeficiency virus [62] และ Norovirus [63] รวมถึงฤทธิ์ในการยับยั้งไวรัสเด็งกีได้อีกด้วย [64]

โดย Marbawati และ Umniyati (2015) พบว่าเมื่อใส่สาร Curcumin และ Pentagamavunon-0 (PGV-0; อนุพันธ์ของ curcumin) หลังติดเชื้อไวรัสในเซลล์ไลน์ของไตลิง (Vero cell) ที่ 1 และ 3 วันหลังการติดเชื้อ หลังจากนั้นตรวจสอบผลด้วยวิธี Immunocytochemistry พบว่าเมื่อใส่สารทั้งสองชนิดที่ 1 และ 3 วันหลังติดเชื้อ สามารถลดจำนวนไวรัสเด็งกีที่เกิดขึ้นได้เมื่อเทียบกับไม่ใส่สารโดยให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยยะสำคัญ และวัดผลด้วยวิธี Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) พบว่าไม่พบแถบดีเอ็นเอของของไวรัสเมื่อใส่สารทั้งสองชนิดที่ 1 วันหลังติดเชื้อ แต่พบแถบดีเอ็นเอของไวรัสเมื่อใส่สาร

Curcumin ที่ 3 วันหลังติดเชื้อ จึงสรุปผลได้ว่า สาร PGV-0 ให้ผลการยับยั้งที่ดีกว่า Curcumin แต่อย่างไรก็ตาม ก็ยังไม่สามารถระบุได้ว่า สาร Curcumin นั้นไปยับยั้งไวรัสแดงกี่ในรูปแบบใด [64]

2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Modis และคณะ (2003) [65] ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับโครงสร้างของโปรตีนสิ่งหุ้มของไวรัสแดงกี่ (DENV envelope) พบว่าเมื่อไวรัสอยู่ในสภาวะกรด โปรตีนสิ่งหุ้มของไวรัสจะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเป็นจาก Dimer เป็น Trimer ทำให้โปรตีนสิ่งหุ้มของไวรัสเกิดการรวมตัว (Fusion) กับโปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมาย เกิดการปลดปล่อยสารพันธุกรรมของไวรัส ออกมายังไซโตพลาสซึมของเซลล์ และนำไปสู่การเพิ่มจำนวนของไวรัสต่อไป ในการศึกษาวิจัยยังพบตำแหน่งสำคัญที่น่าจะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนโครงสร้างของโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัส นั่นคือบริเวณของ *n-octyl-β-D-glucoside (β-OG) binding site* ในโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัสแดงกี่ โดยพบว่าเมื่อมีสาร β -OG มาจับบริเวณ *binding site* นี้ จะส่งผลให้โครงสร้างของโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัสมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไป ทำให้ไวรัสไม่สามารถรวมตัวกับเยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมายจึงไม่สามารถปลดปล่อยสารพันธุกรรมออกมาสู่เซลล์ได้ *binding site* ของ β -OG ในโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัสแดงกี่ จึงน่าจะเป็นเป้าหมายที่สำคัญในการใช้ออกแบบยาหรือสารยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสแดงกี่ต่อไป [65, 66]

ดังนั้นในงานวิจัยนี้ มีความสนใจสารบริสุทธิ์จากพืชทั้งสามชนิด ได้แก่ ต้นระย่มน้อย (*Rauwolfia serpentina*) ต้นบอระเพ็ดพุงช้าง (*Stephania suberosa*) และว่านชักมดลูก (*Curcuma comosa* Roxb.) เพื่อหาความเข้มข้นสูงสุดของสารบริสุทธิ์ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับมนุษย์ (HepG2) และคัดเลือกสารบริสุทธิ์ที่มีประสิทธิภาพยับยั้งการจำลองตัวของไวรัสแดงกี่ พร้อมทั้งศึกษาช่วงการออกฤทธิ์ยับยั้งของสารบริสุทธิ์ในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนของไวรัสในระดับห้องปฏิบัติการ และศึกษาหาความน่าจะเป็นของประสิทธิภาพและรูปแบบการจับของสารบริสุทธิ์กับ *binding site* ของ β -OG ในโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัสแดงกี่ซีโรไทป์-2 โดยใช้วิธีการทดลองทางคอมพิวเตอร์

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์

1. กระจาดกรองแบบถ้วย (Filter upper cups) ขนาด 0.22 ไมโครเมตร บริษัท Guangzhou JET Bio-Filtration, China
2. กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (Inverted microscope) รุ่น CK2 บริษัท Olympus, Japan
3. เครื่องชั่งรุ่น PG2002-S บริษัท Mettler Toledo, US
4. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น ES-215 บริษัท TOMY Seiko, Japan
5. เครื่องปั๊มสุญญากาศ รุ่น DOA-P104-BN บริษัท Gast, US
6. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น 5702 บริษัท Eppendorf, Germany
7. เครื่องผสมสาร (Vortex) รุ่น ZX3 บริษัท VELP Scientifica, Italy
8. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance Reader) รุ่น ELx800 ของบริษัท Bio-Tex, US
9. จานเพาะเลี้ยงเซลล์ปลอดเชื้อ 6 24 และ 96 หลุม (6 24 และ 96 wells-plate) แบบ Non-Pyrogenic Polystyrene บริษัท Corning Incorporated, US
10. ตู้แช่แข็ง (Ultra-low temperature freezer) -86 องศาเซลเซียส รุ่น MDF-U71V Vip series -86 องศาเซลเซียส บริษัท SANYO Electric Biomedical, Japan
11. ตู้เลี้ยงเซลล์แบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ (Water jacketed CO₂ incubator) รุ่น Forma series ii 3111 บริษัท Thermo Scientific, US
12. ตู้ปลอดเชื้อ (Biosafety cabinet) รุ่น SC 12 R บริษัท Labcaire, UK
13. ตู้อบแห้ง (Hot air oven) รุ่น UE600 ของบริษัท Memmert, Germany
14. ทิปขนาด 10 200 และ 1,000 ไมโครลิตร รุ่น MultiFit™ Universal Fit Pipet Tips บริษัท Sorenson BioScience, US
15. ปิเปตอัตโนมัติ (Pipet controller) รุ่น Pipet-X Pipet Controller PX-100 บริษัท RAININ, Germany

16. ฟลาสก์เลี้ยงเซลล์ปลอดเชื้อ (Cell culture flasks) ขนาด 75 และ 175 ตารางเซนติเมตร รุ่น Nunclon Cell Culture Treated Polystyrene, Graduated With Angled Neck And Filter HDPE Cap บริษัท Thermo Scientific, US
17. ไมโครปิเปตต์ขนาด 10 20 200 และ 1,000 ไมโครลิตร รุ่น BioPette™ A Variable Volume Pipette w/ Tip Ejector บริษัท Labnet International, US
18. หลอดเก็บสารแช่เย็นปลอดเชื้อ (Cryogenic Vial) รุ่น Self Standing, Silicon Washer, Internal Thread, Marking Spot, Non-pyrogenic Polypropylene บริษัท Corning Incorporated, US
19. หลอดเหวี่ยงปั่นฟิวจ์ปลอดเชื้อ (Centrifuge tube) ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร รุ่น Medical Grade Polypropylene RNase-/DNase-free Nonpyrogenic บริษัท Corning Incorporated, US
20. หลอดไมโครเหวี่ยงปั่นฟิวจ์ (Microcentrifuge tube) ขนาด 1.7 ไมโครลิตร รุ่น Safeseal บริษัท Sorenson BioScience, US
21. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าได้ (Shaking Water Bath) รุ่น SW23 บริษัท Julabo, Germany
22. Accelrys Discovery Studio 2.5 software สำหรับ Molecular Docking
23. AMBER 12 molecular dynamic package software สำหรับ Molecular Dynamic

3.2 เคมีภัณฑ์

1. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) Free acid High Purify บริษัท Bio Basic INC, Canada
2. Dulbecco's Modified Eagle's Medium Powder (DMEM powder) with high glucose บริษัท Thermo Scientific HyClone, US
3. Minimum Essential Medium (MEM powder) with L-glutamine, and nucleosides. Without sodium bicarbonate บริษัท Caisson Labs, US
4. Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide บริษัท Alfa Aesar A Johnson Matthey, UK

5. กรดเอทิลีนไดอามีนเตตราอะซีติก (Ethylenediaminetetraacetic Acid, (EDTA) Disodium Salt, Dihydrate) บริษัท Affymetrix Thermo Fisher Scientific, US
6. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (HCl) บริษัท Merck, Germany
7. กลูโคส (D-(+)-Glucose) รุ่น G0048 บริษัท TCI America, US
8. แคลเซียม คลอไรด์ ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) บริษัท Merck, Germany
9. ซีรัมจากตัวอ่อนวัว (Heat-inactivated fetal bovine serum; Δ FBS) บริษัท Thermo Scientific HyClone, US โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Merck, Germany
10. โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (NaHCO_3) บริษัท UNILAB Ajax Finechem Thermo Fisher Scientific, US
11. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) บริษัท BDH chemical WWR International Ltd, UK
12. ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) บริษัท Merck, Germany
13. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) บริษัท BDH chemical WWR International Ltd, UK
14. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) บริษัท BDH chemical WWR International Ltd, UK
15. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) บริษัท UNIVAR Ajax Finechem Thermo Fisher Scientific, US
16. โมโนโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) บริษัท UNIVAR Ajax Finechem Thermo Fisher Scientific, US
17. ยีสต์สกัด (Yeast extract) บริษัท Bio Basic INC, Canada
18. ยาเพนนิซิลลินและสเตรปโตมัยซิน (Penicillin/Streptomycin (10,000 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) บริษัท Thermo Scientific HyClone, US
19. แลคตาบูมินไฮโดรไลเซส (Lactalbuminhydrolysate) บริษัท Sigma-Aldrich, US
20. สีทริปแฟนบลู (Trypan blue) 0.4% บริษัท Gibco™ Thermo Fisher Scientific, US
21. สีนิวทรัลเรด (Neutral red) บริษัท LABCHEM Ajax Finechem Thermo Fisher Scientific, US
22. อะกาโรส (Agarose SERVA Wide Range) บริษัท SERVA Serving Scientists, US

23. เอนไซม์ทริปซิน (Trypsin from porcine pancreas) บริษัท Sigma-Aldrich, US

3.3 วิธีการทดลอง

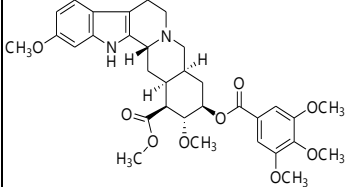
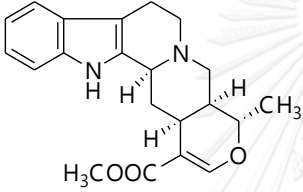
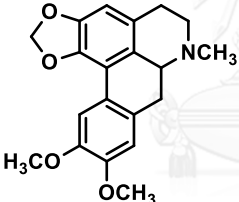
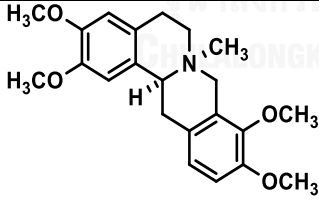
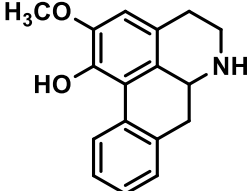
3.3.1 เตรียมสาร เซลล์ไลน์ และไวรัสแดงก็เพื่อใช้ในการทดสอบ

3.3.1.1 เตรียมสารเพื่อใช้ในการทดสอบ

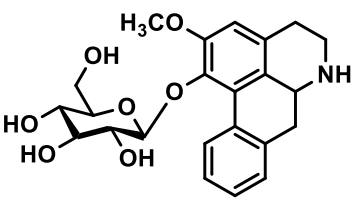
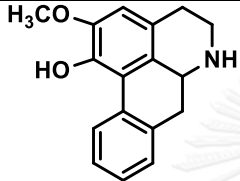
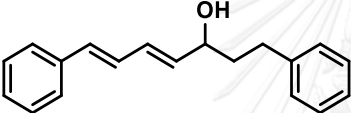
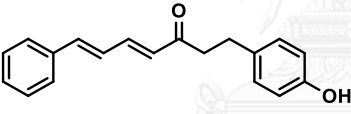
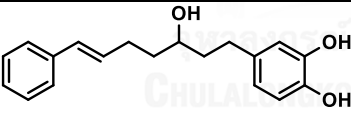
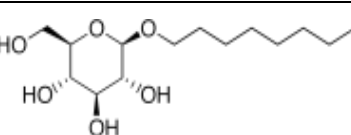
ทดสอบสารบริสุทธิ์ (Purified compounds) ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.ดร. อภิชาติ สุขสำราญ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง โดยสกัดได้จากธรรมชาติทั้งหมด 3 กลุ่มสาร คือ สาร AS-WA 009-010 (สารบริสุทธิ์จากต้นระย้อม; *Rauvolfia serpentina*) AS-WA 012-017 (สารบริสุทธิ์จากต้นบอระเพ็ดพุงช้าง; *Stephania suberosa*) และ AS-WA 018-020 (สารบริสุทธิ์จากต้นว่านชักมดลูกตัวเมีย; *Curcuma comosa* Roxb.) จำนวนทั้งหมด 10 ชนิด มีโครงสร้างสารแต่ละชนิดดังตารางที่ 1 โดยนำสารมาละลายใน 100% Dimethyl sulfoxide (DMSO) ให้ได้ความเข้มข้นของสารเท่ากับ 100 มิลลิโมลาร์ เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการทดสอบ โดยคำนวณจากสูตร

$$\text{โมลาริตี (Molarity; M)} = \frac{\text{น้ำหนักของสาร (กรัม)}}{\text{มวลโมเลกุล (Mw) \times ปริมาตร (ลิตร)}}$$

ตารางที่ 1 แสดงรหัสสาร โครงสร้าง สูตรทางเคมี น้ำหนักโมเลกุลและชื่อทางเคมีของสารบริสุทธิ์และชนิดที่ใช้ในการทดลอง

รหัสสาร AS-WA	โครงสร้าง	สูตรทางเคมี / น้ำหนักโมเลกุล	ชื่อทางเคมี
009		$C_{33}H_{40}N_2O_9$ 608.67	Methyl (3 β , 16 β , 17 α , 18 β , 20 α)-11,17-dimethoxy-18-[(3,4,5-trimethoxybenzoyl)oxy]yohimban-16-carboxylate; Reserpine
010		$C_{21}H_{24}N_2O_3$ 352.42	Methyl (4S,4aS,13bS,14aS)-4-methyl-4a, 5, 7, 8, 13, 13b, 14, 14a-octahydro-4H-indolo[2,3-a]pyrano[3,4-g]quinolizine-1-carboxylate
012		$C_{20}H_{21}NO_4$ 339.15	10,11-Dimethoxy-7-methyl-6,7,7a,8-tetrahydro-5H-[1,3]benzodioxolo[6,5,4-de]benzo[g]chinolin; Dicentrine
013		$C_{22}H_{28}NO_4$ 369.00	2,3,9,10-Tetramethoxy-5,8,13, 13a-tetrahydro-6H-isoquinolino[3,2-a]isoquinoline
015		$C_{17}H_{17}NO_2$ 267.13	(6aR)-2-methoxy-5,6,6a,7-tetrahydro-4H-dibenzo [de,g]quinolone-1-ol

ตารางที่ 1 (ต่อ) แสดงรหัสสาร โครงสร้าง สูตรทางเคมี น้ำหนักโมเลกุลและชื่อทางเคมีของสาร
บริสุทธิ์แต่ละชนิดที่ใช้ในการทดลอง

รหัสสาร AS-WA	โครงสร้าง	สูตรทางเคมี / น้ำหนักโมเลกุล	ชื่อทางเคมี
016		$C_{23}H_{27}NO_7$ 429.18	beta-D-Glucopyranoside, 5,6,6a,7-tetrahydro-1- methoxy-4H-dibenzo(de,g) quinolin-2-yl
017		$C_{17}H_{17}NO_2$ 267.13	(6aR)-2-methoxy-5,6,6a,7- tetrahydro-4H-dibenzo [de,g]quinolone-1-ol
018		$C_{19}H_{20}O$ 264.36	[2],(3R)-1,7-diphenyl-(4E, 6E)-4,6-heptadien-3-ol
019		$C_{19}H_{18}O_2$ 278.35	1-(4-hydroxyphenyl)-7- phenyl-(4E,6E)-4,6- heptadien-3-one
020		$C_{19}H_{22}O_3$ 310.39	(3S)-1-(3,4-dihydroxyphenyl) -7-phenyl-(6E)-6-hepten-3-ol
β -OG ^[65]		$C_{14}H_{28}O_6$ 292.37	n-Octyl- β -D-glucoside

3.3.1.2 เพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ของยุง เซลล์ไต้ลิง และเซลล์มะเร็งตับมนุษย์

- เซลล์ไลน์ของยุง (*Aedes albopictus* clone C6/36; ATCC® CRL-1660™)

เริ่มแรกทำการกระตุ้นเซลล์ไลน์จากตู้เก็บรักษาอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นำเซลล์ไลน์ที่เก็บรักษาไว้ที่ตู้เก็บรักษาอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาละลายอย่างรวดเร็วจนละลายได้กึ่งหนึ่ง (Semi-thaw) จากนั้นดูดสารละลายเซลล์ที่เริ่มละลายปริมาตร 1 มิลลิลิตร (5×10^6 ถึง 1×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Minimum essential medium (MEM) ที่มีส่วนผสมของ Fetal bovine serum (FBS) ปริมาณ 10% และ Penicillin Streptomycin 100X Solution (PS) ปริมาณ 1% (MEM (10% FBS, 1% PS)) ขณะเย็นปริมาตร 15 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นหมุนเหวี่ยงด้วยแรงเหวี่ยง 1,000 g เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้เซลล์ตกตะกอน จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมทิ้ง เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM (10% FBS, 1% PS) ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ลงในเซลล์ที่ตกตะกอน ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมอาหารเลี้ยงเซลล์และเซลล์ให้เข้ากัน จากนั้นนำไปเลี้ยงในฟลasks สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 75 ตารางเซนติเมตร เลี้ยงเซลล์ในตู้เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เมื่อเซลล์เจริญเติบโตเต็มฟลask ทำการลอกเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ใหม่หรือนำไปใช้ในการทดลองโดยใช้เอนไซม์ทริปซิน โดยนำฟลask ที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ต้องการมาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก จากนั้นล้างเซลล์ด้วย Phosphate buffer saline (PBS) แล้วเติม 0.25% เอนไซม์ทริปซิน (Trypsin enzyme) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เพื่อทำให้เป็นเซลล์เดี่ยวและแยกออกจากภาชนะ จากนั้นเติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM (10% FBS, 1% PS) ปริมาตร 8-12 มิลลิลิตร (2-3 เท่าของปริมาตรเอนไซม์ทริปซินที่ใช้) เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน และชะภาชนะเพื่อลอกเซลล์ นำเซลล์ที่แยกออกจากภาชนะได้แล้วไปปั่นเหวี่ยงเครื่องปั่นหมุนเหวี่ยงด้วยแรงเหวี่ยง 1,000 g เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้เซลล์ตกตะกอน ดูดอาหารที่ผสมเอนไซม์ทิ้ง แล้วเติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM (10% FBS, 1% PS) แล้วผสมให้เข้ากัน จากนั้นทำการนับเซลล์ (ตามข้อที่ 3.3.2.1) เพื่อนำเซลล์ไปใช้ในการทดลอง หรือนำไปเพาะเลี้ยงในฟลask เพาะเนื้อเยื่อต่อไป โดยเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

- เซลล์ไตลิง (LLC-MK2 Original; ATCC®CCL-7™) และเซลล์มะเร็งตับมนุษย์ (HepG2; HEPG2; ATCC® HB-8065™)

การเลี้ยงเซลล์ไลน์ เริ่มแรกทำการกระตุ้นเซลล์ไลน์จากตู้เก็บรักษาอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นำเซลล์ไลน์ที่เก็บรักษาไว้ที่ตู้เก็บรักษาอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาละลายอย่างรวดเร็วจนละลายได้กึ่งหนึ่ง (Semi-thaw) จากนั้นดูดสารละลายเซลล์ที่เริ่มละลายปริมาตร 1 มิลลิลิตร (5×10^6 ถึง 1×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ขณะเย็นที่มีส่วนผสมของ FBS และ PS ปริมาณ 1% (DMEM (FBS, 1% PS)) ขณะเย็นปริมาตร 15 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นหมุนเหวี่ยงด้วยแรงเหวี่ยง 800 $\times g$ เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้เซลล์ตกตะกอน จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมทิ้ง เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM (FBS, 1% PS) ที่อุณหภูมิห้อง 37 องศาเซลเซียส ลงในเซลล์ที่ตกตะกอน ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมอาหารเลี้ยงเซลล์และเซลล์ให้เข้ากัน จากนั้นนำไปเลี้ยงในพลาสติกสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 75 ตารางเซนติเมตร เลี้ยงเซลล์ในตู้เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% (37 องศาเซลเซียส (5% CO₂)) เมื่อเซลล์เจริญเติบโตเต็มพลาสติก ทำการลอกเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ใหม่หรือนำไปใช้ในการทดลอง โดยพลาสติกที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ต้องการมาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก จากนั้นล้างเซลล์ด้วย PBS แล้วเติม 0.25% เอนไซม์ทริปซิน (Trypsin enzyme) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที เพื่อแยกเซลล์ออกจากภาชนะ จากนั้นเติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM (FBS, 1% PS) ปริมาตร 8-12 มิลลิลิตร (2-3 เท่าของปริมาตรเอนไซม์ทริปซินที่ใส่) เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน และชะภาชนะเพื่อลอกเซลล์ นำเซลล์ที่แยกออกจากภาชนะได้แล้วไปปั่นเหวี่ยงเครื่องปั่นหมุนเหวี่ยงด้วยแรงเหวี่ยง 800 $\times g$ เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้เซลล์ตกตะกอน ดูดอาหารที่ผสมเอนไซม์ทิ้ง แล้วเติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM (FBS, 1% PS) แล้วผสมให้เข้ากัน จากนั้นทำการนับเซลล์ (ตามข้อที่ 3.3.2.1) เพื่อนำเซลล์ไปใช้ในการทดลอง หรือนำไปเพาะเลี้ยงในพลาสติกเพาะเนื้อเยื่อต่อไป โดยเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (5% CO₂)

หมายเหตุ ปริมาณ FBS ที่ 5% ใช้สำหรับเซลล์ไตลิง และ 10% สำหรับเซลล์มะเร็งตับมนุษย์

3.3.1.3 เพิ่มจำนวนไวรัสเดงกีซีโรไทป์-2

ใช้เอนไซม์ทริปซินลอกเซลล์ไลน์ของยุงตามข้อที่ 3.3.1.2. แล้วนับจำนวนเซลล์ไลน์ของยุง (ตามข้อที่ 3.3.2.1) นำเซลล์ไลน์ของยุงจำนวนเท่า ๆ กันมาเลี้ยงในพลาสติกขนาด 175 ตารางเซนติเมตร จำนวน 2 พลาสติก เลี้ยงเซลล์ไลน์ในตู้เพาะเลี้ยงอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ หลังจากเซลล์โตจนเต็มพลาสติก นำพลาสติก 1 พลาสติกมานับจำนวนเซลล์ (ตามข้อที่ 3.3.2.1) เมื่อทราบจำนวนเซลล์แล้วที่มีทั้งหมดแล้ว นำไวรัสเดงกีซีโรไทป์-2 ที่ทราบจำนวนไวรัสที่แน่นอน ซึ่งได้รับการอนุเคราะห์จาก Prof. Duncan R Smith จากสถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล มาทำการเจือจางไวรัสให้มีปริมาณไวรัสต่อจำนวนเซลล์ หรือ Multiplicity of infection (MOI) เท่ากับ 1 โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ MEM แล้วใส่ไวรัสทั้งหมดในเซลล์ไลน์ของยุงเพื่อทำการติดเชื้อ จากนั้นเอียงขึ้นลง (Rocking) อย่างช้า ๆ เพื่อให้ไวรัสกระจายทั่วเซลล์ไลน์ของยุง โดยจะเอียงขึ้นลงทุก 10 นาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในตู้เพาะเลี้ยงอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM (10% FBS, 1% PS) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในพลาสติกเพาะเนื้อเยื่อ เลี้ยงเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีที่ตู้เพาะเลี้ยงอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน จากนั้นเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์มาปั่นเหวี่ยงที่ความแรงเหวี่ยง 2000 $\times g$ เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกเศษเซลล์ที่อาจติดมา แล้วเติม FBS ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 20% ต่ออาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งหมด แล้วแบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 1.7 มิลลิลิตร เก็บที่ตู้เก็บรักษาอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ในการทดลอง

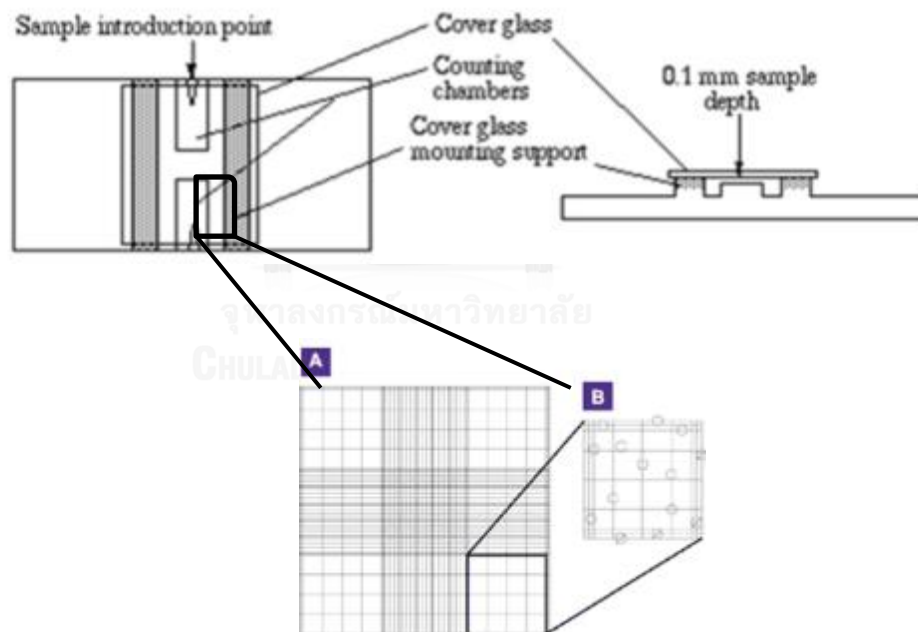
3.3.2 วิธีนับจำนวนเซลล์ และจำนวนไวรัสเดงกีเพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของสาร

3.3.2.1 การนับจำนวนเซลล์ โดยใช้ Hemocytometer chamber

ลักษณะของ Hemocytometer chamber จะแบ่งเป็น 2 ฝั่ง แต่ละฝั่งมีตาราง 9 ช่อง แต่ละช่องมีด้านกว้าง X ด้านยาว X ความลึก เท่ากับ 1 X 1 X 0.1 มิลลิเมตร ทำให้มีปริมาตรเท่ากับ 0.1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร (รูปที่ 7) การนับจำนวนเซลล์ไลน์จะทำโดยนำเซลล์ที่ลอกจากพลาสติกเพาะเลี้ยงด้วยเอนไซม์ทริปซิน ทำการปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์แล้วละลายเซลล์ด้วยอาหารปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำสารละลายเซลล์มาย้อมสีเซลล์ด้วยสี 0.4% Trypan Blue Stain ในปริมาตรเซลล์ 20 ไมโครลิตร ต่อสี 20 ไมโครลิตร (อัตราส่วน 1:1) ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำเซลล์ที่ผ่านการย้อมสีแล้ว ดูดมาใส่ในตารางนับจำนวนเซลล์ใน Hemocytometer chamber แล้วนำไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ โดยนับจำนวนเซลล์ทั้ง 2 ฝั่ง ฝั่งละ 4 ตาราง ในตารางช่องบนซ้ายบนขวา ล่างซ้าย

และล่างขวาของแต่ละฝั่ง รวมทั้งหมด 8 ตาราง การนับเซลล์จะนับเฉพาะเซลล์ที่รอดชีวิตซึ่งจะมีลักษณะโปร่งแสงภายในเซลล์ ไม่ติดสีจนทึบ สำหรับเซลล์ที่อยู่ทับเส้นขอบ จะนับเพียงเซลล์ที่ทับบนเส้นด้านซ้ายและเส้นด้านล่าง หรือเส้นด้านขวาและเส้นด้านบนอย่างใดอย่างหนึ่งเท่านั้น (รูปที่ 7B) และนำจำนวนเซลล์ที่นับได้ทั้งหมด มาคำนวณหาจำนวนเซลล์จากสมการดังต่อไปนี้

$$\text{จำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร (Cells/ml)} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่นับได้ทั้งหมด} \times 2 \times 10^4}{4 (\text{จำนวนตาราง}) \times 2 (\text{จำนวนฝั่ง})}$$



รูปที่ 7 แสดงองค์ประกอบ Hemocytometer chamber^[67, 68]

(A) ภาพขยายช่องนับเซลล์ใน Hemocytometer

(B) รูปวิธีการนับเซลล์ในแต่ละตาราง

3.3.2.2 หาปริมาณไวรัสด้วยวิธี Plaque assay

เลี้ยงเซลล์ไตลิงในจานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบ 6 หลุม ที่จำนวนเซลล์ 1×10^6 เซลล์ต่อหลุม แล้วเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (5% CO₂) เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางไวรัส 10 เท่าในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM เติมไวรัสที่ผ่านการเจือจางที่ความเข้มข้นที่ต้องการปริมาตร 400 ไมโครลิตรต่อหลุม ความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ จากนั้นนำไปเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (5% CO₂) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยเอียงขึ้นลงอย่างช้า ๆ ทุก ๆ 10 นาที เมื่อครบ 2 ชั่วโมง เติมน้ำ First overlay agar (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 4 มิลลิตรต่อหลุมของจานเพาะเลี้ยงเชื้อ รอจนอาหารแข็งตัว เลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (5% CO₂) เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นเติมน้ำ Second overlay agar (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 2 มิลลิตรต่อหลุมของจานเพาะเลี้ยงเชื้อ รอจนอาหารแข็งตัว นำไปเลี้ยงที่ตู้เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (5% CO₂) ข้ามคืน จากนั้นนับจำนวนพลาคว (plaque) ของไวรัสที่ได้ แล้วคำนวณหาปริมาณไวรัสจากสมการดังต่อไปนี้

จำนวนไวรัสต่อมิลลิตร (PFU/ml)

$$= \text{จำนวนพลาคว} \times \text{ค่าการเจือจาง (Dilution factor)} \times 2.5$$

3.3.3 คัดเลือกกลุ่มสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งไวรัสเดงกีซีโรไทป์-2

3.3.3.1 ทดสอบความเป็นพิษของสารต่อเซลล์มะเร็งตับมนุษย์ด้วยวิธี MTT assay

สารบริสุทธิ์ที่จะนำมาทดสอบ จะถูกนำมาทดสอบความเป็นพิษของสารโดยเลี้ยงเซลล์มะเร็งตับมนุษย์ที่ต้องการทดสอบในจานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบ 96 หลุม ที่มีจำนวนเซลล์ 2×10^4 เซลล์ต่อหลุม แล้วเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (5% CO₂) เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำสารที่ต้องการทดสอบมาเจือจางในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM (10% FBS, 1% PS) ให้ได้ความเข้มข้น 1 นาโนโมลาร์ 10 นาโนโมลาร์ 100 นาโนโมลาร์ 1 ไมโครโมลาร์ 10 ไมโครโมลาร์ 100 ไมโครโมลาร์ (โดยเติม DMSO ให้ได้ 0.5% เท่ากันในทุก ๆ ความเข้มข้น) และไม่ใส่สารตัวอย่างแต่ใส่ 0.5% DMSO เพื่อใช้เป็นชุดควบคุม (Control) จากนั้นนำจานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบ 96 หลุม

ที่เตรียมไว้มาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก แล้วเติมสารที่เจือจางตามความเข้มข้นข้างต้น 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ทดลอง 4 ซ้ำต่อความเข้มข้น เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (5% CO₂) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วดูดสารที่ใช้ทดสอบทิ้ง เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ผสมกับ 10% ของสารละลาย MTT ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วดูดสารละลาย MTT ที่เติม 100% DMSO ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม โดยเติมหลุมเปล่าที่ไม่มีเซลล์และสารเพื่อใช้เป็นค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายไร้สิ่งตัวอย่าง (Blank) เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และเขย่าเบา ๆ เพื่อละลายผลึก MTT แล้วนำจานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบ 96 หลุมที่ได้ ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ที่ จากสมการดังต่อไปนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต (Percent of viability)} = \frac{\text{OD1} - \text{OD2}}{\text{OD3} - \text{OD2}} \times 100$$

โดยที่ OD1 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ความเข้มข้นของสารที่ต้องการทดสอบ
 OD2 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายไร้สารตัวอย่าง
 OD3 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ไม่ใส่สารตัวอย่าง

3.3.3.2 การบำบัดร่วม (Co-treatment)

เลี้ยงเซลล์มะเร็งระดับมนุษย์ที่ต้องการทดสอบในจานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบ 24 หลุม จำนวนเซลล์ 1×10^5 เซลล์ต่อหลุม แล้วเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (5% CO₂) เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำสารที่ต้องการทดสอบมาเจือจางในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ผสมด้วย 0.5% DMSO ให้ได้ 2 เท่าของความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบที่ผ่านการทดสอบแล้วว่าไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ผสมกับไวรัสแดงที่ละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี 0.5% DMSO ในอัตราส่วน 1 : 1 ให้ได้ค่า MOI เท่ากับ 10 จากนั้นนำจานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบ 24 หลุมดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้ง เติมน้ำที่ผสมไวรัสปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ทำ 3 ซ้ำต่อความเข้มข้น เลี้ยง

ในตู้เพาะเลี้ยงอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (5% CO₂) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยเอียงขึ้นลงอย่างช้า ๆ ทุก ๆ 10 นาที เมื่อครบ 2 ชั่วโมงแล้ว ดูดสารที่ผสมไวรัสเดงกีทิ้ง ล้างด้วย PBS 500 ไมโครลิตรต่อหลุม 1 รอบแล้วดูดออก จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM (10% FBS, 1% PS) ปริมาตร 500 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (5% CO₂) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งจะใช้ชุดควบคุมเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสม 0.5% DMSO ที่ไม่เติมสาร จากนั้นเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อนำไปหาปริมาณไวรัสด้วยวิธี Plaque assay (ตามข้อที่ 3.3.2.2) แล้วหาจำนวนไวรัสที่เกิดขึ้นใหม่ว่าสารกลุ่มใดให้ผลในการลดการสร้างไวรัสลูกหลานได้ดีที่สุด เพื่อเลือกมาทดสอบอย่างละเอียดในขั้นตอนต่อไป

ทดสอบความเป็นพิษของสารต่อเซลล์มะเร็งตับมนุษย์ด้วยวิธี MTT assay ในจานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบ 96 หลุม จำนวนเซลล์ 2×10^4 เซลล์ต่อหลุมเพื่อใช้ ตามวิธีที่กล่าวในข้อ 3.3.3.1 ควบคู่ไปกับการทดลองเพื่อยืนยันว่าความเข้มข้นของสารนั้นไม่เป็นพิษต่อเซลล์

3.3.4 วิธีดำเนินการทดลองทางคอมพิวเตอร์

3.3.4.1 การเตรียมโครงสร้างเริ่มต้นและพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้อง

- นำโครงสร้างผลึกของโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัสเดงกีซีโรไทป์-2 ที่จับอยู่กับ n-octyl- β -D-glucoside (β -OG) รหัส 1OKE จากฐานข้อมูลโปรตีน (RCSB Protein Data Bank)
- ทำการตรวจสอบโปรตอนชั้นสเตต (protonation state) ของกรดอะมิโนที่สามารถแตกตัวได้ ได้แก่ ไลซีน (Lysine) อาร์จินีน (Arginine) กรดแอสปาร์ติก (Aspartic acid) กรดกลูตามิก (Glutamic acid) และฮิสติดีน (Histidine) ณ สภาวะ pH 7.4 ด้วยโปรแกรม PROPKA 3.1 [69, 70]
- พิจารณาพันธะไฮโดรเจนที่สามารถเกิดขึ้นได้ระหว่างกรดอะมิโนเหล่านี้กับกรดอะมิโนบริเวณรอบข้าง
- เตรียมพารามิเตอร์สำหรับสารแต่ละชนิด โดยประจุของแต่ละอะตอมได้จากการคำนวณด้วยวิธีการคำนวณทางควอนตัมด้วยระเบียบวิธี HF/6-31G โดยใช้โปรแกรม Gaussian09 ขณะที่พารามิเตอร์อื่น ๆ ที่ใช้ในระบอบนี้ได้จาก gaff (general AMBER force field) และ AMBER ff03 force field สำหรับลิแกนด์และโปรตีน ตามลำดับ

3.3.4.2 การทำนายรูปแบบการจับของสาร ด้วยวิธี Molecular Docking

นำโครงสร้างสามมิติของสารแต่ละชนิดจากข้อ 3.3.4.1 มาศึกษาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างสารแต่ละชนิดกับโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัสเดงกีซีโรไทป์-2 ด้วยวิธี Molecular Docking เป็นจำนวน 100 poses ด้วยโปรแกรม CDOCKER ใน Discovery Studio 2.5 [69, 70]

- กำหนดขนาด (sphere) ที่ 10.6 Å เพื่อให้ครอบคลุมตำแหน่ง binding site ของ β -OG ในโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัสเดงกี ซึ่งประกอบไปด้วยตำแหน่งกรดอะมิโนดังต่อไปนี้ ทรีโอนีน 48 กรดกลูตามิก 49 อะลานีน 50 ฟีนิลอะลานีน 193 อะลานีน 205 ลูซีน 207 เซอรีน 274 กลูตามีน 271 ลูซีน 277 และทรีโอนีน 280 สำหรับการทำให้ Molecular Docking

- เลือกโครงสร้างสารประกอบเชิงซ้อนที่ให้ค่า CDOCKER interaction energy ที่ติดลบมากที่สุด ซึ่งถือว่าเป็นโครงสร้างที่มีความเสถียรและสารสามารถจับได้ดีที่สุดเพื่อใช้ในการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลต่อไป

3.3.4.3 การจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล

การจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลจะเป็นการจำลองภายใต้ periodic boundary condition (PBC) ซึ่งเป็นการเติมน้ำเข้าสู่ระบบโดยน้ำที่ถูกเติมเข้าไปใน simulation box ที่มีสารประกอบเชิงซ้อนอยู่บริเวณกลางกล่อง ทำการทดสอบโดย

- กำหนดขนาดของกล่องประมาณ $62 \times 77 \times 148 \text{ \AA}^3$
- เลือกใช้ชนิดของโมเลกุลน้ำแบบ TIP3P โดยโมเลกุลน้ำที่ซ้อนทับหรืออยู่ใกล้เคียงกับสารประกอบเชิงซ้อนมากเกินไปจะกำจัดออกจากระบบ
- เติมคลอไรด์ไอออนเข้าสู่ระบบเพื่อเป็นการปรับสมดุลของระบบให้เป็นกลางทางประจุ
- นำทั้ง 3 ระบบ (AS-WA018 AS-WA019 และ AS-WA020) ที่ได้จากระเบียบวิธีการคำนวณ Molecular Docking ก่อนหน้านี้ (ข้อ 3.3.4.2) มาทำการปรับโครงสร้างเพื่อลดผลของความเกะกะอันเกิดจากการเติมน้ำและอะตอมไฮโดรเจน
- หาโครงสร้างเสถียรที่มีความเหมาะสมด้วยวิธี steepest decent (SD) และ conjugate gradient (CG) minimizations โดยอาศัยพารามิเตอร์ในข้อ 3.3.4.1

- นำโครงสร้างของสารประกอบเชิงซ้อนที่ได้มาทำการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล โดยใช้ NPT ensemble ในสถานะอุณหภูมิ 310 องศาเซลเซียส ความดัน 1 atm เป็นระยะเวลาทั้งสิ้น 50 นาโนเซคคั่น (ns)

- พันธะโคเวเลนต์ของอะตอมไฮโดรเจนจะถูกตรึงไว้ด้วยอัลกอริทึม SHAKE และใช้วิธี Particle mesh Ewald (PME) summation ในการพิจารณา long-range electrostatic interaction ซึ่ง Time step ที่ใช้ในแต่ละระบบคือ 2 เฟมโตเซคคั่น (fs)

- เก็บ trajectory ทุก ๆ 5 พิโคเซคคั่น (ps) เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ผลการทดลองต่อไป

3.3.4.4 การวิเคราะห์ผลการทดลองการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล

- วิเคราะห์ข้อมูลเชิงโครงสร้าง พลาศาสตร์ และอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัสแดงกึ่งซีโรไทป์-2 กับสารแต่ละชนิดหลังจากสารประกอบเชิงซ้อนทุกระบบเข้าสู่สมดุลแล้ว โดยพิจารณาจากผลการคำนวณค่า Root-mean square deviation (RMSD) ระหว่างโครงสร้างของสารเชิงซ้อนเริ่มต้นและโครงสร้างของสารเชิงซ้อนที่เวลาต่าง ๆ

- คำนวณสมบัติเชิงโครงสร้าง ลักษณะการยึดจับ และอันตรกิริยาที่เกิดขึ้น ได้แก่ แรงแรงระหว่างประจุ แรงแรงแวนเดอร์วาลส์ และพันธะไฮโดรเจนที่สถานะสมดุล รวมถึงคำนวณพลังงานการยึดจับอิสระ (binding free energy) ของทั้ง 3 ระบบด้วยวิธีการ Molecular Mechanics/Poisson-Boltzmann Surface Area (MM/PBSA) และ Molecular Mechanics/Generalized Born Surface Area (MM/GBSA) พร้อมทั้งเปรียบเทียบผลของแต่ละระบบ

3.3.4.5 พลังงานการยึดจับอิสระด้วยวิธี MM/PBSA และ MM/GBSA

วิธี MM/PBSA และ MM/GBSA จัดเป็นวิธีการคำนวณที่ได้รับการยอมรับและเป็นที่ยอมรับในการประเมินค่าพลังงานการยึดจับอิสระของสารประกอบเชิงซ้อนในระบบชีวโมเลกุล โดยค่าพลังงานการยึดจับอิสระของสารประกอบเชิงซ้อน (ΔG_{bind}) สามารถคำนวณได้จากความแตกต่างของค่าพลังงานอิสระของสารประกอบเชิงซ้อน (ΔG_{cpd}) ค่าพลังงานการยึดจับอิสระของโปรตีน (ΔG_{prot}) และค่าพลังงานการยึดจับอิสระของลิแกนด์ (ΔG_{lig}) ดังแสดงในสมการที่ (1)

$$\Delta G_{bind} = \Delta G_{cpx} - (\Delta G_{prot} - \Delta G_{lig}) \quad (1)$$

โดยทั่วไปแล้วพลังงานการยึดจับอิสระทั้งหมดจะมาจากค่าพลังงานเอนทัลปี (ΔH) และเอนโทรปี ณ อุณหภูมิคงที่ ($T\Delta S$)

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (2)$$

อย่างไรก็ตาม ค่า ΔH ของระบบสามารถประมาณได้จากผลรวมของค่าพลังงานที่เปลี่ยนไปในสถานะแก๊ส (ΔE_{MM}) และในสารละลาย (ΔG_{sol}) โดยจากสมการที่ (2) สามารถประมาณค่าพลังงานการยึดจับอิสระทั้งหมดได้ ดังแสดงในสมการที่ (3)

$$\Delta G = (\Delta E_{MM} + \Delta G_{sol}) - T\Delta S \quad (3)$$

โดยที่ค่า ΔE_{MM} ประกอบด้วยค่าพลังงานสองส่วน คือ ค่าพลังงานที่เกิดจากแรงระหว่างประจุ (ΔE_{ele}) และค่าพลังงานที่เกิดจากแรงแวนเดอร์วาลส์ (ΔE_{vdw}) ดังแสดงในสมการที่ (4) ขณะที่ค่า ΔG_{sol} สามารถแบ่งออกเป็นสองส่วนเช่นกัน คือ ส่วนที่มีขั้ว ($\Delta G_{sol}^{ele(PB/GB)}$) และส่วนที่ไม่มีขั้ว ($\Delta G_{sol}^{nonpolar}$) ดังแสดงในสมการที่ (5)

$$\Delta E_{MM} = \Delta E_{ele} + \Delta E_{vdw} \quad (4)$$

$$\Delta G_{sol} = \Delta G_{sol}^{ele(PB/GB)} + \Delta G_{sol}^{nonpolar} \quad (5)$$

โดยที่ส่วน ΔG_{sol}^{ele} ในสมการที่ (5) สามารถคำนวณได้จากวิธี Poisson Boltzmann (PB) และ Generalized Born (GB) ในขณะที่ส่วนของ $\Delta G_{sol}^{nonpolar}$ นั้นสามารถประเมินได้จากค่า surface accessible surface area (SASA) ดังแสดงในสมการที่ (6)

$$\Delta G_{sol}^{nonpolar} = \gamma SASA + \beta \quad (6)$$

โดยค่า γ และ β ที่ใช้คือ 0.00542 กิโลแคลอรีต่อโมล·Å² และ 0.92 กิโลแคลอรีต่อโมล ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าที่ได้จาก linear regression ของสารประกอบที่ไม่มีขั้วในน้ำ

3.3.5 ทดสอบการยับยั้งการติดเชื้อไวรัส หรือการลดการสร้างไวรัสลูกหลาน เพื่อคาดคะเนช่วงการยับยั้งของสารต่อไวรัสแดงกี

กลุ่มสารที่มีประสิทธิภาพจะถูกนำมาทดสอบหาความเป็นพิษของสารต่อเซลล์มะเร็งระดับมนุษย์ด้วยวิธี MTT Assay อีกครั้ง โดยจะทดสอบความเข้มข้นของสารในช่วงที่แคบขึ้น เพื่อหาความเข้มข้นที่สูงที่สุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์มาใช้ในการทดสอบในขั้นต่อไป ทำการทดสอบตามข้อที่ 3.3.3.1 แต่เปลี่ยนความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบสารเป็น 5 10 25 50 75 100 125 และ 150 ไมโครโมลาร์ (โดยเติม DMSO ให้ได้ 0.5% เท่ากันในทุก ๆ ความเข้มข้น) และไม่ใส่สารตัวอย่างแต่ใส่ 0.5% DMSO เพื่อใช้เป็นชุดควบคุม (Control) ทำการวัดค่า OD มาคำนวณหาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ เพื่อหาความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษของเซลล์ ตามข้อที่ 3.3.3.1 ต่อไป

นำความเข้มข้นที่สูงที่สุดและผ่านการทดสอบหาความเป็นพิษแล้วว่าไม่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งระดับมนุษย์ มาใช้ทดสอบการยับยั้งการติดเชื้อ หรือการลดการสร้างไวรัสแดงกีลูกหลาน โดยจะแบ่งการทดสอบเป็น 4 วิธี ดังต่อไปนี้

3.3.5.1 การฆ่าไวรัส (Virucidal test)

เลี้ยงเซลล์ไตลิงในจานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบ 6 หลุม ที่จำนวน 1×10^6 เซลล์ต่อหลุม เลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (5% CO₂) เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำสารที่ต้องการทดสอบมาเจือจางในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี 0.5% DMSO ให้ได้ 2 เท่าของความเข้มข้นที่ต้องการ ผสมกับไวรัสแดงกีจำนวน 1×10^6 PFU ต่อมิลลิลิตรที่ละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ผสมด้วย 0.5% DMSO ในอัตราส่วน 1 : 1 ซึ่งจะใช้ชุดควบคุมเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ผสม 0.5% DMSO ที่ไม่เติมสารมาผสมกับไวรัสแดงกี จากนั้นหาจำนวนไวรัสด้วยวิธี Plaque assay (ตามข้อที่ 3.3.2.2)

ทดสอบความเป็นพิษของสารต่อเซลล์มะเร็งระดับมนุษย์ด้วยวิธี MTT assay ในจานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบ 96 หลุม จำนวนเซลล์ 2×10^4 เซลล์ต่อหลุมเพื่อใช้ ตามวิธีที่กล่าวในข้อ

3.3.3.1 ควบคู่ไปกับการทดลองเพื่อยืนยันว่าความเข้มข้นของสารนั้นไม่เป็นพิษต่อเซลล์

3.3.5.2 การบำบัดร่วม (Co-treatment)

เลี้ยงเซลล์มะเร็งระดับมนุษย์ที่ต้องการทดสอบในจานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบ 24 หลุม ที่จำนวนเซลล์ 1×10^5 เซลล์ต่อหลุม แล้วเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (5% CO₂) เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำสารที่ต้องการทดสอบมาเจือจางในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ผสมด้วย 0.5% DMSO ให้ได้ 2 เท่าของความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบผสมกับไวรัสเดงกีที่ละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ผสมด้วย 0.5% DMSO ในอัตราส่วน 1 : 1 ให้ได้ค่า MOI เท่ากับ 10 จากนั้นนำจานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบ 24 หลุมดูอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้ง เติมสารที่ผสมไวรัสปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ทำ 3 ซ้ำต่อความเข้มข้น แล้วนำไปเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (5% CO₂) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยเอียงขึ้นลงอย่างช้า ๆ ทุก ๆ 10 นาที เมื่อครบ 2 ชั่วโมง แล้ว ดูดสารที่ผสมไวรัส

เดงกีที่ล้างด้วย PBS 500 ไมโครลิตรต่อหลุม 1 รอบแล้วดูดออก แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM (10% FBS, 1% PS) ปริมาตร 500 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (5% CO₂) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อนำไปหาปริมาณไวรัสด้วยวิธี Plaque assay (ตามข้อที่ 3.3.2.2) โดยมีชุดควบคุมเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสม 0.5% DMSO ที่ไม่เติมสาร

ทดสอบความเป็นพิษของสารต่อเซลล์มะเร็งระดับมนุษย์ด้วยวิธี MTT assay ในจานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบ 96 หลุม จำนวนเซลล์ 2×10^4 เซลล์ต่อหลุมเพื่อใช้ ตามวิธีที่กล่าวในข้อ

3.3.3.1 ควบคู่ไปกับการทดลองเพื่อยืนยันว่าความเข้มข้นของสารนั้นไม่เป็นพิษต่อเซลล์

3.3.5.3 การบำบัดก่อนติดเชื้อ (Pre-exposure treatment)

เลี้ยงเซลล์มะเร็งระดับมนุษย์ที่ต้องการทดสอบในจานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบ 24 หลุม ที่จำนวนเซลล์ 1×10^5 เซลล์ต่อหลุม แล้วนำไปเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (5% CO₂) เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำสารที่ต้องการทดสอบมาเจือจางในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมที่ผสมด้วย 0.5% DMSO ตามความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบซึ่งทราบแน่นอนว่าไม่เป็นพิษต่อเซลล์ นำจานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบ 24 หลุม มาดูอาหารเก่าทิ้ง แล้วเติมสารที่ผ่านการเจือจาง

ปริมาณ 500 ไมโครลิตรความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ เลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (5% CO₂) เป็นเวลา 0 2 6 12 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมไวรัสแดงก็โดยละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมซึ่งไม่มีส่วนผสมของ FBS ที่ผสมด้วย 0.5% DMSO ให้ได้ค่า MOI เท่ากับ 10 แล้วเติมสารละลายไวรัสปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (5% CO₂) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยเอียงขึ้นลงอย่างช้า ๆ ทุก ๆ 10 นาที เมื่อครบ 2 ชั่วโมง ดูดสารที่ผสมไวรัสแดงก็ทิ้ง ล้างด้วย PBS 500 ไมโครลิตรต่อหลุม 1 รอบแล้วดูดออก เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมปริมาณ 500 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (5% CO₂) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อนำไปหาปริมาณไวรัสด้วยวิธี Plaque assay (ตามข้อที่ 3.3.2.2) โดยมีชุดควบคุมเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสม 0.5% DMSO ที่ไม่เติมสาร

ทดสอบความเป็นพิษของสารต่อเซลล์มะเร็งตับมนุษย์ด้วยวิธี MTT assay ในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบ 96 หลุม จำนวนเซลล์ 2×10^4 เซลล์ต่อหลุมเพื่อใช้ ตามวิธีที่กล่าวในข้อ 3.3.3.1 ควบคู่ไปกับการทดลองเพื่อยืนยันว่าความเข้มข้นของสารนั้นไม่เป็นพิษต่อเซลล์

3.3.5.4 การบำบัดหลังติดเชื้อ (Post-exposure treatment)

เลี้ยงเซลล์มะเร็งตับมนุษย์ ที่ต้องการทดสอบในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบ 24 หลุม ที่จำนวนเซลล์ 1×10^5 เซลล์ต่อหลุม นำไปเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (5% CO₂) เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมไวรัสแดงก็โดยละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมซึ่งไม่มีส่วนผสมของ FBS ที่ผสมด้วย 0.5% DMSO ให้ได้ค่า MOI เท่ากับ 10 แล้วเติมสารละลายไวรัสปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (5% CO₂) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยเอียงขึ้นลงอย่างช้า ๆ ทุก ๆ 10 นาที เมื่อครบ 2 ชั่วโมง ดูดสารที่ผสมไวรัสแดงก็ทิ้ง ล้างด้วย PBS 500 ไมโครลิตรต่อหลุม 1 รอบแล้วดูดออก เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมปริมาณ 500 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (5% CO₂) เป็นเวลา 0 2 4 และ 6 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ จากนั้นนำสารที่ต้องการทดสอบมาเจือจางในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมที่ผสมด้วย 0.5% DMSO ให้ได้ 2 เท่าของความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบซึ่งทราบแน่นอนว่าไม่เป็นพิษต่อเซลล์ เมื่อครบเวลาตามที่กำหนด นำงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบ 24 หลุม มาดูดอาหารเก่าปริมาณ 250 ไมโครลิตรทิ้ง จากนั้นแล้วเติมสารความเข้มข้น 2 เท่าของความเข้มข้นที่ต้องการปริมาณ 250 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน ทำการทดลองความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ เลี้ยงใน

ตู้เพาะเลี้ยงอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (5% CO₂) ต่อจนครบ 24 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ จากนั้นเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อนำไปหาปริมาณไวรัสด้วยวิธี Plaque assay (ตามที่ข้อ 3.3.2.2) โดยมีชุดควบคุมเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสม 0.5% DMSO ที่ไม่เติมสาร

ทดสอบความเป็นพิษของสารต่อเซลล์มะเร็งตับมนุษย์ด้วยวิธี MTT assay ในจานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบ 96 หลุม จำนวนเซลล์ 2×10^4 เซลล์ต่อหลุมเพื่อใช้ ตามวิธีที่กล่าวในข้อ 3.3.3.1 ควบคู่ไปกับการทดลองเพื่อยืนยันว่าความเข้มข้นของสารนั้นไม่เป็นพิษต่อเซลล์



บทที่ 4

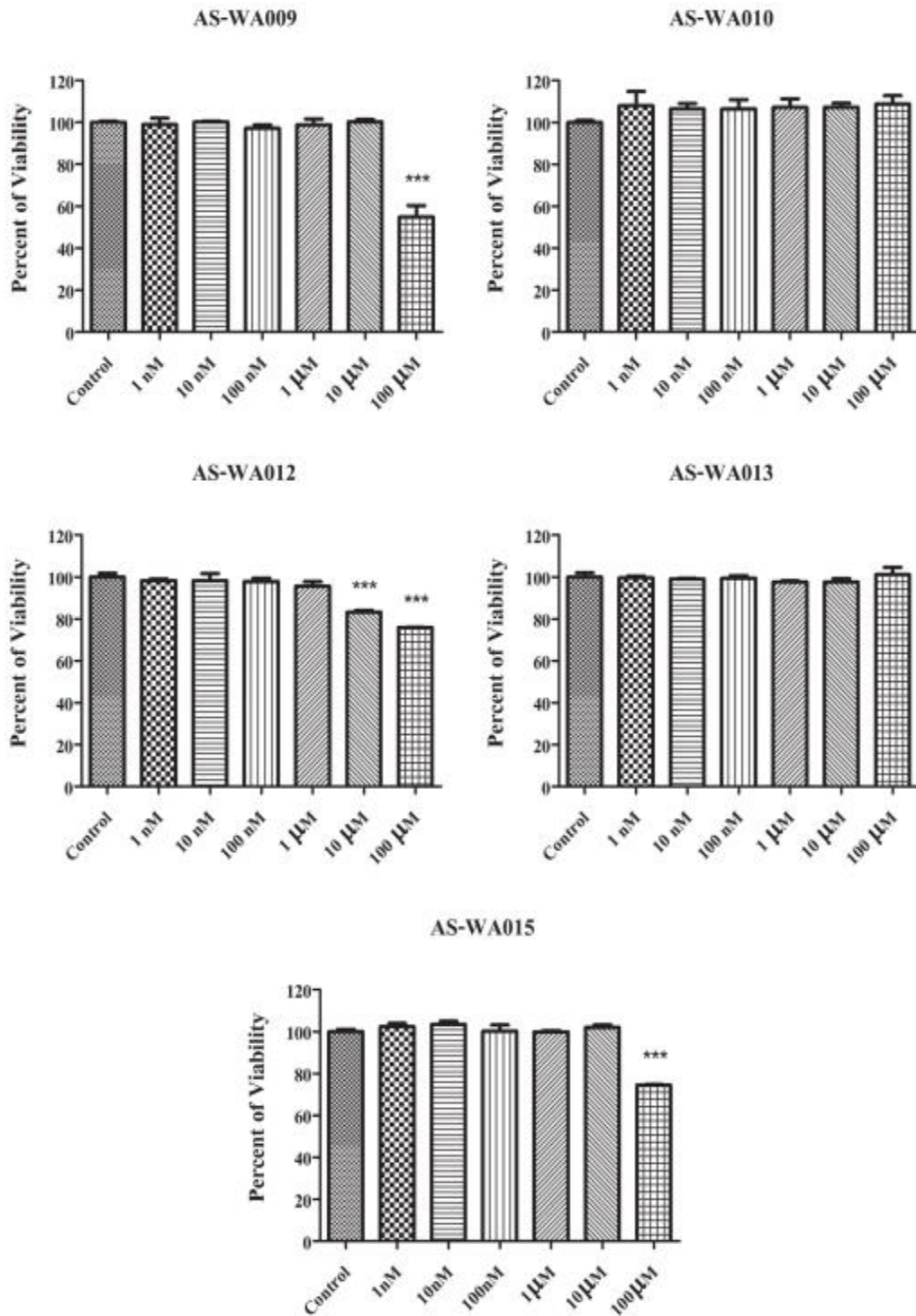
ผลการวิจัย

4.1 ทดสอบความเป็นพิษของสารบริสุทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งตับมนุษย์ด้วยวิธี MTT assay

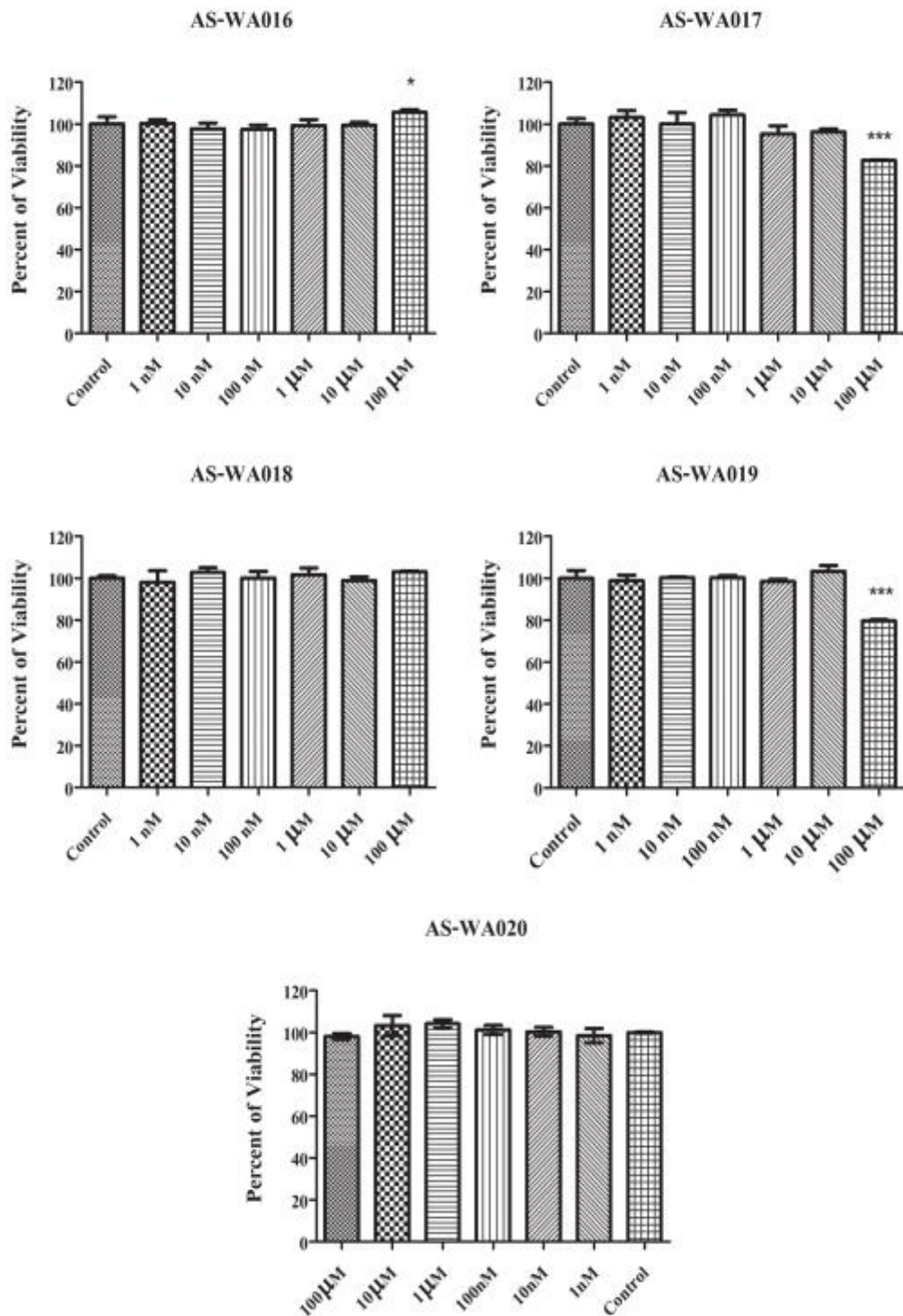
การทดสอบความเป็นพิษของสารบริสุทธิ์แต่ละชนิดต่อเซลล์มะเร็งตับมนุษย์ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ 10 ไมโครโมลาร์ 1 ไมโครโมลาร์ 100 นาโนโมลาร์ 10 นาโนโมลาร์ 1 นาโนโมลาร์ และใช้ 0.5% DMSO เป็นสารที่ใช้ในการทำละลายสารแทนสารบริสุทธิ์เพื่อใช้เป็นชุดควบคุม (Control) ทดสอบสารบริสุทธิ์ทั้ง 10 ชนิดกับเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดสอบพบค่าความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับมนุษย์ แสดงในตารางที่ 2 ($p < 0.05$) ซึ่งมีค่าเปอร์เซ็นต์อัตราการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งตับมนุษย์หลังเลี้ยงกับสารบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ($p < 0.05$) โดยค่าของสาร AS-WA009 ถึง AS-WA015 และ AS-WA016 ถึง AS-WA020 จะแสดงดังรูปที่ 8 และ 9 ตามลำดับ

ตารางที่ 2 แสดงค่าความเข้มข้นสูงสุดของสารบริสุทธิ์ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับมนุษย์เมื่อเลี้ยงสารและเซลล์มะเร็งตับมนุษย์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ชนิดของสารบริสุทธิ์	ความเข้มข้นสูงสุดที่ได้จากการทดลอง (ไมโครโมลาร์)
AS-WA009	10
AS-WA010	100
AS-WA012	1
AS-WA013	100
AS-WA015	10
AS-WA016	100
AS-WA017	10
AS-WA018	100
AS-WA019	10
AS-WA020	100



รูปที่ 8 แสดงเปอร์เซ็นต์อัตราการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งระดับมนุษย์หลังเลี้ยงกับสารบริสุทธิ์ AS-WA009 AS-WA010 AS-WA012 AS-WA013 และ AS-WA015 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมี DMEM + 0.5% DMSO เป็นชุดควบคุม ($p < 0.05$)

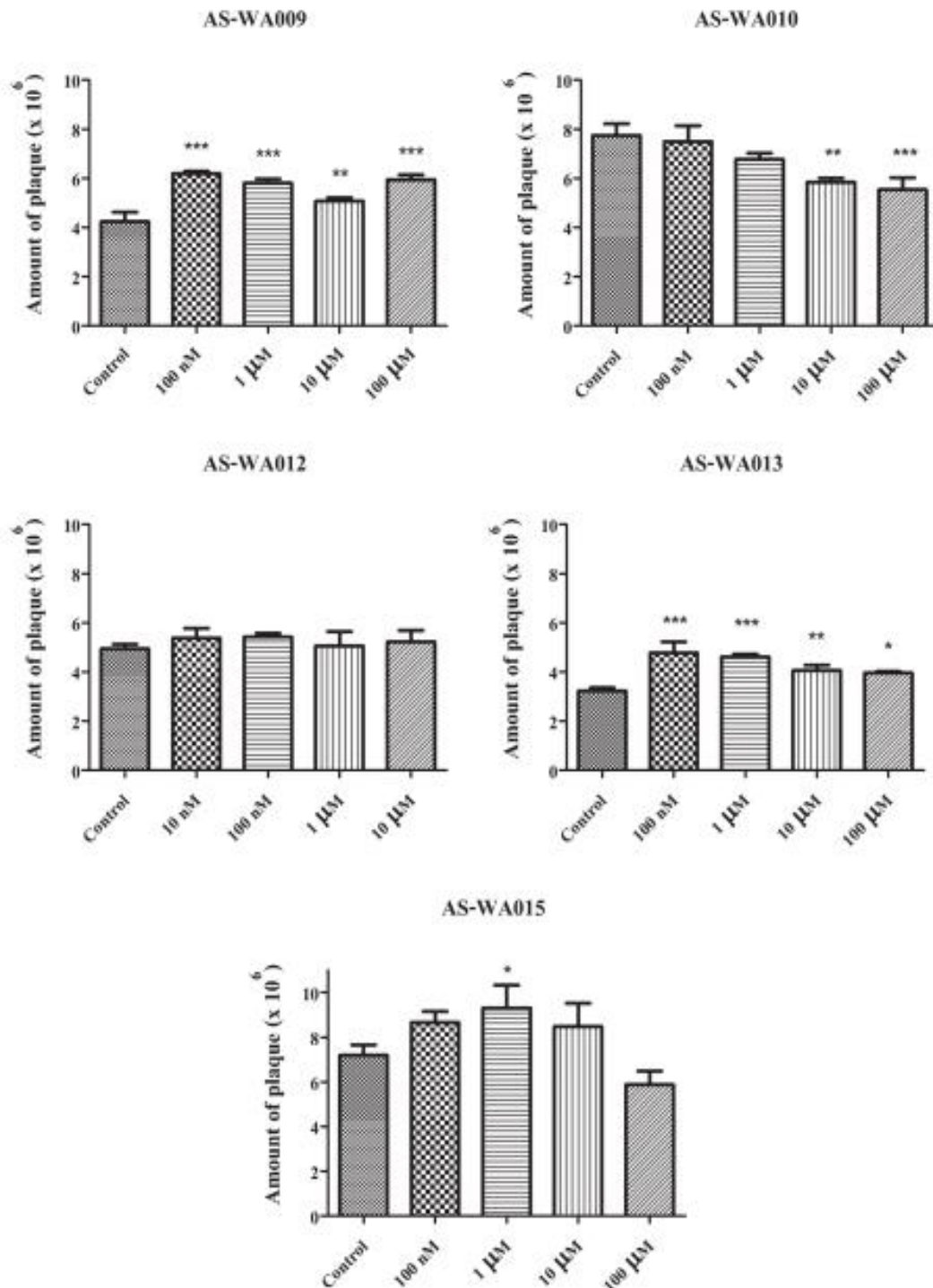


รูปที่ 9 แสดงเปอร์เซ็นต์อัตราการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งระดับมนุษย์หลังเลี้ยงกับสารบริสุทธิ์ AS-WA016 AS-WA017 AS-WA018 AS-WA019 และ AS-WA020 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมี DMEM + 0.5% DMSO เป็นชุดควบคุม ($p < 0.05$)

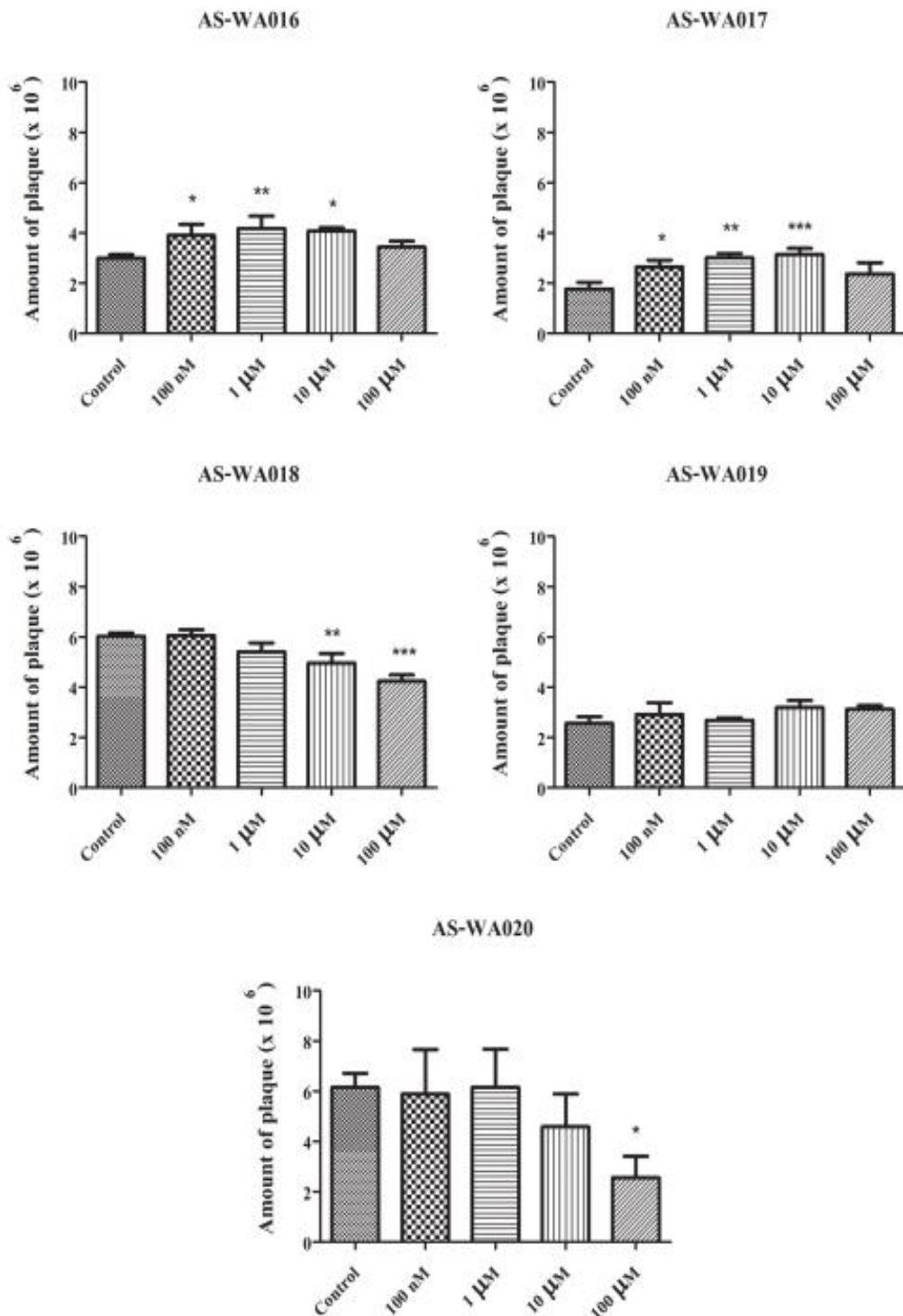
4.2 การบำบัดร่วม (Co-treatment)

จากผลการทดลองที่ 4.1 นำสารบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นสูงสุดและความเข้มข้นรองลงมา 3 ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับมนุษย์ ทำการทดสอบด้วยวิธีการบำบัดร่วม (Co-treatment) เพื่อหากลุ่มสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนไวรัสลูกหลานที่ดีที่สุด โดยผสมกับไวรัสเดงกีซีโรไทป์-2 จำนวน 10^6 PFU ต่อเซลล์มะเร็งตับมนุษย์จำนวน 10^5 เซลล์ต่อหลุม (MOI 10) ติดเชื้อเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างออกด้วย PBS และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM เพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำอาหารเลี้ยงเซลล์มาหาจำนวนไวรัสลูกหลานแต่ละหลุมด้วยวิธี Plaque assay

จากผลการทดลองจากสารบริสุทธิ์ทั้งหมด 10 ชนิด พบว่ามีสารบริสุทธิ์เพียง 3 ชนิด คือ AS-WA010 AS-WA018 และ AS-WA020 ที่พบประสิทธิภาพในการลดจำนวนไวรัสลูกหลาน ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ สาร AS-WA010 ลดจำนวนไวรัสลูกหลานจากค่าเฉลี่ยของชุดควบคุมที่ 7.75×10^6 PFU ต่อมิลลิลิตร เป็น 5.51×10^6 PFU ต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 10; AS-WA010) สาร AS-WA018 ลดจำนวนไวรัสลูกหลานจากค่าเฉลี่ยของชุดควบคุมที่ 6.03×10^6 PFU ต่อมิลลิลิตร เป็น 4.24×10^6 PFU ต่อมิลลิลิตร และสาร AS-WA020 ลดจำนวนไวรัสลูกหลานจากค่าเฉลี่ยของชุดควบคุมที่ 6.15×10^6 PFU ต่อมิลลิลิตร เป็น 2.57×10^6 PFU ต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 11; AS-WA018 และ AS-WA020) เมื่อนำค่าที่ได้มาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ลดการสร้างไวรัสลูกหลาน พบว่าสาร AS-WA010 AS-WA018 และ AS-WA020 ที่ความเข้มข้นสาร 100 ไมโครโมลาร์ สามารถลดเปอร์เซ็นต์การสร้างไวรัสลูกหลานได้ $28.46 \pm 6.28\%$ $29.72 \pm 4.21\%$ และ $58.27 \pm 13.8\%$ ตามลำดับ



รูปที่ 10 แสดงจำนวนไวรัสกลุ่กลานที่เกิดจากการผสมสารบริสุทธิ์ AS-WA009 AS-WA010 AS-WA012 AS-WA013 และ AS-WA015 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กับไวรัสแดงกีซีโรไทป์-2 ที่ MOI 10 พร้อมกันเป็นเวลา 2 ชั่วโมงขณะติดเชื้อ โดยมี DMEM + 0.5% DMSO เป็นชุดควบคุม ($p < 0.05$) ด้วยวิธีการบำบัดร่วม (Co-treatment)



รูปที่ 11 แสดงจำนวนไวรัสลูกหลานที่เกิดจากการผสมสารบริสุทธิ์ AS-WA016 AS-WA017 AS-WA018 AS-WA019 และ AS-WA020 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กับไวรัสเดงกีซีโรไทป์-2 ที่ MOI 10 พร้อมกันเป็นเวลา 2 ชั่วโมงขณะติดเชื้อ โดยมี DMEM + 0.5% DMSO เป็นชุดควบคุม ($p < 0.05$) ด้วยวิธีการบำบัดร่วม (Co-treatment)

สาร AS-WA018 และ AS-WA020 ที่มีฤทธิ์ในการลดการสร้างไวรัสลูกหลานเป็นสารที่มีโครงสร้างหลักเป็น Diarylheptanoid โดยแตกต่างกันเพียง Side Chain และ AS-WA020 เป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการลดการสร้างไวรัสลูกหลานได้ดีที่สุดใน 3 สาร ผู้วิจัยจึงมุ่งศึกษาสาร AS-WA018 AS-WA019 และ AS-WA020 ซึ่งเป็นกลุ่มสารบริสุทธิ์ที่สกัดจากว่านชักมดลูก แม้สาร AS-WA019 จะไม่ให้ผลในการยับยั้ง แต่เนื่องจากเป็นสารบริสุทธิ์ที่สกัดมาจากพืชชนิดเดียวกัน และมีโครงสร้างหลักเป็น Diarylheptanoid เหมือนกัน จึงนำมาทดสอบร่วมกันเพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบในการศึกษาหาความน่าจะเป็นของประสิทธิภาพและรูปแบบการจับของสารบริสุทธิ์กับโปรตีนสิ่งหุ้มของไวรัสเดงกีซีโรไทป์-2 โดยใช้วิธีการทดลองทางคอมพิวเตอร์ และศึกษาช่วงการออกฤทธิ์ยับยั้งของสารบริสุทธิ์ในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนของไวรัสในระดับห้องปฏิบัติการต่อไป

4.3 Molecular Docking

จากผลการทดลองการทำนายรูปแบบการจับของสารด้วยระเบียบวิธีการคำนวณ Molecular Docking (ตามข้อที่ 3.3.4.2) ผลการคำนวณค่าพลังงานยึดจับอิสระ (ตารางที่ 3) พบว่าสารบริสุทธิ์ทั้งสามชนิดสามารถจับบริเวณ binding site ของ β -OG ในโปรตีนสิ่งหุ้มของไวรัสเดงกีซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีบทบาทสำคัญในการ Fusion เข้ากับเซลล์เป้าหมายของโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัส โดยผลการทำนายโครงสร้างสารประกอบเชิงซ้อนจำนวน 100 poses แสดงให้เห็นว่าสารทั้ง 3 ชนิดสามารถเข้าจับบริเวณ binding site ของ β -OG ในโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัสเดงกีได้ทั้งหมดและให้ค่าพลังงานยึดจับอิสระที่ดี (มีค่าติดลบสูง) ซึ่งสามารถบอกได้ว่าสารทุกชนิดมีแนวโน้มที่จะจับที่บริเวณ binding site ของ β -OG ในโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัสเดงกีได้ โดยที่สาร AS-WA020 มีค่าพลังงานยึดจับอิสระต่ำที่สุด (-41.10 กิโลแคลอรีต่อโมล) ในขณะที่สาร AS-WA019 และสาร AS-WA018 มีค่าพลังงานยึดจับอิสระรองลงมาที่ -36.67 และ -32.62 กิโลแคลอรีต่อโมล ตามลำดับ ดังนั้น AS-WA020 จึงน่าจะเป็นสารบริสุทธิ์ที่มีโอกาสจับกับ binding site ของ β -OG ในโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัสเดงกีได้ดีที่สุด โดยใช้ β -OG เป็นชุดควบคุมเพื่อตรวจสอบการตั้งค่าของระบบ Molecular Docking ด้วยโปรแกรม CDOCKER ใน Accelrys Discovery Studio 2.5 พบว่า β -OG ให้ค่าพลังงานติดลบ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าที่พบว่า β -OG สามารถเข้าจับบริเวณ binding site ของ β -OG ในโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัสเดงกีได้ [65] จึงสรุปได้ว่าระบบมีการตั้งค่าที่ถูกต้อง แต่อย่างไรก็ตามการทำนายรูปแบบและพลังงานยึดจับของสารประกอบเชิงซ้อนด้วยเทคนิค Molecular Docking เป็นเพียงการประมาณการณ์ในเบื้องต้น

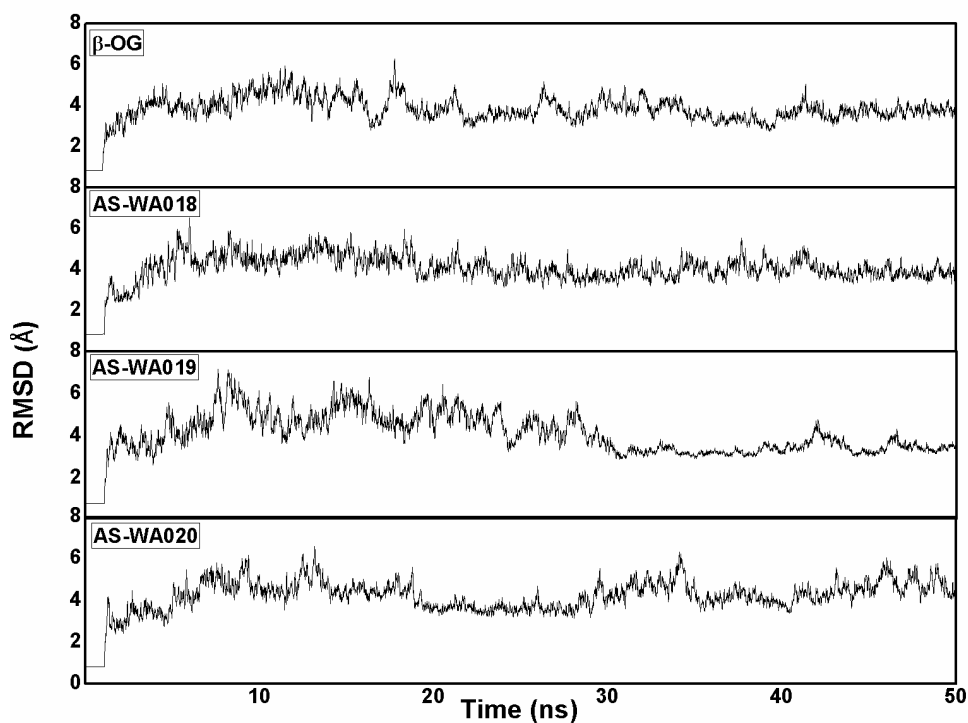
เท่านั้น ดังนั้นการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลจึงจำเป็นที่จะนำมาใช้ในการอธิบายผลการทดลองเชิงลึกต่อไป

ตารางที่ 3 แสดงค่าพลังงานยึดจับ (กิโลแคลอรีต่อโมล) จากการคำนวณทาง Molecular Docking ด้วยโปรแกรม CDOCKER ใน Accelrys Discovery Studio 2.5 ของสาร AS-WA018 AS-WA019 และ AS-WA020 โดยมีสาร β -OG เป็นสารควบคุม

	พลังงานยึดจับ จากโปรแกรม CDOCKER ใน Accelrys Discovery Studio 2.5 (กิโลแคลอรีต่อโมล)			
	AS-WA018	AS-WA019	AS-WA020	β -OG
Envelope protein DENV-2 (1OKE)	-32.62	-36.67	-41.10	-44.34

4.4 การจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล

จากผลการทดลองการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล (ตามข้อที่ 3.3.4.3) จากรูปที่ 12 แสดงให้เห็นว่าค่า RMSD ของสารทั้งสามชนิด (AS-WA018 AS-WA019 และ AS-WA020) กับบริเวณ binding site ของ β -OG ในโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัสแดงก็มีแนวโน้มเข้าสู่ภาวะสมดุลที่เวลาประมาณ 30 นาโนเซคคั่น ดังนั้น MD trajectories ในช่วงเวลา 30-50 นาโนเซคคั่น จึงนำมาใช้ในการวิเคราะห์คุณสมบัติเชิงโครงสร้าง และพฤติกรรมเชิงไดนามิกส์ ด้วยระบบ MM/PBSA และ MM/GBSA ในผลการทดลองถัดไป



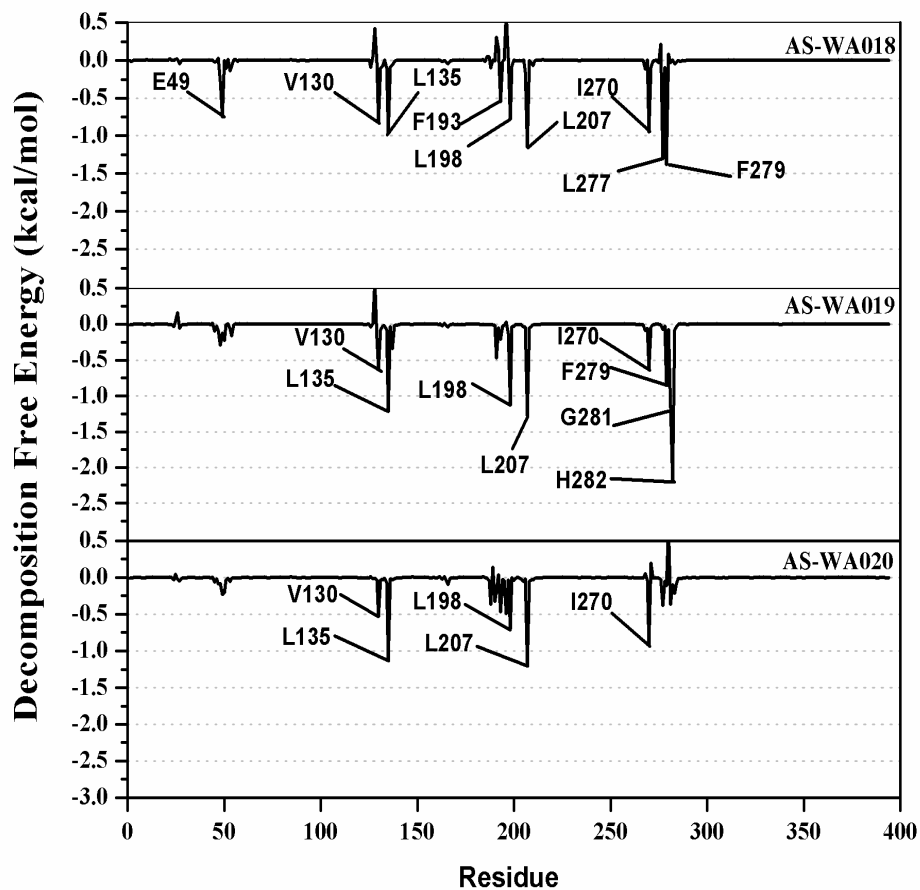
รูปที่ 12 แสดงค่า Root-mean square deviation (RMSD) ของสาร AS-WA018 AS-WA019 และ AS-WA020 ที่จับบริเวณ binding site ของ β -OG ในโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัสแดงกีซีโรไทป์-2 (1OKE)

จากตารางที่ 4 แสดงให้เห็นถึงค่าพลังงานยึดจับอิสระ (ΔG_{bind}) ในแต่ละระบบ ที่คำนวณด้วยวิธี MM/PBSA และ MM/GBSA เพื่อใช้ประเมินความสามารถในการยึดจับของสารแต่ละชนิดที่มีต่อ binding site ของ β -OG ในโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัสแดงกีซีโรไทป์-2 โดยผลการคำนวณจากทั้งสองวิธีแสดงให้เห็นว่าค่าพลังงานยึดจับอิสระระหว่างโปรตีนสิ่งหุ้มของไวรัสแดงกีซีโรไทป์-2 และสารบริสุทธิ์ (ΔG_{bind}) ของสาร AS-WA020 มีค่าดีที่สุด (ค่าติดลบมากที่สุด) ในขณะที่สาร AS-WA018 และสาร AS-WA019 มีค่าพลังงานยึดจับอิสระรองลงมาตามลำดับ โดยพบว่าแรงแวนเดอร์วาลส์มีบทบาทสำคัญในการเกิดอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนและสาร (ตารางที่ 4; $\Delta E_{vdW} \approx -35$ กิโลแคลอรีต่อโมล) เมื่อเทียบกับแรงระหว่างประจุ (ΔE_{ele}) ดังนั้นผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่า สารบริสุทธิ์ทุกชนิดมีแนวโน้มที่จะจับได้ดีที่บริเวณ binding site ของโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัสแดงกีซีโรไทป์-2 ทำการวิเคราะห์ผลของ β -OG เพื่อใช้เป็นชุดควบคุม ซึ่งพบว่า β -OG มีความสามารถในการจับกับ binding site ของ β -OG ในโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัสแดงกีซีโรไทป์-2 ได้ดีและสอดคล้องกับผลการคำนวณการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลของงานวิจัยที่มีการรายงานมาก่อนหน้า [65, 66]

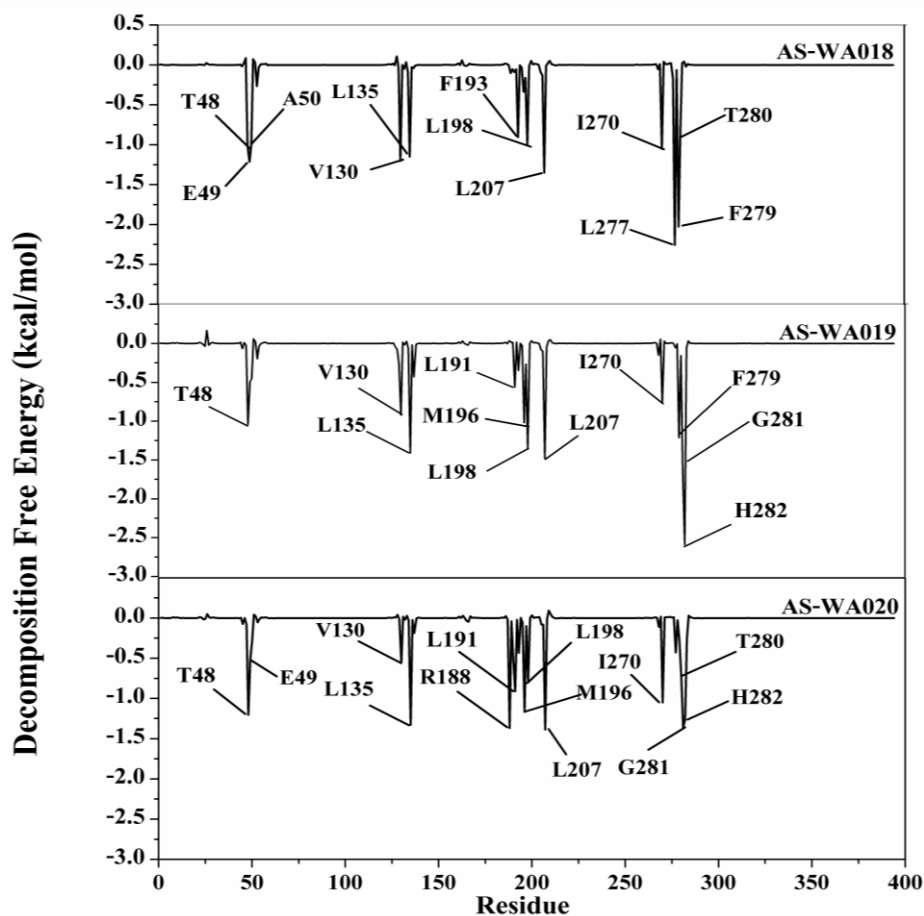
ตารางที่ 4 แสดงค่าพลังงานยึดจับอิสระคำนวณด้วยวิธี MM/PBSA และ MM/GBSA

(Kcal/mol)	Bog		AS-WA018		AS-WA019		AS-WA020	
	/Envelope		/Envelope		/Envelope		/Envelope	
	MM /PBSA	MM /GBSA	MM /PBSA	MM /GBSA	MM /PBSA	MM /GBSA	MM /PBSA	MM /GBSA
ΔE_{ele}	-19.91 \pm 7.49		-10.79 \pm 3.69		-10.66 \pm 2.00		-19.57 \pm 5.76	
ΔE_{vdW}	-33.75 \pm 3.73		-37.22 \pm 3.81		-34.50 \pm 2.21		-36.06 \pm 4.50	
ΔE_{MM}	-53.66 \pm 6.92		-48.00 \pm 4.69		-45.16 \pm 2.93		-55.63 \pm 4.24	
ΔG_{nsolv}	-5.59 \pm 0.19	-5.34 \pm 0.40	-5.65 \pm 0.15	-5.43 \pm 0.29	-5.47 \pm 0.23	-5.11 \pm 0.29	-5.97 \pm 0.18	-5.66 \pm 0.38
ΔG_{psolv}	34.65 \pm 7.12	32.11 \pm 5.42	29.41 \pm 4.68	23.07 \pm 3.06	21.80 \pm 1.98	20.00 \pm 2.0	38.58 \pm 4.59	33.79 \pm 3.48
ΔG_{solv}	29.07 \pm 7.11	26.77 \pm 5.25	23.76 \pm 4.72	17.64 \pm 2.96	16.34 \pm 1.92	14.89 \pm 1.98	32.61 \pm 4.62	28.13 \pm 3.34
ΔG_{total}	-24.6 \pm 2.93	-26.9 \pm 3.65	-24.25 \pm 2.88	-30.36 \pm 3.76	-28.82 \pm 2.7	-30.27 \pm 2.7	-23.02 \pm 4.31	-27.50 \pm 2.43
$-T\Delta S$	4.97 \pm 2.93	7.27 \pm 3.65	4.07 \pm 2.88	10.19 \pm 3.76	12.24 \pm 2.70	13.69 \pm 2.70	1.20 \pm 4.31	5.67 \pm 2.43
ΔG_{bind}	-19.63 \pm 4.14	-19.63 \pm 5.16	-20.18 \pm 4.07	-20.17 \pm 5.32	-16.58 \pm 3.82	-16.58 \pm 3.82	-21.82 \pm 6.10	-21.83 \pm 3.44

เมื่อพิจารณาบริเวณ binding site ของ β -OG ในโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัสแดงกึ่งในระดับโมเลกุล โดยพิจารณากรดอะมิโนที่สำคัญในโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัสแดงกึ่งที่เกิดอันตรกิริยากับสารบริสุทธิ์แต่ละชนิด โดยสามารถหาได้จากการคำนวณค่า free energy decomposition ($\Delta G_{bind}^{residue}$) จากการคำนวณด้วยวิธี MM/PBSA พบว่าการคำนวณด้วยวิธี MM/PBSA มีจำนวนกรดอะมิโนในโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัสที่จับกับสาร AS-WA020 น้อยมาก เมื่อเทียบกับจำนวนกรดอะมิโนที่จับกับสาร AS-WA018 และ AS-WA019 ซึ่งไม่สอดคล้องกับค่าพลังงานยึดจับอิสระ (รูปที่ 13) และผลการทดลองทางห้องปฏิบัติการ จึงไม่นำมาใช้ในการอธิบายผลการทดลอง แต่จะพิจารณากรดอะมิโนที่สำคัญในโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัสแดงกึ่งที่เกิดอันตรกิริยากับสารบริสุทธิ์แต่ละชนิด ที่ได้จากการคำนวณด้วยวิธี MM/GBSA ซึ่งแสดงดังรูปที่ 14 โดยมีค่า free energy decomposition ($\Delta G_{bind}^{residue}$) สอดคล้องกับค่าพลังงานยึดจับอิสระ และผลการทดลองทางห้องปฏิบัติการ



รูปที่ 13 แสดงค่าพลังงาน Decomposition Free Energy ที่มีค่าน้อยกว่า 0.5 กิโลแคลอรีต่อโมล โดยวิธีการคำนวณ MM/PBSA ของกรดอะมิโนแต่ละตัวในโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัสแดงกึ่งที่มีต่อสารบริสุทธิ์ AS-WA018 AS-WA019 และ AS-WA020



รูปที่ 14 แสดงค่าพลังงาน Decomposition Free Energy ที่มีค่าน้อยกว่า 0.5 กิโลแคลอรีต่อโมล โดยวิธีการคำนวณ MM/GBSA ของกรดอะมิโนแต่ละตัวในโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัสแดงที่มีต่อสารบริสุทธิ์ AS-WA018 AS-WA019 และ AS-WA020

ค่า free energy decomposition ($\Delta G_{bind}^{residue}$) ที่คำนวณด้วยวิธี MM/GBSA จาก 100 MD snapshots ที่เวลา 30-50 นาโนเซคชั่น พบว่ากรดอะมิโนไทโอนีน 48 วารีน 130 ลูซีน 135 ลูซีน 198 ลูซีน 207 และ ไอโซลูซีน 270 มีความสำคัญในการเกิดอันตรกิริยากับสารบริสุทธิ์ทั้งสามชนิด และเนื่องจากสารบริสุทธิ์ทั้งสามชนิดมีโครงสร้างหลักทางเคมีเหมือนกัน คือ ส่วนที่เป็น Diarylheptanoid backbone ผลที่คำนวณได้จึงมีความคล้ายคลึงกันในแต่ละระบบ โดยพบว่ากรดอะมิโนจำนวนทั้งสิ้น 17 ชนิด ได้แก่ ไทโอนีน 48 กรดกลูตามิก 49 อะลานีน 50 วารีน 130 ลูซีน 135 อาร์จินีน 188 ลูซีน 191 ฟีนอลอะลานีน 193 เมทไทโอนีน 196 ลูซีน 198 ลูซีน 207 ไอโซลูซีน 270 ลูซีน 277 ฟีนอลอะลานีน 279 ทรีโอนีน 280 ไกลซีน 281 และ ฮีสติดีน 282 มีบทบาทสำคัญในการจับกับสารแต่ละชนิด ดังนั้นเพื่อที่จะดูความสำคัญของกรดอะมิโนทั้ง 17 ตัวนี้ในเชิงลึก กรดอะมิโน

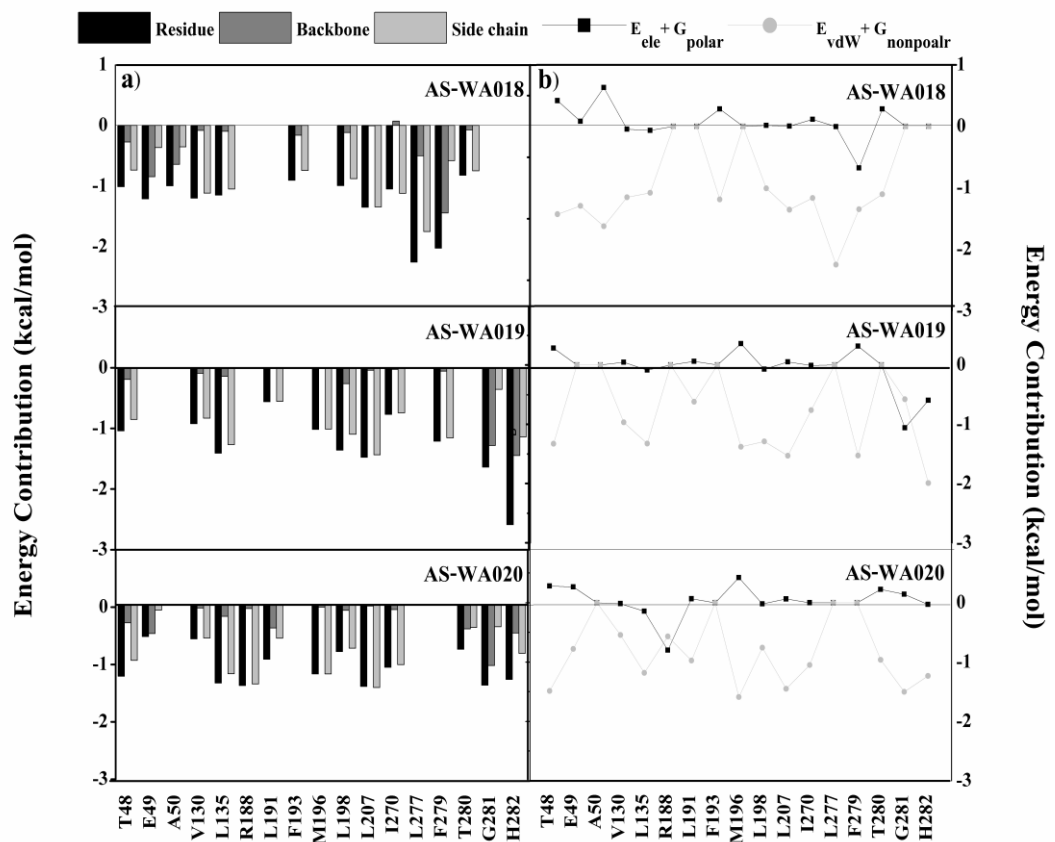
โนเหล่านี้จึงถูกพิจารณาแยกกันว่าการจับของกรดอะมิโนแต่ละตัวต่อสารแต่ละชนิดมาจากส่วนที่เป็น backbone ($\text{NH}_2\text{-CH-COOH}$) หรือ side chain (หมู่ฟังก์ชัน R) ของกรดอะมิโน (รูปที่ 15a) และมาจากเทอมพลังงานที่มีขั้วหรือเทอมพลังงานที่ไม่มีขั้ว (รูปที่ 15b) โดยผลการทดลองชี้ให้เห็นว่ากรดอะมิโนส่วนใหญ่มีแนวโน้มที่จะใช้ส่วนที่เป็น side chain ในการจับกับสารบริสุทธิ์มากกว่าส่วนที่เป็น backbone และพลังงานส่วนใหญ่ของกรดอะมิโนแต่ละตัวที่ใช้ในการเกิดอันตรกิริยากับสารบริสุทธิ์แต่ละชนิดส่วนใหญ่มาจากเทอมพลังงานที่ไม่มีขั้ว

อย่างไรก็ตาม ผลของ AS-WA020 แสดงให้เห็นว่าแรงระหว่างประจุหรือเทอมพลังงานที่มีขั้ว ณ ตำแหน่ง อาร์จินีน 188 มีค่ามากกว่าแรงแวนเดอร์วาลส์หรือเทอมพลังงานที่ไม่มีขั้วซึ่งอาจเป็นผลอันเนื่องมาจากการเกิดพันธะไฮโดรเจน (รูปที่ 16)

พันธะไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นระหว่างกรดอะมิโนบริเวณ binding site ของ β -OG ในโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัสแดงก็และสารแต่ละชนิด ดังแสดงในรูปที่ 16 สามารถประเมินความแรงของพันธะไฮโดรเจนได้จากความถี่ในการเกิดของพันธะไฮโดรเจนนั้น (percentage of hydrogen bond occupation) โดยอาศัยหลักเกณฑ์เชิงโครงสร้างดังต่อไปนี้

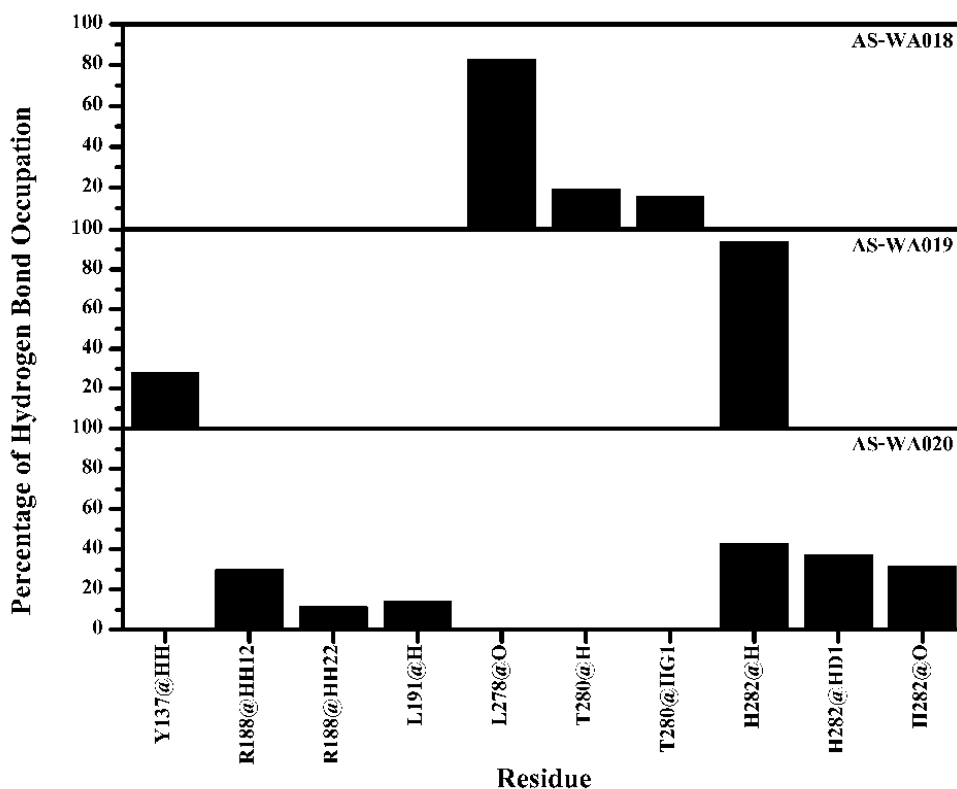
- 1.) ระยะห่างระหว่างตัวให้และตัวรับโปรตอนต้องน้อยกว่าหรือเท่ากับ 3.5 Å
- 2.) มุมของพันธะไฮโดรเจนต้องมากกว่าหรือเท่ากับ 120 องศา

ผลการวิเคราะห์พบว่าสาร AS-WA020 มีจำนวนพันธะไฮโดรเจน (6 พันธะ) ที่จับกับโปรตีนบริเวณ binding site ของ β -OG ในโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัสแดงที่สูงที่สุด มากกว่าสาร AS-WA018 (3 พันธะ) และสาร AS-WA019 (2 พันธะ) ตามลำดับ



รูปที่ 15 แสดงค่าพลังงาน Energy Contribution (กิโลแคลอรีต่อโมล) ของกรดอะมิโนในโปรตีนสิ่ง
หุ้มไวรัสแดงที่สำคัญในการจับกับสาร AS-WA018 AS-WA019 และ AS-WA020 ที่บริเวณ
binding site ของ β -OG ในโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัสแดงที่ซีโรไทป์-2

- แสดงถึงกรดอะมิโนต่าง ๆ ของโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัสแดงที่จับโครงสร้างส่วน backbone หรือ side chain ของสารต่าง ๆ
- แสดงถึงกรดอะมิโนต่าง ๆ ของโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัสแดงที่จับด้วยพลังงานแบบ non-polar term หรือ polar term กับสารต่าง ๆ



รูปที่ 16 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความถี่ในการเกิดพันธะไฮโดรเจนของกรดอะมิโนในโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัส
แดงก็กับสาร AS-WA018 AS-WA019 และ AS-WA020

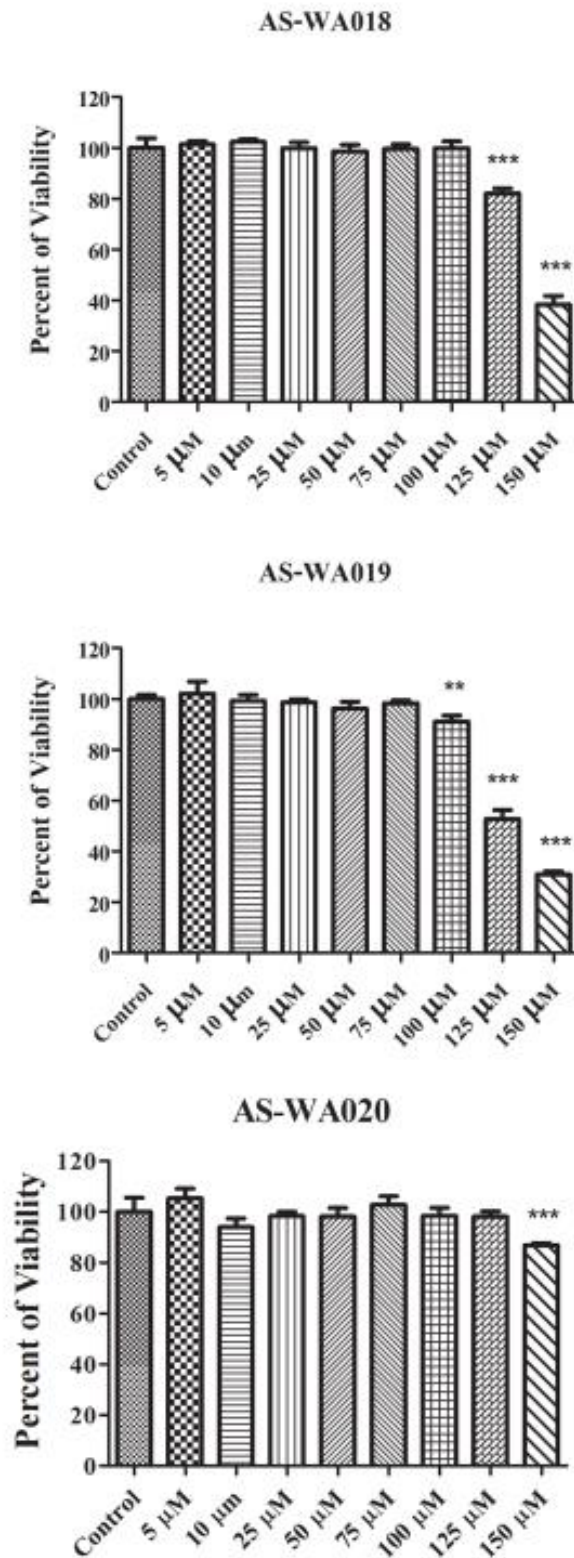
จากผลการทดลอง คัดเลือกกลุ่มสารบริสุทธิ์ที่มีประสิทธิภาพในการลดการสร้างไวรัส
ลูกหลานระดับห้องปฏิบัติการทั้งหมด 10 ชนิด พบว่ามีสาร 3 ชนิด คือ AS-WA010 AS-WA018 และ
AS-WA020 ประสิทธิภาพในการลดการสร้างไวรัสลูกหลาน โดยสาร AS-WA020 ให้ผลการยับยั้งที่ดี
ที่สุด (รูปที่ 10 และ 11) ผู้วิจัยจึงเลือกสาร AS-WA018 AS-WA019 และ AS-WA020 ซึ่งเป็นสาร
บริสุทธิ์จากต้นว่านชั้กมตุ๊กและมีโครงสร้างหลักทางเคมีคล้ายกันมาศึกษาต่อในการทดลองทาง
คอมพิวเตอร์ โดยพบว่าสาร AS-WA018 AS-WA019 และ AS-WA020 ทั้ง 3 ชนิด มีแนวโน้มที่จะ
สามารถจับบริเวณ binding site ของ β -OG ในโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัสแดงก็ โดยที่สาร AS-WA018 และ
AS-WA020 มีแนวโน้มที่จะจับได้ดีกว่าสาร AS-WA019 และไม่แตกต่างอย่างมีนัยยะสำคัญระหว่าง
สาร AS-WA018 และ AS-WA020 ดังนั้นในการทดลองทางห้องปฏิบัติการ จะทำการทดลองโดยใช้
สารบริสุทธิ์ทั้งสามชนิดนี้ ในการหาช่วงการลดการสร้างไวรัสลูกหลานต่อไป

4.5 ทดสอบความเป็นพิษของสารต่อเซลล์มะเร็งระดับมนุษย์ด้วยวิธี MTT assay

ทำการทดสอบหาความเข้มข้นที่สูงที่สุดของสารที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งระดับมนุษย์ใหม่อีกครั้ง โดยการเพิ่มช่วงความเข้มข้นให้แคบลง เพื่อหาความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ได้แม่นยำมากขึ้น โดยทำการทดสอบที่ 5 10 25 50 75 100 125 และ 150 ไมโครโมลาร์ (โดยเติม DMSO ให้ได้ 0.5% เท่ากันในทุก ๆ ความเข้มข้น) และไม่ใส่สารตัวอย่างแต่ใส่ 0.5% DMSO เพื่อใช้เป็นชุดควบคุม (Control) ทำ 3 การทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ (ภาคผนวก ข; ตารางที่ 5-7)

ผลการทดสอบพบว่า สาร AS-WA018 AS-WA019 และ AS-WA020 มีความเข้มข้นที่สูงที่สุดและไม่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งระดับมนุษย์ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ 75 ไมโครโมลาร์ และ 125 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ดังรูปที่ 17

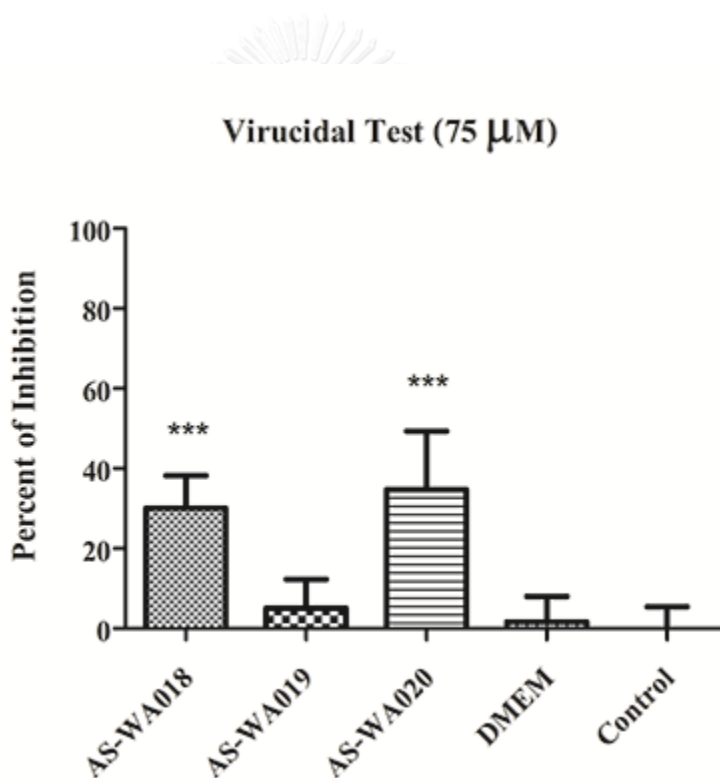
จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งระดับมนุษย์ พบว่าความเข้มข้นที่สูงที่สุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่เหมือนกันทั้งสามชนิดคือความเข้มข้น 75 ไมโครโมลาร์ ดังนั้นการทดลองขั้นต่อไป จะใช้ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครโมลาร์ เพียงความเข้มข้นเดียว เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารบริสุทธิ์ทั้งสามชนิด



รูปที่ 17 แสดงเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์มะเร็งตับมนุษย์หลังเลี้ยงกับสาร AS-WA018 AS-WA019 และ AS-WA020 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ($p < 0.05$)

4.6 การฆ่าไวรัส (Virucidal test)

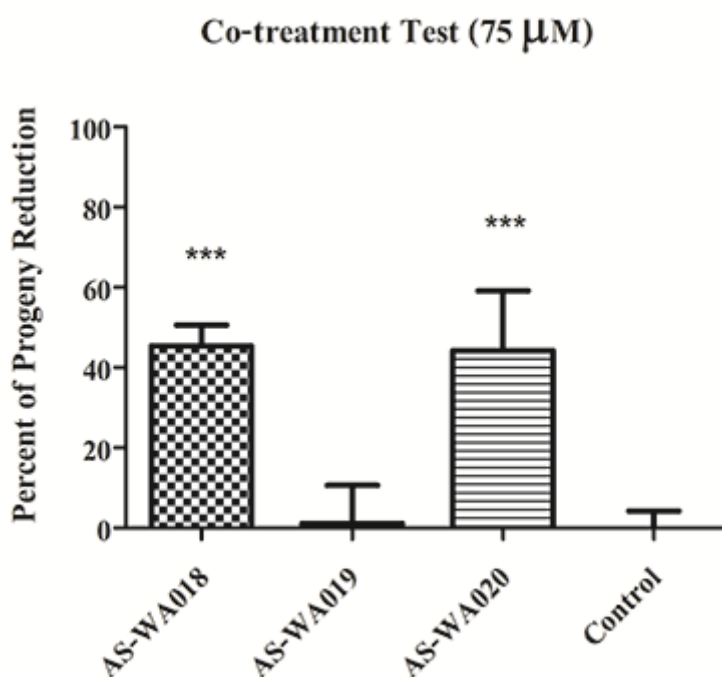
ทดสอบการยับยั้งการติดเชื้อไวรัสเดงกีซีโรไทป์-2 โดยผสมสารที่ความเข้มข้น 75 ไมโครโมลาร์ กับไวรัสเดงกีเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในสภาวะที่เหมาะสม จากนั้นนำไปหาจำนวนไวรัสด้วยวิธี Plaque Assay ทำ 3 การทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ (ภาคผนวก ข; ตารางที่ 8) โดยคำนวณผลเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งรวมทั้งหมดของสารบริสุทธิ์แต่ละชนิด ดังรูปที่ 18 พบว่าสาร AS-WA018 และ AS-WA020 สามารถยับยั้งเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของไวรัสได้ที่ $30.04 \pm 8.17\%$ และ $34.68 \pm 14.67\%$ ตามลำดับ โดยที่สารทั้งสองให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยยะสำคัญ ในขณะที่สาร AS-WA019 ไม่พบการยับยั้งการติดเชื้อของไวรัส ($p < 0.05$)



รูปที่ 18 แสดงเปอร์เซ็นต์การฆ่าไวรัสเดงกี (Virucidal test) เมื่อผสมสาร AS-WA018 AS-WA019 และ AS-WA020 ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครโมลาร์ กับไวรัสเดงกีซีโรไทป์-2 ที่ MOI 10 พร้อมกันเป็นเวลา 1 ชั่วโมงโดยตรง โดยมี DMEM + 0.5% DMSO เป็นชุดควบคุม ($p < 0.05$) ด้วยวิธีการฆ่าไวรัส (Virucidal test)

4.7 การบำบัดร่วม (Co-treatment)

ทดสอบการลดการสร้างไวรัสลูกหลานในเซลล์มะเร็งตับมนุษย์ โดยการผสมสารต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครโมลาร์ กับไวรัสเดงกี แล้วทำการติดเชื้อเข้าสู่เซลล์มะเร็งตับมนุษย์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างและเติมอาหาร DMEM ที่มี FBS เลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้มาหาปริมาณไวรัสลูกหลานด้วยวิธี Plaque Assay ทำ 3 การทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ (ภาคผนวก ข; ตารางที่ 9) คำนวณหาผลเฉลี่ยการยับยั้งรวมทั้งหมดของสารแต่ละชนิด โดยแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ลดการสร้างไวรัสลูกหลาน ดังแสดงในรูปที่ 19 พบว่า AS-WA018 และ AS-WA020 สามารถลดเปอร์เซ็นต์การสร้างไวรัสลูกหลานที่ $45.41 \pm 5.20\%$ และ $44.22 \pm 14.90\%$ ตามลำดับ โดยที่สารทั้งสองให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยยะสำคัญ ในขณะที่สาร AS-WA019 ไม่สามารถลดการสร้างไวรัสลูกหลานได้ ($p < 0.05$)



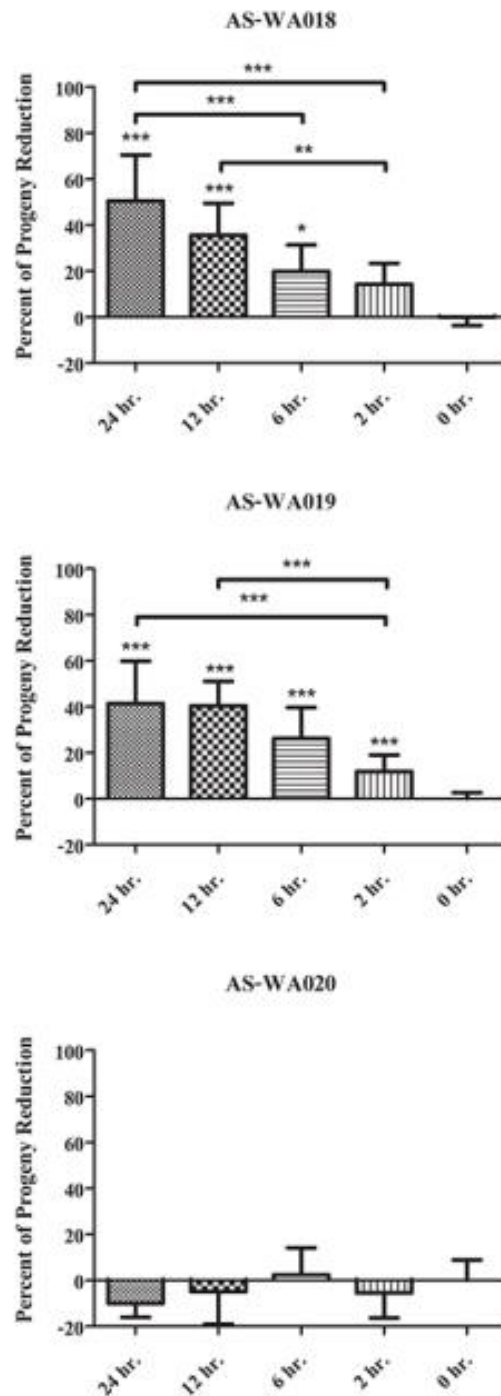
รูปที่ 19 แสดงเปอร์เซ็นต์ลดการสร้างไวรัสลูกหลานในเซลล์มะเร็งตับมนุษย์ เมื่อผสมสาร AS-WA018 AS-WA019 และ AS-WA020 ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครโมลาร์ กับไวรัสเดงกี ซีโรไทป์-2 ที่ MOI 10 พร้อมกันเป็นเวลา 2 ชั่วโมงขณะติดเชื้อ โดยมี DMEM + 0.5% DMSO เป็นชุดควบคุม ($p < 0.05$) ด้วยวิธีการบำบัดร่วม (Co-treatment)

4.8 การบำบัดก่อนติดเชื้อ (Pre-exposure treatment)

นำสารแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 75 ไมโครโมลาร์ มาเลี้ยงกับเซลล์มะเร็งตับมนุษย์เป็นเวลา 0 2 6 12 และ 24 ชั่วโมง ก่อนการติดเชื้อไวรัสแดงกีซีโรไทป์-2 โดยใช้การเลี้ยงสารและล้างออกทันทีเป็นชุดควบคุม (0 ชั่วโมง) หลังติดเชื้อแล้วล้างด้วย PBS และเติมอาหาร DMEM ที่มี FBS เลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บอาหารและนำมาหาจำนวนไวรัสในอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธี Plaque Assay นำจำนวนไวรัสลูกหลานที่ได้ (ภาคผนวก ข; ตารางที่ 10-12) มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การลดการสร้างไวรัสลูกหลานดังแสดงในรูปที่ 20 พบว่า สาร AS-WA018 สามารถลดการสร้างไวรัสลูกหลานได้ดีที่สุดเมื่อใส่สารก่อนติดเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีแนวโน้มการยับยั้งที่ดีกว่าแต่ให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยยะสำคัญกับการใส่สารที่ 12 ชั่วโมงก่อนการติดเชื้อ ($p < 0.05$) และให้ผลลดลงตามลำดับ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม โดยเปอร์เซ็นต์การลดการสร้างไวรัสลูกหลานของสาร AS-WA018 ที่ 2 6 12 และ 24 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ $14.27 \pm 9.07\%$ $19.81 \pm 11.56\%$ $35.57 \pm 13.81\%$ และ $50.45 \pm 19.97\%$ ตามลำดับ

สาร AS-WA019 สามารถลดการสร้างไวรัสลูกหลานได้ดีที่สุดเมื่อใส่สารก่อนติดเชื้อเป็นเวลา 24 และ 12 โดยมีแนวโน้มการยับยั้งที่ดีกว่าแต่ให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยยะสำคัญกับการใส่สารที่ 6 ชั่วโมงก่อนการติดเชื้อ ($p < 0.05$) และให้ผลลดลงตามลำดับ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม โดยเปอร์เซ็นต์การลดการสร้างไวรัสลูกหลานของสาร AS-WA019 ที่ 2 6 12 และ 24 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ $11.87 \pm 7.08\%$ $26.15 \pm 13.52\%$ $40.37 \pm 10.64\%$ และ $41.38 \pm 18.46\%$ ตามลำดับ

ในขณะที่ สาร AS-WA020 ไม่สามารถลดการสร้างไวรัสลูกหลานได้ในทุกช่วงของการเลี้ยงสารก่อนติดเชื้อ 24 ชั่วโมง

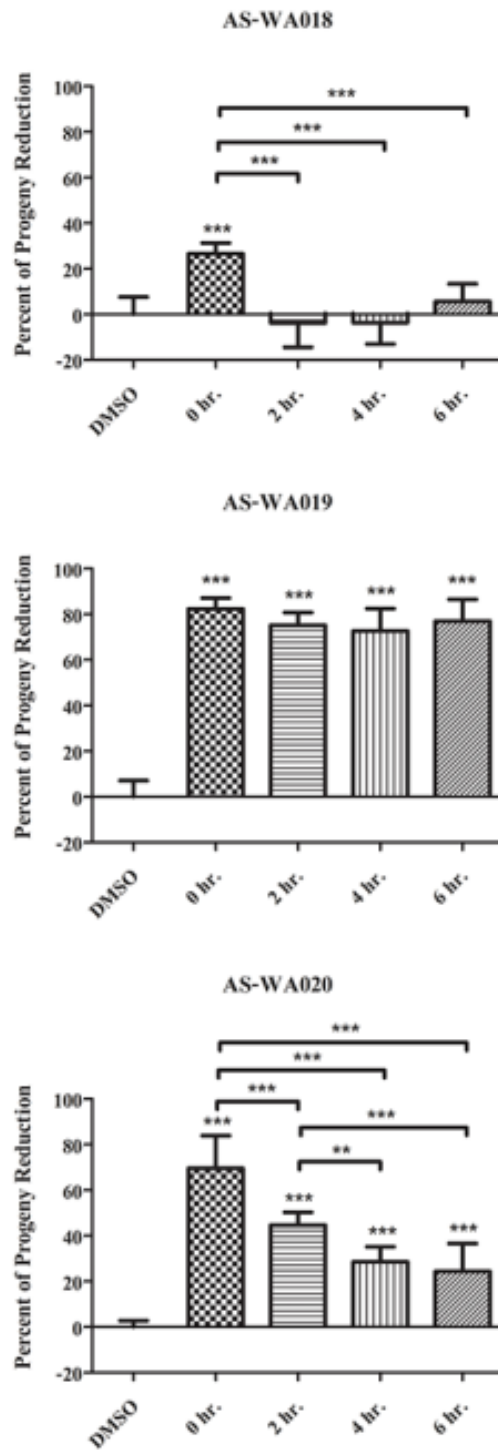


รูปที่ 20 แสดงเปอร์เซ็นต์ลดการสร้างไวรัสลูกหลานในเซลล์มะเร็งตับมนุษย์เมื่อใส่สาร AS-WA018 AS-WA019 และ AS-WA020 ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 12 6 และ 2 ก่อนการติดเชื้อไวรัสเดงกีซีโรไทป์-2 ที่ MOI 10 โดยใส่สารและล้างออกทันที (0 ชั่วโมง) เป็นชุดควบคุม ($p < 0.05$) ด้วยวิธีการบำบัดก่อนติดเชื้อ (Pre-exposure treatment)

4.9 การบำบัดหลังติดเชื้อ (Post-exposure treatment)

หลังจากติดเชื้อไวรัสเดงกีเข้าสู่เซลล์ ล้างเซลล์ด้วย PBS แล้วใส่สารแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 75 ไมโครโมลาร์ กับเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีที่เวลา 0 2 4 และ 6 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ จากนั้นใส่สารกับเซลล์และเลี้ยงต่อจนครบ 24 ชั่วโมง หาจำนวนไวรัสในอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธี Plaque Assay (ภาคผนวก ข; ตารางที่ 13-15) จากรูปที่ 21 พบว่า สาร AS-WA018 สามารถลดการสร้างไวรัสลูกหลานเมื่อใส่สารทันทีหลังติดเชื้อเท่านั้น โดยให้เปอร์เซ็นต์การลดการสร้างไวรัสลูกหลานที่ $26.53 \pm 4.74\%$

ในขณะที่สาร AS-WA019 และ AS-WA020 พบว่าสามารถลดการสร้างไวรัสลูกหลานได้ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่สารไม่ว่าจะใส่สารหลังจากติดเชื้อที่ 0 2 4 หรือ 6 ชั่วโมงก็ตาม โดยเฉพาะ AS-WA019 พบว่าเมื่อใส่สารหลังการติดเชื้อที่ 0 2 4 และ 6 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ ให้ค่าการลดการสร้างไวรัสมาก โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การลดการสร้างไวรัสลูกหลานที่ $82.36 \pm 4.7\%$ $75.12 \pm 5.64\%$ $72.65 \pm 9.80\%$ และ $76.98 \pm 9.49\%$ ตามลำดับ โดยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยยะสำคัญ ในขณะที่สาร AS-WA020 ให้ค่าลดการสร้างไวรัสลูกหลานที่สูงเมื่อใส่สารทันทีหลังติดเชื้อ และมีค่าน้อยลงเมื่อใส่สารช้าลง โดยมีค่าการลดการสร้างไวรัสลูกหลานที่ $69.51 \pm 14.31\%$ $44.63 \pm 5.66\%$ $28.52 \pm 6.68\%$ และ $24.38 \pm 12.17\%$ เมื่อใส่สารหลังการติดเชื้อที่ 0 2 4 และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ



รูปที่ 21 แสดงเปอร์เซ็นต์ลดการสร้างไวรัสลูกหลานในเซลล์มะเร็งตับมนุษย์เมื่อใส่สาร AS-WA018 AS-WA019 และ AS-WA020 ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครโมลาร์ ที่เวลา 0 2 4 และ 6 ชั่วโมง การติดเชื้อไวรัสเดงกีซีโรโทป-2 ที่ MOI 10 โดยมี DMEM + 0.5% DMSO เป็นชุดควบคุม ($p < 0.05$) ด้วยวิธีการบำบัดหลังติดเชื้อ (Post-exposure treatment)

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

นำสารบริสุทธิ์ที่ผ่านการทดสอบหาความเข้มข้นสูงที่สุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ มาทดสอบความสามารถในการลดการสร้างไวรัสลูกหลานด้วยวิธีการบำบัดร่วม (Co-treatment) พบว่ามีสารบริสุทธิ์เพียง 3 ชนิด ได้แก่ AS-WA010 AS-WA018 และ AS-WA020 ที่สามารถยับยั้งการติดเชื้อของไวรัสแดงก็ได้

สาร AS-WA010 มีโครงสร้างหลักอยู่ในกลุ่ม Indolealkaloids พบว่ามีฤทธิ์ในการช่วยลดความดันโลหิตสูง ความดันโลหิตต่ำ ระบบหลอดเลือดหัวใจ โรคทางระบบประสาท อหิวาตกโรค โรคระบบทางเดินอาหาร ท้องเสีย โรคบิด ช่วยการทำงานของกล้ามเนื้อเรียบ และป้องกันการเกิดโรคหลอดเลือดในสมอง (Strokes) เป็นต้น [33-36] ในขณะที่สารบริสุทธิ์ AS-WA018 และ AS-WA020 มีโครงสร้างหลักเป็น Diarylheptanoid ซึ่งสาร Diarylheptanoid มีประสิทธิภาพทางชีวภาพที่หลากหลายเช่นกัน อาทิ ฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็ง [46, 47] การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ [48] ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Anti-oxidant) การยับยั้งการอักเสบ (Anti-inflammatory) [51] และการยับยั้งเชื้อรา (Anti-fungal) [52, 53] ซึ่งจากการศึกษาสาร Curcumin ซึ่งเป็นสารที่มีโครงสร้างหลักเป็น Diarylheptanoid เช่นกัน พบว่า Curcumin สามารถยับยั้งไวรัสได้หลายชนิด อาทิ Zika virus (ZIKV) Chikungunya virus (CHIKV) [56] รวมถึงไวรัสแดงอีกด้วย [64]

ผลการทดลองในการหากลุ่มสารบริสุทธิ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสแดงได้ด้วยวิธีการบำบัดร่วม พบว่าสารบริสุทธิ์ AS-WA020 มีประสิทธิภาพการลดการสร้างไวรัสลูกหลานได้ดีที่สุด รวมถึงสารบริสุทธิ์ AS-WA018 ก็สามารถยับยั้งการสร้างไวรัสลูกหลานได้ ผู้วิจัยจึงคัดเลือกกลุ่มสาร AS-WA018 AS-WA019 และ AS-WA020 ซึ่งมีโครงสร้างหลักอยู่ในกลุ่ม Diarylheptanoid เดียวกันมาทำการศึกษายับยั้งไวรัสแดงที่ต่อไป ที่ถึงแม้สารบริสุทธิ์ AS-WA019 จะไม่พบผลในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสแดงก็ในวิธีการบำบัดร่วม จึงนำสารบริสุทธิ์ทั้ง 3 ชนิด มาศึกษาในเชิงเปรียบเทียบด้วยวิธีทางคอมพิวเตอร์

สำหรับการทดสอบด้วยวิธีทางคอมพิวเตอร์ โดยจำลองการจับของสาร AS-WA018 AS-WA019 และ AS-WA020 กับ binding site ของ β -OG ในโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัสแดงที่ ซึ่งเป็นบริเวณที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงการจัดเรียงโครงสร้างของโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัส หากบริเวณ binding site ของ β -OG นี้ถูกจับด้วยโมเลกุลหรือสารใด ๆ จะทำให้โปรตีนสิ่งหุ้มของไวรัสไม่สามารถเปลี่ยนการ

จัดเรียงตัวใหม่ได้ ทำให้ไวรัสไม่สามารถปลดปล่อยสารพันธุกรรมออกมานอกเอนโดโซม จึงเกิดการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสได้ [65, 66]

ผลการทดสอบด้วยวิธี Molecular Dynamic ในงานวิจัยนี้พบว่า β -OG สามารถเข้าจับที่บริเวณ binding site ของ β -OG ในโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัสแดงก็ได้และมีการจัดเรียงตัวของโมเลกุลใกล้เคียงกับโครงสร้างที่ได้จากการตกผลึก จึงแสดงให้เห็นว่าผลที่ได้จากการทดสอบนี้มีความถูกต้องและน่าเชื่อถือในการตั้งค่าระบบโดยอ้างอิงจากการทดลองก่อนหน้า และผลการทดลองพบว่าสาร AS-WA020 ให้ค่าพลังงานยึดจับอิสระ (ΔG_{bind}) ดีที่สุด แต่ไม่แตกต่างอย่างนัยยะสำคัญกับสาร AS-WA018 โดยที่สาร AS-WA019 มีค่าพลังงานยึดจับอิสระน้อยที่สุด ซึ่งค่าพลังงานยึดจับอิสระของทั้งสามสารนั้นพบว่าแรงแวนเดอร์วาลส์มีบทบาทสำคัญในการเกิดอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนและลิแกนด์มากที่สุด ($\Delta E_{vdW} \approx -35$ กิโลแคลอรีต่อโมล; ตารางที่ 4)

นอกจากนี้การทดสอบทางคอมพิวเตอร์ด้วยวิธี Molecular Dynamic ยังพบว่า ตำแหน่งกรดอะมิโนที่มีความสำคัญในการเกิดอันตรกิริยามีทั้งสิ้น 17 กรดอะมิโน ได้แก่ ไทโอนีน 48 กรดกลูตามิก 49 อะลานีน 50 วารีน 130 ลูซีน 135 อาร์จินีน 188 ลูซีน 191 ฟีนิลอะลานีน 193 เมทไทโอนีน 196 ลูซีน 198 ลูซีน 207 และ ไอโซลูซีน 270 ลูซีน 277 ฟีนิลอะลานีน 279 ทรีโอนีน 280 ไกลซีน 281 ฮีสติดีน 282 แต่กรดอะมิโนที่มีเหมือนกันทั้งสามระบบ (AS-WA018 AS-WA019 และ AS-WA020) คือ กรดอะมิโน ไทโอนีน 48 วารีน 130 ลูซีน 135 อาร์จินีน 188 ลูซีน 198 ลูซีน 207 และ ไอโซลูซีน 270 กรดอะมิโนที่เหมือนกันเหล่านี้จะเป็นกรดอะมิโนหลักที่ทำพันธะกับโครงสร้างหลักของสาร และพบว่ากรดอะมิโนส่วนใหญ่จะใช้ส่วนที่เป็น side chain (หมู่ R) ในการจับกับสาร มากกว่าส่วนที่เป็น backbone (HC-N)(-C=O-N) พลังงานส่วนใหญ่ของกรดอะมิโนแต่ละตัวที่ใช้ในการเกิดอันตรกิริยากับสารแต่ละชนิดส่วนใหญ่มาจากเทอมพลังงานที่ไม่มีขั้ว แต่อย่างไรก็ตาม ผลของ AS-WA020 แสดงให้เห็นว่าแรงระหว่างประจุหรือเทอมพลังงานที่มีขั้ว ณ ตำแหน่ง อาร์จินีน 188 เนื่องมาจากการเกิดพันธะไฮโดรเจนมีค่ามากกว่าแรงแวนเดอร์วาลส์หรือเทอมพลังงานที่ไม่มีขั้ว

จากผลการวิเคราะห์จำนวนพันธะไฮโดรเจนบริเวณ binding site ของ β -OG ในโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัสแดงก็ พบว่า AS-WA020 มีจำนวนพันธะไฮโดรเจน 6 พันธะ ซึ่งมีจำนวนพันธะมากที่สุดในสารทั้ง 3 ชนิด เนื่องจากโครงสร้างของสาร AS-WA020 มีหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl) มากกว่าสารชนิดอื่น และแม้ผลจะพบว่าสาร AS-WA018 และสาร AS-WA019 มีความถี่ในการเกิดพันธะไฮโดรเจนที่สูงมากที่ตำแหน่งกรดอะมิโน ลูซีน 278 (82.76%) และ ฮีสติดีน 282 (93.95%) แต่มี

พันธะไฮโดรเจนจำนวน 3 และ 2 พันธะ ตามลำดับ จึงอาจบอกเป็นนัยได้ว่าที่สาร AS-WA020 สามารถยึดจับบริเวณ binding site ของ β -OG ในโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัสแดงก็ได้ดีอาจเกิดเนื่องจากมีจำนวนพันธะไฮโดรเจนที่มากกว่าทำให้การยึดจับกับสารได้ดีกว่า

ดังนั้นผลการวิเคราะห์ทางคอมพิวเตอร์แสดงให้เห็นว่า สารทุกชนิดมีแนวโน้มที่จะจับได้ดีที่บริเวณ binding site ของ β -OG ในโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัสแดงก็ โดยสารที่จับได้ดีที่สุดคือสาร AS-WA020 และ AS-WA018 สารทั้งสองชนิดนี้จึงมีแนวโน้มที่จะออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัสแดงก็ ทำให้ไวรัสไม่สามารถปลดปล่อยสารพันธุกรรมจากเอนโดโซมเพื่อเพิ่มจำนวนไวรัสในเซลล์เป้าหมายได้

สาร AS-WA018 AS-WA019 และ 020 ถูกนำมาทดสอบทางห้องปฏิบัติการเชิงลึก 4 การทดลอง คือ Virucidal test Co-treatment Pre-exposure treatment และ Post-exposure treatment

พบว่าสาร AS-WA018 และ AS-WA020 สามารถยับยั้งการติดเชื้อในการทดสอบ Virucidal test และลดการสร้างไวรัสลูกหลานในการทดสอบ Co-treatment ได้ โดยให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยยะสำคัญ ซึ่งสอดคล้องกับการทดสอบทางคอมพิวเตอร์ที่กล่าวมาข้างต้น จึงมีความเป็นไปได้สูงว่า สารทั้ง 2 นั้นสามารถจับบริเวณ binding site ของ β -OG ในโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัสแดงก็ ทำให้โครงสร้างโปรตีนสิ่งหุ้มของไวรัสเกิดการเปลี่ยนแปลง ไม่สามารถปลดปล่อยสารพันธุกรรมจากเอนโดโซมได้ จนเกิดการยับยั้งการติดเชื้อไวรัสแดงก็ซีโรไทป์-2

จากการศึกษาของ Mounce BC และคณะ (2017) ทำการทดสอบโดยเลี้ยงสาร Curcumin กับไวรัสสองกลุ่ม กลุ่มแรกเป็นกลุ่มไวรัสที่มีโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัส (Envelope virus) คือ ZIKV และ CHIKV กับกลุ่มสองเป็นไวรัสที่ไม่มีโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัส (Non-envelope virus) คือ Coxsackie virus B3 (CVB3) ทำการทดสอบโดยผสม Curcumin กับไวรัสโดยตรง และผสม Curcumin และไวรัสก่อนการติดเชื้อ พบว่า Curcumin สามารถลดจำนวนของไวรัส ZIKV และ CHIKV ได้ โดยไม่มีผลกับ CVB3 ซึ่งเป็นไวรัสที่ไม่มีโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัส (Non-envelope virus) นอกจากนี้ยังทำการทดสอบโดยเลี้ยงสารก่อนและหลังการติดเชื้อไวรัสที่เวลาต่าง ๆ พบว่า สาร Curcumin สามารถลดการเพิ่มจำนวนของไวรัส ZIKV และ CHIKV ได้ เมื่อใส่สารก่อนและพร้อมการติดเชื้อ แต่ไม่สามารถลดจำนวนการเพิ่มไวรัสลูกหลานเมื่อใส่สารหลังติดเชื้อได้ ในขณะที่ผลทดสอบของ CVB3 ไม่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสได้เลยไม่ว่าจะใส่สารที่เวลาใดก็ตาม และเมื่อทำการทดสอบอนุพันธ์ของ

Curcumin อีก 4 ชนิด พบว่าสามารถยับยั้งการติดเชื้อของไวรัสที่มีโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัส คือ ZIKV และ CHIKV ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้ง CVB3 ได้ จากผลการทดลองทั้งหมดจึงกล่าวได้ว่า สาร Curcumin มีฤทธิ์การยับยั้งในช่วงติดเชื้อ และการเพิ่มจำนวนของไวรัส คาดว่าบริเวณโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัส น่าจะเป็นเป้าหมายสำคัญในการออกฤทธิ์ของ Curcumin และอนุพันธ์ของ Curcumin จากการทดสอบแสดงให้เห็นว่า สารบริสุทธิ์ที่มีโครงสร้างหลักเป็น Diarylheptanoid มีแนวโน้มที่จะออกฤทธิ์บริเวณโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัส จึงสามารถยับยั้งการติดเชื้อของไวรัสที่มีโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัสได้ [56]

เช่นเดียวกับ Chen TY และคณะ (2013) ทำการทดสอบ Curcumin กับไวรัส 8 ชนิด โดยเป็นไวรัสที่มีโปรตีนสิ่งหุ้ม 7 ชนิด คือ Influenza A virus ซับไทป์ H1 และ H6 Pseudorabies virus (PRV) Japanese encephalitis virus (JEV) Dengue virus type II (DVII) Vaccinia virus และ Newcastle Disease viruses (NDV) และไวรัสที่ไม่มีโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัสอีก 1 ชนิด คือ Enterovirus 71 พบว่า Curcumin สามารถยับยั้งการเกิดผลของไวรัสชนิดที่มีโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัส 7 ชนิดได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเกิดผลใน Enterovirus 71 ซึ่งเป็นไวรัสที่ไม่มีโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัส จากผลการทดลองจึงกล่าวได้ว่า Curcumin มีฤทธิ์ในการยับยั้งโปรตีนสิ่งหุ้มของไวรัส [71]

จากงานวิจัยของ Chen TY และคณะ (2013) รวมถึง Mounce BC และคณะ (2017) ที่กล่าวไปข้างต้น ให้ผลสอดคล้องกับผลการทดลองในงานวิจัยฉบับนี้ รวมกับผลการศึกษาทางคอมพิวเตอร์ข้างต้น จึงสรุปได้ว่า AS-WA018 และ AS-WA020 มีฤทธิ์ในการยับยั้งโปรตีนสิ่งหุ้มของไวรัสแดงที่ ทำให้การติดเชื้อไวรัสแดงที่ ลดลง โดยบริเวณ binding site ของ β -OG ในโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัสแดงที่ น่าจะเป็นหนึ่งในเป้าหมายที่สารสามารถออกฤทธิ์ได้

ในการทดสอบในการทดสอบด้วยวิธี Pre-exposure treatment สาร AS-WA018 และ AS-WA019 สามารถลดการสร้างไวรัสลูกหลานได้ดีเมื่อเซลล์ได้รับสารก่อนติดเชื้อไวรัส เป็นเวลา 12 และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ สารน่าจะเข้าไปอยู่ภายในเซลล์ก่อนเชื้อจะเข้าสู่เซลล์ และแสดงผลการยับยั้งอย่างมีประสิทธิภาพ โดยคาดว่าสารยับยั้งในช่วงวงจรการเพิ่มจำนวนของไวรัสในเซลล์

ในขณะที่การทดสอบด้วยวิธี Post-exposure treatment พบว่า สาร AS-WA018 ให้ผลการยับยั้งการสร้างไวรัสลูกหลานเล็กน้อยเมื่อใส่สารทันทีหลังติดเชื้อเท่านั้น และเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดสอบด้วยวิธี Virucidal และ Co-treatment พบว่าสาร AS-WA018 น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องในการลดการสร้างไวรัสลูกหลานในช่วงการเพิ่มจำนวนไวรัสช่วงต้นเท่านั้น และในการทดสอบนี้ พบว่าสาร AS-WA019 สามารถลดการสร้างไวรัสลูกหลานได้สูงในทุกช่วงเวลาหลังการติดเชื้อของการ

ทดลอง อาจกล่าวได้ว่า สาร AS-WA019 น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องในการยับยั้งการสร้างไวรัสลูกหลาน ในช่วงการเพิ่มจำนวนจนถึงช่วงการส่งออกไวรัสออกนอกเซลล์ ซึ่งมีประสิทธิภาพการยับยั้งที่สูงกว่า การทดสอบด้วยวิธี Pre-exposure treatment ในขณะที่สาร AS-WA020 ให้ผลการยับยั้งกับการทดสอบด้วยวิธี Virucidal test Co-treatment และ Post-exposure treatment จึงเป็นไปได้ว่า สาร AS-WA020 มีส่วนช่วยในการลดการติดเชื้อ การเพิ่มจำนวนไวรัสจนถึงช่วงปลดปล่อยไวรัสออกนอกเซลล์ อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดสอบด้วยวิธี Pre-exposure treatment ซึ่งไม่พบผลในการลดการสร้างไวรัสลูกหลานเมื่อใส่สารก่อนการติดเชื้อไวรัส อาจเป็นไปได้ว่าสาร AS-WA020 ไม่เสถียรพอทำให้ไม่เห็นผลการยับยั้งเมื่อใส่สารก่อนการติดเชื้อมานานเกินไป

จากงานวิจัยก่อนหน้าของ Marbawati และ Umniyati, 2015 [64] พบว่า สาร Curcumin และ Pentagamavunon-0 (PGV-0; อนุพันธ์ของ curcumin) ซึ่งมีโครงสร้างหลักเป็น Diarylheptanoid พบความเป็นพิษสูงที่สุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ Vero ด้วยวิธี MTT Assay ที่ 6.25 และ 1.56 ppm ตามลำดับ และสามารถยับยั้งไวรัสแดงกีซีโรไทป์-2 ได้ โดยวัดผลด้วยวิธี Immunocytochemistry และ RT-PCR ซึ่งเมื่อเทียบกับผลการทดลองความเป็นพิษในงานวิจัยนี้ พบว่าสาร AS-WA018 (26.44 ppm) AS-WA019 (20.88 ppm) และ AS-WA020 (38.80 ppm) มีความเป็นพิษน้อยกว่าสาร Curcumin และสาร PGV-0 ในขณะที่ผลการยับยั้งไวรัสแดงกีซีโรไทป์-2 ด้วยสาร Curcumin และ PGV-0 เมื่อติดตามการติดเชื้อด้วยวิธี Immunocytochemistry พบว่าสาร Curcumin และ PGV-0 ให้ผลยับยั้งไวรัสแดงกีซีโรไทป์-2 เมื่อใส่สาร 1 วันหลังติดเชื้อที่ประมาณ 76% และ 74% ตามลำดับ และเมื่อใส่สารหลังติดเชื้อ 3 วันให้ค่าการยับยั้งที่ประมาณ 37% และ 46% ตามลำดับ โดยเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่สาร และเมื่อติดตามไวรัสแดงกีซีโรไทป์-2 ด้วยวิธี RT-PCR พบว่าเมื่อใส่สาร Curcumin ในวันที่ 3 หลังการติดเชื้อสามารถพบแถบดีเอ็นเอของไวรัส แต่เมื่อใส่สาร PGV-0 ตรวจไม่พบแถบดีเอ็นเอของไวรัส กล่าวได้ว่า PGV-0 ให้ประสิทธิภาพการยับยั้งไวรัสแดงกีซีโรไทป์-2 Curcumin จากงานวิจัยนี้จึงเห็นได้ว่าสาร Curcumin หรือสารที่มีโครงสร้างใกล้เคียง Curcumin มีแนวโน้มในการยับยั้งไวรัสแดงกีซีโรไทป์-2 ได้ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยฉบับนี้ โดยในงานวิจัยนี้พบสาร AS-WA019 สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสแดงกีซีโรไทป์-2 ได้ประมาณ 80% เมื่อใส่สารหลังติดเชื้อที่ 6 ชั่วโมง จึงคาดว่าสาร AS-WA019 อาจมีประสิทธิภาพการยับยั้งไวรัสแดงกีซีโรไทป์-2 อย่างไรก็ตามวิธีการวัดประสิทธิภาพการยับยั้งไวรัสแดงกีซีโรไทป์-2 ในงานวิจัยนี้ ใช้วิธีการหาจำนวนไวรัสด้วยวิธี Plaque assay การใช้เซลล์มะเร็งบมนุษย์เป็นเซลล์เป้าหมาย และวิธีที่ใช้ในการทดลองนี้แตกต่างกับการ

ทดลองดังกล่าว ทำให้ไม่สามารถสรุปอย่างแน่นอนได้ว่า สารชนิดใดมีความเป็นพิษ และประสิทธิภาพการยับยั้งดีกว่าได้อย่างชัดเจน จึงจำเป็นต้องศึกษาเพื่อเปรียบเทียบต่อไป



บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

1. สารบริสุทธิ์ AS-WA018 มีค่าความเข้มข้นสูงที่สุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่ 100 ไมโครโมลาร์ โดยให้ผลการยับยั้งในช่วงการติดเชื้อไวรัสแดงที่เข้าสู่เซลล์ และการเพิ่มจำนวนไวรัสแดงที่ภายในเซลล์ ซึ่งจากผลทดสอบทางคอมพิวเตอร์ให้ผลการทดสอบสอดคล้องกับการทดสอบทางห้องปฏิบัติการ พบว่าเป้าหมายหนึ่งของสารบริสุทธิ์ AS-WA018 น่าจะเป็นบริเวณ binding site ของ β -OG ในโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัสแดงที่ ทำให้โครงสร้างโปรตีนสิ่งหุ้มของไวรัสเกิดการเปลี่ยนแปลง ส่งผลให้ยับยั้งการติดเชื้อไวรัสแดงที่ซีโรไทป์-2
2. สารบริสุทธิ์ AS-WA019 มีค่าความเข้มข้นสูงที่สุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่ 75 ไมโครโมลาร์ โดยให้ผลการยับยั้งในช่วงการเพิ่มจำนวนไวรัสแดงที่ภายในเซลล์ และการปลดปล่อยไวรัสแดงที่ออกนอกเซลล์ แต่ยังไม่สามารถสรุปเป้าหมายของสารได้
3. สารบริสุทธิ์ AS-WA020 มีค่าความเข้มข้นสูงที่สุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่ 125 ไมโครโมลาร์ โดยให้ผลการยับยั้งในช่วงการติดเชื้อไวรัสแดงที่เข้าสู่เซลล์ การเพิ่มจำนวนไวรัสแดงที่ภายในเซลล์ และการปลดปล่อยไวรัสออกนอกเซลล์ ซึ่งจากผลทดสอบทางคอมพิวเตอร์ให้ผลการทดสอบสอดคล้องกับการทดสอบทางห้องปฏิบัติการ พบว่าเป้าหมายหนึ่งของสารบริสุทธิ์ AS-WA018 น่าจะเป็นบริเวณ binding site ของ β -OG ในโปรตีนสิ่งหุ้มไวรัสแดงที่ ทำให้โครงสร้างโปรตีนสิ่งหุ้มของไวรัสเกิดการเปลี่ยนแปลง ส่งผลให้ยับยั้งการติดเชื้อไวรัสแดงที่ซีโรไทป์-2

รายการอ้างอิง

- 1] World Health Organization. Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control: new edition. 2009.
- [2] World Health Organization. Global strategy for dengue prevention and control, 2012–2020. 2012; 43.
- [3] Capeding MR, Tran NH, Hadinegoro SRS, Ismail HHM, Chotpitayasunondh T, Chua MN, Luong CQ, Rusmil K, Wirawam DN, Nallusamy R, Pitisuttithum P, Thisyakorn U, Yoon IK, Vliet DVD, Langevin E, Laot T, Hutagalung Y, Frago C, Boaz M, Wartel TA, Tornieporth NG, Saville M, Bouckennooghe A and CYD14 study group. Clinical efficacy and safety of a novel tetravalent dengue vaccine in healthy children in Asia: a phase 3, randomised, observer-masked, placebo-controlled trial. *Lancet*, 2014; 384(9951) 1358-65.
- [4] Halstead SB and O'Rourke EJ. Antibody-enhanced dengue virus infection in primate leukocytes. *Nature*, 1977; 265(5596) 739-41.
- [5] Pandey A and Medlock J. The introduction of dengue vaccine may temporarily cause large spikes in prevalence. *Epidemiol Infect*, 2015; 143(6) 1276-86.
- [6] Normile D. Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts. *Science*, 2013; 342(6157) 415.
- [7] Schnirring L. Researchers identify fifth dengue subtype. *CIDRAP News* 2013.
- [8] World Health Organization. Dengue, countries or areas at risk, 2013. 2014. Available from: http://gamapservr.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_
- [9] World Health Organization. Dengue data application. Available from: http://www.who.int/denguecontrol/epidemiology/dengue_data_application/en/ [2017, June 15]
- [10] Haider M and Turner J. Variables that may affect the transmission of dengue – A case study for health management in Asia. *Topics in Public Health*, Dr. David Claborn (Ed.). InTech, DOI: 10.5772/59983. ch 04.
- [11] สำนักงานโรคติดต่อฯ โดยแมลง. สถานการณ์โรคไข้เลือดออก. 2560.

- [12] Sreaton G, Mongkolsapaya J, Yacoub S and Roberts C. New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. *Nat Rev Immunol*, 2015; 15(12) 745-59.
- [13] Natthanej L. Overview of dengue viruses and their relation. *J Trop Med Parasitol*, 2008; 31(95) 95-107.
- [14] พีระ สมบัติดี, ภพ โภศลารักษ์ และ สมร พลดงนอก. ความรู้เรื่องโรคไข้เลือดออก Dengue fever (DF), Dengue hemorrhagic fever (DHF). หน่วยสร้างเสริมสุขภาพ งานเวชกรรมสังคม โรงพยาบาลศรีนครินทร์, 2558.
- [15] Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev*, 1998; 11(3) 480-96.
- [16] Mole BM. Antibody-Dependent Enhanced (ADE) Immunity. 2013. Available from: <http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/34586/title/Antibody-Dependent-Enhanced--ADE--Immunity/>[2017, June 15]
- [17] Chareonsirisuthigul T, Kalayanarooj S and Ubol S. Dengue virus (DENV) antibody-dependent enhancement of infection upregulates the production of anti-inflammatory cytokines, but suppresses anti-DENV free radical and pro-inflammatory cytokine production, in THP-1 cells. *J Gen Virol*, 2007; 88(Pt 2) 365-75.
- [18] Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Lnnis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Endy TP, Raengsakulrach B, Rothman AL, Ennis FA, Nisalak A. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis*, 2000; 181(1) 2-9.
- [19] Cologna R and Hesse RR. American genotype structures decrease dengue virus output from human monocytes and dendritic cells. *J Virol*, 2003; 77(7) 3929-38.
- [20] Sierra BDLC, Kouri G and Guzman MG. Race: a risk factor for dengue hemorrhagic fever. *Arch Virol*, 2007; 152(3) 533-42.
- [21] Kyle JL and Harris E. Global spread and persistence of dengue. *Annu Rev Microbiol*, 2008; 62 71-92.

- [22] World Health Organization. Weekly epidemiological record. 2016; 30(91) 349-64.
- [23] Sabchareon A, Wallace D, Sirivichayakul C, Limkittikul K, Chanthavanich P, Suvannadabba S, Jiwariyavej V, Dulyachai W, Pengsaa K, Wartel TA, Moureau A, Saville M, Bouckenoghe A, Viviani S, Tornieporth NG and Lang J. Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial. *The Lancet*, 2012; 380(9853) 1559-67.
- [24] Villar L, Dayan GH, García JLA, Rivera DM, Cunha R, Deseda C, Reynales H, Costa MS, Ramírez JOM, Carrasquilla G, Rey LC, Dietze R, Luz K, Rivas E, Montoya MCM, Supelano MC, Zambrano B, Langevin E, Boaz M, Tornieporth N, Saville M and Noriega F. Efficacy of a tetravalent dengue vaccine in children in latin america. *N Engl J Med*, 2015; 372(2) 113-23.
- [25] World Health Organization. Background paper on dengue vaccines. 2016.
- [26] Cragg GM and Newman DJ. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochim Biophys Acta*, 2013; 1830(6) 3670-95.
- [27] Hu XJ, He HP, Zhou H, Di YT, Yang XW, Hao XJ, Kong LY. New indole alkaloids from *Rauvolfia yunnanensis*. *Helv Chim Acta*, 2006; 89(7) 1344-50.
- [28] Chao B, Tong XK, Tang W, Li DW, He PL, Garcia JM, Zeng LM, Gao AH, Yang L, Li J, Nan FJ, Jacobs M, Altmeyer R, Zuo JP, Hu YH. Discovery and optimization of 2,4-diaminoquinazoline derivatives as a new class of potent dengue virus inhibitors. *J Med Chem*. 2012; 55(7), 3135-43.
- [29] Chen YL, Yin Z, Lakshminarayana SB, Qing M, Schul W, Duraiswamy J, Kondreddi RR, Goh A, Xu HY, Yip A, Liu B, Weaver M, Dartois V, Keller TH, Shi PY. Inhibition of dengue virus by an ester prodrug of an adenosine analog. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010; 54(8) 3255-61.
- [30] Kaptein SJ, Burghgraeve TD, Froeyen M, Pastorino B, Alen MM, Mondotte JA, Herdewijn P, Jacobs M, Lamballerie XD, Schols D, Gamarnik AV, Sztaricskai F, Neyts J. A derivate of the antibiotic doxorubicin is a selective inhibitor of

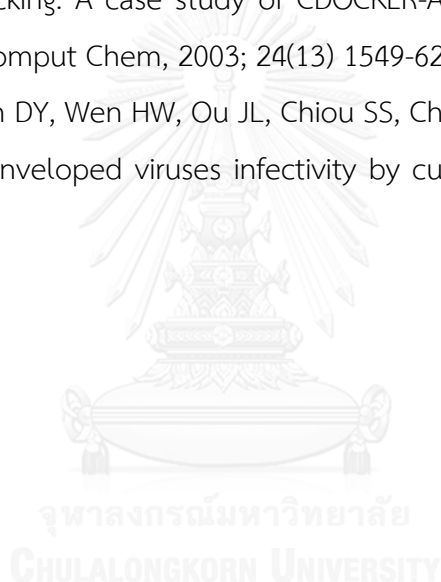
- dengue and yellow fever virus replication *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010; 54(12) 5269-80.
- [31] Lai H, Prasad GS, Padmanabhan R. Characterization of 8-hydroxyquinoline derivatives containing aminobenzothiazole as inhibitors of dengue virus type 2 protease *in vitro*. *Antiviral Res*, 2013; 97(1) 74-80.
- [32] Boonyasuppayakorn S, Reichert ED, Manzano M, Nagarajan K, Padmanabhan R. Amodiaquine, an antimalarial drug, inhibits dengue virus type 2 replication and infectivity. *Antiviral Res*. 2014; 106 125-34.
- [33] Kumari R, Rathib B, Ranic A, Bhatnagar S. *Rauwolfia serpentina* L. Benth. ex Kurz.: Phytochemical, pharmacological and therapeutic aspects. *Int J Pharm Sci Rev Res*. 2013; 23(2) 348-55.
- [34] Dey A and De JN. *Rauwolfia serpentina* (L). Benth. ex Kurz.-A Review. *Asian J Plant Sci*, 2010; 9 285-98.
- [35] Itoh A, Kumashiro T, Yamaguchi M, Nagakura N, Mizushima Y, Nishi T and Tanahashi T. Indole alkaloids and other constituents of *Rauwolfia serpentina*. *J Nat Prod*, 2005; 68(6) 848-52.
- [36] Gupta S, Khanna VK, Maurya A, Bawankule DU, Shukla RK, Pal A and Srivastava SK. Bioactivity guided isolation of antipsychotic constituents from the leaves of *Rauwolfia tetraphylla* L. *Fitoterapia*, 2012; 83(6) 1092-9.
- [37] Furusawa S and Wu J. The effects of biscoclaurine alkaloid cepharanthine on mammalian cells: Implications for cancer, shock, and inflammatory diseases. *Life Sci*, 2007; 80(12) 1073-9.
- [38] Semwal DK, Badoni R, Semwal R, Kothiyal SK, Singh GJP and Rawat U. The genus *Stephania* (Menispermaceae): chemical and pharmacological perspectives. *J Ethnopharmacol*, 2010; 132(2) 369-83.
- [39] Meerungrueang W and Panichayupakaranant P. Antimicrobial activities of some Thai traditional medical longevity formulations from plants and antibacterial compounds from *Ficus foveolata*. *Pharm Biol*, 2014; 52(9) 1104-9.

- [40] Teethaisong Y, Autarkool N, Sirichaiwetchakoon K, Krubphachaya P, Kupittayanant S and Eumkeb G. Synergistic activity and mechanism of action of *Stephania suberosa* forman extract and ampicillin combination against ampicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Biomed Sci, 2014; 21 90.
- [41] Ingkaninan K, Temkitthawon P, Chuenchom K, Yuyaem T and Thongnoi. Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. J Ethnopharmacol, 2003; 89(2-3) 261-4.
- [42] Su J, Sripanidkulchai K, Wyss JM and Sripanidkulchai B. *Curcuma comosa* improves learning and memory function on ovariectomized rats in a long-term morris water maze test. J Ethnopharmacol, 2010; 130(1) 70-5.
- [43] Boonmee A, Srisomsap C, Karnchanatat A and Sangvanich P. An antioxidant protein in *Curcuma comosa* Roxb. rhizomes. Food Chem, 2011; 124(2) 476-80.
- [44] Weerachayaphorn J, Chuncharunee A, Mahagita C, Lewchalermwongse, Suksamrarn A and Piyachaturawat P. A protective effect of *Curcuma comosa* Roxb. on bone loss in estrogen deficient mice. J Ethnopharmacol, 2011; 137(2) 956-62.
- [45] Sornkaewa N, Lin Y, Wang F, Zhang G, Chokchaisiri R, Zhang A, Wongkrajang K, Suebsakwong P, Piyachaturawat P and Suksamrarn A. Diarylheptanoids of *Curcuma comosa* with inhibitory effects on nitric oxide production in macrophage RAW 264.7 cells. Nat Prod Commun, 2015; 10(1) 89-93.
- [46] Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA and Aggarwal BB. Bioavailability of curcumin: problems and promises. Mol Pharm, 2007; 4(6) 807-18.
- [47] Maheshwari RK, Singh AK, Gaddipati J and Srimal RC. Multiple biological activities of curcumin: a short review. Life Sci, 2006; 78(18) 2081-7.
- [48] Jagannath JH and Radhika M. Antimicrobial emulsion (coating) based on biopolymer containing neem (*Melia azardichta*) and turmeric (*Curcuma longa*) extract for wound covering. Biomed Mater Eng, 2006; 16(5) 329-36.

- [49] Liu Z, Fang L, Zhang H, Gou S and Chen L. Design, synthesis and biological evaluation of multifunctional tacrine-curcumin hybrids as new cholinesterase inhibitors with metal ions-chelating and neuroprotective property. *Bioorg Med Chem*, 2017; 25(8) 2387-98.
- [50] Ibrahim ZS, Alkafafy ME, Ahmed MM and Soliman MM. Renoprotective effect of curcumin against the combined oxidative stress of diabetes and nicotine in rats. *Mol Med Rep*, 2016; 13(4) 3017-26.
- [51] Leong SW, Faudzi SMM, Abas F, Aluwi MFFM, Rullah K, Lam KW, Bahari MNA, Ahmad S, Tham CL, Shaari K and Lajis NH. Nitric oxide inhibitory activity and antioxidant evaluations of 2-benzoyl-6-benzylidenecyclohexanone analogs, a novel series of curcuminoid and diarylpentanoid derivatives. *Bioorg Med Chem Lett*, 2015; 25(16) 3330-7.
- [52] Chen J, He ZM, Wang FL, Zhang ZS, Liu XZ, Zhai DD and Chen WD. Curcumin and its promise as an anticancer drug: An analysis of its anticancer and antifungal effects in cancer and associated complications from invasive fungal infections. *Eur J Pharmacol*, 2016; 772 33-42.
- [53] Huang L, Zhang J, Song T, Yuan L, Zhou J, Yin H, He T, Gao W, Sun Y, Hu X and Huang H. Antifungal curcumin promotes chitin accumulation associated with decreased virulence of *Sporothrix schenckii*. *Int Immunopharmacol*, 2016; 34 263-70
- [54] Chen DY, Shien JH, Tiley L, Chiou SS, Wang SY, Chang TJ, Lee YJ, Chan KW and Hsu WL. Curcumin inhibits influenza virus infection and haemagglutination activity. *Food Chem*, 2010; 119(4) 1346-51.
- [55] Umar S, Shah MAA, Munir MT, Yaqoob M, Fiaz M, Aujum S, Kaboudi K, Bouzouaia M, Younus M, Nisa Q, Iqbal M and Umar W. Synergistic effects of thymoquinone and curcumin on immune response and anti-viral activity against avian influenza virus (H9N2) in turkeys. *Poult Sci*, 2016; 95(7) 1513-20.
- [56] Mounce BC, Cesaro T, Carrau L, Vallet T and Vignuzzi M. Curcumin inhibits zika and chikungunya virus infection by inhibiting cell binding. *Antiviral Res*, 2017; 142 148-57.

- [57] Qin Y, Lin L, Chen Y, Wu S, Si X, Wu H, Zhai X, Wang Y, Tong L, Pan B, Zhong X, Wang T, Zhao W and Zhong Z. Curcumin inhibits the replication of enterovirus 71 *in vitro*. *Acta Pharm Sin B*, 2014; 4(4) 284-94.
- [58] Song Y, Ge W, Cai HB and Zhang H. Curcumin protects mice from coxsackievirus B3-induced myocarditis by inhibiting the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt/nuclear factor-kappaB pathway. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2013; 18(6) 560-9.
- [59] Rechtman MM, Yishay IB, Fishman S, Adamovich Y, Shaul Y, Halpern Z and Shlomail A. Curcumin inhibits hepatitis B virus via down-regulation of the metabolic coactivator PGC-1alpha. *FEBS Lett*, 2010; 584(11) 2485-90.
- [60] Kim K, Kim KH, Kim HY, Cho HK, Sakamoto N and Cheong J. Curcumin inhibits hepatitis C virus replication via suppressing the Akt-SREBP-1 pathway. *FEBS Lett*, 2010; 584(4) 707-12.
- [61] Kutluay SB, Doroghazi J, Roemer ME, Triezenberg J. Curcumin inhibits herpes simplex virus immediate-early gene expression by a mechanism independent of p300/CBP histone acetyltransferase activity. *Virology*, 2008; 373(2) 239-47.
- [62] Ferreira VH, Nazli A, Dizzell SE, Mueller K and Kaushic C. The anti-inflammatory activity of curcumin protects the genital mucosal epithelial barrier from disruption and blocks replication of HIV-1 and HSV-2. *PLoS One*, 2015; 10(4) e0124903.
- [63] Yang M, Lee G, Si J, Lee SJ, You HJ and Ko GP. Curcumin shows antiviral properties against norovirus. *Molecules*, 2016; 21(10) 1420-3049.
- [64] Marbawati D and Umniyati SR. Effects of curcumin and pentagamavunon-0 against dengue-2 virus infection in vero cells; an *in vitro* study. *Procedia Environ Sci*, 2015; 23 215-21.
- [65] Modis Y, Ogata S, Clements D and Harrison SC. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003; 100(12) 6986-91.
- [66] Fuzo CA and Degreve L. New pockets in dengue virus 2 surface identified by molecular dynamics simulation. *J Mol Model*, 2013; 19(3) 1369-77.

- [67] Falco N. Determining the viability of a cell culture. Available from: <http://www40.homepage.villanova.edu/nicholas.falco/pd2.htm>[2017, June 15]
- [68] Caprette DR. Using a counting chamber. 2006. Available from: <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/microscopy/cellcounting.html> [2017, June 15]
- [69] Kitchen DB, Decornez H, Furr JR and Bajorath J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat Rev Drug Discov*, 2004; 3(11) 935-49.
- [70] Wu G, Robertson DH, Brooks CL and Vieth. Detailed analysis of grid-based molecular docking: A case study of CDOCKER-A CHARMM-based MD docking algorithm. *J Comput Chem*, 2003; 24(13) 1549-62.
- [71] Chen TY, Chen DY, Wen HW, Ou JL, Chiou SS, Chen JM, Wong ML and Hsu WL. Inhibition of enveloped viruses infectivity by curcumin. *PLoS One*, 2013; 8(5) e62482.





ภาคผนวก ก
สูตรอาหารและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. Heat inactivated FBS

บ่ม FBS ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เขย่าทุก 10 นาที และทำการแบ่งเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

2. 1X MEM medium

MEM powder สำหรับเตรียม 1 ลิตร

NaHCO ₃	2.2	กรัม
HEPES	5.206	กรัม
MilliQ H ₂ O	900	มิลลิลิตร

ปรับค่า pH ให้ได้ 7.4 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น แล้วเติม MilliQ H₂O จนครบปริมาตร 1 ลิตร จากนั้นกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. 1X DMEM medium

DMEM powder สำหรับเตรียม 1 ลิตร

NaHCO ₃	3.7	กรัม
MilliQ H ₂ O	900	มิลลิลิตร

ปรับค่า pH ให้ได้ 7.4 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น แล้วเติม MilliQ H₂O จนครบปริมาตร จากนั้นกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. Complete MEM หรือ DMEM with 10% FBS

1X MEM หรือ DMEM	445	มิลลิลิตร
Heat-inactivated FBS	50	มิลลิลิตร
Penicillin และ Streptomycin (10,000 ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	5	มิลลิลิตร

เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. 1X PBS

NaCl	32.03	กรัม
KCl	0.81	กรัม
Na ₂ HPO ₄	2.44	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.76	กรัม
MilliQ H ₂ O	4	ลิตร

ทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

6. 0.25% (น้ำหนักต่อปริมาตร) Trypsin/EDTA

Trypin	1.25	กรัม
0.5M EDTA pH 8.0	1	มิลลิลิตร
1X PBS จนครบ	500	มิลลิลิตร

ทำการกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

7. Cryo-media

FBS	2	มิลลิลิตร
DMSO	1	มิลลิลิตร
1X MEM หรือ DMEM	7	มิลลิลิตร

8. 0.4% Trypan blue

Trypan blue	0.4	กรัม
1X PBS	100	มิลลิลิตร

ทำการละลายให้สมบูรณ์และเก็บที่อุณหภูมิห้อง

9. 7.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) NaHCO_3

NaHCO_3	75	กรัม
MilliQ H_2O	1	ลิตร

ทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

10. 20X Earl's Balance Salts Solution (20X EBSS)

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.65	กรัม
KCl	4	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2	กรัม
NaCl	68	กรัม
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.25	กรัม
Glucose	10	กรัม
MilliQ H_2O ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	500	มิลลิลิตร

ทำการกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

11. YE-LAH medium

Yeast extract	1	กรัม
Lactalbuminhydrolysate	5	กรัม
MilliQ H ₂ O ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	100	มิลลิลิตร

ทำการกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

12. 1st Overlay 2X nutrient solution ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

20X EBSS	4.9	มิลลิลิตร
Heat-inactivated FBS	3	มิลลิลิตร
YE-LAH	3.3	มิลลิลิตร
MilliQ H ₂ O ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	36	มิลลิลิตร
7.5% NaHCO ₃	3	มิลลิลิตร
Penicillin และ Streptomycin (10,000 ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	250	ไมโครลิตร

13. 2nd Overlay 2X nutrient solution ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

20X EBSS	4.9	มิลลิลิตร
YE-LAH medium	6.3	มิลลิลิตร
MilliQ H ₂ O ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	33	มิลลิลิตร
7.5% NaHCO ₃	3	มิลลิลิตร
Penicillin และ Streptomycin (10,000 ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	250	ไมโครลิตร
0.5% Neutral red	3	มิลลิลิตร

14. 0.5% Neutral red

Neutral red	0.5	กรัม
Distilled H ₂ O	100	มิลลิลิตร

ทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง



ภาคผนวก ข

ผลการทดลองแต่ละการทดลอง

1. ทดสอบความเป็นพิษของสารต่อเซลล์มะเร็งตับมนุษย์ด้วยวิธี MTT assay

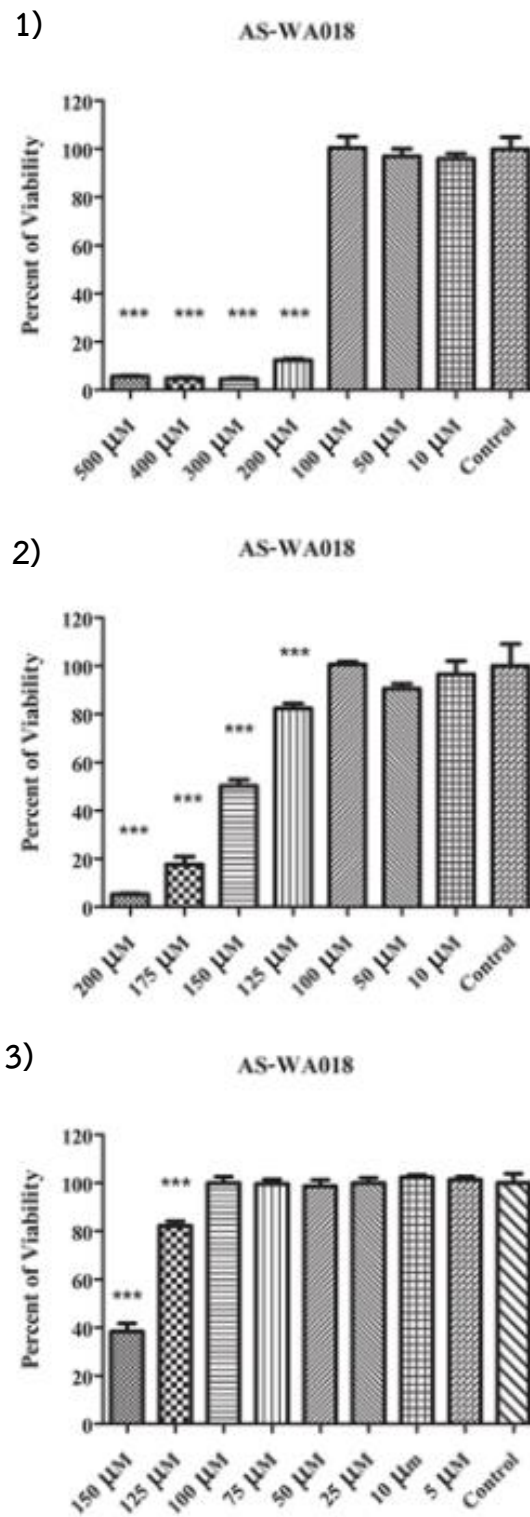
ตารางที่ 5 แสดงเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์มะเร็งตับมนุษย์หลังเลี้ยงกับสาร AS-WA018 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารแต่ละชนิด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมี DMEM + 0.5% DMSO เป็นชุดควบคุม ($p < 0.05$) ทำ 3 การทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ

ความเข้มข้นสาร (ไมโครโมลาร์)	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์มะเร็งตับมนุษย์ (Percent of viability)							
	500	400	300	200	100	50	10	ชุดควบคุม
การทดลองที่ 1	6.02	4.45	4.19	12.30	105.24	94.24	96.07	95.29
	5.50	5.24	4.98	12.04	100.26	96.34	93.46	104.97
	5.50	4.98	4.45	13.09	95.81	100.26	97.91	99.74

ความเข้มข้นสาร (ไมโครโมลาร์)	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์มะเร็งตับมนุษย์ (Percent of viability)							
	200	175	150	125	100	50	10	ชุดควบคุม
การทดลองที่ 2	5.63	20.50	50.64	79.98	101.69	92.85	102.69	110.53
	5.23	18.29	52.65	83.80	99.28	89.23	94.65	95.06
	4.82	14.07	47.43	83.20	100.68	89.63	92.24	94.45

ความเข้มข้นสาร (ไมโครโมลาร์)	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์มะเร็งตับมนุษย์ (Percent of viability)								
	150	125	100	75	50	25	10	5	ชุดควบคุม
การทดลองที่ 3	42.16	82.88	102.85	100.49	98.78	97.60	102.72	100.49	97.20
	37.44	83.54	97.99	100.88	95.89	101.80	103.11	102.85	104.43
	35.47	79.99	99.04	97.60	101.14	100.49	101.27	100.62	98.38

ซึ่งค่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์มะเร็งตับมนุษย์หลังเลี้ยงกับสาร AS-WA018 ที่ได้นี้จะนำไปสร้างกราฟ ซึ่งแสดงในรูปถัดไป (รูปที่ 22)



รูปที่ 22 แสดงเปอร์เซ็นต์อัตราการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งตับมนุษย์หลังเลี้ยงกับสาร AS-WA018 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ($p < 0.05$) ทำ 3 การทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ โดย 1) 2) และ 3) คือการทดลองที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ

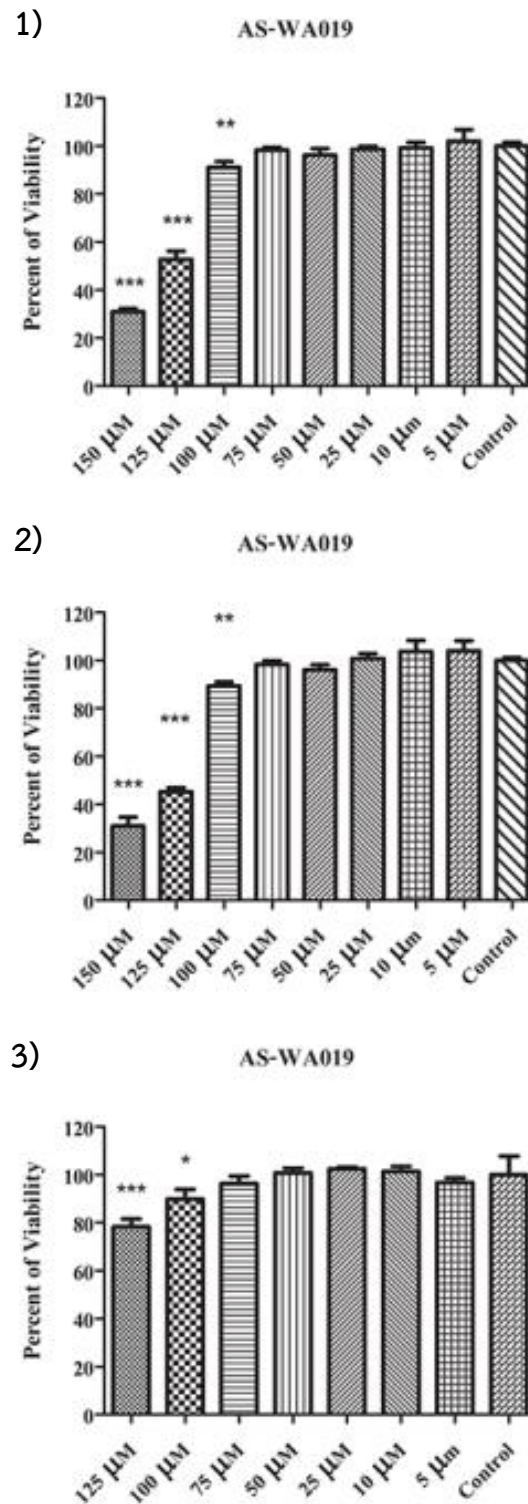
ตารางที่ 6 แสดงเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์มะเร็งตับมนุษย์หลังเลี้ยงกับสาร AS-WA019 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารแต่ละชนิด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมี DMEM + 0.5% DMSO เป็นชุดควบคุม ($p < 0.05$) ทำ 3 การทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ

ความเข้มข้นสาร (ไมโครโมลาร์)	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์มะเร็งตับมนุษย์ (Percent of viability)								
	150	125	100	75	50	25	10	5	ชุดควบคุม
การทดลองที่ 1	29.91	49.79	92.78	97.43	93.85	97.08	101.73	97.08	101.73
	32.42	56.60	88.30	99.58	99.22	99.58	97.25	102.63	98.87
	30.45	51.94	92.24	98.15	95.64	99.22	98.87	106.57	99.40

ความเข้มข้นสาร (ไมโครโมลาร์)	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์มะเร็งตับมนุษย์ (Percent of viability)								
	150	125	100	75	50	25	10	5	ชุดควบคุม
การทดลองที่ 2	34.79	45.34	90.53	100.00	98.29	102.48	102.79	106.06	100.93
	30.75	46.89	90.06	97.98	95.96	101.40	108.70	106.83	100.31
	27.33	43.48	87.42	97.05	93.79	98.45	99.69	99.07	98.76

ความเข้มข้นสาร (ไมโครโมลาร์)	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์มะเร็งตับมนุษย์ (Percent of viability)							
	125	100	75	50	25	10	5	ชุดควบคุม
การทดลองที่ 3	76.47	93.12	94.35	99.28	103.29	102.98	95.58	92.81
	76.16	90.96	99.90	99.90	102.06	102.06	95.58	98.97
	82.02	85.41	94.66	102.98	102.06	98.97	98.97	108.22

ซึ่งค่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์มะเร็งตับมนุษย์หลังเลี้ยงกับสาร AS-WA019 ที่ได้นี้จะนำไปสร้างกราฟ ซึ่งแสดงในรูปถัดไป (รูปที่ 23)



รูปที่ 23 แสดงเปอร์เซ็นต์อัตราการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งระดับมध्यหลังจากเลี้ยงกับสาร AS-WA019 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ($p < 0.05$) ทำ 3 การทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ โดย 1) 2) และ 3) คือการทดลองที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ

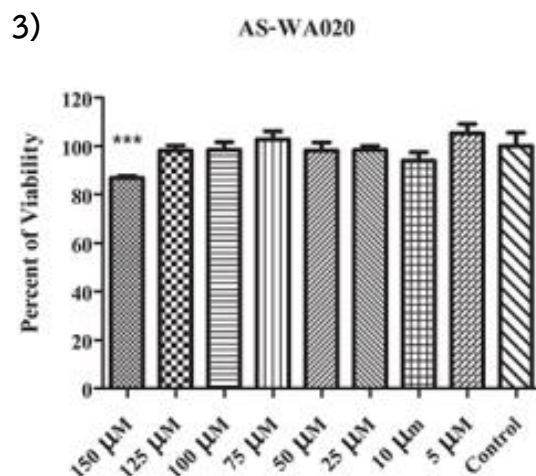
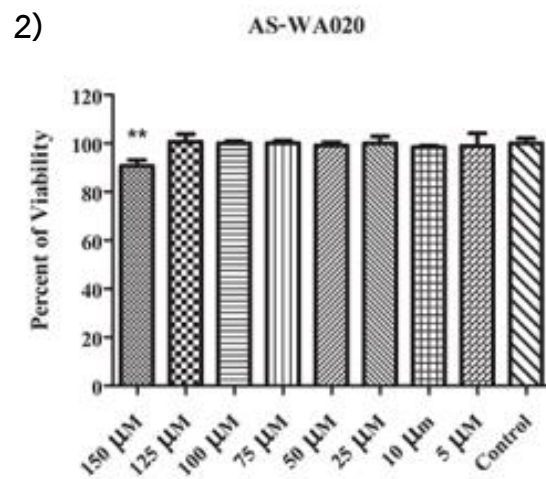
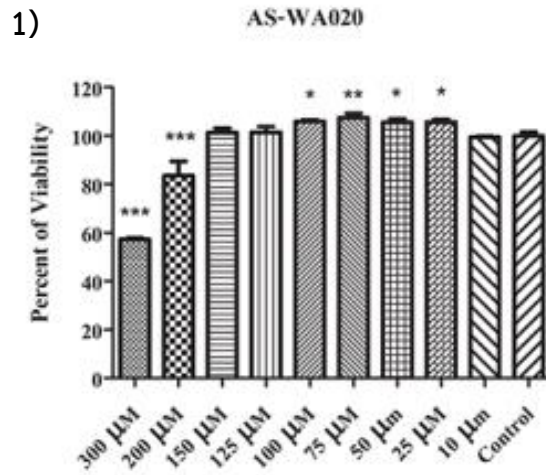
ตารางที่ 7 แสดงเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์มะเร็งระดับมนุษย์หลังเลี้ยงกับสาร AS-WA020 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารแต่ละชนิด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมี DMEM + 0.5% DMSO เป็นชุด ($p < 0.05$) ทำ 3 การทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ

ความเข้มข้นสาร (ไมโครโมลาร์)	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์มะเร็งระดับมนุษย์ (Percent of viability)									
	300	200	150	125	100	75	50	25	10	ชุดควบคุม
การทดลองที่ 1	56.8	76.9	103.47	104.06	106.24	105.45	106.84	106.94	98.91	100.00
	57.2	85.2	100.40	99.91	106.34	108.92	105.85	105.15	99.80	98.41
	58.0	88.4	100.30	100.30	105.35	107.93	104.06	104.86	99.50	101.59

ความเข้มข้นสาร (ไมโครโมลาร์)	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์มะเร็งระดับมนุษย์ (Percent of viability)								
	150	125	100	75	50	25	10	5	ชุดควบคุม
การทดลองที่ 2	90.23	104.36	101.02	100.11	100.56	101.63	98.44	102.08	102.38
	88.56	98.89	99.19	101.17	99.04	96.76	99.04	101.93	99.50
	93.27	98.59	99.80	99.04	97.98	101.78	97.83	92.81	98.13

ความเข้มข้นสาร (ไมโครโมลาร์)	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์มะเร็งระดับมนุษย์ (Percent of viability)								
	150	125	100	75	50	25	10	5	ชุดควบคุม
การทดลองที่ 3	85.89	100.27	100.47	99.06	94.40	97.03	93.59	104.73	105.54
	87.31	98.04	100.07	105.54	101.08	100.27	97.64	109.39	100.07
	87.31	96.08	94.80	103.72	98.85	97.84	90.55	101.89	94.40

ซึ่งค่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์มะเร็งระดับมนุษย์หลังเลี้ยงกับสาร AS-WA020 ที่ได้นี้จะนำไปสร้างกราฟ ซึ่งแสดงในรูปถัดไป (รูปที่ 24)



รูปที่ 24 แสดงเปอร์เซ็นต์อัตราการรอดของเซลล์มะเร็งระดับมนุษย์หลังเลี้ยงกับสาร AS-WA020 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ($p < 0.05$) ทำ 3 การทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ โดย 1) 2) และ 3) คือการทดลองที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ

2. การฆ่าไวรัส (Virucidal test)

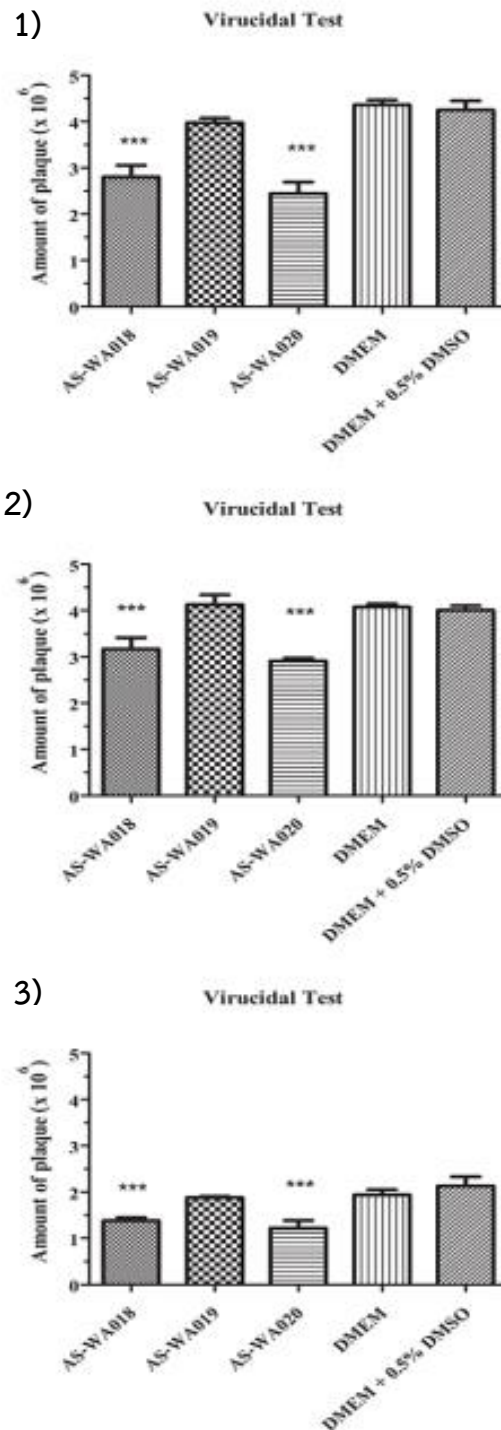
ตารางที่ 8 แสดงจำนวนไวรัสลูกหลานเมื่อผสมสาร AS-WA018 AS-WA019 และ AS-WA020 ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครโมลาร์ กับไวรัสเดงกีซีโรไทป์-2 ที่ MOI 10 พร้อมกันเป็นเวลา 1 ชั่วโมงโดยตรง โดยมี DMEM + 0.5% DMSO เป็นชุดควบคุม ($p < 0.05$) ด้วยวิธีการฆ่าไวรัส (Virucidal test) ทำ 3 การทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ

ชนิดของสาร	จำนวนไวรัส ($\times 10^6$ PFU ต่อมิลลิลิตร)				
	AS-WA018	AS-WA019	AS-WA020	DMEM	ชุดควบคุม
การทดลองที่ 1	2.51	4.05	2.16	4.24	4.10
	2.96	3.86	2.61	4.40	4.16
	2.94	4.01	2.56	4.44	4.48

ชนิดของสาร	จำนวนไวรัส ($\times 10^6$ PFU ต่อมิลลิลิตร)				
	AS-WA018	AS-WA019	AS-WA020	DMEM	ชุดควบคุม
การทดลองที่ 2	2.90	3.90	2.98	4.09	3.91
	3.39	4.33	2.91	4.01	4.10
	3.21	4.15	2.85	4.14	4.01

ชนิดของสาร	จำนวนไวรัส ($\times 10^6$ PFU ต่อมิลลิลิตร)				
	AS-WA018	AS-WA019	AS-WA020	DMEM	ชุดควบคุม
การทดลองที่ 3	1.33	1.85	1.41	2.04	2.28
	1.38	1.90	1.13	1.96	1.90
	1.45	1.89	1.11	1.81	2.23

ซึ่งจำนวนไวรัสลูกหลานที่ได้นี้ จะนำไปสร้างกราฟ ซึ่งแสดงในรูปถัดไป (รูปที่ 25)



รูปที่ 25 แสดงจำนวนไวรัสลูกหลานที่เกิดจากการผสมสารบริสุทธิ์ AS-WA018 AS-WA019 และ AS-WA020 ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครโมลาร์ กับไวรัสเดงกีซีโรไทป์-2 จำนวน 1×10^6 PFU มิลลิลิตร พร้อมกันเป็นเวลา 1 ชั่วโมงโดยตรง โดยมี DMEM + 0.5% DMSO เป็นชุดควบคุม ($p < 0.05$) ด้วยวิธีการฆ่าไวรัส (Virucidal test) ทำ 3 การทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ โดย 1) 2) และ 3) คือการทดลองที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ

3. การบำบัดร่วม (Co-treatment)

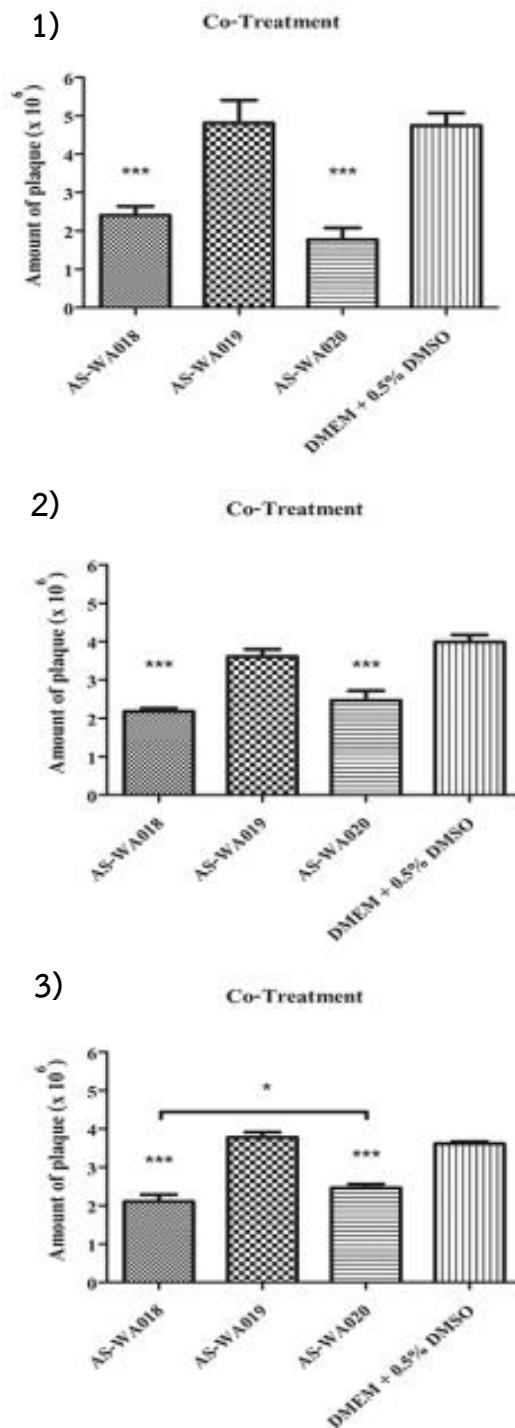
ตารางที่ 9 แสดงจำนวนไวรัสลูกหลานที่เกิดจากการผสมสาร AS-WA018 AS-WA019 และ AS-WA020 ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครโมลาร์ กับไวรัสแดงกีซีโรโทป-2 ที่ MOI 10 พร้อมกันเป็นเวลา 2 ชั่วโมงขณะติดเชื้อ โดยมี DMEM + 0.5% DMSO เป็นชุดควบคุม ($p < 0.05$) ด้วยวิธีการบำบัดร่วม (Co-treatment) ทำ 3 การทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ

ชนิดของสาร	จำนวนไวรัส ($\times 10^6$ PFU ต่อมิลลิลิตร)			
	AS-WA018	AS-WA019	AS-WA020	ชุดควบคุม
การทดลองที่ 1	2.33	4.48	1.65	4.71
	2.23	4.46	1.54	4.48
	2.68	5.50	2.13	5.09

ชนิดของสาร	จำนวนไวรัส ($\times 10^6$ PFU ต่อมิลลิลิตร)			
	AS-WA018	AS-WA019	AS-WA020	ชุดควบคุม
การทดลองที่ 2	2.13	3.48	2.18	3.79
	2.24	3.53	2.60	4.15
	-	3.83	2.63	4.03

ชนิดของสาร	จำนวนไวรัส ($\times 10^6$ PFU ต่อมิลลิลิตร)			
	AS-WA018	AS-WA019	AS-WA020	ชุดควบคุม
การทดลองที่ 3	2.03	3.63	2.55	3.55
	1.99	3.86	2.49	3.63
	2.31	3.85	2.35	3.66

ซึ่งจำนวนไวรัสลูกหลานที่ได้นี้ จะนำไปสร้างกราฟ ซึ่งแสดงในรูปถัดไป (รูปที่ 26)



รูปที่ 26 แสดงจำนวนไวรัสลูกหลานที่เกิดจากการผสมสารบริสุทธิ์ AS-WA018 AS-WA019 และ AS-WA020 ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครโมลาร์ กับไวรัสเดงกีซีโรไทป์-2 ที่ MOI 10 พร้อมกัน เป็น 2 ชั่วโมงขณะติดเชื้อ โดยมี DMEM + 0.5% DMSO เป็นชุดควบคุม ($p < 0.05$) ด้วยวิธีการบำบัดร่วม (Co-treatment) ทำ 3 การทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ โดย 1) 2) และ 3) คือการทดลองที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ

4. การบำบัดก่อนติดเชื้อ (Pre-exposure treatment)

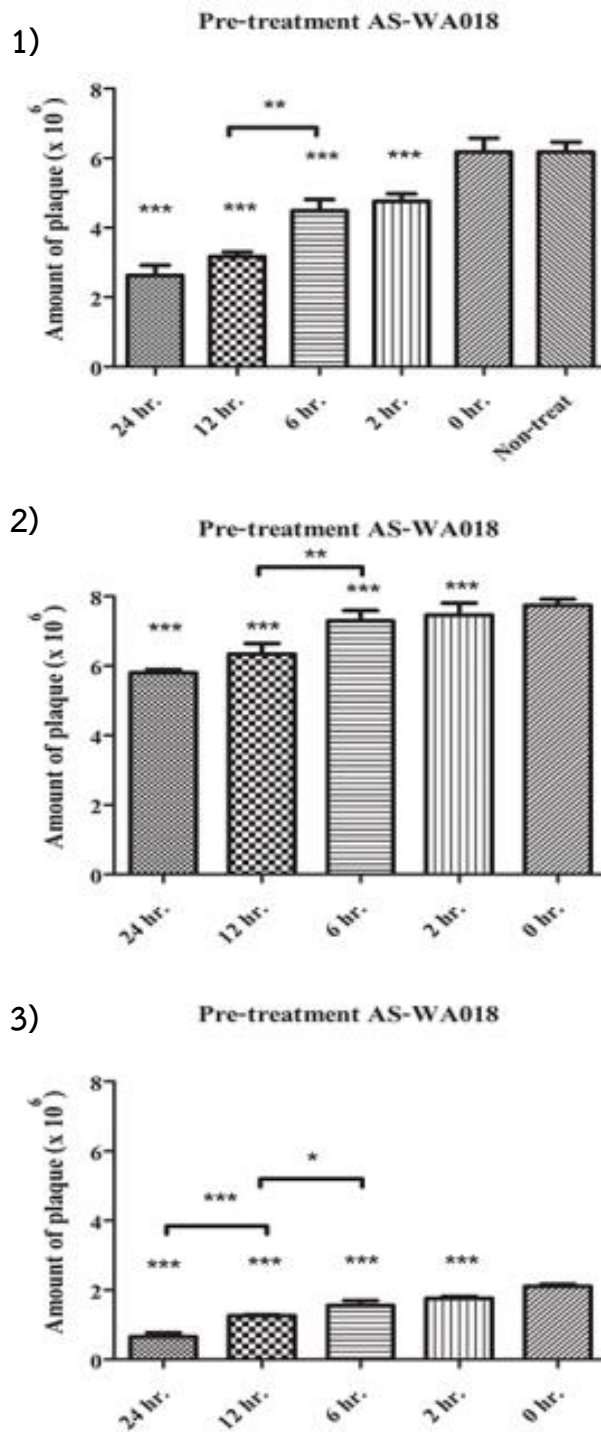
ตารางที่ 10 แสดงจำนวนไวรัสลูกหลานที่เกิดจากการนำเซลล์มะเร็งตับมนุษย์ซึ่งจะถูกเลี้ยงกับสาร AS-WA018 ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 0 2 6 12 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นติดเชื้อไวรัสเดงกีซีโรไทป์-2 ที่ MOI 10 โดยใช้การใส่สารและล้างออกทันที (0 ชั่วโมง) เป็นชุดควบคุม ($p < 0.05$) ด้วยวิธีการบำบัดก่อนติดเชื้อ (Pre-exposure treatment) ทำ 3 การทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ

เวลาก่อนติดเชื้อ	จำนวนไวรัส ($\times 10^6$ PFU ต่อมิลลิลิตร)					
	24 ชั่วโมง	12 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง	2 ชั่วโมง	0 ชั่วโมง (ชุดควบคุม)	Non-treat
การทดลองที่ 1	2.30	3.11	4.11	4.50	5.73	5.94
	2.88	3.33	4.63	4.93	6.31	6.11
	2.70	3.08	4.71	4.84	6.49	6.49

เวลาก่อนติดเชื้อ	จำนวนไวรัส ($\times 10^6$ PFU ต่อมิลลิลิตร)				
	24 ชั่วโมง	12 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง	2 ชั่วโมง	0 ชั่วโมง (ชุดควบคุม)
การทดลองที่ 2	5.87500	6.6875	7.2125	7.4875	7.5625
	5.82500	6.1000	7.0375	7.1000	7.7250
	5.68750	6.2125	7.6250	7.7875	7.9250

เวลาก่อนติดเชื้อ	จำนวนไวรัส ($\times 10^6$ PFU ต่อมิลลิลิตร)				
	24 ชั่วโมง	12 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง	2 ชั่วโมง	0 ชั่วโมง (ชุดควบคุม)
การทดลองที่ 3	0.58	1.24	1.70	1.79	2.10
	0.61	1.29	1.55	1.80	2.05
	0.79	1.28	1.41	1.71	2.18

ซึ่งจำนวนไวรัสลูกหลานที่ได้นี้ จะนำไปสร้างกราฟ ซึ่งแสดงในรูปถัดไป (รูปที่ 27)



รูปที่ 27 แสดงจำนวนไวรัสลูกหลานที่เกิดจากการนำเซลล์มะเร็งตับมนุษย์ซึ่งจะถูกเลี้ยงกับสาร AS-WA018 ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 12 6 และ 2 ชั่วโมงก่อนการติดเชื้อไวรัสเดงกีซีโรไทป์-2 ที่ MOI 10 โดยการใช้การใส่สารและล้างออกทันที (0 ชั่วโมง) เป็นชุดควบคุม ($p < 0.05$) ด้วยวิธีการบำบัดก่อนติดเชื้อ (Pre-exposure treatment) ทำ 3 การทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ โดย 1) 2) และ 3) คือการทดลองที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ

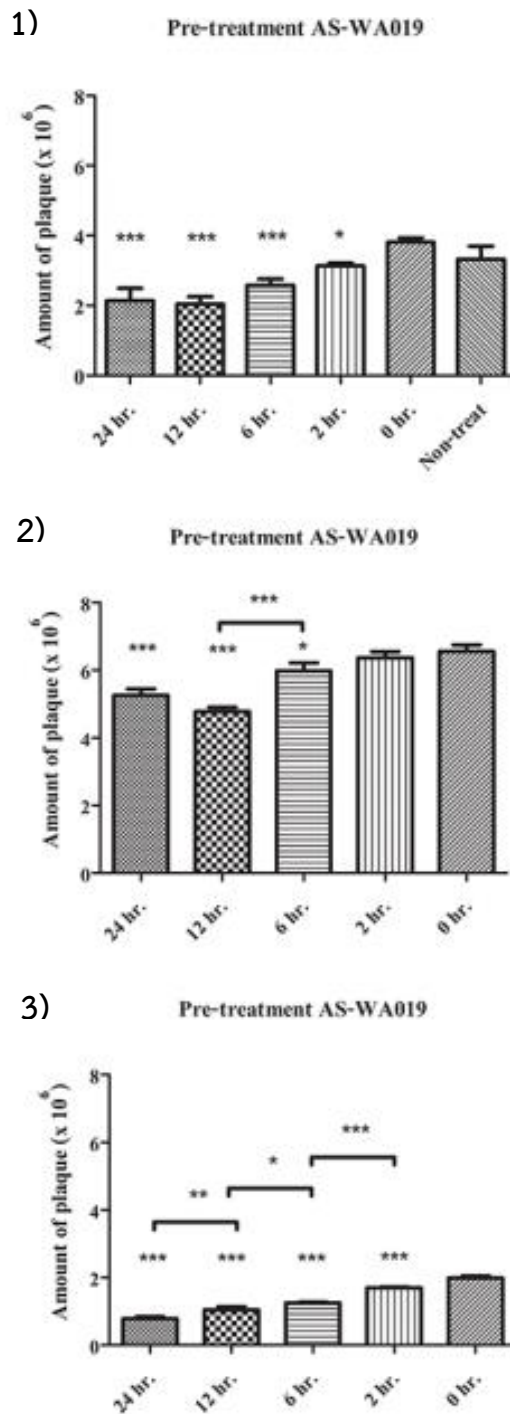
ตารางที่ 11 แสดงจำนวนไวรัสลูกหลานที่เกิดจากการนำเซลล์มะเร็งระดับมนุษย์ซึ่งจะถูกเลี้ยงกับสาร AS-WA019 ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 0 2 6 12 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นติดเชื้อไวรัสเดงกีซีโรไทป์-2 ที่ MOI 10 โดยใช้การใส่สารและล้างออกทันที (0 ชั่วโมง) เป็นชุดควบคุม ($p < 0.05$) ด้วยวิธีการบำบัดก่อนติดเชื้อ (Pre-exposure treatment) ทำ 3 การทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ

เวลาก่อนติดเชื้อ	จำนวนไวรัส ($\times 10^6$ PFU ต่อมิลลิลิตร)					
	24 ชั่วโมง	12 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง	2 ชั่วโมง	0 ชั่วโมง (ชุดควบคุม)	Non-treat
การทดลองที่ 1	1.79	1.88	2.40	3.05	3.66	2.89
	2.18	2.28	2.56	3.21	3.86	3.55
	2.48	1.99	2.76	3.13	3.90	3.53

เวลาก่อนติดเชื้อ	จำนวนไวรัส ($\times 10^6$ PFU ต่อมิลลิลิตร)				
	24 ชั่วโมง	12 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง	2 ชั่วโมง	0 ชั่วโมง (ชุดควบคุม)
การทดลองที่ 2	5.05	4.65	5.76	6.23	6.36
	5.40	4.79	5.94	6.30	6.56
	5.33	4.90	6.24	6.58	6.75

เวลาก่อนติดเชื้อ	จำนวนไวรัส ($\times 10^6$ PFU ต่อมิลลิลิตร)				
	24 ชั่วโมง	12 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง	2 ชั่วโมง	0 ชั่วโมง (ชุดควบคุม)
การทดลองที่ 3	0.83	1.15	1.23	1.68	1.93
	0.71	1.01	1.25	1.70	2.04
	0.81	0.96	1.28	1.71	2.01

ซึ่งจำนวนไวรัสลูกหลานที่ได้นี้ จะนำไปสร้างกราฟ ซึ่งแสดงในรูปถัดไป (รูปที่ 28)



รูปที่ 28 แสดงจำนวนไวรัสลูกหลานที่เกิดจากการนำเซลล์มะเร็งตับมนุษย์ซึ่งจะถูกเลี้ยงกับสาร AS-WA019 ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 12 6 และ 2 ชั่วโมงก่อนการติดเชื้อไวรัสเดงกีซีโรไทป์-2 ที่ MOI 10 โดยใช้การใส่สารและล้างออกทันที (0 ชั่วโมง) เป็นชุดควบคุม ($p < 0.05$) ด้วยวิธีการบำบัดก่อนติดเชื้อ (Pre-exposure treatment) ทำ 3 การทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ โดย 1) 2) และ 3) คือการทดลองที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ

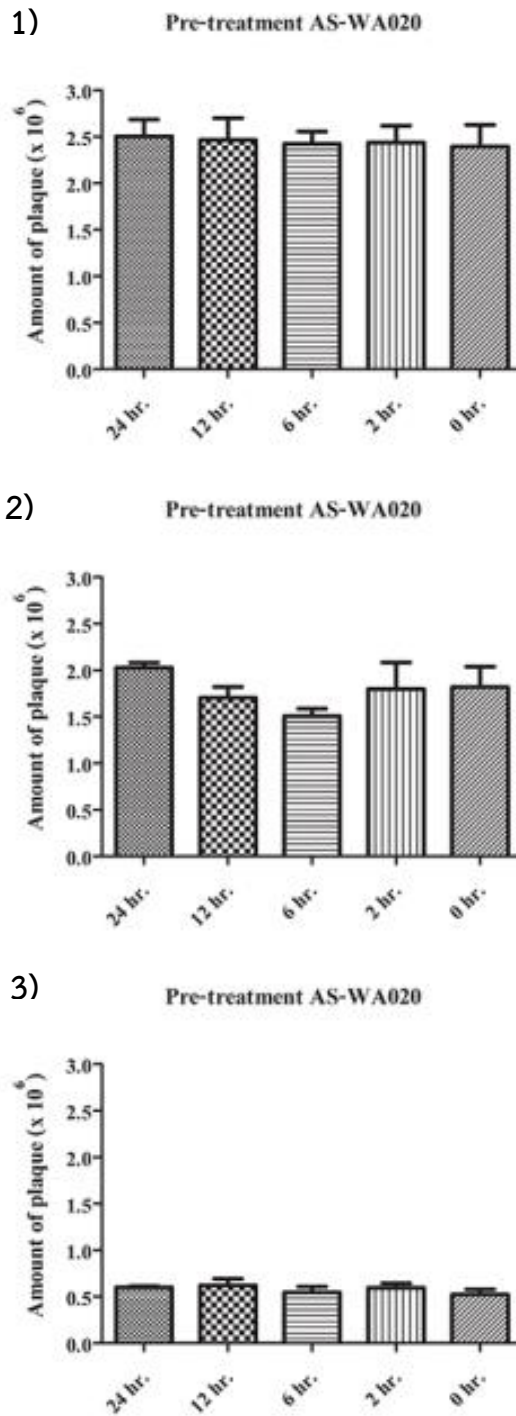
ตารางที่ 12 แสดงจำนวนไวรัสลูกหลานที่เกิดจากการนำเซลล์มะเร็งตับมนุษย์ซึ่งจะถูกเลี้ยงกับสาร AS-WA020 ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 0 2 6 12 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นติดเชื้อไวรัสเดงกีซีโรไทป์-2 ที่ MOI 10 โดยใช้การใส่สารและล้างออกทันที (0 ชั่วโมง) เป็นชุดควบคุม ($p < 0.05$) ด้วยวิธีการบำบัดก่อนติดเชื้อ (Pre-exposure treatment) ทำ 3 การทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ

เวลาก่อนติดเชื้อ	จำนวนไวรัส ($\times 10^6$ PFU ต่อมิลลิลิตร)					
	24 ชั่วโมง	12 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง	2 ชั่วโมง	0 ชั่วโมง (ชุดควบคุม)	Non-treat
การทดลองที่ 1	2.46	2.23	2.29	2.39	2.14	2.46
	2.35	2.49	2.44	2.64	2.59	2.35
	2.70	2.69	2.55	2.29	2.46	2.70

เวลาก่อนติดเชื้อ	จำนวนไวรัส ($\times 10^6$ PFU ต่อมิลลิลิตร)				
	24 ชั่วโมง	12 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง	2 ชั่วโมง	0 ชั่วโมง (ชุดควบคุม)
การทดลองที่ 2	2.01	1.74	1.45	1.60	1.66
	2.09	1.58	1.56	2.00	1.98
	1.98	1.80	-	-	-

เวลาก่อนติดเชื้อ	จำนวนไวรัส ($\times 10^6$ PFU ต่อมิลลิลิตร)				
	24 ชั่วโมง	12 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง	2 ชั่วโมง	0 ชั่วโมง (ชุด ควบคุม)
การทดลองที่ 3	0.60	0.65	0.48	0.65	0.49
	0.61	0.54	0.60	0.58	0.50
	0.59	0.68	0.56	0.56	0.59

ซึ่งจำนวนไวรัสลูกหลานที่ได้นี้ จะนำไปสร้างกราฟ ซึ่งแสดงในรูปถัดไป (รูปที่ 29)



รูปที่ 29 แสดงจำนวนไวรัสลูกหลานที่เกิดจากการนำเซลล์มะเร็งตับมนุษย์ซึ่งจะถูกเลี้ยงกับสาร AS-WA020 ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 12 6 และ 2 ชั่วโมงก่อนการติดเชื้อไวรัสเดงกีซีโรไทป์-2 ที่ MOI 10 โดยการใช้การใส่สารและล้างออกทันที (0 ชั่วโมง) เป็นชุดควบคุม ($p < 0.05$) ด้วยวิธีการบำบัดก่อนติดเชื้อ (Pre-exposure treatment) ทำ 3 การทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ โดย 1) 2) และ 3) คือการทดลองที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ

5. การบำบัดหลังติดเชื้อ (Post-exposure treatment)

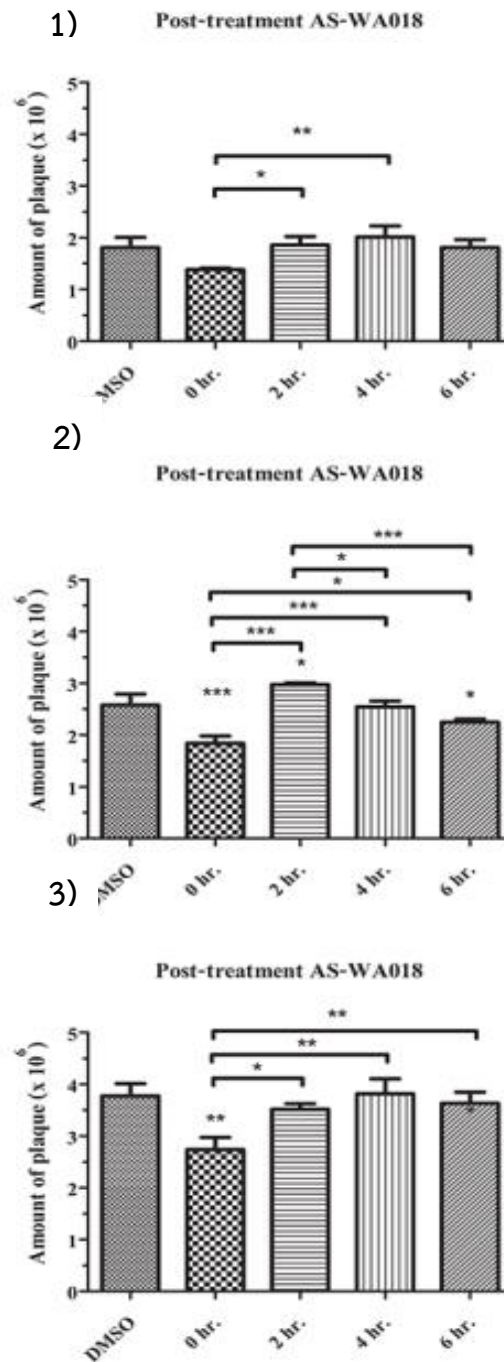
ตารางที่ 13 แสดงจำนวนไวรัสลูกหลานในเซลล์มะเร็งตับมนุษย์เมื่อใส่สาร AS-WA018 ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครโมลาร์ ที่เวลา 0 2 4 และ 6 ชั่วโมง หลังการติดเชื้อไวรัสเดงกี ซีโรไทป์-2 ที่ MOI 10 โดยมี DMEM + 0.5% DMSO เป็นชุดควบคุม ($p < 0.05$) ด้วยวิธีการบำบัดหลังติดเชื้อ Post-exposure treatment) ทำ 3 การทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ

เวลาหลังติดเชื้อ	จำนวนไวรัส ($\times 10^6$ PFU ต่อมิลลิลิตร)				
	ชุดควบคุม	0 ชั่วโมง	2 ชั่วโมง	4 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง
การทดลองที่ 1	1.64	1.36	1.73	1.80	1.64
	1.76	1.38	1.81	2.01	1.86
	2.03	1.41	2.04	2.23	1.93

เวลาหลังติดเชื้อ	จำนวนไวรัส ($\times 10^6$ PFU ต่อมิลลิลิตร)				
	ชุดควบคุม	0 ชั่วโมง	2 ชั่วโมง	4 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง
การทดลองที่ 2	2.45	1.75	3.00	2.53	2.21
	2.46	1.78	2.94	2.66	2.31
	2.83	2.00	2.99	2.45	2.21

เวลาหลังติดเชื้อ	จำนวนไวรัส ($\times 10^6$ PFU ต่อมิลลิลิตร)				
	ชุดควบคุม	0 ชั่วโมง	2 ชั่วโมง	4 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง
การทดลองที่ 3	3.51	2.75	3.64	3.68	3.55
	3.96	2.50	3.46	4.15	3.88
	3.85	2.96	3.45	3.61	3.46

ซึ่งจำนวนไวรัสลูกหลานที่ได้นี้ จะนำไปสร้างกราฟ ซึ่งแสดงในรูปถัดไป (รูปที่ 30)



รูปที่ 30 แสดงจำนวนไวรัสลูกหลานที่เกิดจากการนำเซลล์เป้าหมายซึ่งจะถูกทำให้ติดเชื้อไวรัสเดงกี ซีโรไทป์-2 จากนั้นจะถูกเลี้ยงกับสาร AS-WA018 ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครโมลาร์ ที่เวลา 0 2 4 และ 6 ชั่วโมง หลังการติดเชื้อไวรัสเดงกีซีโรไทป์-2 ที่ MOI 10 โดยมี DMEM + 0.5% DMSO เป็นชุดควบคุม ($p < 0.05$) ด้วยวิธีการบำบัดหลังติดเชื้อ (Post-exposure treatment) ทำ 3 การทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ โดย 1) 2) และ 3) คือการทดลองที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ

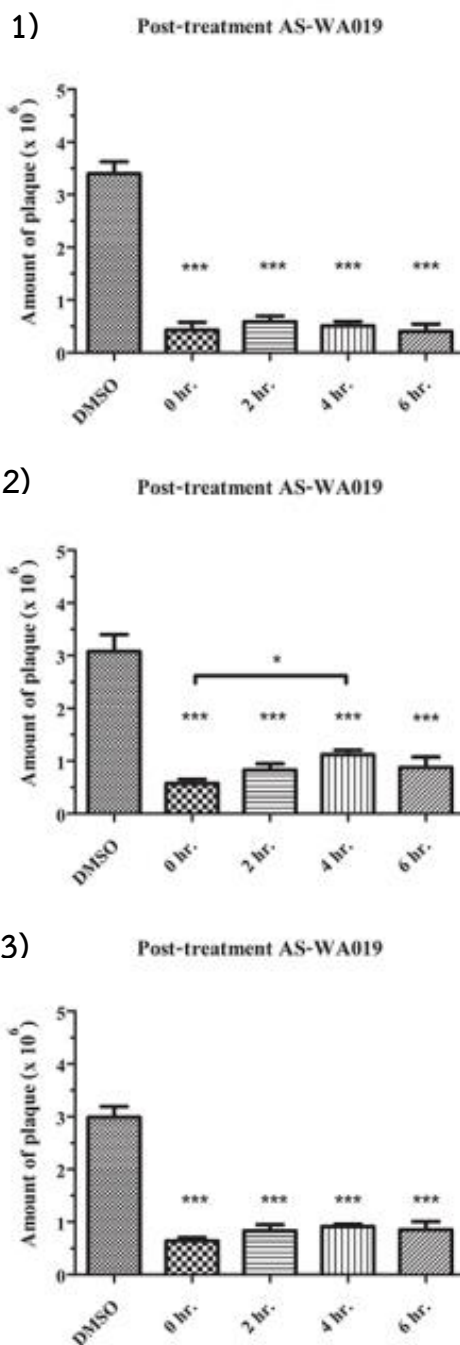
ตารางที่ 14 แสดงจำนวนไวรัสลูกหลานในเซลล์มะเร็งตับมนุษย์เมื่อใส่สาร AS-WA019 ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครโมลาร์ ที่เวลา 0 2 4 และ 6 ชั่วโมง หลังการติดเชื้อไวรัสเดงกี ซีโรไทป์-2 ที่ MOI 10 โดยมี DMEM + 0.5% DMSO เป็นชุดควบคุม ($p < 0.05$) ด้วยวิธีการบำบัดหลังติดเชื้อ (Post-exposure treatment) ทำ 3 การทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ

เวลาหลังติดเชื้อ	จำนวนไวรัส ($\times 10^6$ PFU ต่อมิลลิลิตร)				
	ชุดควบคุม	0 ชั่วโมง	2 ชั่วโมง	4 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง
การทดลองที่ 1	3.64	0.41	0.51	0.44	0.33
	3.19	0.59	0.66	0.60	0.56
	3.36	0.30	-	0.49	0.33

เวลาหลังติดเชื้อ	จำนวนไวรัส ($\times 10^6$ PFU ต่อมิลลิลิตร)				
	ชุดควบคุม	0 ชั่วโมง	2 ชั่วโมง	4 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง
การทดลองที่ 2	2.80	0.66	0.95	1.16	1.10
	3.43	0.51	0.71	1.03	0.74
	3.01	0.55	0.83	1.18	0.80

เวลาหลังติดเชื้อ	จำนวนไวรัส ($\times 10^6$ PFU ต่อมิลลิลิตร)				
	ชุดควบคุม	0 ชั่วโมง	2 ชั่วโมง	4 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง
การทดลองที่ 3	2.93	0.58	0.73	0.93	0.69
	3.21	0.65	0.95	0.95	0.99
	2.83	0.70	0.83	0.88	0.89

ซึ่งจำนวนไวรัสลูกหลานที่ได้นี้ จะนำไปสร้างกราฟ ซึ่งแสดงในรูปถัดไป (รูปที่ 31)



รูปที่ 31 แสดงจำนวนไวรัสลูกหลานที่เกิดจากการนำเซลล์เป้าหมายซึ่งจะถูกทำให้ติดเชื้อไวรัสแดงที่ซีโรไทป์-2 จากนั้นจะถูกเลี้ยงกับสาร AS-WA019 ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครโมลาร์ ที่เวลา 0 2 4 และ 6 ชั่วโมง หลังการติดเชื้อไวรัสแดงที่ซีโรไทป์-2 ที่ MOI 10 โดยมี DMEM + 0.5% DMSO เป็นชุดควบคุม ($p < 0.05$) ด้วยวิธีการบำบัดหลังติดเชื้อ (Post-exposure treatment) ทำการทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ โดย 1) 2) และ 3) คือการทดลองที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ

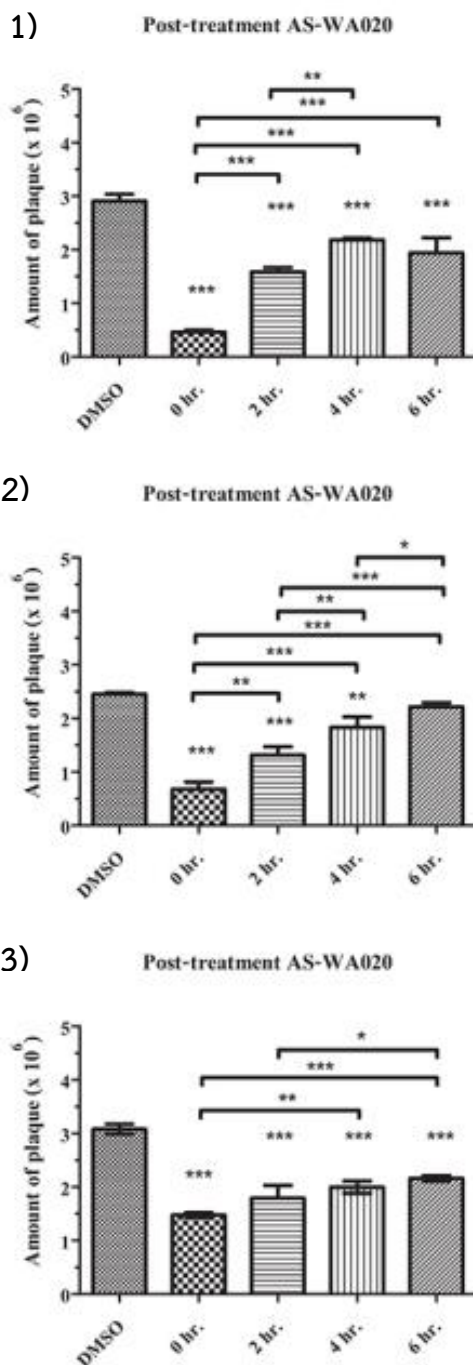
ตารางที่ 15 แสดงจำนวนไวรัสลูกหลานในเซลล์มะเร็งตับมนุษย์เมื่อใส่สาร AS-WA020 ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครโมลาร์ ที่เวลา 0 2 4 และ 6 ชั่วโมง หลังการติดเชื้อไวรัสเดงกี ซีโรไทป์-2 ที่ MOI 10 โดยมี DMEM + 0.5% DMSO เป็นชุดควบคุม ($p < 0.05$) ด้วยวิธีการบำบัดหลังติดเชื้อ (Post-exposure treatment) ทำ 3 การทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ

เวลาหลังติดเชื้อ	จำนวนไวรัส ($\times 10^6$ PFU ต่อมิลลิลิตร)				
	ชุดควบคุม	0 ชั่วโมง	2 ชั่วโมง	4 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง
การทดลองที่ 1	2.88	0.49	1.68	2.23	2.06
	3.05	0.48	1.51	2.16	2.14
	2.80	0.43	1.56	2.15	1.61

เวลาหลังติดเชื้อ	จำนวนไวรัส ($\times 10^6$ PFU ต่อมิลลิลิตร)				
	ชุดควบคุม	0 ชั่วโมง	2 ชั่วโมง	4 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง
การทดลองที่ 2	2.44	0.53	1.35	1.91	2.28
	2.44	0.75	1.14	1.98	2.24
	2.49	0.76	1.45	1.61	2.13

เวลาหลังติดเชื้อ	จำนวนไวรัส ($\times 10^6$ PFU ต่อมิลลิลิตร)				
	ชุดควบคุม	0 ชั่วโมง	2 ชั่วโมง	4 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง
การทดลองที่ 3	2.99	1.44	1.88	2.08	2.21
	3.08	1.46	1.98	2.05	2.11
	3.18	1.53	1.53	1.86	2.15

ซึ่งจำนวนไวรัสลูกหลานที่ได้นี้ จะนำไปสร้างกราฟ ซึ่งแสดงในรูปถัดไป (รูปที่ 32)



รูปที่ 32 แสดงจำนวนไวรัสลูกหลานที่เกิดจากการนำเซลล์เป้าหมายซึ่งจะถูกทำให้ติดเชื้อไวรัสเดงกี ซีโรไทป์-2 จากนั้นจะถูกเลี้ยงกับสาร AS-WA020 ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครโมลาร์ ที่เวลา 0 2 4 และ 6 ชั่วโมง หลังการติดเชื้อไวรัสเดงกีซีโรไทป์-2 ที่ MOI 10 โดยมี DMEM + 0.5% DMSO เป็นชุดควบคุม ($p < 0.05$) ด้วยวิธีการบำบัดหลังติดเชื้อ (Post-exposure treatment) ทำ 3 การทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ โดย 1) 2) และ 3) คือการทดลองที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวกาญจนา บำรุงศรี เกิดวันที่ 24 เมษายน พ.ศ. 2534 ที่จังหวัดนครสวรรค์ สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2555 และศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิชาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2556 ได้เข้าร่วมงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ “International Conference of Pharmaceutical Sciences and Medicines 2017 (ICPAM 2017)” เมื่อวันที่ 16 มิถุนายน พ.ศ. 2560 ณ อาคารปฏิบัติการพื้นฐานและศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา โดยได้รับรางวัล 2nd Best Poster Presentation Award ในการนำเสนอหัวข้องานวิจัยเรื่อง “Screening of bioactive compounds from Rauwolfia serpentina, Stephania suberosa and Curcuma comosa for inhibition of DENV-2 from infecting HepG2 cells.”