หัวข้อดุษฎีนิพนธ์ ฤทธิ์การยับยั้งไวรัสก่อโรคเริมโดยสารสกัด *Spirogyra* spp.

ผู้เขียน นางสาวอ้อมหทัย ดีแท้

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (จุลชีววิทยาประยุกต์)

คณะกรรมการที่ปรึกษา
ผศ. ดร. ยิ่งมณี ตระกูลพัว อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
รศ. ดร. ยุวดี พีรพรพิศาล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ผศ. ดร. พัชณี แสงทอง อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

ไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 1 และชนิดที่ 2 จัดเป็นไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอ สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อที่ผิวหนัง และทำให้เกิดการติดเชื้อที่มีความรุนแรงเป็นเหตุให้เสียชีวิตได้ ในกรณีก่อให้เกิดโรคไข้สมองอักเสบเฉียบพลัน โดยทั่วไปอาการแสดงของโรคติดเชื้อไวรัสเริม พบเป็นตุ่มน้ำใสบริเวณปาก โรคเริมไม่สามารถรักษาหายขาดได้ และสามารถแพร่กระจายเชื้อได้ง่าย ยารักษาโรคเริมที่มีประสิทธิภาพมาก เช่น acyclovir, valaciclovir และ penciclovir ซึ่งมักก่อให้เกิดผลข้างเคียงและมีราคาแพง หากใช้รักษาเป็นเวลานาน ทำให้เชื้อไวรัสดื้อยาได้ ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจอย่างมากในการศึกษาประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์จากธรรมชาติของสาหร่าย ในการยับยั้งการติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริม

ในการวิจัยครั้งนี้ ได้ทำการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไวรัสก่อโรคเริมของสาหร่ายน้ำจืดสีเขียวขนาดใหญ่ *Spirogyra* spp. หรือสาหร่ายเตา ที่พบในพื้นที่ในภาคเหนือของไทย ทำการสกัดสาหร่ายด้วยน้ำ เอทานอล (95%) และเมทานอล ผลพบว่าสารสกัดเมทานอล (ME) ให้ผลร้อยละของน้ำหนักแห้งสูงสุด คือ 23.52% จากนั้นนำสารสกัดทั้งหมดทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero ด้วยวิธี MTT assay ซึ่งผลการทดสอบพบว่าสารสกัดน้ำ (AE) ให้ผลความเป็นพิษต่ำสุดที่ความเข้มข้นที่ทำให้เป็นพิษต่อเซลล์ 50% (CD_{50}) คือ 4,363.30 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร ในขณะที่สารสกัดเมทานอล ให้ผลความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงสูงที่สุดโดยแสดงค่าของ CD_{50} เท่ากับ 250.80 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร จากนั้นนำสารสกัดความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ทดสอบการยับยั้งไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 1, ไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 1 ที่ดื้อต่อยาอะไซโคลเวียร์ จำนวน 5 ตัวอย่าง และไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โดยวิธี plaque reduction assay ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดเมทานอล (ME) และเอทานอล (EE) ให้ผลการยับยั้งไวรัสก่อโรคเริมทั้งสองชนิดได้สูงสุด โดยยับยั้งไวรัสขณะเกาะติดเซลล์ และหลังไวรัสเกาะติดเซลล์ ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพสารสกัดจากสาหร่ายเตาในการยับยั้งขั้นตอนต่างๆ ของการติดเชื้อไวรัสเริม

การศึกษาการยับยั้งอนุภาคไวรัสก่อโรคเริมโดยตรง พบว่าสารสกัดเอทานอล และสารสกัดเมทานอลให้ผลการยับยั้งไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 1, ตัวอย่างไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 1 ที่ดื้อต่อยาอะไซโคลเวียร์ จำนวน 5 ตัวอย่าง และไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 ได้สูงสุด สกัดเมทานอลให้ผลยับยั้งไวรัสเริมชนิดที่ 2 (HSV-2G) ได้สูงที่สุด โดยสามารถยับยั้งอนุภาคไวรัสได้อย่างสมบูรณ์ภายในเวลา 2 ชั่วโมง ขณะที่อนุภาคไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 1 (HSV-1F), ตัวอย่างไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 1 ที่ดื้อต่อยาอะไซโคลเวียร์จำนวน 5 ตัวอย่าง สามารถถูกยับยั้งได้ในเวลา 4 ชั่วโมง นอกจากนี้ผลของสารสกัดเอทานอล มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งไวรัสเริมทั้งสองชนิด และไวรัสเริมชนิดที่ 1 สายพันธุ์ที่ดื้อยาอะไซโคลเวียร์ ขณะไวรัสเกาะติดเซลล์ และหลังจากไวรัสเกาะติดเซลล์เพาะเลี้ยง รวมทั้งสารสกัดเอทานอลยังสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส HSV-1F และตัวอย่างไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 1 ที่ดื้อต่อยาอะไซโคลเวียร์ได้สูงสุด ที่เวลา 30 ชั่วโมงหลังจากการติดเชื้อ ส่วนสารสกัดน้ำสามารถยับยั้งเชื้อ HSV-2G ได้สูงสุด นอกจากนั้นสารสกัดเอทานอลให้ผลการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอและโปรตีนของไวรัส HSV-1F และ ไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 1 ที่ดื้อต่อยาอะไซโคลเวียร์ได้สูงสุด ซึ่งสารสกัดน้ำแสดงผลการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอและโปรตีนของไวรัส HSV-2G ได้ดีที่สุด ดังนั้นสารสกัดเอทานอล และสารสกัดน้ำของสาหร่ายเตาจึงถูกคัดเลือก เพื่อนำไปสกัดแยกส่วนเพื่อตรวจหาองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของสารสกัดด้วยวิธีพฤกษเคมี ผลที่ได้พบว่า สารสกัดเอทานอลและสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ตัวอย่างที่ EE01 และ EE02 ประกอบด้วยสารอัลคาลอยด์, น้ำมันหอมระเหย และสารกลุ่มเทอปีนอยด์ (terpenoid) ซึ่งมีประสิทธิภาพการยับยั้งการติดเชื้อไวรัส HSV ได้ สูงสุด

ในการวิจัยครั้งนี้ ได้ทำการวิเคราะห์โปรตีนทั้งหมดโดยวิธี two-dimensional electrophoresis (2-DE) และศึกษากลไกการทำงานร่วมกันของโปรตีน ผลจากการศึกษาโดยวิธี 2-DE พบว่าจุดของโปรตีนมีปริมาณลดลงในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสที่มีการเติมสารสกัดสาหร่าย โดยเมื่อเซลล์ติดเชื้อไวรัส HSV-1F ที่ไม่เติมสารสกัดเทียบกับเซลล์ติดเชื้อไวรัส HSV-1F ที่มีการเติมสารสกัดเอทานอล พบว่ามีจุดโปรตีนที่แสดงออก 19 จุด ส่วนการทดสอบเซลล์ติดเชื้อไวรัส HSV-2G ที่ไม่เติมสารสกัดเทียบกับเซลล์ติดเชื้อไวรัส HSV-2G ที่มีการเติมสารสกัดน้ำของสาหร่าย พบว่ามีจุดโปรตีนที่แสดงออก 26 จุด จากนั้นทำการตรวจวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนที่แสดงออกโดยใช้โปรแกรม Mascot เพื่อศึกษากลไกการทำงานร่วมกันของโปรตีน (protein interaction) พบว่าภายหลังจากเติมสารสกัด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เอทานอล มีโปรตีนที่แสดงออก และทำงานร่วมกันระหว่างโปรตีนของไวรัส HSV-1F และเซลล์โฮสต์ คือมีการแสดงออกสูงมากขึ้นของโปรตีน Nesprin-1 แต่มีการแสดงออกที่ลดลงของโปรตีนเบต้า 2 integrin และ E3 ubiquitin ส่วน HSV-2 โปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงจะเกี่ยวข้องกับการควบคุมวัฏจักรของเซลล์ และการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนภายในเซลล์ติดเชื้อ HSV-2G หลังจากเติมสารสกัดสาหร่ายเตา

ดังนั้นจึงได้นำสารสกัดมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เจลสาหร่ายที่มีส่วนผสมของสารสกัดเอทานอลของสาหร่ายเตา พบว่าเจลสาหร่ายเตาสามารถยับยั้งเชื้อไวรัส HSV-1F, ไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 1 ที่ดื้อต่อยาอะไซโคลเวียร์ และเชื้อไวรัส HSV-2G ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ HSV ของเจลสาหร่ายเตา โดยเก็บรักษาเป็นเวลา 7 เดือน และทดสอบการเก็บรักษาผ่านอุณหภูมิร้อนและเย็น ที่ 4ºC เป็นเวลา 48 ชั่วโมงและ 45ºC เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จำนวน 6 รอบการทดสอบ พบว่าผลิตภัณฑ์เจลสาหร่ายยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อไวรัส นอกจากนี้ได้ทดสอบการใช้เจลสาหร่ายกับอาสาสมัคร พบว่าเจลสาหร่ายไม่ก่อให้เกิดการระคายเคือง ดังนั้นประโยชน์จากงานวิจัยนี้สามารถนำสารสกัดจากสาหร่ายมาประยุกต์ใช้ และพัฒนาผลิตภัณฑ์ยับยั้งเชื้อไวรัส HSV ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Dissertation Title	Anti-Herpes Simplex Virus Activity by *Spirogyra* spp. Extracts
Author	Miss Aomhatai Deethae
Degree	Doctor of Philosophy (Applied Microbiology)
Advisory Committee	Asst. Prof. Dr. Yingmanee Tragoolpua Advisor Assoc. Prof. Dr. Yuwadee Peerapornpisal Co-advisor Asst. Prof. Dr. Padchanee Sangthong Co-advisor

ABSTRACT

Herpes simplex virus (HSV) type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) are large DNA viruses, causing localized skin infections and can produce severity of infection leading to death in acute encephalitis. The diseases that are occurred as cold sore or fever blister on the lip is the most manifestation of HSV infection. HSV disease is not entirely therapy and it is easy for transmission. Many effective drug such as acyclovir, valaciclovir and penciclovir have disadvantages such as side effects, expensive cost and drug resistant strains may occur after long term treatment. Therefore, the antiviral agent of natural substance from algae becomes of considerable interest to study an efficacy against HSV infection.

Anti-HSV activity of green freshwater macroalga, *Spirogyra* spp. or Tao that was locally found in Northern of Thailand, was investigated in this research. These macroalga were extracted with water, 95% ethanol and methanol. The result showed that the highest percentage yield of this algal extract was obtained from methanolic extract (ME) of *Spirogyra* spp., which was 23.52%. The extracts were examined for cytotoxicity on Vero cell by MTT assay. The result revealed that the aqueous extract (AE) of *Spirogyra* spp. showed the lowest cytotoxicity with CD_{50} value of 4,363.30 µg/ml, while the ME extract of *Spirogyra spp.* revealed the highest cytotoxicity in Vero cells with CD_{50} value of 250.80 µg/ml. Then, nontoxic concentrations of extracts were

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

used to determine against HSV-1F, five samples of ACV-resistant HSV-1 isolates and HSV-2G by plaque reduction assay. It was found that the ME and ethanolic (EE) extract of *Spirogyra* spp. during and after viral attachment to Vero cell showed the highest anti-HSV against both types of HSV. Thus, the study of anti-viral effect on various stages of HSV infection was performed.

Direct inactivation kinetic of HSV particles revealed the high ability of EE and ME extracts on inactivation of HSV-1F, ACV-resistant HSV-1 isolates and HSV-2G particles. Interestingly, HSV-2G was the highest inactivated by ME extract to completely inhibition within 2 hours, while the HSV-1F and ACV-resistant HSV-1 isolates were inactivated to negligible amounts within 4 hours. Moreover, the EE extract showed the highest ability to inhibit both types of HSV and ACV-resistant HSV-1 isolates during viral attachment, and after viral attachment. The EE extract also exhibited the highest inhibition on replication of HSV-1F and ACV-resistant HSV-1 isolates replication at 30 hours post infection, while the highest inhibition of HSV-2G was shown after treatment by AE extract. Moreover, the EE extract of *Spirogyra* spp. showed the potential inhibitory effect on HSV-1F and ACV-resistant HSV-1 viral DNA and protein synthesis, while the highest inhibition of HSV-2G DNA was demonstrated after treatment by AE extract. The EE and AE extracts of *Spirogyra spp.* were selected to further fractionate in order to determine the phytochemical analysis. The result illustrated that the EE01 and EE02 fractions which separated from the EE extract of *Spirogyra spp.* composed of alkaloid, essential oil and terpenoid. The EE01 and EE02 fractions showed the highest efficacy against HSV infection.

Furthermore, the results of two-dimensional electrophoresis (2-DE) and protein-protein interactions were analyzed in this research. The result of 2-DE revealed the protein spots were decreased in infected cells after treatment with *Spirogyra spp.* extract. The results of the HSV-1F infected cells and HSV-1F infected cells after treatment with EE extract of *Spirogyra* spp. revealed nineteen differentially expressed protein spots. Moreover, the comparison of the HSV-2G infected cells and HSV-2G infected cells after treatment with AE extract of *Spirogyra* spp., reported twenty-six differentially expressed protein spots. The identification of differentially expressed HSV-1F and HSV-2G protein spots were analyzed by Mascot program. The protein

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

interaction between HSV-1 and host cell proteins after treatment with EE extract suggested that Nesprin-1 protein was up-regulated but the integrin beta-2 and E3 ubiquitin were down-regulated. Whereas, the functional mechanism of changed global proteins were included the regulation of cell cycle and intracellular non-membrane bounded organelle of HSV-2G infected cell after treatment with AE extract.

Therefore, algal gel product containing crude ethanolic extract of *Spirogyra* spp. was developed and determined for anti-HSV effect and stability. It was found that, the algal gel also retained the anti-viral effect against HSV-1F, ACV-resistant HSV-1 isolates and HSV-2G after 7 months of storage. Moreover, anti-HSV activity of the algal gel were also retained after 6 cycles of heating-cooling when storage at 4ºC for 48 hours and 45ºC for 48 hours. The algal gel also did not cause any irritation on skin of volunteers. Therefore, the knowledge from this research will be used for development of effective anti-HSV agent from *Spirogyra* spp. macroalgae extract.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved