

บทที่ 5

อภิปรายผลการวิจัย

ไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 1 จำนวน 32 ตัวอย่าง มีลักษณะ plaque ขนาดเล็ก และเมื่อนำมาทำการเพิ่มจำนวนและหาปริมาณไวรัสตั้งต้น พบว่ามีปริมาณไวรัสตั้งต้นระหว่าง $8.3 \times 10^3 - 9.6 \times 10^{10}$ PFU/ml

จากการตรวจสอบหาค่าความเข้มข้นของยา ACV ที่ยับยั้งเชื้อไวรัสได้ 50% โดยวิธี Plaque reduction assay พบว่าค่า Inhibitory concentration (IC_{50}) ที่ใช้ยับยั้งเชื้อ HSV สายพันธุ์มาตรฐาน HSV-1F เท่ากับ 1.39 ส่วนผลค่า IC_{50} ของไวรัสตัวอย่างทั้งหมด 32 ตัวอย่าง พบว่าให้ผลค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 1-5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ เป็นจำนวน 23 ตัวอย่าง คือหมายเลข 2, 3, 4, 6, 7, 10, 15, 17, 18, 20, 23, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 34, 35, 39 และ 41 มีไวรัสตัวอย่างจำนวน 5 ตัวอย่างที่มีค่า IC_{50} ที่อยู่ในช่วง 5-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ คือหมายเลข 1-A, 1-B, 11, 19 และ 25 พบไวรัส 3 ตัวอย่างที่มีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 10-15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ คือหมายเลข 12, 22 และ 31 และมีไวรัส 1 ตัวอย่างเท่านั้น ที่มีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 15-20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ คือหมายเลข 5 ซึ่งโดยทั่วไป HSV สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์จะมีค่า IC_{50} ค่อนข้างสูง โดยสายพันธุ์ปกติจะมีค่า $IC_{50} < 3 \mu\text{g}/\text{ml}$ (อนวัช, 2538; อรพรรณ, 2538; Field, 2001)

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ จึงเลือกไวรัสตัวอย่างที่มีค่า IC_{50} มากกว่า 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ทั้งหมด 9 ตัวอย่าง คือไวรัสหมายเลข 1-A, 1-B, 5, 11, 12, 19, 22, 25 และ 31 ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 8.41, 6.14, 15.39, 6.74, 11.98, 7.13, 11.78, 7.04 และ 11.81 ตามลำดับ เพื่อวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน DNA polymerase ของเชื้อไวรัส HSV ที่มีผลการดื้อยา acyclovir โดยทำการแยกสกัด DNA จากไวรัส 9 ตัวอย่างนี้ เริ่มจากการติดเชื้อไวรัสบนเซลล์เพาะเลี้ยง GMK และสกัด DNA ของไวรัสด้วย Triton X-100 และ NaCl พบว่าสามารถสกัด DNA ของไวรัสได้ genomic DNA ของไวรัสสายพันธุ์มาตรฐาน HSV-1F และเชื้อไวรัสตัวอย่างทั้งหมด 9 ตัวอย่าง มีขนาดประมาณ 150 kbp

ยีน DNA polymerase ของเชื้อไวรัส HSV มีขนาด 3705 bp ประกอบด้วย 1235 amino acids (Wong *et al.*, 1988) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการออกแบบ primer ที่จำเพาะต่อลำดับเบสบริเวณ DNA polymerase gene ของ HSV-1 สายพันธุ์มาตรฐาน คือ HSV-1 สายพันธุ์ F (accession no. AX358316) เพื่อทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ DNA polymerase gene (Loregian *et al.*, 2000; Knipe and Howley, 2007) โดยในส่วนด้านเริ่มต้นของยีน ได้ทำการออกแบบ

primer 2 ชนิด คือ primer PF5 ซึ่งเป็น forward primer จะจับกับ HSV-1F DNA polymerase gene ตำแหน่งลำดับเบสที่ 902-923 ส่วน primer PR4 ซึ่งเป็น reverse primer จะจับลำดับเบสที่ตำแหน่ง 2409-2430 โดย PCR product ที่ได้คือ ชิ้น DNA ขนาด 1528 bp และส่วนด้านท้ายของยีนใช้ primer 2 ชนิด คือ primer P1 และ primer P2 (มนิชญา, 2549) ซึ่ง primer P1 เป็น forward primer จะจับกับ HSV-1F DNA polymerase gene ตำแหน่งลำดับเบสที่ 2350-2369 และ primer P2 เป็น reverse primer จะจับตำแหน่งลำดับเบสที่ 3670-3690 ตามลำดับโดย PCR product ที่ได้คือ ชิ้น DNA ขนาด 1340 bp

ในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR นั้น ได้ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค PCR โดยใช้ DNA ของไวรัสมาตรฐาน HSV-1F ที่สกัดได้ มาทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำ PCR (Mitchell *et al.*, 1997; Rozenberg and Lebon, 1991) โดยใช้เอนไซม์ *Pfu* DNA polymerase ที่มีคุณสมบัติ 3' → 5' exonuclease activity ที่ใช้เพื่อตรวจสอบ (proofreading) ความถูกต้อง (fidelity) และป้องกันการเกิด mismatched bases ทำให้ผลการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอมีความถูกต้องมากขึ้น (Cline *et al.*, 1996; Innis, 1990; Innis, 1995; วชิรและมนตรี, 2536) แต่เนื่องจากในการปรับหาสภาวะที่เหมาะสมทำได้ยาก ซึ่งจำเป็นต้องปรับความเหมาะสมของสภาวะอื่นๆ ที่ควรคำนึงถึงในการทำ PCR ด้วย ได้แก่ ความเข้มข้นของ Mg^{2+} dNTPs และ primer รวมไปถึงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในขั้นตอนต่างๆของการทำ PCR จึงได้เลือกใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ควบคู่ไปด้วย ทำให้ได้ผลของสภาวะที่เหมาะสมในการทำ PCR ของทั้งสองเอนไซม์

เมื่อศึกษาความสัมพันธ์กับการดื้อยา ACV ในงานวิจัยนี้ได้วิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน DNA polymerase ของเชื้อไวรัส HSV-1 ที่มีค่า IC_{50} มากกว่า $5 \mu g/ml$ จำนวน 9 ตัวอย่างคือ 1A, 1B, 5, 11, 12, 19, 22, 25 และ 31 พบว่ามีไวรัสจำนวน 5 ตัวอย่างคือ หมายเลข 1A, 1B, 12, 22 และ 31 ที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความต่อเนื่องจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ตั้งแต่ตำแหน่งที่ 2065-3291 เมื่อทำการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสมาตรฐาน HSV-1F และตรวจสอบตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ พบว่ามีนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน 8 ตำแหน่ง และพบตรงกันทั้ง 5 ตัวอย่าง คือบริเวณตำแหน่งที่ 2127 เปลี่ยนจาก T → C, 2451 (T → G), 2468 (C → T), 2670 (C → A), 2713 (G → A), 2758 (T → C) และ 3288 (C → A) และมีการขาดหายไป (deletion) ของนิวคลีโอไทด์ 1 ตำแหน่งคือ T ในตำแหน่งที่ 2375

โดยนิวคลีโอไทด์ 3 ตำแหน่งที่สำคัญ คือตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 2468 ทำให้กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 823 เปลี่ยนจาก Ala → Val อยู่ในบริเวณ conserve region (region III) ถึงแม้ว่าตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 2713 ทำให้กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 905 เปลี่ยนจาก Val → Met และตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 2758 ทำให้กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 920 เปลี่ยนจาก Ser → Proอยู่นอกบริเวณ conserve

region แต่การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 905 จากกรดอะมิโน valine ซึ่งเป็น neutral amino acid เปลี่ยนเป็น methionine ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มี surfhydryl group และตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 920 จาก serine ซึ่งเป็น hydroxylated amino acid เปลี่ยนเป็น proline ซึ่งเป็น aromatic heterocyclic amino acid (พนม, 2531; มนตรีและคณะ, 2542; สุรินทร์และคณะ, 2521) อาจมีผลต่อคุณสมบัติของ polypeptide ที่ประกอบเป็นโครงสร้างของโปรตีน แล้วมีผลทำให้เกิดความผิดปกติในการทำหน้าที่ในส่วน UL30 ของยีน DNA polymerase ซึ่งเป็นส่วน catalytic subunit ของเอนไซม์ DNA polymerase (Loregian *et al.*, 2000; Knipe and Howley, 2007) ส่วนการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์อีก 5 ตำแหน่งที่เหลือ คือตำแหน่งที่ 2127, 2375, 2451, 2670 และ 3288 ไม่ทำให้การแปลรหัสเปลี่ยนแปลง

ไวรัสตัวอย่างหมายเลข 11 ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 6.74 $\mu\text{g/ml}$ ให้ผลในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับไวรัสมาตรฐาน HSV-1F พบการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ 3 ตำแหน่งที่เหมือนกับไวรัสหมายเลข 1A, 1B, 12, 22 และ 31 คือตำแหน่งที่ 2468, 2713 และ 2758 นอกจากนั้นได้มีตำแหน่งที่แตกต่างเพิ่มขึ้น 1 ตำแหน่ง คือนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 3272 ทำให้กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 1091 เปลี่ยนจาก Ala→Gly อยู่นอกบริเวณ conserve region ซึ่งเป็น neutral amino acid (พนม, 2531; มนตรี, 2542; สุรินทร์และคณะ, 2521) ซึ่งจะมีผลต่อการทำหน้าที่ของเอนไซม์ DNA polymerase ส่วนการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ 6 ตำแหน่งที่เหลือ คือตำแหน่งที่ 2127, 2278, 2375, 2451, 2670 และ 3288 ไม่ทำให้การแปลรหัสเปลี่ยนแปลง

จากไวรัสตัวอย่างหมายเลข 19 ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 7.13 $\mu\text{g/ml}$ ให้ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนกับไวรัสมาตรฐาน HSV-1F พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ 3 ตำแหน่ง ที่เหมือนกับไวรัสหมายเลข 1A, 1B, 11, 12, 22 และ 31 คือตำแหน่งที่ 2468, 2713 และ 2758 และมีตำแหน่งที่แตกต่างเพิ่มขึ้น 2 ตำแหน่ง คือตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 2863 ทำให้กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 955 เปลี่ยนจาก Val→Leu อยู่ในบริเวณ conserve region (region V) การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่งนี้ยังคงเป็น neutral amino acid เช่นเดิม ซึ่งมีผลต่อการทำหน้าที่ของเอนไซม์ และในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 2866 ทำให้กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 956 เปลี่ยนจาก Asp→Tyr อยู่ในบริเวณ conserve region (region V) เช่นกัน เปลี่ยนจาก aspartic acid ซึ่งเป็น acidic amino acid เป็น tyrosine ที่เป็น aromatic heterocyclic amino acid (พนม, 2531; มนตรี, 2542; สุรินทร์และคณะ, 2521) ดังนั้นการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนี้จึงมีผลต่อโครงสร้างของ polypeptide และมีผลทำให้การทำหน้าที่ของเอนไซม์ DNA polymerase ผิดปกติไป ส่วนการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์อีก 5 ตำแหน่งที่เหลือ คือตำแหน่งที่ 2127, 2375, 2451, 2670 และ 3288 ไม่ทำให้การแปลรหัสเปลี่ยนแปลง

ในไวรัสตัวอย่างหมายเลข 25 ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 7.04 $\mu\text{g/ml}$ ผลในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนกับไวรัสมาตรฐาน HSV-1F พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ 3 ตำแหน่ง ที่เหมือนกับไวรัสหมายเลข 1A, 1B, 11, 12, 19, 22 และ 31 คือตำแหน่งที่ 2468, 2713 และ 2758 และมีตำแหน่งที่แตกต่างเพิ่มขึ้น 1 ตำแหน่ง คือตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 2885 ทำให้กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 962 เปลี่ยนจาก Asn→Ile อยู่ในบริเวณ conserve region (region V) ซึ่งเปลี่ยนจาก asparagine ที่เป็น acidic amino acid เปลี่ยนเป็น isoleucine ที่เป็น neutral amino acid (พนม, 2531; มนตรี, 2542; สุรินทร์และคณะ, 2521) ดังนั้นการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนี้จึงมีผลต่อโครงสร้างของโปรตีนและการทำหน้าที่ของเอนไซม์ DNA polymerase ส่วนการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ 7 ตำแหน่งที่เหลือ คือ ตำแหน่งที่ 2127, 2375, 2451, 2670, 2865, 2904 และ 3288 ไม่ทำให้การแปลรหัสเปลี่ยนแปลง นอกจากนี้ไวรัสตัวอย่างหมายเลข 5 ได้ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ต่อเนื่องกัน จึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาวิเคราะห์การแปลรหัสกรดอะมิโน

ดังนั้นในการศึกษาผลของการกลายพันธุ์ในยีน DNA polymerase ของไวรัส HSV-1 ที่มีผลเกี่ยวข้องกับการดื้อยา ACV จึงสรุปได้ว่า ไวรัสตัวอย่างที่มีค่า IC_{50} มากกว่า 5 $\mu\text{g/ml}$ ทั้งหมด 9 ตัวอย่างนั้น มีไวรัสที่ตรวจสอบนิวคลีโอไทด์ได้สมบูรณ์จำนวน 8 ตัวอย่าง และสามารถนำมาวิเคราะห์การแปลรหัสกรดอะมิโนได้ ผลพบว่ามีกลายพันธุ์ในยีน DNA polymerase ที่ตรงกัน 3 ตำแหน่ง คือตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 2468, 2713 และ 2758 เป็นกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 823 อยู่ในบริเวณ conserve region (region III), 905 และ 920 (อยู่นอกบริเวณ conserve region) ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Hwang และคณะ ในปี ค.ศ.1998 พบว่าบริเวณที่มักพบการกลายพันธุ์ คือบริเวณ conserve region ของ DNA polymerase gene ตั้งแต่กรดอะมิโนลำดับที่ 437-963 ซึ่งในส่วน conserve region นี้ พบการกลายพันธุ์ได้มากในบริเวณ region II และ region III ของ DNA polymerase gene คือกรดอะมิโนลำดับที่ 694-845 (Hwang *et al.*, 1998) นอกจากนั้นยังพบว่า มีรายงานการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นนอกบริเวณ conserve region คือในตำแหน่งของกรดอะมิโนลำดับที่ 355, 605, 645, 671 และ 1904 (Frobert, 2008; Larder *et al.*, 1987; Morfin and Thouvenot, 2003) และกลายพันธุ์ที่บริเวณนอก conserve region ตำแหน่งกรดอะมิโนลำดับที่ 171 เปลี่ยนจาก phenylalanine เป็น serine (F171S), กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 908 เปลี่ยนจาก glutamine เป็น arginine (K908R) และกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 1203 เปลี่ยนจาก alanine เป็น threonine (A1203T) (Chibo *et al.*, 2004)

นอกจากนี้มีรายงานการกลายพันธุ์ที่มักพบในบริเวณ region II และ region III ตำแหน่งกรดอะมิโนลำดับที่ 715, 719, 724-729, 815 และ 841 แล้วมีผลทำให้ไวรัสดื้อต่อยา acyclovir (Frobert, 2008; Gilbert *et al.*, 2002; Larder *et al.*, 1987) ส่วนในบริเวณ region I และ region A

พบที่ตำแหน่งกรดอะมิโนลำดับที่ 597, 891 และ 910 (Frobert, 2008; Larder *et al.*, 1987 Morfin and Thouvenot, 2003) และงานวิจัยของ Chibo และคณะ ในปีค.ศ. 2002 ได้พบว่าการกลายพันธุ์ใน DNA polymerase gene บริเวณ region II ตำแหน่งกรดอะมิโนลำดับที่ 725 เปลี่ยนจาก serine เป็น glycine (S725G) ทำให้ไวรัสต่อต้านยา ACV และ foscarnet (Chibo *et al.*, 2002)

ผลของการกลายพันธุ์ในยีน DNA polymerase ของไวรัส HSV ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน จึงทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไป และมีผลต่อการทำหน้าที่ของเอนไซม์ (Haffey *et al.*, 1990) ดังนั้นจึงทำการศึกษาเกี่ยวกับการทำหน้าที่ของโปรตีนที่ประกอบเป็นโครงสร้างของเอนไซม์ DNA polymerase ในตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์ของไวรัสตัวอย่าง คือ ตำแหน่งของกรดอะมิโนลำดับที่ 823, 905 และ 920 โดยการใช้ชีวสารสนเทศศาสตร์ในการศึกษาโครงสร้างโปรตีนแบบ 3 มิติ ด้วยฐานข้อมูลโครงสร้างโปรตีน คือ Protein Data Bank (PDB) (Mazumder and Vasudevan, 2008) ซึ่งผลการพยากรณ์โครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีน จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ปรากฏว่าโครงสร้างของเอนไซม์ในส่วนที่เกิดการกลายพันธุ์เป็นส่วนที่มีหน้าที่ในการจับกับโมเลกุลที่จำเพาะ เมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่เป็นโครงสร้างในบริเวณนี้ จึงมีผลต่อความจำเพาะของเอนไซม์ในการจับกับโมเลกุลเป้าหมาย ส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไป

การกลายพันธุ์ในยีน DNA polymerase ของไวรัส HSV จึงทำให้ค่าความเข้มข้นของยา ACV ($\mu\text{g/ml}$) ที่ยับยั้งเชื้อไวรัสได้ 50% (IC_{50}) เพิ่มสูงขึ้น ดังที่พบในคนไข้ติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 1 ที่คือยา ACV ต้องเพิ่มปริมาณการใช้ยาในการรักษาโรค (Chibo *et al.*, 2002; Chilukuri and Rosen, 2003; Field, 2001; Gilbert *et al.*, 2002)

ดังนั้นการกลายพันธุ์ในยีน DNA polymerase ของเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 1 ที่มีผลเกี่ยวข้องกับการคือยา ACV ทำให้คุณสมบัติของกรดอะมิโนที่ประกอบเป็นโครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไป เอนไซม์จึงไม่สามารถทำงานได้ปกติดังเดิม ทำให้ยา ACV ที่เป็น deoxyguanosine analogue จับกับ DNA polymerase ที่กลายพันธุ์ แล้วไม่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสได้เหมือนปกติ จึงจำเป็นต้องใช้ปริมาณยาเพิ่มมากขึ้นในการรักษาโรค