บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

อภิปรายผลการวิจัย

ไวโรโซม (virosome) เป็นอนุภาคที่เกิดจากการจัดเรียงตัวของชั้นไขมันและโปรตีนที่อยู่บนโครงสร้างของเปลือกหุ้มไวรัส (viral envelopes) เกิดเป็นโครงสร้างใหม่ที่มีรูปร่างและส่วนประกอบใกล้เคียงกับไวรัสต้นแบบ (Almeida et al., 1975; Huckrieda et al., 2003) กระบวนการสร้างไวโรโซมจะเกิดจากการทำลายโครงสร้างของเยื่อหุ้มไขมัน ด้วยสารซักฟอกชนิดต่างๆที่มีคุณสมบัติในการสลายไขมันร่วมกับการจัดเรียงโครงสร้างของเยื่อหุ้มไขมันขึ้นใหม่ ภายหลังจากการแยกเอาส่วนของสารซักฟอกออกไป (Bron et al., 1993; Stegmann et al., 1987) การสร้างไวโรโซมสามารถนำไปใช้ได้กับไวรัสหลายชนิดที่มีเปลือกหุ้ม เช่น เมตานิวโมไวรัส (Kapczynski, 2004) ไวรัสนิวคาสเซิล (Homhuan et al., 2004; Kapczynskiand Tumpey, 2003) โครงสร้างของไวโรโซมมีลักษณะคล้ายคลึงกับไวรัสที่เป็นต้นแบบ ในแง่ของลักษณะรูปร่างความสามารถในการจับกันระหว่างโปรตีนบนเปลือกหุ้มไวโรโซมกับตำแหน่งที่มีความจำเพาะของเซลล์โฮสต์ รวมทั้งการเคลื่อนตัวผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์โฮสต์ แต่ทั้งนี้เนื่องจากอนุภาคของไวโรโซมไม่มีส่วนประกอบของสารพันธุกรรม จึงไม่มีความสามารถในการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนได้ในเซลล์โฮสต์ (Huckriede et al., 2003) แต่ทั้งนี้ยังพบว่าโครงสร้างของโปรตีนที่ปรากฏอยู่บนเปลือกของอนุภาคของไวโรโซมยังคงมีความสามารถในการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้เป็นอย่างดี (Huckrieda et al., 2003.; Kerstein and Crommelin, 1995.)

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเตรียมไวโรโซมจากไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา เอช5เอน1 ที่ผ่านการลดฤทธิ์ด้วยสารละลาย BEI โดยใช้สาร octaethyleneglycol mono (n-dodecyl) ether ในการละลายชั้นไขมันบริเวณเปลือกหุ้มของไวรัส และการศึกษาลักษณะโครงสร้างและองค์ประกอบต่างๆที่มีอยู่ภายในอนุภาคไวโรโซม เปรียบเทียบกับไวรัสต้นแบบในด้านต่างๆ ได้แก่ องค์ประกอบของโปรตีนภายในอนุภาคของไวโรโซม ลักษณะรูปร่างและคุณสมบัติในการจับตัวตกตะกอนกับเม็ดเลือดแดง

การทำลายฤทธิ์ของไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา เอช5เอน1 ด้วยสารละลาย BEI พบว่าสารละลาย BEI มีความสามารถในการลดฤทธิ์ของไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา เอช5เอน1 โดยมีความสัมพันธ์กับระดับความเข้มข้นสารละลาย BEI และระยะเวลาที่ใช้ในการทำลายฤทธิ์ของไวรัส การลดฤทธิ์ของไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา เอช5เอน1 ด้วยสารละลาย BEI ความเข้มข้น 0.001 M ต้องใช้เวลาในการทำลายฤทธิ์นาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จึงสามารถลดฤทธิ์ของไวรัสได้ แต่ถ้าใช้เวลาในการทำลายฤทธิ์นาน 2-8 ชั่วโมง พบว่าไม่สามารถลดฤทธ์ของไวรัสได้ภายใน

เวลาในช่วงระยะเวลาดังกล่าว เนื่องจากพบการติดไวรัสในไข่ไก่ฟักและทำให้ตัวอ่อนเกิดการตายขึ้น ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวมีความสอดคล้องกับรายงานการทดลองของ King (1991) ในขณะที่การเพิ่มระดับความเข้มข้นของสารละลาย BEI เป็น 0.01 M สามารถทำให้ไวรัสถูกลดฤทธิ์ได้ในระยะเวลาอย่างน้อย 6 ชั่วโมง

การใช้สารละลาย BEI ในการลดฤทธิ์ของไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา เอช5เอน1 นั้น พบว่าไม่ส่งผลต่อระดับของ HA titer เนื่องจากสาร Ethylenimine ซึ่งเป็นสารเคมีในกลุ่ม aziridines จะไปออกฤทธิ์ในตำแหน่งของ nucleic acid ที่อยู่บน RNA ของไวรัส แต่ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีนชนิดอื่นๆที่อยู่ปรากฏบนไวรัส และโปรตีนที่เจือปนอยู่ในสารละลายไวรัส (Brown et al., 1998) จึงทำให้โปรตีนต่างๆที่อยู่ในสารละลายไม่มีผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการลดฤทธิ์ของไวรัสด้วยสารละลาย BEI (Hanson, 1982) การออกฤทธิ์ของสารเคมีกลุ่ม aziridines กับไวรัสหรือเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ จะมีประสิทธิภาพในการทำงานเพิ่มสูงขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อเปรียบเทียบกับการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทั้งนี้เนื่องจากสารเคมีจะแทรกเข้าสู่ภายในอนุภาคของไวรัสได้เร็วขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นและสามารถเกิดปฏิกิริยาได้สูงขึ้น (Burrage et al., 2000) แต่เมื่อมีความจำเป็นต้องลดฤทธิ์ในสภาวะที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า 37 องศาเซลเซียส จำเป็นต้องเพิ่มระดับความเข้มข้นของสารละลาย BEI เพื่อให้การออกฤทธิ์มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น (Bahnemann, 1990)

การเตรียมไวโรโซมโดยวิธีการสลายเยื่อหุ้มไขมันด้วยสารซักฟอกชนิดต่างๆ เช่น Triton-X 100 Octylglycoside หรือ octaethyleneglycol mono (n-dodecyl) ether จะพบการตกค้างของสารละลายดังกล่าว จึงต้องมีกระบวนการสำหรับแยกเอาส่วนของสารซักฟอกออกไป โดยอาศัยคุณสมบัติในการดูดซับด้วย styrene-divinylbenzene copolymer (Bio-Beads SM2) ซึ่งเมื่อเกิดการดูดซับสมบูรณ์ จะเกิดการรวมตัวและเชื่อมต่อกันของไขมันฟอสโฟลิปิด เกิดเป็นโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ รวมทั้งมีการประกอบของไกลโปรตีนฮีแมกกลูตินินและนิวรามินิเดสบนเยื่อหุ้มดังกล่าว สังเกตได้จากการเปลี่ยนแปลงลักษณะของสารละลายที่เจือจางด้วยสารซักฟอก จากฟอสโฟลิปิดและโปรตีนของไวรัสซึ่งมีลักษณะเป็นสารละลายใส แต่ภายหลังจากการเติม Bio-Beads SM2 และเกิดปฏิกิริยา โดยเมื่อเกิดโครงสร้างอนุภาคของไวโรโซมขึ้นจะสามารถสังเกตได้จากลักษณะการเปลี่ยนแปลงของสารละลายโดยจะมีความขุ่นเพิ่มขึ้น เนื่องจากการเกิดโครงสร้างไวโรโซมจะมีผลให้ความโปร่งแสงของสารละลายลดลง (Bron et al., 1993)

การตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพของอนุภาคไวโรโซม พบว่าไวโรโซมที่เตรียมขึ้นมีรูปร่างคล้ายกับไวรัสต้นแบบ กล่าวคือมีรูปร่างคล้ายทรงกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 80-120 ไมโครเมตรและปรากฏส่วนของไกลโคโปรตีนยื่นออกมาจากเยื่อหุ้มของอนุภาคไวโรโซม (Bron et al., 1993) การวิเคราะห์โปรตีนองค์ประกอบของไวโรโซมและไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา เอช5เอน1 ด้วยวิธี SDS-PAGE ที่ระดับความเข้มข้นของ acrylamide 12% เป็นเทคนิคที่นิยมใช้อย่าง

แพร่หลายในการแยกโปรตีนชนิดต่างๆ ออกจากกัน โดยการใช้โซเดียม โดดิซิล ซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate) และ เบต้า-เมอร์แคปโตเอทานอล (beta-mercapto ethanol) ในการทำลายพันธะที่จับกันภายในโมเลกุลของโปรตีน ทำให้สามารถแยกโปรตีนออกเป็นหน่วยย่อย (subunit) ที่มีขนาดเล็กลง และยังเกิดการเคลือบของประจุลบบนหน่วยย่อยดังกล่าว ความแตกต่างของขนาด (size) น้ำหนักโมเลกุล (molecular weights) และประจุลบ (negative charges) สามารถนำมาใช้ในการแยกชนิดของโปรตีนในขณะที่มีการเคลื่อนที่ของโปรตีนผ่านช่องว่างภายในแผ่นเจลที่วางอยู่ระหว่างสนามไฟฟ้า พบว่าแถบของโปรตีนองค์ประกอบของไวรัสมีขนาดน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 10 kDa, 15 kDa, 25 kDa, 50-55 kDa, 60-75 kDa, 80-90 kDa และ 200-220 kDa (ภาพที่ 3) ซึ่งน้ำหนักโมเลกุลต่างๆที่ปรากฏนั้น มีความใกล้เคียงกับน้ำหนักของโปรตีนชนิดต่างๆที่เป็นองค์ประกอบของไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา เอช5เอน1 คือ 1.) เมทริกซ์โปรตีน (M2) 2.) นอนสตรักเจอร์รอลโปรตีน (NA2) 3.) นอนสตรักเจอร์รอลโปรตีน (NA1) และเมทริกซ์โปรตีน (M1) 4.)นิวคลิโอโปรตีน 5.)กลัยโคโปรตีนฮีแมกกลูตินิน 6.)โพลีเมอร์เรสโปรตีน และ 7.)นิวรามินิเดส ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Lamb และ Krug (2001) เมื่อเปรียบเทียบกับอนุภาคของไวโรโซมจะปรากฏเฉพาะแถบของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 60-75 kDa และ 200-220 kDa (ภาพที่ 6) แสดงให้เห็นว่าในกระบวนการสร้างไวโรโซมสามารถแยกโปรตีนส่วนที่เป็นนิวคลิโอแคปซิดโปรตีนออกจากอนุภาคของไวโรโซมได้ โดยทั่วไปโปรตีนที่หลงเหลืออยู่ในอนุภาคไวโรโซมจะเป็นโปรตีนที่อยู่บริเวณผิวเปลือกของไวรัส ได้แก่ ไกลโคโปรตีนฮีแมกกลูตินินและนิวรามินิเดส (Bron et al., 1993) ซึ่งสอดคล้องกับ Wang และคณะ (2006) โดยพบเช่นเดียวกันว่า HA monomer ของไวรัสอินฟลูเอนซา A/New Caledonia/20/99 ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนทั้งหมด 547 กรดอะมิโน มีน้ำหนักโมเลกุล 63,156.43 kDa และมีขนาดสูงสุดประมาณ 70 kDa และเมื่อเกิดการแตกตัวของไกลโคโปรตีนฮีแมกกลูตินินออกเป็น HA_1 และHA_2 จะมีน้ำหนักประมาณ 50 kDa และ 28 kDa ตามลำดับ การทดลองของ Crawford และคณะ (1999) พบว่าไกลโคโปรตีนฮีแมกกลูตินินที่ยังไม่เกิดการแตกตัว (HA_0) ของกลุ่มย่อย เอช5 และเอช7 มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลสูงสุด 69,000 Da (69 kDa) ใกล้เคียงกับขนาดน้ำหนัก 74 kDa ของไกลโคโปรตีนฮีแมกกลูตินิน กลุ่มย่อย เอช5 ซึ่งได้จากการทดลองของ Qiao และคณะ (2003) ขนาดน้ำหนักโมเลกุลของนิวรามินิเดสในการศึกษานี้พบว่ามีขนาดประมาณ 220 kDa มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับขนาดของไกลโคโปรตีนนิวรามินิเดสที่ได้จากการทดลองของ Johansson และ Kilbourne (1996) และจากการตรวจสอบองค์ประกอบโปรตีนด้วยวิธี Western blotting ซึ่งเป็นวิธีการที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายในกระบวนการตรวจสอบชนิดของโปรตีนในสารละลายที่มีองค์ประกอบของโปรตีนมากกว่า 1 ชนิด (Kurien, 2006; Westermeier, 2005) โดยอาศัยหลักการจับกันระหว่างโปรตีนที่ต้องการตรวจหาและแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับโปรตีน เพื่อยืนยันความสัมพันธ์ของโปรตีนองค์ประกอบของอนุภาคไวโรโซมกับไวรัสด้วยโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา เอช5เอน1 พบว่ามี

เพียงแถบของโปรตีนที่ตำแหน่งน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 60-75 kDa และ 200-220 kDa ซึ่งสอดคล้องกับขนาดของไกลโคโปรตีนฮีแมกกลูตินินและนิวรามินิเดส แสดงให้เห็นว่าไวโรโซมที่เตรียมขึ้นสามารถแยกส่วนประกอบโปรตีนชนิดอื่นๆ ที่ปรากฏอยู่ภายในโมเลกุลของไวรัสออกจากอนุภาคของไวโรโซมได้

คุณสมบัติทางชีวภาพของอนุภาคไวโรโซม โดยทั่วไปจะมีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับไวรัสต้นแบบ (Gluck and Metcalfe, 2002; Huckrieda et al., 2003) สามารถตรวจสอบคุณสมบัติดังกล่าวของไกลโคโปรตีนฮีแมกกลูตินินโดยการทดสอบการจับกับตัวรับบนผิวของเม็ดเลือดแดงไก่ พบว่าอนุภาคของไวโรโซมที่เตรียมขึ้นมาจากไวรัสที่ผ่านกระบวนการลดฤทธิ์ ยังคงมีสามารถในการจับกลุ่มกับเม็ดเลือดแดงได้เช่นเดียวกับไวรัสเอเวียน อินฟลูเอนซา เอช5เอน1 แสดงให้เห็นว่าไกลโคโปรตีนฮีแมกกลูตินินที่เป็นส่วนประกอบบนโครงสร้างของไวโรโซมสามารถทำหน้าที่จับกับกรดซัยอะลิค (sialic acid) บนรีเซฟเตอร์ของเซลล์เม็ดเลือดแดงไก่ได้ การจับตัวดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับการคงคุณสมบัติของโปรตีน ลักษณะรูปร่างของไวโรโซม และสัดส่วนของไกลโคโปรตีนฮีแมกกลูตินินและนิวรามินิเดส (Laver et al., 1984) แต่ทั้งนี้การใช้สารซักฟอกในการสลายไขมันบนชั้นเยื่อหุ้มไวรัส อาจส่งผลให้เกิดการลดประสิทธิภาพของโปรตีน ซึ่งพบว่าระดับของ HA titer ของอนุภาคโรโซมจะมีค่าต่ำกว่าไวรัสต้นแบบ (Homhuan et al., 2004) นอกนั้นคุณสมบัติดังกล่าวยังมีความสัมพันธ์กับปริมาณของไกลโคโปรตีนฮีแมกกลูตินินที่ปรากฏอยู่บนผิวอนุภาคไวโรโซม (Huckriede et al., 2003)

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าไวรัสที่ผ่านกระบวนการลดฤทธิ์ด้วยสารละลาย BEI ยังคงสามารถนำมาใช้ในการเตรียมอนุภาคไวโรโซมได้เช่นเดียวกับไวรัสซึ่งไม่ผ่านกระบวนการลดฤทธิ์ แต่ทั้งนี้องค์ประกอบโปรตีนที่ปรากฏภายในโครงสร้างของไวโรโซมอาจมีปริมาณที่น้อยกว่า เมื่อเปรียบเทียบจากการทดสอบการจับกับตัวรับบนผิวของเม็ดเลือดแดงไก่ (hemagglutinaton activity) โครงสร้างที่เกิดขึ้นชี้ให้เห็นว่ามีคุณลักษณะที่แตกต่างจากไวรัสต้นแบบ โดยไม่ปรากฏองค์ประกอบของสารพันธุกรรมและนิวคลิโอแคปซิดโปรตีน แต่ยังมีการยื่นของโปรตีนบริเวณเยื่อหุ้ม ซึ่งจากลักษณะดังกล่าวทำให้อนุภาคของไวโรโซมยังคงความสามารถในการจับกับตัวรับบนเซลล์โฮสต์ และการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย แต่ไม่สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนในเซลล์โฮสต์

จากคุณสมบัติของอนุภาคไวโรโซมข้างต้น สามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อเป็นแนวทางในการตรวจวินิจฉัย เมื่อมีการติดเชื้อตามธรรมชาติและการได้รับไวรัสจากวัคซีน ซึ่งอาจจำเป็นต้องทำการศึกษาเกี่ยวกับความสามารถในการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายของ

สัตว์ปีก การปล่อยไวรัสสู่ธรรมชาติ และการเกิดเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา โดยการเปรียบเทียบระหว่างการได้รับเชื้อไวรัสตามธรรมชาติและอนุภาคไวโรโซม

I23065191