

249699

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



249699

การขึ้นบัญชีไว้ระงับข้อพิพาทและเขตผลประโยชน์ทางเศรษฐกิจโดยนิรโทษกรรม

ศิริพงษ์ สุทธิโชค

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
สาขาวิชาดุสิตวิทยาประยุกต์

บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เมษายน 2554



การยับยั้งไวรัสก่อโรคเริมและเซลล์มะเร็งปากมดลูกโดยโพรพอลิต



ศิรินาฏ มุสิเอก

วิทยานิพนธ์นี้เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัยเพื่อเป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์

บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
เมษายน 2554

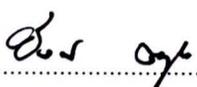
การยับยั้งไวรัสก่อโรคริบและเซลล์มะเร็งปากมดลูกโดยโพรพอลิตส

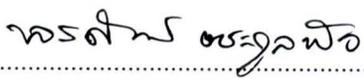
ศรินาฏ มุสิกเอก

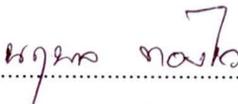
วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

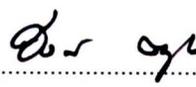

.....ประธานกรรมการ
อาจารย์ ดร. ดวงพร อมรเลิศพิศาล

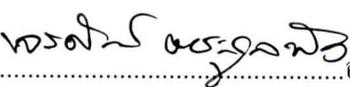

.....กรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ยิ่งมณี ตระกูลพั้ว


.....กรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ขจรศักดิ์ ตระกูลพั้ว


.....กรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นอมล ทองไว

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์


.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ยิ่งมณี ตระกูลพั้ว


.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ขจรศักดิ์ ตระกูลพั้ว

28 เมษายน 2554

© ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ ด้วยความกรุณาจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ยิ่งมณี ตระกูลพั้ว อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ขจรศักดิ์ ตระกูลพั้ว อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำ ให้ความรู้ เทคนิคต่างๆ รวมทั้งให้คำปรึกษา กำลังใจ ดูแลเอาใจใส่ ตลอดจนแก้ไขตรวจทานทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คณาจารย์ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และแก้ไขข้อบกพร่อง พร้อมทั้งให้คำแนะนำอันเป็นประโยชน์ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ คุณวิระพันธ์ ดันติพงษ์ เจ้าของบริษัทบีโปรดักส์อินดัสตรี จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์สารสกัดโพรพอลิสเพื่อใช้ในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ทุนวิจัยมหำบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ภายใต้โครงการเชื่อมโยงภาคการผลิตกับงานวิจัย ทุน สกว.-อุตสาหกรรม ที่มอบทุนสนับสนุนการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่าน ที่ได้ประสิทธิประสาทวิชาความรู้อันเป็นประโยชน์แก่ข้าพเจ้า และขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ทุกท่าน ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ อำนวยความสะดวก ตลอดระยะเวลาการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ คุณเรณู อยู่เจริญ ที่คอยช่วยให้คำปรึกษาด้านเทคนิคต่างๆ ในการทำการวิจัย คุณเชิญขวัญ พันดี คุณปรัชญา เฉลียวฉลาด คุณเกวลิณ อินทนนท์ ตลอดจน พี่ เพื่อน และน้องๆ ในห้องปฏิบัติการ ไร่สวีท และห้องปฏิบัติการข้างเคียง รวมทั้งคณาจารย์ ที่มีส่วนในการให้คำแนะนำ และให้ความช่วยเหลือต่างๆ รวมถึงให้กำลังใจในการทำงานด้วยดีตลอดมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่มอบความรัก และให้การสนับสนุนในเรื่องต่างๆ ตลอดจนให้คำปรึกษา คำแนะนำ และเป็นกำลังใจที่ดีแก่ข้าพเจ้าเสมอมา ข้าพเจ้าหวังเป็นอย่างยิ่งว่าวิทยานิพนธ์นี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจหรือมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การยับยั้งไวรัสก่อโรคเริมและเซลล์มะเร็งปากมดลูกโดยโพรพอลิส

ผู้เขียน นางสาวศรีนาฏ มุสิกเอก

ปริญญา วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุลชีววิทยาประยุกต์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ยິงมณี ตระกูลพั้ว อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ขจรศักดิ์ ตระกูลพั้ว อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

249699

Herpes simplex virus แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ HSV-1 และ HSV-2 เชื้อก่อโรคเริมนี้สามารถติดเชื้อได้หลายบริเวณ เช่นบริเวณปาก ตาและผิวหนัง สามารถติดต่อทางเพศสัมพันธ์ และยังเป็นสาเหตุของมะเร็งปากมดลูกได้อีกด้วย ในปัจจุบันยังไม่มียาชนิดใดที่สามารถรักษาโรคเริมให้หายขาดได้ เชื้อไวรัสกลุ่มนี้มีลักษณะการติดเชื้อที่แอบแฝงทำให้สามารถกลับมาเป็นซ้ำได้ใหม่สำหรับยาด้านไวรัสเริมที่มีผลในการรักษาค่อนข้างมีราคาแพง ดังนั้นการหันมาใช้สารสกัดจากธรรมชาติจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ปลอดภัยในการรักษาโรค โพรพอลิสเป็นส่วนผสมที่มีลักษณะเหนียวข้น เป็นยางไม้ที่ผึ้งเก็บได้จากส่วนต่างๆของพืช การวิจัยครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาผลการยับยั้งของสารสกัดโพรพอลิสต่อเชื้อไวรัสก่อโรคเริมและเซลล์มะเร็งปากมดลูก จากผลการทดสอบเมื่อนำสารสกัดโพรพอลิสมาทดสอบความเป็นพิษของเซลล์เพาะเลี้ยง (Vero cells) พบว่าสารสกัดโพรพอลิสที่ความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์เพาะเลี้ยง ตาย 50 % เท่ากับ 280 µg/ml เมื่อทำการทดสอบโดยใช้สารสกัดโพรพอลิสในความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ โดยทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อไวรัสในการเข้าสู่เซลล์ในระยะต่างๆพบว่า โพรพอลิสที่ความเข้มข้นที่ 97.6 µg/ml สามารถยับยั้งการติดเชื้อ HSV-1 และ HSV-2 ก่อนเกาะติดกับเซลล์ เท่ากับ 32.3% และ 43.1% สามารถยับยั้งการติดเชื้อไวรัส HSV-1 และ HSV-2 ขณะเกาะติดกับเซลล์เท่ากับ 42.8% และ 47.3% สามารถยับยั้งการติดเชื้อไวรัส HSV-1 และ HSV-2 หลังเกาะติดกับเซลล์ เท่ากับ 60.0% และ 74.6 % โพรพอลิสที่

249699

ความเข้มข้น 195.3 $\mu\text{g/ml}$ สามารถทำลายอนุภาคของเชื้อ HSV-1 โดยตรงที่เวลา 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 นาที เท่ากับ 23.2, 36.5, 77.4, 85.1, 97.4 และ 99.7% ตามลำดับ และการทำลายเชื้อ HSV-2 โดยตรง ที่เวลา 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง เท่ากับ 9.7, 19.3, 52.3 และ 70.7% ตามลำดับ โพรพอลิสสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนอนุภาคไวรัสทั้งสองชนิด โดยสามารถยับยั้งเชื้อ HSV-1 และ HSV-2 ได้ 99.4% และ 99.6% ในชั่วโมงที่ 7 หลังจากการติดเชื้อ นอกจากนี้เมื่อทำการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดโพรพอลิสกับเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cells) พบว่าสารสกัดโพรพอลิสที่ความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์มะเร็งปากมดลูกตาย 50 % เท่ากับ 316 $\mu\text{g/ml}$ จากการทดสอบผลของสารสกัดโพรพอลิสในการทำลายเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ความเข้มข้นมากกว่า 316 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าที่ 24 ชั่วโมง โพรพอลิสที่ความเข้มข้นที่ 2190 $\mu\text{g/ml}$ สามารถทำลายเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้ 46.7% ดังนั้นความรู้จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้สามารถนำไปพัฒนาผลิตภัณฑ์จากโพรพอลิส ซึ่งเป็นสารจากธรรมชาติเพื่อใช้ในการรักษาโรคริม และมะเร็งปากมดลูก

249699

97.4 and 99.7% respectively at 10, 20, 30, 40, 50 and 60 minutes of treatment. HSV-2 virus particles were directly inhibited by 9.7, 19.3, 52.3 and 70.7% respectively at 1, 2, 3 and 4 hours of treatment. HSV-1 and HSV-2 replication were also inhibited by 99.4% and 99.6% at 7 hours after infection. Moreover, after testing of propolis extract on HeLa cells, the results showed that 50% cytotoxic doses of propolis was 316 $\mu\text{g/ml}$. HeLa cells were destroyed by propolis at concentration more than 316 $\mu\text{g/ml}$. After treatment HeLa cells with propolis (2190 $\mu\text{g/ml}$) for 24 hours, percentage of apoptotic cell dead was 46.7%. Therefore, the knowledge obtained from this research study will be used for development of product from propolis, which is natural product for treatment of HSV infection and cervical cancer.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ค
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ฌ
สารบัญภาพ	ฎ
อักษรย่อและสัญลักษณ์	ฐ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทบทวนเอกสาร	3
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการวิจัย	25
บทที่ 4 ผลการวิจัย	35
บทที่ 5 อภิปรายผลการวิจัย	54
บทที่ 6 สรุปผลการวิจัย	61
บรรณานุกรม	63
ภาคผนวก	71
ภาคผนวก ก เซลล์เพาะเลี้ยงเซลล์	72
ภาคผนวก ข อาหารและสารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์	74
ภาคผนวก ค สารเคมีและสีย้อม	76
ประวัติผู้เขียน	78

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1	8
2	10
3	13
4	16
5	35
6	36
7	36
8	37
9	38
10	39
11	40
12	41
13	44
14	45
15	46

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง		หน้า
16	การยับยั้งเชื้อ HSV-2 เมื่อทดสอบการยับยั้งการเพิ่มจำนวนกับสารสกัด โพรพอลิส และขาด้านไวรัส ACV ที่เวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 ชั่วโมง	48
17	เปอร์เซ็นต์เซลล์ตายของ HeLa cell เมื่อทดสอบกับสารสกัดโพรพอลิส	50
18	ตารางแสดงค่าดูดกลืนแสงที่ 540 nm เมื่อทดสอบสารสกัดโพรพอลิสในการ ทำลายดีเอ็นเอของเซลล์มะเร็งปากมดลูกแบบ apoptosis	51

สารบัญภาพ

รูป	หน้า
1 โครงสร้างและส่วนประกอบสำคัญของไวรัส	3
2 กลไกการออกฤทธิ์ของยา acyclovir	11
3 multinucleated giant cell	12
4 การเปรียบเทียบลักษณะการตายแบบ apoptosis และ necrosis	18
5 apoptosome	19
6 กลไกการตายแบบ apoptosis	21
7 การยับยั้งเชื้อ HSV-1 ก่อนไวรัสเกาะติดกับเซลล์ โดยสารสกัดโพรพอลิส และยาด้านไวรัส ACV	37
8 การยับยั้งเชื้อ HSV-2 ก่อนไวรัสเกาะติดกับเซลล์ โดยสารสกัดโพรพอลิส และยาด้านไวรัส ACV	38
9 การยับยั้งเชื้อ HSV-1 ขณะไวรัสเกาะติดกับเซลล์ โดยสารสกัดโพรพอลิส และยาด้านไวรัส ACV	39
10 การยับยั้งเชื้อ HSV-2 ขณะไวรัสเกาะติดกับเซลล์ โดยสารสกัดโพรพอลิส และยาด้านไวรัส ACV	40
11 การยับยั้งเชื้อ HSV-1 หลังไวรัสเกาะติดกับเซลล์ โดยสารสกัดโพรพอลิส และยาด้านไวรัส ACV	41
12 การยับยั้งเชื้อ HSV-2 หลังไวรัสเกาะติดกับเซลล์ โดยสารสกัดโพรพอลิส และยาด้านไวรัส ACV	42
13 กราฟแสดงการเปรียบเทียบการยับยั้ง HSV-1 ในขั้นตอนก่อนเกาะติด ขณะเกาะติด และหลังเกาะติดกับเซลล์เพาะเลี้ยง	42
14 กราฟแสดงการเปรียบเทียบการยับยั้ง HSV-2 ในขั้นตอนก่อนเกาะติด ขณะเกาะติด และหลังเกาะติดกับเซลล์เพาะเลี้ยง	43

สารบัญภาพ (ต่อ)

รูป	หน้า
15 การยับยั้งอนุภาคของเชื้อ HSV-1 โดยตรง โดยสารสกัดโพรพอลิสที่ความเข้มข้น 195.3 µg/ml	44
16 การยับยั้งอนุภาคของเชื้อ HSV-2 โดยตรง โดยสารสกัดโพรพอลิสที่ความเข้มข้น 195.3 µg/ml	45
17 ปริมาณ HSV-1 ที่เวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 ชั่วโมง หลังจากการติดเชื้อ เมื่อทดสอบกับสารสกัดโพรพอลิส เปรียบเทียบกับยาด้านไวรัส acyclovir และไวรัสควบคุม	47
18 ปริมาณ HSV-2 ที่เวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 ชั่วโมง หลังจากการติดเชื้อ เมื่อทดสอบกับสารสกัดโพรพอลิส เปรียบเทียบกับยาด้านไวรัส acyclovir และไวรัสควบคุม	49
19 เซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ย้อมติดสีแดงของ APOPercentage dye เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดโพรพอลิสที่ความเข้มข้น 730 µg/ml	52
20 กราฟแสดงการเปรียบเทียบการทำลายดีเอ็นเอของเซลล์มะเร็งปากมดลูกแบบ apoptosis เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดโพรพอลิสความเข้มข้น 730, 1100, 1460, 2190 µg/ml เป็นเวลา 12, 18 และ 24 ชั่วโมง	53
21 Vero cells	72
22 HeLa cells	73

อักษรย่อและสัญลักษณ์

%	=	percentage
ACV	=	acyclovir
Apaf-1	=	apoptotic protease activating factor-1
ATP	=	adenosine triphosphate
°C	=	degree celcius
CAD	=	caspase activated DNase
cm ²	=	square centrimeter
DED	=	death effector domain
DMSO	=	dimethyl sulfoxide
DNA	=	deoxyribonucleic acid
EDTA	=	ethylenediamine tetra-acetic acid
HSV	=	herpes simplex virus
HSV-1F	=	herpes simplex virus type 1 strain F
HSV-2G	=	herpes simplex virus type 2 strain G
ICAD	=	inhibitor of caspase activated DNase
log	=	logarithm
mg	=	milligram
ml	=	milliliter
mRNA	=	messenger RNA
nm	=	nanometer
PBS	=	phosphate buffer saline
PFU	=	plaque forming unit
TK	=	thymidine kinase gene
µg	=	microgram
µl	=	microliter