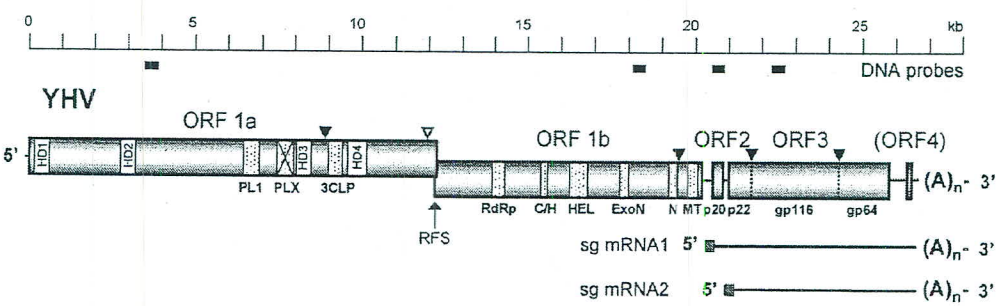
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. *การใช้ป้องกันการติดเชื้อไวรัสในกุ้ง*

การยับยั้งการติดเชื้อไวรัสในกุ้งกุลาดำนับเป็นแนวทางแรกที่สามารถป้องกันความเสียหายต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ซึ่งความพยายามในการป้องกันการติดเชื้อไวรัสในกุ้งมีหลายวิธีการ โดยจะศึกษากันมากในกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot syndrome virus – WSSV) โดยจะเน้นการยับยั้งที่โปรตีนโครงสร้างของไวรัส หรือเอนไซม์บางชนิดของไวรัส เช่นการใช้ dsRNA หรือ siRNA (Xu, 2007 และ Kim, 2007), DNA vaccine (Rout, 2007 และ Kumar, 2008), การใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนโครงสร้างของไวรัส (Musthaq, 2006, Robalino, 2006 และ Natividad, 2007) หรือการใช้ inactivated WSSV (Zhu, 2009) ทั้งนี้ ยังไม่พบวิธีการป้องกันการติดเชื้อได้สมบูรณ์ และในบางวิธีไวรัสยังคงสามารถกลับมาเพิ่มจำนวนได้ และทำให้เกิดการติดเชื้อเพียงไม่กี่วันหลังจากการทดสอบ

เนื่องจากไวรัสหัวเหลืองประกอบด้วยโปรตีนโครงสร้างที่เป็นองค์ประกอบของไวรัส (Structural proteins) สามชนิดคือ โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบส่วนเปลือกของไวรัส (envelop and spike glycoproteins) คือ gp116 และ gp64 และโปรตีนที่ใช้จับกับสารพันธุกรรมของไวรัส หรือ nucleocapsid protein คือ p20 (Jitrapakdee, 2003) และมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวน (replication) ของไวรัส เช่น helicase, RNA polymerase และ protease (Sittidilokratna, 2008) (ดังแสดงในรูป 1)



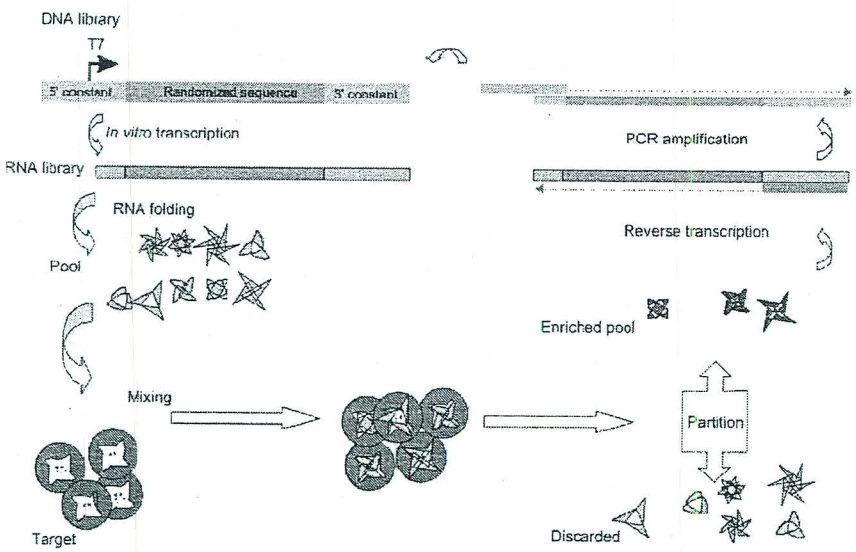
รูป 1. โครงสร้างของสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสหัวเหลือง ประกอบด้วย 5 open reading frames คือ ORF1a, ORF1b, ORF2, ORF3 และ ORF4 (Sittidilokratna, 2008)

ดังนั้นในงานวิจัยที่มีจุดประสงค์เพื่อป้องกันและรักษาการติดโรคไวรัสหัวเหลืองในกุ้ง จึงใช้โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของไวรัสเหล่านี้เป็นเป้าหมาย เช่น การยับยั้งการเข้าสู่เซลล์ของไวรัส (Neutralization) โดยใช้เป้าหมายเป็นโปรตีนที่โครงสร้างของไวรัสที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ viral entry ซึ่งสามารถทำได้โดยการใช้ polyclonal antibody ต่อ gp116 (Assavalapsakul, 2005) และงานวิจัยที่ใช้แอนติบอดียับยั้งการเข้าสู่เซลล์ ก็มีการศึกษามากในไวรัสกุ้งอีกชนิดคือ ไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot syndrome virus – WSSV) โดยแอนติบอดีที่ให้ผลดีในการยับยั้งการเข้าสู่เซลล์คือแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนส่วนเปลือกของไวรัสที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ virus entry เช่น vp28 (Musthaq, 2006 Robalino, 2006 และ Natividad, 2007) แต่การ neutralization ด้วยแอนติบอดีนั้นยังมีข้อจำกัดคือ เป็น concentration-dependent กล่าวคือ ขึ้นอยู่กับปริมาณไวรัสที่ challenge ซึ่งถ้ามีไวรัสปริมาณสูงเกินไปกระบวนการนี้ก็ไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อได้ อีกประการหนึ่งคือ สามารถยับยั้งการติดไวรัสได้ในระยะเวลาจำกัด โดยไวรัสสามารถคงอยู่ในสภาพแวดล้อมและสามารถเกิดการ re-infection ได้อีกครั้งที่ 48 ชั่วโมง (Natividad, 2007) และในไวรัสหัวเหลืองเอง จะต้องใช้แอนติบอดีต่อ gp116 ในปริมาณสูง (1:500) จึงจะสามารถป้องกันการติดเชื้อได้ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการใช้แอนติบอดีเพื่อป้องกันการติดไวรัส ยังคงไม่สามารถยับยั้งการติดเชื้อได้สมบูรณ์แบบ

อีกเป้าหมายหนึ่งที่นิยมใช้เพื่อป้องกัน คือการใช้ Nucleic-based therapeutics เพื่อป้องกันหรือรักษา (Shekhar, 2009) เช่น การใช้ dsRNA หรือ siRNA ต่อโปรตีนโครงสร้างของไวรัสตัวแดงดวงขาว (Robalino, 2005, Westenberg, 2005, Xu, 2007, Kim, 2007 and Wu, 2007) หรือการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเพิ่มจำนวนของไวรัส โดยการใช้ dsRNA ที่จำเพาะต่อเอนไซม์ polymerase ในไวรัสตัวแดงดวงขาว (Robalino, 2005) หรือเอนไซม์ helicase, RNA polymerase และ protease ของไวรัสหัวเหลือง (Tirasophon, 2005, Yodmuang, 2006 และ Tiraophon, 2007) โดยเฉพาะ dsRNA ที่จำเพาะต่อเอนไซม์ protease ของไวรัสหัวเหลือง สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสในกุ้งที่กระตุ้นด้วย dsRNA ได้ทั้งก่อนและหลังจากการ challenge ด้วยไวรัสหัวเหลือง แต่จะต้องใช้ dsRNA ปริมาณมาก กล่าวคือใช้ 25 µg dsRNA ต่อกุ้งขนาด 12 กรัม (Yodmuang, 2006 และ Tirasophon, 2007) และแนวทางในการรักษาโรคหลังจากกุ้งติดไวรัสด้วย RNAi ต้องทำในระยะแรกของการติดเชื้อ คือประมาณ 3 ชั่วโมงหลังจากการติดเชื้อ มิฉะนั้นอัตราการตายของกุ้งก็จะเทียบเท่ากันกับไม่ได้กระตุ้นด้วย RNAi

2. การใช้ Aptamer ในการป้องกันการติดเชื้อไวรัส

Aptamer คือ single-stranded (SS) nucleic acids ที่สามารถม้วนพับเกิดเป็นโครงสร้างทุติยภูมิ (tertiary structure) ที่สามารถจับกับเป้าหมาย ไม่ว่าจะเป็นโปรตีน โมเลกุลเล็กหรือดีเอ็นเอได้อย่างจำเพาะและมีความชอบสูง (high specificity and high affinity) (Ellington, 1990, Koizumi, 2000, Tok, 2000, Tuerk, 2000 และ Beate, 2008) ในปัจจุบันนี้นิยมใช้ aptamer สำหรับในการตรวจสอบโรค (diagnostic) เนื่องจากสามารถผลิตได้ง่าย มีความจำเพาะสูง เสมือนกับ monoclonal antibody และมีความทนทาน (Jayasena, 1999, Porschewski, 2006 และ Nicholas, 2008) และในไวรัสวิทยา พยายามใช้ aptamer ในการรักษาโรค เช่นการใช้ aptamer เพื่อรักษาโรคเอดส์ (HIV) โดยใช้ aptamer ที่จำเพาะต่อเอนไซม์ reverse transcriptase, integrase (Soultrait, 2002, Chou, 2005, Joshi, 2005 และ Métifiot, 2005) หรือจำเพาะต่อโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเปลือกไวรัส และเกี่ยวข้องกับกระบวนการ virus entry เช่น gp120 (Khati, 2003, Dey, 2005 และ Zhou, 2009) ซึ่งหลักการของการทำ aptamer แสดงในรูป 2



รูป 2. กลไกการค้นหา aptamer ต่อโปรตีนเป้าหมายตามขั้นตอนของ SELEX (James, 2007)

ตามหลักการแล้ว ในขั้นตอนแรกของการค้นหา aptamer จะต้องออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์แบบสุ่ม (Randomized sequence) ซึ่งขนาบข้างด้วยโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ทราบลำดับเบส ซึ่งจำนวนชนิดของโอลิโกนิวคลีโอไทด์นั้นจะมีความหลากหลายมากอันเนื่องมาจากความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์แบบสุ่มที่อยู่ตรงกลาง ซึ่งในการทำงาน จะสร้างสายโอลิโกนิวคลีโอไทด์แบบเส้นเดี่ยว ทำให้เกิดการม้วนพับเกิดเป็นโครงสร้างต่างๆ ที่ขึ้นกับลำดับนิวคลีโอไทด์ จึงเปรียบเสมือนการสร้าง library ขึ้นมา ซึ่งคาดว่าน่าจะมีความหลากหลายสูงมากกว่า 10^{30} ชนิด อย่างไรก็ดีในขั้นตอนแรกของการคัดเลือก จะคัดส่วนที่ไม่จำเพาะออกไปมากกว่าครึ่งหนึ่งของ library (10^{15}) ซึ่งในการทดลองนี้จะสร้าง library ของนิวคลีโอไทด์สายเดี่ยว คือ aptamer ขึ้นมา โดยอาจจะใช้เอนไซม์ T7 RNA polymerase เพื่อสร้างเป็นสาย RNA เนื่องจากสาย RNA มีความสามารถในการม้วนพับได้หลากหลายกว่า จากนั้นจะนำไปทำการจับกับโปรตีนเป้าหมายเพื่อหาส่วนจำเพาะและคัดแยก aptamer ที่ไม่จับทิ้งไป สายนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะกับโปรตีนเป้าหมายจะนำกลับมาอีกครั้ง (recovery) โดยการใช้ reverse-transcriptase และ PCR amplification โดยใช้ primer ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ขนาบข้างตามที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น และ product ที่ได้จากขั้นตอนนี้ จะนำไปเข้าสู่ cloning vector เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในทุกๆรอบ และใช้เป็นสารตั้งต้นเพื่อเอาไปจับกับโปรตีนเป้าหมายในรอบถัดไป และสุดท้าย จากการทำการคัดเลือกมากกว่า 12 รอบ คาดว่าจะได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะต่อโปรตีนเป้าหมาย ซึ่งจะเพิ่มจำนวนและนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

ในปัจจุบัน การใช้ aptamer เพื่อป้องกันการติดเชื้อไวรัส มีการวิจัยกันมากในเชื้อไวรัสโดยเฉพาะไวรัสโรคเอดส์ (HIV) ซึ่งโปรตีนเป้าหมายที่สำคัญ เช่น Reverse transcriptase (RT), integrase และ proteinase I (Khati, 2003, Dey, 2005 และ Zhou, 2009) เพื่อป้องกันการเพิ่มจำนวนไวรัส การใช้ aptamer ที่จำเพาะต่อ nucleocapsid (Kim , 2003 และ Jeong, 2008) และ p55Gag polyprotein (Lochrie, 1997)เพื่อป้องกันการ packaging หรือการใช้ aptamer ต่อ glycoprotein gp120 และ gp41 (Khati, 2003, Dey, 2005 และ Zhou, 2009) เพื่อป้องกันการกระบวนการเข้าเซลล์ของไวรัส เป็นต้น ซึ่งข้อดีของการใช้ aptamer ในกระบวนการป้องกันการเพิ่มจำนวนของไวรัส คือมีความจำเพาะและมีความชอบสูง (High specificity and high affinity) โดยเพียงใช้ aptamer ในปริมาณน้อยในระดับนาโนโมลาร์ (nM) ก็สามารถจับกับโปรตีนเป้าหมายได้แม่นยำ นอกจากนี้ Aptamer ก็มีการใช้อย่างแพร่หลายในการตรวจ และวิเคราะห์การติดเชื้อไวรัสในผู้ป่วย เช่น การใช้ aptamer ซึ่งมีความจำเพาะสูงต่อส่วน core

protein ของไวรัส hepatitis C virus เพื่อประโยชน์ในการวินิจฉัยการติดโรคไวรัสตับอักเสบชนิด ซี ในผู้ป่วย (Lee, 2007)

เนื่องจากในปัจจุบันพบว่าไวรัสหัวเหลืองมี 6 isolate และแต่ละ isolate มีความรุนแรงในการก่อโรคต่างกัน (Wijegoonawardane, 2009) และเมื่อพิจารณาคุณสมบัติของโปรตีนโครงสร้างในแต่ละส่วน พบว่าส่วนที่ส่งผลต่อความรุนแรงของโรคคือส่วน spike glycoprotein (gp 116) และส่วนที่มีความคล้ายคลึงในทุก isolate คือส่วน open reading frame ที่แปลรหัสให้โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของไวรัส คือ polymerase เป็นต้น (Sittidilokratna, 2009) นอกจากนี้การใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ gp116 ของ isolate ที่มีความรุนแรงสูง ไม่สามารถ neutralization ไวรัสหัวเหลือง isolate อื่นได้ (Sittidilokratna, 2009) จึงเป็นที่แน่ชัดแล้วว่า การใช้แอนติบอดีในการ neutralization ไวรัสหัวเหลืองไม่สามารถใช้ได้ทุก isolate ของไวรัสที่พบในปัจจุบันนี้ ดังนั้น ในโครงการนี้จึงสนใจที่จะใช้ aptamer ที่จำเพาะต่อ RNA polymerase และ protease ของไวรัสหัวเหลือง ซึ่งอาจจะเป็นทางเลือกเพื่อเพิ่มความสามารถในการป้องกันการติดเชื้อและการตายที่เกิดจากเชื้อไวรัสดังกล่าว