บทสรุปผู้บริหาร

(Executive summary)

ไวรัสหัวเหลืองเป็นไวรัสที่ก่อให้เกิดความเสียหายในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทยตั้งแต่ปี คศ 1991 ทั้งกุ้งกุลาดำ (Black tiger shrimp – Penaeus monodon) และกุ้งขาว (White shrimp – P. vannamei) สามารถติดเชื้อและตายได้ด้วยโรคหัวเหลืองทั้งสิ้น ซึ่งอัตราการตายจะมีความรุนแรงมาก กล่าวคือกุ้งทั้งบ่อจะตายหมดภายในสามวันหลังจากการแสดงออกของโรค ไวรัสชนิดนี้เป็นอาร์เอนเอไวรัส ซึ่งมีสารพันธุกรรมเป็นสายบวก ชนิดเส้นเดี่ยว (single stranded RNA virus) มีความยาวประมาณ 26 กิโลเบส (Sittidilokratna, 2008) จากการศึกษาที่ผ่านมา ในความพยายามในการป้องกันการติดเชื้อ ตลอดจนป้องกันการเกิดโรค พบว่าเมื่อใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อส่วน Spike glycoprotein ขนาด 116 กิโลดาลตัน (Gp116) ของไวรัสหัวเหลือง สามารถลดอัตราการติดเชื้อได้ใน primary cell culture ของกุ้งกุลาดำ (Assavalapsakul, 2005) อีกประการหนึ่งคือการใช้เทคนิคทาง RNAi คือการใช้ dsRNA ที่จำเพาะต่อยีน protease, helicase และ polymerase ของไวรัสหัวเหลือง แสดงให้เห็นว่า dsRNA สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส (YHV replication) ได้ใน primary cell culture ของกุ้ง (Tirasophon, 2005 และ Tirasophon, 2007)

ในที่นี้ จึงมีความสนใจที่จะใช้เทคนิคการค้นหาสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ของไวรัสหัวเหลืองด้วยวิธี Molecular modeling และวิธีการคัดเลือกสายนิวคลีโอไทด์ที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ด้วยการใช้ aptamer

1.1 Molecular modeling

ในส่วนของ molecular modeling ออกแบบโครงสร้างจำลองของ YHV protease ด้วยการใช้คอมพิวเตอร์ และวิเคราะห์ small molecules ที่สามารถเข้าจับกับ active site ของเอนไซม์ YHV protease ได้อย่างจำเพาะ ดังนั้น จากความสามารถในการเข้าจับกับของ small molecule ในบริเวณ active site ของ YHV protease จะมีการวิเคราะห์แบบละเอียดโดยการใช้โปรแกรม Docking (AutoDockTools version 1.5.2) ในการวิเคราะห์หาโมเลกุลที่สามารถเข้าจับได้ ซึ่งมีการเตรียมโครงสร้างของโมเลกุลที่จะใช้วิเคราะห์ โดยอ้างอิงจากฐานข้อมูล NCI diversity dataset ที่ใส่ไว้ใน The Office of the Associated Director of the Developmental Therapeutics Program (DTP), Division of Cancer Treatment and Diagnosis, National Cancer Institute

จากการศึกษาโครงสร้างของ YHV protease ด้วยวิธีการทาง Bioinformatics สามารถจำลองโครงสร้างสามมิติของโปรตีนดังกล่าวได้ ซึ่งจากรายงานความก้าวหน้าครั้งที่ 1 ปีที่ 2 นั้น ได้วิเคราะห์ถึงสารประกอบที่สามารถเกิดพันธะได้กับกรดอะมิโน His Cys และ Asp (Glu) และกรดอะมิโนสำคัญบริเวณข้างเคียงในบริเวณ active site ของ YHV protease ได้ โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์เพื่อหาหมู่ functional group ที่สามารถเกิดพันธะได้ดีที่สุด ซึ่งสามารถป้องกันการเข้าจับของ substrate ได้อย่างแท้จริง ซึ่งการวิเคราะห์นี้ สามารถทำนายสารประกอบที่มีหมู่ functional group ที่สามารถสร้างพันธะได้กับกรดอะมิโนในบริเวณ active site ได้ โดยเรียงลำดับความสามารถในการเข้าทำพันธะ ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ได้

สารประกอบที่ต้องการแล้ว จึงสั่งสารประกอบดังกล่าวมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการทำงานของโปรตีน YHV protease ในหลอดทดลอง ซึ่งพบว่า สารประกอบที่ทำนายได้ สามารถเข้ายับยั้งการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวได้

1.2 Aptamer

Aptamer ที่คัดเลือกด้วยวิธีนี้นั้น จะใช้วิธี SELEX (Systematic evolution of ligands by exponential enrichment) (Stoltenburg, 2007) ซึ่ง aptamer นี้เป็นสายโอลิโกนิวคลีโอไทด์สั้นๆ ที่มีคุณสมบัติในการสร้างโครงสร้างสามมิติที่มีความหลากหลายและสามารถจับกับโปรตีนเป้าหมายได้อย่างจำเพาะ ซึ่งในแง่ของไวรัสวิทยา Aptamer ได้ใช้เพื่อการศึกษาในสองแนวทางหลักคือ การประยุกต์ใช้เพื่อการศึกษาทางอณูชีววิทยาของการ replication ซึ่งเมื่อสามารถเทียบได้ว่า aptamer มีคุณสมบัติเหมือน monoclonal antibody และการประยุกต์ใช้ในแง่ของการตรวจโรค (diagnostic) (Osborne, 1997, Lee, 2006 และ James, 2007) จากการศึกษาในไวรัสหลายชนิด เช่น ไวรัสโรคเอดส์ (HIV), ไวรัสโรคตับอักเสบ (Hepatitis B virus) (Butz, 2001), HCV (Bellecave, 2008) และ human influenza H5N1 (Cheng, 2008) พบว่าการใช้ aptamer ได้ผลดีต่อการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส ซึ่งจะเห็นได้ว่ามีการศึกษามากในไวรัสที่ก่อโรคในมนุษย์ คือ HIV ซึ่งในปัจจุบันได้ใช้ aptamer ที่จำเพาะต่อโปรตีนเป้าหมายหลายชนิด เช่น Reverse transcriptase (RT) (Nickens, 2003, Joshi, 2005 และ Jochmans, 2008), spike glycoprotein เช่น gp120 (Zhou, 2009) และ integrase (De Soultrait, 2002, Metifiot, 2005 and YinChun, 2008) โดยเฉพาะ RT พบว่ามีความจำเพาะและสามารถ neutralize การติดเชื้อ HIV ได้ นอกจากนี้ ความจำเพาะของ aptamer ต่อโปรตีนเป้าหมาย เป็นประโยชน์ในการประยุกต์ใช้เพื่อการวิเคราะห์การตรวจโรคติดเชื้อไวรัส เช่น การใช้ aptamer ซึ่งมีความจำเพาะสูงต่อส่วน core protein ของไวรัส hepatitis C virus เพื่อประโยชน์ในการวินิจฉัยการติดโรคไวรัสตับอักเสบชนิด ซี ในผู้ป่วย เป็นต้น (Lee, 2007)

ในโครงการนี้จึงใช้ สารประกอบจากการทำนายด้วยวิธี molecular modeling แล RNA aptamer เพื่อเป็น tool ในการป้องกันการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งและการประยุกต์ใช้เพื่อการตรวจโรค โดยจะค้นหา aptamer ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน (เอนไซม์) ที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของไวรัส คือ RNA polymerase และ protease และทดสอบความสามารถของ dsRNA ที่จำเพาะต่อส่วนโปรตีนดังกล่าว ทั้งต่อการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสในกุ้งกุลาดำ และในแง่ของการ detection ของกุ้งที่การติดเชื้อชนิดนี้ ดังนั้น aptamer นี้จึงมีความน่าสนใจที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในการยับยั้งไวรัสหัวเหลืองในกุ้งในระดับห้องทดลอง เพื่อมุ่งเน้นไปยังการรักษาหรือป้องกันการติดโรค โดยมุ่งหวังว่าจะสามารถนำไปใช้พัฒนาในอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งต่อไป