

บทความวิจัย (Research Article)

การยับยั้งปฏิกิริยาฮีแมกกลูตินเนชันของไวรัสไข้หวัดนกด้วยสารเพอไรโอเดตในหลอดทดลอง

In vitro inhibition of avian influenza A (H5N1) virus hemagglutination by periodateอัญชลี ระวังการ^{1*}, จันทร์เพ็ญ ชำนาญพุด² และ ไมตรี สุทธจิตต์³Anchalee Rawangkran^{1*}, Chanpen Chamnanpood² and Maitree Suttajit³

บทคัดย่อ

กรดไซอะลิก หรือ N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac, NANA) เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่มีคาร์บอนจำนวน 9 อะตอม ทำหน้าที่เป็นตัวรับของไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิดเอ ในขั้นตอนการจับระหว่างเซลล์เยื่อเมือกของโฮสต์กับฮีแมกกลูตินินของไวรัสซึ่งเป็นขั้นตอนแรกของการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ สารเพอไรโอเดต (NaIO₄) สามารถออกซิไดซ์ NANA ในมิวโคโปรตีนในอัตราส่วนโมลาร์ระหว่าง NaIO₄ ต่อกรดไซอะลิกที่ 1:1 - 1:4 NANA จะเปลี่ยนไปเป็นอนุพันธ์ของ NANA ที่มีจำนวนคาร์บอน 8 และ 7 ตัว ตามลำดับ เป็นสิ่งที่น่าสนใจว่าการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของ NANA จะมีผลกระทบต่อ การจับกับฮีแมกกลูตินินของไวรัสหรือไม่และอย่างไร ในการศึกษาครั้งนี้ใช้มิวโคโปรตีนจากน้ำลายนกนางแอ่น (*Collocalia mucoid*, CM) ต่อม่น้ำลายไก่และหลอดลมไก่เป็นสารตัวรับของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ A/duck/Phitsanulok/NIAH6-5-0001/2007 (H5N1) ปริมาณกรดไซอะลิกทั้งหมดในตัวอย่างตรวจวัดด้วยวิธี standard Ehrlich's method พบว่า CM มีกรดไซอะลิกมากที่สุด คือ ร้อยละ 10.27 รองมาเป็นต่อน้ำลายไก่ ส่วนหลอดลมไก่นั้นพบปริมาณน้อยที่สุดคิดเป็นร้อยละ 1.24 และ 0.31 ตามลำดับ เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการจับกับเชื้อไวรัสด้วยวิธี hemagglutination inhibition (HI) พบว่ามีเพียงมิวโคโปรตีนจาก CM เท่านั้นที่เป็นสารยับยั้งปฏิกิริยาได้ (HI titer = 64) เมื่อ NANA ใน CM ถูกออกซิไดซ์ด้วย NaIO₄ เปลี่ยนเป็นอนุพันธ์ของ NANA แล้วจะทำให้ modified CM ไม่สามารถจับกับไวรัสต่อไปได้ เพราะว่า modified CM ไม่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาฮีแมกกลูตินเนชันของไวรัสไข้หวัดนกได้ดังเดิม ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าเมื่อเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของกรดไซอะลิกด้วยสารเพอไรโอเดต อนุพันธ์ของ NANA จะไม่สามารถรวมตัวกับไวรัสไข้หวัดนกได้ ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ NANA ซึ่งเป็นตัวรับของไวรัสไข้หวัดนกในระบบทางเดินหายใจของโฮสต์ด้วย NaIO₄ นั้น น่าจะเป็นแนวทางหนึ่งในการยับยั้งการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดนกในไก่และสัตว์ปีกอื่นๆ ได้

คำสำคัญ : ไวรัสไข้หวัดนก, เพอไรโอเดตออกซิเดชัน, กรดไซอะลิก, ฮีแมกกลูตินิน, อินฮิบิชั่น

¹ สาขาวิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000

² ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคเหนือตอนล่าง จังหวัดพิษณุโลก 65000

³ สาขาวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000

¹ Microbiology and Parasitology Division, School of Medical Science, University of Phayao, Phayao Province

² Veterinary Research and Development Center (Lower Northern Region), Phitsanulok Province

³ Biochemistry Division, School of Medical Science, University of Phayao, Phayao Province

*Corresponding author e-mail : ewmedsci@hotmail.com, Received: 5 August 2013; Accepted: 30 March 2014

Abstract

Sialic acid or N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac, NANA) is a monosaccharide with nine-carbon backbone acts as a receptor for influenza A viruses, allowing attachment of the viruses to mucous cells via hemagglutinin (HA). It's an early step in acquiring influenza virus infection. NANA in mucoprotein can be oxidized with periodate (NaIO_4) at low concentrations of molar ratio NaIO_4 to NANA. NaIO_4 can selectively oxidize NANA to the 8- and 7-carbon aldehydes. It is interesting to determine how periodate modification of NANA's side chain affect the binding of NANA to HA of the viruses. In this study, mucoproteins of *Collocalia mucoid* (CM), chicken submaxillary glands and chicken tracheas were used as receptor for avian influenza virus A/duck/Phitsanulok/NIAH6-5-0001/2007 (H5N1). Total amount of NANA in each mucoprotein assayed by direct Ehrlich's method showed that NANA in CM was 10.27% which was higher than that of chicken submaxillary glands and chicken tracheas, 1.24% and 0.31% respectively. By hemagglutination inhibition (HI) test, it was found that only CM could completely inhibit HA activity (HI titer = 64). The decrease and abolishment of binding capacity between virus particles and periodate-modified CM was observed by HI test. These results suggest that the periodate-modified NANA cannot inhibit viral hemagglutination toward chicken erythrocytes. It indicates that NANA analogues cannot bind with the virus. Therefore, the periodate-modification of virus receptors could reduce viral infection. By this evidence, it is possible to use NaIO_4 for the inhibition of avian influenza viral attachment to NANA on cell surface in respiratory system of the avian host.

Keywords: Avian Influenza virus, periodate oxidation, sialic acid, hemagglutination inhibition

บทนำ

โรคไข้หวัดใหญ่เกิดจากเชื้อไวรัส influenza A ก่อโรคได้ทั้งในคนและสัตว์ โรคไข้หวัดใหญ่ที่เกิดขึ้นในสัตว์ปีกมีสาเหตุมาจาก avian influenza viruses ชนิดที่ก่อโรครุนแรง ได้แก่ สายพันธุ์ H5N1 [1, 2, 3], H7N7 [4] และ H9N1 [5] แต่ที่พบว่าเป็นปัญหามากทางด้านสาธารณสุขและเศรษฐกิจคือสายพันธุ์ H5N1 เนื่องจากพบการระบาดได้บ่อยทั้งในประเทศไทยเองและทั่วโลก [6] มีอัตราการกลายพันธุ์สูงจนนำไปสู่การเกิดไวรัสสายพันธุ์ใหม่ ยิ่งไปกว่านั้นในปัจจุบันพบว่าเชื้อไวรัสมีอัตราการดื้อยา zanamivir และ oseltamivir ที่สูงขึ้น [7, 8] เพราะฉะนั้นแนวทางการคิดค้นและวิจัยเกี่ยวกับการยับยั้งการติดเชื่อไวรัสจึงเป็นที่สำคัญอย่างยิ่ง

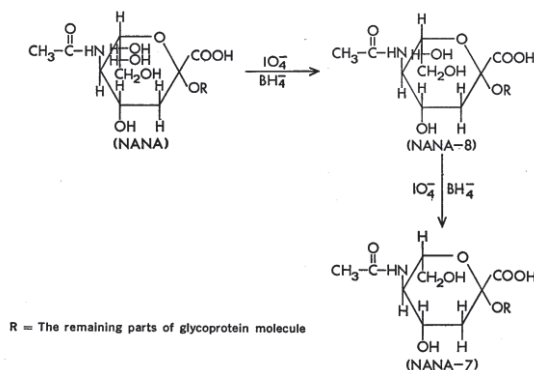
ฮีแมกกลูตินิน (hemagglutinin, HA) เป็น glycoprotein type I ที่พบบนผิวของอนุภาคไวรัสทำหน้าที่จับกับตัวรับบนผิวเซลล์ของโฮสต์ คือ sialyloligosaccharide จัดเป็น cell surface glycoprotein ที่ประกอบด้วยกรดไซอะลิก (sialic acid, SA) หรือ เอ็น-อะซิติก นิวรา

มินิก แอซิด (N-acetyl neuraminic acid, NANA) สูตรโครงสร้าง $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{NO}_9$ ซึ่งเป็น amino sugar ที่ประกอบด้วยคาร์บอน 9 อะตอม ที่เชื่อมกับน้ำตาลตัวสุดท้ายพบได้บริเวณเยื่อเมือกในระบบทางเดินหายใจ [9] ซึ่งกระบวนการดังกล่าวถือเป็นขั้นตอนแรกของการติดเชื่อไวรัส [10]

ก่อนหน้านี้คณะวิจัยต่างๆ [11 - 16] ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการออกซิเดชัน NANA ในไกลโคโปรตีนชนิดต่างๆ ด้วยสารเพอไรโอเดตแสดงให้เห็นว่าสารเพอไรโอเดตที่ประกอบด้วย sodium-meta-periodate (NaIO_4) และ 85% ortho-phosphoric acid มีความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาเพอไรโอเดตออกซิเดชัน (periodate oxidation) ต่อ NANA โดยในการเกิดออกซิไดซ์จะมีการทำลายพันธะระหว่าง C-8 กับ C-7 (8-carbon and 7-carbon aldehydes) และเมื่อทำปฏิกิริยาต่อด้วยสารละลาย sodium borohydride (NaBH_4) จะเกิดปฏิกิริยาโบโรไฮไดรด์รีดักชัน (borohydride reduction) ที่ตำแหน่งเดิมส่งผลให้โครงสร้างเคมีของ NANA เปลี่ยนแปลงไปเป็น NANA analogues (ภาพ

ที่ 1) ดังนั้นเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ จึงไม่สามารถเกาะติดกับตัวรับได้ อย่างไรก็ตามการศึกษาลักษณะดังกล่าวนี้มีเพียงการศึกษาในตัวอย่างไวรัส human influenza type A และ type B เท่านั้น ส่วน avian influenza virus นั้นยังไม่พบรายงานการวิจัย

ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบการยับยั้งปฏิกิริยาฮีแมกกลูตินินของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ A/duck/Phitsanulok/NIAH6-5-0001/2007 (H5N1) ด้วยสารเพอไรโอเดตที่ศึกษาในระดับหลอดทดลอง โดยใช้มิวโคโปรตีนจากน้ำลายนกนางแอ่น ต่อม่น้ำลายไก่และหลอดลมไก่เป็นสารตัวรับของเชื้อไวรัส จากนั้นนำมาผ่านกระบวนการ periodate oxidation และ borohydride reduction เกิดเป็น NANA analogues ที่เชื้อไวรัสไม่สามารถจับได้ สามารถติดตามผลการทดลองได้จาก HI เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม



ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้าง NANA ที่เกิดปฏิกิริยา oxidation/reduction ด้วยสารเพอไรโอเดต [15]

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษา

ตัวอย่างไวรัสที่ใช้ในการทดลอง

ไวรัส influenza A สายพันธุ์ A/duck/ Phitsanulok/ NIAH6-5-0001/2007 (H5N1) แยกได้จากเป็ดในช่วงที่มีการระบาดของไวรัสไข้หวัดนกในจังหวัดพิษณุโลก โดยขอความอนุเคราะห์ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษานี้จาก ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคเหนือตอนล่าง อำเภอลำทะเมนชัย จังหวัดพิษณุโลก โดยผ่านกระบวนการขออนุญาตทำวิจัยและขอใช้ตัวอย่างไวรัสไข้หวัดนก

จากกรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ โดยไวรัสจะถูกเพิ่มจำนวนบริเวณ allantoic cavity ในไข่ไก่ฟัก และเก็บ allantoic fluid มาตรวจหาปริมาณไวรัสด้วยวิธี HA test ตามวิธีมาตรฐานขององค์การอนามัยโลก [17] จากนั้นทำให้ไวรัสขาดคุณสมบัติในการติดเชื้อด้วยสารละลาย 0.01% formalin (v/v) ตามวิธีการที่เคยมีรายงานก่อนหน้านี้ [18] เก็บรักษาไวรัสไว้ที่อุณหภูมิ -80°C เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

สารตัวอย่างมิวโคโปรตีน

ตัวอย่างมิวโคโปรตีนในน้ำลายนกนางแอ่นได้จากรังนกนางแอ่นสายพันธุ์ *Collocalia* ชนิดสามารถรับประทานได้ จำนวน 5 รัง โดยซื้อจากร้านขายรังนกนางแอ่น เขตเยาวราช กรุงเทพมหานคร มิวโคโปรตีนจากต่อมน้ำลายไก่และหลอดลมไก่ได้จากไก่พันธุ์เนื้อสำหรับชำแหละขายในตลาดสด อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา ทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างจากไก่ชนิดละ 40 ตัว โดยใช้วิธีการตามที่เคยมีรายงานก่อนหน้านี้ [19]

การเตรียม crude lyophilized mucoprotein

ดัดแปลงจากวิธีการของ Suttajit และคณะ [14] ดังนั้นคือ ตัวอย่างรังนก 20 กรัม, ต่อม่น้ำลายไก่ 62 กรัม และหลอดลมไก่ 45 กรัม แช่น้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ทั้งไข่ม้วนคั้น ปรับ pH ให้เท่ากับ 11 ด้วย 1 N NaOH จากนั้นทำให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยเครื่อง homogenizer เป็นเวลา 15 นาที นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65°C นาน 3 ชั่วโมง บนเครื่องกวนสารให้ความร้อน จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เก็บสารละลายส่วนใสด้านบนและล้างตะกอนที่เหลือด้วยน้ำกลั่น 2 รอบ นำไปปั่นตกตะกอนอีกครั้ง เก็บส่วนใสด้านบนรวมกัน นำไปทำ dialysis ด้วยน้ำกลั่น โดยใช้ dialysis bag (MWCO 14,000 Dalton) ที่อุณหภูมิห้อง ทั้งไข่ม้วนคั้น จากนั้นทำให้เป็นผงด้วยกระบวนการ lyophilization

การตรวจวัดปริมาณ NANA ทั้งหมด

การวัดปริมาณ NANA ทั้งหมดในตัวอย่างมีวโคโปรตีนใช้วิธี standard Ehrlich's method ที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Surangkul และคณะ [20] ดังวิธี การต่อไปนี้ ตัวอย่างปริมาตร 200 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ผสมกับ 0.2 N H_2SO_4 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ $80^\circ C$ นาน 1 ชั่วโมง เติม 10% trichloroacetic acid (TCA) 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เก็บส่วนใสด้านบนปริมาตร 500 ไมโครลิตร เจือจางในน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Ehrlich reagents อีก 500 ไมโครลิตร (ประกอบด้วย p-dimethylaminobenzaldehyde (DMAB) 2 กรัม ผสมกับ 95% ethanol 50 มิลลิลิตร และ HCl 50 มิลลิลิตร โดยต้องเตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง) จากนั้นนำสารละลายไปต้มในน้ำเดือดนาน 30 นาที และหยุดปฏิกิริยาด้วยการแช่ในน้ำแข็ง จากนั้นนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 565 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยมี 0.2 N H_2SO_4 - 10% TCA เป็น blank และใช้ NANA บริสุทธิ์ (pure sialic acid, Sigma) ความเข้มข้น 0, 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นสารมาตรฐานสำหรับการเขียนกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้น โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

การเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง NANA ด้วยสารเพอไรโอเดต

เป็นกระบวนการทดสอบปฏิกิริยา oxidation และ reduction ด้วยสารละลาย periodate และ borohydride ตามลำดับ ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Suttajit และคณะ [14] โดยใช้อัตราส่วน molar ratio $NaIO_4$ ต่อ NANA เป็น 1:1, 1:2, 1:3 และ 1:4 โดยละลายมีวโคโปรตีนใน 0.9% NaCl ผสมกับสารละลาย $NaIO_4$ (Bio Basic Inc.) อย่างละ 1 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน บ่มในน้ำแข็งและพันแสง เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง จากนั้นกำจัด $NaIO_4$ ที่เหลือโดยเติม glycerol ในอัตราส่วน $NaIO_4$ 1 mole ต่อ glycerol 3 mole นำไปทำ dialysis ด้วย 0.9% NaCl นาน 24 ชั่วโมง เติม 0.1 M sodium carbonate pH 9.6 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 0.1 M $NaBH_4$ (Rankem) ที่เตรียมใหม่

ก่อนใช้ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 2 ชั่วโมง กำจัด $NaBH_4$ ที่เหลือในปฏิกิริยาโดยเติม glacial acetic acid อย่างช้าๆ จนได้ค่า pH เท่ากับ 4.5 จากนั้นทำ dialysis อีกครั้ง ด้วยน้ำกลั่น นาน 24 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายดังกล่าวไปวัดปริมาณ NANA ทั้งหมด และ NANA analogues ด้วยวิธีการข้างต้น เก็บส่วนที่เหลือนำไปทำให้เป็นผงด้วยกระบวนการ lyophilization เพื่อใช้ทดสอบกับเชื้อไวรัสต่อไป

การทดสอบ hemagglutination (HA)

เป็นวิธีทดสอบการจับกันอย่างจำเพาะระหว่างเชื้อไวรัสกับตัวรับบนผิวเม็ดเลือดแดงไก่ ทำให้เกิดการจับกลุ่มตกตะกอน (agglutination) ของเม็ดเลือดแดง ที่สามารถทดสอบด้วยวิธีมาตรฐานขององค์การอนามัยโลก [17] โดยเจือจางไวรัสแบบ 2 เท่าด้วยสารละลาย phosphate buffered saline (PBS) ตั้งแต่ 1:1 ไปจนถึง 1:2048 ใน 96-well micro titer plate ปริมาตรอย่างละ 25 ไมโครลิตร เติม 1% chicken red blood cell (RBC) 25 ไมโครลิตร ในทุกหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที บันทึกผลการเกิด agglutination

การทดสอบ hemagglutination inhibition (HI)

เป็นการทดสอบการยับยั้งการจับกันระหว่างเชื้อไวรัสกับมีวโคโปรตีน โดยดัดแปลงจากวิธีทดสอบการยับยั้งการจับระหว่างไวรัสไข้หวัดนกกับตัวรับบนผิวเม็ดเลือดแดงไก่เข้มข้น 1% RBC โดยวิธี HI ตามวิธีมาตรฐานขององค์การอนามัยโลก [17] โดยมีทั้ง native และ modified mucoprotein เป็นสารยับยั้งหรือ inhibitor เริ่มจากการเตรียมตัวอย่างไวรัสเริ่มต้นให้ได้เท่ากับ 4 HA unit ด้วยวิธี HA test และยืนยันปริมาณไวรัสด้วยการทำ back titration ทำการเจือจางมีวโคโปรตีนที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แบบ 2 เท่า ด้วยสารละลาย PBS ตั้งแต่ 1:1 ไปจนถึง 1:2048 ใน 96-well micro titer plate เติมไวรัสในทุกหลุมปริมาตร 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที เติม 1% RBC 25 ไมโครลิตร ในทุกหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องอีกครั้งนาน 40 นาที บันทึกผลการทดลอง ในการศึกษานี้ใช้ avian

influenza A H5N1 antiserum เป็นตัวควบคุมบวก ส่วนควบคุมลบจะไม่เติม inhibitor และทำการทดสอบทั้งหมด 3 ซ้ำ เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารเพอไรโอเดตกับกลุ่มควบคุม

ผลการศึกษา

การหาปริมาณไวรัส influenza A สายพันธุ์ A/duck/Phitsanulok/NIAH6-5-0001/2007 (H5N1) ด้วยวิธี HA test พบไวรัสมีปริมาณเริ่มต้นเป็น log 9 HA titer หรือ 128 HA unit และขาดคุณสมบัติในการติดเชื้อ การเตรียมตัวอย่างมิวโคโปรตีนชนิดหยาบสำหรับการทดลอง ได้แก่ น้ำลายนกนางแอ่น ต่อม้ำลายไก่และหลอดลมไก่ พบว่าได้น้ำหนักแห้งของน้ำลายนกนางแอ่นได้ปริมาณมากที่สุด รองลงมาเป็นต่อม้ำลายไก่และหลอดลมไก่ คิดเป็นร้อยละ 19.2, 11.1 และ 4.4 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) และเมื่อตรวจวัดปริมาณ NANA ทั้งหมดในตัวอย่างด้วยวิธี standard Ehrlich's method โดยเทียบกับความเข้มข้นของ NANA บริสุทธิ์ นำมาเขียนกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างปริมาณ NANA ที่ความเข้มข้นสุดท้ายกับค่าการดูดกลืนแสงได้สมการเชิงเส้น $y=0.0028x$ ($R^2=0.9831$) (ไม่แสดงข้อมูล) พบปริมาณ NANA เฉลี่ยในน้ำลายนกนางแอ่นมีปริมาณมากที่สุดคือ 0.33 ไมโครโมล/กรัม รองลงมาเป็นต่อม้ำลายไก่คือ 0.04 ไมโครโมล/กรัม ส่วนหลอดลมไคนั้น พบปริมาณน้อยที่สุดเพียง 0.01 ไมโครโมล/กรัม หรือคิดเป็นร้อยละ 10.27, 1.24 และ 0.31 ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

เมื่อนำตัวอย่างมิวโคโปรตีนทั้ง 3 ชนิด มาทดสอบความสามารถในการจับกับเชื้อไวรัสด้วยวิธี HI test โดยมี native mucoprotein ทำหน้าที่เป็นสาร inhibitor พบว่า native CM มีความสามารถในการจับกันได้อย่างจำเพาะกับ HA ของเชื้อไวรัส โดยแสดงความสามารถในการยับยั้งการจับกันของไวรัสกับเม็ดเลือดแดงไก่ หรือค่า HI titer เท่ากับ 64 ส่วนทั้ง native chicken submaxillary glands และ native chicken trachea mucoprotein นั้นพบว่าไม่สามารถ

การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ CM ด้วยสารเพอไรโอเดตจากปฏิกิริยาออกซิเดชันในอัตราส่วน molar ratio NaIO_4 ต่อ NANA เป็น 1:1, 1:2, 1:3 และ

1:4 โดยใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของมิวโคโปรตีนเป็น 0.33 ไมโครโมล/มิลลิกรัม น้ำหนักแห้ง ซึ่งจะให้ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 565 นาโนเมตรจากการวัดปริมาณ NANA ทั้งหมดด้วยวิธี standard Ehrlich's assay เป็น 0.032 เมื่อทดสอบปฏิกิริยา periodate oxidation และ borohydride reduction แล้วส่งผลให้มีค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงเพิ่มสูงขึ้นทั้ง 4 อัตราส่วนการทดลอง แสดงให้เห็นว่ามีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ NANA ใน CM เกิดขึ้น เมื่อนำ periodate-oxidized CM มาทดสอบการจับกับเชื้อไวรัสด้วยวิธี HI พบว่าเชื้อไวรัสยังคงสามารถจับได้กับตัวรับบนเม็ดเลือดแดงไก่ได้ แสดงให้เห็นว่า modified CM ทั้งหมดถูกเปลี่ยนเป็น NANA analogue (NANA-8 และ NANA-7) ทำให้ไวรัสไม่สามารถจับได้ จึงไม่พบการเกิด HI ในทุกความเจือจางของสารยับยั้ง รวมไปถึงทุกอัตราส่วน การทำปฏิกิริยาของสารเพอไรโอเดตต่อ NANA เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 3 และภาพที่ 2)

วิจารณ์และสรุปผล

จากการศึกษาตัวอย่างมิวโคโปรตีนทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ น้ำลายนกนางแอ่น ต่อม้ำลายไก่และหลอดลมไก่ พบว่าน้ำลายนกนางแอ่นมี NANA เฉลี่ยมีปริมาณมากที่สุดคือ ร้อยละ 10.27 หรือ 0.33 ไมโครโมล/กรัม ซึ่งใกล้เคียงกับการรายงานก่อนหน้านี้ คือ 0.31 ไมโครโมล/กรัม [14] และคิดเป็นร้อยละ 9 จากการรายงานของ Kathan และคณะ [21] ส่วนต่อม้ำลายไก่และหลอดลมไคนั้นพบ NANA ในปริมาณเพียงแค่ว่า 0.04 และ 0.01 ไมโครโมล/กรัม เท่านั้น เมื่อนำมาทดสอบ HI โดยใช้มิวโคโปรตีนเหล่านี้เป็นสาร inhibitor ซึ่งตามหลักการแล้วมิวโคโปรตีนจะสามารถจับกับไวรัสสายพันธุ์ H5N1 ได้ดี ระหว่าง viral HA กับน้ำตาลกาแลคโตสตัวสุดท้ายแบบ alpha-2,3 linkage (SA- α 2,3-Gal) ที่พบในเยื่อเมือกของระบบทางเดินหายใจสัตว์ปีก [22] และเมื่อเชื้อไวรัสจับกับ NANA ในมิวโคโปรตีนก่อนแล้ว ไวรัสจึงไม่สามารถจับกับ NANA บนผิวเซลล์เม็ดเลือดแดงอีกได้ จึงมี HI เกิดขึ้นดังผลการรายงานค่า HI titer ของ CM เป็น 64 ส่วนต่อม้ำลายไก่และหลอดลมไคนั้นไม่แสดงผลการเกิดการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง อาจเนื่องมาจากมีปริมาณของ

NANA เริ่มต้นที่น้อยเกินไปจึงไม่สามารถจับได้กับไวรัสปริมาณเริ่มต้นเป็น 4 HA unit ตามวิธีการมาตรฐานขององค์การอนามัยโลก [17] ประกอบกับ

lyophilized mucoprotein ที่สกัดได้นั้นยังอยู่ในลักษณะของสารสกัดหยาบด้วยประกอบกับยังไม่เคยมีการรายงานก่อนหน้านี้

ตารางที่ 1 ผลการเตรียม crude lyophilized glycoprotein และปริมาณ NANA

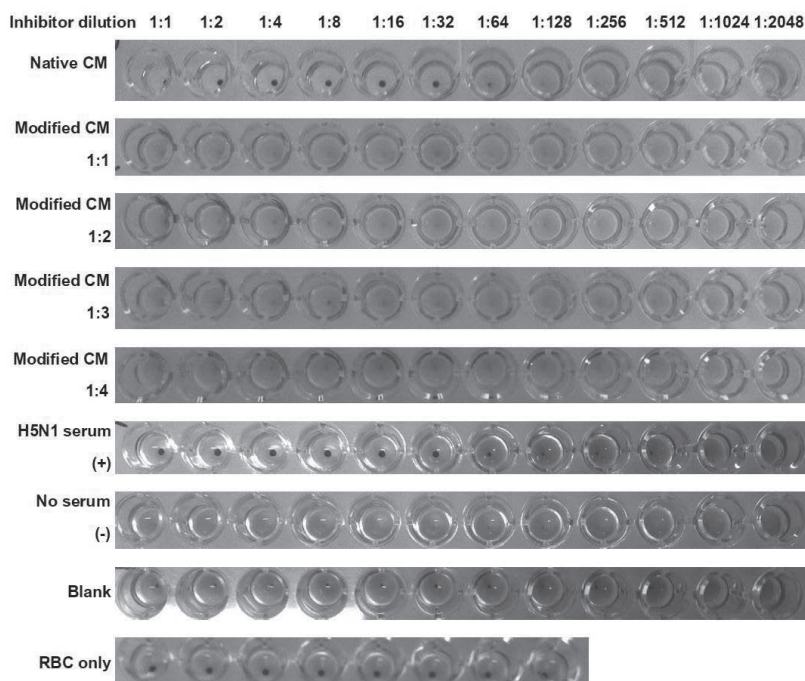
ตัวอย่าง มิวโคโปรตีน	ปริมาณเริ่มต้น (กรัม)	น้ำหนักแห้ง (กรัม) (ร้อยละ)	ปริมาณ NANA เจลลี่ ($\mu\text{mole/mg}$) (ร้อยละ)
น้ำลายนกนางแอ่น	20.0	3.8 (19.2)	0.33 (10.27)
ต่อมน้ำลายไก่	62.0	6.9 (11.1)	0.04 (1.24)
หลอดลมไก่	45.0	2.0 (4.4)	0.01 (0.31)

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบ HI test ระหว่าง native mucoprotein กับไวรัส

ตัวอย่าง native mucoprotein หรือ inhibitor	HI titer
น้ำลายนกนางแอ่น	64
ต่อมน้ำลายไก่	0
หลอดลมไก่	0
Avian influenza H5N1 antiserum	64
ไม่เติมสารยับยั้ง	0

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบ HI ระหว่าง periodate-modified CM กับไวรัส

อัตราส่วน molar ratio NANA : NaIO_4	ค่าเฉลี่ย O.D. (565 nm)	HI titer
Native CM	0.032	64
Modified CM 1:1	0.077	0
Modified CM 1:2	0.064	0
Modified CM 1:3	0.080	0
Modified CM 1:4	0.108	0
avian influenza A H5N1 antiserum	-	64
No inhibitor	-	0
Blank	0.000	0



ภาพที่ 2 แสดงผล HI ของ native และ periodate-modified CM (molar ratio NaIO_4 : NANA เป็น 1:1, 1:2, 1:3 และ 1:4 ตามลำดับ) ใน 96-well micro titer plate ที่เจือจางสาร inhibitor ตั้งแต่ 1:1 ถึง 1:2048 โดยมี avian influenza A H5N1 antiserum เป็นกลุ่มควบคุมบวก (พบการเกาะกลุ่มของ RBC แบบเม็ดกระดุม), ไม่มีการเติมสาร inhibitor เป็นกลุ่มควบคุมลบ (พบการเกาะกลุ่มของ RBC แบบร่างแห), Blank จากการทำ standard Ehrlich's NANA assay และเติมเฉพาะ RBC เป็นกลุ่มควบคุมภายใน (พบการเกาะกลุ่มของ RBC แบบเม็ดกระดุม)

ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่า NANA ในน้ำลายนกนางแอ่นเป็นสารเป้าหมายที่ดีของไวรัส ซึ่งเป็นแนวทางการศึกษาต่อไปว่าการทำลายหรือการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง NANA ของน้ำลายนกนางแอ่นจะสามารถยับยั้งการเกาะติดของไวรัสได้ด้วยโดยอาศัยปฏิกิริยา periodate oxidation ที่จะทำให้ NANA ในน้ำลายของนกนางแอ่นถูกออกซิไดซ์ได้ผลิตภัณฑ์เป็น modified mucoprotein ภายใต้สภาวะที่มีเพอร์ไอโอดีความเข้มข้นต่ำในอัตราส่วนของ molar ratio NaIO_4 : NANA เป็น 1:1, 1:2, 1:3 และ 1:4 จากผลการทดลองพบว่าเพียงอัตราส่วน 1:1 ก็สามารถเกิดปฏิกิริยา periodate oxidation ได้ โดยทำลายพันธะระหว่าง C-8 กับ C-7 เกิดเป็น NANA-8 และ NANA-7 หรือ NANA analogues สามารถสังเกตได้จากค่า O.D. ที่สูงขึ้นนั่นเอง [13,14]

เมื่อเปรียบเทียบค่า O.D. ที่เพิ่มขึ้นระหว่างก่อนและหลังการออกซิไดซ์โดยใช้อัตราส่วนของ NaIO_4 : NANA เป็น 1:1 molar ของ native CM และ

modified CM จาก 0.032 เป็น 0.077 เป็นผลเนื่องจากการเกิด over oxidation ส่วนระหว่าง modified CM ในอัตราส่วนต่างๆ กันนั้นพบค่า O.D. มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามปริมาณ NANA ที่เพิ่มขึ้น ทั้งนี้ modified mucoprotein ทุกการทดลองจะไม่สามารถจับกับ viral HA ได้ เมื่อทดสอบ HI ดังนั้นสามารถเลือกใช้สภาวะที่เหมาะสมในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างตัวรับของไวรัสไข้หวัดนกโดยใช้สารเพอร์ไอโอดีความเข้มข้นน้อยที่สุดทำปฏิกิริยาพอดีกับ NANA ในอัตราส่วน 1:1 โมลาร์ ทั้งนี้ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารเพอร์ไอโอดีนี้จะต้องมีการศึกษาต่อในอนาคต เช่นเดียวกับกลุ่มนักวิจัยที่กำลังศึกษาในไวรัสไข้หวัดใหญ่ในคน [16]

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่า CM มี NANA มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 10.27 รองมาเป็นตอมน้ำลายไก่ ส่วนหลอดลมไก่อ้นพบปริมาณน้อยที่สุดคิดเป็นร้อยละ 1.24 และ 0.31 ตามลำดับ และพบว่า CM เป็นเป้าหมายตัวรับที่ดีของไวรัสไข้หวัดนก โดยแสดงค่า HI titer = 64 และเมื่อผ่านกระบวนการ periodate

oxidation ที่ความเข้มข้นในอัตราส่วนโมลาร์ระหว่าง NaIO_4 ต่อ NANA ที่ 1:1, 1:2, 1:3 และ 1:4 พบว่า modified CM ทั้งหมดถูกเปลี่ยนเป็น NANA analogue เมื่อทดสอบ HI ทำให้เชื้อไวรัสไม่สามารถจับได้อย่างจำเพาะ

โดยจะเห็นว่า จากหลักการศึกษาวิจัยนี้สามารถจะนำมาใช้เป็นแนวทางการป้องกันการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดนกในสัตว์ปีกได้โดยนำสารเพอไรโอเดตความเข้มข้นต่ำที่ไม่ทำลายระบบทางเดินหายใจของสัตว์ปีกมาฉีดพ่นทางจมูกไก่ให้สารไปเปลี่ยนแปลงตัวรับเป้าหมายในเยื่อเมือกซึ่งมีความคงที่ทางชีวเคมีส่งผลให้เชื้อไวรัสไม่สามารถติดเชื้อได้ งานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์มากในอนาคต สามารถนำมาผลิตสารที่ใช้ป้องกันการติดเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ในสัตว์ปีกได้ และมีราคาไม่แพง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณบุคลากรจากศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคเหนือตอนล่าง จังหวัดพิษณุโลก ที่ให้ความช่วยเหลือและเอื้อเฟื้อสถานที่วัสดุอุปกรณ์รวมถึงสารเคมี งานวิจัยนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนจากรายได้มหาวิทยาลัยพะเยา ประจำปี พ.ศ. 2555

เอกสารอ้างอิง

- Subbarao K., Klimov A., Katz J., Regnery H., Lim W., Hall H., et al. (1998). Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science*, 279(5349), 393-396.
- Claas E.C., Osterhaus A.D, van Beek R., De Jong J.C., Rimmelzwaan G.F., Senne, D.A., et al. (1998). Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet*, 351(9101), 472-477.
- De Jong M.D. and Hien T.T. (2006). Avian influenza A (H5N1). *Journal of Clinical Virology*, 35(1), 12-13.
- Butt K.M., Smith G.J., Chen H., Zhang L.J., Leung Y.H., Xu K.M., et al. (2005). Human infection with an avian H9N2 influenza A virus in Hong Kong in 2003. *J Clin Microbiol*, 43(11), 5760-5767.
- Fouchier R.A., Schneeberger P.M., Rozendaal F.W., Broekman J.M., Kemink S.A., Munster V., et al. (2004). Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(5), 1356-1361.
- World Health Organization. (2009). Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1). Geneva Switzerland: World Health Organization
- McKimm-Breschkin J.L. (2000). Resistance of influenza viruses to neuraminidase inhibitors--a review. *Antiviral Res*, 47(1), 1-17
- Moscona A. (2005). Neuraminidase inhibitors for influenza. *N Engl J Med*, 353(13), 1363-1373
- Barry B., Gerard G. D. and Richard O'Kennedy. (2007) Sialic acids: carbohydrate moieties that influence the biological and physical properties of biopharmaceutical proteins and living cells. *Drug Discovery Today*, Volume 12, Numbers 7/8
- Lamb R. A., and Krug R. M. (2007). Orthomyxoviridae: The viruses and their replication. In Knipe, D. M. and Howley, P. M. (Eds.), *Fundamental virology* (5th ed., pp. 1647-1689.) Chicago, Illinois, USA.: Lippincott Williams & Wilkins.
- Paerels G.B. and Schut J. (1965). The mechanism of the periodate-thiobarbituric acid reaction of sialic acids. *Biochem J*, 96(3), 787-792.

12. Matrosovich M. N, Gambaryan A. S., Reizin F. N. and Chumakov M. P. (1991) Recognition by human A and B influenza viruses of 8- and 7-carbon analogues of sialic acid modified in the polyhydroxyl side chain. *Virology*. 182(2), 879-82.
13. Suttajit M, Carol Urban C and McLean R. L. (1971). *N*-Acetylneuraminic Acid Analogues II. The action of *N*-acetylneuraminic acid aldolase on 8-carbon and 7-carbon analogues. *J Biol Chem*, 246,(3), 810-814
14. Suttajit M and Winzler R.J. (1971). Effect of Modification of *N*-Acetylneuraminic Acid on the Binding of Glycoproteins to Influenza Virus and on Susceptibility to Cleavage by Neuraminidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 246,(10), 3398-3404
15. Koonanuwatchaidet P., Winyar B. and Suttajit M. (1979). Effect of chemical modification of *N*-Acetylneuraminic acid on hormonal activity of erythropoietin *in vivo* and *in vitro*. *ScienceAsia* 5 (1979): 161-167
16. Paulpandi M., Thangam R., Gunasekaran P. and Kannan S. (2011). Sodium periodate inhibits the binding efficiency of influenza A virus (H3N2) with mammalian cell lines. *Journal of Cell and Animal Biology* Vol. 5(1), pp. 1-5.
17. Webster R., Cox N. and Stöhr K. (2002). WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance. Geneva Switzerland: World Health Organization.
18. Rawangkhan A., Sanguansermisri D., Suwannakhon N., Pongcharoen S., Pensuwan P., Chamnanpood C., et al. (2010). Comparison of Neuraminidase Activity of the Influenza A virus subtype H5N1 and H1N1 Using the Reverse Genetics Viruses. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. Vol 41 (3), 562.
19. Renata K. T. Kobayashi, Luis Carlos J. G, and Marilda C. V. (2010). Functional activities of the Tsh protein from avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strains. *J Vet Sci*. December; 11(4): 315–319.
20. Surangkul D, Pothacharoen P, Suttajit M., et al. (2001). A periodate-Resorcinol microassay for the quantitation of total sialic acid in human serum. *Chiang Mai Med Bull*. 40(3):111-118.
21. Ralph H. K. and Dianna I. W. (1969). Structure studies of collocalia mucoid : I. Carbohydrate and amino acid composition. *Archives of Biochemistry and Biophysics* Volume 134, Issue 2, 572–576
22. Harvey R, Martin A.C., Zambon M., and Barclay W.S. (2004). Restrictions to the Adaptation of Influenza A Virus H5 Hemagglutinin to the Human Host. *J virol*, 78(1): 502–507