การศึกษาฤทธิ์ของวิตามินซีและวิตามินอีต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสพีอาร์อาร์เอสในเซลล์ MARC-145 และศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด monocyte-derived macrophages

พิชานันท์ สืบสอาด

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2564

การศึกษาฤทธิ์ของวิตามินซีและวิตามินอีต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสพีอาร์อาร์เอสในเซลล์ MARC-145 และศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด monocyte-derived macrophages

พิชานันท์ สืบสอาด

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2564

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้

การศึกษาฤทธิ์ของวิตามินซีและวิตามินอีต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสพีอาร์อาร์เอสในเซลล์ MARC-145 และศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด monocyte-derived macrophages

พิชานันท์ สืบสอาด

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

พิจารณาเห็นชอบโดย **อาจารย์ที่ปรึกษา**

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก .....
(รองศาสตราจารย์ ดร.วศิน เจริญตัณธนกุล)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....
(อาจารย์ ดร.สมคิด ดีจริง)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....
(รองศาสตราจารย์ ดร.วาที คงบรรทัด)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

ประธานอาจารย์ผู้รับผิดชอบหลักสูตร .....
(รองศาสตราจารย์ ดร.วศิน เจริญตัณธนกุล)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการรับรองแล้ว .....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ญาณิน โอภาสพัฒนกิจ)
รองอธิการบดี ปฏิบัติการแทน
อธิการบดี มหาวิทยาลัยแม่โจ้
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

ชื่อเรื่อง การศึกษาฤทธิ์ของวิตามินซีและวิตามินอีต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสพีอาร์อาร์เอสในเซลล์ MARC-145 และศึกษาความเป็นพิษต่อ เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด monocyte-derived macrophages

ชื่อผู้เขียน นางสาวพิชานันท์ สืบสอาด

ชื่อปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก รองศาสตราจารย์ ดร.วศิน เจริญตัณธนกุล

บทคัดย่อ

โรคพีอาร์อาร์เอส (porcine reproductive and respiratory syndrome) ในสุกร เกิดจากเชื้อไวรัสใน Family *Arteriviridae* ซึ่งเป็นปัญหาหลักของเกษตรกรในปัจจุบัน เชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสมีการกลายพันธุ์อยู่ตลอดเวลา ทำให้วัคซีนที่มีอยู่ในปัจจุบันไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งไวรัสพีอาร์อาร์เอสได้อย่างครอบคลุม และส่งผลกระทบต่อสุกรที่กำลังตั้งท้อง งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของวิตามินซีและวิตามินอีต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสพีอาร์อาร์เอสในเซลล์ MARC-145 และศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด monocyte-derived macrophages (MDM) ซึ่งสามารถพบวิตามินซีและวิตามินอีได้ในพืชผักผลไม้เกือบทุกชนิด ทำการทดสอบโดยการนำวิตามินซีและวิตามินอีมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ MARC-145 โดยเลือกความเข้มข้นที่มากที่สุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ MARC-145 ได้แก่ 3.91 และ 15.63 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ด้วยวิธี crystal violet staining จากนั้นนำมาทดสอบการยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสพีอาร์อาร์เอสด้วยวิธี Cytopathic effect และ Immunoperoxidase monolayer assay พบว่า วิตามินที่ทดสอบสามารถยับยั้งไวรัสพีอาร์อาร์เอสได้ จึงนำไปศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด MDM โดยวิธีนับเซลล์ภายใต้กล้องด้วย Hemocytometer พบว่า ความเข้มข้นของวิตามินซีและวิตามินอีที่มากที่สุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด MDM คือ 31.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

คำสำคัญ : ไวรัสพีอาร์อาร์เอส, วิตามินซี, วิตามินอี, ต้านไวรัส, MARC-145, monocyte-derived macrophages

Title EVALUATION OF VITAMIN C AND VITAMIN E ON INHIBITION OF PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS IN MARC-145 CELLS AND CYTOTOXICITY IN MONOCYTE-DERIVED MACROPHAGES

Author Miss Phichanan Suebsa-ard

Degree Master of Science in Biotechnology

Advisory Committee Chairperson Associate Professor Dr. Wasin Charerntantanakul

ABSTRACT

Porcine reproductive and respiratory syndrome is caused by PRRS virus (PRRSV) which belongs to family *Arteriviridae.* It causes serious loss to swine industry. The virus can mutate rapidly, thus currently available vaccines cannot protect pigs from various PRRSV isolates and affect pregnant gilts. The objective of this study is to assess the effect of vitamin C and vitamin E on inhibition of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in MARC-145 cells and cytotoxicity in monocyte-derived macrophages. The tested vitamins vitamin C and vitamin E, which can be found in a variety of plants. The non-cytotoxic concentrations were determined in MARC-145 cells and were 3.91 and 15.63 ug/mL for vitamin C and vitamin E, respectively. Then, cytopathic effect and immunoperoxidase monolayer assay showed that the tested vitamins can inhibit PRRSV replication. And then to assess the effect of vitamins non-cytotoxic was determined in MDM by counting cells with a hemocytometer. The non-cytotoxic concentrations were determined in MDM cells was 31.25 ug/mL for vitamin C and vitamin E.

Keywords : PRRSV, vitamin C, vitamin E, antiviral, MARC-145, monocyte-derived macrophages

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ได้รับความกรุณาช่วยเหลือแนะนำจากคณาจารย์และผู้ช่วยนักวิจัย ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.วศิน เจริญตัณธนกุล อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก อาจารย์ ดร.สมคิด ดีจริง และรองศาสตราจารย์ ดร.วาที คงบรรทัด อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ให้คำแนะนำ ตรวจสอบและแก้ไขให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้มีความสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ฐปนีย์ สารครศรี ประธานกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ตลอดจนให้คำปรึกษาแนะนำ

ขอบคุณคุณรุ่งทิพย์ กาวารี เจ้าหน้าที่นักวิทยาศาสตร์ ที่ให้คำปรึกษาสนับสนุนสารเคมี เครื่องมือและอุปกรณ์ตลอดจนให้คำแนะนำในการปฏิบัติงานในการทำวิจัยครั้งนี้

สิ่งอื่นใดข้าพเจ้าขอมอบคุณประโยชน์ของวิทยานิพนธ์เล่มนี้ขอมอบให้แก่นายวันชัย สืบสอาด และ นางวศินี สืบสอาด ผู้ซึ่งเป็นบิดามารดาของข้าพเจ้า ทั้งยังอบรมสั่งสอนชี้แนะ และสนับสนุนทุกการทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้ให้สำเร็จลุล่วงมาได้ด้วยดีจวบจนประสบความสำเร็จในด้านการศึกษา

พิชานันท์ สืบสอาด

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ค

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ง

กิตติกรรมประกาศ ..... จ

สารบัญ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ซ

สารบัญภาพ ..... ฌ

สารบัญภาพภาคผนวก ..... ญ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2

1.3 ขอบเขตของการวิจัย 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3

บทที่ 2 ทฤษฎีและการตรวจเอกสาร 4

โรคพีอาร์อาร์เอส หรือ Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) 4

กลไกในการก่อโรคของไวรัส (pathogenesis) 5

การแบ่งตัวของไวรัสพีอาร์อาร์เอส 5

การตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันของไวรัสพีอาร์อาร์เอส (immune response) 6

การวินิจฉัยโรคพีอาร์อาร์เอส 7

วิตามินที่ใช้ในการศึกษา 7

ชนิดและหน้าที่ของเม็ดเลือดขาว 11

หน้าที่ของเม็ดเลือดขาว 12

วิธีที่ใช้ในการตรวจสอบไตเตอร์ของไวรัสในงานวิจัย 14
บทที่ 3 วิธีการวิจัย 15
3.1 สถานที่ทำการทดลอง 15
3.2 วิธีการวิจัย 15
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์ 16
4.1. ผลของการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ MARC-145 ของวิตามินซีและวิตามินอี 16
4.2. ผลของการศึกษาฤทธิ์ของวิตามินซีและวิตามินอีต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสพีอาร์อาร์เอสในเซลล์ MARC-145 โดยวิธี CPE และวิธี IPMA 18
4.3. ผลของการศึกษาและระบุปริมาณของวิตามินซีและวิตามินอีที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด MDM ด้วยวิธี trypan blue dye exclusion assay 22
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ 25
ภาคผนวก 26
ภาคผนวก ก วิธีการวิจัย 27
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมีในการทดสอบกับเซลล์ MARC-145 35
ภาคผนวก ค การเตรียมสารเคมีในการทดสอบกับเซลล์เม็ดเลือดขาว 38
ภาคผนวก ง ผลการทดลอง 39
บรรณานุกรม 45
ประวัติผู้วิจัย 51

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ MARC-145 ของวิตามินซี.....16
ตารางที่ 2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ MARC-145 ของวิตามินอี.....17
ตารางที่ 3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ MDM ของวิตามินซี.....23
ตารางที่ 4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ MDM ของวิตามินอี.....24

มหาวิทยาลัยแม่โจ้ MAEJO UNIVERSITY

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 โครงสร้างจีโนมของไวรัสพีอาร์อาร์เอส.....5
ภาพที่ 2 สูตรโครงสร้างทางเคมีของวิตามินซี.....7
ภาพที่ 3 สูตรโครงสร้างทางเคมีของวิตามินอี.....9
ภาพที่ 4 เซลล์เม็ดเลือดขาว (white blood cells) 11
ภาพที่ 5 เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte.....12
ภาพที่ 6 ฤทธิ์ของวิตามินซีต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสพีอาร์อาร์เอสในเซลล์ MARC-145 โดยวิธี CPE.....19
ภาพที่ 7 ฤทธิ์ของวิตามินอีต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสพีอาร์อาร์เอส ในเซลล์ MARC-145 โดยวิธี CPE.....19
ภาพที่ 8 ฤทธิ์ของวิตามินซีต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสพีอาร์อาร์เอส ในเซลล์ MARC-145 โดยวิธี IPMA.....20
ภาพที่ 9 ฤทธิ์ของวิตามินอีต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสพีอาร์อาร์เอส ในเซลล์ MARC-145 โดยวิธี IPMA.....21

สารบัญภาพภาคผนวก

หน้า

ภาพที่ 10 ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ MARC-145 ของวิตามินซี
วิเคราะห์โดย ANOVA.....39
ภาพที่ 11 ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ MARC-145 ของวิตามินซี
วิเคราะห์โดย Tukey HSD[a].....39
ภาพที่ 12 ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ MARC-145 ของวิตามินซี.....40
ภาพที่ 13 ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ MARC-145 ของวิตามินอี
วิเคราะห์โดย ANOVA.....40
ภาพที่ 14 ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ MARC-145 ของวิตามินอี
วิเคราะห์โดย Tukey HSD[a].....41
ภาพที่ 15 ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ MARC-145 ของวิตามินอี.....41
ภาพที่ 16 ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ MDM ของวิตามินซีที่ 36 ชั่วโมง.....42
ภาพที่ 17 ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ MDM ของวิตามินอีที่ 36 ชั่วโมง.....42
ภาพที่ 18 ภาพแสดงเซลล์ MARC-145.....43
ภาพที่ 19 เซลล์เชื้อไวรัส PRRS ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ.....43
ภาพที่ 20 เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด peripheral blood mononuclear cell.....44
ภาพที่ 21 เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด MDM.....44

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญของปัญหา

โรคพีอาร์อาร์เอสในสุกร เกิดจากเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส (porcine reproductive and respiratory syndrome virus : PRRSV) เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคและกลุ่มอาการบกพร่องเกี่ยวกับระบบสืบพันธุ์และระบบทางเดินหายใจในสุกร (Galliher-Beckley *et al.*, 2015) ซึ่งในปัจจุบันเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสมีการกลายพันธุ์ของจีโนมมาก ส่งผลทำให้วัคซีนที่ผลิตออกมานั้นไม่สามารถรักษาได้ครอบคลุมทุกสายพันธุ์ของไวรัส อีกทั้งยังมีราคาแพง โดยปกติเป็นที่ทราบกันดีว่าเอนไซม์และปฏิกิริยาบางชนิดมีกลไกที่สามารถกำจัดสารอนุมูลอิสระและกำจัดสิ่งแปลกปลอม (แอนติเจน) ได้ นอกจากนี้ยังพบว่า มีวิตามินที่จำเป็นบางชนิดสามารถมีฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระและช่วยเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกันได้ด้วยเช่นกัน ตัวอย่างเช่น วิตามินซีและวิตามินอี จึงเป็นสาเหตุที่เลือกใช้วิตามินซีและวิตามินอีในการศึกษาวิจัยเล่มนี้ ซึ่งวิตามินทั้ง 2 ชนิดนี้สามารถพบได้ทั่วไปในพืช ผัก ผลไม้และเป็นวิตามินที่มีประโยชน์ต่อร่างกายมนุษย์และสัตว์ ทั้งยังเป็นตัวช่วยในการชะลอความเสียหายของเซลล์ โดยจะปกป้องเซลล์จากสารอนุมูลอิสระได้อีกด้วย (Chan, 1993) โดยวิตามินซี (vitamin C) หรือ กรดแอล-แอสคอร์บิก (L-ascorbic acid) ซึ่งสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมส่วนใหญ่สามารถสังเคราะห์วิตามินซีได้เอง แต่เมื่อเกิดการติดเชื้อจากแบคทีเรีย ไวรัส หรือโปรตัวซัว ส่งผลให้สัตว์ที่สังเคราะห์วิตามินซีได้เองนั้นอาจมีประสิทธิภาพในการผลิตวิตามินซีลดลง (Hemilä, 2017) จึงต้องมีการให้วิตามินซีเสริมเข้าไป เพื่อเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกัน ทั้งยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีบ(Hemilä, 2017)ทบาทในการรักษาบาดแผล ช่วยป้องกันหรือชะลอการเกิดมะเร็งบางชนิด โรคหัวใจและหลอดเลือด เป็นต้น ทั้งยังมีบทบาทสำคัญในการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันอีกด้วย (Jacob and Sotoudeh, 2002) และมีงานวิจัยศึกษาพบว่าเมื่อให้วิตามินซีแก่ผู้ป่วยที่มีอาการภาวะทางระบบทางเดินหายใจเฉียบพลัน ซึ่งมีนัยสำคัญกับโรคปอดบวมโดยให้รับประทานวิตามินซี 200 มิลลิกรัม/วัน ส่งผลให้ปริมาณวิตามินซีในเม็ดเลือดขาวและในพลาสมามีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญส่งผลให้ภาวะระบบทางเดินหายใจดีขึ้น (Hunt *et al.*, 1994) และช่วยลดระยะเวลาในการเป็นโรคหวัด (Hemila, 2017) สามารถพบวิตามินซีได้ในพืช ผัก และผลไม้ ได้แก่ ผักบุ้ง ดอกกะหล่ำ ฝรั่ง มะนาว มะม่วง ส้ม เป็นต้น ในส่วนของวิตามินอี (vitamin E) หรือ แอลฟา-โทโคเฟอรอล (alpha-tocopherol) มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สามารถละลายได้ในไขมัน โดยส่วนใหญ่จะทำหน้าที่เกี่ยวกับระบบเลือด ช่วยในการยับยั้งการสะสมของเกล็ดเลือด ทั้งยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ในร่างกาย ช่วยเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกันได้เป็นอย่างดี เนื่องจากมีผลงานวิจัยพบว่า พบ

วิตามินอีมากที่สุดในระบบภูมิคุ้มกัน (Tengerdy *et al.*, 1973) เราสามารถพบวิตามินอีได้ในจำพวกธัญพืช และผักใบเขียว (Krinsky *et al.*, 2000)

เมื่อมีการระบาดของโรคพีอาร์อาร์เอสส่งผลให้ผลผลิตทางด้านปศุสัตว์ในส่วนของสุกรนั้นลดน้อยลง ซึ่งเกษตรกรเป็นผู้ได้รับผลกระทบโดยตรงจากไวรัสชนิดนี้ค่อนข้างมาก จึงเป็นที่มาของการศึกษาฤทธิ์ของวิตามินซีและวิตามินอีต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสพีอาร์อาร์เอสในเซลล์ MARC-145 และศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด monocyte-derived macrophages (MDM)

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาความเข้มข้นของวิตามินซีและวิตามินอีที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ MARC-145 ด้วยวิธี crystal violet staining
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของวิตามินซีและวิตามินอีต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสพีอาร์อาร์เอสในเซลล์ MARC-145 โดยวิธี cytopathic effect assay (CPE) และวิธี immunoperoxidase monolayer assay (IPMA)
3. เพื่อศึกษาและระบุปริมาณของวิตามินซีและวิตามินอีที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด MDM ด้วยวิธี trypan blue dye exclusion assay

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษาฤทธิ์ของวิตามินซีและวิตามินอีต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสพีอาร์อาร์เอสในเซลล์ MARC-145 และศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด monocyte-derived macrophage

ประชากรที่ใช้ในการทำวิจัยคือ ไวรัสพีอาร์อาร์เอส (PRRSV) และเซลล์ MARC-145 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลือดสุกร ได้รับความอนุเคราะห์จากคณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัยคือ วิตามินซีและวิตามินอี โดยกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัยคือฤทธิ์ของวิตามินซีและวิตามินอีต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสพีอาร์อาร์เอสในเซลล์ MARC-145 และความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด MDM

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากวิตามินซี และวิตามินอีที่มีฤทธิ์ต่อการต้านเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส อย่างน้อย 1 สูตร
2. เมื่อระบุปริมาณของวิตามินซีและวิตามินอีที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ MDM ได้แล้วสามารถนำไปต่อยอดเพื่อศึกษาฤทธิ์ต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้
3. ด้านการเกษตรและอุตสาหกรรมทางด้านสุกรได้ผลผลิตที่มีคุณภาพมากยิ่งขึ้น

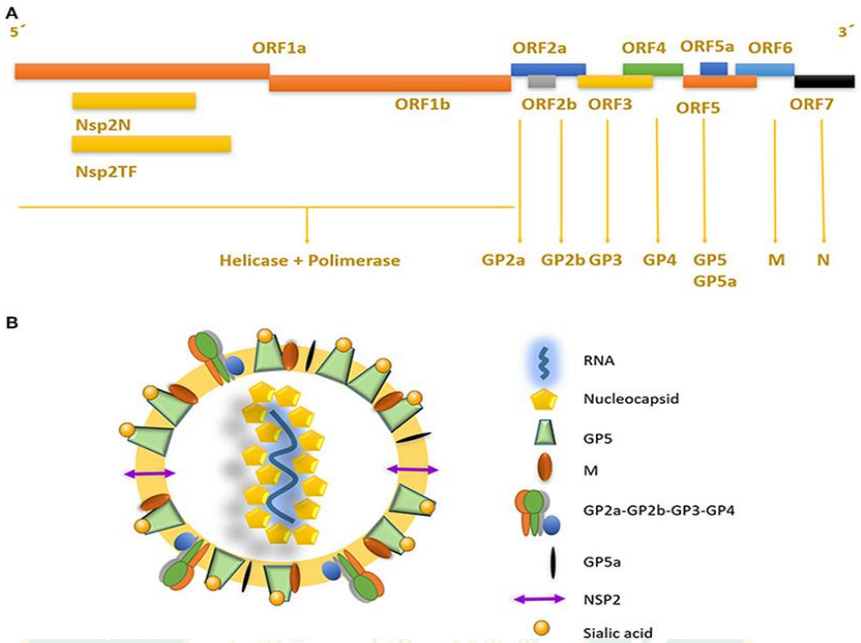
มหาวิทยาลัยแม่โจ้ MAEJO UNIVERSITY

บทที่ 2
ทฤษฎีและการตรวจเอกสาร

โรคพีอาร์อาร์เอส หรือ Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS)

เป็นโรคที่ส่งผลให้เกิดกลุ่มอาการทางระบบสืบพันธุ์และระบบทางเดินหายใจ โรคนี้เกิดจากเชื้อไวรัสกลุ่มแฟมิลี่ *Arteriviridae* ซึ่งมีจีโนมเป็น RNA ชนิด positive single stranded RNA เป็นไวรัสที่มีเปลือกหุ้ม (enveloped) (Collins *et al.*, 1992) ด้วยเหตุนี้ส่งผลให้ไวรัสพีอาร์อาร์เอสสามารถกลายพันธุ์ได้ง่ายทำให้ยากต่อการควบคุมและรักษา โดยไวรัสพีอาร์อาร์เอสแบ่งออกเป็น 2 สายพันธุ์ คือ PRRSV-1 (European genotype) และ PRRSV-2 (North American genotype) (Montaner-Tarbes *et al.*, 2019) ตามลำดับ ซึ่งล่าสุดมีผลการรายงานออกมาว่า PRRSV-2 ในประเทศจีน มีการพัฒนาด้านสายพันธุ์ที่รุนแรงขึ้น (Zhou *et al.*, 2008) อนุภาคของไวรัสชนิดนี้มีขนาดเล็กโดยประมาณ 45-65 นาโนเมตร ซึ่งประเทศไทยได้รับผลกระทบจากเชื้อไวรัสชนิดนี้ มีการพบไวรัสทั้ง 2 สายพันธุ์ และอาจพบไวรัสทั้งสองสายพันธุ์ในสุกรตัวเดียวกันได้ มีการศึกษาพบว่าไวรัสสายพันธุ์ PRRSV-2 มีการกระจายอยู่ทั่วในประเทศไทยโดยเฉพาะสายพันธุ์ HP-PRRSV

โดยโครงสร้างลำดับจีโนมของไวรัสพีอาร์อาร์เอส ระบุว่าไวรัสพีอาร์อาร์เอสมีขนาดจีโนมประมาณ 15 กิโลไบต์ ซึ่งประกอบด้วย 10 Open Reading Frames (ORFs) โดยมีการ replicase genes จากด้านปลาย 5'-end (5'-cap) แล้วถอดรหัสโปรตีนไปทางด้าน 3'-end (3'-polyadenylation) (Nelsen *et al.*, 1999) เมื่อถอดรหัสของจีโนมออกมาแล้วประมาณ 60-70% ของโปรตีนจะเกี่ยวข้องกับการ replication ของ ORF1a และ ORF1b เป็นโปรตีนประกอบด้วย Nsp2N และ Nsp2TF ในขณะที่ ORFs2-7 ถอดรหัสของโครงสร้างของโปรตีนได้เป็น GP2a-b, GP3, GP4, GP5 และ GP5a, โปรตีน M และ โปรตีน N ดังภาพที่ 1(A, B) (Montaner-Tarbes *et al.*, 2019)



ภาพที่ 1 โครงสร้างจีโนมของไวรัสพีอาร์อาร์เอส

ที่มา: https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00038 [25 กันยายน 2564]

กลไกในการก่อโรคของไวรัส (pathogenesis)

เมื่อสุกรได้รับไวรัสเข้าสู่ร่างกายจะเข้าไปแบ่งตัวในเซลล์เม็ดเลือดขาว หลังจากนั้นไวรัสจะเข้าไปทำลายเซลล์แมคโครฝาจ (macrophage) แล้วแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลือง ปอดและเนื้อเยื่อต่างๆ ตามลำดับ ซึ่งบางสายพันธุ์ที่มีความก่อโรครุนแรงมักจะพบภาวะติดเชื้อไวรัสในกระแสเลือดด้วย (viremia) ภายใน 12 ชั่วโมงหลังจากได้รับเชื้อเข้าสู่ร่างกาย แต่บางสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรครุนแรงอาจใช้เวลาประมาณ 24 ชั่วโมงหลังจากได้รับเชื้อเข้าสู่ร่างกาย โดยปริมาณของไวรัสนั้นจะเพิ่มสูงขึ้นภายใน 7-14 วัน และจะพบว่าที่ปอดมีปริมาณไวรัสสูงที่สุด นอกจากนี้ยังสังเกตได้ว่าเซลล์เป้าหมายของเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส คือ Pulmonary Alveolar Macrophages (PAM) และ Pulmonary Intravascukar Macrophages (PIM) ที่อยู่ภายในปอด (หนูจันทร์, 2554)

การแบ่งตัวของไวรัสพีอาร์อาร์เอส

เซลล์เป้าหมายหลักในการแบ่งตัวของไวรัสพีอาร์อาร์เอสคือ dendritic cell, monocyte และ macrophage lineage และเซลล์ในระบบน้ำเหลือง (ทิพวัลย์, 2561) (Thanawongnuwech *et al.*, 2000) โดยมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนที่เยื่อบุทางเดินหายใจในเยื่อหุ้มปอด PAMs (porcine alveolar macrophages) ไวรัสพีอาร์อาร์เอสเข้าสู่เซลล์โดยวิธี receptor-mediated endocytosis

คือการนำสารพันธุกรรมของไวรัสเข้าไปในเซลล์โดยที่ผิวเซลล์ของเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) มี receptor จำเพาะต่อไวรัสพีอาร์อาร์เอสคือ heparin sulfate GAGs (glycosaminoglycans), CD163 และ sialoadhesin (Thanawongnuwech *et al.*, 2000) (Delputte *et al.*, 2005) แสดงถึงความสัมพันธ์ของ GP2, GP3 และ GP4 กับ CD163 เมื่อไวรัส (virion) จับกับ sialoadhesin เรียบร้อยแล้ว มีการปล่อยสารพันธุกรรมเข้าไปในเซลล์ host ด้วยวิธี viral internalization endocytosis เข้าสู่เซลล์ host โดย CD163 (Calvert *et al.*, 2007) หลังจากนั้นเกิดการ uncoating แล้ว host cell ปล่อยเอนไซม์มาสลาย capsid จากนั้นเกิดปฏิกิริยา gene replication ใน cytoplasm โดยมี RNA polymerase และ RNA helicase เป็นเอนไซม์หลักในปฏิกิริยา gene replication (Van Dinten *et al.*, 1996)

gene replication

$^{+}5'$———— $^{-}3'$

↓ translation to replicase polyproteins

replication and transcription factor complex (RTC) (Snijder *et al.*, 2013)

↓

สังเคราะห์ minus-strand RNA synthesis (transcription)

ได้ subgenomic (sg) negative-sense RNAs เป็น template ในการสังเคราะห์ positive-strand mRNA synthesis

$^{-}3'$ ———— $^{+}5'$

จากนั้นมีการสร้าง nucleocapsid ออกมาเพื่อ budding ออกจากเยื่อหุ้มเซลล์ แล้วเกิดการปล่อย virion โดยวิธี exocytosis (Lunney *et al.*, 2016)

การตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันของไวรัสพีอาร์อาร์เอส (immune response)

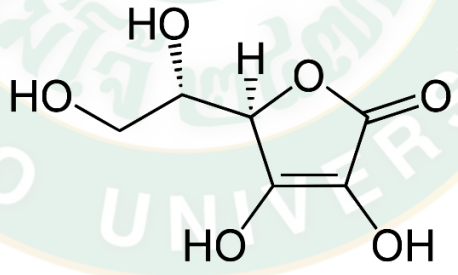
หลังจากเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอสเข้าสู่สุกรแล้วระยะเวลาหนึ่งพบว่าไวรัสพีอาร์อาร์เอสส่งผลให้มีการกดภูมิคุ้มกันในร่างกายของสุกร โดยการลดการตอบสนองของการสื่อสารการอักเสบ หรือเรียกว่า inflammatory cytokines (คือ IFN-beta, IFN-alpha, TNF-alpha และ IL-1) (Van Reeth *et al.*, 1999) จากการศึกษาของ (Beura *et al.*, 2010) พบว่า nsp-1 beta ยับยั้ง TLR3-mediated signaling pathways และลดการสร้าง IFN-beta ส่วน nsp-2 ลดการสร้าง TNF-alpha และ IL-1 (Chen *et al.*, 2010)

การวินิจฉัยโรคพีอาร์อาร์เอส

1. การตรวจทางซีรัมวิทยา โดยตรวจเพื่อประเมินสภาพของฟาร์มว่าได้รับผลกระทบในระดับใด โดยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
2. การตรวจหาไวรัสหรือแอนติเจน สามารถตรวจได้โดยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) การตรวจหาแอนติเจนโดยวิธี Immunohistochemistry โดยจะส่งเนื้อเยื้อปอด และน้ำเหลือง
3. การตรวจแยกชนิดของไวรัสโดยวิธี Sequencing ส่วนของ ORF5, ORF7 หรือ NSP2 (สมาคมสัตวแพทย์ควบคุมฟาร์มสุกรไทย, 2554)

วิตามินที่ใช้ในการศึกษา

1. วิตามินซี (Vitamin C or L-ascorbic acid)
   สูตรโมเลกุล $C_6H_8O_6$
   น้ำหนักโมเลกุล 176.13
   จุดหลอมเหลว 190-192 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 2 สูตรโครงสร้างทางเคมีของวิตามินซี
ที่มา: https://en.wikipedia.org/wiki/Vitamin_C [25 กันยายน 2564]

วิตามินซีเป็นสารอินทรีย์ที่สามารถละลายได้ในน้ำ มีโครงสร้างทางเคมีดังภาพที่ 2 เป็นสารที่แตกตัวให้อิเล็กตรอน (electron donor) ทั้งยั้งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นโคแฟกเตอร์จำเพาะและไม่จำเพาะต่อปฏิกิริยาทางเอนไซม์ หรือเป็นโมเลกุลควบคุม (Carr and Lykkesfeldt, 2018) ซึ่งสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมโดยส่วนใหญ่นั้นร่างกายสามารถสังเคราะห์วิตามินซีได้เอง แต่เมื่อเกิดการติดเชื้อจากแบคทีเรีย ไวรัส หรือโปรตัวซัว ความเข้มข้นของวิตามินซีและเม็ดเลือดขาวในพลาสมาลดลง

เนื่องจากสัตว์ที่ผลิตวิตามินซีได้เองนั้นมีประสิทธิภาพในการผลิตลดลง จึงต้องมีการเสริมวิตามินซีเพิ่มเข้าไป พบว่าการเสริมวิตามินซีช่วยซ่อมแซมระบบภูมิคุ้มกัน เช่น ช่วยเพิ่มจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาว ทำให้มีฤทธิ์ในการต้านจุลชีพมากขึ้น ทั้งยังช่วยปรับสมดุลของปฏิกิริยารีดอกซ์ของเซลล์ และเป็นสารเคมีบำบัด (Wintergerst *et al.*, 2006) มีฤทธิ์ในการต้านเลือดออกตามไรฟันในมนุษย์ ทั้งยังช่วยยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา peroxidation ของเนื้อเยื่อ phospholipids และเป็นสารจำเป็นในการสังเคราะห์ฮอร์โมน และเป็นสารสื่อประสาท (Shaik-Dasthagirisaheb *et al.*, 2013)

โดยดั้งเดิมวิตามินซีให้เป็นที่รู้จักกันในเรื่องของการช่วยลดหรือบรรเทาและป้องกันการติดเชื้อจากไวรัส แบคทีเรีย หรือโปรโตซัวได้ โดยเฉพาะช่วยลดระยะการเป็นโรคหวัด ซึ่งบทบาทที่สำคัญนั้นยังระบุได้ไม่แน่ชัด (Hemila, 2017) นอกจากนี้วิตามินซียังช่วยลดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ ลดอัตราการเป็นโรคปอดบวมซึ่งมีนัยสำคัญกับโรคเลือดออกตามไรฟันอันเนื่องมาจากการขาดวิตามินซี โรคมาลาเรียและโรคท้องร่วงได้ (Wintergerst *et al.*, 2006)

มีงานวิจัยหนึ่งศึกษาเกี่ยวกับวิตามินซีโดยการเสริมวิตามินซีให้แก่ผู้ป่วยสูงอายุที่ติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจแบบเฉียบพลัน คือมีอาการหลอดลมอักเสบและโรคปอดบวม โดยให้ยาปฏิชีวะนะ ที่ 2 และ 4 สัปดาห์หลังเข้ารับการรักษา จากนั้นให้วิตามินซี 200 มิลลิกรัม/วัน ส่งผลให้ปริมาณของวิตามินซีในเม็ดเลือดขาวและในพลาสมามีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ทำให้ภาวะระบบทางเดินหายใจดีขึ้น (Hunt *et al.*, 1994)

ฤทธิ์ของวิตามินซีในการยับยั้งไวรัส

กลไกของวิตามินซีต่อการยับยั้งไวรัส A/FM/1/47(H1N1) ที่ก่อให้เกิดโรคปอดบวมในหนูทดลองโดยการให้หนูกินวิตามินซีปริมาณ 125 และ 250 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ส่งผลให้วิตามินซีไปลดการแสดงออกของยีน mitochondrial antiviral signaling (MAVS) และ interferon regulatory factor 3 (IRF3) แล้วกระตุ้นให้เกิดการสร้างยีน NF-κB จากนั้นทำงานร่วมกันแล้วเกิดสร้าง type I interferons (IFNs) ไปยับยั้งไวรัสนั่นเอง (Cai *et al.*, 2015)

โสมแดงและวิตามินซีช่วยลดการอักเสบของปอดที่เกิดจากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (influenza A virus/H1N1) และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน โดยวิตามินซีจะกระตุ้นการผลิต T cell เนื่องจากพบการแสดงออกของยีนส์ CD69, CD 25 และ $CD3^+$ T cell ซึ่งตรวจสอบโดยวิธี flow cytometry เมื่อบ่มที่ 48 ชั่วโมง นอกจากกระตุ้นการผลิต T cell แล้วยังมีฤทธิ์ในการช่วยการกระตุ้นการทำงานของ NK cells อีกด้วย (Kim *et al.*, 2016)

การศึกษาของ Kim *et al.* (2016) พบว่า โสมแดงและวิตามินซีสามารถยับยั้งเชื้อไวรัส kaposi's sarcoma associated herpesvirus (KSHV) หรือที่เรียกว่า HHV-8 ซึ่งเกิดจากเชื้อไวรัส human herpesvirus 8 โดยโสมแดงและวิตามินซีจะลดการแสดงออกของ RTA และ K8 ที่เกิดจาก

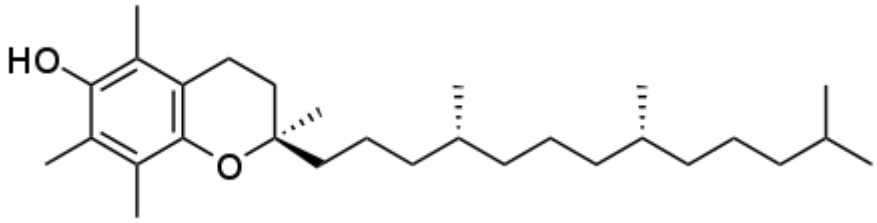
TPA ใน BCBL-1 กล่าวคือโสมแดงและวิตามินซียับยั้งการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักร lytic

2. วิตามินอี (vitamin E or alpha-tocopheral)

สูตรโมเลกุล $C_{29}H_{50}O_2$

น้ำหนักโมเลกุล 430.71

จุดเดือด 235 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของวิตามินอี

ที่มา: https://th.wikipedia.org [25 กันยายน 2564]

วิตามินอีเป็นกลุ่มสารประกอบอินทรีย์ที่ละลายได้ในไขมัน ใช้เรียกในกลุ่มของ tocopherols และ tocotrienols มีโครงสร้างทางเคมีดังภาพที่ 3 ซึ่งร่างกายไม่สามารถผลิตขึ้นมาเองได้ จึงต้องมีการรับประทานเพิ่มเข้าไป ส่วนใหญ่จะพบวิตามินอีในพืช ธัญพืช เช่น น้ำมันข้าวโพด เมล็ดถั่ว และจากสัตว์ เช่น ปลาที่มีไขมันสูง น้ำมันตับปลา เนื้อสัตว์ ไข่ ตับ เป็นต้น ซึ่ง alpha-tocopheral มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สูงที่สุด และมีบทบาทมากที่สุดในระบบภูมิคุ้มกัน ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระในการปกป้องเยื่อหุ้มเซลล์ อันเนื่องมาจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว (Lewis *et al.*, 2019) เมื่อมีการเกิดกระบวนการเผาผลาญในร่างกาย และช่วยในการเสริมสร้างภูมิต้านทานในร่างกายให้แข็งแรงมากยิ่งขึ้น (Brigelius-Flohé and Traber, 1999) โดยวิตามินอีจะเข้าสู่ร่างกายในลักษณะคล้ายกับไขมันผ่านพลาสมาและจับกับชั้นไขมัน lipoproteins ถูกดูดซึมที่ลำไส้เล็ก และเก็บในรูปแบบ chylomicrons ซึ่งสามารถเคลื่อนที่ผ่านน้ำเหลืองโดยทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ lipoprotein lipase และกระจายเคลื่อนที่ไปยังเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของร่างกาย และมีฤทธิ์ในการป้องกันเกี่ยวกับการเกิดโรคเรื้อรัง (Herrera and Barbas, 2001) มีรายงานว่าโรคขาดวิตามินอีมาจากการที่ลำไส้มีการดูดซึมที่ผิดปกติ คือมีปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นช้า (delayed-type hypersensitivity: DTH) (Kowdley *et al.*, 1992)

บทบาทของวิตามินอีในด้านของระบบภูมิคุ้มกันเป็นที่รู้กันว่าวิตามินอีมีความสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันมาก เนื่องจากพบปริมาณความเข้มข้นของวิตามินอีในระบบภูมิคุ้มกันมากกว่าเซลล์ส่วนอื่น มีการศึกษาในสัตว์และมนุษย์ที่ขาดวิตามินอี ส่งผลให้เกิดภูมิคุ้มกันบกพร่องทั้งในระดับร่างกาย คือมีการผลิตแอนติบอดีลดลงโดยเฉพาะ T cell ในหนู (Tengerdy *et al.*, 1973) และมีการเพิ่มจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวบกพร่องในสุกร (Jensen *et al.*, 1988) ลูกแกะ (Turner and Finch, 1990) สุนัข (Langweiler *et al.*, 1981) ไก่ (Chang *et al.*, 1994) และหนู (Eskew *et al.*, 1985) ทำให้ต้องมีการเพิ่มวิตามินอีที่ปริมาณพอเหมาะ เพื่อช่วยเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกันโดยจะไปช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานของ T cell ซึ่งมีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์โดยตรง (Lewis *et al.*, 2019)

มีการศึกษาพบว่า บทบาทของวิตามินอีในด้านระบบภูมิคุ้มกันมีความสัมพันธ์กับการลดความเสี่ยงของโรค เช่น โรคปอดบวม ไข้หวัดใหญ่ การติดเชื้อทางเดินหายใจ โรคภูมิแพ้บางชนิด เช่น โรคหอบหืด การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ เช่น *Streptococcus pneumonia* (Lewis *et al.*, 2019)

ฤทธิ์ของวิตามินอีในการยับยั้งไวรัส

มีการศึกษาผลของเซเลเนียม (Se) และวิตามินอีต่อการตอบสนองภูมิคุ้มกันจากการติดเชื้อไวรัส parainfluenza virus ซึ่งเป็นเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจ หลังจากลูกแกะป่วยด้วยเชื้อไวรัสดังกล่าวได้ทำการรักษาโดยการให้ Se 2 มิลลิกรัม/กิโลกรัมของอาหาร และวิตามินอี 20 มิลลิกรัม/กิโลกรัมของอาหาร ตามลำดับ พบว่า ระยะเวลาหลัง 10 สัปดาห์ ปริมาณ glutathione peroxidase (GSH-Px) เพิ่มขึ้น immunoglobulin M (IgM) ในเซรั่มเพิ่มขึ้น ระดับแอนติบอดีเพิ่มขึ้น (Reffett *et al.*, 1988)

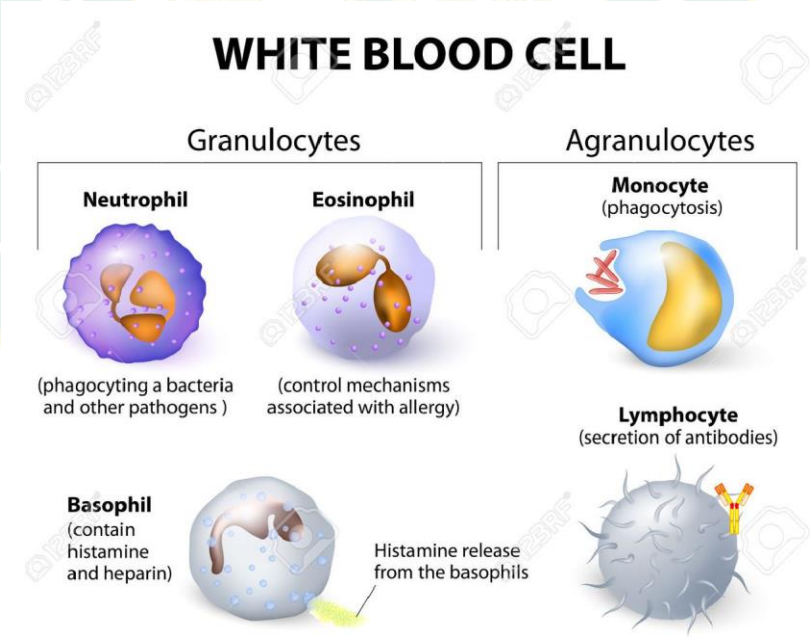
โรคปอดบวม มีการศึกษาหนูที่ติดเชื้อ *Streptococcus pneumonia* และเกิดการอักเสบที่ปอด มีภาวะนิวโทรฟิลแทรกซึม และภาวะแบคทีเรียในปอด และเมื่อเสริมด้วยวิตามินอี 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า วิตามินอีสามารถลดนิวโทรฟิลและการผลิตสารไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับอาการอักเสบได้ซึ่งสัมพันธ์กับภาวะเลือดเป็นพิษที่ลดลง ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าวิตามินอีสามารถทำปฏิกิริยากับระบบภูมิคุ้มกันช่วยลดแบคทีเรียในปอดได้ (Ghanem *et al.*, 2015)

โรคไข้หวัดใหญ่มีอาการคล้ายกับโรคปอดบวม จะมีภาวะน้ำหนักลดลงและการตายเกิดขึ้น (Bender *et al.*, 1991) ซึ่งมีการผลิต Th1 cytokines IL-2 และ IFN-γ และมีการติดเชื้อไวรัสในปอดสูงหลังจากติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ influenza A/Port Chalmers/1/27/(H3N2) (Hayek *et al.*, 1997) จากนั้นมีการเสริมวิตามินอี 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เป็นเวลา 30 วัน พบว่า มีการตอบสนองต่อ Th1 เพิ่มขึ้นและช่วยปรับสภาวะในปอดให้ดีขึ้น

ชนิดและหน้าที่ของเม็ดเลือดขาว

เม็ดเลือดขาว (white blood cells : WBCs หรือ leucocytes) เป็นที่รู้จักกันดีว่าเม็ดเลือดขาวมีบทบาทหน้าที่ที่สำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย คือการกำจัดเชื้อโรค รวมทั้งสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู้ร่างกายหรือที่เรียกว่า แอนติเจน (antigen) เช่น ไวรัส แบคทีเรีย เชื้อรา และปรสิต เป็นต้น (Kutlu *et al.*, 2020) เม็ดเลือดขาวมีแหล่งที่สร้างจาก ไขกระดูก ม้าม และต่อมน้ำเหลือง โดยเม็ดเลือดขาว (Fitri *et al.*, 2020) แบ่งออกเป็น 5 ชนิด ดังภาพที่ 4 คือ

1. ลิมโฟไซต์ (lymphocytes)
2. นิวโทรฟิลล์ (neutrophils)
3. อีโอซิโนฟิลล์ (eosinophils)
4. เบโซฟิลล์ (basophils)
5. โมโนไซต์ (monocytes)



ภาพที่ 4 เซลล์เม็ดเลือดขาว (white blood cells)

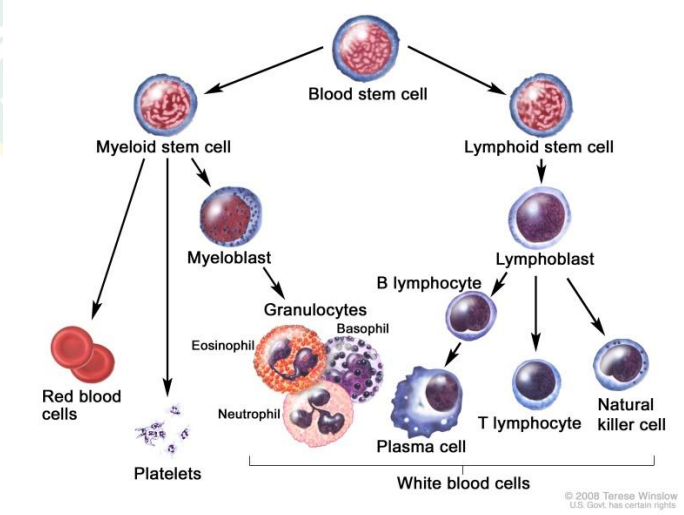
ที่มา: https://www.123rf.com/photo_52698232_types-of-white-blood-cells-infographics.html [25 กันยายน 2564]

หน้าที่ของเม็ดเลือดขาว

1. ลิมโฟไซต์ (lymphocytes)

   พบมากที่สุดในระบบต่อมน้ำเหลือง มีทั้งหมด 3 ชนิด ดังภาพที่ 5 คือ B cell, T cell และ NK cell

   - B cell จะสร้างและพัฒนาเจริญที่ไขกระดูก มีหน้าที่ในการสร้างแอนติบอดีออกมาจับกับเชื้อโรค เกี่ยวข้องกับการสร้างภูมิคุ้มกันและ B cell บางส่วนจะทำหน้าที่เป็น memory system คือจดจำสิ่งแปลกปลอมเหล่านั้นแล้วสร้างแอนติบอดี กล่าวคือ เมื่อเกิดการติดเชื้อชนิดนั้นอีก B cell ก็จะสร้างแอนติบอดีออกมากำจัดแอนติเจนนั้นได้เลย เนื่องจากเคยมีการติดเชื้อนั้นมาแล้ว
   - T cell จะพัฒนาและเจริญที่ต่อมธัยมัส (thymus) มีหน้าที่ในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมหรือแอนติเจนที่เข้าสู่ร่างกายโดยตรง เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันและแบ่งออกเป็น 3 ชนิด คือ cytotoxic T cell, Helper T cell และ memory T cell
   - NK cell (natural killer cells) หรือเซลล์นักฆ่า มีหน้าที่ทำลายสิ่งแปลกปลอมหรือแอนติเจนที่เข้ามา โดยไม่ต้องเกิดการกระตุ้นหรือการเรียนรู้ต่อแอนติเจนนั้น กล่าวคือสามารถทำลายไวรัสหรือเซลล์มะเร็งในระยะเริ่มแรก (Cheent and Khakoo, 2009)



ภาพที่ 5 เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte

ที่มา: https://www.siamhealth.net/public_html/Health/Lab_interprete/lymph.html [25 กันยายน 2564]

2. นิวโทรฟิลล์ (neutrophils) พบมากที่สุดในกระแสเลือด มีหน้าที่ในการป้องกันการติดเชื้อจากพวกเชื้อราหรือแบคทีเรีย โดยการปล่อยเอนไซม์ออกมาย่อยสลายผนังของแอนติเจนนั้นๆ และโอบล้อมกินเชื้อโรคโดยวิธีฟาโกไซโทซิส เมื่อทำลายแอนติเจนนั้นๆแล้วนิวโทรฟิลล์จะตายไปพร้อมกับแอนติเจน แล้วจะกลายเป็นหนอง
3. อีโอซิโนฟิลล์ (eosinophils) มีหน้าในการทำลายสิ่งแปลกปลอมและโอบล้อมกินเชื้อโรคโดยวิธีฟาโกไซโทซิส เป็นเม็ดเลือดขาวที่เกี่ยวข้องและตอบสนองเกี่ยวกับอาการภูมิแพ้ และปรสิตต่างๆ โดยจะหลั่งสาร histamine ออกมาทำลายแอนติเจนนั้นๆ และเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ย้อมติดสีชมพู
4. เบโซฟิลล์ (basophils) มีหน้าในการทำลายสิ่งแปลกปลอมหรือแอนติเจน โดยจะหลั่งสาร histamine ออกมาทำลายแอนติเจนนั้นๆ ซึ่งเป็นสาเหตุในการเกิดการอักเสบและภูมิแพ้อย่างรุนแรง และเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ย้อมติดสีน้ำเงิน
5. โมโนไซต์ (monocytes) มีหน้าในการทำลายสิ่งแปลกปลอมและโอบล้อมกินเชื้อโรคโดยวิธีฟาโกไซโทซิส มีรูปร่างของนิวเคลียสคล้ายไต และเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีขนาดใหญ่ที่สุด (โครงการทรูปลูกปัญญา, 2560)

เซลล์เม็ดเลือดขาวที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือ monocyte-derived macrophage (MDM)

monocyte-derived macrophage (MDM) คือ เซลล์เม็ดเลือดขาวที่พัฒนามาจาก monocyte โดย monocyte จะพัฒนาไปเป็น macrophage ระยะแรกและเคลื่อนที่อยู่ในกระแสเลือดโดยประมาณ 3 วันก่อนที่จะเข้าสู่เนื้อเยื่อและพัฒนาไปเป็น macrophage เต็มที่ เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนี้เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน มีหน้าที่ในการปกป้อง host cell โดยการกินเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายหรือแอนติเจน โดยวิธีฟาโกไซโทซิส โดยจะสร้างเท้าเทียม (pseudopodia) ออกมาล้อมรอบแอนติเจน และมีหน้าที่ในการหลั่งสาร cytokine (IL-1, IL-6, IL-12 และ tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)) ซึ่งสาร cytokine จะทำให้เกิดภาวะการอักเสบ ส่งผลให้ไปกระตุ้นการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดอื่นๆ เช่น lymphocyte และ neutrophil (Strephonsays, 2560; ณตพล, 2552)

วิธีที่ใช้ในการตรวจสอบไตเตอร์ของไวรัสในงานวิจัย

Cytopathic effect assay (CPE) คือการศึกษาการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของ host cell เมื่อติดไวรัส โดยไวรัสจะทำลายผนังเซลล์ของ host cell เราสามารถสังเกตการเปลี่ยนแปลงของ host cell ได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แล้วนับจำนวนหลุมของเซลล์เพาะเลี้ยงที่ถูกทำลายด้วยไวรัสเทียบกับกลุ่มควบคุม(มีแค่อาหารกับเซลล์เพาะเลี้ยง) มีหน่วยเป็น $TCID_{50}$/ml (สุภาพร และคณะ, 2553, Nexcelom)

Immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) คือการตรวจสอบและวินิจฉัยโรคทางซีรั่มวิทยา เพื่อตรวจสอบหาแอนติบอดีต่อไวรัส (Houben *et al.*, 1995) แอนติบอดีนั้นคือ immunoglobulin G antibody (IgG antibody) โดยใช้ primary antibody (mouse anti-PRRSV monoclonal antibody) และ secondary antibody (goat anti-mouse IgG) โดย IPMA มีความจำเพาะและความไวสูงในการทดสอบ สามารถสังเกตการย้อมติดสี (Zhang *et al.*, 2016) ตรวจสอบได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (Guedes *et al.*, 2002) มีหน่วยเป็น $TCID_{50}$/ml

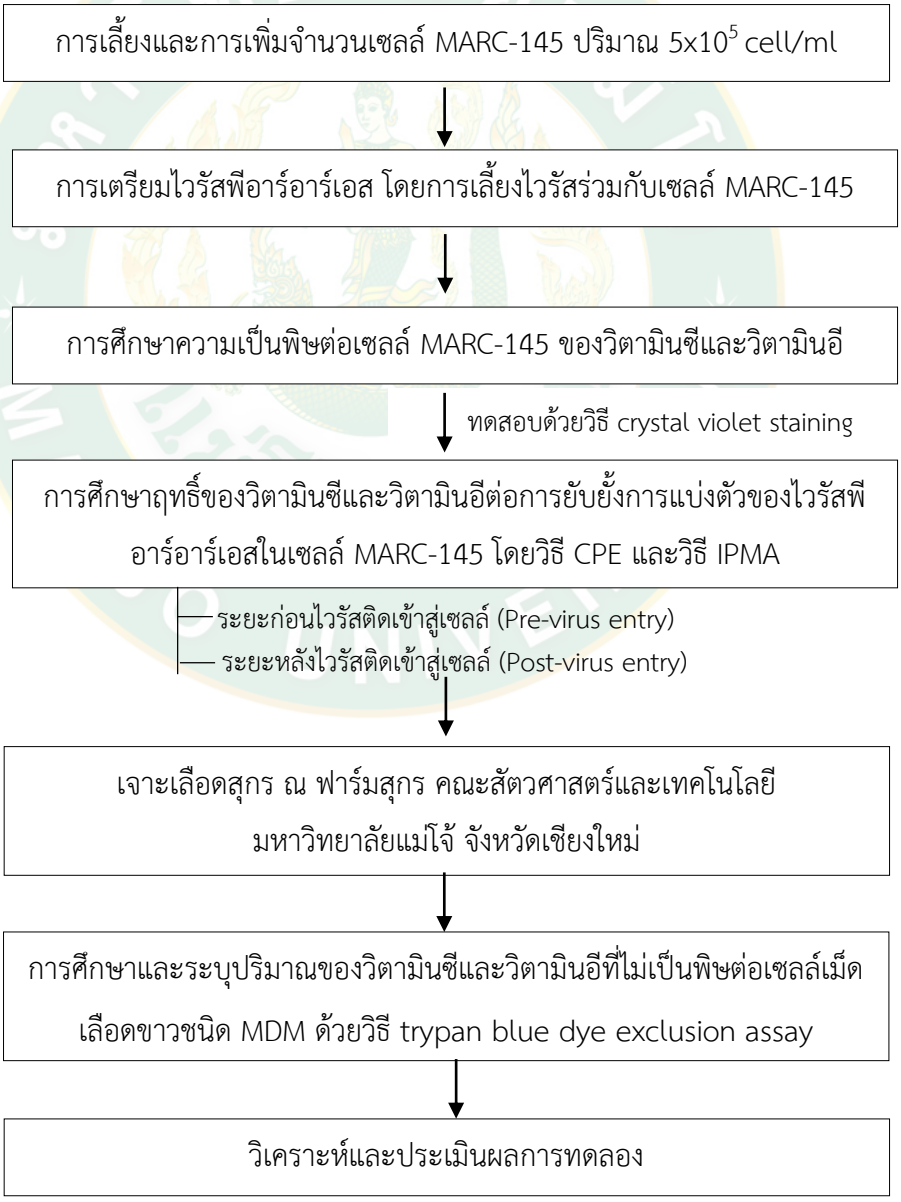
Trypan blue dye exclusion assay คือ การหาปริมาณอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ โดยใช้ trypan blue สารที่มีสีน้ำเงิน ซึ่งสามารถตรวจสอบการติดสีของเซลล์และนับเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (cell counting chamber) โดยใช้ hemacytometer หากเซลล์ติดสีน้ำเงิน หมายถึงเซลล์นั้นตายแล้ว ไซโตพลาสซึมถูกทำลายแล้วสีของ trypan blue เข้าสู่เซลล์ แต่หากเซลล์ไม่ติดสีน้ำเงินของ trypan blue แปลว่าเซลล์ยังมีชีวิตอยู่ (Strober, 2015)

บทที่ 3
วิธีการวิจัย

3.1 สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการวิจัยเพื่อส่งเสริมภูมิต้านทานในมนุษย์และสัตว์ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ ตึกจุฬาภรณ์ ชั้น 3 มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ เลขที่ 63 หมู่ 4 ตำบลหนองหาร อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ 50290 ระยะเวลาในการทำการทดลอง 30 พฤษภาคม 2561 ถึง 22 เมษายน 2563

3.2 วิธีการวิจัย



บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์

4.1. ผลของการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ MARC-145 ของวิตามินซีและวิตามินอี

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ MARC-145 ของวิตามินซีและวิตามินอีโดยเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 1,000, 500, 250, 125, 62.50, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91, 1.95 และ 0.98 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 1 ตารางที่ 2) ตามลำดับ โดยคิดร้อยละอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ MARC-145 มากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ความเข้มข้นที่สูงที่สุดของวิตามินซีและวิตามินอีที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ MARC-145 คือ 3.91 และ 15.63 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ตามลำดับ

ตารางที่ 1 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ MARC-145 ของวิตามินซีที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้

ความเข้มข้น (µg/ml)	อัตราการรอดชีวิต (%)				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ค่าเฉลี่ย ± S.D.
1,000	14.92	13.63	12.03	14.01	13.65 ± 1.21^{e}
500	15.00	14.85	13.55	11.88	13.82 ± 1.45^{e}
250	13.17	12.94	11.80	11.42	12.34 ± 0.85^{e}
125	37.08	16.30	11.27	11.11	18.94 ± 12.33^{e}
62.5	46.75	53.99	39.06	29.78	42.39 ± 10.39^{d}
31.25	57.26	49.72	66.10	47.97	55.26 ± 8.27^{c}
15.63	61.98	56.58	54.14	46.15	54.71 ± 6.58^{c}
7.81	73.63	80.41	65.41	68.68	72.04 ± 6.53^{b}
3.91	83.53	98.23	86.12	84.68	88.14 ± 6.81^{a}
1.95	98.31	100.44	90.31	80.11	92.30 ± 9.22^{a}
0.98	112.62	81.40	101.88	104.70	100.15 ± 13.30^{a}

ตารางที่ 2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ MARC-145 ของวิตามินอีที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้

ความเข้มข้น	อัตราการรอดชีวิต (%)			
(µg/ml)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย ± S.D.
1,000	13.09	13.32	12.86	13.09 ± 0.23[c]
500	19.58	17.49	13.32	16.80 ± 3.19[c]
250	17.38	15.64	14.13	15.72 ± 1.62[c]
125	20.97	27.69	17.38	22.01 ± 5.23[c]
62.5	30.59	22.24	20.39	24.41 ± 5.43[c]
31.25	54.34	50.28	65.11	56.58 ± 7.66[b]
15.63	93.85	72.18	92.11	86.04 ± 12.04[a]
7.81	97.09	91.41	96.51	95.00 ± 3.12[a]
3.91	97.20	107.40	115.39	106.67 ± 9.12[a]
1.95	93.61	80.29	115.39	96.43 ± 17.72[a]
0.98	87.82	90.49	113.65	97.32 ± 14.21[a]

จากผลการทดลองสารเป็นพิษต่อเซลล์ MARC-145 ของวิตามินซีและวิตามินอีชี้ให้เห็นว่าการให้วิตามินซีและวิตามินอีที่ความเข้มข้น 3.91 และ 15.63 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ MARC-145

จากการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานของ Chan (1993) ที่รายงานว่าวิตามินจะเป็นประโยชน์ต่อร่างกายมนุษย์และสัตว์ ช่วยในการชะลอความเสียหายของเซลล์ โดยการปกป้องเซลล์จากอนุมูลอิสระได้ ทั้งนี้ในผลการทดลองดังกล่าวได้ใช้กับเซลล์ปกติ บ่งชี้ได้ว่าไม่เป็นพิษเช่นเดียวกับรายงานวิจัยของ Hemila (2017) และ Wintergerst *et al.* (2006) เช่นกัน

สำหรับความเข้มข้นของวิตามินซีที่ 3.91 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการทดสอบกับเซลล์ปกติดังกล่าว เทียบกับปริมาณการใช้ในคนจากรายงานวิจัยของ Hunt *et al*. (1994) ที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคปอดบวมทำให้ผู้ป่วยหายจากการให้วิตามินซีปริมาณ 200 มิลลิกรัม/วัน บ่งชี้ว่าการได้รับ

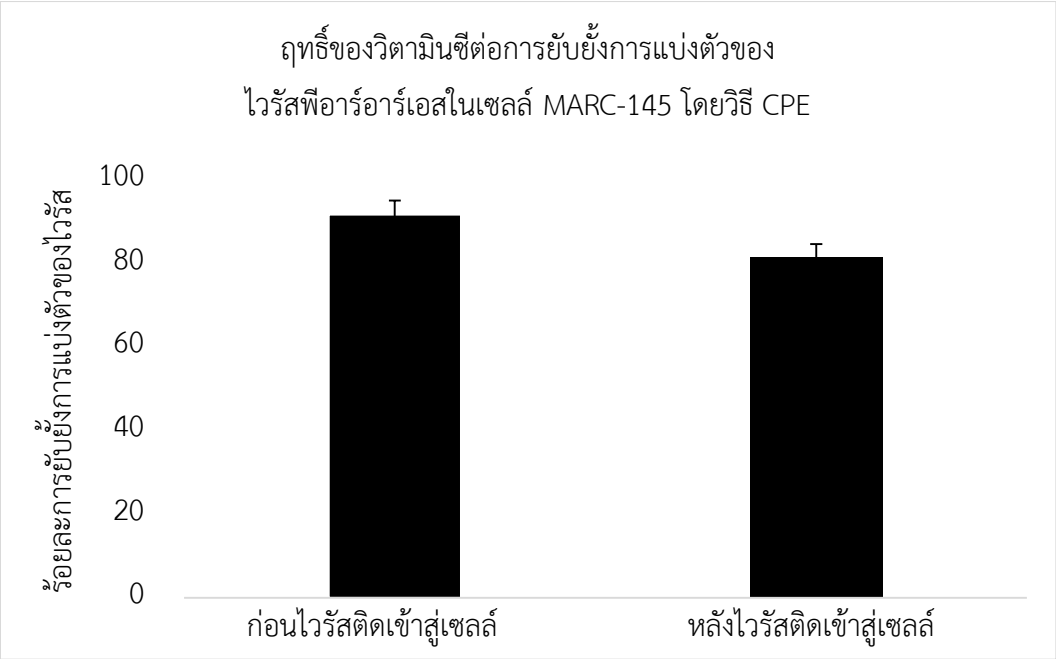
วิตามินในปริมาณที่มากเกินไปอาจไม่เกิดประโยชน์หรือการให้ในปริมาณมากจะส่งผลทำให้เกิดเป็นพิษต่อร่างกายได้

กลไกที่วิตามินซีช่วยให้เซลล์ปกตินั้นอาจเกิดจากกลไกช่วยเพิ่มจำนวนเม็ดเลือดขาว ทำให้มีฤทธิ์ในการต้านจุลชีพมากขึ้นทำให้ร่างกายปรับสมดุลของปฏิกิริยารีดอกซ์ของเซลล์และเป็นสารเคมีบำบัดตามรายงานของ Wintergerst *et al.* (2006)

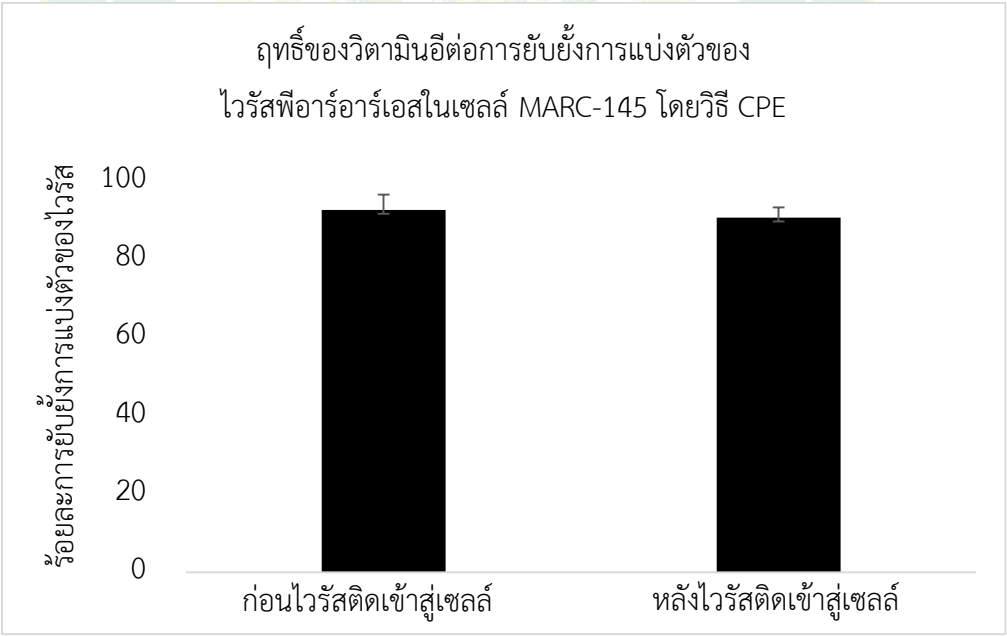
สำหรับวิตามินอีเป็นกลุ่มของสารประกอบอินทรีย์ที่ละลายได้ในไขมัน การให้เซลล์ปกติได้รับวิตามินอีได้ในปริมาณมากกว่าวิตามินซี อาจเป็นผลเนื่องมาจากวิตามินอีมีบทบาทในการป้องกันเซลล์ T cell สอดคล้องกับรายงายวิจัยของ Lewis *et al.* (2006)

4.2. ผลของการศึกษาฤทธิ์ของวิตามินซีและวิตามินอีต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสพีอาร์อาร์เอสในเซลล์ MARC-145 โดยวิธี CPE และวิธี IPMA

จากการทดสอบฤทธิ์ของวิตามินซีและวิตามินอีต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสพีอาร์อาร์เอสในเซลล์ MARC-145 พบว่า วิตามินซีแสดงร้อยละอัตราการยับยั้งไวรัสพีอาร์อาร์เอสในระยะก่อนไวรัสติดเข้าสู่เซลล์ (Pre-virus entry)และระยะหลังไวรัสติดเข้าสู่เซลล์ (Post-virus entry) โดยวิธี CPE คือ 91.67 และ 81.58 ตามลำดับ (ภาพที่ 6) วิตามินอีแสดงร้อยละอัตราการยับยั้งไวรัสพีอาร์อาร์เอสในระยะก่อนไวรัสติดเข้าสู่เซลล์ (Pre-virus entry) และระยะหลังไวรัสติดเข้าสู่เซลล์ (Post-virus entry) โดยวิธี CPE คือ 92.71 และ 90.79 ตามลำดับ (ภาพที่ 7)



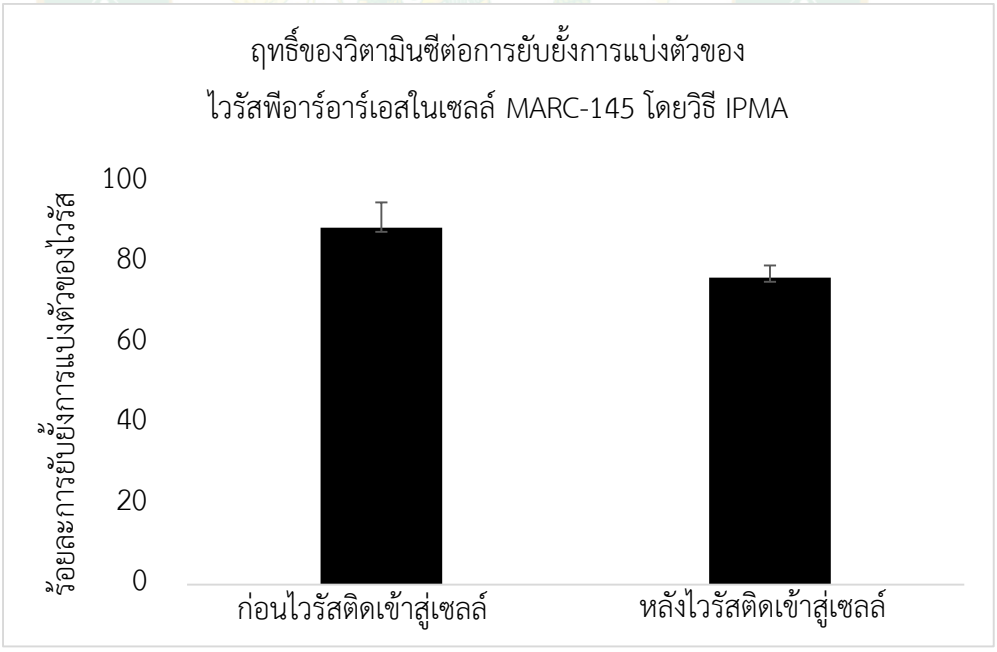
ภาพที่ 6 ฤทธิ์ของวิตามินซีต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสพีอาร์อาร์เอส ในเซลล์ MARC-145 โดยวิธี CPE



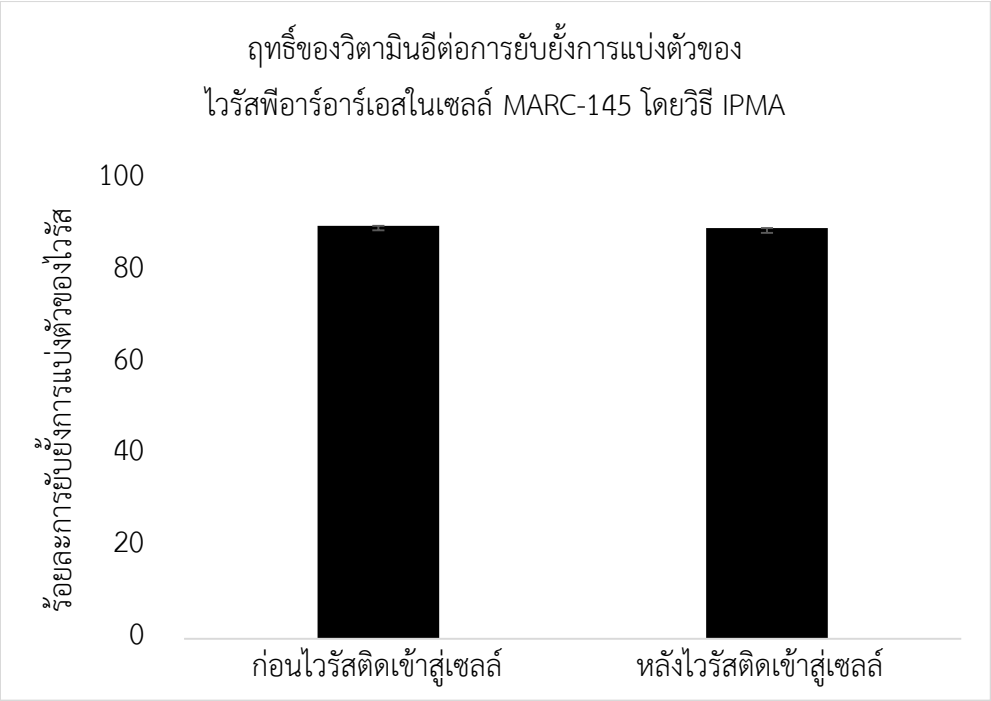
ภาพที่ 7 ฤทธิ์ของวิตามินอีต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสพีอาร์อาร์เอส ในเซลล์ MARC-145 โดยวิธี CPE

เมื่อทดสอบโดยวิธี IPMA พบว่า วิตามินซีแสดงร้อยละอัตราการยับยั้งไวรัสพีอาร์อาร์เอสในระยะก่อนไวรัสติดเข้าสู่เซลล์ (Pre-virus entry) และระยะหลังไวรัสติดเข้าสู่เซลล์ (Post-virus entry) คือ 88.75 และ 76.32 ตามลำดับ (ภาพที่ 8) วิตามินอีแสดงร้อยละอัตราการยับยั้งไวรัสพีอาร์อาร์เอสในระยะก่อนไวรัสติดเข้าสู่เซลล์ (Pre-virus entry)และระยะหลังไวรัสติดเข้าสู่เซลล์ (Post-virus entry) คือ 90 และ 89.47 ตามลำดับ (ภาพที่ 9)

มีการศึกษาเรื่องกลไกของวิตามินซีต่อไวรัส A/FM/1/47(H1N1) โดยไวรัสชนิดนี้มีจีโนมเป็น single-stranded RNA มีเซลล์เป้าหมายคือ alveolar macrophages (AMs) ในเยื่อหุ้มปอด (Arimori *et al.*, 2013; Bender and Small Jr, 1992) ส่งผลให้มีความบกพร่องในระบบทางเดินหายใจและตายได้ (La Gruta *et al.*, 2007) เมื่อเกิดการติดเชื้อไวรัส A/FM/1/47(H1N1) จะเกิดการตายแบบ apoptosis แล้วเกิดการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Fesq *et al.*, 1994) และเมื่อได้รับวิตามินซีส่งผลให้ลดระยะและลดความรุนแรงของการติดเชื้อไวรัส A/FM/1/47(H1N1) ซึ่งสอดคล้องกับไวรัสพีอาร์อาร์เอสที่มีจีโนมเป็น single-stranded RNA และมีเซลล์เป้าหมายคือปอดเช่นเดียวกัน เมื่อได้ทำการทดลองแล้วพบว่าวิตามินซีช่วยลดความรุนแรงของการเกิดโรคพีอาร์อาร์เอสได้เมื่อทดสอบโดยวิธี CPE และวิธี IPMA



ภาพที่ 8 ฤทธิ์ของวิตามินซีต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสพีอาร์อาร์เอส
ในเซลล์ MARC-145 โดยวิธี IPMA



ภาพที่ 9 ฤทธิ์ของวิตามินอีต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสพีอาร์อาร์เอส ในเซลล์ MARC-145 โดยวิธี IPMA

จากการศึกษาผลของวิตามินซีและวิตามินอีในการยับยั้งไวรัสชี้ให้เห็นว่าวิตามินซีและวิตามินอีสามารถยับยั้งไวรัสได้จากการทดสอบทั้ง 2 วิธี และพบว่าวิตามินซีและวิตามินอีจะชี้ผลในการป้องกันไม่ให้ไวรัสเข้าสู่เซลล์ได้ดีกว่าหลังจากไวรัสเข้าสู่เซลล์แล้วทั้ง 2 วิธีเช่นกัน จากรายงานดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Cai *et al.* (2015) พบว่า กลไกของวิตามินซีต่อการยับยั้งไวรัส A/FM/1/47(H1N1) ที่ก่อให้เกิดโรคปอดบวมในหนู ทดลองโดยการให้หนูกินวิตามินซีปริมาณ 125 และ 250 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ส่งผลให้วิตามินซีไปลดการแสดงออกของยีน mitochondrial antiviral signaling (MAVS) และ interferon regulatory factor 3 (IRF3) แล้วกระตุ้นให้เกิดการสร้างยีน NF-κB จากนั้นทำงานร่วมกันแล้วเกิดสร้าง type I interferons (IFNs) ไปยับยั้งไวรัส และรายงานวิจัยของ Kim *et al.* (2016) ศึกษาโสมแดงและวิตามินซีช่วยลดการอักเสบของปอดที่เกิดจากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน โดยวิตามินซีจะกระตุ้นการผลิต T cell เนื่องจากพบการแสดงออกของยีนส์ CD69, CD 25 และ CD3+ T cell ซึ่งตรวจสอบโดยวิธี flow cytometry เมื่อบ่มที่ 48 ชั่วโมง นอกจากกระตุ้นการผลิต T cell แล้วยังมีฤทธิ์ในการช่วยการกระตุ้นการทำงานของ NK cells และสามารถยับยั้งเชื้อไวรัส kaposi's sarcoma

associated herpesvirus (KSHV) หรือที่เรียกว่า HHV-8 ซึ่งเกิดจากเชื้อไวรัส human herpesvirus 8 โดยโสมแดงและวิตามินซีจะลดการแสดงออกของ RTA และ K8 ที่เกิดจาก TPA ใน BCBL-1 กล่าวคือโสมแดงและวิตามินซียับยั้งการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักร lytic

สำหรับวิตามินอีสอดคล้องกับงานวิจัยของ Reffett *et al.* (1988) ที่ทำการทดลองกับลูกแกะป่วยด้วยเชื้อไวรัส parainfluenza virus ทำการรักษาโดยการให้ Se 2 มิลลิกรัม/กิโลกรัมของอาหาร และ วิตามินอี 20 มิลลิกรัม/กิโลกรัมของอาหาร พบว่า ระยะเวลาหลัง 10 สัปดาห์ ปริมาณ glutathione peroxidase (GSH-Px) เพิ่มขึ้น immunoglobulin M (IgM) ในเซรั่มเพิ่มขึ้น ระดับแอนติบอดีเพิ่มขึ้น ส่งผลให้วิตามินอีสามารถยับยั้งไวรัสได้ และงานวิจัยของ Ghanem *et al.* (2015) หนูที่ติดเชื้อ *Streptococcus pneumonia* เกิดการอักเสบที่ปอด เมื่อเสริมด้วยวิตามินอี 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า วิตามินอีสามารถลดนิวโทรฟิลและการผลิตสารไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับอาการอักเสบได้ซึ่งสัมพันธ์กับภาวะเลือดเป็นพิษที่ลดลง ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าวิตามินอีสามารถทำปฏิกิริยากับระบบภูมิคุ้มกันช่วยลดแบคทีเรียในปอดได้ นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Bender *et al.* (1991) และ Hayek *et al.* (1997) ที่พบว่า โรคไข้หวัดใหญ่มีอาการคล้ายกับโรคปอดบวม จะมีภาวะน้ำหนักลดลงและการตายเกิดขึ้น ซึ่งมีการผลิต Th1 cytokines IL-2 และ IFN-γ และมีการติดเชื้อไวรัสในปอดสูงหลังจากติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ influenza A/Port Chalmers/1/27/(H3N2) จากนั้นมีการเสริมวิตามินอี 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เป็นเวลา 30 วัน พบว่า มีการตอบสนองต่อ Th1 เพิ่มขึ้นและช่วยปรับสภาวะในปอดให้ดีขึ้น

4.3. ผลของการศึกษาและระบุปริมาณของวิตามินซีและวิตามินอีที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด MDM ด้วยวิธี trypan blue dye exclusion assay

จากการทดสอบความไม่เป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด MDM ของวิตามินซีและวิตามินอี โดยเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91, 1.95 และ 0.98 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยคิดร้อยละอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ MDM มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ความเข้มข้นที่สูงที่สุดของวิตามินซีและวิตามินอีที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ MDM คือ 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 3 และตารางที่ 4)

ตารางที่ 3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ MDM ของวิตามินซีที่บ่มเป็นเวลา 36 ชั่วโมงที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้

ความเข้มข้น	อัตราการรอดชีวิต (%)				
(µg/ml)	1	2	3	4	ค่าเฉลี่ย ± S.D.
250	43.48	42.86	44.44	36.36	41.79 ± 3.67
125	50.00	51.14	44.44	42.86	47.11 ± 4.07
62.5	60.00	62.50	50.00	56.25	57.19 ± 5.44
31.25	60.00	62.67	57.50	60.37	60.14 ± 2.12
15.63	58.33	62.50	66.67	60.00	61.88 ± 3.63
7.81	61.11	63.64	55.56	66.04	61.59 ± 4.49
3.91	62.72	62.50	66.67	64.29	64.05 ± 1.92
1.95	60.00	62.50	71.43	66.67	65.15 ± 5.01
0.98	69.23	68.50	71.43	75.00	71.04 ± 2.92

MAEJO UNIVERSITY

ตารางที่ 4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ MDM ของวิตามินอีที่บ่มเป็นเวลา 36 ชั่วโมงที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้

ความเข้มข้น	อัตราการรอดชีวิต (%)				
(µg/ml)	1	2	3	4	ค่าเฉลี่ย ± S.D.
250	33.33	40.00	36.36	43.75	38.36 ±4.51
125	38.46	46.67	41.67	44.44	42.81 ± 3.55
62.5	50.00	62.50	42.86	57.14	53.13 ± 8.55
31.25	66.67	54.55	69.23	57.14	61.90 ± 7.15
15.63	71.43	50.00	60.00	62.10	60.88 ± 8.79
7.81	62.50	66.67	66.67	62.50	64.59 ± 2.41
3.91	85.71	58.18	68.42	66.67	69.75 ± 11.54
1.95	69.23	63.64	64.29	75.00	68.04 ± 5.27
0.98	66.70	69.23	66.67	72.73	68.83 ± 2.86

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

1. การศึกษาฤทธิ์ของวิตามินซีและวิตามินอีต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสพีอาร์อาร์เอสนซลล์ MARC-145 พบว่า วิตามินซีและวิตามินอีสามารถยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสระยะก่อนเข้าสู่เซลล์ได้ดีกว่าระยะหลังการเข้าสู่เซลล์ ดังนั้น จึงเหมาะแก่การเสริมวิตามินดังกล่าวเพื่อเป็นการป้องกันการติดเชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส

2. การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด MDM พบว่า ความเข้มข้นที่ระดับ 31.25 μg/ml ของวิตามินซีและวิตามินอีไม่เป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว โดยมีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 60% ซึ่งสามารถที่จะนำที่ได้จากงานวิจัยนี้ไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันได้ต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1. การทดสอบครั้งนี้เป็นการศึกษาเฉพาะในเซลล์เม็เลือดขาวเท่านั้น ควรศึกษาเพิ่มเติมในเซลล์อื่นๆ

2. ควรเพิ่มระยะเวลาในการทดสอบ

3. ควรศึกษาเพิ่มเติมในสุกรจะทำให้เห็นผลต่อการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
วิธีการวิจัย

การเลี้ยงและการเพิ่มจำนวนเซลล์ MARC-145

นำขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีเซลล์ MARC-145 ปริมาณ $5x10^5$ cell/ml ที่เจริญเต็มพื้นผิวของขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยนำมาเทอาหารเก่าชนิด MEM^{++} ออก แล้วนำมาล้างด้วย 1X PBS buffer ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วเททิ้ง จากนั้นเติม Trypsin (0.05 %) - EDTA (0.1%) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วทิ้งไว้เป็นเวลา 3 นาที (เพื่อให้เซลล์ MARC-145 ที่เจริญเต็มพื้นผิวของขวดเพาะเลี้ยงเซลล์หลุดออก) แล้วจึงทำการเคาะเบา ๆ เพื่อช่วยให้เซลล์หลุดเร็วขึ้น โดยไม่ต้องเททิ้ง จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM^{++} ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูดมาใส่ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขวดใหม่ 5 มิลลิลิตร แล้วเติม Fungizone ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ทุกขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ จากนั้นนำไปบ่มที่ตู้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หรือมากกว่า เพื่อให้เซลล์เจริญเติบโตมากพอที่จะเพิ่มจำนวนใหม่ได้ เรียกการเพิ่มจำนวนเซลล์นี้ว่า Subculture โดยสามารถสังเกตได้จากการส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ หากมีปริมาณเซลล์มากพอแล้วสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ตามวิธีข้างต้น

การเตรียมไวรัสพีอาร์อาร์เอส

เทอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM^{++} ออกจากขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ MARC-145 ไว้ข้างต้นเป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วเติมไวรัสพีอาร์อาร์เอสใส่ลงในเซลล์ MARC-145 ที่เพาะเลี้ยงไว้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วทำการเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM^{++} ปริมาตร 3 มิลลิลิตร แล้วทำการเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ และเวลาดังกล่าวครบแล้วให้ย้ายไปเก็บที่ตู้อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำออกมาทำการละลายที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำกลับไปเก็บที่ตู้อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (freeze-thaw) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (ทำซ้ำกัน 2 ครั้ง เพื่อทำให้เซลล์เสียสภาพแล้วปล่อยไวรัสออกมา) จากนั้นปิเปตสารทั้งหมดใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยงใหม่ที่ทำการปลอดเชื้อเพื่อนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เวลา 10 นาที

ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการเก็บเกี่ยวไวรัสพีอาร์อาร์เอสโดยการดูดส่วนใสใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็กที่ปลอดเชื้อ แล้วนำไปเก็บที่ตู้อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อเป็น stock เก็บไว้เมื่อต้องการนำไวรัสพีอาร์อาร์เอสมาใช้ทำการทดลองนั้นให้นำไปละลายที่อุณหภูมิห้อง

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ MARC-145 ของวิตามินซีและวิตามินอี

ทำการเจือจางวิตามินซีและวิตามินอี โดยการชั่งสารทดสอบอย่างละ 0.0040 กรัม โดยวิตามินซีเจือจางด้วยน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร และวิตามินอีเจือจางด้วย 100% DMSO 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารทดสอบดังกล่าวที่ผสมเข้ากันแล้วมากรองด้วยไซริงค์กรองสารขนาด 0.22 µm แล้วทำการเจือจางต่อแบบลำดับส่วนทีละ 2 เท่า (2 fold dilution) นำสารทดสอบที่เจือจางตามลำดับส่วนข้างต้นปิเปตลงถาดเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร ที่มีเซลล์ MARC-145 ที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงไว้ 16 ชั่วโมงก่อนหน้านี้ในถาดเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตรเช่นเดียวกัน ทำให้ได้ปริมาตรรวมเป็นเท่ากับ 200 ไมโครลิตร โดยเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 1,000, 500, 250, 125, 62.50, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91, 1.95 และ 0.98 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เมื่อบ่มครบตามเวลาและอุณหภูมิดังกล่าวแล้วนำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ MARC-145 ของวิตามินซีและวิตามินอี ด้วยวิธี crystal violet staining

วิธี crystal violet staining

1. เทอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM^{++} และสารทดสอบออกจากถาดเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม
2. ล้างเซลล์ด้วย 1X PBS หลุมละ 200 ไมโครลิตร แล้วเททิ้ง (ทำซ้ำ 2 ครั้ง)
3. เติม 60 : 40 (acetone : methanol) หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปใส่ในตู้เย็นเป็นเวลา 30 นาที ไม่ต้องเททิ้ง
4. เติม 0.5% crystal violet หลุมละ 20 ไมโครลิตร แล้วนำไปตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วเททิ้ง
5. นำมาล้างด้วยน้ำเปล่าจนสีม่วงออกหมด แล้วนำไปตากให้แห้ง
6. เติม sorensen’s citrate buffer หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปใส่ในตู้เย็นเป็นเวลา 30 นาที ไม่ต้องเททิ้ง
7. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร (OD_{595} nm) โดยเครื่อง spectrophotometer
8. วิเคราะห์และประเมินผลการทดลอง โดยนำผลการทดลองเทียบกับกลุ่มควบคุม แล้วเลือกความเข้มข้นที่สูงที่สุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ เพื่อไปทำการทดลองขั้นต่อไป

การศึกษาฤทธิ์ของวิตามินซีและวิตามินอีต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสพีอาร์อาร์เอสในเซลล์ MARC-145 โดยวิธี CPE และวิธี IPMA

ทดสอบฤทธิ์ของวิตามินซีและวิตามินอีต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสพีอาร์อาร์เอสในระยะก่อนไวรัสติดเข้าสู่เซลล์ (Pre-virus entry) โดยนำความเข้มข้นที่สูงที่สุดของวิตามินซีและวิตามินอีที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ MARC-145 มาคำนวณหาปริมาตรของวิตามินซีและวิตามินอี และอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM^{++} ที่ต้องเติมลงไป

โดยใช้สูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

- คำนวณหาปริมาตรของวิตามินซี

$C_1V_1 = C_2V_2$

(2,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) V_1 = (3.9 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) (5,000 ไมโครลิตร)

V_1 = 9.75 ไมโครลิตร

ดังนั้นต้องใช้วิตามินซีจากสต็อค 9.75 ไมโครลิตร

ถ้าทดสอบ 5 มิลลิลิตร = 5,000 ไมโครลิตร

แสดงว่าต้องเติม	ไวรัสพีอาร์อาร์เอส	1,000	ไมโครลิตร
	วิตามินซี	9.7	ไมโครลิตร
	Fungizone	5	ไมโครลิตร
	อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM^{++}	3,985.25	ไมโครลิตร

- คำนวณหาปริมาตรของวิตามินอี

$C_1V_1 = C_2V_2$

(2,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) V_1 = (15.6 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) (5,000 ไมโครลิตร)

V_1 = 39 ไมโครลิตร

ดังนั้นต้องใช้วิตามินซีจากสต็อค 39 ไมโครลิตร

ถ้าทดสอบ 5 มิลลิลิตร = 5,000 ไมโครลิตร

แสดงว่าต้องเติม	ไวรัสพีอาร์อาร์เอส	1,000	ไมโครลิตร

วิตามินอี	39	ไมโครลิตร
Fungizone	5	ไมโครลิตร
อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM^{++}	3,956	ไมโครลิตร

จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM^{++} ออกจากขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ MARC-145 ไว้ข้างต้นเป็นเวลา 16 ชั่วโมง เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM^{++} ที่คำนวณได้ข้างต้น เติมยาฆ่าเชื้อรา 5 ไมโครลิตร เติมวิตามินซีและวิตามินอีที่คำนวณได้ข้างต้น บ่มร่วมกันโดยทำการเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเติมไวรัสพีอาร์อาร์เอส 1,000 ไมโครลิตร แล้วทำการเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เมื่อบ่มที่อุณหภูมิและเวลาดังกล่าวครบแล้วให้ย้ายไปเก็บที่ตู้อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ห่อพาราฟิล์มที่ฝาปิดให้มิดชิดโดยสารทดสอบควบคุมเติม

-อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM^{++}	3,995	ไมโครลิตร
-ยาฆ่าเชื้อรา	5	ไมโครลิตร
-ไวรัสพีอาร์อาร์เอส	1,000	ไมโครลิตร

ทดสอบฤทธิ์ของวิตามินซีและวิตามินอีต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสพีอาร์อาร์เอสในระยะหลังไวรัสติดเข้าสู่เซลล์ (Post-virus entry) โดยนำความเข้มข้นที่สูงที่สุดของวิตามินซีและวิตามินอีที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ MARC-145 มาคำนวณหาปริมาตรของวิตามินซีและวิตามินอี และอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM^{++} ที่ต้องเติมลงไป

โดยใช้สูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

- คำนวณหาปริมาตรของวิตามินซี

$C_1V_1 = C_2V_2$

(2,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) V_1 = (3.9 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) (5,000 ไมโครลิตร)

V_1 = 9.75 ไมโครลิตร

ดังนั้นต้องใช้วิตามินซีจากสต็อค 9.75 ไมโครลิตร

ถ้าทดสอบ 5 มิลลิลิตร = 5,000 ไมโครลิตร

แสดงว่าต้องเติม ไวรัสพีอาร์อาร์เอส 1,000 ไมโครลิตร

วิตามินซี	9.7	ไมโครลิตร
Fungizone	5	ไมโครลิตร
อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM^{++}	3,985.25	ไมโครลิตร

- คำนวณหาปริมาตรของวิตามินอี

$C_1V_1 = C_2V_2$

(2,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) V_1 = (15.6 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) (5,000 ไมโครลิตร)

V_1 = 39 ไมโครลิตร

ดังนั้นต้องใช้วิตามินซีจากสต็อค 39 ไมโครลิตร

ถ้าทดสอบ 5 มิลลิลิตร = 5,000 ไมโครลิตร

แสดงว่าต้องเติม ไวรัสพีอาร์อาร์เอส	1,000	ไมโครลิตร
วิตามินอี	39	ไมโครลิตร
Fungizone	5	ไมโครลิตร
อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM^{++}	3,956	ไมโครลิตร

เทอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM^{++} ออกจากขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ MARC-145 ไว้ข้างต้นเป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วเติมไวรัสพีอาร์อาร์เอส 1,000 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มร่วมกันโดยทำการเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM^{++} ที่คำนวณได้ข้างต้น เติมยาฆ่าเชื้อรา 5 ไมโครลิตร เติมวิตามินซีและวิตามินอีที่คำนวณได้ข้างต้น แล้วทำการเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เมื่อบ่มที่อุณหภูมิและเวลาดังกล่าวครบแล้วให้ย้ายไปเก็บที่ตู้อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ห่อพาราฟิล์มที่ฝาปิดให้มิดชิดโดยสารทดสอบควบคุมเติม

-อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM^{++}	4,995	ไมโครลิตร
-ยาฆ่าเชื้อรา	5	ไมโครลิตร

จากนั้นนำสารทดสอบระยะก่อนไวรัสติดเข้าสู่เซลล์ (Pre-virus entry)และระยะหลังไวรัสติดเข้าสู่เซลล์ (Post-virus entry) ข้างต้นมาทำการละลายแบบ freeze-thaw ทำซ้ำกัน 2 ครั้ง แล้ว

ปิเปตสารทั้งหมดใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยงที่ทำการปลอดเชื้อแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส จากนั้นเกี่ยวไวรัสพีอาร์อาร์เอสโดยการดูดส่วนใสใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็กที่ปลอดเชื้อ แล้วทำการเจือจางกับอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM^{++} แบบลำดับส่วนทีละ 10 เท่า (10 fold dilution) แล้วนำสารทดสอบที่ทำการเจือจางตามลำดับส่วนข้างต้นปิเปตลงในถาดเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร ที่มีเซลล์ MARC-145 ที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงไว้ 16 ชั่วโมงก่อนหน้านี้ในถาดเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร เช่นเดียวกัน ทำให้ได้ปริมาตรรวมเป็นเท่ากับ 200 ไมโครลิตร จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง แล้วนำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสพีอาร์อาร์เอสในเซลล์ MARC-145 โดยวิธี CPE และวิธี IPMA

วิธี CPE โดยการนำถาดเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุมดังกล่าวนำมาสังเกตการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ มีหน่วยเป็น $TCID_{50}$/ml

วิธี IPMA

เทอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM++ ออกจากถาดเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุมดังกล่าว แล้วล้างด้วย PBST หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วเททิ้ง จากนั้นเติม 4% formalin หลุมละ 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วย PBST หลุมละ 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3-5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเททิ้ง (ทำซ้ำ 3 ครั้ง) จากนั้นเติม Antibody 1° (primary antibody of PRRS) หลุมละ 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วย PBST หลุมละ 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3-5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเททิ้ง (ทำซ้ำ 3 ครั้ง) แล้วเติม Antibody 2° (secondary antibody of PRRS) หลุมละ 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วย PBST หลุมละ 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3-5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเททิ้ง (ทำซ้ำ 3 ครั้ง) จากนั้นเติมสารละลาย DAB substrate หลุมละ 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วยน้ำเปล่า จากนั้นนำมาสังเกตการติดสีของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ มีหน่วยเป็น $TCID_{50}$/mL แล้วนำมาวิเคราะห์และประเมินผลการทดลอง โดยนำผลการทดลองเทียบกับกลุ่มควบคุม

การศึกษาและระบุปริมาณของวิตามินซีและวิตามินอีที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด MDM ด้วยวิธี trypan blue dye exclusion assay

เจาะเลือดสุกร ณ ฟาร์มสุกร คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุ EDTA ที่มีความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเก็บลงในลังน้ำแข็ง นำเลือดสุกรที่ได้มาเจือจางด้วย 1X PBS ปริมาตร 14 มิลลิลิตร เตรียม LYMPHOPREPTM ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงหลอดใหม่ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วปิเปตเลือดใส่ลงในหลอดที่มี LYMPHOPREP^{TM} โดยจะต้องใส่ด้วยความระมัดระวังห้ามให้เลือดและ LYMPHOPREP^{TM} ผสมกัน (ข้อควรระวัง ไม่ต้องเปิดลมในตู้ปลอดเชื้อ) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงโดยตั้งค่าเครื่อง RCF = 800 xg เวลา 30 นาที speed 9 r/m break down 0 r/m อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แล้วปิเปตส่วนขุ่นออกมาใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงหลอดใหม่ขนาด 15 มิลลิลิตร ส่วนขุ่นนั้นเรียกว่า PBMC จากนั้นเติม 1X PBS ลงใน PBMC โดยเติมให้ปริมาตรเท่ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงโดยตั้งค่าเครื่อง RCF = 210 xg เวลา 10 นาที speed 9 r/m break down 4 r/m อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แล้วปิเปตส่วนใสทิ้ง

- กรณีที่เหลือแต่ PBMC โดยที่ไม่มีเซลล์เม็ดเลือดแดงปะปนอยู่แล้ว
    1. เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI++ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร
    2. นำไปนับเซลล์โดยใช้ hemacytometer เพื่อให้ทราบความเข้มข้นของเซลล์ PBMC
- กรณีที่มีเซลล์เม็ดเลือดแดงปะปนอยู่
    1. เติม 1X PBS ปริมาตร 2 มิลลิลิตร
    2. เติม red blood cell lysis buffer ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
    3. นำไปปั่นเหวี่ยงโดยตั้งค่าเครื่อง RCF = 210 xg เวลา 10 นาที speed 9 r/m break down 4 r/m อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
    4. ทำจนไม่มีเซลล์เม็ดเลือดแดงเหลืออยู่
    5. เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI^{++} ปริมาตร 2 มิลลิลิตร
    6. นำไปนับเซลล์โดยใช้ hemacytometer เพื่อให้ทราบความเข้มข้นของเซลล์ PBMC

จากนั้นนำมาคำนวณหาปริมาตรของอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI^{++} ที่ต้องเติมลงไป เพื่อให้ปริมาณ PBMC เท่ากัน ที่ $1x10^7$ เซลล์/มิลลิลิตร เพื่อเหมาะสมแก่การทดลองโดยใช้สูตร $C_1V_1 = C_2V_2$ จากนั้นปิเปต PBMC ลงในถาดเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วทำการเพาะเลี้ยงใน

ตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด PBMC จะพัฒนาไปเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด MDM แล้วปิเปตอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด $RPMI^{++}$ เก่าบริเวณผิวหน้าออกให้หมด แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด $RPMI^{++}$ ใหม่ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำการเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมสารโดยชั่งวิตามินซีและวิตามินอีอย่างละ 0.0010 กรัม จากนั้นนำวิตามินซีเจือจางด้วยน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร และวิตามินอีเจือจางด้วย 100% DMSO 1 มิลลิลิตร แล้วผสมให้สารเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำมากรองด้วยไซริงค์กรองสารขนาด 0.22 µm จากนั้นทำการเจือจางสารทดสอบดังกล่าวแบบลำดับส่วนทีละ 2 เท่า (2 fold dilution) แล้วนำมาปิเปตลงถาดเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร ที่มีเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด MDM ที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงไว้ก่อนหน้านี้ในถาดเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตรเช่นเดียวกัน ทำให้ได้ปริมาตรรวมเป็นเท่ากับ 200 ไมโครลิตร โดยเริ่มต้นที่เข้มข้น 250, 125, 62.50, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91, 1.95 และ 0.98 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วทำการเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทดสอบความเป็นพิษของวิตามินซีและวิตามินอีต่อเซลล์ MDM ด้วยวิธีย้อมสี trypan blue แล้วนำไปนับเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (cell counting chamber) โดยใช้ hemacytometer แล้วเลือกความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมีในการทดสอบกับเซลล์ MARC-145

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์สูตร Minimal Essential Medium (MEM^{++}) ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร(เตรียมด้วยวิธีการปลอดเชื้อ)

-	น้ำกลั่น (Distilled water)	890	มิลลิลิตร
-	MEM^{++} สูตรสำเร็จ	1	ซอง
-	เซรั่ม FBS (Fetal bovine serum)	100	มิลลิลิตร
-	Antibiotic/antimycotic	10	มิลลิลิตร
-	Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$)	2.2	กรัม

ปรับค่า pH ให้มีค่า = 7.4 ด้วย 1 Normal NaCl กับ 1 Normal HCl

ผสมส่วนผสมให้เข้ากันแล้วนำมากรองด้วยไซริงค์กรองสารขนาด 0.22 µm

2. การเตรียม 1X PBS buffer (Phosphate Buffered Saline) ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร (เตรียมด้วยวิธีการปลอดเชื้อ)

-	Sodium Chloride (NaCl)	8	กรัม
-	Disodium Phosphate (Na_2HPO_4)	1.44	กรัม
-	Potassium Dihydrogen Orthophosphate (KH_2PO_4)	0.25	กรัม
-	Potassium Chloride (KCl)	0.2	กรัม
-	น้ำกลั่น (Distilled water)	≈700	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร)

ปรับค่า pH ให้มีค่า = 7.4 ด้วย 1 Normal NaCl กับ HCl

3. การเตรียม 0.5% PBST (Phosphate Buffered Saline Tween20) ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เพื่อไปเตรียม 1% BSA

ดังนั้น	TWEEN 20	5	มิลลิลิตร
	1X PBS	995	มิลลิลิตร

4. การเตรียม 4% Formalin จากสารมาตรฐาน 40% Formalin ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

	C_1V_1	=	C_2V_2
	(40%)(V_1)	=	(4%)(100 มล.)
	V_1	=	10 มิลลิลิตร
ดังนั้น	Formalin	=	10 มิลลิลิตร
	PBST	=	90 มิลลิลิตร

5. การเตรียม 5% Hydrogen peroxide (H_2O_2) จากสารมาตรฐาน 50% H_2O_2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพื่อไปเตรียม DAB

	C_1V_1	=	C_2V_2
	(50%)(V_1)	=	(5%) (10 มล.)
	V_1	=	1 มิลลิลิตร
ดังนั้น	H_2O_2	=	1 มิลลิลิตร
	DW	=	9 มิลลิลิตร

6. การเตรียม DAB Substrate ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

-	1X PBS	94.8	มิลลิลิตร
-	0.1M NaCl	0.58	กรัม
-	50mM TrisCl	5	มิลลิลิตร
-	0.01% H_2O_2	0.2	มิลลิลิตร
-	DAB 6 มิลลิกรัม	0.006	กรัม

7. การเตรียม 1% BSA ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เพื่อไปเตรียม Antibody

-	Albumin	1	กรัม
-	0.5% PBST	100	มิลลิลิตร

8. การเตรียม Antibody 30,000 ไมโครลิตร

1.1 Antibody 1°	37.5	ไมโครลิตร : 1% BSA	30,000 ไมโครลิตร
1.2 Antibody 2°	50	ไมโครลิตร : 1% BSA	30,000 ไมโครลิตร

ภาคผนวก ค
การเตรียมสารเคมีในการทดสอบกับเซลล์เม็ดเลือดขาว

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์สูตร Roswell Park Memorial Institute ($RPMI^{++}$)

   ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร **เตรียมด้วยวิธีการปลอดเชื้อ

-	น้ำกลั่น (Distilled water : DW)	890	มิลลิลิตร
-	RPMI-1640	1	ซอง
-	Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$)	2	กรัม
-	Heat-inactivated FBS	100	มิลลิลิตร
-	Antibiotics/antimycotic	10	มิลลิลิตร

   ปรับค่า pH ให้มีค่า = 7.4 ด้วย 1 Normal NaCl กับ HCl

   ผสมส่วนผสมให้เข้ากันแล้วนำมากรองด้วยไซริงค์กรองสารขนาด 0.22 µm

ภาคผนวก ง

ผลการทดลอง

ANOVA

vitC

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	45392.173	10	4539.217	68.689	.000
Within Groups	2180.768	33	66.084		
Total	47572.941	43			

ภาพที่ 10 ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ MARC-145 ของวิตามินซีวิเคราะห์โดย ANOVA

vitC

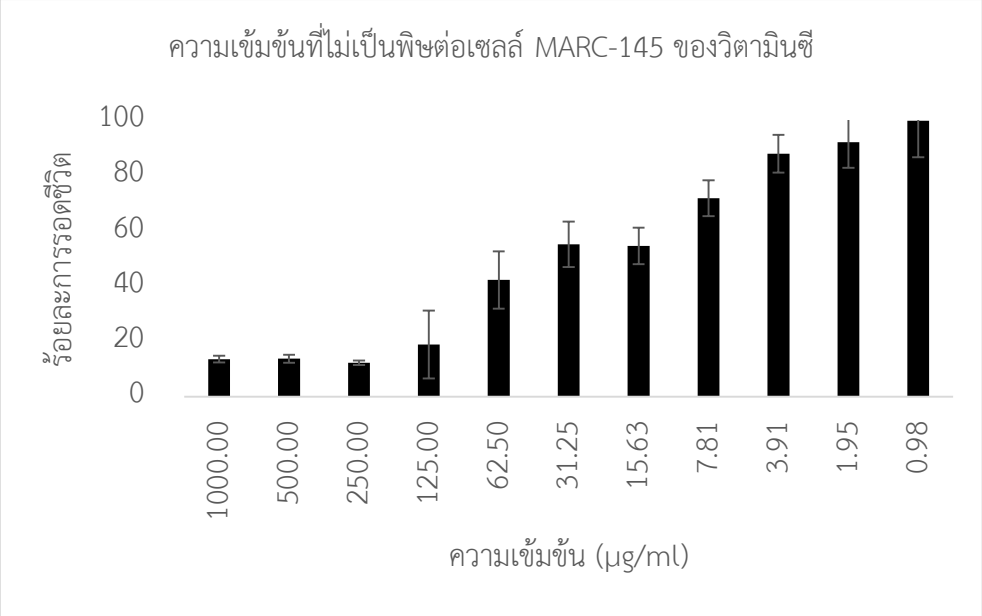
Tukey HSD[a]

cocnvitC	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
250.00	4	12.3358				
1000.00	4	13.6493				
500.00	4	13.8207				
125.00	4	18.9416				
62.50	4		42.3948			
15.63	4		54.7116	54.7116		
31.25	4		55.2637	55.2637		
7.81	4			72.0350	72.0350	
3.91	4				88.1401	88.1401
1.95	4					92.2901
.98	4					100.1523
Sig.		.984	.496	.132	.201	.592

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

ภาพที่ 11 ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ MARC-145 ของวิตามินซีวิเคราะห์โดย Tukey HSD[a]



ภาพที่ 12 ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ MARC-145 ของวิตามินซี

ANOVA

vitE

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	46408.594	10	4640.859	57.860	.000
Within Groups	1764.579	22	80.208		
Total	48173.172	32			

ภาพที่ 13 ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ MARC-145 ของวิตามินอีวิเคราะห์โดย ANOVA

vitE

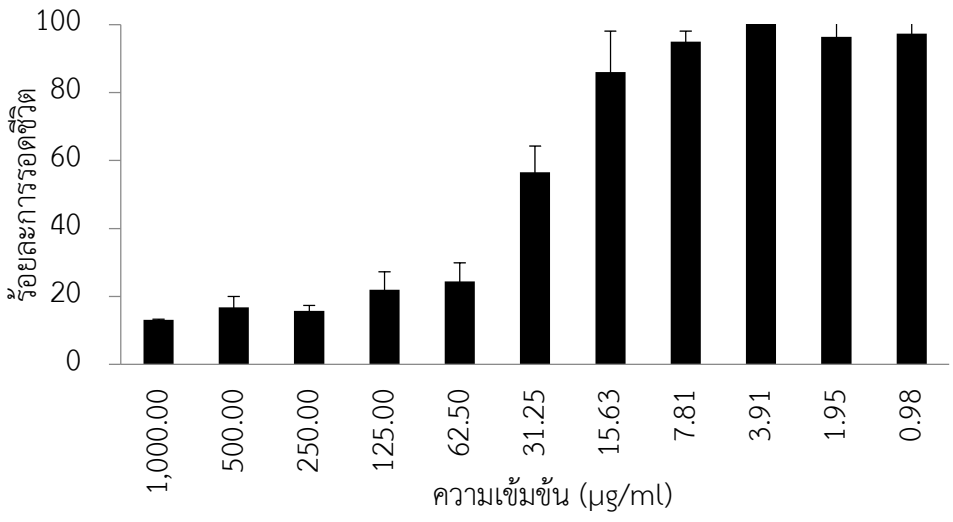
Tukey HSD[a]

concvitE	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
1000.00	3	13.0900		
250.00	3	15.7167		
500.00	3	16.7967		
125.00	3	22.0133		
62.50	3	24.4067		
31.25	3		56.5767	
15.63	3			86.0467
7.81	3			95.0033
1.95	3			96.4300
.98	3			97.3233
3.91	3			106.6633
Sig.		.887	1.000	.214

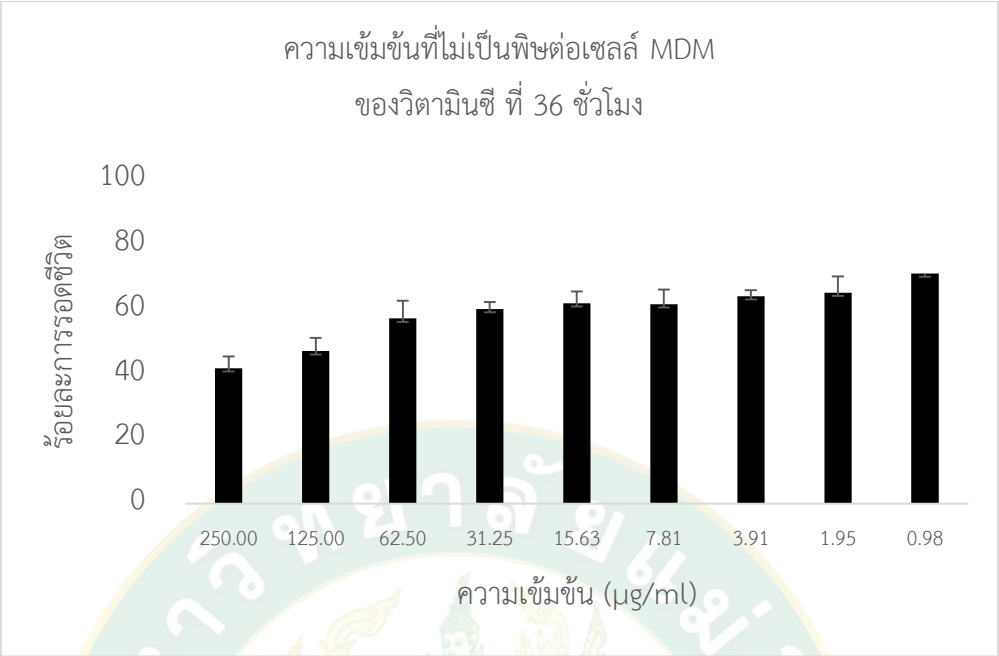
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

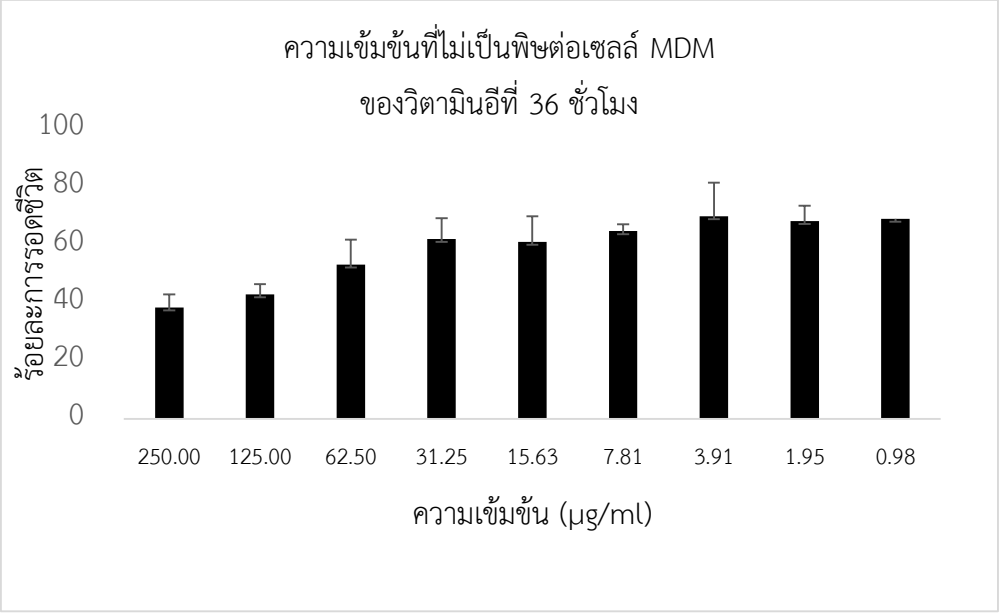
ภาพที่ 14 ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ MARC-145 ของวิตามินอีวิเคราะห์โดย Tukey HSD[a]



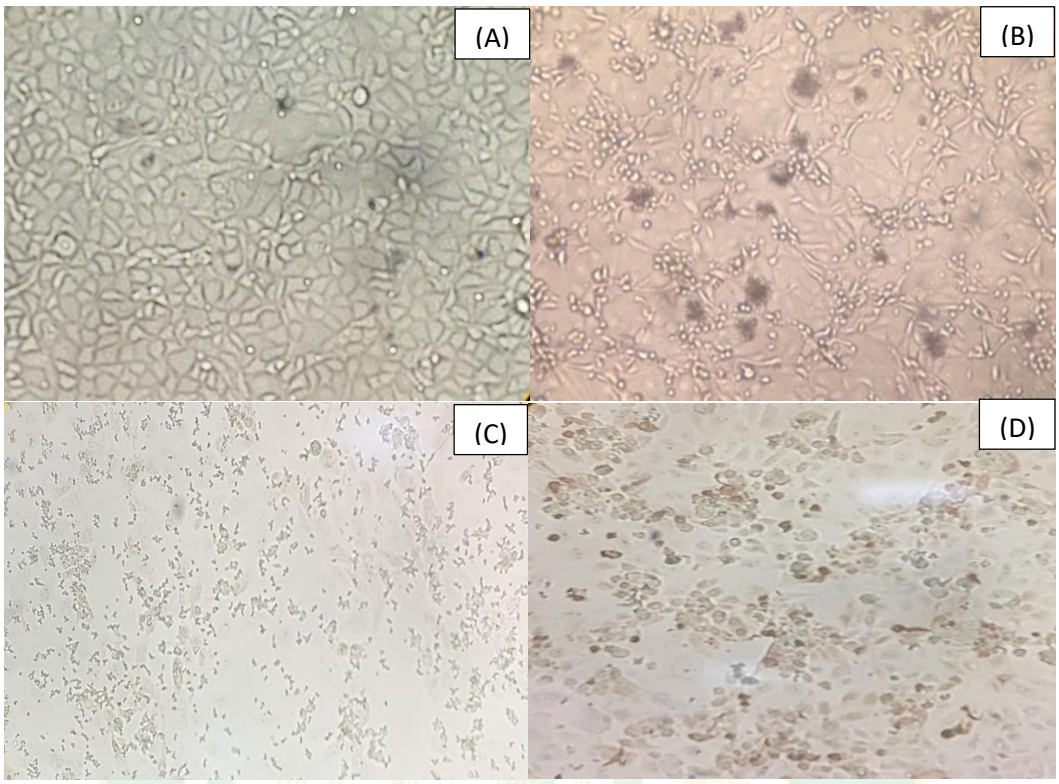
ภาพที่ 15 ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ MARC-145 ของวิตามินอี



ภาพที่ 16 ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ MDM ของวิตามินซีที่ 36 ชั่วโมง



ภาพที่ 17 ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ MDM ของวิตามินอีที่ 36 ชั่วโมง



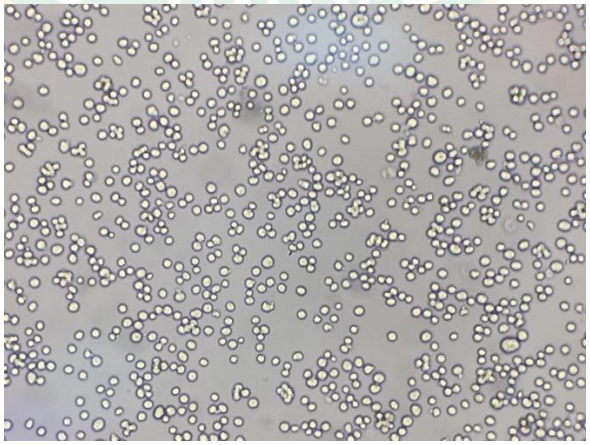
ภาพที่ 18 เซลล์ MARC-145

(A) MARC-145 non PRRSV

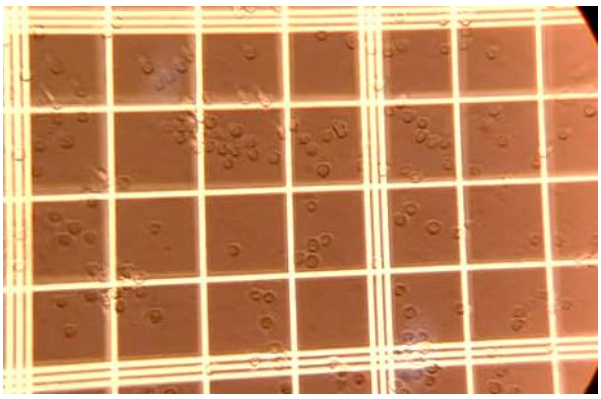
(B) CPE of MARC-145 with PRRSV

(C) IPMA of MARC-145 non PRRSV

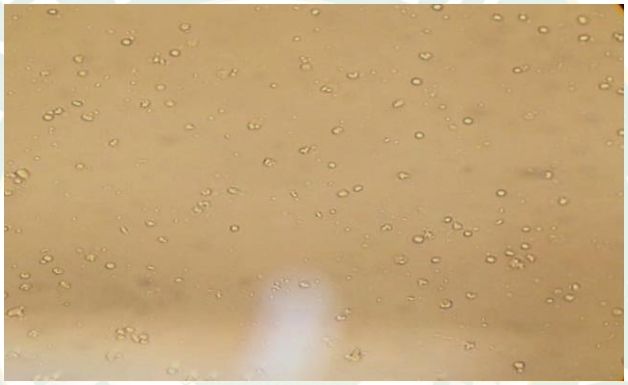
(D) IPMA of MARC-145 with PRRSV



ภาพที่ 19 เซลล์เชื้อไวรัส PRRS ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ



ภาพที่ 20 เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด peripheral blood mononuclear cell (PBMC)



ภาพที่ 21 เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด MDM

บรรณานุกรม

Arimori, Y., Nakamura, R., Yamada, H., Shibata, K., Maeda, N., Kase, T. & Yoshikai, Y. 2013. Type I interferon limits influenza virus-induced acute lung injury by regulation of excessive inflammation in mice. **Antiviral Research**, 99(3), 230-237.

Bender, B., Johnson, M. & Small, P. 1991. Influenza in senescent mice: impaired cytotoxic T-lymphocyte activity is correlated with prolonged infection. **Immunology**, 72(4), 514.

Bender, B. S. & Small Jr, P. A. 1992. **Influenza: pathogenesis and host defense**.

Beura, L. K., Sarkar, S. N., Kwon, B., Subramaniam, S., Jones, C., Pattnaik, A. K. & Osorio, F. A. 2010. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 1β modulates host innate immune response by antagonizing IRF3 activation. **Journal of Virology**, 84(3), 1574-1584.

Brigelius-Flohé, R. & Traber, M. G. 1999. Vitamin E: function and metabolism. **The FASEB Journal**, 13(10), 1145-1155.

Cai, Y., Li, Y. F., Tang, L. P., Tsoi, B., Chen, M., Chen, H., Chen, X. M., Tan, R. R., Kurihara, H. & He, R. R. 2015. A new mechanism of vitamin C effects on A/FM/1/47 (H1N1) virus-induced pneumonia in restraint-stressed mice. **BioMed Research International,** 2015.

Calvert, J. G., Slade, D. E., Shields, S. L., Jolie, R., Mannan, R. M., Ankenbauer, R. G. & Welch, S. K. W. 2007. CD163 expression confers susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. **Journal of Virology**, 81(14), 7371-7379.

Carr, A. C. & Lykkesfeldt, J. 2018. Vitamin C in Health and Disease.

Chan, A. C. 1993. Partners in defense, vitamin E and vitamin C. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, 71(9), 725-731.

Chang, W. P., Hom, J. S. H., Dietert, R. R., Combs, G. F. & Marsh, J. A. 1994. Effect of dietary vitamin E and selenium deficiency on chicken Splenocyte Proliferan and cell surface marker Expresssion. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, 16(2), 203-223.

Cheent, K. & Khakoo, S. I. 2009. Natural killer cells: integrating diversity with function. **Immunology**, 126(4), 449-457.

Chen, Z., Zhou, X., Lunney, J. K., Lawson, S., Sun, Z., Brown, E., Christopher-Hennings, J., Knudsen, D., Nelson, E. & Fang, Y. 2010. Immunodominant epitopes in nsp2 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus are dispensable for replication, but play an important role in modulation of the host immune response. **Journal of General Virology**, 91(4), 1047-1057.

Collins, J. E., Benfield, D. A., Christianson, W. T., Harris, L., Hennings, J. C., Shaw, D. P., Goyal, S. M., McCullough, S., Morrison, R. B. & Joo, H. S. 1992. Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, 4(2), 117-126.

Delputte, P., Costers, S. & Nauwynck, H. 2005. Analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus attachment and internalization: distinctive roles for heparan sulphate and sialoadhesin. **Journal of General Virology**, 86(5), 1441-1445.

Eskew, M. L., Scholz, R., Reddy, C., Todhunter, D. & Zarkower, A. 1985. Effects of vitamin E and selenium deficiencies on rat immune function. **Immunology**, 54(1), 173.

Fesq, H., Bacher, M., Nain, M. & Gemsa, D. 1994. Programmed cell death (apoptosis) in human monocytes infected by influenza A virus. **Immunobiology**, 190(1-2), 175-182.

Fitri, Z. E., Syahputri, L. N. Y. & Imron, A. M. N. 2020. Classification of white blood cell abnormalities for early detection of myeloproliferative neoplasms syndrome based on k-nearest neighbor. **Scientific Journal of Informatics** 7(1), 136-142.

Galliher-Beckley, A., Li, X., Bates, J. T., Madera, R., Waters, A., Nietfeld, J., Henningson, J., He, D., Feng, W. & Chen, R. S., Jishu. 2015. Pigs immunized with Chinese highly pathogenic PRRS virus modified live vaccine are protected from challenge with North American PRRSV strain NADC-20. **Vaccine**, 33(30), 3518-3525.

Ghanem, E. N. B., Clark, S., Du, X., Wu, D., Camilli, A., Leong, J. M. & Meydani, S. N. 2015. The **α**-tocopherol form of vitamin E reverses age-associated susceptibility

to streptococcus pneumoniae lung infection by modulating pulmonary neutrophil recruitment. **The Journal of Immunology**, 194(3), 1090-1099.

Guedes, R. M. C., Gebhart, C. J., Winkelman, N. L. & Mackie-Nuss, R. A. 2002. A comparative study of an indirect fluorescent antibody test and an immunoperoxidase monolayer assay for the diagnosis of porcine proliferative enteropathy. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, 14(5), 420-423.

Hayek, M. G., Taylor, S. F., Bender, B. S., Han, S. N., Meydani, M., Smith, D. E., Eghtesada, S. & Meydani, S. N. 1997. Vitamin E supplementation decreases lung virus titers in mice infected with influenza. **Journal of Infectious Diseases**, 176(1), 273-276.

Hemila, H. 2017. Vitamin C and Infections. **Nutrients**, 9(4).

Herrera, E. & Barbas, C. 2001. Vitamin E: action, metabolism and perspectives. **Journal of Physiology and Biochemistry**, 57(1), 43-56.

Houben, S., Callebaut, P. & Pensaert, M. 1995. Comparative study of a blocking enzyme-linked immunosorbent assay and the immunoperoxidase monolayer assay for the detection of antibodies to the porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pigs. **Journal of Virological Methods**, 51(1), 125-128.

Hunt, C., Chakravorty, N., Annan, G., Habibzadeh, N. & Schorah, C. 1994. The clinical effects of vitamin C supplementation in elderly hospitalised patients with acute respiratory infections. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, 64(3), 212-219.

Jacob, R. A. & Sotoudeh, G. 2002. Vitamin C function and status in chronic disease. **Nutrition in Clinical Care**, 5(2), 66-74.

Jensen, M., Fossum, C., Ederoth, M. & Hakkarainen, R. 1988. The effect of vitamin E on the cell-mediated immune response in pigs. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, 35(1-10), 549-555.

Kim, H., Jang, M., Kim, Y., Choi, J., Jeon, J., Kim, J., Hwang, Y.-i., Kang, J. S. & Lee, W. J. 2016. Red ginseng and vitamin C increase immune cell activity and decrease lung inflammation induced by influenza A virus/H1N1 infection. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 68(3), 406-420.

Kowdley, K. V., Mason, J. B., Meydani, S. N., Cornwall, S. & Grand, R. J. 1992. Vitamin E deficiency and impaired cellular immunity related to intestinal fat malabsorption. **Gastroenterology**, 102(6), 2139-2142.

Krinsky, N. I., Beecher, G., Burk, R., Chan, A., Erdman, j. J., Jacob, R., Jialal, I., Kolonel, L., Marshall, J. & Taylor Mayne, P. R. 2000. Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids. **Institute of Medicine**.

Kutlu, H., Avci, E. & Özyurt, F. 2020. White blood cells detection and classification based on regional convolutional neural networks. **Medical Hypotheses**, 135(109472).

La Gruta, N. L., Kedzierska, K., Stambas, J. & Doherty, P. C. 2007. A question of self-preservation: immunopathology in influenza virus infection. **Immunology and Cell Biology**, 85(2), 85-92.

Langweiler, M., Schultz, R. & Sheffy, B. 1981. Effect of vitamin E deficiency on the proliferative response of canine lymphocytes. **American Journal of Veterinary Research**, 42(10), 1681-1685.

Lewis, E. D., Meydani, S. N. & Wu, D. 2019. Regulatory role of vitamin E in the immune system and inflammation. **IUBMB life**, 71(4), 487-494.

Lunney, J. K., Fang, Y., Ladinig, A., Chen, N., Li, Y., Rowland, B. & Renukaradhya, G. J. 2016. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): pathogenesis and interaction with the immune system. **Annual Review of Animal Biosciences**, 4(129-154).

Montaner-Tarbes, S., del Portillo, H. A., Montoya, M. & Fraile, L. 2019. Key gaps in the knowledge of the porcine respiratory reproductive syndrome virus (PRRSV). **Frontiers in Veterinary Science**, 6(38).

Nelsen, C. J., Murtaugh, M. P. & Faaberg, K. S. 1999. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents. **Journal of Virology**, 73(1), 270-280.

Nexcelom, B. **Cytopathic Effect**. [Online]. Available https://www.nexcelom.com/applications/virology/cytopathic-effect/.

Reffett, J. K., Spears, J. W. & Brown Jr, T. T. 1988. Effect of dietary selenium and vitamin E on the primary and secondary immune response in lambs challenged with parainfluenza3 virus. **Journal of Animal Science**, 66(6), 1520-1528.

Shaik-Dasthagirisaheb, Y., Varvara, G., Murmura, G., Saggini, A., Caraffa, A., Antinolfi, P., Tete, S., Tripodi, D., Conti, F. & Cianchetti, E. 2013. Role of vitamins D, E and C in immunity and inflammation. **Journal of Biological Regulators & Homeostatic Agents**, 27(2), 291-295.

Snijder, E. J., Kikkert, M. & Fang, Y. 2013. Arterivirus molecular biology and pathogenesis. **Journal of General Virology**, 94(10), 2141-2163.

Strephonsays. 2560. ความแตกต่างระหว่าง Monocyte และ Macrophage. [Online]. Available https://th.strephonsays.com/difference-between-monocyte-and-macrophage.

Strober, W. 2015. Trypan blue exclusion test of cell viability. **Current Protocols in Immunology**, 111(1), A3-B.

Tengerdy, R., Heinzerling, R., Brown, G. & Mathias, M. 1973. Enhancement of the humoral immune response by vitamin E. **International Archives of Allergy and Immunology**, 44(2), 221-232.

Thanawongnuwech, R., Brown, G., Halbur, P., Roth, J., Royer, R. & Thacker, B. 2000. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced increase in susceptibility to *Streptococcus suis* infection. **Veterinary Pathology**, 37(2), 143-152.

Turner, R. & Finch, J. 1990. Immunological malfunctions associated with low selenium-vitamin E diets in lambs. **Journal of Comparative Pathology**, 102(1), 99-109.

Van Dinten, L., Wassenaar, A., Gorbalenya, A. E., Spaan, W. & Snijder, E. J. 1996. Processing of the equine arteritis virus replicase ORF1b protein: identification of cleavage products containing the putative viral polymerase and helicase domains. **Journal of Virology**, 70(10), 6625-6633.

Van Reeth, K., Labarque, G., Nauwynck, H. & Pensaert, M. 1999. Differential production of proinflammatory cytokines in the pig lung during different respiratory virus infections: correlations with pathogenicity. **Research in Veterinary Science**, 67(1), 47-52.

Wintergerst, E. S., Maggini, S. & Hornig, D. H. 2006. Immune-enhancing role of vitamin C and zinc and effect on clinical conditions. **Annals of Nutrition and Metabolism**, 50(2), 85-94.

Zhang, J., Liu, W., Chen, W., Li, C., Xie, M. & Bu, Z. 2016. Development of an immunoperoxidase monolayer assay for the detection of antibodies against peste des petits ruminants virus based on BHK-21 cell line stably expressing the goat signaling lymphocyte activation molecule. **Plos One**, 11(10), e0165088.

Zhou, Y. J., Hao, X. F., Tian, Z. J., Tong, G. Z., Yoo, D., An, T. Q., Zhou, T., Li, G. X., Qiu, H. J. & Wei, T. C. 2008. Highly virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus emerged in China. **Transboundary and Emerging Diseases**, 55(3-4), 152-164.

โครงการทรูปลูกปัญญา. 2560. ส่วนประกอบของเลือด. [Online]. Available https://www.trueplookpanya.com/knowledge/content/60781/-scibio-sci-.

ณตพล ศุภณัฐเศรษฐกุล. 2552. Immunopathology. (Publication. Available http://www.med.nu.ac.th/pathology/405313/immunopathodent52sheet.pdf

ทิพวัลย์ จันทะฟอง. 2561. การพัฒนาวัคซีนรูปแบบใหม่ต่อไวรัสพีอาร์อาร์เอสในสุกร. **Journal of Mahanakorn Veterinary Medicine**, 13(1), 85-99.

สมาคมสัตวแพทย์ควบคุมฟาร์มสุกรไทย. 2554. แนวทางการปฏิบัติงานทางคลินิกต่อปัญหาโรคพีอาร์อาร์เอสในประเทศไทย ปรับปรุงครั้งที่ 3. [Online]. Available http://niah.dld.go.th/th/index.php?option=com_content&view=article&id=399:controlprrs3&catid=24:book&Itemid=300.

สุภาพร ภูมิอมรม., ณัฐกานต์, มิ่งงามทรัพย์. & กรณิกา, กุลบุตร. (2553). การเปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบค่าความแรงของวัคซีนป้องกันโรคสุกใส ระหว่างวิธี plaque assay และวิธี $CCID_{50}$. In สถาบันชีววัตถุ. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.

หนูจันทร์ มาตา. 2554. โรคพีอาร์อาร์เอสกับความเสียหายของสุกร. วารสารปศุสัตว์เกษตรศาสตร์, 149), 18-25.

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล นางสาวพิชานันท์ สืบสอาด

เกิดเมื่อ 2 ตุลาคม 2537

ประวัติการศึกษา ปี พ.ศ. 2550 ระดับมัธยมศึกษา โรงเรียนเซนต์โยเซฟนครสวรรค์

ปี พ.ศ. 2556 ระดับปริญญาตรี คุณวุฒิ วท.บ. (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ประวัติการทำงาน 1. ชื่อเรื่องที่นำเสนอ ผลของสารพฤกษเคมี และวิตามินต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสพีอาร์อาร์เอส

ชื่อการประชุมวิชาการ การประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต ครั้งที่ 11 : 2561 "การบูรณาการภูมิปัญญาสู่นวัตกรรมและการพัฒนาท้องถิ่นอย่างยั่งยืน"

ชื่อหน่วยงานที่จัดประชุม มหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต

สถานที่จัดประชุม ณ อาคารเฉลิมพระเกียรติมหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต

วัน เดือน ปี ที่จัดประชุม 20/ธันวาคม/2561 หน้าที่ตีพิมพ์ 382

2. ชื่อเรื่องที่นำเสนอ Effects of phytochemicals and vitamins on inhibition of porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication and preliminary ex vivo assessment of gallic acid in porcine peripheral blood mononuclear cells and monocyte-derived macrophages

ชื่อการประชุมวิชาการ The International Conference of Science and Technology 2019(TICST 2019)

ชื่อหน่วยงานที่จัดประชุม National Pingtung University

สถานที่จัดประชุม National Pingtung University Taiwan

วัน เดือน ปี ที่จัดประชุม 22-24/พฤศจิกายน/2562 Paper ID : S77