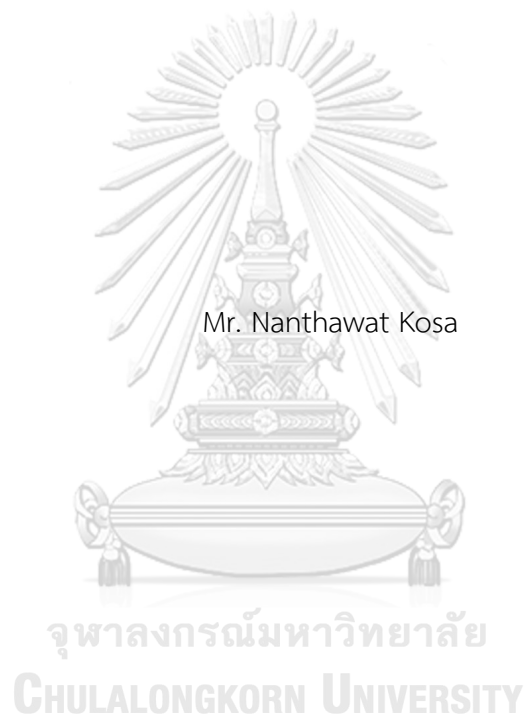


การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของส่วนประกอบเลือดจากตัวเงินตัวทอง (*Varanus salvator*)



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน ภาควิชาเวช  
ศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก  
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2562  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

STUDY OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF THE BLOOD COMPONENTS OF MONITOR  
LIZARD (*Varanus salvator*)



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Molecular Science of Medical Microbiology and  
Immunology

Department of Transfusion Medicine and Clinical Microbiology

FACULTY OF ALLIED HEALTH SCIENCES

Chulalongkorn University

Academic Year 2019

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของส่วนประกอบเลือดจากตัวเงินตัวทอง ( <i>Varanus salvator</i> )
โดย	นายณัฏฐวัฒน์ โฆษา
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เขมาภรณ์ บุญบำรุง

---

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.....	คณบดีคณะสหเวชศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปาลณี อัมรานนท์)	
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ประธานกรรมการ
.....	
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน รัชวงศ์จิรกุล)	อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
.....	
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เขมาภรณ์ บุญบำรุง)	กรรมการ
.....	
(อาจารย์ ดร.รัชนิพร ตียะวิสุทธิ์ศรี)	กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
.....	
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีรพร กทิตาสตรี)	

นันทวัฒน์ โฆษา : การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของส่วนประกอบเลือดจากตัวเงินตัวทอง (*Varanus salvator*). (STUDY OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF THE BLOOD COMPONENTS OF MONITOR LIZARD (*Varanus salvator*)) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เขมาภรณ์ บุญบำรุง

สถานการณ์การดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียเป็นปัญหาใหญ่ที่ส่งผลกระทบต่อทั่วโลก จึงจำเป็นต้องศึกษาเพื่อพัฒนาสารทดแทนยาปฏิชีวนะ ตัวเงินตัวทอง (*Varanus salvator*) เป็นสัตว์เลื้อยคลานมีความสามารถในการอยู่รอดจากสภาวะที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อ อาจเนื่องจากสัตว์เหล่านี้มีระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดซึ่งมีวิวัฒนาการมาแต่โบราณจึงเป็นจุดเด่นที่น่าสนใจ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียขององค์ประกอบเลือดจากตัวเงินตัวทองและโปรตีนหรือเปปไทด์ที่มีคุณสมบัติต้านจุลชีพ ซึ่งข้อมูลของลำดับกรดอะมิโนของตัวเงินตัวทองที่ได้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้จะเป็นพื้นฐานที่สำคัญใน โดยนำพลาสมาและซีรัมจากตัวเงินตัวทองมาทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคด้วยเทคนิค agar diffusion พบว่าพลาสมาสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุดมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสยับยั้งเชื้อ (inhibition zone) เท่ากับ 17-20 มิลลิเมตร เมื่อทำการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของพลาสมาและซีรัมที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (minimal inhibitory concentration, MIC) ด้วยวิธี broth dilution พบว่าสารสกัดพลาสมาให้ผลการทดสอบกับเชื้อได้ดีที่สุดโดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MIC) เท่ากับ 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากผลของการแยกบริสุทธิ์บางส่วนของพลาสมาและซีรัมโดยเทคนิค ion exchange chromatography ด้วย Q - sepharose คอลัมน์ พบว่าทั้งพลาสมาและซีรัมสามารถแยกโปรตีนแพรคชันได้ 5 แพรคชันเท่ากัน เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) พบขนาดโมเลกุลอยู่ระหว่าง 16 – 200 กิโลดัลตัน แต่เมื่อทดสอบคุณสมบัติการต้านเชื้อ พบบางแพรคชันจากพลาสมา (P) และซีรัม (S) ซึ่งกำหนดเป็น P1 / P2 / P5 และ S1 / S2 / S4 ตามลำดับ ที่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยเทคนิค liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) สามารถระบุชนิดโปรตีนได้ทั้งหมด 33 ชนิดและพบโปรตีนที่มีศักยภาพเป็นเปปไทด์ต้านจุลชีพ 15 ชนิด มีเพียง 3 ชนิด จากส่วนของพลาสมา (P1) 2 ชนิด และ (P2) 1 ชนิด ที่มีโครงสร้างเป็น  $\alpha$ -helical peptide ซึ่งเป็นคุณสมบัติของเปปไทด์ต้านจุลชีพ เปปไทด์ที่พบในการศึกษานี้มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นสารต้านการติดเชื้อและมีคุณค่าต่อการรักษาโรคติดเชื้อ งานวิจัยนี้เป็นการรายงานครั้งแรกถึงประสิทธิภาพการต้านเชื้อจุลชีพจากเปปไทด์ที่แยกได้จากพลาสมาและซีรัมของตัวเงินตัวทอง ซึ่งควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงโครงสร้าง กลไกการออกฤทธิ์ของเปปไทด์เหล่านี้เพื่อพัฒนาเป็นยาด้านจุลชีพชนิดใหม่

สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน	ลายมือชื่อนิสิต .....
ปีการศึกษา	2562	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

# # 5976757237 : MAJOR MOLECULAR SCIENCE OF MEDICAL MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY

KEYWORD: water monitor lizard, *Varanus salvator*, Reptile, Antibacterial agent

Nanthawat Kosa : STUDY OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF THE BLOOD COMPONENTS OF MONITOR LIZARD (*Varanus salvator*). Advisor: Asst. Prof. Dr. KHAEMAPORN BOONBUMRUNG, Ph.D.

The water monitor (*Varanus salvator*) is a large varanid lizard. Water monitor lizard has a challenge with an opportunistic bacterial infection but no evidence for adverse effects. These animals have an evolutionarily ancient innate immune system which a great part of the research. The purposes of this research were to study antibacterial activities of the blood components from the water monitor lizard and to identify protein and antimicrobial peptides. This study generated an initial database of the related protein involved with the water monitor lizard immune system that could lead to developing the newly antimicrobial peptides in the future. Both plasma and serum were evaluated their inhibitory effect against pathogenic bacteria by agar well diffusion technique. The result showed that crude plasma could inhibit against all tested bacteria strains with the inhibition zone of 17-20 mm. The minimal inhibitory concentration (MIC) of plasma and serum were tested by broth microdilution technique. The MIC of the plasma is presented by 125 ug/ul. The crude plasma serum was purified by anion exchange column chromatography with Q – sepharose. Five peaks of the purified plasma and serum were determined to 16 and 200 kDa by Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE). The protein fraction from plasma (P) and serum (S), defined as P1/P2/ P5 and S1/S2/S4, showed antibacterial activity against tested bacteria strains. The protein fraction, based on the proteomics approach, found 33 proteins with revealed 15 interesting proteins as potential antimicrobial peptides. Additionally, the structure of  $\alpha$ -helical peptide was found in plasma fraction by two peptides (P1) and one peptide (P2) which was shown as a property of the antimicrobial peptides. These peptides with the greatest potential for development into a therapeutically valuable anti-infective agent. This research is the first report of antimicrobial efficacy from peptides which isolated from plasma and serum of the water monitor lizard. This should be further studied in the structure and mechanism of these peptides to develop into novel antimicrobial agents.

Field of Study: Molecular Science of Medical      Student's Signature .....

Microbiology and Immunology

Academic Year: 2019

Advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เขมาภรณ์ บุญบำรุง อาจารย์ที่ปรึกษาหลักวิทยานิพนธ์ และคุณวินันท์ วิระนะ หัวหน้าสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาสน รวมถึงเจ้าหน้าที่ของสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาสน จังหวัดราชบุรี ทุกท่าน และขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล ประธานกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ อีรพร กทิตศาสตร์ อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่สละเวลามาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยจากกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ประจำปีงบประมาณ 2562 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ขอขอบคุณภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในการทำวิจัย รวมถึงทุกกำลังใจจากเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกันทุกท่านที่ช่วยอำนวยความสะดวกและช่วยเหลือในระหว่างการทำงานวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

นนทวัฒน์ โฆษณา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

## สารบัญ

	หน้า
.....	ค
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ.....	ฐ
บทที่ 1.....	1
บทนำ.....	1
1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
1.2. คำถามของการวิจัย.....	3
1.3. วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
1.4. สมมุติฐาน.....	3
1.5. กรอบแนวความคิดในการวิจัย.....	4
1.6. ขอบเขตงานวิจัย.....	5
1.7. สถานที่ทำการศึกษาวิจัย.....	5
1.8. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
บทที่ 2.....	6
ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	6
2.1. การติดเชื้อแบคทีเรีย.....	6
2.1.1 ปัญหาทางด้านสาธารณสุข.....	6
2.1.2 เชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญทางสาธารณสุข.....	7
2.2 โรคติดเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะ.....	17

2.2.1	สภาพปัญหาและผลกระทบจากการดื้อยาปฏิชีวนะ .....	18
2.2.2	ปัจจัยที่ส่งผลต่อการเกิดและการแพร่กระจายเชื้อดื้อยา.....	18
2.3	แนวทางการใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ .....	19
2.3.1	สมุนไพร .....	19
2.3.2	อนุภาคนาโน.....	20
2.3.3	เปปไทด์ต้านจุลชีพ (antimicrobial peptides) .....	21
2.3.3.1	อันดับ Testudines (เต่า) .....	22
2.3.3.2	อันดับ Sphenodontia (หัวทारा).....	22
2.3.3.3	อันดับ Squamata (งู และ ลิซาร์ด) .....	22
2.3.3.4	อันดับ Crocodylia (จระเข้).....	23
2.4	สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในสัตว์เลื้อยคลาน .....	23
2.4.1	โปรตีนต้านจุลชีพในสัตว์เลื้อยคลาน.....	24
2.4.2	เปปไทด์ต้านจุลชีพในสัตว์เลื้อยคลาน.....	25
2.4.3	ลักษณะทั่วไปของตัวเงินตัวทอง.....	28
2.5	กลไกการป้องกันการติดเชื้อโรคของสัตว์เลื้อยคลาน .....	32
2.5.1	เชิงพฤติกรรม .....	32
2.5.2	ระบบภูมิคุ้มกันแบบสืบทอดแต่กำเนิด (innate immunity).....	32
2.5.3	ระบบภูมิคุ้มกันแบบที่ต้องมีการกระตุ้น (adaptive immunity) .....	33
2.5.3.1	ระบบภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ (cell-mediated immunity).....	34
2.5.3.2	ระบบภูมิคุ้มกันด้านสารน้ำ (humoral adaptive immunity) .....	35
2.6	อวัยวะที่สร้างภูมิคุ้มกันในสัตว์เลื้อยคลาน .....	36
2.6.1	ไขกระดูก (bone marrow).....	36
2.6.2	ต่อมไทมัส (thymus gland) .....	36
2.6.3	ม้าม (spleen) .....	36
2.6.4	ต่อมน้ำเหลืองบริเวณทางเดินอาหาร (payer path) .....	36
2.7	องค์ประกอบในน้ำเลือดของสัตว์เลื้อยคลาน.....	37
2.7.1	ส่วนของเซลล์ (corpuscle).....	37



2.7.1.1 เม็ดเลือดแดง (red blood cells).....	37
2.7.1.2 เซลล์เม็ดเลือดขาว (white blood cells).....	37
2.7.2 ส่วนของน้ำเลือด.....	38
2.8 การใช้ประโยชน์จากตัวเงินตัวทอง .....	39
บทที่ 3 .....	40
วัสดุและวิธีการดำเนินการวิจัย.....	40
3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย .....	40
3.1.1 อุปกรณ์และสารเคมี .....	40
3.1.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย .....	42
3.2. เชื้อทดสอบที่ใช้ในการวิจัย.....	43
3.2.1 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้งานวิจัยและแหล่งที่มาของเชื้อ .....	43
3.2.2 การต่อเชื้อ (subculture) และการเก็บรักษาเชื้อทดสอบ.....	43
3.2.3 การเตรียมกล้าเชื้อสำหรับทดสอบ .....	43
3.3. ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง .....	44
3.3.1 การเก็บตัวอย่างเลือดจากตัวเงินตัวทอง.....	44
3.3.2 การแยกองค์ประกอบน้ำเลือดของตัวเงินตัวทอง.....	45
3.4. การวัดความเข้มข้นของโปรตีน.....	46
3.5. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียจากองค์ประกอบเลือด .....	47
3.5.1 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบพลาสมา และ สารสกัดหยาบซีรัม ที่ได้จากเลือดตัวเงินตัวทองโดยวิธี agar well diffusion method .....	47
3.5.2 การหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (minimal inhibitory concentration, MIC) จากสารสกัดหยาบพลาสมาและสารสกัดหยาบซีรัม ที่ได้จาก เลือดตัวเงินตัวทอง ด้วยวิธี broth microdilution (161).....	48
3.6. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียจากสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากสารสกัด หยาบพลาสมาและซีรัมจากเลือดตัวเงินตัวทอง.....	50
3.6.1 การแยกบริสุทธิ์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพบางส่วนจากสารสกัดหยาบพลาสมา และ สารสกัดหยาบซีรัมจากเลือดตัวเงินตัวทอง ด้วยเทคนิค ion exchange chromatography.....	50

3.6.2 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพบางส่วนที่แยกได้จากสารสกัด หยาบพลาสมาและสารสกัดหยาบซีรัมจากเลือดตัวเงินตัวทอง ด้วยเทคนิค sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) .....	51
3.6.3 การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกได้จากสารสกัดหยาบ พลาสมาและซีรัมจากเลือดตัวเงินตัวทองที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (minimal inhibitory concentrations, MIC).....	55
โดยใช้ความเข้มข้นของโปรตีนแฟรกชันในรูปแบบ pooled fraction และ                   มี positive control คือ gentamycin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ส่วน negative control ที่ใช้ คือน้ำกลั่นปลอดเชื้อ มีขั้นตอนดังนี้ .....	55
3.7 การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของโปรตีนด้วย LC-MS/MS .....	56
3.7.1 การย่อยโปรตีนแฟรกชันด้วยเอนไซม์ทริปซิน.....	56
3.7.2 การตรวจวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของโปรตีน (protein identification) ที่ เป็นองค์ประกอบจากเลือดของตัวเงินตัวทองด้วยเครื่อง LC-MS/MS-QTOF.....	57
3.7.3 การระบุชนิดของโปรตีนด้วยโปรแกรม Mascot .....	57
3.7.4 การวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหา potential protein antimicrobial peptide ด้วย โปรแกรม antimicrobial peptide calculator and predictor.....	58
3.7.5 การทำนายโครงสร้างทุติยภูมิของชนิดโปรตีนที่พบด้วยโปรแกรม PEPFOLD.....	58
บทที่ 4 .....	63
ผลการทดลอง .....	63
4.1 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบ พลาสมาและ สารสกัดหยาบซีรัมที่แยกได้จากเลือด .....	63
4.1.1 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบพลาสมา และสารสกัดหยาบซีรัมที่ได้จากเลือดตัวเงินตัวทองโดยวิธี agar well diffusion method.....	63
4.1.2. ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบ พลาสมาและสารสกัดหยาบซีรัมที่แยกได้จากเลือดตัวเงินตัวทอง.....	66
4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพบางส่วน จากสาร สกัดหยาบพลาสมาและสารสกัดหยาบซีรัมที่แยกได้จากเลือดตัวเงินตัวทอง.....	69

4.2.1 การแยกบริสุทธิ์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพบางส่วนจากสารสกัดหยาบพลาสมา และสารสกัดหยาบซีรัมที่แยกได้จากเลือดตัวเงินตัวทองด้วยเทคนิค ion exchange chromatography.....	69
4.2.2 การตรวจสอบความบริสุทธิ์และหาน้ำหนักโมเลกุลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยเทคนิค sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).....	70
4.2.3 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกได้จากสารสกัดหยาบพลาสมาและสารสกัดหยาบซีรัมจากเลือดตัวเงินตัวทอง ด้วยเทคนิค broth dilution method .....	74
4.2.4 การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของโปรตีนในสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกได้จากสารสกัดหยาบพลาสมาและสารสกัดหยาบซีรัมจากเลือดตัวเงินตัวทอง ด้วยเทคนิค LC-MS/MS.....	76
4.2.5. วิเคราะห์หน้าที่ของโปรตีนที่พบในสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกบริสุทธิ์บางส่วนจากสารสกัดหยาบพลาสมา และสารสกัดหยาบซีรัม ที่แยกได้จากเลือดตัวเงินตัวทอง .....	87
4.2.6 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหา potential protein antimicrobial peptide .....	93
บทที่ 5 .....	99
สรุปผลการวิจัย อภิปรายและข้อเสนอแนะ.....	99
5.1 อภิปรายผลการทดลอง.....	99
5.2 สรุปผลการทดลอง .....	105
5.3 ข้อเสนอแนะ .....	106
บรรณานุกรม.....	107
ประวัติผู้เขียน.....	123

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel .....	54
ตารางที่ 2 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม stacking gel.....	54
ตารางที่ 3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียด้วยสารสกัดหยาบ พลาสมาที่ได้จากเลือดตัวเงินตัวทอง โดยวิธี agar well diffusion method.....	64
ตารางที่ 4 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียด้วยสารสกัดหยาบซีรัม ที่ได้จากเลือดตัวเงินตัวทองโดยวิธี agar well diffusion method.....	64
ตารางที่ 5 แสดงความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัด หยาบพลาสมาและสารสกัดหยาบซีรัมที่แยกได้จากองค์ประกอบของเลือดจากตัวเงินตัวทอง .....	67
ตารางที่ 6 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (MIC) จากพลาสมาและ ซีรัมตัวเงินตัวทองหลังจากการแยกบริสุทธิ์บางส่วนด้วย Q-sepharose column.....	75
ตารางที่ 7 การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของของโปรตีนจากแฟรกชันโปรตีน P1, P2, และ P5 ที่ได้จากสารสกัดหยาบพลาสมา โดย LC-MS/MS.....	81
ตารางที่ 8 การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของของโปรตีนจากแฟรกชันโปรตีน S1, S2, และ S4 ที่ได้จากสารสกัดหยาบซีรัม โดย LC-MS/MS.....	84
ตารางที่ 9 แสดงชนิดโปรตีนที่พบในพลาสมาและซีรัม .....	86
ตารางที่ 10 การจำแนกกลุ่มโปรตีนตามหน้าที่ (National Center for Biotechnology Information, NCBI).....	88
ตารางที่ 11 แสดงคุณสมบัติของลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการจำลองด้วยโปรแกรม APD3: antimicrobial peptide calculator and predictor จากสารสกัดหยาบพลาสมาและ สารสกัด หยาบซีรัม.....	94
ตารางที่ 12 ผลการจำลองด้วยโปรแกรม APD3: antimicrobial peptide calculator and predictor ของลำดับกรดอะมิโนจากสารสกัดหยาบพลาสมา .....	95
ตารางที่ 13 ผลการจำลองด้วยโปรแกรม APD3: antimicrobial peptide calculator and predictor ของลำดับกรดอะมิโนจากสารสกัดหยาบซีรัม .....	96

## สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1 อัตราการดื้อยา (%R) ของยาปฏิชีวนะ imipenem ของเชื้อแบคทีเรีย <i>P. aeruginosa</i> และเชื้อกลุ่ม <i>Acinetobacter spp.</i> ตั้งแต่ปี 2000-2016 ในประเทศไทย ศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้าน จุลชีพแห่งชาติ กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดนนทบุรี (28).....	8
รูปที่ 2 แนวโน้มการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียที่สำคัญทางการแพทย์ (28).....	9
รูปที่ 3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ <i>A. baumannii</i> (43) .....	11
รูปที่ 4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ <i>S. aureus</i> (56).....	14
รูปที่ 5 รูปแบบแสดง ชั้น peptidoglycan ของผนังเซลล์ของแบคทีเรีย .....	14
รูปที่ 6 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ <i>E. coli</i> (43).....	16
รูปที่ 7 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ <i>P. aeruginosa</i> (75).....	17
รูปที่ 8 โปรตีนและเปปไทด์ที่พบจากอวัยวะหรือองค์ประกอบต่างๆ ของจระเข้สายพันธุ์ไทย (135) 27	
รูปที่ 9 ตัวเต็มวัยของตะกวด clouded monitor (143).....	30
รูปที่ 10 เปรียบเทียบลักษณะของหัวและตำแหน่งของรูจมูก.....	30
รูปที่ 11 เहांซ้าง rough neck monitor (144).....	31
รูปที่ 12 ตุ๊ดตู่ dumeril's monitor (144).....	31
รูปที่ 13 ลักษณะเซลล์เม็ดเลือดของสัตว์เลื้อยคลาน (ก) เซลล์เม็ดเลือดแดงจระเข้ (ข) เซลล์เม็ดเลือดแดงอี๊กัวนา (ค) เซลล์เม็ดเลือดแดงเต่า (ง) เซลล์ทรอมโบไซต์ (จ) เฮเทอโรฟิลจระเข้ (ฉ) เฮเทอโรฟิลเต่า (ช) อีโอซิโนฟิลเต่า (ฌ) แอโซโรฟิล (ญ) โมโนไซต์ (ฎ) ลิมโฟไซต์ (ด) เบโซฟิล (152).....	35
รูปที่ 14 รูปแบบการเจาะรูบนอาหาร mueller -hinton agar เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบพลาสมาและสารสกัดหยาบซีรัม.....	48
รูปที่ 15 แสดงขั้นตอนการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (minimum inhibition concentration: MIC) ของสารสกัดหยาบพลาสมาและสารสกัดหยาบซีรัมที่ได้จากตัวเงินตัวทอง.....	49
รูปที่ 16 การแยกโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE ประกอบด้วย stacking gel และ resolving gel (163) .....	53
รูปที่ 17 การกำหนดค่า search parameter.....	59
รูปที่ 18 หน้าต่างเว็บไซต์ของฐานข้อมูลเปปไทด์ต้านจุลชีพ (167).....	60

รูปที่ 19 ตัวอย่างผลการทำนายและรายละเอียดของตัวอย่างเปปไทด์ด้านจุลชีพ (168) ..... 61

รูปที่ 20 ตัวอย่างผลการทำนายและรายละเอียดของตัวอย่างเปปไทด์ด้านจุลชีพ (168) ..... 62

รูปที่ 21 ตัวอย่างการเกิดวงใสยับยั้งของสารสกัดหยาบพลาสมาที่ความเข้มข้น 100%, 75%, 50%, 25%, 10% และ 5% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ที่ได้จากเลือดตัวเงินตัวทอง แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 และเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 ด้วยวิธี agar well diffusion ..... 65

รูปที่ 22 ตัวอย่างการเกิดวงใสยับยั้งของสารสกัดหยาบซีรัมที่ความเข้มข้น 100%, 75%, 50%, 25%, 10% และ 5% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ที่ได้จากเลือดตัวเงินตัวทอง แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 และเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 ด้วยวิธี agar well diffusion ..... 66

รูปที่ 23 ตัวอย่างผลความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบพลาสมาในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 และเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 ..... 68

รูปที่ 24 ตัวอย่างผลความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบซีรัมในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อ ..... 68

รูปที่ 25 Elution profile การแยกบริสุทธิ์ของสารสกัดหยาบซีรัม ด้วยเทคนิค ion exchange chromatography (HiTrap Q FF,GE) ด้วยเครื่อง fast protein liquid chromatography (FPLC) โดยตรวจติดตามโปรตีนแฟรกชันที่ 280 nm ..... 71

รูปที่ 26 Elution profile การแยกบริสุทธิ์ของสารสกัดหยาบจากพลาสมา ด้วยเทคนิค ..... 71

รูปที่ 27 การตรวจสอบความบริสุทธิ์เบื้องต้นโดยวิธี SDS-PAGE ของโปรตีนแฟรกชันที่ได้ ..... 72

รูปที่ 28 การตรวจสอบความบริสุทธิ์เบื้องต้น โดยวิธี SDS-PAGE ของโปรตีนแฟรกชันที่ได้ ..... 73

รูปที่ 29 mass spectrum ของ (1) โปรตีนแฟรกชัน P1 (2) โปรตีนแฟรกชัน P2 ..... 77

รูปที่ 30 mass spectrum mass spectrum ของ (1) โปรตีนแฟรกชัน S1 (2) โปรตีนแฟรกชัน S2 ..... 78

รูปที่ 31 ตัวอย่างการระบุโปรตีนแฟรกชัน P1 จากพลาสมาของตัวเงินตัวทอง (1) mascot search result แสดงชนิดของโปรตีนที่ระบุชนิดได้ (protein hits) (2) รายละเอียดของ protein hits แสดง mascot score จำนวน peptide matches และ sequence ที่ match กับโปรตีนชนิดดังกล่าว ในตัวอย่างนี้จะเห็นว่าโปรตีนที่มีคะแนนสูงสุดคือ Complement C3 ..... 79

รูปที่ 32 protein view แสดงรายละเอียดของโปรตีนที่ระบุชนิดได้ ตามฐานข้อมูล SWISS-PROT และ protein sequence coverage ..... 80

รูปที่ 33 โครงสร้างทุติยภูมิของ potential antimicrobial peptide ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ซึ่งวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม PEP-FOLD ..... 98

รูปที่ 34 โครงสร้างทุติยภูมิของ potential antimicrobial peptide ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ซึ่งวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม PEP-FOLD ..... 98

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่แพร่ขยายวงกว้างและเพิ่มความรุนแรงมากขึ้นตามลำดับ มีสาเหตุส่วนหนึ่งมาจากพฤติกรรมของมนุษย์ เช่น การเข้าถึงยาปฏิชีวนะได้ง่ายหรือสามารถหาซื้อรับประทานเองได้เมื่อเกิดอาการเจ็บป่วย ขาดความรู้ความเข้าใจต่อการใช้ยาปฏิชีวนะจนทำให้เกิดผลกระทบที่ตามมาจากพฤติกรรมเหล่านั้น (1) การรับประทานยาไม่ครบตามแพทย์สั่ง หยุดยาเองเมื่ออาการบรรเทา ซึ่งเป็นสาเหตุร่วมทำให้เชื้อก่อโรคถูกกระตุ้นและสร้างกลไกป้องกันตัวเองต่อยาปฏิชีวนะ ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการรักษาหรือยับยั้งเชื้อโรคลดลง จนในที่สุดไม่สามารถใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษา ปัญหาเชื้อจุลชีพดื้อยา (antimicrobial resistant: AMR) ได้กลายเป็นปัญหาทางสาธารณสุขและภัยคุกคามทางสุขภาพที่ส่งผลกระทบต่อประชาชนทั่วโลก (2) หลายนวัตกรรมที่ผ่านมานักวิจัยได้พยายามค้นคว้าวิจัยสารต่างๆ ที่มาจากธรรมชาติทั้งพืช สัตว์และจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่มีประสิทธิภาพในการทำลายหรือยับยั้งเชื้อก่อโรคได้เพื่อนำมาทดแทนยาปฏิชีวนะและเพื่อลดผลกระทบของปัญหาเชื้อจุลชีพดื้อยานอกเหนือจากนั้นยังลดการสูญเสียทางเศรษฐกิจ โดยมุ่งหวังว่าสารทดแทนที่ได้จะมีคุณสมบัติในการทำลายเชื้อจุลชีพและออกฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพได้หลายชนิด (broad spectrum) มีความคงตัวและที่สำคัญต้องไม่เกิดผลข้างเคียงจากการใช้สารที่ได้ โปรตีนหรือเปปไทด์ต้านจุลชีพเป็นตัวเลือกที่นักวิจัยให้ความสนใจโดยมีการค้นคว้าอย่างต่อเนื่องเป็นจำนวนมากเปปไทด์ต้านจุลชีพ (antimicrobial peptides) ที่เกิดจากการวิวัฒนาการที่ซับซ้อนของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด มีการศึกษาเกี่ยวกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเหล่านี้ในสัตว์เลื้อยคลานถึงระดับโครงสร้างของโมเลกุลรวมถึงกลไกการทำลายหรือยับยั้งเชื้อจุลชีพ มีรายงานการวิจัยของสารสกัดที่ได้จากจระเข้ งู และเต่า พบว่าในสัตว์เลื้อยคลานกลุ่มดังกล่าวมีองค์ประกอบของโปรตีนและเปปไทด์หลายชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ เช่น ไลโซไซม์ เฮโมโกลบิน แคธีลิกซิน และ ดีเฟนซิน รายงานวิจัยเพิ่มเติมแสดงว่าโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการต้านจุลชีพในสัตว์เลื้อยคลานนั้นสามารถแบ่งออกได้ 2 ชนิด คือ ไลโซไซม์และเฮโมโกลบิน โดยไลโซไซม์เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยเปปติโดไกลแคนซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ของแบคทีเรีย เอนไซม์นี้สามารถพบได้ในระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์เลื้อยคลานและไขขาว โดยเฉพาะสัตว์เลื้อยคลานที่ออกลูกเป็นไข่ เช่น ตะพาบหรือเต่า จากการศึกษาในตะพาบได้หวั่น (*Trionyx sinensis*) และตะพาบสวน (*Amyda cartilaginea*) พบไลโซไซม์สองชนิดคือ SSTL A และ SSTL B สามารถทำลายเชื้อจุลชีพได้หลายชนิด (3) ส่วนเฮโมโกลบินเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ขนส่งออกซิเจน ภายในเซลล์เม็ดเลือดแดง กลุ่มของสัตว์เลื้อยคลานมีการพัฒนาระบบภูมิคุ้มกันที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด โดยมีการทำงานร่วมกันของโปรตีนหรือเปปไทด์หลายชนิด เช่น ไลโซไซม์ เฮโมโกลบิน ดีเฟนซิน แคธีลิกซิน เฮปซิดิน ลิวครีออคซิน และ เฮโมซิดิน เป็นต้น ซึ่งโปรตีนหรือ

เปปไทด์เหล่านี้มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น ต้านจุลชีพ ต้านเซลล์มะเร็ง สมานแผลและต้านการอักเสบ เป็นต้น (4) ด้วยคุณสมบัติเหล่านี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์เพื่อพัฒนาเป็นยารักษาโรคติดเชื้อดื้อยาและลดอัตราการเสียชีวิตจากการติดเชื้อในกระแสเลือด

งานวิจัยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในสัตว์เลื้อยคลานยังมีการศึกษาวิจัยอยู่ในวงจำกัดหรือเพียงเฉพาะกลุ่มเท่านั้น ซึ่งในประเทศไทยมีความหลากหลายของสัตว์เลื้อยคลานมากและบางชนิดยังขาดข้อมูลจากงานวิจัยเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการแพทย์หรือทางด้านเศรษฐกิจ ตัวเงินตัวทอง หรือตัวเหี้ย (water monitor lizard ) จัดเป็นสัตว์เลื้อยคลานในวงศ์ตะกวด (*Varanidae*) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Varanus salvator* เป็นวงศ์ตะกวดที่พบบ่อยที่สุดของสัตว์เลื้อยคลานในวงศ์นี้ (5) โดยสามารถพบได้ในเกือบทุกพื้นที่ของทวีปเอเชีย เช่น อินเดีย ศรีลังกา มาเลเซีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ รวมถึงในประเทศไทย ลักษณะโดยทั่วไปของสัตว์เลื้อยคลานในกลุ่มนี้มีพฤติกรรมและความเป็นอยู่คล้ายคลึงกับจระเข้ ซึ่งพฤติกรรมของตัวเงินตัวทองที่มีการแย่งชิงอาหาร หรือการต่อสู้แย่งชิงคูในฤดูผสมพันธุ์ ส่งผลให้ได้รับบาดเจ็บหรือเกิดบาดแผลจากการต่อสู้กันเอง แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าบาดแผลที่เกิดขึ้นนี้ไม่ส่งผลหรือก่อให้เกิดอาการของการติดเชื้อแบคทีเรียเลยแม้แต่น้อย สำหรับข้อมูลการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสัตว์เลื้อยคลานกลุ่มนี้ในประเทศไทยและต่างประเทศมีอย่างจำกัด โดยมีการศึกษาในสัตว์เลื้อยคลานในวงศ์เดียวกัน เมื่อปี 1998 Montgomery และคณะได้ทำการเก็บตัวอย่างน้ำลายและเลือดของมังกรโคโมโด (*Varanus komodoensis*) ซึ่งเป็นสัตว์เลื้อยคลานในกลุ่ม *Varanidae* เช่นเดียวกับตัวเงินตัวทอง (6) พบว่าในน้ำลายของมังกรโคโมโดมีแบคทีเรียมากถึง 28 ชนิด (7) และมีแบคทีเรียบางชนิดที่พบในน้ำลายที่สามารถทำให้หนูทดลองตายได้ (6, 8, 9) Ezra และคณะได้ทำการศึกษาวิจัยในมังกรโคโมโด (*Varanus komodoensis*) เพิ่มเติมพบว่าซีรัมของมังกรโคโมโดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้ (10, 11) ซึ่งปัจจุบันนักวิจัยกำลังสังเคราะห์สารเพื่อเลียนแบบการทำงานของเลือดของมังกรโคโมโด เพื่อนำไปทดสอบว่าสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดื้อยาได้หรือไม่ดังที่กล่าวข้างต้น ตัวเงินตัวทองซึ่งเป็นสัตว์เลื้อยคลานในวงศ์ *Varanidae* เช่นเดียวกับกับมังกรโคโมโดและมีพฤติกรรมต่างๆ ที่คล้ายคลึงกันรวมถึงสภาพแวดล้อมที่อาศัยอยู่เสี่ยงต่อการติดเชื้อโรคอยู่ตลอดเวลาเมื่อเกิดบาดแผล ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่นำเอาเลือดจากตัวเงินตัวทองมาทำการศึกษาฤทธิ์องค์ประกอบของเลือดจากตัวเงินตัวทองที่อาจพบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ได้ ซึ่งข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้จะนำไปใช้เป็นพื้นฐานในการพัฒนาสารทดแทนยาปฏิชีวนะในเชิงลึก เช่น การดัดแปลงโครงสร้างเพื่อให้ได้ฤทธิ์หรือคุณสมบัติทางชีวภาพที่ต้องการรวมถึงการศึกษาโครงสร้างของเปปไทด์ในระดับที่สูงขึ้นไป ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาใช้โปรตีนหรือเปปไทด์ที่แยกได้ และนำไปประยุกต์ใช้รักษาโรคที่มีสาเหตุเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยาหรือการรักษาโรคต่างๆ ตลอดจนแนวทางในการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต



## 1.2. คำถามของการวิจัย

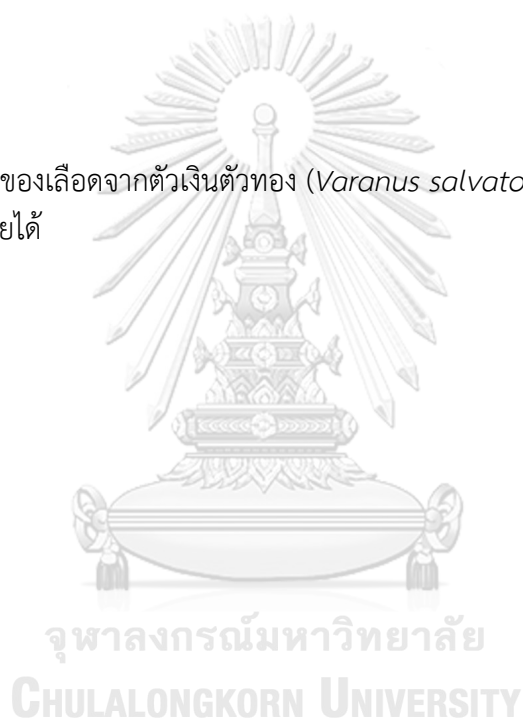
องค์ประกอบของเลือดตัวเงินตัวทอง (*Varanus salvator*) มีสารสำคัญหรือโปรตีนที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้หรือไม่

## 1.3. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

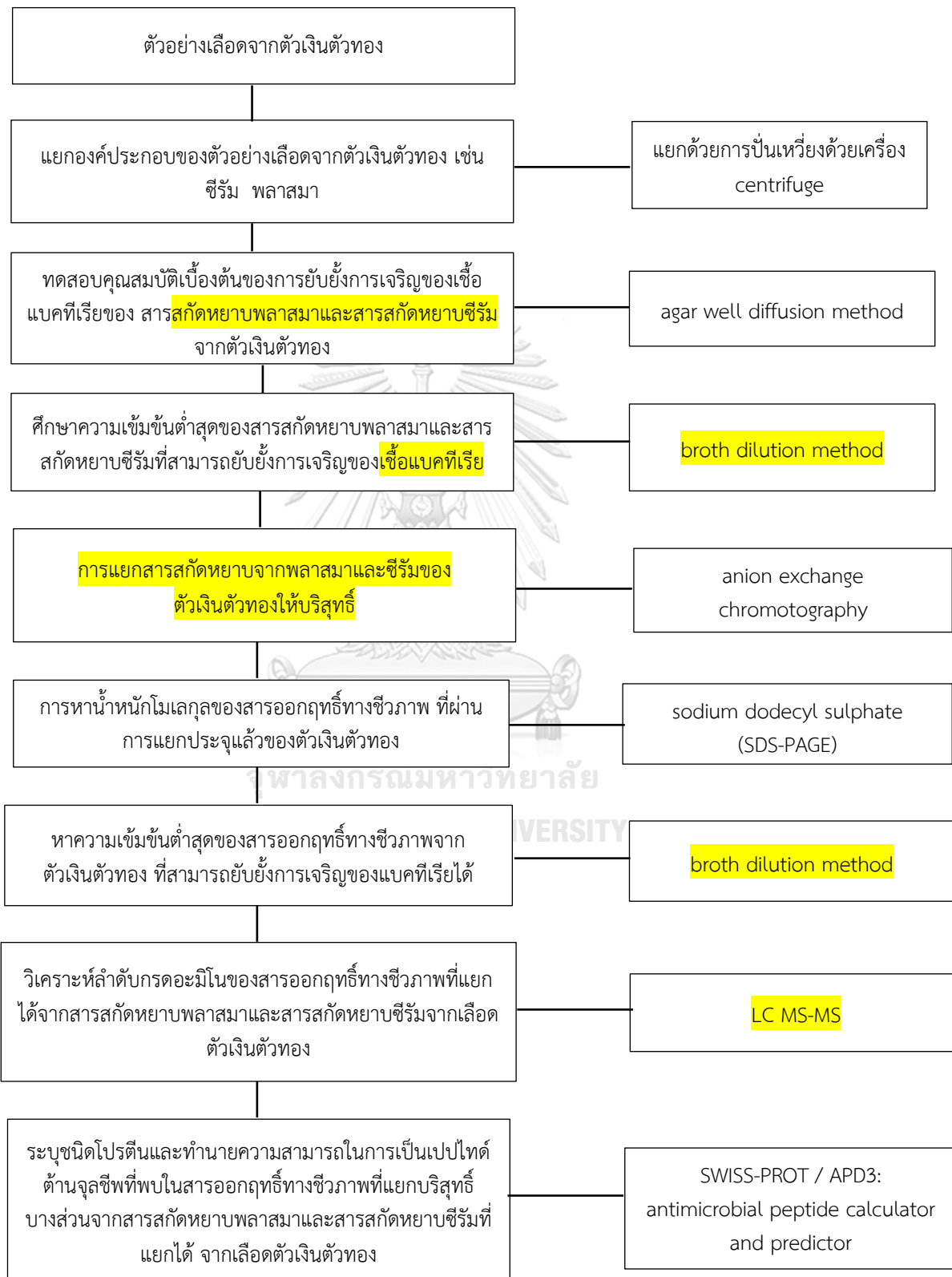
เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดที่แยกได้จากองค์ประกอบของเลือดตัวเงินตัวทอง (*Varanus salvator*) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

## 1.4. สมมุติฐาน

องค์ประกอบของเลือดจากตัวเงินตัวทอง (*Varanus salvator*) มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้



## 1.5. กรอบแนวความคิดในการวิจัย



## 1.6. ขอบเขตงานวิจัย

งานวิจัยนี้ได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างเลือดจากสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาสน จังหวัดราชบุรี โดยเป็นการจับและเจาะเลือดโดยเจ้าหน้าที่ของสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาสน นำตัวอย่างเลือดที่ได้ของตัวเงินตัวทองมาทำการศึกษาวิจัย เนื่องจากมีรายงานการพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจากสัตว์เลี้ยงคานในวงศ์นี้มาแล้ว โดยทำการศึกษาค้นคว้าประกอบต่างๆ ในน้ำเลือดของตัวเงินตัวทอง จากนั้นทำการเลือกองค์ประกอบของเลือดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่น่าสนใจเพื่อทำการศึกษาต่อไป ซึ่งในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการเลือกเอาส่วนของซีรัมและพลาสมาทำการศึกษาต่อ โดยนำซีรัมและพลาสมาไปเจือจางด้วยสารละลายที่เหมาะสมจากนั้นก็นำทั้งสองส่วนไปทำให้แห้งด้วยวิธี lyophilization แล้วละลายตะกอนด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม ทำการตรวจสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรียเบื้องต้นด้วยวิธี agar well diffusion method จากนั้นทำการแยกบริสุทธิ์บางส่วนทั้งซีรัมและพลาสมาที่ผ่านการทดสอบที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียในเบื้องต้นโดยใช้เทคนิค anion exchange chromatography ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนที่ผ่านการแยกแล้วด้วยวิธี SDS-PAGE จากนั้นนำไปทำการวิเคราะห์เพื่อจำแนกชนิดของโปรตีนด้วยวิธี LC-MS –MS ทำนายและวิเคราะห์สายเปปไทด์ที่ได้จากฐานข้อมูลของ peptide prediction servers ด้วยโปรแกรม antimicrobial peptide calculator and predictor

## 1.7. สถานที่ทำการศึกษาวิจัย

อาคารจุฬาพัฒน์ 14 คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## 1.8. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ทราบฤทธิ์ของสารจากองค์ประกอบเลือดของตัวเงินตัวทองที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้
2. ได้ข้อมูลเปปไทด์จากองค์ประกอบเลือดของตัวเงินตัวทอง และสามารถนำไปศึกษาพัฒนาต่อยอดเพิ่มเติม เช่น กลไกการออกฤทธิ์ของสารองค์ประกอบต่างๆ จากตัวเงินตัวทองต่อเชื้อแบคทีเรีย
3. ผลของการศึกษาจะเป็นประโยชน์กับแพทย์และผู้ป่วยที่ติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยาที่รุนแรง โดยการนำเอาข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้ไปพัฒนาต่อยอดเพื่อหาสารหรือยาชนิดใหม่ไปใช้ในการรักษาได้ในอนาคต

## บทที่ 2

### ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1. การติดเชื้อแบคทีเรีย

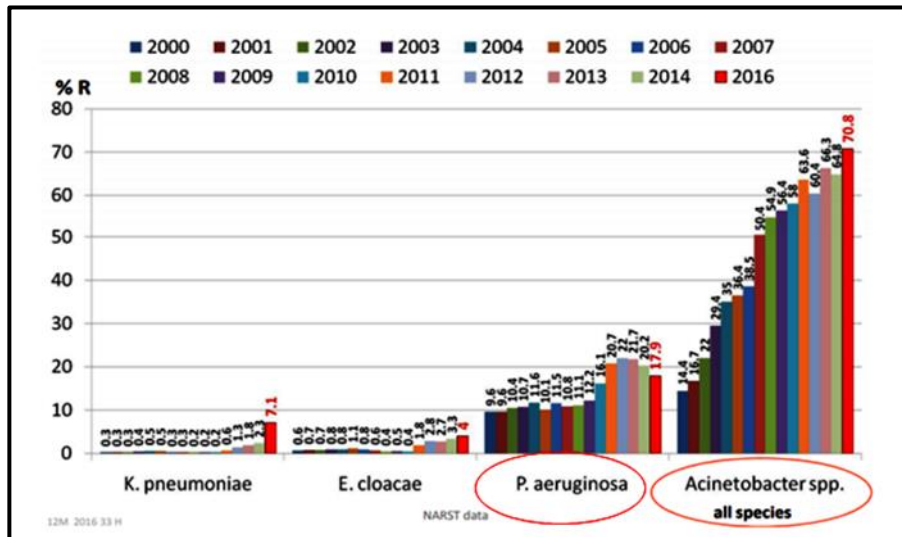
##### 2.1.1 ปัญหาทางด้านสาธารณสุข

โรคติดเชื้อเป็นหนึ่งในสาเหตุการเสียชีวิตที่สำคัญ จากการพัฒนาคุณสมบัติการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อก่อโรคมียุคความรุนแรงมากขึ้น ทำให้การรักษาโรคติดเชื้อดื้อยาเหล่านี้ไม่มีประสิทธิภาพส่งผลให้สถานการณ์การเจ็บป่วยจากการติดเชื้อดื้อยาในปัจจุบันทวีความรุนแรงมากขึ้น จากยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษานั้นไม่สามารถใช้รักษาได้อย่างมีประสิทธิภาพอีกต่อไป กล่าวคือหากเกิดการติดเชื้อแม้เพียงเล็กน้อยก็สามารถทำให้เป็นอันตรายถึงแก่ชีวิตได้ ในช่วงหลายปีที่ผ่านมาประเทศไทยมีการนำเข้าและใช้ยาปฏิชีวนะเพิ่มมากขึ้นโดยส่วนหนึ่งมาจากประเทศไทยกำลังก้าวเข้าสู่สังคมผู้สูงอายุในปี 2568 (12) นอกจากนี้ค่าใช้จ่ายที่เพิ่มขึ้นแล้ว ยังมีปัญหาที่เกิดตามมาคือปัญหาเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะซึ่งเชื้อดื้อยาถือเป็นปัญหาและภัยคุกคามทางสุขภาพที่หลายประเทศกำลังประสบอยู่ เชื้อดื้อยาสามารถพบได้ทั่วโลกทั้งในกลุ่มประเทศที่พัฒนาแล้วและกำลังพัฒนารวมถึงประเทศไทย จากรายงานเกี่ยวกับอุบัติการณ์ความรุนแรงของเชื้อดื้อยา พบว่าเชื้อแบคทีเรียดื้อยาทำให้คนไทยเสียชีวิตประมาณ 100 คนต่อวันหรืออาจสูงมากกว่านี้หากขาดการบริหารจัดการที่ดี มีการคาดการณ์พบว่าภายในปี ค.ศ. 2050 จะมีผู้เสียชีวิตจากเชื้อดื้อยาทั่วโลกปีละมากกว่า 10 ล้านคน (13) ด้วยเหตุนี้จึงทำให้นักวิจัยเร่งศึกษาค้นคว้าหาสารชนิดใหม่เพื่อนำมาใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะในการรักษาโรคติดเชื้อ เช่น การทดสอบจุลินทรีย์จากแหล่งต่าง ๆ ทั้งในดิน ในน้ำรวมถึงการสังเคราะห์ยาใหม่ในห้องทดลองหรือแม้แต่การนำเอาผลิตภัณฑ์ที่ได้จากธรรมชาติมาประยุกต์ใช้ในการรักษาเพื่อทดแทนยาปฏิชีวนะและลดปัญหาการดื้อยาของเชื้อก่อโรคเหล่านี้ เนื่องจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมีความหลากหลายขององค์ประกอบทางเคมีจึงทำให้เชื้อเกิดการต้านน้อยกว่าการใช้ยาปฏิชีวนะที่เป็นเคมีสังเคราะห์ (14, 15) โรคติดเชื้อที่พบในปัจจุบันมีแนวโน้มเกิดจากเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะด้วยกลไกที่หลากหลาย ตั้งแต่การปรับเปลี่ยนลักษณะทางพันธุกรรมการแสดงออกของยีน รวมถึงโมเลกุลเป้าหมายของยาที่เปลี่ยนไป ทำให้ยาไม่สามารถเข้าจับกับโมเลกุลเป้าหมายได้ หรือไม่สามารถออกฤทธิ์ในการยับยั้งหรือทำลายเชื้อโรคได้ (16-18) ผลจากการสำรวจขององค์การอนามัยโลก World Health Organization (WHO) เกี่ยวกับปัญหาเชื้อก่อโรคดื้อยา พบว่าประเทศแถบทวีปยุโรปมีรายงานอุบัติการณ์การติดเชื้อดื้อยาชนิด methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ในโรงพยาบาลเพิ่มมากขึ้นทุกปี (19) เช่นเดียวกับประเทศไทยที่พบการแพร่ระบาดของเชื้อดื้อยาในโรงพยาบาลเพิ่มสูงขึ้น (20) จากผู้ป่วยที่เข้ามารับการรักษาหรือรับบริการเพิ่มมากขึ้น สาเหตุอาจมาจากการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างประชากรของประเทศไทยประกอบกับความก้าวหน้าทางด้านการแพทย์ที่ทำให้คนไทยมีอายุไขเฉลี่ย (life expectancy) ยืนยาวมากขึ้นจึงทำให้จำนวนของผู้เข้า

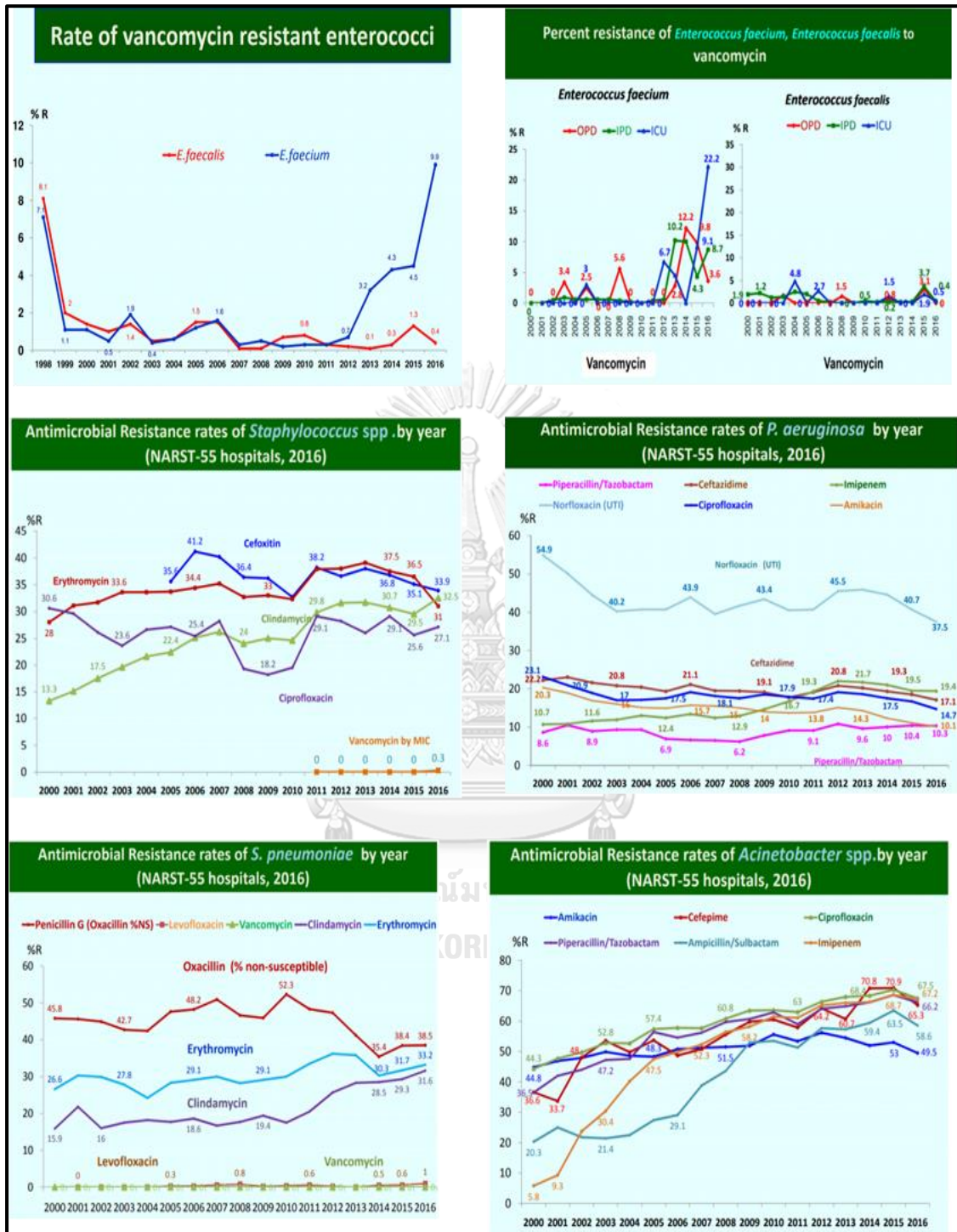
รับการรักษาในโรงพยาบาลเพิ่มมากขึ้นตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียบางชนิดไม่แสดงอาการหรือแสดงอาการช้าหลังจากมีการติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยา ซึ่งส่วนใหญ่มักจะเกิดการติดเชื้อหลังจากการผ่าตัดหรือภายหลังจากเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล ดังนั้นจึงยังมีความจำเป็นที่ยังต้องพึ่งพายาปฏิชีวนะเพื่อใช้ในการป้องกันและรักษาโรคซึ่งส่งผลต่อการดื้อยาของเชื้อก่อโรคตามมา การควบคุมเชื้อโรคนิตต่างๆ รวมถึงเชื้อดื้อยาให้ได้ผลจึงจำเป็นต้องมีวิธีการหรือกลไกอื่นๆ ที่แตกต่างจากการใช้ยาปฏิชีวนะเดิมที่เคยใช้รักษาและยังมีความจำเป็นอย่างเร่งด่วนในการค้นหาวิธีการหรือตัวยาที่มีประสิทธิภาพในการรักษาโรคติดเชื้อที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียดื้อยาที่เหมาะสมเพื่อทำลายเชื้อแบคทีเรียให้ลดลงอย่างรวดเร็ว ทำให้ผู้ป่วยฟื้นตัวและกลับสู่ภาวะปกติได้เร็วที่สุด

### 2.1.2 เชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญทางสาธารณสุข

แบคทีเรียชนิดแกรมบวกและแกรมลบที่มีความสำคัญทางการแพทย์ โดยเฉพาะกลุ่มเชื้อฉวยโอกาสที่สามารถก่อโรคในกลุ่มประชากรที่มีร่างกายอ่อนแอ ภูมิคุ้มกันต่ำ ผู้สูงอายุหรือผู้ป่วยมะเร็งที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน ทำให้เกิดการติดเชื้อได้หลายระบบ เช่น ระบบทางเดินอาหาร กระแสโลหิต และทางเดินหายใจ เป็นต้น ปัจจุบันพบว่าการติดเชื้อในโรงพยาบาลเพิ่มมากขึ้นโดยมีสาเหตุมาจากเชื้อก่อโรคกลุ่มดังกล่าว จากรายงานการสำรวจและเฝ้าระวังเกี่ยวกับเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะโดยศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ กระทรวงสาธารณสุขประเทศไทยในช่วงปี ค.ศ. 2000 - 2016 พบว่าการแพร่ระบาดของเชื้อแบคทีเรียดื้อยาโดยเฉพาะเชื้อที่ดื้อยาในกลุ่มยา imipenem เช่น เชื้อ *Acinetobacter* spp. และเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ในโรงพยาบาลมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น (รูปที่ 1) และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปี นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นก็มีแนวโน้มการดื้อยาเพิ่มขึ้นเช่นกัน (รูปที่ 2) ทั้งยังพบการกระจายของกลุ่มเชื้อดื้อยาในสิ่งแวดล้อม และสถานพยาบาล (27) โดยเชื้อที่พบในสถานพยาบาลจะมีปัจจัยความรุนแรงและความสามารถในการก่อโรคสูงกว่าเชื้อที่พบในสิ่งแวดล้อมทุกๆ ไป (21) ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่พบบ่อยและก่อให้เกิดผลเสียต่อสุขภาพ เช่น *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus cereus* เป็นต้น



รูปที่ 1 อัตราการดื้อยา (%R) ของยาปฏิชีวนะ imipenem ของเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* และเชื้อกลุ่ม *Acinetobacter spp.* ตั้งแต่ปี 2000-2016 ในประเทศไทย ศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดนนทบุรี (28)

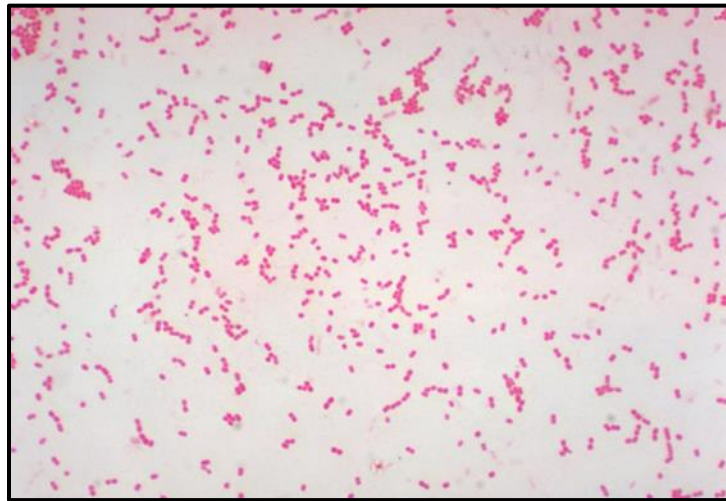


รูปที่ 2 แนวโน้มการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียที่เรียกว่ายาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียที่สำคัญทางการแพทย์ (28)

### *Acinetobacter baumannii*

Lee และคณะได้ทำการศึกษาจากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลพบว่าผู้ป่วยที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อต่อยาหลายชนิด (multidrug-resistant) มีความเสี่ยงสูงต่อการเสียชีวิตเนื่องจากอาการแทรกซ้อน เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่ไม่ได้ติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยา (29) ซึ่งผลการศึกษาดังกล่าวยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Kuo และ Tseng ที่พบว่าผู้ป่วยมีอัตราการตายเฉลี่ยสูงถึงร้อยละ 49 – 60 หลังจากได้รับเชื้อ *A. baumannii* ชนิดที่ดื้อยาปฏิชีวนะเชื้อ *A. baumannii* เป็นเชื้อสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในโรงพยาบาลที่รุนแรง พบรองมาจากเชื้อ *P. aeruginosa* (30) เชื้อ *A. baumannii* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบมีรูปร่างแบบ coccobacilli (รูปที่ 3) เนื่องจาก *A. baumannii* มีความสามารถในการปรับตัวให้ทนต่อสภาวะแวดล้อมต่างๆ ได้ดีและยังเคยมีรายงานการพบเชื้อ *A. baumannii* จากอ่างล้างมือและเตียงของ คนไข้ในโรงพยาบาล (31-33) อีกทั้งเชื้อยังสามารถก่อโรคได้ในหลายระบบของร่างกาย *A. baumannii* จึงเป็นเชื้อสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในโรงพยาบาลที่ทำให้ผู้ป่วยติดเชื้อเสี่ยงต่อการเสียชีวิตสูง เชื้อ *A. baumannii* มีกลไกหลากหลายรูปแบบที่ใช้ป้องกันตัวเองจากยาปฏิชีวนะ โดยกลไกที่สำคัญและพบบ่อยที่สุดคือการสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยหรือยับยั้งการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะ เช่น beta-lactamases นอกจากนี้ยังมีกลไกที่ลดการนำเข้าของยาปฏิชีวนะ เช่น ลดจำนวน porin บริเวณผนังเซลล์หรือใช้กระบวนการ efflux pump เพื่อขับยาออกจากเซลล์ กรณีที่เชื้อได้รับยีนดื้อยาและ/หรือปรับตัวโดยมีกลไกที่แตกต่างกันนี้จะทำให้เชื้อสามารถพัฒนากลายเป็นสายพันธุ์ที่ดื้อยาปฏิชีวนะหลายขนาน ที่เรียกว่า multidrug-resistant (MDR) ส่งผลให้ตัวเลือกของยาปฏิชีวนะในการรักษาโรคติดเชื้อ *A. baumannii* มีจำนวนน้อยลง (34-38) โดยเฉพาะหากเกิดการติดเชื้อในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง อาการของโรคจะมีความรุนแรงและยากต่อการรักษา ด้วยแนวทางในการรักษาเมื่อได้รับเชื้อ *A. baumannii* เบื้องต้นแพทย์จะให้ยาชนิดที่ครอบคลุมในการรักษา (broad spectrum) ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม cephalosporins เช่น ceftazidime และ cefipime (39-41) แต่การใช้ยาปฏิชีวนะก็ยังให้ผลในการรักษาไม่เป็นที่น่าพอใจเท่าที่ควร ในอดีตมีการใช้ยาปฏิชีวนะในกลุ่ม carbapenems เพียงอย่างเดียวในการรักษาโรคติดเชื้อจาก *A. baumannii* เช่น imipenem แต่ปัจจุบันพบว่าความไวของยาต่อเชื้อกลุ่มนี้ลดลง ปัจจุบันได้นำเอายาชนิดใหม่หรือยาเดิมที่มีข้อบ่งชี้ว่าเชื้อ *A. baumannii* ไม่มีการดื้อต่อยามาใช้ในการรักษาทดแทน เช่น colistin และ tigecycline ซึ่งพบว่ากว่าร้อยละ 30.8 ของผู้ป่วยตอบสนองทางคลินิกดีขึ้น (42) แต่หากมีการใช้ยาในกลุ่มนี้ในปริมาณที่มากเกินไปจะส่งผลอันตรายต่อไตหรือทำลายระบบประสาทได้ ดังนั้นการใช้ยา colistin จึงต้องอยู่ในการควบคุมดูแลของแพทย์หรือเภสัชกรและด้วยกลไกการดื้อยาของเชื้อมีหลายชนิดจึงยังไม่สามารถหาข้อสรุปที่ชัดเจนได้ ดังนั้นการเลือกยาปฏิชีวนะในการรักษาการติดเชื้อ *A. baumannii* จึงมีความยุ่งยากและซับซ้อนมากยิ่งขึ้น





รูปที่ 3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *A. baumannii* (43)

### *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* เป็นเชื้อที่สามารถก่อโรคได้ทั้งในคนและสัตว์สามารถพบเชื้อนี้ได้ตามอวัยวะต่างๆ ของร่างกายรวมถึงอุปกรณ์ทางการแพทย์ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเชื้อฉวยโอกาสโดยเฉพาะในผู้ป่วยที่ร่างกายอ่อนแอ ผู้ป่วยสูงอายุหรือผู้ป่วยที่อยู่ในภาวะพักฟื้นโดยเชื้อจะบุกรุกเข้าสู่เนื้อเยื่อชั้นในและเข้าสู่กระแสเลือดแล้วจึงแพร่กระจายไปสู่ส่วนต่างๆ ของร่างกาย (44) จากรายงานการวิจัยพบว่าเชื้อ *S. aureus* มีความสามารถทนต่อยาปฏิชีวนะได้หลายชนิดโดยสามารถแบ่งเชื้อในกลุ่ม *Staphylococcus* ได้ 3 ชนิดคือ methicillin resistant *S. aureus* (MRSA), vancomycin intermediate *S. aureus* (VISA) และ vancomycin resistant *S. aureus* (VRSA) ที่เป็นสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา vancomycin ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาการติดเชื้อชนิด MRSA ที่มีความรุนแรงและยาปฏิชีวนะชนิดอื่นใช้รักษาไม่ได้ โดยเชื้อ *S. aureus* ส่วนใหญ่ที่พบในสถานพยาบาลหลายแห่งมีความทนต่อยาปฏิชีวนะชนิด methicillin (45) เชื้อ *S. aureus* เป็นแบคทีเรียก่อโรคโดยมีปัจจัยความรุนแรงจากสารพิษที่สร้าง คือ เอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) ที่สามารถทนต่อความร้อนได้สูงถึง 100 องศาเซลเซียส (46, 47) และเชื้อ *S. aureus* สามารถปรับตัวให้ทนกับสภาพแวดล้อมต่างๆ ได้ดี เช่น สามารถเจริญอยู่ในหนองหรือเสมหะแห้งได้นานหลายสัปดาห์ ดังนั้นเชื้อ *S. aureus* จึงเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อที่สามารถพบได้ในสถานพยาบาลเกือบทุกแห่งและยังเคยมีรายงานว่าเชื้อ *S. aureus* มีแนวโน้มของการดื้อยาเพิ่มขึ้นทุกปีโดยเฉพาะกลุ่ม methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) ที่ดื้อต่อยากลุ่ม  $\beta$ -lactams, aminoglycosides และ macrolides ซึ่งเมื่อเกิดการติดเชื้อ

ดื้อยาเหล่านี้จะแสดงอาการรุนแรงและรักษาให้หายได้ยากและยังเสี่ยงต่อการเสียชีวิตสูงเนื่องจากการรักษาเชื้อดื้อยาต้องใช้ยาที่มีประสิทธิภาพสูงเช่น fosfomycin หรือ vancomycin ซึ่งพบว่ามีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยตามมา (44) เชื้อ *S. aureus* มีลักษณะเด่นคือโคโลนีมีสีเหลืองทองไม่สร้างสปอร์ (รูปที่ 4) แต่บางชนิดสามารถสร้างเมือก (slime) ได้ (48) จึงทำให้เชื้อสามารถทนต่อการทำลายของยาปฏิชีวนะหรือป้องกันการเกิดกระบวนการฟาโกไซโตซิสของเม็ดเลือดขาวได้ เชื้อ *S. aureus* เป็นแบคทีเรียรูปร่างกลมย้อมติดสีแกรมบวกและมีความสำคัญทางการแพทย์ เนื่องจาก *S. aureus* สามารถก่อให้เกิดโรคได้หลายระบบ เช่น การติดเชื้อที่ผิวหนัง ก่อให้เกิดอาหารเป็นพิษ ปอดอักเสบ รวมถึงเป็นเชื้อสาเหตุที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือด (septicemia) ซึ่งความรุนแรงของการเกิดโรคจะแตกต่างกันออกไปแล้วแต่สายพันธุ์ของเชื้อ ซึ่งเชื้อมีปัจจัยที่ก่อให้เกิดความรุนแรงในการเกิดโรคดังนี้ (virulence factors) (49) ดังนี้

1. โปรตีนผนังเซลล์ (cell wall protein) ได้แก่โปรตีนเอ (protein A) ทำหน้าที่ป้องกันการกลืนกินของเม็ดเลือดขาวและ fibrinogen-binding protein ทำหน้าที่ยึดเกาะกับไฟโบรเนกตินของเซลล์

2. สารพิษที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์หรือเอกโซทอกซิน (exotoxin) แบ่งออกได้ดังนี้

2.1 สแตฟฟีโลค็อกคัส เอนเทอโรทอกซิน (staphylococcus enterotoxin) เป็นสารพิษที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ ซึ่งสารพิษนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 5 ชนิด คือ A B C D และ E ซึ่งทั้ง 5 ชนิด นี้เป็นสารพิษที่สามารถทนความร้อนได้หากผู้ป่วยได้รับสารพิษนี้จะมีอาการคลื่นไส้อาเจียน ปวดท้องและอุจจาระร่วงภายหลังได้รับเชื้อเข้าสู่ร่างกายเป็นเวลา 1– 6 ชั่วโมงในโรคอาหารเป็นพิษ

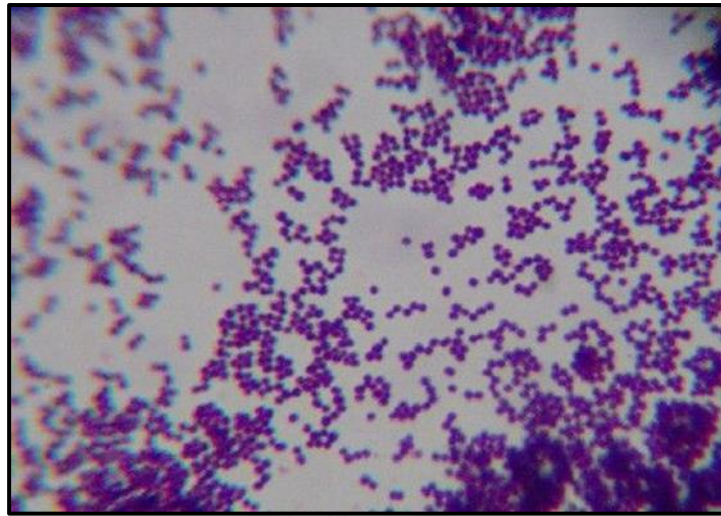
2.2 ท็อกซิก ช็อก ซินโดรม (toxic shock syndrome toxin (TSST)) สารพิษชนิดนี้จัดว่าเป็น super antigen มีความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันต่างๆ ของร่างกายทำให้ผู้ป่วยมีอาการไข้สูงมีผื่น เจ็บคอ อุจจาระร่วงเป็นน้ำและมีภาวะขาดน้ำ (dehydration) ในบางรายมีอาการรุนแรงอาจเกิดอาการช็อก ตับและไตวายเฉียบพลัน

2.3 เอกโฟลิเอทีฟ ทอกซิน (exfoliatin toxin) เป็นสารพิษที่มีฤทธิ์ในการทำลายผิวหนังชั้นกำพวด (epidermal layer) ทำให้ผิวหนังชั้นกำพวดหลุดลอกออกไป ก่อให้เกิดกลุ่มอาการผิวหนังหลุดลอกที่เรียกว่า staphylococcal scalded skin syndrome

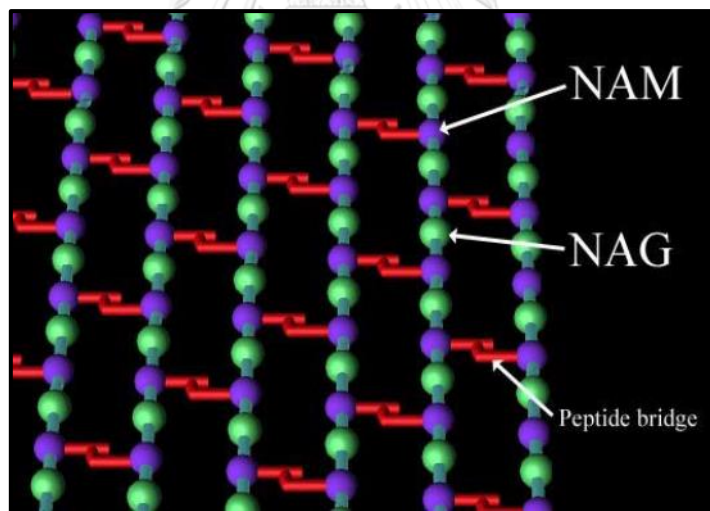
2.4 ไซโทไลติก ทอกซิน (cytolytic toxin) เป็นกลุ่มสารพิษที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ เพื่อทำลายเซลล์ของร่างกายได้แก่ ฮีโมไลซิน (hemolysin) ชนิดแอลฟา บีตาและเดลตา hemolysin มีฤทธิ์ทำลายเม็ดเลือดแดง และ ลิวโคซิดิน (leucosidin) มีฤทธิ์ในการทำลายเม็ดเลือดขาวและยังช่วยเชื้อสามารถหลบเลี่ยงการกลืนกินของเม็ดเลือดขาว (anti-phagocytosis)

3. สารพิษประเภทเอนไซม์ ได้แก่ โคแอกกูเลส (coagulase) ไฮยาลูโรนิเดส (hyaluronidase) ลิเพส (lipase) ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้มีบทบาททำให้เชื้อ *S. aureus* สามารถบุกรุกและทำลายเซลล์โฮสต์ได้ดียิ่งขึ้นซึ่งถือว่าเป็นปัจจัยเหล่านี้มีส่วนสำคัญที่ช่วยให้เชื้อ *S. aureus* ก่อความรุนแรง (48, 50) เชื้อ *S. aureus* มีลักษณะโครงสร้างผนังเซลล์ของเชื้อ *S. aureus* เป็น

hydrophilic polymer ขนาดใหญ่ที่ประกอบด้วย building blocks 2 ชนิดคือ น้ำตาล (N-Acetyl Glucosamine (NAG), N-acetyl muramic acid (NAM )) และ เปปไทด์ (L- alanine, D- alanine, glycine, D - glutamic acid และ lysine ) ประกอบกันเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า peptidoglycan (รูปที่ 5) โดยเชื้อแบคทีเรียจะสร้างโปรตีนที่เรียกว่า PBPs (penicillin binding proteins) ควบคุม โดยยีน *mec* โดย PBPs จะทำหน้าที่ในการเชื่อมโมเลกุลของ D-alanyl-D- alanine กับ N-acetyl muramic acid ด้วยพันธะเพปไทด์ซึ่งบริเวณดังกล่าวเป็นบริเวณที่ยาในกลุ่มปีตาแลคแตมจะเข้าจับ เพื่อยับยั้งโปรตีน PBPs ทำให้โครงสร้าง peptidoglycan ของเชื้อแบคทีเรียไม่สมบูรณ์ส่งผลให้เชื้อ แบคทีเรียไม่สามารถอยู่รอดได้แต่เชื้อ *S. aureus* จะมีกลไกป้องกันการเข้าทำลายของยาปฏิชีวนะ โดยเชื้อจะสร้างโปรตีน PBP2a ทำให้บริเวณเป้าหมายการเข้าจับของยาเปลี่ยนไปและทำให้ยาในกลุ่ม ปีตาแลคแตมเข้าจับบริเวณนี้ไม่ได้ส่งผลให้ยาในกลุ่มปีตาแลคแตมไม่มีประสิทธิภาพในการรักษาและ เกิดการดื้อต่อยาตามมา หลายปีที่ผ่านมาพบว่าเชื้อกลุ่มนี้ดื้อยาเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วซึ่งในปัจจุบันยา vancomycin เป็นยาในกลุ่ม glycopeptides มีฤทธิ์เป็น bactericidal ใช้รักษาโรคติดเชื้อชนิด รุนแรงที่เกิดจากเชื้อกลุ่ม staphylococci รวมทั้ง methicillin – resistant strain staphylococci โดยยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่ D-alanyl-D-alanine ของ peptidoglycan ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย(51, 52) ยา vancomycin แม้จะเป็นยาที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ MRSA แต่พบว่าการแพร่กระจายของยา นั้นยังมีขีดจำกัดต่อเนื้อเยื่อบางชนิด เช่น ปอด กระดูก น้ำเลี้ยงสมองและไขสันหลังซึ่งส่งผลให้การ รักษาล้มเหลว เพราะระดับยาที่แพร่เข้าสู่เนื้อเยื่อนั้นมีปริมาณความเข้มข้นของยาน้อยเกินไป ไม่ สามารถกำจัดเชื้อได้ ทำให้การรักษาไม่ได้ผล (53-55)



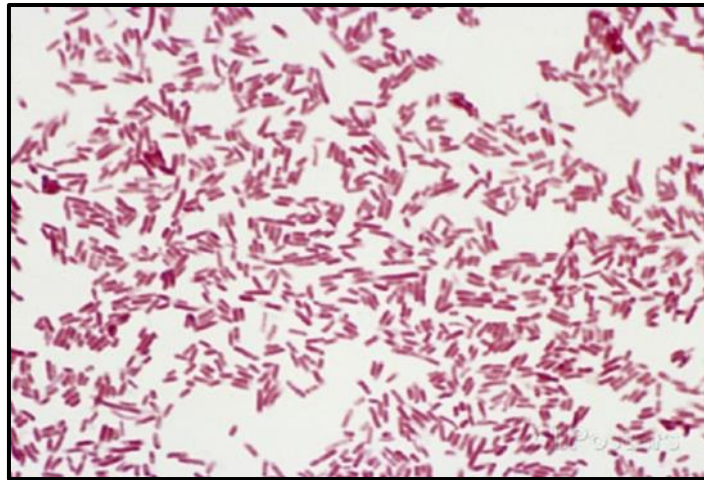
รูปที่ 4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *S. aureus* (56)



รูปที่ 5 รูปแบบแสดง ชั้น peptidoglycan ของผนังเซลล์ของแบคทีเรีย N-acetyl glucosamine (NAG) และ N-acetyl muramic acid (NAM) (57)

### *Escherichia coli*

จากรายงานของศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ พบว่าเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากปัสสาวะของผู้ป่วยที่เข้ามารับการรักษาในโรงพยาบาลมีแนวโน้มดื้อต่อยาในกลุ่ม cotrimoxazole เช่น trimethoprim, sulfamethoxazole และ ampicillin เพิ่มสูงขึ้นซึ่งเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากปัสสาวะผู้ป่วยไม่ตอบสนองต่อยาชนิดเดิมที่ใช้ในการรักษา (58, 59) ปัจจุบันได้นำเอายาในกลุ่ม quinolones มาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ *E. coli* แทนยาปฏิชีวนะกลุ่มเดิมที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษา ต่อมาพบว่าเชื้อ *E. coli* ตอบสนองต่อยาในกลุ่ม quinolones ลดลงเช่นกัน ทำให้แนวทางการรักษาโรคติดเชื้อ *E. coli* มีแนวโน้มเปลี่ยนแปลงโดยใช้ยาในกลุ่มอื่นที่มีอัตราการดื้อยาค้นพบต่ำกว่ามาใช้แทนที่ยาในกลุ่ม quinolone เชื้อ *E. coli* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (60) รูปร่างเป็นแท่งอยู่ในกลุ่ม *Enterobacteriaceae* (รูปที่ 6) เป็นเชื้อที่พบได้ทั่วไปในระบบทางเดินอาหารของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมักก่อโรคแบบฉวยโอกาสทำให้เกิดการติดเชื้อของระบบทางเดินอาหาร เช่น enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC) และ enteroaggregative *E. coli* (EAEC) (61) การติดเชื้อ *E. coli* เกิดจากแบคทีเรียยึดเกาะที่ผนังเซลล์ของอวัยวะต่างๆ ในร่างกาย เช่น ไต กระเพาะปัสสาวะ จากนั้นเชื้อจะปล่อยสารที่ช่วยในการยึดเกาะออกมาทำให้เชื้ออาศัยอยู่ในบริเวณนั้นได้นานมากขึ้นและเริ่มสร้างสารที่เกี่ยวข้องออกมาทำลายเซลล์หรือเนื้อเยื่อบริเวณรอบเชื้อทำให้เกิดการติดเชื้อในบริเวณดังกล่าว ปัจจุบันพบว่าเชื้อ *E. coli* สามารถสร้างเอนไซม์ที่เรียกว่า extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) มีฤทธิ์ทำลายยาปฏิชีวนะหลายชนิดรวมถึงยาในกลุ่มเบต้าแลคตาม เช่น penicillin และ cephalosporin จึงทำให้เชื้อสามารถทนต่อยาปฏิชีวนะกลุ่มนี้ได้ (62) การดื้อยาในกลุ่ม quinolone ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรีย 2 ชนิด คือ DNA gyrase และ topoisomerase IV ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ DNA โดย DNA gyrase จะมียีน *gyrA* และ *gyrB* เป็นตัวควบคุมการสังเคราะห์ ส่วน topoisomerase IV จะถูกควบคุมด้วยยีน *parC* (63) ปัจจุบันรูปแบบการรักษาหรือยาที่ใช้ในการรักษาเมื่อผู้ป่วยมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อยานั้นยังไม่แน่นอน มีเพียงข้อมูลย้อนหลังเกี่ยวกับความไวของยา amoxicillin/clavulanic acid และ nitrofurantoin เท่านั้น ที่พบว่ายามีความไวเกินร้อยละ 90 ซึ่งอาจเป็นยาทางเลือกที่จะนำมาใช้ในกลุ่มของผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดการดื้อยาในกลุ่มยา quinolones ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Karlowsky และคณะที่ทำการศึกษาในปี ค.ศ. 2006 เพื่อประเมินความไวของยา (*in vitro*) ซึ่งทำการศึกษาในกลุ่มของผู้ป่วยนอกโดยทำการเพาะเชื้อ *E. coli* และทดสอบการดื้อยาในกลุ่ม quinolones ทั้งหมด ผลการศึกษาพบว่า third generation cephalosporins, ertapenem และ nitrofurantoin เป็นยาที่มีความไวเกินร้อยละ 85 ต่อเชื้อสายพันธุ์ที่เป็น ciprofloxacin resistant *E. coli* โดยเฉพาะยา nitrofurantoin ซึ่งให้ผลความไวต่อเชื้อ *E. coli* สูงถึงร้อยละ 93.71 ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่ายา amoxicillin/clavulanic acid, third generation cephalosporins และ nitrofurantoin เป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่เกิดการติดเชื้อดื้อยาได้ (64, 65)

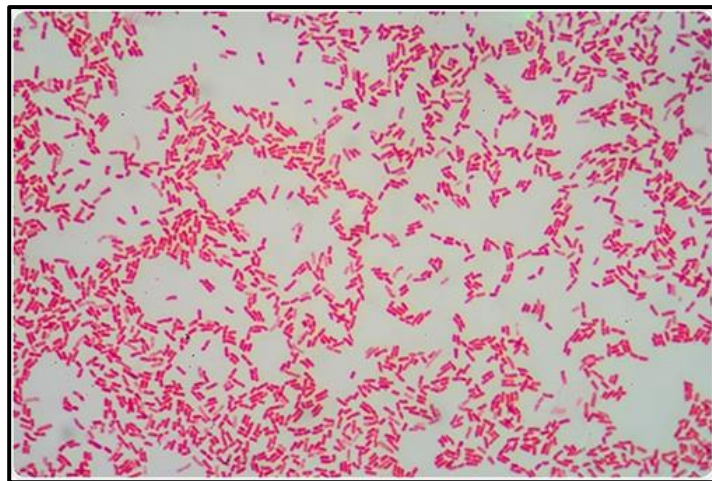


รูปที่ 6 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *E. coli* (43)

### *Pseudomonas aeruginosa*

*P. aeruginosa* จัดเป็นเชื้อก่อโรคฉวยโอกาส มักก่อโรคในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันต่ำหรือผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาและต้องนอนพักในโรงพยาบาลหรือสถานพยาบาลเป็นระยะเวลาานาน *P. aeruginosa* ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการติดเชื้อในกระแสโลหิต (66) โดยเฉพาะกลุ่มผู้ป่วยที่ต้องใช้เครื่องช่วยหายใจพบว่าผู้ป่วยจะมีอาการปอดอักเสบที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียชนิด *P. aeruginosa* (67) และจากการศึกษาายังพบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* มีอัตราการดื้อต่อยา ceftriaxone และ imipenem เพิ่มขึ้น เชื้อ *P. aeruginosa* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างแท่งตรง ไม่สร้างสปอร์ (รูปที่ 7) เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลล่าที่อยู่ตรงปลายด้านหนึ่งของเซลล์ (monotrichous flagella) (68, 69) มีการสร้างรงควัตถุที่เรียกว่า pyocyanin pigment บางสายพันธุ์พบการสร้างกลิ่นคล้ายองุ่น (grape-like odor) สามารถพบเชื้อได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม เช่น ตามพื้นดินหรือแหล่งน้ำ เชื้อ *P. aeruginosa* สามารถสร้างสารพิษและเอนไซม์ (70) เพื่อทำลายเนื้อเยื่อของผู้ป่วยและการติดเชื้อจะเกิดกับคนที่มีร่างกายอ่อนแอหรือผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำโดยเฉพาะผู้ป่วยที่พักรักษาในโรงพยาบาลนานๆ ซึ่งเชื้อ *P. aeruginosa* ที่พบในสถานพยาบาลส่วนใหญ่เป็นชนิดที่ดื้อต่อยาหลายขนาน (multidrug resistant) โดยเชื้อ *P. aeruginosa* มีกลไกการดื้อยาต้านจุลชีพที่หลากหลายทั้งเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติหรือได้รับยีนดื้อยา เช่น การผลิตเอนไซม์เพื่อทำลายประสิทธิภาพของยา (71) รวมถึงการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งการเข้าจับของยาหรือการใช้กลไกที่เรียกว่า multidrug efflux systems (MEX) โดยระบบที่พบว่ามีผลสำคัญต่อการดื้อยามากที่สุดคือ MexAB-OprM, MexCDOprJ, MexEF-OprN และ MexXY ซึ่งแต่ละระบบสามารถขับยาออกได้

มากกว่า 1 ชนิด และยาแต่ละชนิดก็อาจถูกขับออกได้ด้วยหลายระบบเช่นกัน เชื้อ *P. aeruginosa* จะมีความรุนแรงมากขึ้นถ้ามีการแสดงออกของระบบ MEX มากกว่า 1 ระบบพร้อมกันหรือร่วมกันกับ กลไกดื้อยาอื่นๆ (72, 73) สาเหตุสำคัญที่ทำให้การแสดงออกของยีนระบบ MEX คือ การใช้ยาปฏิชีวนะเกินความจำเป็น (74) ดังนั้นเมื่อเกิดการติดเชื้อสายพันธุ์ที่ดื้อยาหลายขนานทำให้การรักษาด้วยยาในกลุ่ม aminoglycosides, cephalosporins, fluoroquinolones และ carbapenems จำเป็นต้องทดสอบความไวรับต่อยา ก่อนเพื่อแพทย์จะได้เลือกยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมในการรักษา



รูปที่ 7 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *P. aeruginosa* (75)

CHULALONGKORN UNIVERSITY

## 2.2 โรคติดเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะ

องค์การอนามัยโลกมีความวิตกกังวลถึงภาวะการขาดแคลนยาปฏิชีวนะ อีกทั้งในช่วงทศวรรษที่ผ่านมาการพัฒนา ยาปฏิชีวนะขนานใหม่ที่มีเพียง 51 ชนิด และพบว่ามีเพียง 8 ชนิดเท่านั้นที่เป็นยาขนานใหม่อย่างแท้จริง ในขณะที่เชื้อก่อโรคลำไส้และดื้อยามากยิ่งขึ้น ทำให้การรักษาโรคติดเชื้อทำได้ยากขึ้นจนกลายเป็นวิกฤตเร่งด่วนทางสาธารณสุขทั่วโลก การดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียในประเทศไทยพบว่าการดื้อยาเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ทำให้การวางแผนการรักษามีความลำบากมากขึ้น และเป็นที่น่าวิตกเมื่อเชื้อดื้อยาเหล่านี้สามารถแพร่กระจายทำให้เกิดการติดเชื้อดื้อยาและเป็นสาเหตุการเสียชีวิตในที่สุด

### 2.2.1 สภาพปัญหาและผลกระทบจากการดื้อยาปฏิชีวนะ

การค้นพบยาปฏิชีวนะ เมื่อ พ.ศ. 2471 ถือเป็นความสำเร็จที่ยิ่งใหญ่ ด้วยยาปฏิชีวนะนี้สามารถช่วยชีวิตของคนนับล้านที่ป่วยจากการติดเชื้อแบคทีเรียให้หายได้ (76) แต่ในปัจจุบันกลับพบว่าความสามารถในการรักษาหรือประสิทธิภาพของยานี้กลับลดลง เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียมีการปรับตัวให้ดื้อต่อยาส่งผลให้ยาปฏิชีวนะที่เคยใช้ในการรักษาไม่สามารถใช้ในการรักษาได้ แนวโน้มการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องแต่จำนวนยาปฏิชีวนะชนิดใหม่ที่พัฒนาและนำมาใช้ได้ในช่วงปี พ.ศ. 2511 - 2555 มีเพียง 2 ชนิดเท่านั้น ที่ผลิตรออกมาแต่ก็ยังไม่สามารถรักษาโรคติดเชื้อชนิดดื้อยาหลายขนานได้ ซึ่งเป็นปัญหาที่ทั่วโลกเผชิญในขณะนี้ (77) ผลกระทบจากเชื้อดื้อยานอกจากจะทำให้เสียชีวิตแล้วยังส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจสูงถึง 3.5 พันล้านล้านบาท (78) เฉพาะประเทศไทย มีการรายงานจำนวนผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยาประมาณปีละ 88,000 ราย โดยเสียชีวิตประมาณปีละ 38,000 ราย คิดเป็นการสูญเสียทางเศรษฐกิจโดยรวมสูงถึง 4.2 หมื่นล้านบาท (27)

### 2.2.2 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการเกิดและการแพร่กระจายเชื้อดื้อยา

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ระบุว่าประเทศไทยมีการใช้ยาต้านจุลชีพเพิ่มมากขึ้นทั้งในการแพทย์ สาธารณสุข ปศุสัตว์และการเกษตร โดยในปี พ.ศ. 2552 มีการนำเข้ายาต้านจุลชีพ (ยาปฏิชีวนะ) กว่าหมื่นล้านบาทและยังพบว่านอกจากจะมีการนำเข้ายาที่มีปริมาณมากขึ้นแล้วประเทศไทยยังมีการใช้ยาต้านจุลชีพอย่างไม่เหมาะสม กล่าวคือมีการใช้ยาต้านจุลชีพเกินความจำเป็น (79) ปัญหาการใช้ยาต้านจุลชีพไม่เหมาะสมหรือใช้ยาเกินความจำเป็นสามารถพบได้ ในสถานพยาบาลทุกระดับของประเทศ เช่น โรงพยาบาลมหาวิทยาลัย โรงพยาบาลเอกชน ร้านขายยาหรือแม้แต่ในโรงพยาบาลรัฐ (80) จากการสำรวจของสำนักงานหลักประกันสุขภาพแห่งชาติ ระบุว่า ในการรักษาโรคติดเชื้อทางเดินหายใจส่วนบนในโรงพยาบาลมีการใช้ยาปฏิชีวนะสูงกว่าค่ามาตรฐานเกินกว่าร้อยละ 40 (81) ปัจจุบันยาปฏิชีวนะหลายขนานถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งเป็นการใช้ยาโดยไม่คำนึงถึงผลที่ตามมา รวมถึงการยาใช้ไม่ถูกวิธีหรือใช้ยาเกินความจำเป็น เช่น หยุดกินยาเมื่ออาการป่วยดีขึ้นหรือกินยาไม่ครบจำนวนตามที่แพทย์สั่งพฤติกรรมเหล่านี้ล้วนเป็นเหตุให้เกิดการดื้อยาของแบคทีเรีย การใช้ยาต้านจุลชีพอย่างไม่ถูกวิธีหรือเหมาะสมนอกจากส่งผล กระทบต่อสิ่งแวดล้อมแล้วยังเป็นปัจจัยกระตุ้นให้แบคทีเรียเกิดการดื้อยาได้ ความสะดวกรวดเร็วในการเดินทาง การค้าระหว่างประเทศหรือการพัฒนาประเทศเพื่อเป็นศูนย์กลางทางการแพทย์ก็เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ทำให้เชื้อดื้อยาเกิดการแพร่กระจายอย่างรวดเร็วเช่นกัน เช่น กรณีของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่มียีนดื้อยา *new delhi metallo-beta-lactamase-1* (NDM-1) ที่มีรายงานใน พ.ศ. 2553 ในนักท่องเที่ยวชาวยุโรปที่มาทำศัลยกรรมความงามที่ประเทศอินเดียและติดเชื้อดื้อยานี้กลับไปประเทศของตน ซึ่งบางรายเสียชีวิต ปัจจุบันพบว่าเชื้อแบคทีเรียที่มียีนดื้อยา NDM-1 มีการแพร่กระจายไปทั่วโลกรวมทั้งประเทศไทย (17) เมื่อการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียได้กลายเป็นวิกฤตทางด้านสาธารณสุขของโลก ประกอบกับปัญหาการผลิตยาที่น้อยลงและ



ประสิทธิภาพของยาที่ได้ไม่สามารถยับยั้งหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ ดังนั้นการคิดค้นหรือวิจัยสารอื่นเพื่อทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะจึงมีความสำคัญและความจำเป็นอย่างเร่งด่วน

## 2.3 แนวทางการใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ

มีความพยายามหาแนวทางในการรักษาและยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อโรค โดยการค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความสำคัญในการรักษาโรคติดเชื้อ เช่น สารยับยั้งเชื้อรา แบคทีเรีย และไวรัส เพื่อทดแทนยาปฏิชีวนะ (82) โดยแหล่งที่มาของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพส่วนใหญ่จะได้อาจมาจากธรรมชาติหรือสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในธรรมชาติเช่น พืช ผัก สมุนไพร ผลไม้ สัตว์ทะเลบางชนิดและเชื้อจุลินทรีย์ โดยสิ่งมีชีวิตเหล่านี้สามารถผลิตสารที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายชนิด ปัจจุบันงานวิจัยเกี่ยวกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสมุนไพรกำลังเป็นที่สนใจโดยเฉพาะการพัฒนาให้เป็นสารต้านจุลชีพเพื่อทดแทนการนำเข้ายาจากต่างประเทศ สมุนไพรและผักพื้นบ้านของไทยที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (83) เช่น สารสกัดจากบัวบกหรือสารสกัดจากสัตว์ทะเล เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารดังกล่าวในการยับยั้งหรือทำลายเชื้อแบคทีเรียดีดื้อยา จากความรู้พื้นฐานในการนำสมุนไพรที่เป็นผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติมาใช้เป็นยารักษาโรคตั้งแต่โบราณประกอบกับเทคโนโลยีที่ก้าวหน้าในปัจจุบันจึงทำให้การสกัดและผลิตยาจากพืชสมุนไพรเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ เนื่องจากสมุนไพรไทยสามารถหาจ่ายราคาถูกและพบผลข้างเคียงน้อย (84, 85) ซึ่งแตกต่างจากยาแผนปัจจุบันและที่สำคัญร่างกายของคนเราสามารถกำจัดออกได้ง่าย แต่การใช้สมุนไพรในการรักษาโรครักก็ยังมีข้อจำกัดหลายอย่าง เช่น ความคงตัวของสารสกัดที่ได้จากพืชสมุนไพร ฤดูกาลในการเก็บเกี่ยวหรือแม้แต่พื้นที่ในการเพาะปลูกแล้วแต่ส่งผลต่อประสิทธิภาพของสารสกัดที่ได้จากพืชสมุนไพร นอกจากการใช้สมุนไพรทดแทนยาปฏิชีวนะแล้วนักวิจัยยังได้นำเอาองค์ความรู้ทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมาประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ เช่น การใช้อนุภาคนาโนซึ่งเป็นกระบวนการควบคุมอนุภาคของสารที่เราสนใจให้มีขนาดเล็กในระดับอนุภาคที่เรียกว่า อนุภาคนาโน ซึ่งอนุภาคนาโนถูกนำมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ทางสุขภาพต่างๆ เช่น ผลิตภัณฑ์ยาหรือเวชสำอาง โดยอาศัยเทคโนโลยีขั้นสูงที่ซับซ้อนร่วมกับการเลือกใช้ตัวทำละลายให้มีความเหมาะสมกับการคงตัวของสารแต่ละชนิดและยังมีข้อพึงระวัง เช่น ปัญหาในกลุ่มผู้ป่วยที่มีความไวและเสี่ยงต่อการแพ้ต่อตัววัสดุหรือตัวนาโนพาร์ติเคิล (86)

### 2.3.1 สมุนไพร

พืชสมุนไพรถือว่าเป็นแหล่งที่มาสำคัญของสารประกอบที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียซึ่งอาจนำมาประยุกต์ใช้ในด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์หรือนำมาพัฒนาต่อยอดประยุกต์ใช้ในการป้องกันและรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆได้ โดยเฉพาะในยุคที่เชื้อแบคทีเรียดื้อยามีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างเช่นในปัจจุบัน (87-89) พืชสมุนไพรสามารถหาได้ง่ายและมีราคาถูกและที่สำคัญพบว่าสารสกัดที่ได้จากสมุนไพรมีผลข้างเคียงในการรักษาน้อยมากเมื่อเทียบกับยาที่สังเคราะห์ขึ้นจากสารเคมี (84) นักวิจัยพบว่าสารสกัดหยาบของพืชบางชนิดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าสาร

สัปดาห์ที่สี่ที่เป็นองค์ประกอบในตัวยา ปัจจุบันจึงมีความสนใจในพืชสมุนไพรมากขึ้น เช่น การศึกษาประสิทธิภาพของกระชายดำและส้มแขกในการต้านเชื้อแบคทีเรีย พบว่าสารสกัดจากสมุนไพรทั้งสองชนิดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* เช่นเดียวกับกับสารสกัดสมุนไพรจากขมิ้นชัน ซึ่ง กระเทียมและมะกรูดที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้เหมือนกัน (90) การเข้าถึงพืชสมุนไพรสามารถเลือกซื้อได้อย่างอิสระหาง่ายและไม่ถูกควบคุมเหมือนยาแผนปัจจุบันตามที่กล่าวมาข้างต้นพืชสมุนไพรที่มีผลิตภัณฑ์ที่เป็นสมุนไพรเดี่ยวและเป็นตำรับบางผลิตภัณฑ์ไม่สามารถทราบชนิดและปริมาณของสารออกฤทธิ์ที่แน่นอนถึงแม้จะเป็นสมุนไพรชนิดเดียวกันก็ตาม เนื่องจากมีปัจจัยบางอย่างที่เข้ามาเกี่ยวข้อง เช่น สถานที่เพาะปลูก ฤดูกาล ส่วนของพืชที่นำมาใช้วิธีการเก็บเกี่ยวรวมถึงกระบวนการผลิต นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์บางตัวอาจมีการปนเปื้อนโลหะหนักหรือแม้แต่เชื้อรา ปัจจุบันพบว่ายาปฏิชีวนะชนิดใหม่ที่เป็นอนุพันธ์ของสารประกอบจากสมุนไพรนั้นยังอยู่ในระหว่างการศึกษาวิจัยในห้องปฏิบัติการเท่านั้น (91)

### 2.3.2 อนุภาคนาโน

ในปัจจุบันอนุภาคนาโนถูกนำเข้ามาใช้ในกระบวนการผลิตที่เกี่ยวข้องกับชีวิตประจำวัน เช่น การนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ต่างๆ โดยอนุภาคนาโนจะมีขนาดของโมเลกุลอยู่ในช่วง 1-100 นาโนเมตร ซึ่งขนาดที่เล็กของอนุภาคนาโนเองเป็นลักษณะเด่นจึงทำให้ให้อนุภาคนาโนมีพื้นที่ผิวสัมผัสที่สูงและยังสามารถเกิดปฏิกิริยาเคมีบริเวณพื้นผิวได้ดี (92) อนุภาคนาโนได้รับความสนใจเป็นอย่างมากเพราะอนุภาคนาโนมีคุณสมบัติพิเศษ คือ สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีเนื่องจากอนุภาคนาโนมีพื้นที่ผิวมากทำให้สามารถสัมผัสกับเชื้อจุลินทรีย์ได้ดี เช่น การศึกษาเกี่ยวกับความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของอนุภาคเงินนาโนที่สังเคราะห์จากสารสกัดใบแค พบว่าสารสกัดจากใบแคสามารถต้านเชื้อ *Salmonella enterica* และ *S. aureus* ได้ (93) Singh และคณะได้ทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* และ *Cryptococcus neoformans* จากอนุภาคของซิลเวอร์นาโนสังเคราะห์ของสารสกัดจากใบโกกงาง (94) พบว่าอนุภาคของซิลเวอร์นาโนมีความสามารถในการต้านเชื้อราได้ดี แต่การสังเคราะห์อนุภาคนาโนในปัจจุบันมีขั้นตอนในการผลิตที่ยุ่งยาก เช่น การควบคุมขนาดและรูปร่างของอนุภาคนาโน เพราะ ขนาดของอนุภาคนาโนถือว่ามีความสำคัญเป็นอย่างมากรวมถึงปัจจัยอื่นๆ เช่น อุณหภูมิหรือค่าความเป็นกรด – ด่าง ซึ่งปัจจัยดังกล่าวอาจจะส่งผลต่อประสิทธิภาพของอนุภาคนาโนในการยับยั้ง เชื้อจุลินทรีย์ได้ (95) อีกทั้งกลไกในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของอนุภาคนาโนก็ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดและการใช้อนุภาคนาโนนั้นยังอยู่ในขั้นตอนของการรวบรวมข้อมูลจากรายงานการศึกษาอยู่

### 2.3.3 เปปไทด์ต้านจุลชีพ (antimicrobial peptides)

ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายถือว่าเป็นกระบวนการที่มีความสำคัญในการป้องกันเชื้อโรคตามธรรมชาติแต่เนื่องจากโรคติดเชื้อหลายๆ โรคที่เกิดจากแบคทีเรียแต่ละชนิดนั้นมีความซับซ้อนมากจึงได้มีการนำเอายาปฏิชีวนะหรือสารต้านจุลชีพบางอย่างมาใช้ในการป้องกันการติดเชื้อ เปปไทด์หรือโปรตีนต้านจุลชีพก็เป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการรักษาหรือยับยั้งการเกิดโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรียตัวย่า เปปไทด์เป็นสารชีวโมเลกุลขนาดเล็กพบได้ในองค์ประกอบต่างๆ ของเซลล์ในสิ่งมีชีวิต เปปไทด์หรือโปรตีนต้านจุลชีพมีลักษณะเป็นโปรตีนสายสั้นๆ มีองค์ประกอบของกรดอะมิโนหลายชนิดโดยเปปไทด์หรือโปรตีนต้านจุลชีพเหล่านี้จะมีฤทธิ์ทางชีวภาพและมีคุณสมบัติที่แตกต่างกันตามชนิดของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในสายของเปปไทด์สำหรับเปปไทด์หรือโปรตีนต้านจุลชีพโดยทั่วไปจะประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวนตั้งแต่ 10-100 กรดอะมิโนซึ่งเซลล์ของสิ่งมีชีวิตชั้นสูง พืช หรือสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังสามารถสังเคราะห์สารดังกล่าวได้ เนื่องจากเปปไทด์หรือโปรตีนต้านจุลชีพในสัตว์เลื้อยคลานนั้นสามารถออกฤทธิ์ได้กว้างและมีกลไกการทำงานคล้ายกับยาปฏิชีวนะและที่สำคัญเปปไทด์หรือโปรตีนต้านจุลชีพไม่มีสารตกค้างที่จะก่อให้เกิดหรือกระตุ้นให้เชื้อแบคทีเรียตัวย่า (96) ปัจจุบันมีเปปไทด์บางชนิดถูกนำมาทดลองใช้ในการแพทย์แล้ว เช่น ฮีรูดีน (hirudin) ซึ่งเป็นเปปไทด์ที่สามารถต้านการแข็งตัวของเลือดซึ่งได้นำมาทดลองใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของกระบวนการเกิดลิ่มเลือดและใช้ในการรักษาอาการเส้นเลือดอุดตัน เป็นต้น และยังมีรายงานผลการศึกษาวิจัยประสิทธิภาพของเปปไทด์ต่อเชื้อตัวย่าพบว่าเปปไทด์จะไวต่อแบคทีเรียในกลุ่มแกรมลบมากกว่าแกรมบวกเพราะผนังเซลล์ด้านนอกของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบนั้นจะเป็น lipopolysaccharide ซึ่งอยู่รวมกันกับ magnesium และ calcium ion เชื่อมกันกับประจุลบของน้ำตาลเมื่อเติมเปปไทด์ที่เป็นประจุบวกเข้าไปจะทำให้เกิดการแทนที่ไอออนทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของสารจากภายนอกเซลล์เข้าสู่ภายในเซลล์เพราะเซลล์เมมเบรนถูกทำลาย (97) โดยสรุปคือเป้าหมายการทำลายของเปปไทด์อยู่ที่เซลล์เมมเบรนของเชื้อแบคทีเรียดังนั้นหากเซลล์เมมเบรนต้องการปรับตัวให้ทนต่อการทำลายของเปปไทด์ได้ต้องมีการปรับองค์ประกอบหรือการจัดเรียงตัวใหม่ของไขมันซึ่งเป็นไปได้ยากและการทำลายสารต้านจุลชีพเปปไทด์ก็ทำได้ยากเช่นเดียวกัน เนื่องจากเปปไทด์ประกอบด้วยกรดอะมิโนหลายชนิดที่ออกฤทธิ์ได้ต่างกัน การออกฤทธิ์ของเปปไทด์จะมีความจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์เมมเบรนของแบคทีเรียซึ่งจะมีประจุเป็นลบจากกลุ่มฟอสเฟตของไขมันแต่ในเซลล์เมมเบรนของพืชและสัตว์ไม่มีประจุ (98) เปปไทด์ต้านจุลินทรีย์ถือเป็นเทคโนโลยีใหม่ถึงแม้ว่าจะยังไม่แพร่หลายแต่นักวิจัยกำลังให้ความสนใจเป็นอย่างมากซึ่งเปปไทด์ส่วนใหญ่ในธรรมชาติมักพบในปริมาณน้อยทำให้ต้องใช้เทคนิคที่เหมาะสมในการศึกษา

เปปไทด์ต้านจุลชีพในสัตว์เลื้อยคลานเป็นอีกหนึ่งทางเลือกใหม่ที่นักวิจัยกำลังศึกษาฤทธิ์และกลไกของเปปไทด์แต่ละชนิดที่พบในกลุ่มของสัตว์เลื้อยคลานอย่างละเอียด เพื่อนำมาใช้ทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อลดปัญหาการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ในอนาคต สัตว์เลื้อยคลานมีความสามารถในการดำรงชีวิตในสภาพแวดล้อมต่างๆ ได้เป็นอย่างดี ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการทำงานที่มีประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายของสัตว์เลื้อยคลานซึ่งประกอบด้วยระบบภูมิคุ้มกันแบบสืบทอดแต่กำเนิด (innate immune system) และระบบภูมิคุ้มกันแบบที่ต้องมีการกระตุ้น

(adaptive immune system) ในระบบภูมิคุ้มกันแบบสืบทอดแต่กำเนิด โปรตีนและเปปไทด์ต้านจุลชีพถือว่าเป็นองค์ประกอบสำคัญในการรักษาสมดุลของระบบภูมิคุ้มกันตามร่างกาย จากการศึกษาที่ผ่านมาของนักวิจัยพบว่าในสัตว์เลื้อยคลานมีทั้งโปรตีนและเปปไทด์เป็นองค์ประกอบหลักที่ทำหน้าที่สำคัญในการต้านจุลชีพเข้าสู่ร่างกายของสัตว์เลื้อยคลานและเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญที่ทำให้สัตว์เลื้อยคลานมีอายุยืน ซึ่งการแสดงออกของโปรตีนและเปปไทด์ต้านจุลชีพในกลุ่มสัตว์เลื้อยคลานแต่ละชนิดนั้นจะมีรูปแบบการแสดงออกที่แตกต่างกันซึ่งในปัจจุบันนักวิจัยได้มีการศึกษาโปรตีนหรือเปปไทด์ต้านจุลชีพในกลุ่มสัตว์เลื้อยคลาน ดังนี้

### 2.3.3.1 อันดับ Testudines (เต่า)

อันดับ Testudines ประกอบด้วยเต่าและตะพาบ (99) ในสัตว์เลื้อยคลานกลุ่มนี้นักวิจัยได้ค้นพบยีนที่เกี่ยวข้องกับเปปไทด์ต้านจุลชีพ 2 ชนิด คือ แคธิลลิดิน (cathelicidin) และดีเฟนซิน (defensin) นอกจากนี้ยังพบว่าในไขขาวของสัตว์เลื้อยคลานกลุ่มนี้มีโปรตีนไลโซไซม์ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียจากการศึกษาวิจัยของ Prajanban และคณะ ในปี พ.ศ. 2555 (100) พบว่ารูปแบบการแสดงออกของโปรตีนและเปปไทด์ที่พบในไขขาวของเต่ามีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับกระชี่ตัวอย่างสัตว์เลื้อยคลานในกลุ่มนี้ เช่น เต่าตนุ (*Chelonia mydas*) เต่าแก้มแดง (*Trachemys scriptaelegans*) และรวมถึงตะพาบด้วย เช่น ตะพาบไต้หวัน (*Toona sinensis*) และตะพาบสวน (*Amyda cartilaginea*)

### 2.3.3.2 อันดับ Sphenodontia (ทัวทารา)

วงศ์ Sphenodontidae ประกอบด้วยสกุล *Sphenodon* ซึ่งในปัจจุบันมีเพียงสปีชีส์เดียว คือ *Sphenodon punctatus* แม้จะไม่ได้จัดอยู่ในกลุ่มลิซาร์ดแต่ก็เรียกว่าจิ้งจกทัวทารา ทัวทารามีถิ่นที่อยู่เฉพาะในหมู่เกาะชายฝั่งของประเทศนิวซีแลนด์ ในปัจจุบันมีความพยายามที่จะศึกษาจีโนมหรือยีนที่เกี่ยวข้องกับเปปไทด์ต้านจุลชีพของทัวทารา แต่กียังไม่มีรายงานการพบเปปไทด์ต้านจุลชีพที่มาจากทัวทารา

### 2.3.3.3 อันดับ Squamata (งู และ ลิซาร์ด)

อันดับ Squamata ประกอบด้วยสัตว์เลื้อยคลานจำพวกลิซาร์ดและงู ซึ่งงูถูกจัดให้เป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังแต่ถูกแยกออกจากสัตว์สี่ขาเนื่องจากไม่มีขาและยังสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ 1) งูมีพิษ ซึ่งมีลักษณะเด่นคือ จะมีเขี้ยวพิษโดยเขี้ยวพิษจะอยู่ใต้ตาและพับได้ เช่น งูจงอาง (*Ophiophagus hannah*) ซึ่งเป็นงูพิษที่พบได้ทั่วไปในทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และแถบประเทศอินเดีย งูพิษกลุ่มนี้จะมีแถบสีชัดเจน 2) งูไม่มีพิษ เช่น งูเหลือม (*Python reticulatus*) พบได้ในทวีปแอฟริกา เอเชีย และออสเตรเลีย งูหลามพม่า (*Python bivittatus*) พบได้ทั่วไปในบริเวณเขตร้อนรวมทั้งทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ สำหรับเปปไทด์ต้านจุลชีพที่มีการศึกษาอย่างกว้างขวางในงู คือ แคธิลลิดินและบีตาดีเฟนซิน (beta-defensin) ที่สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบอย่างเชื้อ *E.coli* นอกจากนี้อันดับ Squamata ยังรวมไปถึงสัตว์เลื้อยคลานในกลุ่มลิซาร์ดซึ่งมีรูปร่างภายนอกไม่เหมือนงู เนื่องจากมี 4 ขา เช่น ตุ๊กแก (gecko) อีกัวนา (iguana) จิ้งเหลน (skink) จิ้งจก (house lizard) และเหี้ย (water monitor) ซึ่งบีตาดีเฟนซิน (beta-defensin) จะทำให้เยื่อ

หุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเกิดการสูญเสียสมดุล (membrane permeability) การเข้าออกของสารและเกิดการตายในที่สุด

### 2.3.3.4 อันดับ Crocodylia (จระเข้)

อันดับ Crocodylia (Crocodylians) แบ่งเป็น 3 วงศ์ ได้แก่ 1) วงศ์ *Alligatoridae* ได้แก่ กลุ่มของ Archosauromorpha ประกอบด้วย อัลลิเกเตอร์ และโคแมน 2) วงศ์ *Crocodylidae* ได้แก่ จระเข้ และ 3) วงศ์ *Gavialidae* ได้แก่ ตะโขง ซึ่งเป็นกลุ่มสัตว์เลื้อยคลานที่นักวิจัยให้ความสนใจและทำการศึกษาเกี่ยวกับเปปไทด์ต้านจุลชีพมากที่สุดเพราะสภาพแวดล้อมและที่อยู่อาศัยของสัตว์เลื้อยคลานกลุ่มนี้มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อโรคได้ง่าย เช่น บาดแผลที่เกิดจากการต่อสู้กันเอง สามารถหายได้เองโดยไม่มีอาการติดเชื้อทั้งที่สภาพแวดล้อมนั้นเต็มไปด้วยเชื้อโรคชนิดต่างๆ จากการศึกษาวิจัย พบการแสดงออกของเปปไทด์ต้านจุลชีพทั้งในระดับยีนและโปรตีน เช่น ไลโซไซม์ (lysozyme) เฮโมโกลบิน (hemoglobin) ดีเฟนซิน (defensing) เฮปซิดิน (hepcidin) เฮโมซิดิน (hemocidin) ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ เช่น *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *Aeromonas sobria* (101) ความสามารถในการดำรงอยู่ของสิ่งมีชีวิตในสายวิวัฒนาการไม่ได้อาศัยเพียงแค่การแสดงออกที่ถูกต้องของยีนหรือโปรตีนเท่านั้นแต่ต้องอาศัยความสามารถในการต่อสู้กับเชื้อก่อโรคต่างๆ อย่างมีประสิทธิภาพนั่นหมายความว่าในการรอดชีวิตของสิ่งมีชีวิตชั้นสูงต้องพึ่งพาระบบภูมิคุ้มกันที่มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อก่อโรคและระบบนี้สามารถปรับเปลี่ยนได้ตามสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปในแต่ละช่วงเวลา จากรายงานการศึกษาของนักวิจัยทำให้ทราบว่าสัตว์เลื้อยคลานเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีการสร้างเปปไทด์ต้านจุลชีพที่สำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบสืบทอดแต่กำเนิด (innate immunity) ได้แก่ แคโรลิซิน ดีเฟนซิน และไลโซไซม์ซึ่งการศึกษาถึงโครงสร้างและหน้าที่ของเปปไทด์ต่างๆ ในสัตว์เลื้อยคลานจะทำให้เข้าใจการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์เลื้อยคลานมากขึ้นและนำไปสู่การค้นพบเปปไทด์ต้านจุลชีพที่มีประสิทธิภาพสูงเพื่อการพัฒนาใช้แทนยาปฏิชีวนะได้ในอนาคต

## 2.4 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในสัตว์เลื้อยคลาน

จากรายงานการศึกษาเกี่ยวกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในสัตว์เลื้อยคลาน พบว่ามีทั้งโปรตีนและเปปไทด์ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ ซึ่งโปรตีนต้านจุลชีพนั้นมีคุณสมบัติใกล้เคียงกันกับเปปไทด์มาก โดยเปปไทด์ต้านจุลชีพ (antimicrobial peptides) มีลักษณะเป็นเปปไทด์สายสั้นประกอบด้วยกรดอะมิโนตั้งแต่ 12-100 ตัว ทำหน้าที่ในการป้องกันการบุกรุกของเชื้อก่อโรคต่างๆ ไม่ให้เข้าสู่ร่างกาย (host defense mechanism) ในปัจจุบันมีการค้นพบและมีการศึกษาเปปไทด์ต้านจุลชีพมากกว่าร้อยชนิดและยังพบว่าเปปไทด์ต้านจุลชีพมีโครงสร้างหลายรูปแบบ ได้แก่  $\alpha$ -helical, cysteine-rich และ  $\beta$ -sheet ซึ่งส่วนใหญ่จะประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิด histidine (his), arginine (arg), proline (pro) และ tryptophan (trp) (102) โดยส่วนใหญ่พบว่า โปรตีนหรือเปปไทด์ต้านจุลชีพมีประจุเป็นบวก เพื่อใช้ดึงดูดกันระหว่างขั้วลบที่อยู่บริเวณพื้นผิวของเชื้อจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรียแกรมบวกจะมีกรดเทโคอิก (techoic acid) และแบคทีเรียแกรมลบมีกลุ่มฟอสเฟต

ของไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) ในกลุ่มที่เป็นโปรตีน เช่น ไลโซไซม์ (lysozyme) เฮโมโกลบิน (hemoglobin) และกลุ่มที่เป็นเปปไทด์ เช่น แคธลิซิน (cathelicidin) ดีเฟนซิน (defensin) ลิวคโรซิน (leucocin) เฮปซิดิน (hepcidin) และเฮโมซิดิน (hemocidin) ทั้งโปรตีนและเปปไทด์ทำหน้าที่ในการป้องกัน เชื้อโรคต่างๆ เข้าสู่ร่างกาย (3) ซึ่งประสิทธิภาพและการออกฤทธิ์ของโปรตีนหรือเปปไทด์แต่ละชนิดนั้นจะมีความแตกต่างกันออกไป มีหลายรายงานทางวิทยาศาสตร์ได้แสดงให้เห็นว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในสัตว์เลื้อยคลาน เช่น ซีร์ม พบว่ามีฤทธิ์ในการป้องกันเชื้อรารวมถึงไวรัสและแบคทีเรียก่อโรคได้หลายชนิด (96, 103, 104) จากรายงานของ Merchant และคณะพบว่าสารสกัดจาก leukocyte ที่ได้จากจระเข้มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *C. albicans* และเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ได้ (105) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาวิจัยของ Leelawongtawon และคณะที่ทำการศึกษเกี่ยวกับประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบจากซีร์มในระเข้ น้ำจืดของไทย โดยพบว่าซีร์มสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มแกรมลบได้ (106) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเพิ่มเติมใน leukocyte ของจระเข้ น้ำจืดไทยเกี่ยวกับคุณสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราพบว่าขนาดโมเลกุลของโปรตีนหรือเปปไทด์มีผลโดยตรงต่อการออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียซึ่งขนาดของเปปไทด์จะอยู่ระหว่าง 5-75 กิโลดัลตัน (107-109) ซึ่งต่อมาได้มีการแยกสารดังกล่าวออกมาและทำให้บริสุทธิ์และเรียกสารนั้นว่า crocosin VI ซึ่ง crocosin VI มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmonella Typhi* และ *S. aureus* (107) และในต่างประเทศเองได้มีการศึกษาวิจัยองค์ประกอบของเลือด จากอัลลิเกเตอร์ (*American alligator, Gator*) ซึ่งเป็นสัตว์เลื้อยคลาน เฉพาะถิ่นพบว่าซีร์มของอัลลิเกเตอร์นั้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้มากถึง 17 ชนิด (110) และพบว่า leukocyte ที่แยกได้จากเลือดของอัลลิเกเตอร์ก็สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราได้หลายชนิดเช่นกัน (105)

#### 2.4.1 โปรตีนต้านจุลชีพในสัตว์เลื้อยคลาน

สารออกฤทธิ์ต้านจุลชีพประเภทโปรตีนในสัตว์เลื้อยคลานสามารถแบ่งออกได้ 2 ชนิดหลักๆ คือ

1. ไลโซไซม์ เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยผนังเซลล์แบคทีเรียสามารถพบได้ในระบบภูมิคุ้มกันชนิดสปีทอแต่กำเนิดและที่สำคัญเอนไซม์ดังกล่าวถูกสร้างและเก็บไว้ในแกรนูลของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวสามารถทำลายเชื้อ แบคทีเรียได้หลายชนิด โดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, methicillin-resistant *S. aureus* โดย ไลโซไซม์จะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาย่อยสลายพันธะปีตา 1,4 ไกลโคซิดิก ( $\beta$ -1,4 glycosidic linkages) ที่เชื่อมระหว่างน้ำตาล N-acetylglucosamine (NAG) และ N-acetylmuramic acid (NAM) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ในแบคทีเรียแกรมลบและไลโซไซม์เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในระบบการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบสปีทอแต่กำเนิดของสัตว์เลื้อยคลานซึ่งสามารถพบได้ทั้งในเซลล์ไขและเซลล์เม็ดเลือดขาวของสัตว์เลื้อยคลาน (3, 111)

2. เฮโมโกลบิน เป็นโปรตีนโมเลกุลใหญ่ทำหน้าที่ในการขนส่งออกซิเจนและยังสามารถทำหน้าที่เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถต้านจุลชีพได้ (112) มีรายงานว่า เฮโมโกลบินจากอัลลิเกเตอร์สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียได้ มากถึง 17 ชนิด เช่น *Klebsiella oxytoca*, *Providencia stuartii*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Citrobacter freundii*, *Shigella sonnei*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella poona*, *Yersenia enterocolitica*, *Enterococcus faecalis*, *S. aureus*, *Staphylococcus epidermitis*, *Streptococcus pyrogenes*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* (113) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาวิจัยของ Srihongthong และคณะ ที่พบว่าเฮโมโกลบินจากจระเข้ไทย (*Crocodylus siamensis*) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ คือ *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* และ *S. aureus* (114) และจากการศึกษาของศูนย์วิจัยโปรตีนและโปรตีโอมิกส์เพื่อการพาณิชย์และอุตสาหกรรมได้ทำการจำแนกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากอวัยวะต่างๆ ของจระเข้ น้ำจืดไทยที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลชีพ (รูปที่ 8) เช่น เฮปซิดิน ลิวคร็อกซิน ไลโซไซม์ เฮโมโกลบินและโอโวทรานส์เฟอร์ริน

#### 2.4.2 เปปไทด์ต้านจุลชีพในสัตว์เลื้อยคลาน

เปปไทด์ต้านจุลชีพในระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์เลื้อยคลานนั้นมีอยู่หลายชนิดสามารถแบ่งออกได้ดังนี้ คือ

1. ดีเฟนซิน เป็นเปปไทด์ที่สำคัญชนิดหนึ่งในกลุ่มของเปปไทด์ต้านจุลชีพสามารถทำลายได้ทั้งเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และเชื้อไวรัส ดีเฟนซินเป็นเปปไทด์ขนาดเล็กมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3 - 4 กิโลดาลตัน มีประจุเป็นบวกและประกอบด้วยกรดอะมิโนซิสเตอีน (cysteine) จำนวน 6 กรดอะมิโนเรียงตัวกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) จำนวน 3 พันธะ ซึ่งเป็นลักษณะที่จำเพาะของเปปไทด์ดีเฟนซิน เปปไทด์ดีเฟนซินสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มหลัก ได้แก่ แอลฟาดีเฟนซิน บีตาดีเฟนซินและซีตาดีเฟนซิน (115) ตัวอย่างเปปไทด์ต้านจุลชีพกลุ่มนี้ คือ HNP- 1 หรือแอลฟาดีเฟนซิน 1 ซึ่งพบในเซลล์เม็ดเลือดขาวมีหน้าที่ในการทำลายเชื้อโรค (115) มีรายงาน การพบบีตาดีเฟนซินในเต่าทะเล (*Caretta caretta*) และซีตาดีเฟนซินซึ่งเป็นเปปไทด์ที่พบได้เฉพาะในกลุ่มของไพรเมต (primate) และนอกจากนี้ยังสามารถพบเปปไทด์ได้ในสิ่งมีชีวิตอื่นๆ เช่น ปลา สัตว์เลื้อยคลาน นก และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (116) มีรายงานการพบบีตาดีเฟนซินครั้งแรกในสัตว์เลื้อยคลานในกลุ่ม anole lizard หรือจิ้งจกซึ่งบริเวณที่พบคือบริเวณบาดแผล จึงมีความเป็นไปได้ว่าเปปไทด์บีตาดีเฟนซินอาจมีความเกี่ยวข้องกับการรักษาและการฟื้นฟูบาดแผลในจิ้งจก (117, 118) เปปไทด์นอกจากจะมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแล้วยังพบว่าเปปไทด์มีความสำคัญในการสร้างเปลือกไข่ของสัตว์เลื้อยคลานบางชนิดอีกด้วย (119)

2. แครีลิซิดิน เป็นเปปไทด์ที่พบมากที่สุดในสัตว์เลื้อยคลาน เปปไทด์ชนิดนี้สามารถพบได้ในเซลล์เม็ดเลือดขาว ซึ่งแครีลิซิดินเปปไทด์จะทำงานหรือออกฤทธิ์ได้ต้องได้รับการกระตุ้นจากเอนไซม์เพื่อให้เปปไทด์แครีลิซิดินทำงาน (120, 121) เปปไทด์แครีลิซิดินพบมากที่สุดในสัตว์เลื้อยคลานประเภท งู ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาวิจัยที่พบว่าเปปไทด์ชนิดนี้มีการแสดงออกมาก

ที่สุดในกลุ่มของ งู เช่น งูสามเหลี่ยม (*Bungarus fasciatus*) งูจงอาง (*Ophiophagus hannah*) และงูเห่าจีน (*Naja atra*) เป็นต้น (122) และยังพบได้ในสัตว์เลื้อยคลานกลุ่มอื่น เช่น กิ้งก่ากรีน อาโนล (Anolis carolinensis) (123) เต่าและจระเข้แต่ไม่มากนักเมื่อเปรียบเทียบกับ งู

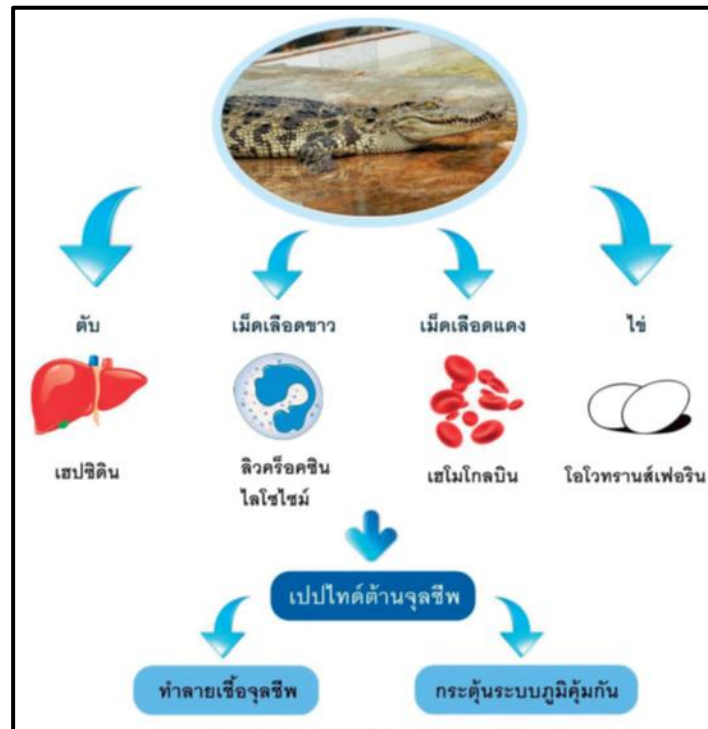
3. เฮปซิดิน เป็นเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพที่พบในตับ มีฤทธิ์ต้านจุลชีพได้หลายชนิด (124, 125) เช่น *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* และ *A. sobria* เป็นต้น (101) เฮปซิดิน ถูกพบครั้งแรกในจระเข้สายพันธุ์ไทย นอกจากจระเข้แล้วเปปไทด์เฮปซิดินยังพบได้ในสัตว์เลื้อยคลานกลุ่ม กิ้งก่าแต่ในกลุ่มของสัตว์ปีกยังไม่มีรายงานการพบ (126)

4. แอลอีเอพี 2 เป็นเปปไทด์ต้านจุลชีพประกอบด้วยกรดอะมิโน ซีสเตอีน (127) เปปไทด์แอลอีเอพี 2 พบได้ตามอวัยวะอื่นๆ แต่พบมากที่สุดที่ตับ เปปไทด์แอลอีเอ พี 2 (LEAP-2) มีฤทธิ์ยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียและเชื้อรา(128-130) เปปไทด์แอลอีเอพี 2 สามารถพบได้ใน สัตว์เลื้อยคลานหลายชนิด เช่น ตะพาบไต้หวัน (*Pelodiscus sinensis*) เต่าตะวันตก (*Chrysemys picta bellii*) อัลลิเกเตอร์จีน (*Alligator sinensis*) และอัลลิเกเตอร์อเมริกา แต่คุณสมบัติหรือ ประสิทธิภาพทางชีวภาพของเปปไทด์แอลอีเอพี 2 นี้ยังไม่มีรายงานการศึกษา

5. เปปไทด์กลุ่มลิควีร็อคซิน ถูกพบในสารสกัดเม็ดเลือดขาวของจระเข้สายพันธุ์ไทย โดย Pata และคณะ (109) ซึ่งเปปไทด์ลิควีร็อคซิน มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิด จากการศึกษากลไกการทำลายเซลล์แบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด พบว่า เปปไทด์กลุ่มลิควีร็อคซินมีผลโดยตรงต่อเซลล์เมมเบรนของแบคทีเรียโดยเปปไทด์จะทำให้เกิดการ พองที่ผิวเซลล์

จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งหรือทำลายเชื้อแบคทีเรียของ โปรตีนหรือเปปไทด์นั้น คือ กรดอะมิโนชนิดต่างๆ (131) โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติ เป็นประจุบวกเนื่องจากคุณสมบัตินี้ทำให้เปปไทด์หรือโปรตีนมีความสามารถในการเข้าจับกับเซลล์ ของแบคทีเรียผ่านฟอสโฟไลปิดที่มีคุณสมบัติเป็นประจุลบ (132-134) จากการทบทวนวรรณกรรม แสดงให้เห็นว่าสัตว์เลื้อยคลานนอกจากจะมีระบบภูมิคุ้มกันที่ดีแล้วยังมีโปรตีนหรือเปปไทด์ต้านจุลชีพ ที่มีประสิทธิภาพสูงซึ่งเราสามารถนำองค์ความรู้นี้ไปพัฒนาต่อยอดเพื่อนำมาใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะ เพื่อแก้ปัญหาเชื้อแบคทีเรียดื้อยาได้ในอนาคต





รูปที่ 8 โปรตีนและเปปไทด์ที่พบจากอวัยวะหรือองค์ประกอบต่างๆ ของจระเข้สายพันธุ์ไทย (135)

จากข้อสังเกตพบว่าการศึกษาศาสตร์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสัตว์เลื้อยคลานนั้นส่วนใหญ่ยังเป็นการศึกษาเฉพาะกลุ่ม เช่น กลุ่มของจระเข้หรือกลุ่มของเต่าเท่านั้นแต่ในกลุ่มของสัตว์เลื้อยคลานประเภทกิ้งก่านั้นยังมีข้อมูลการศึกษาวิจัยไม่มากเท่าที่ควร โดยเฉพาะในกลุ่มของลิซาร์ด เช่น ตัวเงินตัวทอง (water monitor lizard) ซึ่งสัตว์เลื้อยคลานกลุ่มนี้นอกจากจะมีพฤติกรรมคล้ายคลึงกันกับสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ crocodylia (crocodylians) อย่างจระเข้แล้วลักษณะที่อยู่อาศัยยังเสี่ยงต่อการติดเชื้อโรคได้ง่ายเช่นกัน จึงเป็นไปได้ว่าในตัวเงินตัวทองอาจจะมีระบบภูมิคุ้มกันที่ดีเหมือนกันกับจระเข้และอาจจะมีโปรตีนหรือเปปไทด์ต้านจุลชีพที่มีประสิทธิภาพสูงที่สามารถนำมาพัฒนาหรือต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น ยาหรือสารทดแทนยาปฏิชีวนะเพื่อใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อในอนาคต

### 2.4.3 ลักษณะทั่วไปของตัวเงินตัวทอง

ตัวเงินตัวทอง หรือ water monitor lizard เป็นสัตว์เลื้อยคลานรูปร่างเหมือนกิ้งก่ามีลิ้นแยกเป็นสองแฉกคล้ายงูมีเกล็ดปกคลุมลำตัวไม่มีต่อมเหงื่อ แต่มีต่อมน้ำมันสำหรับป้องกันการสูญเสียน้ำ ผิวหนังจะมีสีน้ำตาลเข้มหรือดำและมีลวดลายตามลำตัวเป็นดอกลีเหลืองซึ่งเป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัวของตัวเงินตัวทอง โดยจุดสีเหลืองเหล่านี้จะจางลงเมื่อตัวเงินตัวทองโตเต็มวัยหรือมีอายุมากขึ้น (136) สัตว์เลื้อยคลานกลุ่มนี้สามารถพบได้ทั่วไปเกือบทุกพื้นที่โดยเฉพาะในพื้นที่แถบเอเชียใต้และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อย่างเช่น บังกลาเทศ ศรีลังกา อินเดีย อินโดนีเซีย รวมถึงประเทศไทย (137) พบได้ทั้งในบริเวณแหล่งน้ำที่เป็นน้ำจืดและน้ำเค็ม เช่น ตามแม่น้ำลำคลองหรือป่าโกงกาง (138) หรือแม้แต่ในบริเวณที่เป็นแหล่งชุมชนหรือใจกลางเมืองใหญ่อย่างกรุงเทพมหานคร (139) ตัวเงินตัวทอง มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Varanus salvator* เป็นสัตว์กินซากมีความยาวเฉลี่ยประมาณ 2.5 – 3 เมตร เมื่อวัดจากปลายจมูกถึงปลายหาง ซึ่งมีขนาดใหญ่รองลงมาจากริงโคโมโด ในวงศ์ตะกวดด้วยกันที่พบบนเกาะโกโมโดในประเทศอินโดนีเซีย (140) ตัวเงินตัวทองจัดอยู่ในแฟมมีลีของ *Varanidae* ซึ่งสามารถจำแนกออกตามลักษณะถิ่นที่อยู่ อาศัยได้อีกสองกลุ่มใหญ่ๆ คือ กลุ่มที่อาศัยอยู่บนบกหรืออาศัยอยู่บนต้นไม้และกลุ่มที่อาศัยอยู่ในน้ำ (141) กินของเน่าเปื่อยหรือซากสัตว์เป็นอาหารบางครั้งอาจจะกินสัตว์ที่มีชีวิต เป็นอาหาร เช่น ไก่หรือเป็ด เป็นต้น จากการสำรวจของ คมศร (142) ในกลุ่มสัตว์เลื้อยคลานวงศ์ตะกวด หรือ *Varanidae* นอกจากตัวเงินตัวทองแล้วในประเทศไทยยังพบอีก 3 ชนิด ได้แก่

#### 1. ตะกวด (clouded monitor)

ตะกวด หรือ แลน (*Varanus bengalensisnebulosus*) มีขนาดตัวใหญ่ หัวยาวและแบน มีหางยาวขนาดใหญ่ ผิวหนังลำตัวมีเกล็ดปกคลุมและมีลักษณะเป็นตุ่ม แลน หรือตะกวดจะมีสีเรียบออกโทนสีน้ำตาลทั้งตัว (รูปที่ 9) รูปร่างส่วนใหญ่อาจจะดูคล้ายกันกับตัวเงินตัวทองแต่เมื่อสังเกตที่รูจมูกของตะกวดจะเห็นว่าอยู่ห่างจากปลายปากมากกว่าตัวเงินตัวทองซึ่งรูจมูกจะอยู่ใกล้ปลายปาก (รูปที่ 10)

#### 2. เहांซ้าง (roughneck monitor lizard)

เहांซ้าง (*Varanus rudicollis*) เป็นสัตว์เลื้อยคลานในวงศ์ตัวเงินตัวทอง (*Varanidae*) และ เป็นสัตว์ป่าคุ้มครองตามพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ. 2535 เहांซ้าง พบได้ทางตอนใต้ ของประเทศไทยเท่านั้น เहांซ้างเป็นสัตว์เลื้อยคลานกลุ่มเดียวกับตะกวดและตัวเงินตัวทอง มีเกล็ดที่คอตุ่มๆ หนามของทุเรียน ตัวสีดำนัน มีจุดสีเหลืองบ้างประปราย ชื่อเहांซ้าง ได้มาจากเสียงที่ใช้ขู่ศัตรู ฟังดูคล้ายเสียงขู่ของงูเहां (รูปที่ 11)

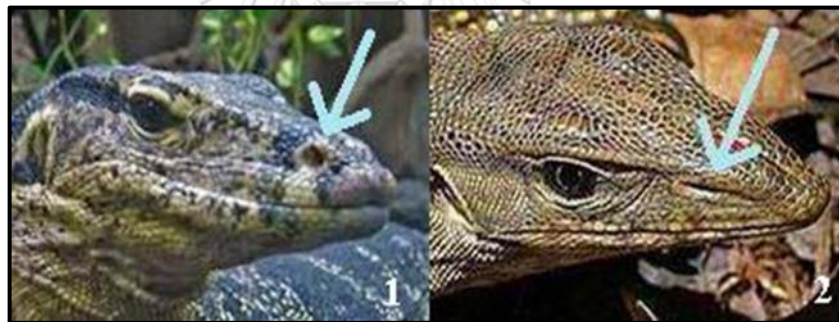
### 3. ตุ๊ดตู่ (dumeril's monitor)

ตุ๊ดตู่ (*Varanus dumerilii*) เป็นสัตว์เลื้อยคลานชนิดหนึ่งในวงศ์ *Varanidae* มีรูปร่างทั่วไปคล้ายตัวเงินตัวทองเป็นชนิดที่เล็กที่สุดในประเทศไทย เกล็ดที่คอแบนราบมีขนาดใหญ่ เมื่อออกมาจากไข่ 1-2 สัปดาห์แรกจะมีสีส้มที่หัวเป็นสีส้มสวยงามจากนั้นสีส้มนี้จะค่อยๆ จางหายไป มีนิสัยรักสงบไม่ดุร้าย (รูปที่ 12 )

Joel Montgomery และคณะได้ทำการทดลองโดยการเอาเก็บตัวอย่างของน้ำลายและเลือดของสัตว์เลื้อยคลานในวงศ์ *Varanidae* เช่น มังกรโคโมโด ซึ่งเป็นสัตว์เลื้อยคลานในกลุ่มเดียวกันกับตัวเงินตัวทอง (6) พบว่าน้ำลายของมังกรโคมาโดมีแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบมากถึง 28 ชนิด โดยส่วนใหญ่พบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Staphylococcus* และ *Streptococcus* เช่น *Staphylococcus capitis*, *Streptococcus bovis* เป็นต้น (7) และมีอย่างน้อยหนึ่งชนิดที่ทำให้สัตว์ทดลองตายได้ (6, 8) นอกจากนี้ซีรัมของมังกรโคมาโดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้ (11) และล่าสุดมีรายงานการศึกษาวิจัยในเลือดของมังกรโคมาโดเพื่อประเมินประสิทธิภาพของเปปไทด์ ชื่อ DRGN-1 ซึ่งเป็นเปปไทด์ที่ทำการสังเคราะห์เลียนแบบการทำงานของเลือดของมังกรโคมาโดเพื่อนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดื้อยา ผลจากการวิจัยพบว่า DRGN-1 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* และเชื้อ *S. aureus* ได้ และทำให้บาดแผลที่เกิดจากการติดเชื้อดังกล่าวหายได้เร็วขึ้นในสัตว์ทดลอง โดย DRGN-1 จะเข้าไปจับกับเซลล์เมมเบรนของเชื้อแบคทีเรียก่อให้เกิดการสูญเสียความสมบูรณ์ของเซลล์ เช่น รบกวนการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ (permanent plasma membrane permeabilization) หรือ การแตกสลายของเซลล์ (cellular fragmentation) แต่จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าข้อมูลของการศึกษาวิจัยสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสัตว์เลื้อยคลานในวงศ์ *Varanidae* นั้นยังมีข้อมูลไม่มากเท่าที่ควร



รูปที่ 9 ตัวเต็มวัยของตะกวด clouded monitor (143)



CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 10 เปรียบเทียบลักษณะของหัวและตำแหน่งของรูจมูก  
ซ้าย คือ ตัวเงินตัวทอง ขวา คือ ตะกวด (137)



รูปที่ 11 เหาข้าง rough neck monitor (144)



รูปที่ 12 ตี๊ดตู่ dumeril's monitor (144)

## 2.5 กลไกการป้องกันการติดเชื้อโรคของสัตว์เลื้อยคลาน

### 2.5.1 เชิงพฤติกรรม

สัตว์เลื้อยคลานจัดเป็นสัตว์เลือดเย็นเพราะอุณหภูมิของร่างกายจะเปลี่ยนแปลงไปตามอุณหภูมิของสิ่งแวดล้อมซึ่งต่างจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่สามารถรักษาระดับอุณหภูมิของร่างกายให้คงที่ ดังนั้น อุณหภูมิจึงมีผลต่อร่างกายของสัตว์เลื้อยคลานโดยสัตว์เลื้อยคลานจะใช้สิ่งแวดล้อมช่วยในการปรับอุณหภูมิของร่างกาย อย่างเช่น ถ้าอากาศหนาวก็จะใช้แสงแดดในการเพิ่มอุณหภูมิของร่างกายโดยขึ้นมานอนอาบแดดบนบกซึ่งช่วยยับยั้งเชื้อโรคและเพิ่มการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันทำให้มีโอกาสรอดชีวิตมากขึ้น แต่ถ้าอากาศร้อนก็จะแช่อยู่ในน้ำหรือนอนหลบใต้เงาไม้เพื่อลดอุณหภูมิของร่างกายเช่น ในการศึกษาวิจัยของ Farag และคณะ พบว่างู striped sand snake (*Psammophis sibilans*) มีจำนวนของ T-cell เพิ่มขึ้นในช่วงฤดูใบไม้ผลิและฤดูใบไม้ร่วง (145) และยังมีงานวิจัยของจิตรกมลและคณะได้ศึกษาวิจัยเกี่ยวผลของอุณหภูมิต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวของตัวเงินตัวทองโดยนำมาทดลองเลี้ยงในสภาวะอุณหภูมิที่แตกต่างกันที่ 27 องศาเซลเซียส และ 37 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นโดยเฉพาะเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ทดลองเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีปริมาณของเซลล์เพิ่มมากขึ้นจากสองแสนเซลล์เป็นเจ็ดแสนเซลล์เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับ การทดลองเลี้ยงที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ซึ่งตรงกับงานวิจัยของ Thopson และคณะที่ทำการศึกษาค้นคว้าผลของอุณหภูมิในกิ้งก่าในสกุล *Varanus* รวมถึงผลการศึกษาของ Pitchappan และคณะที่มีการศึกษาเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันของกิ้งก่าสวน (*Calotes versicolor*) พบว่ามีการสร้าง cytotoxic-like T-cell และ T-helper cell เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น (146, 147) ซึ่งเซลล์เม็ดเลือดขาวถือว่ามีผลสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันมาก โดยเฉพาะเซลล์เม็ดเลือดขาวกลุ่ม T-cell โดย T-cell จะเปลี่ยนรูปร่างเป็น cytotoxic T-cell (TC) และ T-helper cell (TH) เมื่อได้รับการกระตุ้นจากแอนติเจนเพื่อทำลายสิ่งแปลกปลอม (148) นอกจากนี้ สัตว์เลื้อยคลานยังมีผิวหนังชั้นนอกที่มีเคอราติน (keratin) เป็นองค์ประกอบซึ่งไม่พบในสัตว์มีกระดูกสันหลังอื่นๆ การมีชั้นผิวหนังพิเศษนี้ส่งผลให้สัตว์เลื้อยคลานสามารถป้องกันการถูกบุกรุกจากสิ่งแปลกปลอมได้ดีกว่าสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ซึ่งลักษณะเหล่านี้อาจมีผลกระทบต่อวิธีการดำรงชีวิต

### 2.5.2 ระบบภูมิคุ้มกันแบบสืบทอดแต่กำเนิด (innate immunity)

ระบบภูมิคุ้มกันแบบสืบทอดแต่กำเนิด เป็นกลไกที่สิ่งมีชีวิตทุกชนิดใช้ในการป้องกันสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคเพราะเป็นภูมิคุ้มกันชนิดไม่จำเพาะ จึงสามารถตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมได้อย่างรวดเร็ว องค์ประกอบหลักๆ ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันนี้ได้แก่ ระบบคอมพลีเมนต์ (complement) ไลโซไซม์ (lysozyme) ทรานส์เฟอริน (transferrin) ออปโซนิน (opsonin) อินเตอร์เฟอรอน (interferon) ดีเฟนซิน (defensin) และสารประเภทโปรตีนต่างๆ เช่น เปปไทด์ (antimicrobial peptide) (149) คอมพลีเมนต์ถือได้ว่าเป็นระบบที่สำคัญต่อภูมิคุ้มกันชนิดนี้มากเพราะโปรตีนที่อยู่ในพลาสมาซึ่งเมื่อถูกกระตุ้นจะเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องกันเป็น

ลูกโซ่มีผลในการทำลายเซลล์หรือสิ่งแปลกปลอมคอมพลีเมนต์ยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบของเนื้อเยื่อด้วย ซึ่งการกระตุ้นคอมพลีเมนต์เกิดได้ 3 ลักษณะคือ

1. classical pathway เป็นกลไกที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของแอนติบอดีโดยตรง ซึ่งระบบนี้มีเพียงมีแอนติบอดีเพียง 2 ชนิดเท่านั้นที่สามารถกระตุ้นด้วย classical pathway ได้คือ IgG (IgG1, IgG2, IgG3) และ IgM

2. alternative pathway เป็นกลไกที่ถูกกระตุ้นด้วยโมเลกุลต่าง ๆ เช่น ไวรัส ไลโปโพลีแซ็กคาไรด์ที่เป็นส่วนประกอบของเซลล์เมมเบรนของแบคทีเรีย กลไกนี้ไม่เกี่ยวข้องกับการทำงานของแอนติบอดี

3. lectin pathway เป็นกลไกที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของโปรตีนเลคตินซึ่งเป็นโปรตีนที่สามารถจับกับโมเลกุลของคาร์โบไฮเดรตที่มีกลุ่มน้ำตาลแมนโนสเป็นองค์ประกอบบนผิวเมมเบรนของแบคทีเรีย

มีการศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการทำงานของระบบคอมพลีเมนต์ในอัลลิเกเตอร์ พบว่ามีระบบคอมพลีเมนต์มีเพียง 2 ระบบเท่านั้น คือ classical pathway และ alternative pathway ส่วน lectin pathway จะพบได้เฉพาะในกลุ่มของสัตว์น้ำ เท่านั้น เช่น ฉลามหรือสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก ซึ่งสัตว์เหล่านี้มีวิวัฒนาการที่ใกล้เคียงกับสัตว์เลื้อยคลานมากจึงมีความเป็นไปได้ว่ากลไกดังกล่าวอาจเกิดในสัตว์เลื้อยคลานกลุ่มอื่นๆ ได้เช่นกัน (150) มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับระบบคอมพลีเมนต์ในซีรัมของอัลลิเกเตอร์เปรียบเทียบกับซีรัมของคน พบว่าซีรัมของอัลลิเกเตอร์มีประสิทธิภาพในการทำละลายเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าซีรัมคน และนอกจากระบบคอมพลีเมนต์แล้วเซลล์เม็ดเลือดต่างๆ ในระบบเลือดของสัตว์เลื้อยคลานก็มีความสำคัญ เช่น กลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาว (leucocytes) (โมโนไซต์, เฮเทอโรฟิล, เบโซฟิลและอีโอซิโนฟิล) รวมถึงเซลล์เม็ดเลือดแดง (erythrocytes) เซลล์เม็ดเลือดของสัตว์เลื้อยคลานนั้นมีรูปร่างหลากหลายแบบ (รูปที่ 13) ซึ่งเซลล์เม็ดเลือดเหล่านี้จะทำงานร่วมกันกับระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์เลื้อยคลานเพื่อต่อต้านสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรคต่างๆ ที่เข้าสู่ร่างกาย (151)

### 2.5.3 ระบบภูมิคุ้มกันแบบที่ต้องมีการกระตุ้น (adaptive immunity)

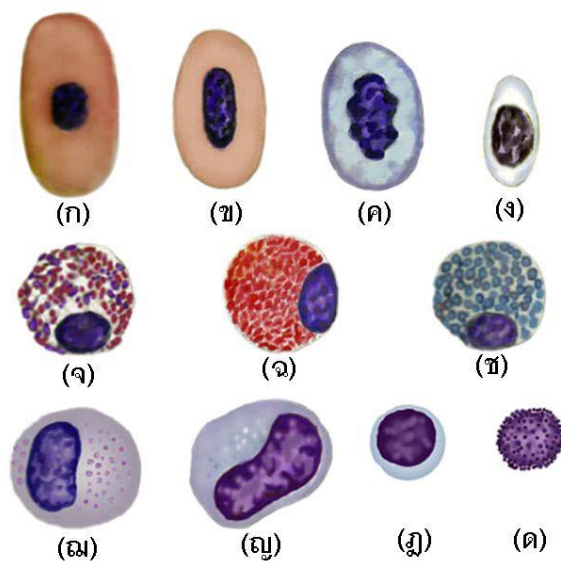
ภูมิคุ้มกันแบบ acquired immunity หรือภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ ในกลุ่มของสัตว์เลื้อยคลานจะเหมือนกับสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดอื่นทั่วไปกล่าวคือภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะจะมีระบบการจดจำลักษณะของสิ่งแปลกปลอมหรือแอนติเจนที่เข้าสู่ร่างกายและเมื่อร่างกายได้รับสิ่งแปลกปลอมหรือแอนติเจนชนิดนั้นอีกครั้งร่างกายจะตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมได้อย่างรวดเร็วซึ่งเป็นลักษณะเด่นของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ มีการทำงานต่อเนื่องจากระบบภูมิคุ้มกันแบบสืบทอดแต่กำเนิด (innate immunity) แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

### 2.5.3.1 ระบบภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ (cell-mediated immunity)

ในสัตว์เลื้อยคลานระบบภูมิคุ้มกันด้านเซลล์มักจะสัมพันธ์กันกับอุณหภูมิและฤดูกาล เช่น ในการศึกษาวิจัยของ Farag และคณะ พบว่างู striped sand snake (*Psammophis sibilans*) จะมีจำนวนของ T-cell เพิ่มขึ้นในช่วงฤดูใบไม้ผลิและฤดูใบไม้ร่วง (145) และยังมีงานวิจัยของจิตรกมล และคณะที่รายงานถึงผลของอุณหภูมิต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวของตัวเงินตัวทอง เมื่อนำมาเปรียบเทียบในอุณหภูมิที่ต่างกันพบว่าที่ 37 องศาเซลเซียส มีจำนวนเซลล์มากกว่า 27 องศาเซลเซียส คล้ายกับที่พบ ในกิ้งก่าในสกุล Varanus จากการวิจัยของ Thopson และคณะ และผลการศึกษาของ Pitchappan และคณะ ที่มีการศึกษาเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันของกิ้งก่าสวน (*Calotes versicolor*) พบว่ามีการสร้าง cytotoxic-like T-cell และ T-helper cell เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น (146, 147) ซึ่งเซลล์เม็ดเลือดขาวถือว่ามีผลสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันมากโดยเฉพาะเซลล์เม็ดเลือดขาวกลุ่ม T-cell ที่เปลี่ยนรูปร่างเป็น cytotoxic T-cell (TC) และ T-helper cell (TH) เมื่อได้รับการกระตุ้นจากแอนติเจนเพื่อทำลายสิ่งแปลกปลอม (148)







รูปที่ 13 ลักษณะเซลล์เม็ดเลือดของสัตว์เลื้อยคลาน (ก) เซลล์เม็ดเลือดแดงจระเข้ (ข) เซลล์เม็ดเลือดแดงอีกว่านา (ค) เซลล์เม็ดเลือดแดงเต่า (ง) เซลล์ทรมโบไซต์ (จ) เฮเทอโรฟิลจระเข้ (ฉ) เฮเทอโรฟิลเต่า (ช) อีโอซิโนฟิลเต่า (ฅ) แอโซโรฟิล (ฉ) โมโนไซต์ (ฎ) ลิมโฟไซต์ (ด) เบโซฟิล (152)

จากรูปจะเห็นได้ว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์เลื้อยคลานส่วนใหญ่จะมีนิวเคลียส (152) ซึ่งมีความแตกต่างจากเม็ดเลือดแดงของคนนอกจากนี้หลายงานวิจัยยังบ่งชี้ว่า เซลล์เม็ดเลือดแดงสามารถทำหน้าที่เป็นเปปไทด์ต้านจุลชีพได้ซึ่งเป็นผลมาจากเฮโมโกลบินที่พบได้ในเม็ดเลือดแดง

### 2.5.3.2 ระบบภูมิคุ้มกันด้านสารน้ำ (humoral adaptive immunity)

ระบบภูมิคุ้มกันด้านสารน้ำของสัตว์เลื้อยคลานเกี่ยวข้องกับ B-cells ที่มีหน้าที่ในการผลิตแอนติบอดีซึ่งแอนติบอดีของสัตว์เลื้อยคลานประกอบด้วยสาย light chain 2 ชนิด ได้แก่ แลมบ์ดา ( $\lambda$ ) และแคปป่า ( $\kappa$ ) เหมือนกับแอนติบอดีของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (153) โดยแอนติบอดีในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะสร้างอิมโมโกลบูลิน ทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ IgM, IgG, IgA, IgD และ IgE แต่ในสัตว์เลื้อยคลานจะสร้างเพียง 2 ชนิด คือ IgM และ IgY (154) ซึ่ง IgY ของสัตว์เลื้อยคลานเปรียบเสมือน IgG และ IgE ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (155) แต่มีโครงสร้างแตกต่างจาก IgG และ IgE ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

## 2.6 อวัยวะที่สร้างภูมิคุ้มกันในสัตว์เลื้อยคลาน

สัตว์เลื้อยคลานที่อาศัยอยู่ตามธรรมชาติมักมีบาดแผลที่เกิดจากการต่อสู้ ซึ่งบาดแผลที่เกิดขึ้นนั้นจะหายได้เองโดยไม่มีการรักษาและแสดงให้เห็นถึงระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์เลื้อยคลานที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันหรือรักษาบาดแผลที่เกิดขึ้น (156) โดยแหล่งที่ทำหน้าที่ในการสร้างหรือเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์เลื้อยคลาน มีดังนี้

### 2.6.1 ไชกระดูก (bone marrow)

ไขกระดูกเป็นเนื้อเยื่อยึดหยุ่นอยู่ในส่วนกลางของกระดูกพบได้ในกระดูกชั้นใน ไขกระดูกมีหน้าที่สร้างเม็ดเลือดทุกชนิดรวมทั้งเกล็ดเลือด ซึ่งสามารถแบ่งไขกระดูกออกได้เป็น 2 ชนิด คือ

1. ไขกระดูกแดง (red bone marrow) มีหน้าที่ผลิตเม็ดเลือดแดงและสร้างเกล็ดเลือด โมโนไซต์ แกรนูโลไซต์ บีลิมโฟไซต์ และพลาสมาเซลล์

2. ไขกระดูกเหลือง (yellow bone marrow) ไขกระดูกชั้นนี้มีเซลล์ไขมันอยู่เป็นจำนวนมากทำหน้าที่สร้างไขมันและสำรองเม็ดเลือดในกรณีที่ร่างกายขาดออกซิเจนหรือเสียเลือด ไขกระดูกเหลืองจะเปลี่ยนแปลงไปเป็นไขกระดูกแดงเพื่อสร้างเม็ดเลือดแดง

### 2.6.2 ต่อมไทมัส (thymus gland)

เป็นอวัยวะน้ำเหลืองซึ่งพบเมื่อยังมีอายุน้อยแต่พออายุมากขึ้นต่อมนี้อจะเล็กลงและฝ่อไปในที่สุด ต่อมไทมัสมีหน้าที่สร้าง ทีลิมโฟไซต์ (T - lymphocyte) โดยเปลี่ยนมาจากเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด (stem cell)

### 2.6.3 ม้าม (spleen) จากกรณีมหาวิทยาลัย

เป็นอวัยวะน้ำเหลืองขนาดใหญ่ที่สุดและเป็นอวัยวะน้ำเหลืองเพียงชนิดเดียวที่ไม่มีท่อน้ำเหลืองมาติดต่อเลย ภายในม้ามมีเนื้อเยื่อน้ำเหลืองเป็นจำนวนมากทำหน้าที่สร้างเม็ดเลือดขาวพวก ลิมโฟไซต์ (lymphocyte) เช่น บีลิมโฟไซต์ (B- lymphocyte) และทีลิมโฟไซต์ (T- lymphocyte) ตลอดจนโมโนไซต์ (monocyte) และยังมีหน้าที่สร้างเม็ดเลือดแดงในกรณีที่ร่างกายขาดเม็ดเลือดแดงอย่างรุนแรง เช่น ในกรณีของโรคโลหิตจาง เป็นต้น

### 2.6.4 ต่อม้ำเหลืองบริเวณทางเดินอาหาร (payer path)

เป็นอวัยวะน้ำเหลืองที่อยู่ตามผนังท่อทางเดินอาหารเช่น ลำไส้ใหญ่ ต่อมบริเวณทางเดินอาหารทำหน้าที่สร้างบีลิมโฟไซต์และดักจับเชื้อโรคที่ปนเปื้อนมากับอาหาร

## 2.7 องค์ประกอบในน้ำเลือดของสัตว์เลี้ยงคาน

เลือดจัดเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันมีหน้าที่ในการลำเลียงก๊าซออกซิเจน ของเสีย ฮอโมน รวมถึงควบคุมความเป็นกรด-ด่างของร่างกาย (157) โดยเลือดสามารถแยกได้เป็น 2 ส่วนคือ

### 2.7.1 ส่วนของเซลล์ (corpuscle)

#### 2.7.1.1 เม็ดเลือดแดง (red blood cells)

มีหน้าที่ในการลำเลียงสารอาหารและก๊าซออกซิเจนจากปอด โดยก๊าซออกซิเจนจะเข้าไปจับกับฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงรวมถึงทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ช่วยในการรักษาภาวะความเป็นกรด - ด่างของร่างกาย จากการศึกษาาระบบเลือดของจระเข้ พบว่าเม็ดเลือดแดงของจระเข้มีนิวเคลียสเช่นเดียวกับสัตว์มีกระดูกสันหลังทั่วไป โดยมีลักษณะกลมรีขนาดกว้าง 5.17–11.40 ไมโครเมตร ยาว 12.35– 20.90 ไมโครเมตร ซึ่งจระเข้ น้ำจืดพันธุ์ไทยมีเม็ดเลือดแดง  $0.36-2.2 \times 10^6$  เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร (158)

#### 2.7.1.2 เซลล์เม็ดเลือดขาว (white blood cells)

จระเข้ น้ำจืดพันธุ์ไทยมีปริมาณเม็ดเลือดขาว  $2.5-32.0 \times 10^3$  เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร (158) สร้างมาจากไขกระดูก มีหน้าที่ทำลายสิ่งแปลกปลอม เม็ดเลือดขาวแบ่งตามการมีแกรนูลชนิดจำเพาะ (specific granule) ได้ 2 แบบ คือ เม็ดเลือดขาวชนิดไม่มีแกรนูลจำเพาะ (agranulocytes) และเม็ดเลือดขาวชนิดมีแกรนูลจำเพาะ (granulocytes)

##### 1. เม็ดเลือดขาวชนิดไม่มีแกรนูลจำเพาะ (agranulocytes)

1.1 โมโนไซต์ มีรูปร่างกลมมีนิวเคลียสขนาดใหญ่ 1 พู เป็นรูปเกือบม้าย้อมติดสีม่วง และไซโทพลาสซึมย้อมติดสีฟ้ามีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 10.45–15.2 ไมโครเมตร ถูกผลิตจากอวัยวะน้ำเหลือง (lymphoid tissue) ทำลายเชื้อโรคโดยกระบวนการฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) รายงานการศึกษาจากจระเข้ น้ำจืดพันธุ์ไทย มีโมโนไซต์ประมาณร้อยละ 0-8

1.2 ลิมโฟไซต์มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ 1 พลู รูปร่างกลม ย้อมติดสีน้ำเงิน แกรนูลในไซโทพลาสซึมย้อมติดสีฟ้าอ่อน ลิมโฟไซต์มี 2 ขนาด คือ ลิมโฟไซต์ขนาดใหญ่ มีขนาดเซลล์ 11-14.5 ไมโครเมตร และ ลิมโฟไซต์ขนาดเล็ก มีขนาดเซลล์ 5.5-10 ไมโครเมตร ซึ่งลิมโฟไซต์ทั้ง 2 ชนิดสามารถทำลายเชื้อโรคโดยกระบวนการฟาโกไซโทซิส (159)

##### 2. เม็ดเลือดขาวชนิดมีแกรนูลจำเพาะ (granulocytes)

2.1 นิวโทรฟิล (neutrophil) มีรูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 12 ไมโครเมตร นิวเคลียสเป็นพู 2-6 พู นิวเคลียสย้อมติดสีม่วง ไซโทพลาสซึมย้อมติดสีชมพู ในจระเข้ น้ำจืดพันธุ์ไทยมีนิวโทรฟิลประมาณร้อยละ 3-7 มีหน้าที่ทำลายเชื้อโรคโดยกระบวนการฟาโกไซโทซิส

2.2 เฮเทอโรฟิล (heterophil) ลักษณะคล้ายนิวโทรฟิล เฮเทอโรฟิล มีรูปร่างกลม มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 10.45–15.2 ไมโครเมตร นิวเคลียสไม่เป็นพู ในจระเข้ น้ำจืดพันธุ์ไทยมีเฮเทอโรฟิลประมาณร้อยละ 50-86

2.3 เบโซฟิล (basophil) มีรูปร่างค่อนข้างกลม มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 9.03–12.83 ไมโครเมตร นิวเคลียสกลมไม่เป็นพลา นิวเคลียสย้อมติดสีม่วง แกรนูโลไนโซโทพลาสซึมย้อมติดสีน้ำเงินหรือม่วงเข้มในจระเข้ น้ำจืดพันธุ์ไทยมีเบโซฟิลประมาณร้อยละ 0-3 มีหน้าที่ทำลายเชื้อโรคโดยกระบวนการฟาโกไซโทซิส เบโซฟิลมักพบเมื่อร่างกายแพ้สารบางอย่าง

2.4 อีโอสิโนฟิล (eosinophil) มีรูปร่างกลม มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 9.5–13.5 ไมโครเมตร นิวเคลียสเป็นพลา 2-4 พู นิวเคลียสย้อมติดสีม่วง แกรนูโลไนโซโทพลาสซึมย้อมติดสีชมพู ในจระเข้ น้ำจืดพันธุ์ไทยมีอีโอสิโนฟิลประมาณร้อยละ 9-43 อีโอสิโนฟิล ทำลายเชื้อโรคโดยกระบวนการฟาโกไซโทซิส และปล่อยแกรนูโลออกมาทำลายเชื้อโรค อีโอสิโนฟิลมักพบเมื่อร่างกายติดพยาธิและแพ้สารบางอย่าง

### 3. ทروมโบไซท์ (thrombocyte)

ทروมโบไซท์ ช่วยในการแข็งตัวของเลือด พบในสัตว์มีกระดูกสันหลังที่ไม่ใช่สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและมีนิวเคลียสตลอดชีวิต แต่ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ทروมโบไซท์จะมีนิวเคลียสเฉพาะตอนที่ถูกสร้างขึ้นใหม่เท่านั้น (159) ทروมโบไซท์ในจระเข้มีขนาดใหญ่ลักษณะกลมรี มีนิวเคลียสขนาดเล็กย้อมติดสีน้ำเงิน แกรนูโลไนโซโทพลาสซึมย้อมติดสีฟ้าอ่อนๆ ทروมโบไซท์ในจระเข้ น้ำจืดพันธุ์ไทยมีจำนวนประมาณ  $40 - 73.5 \times 10^3$  เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร (158)

#### 2.7.2 ส่วนของน้ำเลือด

จากการศึกษาในจระเข้ พบว่ามีน้ำเลือดเป็นองค์ประกอบของร่างกายประมาณ 60-75 มิลลิลิตร ต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (157) โดยทั่วไปน้ำเลือดประกอบด้วย น้ำ แอนติบอดี คอมพลิเมนต์ ฮอร์โมน และสารอาหารเช่น กลีโค โปรตีน กลูโคส กรดไขมัน น้ำเลือดมีหน้าที่ในการควบคุมอุณหภูมิและรักษาระดับความเป็นกรด-ด่างของร่างกายและเป็นส่วนของภูมิคุ้มกัน

## 2.8 การใช้ประโยชน์จากตัวเงินตัวทอง

ปัจจุบันตัวเงินตัวทองถือเป็นสัตว์เศรษฐกิจอย่างหนึ่งที่มีการส่งเสริมให้มีการเพาะเลี้ยงกัน เพื่อนำเนื้อไปใช้ในการบริโภค โดยเฉพาะเนื้อบริเวณส่วนโคนหางที่เรียกว่า บ้องตันและหนังไปทำเครื่องหนัง เช่น กระเป๋า, เข็มขัด เช่นเดียวกับจระเข้ แต่ยังไม่เป็นที่แพร่หลายเท่าไหร่นัก ส่วนในทางวิชาการมีการเก็บและตรวจสอบดีเอ็นเอของตัวเงินตัวทอง โดยภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เพื่อศึกษาถึงความหลากหลายทางพันธุกรรม เพื่อพัฒนาให้เป็นสัตว์เศรษฐกิจต่อไปในอนาคต การใช้ประโยชน์จากตัวเงินตัวทองในประเทศไทยยังไม่ค่อยได้รับการส่งเสริมมากเท่าที่ควร



### บทที่ 3

#### วัสดุและวิธีการดำเนินการวิจัย

#### 3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

##### 3.1.1 อุปกรณ์และสารเคมี

สารเคมี	ยี่ห้อ	บริษัท	ประเทศผู้ผลิต
1. ผงวุ้น	Merck	Merck	เยอรมนี
2. Beef extract	Himedia	Himedia Laboratory	อินเดีย
3. Peptone	Himedia	Himedia Laboratory	อินเดีย
4. โปรตีนมาตรฐาน (protein marker)	Precision Plus Protein	Bio-Rad	สหราชอาณาจักร
5. Acrylamide	Sigma-Aldrich	Merck	เยอรมนี
6. Ammonium persulfate	Sigma-Aldrich	Merck	เยอรมนี
7. Tris base	USB	GE Healthcare	สหรัฐอเมริกา
8. Hydrochloric acid	RCI LABSCAN	LABSCAN	ไทย
9. Sodium dodecyl sulfate	Vivantis	Vivantis	มาเลเซีย
10. TEMED (Tetramethylethylenediamine)	USB	GE Healthcare	สหรัฐอเมริกา
11. Glycine	Calbiochem	Merck	เยอรมนี
12. Methylenebisacrylamide	Plus one	Merck	เยอรมนี
13. Coomassie Blue R250	Thermo Scientific	FisherSci	สหราชอาณาจักร
14. เอทิลแอลกอฮอล์	RCI LABSCAN	LABSCAN	ไทย

สารเคมี	ยี่ห้อ	บริษัท	ประเทศผู้ผลิต
15. Acetic acid	RCI LABSCAN	LABSCAN	ไทย
16. Glycerol	Vetec	Merck-Sigma	เยอรมนี
17. Gentamycin	Gibco	ThermoFisher	สหราชอาณาจักร
18. 1, 4-Dithiothreitol (DTT)	Vivantis	Vivantis	มาเลเซีย
19. Bromophenol Blue	USB	GE Healthcare	สหรัฐอเมริกา
20. Sodium chloride	RCI LABSCAN	LABSCAN	ไทย
21. Bovine serum albumin	Sigma	Merck-Sigma	เยอรมนี
22. Dry reagent concentrates	Bio-rad	Bio-rad	สหรัฐอเมริกา



## 3.1.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องมือ	ยี่ห้อ	บริษัท	ประเทศผู้ผลิต
1. เครื่องฟรีซดราย	HETOSICC	Labconco Corporation	สหรัฐอเมริกา
2. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ	HIRAYAMA	HIRAYAMA	ญี่ปุ่น
3. ตู้เขี่ยเชื้อ	Jouan	Thermo Fisher Scientific	ฝรั่งเศส
4. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง	Precica	METTLER TOLEDO	สวิตเซอร์แลนด์
5. เครื่องชั่งน้ำหนักดิจิทัล ทศนิยม 4 ตำแหน่ง	METTLER TOLEDO	METTLER TOLEDO	สหรัฐอเมริกา
6. เครื่องปั่นเหวี่ยง	Medifug	Thermo Scientific	สหรัฐอเมริกา
7. เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโคร เพลท	Fluoroskan	Thermo Scientific	สหรัฐอเมริกา
8. ชุดอุปกรณ์รันเจล ( Model SE250)	Hoefer	Amersham Biosciences	สหรัฐอเมริกา
9. Fast-Protein Liquid Chromatography (FPLC)	ÄKTA start	Cytiva	สหรัฐอเมริกา
10. Power supply	Thermo EC	Thermo Scientific	สหรัฐอเมริกา
11. ตู้บ่มเชื้อ/ตู้บ่มเพาะเชื้อ รุ่น BM400	Memmert	Memmert	เยอรมนี
12. เครื่องวัดค่า pH	SevenCompact	METTLER	สหรัฐอเมริกา
13. HiTrap Column chromatography 1 มิลลิลิตร	HiTrap	GE Healthcare	สหรัฐอเมริกา
14. Spin Desalting Columns	Zeba Spin	Thermo Scientific	สหรัฐอเมริกา



## 3.2. เชื้อทดสอบที่ใช้ในการวิจัย

### 3.2.1 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัยและแหล่งที่มาของเชื้อ

1. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
2. *Bacillus cereus* ATCC 11778
3. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
4. *Escherichia coli* ATCC 25922

โดยเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดเป็นเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานได้รับความอนุเคราะห์จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดนนทบุรี ซึ่งเชื้อทั้งหมดถูกเก็บรักษาในอาหารชนิด nutrient agar slant ( NA slant) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

### 3.2.2 การต่อเชื้อ (subculture) และการเก็บรักษาเชื้อทดสอบ

1. การต่อเชื้อแบคทีเรีย (subculture) ก่อนนำเชื้อมาทำการทดสอบ โดยนำเชื้อแบคทีเรียสำหรับทดสอบทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ *P. aeruginosa* ATCC 27853, *B. cereus* ATCC 11778, *S. aureus* ATCC 25923 และ *E. coli* ATCC 25922 มาเพาะเลี้ยงลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด mueller -hinton agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

2. การเก็บและรักษาสภาพเชื้อทดสอบ (glycerol stock culture) ทำการเพาะเลี้ยง เชื้อแบคทีเรียสำหรับทดสอบทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ *P. aeruginosa* ATCC 27853, *B. cereus* ATCC 11778, *S. aureus* ATCC 25923, และ *E. coli* ATCC 25922 ในอาหาร mueller- hinton broth (MHB) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ปิเปตดูดเชื้อปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโคร (microtube) ปราดจากเชื้อแล้วเติมสารละลายกลีเซอรอล 60% ปริมาตร 250 ไมโครลิตรผสมให้อยู่ในรูปของเซลล์แขวนลอยนำไปจุ่มลงในไนโตรเจนชนิดเหลวแล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสเพื่อทำการเก็บรักษาเชื้อ

### 3.2.3 การเตรียมกล้าเชื้อสำหรับทดสอบ

วิธีการเตรียมกล้าเชื้อสำหรับทดสอบ (working culture) เพาะเลี้ยง *P. aeruginosa* ATCC 27853, *B. cereus* ATCC 11778 , *S. aureus* ATCC 25923, และ *E. coli* ATCC 25922 ในอาหารแข็งชนิด mueller -hinton agar (MHA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นคัดเลือกโคโลนีเดี่ยว ของเชื้อแบคทีเรียมาเจือจางด้วยน้ำเกลือปราศจากเชื้อความเข้มข้น 0.85% และปรับความขุ่นให้เท่ากับความขุ่นของสารมาตรฐาน 0.5 McFarland ได้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ  $10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ดูดเชื้อมาปริมาตร 1 มิลลิลิตรผสมกับอาหาร mueller hinton broth ในอัตรา 9 มิลลิลิตร เขย่าด้วย vortex ให้เข้ากันจะได้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ  $10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร

ทำการเจือจางอีกครั้งโดยดูดเชื้อมาปริมาตร 1 มิลลิลิตรผสมกับอาหาร mueller -hinton broth ในอัตรา 9 มิลลิลิตรเขย่าด้วย vortex ให้เข้ากันจะได้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ  $10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นของเชื้อเพื่อศึกษาวิจัยนี้ (160)

### 3.3. ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ใช้ตัวเงินตัวทอง (*Varanus solvator*) อายุประมาณ 2.5-3 ปี น้ำหนักประมาณ 25 กิโลกรัม จำนวน 40 ตัว โดยตัวอย่างเลือดจากตัวเงินตัวทอง ได้รับความอนุเคราะห์จากสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาสน จังหวัดราชบุรี ในขั้นตอนการจับและเก็บตัวอย่างเลือดเจ้าหน้าที่จะทำด้วยความระมัดระวังและรวดเร็ว พร้อมกับทำเครื่องหมายบนลำตัวของตัวเงินตัวทอง แต่ละตัวหลังจากเก็บตัวอย่างเลือดเสร็จแล้ว เพื่อป้องกันการเก็บตัวอย่างเลือดซ้ำ โดยเป็นการปฏิบัติงานตามคู่มือการปฏิบัติงาน เรื่อง การเก็บตัวอย่างเลือด สำหรับเจ้าหน้าที่กรมการปกครอง กรมปศุสัตว์ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช ที่ 60/2559 ลงวันที่ 28 กันยายน พุทธศักราช 2559 ด้วยข้อจำกัดของปริมาณตัวอย่างเลือดที่เจาะเก็บได้จากตัวเงินตัวทองแต่ละตัวนั้น จึงได้นำตัวอย่างเลือดรวมกัน (pool blood sample) เพื่อนำไปศึกษาวิจัยต่อไป

#### 3.3.1 การเก็บตัวอย่างเลือดจากตัวเงินตัวทอง

##### 1. การจับตัวเงินตัวทอง

1.1 ใช้เชือกบ่วงบาศก์ที่ต่อกับปลายไม้สำหรับใช้ในจับตัวเงินตัวทอง ทำการจับตัวเงินตัวทองโดยเจ้าหน้าที่ของสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาสน จังหวัดราชบุรี

1.2 มัดปากตัวเงินตัวทองด้วยเทปเหนียวพันแผล จับขาหน้าสองขาไปหลังมัดขาหลังสองขาไปหลังมาทางขาหน้าแล้วมัด ซึ่งการจับแบบนี้จะทำให้ตัวเงินตัวทองไม่สามารถเดินหรือพาดหางได้ และเป็นท่าที่เจ้าหน้าที่สามารถปฏิบัติงานได้ง่ายที่สุดและไม่ทำให้ตัวเงินตัวทองได้รับบาดเจ็บ

##### 2. การเก็บตัวอย่างเลือดตัวเงินตัวทอง

การเจาะเก็บตัวอย่างเลือดจากตัวเงินตัวทองจะทำการเจาะครั้งเดียวต่อตัวเงินตัวทอง โดยกำหนดปริมาตร 20 มิลลิลิตร แบ่งใส่ในหลอดเก็บตัวอย่าง clotted blood (จุกฝาสีแดง) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพื่อแยกซีรัม และ Ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) blood (จุกฝาสีม่วง) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพื่อแยกพลาสมา ตามลำดับ

ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างเลือดตัวเงินตัวทองตามข้อกำหนดการปฏิบัติงานเก็บตัวอย่างเลือด สำหรับเจ้าหน้าที่กรมการปกครอง กรมปศุสัตว์ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ที่ 60/2559 ลงวันที่ 28 กันยายน พุทธศักราช 2559

2.1 ใช้สาลีซูปแอลกอฮอล์เซ็ดบริเวณโคนหาง (caudal tail vein)

2.2 นำเข็มฉีดยาเจาะบริเวณโคนหาง (caudal vein) ดูดเลือดมา 20 มิลลิลิตร โดยใช้เข็มฉีดยาขนาด 18 มิลลิเมตร กระจกฉีดยาขนาด 20 มิลลิลิตร

2.3 ถอนเข็มออกแล้วใช้สำลีกดแผลไว้สักครู่

2.4 ปล่อยเลือดปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดเก็บเลือดขนาด 15 มิลลิลิตร ที่ไม่มี 0.5 โมลาร์ EDTA สำหรับเตรียมซีรัม

2.5 ปล่อยเลือดปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดเก็บเลือดขนาด 15 มิลลิลิตรที่มี 0.5 โมลาร์ EDTA ซึ่งเป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด ผสมเลือดให้เข้ากับสารละลาย EDTA โดยการคว่ำหลอดไปมาเบาๆ สำหรับเตรียมพลาสมา

2.6 นำตัวอย่างเลือดที่ได้เก็บไว้ในน้ำแข็งทันที

### 3.3.2 การแยกองค์ประกอบน้ำเลือดของตัวเงินตัวทอง

#### 1. การเตรียมพลาสมา

1.1 นำเลือดตัวเงินตัวทองปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่เก็บเอาไว้ในหลอดเก็บเลือดขนาด 15 มิลลิลิตร ที่มี 0.5 โมลาร์ EDTA ซึ่งเป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ภายหลังการปั่นได้เลือดที่แบ่งเป็น 2 ชั้น ชั้นของน้ำเลือดในชั้นบนและชั้นของเม็ดเลือดในชั้นล่าง

1.2 ใช้ micropipette ดูดแยกส่วนของน้ำเลือดในชั้นบน ตัวอย่างที่ได้ในชั้นตอนนี้เรียกว่า crude plasma เก็บในหลอดเก็บน้ำเลือด จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ในการทดลองแต่ไม่ควรเก็บนานเกินกว่า 2 อาทิตย์

#### 2. การเตรียมซีรัม

2.1 นำเลือดตัวเงินตัวทองปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่เก็บเอาไว้ในหลอดเก็บเลือดขนาด 15 มิลลิลิตรที่ไม่มี 0.5 โมลาร์ EDTA มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 10 นาที ภายหลังการปั่นได้เลือดที่แยกเป็น 2 คือ ชั้นของน้ำเลือดในชั้นบน และชั้นของเม็ดเลือดในชั้นล่าง

2.2 เก็บส่วนใสที่อยู่ด้านบนสุดของโดยใช้ micropipette ดูดแยกส่วนของน้ำเลือดในชั้นบน ตัวอย่างที่ได้ในชั้นตอนนี้เรียกว่า crude serum จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ในการทดลองแต่ไม่ควรเก็บนานเกินกว่า 2 อาทิตย์

### 3.4. การวัดความเข้มข้นของโปรตีน

การวัดปริมาณโปรตีนจากพลาสมาและซีรัมที่ได้ โดยประยุกต์วิธีของ Bradford โดยใช้สารละลายสำเร็จรูปของบริษัท Bio-Rad laboratories มีขั้นตอนการวัดดังนี้

1.เตรียม dry reagent โดยทำการเจือจาง dry reagent concentrates ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อในอัตราส่วน 1:4

2.เตรียม standard stock solution: โดยละลาย bovine serum albumin (BSA) ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน ให้มีความเข้มข้น 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, และ 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นลำดับ โดยการนำ stock solution (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) มาทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

2.1 ใช้ micropipete ดูด standard protein ที่เตรียมไว้มา 10 ไมโครลิตรเป็น ลงใน 96 well plates โดยให้แถวแรกของคอลัมน์เป็น standard protein

2.2 ใช้ micropipete ดูดตัวอย่างของสารสกัดหยาบพลาสมาและซีรัม จากตัวเงินตัวของ ลงใน 96 well plates

2.3 เติม dry reagent ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในหลุม standard protein และหลุมของตัวอย่างสารสกัดหยาบพลาสมาและซีรัม ตามลำดับ

2.4 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที

2.5 นำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท

2.6 นำค่าการดูดกลืนแสงของ standard protein ที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (แกน x) และค่าดูดกลืนแสง (แกน y) บันทึกค่า slope ของกราฟความสัมพันธ์และค่า R

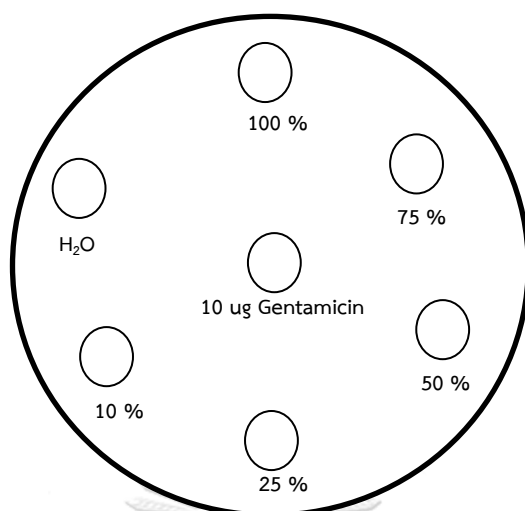
2.7 คำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนในตัวอย่างสารสกัดหยาบพลาสมาและซีรัม โดยใช้กราฟมาตรฐาน

2.8 ความเข้มข้นของโปรตีนในสารสกัดหยาบพลาสมาและสารสกัดหยาบซีรัม ถูกนำไปคำนวณเพื่อทำการทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อได้ ในขั้นตอนต่อไป

### 3.5. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียจากองค์ประกอบเลือด

#### 3.5.1 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบพลาสมา และสารสกัดหยาบซีรัม ที่ได้จากเลือดตัวเงินตัวทองโดยวิธี agar well diffusion method

1. ทำเครื่องหมายลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ mueller -hinton agar เพื่อระบุตำแหน่งที่ต้องการเจาะรูทั้งหมด 7 ตำแหน่ง (ตามรูป14)
2. ทำการเตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรีย โดยนำโคลนของเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบมาเจือจางด้วยน้ำเกลือปราศจากเชื้อเข้มข้น 0.85 %
3. เจือจางเชื้อในน้ำเกลือปราศจากเชื้อให้ได้ความขุ่น 0.5 McFarland ปริมาณเชื้อแขวนลอยเริ่มต้น  $10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปรับความขุ่นอีกครั้งด้วย mueller hinton broth ในอัตรา 1: 100 ให้ได้ความขุ่นของเชื้อเท่ากับ  $10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่กำหนดในการทดสอบ ในขั้นตอนต่อไป
4. ใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อ (cotton swab) ชุบแบคทีเรียที่ปรับความขุ่นแล้ว จุ่มลงในเชื้อทดสอบและกดสำลีข้างๆ หลอดเพื่อไม่ให้ cotton swab ชุ่มจนเกินไปทำการกระจายเชื้อลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อในแนวระนาบ 3 ระนาบ
5. ทำการเจาะหลุมด้วย cork borer ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร จุ่มแอลกอฮอล์และเผาไฟเพื่อฆ่าเชื้อ ทิ้งให้เย็นสักครู่ก่อนนำมาเจาะเพื่อสร้างหลุมสำหรับทดสอบบนอาหาร mueller -hinton agar โดยทำการเจาะให้ตรงกับตำแหน่งที่กำหนดไว้ (ตามรูปที่14)
6. เจือจางพลาสมาและซีรัมด้วยน้ำเกลือปราศจากเชื้อเข้มข้น 0.85% ในสัดส่วนต่างๆ ที่ระดับความเข้มข้น 100, 75, 50, 25% และ 10% ตามลำดับ
7. ทำการดูดพลาสมาและซีรัมที่เจือจางแล้วลงในหลุมที่เจาะเอาไว้หลุมละ 50 ไมโครลิตร โดยมี positive control เป็นยา gentamicin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม และ negative control เป็นน้ำกลั่น ตามลำดับ
8. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone ที่เกิดขึ้นบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อพร้อมบันทึกผล



รูปที่ 14 รูปแบบการเจาะรูบนอาหาร mueller -hinton agar เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบพลาสมาและสารสกัดหยาบซีรัมที่ได้จากตัวเงินตัวทอง

### 3.5.2 การหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (minimal inhibitory concentration, MIC) จากสารสกัดหยาบพลาสมาและสารสกัดหยาบซีรัม ที่ได้จากเลือดตัวเงินตัวทอง ด้วยวิธี broth microdilution (161)

1. ทำการเตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรีย โดยนำโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบมาเจือจางด้วยน้ำเกลือปราศจากเชื้อเข้มข้น 0.85%

2. เจือจางเชื้อในน้ำเกลือปราศจากเชื้อให้ได้ความขุ่น 0.5 McFarland ปริมาณเชื้อแขวนลอยเริ่มต้น  $10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปรับความขุ่นอีกครั้งด้วย mueller hinton broth ในอัตรา 1: 100 ให้ได้ความขุ่นของเชื้อเท่ากับ  $10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่กำหนดในการทดสอบ ในขั้นตอนต่อไป

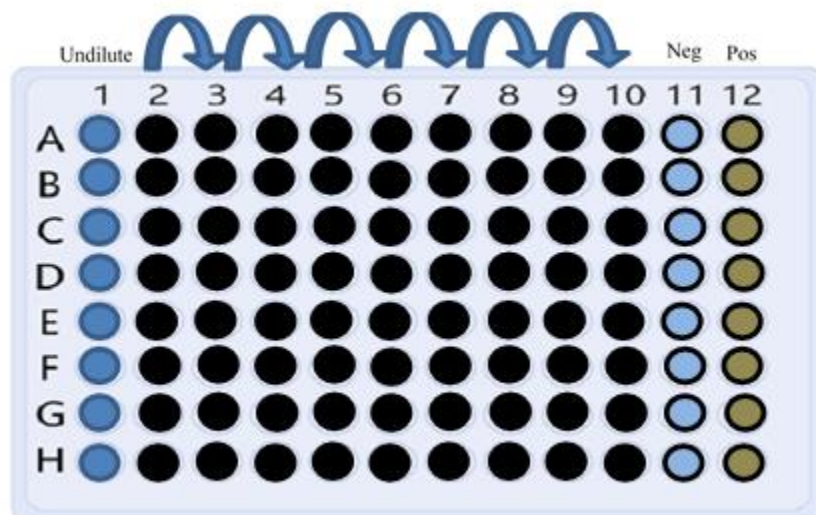
3. เจือจางสารสกัดหยาบพลาสมาและสารสกัดหยาบซีรัม ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ให้มีความเข้มข้นเจือจางเป็นลำดับ 2 เท่า โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.97 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ด้วยอาหาร mueller -hinton broth (รูปที่15) โดยมี positive control เป็นยา gentamicin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรและมี negative control เป็นน้ำกลั่น ตามลำดับ

4. เติมเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ATCC 27853, *B. cereus* ATCC 11778, *S. aureus* ATCC 25923, และ *E. coli* ATCC 25922 ที่ปรับความขุ่นของเชื้อให้มีปริมาณเชื้อ

แขวนลอย  $10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงใน 96 well plate ในแต่ละหลุมของแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพลาสมาและสารสกัดหยาบซีรัมปริมาตรรวมทั้งหมด 200 ไมโครลิตร ตามลำดับ

5. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท

6. ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพลาสมาและสารสกัดหยาบซีรัมที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้เมื่อเทียบกับกลุ่ม control เรียกว่า minimal inhibitory concentrations (MIC) โดยในขั้นตอนนี้ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ (162)



รูปที่ 15 แสดงขั้นตอนการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (minimum inhibition concentration: MIC) ของสารสกัดหยาบพลาสมาและสารสกัดหยาบซีรัมที่ได้จากตัวเงินตัวทอง โดย microdilution broth dilution

### 3.6. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียจากสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากสารสกัดหยาบพลาสมาและซีรัมจากเลือดตัวเงินตัวทอง

#### 3.6.1 การแยกบริสุทธิ์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพบางส่วนจากสารสกัดหยาบพลาสมาและสารสกัดหยาบซีรัมจากเลือดตัวเงินตัวทอง ด้วยเทคนิค ion exchange chromatography

1. นำสารสกัดหยาบพลาสมาและสารสกัดหยาบซีรัมที่ให้ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเบื้องต้น จากขั้นตอนการทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion และจากการหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ มาทำการแยกบริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ Q-sepharose fast flow column ซึ่งเป็นคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุชนิดบวก (cation column) โดยมีขั้นตอนดังนี้

1.1. ก่อนนำสารสกัดหยาบพลาสมาและสารสกัดหยาบซีรัมมาทำการแยกให้นำสารสกัดหยาบพลาสมาและสารสกัดหยาบซีรัมเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ A (25mM Tris-HCl pH 8.1) ในอัตราส่วน 1:3 และกรองด้วย membrane filter ขนาด 0.45 ไมครอน

1.2. นำไปแยกด้วย HiTrap column chromatography ขนาด 1 มิลลิลิตร ร่วมกับคอลัมน์ชนิด Q-sepharose fast flow column ด้วยเครื่องแยกสารชีวโมเลกุลโปรตีนให้บริสุทธิ์ (fast protein liquid chromatography) ที่ปรับความเที่ยงตรงแล้ว (equilibration) ด้วยบัฟเฟอร์ A (25 mM Tris-HCl pH 8.1)

1.3. เปิดเครื่องและเข้าสู่โปรแกรมควบคุมทำการติดตั้งระบบ reservoir buffer, sample loop จากนั้น purge เพื่อไล่ฟองอากาศจาก line

1.4. ต่อคอลัมน์และล้างเรซินด้วยบัฟเฟอร์ B (25mM Tris-HCl pH 8.1+0.5 M NaCl) นาน 20 นาที จากนั้นทำการแช่คอลัมน์ (equilibrate column) ด้วยบัฟเฟอร์ A จนกระทั่ง base line คงที่

1.5. ทำการฉีดสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบเข้าเครื่องแล้วชะด้วยน้ำเกลือ (NaCl) (elution buffer) ซึ่งโปรตีนต่างชนิดกันจะมีสมบัติทางเคมีและ ฟิสิกส์ต่างกัน ดังนั้นเมื่อชะด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมและด้วยอัตราการไหลที่เหมาะสมโปรตีนต่างชนิดกันจะถูกชะออกจากคอลัมน์ใน เวลาที่แตกต่างกัน

1.6. ทำการเก็บโปรตีนแฟรกชันที่ถูกชะออกมาด้วย elution buffer และนำโปรตีนแฟรกชันที่ได้ไปกำจัดเกลือออกโดยใช้ spin desalting columns

1.7. นำโปรตีนแฟรกชันที่ผ่านการกำจัดเกลือออกแล้วไปทำให้แห้งแบบเยือกแข็งด้วยวิธีการ lyophilization เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนและละลายกลับด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

1.8. วิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลและดูความบริสุทธิ์ของโปรตีนแฟรกชันที่ได้ด้วย sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)



1.9. นำโปรตีนแฟรกชันที่ได้ไปตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร เพื่อหา ความเข้มข้นของโปรตีนแฟรกชันเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

1.10. จากนั้นนำ pooled fraction ผ่านการกำจัดเกลือออกและทำให้แห้งด้วยวิธี lyophilization เพื่อทำให้สารมีความเข้มข้นและสามารถรักษาคุณสมบัติของสารได้นาน จนกว่าจะนำมาทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ด้วยวิธี broth dilution method ในขั้นตอนนี้ต่อไป

### 3.6.2 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพบางส่วนที่แยกได้จากสารสกัดหยาบพลาสมาและสารสกัดหยาบซีรัมจากเลือดตัวเงินตัวทอง ด้วยเทคนิค sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

ในการแยกโปรตีนโดยใช้กระแสไฟฟ้าหรือที่เรียกว่า sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ใช้เจลพอลิอะคริลาไมด์ (polyacrylamide gel) ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนโดยนำแผ่นเจลมาย้อมด้วย coomassie blue R 250 staining ซึ่งวิธีนี้ประกอบด้วยเจล 2 ช่วง คือ เจลช่วงบนเรียก stacking gel หรือ spacer gel และ เจลช่วงล่างเรียกว่า resolving gel หรือ separating gel มีวิธีการเตรียมดังต่อไปนี้

#### 1. การเตรียม separating gel

1.1 นำกระจก (glass plate) ขนาด 8 x 10 เซนติเมตร และ notched alumina plates มาเช็ดทำความสะอาดจากนั้นนำกระจกและ notched alumina plates มาประกบกันโดยมี spacer คั่นไว้ตรงกลางจากนั้นนำมาประกอบเข้ากับ dual gel caster (รูปที่ 16) เรียกว่า gel sandwich

1.2 ทดสอบการรั่วของกระจกทุกครั้งโดยการเติมน้ำให้เต็มช่องว่างระหว่างกระจกกับ notched alumina plate ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที ถ้ามีการรั่วน้ำในกระจกจะลดระดับลงมา

1.3 ผสมสารเคมีตามเปอร์เซ็นต์เจลที่ต้องการใช้ (ตารางที่ 1) ซึ่งในการวิจัยครั้งนี้จะใช้ separating gel ที่มีความเข้มข้น 16.5%

1.4 ค่อยๆ เติมสารละลายที่ได้จากข้อ 1.3 ลงใน gel sandwich โดยใช้ pipette ค่อยๆ เติม สารละลายลงอย่างช้าๆ เพื่อลดโอกาสในการเกิดฟองอากาศ เมื่อเติมสารละลายได้ประมาณ 3/4 ส่วนของกระจก ให้เททับ (overlay) ผิวหน้าเจลด้วยน้ำกลั่น (distilled water) จากนั้นรอจนกระทั่งเจลแข็งตัว (polymerization) ประมาณ 30-45 นาที เมื่อเจลแข็งตัวให้เทน้ำออกและซับให้แห้ง ซึ่งการเททับผิวหน้าด้วยน้ำจะทำให้ผิวหน้าเจลเรียบไม่มีฟองอากาศ

#### 2. การเตรียม stacking gel

2.1 ผสมสารสำหรับเตรียมทำ stacking gel (ตารางที่ 2) ให้เข้ากันเขย่าเบาๆ เพื่อไม่ให้ เกิดฟองอากาศ ซึ่ง stacking gel ที่ใช้ในการวิจัยมีความเข้มข้น 4%

2.2 เทน้ำออกจาก gel sandwich พร้อมซับน้ำให้แห้งจากนั้นนำ comb มาใส่ระหว่างช่องว่างของกระจกและ notched alumina plate จากนั้นค่อยๆ โหลด stacking gel ที่ผสมเรียบร้อยแล้วลงไปให้ท่วมกระจกและรองน stacking gel เซ็ตตัว ประมาณ 20 นาที

2.3 ขณะโหลด stacking gel ควรสังเกตฟองอากาศบริเวณ comb ต้องไล่ฟองอากาศออกให้หมด เพราะจะทำให้ผิวหน้าเจลไม่เรียบ

2.4 นำ gel sandwich ไปประกอบกับ chamber และหนีบด้วย spring clamp (รูปที่16)

2.5 เมื่อประกบ gel sandwich กับ gasket เรียบร้อยแล้วเท running buffer ให้ท่วมเจล และเติมในถาด chamber จากนั้นค่อยๆ ดึง comb ออกจาก stacking gel

### 3. การเตรียมตัวอย่างโปรตีนสำหรับทดสอบ

3.1 การเตรียมตัวอย่างสำหรับทำ SDS-PAGE โดยใช้พลาสติกและซีรัมที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค ion exchange chromatography นำทุกแฟรกชันที่แยกได้ (จากพลาสติก 28 แฟรกชันและจากซีรัมได้ 25 แฟรกชัน) มาตรวจสอบความบริสุทธิ์เบื้องต้น

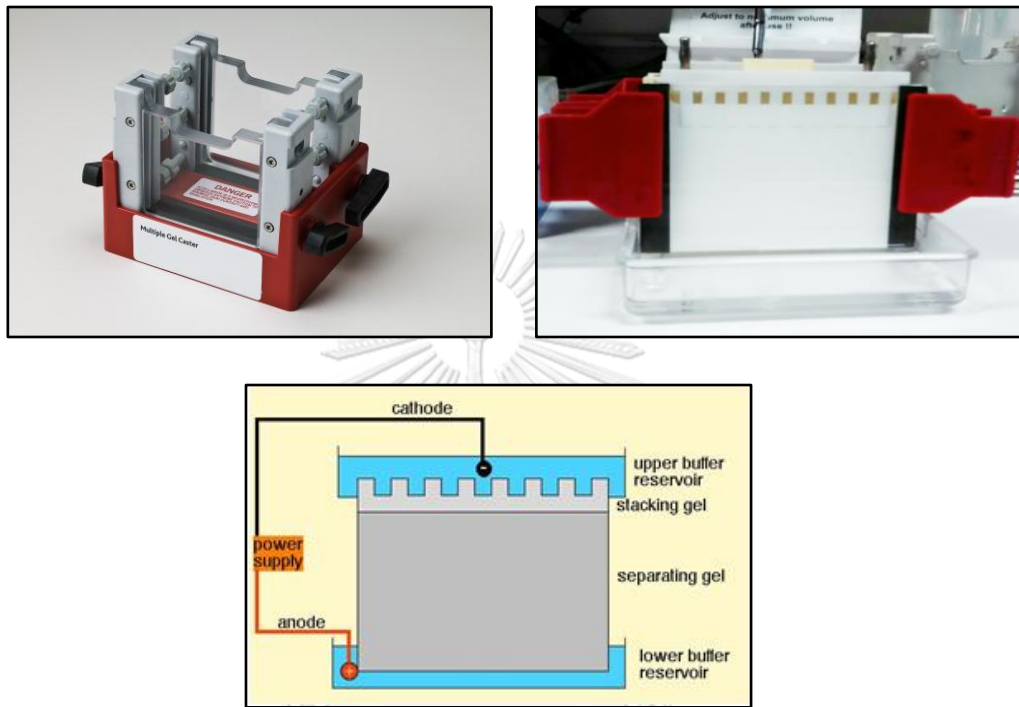
3.2 นำแฟรกชันโปรตีนที่ได้จากการแยกบริสุทธิ์ของพลาสติกและซีรัม มาตัวอย่างละ 10 ไมโครลิตรมาผสมกับ sample buffer 10 ไมโครลิตรจากนั้นนำไปต้มเดือดเป็นเวลา 5 นาทีและทำให้เย็นทันทีด้วยการแช่ในน้ำแข็งแล้วนำไปโหลดลงเจลที่เตรียมไว้

3.3 ทำการ run electrophoresis โดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 25 mA นานประมาณ 1 ชั่วโมง

3.4 นำแผ่นเจลที่ได้ใส่ลงในกล่องพลาสติก จากนั้นเทสีย้อม coomassie blue R 250 staining ให้ท่วมเจลทิ้งไว้ข้ามคืน

3.5 เมื่อครบเวลาให้เทสีย้อมออกพร้อมกับล้างน้ำสีส่วนเกินออก จากนั้นเท destaining solution ลงไปแช่ให้ท่วมเจลทำซ้ำๆ จนเห็นแบนด์โปรตีนติดสีขึ้นมาและพื้นหลังพยายามให้ติดสีอ่อนน้อยที่สุด

3.6 ทำการอ่านผลการทดสอบโดยเปรียบเทียบกับ โปรตีนมาตรฐาน (protein marker/protein ladder) คือการนำเอาโปรตีนบริสุทธิ์ที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลที่แน่นอนมาเพื่อใช้ในการบอกน้ำหนักโมเลกุลและติดตามการเคลื่อนที่ของโปรตีนที่สนใจเบื้องต้นจะทำให้ทราบค่าน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่เราได้จากการแยกบริสุทธิ์



รูปที่ 16 การแยกโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE ประกอบด้วย stacking gel และ resolving gel (163)

ตารางที่ 1 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel

สารเคมีที่ใช้	ปริมาณ	หน่วย
acrylamide stock (30% acrylamide, 0.8% bis-acrylamide)	2.50	มิลลิลิตร
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	1.50	มิลลิลิตร
10% SDS	60.0	ไมโครลิตร
distilled water	1.90	มิลลิลิตร
10% ammonium persulfate	30.0	ไมโครลิตร
TEMED	2.0	ไมโครลิตร

ตารางที่ 2 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม stacking gel

สารเคมีที่ใช้	ปริมาณ	หน่วย
acrylamide stock (30% acrylamide, 0.8% bis-acrylamide)	335.0	ไมโครลิตร
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	625.0	ไมโครลิตร
10% SDS	25.0	ไมโครลิตร
distilled water	1.50	มิลลิลิตร
10% ammonium persulfate	12.50	ไมโครลิตร
TEMED	1.30	ไมโครลิตร

### 3.6.3 การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกได้จากสารสกัด หยาบพลาสมาและซีรัมจากเลือดตัวเงินตัวทองที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (minimal inhibitory concentrations, MIC)

โดยใช้ความเข้มข้นของโปรตีนแฟรกชันในรูปแบบ pooled fraction และมี positive control คือ gentamycin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ส่วน negative control ที่ใช้ คือน้ำกลั่นปลอดเชื้อ มีขั้นตอนดังนี้

1. ทำการเตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรียโดยนำโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบมาเจือจางด้วยน้ำเกลือปราศจากเชื้อเข้มข้น 0.85%
2. เจือจางเชื้อในน้ำเกลือปราศจากเชื้อให้ได้ความขุ่น 0.5 McFarland ปริมาณเชื้อแขวนลอยเริ่มต้น  $10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปรับความขุ่นอีกครั้งด้วย mueller -hinton broth ในอัตรา 1: 100 ให้ได้ความขุ่นของเชื้อเท่ากับ  $10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทดสอบ ในขั้นตอนต่อไป
3. ละลายโปรตีนแฟรกชัน (pooled fraction) คือ P1, P2, P3, P4, P5, S1, S2, S3, S4, และ S5 ที่ผ่านการทำให้แห้งด้วยวิธี lyophilization ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ทำการเจือจางโปรตีนแฟรกชันให้มีความเข้มข้นเจือจางเป็นลำดับ 2 เท่า โดยให้มีความเข้มข้นตามกำหนด P1 (1,372 – 2.67 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร), P2 (2,034-7.94 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร), P3 (990-3.86 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร), P4 (139-0.54 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร), P5 (62.0-0.24 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร), S1 (1,946-7.60 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร), S2 (2,318-9.05 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร), S3 (1,072-4.18 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร), S4 (84.00-0.32 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร) และ S5 (63.00-0.24 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร) ด้วยอาหาร mueller -hinton broth (ตารางที่ 15)
4. เติมสารละลายแบคทีเรีย  $10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงใน 96 well microtiter plates ให้ครบทุกหลุม โดยมี gentamycin เป็น positive control และมีน้ำกลั่นเป็น negative control ในสองคอลัมน์สุดท้าย ตามลำดับ
5. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำมาอ่านค่าด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร เพื่อหาความเข้มข้นของโปรตีนแฟรกชันที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ minimal inhibitory concentrations (MIC)
6. เลือกโปรตีนแฟรกชันที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียไปทดสอบในขั้นต่อไป

### 3.7 การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของโปรตีนด้วย LC-MS/MS

การตรวจวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของโปรตีน (protein identification) ที่เป็นองค์ประกอบจากเลือดของตัวเงินตัวทองด้วยเครื่อง LC-MS/MS-QTOF (Bruker) ณ หน่วยบริการเครื่องมือกลาง มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา หลักการทำงานของเครื่องเป็นการแยกโปรตีนที่อยู่ในสถานะของเหลวด้วยวิธี liquid chromatography และทำการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค mass spectrometry ซึ่งเป็นเทคนิคการวิเคราะห์สารชนิดหนึ่งโดยอาศัยหลักเกี่ยวกับการตรวจวัดเชิงมวลของสารในรูปของไอออน โดยสารตัวอย่างจะเข้าสู่ส่วนผลิตไอออน (ion source) ของเครื่อง mass spectrometer เมื่อโมเลกุลของสารได้รับพลังงานจะทำให้เกิด ionization กลายเป็นไอออน จากนั้นไอออนต่างๆ จะถูกส่งผ่านเข้าสู่ส่วนวิเคราะห์มวล (mass analyzer) ซึ่งทำการแยกไอออนทั้งหมดที่ได้จากการแตกตัวออกจากกันตามค่ามวลต่อประจุ (mass-to-charge ratio หรือ m/z) ของไอออนแต่ละชนิด จากนั้นไอออนซึ่งผ่านการแยกมวลแล้ว จะถูกส่งผ่านเข้าไปสู่ส่วนตรวจวัด (detector) ซึ่งส่วนนี้จะทำหน้าที่ตรวจวัดปริมาณของไอออนแต่ละชนิดที่ผ่านเข้ามาทำการประมวลผลและแสดงข้อมูลออกมาในรูปของ mass spectrum ซึ่งเป็นกราฟที่แสดงปริมาณของไอออนเหล่านี้ต่อค่ามวลต่อประจุของไอออนแต่ละชนิดนั้นๆ โดยมีการตั้งค่าการทำงานและสถานะที่ใช้ในการวิเคราะห์โปรตีนแฟรกชันที่ได้จากตัวเงินตัวทองดังนี้

#### 3.7.1 การย่อยโปรตีนแฟรกชันด้วยเอนไซม์ทริปซิน

1. เลือกโปรตีนแฟรกชันที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจากขั้นตอนการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ ด้วยวิธี broth dilution tech ที่ต้องวิเคราะห์ด้วยเครื่องแมสสเปคโทมิเตอร์ ชนิด LC-MS/MS
2. ทำการย่อยโปรตีนสายยาวให้เป็นเปปไทด์สายสั้นลง โดยใช้เอนไซม์ทริปซิน เอนไซม์ชนิดนี้จะจดจำตำแหน่งและทำการตัดกรดอะมิโนหลังตำแหน่ง arginine และ lucien ทำให้ได้เปปไทด์ที่มีขนาดประมาณสายละ 10 กรดอะมิโน ซึ่งเหมาะสมต่อการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแมสสเปคโทมิเตอร์ชนิด LC-MS/MS
3. ย่อยตัวอย่างเปปไทด์ด้วย 6 N HCl ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง
4. นำ hydrolysate ไปทำให้แห้งแล้วละลายกลับด้วย 0.02 N HCl 100 ไมโครลิตร
5. วิเคราะห์องค์ประกอบของกรดอะมิโนโดยใช้ เครื่อง L-8500 amino acid analyzer (Hitachi, Japan)
6. หาลำดับกรดอะมิโนโดยเครื่อง Automated Procise<sup>TM</sup> 492 protein sequencer (Applied Biosystems, Japan)
7. มวลโมเลกุลของเปปไทด์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS Q-TOF
8. สำหรับ de-novo sequencing วิเคราะห์โดย ESI-Q-TOF

### 3.7.2 การตรวจวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของโปรตีน (protein identification) ที่เป็นองค์ประกอบจากเลือดของตัวเงินตัวทองด้วยเครื่อง LC-MS/MS-QTOF

1. เลือกโปรตีนแฟรกชันที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจากขั้นตอนการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ ด้วยวิธี broth dilution technique ที่ผ่านกระบวนการย่อยด้วยทริปซิน (tryptic peptide) มาฉีดผ่านคอลัมน์ขนาด 75  $\mu\text{m}$  ID x 150 mm C18 PepMap column (LC Packings, Amsterdam, The Netherlands) เพื่อกำจัดเกลือในโปรตีนแฟรกชัน

2. ฉีดตัวอย่างโปรตีนแฟรคชันปริมาณ 6 ไมโครลิตร เข้าสู่ LC-MS/MS ซึ่งเครื่อง จะทำให้เปปไทด์แตกตัวในลักษณะต่าง ๆ กันและบันทึกผลของเปปไทด์นั้นๆ ซึ่งผลที่ได้แสดงผลออกมาเป็นโครมาโทแกรม (chromatogram)

3. นำผลโครมาโทแกรม (Chromatogram) ที่ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลชีวสารสนเทศ เช่น GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ก็จะสามารถระบุชนิดของโปรตีนได้ โดยจะใช้ Mascot ของ Matrix Science (<http://www.matrixscience.com>) เทียบกับฐานข้อมูลโปรตีนของ SWISS-PROT annotated protein sequence database และฐานข้อมูลจีโนมของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) เพื่อระบุชนิดของโปรตีนและนำผลชนิดของโปรตีนที่ได้มาทำการวิเคราะห์หาโปรตีนที่น่าสนใจสำหรับนำมาพัฒนาเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหรือเปปไทด์ต้านจุลชีพได้

### 3.7.3 การระบุชนิดของโปรตีนด้วยโปรแกรม Mascot

การระบุชนิดของโปรตีนนั้นทำได้โดยนำเปปไทด์ซึ่งถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินที่ได้จากขั้นตอนข้างต้นมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) ที่ประกอบด้วยส่วนของ liquid chromatography และส่วนของ electrospray ionization (ESI)/ ion trap mass spectrometer ซึ่งผลที่ได้จะเป็น chromatogram และนำผลที่ได้นี้ไป วิเคราะห์ต่อเพื่อระบุชนิดของโปรตีนโดยการสืบค้นในฐานข้อมูลชีวสารสนเทศ ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้เราใช้ Mascot ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)) โดยตั้งค่าพารามิเตอร์ (parameters) ค่า peptide tolerant คือ  $\pm 1.2$  Da ค่า MS/MS tolerant คือ  $\pm 0.6$  Da เลือกเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีนของ SWISSPROT หรือฐานข้อมูลจีโนมของ NCBI ดังแสดงในภาพที่แสดงในรูปที่ 17 (164) พร้อมระบุหน้าที่ของโปรตีนที่ระบุชนิดได้โดยโปรตีนแต่ละชนิดถูกนำมาจัดกลุ่มตามหน้าที่ NCBI ตามลำดับ

### 3.7.4 การวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหา potential protein antimicrobial peptide ด้วยโปรแกรม antimicrobial peptide calculator and predictor

เป็นการนำเอาโปรตีนที่ระบุชนิดได้มาวิเคราะห์หาโปรตีนที่มีแนวโน้มความน่าจะเป็น antimicrobial peptide โดยนำเอาลำดับกรดอะมิโน (peptide sequence) จากโปรตีนที่ผ่านการระบุชนิดแล้วไปจำลองทางคอมพิวเตอร์เพื่อการทำนายและวิเคราะห์สายเปปไทด์ด้วยการสืบค้นจากฐานข้อมูลของ peptide prediction servers ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้ใช้โปรแกรม antimicrobial peptide calculator and predictor (APD, <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ของโปรตีนหรือเปปไทด์ในการเป็น antimicrobial peptide ซึ่ง APD server เป็นแหล่งรวบรวม ข้อมูลของเปปไทด์ด้านจุลชีพทั้งในส่วนของโครงสร้างและหน้าที่ ที่ได้มีการค้นพบจากสิ่งมีชีวิต ทุกชนิด เช่น แบคทีเรีย พืช สัตว์ และมนุษย์ (165) และทำนายโครงสร้างทุติยภูมิของชนิดโปรตีนที่พบด้วยโปรแกรม PEPFOLD server (<http://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD/>) สำหรับขั้นตอนการทำนายและวิเคราะห์สายเปปไทด์ด้วยการใช้โปรแกรม Antimicrobial Peptide Calculator and Predictor (รูปที่18) มีขั้นตอนดังนี้

1. เปิดหน้าโปรแกรม (APD, <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>)
2. กดเลือกหัวข้อ calculation and prediction
3. ใส่ลำดับกรดอะมิโน (peptide sequence) ที่ต้องการตรวจวิเคราะห์แล้วกดปุ่ม submit
4. จากนั้นเข้าสู่ระบบการทำนายและวิเคราะห์สายเปปไทด์ของโปรแกรม antimicrobial peptide calculator and predictor ซึ่งในโปรแกรมจะแสดงรายละเอียด จำนวนของกรด อะมิโนที่เป็น hydrophobic และบอกความน่าจะเป็นของ peptide sequence ที่ถูกใส่เข้าไป ในระบบว่ามีแนวโน้มความน่าจะเป็น antimicrobial peptide หรือไม่
5. กดปุ่ม do alignment ในกรณีที่โปรแกรมทำนายว่ามีความน่าจะเป็น antimicrobial peptide เพื่อค้นหาเปปไทด์ที่คล้ายกันมากที่สุดในฐานข้อมูล ซึ่งในโปรแกรมจะให้เปปไทด์ที่ใกล้เคียงกันมากที่สุดมาให้ 5 อันดับแรกโดยเรียงตามลำดับเปอร์เซ็นต์ที่มีความเหมือนมากที่สุดจากมากไปน้อยซึ่งเราสามารถกดเข้าไปดูรายละเอียดของเปปไทด์แต่ละชนิดได้ (รูปที่19)

### 3.7.5 การทำนายโครงสร้างทุติยภูมิของชนิดโปรตีนที่พบด้วยโปรแกรม PEPFOLD

การทำนายโครงสร้างในระดับทุติยภูมิเป็นการทำนายลักษณะของโครงสร้างว่าบริเวณใดที่มีลักษณะโครงสร้างเป็น helix, strand, coil หรือ turn โดยอาศัยการจดจำการเรียงตัวของกรดอะมิโนต่างๆ ใน protein sequence นั้นๆ มีขั้นตอนดังนี้ (รูปที่20)

1. เข้าเว็บไซต์ PEPFOLD server (<http://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD/>)
2. ป้อนข้อมูลลงในช่องค้นหา “peptide sequence” จากนั้นกด run
3. เลือกโครงสร้างสามมิติ



## 4. คลิก download files

The screenshot shows the MASCOT MS/MS Ions Search interface with the following parameters and annotations:

- Database(s):** contaminants (AA) - Annotation: เลือกฐานข้อมูล SwissProt
- Amino acid (AA):** cRAP, NCBIprot, SwissProt - Annotation: Taxonomy เลือก All entries
- Nucleic acid (NA):** Environmental\_EST, Fungi\_EST, Human\_EST, Invertebrates\_EST, Mammals\_EST - Annotation: Enzyme ที่ใช้ย่อยเลือกเป็น Trypsin
- Taxonomy:** All entries
- Enzyme:** Trypsin
- Allow up to:** 1 missed cleavages
- Fixed modifications:** --- none selected ---
- Variable modifications:** --- none selected ---
- Peptide tol.:** 1.2 Da - Annotation: Peptide tol. เลือก 1.2
- MS/MS tol.:** 0.6 Da
- Peptide charge:** 2+ - Annotation: Peptide charge เลือกเป็น 1+ 2+ and 3+
- Monoisotopic:**  **Average:**  - Annotation: เลือกไฟล์ที่ต้องการ search (.mgf)
- Data file:** Choose File (No file chosen)
- Data format:** Mascot generic - Annotation: Data format เลือก Mascot generic
- Instrument:** Default - Annotation: Instrument เลือก ESI-TRAP
- Decoy:**
- Report top:** AUTO hits
- Buttons:** Start Search ..., Reset Form

©2014 Matrix Science | Links | Site map | Terms of use | Design: Gibson

รูปที่ 17 การกำหนดค่า search parameter  
ในโปรแกรม Mascot www.matrixscience.com (166)

The Antimicrobial Peptide Database (APD) contains 3240 antimicrobial peptides from six kingdoms (358 bacteriocins/peptide antibiotics from bacteria, 5 from archaea, 8 from protists, 20 from fungi, 360 from plants, and 2405 from animals, including some synthetic peptides) with the following activities:

- Antibacterial peptides; Antibiofilm peptides;
- Anti-MRSA peptides; Anti-TB peptides **New**;
- Anti-endotoxin peptides **New**; Anti-toxin peptides;
- Antiviral peptides; Anti-HIV peptides;
- Antifungal peptides; Anti-Candida peptides **New**;
- Antiparasitic peptides; Antimalarial peptides;
- Anticancer peptides;
- Anti-diabetic peptides **New**;
- Wound healing peptides;
- Chemotactic peptides; Anti-inflammatory peptides;
- Spermiocidal peptides;
- Insecticidal peptides;
- Ion channel inhibitors;
- Protease inhibitors;
- Antioxidant peptides; and Surface immobilized peptides.

This comprehensive database for antimicrobial peptides is manually curated based on a set of data-collection criteria. There

กดเลือก calculation and prediction

### APD3: Antimicrobial Peptide Calculator and Predictor

Please input your peptide sequence (one-letter code for the standard 20 amino acids and no space).

ใส่ลำดับกรดอะมิโน (peptide sequence)

กดปุ่ม submit

You input sequence is: NEQVEIRDFFIDLNRWEE

N-E-Q-V-E-I-R-D-F-F-I-D-L-R-N-R-W-E-E

NEQVEIRDFFIDLNRWEE

NEQVEIRDEEIDLNRWEE

Hydrophobic residues are in red, hydrophobic residues on the same surface are underlined.

Total hydrophobic residues on the same surface is 6

Your peptide may form alpha helices and it may have at least 6 residues on the same hydrophobic surface.

Your peptide may interact with membranes and has a chance to be an antimicrobial peptide.

You can [do alignment](#) to find the most similar peptides in the database.

จำนวนของกรดอะมิโนที่เป็น hydrophobic

แสดงความน่าจะเป็น antimicrobia peptide

กดปุ่ม do alignment

รูปที่ 18 หน้าต่างเว็บไซต์ของฐานข้อมูลเปปไทด์ต้านจุลชีพ (167)

The alignment program is comparing your input with all sequences stored in the database. The five peptides most similar to your input will be posted.

**Please be patient.**

It will take between ten seconds and two minutes based on the sequence and the performance of the computers and networks. If your input sequence is less than 20 residues, normally the alignment can be done in one minute.

Your input sequence is: NEQVEIRDFFIDLNRWEE

---- Alignment results ----

Number 1, Similarity percentage: 39.13 %  
[AP00625](#)  
 -Alignment Result: KRIVQRIKDF++LRNLVPRTE  
 --Input Sequence--: NEQV+EIRDFFIDLNR+++RWEE

Number 2, Similarity percentage: 35.13 %  
[AP01768](#)  
 -Alignment Result: QLGELIQGGQKIVEKIQKIQRIIDFFSNLRPRQEA  
 --Input Sequence--: ++NE+++++Q++VE+++++++IRDFFIDLNRWEE

Number 3, Similarity percentage: 34.61 %  
[AP02855](#)  
 -Alignment Result: +IGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTE  
 --Input Sequence--: NEQVE+IR+DFFI+D+LRN+++RWEE

Number 4, Similarity percentage: 33.33 %  
[AP00626](#)  
 -Alignment Result: KSKKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTE  
 --Input Sequence--: ++NE++QVE+IR+DFFI+D+LRN+++RWEE

Number 5, Similarity percentage: 32.25 %  
[AP00627](#)  
 -Alignment Result: RKSKKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTE  
 --Input Sequence--: +++NE++QVE+IR+DFFI+D+LRN+++RWEE

### Antimicrobial Peptide AP00625

APD ID:	AP00625
Name/Class:	human KR-20 (KR20 from parent cathelicidin; UCLL1; primates, mammals, animals)
Source:	sweat, <i>Homo sapiens</i>
Sequence:	KRIVQRIKDFLRNLVPRTE
Length:	20
Net charge:	4
Hydrophobic residue%:	35%
Boman Index:	3.68 kcal/mol
3D Structure:	Unknown
SwissProt ID:	Reference ID: Ref
Activity:	Anti-Gram+ & Gram-, Antifungal, candidacidal,
Crucial residues:	
Additional info:	Derived from LL-37. Active against <i>C. albicans</i> . Structure is predicted to be helical based on NMR studies of intact LL-37 and its fragments in micelles.
Title:	Postsecretory processing generates multiple cathelicidins for enhanced topical antimicrobial defense
Author:	Murakami M et al. Gallo RL2004
Reference:	J Immunol 2004; 172: 3070-3077. <a href="#">PubMed</a> .

[Close this window](#)

รูปที่ 19 ตัวอย่างผลการทำนายและรายละเอียดของตัวอย่างเปปไทด์ต้านจุลชีพ (168)

**RPBS Web Portal** (guest) set email sign-in sign-out refresh workspace

Welcome Forms Data Bookmarks Jobs Tutorials

PEP-FOLD3 X

### PEP-FOLD 3.5

De novo peptide structure prediction.

Run cancel Main page Advanced options

2. กด Run

1. ป้อน peptide

3. เลือกโครงสร้างสามมิติ

Input Data

Peptide amino acid sequence

paste db upload edit clear

Enter your data below:

select

Options

Run label: PEPFOLD

Number of simulations: 100

Sort models by: sOPEP

Output

Visualize the best models (HTML)

bestModels.html

4. คลิก Download Files

Input style

- Cartoon
- Balls & Sticks
- Lines
- Line Trace
- Smooth Line Trace
- Trace

Color by

- Chain
- Uniform
- Rainbow

Model

Model 1

Information

Selected

Bookmark this page

รูปที่ 20 ตัวอย่างผลการทำนายและรายละเอียดของตัวอย่างเปปไทด์ต้านจุลชีพ (168)

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบพลาสมาและสารสกัดหยาบซีรัมที่แยกได้จากเลือด

##### 4.1.1 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบพลาสมาและสารสกัดหยาบซีรัมที่ได้จากเลือดตัวเงินตัวทองโดยวิธี agar well diffusion method

จากการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียโดยทำการทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย ทั้ง 4 ชนิด คือ *P. aeruginosa* ATCC 27853, *B. cereus* ATCC 11778, *S. aureus* ATCC 25923, และ *E. coli* ATCC 25922 ด้วยวิธี agar well diffusion method ผลจากการทดลองพบว่า สารสกัดหยาบพลาสมาและสารสกัดหยาบซีรัม (รูปที่ 21) สารสกัดหยาบพลาสมามีฤทธิ์ในการยับยั้งกว้างกว่าสารสกัดหยาบซีรัมโดยสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งในกลุ่มแกรมบวกและแกรมลบซึ่งให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* ATCC 11778 และ *S. aureus* ATCC 25923 ได้ดีและมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสยับยั้งเชื้อในแต่ละความเข้มข้น ตามที่แสดงในตารางที่ 3 ส่วนสารสกัดหยาบซีรัมที่ความเข้มข้นต่างๆ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853 ได้เท่านั้น (รูปที่ 22) และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสยับยั้งเชื้อตามที่แสดงในตารางที่ 4 จากการทดสอบพบว่า ที่ความเข้มข้น 100%, 75%, 50%, และ 25% ของสารสกัดหยาบจากพลาสมาสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบได้ทั้ง 4 ชนิด ซึ่งสามารถยับยั้งได้ดีในเชื้อ *B. cereus* ATCC 11778 และเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสยับยั้งเชื้อ (inhibition zone) แสดงผลดังตารางที่ 3 ตามลำดับ ส่วนสารสกัดหยาบซีรัมสามารถยับยั้งได้เฉพาะเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853 ได้ที่ความเข้มข้น 100% เท่านั้นและมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสยับยั้งเชื้อตามที่แสดงในตารางที่ 4 พบว่าทั้งพลาสมาและซีรัมมีผลต่อการเจริญของเชื้อทดสอบโดยมีฤทธิ์ที่แตกต่างกัน ซึ่งผลจากการประเมินเบื้องต้นนี้ทำให้มีการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ (MIC) เพื่อทราบถึงประสิทธิภาพของซีรัมและพลาสมาต่อการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียด้วยสารสกัดหยาบ  
พลาสมาที่ได้จากเลือดตัวเงินตัวทอง โดยวิธี agar well diffusion method

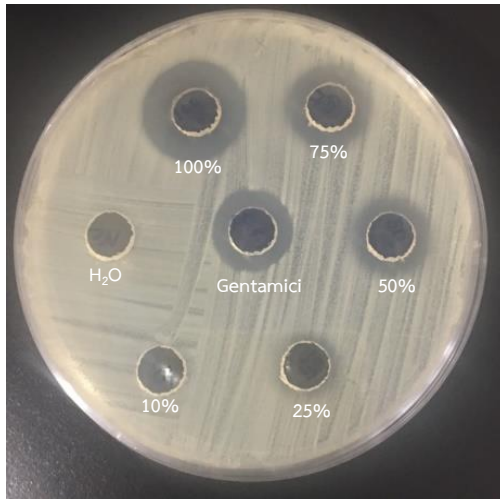
จุลินทรีย์ทดสอบ	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสยับยั้งเชื้อ (mm)								
	สารสกัดหยาบพลาสมาความเข้มข้น							genta micin	น้ำ กลั่น
	100 %	75%	50%	25%	10%	5%			
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	10	0.5	nz	nz	nz	nz	15	nz	
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	20	18	16	13	10	nz	16	nz	
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	17	11	10	nz	nz	nz	16	nz	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	12	0.8	nz	nz	nz	nz	18	nz	

nz = ไม่พบวงใสยับยั้งเชื้อ

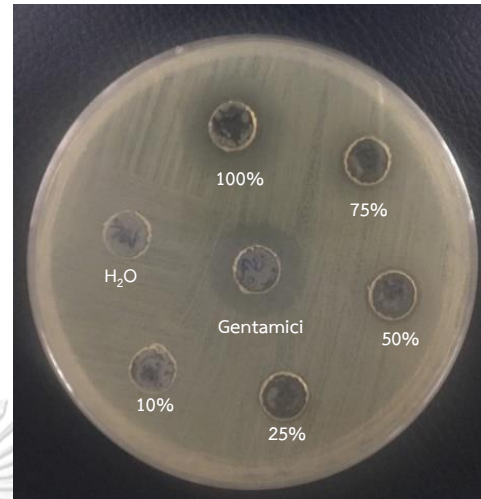
ตารางที่ 4 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียด้วยสารสกัดหยาบซีรัม  
ที่ได้จากเลือดตัวเงินตัวทองโดยวิธี agar well diffusion method

จุลินทรีย์ทดสอบ	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสยับยั้งเชื้อ (mm)								
	สารสกัดหยาบซีรัมความเข้มข้น							genta micin	น้ำ กลั่น
	100 %	75%	50%	25%	10%	5%			
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	11	0.5	nz	nz	nz	nz	17	nz	
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	nz	nz	nz	nz	nz	nz	16	nz	
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	nz	nz	nz	nz	nz	nz	18	nz	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	nz	Nz	nz	nz	nz	nz	17	nz	

nz = ไม่พบวงใสยับยั้งเชื้อ

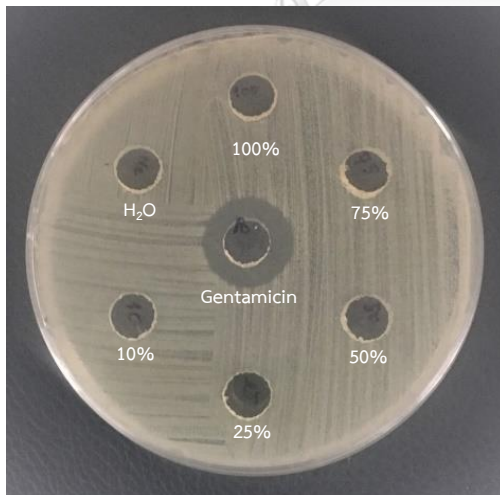


*S. aureus* ATCC 25923

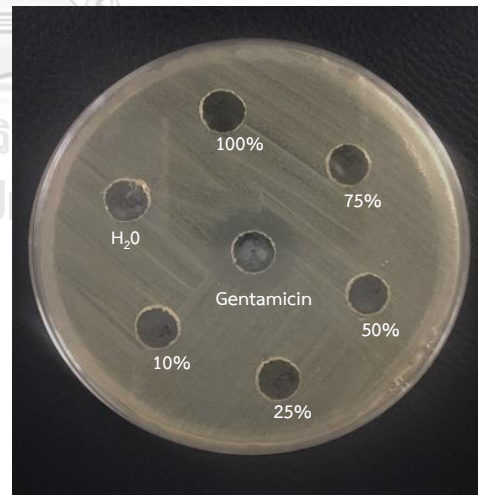


*E. coli* ATCC 25922

รูปที่ 21 ตัวอย่างการเกิดวงใสยับยั้งของสารสกัดหยาบพลาสมาที่ความเข้มข้น 100%, 75%, 50%, 25%, 10% และ 5% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ที่ได้จากเลือดตัวเงินตัวทอง แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 และเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 ด้วยวิธี agar well diffusion



*S. aureus* ATCC 25923



*E. coli* ATCC 25922

รูปที่ 22 ตัวอย่างการเกิดวงใสยับยั้งของสารสกัดหยาบซีรัมที่ความเข้มข้น 100%, 75%, 50%, 25%, 10% และ 5% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ที่ได้จากเลือดตัวเงินตัวทอง แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 และเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 ด้วยวิธี agar well diffusion

#### 4.1.2. ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบพลาสมาและสารสกัดหยาบซีรัมที่แยกได้จากเลือดตัวเงินตัวทอง

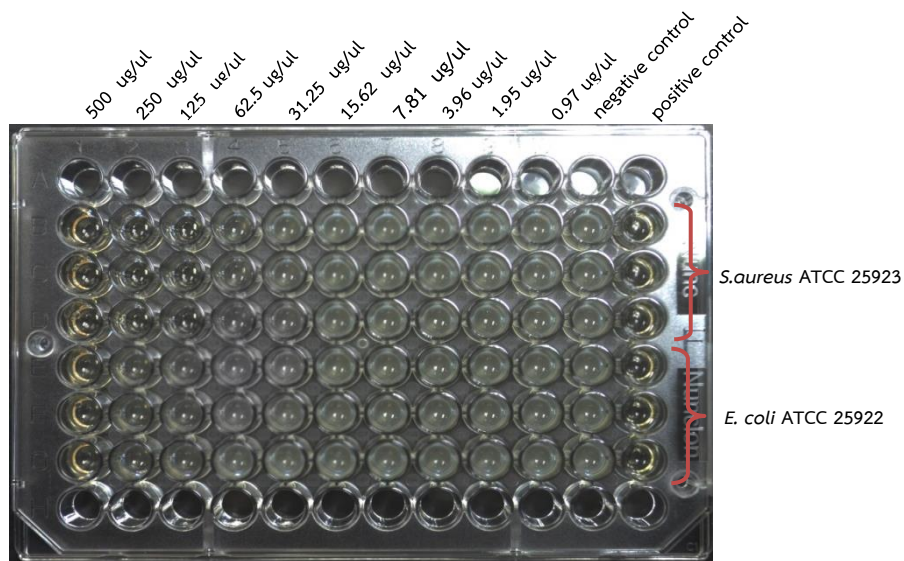
การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (minimum inhibition concentration) โดยใช้เทคนิค microdilution broth dilution แบบเจือจาง 2 เท่า (MIC) จากสารสกัดหยาบพลาสมาและสารสกัดหยาบซีรัมที่แยกได้จากตัวเงินตัวทอง ต่อเชื้อ แบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด คือ *P. aeruginosa* ATCC 27853, *B. cereus* ATCC 11778, *S. aureus* ATCC 25923 และ *E. coli* ATCC 25922 โดยใช้ gentamicin เป็นชุดควบคุมเชิงบวก (positive control) และใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมเชิงลบ (negative control) ผลจากการทดสอบพบว่า สารสกัดหยาบพลาสมาให้ผลการทดสอบกับเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853, *B. cereus* ATCC 11778 และ *S. aureus* ATCC 25923 (รูปที่ 23) ได้ดีที่สุดโดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MIC) เท่ากับ 125 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร รองลงมาคือเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MIC) เท่ากับ 250 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร (ตารางที่ 5) ในขณะที่สารสกัดหยาบจากซีรัมให้ผลการทดสอบกับเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ เชื้อ *E. coli* ATCC 25922 ได้ดีที่สุด (รูปที่ 24) โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MIC) เท่ากับ 250 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร รองลงมาคือเชื้อ *B. cereus* ATCC 11778 และ เชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MIC) เท่ากับ 500 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 5) ผลจากการทดสอบแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจากพลาสมามีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าสารสกัดหยาบจากซีรัมเมื่อเปรียบเทียบกับค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบทั้งสอง ทั้งนี้ได้ทำการทดสอบต่อโดยการแยกแฟรกชันเพื่อค้นหาองค์ประกอบย่อยในตัวอย่างพลาสมาและซีรัมที่แสดงถึงความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ เนื่องจากผลที่ต่างกันนี้อาจเกิดจากความหลากหลายของโปรตีนหรือเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบ ดังนั้นแฟรกชันที่แยกได้จะนำมาทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งในแต่ละแฟรกชันเพื่อค้นหาโปรตีนหรือเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียต่อไป



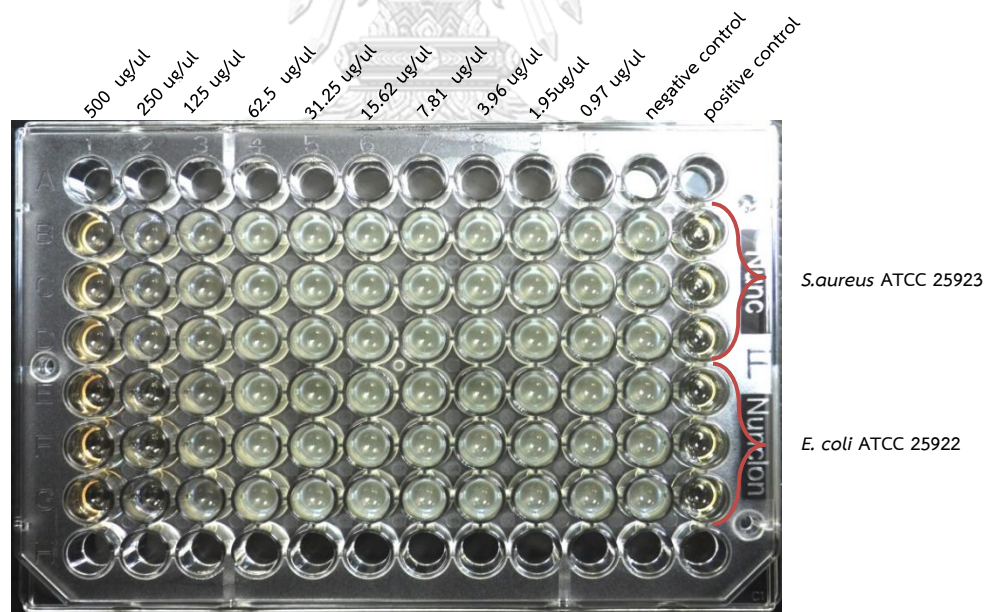
ตารางที่ 5 แสดงความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัด  
 หยาดพลาสมาและสารสกัดหยาดซีรัมที่แยกได้จากองค์ประกอบของเลือดจากตัวเงินตัวทอง

จุลินทรีย์ทดสอบ	MIC (ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)	
	พลาสมา	ซีรัม
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 39327	125	250
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	125	>500
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	125	>500
<i>E. coli</i> ATCC 25922	250	250

หมายเหตุ > หมายถึง ความเข้มข้นของโปรตีน ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) ซึ่งเป็นความเข้มข้นสุดท้ายของช่วง  
 ความเข้มข้นที่ทดสอบมีความชุนน้อยกว่าชุดควบคุม



รูปที่ 23 ตัวอย่างผลความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบพลาสมาในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 และเชื้อ *E. coli* ATCC 25922



รูปที่ 24 ตัวอย่างผลความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบซีรัมในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 และเชื้อ *E. coli* ATCC 25922

## 4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพบางส่วนจากสารสกัดหยาบพลาสมาและสารสกัดหยาบซีรัมที่แยกได้จากเลือดตัวเงินตัวทอง

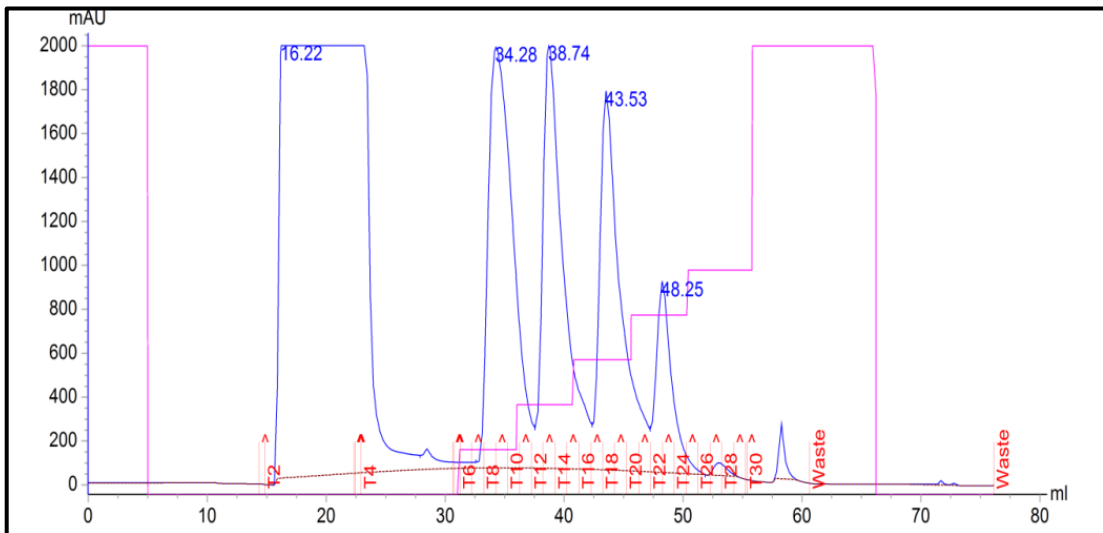
### 4.2.1 การแยกบริสุทธิ์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพบางส่วนจากสารสกัดหยาบพลาสมาและสารสกัดหยาบซีรัมที่แยกได้จากเลือดตัวเงินตัวทองด้วยเทคนิค ion exchange chromatography

การแยกบริสุทธิ์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพบางส่วนจากสารสกัดหยาบพลาสมาและสารสกัดหยาบซีรัมของตัวเงินตัวทองโดยใช้เครื่อง fast protein liquid chromatography (FPLC) โดยเทคนิค ion exchange chromatography พบว่า ทั้งสารสกัดหยาบพลาสมาและสารสกัดหยาบซีรัมเกิดการแยกของโปรตีนเป็นได้ฟิคโปรตีนทั้งหมด 5 ฟิค เท่ากัน ดังที่แสดงรายละเอียดตามรูปที่ (25-26) ซึ่ง elution profile จะถูกตรวจติดตามแฟรกชันของโปรตีนและวัดความเข้มข้นของโปรตีนผ่านเครื่อง AKTA purifier UPC100 ที่ ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร การแยกด้วยเทคนิค ion exchange chromatography ใช้ คอลัมน์ Q -sepharose ซึ่งเป็นคอลัมน์แบบแลกเปลี่ยนประจุ ดังนั้นการแยกด้วยวิธีนี้เป็นการ คัดเลือกเอาเฉพาะโปรตีนที่มีประจุบวก (cationic proteins) โดยใช้ Tris - HCl 25 mM เป็น mobile phase และใช้ความเข้มข้นของ NaCl ที่ pH 8.1 (0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 M ) เป็น elution buffer ในการการชะเอาโปรตีนออกมา พบว่าสามารถทำการเก็บโปรตีนแฟรกชัน ได้ทั้งหมด 28 แฟรกชันจากฟิคของโปรตีนทั้ง 5 ฟิค จากการแยกสารสกัดหยาบพลาสมา คือ P1 ประกอบไปด้วยโปรตีนแฟรกชันที่ 1- 7, P2 ประกอบไปด้วยโปรตีนแฟรกชัน 8-14, P3 ประกอบไปด้วยโปรตีนแฟรกชัน ที่ 15-21, P4 ประกอบไปด้วยโปรตีนแฟรกชันที่ 22-25 และ P5 ประกอบไปด้วยโปรตีนแฟรกชัน ที่ 26-28 ตามลำดับ ซึ่งพบว่าความเข้มข้นของโปรตีนสูงสุดอยู่ที่ 48.25 mAU ซึ่งปรากฏใน fraction 4 ดังแสดงในภาพที่ 25 ส่วนสารสกัดหยาบซีรัมสามารถทำการเก็บ โปรตีนแฟรกชันได้ทั้งหมด 25 fraction จากฟิคของโปรตีนทั้งหมด 5 ฟิค คือ S1 ประกอบไปด้วย โปรตีนแฟรกชันที่ 1-6, S2 ประกอบไปด้วยโปรตีนแฟรกชันที่ 7-12, S3 ประกอบไปด้วยโปรตีนแฟรกชันที่ 13 – 18, S4 ประกอบไปด้วยโปรตีนแฟรกชันที่ 19 - 22 และ S5 ประกอบไปด้วย โปรตีนแฟรกชันที่ 23-25 ตามลำดับ ซึ่งพบว่าโปรตีนมีความเข้มข้นสูงสุดอยู่ที่ 48.36 mAU ซึ่งปรากฏใน fraction 4 ดังแสดงในภาพที่ 26

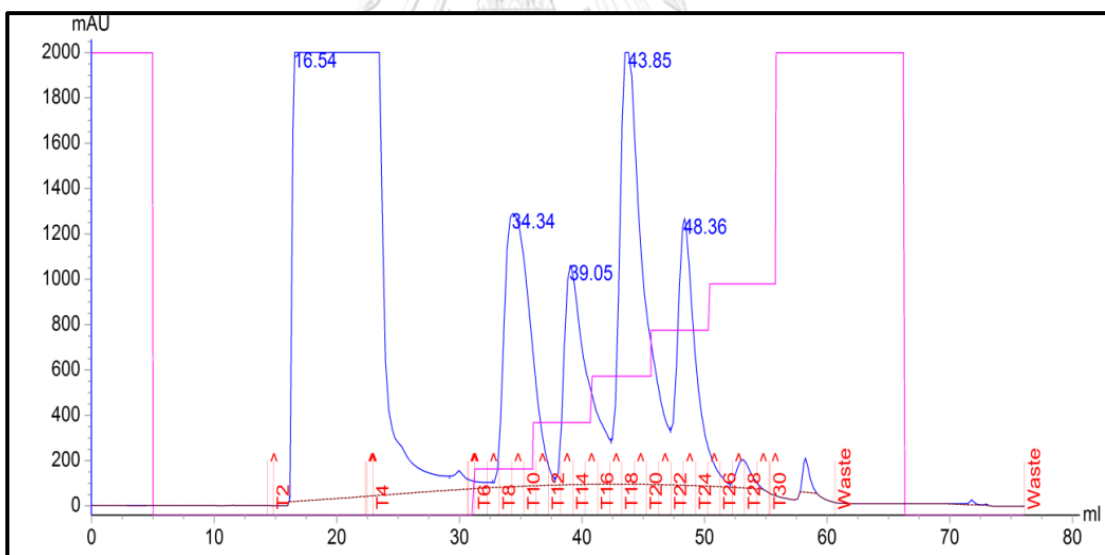
#### 4.2.2 การตรวจสอบความบริสุทธิ์และหาน้ำหนักโมเลกุลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยเทคนิค sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

เมื่อนำสารสกัดหยาบพลาสมาและสารสกัดหยาบซีรัมที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์บางส่วนโดยใช้เครื่อง fast protein liquid chromatography (FPLC) ด้วยเทคนิค ion exchange chromatography แล้วนำสารบริสุทธิ์ที่ได้จากการแยกมาตรวจสอบความบริสุทธิ์และขนาดของโมเลกุลด้วยเทคนิค sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) หลังจากย้อมด้วยสี coomassie brilliant blue R- 250 พบว่าทั้งสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากสารสกัดหยาบพลาสมาและสารสกัดหยาบซีรัมมีแถบสีโปรตีนเกิดขึ้นมองเห็นได้อย่างชัดเจนรวมถึงมีแถบสีโปรตีนขนาดเล็กอีกหลายแถบ ซึ่งแถบสีของโปรตีนที่ได้มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 16 ถึง 200 กิโลดัลตัน (ภาพที่ 27-28)

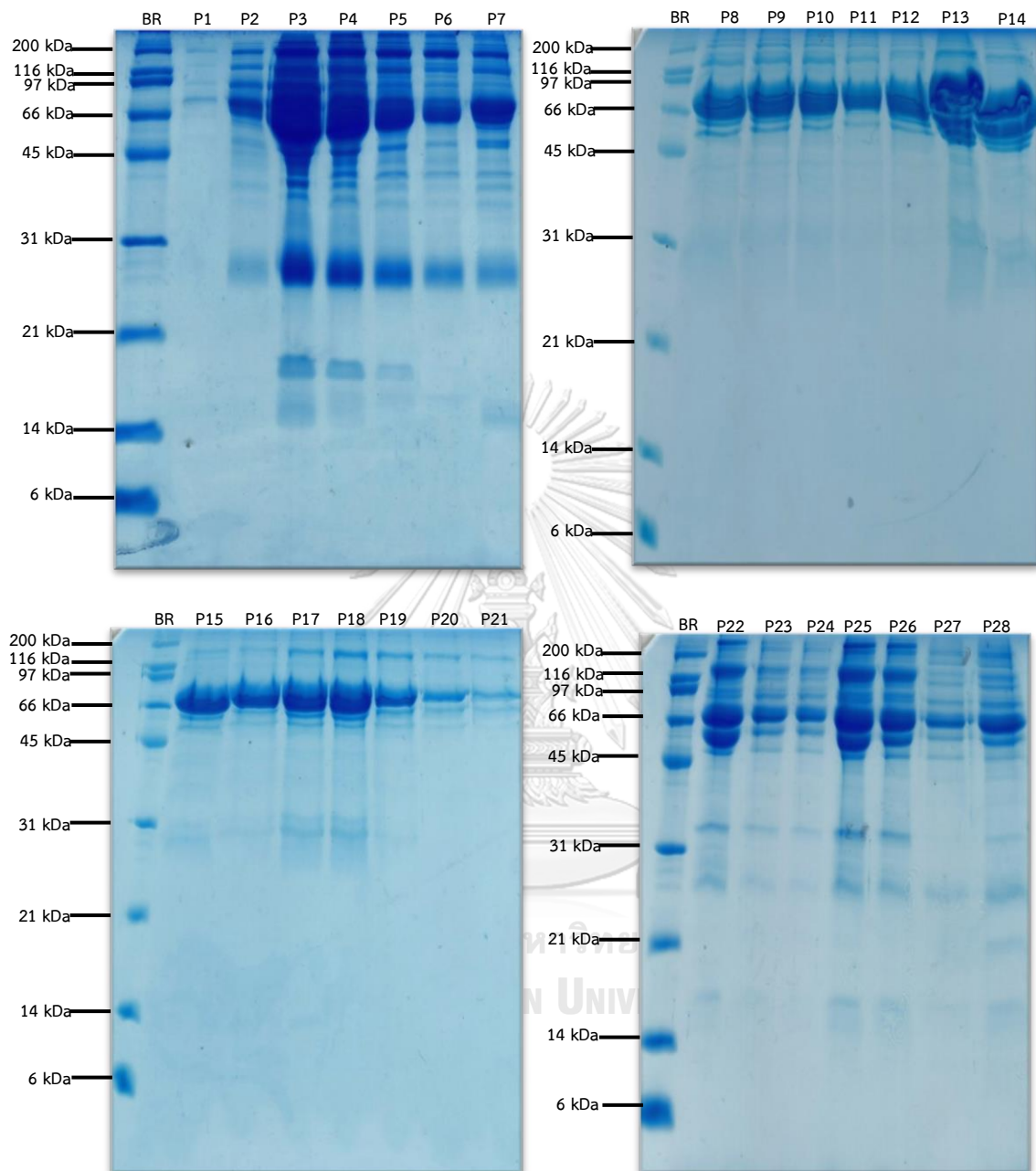




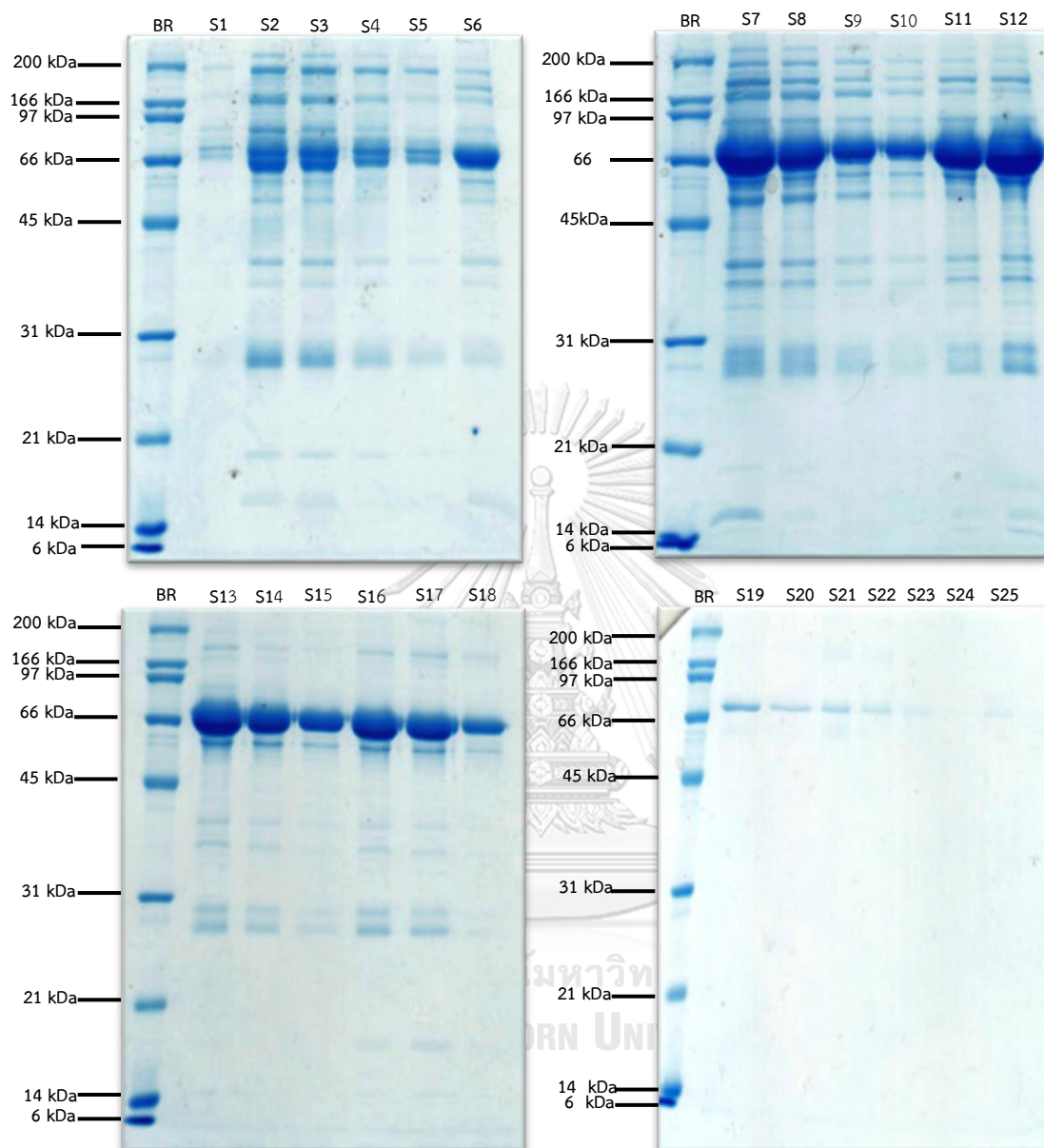
รูปที่ 25 Elution profile การแยกบริสุทธิ์ของสารสกัดหยาดซีรัม ด้วยเทคนิค ion exchange chromatography (HiTrap Q FF,GE) ด้วยเครื่อง fast protein liquid chromatography (FPLC) โดยตรวจติดตามโปรตีนแฟรกชันที่ 280 nm



รูปที่ 26 Elution profile การแยกบริสุทธิ์ของสารสกัดหยาดจากพลาสมา ด้วยเทคนิค ion exchange chromatography (HiTrap Q FF,GE) ด้วยเครื่อง fast protein liquid chromatography (FPLC) โดยตรวจติดตามโปรตีนแฟรกชันที่ 280 nm



รูปที่ 27 การตรวจสอบความบริสุทธิ์เบื้องต้นโดยวิธี SDS-PAGE ของโปรตีนแฟรกชันที่ได้  
จากสารสกัดหยาบพลาสมา



รูปที่ 28 การตรวจสอบความบริสุทธิ์เบื้องต้น โดยวิธี SDS-PAGE ของโปรตีนแฟรกชันที่ได้  
จากสารสกัดหยาบซีรัม

#### 4.2.3 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกได้จากสารสกัดหยาบพลาสมาและสารสกัดหยาบซีรัมจากเลือดตัวเงินตัวทอง ด้วยเทคนิค broth dilution method

การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกได้จากสารสกัดหยาบพลาสมาและสารสกัดหยาบซีรัมโดยได้ทำการศึกษากับเชื้อแบคทีเรีย 4 ชนิด คือ *P.aeruginosa* ATCC39327, *B. cereus* ATCC 11778, *S. aureus* ATCC 25923 และ *E. coli* ATCC 25922 โดยวิธี broth dilution method แบบเจือจาง 2 เท่า (MIC) ผลจากการหาค่า MIC ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกได้จากสารสกัดหยาบพลาสมาและสารสกัดหยาบซีรัม พบว่าโปรตีนแฟรกชันที่แยกได้จากสารสกัดหยาบพลาสมา ทั้ง 5 แฟรกชัน มีความเข้มข้นของโปรตีนอยู่ในช่วง 62 – 2,034 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร โดยพบว่าแต่ละแฟรกชันจะมีค่าความเข้มข้นของโปรตีนแตกต่างกัน คือ P1 (1,372 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร), P2 (2,034 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร), P3 (990 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร), P4 (139 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร) และ P5 (62 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร) ผลการทดสอบพบว่ามีเพียงโปรตีนแฟรกชัน P1 เท่านั้นที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ทั้ง 4 ชนิด คือ *P.aeruginosa* ATCC 39327, *B. cereus* ATCC 11778, *S. aureus* ATCC 25923 และ *E. coli* ATCC 25922 ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S.aureus* ATCC 25923 ได้ดีที่สุด โดยแสดงค่า MIC เท่ากับ 10.71 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร และยังพบว่าโปรตีนแฟรกชัน P2 และ P5 สามารถยับยั้ง การเจริญของเชื้อ *P.aeruginosa* ATCC 39327, *B. cereus* ATCC 11778 และเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 ได้ โดยแสดงค่า MIC ในตารางที่ 8 ตามลำดับ ส่วนโปรตีนแฟรกชันที่แยกได้จากสารสกัดหยาบซีรัมทั้ง 5 แฟรกชัน มีความเข้มข้นของโปรตีนอยู่ในช่วง 63 – 2,318 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร โดยพบว่าแต่ละแฟรกชันจะมีค่าความเข้มข้นของโปรตีนแตกต่างกัน คือ S1 (1,946 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร), S2 (2,318 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร), S3 (1,072 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร), S4 (84 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร) และ S5 (63 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร) พบว่ามีเพียงโปรตีนแฟรกชัน S1 เท่านั้นที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ทั้ง 4 ชนิด คือ *P.aeruginosa* ATCC39327, *B.cereus* ATCC 11778, *S.aureus* ATCC 25923, และเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S.aureus* ATCC 25923 ได้ดีที่สุดโดย แสดงค่า MIC เท่ากับ 486.50 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ในขณะที่ S2 และ S4 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC39327 และเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 ได้ตามลำดับ โดยแสดงค่า MIC ในตารางที่ 6



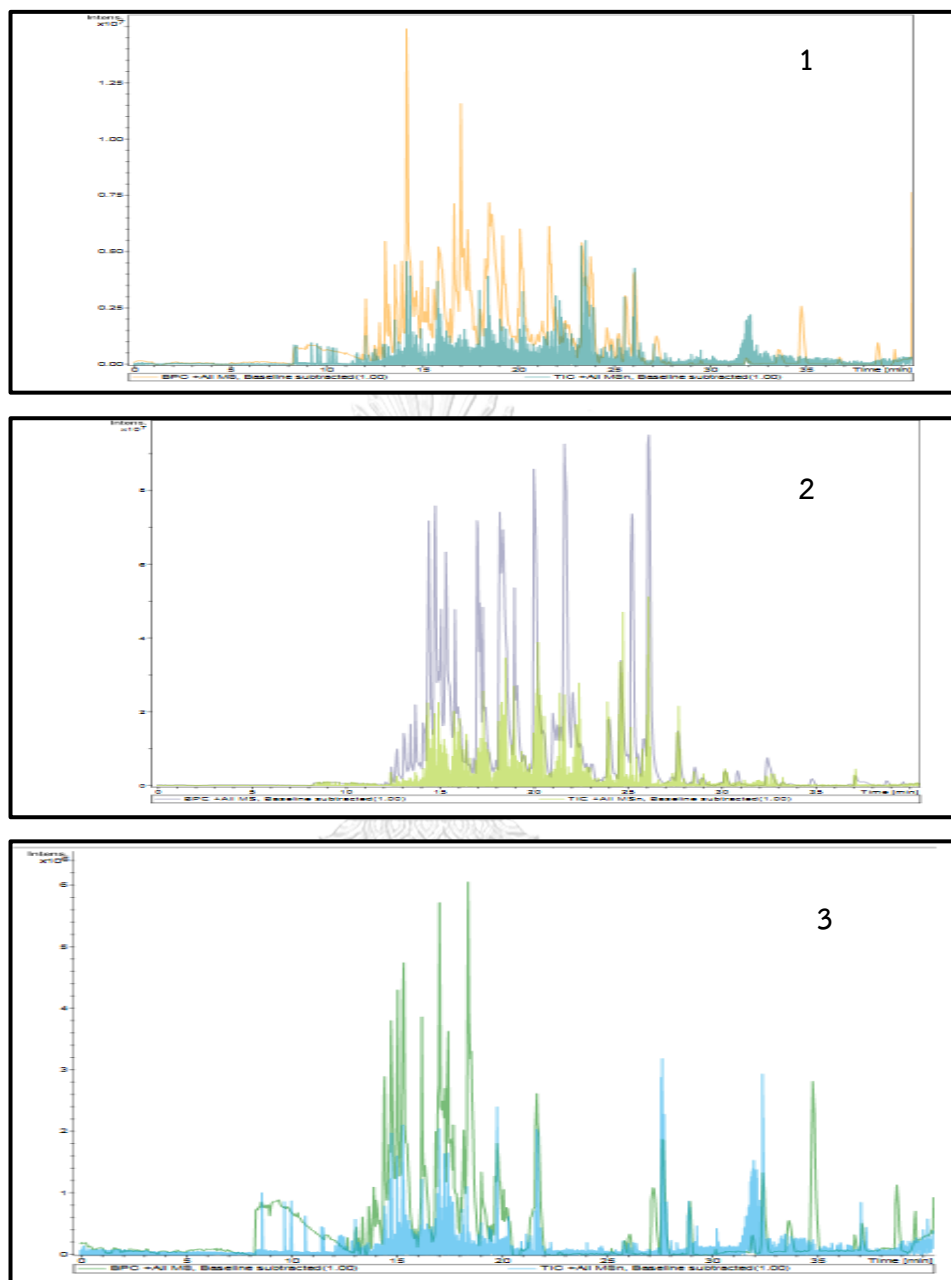
ตารางที่ 6 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (MIC) จากพลาสมาและซีรัมตัวเงินตัวทองหลังจากการแยกบริสุทธิ์บางส่วนด้วย Q-sepharose column

separated fraction	minimal inhibitory concentration; MIC (ug/ul)			
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>B. cereus</i> ATCC11778	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922
P1	85.75	42.87	10.71	171.50
P2	>2034	254.25	63.56	>2034
P3	>990	>990	>990	>990
P4	>139	>139	>139	>139
P5	>62	31.00	31.00	>62
S1	1946.00	973.00	486.50	1946.00
S2	1159.00	>2318	>2318	>2318
S3	>1072	>1072	>1072	>1072
S4	>84	>84	84.00	>84
S5	>63	>63	>63	>63

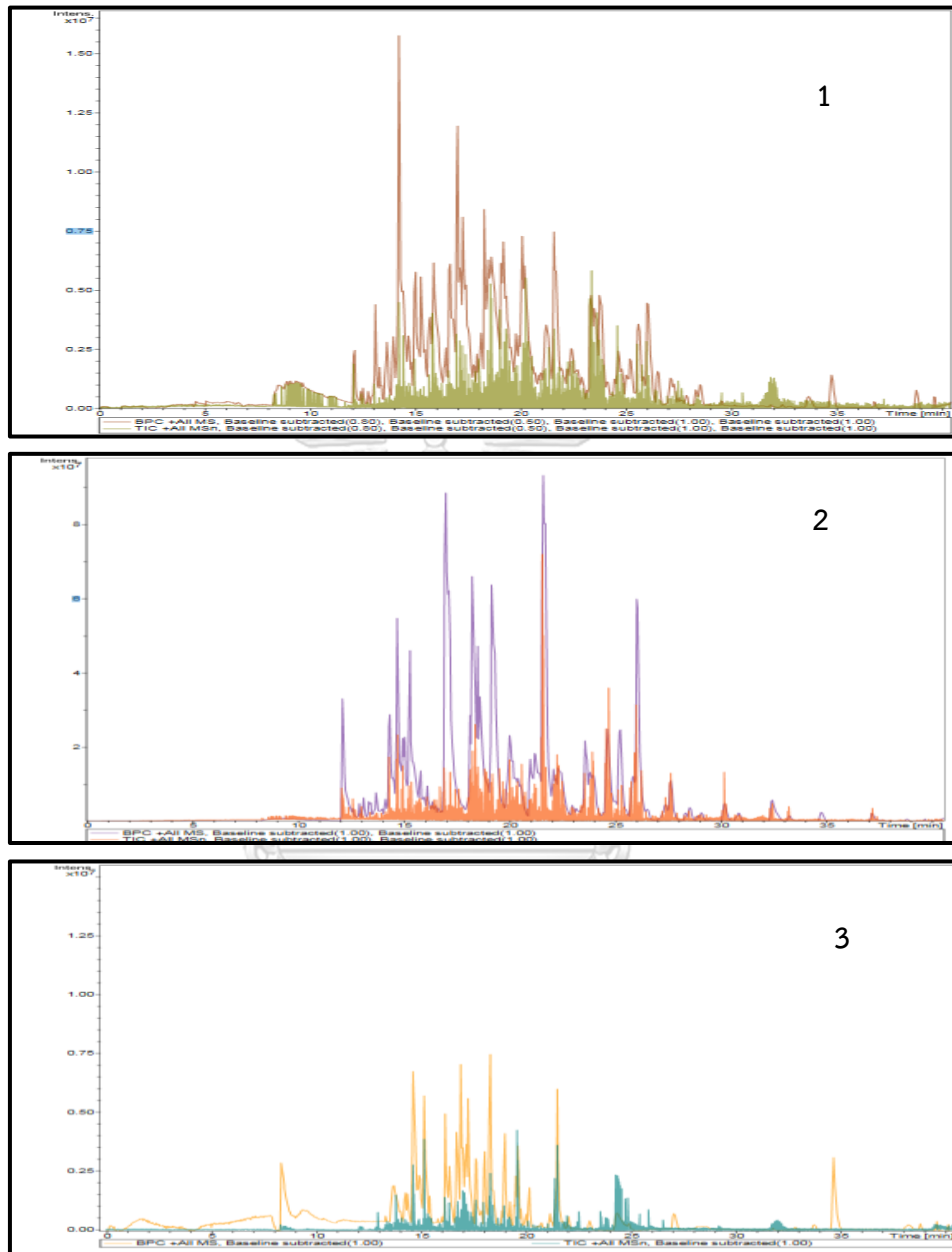
หมายเหตุ : P หมายถึง พลาสมา S หมายถึง ซีรัม  
> หมายถึง ความเข้มข้นของโปรตีน ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) ซึ่งเป็นความเข้มข้นสุดท้ายของช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบมีความชุนน้อยกว่าชุดควบคุม

#### 4.2.4 การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของโปรตีนในสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกได้จากสารสกัดหยาบพลาสมาและสารสกัดหยาบซีรัมจากเลือดตัวเงินตัวทอง ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของโปรตีนที่พบในสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยเทคนิค ion exchange chromatography โดยเลือกโปรตีนแฟรกชันจากพลาสมาและซีรัมที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่เรียกว่าโปรตีนแฟรกชัน หลังจากถูกตัดและย่อยให้เป็นเปปไทด์สายสั้นๆ ด้วยเอนไซม์ทริปซิน ซึ่งเอนไซม์จะตัดตรงตำแหน่งกรดอะมิโนที่จำเพาะต่อเอนไซม์ของโปรตีนแต่ละชนิดจากนั้นนำมาวิเคราะห์ต่อโดยใช้เทคนิค liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) จะได้ข้อมูล MS/MS ของเปปไทด์แต่ละชิ้น และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีนของ SWISS-PROT และ ฐานข้อมูลจีโนมของ NCBI ทำให้ทราบว่าเปปไทด์นี้เป็นส่วนหนึ่งของโปรตีนชนิดใด พบว่าโปรตีนแฟรกชัน P1, P2, P5 และโปรตีนแฟรกชัน S1, S2 และ S4 ที่ได้จากการแยกบริสุทธิ์ของสารสกัดหยาบพลาสมาและสารสกัดหยาบซีรัม (รูปที่ 29 - 30) มีลำดับกรดอะมิโนมากถึง 46 ลำดับกรดอะมิโน โดยพบในโปรตีนแฟรกชัน P1, P2 และ P5 มีลำดับกรดอะมิโน รวมทั้งหมด 31 ลำดับกรดอะมิโน โดยแต่ละแฟรกชัน มีจำนวนของลำดับกรดอะมิโน คือ P1 มี 10 ลำดับกรดอะมิโน P2 มี 14 ลำดับกรดอะมิโน และ P5 มี 7 ลำดับกรดอะมิโน และสามารถระบุชนิดของโปรตีนได้ทั้งหมด 20 ชนิด โปรตีนจากฐานข้อมูลโปรตีน SWISS-PROT ใน ขณะเดียวกันโปรตีน แฟรกชันของ S1, S2 และ S4 พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนทั้งหมด 15 ลำดับกรดอะมิโนโดยแต่ละแฟรกชันมีจำนวนของลำดับกรดอะมิโน คือ S1 มี 7 ลำดับกรดอะมิโน S2 มี 4 ลำดับกรดอะมิโนและ S4 มี 4 ลำดับกรดอะมิโน และสามารถระบุชนิดของโปรตีนได้ทั้งหมด 13 ชนิดโปรตีนจากฐานข้อมูลโปรตีน SWISS-PROT ดังรายละเอียดที่ระบุใน ตารางที่ 7 และ 8 ตามลำดับ ประกอบด้วย ชนิดของโปรตีนที่ระบุชนิดได้ (protein hits) โดยเรียงลำดับจาก mascot score สูงที่สุดไว้ด้านบน (รูปที่ 31) และตามฐานข้อมูลใน SWISS-PROT จะแสดงผลของ protein view (รูปที่ 32) รวมถึง protein sequence coverage เอาไว้ด้วย



รูปที่ 29 mass spectrum ของ (1) โปรตีนแฟรกชัน P1 (2) โปรตีนแฟรกชัน P2 (3) โปรตีนแฟรกชัน P5 จากสารสกัดหยาดพลาสมา ตัวเงินตัวทองที่วิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS



รูปที่ 30 mass spectrum mass spectrum ของ (1) โปรตีนแฟรกชัน S1 (2) โปรตีนแฟรกชัน S2 (3) โปรตีนแฟรกชัน S4 จากสารสกัดหยาบซีรัม ตัวเงินตัวทองที่วิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS

**MATRIX SCIENCE MASCOT Search Results**

**User** :  
**E-mail** :  
**MS data file** : P1.mgf  
**Database** : SwissProt 2019\_09 (561,176 sequences; 201,758,313 residues)  
**Taxonomy** : Other lobe-finned fish and tetrapod clade (9,168 sequences)  
**Timestamp** : 19 Jun 2020 at 03:41:59 GMT

Not what you expected? Try [the select summary](#).

**▼ Search parameters**

**Type of search** : MS/MS Ion Search  
**Enzyme** : Trypsin  
**Fixed modifications** : **Carbamidomethyl (C)**  
**Variable modifications** : **Oxidation (M)**  
**Mass values** : Monoisotopic  
**Protein mass** : Unrestricted  
**Peptide mass tolerance** : ± 1.2 Da  
**Fragment mass tolerance** : ± 0.6 Da  
**Max missed cleavages** : 1  
**Instrument type** : ESI-QUAD-TOF  
**Number of queries** : 9,171

1

	Score	Mass	Matches	Sequences	emPAI
<input checked="" type="checkbox"/> 1.1 <b>CO3_NAJNA</b>	52	186350	20 (4)	18 (4)	0.07
Complement C3 OS=Naja naja OX=35670 GN=C3 PE=2 SV=1					
<input checked="" type="checkbox"/> 1.2 <b>VC03_OPHHA</b>	47	185408	25 (2)	22 (2)	0.03
Ophiophagus venom factor OS=Ophiophagus hannah OX=8665 PE=1 SV=1					

**▼ 41 peptide matches (40 non-duplicate, 1 duplicate)**

Query	Dupes	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta	M	Score	Expect	Rank	U	1	2	Peptide
1937	.....	352.3274	1053.9602	1054.5771	-0.6169	1	4	2.6	1	U	1	2	K.IKLEGDPGAR.V
2299		388.2033	774.3921	774.3872	0.0050	0	39	0.0021	1	U	1	2	R.LSEGVDR.Y
2333		784.3552	783.3479	782.3997	0.9482	0	1	1.1	2	U	1	2	K.VFAMATK.M + Oxidation (M)
2406		400.7509	799.4872	799.4804	0.0068	0	23	0.15	1	U	1	2	R.VGLVAVDK.A
2505		818.3733	817.3661	818.4650	-1.0990	0	2	0.63	1	U	1	2	R.VPYSVVR.K
2834		444.2352	886.4558	886.4508	0.0050	0	44	0.0019	1	U	1	2	K.NEQVEIR.A
2836		444.2524	1329.7354	1328.6870	1.0484	1	2	8.1	10	U	1	2	R.DDRIQKPGAMK.I
2878		447.2166	1784.8372	1785.8495	-1.0123	0	1	10	8	U	1	2	K.DGNDIYFMDVLEVIK.G + Oxidation (M)
2972		459.7160	917.4175	917.4607	-0.0432	0	11	0.71	2	U	1	2	R.QQPDGVFK.E
3003		463.2495	924.4844	924.4705	0.0139	0	35	0.011	1	U	1	2	K.DFFIDLR
3192		484.2199	966.4253	966.4195	0.0058	0	17	0.038	1	U	1	2	R.WEYNAR.T

2

รูปที่ 31 ตัวอย่างการระบุโปรตีนแฟรกชัน P1 จากพลาสมาของตัวเงินตัวทอง (1) mascot search result แสดงชนิดของโปรตีนที่ระบุชนิดได้ (protein hits) (2) รายละเอียดของ protein hits แสดง mascot score จำนวน peptide matches และ sequence ที่ match กับโปรตีนชนิดดังกล่าว ในตัวอย่างนี้จะเห็นว่าโปรตีนที่มีคะแนนสูงสุดคือ Complement C3

**MATRIX SCIENCE MASCOT Search Results**

**Protein View: AMI\_XENTR**

**Serine protease ami OS=Xenopus tropicalis OX=8364 GN=ami PE=2 SV=1**

**Database:** SwissProt  
**Score:** 29  
**Nominal mass (M<sub>r</sub>):** 29534  
**Calculated pI:** 8.52  
**Taxonomy:** Xenopus tropicalis

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of AMI\\_XENTR against nr.](#)

**Search parameters**

**MS data file:** P1.mgf  
**Enzyme:** Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.  
**Fixed modifications:** Carbamidomethyl (C)  
**Variable modifications:** Oxidation (M)

**Protein sequence coverage: 15%**

Matched peptides shown in **bold red**.

```

1  MNVSWALLAV VLVLTVATYE CRPRGRILGG QDSKAEVRPY MASIQQNGIH
51  QCGGVLIADK WVLAAHCAAT NSSNSSLVNM LGAISLSKPE KYKIVVKVLR
101 EIPHPLYNST IKHHDLLLE LSEKVTLSPA VNPLPFQNEI IDISAGRCL
151 VAGWQMRLT GKKPDTLQEL WVPLISRDVC NRRNYDNEI TANMICAGES
201 RKDSCEGDSG GPLVCDGIAV AIVQGGFRKC GNPTKPGIYT LIEPYKSWIM
251 ESMYNATLQS NPSPL

```

รูปที่ 32 protein view แสดงรายละเอียดของโปรตีนที่ระบุชนิดได้ ตามฐานข้อมูล SWISS-PROT และ protein sequence coverage

ตารางที่ 7 การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของโปรตีนจากแฟรกชันโปรตีน P1, P2, และ P5 ที่ได้จากการสกัดหยาบพลาสมา โดย LC-MS/MS

protein fraction	swissprot accession	protein name	mascot score	# match sequence	MW (Da)	pI	% cover	organism	peptide sequence
P1	Q01833	Complement C3	52	4	186350	5.91	10	<i>Naja naja</i> (Indian cobra)	NEQVEIR, DFFIDLR, NRWEEYNAR,VGLVAVDK
	I2C090	Ophiophagus venom factor	47	2	185408	6.08	20	<i>Ophiophagus hannah</i> (King cobra)	DFFIDLR, NEAVKQIMTGYAQQMWYK
	P10060	Hemoglobin subunit beta-1	38	1	16295	8.61	19	<i>Sphenodon punctatus</i> (Tuatara)	LLWYYPWTQR
	A4IHP4	Cullin-3	37	1	89479	8.68	16	<i>Xenopus tropicalis</i>	NMISKLK
	Q02020	Fibrinogen beta chain	32	1	53272	7.18	3	<i>Gallus gallus</i> (Chicken)	EDGGGWYNR
	Q6P326	Serine protease ami	29	1	29534	8.52	15	<i>Xenopus tropicalis</i>	KPDTLQELWYPLISR
	Q02020	Fibrinogen beta chain	103	3	53272	7.18	20	<i>Gallus gallus</i> (Chicken)	EDGGGWYNR, HGTDGIVWMNK, HGTDGIVWMNW
	Q6NVA9	Actin, cytoplasmic	29	1	42068	5.29	29	<i>Xenopus tropicalis</i>	LCYVALDFEQEMATAASSSLEK
	P18993	Hemoglobin beta-1	89	3	16297	9.15	69	<i>Varanus atbigularis</i>	NLDNIKDTEAK, VLTSFGDAIK, KSELHCDK
	P08423	Hemoglobin beta-2	64	1	15990	7.11	42	<i>Xenopus tropicalis</i>	LLWYYPWTQR

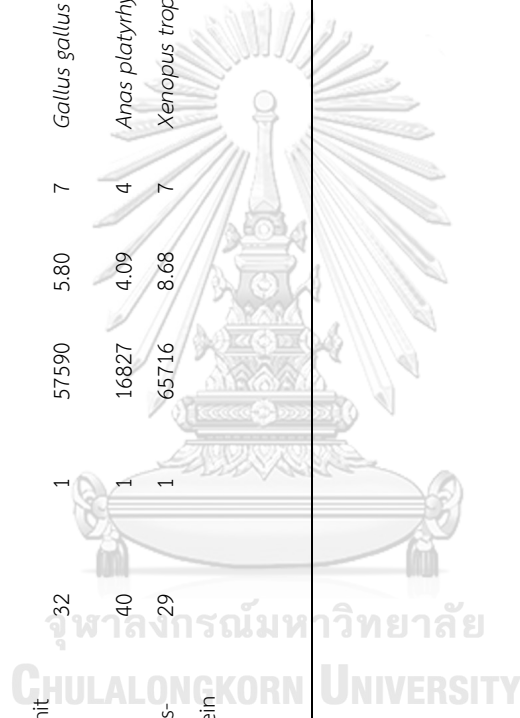
ตารางที่ 7 การวิเคราะห์ลำดับการต่อที่มีในบางส่วนของโปรตีนจากแฟรกชันโปรตีน P1, P2, และ P5 ที่ได้จากการสกัดหยาบพลาสติกมา โดย LC-MS/MS (ต่อ)

protein fraction	swissprot accession	protein name	mascot score	# match sequence	MW (Da)	pI	% cover	organism	peptide sequence
P 2	Q11133	Interstitial collagenase	43	1	43782	5.52	26	<i>Lithobates catesbeianus</i>	GPQTPQVCDISK
	I2C090	Ophiophagus venom factor	35	1	185408	6.08	13	<i>Ophiophagus hannah</i> (King cobra)	LSEGVDR
	P02125	Hemoglobin subunit beta	33	1	16367	8.48	38	<i>Ciconia ciconia</i> (White stork)	LVRVVAHALAR
	A4IHR1	Tetratricopeptide repeat protein 30A	31	1	76390	5.06	10	<i>Xenopus tropicalis</i>	HIADIIR
	F1NSM7	Ovocleidin-116	30	1	77165	6.42	28	<i>Gallus gallus</i>	LGOAARPEVAPAPSTGGRIVAPG GHR
	Q640V2	E3 ubiquitin-protein ligase	29	1	44802	5.47	15	<i>Xenopus tropicalis</i>	EPFVELNR
	Q5K2P6	Keratin, type 1	64	1	52248	6.32	13	<i>Protopterus aethiopicus</i>	EAMQNINDR
	Q02020	Fibrinogen beta chain	43	1	53272	7.81	15	<i>Gallus gallus</i>	EDGGGWYINR
	P02588	Troponin C	40	1	41821	4.05	9	<i>Gallus gallus</i>	ELGTVMR
Q8JH64	Tyrosine-protein kinase	36	1	76571	8.43	15	<i>Gallus gallus</i>	KPLPPTPEEDTMMVKPLPPEPAP SAAGEMKK	



ตารางที่ 7 การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของโปรตีนจากแฟรกชันโปรตีน P1, P2, และ P5 ที่ได้จากสารสกัดหยาบพลาสติกมา โดย LC-MS/MS (ต่อ)

protein fraction	swissprot accession	protein name	mascot score	# match sequence	MW (Da)	pI	% cover	organism	peptide sequence
P5	Q5ZL57	Coatmer subunit delta	32	1	57590	5.80	7	<i>Gallus gallus</i>	APFGFGGSSAVSGGTTAAMITETIETKPK
	P62144	Calmodulin	40	1	16827	4.09	4	<i>Anas platyrhynchos</i>	ELGTVMR
	Q0VA52	Spermatogenesis-associated protein 5-like protein 1	29	1	65716	8.68	7	<i>Xenopus tropicalis</i>	QSIWPMK



ตารางที่ 8 การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของโปรตีนจากแฟรกชันโปรตีน S1, S2, และ S4 ที่ได้จากสารสกัดหยาดหยาดโดย LC-MS/MS

protein fraction	swissprot accession	protein name	mascot score	# match sequence	MW (Da)	pI	% cover	organism	peptide sequence
S1	Q01833	Complement C3	59	3	186350	5.91	11	<i>Naja naja</i> (Indian cobra)	NEQVEIR, VLMAASTGR, WEEYNAR
	A4IHP4	Cullin-3	42	1	89479	8.68	21	<i>Xenopus tropicalis</i>	MNISKLK
	P10060	Hemoglobin subunit beta-1	32	1	1629	8.61	40	<i>Sphenodon punctatus</i> (Tuatara)	LLVYPWTQR
	A4I109	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	28	1	165353	6.33	6	<i>Xenopus tropicalis</i>	AIVDAAR
	Q0IIX9	Tuftelin-interacting protein 11	25	1	95634	5.96	14	<i>Xenopus tropicalis</i>	LANALQA
	S2	P02134	Hemoglobin subunit beta	54	1	15528	7.36	22	<i>Pelophylax esculentus</i>
Q0IIX9		Tuftelin-interacting protein 11	34	1	95913	5.70	18	<i>Xenopus tropicalis</i>	LANALQK
Q0IHQ8		Serine/threonine-protein kinase 10	32	1	112157	7.95	14	<i>Xenopus tropicalis</i>	HDAVNGKPDIIILNPVSSNHEPKR

ตารางที่ 8 การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของโปรตีนจากแฟรกชันโปรตีน S1, S2, และ S4 ที่ได้จากสารสกัดทอยาซีรัม โดย LC-MS/MS (ต่อ)

protein fraction	swissprot accession	protein name	mascot score	# match sequence	MW (Da)	pI	% cover	organism	peptide sequence
S2	Q640V2	E3 ubiquitin-protein ligase RMND5A	26	1	44802	5.47	22	<i>Xenopus tropicalis</i>	EPFVELNR
	Q5K2P4	Keratin, type I	49	1	52316	5.62	4	<i>Protopterus aethiopicus</i>	EAMQNLNDR
S4	P84230	Histone H3.2	28	1	15436	11.27	18	<i>Cairina moschata</i>	STELLIR
	Q0VA52	Spermatogenesis-associated protein 5-like protein 1	27	1	65716	8.68	8	<i>Xenopus tropicalis</i>	QSIEWPMK
	Q5Z13KC9	14-3-3 protein zeta	38	1	27929	4.73	19	<i>Gallus gallus</i>	SVTEQGAELSNEER

ผลจากการระบุชนิดของโปรตีนนอกจากจะทำให้ทราบลำดับกรดอะมิโนหรือเปปไทด์ที่ได้เป็นส่วนหนึ่งของโปรตีนชนิดใดแล้วนั้น จากการสังเกตพบว่า มีลำดับเปปไทด์ของโปรตีนจำนวน 14 ลำดับเปปไทด์ของโปรตีนที่สามารถพบได้ทั้งในพลาสมาและซีรัม (ตารางที่ 9) ซึ่งกลุ่มโปรตีนที่พบนี้อาจเป็นกลุ่มโปรตีนที่สำคัญต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก็ได้

ตารางที่ 9 แสดงชนิดโปรตีนที่พบในพลาสมาและซีรัม

protein fraction	swissprot accession	protein name	peptide sequence	Fuction
P1	Q01833	Complement C3	NEQVEIR, DFFIDLR, NRWEEYNAR, VGLVAVDK	protective protein
S1	Q01833	Complement C3	NEQVEIR, VLMAASTGR, WEEYNAR	protective protein
P1	P10060	Hemoglobin subunit beta-1	LLWYPWTQR	transport protein
S1	P10060	Hemoglobin subunit beta-1	LLWYPWTQR	transport protein
P1	A4IHP4	Cullin-3	NMISKLK	enzyme
S1	A4IHP4	Cullin-3	MNISKLK	enzyme
P2	Q640V2	E3 ubiquitin-protein ligase	EPFVELNR	enzyme
S2	Q640V2	E3 ubiquitin-protein ligase	EPFVELNR	enzyme
P5	Q0VA52	Spermatogenesis-associated protein 5-like protein 1	QSIEWPMK	special purpose protein
S4	Q0VA52	Spermatogenesis-associated protein 5-like protein 1	QSIEWPMK	special purpose protein

#### 4.2.5. วิเคราะห์หน้าที่ของโปรตีนที่พบในสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกบริสุทธิ์บางส่วน จากสารสกัดหยาบพลาสมา และสารสกัดหยาบซีรัม ที่แยกได้จากเลือดตัวเงินตัวทอง

หลังจากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของโปรตีนจากพลาสมาและซีรัมที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค liquid chromatography- mass spectrometry (LC-MS/MS) ได้นำ peptide sequence แต่ละชิ้นมาทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลทั้งนี้ฐานข้อมูลโปรตีนที่ใช้ในการแปลผล ได้แก่ SWISS-PROT และฐานข้อมูลจีโนมของ NCBI การระบุชนิดของเปปไทด์จะใช้ การวิเคราะห์ทางสถิติโดยค่าทางสถิติที่พิจารณา ได้แก่ MASCOT score, เป็นต้น ผลจากสืบค้นในฐานข้อมูลโปรตีนพบว่า โปรตีน fraction P1, P2, P5 และโปรตีน fraction S1, S2 และ S4 ที่สามารถระบุชนิดของโปรตีนได้ทั้งหมดนั้นมีจำนวนทั้งสิ้น 33 ชนิด ซึ่งโปรตีนแต่ละชนิดถูกนำมาจัดกลุ่มตามหน้าที่ (NCBI) ออกเป็นกลุ่ม (ตารางที่ 10) ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนที่อยู่ในกลุ่มโปรตีนป้องกัน (protective protein) 4 ชนิด โปรตีนโครงสร้าง (structure protein) 3 ชนิด กลุ่มโปรตีนขนส่ง (transport protein) 5 ชนิด กลุ่มเอนไซม์ (enzyme) 6 ชนิด กลุ่มโปรตีนส่งสัญญาณ (signaling protein) 4 ชนิด กลุ่มโปรตีนที่ทำหน้าที่พิเศษ (special purpose protein) 2 ชนิด และโปรตีนที่ควบคุมการแสดงออกของยีน (gene regulatory protein) อีก 3 ชนิด ตามลำดับ เบื้องต้นโปรตีนเกือบทั้งหมดที่ถูกระบุชนิดมีความใกล้เคียงกับโปรตีนหลายชนิดในกลุ่มของสัตว์เลื้อยคลาน อย่างเช่น งู กบ และตัวทาร์รา ถือได้ว่าเป็นกลุ่มของสัตว์เลื้อยคลานที่มีความสัมพันธ์กัน แต่ไม่พบว่ามีโปรตีนชนิดใดที่ตรงกับโปรตีนของตัวเงินตัวทอง สาเหตุเนื่องมาจากงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาวิจัยครั้งแรกในตัวเงินตัวทองซึ่งการระบุชนิดของโปรตีนต้องอาศัยฐานข้อมูลของสัตว์กลุ่มนี้ แต่ข้อมูลยังมีไม่มากจึงทำให้การระบุชนิดโปรตีนพบได้ในสัตว์ที่มีความใกล้เคียงกันเท่านั้น

ตารางที่ 10 การจำแนกกลุ่มโปรตีนตามหน้าที่ (National Center for Biotechnology Information, NCBI)

กลุ่มโปรตีน	หน้าที่
<b>กลุ่มที่ 1 โปรตีนป้องกัน (protective protein)</b> Complement C3 (Q01833) Ophiophagus venom factor (I2C090) Troponin C (P02588) Ovocleidin-116 (F1NSM7)	ทำหน้าที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมจากภายนอกเซลล์
<b>กลุ่มที่ 2 โปรตีนโครงสร้าง (structure protein)</b> Actin, cytoplasmic (Q6NVA9) Keratin type 1 (Q5K2P6) Keratin, type I (Q5K2P4)	ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างให้กับเซลล์และเนื้อเยื่อ
<b>กลุ่มที่ 3 โปรตีนขนส่ง (transport protein)</b> Hemoglobin subunit beta (P02134) Hemoglobin subunit beta (P02125) Hemoglobin subunit beta-1 (P10060) Hemoglobin beta-1 (P18993) Hemoglobin beta-2 (P08423)	ทำหน้าที่ขนส่งโมเลกุลขนาดเล็ก หรืออออน
<b>กลุ่มที่ 4 เอนไซม์ (enzyme)</b> Cullin-3 (A4IHP4) Serine protease ami (Q6P326) Interstitial collagenase (Q11133) E3 ubiquitin-protein ligase RMND5A (Q640V2) Tyrosine-protein kinase (Q8JH64) Serine/threonine-protein kinase 10 (Q0IHQ8)	เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่สามารถเร่งอัตราการเกิดปฏิกิริยา

ตารางที่ 10 การจำแนกกลุ่มโปรตีนตามหน้าที่ (National Center for Biotechnology Information, NCBI) (ต่อ)

กลุ่มโปรตีน	หน้าที่
<p><b>กลุ่มที่ 5 โปรตีนส่งสัญญาณ (signaling protein)</b>            Calmodulin (P62144)            Tetratricopeptide repeat protein 30A (A4IHR1)            Coatomer subunit delta (Q5ZL57)            14-3-3 protein zeta (Q5Z13KC9)</p>	<p>ทำหน้าที่ในการนำสัญญาณจากเซลล์หนึ่งไปยังเซลล์อีกเซลล์หนึ่ง</p>
<p><b>กลุ่มที่ 6 โปรตีนที่ทำหน้าที่พิเศษ (special purpose protein)</b>            Fibrinogen beta chain (Q02020)            Spermatogenesis-associated protein 5-like protein 1 (Q0VA52)</p>	<p>เป็นโปรตีนทำหน้าที่หลากหลายแตกต่างกันไป</p>
<p><b>กลุ่มที่ 7 โปรตีนที่ควบคุมการแสดงออกของยีน (gene regulatory protein)</b>            Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A (A4II09)            Tuftelin-interacting protein 11 (Q0IIX9)            Histone H 3.2 (P84230)</p>	<p>ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับแสดงออกของยีน</p>

#### 4.2.6 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหา potential protein antimicrobial peptide

เนื่องจากในการศึกษาครั้งนี้ทางผู้วิจัยสนใจศึกษากลุ่มโปรตีนที่มีแนวโน้มสามารถนำมาใช้เป็น potential antimicrobial peptide เพื่อนำไปศึกษาต่อยอดและพัฒนาเป็นสารทดแทนยาปฏิชีวนะ โดยนำเอาลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากขั้นตอนการระบุชนิด โปรตีนที่พบทั้งหมด 46 ลำดับกรดอะมิโน โดยได้มาจากพลาสมาทั้งหมด 31 ลำดับกรดอะมิโน และจากซีรัมทั้งหมด 15 ลำดับกรดอะมิโนมาจำลองทางคอมพิวเตอร์เพื่อทำนายและวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโน ด้วยการสืบค้นจากฐานข้อมูล ซึ่งในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้ใช้โปรแกรม antimicrobial peptide calculator and predictor เพื่อศึกษาความน่าจะเป็นของโปรตีนหรือเปปไทด์ในการเป็น antimicrobial peptide พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนที่มีความน่าจะเป็น potential antimicrobial peptide ทั้งหมด 15 ลำดับกรดอะมิโน โดยได้มาจากพลาสมา 13 ลำดับกรดอะมิโน ในขณะที่ในซีรัมพบเพียง 2 ลำดับกรดอะมิโน รายละเอียดแสดงดังตารางที่ 11 ซึ่งผลจากการจำลองทางคอมพิวเตอร์เพื่อด้วยโปรแกรม antimicrobial peptide calculator and predictor พบว่าทั้งในพลาสมาและซีรัมไม่มีลำดับกรดอะมิโน (peptide sequence) ใดเลยที่เหมือนหรือตรงกัน ซึ่งต่างจากการสืบค้นข้อมูลด้วยฐานข้อมูลโปรตีนของ SWISS-PROT รายละเอียดแสดงดังตารางที่ 12 – 13



ตารางที่ 11 แสดงคุณสมบัติของลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการจำลองด้วยโปรแกรม APD3: antimicrobial peptide calculator and predictor จากสารสกัดหยาบพลาสมาและ สารสกัดหยาบซีรัม

protein fraction	peptide sequence	จำนวนกรดอะมิโน	ประจุ	ลักษณะโครงสร้าง
P1	DFFIDLR	7	-1	$\alpha$ -helical peptides
P1	DFFIDLR	7	-1	$\alpha$ -helical peptides
P1	NEAVKQIMTGYAQQMVYK	18	+ 1	$\alpha$ -helical peptides
P1	NMISKLK	7	+ 2	$\alpha$ -helical peptides
P1	KPDTLQELWPLISR	15	0	$\alpha$ -helical peptides
P2	LCYVALDFEQEMATAASSSSLEK	23	-3	$\alpha$ -helical peptides
P2	VLTSFGDAIK	10	0	$\alpha$ -helical peptides
P2	LVRVWAHALAR	11	+ 2	$\alpha$ -helical peptides
P2	HIADIIR	8	0	$\alpha$ -helical peptides
P5	EAMQNLNDR	9	-1	$\alpha$ -helical peptides
P5	ELGTVMR	7	0	$\alpha$ -helical peptides
P5	APGFGGFGSSAVSGGTTAAMITETI IETEKPK	32	-1	$\alpha$ -helical peptides
P5	ELGTVMR	7	0	$\alpha$ -helical peptides
S1	AIVDAAR	7	0	$\alpha$ -helical peptides
S4	EAMQNLNDR	9	-1	$\alpha$ -helical peptides

ตารางที่ 12 ผลการจำลองด้วยโปรแกรม APD3: antimicrobial peptide calculator and predictor ของลำดับกรดอะมิโนจากสารสกัดหยาดพลาสมา

protein fraction	protein name	peptide sequence	หน้าที่
P1	Complement C3	DFFIDLR	protective protein
P1	Ophiophagus venom factor	DFFIDLR	protective protein
P1	Ophiophagus venom factor	NEAVKQIMTGAYAQQMVYK	protective protein
P1	Cullin-3	NMISKLK	enzyme
P1	Serine protease ami	KPDTLQELWVPLISR	enzyme
P2	Actin, cytoplasmic	LCYVALDFEQEMATAASSSLEK	structure protein
P2	Hemoglobin beta-1	VLTSFGDAIK	transport protein
P2	Hemoglobin subunit beta	LVRVVAHALAR	transport protein
P2	Tetratricopeptide repeat protein 30A	HIADIIR	signaling protein
P5	Keratin, type 1	EAMQNLNDR	structure protein
P5	Troponin C	ELGTVMR	protective protein
P5	Coatomer subunit delta	APGFGGFGSSAVSGGTTAAMITETII ETEKPK	signaling protein
P5	Calmodulin	ELGTVMR	signaling protein

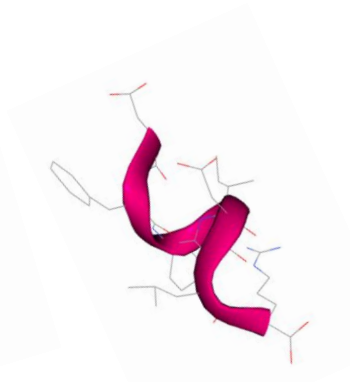
ตารางที่ 13 ผลการจำลองด้วยโปรแกรม APD3: antimicrobial peptide calculator and predictor ของลำดับกรดอะมิโนจากสารสกัดหยาบซีรัม

protein fraction	protein name	peptide sequence	หน้าที่
S1	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	AIVDAAR	enzyme
S4	Keratin, type I	EAMQNLNDR	structure protein

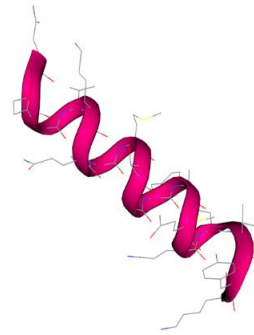
เมื่อทราบชนิดของโปรตีนและได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของโปรตีนที่มีความน่าจะเป็น potential antimicrobial peptide จากการจำลองทางคอมพิวเตอร์ด้วยโปรแกรม APD3: antimicrobial peptide calculator and predictor ของลำดับกรดอะมิโนแล้วจะใช้ลำดับกรดอะมิโนดังกล่าวในการทำนายโครงสร้างทุติยภูมิของชนิดโปรตีนหรือเปปไทด์ที่พบด้วยโปรแกรม PEP-FOLD server (<http://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD/>) พบว่า potential antimicrobial peptide ที่ได้จากการจำลองทางคอมพิวเตอร์ด้วยโปรแกรม APD3: antimicrobial peptide calculator and predictor มีลักษณะโครงสร้างเป็น  $\alpha$ -helical peptides ซึ่งเป็นโครงสร้างพื้นฐานที่จำเป็นของเปปไทด์ต้านจุลชีพหลายชนิดที่พบในปัจจุบัน (รูปที่ 33- 34) การที่โปรตีนทำหน้าที่ได้หลากหลายนั้น มาจากความแตกต่างกันของสายเปปไทด์ ที่มีความแตกต่างกันทั้งลำดับของกรดอะมิโน ความยาวของสายเปปไทด์ ซึ่งความแตกต่างนี้เองทำให้สายเปปไทด์รวมตัวเป็นโครงสร้างระดับทุติยภูมิ (secondary structure) และโครงสร้างทุติยภูมิที่พบมี 2 ชนิดคือ เกลียวแอลฟา ( $\alpha$ -helical peptides) และแผ่นพลิตปีต้า ( $\beta$ -pleated sheet)



Complement C3



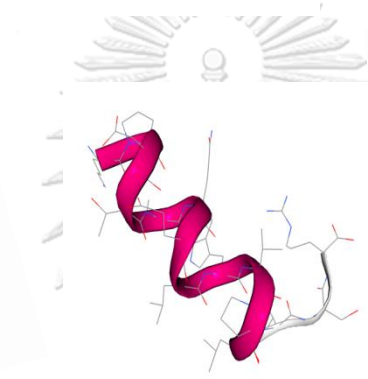
Ophiophagus venom factor



Ophiophagus venom factor



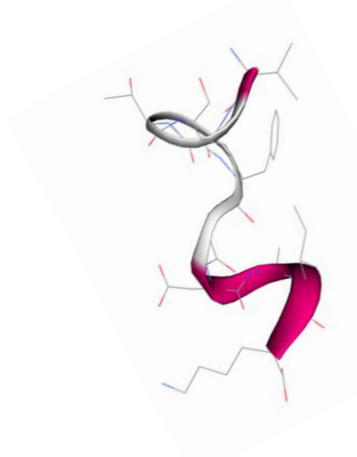
Cullin-3



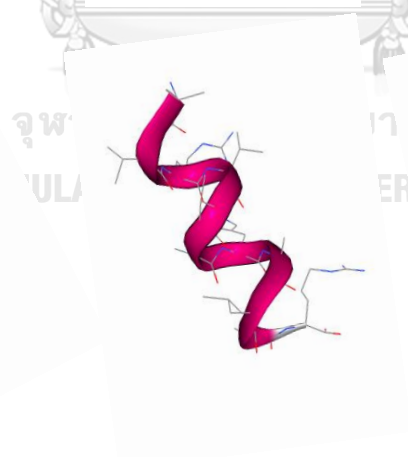
Serine protease ami



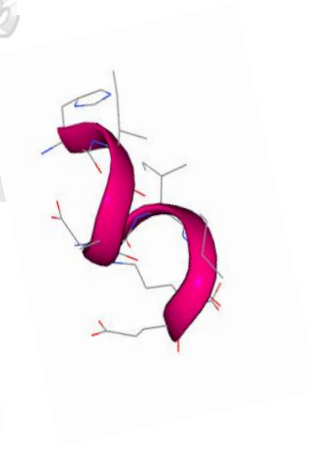
Actin, cytoplasmic



Hemoglobin beta-1

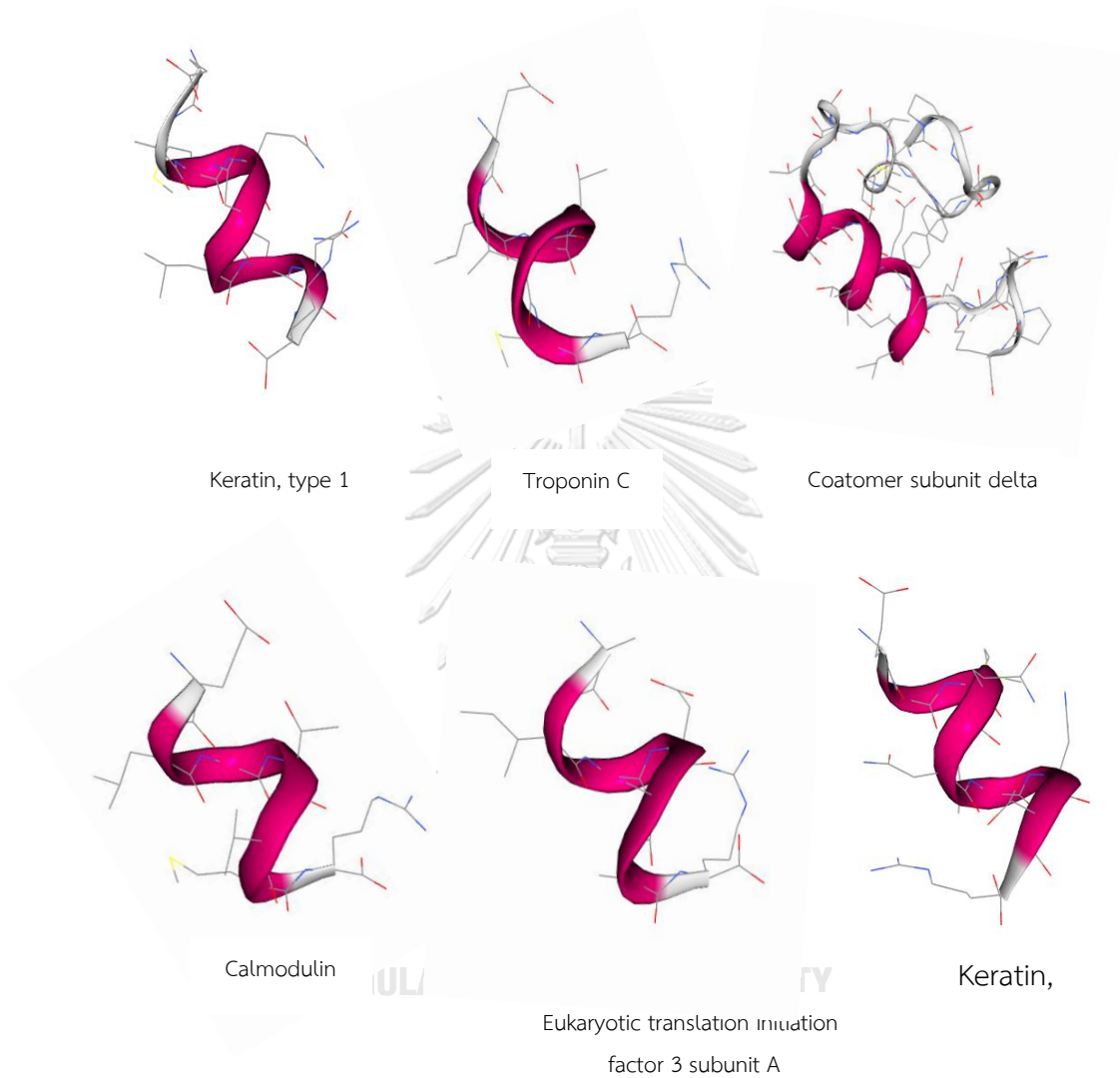


Hemoglobin subunit beta



Tetratricopeptide repeat protein 30A

รูปที่ 33 โครงสร้างทุติยภูมิของ potential antimicrobial peptide ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ซึ่งวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม PEP-FOLD



รูปที่ 34 โครงสร้างทุติยภูมิของ potential antimicrobial peptide ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ซึ่งวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม PEP-FOLD



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย อภิปรายและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 อภิปรายผลการทดลอง

การดื้อยาต่อสารต้านจุลชีพหลายขนานในจุลชีพได้เพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็วและเป็นหนึ่งในภัยคุกคามทางด้านสุขภาพที่สำคัญ ด้วยเหตุนี้การพัฒนาสารต้านจุลชีพตัวใหม่และพัฒนาแนวทางการรักษาใหม่เพื่อที่ต่อสู้กับจุลชีพที่ดื้อยาปฏิชีวนะจึงมีความจำเป็นอย่างมาก (169-171) หนึ่งในแนวทางที่น่าสนใจคือการค้นหาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียจากธรรมชาติ เช่น พืชหรือสัตว์ ซึ่งมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพบางชนิดได้รับการพิสูจน์จากการศึกษาวิจัยว่าสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดื้อยาได้ ตัวอย่างเช่น สาร galangin ที่แยกได้จากผิวหนังกบสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะกลุ่มบีต้าแลคแทมได้ เป็นต้น (170) ผลการศึกษาความเข้มข้นของพลาสมาสกัดหยาบและซีรัมสกัดหยาบจากตัวเงินตัวทองเพื่อ ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี agar well diffusion แสดงให้เห็นว่าพลาสมาที่แยกได้จากเลือดตัวเงินตัวทองสามารถยับยั้งการเจริญของ เชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบซึ่งสอดคล้องกับรายงานของพลาสมาจากเลือดจระเข้ฟ้าจัดไทย (*Crocodylus siamensis*) ที่พบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้กว้าง (broad spectrum) โดยยับยั้งได้ทั้งเชื้อในกลุ่มแกรมบวกและแกรมลบ เช่น เชื้อ *S. Typhi*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* และเชื้อ *V. cholera* (107, 172) ในขณะที่สารสกัดหยาบซีรัมสามารถยับยั้งได้เฉพาะเชื้อแบคทีเรียแกรมลบเท่านั้นเคยมีรายงานการศึกษาซีรัมของอัลลิเกเตอร์อเมริกาหรือจระเข้ ตินเป็ดอเมริกา (*A. mississippiensis*) พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแกรมลบและแกรมบวกได้มากถึง 17 ชนิดรวมถึงเชื้อไวรัสก่อโรคเริม (herpes simplex virus type-1) เชื้อ Human Immunodeficiency Virus (HIV) และเชื้อ west nile virus (103, 104) อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าซีรัมของตัวเงินตัวทองมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียน้อยกว่าพลาสมา มีรายงานการศึกษาในซีรัมของจระเข้พันธุ์อัลลิเกเตอร์มาทดสอบหาคุณสมบัติในการต้านเชื้อจุลชีพ พบว่าซีรัมของจระเข้พันธุ์อัลลิเกเตอร์มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งชนิดแกรมบวกและแกรมลบด้วยอัตราที่แตกต่างกัน และเมื่อนำซีรัมมาให้ความร้อนที่ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่าคุณสมบัติในการต้านเชื้อจุลชีพลดลง ทำให้คาดว่า ระบบคอมพลิเมนต์ในซีรัมมีความเกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย รวมทั้งเมื่อทดสอบโดยการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรตีเอส พบว่าคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อลดลงเช่นเดียวกัน อาจเป็นไปได้ว่ามีระบบคอมพลิเมนต์และโปรตีนบางชนิดที่เกี่ยวข้องในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ในซีรัมของจระเข้พันธุ์อัลลิเกเตอร์โดยไม่เกี่ยวข้องกับเปปไทด์ เนื่องจากเปปไทด์ต้านเชื้อจุลชีพนั้นจะมีคุณสมบัติทนความร้อนได้ Zheat stable (173) ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าค่า MIC ของสารสกัดหยาบพลาสมาสามารถยับยั้งการเจริญต่อเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853, *B. cereus* ATCC 11778 และเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 ได้ดีที่สุด ขณะที่สารสกัดหยาบซีรัมให้ผลการ

ทดสอบกับ *P. aeruginosa* เท่านั้น มีรายงานว่าพลาสมาจากกระเข้ น้ำจืดไทย (*C. siamensis*) มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *S. aureus*, *S. epidermidis* และเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *E. coli*, *P. aeruginosa*, *V. cholera* และเชื้อ *Salmonella Typhi* ซึ่งพบว่าความเข้มข้นของโปรตีนในพลาสมาที่ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคที่สำคัญในคนได้ โดยมีอัตรายับยั้งที่แตกต่างกัน แต่เชื้อทดสอบทุกชนิดถูกยับยั้งได้มากกว่าร้อยละ 50 (172) และเมื่อนำมาศึกษากลไกการยับยั้งภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าผนังเซลล์และเซลล์เมมเบรนของเชื้อ *S. Typhi* เกิดเป็นรูพรุนทำให้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสามารถแทรกผ่านผนังเซลล์และเข้าไปทำลายเชื้อได้ จากการศึกษาวิจัยในกระเข้ทั้งสองกลุ่มแสดงให้เห็นว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในสัตว์กลุ่มเลื้อยคลานมีความน่าสนใจและอาจจะนำมาพัฒนาเป็นสารต้านเชื้อแบคทีเรียได้ อย่างไรก็ตามยังไม่มีข้อมูลการศึกษาเกี่ยวกับผลของพลาสมาหรือซีรัมจากตัวเงินตัวทองต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคนั้น การศึกษาวิจัยนี้จึงนับว่าเป็นผลงานวิจัยแรกที่ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียในส่วนประกอบเลือดของตัวเงินตัวทอง โดยทำการศึกษาศาสกัทยาพลาสมาและสารสกัดหยาบซีรัมเมื่อนำมาทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน ผลทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบพลาสมาและสารสกัดหยาบซีรัมที่ได้จากตัวเงินตัวทองโดยวิธี Agar well diffusion method และผลทดสอบหาค่า MIC พบว่าสารสกัดหยาบจากพลาสมาสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าสารสกัดหยาบซีรัม มีขนาดวงใสแสดงการยับยั้งกว้างกว่าสารสกัดหยาบจากซีรัมและให้ค่า MIC ที่ต่ำกว่าสารสกัดหยาบซีรัม ในขณะที่สารสกัดหยาบซีรัมสามารถยับยั้งได้เฉพาะเชื้อแบคทีเรียแกรมลบและมีค่า MIC สูงกว่าสารสกัดหยาบพลาสมา อาจเป็นไปได้ว่ามีโปรตีนบางชนิดที่เกี่ยวข้องในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เพราะพลาสมาและซีรัมเป็นส่วนประกอบของน้ำเลือดเหมือนกันแต่มีองค์ประกอบของโปรตีนที่ต่างกัน อีกทั้งในพลาสมาองค์ประกอบของสารที่ช่วยในการแข็งตัวของเลือด เช่น ไฟบริโนเจน วิตามินเค แคลเซียม และโพรทอมบิน เป็นต้น แต่ในซีรัมจะไม่พบสารเหล่านี้ มีรายงานการศึกษาวิจัยคุณสมบัติของไฟบริโนเจนที่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ โดยกลไกเริ่มจากไฟบริโนเจนหรือเมทริกซ์ไฟบรินที่ละลายน้ำได้จะฟอร์มตัวเป็น fibrin matrices หรือ matrix protein เพื่อดักจับแบคทีเรียเอาไว้ภายในเนื้อเยื่อที่ติดเชื่อทำให้จำกัดการเจริญเติบโตและการแพร่กระจายของเชื้อโรคได้จากนั้นไฟบรินกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด macrophage เข้ามายังบริเวณเนื้อเยื่อที่ติดเชื่อเพื่อมาช่วยจับกินแบคทีเรียที่ปนเปื้อนและเศษเซลล์ที่ตายแล้วกระบวนการนี้เรียกว่า fibrinogen-mediated host defense (174) นอกจากนั้นอาจเพราะโปรตีนที่มีพบในสารสกัดหยาบพลาสมามีชนิดของโปรตีนมากกว่าสารสกัดหยาบซีรัม เพราะซีรัมมีการตกตะกอนของโปรตีนซึ่งมีผลทำให้โปรตีนบางชนิดที่พบในพลาสมาแต่ไม่พบในซีรัม

ผลการทดสอบของสารสกัดหยาบพลาสมาที่ให้ผลแตกต่างจากซีรัม อาจเนื่องจากในขั้นตอนการเก็บตัวอย่างเลือดของตัวเงินตัวทองมีการใช้สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด คือ 0.5 โมลาร์ EDTA อีกทั้งการศึกษานี้ไม่ได้ทำการทดสอบผลของ EDTA ต่อการเจริญของแบคทีเรียควบคู่ไปด้วย ทำให้ผลของการทดสอบเบี่ยงต้นจาก agar well plate และ broth microdilution ที่แตกต่างกันนี้อาจเกิดจากการทำหน้าที่เป็น chelating agent ของ EDTA ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อทดสอบได้ ดังนั้นหากต้องการทดลองในครั้งต่อไปควรเลือกสารป้องกันการแข็งตัวที่เหมาะสม



เมื่อนำพลาสมาและซีรัมของตัวเงินตัวทองมาสกัดแยกด้วยวิธี ion exchange chromatography โดยใช้คอลัมน์ Q-Sepharose ทำให้ได้โปรตีนแฟรกชันทั้งหมด 5 พิค เท่ากันทั้งในพลาสมาและซีรัม (P1-P5) และ (S1-S5) แต่ละส่วนได้ถูกนำไปทดสอบยืนยันน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight; MW) โดยใช้เทคนิค SDS-PAGE และนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย พบว่า แลปโปรตีนของโปรตีนแฟรกชันที่ได้จากพลาสมา (P1-P5) และซีรัม (S1-S5) มีรูปแบบโปรตีนไม่แตกต่างกันโดยมีขนาดโมเลกุลอยู่ระหว่าง 16-200 กิโลดัลตัน โดยพบแลปโปรตีนที่เข้มและกว้างที่สุดที่น้ำหนักโมเลกุล 67 กิโลดัลตันและสามารถระบุได้ว่าเป็นแลปโปรตีนแอลบูมินซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Threenet และคณะที่พบว่าโปรตีนจากซีรัมของจระเข้ น้ำจืดสายพันธุ์ไทย มีขนาดโปรตีนอยู่ในช่วงน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 21 – 250 กิโลดัลตัน (175) ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าที่พบในโปรตีนของตัวเงินตัวทองเล็กน้อย มีงานวิจัยรายงานถึงโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลเล็กแต่มีคุณสมบัติทางชีวภาพที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ เช่น ฮีโมซิดิน (hemocidins) ที่ถูกค้นพบในกลุ่มสัตว์เลื้อยคลาน เช่น จระเข้ ซึ่งเป็น เปปไทด์ที่ได้จากการย่อยโมเลกุลของฮีโมโกลบิน (hemoglobin) หรือไมโอโกลบิน (myoglobin) ทั้งยังได้พิสูจน์แล้วว่าสามารถต้านเชื้อ *E. coli* ได้ (176) จากรายงานของ Pata และคณะ ที่ทำการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของโปรตีนต้านจุลชีพ พบว่าโปรตีนที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 14-15 กิโลดัลตัน สามารถทำลายเชื้อจุลชีพได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบอย่างเช่น *S. epidermidis*, *S. Typhi* และ *V. cholerae* โดยออกฤทธิ์ที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อส่งผลให้การซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นในเพิ่มขึ้นและเมื่อตรวจสอบพบว่า เป็นไลโซไซม์ (lysozyme) ซึ่งเป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่พบในไขของสัตว์เลื้อยคลานหลายชนิด และคาดว่าโปรตีนดังกล่าวทำหน้าที่ปกป้องไขจากเชื้อก่อโรคในสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้การสกัดโปรตีนจากพลาสมาของจระเข้ น้ำจืดไทยที่มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 525 – 796 กิโลดัลตัน แสดงผลยับยั้ง *S. Typhi* และ *S. aureus* พบว่าเป็นคลอโคซิน (crocosin) (177) ยังมีรายงานเพิ่มเติมถึงโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลเล็กเพียง 1 กิโลดัลตันที่แยกได้จากพลาสมาของจระเข้ น้ำจืดไทยและมีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* และ *S. Typhi* ได้ (107) และเมื่อนำแต่ละส่วนของโปรตีนแฟรกชันที่ได้จากสารสกัดพลาสมาและสารสกัดหยาบซีรัมไปทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย พบว่าเฉพาะโปรตีนแฟรกชัน P1, P2, P5 และโปรตีนแฟรกชัน S1, S2 และ S4 สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ จากการทดลองพบว่าปริมาณของโปรตีนแฟรกชันที่ใช้ในการทดสอบนั้นมีความเข้มข้นของโปรตีนไม่เท่ากัน เนื่องจากเมื่อนำโปรตีนแฟรกชันที่ได้จากการทำให้แห้งแบบ lyophilization แล้วละลายกลับด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ พบว่าโปรตีนแฟรกชันแต่ละส่วนมีความสามารถในการละลายแตกต่างกัน ทำให้มีเฉพาะโปรตีนส่วนที่ละลายน้ำได้ถูกทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของเชื้อ รวมทั้งมาวิเคราะห์หาเปปไทด์ต่อไปด้วย ซึ่งข้อจำกัดนี้ควรมีการปรับปรุงในการศึกษาเพิ่มเติมนั้นควรเลือกสารละลายที่เหมาะสมมาใช้ในการละลายโปรตีนแฟรกชัน และไม่มีผลกระทบต่อ การเจริญของเชื้อทดสอบ

ด้วยข้อมูลที่จำกัดเกี่ยวกับน้ำหนักโมเลกุลของพลาสมาหรือโปรตีนแพรงชั้นจากพลาสมาในกลุ่มของสัตว์เลื้อยคลาน ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทำให้การศึกษาครั้งนี้เป็นหลักฐานสำคัญที่ชี้ให้เห็นว่าขนาดน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมีส่วนสำคัญในการยับยั้งเชื้อจุลชีพ จากการศึกษาครั้งนี้จึงสนใจศึกษากลุ่มโปรตีนที่พบในองค์ประกอบของเลือดจากตัวเงินตัวทองเมื่อทำการแยกบริสุทธิ์บางส่วนจากสารสกัดหยาบพลาสมาและซีรัมเพื่อนำมาประยุกต์ใช้เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหรือเปปไทด์ต้านจุลชีพ ซึ่งจำเป็นต้องอาศัยเทคนิคการวิเคราะห์ที่มีศักยภาพ ความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ที่สูงร่วมกับเทคนิคการวิเคราะห์ทางโปรตีโอมิกส์จึงได้ทดสอบด้วยเทคนิค liquid chromatography mass spectrometry ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์ด้านโปรตีโอมิกส์ โดยทำการแยกโปรตีนที่อยู่ในสถานะของเหลวด้วยวิธี liquid chromatography LC-MS ควบคู่กับการใช้เทคโนโลยีในรูปแบบที่เรียกว่า high throughput technology ในการวิเคราะห์หาลำดับเปปไทด์ (178, 179) โดยใช้หลักการของ matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) ทำให้สารแตกตัวแบบพลังงานต่ำและทำให้เกิดไอออนได้ โดยสารไม่สลายตัว นำมาตรวจวิเคราะห์จำแนกโปรตีนที่ประกอบด้วยสายเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนเรียงตัวกัน เมื่อลำดับกรดอะมิโนต่างกันก็จะมีน้ำหนักของสายเปปไทด์ (peptide masses) ที่ต่างกัน ผลที่วัดได้จะแสดงออกมาในรูปแบบแมสสเปกตรัม (mass spectrum) ทำให้จำแนกน้ำหนักของโปรตีน (MS/MS) ถูกเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีนของ SWISS-PROT และฐานข้อมูลจีโนมของ NCBI ด้วยหลักการนี้ทำให้สามารถระบุชนิดโปรตีนได้ถูกต้องแม่นยำสูง (accuracy) และรวดเร็วและสามารถตรวจวิเคราะห์ได้ในกรณีที่มีปริมาณโปรตีนในตัวอย่างน้อยมาก (180) และยังสามารถใช้วิเคราะห์โปรตีนได้หลายชนิด ผลจากการทำนายโครงสร้างพื้นฐานและคุณสมบัติของโปรตีนโดยวิธี liquid chromatography mass spectrometry สามารถจำแนกเปปไทด์ได้ทั้งหมด 46 ชนิด ทั้งจากพลาสมาและซีรัมและสามารถระบุชนิดโปรตีนได้ 33 ชนิด จำแนกเปปไทด์ออกเป็นกลุ่มได้ดังนี้ กลุ่มโปรตีนป้องกัน (protective protein) 4 ชนิด กลุ่มโปรตีนโครงสร้าง (structure protein) 3 ชนิด กลุ่มโปรตีนขนส่ง (transport protein) 2 ชนิด กลุ่มเอนไซม์ (enzyme) 3 ชนิด กลุ่มโปรตีนส่งสัญญาณ (signaling protein) 3 ชนิด โดยเปปไทด์ที่ได้จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ทั้งในพลาสมาและซีรัมส่วนใหญ่พบว่าเหมือนเปปไทด์ที่พบในกลุ่มของสัตว์เลื้อยคลาน สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ และมีเปปไทด์บางชนิดที่พบในสัตว์ปีก เช่น ไก่ (*Gallus gallus*) แต่ก็จัดได้ว่าเป็นสัตว์ในสายวิวัฒนาการเดียวกัน ซึ่งเปปไทด์ที่ได้นี้ทั้งในพลาสมาและซีรัมมีขนาดของน้ำหนักโมเลกุลและค่า isoelectric point ใกล้เคียงกัน ผลที่ได้สอดคล้องกับการทำ SDS-PAGE ที่พบว่าทั้งพลาสมาและซีรัมแสดงแถบสีโปรตีนมีรูปแบบคล้ายกัน (รูปที่ 27-28) โปรตีนนอกจากจะเป็นองค์ประกอบของโครงสร้างของเซลล์ในสิ่งมีชีวิตแล้วยังทำหน้าที่เป็นตัวรับสัญญาณ ขนส่งสาร ภูมิคุ้มกันรวมถึงเป็นเอนไซม์ ในการศึกษาโปรตีนถึงระดับกรดอะมิโนหรือเปปไทด์ (peptide) ทำให้ทราบถึงคุณสมบัติและการทำหน้าที่ที่แตกต่างกันซึ่งมาจากความแตกต่างของสายเปปไทด์ เช่น ลำดับของกรดอะมิโนและความยาวของสายเปปไทด์ (181) ดังนั้นความหลากหลายของโครงสร้างและลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ในสัตว์เลื้อยคลานจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจที่สามารถบ่งชี้คุณสมบัติที่สำคัญของเปปไทด์ต้านจุลชีพ ซึ่งเป็นสารกลุ่มโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก (<10 กิโลดัลตัน) สามารถยับยั้งหรือฆ่าเชื้อ

แบคทีเรียได้และมีความสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันของสิ่งมีชีวิตมีขนาดความยาวของกรดอะมิโนตั้งแต่ 12 - 100 ตัว ประกอบด้วยหมู่กรดอะมิโนที่มีประจุบวก มีคุณสมบัติเป็น amphipatic และมีความยาวรวมทั้งโครงสร้างทุติยภูมิที่หลากหลายสามารถทำลายเชื้อก่อโรคได้อย่างรวดเร็ว และไม่มีผลข้างเคียง (182) ในการวิเคราะห์ผ่านโปรแกรม antimicrobial peptide calculator and prediction พบเปปไทด์ที่มีคุณสมบัติในการเป็น antimicrobial peptide ได้ เช่น Complement C3, Hemoglobin beta-1 และ Hemoglobin subunit beta เป็นต้น มีรายงานการวิจัยของ Srihongthong และคณะเกี่ยวกับเฮโมโกลบินในกระช้ำสายพันธุ์ไทยพบว่าเฮโมโกลบินเมื่อถูกย่อยเป็นชิ้นส่วนขนาดเล็กสามารถแสดงคุณสมบัติเป็นเปปไทด์ต้านจุลชีพ ออกฤทธิ์ทำลายเชื้อ *B. subtilis* ได้ (114) นอกจากนี้ยังพบว่าโมเลกุลของเฮโมโกลบินในสัตว์เลื้อยคลานยังทำหน้าที่เป็นด่านแรกในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย ทั้งนี้ได้มีการทดสอบยืนยันในสัตว์ทดลองแล้วว่าเฮโมโกลบินเป็นหนึ่งในโปรตีนสำคัญของระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์เลื้อยคลาน (183)

ผลจากการวิเคราะห์และสืบค้นลำดับกรดอะมิโน (peptide sequence) ของเปปไทด์ทั้ง 46 เปปไทด์ ที่พบจากการทำนายโครงสร้างพื้นฐานและคุณสมบัติของโปรตีนโดยวิธี liquid chromatography mass spectrometry จากฐานข้อมูล antimicrobial peptide calculator and predictor เพื่อค้นหาเปปไทด์ต้านจุลชีพ (potential antimicrobial peptide) พบว่ามีเปปไทด์ที่น่าสนใจและมีแนวโน้มที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งหมด 15 เปปไทด์ โดยได้มาจากพลาสมา 13 เปปไทด์ และในซีรัมพบ 2 เปปไทด์ ขนาดของเปปไทด์ส่วนใหญ่ที่ได้จากพลาสมาที่มีความยาวของกรดอะมิโนตั้งแต่ 8 - 32 ตัว และมีค่าประจุสุทธิเท่ากับ -1, -3, 0, +1 และ +2 ตามลำดับ ส่วนเปปไทด์ที่ได้จาก ซีรัมมีความยาวของกรดอะมิโนตั้งแต่ 7 - 9 ตัว มีค่าประจุสุทธิเท่ากับ -1 และ 0 ทั้งนี้พบว่า เปปไทด์ที่ได้จากพลาสมาและซีรัมมีลักษณะโครงสร้าง เป็นชนิด  $\alpha$ -helical peptides เหมือนกัน (รูปที่ 33- 34) จากคุณสมบัติเบื้องต้นของเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลชีพมีคุณสมบัติเป็นโมเลกุลไม่มีขั้ว (hydrophobicity) มีประจุเป็นบวก (cationicity) และสามารถเกิดโครงสร้างระดับทุติยภูมิแบบ  $\alpha$ -helical ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น amphipatic ได้ จากการศึกษาพบว่าเปปไทด์ที่ได้จากทั้งพลาสมาและซีรัมที่แยกได้จากตัวเงินตัวทองและมีโครงสร้างระดับทุติยภูมิแบบ  $\alpha$ -helical ทั้งหมด 15 ชนิด แต่มีเพียง 3 ชนิดที่มีประจุเป็นบวก เนื่องจากกลไกการทำงานของเปปไทด์ต้านจุลินทรีย์เริ่มจากการดึงดูดกันระหว่างขั้วบวกของเปปไทด์กับขั้วลบที่อยู่บริเวณพื้นผิวของเชื้อจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรียแกรมบวกจะมีกรดเทโคอิก (techoic acid) และแบคทีเรียแกรมลบมีกลุ่มฟอสเฟตของไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) เมื่อเปปไทด์ถูกดูดเข้ามาใกล้กับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเปปไทด์จะทำปฏิกิริยากับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียทำให้เปปไทด์สามารถยึดติดกับเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ได้ (184) พบว่าจากสารสกัดหยาดพลาสมา P1 จำนวน 2 ลำดับกรดอะมิโนและจาก P2 จำนวน 1 ลำดับกรดอะมิโน คือ NEAVKQIMTGAYAQQMVYK, NMISKLK และจาก P2 ที่มีลำดับกรดอะมิโนเป็น LVRVAHALAR ซึ่งเปปไทด์ทั้ง 3 ชนิดนี้มีความเป็นไปได้ที่จะเป็นเปปไทด์ต้านจุลชีพ จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม APD3 พบว่าเปปไทด์ที่ได้จาก P1 (NEAVKQIMTGAYAQQMVYK) มีความคล้ายในระดับ 31.81% กับ Phylloseptin-3.3 ที่ได้พบในกบ (*Phyllomedusa trinitatis*) ที่แสดง

ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา (185) ส่วนเปปไทด์ P1 (NMISKLK) มีความคล้ายในระดับ 36.36% กับ PGLa-H ของกบ แอฟริกัน (*Xenopus laevis*) สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ (186) และเปปไทด์ P2 (LVRVAHALAR) มีความคล้ายในระดับ 40% กับ Mastoparan-VT7 ของตัวต่อ (*Vespa tropica*) สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ และเชื้อราบางชนิด (187) ในขณะที่เปปไทด์ในกลุ่มที่เป็นลบอาจจะเป็นกลุ่มเปปไทด์ที่มีสมบัติเป็นประจุลบ (anionic peptides) ที่พบได้จากสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ (181) จากผลการศึกษาเปปไทด์ที่ได้มีบางส่วนที่มีความเหมือนกับเปปไทด์ที่พบในสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ โดยในการทดลองนี้พบเปปไทด์ที่มีประจุลบ 6 ชนิด ซึ่งมีจำนวนเท่ากับเปปไทด์ที่มีประจุเป็นศูนย์

นอกจากโปรตีนที่สามารถระบุชนิดและคุณสมบัติได้ดังกล่าวแล้ว ยังมีโปรตีนหลายชนิดที่ไม่สามารถวิเคราะห์ได้ในการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งอาจเกิดสาเหตุจากหลายประการ เช่น ความบริสุทธิ์ของแฟรกชันโปรตีน ประเด็นสำคัญอีกประการหนึ่งคือปัญหาในการวิเคราะห์ เนื่องจากข้อจำกัดด้านฐานข้อมูล จึงประสบปัญหาในการระบุชนิดของโปรตีน ทั้งนี้ในกลุ่มของสัตว์เลื้อยคลานโดยเฉพาะในกลุ่มที่ออกลูกเป็นไข่ที่มีระบบภูมิคุ้มกันแบบสืบทอดแต่กำเนิด ถือว่าเป็นสิ่งสำคัญในการปกป้องตัวอ่อนจากการติดเชื้อ โดยองค์ประกอบหลักของไข่ประกอบด้วยโปรตีนและเปปไทด์ต้านจุลชีพหลายชนิด จากรายงานการศึกษาพบว่าเปปไทด์ฟีโลวาเทอรินบีตาดีเฟนซินไลค์ (beta-defensin-like peptide pelovaterin) ที่แสดงออกในเปลือกไข่ของตะพาบไต้หวัน (chinese soft-shelled turtle) นอกจากจะมีส่วนสำคัญในการสร้างของเปลือกไข่ด้วยแล้วยังมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้ด้วย (188) และในการศึกษาวิจัยนี้พบว่าในส่วนสกัดจากปลาสม (P2) มีโปรตีน Ovocleidin-116 ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างให้กับเซลล์และเนื้อเยื่อ ซึ่งอยู่ในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเปลือกไข่เหมือนกันกับเปปไทด์เกลลิน (gallin) ที่พบในไข่ของสัตว์ปีก (189-193) โปรตีนชนิดนี้จึงเป็นโปรตีนที่น่าสนใจสำหรับพัฒนาเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหรือเปปไทด์ต้านจุลชีพ ยังมีการวิจัยเกี่ยวกับสารต่อต้านเชื้อจุลชีพจากเลือดมังกรโคโมโด โดยนักวิจัยจาก George Mason University ได้ค้นพบสารประกอบตัวใหม่ ชื่อว่า DRGN-1 ซึ่งเป็นชิ้นส่วนของโปรตีนฮีสโตน (H1 หรือ H2B) สามารถต่อต้านเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในเลือดของมังกรโคโมโดซึ่งเป็นสัตว์เลื้อยคลานที่ใกล้เคียงกับจระเข้มากที่สุด พบว่าสามารถกระตุ้นให้เซลล์ร่างกายของสัตว์ทดลองให้แผลหายได้เร็วขึ้น โปรตีนฮีสโตนนั้นสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตทั่วไป จากการศึกษาพบว่าโปรตีนฮีสโตนมีโครงสร้างทางด้านปลาย N-terminal เป็นกรดอะมิโนชนิดซีรีนและโพรลีน (serine - proline) **SPKKT KPVKPKKVA** โปรตีนจะไม่แสดงคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อจุลชีพได้ แต่ถ้านำมาทำการสังเคราะห์ใหม่โดยปรับเปลี่ยนกรดอะมิโนบางตัวที่ปลาย N-terminal ให้เป็นโพรลีนและซีรีน (proline -serine) **PSKKT KPVKPKKVA** พบว่าโปรตีนฮีสโตนจะแสดงคุณสมบัติทำลายเชื้อจุลชีพได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยที่บ่งชี้ว่าลำดับของกรดอะมิโนไม่ใช่ปัจจัยสำคัญเพียงอย่างเดียวที่ใช้บ่งบอกฤทธิ์ทางชีวภาพ ในหลายกรณีที่กรดอะมิโนในธรรมชาติถูกแทนที่แล้วสามารถเพิ่มฤทธิ์ในการต้านจุลชีพได้ (194) ปัจจุบันการประยุกต์ใช้เปปไทด์ต้านจุลชีพมาใช้ในการรักษาโรคนั้นส่วนใหญ่เป็นเปปไทด์ที่ได้จากการสังเคราะห์และปรับปรุงคุณสมบัติบางประการ ซึ่งเป็นข้อจำกัดที่มีในเปปไทด์ตามธรรมชาติ เช่น การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนของสายเปปไทด์จากรูป L (L-form) เป็นรูป D (D-form) เนื่องจากกรดอะมิ

โนในรูป L-form จะไม่เสถียร ทำให้ถูกย่อยได้โดยเอนไซม์ชนิดต่างๆ เป็นต้น ดังนั้นจึงมีการพัฒนาปรับปรุงหรือเปลี่ยนแปลงภายในโมเลกุลของเปปไทด์เพื่อเพิ่มความเสถียรให้กับโมเลกุลของเปปไทด์ ได้แก่ การเติมกรดอะมิโนที่ไม่มีในธรรมชาติ (introducing non-natural amino acids) การป้องกันปลายสายเปปไทด์ (terminal protection) การทำให้เกิดโครงสร้างแบบไซคลิก (cyclization) และการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างแกนกลาง (backbone modification) (195) ซึ่งวิธีการปรับปรุงคุณสมบัติทางเคมีนี้จะเพิ่มคุณสมบัติทางยาของเปปไทด์ให้ดีขึ้น ด้วยผลการศึกษาวิจัยนี้ที่พบ Histone H 3.2 ที่น่าสนใจนำมาพัฒนาให้เป็นเปปไทด์ต้านจุลชีพได้ (10) อีกทั้งโปรตีนทั้ง 3 ชนิดที่มีการรายงานถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในสัตว์เลื้อยคลานชนิดอื่นมาแล้ว แต่ยังไม่มีการศึกษาในตัวเงินตัวทอง จากรายงานล่าสุดที่ค้นพบเปปไทด์ต้านจุลชีพชนิดใหม่จากมังกรโคมาโด ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ (196) โดยนักวิจัยได้ทำการสังเคราะห์เปปไทด์ชนิดใหม่ขึ้นมาโดยใช้โปรตีน Histone เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ ทำให้ผลการวิเคราะห์เปปไทด์ที่มีคุณสมบัติต้านจุลชีพจากองค์ประกอบของเลือดตัวเงินตัวทอง ซึ่งเป็นสัตว์เลื้อยคลานอยู่ในวงศ์ *Varanidae* เดียวกับมังกรโคมาโดนั้นเป็นที่น่าสนใจ เปปไทด์ที่ได้จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จะสามารถนำมาพัฒนาหรือทำการศึกษาเชิงลึกต่อไปได้ในอนาคต

## 5.2 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้จัดทำขึ้นเพื่อศึกษาค้นคว้าสารต้านจุลชีพทางเลือกชนิดใหม่เพื่อช่วยแก้ปัญหาโรคติดเชื้อและดื้อต่อยาของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค จึงได้ทำการค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยมุ่งเน้นการค้นหาไปที่กลุ่มของสัตว์เลื้อยคลาน โดยตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้คือ องค์ประกอบของเลือดจากตัวเงินตัวทอง ที่ได้รับความอนุเคราะห์มาจากสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาสน จังหวัดราชบุรี โดยพบว่าเบื้องต้นทั้งสารสกัดหยาบพลาสมาและสารสกัดหยาบซีรัมสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้และเมื่อนำพลาสมาและซีรัมของตัวเงินตัวทองมาสกัดแยกด้วยวิธี ion exchange chromatography โดยใช้คอลัมน์ Q-sepharose ทำให้ได้โปรตีนแฟรกชันทั้งหมด 5 เฟคเท่ากันทั้งในพลาสมาและซีรัม (P1-P5) และ (S1-S5) โดยมีขนาดโมเลกุลอยู่ระหว่าง 15-116 กิโลดัลตัน โดยพบแถบโปรตีนที่เข้มและกว้างที่สุดที่น้ำหนักโมเลกุล 67 กิโลดัลตันและผลจากการทำนายโครงสร้างพื้นฐานและคุณสมบัติของโปรตีนโดยวิธี liquid chromatography mass spectrometry สามารถจำแนกเปปไทด์ได้ทั้งหมด 46 ชนิด ทั้งจากพลาสมาและซีรัมและสามารถระบุชนิดโปรตีนได้ 33 ชนิด โดยเปปไทด์ที่ได้จากการศึกษาวิจัย ในครั้งนี้ทั้งในพลาสมาและซีรัมส่วนใหญ่พบว่าเหมือนเปปไทด์ที่พบในกลุ่มของสัตว์เลื้อยคลาน สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำและมีเปปไทด์บางชนิดที่พบในสัตว์ปีก เช่น ไก่ เปปไทด์ที่ได้จากทั้งซีรัมและพลาสมามีขนาดของน้ำหนักโมเลกุลและค่า isoelectric point ใกล้เคียงกัน

ผลจากการวิเคราะห์และสืบค้นลำดับกรดอะมิโน (peptide sequence) ของเปปไทด์ทั้ง 46 เปปไทด์ พบว่ามีเปปไทด์ที่น่าสนใจและมีแนวโน้มที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งหมด 15 เปปไทด์ โดยได้มาจากพลาสมา 13 เปปไทด์ และในซีรัมพบ 2 เปปไทด์ ทั้งนี้พบว่าเปปไทด์ที่ได้จากพลาสมาและซีรัมมีลักษณะโครงสร้าง เป็นชนิด  $\alpha$ -helical peptides มีเพียง 3 ชนิดจากทั้งหมด 15 ชนิด โดยพบจากส่วนที่สกัดจากพลาสมา 1 (P1) มีลำดับกรดอะมิโน เป็น NEAVKQIMTGVAQQMVYK และ NMISKLK และ P2 ที่มีลำดับกรดอะมิโนเป็น LVRVVAHALAR ตามลำดับ ซึ่งเปปไทด์ทั้ง 3 ชนิดนี้มีความเป็นไปได้ที่จะเป็นเปปไทด์ต้านจุลชีพได้

### 5.3 ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาพบว่าปัจจัยที่มีผลในการแสดงความสามารถของเปปไทด์นั้นมีหลายประการ เช่น ลำดับของกรดอะมิโน ประจุ ทั้งชนิด hydrophilic และ hydrophobic ของเปปไทด์ และรูปแบบการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนในสายเปปไทด์ นอกจากลักษณะทางโครงสร้างแล้วยังต้องมีคุณสมบัติอื่นๆ เช่น โมเลกุลขนาดเล็กประกอบด้วยกรดอะมิโนตั้งแต่ 10 – 100 กรดอะมิโน โดยกลไกการทำงานของเปปไทด์ต้านจุลินทรีย์เริ่มจากการดึงดูดกันระหว่าง ขั้วบวกของเปปไทด์กับขั้วลบที่อยู่ในบริเวณพื้นผิวของเชื้อจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรียแกรมบวกจะมีกรดเทโคอิกและแบคทีเรียแกรมลบมีกลุ่มฟอสเฟตของไลโปโพลีแซคคาไรด์ จากข้อมูลของลำดับกรดอะมิโนของตัวเงินตัวทองที่ได้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้จะเป็นพื้นฐานที่สำคัญในการศึกษาหรือพัฒนาต่อยอดให้เป็นสารทดแทนยาปฏิชีวนะ ซึ่งข้อมูลดังกล่าวมีประโยชน์อย่างยิ่งในการปรับปรุงโครงสร้างของเปปไทด์ที่สนใจโดยมุ่งเน้นที่คุณสมบัติต้านจุลชีพ สามารถแทรกผ่านเซลล์ โดยพัฒนาเป็นระบบนำส่งยาอีกรูปแบบหนึ่งได้ทั้งนี้ในการแยกเปปไทด์ให้มีความบริสุทธิ์นั้นต้องผ่านกระบวนการหลายขั้นตอน อีกทั้งปริมาณที่แยกได้มีเพียงเล็กน้อย ดังนั้นการสังเคราะห์สายเปปไทด์โดยวิธีทางเคมีเพื่อนำมาพัฒนาเป็นสารต้านจุลชีพโดยอาศัยข้อมูลของลำดับกรดอะมิโนที่ค้นพบในครั้งนี้เป็นแนวทาง

## บรรณานุกรม

1. Rammelkamp CH, Maxon T. Resistance of *Staphylococcus aureus* to the action of penicillin. Proc Royal Soc Exper Biol Med. 1942(51):386-9.
2. Livermore DM. Has the era of untreatable infections arrived. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2009;64 Suppl 1:i29-36.
3. Ponkham P, Daduang S, Kitimasak W, Krittanai C, Chokchaichamnankit D, Srisomsap C, et al. Complete amino acid sequence of three reptile lysozymes. Comparative biochemistry and physiology Toxicology pharmacology : CBP. 2010;151(1):75-83.
4. สมปอง คล้ายหนองสรวง. เปปไทด์ต้านจุลชีพ. กรุงเทพฯ ฯ บริษัทอมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชซิ่ง จำกัด (มหาชน): ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2558.
5. Pianka ERK, Dennis; King, Ruth Allen Varanoid Lizards of the World. Indiana University Press2004.
6. Montgomery JM, Gillespie D, Sastrawan P, Fredeking TM, Stewart GL. Aerobic salivary bacteria in wild and captive Komodo dragons. J Wildl Dis. 2002;38(3):545-51.
7. Swingland I, Affenberg W. The behavioral ecology of the Komodo monitor. The Journal of Animal Ecology. 1982;51:1017.
8. Bull JJ, Jessop TS, Whiteley M. Deathly drool: evolutionary and ecological basis of septic bacteria in Komodo dragon mouths. PloS one. 2010;5(6):e11097.
9. Bull JJ, Jessop TS, Whiteley M. Deathly drool: evolutionary and ecological basis of septic bacteria in Komodo dragon mouths. PloS one. 2010;5(6):e11097.
10. Ezra MC, Chung SN, Dean CN, Propst BM, Monique L. van Hoek. Komodo dragon-inspired synthetic peptide DRGN-1 promotes wound-healing of a mixed-biofilm infected wound. Biofilms and Microbiomes. 2017:3-9.
11. Mark Merchant DH, RF, BM, JB. Characterization of serum complement activity in serum of the Komodo dragon (*Varanus komodoensis*) Advances in Biological Chemistry. 2012;2: 353-9
12. สุวิทย์ วิบุลผลประเสริฐ, วิชัย โชควิวัฒน์, ศรีเพ็ญ ตันติเวสส. ระบบยาของประเทศไทย. นนทบุรี: สำนักงานพัฒนานโยบายสุขภาพระหว่างประเทศ, 2545.
13. เอกสารประกอบการประชุมคณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ ครั้งที่ 1/2556.. ทำเนียบรัฐบาล, 2556.
14. Chanda S, Baravalia Y, Kaneria M, Rakholiya K. Fruit and vegetable peels-strong natural source of antimicrobics.2010.

15. Lee C. Therapeutic challenges in the era of antibiotic resistance. *International journal of antimicrobial agents*. 2008;32 Suppl 4:S197-9.
16. Otto M. MRSA virulence and spread. *Cell Microbiol*. 2012;14(10):1513-21.
17. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerging infectious diseases*. 2011;17(10):1791-8.
18. Kanoksil M, Jatapai A, Peacock SJ, Limmathurotsakul D. Epidemiology, microbiology and mortality associated with community-acquired bacteremia in northeast Thailand: a multicenter surveillance study. *PloS one*. 2013;8(1):54714.
19. World Health Organization. Regional strategy on prevention and containment of Antimicrobial resistance 2010-2015. Retrieved January 1, 2011, 2010. Available from: from [http://www.searo.who.int/LinkFiles/BCT\\_hlm-407.pdf](http://www.searo.who.int/LinkFiles/BCT_hlm-407.pdf).
20. วิษณุ ธรรมลิขิตกุล. รายงานสถานการณ์การดื้อยาต้านจุลชีพของแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญของโรงพยาบาลในประเทศไทย พ.ศ.2554-2555 2555.
21. Regional strategy on prevention and containment of Antimicrobial resistance 2010-2015 [Internet]. 2010. Available from: from [http://www.searo.who.int/LinkFiles/BCT\\_hlm-407.pdf](http://www.searo.who.int/LinkFiles/BCT_hlm-407.pdf).
22. Hanberger H, Walther S, Leone M, Barie PS, Rello J, Lipman J, et al. Increased mortality associated with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection in the intensive care unit: results from the EPIC II study. *International journal of antimicrobial agents*. 2011;38(4):331-5.
23. Eagye KJ, Kuti JL, Nicolau DP. Risk factors and outcomes associated with isolation of meropenem high-level-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2009;30(8):746-52.
24. Fillice GA, Nyman, J. A., Lexau, C., Lee, C. H., Bockstedt, L. A., Como-Sabetti, K., et al. Excess cost and utilization associated with methicillin resistance for patients with *Staphylococcus aureus* infection. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2010(31):365-73.
25. Salgado C, Gonçalves JC, Souza CMD, Silva NBD, Sánchez TEG, Oliveira GD, et al. Cost of antimicrobial treatment of patients infected with multidrug resistant organisms in the intensive care unit. *Medicina (B Aires)*. 2011;71(6):531-5.
26. Maharat Nakhonratchasima hospital. Microbiology Report: Antibiotic Resistance Profile and Prevalence of Isolated Organisms. Nakhon Ratchasima, Thailand. ,Maharat Nakhon Ratchasima hospital, Pathology DoC; 2012.
27. ภาณุมาศ ภูมาศ, ดวงรัตน์โพธิ์, วิษณุ ธรรมลิขิตกุล, อาธร ธีวไพบูลย์, ภูษิต ประคองสาย, สุพล ลิ้มวัฒนานนท์. ผลกระทบด้านสุขภาพและเศรษฐศาสตร์จากการติดเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพในประเทศไทย: การศึกษาเบื้องต้น. *วารสารวิจัยระบบสาธารณสุข*. 2555; 6(3):352-60.



28. ภาณุมาศ ภูมาศ, วิษณุ ธรรมลิขิตกุล, ภูษิต ประคองสาย, ตวงรัตน์ โโพระ, อาหาร ธีวไพบูลย์, สพล ลิ้มวัฒนานนท์. Antimicrobial Resistance 2000-2019. 2019.
29. Lee NY, Lee HC, Ko NY, Chang CM, Shih HI, Wu CJ, et al. Clinical and economic impact of multidrug resistance in nosocomial *Acinetobacter baumannii* bacteremia. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2007;28(6):713-9.
30. Tassios PT, Gennimata V, Spaliara-Kalogeropoulou L, Kairis D, Koutsia C, Vatopoulos AC, et al. Multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* serogroup O:11 outbreak in an intensive care unit. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 1997;3(6):621-8.
31. Bergogne-Berezin E, Towner KJ. *Acinetobacter spp.* as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clinical microbiology reviews*. 1996;9(2):148-65.
32. Rosenthal SL. Sources of *pseudomonas* and *acinetobacter* species found in human culture materials. *Am J Clin Pathol*. 1974;62(6):807-11.
33. Crombach WH, Dijkshoorn L, van Noort-Klaassen M, Niessen J, van Knippenberg-Gordebeke G. Control of an epidemic spread of a multi-resistant strain of *Acinetobacter calcoaceticus* in a hospital. *Intensive care medicine*. 1989;15(3):166-70.
34. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clinical microbiology reviews*. 2008;21(3):538-82.
35. Saelao S UA. Therapy for patients with multidrugresistant *Acinetobacter Baumannii*. *J Health Res*. 2008;22(3) 131-6.
36. Jamulitrat S, Thongpiyapoom S, Suwalak N. An outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* at Songklanagarind Hospital: the risk factors and patient prognosis. *Journal of the Medical Association of Thailand Chotmaihet thangphaet*. 2007;90(10):2181-91.
37. Chaiwarith R, Mahatthanaphak S, Boonchoo M, Supparatpinyo K, Sirisanthana T. Pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* at Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital *J Infect Dis Antimicrob Agents*. 2005;22:1-8.
38. Munoz-Price LS, Weinstein RA. *Acinetobacter* infection. *N Engl J Med*. 2008;358(12):1271-81.
39. Saelao S, Utiswannakul A. Therapy for patients with multidrugresistant *Acinetobacter Baumannii*. *Health Res* 2008; 22(3):131-6.
40. Chaladchalam S, Diraphat P, Utrarachkij F, Suthienkul O, Samakoses R, Siripanichgon K. Bed rails and endotracheal tube connectors as possible sources

- for spreading *Acinetobacter baumannii* in ventilator-associated pneumonia patients. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2008;39(4):676-85.
41. Afzal-Shah M, Livermore DM. Worldwide emergence of carbapenem-resistant *Acinetobacter spp.* The Journal of antimicrobial chemotherapy. 1998;41(5):576-7.
  42. Koomanachai P, Tiengrim S, Kiratisin P, Thamlikitkul V. Efficacy and safety of colistin (colistimethate sodium) for therapy of infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in Siriraj Hospital, Bangkok, Thailand. Int J Infect Dis. 2007;11(5):402-6.
  43. MICROBIOLOGIA A. *ACINETOBACTER SPP* (online) 2018. Available from: <http://www.luciacangussu.bio.br/atlas/acinetobacter-spp> (2020 May 21).
  44. Livermore DM. Antibiotic resistance in staphylococci. International journal of antimicrobial agents. 2000;16 Suppl 1:S3-10.
  45. Roder BL, Wandall DA, Frimodt-Moller N, Espersen F, Skinhoj P, Rosdahl VT. Clinical features of *Staphylococcus aureus* endocarditis: a 10-year experience in Denmark. Arch Intern Med. 1999;159(5):462-9.
  46. Brewer JD, Hundley MD, Meves A, Hargreaves J, McEvoy MT, Pittelkow MR. Staphylococcal scalded skin syndrome and toxic shock syndrome after tooth extraction. J Am Acad Dermatol. 2008;59(2):342-6.
  47. Iwatsuki K, Yamasaki O, Morizane S, Oono T. Staphylococcal cutaneous infections: invasion, evasion and aggression. J Dermatol Sci. 2006;42(3):203-14.
  48. Brown DF, Edwards DI, Hawkey PM, Morrison D, Ridgway GL, Towner KJ, et al. Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2005;56(6):1000-18.
  49. Millar BC, Loughrey A, Elborn JS, Moore JE. Proposed definitions of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). The Journal of hospital infection. 2007;67(2):109-13.
  50. นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรคพิษฝีครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร โนเบิ้ลพรีน; 2554.
  51. Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, Daum RS, Fridkin SK, Gorwitz RJ, et al. Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults

- and children: executive summary. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2011;52(3):285-92.
52. Gould FK, Brindle R, Chadwick PR, Fraise AP, Hill S, Nathwani D, et al. Guidelines (2008) for the prophylaxis and treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections in the United Kingdom. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2009;63(5):849-61.
  53. Darley ES, MacGowan AP. Antibiotic treatment of gram-positive bone and joint infections. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2004;53(6):928-35.
  54. Nailor MD, Sobel JD. Antibiotics for gram-positive bacterial infections: vancomycin, teicoplanin, quinupristin/dalfopristin, oxazolidinones, daptomycin, dalbavancin, and telavancin. *Infect Dis Clin North Am*. 2009;23(4):965-82, ix.
  55. Cruciani M, Gatti G, Lazzarini L, Furlan G, Broccali G, Malena M, et al. Penetration of vancomycin into human lung tissue. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 1996;38(5):865-9.
  56. Jason C. Baker. Microbiology (online) Department of Biology: Missouri Western State University; 2019. Available from: <http://academic.missouriwestern.edu/jcbaker/bio251sec01/DSC00441.JPG> (2020 May 21).
  57. Department of Bacteriology. MICROBIOLOGIA (online) 2020. Available from: <http://www.bact.wisc.edu/microtextbook/bacterialstructure/Introduction.html> (2020 May 21).
  58. Gupta K, Hooton TM, Naber KG, Wullt B, Colgan R, Miller LG, et al. International clinical practice guidelines for the treatment of acute uncomplicated cystitis and pyelonephritis in women: A 2010 update by the Infectious Diseases Society of America and the European Society for Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2011;52(5):e103-20.
  59. Warren JW, Abrutyn E, Hebel JR, Johnson JR, Schaeffer AJ, Stamm WE. Guidelines for antimicrobial treatment of uncomplicated acute bacterial cystitis and acute pyelonephritis in women. *Infectious Diseases Society of America (IDSA). Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 1999;29(4):745-58.
  60. Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep*. 2013;5(1):58-65.
  61. Hansen DS, Schumacher H, Hansen F, Stegger M, Hertz FB, Schonning K, et al.

- Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) in Danish clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: prevalence, beta-lactamase distribution, phylogroups, and co-resistance. *Scand J Infect Dis*. 2012;44(3):174-81.
62. Rogers BA, Sidjabat HE, Paterson DL. *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2011;66(1):1-14.
  63. Ito CA, Gales AC, Tognim MC, Munerato P, Dalla Costa LM. Quinolone-resistant *Escherichia coli*. *Braz J Infect Dis*. 2008;12(1):5-9.
  64. Johnson L, Sabel A, Burman WJ, Everhart RM, Rome M, MacKenzie TD, et al. Emergence of fluoroquinolone resistance in outpatient urinary *Escherichia coli* isolates. *Am J Med*. 2008;121(10):876-84.
  65. Karlowsky JA, Hoban DJ, Decorby MR, Laing NM, Zhanel GG. Fluoroquinolone-resistant urinary isolates of *Escherichia coli* from outpatients are frequently multidrug resistant: results from the North American Urinary Tract Infection Collaborative Alliance-Quinolone Resistance study. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(6):2251-4.
  66. Tielker D, Hacker S, Loris R, Strathmann M, Wingender J, Wilhelm S, et al. *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. *Microbiology*. 2005;151(Pt 5):1313-23.
  67. Rello J, Diaz E. Pneumonia in the intensive care unit. *Crit Care Med*. 2003;31(10):2544-51.
  68. ภัทรชัย กীরติสิน. ตำราวิทยาแบคทีเรียการแพทย์. กรุงเทพฯ: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล, มหาวิทยาลัยมหิดล; 2549.
  69. Holt JG, Krieg NR, Sneath P. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. edition t, editor. Maryland: Williams & Wilkins; 1994.
  70. Dunne WM Jr. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately. *Clinical microbiology reviews*. 2002;15(2):155-66.
  71. Zavascki AP, Carvalhaes CG, Picao RC, Gales AC. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. *Expert review of anti-infective therapy*. 2010;8(1):71-93.
  72. Schweizer HP. Triclosan: a widely used biocide and its link to antibiotics. *FEMS microbiology letters*. 2001;202(1):1-7.
  73. Zhang L, Li X, Poole K. SmeDEF multidrug efflux pump contributes to intrinsic multidrug resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents*

- Chemother. 2001;45(12):3497-503.
74. Gold HS, Moellering RCJ. Antibiotic resistance: lessons for the future. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 1998;27 Suppl 1:S135-40; discussion S41-2.
  75. News medical life sciences. medical information service (online) 2016. Available from: <https://www.news-medical.net/whitepaper/20150526> (2020 May 21).
  76. Carlet J, Collignon P, Goldmann D, Goossens H, Gyssens IC, Harbarth S, et al. Society's failure to protect a precious resource: antibiotics. *Lancet*. 2011;378(9788):369-71.
  77. Carlet J, Jarlier V, Harbarth S, Voss A, Goossens H, Pittet D, et al. Ready for a world without antibiotics? The Pensieres Antibiotic Resistance Call to Action. *Antimicrobial resistance and infection control*. 2012;1(1):11.
  78. O'Neill J. Review on antimicrobial resistance. *Antimicrobial resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations* 2014. 2014.
  79. อัญชลี จิตรภักดิ์. รายงานสถานการณ์ระบบยาประจำปี 2553: สถานการณ์เชื้อดื้อยาและการใช้ยาปฏิชีวนะ. กรุงเทพฯ: อุษาการพิมพ์; 2554.
  80. รัตนา พันธุ์พานิช, เพ็ญประภา ศิริโรจน์, ภัท แสนไชยสุรยา, สมพนธ์ ทศนิยม, ยุพิน อังสุโรจน์, วิภาดา พลภูมิภักดิ์. อัตราการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อรักษาโรคติดเชื้อทางเดินหายใจส่วนบนในระบบประกันสุขภาพของประเทศไทย. *วารสารวิชาการสาธารณสุข*. 2546;12(4):522-9.
  81. นิธิมา สุ่มประดิษฐ์, ศิริตรี สุทธิจิตต์, สีดานันท์ พูลผลทรัพย์, รุ่งทิพย์ ขวนชื่น, ภูษิต ประคองสาย. ภูมิทัศน์ของสถานการณ์และการจัดการการดื้อยาต้านจุลชีพในประเทศไทย. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์อักษรกราฟิกแอนด์ดีไซน์; 2558.
  82. Xu YW CQ, Zhao D, Wu W.,. Monoterpene composition of flower and bract from *Houttuynia cordata*. *Sichuan Agricultural University*. 2011;5:3883-6. .
  83. กิจ สุนทร และ พรทิพย์ คุณวิวัฒนาการ. ศักยภาพของสมุนไพรในอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์มูมมอการใช้สมุนไพร. เอกสารประกอบการประชุมวิชาการสมุนไพรโอกาสและทางเลือกใหม่ของอุตสาหกรรมผลิตสัตว์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร. 2545:6-8.
  84. Quave CL, Plano LR, Pantuso T, Bennett BC. Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of ethnopharmacology*. 2008;118(3):418-28.
  85. วันดี กฤษณพันธ์. สมุนไพรน้ำรั้ว (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2541.86. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-

- resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2012;18(3):268-81.
87. Cos P, Vlietinck AJ, Berghe DV, Maes L. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *Journal of ethnopharmacology*. 2006;106(3):290-302.
  88. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*. 1999;12(4):564-82.
  89. Abreu AC, McBain AJ, Simoes M. Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. *Natural product reports*. 2012;29(9):1007-21.
  90. Darwish RM, Aburjai T, Al-Khalil S, Mahafzah A. Screening of antibiotic resistant inhibitors from local plant materials against two different strains of *Staphylococcus aureus*. *Journal of ethnopharmacology*. 2002;79(3):359-64.
  91. Kenny CR, Furey A, Lucey B. A post-antibiotic era looms: can plant natural product research fill the void? *British journal of biomedical science*. 2015;72(4):191-200.
  92. Wang JC, Neogi P, Forciniti D. On one-dimensional self-assembly of surfactant-coated nanoparticles. *J Chem Phys*. 2006;125(19):194717.
  93. Das J, Paul Das M, Velusamy P. *Sesbania grandiflora* leaf extract mediated green synthesis of antibacterial silver nanoparticles against selected human pathogens. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2013;104:265-70.
  94. Singh M, Kumar M, Kalaivani R, Manikandan S, Kumaraguru AK. Metallic silver nanoparticle: a therapeutic agent in combination with antifungal drug against human fungal pathogen. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2013;36(4):407-15.
  95. Gan PP, Li SFY. Potential of plant as a biological factory to synthesize gold and silver nanoparticles and their applications. *Environmental Science and Biotechnology*. 2012(11(2)): 169-206.
  96. Merchant ME, Roche C, Elsey RM, Prudhomme J. Antibacterial properties of serum from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Comparative biochemistry and physiology Part B, Biochemistry & molecular biology*. 2003;136(3):505-13.
  97. Bechinger B, Zasloff M, Opella SJ. Structure and orientation of the antibiotic peptide magainin in membranes by solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Protein Sci*. 1993;2(12):2077-84.
  98. Matsuzaki K. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-

- defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1462(1-2):1-10.
99. Ernst CH, Lovich J. *Turtles of the United States and Canada*. Baltimore, MD,USA: Johns Hopkins University Press; 2009.
  100. Prajanban BO, Shawsuan L, Daduang S, Kommanee J, Roytrakul S, Dhiravisit A, et al. Identification of five reptile egg whites protein using MALDI-TOF mass spectrometry and LC/MS-MS analysis. *Journal of proteomics*. 2012;75(6):1940-59.
  101. Hao J, Li YW, Xie MQ, Li AX. Molecular cloning, recombinant expression and antibacterial activity analysis of hepcidin from *Siamese crocodile* (*Crocodylus siamensis*). *Comparative biochemistry and physiology Part B, Biochemistry molecular biology*. 2012;163(3-4):309-15.
  102. Maroti G, Kereszt A, Kondorosi E, Mergaert P. Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals. *Research in microbiology*. 2011;162(4):363-74.
  103. Merchant M, Thibodeaux D, Loubser K, Elsey RM. Amoebacidal effects of serum from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *The Journal of parasitology*. 2004;90(6):1480-3.
  104. Merchant ME, Pallansch M, Paulman RL, Wells JB, Nalca A, Ptak R. Antiviral activity of serum from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Antiviral research*. 2005;66(1):35-8.
  105. Merchant ME, Leger N, Jerkins E, Mills K, Pallansch MB, Paulman RL, et al. Broad spectrum antimicrobial activity of leukocyte extracts from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Vet Immunol Immunopathol*. 2006;110(3-4):221-8.
  106. Leelawongtawon R, Siruntawineti J, Chaeychomsri W, Sattaponpan C. Antibacterial and antifungal activities from *Siamese crocodile* blood. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet*. 2010;93 Suppl 7:S58-64.
  107. Preecharram S, Daduang S, Bunyatratthata W, Araki T, Thammasirak S. Antibacterial activity from *Siamese crocodile* (*Crocodylus siamensis*) serum. *African Journal of Biotechnology*. 2008;7:3121-8.
  108. Thammasirak S, Ponkham P, Preecharram S, Khanchanuan R, Phonyothee P, Daduang S, et al. Purification, characterization and comparison of reptile lysozymes. *Comparative biochemistry and physiology Toxicology & pharmacology : CBP*. 2006;143(2):209-17.
  109. Pata S, Yarksa N, Daduang S, Tamsiripong Y, Svasti J, Araki T, et al. Characterization of the novel antibacterial peptide Leucrocin from crocodile

- (*Crocodylus siamensis*) white blood cell extracts. Developmental and comparative immunology. 2011;35(5):545-53.
110. Chrerie R. CK, Young B. and M.E. Merchant. Antibiotic properties and complement activity of serum in the american alligator (*Alligator Mississippiensis*). 2002.
  111. Fersht A. Structure and mechanism in protein science : a guide to enzyme catalysis and protein folding. New York: Freeman and Company; 1999.
  112. Hoffman B KB, Ofer B, Kiryat T. Reptilian-derived peptides for the treatment of microbial infections. In: United States Patent (USA). 2002;6:340-667.
  113. Chrerie R, Cabello K, Young B, Merchant ME. Antibiotic properties and complement activity of serum in the american alligator (*Alligator Mississippiensis*). LA: Department of Chemistry, McNeese State University; 2002.
  114. Srihongthong S, Pakdeesuwan A, Daduang S, Araki T, Dhiravisit A, Thammavirak S. Complete amino acid sequence of globin chains and biological activity of fragmented crocodile hemoglobin (*Crocodylus siamensis*). Protein J. 2012;31(6):466-76.
  115. Butler AR, Khan S, Ferguson E. A brief history of malaria chemotherapy. The journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh. 2010;40(2):172-7.
  116. Garcia JR, Jaumann F, Schulz S, Krause A, Rodriguez-Jimenez J, Forssmann U, et al. Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction. Cell Tissue Res. 2001;306(2):257-64.
  117. Segurado AA, di Santi SM, Shiroma M. In vivo and in vitro *Plasmodium falciparum* resistance to chloroquine, amodiaquine and quinine in the Brazilian Amazon. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo. 1997;39(2):85-90.
  118. Petersen I, Eastman R, Lanzer M. Drug-resistant malaria: molecular mechanisms and implications for public health. FEBS letters. 2011;585(11):1551-62.
  119. Wellems TE, Plowe CV. Chloroquine-resistant malaria. The Journal of infectious diseases. 2001;184(6):770-6.
  120. Wang G, Li X, Wang Z. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. Nucleic Acids Res. 2009;37(Database issue):D933-7.
  121. Talisuna AO, Bloland P, D'Alessandro U. History, dynamics, and public health importance of malaria parasite resistance. Clinical microbiology reviews. 2004;17(1):235-54.



122. Packard RM. The origins of antimalarial-drug resistance. *The New England journal of medicine*. 2014;371(5):397-9.
123. Dalla Valle L BF, Maistro S, Quinzani S, Alibardi L. Bioinformatic and molecular characterization of beta-defensins-like peptides isolated from the green lizard *Anolis carolinensis*. *Dev Comp Immunol*. 2012;36:222-9.
124. Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. Hecpudin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(11):7806-10.
125. Rodriguez R, Jung CL, Gabayan V, Deng JC, Ganz T, Nemeth E, et al. Hecpudin induction by pathogens and pathogen-derived molecules is strongly dependent on interleukin-6. *Infection and immunity*. 2014;82(2):745-52.
126. Hilton KB, Lambert LA. Molecular evolution and characterization of hecpudin gene products in vertebrates. *Gene*. 2008;415(1-2):40-8.
127. Krause A, Sillard R, Kleemeier B, Kluver E, Maronde E, Conejo-Garcia JR, et al. Isolation and biochemical characterization of LEAP-2, a novel blood peptide expressed in the liver. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 2003;12(1):143-52.
128. Sang Y, Ramanathan B, Minton JE, Ross CR, Blecha F. Porcine liver-expressed antimicrobial peptides, hecpudin and LEAP-2: cloning and induction by bacterial infection. *Developmental and comparative immunology*. 2006;30(4):357-66.
129. Hocquellet A, Odaert B, Cabanne C, Noubhani A, Deryck W, Joucla G, et al. Structure-activity relationship of human liver-expressed antimicrobial peptide 2. *Peptides*. 2010;31(1):58-66.
130. Henriques ST, Tan CC, Craik DJ, Clark RJ. Structural and functional analysis of human liver-expressed antimicrobial peptide 2. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*. 2010;11(15):2148-57.
131. Mayeaux MH, Winston GW. Antibiotic effects on cytochromes P450 content and mixed-function oxygenase (MFO) activities in the American alligator, *Alligator mississippiensis*. *J Vet Pharmacol Ther*. 1998;21(4):274-81.
132. Zaiou M. Multifunctional antimicrobial peptides: therapeutic targets in several human diseases. *J Mol Med (Berl)*. 2007;85(4):317-29.
133. Jenssen H, Hamill P, Hancock RE. Peptide antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*. 2006;19(3):491-511.
134. Mangoni ML. Host-defense peptides: from biology to therapeutic strategies. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68(13):2157-9.
135. สมปอง คล้ายหนองสรวง. เปปไทด์ต้านจุลชีพในสัตว์เลื้อยคลาน. ขอนแก่น: ภาควิชาเคมี คณะ

- วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2558.
136. Clatworthy AE, Pierson E, Hung DT. Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nature chemical biology*. 2007;3(9):541-8.
  137. André Koch MA, Andreas Schmitz,, Böhme UKW. Morphological Studies on the Systematics of South East Asian Water Monitors (*Varanus salvator* Complex): Nominotypic Populations and Taxonomic Overview. 2007:109-80.
  138. Weijola VS-Å. Geographic distribution and habitat use of monitor lizards of the North Moluccas. *Biawak* 2010;4(1):7-23.
  139. Gaulke M, Horn H. *Varanus salvator* (Nominate Form)In: Pianka, E.R. and King, D.R. (eds), *Varanoid lizards of the world*. Bloomington, USA.: Indiana University Press; 2004.
  140. Wood G. *The Guinness Book of Animal Facts and Feats*. Enfield, Middlesex : Guinness Superlatives, 19821983. 252 p.
  141. Silva A. Current status of the reptiles of Sri Lanka. In: Bambaradeniya CNB, editor. *The fauna of Sri Lanka: status of taxonomy, research and conservation*,Colombo: The World Conservation Union Sri Lanka & Government of Sri Lanka. In: (ARROS) AaRROoSL, editor. Colombo: *The fauna of Sri Lanka*; 2006. p. 134-63.
  142. คมศร เล่าห์ประเสริฐ. ความหลากหลายของชนิด การแพร่กระจายและความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาของสัตว์ในวงศ์ตะกวดในภาคใต้ของประเทศไทย [วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต]: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. บัณฑิตวิทยาลัย; 2542.
  143. Just chaos. *Varanus bengalensis* (online) 2008. Available from: <https://www.flickr.com/photos/7326810@N08/2565059310/in/set-72157602676067797> (2020 May 21).
  144. Beolens BW, Michael; Grayson, Michael .. *The Eponym Dictionary of Reptiles*. Baltimore: Johns Hopkins University Press; 2011.
  145. Farag MA, el Ridi R. Mixed leucocyte reaction (MLR) in the snake *Psammophis sibilans*. *Immunology*. 1985;55(1):173-81.
  146. Pitchappan R, Muthukkaruppan V. Thymus-dependent lymphoid regions in the spleen of the lizard, *Calotes versicolor*. *The Journal of experimental zoology*. 1977;199(2):177-88.
  147. Thompson GG., Pianka ER., de Boer M. Body temperatures of an arboreal monitor lizard, *Varanus tristis* (Squamata: *Varanidae*), during the breeding season. *Amphibia-Reptilia*. 1999;20:82-8.
  148. Burnham DK, Keall SN, Nelson NJ, Daugherty CH. T cell function in tuatara (*Sphenodon punctatus*). *Comparative immunology, microbiology and infectious*

- diseases. 2005;28(3):213-22.
149. Brown DR. Mycoplasmosis and immunity of fish and reptiles. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2002;7:d1338-46.
  150. Sunyer JO, Lambris JD. Evolution and diversity of the complement system of poikilothermic vertebrates. *Immunological reviews*. 1998;166:39-57.
  151. Montali RJ. Comparative pathology of inflammation in the higher vertebrates (reptiles, birds and mammals). *Journal of comparative pathology*. 1988;99(1):1-26.
  152. Claver JA QA. Comparative morphology development and function of blood cells in nonmammalian vertebrates. *J Exotic Pet Medicine*. 2009;18: :87-97.
  153. Das S, Nikolaidis N, Klein J, Nei M. Evolutionary redefinition of immunoglobulin light chain isotypes in tetrapods using molecular markers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(43):16647-52.
  154. Natarajan K, Muthukkaruppan VR. Distribution and ontogeny of B cells in the garden lizard, *Calotes versicolor*. *Developmental and comparative immunology*. 1985;9(2):301-10.
  155. Leslie GA CL. Phylogeny of immunoglobulin structure and function. III. Immunoglobulins of the chicken. *J Exp Med*. 1969;130: :1337-52.
  156. R.J T. *Immunology: John Wiley and Sons Ltd. UK; 1994.*
  157. Dessauer HC. *Blood chemistry of reptiles: Physiological and evolutionary aspects: Biology of the Reptilia, 3-C Morphology. Academic Press, New York.1970.*
  158. สมหมาย หอมสวาท. ค่าโลหิตวิทยาและชีวเคมีบางประการของจระเข้บ้านจืดพันธุ์ไทย. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2539.
  159. Piennaar UdV. *Hematology of Some South African Reptiles. Witwatersrand University Press, Johannesburg: 1962.*
  160. Jacquelyn GB. *Microbiology. New York: John Wiley and Sons Inc; 2002.*
  161. Nosten F, White NJ. Artemisinin-based combination treatment of falciparum malaria. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2007;77(6 Suppl):181-92.
  162. Institute. CLS. Method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. In A. W. Matthew, Franklin, R.C., William, A.C., Micheal, N.D., George, M.E., David W.H. Janet, F.H., Mary, J.F., Jana, M.S., Donal, E.L., Danie, J.S., Fred, C.T., John, D.T., Melvin, P.W., & Barbara, L.Z. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.

163. Enzmart. SDS-PAGE analysis for protein (online) 2008. Available from: <http://www.gelifesciences.com/> (2020 May 21).
164. สุทิน กิ่งทอง, จันทรกานต์ ศรีสมทรัพย์ , ดารณี โชคชัยชำนาญกิจ. Ultrastructure of spermatogenesis and sperm proteome analysis in the Cupped oyster. ชลบุรี: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา, 2560.
165. Wang Z, Wang G. APD: the Antimicrobial Peptide Database. *Nucleic acids research*. 2004;32(Database issue):D590-2.
166. สุทิน กิ่งทอง, จันทรกานต์ ศรีสมทรัพย์ , ดารณี โชคชัยชำนาญกิจ. โครงการวิจัยเรื่อง โครงสร้างจุลกายวิภาคของการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และการวิเคราะห์โปรตีโอมของอสุจิในหอยนางรมปากจีบ (ปีที่ 2): มหาวิทยาลัยบูรพา; 2560.
167. สมปอง คล้ายหนองสรวง. เปปไทด์ต้านจุลชีพในสัตว์เลื้อยคลาน. กรุงเทพฯ: บริษัทอมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง; 2558.
168. PEP-FOLD service . Access the service through the RPBS Mobyly portal: PEP-FOLD: an updated de novo structure prediction server for both linear and algorithm such as the forward backtrack algorithm or a taboo sampling algorithm. 2006.
169. Eumkeb G, Chukrathok S. Synergistic activity and mechanism of action of ceftazidime and apigenin combination against ceftazidime-resistant *Enterobacter cloacae*. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*. 2013;20(3-4):262-9.
170. Eumkeb G, Sakdarat S, Siriwong S. Reversing beta-lactam antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* with galangin from *Alpinia officinarum* Hance and synergism with ceftazidime. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*. 2010;18(1):40-5.
171. Eumkeb G, Siriwong S, Phitaktim S, Rojtinakorn N, Sakdarat S. Synergistic activity and mode of action of flavonoids isolated from smaller galangal and amoxicillin combinations against amoxicillin-resistant *Escherichia coli*. *Journal of applied microbiology*. 2012;112(1):55-64.
172. Kommanee J, Preecharram S, Daduang S, Temsiripong Y, Dhiravisit A, Yamada Y, et al. Antibacterial activity of plasma from crocodile (*Crocodylus siamensis*) against pathogenic bacteria. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*. 2012;11:22.
173. Chrerie R. KC, B. Young and M.E. Merchant.,. Antibiotic properties and complement activity of serum in the american alligator (*Alligator Mississippiensis*). LA: McNeese State University; 2002.
174. Ya-Ping Ko and Matthew J. Flick. Fibrinogen Is at the Interface of Host Defense

- and Pathogen Virulence in *Staphylococcus aureus* Infection. *Semin Thromb Hemost* 2016;42(4):408–21.
175. Threenet E, Siruntawineti, J., and Chaeychomsri, W.,. Proteins profiles of *Siamese crocodile* blood. Proceeding of 49th Kasetsart University annual conference. Science. Kasetsart University, Thailand. 2011.
  176. Dubin A, Mak P, Dubin G, Rzychon M, Stec-Niemczyk J, Wladyka B, et al. New generation of peptide antibiotics. *Acta Biochim Pol.* 2005;52(3):633-8.
  177. Pata S, Daduang S, Svasti J, Thammasirirak S. Isolation of Lysozyme like protein from crocodile leukocyte extract (*Crocodylus siamensis*). *KMITL Sci Technol J.* 2007;7:70-85.
  178. Liu X, Ren H, Peng D. Sepsis biomarkers: an omics perspective. *Front Med.* 2014;8(1):58-67.
  179. Hu ZZ, Huang H, Wu CH, Jung M, Dritschilo A, Riegel AT, et al. Omics-based molecular target and biomarker identification. *Methods Mol Biol.* 2011;719:547-71.
  180. Sauer S, Kliem M. Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(1):74-82.
  181. นวลใย ญารักษา, และสมปอง ธรรมศิริรักษ์. เปปไทด์ทำลายเชื้อแบคทีเรีย : ยาปฏิชีวนะทางเลือกใหม่. *วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.* 2553;38:143-53.
  182. Onaizi SA, Leong S.J. Tethering antimicrobial peptides: Current status and potential challenges. *Biotechnology advances.* 2011;29(1):67-74.
  183. Phosri S, Mahakunakorn P, Lueangsakulthai J, Jangpromma N, Swatsitang P, Daduang S, et al. An investigation of antioxidant and anti-inflammatory activities from blood components of Crocodile (*Crocodylus siamensis*). *Protein J.* 2014;33(5):484-92.
  184. Kim A.B. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria. *Nature Reviews Microbiology.* 2005;3: 238-50.
  185. Mechkarska M, Coquet L, Leprince J, Auguste RJ, Jouenne T, Mangoni ML, et al. Peptidomic analysis of the host-defense peptides in skin secretions of the Trinidadian leaf frog *Phyllomedusa trinitatis* (*Phyllomedusidae*). *Comparative biochemistry and physiology Part D, Genomics & proteomics.* 2018;28:72-9.
  186. Hou F, Li J, Pan P, Xu J, Liu L, Liu W, et al. Isolation and characterisation of a new antimicrobial peptide from the skin of *Xenopus laevis*. *International journal of antimicrobial agents.* 2011;38(6):510-5.
  187. Yang X, Wang Y, Lee WH, Zhang Y. Antimicrobial peptides from the venom gland

- of the social wasp *Vespa tropica*. *Toxicon* : official journal of the International Society on Toxinology. 2013;74:151-7.
188. Lakshminarayanan R, Chi-Jin EO, Loh XJ, Kini RM, Valiyaveetil S. Purification and characterization of a vaterite-inducing peptide, pelovaterin, from the eggshells of *Pelodiscus sinensis* (Chinese soft shelled turtle). *Biomacromolecules*. 2005;6(3):1429-37.
189. Abdel Mageed AM, Isobe N, Yoshimura Y. Immunolocalization of avian beta-defensins in the hen oviduct and their changes in the uterus during eggshell formation. *Reproduction*. 2009;138(6):971-8.
190. Gong D, Wilson PW, Bain MM, McDade K, Kalina J, Herve-Grepinet V, et al. Gallin; an antimicrobial peptide member of a new avian defensin family, the ovodefensins, has been subject to recent gene duplication. *BMC Immunol*. 2010;11:12.
191. Herve V, Meudal H, Labas V, Rehault-Godbert S, Gautron J, Berges M, et al. Three-dimensional NMR structure of Hen Egg Gallin (Chicken Ovodefensin) reveals a new variation of the beta-defensin fold. *J Biol Chem*. 2014;289(10):7211-20.
192. Herve-Grepinet V, Rehault-Godbert S, Labas V, Magallon T, Derache C, Lavergne M, et al. Purification and characterization of avian beta-defensin 11, an antimicrobial peptide of the hen egg. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(10):4401-9.
193. Mine Y, Oberle C, Kassaify Z. Eggshell matrix proteins as defense mechanism of avian eggs. *J Agric Food Chem*. 2003;51(1):249-53.
194. Maloy WL, Kari UP. Structure-activity studies on magainins and other host defense peptides. *Biopolymers*. 1995;37(2):105-22.
195. Li H, Aneja R, Chaiken I. Click chemistry in peptide-based drug design. *Molecules*. 2013;18(8):9797-817.
196. Merchant. M, Henry D, Falconi R, Mushe B, Bryja J. Characterization of serum complement activity in serum of the Komodo dragon (*Varanus komodoensis*) *Advances in Biological Chemistry*. 2012;2:359-.

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นายันทวัฒน์ โฆษะ
วัน เดือน ปี เกิด	5 เมษายน 2523
สถานที่เกิด	จังหวัดกาฬสินธุ์
วุฒิการศึกษา	หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย
ที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 80 หมู่ที่ 1 บ้านโคกเครือ ตำบลโคกเครือ อำเภอนองกุ้งศรี จังหวัดกาฬสินธุ์ รหัสไปรษณีย์ 46220
ผลงานตีพิมพ์	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Veerachai Eursitthichaia, Vithoon Viyananta, Smarn Tesanab, Paiboon Sithithawornb, Nanthawat Kosa, Rudi Gramsa, Acta Tropica 114 (2010) 76–80 Opisthorchis viverrini: Evaluation of 28 kDa glutathione S-transferase as diagnostic tool in human opisthorchi</li> <li>2. Geadkaew A, Kosa N, Siricoon S, Grams SV, Grams: A 170 kDa multi-domain cystatin of Fasciola gigantica is active in the male reproductive system. R. Mol Biochem Parasitol. 2014 Sep; 196(2):100-7.</li> <li>3. Palida Emmanoch, Nanthawat Kosa, Suksiri Vichasri-Grams, Smarn Tesana, Rudi Grams, Amornrat Geadkaew-Krenc. Comparative Characterization of Four Calcium-Binding EF Hand Proteins from Opisthorchis viverrini. Korean J Parasitol. 2018;56(1):81-86.</li> <li>4. Na T. D. Tran, Phuong Anh Ton Nu, Kitti Intuyod, Ly T. K. Dao, Porntip Pinlaor, Yukifumi Nawa, Kiattawee Choowongkomon, Amornrat Geadkaew-Krenc, Nanthawat Kosa, Rudi Grams, Somchai Pinlao. Evaluation of a commercial ELISA kit and in-house Fasciola gigantica cysteine proteinases-based ELISAs for diagnosis of human fascioliasis. American Journal of Tropical</li> </ol>

Medicine & Hygiene.

5. Toxicity and Repellent Effects of Essential Oils against Red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst), vector of human pathogens Phanukit Kunhachan, Jakkrawarn Chompoosri, Payu Bhakdeenuan, Patcharawan Sirisopa, Chayada Khumsawad, Nanthawat Kosa, Decha Pangjai and Apiwat Tawatsin.

6. Amornrat Geadkaew-Krenc, Rudi Grams, Wansika Phadungsil, Wanlapa Chaibangyang, Nanthawat Kosa, Poom Adisakwattana, Paron Dekumyoy. Evaluation of Rhophilin Associated Tail Protein (ROPN1L) in the Human Liver Fluke *Opisthorchis viverrini* for Diagnostic Approach. *Korean J Parasitol.* 2020; Vol. 58, No. 4: 475-479.

#### รางวัลที่ได้รับ

1. นักวิจัยดีเด่นระดับคณะ ประเภทนักวิจัย หรือผู้ปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย ประจำปี 2556 จาก กองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
2. รางวัลเชิดชูเกียรติบุคลากรดีเด่น คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ประจำปี พุทธศักราช 2560
3. รางวัล The Best Poster Presentation Award การนำเสนอผลงาน ประเภทโปสเตอร์ งานประชุมวิชาการ The International Conference of Pharmaceutical Sciences and Medicines 2017 (ICPAM 2017) เรื่อง “Genetic polymorphisms of *mdr1* and *bcrp* (*abcg2*) genes in Burmese patients with *plasmodium falciparum* malaria.”