

1.1 Abstract

Project Code : MRG5680030

Project Title : Development of New Endotoxin Sensors Based on Novel Anti-sepsis Scaffold

Investigator and Institute : Dr. Kriangsak Khownum King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

E-mail Address : kkhownium@gmail.com

Project Period : June 3, 2013 to Aug 31, 2020

Abstract:

The development of a more robust and more specific fluorescent probe is highly desirable for time-critical diagnosis and treatment of sepsis patients. We envision that *bis*-cationic nature of the terephthalaldehyde-*bis*-guanylylhydrazone scaffold would be a good template to develop a series of small molecule sensors with effective selectivity for lipopolysaccharide (LPS, endotoxin) detection through electrostatic interactions with *bis*-phosphate portion of lipid A. Bispyrenyl terephthalaldehyde-*bis*-guanylylhydrazone (**BPTG**) fluorescent chemosensor with two fluorogenic pyrene units has been designed and synthesized for lipopolysaccharide (LPS) detection through excimer emission "turn-on". It shows a dose-dependent increase of fluorescent intensity in aqueous media and exhibits a typical excimer emission peaked at 485 nm along with monomer emission peaked at 375 nm with a low detection limit (5 nM). The enhancement of both excimer and monomer emissions was accounted for the unique molecular architecture of sandwich conformation at ground state prior the binding to LPS. The conformational search at ground state using ConfGen method with OPLS_2005 force field in Schrödinger software provided three distinct clusters of **BPTG** namely: sandwich-, semi- and open-bisguanylylhydrazone pyrene. The sandwich form was appeared to be the lowest energy form in the DFT calculations using M06-2X functional in Gaussian 09 program. 2D NOESY spectrum provided evidence in a good agreement with both fluorescent and computational works. Importantly, **BPTG** is highly selective for LPS over heparin and other anionic biological species. Due to the expression of LPS on cell surface of Gram negative bacteria, **BPTG** was successfully applied as a fluorescent dye to visualize live *Vibrio cholerae*, life-threatening bacteria causing diarrhoeal disease.

Keywords : endotoxin sensing, lipopolysaccharide, fluorescent sensor, bisguanylylhydrazone, pyrene

1.2 บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5680030

ชื่อโครงการ : การพัฒนาฟลูออเรสเซนต์เซนเซอร์ เพื่อตรวจจับเอ็นโดท็อกซิน (endotoxin) โดยใช้สารต้าน ภาวะเลือดเป็นพิษ (blood poisoning or sepsis) ชนิดใหม่

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน : ดร.เกรียงศักดิ์ ขาวเนียม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อีเมลล์ : kkhownium@gmail.com

ระยะเวลาโครงการ : 3 มิถุนายน 2556 ถึง 31 สิงหาคม 2563

บทคัดย่อ

การติดเชื้อในกระแสเลือด (sepsis, blood poisoning) เป็นสาเหตุการเสียชีวิตที่สำคัญในกลุ่มผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ ผู้ป่วยที่มีปัญหาโรคเบาหวานซึ่งมีแผลเรื้อรัง ผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนอวัยวะ และผู้ป่วยกลุ่มที่สูงอายุ หรือกลุ่มที่ต้องมีการฟอกไตเป็นประจำ ส่งผลให้อัตราการเสียชีวิตยังคงเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจากทั่วทุกมุมโลก การติดเชื้อในกระแสเลือดเกิดจากปริมาณของสารก่อภูมิแพ้ลิโปลิแซคคาไรด์ของแบคทีเรียกลุ่ม Gram-negative ที่มีส่วนที่มีไขมันและน้ำตาลเป็นองค์ประกอบหลัก รวมทั้งมีหมู่พอสเฟตที่มีประจุลบอยู่สองหมู่ (lipopolysaccharide, LPS) อยู่ในกระแสเลือด ส่งผลให้เกิดการตอบสนองของภูมิคุ้มกันของร่างกายอย่างรุนแรง ซึ่งถ้าการรักษาทำไม่ได้อย่างทันท่วงทีก็นำไปสู่การเสียชีวิตของผู้ป่วยได้ โครงการวิจัยนี้ได้ออกแบบการพัฒนาฟลูออเรสเซนต์เซนเซอร์เพื่อตรวจจับเอ็นโดท็อกซิน (endotoxin) โดยใช้สารต้านภาวะเลือดเป็นพิษ (blood poisoning or sepsis) ชนิดใหม่ โดยมีโครงสร้างเป็น Bispirenyl terephthalaldehyde-bis-guanylhydrazone (BPTG) เพื่อตรวจจับและวัดปริมาณ LPS ในตัวอย่าง ซึ่งสามารถให้ผลในการวัดได้อย่างรวดเร็วทันทีเมื่อมีการหยดสารฟลูออเรสเซนต์เซนเซอร์ลงในตัวอย่าง เราพบว่าฟลูออเรสเซนต์เซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมาสามารถวัดปริมาณ LPS ได้ที่ความเข้มข้นต่ำถึง 5 นาโนโมลาร์ โดยมีการปล่อยแสง เอ็กซิเมอร์ที่มีความยาวคลื่น 485 นาโนเมตร ควบคู่กับแสงโนเมอร์ที่มีความยาวคลื่น 375 นาโนเมตร ซึ่งสามารถประยุกต์ใช้ได้กับการย้อมแบคทีเรียชนิดแกรมลบที่มีองค์ประกอบเป็น LPS อยู่ด้านนอกของผนังเซลล์ ในที่นี้ เราได้ย้อมแบคทีเรีย *Vibrio cholera* ซึ่งก่อให้เกิดโรคอหิวาตกโรคในขณะที่มีชีวิตได้อีกด้วย ดังนั้นการนำเอาองค์ความรู้และฟลูออเรสเซนต์เซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมาต่อยอดเพื่อนำไปสู่การใช้จริงในการพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบในทางคลินิกเป็นสิ่งที่ควรทำในอันดับถัดไป

Keywords : เอ็นโดท็อกซิน, ลิโปลิแซคคาไรด์, ฟลูออเรสเซนต์เซนเซอร์, บิสกัวนิวไฮดราโซน, ไพรีน