



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
เรื่อง

กลไกการทำลายเชื้อแบคทีเรียและการพัฒนาใช้ประโยชน์ของ
Leucrocins จากสารสกัดเม็ดเลือดขาวจระเข้สายพันธุ์ไทย
(*Crocodylus siamensis*)

โดย รศ.ดร. สมปอง ธรรมศิริรักษ์ และคณะ
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
มิถุนายน 2556

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
เรื่อง

กลไกการทำลายเชื้อแบคทีเรียและการพัฒนาใช้ประโยชน์ของ
Leucrocins จากสารสกัดเม็ดเลือดขาวจระเข้สายพันธุ์ไทย
(*Crocodylus siamensis*)

รศ. ดร. สมปอง ธรรมศิริรักษ์ และคณะ
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และ
สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้ได้รับเงินสนับสนุนการวิจัยจากทุนเพิ่มขีดความสามารถด้านการวิจัยของอาจารย์รุ่นกลางฯ ประจำปี 2553 จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : RMU5380045

ชื่อโครงการ : กลไกการทำลายเชื้อแบคทีเรียและการพัฒนาใช้ประโยชน์ของ Leucrocins จากสารสกัด
เม็ดเลือดขาวจระเข้สายพันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*)

ชื่อนักวิจัย : รศ.ดร.สมปอง ธรรมศิริรักษ์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

E-mail Address : somkly@kku.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 3 ปี

ในการศึกษานี้ได้แยกบริสุทธิ์เปปไทด์ Leucrocins ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียจากเม็ดเลือดขาว จระเข้สายพันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*) ได้ 4 ชนิด แต่สามารถหาลำดับกรดอะมิโนได้เพียงสอง เส้น คือ Leucrocine I มีโครงสร้างปฐมภูมิบางส่วน คือ NGVQPKY ส่วน Leucrocine II มีโครงสร้างปฐมภูมิ คือ NAGSLLSGWG จากนั้นสังเคราะห์เปปไทด์ Leucrocine I, Leucrocine II และ Leucrocine analogues (L-form และ D-form) ที่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนบางตำแหน่ง หรือเพิ่มกรดอะมิโนที่มีประจุบวก และกรดอะมิโนที่มีความเป็นไฮโดรโฟบิกสูงเข้าไปในโมเลกุลของ Leucrocine เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ และลดความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงของมนุษย์ ผลพบว่าเปปไทด์ Leucrocins ต้นแบบมีค่า MIC ที่สูงกว่า Leucrocins analogues และยังพบว่า Leucrocine I analogues ที่สังเคราะห์ด้วย D-amino acid ทั้งโมเลกุลนั้น มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดีกว่า Leucrocine I analogue ที่สังเคราะห์ด้วย L-amino acid ทั้งโมเลกุล จากนั้นทำการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงของเปปไทด์สังเคราะห์ Leucrocine I analogues พบว่า Leucrocine I analogues ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เมื่อตรวจสอบกลไกการเข้าทำลายเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่า Leucrocine I analogues มีเป้าหมายในการทำลายเซลล์ที่เซลล์เมมเบรน โดยจะทำให้เมมเบรนเกิดความเสียหาย ทำให้เชื้อแบคทีเรียตายในที่สุด ทั้งนี้ได้มีการออกแบบเปปไทด์โดยใช้ Leu I เป็นเปปไทด์ต้นแบบเพิ่มเติมจำนวนทั้งสิ้น 9 เส้นเปปไทด์ โดยอาศัยความไม่มีขั้วและมีขั้วในการเติมกรดอะมิโน ซึ่งการเติมกรดอะมิโนให้มีความเป็น hydrophobic และ hydrophilic facet สูงขึ้น โดยออกแบบให้เติม tryptophan เพื่อเพิ่มความเป็น hydrophobic facet และเติม arginine หรือ lysine เพื่อเพิ่มความเป็น hydrophilic facet เพื่อทดสอบสมมุติฐานที่ว่า hydrophobic และ hydrophilic facet ที่เหมาะสมมีความสำคัญกับเปปไทด์สายสั้นๆ ผลการทดลองพบว่า เปปไทด์ส่วนใหญ่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดี และมีค่า MIC & MBC ที่ต่ำ อีกทั้งยังไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงของมนุษย์ในความเข้มข้นที่ฆ่าแบคทีเรียได้ และเมื่อตรวจสอบความสามารถในการทำให้สารโมเลกุลขนาดเล็กรั่วจากแบบจำลองเมมเบรน (ไลโปโซม) พบว่าจากเปปไทด์ที่ทำการสังเคราะห์มาทั้ง 9 เส้นนั้น มีเพียง CRT2 และ RW2 ที่สามารถทำให้ไลโปโซมเกิดการรั่วของสารฟลูออเรสเซนซ์ได้โดยมีร้อยละการรั่วคือร้อยละ 24 และ 16 ตามลำดับ จากนั้นศึกษาความสามารถในการจับกับ DNA ของเปปไทด์ที่ออกแบบ พบว่าเปปไทด์สังเคราะห์ที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ดี (KT2 RT2 KT3 และ CRT2) นั้นสามารถจับกับ DNA ได้ดีกว่าเปปไทด์ buforin II และเมื่อทำการศึกษาผลของเปปไทด์ต่อเซลล์แบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) นั้น สามารถพบความผิดปกติของเซลล์แบคทีเรียได้ตั้งแต่นาทีที่ 1 ของการบ่ม ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของเปปไทด์ว่าสามารถทำให้แบคทีเรียเกิดความเสียหายได้โดยทันที ซึ่งพบลักษณะที่ผิดปกติแบบโป่งพองเกิดขึ้น

Keywords : Antimicrobial peptides, Mechanism of action, Leucrocine

Abstract

Project Code : RMU5380045

Project Title : Mechanism of action and application used of leucrocin : antimicrobial peptides from Crocodile leukocyte extracts

Investigator : Sompong Thammasirirak, Ph.D (Biochemistry), Khon Kaen University

E-mail Address : somkly@kku.ac.th

Project Period : 3 years

Leucrocine I is an antibacterial peptide isolated from crocodile (*Crocodylus siamensis*) white blood cell extracts. Although Leucrocine I exhibits strong antibacterial activity, the hemolytic activity, which may compromise its therapeutic effects and the minimal inhibitory concentration (MIC) values of synthetic Leucrocine I seem higher than native peptide. To improve antibacterial analogues of Leucrocine I that lack hemolytic activity, we designed a Leucrocine I analogue molecule based on the Leucrocine I sequence. The peptide made from all D-amino acids was more active than the corresponding L-enantiomer. In our detailed study, the interaction between peptides and the cell membrane of *Vibrio cholerae* as part of their killing mechanism was studied by fluorescence and electron microscopy. The results show that the outer membrane was the target of action of Leucrocine I analogues. Finally, the cytotoxicity assays revealed that both L- and D-Leucrocine I analogues are non-toxic to mammalian cells. In order to expand the systematic approach to short-antibacterial peptide design, the principle of amino acid stretches tagged at the C terminal of Leucrocine I, which is an ultra-short antibacterial peptide, by tryptophan, arginine or lysine has been reported. The choice of amino acid type at each position of a stretch depends on the hydrophobic and hydrophilic regions visualized in the helical wheel pattern of Leucrocine I. The results suggest that this design by oligopeptide tagging should also consider the properties such as net charge, hydrophobicity, the content of hydrophobic amino acids, polar angle, the properly hydrophilic and hydrophobic facets. Amidation at C terminal and arginine substitute for lysine can increase selectivity between mammalian cells (hemolytic and MTT assay) and bacterial cells. KT2 and RT2 are effective against five bacterial strains tested (*S. typhi* DMST 22842, *S. epidermidis* ATCC 12228, *E. coli* ATCC 25922 and *S. aureus* ATCC 25923). They also have selectivity at their MICs, which were under approximately 10% hemolytic activity and no toxicity at 19 μ M toward Vero and RAW 264.7 cells for KT2, whereas RT2 had no toxicity at 38 μ M. The SEM images imply that the antibacterial mechanism of RT2, KT2, KT3 and CRT2 may depend on concentration rather than time. Circular dichroism results indicate that the main antibacterial mechanism of them might be DNA binding. Finally, RT2 and KT2 can be new alternative antibacterial agents or may be further developed for alternative antibiotics.

Keywords : Antimicrobial peptides, Mechanism of action, Leucrocine

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
สารบัญ	จ
สารบัญรูป	ช
สารบัญตาราง	ญ
บทนำ	1
วิธีการทดลอง	16
ผลการทดลอง	24
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	49
เอกสารอ้างอิง	51
Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุน สกว.	54
ภาคผนวก	56

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1 แสดง Molecular models of the different structural classes of antimicrobial peptides	3
รูปที่ 2 แสดงลักษณะแบบจำลอง barrel -stave (ซ้าย) และแบบจำลอง Carpet (ขวา)	5
รูปที่ 3 แสดงลักษณะแบบจำลอง barrel-stave (ซ้าย) และแบบจำลอง toroidal pore (ขวา)	6
รูปที่ 4 ตัวอย่างการเกิด Clear zone ในเชื้อ <i>Bacillus megaterium</i> ที่ทดสอบกับสารสกัดเม็ดเลือดขาวของจระเข้	24
รูปที่ 5 (A) การแยกเปปไทด์ Leucrocins โดยใช้คอลัมน์รีเวอร์เฟสชนิดซี 18 สารละลายเฟสเคลื่อนที่ A: 0.1% Trifluoro acetic acid (0.1% TFA) สารละลายเฟสเคลื่อนที่ B: 60% Acetonitrile ใน 0.1% TFA; HP1=Leucrocine I, HP9= Leucrocine II, HP3= Leucrocine III และ HP4= Leucrocine IV (B) ผลการยับยั้งเชื้อ <i>S. epidermidis</i> ของเปปไทด์ Leucrocine I และ Leucrocine II (C) ผลการยับยั้งเชื้อ <i>V. cholerae</i> ของเปปไทด์ Leucrocine I II และ Leucrocine IV	26
รูปที่ 6 (A) HPLC profile และ (B) Mass Spectrum ของ Leucrocine I	28
รูปที่ 7 (A) HPLC profile และ (B) Mass Spectrum ของ Leucrocine II	29
รูปที่ 8 (A) HPLC profile และ (B) Mass Spectrum ของ Leucrocine I analogue	30
รูปที่ 9 (A) HPLC profile และ (B) Mass Spectrum ของ Leucrocine II analogue	31
รูปที่ 10 โครงสร้างระดับสองของเปปไทด์เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง CD	33
รูปที่ 11 ความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงของเปปไทด์สังเคราะห์ Leucrocins และ Leucrocine I analogue; ใช้ 0.1% Triton X-100 ในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก 100 เปอร์เซ็นต์, negative control คือ 0.01% acetic acid	34
รูปที่ 12 ความเป็นพิษต่อเซลล์ vero cell ของเปปไทด์สังเคราะห์ Leucrocins และ Leucrocine I analogue; negative control คือ medium ที่ใช้เลี้ยงเซลล์	34

สารบัญรูป (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 13 การเกิด permeabilization เมมเบรนชั้นนอกของเชื้อ <i>V. cholera</i> ; Leu I 500 µg/ml, Leu I analogue (L-form) 90.91 µg/ml, Leu I analogue (D-form) 27.27 µg/ml, Magainin2 18.18 µg/ml และ PMB 9.71 µg/ml	35
รูปที่ 14 การเกิด permeabilization เมมเบรนชั้นในของเชื้อ <i>V. cholera</i> ; Leu I analogue (L-form) 90.91 µg/ml, Leu I analogue (D-form) 27.27 µg/ml และ Magainin2 18.18 µg/ml	36
รูปที่ 15 ผลของเปปไทด์ต่อการเกิด Permeabilization ที่เมมเบรนชั้นในของแบคทีเรีย <i>V. cholerae</i> โดยการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ β -galactosidase	37
รูปที่ 16 ผลของเปปไทด์ต่อการเกิด Permeabilization ของแบบจำลองเมมเบรน โดยการตรวจวัดสารฟลูออเรสเซนต์ที่รั่วออกจากไลโปโซม	38
รูปที่ 17 แสดง Interaction ระหว่าง DNA กับเปปไทด์	39
รูปที่ 18 ผลของเปปไทด์ต่อเซลล์แบคทีเรีย <i>V. cholerae</i> ที่เวลา 1 ชั่วโมง ที่ส่องด้วยกล้อง SEM	40
รูปที่ 19 ผลของเปปไทด์ต่อเซลล์แบคทีเรีย <i>V. cholerae</i> ที่เวลา 1 ชั่วโมง ที่ส่องด้วยกล้อง TEM	42
รูปที่ 20 แสดงลักษณะของการเกิดรู (pore) และ micelles ในแบบจำลอง carpet model (Oren Z et al., 1999)	43
รูปที่ 21 ความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงของเปปไทด์สังเคราะห์ Leucrocins I analogues	45
รูปที่ 22 แสดงความสามารถในการจับกับ DNA ของเปปไทด์ที่ถูกออกแบบ (DNA retardation assay) โดยช่องแรก (0) นั่นคือ negative control ช่องที่ 2 3 4 5 และ 6 คือ อัตราส่วนระหว่าง peptide ต่อ DNA เป็น 1 2 4 และ 8 ตามลำดับ สัญลักษณ์ A B C D และ E คือการทดลองของเปปไทด์สังเคราะห์ magainin (well known peptide) KT2 RWKT2 KT3 และ RT2 ตามลำดับ	46

สารบัญรูป (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 23 แสดงภาพความเสียหายของแบคทีเรียโดยเปปไทด์ที่ถูกออกแบบที่เวลาบ่ม 1 นาที และ 60 นาที	47
รูปที่ 24 Aggregation assay ของเปปไทด์ KT2 และ RT2	48
รูปที่ 25 LPS binding assay ของเปปไทด์ KT2 และ RT2	48

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดง antimicrobial peptide ในกลุ่ม α -helical และ β -sheet	1
ตารางที่ 2 ตัวอย่างของ Cationic antimicrobial peptides	2
ตารางที่ 3 ตัวอย่างของ Non-cationic antimicrobial peptides	3
ตารางที่ 4 แสดงกลุ่มของ antimicrobial peptides จากแหล่งสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ	12
ตารางที่ 5 โปรตีนและเปปไทด์ต่างๆที่ทดลองทางคลินิก	13
ตารางที่ 6 ลำดับกรดอะมิโนของ เปปไทด์ Leucrocin I, II, Leucrocin I analogue และ Leucrocin II analogue	18
ตารางที่ 7 แสดงเปปไทด์ที่มีการออกแบบโดยอาศัยความไม่มีขั้วและมีขั้วในการเติมกรดอะมิโนต่อจากเปปไทด์ Lue I	22
ตารางที่ 8 ผลการทดสอบความสามารถต้านการเจริญเชื้อแบคทีเรียทั้ง 21 ชนิดของสารสกัดเม็ดเลือดขาวของจระเข้ (Leukocyte extracts) ด้วยเทคนิค Disc diffusion assay	25
ตารางที่ 9 ลำดับกรดอะมิโนของ Leucrocin I and II โดยวิธี De novo sequencing LC MS/MS	27
ตารางที่ 10 ลำดับกรดอะมิโนของ เปปไทด์ Leucrocin I, II, Leucrocin I analogue และ Leucrocin II analogue	27
ตารางที่ 11 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของเปปไทด์ Leucrocins และ Leucrocins analogue ในการยับยั้งแบคทีเรีย	28
ตารางที่ 12 แสดงค่า MIC และ MBC ของเปปไทด์แต่ละเส้น	41

บทนำ

ในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ได้มุ่งศึกษาและพัฒนาสารออกฤทธิ์ต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่มีอยู่ในธรรมชาติ เพื่อนำมาใช้ทดแทน การรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อโดยใช้ยาปฏิชีวนะ ซึ่งพบว่ากำลังประสบกับปัญหาการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค มีจำนวนที่เพิ่มสูงขึ้น เนื่องมาจากมีการนำยาปฏิชีวนะมาใช้กันอย่างแพร่หลาย และมีการใช้ไม่ถูกวิธีส่งผลทำให้เชื้อจุลินทรีย์มีการพัฒนาตนเองให้ทนต่อยาปฏิชีวนะ ส่งผลทำให้ต้องใช้ยาในปริมาณที่เพิ่มสูงขึ้น หรือยาปฏิชีวนะตัวเดิมใช้ไม่ได้ผล อีกทั้งในผู้ป่วยบางรายอาจเกิดอาการแพ้ยาปฏิชีวนะได้ ด้วยสาเหตุดังกล่าวนี้ จึงทำให้นักวิทยาศาสตร์พยายามคิดค้นตัวยา หรือสารชีวภาพที่มีคุณสมบัติที่เหมือนหรือให้ประสิทธิภาพในการป้องกันเชื้อก่อโรคเช่นเดียวหรือใกล้เคียงกันกับการใช้ยาปฏิชีวนะ เพื่อหลีกเลี่ยงหรือลดปัญหาการดื้อยาที่จะเกิดตามมา จึงส่งผลให้นักวิทยาศาสตร์ทำการศึกษาวิจัย antimicrobial substances อย่างต่อเนื่อง ซึ่ง antimicrobial substances ที่ศึกษาพบนั้น ส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มโปรตีน และเปปไทด์ โดยข้อดีของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเหล่านี้ คือ เป็นสารที่พบในสิ่งมีชีวิต ซึ่งส่วนมากเป็นสารประกอบในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (innate immunity) ลักษณะการออกฤทธิ์จะออกฤทธิ์ต่อเชื้อแบบไม่จำเพาะเจาะจง (broad spectrum) คือ มีเป้าหมายในการเข้าทำลายเชื้ออย่างไม่จำเพาะ ที่มีโครงสร้างและกลไกการเข้าทำลายเชื้อที่หลากหลาย (Brogden et al., 2005)

การศึกษา antimicrobial peptide ในอดีตเริ่มมีการศึกษาในสัตว์กลุ่มแมลง และในช่วง 10 ปีที่ผ่านมาการศึกษา antimicrobial peptide เพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ โดยมีการศึกษาในสัตว์ชั้นสูง เช่น ในสุกร หรือแม้แต่ในมนุษย์ ปัจจุบันมีการจัดแบ่ง antimicrobial peptide ออกได้เป็นประเภทต่างๆ เช่น amphipathic and hydrophobic α -helices, β -Sheet peptides and small proteins, peptides with irregular amino acid composition, peptides with thio-ether rings, peptaibols และ microcyclic cystine knot peptides ตัวอย่างของ antimicrobial peptide บางกลุ่มที่กล่าวมาแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดง antimicrobial peptide ในกลุ่ม α -helical และ β -sheet

peptide	source	primary structure ^a
α-helical		
magainin 1	<i>Xenopus laevis</i>	H ₂ N-GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKS-COOH
magainin 2		H ₂ N-GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMNS-COOH
PGLa		H ₂ N-GMASKAGAIAGKIAKVALKAL-NH ₂
cecropin P1	porcine small intestines	H ₂ N-SWLSKTAKKLENSAKKRISSEGLAIAIAIQGGPR-COOH
β-sheet		
tachyplesin I ^b	<i>Tachyplesus tridentatus</i>	H ₂ N-KWCFRVCYRGIC ¹ YRRCR-NH ₂
tachyplesin II		H ₂ N-RWCFRVCYRGIC ¹ YRKCR-NH ₂
tachyplesin III	<i>Tachyplesus gigas</i>	H ₂ N-RWCFRVCYRGIC ¹ YRKCR-NH ₂
polyphemus I	<i>Limulus polyphemus</i>	H ₂ N-RRWCFRVCYRGFCYRKCR-NH ₂
polyphemus II		H ₂ N-RRWCFRVCYKGF ² CYRKCR-NH ₂
protegrin-1	porcine leukocytes	H ₂ N-RGGRLCYCRRRFCVCVGR-NH ₂

ที่มา: ดัดแปลงจาก Katsumi M, 1999

นอกจากนี้สามารถจำแนกประเภท antimicrobial peptide ตามลักษณะโครงสร้างได้ดังนี้

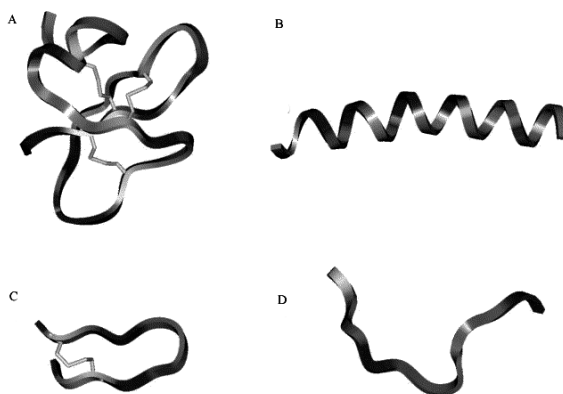
1. Cationic antimicrobial peptide

ซึ่งกลุ่ม cationic antimicrobial peptide สามารถแบ่งออกเป็นอีก 3 กลุ่มใหญ่คือ linear peptides forming α -helical structures, cysteine-rich open-ended peptides containing single or several disulfide bridges และ molecules rich in specific amino acids such as proline, glycine ซึ่งตัวอย่างของ antimicrobial peptides ในกลุ่มนี้แสดงในตารางที่ 2 และตัวอย่างลักษณะโครงสร้างของเปปไทด์สามารถแสดงดังรูปที่ 1

ตารางที่ 2 ตัวอย่างของ Cationic antimicrobial peptides

Structure and representative peptides	Organism	Antimicrobial activity
Linear α-helix peptides		
Cecropins	Insects, pig	Bacteria, fungi, virus, protozoa, metazoa
Clavanin, styelin	Tunicates	Bacteria
Magainin, dermaseptin	Amphibians	Bacteria, protozoa
Buforins	Amphibians	Bacteria, fungi
Linear peptides rich in certain amino acids		
Pro-rich:		
drosocin, metchnikowins,	Fruit fly	Bacteria
pyrrhocoricin, metalnikowin	Hemipteran	Bacteria, fungi
Gly-rich:		
dipterocins, attacins	Dipterans	Bacteria
His-rich:		
histatin	Human	Bacteria, fungi
Try-rich:		
indolicidin	Cattle	Bacteria
Single disulfide bridge		
Thanatin	Hemipteran	Bacteria, fungi
Brevinins	Frog	Bacteria
Two disulfide bridges		
Tachyplesin II	Horseshoe crab	Bacteria, fungi, virus
Androctonin	Scorpion	Bacteria, fungi
Protegrin I	Pig	Bacteria, fungi, virus
Three disulfide bridges		
α -Defensins	Mammals	Bacteria, fungi
β -Defensins	Mammals	Bacteria, fungi
Defensins	Insects	Bacteria, fungi, protozoa
Penaeidins	Shrimp	Bacteria, fungi
More than three disulfide bridges		
Tachycitin	Horseshoe crab	Bacteria, fungi
Drosomycin	Fruit fly	Fungi
Gambicin	Mosquito	Bacteria, fungi, protozoa
Heliomicin	Lepidopteran	Bacteria, fungi
Defensins	Plants	Fungi

ที่มา: ดัดแปลงจาก Jacopo V. and Michel S., 2002.



รูปที่ 1 แสดง Molecular models of the different structural classes of antimicrobial peptides

(A) human β -defensin-2, which forms a triple-stranded β -sheet structure (containing a small α -helical segment at the N-terminus) stabilized by three cysteine disulphide bridges.

(B) The amphipathic α -helical structure of magainin 2

(C) The β -turn loop structure of bovine battenecin.

(D) The extended boat-shaped structure of bovine indolicidin.

ที่มา: ดัดแปลงจาก Zhao H. 2003

2. Non-cationic antimicrobial peptide

ซึ่งตัวอย่างของ antimicrobial peptides ในกลุ่มนี้แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ตัวอย่างของ Non-cationic antimicrobial peptides

Structure and representative peptides	Organism	Antimicrobial activity
Anionic peptides		
Neuropeptide derived:		
Enkelytin	Bovine, human,	Bacteria
Peptide B	Bovine, human, leech, mussel	Bacteria
Aspartic acid rich:		
H-GDDDDDD-OH	Ovine	Bacteria
Dermcidin	Human	Bacteria
Aromatic dipeptides		
N- β -alanyl-5-S-glutathionyl-3,4-dihydroxyphenylalanine	Flesh fly	Bacteria, fungi
p-Hydroxycinnamaldehyde	Saw fly	Bacteria, fungi
Peptides derived from oxygen-binding proteins		
Hemocyanin derived	Shrimp	Bacteria
Hemoglobin derived	Tick	Bacteria
Lactoferrin	Human	Bacteria, virus

ที่มา: ดัดแปลงจาก Jacopo V. and Michel S, 2002.

โดยในปัจจุบันพบว่ามีการศึกษาเพื่อค้นหาเปปไทด์ทำลายเชื้อจุลินทรีย์มากมายหลายชนิด ทั้งการสกัดจากแหล่งธรรมชาติ และการสังเคราะห์ ข้อมูลของเปปไทด์ดังกล่าวแสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงกลุ่มของ antimicrobial peptides จากแหล่งสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ

Group	Peptide	Sequence	Origin
I α -helix	temporin L temporin B magainin 2 SMAP29 LL-37 cecropin A	FVQWFSKFLGRIL LLPIVGNLLKSL- <i>Am</i> GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS RGLRRLGRKIAHGVKKYGPTVLRIIRIAG LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES KWKLFKKIEKVGQNIRDGIKAGPAVAVVGQATQIAK- <i>Am</i>	<i>Rana temporaria</i> (European red frog skin) <i>Rana temporaria</i> (European red frog skin) <i>Xenopus laevis</i> (clawed toad skin) sheep myeloid humans, leukocytes, epithelia <i>Hyalophora cecropia</i> (moth)
II β -sheet	protegrin-1 tachyplesin-1 polyphemusin-1 androctonin human β -defensin-1	RGGRLC ₁ YC ₂ RRRFC ₁ VC ₂ VGR- <i>Am</i> KWC ₁ FRVC ₂ YRGIC ₂ YRRC ₁ R- <i>Am</i> RRWC ₁ FRVC ₂ YRGFC ₂ YRKC ₁ R- <i>Am</i> RSVC ₁ RQIKIC ₂ RRGGC ₂ YYKC ₁ TNRPY DHYNC ₁ VSSGGQC ₂ LYSAC ₃ PIFTKIQTGC ₂ YRGKAKC ₁ C ₃ K	porcine leukocytes <i>Tachypleus gigas</i> (Asian horseshoe crab) <i>Limulus polyphemus</i> (Atlantic horseshoe crab) <i>Androctonus australis</i> (scorpion hemolymph) several human tissues
III unusual composition	indolicidin histatin-5 bactenecin-5 PR-39	ILPWKWPWWPWR- <i>Am</i> DSHAKRHHGYKRKFHEKHSHRGY RERPPIRRPPIRPPFPYPPFRPPIRPPIFPPIRPPFRPPLRFP RRRPRPPYLP RPRPPFPFPRLPPRI PPGFPFRFPFRFP- <i>Am</i>	bovine neutrophils human saliva bovine neutrophils pig intestine
IV looped peptide	bactenecin-1 ranalexin thanatin brevinin 1E lactoferricin	RLC ₁ RIVVIRVC ₁ R FLGLIKIVPAMIC ₁ AVTKKC ₁ GSKKPVPPIIYC ₁ NRRTGKC ₁ QRM FLPLLAGLAANFLPKIFC ₁ KITRKC ₁ FKC ₁ RRWQWRMKKLGAPSI TC ₁ VRRAF	bovine neutrophils <i>Rana catesbeiana</i> (bullfrog skin) insect hemocytes <i>Rana esculenta</i> (European frog skin) cow and human milk

Note: -Am represents an amidated C-terminus and subscript numbers represent amino acids that are joined by disulfide bridges.

ที่มา: ดัดแปลงจาก Van't Hof *et al.* 2001

อย่างไรก็ตามการระบาดของโรคติดเชื้อในมนุษย์และสัตว์ก่อให้เกิดปัญหาทางเศรษฐกิจ สังคมและสาธารณสุขอย่างยิ่ง นอกจากนี้โรคติดเชื้อยังเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขอย่างหนึ่งของ ประเทศไทยและของทั้งโลก การพัฒนาสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial agent) หรือยาปฏิชีวนะ (antibiotic) ได้ดำเนินการมาอย่างต่อเนื่องนับตั้งแต่การค้นพบเพนิซิลลิน โดยอาศัยการสังเคราะห์หรือดัดแปลงทางเคมี หรือการค้นหาจากแหล่งใหม่ในธรรมชาติ ทั้งนี้ก็เนื่องจากการดื้อยาของเชื้อโรค และมีเชื้อโรคระบาดใหม่ๆ เกิดขึ้นทั้งในมนุษย์และสัตว์ ซึ่งก่อให้เกิดโรคติดเชื้อที่รักษายากเพิ่มขึ้น ซึ่งสันนิษฐานว่าสาเหตุสำคัญที่เชื้อก่อโรคในมนุษย์เกิดการดื้อยามาจากพฤติกรรมของมนุษย์กล่าวคือ เมื่อเกิดอาการป่วยมักซื้อยามารับประทานเองโดยไม่มีความรู้เกี่ยวกับเชื้อโรคนั้นอย่างแท้จริง ซึ่งอาจทำให้ใช้ยาไม่ถูกต้องกับโรค ขนาดไม่เหมาะสม ใช้ยาไม่ครบ และรับประทานไม่ต่อเนื่อง ทำให้เชื้อก่อโรคสามารถสร้างภูมิคุ้มกันต่อยาชนิดนั้น ส่งผลให้ประสิทธิภาพของยาในการยับยั้งหรือทำลายเชื้อก่อโรคลดลง จนกระทั่งไม่สามารถที่จะใช้ยาตัวเดิมในการรักษาได้ และนอกจากนี้บางรายก็เกิดอาการแพ้ยาที่ใช้ในการรักษาด้วย นอกจากนี้ในด้านการแพทย์ยังมีแบคทีเรียที่มักจะแสดงอาการซ้ำหลังจากมีการติดเชื้อแบคทีเรียพวกนี้ซึ่งมักก่อให้เกิดการติดเชื้อหลังการผ่าตัด หรือภายหลังการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ ส่งผลให้เกิดปัญหาอย่างมากต่อการรักษาคนไข้ และในทางการเกษตรยังมีแบคทีเรียหรือเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในพืชเช่นกัน ด้วยสาเหตุนี้จึงทำให้นักวิทยาศาสตร์พยายามค้นหาสารจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคที่ไม่ก่อให้เกิดการดื้อยาหรือเกิดขึ้นได้ซ้ำ ไม่ว่าจะเป็นการตรวจหาสารสกัดจากพืชสมุนไพรหรือการสกัดสารที่ได้จากสัตว์ หรือสารชีวภาพที่มีคุณสมบัติที่เหมือนหรือให้ประสิทธิภาพในการป้องกันเชื้อก่อโรค เช่นเดียวกับหรือใกล้เคียงกันกับการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อหลีกเลี่ยงหรือลดปัญหาการดื้อยาที่จะเกิดตามมา

สารยับยั้งจุลินทรีย์กลุ่มเปปไทด์ (antimicrobial peptides; AMPs) มีการค้นพบมานานกว่า 20 ปีและถูกค้นพบครั้งแรกในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (Zhao H, 2003) AMPs ผลิตมาจากเนื้อเยื่อและเซลล์หลากหลายชนิดในสิ่งมีชีวิตได้แก่ แบคทีเรีย สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังและสัตว์มีกระดูกสันหลัง โดยทั่วไปสารยับยั้งจุลินทรีย์กลุ่มเปปไทด์นั้นประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 9-100 residues น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10 kDa (Won A, and Ianoul A, 2009) ส่วนใหญ่จะพบในรูป L-amino acid และมีประจุบวกซึ่งสามารถจับกับ lipopolysaccharide (LPS) ที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรียได้ดี ส่งผลให้กลไกการเข้าทำลายเซลล์ส่วนใหญ่ของสารยับยั้งกลุ่มเปปไทด์จะมีความสามารถในการทำให้เกิดรูที่เมมเบรน (permeabilize membrane) AMPs จัดอยู่ในกลุ่ม cytolytic peptides ที่มีคุณสมบัติเป็น innate immunity และ broad spectrum antimicrobial activity ที่ใช้ในการป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรียในสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิด มีคุณสมบัติที่ดีต่อการรักษาโรคติดเชื้อคือเป็น selective antibiotic และไม่ก่อให้เกิดการดื้อยา ทั้งนี้เนื่องมาจากสารยับยั้งจุลินทรีย์กลุ่มเปปไทด์มีกลไกการเข้าทำลายเซลล์แบคทีเรียที่แตกต่างจากยาปฏิชีวนะ

นอกจากนี้มียานวิจัยมากมายที่มีการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในกลุ่มโปรตีนและเปปไทด์จากสิ่งมีชีวิตตั้งแต่พวกโปรคาริโอตจนถึงพวกยูคาริโอต พืช สัตว์ และมนุษย์ ในปัจจุบันได้มีการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพถึงระดับของโครงสร้าง ส่วนประกอบของโมเลกุล กลไกการทำลายหรือการต้านเชื้อ และสารบางกลุ่มก็ได้มีการนำมาใช้ ใน clinical trial ถึงเฟส 3 แล้วเช่น Indolicidin, defensin สำหรับความเป็นไปได้ในด้านเชิงพาณิชย์ ในปัจจุบันพบว่าในต่างประเทศมีการศึกษาหรือนำสารโปรตีนและเปปไทด์ต่างๆไปทดลองทางคลินิกเรียบร้อยแล้วดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 โปรตีนและเปปไทด์ต่างๆที่ทดลองทางคลินิก

Synthetic compound	Company	AMP type (Species)	Clinical trial outcomes	Planned clinical trials
Pexiganan (MSI-78)	Genaera Plymouth Meeting, PA (formerly Magainin Pharmaceutical Inc.)	Magainin 2 (<i>Xenopus</i> frog)	No advantage over conventional antibiotics in a Phase III trial for topical Rx of diabetic foot ulcers. Failed to gain FDA approval.	None.
Iseiganan (IB-367)	Intrabiotics Pharmaceuticals, Inc. Mountainview, CA	Protegrin (Pig)	Failed two Phase III trials as mouthrinse for stomatitis in highrisk patients. Failed Phase III trial as aerosolized Rx in ventilator-associated pneumonia.	Phase IIa trial as aerosolized Rx for CF patients with chronic respiratory infections.
Omiganan (MBI-226)	Microbiologix Biotech Vancouver, BC	Indolicidin (Bovine)	Failed Phase III trial as topical Rx to prevent or reduce venous catheter-related bloodstream infections.	Repeat Phase III trial to confirm reduction in catheter colonization and local infections under consideration.
MBI 594AN	Microbiologix Biotech Vancouver, BC, Canada	Indolicidin (Bovine)	Phase IIb trial showed efficacy as topical Rx for acne.	Phase III trial.
P113 P113D	Demegen, Pittsburgh, PA Dow Pharmaceutical Sciences, Patuloma, CA	Histatins (Human)	Completed Phase II trial as mouthrinse for oral candidiasis in HIV patients.	Inhalation Rx for <i>Pseudomonas</i> infections in CF patients under consideration.
XMP.629	Xoma (US) Berkeley, CA	BPI (Human)	Failed Phase III trial as topical Rx for acne.	None at present time.
Neuprex (rBPI21)	Xoma (US) Berkeley, CA	BPI (Human)	Failed Phase III trial as adjunctive parenteral Rx to reduce mortality in pediatric meningococemia.	Planned Phase I/II trial to reduce inflammatory complications in pediatric open heart-surgery patients.

ที่มา: Y, Gerold Gardon, Eric G. Romonoski and Alison M macdermot, 2005 Eye Current Research.

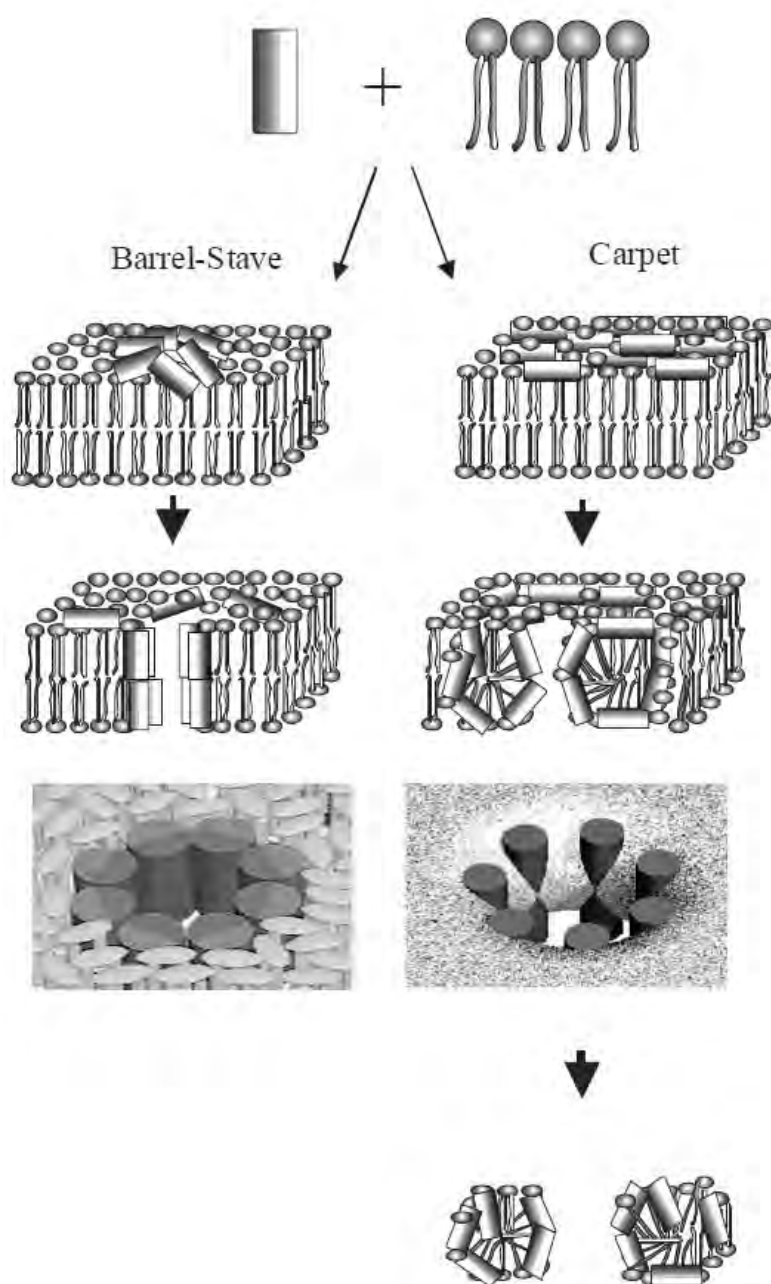
Antimicrobial peptides ที่กล่าวถึงทั้งหมดนี้ทำหน้าที่ฆ่าเซลล์แบคทีเรียโดยอาจจะใช้กลไกการเข้าทำลายเซลล์ที่และมีการใช้เวลาที่แตกต่างกัน ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า มีขั้นตอนกลไกดังนี้

1. Attraction การเข้าจับของ antimicrobial peptide กับเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งพบว่าน่าจะเกิดจากแรง electrostatic ระหว่างประจุของเปปไทด์กับเซลล์ของแบคทีเรีย ซึ่งพบว่า antimicrobial peptide ที่เป็นประจุบวกจะเข้าจับกับผิวด้านนอกของแบคทีเรียที่มีประจุลบ (LPS ของ Gram-negative) และ teichoic acid ที่อยู่บนผนังเซลล์ของแบคทีเรีย
2. ขั้น Attachment เป็นขั้นตอนที่สำคัญของ antimicrobial peptide ที่จะผ่านเข้าสู่เซลล์เมมเบรน ซึ่งจากการศึกษาพบว่า น่าจะเกี่ยวกับการ concentration ของเปปไทด์ โครงสร้าง 2 มิติ ที่จะถูกฝังลงไป lipid head group ในสภาพที่ไม่ทำงานแล้วทำให้เมมเบรนยืดออก ซึ่งจะทำให้เมมเบรนบางตัว ซึ่งมีความจำเพาะกับเปปไทด์และ concentration ของ เปปไทด์ด้วย
3. ขั้นการสอด antimicrobial peptide แล้วทำให้เกิด membrane permeability จากการทดลองจะพบว่า ถ้าความเข้มข้นของ antimicrobial peptide/lipid น้อย เปปไทด์จะจับแบบขนานกับ

lipid bilayer และถ้ามีความเข้มข้นของเปปไทด์สูงขึ้น เปปไทด์จะถูกสอดเข้าไปในเมมเบรน และเมื่อความเข้มข้นของเปปไทด์สูงขึ้น เปปไทด์จะสอดเข้าไปในเมมเบรนและสร้างเป็นรูขึ้น ซึ่งจะมีหลายแบบจำลองของการเกิดขึ้น ดังนี้คือ

แบบจำลอง barrel-stave กลไกการทำงานของแบบจำลองประเภทนี้จะมีลักษณะที่พิเศษ โดยการกระตุ้นของ Alamethicin ซึ่งจากการศึกษาหลายเทคนิคพบว่า Alamethicin จะเกิดเป็น α -helix จับกับเมมเบรน และรวมกลุ่มกันสอดเข้าไปใน lipid bilayer โดยส่วนที่เป็น hydrophobic ของเปปไทด์จะทำปฏิกิริยากับ lipid bilayer และส่วนที่เป็น hydrophilic จะทำปฏิกิริยากันเองทำให้เกิดรูขึ้นมา Alamethicin ที่ทำให้เกิด pore ได้ จะประกอบด้วย 3-11 α -helix แสดงดังรูปที่ 2

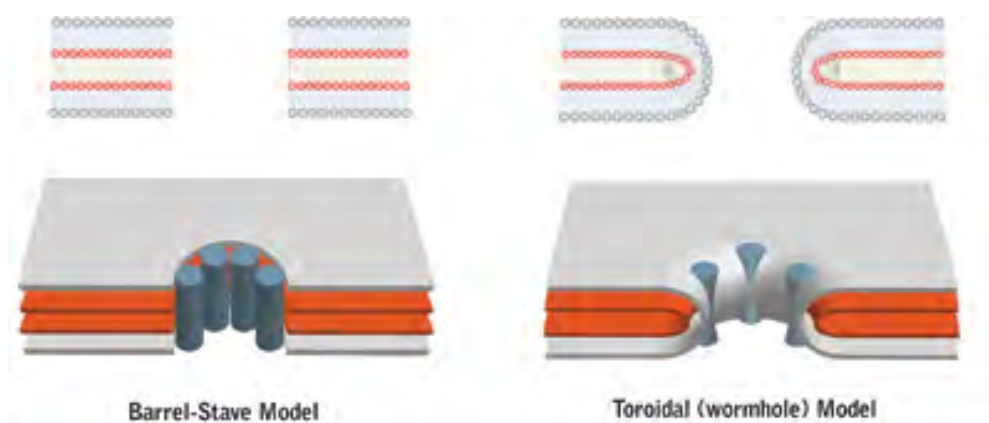
แบบจำลอง Carpet กลไกการทำงานของแบบจำลองประเภทนี้คือจะมีการสะสมของเปปไทด์ที่ผิวของ lipid bilayer เช่น ovispirin ซึ่งจะมีความเข้มข้นของเปปไทด์สูงจะทำให้เกิดการขัดขวางการทำงานของชั้น bilayer ซึ่งมีลักษณะคล้ายคลึงกับการทำงานของ detergent และในบางจุดจะทำให้เปปไทด์สร้างรูชั่วคราวขึ้นในเมมเบรนทำให้เปปไทด์อื่นๆเข้าสู่เมมเบรนได้มากขึ้น จนทำให้เมมเบรนหลุดแยกจากกันเกิดลักษณะโครงสร้างที่เรียกว่า micelles ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 แสดงลักษณะแบบจำลอง barrel -stave (ซ้าย) และแบบจำลอง Carpet (ขวา)

ที่มา: ดัดแปลงจาก Zhao H. 2003

แบบจำลอง **toroidal pore** ตัวแทนของ antimicrobial peptide ที่มีกลไกการทำงานในลักษณะนี้คือ margainings , protegrins และ melittin ซึ่งเปปไทด์ที่เป็น α -helix นี้จะสอดเข้าไปในเมมเบรนแล้วกระตุ้น lipid monolayer ให้โค้งจนทำให้เกิดรู ซึ่งทำให้เกิดน้ำที่เป็นแกนกลางถูกเปปไทด์ที่ถูกลอด และที่ lipid head group โดยส่วนที่ขอบน้ำของเปปไทด์จะทำปฏิกิริยากับ polar head group ของ lipid อย่างไรก็ตามพบว่าข้อแตกต่างของ barrel-stave model กับ toroidal pore คือ เปปไทด์ของ toroidal pore จะมี interaction กับ lipid head group ถึงแม้จะสอดเข้าไปใน lipid bilayer แล้วก็ตาม ดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 แสดงลักษณะแบบจำลอง barrel-stave (ซ้าย) และแบบจำลอง toroidal pore (ขวา)
ที่มา: ดัดแปลงจาก Qian S. *et.al.*, 2008.

หลังจากที่ peptides ได้ก่อให้เกิดความเสียหายและความผิดปกติต่างๆต่อเซลล์ เช่น เซลล์เสีย membrane fluidity เสียสมดุลระหว่างไอออนต่างๆ สูญเสียสารชีวเคมีต่างๆออกสู่ภายนอกเซลล์ เกิดการแตกของเซลล์จนทำให้เซลล์ตาย อย่างไรก็ตามกลไกการฆ่าเชื้อแบคทีเรียอาจจะเกี่ยวข้องกับสัมพันธ์กับการสร้าง ion channel การสร้างรูที่เมมเบรน หรือการเกิดความเสียหายกับเมมเบรน แต่ก็ไม่ได้หมายความว่ากลไกต่างๆเหล่านี้จะเกี่ยวข้องสัมพันธ์ในทุกเปปไทด์

Selsted *et al.* (1992) ค้นพบว่า indolicidin ซึ่งแยกได้จากไซโตพลาสซึมของ neutrophils ของวัว (bovine) ในความเข้มข้น 10 mg/ml สามารถทำลายเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* ได้ indolicidin นี้เป็นเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโน tryptophan อยู่ในอัตราส่วนที่สูงมาก ซึ่งโดยปกติโปรตีนหรือเปปไทด์จะมีปริมาณของกรดอะมิโนชนิดนี้อยู่ในสัดส่วนที่น้อยมาก

จากการศึกษาโครงสร้างระดับทุติยภูมิของ fragment ส่วนหนึ่งของ histatin-5 จากน้ำลายพบว่า histatin ใช้โครงสร้างที่เป็น α -helical เข้าจับกับ membrane ของ *Candida albicans* ด้วยแรงระหว่างประจุและพันธะไฮโดรเจนระหว่างส่วนที่เป็นประจุบวกกับประจุลบของ plasma membrane (Raj *et al* 1994)

Yan and Adams (1998) แยก lycotoxin I และ lycotoxin II จากพิษของแมงป่อง *Lycosa carolinensis* โดยใช้เทคนิค reversed-phase HPLC และทดสอบการยับยั้งและต้านแบคทีเรียพบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* และ *Candida glabrata* ได้ โดยใช้ในปริมาณเป็นไมโครโมลาร์เท่านั้น

Benincasa *et al.* (2003) ศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของ α -helical cathelicidin peptides 2 ชนิด คือ BMAP-27 และ BMAP-28 พบว่า BMAP-27 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้ดี ส่วน BMAP-28 นั้นสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ อีกทั้งยังพบว่า BMAP-28 นั้นมีความสามารถในการต้านการเจริญของเชื้อไวรัส human herpes simplex virus type 1 (HSV-1) ได้ในการทดลองแบบ *in vitro*

Feng-Sheng Wang (2003) ทำการศึกษาผลของ antimicrobial proteins ที่แยกได้จากเม็ดเลือดขาวของหนู ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *E.coli* ในเนื้อบด พบว่า มี

โปรตีนขนาด 6 และ 7.5 kDa สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดในเนือบดได้ โดยการทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกและตายในที่สุด ซึ่งจะเห็นได้จากการวัดค่า OD₂₆₀ nm ที่เพิ่มมากขึ้นหลังจากบ่มเชื้อทดสอบกับ antimicrobial proteins ที่ได้จากเม็ดเลือดขาวของหนู

Benincasa *et al.* (2004) ทำการสังเคราะห์ Pro-rich peptide Bac7 ซึ่งเป็น cathelicidin-derived peptide ที่แยกได้จาก bovine neutrophils โดยสังเคราะห์เป็น fragment peptides ที่มีความยาวตั้งแต่ 13-35 residues แล้วทำการทดสอบฤทธิ์การต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นชนิด drug-resistant clinical isolates พบว่า fragment Bac7(1-16) และ fragment Bac7(1-35) ซึ่งมีส่วนของ highly cationic N-terminal sequence อยู่ นั้น มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้ดี และพบว่า fragment Bac7(1-35) ยังสามารถต้านการเจริญของเชื้อรา *Cryptococcus neoformans* ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Candida albicans*

Carlo P.J.M. Brouwer *et al.* (2006) ทำการสังเคราะห์ ubiquicidin ซึ่งเป็น antimicrobial peptide ที่แยกได้จากคน โดยทำการสังเคราะห์ในรูปแบบที่เป็น full sequence คือ ubiquicidin (UBI 1-59) และที่เป็นเปปไทด์สายสั้นๆ ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนลำดับที่ 31-38 residues (UBI 31-38) แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่เป็นชนิด methicillin resistant เรียกว่า MRSA พบว่า เปปไทด์ที่สังเคราะห์ขึ้นมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบได้ ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะนำ UBI 31-38 ซึ่งเป็นเปปไทด์สังเคราะห์ที่มีขนาดสั้นมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อในมนุษย์ได้

Liu *et al.* (2008) ทำการศึกษาผลของ rabbit sacculus rotundus antimicrobial peptides (RSRP) ต่อระบบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในลำไส้ของไก่ พบว่า ในลำไส้ไก่ (duodenum และ jejunum) ที่ได้รับ RSRP นั้นมีการเพิ่มขึ้นของ villus และ intraepithelial lymphocytes เมื่อเทียบกับไก่ที่ไม่ได้รับ RSRP และพบว่า RSRP ยังกระตุ้นให้มีการเพิ่มพื้นที่ของ IgA-secreting cells ใน 3 จุดของลำไส้ไก่อีกด้วย

อย่างไรก็ตามแม้ว่าจะมีการศึกษาเกี่ยวกับความสามารถในการทำลายเซลล์ของ antimicrobial peptide มากมายหลายชนิด ซึ่งส่วนใหญ่ไม่ได้ศึกษาถึงกลไกการทำงานอย่างลึกซึ้งเท่าใดนัก ทำให้ยังมีข้อมูลทางด้านวิชาการค่อนข้างน้อย ทั้งนี้ก็มียานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพถึงระดับโครงสร้าง ส่วนประกอบของโมเลกุล และกลไกการเข้าทำลายหรือการต้านทานเชื้อ เช่น

Chan Bae Park *et al.* (1998) ทำการศึกษากลไกการทำลายเชื้อ *E.coli* ของ Buforin II ซึ่งเป็น antimicrobial peptide ที่ได้จากท้องคกเทียบกับ magainin 2 ซึ่งเป็น antimicrobial peptide ที่ทราบคุณสมบัติดีแล้ว โดยใช้เทคนิค fluoresceine isothiocyanate (FITC)-labeled และเทคนิค gel-retardation พบว่า Buforin II มีกลไกการทำลายเชื้อแบบ non-lytic mechanism โดยจะเข้าไปในเซลล์แล้วจับกับ DNA หรือ RNA ยับยั้ง cellular function ของแบคทีเรีย ส่วน magainin 2 นั้นจะทำลายเชื้อโดยใช้ lytic mechanism

Genco *et al.* (2003) ได้ทำการศึกษาเปปไทด์ magainins ที่แยกได้จากคางคก (African clawed frog) 2 ชนิด คือ MSI-751 และ MSI-774 ในการต้านการเจริญของเชื้อก่อโรคในช่องปากและกลไกการทำลายเซลล์แบคทีเรีย พบว่าเชื้อก่อโรคในช่องปาก *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium*

nucleatum, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens*, *Prevotella loescheii* และ *Prevotella intermedia*. *P. gingivalis* จะมีความไวต่อ MSI-751 มากกว่า MSI-774 และจากการศึกษา กลไกการทำลายเซลล์แบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Electron microscopy) พบว่า magainins มีเป้าหมายในการทำลายเซลล์ที่เซลล์เมมเบรน โดยจะทำให้เมมเบรนเกิดความเสียหาย ทำให้ เซลล์แบคทีเรียตายในที่สุด

Maria Luisa *et al.* (2004) ทำการศึกษาผลการทำลายเชื้อ *E. coli* ของ temporin L โดยใช้ เทคนิค triple-staining method พบว่าความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของ temporin L ส่งผลต่อการเข้าทำลายที่ inner membrane ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Thennarasu *et al.* (2005) สังเคราะห์ Lipopeptide MSI-843 ที่ประกอบด้วย nonstandard amino acid ornithine (Oct-OOLLOOLOOL-NH₂) เป็นเปปไทด์ที่มีขนาดสั้น และมีกรดไขมัน Octanoic acid ที่ปลาย N-terminal ซึ่งช่วยเพิ่มความเป็น hydrophobic ให้กับเปปไทด์ แล้วทดสอบคุณสมบัติการ ต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา พบว่า MSI-843 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ทั้งแบคทีเรียและเชื้อราที่ ความเข้มข้นต่ำ โดยสามารถ permeabilizes ทั้ง outer membrane ของ Gram-negative bacteria และ model membrane mimicking bacterial inner membrane และไม่ทำให้เกิดเลือดแดงแตกที่ความเข้มข้น ของค่า MIC ผลของ Circular dichroism (CD) แสดงให้เห็นว่า MSI-843 มีโครงสร้างเป็นเกลียว α -helix เมื่อจับกับ lipid membranes และการศึกษาโครงสร้างของเปปไทด์ด้วยเทคนิค NMR ให้ผลอย่างชัดเจน ว่า กลไกการทำลายเมมเบรนของแบคทีเรียของ MSI-843 นั้นมีความสอดคล้องกับ toroidal-type pore mechanism

Podda *et al.* (2006) ทำการศึกษากลไกการเข้าทำลายเชื้อ *Salmonella enterica* และ *E. coli* ของ proline-rich cathelicidin Bac7 ที่ได้จากวัว พบว่ากลไกเข้าทำลายเชื้อขึ้นอยู่กับโครงสร้างและความ เข้มข้นของเปปไทด์ กล่าวคือ ถ้าความเข้มข้นใกล้ค่า MIC (Minimum Inhibitory Concentration) จะ ทำลายเชื้อแบคทีเรียโดยใช้กลไกแบบ non-lytic mechanism โดยจะเข้าไปในเซลล์แล้วจับกับ DNA หรือ RNA แต่ถ้ามีความเข้มข้นมากกว่าค่า MIC หลายเท่าจะทำลายเชื้อโดยใช้กลไกแบบ lytic mechanism โดยมุ่ง เป้าหมายของการทำลายเชื้ออยู่ที่เมมเบรน

Haryadi and Pak-Lam Yu (2007) ได้ศึกษากลไกการเข้าทำลายเชื้อ *E. coli* ของ β -defensins ที่ได้จากนกกระจอกเทศ พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้โดย การเข้าไปภายใน เซลล์ แล้วยับยั้งการสังเคราะห์ DNA, RNA และโปรตีน รวมไปถึงการยับยั้ง enzymatic activities ของ เชื้อได้ด้วย

Gang Hao *et al.* (2009) ทำการสังเคราะห์ Bufurin2-A และ Bufurin2-B ที่เป็น antimicrobial peptide analogs ของ Bufurin2 ที่แยกจาก stomach tissue เพื่อศึกษากลไกการทำงานใน แ่งการเข้าทำลายเซลล์ *E. coli* พบว่า antimicrobial analogs ทั้งสองมีความประสิทธิภาพการเข้าทำลาย เซลล์เพิ่มขึ้น

จะเห็นได้ว่าเปปไทด์ที่ทำลายเชื้อแบคทีเรียได้ มีความหลากหลายทั้งในด้านโครงสร้างและ การทำหน้าที่ในการเข้าทำลายเชื้อแบคทีเรีย โดยทั่วไปพบว่า กลไกการทำลายหรือยับยั้งการเจริญของ เชื้อ จะขึ้นอยู่กับรูปร่างและประจุที่มีอยู่ในโครงสร้างของเปปไทด์นั้น มีหลายเทคนิคที่ใช้ในการศึกษากลไก

การทำงานของเปปไทด์ และแต่ละเทคนิคก็จะทำให้ทราบรายละเอียดในแต่ละจุดซึ่งต้องมีการใช้หลายเทคนิคร่วมกันจึงจะทำให้ทราบกลไกที่แน่ชัดได้

นอกจากนี้ในกลุ่มของสัตว์เลื้อยคลาน เช่น จระเข้ มีการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพน้อยมาก ทั้งที่จระเข้เป็นสัตว์ที่มีความทนทานอย่างมากต่อการติดเชื้อโดยจะเห็นได้จากการที่จระเข้สามารถอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่มีเชื้อโรคจำนวนมาก หรือเมื่อจระเข้เกิดบาดแผลจากการต่อสู้กันเอง แผลที่เกิดขึ้นก็สามารถหายสนิทได้เองโดยไม่มีการติดเชื้อ ทำให้ไม่มีปัญหาของการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียหรือติดเชื้อซ้ำเติมเช่นเชื้อรา ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าจะจะมีการสร้างโปรตีนหรือเปปไทด์ หรือมีระบบภูมิคุ้มกันตามธรรมชาติชนิดพิเศษที่สามารถทำลายแบคทีเรียได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูง จระเข้เป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญอย่างหนึ่งของประเทศไทย ถึงแม้ว่าจะยังไม่ได้อยู่ในอันดับต้นๆ ของสัตว์เศรษฐกิจส่งออกอย่างเช่น กุ้งกุลาดำหรือสัตว์น้ำอื่นๆ แต่ก็สามารถสร้างรายได้ให้กับประเทศไทยได้ไม่น้อย ในปัจจุบันประเทศไทยถือว่าค่อนข้างประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงจระเข้ทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพ อย่างไรก็ตาม ในตลาดอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงจระเข้ขึ้นนั้น การส่งออกผลิตภัณฑ์หนังจระเข้มีตลาดทางยุโรปและอเมริกาเป็นหลักแต่ในปัจจุบันก็มีปัญหาด้านการแข่งขันและการกีดกันทางการค้าค่อนข้างสูง พบว่าประเทศจีนเป็นตลาดหลักการส่งออกผลิตภัณฑ์หนังและเนื้อจระเข้ ซึ่งถือได้ว่าเป็นการแปรรูปหลักแต่ส่วนอื่นที่เกิดขึ้นในอุตสาหกรรมโดยเฉพาะในเลือดหรือส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำเลือดของจระเข้ ซึ่งถือว่าเป็นผลผลิตที่มาจากการแปรรูปอีกอย่างหนึ่งที่มีมากเกินพอ และยังมีการศึกษาหรือนำประโยชน์ไปใช้น้อยมาก โดยพบว่าแพทย์แผนโบราณมีการนำซีรัมโปรตีนจากเลือดจระเข้ไปใช้เป็นยาสมุนไพรในการรักษาโรคต่างๆได้

ส่วนในจระเข้ของต่างประเทศพบว่าซีรัมของจระเข้สายพันธุ์ในออสเตรเลียสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ 17 ชนิด เมื่อเปรียบเทียบกับซีรัมมนุษย์ซึ่งยับยั้งได้เพียง 6 ชนิด ล่าสุดจากการศึกษาของ Merchant *et al.* (2003) รายงานว่า ซีรัมจระเข้สายพันธุ์อเมริกา (*Alligator mississippiensis*) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* ได้ดีกว่าซีรัมมนุษย์และยืนยันคุณสมบัติการทำลายเชื้อแบคทีเรียอาจมาจากการทำงานของระบบ complement นอกจากนี้ Merchant *et al.* (2005b) ยังพบว่า ซีรัมจระเข้สายพันธุ์อเมริกาสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ HIV-1, WNV และ HSV-1 และในปัจจุบัน Merchant *et al.* (2005c) ได้แยก leukocyte extract จากเลือดจระเข้และพบเปปไทด์ที่สามารถทำลายแบคทีเรียและเชื้อราได้หลายชนิด ส่วนในประเทศไทย จากการศึกษาประสิทธิภาพของซีรัมของจระเข้ น้ำจืดพันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*) โดยการนำซีรัมจระเข้ความเข้มข้น 100, 75, 50, 25% ทดสอบกับ *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus subtilis* บ่มที่ 37 °C และนำแบคทีเรียที่บ่มในช่วงเวลา 0, 1, 3, 6, 9 และ 12 ชั่วโมง มาเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น พบว่า *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* มีปริมาณลดลงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1, 3 และ 6 ของการบ่ม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และไม่พบเลยตั้งแต่ชั่วโมงที่ 9 ของการบ่ม ส่วน *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* พบในปริมาณที่ไม่แตกต่างกันในแต่ละชั่วโมงของการบ่มและทุกความเข้มข้นของซีรัม และนอกจากนี้ พบว่าในจระเข้ น้ำจืด complement มีคุณสมบัติในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย (วิน เชยสมศรี และคณะ, ไม่ปรากฏปีพิมพ์) ล่าสุดผลงานตีพิมพ์จากห้องปฏิบัติการของ ร.ศ.ดร. สมปอง ธรรมศิริรักษ์ คือ Preecharam *et al.* (2008, 2009) ได้ยืนยันว่าในซีรัมและพลาสมาของจระเข้สายพันธุ์ไทยมีคุณสมบัติการเป็นสารต้านจุลชีพ (antibacterial substance) ที่

สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิด นอกจากนี้ Pata *et al.* (2011) ก็สามารถแยกบริสุทธิ์ antimicrobial peptides: leucrocins ได้จากสารสกัดเม็ดเลือดขาว ซึ่ง leucrocins มีสมบัติเป็น broad spectrum antimicrobial activity และมีกลไกการเข้าทำลายเชื้อแบคทีเรียที่เมมเบรน

จากรายงานการศึกษามาแล้วในพวกสัตว์มีกระดูกสันหลัง เช่น คน (Zasloff, 2002) หมู (Lee *et al.*, 1989) โค (Michael *et al.*, 1992) และกบ (Thomas *et al.*, 2000) พบว่าสัตว์เหล่านี้สามารถสร้างโปรตีนหรือเปปไทด์ที่ทำลายแบคทีเรียและเชื้อราได้ และสารสกัดจากสัตว์เหล่านี้อยู่ในระหว่างการพัฒนาไปใช้เป็นยาในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย แต่อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานการศึกษาที่แน่นอนว่ามีโปรตีนหรือเปปไทด์ประเภทใดหรือสารกลุ่มใดที่เกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่ในการป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรียในจระเข้สายพันธุ์ที่มีในประเทศไทย ซึ่งถ้าสามารถทราบถึงโปรตีนหรือสารต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันการติดเชื้อในจระเข้จะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการนำไปสู่การพัฒนา ใช้เพื่อผลิตเป็นวัคซีนหรือการพัฒนาจากผลิตภัณฑ์ที่มีอยู่มากเกินพอจากอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงจระเข้ อีกทั้งเป็นการเพิ่มมูลค่าในด้านการตลาดของวงการอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงจระเข้และเพิ่มรายได้ให้แก่ประเทศไทยมากยิ่งขึ้น ที่สำคัญปัจจุบันนี้ประเทศไทยมีการใช้ยาปฏิชีวนะมากขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งก่อให้เกิดแบคทีเรียที่มีการดื้อยามากขึ้น ดังนั้น การศึกษาหาโปรตีนเปปไทด์หรือสารกลุ่มออกฤทธิ์ที่มีสมบัติต้านแบคทีเรียชนิดใหม่ที่มีอยู่ในธรรมชาติน่าจะเป็นอีกทางหนึ่งที่มีประโยชน์อย่างมากต่อการต่อสู้กับโรคติดเชื้อแบคทีเรียและโรคเชื้อรา โดยเฉพาะในจระเข้ซึ่งมีการศึกษาว่าเป็นสัตว์ที่มีความทนทานอย่างมากต่อการติดเชื้อ จากการศึกษาพบว่า ซีรัมของจระเข้สายพันธุ์ในออสเตรเลียสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ 17 ชนิด เมื่อเปรียบเทียบกับซีรัมมนุษย์ซึ่งยับยั้งได้เพียง 6 ชนิด ล่าสุดจากการศึกษาของ Merchant *et al.* (2003) รายงานว่า ซีรัมจระเข้ (*Alligator mississippiensis*) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* ได้ดีกว่าซีรัมมนุษย์และยืนยันคุณสมบัติการทำลายเชื้อแบคทีเรียอาจจะมาจากการทำงานของระบบ complement (2005a) นอกจากนี้ Merchant *et al.* (2005b) ยังพบว่า ซีรัมจระเข้สายพันธุ์อเมริกาสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ HIV-1, WNV และ HSV-1 และในปัจจุบัน Merchant และคณะ (2005c) ได้แยก leukocyte extract จากเลือดจระเข้และพบเปปไทด์ที่สามารถทำลายแบคทีเรียและเชื้อราได้หลายชนิด และจากการ ศึกษาของ Preecharam *et al.* (2008, 2009) ได้ยืนยันว่าในซีรัมและพลาสมาของจระเข้สายพันธุ์ไทยมี antibacterial substance ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิด นอกจากนี้ Pata *et al.* (2011) ก็สามารถแยกบริสุทธิ์ antimicrobial peptides: leucrocins ได้จากสารสกัดเม็ดเลือดขาว ซึ่ง leucrocins มีสมบัติเป็น broad spectrum antimicrobial activity และมีกลไกการเข้าทำลายเชื้อแบคทีเรียที่เมมเบรน

สำหรับในประเทศไทยห้องปฏิบัติการของ รศ.ดร.สมปอง ธรรมศิริรักษ์ได้ดำเนินการทดลองศึกษาและแยกบริสุทธิ์ antimicrobial peptides หรือ antimicrobial proteins จากเลือดจระเข้เป็นแห่งแรกตั้งแต่ปี พ.ศ. 2546 จากข้อมูลที่ได้จากการศึกษาของ รศ.ดร. สมปอง ธรรมศิริรักษ์ (2546) ซึ่งได้รับทุน IPUS ปี 2546 (FS0045/46) จาก สกว. ได้เริ่มทำการศึกษาสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียในซีรัมจระเข้สายพันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*) โดยแยกบริสุทธิ์ antimicrobial peptide ด้วยเทคนิค DEAE anion exchange chromatography และพบว่าซีรัมจระเข้มีความสามารถทำลายหรือยับยั้งกาเจริญเติบโตของเชื้อ *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, และ *Pseudomonas aeruginosa* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากนั้นก็ได้ทำการศึกษา antimicrobial peptides จากเลือดจระเข้อย่างต่อเนื่อง และจากการที่ได้รับทุน

เพิ่มขีดความสามารถด้านการวิจัยของอาจารย์รุ่นกลางในสถาบันอุดมศึกษา จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยในปี พ.ศ. 2549-2552 ทำให้สามารถทราบข้อมูลโครงสร้างระดับปฐมภูมิ (primary structure) ของ antimicrobial peptides ที่แยกได้จากสารสกัดเม็ดเลือดขาวของจระเข้ ซึ่งได้ตั้งชื่อ antimicrobial peptides กลุ่มนี้ว่า leucrocins โดยพบว่า Leucrocins I มีลำดับกรดอะมิโนเป็น NH_3^+ -KLGPQGAQLLGQP-COO⁻ ส่วน Leucrocins II มีลำดับกรดอะมิโนเป็น NH_3^+ -DAKGEGNPDAKDGDAASEK-COO⁻ เมื่อศึกษากลไกการเข้าทำลายเชื้อแบคทีเรียเบื้องต้นโดย Scanning Electron Microscopy (SEM) และกล้องฟลูออเรสเซนซ์พบว่า Leucrocins I - II ทำให้เซลล์ *S. epidermidis* และ *S. typhi* มีลักษณะของเซลล์ที่ผิดปกติไปและคาดว่าจะมีกลไกการเข้าทำลายเซลล์โดยรบกวนขบวนการ permeabilization ของเซลล์แบคทีเรีย และจากการศึกษาความเป็นพิษของเปปไทด์พบว่า Leucrocins II มีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงสูง

ดังนั้นการทำให้โครงการวิจัยครั้งนี้จึงจะทำการศึกษาต่อเนื่องโดยเน้นการศึกษาเกี่ยวกับกลไกการเข้าทำลายเซลล์แบคทีเรียของ Leucrocins รวมทั้งศึกษาโครงสร้างระดับทุติยภูมิ (secondary structure) และตติยภูมิ (tertiary structure) เพื่อให้สามารถอธิบายถึงกลไกการเข้าทำลายเซลล์ของ Leucrocins I ได้อย่างเป็นแบบแผนที่แน่นอนเพื่อใช้เป็นต้นแบบ “**Microbial Killing Mechanisms Model**” สำหรับการอธิบายกลไกการทำงานของ antimicrobial peptides อื่นๆ ที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับ Leucrocins I ซึ่งหากเราทราบกลไกการทำงานที่แน่นอนแล้วก็สามารถนำ Leucrocins I ไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ได้ง่ายและสะดวกขึ้น นอกจากนี้ อาจจะมีการดัดแปลงโครงสร้าง Leucrocins ให้สามารถทำลายเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพพร้อมกับเป็นมิตรต่อเซลล์ของสัตว์ชั้นสูง เพื่อให้สามารถนำ antimicrobial peptide กลุ่ม leucrocins มาใช้เป็นยารักษาโรคติดเชื้อได้ในอนาคต โดยจะทำการสังเคราะห์สารต้นแบบคือ leucrocins ในรูปแบบต่างๆ คือ

1. เพิ่มความสามารถในการเข้าทำลายเชื้อแบคทีเรียโดยเพิ่มประจุบวกให้กับโครงสร้างเพื่อช่วยให้เกิดการจับกับแบคทีเรียได้ดีขึ้นเช่น
2. เพิ่มกรดไขมันเช่น Octanoic acid ที่ปลาย N-terminal เพื่อช่วยเพิ่มความเป็น hydrophobic (Thennarasu S. et al., 2005) หรือกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติเป็นไฮโดรโฟบิกสูง เช่น
3. เพิ่มกรดอะมิโนที่ทำให้โครงสร้างเป็น helix มากขึ้นเพื่อช่วยในการเข้าทำลายเซลล์ที่เมมเบรนของแบคทีเรีย
4. สังเคราะห์ในรูปแบบ D-form เพื่อประโยชน์ในการทนต่อ proteases เพื่อการนำไปใช้ในอนาค

วิธีการทดลอง

1. วิธีดำเนินการวิจัย

1.1 การเก็บตัวอย่างเลือดของจระเข้สายพันธุ์ไทย

1.1.1 ใช้เข็มฉีดยาดูดเก็บเลือดจระเข้จากส่วน Supravertebral branch ของ internal jugular vein ใส่ลงใน Sterile test tube ที่มี 0.5 M EDTA

1.1.2 ผสมให้เข้ากับ 0.5 M EDTA โดยพลิกคว่ำหลอดไปมาเบาๆ

1.1.3 เก็บไว้ในกล่องน้ำแข็งตั้งทิ้งไว้ให้เกิดการแยกชั้นของพลาสมา เม็ดเลือดขาว และเม็ดเลือดแดง

1.2 การแยกเก็บเม็ดเลือดขาว และการสกัดเม็ดเลือดขาว

1.2.1 เมื่อเลือดเกิดการแยกชั้นระหว่างของพลาสมา เม็ดเลือดขาว และเม็ดเลือดแดงใช้ sterile pastures pipette ดูดเก็บส่วนของเม็ดเลือดขาว ที่อยู่ในชั้นกึ่งกลางระหว่างส่วนบนคือพลาสมา กับส่วนเม็ดเลือดแดงส่วนล่าง

1.2.2 นำมา Centrifuged ที่ 800 xg (25 °C) เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วน pellets มาล้างซ้ำด้วย Normal saline

1.2.3 เติม 0.83% ammonium chloride เพื่อทำให้เม็ดเลือดแดงที่ปนมาแตก

1.2.4 นำมา Centrifuged ที่ 800 xg (25 °C) เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำส่วน cell pellet มาละลายใน 10% acetic acid (v/v) เก็บไว้ที่ -70 °C

1.2.5 ทำให้เม็ดเลือดขาวแตกโดยการ sonicate ที่ 4 °C 15 นาที นำมา Centrifuged ที่ 12,000 x g (4 °C) เป็นเวลา 30 นาที เก็บเอาเฉพาะส่วน supernatant ไปทำ speedVac หรือ Lyophilize แล้วละลายโปรตีนกลับด้วย 0.01 % acetic acid (v/v) เพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

1.3 การทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียจากสารสกัดเม็ดเลือดขาวของเลือดจระเข้ โดยวิธี disc diffusion method

1.3.1 เลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบในอาหารเหลว NB โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง ให้ได้ค่า OD₆₀₀ ประมาณ 0.5

1.3.2 นำ cotton swab ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จุ่มเชื้อแล้วกดสัมผัสกับข้างหลอดบรรจุเชื้อเพื่อไม่ให้ชุ่มเกินไป ป้ายเชื้อลงบนผิวหน้าอาหาร ในแนวระนาบ 3 ระนาบ

1.3.3 ใช้ปากคีบจุ่มแอลกอฮอล์แล้วฉีกไฟเพื่อฆ่าเชื้อ ทิ้งไว้ให้เย็น คีบแผ่น disc วางบนผิวหน้าอาหารให้ตรงกับตำแหน่งที่กำหนดไว้ ใช้ปากคีบกดเบาๆ ให้แนบกับผิวหน้าอาหาร

1.3.4 ปิเปตสารละลายที่ต้องการทดสอบลงบน disc ปริมาตร 30 µl

1.3.5 ทดสอบ positive control คือ streptomycin และ negative control คือ น้ำกลั่นร่วมด้วย

1.3.6 บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 6-12 ชั่วโมง

1.3.7 วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone

1.4 การแยกบริสุทธิ์ antimicrobial peptides จากสารสกัดเม็ดเลือดขาว ด้วยเทคนิค Anion exchange chromatography โดยใช้เครื่อง Fast protein liquid chromatography (FPLC)

1.4.1 เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ A (25 mM Tris-HCl pH 8.1) และ บัฟเฟอร์ B (25 mM Tris-HCl pH 8.1 + 0.5 M NaCl)

1.4.2 นำตัวอย่างที่ต้องการแยกมาเจือจาง 3 เท่า ด้วย buffer A

1.4.3 กรองด้วย filter membrane ขนาด 0.45 μm และเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

1.4.4 เปิดเครื่องเข้าสู่โปรแกรมควบคุม ติดตั้ง reservoir buffer, sample loop ปริมาตร 50 μL จากนั้น purge ไล่ฟองอากาศออกจาก line แล้วต่อ Anion exchange column ให้เรียบร้อย ทำการล้างเรซิน ด้วยบัฟเฟอร์ B ประมาณ 20 นาที และ equilibrate column ด้วย บัฟเฟอร์ A จนกระทั่ง base line คงที่

1.4.5 load และฉีดสารละลายโปรตีนหรือเปปไทด์ pooled fraction ที่มี peak โปรตีนหรือเปปไทด์ เพื่อนำไปตรวจสอบหาความสามารถในการ ทำลายเชื้อโดยเทคนิค Disc diffusion assay ทดสอบความบริสุทธิ์และหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยเทคนิค Tricine SDS-PAGE ในลำดับต่อไป

1.5 การแยกบริสุทธิ์เปปไทด์ leucrocins I และ leucrocins II ด้วยเทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC) และการสังเคราะห์เปปไทด์ leucrocins I, leucrocins II และ leucrocins analogues

1.5.1 เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ A (0.1% TFA) และ บัฟเฟอร์ B (60% acetonitrile (ACN) ใน 0.1% TFA)

1.5.2 กรองสารละลายเปปไทด์ด้วย filter membrane ขนาด 0.45 μm และเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

1.5.3 เปิดเครื่องเข้าสู่โปรแกรมควบคุม ติดตั้ง Reservoir buffer, Sample loop ปริมาตร 50 μL จากนั้น purge ไล่ฟองอากาศออกจาก line แล้วต่อ Apollo C18 5u ขนาด 250x4.6 mm column ให้เรียบร้อย ทำการล้าง Stationary phase ด้วย บัฟเฟอร์ B ประมาณ 30 นาที equilibrate column ด้วย บัฟเฟอร์ A จนกระทั่ง base line คงที่

1.5.4 load และฉีดสารละลายเปปไทด์

1.5.5 เก็บ peak เปปไทด์ เพื่อนำไปตรวจสอบหาความสามารถในการทำลายเชื้อโดยเทคนิค Disc diffusion assay และทดสอบความบริสุทธิ์

1.5.6 สังเคราะห์เปปไทด์ Leucrocins และเปปไทด์เลียนแบบ Leucrocins โดยวิธี Fmoc synthesis และแยกบริสุทธิ์พร้อมกับ confirm น้ำหนักโดย mass spectrometry

ทำการสังเคราะห์เปปไทด์ Leucrocins I, II, Leucrocins I analogue (ในรูป L-form D-form) และ Leucrocins II analogue ดังแสดงในตารางที่ 6 จากบริษัท GL Biochem (Shanghai) จากนั้นได้ตรวจสอบความบริสุทธิ์และบอกชนิดของเปปไทด์โดย HPLC และ Mass spectrometry

ตารางที่ 6 ลำดับกรดอะมิโนของ เปปไทด์ Leucrocine I, II, Leucrocine I analogue และ Leucrocine II analogue

Amino acid sequences	Total net charge	Total hydrophobic ratio
Leucrocine I: NGVQPKY (7 residues)	+1	11
Leucrocine II: NAGSLLSGWG (10 residues)	0	40
Leucrocine I analogue NKKAGLFVVQFPKKY (15 residues)	+ 4	40 %
Leucrocine II analogue NIKKWGKSKISGKWG (15 residues)	+ 5	26 %

1.6 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่เปปไทด์สังเคราะห์ leucrocine I, leucrocine II และ leucrocine analogues สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ (minimum inhibitory concentration (MIC)) ด้วยวิธี Broth microdilution assay

1.6.1 เลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบในอาหารเหลว NB โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง ให้ได้ค่า OD₆₀₀ ประมาณ 0.5 แล้วเจือจางเซลล์ให้ได้ 10⁴-10⁶ CFU/ml

1.6.2 เตรียมสารละลายแบคทีเรีย 10⁴ CFU/ml ปริมาณ 100 µl ลงใน 96-well microtiter cell-culture plates

1.6.3 เตรียมสารละลายเปปไทด์ 10 µl (เจือจางให้มีความเข้มข้นต่างๆ กัน) ลงใน 96-well microtiter cell-culture plates (ชุดควบคุมใช้ antibiotic แทนสารละลายเปปไทด์)

1.6.4 เลี้ยงเซลล์ที่ 37 °C เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง

1.6.5 วัดค่า A₅₅₀ ความเข้มข้นของเปปไทด์ที่น้อยที่สุดที่สามารถต้านการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรียได้เรียกว่า Minimal inhibitory concentration (MIC)

1.7 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมของเปปไทด์สังเคราะห์ leucrocine I, leucrocine II และ leucrocine analogues

1.7.1 Hemolytic activity assay

1.7.1.1 เตรียม 2% Human red blood cell (HRBCs)

1.7.1.2 ล้าง HRBCs ด้วย phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเฉพาะเซลล์เม็ดเลือดแดง

1.7.1.3 ผสม 2% HRBCs ปริมาตร 1 ml กับเปปไทด์ แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

1.7.1.4 นำสารผสม (reaction mixture) ไปปั่นเหวี่ยง แล้วเก็บสารละลายส่วนใส (supernatant) ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 525 นาโนเมตร

1.7.1.5 คำนวณเปอร์เซ็นต์ Hemolysis

1.7.2 Cytotoxicity assay

1.7.2.1 เตรียมเซลล์ Vero cell ใน 96-well plates ให้ได้ 1.34×10^4 cells/well ในอาหาร Ham F12 (มี L-glutamine และ 10% foetal calf serum เป็น supplemented) ที่มีสาร MTT อยู่

1.7.2.2 บ่มที่ 37 °C ภายใต้ ความดันบรรยากาศ 95% และ CO₂ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.7.2.3 เติมสารละลายเปปไทด์ (เจือจางให้มีความเข้มข้นต่างๆ กัน) ลงใน 96-well plates แล้วบ่มที่ 37 °C ภายใต้ ความดันบรรยากาศ 95% และ CO₂ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.7.2.4 นำเซลล์ไปวัดสีที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร โดยสาร MTT จะถูกเปลี่ยนเป็นสารประกอบสีม่วง formazan โดยเอนไซม์ mitochondrial dehydrogenase ที่ยังสามารถทำงานได้เฉพาะในเซลล์ที่มีชีวิต

1.8 การวิเคราะห์โครงสร้างระดับทุติยภูมิของเปปไทด์ด้วยเทคนิค Circular dichroism (CD)

1.8.1 ละลายเปปไทด์ใน 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) หรือ 50% trifluoroethanol (TFE) หรือ 30 mM SDS micelles ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1 mg/ml

1.8.2 วัดค่า molar ellipticities ของเปปไทด์ด้วยเครื่อง spectropolarimeter (สแกนที่ความยาวคลื่น 190-260 นาโนเมตร)

1.9 การศึกษาการกลไกการเข้าทำลายเชื้อแบคทีเรียของเปปไทด์ L-,D-peptides

1.9.1 Outer membrane permeabilization assay

ในการทดลองจะใช้ 1-N-phenyl naphthylamine (NPN) เป็นตัวตรวจสอบ ซึ่ง NPN เป็นสาร fluorescent โดยจะเกิดการเรืองแสงได้ดีเมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่เป็น hydrophobic โดยหากเปปไทด์สามารถทำให้เมมเบรนชั้นนอกเกิด permeabilization สาร NPN จะเข้าไปจับกับบริเวณ hydrophobic ของ lipid bilayer ซึ่งจะทำให้ค่าการเรืองแสงของ NPN เพิ่มขึ้น

1.9.1.1 เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลวให้อยู่ในช่วง log phase ($OD_{600} = 0.5-0.6$)

1.9.1.2 ปั่นเก็บเซลล์ แล้วล้างเซลล์ด้วย HEPES buffer pH 7.2 แล้ว re-suspended เซลล์ใน 50 mM KCN ใน HEPES buffer pH 7.2 ($OD_{600} = 0.5-0.6$)

1.9.1.3 ปิเปต 500 mM NPN ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ใส่ในเซลล์แบคทีเรียที่จะทดสอบ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 30 วินาที แล้วเติมเปปไทด์ที่ต้องการทดสอบความสามารถในการทำลายเซลล์เมมเบรนชั้นนอกของแบคทีเรีย

1.9.1.4 บ่มสารละลายผสมนาน 14 นาที แล้ววัดฟลูออเรสเซนส์ที่เพิ่มขึ้นของสาร NPN ด้วยเครื่องfluorescence spectrophotometer โดยใช้ streptomycin sulphate เป็น positive control

1.9.2 Inner membrane permeabilization assay

1.9.2.1 SYTOX[®] Green influx assay

1. เลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบในอาหารเหลว NB โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง ให้ได้ค่า OD₆₀₀ ประมาณ 0.5

2. จากนั้นปั่นเก็บเซลล์ที่ 3,000xg นาน 5 นาที แล้วล้างเซลล์ด้วย 10 mM sodium phosphate buffer (PBS) pH 7.4 สองครั้งและละลายเซลล์ในบัฟเฟอร์เดิมให้ได้ OD₆₀₀ = 0.1 (1x10⁸ CFU/mL)

3. Aliquots สารละลายเซลล์ 100 ไมโครลิตร ใส่ใน 96-black well plate จากนั้นเติมสารละลายเปปไทด์ 10 ไมโครลิตร ที่มี SYTOX[®] Green (5 µM)

4. วัดด้วยเครื่อง Fluorescence Microplate reader (EX.504, Em.523) ตั้งแต่นาทีที่ 0-60

1.9.2.2 β-galactosidase leakage assay

1. เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทดสอบในอาหารเหลว NB ที่มี 2% lactose โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง ให้ได้ค่า OD₆₀₀ ประมาณ 0.5

2. ปั่นเก็บเซลล์แล้วละลายเซลล์ใน 0.5% NaCl ให้ได้ค่า OD₄₂₀ ประมาณ 1.2

3. เตรียมสารละลายเซลล์แบคทีเรียใน 96-well plates เติมน้ำกับ ONPG ลงในสารละลายเซลล์แบคทีเรีย

4. ตรวจวัดผลิตภัณฑ์ (o-nitrophenol) ที่เกิดขึ้นโดยวัดค่า OD₄₂₀

1.9.3 DNA-binding assay

1.9.3.1 ผสม λDNA กับ 10x binding buffer, น้ำ และ สารสกัดเม็ดเลือดขาว โดยใช้ อัตราส่วนระหว่าง DNA ต่อ สารสกัดเม็ดเลือดขาว ดังนี้ 1:0.5, 1:1, 1:2, 1:4 และ 1:8

1.9.3.2 บ่มสารละลายที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

1.9.3.3 เมื่อครบ 1 ชั่วโมง ทำการแยกชิ้นส่วน DNA ด้วย 0.75% agarose/TAE gel, 70 mA เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง

1.9.3.4 ย้อมเจลด้วย Ethidium bromide แล้วถ่ายรูปเจลด้วยเครื่อง Gel Document (Bio-Rad)

1.9.4 ตรวจสอบด้วยเทคนิคกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (SEM หรือ TEM)

1.9.4.1 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง

(1) เตรียม cell starter ของเชื้อแบคทีเรีย

(2) ปิเปต cell starter ปริมาตร 1 ml ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml ที่มีอาหาร NB อยู่ 100 ml

(3) ทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C จนกระทั่งสามารถวัดค่า OD₆₀₀ 0.5

(4) ทำการ centrifuge ที่ 1,500 g เป็นเวลาประมาณ 10 นาที ในขั้นตอนนี้อาจทำการ centrifuge หลายรอบ จนกว่าจะได้ปริมาณเซลล์แบคทีเรียตามต้องการ

(5) ทำการล้างเซลล์ด้วย 10 mM phosphate buffer saline (PBS) pH 7.0 ประมาณ 2 ครั้ง

(6) จากนั้นทำการละลายเซลล์ด้วย 10 mM PBS ให้ได้ค่า OD₆₀₀ ประมาณ 0.1

(7) ปิเปตสารละลายเซลล์แบคทีเรีย 100 µl และสารละลายเปปไทด์ 100 µl (1:1) ลงใน microtube ขนาด 1.5 ml จากนั้นทำการบ่มที่ 37 °C เป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง

(8) ทำการ fix เซลล์ด้วย 2.5% glutaraldehyde (w/v) ประมาณ 1 ชั่วโมง วางบน polycarbonate membrane

(9) ล้างด้วย 10 mM PBS

1.9.4.2 ขั้นตอนการส่องด้วย กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

(1) นำเซลล์บน membrane มาทำการ dehydrate ด้วย 30% ethanol, 50% ethanol, 70% ethanol และ 90% ethanol อย่างละ 1 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที ตามลำดับ จากนั้นล้างด้วย 100% ethanol 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาทีเช่นกัน

(2) นำ membrane เข้าเครื่อง CPD จากนั้นทำการเคลือบทองลงบนผิวเซลล์

(3) นำมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

1.10 การออกแบบเปปไทด์เพิ่มเติมโดยใช้ Lue I เป็นแม่แบบ และการศึกษาคุณสมบัติการเป็น antibacterial peptide

(1) การออกแบบเปปไทด์โดยอาศัยความไม่มีขั้วและมีขั้วในการเติมกรดอะมิโน

ออกแบบเปปไทด์จำนวน 9 เส้นเปปไทด์ เพิ่มเติม ซึ่งออกแบบโดยใช้ Lue I เป็นแม่แบบโดยการมองในรูปแบบ helical wheel และอาศัยความไม่มีขั้วและมีขั้วในการเติมกรดอะมิโนให้มีความเป็น hydrophobic และ hydrophilic facet สูงขึ้น โดยออกแบบให้เติม tryptophan เพื่อเพิ่มความเป็น hydrophobic facet และเติม arginine หรือ lysine เพื่อเพิ่มความเป็น hydrophilic facet เพื่อทดสอบสมมุติฐานที่ว่า hydrophobic และ hydrophilic facet ที่เหมาะสมมีความสำคัญกับเปปไทด์สายสั้นๆ ผลการทดลอง เปปไทด์ที่ออกแบบแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงเปปไทด์ที่มีการออกแบบโดยอาศัยความไม่มีขั้วและมีขั้วในการเติมกรดอะมิโนต่อจากเปปไทด์ Lue I

Peptides	Sequence	Theoretical (Mw)	Measured (Mw)	Net charge	Hydrophobicity (%)
KT2	NGVQPKYKWWKWWKKWW-NH ₂	2433.88	2433.92	+6	41
RWKT2	NGVQPWYKWWKWWKKWW-NH ₂	2491.92	2491.96	+5	47
RW2	RWWRWRRWW-NH ₂ (tail)	1759.04	1759.08	+4	60
CRT2	NGVQPKYRWWRWRRWW	2546.93	2546.95	+5	41
RT2	NGVQPKYRWWRWRRWW-NH ₂	2545.93	2545.97	+6	41
RT4	NGVQPKYRWWRWRRWWWW-NH ₂	2918.36	2918.40	+6	47
CRT3	NGVQPKYRWWRWRRWW	2732.14	2732.18	+5	41
RW3	RWWRWRRWW-NH ₂	1945.26	1945.29	+4	63
KT3	NGVQPKYKWWKWWKKWW-NH ₂	2620.09	2620.13	+5	44

(2) การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MIC) และความสามารถในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC)

- MIC เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจนถึงช่วง mid log growth phase และมีค่า O.D.600 = 0.001 และนำมา 100 microliters ใส่ใน 96 well plate จากนั้นเติมเปปไทด์ที่มีความเข้มข้นต่างๆซึ่งตัวแปรควบคุม negative control จะเติมเพียงบัฟเฟอร์ จากนั้นนำไปวัดค่า O.D.600 เริ่มต้นและนำไปบ่มที่ 37 °C จนถึงช่วง mid log growth phase และนำไปวัดค่า O.D.600 จากนั้นคำนวณหาค่า MIC โดย positive control คือค่า O.D.600 เริ่มต้น ค่า MIC ที่แสดงในตารางคือค่าที่สามารถยับยั้งได้มากกว่า 90%

- MBC นำตัวอย่างที่วัดแล้วว่าไม่มีค่าความขุ่นเพิ่มขึ้นที่ได้จากการทำ MIC มาเลี้ยงต่อใน agar plates บ่มต่อที่ 37 °C, 48 h

1.11 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงของมนุษย์

ทำเช่นเดียวกับหัวข้อ 1.7

1.12 ศึกษาความสามารถในการทำลาย bacterial membrane โดยใช้ไลโปโซม

1.12.1 เตรียม Large unilamellar vesicles (LUVs) โดยละลาย 2DOPC: 3DOPG ใน chloroform และทำการระเหยตัวทำละลายโดยใช้ evaporator 12 ชั่วโมง จนได้ lipid film

1.12.2 นำสารละลายบัฟเฟอร์ ANTS 12.5 mM DPX 45 mM, NaCl 20 mM, Tris-HCl 10 mM ค่า pH 7.5 ปริมาณ 0.5 ml มาผสมกันแล้วเขย่าอย่างรุนแรงจนกระทั่งแผ่นไขมัน (lipid film) หายไป แยกไลโปโซมที่ห่อหุ้มสาร ANTS/DPX ออกจากสารละลาย ANTS/DPX ที่ไม่ถูกห่อหุ้ม โดย gel filtration chromatography

1.12.3 รวบรวมสารไลโปโซม (liposome suspension) ทั้งหมด วัดรังสีฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescent intensity) ของ ANTS ที่รั่วออกมาด้วย spectrofluoro photometer โดยตั้งค่า excitation ที่ความยาวคลื่น 386 nm และตั้งค่า emission ที่ความยาวคลื่น 512 nm

1.12.4 คำนวณหาร้อยละการรั่ว (% leakage) ของ ANTS ในแต่ละอัตราส่วนของความเข้มข้นของไขมันต่อเปปไทด์ จากสมการ $%L = 100 (F_s - F_0 - F_p) / (F_{100} - F_0)$ แล้วนำมาสร้างกราฟ ซึ่ง F_s คือ ค่า fluorescence intensity ของไลโปโซมในสารละลาย บัฟเฟอร์ที่บ่มกับเปปไทด์ F_0 คือค่า fluorescence intensity ของไลโปโซมในสารละลายบัฟเฟอร์ F_p คือค่า fluorescence intensity ของเปปไทด์ที่อยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ F_{100} คือค่า fluorescence intensity ของไลโปโซมในสารละลายบัฟเฟอร์ ที่บ่มกับ triton x 100

1.13 การศึกษาลักษณะภายนอกของเซลล์แบคทีเรียเมื่อสัมผัสกับเปปไทด์

ศึกษาลักษณะภายนอกของเซลล์แบคทีเรียเมื่อบ่มกับเปปไทด์โดยใช้กล้อง scanning electron microscope ทำเช่นเดียวกับหัวข้อ 1.9.4.1 แต่ใช้ความเข้มข้นของเปปไทด์เท่ากับ 10x MIC และบ่มที่เวลา 1 นาทีและ 60 นาที

1.14 ศึกษาความสามารถในการจับกับ DNA ของเปปไทด์ที่ออกแบบ

ทำเช่นเดียวกับหัวข้อ 1.9.3

1.15 Aggregation assay

1.15.1 เตรียมไลโปโซม (LUV suspension) และทำการตรวจวัดความเข้มข้นโดยวิธีการ colorimetric method

1.15.2 ผสมไลโปโซมกับเปปไทด์ในหน่วยความเข้มข้น molar ratio ใน 96 well microplate โดยมีบัฟเฟอร์เป็น negative control

1.15.3 บ่มเป็นเวลา 30 นาที

1.15.4 ตรวจวัดความสามารถในการทำให้ไลโปโซมเกาะกันโดยใช้ microplate reader ที่ 450 nm

1.16 LPS binding assay

1.16.1 นำสารละลาย LPS ผสมกับสาร PMB-BY และบ่มเป็นเวลา 60 นาที

1.16.2 ผสมเปปไทด์ในสารละลาย LPS ผสมกับสาร PMB-BY ในความเข้มข้นอัตราส่วนของ peptide และ PMB-BY 1:1, 10:1 และ 100:1 ส่วนปริมาณ LPS มากเกินพอ

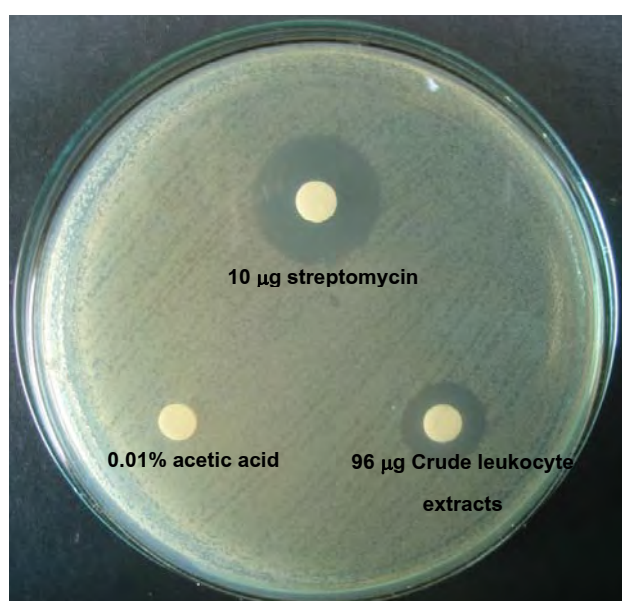
1.16.3 วัดปริมาณ fluorescent ที่ Ex: 504 และ Em: 511

1.16.4 คำนวณหาปริมาณการแทนที่ PMB-BY ด้วยเปปไทด์

ผลการทดลอง

1. ความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดเม็ดเลือดขาว และแยกบริสุทธิ์ *Leucrocins* ด้วย เทคนิคโครมาโตกราฟี

โดยการทดสอบการออกฤทธิ์ของสารสกัดเม็ดเลือดขาว (leukocyte extracts) ของจระเข้ต่อเชื้อแบคทีเรีย 21 ชนิด เป็นแบคทีเรียแกรมบวก 13 ชนิด และแบคทีเรียแกรมลบ 8 ชนิด ด้วยเทคนิค Disc diffusion assay โดยใช้ streptomycin เป็น Positive control ปริมาณ 10 ไมโครกรัม ส่วน Negative control คือ สารละลาย 0.01% acetic acid ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4 และตารางที่ 8



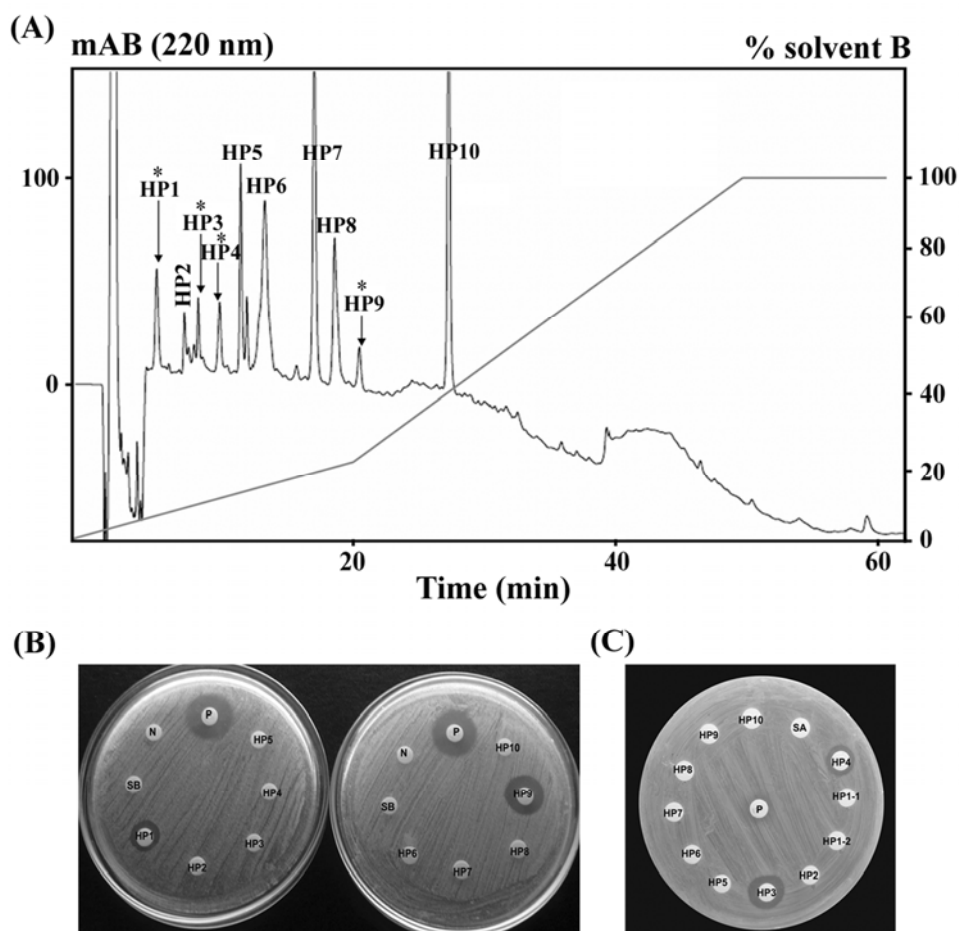
รูปที่ 4 ตัวอย่างการเกิด Clear zone ในเชื้อ *Bacillus megaterium* ที่ทดสอบกับสารสกัดเม็ดเลือดขาวของจระเข้

จากผลการทดลอง พบว่า สารสกัดเม็ดเลือดขาวจระเข้สายพันธุ์ไทยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ได้ทั้งหมด 9 ชนิด ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก 5 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus pumilus* TISTR 905 , *Bacillus subtilis* TISTR 008, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Bacillus megaterium* (clinical isolated) และแบคทีเรียแกรมลบได้ 4 ชนิด คือ *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae* (clinical isolated) , *Salmonella typhi* ATCC 5784 และ *Pseudomonas aeruginosa*

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบความสามารถในการต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 21 ชนิดของสารสกัดเม็ดเลือดขาวของจระเข้ (Leukocyte extracts) ด้วยเทคนิค Disc diffusion assay

Pathogen	Positive control	Negative control	Leukocyte Extracts
<u>Gram Positive</u>			
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	√	-	√
<i>Staphylococcus aureus</i> 1466	√	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	√	-	-
<i>Bacillus sphaericus</i> TISTR 678	√	-	-
<i>Bacillus pumilus</i> TISTR 905	√	-	√
<i>Bacillus licheniformis</i> TISTR 1010	√	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> TISTR 008	√	-	√
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	√	-	√
<i>Bacillus megaterium</i> (clinical isolated)	√	-	√
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	√	-	-
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> TISTR 1045	√	-	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i> DMS 5851	√	-	-
<i>Xanthomonas</i> sp.	√	-	-
<u>Gram Negative</u>			
<i>Salmonella typhi</i>	√	-	√
<i>Vibrio cholerae</i> (clinical isolated)	√	-	√
<i>Salmonella typhi</i> ATCC 5784	√	-	√
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	√	-	√
<i>E.coli</i> 0157:H7	√	-	-
<i>Pseudomonas putida</i> 1522	√	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 17736	√	-	-
<i>Salmonella paratyphi</i> B	√	-	-

เมื่อแยกบริสุทธิ์ Leucrocins ด้วย เทคนิคโครมาโตกราฟี และทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิค Disc diffusion assay ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 5A-C



รูปที่ 5 (A) การแยกเปปไทด์ Leucrocins โดยใช้คอลัมน์รีเวอร์เฟสชนิดซี 18 สารละลายเฟสเคลื่อนที่ A: 0.1% Trifluoro acetic acid (0.1% TFA) สารละลายเฟสเคลื่อนที่ B: 60% Acetonitrile ใน 0.1% TFA; HP1=Leucrocine I, HP9= Leucrocine II, HP3= Leucrocine III และ HP4= Leucrocine IV

(B) ผลการยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* ของเปปไทด์ Leucrocine I และ Leucrocine II

(C) ผลการยับยั้งเชื้อ *V. cholerae* ของเปปไทด์ Leucrocine I II และ Leucrocine IV

หลังจากนั้นได้ทำการยืนยันลักษณะโครงสร้างปฐมภูมิ (primary structure) ของ Leucrocins โดย Mass spectrometry จากการวิเคราะห์ Leucrocine I และ Leucrocine II โดยวิธี mass spectrometry พบว่า Leucrocine I มี precursor mass ประมาณ 806.99 Da ส่วน Leucrocine II มี precursor mass ประมาณ 956.37 Da โดยการวิเคราะห์โดยวิธี De novo LC-MS/MS sequencing พบว่า Leucrocine I มีลำดับกรดอะมิโนบางส่วนเป็น NGVQPKY และลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของ Leucrocine II คือ NAGSLSGWG (ตารางที่ 9) แต่ไม่สามารถหาลำดับกรดอะมิโนของ Leucrocine I II และ Leucrocine IV อาจเนื่องมาจากมีความบริสุทธิ์ไม่เพียงพอ

ตารางที่ 9 ลำดับกรดอะมิโนของ Leucrocine I and II โดยวิธี De novo sequencing LC MS/MS

Samples	Precursor Mass	Amino acid sequence	Charge	Mass analysis (Da)	% hydrophobicity	pI	Secondary structure prediction
Leucrocine I	806.99	NGVQPKY	1	804.9	11	8.59	28.57% Extended strand 71.43% Random coil
Leucrocine II	956.37	NAGSLLSGWG	0	847.88	40	5.52	44.44% Extended strand 55.56% Random coil

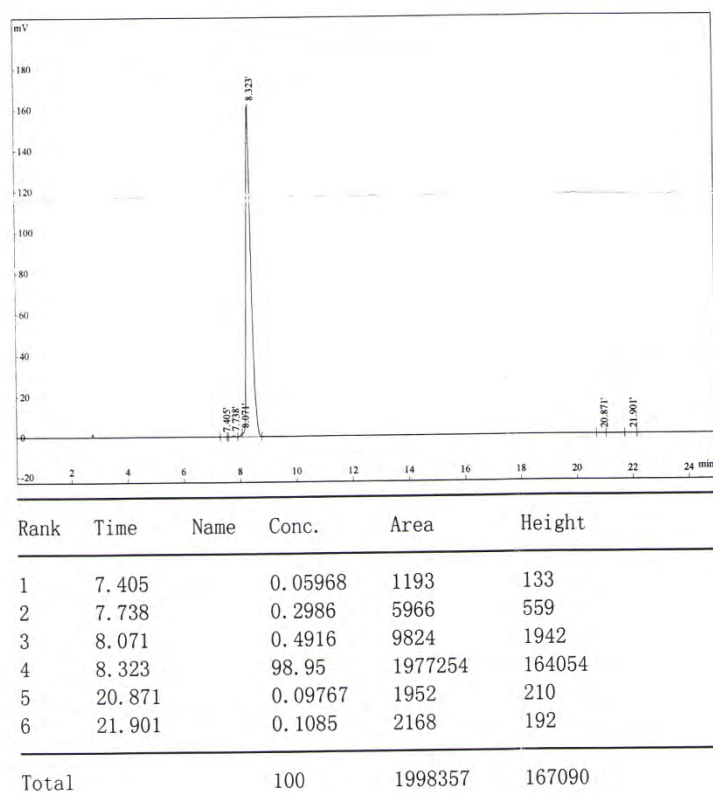
2. สังเคราะห์เปปไทด์ Leucrocins และเปปไทด์เลียนแบบ Leucrocins โดยวิธี F-moc synthesis

ทำการสังเคราะห์เปปไทด์ Leucrocine I, II, Leucrocine I analogue (ในรูป L-form D-form) และ Leucrocine II analogue ดังแสดงในตารางที่ 10 จากบริษัท GL Biochem (Shanghai) จากนั้นได้ตรวจสอบความบริสุทธิ์และบอกรีตของเปปไทด์โดย HPLC และ Mass spectrometry

ตารางที่ 10 ลำดับกรดอะมิโนของ เปปไทด์ Leucrocine I, II, Leucrocine I analogue และ Leucrocine II analogue

Amino acid sequences	Total net charge	Total hydrophobic ratio
Leucrocine I: NGVQPKY (7 residues)	+1	11
Leucrocine II: NAGSLLSGWG (10 residues)	0	40
Leucrocine I analogue NKKAGLFVVQFPKKY (15 residues)	+ 4	40 %
Leucrocine II analogue NIKKWGKSKISGKWG (15 residues)	+ 5	26 %

(A)

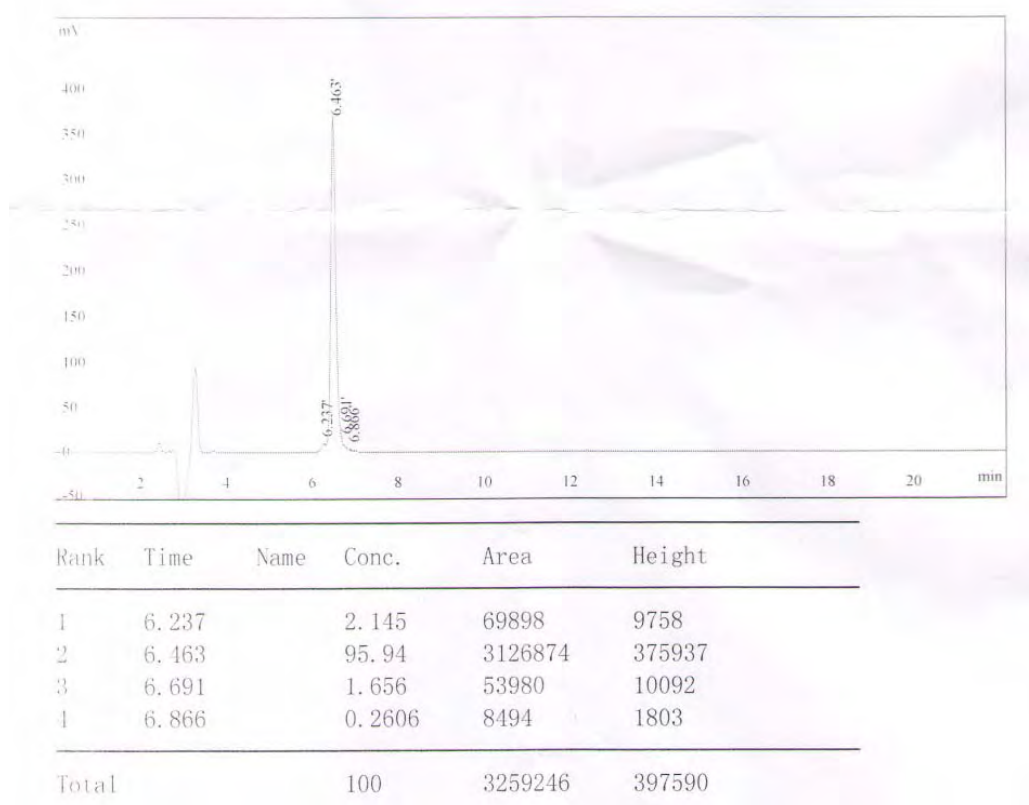


(B)

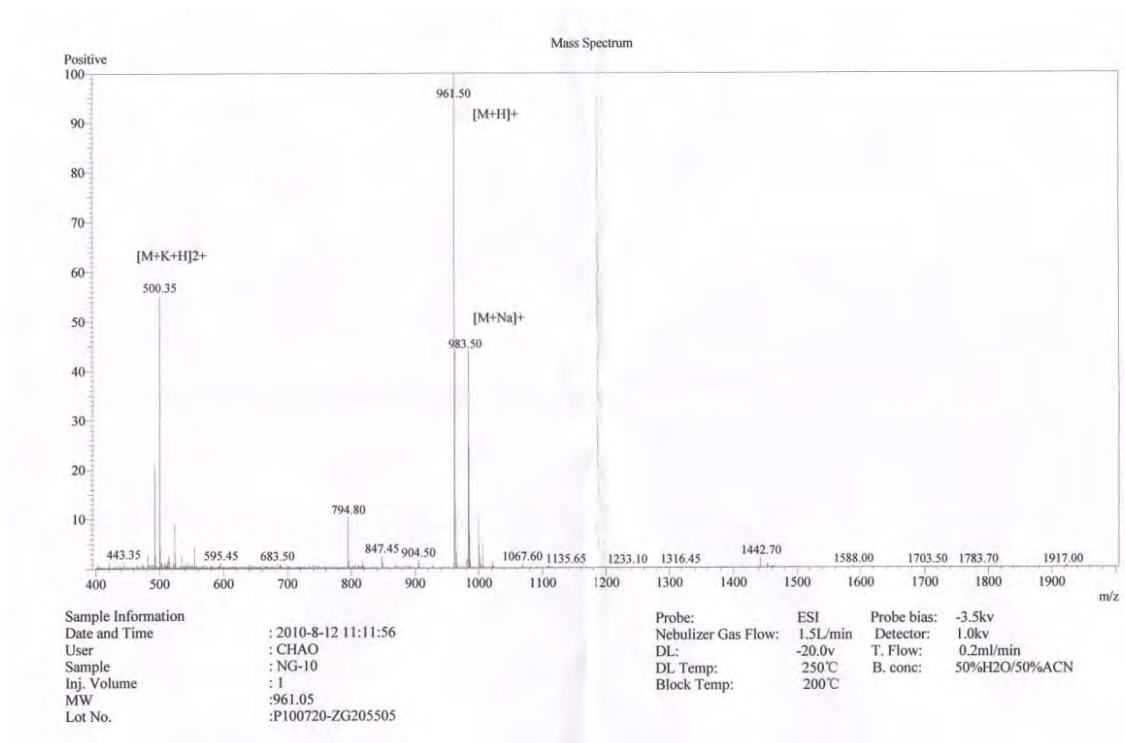


รูปที่ 6 (A) HPLC profile และ (B) Mass Spectrum ของ Leucrocinn I

(A)

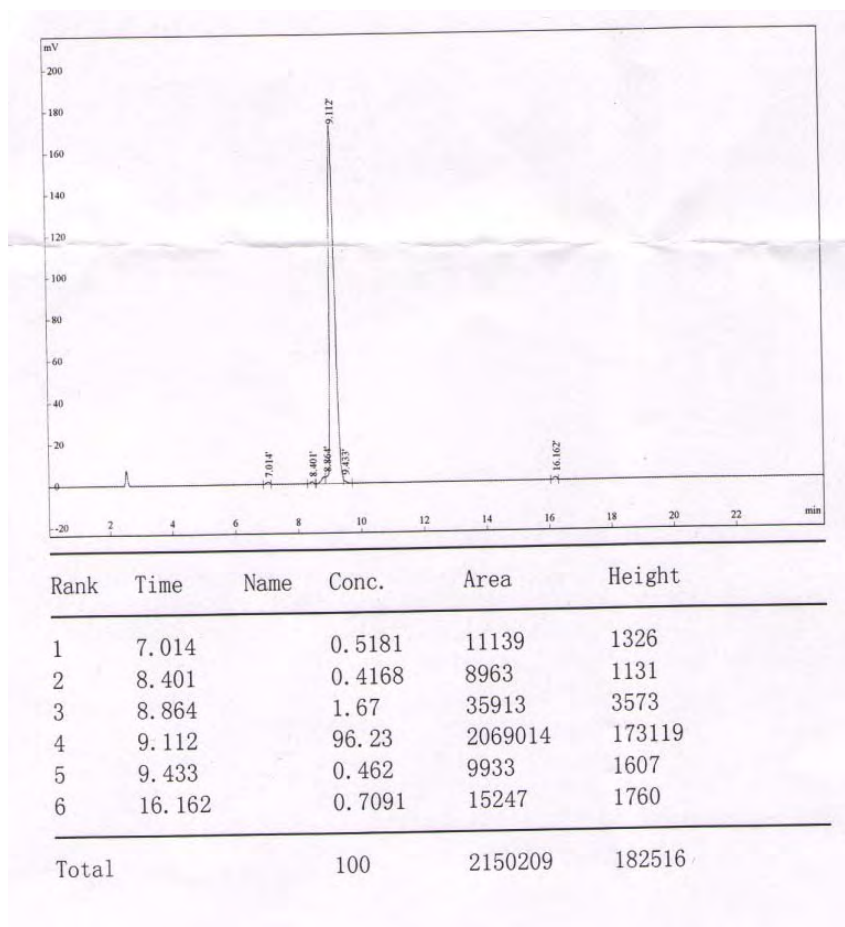


(B)

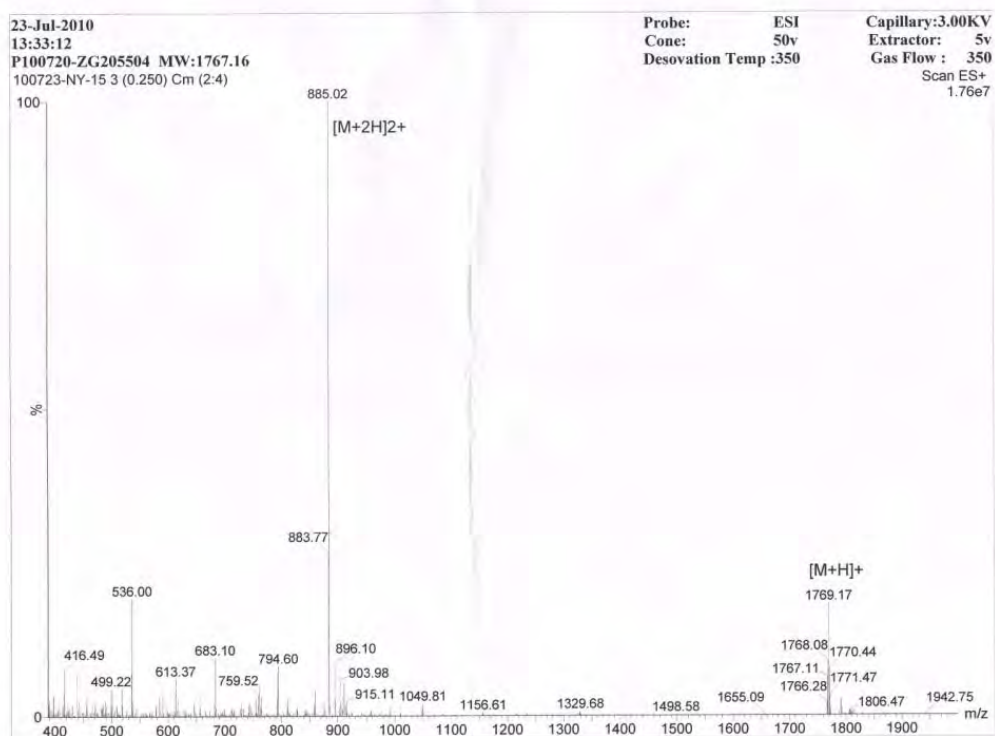


ຮູບທີ່ 7 (A) HPLC profile ແລະ (B) Mass Spectrum ຂອງ Leucrocinn II

(A)

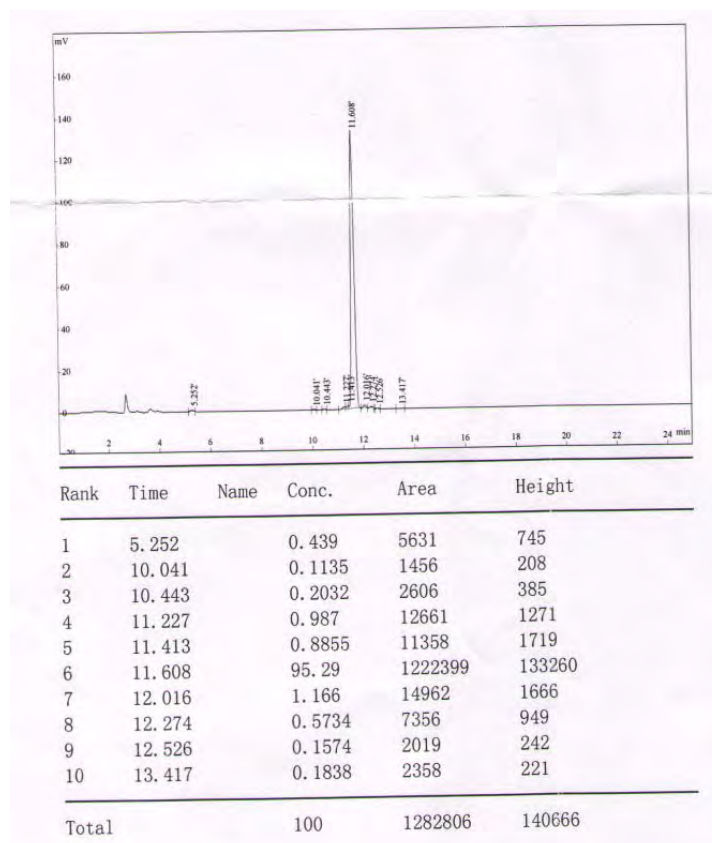


(B)

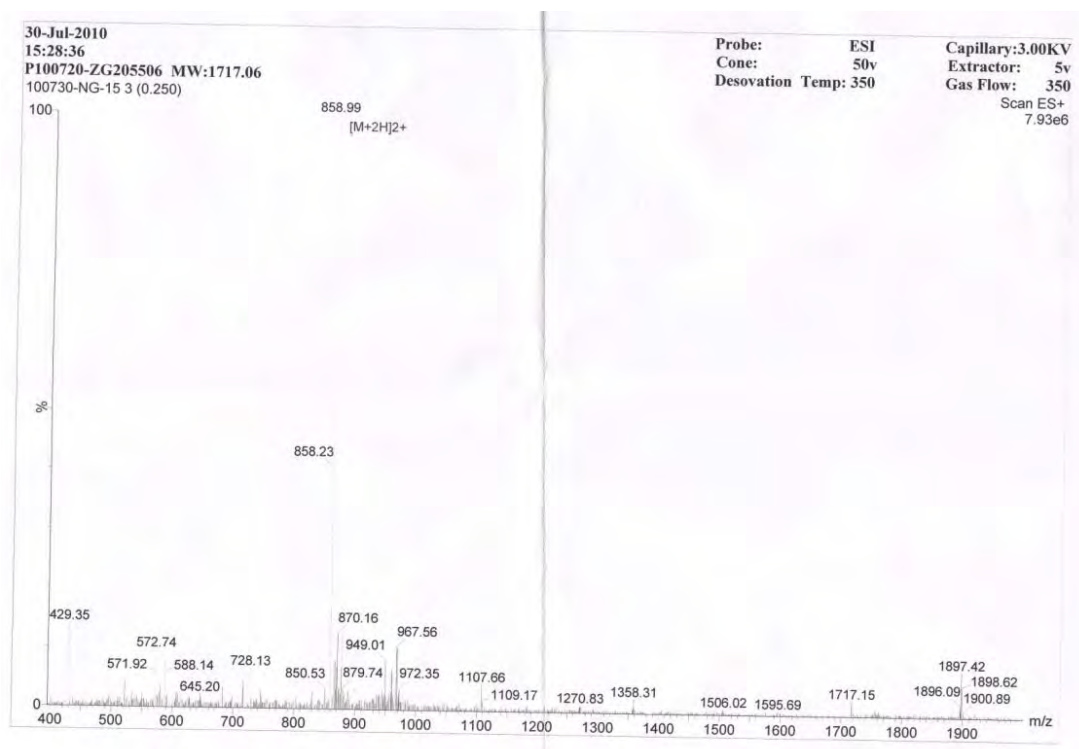


รูปที่ 8 (A) HPLC profile และ (B) Mass Spectrum ของ Leucrocin I analogue

(A)



(B)



รูปที่ 9 (A) HPLC profile และ (B) Mass Spectrum ของ Leucrocinn II analogue

3. ความเข้มข้นต่ำสุดที่เปปไทด์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ (MIC)

ความเข้มข้นต่ำสุดที่เปปไทด์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ (MIC) ด้วย

เทคนิค Broth microdilution susceptibility test ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของเปปไทด์ Leucrocins และ Leucrocins analogue ในการยับยั้งแบคทีเรีย

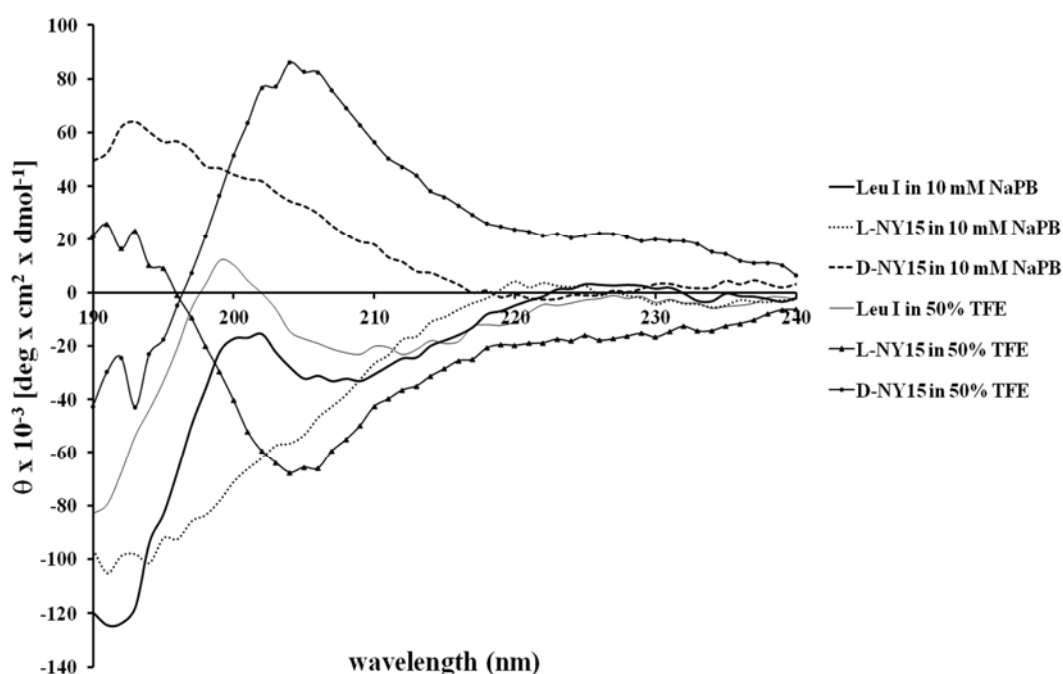
Peptide	MCI (µg/ml)					
	Gram-Positive bacteria		Gram-Negative bacteria			
	<i>B. megaterium</i> (clinical isolate)	<i>B.sphaericus</i> TISTR 678	<i>V.cholerae</i> (clinical isolate)	<i>E. coli</i> 0157:H7	<i>S. typhi</i> (clinical isolate)	<i>S. typhi</i> ATCC 5784
Leucrocine I	>500	>500	>500	>500	>500	>500
Leucrocine II	>500	>500	>500	>500	>500	>500
Leucrocine I analogue (L-form)	50.00	363.64	90.91	>500	>500	>500
Leucrocine I analogue (D-form)	9.09	27.27	27.27	72.73	>100	90.91
Leucrocine II analogue	72.27	>500	>500	>500	>500	>500
Magainin2	9.09	45.45	18.19	90.91	27.27	36.36

จากผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของเปปไทด์สังเคราะห์ พบว่าเปปไทด์ Leucrocins ต้นแบบมีค่า MIC ที่สูงกว่า Leucrocine analogues ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากเปปไทด์สังเคราะห์ Leucrocins ไม่สามารถม้วนตัวให้อยู่ในโครงสร้างที่สามารถทำงานได้ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ละลาย ซึ่งจำเป็นต้องมีการหาบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการละลาย และพบว่า Leucrocine analogue ที่สังเคราะห์ด้วยกรดอะมิโนที่อยู่ในรูป D-form (D-amino acids) นั้นมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าเปปไทด์ที่สังเคราะห์ด้วย L-amino acids ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยของ Vorland *et al.* (1999) ที่ได้ทำการสังเคราะห์เปปไทด์ Lactoferricin B (Lf-cin B) ทั้งในรูป L-form และ D-form แล้วนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ พบว่า Lf-cin B ที่สังเคราะห์ด้วย

D-amino acids ทั้งหมดนั้น มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีกว่า L-cin B ที่สังเคราะห์ด้วย L-amino acids

4. วิเคราะห์โครงสร้างระดับทุติยภูมิของเปปไทด์ด้วยเทคนิค Circular dichroism (CD)

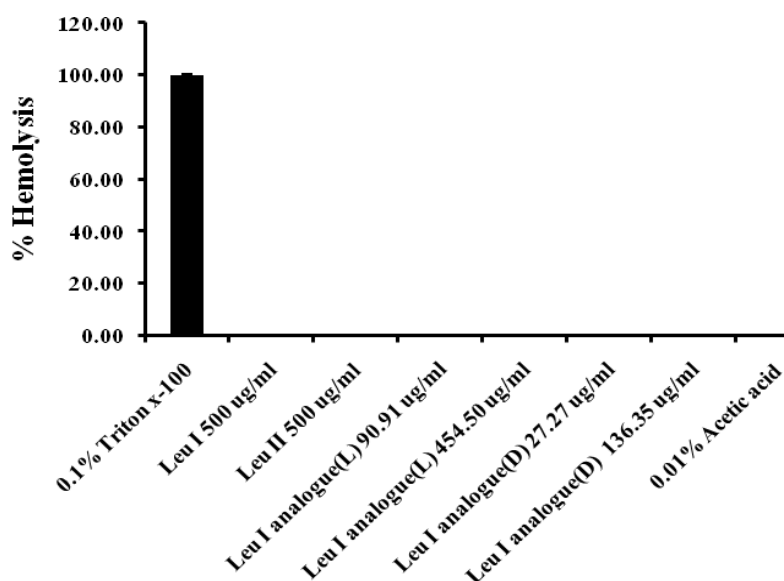
การศึกษานี้เพื่อต้องการทราบว่าในสภาวะที่เป็น hydrophilic (สารละลายบัฟเฟอร์) และ hydrophobic นั้นเปปไทด์มีโครงสร้างระดับทุติยภูมิเป็นแบบใด โดยละลายเปปไทด์ใน 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) (สภาวะ hydrophilic) หรือ 50% trifluoroethanol (TFE) (สภาวะ hydrophobic) ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1 mg/ml วัดค่า molar ellipticities ของเปปไทด์ด้วยเครื่อง spectropolarimeter (สแกนที่ความยาวคลื่น 190-260 นาโนเมตร) ผลการทดลองพบว่า เปปไทด์ leucrociclin I analogue (L-form และ D-form) ที่อยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ มีโครงสร้างแบบไร้รูปร่าง (random coil) แต่ในสภาวะ hydrophobic นั้นเปปไทด์มีโครงสร้างเปลี่ยนเป็น helix ดังแสดงในรูปที่ 6 ซึ่งเปปไทด์ L-form และ D-form จะมีโครงสร้างเป็นกระจกเงาซึ่งกันและกัน



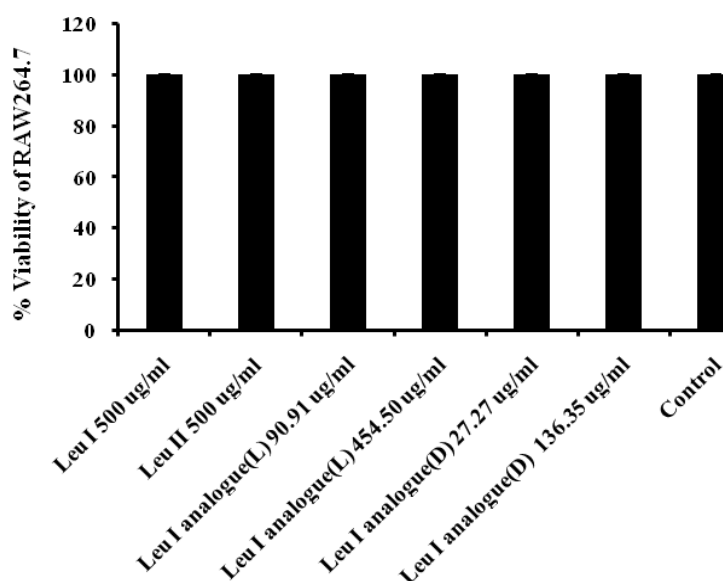
รูปที่ 10 โครงสร้างระดับสองของเปปไทด์เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง CD

5. ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงของเปปไทด์สังเคราะห์ Leucrociclin และ Leucrociclin I analogue

นำ Leucrociclin I analogue ไปทำการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงของมนุษย์ และเซลล์แมคโครฟาจ โดยวัดฮีโมโกลบินที่เกิดจากการแตกของเม็ดเลือดแดง และการทำ MTT assay พบว่าถ้าใช้ความเข้มข้นของเปปไทด์ที่ค่า MIC และที่ค่า 5xMIC ต่อเชื้อ *V. cholerae* นั้น Leucrociclin I analogue ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงของมนุษย์ และ vero cell ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 7 และ 8



รูปที่ 11 ความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงของเปปไทด์สังเคราะห์ Leucrocins และ Leucrocine I analogue; ใช้ 0.1% Triton X-100 ในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก 100 เปอร์เซ็นต์, negative control คือ 0.01% acetic acid



รูปที่ 12 ความเป็นพิษต่อเซลล์ vero cell ของเปปไทด์สังเคราะห์ Leucrocins และ Leucrocine I analogue; negative control คือ medium ที่ใช้เลี้ยงเซลล์

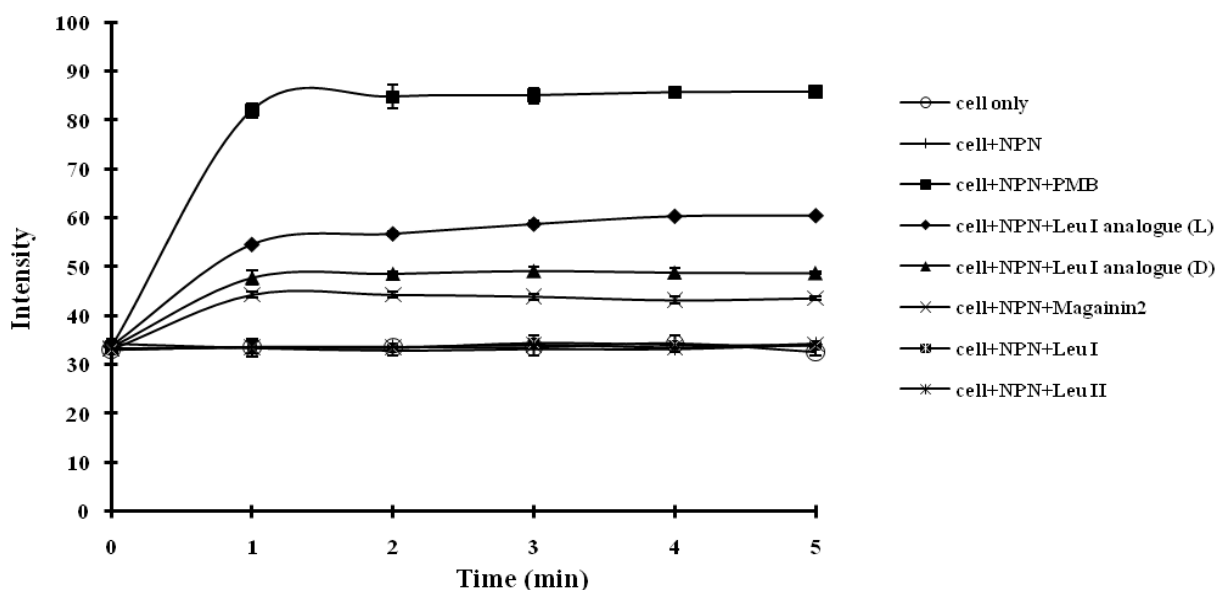
6. การศึกษากลไกการเข้าทำลายเชื้อแบคทีเรียของเปปไทด์สังเคราะห์ Leucrocine I และ Leucrocine I analogue

(1) Outer membrane permeabilization assay

ศึกษาการเกิด Permeabilization ที่เมมเบรนชั้นนอกของแบคทีเรียเนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบมีเยื่อหุ้มเซลล์ (cytoplasmic membrane) สองชั้น คือ เมมเบรนชั้นนอก และเมมเบรนชั้นใน โดยใน

การศึกษานี้เพื่อต้องการระบุว่า เปปไทด์สังเคราะห์ Leucrocin I และ Leucrocin I analogue นั้นทำให้เมมเบรนชั้นนอกของแบคทีเรียเกิด permeabilization ได้หรือไม่ ซึ่งในกระบวนการทดลองจะใช้ 1-N-phenyl-naphthylamine (NPN) เป็นตัวตรวจสอบ

NPN เป็นสาร fluorescent โดยจะเกิดการเรืองแสงได้ดีเมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่เป็น hydrophobic โดยหากเปปไทด์ทำให้เมมเบรนชั้นนอกของเมมเบรนเกิด permeabilization สาร NPN จะเข้าไปจับกับบริเวณ hydrophobic ของ lipid bilayer ซึ่งจะทำให้ค่าการเรืองแสงของ NPN เพิ่มขึ้น ซึ่งผลการทดลองพบว่าเปปไทด์สังเคราะห์ Leucrocin I analogue ทั้งในรูปแบบที่เป็น L-form และ D-form (ความเข้มข้นที่ใช้เท่ากับค่า MIC ของแต่ละเปปไทด์) สามารถทำให้เมมเบรนชั้นนอกเกิด permeabilization ดังแสดงในรูปที่ 9 โดยจะเห็นได้จากเซลล์ที่ถูก treated ด้วยเปปไทด์ให้ค่าฟลูออเรสเซนซ์สูงขึ้นภายในเวลาประมาณ 1 นาที เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งไม่มีการเติมเปปไทด์ ในการทดลองนี้ได้ยาปฏิชีวนะ Polymyxin B sulfate (PMB) เป็น positive control เนื่องจากเป็นสารที่ออกฤทธิ์ทำลายเชื้อแบคทีเรียที่เมมเบรนโดยตรง และพบว่า PMB สามารถทำให้เกิด permeabilization ที่เมมเบรน และพบค่าฟลูออเรสเซนซ์สูงที่สุด ในส่วนของเปปไทด์ magainin2 (ion channel-formation; toroidal (or wormhole) model) เมื่อ treated เซลล์ *V. cholerae* ด้วยค่า MIC พบว่า สามารถทำให้เมมเบรนชั้นนอกเกิด permeabilize ได้เช่นกัน



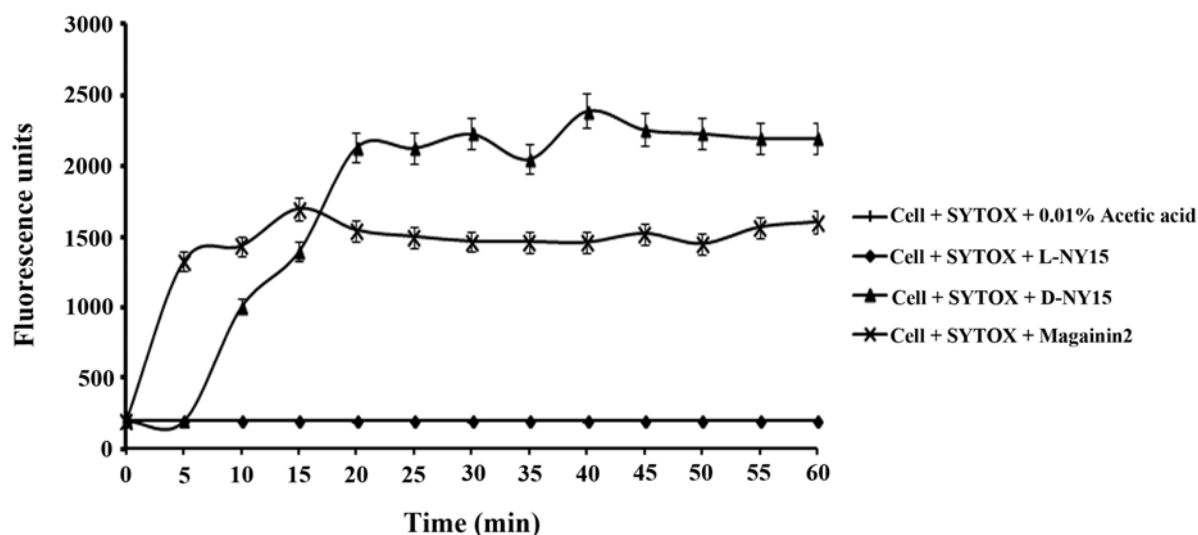
รูปที่ 13 การเกิด permeabilization เมมเบรนชั้นนอกของเชื้อ *V. cholera*; Leu I 500 µg/ml, Leu I analogue (L-form) 90.91 µg/ml, Leu I analogue (D-form) 27.27 µg/ml, Magainin2 18.18 µg/ml และ PMB 9.71 µg/ml

(2) Inner membrane permeabilization assay

- SYTOX[®] Green influx assay

การศึกษานี้เพื่อต้องการระบุว่าเปปไทด์นี้สามารถทำให้เมมเบรนชั้นในของแบคทีเรียเกิด permeabilization ได้หรือไม่ โดยสาร SYTOX[®] Green นี้จะไม่สามารถเคลื่อนที่ผ่านเมมเบรนชั้นในของ

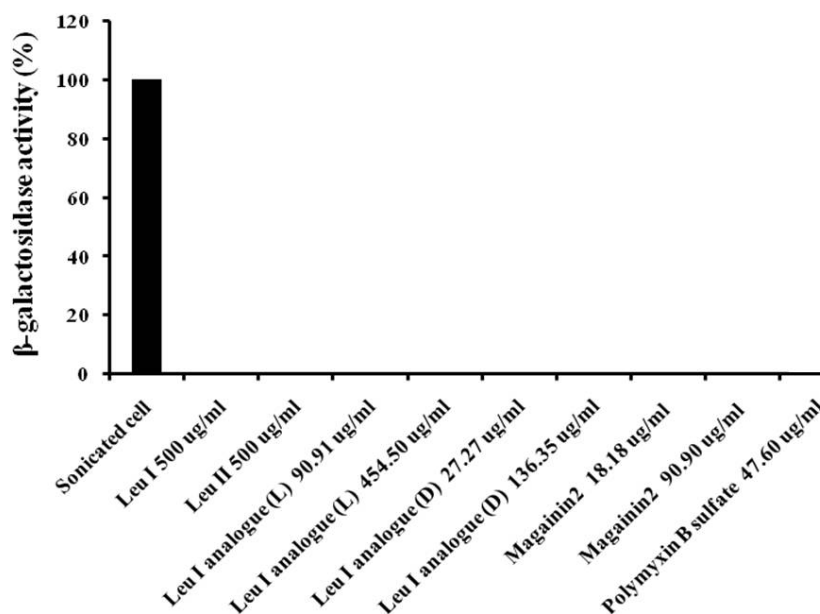
เชื้อแบคทีเรียได้ แต่หากเปปไทด์สามารถทำให้เมมเบรนชั้นในเกิด permeabilize ได้ สารนี้จะสามารถคลิ่นที่เข้าไปในเซลล์และไปจับกับ DNA/RNA และทำให้เกิดแสงฟลูออเรสเซนซ์ขึ้นได้ ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า D-form และเปปไทด์ magainin2 นั้นสามารถทำให้เมมเบรนชั้นในของเชื้อ *Vibrio cholerae* เกิด permeabilize โดยจะเห็นได้จากการที่สามารถตรวจพบแสงฟลูออเรสเซนซ์หลังจากบ่มกับเปปไทด์



รูปที่ 14 การเกิด permeabilization เมมเบรนชั้นในของเชื้อ *V. cholera*; Leu I analogue (L-form) 90.91 µg/ml, Leu I analogue (D-form) 27.27 µg/ml และ Magainin2 18.18 µg/ml

- β -galactosidase leakage assay

การศึกษานี้เพื่อต้องการระบุว่า Leucrocins นั้นทำให้เมมเบรนชั้นในของแบคทีเรียเกิด permeabilization แล้วทำให้สารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่รั่วออกมาได้หรือไม่ ซึ่งในกระบวนการทดลองนี้จะศึกษาโดยใช้เซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย *V. cholerae* ที่เลี้ยงในอาหารเหลว NB ที่มี 2% lactose เพื่อกระตุ้นให้เชื้อมีการสร้างเอนไซม์ β -galactosidase มากขึ้น ซึ่งหากเปปไทด์สามารถทำให้เมมเบรนชั้นในเกิด permeabilization ที่มีรูขนาดใหญ่ เอนไซม์ β -galactosidase ที่อยู่ในไซโตพลาสซึมก็จะรั่วออกมาสู่ภายนอกแล้วทำปฏิกิริยากับสับสเตรท (O-nitrophenyl β -galactopyranoside; ONPG) เกิดการย่อยสลาย substrate ซึ่งจะได้สารละลายสีเหลืองเข้มขึ้นสามารถวัดการดูดกลืนแสงที่ 420 nm จากการทดลองพบว่าเซลล์ที่มีการทำให้แตกโดยการ sonicated เพื่อให้เอนไซม์ β -galactosidase ที่อยู่ภายในเซลล์หลุดออกมาแล้วนำเฉพาะส่วนใสไปตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ สามารถตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ β -galactosidase โดยคิดเป็น 100% ของกิจกรรมเอนไซม์ แต่ผลพบว่าเปปไทด์สังเคราะห์ Leucrocins I analogue ทั้งในรูปที่เป็น L-form และ D-form ไม่สามารถทำให้เอนไซม์ β -galactosidase ที่อยู่ภายในเซลล์รั่วออกมาได้ (รูปที่ 11) ซึ่งเป็นไปได้ว่า รูที่เกิดจากการทำงานของเปปไทด์น่าจะมีขนาดเล็กไม่สามารถทำให้เอนไซม์ β -galactosidase ซึ่งมีโมเลกุลขนาดใหญ่หลุดออกมาได้ เช่นเดียวกับยาปฏิชีวนะ Polymyxin B sulfate ดังนั้น ในการทดลองต่อไปจะทำการศึกษาความสามารถของเปปไทด์ในการทำให้สารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กรั่วออกมาได้หรือไม่ โดยการสร้างแบบจำลองเมมเบรน (liposome)

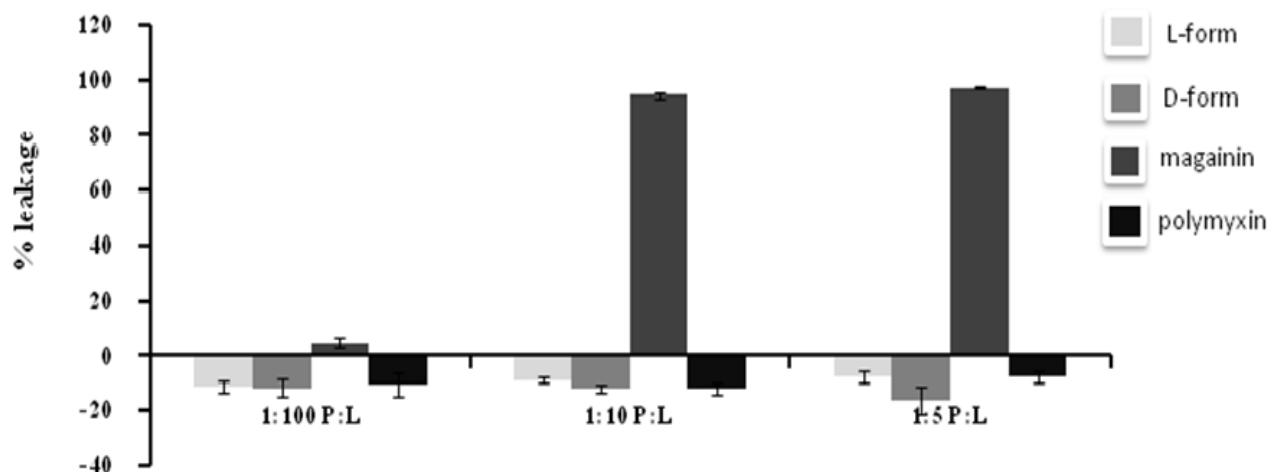


รูปที่ 15 ผลของเปปไทด์ต่อการเกิด Permeabilization ที่เมมเบรนชั้นในของแบคทีเรีย *V. cholerae* โดยการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ β-galactosidase

(3) การศึกษาความสามารถของเปปไทด์ในการทำให้สารโมเลกุลขนาดเล็กรั่วออกจากแบบจำลองเมมเบรน (small molecule leakage assay)

การศึกษานี้เพื่อต้องการระบุว่า Leucrocins นั้นทำให้เมมเบรนชั้นในของแบคทีเรียเกิด permeabilization แล้วทำให้สารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กรั่วออกมาได้หรือไม่ ซึ่งในกระบวนการทดลองนี้จะศึกษาโดยใช้แบบจำลองเมมเบรน (liposome) ที่บรรจุสาร ANTS/DPX ซึ่งเป็นสารฟลูออเรสเซนต์ไว้ภายในไลโปโซม ซึ่งวิธีการเตรียมไลโปโซม มีดังนี้ ละลาย DOPG และ DOPC ในอัตราส่วน 2:3 molar ratio ใน chloroform จนได้ความเข้มข้น 10 mg/ml ปริมาตร 1 ml เพื่อเลียนแบบเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย ระเหยคลอโรฟอร์มให้แห้งโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศ (evaporator) จะได้แผ่นไขมัน (lipid film) จากนั้นนำสารละลายบัฟเฟอร์ ANTS 12.5 mM, DPX 45 mM, NaCl 20 mM, Tris-HCl 10 mM ค่า pH 7.5 ปริมาณ 0.5 ml มาผสมแล้วเขย่าอย่างรุนแรงจนกระทั่ง lipid film หายไป แล้วแยกไลโปโซมที่ห่อหุ้มสาร ANTS/DPX ออกจากสารละลาย ANTS/DPX ที่ไม่ถูกห่อหุ้ม โดย gel filtration chromatography รวบรวมสารละลายไลโปโซมทั้งหมด แล้วคำนวณหาความเข้มข้นของไลโปโซม จากนั้นทำการบ่มเปปไทด์กับไลโปโซมตามระยะเวลาที่ต้องการ แล้ววัดรังสีฟลูออเรสเซนต์ของ ANTS ที่รั่วออกมาด้วย fluorescent spectrometer โดยตั้งค่า excitation ที่ความยาวคลื่น 386 nm และตั้งค่า emission ที่ความยาวคลื่น 512 nm คำนวณหาร้อยละการรั่วไหล (% leakage) ของ ANTS ในแต่ละอัตราส่วนของความเข้มข้นของไขมันต่อ เปปไทด์ จากสมการ $%L = 100 \times (Fs - F0 - Fp) / (F100 - F0)$ ซึ่ง Fs คือ ค่า fluorescence intensity ของไลโปโซมในสารละลายบัฟเฟอร์ที่บ่มกับเปปไทด์สังเคราะห์ F0 คือค่า fluorescence intensity ของไลโปโซมในสารละลายบัฟเฟอร์ Fp คือค่า fluorescence intensity ของเปปไทด์ที่อยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ F100 คือค่า fluorescence intensity ของไลโปโซมในสารละลายบัฟเฟอร์ที่บ่มกับ 1% triton x 100 แล้วนำมาสร้างกราฟ วิเคราะห์ผลจากกราฟ จะสามารถประมาณได้ว่าความเข้มข้นของ antimicrobial peptide เท่าใดในเวลาเท่าไรที่จะทำให้เริ่มเกิดการรั่วไหลของสารโมเลกุลเล็ก

(permeability) โดยในการทดลองนี้ใช้เปปไทด์ magainin 2 เป็น positive control เนื่องจากเปปไทด์ตัวนี้มีความสามารถทำให้สารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กรั่วออกมาจากเมมเบรนได้ และยังให้ยาปฏิชีวนะ polymyxin B sulfate เป็นตัวเปรียบเทียบ ซึ่งให้ผลการทดลองดังรูปที่ 12



รูปที่ 16 ผลของเปปไทด์ต่อการเกิด Permeabilization ของแบบจำลองเมมเบรน โดยการตรวจวัดสารฟลูออเรสเซนต์ที่รั่วออกจากไลโปโซม

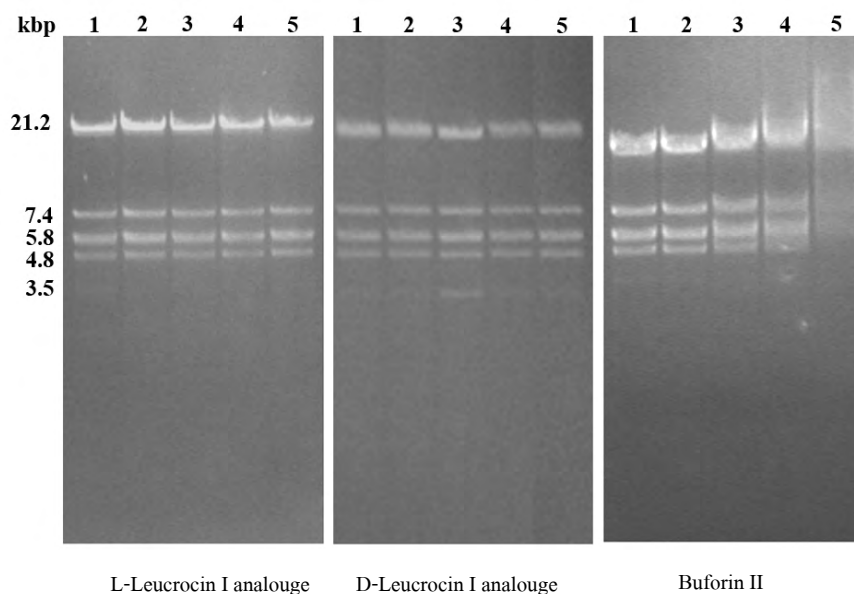
โดยผลพบว่า leucocin I analogue ทั้งในรูป L-form และ D-form และ polymyxin B sulfate ไม่สามารถทำให้สารฟลูออเรสเซนต์ขนาดเล็กที่บรรจุอยู่ในไลโปโซมรั่วออกมาได้ แต่ในส่วนของ magainin 2 (positive control) สามารถทำให้สารขนาดเล็กรั่วออกมาได้ ซึ่งกลไกการทำงานของ magainin 2 นั้นเป็นแบบ Ion channel-formation; toroidal (or wormhole) model โดยมีการทำงานที่เมมเบรนของแบคทีเรียทั้งชั้นนอกและชั้นใน โดยการทำให้เกิดช่องผ่านของไอออน จึงทำให้สารโมเลกุลขนาดเล็กสามารถรั่วออกมาได้

สำหรับ leucocin I analogue ทั้งในรูป L-form และ D-form พบว่าสามารถทำให้เมมเบรนชั้นนอกของแบคทีเรียเกิด permeable ได้ แต่ไม่สามารถทำให้เมมเบรนชั้นใน ทั้งใน intact cell และแบบจำลองเมมเบรนรั่วได้ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า leucocin I analogue นั้นอาจมีความสามารถในการแทรกตัวผ่านเมมเบรนชั้นในแล้วไปจับกับ DNA หรือ RNA เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะทำการศึกษาความสามารถในการจับกับ DNA ของ leucocin I analogue

7. ศึกษาความสามารถในการจับกับ DNA ของเปปไทด์

เนื่องจาก antimicrobial peptides ส่วนใหญ่นั้นมีประจุบวก ซึ่งทำให้มีความสามารถที่จะจับกับ DNA ซึ่งมีประจุลบได้ ดังนั้น จึงทำการศึกษาความสามารถในการจับกับ DNA ของสารสกัดเม็ดเลือดขาว โดยการทำให้ DNA gel electrophoresis ซึ่งหากโปรตีนในสารสกัดเม็ดเลือดขาวสามารถจับกับ DNA ได้ จะทำให้เกิดเป็นโมเลกุลที่ใหญ่ขึ้น ซึ่งจะทำให้การเคลื่อนที่ของ DNA บนเจลเปลี่ยนแปลงไป หรือเกิดการยับยั้งการเคลื่อนที่ของ DNA ใน agarose gel ได้ โดยในการทดลองนี้จะใช้ λ DNA/EcoRI (Promega US G1721) ขนาด 21.2, 7.4, 5.8, 4.8 และ 3.5 kbp เป็นตัวแทนของ DNA ภายในเซลล์แบคทีเรีย และใช้

เปปไทด์ Buforin II เป็น positive control จากผลการทดลองพบว่า leucrocicn I analogues ทั้งในรูป L-form และ D-form ไม่สามารถจับกับ DNA ได้ ซึ่งจะเห็นได้จาก λ DNA/EcoRI maker ยังมีการเคลื่อนได้เป็นปกติแม้ว่าจะมีการเติมเปปไทด์ลงไป ผลแสดงดังรูปที่ 13



รูปที่ 17 แสดง Interaction ระหว่าง DNA กับเปปไทด์

Lane 1, DNA :protein ratio 1 : 0

Lane 2, DNA: protein ratio 1 : 0.5

Lane 3, DNA: protein ratio 1 : 1

Lane 4, DNA: protein ratio 1 : 2

Lane 5, DNA: protein ratio 1 : 4

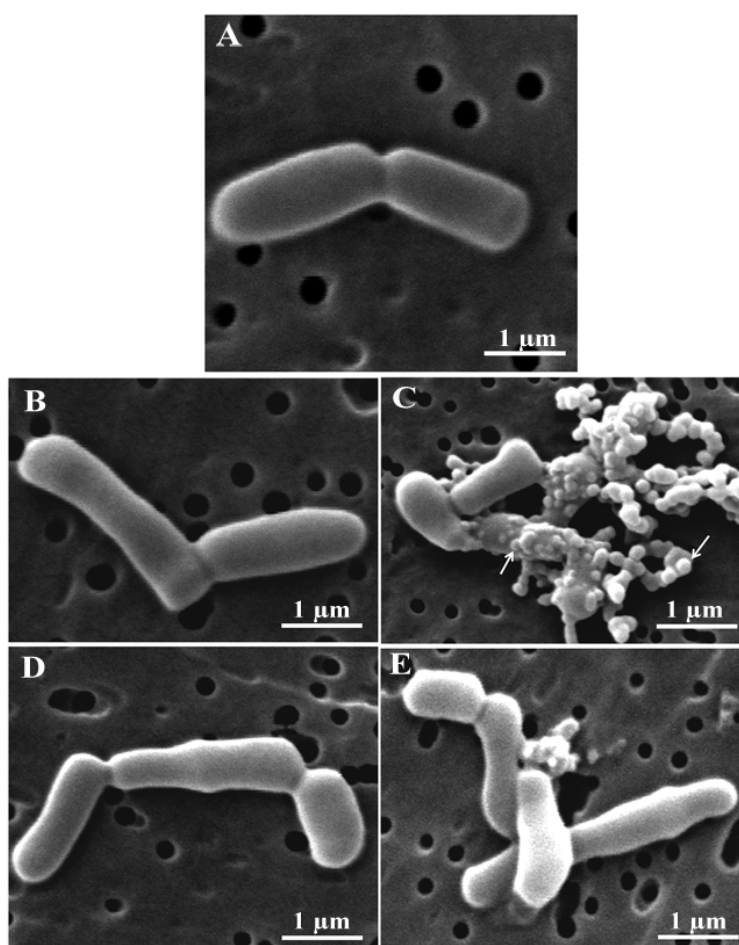
ดังนั้น ในการทดลองต่อไปจึงทำการศึกษากลไกการเข้าทำลายเชื้อของ leucrocicn I analogues โดยการใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM) เพื่อส่องดูผิวเมมเบรนของเชื้อแบคทีเรียหลังจาก treated ด้วยเปปไทด์

2.3.8 การศึกษาผลของเปปไทด์ต่อเซลล์แบคทีเรียโดยวิธีใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

(1) Scanning electron microscopy (SEM)

เมื่อนำเปปไทด์สังเคราะห์ Leucrocicn I analogus (L- and D-form) และเปปไทด์ Magainin2 ไปบ่มกับเซลล์แบคทีเรีย *V. cholerae* นาน 1 ชั่วโมง โดยใช้ความเข้มข้นเท่ากับค่า MIC และ 5xMIC หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์ดูลักษณะหรือการเปลี่ยนแปลงของเซลล์แบคทีเรียโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ซึ่งผลที่ได้คือ ในส่วนของเปปไทด์ Leu I analogue (L-form และ D-form) นั้นเมื่อบ่มเซลล์ *V. cholerae* โดยใช้ความเข้มข้นเท่ากับค่า MIC (รูปที่ 14B, 14D) ยังไม่พบความแตกต่างจากเซลล์กลุ่มควบคุมที่ไม่มีการบ่มกับเปปไทด์ (negative control) (รูปที่ 14A) แต่เมื่อเพิ่ม

ความเข้มข้นของเปปไทด์เป็น 5 เท่าของค่า MIC พบว่า เปปไทด์ Leu I analogue (L-form และ D-form) ทำให้เซลล์ *V. cholerae* มีลักษณะขรุขระ เกิดเป็นตุ่มพองขึ้นดังแสดงในรูปที่ 14C, 14E แต่ในเปปไทด์ Magainin2 ที่มีกลไกในการทำลายเชื้อแบคทีเรียโดยการสร้างช่องผ่านของไอออน (toroidal model) ไม่ได้ทำให้ผิวเซลล์ของเชื้อเกิดตุ่มพอง แต่ทำให้เซลล์มีลักษณะผิดปกติไปจากกลุ่มควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 14F-G ซึ่งจากผลการศึกษาการเกิด Permeabilization ที่เมมเบรนชั้นนอกของแบคทีเรียและผล SEM ในเบื้องต้นนี้คาดว่า Leu I analogues ทั้งในรูป L-form และ D-form มีตำแหน่งในการเข้าทำลายที่บริเวณเมมเบรนของแบคทีเรีย



รูปที่ 18 ผลของเปปไทด์ต่อเซลล์แบคทีเรีย *V. cholerae* ที่เวลา 1 ชั่วโมง ที่ส่องด้วยกล้อง SEM

A; เซลล์ *V. cholerae* ปกติที่ไม่ได้บ่มกับเปปไทด์

B; เซลล์ *V. cholerae* ที่บ่มร่วมกับ Leu I analogue (L-form) (90.91 $\mu\text{g/ml}$: MIC)

C; เซลล์ *V. cholerae* ที่บ่มร่วมกับ Leu I analogue (L-form) (454.55 $\mu\text{g/ml}$: 5xMIC)

D; เซลล์ *V. cholerae* ที่บ่มร่วมกับ Leu I analogue (D-form) (27.27 $\mu\text{g/ml}$: MIC)

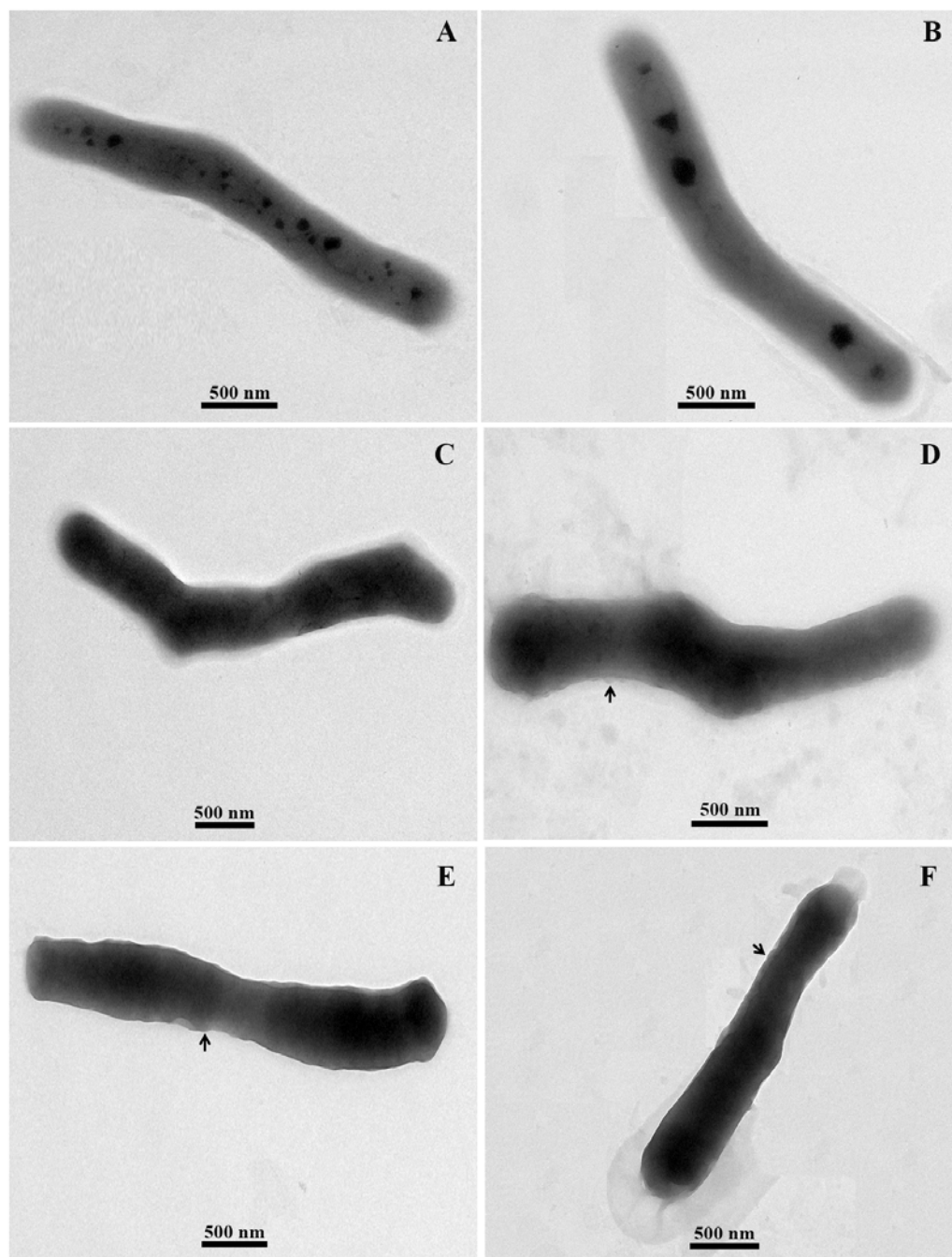
E; เซลล์ *V. cholerae* ที่บ่มร่วมกับ Leu I analogue (D-form) (136.35 $\mu\text{g/ml}$: 5xMIC)

F; เซลล์ *V. cholerae* ที่บ่มร่วมกับ Magainin-2 (18.19 $\mu\text{g/ml}$: MIC)

G; เซลล์ *V. cholerae* ที่บ่มร่วมกับ Magainin-2 (90.95 $\mu\text{g/ml}$: 5xMIC)

(2) Transmission electron microscopy (TEM)

เนื่องจากเชื้อแบคทีเรีย *V. cholerae* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งมีผนังเซลล์ที่ซับซ้อนกว่าแบคทีเรียแกรมบวก และยังมีแคปซูลซึ่งส่วนใหญ่เป็นสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ ดังนั้นในการทดลองนี้จะทำการ treated แบคทีเรีย *V. cholerae* ด้วยเปปไทด์เช่นเดียวกับการทำ SEM แล้วนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) เพื่อตรวจดูแคปซูลและเมมเบรนของ *V. cholera* ว่ามีการเปลี่ยนแปลงอย่างไรหลังจากถูก treated ด้วยเปปไทด์ Leu I analogue (L-form และ D-form) โดยผลที่ได้พบว่า กลุ่มควบคุม (negative control) (รูปที่ 15A, 15B) รูปร่างและผิวเซลล์มีลักษณะเรียบ โดยมีแคปซูลล้อมรอบเซลล์ และมองเห็นจุดสีดำขนาดใหญ่กระจายอยู่บนผิวเซลล์ ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่อยู่ภายในแคปซูล (capsular material) แต่ในส่วนของเปปไทด์ Leu I analogue (L-form และ D-form) นั้นเมื่อบ่มเซลล์ *V. cholerae* โดยใช้ความเข้มข้นเท่ากับค่า MIC (รูปที่ 15C, 15E) เซลล์มีรูปร่างที่เปลี่ยนแปลงไปและเซลล์ที่ถูก treated ด้วย D-form เริ่มพบลักษณะผิวเซลล์ที่ขรุขระ และพบว่า แคปซูลที่อยู่รอบๆ เซลล์มีบางส่วนที่ถูกทำลายไป และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเปปไทด์เป็น 5 เท่าของค่า MIC พบว่า เปปไทด์ Leu I analogue (L-form และ D-form) ทำให้เซลล์ *V. cholerae* มีลักษณะขรุขระ เกิดเป็นตุ่มพองขึ้นดังแสดงในรูปที่ 15D, 15F และพบการแตกรั่วออกมาของ capsular material ทำให้มองไม่เห็นจุดสีดำที่อยู่บนผิวเซลล์อีก แต่จะเห็นเป็นลักษณะสารสีดำที่กระจายทั่วผิวเซลล์ ซึ่งจากผลการศึกษาที่ยืนยันผลได้ว่า Leu I analogues ทั้งในรูป L-form และ D-form มีตำแหน่งในการเข้าทำลายที่บริเวณเมมเบรนของแบคทีเรีย



รูปที่ 19 ผลของเปปไทด์ต่อเซลล์แบคทีเรีย *V. cholerae* ที่เวลา 1 ชั่วโมง ที่ส่องด้วยกล้อง TEM

A; เซลล์ *V. cholerae* ปกติที่ไม่ได้บ่มกับเปปไทด์

B; เซลล์ *V. cholerae* ปกติที่ไม่ได้บ่มกับเปปไทด์

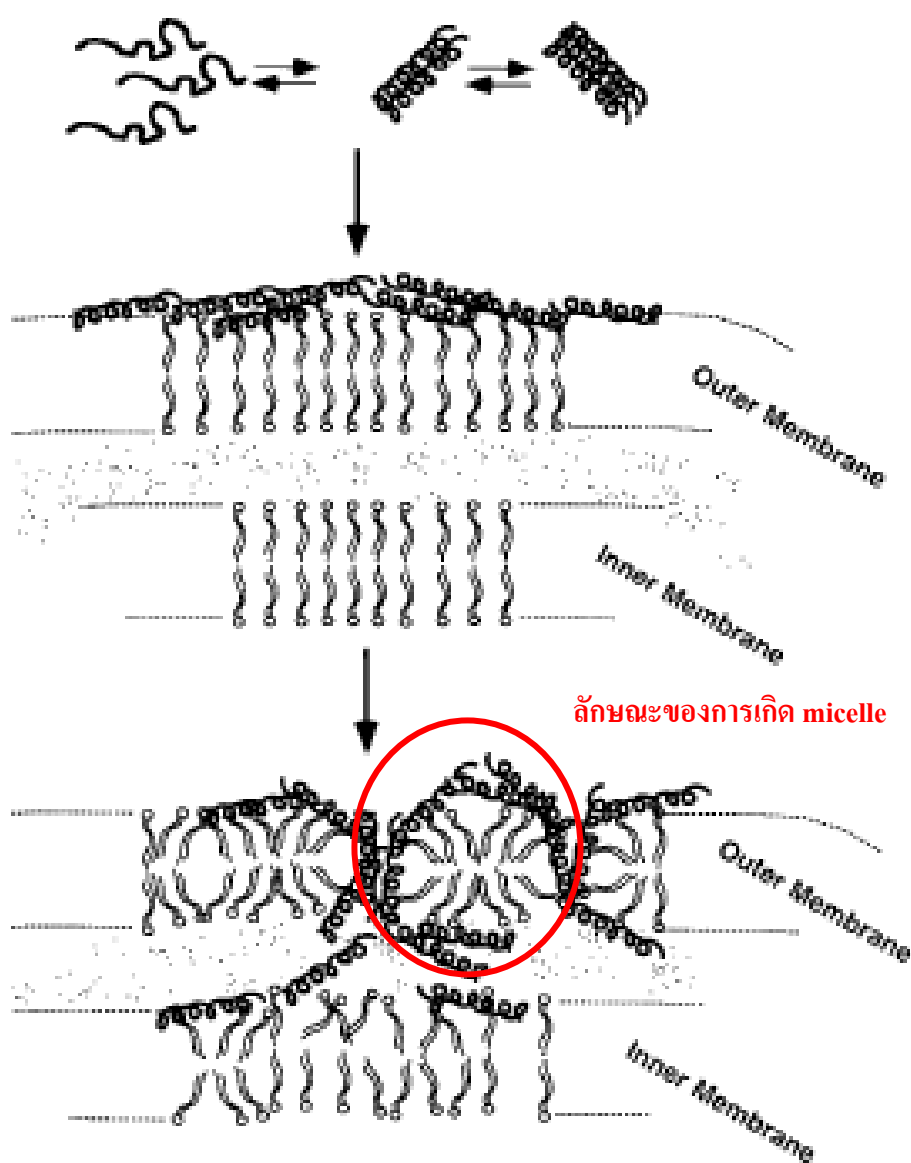
C; เซลล์ *V. cholerae* ที่บ่มร่วมกับ Leu I analogue (L-form) (90.91 $\mu\text{g/ml}$: MIC)

D; เซลล์ *V. cholerae* ที่บ่มร่วมกับ Leu I analogue (L-form) (454.55 $\mu\text{g/ml}$: 5xMIC)

E; เซลล์ *V. cholerae* ที่บ่มร่วมกับ Leu I analogue (D-form) (27.27 $\mu\text{g/ml}$: MIC)

F; เซลล์ *V. cholerae* ที่บ่มร่วมกับ Leu I analogue (D-form) (136.35 $\mu\text{g/ml}$: 5xMIC)

โดยจากผลการศึกษากลไกการเข้าทำลายเชื้อแบคทีเรียของ Leucrocine I analogus (L- and D-form) โดยวิธีต่างๆ นั้น อาจพอสรุปได้ว่า Leucrocine I analogus มีเป้าหมายการทำลายเชื้อที่เมมเบรนชั้นนอกของแบคทีเรียโดยยืนยันจากผลการศึกษาในส่วนของ Outer membrane permeabilization assay และการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ซึ่งพบว่า เปปไทด์นี้สามารถทำให้เมมเบรนชั้นนอกของแบคทีเรียเกิดความเสียหาย โดยพบว่าหลังจากส่องด้วยกล้อง SEM และ TEM แล้วพบว่า เปปไทด์ทำให้ผิวเมมเบรนของแบคทีเรียเกิดตุ่มพองขึ้น และตุ่มพองนั้นหลุดออกมาเป็นก้อนกลมเล็กๆ แล้วส่งผลให้แบคทีเรียตายในที่สุด โดยเปปไทด์ Leucrocine I analogus อาจมีกลไกแบบ carpet model ดังแสดงในรูปที่ 16 คือ เปปไทด์ที่ความเข้มข้นสูงจะทำให้เกิดการรื้อขวางการเรียงตัวของไลปิดไบเลเยอร์เหมือนกับการทำงานของดีเทอเจนท์ (detergent) ซึ่งจะส่งผลทำให้เมมเบรนหลุดออกจากกันเกิดเป็น micelles



รูปที่ 20 แสดงลักษณะของการเกิดรู (pore) และ micelles ในแบบจำลอง carpet model (Oren *et al.*, 1999)

2.3.9 การศึกษาคุณสมบัติของเปปไทด์ที่ออกแบบโดยอาศัยความไม่มีขั้วและมีขั้วในการเติมกรดอะมิโน โดยใช้ Leucrocin I เป็นแม่แบบ

เพื่อเป็นการปรับปรุงคุณสมบัติของ Leucrocin I ให้มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อได้ดียิ่งขึ้นจึงได้ทำการออกแบบเปปไทด์จำนวน 9 เส้น ซึ่งใช้ Lue I เป็นแม่แบบ โดยอาศัยความไม่มีขั้วและมีขั้วในการเติมกรดอะมิโน (ตารางที่ 7) จากนั้นทำการศึกษาคูณสมบัติการเป็น antibacterial peptide ต่างๆ โดยมีผลการทดลองดังแสดงด้านล่าง

(1) ทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MIC) และความสามารถในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC)

- MIC เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจนถึงช่วง mid log growth phase และมีค่า O.D.600 = 0.001 และนำมา 100 microliters ใส่ใน 96 well plate จากนั้นเติมเปปไทด์ที่ความเข้มข้นต่างๆซึ่งตัวแปรควบคุม negative control จะเติมเพียงบัฟเฟอร์ จากนั้นนำไปวัดค่า O.D.600 เริ่มต้นและนำไปบ่มที่ 37 °C จนถึงช่วง mid log growth phase และนำไปวัดค่า O.D.600 จากนั้นคำนวณหาค่า MIC โดย positive control คือค่า O.D.600 เริ่มต้น ค่า MIC ที่แสดงในตารางคือค่าที่สามารถยับยั้งได้มากกว่า 90%

- MBC นำตัวอย่างที่วัดแล้วว่าไม่มีค่าความขุ่นเพิ่มขึ้นที่ได้จากการทำ MIC มาเลี้ยงต่อใน agar plates บ่มต่อที่ 37 °C, 48 h ค่า MBC ที่แสดงในตารางคือค่าที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ 100% ผลการทดลองดังตารางที่ 12

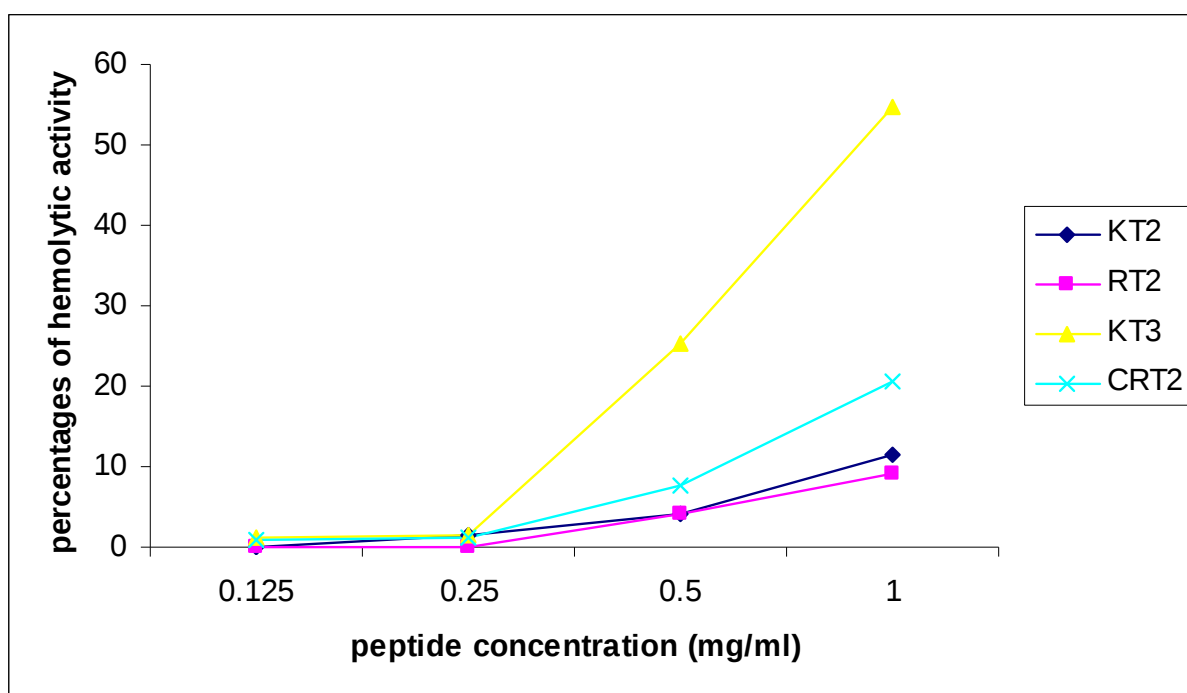
ตารางที่ 12 แสดงค่า MIC และ MBC ของเปปไทด์แต่ละเส้น

Peptides	sequence	<i>S.epidermidis</i> ATCC 12228 (μ M)	<i>S.typhi</i> DMST22842 (μ M)	<i>E.coli</i> ATCC 25922 (μ M)	<i>S.aureus</i> ATCC 25923 (μ M)	<i>P.aeruginosa</i> ATCC27853 (μ M)	<i>V.cholerae</i> non01, non0139 (μ M)
KT2	NGVQPKYKWWKWWKWW-NH ₂	9.4*	9.4	4.7*	18.8	37.6	4.7
RWKT2	NGVQPWYKWWKWWKWW-NH ₂	36*	>36	>36	>36	x	36
RW2	RWWRWRRWW-NH ₂ (tail)	>52.4	>52.4	>52.4	>52.4	26	13
CRT2	NGVQPKYRWWRWRRWW	8.6	>34.3	17.2*	>34.3	x	x
RT2	NGVQPKYRWWRWRRWW-NH ₂	9	9	18 *	36	x	18
RT4	NGVQPKYRWWRWRRWWWW-NH ₂	29.3	>29.3	>29.3	>29.3	>29.3	x
CRT3	NGVQPKYRWWRWRRWW	31*	>31	>31	>31	x	x
RW3	RWWRWRRWW-NH ₂	>44	>44	x	>44	x	>44
KT3	NGVQPKYKWWKWWKWW-NH ₂	8.7 *	8.7 *	4.4*	>34.8	x	x

* เป็นค่าที่แสดงถึงความเข้มข้นของเปปไทด์ที่สามารถฆ่าแบคทีเรียได้ 100%

(2) ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ยูคาริโอตโดยใช้ human red blood cells

นำ Leucrocine I analogue ไปทำการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงของมนุษย์ โดยวิธีฮีโมโกลบินที่เกิดจากการแตกของเม็ดเลือดแดง และการทำ MTT assay พบว่า เปปไทด์ KT2, RT2, KT3 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ยูคาริโอตน้อย และพบว่าที่ความเข้มข้นที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ 100% ของเปปไทด์นั้น พบว่าไม่พบการแตกของเม็ดเลือดแดงเลย ส่วนในการเพิ่มความเป็น hydrophobicity โดยการเติมกรดอะมิโน tryptophan ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกมากขึ้น แต่การเพิ่มความ hydrophilicity โดยการเติมกรดอะมิโน arginine และ lysine ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกน้อยลง ซึ่งพบว่า ความแตกต่างในการแทนที่กรดอะมิโนทั้งสองชนิดนี้ไม่แตกต่างกันมากนัก โดย arginine ส่งผลให้เม็ดเลือดแดงแตกน้อยกว่าเล็กน้อย ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 17



รูปที่ 21 ความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงของเปปไทด์สังเคราะห์ Leucrocine I analogues

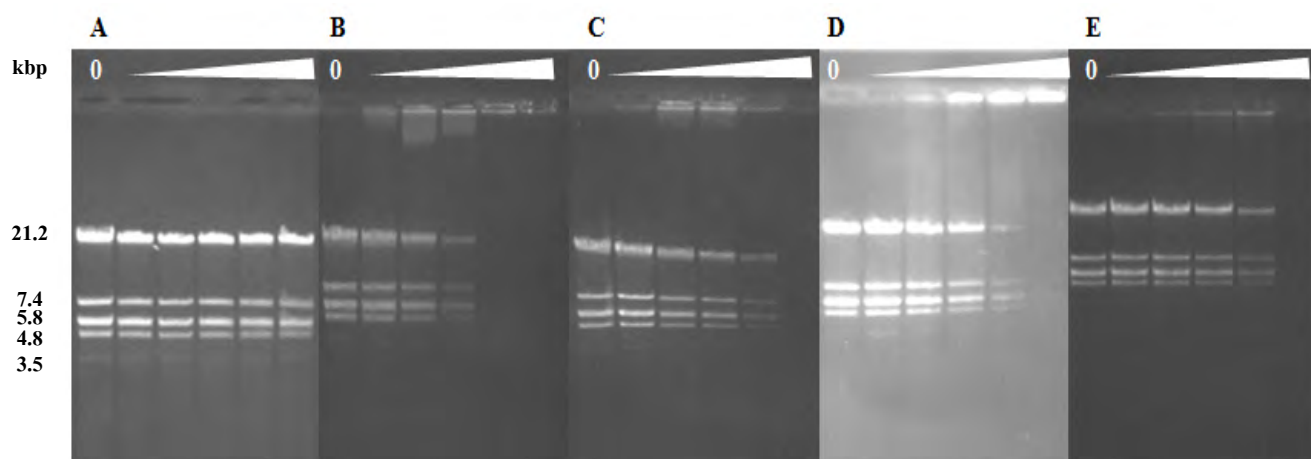
(3) ศึกษาความสามารถในการทำลายเมมเบรนของแบคทีเรียโดยใช้ไลโปโซม

ผลการทดลองพบว่าจากเปปไทด์ที่สังเคราะห์มาทั้งหมดนั้นมีเพียง CRT2 และ RW2 ที่สามารถทำให้ไลโปโซมเกิดการรั่วของสารฟลูออเรสเซนส์ได้ โดยมีร้อยละการรั่วคือร้อยละ 24 และ 16 ตามลำดับ แสดงว่า เปปไทด์ที่ไม่ทำให้ไลโปโซมรั่วเหล่านั้นอาจจะมีกลไกหลักในการทำลายเชื้อแบคทีเรียที่ไม่อาศัยการทำให้ bacterial membrane รั่ว ซึ่งจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

(4) ศึกษาความสามารถในการจับกับ DNA ของเปปไทด์ที่ออกแบบ

เนื่องจาก antimicrobial peptides ส่วนใหญ่นั้นมีประจุบวกจึงทำให้สามารถจับกับ DNA ซึ่งมีประจุลบได้ ดังนั้นจึงทำการศึกษาความสามารถในการจับกับ DNA ของสารสกัดเม็ดเลือดขาว โดยการทำ DNA gel electrophoresis ซึ่งหากโปรตีนในสารสกัดเม็ดเลือดขาวสามารถจับกับ DNA ได้ จะทำให้เกิดเป็นโมเลกุลที่ใหญ่ขึ้น ซึ่งจะทำให้การเคลื่อนที่ของ DNA บนเจลเปลี่ยนแปลงไป หรือเกิดการยับยั้งการ

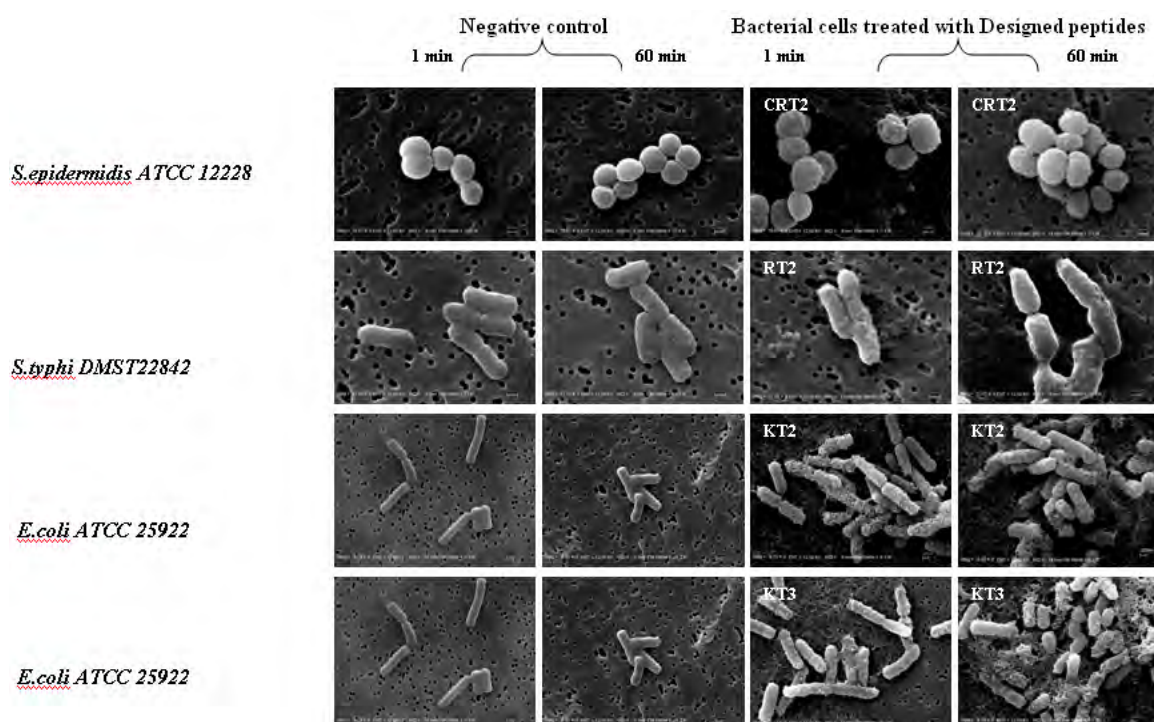
เคลื่อนที่ของ DNA ใน agarose gel ได้ โดยใช้ λ DNA/EcoRI (Promega US G1721) ขนาด 21.2, 7.4, 5.8, 4.8 และ 3.5 kbp เป็นตัวแทนของ DNA ภายในเซลล์แบคทีเรีย จากผลการทดลองพบว่าเปปไทด์สังเคราะห์ที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ดี (KT2 RT2 KT3 และ CRT2) นั้นสามารถจับกับ DNA ได้ดีกว่าเปปไทด์ buforin II ที่เคยมีการรายงานไว้โดย Su A. Jang และคณะ โดย buforin II จับกับ DNA ได้ที่อัตราส่วน 1:10 (DNA: peptide) แต่สำหรับ KT2 RT2 KT3 และ CRT2 จับกับ DNA ได้ที่อัตราส่วน 1:0.5, 1:1, 1:1, 1:1 (DNA: peptide) ตามลำดับ อย่างไรก็ตามกลไกการทำลายเชื้อแบคทีเรียที่แน่ชัดต้องมีการศึกษาต่อไป (รูปที่ 18)



รูปที่ 22 แสดงความสามารถในการจับกับ DNA ของเปปไทด์ที่ถูกออกแบบ (DNA retardation assay) โดย lane ที่ 1 (0) คือ negative control, lane ที่ 2 3 4 5 และ 6 คืออัตราส่วนระหว่าง peptide ต่อ DNA เป็น 1 2 4 และ 8 ตามลำดับ สัญลักษณ์ A B C D และ E คือการทดลองของเปปไทด์สังเคราะห์ magainin (well known peptide) KT2 RWKT2 KT3 และ RT2 ตามลำดับ

(5) ลักษณะภายนอกของเซลล์แบคทีเรียเมื่อบ่มร่วมกับเปปไทด์

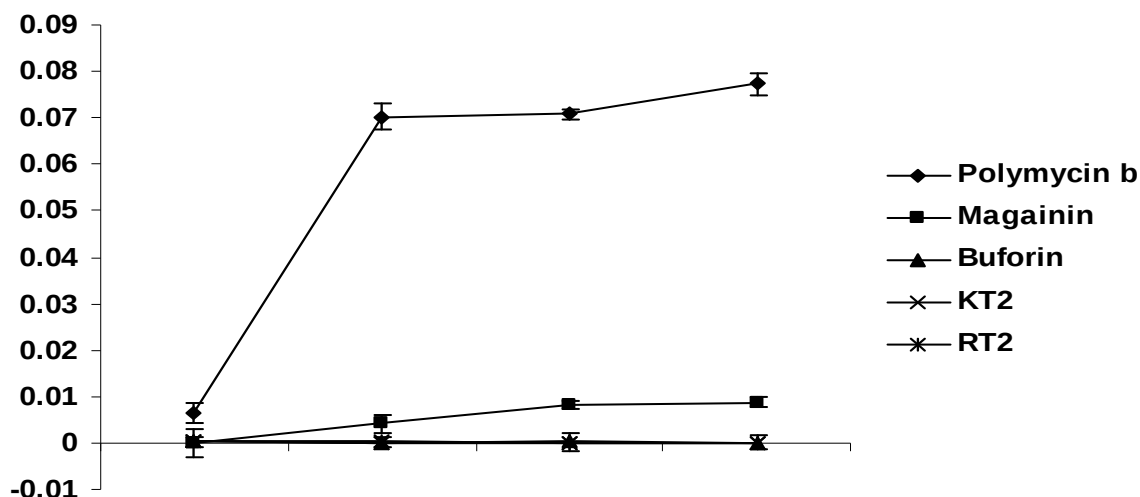
ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 19 ซึ่งพบความผิดปกติของเซลล์แบคทีเรียได้ตั้งแต่ 1 นาที่ หลังจากการบ่ม แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของเปปไทด์ว่าสามารถทำให้แบคทีเรียเกิดความเสียหายได้โดยทันที ซึ่งพบลักษณะที่ผิดปกติแบบโป่งพอง



รูปที่ 23 แสดงภาพความเสียหายของแบคทีเรียโดยเปปไทด์ที่ถูกออกแบบที่เวลาบ่ม 1 นาที และ 60 นาที

(6) Aggregation assay

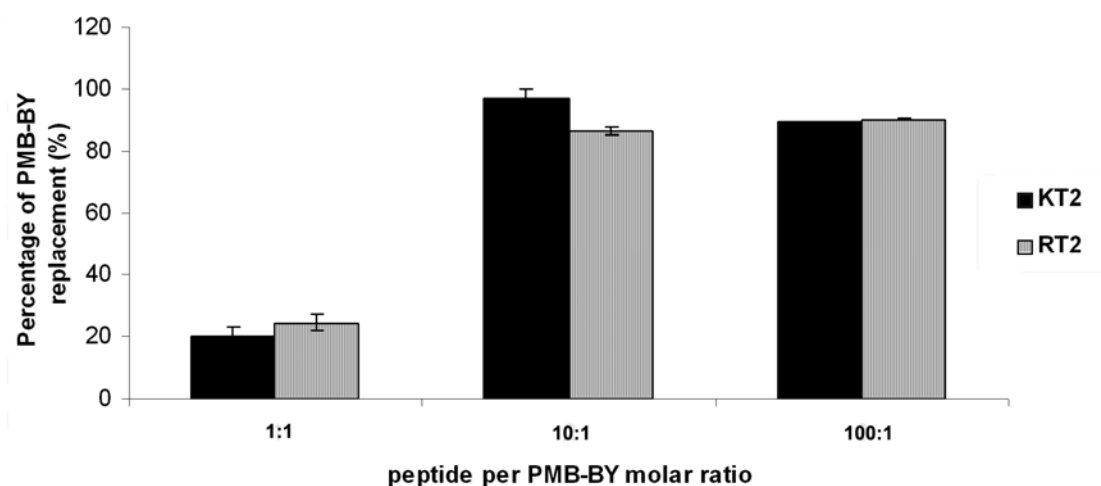
ผลการทดลองพบว่า RT2 และ KT2 ไม่สามารถทำให้ไลโปโซมที่มีส่วนประกอบของ DOPC และ DOPG ในอัตราส่วน 3:2 เกิดการเกาะกัน (รูปที่ 20) ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับผลของ buforin II ที่มีการรายงานถึงกลไกการทำลายเชื้อคือสามารถแทรกตัวผ่านเซลล์แบคทีเรียเข้าไปจับกับ DNA ของแบคทีเรียได้ ส่วน polymyxin ได้มีการรายงานว่ากลไกการทำลายเชื้อหลักคือ carpet model นั้นพบว่าสามารถทำให้ไลโปโซมเกิดการเกาะกันได้อย่างชัดเจน แต่ magainin II นั้นสามารถเหนี่ยวนำให้ไลโปโซมเกิดการเกาะกันได้ในระดับหนึ่งแต่ไม่มากเท่า polymyxin ซึ่งมีการรายงานกลไกทำลายเชื้อแบคทีเรียหลักแบบ toroidal pore ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ที่ว่าก่อนที่จะเกิดรูปแบบ transient hole แบบ toroidal pore นั้น peptide จะสามารถเรียงตัวแบบขนานกับ lipid bilayer และรบกวนสภาพของ lipid bilayer



รูปที่ 24 Aggregation assay ของเปปไทด์ KT2 และ RT2

(7) LPS binding assay

ผลการทดลองพบว่า ที่ความเข้มข้นของ peptide และ PMB-BY ที่เท่ากัน คืออัตราส่วน 1:1 RT2 และ KT2 นั้นสามารถแทนที่ PMB-BY เพื่อจับกับ LPS ได้เพียง 20% แต่เมื่อปริมาณอัตราส่วนของเปปไทด์เพิ่มสูงขึ้น 10 และ 100 เท่า จะมีร้อยละการแทนที่ประมาณ 90% (รูปที่ 21) แสดงให้เห็นว่าการจับกันแบบelectrostatic forceของเปปไทด์กับ LPS นั้นเป็นขั้นตอนหนึ่งที่มีความสำคัญในกลไกการทำลายเชื้อแบคทีเรีย แต่อย่างไรก็ตามกลไกการทำลายเชื้อแบคทีเรียหลักของ RT2 และ KT2 นั้นไม่น่าจะเป็น carpet model แบบ LPS binding ซึ่งได้รับการรายงานว่าเป็นกลไกหลักของ polymyxin b



รูปที่ 25 LPS binding assay ของเปปไทด์ KT2 และ RT2

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการยืนยันฤทธิ์ในการทำลายเชื้อของสารสกัดเม็ดเลือดขาวจะเข้าสู่สายพันธุ์ไทยพบว่า สารสกัดเม็ดเลือดขาวจะเข้าสู่สายพันธุ์ไทยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ได้ทั้งหมด 9 ชนิด ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก 5 ชนิด และแบคทีเรียแกรมลบอีก 4 ชนิด เมื่อทำการแยกบริสุทธิ์เปปไทด์จากสารสกัดเม็ดเลือดขาว พบว่า Leucrocins มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้สูงที่สุด โดยเปปไทด์ที่แยกได้มีลำดับกรดอะมิโนหรือโครงสร้างปฐมภูมิบางส่วน ดังนี้ Leucrocins I มีโครงสร้างปฐมภูมิบางส่วน คือ NGVQPKY ส่วน Leucrocins II มีโครงสร้างปฐมภูมิ คือ NAGSLLSGWG จากนั้นสังเคราะห์เปปไทด์ Leucrocins I, Leucrocins II และ Leucrocins analogues ทั้งแบบ L-form และ D-form โดยการออกแบบเปปไทด์นั้นได้อาศัยการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนบางตำแหน่ง หรือเพิ่มกรดอะมิโนที่มีประจุบวกและกรดอะมิโนที่มีความเป็นไฮโดรโฟบิกสูงเข้าไปในโมเลกุลของ Leucrocins เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ และลดความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงของมนุษย์ ผลพบว่า เปปไทด์ Leucrocins ต้นแบบมีค่า MIC ที่สูงกว่า Leucrocins analogues ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากเปปไทด์สังเคราะห์ Leucrocins ไม่สามารถม้วนตัวให้อยู่ในโครงสร้างที่สามารถทำงานได้ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการละลาย ซึ่งจำเป็นต้องมีการหาบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการละลาย และยังพบว่า Leucrocins I analogues ที่สังเคราะห์ด้วย D-amino acid ทั้งโมเลกุลนั้น มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดีกว่า Leucrocins I analogue ที่สังเคราะห์ด้วย L-amino acid ทั้งโมเลกุล

เมื่อทำการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงของเปปไทด์สังเคราะห์ Leucrocins I analogues พบว่า Leucrocins I analogues ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงของมนุษย์และเซลล์แมคโครฟาจ เมื่อตรวจสอบกลไกการทำลายเชื้อแบคทีเรียพบว่า Leucrocins I analogues มีเป้าหมายในการทำลายเซลล์ที่เซลล์เมมเบรน โดยจะทำให้เมมเบรนเกิดความเสียหาย ทำให้เชื้อแบคทีเรียตายในที่สุด ซึ่งได้มีการทดลองยืนยันกลไกการทำลายเชื้อในแบคทีเรียแกรมลบด้วยวิธี NPN uptake assay การศึกษานี้จะทำให้ทราบว่าเปปไทด์นั้นสามารถทำให้เมมเบรนชั้นนอกของแบคทีเรียเกิด permeabilization โดยจะใช้ 1-N-phenyl naphthylamine (NPN) เป็นตัวตรวจสอบ โดย NPN นั้น เป็นสาร fluorescent ซึ่งจะเกิดการเรืองแสงได้ดีเมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่เป็น hydrophobic โดยหากเปปไทด์ทำให้เมมเบรนชั้นนอกเกิด permeabilization สารได้ NPN จะเข้าไปจับกับบริเวณ hydrophobic ของ lipid bilayer ซึ่งจะทำการเรืองแสงของ NPN เพิ่มขึ้น ผลพบว่า Leucrocins I analogues นั้นสามารถทำให้เมมเบรนชั้นนอกของแบคทีเรียเกิด permeabilization ได้ อีกทั้งเมื่อทำการศึกษาในส่วนการเกิด Permeabilization ที่เมมเบรนชั้นในของแบคทีเรียโดยการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ β -galactosidase ซึ่งทำการทดลองโดยใช้เซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย *V. cholerae* โดยหากเปปไทด์สามารถทำให้เมมเบรนชั้นในเกิด permeabilization ที่มีรูขนาดใหญ่ เอนไซม์ β -galactosidase ที่อยู่ในไซโตพลาสซึมก็จะรั่วออกมาสู่ภายนอกแล้วทำปฏิกิริยากับสับสเตรท (O-nitrophenyl β -galactopyranoside; ONPG) เกิดการย่อยสลาย substrate ซึ่งจะได้สารละลายสีเหลืองเข้มขึ้น และสามารถวัดการดูดกลืนแสงที่ 415 nm ได้ จากการทดลองพบว่าเปปไทด์สังเคราะห์ Leucrocins I analogue ทั้งในรูปที่เป็น L-form และ D-form ไม่สามารถทำให้เอนไซม์ β -galactosidase ที่อยู่ในเซลล์รั่วออกมาได้ เนื่องจากไม่สามารถตรวจพบ

กิจกรรมของเอนไซม์ β -galactosidase ซึ่งเป็นไปได้ว่า รูที่เกิดจากการทำงานของเปปไทด์น่าจะมีขนาดเล็กกว่าขนาดของ β -galactosidase จึงไม่สามารถทำให้เอนไซม์ β -galactosidase หลุดออกมาได้

เมื่อทำการศึกษาความสามารถของเปปไทด์ในการทำให้สารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กรั่วออกจากเมมเบรนโดยใช้แบบจำลองเมมเบรน (ไลโปโซม) พบว่า L-form และ D-form นั้น ไม่สามารถทำให้สารโมเลกุลขนาดเล็กรั่วออกจากแบบจำลองเมมเบรนได้ อีกทั้งยังไม่มีความสามารถในการจับกับ DNA ได้

ส่วนการตรวจสอบผลของเปปไทด์ต่อเซลล์แบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (SEM และ TEM) ในเบื้องต้นนั้น พบว่า Leu I analogues ทั้งในรูป L-form และ D-form มีตำแหน่งในการเข้าทำลายที่บริเวณเมมเบรนของแบคทีเรีย แต่มีกลไกที่แตกต่างกัน ซึ่งจะทำให้การยืนยันผลอีกครั้งด้วยการทำ Immunolabelling โดยจะใช้แอนติบอดีเป็นตัวติดตามเปปไทด์แล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ Transmission electron microscopy (TEM) ทั้งนี้ได้มีการออกแบบเปปไทด์โดยใช้ Leu I เป็นเปปไทด์ต้นแบบเพิ่มเติมจำนวนทั้งสิ้น 9 เส้น โดยอาศัยความไม่มีขั้วและมีขั้วในการเติมกรดอะมิโน ซึ่งการเติมกรดอะมิโนให้มีความเป็น hydrophobic และ hydrophilic facet สูงขึ้น โดยออกแบบให้เติม tryptophan เพื่อเพิ่มความเป็น hydrophobic facet และเติม arginine หรือ lysine เพื่อเพิ่มความเป็น hydrophilic facet เพื่อทดสอบสมมุติฐานที่ว่า hydrophobic และ hydrophilic facet ที่เหมาะสมมีความสำคัญกับเปปไทด์สายสั้นๆ ซึ่งผลการทดลองพบว่าเปปไทด์ส่วนใหญ่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดี และมีค่า MIC & MBC ที่ต่ำ อีกทั้งไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงของมนุษย์ในความเข้มข้นที่ฆ่าแบคทีเรียได้ (MIC) และเมื่อตรวจสอบความสามารถในการทำให้สารโมเลกุลขนาดเล็กรั่วจากแบบจำลองเมมเบรน (ไลโปโซม) พบว่าเปปไทด์ที่สังเคราะห์มาทั้ง 9 เส้นนั้น มีเพียง CRT2 และ RW2 ที่สามารถทำให้ไลโปโซมเกิดการรั่วของสารฟลูออเรสเซนซ์ได้โดยมีร้อยละการรั่วคือร้อยละ 24 และ 16 ตามลำดับ ซึ่งเมื่อศึกษาความสามารถในการจับกับ DNA ของเปปไทด์ที่ออกแบบ พบว่าเปปไทด์สังเคราะห์ที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ดี (KT2 RT2 KT3 และ CRT2) นั้นสามารถจับกับ DNA ได้ดีกว่าเปปไทด์ buforin II ที่เคยมีการรายงานไว้โดย Su A. Jang และคณะ โดย buforin II จับกับ DNA ได้ที่ 1:10 DNA: peptide ratio แต่สำหรับ KT2 RT2 KT3 และ CRT2 จับกับ DNA ได้ที่ 1:0.5, 1:1, 1:1, 1:1 DNA: peptide ratio ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อตรวจสอบเมมเบรนของเซลล์แบคทีเรียที่ปนเปื้อนกับเปปไทด์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) นั้น สามารถพบความผิดปกติของเซลล์แบคทีเรียซึ่งเกิดจากการทำงานของเปปไทด์ได้ตั้งแต่นาทีที่ 1 หลังจากการบ่ม แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของเปปไทด์ว่าสามารถทำให้แบคทีเรียเกิดความเสียหายได้โดยทันที ซึ่งพบลักษณะที่ผิดปกติแบบโป่งพองเกิดขึ้นที่เซลล์ของแบคทีเรีย

เอกสารอ้างอิง

- มหาวิทยาลัยขอนแก่น คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาจุลชีววิทยา. 2539. *คู่มือปฏิบัติการจุลชีววิทยาทั่วไป*.
มหาวิทยาลัยขอนแก่น คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาจุลชีววิทยา.
- วิน เชยชมศรี, จินดาวรรณ สิริन्हินติ, บุญเกื้อ วัชรเสถียร, มณี ตันติรุ่งกิจ, สุตาวรรณ เชยชมศรี, ยศ
พงษ์ เต็มศิริพงศ์ และ เรืองฤทธิ์ สัปปพันธ์. ม.ป.ป. ประสิทธิภาพของซีรัมจะเข้มข้นจัดพันธุ์ไทยใน
การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย. วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด.
- Benincasa, M., Skerlavaj B., Gennaro R., Pellegrini A. and Zanetti M. 2003. In vitro and in vivo
antimicrobial activity of two α -helical cathelicidin peptides and of their synthetic analogs.
Peptides 24 : 1723–1731
- Benincasa, M., Scocchi M., Podda E., Skerlavaj B., Dolzani L. and Gennaro R. 2004.
Antimicrobial
activity of Bac7 fragments against drug-resistant clinical isolates. *Peptides* 25 : 2055–
2061
- Brouwer, C. P.J.M., Bogaards S. J.P., Wulferink M., Velders M. P. and Welling M. M. 2006.
Synthetic peptides derived from human antimicrobial peptide ubiquicidin accumulate at
sites
of infections and eradicate (multi-drug resistant) *Staphylococcus aureus* in mice. *peptides*
27 : 2585 – 2591
- Brogden K.A. 2005. Antimicrobial peptide: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?
Nature (3):238-248
- Fahrner R.L., Dieckmann T., Harwig S.S., Lehrer R.I., Eisenberg D. and Feigon J. 1996. Solution
structure of protegrin-1, a broad-spectrum antimicrobial peptide from porcine leukocytes.
Chem Biol. 3(7): 543-50.
- Feng-Sheng Wang. 2003. Effect of antimicrobial proteins from porcine leukocyte on
Staphylococcus
aureus and *Escherichia coli* in comminuted meats. *Meat Science* 65 : 615-621.
- Genco, C. A., Maloy W. L., Kari U. P. and Motley M. 2003. Antimicrobial activity of magainin
analogues against anaerobic oral pathogens. *International Journal of Antimicrobial Agents*
21 : 75-78
- Hao G., Shi Y, Tang Y, and Le G.2009. The membrane action mechanism of analogs of the
antimicrobial peptide Buforin 2
- Jacopo V. and Michel S. 2002. Antimicrobial peptides from animals: focus on Invertebrates.
TRENDS in Pharmacological. Sciences. 23(11): 494-496.

- Luisa M., Niv P, Donatella B, Maurizio S, Argante B, Antonio D. and Andrea C. 2004. Effects of the antimicrobial peptide temporin L on cell morphology membrane permeability and viability of *Escherichia coli*.
- Lee J.Y., Boman A., Sun C.X., Andersson M, Jornvall H, Mutt V, Boman HG. 1989. Antibacterial peptides from pig intestine: isolation of a mammalian cecropin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 86(23):9159-62.
- Liu T., She R., Wang K., Bao H., Zhang Y., Luo D., Hu Y., Ding Y., Wang D. and Peng K. 2008. Effects of rabbit sacculus rotundus antimicrobial peptides on the intestinal mucosal immunity in chickens. *Poultry science* 87(2):250-4.
- Luisa M., Niv P, Donatella B, Maurizio S, Argante B, Antonio D. and Andrea C. 2004. Effects of the antimicrobial peptide temporin L on cell morphology membrane permeability and viability of *Escherichia coli*.
- Michael E.S., Michael J.N., Wendy L.M., Yi-Quan T, Wayne S. and James S.C. 1992. Indolicidin, a Novel Bactericidal Tridecapeptide Amide from Neutrophils. *The Journal of Biological Chemistry*. 267 (7): 4292-4295.
- Merchant, M., Roche, C., Elsey, R and Prudhomme, J. 2003. Antibacterial properties of blood from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Comp. Biochem. Physiol. B* : 136, 505–513.
- Merchant, M., Leger N., Jerkins E., Mills K., Pallansch B.M., Paulman L.R, Ptak G. R. 2006. Broad spectrum antimicrobial activity of leukocyte extracts from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Journal of Veterinary Immunology and Immunopathology* :110, 221-228.
- Park, C. B., Kim, H. S. and Kim, S. C. 1998. Mechanism of Action of the Antimicrobial Peptide Buforin II: Buforin II Kills Microorganisms by Penetrating the Cell Membrane and Inhibiting Cellular Functions. *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS* 244: 253–257.
- Preecharam, S., Daduang, S., Bunyatratchata, W., Araki, T. and Thammasirirak, S. (2008) Antibacterial activity from Siamese crocodile (*Crocodylus siamensis*) serum African Journal of Biotechnology Vol. 7 No 17. (3 Sep.) 3121-3128.
- Preecharam, S., Jeranaipreprem, P., Daduang, S. Temsiripong, Y., Somdee, T., Tamo, F., Svasti, J. and Thammasirirak, S. (2009) Antimicrobial peptide: Crocosin from freshwater crocodile (*Crocodylus siamensis*) plasma. (Submitting Manuscript Number: ASJ-2009-0193) *Animal Science Journal*.
- Pata, S., Daduang, S., Svasti, J., Tomohiro, A. and Thammasirirak S., 2009 Leucrosin: antimicrobial peptide from fresh water crocodile. Peptide (Manuscript in preparation)

- Podda, E., Benincasa, M., Pacor, S., Micali, F., Mattiuzzo, M., Gennaro, R. and Scocchi, M. 2006. Dual mode of action of Bac7, a praline-rich antibacterial peptide. *Biochimica et biophysica Acta* 1760:1732-1740.
- Qian S., Wang W., Yang L and Huang H.W., 2008. Structure of transmembrane pore induced by Bax-derived peptide: Evidence for lipidic pores. Department of Physics and Astronomy, Rice University, Houston
- Raj P.A., Soni S.D. And Levine M.J. 1994. Membrane-induced helical conformation of an active candidacidal fragment of salivary histatins. *J Biol Chem.* 269(13): 9610-9.
- Fahrner R.L., Dieckmann T., Harwig S.S., Lehrer R.I., Eisenberg D. and Feigon J. 1996. Solution structure of protegrin-1, a broad-spectrum antimicrobial peptide from porcine leukocytes. *Chem Biol.* 3(7): 543-50.
- Thomas H., Yousef J.B., Floyd C.K. and J. Michael C. 2000. Purification and characterization of antimicrobial peptides from the skin of the North American green frog *Rana clamitans*. *Peptides.* 21: 469-476.
- Sugiarto, H. and Yu P.M. 2007. Mechanisms of action of ostrich β -defensins against *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 270 : 195–200.
- Thennarasu S, Lee, D-K, Tan A, Kari U. P. and Ramamoorthy A. 2005. Antimicrobial activity and membrane selective interactions of a synthetic lipopeptide MSI-843. *Biochimica et Biophysica Acta* 1711: 49–58.
- Tom B. and Tirra S. 1998. 2-D Electrophoresis using immobilized pH gradient Principles and Methods (AB ed.). *Amersham Biosciences*.
- Won A. and Ianoul A. 2009. Interactions of antimicrobial peptide from C-terminus of myotoxin II with phospholipid mono- and bilayers. Department of Chemistry, Carleton University *BBA – Biomembranes*.
- Yan L. and Adams M.E. 1998. Lycotoxins, antimicrobial peptides from venom of the wolf spider *Lycosa carolinensis*. *J Biol Chem.* 273(4): 2059-66.
- Zaslloff M. (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415:389–395.
- Zhao H. 2003. Mode of action of antimicrobial peptides. Faculty of Medicine, University of Helsinki

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุน สกว.

1. ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

- Supawadee Pata., Nualyai Yaraksa., Sakda Daduang., Yosapong Temsiripong., Jisnuson Svasti., Tomohiro Araki. and **Sompong Thammasirirak.** (2011) Characterization of the novel antibacterial peptide Leucrocine from crocodile (*Crocodylus siamensis*) white blood cell extracts. **Developmental and Comparative Immunology**, **35**: 545–553.
- Thitiporn Anunthawan, Nualyai Yaraksa, Santi Phosri, Tinnakorn Theansungnoen, Sakda Daduang, Apisak Dhiravisit and **Sompong Thammasirirak.** (2013) Improving the antibacterial activity and selectivity of an ultra short peptide by hydrophobic and hydrophilic amino acid stretches. **This paper is accepted to publish in The Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.** DOI: 10.1016/j.bmcl.2013.06.005.
- Nualyai Yaraksa, Thitiporn Anunthawan, Tinnakorn Theansungnoen, Sakda Daduang, Tomohiro Araki , Apisak Dhiravisit and **Sompong Thammasirirak.** Design and synthesis of cationic antibacterial peptide based on Leucrocine I sequence, antibacterial peptide from crocodile (*Crocodylus siamensis*). **Manuscript was submitted to *Journal of Antibiotics*.**
Current Stage: Under Review.

2. การนำผลงานไปใช้ประโยชน์

3. ผลงานการเข้าร่วมประชุมนานาชาติ

- Tinnakorn Theansungnoen, Sakda Daduang, and **Sompong Thammasirirak.** (2012) Antibacterial and antioxidant properties of crude leukocyte from the Siamese crocodile (*Crocodylus siamensis*). **The Fourth International Conference on Science and Technology for Sustainable Development of the Greater Mekong Sub-region**, 23 January – 24 January 2012, Pullman Khon Kaen Raja Orchid Hotel Khon Kaen, Thailand. Abstracts p.40 and Proceeding on CD.
- Nualyai Yaraksa, Sakda Daduang, **Sompong Thammasirirak.** (2011). Antibacterial activity of Leucrocine I analogue; antibacterial peptide from crocodile (*Crocodylus siamensis*) white blood cell extracts. The 2nd International Conference on Applied Science (2nd ICAS) The 3rd International Conference on Science and Technology for Sustainable Development of the Greater Mekong Sub-region (3 rd STGMS). Souphanouvong University, Luang Prabang, Lao PDR. 24-25 March, Abstracts p. 41 and Proceeding on CD. [Oral].

- Thitiporn Anunthawun, Prasan Swatsitang, **Sompong Thammasirirak**. (2011). Preliminary study on interaction between the peptides from crude hemoglobin of *crocodylus siamensis* and liposomes. The 2nd International Conference on Applied Science (2nd ICAS) The 3rd International Conference on Science and Technology for Sustainable Development of the Greater Mekong Sub-region (3 rd STGMS). Souphanouvong University, Luang Prabang, Lao PDR. 24-25 March, Abstracts p. 40 and Proceeding on CD. [Oral].

4. ผลงานการเข้าร่วมประชุมระดับชาติ

- Tinnakorn Theansungnoen, Sakda Daduang and **Sompong Thammasirirak**. (2011) Antibacterial property of crude leukocyte from the siamese crocodile (*Crocodylus siamensis*). **The 6th International Symposium of The Protein Society of Thailand**, 30 August - 2 September 2011, Chulabhorn Research Institute Conference Center, Bangkok, Thailand. Abstract p. 41. [Poster]
- Nualyai Yaraksa, Sakda Daduang and **Sompong Thammasirirak**. (2010) Preliminary study of antimicrobial activity and killing mechanism of crocodile (*Crocodylus siamensis*) leukocyte extracts. **The Fifth Annual Symposium of Protein Society of Thailand, FROM BASIC APPROACHES TO MODERN TECHNOLOGIES**, 23-25 June 2010, Chulabhorn Research Institute Conference Center, Bangkok, Thailand. Proceeding p. 163. [Poster]
- Nualyai Yaraksa, Sakda Daduang and **Sompong Thammasirirak**. (2010) Antibacterial activity of leukocyte extracts from crocodile (*Crocodylus siamensis*). **RGJ Seminar Series LXXV“Biomedical Sciences: Research for Healthy Society”**. Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand, October 11, 2010. Abstracts p. 42. [Poster]
- Nualyai Yaraksa, Sakda Daduang and **Sompong Thammasirirak**. (2010) Antimicrobial activity and killing mechanism of crocodile (*Crocodylus siamensis*) leukocyte extracts. **Commission on Higher Education CongressIII University Staff Development Consortium (CHE-USDC Congress III)**, 9-11 September 2010, Rayal Criff Grand Hotel and Spa, Chonburi, Thailand. Abstract p. 167. [Poster]