



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ Anti-acne and anti-inflammatory activity of
Crocodylus siamensis hemoglobin and leukocyte extracts

โดย อ.ดร. นิสาชล แจ้งพรมมา

เดือน มิถุนายน ปี 2560

สัญญาเลขที่ TRG5880017

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ Anti-acne and anti-inflammatory activity of
Crocodylus siamensis hemoglobin and leukocyte extracts

โดย อ.ดร. นิสาชล แจ่มพรมมา
สำนักงานคณบดี (นิติวิทยาศาสตร์) คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและต้นสังกัด

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย
สกว. และต้นสังกัดไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Abstract (บทคัดย่อ)

Project Code : TRG5880017

Project Title : Anti-acne and anti-inflammatory activity of *Crocodylus siamensis*
hemoglobin and leukocyte extracts

Investigator : Dr. Nisachon Jangpromma

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

Project Period : 2 Years

บทคัดย่อ

จะเข้าสู่สายพันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*) ถือเป็นหนึ่งในไม่กี่ชนิดของสัตว์เลื้อยคลานโบราณที่สามารถอยู่รอดได้จนถึงปัจจุบัน ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าจะมีระบบภูมิคุ้มกันแบบสืบทอดแต่กำเนิด (innate immunity) ที่มีประสิทธิภาพทำให้สามารถปรับตัวในสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปได้เป็นอย่างดี โดยเฉพาะภูมิคุ้มกันสืบทอดของกลุ่มเปปไทด์ต้านจุลชีพ ซึ่งน่าจะเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้สัตว์เลื้อยคลานสามารถดำรงคงอยู่ในสายวิวัฒนาการมาอย่างยาวนาน ดังนั้นโครงการนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนหรือเปปไทด์จากเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทย โดยเฉพาะฤทธิ์ต้านเชื้อสิว (*Propionibacterium acnes*) ฤทธิ์ต้านอักเสบ รวมทั้งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เพื่อเป็นการศึกษาถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระขององค์ประกอบต่างๆ ของเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทย ซึ่งได้แก่ พลาสมา ซีรัม ฮีโมโกลบิน และสารสกัดเม็ดเลือดขาว ในเซลล์ผิวหนังมนุษย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซึ่งถือเป็นอนุมูลอิสระกลุ่มออกซิเจน (reactive oxygen species; ROS) ที่มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคต่างๆ มากมาย จึงถูกนำมาใช้เป็นตัวแทนของอนุมูลอิสระในการทดลองครั้งนี้ ซึ่งผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าองค์ประกอบต่างๆ จากเลือดจระเข้ดังกล่าวข้างต้น ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ไฟโบรบลาสต์จากผิวหนังมนุษย์ (BJ; human skin fibroblasts) และเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์ (peripheral blood mononuclear cells; PBMC) เมื่อตรวจวัดด้วยวิธี 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide solution (MTT) แต่เมื่อเซลล์ได้รับ H_2O_2 นั้น พบว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์มีอัตราการรอดชีวิตลดลงมากกว่า 50% อย่างไรก็ตามความเป็นพิษจาก H_2O_2 นี้สามารถบรรเทาได้เมื่อเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ร่วมกับองค์ประกอบของเลือดจระเข้ก่อนได้รับอนุมูลอิสระ H_2O_2 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ซึ่งพบว่าฮีโมโกลบินสามารถลดพิษที่เกิดจาก H_2O_2 ได้สูงที่สุด โดยพบว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์มีอัตราการรอดชีวิตสูงถึง 89% ถึงแม้จะได้รับอนุมูลอิสระ ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการยับยั้งเซลล์ไฟโบรบลาสต์แล้วตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ จากผลการทดลองข้างต้นนี้ จึงมีความเป็นไปได้ที่เลือดจระเข้จะมีความสามารถในการต้านการอักเสบด้วย ทั้งนี้เนื่องจากอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในเซลล์นั้น สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบได้ ดังนั้นสารที่มีฤทธิ์

ด้านอนุมูลอิสระจึงอาจมีฤทธิ์ต้านอักเสบด้วยเช่นกัน เพื่อทดสอบฤทธิ์ในการต้านอักเสบนั้น การทดลองครั้งนี้จึงได้นำฮีมोगلوبิน และสารสกัดเม็ดเลือดขาวที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ได้อย่างดีเยี่ยมมาศึกษาต่อเนื่องถึงฤทธิ์ต้านการอักเสบในเซลล์เพราะเลี้ยงแมคโครฟาจ (RAW 264.7) โดยผลการทดลองพบว่าเมื่อทำการกระตุ้นเซลล์ RAW 264.7 ให้เกิดการอักเสบด้วยทั้งไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide; LPS) และเชื้อก่อสิว (Heat-killed *P. acnes*) สารสกัดเม็ดเลือดขาวจากเลือดจะเข้าสู่สายพันธุ์ไทยที่ความเข้มข้น 25 50 และ 100 µg/ml สามารถลดระดับของไนตริกออกไซด์ (NO) ได้อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสอดคล้องกับผลการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบคือ พบว่าสารสกัดเม็ดเลือดขาวสามารถลดระดับการแสดงออกของยีนของสารสื่อกลางอักเสบและไซโตไคน์ในเซลล์ RAW 264.7 เมื่อถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย LPS และ *P. acnes* ได้ ตัวอย่างเช่น ลดการแสดงออกของยีน inducible nitric oxide synthase (iNOS) Interleukin 6 (IL-6), Interleukin 1β (IL-1β) และ Tumor necrosis factor-α (TNF-α) เมื่อทำการตรวจวัดด้วยเทคนิค RT-PCR และสามารถลดระดับของโปรตีน IL-6 และ TNF-α เมื่อทำการตรวจวัดด้วยเทคนิค ELISA นอกจากนี้เมื่อทำการทดสอบผลของสารสกัดเม็ดเลือดขาวในการป้องกันการตายแบบ apoptosis ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นการอักเสบ พบว่าสารสกัดเม็ดเลือดขาว (25 และ 50 µg/ml) สามารถป้องกันเซลล์จากกระบวนการ apoptosis เพื่อเซลล์ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย LPS และ *P. acnes* ได้ โดยพบว่าสารสกัดเม็ดเลือดขาวที่ความเข้มข้นสูงสุด (50 µg/ml) สามารถลดระดับการตายแบบ apoptosis ในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นการอักเสบด้วย LPS ได้ถึง 74% และสามารถลดระดับการตายแบบ apoptosis ในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นการอักเสบด้วย *P. acnes* ได้ถึง 59% ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. acnes* ด้วยเทคนิค broth dilution พบว่าสารสกัดเม็ดเลือดขาวสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. acnes* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ สำหรับฮีมोगلوبินนั้น พบว่าฮีมोगلوبินจากเลือดจะเข้าสู่สายพันธุ์ไทยสามารถลดระดับการอักเสบได้ในทำนองเดียวกันกับสารสกัดเม็ดเลือดขาว เมื่อทำการศึกษาแบบแผนของโปรตีนในเซลล์ RAW 264.7 เมื่อถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย LPS และได้รับฮีมोगلوبินจากเลือดจะเข้าสู่สายพันธุ์ไทยร่วม ด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ (proteomics) ร่วมกับเทคนิคแมสสเปคโตรสโกปี (LC-MS/MS) พบว่าฮีมोगلوبินจากเลือดจะเข้าสู่สายพันธุ์ไทยสามารถลดการอักเสบโดยอาศัยหลายกลไกที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น cellular metabolism protein fate oxidative burst signal transduction และ morphogenesis ผลงานวิจัยทั้งหมดในครั้งนี้เป็นงานวิจัยแรกที่ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย ไม่ว่าจะเป็นฤทธิ์ต้านเชื้อสิว ฤทธิ์ต้านอักเสบ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งถือเป็นข้อมูลพื้นฐานในการสนับสนุนการพัฒนาใช้เลือดจระเข้เพื่อการรักษาหรือเป็นอาหารเสริมต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ : ด้านการอักเสบ, สิว, เซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7, จระเข้สายพันธุ์ไทย, เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผิวหนังมนุษย์

Abstract

Siamese crocodile (*Crocodylus siamensis*) is one of a few ancient reptile species which was survived until nowadays. Regarding from this evidence, it indicates that the innate immunity of the crocodiles is very powerful to protect itself from several pathogens infection. Thus, in this project we are interested to study biological properties of crocodile blood proteins and peptides in the term of the anti- *P. acnes*, anti-inflammatory and antioxidant activity. To elucidate the antioxidant activity of *C. siamensis* blood components (plasma, serum, hemoglobin (cHb) and white blood cells extract (cWBC) on BJ human skin fibroblasts, hydrogen peroxide (H_2O_2), a reactive oxygen species (ROS) causing cellular injury associated with the induction of numerous diseases, was selected as the oxidant in this research. Using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide solution (MTT) assay, *C. siamensis* blood components were found exhibit no toxicity on BJ cells. A pronounced protective effect against H_2O_2 damage was observed upon pre-incubation of the cells with 25, 50 and 100 $\mu\text{g/ml}$ of each *C. siamensis* blood component for 1 h prior to H_2O_2 exposure. The highest potential to preserve cell viability was found in *C. siamensis* hemoglobin (cHb) (89.0%). These results were coincided with visible light microscopy observation. Additionally, it could further be shown that treatment with *C. siamensis* blood components did not exhibit any toxic effect on human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Moreover, the collected data clearly demonstrates that H_2O_2 induces apoptosis within human skin fibroblast cells, which was evidently decreased by pre-treatment with cHb. Free radicals lead to oxidation and this accumulates within cells can contributes to the inflammatory state of various diseases. Thus, antioxidant compounds are potent scavengers of free radicals that may have a possible role in improving inflammatory conditions. From this evidence, cHb and cWBC that exhibited antioxidant behavior might also have the anti-inflammatory function. Consequently, this report represents the first study aimed to shed light on the basic mechanism of the anti-inflammatory activities of cHb and cWBC. In the present study, 25, 50 and 100 $\mu\text{g/ml}$ of cWBC were found to reduce the production of NO in both LPS and *P. acnes*-stimulated RAW 264.7 cells. Consistent with the NO testing results, it was observed that co-treatment with cWBC also significantly decreased inducible nitric oxide synthase (iNOS), likely due to decreased expression levels of Inducible nitric oxide synthase (iNOS), Interleukin 6 (IL-6), Interleukin 1β (IL- 1β) and Tumor necrosis factor- α (TNF- α) mRNA expression level and also decreased IL-6 and TNF- α protein level as determined by RT-PCR and ELISA, respectively. Moreover, combining the cWBC (25 and 50 $\mu\text{g/ml}$) with LPS or *P. acnes*- would decrease the apoptosis of RAW 264.7 cells. At the concentration of 50 $\mu\text{g/ml}$, cWBC significantly decreased apoptosis process that induced by LPS and *P. acnes* about 74% and

59%, respectively. Additionally, the result from broth dilution method revealed that cWBC inhibited the growth of *P. acnes*. To elucidate the proteomics response of macrophages treated with LPS in the presence or absence of cHb, several proteins with differential expressions were identified by using LC-MS/MS analysis. With respect to the individual functions of these proteins, our data indicated involvement in various processes during inflammation, such as cellular metabolism, protein fate, oxidative burst, signal transduction and morphogenesis. Consequently, all results of this study directly indicated that cHb exhibits anti-inflammatory activity on LPS-stimulated RAW 264.7 cells via functioning as an activator or suppressor in the expression of inflammatory factor genes and affects several specific proteins that related to important inflammation pathways. Therefore, this work represents the first study to demonstrate the efficiency of *C. siamensis* blood components with respect to their biological function and strongly supports the utilization of *C. siamensis* blood as a therapeutic products or dietary supplements.

Keywords : Anti-inflammatory, Acne vulgaris, RAW 264.7, Siamese crocodile, Human skin fibroblast

สารบัญ

หัวเรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	ค
สารบัญ	จ
สารบัญรูปภาพ	ฉ
สารบัญตาราง	ณ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	5
บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง	22
บทที่ 4 ผลการวิจัย	32
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการวิจัย	57
เอกสารอ้างอิง	63

สารบัญรูปภาพ

ชื่อรูป	หน้า
รูปที่ 2.1 ภาพแสดงเซลล์เม็ดเลือดของสัตว์เลื้อยคลาน	7
รูปที่ 2.2 การเปรียบเทียบการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันของสารน้ำระหว่างสัตว์เลื้อยคลานและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม	9
รูปที่ 2.3 แผนภาพวิวัฒนาการชาติพันธุ์ (cladogram) ของสัตว์เลื้อยคลานและสัตว์ปีก	10
รูปที่ 2.4 อันดับ Crocodilia (Crocodilians) (ก) จระเข้น้ำกร่อย <i>Crocodylus porosus</i> (ข) จระเข้น้ำจืด (<i>Crocodylus siamensis</i>) (ค) ตะโขง (<i>False gavia</i>)	11
รูปที่ 4.1 ผลการตรวจสอบแบบแผนโปรตีนของเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทยโดยใช้เทคนิคSDS-PAGE	32
รูปที่ 4.2 ผลการทดสอบความสามารถของสารสกัดเม็ดเลือดขาวในการยับยั้งเชื้อ <i>P. acnes</i> DMST 14916	33
รูปที่ 4.3 ผลการทดสอบความเป็นพิษ (cytotoxicity) ของฮีโมโกลบิน (cHb) และสารสกัดเม็ดเลือดขาว (cWBC) ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ (RAW 264.7)	34
รูปที่ 4.4 ผลการทดสอบความเป็นพิษของเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทย ด้วยเทคนิค MTT assay โดยใช้เซลล์ไฟโบรเบลสต์ (BJ) ที่ความหนาแน่นเซลล์เท่ากับ 1×10^4 เซลล์/หลุม และทดสอบด้วยเลือดจระเข้ที่ความเข้มข้น 0-500 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	35
รูปที่ 4.5 ผลของเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทยต่อการลดความเครียดออกซิเดชันที่เกิดจาก H_2O_2 (H_2O_2 -stimulated oxidative stress) ในเซลล์ไฟโบรเบลสต์	36
รูปที่ 4.6 ผลการศึกษาทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ในสภาวะเครียดออกซิเดชันที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย hydrogen peroxide (H_2O_2) ภายใต้กล้อง phase contrast inverted microscope	37
รูปที่ 4.7 ผลความเป็นพิษของเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทยต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์ (PBMC) ที่แยกได้จากเลือดของมนุษย์ที่มีสุขภาพดี ด้วย Ficoll-Paque (GE Healthcare, Sweden)	38
รูปที่ 4.8 ผลของฮีโมโกลบินในการป้องกันการตายแบบ apoptosis จาก H_2O_2 ในเซลล์ไฟโบรเบลสต์ของมนุษย์ ด้วยเทคนิค Annexin V-FITC/PI flow cytometry	39
รูปที่ 4.9 ผลของสารสกัดสารสกัดเม็ดเลือดขาวต่อการสร้างไนตริกออกไซด์ (NO) ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย Heat-killed <i>P. acnes</i>	40
รูปที่ 4.10 (a) คือกราฟแท่งแสดงผลของสารสกัดเม็ดเลือดขาวต่อการสร้าง iNOS ในเซลล์แมคโครฟาจสายพันธุ์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย Heat-killed <i>P. acnes</i> และ (b) คือ ผล RT-PCR ของยีน iNOS เปรียบเทียบกับ GAPDH	41

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

ชื่อรูป	หน้า
รูปที่ 4.11 (a) คือ กราฟแท่งแสดงผลของสารสกัดเม็ดเลือดขาวต่อการสร้าง IL-6 ในเซลล์แมคโคร ฟาจสายพันธุ์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร Heat-killed <i>P. acnes</i> และ (b) คือ ผลของ RT-PCR ของยีน IL-6 เปรียบเทียบกับ GAPDH	42
รูปที่ 4.12 กราฟแท่งแสดงผลของสารสกัดเม็ดเลือดขาวต่อการสร้าง IL-1 β ในเซลล์แมคโครฟาจ สายพันธุ์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร Heat-killed <i>P. acnes</i> (a) และ (b) ผลของ RT-PCR ของยีน IL-1 β เปรียบเทียบกับ GAPDH	43
รูปที่ 4.13 (a) คือ กราฟแท่งแสดงผลของสารสกัดเม็ดเลือดขาวต่อการสร้าง TNF- α ในเซลล์แมค โครฟาจสายพันธุ์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร Heat-killed <i>P. acnes</i> และ (b) คือ ผลของ RT-PCR ของยีน TNF- α เปรียบเทียบกับ GAPDH	44
รูปที่ 4.14 ผลของสารสกัดเม็ดเลือดขาวต่อการสร้างไนตริกออกไซด์ (NO) ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร LPS	45
รูปที่ 4.15 (a) คือ กราฟแท่งแสดงผลของสารสกัดเม็ดเลือดขาวต่อการสร้าง iNOS ในเซลล์แมคโคร ฟาจสายพันธุ์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร LPS และ (b) คือ ผล RT-PCR ของยีน iNOS เปรียบเทียบกับ GAPDH	46
รูปที่ 4.16 (a) คือ กราฟแท่งแสดงผลของสารสกัดเม็ดเลือดขาวต่อการสร้าง IL-6 ในเซลล์แมคโคร ฟาจสายพันธุ์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร LPS และ (b) คือ ผลของ RT-PCR ของ ยีน IL-6 เปรียบเทียบกับ GAPDH	47
รูปที่ 4.17 (a) คือ กราฟแท่งแสดงผลของสารสกัดเม็ดเลือดขาวต่อการสร้าง IL-1 β ในเซลล์แมคโคร ฟาจสายพันธุ์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร LPS และ (b) คือ ผลของ RT-PCR ของ ยีน IL-1 β เปรียบเทียบกับ GAPDH	48
รูปที่ 4.18 (a) คือ กราฟแท่งแสดงผลของสารสกัดเม็ดเลือดขาวต่อการสร้าง TNF- α ในเซลล์แมค โครฟาจสายพันธุ์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร LPS และ (b) คือ ผลของ RT-PCR ของยีน TNF- α เปรียบเทียบกับ GAPDH	49
รูปที่ 4.19 ผลของสารสกัดเม็ดเลือดขาวจากจระเข้สายพันธุ์ไทย (cWBC) ต่อระดับ IL-6 (a) และ TNF- α (b) ใน RAW 264.7	50
รูปที่ 4.20 ผลของสารสกัดเม็ดเลือดขาวในการป้องกันการตายแบบ apoptosis จากการอักเสบที่เกิด จากการกระตุ้นด้วยเชื้อ <i>P. acnes</i> ในเซลล์ RAW 264.7 ด้วยเทคนิค Annexin V- FITC/PI flow cytometry	51

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

ชื่อรูป	หน้า
รูปที่ 4.21 ผลของสารสกัดเม็ดเลือดขาวในการป้องกันการตายแบบ apoptosis จากการอักเสบที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยเชื้อ LPS ในเซลล์ RAW 264.7 ด้วยเทคนิค Annexin V-FITC/PI flow cytometry	52
รูปที่ 4.22 ผลของฮิโมโกลบินจากเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทยต่อการสร้างไนตริกออกไซด์ (NO) ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร LPS	53
รูปที่ 4.23 แสดงแบบแผนโปรตีนจากเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 เมื่อได้รับการอักเสบร่วมกับฮิโมโกลบินจากเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทยด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ (proteomics)	54

สารบัญตาราง

ชื่อตาราง	หน้า
ตารางที่ 3.1	แสดง primer ที่ใช้ในการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ
ตารางที่ 3.2	ขั้นตอนการย้อมสีโปรตีนด้วย Silver Staining (Amersham Biosciences)
ตารางที่ 4.1	ตารางการเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์ RAW 264.7 เมื่อได้รับการอักเสบร่วมกับฮีโมโกลบิน และระบุชนิดของโปรตีนโดยใช้เทคนิค LC-MS/MS

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและเหตุผล

วิถีการดำรงชีวิตของคนในปัจจุบันพบว่ามี การเปลี่ยนแปลงจากอดีตอย่างมาก ซึ่งมักส่งผลทำให้ร่างกายถูกทำร้ายด้วยสารอนุมูลอิสระ (free radicals) ที่เกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วและเป็นจำนวนมาก โดยทั่วไปอนุมูลอิสระสามารถเกิดขึ้นในร่างกายได้ตลอดเวลา เช่น การใช้ชีวิตประจำวันอย่างเร่งรีบ การบริโภคอาหารที่มีสารเคมีตกค้าง แสงอัลตราไวโอเลต มลภาวะ รวมทั้งควันพิษจากท่อไอเสียรถยนต์ และจากขบวนการเผาผลาญอาหารเพื่อเปลี่ยนเป็นพลังงานให้แก่ร่างกาย นอกจากนี้ยังพบว่าอนุมูลอิสระอาจเกิดขึ้นได้จากการติดเชื้อ เช่น ไวรัส หรือแบคทีเรีย ซึ่งพบว่ามี ความเชื่อมโยงในการเกิดการอักเสบ โดยพบว่าอนุมูลอิสระที่ร่างกายไม่สามารถกำจัดได้หมดนั้น จะเข้าทำลายเนื้อเยื่อ เซลล์ต่างๆ จนทำให้เกิดการอักเสบ เซลล์เสื่อม เซลล์แก่ และอาจเสี่ยงต่อการเกิดโรค เช่น โรคทางระบบหัวใจและหลอดเลือด โรคมะเร็ง หรือโรคทางระบบภูมิคุ้มกัน (Brodsky et al., 2010)

การอักเสบ เป็นปฏิกิริยาการตอบสนองของร่างกายต่อการบาดเจ็บและการติดเชื้อของเนื้อเยื่อ เพื่อไปทำลายสิ่งแปลกปลอมและช่วยซ่อมแซมเนื้อเยื่อให้กลับสู่ภาวะปกติ ซึ่งการอักเสบแบบเฉียบพลันจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว และใช้เวลาไม่นาน และมีความสัมพันธ์กับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน ส่วนการอักเสบแบบเรื้อรังเป็นการอักเสบที่เกิดขึ้นยาวนานกว่า 4 สัปดาห์ มีผลทำให้เนื้อเยื่อเสียหาย เช่น เกิดการเสื่อมของเส้นประสาท หรือสามารถทำให้เกิดโรคทางระบบหัวใจและหลอดเลือดได้ การอักเสบที่เกิดเนื่องมาจากระบบภูมิคุ้มกันเกิดขึ้นจากระบบภูมิคุ้มกันแต่กำเนิด (innate immunity) ร่วมกับสารที่หลั่งจากเซลล์และสารจากพลาสมา ซึ่งกระบวนการอักเสบชนิดนี้เกิดจากการต่อต้านการติดเชื้อไวรัส หรือแบคทีเรียของร่างกาย กล่าวคือเมื่อ macrophages กลืนกินไวรัส หรือแบคทีเรียแล้ว จะมีการปล่อยโปรตีนของไวรัส หรือผนังเซลล์ของแบคทีเรียบางส่วนออกมา ซึ่งโปรตีนเหล่านี้สามารถเหนี่ยวนำและกระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันให้ตอบสนองทำให้เกิดการอักเสบด้วยการหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบ (inflammatory mediators) เช่น nitric oxide (NO), prostaglandins E_2 (PGE_2) และ pro-inflammatory cytokines เช่น Tumor necrosis factor alpha ($TNF-\alpha$), Interleukin-8 (IL-8), Interleukin- 1β (IL- 1β) ออกมา (Rodriguez-Vita et al., 2010)

หากกล่าวถึงการอักเสบพบว่า Acne vulgaris หรือสิว นั้น ถือเป็นการอักเสบแบบเรื้อรัง (chronic inflammatory) ที่เป็นปัญหาทางผิวหนังที่พบได้บ่อย และเป็นโรคเรื้อรังที่มีแนวโน้มที่จะกลับมาใหม่ตลอดเวลา ประชากรเก้าในสิบคนเคยมีปัญหาสิวอย่างน้อยครั้งหนึ่งในชีวิต ปัญหาสิวมักได้ส่งผลให้เกิดแผลเป็นที่ผิวหนังเท่านั้น พบว่าในหลายครั้งปัญหาสิวก่อให้เกิดแผลเป็นในจิตใจ ทำให้ขาดความมั่นใจในตัวเอง ซึมเศร้า แยกตัวจากสังคม รวมไปถึงการเลือกปฏิบัติจากสังคม และโอกาสในหน้าที่การงานอีกด้วย (ธิดากานต์ รุจิพัฒนกุล, ม.ป.ป.) สาเหตุของการเกิดสิวนั้นพบว่ายังไม่ทราบแน่ชัด แต่เชื่อว่าเกิดจากการเปลี่ยนแปลงระดับฮอร์โมนในร่างกาย การทำงานของต่อมไขมัน อาหารหรือยาที่รับประทาน และอีกปัจจัยที่สำคัญในการก่อเกิดสิวคือแบคทีเรีย *P. acnes* (Choi

et al., 2008; Grange et al., 2009; Park et al., 2004) เชื้อ *Propionibacterium acnes* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ชนิดไม่พึ่งออกซิเจน สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส (lipase) ย่อยสารไตรกลีเซอไรด์ในไขมันที่ผลิตจากต่อมไขมัน ให้กลายเป็นกลีเซอรอลและกรดไขมันอิสระ ช่วยให้แบคทีเรียเติบโตได้ดีขึ้น และกระตุ้นปฏิกิริยาการอักเสบให้รุนแรงขึ้น (Drott et al., 2010; Grange et al., 2009) โดยกระบวนการอักเสบนั้นเกิดจาก *P.acnes* กระตุ้นให้เซลล์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องเช่น เซลล์โมโนไซต์ (monocytes cell) เซลล์เอนโดทีเลียม (endothelial cell) เซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast cell) และเซลล์คีราติโนไซต์ (keratinocytes cell) ผ่าน toll-like receptors TLR-2 ซึ่งเป็นตัวรับบนผิวเซลล์ให้หลั่งสารสื่อกลางการอักเสบ (pro-inflammatory cytokines) เช่น Interleukin-1 (IL-1), IL-8 และ tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) (Choi et al., 2008; Drott et al., 2010; Grange et al., 2009) ซึ่งส่งผลให้เกิดกระบวนการอักเสบตามมา

โดยทั่วไปแนวทางสำคัญในการควบคุมและบรรเทาอาการอักเสบจะเน้นการยับยั้งการทำงานของสารสื่อกลางการอักเสบ เช่น NO และ PGE₂ ดังนั้นยา หรือสารเคมีที่สามารถยับยั้งการสร้าง หรือยับยั้งการทำงานของ inducible nitric oxide synthase (iNOS) และ/หรือ cyclooxygenase-2 (COX-2) หรือสามารถยับยั้งการสร้างสารสื่อกลางการอักเสบตัวอื่นๆ ได้ ก็จะสามารถยับยั้งและบรรเทาอาการอักเสบได้ด้วย (Kim et al., 2012) ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้เป็นกลไกในการออกฤทธิ์ของยาต้านอักเสบแผนปัจจุบันส่วนใหญ่ เช่น ยากลุ่ม NSAIDs และ steroids แต่ยาดังกล่าวมักมีฤทธิ์ข้างเคียงและส่งผลที่ไม่พึงประสงค์ต่อผู้ป่วยสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อระบบทางเดินอาหาร ส่วนยาที่มีผลข้างเคียงต่ำยังมีราคาค่อนข้างสูง ส่วนการรักษาสิวนั้นปัจจุบันนิยมใช้ยาปฏิชีวนะทั้งชนิดกินและทา ซึ่งหากใช้เพียงชนิดใดชนิดหนึ่งมักพบปัญหาเชื้อดื้อยาได้บ่อย การใช้ยาปฏิชีวนะชนิดกินร่วมกับยาทาจึงอาจช่วยลดปัญหาเชื้อดื้อยาได้ อย่างไรก็ตามการกินยาต่อเนื่องกันเป็นเวลานานอาจมีผลเสียต่อร่างกายได้เช่นกัน (Kim et al., 2008; Park et al., 2004) เพื่อแก้ปัญหาที่กล่าวมาข้างต้นปัจจุบันจึงได้มีการนำสารสกัดจากธรรมชาติมาใช้ในการรักษาโรคผิวหนังโดยเชื้อแบคทีเรีย *P.acnes* จำนวนมาก (Kim et al., 2008; Lee et al., 2014; Park et al., 2004) ดังนั้นการนำโปรตีนหรือเปปไทด์จากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านอักเสบมาพัฒนาเป็นยาต้านอักเสบที่มีผลข้างเคียงน้อย น่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งในการรักษา เนื่องจากมีราคาถูกกว่ายาแผนปัจจุบัน และยังสามารถนำทรัพยากรของประเทศมาใช้ประโยชน์ได้อย่างสูงสุด

จะเห็นเป็นสัตว์เศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่ประชาชนทั้งภายในประเทศและต่างประเทศนำมาบริโภคเป็นอาหารเสริมและบำรุงร่างกาย จากข้อมูลของการเพาะเลี้ยงจะพบว่าจะจะมีพฤติกรรมก้าวร้าว กัดและต่อสู้ โดยเฉพาะในฤดูผสมพันธุ์ จนทำให้เกิดบาดแผลที่ใหญ่มาก แต่พบว่าจะจะไม่มีปัญหาของการติดเชื้อแบคทีเรียหรือการอักเสบจากการได้รับบาดเจ็บนั้นเลยถึงแม้ว่าสภาพแวดล้อมที่อยู่อาศัยจะเอื้ออำนวยต่อการติดเชื้อก็ตาม ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า จะจะมีการสร้างโปรตีนหรือเปปไทด์ หรือมีระบบภูมิคุ้มกันตามธรรมชาติชนิดพิเศษที่สามารถทำลายแบคทีเรียและยับยั้งการอักเสบได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูง จากการศึกษาการนำเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*) มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยนักวิจัยในศูนย์วิจัยโปรตีนและโปรตีนโอมิคส์เพื่อการพาณิชย์และอุตสาหกรรม (ศปพ.) พบว่าทั้งสารสกัดเม็ดเลือดขาว ฮีโมโกลบิน พลาสมา และซีรัม นั้นมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวก แกรมลบ เช่น คือ *P. aeruginosa* (clinical isolate), *P. aeruginosa* ATCC 2785, *Staphylococcus epidermidis*, *S. typhi* (clinical isolate), *S. typhi* B (clinical isolate), *S. typhi* ATCC 5784 , *V. cholerae* (clinical isolate) รวมทั้งสามารถยับยั้งการเจริญ

ของเชื้อรา *Candida albican* ได้ (Preecharram et al., 2008 & 2010; Srihongthong et al., 2010; Pata et al., 2011; Jandaruang et al., 2012; Kommanee et al., 2012) นอกจากฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราแล้วยังพบว่าเลือดจระเข้มีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และลดการอักเสบได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารสกัดเม็ดเลือดขาวซึ่งพบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและต้านอนุมูลอิสระได้สูงสุด อย่างไรก็ตาม ผลงานวิจัยที่ผ่านมายังไม่พบการประยุกต์ใช้สารสกัดเม็ดเลือดขาวจากเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทยในการลดอักเสบ เนื่องจากแบคทีเรีย *P.acnes* ดังนั้นเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการประยุกต์ใช้สารสกัดเม็ดเลือดขาวในผลิตภัณฑ์ รักษาและลดสิวอักเสบ การศึกษาถึงความสามารถในการต้านการอักเสบที่เกิดจากแบคทีเรีย *P.acnes* รวมทั้ง การอักเสบที่เกิดจากกระตุ้นของ Lipopolysaccharide (LPS) ของสารสกัดเม็ดเลือดขาวจากจระเข้สายพันธุ์ไทย จึงมีความจำเป็นและสำคัญ

งานวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาฤทธิ์ต้านอักเสบของสารสกัดเม็ดเลือดขาวจากเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทยใน เซลล์มาโครฟาจที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วยแบคทีเรีย *P.acnes* และ LPS จากนั้นทำการตรวจสอบระดับ ของสารสื่อกลางการอักเสบและศึกษาระดับการแสดงออกของโปรตีน หรือยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบที่เซลล์ มาโครฟาจ ผลิตขึ้นด้วยเทคนิค Quantitative real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (PCR) นอกจากนี้เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการประยุกต์ใช้โปรตีนหรือเปปไทด์จากเลือดจระเข้สายพันธุ์ ไทยในผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพและความงาม จึงได้ทำการศึกษาเชิงลึกถึงกลไกการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ รวมทั้ง ความเป็นพิษของเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทยร่วมด้วย ซึ่งองค์ความรู้ที่ได้ทั้งหมดจะช่วยส่งเสริมการนำเลือดจระเข้มา ใช้เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์รักษาและลดสิวอักเสบได้ และถือได้ว่าเป็นการเพิ่มมูลค่าของเลือด ที่ยังมีการใช้ ประโยชน์อย่างจำกัดในปัจจุบัน และสอดคล้องกับแนวคิดของกระบวนการผลิตแบบไร้ของเสีย เป็นการสร้างสรรค์ ผลิตภัณฑ์ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ ซึ่งเป็นแนวโน้มของอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์ความงามและผู้บริโภคในปัจจุบัน ก่อให้เกิดการใช้ประโยชน์จากผลิตผลพลอยได้ (by-product) จากอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงจระเข้ให้เกิดประโยชน์ สูงสุด

1.2 วัตถุประสงค์

- 1.2.1 เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอักเสบของเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*) ต่อเซลล์ มาโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วย lipopolysaccharide (LPS)
- 1.2.2 เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอักเสบของเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*) ต่อเซลล์ มาโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วยแบคทีเรีย *P.acnes*
- 1.2.3 เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันภายในเซลล์ผิวหนังมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดสภาวะออกซิเดชันด้วย ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ของเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*)

1.3 แผนและทิศทางการดำเนินงานวิจัย

ทำการเก็บเลือดจากจระเข้สายพันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*) จากนั้นนำมาวิเคราะห์ฤทธิ์ต้าน อักเสบของสารสกัดเม็ดเลือดขาวจากเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทยต่อเซลล์มาโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้ เกิดการอักเสบด้วยแบคทีเรีย *P.acnes* และ LPS รวมทั้งศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันภายในเซลล์ผิวหนังมนุษย์ที่ถูก

กระตุ้นให้เกิดสภาวะออกซิเดชันด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ของเลือดจระเข้ น้ำจืดสายพันธุ์ไทย ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้จะเป็น Platform technology ในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนและเปปไทด์ในสัตว์เลื้อยคลานชนิดอื่นๆ หรือในสปีชีส์อื่นๆ ต่อไปในอนาคต และยังเป็นการใช้ของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเลี้ยงจระเข้ให้เกิดประโยชน์สูงสุดและสอดคล้องกับแนวคิดของกระบวนการผลิตแบบไร้ของเสีย (zero discharge)

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

องค์ความรู้ที่ได้จะทำให้เข้าใจถึงกลไกบางประการในการออกฤทธิ์ต้านอักเสบของสารสกัดเม็ดเลือดขาวจากเลือดจระเข้ น้ำจืดสายพันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*) ต่อเซลล์มาโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วยแบคทีเรีย *P.acnes* และ LPS รวมทั้งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระหรือต้านออกซิเดชันภายในเซลล์ของเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทย ซึ่งอาจนำไปสู่การพัฒนาใช้เลือดจระเข้สายพันธุ์ไทยในผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพและความงาม ก่อให้เกิดการใช้ประโยชน์จากเลือดจระเข้ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ (by-product) จากอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงจระเข้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด

บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 ระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์เลื้อยคลาน

สัตว์เลื้อยคลานเป็นกลุ่มสัตว์เลือดเย็นเพียงกลุ่มเดียวที่มีวิวัฒนาการของระบบภูมิคุ้มกันร่างกายที่มีประสิทธิภาพและน่าสนใจอย่างมาก จึงมีบทบาทสำคัญต่อการศึกษาเกี่ยวกับการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน และวิวัฒนาการของระบบภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวข้องสัมพันธ์กับระบบนิเวศ นอกจากนี้สัตว์เลื้อยคลานยังมีลักษณะการดำรงชีวิตที่โดดเด่นมากกว่าสัตว์เลือดเย็นอื่นๆ และยังมีวิธีการดำรงชีวิตในการสืบพันธุ์ที่เกิดขึ้นบนบกอย่างเด่นชัด ไม่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานเช่นเดียวกับสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกทั่วไป อย่างไรก็ตามสัตว์เลื้อยคลานเป็นกลุ่มสัตว์เลือดเย็นที่มีวิวัฒนาการการดำรงชีวิตที่ยาวนาน โดยอุณหภูมิในร่างกายจะเปลี่ยนแปลงตามอุณหภูมิของสิ่งแวดล้อมตามฤดูกาล นอกจากนี้ลักษณะเด่นของสัตว์เลื้อยคลาน คือ ผิวหนังชั้นนอกจะมีเคอราติน (keratin) เป็นองค์ประกอบ ซึ่งไม่พบในสัตว์มีกระดูกสันหลังอื่นๆ การมีชั้นผิวหนังพิเศษนี้ส่งผลให้สัตว์เลื้อยคลานสามารถป้องกันการถูกบุกรุกจากสิ่งแปลกปลอมได้ดีกว่าสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ซึ่งลักษณะเหล่านี้ย่อมมีผลกระทบต่อวิธีการดำรงชีวิตรวมถึงการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์กลุ่มนี้เป็นอย่างมาก ถึงแม้ว่านักวิจัยจะพยายามศึกษา ระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์เลื้อยคลานอย่างต่อเนื่อง แต่อย่างไรก็ตามข้อมูลจากการวิจัยยังคงต้องมีการเรียนรู้เกี่ยวกับการตอบสนองภูมิคุ้มกันของสัตว์เลื้อยคลานต่อไป เพื่อให้สามารถอธิบายกระบวนการทำงานที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์กลุ่มนี้ได้อย่างลึกซึ้งมากขึ้น

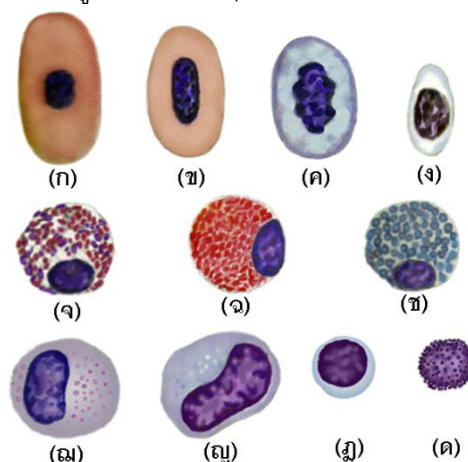
สำหรับการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันของจระเข้แม้ว่าจะมีการศึกษาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2546 โดย Merchant และคณะ (Merchant et. al., 2003; 2005; 2006a; 2006b) แต่ยังไม่สามารถอธิบายกลไกการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของจระเข้ได้อย่างชัดเจน มีงานวิจัยหลายเรื่องรายงานว่า ในระบบภูมิคุ้มกันของอัลลิเกเตอร์ประกอบด้วยสารที่ตอบสนองด้านเซลล์ ได้แก่ B-cell และ T-cell ที่ชัดเจน นอกจากนี้ยังพบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะทางเซลล์วิทยาน่าจะมีความเกี่ยวข้องสัมพันธ์กับการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในจระเข้ อัลลิเกเตอร์อีกด้วย (Mateo et. al., 1984) อย่างไรก็ตามระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์เลื้อยคลานมีลักษณะคล้ายคลึงกับระบบภูมิคุ้มกันของสิ่งมีชีวิตอื่นทั่วไป ซึ่งประกอบด้วย 2 ระบบ ดังนี้

2.1.1 ระบบภูมิคุ้มกันแบบสืบทอดแต่กำเนิด (innate immunity) เป็นกลไกป้องกันตัวเองด่านแรกของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดที่สืบทอดจากรุ่นพ่อแม่ ที่ใช้ในการต่อสู้กับสิ่งแปลกปลอมที่รับเข้าครั้งแรกและมีการตอบสนองอย่างรวดเร็ว โมเลกุลที่มีความเกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบสืบทอดแต่กำเนิดได้แก่ ระบบคอมพลีเมนต์ ไลโซไซม์ ทรานส์เฟอริน ออฟโซนิน (opsonin) อินเตอร์เฟอรอน (interferon) ดีเฟนซิน และเปปไทด์ต้านจุลชีพ (Brown, 2002) เมื่อสิ่งมีชีวิตได้รับสิ่งแปลกปลอมกระตุ้นจากภายนอกจะส่งผลกระทบกระตุ้นให้ร่างกายสร้างระบบภูมิคุ้มกันที่จำเพาะที่เรียกว่า แอนติบอดี (antibody) นอกจากนี้ระบบคอมพลีเมนต์ (complement) ยังเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่มีความสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบสืบทอดแต่กำเนิด ซึ่งประกอบด้วยกลุ่มโปรตีนที่มีอยู่ในพลาสมา มีความสามารถในการทำลายเชื้อแบคทีเรียหรือสิ่งแปลกปลอมที่เรียกว่า แอนติเจน (antigen) โดยกระบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอมโดยตรง (opsonization) และกระบวนการทำให้เซลล์แตก อย่างไรก็ตามการทำงานของระบบคอมพลีเมนต์จะเกิดขึ้นโดยผ่านกลไก 3 ทาง ดังนี้

1. Classical pathway เป็นกลไกที่เกิดขึ้นหลังสุด แต่ได้รับการค้นพบก่อนกลไกอื่นๆ กลไกนี้เกี่ยวข้องกับการทำงานของแอนติบอดีโดยตรงจากการกระตุ้นโดยโปรตีนกลุ่มอิมมูโนโกลบูลินจี (immunoglobulin G; IgG) และ อิมมูโนโกลบูลินเอ็ม (immunoglobulin G; IgM)
2. Alternative pathway เป็นกลไกที่ถูกกระตุ้นด้วยโมเลกุลต่างๆ เช่น ไวรัส ไลโปโพลีแซ็กคาไรด์ ที่เป็นส่วนประกอบของเซลล์เมมเบรนของแบคทีเรีย กลไกนี้ไม่เกี่ยวข้องกับการทำงานของแอนติบอดี
3. Lectin pathway เป็นกลไกที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของโปรตีนเลคติน ซึ่งเป็นโปรตีนที่สามารถจับกับโมเลกุลคาร์โบไฮเดรตกลุ่มน้ำตาลแมนโนสที่เป็นองค์ประกอบบนผิวเซลล์เมมเบรนแบคทีเรีย

การทำงานของระบบคอมพลีเมนต์ในสัตว์เลื้อยคลานด้วยนม มีการศึกษาจนทราบแน่ชัดถึงกระบวนการทำงาน คือ 1) กำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยตรงผ่านการทำงานของ membrane-attack complex (C5b9 complex) 2) กระตุ้นการสร้างสารองค์ประกอบของเคโมแทกติก 3) กระตุ้นให้มีการกำจัดเศษเซลล์ของสิ่งแปลกปลอมที่เกิดจากการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันภายในเซลล์ 4) กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแบบที่ต้องมีการกระตุ้นให้มีการทำงานได้ดีขึ้น (Gasque, 2004) แต่กระบวนการทำงานของระบบคอมพลีเมนต์ในสัตว์เลื้อยคลานยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด จากการศึกษาในสัตว์เลื้อยคลานพบว่ามียระบบคอมพลีเมนต์เพียง 2 ระบบ คือ classical pathway และ alternative pathway เท่านั้น ส่วนวิถี lectin pathway จะเกิดขึ้นในกลุ่มสัตว์น้ำ อาทิ ฉลาม ปลาไม่มีขากรรไกร สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก นก ฯลฯ ซึ่งสัตว์เหล่านี้มีสายวิวัฒนาการที่ใกล้เคียงกับสัตว์เลื้อยคลาน จึงมีความเป็นไปได้ว่ากลไกดังกล่าวนี้อาจเกิดในสัตว์เลื้อยคลานได้เช่นกัน แต่ยังไม่พบหลักฐานการศึกษาที่แน่ชัด (Sunyer et. al., 1998) นอกจากนี้ได้มีการศึกษาระบบคอมพลีเมนต์ของจระเข้ในซีรัมของอัลลิเกเตอร์เปรียบเทียบกับซีรัมของมนุษย์พบว่า ซีรัมของจระเข้มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายสิ่งแปลกปลอม เช่น แบคทีเรียได้ดี แต่ซีรัมของมนุษย์ไม่พบคุณสมบัติดังกล่าว ซึ่งแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าระบบคอมพลีเมนต์ของจระเข้มีประสิทธิภาพสูงต่อการทำลายเชื้อแบคทีเรีย นอกจากระบบคอมพลีเมนต์แล้ว กลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดต่างๆ ในระบบหมุนเวียนเลือดของสัตว์เลื้อยคลาน ได้แก่ กลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาว (leucocytes) เช่น โมโนไซต์ (monocytes) เฮเทอโรฟิล (heterophil) เบโซฟิล (basophils) และอีโอซิโนฟิล (eosinophils) และกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดแดง (erythrocytes) โดยเซลล์เม็ดเลือดเหล่านี้มีความสำคัญในการทำงานร่วมกันกับระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์เลื้อยคลาน เพื่อต่อต้านสิ่งแปลกปลอมหรือจุลชีพก่อโรคต่างๆ ซึ่งพบว่ากระบวนการตอบสนองที่เด่นชัด คือ กระบวนการที่เรียกว่า ฟาโกไซโตซิส (phagocytosis) และอุณหภูมิมีอิทธิพลอย่างมากต่อกระบวนการตอบสนองดังกล่าวในสัตว์เลื้อยคลาน นอกจากนี้เฮเทอโรฟิลของสัตว์เลื้อยคลาน นอกจากจะช่วยยับยั้งการเข้าบุกรุกจากเชื้อจุลชีพก่อโรคแล้ว ยังมีอิทธิพลต่อกระบวนการยับยั้งการอักเสบอีกด้วย (Montali, 1988) โดยสามารถแสดงลักษณะรูปร่างเซลล์เม็ดเลือดของสัตว์เลื้อยคลานดังรูปที่ 2.1 จะเห็นได้อย่างชัดเจนว่ากลุ่มเซลล์เม็ดเลือดโดยเฉพาะเม็ดเลือดแดงของสัตว์เลื้อยคลานยังคงมีนิวเคลียส และมีอายุประมาณ 600-800 วัน (Claver and Quaglia, 2009) ซึ่งต่างจากเซลล์เม็ดเลือดแดงของมนุษย์ที่มีอายุเพียง 120 วัน นอกจากนี้หลายงานวิจัย พบว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงซึ่งมีโปรตีนสำคัญคือ ฮีโมโกลบิน สามารถทำหน้าที่เป็นเปปไทด์ต้านจุลชีพได้อีกด้วย ข้อสังเกตนี้ชี้ให้เห็นอย่างชัดเจนว่าระบบหมุนเวียนเลือดของสัตว์เลื้อยคลานน่าจะมีศักยภาพสูงต่อกระบวนการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันทั้งการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบสปีดแต่กำเนิด และระบบภูมิคุ้มกันแบบที่ต้องมีการกระตุ้น

ในแง่ของการทำงานร่วมกันเป็นระบบเพื่อต่อต้านจุลชีพก่อโรค ส่งผลให้สัตว์เลื้อยคลานมีความสามารถในการปรับตัวเพื่อให้ชีวิตรอดได้ดีกว่าสัตว์มีกระดูกสันหลังอื่นๆ



รูปที่ 2.1 ภาพแสดงเซลล์เม็ดเลือดของสัตว์เลื้อยคลาน (ก) เซลล์เม็ดเลือดแดงจระเข้ (ข) เซลล์เม็ดเลือดแดงอีกัวนา (ค) เซลล์เม็ดเลือดแดงเต่า (ง) เซลล์ทอมโบไซต์ (จ) เฮเทอโรฟิลจระเข้ (ฉ) เฮเทอโรฟิลเต่า (ช) อีโอซิโนฟิลเต่า (ณ) แอโซโรฟิล (ญ) โมโนไซด์ (ฎ) ลิมโฟไซด์ (ด) เบโซฟิล

ที่มา: ดัดแปลงจาก Claver and Quaglia, 2009 อ้างโดย สมปอง คล้ายหนองสรวง, 2558

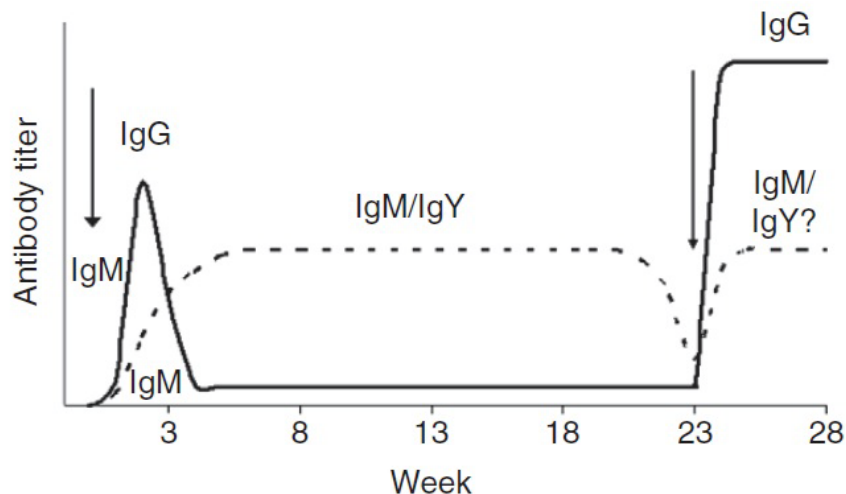
อย่างไรก็ตามการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันแบบสืบทอดแต่กำเนิด พบว่าในกลุ่มสัตว์มีกระดูกสันหลังมี Toll-like receptors (TLRs) เป็นส่วนสำคัญในการจดจำสิ่งแปลกปลอมที่บุกรุก เช่น จุลชีพต่างๆ โดย TLRs สามารถกระตุ้นการตอบสนองทั้งระบบภูมิคุ้มกันแบบสืบทอดแต่กำเนิด และระบบภูมิคุ้มกันแบบที่ต้องมีการกระตุ้น (Leulier and Lemaitre, 2008) TLRs ถูกจำแนกได้ 6 กลุ่ม ซึ่งแต่ละกลุ่มมีความสามารถในการจดจำลักษณะโมเลกุลหรือรูปแบบของสิ่งแปลกปลอมได้แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามแม้ว่า TLRs จะมีความสำคัญต่อกระบวนการตอบสนองภูมิคุ้มกันในระยะเริ่มต้น แต่ยังไม่มีความชัดเจนเกี่ยวกับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ TLRs ในสัตว์เลื้อยคลานใดๆ หน้าที่สำคัญอีกประการของระบบภูมิคุ้มกันแบบสืบทอดแต่กำเนิด คือการตอบสนองเมื่อได้รับบาดเจ็บหรือติดเชื้อผ่านกระบวนการอักเสบ ในสัตว์เลื้อยคลานเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยสิ่งแปลกปลอมจากภายนอก (extracellular pathogen) เซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันจะชักนำให้เกิดการสร้างเฮเทอโรฟิลิกแกรนูโลมา (heterophilic granuloma) โดยไปกระตุ้นให้เซลล์แมคโครฟาจตอบสนองได้ดีขึ้นในทางกลับกันเมื่อถูกกระตุ้นด้วยสิ่งแปลกปลอมจากภายใน (intracellular pathogen) เซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันจะชักนำให้เกิดการสร้างฮิสติโอซัยติกแกรนูโลมา (histiocytic granuloma) เพื่อเหนี่ยวนำให้เซลล์แมคโครฟาจรวมตัวกันกำจัดสิ่งแปลกปลอมในรูปแบบที่เรียกว่า การตายเฉพาส่วน (necrosis) กระบวนการดังกล่าวนี้มีความแตกต่างจากการตอบสนองต่อการอักเสบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งจะสร้างน้ำหนองเมื่อเกิดการอักเสบ จากนั้นจะมีการหลั่งสารไซโตไคน์ (cytokine) และเคโมไคน์ (chemokine) ตามมาภายหลัง อย่างไรก็ตามยังไม่พบกระบวนการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเกี่ยวกับสารเหล่านี้ในสัตว์เลื้อยคลาน (Zimmerman et. al., 2009)

2.1.2 ระบบภูมิคุ้มกันแบบที่ต้องมีการกระตุ้น (adaptive immunity) ของสัตว์เลื้อยคลานมีลักษณะการตอบสนองคล้ายคลึงกับสัตว์มีกระดูกสันหลังอื่นๆ คือ เป็นระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจง และมีการจดจำ

ลักษณะของสิ่งกระตุ้น ซึ่งเป็นระบบการทำงานต่อเนื่องจากระบบภูมิคุ้มกันแบบสปีทอแต่กำเนิดเมื่อร่างกายได้รับสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อจุลินทรีย์อีกครั้ง ร่างกายจะสามารถตอบสนองได้อย่างรวดเร็ว โดยการสร้างแอนติบอดีจาก B-cell ซึ่งจะกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองด้านเซลล์ (cell-mediated immunity) และการตอบสนองด้านสารน้ำ (humoral adaptive immunity) ดังนี้

1) ระบบภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ในสัตว์เลื้อยคลานมีความสัมพันธ์โดยตรงกับอุณหภูมิและฤดูกาลเป็นสำคัญ โดยจะมีความเกี่ยวข้องกับการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวกลุ่ม T-cell โดยพบว่าสัตว์เลื้อยคลานหลายชนิดมีการสร้าง T-cell ได้เช่นเดียวกับสัตว์ชั้นสูง ได้แก่ งู ลิซาร์ดเต่า และ ทัวทารา (Burnham et. al., 2005) หน้าที่สำคัญของ T-cell คือ เมื่อได้รับการกระตุ้นจากสิ่งแปลกปลอมหรือแอนติเจน จะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์เป็น 2 ชนิด คือ cytotoxic T-cell (TC) และ T-helper cell (TH) จากการศึกษาโดย Pitchappan และคณะ ในปี พ.ศ. 2520 (Pitchappan and Muthukkaruppan, 1997) พบว่าต่อมไธมัสในระบบภูมิคุ้มกันของ ลิซาร์ด (*Calotes versicolor*) มีการสร้างทั้ง cytotoxic-like T-cell และ T-helper cell อย่างไรก็ตาม ในสัตว์เลื้อยคลานไม่มีต่อมน้ำเหลือง ซึ่งเป็นบริเวณที่เกิดปฏิสัมพันธ์ของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน (immune cell interactions) เหมือนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจึงคาดว่า T-helper cell ในสัตว์เลื้อยคลานอาจมีบทบาทความสำคัญที่แตกต่างจาก T-helper cell ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยจะทำหน้าที่ร่วมกับ B-cell เพื่อยับยั้งการติดเชื้อปรสิตและเชื้อก่อโรคอื่น ๆ ซึ่งการเพิ่มจำนวนของ T-cell ในสัตว์เลื้อยคลานจะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับฤดูกาลที่เปลี่ยนแปลงไป จากรายงานการตอบสนองด้านเซลล์ในงู striped sand snake (*Psammophis sibilans*) โดย Farag และคณะ ในปี พ.ศ. 2528 (Farag and El Ridi, 1985) พบว่า มีการเพิ่มจำนวนของ T-cell ในช่วงฤดูใบไม้ผลิและฤดูใบไม้ร่วงมากกว่าฤดูกาลอื่น ๆ

2) ระบบภูมิคุ้มกันด้านสารน้ำ จะได้รับการกระตุ้นต่อเนื่องจากระบบภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ ซึ่งระบบภูมิคุ้มกันด้านสารน้ำมีความเกี่ยวข้องกับ B-cells มีหน้าที่ในการผลิตแอนติบอดี โดยทั่วไปแอนติบอดีของสัตว์เลื้อยคลานและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมประกอบด้วย แอนติบอดีสายสั้น (light chain) 2 ชนิด ได้แก่ λ และ κ (Das et. al., 2008) โดยแอนติบอดีในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะสร้างอิมโมโนโกลบูลิน ทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ IgM IgG IgA IgD และ IgE แต่ในสัตว์เลื้อยคลานจะสร้างเพียง 2 ชนิด คือ IgM และ IgY (Natarajan and Muthukkaruppan, 1985) จากการศึกษาพบว่า IgY ของสัตว์เลื้อยคลานเปรียบเสมือน IgG และ IgE ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Leslie and Clem, 1969) ซึ่ง IgY ของสัตว์เลื้อยคลานมีโครงสร้างแตกต่างจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม คือในโมเลกุลจะไม่มีบริเวณบานพับ (hinge region) บนแอนติบอดีสายยาว (heavy chain) ส่งผลให้ IgY ของสัตว์เลื้อยคลานมีความยืดหยุ่นน้อยกว่าสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ระบบการตอบสนองภูมิคุ้มกันด้านสารน้ำของสัตว์เลื้อยคลานมีความแตกต่างจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอย่างชัดเจน ดังแสดงในรูปที่ 2.2 โดย พบว่าการตอบสนองด้านสารน้ำของสัตว์เลื้อยคลานจะเกิดขึ้นช้ากว่าสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเมื่อได้รับการกระตุ้นจากแอนติเจน เนื่องจากจะมีการสร้าง IgM ในระยะแฝง (latent period) นานกว่าสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมก่อนที่จะมีการกระตุ้นให้เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันสร้าง IgY เพื่อตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมหรือแอนติเจนต่อไป



รูปที่ 2.2 การเปรียบเทียบการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันของสารน้ำระหว่างสัตว์เลื้อยคลาน (เส้นประ) และ สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (เส้นทึบ)

หมายเหตุ : เครื่องหมายลูกศรแสดงถึงระยะเวลาการสร้างภูมิคุ้มกัน

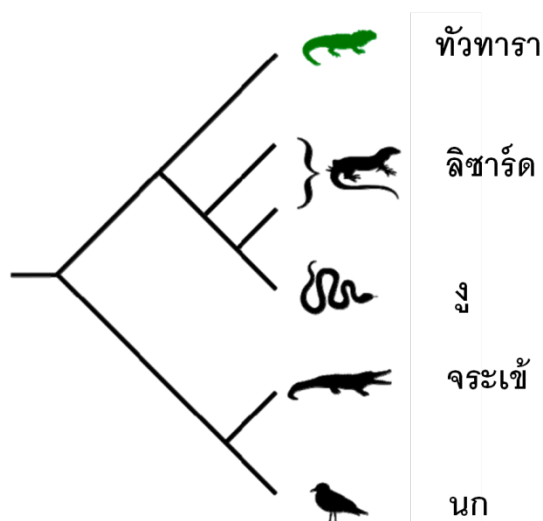
ที่มา: Zimmerman et al., 2009 อ้างโดย สมปอง คล้ายหนองสรวง, 2558

กระบวนการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบที่ต้องมีการกระตุ้นจะเกิดขึ้นเมื่อเซลล์ได้รับการกระตุ้นจากแอนติเจนผ่านการนำเสนอของ antigen presenting cell (APC) ซึ่งเซลล์กลุ่มนี้จะทำหน้าที่ในการนำเสนอแอนติเจนแบบจำเพาะให้กับ T-cell และ B-cell โดยอาศัยการทำงานของโปรตีนบริเวณของเซลล์ตอบสนอง ที่เรียกว่า major histocompatibility complex (MHC) ลักษณะทั่วไปของเซลล์ MHC จะเป็นบริเวณที่มีความหลากหลายขององค์ประกอบของเซลล์ (highly polymorphic components) โดยทั่วไปประกอบด้วยยีน 2 ชนิด คือ MHC class I และ MHC class II ซึ่งทำหน้าที่นำเสนอชิ้นส่วนแอนติเจน เช่น แบคทีเรีย ไวรัส เสนอแอนติเจนให้กับ T-cell ซึ่งมีบทบาทสำคัญอย่างมากในกระบวนการตอบสนองภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ในสัตว์มีกระดูกสันหลังทุกชนิด (Farag and El Ridi, 1985; Klein, 1986) ยีน MHC class I จะมีการแสดงออกได้ในทุกเซลล์ที่มีนิวเคลียส และจะนำเสนอแอนติเจนที่มาจากภายใน (endogenous pathogens) ให้กับ CD8+ บนผิว TC (Bjorkman and Parham, 1990) ส่วนยีน MHC class II จะนำเสนอแอนติเจนที่มาจากภายนอก (extracellular pathogens) ให้กับ CD4+ บนผิว TH (Kappes and Strominger, 1988) โดยทั่วไปพบว่า MHC ที่มีการศึกษากันมาก คือ MHC class I และ class II เนื่องจากมีบทบาทสำคัญโดยตรงกับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบที่ต้องมีการกระตุ้น และเกี่ยวข้องกับวิวัฒนาการของระบบนิเวศอีกด้วย (Piertney and Oliver, 2006; Alcaide et al., 2010) ซึ่งมีการศึกษาเกี่ยวกับยีน MHC อย่างกว้างขวางในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นก สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก และปลา แต่มีการศึกษาน้อยมากในสัตว์เลื้อยคลานโดยเฉพาะจระเข้

อย่างไรก็ตามจากรายงานของ Jaratlerdsiri และคณะ ในปี พ.ศ. 2557 (Jaratlerdsiri et al., 2014) ทำการศึกษาเกี่ยวกับวิวัฒนาการของ MHC class I ในจระเข้ 20 สายพันธุ์ โดยทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในโครงสร้างยีนของ exon 3, intron 3 และ exon 4 นอกจากนี้ยังพบว่า MHC Class I ของจระเข้มีความผันแปรของการแสดงออกของยีนเป็นอย่างมากในจระเข้สายพันธุ์ต่างๆ ที่อยู่ในวงศ์เดียวกันการแสดงออกของยีน MHC

class I พบว่ามี 3 กลุ่มในจระเข้ Crocodiliae โดยพบทั้ง 3 ยีนในวงศ์ crocodile แต่พบเพียง 1 ยีนในวงศ์ alligator ซึ่งการค้นพบนี้มีความสำคัญต่อการปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อต้านทานต่อการติดเชื้อจุลชีพก่อโรคต่างๆ จากการศึกษาข้างต้นชี้ให้เห็นว่า MHC class I มีบทบาทสำคัญอย่างมากต่อการตอบสนองในระบบภูมิคุ้มกันแบบที่ต้องมีการกระตุ้น ส่งผลให้การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของจระเข้มีความแข็งแรงอย่างมากในการต่อต้านจุลชีพต่างๆ ส่งผลให้จระเข้ซึ่งเป็นสัตว์เลื้อยคลานดึกดำบรรพ์เพียงชนิดเดียวที่ยังคงสายวิวัฒนาการยาวนานที่สุดจวบจนปัจจุบัน (Jaratlerdsiri et al., 2014)

สำหรับยีน MHC class II นั้นมีการศึกษากันมากในสัตว์เลื้อยคลานด้วยนม นก สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก และปลา แต่ยังไม่มีการศึกษาในกลุ่มจระเข้ (Kelley et al., 2005) อย่างไรก็ตามได้มีการศึกษาในสัตว์เลื้อยคลานกลุ่มทวารวรา (Sphenodontia) เพียงเท่านั้น (Kelley et al., 2005) และเมื่อพิจารณาในสายวิวัฒนาการชาติพันธุ์ (cladogram) พบว่าจระเข้มีความห่างไกลกับทวารวราในสายวิวัฒนาการค่อนข้างมาก (รูปที่ 2.3) จากข้อมูลนี้อาจเป็นไปได้ว่า MHC class I น่าจะมีบทบาทสำคัญมากกว่า MHC class II ต่อกระบวนการตอบสนองด้านเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันแบบที่ต้องมีการกระตุ้นของสัตว์เลื้อยคลานโดยเฉพาะจระเข้



รูปที่ 2.3 แผนภาพวิวัฒนาการชาติพันธุ์ (cladogram) ของสัตว์เลื้อยคลานและสัตว์ปีก

ที่มา: ดัดแปลงจาก Van Hoek et al., 2014 อ้างโดย สมปอง คล้ายหนองสรวง, 2558

2.2 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับจระเข้

จระเข้ เป็นสัตว์เลื้อยคลานขนาดใหญ่ในวงศ์ Crocodylidae ชอบอาศัยบริเวณปาริมน้ำ ผิวหนังแข็งเป็นเกล็ด (osteoderm) ปากยาวและปลายปากนูนสูงชันเป็นช่องเปิดของรูจมูก เรียกว่า ก้อนขี้หมา หางแบนยาวใช้โบกว่ายน้ำ เพราะชอบหากินในน้ำ ในประเทศไทยมี 3 ชนิด คือ จระเข้ปึง หรือ จระเข้น้ำจืด (*Crocodylus siamensis*) จระเข้อ้ายเคียม หรือ จระเข้น้ำเค็ม (*C. porosus*) และ จระเข้ปากกระทุงเหว หรือ ตะโขง (*Tomistoma schlegelii*) (รูปที่ 2.4)

หากจัดจำแนกสัตว์ในวงศ์จระเข้ (Crocodylidae) พบว่าสปีชีส์ของจระเข้ส่วนใหญ่ถูกจัดอยู่ในสกุล *Crocodylus* ส่วนอีกสกุลที่เหลือ *Osteolaemus* เป็นสกุลที่มีสปีชีส์เดียว (monotypic)

สกุล *Crocodylus* ประกอบด้วย

1. จระเข้อเมริกา (American Crocodile) *Crocodylus acutus*
2. จระเข้ปากแหลม (Slender-snouted Crocodile) *Crocodylus cataphractus*
3. จระเข้โอรีโนโก (Orinoco Crocodile) *Crocodylus intermedius*
4. จระเข้น้ำจืดออสเตรเลีย (Freshwater Crocodile) *Crocodylus johnstoni*
5. จระเข้ฟิลิปปินส์ (Philippines Crocodile) *Crocodylus mindorensis*
6. จระเข้โมเรเล็ต (Morelet's Crocodile) *Crocodylus moreletii*
7. จระเข้แม่น้ำไนล์ (Nile Crocodile) *Crocodylus niloticus*
8. จระเข้นิวกินี (New Guinea Crocodile) *Crocodylus novaeguineae*
9. จระเข้อินเดีย (Mugger Crocodile, Marsh Crocodile หรือ Persian Crocodile) *Crocodylus palustris*
10. จระเข้น้ำเค็ม (Saltwater Crocodile) *Crocodylus porosus*
11. จระเข้คิวบา (Cuban Crocodile) *Crocodylus rhombifer*
12. จระเข้น้ำจืด (Siamese Crocodile) *Crocodylus siamensis*

สกุล *Osteolaemus* ประกอบด้วย

1. จระเข้แคระ (Dwarf crocodile) *Osteolaemus tetraspis*



(ก)



(ข)



(ค)

รูปที่ 2.4 อันดับ Crocodilia (Crocodilians) (ก) จระเข้น้ำกร่อย (*Crocodylus porosus*) (ข) จระเข้น้ำจืด (*Crocodylus siamensis*) (ค) ตะโขง (*False gavia*)

ที่มา: ภาพสัตว์เลื้อยคลานโดย วริศรา ชื่นอารมย์ ศูนย์วิจัยโปรตีนและโปรตีโอมิกส์เพื่อการพาณิชย์ และอุตสาหกรรม (สมปอง คล้ายหนองสรวง, 2558)

จระเข้น้ำจืด หรือ จระเข้น้ำจืดสายพันธุ์ไทย หรือ จระเข้ปึง (อังกฤษ: Freshwater หรือ Siamese Crocodile; ชื่อวิทยาศาสตร์: *Crocodylus siamensis*) มีถิ่นกำเนิดในบริเวณ เวียดนาม กัมพูชา ลาว ไทย กะลิมันตัน ชวา และสุมาตรา มีขนาดปานกลาง ค่อนมาทางใหญ่ (3 - 4 เมตร) มีเกล็ดท้ายทอย มีช่วงวัยเจริญพันธุ์เมื่ออายุ 10 - 12 ปี จระเข้ชนิดนี้วางไข่ครั้งละ 20 - 48 ฟอง โดยมีระยะเวลาฟักไข่นาน 68 - 85 วัน เริ่มวางไข่ในช่วงต้นฤดูฝนประมาณเดือนพฤษภาคม โดยขุดหลุมในหาดทรายริมแม่น้ำ ใช้เวลาเฉลี่ยราว 80 วัน ขอบอยู่และหากินเดี่ยว

จระเข้น้ำจืด โดยปกติจะกินปลาและสัตว์อื่นที่เล็กกว่าเป็นอาหาร จะไม่ทำร้ายมนุษย์หากไม่ถูกรบกวน หรือมีอาหารเพียงพอ ในอดีตประเทศไทยเคยพบขุดหลุมในแหล่งน้ำทั่วทุกภาคของประเทศ โดยเฉพาะในแถบที่ราบลุ่มภาคกลาง เช่น ที่บึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์ ได้ชื่อว่าเป็นสถานที่จระเข้ชุม เคยมีรายงานว่าพบจระเข้ถึง 200 ตัว หรือในวรรณกรรมพื้นบ้านเรื่องต่างๆ เช่น ไกรทอง ของจังหวัดพิจิตร เป็นต้น แต่ปัจจุบันได้สูญหายไปจนหมดแล้ว สถานะในธรรมชาติเชื่อว่าหลงเหลืออยู่เพียงที่เดียวคือ ที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤๅไน จังหวัดฉะเชิงเทรา อุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี และอุทยานแห่งชาติปางสีดา จังหวัดสระแก้ว เท่านั้น แต่ในต่างประเทศยังคงพบอยู่ที่ทะเลสาบเขมร ซึ่งอยู่สถานะในอนุสัญญาของไซเตสได้ขึ้นบัญชีจระเข้น้ำจืดไว้ในบัญชีหมายเลข 1

2.2.1 การขยายพันธุ์จระเข้

การเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์จระเข้ก่อนอื่นต้องเริ่มต้นด้วยการเลี้ยงจระเข้ไว้เป็นพ่อแม่พันธุ์ก่อน จระเข้ตัวผู้และตัวเมียมีลักษณะภายนอกเหมือนกันมาก ผู้ไม่มีความชำนาญจะไม่สามารถแยกแยะได้โดยง่าย จระเข้เพศผู้และเพศเมีย สามารถดูได้จากลักษณะภายนอกเมื่ออายุ 3 ปีขึ้นไป ตัวผู้มีเกล็ดใหญ่ที่หลังและสูงกว่าตัวเมีย การตรวจเพศจระเข้ที่แน่ชัด อาศัยการล้วงดูช่องทวารหนักบริเวณโคนหางใต้ท้องช่วงกึ่งกลางตัว วิธีการจะต้องจับมัดตัวจระเข้แล้วจับหงายขึ้น ใช้นิ้วมือสอดเข้าไปทางทวาร ถ้าเป็นจระเข้ตัวผู้จะสัมผัสได้ขนาดเล็กเท่านั้นซี่ ถ้าเป็นจระเข้ตัวเมียภายในช่องนี้จะว่างเปล่า

2.2.1.1 จระเข้น้ำจืด ตัวผู้จะโตเต็มวัยที่จะผสมพันธุ์ได้เมื่ออายุ 10 ปีขึ้นไป และสามารถที่จะผสมพันธุ์ไปได้เรื่อยๆ โดยไม่จำกัดอายุ ส่วนจระเข้ตัวเมียจะโตเต็มวัยพร้อมที่จะผสมพันธุ์และวางไข่ได้เมื่ออายุ 10 ปีขึ้นไปเช่นกัน แต่เมื่ออายุได้ประมาณ 20 - 25 ปีแล้ว การวางไข่ก็จะเริ่มลดลง หรืออาจวางไข่เว้นปี

2.2.1.2 จระเข้น้ำเค็ม ตัวผู้พร้อมที่จะผสมพันธุ์ได้เมื่ออายุ 12 ปีขึ้นไป และมีช่วงเวลาผสมพันธุ์ได้นาน โดยไม่จำกัดอายุเช่นเดียวกันกับจระเข้น้ำจืด ส่วนตัวเมียจะโตเต็มวัยพร้อมที่จะผสมพันธุ์ได้ตั้งแต่ 12 - 15 ปีขึ้นไป แต่เมื่อมีอายุได้ประมาณ 25 ปี การวางไข่จะเริ่มลดน้อยลงเช่นกัน การผสมพันธุ์และการวางไข่

ฤดูผสมพันธุ์ของจระเข้อยู่ในช่วงระหว่างเดือนธันวาคมถึงมีนาคม ในช่วงแรกๆ พฤติกรรมการหากินและจับคู่กันจะยังมีไม่มากนัก แต่จะเริ่มมากขึ้นในเดือนมกราคมถึงกุมภาพันธ์และ มีนาคม หลังจากนั้นก็จะลด

น้อยลง จระเข้จะผสมพันธุ์กันใต้น้ำ ช่วงฤดูผสมพันธุ์จระเข้ตัวเมียจะมีนิสัยดุร้ายมาก จระเข้ตัวเมียจะวางไข่ หลังจากที่ได้รับการผสมพันธุ์ประมาณเดือนครึ่ง โดยจะวางไข่ประมาณเดือนมีนาคมถึงมิถุนายนของทุกปี ช่วงนี้ หากสังเกตจะเห็นแม่จระเข้ท้องโตขึ้นและกินอาหารน้อยลง ก่อนถึงกำหนดการวางไข่ประมาณ 3 - 7 วันแม่จระเข้ จะเริ่มหาที่สำหรับวางไข่เมื่อหาได้แล้ว จะใช้หางกวาดใบไม้ ใบหญ้า และฟางมากองสูงไว้สูงประมาณ 80 เซนติเมตร กว้างประมาณ 1 เมตร จากนั้นก็จะขึ้นไปนอนทับบนกองหญ้าจนแน่น หรือถ้าไม่มีหญ้า แต่เป็นพื้นดิน จระเข้ก็จะใช้ขาหลังขุดหลุมไข่ซึ่งจะใช้เวลาในการขุดประมาณ 1 - 3 ชั่วโมงแล้วแต่ดินที่ขุดจะแข็งหรือร่วน หาก ดินแข็งเกินไปแม่จระเข้จะถ่ายของเหลวออกมาทำให้ดินอ่อนนุ่มลง เพื่อให้ขุดง่ายขึ้น เมื่อขุดเสร็จแล้วจะกลบหลุม นั้น ลักษณะการกลบจะให้ดินบนปากหลุมพูนขึ้นมากประมาณ 30 - 50 เซนติเมตร บางตัวอาจนอนเฝ้าหลุมไข่ หรือไม่เฝ้าก็ได้ เมื่อถึงเวลาไข่จริง ซึ่งมักจะเป็นเวลาในตอนกลางคืนหรือตอนเช้าตรู่ แม่จระเข้จะขุดหลุมเดิมที่ เติร์มไว้ โดยใช้เท้าหลังขุดลึกประมาณ 30 เซนติเมตร กว้างประมาณ 40 เซนติเมตร แล้วทำการวางไข่โดยแม่ จระเข้จะยึนคร่อมปากหลุมด้วยขาหลังทั้ง 2 ข้าง มีหางช่วยพยุงลำตัวไว้ และเริ่มแบ่งไข่ออกมาที่ละใบ แม่จระเข้จะ พยายามเอาขาหลังทั้ง 2 ข้างรับไข่และปล่อยให้ตกลงสู่ก้นหลุม ระยะเวลาในการไข่ประมาณ 20 - 30 นาที บางตัว อาจเป็นชั่วโมง แล้วแต่จำนวนไข่มากหรือน้อย จำนวนไข่ต่อครอกประมาณ 30 - 50 ฟอง ไข่แต่ละฟองจะมีเมือก โสคล้ายวุ้นหุ้มอยู่หนาประมาณ 1 เซนติเมตร ทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้เปลือกไข่กระแทกกันจนแตกเวลาหล่นลงก้น หลุม เมื่อไข่เสร็จแล้วแม่จระเข้จะเริ่มทำการกลบหลุมไข่ โดยใช้ขาหลังทั้งสองข้างโกยดินบนปากหลุมขึ้นมากลบ และกวาดเอาใบไม้แห้งรอบๆ มาเสริมด้วย กลบเสร็จแม่จระเข้จะเดินวนเป็นวงกลมรอบหลุมไข่เพื่อดูว่ากลบไข่ เรียบร้อยหรือไม่ หากไม่เรียบร้อยก็จะทำการกลบหลุมไข่เพิ่มเติมอีกเช่นนี้จนเรียบร้อย หากหลุมไข่ที่แม่จระเข้ เติร์มไว้ล่วงหน้าถูกคนรบกวน แม่จระเข้บางตัวก็อาจวางไข่ในหลุมนั้น แต่บางตัวอาจย้ายที่วางไข่ โดยขุดหลุมใหม่ แล้วกลบให้ปากหลุมเรียบเท่าพื้นดิน ส่วนหลุมเดิมก็กลบแบบพูนเพื่อหลอกอำพรางการรบกวนไข่ แม่จระเข้จะมี น้ำตาไหลออกมาให้เห็นเป็นสายขณะแบ่งไข่ เมื่อไข่เสร็จก็ยังคงมีคราบน้ำตาตกค้างอยู่ที่แอ่งใต้ตาสังเกตเห็นได้ชัด ทำให้เป็นการพิจารณาได้ชัดเจนว่าแม่จระเข้วางไข่แล้ว และท้องก็จะยุบลงไม่ตึงเหมือนขณะใกล้วางไข่ แม่จระเข้ จะหวงไข่และนอนเฝ้าไข่ของตัวเองตลอดเวลา อาจลงน้ำหรือหาอาหารบ้างแต่น้อยครั้ง และมักวนเวียนใกล้ไข่ไม่ ยอมห่าง

ในระยะนี้จระเข้จะดุร้ายขึ้นเพราะสัญชาตญาณหวงไข่ เมื่อมีสัตว์อื่นหรือคนเข้ามาใกล้ไข่ แม่ จระเข้ก็จะรีบมาปกป้องไข่ของตนเองทันทีและพร้อมที่จะกัดทำร้าย แม้ว่าจะมีการย้ายไข่จระเข้ออกมาฟักวิธีอื่นๆ หรือมีสัตว์ต่างๆ มาขโมยไข่ โดยรู้จริงไข่ที่จระเข้ทำไว้ แม่จระเข้ก็จะแต่งรังให้เหมือนเดิมแล้วนอนเฝ้าไข่ต่อ โดยคิด ว่ายังมีไข่อยู่ในรังและจะนอนเฝ้าอยู่อีกนานประมาณ 70 - 90 วัน เท่ากับระยะฟักไข่แล้วจึงเลิกเฝ้า แต่ถ้ามีการ ปล่อยให้ไข่ฟักออกตามธรรมชาติ เมื่อไข่จะฟักออกเป็นตัว ลูกจระเข้จะส่งเสียงร้องตั้งแต่อยู่ในไข่ แม่จระเข้เมื่อได้ ยินเสียงร้อง ก็จะเข้าช่วยลูกขึ้นมาจากหลุม โดยใช้ขาหน้าและปากขุดคุ้ยดินขึ้นมา ลูกจระเข้บางตัวจะเจาะเปลือก ไข่ออกมาเอง แต่บางตัวอาจเจาะเปลือกไข่ออกมาไม่ได้ แม่จระเข้ก็จะคาบไข่และกะเทาะเปลือกให้แตกออก เพื่อให้ลูกจระเข้ออกมาจากไข่ได้ จากนั้นก็จะคาบลูกจระเข้ลงน้ำและคอยปกป้องลูกจระเข้ที่ยังเล็กอยู่ตลอดเวลา

2.2.2 การใช้ประโยชน์จากจระเข้

โดยทั่วไปคนส่วนใหญ่จะเข้าใจกันว่า การใช้ประโยชน์จากจระเข้จะมีเฉพาะหนังเท่านั้น แต่จากการศึกษาวิจัย โดยเฉพาะที่ทำกันในประเทศจีน มีรายงานว่า ผลิตภัณฑ์จากจระเข้หลายอย่างด้วยกันที่มีประโยชน์ในทางการแพทย์ เช่น

2.2.2.1 หนัง ราคาซื้อขายหนังจระเข้จะแตกต่างกันออกไปตามชนิดของหนัง โดยหนังแผ่นท้องจะแพงกว่าหนังแผ่นหลัง เพราะหนังแผ่นท้องนำมาใช้สะดวกกว่าเนื่องจากหนังแผ่นหลังต้องถากให้ได้ความหนาตามกำหนดเสียก่อน ซึ่งก็นับว่ายากอยู่พอสมควร และหนังส่วนนี้มีสีสันทสวยงามสู้ส่วนท้องไม่ได้ อย่างไรก็ตาม ความแตกต่างเรื่องสีสันทของหนังจระเข้ก็ไม่ได้เป็นการแสดงว่าเป็นหนังที่ด้อยคุณภาพแต่ประการใด

2.2.2.2 เนื้อ สามารถขายได้ในรูปเนื้อสดและเนื้อแห้ง ซึ่งเป็นที่นิยมของชาวเอเชีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งชาวจีน เนื่องจากถือว่ามีความสมบูรณ์ในการเป็นยารักษาโรคได้ ตลาดในไทยนั้นนิยมเนื้อสดเพื่อใช้ปรุงอาหาร เช่น ผัด ต้ม ทอด เนื่องจากรสชาติดีมาก คล้ายกับหมูปนไก่ อีกทั้งยังมีไขมันต่ำอีกด้วย ชาวจีนใช้เนื้อจระเข้เป็นส่วนประกอบเข้ากับตัวยาสุนัขไพรเพื่อใช้รักษาโรคหอบหืด ดังนั้นมูลค่าเนื้อแดงจึงเกือบจะเท่าหนัง ปัจจุบันมีการทำเป็นเนื้อกระป๋องในรูปเนื้อจระเข้ตุ๋น และเนื้อจระเข้รสต่าง ๆ อีกด้วย

2.2.2.3 กระดุกและฟัน ใช้เป็นส่วนผสมของยากวาดคอเด็กอ่อนและยังทำเป็นเครื่องประดับได้อีกด้วย

2.2.2.4 อุ้งมืออุ้งเท้าของจระเข้ เมื่อถลกหนังออกแล้วนำมาทำเป็นพวงกุญแจได้อย่างสวยงาม หรือนำมาทำเป็นที่เกาหลังก็ได้

2.2.2.5 ไขมัน ในต่างประเทศมีการนำไขมันจระเข้ไปใช้ในหลายรูปแบบ เช่น จีนและสิงคโปร์ นิยมนำไปใช้เป็นน้ำมันทาผิวหนังสำหรับรอยฟกช้ำ น้ำร้อนลวก ไฟลวก ใช้ทำยารักษาโรคผิวหนังและแผลสด ที่ออสเตรเลียใช้น้ำมันจระเข้เข้าไปใช้เป็นส่วนผสมหลักของน้ำมันและครีมบำรุงผิวกันแดด ฯลฯ ซึ่งเป็นที่นิยมมาก

2.2.2.6 เครื่องใน เดิมทีเครื่องในจระเข้มันถูกทอดทิ้ง โดยใช้เป็นอาหารแก่จระเข้หมูนเวียนกลับลงไปอีก แต่ปัจจุบันสามารถนำมาขายได้ทั้งชุด (หัวใจ ปอด ตับ ม้าม ไต ดี ลำไส้ ฯลฯ) เนื่องจากมีผู้นำไปใช้เป็นยาแผนโบราณและยาจีน ตลอดจนกระดุกและเลือดก็เช่นเดียวกัน

2.2.2.7 ลูกจระเข้ตัวเล็กๆ ที่ตาย ก็ยังสามารถนำมาสด้าฟขายเป็นเครื่องประดับบ้านที่มีราคาสูงและเป็นที่นิยมมาก

จระเข้แม่น้ำจืดพันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*) เป็นสัตว์เศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่ประชาชนทั้งภายในประเทศและต่างประเทศนำมาบริโภคเป็นอาหารเสริมและบำรุงร่างกาย นำมาใช้ในการแพทย์แผนโบราณ โดยเฉพาะในจีน ฮองกง และไต้หวัน นิยมบริโภคเลือดจระเข้เพื่อบรรเทาอาการหอบหืด บำรุงร่างกาย และช่วยเสริมสร้างภูมิคุ้มกันให้แก่ร่างกาย

2.2.3 การศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของเลือดจระเข้

จระเข้เริ่มปรากฏบนโลกประมาณ 200 ร้อยล้านปีในยุคเดียวกับไดโนเสาร์ มีนิสัยดุร้ายและมีการต่อสู้เพื่อปกป้องอาณาเขตและในการล่าอาหาร ทั้งต่อสู้ภายในสายพันธุ์จระเข้ด้วยกันหรือกับสัตว์อื่น ซึ่งก่อให้เกิดบาดแผลจากการต่อสู้แต่ไม่พบรายงานเกี่ยวกับการอักเสบหรือการติดเชื้อในบาดแผลของจระเข้เลยถึงแม้ว่าแหล่งที่อยู่ของจระเข้นั้นจะเป็นปาริมน้ำหรือพื้นที่ชุ่มน้ำที่เหมาะสมแก่การเจริญของจุลชีพและเชื้ออานวยต่อการติดเชื้อก็ตาม ทำให้นักวิจัยให้ความสนใจต่อระบบภูมิคุ้มกันของจระเข้โดยคาดว่าจระเข้น่าจะมีระบบภูมิคุ้มกันที่มีประสิทธิภาพสูงจึงสามารถดำรงชีวิตและสามารถแพร่สายพันธุ์ต่อเนื่องมาตั้งแต่ยุคโบราณจนถึงปัจจุบัน รวมทั้ง

สามารถป้องกันการติดเชื้อของบาดแผลที่เกิดจากการต่อสู้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Merchant et al., 2006b) สำหรับประเทศไทยจะเข้เป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญอย่างหนึ่งของประเทศ ถึงแม้ว่าจะยังไม่ได้อยู่ในอันดับต้นๆ ของสัตว์เศรษฐกิจส่งออกอย่างเช่น กุ้งกุลาดำหรือสัตว์น้ำอื่นๆ แต่ก็สามารถสร้างรายได้ให้กับประเทศไทยได้ไม่น้อย ในปัจจุบันประเทศไทยถือว่าค่อนข้างประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงจะเข้ในเชิงปริมาณและคุณภาพ อย่างไรก็ตาม ในตลาดอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงจะเข้การส่งออกหนึ่งและเนื้อจะเข้ถือได้ว่าเป็นการแปรรูปหลักแต่ส่วนอื่นโดยเฉพาะในเลือดหรือส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำเลือดของจะเข้ซึ่งถือว่าเป็นผลผลิตที่มาจากการแปรรูปอีกอย่างหนึ่งที่มีมากเกินพอแต่ยังมีการนำไปใช้ประโยชน์น้อยมาก แต่อย่างไรก็ตามได้พบรายงานการนำเลือดจะเข้ไปใช้โดยแพทย์แผนโบราณจำนวนหนึ่ง โดยพบการนำซีรัมจากเลือดจะเข้ไปใช้เป็นยาสมุนไพรในการรักษาโรคต่างๆ และมีข้อมูลจากการศึกษาในซีรัมของจะเข้สายพันธุ์ออสตรเลียพบที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ 17 ชนิด ให้ผลดีกว่าเมื่อเทียบกับซีรัมของมนุษย์ซึ่งยับยั้งได้เพียง 6 ชนิด จากการศึกษาของ Merchant et al (2003) พบว่า ซีรัมจะเข้สายพันธุ์อเมริกา (*Alligator mississippiensis*) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* ได้ดีกว่าซีรัมของมนุษย์ ในอัตราส่วนซีรัมจะเข้:ซีรัมมนุษย์เป็น 100% : 35% ตามลำดับ

จากการศึกษาในปัจจุบันนั้นพบว่ามีงานศึกษาน้อยมากที่มีจุดมุ่งหมายเกี่ยวกับการศึกษาทางด้านภูมิคุ้มกัน (immunology) โดยมีการใช้สัตว์เลื้อยคลานเป็นแบบจำลอง แต่อย่างไรก็ตามพบว่ากลุ่มสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังนั้นมีข้อมูลที่มีความสำคัญต่อวิวัฒนาการทางกลไกทั้งการปรับตัว (adaptive) และระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immune system) ที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง โดยจากการศึกษาของ (Brown et al., 2001; Cuchens and Clem, 1979) พบว่าจะเข้สายพันธุ์ alligators มีบทบาทสำคัญในระบบ adaptive immunity โดยพบโปรตีนที่มีความน่าสนใจคือโปรตีน transgelin-2 ที่จะถูกเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกใน alligator leukocytes โดยโปรตีนนี้จะมีการแสดงออกอย่างต่อเนื่องในเซลล์ human peritoneal B1 และทำหน้าที่ในการกระตุ้นการแสดงออกของ B2 cells (Frances et al., 2006) จากการศึกษาของ Nagase et al (1995) แสดงให้เห็นว่าโปรตีน transgelin-2 นี้มีบทบาทหน้าที่ที่สำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันเป็นอย่างยิ่ง นอกจากนี้การศึกษาของ Merchant และคณะยังชี้ให้เห็นว่าซีรัมจาก American alligator มีคุณสมบัติด้านการเจริญของแบคทีเรีย (antibacterial) (Merchant et al., 2003) ด้านการเจริญของอะมีบา (amoebacidal) (Merchant et al., 2004) และด้านการเจริญของไวรัส (antiviral) (Merchant et al., 2005) โดยการศึกษาของ Merchant และคณะในปี 2005 นี้จะพบว่า Complement protein C3 นั้นมีบทบาทหน้าที่ที่สำคัญใน serum complement activation ทั้งระบบ classical และ alternative pathways โดย surface antigenic character ของ human และ alligator proteins มีความคล้ายคลึงกันเป็นอย่างมาก ส่งผลให้การพบ C3 protein ทั้งในมนุษย์และจะเข้ นี้มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งต่อระบบภูมิคุ้มกัน (immunological) ในกระบวนการปกป้องตัวเองของเซลล์ นอกจากนี้ระบบ serum complement ยังจัดว่าเป็นระบบที่มีความสำคัญต่อ humoral immune response อีกด้วย โดยที่จะประกอบไปด้วยโปรตีน 25-30 ชนิดที่สามารถกระตุ้นการตอบสนองต่อการอักเสบ, การกระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดขาวมารวมกลุ่มกันที่บริเวณที่เกิดการอักเสบและเข้าทำลายเชื้อจุลินทรีย์โดยการรวมกันของ multiprotein membrane (Muller-Eberhard 1986) และนอกจากที่กล่าวมาข้างต้นนี้ยังมีหลักฐานที่บ่งชี้ว่า จะเข้มีความสามารถในการป้องกันตัวเองต่อโรคมามากมายหลายชนิดที่ส่งผลเสียต่อสุขภาพของมนุษย์ (Brown et al., 2001; Debyser and Zwart 1991) ได้อีกด้วย อีกทั้งยังมีการรายงานเกี่ยวกับสารสกัดเม็ดเลือดขาวจาก

จะเข้าใจว่า alligator ว่ามีคุณสมบัติ antimicrobial activity ที่หลากหลายต่อ pathogens ที่สำคัญในมนุษย์ ยกตัวอย่างเช่น *C. albicans*, *S. faecalis* และ *E. coli* (Merchant et al., 2006a) และจากการศึกษาในปี 2007 และ 2008 พบว่าจระเข้สายพันธุ์ alligators มีบทบาทที่สำคัญต่อ innate immune เป็นอย่างมาก และในปี 2009 พบว่า ubiquitin-activating enzyme E1 มีการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้นหลังจากถูกเหนี่ยวนำด้วย Lipopolysaccharide (LPS) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันโดยกระบวนการ ubiquitination-deubiquitination ซึ่งมีบทบาทหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับ ubiquitin-activating enzyme E1 โดยผ่าน NF-KB signaling cascade ซึ่งเป็น mediator ที่สำคัญต่อกระบวนการเกิดการอักเสบอีกด้วย (Sun and Ley 2008)

นอกจากนี้จากการศึกษาการนำเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*) มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยนักวิจัยของศูนย์วิจัยโปรตีนและโปรตีโอมิกส์เพื่อการพาณิชย์และอุตสาหกรรม (ศปพ.) ยังพบว่าทั้งสารสกัดเม็ดเลือดขาว ฮีโมโกลบิน พลาสมา และซีรัม นั้นมีความสามารถทั้งการต้านเชื้อแบคทีเรีย รวมทั้งต้านอนุมูลได้เช่นกัน (Anunthawan et al., 2013; Jandaruang et al., 2012; Kommanee et al., 2012; Preecharram et al., 2008; Preecharram et al., 2010; Srihongthong et al., 2012; Theansungnoen et al., 2014; Yaraksa et al., 2014) โดยในปี 2546 สุทธิเดช ปรีชารัมย์ และคณะ ได้ศึกษาการแยกบริสุทธิ์ antimicrobial agent จากซีรัมและพลาสมาของจระเข้โดยสามารถแยกบริสุทธิ์ สารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้ 6 ชนิด โดยใช้เทคนิค anion exchanger FPLC และเทคนิค RP-HPLC และในปี 2549 สุวิทย์ รักมณี และคณะ ทำการศึกษาคุณสมบัติในการเป็น antimicrobial และ antifungal activity จากเม็ดเลือดขาวของจระเข้สายพันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*) โดยเทคนิค Lysoplate assay และทำการแยกบริสุทธิ์ antimicrobial peptide จากเม็ดเลือดขาวของจระเข้โดยเทคนิค FPLC พบว่าสามารถแยกโปรตีนหรือเปปไทด์ได้ 4 พิก คือ P1 P2 P3 และ P4 พบว่าสามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแกรมลบ แกรมบวก และเชื้อราได้ ต่อมาในปี 2552 สุภาวดี ปาพา และคณะ ได้ทำการศึกษาต่อเนื่องจากงานวิจัยที่ผ่านมาในส่วนของสารสกัดเม็ดเลือดขาว โดยนำ fraction P1 มาทำการแยกบริสุทธิ์ต่อโดยใช้ RP-HPLC พบว่าสามารถแยกบริสุทธิ์ Leucocin I – IV ที่มีคุณสมบัติในการทำลายเชื้อแบคทีเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อตรวจสอบการเข้าทำลายเซลล์แบคทีเรียของ Leucocin I และ II ด้วยกล้อง SEM ทำให้ทราบกลไกการทำลายเชื้อเบื้องต้นว่า สารนี้ทำให้เมมเบรนของเซลล์แบคทีเรียเกิดการแตกเสียหายและส่งผลให้เซลล์แบคทีเรียตายในที่สุด แต่ยังไม่มีการยืนยันผลของกลไกการทำลายเชื้อ และเมื่อนำสารสกัดเม็ดเลือดขาวไปตรวจสอบคุณสมบัติโดยการทำ heat treatment, ย่อยด้วยเอนไซม์ pronase และผลของ EDTA ต่อฤทธิ์การทำลายเชื้อ พบว่าสารที่มีฤทธิ์ทำลายเชื้อแบคทีเรียในสารสกัดเม็ดเลือดขาวมีความสามารถทนต่อความร้อน แต่ไม่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ pronase ซึ่งสารนี้น่าจะมีโปรตีนหรือเปปไทด์เป็นองค์ประกอบ ส่วน EDTA ไม่มีผลต่อฤทธิ์การทำลายเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดเม็ดเลือดขาว ผลการวิจัยดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า สารที่มีฤทธิ์ทำลายเชื้อในสารสกัดเม็ดเลือดขาวไม่ต้องการ divalent metal ions ในการทำงาน สำหรับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดย สันติ โพธิ์ศรี และคณะ นั้นพบว่าเมื่อทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค nitric oxide radical inhibition ฮีโมโกลบินจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด (40.58%) เมื่อทำการตรวจวัดด้วยเทคนิค linoleic peroxidation inhibition พบว่าสารสกัดเม็ดเลือดขาวมีฤทธิ์ในการต้านสูงสุด คือ 78% และเมื่อทำการตรวจวัดด้วยเทคนิค hydroxyl radical inhibition พบว่าพลาสมา มีฤทธิ์ในการต้านสูงสุดคือ 57.27 %

สำหรับการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันของจระเข้ด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ (proteomics) นั้น พบว่ายังมีข้อมูลน้อย และเป็นการศึกษาเฉพาะในสารสกัดเม็ดเลือดขาวจากเลือดจระเข้ที่อยู่ในสภาวะปกติเท่านั้น โดยในปี

2010 Darville et al ได้มีการศึกษาและวิเคราะห์โปรตีนโอมิคส์ของเซลล์เม็ดเลือดขาวจาก American alligator (*Alligator mississippiensis*) พบว่าโปรตีนที่มีการวิเคราะห์นั้นจะถูกจัดแบ่งตามคุณสมบัติของโปรตีน โดยกลุ่มของโปรตีนที่พบมากที่สุดคือกลุ่ม cytoskeletal ระบบ immune และอื่นๆ ตามลำดับ โดยกลุ่มของโปรตีนที่พบมีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันนั้นคือ fibrinonectin, histone H4, Ig kappa chain V-1 region, Ig lambda chain V-III region, lysozyme C (Cell-derived leukocyte ที่มีบทบาทที่สำคัญในระบบ immune เพื่อต่อต้าน infectious diseases และ foreign material), acyl-CoA binding protein, myeloid protein, cathepsin C, complement component c3, ubiquitin และ polyubiquitin เป็นต้น

2.3 ความรู้เกี่ยวกับการอักเสบ

กระบวนการอักเสบเป็นปฏิกิริยาของเซลล์เนื้อเยื่อ (tissue) ของร่างกายที่ตอบสนองต่อสิ่งรบกวน ซึ่งมีผลกระทบต่อการทำงานของอวัยวะในร่างกาย การเกิดปฏิกิริยาจะมีมากหรือน้อย จะเกิดขึ้นเร็วหรือช้าขึ้นอยู่กับชนิดและความรุนแรงของสิ่งที่มารบกวน และความต้านทานรวมทั้งความทนต่อภาวะผิดปกติของแต่ละบุคคลด้วย เนื่องจากกระบวนการอักเสบเป็นกระบวนการที่ซับซ้อน ซึ่งเป็นผลจากการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันปกติของร่างกาย จะเกิดขึ้นเมื่อเนื้อเยื่อถูกกระทบกระเทือนมีบาดแผลหรือบาดเจ็บโดยกระบวนการนี้จะอาศัยทั้ง humoral และ cellular immunity เพื่อไปทำลายสิ่งแปลกปลอมหรือสารที่ก่อให้เกิดการอักเสบ และช่วยซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่เสียหายให้กลับสู่สภาพเดิม อาการของการอักเสบส่วนใหญ่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี และจากความพยายามของร่างกายที่จะปรับสภาพให้คืนสู่สภาพเดิม ซึ่งผลที่ได้อาจทำให้หายจากการอักเสบหรือการอักเสบนั้นทวีความรุนแรงมากขึ้น (พิมพ์พรณ เกิดอุดม, 2520) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่หลอดเลือดเล็กๆ ส่งผลให้สารภายในหลอดเลือดรั่วสู่ช่องว่างระหว่างเซลล์ ดังนั้น เม็ดเลือดขาวจึงเคลื่อนเข้าสู่บริเวณอักเสบมีผลให้ไลโซโซมแตกออกและปลดปล่อยเอนไซม์หลายชนิดออกมาเพื่อทำลายสิ่งแปลกปลอมและเซลล์ใกล้เคียง อาการที่ปรากฏคือ บวม แดง และร้อน สาเหตุของอาการดังกล่าวเกิดเนื่องมาจาก inflammatory mediator และ proinflammatory cytokine เช่น nitric oxide (NO) ที่ถูกปลดปล่อยออกมาระดับบริเวณปลายประสาททำให้รู้สึกปวด มีการเพิ่มความสามารถในการซึมผ่านของผนังหลอดเลือดทำให้เกิดอาการบวม และเกิดการเปลี่ยนแปลงการไหลเวียนของเลือดในหลอดเลือดฝอยทำให้บริเวณที่เกิดการอักเสบมีลักษณะแดงและร้อน (Zeilhofer et al., 2007)

Nitric oxide (NO) เป็นสารที่ถูกสร้างขึ้นมากในกระบวนการอักเสบ โดยมีผลให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือด เพิ่มความสามารถในการซึมผ่านของผนังหลอดเลือด ทำให้เกิดอาการบวมในบริเวณอักเสบ (Abramson et al., 2001) โดย NO จะทำปฏิกิริยากับสาร superoxide anion เกิดเป็นสาร peroxynitrite ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระที่มีความว่องไวต่อปฏิกิริยาสูงมากสามารถทำปฏิกิริยากับเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์บริเวณที่มีการอักเสบ การสังเคราะห์ NO จำเป็นต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS) ปัจจุบันพบว่า NOS ที่พบในร่างกายมี 3 รูป (isozyme) ได้แก่ neuronal NOS (nNOS) endothelial NOS (eNOS) และ inducible NOS (iNOS) ซึ่ง nNOS และ eNOS เป็นเอนไซม์ที่พบได้โดยทั่วไปในสภาวะปกติ (constitutive enzyme) ในทางตรงกันข้าม iNOS เป็นเอนไซม์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้สร้างขึ้นในปริมาณมาก เมื่อเกิดกระบวนการอักเสบ ซึ่ง iNOS จะถูกเหนี่ยวนำให้การทำงานได้โดยสารเคมีบางชนิดเช่น lipopolysaccharide (LPS) interferon- γ และ proinflammatory cytokines (MacMicking et al., 1997)

Prostaglandin (PGs) จัดเป็นสารจำพวก eicosanoids ที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงของ arachidonic acid (AA) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งที่สำคัญของ phospholipids ในเยื่อหุ้มเซลล์ เมื่อมีสิ่งกระตุ้นจากภายนอกเข้ามาจะทำให้ AA หลั่งออกมามาก แล้วมีเอนไซม์ cyclooxygenase (COX) เข้ามาเปลี่ยนแปลงสารนี้ จึงเกิดอาการอักเสบ ในกระบวนการสร้างสาร PGs นั้นจำเป็นต้องอาศัยเอนไซม์ cyclooxygenase ในการเปลี่ยนแปลงเพื่อให้ได้ PGs ในรูปแบบต่างๆ ได้แก่ prostaglandin G_2 (PGG_2) prostaglandin H_2 (PGH_2) prostaglandin I_2 (PGI_2) prostaglandin E_2 (PGE_2) และ thromboxane A_2 (TXA_2) ซึ่งสาร PGE_2 จัดว่าเป็น inflammatory mediator ที่มีความสำคัญในกระบวนการอักเสบ ในปัจจุบันพบว่า COX เป็น isozymes ที่มี 2 รูป ซึ่งถูกควบคุมด้วยยีนที่แตกต่างกัน ได้แก่ cyclooxygenase-1 (COX-1) และ cyclooxygenase-2 (COX-2) เอนไซม์ COX-1 เป็น constitutive enzyme ทำหน้าที่ควบคุมการสร้าง PGs ซึ่งมีบทบาทในการทำงานของระบบต่างๆ ในร่างกาย เช่น ทางเดินอาหาร ไต และเกร็ดเลือด จึงมักพบ COX-1 ได้ทั่วไปในร่างกาย การยับยั้งการทำงานของ COX-1 โดยยาระงับปวดและ nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) ทำให้เกิดผลไม่พึงประสงค์ของยา เช่น แผลในทางเดินอาหาร ภาวะเลือดออกในทางเดินอาหาร ส่วนเอนไซม์ COX-2 จะถูกสร้างขึ้นเฉพาะเมื่อเกิดกระบวนการอักเสบ สามารถตรวจพบการสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ได้ใน macrophages, endothelial cells และ fibroblast เป็นต้น ปัจจุบันได้มีการพัฒนายาที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ COX-2 (selective COX-2 inhibitors) ซึ่งมีผลยับยั้งการอักเสบแบบจำเพาะเจาะจง โดยมีผลอันไม่พึงประสงค์น้อยกว่ายาที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX แบบไม่จำเพาะเจาะจง

รายงานการวิจัยหลายชิ้นได้แสดงถึงการเหนี่ยวนำการทำงานของ iNOS (Kujubu et al., 1991; Lowenstein et al., 1993) ในกระบวนการอักเสบ โดยพบว่า NO จะถูกสร้างขึ้นในปริมาณสูงมากในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบจากสาร LPS ซึ่งกระบวนการอักเสบที่เกิดขึ้นมีผลให้การทำงานของเอนไซม์ iNOS เพิ่มขึ้น ตามลำดับ จากการศึกษาในระดับโมเลกุลพบว่า การควบคุมการทำงานของยีน iNOS ถูกควบคุมผ่านกระบวนการถอดรหัส (transcription) โดยอาศัยการทำงานของ nuclear factor- κ B (NF- κ B) (Baeuerle et al., 1991) ข้อมูลการศึกษาโครงสร้างของยีน iNOS ในบริเวณ 5'-flanking region ของยีนดังกล่าว พบว่ามี cis-acting NF- κ B element (Kujubu et al., 1991; Lowenstein et al., 1993) การกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ inhibitor κ B kinase (IKK) ผ่านกระบวนการ phosphorylation ของโปรตีน inhibitor κ B (IKB) ส่งผลให้เกิดการสลายตัวของโปรตีน IKB จึงทำให้โปรตีน NF- κ B หลุดออกมา แล้วจึงเกิดการเคลื่อนที่ (translocation) ของโปรตีน NF- κ B เข้าสู่นิวเคลียสของเซลล์และเข้าจับบริเวณ cis-acting NF- κ B element บนยีน iNOS ทำให้ยีนเหล่านี้สามารถทำงานได้และส่งผลให้เกิดกระบวนการอักเสบตามมา (Griscavage et al., 1996)

2.3.1 ยาต้านการอักเสบ (anti-inflammatory drugs)

ยาต้านการอักเสบในปัจจุบันแบ่งตามโครงสร้างทางเคมีได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ

1) ยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (nonsteroidal anti-inflammatory drugs; NSAIDs)

ยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (NSAIDs) ออกฤทธิ์ต้านการอักเสบได้โดยกลไกหลักจากการยับยั้งการสังเคราะห์ prostaglandins ซึ่งเป็นสารสื่อการอักเสบ (inflammatory mediators) ที่สำคัญชนิดหนึ่งในการก่อให้เกิดความเจ็บปวด การบวม อาการไข้ ร่วมกับสารสื่อการอักเสบชนิดอื่นๆ ได้แก่ kinin histamine

ด้วยกัน เป็นที่ทราบแน่ชัดแล้วว่า สเตียรอยด์ยับยั้งการสร้างสารสื่อหลายชนิดที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการอักเสบจากเซลล์ต่างๆ เช่น เซลล์เม็ดเลือดขาว เซลล์เยื่อบุหลอดเลือดและ fibroblast (จิรเดช มโนสร้อย และคณะ, 2546)

Prednisolone เป็นยามาตรฐานในกลุ่มสเตียรอยด์ สังเคราะห์มาจาก adrenal corticosteroid โดยเป็นสารที่สร้างจากธรรมชาติ (adrenal glands) มีคุณสมบัติด้านการอักเสบได้ดีและเป็นยาที่มีข้อบ่งใช้อย่างกว้างขวางในสภาวะการอักเสบ เช่น อาการแพ้ การอักเสบบริเวณจมูกและตา หลอดลมอักเสบ ผื่นคันที่ผิวหนัง rheumatic fever colitis chronic active hepatitis rheumatoid arthritis systemic lupus acute gouty arthritis psoriatic arthritis ulcerative colitis และ Crohn's disease เป็นต้น โดยสรุปจะใช้รักษาอาการอักเสบ (ประกอบด้วยอาการ 4 อย่าง คือ ปวด บวม แดง ร้อน) และ กดอาการแพ้ต่างๆ ให้มีอาการลดลง

2.3.2 ผลข้างเคียงจากการใช้ยากลุ่มสเตียรอยด์ที่พบบ่อย

พิษในระยะสั้น อาจทำให้แผลในกระเพาะอาหารกำเริบ น้ำตาลในเลือดสูง ความดันโลหิตสูง ลดภูมิคุ้มกันของร่างกายทำให้ติดเชื้อ (เช่น วัณโรค ปอดอักเสบ) ได้ง่าย หน้าบวม มีหนองขึ้น เป็นสิ่ว

พิษในระยะยาว การใช้ยาเป็นเวลานาน หรือ รับประทานยาในขนาดสูง นอกจากจะมีพิษในระยะสั้นแล้วยังอาจทำให้เกิด cushing syndromes เช่น มีการสะสมของไขมันบริเวณหน้าและลำตัว หลังมีลักษณะเป็นหนอก (buffalo hump) กระดูกผุ กระดูกหักง่าย แผลหายช้า มีจ้ำเขียวขึ้นตามผิวหนัง แผลในช่องปาก ความสมดุล หน้าบวมเหมือนพระจันทร์ (moon face) ลำตัวบวมทำให้เห็นว่าหน้าและตัวอ้วนกลมผิดปกติแต่แขนขาลีบ โรคจิตประสาท ตาเป็นต้อกระจกหรือต้อหิน ระดับน้ำตาลในเลือดสูง ความดันโลหิตสูง กระดูกพรุน ทำให้สูญเสียสารโปแตสเซียมในเลือดและระคายเคืองกระเพาะอาหาร พิษที่รุนแรงที่สุดคือ ทำให้ต่อมหมวกไตฝ่อ เมื่อเกิดภาวะเครียดของร่างกาย อาจทำให้ช็อคถึงตายได้ เรียกภาวะนี้ว่า “ภาวะวิกฤตจากต่อมหมวกไตฝ่อ”

จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่ายาต้านการอักเสบในกลุ่ม NSAIDs และ steroids มีฤทธิ์ข้างเคียงและผลไม่พึงประสงค์ต่อผู้ป่วยสูงโดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อระบบทางเดินอาหาร ส่วนยาที่มีผลข้างเคียงต่ำยังมีราคาค่อนข้างสูง ประชาชนที่มีรายได้น้อยยังไม่สามารถซื้อหามาใช้ได้ ดังนั้นการนำโปรตีนหรือเปปไทด์จากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านอักเสบมาพัฒนาเป็นยาต้านอักเสบที่มีผลข้างเคียงน้อย น่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งในการรักษา เนื่องจากมีราคาถูกกว่ายาแผนปัจจุบัน และยังสามารถนำทรัพยากรของประเทศมาใช้ประโยชน์ได้อย่างสูงสุด

2.5 การศึกษาเกี่ยวกับสิ่ว

Acne vulgaris หรือสิ่วเป็นการอักเสบแบบเรื้อรัง (chronic inflammatory) ที่เกิดจากปัจจัยหลายอย่างร่วมกัน เช่น พันธุกรรม ฮอรโมน การทำงานของต่อมไขมัน อาหารหรือยาที่รับประทาน รวมทั้งเชื้อแบคทีเรียชนิด *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในบริเวณผิวหนัง และเป็นสาเหตุสำคัญของ การก่อให้เกิดสิ่วอักเสบ (Choi et al., 2008; Kim et al., 2008; Lee et al., 2014; Park et al., 2004) โดย *P. acnes* จะผลิตและปล่อยเอนไซม์ไลเปส (lipase) ย่อยสารไตรกลีเซอไรด์ในไขมันที่ผลิตจากต่อมไขมัน ให้กลายเป็นกลีเซอรอลและกรดไขมันอิสระ รวมทั้งปล่อยเอนไซม์โปรตีเอส (protease) เอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส (hyaluronidase) และสารเคมีที่มีผลทำให้เกิดการอักเสบ (pro-inflammatory cytokines) เช่น Interleukin-1 β (IL-1 β), IL-8 และ tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) (Choi et al., 2008; Lee et al., 2014; Park et

al., 2004) ซึ่งการปล่อยสารดังกล่าวจะช่วยให้แบคทีเรียเจริญได้ดีขึ้น และกระตุ้นปฏิกิริยาการอักเสบให้รุนแรงขึ้น และเกิดตุ่มหนองที่ผิวหนังในที่สุด ในระยะแรกที่เริ่มเกิดหัวสิวมักจะตรวจไม่พบเชื้อนี้ แต่ในระยะท้ายๆ หรือระยะที่มีการอักเสบจะตรวจพบเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ได้ทุกราย สำหรับการรักษาโรคสิวอักเสบปานกลางจนถึงรุนแรงเพื่อฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* นั้นปัจจุบันนิยมใช้ยาปฏิชีวนะทั้งชนิดกินและทา ซึ่งหากใช้เพียงชนิดใดชนิดหนึ่งมักพบปัญหาเชื้อดื้อยาได้บ่อย การใช้ยาปฏิชีวนะชนิดกินร่วมกับยาทาจึงอาจช่วยลดปัญหาเชื้อดื้อยาได้ อย่างไรก็ตาม การกินยาต่อเนื่องกันเป็นเวลานานอาจมีผลเสียต่อร่างกายได้ (Kim et al., 2008; Park et al., 2004) เพื่อแก้ปัญหาที่กล่าวมาข้างต้นปัจจุบันจึงได้มีรายงานการนำสารสกัดจากธรรมชาติมาใช้ในการรักษาโรคสิวโดยเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* จำนวนมาก (Kim et al., 2008; Lee et al., 2014; Park et al., 2004) ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาการนำโปรตีนหรือเปปไทด์จากแหล่งธรรมชาติมาใช้ในการลดอาการสิวอักเสบ

ตำแหน่งต้นตอที่เกิดสิวคือต่อมไขมัน ต่อมไขมันมีหน้าที่ผลิตไขมัน และมีท่อเปิดออกสู่รูขุมขน เพื่อให้ไขมันออกมาหล่อลื่นผิวหนังภายนอก ต่อมไขมันที่แต่ละตำแหน่งของร่างกาย มีขนาดและความหนาแน่นไม่เท่ากัน บริเวณใบหน้าจะมีต่อมไขมันขนาดใหญ่ และหนาแน่นกว่าบริเวณอื่น เราจึงพบสิบบริเวณใบหน้าได้บ่อย การสร้างไขมันขึ้นกับฮอร์โมนแอนโดรเจนและเอสโตรเจน แอนโดรเจน หรือฮอร์โมนเพศชายกระตุ้นให้มีการสร้างไขมัน โดยกระตุ้นเซลล์ที่เรียกว่าซีโบไซท์ (sebocyte) ในขณะที่เอสโตรเจนหรือฮอร์โมนเพศหญิงยับยั้งการสร้างไขมัน (Acne หรือสิว, ม.ป.ป.) วิธีการรักษาสิวในปัจจุบันอาจแบ่งออกเป็นหมวดหมู่ใหญ่ๆ คือ กลุ่มยาอนุพันธ์ของวิตามินเอ กลุ่มยาปฏิชีวนะ กลุ่มยาฮอร์โมน การใช้เลเซอร์/แสง การผลัดเซลล์ผิวด้วยกรดผลไม้ และการกดสิว การเลือกวิธีการรักษาต้องคำนึงถึงประเภทของสิว ความรุนแรง และความเหมาะสมต่อผิวของแต่ละคน รวมถึงปัจจัยอื่นๆ ของผู้เป็นสิवर่วมด้วย สำหรับการรักษาสิวที่เกิดจากแบคทีเรีย *P. acnes* นั้นจะเป็นการใช้ยาในกลุ่มปฏิชีวนะ ซึ่งพบว่ายาปฏิชีวนะแบบทาสามารถช่วยลดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* ที่ผิวหนัง ส่งผลให้เกิดสิวลดลง โดยยาที่ใช้กันมากคือ Erythromycin Clindamycin และ Sotretinoin แต่อย่างไรก็ตามยังพบผลข้างเคียงที่พบได้บ่อยคือการระคายเคืองที่ผิวหนัง สำหรับยาปฏิชีวนะแบบรับประทานนั้นพบว่าให้ผลการรักษาได้เช่นเดียวกับแบบทา แต่เห็นผลได้เร็วกว่า ส่วนข้อเสียคือทำให้เกิดการดื้อยา หรือเชื้อดื้อยาได้มากกว่า และมีโอกาสเกิดผลข้างเคียงได้มากกว่า ซึ่งขึ้นกับแต่ละชนิดของยาปฏิชีวนะนั้นๆ ยาปฏิชีวนะที่ถูกนำมาใช้รักษาสิวอักเสบกันมากคือ Doxycycline, Erythromycin, Minocycline และ Tetracycline (จิตากานต์ รุจิพัฒนกุล, ม.ป.ป.) เพื่อแก้ปัญหาที่กล่าวมาข้างต้นปัจจุบันจึงได้มีรายงานการนำสารสกัดจากธรรมชาติมาใช้ในการรักษาโรคสิวโดยเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* จำนวนมาก เช่น การศึกษาโดย Lee et al (2014) ซึ่งพบเปปไทด์ที่มีคุณสมบัติเป็นแคทไอออนิก (cationic peptide) จากพิษผึ้งที่เรียกว่า melittin สามารถยับยั้งการอักเสบและการเกิด apoptosis ในเซลล์โมโนไซต์จากมนุษย์ (human THP-1 monocyte cell) โดยเมื่อทำการตรวจสอบสารสื่อกลางการอักเสบที่เกิดขึ้นพบว่า melittin นั้นสามารถยับยั้งการสร้างสารสื่อกลางอักเสบเช่น TNF- α และ IL-1 β ที่ถูกสร้างขึ้นเมื่อเซลล์โมโนไซต์ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วย *P. acnes* ได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้สารสกัดจากพืชสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *P. acnes* รวมทั้งยับยั้งการอักเสบเนื่องจากเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* อีกด้วย โดยตัวอย่างพืชสมุนไพรที่ใช้ได้แก่ *Mollugo pentaphylla*, *Angelica anomala*, *Matteuccia orientalis* และ *Olea japonica* (Kim et al., 2008) จากข้อมูลดังกล่าวผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาการนำโปรตีนหรือเปปไทด์จากแหล่งธรรมชาติมาใช้ในการลดอาการสิวอักเสบ

บทที่ 3

วิธีดำเนินการทดลอง

3.1 การแยกองค์ประกอบเลือดจระเข้ น้ำจืดสายพันธุ์ไทย

ทำการเก็บเลือดจระเข้ น้ำจืดสายพันธุ์ไทย ที่ศรีราชาโมต้าฟาร์ม จ. ชลบุรี เริ่มจากใช้เข็มฉีดยาขนาด 10 ml ดูดบริเวณที่เรียกว่า supravertibral branch ซึ่งอยู่บริเวณกะโหลกศีรษะของจระเข้ จากนั้นทำการถ่ายเลือดใส่ลงในหลอดทดลองพลาสติกขนาด 15 ml ที่บรรจุ EDTA ปริมาณ 0.08 g เพื่อป้องกันเลือดแข็งตัว เมื่อแล้วเสร็จทำการเขย่าหลอดเบาๆ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C หลังจากเลือดเกิดการเซตตัวจะปรากฏชั้นเม็ดเลือดขาวอยู่ระหว่างชั้นของพลาสมาและเม็ดเลือดแดงแล้วจึงทำการเก็บเลือดส่วนต่างๆ ตามขั้นตอนด้านล่าง เลือดอีกส่วนจะเติมลงไป ในหลอดทดลองที่ไม่มีสารกันเลือดแข็งตัวเพื่อเก็บส่วนของซีรัม

3.1.1 พลาสมา เม็ดเลือดขาว และเม็ดเลือดแดง

เมื่อเกิดการแยกชั้นระหว่างพลาสมา เม็ดเลือดขาว และเม็ดเลือดแดง จะพบพลาสมาอยู่ชั้นบนสุด ชั้น interphase จะเป็นเม็ดเลือดขาว และชั้นล่างสุดจะเป็นเม็ดเลือดแดง ทำการดูดแยกส่วนที่เป็นพลาสมาโดยใช้ sterile pastures pipette เก็บใส่หลอดทดลองใหม่ จากนั้นดูดเก็บชั้นของเม็ดเลือดขาว และชั้นเม็ดเลือดแดงใส่ลงในหลอดทดลองพลาสติกขนาด 15 ml ตามลำดับ

3.1.2 ฮีโมโกลบิน

ล้างเม็ดเลือดแดงโดยใช้ sterile pastures pipette ดูดเม็ดเลือดแดงใส่ในหลอดเซนต์ปีฟัวที่มี phosphate buffer saline pH 7.0 ปริมาตร 4 เท่าของเลือดจระเข้ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 xg นาน 5 นาที ทั้งส่วนใส แล้วเก็บส่วนของเม็ดเลือดแดง ทำการล้างเม็ดเลือดแดง และปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ซ้ำอีก 2 ครั้ง จากนั้นทำให้เม็ดเลือดแดงแตกโดยเทน้ำกลั่นแช่เย็นที่ปราศจากเชื้อลงไปปริมาตร 5 เท่าของเม็ดเลือดแดง ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 xg ที่ 4°C นาน 20 นาที ฮีโมโกลบินจะอยู่ในส่วนของเหลว ทั้งส่วนที่เป็นตะกอนของเซลล์เม็ดเลือดแดง

3.1.3 สารสกัดเม็ดเลือดขาว

ทำการเก็บเม็ดเลือดขาวจากข้อ 3.1.1 และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000xg เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างเซลล์เม็ดเลือดขาวด้วย normal saline (0.89% NaCl) เพื่อกำจัดเม็ดเลือดแดงบางส่วนที่อาจปนมา แล้วจึงทำการปั่นเหวี่ยงที่ 3,000xg เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวมาละลายกลับด้วยสารละลายกรดอะซิติกที่มีความเข้มข้น 10% แล้วเขย่าอย่างแรง เพื่อให้เซลล์เม็ดเลือดขาวกระจายตัวทั่วในสารละลายกรดอะซิติก จากนั้นทำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวและแกรนูโลต่างๆ ภายในเซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงที่มีความถี่สูง เป็นเวลา 5 นาที (sonication) โดยทำซ้ำ 3 รอบ โดยแต่ละรอบต้องทำการพักตัวอย่างบนถังน้ำแข็งจนตัวอย่างมีอุณหภูมิลดลงจึงทำซ้ำได้ เมื่อแล้วเสร็จนำตัวอย่างที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นจึงเก็บเอาเฉพาะส่วนใส (supernatant) มาทำแห้งโดยใช้เครื่อง Speed Vac ซึ่งในขั้นตอนนี้จะทำให้ตัวอย่างมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น และสามารถกำจัด 10% acetic acid ที่ใช้เป็นตัวสกัดสารตัวอย่างได้ด้วย จากนั้นละลายสารสกัดกลับด้วยน้ำกลั่น

ทำการวัดปริมาณโปรตีนของสารสกัดเม็ดเลือดขาว โดยวิธี Bradford ซึ่งในการคำนวณหาปริมาณโปรตีนนั้นจะคำนวณเทียบกับกราฟของโปรตีนมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA) สุดท้ายทำการตรวจสอบแบบแผนโปรตีนของสารสกัดเม็ดเลือดขาว โดยใช้ 13.5% SDS-PAGE

3.1.3 ซีรัม

นำเลือดจระเข้ที่ไม่ได้ผสมกับ EDTA ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อให้เกิดการแยกกันระหว่างซีรัมกับตะกอนของเลือด ใช้ steriled pastures pipette ดูดแยกส่วนที่เป็นซีรัมซึ่งเป็นส่วนของของเหลวที่มีการแยกตัวออกมาจากตะกอนเลือดเก็บไว้ และทิ้งส่วนที่เป็นตะกอนเลือดไป นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3000 xg นาน 10 นาที ดูดเก็บเอาส่วนที่เป็นของเหลวไว้ นำซีรัมไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70°C เพื่อเก็บรักษาไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

3.2 การศึกษา Cell Viability / Cytotoxicity

3.2.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์

1) เซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ (RAW264.7)

ทำการเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ (RAW264.7) ใน Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium ที่มีส่วนประกอบของ 10% (v/v) fetal bovine serum และ 1% antibiotic: antimycotic (Gibco, USA) จากนั้นบ่มเซลล์ใน CO₂ incubator ซึ่งมีปริมาณ CO₂ อยู่ 5% ที่อุณหภูมิ 37°C และทำการ sub-cultured ทุกๆ 3-5 วัน เมื่อต้องการทดสอบเลี้ยงเซลล์ให้ได้ความหนาแน่น (confluence) ประมาณ 90-95% แล้วจึงทำการ trypsinize เซลล์ และนับจำนวนเซลล์ให้ได้จำนวนที่ต้องการในแต่ละการทดลองโดยใช้ Hemacytometer (Bright-Line™, USA)

2) เซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสต์จากผิวหนังมนุษย์ (BJ; ATCC CRL2522)

ทำการเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสต์จากผิวหนังมนุษย์ (BJ; ATCC CRL2522) ใน minimum essential medium with Earl's salts (EMEM) ที่มีส่วนประกอบของ 10% (v/v) fetal bovine serum และ 1% antibiotic:antimycotic (Gibco, USA) จากนั้นบ่มเซลล์ใน CO₂ incubator ซึ่งมีปริมาณ CO₂ อยู่ 5% ที่อุณหภูมิ 37°C และทำการ sub-cultured ทุกๆ 3-5 วัน เมื่อต้องการทดสอบเลี้ยงเซลล์ให้ได้ความหนาแน่น (confluence) ประมาณ 90-95% แล้วจึงทำการ trypsinize เซลล์ และนับจำนวนเซลล์ให้ได้จำนวนที่ต้องการในแต่ละการทดลองโดยใช้ Hemacytometer (Bright-Line™, USA)

3.2.2 การทดสอบความเป็นพิษ (cytotoxicity) ของเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทยต่อเซลล์ด้วยวิธี 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay

เลี้ยงเซลล์ดังกล่าวข้างต้น จากนั้นนำมาเลี้ยงในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (96-well plates) โดยให้มีปริมาณเซลล์เท่ากับ 1×10^5 cells/well (96-well plates) ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับเซลล์แต่ละชนิดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นบ่มเซลล์ใน CO₂ incubator ซึ่งมีปริมาณ CO₂ อยู่ 5% ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดเดิมออก จากนั้นเติมอาหารที่เหมาะสมกับเซลล์แต่ละชนิดที่ประกอบด้วยเลือดจากจระเข้สายพันธุ์ไทยที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน และบ่มเซลล์ใน CO₂ incubator ซึ่งมีปริมาณ CO₂ อยู่ 5% ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากงานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม

(96-well plates) และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารละลาย MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ความเข้มข้น 0.5 mg/ml จากนั้นบ่มเซลล์ใน CO₂ incubator ซึ่งมีปริมาณ CO₂ อยู่ 5% ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที ดูอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (96-well plates) และเติม 100% DMSO ปริมาณ 150 µl/well เพื่อละลายผลึก formazan salt แล้วจึงนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 nm โดยใช้เครื่อง Microplate reader (Bio-Rad, Model 680, USA) หลังจากนั้นคำนวณค่าความมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) ที่ทดสอบด้วยเลือดจะเข้สายพันธุ์ไทยที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารทดสอบ (untreated control) โดยแสดงค่า cell viability ในรูปของ % of control โดยให้เซลล์ในกลุ่มเลี้ยงตามปกติ (untreated control) มีค่า cell viability เท่ากับ 100% ทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ Analysis of Variance (ANOVA) โดยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ข้อมูลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

3.2.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์ (human peripheral blood mononuclear cell; PBMC)

1) การเตรียมเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์ (human peripheral blood mononuclear cell; PBMC)

ขอความอนุเคราะห์ใช้ตัวอย่างชีวภาพ (เลือดมนุษย์) ของผู้บริจาค จากคลังเลือดกลาง คณะแพทยศาสตร์ (โรงพยาบาลศรีนครินทร์) มหาวิทยาลัยขอนแก่น (ethical approval number HE601010) ทำการแยก PBMC cells จาก buffy coat นำตัวอย่าง buffy coat ของผู้บริจาคโลหิตจากคลังเลือดกลางมาเติมลงใน 1X PBS pH 7.4 ในอัตราส่วนเลือด 10 ml ต่อ 1X PBS 20 ml ใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 50 ml ปิดฝาคว่ำหลอดไปมาอย่างเบา มือ จากนั้นเปิดหลอดที่ผสมกับ 1X PBS แล้วมา overlay บนผิวหน้าของน้ำยา Ficol ด้วยอัตราส่วน 1:1 ซึ่งบรรจุในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 ml นำไปเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็วรอบ 2000 rpm เป็นเวลา 35 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูส่วนของ total PBMC ใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ใหม่ แล้วเติม 1X PBS 2-4 ml ผสมอย่างเบา มือ นำไปเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็วรอบ 5000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นดูส่วน supernatant ทิ้งไป ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง ทำการ resuspend PBMC cells ด้วย RPMI medium ปริมาตร 2-4 ml แล้วนับเซลล์ที่รอดชีวิตมาศึกษาความเป็นพิษต่อไป

2) การศึกษาความเป็นพิษของเลือดจะเข้สายพันธุ์ไทยกับ PBMC cells ด้วยวิธี MTT assay

ทำการเตรียมเซลล์ใน 96-well plate โดย เตรียม resuspend PBMC cells ใน RPMI medium ให้มีปริมาณเซลล์ 2×10^6 cells/ml โดยทำการ Seed 2×10^6 cells/ml ของ PBMC cells ลงใน 96-well plate ปริมาตร 100 µl กระจายเซลล์ในแต่ละ well ด้วยการนำไปเขย่าโดยใช้ microplate shaker เป็นเวลา 3-5 นาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C 5% คาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) และ 95% อากาศ (Air) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (pre-treatment) แล้วเติมสารที่ต้องการทดสอบลงไป คือน้ำองศ์ประกอบเลือดจะเข้เติมลงในแต่ละ well ที่มี PBMC cells โดยเติมลงไปตัวอย่างละ 100 µl โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ใช้ทดสอบเป็น 25 50 และ 100 µg/ml นำ plate ที่เติมสารตัวอย่างเรียบร้อยแล้วไปเขย่าด้วย microplate shaker เป็นเวลา 3-5 นาที จากนั้นนำ plate ไปบ่มที่ตู้บ่ม อุณหภูมิ 37°C 5% คาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) และ 95% อากาศ (Air) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำแต่ละ plate มาเติมสารละลาย 5 mg/ml ของสารละลาย MTT (5 mg/mL MTT in 1X PBS กรอง

ด้วย 0.2 μm syring filter membrane) จำนวน 20 μl เขย่าด้วย microplate shaker เป็นเวลา 3-5 นาที นำ plate ไปบ่มที่ตู้บ่ม อุณหภูมิ 37°C 5% คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และ 95% อากาศ (Air) เป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง จากนั้นนำ plate ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็วรอบ 3000 rpm เป็นเวลา 30 นาที แล้วเปิดสารละลายทิ้งอย่างเบามือ ละลาย formazan ด้วย 100 μl ของ DMSO เขย่าด้วย microplate shaker เป็นเวลา 3-5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm ด้วยเครื่อง microplate reader คำนวณ % การรอดชีวิตของ PBMC cells โดยใช้สูตร

$$\% \text{ PBMC viability (\% of control)} = \frac{[\text{A570 test} - \text{blanks}] \times 100}{[\text{A570 control-blank}]}$$

3.3 การทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านภาวะเครียดออกซิเดชันของเลือดจระเข้ต่อเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย hydrogen peroxide (H_2O_2)

3.3.1 เซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสต์จากผิวหนังมนุษย์ (BJ; ATCC CRL2522)

เลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผิวหนังมนุษย์ (BJ; ATCC CRL2522) ในอาหารที่เหมาะสมดังกล่าวข้างต้น จากนั้นนำมาเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (96-well plates) ที่มีอาหารที่เหมาะสม โดยให้มีปริมาณเซลล์เท่ากับ 1×10^5 cells/well แล้วบ่มเซลล์ใน CO_2 incubator ซึ่งมีปริมาณ CO_2 อยู่ 5% ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เตรียมตัวอย่างเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทยที่ความเข้มข้นต่างกันอย่างน้อย 3 ความเข้มข้น และบ่มร่วมกับเซลล์ทดสอบเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (pre-incubate) จากนั้นเติมสารละลาย H_2O_2 ลงในเซลล์ทดสอบให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 500 μM และบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงวัดค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT ที่ได้อธิบายไว้ข้างต้น

3.3.2 การศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์ในสภาวะออกซิเดชันต่อเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย hydrogen peroxide (H_2O_2) ภายใต้กล้อง phase contrast inverted microscope

เลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผิวหนังมนุษย์ (BJ; ATCC CRL2522) ดังกล่าวข้างต้น จากนั้นนำมาเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 24 หลุม (24-well plates) ที่มีอาหารชนิดที่เหมาะสม โดยให้มีปริมาณเซลล์เท่ากับ 1×10^5 cells/well จากนั้นบ่มเซลล์ใน CO_2 incubator ซึ่งมีปริมาณ CO_2 อยู่ 5% ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เตรียมตัวอย่างเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทยที่ความเข้มข้นต่างกันอย่างน้อย 3 ความเข้มข้น และบ่มร่วมกับเซลล์ทดสอบเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย H_2O_2 ลงในเซลล์ทดสอบให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 500 μM และบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก ล้างเซลล์ด้วย PBS จำนวน 2 ครั้ง แล้วย้อมสีเซลล์ด้วย Wright-Giemsa บันทึกภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (phase contrast inverted microscope) โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งเลี้ยงเซลล์ในอาหารปกติที่ไม่ได้บ่มร่วมกับ H_2O_2

3.3.3 การศึกษาการป้องกันการตายแบบ apoptosis ของเลือดจระเข้ต่อเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย hydrogen peroxide (H₂O₂)

เลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผิวหนังมนุษย์ (BJ; ATCC CRL2522) ดังกล่าวข้างต้น จากนั้นนำมาเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 6 หลุม (6-well plates) ที่มีอาหารที่เหมาะสมกับเซลล์แต่ละชนิด โดยให้มีปริมาณเซลล์เท่ากับ 1×10^6 cells/well จากนั้นบ่มเซลล์ใน CO₂ incubator ซึ่งมีปริมาณ CO₂ อยู่ 5% ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เตรียมตัวอย่างเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทยที่ความเข้มข้นต่างกันอย่างน้อย 3 ความเข้มข้น และบ่มร่วมกับเซลล์ทดสอบเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (pre-incubate) เติมน้ำละลาย H₂O₂ ลงในเซลล์ทดสอบให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 500 μ M และบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บเซลล์ด้วยการเติม 0.25 % trypsin ปริมาณ 1 ml แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 5-10 นาที ซึ่งการเติม trypsin จะช่วยให้เซลล์ที่เกาะอยู่ที่ก้นจานเพาะเลี้ยงหลุดออกมา ซึ่งจะง่ายต่อการใช้ pasteur pipette ดูดเซลล์ และจะไม่ทำให้เซลล์เสียหายหรือถูกทำลาย จากนั้นล้างเซลล์ด้วย PBS ที่เย็นจัด จำนวน 2 ครั้ง แล้วละลายตะกอนเซลล์กลับด้วย binding buffer (BioLegend, San Diego, CA) ให้ได้จำนวนเซลล์ 1×10^5 cells/ml ปิเปตเซลล์ที่ละลายอยู่ใน binding buffer ลงใน 5-ml polystyrene round-bottom tube จำนวน 100 μ l จากนั้นย้อมเซลล์ด้วยการเติม fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated annexin V (annexin V-FITC) จำนวน 5 μ l และ propidium iodide (PI) จำนวน 10 μ l (BioLegend, San Diego, CA) บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงเติม binding buffer จำนวน 400 μ l จากนั้นทำการวัดการเกิด apoptosis ด้วย BD FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences)

3.4 ศึกษาฤทธิ์ต้านอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจสายพันธุ์ RAW 264.7

3.4.1 ศึกษาฤทธิ์ต้านอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจสายพันธุ์ RAW 264.7 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วยเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes*

1) การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes*

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* ในสภาวะ anaerobe condition โดยนำ single colony บน agar plate มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Schaedler broth บ่มในภาชนะที่ปิดสนิท โดยใช้ gas pack ในการสร้างสภาวะไร้ออกซิเจน แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นทำให้อ่อนฤทธิ์ลงด้วยอุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 10 นาที (Heat-killed)

2) การกระตุ้นให้เซลล์แมคโครฟาจสายพันธุ์ RAW 264.7 เกิดการอักเสบด้วย *P. acnes*

ศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดเม็ดเลือดขาวจากเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทย โดยการกระตุ้นให้เซลล์แมคโครฟาจสายพันธุ์ RAW 264.7 เกิดการอักเสบด้วย *P. acnes* ซึ่งแบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ คือ 1) เซลล์ RAW 264.7 ที่เลี้ยงปกติ (untreated) 2) เซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วยแบคทีเรีย *P. acnes* (Heat-killed) เพียงอย่างเดียว 3) เซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วยแบคทีเรีย *P. acnes* (Heat-killed) และได้รับสารสกัดเม็ดเลือดขาวที่ความเข้มข้นต่างกันอย่างน้อย 3 ความเข้มข้นรวมด้วย โดยมีขั้นตอนดังนี้ เลี้ยงเซลล์ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุม บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C ที่มี CO₂ 5% เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดเดิมออกและเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีเชื้อ *P. acnes* (Heat-killed) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ที่มี CO₂ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่

กำหนดดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 100 μ l ผสมกับสารละลาย Griess [2% (%w/v) N-(1-naphtyl)-ethylenediamine and 2% (%w/v) sulfanilamide in 4% (%w/v) phosphoric acid] ปริมาตร 100 μ l จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท ส่วนอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหลือนำมาใช้ในการตรวจวัดปริมาณสาร IL-6, IL-1 β , IL-10 และ TNF- α โดยใช้ ELISA kit

3.4.2 ศึกษาฤทธิ์ต้านอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจสายพันธุ์ RAW 264.7 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วยเชื้อ LPS

1) การกระตุ้นให้เซลล์แมคโครฟาจสายพันธุ์ RAW 264.7 เกิดการอักเสบด้วย LPS

ศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดเม็ดเลือดขาวจากเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทย โดยการกระตุ้นให้เซลล์แมคโครฟาจสายพันธุ์ RAW 264.7 เกิดการอักเสบด้วย LPS ซึ่งแบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ คือ 1) เซลล์ RAW 264.7 ที่เลี้ยงปกติ (untreated) 2) เซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย LPS เพียงอย่างเดียว 3) เซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย LPS และได้รับสารสกัดเม็ดเลือดขาวที่ความเข้มข้นต่างกันอย่างน้อย 3 ความเข้มข้นรวมด้วย โดยมีขั้นตอนดังนี้ ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจสายพันธุ์ RAW 264.7 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มีส่วนประกอบของ 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin และ 25 μ g/ml amphotericin B จากนั้นนำไปเลี้ยงใน CO₂ incubator ที่มีปริมาณ CO₂ อยู่ 5% และอุณหภูมิ 37°C จากนั้นเตรียมเซลล์แมคโครฟาจสายพันธุ์ RAW 264.7 มาเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (96 well plates) ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยให้มีปริมาณเซลล์เท่ากับ 1×10^5 /well ใน CO₂ incubator ที่มี CO₂ อยู่ 5% และอุณหภูมิ 37°C เตรียมสารสกัดเม็ดเลือดขาวในอาหารเลี้ยงเซลล์ให้มีความเข้มข้นต่างๆ กัน โดยในแต่ละ well จะเติมสาร LPS ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายในอาหารเลี้ยงเซลล์เท่ากับ 100 ng/ml เพื่อกระตุ้นการอักเสบ จากนั้นนำไปเลี้ยงใน 5% CO₂ incubator ที่มีอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 100 μ l ผสมกับสารละลาย Griess [2% (%w/v) N-(1-naphtyl)-ethylenediamine and 2% (%w/v) sulfanilamide in 4% (%w/v) phosphoric acid] ปริมาตร 100 μ l จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท

3.4.3 ศึกษาการป้องกันการตายแบบ apoptosis ของเลือดจระเข้ต่อเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ

เลี้ยงเซลล์ RAW264.7 ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 24 หลุม (24-well plates) ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 Medium ที่มีส่วนประกอบของ 10% (v/v) fetal bovine serum และ 1% antibiotic:antimycotic (Gibco, USA) โดยให้มีปริมาณเซลล์เท่ากับ 1×10^6 เซลล์/well จากนั้นบ่มเซลล์ใน CO₂ incubator ซึ่งมีปริมาณ CO₂ อยู่ 5% ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบในเซลล์ RAW 264.7 ทั้งที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วย *P. acnes* และ LPS ดังแสดงในข้อ 3.4.1 และ 3.4.2 จากนั้นเก็บเซลล์โดยการ trypsinize (0.25% trypsin) และปั่นเซลล์ลงใน micro-centrifuge tube ปั่นเหวี่ยงเซลล์ที่ความเร็วรอบ 1500 rpm เป็นเวลา 3 นาที และปั่นล้างด้วย 1x PBS ที่แช่เย็น ทำการ resuspend เซลล์ด้วย 1x Annexin V binding buffer ให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์สุดท้ายอยู่ในช่วง 5×10^5 -

1×10^6 cell/ml จากนั้นย้อมสีโดยเปิด cell suspension ปริมาตร 100 μ l ผสมกับ 1 μ l annexin V FITC (BioLegend, San Diego, CA) และ 2 μ l ของ 1mg/ml propidium iodide (Sigma, USA) เขย่าเบาๆ และบ่มในที่มืดเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 500 μ l ด้วย 1x Annexin V binding buffer จากนั้นทำการวัดการเกิด apoptosis ด้วย BD FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences)

3.4.4 ตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบด้วยเทคนิค PCR

เลี้ยงเซลล์ RAW 264.7 ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 6 หลุม (6-well plates) ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 ที่มีส่วนประกอบของ 10% (v/v) fetal bovine serum และ 1% antibiotic:antimycotic (Gibco, USA) โดยให้มีความหนาแน่นเซลล์เท่ากับ 1×10^5 cell/well จากนั้นบ่มเซลล์ใน CO₂ incubator ซึ่งมีปริมาณ CO₂ อยู่ 5% ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดสอบการอักเสบดังแสดงในข้อ 3.4.1 และ 3.4.2 จากนั้นเก็บเซลล์ในแต่ละหลุมเพื่อสกัด RNA โดยการใช้สาร trizol นำ RNA ที่สกัดได้มาเป็นแม่แบบในการสังเคราะห์ cDNA ด้วยเอนไซม์ reverse transcriptase แล้วจึงตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดการอักเสบ (ตารางที่ 3.1) ด้วยเทคนิค PCR และคำนวณระดับการแสดงออกของแต่ละยีนโดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งเลี้ยงเซลล์ RAW 264.7 ในอาหารที่ไม่ได้บ่มร่วมกับสารใดๆ (untreated)

ตารางที่ 3.1 แสดง primer ที่ใช้ในการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ

Gene		Primer Sequence (5'-3')	product size (bp)	Annealing temperature (°C)	References
TNF- α	sense	GTTCTATGGCCAGACCCTCACA	335	60	Escocard et al., 2006
	anti-sense	TCCCAGGTATATGGGCTCATACC			
iNOS	sense	TGGGAATGGAGACTGTCCCAG	306	60	Escocard et al., 2006
	anti-sense	GGGATCTGAATGTGATGTTTG			
IL-1 β	sense	AAGCTCTCCACCTCAATGGACAG	260	57	Escocard et al., 2006
	anti-sense	CTCAAACCTCACTTTGCTCTTGA			
IL-6	sense	CCTCTGGTCTTCTGGAGTACCAT	307	60	Escocard et al., 2006
	anti-sense	GGCATAACGCACTAGGTTTGCCG			
COX-2	sense	TGTATGCTACCATCTGGCTTCGG	237	58	Peinnequin et al., 2004
	anti-sense	GTTTGGAACAGTCGCTCGTCATC			
GAPDH	sense	GAGAAACCTGCCAAGTATGATGAC	212	55	Wang et al., 2014
	anti-sense	TAGCCGTATTCATTGTCATACCAG			

3.5 การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *P. acnes* ด้วยสารสกัดเม็ดเลือดขาว

นำเชื้อ *P. acnes* มาเลี้ยงในอาหาร BHIB ภายใต้สภาวะไร้อากาศ ที่อุณหภูมิ 37°C จนกระทั่งเซลล์เข้าสู่ log phase หรือได้ OD600 เท่ากับ 0.5-0.8 จากนั้นเจือจางเซลล์แบคทีเรียด้วยอาหาร BHIB ใหม่ให้ได้ 10^4 cfu/ml

ทำการปิเปตเชื้อที่มีการเจือจางลงในเพลตขนาด 96-well ปริมาตร 100 μ l ผสมตัวอย่างทดสอบปริมาตร 10 μ l ลงในเพลตที่มีเชื้ออยู่ แล้วจึงนำเพลตนี้ไปบ่มภายใต้สภาวะไร้อากาศ ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นวัดการเจริญของเชื้อที่ OD₆₀₀ โดยในการทดลองครั้งนี้ใช้ Clindamycin เป็น Positive control และใช้สารที่ใช้สกัดเม็ดเลือดขาวเป็นตัว Negative control

3.6 ศึกษาแบบแผนโปรตีนจาก RAW 264.7 เมื่อได้รับการอักเสบร่วมกับฮีโมโกลบินจากเลือดจะเข้าสู่สายพันธุ์ไทยด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ (proteomics)

3.6.1 การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของฮีโมโกลบินจากเลือดจะเข้าสู่สายพันธุ์ไทย

เพาะเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจ (RAW 264.7) ในอาหารเลี้ยงชนิด RPMI 1640 ที่มี 10% Fetal bovine serum จำนวน 2×10^6 cells ต่อ 15 $\times$ 60 mm plastic petri dish จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มเซลล์แบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂ incubator) ที่อุณหภูมิ 37°C ที่มี CO₂ ในอากาศ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ที่ได้มาเปลี่ยนอาหารเลี้ยงใหม่ และกระตุ้นเซลล์ด้วยสาร LPS และฮีโมโกลบิน โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ คือ 1) เซลล์ RAW 264.7 ที่เลี้ยงปกติ (untreated) 2) เซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย 100 ng/ml LPS เพียงอย่างเดียว 3) เซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย 100 ng/ml LPS และได้รับฮีโมโกลบินที่ความเข้มข้น 100 μ g/ml ร่วมด้วย จากนั้นทำการเลี้ยงเซลล์แต่ละกลุ่มการทดลองใน 5% CO₂ incubator ที่มีอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 100 μ l ผสมกับสารละลาย Griess [2% (%w/v) N-(1-naphtyl)-ethylenediamine and 2% (%w/v) sulfanilamide in 4% (%w/v) phosphoric acid] ปริมาตร 100 μ l จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท ส่วนของเซลล์นั้นจะทำการเก็บเซลล์โดย ทำการล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 3 ml และขูดเก็บเซลล์โดยใช้ scraper ขูดเบาๆ เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากผิวภาชนะ ดูดสารละลายเซลล์ใส่หลอดทดลองขนาด 15 ml จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยง ที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งและเก็บตะกอนเซลล์ที่ -70°C เพื่อรอการวิเคราะห์โปรตีนในขั้นตอนต่อไป

3.6.2 การเตรียมโปรตีนตัวอย่าง (protein extraction) สำหรับการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค 2D-PAGE

นำตะกอนเซลล์ RAW 264.7 ที่ผ่านการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการอักเสบของฮีโมโกลบิน (100 μ g/ml) มาทำการสกัดโปรตีนด้วยการเติมสารละลาย lysis buffer (7M urea, 2M thiourea, 4% (w/v) CHAPS, 2% (w/v) DTT) ปริมาตร 100 μ l เติม Glass bead จำนวน 2-3 เม็ด และใช้เทคนิคแช่แข็ง (freeze and thaw) ด้วยไนโตรเจนเหลว จากนั้นนำมาปั่นให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 5 แล้วดูดเอาสารละลายส่วนใสใส่ใน micro tube นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาทีอีกครั้ง เก็บเอาเฉพาะส่วนใส นำไปวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford โดยปิเปตสารละลาย Bradford dry จำนวน 1 ml ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมโปรตีนตัวอย่างจำนวน 1- 5 μ l ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณความเข้มข้นของโปรตีนโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย Bovine serum albumin (BSA) ในหน่วย μ g/ μ l

3.6.3 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE)

การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค Two Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis (2D-PAGE) เป็นการแยกบนเจลด้วยกระแสไฟฟ้าสองมิติ ในการแยกโปรตีนในระนาบแรกใช้ isoelectric focusing (IEF) gel strip pH 4-7 ความยาว 7 cm โดยปิเปตสารละลายโปรตีน 100 μ g ผสมกับสารละลาย Rehydration (7M urea, 2M thiourea, 2% CHAPS, 0.002% Bromophenol blue) และเติม DTT 0.001 g และ IPG buffer 1 μ l โดยให้มีปริมาตรรวมของสารละลายเท่ากับ 125 μ l ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไหลลงใน strip holder ตามด้วยการวาง IPG dry strip ลงใน strip holder และ overlay ด้วย mineral oil วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Ettan[®] IPGphor (Amersham Biosciences) อุณหภูมิ 20°C โดยตั้งค่า program สำหรับ run IEF ดังนี้

Rehydration time 12 hr.

Step	Voltage mode	Voltage (V)	Vhr	Time (hr.)
Step 1	Step and Hold	500	250	0.50
Step 2	Gradient	1,000	500	0.50
Step 4	Step and Hold	6,800	8,500	1.25
total			9,250	2.25

เมื่อเสร็จสิ้นการวิเคราะห์ด้วย เครื่อง Ettan[®] IPGphor นำ Strip เข้าสู่ขั้นตอนของ SDS-Equilibration ด้วย Equilibration solution (75 mM Tris-HCl pH 8.8, 6 M Urea, 30% glycerol, 2% SDS and 0.002% bromophenol blue) โดยทำการปรับสมดุลจำนวนสองครั้ง คือ ครั้งแรกปรับสมดุลด้วย SDS Equilibration Buffer (2.5 ml) ที่มี DTT (0.025g) เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นย้าย Strip ไปปรับสมดุลครั้งที่สองด้วย SDS Equilibration Buffer (2.5 ml) ที่มี IAA (0.0625g) เป็นเวลา 15 นาที นำ strip เข้าสู่การแยกโปรตีนในระนาบที่สองโดยใช้ 13.5% separating gel (SDS-PAGE) ด้วยกระแสไฟฟ้าขนาด 20 mA เวลา 15 นาที จากนั้นเพิ่มเป็น 30 mA จนกว่าแถบของ dry ตกลงพอดี นำเจลที่ได้มาทำการย้อมโดยใช้ silver โดยมีขั้นตอนการย้อมแสดงดังตารางที่ 3.2 ทำการสแกนแผ่นเจล และวิเคราะห์ความแตกต่างของจุด (spot) โปรตีนด้วยโปรแกรม Image masterTM 2D platinum version 7.0 เพื่อให้ได้จุดโปรตีนที่สนใจ คือโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น หรือลดลง หรือมีการแสดงออกเฉพาะในบางกลุ่มทดลอง เมื่อทำการเปรียบเทียบแบบแผนของโปรตีนในแต่ละกลุ่มการทดลอง เมื่อได้จุดโปรตีนที่สนใจจึงนำไปวิเคราะห์ผลต่อด้วย Mass spectrometry (LC-MS/MS) แล้วนำข้อมูลของ MS/MS Ions ที่ได้ รวมทั้งค่า MW และ pI ของโปรตีนแต่ละตัวมาสืบค้นบนฐานข้อมูลโปรตีนโดยใช้ Mascot (<http://www.matrixscience.com>) เพื่อระบุชนิดของโปรตีน

ตารางที่ 3.2 ขั้นตอนการย้อมสีโปรตีนด้วย Silver Staining (Amersham Biosciences)

Step	Solution	Amount		Time (min)
		1 gel	2 gels	
Fixation	Ethanol	10 ml	20 ml	30
	Acetic acid glacial	2.5 ml	5 ml	
	Add double distilled water to	25 ml	50 ml	
Sensitizing	Ethanol	7.5 ml	15 ml	30
	Glutardialdehyde (25% w/v)†	125 µl	250 µl	
	Sodium thiosulphate (5% w/v)	1 ml	2 ml	
	Sodium acetate	1.7 g	3.4 g	
	Add double distilled water to	25 ml	50 ml	
Washing	Double distilled water			3x5
Silver reaction	Silver nitrate solution (2.5% w/v)	2.5 ml	5 ml	20
	Formaldehyde (37% w/v)†	10 µl	20 µl	
	Add double distilled water to	25 ml	50 ml	
Washing	Double distilled water			2x1
Developing	Sodium carbonate	0.63 g	1.25 g	2-5
	Formaldehyde (37% w/v)†	5 µl	10 µl	
	Stir vigorously to dissolve			
	Add double distilled water to	25 ml	50 ml	
Stopping	EDTA-Na ₂ .2H ₂ O	0.37 g	0.73 g	10
	Add double distilled water to	25 ml	50 ml	
Washing	Double distilled water			3x5

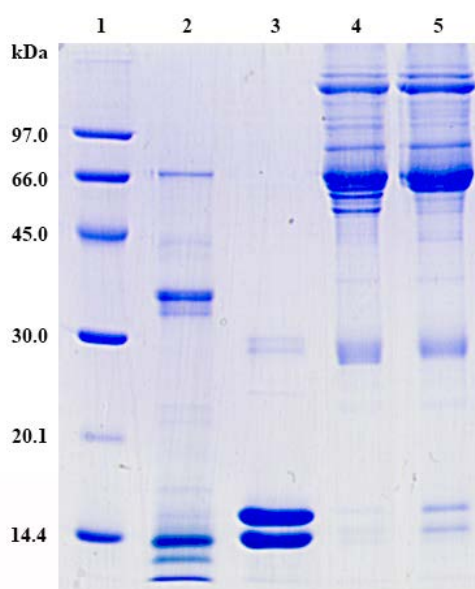
**Add component marked † immediately before use

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลการตรวจสอบแบบแผนโปรตีนโดยใช้ SDS-PAGE

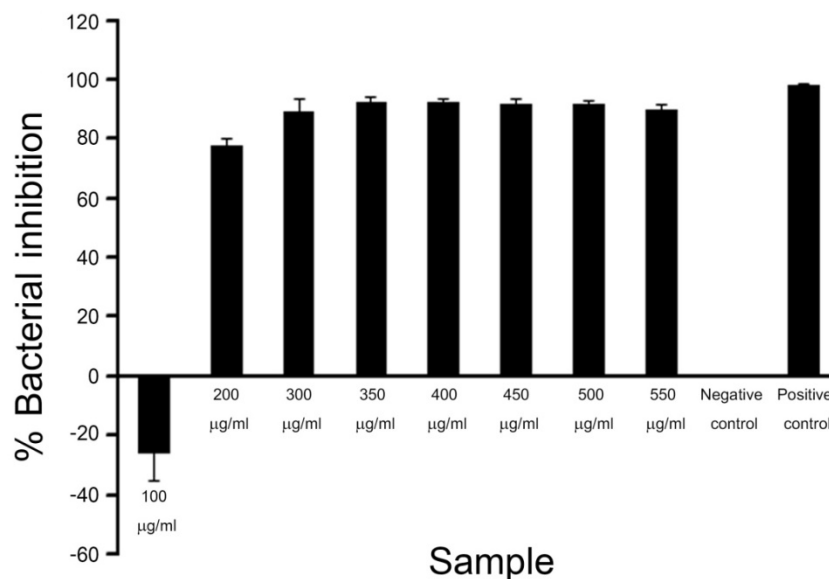
เมื่อทำการแยกองค์ประกอบต่างๆ จากเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทยด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบขนาดโปรตีนของสารสกัดเม็ดเลือดขาวอยู่ในช่วง 66-14 kDa ฮีโมโกลบิน 30-14 kDa พลาสมา 96-14 kDa และซีรัม 96-14 kDa ดังแสดงในรูปที่ 4.1 ซึ่งแบบแผนโปรตีนที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE ในครั้งนี้ ประกอบด้วยโปรตีนหลักที่คล้ายคลึงกับรายงานที่ผ่านมา ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าฮีโมโกลบิน และสารสกัดเม็ดเลือดขาวที่สกัดได้น่าจะยังคงมีฤทธิ์ทางชีวภาพเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป



รูปที่ 4.1 ผลการตรวจสอบแบบแผนโปรตีนของเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทยโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE Lane 1 คือแถบโปรตีนมาตรฐาน Lane 2 คือสารสกัดเม็ดเลือดขาว (cWBC) Lane 3 คือฮีโมโกลบิน (cHb) Lane 4 คือพลาสมา และ Lane 5 คือซีรัม

4.2 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *P. acnes* DMST 14916 ด้วยวิธี Broth dilution assay

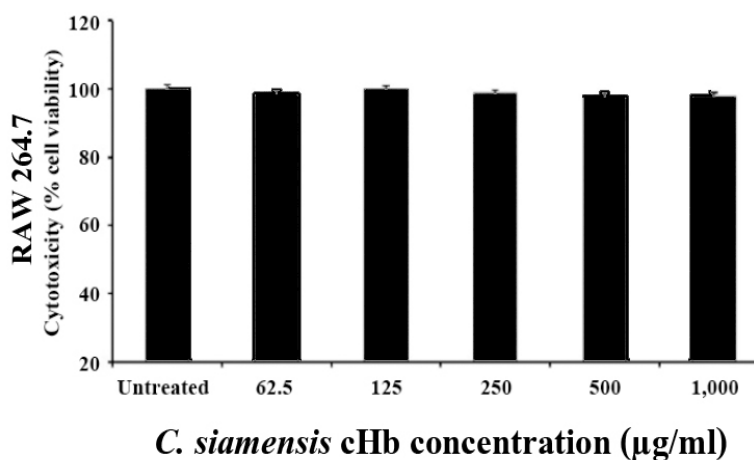
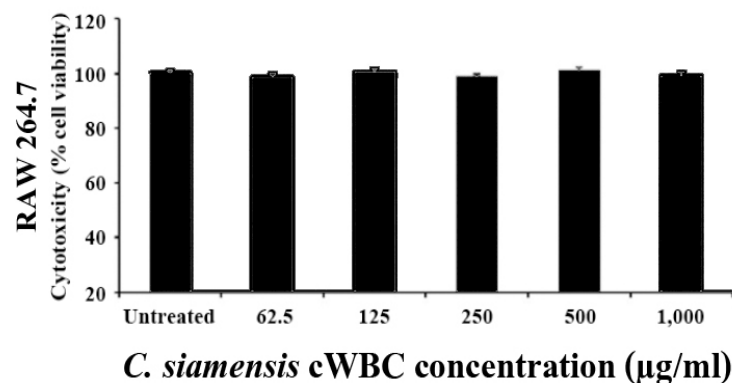
จากผลการทดสอบพบว่าสารสกัดเม็ดเลือดขาวของจระเข้สายพันธุ์ไทยที่ความเข้มข้น 0.45 และ 0.9 mg/ml สามารถต้านเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* ได้ 85.8 และ 86.6% ตามลำดับ ในขณะที่ Clindamycin ที่ความเข้มข้น 0.45 mg/ml สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียได้ 86.8% (รูปที่ 4.2) จากผลการทดสอบนี้สามารถสรุปได้ว่าสารสกัดเม็ดเลือดขาวของจระเข้สายพันธุ์ไทยสามารถต้านเชื้อ *P. acnes* ได้ นอกจากนี้ยังพบประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อระหว่างสารสกัดเม็ดเลือดขาวและยาปฏิชีวนะมีความใกล้เคียงกัน



รูปที่ 4.2 ผลการทดสอบความสามารถของสารสกัดเมล็ดเลื้อดขาวในการยับยั้งเชื้อ *P. acnes* DMST 14916

4.3 ผลการทดสอบความเป็นพิษ (cytotoxicity) ของอีโมโกลบินและสารสกัดเมล็ดเลื้อดขาวต่อเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ (RAW 264.7)

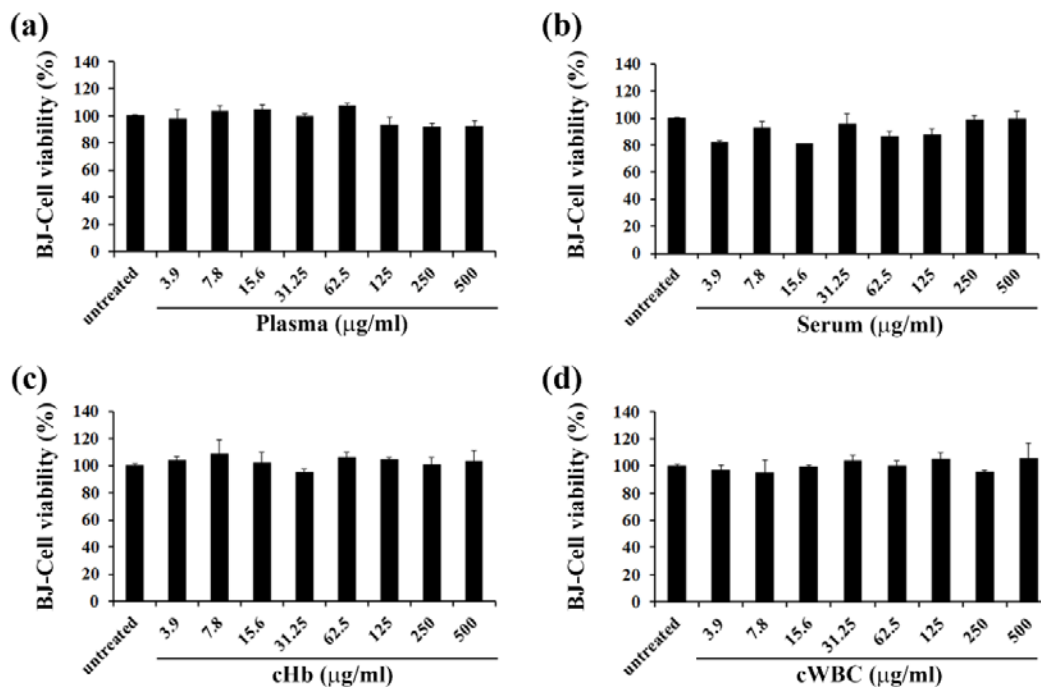
เมื่อนำอีโมโกลบินและสารสกัดเมล็ดเลื้อดขาวมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ (RAW 264.7) โดยวิธี MTT assay ผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากเลื้อดขาวจะแช่ทั้ง 2 ชนิดนั้นไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ RAW 264.7 ดังแสดงในรูปที่ 4.3 โดยจากรูปพบว่าการเจริญเติบโตของเซลล์ที่เลี้ยงร่วมกับอีโมโกลบินและสารสกัดเมล็ดเลื้อดขาว ไม่มีความแตกต่างจากเซลล์ที่เลี้ยงปกติ หรือ untreated control (100% cell viability)



รูปที่ 4.3 ผลการทดสอบความเป็นพิษ (cytotoxicity) ของฮีโมโกลบิน (cHb) และสารสกัดเม็ดเลือดขาว (cWBC) ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ (RAW 264.7)

4.4 ผลการทดสอบความเป็นพิษ (cytotoxicity) ขององค์ประกอบเลือดจระเข้ น้ำจืดสายพันธุ์ไทยต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ผิวหนังของมนุษย์ (BJ cells)

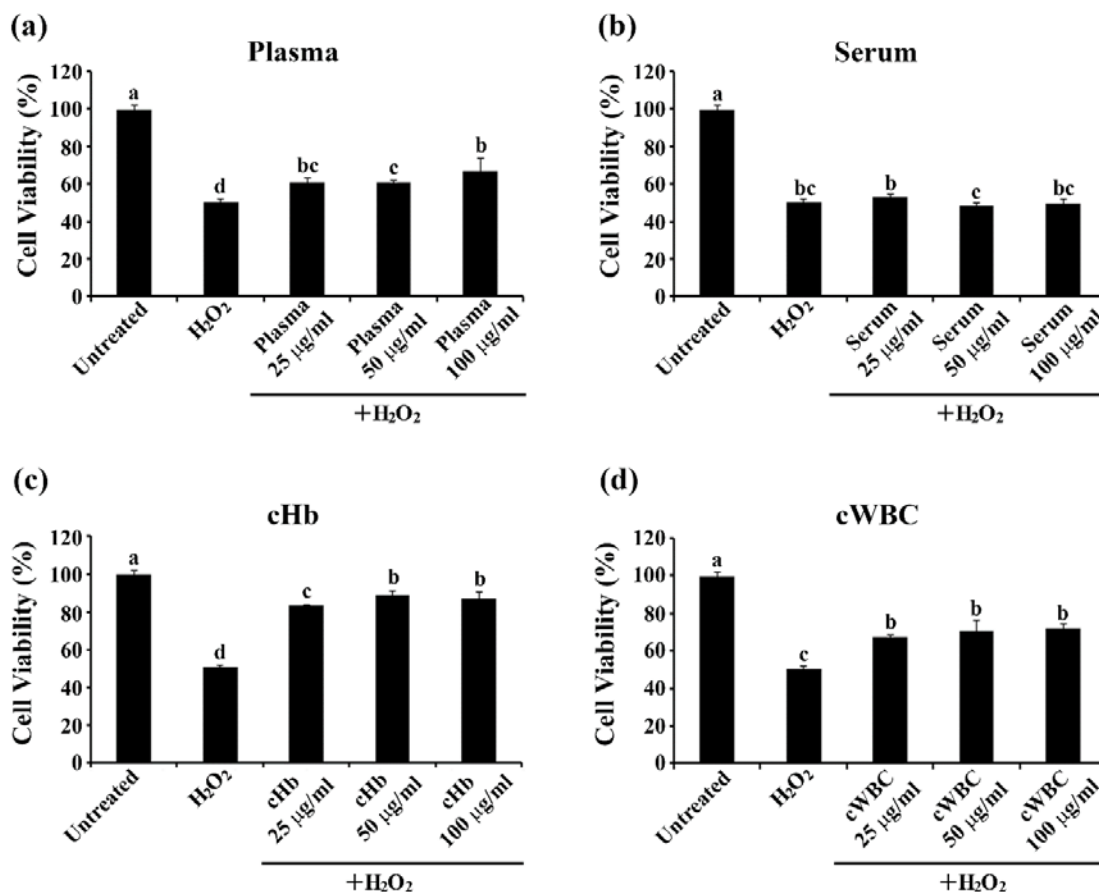
เพื่อทำการทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านภาวะเครียดออกซิเดชันของเลือดจระเข้ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ผิวหนังของมนุษย์ (BJ cells) ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย hydrogen peroxide (H_2O_2) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทดสอบเพื่อหาความเข้มข้นขององค์ประกอบของเลือดจระเข้ที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ดังกล่าว ซึ่งเมื่อทำการเลี้ยงเซลล์ BJ ร่วมกับ พลาสมา ซีรัม ฮีโมโกลบิน (cHb) และสารสกัดเม็ดเลือดขาว (cWBC) ที่ความเข้มข้น 0-500 µg/ml (เจือจางด้วยวิธี two-fold serial dilution) นั้นพบว่าองค์ประกอบจากเลือดส่วนมากไม่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ BJ อย่างไรก็ตามพบว่าซีรุ่มนั้นมีผลต่อการเจริญของเซลล์ BJ เพียงเล็กน้อย โดยทำให้เซลล์ตายมากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับซีรุ่ม (untreated group) ประมาณ 20% (รูปที่ 4.4) ดังนั้น ในการทดลองเพื่อศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านภาวะเครียดออกซิเดชันของเลือดจระเข้ต่อเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย hydrogen peroxide (H_2O_2) จึงเลือกใช้อำนาจขององค์ประกอบจากเลือดจระเข้ (พลาสมา ซีรัม ฮีโมโกลบิน และสารสกัดเม็ดเลือดขาว) ที่ความเข้มข้น 25 50 100 µg/ml ซึ่งเป็นช่วงความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ BJ



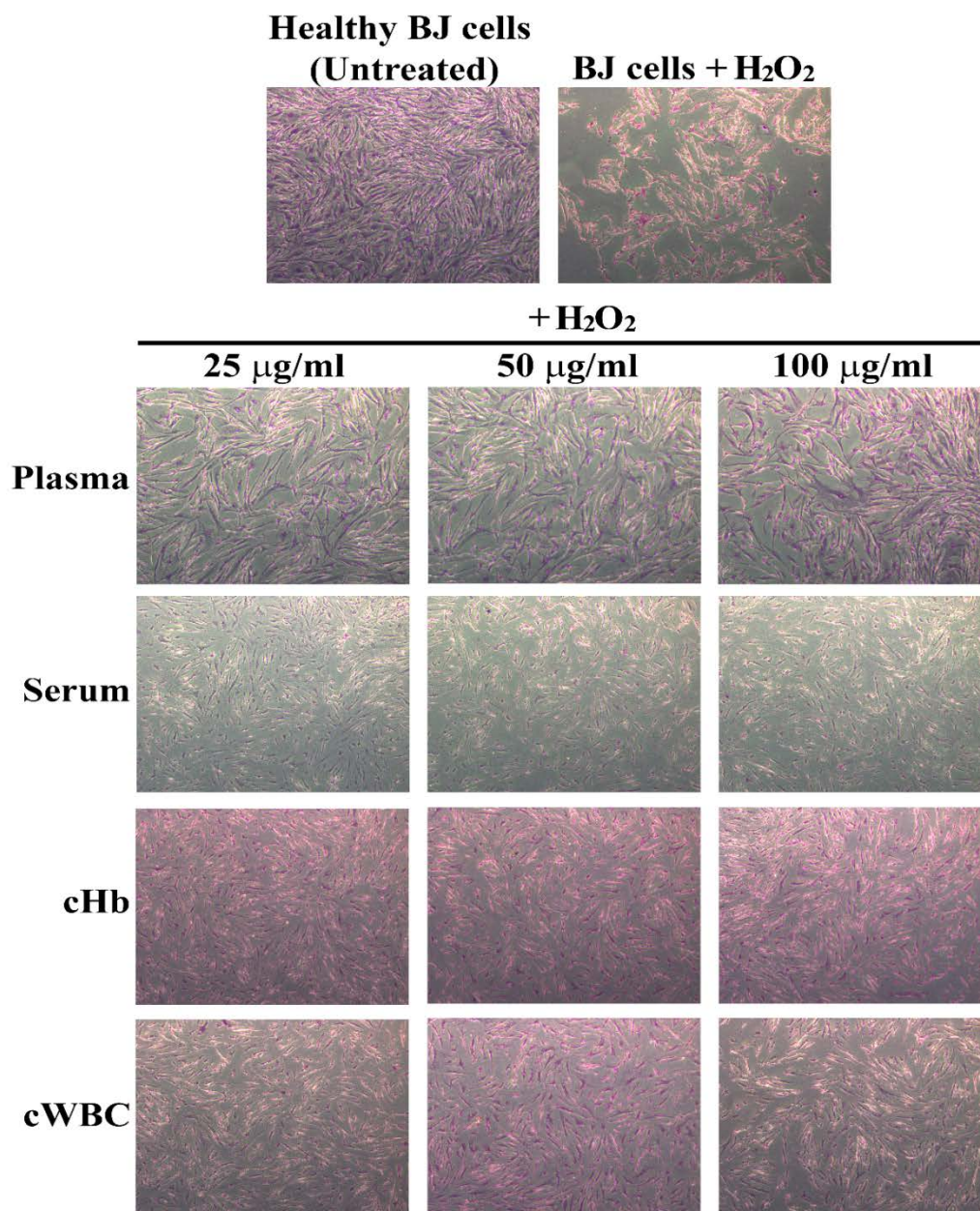
รูปที่ 4.4 ผลการทดสอบความเป็นพิษของเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทย ด้วยเทคนิค MTT assay โดยใช้เซลล์ไฟโบร بلاสต์ (BJ) ที่ความหนาแน่นเซลล์เท่ากับ 1×10^4 เซลล์/หลุม และทดสอบด้วยเลือดจระเข้ที่ความเข้มข้น 0-500 µg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค MTT assay (a) พลาสมา (b) ซีรัม (c) ฮีโมโกลบิน (cHb) และ (d) สารสกัดเม็ดเลือดขาว (cWBC) โดยผลการทดลองแสดงในรูปของค่า mean $\pm$ SD

4.5 ผลการทดสอบความสามารถของเลือดจระเข้ ในการป้องกันการเกิดความเครียดออกซิเดชันจาก H_2O_2 ในเซลล์ไฟโบร بلاสต์

จากรูปที่ 4.5 แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 500 µM สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดสภาวะเครียดออกซิเดชันในเซลล์ BJ ได้เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เติม H_2O_2 ซึ่งถือว่าเซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ 100% นอกจากนี้ยังพบ H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 500 µM ทำให้การรอดชีวิตของเซลล์ BJ ลดลงถึง 50% อย่างไรก็ตามเมื่อทำการเลี้ยงเซลล์ในสภาวะเครียดออกซิเดชันร่วมกับพลาสมา ซีรัม ฮีโมโกลบิน และสารสกัดเม็ดเลือดขาวจากเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทย พบว่าการตายของเซลล์นั้นลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้นเซลล์ที่ได้รับซีรัม โดยเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์เมื่อเลี้ยงร่วมกับพลาสมา มีค่า 60.7-66.0% ซีรัม มีค่า 48.5-52.9% ฮีโมโกลบิน มีค่า 83.4-89.0% และสารสกัดเม็ดเลือดขาว มีค่า 67.2-71.8% ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า พลาสมา ฮีโมโกลบิน และสารสกัดเม็ดเลือดขาว มีความสามารถในการป้องกันเซลล์ไฟโบร بلاสต์ผิวหนังของมนุษย์ (BJ cells) จากสภาวะเครียดออกซิเดชันได้ (รูปที่ 4.5) ซึ่งสามารถยืนยันผลการทดลองได้โดยการศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์ในสภาวะออกซิเดชันต่อเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย hydrogen peroxide (H_2O_2) ภายใต้กล้อง phase contrast inverted microscope (รูปที่ 4.6)



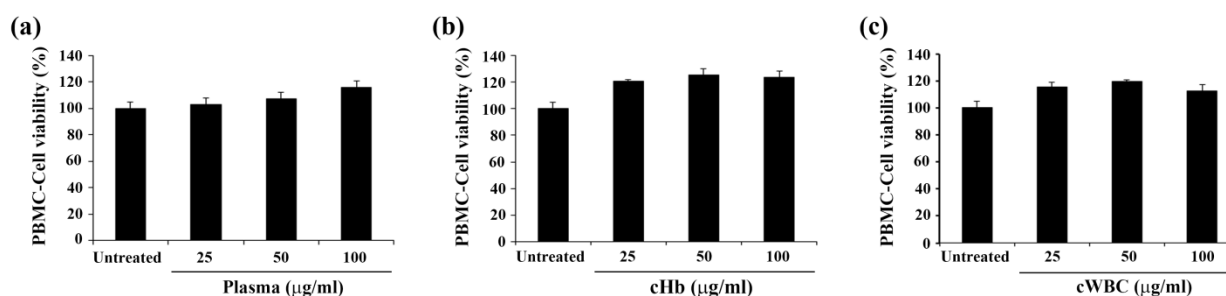
รูปที่ 4.5 ผลของเลือดกระเข้สายพันธุ์ไทยต่อการลดความเครียดออกซิเดชันที่เกิดจาก H₂O₂ (H₂O₂-stimulated oxidative stress) ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ซึ่งข้อมูลจะแสดงเป็นค่าการรอดชีวิตของเซลล์ เมื่อทดสอบด้วย H₂O₂ เพียงอย่างเดียว หรือเลี้ยงร่วมกับเลือดกระเข้สายพันธุ์ไทยในแต่ละความเข้มข้น (a) พลาสมา (b) ซีรัม (c) ฮีโมโกลบิน (cHb) และ (d) สารสกัดเม็ดเลือดขาว (cWBC) โดยผลการทดลองแสดงในรูปของค่า mean ± SD ค่าที่กำกับด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันบนแท่งกราฟคือไม่แตกต่างกันทางสถิติ และค่าที่กำกับด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันบนแท่งกราฟคือมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) โดยวิธี Analysis of Variance (ANOVA)



รูปที่ 4.6 ผลการศึกษาทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ในสภาวะเครียดออกซิเดชันที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย hydrogen peroxide (H₂O₂) ภายใต้กล้อง phase contrast inverted microscope เพื่อศึกษาผลของเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทยต่อการลดความเครียดออกซิเดชันที่เกิดขึ้น โดยการบ่มเซลล์ร่วมกับเลือดจระเข้ที่ความเข้มข้น 25 50 และ 100 µg/ml เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (pre-incubation) ก่อนทำการเติม H₂O₂

4.6 ผลการทดสอบความเป็นพิษ (cytotoxicity) ขององค์ประกอบเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทยต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์ (human peripheral blood mononuclear cell; PBMC)

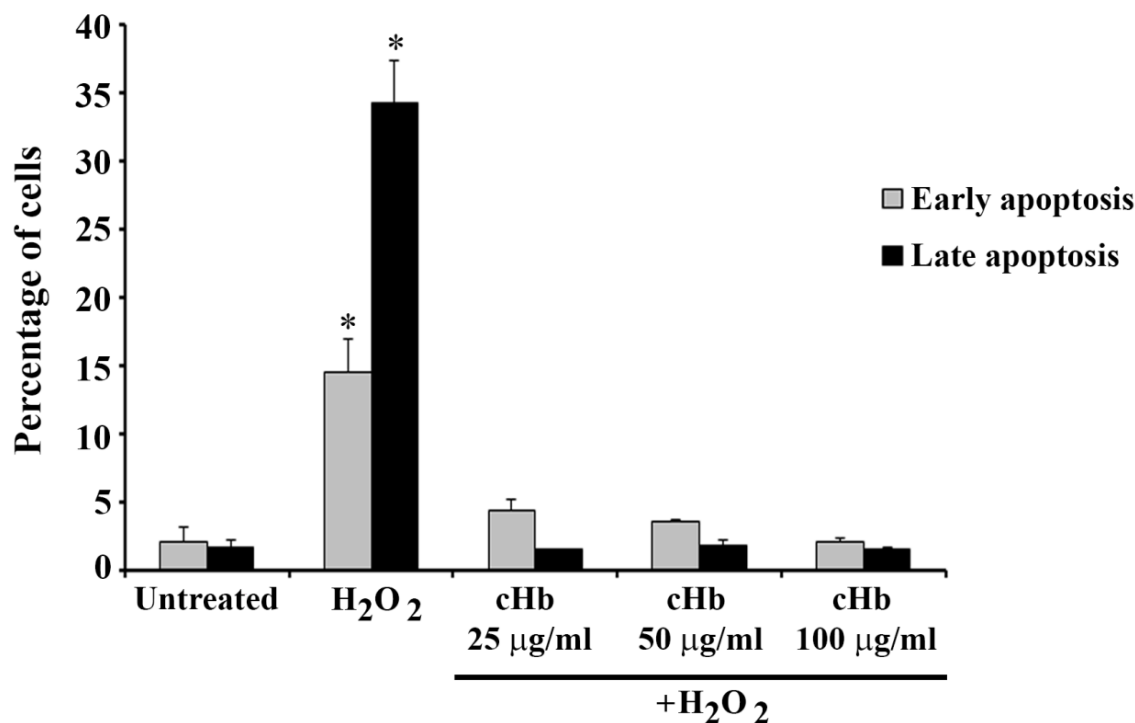
เนื่องจากซีรัมไม่มีฤทธิ์ในการป้องกันเซลล์จากสภาวะเครียดออกซิเดชัน ดังนั้นในการทดลองนี้จึงไม่นำซีรัมมาใช้ในการทดสอบ เพื่อเป็นข้อมูลในการนำไปพัฒนาใช้ต่อไป ดังนั้นจึงได้นำ พลาสมา ฮีโมโกลบิน และสารสกัดเม็ดเลือดขาวจากเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทยมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว (PBMC) ของมนุษย์ โดยผลการทดลองพบว่าองค์ประกอบของเลือดจระเข้ทั้ง 3 ชนิดที่ความเข้มข้น 25 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว (PBMC) ของมนุษย์ แสดงดังรูปที่ 4.7



รูปที่ 4.7 ผลความเป็นพิษของเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทยต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์ (PBMC) ที่แยกได้จากเลือดของมนุษย์ที่มีสุขภาพดี ด้วย Ficoll-Paque (GE Healthcare, Sweden) โดยใช้เซลล์ที่มีความหนาแน่น 2×10^5 เซลล์/หลุม (96-well plates) ทดสอบด้วยการเลี้ยงเซลล์ร่วมกับองค์ประกอบเลือดจระเข้ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน (25-100 $\mu\text{g/ml}$) หลังจากทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดสอบการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยเทคนิค MTT และคำนวณเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ PBMC ด้วยการเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงเซลล์ปกติ (untreated cell) (a) พลาสมา (b) ฮีโมโกลบิน (cHb) และ (c) สารสกัดเม็ดเลือดขาว (cWBC)

4.7 ผลของฮีโมโกลบินจากจระเข้สายพันธุ์ไทยในการป้องกันการตายแบบ apoptosis ในเซลล์ BJ ที่ได้รับสภาวะเครียดออกซิเดชัน

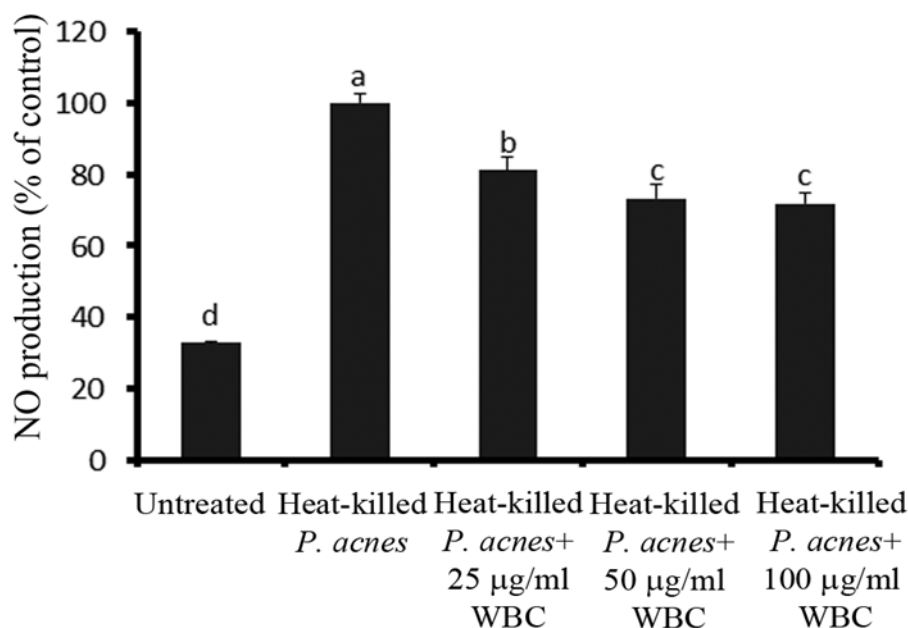
ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.8 เนื่องจากฮีโมโกลบินสามารถป้องกันเซลล์จากสภาวะเครียดออกซิเดชันได้สูงที่สุดคือ 83.4-89.0% เมื่อเทียบกับองค์ประกอบจากเลือดจระเข้ชนิดอื่นๆ (รูปที่ 4.5) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้นำเฉพาะฮีโมโกลบินมาศึกษาถึงกลไกเบื้องต้นในการป้องกันสภาวะเครียดเนื่องจากออกซิเดชันภายในเซลล์ ซึ่งพบว่าฮีโมโกลบินทั้ง 3 ความเข้มข้น (25 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$) สามารถป้องกันเซลล์จากกระบวนการ apoptosis เมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะเครียดออกซิเดชันได้



รูปที่ 4.8 ผลของฮีโมโกลบินในการป้องกันการตายแบบ apoptosis จาก H₂O₂ ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของมนุษย์ ด้วยเทคนิค Annexin V-FITC/PI flow cytometry โดยใช้เซลล์ที่มีความหนาแน่น 1×10^5 เซลล์/หลุม (12-well plates) และใช้ความเข้มข้นของฮีโมโกลบินจากจระเข้สายพันธุ์ไทยที่แตกต่างกัน (25-100 µg/ml) หลังจากเลี้ยงเซลล์ร่วมกับฮีโมโกลบินเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะทำการเติม 500 µM H₂O₂ ลงไป แล้วเลี้ยงเซลล์ต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการย้อมเซลล์ด้วย annexin V-FITC/PI โดยอัตราการเกิด apoptosis จะทำการวัดด้วยเทคนิค flow cytometry โดยผลการทดลองแสดงในรูปของค่า mean $\pm$ SD และแสดงค่าทางสถิติที่ข้อมูลมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ โดย one-way ANOVA.

4.8 ความสามารถของสารสกัดเม็ดเลือดขาวในการป้องกันการอักเสบในเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes*

เมื่อทดสอบฤทธิ์การสร้างไนตริกออกไซด์ (NO) ซึ่งเป็นสารสื่อกลางการอักเสบของสารสกัดเม็ดเลือดขาวจากเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทยพบว่า เมื่อเลี้ยง RAW 264.7 ร่วมกับ Heat-killed *P. acnes* เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ระดับของการสร้าง NO มีค่าสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่เลี้ยงปกติ (untreated cells) ซึ่งหมายถึง Heat-killed *P. acnes* กระตุ้นเซลล์ RAW 264.7 ให้เกิดการอักเสบ อย่างไรก็ตามระดับของ NO พบว่ามีค่าลดลงเมื่อทำการเลี้ยงเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นให้เกิดการอักเสบร่วมกับสารสกัดเม็ดเลือดขาวที่มีความเข้มข้น 25 50 และ 100 µg/ml ซึ่งสามารถยับยั้งการผลิต NO จากเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย Heat-killed *P. acnes* ได้ 19 27 และ 28% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะ *P. acnes* เพียงอย่างเดียว (รูปที่ 4.9)

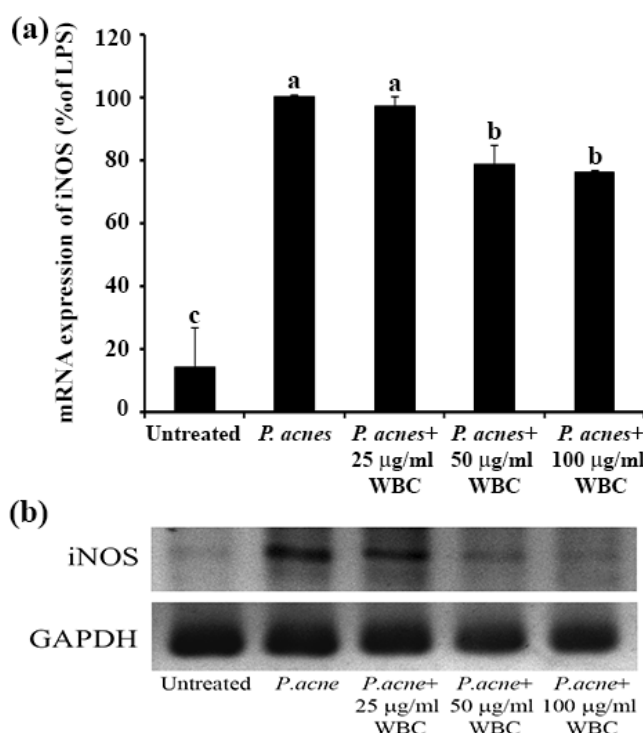


รูปที่ 4.9 ผลของสารสกัดสารสกัดเม็ดเลือดขาวต่อการสร้างไนตริกออกไซด์ (NO) ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย Heat-killed *P. acnes* (โดยแสดงในรูปค่าเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการสร้างไนตริกออกไซด์ ซึ่งให้กลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย Heat-killed *P. acnes* มีปริมาณไนตริกออกไซด์เป็น 100%) ค่าที่กำกับด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันบนแท่งกราฟคือไม่แตกต่างกันทางสถิติ และค่าที่กำกับด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันบนแท่งกราฟคือมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) โดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA)

4.9 ผลของสารสกัดเม็ดเลือดขาวต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบที่ถูกกระตุ้นด้วย *P. acnes*

การศึกษาระดับการแสดงออกของยีนด้วยวิธี Semiquantitative RT-PCR นั้น ทำได้โดยการเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย Heat-killed *P. acnes* อย่างเดียว หรือ ได้รับ Heat-killed *P. acnes* ร่วมกับสารสกัดเม็ดเลือดขาวความเข้มข้น 25 50 และ 100 µg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการสกัด RNA จากเซลล์ RAW 264.7 เพื่อนำมาวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน ผลการทดลองพบว่า พบการแสดงออกของยีน GAPDH (ขนาด 212 bp) ซึ่งเป็นยีนควบคุม (housekeeping gene) ในทุกกลุ่มการทดลอง โดยมีระดับการแสดงออกที่ใกล้เคียงกัน และพบว่าการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ มีแถบ PCR product ตรงกับขนาดที่ต้องการ เมื่อเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน และเมื่อเปรียบเทียบ PCR product กับยีนควบคุม พบว่ามี 4 ยีนที่มีระดับแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเลี้ยง RAW 264.7 ร่วมกับ Heat-killed *P. acnes* เพียงอย่าง คือ Inducible nitric oxide synthase (iNOS), Interleukin 6 (IL-6), Interleukin 1β (IL-1β) และ Tumor necrosis factor-α (TNF-α) อย่างไรก็ตามพบว่ายีนเหล่านี้มีระดับการแสดงออกที่ลดลงเมื่อได้รับสารสกัดเม็ดเลือดขาวจากเลือดกระซังสายพันธุ์ไทยที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

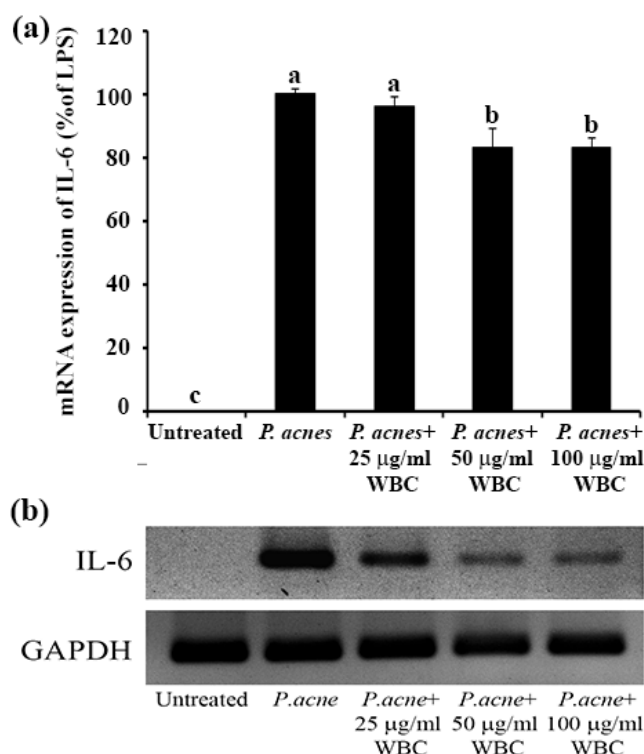
4.9.1 ระดับการแสดงออกของยีน iNOS จากผลการทดลองพบว่า เซลล์ที่ไม่ได้กระตุ้นด้วย Heat-killed *P. acnes* (untreated) พบการแสดงออกของยีน iNOS ในระดับต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่นๆ ในทางตรงกันข้ามกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วย Heat-killed *P. acnes* อย่างเดียว พบว่ามีการแสดงออกของยีน iNOS ในปริมาณสูงที่สุด โดยเมื่อคิดเปรียบเทียบระดับของการแสดงออกของยีน iNOS ในกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย Heat-killed *P. acnes* เป็น 100% พบว่าในกลุ่มที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย Heat-killed *P. acnes* ร่วมกับสารสกัดเม็ดเลือดขาวที่ความเข้มข้น 25 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ สารสกัดเม็ดเลือดขาวสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน iNOS ได้ 18 24 และ 28% ตามลำดับ (รูปที่ 4.10)



รูปที่ 4.10 (a) คือกราฟแท่งแสดงผลของสารสกัดเม็ดเลือดขาวต่อการสร้าง iNOS ในเซลล์แมคโครฟาจสายพันธุ์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย Heat-killed *P. acnes* และ (b) คือ ผล RT-PCR ของยีน iNOS เปรียบเทียบกับ GAPDH ค่าที่กำกับด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันบนแท่งกราฟคือไม่แตกต่างกันทางสถิติ และค่าที่กำกับด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันบนแท่งกราฟคือมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) โดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA)

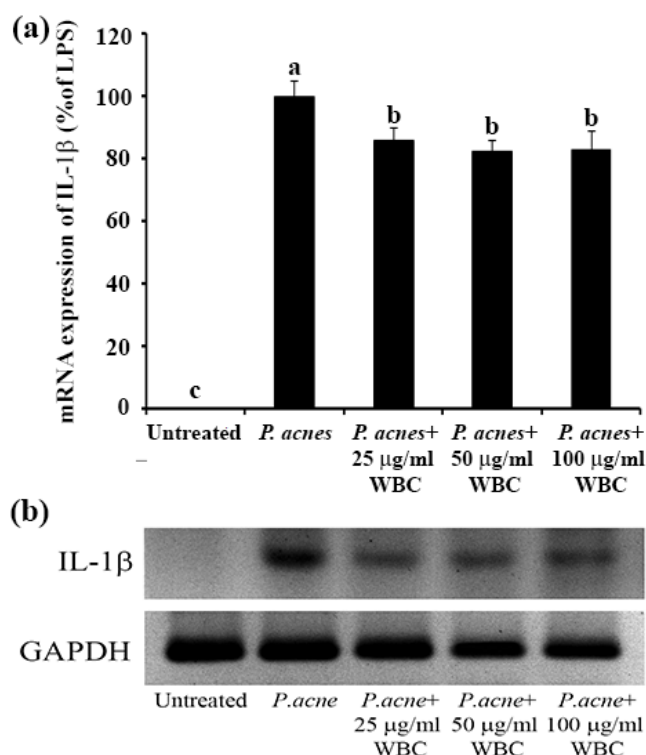
4.9.2 ระดับการแสดงออกของยีน IL-6 จากผลการทดลองพบว่า เซลล์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วย Heat-killed *P. acnes* (untreated) พบการแสดงออกของยีน IL-6 ในระดับต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่นๆ ในทางตรงกันข้าม กลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วย Heat-killed *P. acnes* อย่างเดียว พบว่ามีการแสดงออกของยีน IL-6 ในปริมาณสูงที่สุด โดยเมื่อคิดเปรียบเทียบระดับของการแสดงออกของยีน IL-6 ในกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย Heat-killed *P. acnes* เป็น 100% พบว่าในกลุ่มที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย Heat-killed *P. acnes* ร่วมกับสารสกัด

เม็ดเลือดขาวที่ความเข้มข้น 25 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ สารสกัดเม็ดเลือดขาวสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน IL-6 ได้ 33 35 และ 46% ตามลำดับ (รูปที่ 4.11)



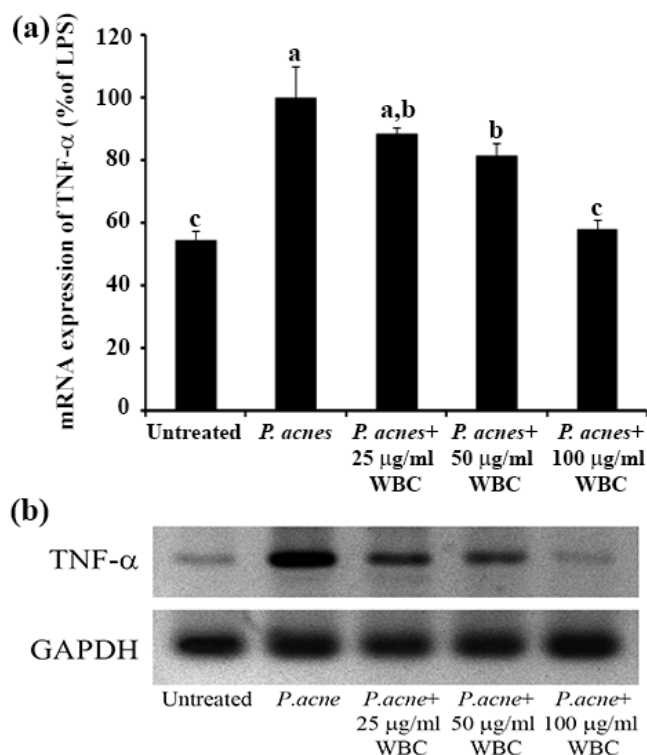
รูปที่ 4.11 (a) คือ กราฟแท่งแสดงผลของสารสกัดเม็ดเลือดขาวต่อการสร้าง IL-6 ในเซลล์แมคโครฟาจสายพันธุ์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร Heat-killed *P. acnes* และ (b) คือ ผลของ RT-PCR ของยีน IL-6 เปรียบเทียบกับ GAPDH ค่าที่กำกับด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันบนแท่งกราฟคือไม่แตกต่างกันทางสถิติ และค่าที่กำกับด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันบนแท่งกราฟคือมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) โดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA)

4.9.3 ระดับการแสดงออกของยีน IL-1 β พบว่า เซลล์ที่ไม่ได้กระตุ้นด้วยสาร Heat-killed *P. acnes* (untreated) พบการแสดงออกของยีน IL-1 β ในระดับต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่นๆ ในทางตรงกันข้าม กลุ่มควบคุมที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสาร Heat-killed *P. acnes* อย่างเดียว พบว่าการแสดงออกของยีน IL-1 β ในปริมาณสูงที่สุด โดยเมื่อคิดเปรียบเทียบระดับของการแสดงออกของยีน IL-1 β ในกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย Heat-killed *P. acnes* เป็น 100% พบว่าในกลุ่มที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย Heat-killed *P. acnes* ร่วมกับสารสกัดเม็ดเลือดขาวที่ความเข้มข้น 25 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ สารสกัดเม็ดเลือดขาวสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน IL-1 β ได้ 33 36 และ 41% ตามลำดับ (รูปที่ 4.12)



รูปที่ 4.12 กราฟแท่งแสดงผลของสารสกัดเม็ดเลือดขาวต่อการสร้าง IL-1β ในเซลล์แมคโครฟาจสายพันธุ์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร Heat-killed *P. acnes* (a) และ (b) ผลของ RT-PCR ของยีน IL-1β เปรียบเทียบกับ GAPDH ค่าที่กำกับด้วยอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกันบนแท่งกราฟคือไม่แตกต่างกันทางสถิติ และค่าที่กำกับด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันบนแท่งกราฟคือมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) โดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA)

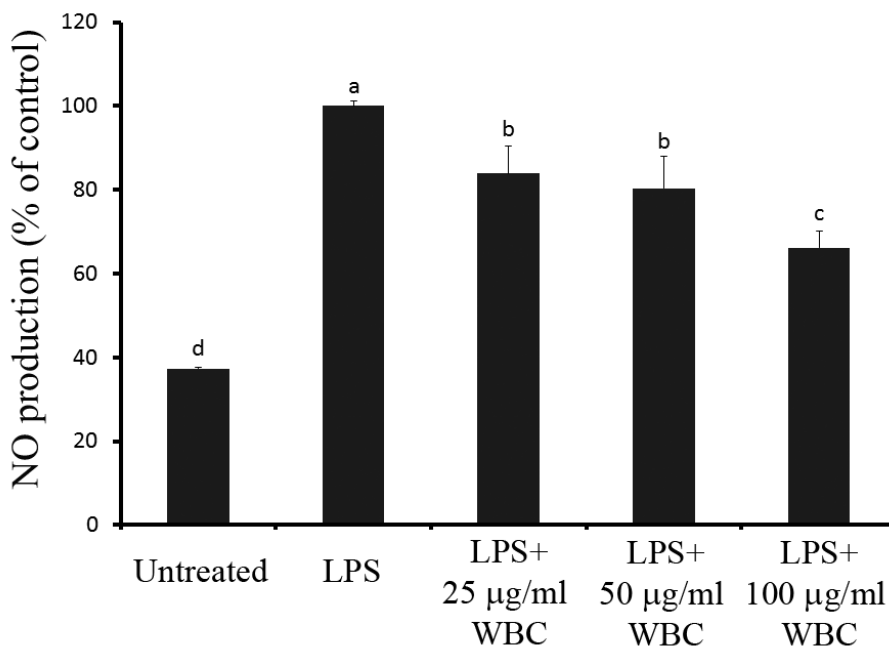
4.9.4 ระดับการแสดงออกของยีน TNF-α จากผลการทดลองพบว่า เซลล์ที่ไม่ได้กระตุ้นด้วยสาร Heat-killed *P. acnes* (untreated) พบการแสดงออกของยีน TNF-α ในระดับต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่นๆ ในทางตรงกันข้าม กลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสาร Heat-killed *P. acnes* เพียงอย่างเดียว พบว่ามีการแสดงออกของยีน TNF-α ในปริมาณสูงที่สุด โดยเมื่อคิดเปรียบเทียบระดับของการแสดงออกของยีน TNF-α ในกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย Heat-killed *P. acnes* เป็น 100% พบว่าในกลุ่มที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย Heat-killed *P. acnes* ร่วมกับสารสกัดเม็ดเลือดขาวที่ความเข้มข้น 25 50 และ 100 μg/ml สารสกัดเม็ดเลือดขาวสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน TNF-α ได้ 14 17 และ 53% ตามลำดับ (รูปที่ 4.13)



รูปที่ 4.13 (a) คือ กราฟแท่งแสดงผลของสารสกัดเม็ดเลือดขาวต่อการสร้าง TNF- α ในเซลล์แมคโครฟาจสายพันธุ์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร Heat-killed *P. acnes* และ (b) คือ ผลของ RT-PCR ของยีน TNF- α เปรียบเทียบกับ GAPDH ค่าที่กำกับด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันบนแท่งกราฟคือไม่แตกต่างกันทางสถิติ และค่าที่กำกับด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันบนแท่งกราฟคือมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) โดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA)

4.10 ความสามารถของสารสกัดเม็ดเลือดขาวในการป้องกันการอักเสบในเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย Lipopolysaccharide (LPS)

เมื่อทดสอบฤทธิ์การสร้าง NO ของสารสกัดเม็ดเลือดขาว หลังจาก 24 ชั่วโมงที่ RAW 264.7 ถูกกระตุ้นการสร้าง NO ด้วย LPS แล้วทำการวิเคราะห์ NO ด้วยวิธี Nitric oxide assay พบว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่เลี้ยงปกติ (untreated cells) ระดับการสร้าง NO ในกลุ่มที่เลี้ยงเซลล์ร่วมกับ LPS เพียงอย่างเดียว มีค่าสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งหมายถึง LPS กระตุ้นเซลล์ RAW 264.7 ให้เกิดการอักเสบ อย่างไรก็ตามระดับของ NO พบว่ามีค่าลดลงเมื่อทำการเลี้ยงเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นให้เกิดการอักเสบร่วมกับสารสกัดเม็ดเลือดขาวที่ความเข้มข้น 25 50 และ 100 µg/ml ซึ่งสามารถยับยั้งการสร้าง NO ได้ 16 20 และ 34% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะ LPS เพียงอย่างเดียว (รูปที่ 4.14)



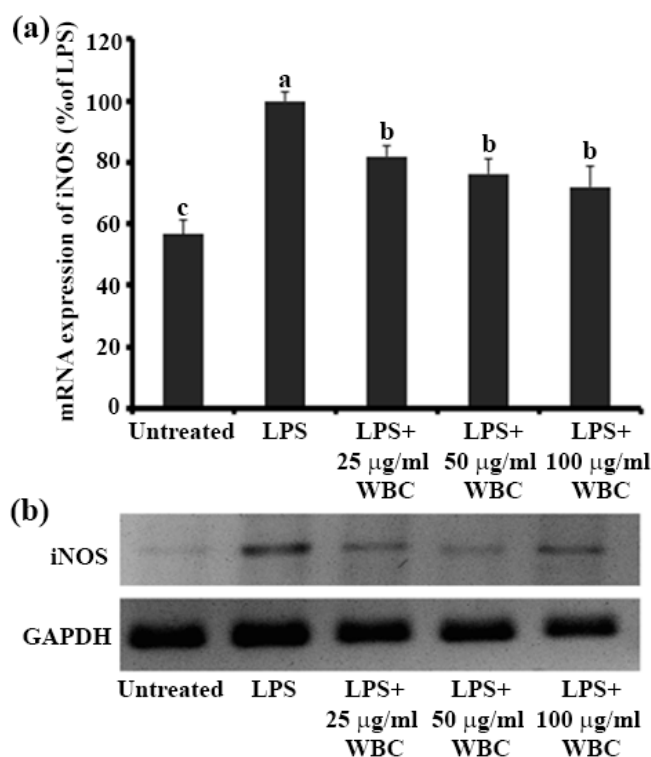
รูปที่ 4.14 ผลของสารสกัดเม็ดเลือดขาวต่อการสร้างไนตริกออกไซด์ (NO) ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร LPS (โดยแสดงในรูปค่าเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการสร้างไนตริกออกไซด์ ให้กลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS มีปริมาณไนตริกออกไซด์เป็น 100%) ค่าที่กำกับด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันบนแท่งกราฟคือไม่แตกต่างกันทางสถิติ และค่าที่กำกับด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันบนแท่งกราฟคือมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) โดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA)

4.11 ผลของสารสกัดเม็ดเลือดขาวต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบที่ถูกกระตุ้นด้วย Lipopolysaccharide (LPS)

การศึกษาระดับการแสดงออกของยีนด้วยวิธี Semiquantitative RT-PCR นั้น ทำได้โดยการเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 แล้วกระตุ้นด้วย LPS อย่างเดียว หรือ ได้รับ LPS ร่วมกับสารสกัดเม็ดเลือดขาวความเข้มข้น 25 50 และ 100 µg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการสกัด RNA จากเซลล์ RAW 264.7 เพื่อนำมาวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า พบการแสดงออกของยีน GAPDH (ขนาด 212 bp) ซึ่งเป็นยีนควบคุม (housekeeping gene) ในทุกกลุ่มการทดลอง โดยมีระดับการแสดงออกที่ใกล้เคียงกัน และพบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบมีแถบ PCR product ตรงกับขนาดที่ต้องการ เมื่อเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน และเมื่อเปรียบเทียบ PCR product กับยีนควบคุมพบว่า มี 4 ยีนที่มีระดับแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเลี้ยง RAW 264.7 ร่วมกับ LPS คือ Inducible nitric oxide synthase (iNOS), Interleukin 6 (IL-6), Interleukin 1β (IL-1β) และ Tumor necrosis factor-α (TNF-α) อย่างไรก็ตามพบว่า ยีนเหล่านี้มีระดับการแสดงออกที่ลดลงเมื่อได้รับสารสกัดเม็ดเลือดขาวจากเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทยที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

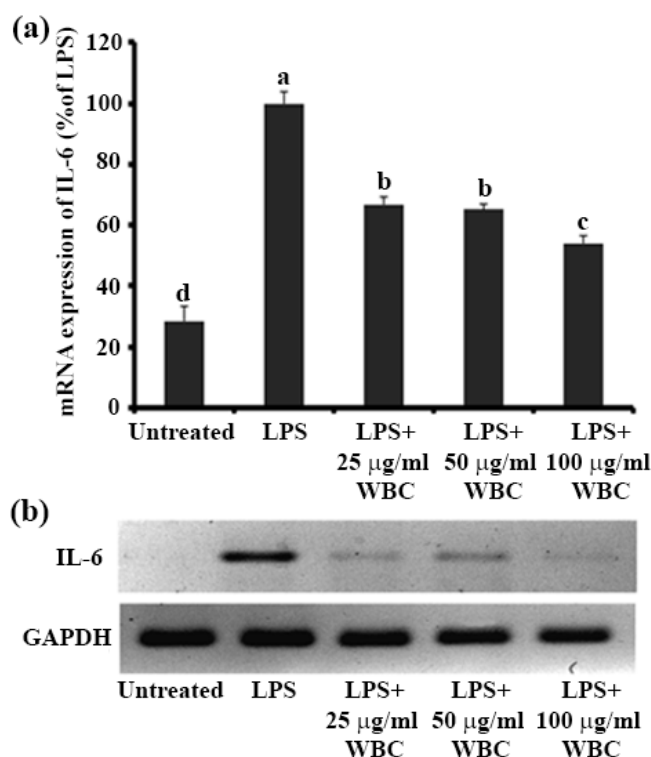
4.11.1 ระดับการแสดงออกของยีน iNOS จากผลการทดลองพบว่า เซลล์ที่ไม่ได้กระตุ้นด้วยสาร LPS (untreated) พบการแสดงออกของยีน iNOS ในระดับต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่นๆ ในทางตรงกันข้ามกลุ่มที่

ได้รับการกระตุ้นด้วยสาร LPS อย่างเดียว พบว่ามีการแสดงออกของยีน iNOS ในปริมาณสูงที่สุด โดยเมื่อคิดเปรียบเทียบระดับของการแสดงออกของยีน iNOS ในกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เป็น 100% พบว่าในกลุ่มที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย LPS ร่วมกับสารสกัดเม็ดเลือดขาวที่ความเข้มข้น 25 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ สารสกัดเม็ดเลือดขาวสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน iNOS ได้ 18 24 และ 28% ตามลำดับ (รูปที่ 4.15)



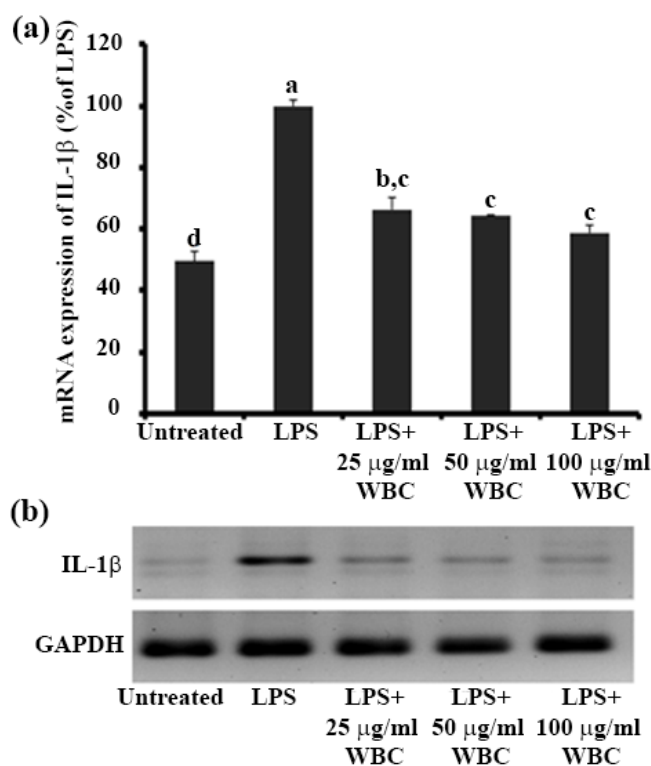
รูปที่ 4.15 (a) คือ กราฟแท่งแสดงผลของสารสกัดเม็ดเลือดขาวต่อการสร้าง iNOS ในเซลล์แมคโครฟาจสายพันธุ์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร LPS และ (b) คือ ผล RT-PCR ของยีน iNOS เปรียบเทียบกับ GAPDH ค่าที่กำกับด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันบนแท่งกราฟคือไม่แตกต่างกันทางสถิติ และค่าที่กำกับด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันบนแท่งกราฟคือมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) โดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA)

4.11.2 ระดับการแสดงออกของยีน IL-6 จากผลการทดลองพบว่า เซลล์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วยสาร LPS (untreated) พบการแสดงออกของยีน IL-6 ในระดับต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่นๆ ในทางตรงกันข้าม กลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสาร LPS อย่างเดียว พบว่ามีการแสดงออกของยีน IL-6 ในปริมาณสูงที่สุด โดยเมื่อคิดเปรียบเทียบระดับของการแสดงออกของยีน IL-6 ในกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เป็น 100% พบว่าในกลุ่มที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย LPS ร่วมกับสารสกัดเม็ดเลือดขาวที่ความเข้มข้น 25 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ สารสกัดเม็ดเลือดขาวสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน IL-6 ได้ 33 35 และ 46% ตามลำดับ (รูปที่ 4.16)



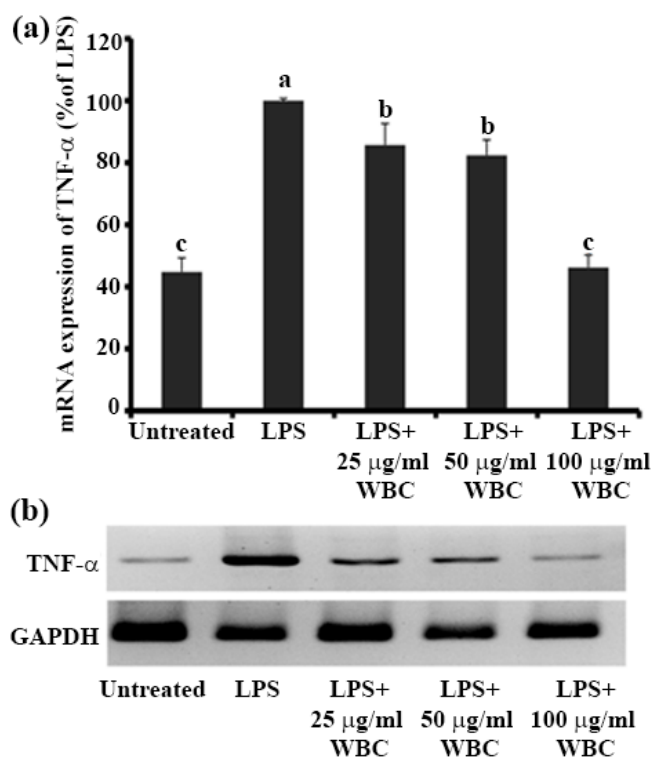
รูปที่ 4.16 (a) คือ กราฟแท่งแสดงผลของสารสกัดเม็ดเลือดขาวต่อการสร้าง IL-6 ในเซลล์แมคโครฟาจสายพันธุ์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร LPS และ (b) คือ ผลของ RT-PCR ของยีน IL-6 เปรียบเทียบกับ GAPDH ค่าที่กำกับด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันบนแท่งกราฟคือไม่แตกต่างกันทางสถิติ และค่าที่กำกับด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันบนแท่งกราฟคือมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) โดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA)

4.11.3 ระดับการแสดงออกของยีน IL-1 β จากผลการทดลองพบว่า เซลล์ที่ไม่ได้กระตุ้นด้วยสาร LPS (untreated) พบการแสดงออกของยีน IL-1 β ในระดับต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่นๆ ในทางตรงกันข้าม กลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสาร LPS อย่างเดียว พบว่ามีการแสดงออกของยีน IL-1 β ในปริมาณสูงที่สุด โดยเมื่อคิดเปรียบเทียบระดับของการแสดงออกของยีน IL-1 β ในกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เป็น 100% พบว่าในกลุ่มที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย LPS ร่วมกับสารสกัดเม็ดเลือดขาวที่ความเข้มข้น 25 50 และ 100 µg/ml สารสกัดเม็ดเลือดขาวสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน IL-1 β ได้ 33 36 และ 41% ตามลำดับ (รูปที่ 4.17)



รูปที่ 4.17 (a) คือ กราฟแท่งแสดงผลของสารสกัดเม็ดเลือดขาวต่อการสร้าง IL-1 β ในเซลล์แมคโครฟาจสายพันธุ์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร LPS และ (b) คือ ผลของ RT-PCR ของยีน IL-1 β เปรียบเทียบกับ GAPDH ค่าที่กำกับด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันบนแท่งกราฟคือไม่แตกต่างกันทางสถิติ และค่าที่กำกับด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันบนแท่งกราฟคือมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) โดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA)

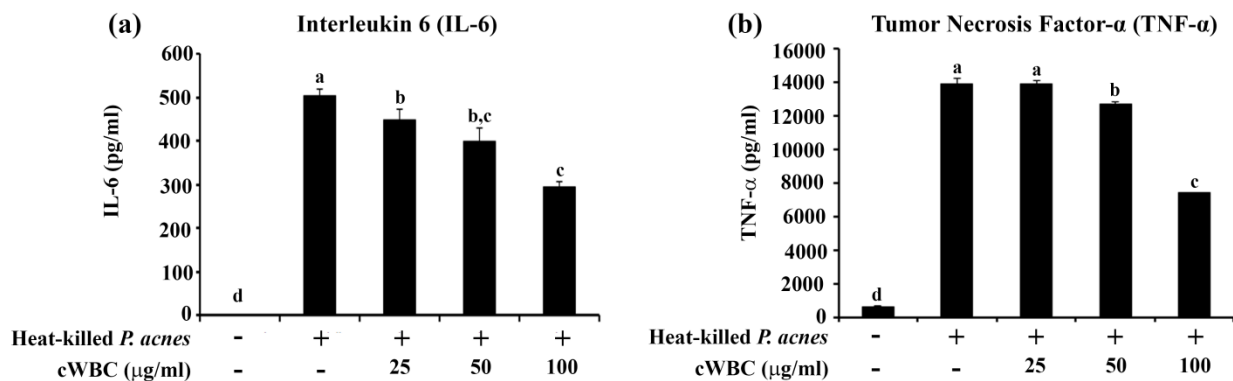
4.11.4 ระดับการแสดงออกของยีน TNF- α จากผลการทดลองพบว่า เซลล์ที่ไม่ได้กระตุ้นด้วยสาร LPS (untreated) พบการแสดงออกของยีน TNF- α ในระดับต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่นๆ ในทางตรงกันข้าม กลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสาร LPS เพียงอย่างเดียว พบว่าการแสดงออกของยีน TNF- α ในปริมาณสูงที่สุด โดยเมื่อคิดเปรียบเทียบระดับของการแสดงออกของยีน TNF- α ในกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เป็น 100% พบว่าในกลุ่มที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย LPS ร่วมกับสารสกัดเม็ดเลือดขาวที่ความเข้มข้น 25 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ สารสกัดเม็ดเลือดขาวสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน TNF- α ได้ 14 17 และ 53% ตามลำดับ (รูปที่ 4.18)



รูปที่ 4.18 (a) คือ กราฟแท่งแสดงผลของสารสกัดเม็ดเลือดขาวต่อการสร้าง TNF- α ในเซลล์แมคโครฟาจสายพันธุ์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร LPS และ (b) คือ ผลของ RT-PCR ของยีน TNF- α เปรียบเทียบกับ GAPDH ค่าที่กำกับด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันบนแท่งกราฟคือไม่แตกต่างกันทางสถิติ และค่าที่กำกับด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันบนแท่งกราฟคือมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) โดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA)

4.12 ผลของสารสกัดเม็ดเลือดขาวจากกระชี่น้ำจืดสายพันธุ์ไทยต่อ pro-inflammatory cytokines เมื่อเซลล์ RAW 264.7 ถูกกระตุ้นด้วย *P. acnes*

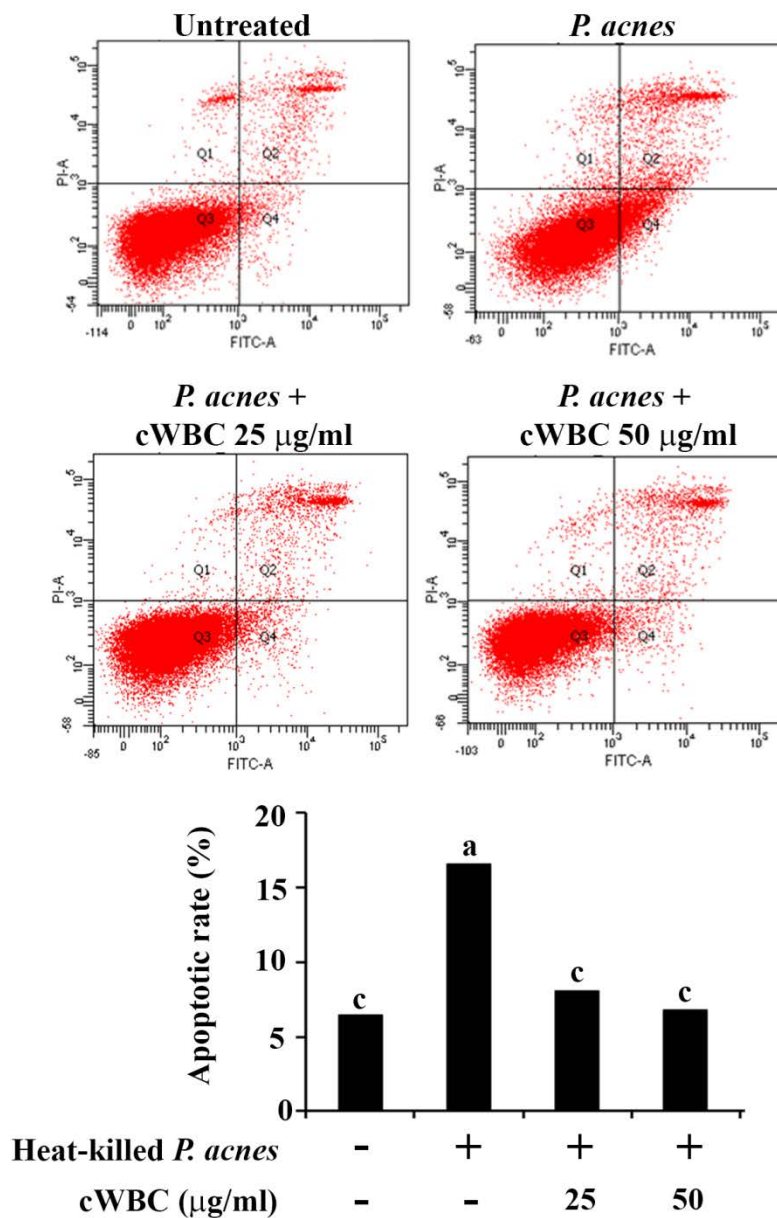
ผลจากการเหนี่ยวนำการอักเสบด้วย Heat-kill *P. acnes* และทดสอบด้วยสารสกัดเม็ดเลือดขาวจากกระชี่สายพันธุ์ไทยพบว่า *P. acnes* กระตุ้นการสร้างระดับของ pro-inflammatory cytokines ทั้ง IL-6 และ TNF- α ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่เลี้ยงตามปกติ (untreated cells) อย่างไรก็ตามเมื่อทำการเลี้ยงเซลล์ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบร่วมกับสารสกัดเม็ดเลือดขาวที่ความเข้มข้น 25 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าสารสกัดเม็ดเลือดขาวสามารถลดระดับของ IL-6 และ TNF- α ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบว่าสารสกัดเม็ดเลือดขาวที่ความเข้มข้นสูงสุด (100 $\mu\text{g/ml}$) สามารถลดระดับ IL-6 ได้ถึง 42% และสามารถลดระดับ TNF- α ได้ถึง 47% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่กระตุ้นการอักเสบด้วย Heat-kill *P. acnes* (รูปที่ 4.19)



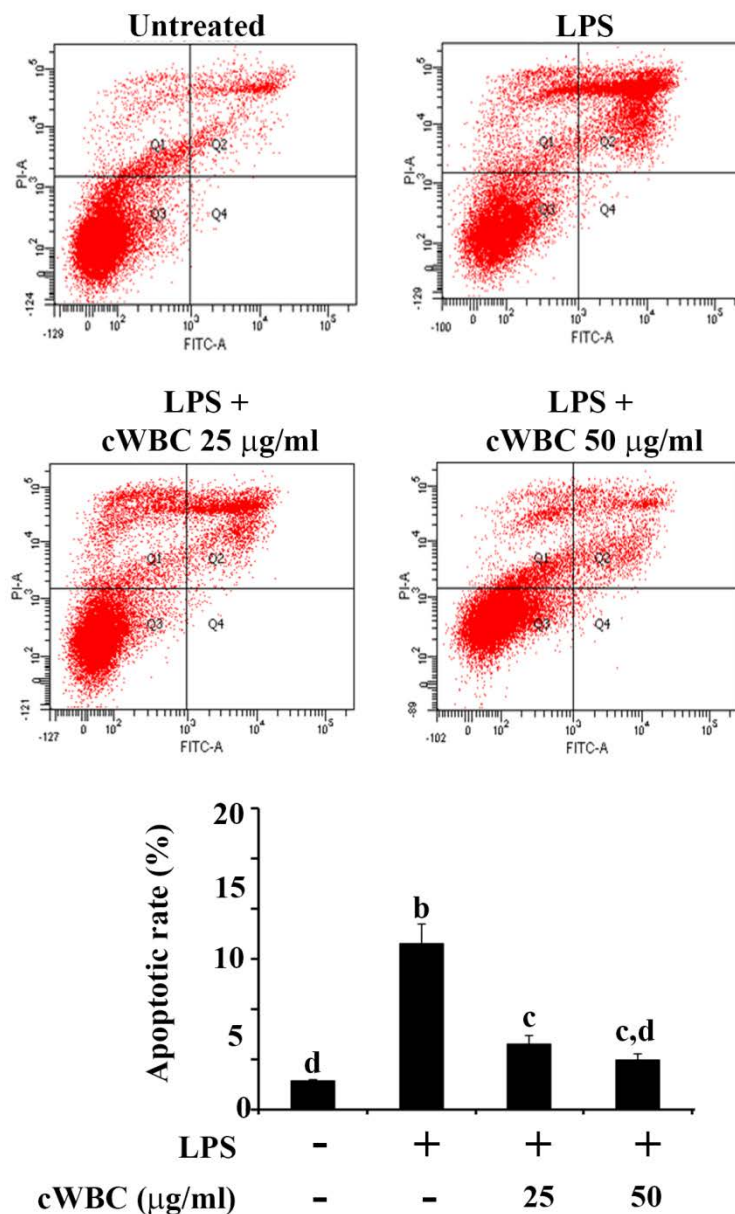
รูปที่ 4.19 ผลของสารสกัดเม็ดเลือดขาวจากจระเข้สายพันธุ์ไทย (cWBC) ต่อระดับ IL-6 (a) และ TNF- α (b) ใน RAW 264.7 ค่าที่กำกับด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันบนแท่งกราฟคือไม่แตกต่างกันทางสถิติ และค่าที่กำกับด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันบนแท่งกราฟคือมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) โดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA)

4.13 ผลของสารสกัดเม็ดเลือดขาวจากจระเข้น้ำจืดสายพันธุ์ไทยในการป้องกันการตายแบบ apoptosis ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นการอักเสบ

ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.20 และ 4.21 ซึ่งพบว่าสารสกัดเม็ดเลือดขาวจากเลือดจระเข้น้ำจืดสายพันธุ์ไทยทั้ง 2 ความเข้มข้น (25 และ 50 $\mu\text{g/ml}$) สามารถป้องกันเซลล์จากกระบวนการ apoptosis เพื่อเซลล์ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย *P. acnes* (รูปที่ 4.20) และ LPS (รูปที่ 4.21) ได้ โดยพบว่าสารสกัดเม็ดเลือดขาวที่ความเข้มข้นสูงสุด (50 $\mu\text{g/ml}$) สามารถลดระดับการตายแบบ apoptosis ในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นการอักเสบด้วย *P. acnes* ได้ถึง 59% และสามารถลดระดับการตายแบบ apoptosis ในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นการอักเสบด้วย LPS ได้ถึง 74%



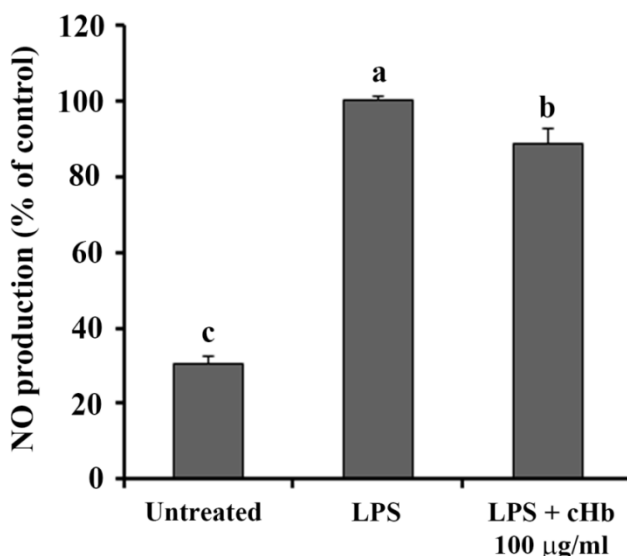
รูปที่ 4.20 ผลของสารสกัดเม็ดเลือดขาวในการป้องกันการตายแบบ apoptosis จากการอักเสบที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยเชื้อ *P. acnes* ในเซลล์ RAW 264.7 ด้วยเทคนิค Annexin V-FITC/PI flow cytometry โดยใช้เซลล์ที่มีความหนาแน่น 1×10^5 เซลล์/หลุม (12-well plates) และใช้ความเข้มข้นของสารสกัดเม็ดเลือดขาวจากกระชี่สายพันธุ์ไทยที่แตกต่างกัน (25 และ 50 µg/ml) ค่าที่กำกับด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันบนแท่งกราฟคือไม่แตกต่างกันทางสถิติ และค่าที่กำกับด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันบนแท่งกราฟคือมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) โดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA)



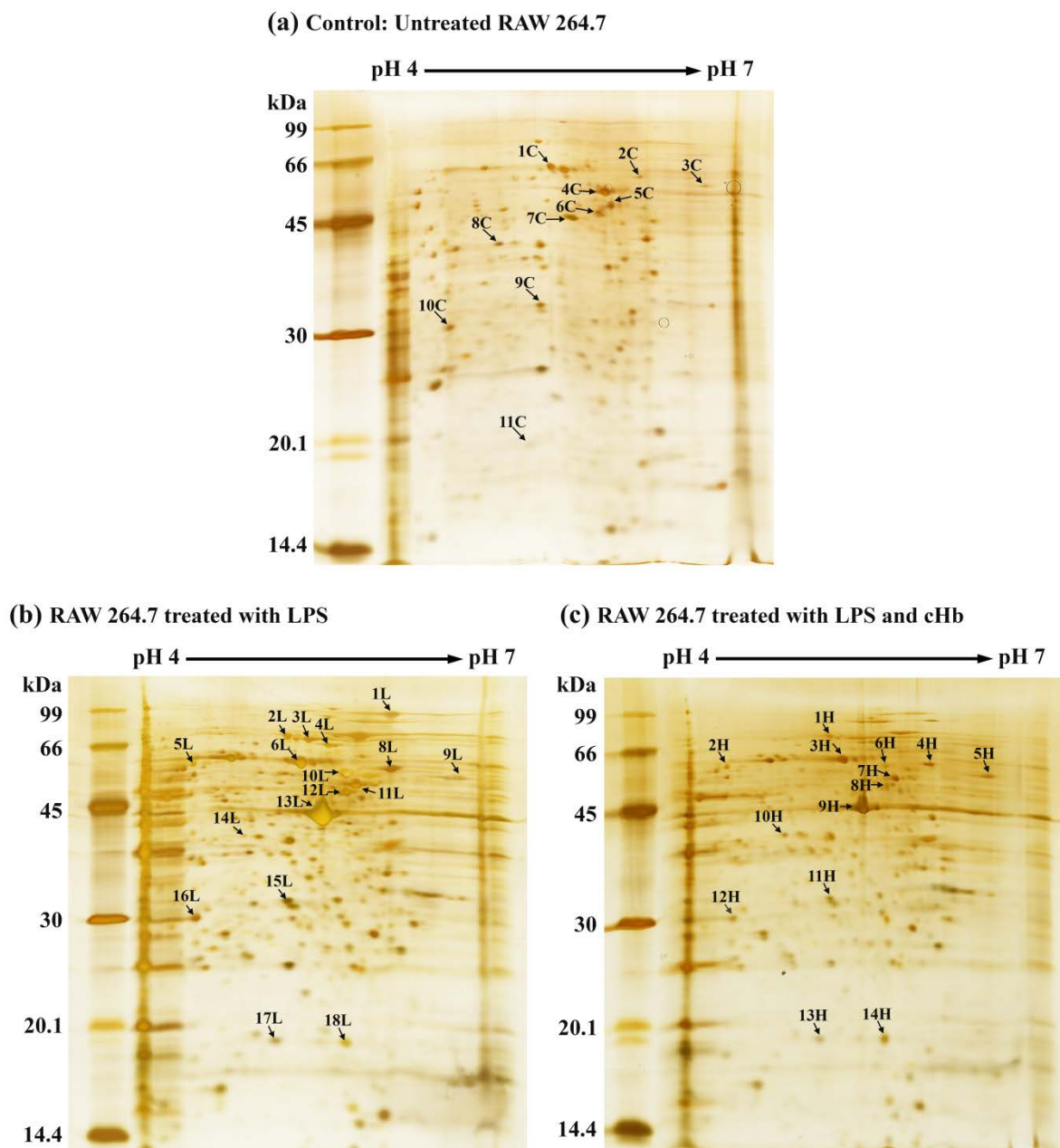
รูปที่ 4.21 ผลของสารสกัดเมล็ดเลื้อดขาวในการป้องกันการตายแบบ apoptosis จากการอักเสบที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยเชื้อ LPS ในเซลล์ RAW 264.7 ด้วยเทคนิค Annexin V-FITC/PI flow cytometry โดยใช้เซลล์ที่มีความหนาแน่น 1×10^5 เซลล์/หลุม (12-well plates) และใช้ความเข้มข้นของสารสกัดเมล็ดเลื้อดขาวจากกระเจี๊ยบฝักรูปไทยที่แตกต่างกัน (25 และ 50 µg/ml) ค่าที่กำกับด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันบนแท่งกราฟคือไม่แตกต่างกันทางสถิติ และค่าที่กำกับด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันบนแท่งกราฟคือมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) โดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA)

4.14 ผลของการศึกษาแบบแผนโปรตีนจาก RAW 264.7 เมื่อได้รับการอักเสบจากการกระตุ้นด้วย LPS ร่วมกับ ฮีโมโกลบินจากเลือดกระซังไทยด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ (proteomics)

เมื่อทดสอบฤทธิ์การสร้าง NO ของสารฮีโมโกลบินหลังจาก 24 ชั่วโมงที่ RAW 264.7 ถูกกระตุ้นการสร้าง NO ด้วย LPS แล้วทำการวิเคราะห์ NO ด้วยวิธี Nitric oxide assay พบว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่เลี้ยงปกติ (untreated cells) ระดับการสร้าง NO ในกลุ่มที่เลี้ยงเซลล์ร่วมกับ LPS เพียงอย่างเดียว มีค่าสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งหมายถึง LPS กระตุ้นเซลล์ RAW 264.7 ให้เกิดการอักเสบ อย่างไรก็ตามระดับของ NO พบว่ามีค่าลดลงเมื่อทำการเลี้ยงเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นให้เกิดการอักเสบร่วมกับฮีโมโกลบินจากเลือดกระซังไทยที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ (รูปที่ 4.22) จากนั้นทำการสกัดโปรตีนจากเซลล์ในแต่ละกลุ่มการทดลองคือ 1) เซลล์ RAW 264.7 ที่เลี้ยงปกติ (untreated) 2) เซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย 100 ng/ml LPS เพียงอย่างเดียว 3) เซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย 100 ng/ml LPS และได้รับฮีโมโกลบินที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ ร่วมด้วย ซึ่งเมื่อทำการแยกโปรตีนด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ (proteomics) พบว่าแต่ละกลุ่มการทดลองมีการแสดงออกของโปรตีนจำนวนมากกว่า 100 spot ดังแสดงในรูปที่ 4.23



รูปที่ 4.22 ผลของฮีโมโกลบินจากเลือดกระซังไทยต่อการสร้างไนตริกออกไซด์ (NO) ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร LPS (โดยแสดงในรูปค่าเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการสร้างไนตริกออกไซด์ให้กลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS มีปริมาณไนตริกออกไซด์เป็น 100%) ค่าที่กำกับด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันบนแท่งกราฟคือไม่แตกต่างกันทางสถิติ และค่าที่กำกับด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันบนแท่งกราฟคือมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) โดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA)



รูปที่ 4.23 แสดงแบบแผนโปรตีนจากเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 เมื่อได้รับการอักเสบร่วมกับฮีโมโกลบิน จากเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทยด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ (proteomics) (a) เซลล์ RAW 264.7 ที่เลี้ยงปกติ (untreated) (b) เซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย 100 ng/ml LPS เพียงอย่างเดียว (c) เซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย 100 ng/ml LPS และได้รับฮีโมโกลบินที่ความเข้มข้น 100 μ g/ml ร่วมด้วย spots โปรตีนที่ชี้ด้วยลูกศรคือโปรตีนที่นำไปศึกษาต่อด้วย Mass spectrometry เพื่อบ่งชี้ชนิดของโปรตีน

เมื่อทำการเปรียบเทียบแบบแผนโปรตีนในแต่ละกลุ่มการทดลองพบว่า โปรตีนที่แสดงออกเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนเมื่อเซลล์ได้รับการอักเสบ และเมื่อระดับการอักเสบลดลงด้วยการเติมฮีโมโกลบินมีจำนวน 17 spot ซึ่งเมื่อนำ spot โปรตีนทั้ง 17 spot ที่ระบุด้วยลูกศรดังแสดงในรูปที่ 4.23 มาศึกษาต่อด้วยเทคนิค LC/MS-MS แล้วนำข้อมูลของ MS/MS ions ที่ได้ รวมทั้งค่า MW และ pI ของโปรตีนแต่ละตัวมาสืบค้นบนฐานข้อมูลโปรตีนโดยใช้ Mascot (<http://www.matrixscience.com>) พบว่าสามารถระบุชนิดของโปรตีนได้ดังตารางที่ 4.1 ซึ่งในจำนวนนี้พบโปรตีนจำนวน 10 spot มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อเซลล์ RAW 264.7 ได้รับการกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย LPS คือ 60-kDa heat shock protein, Protein disulfide-isomerase, Catalase, Vimentin, ATP synthase subunit beta, Protein disulfide-isomerase A6 precursor, Beta-actin, Multiple inositol polyphosphate phosphatase 1, HPr kinase/Phosphorylase และ Betaine reductase และพบโปรตีนจำนวน 1 spot ที่มีการแสดงออกลดลงเมื่อเซลล์ RAW 264.7 ได้รับการอักเสบ คือ Ribose ABC transporter ATP-binding protein นอกจากนี้ยังพบโปรตีนอีกจำนวน 3 spot ที่มีการแสดงเฉพาะในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย LPS คือ Endoplasmic reticulum protein, Heat shock cognate 71-kDa protein และ 65-kDa macrophage protein อย่างไรก็ตามเมื่อทำการเปรียบเทียบกลุ่มที่ได้รับการอักเสบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการอักเสบร่วมกับฮีโมโกลบินพบว่า โปรตีนจำนวน 10 spot มีการแสดงออกลดลงเมื่อเซลล์ RAW 264.7 ได้รับฮีโมโกลบินร่วมด้วย คือ Stress-70 protein, protein disulfide-isomerase, catalase, vimentin, ATP synthase subunit beta, protein disulfide-isomerase A6 precursor, beta-actin, multiple inositol polyphosphate phosphatase 1, HPr kinase/phosphorylase และ betaine reductase โปรตีนจำนวน 4 spot มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น คือ coronin-1A, 60-kDa heat shock protein, ribose ABC transport ATP-binding protein และ E3 ubiquitin-protein ligase ซึ่งพบว่าโปรตีนที่กล่าวมาข้างต้นมีหน้าที่หลากหลายบทบาท รวมทั้งอาจมีบทบาทในกระบวนการอักเสบ เช่น โปรตีน cellular metabolism ตัวอย่างเช่น ATP synthase subunit beta, protein disulfide-isomerase A6 precursor และ ribose ABC transporter ATP-binding protein รวมทั้ง protein fate ตัวอย่างเช่น heat shock cognate 71-kDa protein, 60-kDa heat shock protein และ E3 ubiquitin โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ oxidative burst ตัวอย่างเช่น catalase และ vimentin โปรตีนที่ทำหน้าที่เป็น signal transduction ตัวอย่างเช่น HPr kinase/phosphorylase และ multiple inositol polyphosphate phosphatase I โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ morphogenesis ตัวอย่างเช่น coronin-1A และ beta-actin

ตารางที่ 4.1 ตารางการเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์ RAW 264.7 เมื่อได้รับการอักเสบร่วมกับฮีโมโกลบิน และระบุชนิดของโปรตีนโดยใช้เทคนิค LC-MS/MS

Spot No.	Treatment effect			Matched protein	Experimental Mw/pI	Theoretical Mw/pI	Score	Sequence coverage (%)	Number of peptides matched	Species
	RAW 264.7 treated with LPS ^(A) compare to Untreated RAW 264.7 ^(B)	RAW 264.7 treated with LPS and cHb ^(A) compare to Untreated RAW 264.7 ^(B)	RAW 264.7 treated with LPS and cHb ^(A) compare to RAW 264.7 treated with LPS ^(B)							
0: 1L: 0	P/A	A/A	A/P	Endoplasmic	93.00/6.24122	92.703/4.74	271	8	3	<i>Mus musculus</i>
0: 2L: 1H	P/A	P/A	↓	Stress-70 protein, mitochondrial	76.00/5.40590	73.768/5.91	174	4	2	<i>Mus musculus</i>
0: 3L: 0	P/A	A/A	A/P	Heat shock cognate 71-kDa protein	71.00/5.56674	71.424/5.37	179	7	2	<i>Bos taurus</i>
0: 4L: 0	P/A	A/A	A/P	65-kDa a macrophage protein	66.00/5.72834	70.784/5.2	78	2	2	<i>Mus musculus</i>
0: 5L: 2H	P/A	P/A	↑	Coronin-1A	59.50/4.63691	51.641/6.05	47	3	3	<i>Mus musculus</i>
1C: 6L: 3H	↑	↑	↑	60-kDa heat shock protein	62.33/5.49055	61.240/5.60	87	5	4	<i>Bos taurus</i>
2C: 7L: 4H	↑	↑	↓	Protein disulfide-isomerase	59.33/6.19539	57.629/4.8	130	5	2	<i>Bos taurus</i>
3C: 8L: 5H	↑	↑	↓	Catalase	57.00/6.64138	60.106/6.78	30	1	1	<i>Bos taurus</i>
4C: 9L: 6H	↑	↓	↓	Vimentin (Fragment)	55.50/5.87718	51.874/4.94	294	17	5	<i>Cricetulus griseus</i>
5C: 10L: 7H	↑	↑	↓	ATP synthase subunit beta, mitochondrial precursor	52.67/5.94189	56.265/5.19	333	13	2	<i>Mus musculus</i>
6C: 11L: 8H	↑	↓	↓	protein disulfide-isomerase A6 precursor	50.33/5.87188	48.659/5.03	60	3	2	<i>Mus musculus</i>
7C: 12L: 9H	↑	↑	↓	Put. beta-actin (aa 27-375)	45.00/5.64335	39.446/5.78	131	11	3	<i>Mus musculus</i>
8C: 13L: 10H	↓	↓	↑	Ribose ABC transporter	42.00/5.03459	52.727/5.82	42	1	1	<i>Patulibacter medicamentivorans</i>
9C: 14L: 11H	↑	↓	↓	ATP-binding protein	32.67/5.40686	55.130/7.21	28	3	2	<i>Mus musculus</i>
10C: 15L: 12H	↑	↓	↓	Multiple inositol polyphosphate phosphatase 1	30.67/4.66733	34.738/5.35	41	4	1	<i>Granulicatella adiacens</i>
11C: 16L: 13H	↑	↑	↓	HPr kinase/phosphorylase	19.00/5.32230	17.172/4.41	43	5	1	<i>Natranacrobins thermophilus</i>
0: 17L: 14H	P/A	P/A	↑	Betaine reductase	19.00/5.85508	19.487/5.65	29	4	1	<i>JW/NM-WN-LF</i>
				E3 ubiquitin-protein ligase						<i>Mus musculus</i>

↑: โปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น; ↓: โปรตีนที่มีการแสดงออกลดลง; A/A: โปรตีนที่ไม่พบการแสดงออกทั้งใน (A) และ (B); P/A: โปรตีนที่พบการแสดงออกใน (A) แต่ไม่พบใน (B); A/P: โปรตีนที่ไม่พบการแสดงออกใน (A) แต่พบใน (B)

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

ภาวะออกซิเดชันเกิดจากสารอนุมูลอิสระซึ่งเป็นสารที่มีอิเล็กตรอนอิสระอยู่ในวงรอบของอะตอมหรือโมเลกุล มีความว่องไวในการทำปฏิกิริยา โดยรับอิเล็กตรอนจากสารอื่น ซึ่งเหนี่ยวนำให้สารที่ให้อิเล็กตรอนนั้นไม่เสถียรและก่อให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิตได้ อนุมูลอิสระทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) หากเกิดในร่างกายมากเกินไป แต่ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระไม่เพียงพอ จะส่งผลให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) และส่งผลให้เกิดการทำลายดีเอ็นเอ โปรตีน ไขมัน และโมเลกุลอื่นๆ ผลเสียหายต่อโมเลกุลเป้าหมายและเซลล์จะขึ้นกับลักษณะของโครงสร้างโมเลกุล ชนิดเซลล์ ชนิดอวัยวะ และความรุนแรงของภาวะเครียดออกซิเดชันที่เกิดขึ้น หากเกิดประจำต่อเนื่อง ก็จะทำให้เสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็ง โรคหัวใจขาดเลือด โรคเบาหวาน โรคทางระบบประสาท ภาวะเสื่อมสภาพ และ แก่ก่อนวัย ปัจจุบันพบงานวิจัยรายงานแสดงให้เห็นถึงการเกิดโรคที่สืบเนื่องมาจาก oxidative stress และส่งผลให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อ เช่น การติดเชื้อ การบาดเจ็บ การได้รับสารพิษ และภาวะอื่นๆ (สมาคมเพื่อการวิจัยอนุมูลอิสระไทย, สวอ., ม.ป.ป.) ตัวอย่างของอนุมูลอิสระโดยเฉพาะอนุมูลอิสระที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ หรือที่เรียกว่า reactive oxygen species (ROS) ได้แก่ hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$), superoxide anion (O_2^-), lipid peroxyl radical ($\text{LOO}\cdot$) singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) และ hydrogen peroxide (H_2O_2) (Turrens et al., 2003; Bickers et al., 2003) จากที่กล่าวมาข้างต้นพบว่าอนุมูลอิสระมีผลกระทบต่อพยาธิสภาพต่างๆ และเป็นสาเหตุของความเสื่อมของเซลล์และร่างกายอย่างมากมาย ดังนั้นเพื่อป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระที่มากเกินไปในร่างกาย ผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพที่มีส่วนผสมของสารจากธรรมชาติทดแทนการใช้สารสังเคราะห์ เช่น โปรตีน หรือเปปไทด์ ที่มีความเป็นพิษน้อยกว่าเมื่อเทียบกับสารสังเคราะห์จึงน่าเป็นทางเลือกที่ดีต่อสุขภาพที่สำคัญเพื่อต่อต้านเหล่าอนุมูลอิสระที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

หากกล่าวถึงการศึกษาหาสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแล้ว การเหนี่ยวนำสภาวะเครียดออกซิเดชันในเซลล์เพาะเลี้ยงถือเป็นโมเดลที่ได้รับการยอมรับว่ามีประสิทธิภาพสำหรับการค้นหาสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติชนิดใหม่ๆ (Dash et al., 2008; Craciunescu et al., 2012; Thring et al., 2011; Piao et al., 2008) โดยวิธีการเหนี่ยวนำสภาวะเครียดออกซิเดชันที่นิยมคือ การเหนี่ยวนำด้วย hydrogen peroxide (H_2O_2) ซึ่งถือว่าเป็นอนุมูลอิสระกลุ่มออกซิเจน (reactive Oxygen Species; ROS) ที่สำคัญที่สุด ทำหน้าที่เปรียบเสมือน precursor ของ ROS อื่นๆ อีกมากมาย และมีศักยภาพในการก่อความเสียหายที่รุนแรงภายในเซลล์ ที่นำไปสู่การเกิดโรคต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับอนุมูลอิสระอย่างหลากหลาย (Craciunescu et al., 2012; Kumar et al., 2010) งานวิจัยครั้งนี้จึงได้นำเลือดจระเข้ น้ำจืดสายพันธุ์ไทยมาศึกษาฤทธิ์ในการป้องกันเซลล์ ไฟโบรบลาสต์ผิวหนังของมนุษย์ (BJ cells) จากสภาวะเครียดออกซิเดชันที่เกิดจากการเหนี่ยวนำของ H_2O_2 ซึ่งผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าองค์ประกอบเลือดจระเข้ น้ำจืดสายพันธุ์ไทยได้แก่ พลาสมา ฮีโมโกลบิน และสารสกัดเม็ดเลือดขาว ยกเว้นซีรัมสามารถป้องกันเซลล์ BJ จากสภาวะเครียดออกซิเดชันได้ โดยพบว่าฮีโมโกลบินสามารถป้องกันการตายของเซลล์ BJ จากสภาวะเครียดออกซิเดชันเนื่องจากการเหนี่ยวนำของ H_2O_2 ได้ดีที่สุด ซึ่งพบว่าเซลล์มีชีวิตรอดถึง 89.0% ในขณะที่เซลล์ที่ได้รับสภาวะเครียดออกซิเดชันเพียงอย่างเดียวมีชีวิตรอดเพียง 50% เท่านั้น นอกจากนี้เมื่อศึกษาถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่า องค์ประกอบเลือดจระเข้สามารถป้องกันลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ BJ ได้ โดยเพราะว่าเมื่อเซลล์ได้รับ H_2O_2 เพียงอย่างเดียว เซลล์ BJ จะมีการเปลี่ยนรูปร่างโดยมีการหดตัวเล็กน้อย

(cell shrinkage) และพบความหนาแน่นของเซลล์ภายในจานเพาะเลี้ยงลดน้อยลง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยที่ผ่านมา ของ Craciunescu et al. (2012), Thring et al. (2011) และ Ao et al. (2014) อย่างไรก็ตามเมื่อเซลล์ที่อยู่ในสภาวะเครียดออกซิเดชันได้รับเลือดจะเข้าร่วมด้วยนั้น พบว่าเซลล์ BJ ยังคงลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้จากผลงานวิจัยที่ผ่านมา ได้มีการรายงานถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระขององค์ประกอบเลือดจะเข้าสู่สายพันธุ์ไทยในหลอดทดลอง ซึ่งพบว่าพลาสมาแสดงฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี 2,20-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical scavenging ซึ่งสามารถยับยั้งได้ 13.6% และวิธี hydroxyl radical inhibition ซึ่งสามารถยับยั้งได้ 57.3% (Phosri et al., 2014) ส่วนฮีมโกลบินและสารสกัดเม็ดเลือดขาวนั้นพบว่า เมื่อทดสอบด้วยวิธี Linoleic peroxidation inhibition ฮีมโกลบินมีฤทธิ์ยับยั้ง 68.7% ส่วนสารสกัดเม็ดเลือดขาวมีฤทธิ์ยับยั้ง 78.0% เมื่อทดสอบด้วยวิธี 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging พบว่าฮีมโกลบินมีฤทธิ์ยับยั้ง 47.3% ส่วนสารสกัดเม็ดเลือดขาวมีฤทธิ์ยับยั้ง 38.0% เมื่อทดสอบด้วยวิธี ABTS พบว่าฮีมโกลบินมีฤทธิ์ยับยั้ง 24.9% ส่วนสารสกัดเม็ดเลือดขาวมีฤทธิ์ยับยั้ง 40.2% และเมื่อทดสอบด้วยวิธี Nitric oxide radical inhibition พบว่าฮีมโกลบินมีฤทธิ์ยับยั้ง 40.6% ส่วนสารสกัดเม็ดเลือดขาวมีฤทธิ์ยับยั้ง 33.6% (Jandaruang et al., 2012; Phosri et al., 2014; Theansungnoen et al., 2014) จากข้อมูลนี้จึงมีความเป็นไปได้ว่าฮีมโกลบินและสารสกัดเม็ดเลือดขาวมีศักยภาพในการบรรเทาความเสียหายภายในเซลล์ BJ ที่เกิดจาก H_2O_2 ได้ดีที่สุดเนื่องจากความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระในหลอดทดลองที่หลากหลาย นอกจากนี้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของฮีมโกลบิน อาจมาจากกลุ่ม thiol ภายในโครงสร้างของฮีมโกลบิน จากการรายงานของ Reischl et al. (2007) แสดงให้เห็นว่า ฮีมโกลบินของจระเข้ (crocodilian) สามารถลด ROS และ RNS ได้ และจากการศึกษาของ Vitturi et al. (2013) ได้แสดงให้เห็นว่า $\beta 93Cys$ ในฮีมโกลบินของมนุษย์มีบทบาทสำคัญในเซลล์เม็ดเลือดแดงสำหรับสารต้านอนุมูลอิสระ

จากผลการทดสอบความสามารถของเลือดจระเข้ ในการป้องกันการเกิดความเครียดออกซิเดชันจาก H_2O_2 ในเซลล์ BJ พบว่า H_2O_2 มีผลทำให้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ BJ เปลี่ยน คือเซลล์มีการหดตัวเล็กลง (cell shrinkage) ซึ่งเป็นลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่บ่งบอกว่าเซลล์กำลังจะตาย หรือเซลล์กำลังเข้าสู่การตายแบบอะพอพโทซิส (apoptosis) ซึ่งเป็นกระบวนการที่เซลล์ใช้ตอบสนองต่อสิ่งเร้าที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ โดยจากงานวิจัยที่ผ่านมาชี้ให้เห็นว่า H_2O_2 เปรียบเสมือนสิ่งเร้า หรือตัวกระตุ้นชนิดหนึ่ง ที่สามารถกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ apoptosis ภายในเซลล์ได้ (Singh et al., 2007; Piao et al., 2008) ดังนั้นเพื่อให้เข้าใจกลไกเบื้องต้นในการป้องกันเซลล์จากสภาวะเครียดออกซิเดชันเนื่องจาก H_2O_2 จึงได้ทำการทดสอบความสามารถของเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทยในการป้องกันการตายแบบ apoptosis ในเซลล์ BJ ที่ได้รับสภาวะเครียดออกซิเดชันดังกล่าวข้างต้น ซึ่งการทดลองนี้ ได้เลือกใช้ฮีมโกลบินเพื่อเป็นตัวแทนขององค์ประกอบจากเลือดจระเข้ทั้งหมดในการศึกษา เนื่องจากฮีมโกลบินมีฤทธิ์ในการป้องกันเซลล์จากสภาวะเครียดออกซิเดชันได้สูงที่สุด และยังจัดเป็นองค์ประกอบที่พบมากที่สุดภายในเลือด ซึ่งผลการทดลองยืนยันว่า H_2O_2 มีผลในการเหนี่ยวนำให้เซลล์ BJ เกิดกระบวนการ apoptosis ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อทำการเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มที่เลี้ยงปกติ (untreated cells) โดยพบเซลล์เกิด early apoptosis จำนวน 14.5% และ late apoptosis จำนวน 32.3% อย่างไรก็ตามพบว่า ฮีมโกลบินสามารถยับยั้งการเกิด apoptosis จากการเหนี่ยวนำของ H_2O_2 ได้อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งจากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า ความสามารถในการป้องกันความเครียดออกซิเดชันจาก H_2O_2 ในเซลล์ BJ ของฮีมโกลบิน อาจเนื่องจากฮีมโกลบินช่วยป้องกันเซลล์จากกระบวนการ apoptosis นั้นเอง

อนุมูลอิสระนอกจากจะเป็นต้นเหตุของการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ยังพบว่าสามารถส่งเสริมการเกิดภาวะเสื่อมของร่างกายจนนำไปสู่การเกิดกระบวนการอักเสบและโรคอื่นๆ ได้อีกด้วย จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ที่เลือดจระเข้จะมีความสามารถในการต้านการอักเสบได้ ทั้งนี้เนื่องจากอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในเซลล์นั้นสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบได้ (Mohamed and Al-Okbi et al., 2004) ดังนั้นสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจึงอาจมีฤทธิ์ต้านอักเสบด้วยเช่นกัน ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงได้ศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของฮีมोगิลบินและสารสกัดเม็ดเลือดขาวจากเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทย โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW 264.7 เป็นโมเดล จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดเม็ดเลือดขาวสามารถลดการอักเสบในเซลล์ RAW 264.7 ทั้งที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย Lipopolysaccharide (LPS) และ *P. acnes* ได้โดยทั่วไป ในระหว่างเกิดกระบวนการอักเสบ เซลล์จะมีการสร้างสารสื่อการอักเสบออกมาจำนวนมาก เช่น iNOS และ COX-2 ซึ่ง iNOS จะเกิดจากสิ่งกระตุ้นต่างๆ ซึ่งรวมถึง LPS แบคทีเรีย TNF- α , IL-1 β และ interferon- γ (Bae et al., 2012) เซลล์แมคโครฟาจมีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่อการอักเสบ โดยเมื่อถูกกระตุ้นจะมีการหลั่ง pro-inflammatory cytokines เช่น ไนตริกออกไซด์ (NO) prostaglandin E₂ (PGE₂) และ pro-cytokines เช่น IL-6, IL-1 β และ TNF- α การผลิต cytokines เหล่านี้จะถูกควบคุมการถอดรหัสของ mRNAs ผ่าน NF- κ B (Deng et al, 2011; Yu et al, 2011) ซึ่งผลการทดลองครั้งนี้ มีความสอดคล้องกับข้อมูลงานวิจัยดังกล่าวข้างต้นคือ เมื่อ RAW 264.7 ถูกกระตุ้นการอักเสบด้วย LPS และ *P. acnes* ระดับของ NO จะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ถูกเลี้ยงปกติ (untreated cells) โดยพบว่าสารสกัดเม็ดเลือดขาวสามารถลดการอักเสบได้ด้วยการลดระดับ NO ที่ถูกกระตุ้นให้สร้างเพิ่มขึ้นนี้ได้ การลดลงของระดับ NO นี้มีแนวโน้มในการทำงานเหมือนกับระดับการแสดงออกของยีน iNOS ซึ่งพบว่าเมื่อเลี้ยงเซลล์ที่ได้รับการอักเสบร่วมกับสารสกัดเม็ดเลือดขาว ระดับของยีน iNOS มีการแสดงออกลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นการอักเสบเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ยีน iNOS แล้วยังพบว่า เมื่อ RAW 264.7 ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ *P. acnes* ระดับการแสดงออกของยีน IL-6, IL-1 β และ TNF- α มีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน อย่างไรก็ตามพบว่ายีนเหล่านี้มีระดับการแสดงออกที่ลดลงเมื่อได้รับสารสกัดเม็ดเลือดขาวจากเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทย ซึ่งสอดคล้องกับระดับของโปรตีน IL-6 และ TNF- α เมื่อตรวจวัดด้วยเทคนิค ELISA ที่มีระดับลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเลี้ยงเซลล์ที่ได้รับการอักเสบร่วมกับสารสกัดเม็ดเลือดขาว ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าสารสกัดเม็ดเลือดขาวสามารถลดการอักเสบได้โดยการควบคุมระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ นอกจากการควบคุมระดับการแสดงออกของยีนดังกล่าวข้างต้นแล้ว ยังพบว่าสารสกัดเม็ดเลือดขาวยังสามารถลดระดับการตายแบบ apoptosis ในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นการอักเสบด้วย *P. acnes* และ LPS ได้มากกว่า 50% ด้วย

สำหรับฤทธิ์ต้านการอักเสบของฮีมोगิลบินนั้น พบว่าเมื่อทำการศึกษาแบบแผนของโปรตีนในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย LPS และได้รับฮีมोगิลบินจากเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทยร่วม ด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ (proteomics) ร่วมกับแมสสเปคโตรสโกปี (LC-MS/MS) พบว่ามีโปรตีนจำนวนทั้งสิ้น 17 ชนิดที่มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปในระหว่างกระบวนการอักเสบและได้รับฮีมोगิลบิน ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบที่หลากหลายกลไก เช่น cellular metabolism ซึ่งได้แก่ ATP synthase subunit beta, protein disulfide-isomerase A6 precursor และ ribose ABC transporter ATP-binding protein เกี่ยวกับ protein fate ซึ่งได้แก่ heat shock cognate 71-kDa protein, 60-kDa heat shock protein และ E3 ubiquitin โปรตีนที่เกี่ยวข้อง oxidative burst ซึ่งได้แก่ catalase และ vimentin โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ signal

transduction ซึ่งได้แก่ HPr kinase/phosphorylase และ multiple inositol polyphosphate phosphatase I และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ morphogenesis ซึ่งได้แก่ coronin-1A and beta-actin ซึ่งสามารถสรุปหน้าที่ที่สำคัญของโปรตีนเหล่านี้ในกระบวนการอักเสบได้ดังนี้

Heat shock proteins (HSPs)

Heat shock proteins หรือ HSPs พบว่าโดยทั่วไปมีการแสดงออกเมื่อถูกกระตุ้นด้วยความร้อน อย่างไรก็ตามยังมีการรายงานการแสดงออกของโปรตีนชนิดนี้เมื่อถูกกระตุ้นจากสิ่งเร้าชนิดอื่นๆ ได้เช่นกัน เช่น ภาวะขาดออกซิเจน (hypoxia) สารเคมีที่มีพิษ (toxic chemicals) รวมทั้งกระบวนการอักเสบ (inflammation) และเชื่อกันว่า HSPs เป็นกลไกในการตอบสนองต่อความเครียดของเซลล์ที่ช่วยปกป้องโปรตีนภายในเซลล์จากสภาวะที่เป็นอันตรายเหล่านั้น (Laplanche et al., 1998) การศึกษาหลายชิ้นได้แสดงให้เห็นว่า HSPs สามารถยับยั้งความผิดปกติของภูมิคุ้มกันได้ เช่น โรคเบาหวานและโรคข้ออักเสบทั้งในสัตว์และการทดลองทางคลินิกเบื้องต้นของผู้ป่วยโรคข้ออักเสบเรื้อรัง และยังพบว่า HSPs สามารถกระตุ้นเซลล์ให้เพิ่มการผลิต anti-inflammatory cytokines เช่น IL-10 ได้อีกด้วย (Hauet-Broere et al., 2006) ซึ่งข้อมูลเบื้องต้นสอดคล้องกับผลการทดลองในครั้งนี้นี้คือ LPS สามารถกระตุ้นระดับการแสดงของ HSPs ในเซลล์ RAW 264.7 ได้ 2 ชนิด ได้แก่ Heat shock cognate 71 kDa protein (HSP71) และ 60 kDa heat shock protein (HSP60) การแสดงออกของ HSP70 พบเฉพาะในเซลล์ที่ได้รับ LPS เท่านั้น สำหรับ HSP60 นั้นยังคงพบการแสดงออกอย่างต่อเนื่องเมื่อเลี้ยงเซลล์ที่ได้รับการอักเสบร่วมกับฮีโมโกลบิน ซึ่งผลการวิจัยเหล่านี้ให้การสนับสนุนอย่างชัดเจนว่าฮีโมโกลบินช่วยต้านการอักเสบผ่านการแสดงออกของโปรตีน HSPs

Coronin 1 (coronin 1A)

Coronin 1 (coronin 1A) มีบทบาทสำคัญในกลไกป้องกันสิ่งมีชีวิตต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย ในสัตว์ที่เลี้ยงลูกด้วยนม พบโปรตีนชนิดนี้จะแสดงออกใน leukocytes ซึ่งไม่สามารถตรวจพบการแสดงออกได้ในเซลล์ชนิดอื่นๆ ถึงแม้เซลล์เม็ดเลือดขาวจะมี coronin หลายชนิด แต่พบว่า coronin I เป็นชนิดที่มีหน้าที่หลากหลายและพิเศษที่สุด (Pieters, 2000) จากการรายงานของ Liu et al. (2014) พบว่าในสุกรที่ติดเชื้อ *H. parasuis* coronin 1A จะแสดงออกเพื่อยับยั้งการทำงานของ NF- κ B ด้วยการยับยั้งการสลายตัวของ I κ B α และยับยั้งการเกิด nuclear translocation ของ p65 ซึ่งในทำนองเดียวกัน NF- κ B ได้ถูกรายงานว่าเป็นตัวกระตุ้น pro-inflammatory cytokines บางชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง IL-1 และส่งผลให้เกิดการอักเสบ จากผลการทดลองในครั้งนี้นี้พบว่า ระดับการแสดงออกของ IL-1 β ในเซลล์ RAW 264.7 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นการอักเสบด้วย LPS ซึ่งมีความเป็นไปได้สูงที่ NF- κ B จะถูกกระตุ้นร่วมด้วย ดังนั้นการเลี้ยงเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นการอักเสบด้วย LPS ร่วมกับฮีโมโกลบินจะส่งผลให้มีการแสดงออกของ coronin-1A ซึ่งจะช่วยยับยั้งการกระตุ้น NF- κ B และทำให้การอักเสบลดน้อยลง

ATP synthase

ATP synthase เป็นเอนไซม์ที่ถอดรหัสทั้งในนิวเคลียสและไมโทคอนเดรีย ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องข้องในการผลิตพลังงานในเซลล์ของทุกสิ่งมีชีวิต ซึ่งพบว่า beta subunit เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของ ATP synthase ในการจับกับ co-factor เพื่อสร้างพลังงาน (ATP) (Dunston et al., 2011) จากการรายงานของ Dunston et al.

(2011) พบว่า ATP synthase beta subunit มีการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกภายในเซลล์แมคโครฟาจ เมื่อถูกการกระตุ้นด้วย LPS ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในครั้งนี้ ที่พบระดับของ ATP synthase subunit beta เพิ่มขึ้นเมื่อเซลล์ RAW 264.7 ถูกกระตุ้นด้วย LPS เช่นกัน ซึ่งระดับการแสดงออกของโปรตีนชนิดนี้มีระดับลดลงจนใกล้เคียงกับระดับการแสดงออกในกลุ่มเซลล์ที่เลี้ยงปกติ (untreated cells) เมื่อเลี้ยงเซลล์ที่เกิดการอักเสบร่วมกับฮีโมโกลบินจากเลือดจะเข้าสู่สายพันธุ์ไทย ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าระดับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ ATP synthase มีความจำเป็นในการรักษาระดับหรือเพิ่มกำลังการผลิตพลังงานของเซลล์ในระหว่างเกิดการอักเสบ ซึ่งเมื่อระดับการอักเสบของเซลล์ RAW 264.7 ลดลงเนื่องจากฮีโมโกลบิน การแสดงออกของ ATP synthase จึงมีระดับลดลงด้วยเช่นเดียวกัน

Antioxidant enzymes

เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระหลายชนิด เช่น Superoxide dismutase (SOD), Glutathione peroxidase (GSH-px) และ Catalase ถือเป็นกลไกที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันเซลล์ยูคาริโอตจากอนุมูลอิสระ ROS เอนไซม์ Catalase เป็นเอนไซม์ที่สามารถป้องกันอนุมูลอิสระที่พบอย่างแพร่หลาย ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่า Catalase มีการทำงานร่วมกับ SOD ในการกำจัด H_2O_2 ให้เป็นน้ำและออกซิเจน (Reid et al., 1981) โดยทั่วไป ROS เป็นที่รู้จักว่าเป็นตัวกลางที่สำคัญในการอักเสบ ในระหว่างการตอบสนองต่อการอักเสบการผลิต ROS ที่มากเกินไป อาจทำให้เกิดความเสียหายที่สำคัญต่อเซลล์ ซึ่งอาจนำไปสู่ความเสียหายของดีเอ็นเอและก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ (Lonkar and Dedon, 2011) ในการทดลองครั้งนี้พบว่าเมื่อเลี้ยงเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย LPS ร่วมกับฮีโมโกลบิน ระดับการแสดงออกของ Catalase มีค่าลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ถูกกระตุ้นการอักเสบด้วย LPS เพียงอย่างเดียว ผลที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่าฮีโมโกลบินสามารถกำจัด ROS ได้ ดังนั้นการแสดงออก catalase จึงลดลงเนื่องจากไม่จำเป็นต้องใช้อีกต่อไป

Vimentin

Vimentin เป็นโปรตีนเส้นใยกลางที่ถูกตัดออกมาเพื่อตอบสนองต่อการกระตุ้นโดยกระบวนการ apoptosis โปรตีนชนิดนี้ถือว่ามีสำคัญต่อการรักษาความสมบูรณ์ของเซลล์ เพื่อให้สามารถต้านสภาวะเครียดต่างๆ ได้นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า vimentin มีส่วนร่วมในกระบวนการเคลื่อนย้ายของเซลล์ (cell migration processes) ในกรณีที่เกิดความเสียหายต่อเนื้อเยื่อและเซลล์ cell migration ถือว่ามีบทบาทสำคัญในกลไกการป้องกัน เช่น การรักษาบาดแผล การอักเสบ และการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกัน (Chernoivanenko et al., 2013) ในการทดลองครั้งนี้ได้พบการแสดงออกของ vimentin ลดลงเมื่อเลี้ยงเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ร่วมกับฮีโมโกลบิน ซึ่งหมายความว่า การแสดงออกของ vimentin ลดลงเมื่อการอักเสบภายในเซลล์ RAW 264.7 ลดลงเนื่องจากฮีโมโกลบิน

จากที่กล่าวมาข้างต้นพบว่าเลือดจะเข้าสู่สายพันธุ์ไทยมีฤทธิ์ในการป้องกันเซลล์จากสภาวะเครียดออกซิเดชันในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ผิวหนังของมนุษย์ (BJ) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ด้วยการป้องกันเซลล์ BJ จากกระบวนการ apoptosis ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำของ H_2O_2 นอกจากนี้ยังพบว่าเลือดจะเข้มข้นยังมีฤทธิ์ในการลดการอักเสบที่เกิดขึ้นภายในเซลล์แมคโครฟาจ (RAW 264.7) เมื่อถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย LPS และ *P. acnes* ได้เช่นเดียวกัน โดยพบว่าฮีโมโกลบินสามารถลดระดับของ NO IL6 และ TNF- α ซึ่งเป็นสารสื่อกลางการอักเสบได้ ซึ่งคาดว่า การลดลงของสารเหล่านี้ อาจเกิดจากเลือดจะเข้าไปควบคุมระดับการแสดงของสาร

สื่อกลางการอักเสบเหล่านี้ในระดับยีน และยังพบว่าเลือดจระเข้ยังสามารถลดการเกิดกระบวนการ apoptosis ภายในเซลล์ RAW 264.7 เมื่อเซลล์ได้รับการอักเสบด้วย ดังนั้นจากองค์ความรู้ที่ได้ในครั้งนี้ แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าโปรตีนหรือเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบในเลือดจระเข้มีบทบาทสำคัญในกระบวนการต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งถือได้ว่าเป็นประโยชน์อย่างมากในแง่ของการต่อยอดงานวิจัย เพื่อนำมาพัฒนาเป็นอาหารเสริมสุขภาพ หรือยาต้านอักเสบที่มีผลข้างเคียงน้อย และยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับอุตสาหกรรม การเพาะเลี้ยงจระเข้ในประเทศไทยให้สามารถนำทรัพยากรของประเทศมาใช้ประโยชน์ได้อย่างสูงสุด

เอกสารอ้างอิง

- จิระเดช มโนสร้อย, อรัญญา มโนสร้อย, พัฒนา ศรีพลากิจ. การผลิตด้วยาสเตียรอยด์. เชียงใหม่: โรงพิมพ์คลองช้าง; 2545
- ณัฐธิดา พงศ์ผาสุก. การพัฒนาสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านอักเสบเพื่อใช้เป็นยาทาภายนอก [วิทยานิพนธ์ปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชภัณฑ์]. ขอนแก่น: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2546.
- ธิดากานต์ รุจิพัฒนกุล. [ม.ป.ป.]. สิว (Acne). ค้นเมื่อ 2 กันยายน 2557, จาก <http://haamor.com/th/%E0%B8%AA%E0%B8%B4%E0%B8%A7/>
- พิมพรรณ เกิดอุตรม (2520). การอักเสบ ยาที่ใช้รักษาการอักเสบ การแพ้ฮีสตามีนและยาต้านฮีสตามีน. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สมปอง คล้ายหนองสรวง (2558). เปปไทด์ต้านจุลชีพในสัตว์เลื้อยคลาน. กรุงเทพมหานคร. อัมรินทร์. 209 หน้า.
- Acneหรือสิว. [ม.ป.ป.]. ค้นเมื่อ 2 กันยายน 2557, จาก <http://www.thailabonline.com/skin&acne1.htm>
- Abramson SB, Attur M, Amin AR, Clancy R (2001). Nitric oxide and inflammatory mediators in the perpetuation of osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep*, 3(6): 535-541.
- Alcaide M, Lemus JA, Blanco G, Tella JL, Serrano D, Negro JJ, Rodriguez A, Garcia-Montijano M (2010). MHC diversity and differential exposure to pathogens in kestrels. *Mol Ecol*, 19: 691-705.
- Anunthawan T, Yaraksa N, Phosri S, Theansungnoen T, Daduang S, Dhiravisit A, Thammasirirak S (2013). Improving the antibacterial activity and selectivity of an ultra short peptide by hydrophobic and hydrophilic amino acid stretches. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23: 4657-4662.
- Ao GZ, Chu XJ, Ji YY, Wang JW (2014). Antioxidant properties and PC12 cell protective effects of a novel curcumin analogue (2E,6E)-2,6-bis(3,5- dimethoxybenzylidene)cyclohexanone (MCH). *Int J Mol Sci*, 15: 3970-3988.
- Bae S, Kang T, Hong J, Lee S, Choi J, Jhun H (2012). Contradictory functions (activation/termination) of neutrophil proteinase 3 enzyme (PR3) in interleukin-33 biological activity. *J. Biol. Chem.* 287: 8205-8213.
- Bjorkman PJ, Parham P (1990). Structure, function and diversity of class I major histocompatibility molecules. *Ann Rev Biochem*, 59: 253-288.
- Brodsky M, Halpert G, Albeck M, Sredni B (2010). The anti-inflammatory effects of the tellurium redox modulating compound, AS101, are associated with regulation of NFκB signaling pathway and nitric oxide induction in macrophages. *Journal of Inflammation*, 7: 3.
- Brown DR, Nogueira MF, Schoeb TR, Vliet KA, Bennett RA, Pye GW, Jacobson ER (2001). Pathology of experimental mycoplasmosis in American alligators. *J Wildl Dis.* 2001; 37: 671-679.

- Brown DR (2002). Mycoplasmosis and immunity of fish and reptiles. *Front Biosci*, 7: 1338-1346.
- Burnham DK, Keall SN, Nelson NJ, Daugherty CH (2005). T cell function in tuatara (*Sphenodon punctatus*). *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 28: 213-222.
- Chernoivanenko IS, Minin AA, Minin AA (2013). Role of vimentin in cell migration. *Russian Journal of Developmental Biology*, 44: 144-157.
- Choi JY, Piao MS, Lee JB, Oh JS, Kim IG, Lee SC (2008). *Propionibacterium acnes* stimulates pro-matrix metalloproteinase-2 expression through tumor necrosis factor- α in human dermal fibroblasts. *Journal of Investigative Dermatology* 128:846-854.
- Claver JA, Quaglia AIE (2009). Comparative morphology development and function of blood cells in nonmammalian vertebrates. *J Exotic Pet Medicine*, 18: 87-97.
- Craciunescu O, Constantin D, Gaspar A, Toma L, Utoiu E, Moldovan L (2012). Evaluation of antioxidant and cytoprotective activities of *Arnica montana* L. and *Artemisia absinthium* L. ethanolic extracts. *Chem Cent J*, 6: 97.
- Cuchens MA, Clem LW (1979). Phylogeny of lymphocyte heterogeneity. III. Mitogenic responses of reptilian lymphocytes. *Dev Comp Immunol*, 3: 287-297.
- Das S, Nikolaidis N, Klein J, Nei M (2008). Evolutionary redefinition of immunoglobulin light chain isotypes in tetrapods using molecular markers. *PNAS*, 105: 16647-16652.
- Dash R, Acharya C, Bindu PC, Kundu SC (2008). Antioxidant potential of silk protein sericin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in skin fibroblasts. *BMB Rep*, 41: 236-241.
- Debyser IWJ, Zwart P (1991). Review of the most important diseases in crocodylia which possibly interfere with human health. *Vlaams Diergeneeskund*, 60: 164-169.
- Deng JS, Chi CS, Huang SS, Shie PH, Lin TH, Huang GJ (2011). Antioxidant, analgesic, and anti-inflammatory activities of the ethanolic extracts of *Taxillus liquidambaricola*. *Journal of Ethnopharmacology*, 137: 1161-1171.
- Drott JB, Alexeyev O, Bergström P, Elgh F, Olsson J (2010). *Propionibacterium acnes* infection induces upregulation of inflammatory genes and cytokine secretion in prostate epithelial cells. *BMC Microbiology*, 10:126-131.
- Escocard RCM, Kanashiro MM, Petretski JH, Azevedo-Silva J, Queiroz de Carvalho EC, Dias da Silva W, Kipnis TL (2006). Neutrophils regulate the expression of cytokines, chemokines and nitric oxide synthase/nitric oxide in mice injected with *Bothrops atrox* venom. *Immunobiology*, 211: 37-46.
- Farag MA, El Ridi R (1985). Mixed leucocyte reaction (MLR) in the snake *Psammophis sibilans*. *Immunology*, 55: 173-181.

- Frances R, Tumang JR, Kaku H, Gurdak SM, Rothstein TL (2006). B-1 cells express transgelin 2: unexpected lymphocyte expression of a smooth muscle protein identified by proteomic analysis of peritoneal B-1 cells. *Mol Immunol*, 43: 2124-2129.
- Gasque P (2004). Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. *Mol Immunol*, 41: 1089-1098.
- Grange P, Chéreau C, Ringeaud J, Nicco C, Weill B, Dupin N, Batteux F (2009). Production of superoxide anions by keratinocytes initiates *P. acnes*-induced inflammation of the skin. *PLoS pathogens* 5:e1000527.
- Griscavage JM, Wilk S, Ignarro LJ (1996). Inhibitors of the proteasome pathway interfere with induction of nitric oxide synthase in macrophages by blocking activation of transcription factor NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(8): 3308-3312.
- Hauet-Broere F, Wieten L, Guichelaar T, Berlo S, van der Zee R, Van Eden W (2006). Heat shock proteins induce T cell regulation of chronic inflammation. *Ann Rheum Dis*, 65: iii65–iii68.
- Jandaruang J, Siritapetawee J, Thumanu K, Songsirittthigul C, Krittana C, Daduang S, Dhiravisit A, Thammasirirak S. (2012). The effects of temperature and pH on secondary structure and antioxidant activity of *Crocodylus siamensis* hemoglobin. *The Protein Journal*, 31: 43-50.
- Jaratlerdsiri W, Isberg SR, Higgins DP, Ho SYW, Salomonsen J, Skjodt K, Miles LG, Gongora G (2014). Evolution of MHC class I in the Order Crocodylia. *Immunogenetics*, 66: 53-65.
- Kappes D, Strominger JL (1988). Human class II major histocompatibility complex genes and proteins. *Ann Rev Biochem*, 57: 991-1028.
- Kelley J, Walter L, Trowsdale J (2005). Comparative genomics of major histocompatibility complexes. *Immunogenetics*, 56: 683-695.
- Klein J (1986). Natural history of the major histocompatibility complex. Wiley, New York.
- Kim SS, Kim JY, Lee NH, Hyun CG (2008). Antibacterial and anti-inflammatory effects of Jeju medicinal plants against acnes-inducing bacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology* 54:101-106.
- Kim Y, Han J, Sung J, Sung M, Choi Y, Jeong HS, Lee J (2012). Anti-inflammatory activity of *Chrysanthemum zawadskii* var. *latilobum* leaf extract through haem oxygenase-1 induction. *Journal of Functional Foods*, 4: 474-479.
- Kommanee J, Preecharram S, Daduang S, Temsiripong Y, Dhiravisit A, Yamada Y, Thammasirirak S. (2012). Antibacterial activity of plasma from crocodile (*Crocodylus siamensis*) against pathogenic bacteria. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 11:22.
- Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC, Lim RW, Herschman HR (1991). TIS10, a phorbol ester Tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem*, 266(20): 12866-12872.

- Kumar R, Balaji S, Sripriya R, Nithya N, Uma TS, Sehgal PK (2010). In vitro evaluation of antioxidants of fruit extract of *Momordica charantia* L. on fibroblasts and keratinocytes. *J Agric Food Chem*, 58: 1518-1522.
- Laplante AF, Moulin V, Auger FA, Landry J, Li H, Morrow G, Tanguay RM, Germain L (1998). Expression of heat shock proteins in mouse skin during wound healing. *J Histochem Cytochem*, 46: 1291-1301.
- Lee WR, Kim KH, An HJ, Kim JY, Han SM, Lee KG, Park KK (2014). Protective effect of melittin against inflammation and apoptosis on *Propionibacterium acnes*-induced human THP-1 monocytic cell. *European Journal of Pharmacology*, 740:218-226.
- Leslie GA, Clem LW (1969). Phylogeny of immunoglobulin structure and function. III. Immunoglobulins of the chicken. *J Exp Med*, 130: 1337-1352.
- Leulier F, Lemaitre B (2008). Toll-like receptors-taking an evolutionary approach. *Nat Rev Genet*, 9: 165-178.
- Lonkar P, Dedon PC (2011). Reactive species and DNA damage in chronic inflammation. *Int J Cancer*, 128: 1999-2009.
- Lowenstein CJ, Alley EW, Raval P, Snowman AM, Snyder SH, Russell SW (1993). Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(20): 9730-9734.
- Liu C, Wang Y, Zhang H, Cheng S, Charreyre C, Audonnet JC, Chen P, He Q (2014). Porcine coronin 1A contributes to nuclear factor-kappa B (NF- κ B) inactivation during *Haemophilus parasuis* infection. *PLoS One*, 9: e103904.
- MacMicking J, Xie QW, Nathan C (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol*, 15: 323-350.
- Mateo MR, Roberts ED, Enright FM (1984). Morphological, cytochemical and functional studies of peripheral blood cells of young healthy American alligators (*Alligator mississippiensis*). *Am J Vet Res*, 45: 1046-1053.
- Merchant ME, Roche C, Elsey RM, Prudhomme J. (2003). Antibacterial properties of serum from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Comp biochem Physiol Part B*, 136: 505-513.
- Merchant M, Thibodeaux D, Loubser K, Elsey RM (2004). Amoebacidal effects of serum from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *J Parasitol*, 90: 1480-1483.
- Merchant ME, Roche CM, Thibodeaux D, Elsey RM (2005). Identification of alternative pathway serum complement activity in the blood of the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 141: 281-288.

- Merchant ME, Leger N, Jerkins E, Mills K, Pallansch MB, Paulman RL, Ptak RG. (2006a). Broad spectrum antimicrobial activity of leukocyte extracts from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Vet Immunol Immunopathol*, 110: 221-228.
- Merchant ME, Mills K, Leger N, Jerkins E, Vliet KA, McDaniel N (2006b). Comparisons of innate immune activity of all known living crocodylian species. *Com Biochem Physiol Part B*, 43: 133-137.
- Mohamed DA, Al-Okbi SY (2004). *In vivo* evaluation of antioxidant and anti-inflammatory activity of different extracts of date fruits in adjuvant arthritis. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 13: 397-402.
- Montali RJ (1998). Comparative pathology of inflammation in the higher vertebrates (reptiles, birds and mammals). *J Comp Pathol*, 99: 1-26.
- Muller-Eberhard HJ (1986). The membrane attack complex of complement. *Annu Rev Immunol*, 4: 503.
- Nagase T, Miyajima N, Tanaka A, Sazuka T, Seki N, Sato S, Tabata S, Ishikawa K, Kawarabayasi Y, Kotani H, Nomura N (1995). Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. III. The coding sequences of 40 new genes (KIAA0081–KIAA0120) deduced by analysis of cDNA clones from human cell line KG-1. *DNA Res*, 2: 37-43.
- Natarajan K, Muthukkaruppan VR (2008). Distribution and ontogeny of B cells in the garden lizard (*Calotes versicolor*). *Dev Comp Immunol*. 1985; 9: 301-310.
- Park J, Lee J, Jung E, Park Y, Kim K, Park B, Jung K, Park E, Kim J, Park D (2004). In vitro antibacterial and anti-inflammatory effects of honokiol and magnolol against *Propionibacterium* sp. *European Journal of Pharmacology* 496:89-195.
- Pata S, Yaraksa N, Daduang S, Temsiripong Y, Svasti J, Araki T, Thammasirirak S (2011). Characterization of the novel antibacterial peptide Leucrocin from crocodile (*Crocodylus siamensis*) white blood cell extracts. *Developmental & Comparative Immunology*, 35: 545-553.
- Peinnequin A, Mouret C, Birot O, Alonso A, Mathieu J, Clarençon D, Agay D, Chancerelle Y, Multon E (2004). Rat pro-inflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction using SYBR green. *BMC Immunol*, 5:3.
- Phosri S, Mahakunakorn P, Lueangsakulthai J, Jangpromma N, Swatsitang P, Daduang S, Dhiravisit A, Thammasirirak S (2014). An investigation of antioxidant and anti-inflammatory activities from blood components of crocodile (*Crocodylus siamensis*). *Protein J*, 33: 484-492.

- Piao MJ, Kang KA, Zhang R, Ko DO, Wang ZH, You HJ, Kim HS, Kim JS, Kang SS, Hyun JW (2008). Hyperoside prevents oxidative damage induced by hydrogen peroxide in lung fibroblast cells via an antioxidant effect. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1780: 1448-1457.
- Piertney SB, Oliver MK (2006). The evolutionary ecology of the major histocompatibility complex. *Heredity*, 96: 7-21.
- Pieters J (2000). *Coronin 1 in Innate Immunity*. Landes Bioscience: Austin (TX).
- Pitchappan RM, Muthukkaruppan VR (1977). Role of the thymus in the immune response to sheep erythrocytes in the lizard *Calotes versicolor*. *Proc Ind Acad Sci*, 85: 25-33.
- Preecharram S, Daduang S, Bunyatratchata W, Araki T, Thammasirirak S (2008). Antibacterial activity from Siamese crocodile (*Crocodylus siamensis*) serum. *African Journal of Biotechnology* 7:3121-3128.
- Preecharram S, Jearanaiprepame P, Daduang S, Temsiripong Y, Somdee T, Fukamizo T, Svasti J, Araki T, Thammasirirak S (2010). Isolation and characterisation of crocosin, an antibacterial compound from crocodile (*Crocodylus siamensis*) plasma. *Journal of Animal Science* 81:393-401.
- Reid TJ, Murthy MR, Sicignano A, Tanaka N, Musick WD, Rossman MG (1981). Structure hence environment of beef liver catalase at 25 Å° resolutions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78: 4767-4771.
- Reischl E, Dafre AL, Franco JL, Wilhelm, and FD (2007). Distribution, adaptation and physiological meaning of thiols from vertebrate hemoglobins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146: 22-53.
- Rodriguez-Vita J, Lawrence T (2010). The resolution of inflammation and cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 21: 61-65.
- Singh M, Sharma H, Singh N (2007). Hydrogen peroxide induces apoptosis in HeLa cells through mitochondrial pathway. *Mitochondrion*, 7: 367-373.
- Srihongthong S, Pakdeesuwan A, Daduang S, Araki T, Dhiravisit A, Thammasirirak S (2012). Complete amino acid sequence of globin chains and biological activity of fragmented crocodile hemoglobin (*Crocodylus siamensis*). *The Protein Journal* 31:466-476.
- Sun SC, Ley SC (2008). New insights into NF-κB regulation and function. *Trends Immunol*, 29(10): 469-478.
- Sunyer JO, Lambris JD (1998). Evolution and diversity of the complement system of poikilothermic vertebrates. *Immunol Rev*, 166: 39-57.
- Theansungnoen T, Yaraksa N, Daduang S, Dhiravisit A, Thammasirirak S (2014). Purification and characterization of antioxidant peptides from leukocyte extract of *crocodylus siamensis*. *The Protein Journal*, 33: 24-31.

- Thring TS, Hili P, Naughton DP (2011). Antioxidant and potential anti-inflammatory activity of extracts and formulations of white tea, rose, and witch hazel on primary human dermal fibroblast cells. *Journal of Inflammation*, 8: 27.
- Van Hoek ML (2014). Antimicrobial peptides in reptiles. *Pharmaceuticals*, 7: 723-753.
- Vitturi DA, Sun CW, Harper VM, Thrash-Williams B, Cantu-Medellin N, Chacko BK, et al. (2013). Antioxidant functions for the hemoglobin β 93 cysteine residue in erythrocytes and in the vascular compartment *in vivo*. *Free Radical Biology and Medicine*, 55: 119–129.
- Wang K, Zhang J, Ping S, Ma Q, Chen X, Xuan H, Shi J, Zhang C, Hu F (2014). Anti-inflammatory effects of ethanol extracts of Chinese propolis and buds from poplar (*Populusxcanadensis*). *Journal of Ethnopharmacology*, 155: 300-311.
- Yaraksa N, Anunthawan T, Theansungnoen T, Daduang S, Araki T, Dhiravisit A, Thammasirirak S (2014). Design and synthesis of cationic antibacterial peptide based on Leucrocin I sequence, antibacterial peptide from crocodile (*Crocodylus siamensis*) white blood cell extracts. *The Journal of Antibiotics*, 67: 205-212.
- Yu T, Ahn HM, Shen T, Yoon K, Jang HJ, Lee YJ, Yang HM, Kim JH, Kim C, Han MH, Cha SH, Kim TW, Kim SY, Lee J, Cho JY (2011). Anti-inflammatory activity of ethanol extract derived from *Phaseolus angularis* beans. *Journal of Ethnopharmacology*, 137: 1197-1206.
- Zeilhofer HU (2007). Prostanoids in nociception and pain. *Biochem Pharmacol*, 73(2): 165-174.
- Zimmerman LM, Vogel LA, Bowden RM (2009). Understanding the vertebrate immune system: insights from the reptilian perspective. *J Exp Biol*, 213: 661-671.



Antioxidant Properties of *Crocodylus siamensis* Blood Components on H₂O₂-induced Human Skin Fibroblast Cells

Nisachon Jangpromma [a,b], Khantheeranut Suttee [a,c], Santi Phosri [a,c],
Tinnakorn Theansungnoen [a,c], Jiraporn Lueangsakulthai [a,c],
Wisarat Payoungkiattikun [a], Sakda Daduang [a,d] and Sompong Klaynongsruang* [a,c]

[a] Protein and Proteomics Research Center for Commercial and Industrial Purposes (ProCCI),
Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand.

[b] Office of the Dean, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand.

[c] Department of Biochemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand.

[d] Division of Pharmacognosy and Toxicology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University,
Khon Kaen 40002, Thailand.

* Author for correspondence; e-mail: somkly@kku.ac.th

Received: 29 September 2016

Accepted: 16 January 2017

ABSTRACT

To elucidate the antioxidant activity of *Crocodylus siamensis* (*C. siamensis*) blood components on BJ human skin fibroblasts, hydrogen peroxide (H₂O₂), a reactive oxygen species (ROS) causing cellular injury associated with the induction of numerous diseases, was selected as the oxidant in this research. Using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide solution (MTT) assay, *C. siamensis* blood components were found to exhibit no cytotoxicity on BJ cells. However, the oxidative damage induced by 500 µM H₂O₂ to BJ cells led to a significant reduction of cell growth. A pronounced protective effect against this damage was observed upon pre-incubation of the cells with 25, 50 and 100 µg/ml of each *C. siamensis* blood component for 1 h prior to H₂O₂-exposure. The highest potential to preserve cell viability was found for *C. siamensis* hemoglobin (cHb) (89.0%). When observed by visible light microscopy, BJ cells exposed to H₂O₂ displayed diverse morphological alterations, including decreased cell density, cell shrinkage and loss of typical fibroblast appearance. In contrast, BJ cells pre-incubated with *C. siamensis* blood components remained largely intact after exposure to H₂O₂. It could further be shown that treatment with *C. siamensis* blood components did not exhibit any cytotoxic effect on human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). To evaluate if the protective effect of cHb against H₂O₂-induced damage to fibroblast cells is correlated to cellular apoptosis, annexin V-FITC/PI-staining flow cytometry analysis was conducted. The collected data clearly demonstrate that H₂O₂ induces apoptosis in human skin fibroblast cells, which was evidently decreased by pre-treatment with cHb. It is therefore concluded that *C. siamensis* blood components possess a great potential to inhibit H₂O₂-induced oxidative damage in BJ human skin fibroblast cells.

Keywords: antioxidant, apoptosis, crocodile, hydrogen peroxide, peripheral blood mononuclear cell, plasma, serum, leucocyte, fibroblast

1. INTRODUCTION

Reactive oxygen species (ROS) are a group of reactive molecules or free radicals derived from molecular oxygen [1]. ROS include not only free radicals, such as the superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) or hydroxyl radical ($\bullet OH$), but also non-radical molecules, such as hydrogen peroxide (H_2O_2) and singlet oxygen (1O_2) [2]. Several ROS are continuously generated under normal physiological conditions during mitochondrial electron transport in organisms that rely on aerobic respiration or oxidoreductase-mediated metabolism [3]. Additionally, free radicals may be released during peroxisomal fatty acid metabolism and phagocytosis by phagocytic cells, such as macrophages [3]. During normal aerobic respiration, low levels of ROS are generated to regulate numerous signal transduction processes necessary for cellular homeostasis [2]. At excessive concentrations, however, ROS lead to elevated oxidative stress in cells, which may cause severe damage to DNA, proteins and lipids. Consequently, pronounced oxidative stress supports the pathogenesis of various degenerative disorders, including carcinogenesis, neurodegeneration, atherosclerosis, diabetes, inflammation and aging [3-6]. Moreover, numerous studies have identified ROS as a cause of several skin diseases [2, 7, 8].

The skin is the largest interface body organ and acts as a guard to prevent harmful effects of temperature, damaging ultraviolet radiation from sunlight, exogenous chemicals and bacterial infections [2, 8]. Oxidative stress induced by excessive ROS production in the skin may induce a variety of clinical conditions, including skin aging, inflammatory skin disorders and carcinogenesis [7]. Thus, natural

bioactive compounds that display antioxidant activity while showing relatively low incidences of detrimental side effects are of significant interest for the prevention and treatment of negative effects arising from oxidative stress.

Crocodile blood represents a rich and valuable source for bioactive compounds of natural origin. Scientific research covering potential applications for crocodile blood is predominantly focused on the utilization as treatment or supplement for human health. Notable examples are the application as alternative antibiotics and artificial blood products [9]. Moreover, traditional Chinese medicine uses crocodile blood and other components, such as oil, bile and gall bladder to treat a broad variety of ailments in patients, ranging from bronchitis, coughing, allergy, skin problems, high blood pressure and cancer [9]. With regard to our previous studies about blood of the Siamese crocodile (*C. siamensis*), we found potent antimicrobial property in all investigated components, including serum [10], plasma [11, 12], hemoglobin (Hb) [13] and white blood cell extract (WBC) [14]. In addition, these blood components were shown to exhibit promising anti-cancer, anti-inflammatory and antioxidant activity [15-18]. With respect to their antioxidant properties, *C. siamensis* blood components displayed high activity in ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)) radical scavenging, DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging, nitric oxide scavenging, hydroxyl radical scavenging and linoleic peroxidation assays. Among the investigated blood components, cHb and WBC were found to possess the highest antioxidant activity. Furthermore, we discovered that *C. siamensis*

blood components contain several proteins or peptides with antioxidant activity [13, 15, 18, 19], which strongly suggests a potential application as novel natural antioxidants, especially useful as skin care products.

Therefore, to the best of our knowledge, the present work constitutes the first report covering antioxidant effects of *C. siamensis* blood components against H₂O₂-induced oxidative stress in BJ human skin fibroblast cells.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Crocodile Blood Collection

Crocodile (*C. siamensis*) blood was purchased from Sriracha Moda Farm., Ltd., Chon Buri, Thailand. As previously described, crocodile blood samples were withdrawn from the supravertibral branch of the internal jugular vein of crocodiles aged between 1-3 years. In order to preserve the crocodile whole blood, one fraction of crocodile blood was transferred into a bottle containing EDTA (8 mg/ml) while the other fractions were transferred into 15-ml conical tubes without any anticoagulant for crocodile serum collection. Afterwards, all blood samples were stored overnight at 4 °C. Serum was obtained after induction of complete blood clotting by centrifugation at 2,000 × *g* for 10 min in a refrigerated centrifuge. Plasma, white blood cells (WBCs) and red blood cells (RBCs) were collected individually after the cells in the whole blood sample were allowed to settle in the top (liquid), middle (buffy coat) and bottom layers of the bottle, respectively. The obtained plasma and serum were kept at -70 °C until further use [15, 17, 18], while RBCs and WBCs were used as starting material for the extraction of the other *C. siamensis* blood components.

2.2 Extraction of Crocodile Hemoglobin

Crocodile hemoglobin (cHb) was extracted from RBCs according to previously reported methods [13, 17-19]. Briefly, centrifugation at 3,000 × *g* for 5 min was performed after RBCs were washed with ice-cold phosphate buffer saline (PBS), pH 7.0, for three times. After centrifugation, the pellet cells were lysed by adding ice-cold distilled water and incubated for 10 min. cHb in the supernatant was obtained after centrifugation at 10,000 × *g* for 20 min and then kept at -70 °C until use.

2.3 Extraction of Crocodile White Blood Cells

White blood cells (WBCs) were extracted as previously described [14, 15]. Briefly, WBCs were washed at least three times with PBS buffer, pH 7.0. After centrifugation at 5,000 × *g* for 10 min, the pellets were re-suspended in 10% acetic acid solution (v/v). The suspended WBCs were extracted by homogenization on ice for 5 min. After that, the homogenate was centrifuged at 12,000 × *g* for 30 min in a refrigerated centrifuge. The supernatant was collected and the acetic acid was removed by a SpeedVac concentrator. The WBC extract was finally dissolved in PBS buffer to yield cWBC.

2.4 Sodium Dodecyl Sulfate

Polyacrylamide Gel Electrophoresis

The protein profile of crocodile blood components, including plasma, serum, cHb and cWBC, was analyzed by 13.5% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Therefore, equal concentration (5 µg/µl) of each blood component was loaded onto the gel. A low

molecular weight kit was run alongside as a standard marker containing six proteins: Phosphorylase b, 97 kDa; albumin, 66 kDa; ovalbumin, 45 kDa; carbonic anhydrase, 30 kDa; trypsin inhibitor, 20.1 kDa and α -lactalbumin, 14.4 kDa (GE Healthcare, Sweden). The proteins were visualized as a pronounced band on SDS-PAGE with Coomassie brilliant blue R-250.

2.5 Cell Culture

Human skin fibroblast (BJ) cells were purchased from ATCC CRL-2522, Rockville, MD, USA. BJ cells were cultured in an Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM), supplemented with fetal bovine serum (FBS) and antibiotic:antimycotic (Gibco, USA) with a final concentration of 10% and 1%, respectively, in order to create an appropriate culture medium. Cell incubation was performed in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37 °C.

2.6 Isolation of Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC)

Whole blood from healthy humans was obtained from Blood Transfusion Center Faculty of Medicine Khon Kaen University (ethical approval number HE601010). PBMCs were isolated from whole blood using Ficoll-Paque (GE Healthcare, Sweden). Blood was diluted with PBS (1:1) and carefully layered on Ficoll medium. Then, centrifugation was performed at $400 \times g$ for 40 min at 22 °C. The layer containing the PBMC was carefully transferred to new 15-ml conical tubes. The remaining red blood cells were lysed with lysis solution (155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃ and 0.1 mM EDTA). Afterwards, centrifugation was performed at $400 \times g$ for 10 min at 22 °C and the supernatant was discarded carefully without disturbing the resulting cell pellet. PBMCs were then washed twice with PBS

and re-suspended in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS and 1% antibiotic:antimycotic (Gibco, USA). The cell suspension was adjusted to contain 2×10^5 cells/well for subsequent MTT analysis.

2.6 MTT Cell Viability Assay

The BJ cells were plated at a density of 1×10^4 cells/well into 96-well tissue culture plates and allowed to adhere by culturing in EMEM supplement with 10% FBS. Cell incubation was performed in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37 °C. In cell viability experiments, the culture medium was replaced with the same medium supplemented with (0-500 µg/ml) of *C. siamensis* plasma, serum, cHb or cWBC. In the case of PBMC, cells at a density of 2×10^5 cells/well were immediately plated into 96-well tissue culture plates after cell isolation, followed by adding 25, 50, and 100 µg/ml of each blood component (*C. siamensis* plasma, cHb, or cWBC). After 24 h incubation, BJ or PBMC cell viability was evaluated using the MTT assay by addition of 150 µl of MTT solution (MTT, 0.5 mg/ml in EMEM) to each well. Incubation for 4 h at 37 °C in a humidified atmosphere was performed to ensure that living cells with active metabolism are able to convert MTT into a purple colored formazan product, precipitating inside the cells. Afterwards, the formazan product was solubilized by addition of 100 µl of dimethyl sulfoxide (DMSO) and gently tapping or shaking for 1 - 2 min. Then, the absorbance of each well was determined at 550 nm using a micro plate reader, and the cell viability was evaluated by comparing the measured absorbance with the absorbance of untreated cells. All experiments were repeated at least three times.

2.7 H₂O₂-Induced Oxidative Stress Assay

The assessment of H₂O₂-induced oxidative stress on BJ human skin fibroblast cells was carried out according to methods reported previously [20, 21] with slight modifications. BJ cells were seeded into 96-well plates at a density of 1×10^3 cells/well. The pre-treatment with crocodile blood components was initiated 24 h after seeding, employing 25, 50, and 100 µg/ml of each blood component (plasma, serum, cHb, and cWBC). After pre-treatment with defined concentrations of crocodile blood components for 1 h, the cells were exposed to 500 µM of H₂O₂ for 24 h and their viability was assessed by the MTT assay as described earlier.

A microscopic technique was used to assess the antioxidant activity of the crocodile blood components. Therefore, BJ cells (1×10^5 cells/well) were plated into 24-well plates and allowed to attach overnight. Afterwards, the cells were pre-treated with defined concentrations of crocodile blood components for 1 h, followed by incubation in the presence of 500 µM H₂O₂ for 24 h. Then, the medium was emptied and washed twice with PBS, and the cells were fixed with 10% neutral buffered formalin for 10 min. The cell morphology was examined after staining with Wright-Giemsa under a light microscope. Untreated cells and cells treated with H₂O₂, which were cultured under the same condition, were used as controls.

2.8 Flow Cytometric Apoptosis Assays

Apoptotic rates were evaluated using a fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated annexin V/propidium iodide (PI) double staining method (BioLegend, San Diego, CA) in conjunction with a flow cytometer [22]. The fibroblast cells were seeded at a density of 1×10^5 cells/well in 12-well plates

and allowed to attach overnight. Afterwards, pre-treatment with cHb at concentrations of 25, 50 and 100 µg/ml for 1 h was performed, followed by exposure to 500 µM of H₂O₂ for 24 h. Adherent cells were collected and washed twice with ice-cold PBS before resuspension in binding buffer at a concentration of 1×10^5 cells/ml. Then, 100 µl of cell suspension were transferred into a 5-ml polystyrene round-bottom tube and labeled with 5 µl of annexin V-FITC and 10 µl of PI. The cell solution was gently stirred and incubated for 15 min at room temperature in the dark. Immediately, after addition of 400 µl binding buffer to each tube the mixture was analyzed on a BD FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences, USA).

2.9 Statistical Analysis

All results are expressed as means $\pm$ standard deviation (SD). Analysis of variance was performed for the MTT-based assay of H₂O₂-induced oxidative stress, which was conducted with 3 replications and the least significant difference (LSD) was used to compare means. The difference between groups of data from flow cytometry assay (apoptosis) was analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA followed by Dunnett's test). Statistical significance was accepted at $P < 0.05$.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Protein Profile of *C. siamensis* Blood Components

In order to elucidate the molecular mass distribution profile of *C. siamensis* blood components (plasma, serum, cHb and cWBC), 13.5% SDS-PAGE was used for the measurement (Figure 1). The derived results were consistent with previous reports stating that most protein bands of crocodile plasma are associated with a molecular mass of over

27 kDa. Major protein bands were found at around 66 and 120 kDa, which correspond to albumin and gamma globulins, respectively [18]. Moreover, the profile of crocodile serum was found to be very similar to that of crocodile plasma, although the serum contained more protein bands between 14 kDa and 15 kDa. In addition, the protein profile of cHb also coincided with earlier observations [18, 19]. Two major bands of α - and β -cHb were observed in the cHb profile around 14 and 15 kDa, respectively, while additional faint bands representing dimeric forms of cHb were found at around 28 kDa and 30 kDa. As described by

Theansungnoen *et al.* and Phosri *et al.* [15, 18], cWBC contains several proteins that can be divided into two groups with respect to protein size: The first group containing proteins of more than 14 kDa, and another group with a molecular mass lower than 14 kDa. The collected data further indicate that the derived *C. siamensis* blood components contained all major proteins as previously reported, even though they were obtained from different of batches (lots). Furthermore, it was determined that all blood components may still retain their normal biological functions, allowing the use of the samples in further studies.

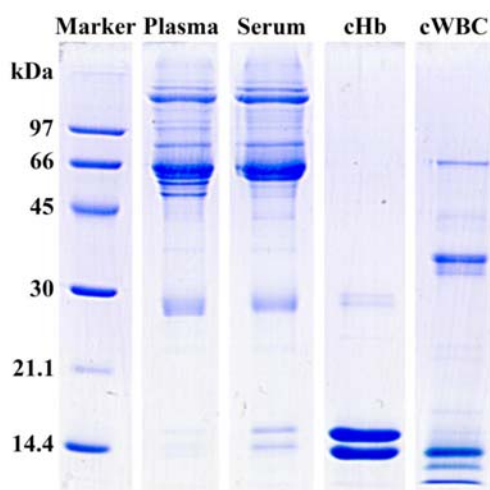


Figure 1. Protein profile of *C. siamensis* blood components derived by 13.5% SDS-PAGE. Equal concentrations of each sample at 5 μ g/ml were used for this experiment. lane 1 (Marker): low molecular weight protein marker, lane 2: plasma, lane 3: serum, lane 4 (cHb): hemoglobin, lane 5 (cWBC): crude white blood cell extract.

3.2 Cell Viability/Cytotoxicity

In order to test the anticipated protective properties of *C. siamensis* blood components against H_2O_2 -induced oxidative damage in BJ cells, the MTT assay was used for the screening of potential effects on the viability of the cells, as well as for cytotoxicity assessment. The MTT assay constitutes an enzyme-based technique widely used in both cell viability and cytotoxicity tests, which

relies on the conversion of MTT into a purple colored formazan product, mediated by a specific mitochondrial reductase only present in living cells. Consequently, a complete loss of MTT conversion ability is observed upon cell death, resulting in clear distinction between living and dead cells and thus allowing an assessment of cell viability by measurement of the formazan-specific absorbance [23]. Herein, we provide evidence that none of

the *C. siamensis* blood components displayed considerable cytotoxic effects toward BJ cells after treatment with defined concentrations for 24 h, as visible from the high percentage of cell viability (Figure 2). Cell viability was calculated in comparison to untreated BJ cells, which were considered to represent 100% viability. The highest reduction in cell viability was found for crocodile serum,

with values not exceeding 20%, while other blood components showed only negligible reductions in cell viability, ranging from 5-9%. These results guaranteed that none of the *C. siamensis* blood components in a range of 25-100 $\mu\text{g/ml}$ exhibited cytotoxic effects toward BJ cells, and, in consequence, similar doses were used in the following experiments.

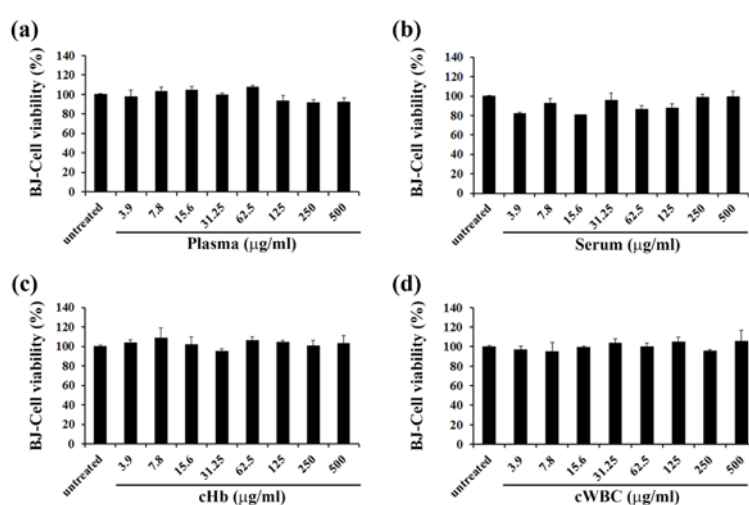


Figure 2. Cell viability/cytotoxicity of *C. siamensis* blood components analyzed using the MTT assay. BJ cells at a density of 1×10^4 cells/well were cultured overnight in a 96-well plate and then co-incubated with *C. siamensis* blood components at defined concentrations ranging between 0-500 $\mu\text{g/ml}$ for 24 h before assessment by the MTT assay. (a) plasma, (b) serum, (c) hemoglobin (cHb) and (d) crude white blood cells extract (cWBC). Each result was expressed as mean $\pm$ SD.

3.3 Protective Effects of *C. siamensis* Blood Components on H_2O_2 -Induced Oxidative Stress in BJ Cells

H_2O_2 -mediated induction of oxidative stress in cell culture models has been utilized in numerous studies as a powerful methodology for the discovery of novel, naturally derived antioxidant compounds [6, 20, 21, 24]. H_2O_2 is generally considered the most important ROS and acts further as a precursor for numerous other ROS with the potential to induce severe cellular injury, consequently leading to the occurrence of a

variety of diseases related to free radicals [20, 25]. In recent research, statistical tests revealed that a concentration of 500 μM H_2O_2 is sufficient to induce significant cytotoxicity to BJ cells. Hence, a reduction of cell viability by approximately 50% was observed for BJ cells in the MTT assay (Figure 3). However, pre-treatment with 25, 50 and 100 $\mu\text{g/ml}$ of each *C. siamensis* blood component for 1 h before exposition to H_2O_2 decreased the observed cell toxicity significantly (Figure 3a, c, d) in all cases, except for serum treated cells (Figure 3b). The elevated cell viability of

BJ cells after pre-treatment was found to range between 60.7-66.0% for plasma (Figure 3a), 48.5-52.9% for serum (Figure 3b), 83.4-89.0% for cHb (Figure 3c), and 67.2-71.8% for cWBC (Figure 3d), respectively. Consistent with earlier reports [18], the highest potential to elevate cell viability was observed for

cHb-treated cells (89.0%). In contrast, serum treatment exhibited the lowest protective effects against H_2O_2 -induced oxidative damage (48.5%), indicating that *C. siamensis* serum has little to no potential to enhance cell viability with respect to H_2O_2 -induced cytotoxicity.

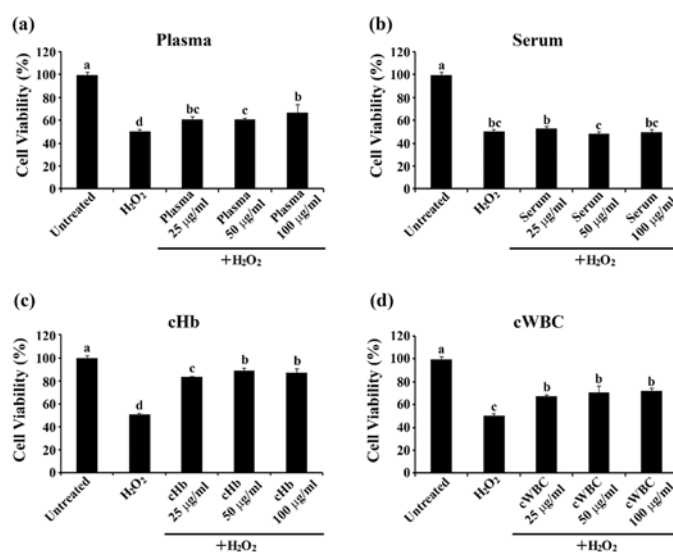


Figure 3. Effects of *C. siamensis* blood components on H_2O_2 -stimulated oxidative stress in BJ cells. Data were reported as viability of cells either pre-incubated with defined concentrations of each *C. siamensis* blood component only, or co-cultured with H_2O_2 . (a) plasma, (b) serum, (c) hemoglobin (cHb) and (d) crude white blood cells extract (cWBC). Each value is shown as the mean $\pm$ SD. Different letters on the top of the bar represent statistically significant differences ($P < 0.05$).

A number of examples for *in vitro* antioxidant activity of *C. siamensis* blood components have recently been reported [13, 15, 18, 19]. Crocodile plasma was found to be potent in suppressing ABTS (13.62%) and hydroxyl (57.27%) radicals [18], while cHb and cWBC inhibited linoleic peroxidation (68.7% for cHb and 78% for cWBC) and displayed antioxidant activity against DPPH (47.3% for cHb and 38% for cWBC), ABTS (24.88% for cHb and 40.18% for cWBC) and NO radicals (40.58% for cHb and 33.6% for cWBC) [15, 18, 19]. However, no data for antioxidant activity of crocodile serum

have been reported up to date. According to this information, it is plausible to conclude that cHb and cWBC bear a high potential to alleviate H_2O_2 -induced intracellular damage of BJ cells, owing to their excellent capability to inhibit a variety of *in vitro* free radicals.

Zilinskas et al. [26] reported a higher antioxidant capacity for blood plasma in patients with periodontitis than for plasma in healthy individuals, while the antioxidant capacity of serum was found to be lower. Therefore, the antioxidant properties of *C. siamensis* plasma might be related to the total antioxidant capacity of several enzymes

(superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase) present within the plasma. Previous work covering cHb indicated that the antioxidant activity of proteins might be exerted by specific domains or functional groups in each subunit that could act as electron donors, eventually leading to the termination of radical chain reactions. Examples include aliphatic and aromatic hydrophobic amino acid residues (Valine, Leucine, Proline, Histidine or Tyrosine) [13, 19]. In analogy, Theansungnoen *et al.* revealed that cWBC contain several peptides which were presumed to be responsible for their antioxidant properties [15]. The activity of these peptides was attributed to the presence of basic amino acids, such as Lysine and Arginine, and protonated amino acids, including Asparagine, Glutamine and Threonine [15], which were proposed to inhibit free radicals by proton donation [15, 27].

Morphological changes of BJ cells were observed under a light microscope after pre-treatment with defined concentrations of *C. siamensis* blood components, followed by incubation with H_2O_2 (Figure 4). Compared with healthy BJ cells (untreated), cells exposed to 500 μM H_2O_2 displayed morphological changes similar to previously reported observations [20, 21, 28]. The alterations of cell morphology included a decrease of cell density, cell shrinkage and loss of typical fibroblast appearance. However, upon pre-incubation with *C. siamensis* blood components, the BJ cells remained intact and retained the typical fibroblast shape after H_2O_2 -exposure. Furthermore, the distribution of cells on a 24-well culture plate was found to be normal and homogeneous. It is noteworthy that serum treatment resulted in the lowest observable cell density, thus supporting our previous assertion that *C. siamensis* serum does not have the potential

to elevate cell viability toward H_2O_2 -induced cytotoxicity.

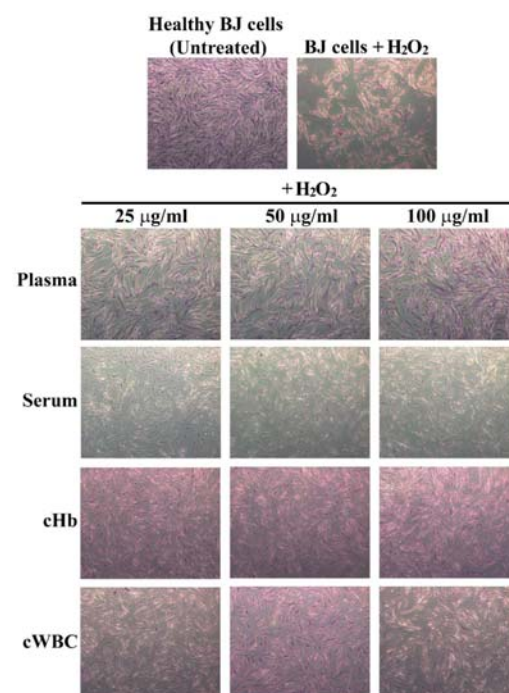


Figure 4. Light microscope photographs of BJ cells under H_2O_2 -induced oxidative stress. Investigation of the ability of individual *C. siamensis* blood components to prevent oxidative damage to BJ cells was carried out by pre-incubation with defined concentrations of each *C. siamensis* blood component for 1 h and subsequent co-culturing with H_2O_2 . Healthy (untreated) cells and cells treated with 500 μM H_2O_2 were used as controls.

3.4 Cytotoxicity of *C. siamensis* Blood Components on Human PBMC

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) belong to a population of immune cells characterized by a round nucleus, such as lymphocytes, monocytes or macrophages. These blood cells are an important component of the immune system and help combatting infection and adapting to pathogenic intruders. Extraction of PBMCs from whole blood can be performed using

Ficoll, which facilitates the separation of the individual blood layers formed by gradient centrifugation. Using this technique, the blood will be partitioned into a top layer consisting of the plasma, followed by a lower layer of PBMCs and a fraction of polymorphonuclear cells (such as neutrophils and eosinophils) and, finally, a bottom layer containing the erythrocytes [29]. PBMCs are widely used in research as well as for clinical or toxicological applications [30]. Therefore, a cytotoxicity assay was performed in order to elucidate safe treatment concentrations of *C. siamensis* plasma, cHb and cWBC by which no toxic effects on PBMC cells were observed after

24 h of incubation. The cytotoxicity results demonstrated that all *C. siamensis* blood components were safe within the investigated concentration range and induced no toxicity to human PBMC immune cells. Moreover, the PBMC population was found to exhibit enhanced cell proliferation in response to 25-100 µg/ml of either *C. siamensis* plasma, cHb or cWBC (Figure 5). Taken collectively, these results imply that the investigated *C. siamensis* plasma, cHb and cWBC contain substances with antioxidant activity, which were considered non-toxic for human PBMC cells over a broad range of concentrations.

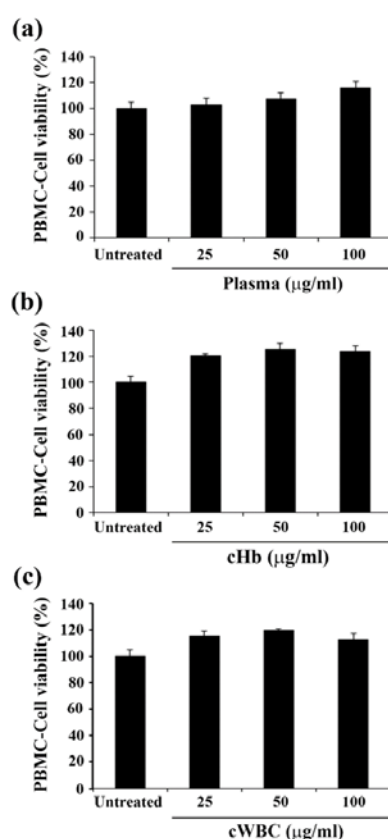


Figure 5. PBMC cells cytotoxic assay. PBMC cells were isolated from whole blood of healthy humans using Ficoll-Paque (GE Healthcare, Sweden). A cell suspension of 2×10^5 cells/well was seeded in 96-well plates and different quantities (25-100 µg/ml) of *C. siamensis* blood components were added. The impact of the individual *C. siamensis* blood components on the cell viability was assessed after treatment for 24 h using the MTT assay. (a) plasma, (b) hemoglobin (cHb) and (c) crude white blood cells extract (cWBC).

3.5 Apoptosis

Apoptosis refers to the process of programmed cell death, which ensures effective cellular disposal in response to development anomalies and specific environmental conditions. The ability of cells to undergo apoptosis can be induced by diverse stimuli, common signaling mediators and ROS (i.e. H_2O_2). In this context, H_2O_2 has been shown to be capable of inducing apoptosis [24, 31]. Hence, inhibition of apoptosis was considered as a plausible mechanism explaining the protective effects of *C. siamensis* blood on H_2O_2 -induced oxidative stress in human skin fibroblast cells. Among all crocodile blood components, cHb represents the most abundant constituent and showed the strongest ability to protect cells from H_2O_2 -induced oxidative damage. Therefore, cHb was chosen to represent

C. siamensis blood in the apoptosis assay used in the present study. The results demonstrated that 500 μM H_2O_2 induced significant oxidative stress-related apoptosis as shown in Figure 6. The induction of early apoptosis, as defined by Annexin V positive but PI-negative staining, was determined as 14.5% increase compared to untreated cells. Late apoptosis (both Annexin V and PI positive) was significantly increased by 32.3%, exceeding the degree of early apoptosis. Notably, no significant increase in either early or late apoptosis could be seen when human skin fibroblast cells were pre-treated with cHb at a concentration of 25, 50 or 100 $\mu g/ml$. Therefore, the data demonstrate that *C. siamensis* blood has the potential to protect cells from oxidative damage induced by H_2O_2 via inhibition of cellular apoptosis.

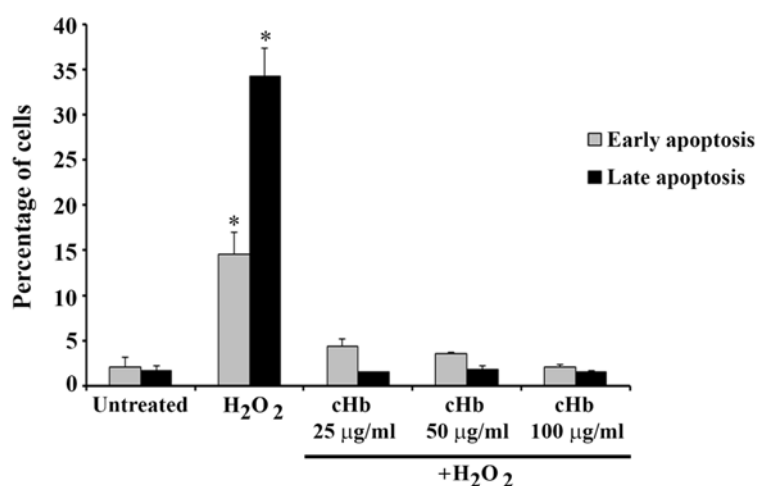


Figure 6. Protective effects of cHb on H_2O_2 -induced apoptosis analysed by Annexin V-FITC/PI flow cytometry. A cell suspension of 1×10^5 cells/well was seeded in 12-well plates and different concentrations (25-100 $\mu g/ml$) of cHb were added. After a 1 h incubation period, cells were exposed to 500 μM H_2O_2 for 24 h and labeled with annexin V-FITC/PI. The apoptosis rate was measured immediately after H_2O_2 -stimulation by flow cytometry. Results are presented as mean $\pm$ SD. *, $P < 0.05$, significantly different from control by one-way ANOVA.

CONCLUSION

The present study provides strong evidence that *C. siamensis* blood components confer a pronounced protective effect against oxidative cellular stress, while showing no adverse effects on BJ skin fibroblast cells. All collected data clearly demonstrate that pre-treatment with *C. siamensis* plasma, cHb or cWBC 1 h prior to H₂O₂ exposure attenuates H₂O₂-induced cytotoxicity in BJ cells. Moreover, incubation with *C. siamensis* plasma, cHb and cWBC in over a broad concentration range for 24 h did not exert any toxic effect on human PBMC immune cells. Flow cytometry measurements proved that H₂O₂ induces the apoptosis of human skin fibroblast cells, which could be evidently attenuated by pre-treatment with cHb. Therefore, the collected results in this study provide a well-founded rationale for the utilization of *C. siamensis* blood components as valuable natural resource in the development of skin therapeutic products.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was financially supported by a scholarship from the Higher Education Research Promotion and National Research University Project of Thailand, Office of the Higher Education Commission, through the Food and Functional Food Research Cluster of Khon Kaen University. Acknowledgment is also extended to the young researcher development project of Khon Kaen University and Thailand Research Fund (TRF) for new researcher (TRG5880017). We also wish to acknowledge the Protein and Proteomics Research Center for Commercial and Industrial Purposes (ProCCI), Faculty of Science, Khon Kaen University Thailand. Further, we are very grateful for the extensive additional support by Sriracha Moda co., Ltd., Chon Buri, Thailand.

REFERENCES

- [1] Turrens J.F., *J. Physiol.*, 2003; **552**: 335-344. DOI 10.1113/jphysiol.2003.049478.
- [2] Bickers D.R. and Athar M., *J. Invest. Dermatol.*, 2006; **126**: 2565-2575. DOI 10.1038/sj.jid.5700340.
- [3] Choi E.M., Kim G.H. and Lee Y.S., *Phytother. Res.*, 2010; **24**: 1037-1041. DOI 10.1002/ptr.3070.
- [4] Ray P.D., Huang B.W. and Tsuji Y., *Cell. Signal.*, 2012; **24**: 981-990. DOI 10.1016/j.cellsig.2012.01.008.
- [5] Fu R., Zhang Y.T., Guo Y.R., Huang Q.L., Peng T., Xu Y., Tang L. and Chen F., *J. Ethnopharmacol.*, 2013; **147**: 517-524. DOI 10.1016/j.jep.2013.03.058.
- [6] Dash R., Acharya C., Bindu P.C. and Kundu S.C., *BMB. Rep.*, 2008; **41**: 236-241.
- [7] Young C.N., Koepke J.I., Terlecky L.J., Borkin M.S., Boyd Savoy L. and Terlecky S.R., *J. Invest. Dermatol.*, 2008; **128**: 2606-2614. DOI 10.1038/jid.2008.122.
- [8] Sander C.S., Chang H., Hamm F., Elsner P. and Thiele J.J., *Int. J. Dermatol.*, 2004; **43**: 326-335. DOI 10.1111/j.1365-4632.2004.02222.x.
- [9] Shim-Prydon G. and Camacho-Barreto H., *RIRDC publication no 06/117, RIRDC project no DAQ 320A*, 2007: 65.
- [10] Preecharram S., Daduang S., Bunyatratchata W., Araki T. and Thammasirirak S., *Afr. J. Biotechnol.*, 2008; **7**: 3121-3128.
- [11] Preecharram S., Jearranaiprepame P., Daduang S., Tamsiripong Y., Somdee T., Fukamizo T., svasti J., araki T. and Thammasirirak S., *Animal Sci. J.*, 2010; **81**: 393-401. DOI 10.1111/j.1740-0929.2010.00752.x.
- [12] Kommanee J., Preecharram S., Daduang S., Tamsiripong Y., Dhiravisit A., Yamada

- Y. and Thammasirirak S., *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, 2012; **11**: 22. DOI 10.1186/1476-0711-11-22.
- [13] Srihongthong S., Pakdeesuwan A., Daduang S., Araki T., Dhiravisit A. and Thammasirirak S., *Protein. J.*, 2012; **31**: 466-476. DOI 10.1007/s10930-012-9424-7.
- [14] Pata S., Yaraksa N., Daduang S., Tamsiripong Y., Svasti J., Araki T. and Thammasirirak S., *Dev. Comp. Immunol.*, 2011; **35**: 545-553. DOI 10.1016/j.dci.2010.12.011.
- [15] Theansungnoen T., Yaraksa N., Daduang S., Dhiravisit A. and Thammasirirak S., *Protein. J.*, 2014; **33**: 24-31. DOI 10.1007/s10930-013-9536-8.
- [16] Patathananone S., Thammasirirak S., Daduang J., Chung J.G., Tamsiripong Y. and Daduang S., *Environ. Toxicol.*, 2015; **31**: 986-997. DOI 10.1002/tox.22108.
- [17] Kommanee J., Phosri S., Daduang S., Tamsiripong Y., Dhiravisit A. and Thammasirirak S., *Chiang. Mai. J. Sci.*, 2014; **41**: 627-634.
- [18] Phosri S., Mahakunakorn P., Lueangsakulthai J., Jangpromma N., Swatsitang P., Daduang S., Dhiravisit A. and Thammasirirak S., *Protein. J.*, 2014; **33**: 484-492. DOI 10.1007/s10930-014-9581-y.
- [19] Jandaruang J., Siritapetawee J., Thumanu K., Songsiriritthigul C., Krittanai C., Daduang S., Dhiravisit A. and Thammasirirak S., *Protein. J.*, 2012; **31**: 43-50. DOI 10.1007/s10930-011-9372-7.
- [20] Craciunescu O., Constantin D., Gaspar A., Toma L., Utoiu E. and Moldovan L., *Chem. Cent. J.*, 2012; **6**: 97. DOI 10.1186/1752-153X-6-97.
- [21] Thring T.S., Hili P. and Naughton D.P., *J. Inflamm.*, 2011; **8**: 27. DOI 10.1186/1476-9255-8-27.
- [22] Liu E., Dua X., Ge R., Liang T., Niu Q. and Li Q., *Food Chem. Toxicol.*, 2013; **60**: 302-308. DOI 10.1016/j.fct.2013.07.072.
- [23] Riss T.L., Moravec R.A., Niles A.L., Benink H.A., Worzella T.J. and Minor L., Cell viability assays. In: Sittampalam GS C.N., Nelson H, et al., editors. Assay Guidance Manual [Internet]: bookshelf; 2013.
- [24] Piao M.J., Kang K.A., Zhang R., Ko D.O., Wang Z.H., You H.J., Kim H.S., Kim J.S., Kang S.S. and Hyun J.W., *Biochimica. et. Biophysica. Acta.*, 2008; **1780**: 1448-1457. DOI 10.1016/j.bbagen.2008.07.012.
- [25] Kumar R., Balaji S., Sripriya R., Nithya N., Uma T.S. and Sehgal P.K., *J. Agric. Food. Chem.*, 2010; **58**: 1518-1522. DOI 10.1021/jf9025986.
- [26] Zilinskas J., Kubilius R., Zekonis G. and Zekonis J., *Medicina (Kaunas)*, 2011; **47**: 193-199.
- [27] Qian Z.J., Jung W.K. and Kim S.K., *Bioresour. Technol.*, 2008; **99**: 1690-1698. DOI 10.1016/j.biortech.2007.04.005.
- [28] Ao G.Z., Chu X.J., Ji Y.Y. and Wang J.W., *Int. J. Mol. Sci.*, 2014; **15**: 3970-3988. DOI 10.3390/ijms15033970.
- [29] Pourahmad J. and Salimi A., *Iran. J. Pharm. Res.*, 2015; **14**: 979.
- [30] Zhang M. and Huang B., *Stem. Cell. Res. Ther.*, 2012; **3**: 48. DOI 10.1186/scrt139.
- [31] Singh M., Sharma H. and Singh N., *Mitochondrion*, 2007; **7**: 367-373. DOI 10.1016/j.mito.2007.07.003.



The 5th Asia Pacific Protein Association Conference
and the 12th International Symposium of
the Protein Society of Thailand

PROGRAM AND ABSTRACTS

July 11-14, 2017
The Tide Resort, Bangsaen, Thailand

PP070-40	Weeraya Phupiewkham	Antimicrobial activity of Crocodile (<i>Crocodylus siamensis</i>) leukocyte extract against <i>Propionibacterium acnes</i> : Application for Acne treatment.....	142
PP071-41	Jiraporn Lueangsakulthai	Novel antioxidant and anti-inflammatory peptides from Siamese crocodile (<i>Crocodylus siamensis</i>) hemoglobin hydrolysates.....	143
PP072-42	Sirinthip Sosiangdi	The protective effect of white blood cell extract from <i>Crocodylus siamensis</i> blood on <i>Propionibacterium acnes</i> -induced inflammation in RAW 264.7 macrophages.....	144
PP073-43	Thanawan Srilert	Investigation of wound healing properties of <i>Crocodylus siamensis</i> serum on human keratinocyte cells (HaCaT).....	145
PP074-44	Surachai Maijaroen	Antimicrobial peptide analogs of <i>Crocodylus siamensis</i> Leucrocin I revealing anticancer activity and apoptotic induction on human colon cancer HCT-116 cells.....	146
PP075-45	Preeyanan Anwised	Over-expression of hemoglobin from <i>Crocodylus siamensis</i> in <i>Pichia pastoris</i>	147
PP076-46	Wisarut Payoungkiattikun	KT2 and RT2, two new anti-inflammatory peptides derived from leucrocin I.....	148
PP077-47	Napaporn Roamcharern	The study of oxygen affinity of cross-linked crocodile (<i>Crocodylus siamensis</i>) hemoglobin.....	149
PP078-48	Nisachon Jangpromma	<i>Crocodylus siamensis</i> blood attenuates oxidative stress and apoptosis induced by hydrogen peroxide in a skin fibroblast cell line.....	150
PP080-49	Yi-Zong Lee	Field-cycling NMR to detect slow-motion backbone dynamics in an early protein unfolding state.....	151
PP082-50	Bordin Butr-Indr	Secretome profile analysis of drug resistance <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	152
PP083-51	Monsiri Chetkhetkran	Comparative study of protein-protein interaction profiles in four gram positive methicillin resistant bacteria.....	153

PP078-48

***Crocodile siamensis* blood attenuates oxidative stress and apoptosis induced by hydrogen peroxide in a skin fibroblast cell line**

Nisachon Jangpromma^{1,2}, Sakda Dadaung^{2,3}, Sompong Klaynongsruang^{2,4}

¹ Office of the dean, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

² Protein and Proteomics Research Center for Commercial and Industrial Purposes (ProCCI), Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

³ Division of Pharmacognosy and Toxicology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

⁴ Department of Biochemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

E-mail: nisaja@kku.ac.th

ABSTRACT

Hydrogen peroxide (H₂O₂) is a reactive oxygen species (ROS) that is believed to cause a variety of diseases. Therefore, the present study aimed to investigate the effect of several potent bioactive peptides and proteins contained in crocodile blood against H₂O₂-induced oxidative stress in a skin fibroblast cell line (BJ). Using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide solution (MTT) assay, *C. siamensis* blood components did not exhibit in any cytotoxic effects on BJ cells up to a concentration of 500 µg/ml. Conversely, oxidative damage to BJ cells induced by 500 µM H₂O₂ led to a marked decrease of cell viability to approximately 50%. However, pre-treatment with 25, 50 and 100 µg/ml of each *C. siamensis* blood component for 1 h before exposition to H₂O₂ was found to significantly attenuate cell toxicity. The cell viability of BJ cells after pre-treatment was found to range between 60.7-66.0% for plasma, 83.4-89.0% for hemoglobin (cHb), and 67.2-71.8% for crude white blood cells extracts (cWBC), respectively. Among all crocodile blood components, cHb showed the strongest ability to protect cells from H₂O₂-induced oxidative stress. Hence, cHb was chosen to represent *C. siamensis* blood in the apoptosis assay. To evaluate if the protective effect of cHb against H₂O₂-induced damage to fibroblast cells, which is correlated to cellular apoptosis, annexin V-FITC/PI-staining flow cytometry analysis was conducted. The collected data clearly demonstrate that H₂O₂ induces apoptosis in BJ cells, which was evidently attenuated by pre-treatment with cHb. It is therefore concluded that *C. siamensis* blood components possess a great potential to inhibit H₂O₂-induced oxidative damage in BJ human skin fibroblast cells.

This research was supported by Thailand Research Fund (TRF) for new researcher (TRG5880017).



The 5th Asia Pacific Protein Association Conference
and the 12th International Symposium of
the Protein Society of Thailand

PROGRAM AND ABSTRACTS

July 11-14, 2017
The Tide Resort, Bangsaen, Thailand

PP070-40	Weeraya Phupiewkham	
	Antimicrobial activity of Crocodile (<i>Crocodylus siamensis</i>) leukocyte extract against <i>Propionibacterium acnes</i> : Application for Acne treatment.....	142
PP071-41	Jiraporn Lueangsakulthai	
	Novel antioxidant and anti-inflammatory peptides from Siamese crocodile (<i>Crocodylus siamensis</i>) hemoglobin hydrolysates.....	143
PP072-42	Sirinthip Sosiangdi	
	The protective effect of white blood cell extract from <i>Crocodylus siamensis</i> blood on <i>Propionibacterium acnes</i> -induced inflammation in RAW 264.7 macrophages.....	144
PP073-43	Thanawan Srilert	
	Investigation of wound healing properties of <i>Crocodylus siamensis</i> serum on human keratinocyte cells (HaCaT).....	145
PP074-44	Surachai Maijaroen	
	Antimicrobial peptide analogs of <i>Crocodylus siamensis</i> Leucrocin I revealing anticancer activity and apoptotic induction on human colon cancer HCT-116 cells.....	146
PP075-45	Preeyanan Anwised	
	Over-expression of hemoglobin from <i>Crocodylus siamensis</i> in <i>Pichia pastoris</i>	147
PP076-46	Wisarat Payoungkiattikun	
	KT2 and RT2, two new anti-inflammatory peptides derived from leucrocin I.....	148
PP077-47	Napaporn Roamcharern	
	The study of oxygen affinity of cross-linked crocodile (<i>Crocodylus siamensis</i>) hemoglobin.....	149
PP078-48	Nisachon Jangpromma	
	<i>Crocodylus siamensis</i> blood attenuates oxidative stress and apoptosis induced by hydrogen peroxide in a skin fibroblast cell line.....	150
PP080-49	Yi-Zong Lee	
	Field-cycling NMR to detect slow-motion backbone dynamics in an early protein unfolding state.....	151
PP082-50	Bordin Butr-Indr	
	Secretome profile analysis of drug resistance <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	152
PP083-51	Monsiri Chetkhetkran	
	Comparative study of protein-protein interaction profiles in four gram positive methicillin resistant bacteria.....	153

PP072-42

The protective effect of white blood cell extract from *Crocodylus siamensis* blood on *Propionibacterium acnes*-induced inflammation in RAW 264.7 macrophages

Sirinthip Sosiangdi^{1,2}, Sompong Klaynongsrungs^{1,2} and Nisachon Jangpromma^{2,3}

¹ Department of Biochemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

² Protein and Proteomics Research Center for Commercial and Industrial Purposes (ProCCI), Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

³ Office of the Dean, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

E-mail: nisaja@kku.ac.th

ABSTRACT

White blood cells (WBC) are an important part of the immune system involved in protecting the body against both infectious disease and foreign invaders, which might be associated to inflammation. Thus, the aim of this work was to study the anti-inflammatory activity of *Crocodylus siamensis* WBC extract by assessment of nitric oxide (NO) production in RAW 264.7 macrophages stimulated with Gram-positive *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*). Prior to evaluating the anti-inflammatory properties of WBC extract, the *in vitro* cytotoxicity against RAW 264.7 cells was investigated using the MTT assay. The results showed that WBC extract in a concentration range of 25-100 µg/ml exhibited no cytotoxic effects toward RAW 264.7 cells. Consequently, similar doses were chosen for the next experiments. For the inflammation assay, heat-killed *P. acnes* was prepared using two individual methods involving either heating at 95 °C for 10 min or autoclaving. Both *P. acnes* preparations were employed to stimulate the inflammatory response in RAW 264.7 cells with or without co-incubation with WBC extract at different concentrations (25, 50 and 100 µg/ml) for 24 h. The obtained results suggest that the bacteria could induce NO production in macrophages under all tested conditions, indicating an inflammatory state was induced within the cells. However, a significant reduction of NO production was effected by the WBC extract at all tested concentrations. Therefore, the results demonstrate that *C. siamensis* WBC extract exhibits anti-inflammatory activity, presumably by modulating NO production in macrophages that were stimulated by *P. acnes*.

This research was supported by The Research Fund for Supporting Lecturer to Admit High Potential Student to Study and Research on His Expert Program Year 2017, Khon Kaen University and Thailand Research Fund (TRF) for new researcher.

The Fourth Workshop on Science and Technology Cooperation

BIODIVERSITY: SECURE OUR FUTURE

Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, CAS
21-24 November, 2016



Chinese Academy of Sciences



Xishuangbanna Tropical Botanical
Garden, CAS



The Thailand Research Fund

diversity priorities. We also compare these to existing biodiversity maps developed by the IUCN, and compare how hotspot priorities differ between the two. Major disparity emerges between these two approaches, highlighting the need for further analyses to develop appropriate priorities for conservation. We also assess if biodiversity hotspots (defined as having 50 and 75% of maximum species diversity per taxa) fall within protected areas, and find in the majority of cases that many of the most important areas for biodiversity of each taxa are currently unprotected and therefore at risk from various forms of exploitation. In addition we explore if indicator taxa can be used to assess diversity and degradation as a surrogate for other taxa, and find that at both family and order level that diversity centres vary considerably between taxa, and caution the use of indicator species as a mainstay to inform conservation approaches.

16. Nisachon Jangpromma

Protective effect of *Crocodylus siamensis* hemoglobin on hydrogen peroxide-induced oxidative damage in HaCaT, a human keratinocyte cell line

NISACHON JANGPROMMA^{1,2}, SAKDA DADAUNG^{2,3} AND SOMPONG KLAYNONGSRUANG^{2,4}

1) Office of the dean, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand. 2) Protein and Proteomics Research Center for Commercial and Industrial Purposes (ProCCI), Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand. 3) Division of Pharmacognosy and Toxicology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand. 4) Department of Biochemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand.

Oxidative stress induced by excessive ROS production in the skin may induce a variety of clinical conditions, including skin aging, inflammatory skin disorders and carcinogenesis. Therefore, natural bioactive compounds that display antioxidant activity while showing relatively low incidences of detrimental side effects are of

significant interest. Although we previously reported that *Crocodylus siamensis* hemoglobin (cHb) is an antioxidant protein by retarding 2,2-diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) radicals, the protective effect on HaCaT, a human keratinocyte cell line is still unknown. By the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide solution (MTT) assay, cHb exhibited no cytotoxicity on HaCaT cells. Furthermore, the oxidative damage induced by 500 μ M hydrogen peroxide (H_2O_2) in HaCaT cells led to a significant decrease in cell viability. However, pre-incubation with 25, 50 and 100 μ g/ml of cHb before exposure to H_2O_2 for 1 h could evidently prevent these cells damage. The morphological changes of HaCaT cells were further evaluated by visible light microscopy. The result demonstrated that HaCaT cells after exposure to H_2O_2 displayed diverse morphological alterations, including decreased cell density, cell shrinkage and loss of typical keratinocyte appearance. In contrast, BJ cells pre-incubated with cHb remained largely intact after exposure to H_2O_2 . Therefore, it can be concluded that cHb possesses a high potential to protect HaCaT cells from H_2O_2 -induced oxidative damage.

17. Supiyanit Maiphae

Taxonomy of the Cladocera (Crustacea: Branchiopoda) in Thailand

SUPIYANIT MAIPHAЕ

*Department of Zoology, Faculty of Science, Kasetsart University, Lad Yao, Chatuchak, Bangkok
10900 supiyanit.m@ku.ac.th*

Progress in biodiversity, evolution and biogeography of freshwater invertebrates in any region are based on firm systematics. In the Cladocera, which is one of the main microcrustacean groups in freshwater ecosystems, taxonomy often forms a bottleneck



ABSTRACTS AND PROCEEDINGS

The 11th International Symposium of the Protein Society of Thailand

3 – 5 August 2016

Convention Center, Chulabhorn Research Institute
Bangkok, Thailand

Protein Society of Thailand (PST)

<http://www.proteinsoc thai.net>

Abstract PP098-24 Md. Abu Zubair White water lily tuber lectin inhibited tumor growth <i>in vivo</i> in mice by G ₀ /G ₁ cell cycle arrest.....	58
Abstract PP105-25 Anupong Tankrathok Effect of sodium arsenite (As ³⁺) on the expression of oxidative stress and DNA damage response genes in Nile tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	59
Abstract PP109-26 Arpaporn Punpad Identification of novel cathelicidin genes in siamese crocodile, <i>Crocodylus siamensis</i>	60
Abstract PP112-27 Santi Phosri Protective effect of crocodile hemoglobin and whole blood on hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human lung fibroblasts (MRC-5).....	61
Abstract PP115-28 Nisachon Jangpromma Evaluation of the properties of plasma from <i>Crocodylus siamensis</i> blood affecting wound repair in human keratinocytes cell line (HaCaT).....	62
Abstract PP116-29 Surachai Maijaroen Antimicrobial peptide analogs of <i>Crocodylus siamensis</i> Leucrocin I with anticancer activity against human colon cancer cells.....	63
Abstract PP118-30 Thiprampai Thamamongood Thermodynamic signatures of antifolates binding to human and malarial dihydrofolate reductase.....	64
Abstract PP119-31 Kanokwan Lowhalidanon Production of monoclonal antibodies against human low density lipoprotein for clinical application.....	65
Abstract PP121-32 Chris Verathamjamras Hollow fiber bioreactor culture system: An efficient tool for study of cell secreted proteins.....	66
Abstract PP122-33 Ratchanu Bunyong Establishment of <i>in vitro</i> assessment of cytotoxic effects of antimalarial drugs on erythropoiesis using hematopoietic pluripotent stem cells (HPSCs).....	67
Abstract PP128-34 Pipop Saejia Metastasis of differentiated thyroid carcinoma induced by environmental contaminant.....	68

Abstract PP115-28

Evaluation of the properties of plasma from *Crocodylus siamensis* blood affecting wound repair in human keratinocytes cell line (HaCaT)

Nisachon Jangpromma^{1,2}, Thanawan Srilert^{2,3}, Pramote Mahakunakorn⁴, Sakda Daduang^{2,4}, Sompong Klaynongsruang^{2,3}

¹ Office of the Dean, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

² Protein and Proteomics Research Center for Commercial and Industrial Purposes (ProCCI), Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

³ Department of Biochemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

⁴ Department of Pharmacognosy and Toxicology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

E-mail: nisaja@kku.ac.th

ABSTRACT

Plasma of *Crocodylus siamensis* was reported to carry strong antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory activity, each constituting requisite properties in supporting the recovery process of injured skin. Although the effects of *C. siamensis* plasma on wound healing have not been thoroughly investigated to date, anecdotal evidence suggests plasma *C. siamensis* plasma has the potential to accelerate the skin recovery process significantly. Therefore, the objective of this study was to assess the wound healing properties of *C. siamensis* plasma on the human keratinocytes cell line (HaCaT). Interestingly, crocodile plasma could activate *in vitro* proliferation and migration of HaCaT, which is regarded as an essential phase of the wound healing process. An *in vitro* cell scratch wounding assay was conducted to investigate the effects of *C. siamensis* plasma in the migration phase, demonstrating that plasma is capable of supporting wound healing in a dose-dependent manner. As a result, the scratch wound area was found almost completely closed after treatment with 200 µg/ml of plasma. Based on these observations, *C. siamensis* plasma is anticipated to bear a great potential for the development of therapeutic products for injured skin.

Supported by the Thailand Research Fund (TRF) for New Researcher Grant, the Higher Education Research Promotion and National Research University Project of Thailand, Office of the Higher Education Commission, through the Food and Functional Food Research Cluster of Khon Kaen University and Protein and Proteomics Research Center for Commercial and Industrial Purposes (ProCCI)