การที่แบคทีเรียมีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน กำลังเป็นปัญหาด้านสาธารณสุขมากขึ้นเรื่อยๆ เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าว นักวิทยาศาสตร์จึงต้องหาสารทำลายเชื้อแบคทีเรียชนิดใหม่ๆ จระเข้เป็นสัตว์ที่มักจะเกิดบาดเจ็บได้ง่าย แม้ว่าจระเข้จะอาศัยอยู่ในแหล่งที่อุดมด้วยจุลชีพก่อโรค แต่แผลของจระเข้กลับหายได้อย่างรวดเร็วและแทบไม่มีการติดเชื้อ ในการศึกษานี้ได้แยกบริสุทธิ์สารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียจากเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*) โดยแยกสารจากส่วนซีรัม พลาสมา และสารสกัดเม็ดเลือดขาวของจระเข้ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตรกราฟฟี จากนั้นศึกษาโครงสร้างหน้าที่และกลไกการทำลายเชื้อแบคทีเรียของสารที่แยกได้โดยจะแยกกล่าวที่ละส่วน

ในส่วนซีรัมจระเข้ได้ใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโตรกราฟฟีชนิดแลกเปลี่ยนประจุลบ เจลฟิวเตรชั่น และ reverse phase -HPLC แยกสารที่มีฤทธิ์ทำลายเชื้อได้จำนวนทั้งสิ้น 6 ชนิด คือ p14.1, p15.9, p17.9, p31.0, p36.1 และ p51.2 ซึ่งมีความสามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี mass spectrometry พบว่า p14.1, p15.9 และ p51.1 มีขนาดเล็กกว่า 1 กิโลดาลตัน โดยสารที่แยกได้กลุ่มนี้มีค่า MIC ประมาณ 15.46μg/ml and 33.97 μg/ml จากการศึกษากลไกการทำลายเชื้อของสารที่แยกโดย SEM พบว่าเมมเบรนของแบคทีเรียน่าจะ target ในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย

ในส่วนของพลาสมาได้ทำการแยกบริสุทธิ์สารทำลายเชื้อแบคทีเรีย (Crocosin) ของเลือดจระเข้ โดยวิธีการแยกด้วยเมมเบรนแยกขนาด วิธี reverse phase-HPLC และคอลัมน์ Hypercarb™ พบว่า Crocosin สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella typhi* และ *Staphylococcus aureus* จากการวิเคราะห์โครงสร้างของ Crocosin โดยการหาลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลายหมู่อะมิโน พบว่า Crocosin มีลำดับกรดอะมิโน 2 ตัวแรกเป็น อะลานีน และไกลซีน และจากการวิเคราะห์โดยวิธี ESI-MS/MS พบลักษณะการซ้ำๆของสเปกตราของมวลขนาด 94 และ 136 ดาลตัล ซึ่งมวลดังกล่าวไม่สอดคล้องกับมวลของกรดอะมิโนตัวใด และ Crocosin สามารถทต่อความร้อนและทนต่อการย่อยของเอนไซม์โปรเนส ผลการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า Crocosin อาจไม่ใช่เปปไทด์ แต่อาจเป็นอนุพันธ์ของเปปไทด์ ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนรวมอยู่กับสารประกอบที่มีมวลโมเลกุล 94 และ 136 ดาลตัล การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่งกราด พบว่า สารทำลายเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากส่วนของซีรั่มและพลาสมาของจระเข้ ทำลายเชื้อแบคทีเรียโดยการเข้าไปในส่วนไซโตพลาสซึมของแบคทีเรียแล้วทำให้เมมเบรนของแบคทีเรียแตกหรือถูกทำลายในที่สุด

และสำหรับในสารสกัดเม็ดเลือดขาวจระเข้ ในการศึกษานี้ได้แยกบริสุทธิ์เปปไทด์ด้วย HPLC จากนั้นศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์จำนวน 30 ชนิดและกลไกการเข้าทำลายเชื้อของเปปไทด์ที่แยกได้พร้อมกับศึกษาโครงสร้างของเปปไทด์โดยเทคนิค LC-MS-MS ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดเม็ดเลือดขาวสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ 8 ชนิด ได้แก่

Staphylococcus. epidermidis, Bacillus. megaterium, B. licheniformis TISTR 1010, *Pseudomonas. aeruginosa, Ps. aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella. typhi, S. typhi* ATCC 5784, *Vibrio. cholerae* และเชื้อรา 1 ชนิด ได้แก่ *Candida. albicans* จากนั้นแยกบริสุทธิ์สารสกัดเม็ดเลือดขาวด้วยคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุ พบโปรตีน 4 กลุ่มเป็นองค์ประกอบนั่นคือ P1, P2, P3 และ P4 โดยโปรตีน P1 และ P3 สามารถยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis, S. typhi* และ *C. albicans* ได้ จากการศึกษาโดย Zymogram refolding gel และ Western immunoblotting พบว่าสารสกัดเม็ดเลือดขาวและ P1 มีโปรตีนขนาด 14 kDa ที่จับกันอย่างอ่อนๆกับ anti hen egg white lysozyme antibody จากนั้นทำการแยกส่วนของเปปไทด์ด้วยคอลัมน์ gel filtration และนำส่วนของเปปไทด์ มาแยกบริสุทธิ์ต่อด้วยคอลัมน์ C18 reverse phase HPLC ซึ่งพบเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบหลัก 10 เส้นแต่มีเฉพาะ Leucrocin I, II, III และ IV ที่สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบได้ โดย Leucrocin I, II, III และ IV มีคุณสมบัติในการฆ่า (Microbicidal activity) เซลล์แบคทีเรียได้แต่ก็มีความแตกต่างกันและมีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงของคน (HRBCs) แตกต่างกัน เมื่อศึกษาวิธีการทำลายเซลล์แบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่าเปปไทด์ Leucrocin I และ II เข้าไปทำลายเซลล์แบคทีเรียในส่วนเมมเบรนชั้นใน ทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกเสียหายและ/หรือตายในที่สุด นั่นแสดงว่าเป้าหมายของเปปไทด์อยู่ที่เซลล์เมมเบรนของแบคทีเรีย จึงทำการศึกษาวิธีการเข้าทำลายเซลล์เมมเบรนชั้นนอกของเชื้อ *S. typhi* (Leucrocin I และ II) และ *V. cholerae* (Leucrocin III และ IV) โดยการวัดค่าการเรืองแสงที่เพิ่มขึ้นของสาร N-phenylnaphtylamine พบว่าเปปไทด์ ทั้งสองกลุ่มสามารถทำลายส่วนเมมเบรนชั้นนอกของเชื้อที่นำมาทดสอบได้โดยดูจากค่า fluorescence intensity ที่เพิ่มสูงขึ้น และได้ทำการวัดการแตกของเซลล์โดยการวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ 260 nm พบว่าเชื้อ *Staphylococcus epidermidis* ถูกทำให้แตกด้วยเปปไทด์ทั้งหมดที่นำมาทดสอบ จากการศึกษาโครงสร้างปฐมภูมิโดยวิธี LC-MS-MS พบว่าลำดับกรดอะมิโนของ Leucrocin I คือ NGVQPKY และ Leucrocin II คือ NAGS_LSGWG จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนพบว่าเปปไทด์ทั้งสองชนิดไม่เหมือนกับเปปไทด์ใดๆในฐานข้อมูล จากการศึกษาทั้งส่วนโครงสร้างและกลไกการทำลายเชื้อแบคทีเรีย พบว่างานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกที่พบว่าในสารสกัดเม็ดเลือดขาวมี antimicrobial peptides ที่มีกลไกการทำลายเชื้อแบคทีเรีย โดยไปรบกวนการผ่านเข้าออกของสารบริเวณเมมเบรนของแบคทีเรีย แต่อย่างไรก็ตามยังต้องมีการศึกษากลไกการทำลายเชื้อแบคทีเรียเพิ่มเติมเพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดในการนำไปใช้เป็นยา

Abstracts

229451

The rapid emergence of antibiotic-resistant bacterial pathogens is a serious problem and extensive efforts have been focused on the development of new classes of antimicrobial agents. Antimicrobial proteins and peptides are one group of antimicrobial agents which are phylogenetically ancient constituents of host defense and are expressed by immune and non-immune cells of invertebrates and vertebrates. These confer considerable potential for their development as novel therapeutic agents to overcome the resistance problem. Crocodilians live in the environment with high risk of bacterial infection but they normally suffer no adverse effects. They are not totally immune to microbial infection, but their resistance thereto is remarkably effective. In this study the blood of freshwater Siamese crocodile was investigated and antimicrobial compound has been identified. The structure and function and their killing mechanism was explored.

Antibacterial agents were purified from Siamese crocodile serum by anion exchange, gel filtration and reversed phase HPLC. Six antibacterial agents designed as p14.1, p15.9, p17.9, p31.0, p36.1 and p51.2 were purified and proved to carry the activity against *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Vibrio chorelae*. The mass analysis of MALDI-TOF for antibacterial agent of p14.1, p15.9 and p51.1 revealed that they are small molecule with a molecular mass less than 1 kDa. The partially purified agents achieved by gel filtration exhibits the broad activity against seven selected bacterial strains and the geometric means of the minimal inhibitory concentration are 15.46 μg/ml and 33.97 μg/ml. The scanning electron microscopy demonstrated that these agents have targeted at the bacterial membrane and they act like as the antimicrobial peptide. The antibacterial agent in the serum may represent the first line of an immune system in a freshwater crocodile.

An antibacterial compound from crocodile plasma was partially purified and functional characterised. The freshwater crocodile (*Crocodylus siamensis*) plasma with antibacterial activity were partially purified by using a centrifugal concentrator and reverse phase HPLC, and designated as crocosin. Crocosin exhibits antibacterial activity towards *Salmonella typhi* and *Staphylococcus aureus*. Crocosin is thermostable and resistant to pronase digestion. The structure of crocosin analysed by mass spectrometry contains repeating units of 94 and 136 m/z and contain Ala and Gly at it N-terminal. Scanning electron microscopy indicates that crocosin probably penetrates

progressively into cytoplasm space, perturbing and damaging bacterial membranes. Crocosin may provide an early defence mechanism toward bacterial infection in fresh water.

In the same manner, the antimicrobial properties of leukocyte extracts of freshwater crocodiles (*Crocodylus siamensis*) were studied. Chromatography technique was used for the purification of the leukocyte extracts. Then, the mechanisms for destroying microorganism of peptides were studied using LC-MS-MS techniques. Results of the study indicated that the leukocyte extracts were able to destroy 8 bacteria; *Staphylococcus. epidermidis*, *Bacillus. megaterium*, *B. licheniformis* TISTR 1010, *Pseudomonas. aeruginosa*, *Ps. aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella. typhi*, *S. typhi* ATCC 5784, *Vibrio. cholerae*, and a kind of fungus; *Candida. albicans*, after testing with 30 species of microorganism. Further more, the leukocyte extracts were purified by using column chromatography. Four protein groups were obtained; P1, P2, P3 and P4. The study found that P1 and P3 proteins were able to inhibit *S. epidermidis*, *S. typhi* and *C. albicans*. Results from zymogram refolding gel and western immunoblotting indicated that the leukocyte extracts contained the proteins size of around 14 kDa that had weak interaction with anti hen egg white lysozyme antibody. Gel filtration was performed to separate the peptides, and Reverse phase high performance liquid column chromatography was done to purify the peptides. Results indicated that 10 peptides could be separated. Four peptides (Leucrocin I-IV) showed antibacterial activity against *S. epidermidis*, *V. cholerae, S. typhi* and *C. albicans*. Leucrocin I, II, III and IV exhibited different properties in antimicrobial activity, and different toxicity to human red blood cells. Electron microscopic study indicated that peptides leucrocin I and II destroyed inner membrane of bacterial cells, resulting in lysis or death of bacterial cells. Thus, the target site of peptide action is at the membrane of bacterial cells. Further, the permeabilization of outer membrane of *S. typhi* (Leucrocin I and II) and *V. cholerae* (Leucrocin III and IV) was studied by using detection of the increasing intensity of fluorescence of N-phenylnaphtylamine. Results showed that both peptide present the permeabilization of outer membrane of the bacterial cell tested, measured by the increasing of fluorescence intensity. Measurement of cell lyses performed by measuring DNA concentration at 260 nm showed that *S. epidermidis* could be lysed by the peptides tested. The study of primary structures of peptides using LC-MS-MS showed that amino acid sequence of Leucrocin I contain NGVQPKY; and Leucrocin II contain

NAGS_LSGWG. Sequence alignment analysis showed no homology to any proteins or polypeptides in data base.

This is the first study to report the antimicrobial peptides in the leukocyte of Siamese crocodiles of both the structure and antibacterial mechanism. These peptides are able to destroy bacteria by perturbing the permeabilization of bacterial cell membrane. However, further studies are needed to define the structure of crocosin and leucrocins to examine possibility as a lead compound for development of novel antimicrobials.