รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

แผนงานวิจัยเรื่อง

การวิจัยและพัฒนาเลือดจระเข้พันธุ์ไทยเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อสุขภาพ

Research and Development of Siamese Crocodile Blood as Food Supplement for Health

(ปีที่ 1 เล่มที่ 2/3)

โดย

นางสาวจินดาวรรณ สิรันทวิเนติ นายวิน เชยชมศรี นางราตรี ลีละวงค์เทวัญ นางกัลยา อารีย์
นางสาวสิรินดา กุสุมภ์ นางบริสุทธิ์ แสนมโน หาญพานิช นางอรุณพร อิฐรัตน์
นางสาวดวงจันทร์ เฮงสวัสดิ์ นางสาวเยาวดี คุปตะพันธ์ นายเอกวิทย์ ตรีเนตร
นางสาววิภาภรณ์ ณ ถลาง นางบุญเกื้อ วัชรเสถียร และ นางสาวสุวรพร แซ่ลิ้ม

ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
สถานวิทยาศาสตร์พรีคลินิก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
โครงการบัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ฝ่ายวิจัยโภชนาการและสุขภาพ สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ศูนย์การแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทย์สาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

พ.ศ. 2551

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปี พ.ศ. 2551

ขอขอบคุณ รศ. น. สพ.ปานเทพ รัตนากร ศูนย์เฝ้าระวังและติดตามโรคจากสัตว์ป่าสัตว์ต่างถิ่น และสัตว์อพยพ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล จ. นครปฐม ที่ปรึกษาโครงการที่กรุณาให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ

และคณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณวิสาชิณี รุ่งทวีชัย ห้างหุ้นส่วนจำกัด วานิไทย และฟาร์มจระเข้รุ่งทวีชัย อ. ดอนตูม จ. นครปฐม ที่ให้การสนับสนุนวัตถุดิบเลือดจระเข้พันธุ์ไทย วัสดุอุปกรณ์ และข้อมูลต่างๆ ตลอดจนอำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่างเพื่อการศึกษาในงานวิจัยของแผนงานวิจัยในปีที่ 1 นี้ให้สำเร็จ และบรรลุวัตถุประสงค์ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

ชื่อแผนงานวิจัย การวิจัยและพัฒนาเลือดจระเข้พันธุ์ไทยเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อสุขภาพ
Research and Development of Siamese Crocodile Blood as Food Supplement for Health

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณ 2551 (แผนงานสนับสนุนการวิจัยรองรับการเปลี่ยนแปลงและพลวัตโลกเพื่อแก้ปัญหาสำคัญของชาติอย่างสมดุลและยั่งยืน)

จำนวนเงิน 3,209,000 บาท (สามล้านสองแสนเก้าพันบาทถ้วน)

ระยะเวลาทำการวิจัย 12 เดือน (ตั้งแต่ ตุลาคม 2551 – กันยายน 2552)

ชื่อผู้วิจัย

1. นางสาวจินดาวรรณ สิรันทวิเนติ
   ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
   โทรศัพท์ 0-2562-5555, 0-2562- 5444 ต่อ 3262
2. นายวิน เชยชมศรี
   ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
   โทรศัพท์ 0-2562-5555, 0-2562- 5444 ต่อ 3264
3. นางราตรี ลีละวงค์เทวัญ
   สาขาวิชาจุลชีววิทยาและภูมิคุ้มกันวิทยา สถานวิทยาศาสตร์พรีคลินิก
   มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ โทรศัพท์ 0-2926-9710 ต่อ 971
4. นางกัลยา อารีย์
   สาขาจุลชีววิทยาและภูมิคุ้มกันวิทยา สถานวิทยาศาสตร์พรีคลินิก คณะแพทยศาสตร์
   มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ โทรศัพท์ 02-926-9710-1
5. นางสาวสิรินดา กุสุมภ์
   ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
   มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ โทรศัพท์ 02-564-4440 ต่อ 2550
6. นางบริสุทธิ์ แสนมโน หาญพานิช
   สถานวิทยาศาสตร์พรีคลินิก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
   โทรศัพท์ 02-929-9806
7. นางสาวดวงจันทร์ เฮงสวัสดิ์
   ฝ่ายค้นคว้าและวิจัย สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร
   มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โทรศัพท์ 0-2942-8629-35 ต่อ 906

8. นางสาวเยาวดี คุปตะพันธ์
ฝ่ายค้นคว้าและวิจัย สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โทรศัพท์ 0-2942-8629-35 ต่อ 905
9. นายเอกวิทย์ ตรีเนตร
โครงการวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
โทรศัพท์ 0-2562-5555, 0-2562- 5444 ต่อ 3264
10. นางสาววิภาภรณ์ ณ ถลาง
ฝ่ายค้นคว้าและวิจัย สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โทรศัพท์ 0-2942-8629-35
11. นางบุญเกื้อ วัชรเสถียร
ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
โทรศัพท์ 0-2562-5555, 0-2562- 5444 ต่อ 3234
12. นางอรุณพร อิฐรัตน์
ศูนย์การแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
โทรศัพท์ 02-9269749
13. นางสาวสุวรพร แซ่ลิ้ม
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
โทรศัพท์ 02-9269830

บทคัดย่อ

ปัจจุบันมีการเพิ่มมูลค่า พัฒนา และใช้ประโยชน์เลือดจระเข้เพิ่มมากขึ้น แต่ยังขาดความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ ที่มีอยู่ในเลือด รวมถึงส่วนต่างๆ ที่แยกจากเลือดจระเข้พันธุ์ไทย การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญโดยเจาะเก็บเลือดจากจระเข้พันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*) อายุ 2-4 ปี ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจากภาคต่างๆ (กลาง ตะวันออก และใต้) พบว่าในเลือดครบโปรตีนมีปริมาณมากที่สุด (87.4 g/100g) รองลงมาคือ ไขมัน (2.4 g/100g) และคาร์โบไฮเดรต (0.6 g/100g) ส่วนในซีรัมพบมีโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน ปริมาณ 69.0, 8.2 และ 6.9 g/100g ตามลำดับ โดยในเลือดครบมีโปรตีน ฟอสฟอรัส และเหล็กมากกว่าในซีรัม วิตามินที่พบในเลือดจระเข้ปริมาณมากที่สุดได้แก่ วิตามินซี รองลงมา คือ วิตามินบี2, วิตามินบี6, วิตามินบี1, และ วิตามินบี12 ตามลำดับ วิตามินที่พบปริมาณน้อยที่สุดคือ วิตามินเอ องค์ประกอบทางเคมีในเลือดจระเข้ฯ ที่ถูกเพาะเลี้ยงในภาคต่างๆ ไม่มีความแตกต่างกันเด่นชัด กรดอะมิโนที่พบปริมาณมากที่สุด 5 อันดับแรก ได้แก่ Glutamic acid (9960.25 mg/100g), Leucine (7761.15 mg/100g), Aspartic acid (7538.34 mg/100g), Lysine (7508.79 mg/100g) และ Alanine (5442.63 mg/100g) ตามลำดับ กรดอะมิโนที่พบปริมาณน้อยที่สุด 3 อันดับสุดท้าย ได้แก่ Tryptophan (1006.58 mg/100g), Methionine (1197.69 mg/100g) และ Isoleucine (2054.58 mg/100g) ตามลำดับ การศึกษารูปแบบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ในภาวะที่มีเมอร์เคปโทเอทานอลเป็นสารรีดิวซ์ ที่ 10% (w/v) ของเจลส่วนแยก พบความแตกต่างของรูปแบบโปรตีนจากตัวอย่างเลือดจระเข้ส่วนที่แตกต่างกัน

การพัฒนากระบวนการเจาะเก็บเลือดโดยไม่ทำลายชีวิตจากจระเข้พันธุ์ไทย (*C. siamensis*) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง เจาะเก็บเลือดจระเข้จากแอ่งเลือดดำหลังกระโหลก ปริมาณ 100 มิลลิลิตรต่อตัว และทิ้งมีช่วงห่างของระยะการเจาะเก็บเลือดแต่ละครั้ง ไม่น้อยกว่า 12 สัปดาห์ โดยไม่มีผลกระทบกับการดำรงชีวิตของจระเข้ ซึ่งปริมาณการเจาะเลือดที่เหมาะสมในแต่ละครั้งควรมีการศึกษาต่อไป

การศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราของเลือดครบแห้ง (FD-WB) และส่วนประกอบของเลือดจระเข้พันธุ์ไทย (ซีรัม (S) และซีรัมแห้ง (FD-S)) โดยใช้เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานและเชื้อรา พบว่า FD-WB (100 mg/ml) ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและเชื้อราได้ อีกทั้ง S และ FD-S (100 mg/ml) นั้นไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ อย่างไรก็ตาม S และ FD-S มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *E. aerogenes* ATCC 13048, *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 27736, *S. typhimurium* ATCC 13311 และ *P. aeruginosa*

ATCC 27853 ได้ และยังมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. neoformans* และ *Aspergillus* sp. ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* แต่อย่างไรก็ตามทั้ง S และ FD-S ไม่สามารถฆ่าเชื้อรา ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าซีรัมสด และซีรัมแห้ง มีศักยภาพในการเป็นสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราบางชนิดได้

การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันประกอบด้วยภูมิคุ้มกันแต่กำเนิด (innate immunity) และภูมิคุ้มกันปรับใช้ (adaptive immunity) ซึ่งทำหน้าที่ร่วมกันในการกำจัดจุลชีพที่อาจเป็นอันตรายต่อร่างกาย ในบรรดาเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันที่มีอยู่หลากหลาย แมโครเฟจ (macrophage) และลิมโฟไซต์ (lymphocyte) เป็นเซลล์ที่มีหน้าที่สำคัญในการเป็นศูนย์กลางของการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ จากการศึกษาการกระตุ้นให้เซลล์เหล่านี้ทำหน้าที่อย่างเหมาะสม โดยใช้เลือดจระเข้และส่วนต่างๆ ที่แยกจากเลือดจระเข้ พบว่าซีรัมจระเข้และพลาสมาระเหิดแห้งมีประสิทธิภาพสูงสุดในการเพิ่มประสิทธิภาพการกลืนกินแบคทีเรียและอนุภาค microspheres ของเซลล์ แสดงให้เห็นว่าสารออกฤทธิ์ที่สำคัญน่าจะเป็นส่วนประกอบของน้ำเลือด

แองจิโอเทนซินคอนเวอร์ตติงเอนไซม์ (Angiotensin converting enzyme, ACE) เป็นเอนไซม์ที่พบในระบบเรนนิน-แองจิโอเทนซิน มีหน้าที่ในการควบคุมความดันโลหิต สมดุลน้ำและอิเลคโตรไลท์ของร่างกาย การใช้สารยับยั้งเอนไซม์แองจิโอเทนซินคอนเวอร์ตติง (ACE inhibitor) เป็นวิธีหนึ่งที่ได้ผลในการรักษาโรคความดันโลหิตสูง งานวิจัยนี้ศึกษาการผลิตเปปไตด์ที่สามารถเป็น ACE inhibitor จากเลือดจระเข้ไทย โดยใช้การย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินและทริปซินที่สภาวะต่างๆ ผลการศึกษาพบว่า ACE inhibitor ที่มีฤทธิ์สูง มีค่า IC_{50} เท่ากับ 447.35 µg/ml สามารถผลิตได้จากการใช้เอนไซม์เปปซินย่อยเลือดจระเข้เป็นเวลา 10 ชั่วโมง โดยส่วนของเม็ดเลือดที่แยกมาได้จากเลือดจระเข้ให้ฤทธิ์ที่สูงที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 404.12 µg/ml จากการศึกษาการจำลองสภาวะการย่อยอาหารในร่างกายมนุษย์พบว่า การรับประทานเลือดจระเข้สามารถผลิต ACE inhibitory peptide ได้เช่นกัน แต่ ACE inhibitory peptide ที่ผลิตได้มีฤทธิ์ต่ำกว่าเปปไตด์ที่ได้จากการใช้เอนไซม์เปปซิน

จากการสังเกตการสมานบาดแผลของผิวหนังจระเข้ภายหลังการต่อสู้กัน จึงได้ทำการศึกษาผลของเลือดจระเข้ที่มีต่อการหายของแผลทั้งผลในหลอดทดลอง และในร่างกาย (*in vitro – in vivo* effect) โดยศึกษาพิษต่อเซลล์ของเลือดจระเข้ (cytotoxicity test) ต่อเซลล์ไฟโบรบลาส (fibroblast) และเซลล์เคอราติโนไซท์ (keratinocyte) และผลต่อการหายของแผลในหนูทดลอง (Re-epithelization in animal model) จากการศึกษาพบว่า ผลการทดลองทั้ง *in vitro* และ *in vivo* เลือดจระเข้ทั้งซีรัมและพลาสมามีผลดีกว่าชุดควบคุมใน *in vitro* effect แต่ไม่แตกต่างใน *in vivo* model และผลจากพลาสมา ที่เหนือกว่าซีรัม น่าจะเป็นผลจากเฮพาริน (heparin) มากกว่า เพราะเฮพารินมี

ผลเร่งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้ด้วยตัวมันเอง อย่างไรก็ตามการพัฒนาสารสกัดจากเลือดจระเข้เพื่อนำไปใช้ในทางคลินิก ควรจะต้องผ่านระบบการคัดกรองความบริสุทธิ์ของสารสกัดและความปลอดภัยที่อาจเกิดจากการปนเปื้อนทางชีวภาพจากผลิตภัณฑ์จากสัตว์

คำสำคัญ : จระเข้ เลือดจระเข้ สัตว์สมุนไพร องค์ประกอบทางเคมี โปรตีน เพปไทด์ คาร์โบไฮเดรต ไขมัน เพปไทด์ต้านจุลชีพ ภูมิคุ้มกัน การรักษาบาดแผล ฤทธิ์ต้านความดัน ผลิตภัณฑ์จระเข้ ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อสุขภาพ

Abstract

Recently, crocodile blood has been added value, developed and increase in its use. However, the knowledge about chemical compositions and biological properties of Siamese crocodile blood and its fractions has been limited. The analyses of crocodile blood main chemical compositions were collected from Siamese crocodile (*Crocodylus siamensis*) in ages of 2-4 years those were captived in difference parts (Middle, Easthern and Southern parts). Results shows that in whole blood the protein had the highest concentration (87.4 g/100g), followed by total fat (2.4 g/100g) and total carbohydrate (0.6 g/100g). The serum demonstrated protein, total carbohydrate and total fat concentrations in amount of 69.0, 8.2 และ 6.9 g/100g, respectively. In addition, crocodile whole blood had higher levels of protein, phosphorus and iron than in serum. Analysis vitamin components of crocodile blood samples (whole blood, serum) revealed vitamin-C had the highest concentration follow by vitamin-B2, vitamin-B6, vitamin-B1 and vitamin-B12, respectively. Vitamin-A was the lowest content in crocodile bloods. No major differences were observed between blood chemical composition and captive places of crocodile. The five major amino acids were Glutamic acid (9960.25 mg/100g), Aspartic acid (7538.34 mg/100g), Lysine (7508.79 mg/100g) and Alanine (5442.63 mg/100g). The three minor amino acids were Tryptophan (1006.58 mg/100g), Methionine (1197.69 mg/100g) and Isoleucine (2054.58 mg/100g). The protein patterns of crocodile blood were studied by SDS-PAGE method in mercaptoethanol-reducing condition at 10% (w/v) separating gel. The pattern was distinct in difference of crocodile blood types.

The donation of crocodile blood was studied by development of blood collection process on animal life maintains in captive Siamese crocodile (*C. siamensis*). The blood collection at the anterior dorsal sinus in a 100 milliliters volume every 12 weeks was not effect the life style of crocodile blood donors. However, the optimal blood volume has remained to be elucidated.

The antibacterial and antifungal activities of freeze-dried (FD-WB) and blood components (serum, S and freeze-dried serum, FD-S) Siamese crocodile blood were studied against the ATCC strains of bacteria and fungus. The result showed FD-WB (100 mg/ml) could not inhibit bacteria and fungus. In addition, S and FD-S (100 mg/ml) could not inhibit gram positive bacteria. However, S and FD-S inhibited gram negative bacteria such as *E. aerogenes*

ATCC 13048, *E. coli* ATCC 25922*, K. pneumoniae* ATCC 27736, *S. typhimurium* ATCC 13311 and *P. aeruginosa* ATCC 27853, and inhibit *C. neoformans* and *Aspergillus* sp., but could not inhibit *C. albicans*. Both S and FD-S did not have minimum fungicidal concentration; MFC. The result showed that the FS and FDS from Siamese Crocodile have a potential of antibacterial and antifungal agent.

The immune system is a crucial defense mechanism of the body that fights infection. It is made up of a wide variety of effector cells and molecules. As parts of the immune system, phagocytes and lymphocytes have central roles in innate and adaptive immunity, respectively. Hence, appropriate stimulation of those cells in a certain circumstances will help the body to battle against harmful microbe. The Siamese crocodile blood and its fractions induced the phagocytic activity of macrophage, cell proliferation, and cytokine secretion from human PBMC, were investigated. The results show that crocodile serum and freeze-dried plasma blood was the most efficient blood products for induction of bacterial and microspheres phagocytic activity of the cells. This effect is possibly caused by the substances inside the serum rather than the blood cells.

Angiotensin converting enzyme (ACE), a multifunctional enzyme present in the rennin-angiotensin system, has a prominent role in the regulations of blood pressure as well as water and electrolyte balance. One of the successful remedy for hypertensive management is an application of angiotensin converting enzyme inhibitor (ACE inhibitor). This study was focused on the production of ACE inhibitory peptide from Siamese crocodile blood. Various peptic and tryptic hydrolysis conditions were applied to generate ACE inhibitory peptide from the blood. The results showed that potent ACE inhibitors can be obtained from 10-hour hydrolysis of pepsin with an IC_{50} of 447.35µg/ml. A blood cell portion of the crocodile blood yielded the highest ACE inhibitory activity with an IC_{50} of 404.12µg/ml. Digestive condition model indicated that ACE inhibitory peptides can be produced from a consumption of crocodile blood. However, the peptides obtained from the digestive condition possessed weaker ACE inhibitory activity than did peptides derived from the peptic hydrolysis.

Base on the observation of healing process on crocodile skin after fighting without any intervention, crocodile blood extraction to wound healing both *in vitro* and *in vivo* result were done. The cytotoxicity test to fibroblast and keratinocyte in vitro and re-epitheliration in animal model were examined. All results showed both serum and plasma of crocodile blood may have some proliferative effect *in vitro* test and plasma showed superior result. Anyways, in animal

model either serum or plasma of crocodile blood failed to accelerate wound healing compare to control site; Zinc paste. Moreover the superior effect of plasma seemed like that was the effect from heparin. Literature reviews showed heparin has its own proliferative effect. However, before developing an animal product for real clinical applications needs to purify the product and also prove of it will not carry animal biological product contamination to human.

Key word: Crocodile, Crocodile blood, Medicinal animal, Chemical compound, Protein, Peptide, Carbohydrate, Lipid, Antimicrobial peptide, Immunity, Wound healing, ACE-inhibitor, Crocodile product, Functional food

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อ	I
Absract	V
สารบัญตาราง	XIII
สารบัญภาพ	XV
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	XXI
บทนำรวม	1
สรุปภาพรวมของแผนงาน	13
ประวัติและผลงานวิจัยที่สำคัญของนักวิจัยและคณะ	17

โครงการวิจัยย่อยที่ 1 : การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเลือดจระเข้พันธุ์ไทย (ปีที่ 1 เล่มที่ 1/3)

บทคัดย่อ	47
Absract	49
บทนำ	51
การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	53
ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย	58
ผลการวิจัยและอภิปรายผล	64
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	88
บรรณานุกรม	89

โครงการวิจัยย่อยที่ 2 : การพัฒนากระบวนการเจาะเก็บเลือดจระเข้โดยไม่ทำลายชีวิต (ปีที่ 1 เล่มที่ 1/3)

บทคัดย่อ	99
Absract	99
บทนำ	101
การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	102
ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย	107
ผลการวิจัยและอภิปรายผล	110
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	120

หน้า

บรรณานุกรม 123
ภาคผนวก 126

โครงการวิจัยย่อยที่ 3 : ฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราของเลือดและส่วนประกอบของเลือดจากจระเข้พันธุ์ไทย
(ปีที่ 1 เล่มที่ 2/3)

บทคัดย่อ 137
Absract 137
บทนำ 139
การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง 140
ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย 142
ผลการวิจัยและอภิปรายผล 150
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 166
บรรณานุกรม 166
ภาคผนวก 168

โครงการวิจัยย่อยที่ 4 : การศึกษาฤทธิ์ของเลือดจระเข้พันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*) ในการกระตุ้นกระบวนการกลืนกินของแมโครเฟจและลิมโฟไซต์
(ปีที่ 1 เล่มที่ 2/3)

บทคัดย่อ 173
Absract 175
บทนำ 177
การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง 178
ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย 180
ผลการวิจัยและอภิปรายผล 185
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 198
บรรณานุกรม 199

หน้า

โครงการวิจัยย่อยที่ 5 : สารยับยั้งแองจิโอเทนซินคอนเวอร์ตติงเอนไซม์ในเลือดจระเข้ไทย (ปีที่ 1 เล่มที่ 2/3)

บทคัดย่อ 207

Absract 207

บทนำ 29

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง 210

ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย 216

ผลการวิจัยและอภิปรายผล 220

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 226

บรรณานุกรม 227

โครงการวิจัยย่อยที่ 6 : การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการสมานแผลของสารสกัดจากเลือดจระเข้ (ปีที่ 1 เล่มที่ 3/3)

สารบัญตาราง

หน้า

โครงการวิจัยย่อยที่ 1 : การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเลือดจระเข้พันธุ์ไทย

ตารางที่

1	วิธีทดสอบสารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ และสารต้านอนุมูลอิสระในการทดลองที่ 1	61
2	ค่าเฉลี่ยของผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีจากเลือดครบ (whole blood) จระเข้พันธุ์ไทย ภาคกลาง (เพศผู้ 30 ตัว เพศเมีย 30 ตัว)	67
3	ค่าเฉลี่ยของผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีจากน้ำเลือด (serum) จระเข้พันธุ์ไทย ภาคกลาง (เพศผู้ 30 ตัว เพศเมีย 30 ตัว)	68
4	ค่าเฉลี่ยของผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีจากเลือดครบ (whole blood) จระเข้พันธุ์ไทย ภาคตะวันออก (เพศผู้ 30 ตัว เพศเมีย 30 ตัว)	69
5	ค่าเฉลี่ยของผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีจากน้ำเลือด (serum) จระเข้พันธุ์ไทย ภาคตะวันออก (เพศผู้ 30 ตัว เพศเมีย 30 ตัว)	70
6	ค่าเฉลี่ยของผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีจากเลือดครบ (whole blood) จระเข้พันธุ์ไทย ภาคใต้ (เพศผู้ 30 ตัว เพศเมีย 30 ตัว)	71
7	ค่าเฉลี่ยของผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีจากน้ำเลือด (serum) จระเข้พันธุ์ไทย ภาคใต้ (เพศผู้ 30 ตัว เพศเมีย 30 ตัว)	72
8	การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในเลือดครบ (whole blood) และน้ำเลือด (serum) ของจระเข้พันธุ์ไทย ที่เพาะเลี้ยงในภาคต่างๆ (ภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคใต้)	73
9	ชนิดของกรดอะมิโนในเลือดครบของจระเข้พันธุ์ไทย	74

โครงการวิจัยย่อยที่ 2 : การพัฒนากระบวนการเจาะเก็บเลือดจระเข้โดยไม่ทำลายชีวิต

ตารางที่

1	ความยาวเฉลี่ย (mean ± SE กิโลกรัม) ของจระเข้น้ำจืดพันธุ์ไทย	112
2	น้ำหนักเฉลี่ย (mean±SE กิโลกรัม) ของจระเข้น้ำจืดพันธุ์ไทย	113
3	ค่าทางชีวเคมีบางประการของจระเข้ในช่วงสัปดาห์ที่ 1, 6 และ 12 ของการทดลอง	117
4	ค่าโลหิตวิทยาของจระเข้ ในช่วงสัปดาห์ที่ 1, 6 และ 12 ของการทดลอง	118

โครงการวิจัยย่อยที่ 3 : ฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราของเลือดและส่วนประกอบของเลือดจากจระเข้พันธุ์ไทย

ตารางที่

1	การทดสอบหาฤทธิ์ของเลือดครบแห้ง (100 mg/ml) ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ	151
2	การทดสอบหาฤทธิ์ของเลือดครบแห้ง (100 mg/ml) ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก	152
3	การทดสอบหาฤทธิ์ของซีรัมสดในการยั บยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ	154

ตารางที่

4	การทดสอบหาฤทธิ์ของซีรัมสดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก	155
5	การทดสอบหาฤทธิ์ของซีรัมแห้ง (100 mg/ml) ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ	156
6	การทดสอบหาฤทธิ์ของซีรัมแห้ง (100 mg/ml) ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก	157
7	การทดสอบหาค่า MIC (mg/ml) จากซีรัมสดและซีรัมแห้งจากตัวอย่างที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย	159
8	การเปรียบเทียบค่า MIC และ MBC (mg/ml) จากตัวอย่างซีรัมแห้ง	159
9	การทดสอบหาฤทธิ์ของซีรัมสดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา 3 ชนิด	161
10	การทดสอบหาฤทธิ์ของซีรัมแห้งในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา 3 ชนิด	162
11	การทดสอบหาค่า MIC (mg/ml) จากซีรัมสดและซีรัมแห้งจากตัวอย่างที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา	163
12	การทดสอบหาค่า MFC (mg/ml) จากซีรัมสดและซีรัมแห้งจากตัวอย่างที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา	163
13	การทดสอบหาฤทธิ์ของซีรัมสดและซีรัมแห้งในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ	164
14	ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* จากซีรัมจระเข้แห้ง (100 mg/ml)	165
15	การทดสอบหาฤทธิ์ของซีรัมสดและซีรัมแห้งในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. neoformans* และ *Aspergillus* sp.	165

โครงการวิจัยย่อยที่ 4 : การศึกษาฤทธิ์ของเลือดจระเข้พันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*) ในการกระตุ้นกระบวนการกลืนกินของแมโครเฟจและลิมโฟไซต์

ตารางที่

1	ร้อยละของ RAW 264.7 ที่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อสัมผัสกับตัวอย่างเลือดจระเข้	185

โครงการวิจัยย่อยที่ 5 : สารยับยั้งแองจิโอเทนซินคอนเวอร์ตติงเอนไซม์ในเลือดจระเข้ไทย

ตารางที่

1	ระดับของความดันโลหิตในลักษณะต่างๆ	210
2	ACE inhibitory activity ของ Hemoglobin ของเลือดหมูที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ต่างๆ	215
3	ACE inhibitory activity ของส่วนต่างๆ ที่แยกได้จาก Gel filtration chromatography	216
4	เปปไตด์ที่มีสมบัติเป็น ACE inhibitory activity ใน hemoglobin ของเลือดหมู	216
5	ACE inhibition ของ Hydrolysate ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ Pepsin และ Trypsin	222
6	% ACE inhibition ของส่วนประกอบเลือดจระเข้ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Pepsin 10 ชั่วโมง	223
7	ความสามารถในการเป็นสารยับยั้งเอนไซม์แองจิโอเทนซินคอนเวอร์ตติงของเลือดจระเข้ whole blood ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ pepsin ที่อุณหภูมิ 37 °C และ pH 2 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตามด้วยเอนไซม์ pancreatin ที่อุณหภูมิ 37 °C และ pH 7.6 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง	224
8	ACE inhibition ของส่วนประกอบเลือดจระเข้ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Pepsin และตามด้วย Pancreatin	224

โครงการวิจัยย่อยที่ 6 : การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการสมานแผลของสารสกัดจากเลือดจระเข้

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่

1. แผนภูมิแสดงกรอบแนวคิดของแผนงานวิจัยฯ 12

โครงการวิจัยย่อยที่ 1 : การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเลือดจระเข้พันธุ์ไทย

ภาพที่

1 รูปแบบของโปรตีนจากส่วนเม็ดเลือดของจระเข้พันธุ์ไทยตัวผู้ (M) และตัวเมีย (F) ที่ได้จากภาคใต้บน SDS-PAGE เมื่อให้เจลส่วนแยกเป็น 10% ในภาวะที่มีสารรีดิวซ์ (reducing condition) **(A)** ไดอะแกรมแสดงรูปแบบโปรตีนของภาพด้านซ้าย **(B)** โดยที่ Lane 1 แสดงโปรตีนมาตรฐานที่ใช้เป็นเครื่องหมาย (standard protein marker, Mr) ซึ่งด้านซ้ายของแต่ละแถบโปรตีนแสดงน้ำหนักโมเลกุลมีหน่วยเป็นกิโลดาลตัน (kDa) Lanes 1-4 แสดงรูปแบบโปรตีนของจระเข้เพศผู้ Lanes 5-8 แสดงรูปแบบโปรตีนของจระเข้เพศเมีย 76

2 รูปแบบของโปรตีนจากเลือดครบของจระเข้พันธุ์ไทยตัวผู้ (M) และตัวเมีย (F) ที่ได้จากภาคใต้บน SDS-PAGE เมื่อให้เจลส่วนแยกเป็น 10% ในภาวะที่มีสารรีดิวซ์ (reducing condition) **(A)** ไดอะแกรมแสดงรูปแบบโปรตีนของภาพด้านซ้าย **(B)** โดยที่ Lane 1 แสดงโปรตีนมาตรฐานที่ใช้เป็นเครื่องหมาย (standard protein marker, Mr) ซึ่งด้านซ้ายของแต่ละแถบโปรตีนแสดงน้ำหนักโมเลกุลมีหน่วยเป็นกิโลดาลตัน (kDa) Lanes 1-4 แสดงรูปแบบโปรตีนของจระเข้เพศผู้ Lanes 5-8 แสดงรูปแบบโปรตีนของจระเข้เพศเมีย 77

3 รูปแบบของโปรตีนจากเลือดครบของจระเข้พันธุ์ไทยตัวผู้ (M) และตัวเมีย (F) โดยผ่านกระบวนการทำระเหิดแห้ง (Freeze-dry) ที่ได้จากภาคใต้บน SDS-PAGE เมื่อให้เจลส่วนแยกเป็น 10% ในภาวะที่มีสารรีดิวซ์ (reducing condition) **(A)** ไดอะแกรมแสดงรูปแบบโปรตีนของภาพด้านซ้าย **(B)** โดยที่ Lane 1 แสดงโปรตีนมาตรฐานที่ใช้เป็นเครื่องหมาย (standard protein marker, Mr) ซึ่งด้านซ้ายของแต่ละแถบโปรตีนแสดงน้ำหนักโมเลกุลมีหน่วยเป็นกิโลดาลตัน (kDa) Lanes 1-4 แสดงรูปแบบโปรตีนในเลือดทั้งหมดของตัวผู้ Lanes 5-8 แสดงรูปแบบโปรตีนในเลือดทั้งหมดของตัวเมีย 78

4 รูปแบบของโปรตีนจากซีรัมของจระเข้พันธุ์ไทยตัวผู้ (M) และตัวเมีย (F) ที่ได้จากภาคใต้บน SDS-PAGE เมื่อให้เจลส่วนแยกเป็น 10% ในภาวะที่มีสารรีดิวซ์ (reducing condition) **(A)** ไดอะแกรมแสดงรูปแบบโปรตีนของภาพด้านซ้าย **(B)** โดยที่ Lane 1 แสดงโปรตีนมาตรฐานที่ใช้เป็นเครื่องหมาย (standard protein marker, Mr) ซึ่งด้านซ้ายของแต่ละแถบโปรตีนแสดงน้ำหนักโมเลกุลมีหน่วยเป็นกิโลดาลตัน (kDa) Lanes 1-4 แสดงรูปแบบซีรัมของตัวผู้ Lanes 5-8 แสดงรูปแบบซีรัมของตัวเมีย 79

ภาพที่ หน้า

5 รูปแบบของโปรตีนจากซีรัมของจระเข้พันธุ์ไทยตัวผู้ (M) และตัวเมีย (F) โดยผ่านกระบวนการทำระเหิดแห้ง (Freeze-der or lyophilizer) ที่ได้จากภาคใต้บน SDS-PAGE เมื่อให้เจลส่วนแยกเป็น 10% ในภาวะที่มีสารรีดิวซ์ (reducing condition) **(A)** ไดอะแกรมแสดงรูปแบบโปรตีนของภาพด้านซ้าย **(B)** โดยที่ Lane 1 แสดงโปรตีนมาตรฐานที่ใช้เป็นเครื่องหมาย (standard protein marker, Mr) ซึ่งด้านซ้ายของแต่ละแถบโปรตีนแสดงน้ำหนักโมเลกุลมีหน่วยเป็นกิโลดาลตัน (kDa) Lanes 1-4 แสดงรูปแบบซีรัมของตัวผู้ Lanes 5-8 แสดงรูปแบบซีรัมของตัวเมีย 80

6 รูปแบบของโปรตีนจากเลือดทั้งหมด (W) ซีรัม (S) และเม็ดเลือด (B) ของจระเข้พันธุ์ไทยตัวผู้ โดยเป็นตัวอย่างสด (FR) หรือโดยผ่านขบวนการทำระเหิดแห้ง (FD) ที่ได้จากภาคใต้บน SDS-PAGE เมื่อให้เจลส่วนแยกเป็น 10% ในภาวะที่มีสารรีดิวซ์ (reducing condition) **(A)** ไดอะแกรมแสดงรูปแบบโปรตีนของภาพด้านซ้าย **(B)** โดย Mr คือโปรตีนมาตรฐานที่ใช้เป็นเครื่องหมาย (standard protein marker) ซึ่งแสดงน้ำหนักโมเลกุลมีหน่วยเป็นกิโลดาลตัน (kDa) 81

7 รูปแบบของโปรตีนจากเลือดครบ (W) ซีรัม (S) และเม็ดเลือด (B) ของจระเข้พันธุ์ไทยตัวเมีย โดยเป็นตัวอย่างสด (FR) หรือโดยผ่านขบวนการทำระเหิดแห้ง (FD) ที่ได้จากภาคใต้บน SDS-PAGE เมื่อให้เจลส่วนแยกเป็น 10% ในภาวะที่มีสารรีดิวซ์ (reducing condition) **(A)** ไดอะแกรมแสดงรูปแบบโปรตีนของภาพด้านซ้าย **(B)** โดย Mr คือโปรตีนมาตรฐานที่ใช้เป็นเครื่องหมาย (standard protein marker) แสดงน้ำหนักโมเลกุลมีหน่วยเป็นกิโลดาลตัน (kDa) 82

8.1 การเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนในเลือดจระเข้พันธุ์ไทยที่ถูกเพาะเลี้ยงในภาคต่างๆ (ภาคใต้(Sp) ภาคกลาง (Mp) และ ภาคตะวันออก (Ep)) แยกตามตัวอย่างเลือดจระเข้ (เลือดครบ (W) ซีรัม (S) และเม็ดเลือด (B)) ของจระเข้พันธุ์ไทยเพศผู้ โดย Mr คือโปรตีนมาตรฐานที่ใช้เป็นเครื่องหมาย (standard protein marker,) น้ำหนักโมเลกุลมีหน่วยเป็นกิโลดาลตัน (kDa) 84

8.2 การเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนในเลือดจระเข้พันธุ์ไทยที่ถูกเพาะเลี้ยงในภาคต่างๆ (ภาคใต้(Sp) ภาคกลาง (Mp) และ ภาคตะวันออก (Ep)) แยกตามตัวอย่างเลือดจระเข้ (เลือดครบ (W) ซีรัม (S) และเม็ดเลือด (B)) ของจระเข้พันธุ์ไทยเพศเมีย โดย Mr คือโปรตีนมาตรฐานที่ใช้เป็นเครื่องหมาย (standard protein marker,) น้ำหนักโมเลกุลมีหน่วยเป็นกิโลดาลตัน (kDa) 85

9.1 การเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนในเลือดจระเข้พันธุ์ไทยที่ถูกเพาะเลี้ยงในภาคต่างๆ (ภาคใต้(Sp) ภาคกลาง (Mp) และ ภาคตะวันออก (Ep)) แยกตามตัวอย่างเลือดจระเข้ (เลือดครบ (W) ซีรัม (S) และเม็ดเลือด (B)) ผ่านกระบวนการทำแห้ง Freeze dry ของจระเข้พันธุ์ไทยเพศผู้ โดย Mr คือโปรตีนมาตรฐานที่ใช้เป็นเครื่องหมาย (standard protein marker,) น้ำหนักโมเลกุลมีหน่วยเป็นกิโลดาลตัน (kDa) 86

9.2 การเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนในเลือดจระเข้พันธุ์ไทยที่ถูกเพาะเลี้ยงในภาคต่างๆ (ภาคใต้(Sp) ภาคกลาง (Mp) และ ภาคตะวันออก (Ep)) แยกตามตัวอย่างเลือดจระเข้ (เลือดครบ (W) ซีรัม (S) และเม็ดเลือด (B)) ผ่านกระบวนการทำแห้ง Freeze dry ของจระเข้พันธุ์ไทยเพศเมีย โดย Mr คือโปรตีนมาตรฐานที่ใช้เป็นเครื่องหมาย (standard protein marker,) น้ำหนักโมเลกุลมีหน่วยเป็นกิโลดาลตัน (kDa) 87

โครงการวิจัยย่อยที่ 2 : การพัฒนากระบวนการเจาะเก็บเลือดจระเข้โดยไม่ทำลายชีวิต

ภาพที่		หน้า
1	การเจาะเลือดจระเข้โดยใช้กระบอกเจาะเก็บเลือด	110
2	การเจาะเลือดจระเข้โดยใช้กระบอกเจาะเก็บเลือดต่อเชื่อมกับข้อต่อ 3 ทาง	111
3	การเจาะเลือดจระเข้โดยใช้ หัวเข็มประดิษฐ์ ด้านหนึ่งต่อกับเข็มเจาะเลือด เบอร์ 16 อีกด้านหนึ่งต่อกับท่อยางซิลิโคน และใช้เครื่องปั้มแบบบีบรัด ปั้มเลือดเข้าขวดเก็บเลือด จำนวน 100 มิลลิลิตร	111
4	ก. จระเข้น้ำจืดพันธ์ไทยอายุ 4-5 ปี ที่มีสุขภาพดี ที่นำมาคัดเพื่อจำแนกเข้ากลุ่มทดลอง ข. จระเข้ที่ได้เลือกเข้ากลุ่มทดลองและทำเครื่องหมายติดหางจระเข้ (ลูกศร)	112
5	เครื่องวัดอุณหภูมิ และความชื้นสัมพัทธ์ ในบ่อทดลอง	113
6	แผนภูมิอุณหภูมิเฉลี่ย (องศาเซลเซียส) บริเวณบ่อเลี้ยงในช่วงสัปดาห์ที่ 3 ถึงสัปดาห์ที่ 12	114
7	แผนภูมิความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ย (เปอร์เซ็นต์) บริเวณบ่อเลี้ยงในช่วงสัปดาห์ที่ 3 ถึงสัปดาห์ที่ 12 ของการทดลอง	114
8	ก) พฤติกรรม อาบแดด และ ข) พฤติกรรมลงเล่นน้ำ ของจระเข้น้ำจืดพันธ์ไทยในบ่อทดลอง	115
9	ปริมาณอาหารเฉลี่ย (กิโลกรัม) ที่จระเข้กินต่อสัปดาห์ ของจระเข้กลุ่มที่ 1 และ 2 และจระเข้กลุ่มที่ 3 และ 4	116
10	ความเข้มข้นเฉลี่ยของฮอร์โมนคอร์ติซอล (µg%) ในช่วงสัปดาห์ที่ 1 และ 12 ของ จระเข้กลุ่มที่ 1 และ 2 และจระเข้กลุ่มที่ 3 และ 4	119

โครงการวิจัยย่อยที่ 3 : ฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราของเลือดและส่วนประกอบของเลือดจากจระเข้พันธุ์ไทย

ภาพที่		
1	โครงสร้างของ Resazurin	146
2	การเปลี่ยนจาก resazurin เป็น resorufin	147
3	ผลการทดสอบหาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจากซีรัมสด	153
4	ผลการทดสอบการหาค่า MIC (mg/ml) จากซีรัมแห้ง ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. aeruginosa*	158
5	ผลการทดสอบหาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. neoformans* จากซีรัมสด	160

โครงการวิจัยย่อยที่ 4 : การศึกษาฤทธิ์ของเลือดจระเข้พันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*) ในการกระตุ้นกระบวนการกลืนกินของแมโครเฟจและลิมโฟไซต์

ภาพที่		
1	การเปลี่ยนแปลงของ RAW 264.7 หลังจากบ่มร่วมกับ fresh whole blood (FWB) RAW 264.7 บ่มร่วมกับ FWB เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (B) เปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม (control RAW 264.7) (A) (100X)	185

ภาพที่		หน้า
2	กราฟแสดง Phagocytic index ของ RAW 264.7 ที่ได้จากการกลืนกิน *S. aureus* และ *E. coli* เมื่อบ่มร่วมกับเลือดจระเข้ RAW 264.7 ได้รับการกระตุ้นด้วย 10% fresh whole blood (FWB), 10% fresh serum/fresh plasma (FS/FP), 10 mg/ml dried whole blood (DWB), 10 mg/ml dried serum/dried plasma (DS/DP) หรือ PBS และบ่มร่วมกับ *S .aureus* **(A)** หรือ *E .coli* **(B)** โดยมีอัตราส่วนแบคทีเรีย:แมโครเฟจ = 10:1 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำเซลล์มาย้อมสี Gram stain แล้วนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์...	187
3	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงการกลืนกิน *S. aureus* และ *E. coli* ของ RAW 264.7 เมื่อบ่มร่วมกับเลือดจระเข้ RAW 264.7 ได้รับการกระตุ้นด้วย 10% FS (**B** และ **D**) หรือ PBS (**A** และ **C**) และบ่มร่วมกับ *S. aureus* (**A** และ **B**) หรือ *E. coli* (**C** และ**D**) โดยมีอัตราส่วนแบคทีเรีย:แมโครเฟจ = 10:1 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ย้อมด้วย Gram stain และถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100X	188
4	Density plot แสดงการกลืนกิน *S. aureus* และ *E. coli* ของ RAW 264.7 RAW 264.7 ได้รับการกระตุ้นด้วย 10% fresh serum (FS) (**C** และ **E**) หรือ PBS (B และ D) และบ่มร่วมกับ *S. aureus*-FITC (**B** และ **C**) หรือ *E. coli*-FITC (**D** และ **E**) โดยมีอัตราส่วนแบคทีเรีย:แมโครเฟจ = 10:1 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และวิเคราะห์ด้วย flow cytometer	189
5	Dot plot แสดงการกลืนกิน TransFluoSphere fluorescent microspheres ของ RAW 264.7 RAW 264.7 ได้รับการกระตุ้นด้วย 10% fresh whole blood (FWB), 10% fresh serum (FS), 10 mg/ml dried whole blood (DWB), 10 mg/ml dried serum (DS) หรือ PBS และบ่มร่วมกับ 20 particles/cell TransFluoSphere fluorescent microspheres เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และนำเซลล์มาวัดปริมาณ microspheres ที่ถูกกลืนกินโดย flow cytometer ซึ่ง microspheres ที่ถูกกลืนกินเข้าไปในเซลล์จะทำให้เซลล์มีการเรืองแสง และแถบเซลล์ที่มีความเข้มของแสงในแกน Y แสดงถึงปริมาณ particle ที่ถูกกลืนกินในแต่ละเซลล์	190
6	กราฟแสดงปริมาณเซลล์ที่กลืนกินอนุภาค TransFluoSphere fluorescent microspheres และ Phagocytic index ของ RAW 264.7 RAW 264.7 ได้รับการบ่มร่วมกับ 10% fresh whole blood (FWB), 10% fresh serum (FS), 10 mg/ml dried whole blood (DWB), 10 mg/ml dried serum (DS) หรือ PBS และ 20 particles/cell microspheres เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และนำเซลล์มาวัดปริมาณ microspheres ที่ถูกกลืนกินโดยใช้ flow cytometer (**A**) แสดงร้อยละของเซลล์ที่กลืนกินอนุภาค mocrospheres และ (**B**) แสดงค่า phagocytic index ที่ได้จากการคำนวณ ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณ microsphere ที่ถูกกลืนกินทั้งหมด	191
7	ภาพถ่ายจาก fluorescent microscope แสดงการกลืนกิน TransFluoSphere fluorescent microspheres ของ RAW 264.7 RAW 264.7 ได้รับการกระตุ้นด้วย 10% fresh serum (**B**) หรือ PBS (**A**) และบ่มร่วมกับ 20 particles/cell Transfluorosphere เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และนำมาดูด้วยกล้อง fluorescent microscope (60X)	192

ภาพที่ หน้า

8 Histogram แสดงปริมาณของ human PBMC ที่ตายจากการบ่มร่วมกับ fresh serum (FS) หรือ phytohemagglutinin (PHA) PBMC ได้รับการบ่มร่วมกับ FS และ PHA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำเซลล์มาย้อมด้วย 2 μg/ml propidium iodide (PI) และวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ตาย (PI positive cell) โดย flow cytometer 194

9 กราฟแสดงปริมาณ cell proliferation เมื่อบ่ม human PBMC ร่วมกับ fresh serum (FS), dried serum (DS), phytohemagglutinin (PHA) หรือ PBS Human PBMC ที่แยกจากเลือดของอาสาสมัครด้วย Histopaque-1077 ได้รับการบ่มร่วมกับ 3.12% FS, 3.12 mg/ml DS, 0.39 – 25 μg/ml PHA หรือ PBS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และบ่มกับ BrdU ต่ออีก 24 ชั่วโมง และนำเซลล์มาวัดปริมาณ BrdU ที่เซลล์นำไปสังเคราะห์ DNA ด้วยวิธี ELISA และวัดการดูดกลืนของแสงที่ 370 nm โดยมี reference wavelength ที่ 492 nm 196

โครงการวิจัยย่อยที่ 5 : สารยับยั้งแองจิโอเทนซินคอนเวอร์ตติงเอนไซม์ในเลือดจระเข้ไทย

ภาพที่

1 การควบคุมความดันโลหิตโดยกลไกของเอนไซม์แองจิโอเทนซินคอนเวอร์ตติง 212

2 ACE inhibitor บางชนิดที่ใช้กันแพร่หลายในปัจจุบัน 213

3 การเปลี่ยนแปลงของ Systolic blood pressure (SBP) และ Diastolic blood pressure (DBP) ของผู้ป่วยที่ให้นมเปรี้ยว Calpis เป็นเวลา 8 สัปดาห์ (□) กับ placebo ผู้ป่วยที่ให้นมเปรี้ยวที่ได้จากการเติมกรด (■)(Nakamura *et al*., 1995) 214

4 Gel filtration chromatography ของ hemoglobin ของเลือดหมูที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Pepsin 215

5 ความสามารถในการเป็นสารยับยั้งเอนไซม์แองจิโอเทนซินคอนเวอร์ตติงของเลือดจระเข้ whole blood ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ pepsin ที่อุณหภูมิ 37 °C และ pH 2 ที่ความเข้มข้นของ hydrolysate 3000 μg/ml 221

6 ความสามารถในการเป็นสารยับยั้งเอนไซม์แองจิโอเทนซินคอนเวอร์ตติงของเลือดจระเข้ whole blood ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ trypsin ที่อุณหภูมิ 37 °C และ pH 7.5 ที่ความเข้มข้นของ hydrolysate 3000 μg/ml 221

โครงการวิจัยย่อยที่ 6 : การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการสมานแผลของสารสกัดจากเลือดจระเข้

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

สัญลักษณ์

β	beta
α	alpha

คำย่อที่ใช้

EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
HIV-I	Human immunodeficiency virus type 1
WNV	West Nile virus
HSV-I	Herpes simplex virus type I
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
FPLC	Fast protein liquid chromatography
HPLC	High performance liquid chromatography
18G	18Gauge
$^{\circ}C$	Degree celcieus
0.75% NaCl	normal saline
T-CM	Thai Compendium of methods for food analysis
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
BHA	Butylated hydroxyanisole
BHT	butylated hydroxytoluene
TBHQ	tert-Butylhydroquinone
GC	Gas Chromatography
ICP	inductively coupled plasma
MALDI-TOF MS	Matrix-assisted laser desorption/ionization–time of flight mass spectrometry
WB, FWB	เลือดครบจระเข้ fresh whole blood
WB-FD, FDWB, DWB	เลือดครบจระเข้แห้ง Freeze dried whole blood

คำย่อที่ใช้

S, FS	ซีรัมจระเข้ Fresh serum
S-FD, FDS, DS	ซีรัมจระเข้แห้ง Freeze dried serum
FP	fresh plasma
DP	freeze dried plasma
BC	ส่วนเม็ดเลือดจระเข้
CBB	Coomassie Brilliant Blue
GABA	Gamma-aminobutyric acid
Pb	สารตะกั่ว (Lead)
As	สารหนู (Arsenic)
IGF-1	Insulin like growth factor
RIA	Radioimmuno-assays
BUN	Blood Urea Nitrogen
ALT	Alanine transaminase
AST	aspartate aminotransferase
Hb	Hemoglobin
Hct	Hematocrit/ Pack cell volume
RBC	Red blood cell
WBC	White blood cell
MCV	Mean corpuscular volume
MCH	Mean corpuscular hemoglobin
MCHC	Mean corpuscular hemoglobin concentration
ATCC	American Type Culture Collection
NaF	Sodium fluoride
DNA	Deoxyribonucleic acid
RP-HPLC	Reversed phase HPLC
MIC	Minimal Inhibitory Concentration
MBC	Minimal bactericidal concentration
MFC	Minimal fungicidal concentration

คำย่อที่ใช้

SDW	sterile distilled water
MHB	Mueller-Hinton broth
OD	optical density
CFU	colony-forming unit
SDA	Sabouraud dextrose agar
PDA	Potato dextrose agar
IL-2	Interleukin-2
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
μ_m	micrometer
μg, ug	microgram
G, mg	Gram, miligram
μM	micromolar
CD	Cluster of differentiation
NK cell	เซลล์เอ็นเค Natural killer cell
ELISA,	Enzyme link immunosorbence assay
FCS	Fetal café serum
FACS	fluorescence-activated cell sorter
FITC	fluorescein isothiocyanate
DMSO	Dimethyl sulfoxide
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
PHA	Phytohemagglutinin
ACE	Angiotensin converting enzyme
IC_{50}	The half maximal inhibitory concentration
HHL	Hippuryl-histidyl-leucine
SFM	Serum Free Medium
DMEM	Dulbecco's modified Eagle media
MTT	3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

บทนำรวม

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา (ภาพรวมทั้งแผนงาน)

อาหาร สิ่งแวดล้อม และพันธุกรรมเป็นปัจจัยที่สำคัญที่มีอิทธิพลต่อการเกิดโรคและการติดเชื้อโรคต่างๆ แหล่งพลังงานที่สำคัญของร่างกายจากโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน มาจากอาหาร ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายมีส่วนสำคัญต่อการต้านทานการเกิดโรค งานวิจัยจำนวนมากให้ความสนใจในการวิเคราะห์หาสารอาหารจำเพาะที่อาจมีอันตรกิริยากับระบบภูมิคุ้มกันนี้ เสริมสร้างความแข็งแรงให้กับระบบฯ อันจะมีผลต่อการเสริมสร้างสุขภาพโดยรวมในประชากรทั่วไป หรืออาจเป็นแนวทางในการเยียวยาเพื่อการป้องกันหรือรักษาความผิดปกติต่างๆ ที่เกิดขึ้นในร่างกายของมนุษย์ สารน้ำจากสัตว์ที่สำคัญและเป็นที่ยอมรับในการใช้เป็นแหล่งอาหาร และมีการประยุกต์ใช้เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารรูปแบบต่างๆ รวมถึงจากใช้ประโยชน์จากส่วนประกอบก็คือ น้ำนม (Hartmann and Meisel, 2007) นอกจากน้ำนมแล้วในสัตว์ยังมีเลือดเป็นสารน้ำที่สำคัญมาก และจัดเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของร่างกายสัตว์ โดยมีระบบไหลเวียนเลือดนำสารอาหารที่สำคัญไปเลี้ยงยังส่วนต่างๆ ของร่างกาย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวิวัฒนาการของสัตว์แต่ละชนิด เลือดสัตว์เป็นสารน้ำที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งที่ถูกใช้ในอุตสาหกรรมอาหารมาเป็นเวลานาน ทั้งในลักษณะของส่วนประกอบของอาหารเพื่อสุขภาพและเสริมสร้างความแข็งแรงให้กับร่างกาย (Petczn'ska and Libelt, 1999) การบริโภคเลือดที่ผ่านขั้นตอนเพื่อเป็นอาหาร (edible blood) รวมถึงการนำองค์ประกอบที่สำคัญที่มีอยู่ในเลือดมาประยุกต์ใช้ หรือพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารอื่นๆ เช่น ซุป สกัด ผลิตภัณฑ์ยา และอาหารเสริม ฯลฯ

จระเข้พันธุ์ไทย (Siamese crocodile, *Crocodylus siamensis*) เป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศที่ประชาชนนิยมเลี้ยงเพื่อการค้า เนื่องจากเลี้ยงง่าย โตเร็ว ค่าใช้จ่ายในการเลี้ยงดูต่ำ ใช้เวลาในการดูแลน้อย และทำรายได้ดีให้แก่เกษตรกร จระเข้เป็นสัตว์ป่าคุ้มครอง ตามพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ. 2535 ที่สามารถซื้อขายได้ตามอนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศซึ่งชนิดสัตว์ป่าและพืชป่าที่ใกล้สูญพันธุ์ (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, CITES) ประเทศไทยมีฟาร์มที่ได้รับการรับรองจาก CITES มากกว่า 20 ฟาร์ม และฟาร์มเกษตรกรรายย่อยไม่ต่ำกว่า 2,000 ราย ซึ่งปัจจุบันจำนวนจระเข้ในประเทศทั้งหมดมีมากกว่าล้านตัว มีการค้าจระเข้มากขึ้นในรอบสิบปีที่ผ่านมา ส่งขายทั้งภายในและต่างประเทศไม่ต่ำกว่าปีละ 5000 ตัว ทำรายได้เข้าสู่ประเทศไม่ต่ำกว่าปีละ 1,000 ล้านบาทต่อปี ประเทศที่นิยมบริโภคจระเข้ได้แก่ จีน เกาหลี ฮ่องกง ไต้หวัน ผู้บริโภคนิยมใช้เนื้อ

เลือด และผลิตภัณฑ์อื่นๆ ของจระเข้เป็นอาหาร อาหารเสริม และเครื่องยาสัตววัตถุ จระเข้จัดเป็นสัตว์สมุนไพรที่สำคัญ ซึ่งประชากรชาวเอเชียโดยเฉพาะในจีน ฮ่องกง และไต้หวัน มีความเชื่อว่าการบริโภคเนื้อจระเข้ และเลือดจระเข้ จะช่วยเสริมสร้างภูมิคุ้มกัน ป้องกันการเกิดโรคภูมิแพ้ และโรคหอบเหนื่อยได้

จระเข้เป็นสัตว์ดึกดำบรรพ์ที่สามารถปรับตัว และอยู่รอดมาจนถึงปัจจุบัน เป็นสัตว์ที่หายใจด้วยปอด แต่เมื่อหายใจแต่ละครั้งสามารถดำรงชีวิตอยู่ใต้น้ำได้เป็นเวลานาน และจากพฤติกรรมการดำรงชีวิตของจระเข้พบว่า เมื่อจระเข้ได้รับบาดเจ็บจากการกัดกันหรือสาเหตุอื่นๆ ทำให้เกิดบาดแผลขนาดใหญ่และลึก สามารถอาศัยอยู่ในน้ำได้โดยที่ระบบภูมิคุ้มกันของจระเข้สามารถต่อต้านการบุกรุกของเชื้อแบคทีเรีย และจุลชีพอื่นๆ ที่อยู่ในน้ำได้อย่างมีประสิทธิภาพ และบาดแผลก็หายได้ในระยะเวลาอันสั้น ในทางตรงกันข้ามถ้าเป็นกรณีของคนเมื่อเกิดบาดแผลและยังแช่อยู่ในน้ำตลอดเวลา จะเกิดการติดเชื้อที่บาดแผลและเสียชีวิตจากเชื้อแบคทีเรียได้ในระยะเวลาอันสั้น จึงเห็นได้ว่าเลือดจระเข้ที่กระจายหล่อเลี้ยงทุกส่วนของร่างกายจระเข้นั้นน่าจะมีองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญทั้งในส่วนที่เป็นสารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ รวมถึงแร่ธาตุต่างๆ ทำหน้าที่เป็นสารอาหาร สารภูมิคุ้มกัน สารออกฤทธิ์ต้านสภาวะต่างๆ จากที่ได้กล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นว่า จระเข้มีระบบภูมิคุ้มกันที่มีประสิทธิภาพมากในการต่อต้านการติดเชื้อแบคทีเรียต่างๆ ได้ดี คุณสมบัติในการต้านจุลชีพนี้จัดเป็นภูมิคุ้มกันที่ได้รับมาตั้งแต่กำเนิด ที่สามารถค้นพบได้ในสัตว์หลายชนิด เช่น แมลง กุ้ง ปลา กบ วัว หมู ลิง คน ฯลฯ โดยสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ (anti-microbial constituents or factors) เหล่านี้พบได้ในเลือด ทั้งในส่วนของน้ำเลือด และเม็ดเลือดชนิดต่างๆ จากรายงานการศึกษาวิจัยต่างๆ พบว่าสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพที่พบในน้ำเลือดนั้น อาจเกิดขึ้นได้จากองค์ประกอบของคอมพลีเมนต์ในเลือด หรือจากสารโปรตีนขนาดสั้นๆ (เพปไทด์) ที่ถูกสร้างจากเซลล์เม็ดเลือดขาว และเซลล์ที่ช่วยในกระบวนการการแข็งตัวของเลือด (เกล็ดเลือด/ ทรอมโบไซด์) นอกจากนี้ยังพบว่าปัจจัยต่างๆ ในน้ำเลือดที่ช่วยในการแข็งตัวของเลือด ยับยั้งการแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรีย และปิดแผลได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ ในการเพาะเลี้ยงจระเข้ไม่มีการใช้ยาและวัคซีน ไม่มีการใช้สารกระตุ้นการเจริญเติบโต ไม่มีรายงานการติดเชื้อโรคที่สำคัญในจระเข้ เช่น โรคปากและเท้าเปื่อย โรคแอนแทรกซ์ โรควัวบ้า โรคไข้หวัดนก ฯลฯ ซึ่งต่างไปจากสัตว์อื่นๆ ในอุตสาหกรรมปศุสัตว์ เช่น ไก่ วัว กระบือ สุกร ซึ่งจะเห็นได้ว่าเลือดจระเข้เป็นแหล่งของวัตถุดิบที่มีค่าและมีความสำคัญต่อการนำมาใช้และประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์มากกว่าเลือดสัตว์อื่นๆ

ประเทศไทย เป็นแหล่งที่อยู่อาศัยและมีการเพาะเลี้ยงจระเข้พันธุ์ไทย อยู่เป็นจำนวนมากกระจายอยู่ทั่วประเทศ อุตสาหกรรมจระเข้ในไทยมีฐานหลักอยู่ที่การผลิตหนังและเครื่องหนัง โดยมีเนื้อ กระดูก เครื่องใน และการแปรรูปผลิตภัณฑ์จากจระเข้เหล่านี้เป็นผลิตผลรองลงมา ใน

กระบวนการผลิตของอุตสาหกรรมจระเข้เหล่านี้มีการชำแหละจระเข้ และมีเลือดเป็นผลิตผลเหลือใช้จากกระบวนการผลิต ซึ่งถ้าปล่อยทิ้งลงสู่แหล่งน้ำจะกลายเป็นของเสียเกิดสภาวะแวดล้อมเป็นพิษ จระเข้ถูกใช้เป็นสัตว์สมุนไพรและเครื่องยาสัตววัตถุในการรักษาทางการแพทย์แผนไทยมานานตั้งแต่อดีตที่มีจระเข้พันธุ์ไทยและจระเข้น้ำเค็มอาศัยอยู่ในธรรมชาติเป็นจำนวนมาก แพทย์แผนไทยรู้จักใช้เครื่องยาที่ได้จากจระเข้หลายอย่างที่สำคัญ ได้แก่ เขี้ยวจระเข้ น้ำมันจระเข้ ดีจระเข้ และหนังจระเข้ ข้อมูลการใช้ประโยชน์จากเลือดจระเข้ที่ได้เป็นเพียงคำบอกเล่าจากบรรพบุรุษและคนรู้จักที่น่าเชื่อถือ ตรงข้ามกับกับในประเทศจีน ชาวจีนรู้จักใช้ประโยชน์จากส่วนต่างๆ ของจระเข้มากกว่า 2,000 ปี โดยใช้ดี เลือด กระดูก และหนัง เป็นยาสมุนไพร (ชยันต์ และ วิเชียร, 2546) เมื่อจระเข้ในธรรมชาติมีจำนวนลดลงและมีพัฒนาการของการเพาะเลี้ยงจระเข้ในประเทศไทยที่ดีมากขึ้น ทำให้เกิดการใช้ประโยชน์จากจระเข้ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเหล่านี้ ดังนั้นผู้ประกอบการในอุตสาหกรรมจระเข้หลายรายมีการส่งออกเลือดจระเข้พันธุ์ไทยในลักษณะเลือดแห้งที่ได้จากการอบแห้งด้วยความร้อนส่งออกไปยังประเทศจีน ไต้หวัน หรือฮ่องกง เพื่อใช้เป็นยาสมุนไพรหรือส่วนผสมของตำรับยาจีน คนไทยซึ่งอยู่ในประเทศไทยที่มีการเพาะเลี้ยงจระเข้พันธุ์ไทยอยู่ภายในประเทศมีการใช้ประโยชน์จากเลือดที่ถูกทิ้งไปในกระบวนการอุตสาหกรรมจระเข้แต่ละวันน้อยมาก

ปัญหาของการใช้เลือดจระเข้เป็นยาสมุนไพร เครื่องยาสัตววัตถุ หรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อสุขภาพ ที่มีอยู่ในวงแคบ ไม่แพร่หลาย อาจเนื่องมาจาก

1) การขาดข้อมูลทางวิชาการจากการศึกษาทางวิทยาศาสตร์สนับสนุนองค์ประกอบหรือสารที่สำคัญ รวมถึงฤทธิ์หรือสรรพคุณที่มีอยู่ในเลือดจระเข้ โดยเฉพาะเลือดจระเข้พันธุ์ไทยซึ่งมีถิ่นกำเนิดและสามารถเพาะเลี้ยงได้อย่างดีในประเทศไทยของเรา

2) กระบวนการผลิตที่ไม่สะอาดและรูปแบบของผลิตภัณฑ์ที่ไม่เหมาะสม โดยแต่เดิมมีกระบวนการผลิตฯ ได้เลือดจระเข้จากการตัดส่วนคอจระเข้ให้เลือดไหลลงมาในภาชนะรองเลือด เก็บเลือดใส่ถาด แล้วใช้การตากแห้งตามธรรมชาติโดยใช้แสงอาทิตย์ ซึ่งต่อมาได้พัฒนามาใช้การอบด้วยความร้อนสูงในตู้อบ ให้อยู่ในรูปเลือดจระเข้แห้งที่เป็นแผ่น หรือผงหยาบ บริโภคด้วยการกินโดยตรง หรือผสมกับน้ำผึ้ง

3) การขาดการสนับสนุนและส่งเสริมงานวิจัย การผลิต และใช้ผลิตภัณฑ์จากเลือดจระเข้ของภาครัฐและเอกชน อย่างจริงจัง

4) การประชาสัมพันธ์และให้ข้อมูลที่ถูกต้องกับผู้บริโภคมีน้อย ไม่กว้างขวาง ทั้งนี้ปัญหาในข้อนี้จะแก้ไขได้ หากไม่มีปัญหาในข้อที่กล่าวแล้วข้างต้น

จากปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะที่เกิดขึ้นในคนและในสัตว์ ตลอดจนการเกิดโรคชนิดใหม่ๆ ที่มีสาเหตุมาจากไวรัส เช่น โรคเอดส์ (AIDS), โรคซาร์ (SAR), โรคไข้หวัดนก (Bird flu) ฯลฯ

รวมถึงอัตราการเกิดโรคไม่ติดเชื้อ เช่น มะเร็ง เบาหวาน ความดันโลหิตสูง ฯลฯ ที่มีสูงขึ้น ทำให้นักวิทยาศาสตร์จำนวนมากทั่วโลกให้ความสนใจในการศึกษาวิจัย ที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันที่ได้รับมาตั้งแต่กำเนิด ทั้งในด้านองค์ประกอบและกลไกการทำงานฯ จากเหตุผลที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้นถึงลักษณะการดำรงชีวิต คุณสมบัติ และการทำงานที่ดีภายในร่างกายของจระเข้ คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาในจระเข้น้ำจืดพันธุ์ไทย มาอย่างต่อเนื่อง (วิน และคณะ, 2546; Siruntawineti *et al*., 2003; Siruntawineti *et al*., 2004a; Siruntawineti *et al*., 2004b; Chaychomsri *et al*., 2004a; Chaeychomsri *et al*., 2004b; Siruntawineti *et al*., 2004c; Siruntawineti *et al*., 2005) ในลักษณะโครงการวิจัยเดี่ยวต่างๆ เลือดจระเข้ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเป็นเลือดจระเข้แห้ง ไม่พบปรสิตทั้งในเลือดและในลำไส้ของจระเข้ เมื่อทดสอบความเป็นพิษหรือมีการทดสอบความปลอดภัยหลังการบริโภคทั้งในแบบเฉียบพลัน กึ่งเรื้อรัง และระยะเรื้อรังในหนูทดลอง พบว่ามีความปลอดภัยสูง ค่าทางโลหิตวิทยาและค่าทางชีวเคมีของหนูทดลองที่บริโภคเลือดจระเข้อยู่ในเกณฑ์ที่ปกติ รวมทั้งยังไม่พบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อในร่างกายสัตว์ทดลองที่กินเลือดจระเข้ด้วย นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเบื้องต้นถึงสารต้านจุลชีพจากซีรัม และส่วนสกัดของเม็ดเลือดขาวจระเข้พันธุ์ไทย (สุวิทย์ และ สมปอง, 2550) ในขณะเดียวกันนักวิทยาศาสตร์จากประเทศอเมริกา และออสเตรเลีย ซึ่งมีจระเข้ป่าและจระเข้เพาะเลี้ยงชนิดจระเข้อเมริกันหรืออัลลิเกเตอร์ (American Alligator, *Alligator mississippiensis*) และจระเข้ออสเตรเลีย (*Crocodylus johnstoni*) ตามลำดับ อยู่มากภายในประเทศ ก็มีการรายงานวิจัยที่คล้ายคลึงกันในจระเข้ดังกล่าว เนื่องจากความพร้อมและศักยภาพทางวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีของประเทศทั้งสองมีมากกว่าในประเทศไทย ทำให้การศึกษาวิจัยพื้นฐานและประยุกต์เกี่ยวกับเลือดจระเข้ในการหาสารออกฤทธิ์ต้านเนื้องอก ไวรัส และเสริมภูมิคุ้มกันของนักวิจัยจากทั้งสองประเทศจึงมีออกมาอย่างมากในช่วงเจ็ดปีที่ผ่านมา (Roche' *et al*., 2003 ; Merchant *et al,* 2003, 2004, 2005a, 2005b, 2005c, 2006a, 2006b, 2006c, 2006d, 2006e, 2007)

ในการสืบค้นข้อมูลสิทธิบัตรพบว่า ได้มีการจดสิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับเลือดจระเข้ และส่วนประกอบ ในกลุ่มประเทศยุโรป ประเทศอเมริกา และประเทศออสเตรเลีย เพื่อใช้เป็นในการต้านเนื้องอก (WO03007874, 2003 ; US20040247589, 2004 ; AU2002354891, 2004) ในประเทศจีนเพื่อใช้เป็นอาหารเม็ดกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านมะเร็ง (CN1465351, 2004) การประยุกต์เลือดจระเข้ในกระบวนการเพื่อเตรียมยาและอาหารเสริมสุขภาพต่อต้านมะเร็ง ไวรัส และเสริมภูมิคุ้มกัน (CN1634147, 2005) ข้อมูลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าต่างประเทศให้ความสนใจ การค้นพบคุณสมบัติที่ดีที่มีในเลือดจระเข้ และนำประโยชน์จากเลือดจระเข้ที่ได้ประดิษฐ์คิดค้นมาพัฒนาเป็นยาสมุนไพรและผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพเป็นการบำบัดรักษาโรคมะเร็ง โรคติดเชื้อไวรัส แล้วจดสิทธิบัตรเพื่อ

คุ้มครองความคิดและการค้นพบเหล่านี้ นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อเดือนมีนาคมของปีนี้ องค์กรความร่วมมือเพื่อการวิจัยและพัฒนาอุตสาหกรรมภายในประเทศ (Rural Industries Research and Development Corporation, 2007) ของรัฐบาลออสเตรเลีย ได้รายงานการศึกษาวิจัยผลิตภัณฑ์ใหม่จากสัตว์ 5 ชนิด ได้แก่ จระเข้ นกอีมู แพะ จิงโจ้ และกระต่าย ซึ่งในประเทศออสเตรเลียมีจระเข้น้ำจืดและจระเข้น้ำเค็มในธรรมชาติ และฟาร์มจระเข้จำนวนมาก มีเลือดเป็นผลิตผลเหลือทิ้งที่มีปริมาณประมาณ 10–20 ตัน/ปี โดยสมมุติจากเลือด 0.6-1.25 กิโลกรัมต่อจระเข้หนึ่งตัว ที่ได้จากการชำแหละจระเข้ 16,000 ตัว/ปี มีการให้ความสำคัญกับโอกาสที่จะทำตลาด และใช้ประโยชน์ทางการค้าและธุรกิจในอนาคตของเลือดจระเข้และผลิตภัณฑ์ที่มีศักยภาพในการขนส่งออกซิเจนของฮีโมโกลบินจระเข้ และผลิตภัณฑ์ยาที่ได้มาจากเลือดจระเข้ และได้รายงานข้อมูลของไทยในการส่งออกเลือดจระเข้แห้งในรูปแคปซูลไปยังประเทศจีน

สำหรับปัญหาในข้อ 2) ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตที่ไม่สะอาดและรูปแบบของผลิตภัณฑ์ที่ไม่เหมาะสมนั้น ได้มีการศึกษาวิจัยและพัฒนากระบวนการเก็บและคุณภาพของผลิตภัณฑ์ ภายใต้การสนับสนุนโครงการวิจัย (IRPUS) จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย (สกว.) ฝ่ายอุตสาหกรรม (ฝ่าย 5) (จินดาวรรณ และคณะ, 2548, 2549) โดยได้วิจัยกระบวนการเจาะเก็บเลือดจระเข้ปริมาณมากจากอุปกรณ์เจาะเก็บเลือดที่จำเพาะ ซึ่งต่อมาได้พัฒนาเป็นเข็มเจาะ (คำขอสิทธิบัตรเลขที่ 0601001179, 16 มิถุนายน 2549 ; คำขอสิทธิบัตรเลขที่ 0801000372, 25 มกราคม 2551) ทำให้ได้เลือดที่สะอาด อยู่ในระบบปิดปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อโรค เก็บในขวดแก้วขนาดใหญ่ที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาก่อนแล้ว จากนั้นนำเลือดจระเข้ดังกล่าวมาผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ และใช้กระบวนการทำแห้งเลือดจระเข้ไทยโดยใช้การระเหิดแห้งภายใต้ความเย็น (freeze-dry, lyophilization) (อนุสิทธิบัตรเลขที่ 5074, 4 กันยายน 2552) เพื่อการรักษาคุณภาพที่ดีของสารอาหารต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในส่วนโปรตีนและเปปไทด์ของเลือดจระเข้ และเมื่อเลือดจระเข้แห้งแล้วนำมาทำให้เป็นผงบรรจุในรูปของแคปซูล เพื่อสะดวกในการบริโภคและใช้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร (เลือดจระเข้แคปซูล) ซึ่งปัจจุบันได้รับเลขสารบบ 10-1-04752-1-0001 จากคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) ของกระทรวงสาธารณสุข เพื่อการจำหน่ายแล้ว ในช่วงที่ผ่านมาได้มีการประชาสัมพันธ์ผ่านทาง สกว. ไปยังสื่อวิทยุ โทรทัศน์ และสื่อสิ่งพิมพ์ เกี่ยวกับแคปซูลเลือดจระเข้แห้ง ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากงานวิจัย ทำให้ผู้บริโภคที่เป็นผู้ชมหรือผู้อ่านเกิดความสนใจ และติดต่อมาเพื่อทดลองใช้เป็นจำนวนมาก ทั้งนี้เป็นกลุ่มผู้บริโภคที่เคยมีประสบการณ์เดิม จากการบริโภคเลือดจระเข้แห้งมาก่อนแล้ว และกลุ่มผู้บริโภครายใหม่ที่ต้องการทดลองใช้เพื่อการบำบัดรักษาโรคต่างๆ ที่สำคัญคือ โรคโลหิตจาง โรคหอบหืด โรคมะเร็ง โรคเอดส์ โรคเบาหวาน และโรคความดันโลหิตสูง ซึ่งผู้บริโภคส่วนใหญ่ให้ข้อมูลตอบรับที่ดีต่อผลิตภัณฑ์เลือดจระเข้แห้ง

เมีความเป็นไปได้ในการสัมฤทธิ์ผลต่ออาการผิดปกติ หรืออาการป่วยของผู้ป่วยที่ขอรับบริการวิชาการจากผลงานวิจัยที่ได้เป็นอย่างดี ทำให้เกิดโจทย์วิจัยใหม่ๆ ที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติที่ดีที่น่าจะมีอยู่ของเลือดจระเข้พันธุ์ไทย

จากผลกระทบของปัญหาและสถานภาพของงานวิจัยเลือดจระเข้พันธุ์ไทย ความสนใจและการตื่นตัวในการใช้ประโยชน์จากเลือดสัตว์สมุนไพร (จระเข้) ของต่างประเทศดังกล่าวข้างต้น เป็นการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนของวัตถุดิบธรรมชาติที่ได้จากทรัพยากรจระเข้ที่มีอยู่ในประเทศภายใต้ทฤษฎีเศรษฐกิจพอเพียง ลดมลพิษทางน้ำของสิ่งแวดล้อมจากการทิ้งเลือดจระเข้ไปอย่างเปล่าประโยชน์ ในระหว่างกระบวนการของอุตสาหกรรมจระเข้ ตลอดจนสถานการณ์ของการเกิดโรคติดเชื้อ (เช่น โรคเอดส์) และโรคไม่ติดเชื้อต่างๆ (เช่น โรคโลหิตจาง โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน โรคหัวใจ) ของประเทศไทยที่มีเพิ่มและรุนแรงมากขึ้น ค่าใช้จ่ายที่เพิ่มสูงขึ้นมากของการนำเข้ายาและผลิตภัณฑ์อาหารเสริมจากต่างประเทศ และแนวโน้มที่ดีของการใช้สารจากธรรมชาติเพื่อการบำบัดรักษาโรค รวมถึงการประยุกต์ใช้ประโยชน์ของการแพทย์แผนไทยในส่วนที่เกี่ยวข้องกับสัตว์สมุนไพร และการพัฒนาตำรับยาในอนาคต จึงเกิดการเชื่อมโยงการทำงานวิจัยร่วมกันของหลายๆ สถาบันทางด้านการเกษตร วิทยาศาสตร์ และการแพทย์ เพื่อให้เกิดศักยภาพในการได้มาซึ่งองค์ความรู้ต่างๆ ที่สำคัญของเลือดจระเข้ ซึ่งจะนำไปสู่การใช้ประโยชน์จากผลงานวิจัยที่ดี และให้ทันกับสถานการณ์ของโลก ใช้ประโยชน์ในการป้องกันโรคและการรักษาสุขภาพ โดยริเริ่มเป็นโครงการวิจัยแบบบูรณาการของเลือดจระเข้พันธุ์ไทยเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อสุขภาพ ตามแผนงานวิจัยฉบับนี้

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย (ภาพรวมทั้งแผนงาน)

วัตถุประสงค์ของแผนงานวิจัยฯ ในปีที่ 1 เพื่อวิจัยศึกษาองค์ความรู้ต่างๆ ที่สำคัญของเลือดจระเข้พันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*) ได้แก่ องค์ประกอบทางเคมี กระบวนการเจาะเก็บเลือดโดยไม่ทำลายชีวิต ฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ฤทธิ์ในการกระตุ้นเม็ดเลือดขาวมนุษย์ สารยับยั้งแองจิโอเทนซินคอนเวอร์ตติงเอนไซม์ในเลือดจระเข้ไทย ฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการสมานแผลของสารสกัดจากเลือดจระเข้ ซึ่งผลจากงานวิจัยต่างๆ ของโครงการย่อยในแผนงานวิจัยนี้จะเป็นแนวทางสู่การใช้ประโยชน์เป็นการผลิตผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรเลือดจระเข้พันธุ์ไทยที่สะอาดมีคุณภาพ เพื่อใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพ สามารถถ่ายทอดเทคโนโลยีให้แก่ภาคเอกชน และเพิ่มศักยภาพในการแข่งขันกับต่างประเทศ ตลอดจนเพื่อสนับสนุนอุตสาหกรรมการผลิตจระเข้ เพิ่ม

มูลค่าให้กับจระเข้ ส่งเสริมรายได้ให้กับเกษตรกรผู้เลี้ยงจระเข้ และเป็นการใช้ประโยชน์ที่ยั่งยืนของทรัพยากรจระเข้ของไทย

3. รายละเอียดความเชื่อมโยงระหว่างโครงการวิจัยย่อย

ในแผนงานวิจัยฯ (ปีที่ 1) นี้ ประกอบด้วยโครงการวิจัยที่ศึกษาคุณสมบัติของเลือดจระเข้ในแง่มุมต่างๆ อันจะนำมาซึ่งองค์ความรู้ใหม่ที่สำคัญเกี่ยวกับเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทยของเราเอง (แสดงดังในแผนภูมิกรอบแนวคิด) ได้แก่ องค์ประกอบทางเคมีของส่วนประกอบของเลือดจระเข้พันธุ์ไทยและการวิเคราะห์โปรตีนของเลือดครบและส่วนแยกต่างๆ ของเลือดจระเข้ *(โครงการวิจัยที่ 1)* การพัฒนากระบวนการเจาะเก็บเลือดจระเข้โดยไม่ทำลายชีวิต *(โครงการวิจัยที่ 2)* ฤทธิ์ต้านจุลชีพ *(โครงการวิจัยที่ 3)* ฤทธิ์เพิ่มหรือกระตุ้นภูมิคุ้มกัน *(โครงการวิจัยที่ 4)* สารยับยั้งแองจิโอเทนซินคอนเวอร์ตติงเอนไซม์ (ACE) ที่มีต่อความดันโลหิต *(โครงการวิจัยที่ 5)* ความสามารถของเลือดจระเข้ในการสมานหรือรักษาบาดแผล *(โครงการวิจัยที่ 6)* และโครงการบริหาร ซึ่งเป็นโครงการประสานโครงการย่อยต่างๆ ในแผนงานวิจัยฯ *(โครงการวิจัยที่ 10)*

โครงการย่อยที่ 1. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเลือดจระเข้พันธุ์ไทย
(Study on Chemical Compositions of Siamese Crocodile Blood)
หน่วยงานที่รับผิดชอบ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
หัวหน้าโครงการ รศ. ดร. จินดาวรรณ สิรันทวิเนติ

โครงการย่อยที่2. การพัฒนากระบวนการเจาะเก็บเลือดจระเข้โดยไม่ทำลายชีวิต
(Process Development for Crocodile Blood Collection with Crocodile Life Maintaining
หน่วยงานที่รับผิดชอบ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
หัวหน้าโครงการ รศ. ดร. วิน เชยชมศรี

โครงการย่อยที่3. ฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราของเลือดและส่วนประกอบของเลือดจากจระเข้พันธุ์ไทย (Antibacterial and Antifungal Activities of Blood and Blood Components from Siamese Crocodile)
หน่วยงานที่รับผิดชอบ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
หัวหน้าโครงการ ผศ. ดร. ราตรี ลีละวงค์เทวัญ

โครงการย่อยที่4. การศึกษาฤทธิ์ของเลือดจระเข้พันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*) ในการกระตุ้นกระบวนการกลืนกินของแมโครเฟจและลิมโฟไซต์ (Study on the Effects of Siamese Crocodile Blood (*Crocodylus siamensis*) on Macrophage Phagocytosis and Lymphocyte Activation)

หน่วยงานที่รับผิดชอบ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

หัวหน้าโครงการ ดร. กัลยา อารีย์

โครงการย่อยที่5. สารยับยั้งแองจิโอเทนซินคอนเวอร์ตติงเอนไซม์ในเลือดจระเข้ไทย (Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor in Siamese Crocodile Blood)

หน่วยงานที่รับผิดชอบ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

หัวหน้าโครงการ ดร. สิรินดา กุสุมภ์

โครงการย่อยที่ 6. การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการสมานแผลของสารสกัดจากเลือดจระเข้ (Study of Wound Healing Effect of Crocodile Blood Extract)

หน่วยงานที่รับผิดชอบ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

หัวหน้าโครงการ พญ.ดร.บริสุทธิ์ แสนมโน หาญพานิช

โครงการย่อยที่ 10. <u>โครงการบริหาร</u>

หน่วยงานที่รับผิดชอบ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

หัวหน้าโครงการ รศ. ดร. จินดาวรรณ สิรันทวิเนติ

สาระสังเขปของแต่ละโครงการวิจัยดังนี้

1) โครงการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเลือดจระเข้พันธุ์ไทย ที่สำคัญต่างๆ ที่มีอยู่ในเลือดจระเข้พันธุ์ไทย และส่วนแยกต่างๆ ของเลือดจระเข้ฯ ทั้งในกลุ่มอินทรีย์สาร ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน และกลุ่มอนินทรีย์สาร ได้แก่ วิตามิน แร่ธาตุต่างๆ รวมถึงการศึกษาวิเคราะห์ในรายละเอียดของอินทรีย์สารที่มีสัดส่วนมากที่สุดในร่างกายคือ โปรตีน โดยอาศัยเทคนิคทางโปรติโอมิกส์ และชีวเคมีอื่นๆ เป็นเครื่องมือในการศึกษา เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญทางวิชาการจากการศึกษาทางวิทยาศาสตร์ สนับสนุนองค์ประกอบหรือสารที่สำคัญ รวมถึงฤทธิ์หรือสรรพคุณที่มีอยู่ในเลือดจระเข้พันธุ์ไทย สามารถนำข้อมูลจากการวิจัยและศึกษานี้ไปใช้อธิบายและเชื่อมโยงกับโครงการวิจัยอื่นๆ ในแผนงานวิจัยนี้ และเป็นแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อสุขภาพโดยใช้เลือดจระเข้หรือสารสกัดจากเลือดจระเข้เป็นส่วนประกอบ *(การดำเนินงานวิจัย ปีงบประมาณ 2551 - 2553)*

2) โครงการศึกษาการพัฒนากระบวนการเจาะเก็บเลือดจระเข้พันธุ์ไทย โดยไม่ทำลายชีวิต ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาในระยะยาวต่อเนื่อง ในแง่ของระยะเวลาและปริมาณเลือดที่

เหมาะสมในการเจาะแต่ละครั้ง ที่ไม่กระทบต่อสุขภาพของจระเข้ผู้ให้เลือด ทั้งนี้เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐาน เป็นทางเลือกหนึ่งในการแก้ปัญหาการขาดแคลนเลือดจระเข้ในอนาคตเมื่อมีความต้องการวัตถุดิบเพิ่มมากขึ้น ใช้ประกอบการวางแผนการผลิตให้เพียงพอกับความต้องการของตลาด และยังใช้จระเข้เป็นพ่อแม่พันธุ์ เป็นทางเลือกใหม่ให้กับกลุ่มผู้บริโภคที่ไม่ต้องการทำลายชีวิตจระเข้ และเป็นการใช้ประโยชน์จากจระเข้อย่างยั่งยืน*(การดำเนินงานวิจัย ปีงบประมาณ 2551 - 2553)*

3) โครงการศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราของเลือดและส่วนประกอบของเลือดจากจระเข้พันธุ์ไทย เปรียบเทียบฤทธิ์ของเลือดจระเข้พันธุ์ไทย ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย(antibacterial activity) และการยับยั้งการเจริญของรา (antifungal activity) จาก เลือดครบแห้งเยือกแข็ง (Freeze dried whole blood) ซีรัมสด (Fresh serum) ซีรัมแห้ง (Freeze dried serum) ด้วยวิธี Modified Disc diffusion assay เพื่อหา Minimium inhibition concentration (MIC) และศึกษาประเภทของเลือดจระเข้พันธุ์ไทยแบบใดที่เหมาะสมในการผลิตเพื่อจำหน่ายซึ่งยังคงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและราได้ ใช้อธิบายฤทธิ์หรือสรรพคุณที่ดีของผลิตภัณฑ์เลือดจระเข้ และนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการออกแบบผลิตภัณฑ์เสริมสร้างสุขภาพ (Functional foods) ในอนาคต

4) โครงการศึกษาฤทธิ์ของเลือดจระเข้พันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*) ในการกระตุ้นกระบวนการกลืนกินของแมโครเฟจและลิมโฟไซต์ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับความสามารถและประสิทธิภาพขององค์ประกอบในเลือดจระเข้ในส่วนของภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดของจระเข้ฯ เพื่อการประโยชน์ในทางเภสัชวิทยาของเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทย และนำผลที่ได้มาเป็นข้อมูลพื้นฐานของการนำไปใช้ศึกษาทางคลินิกในคนต่อไป ตลอดจนเป็นแนวทางในการศึกษาขั้นลึกถึงสารออกฤทธิ์และกลไกการทำงานที่เกี่ยวข้องในอนาคตใช้เป็นแหล่งข้อมูลในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่มีเลือดจระเข้เป็นส่วนผสม

5) โครงการศึกษาสารยับยั้งแองจิโอเทนซินคอนเวอร์ตติงเอนไซม์ในเลือดจระเข้ไทย โดยศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เลือดจระเข้ของไทยเป็นแหล่งสกัดสาร ACE inhibitor ซึ่งใช้เป็นยาลดความดันเลือดสูง อันจะเป็นประโยชน์ในทางเภสัชวิทยาของเลือดจระเข้ และใช้เป็นแหล่งข้อมูลในการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสร้างสุขภาพ

6) โครงการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการสมานแผลของสารสกัดจากเลือดจระเข้ โดยศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเลือดจระเข้ต่อเซลล์ผิวหนัง keratinocytes และ Fibroblasts และการสมานแผลในสัตว์ทดลอง เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสร้างสุขภาพผิวหนัง และช่วยในการสมานแผล

10) โครงการบริหาร เป็นโครงการประสานโครงการย่อยต่างๆ ในแผนงานวิจัย ดำเนินการเรื่องการจัดประชุมเพื่อประเมินผลและติดตามงาน การจัดทำรายงานความก้าวหน้า และเป็นศูนย์กลางของจัดการเจาะเก็บเลือดจระเข้พันธุ์ไทย เตรียมตัวอย่างจระเข้ และส่วนแยกต่างๆ ของเลือดจระเข้ ซึ่งต้องใช้ร่วมกันหลายโครงการย่อย เพื่อลดงบประมาณ

4. ประโยชน์ที่ได้รับ

4.1 ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีผลต่อสุขภาพและเป็นที่ยอมรับของสากลและสามารถขายไปยังต่างประเทศได้ ดังต่อไปนี้

ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

- แคปซูลเลือดจระเข้แห้งสำหรับผู้ที่ต้องการบำรุงร่างกาย 1 ผลิตภัณฑ์
- ทราบองค์ประกอบทางเคมีของเลือดจระเข้และส่วนแยกต่างๆ
- แนวทางการผลิตภัณฑ์เสริมอาหารรูปแบบใหม่จากส่วนแยกต่างๆ ที่มีสารออกฤทธิ์

ผลิตภัณฑ์อาหารเสริมเพื่อสุขภาพ (Functional food)

- ผลิตภัณฑ์ไส้กรอกลดไขมันเสริมใยอาหาร
- ทราบฤทธิ์ของสารสำคัญในเลือดจระเข้และส่วนแยกต่างๆ ตลอดจนสารที่สกัดได้จากเลือดจระเข้ ในการป้องกันและช่วยรักษาโรค เช่น โรคติดเชื้อ โรคมะเร็ง โรคความดัน โรคเบาหวาน โรคโลหิตจาง
- ทราบผลของการใช้สารสกัดจากเลือดจระเข้ในสร้างความแข็งแรงของเซลล์ผิวหนังและการสมานแผล

4.2 ได้แนวทางในการพัฒนาเป็นตำรับยาและผลิตภัณฑ์ที่ใช้กับผู้ป่วยโดยเฉพาะที่มีปัญหาเรื่องโลหิตจาง ความดัน เบาหวาน มะเร็ง โรคติดเชื้อ ที่มีงานวิจัยทางคลินิกรองรับจนใช้ในโรงพยาบาลได้

4.3 เป็นการสร้างงานแก่ภาคเกษตรกรและภาคอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงจระเข้

4.4 มีนักวิจัยที่มีความหลากหลายมาคิดงาน และทำงานบูรณาการ ซึ่งกันและกัน

4.5 ได้สิทธิบัตรจากการเตรียมผลิตภัณฑ์ และผลงานตีพิมพ์อย่างน้อย 5 ผลงาน

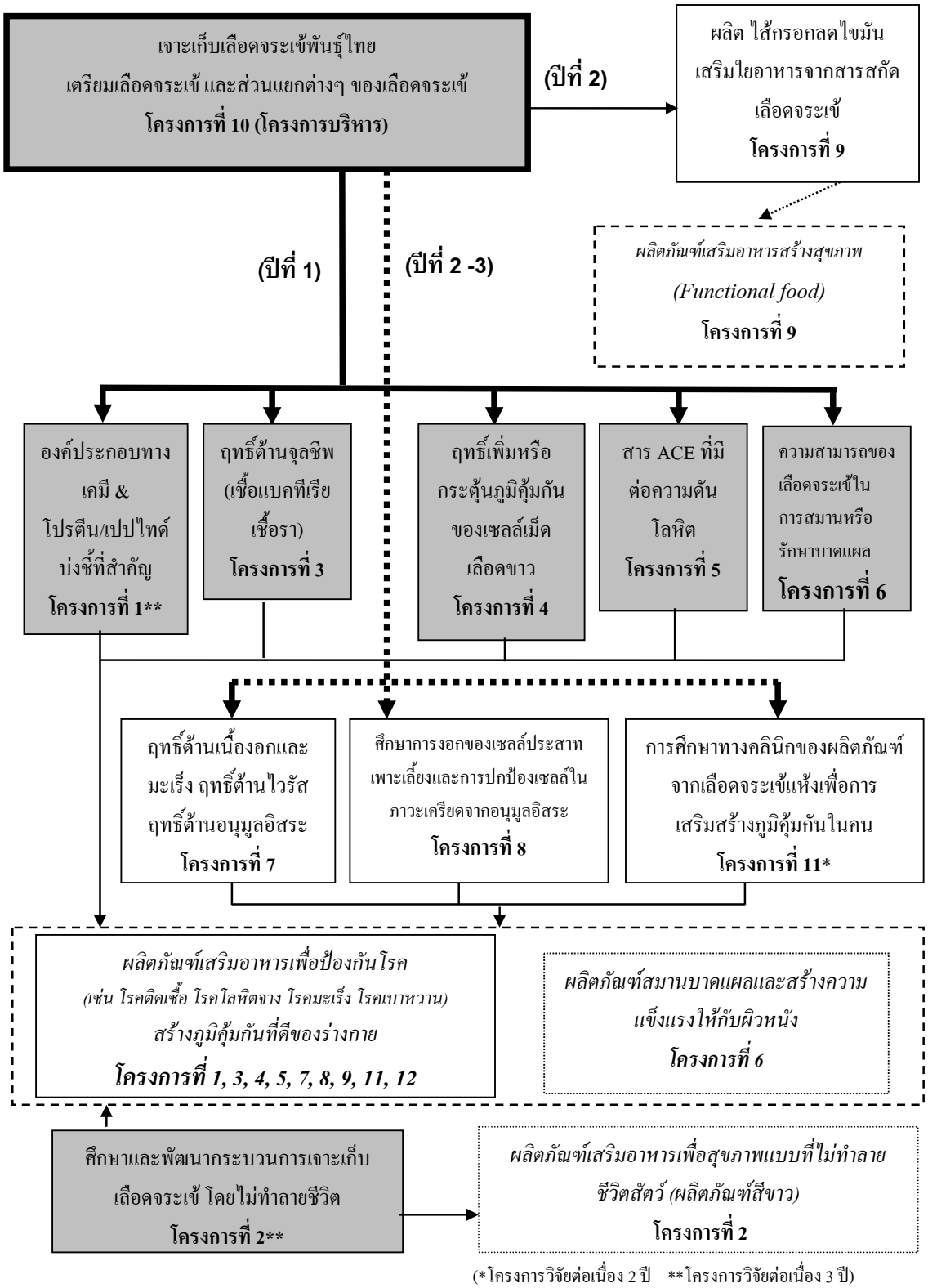
5. หน่วยงานที่นำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

5.1 หน่วยงานรัฐ

กระทรวงสาธารณสุข สภาวิจัย สถาบันการศึกษา (องค์ความรู้และผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพ)

5.2 หน่วยงานเอกชน

ฟาร์มและบริษัทที่เกี่ยวข้องกับจระเข้	(องค์ความรู้ การพัฒนากระบวนการผลิตเพื่อใช้เลือดเป็นวัตถุดิบที่สะอาดมีคุณภาพ)
บริษัทและโรงงานที่มีธุรกิจสมุนไพร	(มีผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่มีมาตรฐานและมีข้อพิสูจน์ทางวิทยาศาสตร์ที่สามารถแข่งขันได้ในตลาดโลก)



ภาพที่ 1. แผนภูมิแสดงกรอบแนวคิดของแผนงานวิจัยฯ

สรุปภาพรวมของแผนงาน

1. สรุปเรื่องราวในการวิจัยในภาพรวม

แผนงานวิจัย “การวิจัยและพัฒนาเลือดจระเข้พันธุ์ไทยเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อสุขภาพ” ในปีที่ 1 ได้รับการจัดสรรงบประมาณและสนับสนุนทุนวิจัย “แผนงานสนับสนุนการวิจัยรองรับการเปลี่ยนแปลงและพลวัตโลกเพื่อแก้ปัญหาสำคัญของชาติอย่างสมดุลและยั่งยืน” ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2551 จากภารกิจโครงการและประสานงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เป็นการทำงานบูรณาการซึ่งกันและกันของคณะผู้วิจัยจากสองสถาบันการศึกษาสองแห่ง คือ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่มีความหลากหลายมาคิด และร่วมทำงานกัน โดยได้รับความร่วมมือจากภาคเอกชนเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงจระเข้พันธุ์ไทยที่สนับสนุนวัตถุดิบเลือดจระเข้และตัวจระเข้ในการศึกษาวิจัยในโครงการวิจัยต่างๆ ทั้ง 6 โครงการการศึกษา โดยมีโครงการที่ 10 ทำหน้าที่ในการประสานโครงการย่อยต่างๆ ในแผนงานวิจัย เป็นศูนย์กลางของจัดการเจาะเก็บเลือดจระเข้พันธุ์ไทย เตรียมตัวอย่างจระเข้ และส่วนแยกต่างๆ ของเลือดจระเข้ ซึ่งต้องใช้ร่วมกันหลายโครงการย่อย เพื่อลดงบประมาณ การดำเนินการศึกษาในโครงการต่างๆ ดำเนินไปด้วยดี บรรลุวัตถุประสงค์ของการวิจัยที่ได้ตั้งไว้ ทั้งนี้โดยมีความล่าช้าบ้างในโครงการวิจัยย่อยที่ 6 ในส่วนที่เกี่ยวข้องกับการทดสอบฤทธิ์ของสารจากเลือดจระเข้ใน ต่อการสมานบาดแผลในหนูทดลอง ผลการศึกษาของโครงการที่ 1 (องค์ประกอบทางเคมี และโปรตีน/เปปไทด์บ่งชี้ที่สำคัญ), โครงการที่ 3 (ฤทธิ์ต้านจุลชีพ (แบคทีเรีย และ เชื้อรา)), โครงการที่ 4 (ฤทธิ์เพิ่มหรือกระตุ้นภูมิคุ้มกันของเซลล์เม็ดเลือดขาว) และ โครงการที่ 5 (สาร ACE ที่มีต่อความดันโลหิต) เป็นข้อมูลที่สำคัญในการสนับสนุนคุณสมบัติที่ดีของเลือดจระเข้พันธุ์ไทย เป็นแนวทางสำหรับผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อสุขภาพสร้างภูมิคุ้มกันที่ดีของร่างกาย และผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อป้องกันโรค เช่น โรคติดเชื้อ โรคโลหิตจาง โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน โรคความดันโลหิตสูงต่อไป ผลการศึกษาของโครงการที่ 6 แสดงให้เห็นถึงความสามารถของเลือดจระเข้ในการสมานหรือรักษาบาดแผล เป็นแนวทางสำหรับผลิตภัณฑ์จากวัตถุดิบเลือดจระเข้ในการสมานบาดแผลและสร้างความแข็งแรงให้กับผิวหนัง ผลการศึกษาของโครงการที่ 2 ให้ข้อมูลสำคัญเพื่อพัฒนากระบวนการเจาะเก็บเลือดจระเข้ โดยไม่ทำลายชีวิต ซึ่งต้องมีการศึกษาต่อเนื่องต่อไปในปีที่ 2-3 อันจะนำไปสู่ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อสุขภาพแบบที่ไม่ทำลายชีวิตสัตว์ (ผลิตภัณฑ์สีขาว) ในอนาคต

2. ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป

เนื่องด้วยปัญหาเรื่องสภาวะเศรษฐกิจที่ตกต่ำในปี พ. ศ. 2551-2552 มีผลกระทบต่ออุตสาหกรรมจระเข้ เป็นอุปสรรคต่อปริมาณตัวอย่างจระเข้ที่ใช้ในการวิจัย จึงจำเป็นต้องใช้ตัวอย่างเลือดจระเข้ในปริมาณที่พอเหมาะกับงานวิจัยในโครงการต่างๆ ของแผนงานวิจัยฯ การวิจัยในขั้นต่อไปในปีที่ 2 ประกอบด้วย โครงการวิจัยต่อเนื่องจากโครงการที่ 1-2 และโครงการที่จะเริ่มดำเนินการในปีที่ 2 ได้แก่ โครงการย่อยที่ 7 (การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ฤทธิ์ต้านเชื้อ HIV และ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากเลือดจระเข้) โครงการย่อยที่ 8 (ผลของเลือดจระเข้ต่อการงอกของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง และการปกป้องเซลล์ในภาวะเครียด จากอนุมูลอิสระ) โครงการย่อยที่ 9 (การพัฒนาไส้กรอกลดไขมันเสริมใยอาหารเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อสุขภาพ จากสารสกัดจากเลือดจระเข้ไทย) และโครงการย่อยที่ 11 การศึกษาทางคลินิกของผลิตภัณฑ์จากเลือดจระเข้แห้งเพื่อการเสริมสร้างภูมิคุ้มกันในคน การวิจัยในขั้นต่อไปดังกล่าว จึงควรมีการเตรียมตัวอย่างวัตถุดิบ สะสมไว้ก่อน และมีการนำการเจาะเก็บเลือดปริมาณมากเข้ามาช่วยในการเจาะเก็บเลือดจระเข้ เพื่อจะสนับสนุนการดำเนินงานวิจัยให้เป็นไปได้ด้วยดี และประกันความเสี่ยงจากสภาวะเศรษฐกิจที่อาจผันผ่วน ซึ่งเป็นปัจจัยภายนอกที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงจระเข้และอุตสาหกรรมจระเข้ในประเทศไทย

3. ประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลงานวิจัยที่ได้

3.1 ผลงานวิจัยที่ได้จากแผนงานวิจัยฯ นำไปใช้เป็นข้อมูลทางวิชาการจากการศึกษาทางวิทยาศาสตร์สนับสนุนองค์ประกอบหรือสารที่สำคัญ รวมถึงฤทธิ์หรือสรรพคุณที่มีอยู่ในเลือดจระเข้ โดยเฉพาะเลือดจระเข้พันธุ์ไทยซึ่งมีถิ่นกำเนิดและสามารถเพาะเลี้ยงได้อย่างดีในประเทศไทยของเรา สำหรับผลิตภัณฑ์เสริมอาหารวัตถุดิบจากเลือดจระเข้พันธุ์ไทย

3.2 การใช้ผลงานวิจัยที่ได้จากโครงการที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของเลือดจระเข้และส่วนแยกต่างๆ โครงการที่ 3 ฤทธิ์ต้านจุลชีพ (แบคทีเรีย และ เชื้อรา และโครงการที่ 4 ฤทธิ์เพิ่มหรือกระตุ้นภูมิคุ้มกันของเซลล์เม็ดเลือดขาว เป็นข้อมูลในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมอาหารรูปแบบใหม่จากส่วนแยกต่างๆ ที่มีสารออกฤทธิ์ ทางชีวภาพ

3.3 การใช้ผลงานวิจัยที่ได้จากโครงการที่ 5 (สาร ACE ที่มีต่อความดันโลหิต) เป็นแนวทางการศึกษาและผลิตผลิตภัณฑ์อาหารเสริมเพื่อสุขภาพ (Functional food) ผลิตภัณฑ์ไส้กรอกลดไขมันเสริมใยอาหาร ของโครงการย่อยที่ 9 (การพัฒนาไส้กรอกลดไขมันเสริมใยอาหารเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อสุขภาพ จากสารสกัด จากเลือดจระเข้ไทย)

3.4 การนำข้อมูลที่ได้จากการวิจัยของโครงการที่ 2 ประกอบเข้าในรายละเอียดการประดิษฐ์ เรื่อง “กระบวนการเจาะเก็บเลือดจระเข้โดยไม่ทำลายชีวิต และผลิตภัณฑ์ของจระเข้บริจาคเลือดที่ได้จากกรรมวิธีนี้” ของการขอรับอนุสิทธิบัตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เลขที่คำขอ 0903001362 ลงวันที่ 20 พฤศจิกายน 2552 (แสดงในภาคผนวกของโครงการที่ 2)

ประวัติและผลงานวิจัยที่สำคัญของนักวิจัยและคณะ

1. นางสาวจินดาวรรณ สิรันทวิเนติ

Miss. Jindawan Siruntawineti

(ผู้รับผิดชอบแผนงานวิจัย/ หัวหน้าโครงการวิจัยย่อยที่ 1/ ผู้ร่วมวิจัยในโครงการย่อยที่ 2-5)

เลขหมายประจำตัวประชาชน 5 3099 90056 69 1

ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์ ระดับ 9

หน่วยงาน/ ที่อยู่/ โทรศัพท์/ โทรสาร/ e-mail

ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

50 ถ. พหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

โทรศัพท์: 0 2562 5555, 0 2562 5444 ต่อ 3262

โทรสาร: 0 2562 5555, 0 2562 5444 ต่อ 3202

E-mail: fscijws@ku.ac.th

ประวัติการศึกษา

ปีที่จบ	ระดับปริญญา	อักษรย่อ ปริญญา และชื่อเต็ม	สาขาวิชา	ชื่อสถาบันการศึกษา	ประเทศ
2531	ปริญญาตรี	วท.บ. (วิทยาศาสตรบัณฑิต)	เทคนิคการแพทย์	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	ไทย
2534	ปริญญาโท	วท.ม. (วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต)	พยาธิวิทยาคลินิก	มหาวิทยาลัยมหิดล	ไทย
2545	ปริญญาเอก	Ph.D. (Docter of Philosophy)	Agricultural Sciences	University of Tsukuba	JAPAN

สาขาวิชาที่ชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชา

ชีววิทยาของเซลล์และโมเลกุล โลหิตวิทยา ภูมิคุ้มกัน สรีรวิทยา

Cell and Molecular Biology, Hematology, Immunology, Physiology

ผลงานวิจัยที่สำคัญ

วิน เชยชมศรี จินดาวรรณ สิรันทวิเนติ บุญเกื้อ วัชรเสถียร มณี ตันติรุ่งกิจ สุดาวรรณ เชยชมศรี ยศพงษ์ เต็มศิริพงศ์ และเริงฤทธิ์ สัปปพัน. 2546. ประสิทธิภาพของซีรัมจระเข้น้ำจืดพันธุ์

ไทยในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย. **วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด**. 15 (ฉบับเพิ่มเติมที่ 1). S120.

Siruntawineti, J., Chaeychomsri, W., Vajarasathira, B., Tuntirungkij, M. and Temsiripong, Y. 2003. Complement Activity of Thai Freshwater Crocodile (*Crocodylus siamensis*) serum. *In*: **Proceeding of the 29th Congress on Science and Technology of Thailand.** 20-22 October, 2003. Khon Kaen.

Siruntawineti J., W. Chaeychomsri, B. Vajarasathira, T. Ong-aat, and Y. Temsiripong. 2004. Efficacy of Siamese Crocodile (*Crocodylus siamensis*) Serum on Bacterial Growth Inhibition. *In*: **Proceeding of the 17th Working Meeting of the Crocodile Specialist Group.** 24–29 May 2004, Darwin Australia.

Siruntawineti, J., W. Chaeychomsri, B. Vajarasathira, A. Ritwichai, T. Ong-aat, and Y. Temsiripong. 2004. Blood Parasites of *Crocodylus siamensis* in Thailand. *In*: **Proceeding of the 17th Working Meeting of the Crocodile Specialist Group.** 24–29 May 2004, Darwin Australia.

Chaeychomsri,W., J. Siruntawineti, B. Vajarasathira, K. Komoljindakul, T. Ong-aat, and Y. Temsiripong. 2004. Intestinal Parasites of Freshwater Crocodile, *Crocodylus siamensis*, in Thailand. *In*: **Proceeding of the 17th Working Meeting of the Crocodile Specialist Group.** 24–29 May 2004, Darwin Australia.

Siruntawineti, J., W. Chaeychomsri, A. Pokharatsiri, B. Vajarasathira, N. Chitchuankij, and Y. Temsiripong. 2004. Crocodile Blood as Food Supplememt: Its Effects on Hematological Values in Wistar Rats. *In*: **Proceeding of the 30th Congress on Science and Technology of Thailand.** 19-21 October, 2004. Bangkok.

Chaeychomsri, W., J. Siruntawineti, A. Pokharatsiri, B. Vajarasathira, N. Chitchuankij, and Y. Temsiripong. 2004. Effects of Crocodile Blood Consumption on Biochemical Changes in Wistar Rats. *In*: **Proceeding of the 30th Congress on Science and Technology of Thailand.** 19-21 October, 2004. Bangkok.

จินดาวรรณ สิรันทวิเนติ วิน เชยชมศรี และบุญเกื้อ วัชรเสถียร. การเคลื่อนสู่ขั้วไฟฟ้าแบบเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจลเพื่อศึกษาซีรัมโปรตีนจากจระเข้พันธุ์ไทย หนูวิสตาร์ และคน. **วารสารเทคนิคการแพทย์** ปีที่ 33 ฉบับที่ 1 (ฉบับเสริม) เมษายน 2548. หน้า 303.

Siruntawineti, J., W. Chaeychomsri, B. Vajarasathira, and Y. Temsiripong. 2005. Evidence for Primary Immune Response to Salmonella paratyphi A in Wistar Rats after Feeding by

crocodile Blood. *In*: **Proceeding of the 31st Congress on Science and Technology of Thailand.** 18-20 October, 2005. Nakhon Ratchasima.

Chaeychomsri, W., J. Siruntawineti, B. Vajarasathira, and Y. Temsiripong. 2005. Mortality of Crocodile Embryonated Eggs during Artificial Incubation. *In*: **Proceeding of the 31st Congress on Science and Technology of Thailand.** 18-20 October, 2005. Nakhon Ratchasima.

จินดาวรรณ สิรันทวิเนติ วินเชยชมศรี และบุญเกื้อ วัชรเสถียร. 2549. การใช้เอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมล์เจลอีเล็กโตรฟอเรซิสเพื่อศึกษาซีรัมโปรตีนจากจระเข้พันธุ์ไทย หนูวิสตาร์ และคน. **วารสารเทคนิคการแพทย์** 34(1). หน้า 1444-1455.

ชูศักดิ์ เศรษฐ์สัมพันธ์ ปิยะรัตน์ ตั้งเสถียร วินเชยชมศรี และจินดาวรรณ สิรันทวิเนติ. กระบวนการที่เหมาะสมในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เลือดจระเข้แห้ง. บูธเลขที่ I309. เลขที่โครงงาน I 4803024. **งานนิทรรศการแสดงผลงานพัฒนาเทคโนโลยีทุนปริญญาตรี สกว. ครั้งที่ 4 (IRPUS Exhibition 49)** วันที่ 31 มีนาคม – 2 เมษายน 2549. ณ MCC Hall ห้างสรรพสินค้าเดอะมอลล์ งามวงศ์วาน ชั้น 4 กรุงเทพฯ. ได้รับรางวัลประเภทบูธดีเด่น

Siruntawineti, J., W. Chaeychomsri, B. Vajarasathira and Y. Temsiripong. Development and Evaluation of Dried Siamese Crocodile Blood Product. *In*: **Proceeding of the 32nd Congress on Science and Technology of Thailand.** 10-12 October 2006, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok.

Chaeychomsri, W., J. Siruntawineti, B. Vajarasathira and Y. Temsiripong. Safety Evaluation of Crocodile Blood Diet. *In*: **Proceeding of the 32nd Congress on Science and Technology of Thailand.** 10-12 October 2006, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok.

สุจิโรตถ์ โตรักตระกูล วินเชยชมศรี และจินดาวรรณ สิรันทวิเนติ. การเก็บรักษาและคุณภาพของผลิตภัณฑ์เลือดจระเข้แห้ง. บูธเลขที่ F1. เลขที่โครงงาน I24903003. **งานนิทรรศการแสดงผลงานพัฒนาเทคโนโลยีทุนปริญญาตรี สกว. ครั้งที่ 5 (IRPUS Exhibition 50)** วันที่ 20 – 22 เมษายน 2550 ณ รอยัลพารากอนฮอล์ ชั้น 5 สยามพารากอน กรุงเทพฯ. ได้รับรางวัลประเภทบูธดีเด่น

Siruntawineti, J., W. Chaeychomsri, D. Hengsawadi, Y. Cuptapun, B. Vajarasathira and E. Threenet. Influence of Iron Supplementation from Dried Crocodile Blood on Reproductive Performance in Iron Deficiency Anemia Female Rats. *In*: **Proceeding of**

the 33nd Congress on Science and Technology of Thailand. 18-20 October 2007, Walailak University, Nakhon Si Thammarat.

Chaeychomsri, W., J. Siruntawineti, D. Hengsawadi, Y. Cuptapun, B. Vajarasathira and Y. Temsiripong. Efficiency of Freeze-dried Crocodile Blood in Iron Deficiency Anemia Male Rats. *In*: **Proceeding of the 33nd Congress on Science and Technology of Thailand.** 18-20 October 2007, Walailak University, Nakhon Si Thammarat.

ภาคภูมิ บุศยพลากร จินดาวรรณ สิรันทวิเนติ และ วิน เชยชมศรี ประสิทธิภาพของเลือดจระเข้แห้งในหนูทดลองที่เป็นโรคโลหิตจางจากการขาดธาตุเหล็ก **รายงานวิจัยภายใต้โครงการ IRPUS ประจำปีการศึกษา 2550 โครงงานที่ I250B03009. และ "งานแสดงผลงานพัฒนาเทคโนโลยีทุนปริญญาตรี สกว. ครั้งที่ 6**" ในระหว่างวันที่ 28-30 มีนาคม 2551 ณ รอยัลพารากอนฮอล์ ชั้น 5 สยามพารากอน.

ณัฐนรี ปิติมล วิน เชยชมศรี และ จินดาวรรณ สิรันทวิเนติ. การพัฒนากระบวนการเจาะเก็บเลือดจระเข้โดยไม่ทำลายชีวิต เพื่อนวัตกรรมของผลิตภัณฑ์เลือดจระเข้. **รายงานวิจัยภายใต้โครงการ IRPUS ประจำปีการศึกษา 2550 โครงงานที่ I250B03011. และ "งานแสดงผลงานพัฒนาเทคโนโลยีทุนปริญญาตรี สกว. ครั้งที่ 6**" ในระหว่างวันที่ 28-30 มีนาคม 2551 ณ รอยัลพารากอนฮอล์ ชั้น 5 สยามพารากอน ได้รับรางวัล ชนะเลิศอันดับสอง ประเภท Professional Vote กลุ่มวิทยาศาสตร์สุขภาพและชีววิทยา

Siruntawineti, J., W. Chaeychomsri, D. Hengsawadi, Y. Cuptapan and B. Vajarasathira. 2008. Efficiency of Freeze – dried Crocodile Blood in Iron Deficiency Anemia Male Rats. *In*: **Proceeding of the 19th Working Meeting of the IUCN-SSC Crocodile Specialist Group.** 2 – 7 June 2008, Santa Cruz, Bolivia.

Pitimol, N, P. Budsayaplakorn, J. Siruntawineti and W. Chaeychomsri. 2008. Development of Crocodile Blood Collection Process on Animal Life Maintains for Innovation of Crocodile Blood Product. *In*: **Proceeding of the 19th Working Meeting of the IUCN-SSC Crocodile Specialist Group.** 2 – 7 June 2008, Santa Cruz, Bolivia.

Siruntawineti, J., W. Chaeychomsri, N. Pitimol and P. Budsayaplakorn. Donation of Crocodile Blood for Food Supplement production. *In*: **Proceeding of the 34th Congress on Science and Technology of Thailand.** 31 October – 2 November 2008, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok.

2. นายวิน เชยชมศรี

Mr. Win Chaeychomsri

(หัวหน้าโครงการวิจัยย่อยที่ 2/ ผู้ร่วมวิจัยในโครงการย่อยที่ 1, 3-5)

เลขหมายประจำตัวประชาชน 3 1199 00004 52 7

ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์ ระดับ 9

หน่วยงาน/ ที่อยู่/ โทรศัพท์/ โทรสาร/ e-mail

ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

50 ถ. พหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

โทรศัพท์: 0 2562 5555, 0 2562 5444 ต่อ 3264

โทรสาร: 0 2562 5555, 0 2562 5444 ต่อ 3202

E-mail: fsciwcc@ku.ac.th

ประวัติการศึกษา

ปีที่จบ	ระดับปริญญา	อักษรย่อ ปริญญาและชื่อเต็ม	สาขาวิชา	ชื่อสถาบันการศึกษา	ประเทศ
2523	ปริญญาตรี	วท.บ. (วิทยาศาสตรบัณฑิต)	ชีววิทยา	มหาวิทยาลัยรามคำแหง	ไทย
2532	ปริญญาโท	วท.ม. (วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต)	อายุรศาสตร์เขตร้อน	มหาวิทยาลัยมหิดล	ไทย
2550	ปริญญาเอก	ปร.ด. (ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต)	เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ไทย

สาขาวิชาที่ชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชา

โลหิตวิทยา จุลทรรศน์อิเลกโตรนศาสตร์ ภูมิคุ้มกันวิทยา ปรสิตวิทยา วิทยาหนอนพยาธิ เทคโนโลยีชีวภาพของสัตว์

Haematology, Electron Microscopy, Immunology, Parasitology, Nematology, Animal biotechnology

ผลงานวิจัยที่สำคัญ

สุดาวรรณ เชยชมศรี มณี ตันติรุ่งกิจ วิน เชยชมศรี และ ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2546. การผลิตนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสของหนอนเจาะสมอฝ้ายในเซลล์หนอนเจาะฝักข้าวโพดที่เลี้ยงแบบแขวนลอย, น. 34-41. *ใน* **เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการ ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 41**, สาขาพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

สุดาวรรณ เชยชมศรี มณี ตันติรุ่งกิจ วิน เชยชมศรี และ ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2547. การเพิ่มปริมาณของนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสหนอนกระทู้หอมในเซลล์เพาะเลี้ยง, น. 183-190. *ใน* **เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการ ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 42**, สาขาพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

วิน เชยชมศรี และ ทัศนีย์ บุญประคอง. 2545. การตรวจหาหนอนพยาธิในปลาที่เลี้ยงในระบบบ่อบำบัดน้ำเสีย **วารสารสิ่งแวดล้อม มก.** 1: 98-101.

วิน เชยชมศรี จินดาวรรณ สิรันทวิเนติ บุญเกื้อ วัชรเสถียร มณี ตันติรุ่งกิจ สุดาวรรณ เชยชมศรี ยศพงษ์ เต็มศิริพงศ์ และเริงฤทธิ์ สัปปพัน. 2546. ประสิทธิภาพของซีรัมจระเข้น้ำจืดพันธุ์ไทยในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย. **วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด.** 15 (ฉบับเพิ่มเติมที่ 1). S120.

Siruntawineti, J., W Chaeychomsri, B. Vajarasathira, M. Tuntirungkij, and Y. Temsiripong. 2003. Complement Activity of Thai Freshwater Crocodile (*Crocodylus siamensis*) serum. *In*: P**roceeding of the 29th Congress on Science and Technology of Thailand.** 20-22 October, 2003. Khon Kaen.

Siruntawineti J., W. Chaeychomsri, B. Vajarasathira, T. Ong-aat, and Y. Temsiripong. 2004. Efficacy of Siamese Crocodile (*Crocodylus siamensis*) Serum on Bacterial Growth Inhibition. *In*: **Proceeding of the 17th Working Meeting of the Crocodile Specialist Group.** 24–29 May 2004, Darwin Australia.

Siruntawineti, J., W. Chaeychomsri, B. Vajarasathira, A. Ritwichai, T. Ong-aat, and Y. Temsiripong. 2004. Blood Parasites of *Crocodylus siamensis* in Thailand. *In*: **Proceeding of the 17th Working Meeting of the Crocodile Specialist Group.** 24–29 May 2004, Darwin Australia.

Chaeychomsri, W., J. Siruntawineti, B. Vajarasathira, K. Komoljindakul, T. Ong-aat, and Y. Temsiripong. 2004. Intestinal Parasites of Freshwater Crocodile, *Crocodylus siamensis*, in Thailand. *In*: **Proceeding of the 17th Working Meeting of the Crocodile Specialist Group.** 24–29 May 2004, Darwin Australia.

Siruntawineti, J., W. Chaeychomsri, A. Pokharatsiri, B. Vajarasathira, N. Chitchuankij, and Y. Temsiripong. 2004. Crocodile Blood as Food Supplememt: Its Effects on Hematological Values in Wistar Rats. *In*: **Proceeding of the 30th Congress on Science and Technology of Thailand.** 19-21 October, 2004. Bangkok.

Chaeychomsri, W., J. Siruntawineti, A. Pokharatsiri, B. Vajarasathira, N. Chitchuankij, and Y. Temsiripong. 2004. Effects of Crocodile Blood Consumption on Biochemical Changes in Wistar Rats. *In*: **Proceeding of the 30th Congress on Science and Technology of Thailand.** 19-21 October, 2004. Bangkok.

Chaeychomsri, W., J. Siruntawineti, B. Vajarasathira, and Y. Temsiripong. 2005. Mortality of Crocodile Embryonated Eggs during Artificial Incubation. *In*: **Proceeding of the 31st Congress on Science and Technology of Thailand.** 18-20 October, 2005. Nakhon Ratchasima.

Siruntawineti, J., W. Chaeychomsri, B. Vajarasathira, and Y. Temsiripong. 2005. Evidence for Primary Immune Response to Salmonella paratyphi A in Wistar Rats after Feeding by crocodile Blood. *In*: **Proceeding of the 31st Congress on Science and Technology of Thailand.** 18-20 October, 2005. Nakhon Ratchasima.

จินดาวรรณ สิรันทวิเนติ วิน เชยชมศรี และบุญเกื้อ วัชรเสถียร. 2549. การใช้เอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมล์เจลอีเล็กโตรฟอเรซิสเพื่อศึกษาซีรัมโปรตีนจากจระเข้พันธุ์ไทย หนูวิสตาร์ และคน. **วารสารเทคนิคการแพทย์** 34 (1). หน้า 1444-1455.

ชูศักดิ์ เศรษฐ์สัมพันธ์ ปิยะรัตน์ ตั้งเสถียร วิน เชยชมศรี และจินดาวรรณ สิรันทวิเนติ. กระบวนการที่เหมาะสมในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เลือดจระเข้แห้ง. บูธเลขที่ I309. เลขที่โครงงาน I 4803024. **งานนิทรรศการแสดงผลงานพัฒนาเทคโนโลยีทุนปริญญาตรี สกว. ครั้งที่ 4 (IRPUS Exhibition 49)** วันที่ 31 มีนาคม – 2 เมษายน 2549. ณ MCC Hall ห้างสรรพสินค้าเดอะมอลล์ งามวงศ์วาน ชั้น 4กรุงเทพฯ. ได้รับรางวัลประเภทบูธดีเด่น

Siruntawineti, J., W. Chaeychomsri, B. Vajarasathira and Y. Temsiripong. Development and Evaluation of Dried Siamese Crocodile Blood Product. *In*: **Proceeding of the 32nd Congress on Science and Technology of Thailand.** 10-12 October 2006, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok.

Chaeychomsri, W., J. Siruntawineti, B. Vajarasathira and Y. Temsiripong. Safety Evaluation of Crocodile Blood Diet. *In*: **Proceeding of the 32nd Congress on Science and Technology of Thailand.** 10-12 October 2006, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok.

สุจิโรตถ์ โตรักตระกูล วิน เชยชมศรี และจินดาวรรณ สิรันทวิเนติ. การเก็บรักษาและคุณภาพของผลิตภัณฑ์เลือดจระเข้แห้ง. บูธเลขที่ F1. เลขที่โครงงาน I24903003. **งานนิทรรศการแสดงผลงานพัฒนาเทคโนโลยีทุนปริญญาตรี สกว. ครั้งที่ 5 (IRPUS Exhibition 50)** วันที่

20 – 22 เมษายน 2550 ณ รอยัลพารากอนฮอล์ ชั้น 5 สยามพารากอน กรุงเทพฯ. ได้รับรางวัลประเภทบูธดีเด่น

Chaeychomsri, W., J. Siruntawineti, D. Hengsawadi, Y. Cuptapan, B. Vajarasathira and Y. Temsiripong. EFFICIENCY OF FREEZE-DRIED CROCODILE BLOOD IN IRON DEFICIENCY ANEMIA MALE RATS. *In*: **Proceeding of the 33rd Congress on Science and Technology of Thailand.** 18-20 October 2007, Walailak University, Nakhon Si Thammarat.

Chaeychomsri, W., J. Siruntawineti, D. Hengsawadi, Y. Cuptapun, B. Vajarasathira and Y. Temsiripong. Efficiency of Freeze-dried Crocodile Blood in Iron Deficiency Anemia Male Rats. *In*: **Proceeding of the 33nd Congress on Science and Technology of Thailand.** 18-20 October 2007, Walailak University, Nakhon Si Thammarat.

Siruntawineti, J., W. Chaeychomsri, D. Hengsawadi, Y. Cuptapun, B. Vajarasathira and E. Threenet. Influence of Iron Supplementation from Dried Crocodile Blood on Reproductive Performance in Iron Deficiency Anemia Female Rats. *In*: **Proceeding of the 33nd Congress on Science and Technology of Thailand.** 18-20 October 2007, Walailak University, Nakhon Si Thammarat.

Chaeychomsri, W., P. Tabthipwon, N. Noparatnaraporn and V. Siripholavat. 2008. Development of Microsatellite Markers for Siamese Crocodile (*Crocodylus siamensis*). **Kasetsart Journal Natural Science.** 42 (2) : 256-262.

Chaeychomsri, W., S. Chaeychomsri, M. Tuntirungkij, P. Tabthipwan, N. Noparatnaraporn and V. Siripholavat. 2008. Development of Microsatellite Markers for Siamese Crocodile (*Crocodylus siamensis*). *In*: **Proceeding of the 34th Congress on Science and Technology of Thailand.** 31 October – 2 November 2008, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok.

Siruntawineti, J., W. Chaeychomsri, N. Pitimol and P. Budsayaplakorn. Donation of Crocodile Blood for Food Supplement production. *In*: **Proceeding of the 34th Congress on Science and Technology of Thailand.** 31 October – 2 November 2008, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok.

3. นาง ราตรี ลีละวงค์เทวัญ

Mrs Ratree Leelawnogtawon

(หัวหน้าโครงการวิจัยย่อยที่ 3)

เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 31301 00572 409

ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ระดับ 8

หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

สาขาจุลชีววิทยาและภูมิคุ้มกันวิทยา สถานพรีคลินิก คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต
ต.คลองหนึ่ง อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12121
โทรศัพท์ที่ทำงาน 0-2926-9710 โทรศัพท์เคลื่อนที่ 0-86819-3768
โทรสาร 0-2926-9711
E-mail: ratree@tu.ac.th

ประวัติการศึกษา

ปีที่จบ	ระดับปริญญา	อักษรย่อปริญญาและชื่อเต็ม	สาขาวิชา	ชื่อสถาบันการศึกษา	ประเทศ
2531	ปริญญาตรี	วท.บ. (วิทยาศาสตรบัณฑิต)	เทคนิคการแพทย์	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	ไทย
2536	ปริญญาโท	วท.ม. (วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต)	จุลชีววิทยาทางการแพทย์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ไทย
2545	ปริญญาเอก	ปร.ด. (ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต)	จุลชีววิทยาและอิมมูโนโลยี	มหาวิทยาลัยมหิดล	ไทย

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)

พันธุวิศวกรรม (genetic engineering technology), oral vaccine

ผลงานวิจัยที่สำคัญ

Ratree Leelawongtawon, Srinuan Somroop, Urai Chaisri, et al. CpG DNA, Liposome and Refined Antigen Oral Cholera Vaccine. **Asian pacific journal of Allergy and Immunology**, 2003; 21: 231-239. ทุน สกว. ศ.ดร. วันเพ็ญ ชัยคำภา

Aree Taylor and Ratree Leelawongtawon " The Retrospective Study of the Epidemiology of Dengue virus in fection in Thammasat Hospital during 2000-2002" **Journal of The**

Medical Technologist Association of Thailand, 2007;35(1) in published ทุนวิจัยเสริมหลักสูตร ม.ธรรมศาสตร์

Ratree Leelawongtawon, Aree Taylor, Kalaya Aree "The Study of Coliform bacteria in Drinking Water from Cafeteria at Thammasat University Rasit Campus during May to July 2005" **The Journal of Thammasat University Medical School**, 2006; 6(4): 434-440.ทุนวิจัยเสริมหลักสูตร ม.ธรรมศาสตร์

4. นาง กัลยา อัตนวานิช-อารีย์

Mrs. Kalaya Attanavanich-Aree

(หัวหน้าโครงการวิจัยย่อยที่ 4)

เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 4-1101-00012-34-7

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ระดับ 7 คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

สถานวิทยาศาสตร์พรีคลินิก
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต
ถนนพหลโยธิน ต. คลองหนึ่ง อ. คลองหลวง จ. ปทุมธานี 12120
โทรศัพท์ 02-926-9710
โทรสาร 02-926-9711
E-mail: Kalaya@tu.ac.th

ประวัติการศึกษา

ปีที่จบ	ระดับปริญญา	อักษรย่อปริญญา และชื่อเต็ม	สาขาวิชา	ชื่อสถาบันการศึกษา	ประเทศ
2532	ปริญญาตรี	วท.บ. (วิทยาศาสตรบัณฑิต)	เทคนิคการแพทย์	มหาวิทยาลัยมหิดล	ไทย
2536	ปริญญาโท	วท.ม. (วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต)	ชีวเคมี	มหาวิทยาลัยมหิดล	ไทย
2546	ปริญญาเอก	Ph.D. (Doctor of Philosophy)	Microbiology	The University of Alabama at Birmingham	USA

สาขาวิชาที่มีความเชี่ยวชาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)

ภูมิคุ้มกันวิทยาระดับเซลล์ (cellular immunology)

ผลงานวิจัยที่สำคัญ

ราตรี ลีละวงค์เทวัญ อารี เทเลอร์ กัลยา อารีย์. การตรวจหาแบคทีเรียโคลิฟอร์มในน้ำดื่มสาธารณะจากโรงอาหารในมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ระหว่างเดือนพฤษภาคม ถึงกรกฎาคม พ.ศ. 2548. 2549. **ธรรมศาสตร์เวชสาร** 6, 434-437.

Attanavanich K. and Kearney J.F. Marginal zone, but not follicular B cells, are potent activators of naive CD4 T cells. 2004**. J Immunol**, 172, 803-811.

5. นางสาว สิรินดา กุสุมภ์

Miss Sirinda Kusump

(หัวหน้าโครงการวิจัยย่อยที่ 5)

เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 1020 02404 51 1

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
โทร. 02-564-4440 ต่อ 2550 โทรสาร 02-564-4486
E-mail: sirinda@tu.ac.th

ประวัติการศึกษา

ปีที่จบ	ระดับปริญญา	อักษรย่อปริญญาและชื่อเต็ม	สาขาวิชา	ชื่อสถาบันการศึกษา	ประเทศ
2535	ปริญญาตรี	วท.บ. (วิทยาศาสตรบัณฑิต)	เทคโนโลยีการอาหาร	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ไทย
2538	ปริญญาโท	วท.ม. (วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต)	เทคโนโลยีการอาหาร	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ไทย
2549	ปริญญาเอก	Ph.D. (Doctor of Philosophy)	Food Science and Technology	University of Alberta	Canada

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)

เคมีนมและการแปรรูปผลิตภัณฑ์นม ผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสร้างสุขภาพ

Dairy Chemistry and Technology Functional foods

ผลงานวิจัยที่สำคัญ

Kusump, S., Silva-Hernandez, E.R., and Ozimek, L. (2007) Isolation of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from casein hydrolysates by ultrafiltration. **Milchwissenschaft.** 62(3): 260-263

Kusump, S., and Ozimek, L., (2006) Probiotic *Lactobacillus casei* ADA03 as a starter culture released angiotensin converting enzyme inhibitors from bovine milk, **Milchwissenschaft.** In press.

Kusump, S., and Ozimek, L. (2002) Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from bovine milk, *In* : **Food Science and Product Technology** (Eds. T. Nakano, and L. Ozimek) Research Signpost, India, 127-139

6. นางบริสุทธิ์ แสนมโน หาญพานิช

Mrs. Borisut Sanmano Hanpanich (former name: Borisut Sanmano)..

(หัวหน้าโครงการวิจัยย่อยที่ 6)

เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3-5099-01140-67-6

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

โครงการบัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์…….

โทรศัพท์ (ที่ทำงาน) 02-9269806 โทรศัพท์ (มือถือ) 084-1234207

E-mail : sborisut@yahoo.com

ประวัติการศึกษา

2001 – 2005 Ph.D. (Medical Science) Department of dermatology
Juntendo University, Tokyo
Thesis entitled "Engraftment of umbilical cord epithelial cells in athymic mice: an attempt to improve reconstructed skin equivalents as epithelial composites"

2000 Dermatology fellow Department of dermatology
Juntendo University, Tokyo

1992-1988 Medical Diploma (MD) Faculty of Medicine
Chulalongkorn University, Bangkok

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)

Tissue engineering (skin), Applied dermatology, Anti-aging, Regenerative Medicine

ผลงานวิจัยที่สำคัญ

Borisut Sanmano, Masayuki Mizoguchi, Yasushi Suga, Shigaku Ikeda and Hideoki Ogawa: Engraftment of umbilical cord epithelial cells in athymic mice: an attempt to improve reconstructed skin equivalents as epithelial composites. **J Dermatol Sci.** 2005; 37:29-39. มี impact factor 1.480.

Masayuki Mizoguchi, Yasushi Suga**,** Borisut Sanmano, Shigaku Ikeda and Hideoki Ogawa: Organotypic culture and surface plantation using umbilical cord epithelial cells: Morphogenesis and expression of differentiation markers mimicking cutaneous epidermis. **J Dermatol Sci.** 2004; 35(3):199-206. มี impact factor 1.480.

Borisut Sanmano, Masayuki Mizoguchi, Masataro Hiruma, and Hideoki Ogawa: Combination therapy consisting of minimal week-pulse oral terbinafine plus topical application of terbinafine cream in treament of onychomycosis. **J Dermatolog Treat.** 2004; 15(4): 246-252. มี impact factor 0.301.

Borisut Sanmano, Masayuki Mizoguchi, Masataro Hiruma, and Hideoki Ogawa: Abbreviated oral itraconazole therapy. **Mycoses.** 2003; 46(8):298-303. มี impact factor 0.805.

Shigaku Ikeda, Masayuki Mizoguchi, Borisut Sanmano, Yasushi Suga, and Hideoki Ogawa: Clinical trial of human amniotic membranes on ulcerated skin surface in epidermolysis bullosa. **The journal of Activity of the rare and intractable Skin diseases** (Phemphigus, Epidermolysis Bullosa, and generalized Pustular Psoriasis). Research Committee of the Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare, Tokyo. 2002. 27-31.

Masayuki Mizoguchi, Borisut Sanmano,Yasushi Suga, Shigaku Ikeda, and Hideoki Ogawa**:** Reconstructed skin equivalent using umbilical cord epithelial cells. **The Meeting of Activity of the rare and intractable Skin diseases** (Phemphigus, Epidermolysis Bullosa, and generalized Pustular Psoriasis). Research committee of the ministry of Health, Labor and Welfare of Japan, Tokyo, July 5, 2001

Borisut Sanmano, Masayuki Mizoguchi, Yasushi Suga, and Hideoki Ogawa: Trial Development of Skin Equivalent Using umbilical cord Derived-Epithelial Cells. **The 26th Annual Meeting of Japanese Society for Investigative Dermatology**, Ehime, September 7-8, 2001

Masayuki Mizoguchi, Borisut Sanmano, Yasushi Suga, Shigaku Ikeda, and Hideoki Ogawa: Clinical trial of human amniotic membranes on ulcerated skin surface in epidermolysis bullosa. **The Meeting of Activity of the rare and intractable Skin diseases** (Phemphigus, Epidermolysis Bullosa, and generalized Pustular Psoriasis). Research committee of the ministry of Health, Labor and Welfare of Japan, Tokyo, January 18, 2002.

Borisut Sanmano, Masayuki Mizoguchi, Masataro Hiruma, and Hideoki Ogawa: Case Report Tinea capitis in Japanese Girl. **The 772nd Tokyo Regional Meeting of Dermatological Society**, Tokyo, April 20, 2002

Borisut Sanmano, Masayuki Mizoguchi, Masataro Hiruma, and Hideoki Ogawa: Tinea Capitis in two Japanese Girls caused by *M. canis*. **The 46th Annual Meeting of Japanese Society for Medical Mycology**, Tokyo, September 28-29, 2002

Borisut Sanmano, Masayuki Mizoguchi, Masataro Hiruma, and Hideoki Ogawa: Minimal week-pulse terbenafine in the treatment of onychomycosis. **The 55th Annual Meeting of Western Japanese Society for Investigative Dermatology**, Ehime, October 25-26, 2003.

Borisut Sanmano, Masayuki Mizoguchi, Yasushi Suga, Shigaku Ikeda, and Hideoki Ogawa**:** Morphogenesis and Differentiation of Umbilical Cord and Epithelial Cells grafted on Nude mice mimicking cutaneus epidermis. **The 29th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (JSID)**, Kyoto, April 14-16, 2004.

Borisut Sanmmano, Maho Kondo, Yumi Shiraki, Masataro Hiruma, Shigaku Ikeda, Hideoki Ogawa: A case of chromomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi* and a review of reported cases of dematiaceous fungal infection in Japan. The **third Congress of Asia-Pacific Society for Medical Mycology (APSMM)**, Bangkok, March 4-6, 2005.

7. นางสาวดวงจันทร์ เฮงสวัสดิ์

Miss. Duangchan Hengsawadi

(ผู้ร่วมวิจัยโครงการย่อยที่ 1)

เลขหมายประจำตัวประชาชน 5 1002 00012 49 5

ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิจัย ชำนาญการ ระดับ 8

หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

ฝ่ายค้นคว้าและวิจัย สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพฯ 10900
50 ถ. พหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900
โทรศัพท์: 02-942-8629-35 ต่อ 906
โทรสาร: 02-940-6455
E-mail: ifcduh@ku.ac,th

ประวัติการศึกษา

ปีที่จบ	ระดับปริญญา	อักษรย่อ ปริญญาและชื่อเต็ม	สาขาวิชา	วิชาเอก	ชื่อสถาบันการศึกษา	ประเทศ
1979	ปริญญาตรี	วท.บ. (วิทยาศาสตรบัณฑิต)	ชีววิทยา	-	มหาวิทยาลัยรามคำแหง	ไทย
1987	ปริญญาโท	M.Sc. (Master of Sciences)	Applied Nutrition	-	University of Indonesia	Indonesia

สาขาวิชาที่ชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชา

การทดสอบความปลอดภัยในอาหาร การประเมินคุณค่าทางโภชนาการ

ผลงานวิจัยที่สำคัญ

Hengsawadi, D.,Tangkanakul. P., Ruamrak. M., Auttaviboonkul, P., Niyomwit,B., TitaTan, Y., Onhem, S., and Phongpipatpong, M. *In*: **Proceedings of the 4 th KU – NPUST Bilateral Conference " Food for Health : The Magic of Asian Agriculture** " Bangkok Thailnd Novenber 6 – 8, 2006

Hengsawadi, D.,Wattanasiritham, L., Ruamrak. M.,., TitaTan, Y., Onhem, S., Sikkamondhol, and C., Srichayet, P " Nutritional Research and Development of Food Products Using Thai Herbs fot Value Added of Health " . *In*: **the Proceedings of the 33rd Congress on Science and Technology of Thailand**, Nakornsrithamrat Thailand October 18-20, 2007

Chaeychomsri., W., Siruntawineti, J., Hengsawadi, D., Cuptapun, Y.,Vajarasathira, B., and Temsiripong, Y. " Efficiency of Freeze – Dried Crocodile Blood in ion Deficiency Anemea Male Rats". *In*: **the Proceedings of the 33rd Congress on Science and Technology of Thailand**, Nakornsrithamrat Thailand October 18-20, 2007

Siruntawineti, J., Chaeychomsri., W., Hengsawadi, D., Cuptapun, Y., Vajarasathira, B., and Threenet, E. " Influence of Ion Supplementation from Dried Crocodile Blood on Reproductive Performance in ion Deficiency Anemea Female Rats". *In:* **the Proceedings of the 33rd Congress on Science and Technology of Thailand**, Nakornsrithamrat Thailand October 18-20, 2007

Cuptapun, Y., Hengsawadi, D., Mesomya, W., Jittanoonta, P., Siripanporn, J and Saengprakai ,J. 2007. Study on Chemical Composition and Shelf Life of High Calcium and High Fiber of Food Bar Products. *In*: **the Proceedings of the 33rd Congress on Science and Technology of Thailand**, Nakornsrithamrat Thailand October 18-20, 2007

Cuptapun, Y., Hengsawadi, D. and Mesomya, W. 2007. Nutritional Evaluation of Nutritious Breakfast Products. *In*: **the Proceedings of the 33rd Congress on Science and Technology of Thailand**, Nakornsrithamrat Thailand October 18-20, 2007

Cuptapun, Y., Hengsawadi, D and Mesomyaw 2006. Utilization of Some Edible Insects in Thailand : Nutritional Qualities and Health Aspects : *In*: **The 4th KU-NPUST Bilateral Conference "Food for Health : The Magic of Asian Agriculture"** November 6-8, 2006. Abstract. และรายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์โครงการวิจัยทุนอุดหนุน มก. ปีงบประมาณ 2547

Cuptapun, Y., Hengsawadi, D., Mesomya, W. and Jittanoonta, P. 2003. Effect of Fermented Soybean (Thua Nao) on Nutritional Status and Heatth Aspects in Rat. *In*: **Symposium Abstract The 1st International Symposium and Workshop on Insight into the World of Indigenous Fermented Foods for Technology Development and Food Safety** August 13-15, 2003, P-12 and full paper.

Mesomya, W., Pakpeankitvatana, V., Komindr, S., Leelahagul, P., Cuptapun, Y., Hengsawadi, D., Tammarate, P. and Tangkanakul, P. 2004 Effect of Health Food from Cereal and Nata De Coco on Serum Lipids in Human. Abstract in **10th World Congress on Clinical Nutrition** November 30-December 3, 2004, Phuket, Thailand and full paper.

วันเพ็ญ มีสมญา ดวงจันทร์ เฮงสวัสดิ์ เยาวดี คุปตะพันธ์ ผ่องศรี จิตตนูนท์ และวิภาภรณ์ ณ ถลาง 2546 เรื่องผลของน้ำมันปลาจากปลาป่นนอร์เวย์ต่อระดับไขมันในเลือดหนูทดลอง **วารสารเกษตรนเรศวร** ปีที่ 7 ฉบับที่ 1 ตุลาคม 2546 – กันยายน 2547 หน้า 117-129

วันเพ็ญ มีสมญา ดวงจันทร์ เฮงสวัสดิ์ เยาวดี คุปตะพันธ์ สร้อยทอง สายหยุดทอง กรุณา วงษ์กระจ่าง ธีระ ทองเผือก สมโภชน์ ใหญ่เอี่ยม และเพลินใจ ตังคณะกุล 2546 การศึกษาอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ใยอาหารสูงเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์จากท้องตลาด เรื่องเต็ม **การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 41 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์** หน้า 388-397

Mesomya,W.,Chotmethepirom,S.,Cuptapun,Y.,Hengsawadi,D.,Jittanoonta, P., Na-Thalang, V., and Sringam, S.2003. Effect of Coconut Oil Compared with Rice Bran Oil on Serum Lipid in Experimental Rats. Presented at **29th Congress on Science and Technology of Thailand**, October20 – 22 , 2003 and full paper.

8. นางสาวเยาวดี คุปตะพันธ์

Miss. YAOVADEE CUPTAPUN

(ผู้ร่วมวิจัยโครงการย่อยที่ 1)

เลขหมายประจำตัวประชาชน 3 1005 02556 22 0

ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิจัย ชำนาญการ ระดับ 8

หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

ฝ่ายค้นคว้าและวิจัย สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพฯ 10900
50 ถ. พหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900
โทรศัพท์: 02-942-8629-35 ต่อ 905
โทรสาร: 02-940-6455
E-mail: ifrydc@ku.ac,th

ประวัติการศึกษา

ปีที่จบ	ระดับปริญญา	อักษรย่อ ปริญญาและชื่อเต็ม	สาขาวิชา	วิชาเอก	ชื่อสถาบันการศึกษา	ประเทศ
2522	ปริญญาตรี	วท.บ. (วิทยาศาสตรบัณฑิต)	ชีววิทยา	-	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ไทย
2527	ปริญญาโท	M.Sc. (Master of Sciences))	Applied Nutrition	-	University of Indonesia	Indonesia

สาขาวิชาที่ชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชา

การประเมินคุณค่าทางโภชนาการของอาหารโดยใช้สัตว์ทดลอง
การทดสอบความปลอดภัยของอาหารโดยใช้สัตว์ทดลอง

ผลงานวิจัยที่สำคัญ

Cuptapun, Y., Hengsawadi, D., Mesomya, W., Jittanoonta, P., Siripanporn, J and Saengprakai ,J. 2007. Study on Chemical Composition and Shelf Life of High Calcium and High Fiber of Food Bar Products. *In:* **the Proceedings of the 33rd Congress on Science and Technology of Thailand**, Nakornsrithamrat Thailand, October 18-20, 2007.

Cuptapun, Y., Hengsawadi, D. and Mesomya, W. 2007. Nutritional Evaluation of Nutritious Breakfast Products. *In*: **the Proceedings of the 33rd Congress on Science and Technology of Thailand**, Nakornsrithamrat Thailand, October 18-20, 2007

Cuptapun, Y., Hengsawadi, D and Mesomyaw 2006. Utilization of Some Edible Insects in Thailand : Nutritional Qualities and Health Aspects : *In*: **The 4th KU-NPUST Bilateral Conference "Food for Health : The Magic of Asian Agriculture"** November 6-8, 2006. Abstract. และรายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์โครงการวิจัยทุนอุดหนุน มก. ปีงบประมาณ 2547

Cuptapun, Y., Hengsawadi, D., Mesomya, W. and Jittanoonta, P. 2003. Effect of Fermented Soybean (Thua Nao) on Nutritional Status and Heatth Aspects in Rat. *In*: **Symposium Abstract The 1st International Symposium and Workshop on Insight into the World of Indigenous Fermented Foods for Technology Development and Food Safety,** August 13-15, 2003, P-12 and full paper.

Mesomya, W., Pakpeankitvatana, V., Komindr, S., Leelahagul, P., Cuptapun, Y., Hengsawadi, D., Tammarate, P. and Tangkanakul, P. 2004 Effect of Health Food from Cereal and Nata De Coco on Serum Lipids in Human. Abstract in **10th World Congress on Clinical Nutrition** November 30-December 3, 2004, Phuket, Thailand and full paper.

วันเพ็ญ มีสมญา ดวงจันทร์ เฮงสวัสดิ์ เยาวดี คุปตะพันธ์ ผ่องศรี จิตตนูนท์ และวิภาภรณ์ ณ ถลาง 2546 เรื่องผลของน้ำมันปลาจากปลาป่นนอร์เวย์ต่อระดับไขมันในเลือดหนูทดลอง **วารสารเกษตรนเรศวร** ปีที่ 7 ฉบับที่ 1 ตุลาคม 2546 – กันยายน 2547 หน้า 117-129

วันเพ็ญ มีสมญา ดวงจันทร์ เฮงสวัสดิ์ เยาวดี คุปตะพันธ์ สร้อยทอง สายหยุดทอง กรุณา วงษ์กระจ่าง ธีระ ทองเผือก สมโภชน์ ใหญ่เอี่ยม และเพลินใจ ตังคณะกุล 2546 การศึกษาอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ไยอาหารสูงเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์จากท้องตลาด เรื่องเต็ม **การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 41 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์** หน้า 388-397

Mesomya,W.,Chotmethepirom,S.,Cuptapun,Y.,Hengsawadi,D.,Jittanoonta, P., Na-Thalang, V., and Sringam, S.2003. Effect of Coconut Oil Compared with Rice Bran Oil on Serum Lipid in Experimental Rats. Presented at **29th Congress on Science and Technology of Thailand**, October 20 – 22, 2003 and full paper.

9. นายเอกวิทย์ ตรีเนตร

Mr. Ekawit Threenet

(ผู้ร่วมวิจัยโครงการย่อยที่ 1)

เลขหมายประจำตัวประชาชน -

ตำแหน่งปัจจุบัน นักศึกษาปริญญาเอกสาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

โครงการวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
50 ถ. พหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900
โทรศัพท์: 0 2562 5555, 0 2562 5444 ต่อ 3264
โทรสาร: 0 2562 5555, 0 2562 5444 ต่อ 3202
E-mail: ekawit73@hotmail.com

ประวัติการศึกษา

ปีที่จบ	ระดับปริญญา	อักษรย่อ ปริญญาและชื่อเต็ม	สาขาวิชา	วิชาเอก	ชื่อสถาบันการศึกษา	ประเทศ
2540	ปริญญาตรี	วท.บ. (วิทยาศาสตรบัณฑิต)	ชีววิทยา	ชีววิทยา	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	ไทย
2543	ปริญญาโท	วท.ม. (วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต)	พิษวิทยา	พิษวิทยา	มหาวิทยาลัยมหิดล	ไทย

สาขาวิชาที่ชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชา

Biochemistry, Animal Biotechnology

ผลงานวิจัยที่สำคัญ

Ekawit Threenet and Noppamars Wongwitdacha. Effects of stress on the plus maze behaviour of carbamazepine-treated rats. **The International Journal of Neuropsycho-pharmacology** 2000;3 Suppl 1:S295.

Noppamars Wongwitdacha and Ekawit Threenet. Social isolation rearing alters the anxiolytic profile valproic acid in the rats elevated plus maze. **The International Journal of Neuropsycho-pharmacology** 2000;3 Suppl 1:S295.

Wongwitdacha N., Threenet E., Soo-Ampon S. and Thaidee H. Effects of light intensity on locomotor activity in isolation and socially reared rats. **Neurosci Letters** 2000;43 (Suppl1):S108.

Wongwitdacha N., Threenet E. Decreased sensitivity to the antidepressant-like effect of carbamazepine following social isolation in the rats. **Neurosci Letters** 2000;43 (Suppl1):S30.

10. นางสาววิภาภรณ์ ณ ถลาง

Miss. Vipaporn Na Thalang

(ผู้ร่วมวิจัยโครงการย่อยที่ 2)

เลขหมายประจำตัวประชาชน 3 1007 01137 01 4

ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิจัย (ชำนาญการ) ระดับ 8

หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน
ตู้ปณฝ. 1024 เกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10903
โทรศัพท์ 0 2942 8629-35 โทรสาร 0 2561 1970
E-mail: ifrvpn@ku.ac.th

ประวัติการศึกษา

ปีที่จบ	ระดับปริญญา	อักษรย่อปริญญาและชื่อเต็ม	สาขาวิชา	ชื่อสถาบันการศึกษา	ประเทศ
2520	ปริญญาตรี	วท.บ. (วิทยาศาสตรบัณฑิต)	สัตววิทยา	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ไทย
2522	ปริญญาตรี	สพ.บ. (สัตวแพทยศาสตรบัณฑิต)	สัตวแพทยศาสตร์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ไทย
2525	ปริญญาโท	วท.ม. (วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต)	สาธารณสุขศาสตร์	มหาวิทยาลัยมหิดล	ไทย
2538	ปริญญาตรี	Dr. med. vet. (Doctor Medicinae Veterinariae)	Medicinae Veterinariae	Veterinary College, Hannover	Germany

สาขาวิชาที่ชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชา

โภชนาการและความปลอดภัยของอาหาร (Nutrition and Food Safety)

ผลงานวิจัยที่สำคัญ

Roy, M.K., Nakahara, K., Na Thalang, V., Trakoontivakorn, G. , Takenaka, M. , Isobe, S. , Tsushida, T. 2007. Baicalein, a flavonoid extracted from a methanolic extract of Oroxylum indicum inhibits proliferation of a cancer cell line in vitro via induction of apoptosis. **Pharmazie** 62 (2), pp. 149-153 (แหล่งทุน – Japan International Research Center for Agricultural Sciences - JIRCAS)

Molay Kumar Roy, Na Thalang V. , Trakoontivakorn G. and Nakahara K. 2005. Mahamine, a carbazole alkaloid from *Micromelum minutum*, inhibits cell growth and induces apoptosis in U937 cells through a mitochondrial dependent pathway. **British Journal of Pharmacology** No. 145: pp 145-155. (แหล่งทุน - JIRCAS)

Molay Kumar Roy, Na Thalang V. , Trakoontivakorn G. and Nakahara K. 2004. Mechanism of mahamine induced apoptosis in human leukemia cells (HL-60). **Biochemical Pharmacology** No. 67 : pp 41-51. (แหล่งทุน - JIRCAS)

Jeong Hwa Hong, Manochai B., Trakoontivakorn G. and Na Thalang V. 2004. Fibrinolytic activity of Thai indigenous vegetables. **Kasetsart J. (Nat.Sci.).** No. 38 : pp 241-246. (แหล่งทุน – ร่วมกับบริษัท Nutra Tech.)

Na Thalang V., Trakoontivakorn G. and Nakahara K. 2001. Determination of Antioxidant Activity of Some Commonly Leafy Vegetables in Thailand. **JIRCAS Journal** No. 9 : pp 39-46. (แหล่งทุน - JIRCAS)

11. นางบุญเกื้อ วัชรเสถียร

Mrs. Boongeua Vajarasathira

เลขหมายประจำตัวประชาชน 5 1006 99014 41 7

ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์ ระดับ 9

หน่วยงาน/ ที่อยู่/ โทรศัพท์/ โทรสาร/ e-mail

ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
50 ถ. พหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900
โทรศัพท์: 0-2562-5555 ต่อ 3234 โทรสาร: 2562-5555 ต่อ 3202

E-mail: fscibov@ku.ac.th

ประวัติการศึกษา

ปีที่จบ	ระดับปริญญา	อักษรย่อปริญญาและชื่อเต็ม	สาขาวิชา	วิชาเอก	ชื่อสถาบันการศึกษา	ประเทศ
2518	ปริญญาตรี	วท.บ. (วิทยาศาสตร์บัณฑิต)	สัตววิทยา	สัตววิทยา	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ไทย
2520	ปริญญาโท	วท.ม. (วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต)	สัตววิทยา	สัตววิทยา	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ไทย
2529	ปริญญาเอก	Ph.D. (Docter of Philosophy)	Entomology	Entomology	Purdue University	U.S.A.

สาขาวิชาที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชา

Insect Ecology, Biological Control of Insects

ผลงานวิจัยที่สำคัญ

วิน เชยชมศรี จินดาวรรณ สิรันทวิเนติ บุญเกื้อ วัชรเสถียร มณี ตันติรุ่งกิจ สุดาวรรณ เชยชมศรี ยศพงษ์ เต็มศิริพงศ์ และเริงฤทธิ์ สัปปพัน. 2546. ประสิทธิภาพของซีรัมจระเข้น้ำจืดพันธุ์ไทยในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย. วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด. 15 (ฉบับเพิ่มเติมที่ 1). S120.

Siruntawineti, J., W Chaeychomsri, B. Vajarasathira, M. Tuntirungkij, and Y. Temsiripong. 2003. Complement Activity of Thai Freshwater Crocodile (*Crocodylus siamensis*) serum. *In*: Proceeding of the 29th Congress on Science and Technology of Thailand. 20-22 October, 2003. Khon Kaen.

Siruntawineti J., W. Chaeychomsri, B. Vajarasathira, T. Ong-aat, and Y. Temsiripong. 2004. Efficacy of Siamese Crocodile (*Crocodylus siamensis*) Serum on Bacterial Growth Inhibition. *In*: Proceeding of the 17th Working Meeting of the Crocodile Specialist Group. 24–29 May 2004, Darwin Australia

Siruntawineti, J., W. Chaeychomsri, B. Vajarasathira, A. Ritwichai, T. Ong-aat, and Y. Temsiripong. 2004. Blood Parasites of *Crocodylus siamensis* in Thailand. *In*: Proceeding of the 17th Working Meeting of the Crocodile Specialist Group. 24–29 May 2004, Darwin Australia

Chaeychomsri, W., J. Siruntawineti, B. Vajarasathira, K. Komoljindakul, T. Ong-aat, and Y. Temsiripong. 2004. Intestinal Parasites of Freshwater Crocodile, *Crocodylus siamensis*,

in Thailand. *In*: Proceeding of the 17th Working Meeting of the Crocodile Specialist Group. 24–29 May 2004, Darwin Australia.

Siruntawineti, J., W. Chaeychomsri, A. Pokharatsiri, B. Vajarasathira, N. Chitchuankij, and Y. Temsiripong. 2004. Crocodile Blood as Food Supplememt: Its Effects on Hematological Values in Wistar Rats. *In*: Proceeding of the 30th Congress on Science and Technology of Thailand. 19-21 October, 2004. Bangkok.

จินดาวรรณ สิรันทวิเนติ วิน เชยชมศรี และบุญเกื้อ วัชรเสถียร. การเคลื่อนสู่ขั้วไฟฟ้าแบบเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจลเพื่อศึกษาซีรัมโปรตีนจากจระเข้พันธุ์ไทย หนูวิสตาร์ และคน. วารสารเทคนิคการแพทย์ ปีที่ 33 ฉบับที่ 1 (ฉบับเสริม) เมษายน 2548. หน้า 303.

Siruntawineti, J., W. Chaeychomsri, B. Vajarasathira, and Y. Temsiripong. 2005. Evidence for Primary Immune Response to Salmonella paratyphi A in Wistar Rats after Feeding by crocodile Blood. *In*: Proceeding of the 31st Congress on Science and Technology of Thailand. 18-20 October, 2005. Nakhon Ratchasima.

Chaeychomsri, W., J. Siruntawineti, B. Vajarasathira, and Y. Temsiripong. 2005. Mortality of Crocodile Embryonated Eggs during Artificial Incubation. *In*: Proceeding of the 31st Congress on Science and Technology of Thailand. 18-20 October, 2005. Nakhon Ratchasima.

จินดาวรรณ สิรันทวิเนติ วินเชยชมศรี และบุญเกื้อ วัชรเสถียร. 2549. การใช้เอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมล์เจลอีเล็กโตรฟอเรซิสเพื่อศึกษาซีรัมโปรตีนจากจระเข้พันธุ์ไทย หนูวิสตาร์ และคน. วารสารเทคนิคการแพทย์ 34(1). หน้า 1444-1455.

Siruntawineti, J., W. Chaeychomsri, B. Vajarasathira and Y. Temsiripong. DEVELOPMENT AND EVALUATION OF DRIED SIAMESE CROCODILE BLOOD PRODUCT. *In*: Proceeding of the 32nd Congress on Science and Technology of Thailand. 10-12 October 2006, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok.

Chaeychomsri, W., J. Siruntawineti, B. Vajarasathira and Y. Temsiripong. SAFETY EVALUATION OF CROCODILE BLOOD DIET. *In*: Proceeding of the 32nd Congress on Science and Technology of Thailand. 10-12 October 2006, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok.

Chaeychomsri, W., J. Siruntawineti, D. Hengsawadi, Y. Cuptapun, B. Vajarasathira and Y. Temsiripong. Efficiency of Freeze-dried Crocodile Blood in Iron Deficiency Anemia Male Rats. *In*: Proceeding of the 33nd Congress on Science and Technology of Thailand. 18-20 October 2007, Walailak University, Nakhon Si Thammarat.

12. นางอรุณพร อิฐรัตน์

Mrs. Arunporn Itharat

(ผู้ร่วมวิจัยโครงการวิจัยย่อยที่ 6/ ที่ปรึกษาโครงการวิจัยย่อยที่ 5)

เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน

ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์ ระดับ 9

หน่วยงานที่สังกัดและที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

ศูนย์การแพทย์แผนไทยประยุกต์
คณะแพทย์สาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
คลองหลวง ปทุมธานี
โทรศัพท์/โทรสาร 02-9269749
E-mail : iarunporn@yahoo.com

ประวัติการศึกษา

ปีที่จบ	ระดับปริญญา	อักษรย่อปริญญาและชื่อเต็ม	สาขาวิชา	ชื่อสถาบันการศึกษา	ประเทศ
2524	ปริญญาตรี	ภ.บ. (เภสัชศาสตรบัณฑิต)	-	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ไทย
2529	ปริญญาโท	ภ.ม. (เภสัชศาสตรมหาบัณฑิต)	เภสัชเวท	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ไทย
2545	ปริญญาเอก	Ph.D. (Docter of Philosophy)	Pharmacognosy	King's College, London	อังกฤษ
2439	-	Certificate of British counsil training course	Cytotoxicity testing on plants extract	King's College, London	อังกฤษ
2546	เภสัชกรรมแผนไทย	บภ.			
2546	เวชกรรมแผนไทย	บว.			

สาขาที่ชำนาญพิเศษ

เภสัชเวท และวิชาเกี่ยวสมุนไพร ยาพื้นบ้าน การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพร

ผลงานวิจัยที่สำคัญ

Saetung, A., Itharat, A., Dejsukum, C, Wattanapiromsakul, C. , Keawpradub, K., Ratanasuwan, P. Cytotoxic Activity of Thai Medicinal Plants for Cancer Treatment . **Songklanakarin J. Sci. Technol**., 2005, 27(supplement.2): 469-478.

Chirunthorn. R., Supavita, T., Intaraksa, N., Kummee, S. , Junkong,N., Chisorn, B., Itharat, A. Study on Biological Activities of Mansao hymenaea (DC.) A. Gentry leaf extracts. **Songklanakarin J. Sci. Technol.** 2005, 27(supplement.2):489-495.

Ungphaiboon, S., Supavita, T., Singchangchai, P., Sungkarak, S., Rattanasuwan, P., Itharat, A. Study on Antioxidant and Antimicrobial Activities of Turmeric Clear Liquid Soap for Wound Treatment of HIV Patients **Songklanakarin J. Sci. Technol.** 2005, 27 (supplement.2): 569-578.

Wattanasit, S., Siriwattananukul, Y., Itharat, A., Chondumrongkul, S. Effect of Andrographis paniculata leaves and Psidium guajava leaves for enhance growth efficiency of broilers **Songklanakarin J. Sci. Technol.** 2005, 27 (supplement.2): 587-596.

Wattanapiromsakul, C., Wangsintaweekul, B., Sangprapan, P., Itharat, A. and Keawpradub, N. Goniothalamin, a cytotoxic compound, isolated from Goniothalamus macrophyllus (Blume) Hook. f. & Thomson var. macrophyllus. **Songklanakarin J. Sci. Technol.** 2005, 27 (supplement.2): 479-487.

Tewtrakul, S., Itharat, A.,Ratnasuwan, P. Anti HIV1 protease and HIV1 integrase of Thai traditional plants known as Hua-Khao-Yen J. **Ethnopharmacology** 2005, 105: 312-315.

Phongpaichit , S, Kummee, S., Nilrat,L. and Itharat, A., Antimicrobial activity of oil from the root of Cinnamomum porrectum S**ongklankarin J.Sci.Technol** 2007 29: 11-16.

Reanmongkol,W and Itharat, A. Antipyretic activity of the extracts of Hibiscus sabdariffa calyces L. in experimental animals. **Songklankarin J.Sci.Technol** 2007 29: 29-36.

Reanmongkol, W. , Itharat, A and Bouking, P. Investigation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the extracts from the rhizome of Dioscorea membranacea Pierre in experimental animals. **Songklankarin J.Sci.Technol** 2007 29: 49-58.

Reanmongkol, W., Itharat, A and Bouking, P. Evaluation of the anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic activities of the extracts from Smilax corbularia Kunth rhizomes in mice and rats (in vivo) **Songklankarin J.Sci.Technol** 2007 29: 59-68.

Sirikatitham, A, Chuchom, T and Itharat, A Development of the chromatographic fingerprint analysis of dioscorealides and dioscoreanone from Dioscorea membranacea Pierre. **Songklankarin J.Sci.Technol** 2007 29: 87-94.

Tewtrakul, S., Itharat, A., Nitric oxide inhibitory substances from the rhizomes of Dioscorea membranacea. **J. Ethnopharmacology** 2007, 109(3):412-416.

Tewtrakul, S., Itharat, A., Anti-allergic substances from the rhizomes of Dioscorea membranacea. **Bioorg Med Chem** 2006; 14(24): 8707-8711.

Sae-Yun A, Ovatlarnporn C, Itharat A, Wiwattanapatapee R. Extraction of rotenone from Derris elliptica and Derris malaccensis by pressurized liquid extraction compared with maceration. **J Chromatogr A.** 2006, 1125 (2): 172-176.

ผลงานวิจัยที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้

Katpanyapong W,Siriwatananukul Y, Itharat A,Ngampongsai W The effects of *Andrographis paniculata* and *Psidium guajava* leaves on growth and feed efficiency of diarrheic piglets. **J of Thai Traditional Medicine,** 5: 33-42, 2001.

Siriwatttananukul, Y., Reungrum, S., Itharat, A., Wattanasit. (2003) Uses of Stevia (Stevia rebaudiana) in suckling and weaned diet. **Songklanakarin J. Sci. Technol.** 25 (1): 19-27.

อรุณพร อิฐรัตน์ เพชรน้อย สิงห์ช่างชัย ปรานี รัตนสุวรรณ วิศิษย์ เกตุปัญญาพงค์ สุมิตรา จันทร์ทอง โครงการพัฒนาวัตถุดิบสมุนไพรจังหวัดสงขลา รายงานวิจัย สถาบันการแพทย์แผนไทย กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข (2540-2544) **(หัวหน้าโครงการ)**

อรุณพร อิฐรัตน์ และคณะ โครงการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากเทพธาโรครบวงจร สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา เครือข่ายวิจัยภาคใต้ตอนล่าง ประจำปี 2549 **(หัวหน้าโครงการ)**

13. นางสาวสุวรพร แซ่ลิ้ม

Miss. Suvaraporn Sae-Lim

(ผู้ร่วมวิจัยโครงการวิจัยย่อยที่ 6)

เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3-1306-00581-741

ตำแหน่งปัจจุบัน เจ้าหน้าที่วิจัย

หน่วยงานที่สังกัดและที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

งานวิจัย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

โทรศัพท์ (ที่ทำงาน) 02-926-9830 โทรศัพท์ (มือถือ) 081-925-9279….

E-mail: suvaraporns@hotmail.com

ประวัติการศึกษา

ปีที่จบ	ระดับปริญญา	อักษรย่อปริญญาและชื่อเต็ม	สาขาวิชา	ชื่อสถาบันการศึกษา	ประเทศ
2543	ปริญญาตรี	วท.บ. (วิทยาศาสตรบัณฑิต)	ชีววิทยา	มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร	ไทย

สาขาวิชาที่มีความเชี่ยวชาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)

Flow cytometer, การตรวจวิเคราะห์ด้าน Clinical chemistry และ Serology ในเลือด

ผลงานวิจัยที่สำคัญ

1. Pimolvan Tappayuthpijarn, Arunporn Itharat, **Suvaraporn Saelim**, Sakultala Uttama. Proliferation enhancing effect of rice extracts on neuronal PC12 cells. Planta Medica, 2009 ; 75 : 940.
2. Pimolvan Tappayuthpijarn, Arunporn Itharat, **Suvaraporn Saelim**, Sakultala Uttama, Vanussaya Suangkavatin. Enhancing cell proliferation and protection hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in PC12 cells by rice extracts. Journal of Thai Pharmacology, 2010; 32(1) : 90-3.

รายงานการวิจัย

ที่ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยแผนงานสนับสนุนการวิจัยรองรับการเปลี่ยนแปลงและพลวัตโลกเพื่อแก้ปัญหาสำคัญของชาติอย่างสมดุลและยั่งยืน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2551

โครงการย่อยที่ 3 ฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราจากเลือดและส่วนประกอบของเลือดจระเข้พันธุ์ไทย

Antibacterial and Antifungal Activities of Blood and Blood Components from Siamese Crocodile

หน่วยงานที่รับผิดชอบ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ: นางราตรี ลีละวงค์เทวัญ

ผู้ร่วมงานวิจัย: นางสาวจินดาวรรณ สิรันทวิเนติ

นายวิน เชยชมศรี

โครงการวิจัยเรื่อง ฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราจากเลือดและส่วนประกอบของเลือดจระเข้พันธุ์ไทย

Antibacterial and Antifungal Activities of Blood and Blood Components from Siamese Crocodile

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปี 2551 จำนวนเงิน 407,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2551 ถึง กันยายน 2552

ชื่อผู้วิจัย

นางราตรี ลีละวงค์เทวัญ ปร.ด. (จุลชีววิทยาและอิมมูโนโลยี) สาขาวิชาจุลชีววิทยาและภูมิคุ้มกันวิทยา สถานวิทยาศาสตร์พรีคลินิก มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ โทรศัพท์ 0-2926-9710 ต่อ 9719

นางสาวจินดาวรรณ สิรันทวิเนติ Ph.D.(Agricultural Science) ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โทรศัพท์ 0-2562-5555, 0-2562- 5444 ต่อ 3262

นายวิน เชยชมศรี ปร. ด. (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร). ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โทรศัพท์ 0-2562-5555, 0-2562- 5444 ต่อ 3264

บทคัดย่อ

การทดสอบฤทธิ์เลือดครบแห้ง (Freeze dried whole blood; FDWB) ซีรัมสด (Fresh serum ;FS) และซีรัมแห้ง (Freeze dried serum; FDS) ของจระเข้พันธุ์ไทยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานและเชื้อรา พบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *E. aerogenes* ATCC 13048, *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 27736, *S. typhimurium* ATCC 13311 และ *P. aeruginosa* ATCC 27853 ในซีรัมสด 80 mg/ml (Fresh serum ;FS) คิดเป็นร้อยละ 23.30, 10.00, 40.00, 70.00 และ 86.67 ตามลำดับ และเซรัมแห้ง 100 mg/ml (Freeze dried serum; FDS) คิดเป็นร้อยละ 30.00, 10.00, 43.33, 76.67 และ 90.00 ตามลำดับ โดย MIC/MBC อยู่ระหว่าง 12.50-100.00 mg/ml และ 25.00-100.00 mg/ml ตามลำดับ โดยมี cefazolin หรือ ceftaxidime เป็นสารควบคุมซึ่งให้ค่า MIC/MBC ต่อแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ระหว่าง 0.97-31.25 μg/ml/1.95-62.50 μg/ml และฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา เช่น *C. neoformans* 250309 และ *Aspergillus niger* ของ FS คิดเป็นร้อยละ 90.00 และ 80.00 ตามลำดับ และ FDS คิดเป็นร้อยละ 100.00 และ 83.33 ตามลำดับ โดย MIC อยู่ระหว่าง 25.00-100.00 mg/ml โดยมี amphotericin B เป็นสารควบคุมซึ่งให้ค่า MIC 3.90 -7.81 μg/ml แต่อย่างไรก็ตามไม่พบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราในเลือดครบแห้ง 100 mg/ml และ ไม่พบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและฤทธิ์ฆ่าเชื้อราทั้งใน FS และ FDS จากผลการทดลองที่ได้แสดงว่า FS และ FDS มีศักยภาพในการเป็นสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราบางชนิดได้

Abstract

The result showed that FS (80 mg/ml) and FDS (100 mg/ml) inhibited Gram negative bacteria including *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27736, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 with the susceptibility rate at 23.30%, 10.00%, 40.00%, 70.00%, and 86.67%, respectively for FS, and 30.00%, 10.00%, 43.33%, 76.67% and 90.00%, respectively for FDS. The MIC and MBC were in the range of 12.50-100.00 mg/ml and 25.00-100.00 mg/ml, respectively. FS and FDS also inhibited *Cryptococcus neoformans* 250309 and *Aspergillus niger* with the susceptibility rate at 90.00% and 80.00%, respectively for FS and 100.00% and 83.33%, respectively for FDS. The MIC was in the range of 25.00-100.00 mg/ml. However, FS and FDS did not inhibit Gram positive bacteria and did not kill fungi. FDWB (100 mg/ml) could neither inhibit bacteria nor fungi. The result showed that the FS and FDS from Siamese Crocodile exhibited the potential of antibacterial and antifungal activities.

บทนำ

ประเทศไทยมีฟาร์มจระเข้จำนวนมากและกระจายอยู่ทุกภาคของประเทศ ซึ่งนับว่าจระเข้เป็นสัตว์เศรษฐกิจที่ทำรายได้ให้กับประเทศปีละหลายพันล้านบาท หากพิจารณาธรรมชาติของจระเข้จะพบว่าจระเข้เป็นสัตว์เลื้อยคลานชนิดหนึ่งที่มีพฤติกรรมก้าวร้าว แหล่งที่อยู่อาศัยส่วนใหญ่อยู่ในหนองน้ำและพื้นดินซึ่งมีจุลชีพมากมาย การอยู่ร่วมกันของจระเข้นั้นมักมีการต่อสู้และกัดกันจนเกิดบาดแผลแต่เป็นที่น่าแปลกใจมากว่ามักไม่มีปัญหาของการติดเชื้อจากบาดแผล ถึงแม้ว่าจระเข้เหล่านั้นจะอาศัยอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ง่ายต่อการติดเชื้อก็ตาม จากประเด็นดังกล่าวจึงทำให้มีผู้สนใจศึกษาถึงความสามารถและประสิทธิภาพของเลือดรวมทั้งส่วนประกอบของเลือดจระเข้ในการต้านทานและ/หรือทำลายเชื้อจุลชีพต่างๆ อย่างกว้างขวาง ความพยายามที่จะศึกษาคุณสมบัติของเลือดจระเข้พันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*) ในแง่มุมต่างๆ ทั้งทางด้านจุลชีววิทยาและภูมิคุ้มกันวิทยา อาทิเช่น การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียนั้น เป็นความพยายามที่จะใช้ประโยชน์จากสิ่งเหลือทิ้ง แต่อย่างไรก็ตามตลาดไม่สามารถบริโภคเป็นเลือดสดได้ เพราะไม่สะดวก ลักษณะไม่น่ารับประทาน และยากต่อการนำส่งถึงผู้บริโภค นอกจากนี้จากการศึกษาเบื้องต้น (pilot study) พบว่าสารกันเลือดแข็งที่ใช้เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือดในเลือดครบสดทั้ง EDTA และ NaF นั้นรบกวนการทดสอบโดยที่สารกันเลือดแข็งสามารถยับยั้ง bacterial activity ได้ เนื่องจากเป็น chelating agent ดังนั้นหากนำเลือดครบสดที่มิได้ใส่สารกันเลือดแข็งมาทำแห้งทันทีโดยวิธี freeze dry ซึ่งเรียกว่า เลือดจระเข้แห้งเยือกแข็งนั้น จะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และ ราได้หรือไม่ นอกจากนี้ฤทธิ์ดังกล่าวข้างต้นจะมีความแตกต่างจากซีรัมสดหรือซีรัมแห้งอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ เพราะหากได้ผลการทดลองที่ไม่ต่างกัน การบริโภคแคปซูลซีรัมแห้ง (ไม่มีฮีโมโกลบิน) นั้นมีความเหมาะสมกับประชากรบางกลุ่ม เช่น ผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่มีภาวะเหล็กเกิน การวิจัยครั้งนี้ทำการศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติในการเป็น anti-bacterial activity และ anti-fungal activity จากเลือดและส่วนประกอบของเลือดจระเข้พันธุ์ไทย โดยหาค่า MIC ตามวิธีมาตรฐานและตามแนวทางของ CLSI M27 A2 และ CLSI M38 ซึ่งผลของงานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อนำไปสู่การพัฒนาผลิตภัณฑ์เลือดจระเข้น้ำจืดพันธุ์ไทยเพื่อจำหน่ายต่อไปในอนาคต

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ขณะนี้พบแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะมากขึ้นซึ่งนับว่าเป็นปัญหาใหญ่ที่ส่งผลกระทบไปทั่วโลก โดยความรุนแรงและความชุกของการดื้อยาในแต่ละพื้นที่จะต่างกันไป ปัจจัยเสี่ยงของการดื้อยาปฏิชีวนะนั้นสัมพันธ์กับการใช้ยาปฏิชีวนะที่ไม่ถูกต้อง ไม่มีแบบแผน รวมทั้งการได้รับยาปฏิชีวนะในขนาดที่ไม่เพียงพอ เนื่องจากยาปฏิชีวนะแต่ละขนานนั้นต้องใช้เวลาในการคิดค้นนาน และการที่เชื้อดื้อยาจะสามารถเปลี่ยนกลับมาเป็นเชื้อที่ไวต่อยานั้นใช้เวลานานมาก ปัจจุบันพบ multi-drug resistance มากมายรวมถึง pan-resistance ในแบคทีเรียหรือราบางชนิดทำให้เกิดโรคติดเชื้อที่รักษาไม่ได้ ซึ่งจะเพิ่มทั้งอัตราการเจ็บป่วยและอัตราการตาย สิ้นเปลืองทั้งยาและบุคลากรทางการแพทย์ หากไม่สามารถที่จะควบคุม หรือ ชะลอการดื้อยาได้ก็เหมือนจะย้อนไปสู่ยุคก่อนที่พบยาปฏิชีวนะ (pre-antibictic era) ดังนั้นการหาสารจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อรา มาเสริมหรือทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีความสำคัญ อีกทั้งในห้วง 10 ปีที่ผ่านมามีการค้นพบเปปไทด์ที่สามารถทำลายเชื้อจุลชีพจากสัตว์เลื้อยคลานได้ ซึ่งรวมทั้งเปปไทด์จากจระเข้ที่เป็นสัตว์เลื้อยคลานที่มีพฤติกรรมก้าวร้าว แหล่งที่อยู่อาศัยของจระเข้นั้นส่วนใหญ่อยู่ในน้ำซึ่งมีจุลชีพมากมาย การอยู่ร่วมกันของสัตว์ชนิดนี้มักมีการต่อสู้และกัดกันจนเกิดบาดแผล แต่มักไม่มีปัญหาของการติดเชื้อจากบาดแผล ถึงแม้ว่าจะอาศัยอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ง่ายต่อการติดเชื้อก็ตาม ประกอบกับในประเทศไทยมีฟาร์มจระเข้กระจายอยู่ทุกภาคของประเทศ สำหรับฟาร์มจระเข้ขนาดใหญ่ซึ่งมีจำนวนจระเข้มากกว่า 10,000 ตัว นั้นมีมากกว่า 20 ฟาร์ม และฟาร์มจระเข้ขนาดเล็กที่มีจำนวนจระเข้น้อยกว่า 10,000 ตัว มีจำนวนประมาณ 2,000 ฟาร์ม ดังได้กล่าวแล้วข้างต้นจระเข้น้ำจืดพันธุ์ไทย เป็นสัตว์เศรษฐกิจที่ทำรายได้ให้ประเทศหลายพันล้านบาท ทั้งนี้เนื่องจากจากความพร้อมทุกด้านของประเทศไทย ที่ถือเป็นแหล่งผลิตวัตถุดิบหนังจระเข้ดีที่สุดในโลกแหล่งหนึ่ง เพราะอยู่ในพื้นที่ที่มีอากาศอบอุ่นพอดีสำหรับจระเข้สายพันธุ์ Siamese จึงทำให้เลี้ยงง่าย โตเร็ว และให้ลายหนังสวยงาม โดยเฉพาะลายกลางตัวเป็นตารางขนาดใหญ่กินพื้นที่ 60 เปอร์เซ็นต์ของลำตัว ลายหนังที่มีขนาดใหญ่ไล่ไปหาเล็กนั้นเป็นที่ปรารถนาของดีไซน์เนอร์ชาวอิตาเลียน ซึ่งชื่นชอบที่จะนำไปออกแบบเครื่องหนังมากกว่าสายพันธุ์อื่นๆ เพราะเป็นลายที่ดูแล้วไม่เลี่ยนตา สำหรับเนื้อถูกจำหน่ายอย่างแพร่หลายโดยเฉพาะ ประเทศจีน ฮ่องกง สิงคโปร์ และไต้หวัน ดังนั้นประเทศไทยจึงมีเลือดจระเข้เป็นของเหลือทิ้งจำนวนมากจากอุตสาหกรรมการทำเครื่องหนังและการขายเนื้อจระเข้ดังได้กล่าวแล้วข้างต้น ซึ่งหากสามารถนำของเหลือทิ้งดังกล่าว มาพัฒนาเชิงอุตสาหกรรมได้ก็จะเป็นประโยชน์อย่างมากและก่อให้เกิดรายได้มหาศาลกับผู้เลี้ยงจระเข้ ซึ่งจะช่วยเสริมสภาพเศรษฐกิจของประเทศให้เข้มแข็งขึ้นได้อีกทางหนึ่ง

จากการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องกล่าวถึงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลชีพ จากเลือด และส่วนประกอบของเลือดจระเข้สายพันธุ์อเมริกา หรืออัลลิเกเตอร์ (*Alligator mississippiensis*) โดยพบว่า ซีรัมของอัลลิเกเตอร์นี้มีประสิทธิภาพในการทำลายแบคทีเรีย ไม่ว่าจะเป็นชนิดแกรมบวก เช่น *Staphylococcus aureus* และ *Streptococcus pyogenes* เป็นต้น หรือชนิดแกรมลบ เช่น *Salmonella typhi* และ *Escherichia coli* เป็นต้น และสารสกัดเม็ดเลือดขาวของอัลลิเกเตอร์นั้นมีศักยภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา (Merchant *et al*., 2003; Merchant *et al*., 2006) และสามารถยับยั้งการเจริญของไวรัส ทั้งที่เป็น DNA virus เช่น HSV-1 และ RNA virus เช่น HIV เป็นต้น (Merchant *et al*., 2005) รวมทั้งสามารถยับยั้งการเจริญของโปรโตซัว เช่น อะมีบาด้วย รวมทั้งเชื้อรา เช่น *Candida albicans* เป็นต้น (Merchant *et al*., 2004) ทั้งนี้เนื่องจากมีสารบางชนิดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลชีพ เช่น ระบบคอมพลีเมนต์ในเลือด (Merchant *et al*., 2005) เปปไทด์ต้านจุลชีพ (antimicrobial peptide) (Sitaram *et al*., 2002; Papagianni *et al*., 2003) นอกจากนี้ จากการศึกษาซีรัมของจระเข้สายพันธุ์ออสเตรเลีย พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ 17 ชนิด เมื่อเปรียบเทียบกับซีรัมมนุษย์ซึ่งยับยั้งได้เพียง 6 ชนิดเท่านั้น สอดคล้องกับการค้นพบของ Merchant และคณะ (2003) ที่พบว่าซีรัมจระเข้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* ได้ดีกว่าซีรัมของมนุษย์ถึง 10 เท่า (Merchant *et al*., 2003) และต่อมา Merchant และคณะได้แยกสารสกัดเม็ดเลือดขาว (leukocyte extract) และพบเปปไทด์ที่สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดและเชื้อรา Candida ได้ (Merchant *et al*., 2006) ในประเทศไทยได้มีผู้ศึกษาวิจัยเลือดจระเข้น้ำจืดพันธุ์ไทยหลายท่าน อาทิเช่น วิน เชยชมศรี และ สุวิทย์ รักมณี ได้ศึกษาเลือดจระเข้น้ำจืดพันธุ์ไทย พบว่าในเบื้องต้นซีรัมของจระเข้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและเชื้อราได้ (วิน และคณะ 2545; สมชาติ 2547; สุวิทย์ และคณะ 2550) ซึ่งต่อมา คณะผู้วิจัยจากภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ทำการศึกษาในห้องปฏิบัติการและได้ทำการแยกบริสุทธิ์เปปไทด์จากซีรัม และพลาสมาของจระเข้โดยวิธีทางเคมี หนึ่งในวิธีเหล่านั้นคือการแยกขนาดโดยใช้เมมเบรนแล้วแยกบริสุทธิ์ต่อโดยใช้ RP-HPLC จากผลการทดลองพบ antimicrobial peptides โดยในเบื้องต้นมีการตั้งชื่อสารออกฤทธิ์ ว่า “คร็อกคอซินส์ แฟมิลี” (Crocosins family) และ antimicrobial peptide ชนิดหนึ่งซึ่งสามารถทำลายเชื้อ *Salmonella typhi* และ *Staphylococcus aureus* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นั้นให้ชื่อว่า Crocosin VI (ศรายุทธ 2548; ทินกร 2549) ปัจจุบันมีการศึกษาการใช้เปปไทด์จากสัตว์เลื้อยคลานหลายชนิดจากการสืบค้นข้อมูลสิทธิบัตร พบสิทธิบัตรเรื่องการใช้เปปไทด์จากสัตว์เลื้อยคลาน เช่น เต่า (Chelonia) จระเข้ (Crocodilia) และงู (Squamata) เป็นต้น เพื่อการรักษาโรคติดเชื้อ (Patent : US5380664, 1999)

สำหรับการหาค่า MIC ตามวิธีมาตรฐานและตามแนวทางของ CLSI M27 A2 และ CLSI M38 โดยวิธี Broth Microdilution Assay นี้อาศัยหลักการเจือจางยาปฏิชีวนะหรือสารที่ต้องการทดสอบในที่นี้คือ เลือดและส่วนประกอบเลือดของจระเข้พันธุ์ไทยในอาหารเหลวให้มีความเข้มข้นแต่ละหลอดหรือแต่ละหลุม (หากกระทำในเพลท) ลดลงครึ่งหนึ่งตามลำดับ (serial two – fold dilution) แล้วนำเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อราซึ่งเทียบค่ามาตรฐานให้มีความขุ่นเท่ากับความขุ่นของ McFarland No. 0.5 เติมลงไปในจำนวนที่เท่ากันทุกหลอด หลังจากบ่มในตู้เพาะเชื้อแล้ว สามารถหาค่าความเข้มข้นของยาต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อได้เรียกค่านี้ว่าค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) สำหรับการอ่านผลนั้น อ่านจากหลอดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อ โดยจะเป็นหลอดที่ใสไม่ขุ่นและมีความเข้มข้นของยาต่ำที่สุด จากวิธีข้างต้นหากทำการถ่ายเชื้อจากหลอดที่ไม่พบว่ามีการเจริญของเชื้อซึ่งเป็นค่า MIC และหลอดอื่นๆ ที่มีความเข้มข้นของยาสูงกว่าค่า MIC ถัดขึ้นไป มาเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารแข็ง (Muller Hinton agar) หลังจากบ่มในตู้เพาะเชื้อจะสามารถหาค่าความเข้มข้นของยาต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ ทราบได้โดยจะไม่พบการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็ง เรียกค่านี้ว่า ค่า MBC (สำหรับแบคทีเรีย, หากทดสอบกับเชื้อราจะเรียกว่า MFC) ปกติยาที่มีฤทธิ์เป็น bactericidal จะมีค่า MIC และ MBC ใกล้เคียงกัน แต่ถ้ามีฤทธิ์เป็น bacteriostatic ค่า MIC และ MBC จะแตกต่างกันมากหรือไม่มีค่า MBC เลยสำหรับการทดสอบความไวของเลือดและส่วนประกอบของเลือดจระเข้พันธุ์ไทย ต่อแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน ใช้วิธี Modified microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of bacterial cell growth (Sarker *et al*., 2007) สำหรับการทดสอบกับเชื้อรานั้น ใช้วิธี Broth microdilution antifungal susceptibility testing of yeasts ตามแนวทางของ CLSI M27 A2 และ Broth microdilution antifungal susceptibility testing of molds ตามแนวทางของ CLSI M38 (Lorian *et al*., 2005)

ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

1. วัตถุดิบและสารเคมี

1.1 เลือดจระเข้

ใช้จระเข้น้ำจืดพันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*) อายุ 2-4 ปี ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่รุ่งทวีชัยฟาร์ม (31 หมู่ 9 ต. สามง่าม อ. ดอนตูม จ. นครปฐม)

1.2 สารเคมี ตามภาคผนวก ก

2. วิธีการวิจัย

2.1 การเก็บตัวอย่างเลือดจระเข้

ทำการเจาะเลือดจระเข้ที่บริเวณแอ่งเลือดดำบริเวณหลังกะโหลกศีรษะ (anterior dorsal sinus) โดยใช้กระบอกฉีดยาพร้อมเข็มขนาด 18G ความยาว 1 ½ นิ้วที่ปราศจากเชื้อ เจาะเลือดปริมาณ 20 มิลลิลิตร ต่อจระเข้ 1 ตัว แบ่งใส่หลอดเก็บเลือด เพื่อเตรียมตัวอย่างแบบต่างๆ ต่อไป

2.2 การเตรียมตัวอย่างเลือดจระเข้

2.2.1 เลือดครบแห้ง (Freeze dried whole blood; FDWB) เตรียมได้โดยเจาะเก็บเลือดจระเข้ใส่ในหลอดขนาดเล็ก หลอดละ 1 มิลลิลิตร เพื่อเตรียมเป็นเลือดครบแห้ง ด้วยการนำเลือด Fresh whole blood มาผ่านการทำแห้งโดยเทคนิค Freeze dry โดยนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -50°C แล้วค่อยๆ เพิ่มอุณหภูมิเป็น +35 °C ภายใต้ความดันที่เหมาะสม แล้วเก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4-5 °C เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป เมื่อต้องการทดสอบให้นำเลือดครบแห้ง ไปชั่งในหลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อแล้วละลายเลือดครบแห้ง ด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ (sterile distilled water; SDW) ทำให้สารละลายมีความเข้มข้น 100 mg/ml ก่อนทำการทดลอง

2.2.2 ซีรัม (Serum) เตรียมได้โดยนำตัวอย่างเลือดจระเข้ใส่ในหลอดเก็บเลือดที่มีตัวเร่งการแข็งตัว (Serum clot Activator) (VACUETTE, greiner bio-one, บริษัท กรุงเทพอินเตอร์โปรดักส์ จำกัด) ผสมเลือดให้เข้ากันแล้วเก็บรักษาสภาพในกล่องโฟมที่บรรจุน้ำแข็งอยู่ภายใน จากนั้นนำหลอดทดลองดังกล่าวมาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนที่เป็นซีรัม และเม็ดเลือดออกจากกัน โดยใช้ความเร็วของการปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทำการแยกส่วนซีรัมด้านบนใส่ในหลอดขนาดเล็ก หลอดละ 1 มิลลิลิตร

2.2.2.1) ซีรัมสด (Fresh serum; FS) นำซีรัมที่แยกได้ หลอดละ 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

2.2.2.2) ซีรัมแห้ง (Freeze dried serum; FDS) นำซีรัมที่แยกได้อีกส่วนหนึ่ง มาแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 °C จากนั้นนำมาผ่านการระเหิดแห้งภายใต้ความเย็น (Freeze dry) ด้วยเครื่อง Freeze dryer (Lyophilization System, Inc., USA)* แล้วเก็บรักษาหลอดทดลองที่มีซีรัมแห้งดังกล่าว ไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4-5 °C เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป เมื่อต้องการทดสอบให้นำซีรัมแห้งไปชั่งใส่หลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อแล้วละลายซีรัมแห้งด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ (sterile distilled water; SDW) ทำให้สารละลายมีความเข้มข้น 100 mg/ml ก่อนทำการทดลอง

(*ขั้นตอนนี้ทำที่ ห้างหุ้นส่วน จำกัด วานิไทย ห้อง 602 ชั้น 6 อาคารวิจัยและพัฒนามหาวิทยาลัย ม. เกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ)

3. วิธีการวิเคราะห์

การทดลองที่ 1 ศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (antibacterial activity) และ การยับยั้งการเจริญของรา (antifungal activity) จากเลือดและส่วนประกอบของเลือดจระเข้

1.1 การวางแผนการทดลอง

แผนการทดลองเป็นแบบ Completely randomized design (CRD) โดยมีทรีตเมนต์ คือ เลือดจระเข้แห้ง (Freeze dried whole blood) ซีรัมจระเข้สด (Fresh serum) ซีรัมจระเข้แห้ง (Freeze dried serum) รวม 3 ทรีตเมนต์ ทรีตเมนต์ละ 3 ซ้ำ

1.2 การเตรียมตัวอย่างเลือดจระเข้ (ดังข้อ 2.2)

เจาะเก็บเลือดจระเข้พันธุ์ไทย อายุ 2-4 ปี ทั้งเพศผู้และเพศเมีย ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจากฟาร์มจำนวน 30 ตัว เลือดบางส่วนจะถูกนำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนที่เป็นซีรัม และเม็ดเลือดแดงออกจากกัน จากนั้นนำตัวอย่างเลือด มาทำแห้งโดยวิธีการระเหิดแห้งภายใต้ความเย็น แล้วเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C ตัวอย่างจะถูกเก็บไว้เพื่อทดสอบทางห้องปฏิบัติการ ในการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และราโดยการหาค่า MIC ต่อไป

1.3 การเตรียม RPMI-1640 medium ประยุกต์จาก Key Features of National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) Methods for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts and Filamentous Fungi (Lorian *et al*., 2005)

ใส่ RPMI-1640 (HyClone) ชนิดผง 1 ซอง ที่มี L- glutamine และ phenol red เป็น indicator (แต่ไม่มี bicarbonate) ลงในขวด Duran ที่ปราศจากเชื้อและ เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (Sterile distilled water) 1 ลิตร คนให้ละลาย ปรับ pH ให้เป็น 7.0 โดยใช้ 10% HCl นำไปกรองผ่าน filter ขนาด 0.22 μm แบ่งใส่หลอดแก้วโดยปิเปต หลอดละ 5 มิลลิลิตร RPMI-1640 ที่เหลือนี้ควรเก็บในขวดแก้ว แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4-6 °C

1.4 การเตรียมแบคทีเรียและราที่ใช้ทดสอบ

1.4.1 แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบได้แก่ *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27736, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Staphylococcus aurease* ATCC 25923, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990 โดยใช้ loop ถ่ายเชื้อ 2 – 3 โคโลนี จากจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar หรือ blood agar ขึ้นกับชนิดของเชื้อแบคทีเรีย ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mueller-Hinton broth (MHB) เลี้ยงเชื้อเพื่อให้ได้ mid log-phase culture ที่อุณหภูมิ 37 °C เวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำมาเจือจางโดยใช้ MHB ที่ปลอดเชื้อให้มีความขุ่นเท่ากับความขุ่นของ McFarland standard no. 0.5 ซึ่งวัดค่าได้โดยใช้ densitometer หรือวัด optical density (OD) ที่ 625 nm (OD_{625} = 0.35-0.38) โดยใช้

spectrophotometer สำหรับจำนวนของแบคทีเรียนั้นหาได้จากการทำ colony plate count โดยวิธี Spread plate พบว่ามีจำนวนแบคทีเรีย 10^6-10^8 CFU/ml ขึ้นกับชนิดของแบคทีเรีย ก่อนทดสอบกับเลือดและส่วนประกอบของเลือดจระเข้เพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยวิธี Microtitre plate-based antibacterial assay ต่อไป

1.4.2 เชื้อราที่ใช้ทดสอบได้แก่ เชื้อราก่อโรคและเชื้อราฉวยโอกาส ซึ่งพบเป็นสาเหตุในการก่อโรคทางการแพทย์ได้บ่อย เช่น *Candida albicans* และ *Cryptococcus neoformans* ซึ่งจัดเป็นเชื้อราชั้นต่ำหรือยีสต์ (yeast) เลี้ยงบน Sabouraud dextrose agar (SDA) ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 25 °C เป็นเวลา 1-2 วัน สำหรับ *Aspergillus sp.* เป็นเชื้อราชั้นสูงหรือราสาย (mold) เลี้ยงบน Potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 25 °C เป็นเวลา 5 -7 วัน

สำหรับ *Candida albicans* และ *Cryptococcus neoformans* ใช้ loop ถ่ายเชื้อยีสต์ 2 – 3 โคโลนี จาก SDA ลงใน RPMI-1640 medium ที่เตรียมจากข้อ 1.3 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ปรับให้มีความขุ่นเท่ากับความขุ่นของ McFarland standard no. 0.5 ด้วย RPMI-1640 วัดค่า 0.5 McFarland standard โดยใช้ densitometer ซึ่งความขุ่น 0.5 McFarland standard จะให้ final inoculum concentration เท่ากับ 0.5-2.5 x 10^3 cells/ml ก่อนทดสอบกับเลือดและส่วนประกอบของเลือดจระเข้เพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราประเภทยีสต์ด้วยวิธี Broth microdilution antifungal susceptibility testing of yeasts ตามแนวทางของ CLSI M27 A2 ต่อไป

ส่วนราสาย *Aspergillus sp.* ใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อจุ่ม 1.0 M PBS pH 7.2 เพื่อป้องกันการฟุ้งกระจายของเชื้อราแล้วแตะที่ spores หรือ conidia ของเชื้อจาก PDA ใส่ลงใน RPMI-1640 medium ที่เตรียมจากข้อ 1.3 จากนั้นปรับให้มีความขุ่น 0.5 McFarland standard ด้วย RPMI-1640 วัดค่า McFarland standard โดยใช้ densitometer ซึ่งความขุ่น 0.5 McFarland standard จะให้ final inoculum concentration เท่ากับ 0.4-5.0 x 10^4 CFU/ml แล้วนำไปทดสอบกับเลือดและส่วนประกอบของเลือดจระเข้เพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราประเภทราสาย ด้วยวิธี Broth microdilution antifungal susceptibility testing of molds ตามแนวทางของ CLSI M38 ต่อไป

1.5 การเตรียม resazurin solution

การเตรียมสารละลาย resazurin ทำได้โดยละลาย 270 มิลลิกรัมของเม็ด resazurin sodium saltในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 40 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 1 mg/ml เขย่าให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จะได้สารละลายสีม่วงน้ำเงิน แล้วกรองผ่านเครื่องกรองที่มี filter ขนาด 0.22 μm แบ่งใส่หลอดพลาสติกที่ปราศจากเชื้อ แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4-6 °C โครงสร้างของ resazurin แสดงดังภาพที่ 1

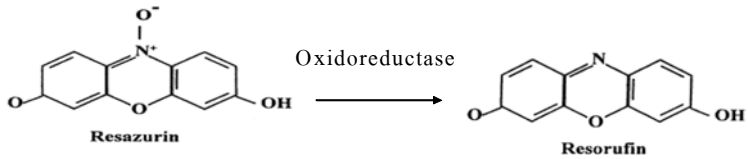
Resazurin

ภาพที่ 1 โครงสร้างของ Resazurin

1.6 ทดสอบหาฤทธิ์ของเลือดและส่วนประกอบของเลือดจระเข้ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และเชื้อราโดยการหาค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC)

1.6.1 การหาฤทธิ์ของเลือดและส่วนประกอบของเลือดจระเข้ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยวิธี Modified microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of bacterial cell growth

วิธีนี้ได้จากการประยุกต์วิธีการของ Sarker และคณะ(2007) โดยทำการทดลองใน sterile 96 well microtitre plate (U plate) โดยมีขั้นตอนการทดสอบดังนี้ ใช้ตัวอย่างเลือดหรือส่วนประกอบของเลือดจระเข้ที่ต้องการหาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทดสอบกับแบคทีเรียข้างต้นที่ปรับให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standard ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่สี sterile resazurin (1 mg/ml) ซึ่งเป็น indicator ปริมาตร 10 ไมโครลิตร สำหรับ Negative control คือ MHB 50 ไมโครลิตร + เชื้อแบคทีเรีย 50ไมโครลิตร + resazurin 10 ไมโครลิตร ขณะที่ positive control คือยาปฏิชีวนะ Cefazolin หรือ Ceftazidime ความเข้มข้น 5 mg/ml ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วทำการเจือจางลงครั้งละ 2 เท่า (serial two-fold dilution) ใส่เชื้อแบคทีเรีย 0.5 McFarland standard ปริมาตร 50ไมโครลิตร และ resazurin 10ไมโครลิตร ห่อ96 well microtitre plate ด้วยแผ่นพลาสติกใส เคาะเพลทเบาๆ บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง หากแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเป็นทวีคูณ เอนไซม์ oxidoreductase จากแบคทีเรียจะเปลี่ยนสีม่วงน้ำเงิน ของ resazurin เป็นสีชมพูของ resorufin ปฏิกริยาดังภาพที่ 2 หรือสีขาวของ hydroresorufin นั่นคือ ตัวอย่างเลือดหรือส่วนประกอบของเลือดจระเข้ ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ (ให้ผลเป็นลบ หรือ Negative) แต่ถ้าตัวอย่างที่เราต้องการทดสอบสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ เชื้อไม่สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนจึงไม่มีเอนไซม์ไปเปลี่ยนสี resazurin ดังนั้นยังคงให้สีเดิมของ resazurin คือ สีม่วงน้ำเงิน (ให้ผลเป็นบวก หรือ Positive)



Resazurin (oxidized form) Resorufin (reduced form)

ภาพที่ 2 การเปลี่ยนจาก resazurin เป็น resorufin

เมื่อตัวอย่างที่ต้องการทดสอบให้ผลเป็นบวก สามารถหาค่าความเข้มข้นของตัวอย่างที่ต้องการทดสอบที่ต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (ค่า MIC) ได้โดยการเจือจางตัวอย่างให้มีความเข้มข้นแต่ละหลุมลดลงครึ่งหนึ่งตามลำดับ (two – fold serial dilution) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วใส่เชื้อแบคทีเรียที่ปรับเทียบความขุ่นแล้วเท่ากับ 0.5 McFarland standard ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และสี sterile resazurin (1 mg/ml) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร การทดลองนี้ทดสอบใน microtitre plate ที่ปราศจากเชื้อ ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ หลังจากบ่มในตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิและเวลาข้างต้น จะสามารถหาค่าความเข้มข้นของตัวอย่างที่ต้องการทดสอบที่ต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ โดยอ่านผลจากหลุมที่ไม่มีเชื้อเจริญจะให้สีม่วงน้ำเงิน และหลุมที่มีเชื้อเจริญจะให้สีชมพูหรือไม่มีสี

1.6.2 การหาฤทธิ์ของเลือดและส่วนประกอบของเลือดจระเข้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราประเภทยีสต์ด้วยวิธี Broth microdilution antifungal susceptibility testing of yeasts ตามแนวทางของ CLSI M27 A2

วิธีนี้ได้จากการประยุกต์วิธีการของ CLSI M27 A2 โดยทำการทดลองใน sterile 96 well plate (U plate) โดยมีขั้นตอนการทดสอบดังนี้ ใช้ตัวอย่างเลือดหรือส่วนประกอบของเลือดจระเข้ที่ต้องการหาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ *Candida albicans* และ *Cryptococcus neoformans* ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ทดสอบกับยีสต์ข้างต้นที่ปรับให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standard ด้วย RPMI-1640 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่สี sterile resazurin (1 mg/ml) ซึ่งเป็น indicator ปริมาตร 10 ไมโครลิตร สำหรับ Negative control คือ RPMI-1640 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร + เชื้อยีสต์ 0.5 McFarland standard 50ไมโครลิตร + resazurin 10 ไมโครลิตร ขณะที่ Positive control คือยาปฏิชีวนะ Amphotericin B ความเข้มข้น 1 mg/ml ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วทำการเจือจางลงให้มีความเข้มข้นแต่ละหลุมลดลงครึ่งหนึ่งตามลำดับ (two –

fold serial dilution) ใส่เชื้อยีสต์ 0.5 McFarland standard ปริมาตร 50ไมโครลิตร และ resazurin 10 ไมโครลิตร ห่อ 96 well plate ด้วยแผ่นพลาสติกใส เคาะเพลทเบาๆ บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 25 °C - 30°C เป็นเวลา 1 วัน สำหรับ *Candida albicans* และ บ่ม 2 วัน สำหรับ *Cryptococcus neoformans* โดยอ่านผลจากหลุมที่ไม่มีเชื้อเจริญจะให้สีม่วงน้ำเงิน และหลุมที่มีเชื้อเจริญจะให้สีชมพูหรือไม่มีสี

เมื่อตัวอย่างที่ต้องการทดสอบให้ผลเป็นบวก สามารถหาค่าความเข้มข้นของตัวอย่างที่ต้องการทดสอบที่ต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Candida albicans* หรือ *Cryptococcus neoformans* ได้โดยการเจือจางตัวอย่างให้มีความเข้มข้นแต่ละหลุมลดลงครึ่งหนึ่งตามลำดับ แล้วทดสอบโดยใช้ protocol ที่กล่าวมาข้างต้น

1.6.3 การหาฤทธิ์ของเลือดและส่วนประกอบของเลือดจระเข้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราประเภทราสาย *Aspergillus niger* ด้วยวิธี Broth microdilution antifungal susceptibility testing of molds ตามแนวทางของ CLSI M38

วิธีนี้ได้จากการประยุกต์วิธีการของ CLSI M38 โดยทำการทดลองใน sterile 96 well plate (U plate) โดยมีขั้นตอนการทดสอบดังนี้ ใส่ตัวอย่างเลือดหรือส่วนประกอบของเลือดจระเข้ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เชื้อรา *Aspergillus niger* ที่ปรับเทียบความขุ่นด้วย RPMI-1640 แล้วโดยมีเท่ากับ 0.5 McFarland standard สี sterile resazurin ปริมาตร 50 ไมโครลิตร 50 ไมโครลิตร และ 10 ไมโครลิตร ตามลำดับ สำหรับ Positive control คือยาปฏิชีวนะ Amphotericin B ความเข้มข้น 1 mg/ml ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วทำการเจือจางลงให้มีความเข้มข้นแต่ละหลุมลดลงครึ่งหนึ่งตามลำดับ (two – fold serial dilution) ใส่เชื้อ *Aspergillus niger* 0.5 McFarland standard ปริมาตร 50ไมโครลิตร และ resazurin 10ไมโครลิตร ขณะที่ Negative control คือ RPMI-1640 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร + เชื้อ *Aspergillus niger* 0.5 McFarland standard 50 ไมโครลิตร + resazurin 10 ไมโครลิตร บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิห้องประมาณ 25 °C - 30°C เป็นเวลา 1 วัน การอ่านผลหลุมที่ไม่มีเชื้อเจริญจะให้สีม่วงน้ำเงิน (positive) และหลุมที่มีเชื้อเจริญจะให้สีชมพูหรือไม่มีสี (negative) เมื่อตัวอย่างเลือดให้ผลเป็นบวก นำไปหาค่า MIC ต่อไป

<u>การทดลองที่2</u> การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของส่วนประกอบของเลือดจระเข้ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimal bactericidal concentration; MBC) และ เชื้อรา (Minimal fungicidal concentration; MFC)

<u>การทดลองที่2.1</u> การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของส่วนประกอบของเลือดจระเข้ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย

นำตัวอย่างส่วนประกอบของเลือดที่ให้ผลบวกจากการหาค่า MIC มาหาความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27736, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 ได้ โดยใช้ loop ที่ปราศจากเชื้อจุ่มลงในหลุมที่เป็นบวกซึ่งให้สีม่วงน้ำเงินทุกหลุม นำไป streak ลงบนอาหารแข็ง Mueller Hinton agar plate แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 -18 ชั่วโมง หากพบว่าเชื้อแบคทีเรียข้างต้น สามารถเจริญได้แสดงว่าตัวอย่างเลือดที่ระดับความเข้มข้นนั้นไม่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ เพียงแต่ยับยั้งการเจริญของเชื้อเท่านั้นและระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่มีเชื้อเจริญได้เลยถือเป็นค่า MBC

<u>การทดลองที่2.2</u> การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของส่วนประกอบของเลือดจระเข้ในการฆ่าเชื้อราประเภทยีสต์ *Cryptococcus neoformans*

นำตัวอย่างส่วนประกอบของเลือดที่ให้ผลบวกจากการหาค่า MIC มาหาความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อ *Cryptococcus neoformans* ได้ โดยใช้ loop ที่ปราศจากเชื้อจุ่มลงในหลุมที่เป็นบวกซึ่งให้สีม่วงน้ำเงินทุกหลุม นำไป streak ลงบนอาหารแข็ง SDA แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง 25 - 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หากพบว่าเชื้อยังเจริญได้แสดงว่า ตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้นนั้นไม่สามารถฆ่าเชื้อ *Cryptococcus neoformans* ได้ เพียงแต่ยับยั้งการเจริญของเชื้อเท่านั้นและระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่มีเชื้อเจริญได้เลยถือเป็นค่า MFC

<u>การทดลองที่2.3</u> การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของส่วนประกอบของเลือดจระเข้ในการฆ่าเชื้อราประเภทราสาย *Aspergillus niger*

นำตัวอย่างส่วนประกอบของเลือดที่ให้ผลบวกจากการหาค่า MIC มาหาความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อ *Aspergillus niger* ได้ โดยใช้ loop ที่ปราศจากเชื้อจุ่มลงในหลุมที่เป็นบวกซึ่งให้สีม่วงน้ำเงินทุกหลุม นำไป streak ลงบนอาหารแข็ง PDA แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง 25 - 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หากพบว่าเชื้อยังเจริญได้แสดงว่า ตัวอย่างเลือดที่ระดับความเข้มข้นนั้นไม่สามารถฆ่าเชื้อ *Aspergillus niger* ได้ เพียงแต่ยับยั้งการเจริญของเชื้อเท่านั้นและระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่มีเชื้อเจริญได้เลยถือเป็นค่า MFC

ผลการวิจัย

1) การทดสอบหาฤทธิ์ของเลือดครบแห้ง ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบ พบว่า เลือดครบแห้งที่ระดับความเข้มข้น 100 mg/ml ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบได้เลย ดังตารางที่ 1-2

2) การทดสอบหาฤทธิ์ของซีรัมสด และซีรัมแห้งในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ พบว่า ซีรัมสด สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ *E.aerogenes, E. coli, K. pneumoniae, S. typhimurium, P. aeruginosa* คิดเป็นร้อยละ 23.30, 10.00, 40.00, 70.00 และ 86.67 ตามลำดับ (ภาพที่ 3) แต่ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ ดังตารางที่ 3-4 ขณะที่ซีรัมแห้งสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ทั้ง 5 ชนิดข้างต้น คิดเป็นร้อยละ 30.00, 10.00, 43.33, 76.67 และ 90.00 ตามลำดับ และไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ ดังตารางที่ 5-6

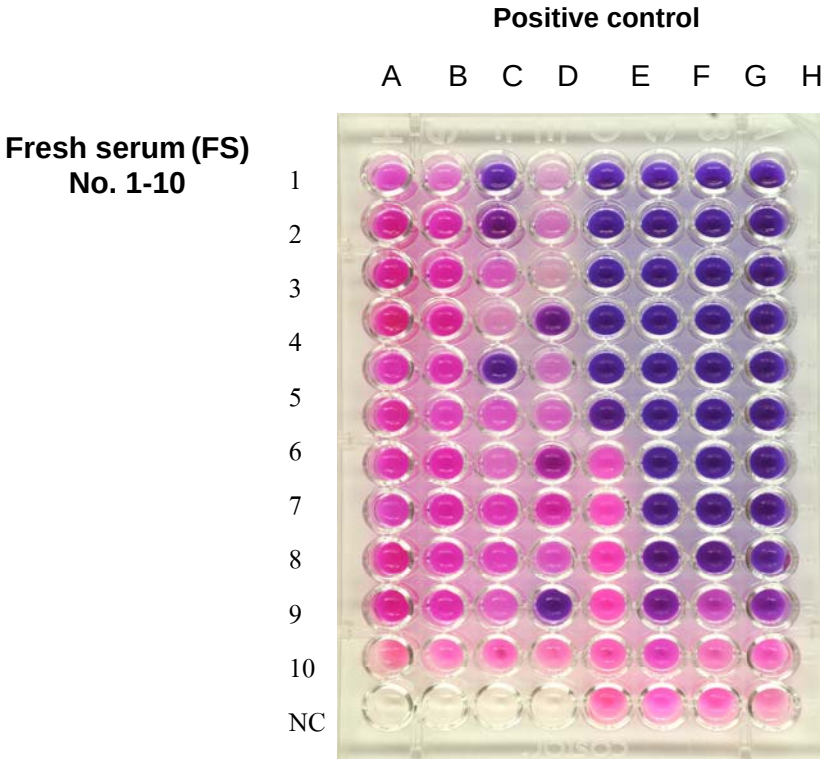
3) ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดจากซีรัมสดและซีรัมแห้งที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Escherichia coli* ATCC 25922*, Klebsiella pneumoniae* ATCC 27736, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 พบว่า ซีรัมสดที่ไม่ได้เจือจาง (undiluted serum) เท่านั้น สามารถยับยั้งแบคทีเรีย 3 ชนิดได้แก่ *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27736 ได้ สำหรับซีรัมสดที่เจือจาง 1:2 สามารถยับยั้ง *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 ได้ ในขณะที่ซีรัมสดที่เจือจาง 1:2-1:4 สามารถยับยั้ง *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ได้ สอดคล้องกับการหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดจากซีรัมแห้งที่พบว่า ซีรัมแห้ง 100 mg/ml สามารถยับยั้งแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดข้างต้น แต่ไม่มีค่า MBC และซีรัมแห้ง 50-100 mg/ml สามารถยับยั้ง *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 ได้และไม่มีค่า MBC เช่นกัน แต่อย่างไรก็ตาม ซีรัมแห้ง 12.5-25.00 mg/ml นั้นสามารถยับยั้ง *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ได้ (ภาพที่ 4) และให้ค่า MBC ที่ 25-100 mg/ml จำนวน 15 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 7-8

ตารางที่ 1 การทดสอบหาฤทธิ์ของเลือดครบแห้ง (100 mg/ml) ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ

Sample No.	*E. aerogenes*	*E. coli*	*K. pneumoniae*	*S. typhimurium*	*P.aeruginosa*
1	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
2	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
3	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
4	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
5	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
6	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
7	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
8	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
9	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
10	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
11	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
12	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
13	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
14	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
15	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
16	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
17	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
18	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
19	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
20	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
21	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
22	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
23	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
24	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
25	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
26	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
27	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
28	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
29	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
30	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
% Positive	**0/30 (0.00%)**	**0/30 (0.00%)**	**0/30 (0.00%)**	**0/30 0.00%)**	**0/30 (0.00%)**

ตารางที่ 2 การทดสอบหาฤทธิ์ของเลือดครบแห้ง (100 mg/ml) ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก

Sample No.	*B. subtilis*	*S. epidermidis*	*S. aureus*	*S. pyrogenes*
1	Negative	Negative	Negative	Negative
2	Negative	Negative	Negative	Negative
3	Negative	Negative	Negative	Negative
4	Negative	Negative	Negative	Negative
5	Negative	Negative	Negative	Negative
6	Negative	Negative	Negative	Negative
7	Negative	Negative	Negative	Negative
8	Negative	Negative	Negative	Negative
9	Negative	Negative	Negative	Negative
10	Negative	Negative	Negative	Negative
11	Negative	Negative	Negative	Negative
12	Negative	Negative	Negative	Negative
13	Negative	Negative	Negative	Negative
14	Negative	Negative	Negative	Negative
15	Negative	Negative	Negative	Negative
16	Negative	Negative	Negative	Negative
17	Negative	Negative	Negative	Negative
18	Negative	Negative	Negative	Negative
19	Negative	Negative	Negative	Negative
20	Negative	Negative	Negative	Negative
21	Negative	Negative	Negative	Negative
22	Negative	Negative	Negative	Negative
23	Negative	Negative	Negative	Negative
24	Negative	Negative	Negative	Negative
25	Negative	Negative	Negative	Negative
26	Negative	Negative	Negative	Negative
27	Negative	Negative	Negative	Negative
28	Negative	Negative	Negative	Negative
29	Negative	Negative	Negative	Negative
30	Negative	Negative	Negative	Negative
% Positive	**0/30 (0.00%)**	**0/30 (0.00%)**	**0/30 (0.00%)**	**0/30 (0.00%)**



ภาพที่ 3 ผลการทดสอบหาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจากซีรัมสด

หมายเหตุ

A คือ ผลการทดสอบหาฤทธิ์ของซีรัมสดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Enterobacter aerogenes*

B คือ ผลการทดสอบหาฤทธิ์ของซีรัมสดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli*

C คือ ผลการทดสอบหาฤทธิ์ของซีรัมสดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Klebsiella pneumoniae*

D คือ ผลการทดสอบหาฤทธิ์ของซีรัมสดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmonella typhimurium*

E คือ ผลการทดสอบหาฤทธิ์ของ Cefazolin (1mg/ml) ทำ 2 fold dilutionในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Enterobacter aerogenes* (MIC=31.25 µg/ml)

F คือ ผลการทดสอบหาฤทธิ์ของ Cefazolin (1mg/ml, 2 fold dilution) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* (MIC=1.95 µg/ml)

G คือ ผลการทดสอบหาฤทธิ์ของ Cefazolin (1mg/ml, 2 fold dilution) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* (MIC=3.90 µg/ml)

H คือ ผลการทดสอบหาฤทธิ์ของ Cefazolin (1mg/ml, 2 fold dilution) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmonella typhimurium* (MIC=1.95 µg/ml)

NC คือ Negative control

ตารางที่ 3 การทดสอบหาฤทธิ์ของซีรัมสดในการยั บยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ

Sample No.	*E. aerogenes*	*E. coli*	*K. pneumoniae*	*S. typhimurium*	*P.aeruginosa*
1	Negative	Negative	Negative	**Positive**	**Positive**
2	Negative	Negative	Negative	**Positive**	**Positive**
3	Negative	Negative	Negative	**Positive**	**Positive**
4	Negative	Negative	Negative	**Positive**	**Positive**
5	Negative	Negative	Negative	**Positive**	**Positive**
6	Negative	Negative	Negative	Negative	**Positive**
7	Negative	Negative	Negative	Negative	**Positive**
8	Negative	Negative	Negative	**Positive**	**Positive**
9	Negative	Negative	Negative	**Positive**	**Positive**
10	Negative	Negative	Negative	**Positive**	**Positive**
11	Negative	Negative	**Positive**	Negative	**Positive**
12	Negative	Negative	**Positive**	Negative	**Positive**
13	Negative	Negative	Negative	Negative	**Positive**
14	Negative	Negative	Negative	**Positive**	**Positive**
15	Negative	Negative	**Positive**	Negative	**Positive**
16	Negative	Negative	Negative	Negative	**Positive**
17	Negative	Negative	Negative	**Positive**	**Positive**
18	Negative	Negative	Negative	**Positive**	**Positive**
19	Negative	Negative	Negative	Negative	**Positive**
20	Negative	Negative	Negative	**Positive**	**Positive**
21	**Positive**	Negative	**Positive**	**Positive**	**Positive**
22	**Positive**	Negative	**Positive**	**Positive**	Negative
23	Negative	Negative	**Positive**	**Positive**	Negative
24	**Positive**	**Positive**	Negative	**Positive**	**Positive**
25	**Positive**	Negative	**Positive**	**Positive**	Negative
26	**Positive**	Negative	**Positive**	**Positive**	Negative
27	Negative	Negative	**Positive**	**Positive**	**Positive**
28	Negative	**Positive**	**Positive**	Negative	**Positive**
29	**Positive**	Negative	**Positive**	**Positive**	**Positive**
30	**Positive**	**Positive**	**Positive**	**Positive**	**Positive**
% Positive	**7/30 (23.30%)**	**3/30 (10.00%)**	**12/30 (40.00%)**	**21/30 (70.00%)**	**26/30 (86.67%)**

ตารางที่ 4 การทดสอบหาฤทธิ์ของซีรัมสดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก

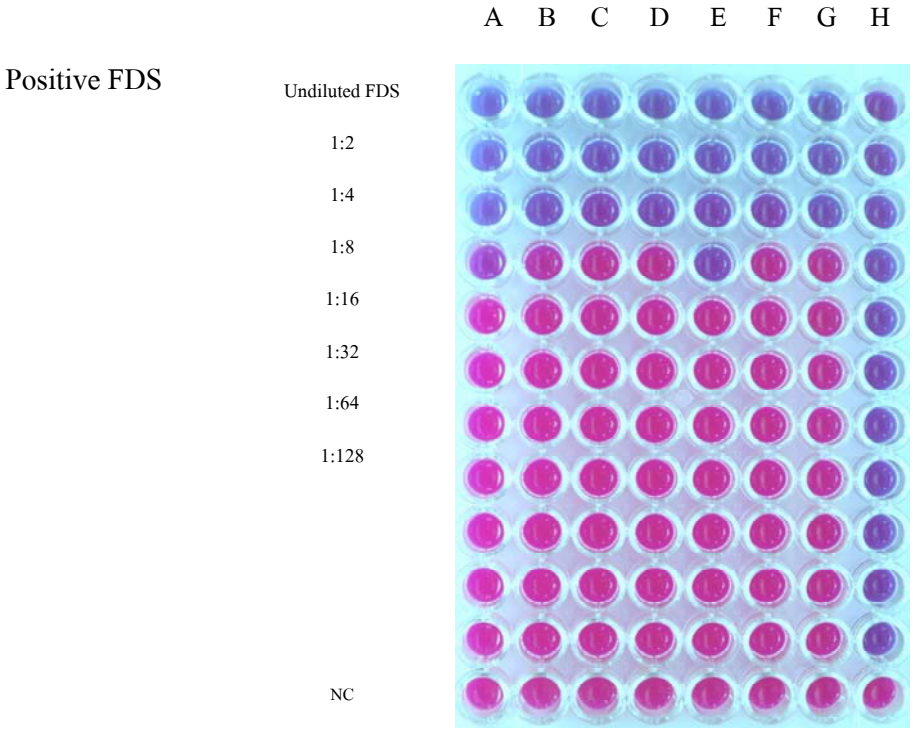
Sample No.	***B. subtilis***	***S. epidermidis***	***S. aureus***	***S. pyrogenes***
1	Negative	Negative	Negative	Negative
2	Negative	Negative	Negative	Negative
3	Negative	Negative	Negative	Negative
4	Negative	Negative	Negative	Negative
5	Negative	Negative	Negative	Negative
6	Negative	Negative	Negative	Negative
7	Negative	Negative	Negative	Negative
8	Negative	Negative	Negative	Negative
9	Negative	Negative	Negative	Negative
10	Negative	Negative	Negative	Negative
11	Negative	Negative	Negative	Negative
12	Negative	Negative	Negative	Negative
13	Negative	Negative	Negative	Negative
14	Negative	Negative	Negative	Negative
15	Negative	Negative	Negative	Negative
16	Negative	Negative	Negative	Negative
17	Negative	Negative	Negative	Negative
18	Negative	Negative	Negative	Negative
19	Negative	Negative	Negative	Negative
20	Negative	Negative	Negative	Negative
21	Negative	Negative	Negative	Negative
22	Negative	Negative	Negative	Negative
23	Negative	Negative	Negative	Negative
24	Negative	Negative	Negative	Negative
25	Negative	Negative	Negative	Negative
26	Negative	Negative	Negative	Negative
27	Negative	Negative	Negative	Negative
28	Negative	Negative	Negative	Negative
29	Negative	Negative	Negative	Negative
30	Negative	Negative	Negative	Negative
% Positive	**0/30 (0.00%)**	**0/30 (0.00%)**	**0/30 (0.00%)**	**0/30 (0.00%)**

ตารางที่ 5 การทดสอบหาฤทธิ์ของซีรัมแห้ง (100 mg/ml) ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ

Sample No.	*E. aerogenes*	*E. coli*	*K. pneumoniae*	*S. typhimurium*	*P.aeruginosa*
1	Negative	Negative	Negative	**Positive**	**Positive**
2	Negative	Negative	Negative	**Positive**	**Positive**
3	Negative	Negative	Negative	**Positive**	**Positive**
4	Negative	Negative	Negative	**Positive**	**Positive**
5	Negative	Negative	Negative	**Positive**	**Positive**
6	Negative	Negative	Negative	Negative	**Positive**
7	Negative	Negative	Negative	Negative	**Positive**
8	Negative	Negative	Negative	**Positive**	**Positive**
9	Negative	Negative	Negative	**Positive**	**Positive**
10	Negative	Negative	Negative	**Positive**	**Positive**
11	Negative	Negative	**Positive**	Negative	**Positive**
12	Negative	Negative	**Positive**	Negative	**Positive**
13	Negative	Negative	**Positive**	Negative	**Positive**
14	Negative	Negative	Negative	**Positive**	**Positive**
15	Negative	Negative	**Positive**	**Positive**	**Positive**
16	Negative	Negative	Negative	Negative	**Positive**
17	Negative	Negative	Negative	**Positive**	**Positive**
18	Negative	Negative	Negative	**Positive**	**Positive**
19	Negative	Negative	Negative	Negative	**Positive**
20	Negative	Negative	Negative	**Positive**	**Positive**
21	**Positive**	Negative	**Positive**	**Positive**	**Positive**
22	**Positive**	Negative	**Positive**	**Positive**	Negative
23	**Positive**	Negative	**Positive**	**Positive**	Negative
24	**Positive**	**Positive**	Negative	**Positive**	**Positive**
25	**Positive**	Negative	**Positive**	**Positive**	Negative
26	**Positive**	Negative	**Positive**	**Positive**	**Positive**
27	Negative	Negative	**Positive**	**Positive**	**Positive**
28	**Positive**	**Positive**	**Positive**	**Positive**	**Positive**
29	**Positive**	Negative	**Positive**	**Positive**	**Positive**
30	**Positive**	**Positive**	**Positive**	**Positive**	**Positive**
% Positive	**9/30 (30.00%)**	**3/30 (10.00%)**	**13/30 (43.33%)**	**23/30 (76.67%)**	**27/30 (90.00%)**

ตารางที่ 6 การทดสอบหาฤทธิ์ของซีรัมแห้ง (100 mg/ml) ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก

Sample No.	*B. subtilis*	*S. epidermidis*	*S. aureus*	*S. pyrogenes*
1	Negative	Negative	Negative	Negative
2	Negative	Negative	Negative	Negative
3	Negative	Negative	Negative	Negative
4	Negative	Negative	Negative	Negative
5	Negative	Negative	Negative	Negative
6	Negative	Negative	Negative	Negative
7	Negative	Negative	Negative	Negative
8	Negative	Negative	Negative	Negative
9	Negative	Negative	Negative	Negative
10	Negative	Negative	Negative	Negative
11	Negative	Negative	Negative	Negative
12	Negative	Negative	Negative	Negative
13	Negative	Negative	Negative	Negative
14	Negative	Negative	Negative	Negative
15	Negative	Negative	Negative	Negative
16	Negative	Negative	Negative	Negative
17	Negative	Negative	Negative	Negative
18	Negative	Negative	Negative	Negative
19	Negative	Negative	Negative	Negative
20	Negative	Negative	Negative	Negative
21	Negative	Negative	Negative	Negative
22	Negative	Negative	Negative	Negative
23	Negative	Negative	Negative	Negative
24	Negative	Negative	Negative	Negative
25	Negative	Negative	Negative	Negative
26	Negative	Negative	Negative	Negative
27	Negative	Negative	Negative	Negative
28	Negative	Negative	Negative	Negative
29	Negative	Negative	Negative	Negative
30	Negative	Negative	Negative	Negative
% Positive	**0/30 (0.00%)**	**0/30 (0.00%)**	**0/30 (0.00%)**	**0/30 (0.00%)**



ภาพที่ 4 ผลการทดสอบการหาค่า MIC (mg/ml) จากซีรัมแห้ง ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. aeruginosa*

<u>หมายเหตุ</u>

A – G คือ ผลการทดสอบหาค่า MIC (mg/ml) จากซีรัมแห้ง 100 mg/ml, 2 fold dilution

H คือ ผลการทดสอบหาฤทธิ์ของ Ceftaxidime (1mg/ml, 2 fold dilution) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* (MIC=0.975 µg/ml)

NC คือ Negative control

ตารางที่ 7 การทดสอบหาค่า MIC (mg/ml) จากซีรัมสดและซีรัมแห้งจากตัวอย่างที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

ประเภทตัวอย่างที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย	ค่า MIC (mg/ml)				
	E. aerogenes	***E. coli***	***K. pneumoniae***	***S. typhimurium***	***P. aeruginosa***
ซีรัมสด	Undiluted serum (n=7)	Undiluted serum (n=3)	Undiluted serum (n=12)	Undiluted serum-Dilute1:2 (n=21)	Dilute1:2-1:4 (n=26)
ซีรัมแห้ง	100.00 (n=9)	100.00 (n=3)	100.00 (n=13)	50-100.00 (n=23)	12.50-25.00 (n=27)

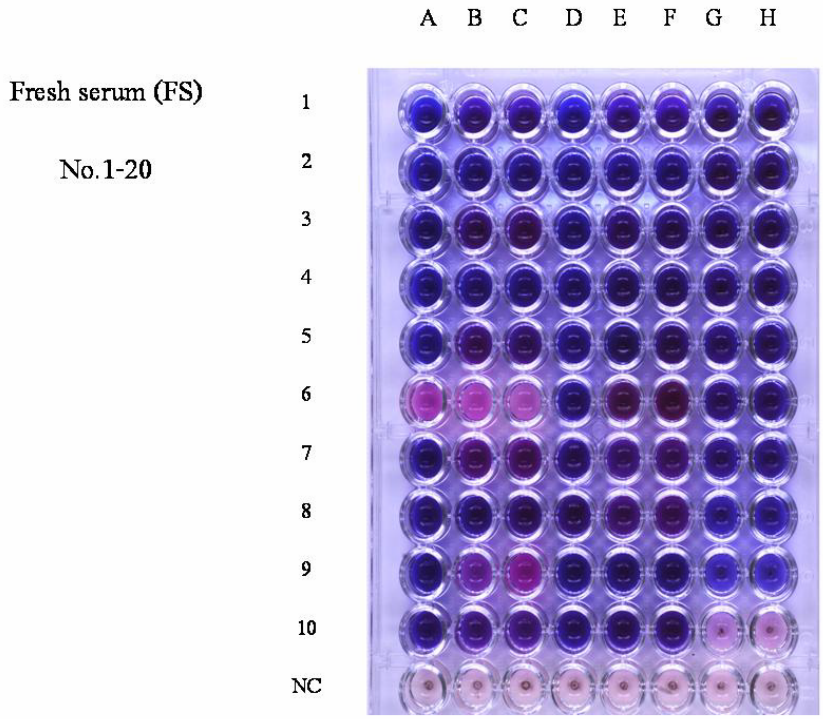
ตารางที่ 8 การเปรียบเทียบค่า MIC และ MBC (mg/ml) จากตัวอย่างซีรัมแห้ง

เชื้อแบคทีเรีย	ค่า MIC (mg/ml)	ค่า MBC (mg/ml)
E. aerogenes	100	ไม่มีค่า MBC
E. coli	100	ไม่มีค่า MBC
K. pneumoniae	100	ไม่มีค่า MBC
S. typhimurium	50-100	ไม่มีค่า MBC
P. aeruginosa	12.50-25.00	ไม่มีค่า MBC (n=12) 25.00-100.00 (n=15)

4) การทดสอบหาฤทธิ์ของซีรัมสด และซีรัมแห้งในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. albicans*, *C. neoformans* (ภาพที่ 5) และ *A. niger* พบว่า ซีรัมสด สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ 2 ชนิด คือ *C. neoformans* และ *A. niger* คิดเป็นร้อยละ 90.00 และ 80.00 ตามลำดับ ขณะที่ซีรัมแห้งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 2 ชนิดข้างต้นเช่นกันโดย คิดเป็นร้อยละ 100.00 และ 83.33 ตามลำดับ ดังตารางที่ 9-10

5) ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดจากซีรัมสดและซีรัมแห้งที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. neoformans* และ *A. niger* พบว่า ซีรัมสดที่ไม่ได้เจือจาง (undiluted

serum) และซีรัมสดที่เจือจาง diluted serum 1:2 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 2 ชนิดได้สอดคล้องกับการหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดจากซีรัมแห้งที่พบว่า ซีรัมแห้งปริมาณ 25-50 mg/ml และ 50-100 mg/ml สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. neoformans* และ *A. niger* ได้ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามทั้งซีรัมสดและซีรัมแห้งไม่สามารถฆ่าเชื้อราได้ (ไม่มีค่า MFC) ดังตารางที่ 11-12



ภาพที่ 5 ผลการทดสอบหาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. neoformans* จากซีรัมสด

<u>หมายเหตุ</u>

A – C คือ ผลการทดสอบหาฤทธิ์ของซีรัมสดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. neoformans* (triplicate no.1-10)

D – F คือ ผลการทดสอบหาฤทธิ์ของซีรัมสดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. neoformans* (triplicate no.11-20)

G – H คือ ผลการทดสอบหาฤทธิ์ของ Amphotericin B (1 mg/ml, 2 fold dilution) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. neoformans* (MIC=3.90 µg/ml)

NC คือ Negative control

ตารางที่ 9 การทดสอบหาฤทธิ์ของซีรัมสดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา 3 ชนิด

Sample No.	*C. albicans*	*C. neoformans*	*A. niger*
1	Negative	**Positive**	**Positive**
2	Negative	**Positive**	**Positive**
3	Negative	**Positive**	**Positive**
4	Negative	**Positive**	**Positive**
5	Negative	**Positive**	**Positive**
6	Negative	Negative	Negative
7	Negative	**Positive**	Negative
8	Negative	**Positive**	Negative
9	Negative	**Positive**	**Positive**
10	Negative	**Positive**	**Positive**
11	Negative	**Positive**	**Positive**
12	Negative	**Positive**	**Positive**
13	Negative	**Positive**	**Positive**
14	Negative	**Positive**	**Positive**
15	Negative	**Positive**	**Positive**
16	Negative	Negative	**Positive**
17	Negative	**Positive**	**Positive**
18	Negative	**Positive**	**Positive**
19	Negative	Negative	Negative
20	Negative	**Positive**	**Positive**
21	Negative	**Positive**	**Positive**
22	Negative	**Positive**	**Positive**
23	Negative	**Positive**	**Positive**
24	Negative	**Positive**	**Positive**
25	Negative	**Positive**	**Positive**
26	Negative	Negative	**Positive**
27	Negative	**Positive**	Negative
28	Negative	**Positive**	**Positive**
29	Negative	**Positive**	Negative
30	Negative	**Positive**	**Positive**
% Positive	**0/30 (0.00%)**	**27/30 (90.00%)**	**24/30 (80.00%)**

ตารางที่ 10 การทดสอบหาฤทธิ์ของซีรัมแห้งในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา 3 ชนิด

Sample No.	***C. albicans***	***C. neoformans***	*A. niger*
1	Negative	**Positive**	**Positive**
2	Negative	**Positive**	**Positive**
3	Negative	**Positive**	**Positive**
4	Negative	**Positive**	**Positive**
5	Negative	**Positive**	**Positive**
6	Negative	**Positive**	Negative
7	Negative	**Positive**	Negative
8	Negative	**Positive**	Negative
9	Negative	**Positive**	**Positive**
10	Negative	**Positive**	**Positive**
11	Negative	**Positive**	**Positive**
12	Negative	**Positive**	**Positive**
13	Negative	**Positive**	**Positive**
14	Negative	**Positive**	**Positive**
15	Negative	**Positive**	**Positive**
16	Negative	**Positive**	**Positive**
17	Negative	**Positive**	**Positive**
18	Negative	**Positive**	**Positive**
19	Negative	**Positive**	**Positive**
20	Negative	**Positive**	**Positive**
21	Negative	**Positive**	**Positive**
22	Negative	**Positive**	**Positive**
23	Negative	**Positive**	**Positive**
24	Negative	**Positive**	**Positive**
25	Negative	**Positive**	**Positive**
26	Negative	**Positive**	**Positive**
27	Negative	**Positive**	Negative
28	Negative	**Positive**	**Positive**
29	Negative	**Positive**	Negative
30	Negative	**Positive**	**Positive**
% Positive	**0/30 (0.00%)**	**30/30 (100.00%)**	**25/30 (83.33%)**

ตารางที่ 11 การทดสอบหาค่า MIC (mg/ml) ซีรัมสดและซีรัมแห้ง จากตัวอย่างที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา

ประเภทตัวอย่างที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา	ค่า MIC (mg/ml)	
	C. neoformans	*A. niger*
ซีรัมสด	Undiluted serum – dilute1:2	Undiluted serum– dilute1:2
ซีรัมแห้ง	25-50.00	50-100.00

ตารางที่ 12 การทดสอบหาค่า MFC (mg/ml) ซีรัมสดและซีรัมแห้ง จากตัวอย่างที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา

ประเภทตัวอย่างที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา	ค่า MFC (mg/ml)	
	C. neoformans	*A. niger*
ซีรัมสด	ไม่มีค่า MFC	ไม่มีค่า MFC
ซีรัมแห้ง	ไม่มีค่า MFC	ไม่มีค่า MFC

อภิปรายและวิจารณ์ผลการทดลอง

การทดสอบหาฤทธิ์ของเลือดครบแห้ง ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ รวมทั้งเชื้อรา ให้ผลการทดสอบเป็นลบ การอ่านผลค่อนข้างยากทั้งนี้เนื่องจาก จะต้องละลายเลือดครบแห้งในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อทำให้เม็ดเลือดแดงแตก (hemolysis) สีของฮีโมโกลบิน (hemoglobin) รบกวนการอ่านผล และได้ทดลองละลายเลือดครบแห้งใน 0.85% NaCl ปรากฏว่าเม็ดเลือดแดงของจระเข้ก็ยังคงแตก จากการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องพบว่า ปริมาณ NaCl ที่สูง, Ca^{2+} Mg^{2+} และ Fe^{2+} สามารถรบกวนการทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพได้

ผลการทดสอบหาฤทธิ์ของซีรัมสด และซีรัมแห้ง (100 mg/ml) ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน พบว่า ซีรัมสดและซีรัมแห้งสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ทั้ง 5 ชนิด และมีฤทธิ์ยับยั้ง *P. aeruginosa* ได้ดีที่สุด ดังตารางที่ 13 นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทดลองนำตัวอย่างไป heat inactivate ด้วยความร้อน 56°C นาน 30 นาที เพื่อทดสอบว่าเนื่องมาจากฤทธิ์ของคอมพลีเมนต์ซึ่งเป็นโปรตีนในซีรัมหรือไม่ แล้วจึงนำไปทดลองด้วยวิธีข้างต้น พบว่าฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบหมดไป สอดคล้องกับงานวิจัยจากคณะผู้วิจัยภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของซีรัม และพลาสมาของจระเข้ พบว่า สารที่

แยกได้จากส่วนซีรัมและพลาสมาจะเข้าทำลายแบคทีเรียทำให้เกิดรูบริเวณผิวเซลล์และส่งผลให้แบคทีเรียตายในที่สุด แต่อย่างไรก็ตามผลการทดลองพบว่าซีรัมไม่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ทั้งนี้อาจเนื่องจากแบคทีเรียแกรมบวกมีส่วนประกอบของผนังเซลล์ที่แตกต่างจากแกรมลบ กล่าวคือ มีชั้นเปปติโดไกลเคนที่หนา จึงอาจต้องใช้ซีรัมที่มีความเข้มข้นสูงกว่า 100 mg/ml จึงจะมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้

ตารางที่ 13 การทดสอบหาฤทธิ์ของซีรัมสดและซีรัมแห้งในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ

Sample	*E. aerogenes*		*E. coli*		*K. pneumoniae*		*S. typhimurium*		*P. aeruginosa*	
	Positive	**Negative**	**Positive**	**Negative**	**Positive**	**Negative**	**Positive**	**Negative**	**Positive**	**Negative**
FS (%)	7/30 (23.33)	23/30 (76.67)	3/30 (10.00)	27/30 (90.00)	12/30 (40.00)	18/30 (60.00)	21/30 (70.00)	9/30 (30.00)	26/30 (86.67)	4/30 (13.33)
FDS (%)	9/30 (30.00)	21/30 (70.00)	3/30 (10.00)	27/30 (90.00)	13/30 (43.33)	17/30 (56.67)	23/30 (76.67)	7/30 (23.33)	27/30 (90.00)	3/30 (10.00)

ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดจากซีรัมแห้งที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและฆ่าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานนั้นพบว่า ซีรัมแห้งมีฤทธิ์ยับยั้งและฆ่าเชื้อ *P. aeruginosa* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคที่มีความสำคัญทางการแพทย์ได้ดีที่สุด กล่าวคือ มีค่า MIC = 12.5-25.00 mg/ml และให้ค่า MBC ที่ 25-100 mg/ml จึงได้นำตัวอย่างเหล่านี้ไปทดสอบความไวของเชื้อต่อซีรัมแห้งของจระเข้ด้วยวิธี Disk diffusion method (Kirby-Bauer method) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ วิธีนี้ถูกพัฒนาโดย Kirby และ Bauer สำหรับการทดสอบหาฤทธิ์ของซีรัมแห้ง ทำได้โดยนำเชื้อ *P. aeruginosa* 0.5 McFarland standard (10^7-10^8 CFU/ml) มาป้ายบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ซึ่งตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ คือ ซีรัม หากใช้ disc ตามวิธีมาตรฐานที่มีลักษณะเป็นแผ่นกระดาษกรองจุ่มลงในซีรัม โปรตีนที่อยู่ในซีรัมอาจถูกตรึงไว้ที่แผ่นกระดาษได้ ดังนั้นจึงประยุกต์โดยเจาะหลุมอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ที่มีความหนา 4 มิลลิเมตร ด้วย equidistant holes เติม FDS 100 mg/ml ปริมาตร 50 ไมโครลิตร โดยมี ceftazidime 20 ไมโครกรัม เป็น positive control หลังจากบ่มในตู้เพาะเชื้อแล้ว ประมาณ 16 – 18 ชั่วโมง ตัวยาหรือสารเคมีที่ต้องการทดสอบจะค่อยๆ แพร่ออกจากหลุม เป็นรัศมีโดยรอบตัวยาหรือสารเคมีนั้น หากสารเหล่านี้มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* จะพบวงใสรอบหลุมที่เรียกว่า inhibition zone จากนั้นวัดเส้นผ่าศูนย์กลาง ซึ่งผลการทดสอบค่า inhibition zone วัดค่าได้สูงสุด 9-10 มิลลิเมตร ดังตารางที่ 14

ตารางที่ 14 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* จากซีรัมจระเข้แห้ง (100 mg/ml)

จำนวนตัวอย่าง	ผลการทดสอบค่า Inhibition Zone (mm)
6	0
11	7-8
3	9-10

หมายเหตุ 0 = ไม่เกิด inhibition zone

ในขณะที่ซีรัมสดและซีรัมแห้งที่ความเข้มข้น 100 mg/ml ไม่สามารถยับยั้ง *C. albicans* ได้ แต่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *C. neoformans* และ *A. niger* ได้ และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *C. neoformans* ได้ดีที่สุดทั้งๆที่ยีสต์ชนิดนี้มีแคปซูลที่หนามากก็ตาม ดังตารางที่ 15นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทดลองนำตัวอย่างไป heat inactivate ด้วยความร้อน 56°C นาน 30 นาที เพื่อทดสอบว่าเนื่องมาจากฤทธิ์ของคอมพลีเมนต์ซึ่งเป็นโปรตีนในซีรัมหรือไม่ แล้วจึงนำไปทดลองตามขั้นตอนข้างต้น พบว่าฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราทั้งสองชนิดยังคงอยู่ จึงมิใช่ฤทธิ์ของคอมพลีเมนต์หรือโปรตีนชนิดอื่นที่ถูกทำลายด้วยความร้อนและระยะเวลาดังกล่าว

ตารางที่ 15 การทดสอบหาฤทธิ์ของซีรัมสดและซีรัมแห้งในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. neoformans* และ *A. niger*

Sample	***C. neoformans***		*A. niger*	
	Positive	**Negative**	**Positive**	**Negative**
FS	27/30	3/30	24/30	6/30
Total (%)	(90.00%)	(10.00%)	(80.00%)	(20.00%)
FDS	30/30	0/30	25/30	5/30
Total (%)	(100.00 %)	(0.00%)	(83.33%)	(16.67%)

สรุปผลการวิจัย

1. เลือดจระเข้ครบแห้งที่ระดับความเข้มข้น 100 mg/ml ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและลบรวมทั้งเชื้อรา
2. ซีรัมสดและซีรัมแห้งที่ความเข้มข้น 100 mg/ml มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27736, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 รวมทั้งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. neoformans* และ *A. niger* ด้วย
3. ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน และเชื้อรา ของซีรัมสดและซีรัมแห้งที่ความเข้มข้น 100 mg/ml ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังนั้นสามารถบริโภคแคปซูลซีรัมแห้งได้ ซึ่งสะดวก และเป็นไปได้มากกว่าจะบริโภคซีรัมสด
4. โปรตีน หรือเปปไตด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย เป็นผลมาจากฤทธิ์ของคอมพลีเมนต์
5. โปรตีน หรือเปปไตด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา มิได้เป็นผลมาจากฤทธิ์ของคอมพลีเมนต์

ข้อเสนอแนะ

ควรมีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas aeruginosa* ที่ได้จาก Clinical isolate เนื่องจากเชื้อนี้มีความสำคัญทางการแพทย์ เป็นเชื้อก่อโรค และก่อให้เกิดการติดเชื้อในโรงพยาบาล รวมทั้งมีปัญหาการดื้อยาค่อนข้างมาก

บรรณานุกรม

ทินกร เถียรสูงเนิน การศึกษาเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียในซีรัมจระเข้สายพันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*) **โครงการวิจัยตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีวเคมี**คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 2549

วิน เชยชมศรี จินดาวรรณ สิรันทวิเนติ บุญเกื้อ วัชรเสถียร มณี ตันติรุ่งกิจ สุดาวรรณ เชยชมศรี ยศ พงษ์ เต็มศิริพงศ์ และเริงฤทธิ์ สัปปพัน ประสิทธิภาพของซีรัมจระเข้น้ำจืดพันธุ์ไทยในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย. **วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด** 2546; 15 (ฉบับเพิ่มเติมที่ 1) S120.

ศรายุทธ ระดาพงษ์ การแยกบริสุทธิ์ Antimicrobial peptides จากซีรัมจระเข้สายพันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*). **โครงการวิจัยตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีวเคมี** คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 2548

สมชาติ วงค์แก้ว การศึกษาสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียในซีรัมจระเข้สายพันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*). **โครงการวิจัยตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีวเคมี** คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 2547

สุวิทย์ รักมณี และ สมปอง ธรรมศิริรักษ์ การศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราจากสารสกัดเม็ดเลือดขาวของจระเข้สายพันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*) **รายงานการวิจัย ภาควิชาชีวเคมี** คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 2550

Lorian V. **Antibiotics in Laboratory Medicine**, Chapter 6 page 247, Fifth Edition 2005, Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia, USA.

Merchant ME., Roche CM., Thibodeaux D., Elsey RM. Identification of alternative pathway serum complement activity in the blood of the American alligator (*Alligator mississippiensis*) **Biochemistry and Molecular Biology** 2005;141(3) 281-288.

Merchant, ME., Leger, N., Jerkins, E, et al. Broad spectrum antimicrobial activity of leukocyte extracts from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). **Veterinary Immunology and Immunopathology** 2006;110: 221–228.

Merchant, ME., Pallansch, M., Paulman, R.,Wells, J., Nalca, A., Ptak, R.. Antiviral activity of serum from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). Antiviral Res. 2005a; 66: 35–38.

Merchant, ME., Thibodeaux, D., Loubser, K., Elsey, R. Amoebacidal activity of serum from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). J. Parasitol. 2004; 90: 1480–1483.

Papagianni, M. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. Biotechnol Adv 2003; 21:465.

Patent : US5380664. Reptilian-derived peptides for the treatment of microbial infection, 1999.

Sarker, SD., Lutfun Nahar, and Yashodharan Kumarasamy. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. Methods. 2007 August; 42(4): 321–324.

Sitaram, N., and R. Nagaraj. Host-defense antimicrobial peptides: importance of structure for activity. Curr Pharm Des 2002; 8:727. 8. Merchant, ME., Roche, C., Elsey, R., Prudhomme, J. Antibacterial properties of blood from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). Comp. Biochem. Physiol-B 2003; 136:505–513.

ภาคผนวก

<u>สารเคมี</u>

1. RPMI-1640 medium (with glutamine and phenol red, without bicarbonate) (Hyclone, USA)
2. Glucose (0.2%, 2%)
3. 0.165 mol/L MOPS (3-[N-morpholino] propanesulfonic acid)(Sigma #M-6270)
4. 0.5 McFarland standard
5. Amphotericin B
6. SDA, PDA
7. Cefazolin sodium, Ceftazidime
8. Resazurin
9. MHB, MHA
10. HCl

รายงานการวิจัย

ที่ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยแผนงานสนับสนุนการวิจัยรองรับการเปลี่ยนแปลงและพลวัตโลกเพื่อแก้ปัญหาสำคัญของชาติอย่างสมดุลและยั่งยืน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2551

โครงการย่อยที่ 4 การศึกษาฤทธิ์ของเลือดจระเข้พันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*) ในการกระตุ้นกระบวนการกลืนกินของแมโครเฟจและลิมโฟไซต์

Study on the Effects of Siamese Crocodile Blood (*Crocodylus siamensis*) on Macrophage Phagocytosis and Lymphocyte Activation

หน่วยงานที่รับผิดชอบ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ: นางกัลยา อารีย์

ผู้ร่วมงานวิจัย: นางสาวจินดาวรรณ สิรันทวิเนติ

นายวิน เชยชมศรี

โครงการวิจัยเรื่อง การศึกษาฤทธิ์ของเลือดจระเข้พันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*) ในการกระตุ้น

กระบวนการกลืนกินของแมโครเฟจและลิมโฟไซต์

Study on the Effects of Siamese Crocodile Blood (*Crocodylus siamensis*) on Macrophage Phagocytosis and Lymphocyte Activation

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปี 2551 จำนวนเงิน 545,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2551 ถึง ตุลาคม 2552 ขอต่อเวลาอีก 4 เดือน

ชื่อผู้วิจัย

นางกัลยา อารีย์ Ph.D. (Microbiology) สาขาจุลชีววิทยาและภูมิคุ้มกันวิทยา สถานวิทยาศาสตร์พรีคลินิก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ โทรศัพท์ 02-926-9710-1

นางสาวจินดาวรรณ สิรันทวิเนติ Ph.D.(Agricultural Science) ภาควิชาสัตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โทรศัพท์ 0-2562-5555, 0-2562- 5444 ต่อ 3262

นายวิน เชยชมศรี ปร. ด. (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร). ภาควิชาสัตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โทรศัพท์ 0-2562-5555, 0-2562- 5444 ต่อ 3264

บทคัดย่อ

การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันประกอบด้วยภูมิคุ้มกันแต่กำเนิด (innate immunity) และภูมิคุ้มกันปรับใช้ (adaptive immunity) ซึ่งทำหน้าที่ร่วมกันในการกำจัดจุลชีพที่อาจเป็นอันตรายต่อร่างกาย ในบรรดาเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันที่มีอยู่หลากหลาย แมโครเฟจ (macrophage) และ ลิมโฟไซต์ (lymphocyte) เป็นเซลล์ที่มีหน้าที่สำคัญในการเป็นศูนย์กลางของการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ ดังนั้นการกระตุ้นให้เซลล์เหล่านี้ทำหน้าที่อย่างเหมาะสมจะส่งผลให้ร่างกายสามารถต่อสู้กับจุลชีพได้อย่างมีประสิทธิภาพ

จระเข้เป็นสัตว์เลื้อยคลานที่มีความต้านทานต่อโรคติดเชื้ออย่างมาก โดยเฉพาะการติดเชื้อทางบาดแผล ถึงแม้จะอาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีจุลชีพมากมายหลายชนิด จึงสันนิษฐานว่าในเลือดจระเข้น่าจะมีสารต้านจุลชีพที่ช่วยให้จระเข้มีภูมิคุ้มกันที่มีประสิทธิภาพ ดังนั้นในหลายประเทศจึงมีผู้นิยมบริโภคเนื้อตลอดจนเลือดจระเข้จากความเชื่อที่ว่าสามารถเพิ่มความต้านทานต่อโรคติดเชื้อได้ การศึกษาระบบภูมิคุ้มกันของจระเข้ พบสารต้านจุลชีพในเลือดจระเข้ ได้แก่ คอมพลิเมนท์ (complement) เพพไทด์ต้านจุลชีพ (anti-microbial peptide) ที่สามารถต้านจุลชีพได้ทั้งแบคทีเรีย ไวรัส และรา หากแต่ยังไม่มีผู้ศึกษาฤทธิ์ของเลือดจระเข้ต่อการทำหน้าที่ของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาฤทธิ์ของส่วนประกอบเลือดจระเข้ประเภทต่าง ๆ ในการเพิ่มประสิทธิภาพกระบวนการกลืนกิน (phagocytosis) ของแมโครเฟจ รวมทั้งการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนและการหลั่งไซโทไคน์ (cytokine) ของ human peripheral blood mononuclear cell (85% lymphocyte) ผลที่ได้จากการศึกษานี้จะเป็นข้อมูลที่จะทำให้เกิดความเข้าใจถึงประสิทธิภาพของเลือดจระเข้ในทางการแพทย์ อันจะนำไปสู่การขยายความต้องการในการบริโภคและส่งเสริมอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์จากเลือดจระเข้ต่อไป

ตัวอย่างเลือดจระเข้น้ำจืดพันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*) ที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ fresh whole blood (FWB), freeze dried whole blood (DWB), fresh serum/plasma (FS/FP), and freeze dried serum/plasma (DS/DP) โดยนำมาศึกษาประสิทธิภาพในการกระตุ้นกระบวนการกลืนกิน (phagocytosis) ของแมโครเฟจ รวมทั้งการเพิ่มจำนวนและการหลั่ง IL-2 ของ human PBMC ผลการวิเคราะห์ประสิทธิภาพของกระบวนการกลืนกินของแมโครเฟจ (RAW 264.7) พบว่า เลือดจระเข้ทุกประเภทที่ใช้ทดสอบ ยกเว้น FWB สามารถกระตุ้นให้ RAW 264.7 มีประสิทธิภาพในการกลืนกินแบคทีเรีย ทั้งชนิดแกรมบวก (*S. aureus*) และแกรมลบ (*E. coli*) เพิ่มสูงขึ้น โดยประสิทธิภาพการกลืนกิน *E. coli* เพิ่มสูงกว่าการกลืนกิน *S. aureus* เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งพบว่า RAW 264.7 มีการกลืนกิน *E. coli* เพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุมประมาณ 2-9 เท่า ในขณะที่การกลืนกิน *S.*

aureus เพิ่มขึ้น 1.5-3 เท่า และในบรรดาผลิตภัณฑ์เลือดจระเข้ที่ใช้ทดสอบพบว่า 10 mg/ml DS/DP มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นกระบวนการกลืนกินของเซลล์มากที่สุด โดยมีค่า phagocytic index ต่อ *S. aureus* เท่ากับ 505 ± 100 และ ต่อ *E. coli* เท่ากับ 387 ± 118 โดยค่าดังกล่าวของกลุ่มควบคุมเท่ากับ 163 ± 47 และ 41± 8 ตามลำดับ และเมื่อใช้แบคทีเรียที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงในการทดสอบ และวิเคราะห์ด้วย flow cytometer สามารถตรวจพบฤทธิ์ของเลือดจระเข้ในการเพิ่มประสิทธิภาพของการะบวนการกลืนกินของเซลล์ได้เช่นกัน นอกจากนี้ เมื่อใช้ TransFluoSpheres fluorescent microspheres แทนการใช้แบคทีเรียพบว่าเลือดจระเข้ทุกประเภท ยกเว้น FWB ช่วยให้เซลล์สามารถกลืนกินอนุภาค microspheres ได้เพิ่มขึ้น 2 ถึง 3 เท่า เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และเลือดจระเข้จะมีประสิทธิภาพในการกระตุ้นกระบวนการกลืนกินลดลงเมื่อนำไป heat inactivate ก่อนการทดสอบ สำหรับการวิเคราะห์ฤทธิ์ในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของ PBMC ของมนุษย์ด้วยการวัดระดับ BrdU ที่ถูกนำไปสร้าง DNA ภายในเซลล์นั้น พบว่าทั้ง FS และ DS สามารถกระตุ้นให้ PBMC มีการเพิ่มจำนวน ถึงแม้ว่าเลือดจระเข้จะเป็นพิษต่อเซลล์ในความเข้มข้นที่สูง โดยระดับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นจาก 3.12% FS และ 3.12 mg/ml DS มีค่าใกล้เคียงกับระดับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นจาก 0.8 μg/ml PHA ซึ่งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ระดับนี้อาจทำให้ตรวจพบปริมาณ IL-2 ที่หลั่งจาก lymphocyte ในระดับต่ำ แต่อย่างไรก็ตามยังต้องมีการทดสอบที่แน่ชัดต่อไป

คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาคุณสมบัติของเลือดจระเข้ในการเสริมประสิทธิภาพกระบวนการกลืนกินของเซลล์ การกระตุ้นการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและการหลั่งไซโทไคน์ของ PBMC ดังกล่าวข้างต้น โดยพบว่าตัวอย่างเลือดจระเข้ชนิดซีรัมหรือพลาสมาระเหิดแห้งมีประสิทธิภาพสูงสุดในการเพิ่มประสิทธิภาพการกลืนกินของเซลล์ ทั้งการกลืนกินแบคทีเรียและการกลืนกินอนุภาค microspheres ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารออกฤทธิ์ที่สำคัญน่าจะเป็นส่วนประกอบของน้ำเลือดมากกว่าเม็ดเลือด โดยเกิดขึ้นได้ทั้งแบบที่อาศัยและไม่อาศัยกระบวนการ opsonization นอกจากนี้ซีรัมในปริมาณความเข้มข้นต่ำยังสามารถกระตุ้นให้ PBMC เพิ่มจำนวนได้อีกด้วย

Abstract

The immune system is a crucial defense mechanism of the body that fights infection. It is made up of a wide variety of effector cells and molecules. As parts of the immune system, phagocytes and lymphocytes have central roles in innate and adaptive immunity, respectively. Hence, appropriate stimulation of those cells in a certain circumstances will help the body to battle against harmful microbe.

Crocodiles are highly resistant to infectious disease, especially wound infection, despite their living in water filled with potentially harmful microorganisms. Recently, their blood has been hypothesized for being responsible for the immune privilege of crocodiles according to its antimicrobial property. Therefore, crocodile blood has been very popular in many Asian countries as a dietary supplement and an alternative medicine. Studies on crocodile immune system discovered antimicrobial peptides and complement that can kill bacteria, virus, and fungi. However, none of these studies has been focused on the effect of these factors on human immune cells. Therefore, the aim of this study was to assess the ability of Siamese crocodile blood to promote phagocytosis of macrophage, proliferation and IL-2 production of human PBMC. These research data obtained will provide basic information critical to development of medicinal crocodile blood products which will benefit the Thai crocodile raiser and Thailand's economy.

In the present study, blood isolated from *Crocodylus siamensis* was prepared into 4 groups of specimen; fresh whole blood (FWB), freeze dried whole blood (DWB), fresh serum/plasma (FS/FP), and freeze dried serum/plasma (DS/DP). Furthermore, the abilities of these prepared blood products to induce phagocytic activity of macrophage, cell proliferation, and cytokine secretion from human PBMC were investigated. The results showed that all types of crocodile blood except FWB were able to increase the ability of macrophage (RAW 264.7) to phagocytose both gram positive (*S. aureus*) and gram negative bacteria (*E. coli*). All of these crocodile blood samples had a higher capability to induce phagocytosis of gram negative bacteria more than that of gram positive counterpart as compared to control groups, ranging from 2- to 9- and 1.5- to 3- fold increases, respectively. Furthermore, 10 mg/ml DS/DP possessed the most efficient sample with phagocytic index of 505 ± 100 for *S. aureus* and 387 ± 118 for *E. coli* compared to control groups which were 163 ± 47 and 41± 8, respectively. An increment of

phagocytosis was also observed with flow cytometer when fluorescent bacteria were used. In addition, a 2- to 3-fold increase in phagocytic index was detected in cells incubated with all crocodile blood samples except FWB when TransFluoSpheres fluorescent microspheres were used as a replacement for the bacteria. Moreover, the effect of crocodile blood on phagocytic activity of RAW 264.7 was reduced after blood samples were heat inactivated. In the BrdU incorporated cell proliferation assay, the results showed that both FS and DS had capacity to stimulate human PBMC proliferation despite their toxicity at high concentration. The levels of proliferation induced by 3.12% FS and 3.12 mg/ml DS were comparable to those induced by 0.8 μg/ml PHA. At this level of cell proliferation, it was assumed that IL-2 may not be involved in the reaction. However, the definite results will be further examined.

We are presently investigating the abilities of crocodile blood product to induce phagocytic activity of macrophage, cell proliferation, and cytokine secretion from human PBMC. The results show that crocodile blood especially freeze dried serum/plasma is the most efficient blood product for induction of macrophage phagocytosis. This effect is possibly caused by the substances inside the serum rather than the blood cells. The possible mechanisms may involve both opsonin-dependent or independent. Furthermore, low concentration of fresh or dried serum is able to trigger human PBMC proliferation.

บทนำ

มนุษย์ต้องสัมผัสกับจุลชีพก่อโรคจากสิ่งแวดล้อมตลอดเวลา แต่จุลชีพเหล่านั้นจะสามารถก่อโรคได้หรือไม่นั้นขึ้นอยู่กับศักยภาพในการก่อโรคของจุลชีพ (virulence) และการต่อสู้ของระบบภูมิคุ้มกัน (immune system) ของร่างกาย นอกจากนี้การเกิดโรคไม่ติดต่ออื่น ๆ เช่น มะเร็ง (cancer) ภูมิแพ้ (allergy) และภูมิคุ้มกันต้านตนเอง (autoimmune disease) ยังเกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่ที่เป็นปกติของระบบภูมิคุ้มกัน ดังนั้นการเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้นจึงเป็นสิ่งสำคัญที่จะช่วยให้ร่างกายปลอดจากโรคต่าง ๆ เหล่านี้

จระเข้เป็นสัตว์เลื้อยคลานที่มีความต้านทานต่อโรคติดเชื้ออย่างมาก นอกจากนี้เมื่อเกิดบาดแผลแล้วสามารถเกิดการสมานแผลได้อย่างรวดเร็ว ถึงแม้บาดแผลนั้นจะใหญ่และลึกหรือถึงขั้นสูญเสียอวัยวะบางส่วน จระเข้ก็ยังสามารถอาศัยอยู่ในน้ำที่มีจุลชีพชนิดต่าง ๆ โดยเฉพาะแบคทีเรียและราอาศัยอยู่มากมายโดยไม่มีการติดเชื้อ (Siruntawineti *et al*., 2003, 2004; Merchant *et al*., 2005) แสดงว่าจระเข้มีระบบภูมิคุ้มกันที่มีประสิทธิภาพมากในการต้านทานจุลชีพเหล่านี้ ดังนั้นในหลายประเทศจึงมีผู้นิยมบริโภคเนื้อตลอดจนเลือดจระเข้จากความเชื่อที่ว่าสามารถทำให้มีภูมิคุ้มกันต่อโรคติดเชื้อและป้องกันโรคภูมิแพ้ เป็นต้น

มีผู้ศึกษาองค์ประกอบของเลือดจระเข้สายพันธุ์ต่าง ๆ เกี่ยวกับฤทธิ์ในการป้องกันการติดเชื้อ โดยพบฤทธิ์การทำลายจุลชีพโดยตรงจาก คอมพลีเมนท์ (complement) (วิน และคณะ, 2546; Siruntawineti *et al*., 2003, 2004; Merchant *et al*., 2003; Merchant and Britton, 2006; Merchant *et al*., 2005) เพพไทด์ต้านจุลชีพ (anti-microbial peptide) (Merchant *et al*., 2005) และสารสกัดจากเม็ดเลือดขาว (leukocyte extracts) (Merchant *et al*., 2006; สุวิทย์ และสมปอง, 2550) เป็นต้น โดยเฉพาะการศึกษาฤทธิ์ของคอมพลีเมนท์ในเลือดจระเข้อเมริกัน (*Alligator mississippiensis*) เปรียบเทียบกับคอมพลีเมนท์จากเลือดมนุษย์ พบว่าคอมพลีเมนท์จากเลือดจระเข้มีประสิทธิภาพในการกำจัดแบคทีเรียได้หลากหลายชนิด และสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้มากกว่าเลือดมนุษย์ถึง 10 เท่า (Merchant *et al*., 2003) นอกจากนี้จากการศึกษาในจระเข้พันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*) พบประสิทธิภาพของซีรัมจระเข้น้ำจืดพันธุ์ไทยในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ซึ่งฤทธิ์ของคอมพลีเมนท์ในซีรัมเลือดจระเข้พันธุ์ไทยมีมากกว่าในซีรัมของคนประมาณ 2-3 เท่า (วิน และคณะ, 2546; Siruntawineti *et al*., 2003, 2004) นอกจากคอมพลีเมนท์จะสามารถทำลายจุลชีพโดยตรงจากการทำให้เซลล์แตกทำลายแล้ว ยังสามารถกระตุ้นกระบวนการกลืนกิน (phagocytosis) ของแมโครเฟจ (macrophage) ผ่านรีเซปเตอร์ของคอมพลีเมนท์ (complement receptor, CR) บนผิวเซลล์ (Campagne *et al*, 2007) นอกจากนี้จระเข้สามารถสร้างภูมิคุ้มกันปรับใช้

(adaptive immunity) เมื่อมีการติดเชื้อ (Brown *et al*., 2001) ดังนั้นในเลือดจระเข้น่าจะมีสารน้ำอื่น ๆ เช่น ไซโทไคน์ (cytokine) ที่ควบคุมการทำหน้าที่ของเซลล์ของภูมิคุ้มกันปรับใช้รวมอยู่ด้วย อย่างไรก็ตามยังไม่มีบทความวิจัยที่แสดงถึงฤทธิ์ของเลือดจระเข้ที่มีผลต่อการทำหน้าที่ของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์ ดังนั้นการศึกษาผลของเลือดจระเข้ต่อประสิทธิภาพการกลืนกินของแมโครเฟจ ซึ่งเป็นหน้าที่ที่สำคัญของภูมิคุ้มกันแต่กำเนิด (innate immunity) และผลต่อการทำหน้าที่ของลิมโฟไซต์ซึ่งเป็นศูนย์กลางของภูมิคุ้มกันปรับใช้จะเป็นข้อมูลสนับสนุนการบริโภคเลือดจระเข้เพื่อสร้างภูมิต้านทานต่อไป

คณะผู้วิจัยเห็นว่าควรมีการศึกษาฤทธิ์ของเลือดและผลิตภัณฑ์จากเลือดจระเข้พันธุ์ไทย ในกระกระตุ้นเม็ดเลือดขาวในการทำหน้าที่ต่าง ๆ ได้แก่ กระบวนการกลืนกิน (phagocytosis) การเพิ่มจำนวน (proliferation) และการหลั่งสารไซโทไคน์ โดยมีกรอบแนวคิดจากสมมติฐานที่ว่าภายในเลือดจระเข้มีคอมพลีเมนท์ซึ่งช่วยในกระบวนการกลืนกินและสารน้ำอื่น ๆ ในระบบภูมิคุ้มกันที่สามารถกระตุ้นการทำงานของเม็ดเลือดขาว ซึ่งส่งผลให้ระบบภูมิคุ้มกันสามารถทำงานประสานกันได้อย่างดี ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยนี้จะเป็นความรู้พื้นฐานที่ช่วยส่งเสริมให้เกิดความรู้ และความเข้าใจถึงประสิทธิภาพของเลือดจระเข้ในทางการแพทย์ อันจะนำไปสู่การขยายความต้องการในการบริโภคและส่งเสริมอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์จากเลือดจระเข้ต่อไป

โครงการนี้มีความสำคัญสืบเนื่องมาจากสมาชิกในกลุ่มคณะผู้วิจัยมีศักยภาพในการผลิตผลิตภัณฑ์จากเลือดจระเข้ในเชิงพาณิชย์ ซึ่งข้อมูลจากการวิจัยนี้จะช่วยสนับสนุนให้มีการบริโภคผลิตภัณฑ์จากเลือดจระเข้กันอย่างกว้างขวางมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาค้นคว้าในระดับลึกต่อไป ก่อให้เกิดประโยชน์ต่อการจดสิทธิบัตรให้กับประเทศ อีกทั้งเพิ่มศักยภาพในการแข่งขันกับต่างประเทศที่สามารถผลิตผลิตภัณฑ์จากเลือดจระเข้ได้เช่นกัน

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันเริ่มจากภูมิคุ้มกันแต่กำเนิดซึ่งนอกจากจะประกอบด้วยผิวหนัง และเยื่อเมือก (mucus membrane) แล้วยังมีส่วนประกอบที่เป็นเซลล์และสารน้ำต่าง ๆ เซลล์ที่สำคัญในภูมิคุ้มกันแต่กำเนิดคือฟาโกไซต์ ซึ่งทำลายจุลชีพและสิ่งแปลกปลอมด้วยกระบวนการกลืนกิน ส่วนสารน้ำที่มีความสำคัญได้แก่ คอมพลีเมนท์ เอนไซม์ (enzyme) เช่น ไลโซไซม์ (lysozyme) เพพไทด์ต้านจุลชีพ เช่นดีเฟนซิน (defensin) โปรตีนยึดเหนี่ยวจุลชีพ (microbial binding protein) เช่น โปรตีนยึดเหนี่ยวแมนโนส (manose-binding protein) เป็นต้น เซลล์และสารน้ำเหล่านี้จะมีการทำงานที่ประสานกันซึ่งอาจทำให้เกิดกระบวนการอักเสบ (inflammation) ซึ่งจะ

ช่วยป้องกันการแพร่กระจายและทำลายจุลชีพในที่สุด โดยทั่วไปแล้วบุคคลที่มีสุขภาพดีจะสามารถกำจัดจุลชีพส่วนใหญ่ที่เข้าสู่ร่างกายได้ภายในเวลา 2-3 วัน ด้วยภูมิคุ้มกันแต่กำเนิดโดยปราศจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันปรับใช้ แต่เมื่อใดที่จุลชีพสามารถผ่านระบบภูมิคุ้มกันแต่กำเนิดไปได้จึงจะมีการกระตุ้นภูมิคุ้มกันปรับใช้ ซึ่งประกอบด้วยเซลล์ที่สำคัญคือลิมโฟไซต์ และสารน้ำต่าง ๆ ได้แก่ ไซโทไคน์ และแอนติบอดี (Goldsby *et al*., 2002; Abbas and Litchtman, 2004; Janeway *et al*., 2005)

ภูมิคุ้มกันแต่กำเนิดเป็นภูมิคุ้มกันที่มีวิวัฒนาการมาช้านานพบได้ทั้งในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (invertebrate) และสัตว์มีกระดูกสันหลัง (vertebrate) สำหรับภูมิคุ้มกันปรับใช้พบเฉพาะในสัตว์มีกระดูกสันหลังตั้งแต่ปลากระดูกอ่อน (cartilaginous fish) จนถึงมนุษย์ (Salzet, 2001; Kasahara *et al*., 2004)

การประเมินประสิทธิภาพการทำหน้าที่ของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันโดยทั่วไปสามารถทำได้ในหลอดทดลอง (*in vitro*) เนื่องจากฟาโกไซต์เป็นเซลล์ที่สำคัญของภูมิคุ้มกันแต่กำเนิด ดังนั้นการวัดประสิทธิภาพของกระบวนการกลืนกิน จึงสามารถบ่งชี้ถึงการทำหน้าที่ส่วนหนึ่งของระบบภูมิคุ้มกันแต่กำเนิดได้ สำหรับภูมิคุ้มกันปรับใช้นั้นสามารถประเมินได้จากการทำหน้าที่ของลิมโฟไซต์ ซึ่งเป็นเซลล์ที่แยกได้จากเลือด กระบวนการแรกที่เกิดขึ้นเมื่อลิมโฟไซต์ได้รับการปลุกฤทธิ์คือการเพิ่มจำนวนซึ่งเป็นกระบวนการที่อยู่ในระยะเหนี่ยวนำ (induction phase) จากนั้นเซลล์จะมีการเปลี่ยนแปลง (differentiation) และเข้าสู่ระยะปฏิบัติการ (effector phase) ซึ่งลิมโฟไซต์จะแสดงหน้าที่ตามแต่ชนิดของลิมโฟไซต์ การประเมินการทำหน้าที่ของ $CD4^+$ T cell สามารถทำได้โดยการวัดปริมาณไซโทไคน์ที่เซลล์สังเคราะห์และหลั่งออกจากเซลล์ การทำหน้าที่ของ $CD4^+$ T cell นี้มีความสำคัญอย่างยิ่งเนื่องจากเป็นเซลล์ที่ผลิตไซโทไคน์ส่วนใหญ่ของร่างกาย ไซโทไคน์เหล่านี้ทำหน้าที่ควบคุมเซลล์อื่น ๆ ในระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ บีลิมโฟไซต์ $CD8^+$ T cell แมโครเฟจ เซลล์เอ็นเค (NK cell) เป็นต้น (Goldsby *et al*., 2002; Abbas and Litchtman, 2004; Janeway *et al*., 2005)

การศึกษาทางวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ของเลือดจระเข้ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันนั้นส่วนใหญ่เป็นรายงานในจระเข้สายพันธุ์อื่นที่ไม่ใช่จระเข้สายพันธุ์ไทย และมีปริมาณงานวิจัยไม่มากนัก อย่างไรก็ตามจากการศึกษาเหล่านี้พบฤทธิ์ต้านจุลชีพในซีรัม (วิน และคณะ, 2546; Siruntawineti *et al*., 2003, 2004) และสารสกัดจากเม็ดเลือดขาวจากเลือดจระเข้ (Merchant *et al*., 2006; สุวิทย์ และสมปอง, 2550) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านจุลชีพหลายชนิด ทั้งแบคทีเรีย เช่น *Salmonella*, *Shigella* และ *Escherichia coli* (Merchant *et al*, 2006a, Merchant *et al*, 2003) ไวรัส เช่น Human immunodeficiency virus type 1, Herpes simplex virus และ West Nile virus (Merchant *et al*., 2005) รา เช่น *Candida* (Merchant *et al*, 2006b) และอะมีบา (amoeba) (Merchant *et al*, 2004) นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียก่อโรค เช่น *Salmonella* อาศัยอยู่ที่อวัยวะภายในของจระเข้โดยไม่ก่อโรค

(Madsen *et al*., 1998) แสดงว่าจระเข้มีระบบภูมิคุ้มกันที่มีประสิทธิภาพสูง นอกจากนี้ได้มีผู้จดสิทธิบัตรเกี่ยวกับคุณสมบัติของเลือดจระเข้ในการต้านมะเร็ง ซึ่งได้อ้างถึงโปรตีนหรือโพลีเพพไทด์ (polypeptide) ที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งแต่ไม่มีพิษต่อเซลล์ปกติ (Binah *et al*., 2004) และจากคุณสมบัตินี้ได้มีผู้จดสิทธิบัตรการผลิตยาเม็ดรักษามะเร็งเม็ดเลือดขาว (leukemia) และมะเร็งชนิดอื่น ๆ อีกด้วย (Linghua, 2004) อย่างไรก็ตามมีความเป็นไปได้ที่เลือดจระเข้ยังมีสารน้ำอื่น ๆ ของระบบภูมิคุ้มกัน ที่เมื่อบริโภคเข้าไปแล้วสามารถช่วยควบคุมการทำหน้าที่ของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น แต่ยังไม่มีผู้ทำการศึกษาผลของส่วนประกอบจากเลือดจระเข้ต่อเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันอย่างละเอียด

ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

1. วัตถุดิบและสารเคมี

1.1 เลือดจระเข้ จระเข้น้ำจืดพันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*) อายุ 2-4 ปี ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่รุ่งทวีชัยฟาร์ม (31 หมู่ 9 ต. สามง่าม อ. ดอนตูม จ. นครปฐม)

1.2 แบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Escherichia coli* ATCC 25922 จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

1.3 TransFluospheres fluorescent microshperes จาก Molecular probes, USA

1.4 เซลล์เพาะเลี้ยง RAW 264.7 จาก ATCC, USA

1.5 Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) จาก Roche Diagnostics, Germany

1.6 Human IL-2 ELISA development kit จาก Preprotech, USA

1.7 Culture medium, FCS, antibiotic และ trypsin จาก Hyclone, USA

1.8 FACSflow, FACSclean และ FACSrinse จาก BD bioscience, USA

1.9 Cell culture plate และ flask จาก Cornning, USA

1.10 สารเคมีและวัสดุอื่น ๆ เช่น FITC, Histopaque-1077, DMSO, Gram stain, permount จาก Sigma-Aldrich, USA และ Fisher-Scientific, USA

2. วิธีการวิจัย

2.1 การเก็บตัวอย่างเลือดจระเข้

จระเข้น้ำจืดพันธุ์ไทย *(Crocodylus siamensis)* ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง อายุ 2-4 ปี ก่อนเข้ารับการชำแหละที่ฟาร์มเพาะเลี้ยงจระเข้เอกชน (รุ่งทวีชัยฟาร์ม 31 หมู่ 9 ต. สามง่าม อ. ดอนตูม จ. นครปฐม) ทำการจดบันทึกข้อมูลจระเข้ที่สำคัญเพื่อใช้ประกอบการวิเคราะห์ผลการศึกษา เช่น เพศ อายุ และข้อมูลการเลี้ยงจากแบบสอบถามที่ได้จากฟาร์มเพาะเลี้ยงจระเข้ ทำการเจาะเลือดจระเข้ที่บริเวณแอ่งเลือดดำ หลังกะโหลกศีรษะ (anterior dorsal sinus) โดยใช้กระบอกฉีดยาพร้อมเข็มขนาด 18G ความยาว 1 ½ นิ้ว เจาะเลือดปริมาตร 20 มิลลิลิตรต่อตัว แบ่งใส่หลอดเก็บเลือด เพื่อเตรียมตัวอย่างประเภทต่างๆ

2.2 การเตรียมตัวอย่างเลือดจระเข้ แบ่งตัวอย่างเลือดเป็น 3 ประเภท คือ

2.2.1 เลือดครบจระเข้ เจาะเก็บเลือดจระเข้ทั้งชนิดที่มีสารกันเลือดแข็งชนิดเฮปพาริน (Lithium Heparin) (VACUETTE, greiner bio-one, บริษัท กรุงเทพอินเตอร์โปรดักส์ จำกัด) และชนิดที่ไม่มีสารกันเลือดแข็ง ผสมเลือดให้เข้ากันแล้วเก็บรักษาสภาพในกล่องโฟมที่บรรจุน้ำแข็งอยู่ภายใน แล้วแบ่งเลือดใส่ในหลอดขนาดเล็ก หลอดละ 1 มิลลิลิตร

2.2.1.1 ตัวอย่างเลือดครบสด (FWB) นำหลอดเลือดครบที่มีสารกันเลือดแข็ง เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C จนกว่าจะทำการวิเคราะห์ และเก็บไว้ไม่เกิน 7 วัน

2.2.1.2 ตัวอย่างเลือดครบสดทำแห้ง (DWB) นำหลอดเลือดครบที่ไม่มีสารกันเลือดแข็งมาแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 °C จากนั้นนำมาผ่านการระเหิดแห้งภายใต้ความเย็น (Freeze dry) ด้วยเครื่อง Freeze dryer (Lyophilization System, Inc., USA)* แล้วเก็บรักษาหลอดทดลองที่มีเลือดครบแห้งดังกล่าวที่อุณหภูมิ 4-5 °C เมื่อจะทำการทดสอบนำมาละลายด้วย RPMI ให้มีความเข้มข้น 100 mg/ml

2.2.2 ซีรัมจระเข้ นำตัวอย่างเลือดจระเข้ใส่ในหลอดเก็บเลือดที่มีตัวเร่งการแข็งตัว (Serum clot Activator) (VACUETTE, greiner bio-one, บริษัท กรุงเทพอินเตอร์โปรดักส์ จำกัด) ผสมเลือดให้เข้ากันแล้วเก็บรักษาสภาพในกล่องโฟมที่บรรจุน้ำแข็งอยู่ภายใน จากนั้นนำหลอดทดลองดังกล่าวมาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนที่เป็นซีรัม และเม็ดเลือดออกจากกัน โดยใช้ความเร็วของการปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทำการแยกส่วนซีรัมด้านบนใส่ในหลอดขนาดเล็ก หลอดละ 1 มิลลิลิตร

2.2.2.1 ตัวอย่างซีรัมสด (FS) นำหลอดซีรัมจากข้อ 2.2.2 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

2.2.2.2 ตัวอย่างซีรัมทำแห้ง (DS) นำหลอดซีรัมจากข้อ 2.2.2 มาแช่เยือกแข็ง ที่อุณหภูมิ -20°C จากนั้นนำมาผ่านการระเหิดแห้งภายใต้ความเย็น (Freeze dry) ด้วยเครื่อง Freeze

dryer (Lyophilization System, Inc., USA)* แล้วเก็บรักษาหลอดทดลองที่มีซีรัมแห้งดังกล่าว ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4-5 °C เมื่อจะทำการทดสอบนำมาละลายด้วย RPMI ให้มีความเข้มข้น 100 mg/ml

2.2.3 พลาสมาจระเข้ นำตัวอย่างเลือดจระเข้ใส่ในหลอดเก็บเลือดที่มีสารกันเลือดแข็งชนิดเฮปพาริน (Lithium Heparin) (VACUETTE, greiner bio-one, บริษัท กรุงเทพอินเตอร์โปรดักส์ จำกัด) ผสมเลือดให้เข้ากันแล้วเก็บรักษาสภาพในกล่องโฟมที่บรรจุน้ำแข็งอยู่ภายใน จากนั้นนำหลอดทดลองดังกล่าวมาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนที่เป็นพลาสมา และเม็ดเลือดออกจากกัน โดยใช้ความเร็วของการปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทำการแยกส่วนพลาสมาด้านบนใส่ในหลอดขนาดเล็ก หลอดละ 1 มิลลิลิตร

2.2.3.1 ตัวอย่างพลาสมาสด (FP) นำหลอดพลาสมาจากข้อ 2.2.3 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

2.2.3.2 ตัวอย่างพลาสมาทำแห้ง (DP) นำหลอดพลาสมาจากข้อ 2.2.3 มาแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20°C จากนั้นนำมาผ่านการระเหิดแห้งภายใต้ความเย็น (Freeze dry) ด้วยเครื่อง Freeze dryer (Lyophilization System, Inc., USA)* แล้วเก็บรักษาหลอดทดลองที่มีซีรัมแห้งดังกล่าว ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4-5°C เมื่อจะทำการทดสอบนำมาละลายด้วย RPMI ให้มีความเข้มข้น 100 mg/ml (*ขั้นตอนนี้ทำที่ ห้างหุ้นส่วน จำกัด วานิไทย ห้อง 602 ชั้น 6 อาคารวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์)

2.3 การเตรียมแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

2.3.1 การเพาะเลี้ยงและการเตรียมแบคทีเรีย

นำแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Escherichia coli* ATCC 25922 จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข มาเพาะเลี้ยงใน blood agar plate เพื่อขยายพันธุ์ เมื่อจะทำการทดสอบนำแบคทีเรียจาก blood agar plate มาเพาะเลี้ยงใน Muller-Hinton broth ที่ 37°C และเขย่านาน 2 ชั่วโมง เพื่อให้ได้ log-phase culture และนำมาหาความเข้มข้นของแบคทีเรีย โดยนำมาวัด OD_{625} เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของแบคทีเรียเท่ากับ 1 X 10^8 cells/ml

2.3.2 การติดฉลากแบคทีเรียด้วยสารเรืองแสง (Campbell *et al*., 1994)

นำแบคทีเรียที่ได้จาก 2.3.1 มาปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เพื่อแยกอาหารเลี้ยงเชื้อ นำแบคทีเรียละลายใน 0.1 mg/ml FITC/ 0.1 M $NaHCO_3$, pH 9.0 (Sigma-Aldrich, USA) บ่มที่ 25°C และเขย่าเป็นเวลา 60 นาที ในที่มืด เมื่อครบเวลาทำการปั่นล้างสารเรืองแสงส่วนเกินด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง และละลายแบคทีเรียที่ติดฉลากแล้วด้วย PBS ให้มีความเข้มข้นของแบคทีเรีย 1 X 10^8 cells/ml

2.4 การเตรียม TransFluoSpheres fluorescent microshperes

นำ TransFluospheres fluorescent microshperes (Molecular probes, USA) ชนิดที่มี excitation/emission ที่ 488/560 ขนาด 1.0 μm มาทำการ sonicate เป็นเวลา 3 นาที และนำมาเจือจางด้วย RPMI ให้มีความเข้มข้น 2 X 10^9 particles/ml ก่อนทำการทดสอบ

2.5 การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง

แยกเซลล์ RAW 264.7 (ATCC, USA) ซึ่งเป็นเซลล์แมคโครเฟจของหนู (*Mus musculus*) จากขวดเพาะเลี้ยงมาเพาะเลี้ยงใน 6 - well plate โดยมี cover slip รองที่ก้นหลุม ใน RPMI 1640 และ 10% fetal calf serum (FCS) โดยให้เซลล์มีความหนาแน่น 1 x 10^6 เซลล์ต่อหลุม ที่อุณหภูมิ 37 °C และ 5% CO_2 ก่อนการทดสอบเป็นเวลาประมาณ 18-24 ชั่วโมง

2.6 การทดสอบการทำหน้าที่ของแมคโครเฟจโดยกระบวนการกลืนกินของเซลล์ (*In vitro* phagocytosis)

2.6.1 การทดสอบฤทธิ์ของเลือดจระเข้ต่อกระบวนการกลืนกินของเซลล์แมคโครเฟจ (ดัดแปลงจาก Wan *et al*., 2007 และ Campbell *et al*., 1994)

เติมตัวอย่างเลือดจระเข้ชนิด 10% FWB และ 10% FS/FP หรือ 10 mg/ml DWB และ 10 mg/ml DS/DP หรือ PBS ลงในหลุมเซลล์เพาะเลี้ยงที่มี RAW 264.7 เกาะติดอยู่บน cover slip หลังจากนั้นเติม *S.aureus* หรือ *E.coli* โดยให้มีอัตราส่วนแบคทีเรีย:แมโครเฟจ = 10:1 นำเซลล์ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C และ 5% CO_2 เริ่มจาก 15 นาที จนถึง 3 ชั่วโมง เมื่อถึงกำหนดเวลานำ cover slip ออกจากถาดเพาะเลี้ยง และล้างด้วย iced cold PBS เพื่อเป็นการหยุดปฏิกิริยา ทิ้งไว้ให้แห้ง นำ cover slip ที่ได้มาย้อมด้วย Gram stain เพื่อให้สามารถมองเห็นแบคทีเรียได้ชัดเจน นำ cover slip ที่ย้อมสีเรียบร้อยแล้ว mount บนสไลด์แก้วด้วย permount (Fisher scientific, USA) แล้วนำมานับด้วยกล้องจุลทรรศน์เปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้ใส่เลือดจระเข้

คำนวณปริมาณ phagocytosis โดยใช้สูตร

Phagocytic index = (เปอร์เซ็นต์แมโครเฟจที่กลืนกินแบคทีเรีย) X (ค่าเฉลี่ยของจำนวนแบคทีเรียที่ถูกกลืนกินใน 1 เซลล์)

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ของเลือดจระเข้ต่อกระบวนการกลืนกินโดย flow cytometer ใช้แบคทีเรียที่ติดฉลากด้วย FITC โดยให้มีอัตราส่วนแบคทีเรีย:แมโครเฟจ = 10:1 หรือ TransFluospheres fluorescent microspheres โดยมีอัตราส่วน microspheres:แมโครเฟจ 20:1 นำเซลล์ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C และ 5% CO_2 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และนำเซลล์ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง flow cytometer โดยใช้โปรแกรม Cellquest (BD bioscience, USA) และวิเคราะห์โดยโปรแกรม Win MDI 2.9 (Trotter@Scripps.edu, USA)

2.6.2 การแยก peripheral blood mononuclear cells (PBMC)

เจาะเลือดอาสาสมัครปริมาณ 10 มิลลิลิตร นำมาแยก PBMC โดยใช้ Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, USA) ตามวิธีการที่บริษัทผู้ผลิตระบุ โดยค่อย ๆ หยดเลือดปริมาตร 3 มิลลิลิตร ให้เป็นชั้นเหนือ Histopaque ปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 400 X g, 25 $^{\circ}$C นาน 30 นาที ซึ่งจะทำให้ได้เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cell (PBMC) ซึ่งประกอบด้วยลิมโฟไซต์ ร้อยละ 85 ลอยเป็นชั้นอยู่ระหว่างพลาสมา และ Histopaque

2.6.3 การทดสอบฤทธิ์ของเลือดจระเข้ในการเพิ่มจำนวนของ PBMC (ดัดแปลงจาก Attanavanich and Kearney, 2004)

นำ PBMC จาก 2.6.3 มาเพาะเลี้ยงใน 96-well plate ใน RPMI 1640 ที่มี 10% FCS โดยให้มีความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 2 X 10^5 เซลล์ต่อหลุม เติม FS, DS หรือ Phytohemagglutinin (PHA) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ หรือ PBS ในแต่ละหลุมโดยทำการทดสอบซ้ำตัวอย่างละ 3 หลุม และบ่มไว้ในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C และ 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ทดสอบการเพิ่มจำนวนของเซลล์โดยใช้ Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) (Roche Diagnostics, Germany) ตามวิธีที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด โดยเติม 20 μM BrdU/well หลังจากที่เซลล์บ่มร่วมกับเลือดจระเข้, PHA หรือ PBS มาแล้วเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และบ่มที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ไว้เพื่อทดสอบหาปริมาณ IL-2 และนำถาดเพาะเลี้ยงมาอบให้แห้ง ตรึงเซลล์และใส่ anti-BrdU-peroxidase และบ่มที่ 25°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้าง ใส่ substrate บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที และนำไปอ่านการดูดกลืนแสงที่ 370 nm (reference wavelength 492 nm)

2.6.4 ทดสอบ toxicity ของเลือดจระเข้

เพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมกับเลือดจระเข้ หรือ PHA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ หรือ PBS โดยบ่มไว้ในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C และ 5% CO_2 เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำเซลล์มาย้อมด้วย 2 μg/ml propidium iodide และนำไปวิเคราะห์โดย flow cytometer

2.6.5 การทดสอบการหลั่งอินเทอร์ลิวคิน 2

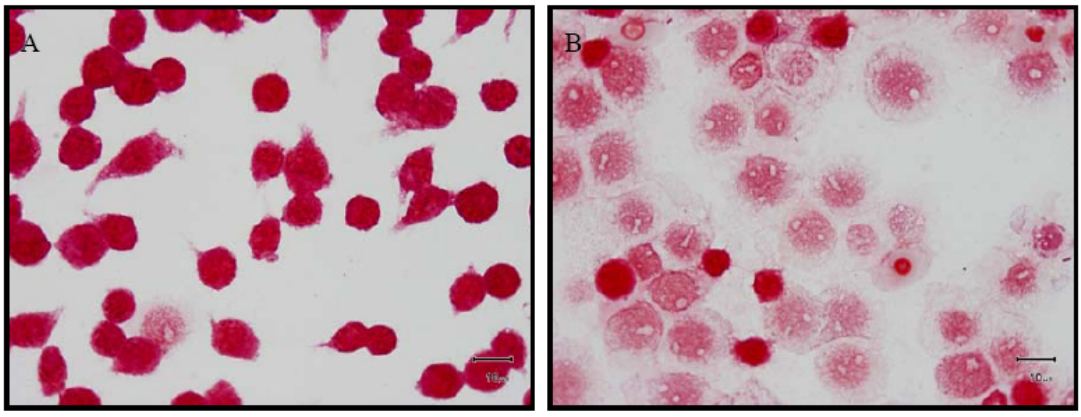
นำ supernatant ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง PBMC ร่วมกับ FS, DS, PHA หรือ PBS มาวัดปริมาณ IL-2 ที่เซลล์เม็ดเลือดขาวผลิตออกมาโดยใช้ human IL-2 ELISA development kit ซึ่งใช้หลักการของ sandwich ELISA และนำไปอ่านการดูดกลืนแสงที่ 405 nm (reference wavelength 650 nm)

ผลการวิจัย

1. ฤทธิ์ของเลือดจระเข้ในการเพิ่มประสิทธิภาพการกลืนกินของเซลล์แมคโครเฟจ (RAW 264.7)

1.1 การเปลี่ยนแปลงของ RAW 264.7 เมื่อสัมผัสกับเลือดจระเข้

เติมตัวอย่างเลือดจระเข้ชนิด 10% FWB, 10% FS, 10% FP, 10 mg/ml DWB หรือ 10 mg/ml DS ลงในหลุมเซลล์เพาะเลี้ยงที่มี RAW 264.7 บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลานำเซลล์มาย้อมสี และตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากการทดสอบพบว่าเซลล์ที่บ่มร่วมกับตัวอย่างเลือดจระเข้ทุกชนิดมีการเปลี่ยนแปลง โดยเซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้น ติดสีจาง มี chromatin ที่หลวมขึ้น และเห็น nucleolus ชัดเจน (ภาพที่ 1) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้เกิดขึ้นกับเซลล์ประมาณ 20 – 60 % ของเซลล์ทั้งหมด (ตารางที่ 1)



ภาพที่ 1 การเปลี่ยนแปลงของ RAW 264.7 หลังจากบ่มร่วมกับ fresh whole blood (FWB) RAW 264.7 บ่มร่วมกับ FWB เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (B) เปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม (control RAW 264.7) (A) (100X)

ตารางที่ 1: ร้อยละของ RAW 264.7 ที่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อสัมผัสกับตัวอย่างเลือดจระเข้

เวลา (ชั่วโมง)	FWB	DWB	FS	FP	DS
1	53	60	17	66	41
2	74	61	26	66	51

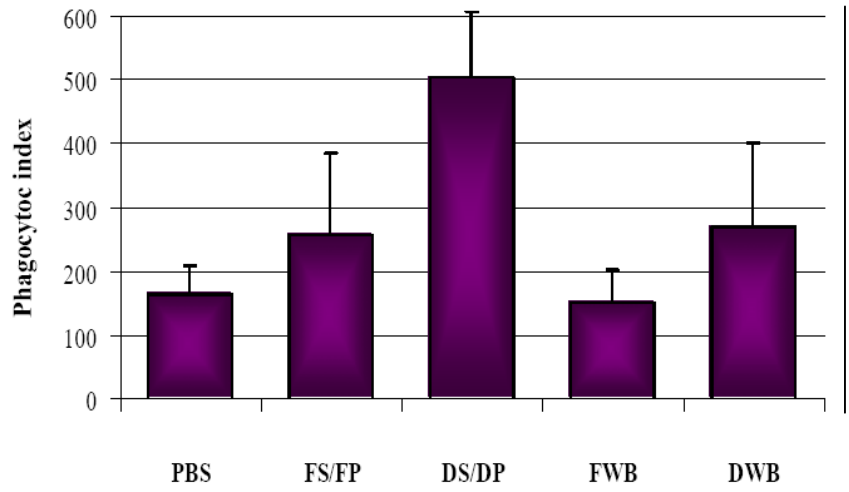
1.2 การทดสอบฤทธิ์ของเลือดจระเข้ในการกระตุ้นกระบวนการกลืนกินของ RAW 264.7

เซลล์ได้รับการกระตุ้นด้วยเลือดจระเข้ประเภทต่าง ๆ ได้แก่ 10% FS/FP, 10% FWB, 10 mg/ml DS/DP, และ 10 mg/ml DWB และบ่มร่วมกับแบคทีเรียชนิดแกรมบวก คือ *S. aureus* และแกรมลบ คือ *E. coli* ทำการวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียที่ถูก phagocytosis ด้วยการย้อมสี Gram stain นับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และนำค่าที่ได้มาคำนวณค่า phagocytic index (ภาพที่ 2-3) หรือวิเคราะห์ปริมาณของแบคทีเรียที่ถูกกลืนกินโดยใช้ flow cytometer เมื่อใช้แบคทีเรียที่ติดฉลากด้วย FITC ในการทดสอบ (ภาพที่ 4) จากการศึกษาพบว่า เซลล์ที่บ่มร่วมกับตัวอย่างเลือดจระเข้ ประเภท 10% FS/FP, 10 mg/ml DS/DP และ 10 mg/ml DWB มี Phagocytic index ของ *S. aureus* (255 ± 128, 505 ± 100 และ 268 ± 131 ตามลำดับ) และ *E. coli* (338 ± 17, 387 ± 118 และ 101 ± 34 ตามลำดับ) มากกว่าเซลล์ควบคุมที่ไม่มีเลือดจระเข้ (162 ± 46 และ 41 ± 7 ตามลำดับ) โดยตัวอย่างเลือดเกือบทุกประเภทโดยเฉพาะ 10 mg/ml DS/DP มีค่า Phagocytic index สูงกว่ากลุ่มควบคุมมากที่สุด (ประมาณ 3-9 เท่า) (ภาพที่ 2) และเลือดจระเข้มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการกลืนกิน *E. coli* มากกว่า *S. aureus* โดยพบว่า RAW 264.7 มีการกลืนกิน *E. coli* เพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุมประมาณ 2-9 เท่า ในขณะที่การกลืนกิน *S. aureus* เพิ่มขึ้น 1.5-3 เท่า (ภาพที่ 2) และเมื่อใช้แบคทีเรียที่ติดฉลากด้วย FITC มาทำการทดสอบ และวิเคราะห์ด้วย flow cytometer พบว่าเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย 10% FS มีประสิทธิภาพในการกลืนกินแบคทีเรียได้มากขึ้น ทั้ง *S. aureus* และ *E. coli* (ภาพที่ 4)

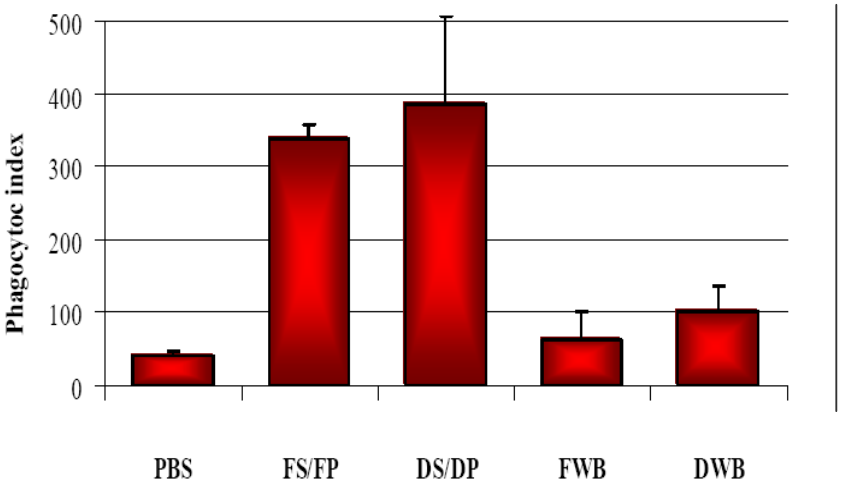
ฤทธิ์ในการกระตุ้นกระบวนการกลืนกินจะลดน้อยลงเมื่อนำเลือดจระเข้ไปทำ heat inactivation ที่ $56^{\circ}C$ เป็นเวลา 30 นาที (ไม่ได้แสดงผล) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าในซีรัมของเลือดจระเข้มี heat labile protein โดยเฉพาะอย่างยิ่งคอมพลีเมนท์ (complement) ที่มีส่วนส่งเสริมกระบวนการกลืนกินของเซลล์ โดยทำหน้าที่เป็น opsonin หรือ anti-microbial peptide ที่มีฤทธิ์ bactericidal หรือ bacteriostasis ช่วยให้แบคทีเรียไม่สามารถเพิ่มจำนวนและมีส่วนส่งเสริมให้เซลล์กลืนกินแบคทีเรียได้ง่ายขึ้น

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ของเลือดจระเข้ประเภท 10% FWB พบว่าเลือดจระเข้ประเภทนี้สามารถทำให้ RAW 264.7 เพิ่มประสิทธิภาพการกลืนกินแบคทีเรียได้เล็กน้อยหรือไม่ได้เลย เนื่องจากเม็ดเลือดแดงในตัวอย่างที่ยังคงสภาพและตกตะกอนครอบคลุมเซลล์ RAW 264.7 ที่บริเวณก้นหลุม ทำให้บดบังการสัมผัสกันระหว่างแบคทีเรียและเซลล์

A.



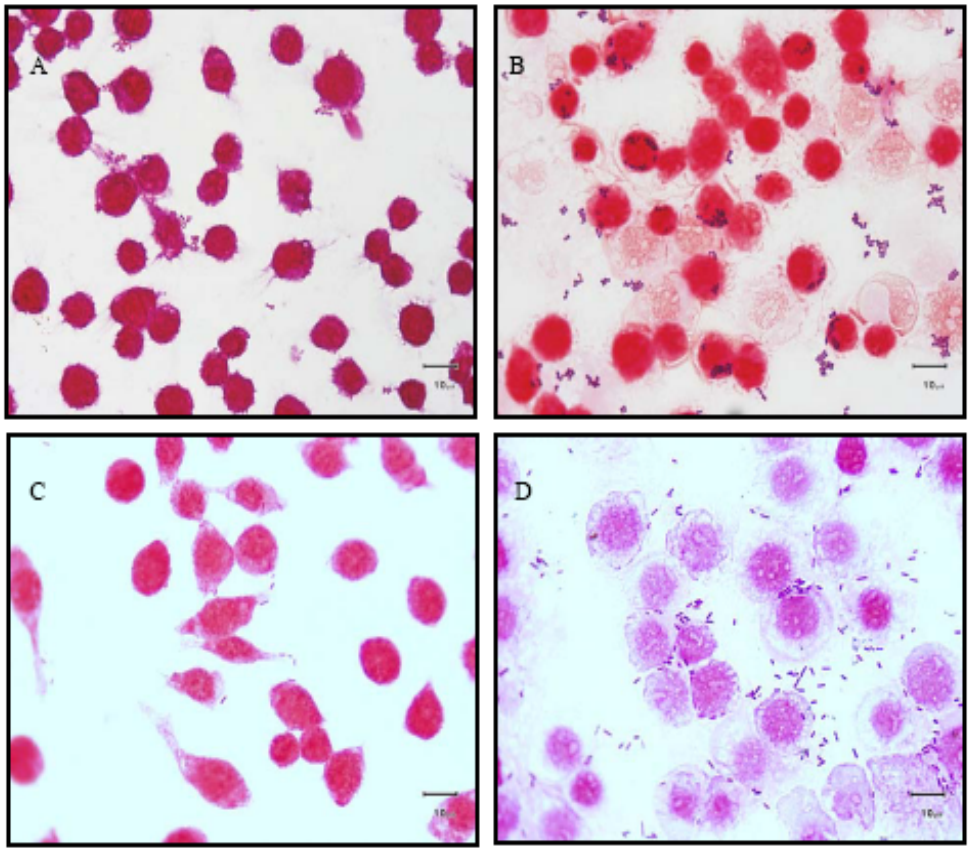
B.



ภาพที่ 2 กราฟแสดง Phagocytic index ของ RAW 264.7 ที่ได้จากการกลืนกิน *S. aureus* และ *E. coli* เมื่อบ่มร่วมกับเลือดจระเข้

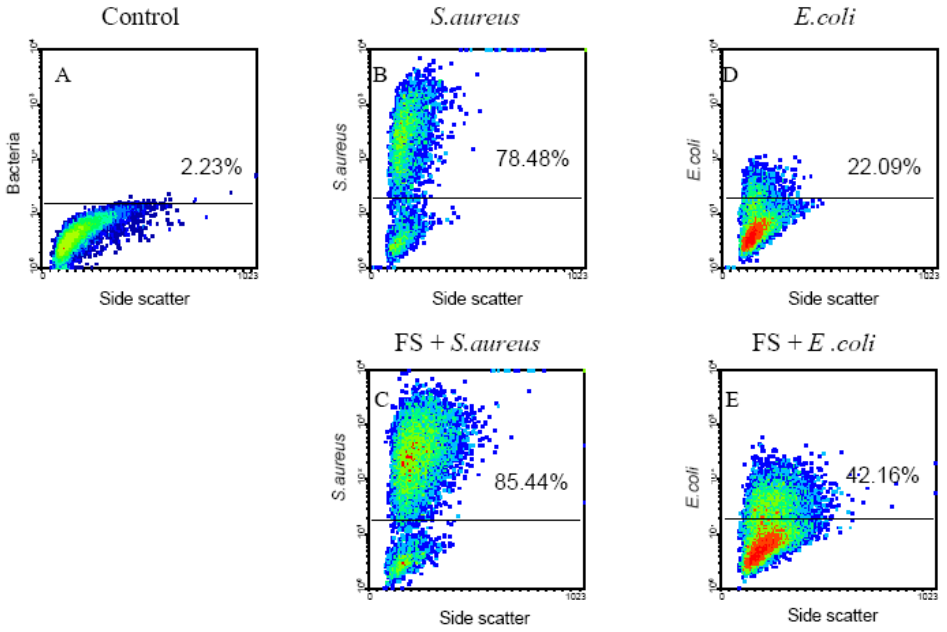
RAW 264.7 ได้รับการกระตุ้นด้วย 10% fresh whole blood (FWB), 10% fresh serum/fresh plasma (FS/FP), 10 mg/ml dried whole blood (DWB), 10 mg/ml dried serum/dried plasma (DS/DP) หรือ PBS และบ่มร่วมกับ *S .aureus* **(A)** หรือ *E .coli* **(B)** โดยมีอัตราส่วนแบคทีเรีย:แมโครเฟจ = 10:1 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำเซลล์มาย้อมสี Gram stain แล้วนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยปริมาณ phagocytosis คำนวณจาก

Phagocytic index = (เปอร์เซ็นต์แมโครเฟจที่กลืนกินแบคทีเรีย) X (ค่าเฉลี่ยของจำนวนแบคทีเรียที่ถูกกลืนกินใน 1 เซลล์)



ภาพที่ 3 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงการกลืนกิน *S. aureus* และ *E. coli* ของ RAW 264.7 เมื่อบ่มร่วมกับเลือดจระเข้

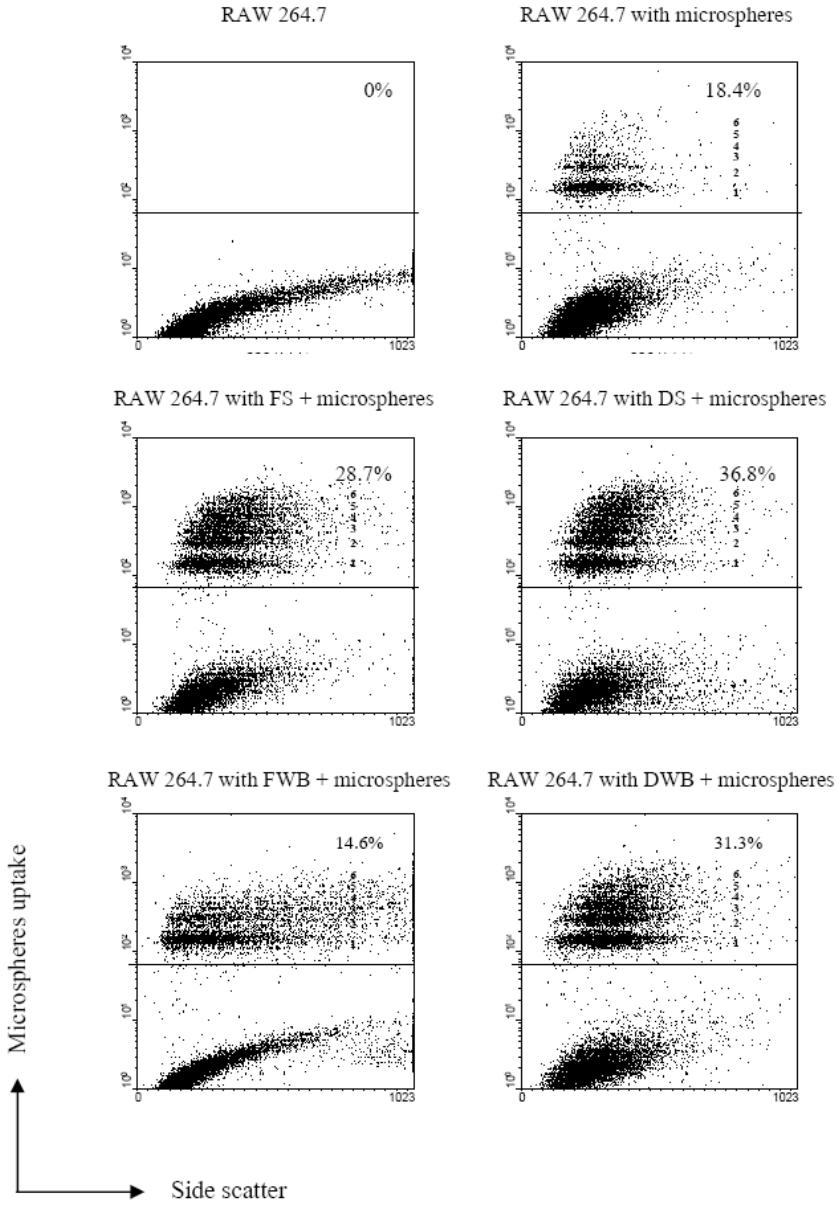
RAW 264.7 ได้รับการกระตุ้นด้วย 10% FS (**B** และ **D**) หรือ PBS (**A** และ **C**) และบ่มร่วมกับ *S. aureus* (**A** และ **B**) หรือ *E. coli* (**C** และ**D**) โดยมีอัตราส่วนแบคทีเรีย:แมโครเฟจ = 10:1 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ย้อมด้วย Gram stain และถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100X



ภาพที่ 4 Density plot แสดงการกลืนกิน *S. aureus* และ *E. coli* ของ RAW 264.7 RAW 264.7 ได้รับการกระตุ้นด้วย 10% fresh serum (FS) (**C** และ **E**) หรือ PBS (B และ D) และบ่มร่วมกับ *S. aureus*-FITC (**B** และ **C**) หรือ *E. coli*-FITC (**D** และ **E**) โดยมีอัตราส่วนแบคทีเรีย:แมโครเฟจ = 10:1 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และวิเคราะห์ด้วย flow cytometer

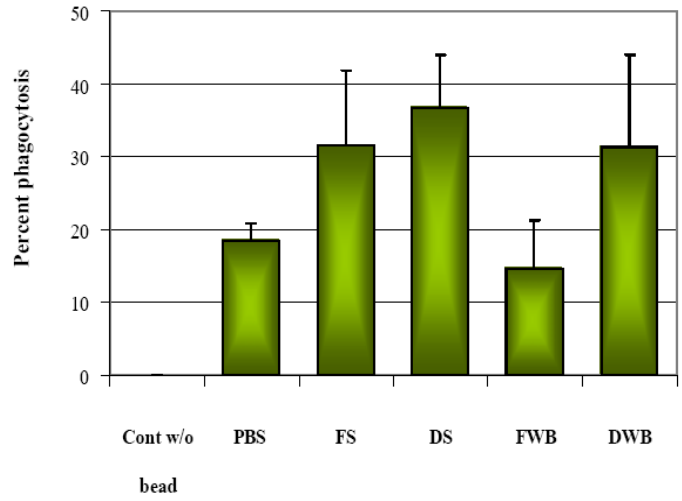
1.3 การทดสอบฤทธิ์ของเลือดจระเข้ในการเพิ่มประสิทธิภาพการกลืนกิน TransFluoroSpheres fluorescent microspheres ของ RAW 264.7

เซลล์ได้รับการกระตุ้นด้วยเลือดจระเข้ประเภทต่าง ๆ ได้แก่ 10% FS, 10% FWB, 10 mg/ml DS, และ 10 mg/ml DWB และบ่มร่วมกับ TransFluoroSpheres fluorescent microspheres ซึ่งเป็นอนุภาค carboxylate-modified polystryrene beads ขนาด 1.0 μM เคลือบด้วยสารเรืองแสง และนำเซลล์มาวิเคราะห์ด้วย flow cytometer และ fluorescent microscope (ภาพที่ 5-7) โดยเลือดจระเข้ทุกประเภทที่ทดสอบ ยกเว้น 10% FWB มีฤทธิ์ในการกระตุ้นกระบวนการกลืนกินของ RAW 264.7 โดยพบว่าร้อยละของเซลล์ที่มีการกลืนกิน (31-37%) มีปริมาณมากว่ากลุ่มควบคุม (18%) (ภาพที่ 5, 6A) นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเซลล์ที่กลืนกินอนุภาค microspheres ที่มีมากกว่า 1 อนุภาคต่อ 1 เซลล์ พบว่าเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเลือดจระเข้โดยเฉลี่ยมีการกลืนกินอนุภาค microspheres ต่อ 1 เซลล์มากกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งจะเห็นได้ชัดเจนขึ้นเมื่อนำผลการทดลองดังกล่าวมาคำนวณค่า phagocytic index โดยพบว่า 10 mg/ml DS มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นกระบวนการดังกล่าวสูงที่สุด (80) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (30) (ประมาณ 3 เท่า) (ภาพที่ 6B)

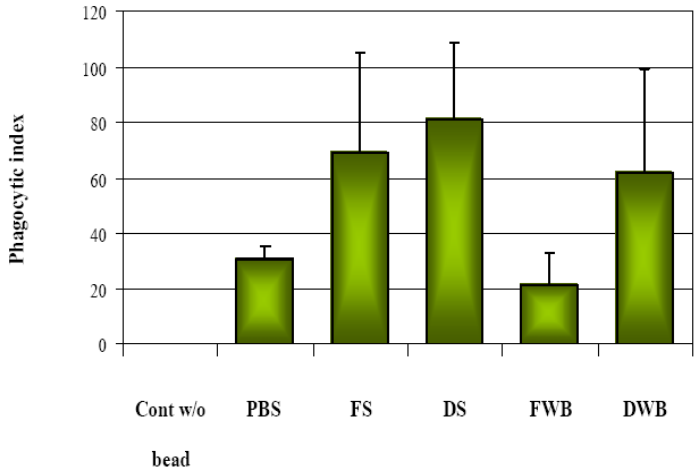


ภาพที่ 5 Dot plot แสดงการกลืนกิน TransFluoSphere fluorescent microspheres ของ RAW 264.7 RAW 264.7 ได้รับการกระตุ้นด้วย 10% fresh whole blood (FWB), 10% fresh serum (FS), 10 mg/ml dried whole blood (DWB), 10 mg/ml dried serum (DS) หรือ PBS และบ่มร่วมกับ 20 particles/cell TransFluoSphere fluorescent microspheres เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และนำเซลล์มาวัดปริมาณ microspheres ที่ถูกกลืนกินโดย flow cytometer ซึ่ง microspheres ที่ถูกกลืนกินเข้าไปในเซลล์จะทำให้เซลล์มีการเรืองแสง และแถบเซลล์ที่มีความเข้มของแสงในแกน Y แสดงถึงปริมาณ particle ที่ถูกกลืนกินในแต่ละเซลล์

A.

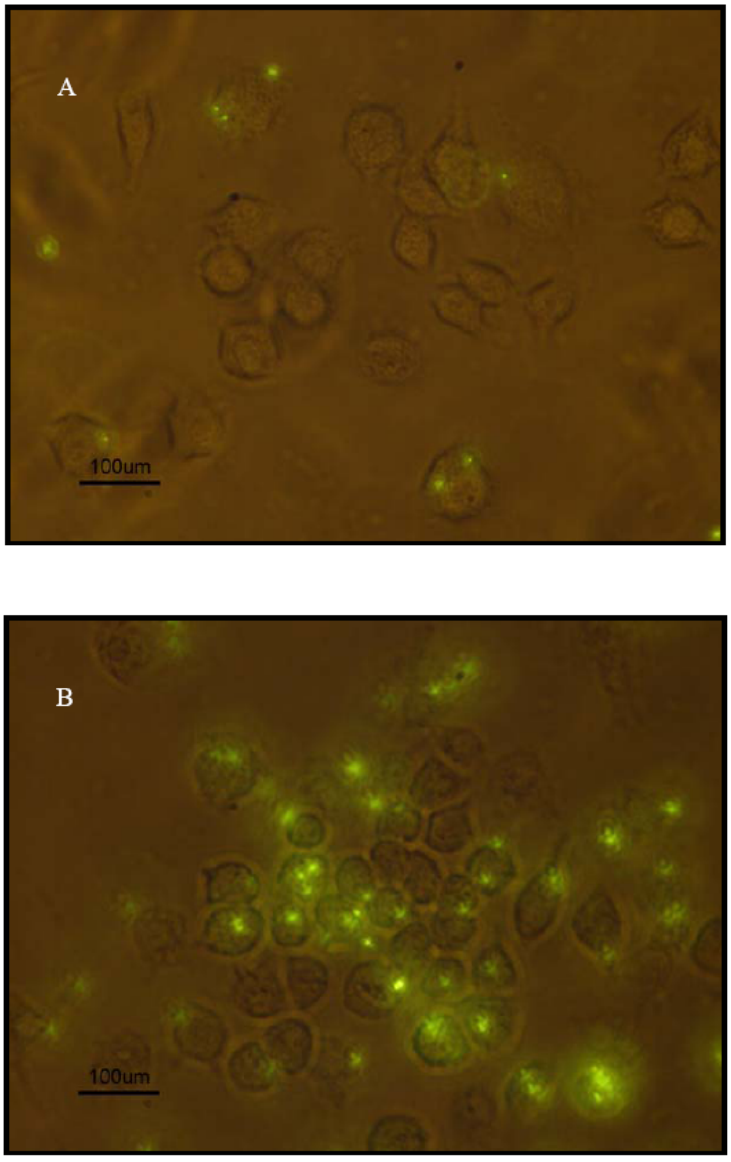


B.



ภาพที่ 6 กราฟแสดงปริมาณเซลล์ที่กลืนกินอนุภาค TransFluoSphere fluorescent microspheres และ Phagocytic index ของ RAW 264.7

RAW 264.7 ได้รับการบ่มร่วมกับ 10% fresh whole blood (FWB), 10% fresh serum (FS), 10 mg/ml dried whole blood (DWB), 10 mg/ml dried serum (DS) หรือ PBS และ 20 particles/cell microspheres เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และนำเซลล์มาวัดปริมาณ microspheres ที่ถูกกลืนกินโดยใช้ flow cytometer (**A**) แสดงร้อยละของเซลล์ที่กลืนกินอนุภาค mocrospheres และ (**B**) แสดงค่า phagocytic index ที่ได้จากการคำนวณ ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณ microsphere ที่ถูกกลืนกินทั้งหมด



ภาพที่ 7 ภาพถ่ายจาก fluorescent microscope แสดงการกลืนกิน TransFluoSphere fluorescent microspheres ของ RAW 264.7

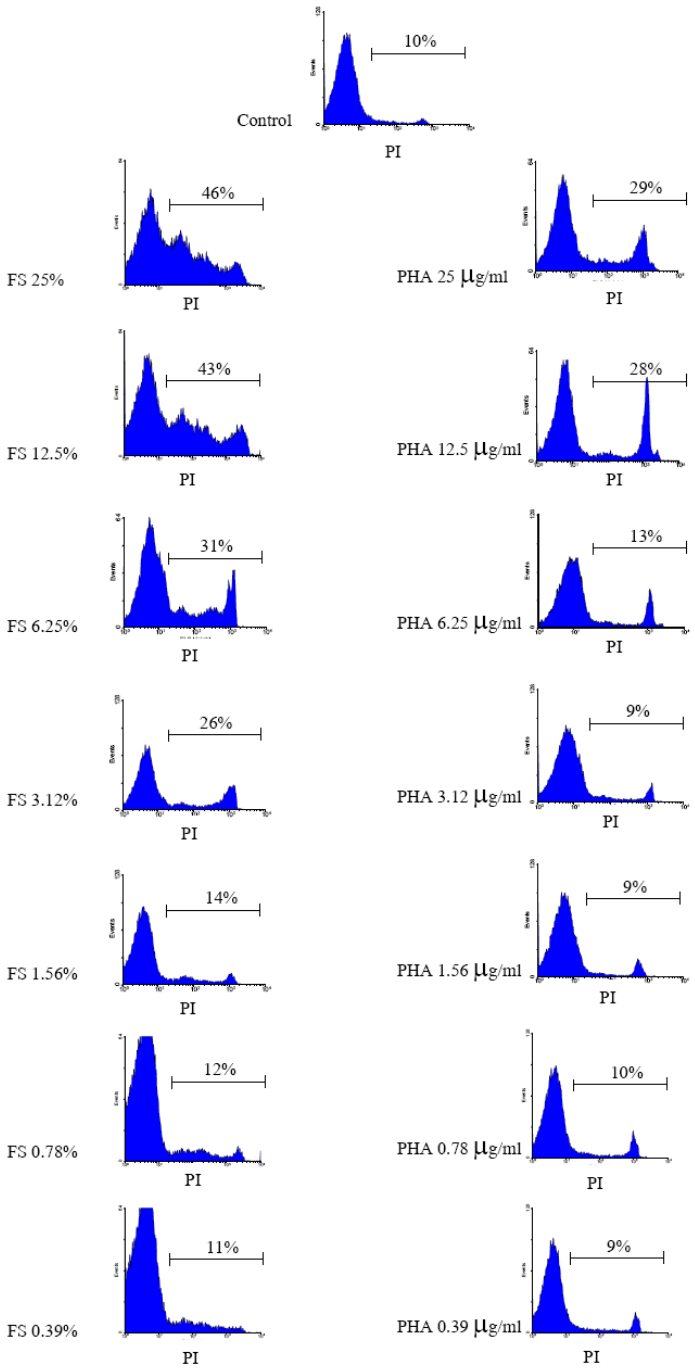
RAW 264.7 ได้รับการกระตุ้นด้วย 10% fresh serum (**B**) หรือ PBS (**A**) และบ่มร่วมกับ 20 particles/cell Transfluorosphere เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และนำมาดูด้วยกล้อง fluorescent microscope (60X)

2. ฤทธิ์ของเลือดจระเข้ในการกระตุ้น human PBMC

2.1 ความเป็นพิษของเลือดจระเข้

นำ human PBMC (85% lymphocyte) ที่ได้จากการปั่นแยกโดยใช้ Histopaque-1077 มาบ่มร่วมกับ FS หรือ phytohemagglutinin (PHA) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนด นำเซลล์ไปวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ตาย (death cell) ด้วย flow cytometer โดยเติม 2 μg/ml propidium iodide (PI) ซึ่ง PI จะสามารถซึมผ่านเข้าเข้าสู่เซลล์ที่ตายแล้ว และเข้าย้อม DNA ภายในเซลล์ เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์มีการเสียสภาพ ทำให้สามารถวิเคราะห์ toxicity ของเลือดจระเข้ต่อ PBMC ได้

เมื่อทำการบ่ม PBMC ร่วมกับ FS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า เซลล์มีการเกาะกลุ่มอย่างเห็นได้ชัดเจนที่ FS ความเข้มข้น 25% และ 12.5% และเมื่อนำไปวิเคราะห์โดยการย้อม PI พบว่าเซลล์มีการตาย (PI positive cell) ประมาณ 30% เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย 25 μg/ml PHA ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ทำให้มีการตายของเซลล์มากที่สุด เท่ากับ 10% และกลุ่มควบคุมเท่ากับ 4% (ไม่ได้แสดงผล) และเมื่อบ่ม PBMC ร่วมกับ FS เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และนำไปวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ตาย พบว่า PBMC ที่บ่มร่วมกับเลือดจระเข้มีการตายเพิ่มขึ้น โดยมีการตายสูงสุดที่ 25% และ 12.5% FS (ภาพที่ 8) และเมื่อนำมาตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเซลล์ที่บ่มร่วมกับ FS ความเข้มข้นนี้มีการเกาะกลุ่มกันอย่างมาก เปรียบเทียบกับเซลล์ที่บ่มกับ FS ที่มีความเข้มข้นเจือจางลงมาจะไม่มีการเกาะกลุ่มและมีปริมาณเซลล์ตายลดลงจนใกล้เคียงกับปริมาณเซลล์ตายที่เกิดขึ้นในกลุ่มควบคุม เมื่อบ่มเซลล์ต่อไปเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มีการตายเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อย (ไม่ได้แสดงผล)



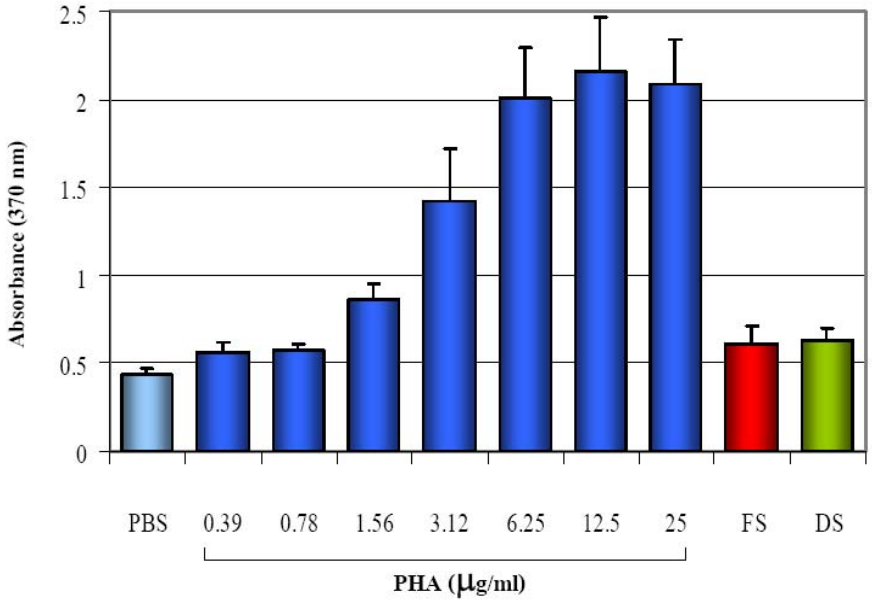
ภาพที่ 8 Histogram แสดงปริมาณของ human PBMC ที่ตายจากการบ่มร่วมกับ fresh serum (FS) หรือ phytohemagglutinin (PHA)

PBMC ได้รับการบ่มร่วมกับ FS และ PHA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำเซลล์มาย้อมด้วย 2 µg/ml propidium iodide (PI) และวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ตาย (PI positive cell) โดย flow cytometer

2.2 การทดสอบฤทธิ์ของเลือดจระเข้ในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของ human PBMC และการหลั่ง IL-2

ทำการบ่ม PBMC กับ 3.12% FS หรือ 3.12 mg/ml DS เปรียบเทียบกับเซลล์ที่บ่มร่วมกับ PHA ซึ่งเป็น mitogen ของ lymphocyte เซลล์ที่มีการเพิ่มจำนวนจะนำ BrdU เข้าสู่เซลล์เพื่อนำไปสังเคราะห์ DNA ทำให้สามารถวัดปริมาณการเพิ่มจำนวนของเซลล์จากปริมาณ BrdU ที่ตรวจพบภายในเซลล์ โดยใช้ anti-BrdU-peroxidase และ substrate ทำให้สามารถวัดการดูดกลืนของแสงที่ 370 nm ซึ่งระดับการดูดกลืนของแสงจะสัมพันธ์กับปริมาณ BrdU ภายในเซลล์ จากการทดลองพบว่าเซลล์ที่มีการบ่มร่วมกับ PHA ที่ความเข้มข้นที่ทดสอบ เริ่มจาก 0.38 μg/ml จนถึง 25 μg/ml มีการเพิ่มจำนวนสูงขึ้นและสัมพันธ์กับปริมาณ PHA และเพิ่มสูงสุดที่ PHA ความเข้มข้น 12.5 μg/ml

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ของเลือดจระเข้ในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ได้ใช้เลือดจระเข้เฉพาะประเภท FS และ DS เนื่องจาก DWB และ FWB มีส่วนประกอบของ hemoglobin ที่รบกวนการดูดกลืนของแสงที่ใช้ในการทดสอบ สำหรับความเข้มข้นของ FS และ DS ที่ใช้ทดสอบคือ 3.12% และ 3.12 mg/ml ตามลำดับ เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่ได้ทดสอบแล้วว่าเกิด toxicity น้อยที่สุด (ภาพที่ 8) ที่ยังสามารถกระตุ้นให้เซลล์เพิ่มจำนวนได้สูงที่สุด (ไม่ได้แสดงผล) จากการทดลองนี้พบว่าทั้ง 3.12% FS และ 3.12 mg/ml DS สามารถกระตุ้นให้เซลล์มีการเพิ่มจำนวนได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน และสูงกว่าปริมาณการเพิ่มจำนวนที่เกิดขึ้นเอง (spontaneous proliferation) ของกลุ่มควบคุม และปริมาณการเพิ่มจำนวนดังกล่าวสามารถเทียบเคียงได้กับการกระตุ้นเซลล์ด้วย PHA ที่ความเข้มข้นประมาณ 0.8 μg/ml (ภาพที่ 9) ซึ่งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในระดับนี้มีปริมาณที่ไม่สูงนัก จึงทำให้คาดว่าการกระตุ้นด้วย FS หรือ DS จะไม่สามารถทำให้ lymphocyte หลั่ง IL-2 ได้ เนื่องจากหากมีการหลั่ง IL-2 ร่วมด้วยในการทดสอบแล้ว จะทำให้ lymphocyte มีการเพิ่มจำนวนขึ้นเป็นทวีคูณ เนื่องจาก IL-2 เป็น growth factor ของเซลล์เหล่านั้น แต่อย่างไรก็ตามสมมติฐานนี้ได้ทำการทดสอบต่อไป และพบว่า lymphocyte สามารถหลั่ง IL-2 ได้ในปริมาณต่ำ ๆ (ไม่ได้แสดงผล)



ภาพที่ 9 กราฟแสดงปริมาณ cell proliferation เมื่อบ่ม human PBMC ร่วมกับ fresh serum (FS), dried serum (DS), phytohemagglutinin (PHA) หรือ PBS

Human PBMC ที่แยกจากเลือดของอาสาสมัครด้วย Histopaque-1077 ได้รับการบ่มร่วมกับ 3.12% FS, 3.12 mg/ml DS, 0.39 – 25 μg/ml PHA หรือ PBS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และบ่มกับ BrdU ต่ออีก 24 ชั่วโมง และนำเซลล์มาวัดปริมาณ BrdU ที่เซลล์นำไปสังเคราะห์ DNA ด้วยวิธี ELISA และวัดการดูดกลืนของแสงที่ 370 nm โดยมี reference wavelength ที่ 492 nm

อภิปรายและวิจารณ์ผลการวิจัย

โครงการวิจัยนี้เป็นโครงการศึกษาฤทธิ์ของเลือดจระเข้พันธุ์ไทยที่มีผลต่อเม็ดเลือดขาว 2 ชนิด ได้แก่ แมโครเฟจ และ human PBMC ซึ่งประกอบด้วย lymphocyte เป็นส่วนประกอบหลัก (85%) โดยทำการศึกษาฤทธิ์ของเลือดจระเข้ในการเพิ่มประสิทธิภาพการกลืนกินของแมโครเฟจ รวมทั้งการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนและการหลั่งไซโทไคน์ชนิด IL-2 ของ PBMC

ผลการศึกษากระบวนการกลืนกินแบคทีเรียของ RAW 264.7 แสดงให้เห็นว่าเลือดจระเข้ทุกประเภท ยกเว้น FWB สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการกลืนกินของแมโครเฟจได้ทั้งการกลืนกินแบคทีเรียชนิดแกรมบวกและแกรมลบ โดยฤทธิ์ของเลือดจระเข้ในการกระตุ้นให้เซลล์เพิ่มประสิทธิภาพการกลืนกินแบคทีเรียแกรมลบ (2-9 เท่า) เพิ่มขึ้นมากกว่าประสิทธิภาพการกลืน

กินแบคทีเรียแกรมบวก (1.5–3 เท่า) นอกจากนี้เลือดจระเข้ที่ผ่านกระบวนการทำระเหิดแห้งจะมีฤทธิ์ในการเพิ่มประสิทธิภาพการกลืนกินของเซลล์ได้มากกว่าเลือดสด ทั้งนี้เนื่องจากในการทดสอบโดยใช้ตัวอย่างเลือดที่ผ่านกระบวนการระเหิดแห้งนั้น มีการเตรียมตัวอย่างที่ปริมาณคงที่ คือ 100 mg/ml แตกต่างจากการใช้ตัวอย่างเลือดสดที่ใช้การวัดปริมาตรในการทดสอบ ซึ่งอาจมีการแปรผันของความเข้มข้นของเลือดจระเข้ในแต่ละตัว นอกจากนี้การชั่งที่ปริมาณ 100 mg/ml จะมีความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ที่มากกว่าเลือดสด กล่าวคือเลือดสดปริมาตร 1 มิลลิลิตร สามารถชั่งเป็นน้ำหนักได้ประมาณ 80 mg และในปริมาตรที่เท่ากัน ตัวอย่างเลือดที่เป็นซีรัมหรือพลาสมา (FS/FP, DS/DP) จะมีฤทธิ์ในการเพิ่มประสิทธิภาพการกลืนกินของ RAW 264.7 มากกว่าตัวอย่างเลือดที่เป็นเลือดครบ (DWB) ทำให้สันนิษฐานได้ว่าสารออกฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการนี้น่าจะอยู่ในส่วนซีรัมของเลือดจระเข้

สำหรับกลไกในการกระตุ้นกระบวนการกลืนกินแบคทีเรียของ RAW 264.7 พบว่ากลไกส่วนหนึ่งน่าจะมีความเกี่ยวข้องกับ heat labile protein เช่น ระบบคอมพลีเมนท์ที่มีอยู่ในซีรัมหรือพลาสมาของเลือดจระเข้ เนื่องจากฤทธิ์ในการเพิ่มประสิทธิภาพกระบวนการกลืนกินของเซลล์ลดลงเมื่อนำตัวอย่างเลือดจระเข้ไป inactivate ที่ 56 ^{o}C ก่อนทำการทดสอบ นอกจากนี้ยังมีความเป็นไปได้ที่จะมี heat labile protein อื่น ๆ เช่น antimicrobial peptide ที่ช่วยให้แบคทีเรียหยุดเคลื่อนไหว และถูกกลืนกินได้ง่ายขึ้น

เมื่อทำการทดสอบกระบวนการกลืนกินด้วย TransFluoSpheres ซึ่งเป็นอนุภาค fluorescent microspheres ขนาดเล็ก ได้ผลการทดลองที่ใกล้เคียงกับการใช้แบคทีเรีย กล่าวคือมีการเพิ่มขึ้นทั้งร้อยละของเซลล์ที่เกิดกระบวนการกลืนกิน และจำนวน microspheres ที่ถูกกลืนกินใน 1 เซลล์ แสดงว่าส่วนประกอบของเลือดจระเข้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการกลืนกินของเซลล์ได้โดยตรง เนื่องจากการกลืนกินอนุภาค microspheres ไม่ต้องอาศัยกระบวนการ opsonization ในการเพิ่มประสิทธิภาพการกลืนกินของเซลล์ ซึ่งแตกต่างกับการกลืนกินแบคทีเรีย และส่วนที่ออกฤทธิ์น่าจะเป็นส่วนประกอบของซีรัมเช่นกัน เนื่องจากซีรัมหรือพลาสมา (FS/FP, DS/DP) มีฤทธิ์ในการเพิ่มประสิทธิภาพการกลืนกินของ RAW 264.7 มากกว่าตัวอย่างเลือดที่เป็นเลือดครบ (DWB)

ผลการศึกษาฤทธิ์ของเลือดจระเข้ในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนและการหลั่ง IL-2 ของ human PBMC พบว่าเลือดจระเข้ทั้งชนิด FS และ DS ที่ความเข้มข้นต่ำ สามารถกระตุ้นให้เซลล์ดังกล่าวมีการเพิ่มจำนวนได้ แต่เป็นในปริมาณที่ไม่สูงนัก เนื่องจาก FS และ DS ที่ความเข้มข้นสูงจะมีความเป็นพิษต่อเซลล์ (ภาพที่ 8) จึงทำให้ไม่สามารถนำมาทดสอบที่ความเข้มข้นที่สูงกว่า 3.12% FS และ 3.12 mg/ml DS ได้ ซึ่งอาจทำให้ไม่สามารถเห็นฤทธิ์ของทั้ง FS และ DS ที่โดดเด่นชัดเจนได้ นอกจากนี้การที่เซลล์มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนในปริมาณที่ไม่มากนักเมื่อได้รับการ

กระตุ้นด้วย FS และ DS จึงทำให้เซลล์สังเคราะห์ IL-2 ได้ในปริมาณต่ำ ซึ่งหากเซลล์ผลิต IL-2 ในปริมาณสูงแล้ว ฤทธิ์ของ IL-2 ในการเป็น autocrine ของ lymphocyte จะส่งผลให้เซลล์มีการเพิ่มจำนวนอย่างมาก

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

1. <u>สรุปผลการวิจัย</u>
    1) ผลิตภัณฑ์เลือดจระเข้ทุกประเภท ยกเว้นเลือดครบสด มีคุณสมบัติในการเพิ่มประสิทธิภาพการกลืนกินของแมโครเฟจ โดยซีรัมหรือพลาสมาระเหิดแห้งมีประสิทธิภาพในการกระตุ้นกระบวนการกลืนกินของเซลล์มากที่สุด
    2) เลือดจระเข้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการกลืนกินแบคทีเรียของแมโครเฟจ ทั้งชนิดแกรมบวก (*S. aureus*) และแกรมลบ (*E. coli*) โดยประสิทธิภาพการกลืนกิน *E. coli* เพิ่มสูงกว่าการกลืนกิน *S. aureus* เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม
    3) สารออกฤทธิ์ในการกระตุ้นกระบวนการกลืนกินที่สำคัญเป็นส่วนประกอบของน้ำเลือด และกลไกที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นสันนิษฐานว่าเกิดขึ้นได้ทั้งแบบที่อาศัยและไม่อาศัยกระบวนการ opsonization
    4) ซีรัมจระเข้ที่ความเข้มข้นต่ำสามารถกระตุ้นให้ human PBMC เพิ่มจำนวน และหลั่ง IL-2 ได้ในระดับต่ำ ๆ แต่ซีรัมที่ความเข้มข้นสูงจะเป็นพิษต่อเซลล์

2. <u>ข้อเสนอแนะ</u>

ควรมีการทดสอบว่าคอมพลีเมนท์เป็นปัจจัยหลักในการเพิ่มประสิทธิภาพการกลืนกินของแมโครเฟจอย่างแท้จริงหรือไม่ หรือยังมีปัจจัยอื่นใดเกี่ยวข้องหรือไม่ อย่างไร นอกจากนี้ควรมีการทดสอบฤทธิ์ในการเพิ่มประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกันในผู้ป่วยโรคติดเชื้อต่าง ๆ

บรรณานุกรม

วิน เชยชมศรี จินดาวรรณ สิรันทวิเนติ บุญเกื้อ วัชรเสถียร มณี ตันติรุ่งกิจ สุดาวรรณ เชยชมศรี ยศพงษ์ เต็มศิริพงศ์ และเริงฤทธิ์ สัปปพัน. 2546. ประสิทธิภาพของซีรัมจระเข้น้ำจืดพันธุ์ไทยในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย. *วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด*. 15 (ฉบับเพิ่มเติมที่ 1). S120.

สุวิทย์ รักมณี และ สมปอง ธรรมศิริรักษ์. 2550. การศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราจากสารสกัดเม็ดเลือดขาวของจระเข้สายพันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*). *รายงานวิจัย.ภาควิชาชีวเคมี* คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

Abbas, A. K. and Litchtman, A. H. 2004. *Basic Immunology*, second edition. Philadelphia: Saunders.

Attanavanich, K. and Kearney, J. F. 2004. Marginal zone, but not follicular, B cells are potent activators of naive CD4 T cells. *J. Immunol.* 172, 803-811.

Binah, O., et al. 2004. Anti-tumor activity from reptile serum. http://v3.espacenet.com/textdoc?DB=EPODOC&IDX=WO03007874&F=0&QPN=WO03007874. *United States patent* application number 20040247589.

Brown, D. R., Schumacher, I. M., Nogueira, M. F., Richey, L. J., Zacher, L. A., Schoeb, T. R., Vliet, K. A., Bennett, R. A., Jacobson, E. R. and Brown, M. B. 2001. Detection of Antibodies to a Pathogenic Mycoplasma in American Alligators (*Alligator mississippiensis*), Broad-Nosed Caimans (*Caiman latirostris*), and Siamese Crocodiles (*Crocodylus siamensis*). *J. Clin. Microbiol.* 39, 285-292.

Campagne, M. L., Wiesmann, C. and Brown E.J. 2007. Macrophage complement receptors and pathogen clearance. *Cell. Microbiol.* 9, 2095–2102.

Campbell, P. A., Canono, B. P. and Drevets, D. A. 1994. Measurement of Bacterial ingestion and killing by macrophage**.** *Curr. Prot. Immunol*. 12CP1**,** 14.6.1-14.6.7.

Goldsby, R. A., Kindt, T.J. and Osborne, B.A. 2002. *Kuby Immunology*, 4th ed. New York: W.H. Freeman & Company.

Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M. l. and Shlomchik, M. J. 2005. Immunobiology, 6th ed. New York: Garland Science.

Kasahara, M., Suzuki, T and Du Pasquier, L. 2004. On the origins of the adaptive immune system: novel insights from invertebrates and cold-blooded vertebrates. *Trends Immunol.* 25, 104-111.

Linghua, G. 2004. Crocodile immunization anti-cancer pill. http://v3.espacenet.com/textdoc?DB=EPODOC&IDX=CN1465351&F=0. Publication number CN1465351.

Merchant, M. and Britton, A. 2006. Characterization of serum complement activity of saltwater (Crocodylus porosus) and freshwater (*Crocodylus johnstoni*) crocodiles. *Com. Biochem. Physiol.* 143, 488-493.

Merchant, M., Thibodeaux, D., Loubser,, K. and Elsey, R. M. 2004. Amoebacidal effects of serum from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *J. Parasitol.* 90, 1480-1483.

Merchant, M. E., Leger, N., Jerkins, E., Mills, K., Pallansch, M. B., Paulman, R. L. and Ptak, R. G. 2006b. Broad spectrum antimicrobial activity of leukocyte extracts from the American alligator (*Alligator mississippiensis*) *Vet. Immunol. Immunopathol* 110, 221-228.

Merchant, M. E., Mills, K., Leger, N., Jerkins, E., Vliet, K. A. and McDaniel, N. 2006a. Comparisons of innate immune activity of all known living crocodylian species. *Com. Biochem. Physiol.* 143, 133-137.

Merchant, M. E., Pallansch, M., Paulman, R. L., Wells, J. B., Nalca, A. and Ptak, R. 2005. Antiviral activity of serum from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Antiviral Res.* 66, 35-38.

Merchant, M. E., Roche, C., Elsey, R. M. and Prudhomme, J. 2003. Antibacterial properties of serum from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Com. Biochem. Physiol.* 136 , 505-513.

Merchant, M. E., Roche, C. M., Thibodeaux, D. and Elsey R.M. 2005. Identification of alternative pathway serum complement activity in the blood of the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Com. Biochem. Physiol.* 141 , 281-288.

Salzet, M. 2001. Vertebrate innate immunity resembles a mosaic of invertebrate immune responses. *Trends Immunol.* 22, 285-288.

Siruntawineti, J., Chaeychomsri, W., Vajarasathira, B., Ong-aat, T. and Temsiripong, Y. 2004. Efficacy of Siamese Crocodile (*Crocodylus siamensis*) Serum on Bacterial Growth Inhibition. In: *Proceeding of the 17th Working Meeting of the Crocodile Specialist Group*. 24–29 May 2004, Darwin Australia.

Siruntawineti, J., Chaeychomsri, W, Vajarasathira, B., Tuntirungkij, M. and Temsiripong,Y. 2003. Complement Activity of Thai Freshwater Crocodile (*Crocodylus siamensis*) serum. In: *Proceeding of the 29th Congress on Science and Technology of Thailand*. 20-22 October, 2003. Khon Kaen.

Wan, H., Versnel, M. A., Cheung, W. Y., Leenen, P. J. M., Khan, N. A., Benner, R. and Kiekens, R. C. M. 2007. Chorionic gonadotropin can enhance innate immunity by stimulating macrophage function. *J. Leuko. Biol.* 82, 1-9.

รายงานการวิจัย

ที่ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยแผนงานสนับสนุนการวิจัยรองรับการเปลี่ยนแปลงและพลวัตโลกเพื่อแก้ปัญหาสำคัญของชาติอย่างสมดุลและยั่งยืน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2551

โครงการย่อยที่ 5 สารยับยั้งแองจิโอเทนซินคอนเวอร์ตติงเอนไซม์ในเลือดจระเข้ไทย

Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor in Siamese Crocodile Blood

หน่วยงานที่รับผิดชอบ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ: นางสาวสิรินดา กุสุมภ์

ผู้ร่วมงานวิจัย: นางสาวจินดาวรรณ สิรันทวิเนติ

นายวิน เชยชมศรี

โครงการวิจัยเรื่อง **สารยับยั้งแองจิโอเทนซินคอนเวอร์ตติงเอนไซม์ในเลือดจระเข้ไทย**

Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor in Siamese Crocodile Blood

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปี 2551 จำนวนเงิน 315,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2551 ถึง กันยายน 2552

ชื่อผู้วิจัย

นางสาวสิรินดา กุสุมภ์ Ph.D. (Food Science and Technology) ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ โทรศัพท์ 02-564-4440 ต่อ 2550

นางสาวจินดาวรรณ สิรันทวิเนติ Ph.D.(Agricultural Science) ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โทรศัพท์ 0-2562-5555, 0-2562- 5444 ต่อ 3262

นายวิน เชยชมศรี ปร. ด. (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร). ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
โทรศัพท์ 0-2562-5555, 0-2562- 5444 ต่อ 3264

บทคัดย่อ

การแพทย์แผนจีนได้มีการใช้เลือดจระเข้ในการรักษาโรคมาเป็นเวลาหลายศตวรรษ อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีรายงานการใช้เลือดจระเข้ในการรักษาโรคความดันโลหิตสูง การใช้สารยับยั้งเอนไซม์แองจิโอเทนซินคอนเวอร์ตติง (ACE inhibitor) เป็นวิธีหนึ่งที่ได้ผลในการรักษาโรคความดันโลหิตสูง แองจิโอเทนซินคอนเวอร์ตติงเอนไซม์ (Angiotensin converting enzyme, ACE) เป็นเอนไซม์ที่พบในระบบเรนนิน-แองจิโอเทนซิน มีหน้าที่ในการควบคุมความดันโลหิตและสมดุลน้ำและอิเลคโตรไลท์ของร่างกาย ACE เพิ่มความดันเลือดโดยสร้างสารเพิ่มการหดตัวของหลอดเลือดชื่อแองจิโอเทนซินทู ร่วมกับลดสารขยายหลอดเลือดชื่อแบรดดีไคนิน ดังนั้นการยับยั้ง ACE จึงมีผลในการลดความดันโลหิต งานวิจัยนี้เพื่อศึกษาการผลิตเปปไตด์ที่สามารถเป็น ACE inhibitor จากเลือดจระเข้ไทย การย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินและทริปซินที่สภาวะต่างๆ ถูกใช้ในการทดลองผลิต ACE inhibitory peptide จากเลือด ผลการทดลองพบว่า ACE inhibitor ที่มีฤทธิ์สูง มีค่า IC_{50} เท่ากับ 447.35 µg/ml สามารถผลิตได้จากการใช้เอนไซม์เปปซินย่อยเลือดจระเข้เป็นเวลา 10 ชั่วโมง โดยส่วนของ Blood cell ที่แยกมาได้จากเลือดให้ฤทธิ์ที่สูงที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 404.12 µg/ml จากการศึกษาการจำลองสภาวะการย่อยอาหารในร่างกายมนุษย์พบว่า การรับประทานเลือดจระเข้สามารถผลิต ACE inhibitory peptide ได้เช่นกัน แต่ ACE inhibitory peptide ที่ผลิตได้มีฤทธิ์ต่ำกว่าเปปไตด์ที่ได้จากการใช้เอนไซม์เปปซิน

Abstract

Crocodile blood has been using in Chinese traditional therapy for centuries; however, there is no report in employing crocodile blood in antihypertensive treatment. One of the successful remedy for hypertensive management is an application of angiotensin converting enzyme inhibitor (ACE inhibitor). Angiotensin converting enzyme (ACE), a multifunctional enzyme present in the rennin-angiotensin system, has a prominent role in the regulations of blood pressure as well as water and electrolyte balance. ACE elevates blood pressure by generating vasoconstrictor, angiotensin II, in conjunction with inactivating vasodilator, bradykinin. Inhibition of ACE results in antihypertensive effect. The present study was focused on the production of ACE inhibitory peptide from Siamese crocodile blood. Various peptic and tryptic hydrolysis conditions were applied to generate ACE inhibitory peptide from the blood. The results showed that potent ACE inhibitors can be obtained from 10-hour hydrolysis of pepsin with an IC_{50} of 447.35 µg/ml. A blood cell portion of the crocodile blood yielded the highest ACE inhibitory activity with an IC_{50} of 404.12 µg/ml. Digestive condition model indicated that ACE inhibitory peptides can be produced from a consumption of crocodile blood. However, the peptides obtained from the digestive condition possessed weaker ACE inhibitory activity than did peptides derived from the peptic hydrolysis.

บทนำ

ประเทศไทยมีเลือดจระเข้เป็นของเหลือทิ้งจำนวนมาก จากอุตสาหกรรมการทำเครื่องหนัง เนื่องจากเลือดจระเข้มีปริมาณโปรตีนสูง จุลินทรีย์สามารถใช้เป็นแหล่งอาหารและเจริญเติบโตได้ดี เลือดจระเข้จึงเป็นสาเหตุให้เกิดมลพิษแก่สิ่งแวดล้อมได้ ถ้ามีระบบการจัดการที่ไม่ได้มาตรฐาน การศึกษาคุณสมบัติของเลือดจระเข้ในแง่มุมต่างๆ เช่น ทางเภสัชวิทยา เป็นความพยายามใช้ประโยชน์จากสิ่งเหลือทิ้ง ช่วยลดมลภาวะ และยังอาจค้นพบการบำบัดหรือรักษาโรคบางชนิดจากเลือดจระเข้

โรคความดันโลหิตสูงเป็นสภาวะที่ก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อการตายด้วยโรคอื่นๆ เช่น โรคหลอดเลือดในสมอง โรคหัวใจ และโรคไต เป็นต้น (Goodfriend, 1999) อัตราการตายที่เกิดจากโรคความดันโลหิตสูงคิดเป็น 6% ของอัตราการตายทั่วโลก (Murray, 1996) การแพทย์แผนปัจจุบันได้ใช้ยาลดความดันเพื่อควบคุมความดันเลือดของผู้ป่วยด้วยโรคความดันโลหิตสูงให้อยู่ในระดับปกติหรือใกล้เคียงกับปกติ หนึ่งในยาลดความดันที่ใช้ได้ผลคือตัวยับยั้งแองจิโอเทนซินคอนเวอร์ตติงเอนไซม์ (Angiotensin converting enzyme inhibitor หรือ ACE inhibitor) ซึ่งเป็นตัวยาสังเคราะห์ทางเคมี มีประสิทธิภาพสูงในการรักษา (McAlister *et al*., 2001) แต่ยา ACE inhibitor มีข้อเสียคือให้ผลข้างเคียงต่อผู้ใช้โดยทำให้ผู้ป่วยมีอาการไอแห้งๆ ภาวะมีโปแทสเซียมในเลือดสูง ความดันเลือดต่ำ ปวดศีรษะ มีผื่นขึ้นตามตัว (Opie, 1994) นอกจากนั้นยา ACE inhibitor ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ทำให้มีราคาแพง

สาร ACE inhibitor นี้ค้นพบครั้งแรกในพิษของงูเห่าจากบราซิล (*Bothrops jararaca*) (Ferreira, 1965) ซึ่งได้ถูกนำมาใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์สาร ACE inhibitor ที่ใช้ในปัจจุบัน แต่เนื่องจากผลข้างเคียงของ ACE inhibitor ที่ได้จากการสังเคราะห์ งานวิจัยหลายงานวิจัยจึงได้หันมาศึกษาการสกัดสาร ACE inhibitor จากธรรมชาติในการรักษาโรคความดันโลหิต (Maruyama and Suzuki, 1982 ; Maruyama *et al*., 1985 ; Maruyama *et al*., 1987 ; Yamamoto *et al*., 1994 ; Abubakar *et al*., 1998 ; Shin *et al*., 2001 ; Kusump *et al*., 2007) โดยพบว่าความดันโลหิตของผู้ป่วยที่ได้รับสาร ACE inhibitor ที่สกัดจากธรรมชาติลดลงมาในระดับปกติ และไม่พบผลข้างเคียงใดๆ จากการใช้ ACE inhibitor นั้น (Takano, 1998 ; Maeno *et al*., 2005) จากผลงานวิจัยดังกล่าวชี้ให้เห็นถึงแนวโน้มของการนำโปรตีนที่มีอยู่ในธรรมชาติมาใช้เป็นแหล่งของ ACE inhibitor เพื่อใช้ในการบำบัดโรคความดันโลหิตสูง

งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาการเตรียมและการสกัดสาร ACE inhibitor จากเลือดจระเข้ของไทย เพื่อศึกษาประโยชน์ทางเภสัชวิทยาของเลือดจระเข้ของไทยในการเป็นแหล่งของสารลดความดัน

เลือดสูง และนำข้อมูลที่ได้มาใช้เป็นแนวทางการผลิตยาจากธรรมชาติซึ่งเป็นทางเลือกใหม่ของผู้ป่วยโรคความดันโลหิตสูงในการใช้ตัวยาที่ผลิตได้ในประเทศ ซึ่งนอกจากเป็นการเพิ่มมูลค่าของเลือดจระเข้แล้ว ยังเป็นการลดค่าใช้จ่ายในการรักษาโรค รวมทั้งสามารถนำข้อมูลที่ได้มาวิจัยต่อยอดเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพในรูปแบบ Functional Food Product ด้วย

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

โรคความดันโลหิตสูงเป็นโรคที่คุกคามสุขภาพของประชาชน เนื่องจากเป็นภาวะที่เสี่ยงต่อการตายด้วยโรคหัวใจ โรคไต โรคหลอดเลือดในสมอง เป็นต้น (Goodfriend, 1999) จากสถิติการตายที่เกิดจากโรคความดันโลหิตสูงคิดเป็น 6% ของอัตราการตายทั่วโลก (Murray, 1996) ความดันโลหิตสูงเป็นความดันเลือดที่มีค่าสูงกว่าระดับปกติ ซึ่งความดันปกติมีค่าประมาณ 130/85 ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยความดันโลหิตค่าบน (Systolic blood pressure) คือ ความดันโลหิตขณะที่หัวใจบีบตัว และความดันโลหิตค่าล่าง (Diastolic blood pressure) คือ ความดันโลหิตขณะที่หัวใจคลายตัว

ตารางที่ 1 ระดับของความดันโลหิตในลักษณะต่างๆ

การจำแนก	ความดันโลหิตตัวบน (Systolic blood pressure) (มิลลิเมตรปรอท)		ความดันโลหิตตัวล่าง (Diastolic blood pressure) (มิลลิเมตรปรอท)
ความดันโลหิตที่เหมาะสม	< 120	และ	< 80
ความดันโลหิตปกติ	< 130	และ	< 85
ความดันโลหิตสูงเล็กน้อย แต่ยังปกติ	130-139	หรือ	85-89
ความดันโลหิตสูง			
ระยะที่ 1 (อ่อน)	140-159	หรือ	90-99
ระยะที่ 2 (ปานกลาง)	160-179	หรือ	100-109
ระยะที่ 3 (รุนแรง)	> 180	หรือ	> 110

ตัวอย่างของยาที่ใช้ได้ผลในการลดความดันโลหิต เช่น ตัวยับยั้งแองจิโอเทนซินคอนเวอร์ตติงเอนไซม์ (Angiotensin converting enzyme inhibitor หรือ ACE inhibitor) แคลเซียมชาแนลบล็อกเกอร์ (Calcium channel blocker) ไดยูเรติก (Diuretic) และอะดรีเนอจิกรีเซปเตอร์แอนตาโกนิสต์ (Adrenergic receptor antagonist) เป็นต้น โดย ACE inhibitor ซึ่งเป็นตัวยาสังเคราะห์ทางเคมี มีประสิทธิภาพสูงในการรักษาและมีการใช้กันอย่างแพร่หลาย (McAlister *et al*., 2001)

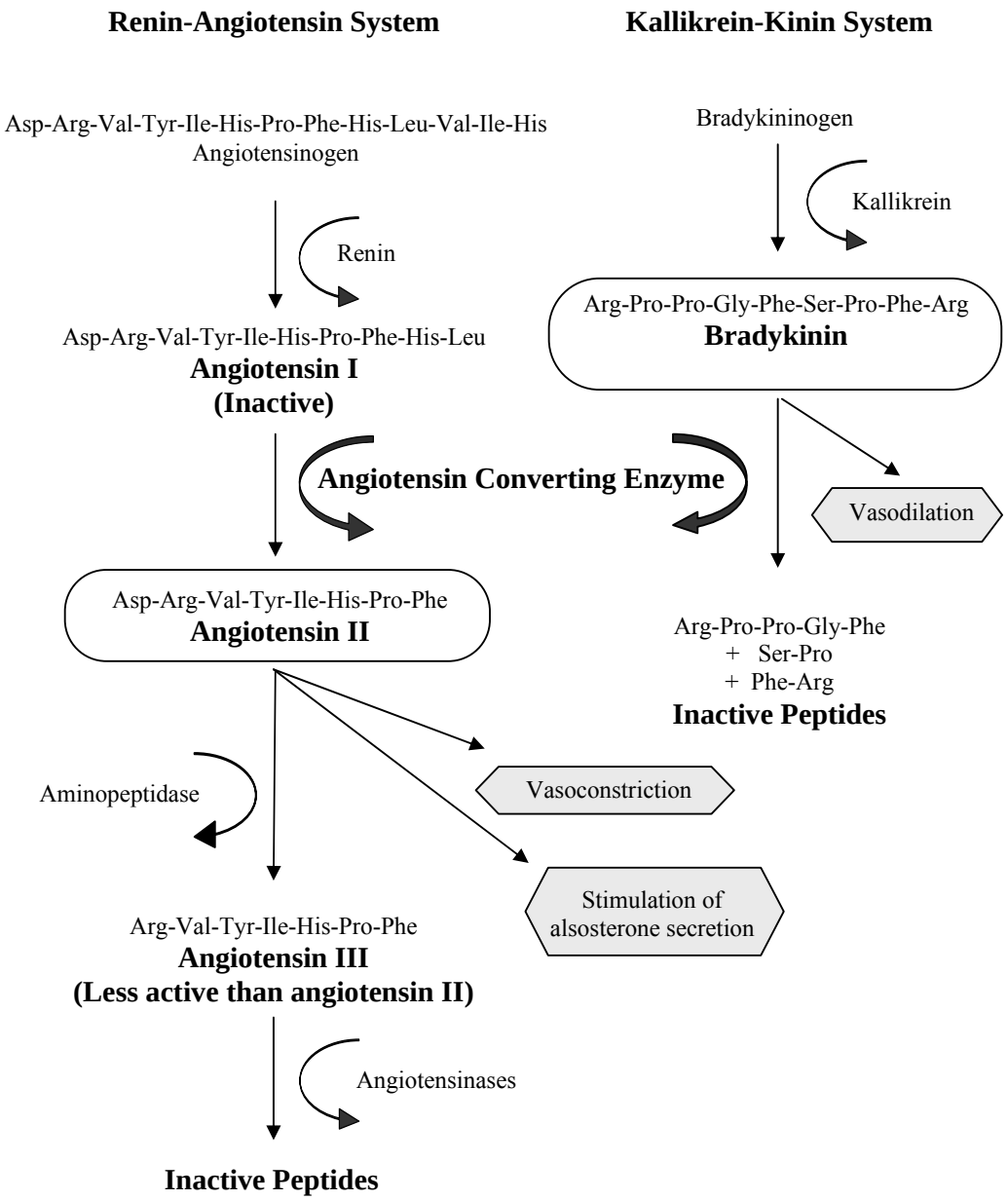
แองจิโอเทนซินคอนเวอร์ตติงเอนไซม์ (Angiotensin converting enzyme, ACE, EC 3.4.15.1) เป็นเอนไซม์ที่พบในระบบเรนนิน-แองจิโอเทนซิน (Renin-angiotensin system) เอนไซม์นี้มีความสำคัญในการควบคุมสมดุลของเหลวและอิเลคโตรไลท์ในร่างกาย รวมทั้งควบคุมความดันโลหิตของร่างกาย (Erdos and Skidgel, 1987 ; Laragh *et al*., 1972) โดยเอนไซม์นี้จะเปลี่ยนสารแองจิโอเทนซินวัน (Angiotensin I) ให้กลายเป็นสารแองจิโอเทนซินทู (Angiotensin II) สารแองจิโอเทนซินทูมีฤทธิ์เพิ่มการบีบตัวของหลอดเลือดโดยตรง ทำให้ความดันเลือดเพิ่มสูงขึ้น และสารแองจิโอเทนซินทูยังมีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งของ aldosterone ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่ควบคุมการดูดน้ำกลับที่ท่อไต ทำให้ปริมาณของเหลวในเลือดลดลง ส่งผลให้ความดันเลือดเพิ่มสูงขึ้น นอกจากนั้น ACE ยังไปลดประสิทธิภาพการทำงานของสารขยายตัวของหลอดเลือด (Bradykinin) ซึ่งเป็นสารที่พบในระบบคาลลิเครอิน-ไคนิน (Kallikrein-Kinin System) มีผลทำให้หลอดเลือดบีบตัวได้มากขึ้น (ภาพที่ 1)

การยับยั้งเอนไซม์นี้โดยการใช้ตัวยับยั้งแองจิโอเทนซินคอนเวอร์ตติงเอนไซม์ (Angiotensin converting enzyme inhibitor หรือ ACE inhibitor) ทำให้ลดการเกิดขึ้นของสารแองจิโอเทนซินทู และลดการหลั่งของฮอร์โมน aldosterone มีผลทำให้ลดการบีบตัวของหลอดเลือด ลดการดูดกลับน้ำที่ท่อไต รวมทั้งยังเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของสารขยายตัวของหลอดเลือดอีกด้วย (Johnston, 1992)

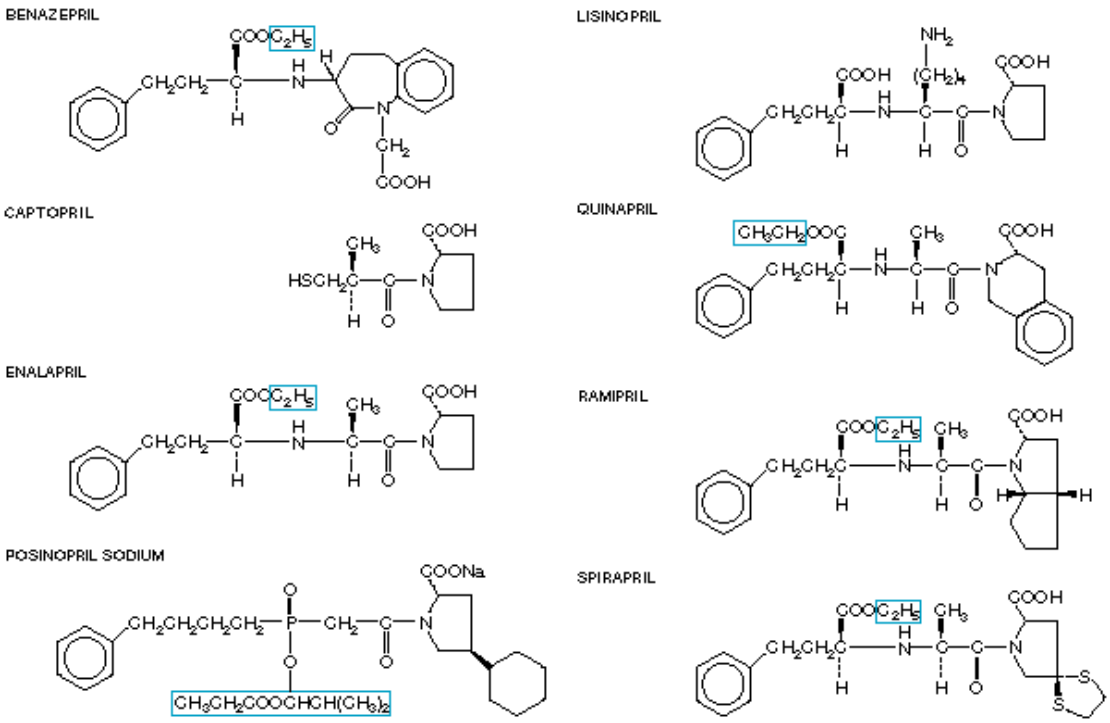
ACE inhibitor ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบันเป็นสารสังเคราะห์ทางเคมี และใช้เป็นยารักษาโรคความดันสูงอย่างได้ผล (McAlister *et al*., 2001) แต่จะให้ผลข้างคียงกับผู้ใช้คือ ทำให้มีอาการไอแบบแห้งๆ เกิดภาวะโปแทสเซียมสูง ความดันโลหิตต่ำ ปวดศีรษะ มีผื่นขึ้น การรับรสผิดปกติ และอาจทำให้เกิดไตวายเฉียบพลันได้ในผู้ป่วยที่แพ้ยา (Opie, 1994)

โลกรู้จัก ACE inhibitor ครั้งแรกจากการศึกษาในพิษของงูเห่า (*Bothrops jararaca*) (Ferreira, 1965) ซึ่งพบภายหลังว่าสารนี้สามารถนำไปใช้ในการลดความดันเลือดของผู้ป่วยโรคความดันสูง ดังนั้นยาที่ใช้ในการลดความดันโลหิตจึงถูกสังเคราะห์ขึ้นโดยเลียนแบบโครงสร้างของ

ACE inhibitor ในพิษของงูเห่าและถูกพัฒนาให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น โครงสร้างของ ACE inhibitor บางชนิดได้แสดงไว้ในภาพที่ 2



ภาพที่ 1 การควบคุมความดันโลหิตโดยกลไกของเอนไซม์แองจิโอเทนซินคอนเวอร์ตติง

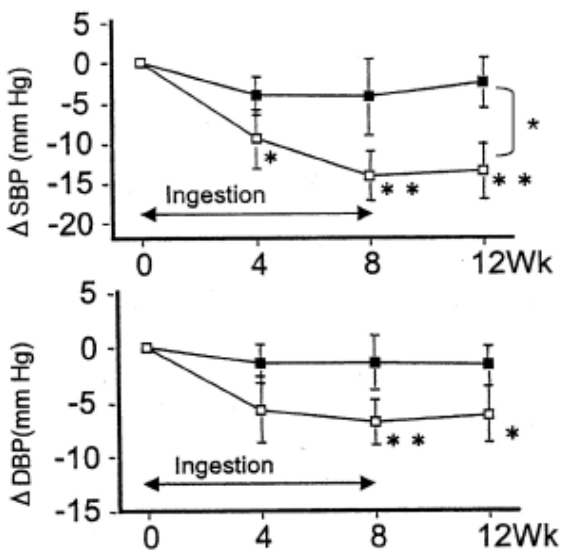


ภาพที่ 2 ACE inhibitor บางชนิดที่ใช้กันแพร่หลายในปัจจุบัน

การค้นพบ ACE inhibitor ครั้งต่อมาในอาหารประเภทเจลลาติน (Oshima *et al*.,1979) ทำให้นักวิจัยหันมาสนใจศึกษาสาร ACE inhibitor ที่มีในอาหาร เนื่องจากความคิดที่ว่าสารที่สกัดจากอาหารธรรมชาติไม่น่าที่จะเป็นอันตรายต่อมนุษย์ การทดลองทางพิษวิทยาของ Maeno และคณะ (Maeno *et al*., 2005) ซึ่งพบว่าสาร ACE inhibitor ที่สกัดได้จากนมเปรี้ยวมีความปลอดภัยสูง ได้สนับสนุนทฤษฎีนี้

สาร ACE inhibitor ได้ถูกค้นพบในอาหารหลากหลายชนิด เช่น อาหารที่ย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆ เช่น ทริปซิน โปรติเนสเค ไคโมทริปซิน (Maruyama and Suzuki, 1982 ; Maruyama *et al*., 1985 ; Maruyama *et al*., 1987 ; Abubakar *et al*., 1998 ; Kusump *et al*., 2007) หรืออาหารที่ผ่านกระบวนการหมัก เช่น เต้าเจี้ยว (Shin *et al*., 2001) โยเกิร์ต (Yamamoto et al., 1999) นมเปรี้ยว (Nakamura *et al*., 1995) เนยแข็ง (Meisel *et al*., 1997) ได้มีการนำเอา ACE inhibitor ที่สกัดได้นี้มาทดลองลดความดันเลือดในสัตว์ทดลองและในมนุษย์ พบว่า สามารถลดความดันเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม (Nakamura *et al*., 1995 ; Hata *et al*., 1996 ; Takano, 1998) และไม่พบผลข้างเคียง ตัวอย่างของการทดลองที่โด่งดัง

ของการใช้ ACE inhibitor ที่ผลิตได้จากอาหารคือ การทดลองของ Nakamura และคณะ ในปี 1995 (Nakamura *et al*., 1995) โดยใช้ Lactic acid bacteria ชื่อ *Lactobacillus helveticus* หมักนมวัวให้เป็นนมเปรี้ยว Calpis และนำนมเปรี้ยวที่ผลิตได้ไปทดสอบประสิทธิภาพในการลดความดันเลือดของผู้ป่วยโรคความดันโลหิตสูง พบว่า ผู้ป่วยที่รับประทานนมเปรี้ยว Calpis เป็นเวลา 8 สัปดาห์ มีความดันเลือดลดลงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$ และ $p \leq 0.01$) จาก Placebo ซึ่งเป็นผู้ป่วยที่รับประทานนมรสเปรี้ยวที่ได้จากการปรับความเป็นกรด-ด่างให้มีค่าใกล้เคียงกับนมเปรี้ยว Calpis (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 การเปลี่ยนแปลงของ Systolic blood pressure (SBP) และ Diastolic blood pressure (DBP) ของผู้ป่วยที่ให้นมเปรี้ยว Calpis เป็นเวลา 8 สัปดาห์ (□) กับ placebo ผู้ป่วยที่ให้นมเปรี้ยวที่ได้จากการเติมกรด (■)(Nakamura *et al*., 1995)

* Significant difference from initial value at $p \leq 0.05$

** Significant difference from initial value at $p \leq 0.01$

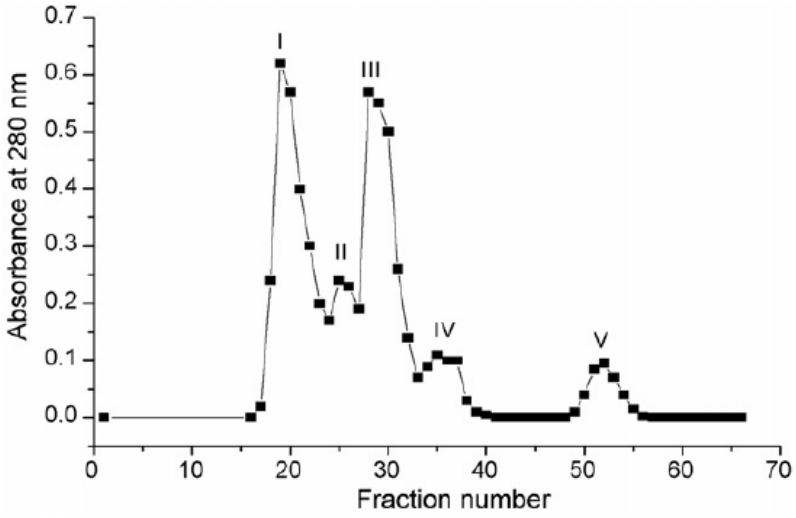
อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยน้อยมากที่ศึกษาการใช้เลือดสัตว์เป็นแหล่งของ ACE inhibitor ในปีพศ. 2549 Yu และคณะ (Yu *et al*., 2006) พบสาร ACE inhibitor จาก hemoglobin ของเลือดหมูที่ย่อยด้วยเอนไซม์ต่างๆ คือ เปบซิน ทริปซิน และปาเปน (ตารางที่ 2) และจากการนำ hydrolysate ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์เปบซินมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธีโครมาโตกราฟฟี พบว่าส่วนที่ผ่าน gel filtration chromato- graphy Sephadex LX-20 (ภาพที่ 4 และ ตารางที่ 3) มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเอนไซม์แองจิโอเทนซินคอนเวอร์ตติง และเมื่อนำส่วนที่มี ACE inhibitory activity สูง

ที่สุดไปหาองค์ประกอบพบว่า เป็น 2 เปบไตด์ที่มีองค์ประกอบของกรดอะมิโนเป็น VVYPWT และ LGFPTTKTYFPHF โดยมีค่า IC_{50} (ความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ 50%) เท่ากับ 6.02 และ 4.92 μM ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 2 ACE inhibitory activity ของ Hemoglobin ของเลือดหมูที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ต่างๆ

เอนไซม์	**IC_{50} (mg/ml)**
เปบซิน	1.19
ทริปซิน	8.79
ปาเปน	2.21

หมายเหตุ IC_{50} คือความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ได้ 50 %



ภาพที่ 4 Gel filtration chromatography ของ hemoglobin ของเลือดหมูที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Pepsin

ตารางที่ 3 ACE inhibitory activity ของส่วนต่างๆ ที่แยกได้จาก Gel filtration chromatography

ส่วนที่	ปริมาณเปปไตด์รวม (mg)	Recovery yield (%)	IC_{50} (mg/ml)
I	451.6	22.58	17.99
II	426.8	21.34	2.10
III	959.4	47.97	1.80
IV	156	7.8	0.67
V	6.2	0.31	0.10

หมายเหตุ IC_{50} คือความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ได้ 50 %

ตารางที่ 4 เปปไตด์ที่มีสมบัติเป็น ACE inhibitory activity ใน hemoglobin ของเลือดหมู

เปปไตด์	**ตำแหน่งใน hemoglobinของเลือดหมู**	**IC_{50} (μM)**
VVYPWT	β (34-39)	6.02
LGFPTTKTYFPHF	α (34-46)	4.92

หมายเหตุ IC_{50} คือความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ได้ 50 %

ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

1. วัตถุดิบและสารเคมี

1.1 เลือดจระเข้

ใช้จระเข้น้ำจืดพันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*) อายุ 2-4 ปี ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่รุ่งทวีชัยฟาร์ม (31 หมู่ 9 ต. สามง่าม อ. ดอนตูม จ. นครปฐม)

1.2 Angiotensin converting enzyme (EC 3.4.15.1), Hippuryl-histidyl-leucine (HHL) เอนไซม์เปปซิน ทริปซิน และแพนครีเอติน จาก Sigma

1.3 สารเคมีอื่นๆ จาก Fisher

2. วิธีการวิจัย

2.1 การเก็บตัวอย่างเลือดจระเข้

ใช้จระเข้น้ำจืดพันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง อายุ 2-4 ปี ซึ่งจะนำมาชำแหละที่หน่วยงานเอกชนที่เพาะเลี้ยงจระเข้ (รุ่งทวีชัยฟาร์ม 31 หมู่ 9 ต. สามง่าม อ. ดอนตูม จ. นครปฐม) ทำการเจาะเลือดจระเข้ที่บริเวณแอ่งเลือดดำ หลังกระโหลกศรีษะ (anterior

dorsal sinus) โดยใช้กระบอกฉีดยาพร้อมเข็มขนาด 18G ความยาว 1 ½ นิ้ว เจาะเลือดปริมาณ 20 มิลลิลิตร ต่อตัว เก็บใส่หลอด

2.2 การเตรียมตัวอย่างเลือดจระเข้

2.2.1 Whole blood

นำเลือดจระเข้ Whole blood จากข้อ 3.1 มาทำแห้งโดยวิธีแช่เยือกแข็ง (Freeze dry) ด้วยเครื่อง Freeze dryer (Lyophilization System, Inc., USA)* แล้วเก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4-5 °C เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

2.2.2 Plasma และ Blood cell

2.2.2.1 นำตัวอย่างเลือดจระเข้ใส่ในหลอดเก็บเลือดที่มีสารกันเลือดแข็งชนิดลิเทียม เฮปพาริน (Lithium Heparin) (VACUETTE, greiner bio-one, บริษัท กรุงเทพอินเตอร์โปรดักส์ จำกัด) ผสมเลือดให้เข้ากันแล้วเก็บรักษาสภาพในกล่องโฟมที่บรรจุน้ำแข็งอยู่ภายใน จากนั้นนำหลอดทดลองดังกล่าวมาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนที่เป็นพลาสมา และเม็ดเลือดออกจากกัน โดยใช้ความเร็วของการปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทำการแยกส่วนพลาสมาด้านบนใส่ในหลอดขนาดเล็ก หลอดละ 1 มล. แล้วนำหลอดทดลองและเม็ดเลือดที่ได้มาแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ 20-°C จากนั้นนำมาทำแห้งโดยวิธีแช่เยือกแข็ง (Freeze dry) ด้วยเครื่อง Freeze dryer (Lyophilization System, Inc., USA)* แล้วเก็บรักษา plasma และ blood cell แห้งที่ได้ที่อุณหภูมิ 4-5 °C เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

2.2.2.2 นำตัวอย่างเลือดจระเข้ที่ได้ จากการเจาะเลือดแบบใช้กระบอกฉีดยาเดียวกันสองครั้ง (Double syrings techniques) นำเลือดที่ได้แต่ละครั้งรวมใส่ในขวดเก็บเลือดที่มีสารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียม เฮปพาริน (Sodium Heparin, 10 – 30 USP/ 1 ml of blood) (Heparin LEO, LEO Pharmaceutical Products, Denmark) ผสมเลือดให้เข้ากันเพื่อไม่ให้เกิดการแข็งตัวของเลือด แล้วเก็บรักษาสภาพในกล่องโฟมที่บรรจุน้ำแข็งอยู่ภายใน จากนั้นนำขวดเก็บเลือดดังกล่าวมาตั้งทิ้งไว้ในตู้ควบคุมความเย็นที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อให้เลือดเกิดการแยกส่วน ใช้หลอดดูดน้ำเลือดด้านบนใส่ในหลอดพลาสติกขนาด 15 มล. ปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนที่เป็นพลาสมาและเม็ดเลือดที่อาจมีปนมาออกจากกัน โดยใช้ความเร็วของการปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทำการแยกส่วนพลาสมาด้านบนใส่ในขวดเก็บเลือด และส่วนของเม็ดเลือด นำ plasma และ blood cell มาทำแห้งโดยวิธีแช่เยือกแข็ง (Freeze dry) ด้วยเครื่อง Freeze dryer (Lyophilization System, Inc., USA)* แล้วเก็บรักษา plasma และ blood cell แห้งที่ได้ที่อุณหภูมิ 4-5 °C เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

(*ขั้นตอนนี้ทำที่ห้างหุ้นส่วนจำกัดวานิไทย ห้อง 602 ชั้น 6 อาคารวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์)

2.3 การเตรียม hydrolysate เลือดจระเข้ Whole blood

นำเลือดจระเข้ Whole blood ที่ผ่านการทำแห้งจากข้อ 3.2.2 มา 4 กรัมมาผสมกับน้ำ 36 กรัม แล้วนำไปย่อยด้วยเอนไซม์ 3 ชนิด ที่อุณหภูมิ 37 °C โดยใช้อัตราส่วนเลือดจระเข้ต่อเอนไซม์เท่ากับ 100:1

2.3.1 เอนไซม์ trypsin ที่ pH 7.5 เป็นเวลา 2, 4, 6 และ 10 ชั่วโมง

2.3.2 เอนไซม์ pepsin ที่ pH 2 เป็นเวลา 2, 4, 6 และ10 ชั่วโมง

2.3.2 เอนไซม์ pepsin ที่ pH 2 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตามด้วย เอนไซม์ pancreatin ที่ pH 7.6 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

โดยมีการปรับ pH ของ hydrolysate ให้คงที่ที่ pH ที่กำหนดตลอดเวลาที่ทำการย่อย เมื่อครบเวลาแล้วหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำ hydrolysate ไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้องที่ความเร็ว 9000 g เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ก่อนที่จะทำแห้งโดยวิธีแช่เยือกแข็ง (Freeze dry) ด้วยเครื่อง Freeze dryer (Lyophilization System, Inc., USA)* แล้วเก็บ hydrolysate แห้งไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อทำการทดลองต่อไป

(*ขั้นตอนนี้ทำที่ห้างหุ้นส่วนจำกัดวานิไทย ห้อง 602 ชั้น 6 อาคารวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์)

2.4 การเตรียม hydrolysate plasma และ hydrolysate blood cell

นำ Plasma และ Blood cell ที่เก็บโดยใช้สารกันเลือดแข็งทั้ง 2 ชนิดที่ผ่านการทำแห้งจากข้อ 2.2.2.1 มา 4 กรัมมาผสมกับน้ำ 36 กรัม แล้วนำไปย่อยด้วยเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 37 °C โดยใช้อัตราส่วน Plasma หรือ Blood cell ต่อเอนไซม์เท่ากับ 100:1 (สำหรับตัวอย่าง Blood cell ต้องนำไปทำ Hemolysis ก่อนนำไปย่อย โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 9000 g เป็นเวลา 15 นาที)

2.4.1 เอนไซม์ pepsin ที่ pH 2 เป็นเวลา 10 ชั่วโมง

2.4.2 เอนไซม์ pepsin ที่ pH 2 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และตามด้วย เอนไซม์ pancreatin ที่ pH 7.6 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

โดยมีการปรับ pH ของ hydrolysate ให้คงที่ที่ pH ที่กำหนดตลอดเวลาที่ทำการย่อย เมื่อครบเวลาแล้วหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำ hydrolysate ไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้องที่ความเร็ว 9000 g เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ก่อนที่จะทำแห้งโดยวิธีแช่เยือก

แข็ง (Freeze dry) ด้วยเครื่อง Freeze dryer (Lyophilization System, Inc., USA)* แล้วเก็บ hydrolysate แห้งไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อทำการทดลองต่อไป

2.5 การทดสอบเสถียรภาพของ Hydrolysate whole blood และ Hydrolysate blood cell ต่อสภาวะในระบบการย่อยของมนุษย์

นำ Hydrolysate whole blood และ Hydrolysate blood cell ที่ย่อยด้วย pepsin เป็นเวลา 10 ชั่วโมง มา 4 กรัมมาผสมกับน้ำ 36 กรัม แล้วนำไปย่อยด้วยเอนไซม์ pepsin ที่ pH 2 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และตามด้วย เอนไซม์ pancreatin ที่ pH 7.6 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยมีการปรับ pH ของ hydrolysate ให้คงที่ที่ pH ที่กำหนดตลอดเวลาที่ทำการย่อย เมื่อครบเวลาแล้วหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำ hydrolysate ไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้องที่ความเร็ว 9000 g เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ก่อนที่จะทำแห้งโดยวิธีแช่เยือกแข็ง (Freeze dry) ด้วยเครื่อง Freeze dryer (Lyophilization System, Inc., USA)* แล้วเก็บ hydrolysate แห้งไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อทำการทดลองต่อไป

2.6 การทดสอบความสามารถในการเป็นสารยับยั้งเอนไซม์แองจิโอเทนซิน (Angiotensin converting enzyme inhibitory activity)

นำตัวอย่างเลือดจระเข้แห้งมาทดสอบความสามารถเป็นสารยับยั้งเอนไซม์แองจิโอเทนซิน โดยใช้วิธีการของ Nakamura และคณะ ซึ่งเป็นการดัดแปลงมาจาก Cushman และ Cheung ใช้การทดสอบ activity ของ สารที่ได้เทียบกับ activity ของ ACE เมื่อไม่มีตัวยับยั้ง โดยใช้ Hippuryl-histidyl-leucine เป็นสารตั้งต้น รายงานผลเป็น % inhibition ของสารสกัด โดยการคำนวณ activity ของ ACE เมื่อไม่มีตัวยับยั้ง ว่าเป็น 0 % inhibition

การคำนวณ % Inhibition ทำได้โดยใช้สมการข้างล่างนี้

$$\%\ Inhibition\ =\ \frac{B-A}{B-C}\times 100$$

เมื่อ A คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 228 nm เมื่อมี HHL, ACE และสารยับยั้งเอนไซม์

B คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 228 nm เมื่อมี HHL และ ACE

C คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 228 nm เมื่อมี HHL

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

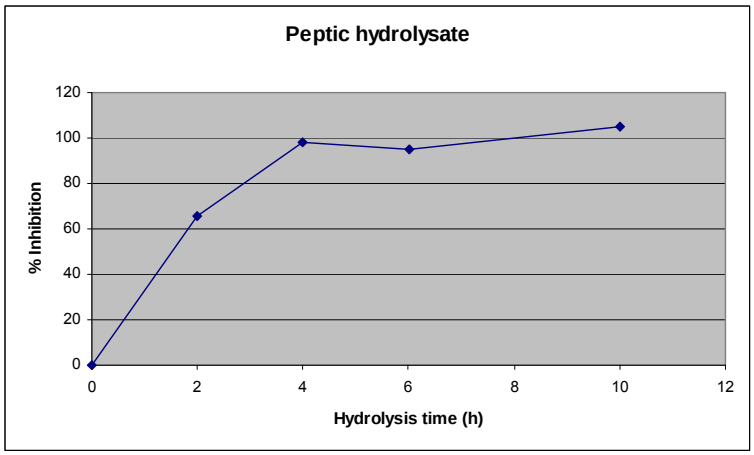
1. <u>การผลิต ACE inhibitory peptide จากเลือดจระเข้</u>

เมื่อนำเลือดจระเข้ whole blood ที่ไม่ผ่านการย่อยมาเปรียบเทียบกับเลือดจระเข้ whole blood ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆ พบว่า เลือดจระเข้ whole blood ที่ไม่ผ่านการย่อยไม่มีความสามารถเป็นสารยับยั้งเอนไซม์แองจิโอเทนซินคอนเวอร์ตติง แต่ hydrolysate ของเลือดจระเข้มีความสามารถเป็นสารยับยั้งเอนไซม์แองจิโอเทนซินคอนเวอร์ตติง (ภาพที่ 5 และ 6) แสดงให้เห็นว่ากระบวนการ hydrolysis สามารถสร้างสารยับยั้งเอนไซม์แองจิโอเทนซินคอนเวอร์ตติงจากเลือดจระเข้ได้ แสดงว่าสาร ACE inhibitor ในเลือดจระเข้นั้นอยู่ในรูปสารประกอบที่จำเป็นต้องใช้เอนไซม์ Proteinase ไปตัดออกจากสายพันธะก่อน ซึ่งลักษณะเช่นนี้ตรงกับลักษณะของ Bioactive peptide คือ สารจำพวกโปรตีนที่เมื่ออยู่ในสภาพธรรมชาติไม่สามารถมีฤทธิ์ได้ ต่อเมื่อมีเอนไซม์มาตัดพันธะให้กลายเป็นเปปไตด์ จึงจะมีฤทธิ์ต่างๆ ได้ (Meisel *et al*., 1997 ; Kusump *et al*., 2007)[22, 24]

โดยเมื่อใช้เอนไซม์ pepsin ในการย่อยพบว่า ความสามารถในการเป็นสารยับยั้งเอนไซม์แองจิโอเทนซินคอนเวอร์ตติงของ hydrolysate เพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไปมากขึ้น (ภาพที่ 5) ในขณะที่เมื่อใช้เอนไซม์ trypsin ในการย่อยพบว่า ความสามารถในการเป็นสารยับยั้งเอนไซม์แองจิโอเทนซินคอนเวอร์ตติงของ hydrolysate เพิ่มขึ้นจนถึงระยะเวลาหนึ่งจึงลดลง (ภาพที่ 6) แสดงให้เห็นว่าเวลาที่ใช้ในการย่อยมีผลต่อการผลิต peptide ที่มีความสามารถในการเป็นสารยับยั้งเอนไซม์แองจิโอเทนซินคอนเวอร์ตติง

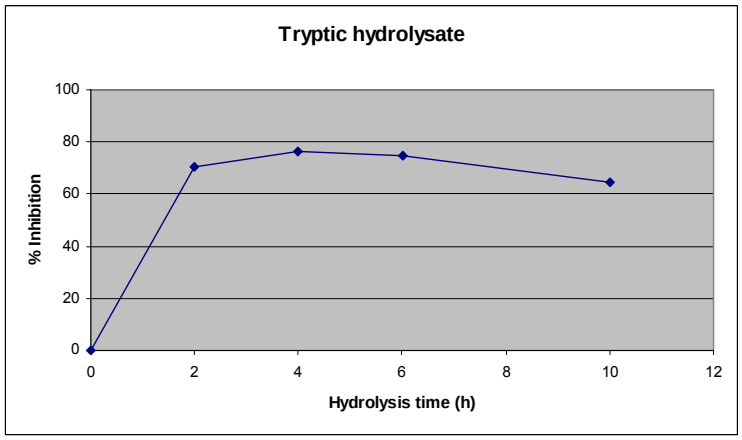
และเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการเป็นสารยับยั้งเอนไซม์แองจิโอเทนซินคอนเวอร์ตติงของ hydrolysate ที่ได้จากเอนไซม์ชนิดต่างๆ พบว่า hydrolysate จาก เอนไซม์ pepsin มีความสามารถในการเป็นสารยับยั้งเอนไซม์แองจิโอเทนซินคอนเวอร์ตติงสูงกว่า hydrolysate จากเอนไซม์ trypsin และเอนไซม์ผสมของ pepsin และ pancreatin แสดงให้เห็นว่าการใช้เอนไซม์ต่างชนิดกัน ทำให้ได้ peptide ที่มีความสามารถต่างกัน โดย hydrolysate จาก pepsin ที่ใช้เวลานานในการย่อยมีความสามารถในการเป็นสารยับยั้งเอนไซม์แองจิโอเทนซินคอนเวอร์ตติงสูงกว่าการใช้เอนไซม์ชนิดอื่น และเมื่อนำ hydrolysate ที่ย่อยด้วยเอนไซม์แต่ละชนิด ที่มีค่าความสามารถในการเป็นสารยับยั้งเอนไซม์แองจิโอเทนซินคอนเวอร์ตติงสูงๆ มาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการเป็นสารยับยั้งเอนไซม์แองจิโอเทนซินคอนเวอร์ตติง โดยการทดลองหาความเข้มข้นของ hydrolysate ที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์แองจิโอเทนซินคอนเวอร์ตติงได้ 50 % (IC_{50}) พบว่า hydrolysate ของเอนไซม์ pepsin ที่เวลา 10 ชั่วโมง มีค่า IC_{50} ต่ำที่สุดคือ 447.35 µg/ml และ

hydrolysate ของเอนไซม์ trypsin ที่เวลา 6 ชั่วโมง มีค่า IC_{50} สูงที่สุดคือ 2514.17 µg/ml (ตารางที่ 5) แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ pepsin สามารถใช้เป็นสารที่เพิ่มความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์แองจิโอเทนซินคอนเวอร์ตติงที่ดีของเลือดจระเข้



ภาพที่ 5 ความสามารถในการเป็นสารยับยั้งเอนไซม์แองจิโอเทนซินคอนเวอร์ตติงของเลือดจระเข้ whole blood ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ pepsin ที่อุณหภูมิ 37 °C และ pH 2 ที่ความเข้มข้น

ของ hydrolysate 3000 µg/ml



ภาพที่ 6 ความสามารถในการเป็นสารยับยั้งเอนไซม์แองจิโอเทนซินคอนเวอร์ตติงของเลือดจระเข้ whole blood ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ trypsin ที่อุณหภูมิ 37 °C และ pH 7.5 ที่ความเข้มข้นของ hydrolysate 3000 µg/ml

เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Yu และคณะ[15] ที่ได้ทำการย่อย hemoglobin ของเลือดหมูด้วยเอนไซม์ pepsin พบว่า IC_{50} ของ hydrolysate เลือดจระเข้ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกัน มีค่าต่ำกว่าค่า IC_{50} ของ hydrolysate ของเลือดหมู (ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.19 mg/ml) (ตารางที่ 6) และ มีค่าต่ำกว่า IC_{50} ของ Fraction ทั้งหมดยกเว้น fraction ที่ 5 ของ hydrolysate ของเลือดหมูนั้นที่ได้จากการใช้ Gel filtration chromatography ทำให้บริสุทธิ์มากขึ้น (fraction ที่ 1 – 4 มีค่า IC_{50} อยู่ระหว่าง 0.67 – 17.99 mg/ml และ fraction ที่ 5 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.1 mg/ml) (ตารางที่ 3) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการเป็น ACE inhibitor ที่มีประสิทธิภาพสูงของ hydrolysate ของเลือดจระเข้ ถึงแม้ยังไม่ได้ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นก็ตาม

ตารางที่ 5 ACE inhibition ของ Hydrolysate ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ Pepsin และ Trypsin

Hydrolysate		IC_{50}
เอนไซม์	เวลาในการย่อย (ชั่วโมง)	(µg/ml)
Pepsin	4	728.05
	6	565.88
	10	447.35
Trypsin	6	2514.17

หมายเหตุ IC_{50} คือความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ได้ 50 %

เมื่อนำ Plasma และ Blood cell ที่ได้จากการแยกส่วนประกอบของเลือดจระเข้มาย่อยด้วยเอนไซม์ Pepsin เป็นเวลา 10 ชั่วโมง แล้วนำมาทดสอบ ACE inhibitory เมื่อใช้ความเข้มข้นของ hydrolysate 1000 µg/ml (ตารางที่ 6) พบว่า % Inhibition ของ Hydrolysate ของ Blood cell มีค่ามากกว่า 90 % ในขณะที่ % Inhibition ของ Hydrolysate ของ Plasma มีค่า 34-50 % แสดงให้เห็นว่า ACE inhibitor ที่พบอยู่ใน Blood cell มีประสิทธิภาพสูงกว่าใน Plasma และเมื่อคำนวณค่าความเข้มข้นของ Hydrolysate ของ Blood cell พบว่ามีค่า IC_{50} เท่ากับ 404.12 µg/ml ซึ่งต่ำกว่าค่า IC_{50} ของ Hydrolysate ของ Whole blood cell ซึ่งเท่ากับ 447.35 µg/ml แสดงให้เห็นว่า ACE inhibitory activity ของ Whole blood ของเลือดจระเข้ มาจากส่วนที่เป็น Blood cell

นอกจากนั้น ไม่พบความแตกต่างของการใช้ Lithium Heparin และ Sodium Heparin เป็นสารป้องกันเลือดแข็งตัว ในการทดสอบ ACE inhibitory activity ของ Blood cell (ตารางที่ 6) ผู้วิจัยจึงได้เลือก Blood cell ที่ได้จากการใช้ Sodium heparin เพราะสะดวกในการเก็บตัวอย่างเลือด

มากกว่ามาใช้ในการทดลองในข้อที่ 3 (ความสามารถในการทนต่อเอนไซม์ย่อยอาหารของมนุษย์ของ ACE inhibitory peptide)ต่อไป

ตารางที่ 6 % ACE inhibition ของส่วนประกอบเลือดจระเข้ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Pepsin 10 ชั่วโมง

ส่วนประกอบของเลือด	สารกันเลือดแข็งตัว	% Inhibition เมื่อใช้ความเข้มข้น 1000 µg/ml	IC_{50} (µg/ml)
Plasma	Lithium Heparin	49.53	-
	Sodium Heparin	33.65	> 2000
Blood cell	Lithium Heparin	91.72	-
	Sodium Heparin	91.29	404.12

หมายเหตุ IC_{50} คือความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ได้ 50 %

2. <u>ระบบการย่อยอาหารของมนุษย์สร้าง ACE inhibitor จากเลือดจระเข้</u>

เมื่อใช้เอนไซม์ pepsin และตามด้วยเอนไซม์ pancreatin ในการย่อยเลือดจระเข้ พบว่า hydrolysate ที่ได้มีความสามารถในการเป็นสารยับยั้งเอนไซม์แองจิโอเทนซินคอนเวอร์ตติงเช่นกัน (ตารางที่ 7) โดยมีค่าความเข้มข้นของ hydrolysate ที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์แองจิโอเทนซินคอนเวอร์ตติงได้ 50 % (IC_{50}) เท่ากับ 830.95 µg/ml และเนื่องจากการใช้เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดมีลำดับการย่อยและสภาวะที่ใช้ในการย่อยในการทดลองนี้ เป็นไปเพื่อเลียนแบบระบบย่อยอาหารของมนุษย์ นั่นคือ pepsin ในกระเพาะอาหาร (pH 2) และ pancreatin ในลำไส้เล็ก (pH 7.6) แสดงให้เห็นว่าเลือดจระเข้เมื่อเข้าสู่ร่างกายของมนุษย์โดยการรับประทานสามารถกลายเป็นสารยับยั้งเอนไซม์แองจิโอเทนซินคอนเวอร์ตติง ซึ่งอาจจะส่งผลให้ความดันเลือดลดลงได้ เพื่อให้ได้มาซึ่งผลสรุปที่แน่นอนของการลดความดันโลหิตโดยการรับประทานเลือดจระเข้นั้น จำเป็นต้องทำการศึกษาในระดับที่สูงขึ้นต่อไป เช่น ในระดับเซล หรือระดับสัตว์ทดลอง และมนุษย์

ตารางที่ 7 ความสามารถในการเป็นสารยับยั้งเอนไซม์แองจิโอเทนซินคอนเวอร์ตติงของเลือดจระเข้ whole blood ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ pepsin ที่อุณหภูมิ 37 °C และ pH 2 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตามด้วยเอนไซม์ pancreatin ที่อุณหภูมิ 37 °C และ pH 7.6 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	% Inhibition ที่ความเข้มข้น3000 µg/ml	IC_{50} (µg/ml)
เลือดจระเข้	0	-
Hydrolysate เลือดจระเข้ จาก pepsin + pancreatin	100.99	830.95

หมายเหตุ IC_{50} คือความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ได้ 50 %

เมื่อนำ Plasma และ Blood cell ที่ได้จากการแยกส่วนประกอบของเลือดจระเข้มาย่อยด้วยเอนไซม์ Pepsin ตามด้วย Pancreatin เพื่อเลียนแบบระบบการย่อยอาหารของมนุษย์ แล้วนำมาทดสอบ ACE inhibitory activity (ตารางที่ 8) พบว่า % Inhibition ของ Hydrolysate ของ Blood cell มีค่ามากกว่า 60% ในขณะที่ Hydrolysate ของ Plasma แทบไม่แสดงความเป็น ACE inhibition เลย และเมื่อคำนวณ IC_{50} ของ Hydrolysate ของ Blood cell พบว่าได้ค่าค่อนข้างต่ำ คือ 503 µg/ml แสดงให้เห็นว่า เมื่อรับประทาน Blood cell ร่างกายจะเปลี่ยน Blood cell ให้เป็น ACE inhibitor ซึ่งอาจมีผลไปลดความดันโลหิตได้ ในขณะที่การรับประทาน Plasma ไม่ทำให้เกิด ACE inhibitor หรืออีกนัยหนึ่งคือ ACE inhibitory activity ที่ได้จากการรับประทานเลือดจระเข้ มาจากส่วนที่เป็น Blood cell ไม่ใช่จากส่วน Plasma

ตารางที่ 8 ACE inhibition ของส่วนประกอบเลือดจระเข้ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Pepsin และตามด้วย Pancreatin

ส่วนประกอบของเลือด	สารกันเลือดแข็งตัว	% inhibition เมื่อใช้ความเข้มข้น 1000 µg/ml	IC_{50} (µg/ml)
Plasma	Lithium Heparin	0.25	-
	Sodium Heparin	4.00	-
Blood cell	Lithium Heparin	65.47	-
	Sodium Heparin	64.75	503.48

หมายเหตุ IC_{50} คือความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ได้ 50 %

เมื่อพิจารณาฤทธิ์ ACE inhibitory activity ที่ได้จากการย่อย Whole blood และ Blood cell ของเลือดจระเข้โดยเอนไซม์ที่มีในระบบย่อยอาหารของมนุษย์ พบว่า Activity ที่เกิดจาก Blood cell สูงกว่า Activity ที่เกิดจาก Whole blood ของเลือดจระเข้ (ตารางที่ 8) ชี้ให้เห็นว่า การรับประทาน Blood cell น่าจะมีผลต่อการลดความดันโลหิตได้มากกว่าการรับประทาน Whole blood แสดงว่า Blood cell น่าจะเป็นแหล่งของ ACE inhibitor ที่ดีกว่า Whole blood อย่างไรก็ตามผลสรุปที่แน่นอนของการลดความดันโลหิตโดยการรับประทานส่วนประกอบใดของเลือดจระเข้นั้น จำเป็นต้องทำการศึกษาในระดับสัตว์ทดลองและมนุษย์ต่อไป

นอกจากนั้น เช่นเดียวกับการผลิต ACE inhibitory peptide จากกระบวนการ hydrolysis ของ Pepsin การใช้ Lithium Heparin และ Sodium Heparin เป็นสารป้องกันเลือดแข็งตัวไม่ส่งผลต่อ ACE inhibitory activity ที่ได้จากการย่อย Blood cell ด้วยเอนไซม์ตามระบบย่อยอาหารของมนุษย์ (ตารางที่ 8)

3. <u>ความสามารถในการทนต่อเอนไซม์ย่อยอาหารของมนุษย์ของ ACE inhibitory peptide ที่ได้จากเลือดจระเข้</u>

เนื่องจากผลการวิจัยชี้ว่า Hydrolysate ของทั้ง Whole blood และ Blood cell ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Pepsin เป็นเวลา 10 ชั่วโมง (ในที่นี้เรียกว่า Peptic hydrolysate) สามารถให้ ACE inhibitory activity สูงที่สุดในสภาวะที่ได้ทำการทดลอง ผู้วิจัยจึงได้ใช้ Whole blood และ Blood cell (ที่ได้จากการใช้ Sodium heparin) มาทำการย่อยด้วยเอนไซม์ Pepsin ตามสภาวะที่ให้ผล ACE inhibition สูงที่สุด แล้วนำ Peptic hydrolysate ที่ได้ไปทดสอบความสามารถในการทนต่อระบบย่อยอาหารของร่างกาย โดยการย่อยด้วยเอนไซม์ pepsin และตามด้วยเอนไซม์ pancreatin ที่ pH 2 และ 7.6 ตามลำดับ พบว่า Peptic hydrolysate ของ Whole blood มีค่า ACE inhibitory activity ลดลง เมื่อเทียบกับ Peptic hydrolysate ของ Whole blood ก่อนทำการย่อยด้วยเอนไซม์ที่มีในระบบย่อยอาหารของมนุษย์ ซึ่งสังเกตได้จากค่า IC_{50} ที่เพิ่มขึ้นหลังการย่อยด้วยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด (ตารางที่ 9) แสดงให้เห็นว่า ระบบย่อยอาหารของมนุษย์สามารถทำลายความสามารถในการยับยั้ง ACE ของเปปไตด์ได้บางส่วน แต่อย่างไรก็ตามค่า IC_{50} ที่ได้ยังคงสูงกว่าค่า IC_{50} ของ Whole blood ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ดังกล่าวโดยตรง (เท่ากับ 830.95 μg/ml)

ในขณะที่ Peptic hydrolysate ของ Blood cell มีค่า ACE inhibitory activity เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับ Peptic hydrolysate ของ Blood cell ก่อนทำการย่อยด้วยเอนไซม์ที่มีในระบบย่อยอาหารของมนุษย์ ซึ่งสังเกตได้จากค่า IC_{50} ที่ลดลงหลังการย่อยด้วยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด (ตารางที่ 9) แสดงให้เห็นว่า ระบบย่อยอาหารของมนุษย์สามารถเพิ่มความสามารถในการยับยั้ง ACE ของเปปไตด์ได้ นั่นคือ เมื่อรับประทาน Peptic hydrolysate ของ Blood cell จะได้สารยับยั้งเอนไซม์แองจิโอเทนซิ

นคอนเวอร์ตติงที่มีฤทธิ์สูงขึ้น ซึ่งน่าจะส่งผลให้ความดันเลือดลดลงสูงที่สุดในสภาวะการผลิตสารยับยั้งเอนไซม์แองจิโอเทนซินคอนเวอร์ต
ติงในงานวิจัยนี้

ตารางที่ 9 ความสามารถในการเป็นสารยับยั้งเอนไซม์แองจิโอเทนซินคอนเวอร์ตติงของ Hydrolysate ของ Whole blood และ Blood cell ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ pepsin ที่อุณหภูมิ 37 °C และ pH 2 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตามด้วยเอนไซม์ pancreatin ที่อุณหภูมิ 37 °C และ pH 7.6 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

Peptic hydrolysate	IC_{50} (µg/ml)	
	ก่อนการย่อย	หลังการย่อย
ของ Whole blood	447.35	563.26
ของ Blood cell	404.12	322.21

หมายเหตุ IC_{50} คือความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ได้ 50 %

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

1. <u>สรุปผลการวิจัย</u>
    1) เลือดจระเข้ โดยเฉพาะในส่วนของ Blood cell สามารถใช้เป็นแหล่งของสารยับยั้งเอนไซม์แองจิโอเทนซินคอนเวอร์ตติง ซึ่งสามารถเพิ่มมูลค่าของเลือดจระเข้ เป็นการเปิดโอกาสของเลือดจระเข้สู่ตลาดใหม่ในอนาคต รวมทั้งเป็นการเปิดมุมมองใหม่ในการใช้เลือดจระเข้เป็นสารลดความดันโลหิต
    2) เปปไตด์ที่มีสมบัติเป็นสารยับยั้งเอนไซม์แองจิโอเทนซินคอนเวอร์ตติงสามารถผลิตได้จากเลือดจระเข้ในส่วนของ Whole blood หรือ Blood cell โดยใช้กระบวนการ Hydrolysis ด้วยเอนไซม์ Pepsin เป็นเวลา 10 ชั่วโมง
    3) การรับประทานเลือดจระเข้ก็สามารถสร้างสารยับยั้งเอนไซม์แองจิโอเทนซินคอนเวอร์ตติงได้ แต่มีฤทธิ์ต่ำกว่าการใช้เอนไซม์ Pepsin ในการผลิต
    4) เปปไตด์ที่ผลิตได้นี้มีลักษณะของ Bioactive peptide คือ เมื่ออยู่ในสภาวะธรรมชาติ (คืออยู่ในสายของโปรตีนตามธรรมชาติ) จะไม่แสดงฤทธิ์ ต่อเมื่อถูกตัดพันธะให้กลายเป็น
    เปปไตด์จึงจะแสดงความสามารถที่คล้ายคลึงกับเอนไซม์หรือฮอร์โมนในร่างกาย

2. ข้อเสนอแนะ

ควรมีการทดสอบฤทธิ์การลดความดันโลหิตทาง Clinical ของเปปไตด์ที่ผลิตได้ เพื่อยืนยันการใช้เลือดจระเข้เป็นแหล่งผลิตของสารยับยั้งเอนไซม์แองจิโอเทนซินคอนเวอร์ตติง

บรรณานุกรม

Abubakar, A., Saito, T., Kitazawa, H., Kawai, Y., and Itoh, T. 1998. Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion. *J. Dairy Sci*. 81: 3131-3138.

Erdos, E.G., and Skidgel, R.A. 1987. The angiotensin I converting enzyme. *Laboratory Investigation*. 56(4): 345-347.

Ferreira, S. 1965. A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of Bothrops jararaca. *Br. J. Pharmacol*. 24: 163-169.

Goodfriend, T.L. 1999. Angiotensin converting enzyme. In: *Hypertension primer : the essentials of high blood pressure*. J.L. Izzo, Jr. and H.R. Black (Eds). Williams & Wilkins. Baltimore.

Hata, Y., Yamamoto, M., Ohni, M., Nakajima, K., Nakamura, Y., and Takano, T. 1996. A placebo-controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects. *Am. J. Clin. Nutr*. 64: 767-771.

Johnston, C. 1992. Renin-angiotensin system: A dual tissue and hormonal system for cardiovascular control. *J. hypertension*. 10 (suppl 7): s13-s26.

Kusump, S., Silva-Hernandez, E.R., and Ozimek, L. 2007. Isolation of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from casein hydrolysates by ultrafiltration. *Milchwissenschaft*. 62(3): 260-263.

Laragh, J. H., Bear, L., Brunner, H.R., Buhler, F.G., Sealey, J.E., and Vaughan, E.D. 1972. Renin, angiotensin and aldosterone system in pathogenesis and management of hypertensive vascular disease. *Am. J. Med*. 52: 633-652.

Maeno, M., Nakamura, Y., Mennear, J.H., and Bernard, B.K. 2005. Studies of the toxicological potential of tripeptides (L-valyl-L-prolyl-L-proline and L-isoleucyl-L-prolyl-L-proline): III. Single-and/or repeated-dose toxicity of tripeptides containing Lactobacillus

helvelitcus fermented milk powder and casein hydrolysate in rats. *Int. J. Toxicol*. 24: 13-23 Suppl. 4.

Maruyama, S., and Suzuki, H. 1982. A peptide inhibitor of angiotensin converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein. *Agric. Biol. Chem*. 46(5): 1393-1394.

Maruyama, S., Mitachi, H., Awaya, J., Kurono, M., Tomizuka, N., and Suzuki, H. 1987. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of the C-terminal hexapeptide of α(S1)-casein. *Agric. Biol. Chem*. 51(9): 2557-2561.

Maruyama, S., Nakagomi, K., Tomizuka, N., and Suzuki, H. 1985. Angiotensin-I converting enzyme inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein. II. Isolation and bradykinin potentiating activity on the uterus and the ileum of rats. *Agric. Biol. Chem*., 49(5): 1405-1409.

McAlister, F.A., Levine, M., Zarnke, K.B., Campbell, N., Lewanczuk, R., Leenen, F., Rabkin, S., Wright, J.M., Stone, J., Feldman, R.D., Lebel, M., Honos, G., Fodor, G., Burgess, E., Tobe, S., Hamet, P., Herman, R., Irvine, J., Culleton, B., Petrella, R., and Touyz, R. 2001. The 2000 Canadian recommendations for the management of hypertension: Part one — Therapy. *Can. J. Cardiol*. 17: 543-559.

Meisel, H., Goepfert, A., and Gunther, S. 1997. ACE-inhibitory activities in milk products. *Milchwissenschaft*. 52: 307-311.

Murray, C.J.L. 1996. The Global Burden Of Disease In 1990: Final Results And Their Sensitivity To Alternative Epidemiological Perspectives, Discount Rates, Age- Weights And Disability Weights. In *The Global burden of disease: A comprehensive assessment of mortality and disability from diseases, injuries, and risk factors in 1990 and projected to 2020*. C.J.L. Murray and A.D. Lopez (Eds). Harvard School of Public Health. Cambridge.

Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Okubo, A., Yamazaki, S., and Takano, T. 1995. Purification and characterization of angiotensin-I converting enzyme inhibitors from sour milk. *J. Dairy Sci*. 78: 777-783.

Opie, L. H. 1994. *Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors – Scientific Basic for Clinical Use*. John Willey and Sons. New York. 218-225.

Oshima, G., Shimabukuro, H., and Nagasawa, K. 1979. Peptide inhibitors of angiotensin I-converting enzyme in digests of gelatin by bacteria collagenase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 566: 128-137.

Shin Z-I, Yu, R., Park, S-A, Chung, D.K., Ahn, C-W., Nam, H-S., Kim, K-S., and Lee, H.J. 2001. His-His-Leu, an angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide derived from Korean soybean paste, exterts antihypertensive activity *in vivo*. *J. Agric. Food Chem*. 49: 3004-3009.

Takano, T. (1998) Milk derived peptides and hypertension reduction. *Int. Dairy J*. 8(5-6): 375-381.

Yamamoto, N., Akino, A., and Takano, T. 1994. Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J. Dairy Sci*. 77(4): 917-922.

Yamamoto, N., Maeno, M., and Takano, T. 1999. Purification and characterization of an antihypertensive peptide from a yoghurt-like product fermented by *Lactobacillus helveticus* CPN4. *J. Dairy Sci.* 82: 1388-1393.

Yu, Y., Hu, J., Miyaguchi, Y., Bai, X., Du, Y., and Lin, B. 2006. Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from porcine hemoglobin. *Peptides*. 27: 2950-2956.