

บทที่ 1

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

จระเข้เป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญอย่างหนึ่งของประเทศไทย ถึงแม้ว่าจะยังไม่ได้อยู่ในอันดับต้นๆ ของสัตว์เศรษฐกิจส่งออกอย่างเช่นกุ้งกุลาดำหรือสัตว์น้ำอื่นๆ แต่ก็สามารถสร้างรายได้ให้กับประเทศไทย ได้ไม่น้อย ในปัจจุบันประเทศไทยถือว่าค่อนข้างประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงในเชิงปริมาณและคุณภาพ อย่างไรก็ตามในตลาดอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงจระเข้ นั้น การส่งออกหนังและเนื้อจระเข้ ถือได้ว่าเป็นการแปรรูปหลักแต่ส่วนอื่นโดยเฉพาะในเลือดหรือส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำเลือดของจระเข้ ซึ่งถือว่าเป็นผลผลิตที่มาจากกระบวนการแปรรูปอีกอย่างหนึ่งที่มีมากเกินพอ และยังมีการศึกษาหรือนำไปใช้ประโยชน์น้อยมาก โดยพบว่ามี การนำซีรัมโปรตีนจากเลือดจระเข้ไปใช้เป็นยาสมุนไพรในการรักษาโรคต่างๆ ได้ จากข้อมูลของการเพาะเลี้ยงจะพบว่าจระเข้มีพฤติกรรมก้าวร้าว กัดและต่อสู้ โดยเฉพาะในฤดูผสมพันธุ์ จระเข้ตัวผู้จะต่อสู้กันเพื่อครอบครองตัวเมียจนทำให้เกิดบาดแผลที่ใหญ่มาก แต่พบว่าจระเข้ไม่มีปัญหาของการติดเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อซ้ำเติมจากการได้รับบาดเจ็บนั้นเลย ถึงแม้ว่าสภาพแวดล้อมที่อยู่อาศัยจะแออัดยัดเยียด การติดเชื้อก็ตาม พบว่าบาดแผลของจระเข้จะหายไปในภายใน 5-6 สัปดาห์ โดยที่ไม่มีอาการของโรคติดเชื้อเลย ทำให้ไม่มีปัญหาของการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย หรือเชื้อซ้ำเติมเช่น เชื้อรา ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าจระเข้มีการสร้างโปรตีน หรือเปปไทด์ หรือมีระบบภูมิคุ้มกันตามธรรมชาติพิเศษที่สามารถทำลายแบคทีเรียได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูง จากรายงานการศึกษามากแล้วในพวกสัตว์มีกระดูกสันหลัง เช่น คน (Zasloff, 2002) หมู (Lee et.al., 1989) โค (Selsted et.al., 1992) และกบ (Halverson et.al., 2000) พบว่าสัตว์เหล่านี้สามารถสร้างโปรตีน หรือเปปไทด์ที่ทำลายแบคทีเรียและเชื้อราได้ และสารสกัดจากสัตว์เหล่านี้อยู่ในระหว่างการพัฒนาไปใช้เป็นยาในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย แต่อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานการศึกษาแน่นอนว่ามีโปรตีนหรือเปปไทด์ตัวใด หรือสารกลุ่มใดที่เกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่ในการป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรียในจระเข้สายพันธุ์ที่มีในประเทศไทย ซึ่งถ้าสามารถทราบถึงโปรตีนหรือสารต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันการติดเชื้อในจระเข้จะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการนำไปสู่การพัฒนาใช้เพื่อผลิตเป็นวัคซีน หรือการพัฒนาจากผลิตภัณฑ์ที่มีอยู่มากเกินพอจากอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงจระเข้ เป็นการเพิ่มมูลค่าเพิ่มในด้านการตลาดของวงการอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงจระเข้ และเพิ่มรายได้ให้แก่ประเทศไทยมากยิ่งขึ้นที่สำคัญปัจจุบันนี้ประเทศไทยมีการใช้ยาปฏิชีวนะมากขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งก่อให้เกิดแบคทีเรียที่มีการดื้อยามากขึ้น ถือว่าเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขอย่างหนึ่งของประเทศไทย นอกจากนี้ในด้านการแพทย์ยังมีแบคทีเรียที่มักจะแสดงอาการซ้ำหลังจากมีอาการติดเชื้อ แบคทีเรียพวกนี้

มักจะก่อให้เกิดการติดเชื้อหลังผ่าตัด หรือภายหลังการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ ก่อให้เกิดปัญหาอย่างมากต่อการรักษาและชีวิตของคนไข้ และในทางการเกษตรยังมีแบคทีเรีย หรือเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในพืช เพราะฉะนั้น การศึกษาหาโปรตีนเปปไทด์หรือสารกลุ่มออกฤทธิ์ที่มีสมบัติด้านแบคทีเรียชนิดใหม่ที่มีอยู่ในธรรมชาติ น่าจะเป็นอีกทางหนึ่งที่มีประโยชน์อย่างมากต่อการต่อสู้กับโรคติดเชื้อแบคทีเรียและโรคเชื้อรา โดยเฉพาะในกระชังซึ่งมีการศึกษาว่าเป็นสัตว์ที่มีความทนทานอย่างมากต่อการติดเชื้อ ซึ่งจากการศึกษาพบว่าซีรัมของกระชังสายพันธุ์ในออสเตรเลียสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ 17 ชนิด เมื่อเปรียบเทียบกับซีรัมมนุษย์ซึ่งยับยั้งได้เพียง 6 ชนิด ล่าสุดจากการศึกษาของ Merchant et al. (2003) รายงานว่า ซีรัมกระชัง (*Alligator mississippiensis*) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E.coli* ได้ดีกว่าซีรัมมนุษย์และยืนยันคุณสมบัติการทำลายเชื้อแบคทีเรียอาจจะมาจากการทำงานของระบบ complement นอกจากนี้ยังพบว่าซีรัมกระชังจากอเมริกาสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ HIV-1, WNV และ HSV-1 และในปัจจุบันได้แยก leukocyte extract จากเลือดกระชังและพบเปปไทด์ที่สามารถทำลายแบคทีเรียและเชื้อราได้หลายชนิด (Merchant et al., 2006) และจากการศึกษาของ สุภาวดี ปาทา และคณะ (2007) แยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเลือดของกระชัง (ซีรัม พลาสมา และสารสกัดเม็ดเลือดขาว) ที่สามารถต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียพบว่าสารที่แยกได้จากซีรัมกระชังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียอย่างน้อย 7 ชนิด ประกอบด้วย *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Vibrio cholerae* โดยทั้งซีรัม พลาสมา และสารสกัดจากเม็ดเลือดขาวของเลือดกระชังมีฤทธิ์ในการยับยั้งในการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมลบ และแกรมบวกได้แตกต่างกัน โดยในส่วนของฮีโมโกลบินได้มีรายงานเกี่ยวกับการศึกษาหน้าที่ของฮีโมโกลบินที่ทำหน้าที่เป็นสาร antimicrobial นอกเหนือจากทำหน้าที่ในการขนส่งออกซิเจน ตัวอย่างเช่น Fogaca et al. (1999) แยกเปปไทด์จากเลือดของเห็บวัว พบว่าเปปไทด์สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และ เช็ด ซึ่งเปปไทด์ที่แยกได้ คือส่วนของลำดับกรดอะมิโน 33-61 ในสายแอลฟาของฮีโมโกลบิน Mak et al. (2004) ทำการศึกษาสายเปปไทด์ของฮีโมโกลบินจากเลือดประจำเดือนของมนุษย์ พบว่ามีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ แต่จะออกฤทธิ์ได้ดีในกลุ่มของแบคทีเรียที่เป็นแกรมบวกมากกว่าแกรมลบ Nedjar-Arroume et al. (2008) ศึกษาคุณสมบัติฮีโมโกลบินของวัวในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยพบว่ามีส่วนของสายพอลิเปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสี่สายพันธุ์ คือ *Micrococcus luteus* A270, *Listeria innocua*, *Escherichia coli* และ *Salmonella enteritidis* และนอกจากนี้ยังมีรายงานที่ศึกษาเกี่ยวกับฮีโมโกลบินของสัตว์เลื้อยคลาน เช่น กระชัง โดย Hoffman et al. (2002) ได้ศึกษาฮีโมโกลบินที่สกัดจากเลือดของกระชังสายพันธุ์อเมริกาโดยศึกษาฮีโมโกลบินทั้งสายแอลฟา และบีตาที่ไม่มีฮีม (heme) อยู่ในสายฮีโมโกลบิน พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบและเชื้อราได้

ได้แก่ *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *C. albicans* งานวิจัยส่วนใหญ่ในการศึกษาเกี่ยวกับฮิโมโกลบินจะเป็นการศึกษาจะอยู่ในวงศ์แอลลิเกเตอร์ (Family Alligatoridae) มีชื่อสามัญว่า แอลลิเกเตอร์ (alligator) และ คายแมน (caiman) แต่ยังมีข้อมูลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของฮิโมโกลบินของจะเข้ในวงศ์ครอกโคคิลิดี (Family Crocodylidae) เรียกกันว่า ครอกโคคิล (crocodile) อยู่น้อยมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งในจะเข้สายพันธุ์ไทยเพราะนั้นในงานวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเพื่อทดสอบประสิทธิภาพและศึกษากลไกการทำลายเชื้อแบคทีเรียของฮิโมโกลบินจะเข้สายพันธุ์ไทย ในรูปยาเม็ด แคปซูลและครีม ในด้านการทำลายเชื้อแบคทีเรีย การละลายกลับ ความคงตัว และความเป็นพิษต่อเซลล์ ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาจะนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ในทางอุตสาหกรรม และพัฒนาไปสู่เชิงพาณิชย์ต่อไปในอนาคต

2. วัตถุประสงค์

2.1 เพื่อทดสอบประสิทธิภาพและศึกษากลไกการทำลายเชื้อแบคทีเรียของฮิโมโกลบินจะเข้ ในรูปยาเม็ด แคปซูลและครีม

2.2 ทดสอบการละลายกลับ ความคงตัว และความเป็นพิษต่อเซลล์ ของฮิโมโกลบินจะเข้ในรูปยาเม็ด แคปซูลและครีม

3. ขอบเขตของโครงการวิจัย

เป็นการศึกษาประสิทธิภาพและศึกษากลไกการทำลายเชื้อแบคทีเรียของฮิโมโกลบินจะเข้สายพันธุ์ไทย ในรูปยาเม็ด แคปซูลและครีม โดยอาศัยเทคนิคทางกล้องจุลทรรศน์ (Fluorescent และ electron microscopy) ซึ่งจะทำให้เข้าใจกลไกการเข้าทำลายเชื้อแบคทีเรียซึ่งอาจทำลายที่ผนังเซลล์ เซลล์เมมเบรนหรือภายในไซโทพลาสซึมของเซลล์แบคทีเรีย จากนั้นทำการตรวจสอบการละลายกลับ ความคงตัว และความเป็นพิษต่อเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยของฮิโมโกลบินจะเข้ในรูปยาเม็ด แคปซูลและครีม

4. ทฤษฎี สมมุติฐานและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

จะเข้เป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญอย่างหนึ่งของประเทศไทย ถึงแม้ว่าจะยังไม่ได้อยู่ในอันดับต้นๆ ของสัตว์เศรษฐกิจส่งออกอย่างเช่นกุ้งกุลาดำหรือสัตว์น้ำอื่นๆ แต่ก็สามารถสร้างรายได้ให้กับประเทศไทยได้ไม่น้อย โดยเฉพาะในช่วงปีที่ผ่านมาประเทศไทยได้ส่งออกผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการแปรรูปในสัดส่วนที่เพิ่มขึ้น และยังมีสถิติการส่งออกในระดับร้อยละในทุกรอบปี จากข้อมูลการเพาะเลี้ยงจะเข้และภูมิปัญญาชาวบ้านพบว่าการนำชีรัมโปรตีนจากเลือดจะเข้ไปใช้เป็นยาสมุนไพรใช้ในการรักษาโรคต่างๆ ได้ และพบว่าจะเข้เป็นสัตว์ที่มีพฤติกรรมก้าวร้าว กัดและต่อสู้กันอย่างมาก โดยเฉพาะในฤดูผสมพันธุ์ จะเข้ตัวผู้จะต่อสู้

กันเพื่อครอบครองตัวเมียจนทำให้เกิดบาดแผลที่ใหญ่มาก แต่จะไม่มีปัญหาของการติดเชื้อแบคทีเรียหรือติดเชื้อซ้ำเติมจากการได้รับบาดเจ็บนั้นเลยถึงแม้ว่าสภาพแวดล้อมที่อยู่อาศัยจะเอื้ออำนวยต่อการติดเชื้อก็ตาม จะพบว่าบาดแผลของจระเข้จะหายไปในภายใน 5-6 สัปดาห์โดยที่ไม่มีอาการของโรคติดเชื้อเลย ทำให้ไม่มีปัญหาของการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งจากข้อมูลนี้อาจเป็นไปได้ว่าจระเข้มีการสร้างโปรตีนหรือเปปไทด์ หรือมีระบบภูมิคุ้มกันตามธรรมชาติชนิดพิเศษที่สามารถทำลายแบคทีเรียได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูง ซึ่งเคยมีรายงานการศึกษามาแล้วในพวกสัตว์มีกระดูกสันหลังเช่น คน หมู โค และ กบ ว่าสามารถสร้างโปรตีนหรือเปปไทด์ที่ทำลายแบคทีเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพและอยู่ในระหว่างการพัฒนาใช้เป็นยาในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการศึกษาแน่นอนว่ามีโปรตีนหรือเปปไทด์ตัวใดหรือกลุ่มใดที่เกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่ในการป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรียในจระเข้สายพันธุ์ที่มีในประเทศไทย ซึ่งถ้าสามารถทราบถึงโปรตีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันการติดเชื้อในจระเข้จะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการนำไปสู่การพัฒนาใช้เพื่อผลิตเป็นวัคซีนหรือการพัฒนาเพื่อป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรียในอนาคต