



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

.....
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (สัตววิทยา)

ปริญญา

.....
สัตววิทยา

.....
สัตววิทยา

.....
สาขา

.....
ภาควิชา

เรื่อง Respiratory Burst Activity ของแมคโครฟาจปลานิล *Oreochromis niloticus* Linn.
ที่ถูกกระตุ้นด้วยแบคทีเรีย *Mycobacterium lacticola* และ *Escherichia coli*

Respiratory Burst Activity in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* Linn.

Macrophages Activated by *Mycobacterium lacticola* and *Escherichia coli*

นามผู้วิจัย นายวีรศักดิ์ แต่งพันธ์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(.....
ผู้ช่วยศาสตราจารย์กนกทิมาณี ประเดิมวงศ์, วท.ด.)

กรรมการ

(.....
ผู้ช่วยศาสตราจารย์สมาน แก้วไวยุทธ, วท.ด.)

กรรมการ

(.....
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ศิริรักษ์ จันทกรู, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(.....
รองศาสตราจารย์บุญเกียรติ วัชรเสถียร, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....
(.....
รองศาสตราจารย์กัญจนา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

Respiratory Burst Activity ของแมคโครฟาจปลาไนล *Oreochromis niloticus* Linn. ที่ถูกกระตุ้นด้วย
แบคทีเรีย *Mycobacterium lacticola* และ *Escherichia coli*

Respiratory Burst Activity in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* Linn. Macrophages Activated
by *Mycobacterium lacticola* and *Escherichia coli*

โดย

นายวีรศักดิ์ แต่งพันธ์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สัตววิทยา)
พ.ศ. 2554

วีรศักดิ์ แต่งพันธ์ 2554: Respiratory Burst Activity ของแมคโครฟาจปลาไนล์

Oreochromis niloticus Linn. ที่ถูกกระตุ้นด้วยแบคทีเรีย *Mycobacterium lacticola* และ

Escherichia coli ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (สัตววิทยา) สาขาสัตววิทยา ภาควิชาสัตววิทยา

ประธานกรรมการที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์กนกทิมาณี ประเดิมวงศ์, วท.ค. 112 หน้า

Mycobacterium lacticola เป็นแบคทีเรียชนิดทนกรดที่พบได้ในดินและน้ำ ในปี 2004 มีรายงานการก่อโรคเป็นครั้งแรกในคน จึงได้ตรวจสอบการด้านการติดเชื้อ *M. lacticola* ของ macrophage ด้วยกระบวนการ respiratory burst โดยใช้ macrophage ของปลาไนล์ *Oreochromis niloticus* ที่แยกได้จากไตส่วนต้นเป็นตัวแทนเปรียบเทียบกับ *Escherichia coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียชนิดแกรมลบ และเปรียบเทียบกับ การตอบสนองของ macrophage ต่อกรดไมโคลิก (mycolic acid) และลิพโพลีแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide; LPS) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ และมีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนของ *M. lacticola* และ *E. coli* ตามลำดับ โดยบ่ม macrophage กับ *M. lacticola*, *E. coli* กรดไมโคลิก และ LPS นาน 60 นาที โดยเซลล์ที่ไม่เติมเชื้อและตัวกระตุ้นเป็นกลุ่มควบคุม จากนั้นวัดความเข้มข้นของอนุมูลอิสระจากส่วนไตด้วยวิธี phenol red method, Griess reaction assay และ superoxide anion assay ตามลำดับ พบว่ากรดไมโคลิกกระตุ้นให้ macrophage ปล่อยไนตริกออกไซด์ออกมาได้มากที่สุดมีความเข้มข้น 4.44 ± 1.4 รองลงมาคือไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน มีความเข้มข้น 2.19 ± 0.2 และ 2.09 ± 0.15 นาโนโมลต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วน *E. coli* และ LPS กระตุ้นให้ macrophage ปล่อยซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน ออกมาได้มากที่สุดมีความเข้มข้น 29.63 ± 0.71 และ 29.54 ± 1.56 นาโนโมลต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ รองลงมาคือไนตริกออกไซด์ 16.52 ± 0.28 และ 17.09 ± 0.69 และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 10.87 ± 0.05 และ 11.06 ± 0.16 นาโนโมลต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ไม่พบการปล่อยอนุมูลอิสระออกมาจาก macrophage ที่กระตุ้นด้วย *M. lacticola* วัดกิจกรรมของเอนไซม์ต้านอนุมูลพิษได้แก่ glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) จากส่วนไตของเซลล์ที่ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ด้วยวิธี colorimetric assay, Cayman's catalase assay และ RANSOD ตามลำดับ พบว่า macrophage ที่กระตุ้นด้วยกรดไมโคลิกมีกิจกรรมของ SOD สูงขึ้นมากที่สุด ความเข้มข้น 124.67 ± 3.65 รองลงมาคือ GSH-Px 124 ± 11.67 และ CAT 115.69 ± 1.67 มิลลิวินิต ตามลำดับ ส่วน *E. coli* และ LPS มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงขึ้นแต่ไม่แตกต่างกัน โดย GSH-Px มีความเข้มข้น 280.48 ± 3.91 และ 275.67 ± 13.07 CAT มีความเข้มข้น 258.48 ± 0.99 และ 255.26 ± 3.16 ส่วน SOD มีความเข้มข้น 256.99 ± 5.07 และ 250.48 ± 4.20 มิลลิวินิต ตามลำดับ แต่ macrophage ที่กระตุ้นด้วย *M. lacticola* พบกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสามชนิดนี้แต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม

ลายมือชื่อนิติ

ลายมือชื่อประธานกรรมการ

Weerasak Taengphan 2011: Respiratory Burst Activity in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* Linn. Macrophages Activated by *Mycobacterium lacticola* and *Escherichia coli*. Master of Science (Zoology), Major Field: Zoology, Department of Zoology. Thesis Advisor: Assistant Professor Kantimane Pradermwong, Ph.D. 112 pages.

Mycobacterium lacticola, acid fast bacteria found in soil and water, has been firstly reported in 2004 to cause disease. The aim of this study was to investigate the respiratory burst of the head kidney isolated macrophages of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* exposed to *M. lacticola*. The experiment was compared with *Escherichia coli*, gram-negative bacteria, and macrophage-activating agents, mycolic acid and lipopolysaccharide (LPS) which were the respective cell wall components of *M. lacticola* and *E. coli*. The cultured macrophages were activated with *M. lacticola*, *E. coli*, mycolic acid and LPS for 60 min. The supernatant of the cultures was subjected to determine toxic radical concentrations by phenol red method, griess reaction assay and superoxide anion assay. The results showed that mycolic acid could stimulate macrophage to release nitric oxide, hydrogen peroxide and superoxide anion at concentrations 4.44 ± 1.4 , 2.19 ± 0.2 and 2.09 ± 0.15 nmol/ml, respectively. In cultures activated with *E. coli* and LPS coincided with the release of superoxide anion at concentrations 29.63 ± 0.71 and 29.54 ± 1.56 nmol/ml, nitric oxide 16.52 ± 0.28 and 17.09 ± 0.69 , and hydrogen peroxide 10.87 ± 0.05 and 11.06 ± 0.16 nmol/ml, respectively, but this was not the case in culture treated with *M. lacticola*. Furthermore, the activities of the antioxidant enzymes, glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD), were evaluated from the supernatant of cell fraction by colorimetric assay, Cayman's catalase assay and RANSOD, respectively. Significantly, activated macrophages by mycolic acid were able to increase the activities of GSH-Px, CAT, SOD at 124 ± 11.67 , 115.69 ± 1.67 and 124.67 ± 3.65 mU, respectively. Moreover, *E. coli* and LPS were able to increase the activities of GSH-Px at 280.48 ± 30.91 and 275.67 ± 13.07 , CAT at 258.48 ± 0.99 and 255.26 ± 3.16 and SOD at 256.99 ± 5.07 and 250.48 ± 4.20 mU, respectively. Unfortunately, activated macrophages by *M. lacticola* was not increased the activities of antioxidant enzymes.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จรูวงได้ด้วยความกรุณา และเอาใจใส่เป็นอย่างดีจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กันทิมาณี ประเดิมวงศ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ ข้อเสนอแนะ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ รวมทั้งเอื้อเฟื้อเอกสารประกอบการวิจัย อุปกรณ์ต่าง ๆ ในการทำการวิจัย และขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมาน แก้วไวยุทธ กรรมการสาขาวิชาเอก และผู้ช่วยศาสตราจารย์ สพ.ญ. ดร. ศิริรักษ์ จันทกร กรรมการสาขาวิชารอง สำหรับความรู้ คำปรึกษา สละเวลาในการให้ข้อคิดเห็น ข้อเสนอแนะ ตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น และให้การสนับสนุนอย่างดียิ่งตลอดมา นอกจากนี้กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. นนทวิทย์ อารีขันธ์ ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่ได้สละเวลาให้ข้อคิดเห็น และข้อเสนอแนะให้วิทยานิพนธ์มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาสัตววิทยาทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอน ประสิทธิ์ประสาทวิชา มอบความรู้อันเป็นคุณค่ายิ่งต่อการนำไปใช้ประโยชน์ในภายภาคหน้า ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. พชร สุนทรนนท์ อาจารย์ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในการอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรีย *Mycobacterium lacticola* ทำให้สามารถปฏิบัติงานได้วัตถุประสงค์ของงานวิจัย ประสบความสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี และขอบคุณพี่ ๆ น้อง ๆ ทุกคนในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อทุกคนที่เป็นกำลังใจ และคำปรึกษาที่ดีตลอดมา

ด้วยความดีหรือประโยชน์อันใดเนื่องจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอมอบแด่คุณพ่อ คุณแม่ และบุคคลในครอบครัว ที่ได้ให้โอกาสในการศึกษา

วิรัชศักดิ์ แต่งพันธ์

มีนาคม 2554

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	35
ผลและวิจารณ์	45
ผล	45
วิจารณ์	52
สรุปและข้อเสนอแนะ	70
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	72
ภาคผนวก	98
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	112

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ความเข้มข้นของอนุมูลอิสระ (mean±SD) ที่ macrophage สร้างขึ้นเพื่อตอบสนองต่อตัวกระตุ้นที่แตกต่างกัน	47
2	กิจกรรมของเอนไซม์ glutathione peroxidase (GSH-Px) ที่ macrophage ตอบสนองต่อตัวกระตุ้นที่แตกต่างกัน (mean±SD)	49
3	กิจกรรมของเอนไซม์ catalase (CAT) ที่ macrophage ตอบสนองต่อตัวกระตุ้นที่แตกต่างกัน (mean±SD)	50
4	กิจกรรมของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ที่ macrophage ตอบสนองต่อตัวกระตุ้นที่แตกต่างกัน (mean±SD)	51
ตารางผนวกที่		
1	การเตรียมสารละลาย potassium phosphate buffer	101
2	McFarland nephelometer standard	102
3	ค่าดูดกลืนแสงของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ 610 นาโนเมตร	104
4	ค่าดูดกลืนแสงของโพแทสเซียมซูเปอร์ออกไซด์ที่ 505 นาโนเมตร	105
5	ค่าดูดกลืนแสงของไนตริกออกไซด์ที่ 540 นาโนเมตร	106

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การจับกินแบคทีเรียของ macrophage ปลานิล	45
ภาพผนวกที่		
1	กราฟมาตรฐานไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	105
2	กราฟมาตรฐานซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน	106
3	กราฟมาตรฐานไนตริกออกไซด์	107
4	กราฟมาตรฐานกิจกรรมของเอนไซม์ catalase	109
5	กราฟเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง log ความเข้มข้นของ superoxide dismutase	111

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

APC	=	antigen presenting cell
CAT	=	catalase
CTL	=	cytotoxic T lymphocyte
<i>E. coli</i>	=	<i>Escherichia coli</i>
GSH-Px	=	glutathione peroxidase
H ₂ O ₂	=	hydrogen peroxide
IFN- γ	=	interferon gamma
IFN- β	=	interferon beta
Ig	=	immunoglobulin
iNOS	=	inducible nitric oxide synthase
IRAK	=	IL-1R-associated kinase
LAM	=	lipoarabinomannan
LPS	=	lipopolysaccharide
LRR	=	leucine-rich receptor
MAL	=	MyD88 –adapter like protein
M-CSF	=	macrophage-colony stimulating factor
MD2	=	soluble-lipid transfer protein MD 2
MHC	=	Major Histocompatibility Complex
<i>M. lacticola</i>	=	<i>Mycobacterium lacticola</i>
MyD 88	=	cytoplasmic adaptor molecule
NADPH	=	reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NF- κ B	=	nuclear factor-kappa B
NK cell	=	natural killer cell
NO	=	nitric oxide
O ₂ ⁻	=	superoxide anion
PKC	=	protein kinase C
ROS	=	reactive oxygen species

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

RNS	=	reactive nitrogen species
SOD	=	superoxide dismutase
T _c cell	=	T- lymphocyte cytotoxic cell
TCR	=	T cell receptor
T _h cell	=	T- lymphocyte helper cell
TIR	=	toll interleukin-rich receptor domain
TIRAP	=	TIR domain –containing adaptor protein
TLR	=	Toll-like receptor
TNF- α	=	tumor necrosis factor-alpha
TRAF 6	=	Tumour -necrosis-factor-receptor-asscoiate –factor 6

Respiratory Burst Activity ของแมคโครฟาจปลาไน *Oreochromis niloticus* Linn.

ที่ถูกกระตุ้นด้วยแบคทีเรีย *Mycobacterium lacticola* และ *Escherichia coli*

Respiratory Burst Activity in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* Linn.

Macrophages Activated by *Mycobacterium lacticola* and *Escherichia coli*

คำนำ

เมื่อร่างกายเกิดการติดเชื้อไม่ว่าจากจุลชีพใดก็ตาม จะมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเพื่อต่อต้านการติดเชื้อ การตอบสนองนั้นเป็นแบบที่มีมาแต่กำเนิด (innate immune response) เกิดขึ้นเพื่อทำลายเชื้อ การตอบสนองนี้ประกอบด้วย การตอบสนองแบบอาศัยสารน้ำ (humoral mediated innate immune response) และการตอบสนองแบบพึ่งเซลล์ (cell mediated innate immune response) เซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันที่ทำหน้าที่ต่อต้านการติดเชื้ออันดับแรกคือ phagocyte (สิทธิศักดิ์, 2549; Dirk *et al.*, 2002; Actor, 2007)

macrophage เป็นเซลล์กลุ่ม phagocyte ทำหน้าที่เป็นลำดับแรกในการต่อต้านเชื้อ โดยเซลล์มีความสามารถในการกินและทำลาย (phagocytosis) จุลชีพ ทั้งรา แบคทีเรีย โปรโตซัว และสิ่งแปลกปลอมอื่น ๆ กระบวนการที่เกิดขึ้นภายในเซลล์เพื่อทำลายจุลชีพมี 2 กลไก คือการทำลายที่ไม่ใช้ออกซิเจน (non-oxidative mechanism) และใช้ออกซิเจน (oxidative mechanism) ซึ่งกลไกหลังจะมีการเปลี่ยนแปลงเมแทบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับออกซิเจนภายในเซลล์อย่างมาก การเปลี่ยนแปลงนี้เรียกว่า respiratory burst สิ่งที่ได้จาก respiratory burst คือ อนุมูลที่มีความเป็นพิษสูง (toxic radical) สามารถทำลายจุลชีพที่บุกรุกร่างกายได้ (อรวดี, 2551; Adams *et al.*, 1997; Maaike *et al.*, 2006)

แบคทีเรีย *Mycobacterium* ส่วนใหญ่ก่อให้เกิดโรคทั้งในคน สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สัตว์ปีก และสัตว์เลือดเย็นอื่น ๆ (Ruth and Yanong, 2002; David, 2005) *Mycobacterium lacticola* สามารถพบในดิน น้ำ ในลำไส้ของไส้เดือนดิน และปนเปื้อนในนํ้านม โดยทั่วไปไม่ก่อโรคแต่เมื่อไม่นานมานี้พบการติดเชื้อในเด็กหญิงวัย 4 ปีที่ป่วยเป็น โรคมะเร็งหลังได้รับการรักษาทางเคมี โดยมีอาการไข้เรื้อรังและคือต่อยา (จูริย์รัตน์, 2547; Khambata and Bhat, 1954; Deanna *et al.*, 2004; Enrico, 2006; Xiang and Kalen, 2007) *Mycobacterium* หลายชนิด เช่น *M. marinum* , *M. bovis*

เป็นต้น สามารถติดต่อจากสัตว์สู่คนได้ (zoonosis) ทนต่อการทำลายด้วยเอนไซม์ และอนุมูลอิสระ และยังแบ่งตัวได้ใน macrophage จึงยากแก่การควบคุม ป้องกันและรักษา ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของประชากรและเศรษฐกิจการเลี้ยงสัตว์อย่างมาก ปัจจุบันก็ยังคงเป็นปัญหาทางสาธารณสุขและทางการแพทย์อย่างต่อเนื่อง องค์การอนามัยโลก (WHO) ได้ลำดับความสำคัญให้โรคที่เกิดจากแบคทีเรียชนิดนี้มีความสำคัญเป็นลำดับต้น ๆ ในประเทศที่กำลังพัฒนา สาเหตุหลักที่ทำให้การควบคุมและการรักษาโรคนั้นมีข้อจำกัดคือการขาดความรู้ ความเข้าใจในกลไกพื้นฐานระดับเซลล์และโมเลกุล ระหว่างเชื้อมีความต้านทานของเซลล์ร่างกาย (สิทธิศักดิ์, 2549; Bannantine and Stable, 1999; David, 2005; Philipp and Pieters, 2006; Rachel *et al.*, 2006) ดังนั้นการศึกษากลไกพื้นฐานการตอบสนองของ macrophage ต่อการรุกรานของ *Mycobacterium* จึงเป็นสิ่งที่จำเป็น

การศึกษานี้ใช้ macrophage ของปลานิลเป็นแบบจำลองในการทดลอง เนื่องจากพบ *M. lacticola* ได้ทั้งในดินและน้ำ (Khambata and Bhat, 1954; Deanna *et al.*, 2004) จึงอาจก่อให้เกิดโรคกับสัตว์น้ำได้เหมือนกับ *M. marinum*, *M. fortuitum* และ *M. chelonae* (Ruth and Yanong, 2002; Virginia and Kent, 2007; Passantino *et al.*, 2008) นอกจากนี้ macrophage ของปลานิลยังมีรูปร่างและหน้าที่คล้ายกับของสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง (วิน และคณะ, 2545; Adenwumi *et al.*, 2006) ซึ่งถ้า *M. lacticola* ติดต่อเข้าสู่คนได้ ผลจากการศึกษานี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการเพิ่มประสิทธิภาพให้ macrophage กำจัด *M. lacticola* ได้ดีขึ้น รวมทั้งการประยุกต์ใช้ข้อมูลจากผลการทดลองทางคลินิก และพัฒนาเพื่อรักษาโรคที่เกิดจาก *Mycobacterium* ให้มีประสิทธิภาพต่อไป โดยการศึกษานี้ใช้ respiratory burst และเอนไซม์กลุ่ม antioxidant เป็นสิ่งบ่งชี้การตอบสนองต่อ *M. lacticola* โดยเปรียบเทียบกับ *Escherichia coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ macrophage สามารถกำจัดได้ (Richard *et al.*, 2000)

วัตถุประสงค์

1. เปรียบเทียบปริมาณอนุมูลอิสระซึ่ง macrophage ของปลานิลผลิตออกมาในการต่อต้านแบคทีเรีย *M. lacticola* และ *E. coli*
2. เปรียบเทียบปริมาณอนุมูลอิสระซึ่ง macrophage ของปลานิลผลิตออกมาในการตอบสนองต่อกรดไมโคลิก (mycolic acid) และลิพโพลีแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide; LPS) ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย
3. เปรียบเทียบกิจกรรม (activity) ของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระที่ macrophage ของปลานิลตอบสนองต่อแบคทีเรีย *M. lacticola*, *E. coli* กรดไมโคลิก (mycolic acid) และลิพโพลีแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide; LPS)

การตรวจเอกสาร

1. ระบบภูมิคุ้มกันของปลากระดูกแข็ง

ระบบภูมิคุ้มกัน (immune system) หมายถึงระบบที่ทำหน้าที่ต่อต้าน หรือตอบสนอง (immune response) ต่อเชื้อโรค หรือสิ่งแปลกปลอมที่เรียกว่าแอนติเจน เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอม หรือต้านทานโรคได้ ผลที่เกิดจากระบบภูมิคุ้มกันเรียกว่า ภูมิคุ้มกัน หรือภูมิต้านทาน (immunity) มีรากศัพท์มาจากภาษาละตินว่า *immunis* แปลว่ายกเว้น (except) หมายถึง การยกเว้นจากโรคที่เคยเป็นมาแล้ว (ไพศาล, 2548; อรวดี, 2551)

สัตว์ในธรรมชาตินอกจากเผชิญอันตรายจากผู้ล่าแล้ว ยังต้องเผชิญกับจุลินทรีย์ ปรสิต เชื้อโรค และสิ่งแปลกปลอมต่าง ๆ สัตว์จึงต้องมีการพัฒนาระบบป้องกันหรือระบบภูมิคุ้มกันเพื่อใช้ต่อต้านอันตรายจากการรุกรานเหล่านั้น (ไพศาล, 2548) ดังนั้นหน้าที่ของระบบภูมิคุ้มกันคือการป้องกันการบุกรุกจากสิ่งแปลกปลอม เชื้อโรคจากสิ่งแวดล้อม และกำจัดเซลล์ที่ผิดปกติภายในร่างกาย เพื่อให้ร่างกายสามารถดำเนินไปโดยไม่เสียสมดุล (สันนิภา, 2549)

ปลาเป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังโบราณ มีวิวัฒนาการอยู่ระหว่างสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังและสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง กระบวนการทางภูมิคุ้มกันในปลาทั้งกลไกของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ได้แก่ กระบวนการ phagocytosis โดย neutrophil, acidophilic granulocyte, macrophage และเม็ดเลือดขาวชนิด granulocyte รวมทั้งกระบวนการทางภูมิคุ้มกันของสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง เช่น การสร้างแอนติบอดี เป็นต้น เนื่องจากปลาไม่มีไขกระดูกดังนั้นกระบวนการสร้างเม็ดเลือดขาวจึงเกิดที่ อวัยวะน้ำเหลือง (lymphoid organ) ได้แก่ ไตส่วนหน้า ม้าม ต่อมไทมัส และเนื้อเยื่อน้ำเหลือง (lymphoid tissue) ซึ่งพบได้ตลอดตามแนวยาวของท่อทางเดินอาหาร (gut-associated lymphoid tissue; GALT) (Press and Evensen, 1999; Adenwumi *et al.*, 2006) นอกจากนี้ปลายังเป็นสัตว์กลุ่มแรกที่มีการพัฒนาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด หรือภูมิคุ้มกันตามธรรมชาติ (natural or innate or non-specific immunity) และภูมิคุ้มกันที่ได้มาแต่ภายหลัง หรือภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (specific or acquired or adaptive immunity) (ไพศาล, 2548; Tort *et al.*, 2003; Shona, 2007)

1.1 ภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (innate immunity)

ภูมิคุ้มกันที่มีอยู่แล้วตั้งแต่กำเนิด ปรากฏอยู่ตลอดเวลา คล้ายเป็นสัญชาตญาณในการป้องกันตัวเอง และเป็นด่านแรกในการต่อต้านสิ่งแปลกปลอม การตอบสนองมีลักษณะเดียวกันทุกครั้ง ซึ่งเดิมคิดว่าไม่จำเพาะต่อเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอม แต่เมื่อศึกษาถึงระดับโมเลกุลจึงพบว่ามีความจำเพาะต่อเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอม และยังมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้น หรือควบคุมให้เกิดภูมิคุ้มกันที่ได้มาแต่ภายหลัง เพื่อกำจัดเชื้อโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทคือ (วิน, 2544; ไพศาล, 2548; กฤษณา, 2550; อรวดี, 2551; Bergljort, 2006)

1.1.1 ภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดแบบพึ่งเซลล์ (cell mediated innate immunity) เป็นกลไกแรกที่ใช้ในการต่อต้านสิ่งแปลกปลอม โดยอาศัยเซลล์ ได้แก่ เซลล์เม็ดเลือดขาว เช่น neutrophil, macrophage, basophil, eosinophil และ non-specific cytotoxic cell (NCC) เป็นต้น รวมทั้งเซลล์ของเยื่อผิวหนังตามอวัยวะ ในปลากระดูกแข็ง บริเวณไตส่วนหน้า ม้าม และตับ มี melano-macrophage center (MMC) ประกอบด้วยกลุ่มเซลล์ที่มีสารสี (pigment-containing cell) อยู่รวมกัน ซึ่งพบ macrophage เป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้ยังพบ lymphocyte บ้างเล็กน้อย สารสีที่พบใน MMC ส่วนใหญ่เป็น melanin และพบ lipofuscin และ hemosiderin ด้วย melano-macrophage center มีหน้าที่ต่อต้านแบคทีเรีย ผลิตเซลล์ memory เพื่อจดจำแอนติเจน และสะสมธาตุเหล็กเพื่อใช้สร้างเม็ดเลือดแดง (วิน, 2544; Press and Evensen, 1999; Agius and Roberts, 2003) ภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดแบบพึ่งเซลล์จำแนกได้ดังนี้

1) สิ่งกีดขวางทางกายภาพและระบบห่อหุ้มร่างกาย (anatomical barrier and integumental mechanism) เป็นด่านแรกในการป้องกันเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมไม่ให้เข้าสู่ร่างกาย ได้แก่ เยื่อเซลล์เยื่อผิวหนัง เหงือก ผิวหนัง และเมือกที่ปกคลุมร่างกายซึ่งมีคุณสมบัติต่อต้านจุลชีพ (วิน, 2544; ไพศาล, 2548; Tort *et al.*, 2003; Bergljort, 2006; Pilar, 2008)

2) การจับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytosis) และ respiratory burst เกิดจาก phagocyte ได้แก่ neutrophil และ macrophage จับกินเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอม เช่น โปรโตซัว และแบคทีเรีย เป็นต้น จากนั้นถูกเอนไซม์ภายในไลโซโซมย่อย แล้วจึงนำเสนอแอนติเจนนั้นไว้บนผิวเซลล์ผ่านทาง Major Histocompatibility Complex (MHC) class II ให้กับเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ เซลล์ที่มีแอนติเจนอยู่บนผิวเซลล์เรียกว่า antigen presenting cell (APC)

นอกจากนี้ระหว่างเกิดกระบวนการ phagocytosis phagocyte ยังสร้างสารที่เกี่ยวข้องกับออกซิเจน (reactive oxygen species; ROS) และสารที่เกี่ยวข้องกับไนโตรเจน (reactive nitrogen species; RNS) ซึ่งเป็นอนุมูลที่มีความเป็นพิษสูงออกมาทำลายสิ่งแปลกปลอม เรียกกระบวนการนี้ว่า respiratory burst (วิน, 2544; ไพศาล, 2548, อรวดี, 2551) ในปลาการตอบสนองนี้เกิดโดย macrophage ที่อยู่ในอวัยวะและเนื้อเยื่อทั่วร่างกายและ macrophage ของปลายังมีบทบาทสำคัญในกระบวนการ phagocytosis และ respiratory burst ในการต่อต้านแบคทีเรีย เช่น *Vibrio anguillarum*, *Yersinia ruckeri*, *Edwardsiella ictaluri*, *Aeromonas salmonicida* เป็นต้น (Ellis, 1999; Press and Evensen, 1999; Adenwumi *et al.*, 2006; Pilar, 2008)

1.1.2 ภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดแบบอาศัยสารน้ำ (humoral mediated innate immunity) ภูมิคุ้มกันแบบนี้อาศัยโปรตีนในกระแสเลือด ได้แก่ คอมพลีเมนต์ (complement) ซึ่งการทำงานของระบบคอมพลีเมนต์ในปลากระตุ้นแข็งคล้ายกับที่พบในสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง โปรตีน C-reactive protein (CRP) สามารถจับกับ phosphorylcholine ที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรียยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ และ antiproteases ทำหน้าที่ต่อต้าน proteolytic toxin ที่แบคทีเรียปล่อยออกมา รวมทั้งสารชนิดอื่นในกระแสเลือด ได้แก่ interferon, transferrin, lectin สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้เช่นกัน และเอนไซม์ในเยื่อเมือกผิวหนัง เช่น protease, lysozyme สามารถทำให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแตก เป็นต้น (วิน, 2544; ไพศาล, 2548; Ellis, 1999; Tort *et al.*, 2003; Bergljort, 2006; Shona, 2007; Pilar, 2008)

1.2 ภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (specific immunity)

ภูมิคุ้มกันชนิดนี้พบเฉพาะในสัตว์มีกระดูกสันหลังเท่านั้น เป็นภูมิคุ้มกันที่สร้างมาภายหลังจากเคยได้รับการกระตุ้นมาก่อน สามารถตรวจจับ เชื้อโรค แอนติเจนแปลกปลอมได้อย่างจำเพาะ โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะเฉพาะเจาะจงต่อเชื้อที่เคยกระตุ้นมาก่อน หรือเชื้อที่มีลักษณะคล้ายกันเท่านั้น ซึ่งการตอบสนองมีลักษณะดังนี้คือ ความสามารถในการจำแนกสิ่งแปลกปลอมออกจากเซลล์ตนเอง (self from non-self) มีความจำเพาะ (specific) ตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมหรือแอนติเจนชนิดใดชนิดหนึ่ง สามารถตรวจจับ โมเลกุลโครงสร้างของแอนติเจนได้หลากหลาย (diversity) และมีความจำ (memory) โดยเมื่อได้รับแอนติเจนชนิดเดียวกันในครั้งต่อมาจะตอบสนองได้อย่างรวดเร็วและปริมาณมากกว่าในครั้งแรก ภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะแบ่งเป็น 2 แบบคือ (วิน, 2544; ไพศาล, 2548; อรวดี, 2551)

1.2.1 ภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะอาศัยเซลล์ (cell mediated immunity) เป็นการกระตุ้น T-lymphocyte (T cell) ให้ทำลายสิ่งแปลกปลอมโดยตรง หรือร่วมกับภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดแบบ ฟังก์ชัน ซึ่ง T-lymphocyte ไม่สามารถรับรู้แอนติเจนได้โดยตรง แต่รับรู้แอนติเจนผ่านทางโปรตีน CD 4⁺ และ CD 8⁺ บนผิวเซลล์ร่วมกับ MHC class I และ II บนผิวเซลล์ของ APC ซึ่ง CD 4⁺ และ CD 8⁺ เป็นตัวกำหนดหน้าที่ของ T cell โดยเรียก T cell ที่มี CD 4⁺ บนผิวเซลล์ว่า T helper cell (T_h cell) จับได้อย่างจำเพาะกับ MHC class II บนผิวของ APC มีผลให้ T_h cell แบ่งตัวเพิ่มจำนวน และหลั่งไซโตไคน์เช่น interleukin 4 (IL-4), interferon gamma (IFN- γ) เป็นต้น กระตุ้น macrophage ให้จับกินสิ่งแปลกปลอมได้ดีขึ้น และกระตุ้น B-lymphocyte (B cell) ให้เปลี่ยนเป็น plasma cell สร้างแอนติบอดี ส่วน T cell ที่มีโปรตีน CD 8⁺ บนผิวเซลล์เรียกว่า T cytotoxic cell (T_c cell) จับได้อย่างจำเพาะกับ MHC class I บนผิวเซลล์ตัวเองที่เปลี่ยนไป เช่น เซลล์มะเร็ง และเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส เป็นต้น และถ้ามีไซโตไคน์ได้แก่ IL-2 จาก T_h cell มากกระตุ้นจะเกิดการเปลี่ยนไปเป็น cytotoxic T lymphocyte (CTL) เพื่อทำหน้าที่กำจัดเซลล์ที่ผิดปกติ และ T cell ส่วนหนึ่งพัฒนาเป็นเซลล์ความจำ (memory T cell) (ไพศาล, 2548, อรวดี, 2551) T cell ของปลากกระดุกแข็งแรงสามารถผลิต macrophage-activating lymphokine ได้เหมือนกับ T_h cell ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม รวมทั้ง T cell maker ของปลากกระดุกแข็งแรง ได้แก่ CD3, CD4 และ CD8 ซึ่งมีคุณสมบัติคล้ายกับ T cell ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (วิน, 2544; Tort *et al.*, 2003; Pilar, 2008)

นอกจากนี้ B cell อาจทำหน้าที่เป็น APC ได้โดยใช้ surface Ig (sIg) เป็นแอนติเจน receptor (Ag receptor) รับรู้แอนติเจนได้โดยตรง หรือแอนติเจนจาก APC เซลล์อื่น หรือแอนติเจนจาก T_h cell แล้วนำแอนติเจนนั้นเข้าไปไว้ในไซโทพลาซึมด้วยวิธี endocytosis จากนั้นนำเสนอแอนติเจนนั้นไว้บนผิวเซลล์ผ่านทาง MHC class II เพื่อส่งให้ T_h cell ซึ่งหน้าที่ของ B cell ในกระดุกแข็งแรงคล้ายกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Pilar, 2008)

1.2.2 ภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะอาศัยสารน้ำ (humoral mediated immunity) เป็นการทำงานของแอนติบอดี หรืออิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin, Ig) ซึ่งสร้างจาก B cell ที่ได้รับการกระตุ้น เช่น ได้รับไซโตไคน์จาก T_h cell ที่เกิดการเพิ่มจำนวนหรือ จับกับแอนติเจนจำเพาะ เป็นต้น จะเกิดการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว แล้วเปลี่ยนเป็น plasma cell สร้างแอนติบอดีแล้วปล่อยสู่กระแสเลือดและสิ่งคัดหลั่งต่าง ๆ ทั่วร่างกาย ซึ่งแอนติบอดีจับกับแอนติเจนอย่างจำเพาะ และก่อให้เกิดผลหลากหลาย เช่น การตรวจจับ การสลายพิษ การทำลายแอนติเจน และการกำจัดแอนติเจนออกนอก

ร่างกาย เป็นต้น ส่วนหนึ่งของ B cell พัฒนาเป็นเซลล์ความจำ (memory B cell) ตอบสนองต่อ แอนติเจนเดิมที่เข้ามาในครั้งต่อไป (ไพศาล, 2548; อรวดี, 2551) ลักษณะ receptor บนผิวเซลล์ของ B cell ที่พบในปลาคลายกับที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมเช่นกัน (วิน, 2544; Pilar, 2008) เมื่อมี แบคทีเรียบุกรุกเข้ามาในร่างกาย plasma cell ของปลาจะสร้างแอนติบอดี หรืออิมมูโนโกลบูลิน ส่วนมากเป็นชนิด IgM และ IgG ซึ่งมีบทบาท และหน้าที่หลากหลาย ได้แก่ ป้องกันไม่ให้แบคทีเรีย ยึดเกาะกับเซลล์บุผิว (anti-adhesin) ถ้างพิษของแบคทีเรีย (anti-toxin)ต่อต้านการบุกรุก (anti-invasion) และกระตุ้นระบบคอมพลีเมนต์ทางตรง (classical complement pathway) เพื่อกำจัด แบคทีเรีย (วิน, 2544; ไพศาล, 2548; Eillis, 1999; Bergljort, 2006; Pilar, 2008) ซึ่ง IgM ในปลาพบ ทั้งในสารคัดหลั่ง กระแสเลือด และเยื่อเมือกที่ต่อทางเดินอาหาร โครงสร้างของ IgM ในปลาเป็น tetramer แต่ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมเป็น pentamer แต่หน้าที่ของ IgM ของปลาและของสัตว์เลี้ยง ลูกด้วยน้ำนมคล้ายกัน (Tort *et al.*, 2003; Pilar, 2008)

เมื่อปลาติดเชื้อแบคทีเรีย ระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดและภูมิคุ้มกันแบบ จำเพาะทำงานร่วมกันในการต่อต้าน และกำจัดแบคทีเรีย ถ้าแบคทีเรียสามารถผ่านสิ่งกีดขวางทาง กายภาพ และไม่ถูกทำลายด้วยสารที่เยื่อเมือก macrophage จะจับกินแบคทีเรีย (phagocytosis) ซึ่ง ผนังเซลล์ของแบคทีเรียจะกระตุ้นองค์ประกอบของคอมพลีเมนต์ C5a ทำหน้าที่เป็น chemotaxin เรียก macrophage เซลล์อื่นเข้ามายังบริเวณติดเชื้อ รวมทั้งกระตุ้นองค์ประกอบของคอมพลีเมนต์ C3b ไปจับที่ผิวของแบคทีเรียส่งผลให้ macrophage จับกินแบคทีเรียได้ดีขึ้น เมื่อ macrophage จับ กินแบคทีเรียแล้วจะใช้เอนไซม์ภายในไลโซโซม และปล่อยอนุมูลอิสระ ได้แก่ ไฮโดรเจนเปอร์ ออกไซด์ ซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน และไนตริกออกไซด์ ทำลายแบคทีเรีย แล้วทำหน้าที่เป็น เซลล์นำเสนอแอนติเจนของแบคทีเรียนั้นไว้บนผิวเซลล์ (APC) ผ่านทาง MHC class II ให้กับ T_H cell เมื่อ T_H cell จับกับ MHC class II จะเป็นการกระตุ้น T_H cell ให้หลั่งไซโตไคน์ ได้แก่ interferon gamma ($IFN-\gamma$) กระตุ้น macrophage ให้เพิ่มประสิทธิภาพในการ phagocytosis และกระตุ้นให้ T_C cell เปลี่ยนเป็น CTL ไปจับกับเซลล์ที่ติดเชื้อที่มีแอนติบอดีเคลือบอยู่บนผิว รวมทั้งไซโตไคน์จาก T_H cell กระตุ้น B cell ให้เปลี่ยนเป็น plasma cell เพื่อสร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อเชื้อ ซึ่งแอนติบอดีที่ สร้างขึ้นนี้มีหน้าที่หลายอย่างเช่น opsonization ซึ่งกระบวนการนี้ช่วยส่งเสริมกระบวนการ phagocytosis โดย แอนติบอดีจะไปเคลือบบนผิวแบคทีเรีย เพื่อเป็นเป้าหมายให้ phagocyte จับกับ แบคทีเรียและยังเป็นการกระตุ้นองค์ประกอบของระบบคอมพลีเมนต์ทางตรงให้ทำลายแบคทีเรีย ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (ไพศาล, 2548; Eillis, 1999; Norman *et al.*, 2001; Tort *et al.*, 2003; Bergljort, 2006; Pilar, 2008) บางครั้ง B cell สามารถทำหน้าที่เป็น APC นำเสนอแอนติเจนของ

แบคทีเรียดังกล่าวร่วมกับ MHC Class II เพื่อส่งให้ T_H cell ต่อไป (อรวัต, 2551; Pilar, 2008) แบคทีเรีย *Vibrio anguillarum* ที่ติดเชื้อในปลาทนต่อการทำลายจากสารในเยื่อเมือกได้ และไม่มีแอนติบอดีจำเพาะต่อเชื้อ แอนติบอดีที่สร้างขึ้นกระตุ้นเพียงระบบคอมพลีเมนต์ทางตรงได้เท่านั้นซึ่งไม่สามารถกำจัดแบคทีเรียได้ และแอนติบอดียังทำหน้าที่เป็น opsonin ร่วมกับคอมพลีเมนต์จับที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียทำให้ macrophage จับกินได้ดีขึ้น (Ellis, 1999) เช่นเดียวกับแบคทีเรีย *Aeromonas salmonicida* ssp. *masoucida* ที่ติดเชื้อในปลาทองกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดีได้ในระดับสูงแต่ก็ไม่สามารถทำลายแบคทีเรียได้ เนื่องจากผนังเซลล์ป้องกันการยึดเกาะของแอนติบอดี (Shona, 2007)

2. Macrophage ของปลากระดูกแข็ง

macrophage ของปลาสร้างมาจากเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด (hematopoietic stem cell) ที่พบในม้ามและไตส่วนต้น (head kidney) การเจริญของ macrophage ปลา มี 2 แนวทางได้แก่ classical pathway (CP-macrophage) เป็นการเจริญจาก progenitor cell พัฒนาไปเป็น monocyte และเป็น macrophage ตามลำดับ อีกแนวทางคือ alternative pathway (AP-macrophage) เป็นการเจริญจาก progenitor cell แล้วเปลี่ยนแปลงไปเป็น macrophage โดยไม่ผ่านขั้นการเป็น monocyte (Miodrag *et al.*, 2006; Hanington *et al.*, 2009) การเจริญของ macrophage ต้องใช้ endogenous macrophage growth factor, transcription factor และการกระตุ้นจากสิ่งแวดล้อมรอบเซลล์ (microenvironment) ควบคุมการเจริญ และเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (Hanington *et al.*, 2009) macrophage ที่เจริญสมบูรณ์ มีรูปร่างไม่แน่นอน มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 ไมโครเมตร ภายในไซโทพลาซึมประกอบด้วย inclusion มากมาย เช่น melanin, hemosiderin และ lipofuscin เป็นต้น ซึ่งเป็นสารสีชนิดเดียวกับที่พบในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก และสัตว์เลื้อยคลานที่อาศัยในน้ำ ในไลโซโซมประกอบด้วย เอนไซม์ย่อยสลายปริมาณสูง เช่น hydrolytic lysosomal enzyme และ cytotoxic protein เป็นต้น มี endoplasmic reticulum ชนิดขรุขระ และไมโทคอนเดรียจำนวนมาก นอกจากนี้ยังพบ acid phosphatase, alkaline phosphatase, non-specific esterase positive และ peroxidase negative นิวเคลียสมีหลายรูปร่าง เช่น ทรงกลม วงรี หรือ ไข่ เป็นต้น (วิน, 2544; Sorensen *et al.*, 1997; Press and Evensen, 1999; Pilar, 2008) บนเยื่อหุ้มเซลล์มี scavenger receptor, C-type lectin receptor (CLRs), NADPH oxidase, carbohydrate recognition domain (CRDS) asialoglycoprotein receptor, mannose receptor, complement receptor, Fc receptor และ Toll-like receptor (TLR) ที่สามารถจดจำและมีวิถีทางการตอบสนองคล้ายกับของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Romano *et al.*, 1998; Shih *et*

al., 1998; Jame *et al.*, 2003; Dwight *et al.*, 2004; Maureen *et al.*, 2006; Shona, 2007; Tadayuki *et al.*, 2004; Alexander *et al.*, 2008; Jenifer *et al.*, 2010) เมื่อตรวจสอบลักษณะรูปร่างและคุณสมบัติทางไซโตเคมีของเม็ดเลือดขาวปลาโดยการทำปฏิกิริยากับสีเฉพาะชนิดต่างๆ คือ Wright's Geimsa stain, Sudan Black B (SBB), Myeloperoxidase (MPO), Periodic Acid Schiff (PAS) และ Acid Phosphatase (AcP) พบว่า monocyte และ macrophage ให้ผลปฏิกิริยาไซโตเคมีต่อ SBB และ MPO รวมทั้ง ลักษณะรูปร่าง และหน้าที่ของ macrophage ปลามีความคล้ายคลึงกับของสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง (วิน และคณะ, 2545)

การทำงานของ macrophage ถูกกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นต่าง ๆ จากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในการบวนการ phagocytosis หรือเมื่อสัมผัสกับแอนติเจนที่เป็นสารแขวนลอย แต่ macrophage สามารถถูกกระตุ้นเพิ่มขึ้นได้โดยไซโทไคน์ ได้แก่ IFN- γ ที่ปล่อยมาจาก T_H cell เมื่อพบกับแอนติเจนแปลกปลอม macrophage เองก็สามารถปล่อย IFN- γ ออกมานอกเซลล์ไปกระตุ้น macrophage เซลล์อื่นได้ด้วย รวมทั้ง IFN- γ ยังสามารถย้อนกลับมากระตุ้นเซลล์ตัวเอง (autocrine) ได้ (Markus *et al.*, 1998)

3. Toll – like receptor

Toll-like receptor (TLR) หรือ Pathogen recognizing receptor (PRR) เป็น receptor ในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด สืบทอดกันมาแบบการอนุรักษ์ตั้งแต่บรรพบุรุษของสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Maureen *et al.*, 2006) อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ macrophage, neutrophil, mast cell และ dendritic cell TLR เป็นโปรตีนที่แทรกผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ด้านที่หันออกนอกเซลล์มีกรดอะมิโนลิวซีน (leucine) มากจึงเรียกว่า leucine-rich receptor (LRR) หรือ leucine-rich motif ส่วนด้านที่ติดกับไซโทพลาซึมเป็นโปรตีนก้อนกลม เรียกว่า toll interleukin-rich receptor domain (TIR) โดย TLR อยู่ร่วมกับ IL-1R ซึ่งเป็น receptor ที่รับสัญญาณ IL-1 และเชื่อมกับเอนไซม์ IL-1R-associated kinase (IRAK) สามารถตรวจจับ และจดจำรูปแบบโมเลกุลของสิ่งแปลกปลอม (Pathogen – Associated Molecular Pattern; PAMP) (James *et al.*, 2003; Tadayuki *et al.*, 2004; Alvarez, 2008; Pilar, 2008)

TLR สามารถจดจำ ligand จำเพาะบนผนังเซลล์ของจุลชีพได้ เช่น lipopolysaccharide (LPS) ที่ผนังเซลล์ด้านนอกสุดของแบคทีเรียแกรมลบ หรือ lipoarabinomannan (LAM) ที่อยู่บนผิว

ของ *Mycobacterium* sp. รวมทั้งยังสามารถจดจำสารพิษของแบคทีเรียแกรมบวก และอาร์เอ็นเอสายคู่ (double-stranded RNA) ของไวรัสกลุ่มที่มีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอ ซึ่งการจับกันระหว่าง TLR กับ ligand ที่จำเพาะนั้น บาง family ของ TLR สามารถจับกับ ligand ได้โดยตรง เช่น TLR family 2 (TLR 2) ที่จับกับ LAM และสารพิษของแบคทีเรียแกรมบวก แต่บาง family ต้องอาศัย โปรตีน MD 2 (soluble-lipid transfer protein MD 2) ร่วมด้วย เช่น TLR family 4 (TLR 4) ที่จับกับ LPS เป็นต้น (David *et al.*, 1999; Takeda 2003)

วิธีการตอบสนอง และการส่งสัญญาณภายในเซลล์ของ TLR ในปลา สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและคน มีความใกล้เคียงกัน (Tort *et al.*, 2003; Alexander *et al.*, 2008) โดยการจับกันระหว่าง ligand จำเพาะกับ TLR เกิดการนำสัญญาณขึ้น ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 แบบ แบบแรกคือ กลไกที่ทำงานร่วมกับโปรตีน MyD 88 (cytoplasmic adaptor molecule) ที่เกาะอยู่กับ TLR ซึ่ง MyD 88 นี้จะไปกระตุ้นโปรตีน IRAK และ Tumour-necrosis-factor-receptor-associated-factor 6 (TRAF 6) ตามลำดับ โดยการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) จากนั้น TRAF6 เข้าสู่นิวเคลียสกระตุ้น nuclear factor- κ B (NF- κ B) โดยการเติมหมู่ฟอสเฟต เพื่อให้เกิดกระบวนการ transcription จนได้เป็น tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-12 และ inflammatory cytokine แบบที่สองพบใน TLR บาง family เกิดกลไกที่ไม่ใช้โปรตีน MyD88 แต่อาศัยโปรตีนชนิดอื่นได้แก่ TIR domain-containing adaptor protein (TIRAP) หรือ MyD88-adaptor like protein (MAL) TLR กลุ่มนี้ได้แก่ TLR 3 และ TLR 4 ซึ่งมีโปรตีน TIRAP เกาะอยู่ด้วย เมื่อ receptor จับกับ ligand โปรตีน TIRAP จะกระตุ้นโปรตีน IFN-regulatory factor 3 (IRF3) โดยการเติมหมู่ฟอสเฟต ทำให้โปรตีนนี้เข้าสู่นิวเคลียส และลงเกาะกับอินเตอร์เฟอรอน (IFN) เพื่อเกิดการ transcription ได้ interferon beta (IFN- β) แล้วหลั่งออกนอกเซลล์ จากนั้น IFN- β ไปจับกับ IFN- β receptor ของเซลล์เดิมหรือเซลล์อื่นก็ได้ การจับกันระหว่าง IFN- β กับ IFN- β receptor เป็นการนำสัญญาณกระตุ้น Stat1 (transcription1) เพื่อให้เกิดการ transcription ได้เป็น เอนไซม์ inducible nitric oxide synthetase (iNOS) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์ (David *et al.*, 1999; Akira and Takeda, 2003; Takeda 2003; Subhendu and Fenton, 2004; Bernhard *et al.*, 2005; Gisa *et al.*, 2007; Pilar, 2008)

4. Phagocytosis

phagocytosis เป็นกระบวนการที่ phagocyte เข้าล้อมรอบและกินเชื้อโรค พบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1883 โดยนักสัตววิทยาชาวรัสเซียชื่อ Elie Metchnikoff ซึ่ง phagocyte ของปลาคาร์ดักแด้ มีทั้ง เม็ดเลือดขาวชนิด granulocyte และชนิด mononuclear ได้แก่ macrophage ที่อยู่ในเนื้อเยื่อ และ monocyte ในระบบหมุนเวียนโลหิต (วิน, 2544; George, 1996) กระบวนการ phagocytosis ของปลาคาร์ดักแด้ และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มีกลไกเหมือนกัน และใช้กลไกนี้ในการป้องกันและกำจัดสิ่งแปลกปลอม (วิน, 2544; Kollner *et al.*, 2002; Pilar, 2008) ซึ่ง macrophage จะมีประสิทธิภาพในการ phagocytosis สูงขึ้นเมื่อได้รับการกระตุ้นจากสิ่งกระตุ้นต่าง ๆ เช่น การสัมผัสกับ แอนติเจนที่เป็นสารแขวนลอย และ IFN- γ ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่หลั่งจาก T_H cell หรือสารต่าง ๆ ในกระบวนการอักเสบ รวมทั้งองค์ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรีย เป็นต้น (ไพศาล, 2548)

กระบวนการ phagocytosis ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนดังนี้ (วิน, 2544; อธิยาและวัชรินทร์, 2553)

1. การเคลื่อนที่ของ phagocyte เข้ามายังบริเวณที่ได้รับเชื้อ หรือสิ่งแปลกปลอม ซึ่งเป็นขั้นตอนแรกก่อนที่สิ่งแปลกปลอมจะถูกกลืนเข้าสู่เซลล์ การเคลื่อนที่นี้ต้องอาศัยสารเคมีบางชนิด เพื่อดึงดูดให้เซลล์เคลื่อนที่เข้าไปหา (chemotactic factor) สารเคมีเหล่านั้น ได้แก่ แอนติเจนจาก แบคทีเรียหรือปรสิต และ IFN- γ ที่หลั่งจาก T cell ที่ถูกกระตุ้น ทำให้ phagocyte กับสิ่งแปลกปลอมมาประกบชิดกันหรือจับกัน (attachment) Fc receptor บนผิวของเซลล์ phagocyte จะจดจำและจับกับสิ่งแปลกปลอม ในการประกบกันนี้ต้องการประจุบวกไปด้วย ได้แก่ Ca^{2+} , Mg^{2+} และจะจับกันดีขึ้นถ้ามีแอนติบอดีชนิด IgG เป็น opsonin ร่วมด้วย ทำให้จุลชีพถูกกินได้ง่ายขึ้น (นงลักษณ์ และปรีชา, 2547)

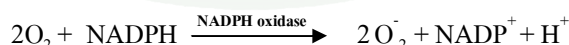
2. การกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytosis) เมื่อ phagocyte สัมผัสกับสิ่งแปลกปลอมจะเกิดการนำสัญญาณขึ้นภายในเซลล์เพื่อให้เกิดการต่อสาย actin (polymerization) ได้ผิวเซลล์ที่สัมผัสกับสิ่งแปลกปลอมนั้น จนเกิดเท้าเทียม (pseudopodia) ยื่นออกไปล้อมสิ่งแปลกปลอม แล้วปลายของเท้าเทียมทั้งสองข้างที่ยื่นออกไปจะประสานกันเกิดเป็นถุง (vacuole) ที่เรียกว่าฟาโกโซม (phagosome)

3. การฆ่าเชื้อโรคและการทำลายสิ่งแปลกปลอม (degranulation and intracellular killing) เมื่อเกิด phagosome ในไซโทพลาซึมแล้วไลโซโซม หรือแกรนูลของ phagocyte จะเคลื่อนที่มารวมกับ phagosome เป็น phagolysosome เพื่อปลดปล่อยเอนไซม์กว่า 60 ชนิดในไลโซโซม เช่น ไมอีโลเพอรอกซิเดส (myeloperoxidase) ฟาโกไซทิน (phagocytin) และลิวกิน (leukin) เป็นต้น เข้ามาใน phagolysosome เพื่อย่อยสิ่งแปลกปลอม การย่อยด้วยวิธีนี้เป็นกลไกที่ไม่ใช้ออกซิเจน

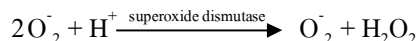
5. Respiratory burst

เมื่อเชื้อหุ้มเซลล์ของ phagocyte ได้แก่ polymorphonuclear leukocyte และ macrophage ถูกกระตุ้นอย่างจำเพาะ โดยสิ่งแปลกปลอม หรือจุลชีพใน phagosome ทำให้การหายใจของเซลล์เปลี่ยนจากแบบไม่ใช้ออกซิเจนเป็นแบบใช้ออกซิเจนซึ่งเป็นกลไกการทำลายสิ่งแปลกปลอมภายในเซลล์ ทำให้มีออกซิเจนเพิ่มมากขึ้นและมีการเปลี่ยนแปลง oxidative metabolism อย่างมาก เรียกกระบวนการนี้ว่า respiratory burst หรือ metabolic burst บางครั้งเรียกว่า oxidative burst (นงลักษณ์ และปรีชา, 2547; อรวดี, 2551)

กลไกนี้ประกอบไปด้วย การใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้น และการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคส (glucose oxidation) เพิ่มขึ้น ผ่านทางกระบวนการเฮกโซสโมโนฟอสเฟตชันท (hexose monophosphate shunt) มีผลทำให้ปล่อย NADPH (reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) ออกมามากมาย เมื่อ NADPH ถูกออกซิไดซ์โดยเอนไซม์ออกซิเดส (NADPH oxidase; NOX) ไปเป็น NADP^+ จะปลดปล่อยออกซิเจนเมแทบอลิท์ที่มีความเป็นพิษสูงได้แก่ ซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน (O_2^-) ออกมาเพื่อทำลายเชื้อโรค ดังสมการ (นงลักษณ์ และปรีชา, 2547; ไพศาล, 2548; อรวดี, 2551; Maaik *et al.*, 2006)



ซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน สลายตัวได้ง่าย ส่วนใหญ่สลายตัวเป็น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ได้เอง แต่บางครั้งต้องอาศัยเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) เพื่อช่วยเปลี่ยนซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ดังสมการ



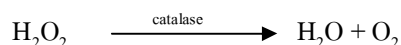
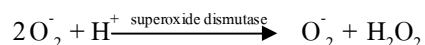
ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นสูงสามารถฆ่าจุลชีพหรือสิ่งแปลกปลอมได้โดยตรงทั้งไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซุปเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน ซิงเกิลออกซิเจน (single oxygen; $^1\text{O}_2$) และ ไฮดรอกซิล (hydroxyl; $\text{OH}^\cdot$) นั้นเรียกรวมกันว่า reactive oxidative species (ROS) ต่างก็มีฤทธิ์สามารถฆ่าจุลชีพได้ (นงลักษณ์ และปรีชา, 2547; ไพศาล, 2548)

นอกจากนี้เมื่อ TLR ซึ่งเป็นโปรตีนที่ผิวเซลล์ของ macrophage ได้รับการกระตุ้นจาก lipopolysaccharide (LPS), muramyl dipeptide (MDP) หรือ lipoarabinomannan (LAM) ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียโดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Mycobacterium* ร่วมกับไซโทไคน์ ได้แก่ $\text{IFN-}\gamma$ จะทำให้เกิดการผลิตเอนไซม์ nitric oxide synthetase เอนไซม์นี้เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ L-arginine เป็น L-citrulline และ ไนตริกออกไซด์ (NO) ดังสมการ



ไนตริกออกไซด์เป็นสารต้านจุลชีพที่มีประสิทธิภาพสูง และสามารถรวมกับซุปเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน ไนตริกออกไซด์สามารถต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย รา โปรโตซัว และพยาธิต่างๆ ได้ (ไพศาล, 2548) ผลผลิตที่ได้จากกระบวนการ respiratory burst ใช้ทำลายสิ่งแปลกปลอมภายใน phagosome และทำลายเซลล์อื่น ๆ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และ ซุปเปอร์ออกไซด์ แอนไอออนที่เพิ่มขึ้น เป็นตัวตั้งต้นที่จะให้อนุพันธ์ที่สำคัญได้แก่ ไฮดรอกซิลและซิงเกิลออกซิเจน ซึ่งไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ยังมีความเป็นพิษทั้งต่อเซลล์และสิ่งแปลกปลอมที่อยู่รอบเซลล์ด้วย (Hernry and Martine, 2002; Maaik *et al.*, 2006)

phagocyte เองก็พยายามป้องกันตนเองจากอนุมูลพิษของออกซิเจน (toxic oxygen intermediate) โดยใช้ปฏิกิริยา dismutation อาศัยเอนไซม์ superoxide dismutase เปลี่ยนซุปเปอร์ออกไซด์ แอนไอออนเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์แล้วเปลี่ยน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นน้ำโดยเอนไซม์ catalase ดังสมการ (Gene, 2008)



ระหว่างการเกิด respiratory burst เอนไซม์ NADPH oxidase มีความสำคัญมากในการสร้างซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน ซึ่งเป็นโมเลกุลตั้งต้นให้เกิด ROS ชนิดอื่นตามมา การสร้างซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน โดยเอนไซม์ NADPH oxidase นั้นจำเป็นต้องมีการขนส่งออกซิเจนจากด้านในเซลล์ (intracellular) ออกสู่ด้านนอกเซลล์ (extracellular) ผ่านทาง voltage-gate proton channel ซึ่งพบว่าในสภาวะปกติ ซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน และ ROS ที่สร้างมาจาก phagocyte ไม่มีความเป็นพิษต่อจุลชีพ แต่ถ้า ซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน และ ROS มีความเข้มข้นในระดับสูง จึงจะสามารถทำลายจุลชีพแปลกปลอมได้ การเพิ่มระดับความเข้มข้นของทั้ง ซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน และ ROS นั้นต้องการ Ca^{2+} โดย Ca^{2+} จะไหลเข้าเซลล์ผ่านทาง Ca^{2+} -activated K^+ (maxi- K^+) ในขณะเดียวกัน H^+ ไหลออกผ่านทาง voltage-gate proton channel ร่วมด้วย เพื่อรักษาประจุไฟฟ้าที่เปลี่ยนแปลง (Thomus, 2004) การทำงานของเอนไซม์ NADPH oxidase ถูกกระตุ้นโดยการเติมหมู่ฟอสเฟตของ calcium- dependent protein kinase C (PKC) (Thomus, 2004)

6. อนุมูลอิสระและเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ

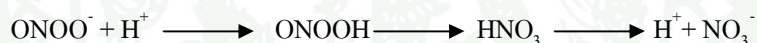
6.1 อนุมูลอิสระ (free radical)

อนุมูลอิสระ คือ อนุภาคที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว จึงเป็นอนุภาคที่ไม่เสถียรและมีแนวโน้มที่จะทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ ในร่างกาย สามารถออกซิไดซ์ (oxidize) ไขมัน กรดอะมิโน และ คาร์โบไฮเดรต รวมทั้งเป็นสาเหตุให้ดีเอ็นเอ (DNA) เกิดการกลาย (mutation) พบในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตที่หายใจโดยใช้ออกซิเจน (Droge, 2002; Wei and Lee, 2002) ซึ่งอนุมูลอิสระเป็นคำเรียกรวมอนุภาคจำพวกอนุมูลออกซิเจน เช่น ซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน ไฮดรอกซิลเปอร์ออกไซด์ (peroxyl; RO_2) และ อัลคอกซิล (alkoxyl; RO) รวมทั้งอนุภาคจำพวกที่ไม่ใช่อนุมูลอิสระ (nonradical) ที่อาจเป็นตัวรับอิเล็กตรอน (oxidizing agent) หรืออาจเปลี่ยนเป็นสารอนุมูลอิสระได้ง่าย เช่น กรดไฮโปคลอรัส (HOCl) เปอร์ออกซิไนไตร์ (peroxynitrite; ONOO^-) ซึ่งเกลทออกซิเจน และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นเมื่อระดับความเข้มข้นต่ำหรือปานกลางจะเป็นประโยชน์ต่อการตอบสนองในกระบวนการต่าง ๆ ได้แก่ การต่อต้านเชื้อโรค การสื่อสารระหว่างเซลล์บางชนิด และการชักนำให้เกิดการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส แต่จะเกิดโทษเมื่อสัดส่วนระหว่างการสร้างอนุมูลอิสระกับการขับสารพิษ (detoxification) ไม่สมดุลกันเรียกว่า ออกซิเดทีฟสเตรส (oxidative stress) หรือสภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (Okezie, 1998; Valko *et al.*, 2006)

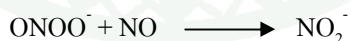
ไนตริกออกไซด์ (NO) พบได้ในเซลล์และเป็นสัญญาณระหว่างเซลล์ในการควบคุมกลไกทางสรีรวิทยาและพยาธิสรีรวิทยา รวมทั้งกลไกทางระบบภูมิคุ้มกัน มีบทบาทอย่างมากในระบบภูมิคุ้มกันแบบมีมาแต่กำเนิด ทำหน้าที่ในการต่อต้านจุลชีพ (antimicrobial response) หรือเป็นอนินทรีย์โมเลกุลต้านจุลชีพ (inorganic antimicrobial molecule) ทั้ง แบคทีเรีย ไวรัส รวมทั้งสิ่งมีชีวิตสร้างขึ้น ปริมาณของไนตริกออกไซด์ที่สูงภายในเซลล์จะรวมกับ ซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออนได้เป็น higher nitrogen oxide (NO_2 , N_2O_3) สามารถถูกไฮโดรไลซ์ได้ง่ายกลายเป็นอนุภาคที่เรียกว่า toxic species peroxynitrite (ONOO^-) และ reactive nitrogen oxide species ได้แก่ ไนเตรต (nitrate; NO_3^-) และ ไนไตรท์ (nitrite; NO_2^-) ดังสมการ



ซึ่ง peroxynitrite สามารถเปลี่ยนโครงสร้าง (isomerize) ได้เมื่อรวมกับกรดเป็นไนไตรท์ดังสมการ



ในอีกกรณีหนึ่ง ONOO^- ก็สามารถเปลี่ยนตัวเองเป็นตัวออกซิเดชันอย่างแรง (strong oxidant) โดยทำปฏิกิริยากับ ไนตริกออกไซด์ ที่มีมากเกินไปภายในเซลล์เป็น nitrite และ nitrogen dioxide ได้ดังสมการ (ไพศาล, 2548; โอภา และคณะ, 2549)



ซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน เป็นอนุมูลตัวแรกที่เกิดขึ้นเมื่อออกซิเจนเข้าสู่เซลล์ มีอิเล็กตรอนโคเดเดี่ยว 1 อนุภาค มีความรุนแรงและอันตรายมากที่สุดในบรรดา ROS และอนุมูลอิสระทั้งหมด (Mohammad *et al.*, 2007) ถูกสร้างขึ้นโดย polymorphonuclear และ macrophage เพื่อใช้ในการทำลายจุลชีพภายในเซลล์ นอกจากนี้ยังมีความสัมพันธ์กับการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไฮดรอกซิล และซิงเกิลออกซิเจน ซึ่งเป็นอนุมูลที่สำคัญในการต่อต้านจุลชีพ monocyte ในกระแสเลือดและ macrophage ในปอด (alveolar macrophage) ใช้ซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออนเป็นตัวตั้งต้นในการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และไฮดรอกซิลในการทำลายแบคทีเรียที่บุกรุก

เข้ามา (Richard *et al.*, 1997) ซึ่งเป็นกลไกการทำลายจุลชีพที่อาศัยออกซิเจน (oxygen-dependent killing mechanism) ดังสมการ



ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นสารหนึ่งที่ได้จากกระบวนการ reactive oxygen metabolism ภายในเซลล์ที่มีการหายใจแบบใช้ออกซิเจน ได้แก่ กระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน ภายในไมโทคอนเดรีย หรือจากปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ oxido-reductase และกระบวนการ metal-catalyzed oxidation (Hernry and Martine, 2002)

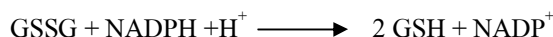
6.2 เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant enzyme)

ROS เช่น ซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน และ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นต้น เป็นสารที่ถูกสร้างขึ้นจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ ภายใต้สภาวะปกติจะถูกควบคุมให้อยู่ในระดับสมดุลโดยการทำงานของ เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ และรีดอกซ์โมเลกุล (redox molecule) อื่น ๆ เนื่องจากถ้ามีปริมาณมากเกินไป ทำให้เกิดสภาวะออกซิเดทีฟสเตรส นำไปสู่การบาดเจ็บของเซลล์ เช่น การทำลายดีเอ็นเอ โปรตีน และไขมันที่เป็นส่วนประกอบในเยื่อหุ้มเซลล์ เซลล์มีกระบวนการกำจัด ROS ที่มากเกินไปจากเซลล์ ด้วยกลไกการทำงานของเอนไซม์กลุ่มที่ปรับเปลี่ยนปฏิกิริยาเคมีให้ผันกลับได้ (enzyme redox system) ซึ่งเป็นระบบแรกที่ต่อต้านอนุมูลอิสระทั้งภายในและภายนอกเซลล์ เอนไซม์ที่สำคัญในกลุ่มนี้ได้แก่ superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase (Karihtala and Soini, 2007)

Glutathione peroxidase (GSH-Px, EC 1.11.1.9) เป็นเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระที่กำจัดสาร ROS โดยการเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไปเป็นน้ำกับ organic peroxide (R-O-O-H) แต่ organic peroxide ไม่เสถียรจึงสลายเป็นแอลกอฮอล์ (R-OH) ได้ง่ายดังสมการ



ซึ่ง GSSG จะไปทำปฏิกิริยากับ NADPH ต่อไปเป็นวัฏจักร โดยใช้เอนไซม์ glutathione reductase (GR) ดังสมการ (Oxford biomedical research, 2008)



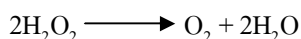
ดังนั้นหน้าที่สำคัญของเอนไซม์นี้คือการป้องกันเซลล์ไม่ให้อนุมูลอิสระทำอันตรายต่อเซลล์ได้ และการเปลี่ยนแปลงระดับของสารต้านอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคต่าง ๆ (โอภา และคณะ, 2549)

Superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1, superoxide oxidoreductase) มีความสำคัญในการเปลี่ยน ซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออนไปเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และออกซิเจนโมเลกุล (โอภา และคณะ, 2549; Valko *et al.*, 2006) ดังสมการ



ความสำคัญของเอนไซม์นี้คือการรักษาสมดุลของซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออนให้อยู่ในระดับปกติ เพื่อไม่ให้ซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออนที่มากเกินไปทำอันตรายต่อเซลล์และยังทำหน้าที่ป้องกันเอนไซม์กลุ่มดีไฮเดรส (dehydrase) ไม่ให้ถูกซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออนทำลาย (โอภา และคณะ, 2549; Christine *et al.*, 1999) SOD ที่อยู่ภายในเซลล์มีสองรูปคือ รูปที่พบในไซโทพลาซึมมีทองแดง (Cu) และสังกะสี (Zn) เป็นองค์ประกอบ (Cu-Zn-SOD) อีกรูปพบที่ไมโทคอนเดรียและในแบคทีเรียบางชนิดได้แก่ *E. coli* มีแมงกานีส (Mn) เป็นองค์ประกอบ (Mn-SOD) แบคทีเรียชนิดอื่น ๆ มีเหล็ก (Fe) เป็นองค์ประกอบ (Fe-SOD) ในมนุษย์ สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม และ สัตว์มีกระดูกสันหลังอื่น ๆ พบ SOD ทั้งสามรูปแบบคือในไซโทพลาซึมพบ SOD ในรูป Cu-Zn-SOD และ Fe-SOD ในไมโทคอนเดรียพบ SOD ในรูป Mn-SOD (Yi *et al.*, 1998)

Catalase (CAT, EC 1.11.1.6, $2\text{H}_2\text{O}_2$ oxidoreductase) พบมากใน peroxisome ของเซลล์ที่หายใจแบบใช้ออกซิเจน มี ferriprotoporphyrin เป็นองค์ประกอบ ทำหน้าที่ในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่เกิดจากเมแทบอลิซึมของเซลล์ปกติ และเซลล์ติดเชื้อ เพื่อป้องกันอันตรายที่จะเกิดขึ้นกับเซลล์ โดยการเปลี่ยนให้เป็นน้ำและออกซิเจน ดังสมการ (โอภา และคณะ, 2549; Okezie, 1998; Valko *et al.*, 2006)



7. แบคทีเรียสกุล *Mycobacterium* และ *Escherichia coli*

7.1 ชีวิตวิทยาของแบคทีเรียสกุล *Mycobacterium*

นพดล (2539) อ้างอิงการจัดจำแนก *Mycobacterium* ตามหลักอนุกรมวิธานของ Lehmann & Neumann (1896) ดังนี้

Kingdom Bacteria

Phylum Actinobacteria

Order Actinomycetales

Suborder Corynebacterineae

Family Mycobacteriaceae

Genus *Mycobacterium*

Mycobacterium คำว่า myco- มาจากภาษาลาตินแปลว่า รา หรือไขมัน (wax) แต่ในที่นี้หมายถึงไขมัน เนื่องจากไขมันเป็นส่วนประกอบหลักของผนังเซลล์ เป็นแบคทีเรียรูปท่อนไม่เคลื่อนที่ (non-motile rod) ยกเว้น *M. marinum* ที่สามารถเคลื่อนที่ได้ใน macrophage ไม่สร้างเอนโดสปอร์ (endospore) ไม่มีแคปซูล ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2-0.6 ไมโครเมตร ยาว 1-10 ไมโครเมตร บางครั้งเรียงตัวเป็นเส้นสายที่แตกกิ่งก้าน มีปริมาณกัวนีนและไซโตซีนในดีเอ็นเออยู่ในช่วง 62-70 ผนังเซลล์มีไขมันมากจึงไม่ทำปฏิกิริยากับน้ำ ทำให้เชื้อมีความทนทานต่อสารทำลายเชื้อ (disinfectant) รวมทั้งทนต่อการย้อมสีแบบแกรม (Gram stain) และจิมซา (Giemsa stain) แต่ถ้าย้อมติดสีแล้ว มักเห็นการติดสีไม่สม่ำเสมอ ลักษณะคล้ายจุดขนาดไม่เท่ากันเรียงต่อกัน (beaded rod) และอาจเห็นรูปร่างเซลล์ไม่ติดสี (ghost cell) ทนต่อการล้างด้วยกรดได้ ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของแบคทีเรียสกุลนี้ จึงเรียกแบคทีเรียกลุ่มนี้ว่า แบคทีเรียชนิดทนกรด (acid fast bacilli) บางครั้งจัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก หรือแบคทีเรียทนกรดชนิดแกรมบวก แต่แยกออกจากแบคทีเรียแกรมบวกตรงที่ ไม่มี empirical stand ความสามารถในการทนกรดของแบคทีเรียขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย และสภาพการเพาะเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเชื้อจะเจริญได้รวดเร็วบนอาหารที่มีไกลซีน ทำให้ความสามารถในการทนกรดลดลง *Mycobacterium* สามารถอาศัยอยู่ในดินที่มีปริมาณไฮโดรเจนสูงได้นาน 9 ปี และนาน 3 ปีเมื่ออยู่ในน้ำ นอกจากนี้ยังสามารถทนสภาวะที่เป็นกรดได้ถึง pH 2.2 (นงลักษณ์, 2547; อนุชา, 2549; Grange, 1980; David *et al.*, 2005; David and Rhodes, 2008) โดย

ปกติพบเชื้อได้ทั่วไปทั้งในสัตว์และสิ่งแวดล้อม เช่น ดิน ฝุ่นผง สิ่งแวดล้อมในฟาร์มเลี้ยงสัตว์
แมลงชนิดต่าง ๆ แหล่งน้ำธรรมชาติรวมไปถึงระบบน้ำในชุมชน เป็นต้น (อนุชา, 2549)

7.1.1 โครงสร้างของ *Mycobacterium* ประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ดังนี้

1) ผนังเซลล์ (cell wall) มีโครงสร้างที่สลับซับซ้อน ประกอบด้วย 4 ชั้น
เรียงลำดับจากชั้นนอกสุดเข้าไปดังนี้

ชั้นของไขมัน ประกอบด้วยชั้น peptidoglycan และ diaminopimelate ซึ่งเป็น
ไขมันถึง 60 เปอร์เซ็นต์ เกาะติดกับพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) หลายชนิด เช่น glucan,
mannan, arabinogalactan และ arabinomannan เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีไขมันเชิงซ้อน (compound
lipid) ประกอบด้วยไกลโคไลปิด และ โปรตีนเกาะกับผนังเซลล์ชั้นนอกอย่างเหนียวแน่น ทำให้เชื้อ
มีคุณสมบัติทนกรด ไม่ยอมให้สีซึมผ่าน ทนต่อการทำลายของกรด เบส และทนต่อการทำลายของ
แอนติบอดีและคอมพลีเมนต์ (นงลักษณ์, 2547) กรดไขมันอัมตัวสำคัญที่พบคือ กรดไมโคลิก
(mycolic acid) มีสูตรโมเลกุลส่วนใหญ่เป็น alpha-alkyl, beta-hydroxy fatty acid ซึ่ง กรดไมโคลิก
นี้เชื่อมกับชั้น peptidoglycan ของผนังเซลล์ (พรทิพภา, 2536; David *et al.*, 2005) และมีคอร์ดแฟก
เตอร์ (cord factor) เป็นสารพวก mycoside และ 6,6'-dimycolylthrehalose ซึ่งเกี่ยวข้องกับความ
รุนแรงของเชื้อ โดยสารเหล่านี้ยับยั้งการเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดขาว ทำให้เกิดแกรนูโลมาชนิดเรื้อรัง
(chronic granuloma) และยังทำหน้าที่เป็นสารที่ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดีขึ้น เรียกว่าแอดจูแวนท์
(adjuvant) ในสายพันธุ์ที่ก่อโรคอย่างรุนแรงจะมีปริมาณคอร์ดแฟกเตอร์ ในผนังเซลล์มากกว่าสาย
พันธุ์ที่ไม่ก่อโรค นอกจากนี้ส่วนสำคัญอีกส่วนคือ Wax D ซึ่งไม่ใช่สารที่ฝังอย่างแท้จริงแต่เป็น
สารประกอบไกลโคเปปไทด์ (glycopeptide) กับกรดไมโคลิก ซึ่งไกลโคเปปไทด์ประกอบด้วยสาย
ของกรดอะมิโนที่เชื่อมต่อกับพอลิเมอร์ของน้ำตาล hexose และ hexosamine เมื่อ Wax D รวมกับ
โปรตีนในผนังเซลล์จะเหนียวทำให้เกิดภูมิแพ้แบบ delayed-type hypersensitivity ซึ่งโปรตีน
เดี่ยว ๆ ไม่สามารถกระตุ้นได้

ชั้นถัดมาเป็นชั้น พอลิแซ็กคาไรด์ประกอบด้วย พอลิแซ็กคาไรด์หลายชนิด ที่
สามารถกระตุ้นให้เกิดภาวะภูมิไวเกินแบบทันทีทันใด (immediate hypersensitivity)

ชั้นในสุดเป็นชั้น peptidoglycan ประกอบด้วยโมเลกุลของ N-glycolyl muramic acid และ N-acetyl glucosamine เชื่อมต่อกัน ชั้นนี้มีบทบาททำให้เซลล์คงรูปร่างอยู่ได้

2) เยื่อหุ้มเซลล์ (cytoplasmic membrane) อยู่ได้ผนังเซลล์ห่อหุ้มโพรโทพลาซึม (protoplasm) ไว้ ทำหน้าที่เป็นเยื่อเลือกผ่าน ควบคุมออสโมซิส และควบคุมการผ่านเข้าออกของสาร มีอยู่ประมาณ 10-20 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง มีลักษณะเป็นเยื่อชนิด (unit membrane) ประกอบด้วย phospholipid 20-30 เปอร์เซ็นต์ โปรตีน 60-70 เปอร์เซ็นต์ ชั้น phospholipid เป็นเยื่อสองชั้น หันส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic head) เข้าด้านในและหันส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic tail) ออกด้านนอก และมีโปรตีนฝังแทรกอยู่ในสองชั้นของ phospholipid (integral protein) นอกจากนี้ยังมีโปรตีนอื่นที่ยึดติดกับด้านนอกของ phospholipid อย่างหลวม ๆ (peripheral protein) เยื่อหุ้มเซลล์อาจมีลักษณะเป็นเยื่อยื่นเข้าสู่ด้านในเซลล์และอาจมีรอยหยักซับซ้อนใน

Mycobacterium บางชนิด

3) ไซโทพลาซึม เป็นส่วนที่ถัดจากเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไป ประกอบด้วยไรโบโซม เม็ดน้ำมัน (lipid bodies), polyphosphate และ ไครมาทิน (נגלית, 2547)

4) บริเวณสารพันธุกรรม (chromatic area) เป็นบริเวณที่มีสารพันธุกรรมอยู่ โดยไม่มีเยื่อหุ้มเหมือนยูแคริโอต (eukaryote) บริเวณนี้อาจเรียกว่า nucleoid หรือ chromatin body หรือ nuclear equivalent ซึ่งประกอบด้วย ดีเอ็นเอเส้นเดียวขดเป็นวงกลม (circular DNA) (נגלית และปริชา, 2547; David *et al.*, 2005)

7.1.2 การจำแนก *Mycobacterium* ทำได้หลายวิธีดังนี้

1. จำแนก *Mycobacterium* ตามความสามารถในการก่อโรค โดยมีหลักการจำแนกเชื่อตามการก่อโรคแตกต่างกันไปดังนี้

อนูชา (2549) จำแนกออกเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 *M. tuberculosis complex* (MTBC) เป็นเชื้อสาเหตุของวัณโรคทั้งในคนและสัตว์ ได้แก่ *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*, *M. pinnipedii*, *M. tuberculosis subsp. caprae* กลุ่มที่ 2 *M. avium complex* (MAC) เป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญในสัตว์ปีก ประกอบด้วย 2 สปีชีส์สำคัญคือ *M.*

avium และ *M. intracellulare* โดยที่ *M. avium* แบ่งออกเป็น 3 สปีชีส์ย่อย คือ *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *hominissuis* และ *M. avium* subsp. *silvaticum* ปกติเชื้อกลุ่มนี้แยกได้จากน้ำ ดิน พืช และสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ รวมทั้งสัตว์ปีกหลายชนิดทั้งปศุสัตว์ นกสวยงามและนกที่อาศัยอยู่ในธรรมชาติ นอกจากนี้ยังสามารถเพาะแยกได้จากสัตว์ชนิดอื่น ๆ อีกหลายชนิดเช่น สุกร โค กระบือ รวมทั้งสัตว์ป่าชนิดอื่น เป็นต้น กลุ่มที่ 3 เชื้อสาเหตุของโรค John's disease คือ *M. avium* subsp. *paratuberculosis* และกลุ่มที่ 4 เชื้อที่เพาะแยกได้จากสิ่งแวดล้อมและสัตว์ชนิดอื่น ๆ เช่น *M. fortuitum*, *M. genavense*, *M. marinum* และ *M. smegmatis* เป็นต้น

พรทิพภา (2536) จำแนก *Mycobacterium* ออกเป็น 2 กลุ่มโดยยึดความสามารถในการก่อโรคของเชื้อต่อคนและการวิเคราะห์เชื้อทางจุลชีววิทยาคลินิกเป็นหลักดังนี้ กลุ่มที่ 1 *Mycobacterium* ที่ก่อโรควัณโรคในคน ได้แก่ *M. tuberculosis*, *M. bovi* กลุ่มที่ 2 *Mycobacterium* ที่ไม่ก่อโรควัณโรคในคน แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มย่อยคือ สปีชีส์ที่ก่อโรคในคนอย่างแน่นอน ได้แก่ *M. leprae* สปีชีส์ที่มีแนวโน้มก่อโรคในคนได้ ได้แก่ *M. kansasii*, *M. xenopi* และ สปีชีส์ที่พบน้อยกว่าก่อโรคในคน เช่น *M. flavescens*, *M. gordonae* และ *M. vaccae* เป็นต้น

ด้านสัตวแพทย์แบ่งสปีชีส์ของเชื้อตามลักษณะที่เชื้อก่อโรกับคนและสัตว์ เป็น 3 กลุ่ม (พรทิพภา, 2536) คือ กลุ่มที่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพแบบแกรนูโลมา ที่เรียกว่า tuberculosis เช่น *M. tuberculosis* และ *M. bovis* เป็นต้น กลุ่มที่ก่อโรคที่ผิวหนังทำให้เกิดตุ่มแบบเฉอะบนผิวหนังหรือขี้เรื้อน (leprosy) เช่น *M. leprae* และ *M. lepraemurium* เป็นต้น และกลุ่มที่มีรูปแบบการก่อโรคที่ไม่แน่นอนเช่น *M. paratuberculosis* เป็นต้น

อิสยา และวัชรินทร์ (2553) จำแนก *Mycobacterium* ออกเป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 Obligate pathogen เป็นเชื้อที่ก่อโรคในมนุษย์เท่านั้น ได้แก่ *M. tuberculosis*, *M. bovis* กลุ่มที่ 2 Facultative pathogen เป็นเชื้อที่มีอยู่ในสัตว์หรือสิ่งแวดล้อมแล้วทำให้เกิดโรคในมนุษย์ เช่น *M. leprae* กลุ่มที่ 3 Potentially opportunistic pathogen เป็นเชื้อในสิ่งแวดล้อมแล้วติดต่อมาสู่คน ได้แก่ *M. kansasii*, *M. abscessus* เป็นต้น และกลุ่มที่ 4 Saprophyte ไม่ก่อโรคพบทั่วไปตามสิ่งแวดล้อม ได้แก่ *M. phlei*, *M. gordonae*

2. จำแนก *Mycobacterium* ตามการสร้างสารสี carotenoid ได้เป็น 4 กลุ่มดังนี้ (นงลักษณ์, 2547; อิสยา และวัชรินทร์, 2553) กลุ่มที่ 1 Photochromogen กลุ่มโคโรดินที่ไม่สร้างสี

เมื่อเจริญในที่มืดจะมีสีเฉพาะหลังให้แสงแล้วเพาะเลี้ยงอีกครั้ง เช่น *M. kansasii*, *M. marinum* และ *M. simiae* เป็นต้น กลุ่มที่ 2 Scotochromogen กลุ่มโคโลนีที่สร้างสีเหลืองส้มเมื่อเจริญในที่มืดหรือแสงน้อย เช่น *M. gordonae*, *M. sacrofulaceum*, *M. xenopi* และ *M. szulgai* เป็นต้น กลุ่มที่ 3 Non-chromogen กลุ่มที่ไม่สร้างสีเมื่อเจริญทั้งในที่มืดและสว่าง ถ้าสร้างสีจะให้สีเหลืองซีด เช่น *M. tuberculosis*, *M. avium-intra-cellulare*, *M. bovis* และ *M. ulcerans* เป็นต้น และกลุ่มที่ 4 Non-chromogen คล้ายกับกลุ่มที่ 3 แต่จะไม่เกิดสีแม้ให้แสงอีกครั้ง เช่น *M. fortuitum* และ *M. chelonae* เป็นต้น

3. จำแนก *Mycobacterium* ตามการเจริญเติบโตตาม อีสยา และวัชรินทร์ (2553) ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่เจริญเติบโตช้า (slow grower) เป็นกลุ่มที่ต้องใช้ระยะเวลาในการเจริญเติบโตมากกว่า 5 วัน โคโลนีมีลักษณะกลม ขอบเรียบ แบน มีสีเหลืองนวลหรือสีเนื้อ เช่น *M. kansasii*, *M. microti*, *M. bovis* และ *M. tuberculosis* เป็นต้น กลุ่มที่เจริญเติบโตเร็ว (rapid grower) เป็นกลุ่มที่สามารถเจริญเติบโตในระยะเวลา 5 วัน เช่น *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. flavescens* และ *M. vaccae* เป็นต้น และกลุ่มที่ไม่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (non-culturable) ได้แก่ *M. leprae*

7.1.3 การเจริญเติบโตของ *Mycobacterium* ในห้องปฏิบัติการ

Mycobacterium ส่วนใหญ่ไม่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดาต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดพิเศษ ได้แก่ Dorset egg, Petroff egg agar medium, Lowenstein-Jensen Petragani, Middlebrook 7H10 แต่สูตรอาหารที่นิยมใช้กันมากคือ Dubos agar, Sauton's agar และ Ogawa egg medium (อีสยา และวัชรินทร์, 2553) *Mycobacterium* sp. เป็นเชื้อที่เลี้ยงยากเนื่องจากผนังเซลล์มีความซับซ้อน ส่วนใหญ่เจริญได้ช้า แบ่งตัวทุก ๆ 12-24 ชั่วโมง การแยกเชื้อพวกที่เจริญเร็วต้องใช้เวลามากกว่า 3 วัน ในขณะที่พวกเจริญช้าได้แก่ *M. tuberculosis* ต้องใช้เวลา 3-8 สัปดาห์ บางชนิดไม่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ เช่น *M. leprae* ที่เป็นสาเหตุของโรคเรื้อน เป็นต้น (นงลักษณ์, 2547; Gregory and Ennis, 2007)

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของ *Mycobacterium* อยู่ระหว่าง 20-30 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลา 2-30 วันขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ ถ้าเป็นเชื้อกลุ่มเจริญเร็วจะสามารถเจริญได้ใน 7 วันภายใต้สภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม แต่ถ้าเป็นกลุ่มที่เจริญเติบโตช้า ต้องใช้เวลาตั้งแต่ 7 วันขึ้น

ไป จึงเห็นโคลนบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ *Mycobacterium* หลายชนิด สามารถปรับตัวให้เจริญได้เร็ว ขึ้นบนอาหารธรรมดาที่มีแอมโมเนียหรือกรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจน มีglycerol เป็นแหล่งคาร์บอน และมีธาตุอาหารที่จำเป็น (อนุชา, 2549; อิศยา และวัชรินทร์, 2553; Barksdale and Kim, 1993)

7.1.4 พยาธิสภาพและการระบาดของ *Mycobacterium*

Mycobacteriosis เป็นโรคที่เกิดจากแบคทีเรียสกุล *Mycobacterium* มีการระบาดอย่างมากทั้งในปลาน้ำจืด ปลาทะเล สัตว์น้ำ สัตว์เลี้ยงคณาน รวมทั้งยังเป็นเชื้อที่สามารถติดต่อจากสัตว์สู่คนได้ (zoonosis) ชนิดที่สำคัญได้แก่ *M. marinum*, *M. chelonae*, *M. abscessae*, *M. fortuitum* (Ruth and Yanong, 2002; Passantino *et al.*, 2008) พบครั้งแรกในปลาคาร์พ (*Cyprinus carpio*) ที่เลี้ยงในบ่อบริเวณสถานพักผ่อนคนป่วยวัณโรคในประเทศฝรั่งเศส สำหรับปลาทะเลพบ *M. piscium* ครั้งแรกในปลา cod (*Gadus morhua*) นอกจากนี้ยังพบรายงานในปลาชนิดอื่นเช่น ปลาซัลมอน และ ปลาในเขตหนาว เป็นต้น ต่อมาก็พบชนิดอื่น ๆ ตามมา เช่น *M. borstelense*, *M. salmoniphilum* และ *M. marinum* เป็นต้น เชื้อนี้ก่อให้เกิดโรคได้ทั้งกับ และสัตว์เลื้อยคลาน (David and Rhodes, 2008) ในคนและสัตว์เกี่ยวข้อง ชนิดที่มีการระบาดและมีความรุนแรงมากที่สุดคือ *M. tuberculosis* และ *M. bovis* (Yumi and Tooru, 2007)

M. marinum สามารถพบได้ทั่วโลกทั้งในปลาทะเล และปลาน้ำจืด มีความรุนแรงและระบาดมากที่สุด เมื่อติดเชื้อในระยะแรกมักไม่แสดงอาการของโรค แต่จะแสดงอาการเมื่อติดเชื้ออย่างรุนแรงแล้ว อาการที่พบคือ ชูบผอม ผิวหนังและตาอักเสบ เกิดเป็นตุ่มทูเบอร์เคิล (tubercle) ในอวัยวะภายใน เช่น ตับ ไต ม้าม หัวใจ และกล้ามเนื้อ เป็นต้น ทำให้เกิดการบวม น้ำ ช่องท้องเป็นแผล อาจลุกลามไปที่กรับ และหาง เมื่อลุกลามไปยังกล้ามเนื้อปลาจะตายในที่สุด (Ruth and Yanong, 2002; Steven, 2002; Virginia and Kent, 2007) ปลาในระยะวัยอ่อนที่ยังไม่มีการเจริญของลิมโฟไซต์สมบูรณ์ การติดเชื้อแม้เพียงเล็กน้อยชักนำให้macrophage เกิดการก่อรูปเป็นแกรนูโลมา นอกจากนี้ยังพบการแพร่กระจายออกสู่สิ่งแวดล้อม (David and Rhodes, 2008) การติดต่อสู่คนมีการระบาดกระจายทั่วโลก เช่น คนที่ทำงานเกี่ยวกับประมง ชาวประมง คนที่อาศัยตามชายฝั่งทะเล คนที่ใช้ชีวิตเกี่ยวข้องกับน้ำ นักชีววิทยาทางทะเล นักกีฬาว่ายน้ำ และพ่อครัวที่ประกอบอาหารทะเล เป็นต้น โดยเชื้อเข้าร่างกายผ่านทางบาดแผลที่สัมผัสกับน้ำที่มีการปนเปื้อน หรือปลาที่ติดเชื้อ จึงเรียกว่า Swimming pool granuloma หรือ Fish tank granuloma หรือ fish handler's

disease อาการของโรคเริ่มเกิดแผล ตุ่มหนองที่ผิวหนังก่อนแล้วจึงลุกลามไปยังอวัยวะอื่น ๆ ตามไป ยังต่อมน้ำเหลือง ในผู้ป่วยโรคเอดส์ คนที่มีปัญหาทางระบบภูมิคุ้มกัน และผู้ป่วยมะเร็งที่เพิ่งได้รับการรักษาทางเคมี (chemotherapy) จะมีการรุนแรงมาก (Steven, 2002; Passantino *et al.*, 2008)

M. fortuitum เป็นเชื้อที่พบในกบ หลังจากนั้นมีการกระจายสู่ปลาเขตอบอุ่นและ ปลาเขตร้อน นอกจากนี้ยังพบในปลาสวยงาม (Passantino *et al.*, 2008) ในเต่าพบเชื้อ *M. chelonae* และมีการระบาดกว้างสู่ ปลา รวมทั้งสัตว์ที่อาศัยอยู่ในระบบนิเวศเดียวกัน (Ruth and Yanong, 2002)

M. avium ssp. *paratuberculosis* ก่อโรค John's disease หรือ paratuberculosis เกิด แกรนูโลมาแบบเรื้อรัง ในสัตว์เคี้ยวเอื้องโดยเฉพาะในโคนมมีอาการท้องเสียเรื้อรัง น้ำหนักตัว ลด และมีปริมาณผลผลิตน้ำนมต่ำ ไม่มีความสำคัญในแง่สุขภาพสัตว์มากนักเนื่องจากสัตว์ที่ได้รับ เชื้อมักไม่แสดงอาการทางคลินิกให้เห็นหรือ อาจแสดงอาการเพียงเล็กน้อย (อนุชา, 2549; Seng *et al.*, 2006)

M. tuberculosis สามารถทำให้เกิดวัณโรคได้เกือบทุกส่วนของร่างกายมนุษย์ เมื่อ สูดดมละอองเชื้อเข้าไป เชื้อจะเจริญที่ถุงลมปอด (alveolus) จะทำให้เกิดโรคหรือไม่ขึ้นอยู่กับความ รุนแรงและภูมิคุ้มกันของโฮสต์ ระยะแรก อาจมีอาการเยื่อหุ้มปอดอักเสบ เจ็บหน้าอกเล็กน้อย มี อาการไอนานเกิน 3 สัปดาห์ เนื่องจากเชื้อมารวมกลุ่มกันโดย macrophage มาล้อมรอบกลายเป็นตุ่ม ทูเบอร์เคิล (tubercle) ตรวจพบโรคจากการเอกซเรย์ เห็นจุดในปอด (ศูนย์ข้อมูลโรคติดต่อและ พหุเวชโร, 2550) การแพร่กระจายสู่อวัยวะอื่น ได้แก่ กระดูก ระบบสืบพันธุ์ ระบบขับถ่าย ระบบ ประสาทส่วนกลางทำให้เยื่อหุ้มสมองอักเสบ เกิดจากการรั่วไหลของหนอง (liquefied caseous) เข้า ไปในหลอดเลือดดำแล้วแพร่ไปตามกระแสเลือด (นงลักษณ์, 2547) นอกจากคนแล้ว *M. tuberculosis* ยังทำให้เกิดวัณโรคที่ต่อมน้ำเหลืองบริเวณคอและเยื่อซีกลำไส้ในลิง โค กระบือ ม้า แพะ แกะ และช้าง รวมทั้งสัตว์เลี้ยงที่มีความใกล้ชิดกับคน เช่น สุนัขและแมว เป็นต้น (Yumi and Tooru, 2007)

M. bovis ระบาดมากในสัตว์เคี้ยวเอื้อง ได้แก่ โค กระบือ ทำให้เกิดโรคที่ชื่อว่า bovis tuberculosis อาการของโรคมีความคล้ายกับวัณโรคที่เกิดในคน มีความสำคัญมากทาง

สาหร่ายเนื่องจากมีการติดเชื้อออกไปในวงกว้างสู่สัตว์มากมายหลายชนิด รวมทั้งคนติดเชื้อชนิดนี้ได้จากการปนเปื้อนในนม หรือ ผลิตภัณฑ์ที่มาจากนม (Michel *et al.*, 2006)

7.1.5 ลักษณะทางแอนติเจนและการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของ *Mycobacterium*

ส่วนประกอบหลายชนิดในเซลล์ของ *Mycobacterium* มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจน เช่น พอลิแซ็กคาไรด์ โปรตีน และเปปไทด์ของผนังเซลล์ รวมทั้งส่วนโปรตีนในไซโทพลาซึม เป็นต้น ส่วนที่เป็นแอนติเจนมี 2 แบบคือ แบบที่ละลายน้ำได้ (cytoplasmic antigen) และไม่ละลายน้ำ (particular antigen) *Mycobacterium* ทั้งเซลล์และองค์ประกอบบางส่วนของเซลล์ทำให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันทั้งแบบพึ่งเซลล์และแบบอาศัยสารน้ำ แต่พบว่าการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบพึ่งเซลล์เป็นกลไกสำคัญในการป้องกันการติดเชื้อ (Bannantine and Stable, 1999; Laura *et al.*, 2006) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการกำจัดแบคทีเรียที่ติดเชื้อภายในเซลล์ (intracellular bacteria) เช่น *Mycobacterium* เป็นต้น ซึ่งกลไกการตอบสนองมีความคล้ายกับของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอย่างมาก โดย macrophage เก็บกินแบคทีเรียหรือสิ่งแปลกปลอม แล้วนำเสนอแอนติเจนของแบคทีเรียหรือสิ่งแปลกปลอมนั้นด้วย MHC class II ไปบนผิวเซลล์เพื่อเสนอให้กับเซลล์ T_H cell เมื่อโมเลกุล $CD\ 4^+$ T_H cell จับกับ MHC class II และ TCR จับกับแอนติเจนแล้ว จัดเป็นการกระตุ้น T_H cell ให้พร้อมทำงาน (active T_H cell) โดยหลังไซโตไคน์กระตุ้นการเกิดภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะให้ มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อดีขึ้น (Laura *et al.*, 2006) นอกจากนี้ macrophage ที่ถูกกระตุ้นสามารถปล่อย chemokine ได้แก่ IL-8, Chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2), monocyte inhibitory protein (MIP) เพื่อดึงดูดเซลล์อื่นมาล้อมรอบตำแหน่งที่ติดเชื้อเกิดเป็นแกรนูโลมาขึ้น (Dwight *et al.*, 2004)

การทำงานร่วมกันระหว่าง macrophage กับ activated T cell สามารถยับยั้งการเจริญของ *M. avium* โดยในสายพันธุ์ที่มีความรุนแรง activated T cell สามารถกระตุ้นให้ macrophage ปล่อย $IFN-\gamma$ ได้มากขึ้น (Hubbard and Colline, 1991; Manuela *et al.*, 1999) แต่ T cell ก็ช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อได้บางสายพันธุ์เท่านั้น ส่วนสายพันธุ์ที่ T cell ไม่สามารถยับยั้งการเจริญได้แก่ *M. paratuberculosis* (Susanne *et al.*, 2003) นอกจากนี้ natural cytotoxic cell (NCC) ของปลาหมึกทบาท และหน้าที่เหมือน natural killer cell (NK cell) ของคน สามารถทำงานร่วมกับ macrophage ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Mycobacterium* โดย NNC หรือ NK cell กระตุ้นให้ macrophage ผลิตไนโตริกออกไซด์เพิ่มมากขึ้น (Tort *et al.*, 2003) อีกทั้ง NK cell

สามารถทำลาย macrophage ที่ติดเชื้อให้ตายได้โดยการใช้อาวุธทำลาย เช่น perforin, granzymes, cytotoxin เป็นต้น หรือด้วยวิธี antibody dependent cytotoxic cell (ADCC) (Adams *et al.*, 2000; Michel *et al.*, 2006) ทั้ง NCC หรือ NK cell และ T cell ต่างก็ประสานงานร่วมกับ macrophage โดย NCC สร้างไซโทไคน์ไปกระตุ้น macrophage ให้ phagocytosis ได้ดีขึ้น ส่วน T cell อาศัยการสื่อสารผ่านทาง MHC class II กระตุ้นให้ macrophage ผลิตอนุมูลพิษมากขึ้นเพื่อทำลายเชื้อโดย macrophage ทำหน้าที่เป็นเซลล์ที่เตรียมและ นำเสนอแอนติเจนของ *Mycobacterium* ไว้บนผิวเซลล์ให้กับ T cell ที่มีโปรตีน CD 4⁺ และ CD 8⁺ อยู่บนผิวเซลล์โดยอาศัย MHC ทั้ง class I และ II ซึ่ง macrophage ที่ติดเชื้อจะหลั่งไซโทไคน์ ไปกระตุ้น T cell ที่ยังไม่พร้อมทำงาน (native T cell) ให้เกิดการเปลี่ยนขั้ว (polarization) โดยเปลี่ยน T cell ที่ผิวเซลล์มี CD 4⁺ ให้เป็น T helper 1 (T_H1) หรือเปลี่ยน T cell ที่ผิวเซลล์มี CD 8⁺ ให้เป็น cytotoxic T cell (T_C cell) (Somia *et al.*, 2002; Fairbrin, 2004)

7.1.6 การหลีกเลี่ยงภูมิคุ้มกันของ *Mycobacterium*

เมื่อ macrophage กิน *Mycobacterium* เข้าไปใน phagosome แบคทีเรียสามารถมีชีวิตอยู่ได้ และยังสามารถเพิ่มจำนวนได้ภายใน macrophage (สิทธิศักดิ์, 2549; Debasish *et al.*, 2001) การที่แบคทีเรียมีชีวิตอยู่ใน macrophage ของปลาได้นั้นเกิดจาก *Mycobacterium* สามารถยับยั้งกลไกของ macrophage ทำให้ phagosome ไม่สามารถเชื่อมรวมกับไลโซโซมได้ (Sahar *et al.*, 2001) ในการเชื่อมรวมกันนี้ Ca²⁺ มีบทบาทสำคัญอย่างมากนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงทางโมเลกุล จนทำให้เกิดการเชื่อมรวมกันระหว่าง phagosome และไลโซโซมเป็น phagolysosome พบว่าสารพิษที่ *Mycobacterium* หลั่งออกมา รวมทั้งผนังเซลล์ส่วนที่เป็นชั้นไขมันซึ่งประกอบด้วย peptidoglycan และ diaminopimelate เกาะติดกับพอลิแซ็กคาไรด์หลายชนิด สามารถขัดขวางการเพิ่มความเข้มข้นของ Ca²⁺ ภายในไซโทพลาซึมได้ ซึ่ง macrophage ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นจะมี Ca²⁺ ในไซโทพลาซึมอยู่ในระดับ 50-100 นาโนโมล และระดับความเข้มข้นของ Ca²⁺ ในจะสูงขึ้นเป็น 500-1,000 นาโนโมลเมื่อถูกกระตุ้นแต่เมื่อกระตุ้นด้วย *Mycobacterium* spp. ระดับ Ca²⁺ กลับลดลง ซึ่งระดับของ Ca²⁺ ยังมีผลต่อ respiratory burst โดยระหว่างการเกิด respiratory burst เซลล์จำเป็นจะต้องรักษาสมดุลของประจุไฟฟ้าที่เปลี่ยนแปลงโดย Ca²⁺ ไหลเข้าภายในเซลล์ ส่วน H⁺ ไหลออกจากเซลล์ (Thomus, 2004; David, 2005; Philipp and Pieters, 2006)

Mycobacterium ที่อยู่ใน phagosome ขัดขวางไม่ให้ phagosome เจริญเต็มที่ จึงไม่ปรากฏ mannose-6-phosphate, cathepsin D และ H^+ -ATPase pump บนเยื่อหุ้ม phagosome ทำให้ phagosome ไม่สามารถไปเชื่อมรวมกับไลโซโซมที่มาจาก trans Golgi network ได้ (Barbara *et al.*, 2004) นอกจากนี้หุ้ม sulfatide และ LAM ที่อยู่บนผิวของ *Mycobacterium* spp. มีบทบาทสำคัญที่ทำให้ *Mycobacterium* สามารถอยู่ภายใน macrophage ได้ เพราะ LAM สามารถยับยั้งการชักนำและการแสดงออกของยีน IFN- γ ทำให้ระดับ IFN- γ คงที่ รวมทั้งระดับ IL-12 ที่สูงขึ้นในระยะแรกก็จะลดลงกลับสู่ระดับปกติ และสามารถยับยั้งกระบวนการ respiratory burst ผ่านการทำงานของ protein kinase C จึงไม่มีการสร้างซูเปอร์ออกไซด์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่มีคุณสมบัติในการกำจัดสิ่งแปลกปลอม และ LAM ยังสามารถยับยั้ง L-arginine ไม่ให้ถูกเปลี่ยนไปเป็นสารที่ใช้สร้างไนตริกออกไซด์ (Bannantine and Stable, 1999; Shabbir *et al.*, 1999; Dirk *et al.*, 2002; Randal *et al.*, 2002) การขนส่งเอนไซม์ iNOS ที่ใช้สังเคราะห์ ไนตริกออกไซด์ เข้าสู่ phagosome ต้องอาศัยการทำงานของ actin filament แต่พบว่า macrophage ที่มี *Mycobacterium* อยู่ ไม่ปรากฏ actin filament จึงไม่มีการขนส่ง iNOS ไปยัง phagosome ส่งผลให้ไม่มีการทำงานของ iNOS เกิดขึ้น (Barbara *et al.*, 2004) แม้ว่า macrophage จะสามารถสร้างอนุมูลพิษได้ เช่น ROS และ Reactive intermediate nitrogen (RIN) เป็นต้น แต่ก็ไม่เพียงพอที่จะกำจัดเชื้อ (Adams *et al.*, 2000; Debasish *et al.*, 2001; David, 2005; Philipp and Pieters, 2006)

Mycobacterium ยังสามารถยับยั้งการตายแบบ apoptosis ของ macrophage ได้ โดยเซลล์ปกติเมื่อ Bad ซึ่งเป็น proapoptotic protein ถูกยับยั้งการทำงานโดยการเติมหมู่ฟอสเฟต ทำให้เซลล์เกือบทุกชนิดมีชีวิตรอดอยู่ ซึ่ง LAM นั้นสามารถเติมหมู่ฟอสเฟต ให้กับ Bad ผ่านทาง phosphatidyl inositol 3-kinase dependent pathway (PI-3K) ทำให้ macrophage ไม่ตายและสามารถดำรงชีวิตรอดอยู่ต่อไป (Debasish *et al.*, 2001) หรือแม้ว่า macrophage ที่ติดเชื้อ *Mycobacterium* spp. จะเกิด apoptosis ปล่อย apoptotic body ออกมา แต่ภายใน apoptotic body ก็มีเชื้ออยู่ ซึ่งจะถูก dendritic cell หรือ phagocyte อื่นจับกินต่อไป แต่เชื้อก็สามารถมีชีวิตรอดได้ในเซลล์นั้น ๆ (Fairbrain, 2004) การขัดขวางและหลีกเลี่ยงการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเป็นสาเหตุที่ทำให้การรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อนี้ตลอดระยะเวลา 40 ปีที่ผ่านมา ยังไม่ประสบความสำเร็จ (David, 2005)

7.1.7 *Mycobacterium lacticola*

M. lacticola เจริญอยู่กับสิ่งเน่าเปื่อยในลำไส้ของไส้เดือนดิน (Khambata and Bhat, 1954) จัดเป็น acid-fast bacteria ที่ไม่ก่อโรค (nonpathogenic bacteria) รูปร่างเป็นท่อนหลากหลายลักษณะ เรียกว่า pleomorphic bacilli หรือ pleomorphic rod พบได้ทั่วไปในน้ำนม ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้น้ำนมเน่าเสีย (จรรย์รัตน์, 2547) และยังพบได้ในธรรมชาติ มีความทนทานต่อความร้อน และความแห้งแล้ง เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยง chocolate Middlebrook 7H11 และ Lowenstein-Jensen agar อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญประมาณ 37 องศาเซลเซียส บ่มนาน 2 วัน แล้วจึงเปลี่ยนอาหารเลี้ยงโดยใช้อาหารเลี้ยงเดิมแต่เปลี่ยนอุณหภูมิเป็น 30 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นประมาณ 4-5 วัน จึงเห็นโคโลนีสีเหลืองอมส้ม (Deanna *et al.*, 2004) ซึ่งก่อนหน้านี้มีการเลี้ยง *M. lacticola* เป็นครั้งแรก โดยแยกเชื้อจากดินแล้วทดลองเลี้ยงในเลี้ยงอาหารสูตร Bhat and Barker's liquid oxalate medium ที่ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดา สารสกัดจากยีสต์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ สารละลายโซเดียม 0.1 เปอร์เซ็นต์ และ oxalate 0.5-0.7 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน (Khambata and Bhat, 1954) ในปี 2004 มีรายงานการติดเชื้อครั้งแรกในเด็กเพศหญิงอายุ 4 ปี หลังจากที่ได้รับการรักษาทางเคมี (myeloablative chemotherapy) โดยพบเชื้อในเลือดและจำแนกชนิดด้วยวิธีวิเคราะห์ลำดับเบส (sequence analysis) อาการที่พบนั้นมีไข้สูงเรื้อรัง และคือต่อยา azithromycin และ rifampin (Deanna *et al.*, 2004)

7.2 *Escherichia coli*

7.2.1 ชีวิตวิทยาของ *E. coli*

E. coli จัดจำแนกได้ดังนี้ (ปิยาณี, 2542; สุวดี, 2543; นงลักษณ์, 2547)

Kingdom Bacteria

Phylum Proteobacteria

Order Enterobacteriales

Family Enterobacteriaceae

Genus *Escherichia*

Species *Escherichia coli*

E. coli เป็นแบคทีเรียรูปท่อนสั้น ขนาดกว้าง 1.1-1.5 และยาว 2.0-6.0 ไมโครเมตร คิตติแกรมลบ เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลารอบตัว (peritrichous flagella) บางสายพันธุ์ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ บางชนิดมีแคปซูลที่ไม่มีสปอร์ จัดเป็นเชื้อประจำถิ่น (normal flora) อาศัยในลำไส้ตอนปลายและลำไส้ใหญ่ของคนและสัตว์เลื้อยคืบ (ปิยาณี, 2542; สุวดี, 2543; นงลักษณ์, 2547) นอกจากนี้ยังพบในระบบทางเดินอาหาร และกล้ามเนื้อของปลาน้ำจืด (Maria *et al.*, 2004) โดยปกติไม่ทำให้เกิดโรคแต่ในปัจจุบันพบว่าบางสายพันธุ์ก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร เรียกกลุ่มนี้ว่า pathogenic *E. coli* ได้แก่ enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) serotype ที่สำคัญในกลุ่มนี้คือ *E. coli* O157:H7 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่เป็นปัญหามากในประเทศที่พัฒนาแล้ว และการก่อโรคขึ้นอยู่กับ virulence factor ของแต่ละสายพันธุ์ (ปิยาณี, 2542; สุวดี, 2543; นงลักษณ์, 2544)

7.2.2 การเจริญเติบโตของ *E. coli*

เชื้อสามารถเจริญในที่ที่ไม่มีอากาศหรือมีออกซิเจนเล็กน้อยได้ สร้างพลังงานโดยกระบวนการหมักของคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate fermentation) แต่ถ้าเจริญในที่ที่มีออกซิเจนเพียงพอจะใช้วัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก (tricarboxylic acid cycle) และกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนเพื่อให้เกิดพลังงาน (นงลักษณ์, 2547)

อุณหภูมิที่ *E. coli* สามารถเจริญได้ อยู่ในช่วง 15-45 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 37 องศาเซลเซียส ให้โคโลนีเรียบ ไม่มีสี มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร จากการเพาะเลี้ยงในเวลา 18 ชั่วโมง แต่ถ้าเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรีย ได้แก่ Mac Conkey agar ให้โคโลนีสีแดงชมพู ขนาดใหญ่ ถ้าเลี้ยงใน Eosin methylene blue agar (EMB) และ Endo agar โคโลนีจะมีมันวาวคล้ายโลหะ (ปิยาณี, 2542; นงลักษณ์, 2547)

7.2.3 โครงสร้างที่เป็นแอนติเจนของ *E. coli*

ผนังเซลล์ของ *E. coli* ประกอบด้วยชั้น murein, lipoprotein, phospholipid และ LPS เรียงเป็นชั้น ชั้นที่เป็น murein และ lipoprotein มีประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ ของผนังเซลล์ทั้งหมด และเป็นส่วนที่ทำให้เซลล์เกิดความแข็งแรง ส่วนที่เหลืออีก 80 เปอร์เซ็นต์ของผนังเซลล์เชื่อมกับไขมัน กลายเป็นชั้น lipid bilayer ส่วน LPS มีพอลิแซ็กคาไรด์จำเพาะเป็นส่วนกำหนด

แอนติเจน และพิษของเชื้อ จากลักษณะของแอนติเจนทำให้แบ่งเชื้อตระกูลนี้ออกเป็น serotype แตกต่างกัน แอนติเจนที่สำคัญ คือ O, H และ K ดังต่อไปนี้ (สุวดี, 2543; นงลักษณ์, 2547)

1) K antigen หรือ capsular antigen เป็นแอนติเจนชนิดที่ไม่ทนความร้อน (heat-labile somatic antigen) อาจเป็นสารประกอบพวกโปรตีน หรือพอลิแซ็กคาไรด์อยู่ส่วนนอกสุดของเชื้อหุ้มเซลล์ มีลักษณะเหมือนแคปซูลบาง ๆ

2) H antigen หรือ flagella antigen เป็น flagellin protein แตกต่างกันที่ลำดับของกรดอะมิโน โปรตีนชนิดนี้อยู่ที่แฟลกเจลลา ไม่ทนความร้อน (heat-labile somatic antigen) และ แอลกอฮอล์ พบว่า H antigen มีส่วนสัมพันธ์กับ O antigen

3) O antigen หรือ somatic antigen เป็นสาร LPS อยู่ที่ผิวเซลล์ทนความร้อนได้ (heat-stable somatic antigen) ประกอบด้วย 3 ส่วนที่ต่างกัน คือ ส่วนที่ 1 เป็นหน่วยซ้ำ ๆ กันของ oligosaccharide ทำหน้าที่เป็น O antigen ส่วนนี้จะไปจับกับส่วนที่ 2 ที่ประกอบด้วย core polysaccharide แล้วจึงไปจับกับส่วนที่ 3 คือ lipid A ซึ่งแสดงความเป็นพิษ

8. การตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน

8.1 การตอบสนองของ macrophage ต่อ *Mycobacterium*

เมื่อปลาดูดเชื้อ *Mycobacterium* ปลาดจะใช้ทั้งระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดแบบพึ่งเซลล์และอาศัยสารน้ำ ในแบบพึ่งเซลล์ macrophage ทำหน้าที่เป็นเซลล์แรกในการต่อต้านโดยการจับกิน ส่วนแบบอาศัยสารน้ำนั้นมีการหลั่ง hematopoietic growth factor ได้แก่ M-CSF (macrophage-colony stimulating factor) เพื่อพัฒนา macrophage ให้มีขนาดใหญ่ขึ้นและเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการ phagocytosis ให้มากขึ้น นอกจากนี้ยังทำให้ macrophage สามารถเคลื่อนที่มายังบริเวณที่ติดเชื้อได้เร็วขึ้น และดึงดูดให้ macrophage มาล้อมรอบเซลล์ที่ติดเชื้อเกิดเป็นแกรนูโลมาเพื่อไม่ให้เชื้อกระจายออกไปสู่อวัยวะอื่น ซึ่งกระบวนการต่อต้าน *Mycobacterium* ที่พบในปลาเป็นเช่นเดียวกับที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Dwight *et al.*, 2004; Chao *et al.*, 2009)

กลไกการตอบสนองของ macrophage ต่อ *Mycobacterium* แบ่งออกได้เป็น 2 แบบ

8.1.1 กลไกการทำลายแบบไม่ใช้ออกซิเจน (oxygen-independent intracellular killing) เกิดจาก macrophage รับรู้แอนติเจนจำเพาะบนผิวของ *Mycobacterium* ได้แก่ โปรตีน कारโบไฮเดรต และไขมัน หรือสารประกอบชนิดอื่น เช่น LAM และ mannose เป็นต้น ผ่าน TLR 2, mannose receptor และ complement receptor (Dwight *et al.*, 2004) หลังจากการรับรู้จะเกิดกระบวนการ phagocytosis ซึ่ง macrophage ที่ถูกกระตุ้นด้วย IFN- γ และ eicosanoid จะมีความสามารถในการ phagocytosis สูงกว่า macrophage ที่ไม่ได้รับการกระตุ้น (Shih *et al.*, 1998; Seng *et al.*, 2006) *Mycobacterium* ที่ทำให้ก่อกลายถูกจับกินเข้าไปอยู่ใน phagosome แล้วจากนั้นไลโซโซมจะมาเชื่อมรวมเป็น phagolysosome (David and Barton, 2001) เอนไซม์ ต่าง ๆ ภายในไลโซโซม เช่น hydrolytic enzyme และ lysozyme จะย่อย *Mycobacterium* (David and Barton, 2001) นอกจากนี้ภายใน phagosome ที่มี *Mycobacterium* สายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรง จะมีสถานะเป็นกรดมากกว่าใน phagosome ที่มีสายพันธุ์ไม่ก่อโรค และสายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรงแต่ทำให้เสียสภาพ (Damm, 2001) จากการศึกษากระบวนการ phagocytosis ของ macrophage ปลา rainbow trout พบว่ามีประสิทธิภาพมากขึ้นเมื่อมีแอนติบอดีชนิด monoclonal antibody (MAb) และ ซีรัมใหม่ (fresh serum) เป็นตัวเสริม (opsonised) ทำให้ macrophage จับกิน *Mycobacterium* ได้มากขึ้น (Shih *et al.*, 1998)

8.1.2 กลไกการทำลายแบบใช้ออกซิเจน (oxygen-dependent intracellular killing) หรือเรียกว่า respiratory burst หรือ oxidative burst กลไกนี้ทั้งในปลา สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และคน มีวิธีเหมือนกัน (วิน, 2544; Mathews, 1990; Norman *et al.*, 2001; Andrea *et al.*, 2004; Debbie *et al.*, 2005; Shona, 2007, Pilar, 2008, Jennifer *et al.*, 2010) เมื่อ *Mycobacterium* อยู่ใน phagosome หรือกระตุ้นเอนไซม์ NADPH oxidase บนเยื่อหุ้มเซลล์ของ macrophage ด้วย IFN- γ เกิดการสร้างและปล่อย ROS ได้แก่ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และ ซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน ออกมาทำลายเชื้อภายในเซลล์ (George and Nakanishi, 1996, Andres, 2004) นอกจากนี้ LAM ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่ผนังเซลล์ของ *Mycobacterium* จะจับอย่างจำเพาะกับ TLR 2 บนผิวเซลล์ของ macrophage แต่การจับกันนี้ไม่เกิดการนำสัญญาณ หรือลดการนำสัญญาณของ TLR 2 แต่ถ้ากระตุ้นร่วมกับ IFN- γ สามารถเกิดการนำสัญญาณได้ซึ่งเป็นทำงานร่วมกับโปรตีน MyD 88 ส่งผลให้ MyD 88 กระตุ้นโปรตีน IRAK และ TRAF6 ตามลำดับโดยการเติมหมู่ฟอสเฟต จากนั้น TRAF 6 จะเข้าสู่นิวเคลียส กระตุ้น NF-KB โดยการเติมหมู่ฟอสเฟต เพื่อให้เกิดกระบวนการ transcription และ translation จน

ได้เป็นไซโตไคน์ได้แก่ IL-8, IL-12, tumor necrosis factor (TNF), IFN ซึ่งไซโตไคน์เหล่านี้สามารถกระตุ้น เอนไซม์ iNOS ในการสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์ (David *et al.*, 1999; Akira *et al.*, 2003; Takeda, 2003; Subhendu and Fenton, 2004; Bernhard *et al.*, 2005; Actor, 2007; Gisa *et al.*, 2007; Alexander *et al.*, 2008; Alvarez, 2008)

การตอบสนองของ macrophage ต่อ *Mycobacterium* โดยการปล่อยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน และ ไนตริกออกไซด์จากกระบวนการ respiratory burst ใน macrophage ของปลา จะเพิ่มปริมาณขึ้นได้โดยการกระตุ้นจาก IFN- γ (Ralph and Kaufman, 1995; Adams *et al.*, 1997) และโพแทสเซียม ไอออน (K^+) โดยโพแทสเซียม ไอออนจะเข้าสู่เซลล์ผ่านทางช่องโพแทสเซียม ไอออน (Potassium ion channel) ซึ่งโพแทสเซียม ไอออนนี้จะเข้าจับกับ NADPH oxidase บนเยื่อหุ้มเซลล์ของ macrophage มีผลทำให้ NADPH oxidase สังเคราะห์อนุมูลอิสระได้ (Thomas, 2004)

8.2 การตอบสนองของ macrophage ต่อ *E. coli*

เมื่อปลาติดเชื้อ *E. coli* macrophage มีกลไกตอบสนองต่อ *E. coli* ได้เป็น 2 แบบคือ

8.2.1 กลไกการทำลายแบบไม่ใช้ออกซิเจน ได้แก่ กระบวนการ phagocytosis โดย macrophage ของปลา จะมีประสิทธิภาพในการจับ *E. coli* มากขึ้น เมื่อมีการเสริม (opsonisation) ด้วย แอนติบอดี และส่วนของคอมพลีเมนต์ โดย macrophage รับรู้แอนติเจนจำเพาะของ *E. coli* ได้แก่ LPS ผ่านทาง scavenger receptor family เช่น macrophage receptor with collagenous structure (MARCO) และ TLR 4 เป็นต้น (Luc *et al.*, 1999) เมื่อ *E. coli* ถูกจับกินแล้วจะอยู่ใน phagosome แล้วถูกเอนไซม์ภายในไลโซโซมย่อยทำลาย (David and Barton, 2001)

8.2.2 กลไกการทำลายแบบใช้ออกซิเจน เกิดขึ้นเมื่อเยื่อหุ้มเซลล์ของ macrophage สัมผัสกับ LPS ของ *E. coli* ทำให้เอนไซม์ NADPH oxidase ที่เยื่อหุ้มเซลล์ของ macrophage ถูกกระตุ้น สร้างและปล่อย ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และ ซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน ออกมา (Norman and Belosevic, 1996; Sarmiento *et al.*, 2004) นอกจากนี้ LPS บนผนังเซลล์ของ *E. coli* จะจับอย่างจำเพาะกับ TLR 4 บนเยื่อหุ้มเซลล์ของ macrophage ของปลา ในการจับกันนี้ต้องอาศัย MD2 ร่วมด้วย จึงจะเกิดการนำสัญญาณขึ้น ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ เกิดกลไกที่ทำงาน

แบบไม้อาศัยโปรตีน MyD 88 (Maria *et al.*, 2009) การจับกันอย่างจำเพาะระหว่าง LPS กับ TLR 4 ทำให้โปรตีน TRIF ที่เกาะอยู่กับ TLR 4 ไปกระตุ้นโปรตีน IRF3 โดยการเติมหมู่ฟอสเฟต เพื่อให้ IRF3 เข้าสู่นิวเคลียสและลงเกาะกับยีน IFN เกิดการ transcription ได้ IFN- β แล้วปล่อยออกนอกเซลล์ IFN- β ไปจับกับ IFN- β receptor ของเซลล์เดิมหรือเซลล์อื่น การจับกันระหว่าง IFN- β และ IFN- β receptor เป็นการกระตุ้น Stat1 เพื่อเกิดการ transcription และ translation ได้เป็นเอนไซม์ iNOS ซึ่งเป็นเอนไซม์ในการสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์ (David *et al.*, 1999; Akira and Takeda, 2003; Takeda, 2003; Pilar, 2008; Subhendu and Fenton, 2004; Bernhard *et al.*, 2005; Gisa *et al.*, 2007; Jeffrey, 2007) นอกจากจะมีการปล่อยไนตริกออกไซด์ออกมาแล้ว ยังมีการปล่อย proinflammatory cytokine ได้แก่ IL-1, IL-6, TNF- α , IFN- γ เพิ่มมากขึ้นด้วย (Luc *et al.*, 1999)

กระบวนการ respiratory burst ใน macrophage ของปลาเพื่อตอบสนองต่อ *E.coli* จะเพิ่มขึ้นได้เมื่อได้รับ macrophage activating factor (MAF) และ IFN- γ (Norman and Belosevis, 1996; Norman *et al.*, 2001; Sarmiento *et al.*, 2004) จากการศึกษากระบวนการ respiratory burst ของ macrophage ปลาใน เมื่อกระตุ้นด้วย LPS พบว่านอกจากจะมีการสร้างอนุมูลอิสระแล้วยังมีการแสดงออกของยีน Ig-like transcript 1 (NILT 1) และมี chemokine receptor ได้แก่ CXCR 2 ซึ่ง CXCR 2 บนเยื่อหุ้มเซลล์ของ macrophage เพิ่มขึ้น ส่งผลให้ macrophage สามารถรับ chemokine ได้มากขึ้น (Maaik *et al.*, 2004) และเมื่อทดลองกระตุ้น macrophage ของปลาด้วยไมโทเจน (mitogen) ได้แก่ germ agglutinin (WGA), immune complex, phorbol myristate acetate (PMA), muramyl dipeptide (MDP), LPS ซึ่งพบที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียพบว่า LPS สามารถชักนำให้สร้างซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออนได้ดีที่สุด (Michael and Richard, 1990)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การแยกและเพาะเลี้ยง macrophage จากปลานิล (Joanne *et al.*, 1999)

1.1 ปลานิลโตเต็มวัยน้ำหนักประมาณ 1,000 กรัม ลำตัวยาวประมาณ 15-20 เซนติเมตร จำนวน 18 ตัว ทำให้ตายด้วยการทุบหัว ฉีดพ่นเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ทั่วตัวปลาเพื่อฆ่าเชื้อภายนอก เปิดหน้าท้องด้วยกรรไกรผ่าตัดซึ่งทำให้ปลอดเชื้อด้วยวิธีนี้ 120 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที และในระหว่างการผ่าตัดแช่กรรไกรในเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปิดหน้าท้องแล้ว ฉีดพ่นเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์อีกครั้ง จากนั้นใช้กรรไกรผ่าตัดเลาะตามแนวไตส่วนท้อง (trunk kidney) ที่เป็นแนวเข็มทอดเป็นคู่ตามด้านหลังของลำตัว จนถึงกะโหลกศีรษะ ไตทางด้านใกล้กะโหลกศีรษะมีลักษณะเป็นก้อนยาว คือไตส่วนต้น (head kidney) ทุกขั้นตอนทำโดยเทคนิคปลอดเชื้อ

1.2 แยกไตแต่ละข้างด้วยปากคีบ (forceps) ใส่ในจานเลี้ยง (petri disc) แต่ละจาน ที่มี phosphate buffer saline (PBS) (ภาควิชา) ผสม antibiotic (penicillin และ streptomycin) (Gibco, USA) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ล้างไตด้วย PBS 3 ครั้ง แล้วบดในโกร่ง (homogenizer) ให้ละเอียด

1.3 กรองส่วนที่บดด้วยตะแกรงไนลอน 2 ชั้น ที่ปลอดเชื้อ ลงในจานเลี้ยงที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 (Gibco, USA) จากนั้นปั่นลงในหลอดทดลอง นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Hettich, Universal 32 R) ที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที

1.4 เก็บส่วนใส เดมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตรทิ้งไว้ 30 วินาทีเพื่อให้เม็ดเลือดแดงแตก แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ปริมาณ 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง เหลือไว้ประมาณ 1 มิลลิลิตร

1.5 ถ่ายเซลล์ที่ได้ลงจานเลี้ยงเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร ที่ประกอบด้วยอาหาร RPMI 1640 ปริมาตร 5 มิลลิลิตรที่มี fetal bovine serum (FBS) (Gibco, USA) 10 เปอร์เซ็นต์ และ antibiotic 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มในตู้บ่ม (Binder KB 115) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 72 ชั่วโมง เซลล์ที่เกาะกับจานเลี้ยง 90 เปอร์เซ็นต์เป็น

macrophage ซึ่งจากวิธีนี้ไตแต่ละข้างจะให้ macrophage ประมาณ 2×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก)

2. การเตรียมการทดลองเพื่อใช้ตรวจสอบอนุโมลอิสระและกิจกรรมของเอนไซม์

ใช้ macrophage จำนวน 2×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตรที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ที่ 72 ชั่วโมง เพื่อใช้ทดสอบการตอบสนองของ macrophage แบ่งการทดลองออกเป็น 5 กลุ่มแต่ละกลุ่มการทดลอง คุดอาหารเลี้ยงเซลล์เท่าที่ถึงแล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ก่อนเริ่มการทดลอง

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ไม่เติมเชื้อ หรือตัวกระตุ้น

กลุ่มที่ 2 กลุ่มทดลองกระตุ้นด้วย *Escherichia coli* (ATCC 25922) จำนวน 2×10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร วัดจำนวนเซลล์ด้วยวิธีความขุ่นมาตรฐาน (McFarland nephelometer standard) (ภาคผนวก) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

กลุ่มที่ 3 กลุ่มทดลองกระตุ้นด้วย LPS (*Escherichia coli* 011:B4; Sigma, St. Louis, MO, USA) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนพบที่ผนังเซลล์ของ *E. coli* โดยเจือจาง LPS 10 ไมโครกรัมใน PBS 1 มิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครกรัม

กลุ่มที่ 4 กลุ่มทดลองกระตุ้นด้วยกรดไมโคลิค (Sigma, St. Louis, MO, USA) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนพบที่ผนังเซลล์ของ *Mycobacterium* โดยเจือจางกรดไมโคลิค 10 ไมโครกรัม ใน PBS 1 มิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครกรัม

กลุ่มที่ 5 กลุ่มทดลองกระตุ้นด้วย *Mycobacterium lacticola* (ได้รับความอนุเคราะห์จาก ภาควิชาจุลชีววิทยา) จำนวน 2×10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร วัดจำนวนเซลล์ด้วยวิธีความขุ่นมาตรฐาน (ภาคผนวก) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

การทดลองในแต่ละกลุ่มทั้งการวัดความเข้มข้นของอนุโมลอิสระ และกิจกรรมของเอนไซม์ ทดลองอย่างละ 3 ซ้ำ

3. การตรวจสอบกระบวนการ phagocytosis

ใช้ macrophage จำนวน 2×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้ง เดิม *M. lacticola* หรือ *E. coli* จำนวน 2×10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 60 นาที เมื่อครบเวลาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง จากนั้นตรวจสอบกระบวนการ phagocytosis ดังนี้

3.1 การตรวจสอบ phagocytosis แบคทีเรีย *M. lacticola* โดยวิธีของ Ziehl - Neelsen (จูริชรัตน์, 2547)

3.1.1 ปล่อยให้จานเลี้ยงเห้งในอากาศ จากนั้นย้อมด้วยสารละลาย carbol fuchsin [basic fuchsin (APS, Australia) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และสารละลาย phenol (Merck, Germany) ปริมาตร 90 มิลลิลิตร)] ให้ทั่วจานเลี้ยง

3.1.2 นำไปวางบนไอน้ำร้อน นาน 5-10 นาที แล้วเทสีทิ้งทิ้งไว้ให้เย็น

3.1.3 ล้างด้วยน้ำ และหยดกรดแอลกอฮอล์ (acid alcohol) 3 เปอร์เซ็นต์ (เอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 97 มิลลิลิตร และกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ปริมาตร 3 มิลลิลิตร) จนสีแดงจางเกือบหมด แล้วล้างด้วยน้ำก็อกอีกครั้ง

3.1.4 ย้อมด้วยเมทิลีนบลู (methylene blue) 1 เปอร์เซ็นต์ [methylene blue (amresco, USA) ปริมาตร 100 มิลลิกรัมในน้ำ 100 มิลลิลิตร)] นาน 1 นาที แล้วล้างน้ำก็อกอีกครั้ง

3.1.5 ปล่อยให้จานเลี้ยงให้แห้งแล้วนำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ซึ่ง *M. lacticola* จะติดสีแดงของ carbol fuchsin อยู่ใน macrophage ที่ติดสีน้ำเงินของเมทิลีนบลู

3.2 การตรวจสอบ phagocytosis แบคทีเรีย *E. coli* โดยวิธีย้อมสีแบบ Gram (จูริชรัตน์, 2547)

3.2.1 ปล่อยให้จานเลี้ยงเห้งในอากาศแล้วผ่านจานเลี้ยงบนเปลวไฟอย่างรวดเร็ว 2-3 ครั้ง การผ่านเปลวไฟเพื่อไม่ให้เชื้อหลุดออกขณะย้อมสี

3.2.2 หยดสีคริสตัลไวโอเลต (crystal violet, Amresco, USA) ให้ทำงานเลี้ยงทิ้งไว้ 1 นาทีแล้วเททิ้ง

3.2.3 หยดสารละลายลูกอลไอโอดีน (Lugol's iodine) ให้ทำงานเลี้ยงทิ้งไว้ 1 นาที จากนั้นเทสารละลายทิ้ง ซึ่งสารละลายไอโอดีนทำหน้าที่เป็นมอร์แดนต์ (mordant) ช่วยให้เซลล์ติดสีย้อมได้ดีขึ้น

3.2.4 ล้างสีออกด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ทิ้งไว้ประมาณ 15 วินาที แล้วจึงล้างด้วยน้ำก๊อก ขั้นตอนการล้างน้ำนี้สำคัญมากเพราะเป็นการหยุดปฏิกิริยาล้างสี

3.2.5 หยดสีซาฟรานิน (Safranin, APS, Australia) ให้ทำงานเลี้ยงทิ้งไว้ 30 วินาที แล้วล้างน้ำ และซับให้แห้ง ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ซึ่ง *E. coli* ติดสีแดงของซาฟรานิน

4. การตรวจสอบอนุมูลอิสระ

ใช้ macrophage จำนวน 2×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร คู่ออาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้งเดิม *M. lacticola* หรือ *E. coli* จำนวน 2×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร หรือ LPS หรือ กรดไมโคลิก ปริมาตร 10 ไมโครกรัม จากนั้นบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 60 นาที แล้วตรวจสอบอนุมูลอิสระดังนี้

4.1 ตรวจสอบการผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของ macrophage (Edgar and Keisari, 1980; Chaible *et al.*, 2005)

4.1.1 คู่ออาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้ง จากนั้นเติมสารละลาย phenol red (ภาคผนวก) ปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงในจานเลี้ยง macrophage บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 60 นาที

4.1.2 เมื่อครบเวลาแล้วถ่ายสารละลาย phenol red ลงในหลอดปั่นเหวี่ยง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที

4.1.3 คูดสารละลายส่วนบน (supernatant) ปริมาตร 2 มิลลิตร ไปยังหลอดวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer tube) เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาณ 10 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectronic 20 Genesys) ที่ 610 นาโนเมตร

4.1.4 ตั้งค่าศูนย์ (Set Blank) โดยใช้สารละลาย phenol red ปริมาตร 2 มิลลิตรแล้วเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาณ 10 ไมโครลิตร แล้วเทียบความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐานของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Carlo, ERBA)

4.2 ตรวจสอบการผลิตไนตริกออกไซด์ของ macrophage (Hey *et al.*, 1995; Mathiesen *et al.*, 2008)

4.2.1 คูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้ง จากนั้นเติมสารละลาย Griess reagent (ภาคผนวก) ลงในจานเลี้ยง macrophage บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 60 นาที

4.2.2 เมื่อครบเวลาถ่ายสารละลาย Griess reagent ลงในหลอดปั่นเหวี่ยง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที

4.2.3 คูดสารละลายส่วนบนปริมาตร 2 มิลลิตร ไปยังหลอดวัดค่าดูดกลืนแสงวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

4.2.4 ตั้งค่าศูนย์โดยใช้น้ำกลั่น แล้วเทียบความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐานของโซเดียมไนไตร (Univar, Australia)

4.3 ตรวจสอบการผลิตซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออนของ macrophage (ดัดแปลงจาก Mathiesen *et al.*, 2008)

4.3.1 คูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้ง จากนั้นเติมสารละลายวิเคราะห์ superoxide anion

(ภาคผนวก) ลงในงานเลี้ยง macrophage บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์นาน 60 นาที

4.3.2 เมื่อครบเวลาถ่ายสารละลายวิเคราะห์ superoxide anion ลงในหลอดปั่นเหวี่ยง นำไปที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที

4.3.3 ดูดสารละลายส่วนบนปริมาตร 2 มิลลิลิตร ไปยังหลอดวัดค่าดูดกลืนแสง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 505 นาโนเมตร

4.3.4 ตั้งค่าศูนย์ โดยใช้ น้ำกลั่น แล้วเทียบความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐานของ โพแทสเซียมเปอร์ออกไซด์

5. การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ

หลังกระตุ้น macrophage จำนวน 2×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นาน 60 นาที ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้ง จากนั้นเติม Tris.HCl-EDTA ที่เย็น (Tris.HCl, Tris (hydroxymethyl) aminomethane ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ที่ pH 7.5 และ EDTA ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์) ลงในงานเลี้ยง เก็บเกี่ยวเซลล์ด้วยการดูด ถ่ายลงโถรงบบนน้ำแข็ง แล้วดูดลงหลอดทดลอง นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บส่วนใส (ตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ) เพื่อใช้ตรวจวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ

5.1 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ glutathione peroxidase ภายใน macrophage
(Colorimetric assay for cellular glutathione peroxidase, Oxford biochemical research, MI, USA)

5.1.1 ปิเปตตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 70 ไมโครลิตร และเติมสารต่าง ๆ ดังนี้ บัฟเฟอร์ ปริมาตร 350 ไมโครลิตร (assay buffer, phosphate buffer pH 7.2 และ EDTA อัตราส่วน 1:1) NADPH reagent ปริมาตร 35 ไมโครลิตร (glutathione reduced ความเข้มข้น 4 มิลลิโมลต่อลิตร glutathione reductase ความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อลิตร และ NADPH ความเข้มข้น 0.34 มิลลิโมลต่อลิตร) ลงในหลอดวัดค่าการดูดกลืนแสง (cuvette) ตามลำดับ วางหลอดวัดค่าการดูดกลืนแสง ลงเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง ที่ตั้งค่าการดูดกลืนแสงไว้แล้วที่ 340 นาโนเมตร

5.1.2 เติม tert-butyl hydroperoxide ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นชนิดปลอดไอออน (deionized) อัตราส่วน 1:100 (v/v) ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ปิเปตดูดขึ้นลง 2-3 ครั้ง ระวังอย่าให้เกิดฟอง บันทึกการเปลี่ยนแปลงค่าดูดกลืนแสงทุก 30 วินาที เป็นเวลา 3 นาที

5.1.3 การวัดกิจกรรมของ glutathione peroxidase (GSH-Px) อาศัยหลักการที่เอนไซม์ GSH-Px เปลี่ยน organic peroxide ให้เป็น glutathione ในรูป oxidized (GSSG) จากนั้นเอนไซม์ glutathione reductase เปลี่ยน NADPH และ glutathione ในรูป oxidized (GSSG) ให้เป็น glutathione (GSH) และ NADP^+ ซึ่งการเปลี่ยนจาก NADPH ไปเป็น NADP^+ สามารถวัดได้จากการลดลงของค่าดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร ดังสมการ



การคำนวณ

อัตราเร็วของเอนไซม์ในตัวอย่างต่อนาที = ค่าเฉลี่ยอัตราเร็วของเอนไซม์ที่ 30 วินาที x 2

อัตราเร็วปฏิกิริยาทั้งหมด = อัตราเร็วของเอนไซม์ในตัวอย่างต่อนาที - 0.003

$$1 \text{ mU/mL} = 1 \text{ nmol NADPH} / \text{mL} / \text{min} = \frac{\text{อัตราเร็วของปฏิกิริยาทั้งหมด}}{0.00622}$$

5.2 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ catalase ภายใน macrophage (Cayman's catalase assay kit, Cayman Chemical, MI, USA)

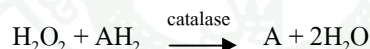
5.2.1 ปิเปตตัวอย่างที่ต้องการทดสอบปริมาตร 20 ไมโครลิตร และเติมบัฟเฟอร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร [assay buffer; potassium phosphate ปริมาตร 100 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 7 เจือจางด้วยน้ำชนิด HPLC grad อัตราส่วน 1:9 (v/v)] เมทานอล ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และ

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เจือจาง (ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 8.82 โมลาร์ ปริมาตร 40 ไมโครลิตร กับ น้ำกลั่น ปริมาตร 9.96 มิลลิลิตร) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในหลุม 96 well plate เปิดฝา นำไปปั่นบนเครื่องเขย่า (Biotek, Power Wave 340) นาน 20 นาที

5.2.2 เดิมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 โมลาร์ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร (แช่เย็นไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) และเพอร์พาลด์ (purpald, chromogen; 4-amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazole) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ปั่นบนเครื่องเขย่านาน 10 นาที

5.2.3 เดิมโพแทสเซียมเพอร์ไอโอเดต (potassium periodate) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ปั่นบนเครื่องเขย่านาน 5 นาที แล้วอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader (Biotek, Powerwave 340)

5.2.4 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ catalase อาศัยหลักการที่เอนไซม์เปลี่ยนเมทานอล และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไปเป็น formaldehyde เกิดสีเมื่อทำปฏิกิริยากับเพอร์พาลด์ ดังสมการ



การคำนวณ

ความเข้มข้นของ formaldehyde ในตัวอย่างคำนวณโดยสูตร

$$\text{formaldehyde } (\mu\text{M}) = \frac{\text{ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่าง} - \text{จุดตัดแกน Y}}{\text{ความชัน}} \times 8.5 \text{ มิลลิลิตร}$$

กิจกรรมของเอนไซม์ catalase ในตัวอย่างคำนวณโดยสูตร

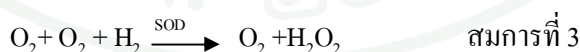
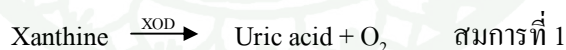
$$\text{catalase activity} = \frac{\text{formaldehyde}(\mu\text{M})}{20\text{min}} \times \text{Sample Dilution} = \text{nmol} / \text{min} / \text{ml}$$

5.3 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ superoxide dismutase ภายใน macrophage (คัดแปลงจาก Ransod kit, Randox Laboratories, Ltds, UK)

5.3.1 ปิเปตตัวอย่างที่ต้องการทดสอบและสารละลายผสม [xanthine ความเข้มข้น 0.05 นาโนโมลต่อลิตร, INT (iodonitrotetrazolium chloride; 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride) ความเข้มข้น 0.025 นาโนโมลต่อลิตร และ phosphate buffer ที่ pH 10.2] ปริมาตร 30 และ 1,000 ไมโครลิตร ลงในหลอดวัดค่าการดูดกลืนแสง ตามลำดับ ผสมสารให้เข้ากัน โดยใช้ปิเปตดูดขึ้นลง 2-3 ครั้ง

5.3.2 ตั้งค่าเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงไว้ที่ 505 นาโนเมตร วางหลอดวัดค่าการดูดกลืนแสงลงในเครื่อง แล้วเติม xanthine oxidase 80 ยูนิตต่อลิตร ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 วินาที (นับเวลาจากที่ใส่ xanthine oxidase) ให้กดปุ่ม zero แล้วทิ้งไว้อีก 3 นาที จึงอ่านค่าการดูดกลืนแสง และตั้งค่าศูนย์ โดยใช้น้ำกลั่น

5.3.3 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์อาศัยหลักการที่ xanthine oxidase (XOD) ทำปฏิกิริยากับ xanthine แล้วเกิดอนุมูล superoxide ขึ้นซึ่งจะไปทำปฏิกิริยากับ INT โดยการทำงานของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) วัดจากอัตราการยับยั้งปฏิกิริยา ดังสมการ



การคำนวณ

$$\text{ผลต่างอัตราเร็วในตัวอย่างต่อนาที} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงนาทีที่สาม} - \text{ค่าการดูดกลืนแสงนาทีที่สอง}}{3}$$

อัตราเร็วทั้งหมดของปฏิกิริยาในตัวอย่าง แปลงเป็นเปอร์เซ็นต์ของอัตราตัวอย่างที่ถูกยับยั้ง จากสมการ

$$\% \text{ การยับยั้ง} = 100 - \frac{\text{ผลต่างของอัตราเร็วในตัวอย่างก่อนที่}}{\text{อัตราเร็วในตัวอย่างที่เจือจาง}} \times 100$$

จากนั้นหากิจกรรมของเอนไซม์ในหน่วยมิลลิยูนิต SOD จากกราฟมาตรฐาน

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

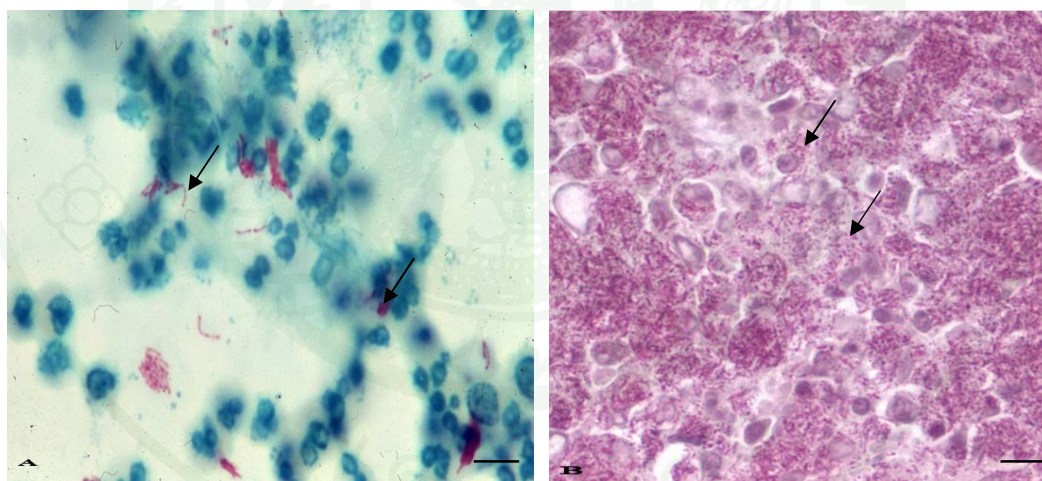
ข้อมูลจากการศึกษาความเข้มข้นของอนุมูลอิสระ ได้แก่ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไนตริกออกไซด์ ซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน รวมทั้งกิจกรรมของเอนไซม์ด้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ glutathione peroxidase, catalase, superoxide dismutase นำมาหาค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) วิเคราะห์ความแปรปรวนโดย One way Anova และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($P = 0.05$)

ผลและวิจารณ์

ผล

1. ตรวจสอบการเกิด phagocytosis ของ macrophage ต่อ *M. lacticola* เปรียบเทียบกับ *E. coli*

จากการทดสอบการตอบสนองของ macrophage ต่อแบคทีเรีย 2 ชนิดคือ *M. lacticola* และ *E. coli* พบว่า macrophage จับกินทั้ง *M. lacticola* และ *E. coli* ตรวจสอบได้โดยการย้อมเซลล์ด้วยวิธี Ziehl-Neelson พบ *M. lacticola* มีลักษณะเป็นแท่งดัดสีแดงอยู่ภายในเซลล์ (ภาพที่ 1 A) และเมื่อย้อมด้วยวิธี Gram พบ *E. coli* มีลักษณะเป็นแท่งดัดสีแดง (ภาพที่ 1 B) จากนั้นจึงนำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงมาตรวจสอบการสร้างอนุมูลอิสระและกิจกรรมของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระต่อไป



ภาพที่ 1 การจับกินแบคทีเรียของ macrophage ปลานิล

A. *M. lacticola* ใน macrophage ของปลานิล (ลูกคร) ย้อมด้วยวิธี Ziehl-Neelson

B. *E. coli* ใน macrophage ของปลานิล (ลูกคร) ย้อมด้วยวิธี Gram

(bar = 10 ไมโครเมตร)

2. การตรวจสอบการผลิตอนุมูลอิสระของ macrophage ภายหลังการกระตุ้นด้วย *M. lacticola* และ *E. coli* และหลังจากการสัมผัสกับแอนติเจนที่ได้จากผนังเซลล์ของแบคทีเรีย

เพาะเลี้ยง macrophage ปลายินิล จำนวน 2×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นาน 72 ชั่วโมง เพื่อใช้ทดสอบการตอบสนองต่อแบคทีเรีย 2 ชนิดคือ *M. lacticola* และ *E. coli* จำนวน 2×10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร รวมทั้งกรดไมโคลิค และ LPS ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนพบที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียที่มีความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจสอบอนุมูลอิสระชนิดต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

2.1 การตรวจสอบไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ด้วยวิธี phenol red

หลังจากกระตุ้น macrophage ด้วย *M. lacticola*, *E. coli*, LPS และกรดไมโคลิค นาน 60 นาที ไม่พบการผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์หลังจากการกระตุ้นด้วย *M. lacticola* แต่พบการตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย *E. coli*, LPS และกรดไมโคลิค เนื่องจากตรวจพบไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 10.87 ± 0.05 , 11.06 ± 0.16 และ 2.19 ± 0.2 นาโนโมลต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ หากค่าได้จากกราฟมาตรฐาน (ภาพผนวกที่ 1) ซึ่งความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่พบในกลุ่มที่กระตุ้นด้วยกรดไมโคลิคแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนกลุ่มที่กระตุ้นด้วย *E. coli* และ LPS นั้น ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทั้งสองกลุ่มนี้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่แตกต่างจากกลุ่มที่กระตุ้นด้วยกรดไมโคลิค และกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นของอนุมูลอิสระ (mean±SD) ที่ macrophage สร้างขึ้นเพื่อตอบสนองต่อตัวกระตุ้นที่แตกต่างกัน

Activators	Free radical concentration (nmol / ml)		
	H ₂ O ₂ [*]	O ₂ ^{-*}	NO [*]
Control	0 ^a	0 ^a	0 ^a
<i>M. lacticola</i>	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Mycolic acid	2.19±0.2 ^b	2.09±0.15 ^b	4.44±1.4 ^b
<i>E. coli</i>	10.87±0.05 ^c	29.63±0.71 ^c	16.52±0.28 ^c
LPS	11.06±0.16 ^c	29.54±1.56 ^c	17.09±0.69 ^c

หมายเหตุ *H₂O₂ (ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์), O₂⁻ (ซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน) และ NO (ไนตริกออกไซด์)

a, b, c ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95 % โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($P = 0.05$)

2.2 การตรวจสอบซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน ด้วยวิธี superoxide anion assay

กระตุ้น macrophage ด้วย *M. lacticola*, *E. coli*, LPS และกรดไมโคลิค นาน 60 นาที ไม่พบการผลิตซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน หลังจากการกระตุ้นด้วย *M. lacticola* แต่พบการตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย *E. coli*, LPS และกรดไมโคลิค เนื่องจากตรวจพบซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน ความเข้มข้น 29.63±0.71, 29.54±1.56 และ 2.09±0.15 นาโนโมลต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ หาค่าได้จากกราฟมาตรฐาน (ภาพผนวกที่ 2) ซึ่งความเข้มข้นของซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน ที่พบในกลุ่มที่กระตุ้นด้วยกรดไมโคลิคแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนกลุ่มที่กระตุ้นด้วย *E. coli* และ LPS นั้นความเข้มข้นของซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออนทั้งสองกลุ่มนี้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่แตกต่างจากกลุ่มที่กระตุ้นด้วยกรดไมโคลิค และกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังตารางที่ 1

2.3 การตรวจสอบไนตริกออกไซด์ ด้วยวิธี Griess reagent

เมื่อกระตุ้น macrophage ด้วย *M. lacticola*, *E. coli*, LPS และกรดไมโคลิค นาน 60 นาที ไม่พบการผลิตไนตริกออกไซด์ หลังจากการกระตุ้นด้วย *M. lacticola* แต่พบการตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย *E. coli*, LPS และกรดไมโคลิค เนื่องจากตรวจพบไนตริกออกไซด์ ความเข้มข้น 16.52 ± 0.28 , 17.09 ± 0.69 และ 4.44 ± 1.4 นาโนโมลต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ หากได้จากกราฟมาตรฐาน (ภาพผนวกที่ 3) ซึ่งความเข้มข้นของไนตริกออกไซด์ที่พบในกลุ่มที่กระตุ้นด้วยกรดไมโคลิคแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนกลุ่มที่กระตุ้นด้วย *E. coli* และ LPS นั้น ความเข้มข้นของไนตริกออกไซด์ทั้งสองกลุ่มนี้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่แตกต่างจากกลุ่มที่กระตุ้นด้วยกรดไมโคลิค และกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังตารางที่ 1

3. การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระภายใน macrophage ภายหลังกระตุ้นด้วย *M. lacticola* และ *E. coli* และหลังจากการสัมผัสกับแอนติเจนที่ได้จากผนังเซลล์ของแบคทีเรีย

3.1 กิจกรรมของเอนไซม์ GSH-Px

ผลการตอบสนองของ macrophage ต่อ *M. lacticola*, *E. coli*, LPS และ กรดไมโคลิค ภายหลังกระตุ้นนาน 60 นาที พบกิจกรรมของเอนไซม์ GSH-Px ที่ความเข้มข้น 98.32 ± 2.67 , 280.48 ± 3.91 , 275.67 ± 13.07 และ 124.54 ± 11.67 มิลลิยูนิต ตามลำดับ ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์ GSH-Px ในกลุ่มที่กระตุ้นด้วยกรดไมโคลิคต่ำกว่ากลุ่มควบคุม แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่กลุ่มที่กระตุ้นด้วย *E. coli* และ LPS พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ GSH-Px ในทั้งสองกลุ่มไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่แตกต่างจากกลุ่มที่กระตุ้นด้วยกรดไมโคลิค และกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ตารางที่ 2

ตารางที่ 2 กิจกรรมของเอนไซม์ glutathione peroxidase (GSH-Px) ที่ macrophage ของปลานิล
ตอบสนองต่อตัวกระตุ้นที่แตกต่างกัน (mean±SD)

Activators	GSH-Px activity (mU)
Control	101.53±1.96 ^a
<i>M. lacticola</i>	98.32±2.67 ^a
Mycolic acid	124.54±11.67 ^b
<i>E. coli</i>	280.48±3.91 ^c
LPS	275.67±13.07 ^c

หมายเหตุ a, b, c ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95 % โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($P = 0.05$)

3.2 กิจกรรมของเอนไซม์ CAT

การตอบสนองของ macrophage ต่อ *M. lacticola*, *E. coli*, LPS และ กรดไมโคลิค หลังกระตุ้นนาน 60 นาที พบกิจกรรมของเอนไซม์ CAT ที่ความเข้มข้น 97.97±0.67, 258.48±0.99, 255.26±3.16 และ 115.60±1.67 มิลลิยูนิต ตามลำดับ หาค่าได้จากกราฟมาตรฐาน (ภาพผนวกที่ 4) ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์ CAT ในกลุ่มที่กระตุ้นด้วยกรดไมโคลิคต่ำกว่ากลุ่มควบคุม แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนกลุ่มที่กระตุ้นด้วย *E. coli* และ LPS พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ CAT ของทั้งสองกลุ่มไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่แตกต่างจากกลุ่มที่กระตุ้นด้วยกรดไมโคลิค และควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ตารางที่ 3

ตารางที่ 3 กิจกรรมของเอนไซม์ catalase (CAT) ที่ macrophage ของปลานิล ตอบสนองต่อตัวกระตุ้นที่แตกต่างกัน (mean±SD)

Activators	Catalase activity (mU)
Control	101.08±0.38 ^a
<i>M. lacticola</i>	97.97±0.67 ^a
Mycolic acid	115.60±1.67 ^b
<i>E. coli</i>	258.48±0.99 ^c
LPS	255.26±3.16 ^c

หมายเหตุ a, b, c ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95 % โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($P = 0.05$)

3.3 กิจกรรมของเอนไซม์ SOD

หลังกระตุ้น macrophage ด้วย *M. lacticola*, *E. coli*, LPS และ กรดไมโคลิค นาน 60 นาที พบกิจกรรมของเอนไซม์ SOD ที่ความเข้มข้น 110.53±2.42, 256.99±5.07, 250.48±4.20 และ 124.67±3.65 มิลลิยูนิต ตามลำดับ หาค่าได้จากกราฟมาตรฐาน (ภาพผนวกที่ 5) กิจกรรมของเอนไซม์ SOD ในกลุ่มที่กระตุ้นด้วยกรดไมโคลิคต่ำกว่ากลุ่มควบคุม แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนกลุ่มที่กระตุ้นด้วย *E. coli* และ LPS พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ SOD ของทั้งสองกลุ่มไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่แตกต่างจากกลุ่มที่กระตุ้นด้วยกรดไมโคลิค และควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ตารางที่ 4

ตารางที่ 4 กิจกรรมของของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ที่ macrophage ของปลานิล
ตอบสนองต่อตัวกระตุ้นที่แตกต่างกัน (mean±SD)

Activators	SOD activity (mU)
Control	114.86±0.94 ^a
<i>M. lacticola</i>	110.53±2.42 ^a
Mycolic acid	124.67±3.65 ^b
<i>E. coli</i>	256.99±5.07 ^c
LPS	250.48±4.20 ^c

หมายเหตุ a, b, c ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95 % โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %
($P = 0.05$)

วิจารณ์

1. การผลิตอนุมูลอิสระของ macrophage ภายหลังการกระตุ้นด้วย *M. lacticola* และ *E. coli* และหลังจากการสัมผัสกับแอนติเจนที่ได้จากผนังเซลล์ของแบคทีเรีย

อนุมูลอิสระเป็นผลที่เกิดขึ้นตลอดเวลาจากกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ (Valko *et al.*, 2006) ซึ่งจากผลการทดลองที่ไม่พบอนุมูลอิสระในกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 1) อาจเป็นไปได้ว่าอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นนั้นมีความเข้มข้นต่ำมากจนไม่สามารถตรวจวัดได้ หรืออาจจะเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจนไม่พบอนุมูลอิสระปริมาณมากพอที่จะตรวจวัดได้

การตรวจวัดความเข้มข้นของอนุมูลอิสระได้แก่ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน และไนตริกออกไซด์ ภายหลังการกระตุ้น macrophage ด้วย *M. lacticola*, *E. coli*, LPS และกรดไขมันโคลิคินั้น เป็นการวัดความเข้มข้นที่ macrophage ปลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์แบบไม่ต้องเกิดกระบวนการ phagocytosis โดยการกระตุ้นผ่านทางเยื่อหุ้มเซลล์ของ macrophage และแบบที่เกิดกระบวนการ phagocytosis โดยทั้ง *M. lacticola*, *E. coli* และ LPS เข้าไปอยู่ phagosome ผ่านการกระตุ้น phagocytosis receptor ได้แก่ scavenger receptor, mannose receptor, complement receptor (Aderem and David, 1999; Larry *et al.*, 2008) ส่วนกรดไขมันโคลิคกระตุ้นผ่านทางกระบวนการ endocytosis (receptor mediated endocytosis), C-type lectin (Mincle) receptor และ C-terminal carbohydrate – recognition-domain (CRD) (Erminia *et al.*, 2005; Larry *et al.*, 2008; Matsunga and Moody, 2009) เมื่อเกิดกระบวนการ respiratory burst ปลั่งอนุมูลอิสระทำลายสิ่งแปลกปลอมภายใน phagosome ซึ่งอนุมูลอิสระต่าง ๆ จะออกสู่ภายนอกด้วยวิธีการ exocytosis รวมทั้งไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ยังสามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ออกมาได้โดยอาศัยความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่แตกต่างกันระหว่างภายในและภายนอกเซลล์ หรือผ่านทางช่องไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide channel) (Gerd *et al.*, 2007) ไนตริกออกไซด์ก็สามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของ macrophage ออกมาได้เช่นกัน (Mathiesen *et al.*, 2008)

1.1 การผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของ macrophage

1.1.1 การผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของ macrophage หลังการกระตุ้นด้วย

M. lacticola และกรดไมโคลิก

จากผลการทดลอง macrophage ไม่ผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์หลังการกระตุ้นด้วย *M. lacticola* เนื่องจาก *Mycobacterium* สามารถยับยั้งการทำงานของ NADPH oxidase บนเยื่อหุ้มเซลล์ของ macrophage ไม่ให้เกิดกลไกการสร้าง ROS ออกมาได้ หรือถ้าสร้างออกมาได้ก็มีระดับต่ำมาก และไม่สามารถทำลาย *Mycobacterium* ได้ เนื่องจากมีผนังเซลล์ทนต่อการย่อยสลาย และทนต่อ ROS และ RNI ที่ macrophage สร้างขึ้นได้ (สิทธิศักดิ์, 2549; Debasish *et al.*, 2001, Marcia and Lee, 2002; David, 2005; Philip and Pieters, 2006; Subbian *et al.*, 2007) นอกจากนี้ LAM ที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของ *Mycobacterium* ยังสามารถยับยั้งการชักนำและการแสดงออกของยีน IFN- γ ของ macrophage ทำให้ระดับ IFN- γ คงที่ และยับยั้งกระบวนการ respiratory burst ผ่านการทำงานของ protein kinase C จึงทำให้ไม่มีการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ออกมากำจัดแบคทีเรีย เชื้อจึงสามารถมีชีวิตอยู่ได้ใน macrophage (Adams *et al.*, 1991; Brozna *et al.*, 1991; Bannantine and Stable, 1999; Shabbir *et al.*, 1999; Debasish *et al.*, 2001; Dirk *et al.*, 2002) จากการตรวจสอบการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จากม้ามของหนูสายพันธุ์ทนโรคหลังการติดเชื้อ *M. leoraemurium* หรือ *M. bovis* พบการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์แต่ในม้ามหนูสายพันธุ์ที่ไม่ทนโรคไม่พบการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Stach, 2007) เช่นเดียวกับ macrophage จากปอดหนูที่ได้รับวัคซีนต้านทานโรค *Mycobacterium* แล้วสามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ออกมากำจัด *M. bovis* ได้ แต่ macrophage จากปอดหนูปกติไม่สามารถกำจัดแบคทีเรียได้ เนื่องจากไม่มีการสร้างหรือสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ออกได้ในปริมาณน้อย (Seamus and Andrew, 2004)

ส่วนการตอบสนองของ macrophage ต่อกรดไมโคลิกโดยผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์นั้นเกิดจากกรดไมโคลิกซึ่งเป็นส่วนเชื่อมกับชั้น peptidoglycan และมีปริมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ของผนังเซลล์ทั้งหมดสามารถกระตุ้นเอนไซม์ NADPH oxidase บนเยื่อหุ้มเซลล์ของ macrophage ให้สร้างอนุมูลอิสระได้ (Gao *et al.*, 2003; David *et al.*, 2005) ถึงแม้ว่า macrophage จะสามารถสร้างอนุมูลอิสระได้แก่ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ แต่มีความเข้มข้นน้อยเมื่อเทียบกับกลุ่มที่กระตุ้นด้วย *E. coli* และ LPS (ตารางที่ 1)

เมื่อกระตุ้น macrophage ด้วย *M. lacticola* และกรดไมโคลิค มีเพียงกรดไมโคลิคเท่านั้นที่สามารถกระตุ้นให้ macrophage สร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ออกมาได้ (ตารางที่ 1) แม้ว่ากรดไมโคลิคซึ่งเป็นแอนติเจนบนผิวเซลล์ของ *M. lacticola* จะกระตุ้น macrophage ให้สร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ออกมา แต่การกระตุ้นด้วย *M. lacticola* ทั้งเซลล์กลับไม่พบการตอบสนอง ทั้งนี้เนื่องจาก LAM ที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ด้านนอกสุดของ *Mycobacterium* สามารถยับยั้งกลไกไม่ให้สร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ (Debasish *et al.*, 2001; Dirk *et al.*, 2002) ซึ่ง *M. lacticola* ก็เป็น *Mycobacterium* ชนิดหนึ่งจึงสามารถยับยั้งกลไกไม่ให้สร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้เช่นเดียวกัน แต่กรดไมโคลิคนั้นเป็นชั้นที่อยู่ถัดเข้ามาจึงไม่ได้สัมผัสกับ macrophage แต่เมื่ออยู่ในรูปอิสระจึงสามารถสัมผัสกับ macrophage และกระตุ้นเอนไซม์ NADPH oxidase บนเยื่อหุ้มเซลล์ของ macrophage ได้ทำให้เกิดกลไกการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ขึ้น (Gao *et al.*, 2003)

1.1.2 การผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของ macrophage หลังการกระตุ้นด้วย *E. coli* และ LPS

จากผลการทดลอง macrophage ตอบสนองต่อทั้ง *E. coli* และ LPS โดยการปล่อยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ออกมานั้น เนื่องจากผนังเซลล์ของ *E. coli* ประกอบด้วยชั้น murein, lipoprotein, phospholipid และ LPS ซึ่งสามารถกระตุ้นเอนไซม์ NADPH oxidase บนเยื่อหุ้มเซลล์ของ macrophage ได้จึงเกิดการสร้างและปล่อย ROS ได้แก่ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ออกมาได้ (Norman and Belosevic, 1996; Christian *et al.*, 2000; Sarmiento *et al.*, 2004) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม หลังจากการกระตุ้นด้วย *E. coli* มีการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ออกมาทำลาย *E. coli* ภายในเซลล์ (Tatsuo *et al.*, 1993) เช่นเดียวกับ macrophage cell line ที่มีการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ออกมา หลังจากการกระตุ้นด้วย *E. coli* (Eliaana *et al.*, 2000)

ส่วนการตอบสนองต่อ LPS นั้น เกิดจาก LPS ซึ่งเป็นโมเลกุลสำคัญของ *E. coli* ที่ใช้ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน มีสมบัติเป็นแอนติเจนอยู่ที่ผิวนอกสุดของแบคทีเรียสามารถกระตุ้นเอนไซม์ NADPH oxidase ให้สร้าง ROS ได้ (Samantha and Amanda, 2009; Zhao *et al.*, 2010) โดยพบว่าเมื่อกระตุ้นทั้ง macrophage และ Kupffer cell ซึ่งเป็น macrophage ชนิดหนึ่งอยู่ในเนื้อเยื่อตับของหนู ด้วย LPS เซลล์ทั้งสองชนิดนี้สามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ออกมาได้ (Solem *et al.*, 1995; Zoltan and Jun-xi, 1997) ส่วน macrophage ของปลาทอง (*Carassius auratus*) ที่กระตุ้น

ด้วย LPS มีการตอบสนองโดยการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แต่จะสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพิ่มขึ้นได้เมื่อกระตุ้นด้วย macrophage activating factor (MAF) ร่วมด้วย (Norman and Miodrag, 1996) นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกของโปรตีนต้านทานการติดเชื้อ (natural resistance-associated macrophage protein family, *MsNramp*) และการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของปลา Striped bass (*Morone saxatilis*) เมื่อกระตุ้นด้วย LPS ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการแสดงออกของยีน *MsNramp* และการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ มีความสัมพันธ์กัน ซึ่งการตอบสนองดังกล่าวที่พบในปลากระดุกแข็งแรงเหมือนกันกับที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม (Erin *et al.*, 2004)

จากการกระตุ้น macrophage ด้วย *E. coli* และ LPS พบว่า macrophage สร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีความเข้มข้นไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 1) เนื่องจากผนังเซลล์ด้านนอกสุดของ *E. coli* ประกอบด้วย LPS ซึ่งทำหน้าที่เป็นแอนติเจนสำคัญในการกระตุ้นการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ดังนั้นความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จึงไม่แตกต่างจากที่กระตุ้นด้วย LPS อีสระ

1.1.3 การผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของ macrophage หลังการกระตุ้นด้วย

M. lacticola และ *E. coli*

การที่ macrophage ไม่ผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ตอบสนองต่อ *M. lacticola* แต่ตอบสนองต่อ *E. coli* นั้นเนื่องจาก LAM, glycolipid และหมู่ sulfatide บนผิวเซลล์ของ *Mycobacterium* ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ protein kinase C ทำให้ NADPH oxidase บนเยื่อหุ้มเซลล์ของ macrophage ไม่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตจึงทำงานไม่ได้ และยับยั้งการแสดงออกของยีน IFN- γ ไม่ให้เกิดกลไกการสร้าง ROS หรือสร้างได้น้อยลง (Cabec *et al.*, 2000; Debasish *et al.*, 2001; Dirk *et al.*, 2002; David, 2005; Philip and Pieters, 2006) นอกจากนี้ที่ผิวของ *Mycobacterium* ยังมีเอนไซม์ Type-II NADH-menaquinone oxidoreductase (NDH-2) ซึ่งมีบทบาทเหมือนเอนไซม์ NADPH oxidase บนเยื่อหุ้มเซลล์ของ macrophage ทำหน้าที่แย่งการออกซิเดชันของ NADPH จากเอนไซม์ NADPH oxidase โดยเปลี่ยน NADPH เป็น NAD^+ ดังนั้นจึงไม่มี NADPH เป็นซับสเตรตเพื่อเข้าทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ NADPH oxidase หรือมี NADPH เข้าทำปฏิกิริยาลดลงจึงไม่เพียงพอที่จะสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Yano *et al.*, 2006) ส่วนการตอบสนองต่อ *E. coli* นั้น เกิดจาก LPS กระตุ้นเอนไซม์ NADPH oxidase ให้สร้างซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน (Samantha and Amanda, 2009; Zhao *et al.*, 2010) โดย LPS เหนี่ยวนำเอนไซม์ src kinase และ PI3 kinase (PI3K)

ให้ทำงานโดยเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ $p47^{\text{phox}}$ ซึ่งเป็น regulatory subunit ของเอนไซม์ NADPH oxidase ทำให้เอนไซม์ NADPH oxidase สร้าง ROS ออกมาได้ (Cao *et al.*, 2005; Jennifer *et al.*, 2009)

1.2 การผลิตซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออนของ macrophage

1.2.1 การผลิตซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออนของ macrophage หลังการกระตุ้นด้วย *M. lacticola* และกรดไมโคลิก

จากผลการทดลองหลังจากกระตุ้น macrophage ด้วย *M. lacticola* ไม่พบการผลิตซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน เพื่อตอบสนอง เนื่องจากผนังเซลล์ของ *Mycobacterium* สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ NADPH oxidase บนเยื่อหุ้มเซลล์ของ macrophage ได้ เช่นเดียวกับการผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (สิทธิศักดิ์, 2549; Cabec *et al.*, 2000 ; Debasish *et al.*, 2001; Kelly *et al.*, 2003; David, 2005; Philip and Pieters, 2006; Subbian *et al.*, 2007) จากการตรวจสอบ การสร้างซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน จาก macrophage ของสัตว์น้ำหลังจากติดเชื้อ *M. leprae* และ *M. avium* พบว่า ไม่มีการผลิตซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออนออกมา (Gomes and Rui, 2002) เช่นเดียวกับ macrophage ของหนูหลังจากติดเชื้อ *M. avium* และก่อนได้รับ α -2-Adrenergic จะไม่มีการผลิตซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน (Kelly *et al.*, 2003) หรืออาจเป็นไปได้ว่าการที่ไม่พบซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออนเนื่องมาจาก *Mycobacterium* มีเอนไซม์ SOD ในรูป Cu-Zn-SOD ที่ผนังเซลล์ด้านนอกแล้วเปลี่ยนซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน ที่ macrophage ผลิตออกมาให้เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แล้วเอนไซม์ CAT จะเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ให้เป็นน้ำ กับออกซิเจน (Bartor *et al.*, 2004; Rabab, 2006)

การตอบสนองของ macrophage ต่อกรดไมโคลิก โดยการผลิตซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออนได้ เนื่องจาก กรดไมโคลิกกระตุ้นเอนไซม์ NADPH oxidase บนเยื่อหุ้มเซลล์ของ macrophage ได้เหมือนกับการตอบสนองโดยการผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (อริยา, 2551; Gao *et al.*, 2003; David *et al.*, 2005) และกรดไมโคลิกยังสามารถกระตุ้นเอนไซม์ protein kinase C ได้ ส่งผลให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระออกมา (Sueoka *et al.*, 1995; Clifton *et al.*, 1998; David *et al.*, 2005) ถึงแม้ว่า macrophage จะสามารถสร้างซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออนได้แต่มีความเข้มข้นน้อยเมื่อเทียบกับกลุ่มที่กระตุ้นด้วย *E. coli* และ LPS (ตารางที่ 1)

เมื่อเปรียบเทียบการตอบสนองของ macrophage ต่อ *M. lacticola* และกรดไมโคลิค โดยการสร้างซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน มีเพียงกรดไมโคลิคเท่านั้นที่สามารถกระตุ้น macrophage ได้ (ตารางที่ 1) เหมือนกันกับการตอบสนองโดยสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ซึ่งการตอบสนองนี้เนื่องมาจาก LAM ที่ผนังเซลล์ *Mycobacterium* สามารถยับยั้งกลไกไม่ให้สร้างซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน (Debasish *et al.*, 2001; Dirk *et al.*, 2002) ดังนั้น *M. lacticola* ที่อยู่ในกลุ่มเดียวกับ *Mycobacterium* ผนังเซลล์จึงสามารถยับยั้งกลไกไม่ให้สร้างซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน แต่กรดไมโคลิคในรูปอิสระสามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ NADPH oxidase ของ macrophage ทำให้เกิดกลไกสร้างซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออนได้

1.2.2 การผลิตซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออนของ macrophage หลังการกระตุ้นด้วย *E. coli* และ LPS

จากผลการทดลอง macrophage ผลิตซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออนตอบสนองต่อ *E. coli* เนื่องจากผนังเซลล์ของ *E. coli* ประกอบด้วย เปปไทด์และ LPS ซึ่งเป็นแอนติเจนสามารถชักนำสัญญาณและกระตุ้นเอนไซม์ NADPH oxidase โดยการเติมหมู่ฟอสเฟต เพื่อให้สร้างซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน (สุวดี, 2543; นงลักษณ์, 2544; Anna *et al.*, 1995; Iles and Forman, 2002; Laroux *et al.*, 2010) นอกจากนี้แล้ว chemoattractant formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) บนผนังเซลล์ของ *E. coli* เมื่อจับกับ fMLP receptor บนเยื่อหุ้มเซลล์ของ phagocyte เช่น neutrophil และ macrophage เป็นต้น ทำให้ phagocyte เกิดกลไกสร้างและปล่อย ROS ออกมา (Anna *et al.*, 1995) เช่นเดียวกับ macrophage จากปอดสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่พบการสร้างซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน หลังจากติดเชื้อ *E. coli* (Michael *et al.*, 2005)

ส่วนการตอบสนองของ macrophage ต่อ LPS โดยการสร้างซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน เกิดจาก LPS กระตุ้น NADPH oxidase โดยการเติมหมู่ฟอสเฟตเพื่อให้เกิดกลไกการสร้างซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน (Samantha and Amanda, 2009) จากการตรวจสอบการสร้างซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน จาก neutrophil และ macrophage ของตับหนู หลังกระตุ้นด้วย LPS พบว่า macrophage ของตับหนู สร้างซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน ได้มากกว่าที่สร้างจาก neutrophil (Abraham *et al.*, 1990) เช่นเดียวกับ macrophage ของปอดหนู ปอดวัว และจากไตส่วนหน้าของปลา sea bass หลังการกระตุ้นด้วย LPS พบว่ามีการสร้างซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน ได้ (Jian *et al.*, 1998; Sarmiento, 2004)

macrophage หลังถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* และ LPS จะสร้างซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน ออกมาในปริมาณความเข้มข้นมากที่สุดเมื่อเทียบกับอนุมูลอิสระชนิดอื่น ๆ (ตารางที่ 1) ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออนเป็นอนุมูลหลักในการกำจัดแบคทีเรียชนิดนี้ ซึ่งสอดคล้องกับโอภา และคณะ (2549) รายงานว่า ซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออนเป็นอนุมูลเริ่มต้นของอนุมูลชนิดอื่น ๆ และเป็นสารที่มีความไวสูง สารที่เกิดจากซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนจะมีความเป็นพิษสูงกว่าอนุมูลเริ่มต้น รวมทั้งเอนไซม์หลายชนิดใน *E. coli* ถูกซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออนทำลายได้อีกด้วย

1.2.3 การผลิตซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออนของ macrophage หลังการกระตุ้นด้วย *M. lacticola* และ *E. coli*

การที่ macrophage สร้างซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน ตอบสนองต่อ *E. coli* แต่ไม่ตอบสนองต่อ *M. lacticola* นั้นเนื่องจากส่วนประกอบของผนังเซลล์ เช่น ไขมัน และ lipoglycan (ManLAM) เป็นต้น ของ *Mycobacterium* สามารถยับยั้งการทำงานของ macrophage และขัดขวางกระบวนการ respiratory burst ได้ (Gordon and Hart, 1994; Moura *et al.*, 1997) ส่วน lipoglycan นั้นยับยั้งการทำงานของ protein kinase C ที่เกาะอยู่กับเอนไซม์ NADPH oxidase ได้ ส่งผลให้เอนไซม์ NADPH oxidase ไม่สามารถสร้างซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน ออกมาได้ (Deepak, 2007) เช่นเดียวกับ macrophage จากไขสันหลังไม่พบกระบวนการ respiratory burst เมื่อกระตุ้นด้วย *M. leprae* (Moura *et al.*, 1997) ส่วนผนังเซลล์ของ *E. coli* ประกอบด้วย LPS สามารถกระตุ้นเอนไซม์ NADPH oxidase ทำให้เกิด respiratory burst ได้ (Karen and Forman, 2007) จากการตรวจสอบ ซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน ใน macrophage จากเต้านม และปอดหนู พบการสร้างซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน หลังจากกระตุ้นด้วย *E. coli* (Speer *et al.*, 2008) เช่นเดียวกับ macrophage หนู ที่พบการสร้างซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน หลังจากกระตุ้นด้วย LPS (Sarada *et al.*, 1993)

1.3 การผลิตไนตริกออกไซด์ของ macrophage

1.3.1 การผลิตไนตริกออกไซด์ของ macrophage หลังการกระตุ้นด้วย *M. lacticola* และกรดไมโคลิค

จากผลการทดลอง macrophage ไม่สร้างไนตริกออกไซด์ ตอบสนองต่อ *M. lacticola* เนื่องจากผนังเซลล์ชั้นนอกสุดของ *Mycobacterium* ซึ่งประกอบด้วย LAM, mannosylated phosphatidylinositol และ lipoprotein จะจับได้อย่างจำเพาะกับ TLR 2 บนเยื่อหุ้มเซลล์ของ macrophage โดยการจับกันดังกล่าว ไม่ทำให้เกิดการนำสัญญาณขึ้น จึงทำให้ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ และไม่เกิดการสร้าง iNOS ซึ่งเป็นเอนไซม์ในการสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์ (Marcia and Lee 2002; Bernhard *et al.*, 2005) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง LAM เมื่อจับกับ TLR 2 ส่งผลให้ TLR 2 เกิดการก่อกลาย ไม่นำสัญญาณ หรือลดการทำงานของ TLR 2 ส่งผลให้สร้างไนตริกออกไซด์ได้ปริมาณน้อยลง (Michael *et al.*, 2004; Gisa *et al.*, 2007) ซึ่งการสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์ จำเป็นต้องอาศัยเอนไซม์ nitric oxide synthase (iNOS) ซึ่งการขนส่งเอนไซม์นี้เข้าสู่ phagosome ต้องอาศัยการทำงานของ actin filament แต่พบว่า macrophage ที่มี *Mycobacterium* อยู่ ไม่ปรากฏ actin filament จึงทำให้ไม่มีการขนส่งและ ทำงานของ iNOS (Barbara *et al.*, 2004) อาจเป็นไปได้ว่า *Mycobacterium* ยับยั้งการจัดเรียงของ actin filament ส่งผลให้ไม่มีการลำเลียง iNOS เข้าสู่ phagosome เชื้อจึงดำรงชีวิตอยู่ได้ภายใน phagosome (Randal *et al.*, 2002; Barbara *et al.*, 2004) จากการตรวจสอบการสร้างไนตริกออกไซด์ใน macrophage ของหนู และสัตว์น้ำหลังจากติดเชื้อ *M. bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG) และ heat-killed BCG พบการสร้างไนตริกออกไซด์หลังจากกระตุ้นด้วย heat-killed BCG เท่านั้น แต่ BCG เชื้อเป็นไม่สามารถกระตุ้นการสร้างไนตริกออกไซด์ได้ ทั้งนี้จะพบการสร้างไนตริกออกไซด์ ก็ต่อเมื่อกระตุ้นร่วมกับ rIFN- γ , T cell และไซโตไคน์เท่านั้น (Hanano and Kaufmann, 1995; Saito and Nakano, 1996, Aldwell *et al.*, 2002) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Selvakumar *et al.* (2007) พบว่า monocyte ของสัตว์ทะเล ไม่สร้างไนตริกออกไซด์ ตอบสนองต่อ *M. marinum* แต่เมื่อกระตุ้นร่วมกับ IFN- γ สามารถชักนำให้สร้างไนตริกออกไซด์ได้แต่ก็ยังอยู่ในระดับต่ำ

ส่วนการผลิตไนตริกออกไซด์ของ macrophage ตอบสนองต่อกรดไมโคลิคนั้น เกิดจากกรดไมโคลิคที่ประกอบด้วย glycolipid เป็น ligand จับได้ทั้ง TLR 2 และ TLR 4 บนเยื่อหุ้ม

เซลล์ macrophage, neutrophil และ dendritic cell การจับกันนี้เป็นการนำสัญญาณภายในเซลล์ให้เกิดการสร้างไนตริกออกไซด์ขึ้น (Shoutaro *et al.*, 2000; Johanna *et al.*, 2005)

ไนตริกออกไซด์เป็นอนุมูลอิสระที่มีความเข้มข้นสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับอนุมูลอิสระชนิดอื่น ๆ ที่ macrophage สร้างขึ้นหลังจากกระตุ้นด้วยกรดไมโครลิก (ตารางที่ 1) ดังนั้นไนตริกออกไซด์ อาจจะเป็นอนุมูลอิสระหลักที่ใช้ในการต่อต้าน *Mycobacterium* ดังนั้นถ้าสามารถทำให้กรดไมโครลิกที่ผนังเซลล์จับกับ macrophage ได้ก็จะเป็นไปได้ที่ไนตริกออกไซด์จะสามารถทำลาย *Mycobacterium* ซึ่งโอภา และคณะ (2549) พบว่าไนตริกออกไซด์สามารถทำปฏิกิริยากับออกซิเจนได้เป็นไนโตรเจนออกไซด์ (NO_2) ซึ่งเป็นสารพิษทำงานได้โดยตรงที่ความเข้มข้นต่ำ และเป็นสารออกซิไดซ์ที่แรง

1.3.2 การผลิตไนตริกออกไซด์ของ macrophage หลังการกระตุ้นด้วย *E. coli* และ LPS

จากผลการทดลอง macrophage ผลิตไนตริกออกไซด์ตอบสนองต่อ *E. coli* นั้น เนื่องจากผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบ เช่น *E. coli* ประกอบด้วย LPS ซึ่งเป็น ligand จับกับ TLR 4 ของ macrophage อย่างจำเพาะ ซึ่งในการจับกันนี้ต้องอาศัยโปรตีน MD2 ร่วมด้วย (David and Barton, 2001; Katharina *et al.*, 2003; Takeda *et al.*, 2003; Maria *et al.*, 2009) หลังจากการจับกันส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ และเกิดการสร้าง iNOS ซึ่งเป็นเอนไซม์ในการสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์ (Bernhard *et al.*, 2005) จากการตรวจสอบไนตริกออกไซด์จาก macrophage ของสัตว์น้ำ หลังจากกระตุ้นด้วย *E. coli* พบการสร้างไนตริกออกไซด์ออกมาจำกัดเชื้อได้ (Tatsuo *et al.*, 1995) เช่นเดียวกับ macrophage cell line หลังจากกระตุ้นด้วย *E. coli* ที่พบไนเตรต (NO_3^-) และไนไตรท์ (NO_2^-) ซึ่งเป็นสาร intermediate ของไนตริกออกไซด์ (Radha *et al.*, 1997) รวมทั้งใน neutrophil จากปอดหนูที่มีการสร้างไนตริกออกไซด์ หลังจากติดเชื้อ *E. coli* (Randal *et al.*, 2002)

ส่วนการผลิตไนตริกออกไซด์ตอบสนองต่อ LPS นั้น เกิดขึ้นเช่นเดียวกับการตอบสนองต่อ *E. coli* นั่นคือ LPS จับกับ TLR 4 บนเยื่อหุ้มเซลล์ของ macrophage ได้อย่างจำเพาะ เกิดการนำสัญญาณภายในเซลล์ และสร้างไนตริกออกไซด์ (David and Barton, 2001; Katharina *et al.*, 2003; Maria *et al.*, 2009) โดยพบว่าเมื่อกระตุ้น macrophage จากปอดหนู และ macrophage

cell line จากหนู ด้วย LPS พบว่าเซลล์ทั้งสองสามารถสร้างไนตริกออกไซด์ ออกมาได้ (Chen *et al.*, 2006; Sonja *et al.*, 2008) เช่นเดียวกับ macrophage cell line จากสัตว์น้ำ และ macrophage จากไต ส่วนหน้าของปลา sea bass พบการสร้างไนตริกออกไซด์ หลังจากกระตุ้นด้วย LPS (Subbain *et al.*, 2007) และไนตริกออกไซด์จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นได้เมื่อกระตุ้นร่วมกับ macrophage activating factor (MAF) (Sarmiento *et al.*, 2004) ซึ่งกระบวนการทางชีวภาพ และกลไกการทำลาย ได้แก่ การสร้างไนตริกออกไซด์ การสร้าง ROS ของปลาล้วนคล้ายกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Norman *et al.*, 2001)

ไนตริกออกไซด์ที่ macrophage สร้างขึ้นหลังจากกระตุ้นด้วย *E. coli* และ LPS มีความเข้มข้นไม่ต่างกัน (ตารางที่ 1) เนื่องจาก *E. coli* และ LPS ต่างก็สามารถจับกับ TLR 4 ของ macrophage ได้อย่างจำเพาะ เกิดการนำสัญญาณในวิถีเดียวกัน

1.3.3 การผลิตไนตริกออกไซด์ของ macrophage หลังการกระตุ้นด้วย *M. lacticola* และ *E. coli*

จากผลการทดลองที่ macrophage สร้างไนตริกออกไซด์ตอบสนองต่อ *E. coli* แต่ไม่ตอบสนองต่อ *M. lacticola* นั้นเนื่องจากผนังเซลล์ชั้นนอกสุดของ *Mycobacterium* โดยเฉพาะอย่างยิ่ง LAM เมื่อจับกับ TLR 2 ส่งผลให้ TLR 2 เกิดการก่อกลาย ไม่นำสัญญาณจึงทำให้ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ และไม่เกิดการสร้าง iNOS ซึ่งเป็นเอนไซม์ในการสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์ (Marcia and Lee 2002; Michael *et al.*, 2004; Bernhard *et al.*, 2005) แต่ตอบสนองต่อ *E. coli* เนื่องจาก LPS ที่ผนังเซลล์เป็น ligand จับกับ TLR 4 ของ macrophage อย่างจำเพาะ หลังจากการจับกันส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ จนเกิดการสร้าง iNOS ขึ้นได้ (Bernhard *et al.*, 2005)

2. กิจกรรมของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระภายใน macrophage ภายหลังการกระตุ้นด้วย *M. lacticola* และ *E. coli* และหลังการสัมผัสกับแอนติเจนที่ได้จากผนังเซลล์ของแบคทีเรีย

จากผลการทดลองที่พบกิจกรรมของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระได้แก่ glutathione peroxidase (GSH-Px), Catalase (CAT) และ superoxide dismutase (SOD) ในกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 2, 3 และ 4) เป็นกิจกรรมของเอนไซม์ตามปกติภายในเซลล์เพื่อรักษาสสมดุลของอนุมูลอิสระซึ่ง

เป็นผลจากปฏิกิริยาเคมี และกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ (Okezie, 1998; Valko *et al.*, 2006)

2.1 กิจกรรมของเอนไซม์ GSH-Px

2.1.1 กิจกรรมของเอนไซม์ GSH-Px ภายใน macrophage หลังการกระตุ้นด้วย *M. lacticola* และกรดไมโคลิก

จากผลการทดลองกิจกรรมของเอนไซม์ GSH-Px ภายใน macrophage ไม่สูงขึ้นเมื่อกระตุ้น macrophage ด้วย *M. lacticola* นั้น เนื่องจากหน้าที่สำคัญของ GSH-Px คือกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพื่อป้องกันไม่ให้ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มากเกินไปจนทำอันตรายต่อเซลล์ โดยการเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไปเป็นน้ำกับแอลกอฮอล์ (Chen *et al.*, 2003; Brent *et al.*, 2004; Hasan *et al.*, 2006) ดังนั้นเมื่อ *M. lacticola* ไม่สามารถกระตุ้นให้ macrophage สร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ได้เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 1) จึงไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์นี้สูงขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาของ Jawed *et al.*, (2006) และ Prasad *et al.* (2008) ที่ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ GSH-Px จาก monocyte และเซลล์เม็ดเลือดแดง หลังจากติดเชื้อ *M. tuberculosis* และ *M. leprae* พบว่ากิจกรรมของ GSH-Px ลดลงแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ GSH-Px ใน macrophage สูงขึ้นหลังจากกระตุ้นด้วยกรดไมโคลิก เนื่องจากกรดไมโคลิกสามารถกระตุ้นให้ macrophage สร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ออกมาได้ (Adams *et al.*, 2000; Gao *et al.*, 2003; David *et al.*, 2005) แต่ในปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่น ๆ (ตารางที่ 1) ดังนั้น macrophage จึงมีกิจกรรมของ GSH-Px สูงขึ้นเล็กน้อยเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมแต่ก็อาจเพียงพอในการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ส่วนเกินเพื่อให้อยู่ในระดับที่ไม่เป็นอันตราย

ดังนั้นกิจกรรมของเอนไซม์ GSH-Px เพิ่มขึ้นเฉพาะเมื่อกระตุ้นด้วยกรดไมโคลิกเท่านั้นก็เนื่องจากกรดไมโคลิกสามารถกระตุ้นให้ macrophage ผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ออกมาได้เพิ่มมากขึ้นจากเมแทบอลิซึมปกติของเซลล์

2.1.2 กิจกรรมของเอนไซม์ GSH-Px ภายใน macrophage หลังการกระตุ้นด้วย *E. coli* และ LPS

กิจกรรมของเอนไซม์ GSH-Px สูงขึ้นมากในกลุ่มที่กระตุ้นด้วย *E. coli* และ LPS นั้น เนื่องจากผนังเซลล์ของ *E. coli* สามารถกระตุ้นเอนไซม์ NADPH oxidase บนเยื่อหุ้มเซลล์ของ macrophage ให้สร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นสูงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่กระตุ้นด้วยกรดไมโคลิก (ตารางที่ 1) ดังนั้น GSH-Px จึงกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้อยู่ในระดับที่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ (Christian *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2003; Sarmiento *et al.*, 2004; Hasana *et al.*, 2006) จากการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ GSH-Px ใน macrophage ของสัตว์น้ำ หลังจากติดเชื้อ *E. coli* พบการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และกิจกรรมของเอนไซม์ GSH-Px สูงขึ้น (Roberto *et al.*, 1995) เช่นเดียวกับไตของหนูมีกิจกรรมของเอนไซม์ GSH-Px สูงขึ้น หลังจากติดเชื้อ *E. coli* (Celik *et al.*, 2007)

ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ GSH-Px ที่สูงขึ้นใน macrophage หลังจากกระตุ้นด้วย LPS นั้น เนื่องจาก LPS สามารถกระตุ้นให้ macrophage สร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ผ่านทางการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับเอนไซม์ NADPH oxidase เป็นเช่นเดียวกับกระตุ้นด้วย *E. coli* (Samantha *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2010) จากการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ GSH-Px ของ macrophage จากปอดเปรียบเทียบกับ monocyte ในกระแสเลือด หลังจากกระตุ้นด้วย LPS พบว่า macrophage จากปอดมีการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และมีกิจกรรมของเอนไซม์ GSH-Px สูงกว่าที่พบใน monocyte (Brent *et al.*, 2004) เช่นเดียวกับ phagocyte จากตับหลังจากกระตุ้นด้วย LPS มีกิจกรรมของเอนไซม์ GSH-Px สูงกว่าที่พบใน endothelial cell (Spolarics, 1996) รวมทั้ง Kuffer cell หลังจากกระตุ้นด้วย LPS มีการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพิ่มขึ้น และพบปริมาณ glutathione ซึ่งเป็นสารตัวกลางที่เข้าร่วมปฏิกิริยาของ GSH-Px เพิ่มมากขึ้น (Spolarics and Jun, 1997)

กิจกรรมของเอนไซม์ GSH-Px ที่สูงขึ้นมากในกลุ่มที่กระตุ้นด้วย *E. coli* และ LPS เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม กลุ่มที่กระตุ้นด้วย *M. lacticola* และกลุ่มที่กระตุ้นด้วยกรดไมโคลิก (ตารางที่ 2) เนื่องจาก LPS ทั้งที่อยู่ในรูปของสารละลาย และอยู่บนผนังเซลล์นอกสุดของ *E. coli* สามารถกระตุ้นให้ macrophage สร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นสูงออกมา ดังนั้น macrophage จึงต้องเพิ่มกิจกรรมของ GSH-Px ให้สูงขึ้นตาม เพื่อป้องกันตนเองจากไฮโดรเจนเปอร์

ออกไซด์ไม่ให้สูงเกินสมดุล และทำอันตรายต่อเซลล์ ดังนั้นเซลล์จึงมีกลไกเพื่อควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระไม่ให้สูงจนเกิดอันตราย (โอภา และคณะ, 2549)

2.1.3 กิจกรรมของเอนไซม์ GSH-Px ภายใน macrophage หลังการกระตุ้นด้วย *M. lacticola* และ *E. coli*

กิจกรรมของเอนไซม์ GSH-Px ที่ไม่สูงขึ้นหลังจากกระตุ้นด้วย *M. lacticola* แต่สูงขึ้นอย่างมากเมื่อกระตุ้นด้วย *E. coli* เนื่องจาก *M. lacticola* ไม่สามารถกระตุ้นให้ macrophage สร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพิ่มมากขึ้นได้ ดังนั้นจึงไม่มีกิจกรรมของ GSH-Px เพิ่มขึ้นจากเดิมในการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์แต่ *E. coli* นั้นสามารถกระตุ้น macrophage ให้สร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ออกมาได้ ในความเข้มข้นสูงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่กระตุ้นด้วยกรดโมลิก (ตารางที่ 1) ดังนั้นเอนไซม์ GSH-Px จึงต้องกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่สูงเกินปกติ เพื่อไม่ให้เกิดอันตรายต่อเซลล์สอดคล้องกับการศึกษาของ Celik *et al.* (2007) พบว่าหนูหลังติดเชื้อ *E. coli* มีการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และมีกิจกรรมของเอนไซม์ GSH-Px สูงขึ้นตามมาภายหลัง

การที่พบกิจกรรมของเอนไซม์ GSH-Px สูงขึ้นในทุกกลุ่มยกเว้นกลุ่มที่กระตุ้นด้วย *M. lacticola* เนื่องจากทุกกลุ่มนั้นสามารถกระตุ้นให้ macrophage สร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ออกมาได้ในปริมาณสูงกว่าระดับปกติของเซลล์ ถ้าสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ออกมาในปริมาณน้อยกิจกรรมของเอนไซม์ GSH-Px สูงขึ้นจากระดับปกติไม่มาก อาจเนื่องจาก GSH-Px เพียงเล็กน้อยก็สามารถกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ส่วนเกินได้ เช่นเดียวกับกลุ่มที่สามารถกระตุ้นให้ macrophage สร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ออกมาได้มากกว่าระดับปกติมากกิจกรรมของเอนไซม์ GSH-Px สูงขึ้นมากตามไปด้วย ทั้งนี้เพื่อกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้อย่างรวดเร็ว เพื่อไม่ให้เกิดอันตรายต่อเซลล์

2.2 กิจกรรมของเอนไซม์ CAT

2.2.1 กิจกรรมของเอนไซม์ CAT ภายใน macrophage หลังการกระตุ้นด้วย

M. lacticola และกรดไมโคลิก

จากการที่กิจกรรมของเอนไซม์ CAT ภายใน macrophage ไม่สูงขึ้นหลังจากกระตุ้น macrophage ด้วย *M. lacticola* นั้น เนื่องจาก CAT มีหน้าที่สำคัญในการกำจัด ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เพื่อไม่ให้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพิ่มสูงขึ้นจนทำอันตรายต่อเซลล์ โดยเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไปเป็นน้ำกับออกซิเจน (Rukmini *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2006) ดังนั้นเมื่อ *M. lacticola* ไม่สามารถกระตุ้น macrophage ให้สร้าง ROS เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพิ่มมากขึ้นจากเดิมได้ ดังนั้นกิจกรรมของเอนไซม์ที่พบนี้จึงเป็นกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกิดขึ้นตามปกติของเซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Wang *et al.* (1998) ที่กระตุ้น macrophage ของสัตว์น้ำด้วย *M. smegmatis* พบว่าไม่มีการแสดงออกของยีน catalase-peroxidase (*KatG*) ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ CAT

ส่วนกรดไมโคลิกนั้นสามารถกระตุ้น macrophage ให้สร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ออกมาได้ แม้ในปริมาณน้อย เมื่อเทียบกับกลุ่มที่กระตุ้นด้วย *E. coli* และ LPS (ตารางที่ 1) เอนไซม์ CAT จึงมีกิจกรรมสูงขึ้นเล็กน้อยเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ก็อาจจะเพียงพอที่จะกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้อยู่ในระดับสมดุลได้

2.2.2 กิจกรรมของเอนไซม์ CAT ภายใน macrophage หลังการกระตุ้นด้วย *E. coli* และ LPS

จากผลการทดลองกิจกรรมของเอนไซม์ CAT ภายใน macrophage สูงขึ้น เมื่อกระตุ้นด้วย *E. coli* และ LPS เนื่องจาก ผนังเซลล์ของ *E. coli* สามารถกระตุ้นเอนไซม์ NADPH oxidase บนเยื่อหุ้มเซลล์ของ macrophage ให้เกิดการสร้างและปล่อยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Sarmiento *et al.*, 2004; Christian *et al.*, 2000) ซึ่งถ้าระดับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สูงมากเกินไปจะทำอันตรายต่อเซลล์ได้ ดังนั้นเอนไซม์ CAT จึงทำหน้าที่กำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไม่ให้สูงเกินไป โดยการเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไปเป็นน้ำ กับออกซิเจน (Kang *et al.*, 2006) ดังนั้นเมื่อทั้ง *E. coli* และ LPS กระตุ้น macrophage สร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ออกมาได้ในปริมาณมากกว่า

กลุ่มควบคุม (ตารางที่ 1) กิจกรรมของเอนไซม์ CAT จึงต้องสูงขึ้นมากกว่าปกติ ซึ่งสอดคล้องกับการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ CAT จากเนื้อเยื่อของหนูและ cell lysated หลังจากติดเชื้อ *E. coli* พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ CAT ในเซลล์ทั้งสองเพิ่มสูงขึ้น (Yao *et al.*, 2006; Celik *et al.*, 2007)

ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ CAT ภายใน macrophage ที่สูงขึ้นเมื่อกระตุ้นด้วย LPS เนื่องจาก LPS สามารถกระตุ้นให้ macrophage ผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ออกมาได้มากขึ้นเช่นเดียวกับหลังติดเชื้อ *E. coli* ดังนั้นเอนไซม์ CAT จึงต้องกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้อยู่ในระดับสมดุล ซึ่งสอดคล้องกับ Samantha and Amanda, (2009) และ Zhao *et al.* (2010) ที่ใช้ LPS กระตุ้น macrophage พบการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ออกมาได้ในความเข้มข้นสูง และกิจกรรมของ CAT ก็สูงขึ้นตามไปด้วย และจากตรวจวัดปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และกิจกรรมของเอนไซม์ CAT ของ monocyte ในกระแสเลือด รวมทั้ง Kupffer cell, phagocyte และ macrophage จากปอดคนพิการบ หลังจากรกระตุ้นด้วย LPS พบว่าเซลล์ทั้งสามสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ออกมาได้ในปริมาณสูง จึงทำให้มีกิจกรรมของเอนไซม์ CAT เพิ่มขึ้นด้วย เพื่อกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้อยู่ในระดับที่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ (Zoltan และ Jun, 1997; Spolarics, 1996) นอกจากนี้ Brent *et al.* (2004) วัดกิจกรรมของเอนไซม์ CAT ใน macrophage จากปอด และ monocyte ในกระแสเลือด หลังจากรกระตุ้นด้วย LPS พบว่า macrophage จากปอดมีปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และกิจกรรมของเอนไซม์ CAT สูงกว่า monocyte ในกระแสเลือด เนื่องจาก macrophage ขนาดใหญ่ และมีประสิทธิภาพการทำลายสูงกว่า monocyte

CAT เป็นเอนไซม์อีกชนิดหนึ่งที่ควบคุมระดับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไม่ให้สูงจนเป็นอันตรายต่อเซลล์ และร่างกาย (โอภา และคณะ, 2549) เมื่อ macrophage สร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่มีความเข้มข้นสูงออกมา หลังจากที่ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* และ LPS (ตารางที่ 1) ซึ่งปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่สูงดังกล่าว ทำให้เซลล์ต้องมีกิจกรรมของ CAT สูงขึ้นตามไปด้วย เพื่อใช้ในการเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้อย่างรวดเร็ว

2.2.3 กิจกรรมของเอนไซม์ CAT ภายใน macrophage หลังการกระตุ้นด้วย

M. lacticola และ *E. coli*

จากผลการทดลองกิจกรรมของเอนไซม์ CAT ที่ไม่เพิ่มขึ้นเมื่อกระตุ้นด้วย *M. lacticola* แต่สูงขึ้นมากเมื่อกระตุ้นด้วย *E. coli* เนื่องจาก *M. lacticola* ไม่สามารถกระตุ้นให้

macrophage สร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ (ตารางที่1) ดังนั้นจึงไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ CAT สูงขึ้นจากระดับปกติเพื่อกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แต่ *E. coli* กระตุ้นให้ macrophage สร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ออกมาได้เอนไซม์ CAT จึงต้องมีกิจกรรมที่สูงขึ้นกว่าปกติมากเพื่อกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไม่ให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ เช่นเดียวกับหนูที่ติดเชื้อ *E. coli* พบกิจกรรมของเอนไซม์ CAT สูงมากขึ้น (Celik *et al.*, 2007)

2.3 กิจกรรมของเอนไซม์ SOD

2.3.1 กิจกรรมของเอนไซม์ SOD ภายใน macrophage หลังการกระตุ้นด้วย

M. lacticola และกรดไมโคลิก

จากผลการทดลอง macrophage หลังการกระตุ้นด้วย *M. lacticola* พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ SOD ไม่เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์ SOD ที่พบในกลุ่มที่กระตุ้นด้วย *M. lacticola* นั้น เป็นกิจกรรมของเอนไซม์นี้ที่เกิดขึ้นตามปกติของเซลล์ ซึ่งเอนไซม์ SOD มีบทบาทความสำคัญในการรักษาสมดุลของซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออนให้อยู่ในระดับสมดุล เพื่อไม่ให้ทำอันตรายต่อเซลล์ (Cabec *et al.*, 2000; Kelly *et al.*, 2003; Subbian *et al.*, 2007) ดังนั้นเมื่อ *M. lacticola* ไม่กระตุ้นให้ macrophage สร้างซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออนเพิ่มมากขึ้นได้ จึงไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์นี้สูงขึ้น เช่นเดียวกับการศึกษาของ Battistoni (2003) พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ SOD ของเซลล์ในกลุ่มควบคุมกับกลุ่มเซลล์ที่ติดเชื้อ *Mycobacterium* มีกิจกรรมของเอนไซม์ SOD ไม่แตกต่างกัน

ส่วนการที่พบกิจกรรมของเอนไซม์ SOD ภายใน macrophage เมื่อกระตุ้นด้วยกรดไมโคลิก เนื่องจากกรดไมโคลิกกระตุ้นให้ macrophage สร้างซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออนออกมาได้ แต่มีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับกลุ่มที่กระตุ้นด้วย *E. coli* และ LPS (ตารางที่ 1) ดังนั้นกิจกรรมของเอนไซม์ SOD ภายใน macrophage จึงสูงขึ้นเล็กน้อยเมื่อเทียบกับกลุ่มที่กระตุ้นด้วย *E. coli* และ LPS (ตารางที่ 4) แต่ก็อาจเพียงพอในการกำจัดซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออนที่เกิดขึ้นจากการกระตุ้นได้

2.3.2 กิจกรรมของเอนไซม์ SOD ภายใน macrophage หลังการกระตุ้นด้วย *E. coli* และ LPS

การที่กิจกรรมของเอนไซม์ SOD เพิ่มขึ้นภายใน macrophage ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli* และ LPS เนื่องจากผนังเซลล์ *E. coli* ที่ประกอบด้วย LPS สามารถกระตุ้นเอนไซม์ NADPH oxidase บนเยื่อหุ้มเซลล์ของ macrophage ให้เกิดการสร้างและปล่อยซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออนออกมา (Sarmiento *et al.*, 2004; Karen and Forman, 2007) เมื่อ *E. coli* กระตุ้นให้ macrophage สร้างปล่อยซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออนได้มากขึ้นกว่าระดับปกติของเซลล์ (ตารางที่ 1) ดังนั้นเพื่อป้องกันไม่ให้ระดับซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน สูงเกินจนทำอันตรายต่อเซลล์ เอนไซม์ SOD จึงต้องมีกิจกรรมสูงขึ้นเพื่อกำจัดซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออนที่เกิดขึ้นให้อยู่ในระดับปกติ (Christine *et al.*, 1999) เช่นเดียวกับการทำงานของเอนไซม์ SOD ของ cell lysated และเนื้อเยื่อจากหนู หลังจากกระตุ้นด้วย *E. coli* พบว่าซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน สูงขึ้นรวมทั้งกิจกรรมเอนไซม์ SOD ก็สูงขึ้นด้วย (Yao *et al.*, 2006; Celik *et al.*, 2007) และจากการศึกษาของ Moshe *et al.* (2003) พบว่า macrophage จากปอดหนู หลังกระตุ้นด้วย LPS มีการสร้าง ROS และมีกิจกรรมของเอนไซม์ SOD เพิ่มขึ้น

ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ SOD ที่สูงขึ้นหลังกระตุ้น macrophage ด้วย LPS นั้นเป็นเช่นเดียวกับการกระตุ้นด้วย *E. coli* เนื่องจาก LPS สามารถกระตุ้นให้ macrophage สร้างซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออนความเข้มข้นสูง เมื่อเทียบกับกลุ่มที่กระตุ้นด้วยกรดไขมันโคลิค (ตารางที่ 1) ดังนั้นเอนไซม์ SOD จึงกำจัดซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน ที่มากเกินไป ก่อนที่จะเป็นอันตรายต่อเซลล์ สอดคล้องกับ Russell *et al.* (2004) พบว่าเมื่อกระตุ้น macrophage จากปอด ด้วย LPS มีการสร้างอนุมูลอิสระขึ้นมา จากนั้นเอนไซม์ SOD ก็มีกิจกรรมสูงขึ้นเพื่อกำจัดอนุมูลเหล่านั้น และจากการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ SOD จากปอดหนู หลังกระตุ้นด้วย LPS พบการสร้างซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออนสูงขึ้น รวมทั้งยังพบการสังเคราะห์เอนไซม์ Cu-Zn SOD สูงขึ้นด้วยเช่นกัน (Jawaid, 1989) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Spolarics *et al.* (1996) พบว่า endothelial cell และ Kuffer cell ของหนู หลังจากกระตุ้นด้วย LPS พบว่ามีการสร้าง ROS สูงขึ้นทำให้มีกิจกรรมของเอนไซม์ SOD สูงขึ้นเพื่อกำจัด ROS ให้อยู่ในระดับที่ไม่สูงเกินไป

จากการที่ *E. coli* และ LPS สามารถกระตุ้นให้ macrophage สร้างซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน ความเข้มข้นสูงมากกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่น ๆ (ตารางที่ 1) ทำให้

macrophage ต้องมีกิจกรรมของเอนไซม์ SOD สูงขึ้นอย่างมากเพื่อกำจัดซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออนได้อย่างรวดเร็ว ก่อนที่จะเป็นอันตรายต่อเซลล์ ซึ่งเอนไซม์ SOD เป็นเอนไซม์ชนิดแรกที่ทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นเพื่อเปลี่ยนซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออนเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ซึ่งจะถูกกำจัดต่อไปโดยเอนไซม์ CAT และ GSH-Px เพื่อควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในระดับสมดุล (โอภา และคณะ, 2549)

2.3.3 กิจกรรมของเอนไซม์ SOD ภายใน macrophage หลังการกระตุ้นด้วย

M. lacticola และ *E. coli*

กิจกรรมของเอนไซม์ SOD ภายใน macrophage ที่ไม่สูงขึ้น เมื่อกระตุ้นด้วย *M. lacticola* แต่เพิ่มขึ้นเมื่อกระตุ้นด้วย *E. coli* เนื่องจาก macrophage ไม่สร้างซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออนเพิ่มขึ้นตอบสนองต่อ *M. lacticola* ดังนั้นกิจกรรมของเอนไซม์ SOD จึงไม่สูงขึ้น ส่วน *E. coli* กระตุ้นให้ macrophage สร้างซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน ออกมาในปริมาณมาก จึงพบกิจกรรมของเอนไซม์ SOD สูงมากขึ้น เพื่อควบคุมความเข้มข้นของซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออนให้อยู่ในระดับที่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษากระบวนการ respiratory burst ของ macrophage ปลานิล *Oreochromis niloticus* พบว่า macrophage ตอบสนองต่อกรดไขมัน โคลิค และ LPS ซึ่งเป็นแอนติเจนพบที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย และการตอบสนองต่อ *E. coli* โดยการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ มีความเข้มข้นเฉลี่ย 2.19 ± 0.2 , 11.06 ± 0.16 และ 10.87 ± 0.05 นาโนโมลต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนมีความเข้มข้นเฉลี่ย 2.09 ± 0.15 , 29.54 ± 1.56 และ 29.63 ± 0.71 นาโนโมลต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และไนตริกออกไซด์มีความเข้มข้นเฉลี่ย 4.44 ± 1.4 , 17.09 ± 0.69 และ 16.52 ± 0.28 นาโนโมลต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่ macrophage ไม่ตอบสนองต่อ *M. lacticola* เนื่องจากไม่พบการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน และไนตริกออกไซด์ เนื่องจาก *M. lacticola* สามารถขัดขวางกระบวนการ respiratory burst ได้

กิจกรรมของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ GSH-Px, CAT, SOD ภายใน macrophage สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อกระตุ้นด้วยกรดไขมัน โคลิค LPS และ *E. coli* โดย GSH-Px มีความเข้มข้นเฉลี่ย 124.48 ± 11.67 , 275.66 ± 13.07 และ 280.48 ± 3.91 มิลลียูนิต ตามลำดับ กิจกรรมของ CAT เฉลี่ย 115.60 ± 1.67 , 255.26 ± 3.16 และ 258.48 ± 0.99 มิลลียูนิต ตามลำดับ และกิจกรรมของ SOD เฉลี่ย 124.67 ± 3.65 , 250.48 ± 4.20 และ 256.99 ± 5.07 มิลลียูนิต ตามลำดับ กิจกรรมของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงขึ้นก็เนื่องมาจาก macrophage พยายามกำจัดอนุมูลอิสระที่สูงขึ้นเพื่อไม่ให้ทำอันตรายต่อเซลล์ แต่กิจกรรมของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระภายใน macrophage หลังกระตุ้นด้วย *M. lacticola* ไม่สูงขึ้นเนื่องจาก *M. lacticola* ไม่ได้กระตุ้นให้ macrophage สร้างอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นกว่าปกติ

แบคทีเรีย *Mycobacterium* ด้านทานการทำลายของ macrophage ทั้งการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ภายในเซลล์ และกระบวนการ respiratory burst ได้ทำให้ *Mycobacterium* สามารถเจริญอยู่ได้ภายใน macrophage จึงควรศึกษาหาแนวทางการเพิ่มประสิทธิภาพการทำลายให้กับ macrophage เช่น การเพิ่มความสามารถในการเชื่อมรวมกันระหว่าง phagosome และไลโซโซมเป็น phagosome เมื่อเกิดกระบวนการ phagocytosis แล้ว เอนไซม์ต่าง ๆ ภายในไลโซโซมอาจสามารถย่อยทำลาย *Mycobacterium* ได้ รวมทั้งหาแนวทางการทำลาย LAM ที่ผนังเซลล์ของ *Mycobacterium* อาจทำ

ให้ macrophage สามารถทำลาย *Mycobacterium* ได้ เนื่องจาก LAM ชั้ยั้งการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและกระบวนการ respiratory burst ของ macrophage ได้



เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กฤษฎา จรรยาพูน. 2550. พื้นฐานการทดสอบทางวิทยาภูมิคุ้มกัน. โรงพิมพ์แอนนาออฟเซด, ปทุมธานี.

จรรย์รัตน์ ลิสมิทธิ. 2547. ปฏิบัติการจุลชีววิทยาทั่วไป. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. 2547. แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรค. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, กรุงเทพฯ.

_____ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2547. จุลชีววิทยาทั่วไป. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

นพดล สุกระกาญจน์. 2539. การพัฒนาการตรวจสอบเชื้อ *Mycobacterium* spp. ในสัตว์น้ำโดยวิธี Sandwich ELISA. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

พรทิพา นวกิจกุล. 2536. แบคทีเรียทางสัตวแพทย์ แบคทีเรียชนิดแกรมบวก. ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548. วิทยาภูมิคุ้มกัน สำหรับการเรียนการสอน และการวิจัย. ศูนย์สื่อเสริม กรุงเทพ, กรุงเทพฯ.

ปิยาณี จันทปัญญาศิลป์. 2542. ประสิทธิภาพของสารประกอบคลอรีนร่วมกับกรดอินทรีย์ในการลด ปริมาณ *Escherichia coli* ในผักสด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิน เขษมศรี. 2544. วิทยาภูมิคุ้มกันเปรียบเทียบ. ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วิน สุรเชษฐพงษ์, มาลินี กิตกำธร, วารินทร์ ธนาสมหวัง, สุรประดิษฐ์ หวังในธรรม, อัจฉริยา ไสละ
 สุต และ เจนนุช ว่องวัชชัย. 2545. **ลักษณะรูปร่างและไซโตเคมีของเม็ดเลือดขาวปลา
 กะพง (*Lates calcalifer*)**. ประมวลบทความคัดย่อผลงานวิจัย ฝ่ายวิจัยและบริหารวิชาการ
 คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

สันนิภา สุรทัตต์. 2549. **วิทยานิพนธ์การสัตวแพทยภาคปฏิบัติการ**. โรงพิมพ์ไตรณสาร.
 กรุงเทพฯ.

สิทธิศักดิ์ หารษาเวก. 2549. **เซลล์วิทยาทางการแพทย์ 2 กลไกการทำงานของเซลล์และเนื้อเยื่อ**.
 ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

สุวดี ทิมคำ. 2543. **การพัฒนาการตรวจสอบเชื้อ *E.coli* O157:H1 ในอาหารโดยวิธี
 Reverse passive Latex agglutination**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท.
 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

สุทธิพันธ์ สารสมบัติ. 2537. **อิมมูโนวิทยา**. โรงพิมพ์อักษรสมัย, กรุงเทพฯ.

ศูนย์ข้อมูลโรคติดเชื้อและพาหะนำโรค. 2550. **วัณโรค**.
 แหล่งที่มา http://webdb.dmsc.mooph.go.th/ifc_nih/a_nih_1_001c.asp?info_id=750,
 23 มีนาคม 2550.

อรวดี หาญวิวัฒน์วงศ์. 2551. **วิทยานิพนธ์พื้นฐาน และคลินิก**. ห้างหุ้นส่วนจำกัดภาพ
 พิมพ์, กรุงเทพฯ.

อิสยา จันทรวิธานุชิต และวัชรินทร์ รังสีภาณุรัตน์. 2553. **แบคทีเรียทางการแพทย์**. สำนักพิมพ์
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

อนุชา ศิริมาลัยสุวรรณ. 2549. **มัคโคแบคทีเรียที่ไม่ก่อให้เกิดโรควัณโรค**. **เชียงใหม่สัตวแพทย์**
 สาร. 4: 149-159.

โอภา วัชรกุลป์, ปรีชา บุญสูง, จันทนา บุญชะรัตน์ และ มาลีรักษ์ อัดดีสินทอง. 2549. สารต้านอนุมูลอิสระ. พี เอส พรินท์, กรุงเทพฯ.

Abraham, P., K. Mezaros, J. Bojta, and J. Spitzer. 1990. Superoxide anion generation in the liver during the early stage of endotoxemia in rats. **J. Leu. Biol.** 48: 123-128.

Actor, K. 2007. **Elsevier's Integrated Immunology and Microbiology**, Mosby Elsever, Texas.

Adams, L.B., M.C. Dinauer, D.E. Morgenstern and J.L. Krahenbuhl. 1997. Comparison of the role of reactive oxygen and nitrogen intermediated in the host response to *Mycobacterium tuberculosis* using transgenic mice. **J. Tubercle Lung Dis.** 78: 237-246.

Adams, K., J. Charles and J. Krahenbuhl. 2000. Role of inducible nitric oxide synthase in resistance to *Mycobacterium leprae* in mice. **Infect. Immune.** 68: 5462-5465.

Adams, S., G. Franzblau, Z. Vavirn., J. Hibbs and J. Krahenbuhl. 1991. L-arginine-dependent macrophage effector function inhibit metabolic activity of *Mycobacterium leprae*. **J. Immunol.** 147: 1642-1646.

Aderem, A. and M. David. 1999. Mechanism of phagocytosis in macrophages. **Annu. Rev. Immunol.** 17: 593-623.

Adenwumi, S., K. Olanike, B. Olufemi and U. Abdulkadir. 2006. Ultrastucture study of the phagocytic activities of splenic macrophages in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Afr. J. Biotech.** 22: 2350-2355.

- Adinolfi, L., M. Dilillo, M. Tripodi, R. Utili, P. Bonventre and G. Ruggiero. 1998. Kinetics of phagocytosis and killing of *E. coli* by murine macrophage in presence of different serum preparations. **J. Immunol.** 11: 13-20.
- Agius, C. and R. Roberts. 2003. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. **J. Fish Dis.** 26: 499-509.
- Alexander, R., B. Hoyheim, U. Fischer, B. Kollner, E. Siegl and H. Seyfert. 2008. Tollip, negative regular of TLR-signaling is encoded by twin genes in salmonid fish. **Fish Shellfish Immunol.** 25: 153-162.
- Alvarez, P. 2008. Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 126: 171-198.
- Aldwell, F., D. Wedlock, L. Slobbe, J. Griffin, B. Buddle and G. Buchan. 2001. In vivo control of *Mycobacterium bovis* by macrophages. **Tuberculosis.** 81: 115-123.
- Anna, M., I. Bandin, Y. Santos and E. Toranzo. 1995. In vitro killing of *Pasteurella piscicida* by fish macrophage. **Dis. Aquat. Org.** 23: 51-57.
- Andrea, C., P. Millard, S. Blake and C. Kim. 2004. Development of respiratory burst assay using zebrafish kidney and embryos. **J. Immunol. Methods.** 292: 119-129.
- Akira, S., M. Yamamoto and K. Takeda. 2003. Role of adapters in Toll-like receptor signaling. **Biochem. Soc. Trans.** 31: 637-642.
- Bannantine, P. and J. Stable. 1999. Killing of *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* within macrophage. **J. Immunol.** 128: 91-99.

- Barbara, M., R. Fartti, J. Poschet, G. Timmins, S. Master, M. Burgos, M. Marletta, and V. Deretic. 2004. Mycobacteria inhibit nitric oxide synthase recruitment to phagosomes during macrophage infection. **Infect. Immune.** 72: 2872-2878.
- Bartor, M., J. Falkinham and I. Pavlik. 2004. Mycobacterial catalase, peroxidase, and superoxide dismutase and their effects on virulence and isoniazid-susceptibility in mycobacterium-a review. **Vet. Med.** 5: 161-170.
- Barksdale, L. and K. Kim. 1993. *Mycobacterium*. **Bacteriol. Rev.** 41: 271-219.
- Bergljort, M. 2006. Innate immunity of fish (overview). **Fish Shellfish Immunol.** 20: 137-151
- Bernhard, R., C. Fremond., M. Jacobs., S. Parida., T. Botha., B. Schnyder and V. Quesniaux. 2005. Innate immunity to mycobacterial infection in mice: Critical role for toll-like receptors. **Tuberculosis.** 85: 395-405.
- Bowler, R., M. Nick, K. Tran, G. Tanner, L. Chang, S. Young and G. Worthen. 2004. Extracellular superoxide dismutase attenuates lipopolysaccharide-induced neutrophilic inflammation. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.** 31: 432-439.
- Brent, C., A. Tephly, S. Venkataraman, W. Oberley, Y. Zhang, R. Buettner, R. Spitz and W. Hunninghake. 2004. High levels of catalase and glutathione peroxidase activity dampen H₂O₂ signaling in human alveolar macrophages. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.** 31: 43-53.
- Brozna, J., M. Horan, J. Rademacher, K. Pabst and M. Pabst. 1991. Monocyte responses to sulfatide from *Mycobacterium tuberculosis*: inhibition of priming for enhanced release of superoxide, associated with increased secretion of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha, and altered protein phosphorylation. **Infect. Immune.** 58: 2542-2548.

- Cabec, V., C. Cols and M. Isabelle. 2000. Nonopsonic phagocytosis of zymosan and *Mycobacterium kansasii* by CR3 (CD11b/CD18) involves distinct molecular determinant and or is not coupled with NADPH oxidase activation. **Infect. Immune.** 68: 4736-4745.
- Cao, Q., M. Mak and S. Lieber. 2005. Cytochrome P4502E1 primes macrophages to increase TNF- α production in response to lipopolysaccharide. **Am. J Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.** 289: 95-107.
- Cayman chemical company. **Cayman's catalase assay kit**, MI. USA.
- Carne, R., L. Wang, T. Cheng, I. Matsunaga, C. Dascher, L. Peng, J. Fenton, C. Kirschning and D. Moody. 2005. *Mycobacterium tuberculosis* Regulates CD1 Antigen presentation pathways through TLR-2. **J. Immunol.** 175: 1758-1766.
- Celik, S., S. Gorur, O. Aslantas, S. Erdogan, S. Ocak and S. Hakverdi. 2007. Caffeic acid phenethyl ester suppresses oxidative stress in Escherichia coli- induced pyelonephritis in rats. **Mol. Cell Biochem.** 297: 131-138.
- Chaible, L., M. Alba-Loureiro, S. Pugine, C. Valle, T. Pithon and R. Curi. 2005. Effect of *Cysticercus cellulosae* on neutrophil function and death. **Vet. Parasitol.** 127: 121-129.
- Chan, J., K. Takana, D. Carroll, J. Flynn and B. Bloom. 1995. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on murine infection with mycobacterium tuberculosis. **Infect. Immune.** 63: 736-740.
- Chao, Y., E. Swaim and L. Ramakrishnan. 2009. Mechanism of m-csf pathway-mediated innate resistance to tuberculosis. **J. Immunol.** 182: 134-176.
- Chen, Y., K. Hsu and Y. Chen. 2006. Acute glucose overload potentiates nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated macrophage: the role of purinergic receptor activation. **Cell Bio. Inter.** 30: 817-822.

- Chen, Y., O. Scholl, J. Leskiw, R. Donaldson and T. Peterstein. 2003. Association of glutathione peroxidase activity with insulin resistance and dietary fat intake during normal pregnancy. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 88:5963–5968.
- Christine, A., E. Diaye, V. Cabec, G. Rittig, J. Pramdi and M. Isabelle. 1999. The mannose receptor mediates uptake of pathogenic and nonpathogenic mycobacteria and bypasses bactericidal responses in human macrophages. **Infect. Immune.** 67: 469–477.
- Christian, B., R. Martin and A. Diefenbach. 2000. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. **Curr. Opin. Immunol.** 12: 64-76.
- Claudia, H., I. Wessler and K. Racke. 1995. Nitric oxide synthase activity is inducible in rat but not rabbit alveolar macrophage, with a concomitant reduction in arginase activity. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.** 351: 651-659.
- Clifton, E., R. Lee, K. Mdluli, A. Sampson, B. Schroeder, R. Slayden and Y. Yuan. 1998. mycolics: structure, biosynthesis and physiological functions. **Prog. Lipid Res.** 37: 143-179.
- Damm, B. 2001. Characterization of the intracellular survival of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* phagosome pH and fusogenicity in J 774 macrophage compared with other *Mycobacterium*. **J. Cell Microbiol.** 8: 551-566.
- David, G., R. Slack and J. Peutherer. 2005. **Med. Microbiol.** Churchill Livingstone, New York.
- David, K. 2005. Mechanisms of mycobacterium persistence in tuberculosis. **J. Clin. Immunol.** 114: 239-247.

- David, K. and J. Barton. 2001. ATP stimulates human macrophage to kill intracellular virulent *Mycobacterium tuberculosis* via calcium – dependent phagosome-lysosome fusion. **J. Immunol.** 167: 3380-3315.
- David, M., A. Ozinsky, K. Smith and A. Aderem. 1999. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophage. **PNAS.** 25: 14459-14463.
- David, T. and M. Rhodes. 2008. Mycobacteriosis in fishes: A review. **J. Vet.** 187: 1-15
- Debbie, A., P. Hanington, J. Walsh, E. Wilson and M. Belosevic. 2005. Comparison of select innate immune mechanisms of fish and mammals. **Xenotransplantation.** 12: 266-277.
- Deanna, K., C. Turenne, A. Dubansky and J. Domachowske. 2004. First case report of catheter - related bacteremia due to *Mycobacterium lacticola*. **J. Clin. Microbiol.** 42: 2855-2857.
- Debasish, M., A. Bhattacharya and J. Basu. 2001. Lipoarabinomannan from mycobacterium tuberculosis promotes macrophage survival by phosphorylating bad through a phosphatidylinositol 3-kinase/akt pathway. **J. Biological Chem.** 276: 329–333.
- Deepak, K. 2007. Coronin-1a epigenomics governs mycobacterial persistence in tuberculosis. **FEMS Microbiol Lett.** 278: 10-14.
- Dirk, W., J. Felix, K. Sang, M. Petrofsky and L. Bermudez. 2002. *Mycobacterium avium* infection of macrophage results in progressive of interleukin-12 production in vitro and in vivo. **J. Leuk. Biol.** 91: 80-88.
- Droge, W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol. Rev.** 82: 47-95.

- Dwight, C., N. James and R. Walker. 2004. Mycobacterium. **Vet. Microl.** 2: 223-227.
- Edgar, P and Y. Keisari. 1980. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cell in culture. **J. Immunol. Method.** 30: 161-170.
- _____. 1981. Superoxide anion and hydrogen peroxide production by chemically elicited peritoneal macrophages-Induction by multiple nonphagocytic stimuli. **Cell. Immunol.** 59: 301-318
- Eliana, S., M. Weiss, I. Rosenhine, R. Kohen and S. Altuvia. 2000. Characterization of *Escherichia coli* DNA lesions generated within J774 macrophages. **J. Bacteriol.** 182: 5225-5230.
- Ellis, E. 1999. Immunity of bacterial in fish. **Fish Shellfish Immunol.** 9: 291-308.
- Enrico, T. 2006. The new mycobacteria: an update. **Immunol. Med. Microbiol.** 48: 159-178.
- Erin, J., D. Gautheir and P. Veld. 2004. In vitro response of the striped bass natural resistance-associated macrophage protein, Nramp, to LPS and Mycobacterium. **Comp. Biochem. Physics.** 138: 391-400.
- Eriminia, B., S. Coade and A. Fiori. 2005. The binding of mycolic acid to galectin-3: anovel interaction between a host soluble lectin and trafficking mycobacterial lipids?. **FEBS Lett.** 579: 6749-6755.
- Enane, N., K. Frenkel, J. Connor, K. Squibb, J. Zelikoff. 1993. Biological markers of macrophage activation applications for fish phagocytes. **Immunol.** 80: 68-72.
- Fairbairn, I. 2004. Macrophage apoptosis in host immunity to mycobacterial infections. **Biochem. Soc. Trans.** 32: 496-498.

- Gary, A., W. Dougall, J. Wilson, I. Burr and H. Nick. 1990. Regulation of manganese superoxidase dismutase by lipopolysaccharide, interleukin-1, and tumor necrosis factor. **J. Biol. Chem.** 15: 2856-2864.
- Gerd, M., B. Anders, A. Kim, A. Schulz, M. Lan, K. Schjoerring and P. Jahn. 2007. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. **J. Biochem.** 12: 1183-1191.
- George, I and T. Nakanishi. 1996. **The fish immune system.** Academic press. Japan
- Gene, M. 2008. **Immunology – chapter one innate (non-specific) immunity.**
Available Sourec:<http://www.med.sc.edu:85/ghaffar/innate.html>, October 1, 2008.
- Gisa, G., A. Zychlinsky and J. Diego. 2007. What is the role of Toll-like receptors in bacterial infections?. **Semi. Immunol.** 19: 41-47.
- Gao, L., F. Laval, H. Lawsan, K. Groget, A. Woodruff, J. Hiroshi, S. Cox, M. Daffe and J. Brown. 2003. Requirement for kas b in mycobacterium mycolic acid biosynthesis, cell wall impermeability and intracellular survival: implications for therapy. **Mol. Microbiol.** 49: 1547-1563.
- Gomes, M. and A. Rui. 2002. NRAMP1- or cytokine-induced bacteriostasis of *Mycobacterium avium* by mouse macrophages is independent of the respiratory burst. **Microbiol.** 148: 3155–3160.
- Gordon, A. and P. Hart. 1994. Stimulation or inhibition of the respiratory burst in cultured macrophages in a mycobacterium model: initial stimulation is followed by Inhibition after phagocytosis. **Infect. Immune.** 62: 4650-4651.
- Grange, J. 1980. **Mycobacterium diseases.** Edward Arnold Publishers, London.

- Gregory, W. and D. Ennis. 2007. *Mycobacterium marinum* produces long-term chronic infections in medaka: A new model for studying human tuberculosis. **Comp. Biochem. Physio.** 145: 45-54.
- Hanano, R., Sh. Kaufmann. 1995. Nitric oxide production and mycobacterial growth inhibition by murine alveolar macrophage: the sequence of rifin-gamma stimulation and *Mycobacterium bovis* BCG infection determines macrophage activation. **Immunol. Lett.** 12: 23-27.
- Hanington, P., J. Tam, B. Katzenback, S. Hitchen, D. Barreda and M. Belosevic. 2009. Development of macrophages of cyprinid fish. **Dev. Comp. Immunol.** 33: 411-29.
- Hasana, N., N. Yusuf, Z. Toossi and N. Islam. 2006. Suppression of mycobacterium tuberculosis induced reactive oxygen species (ROS) and TNF- α mRNA expression in human monocytes by allicin. **FEBS Lett.** 580: 2517–2522.
- Henry, F. and T. Martine. 2002. Reactive oxygen species and cell signaling respiratory burst in macrophage signaling. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 166: 4–8.
- Hey, C., I. Wessler and K. Racke. 1995. Nitric oxide synthase activity is inducible in rat but not rabbit alveolar macrophage, with a concomitant reduction in arginase activity. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.** 351: 651-659.
- Hiroaki, T., S. Aiba, K. Shibata, T. Ohteki and H. Takada. 2005. Synergistic effect of nod1 and nod 2 agonists with toll-like receptor agonists on human dendritic cells to generate interleukin-12 and T helper type 1 cells. **Infect. Immune.** 73: 7967-7976.
- Hubbard, R. and F. Colline. 1991. Immunomodulation of mouse macrophage killing *Mycobacterium avium* in vitro. **Infect. Immune.** 59: 570-574.

- Hyun, S. and G. Li. 2007. Role of macrophage-derived nitric oxide in endotoxin lethality in mice. **Cell Biol. Inter.** 31: 565-569.
- Inge, A., J. Hess, I. Oswald and H. Kaufmann. 1994. Growth inhibition of *Mycobacterium bovis* by IFN- γ stimulated macrophages: regulation by endogenous tumor necrosis factor- α and IL-10. **Int. Immunol.** 6: 693-700.
- Iles, K. and H. Forman. 2002. Macrophage signaling and respiratory burst. **Immunol. Res.** 26: 95-106.
- Irene S., P. Diaz-Rosales, A. Cuesta, J. Meseguer, M. Chbrillion, M. Morinigi and M. Esteban. 2006. Effect of heat –inactivated fish and non-fish derived probiotic on the innate immune parameters of a teleost fish (*Sparus aurata*). **J. Vet. Immunopathol.** 11: 279-289.
- Jacobson, S., M. Trucksis, A. Kane and R. Reimschuessel. 1999. Superoxide production in phagocyte obtained from *Mycobacterium marinum*-stimulated goldfish (*Carassius auratus*) that were exposed to copper. **Am. J. Vet. Res.** 60: 699-675.
- Jawed, I., A. Kumar and N. Islam. 2006. *Azadirachta indica* induced suppression of *Mycobacterium tuberculosis* secreted proteins in human monocyte. **J. Lab. Clin. Med.** 144: 108-15.
- Jennifer, C., C. Byrd, J. Menio, R. Rippe, I. Hines and M. Wheeler. 2010. Src kinase participates in LPS-induced activation of NADPH oxidase. **Mol. Immunol.** 47: 756-762.
- Jame, L., F. Galvez, G. Goss and M. Belosevic. 2003. Induction of nitric oxide and respiratory burst response in activated of goldfish macrophage requires potassium channel activity. **Dev. Comp. Immunol.** 26: 445-459.

- Jian, W., M. Burger and K. Drlica. 1998. Role of superoxide in catalase-peroxidase-mediated isoniazid action against mycobacteria. **Antimicrob. Agents Chemothe.** 42: 709–711.
- James, L., K. Ellestad, E. Magor, M. Belosevis and G. Magor. 2003. A toll-like receptor (TLR) gene that is up-regulated in activated goldfish macrophage. **Dev. Comp. Immunol.** 27: 685-698.
- Jawaid, I., B. Clerch, A. Hass, L. Frank and D. Massaro. 1989. Endotoxin increases Lung Cu,Zn superoxide dismutase mRNA: 02 raises enzyme synthesis. **Am. J. Physiol.** 257: 61-64.
- Joanne, S., C. Fletcher, F. Rowley, T. Zelikoff, L. Kaattari and A. Smith. 1999. **Techniques in fish immunology.** SOS publication. USA.
- Johanna, K., A. Stoltz, J. Verschoor, P. Baetselier and J. Grooten. 2005. The *Mycobacterium tuberculosis* cell wall component mycolic acid elicits pathogen-associated host innate immune responses. **Eur. J. Immunol.** 35: 890-900.
- John, B., K. Mean, A. Heldwein, A. Keen, J. Hill, T. Belisle and J. Fenton. 2001. Different toll-like receptor agonists distinct macrophage responses. **Leuk. Biol.** 69: 1036-1044.
- John, C., X. Fan, S. Hunter, J. Brennan and R. Bloom. 1991. Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. **Infect. Immune.** 59: 1755-1761.
- John, J. and R. Wei. 1998. Reduction of iodonitrotetrazolium violet by superoxide radicals. **Biochem. And Biophys Res. Comm.** 150: 1294-1301.

- Kang, K., K. Hwa Lee, S. Chae, R. Zhang, M. Sun Jung, Y. Min Ham, J. Baik, N. Ho Lee and J. Won Hyun. 2006. Cytoprotective effect of phloroglucinol on oxidative stress induced cell damage via catalase activation. **J. Cell Biochem.** 97: 609–620
- Karen, E. and H. Forman. 2007. Macrophage signaling and respiratory burst. **Immunol Res.** 26: 95-105.
- Katharina, A., M. Brcic and W. Jungi. 2003. Toll-like receptor-4 is involved in eliciting an LPS-induced oxidative burst in neutrophils. **Immunol. Let.** 85: 75-80.
- Katherine, A., M. Hill, K. Youkhana, F. Wanker and J. Gimble. 1994. Dimethyl sulfoxide modulates NF- κ B and cytokine activation in lipopolysaccharide-treated murine macrophages. **Infect. Immune.** 62: 3122-3128.
- Karihtala, P. and Y. Soini. 2007. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancy. **APMIS.** 115: 81-103.
- Kelly, A., R. Hill, K. Youkhana, F. Wanker and M. Gimble. 2003. Dimethyl sulfoxide modulates NF- κ B and cytokine activation in lipopolysaccharide-treated murine macrophages. **Infect. Immune.** 62: 3122-3128.
- Khambata, S. and J. Bhat. 1954. Decomposition of oxalate by *Mycobacterium lacticola* isolated from the intestine of earthworm. **Ind. J. Tub.** 8: 277-278.
- Laroux, F., X. Romero, L. Wetzler, P. Engel and C. Terhorst. 2010. Cutting edge: MyD88 controls phagocyte NADPH oxidase function and killing of gram-negative bacteria1. **J. Immunol.** 175: 5596-5600.

- Laura, E., E. Connolly, E. Volkman, O. Humbert, E. Born and L. Ramakrishnan. 2006. *Mycobacterium marinum* infection of adult zebrafish causes caseating granulomatous tuberculosis and is moderated by adaptive immunity. **Infect. Immune.** 74: 6108–6117.
- Larry, S., K. Azad, B. Torrelles, E. Roberts, I. Vergne and V. Deretic. 2008. Determination of phagocytosis, phagosome biogenesis and autophagy for mycobacterium tuberculosis. **Immunol. Cell Biol.** 45: 1-14
- Lorenz, E., D. Patel, T. Hartung and D. Schwartz. 2002. Toll-like receptor (TLR4)-deficient murine macrophage cell line as an in vitro assay system to show TLR4-independent signaling of bacteroides fragilis lipopolysaccharide. **Infect. Immune.** 70: 4892-4896.
- Lewis, C. and J. McGee. 1992. **The Macrophage.** Oxford university, New York.
- Luc, J., E. Dopp, R. Haworth, T. Pikkarainen, M. Kangas, O. Elomaa, C. Dijkstra, S. Gordon, K. Trygvason and G. Kraal. 1999. Regulation and functional involvement of macrophage scavenger receptor MARCO in clearance of bacteria in vivo. **J. Immunol.** 162: 939-947.
- Maaik, J., C. Roberio, R. Stet, T. Hermesen, H. Savelkoul and G. Wiegertjes. 2006. Head-kidney derived macrophage of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) show plasticity and functional stimulation. **Am. J. Immunol.** 63: 61-69
- Manuela, F., A. Goncalves, R. Silva, S. Ehlers, A. Cooper and R. Appelberg. 1999. Resistance of virulent *Mycobacterium avium* to gamma interferon-mediated antimicrobial activity suggests additional signals for induction of Mycobacteriosis. **Infect. Immune.** 67: 3610-3618.
- Mathews, J. and W. Vermeulen. Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes. **Infect. Immune.** 64: 683–690.

Mathews, S., J. Warinner and B. Weeks. 1990. Assays of immune function in fish macrophage.

Dev. Comp. Immunol. 11: 117-124.

Mathiesen S., D. Lindemann, M. Warnken, U. R. Juergen and K. Racke. 2008. Inhibition of

NADPH oxidation of arginase in rat alveolar macrophage. **Eu. J. Pharmacol.** 579: 403-410.

Matsunaga, I. and D. Moody. 2009. Mincle is along sought receptor for mycobacterial cord factor. **J. Exp. Med.** 14: 2865-2868.

Marcia, A. and W. Lee. 2002. *Mycobacterium tuberculosis* CDC1551 is resistant to reactive nitrogen and oxygen intermediates in vitro. **Infect. Immune.** 70: 3965–3968.

Maria, G., M. Bistoni, L. Tamagnini and R. Gonzalez. 2004. Recovery of *Escherichia coli* in fresh water fish, *Jenynsia multidentata* and *Bryconamericus iheringi*. **Water Res.** 38: 2368-2374.

Maria, P., A. Francisca, M. Azucena, F. Roca, J. Meseguer, M. Cayuela and V. Mulero. 2009. Evolution of lipopolysaccharide (LPS) recognition and signaling: fish TLR4 does not recognize LPS and negatively regulates NF- κ B activation. **Immunol.** 82: 1836–1845.

Markus, M., M. Mallo, K. Echmann and M. Modolell. 1998. Murine macrophages secrete interferon γ upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of macrophage of autocrine macrophage activation. **J. Exp. Med.** 187: 2103-2108.

Maureen, P., K. Smith, L. Hood, J. Winton and C. Jared. 2006. Conservation of toll-like receptor signaling pathways in teleost fish. **Comp. Biochem Physiol.** 1: 77-88.

- May, M. and J. Spagnuolo. 1987. Evidence for activation of a respiratory burst in the interaction of human neutrophils with mycobacterium tuberculosis. **Infect. Immune.** 55: 2304-2307.
- Michel, C., K. Hunt and M. Hussain. 2005. Hydrogen peroxide stimulates macrophage vascular endothelial growth factor release. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.** 280: 2357-2363.
- Michel, P. and R. Johnston. 1990. Increases production of superoxide anion by macrophage exposed in vitro to muramyl dipeptide or lipopolysaccharide. **Exp. Med.** 151: 101-114.
- Michel, L., C. Whipps, J. Matthews, D. Florio, V. Watral, J. Bishop-Stewart, M. Poort and L. Bermudez. 2004. Mycobacterium in zebrafish (*Danio rerio*) research facilities. **Comp. Biochem. Physiol.** 138: 383-390.
- Michel, D., D. Keen, N. Parlane, A. Storset and B. Buddle. 2006. Bovine natural killer cell restricts the replication of *Mycobacterium bovis* in bovine macrophage and enhance IL-12 release by infected macrophage. **J. Tuberculosis.** 87: 53-62.
- Miodrag, B., P. Hanington and D. Barreda. 2006. Development of goldfish macrophage in vitro. **Fish Shellfish Immunol.** 20: 152-171.
- Mohammad, S., T. Akaike, S. Okamoto, T. Kubota, J. Yoshitake, T. Sawa, Y. Miyamoto, F. Tamura and Hiroshi Maeda. 2007. Role of nitric oxide in host defense in murine salmonellosis as a function of its antibacterial and antiapoptotic activities. **Infect. Immune.** 70: 3130-3142
- Moura, A., M. Modolell and M. Mariano, 1997. Down-regulatory effect of *Mycobacterium leprae* cell wall lipids on phagocytosis, oxidative respiratory burst and tumor cell killing by mouse bone marrow derived macrophages. **J. Immunol.** 46: 500-505.

- Moshe, M., V. Ziv, N. Nevo, C. Harris-Cerruti and O. Mahler. 2003. Cu/Zn superoxide dismutase plays important role in immune response. **J. Immunol.** 170: 2993-3001.
- Norman, F. and M. Belosevic. 1996. Deactivation of primed respiratory burst response of goldfish macrophage by leukocyte-derived macrophage activating factor (s). **Dev. Comp. Immunol.** 20: 427-439.
- Norman, J. Stafford, D. Barreda, A. Ainsworth and M. Belosevic. 2001. Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. **Dev. Comp. Immunol.** 25: 807-825.
- Nozaki, Y., Y. Hasegawa, S. Ichiyama, I. Nakashima and K. Shimokata. 1997. Mechanism of nitric oxide-dependent killing of *Mycobacterium bovis* BCG in human alveolar macrophages. **Infect. Immune.** 65: 3644-3647.
- Okezie, I. 1998. Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease. **JAOCs.** 75: 199-212.
- Oxford biochemical research. 2008. **Colorimetric Assay for cellular glutathione peroxidase**, MI. USA.
- Pabst, M., J. Gross, J. Brozna and M. Goren. 1988. Inhibition of macrophages priming by sulfatide from *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Immunol.** 140: 634-640.
- Passantino, A., D. Macri, P. Coluccio, F. Foti and F. Marino. 2008. Importation of mycobacteriosis with ornamental fish: medico-legal implications. **Travel Med. Infect. Dis.** 6: 240-244
- Philipp, M and J. Pieters. 2006. Modulation of macrophage antimicrobial mechanisms by pathogenic Mycobacteria. **J. Immunol.** 211: 549-556.

- Parmod, K., A. Pandey, S. Subbian, S. El-Etr, S. Cirillo, M. Samrakandi and J. Cirillo. 2006. Identification of *Mycobacterium marinum* macrophage infection mutants. **J. Microb. Pathol.** 40: 139-151.
- Pilar, A. 2008. Fish immunity and parasite infection: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. **J. Vet. Immunopathol.** 13: 1-28.
- Prasad, B., K. Mallikarjun and G. Kodliwadmth. 2008. Erythrocyte glutathione peroxidase, glutathione reductase activities and blood glutathione content in leprosy. **J. Infect.** 56: 469-473.
- Press, C. and O. Evensen. 1999. The morphology of the immune system in teleost fishes. **Fish Shellfish Immunol.** 9: 309-318.
- Rabab, K. 2006. **A new insight into mycobacterium resistance to reactive oxygen intermediates.** Thesis, University of Maryland.
- Ralph, H. and S. Kaufman. 1995. Nitric oxide production and mycobacterial growth inhibition by murine alveolar macrophage: the sequence of IFN- γ stimulation and *Mycobacterium bovis* BCG infection determines macrophage activation. **Immunol. Lett.** 45: 23-27.
- Radha, L., D. Stuehr and M. Michael. 1997. Macrophage synthesis of nitrite, nitrate, and *N*-nitrosamines: Precursors and role of the respiratory burst. **Biochem.** 84: 6369-6373.
- Rachel, F., L.S. Fonseca, A.M. Afonso, M.G. Silva, M.H. Saad and W. Lilenbaum. 2006. A report of Mycobacteriosis caused by *Mycobacterium marinum* in bullfrogs (*Rana catesbeiana*). **J. Vet.** 171: 177-180.

- Randal, S., G. Xiao-pei, V. Brovkovy, D. Jho, S. Predescu, T. Standiford and A. Mailk. 2002. Nitric oxide stimulates macrophage inflammatory protein-2 expression in sepsis. **J. Immunol.** 169: 2093-2101.
- Randox laboratoies Ltd. **Ransod superoxide dismutase manual.** Ardmore, UK.
- Richard, B., A. Godzik and A. Cohn. 1997. Incresed superoxide anion production by immunologically activated and chemically elecited macrophage. **J. Exp. Mzv.** 1: 115-127.
- Richard, K., L. Grace, C. Schmidt, A. Aminlari, L. Steintraesser, W. Alarcon, H. Zhang and S. Wang. 2000. **J. Surgical Res.** 94: 159-166.
- Roberto, P., D. Wink, J. Cook, M. Krishna, W. Degraff, N. Friendman, M. Tsokod, A. Samuni and J. Mitchell. 1995. Nitric oxide potentiates hydrogen peroxide-induced Killing of *Escherichia coli*. **J. Exp. Med.** 182: 1496-1479.
- Romano, N., S. Picchiatti, J. Taverna-Thiele, N. Taverne, L. Abelli, B. Verburg and J. Rombout. 1998. Distribution of macrophages during fish development: an immunohistochemical study in carp (*Cryrinus carpio*, L.). **Anat. Embryol.** 198: 31-41.
- Rukmini,S., B. Souza and V. Souza. 2004. Superoxide dissmutase and catalase activities and their correlation with malondialdehyde in schizophrenic patients. **Ind. J. Clin. Biochem.** 19: 114-118.
- Russell, P., M. Nicks, K. Tran, G. Tanner, L. Chang, K. Young and G. Worthen. 2004. Extracellular superoxide dismutase attenuates lipopolysaccharide-induced neutrophilic inflammation. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.** 31: 432-439.

Ruth, F. and R. Yanong. 2002. **Mycobacteriosis in Fish.**

Available Source: <http://edis.ifas.ufl.edu>, July 18, 2007.

Sahar, H., L. Yan and D. Cirillo. 2001. Fish monocytes as a model for mycobacterial host-pathogen interactions. **Infect. Immune.** 69: 7310–7317.

Sasada, M., J. Pabst and B. Johnston. 1993. Activation of mouse peritoneal macrophages by lipopolysaccharide alters the kinetic parameters of the superoxide-producing NADPH oxidase. **J. Biol. Chem.** 258: 9631-9635.

Samantha, F. and B. Amanda. 2009. NADPH oxidase NOX2 mediates rapid cellular oxidation following ATP Stimulation of endotoxin-primed macrophages. **J. Immunol.** 183: 3302–3308.

Saito, S. and M. Nakano. 1996. Nitric oxide production by peritoneal macrophages of *Mycobacterium bovis* BCG-infected or non-infected mice: regulatory of T lymphocytes and cytokines. **J. Leu. Biol.** 59: 908-915.

Sarmiento, S. 2004. Modulation of the activation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) head-kidney macrophages by macrophage activity factor (s) and lipopolysaccharide. **Fish Shellfish Immunol.** 16: 79-92.

Seamus, B. and P. Andrew. 2004. Guinea-pig alveolar macrophage killing of *Mycobacterium tuberculosis*, in vitro, does not require hydrogen peroxide or hydroxyl radical. **Microb Pathol.** 11: 229-236.

Seng, W., J. Sotos, A. Hart, R. Barletta and C. Czuprynski. 2006. Bovine monocytes and a macrophage cell line differ in their ability to phagocytose and support the intracellular survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **J. Vet. Immunol. Immunopathol.** 110: 109-120.

- Selvakumar, S., K. Mehta, G. Cirillo, E. Bermudez and D. Cirillo. 2007. A *Mycobacterium marinum mel2* mutant is defective for growth in macrophages that produce reactive oxygen and reactive nitrogen species. **Infect. Immune.** 75: 27–134
- Shabbir, H., B. Zwillling and W. Lafuse. 1999. *Mycobacterium avium* infection of mouse macrophage inhibits IFN- γ janus kinase –STAT signaling and gene introduction by Down-Regulation of the IFN- γ receptor. **J. Immunol.** 163: 2041-2048.
- Shih, C., A. Adams, K. Thompson and R. Richard. 1998. Electron microscope studies of the *in vitro* phagocytosis of *Mycobacterium* spp. by rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* head kidney macrophages. **Dis. Aquat. Organism.** 32: 99-110.
- Shona, K. 2007. The innate immune receptor of finfish-A review of current knowledge. **Fish Shellfish Immunol.** 23: 1127-1151.
- Shoutaro, T., M. Matsumoto, O. Takeuchi, S. Akira, I. Azuma, A. Hayashi, K. Toyoshima and T. Seya. 2000. Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* bacillus calmette-guerin involvement of toll-like receptors. **Infect. Immune.** 68: 6883-6890.
- Solem, T., B. Jorgensen and B. Robertsen. 1995. Stimulation of respiratory burst and phagocytic activity in atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages by lipopolysaccharide. **Fish Shellfish Immunol.** 5: 475-491.
- Somia, H., J. Chan and P. Salgame. 2002. *Mycobacterium tuberculosis* induces differential cytokine production from dendritic cell and macrophages with divergent effects on native T cell polarization. **Immunol.** 168: 4636-4642.

- Soma M. and R. Umseh. 2001. In vitro effect of temperature on phagocytosis and cytokine activities of splenic phagocytes of the wall lizard (*Hemidactylus flaviviridis*). **Comp. Biochem. Physiol.** 129: 391-398.
- Sonja, M., D. Lindemann, M. Warnken, U. Juergens and K. Racke. 2008. Inhibition of NADPH oxidase by apocynin inhibits lipopolysaccharide (LPS) induced up-regulation of arginase in rat alveolar macrophages. **Eu. J. Pharmacol.** 579: 403-410.
- Sorensen, K., B. Sveinbjornsson, R. Dalmo, B. Smedsrod and K. Bertheussen. 1997. Isolation, cultivation and characterization of head kidney macrophages from Atlantic cod, *Gadus morhua* L. **J Fish Dis.** 20: 93-107.
- Speer, Ch., M. Gahr and M. Pabst. 2008. Phagocytosis-associated oxidative metabolism in human milk macrophages. **Acta. Paediatrica.** 75: 444-451.
- Spolarics, Z. 1996. Endotoxemia, pentose cycle, and the oxidant/antioxidant balance in the hepatic sinusoid. **Leuk Biol.** 63: 534-541.
- Spolarics, Z., S. Stein and C. Garcia. 1996. Endotoxin stimulated hydrogen peroxide detoxifying activity in rat hepatic endothelial cells. **Hepatol.** 24: 691-696.
- Spolarics, Z. and J. Wu. 1997. Role of glutathione and catalase in h₂O₂ detoxification in LPS-activated hepatic endothelial and kuffer cells. **Am. Physiol. Soc.** 273: 1304-1311.
- Stach, L., G. Delgnda, V. Tchibozo, M. Strobel and P.H. Lagrange. 2007. Natural resistance to mycobacteria: Antimicrobial activity and reactive oxygen intermediate releasing of murine macrophages. **Immunol.** 135: 25-37.
- Stefan, K and E. Schaible. 2005. Antigen presentation and recognition in bacterial infections. **Cur. Opin. Immunol.** 17: 79-87.

Steven, P. 2002. *Mycobacterium marinum*: The Fish Disease You Could Catch.

Available Source: <http://edis.ifas.ufl.edu>, July 18, 2007.

Subhendu, B. and M. Fenton. 2004. Toll-like receptors: function and role in lung disease

Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 286: 887-892.

Sueoka, E., S. Nishiwaki, S. Okabe, M. Suganuma, I. Yano, K. Aoki and H. Fujiki. 1995.

Activation of protein kinase c by mycobacterial cord factor, trehalose 6-monomycolate, resulting in tumor necrosis factor- α release in mouse lung tissue. **Jpn. J. Cancer Res.** 86: 749-755.

Susanne, L., R. Goethe, A. Darji, P. Valentine and S. Weiss. 2003. Activation of macrophages

and interference with CD 4⁺ T-cell stimulation by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subspecies *avium*. **J. Immunol.** 108: 62-69.

Suzuki, E. and K. Umezawa. 2006. Inhibition of macrophage activation and phagocytosis by a

novel NF- κ B inhibitor, dehydroxymethylepoxiquinomicin. **Biomed. Pharmacol.** 60: 578-586.

Tadayuki, T., H. Tsuda, M. Nakao, H. Oshiumi, M. Matsumoto and T. Seya. 2004. Sensing

bacterial flagellin by membrane and soluble orthologs of toll-like receptor 5 in rainbow trout (*Onchorhynchus mikiss*). **J. Biol. chem.** 279: 48588-48597.

Tae-Jin, K., Y. Ji-Chang and Gue-Tae. C. 2001. Identification of catalase-like activity from

Mycobacterium leprae and the relationship between catalase and isonicotinic acid hydrazide. **J. Med. Microbiol.** 50: 675-681.

Takeda, K. 2003. Toll-like receptors. **Annu. Rev. Immunol.** 21: 335-376.

- Tatsuo, N., T. Derojas-Walker, S. Wishnok, R. Tannenbaum and B. Demple. 1995. Activation by nitric oxide of an oxidative-stress response that defend *Escherichia coli* against activated macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 90: 9993-9997.
- Tebekeme, O. 2010. Significance of immune complex activation of macrophages in pigeon fanciers' lung. **Inter. J Med Sci.** 7: 226-231.
- Thomas, E. 2004. During the respiratory burst, do phagocytes need proton channels or potassium channels, or both?. **Sci Stke.** 18: 21
- Timothy, J., E. Nelson, V. Schauf, G. Crispen and R. Anderson. 1986. *Mycobacterium leprae* fails to stimulate phagocytic cell superoxide anion generation. **Infect. Immune.** 51: 514-520.
- Tort, L., C. Balasch and S. Mackenzie. 2003. Fish immune system a crossroads between innate and adaptive response. **Immune.** 22: 277-286.
- Valerie, Q., C. Fremond, M. Jacobs, S. Parida, D. Nicolle, V. Yermeev, F. Bihl, M. Drennan M. Soler, M. Bert, B. Schnyder and B. Ryffel. 2004. Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria. **Microb Infect.** 10: 946-959.
- Valko, M., D. Leibfritz, J. Moncol, M. Cronin, M. Mazur and J. Telser. 2006. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.** 39: 44-84.
- Virginia, W. and M. Kent. 2007. Pathogenesis of *Mycobacterium* spp. in Zebrafish (*Danio rerio*) from research facilities. **Comp. Biochem. Physiol.** 145: 55-60.
- Wang, J., M. Burger and K. Drlica. 1998. Role of superoxide in catalase-peroxidase-mediated isoniazid action against mycobacteria. **Antimicrob. Agents Chemother.** 42: 709-711.

- Wei, Y. and H. Lee. 2002. Oxidative Stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. **Exp. Biol. Med.** 227: 671-82.
- Xiang, Y. and L. Kalen. 2007. Rapidly growing mycobacteria: clinical and microbiologic studies. **Am. J. Clin. Pathol.** 128: 612-621.
- Yano, T., L. Li, E. Weinstein, J. Teh and H. Rubin. 2006. Steady-state kinetics and inhibitory action of antitubercular phenothiazines on *Mycobacterium tuberculosis* type-II NADH-menaquinone oxidoreductase (NDH-2). **J. Biol. Chem.** 17:11456-63.
- Yao, X., H. Min and L. Zhen. 2006. Response of superoxide dismutase, catalase, and ATPase activity in bacteria exposed to acetamiprid. **Biochem. Envi. Sci.** 19: 309-314.
- Yi, W., N. Tibrewal and B. Birge. 1998. Phosphatidylserine recognition by phagocytes: a view to a kill. **Trends in Cell Biol.** 16: 189-197.
- Yumi, U. and M. Tooru. 2007. Tuberculosis as a zoonosis from a veterinary perspective. **CIMID.** 30: 415-425.
- Zhao, G., S. Thomas, G. Kowalsky, J. Christman, F. Qian, I. Levitan, J. Deng and L. Xiao. 2010. Lipopolysaccharide (LPS) stimulation up-regulates the expression of NADPH oxidase (NOX) in mouse bone marrow-derived macrophages (BMDM). **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 181:1277-1287.
- Zoltan, S. and J. Wu. 1997. Role of glutathione and catalase in H₂O₂ detoxification in LPS-activated hepatic endothelial and kupffer cell. **Am. J. Physiol. Gastrointes. Liver Physiol.** 273: 1340-1311.



ภาคผนวก

การนับจำนวนเม็ดเลือดขาว

(ภาควิชาจุลทรรศน์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์มหาวิทยาลัยขอนแก่น 2547)

อุปกรณ์และน้ำยา

1. ปิเปตต์นับเม็ดเลือดขาว
2. ลูกยางเบอร์ 6 หรืออุปกรณ์ดูดเลือดด้วยปิเปตต์ขนาดเล็ก
3. แผ่นแก้วนับเม็ดเลือดและกระจกปิดทับมาตรฐาน
4. เครื่องเขย่าผสมเม็ดเลือด
5. กล้องจุลทรรศน์
6. น้ำยาเจือจางเม็ดเลือดขาว Turk's solution ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้

Glacial acetic acid (CH_3COOH)	3	มิลลิลิตร
1% (w/v) aqueous gentian violet	1	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นจนครบ	100	มิลลิลิตร

วิธีการ

1. ผสมเลือดที่มีสารกันเลือดแข็งให้เข้ากัน แล้วดูดเลือดจากขวดเข้าในปิเปตต์นับเม็ดเลือดขาวให้ถึงขีด 0.5 พอดี ขณะดูดเลือดให้ปิเปตต์อยู่ในลักษณะเกือบเป็นแนวตั้ง
2. เช็ดกราบเลือดด้านนอกปิเปตต์ให้สะอาด ดูดน้ำยาเจือจางเม็ดเลือดขาวถึงขีด 11
3. จับปิเปตต์ให้อยู่ในแนวราบ ใช้นิ้วปิดปลายปิเปตต์ไว้ แล้วถอดลูกยางหรืออุปกรณ์ดูดเลือดด้วยปิเปตต์ขนาดเล็กออก
4. จับปิเปตต์โดยปิดปลายทั้งสองข้างด้วยนิ้วหัวแม่มือและนิ้วกลาง แล้วสะบัดข้อมือไปมานาน 5 นาที
5. หยดสารละลายจากปิเปตต์ 2 หยดแรกทิ้งไป
6. หยดสารละลายหยดต่อไปลงตรงร่องของแผ่นแก้วนับเม็ดเลือดที่ปิดกระจกปิดทับมาตรฐานไว้เรียบร้อยแล้วทั้งสองด้าน โดยให้ปิเปตต์ทำมุมกับแผ่นแก้วนับเม็ดเลือดประมาณ 45 องศา ใช้นิ้วชี้ปิดปลายด้านบนของปิเปตต์ไว้ เพื่อควบคุมให้สารละลายออกจากปิเปตต์เข้าสู่แผ่นแก้วนับเม็ดเลือดพอดี จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 2 นาที
7. นับจำนวนเม็ดเลือดขาวด้วยกล้องจุลทรรศน์

การคำนวณ

$$\text{จำนวนเม็ดเลือดขาว/ ลิตร} = \frac{\text{จำนวนเม็ดเลือดขาวที่นับได้} \times \text{dilution factor} \times 10^6}{\text{ปริมาตรที่ใช้ นับ (ไมโครลิตร)}}$$

dilution factor คำนวณ ได้ดังนี้

จากการเจือจางเลือดเพื่อนับเม็ดเลือดขาว คูณเลือดถึงขีด 0.5 และคูนน้ำยาเจือจางไปถึงขีด 11 แต่เลือดผสมกับน้ำยาจริงๆ ในบริเวณกระเปาะ 10 ส่วน เพราะยังคงมีน้ำยาเจือจางอีก 1 ส่วน ค้างอยู่ในปิเปตต์และไม่ได้ผสมกับเลือด ดังนั้นเลือดจึงถูกเจือจางไป 1: 20 และ dilution factor เท่ากับ 20 ปริมาตรที่ใช้ นับเม็ดเลือดขาว คำนวณได้จากปริมาตรของแผ่นแก้วนับเม็ดเลือดบริเวณที่ นับเม็ดเลือดขาว ดังนี้

$$\begin{aligned} \text{ปริมาตรที่ใช้ นับเม็ดเลือดขาว} &= \text{พื้นที่} \times \text{ความลึก} \times \text{จำนวนช่อง W ที่นับ} \\ &= (1 \times 1) \times 0.1 \times 4 \\ &= 0.4 \text{ ลบ.มม. หรือประมาณ } 0.4 \text{ ไมโครลิตร} \end{aligned}$$

$$\text{ดังนั้น จำนวนเม็ดเลือดขาว/ ลิตร} = \frac{N \times 20 \times 10^6}{0.4} = N \times 50 \times 10^6$$

N คือ จำนวนเม็ดเลือดขาวที่นับได้ทั้ง 4 ช่อง W

การเตรียมสารละลาย phosphate buffer saline (กัลยาณี, 2548)

phosphate buffer saline (PBS) เป็นสารละลายเกลือทำหน้าที่รักษาสมดุล (balance salt solution) มีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ สามารถทำงานโดยไม่มีคาร์บอนไดออกไซด์ และยังรักษาความดันออสโมติกให้เหมาะสม เซลล์จึงอยู่รอดได้ แต่เซลล์ไม่สามารถเจริญเพิ่มจำนวนได้เนื่องจากไม่มีอาหาร จึงนิยมใช้ล้างเซลล์ และแช่เซลล์ในช่วงระยะเวลาสั้น ๆ

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง sodium chloride (NaCl), potassium chloride (KCl), sodium dihydrogen phosphate (Na_2HPO_4) และ sodium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) จำนวน 8, 0.2, 1.25 และ 0.2 กรัม ตามลำดับ
2. ละลายสารต่าง ๆ ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นปรับค่า pH ให้ได้ 7.4
3. บรรจุลงในขวดปลอดเชื้อแล้วนำไปทำให้ไร้เชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่ 120 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที หรือกรองผ่าน membrane filter 0.2 ไมโครเมตร

วิธีเตรียมสารละลาย potassium phosphate buffer

ผสมปริมาตรของ Na_2HPO_4 0.2 โมลาร์ กับปริมาตรของ NaH_2PO_4 0.2 โมลาร์ ตามตาราง แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตรแล้วตรวจสอบด้วยเครื่อง pH อีกครั้ง

ตารางผนวกที่ 1 การเตรียมสารละลาย potassium phosphate buffer

pH	Na_2HPO_4 ml	NaH_2PO_4 ml
6	30.75	219.25
7	152.5	97.50
8	236.75	13.25

การเตรียมความขุ่นมาตรฐาน (McFarland nephelometer standard)

การเตรียมความขุ่นมาตรฐานตามวิธีของ McFarland ใช้กรดซัลฟุริก (H_2SO_4) และแบเรียมคลอไรด์ (BaCl_2) มีขั้นตอนดังนี้

1. เตรียมกรดซัลฟุริก 1 เปอร์เซ็นต์ และแบเรียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์
2. ผสมกรดซัลฟุริก 1 เปอร์เซ็นต์ และแบเรียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ในหลอดทดสอบใหม่ ๆ ที่ไม่มีรอยสีแก้ว และต้องล้างให้สะอาด การผสมสารทั้งสองในปริมาณเท่าใดนั้นขึ้นอยู่กับความต้องการว่าจะเตรียมเป็น McFarland tube number ที่เท่าใดดังตาราง

ตารางผนวกที่ 2 McFarland nephelometer standard

Tube number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1% BaCl ₂ (ml)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1
1% H ₂ SO ₄ (ml)	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3	9.2	9.1	9
Approx. cell density (x 10 ⁸ / ml)	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30

การเตรียมสารละลาย phenol red (Edgar and Yana, 1980; Chable *et al.*, 2005)

วิธี phenol red เป็นการวัดปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ macrophage หรือ neutrophil ปล่อยออกมาใน horseradish peroxidase โดยสีของ phenol red จะเปลี่ยนสีจากสีแดงเป็นสีเหลือง

ส่วนประกอบ

1. sodium chloride (NaCl) ความเข้มข้น 140 มิลลิโมลาร์
2. phosphate buffer pH 7.0 ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์
3. D-glucose (dextrose) 0.1 กรัมต่อลิตร
4. phenol red 0.1 กรัมต่อลิตร
5. horseradish peroxidase (HRPO) 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

วิธีเตรียม

1. ชั่งส่วนประกอบต่าง ๆ ตามต้องการละลายใน potassium phosphate buffer pH 7.0
2. เทใส่ขวดและตรวจสอบ pH อีกครั้ง เตรียมแล้วควรใช้วันต่อวัน

การเตรียมสารละลาย Griess reagent (Hey *et al.*, 1995; Mathiesen *et al.*, 2008)

การวัดปริมาณไนตริกออกไซด์ระหว่างการเลี้ยงเซลล์เป็นการวัดปริมาณของไนโตรที่เพิ่มขึ้นให้ทำปฏิกิริยากับสารละลาย Griess reagent ซึ่งจะมีการเปลี่ยนสีจากไม่มีสีเป็นสีชมพูแล้ววัดสีโดยใช้เครื่อง spectrophotometer เรียกวิธีนี้ว่า Griess reaction assay

ส่วนประกอบ

1. sulfanilic acid ($C_6H_7NO_3S$) 1 เปอร์เซ็นต์
2. N-(1-naphthyl) ethylenediamine hydrochloride (NED; $C_{12}H_7N_2 \cdot 2HCl$) 0.1 เปอร์เซ็นต์
3. phosphoric acid (H_3PO_4) 2.5 เปอร์เซ็นต์

วิธีเตรียม

1. ชั่งส่วนประกอบต่าง ๆ ตามต้องการ แล้วละลายใน phosphoric acid
2. เทใส่ขวด เตรียมแล้วควรใช้วันต่อวัน

การเตรียมสารละลายวิเคราะห์ superoxide anion (ดัดแปลงจาก Mathiesen *et al.*, 2008)

ส่วนประกอบ

1. xanthine ($C_5H_4O_2$) 0.5 มิลลิโมลาร์
2. EDTA 0.3 มิลลิโมลาร์
3. iodonitrotetrazolium formazanazolium violet (INT) 49 มิลลิโมลาร์
4. xanthine oxidase 0.25 ไมโครกรัมต่อลิตร
5. phosphate buffer pH 10.2 10 มิลลิโมลาร์

วิธีการเตรียม

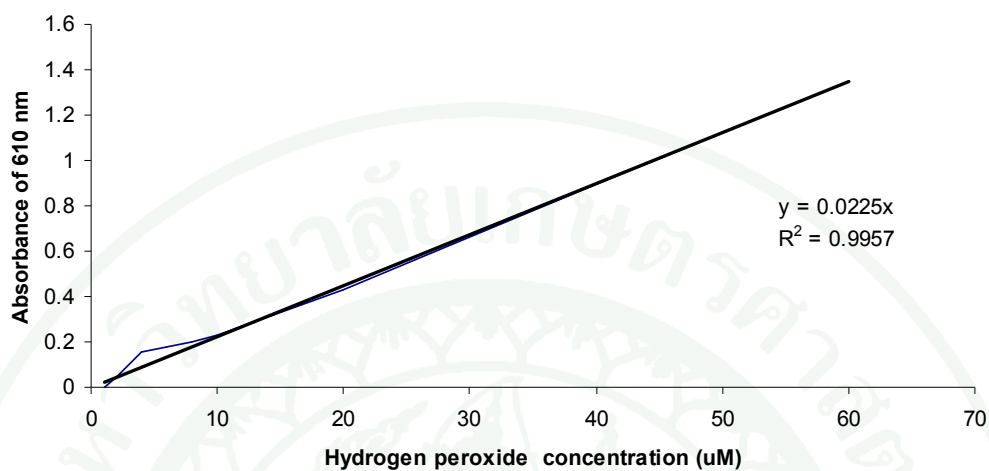
1. ชั่งส่วนประกอบต่าง ๆ ตามต้องการ แล้วละลายใน phosphate buffer pH 10.2
2. เทใส่ขวดและตรวจสอบ pH อีกครั้ง เตรียมแล้วควรใช้เลยวันต่อวัน

การเตรียมกราฟมาตรฐาน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogenperoxide standard curve)

1. เติมน้ำสารละลาย phenol red ลงหลอดวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer tube)
2. เติมน้ำไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 40 และ 60 ไมโครโมลาร์
3. บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่มี คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 60 นาที
4. เติมน้ำโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาณ 10 ไมโครลิตร
5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 610 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectronic 20 Genesys) ใช้สารละลาย phenol red เติมน้ำโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาณ 10 ไมโครลิตรตั้งค่าศูนย์ (Set Blank)

ตารางผนวกที่ 3 ค่าดูดกลืนแสงของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ 610 นาโนเมตร

ความเข้มข้นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์(ไมโครโมลาร์)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 610 นาโนเมตร
1	0.003
2	0.041
4	0.153
6	0.175
8	0.198
10	0.232
20	0.428
40	0.893



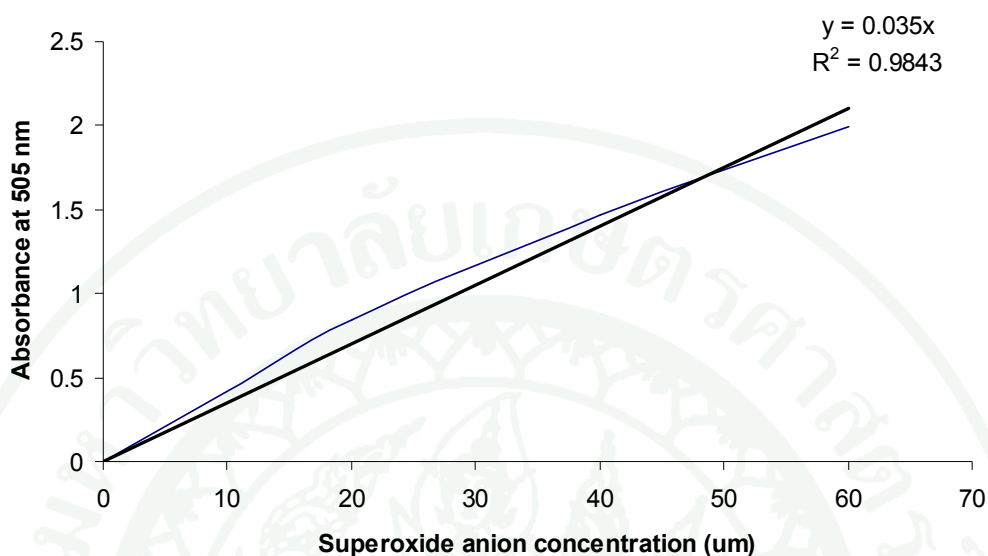
ภาพผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

การเตรียมกราฟมาตรฐานซูเปอร์ออกไซด์ไอออน (superoxide anion Standard curve)

1. เตรียมสารละลายวิเคราะห์ superoxide ion ลงหลอดวัดค่าดูดกลืนแสง
2. เตรียมโพแทสเซียมซูเปอร์ออกไซด์ที่มีความเข้มข้น 10, 20, 40 และ 60 ไมโครโมลาร์
3. บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 60 นาที
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 505 นาโนเมตร ใช้น้ำกลั่นตั้งค่าศูนย์

ตารางผนวกที่ 4 ค่าดูดกลืนแสงของโพแทสเซียมซูเปอร์ออกไซด์ที่ 505 นาโนเมตร

ความเข้มข้นโพแทสเซียมซูเปอร์ออกไซด์ (ไมโครโมลาร์)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 505 nm
10	0.412
20	0.847
40	1.467
60	1.998



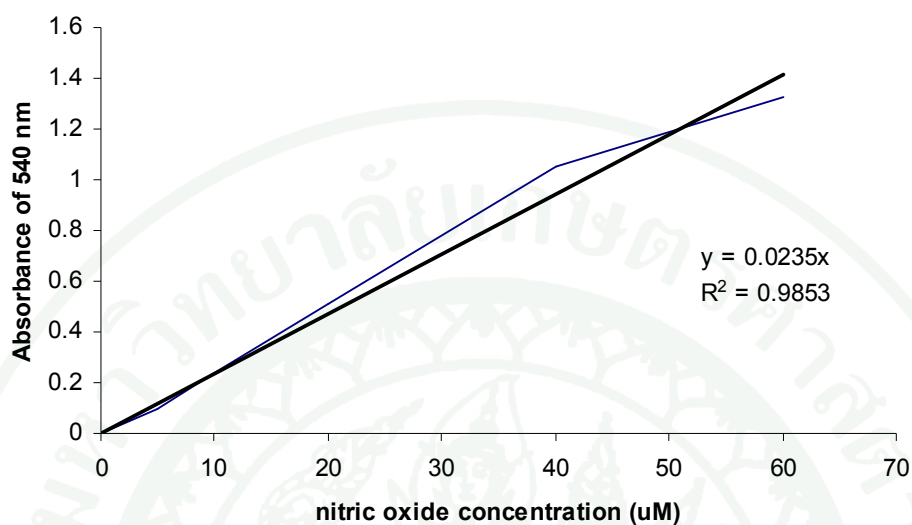
ภาพผนวกที่ 2 กราฟมาตรฐานซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน

การเตรียมกราฟมาตรฐานไนตริกออกไซด์ (nitric oxide standard curve)

1. เตรียมสารละลาย Griess reagent ลงหลอดวัดค่าดูดกลืนแสง
2. เตรียมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่มีความเข้มข้น 5, 10, 20, 40 และ 60 ไมโครโมลาร์
3. บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 60 นาที
4. วัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectronic 20 Genesys) ที่ 540 นาโนเมตร น้ำกลั่นตั้งค่าศูนย์

ตารางผนวกที่ 5 ค่าดูดกลืนแสงของไนตริกออกไซด์ที่ 540 นาโนเมตร

ความเข้มข้น ไนตริกออกไซด์ (ไมโครโมลาร์)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm
5	0.093
10	0.234
20	0.514
40	1.051
60	1.328



ภาพผนวกที่ 3 กราฟมาตรฐานไนตริกออกไซด์

การเตรียมกราฟมาตรฐานกิจกรรมเอนไซม์ catalase

1. เตรียมฟอร์มาลดีไฮด์มาตรฐาน (formaldehyde) โดยดูดฟอร์มาลดีไฮด์ความเข้มข้น 4.25 ไมโครโมลาร์มา 10 ไมโครลิตรแล้วเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 9.99 มิลลิลิตร
2. เตรียมสารละลายฟอร์มาลดีไฮด์ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังตาราง

หลอดที่	ฟอร์มาลดีไฮด์ (ไมโครลิตร)	บัฟเฟอร์ (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์ (ไมโครโมลาร์)
1	0	1,000	0
2	10	990	5
3	30	970	15
4	60	940	30
5	90	910	45
6	120	880	60
7	150	850	75

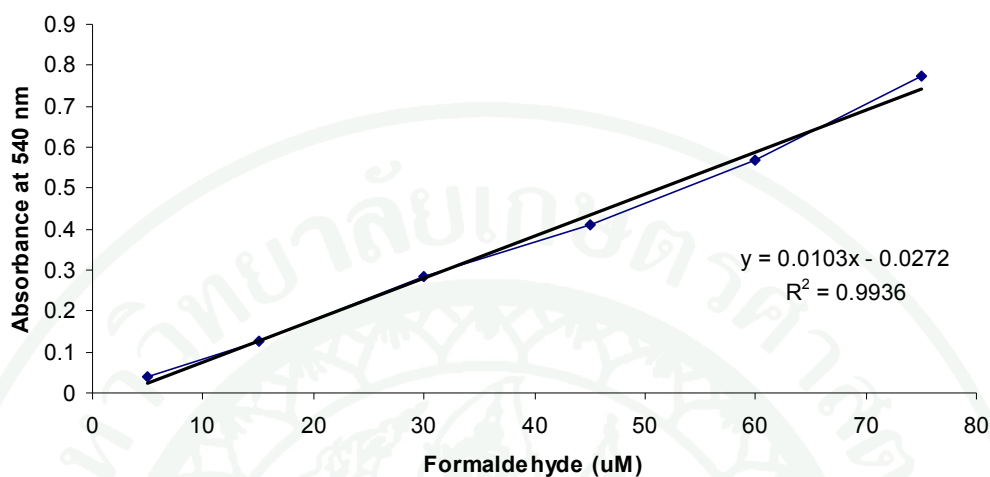
3. เติมน้ำฟอสเฟอรัปริมาณ 100 ไมโครลิตร เมทานอล 30 ไมโครลิตร และ สารละลาย
ฟอร์มาลดีไฮด์ความเข้มข้นต่าง ๆ ตามลำดับลงใน microplate หลุม 1 A ถึง 1 G

4. เติมน้ำไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 8.82 โมลาร์
ปริมาตร 40 ไมโครลิตรกับน้ำกลั่นปริมาตร 9.96 มิลลิลิตร) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละ
หลุม ปิด plate แล้วบ่มบนเครื่องเขย่า (Biotek, PowerWave 340) ที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที
จากนั้นเติมน้ำโพแทสเซียม ไฮดรอกไซด์ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และเพอร์ฟาลด์ ปริมาตร 30
ไมโครลิตรลงในแต่ละหลุม ปิด plate แล้วบ่มบนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที

5. เติมน้ำโพแทสเซียม เปอร์ริโอเดต ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ปิด plate เอาเข้าเครื่อง
microplate reader (Biotek, Powerwave 340) เขย่า 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง อ่านค่าที่ 540 นาโนเมตร

6. เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์กับการ
ดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

ความเข้มข้นฟอร์มาลดีไฮด์ (ไมโครโมลาร์)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร
5	0.0395
15	0.125
30	0.284
45	0.409
60	0.5665
75	0.7745



ภาพผนวกที่ 4 กราฟมาตรฐานกิจกรรมของเอนไซม์ catalase

การคำนวณอัตราของปฏิกิริยา

1. ความเข้มข้นของ formaldehyde ในตัวอย่างคำนวณโดยสูตร

$$\text{formaldehyde } (\mu\text{M}) = \frac{\text{ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่าง} - \text{จุดตัดแกน Y}}{\text{ความชัน}} \times 8.5 \text{ มิลลิลิตร}$$

2. การทำงานของเอนไซม์ catalase ในตัวอย่างคำนวณโดยสูตร

$$\text{catalase activity} = \frac{\text{formaldehyde}(\mu\text{M})}{20 \text{ min}} \times \text{Sample Dilution} = \text{nmol / min / ml}$$

การเตรียมกราฟมาตรฐานกิจกรรมเอนไซม์ superoxide dismutase

1. เตรียมสารละลายมาตรฐาน โดยเติมน้ำกลั่นลงในขวด superoxide dismutase ปริมาณ 10 มิลลิลิตร จากนั้นเตรียมสารละลาย superoxide dismutase ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังตาราง

หลอดที่	ปริมาณสารละลายมาตรฐาน	ปริมาณบัฟเฟอร์ (มิลลิลิตร)
1	ไม่เจือจาง	-
2	5 มิลลิลิตร ของหลอดที่ 1	5
3	5 มิลลิลิตร ของหลอดที่ 2	5
4	5 มิลลิลิตร ของหลอดที่ 3	5
5	3 มิลลิลิตร ของหลอดที่ 4	6

2. ปิเปตสารละลายมาตรฐานหลอดที่ 1 และสารละลายผสมระหว่าง xathine กับ 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride ปริมาตร 30 และ 1,000 ไมโครลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันโดยการใช้อนุภาคน้ำตาล 2-3 ครั้ง วางหลอดทดลอง (cuvette) ลงในเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง จากนั้นเติม xanthine oxidase ปริมาณ 150 ไมโครลิตร อ่านค่าดูดกลืนแสงที่ 505 nm เมื่อถึงเวลา 30 วินาทีให้กด zero แล้วทิ้งไว้ 3 นาที จึงอ่านค่าอีกครั้ง คำนวณหาอัตราปฏิกิริยาของสารละลายมาตรฐานจากสูตร

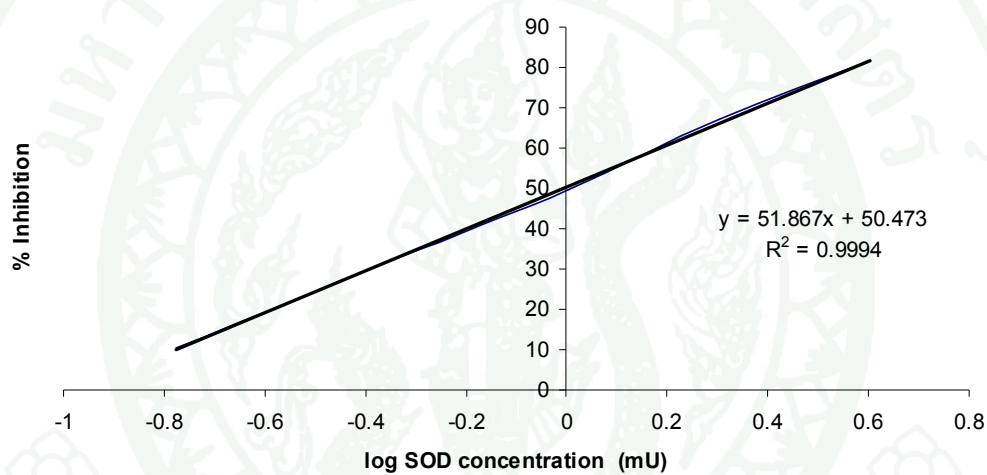
$$\text{อัตราของปฏิกิริยาต่อนาที} = \frac{\text{ค่าดูดกลืนแสงนาที่ที่สาม}}{3}$$

3. ปิเปตสารละลายมาตรฐานหลอดที่ 2-5 และสารละลายผสมระหว่าง xathine กับ 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride ปริมาตร 30 และ 1,000 ไมโครลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันโดยการใช้อนุภาคน้ำตาล 2-3 ครั้ง วางหลอดทดลอง (cuvette) ลงในเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง จากนั้นเติม xanthine oxidase ปริมาณ 150 ไมโครลิตร อ่านค่าดูดกลืนแสงที่ 505 nm เมื่อถึงเวลา 30 วินาทีให้กด zero แล้วทิ้งไว้ 3 นาที จึงอ่านค่าอีกครั้ง อัตราเร็วทั้งหมดของปฏิกิริยาในสารมาตรฐาน ต้องแปลงไปเป็นเปอร์เซ็นต์ถูกยับยั้งจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = 100 - \frac{(\text{อัตราปฏิกิริยาของสารมาตรฐานเจือจางต่อนาที} \times 100)}{\text{อัตราปฏิกิริยาของสารมาตรฐาน}}$$

4. เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของแต่ละสารมาตรฐานกับ $\log_{10}$ ความเข้มข้นของเอนไซม์ superoxide dismutase

เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	$\log_{10}$ ความเข้มข้นของ superoxide dismutase (มิลลิยูนิต)
-0.777	10.417
-0.2999	34.722
0.001084	49.767
0.302114	67.13
0.603144	81.481



ภาพผนวกที่ 5 กราฟเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง $\log$ ความเข้มข้นของ superoxide dismutase

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล

วิรัชดี แต่งพันธ์

วัน เดือน ปี ที่เกิด

4 ตุลาคม พ.ศ. 2523

สถานที่เกิด

กรุงเทพฯ

ประวัติการศึกษา

วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ศึกษาศาสตร์)

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน

-

สถานที่ทำงานปัจจุบัน

-

ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ

-

ทุนการศึกษาที่ได้รับ

1. อาจารย์พิเศษสอนวิชา วท. 161 ปฏิบัติการชีววิทยา

และ วท. 163 ปฏิบัติการชีววิทยาทั่วไป

ประจำภาคเรียนที่ 1 ปีการศึกษา 2550

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

2. อาจารย์ผู้ช่วยสอนวิชา 01424112 ปฏิบัติการชีววิทยา

ภาคต้น ปีการศึกษา 2552 และภาคต้น ปีการศึกษา 2553

ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์