

## รายงานชุดโครงการวิจัย

# การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน ของ siderophores ที่แยกจากแบคทีเรียแกรมลบ A Study on Chemical Property and Antioxidative Effect of Bacterial Siderophores

นางนิตย์ ธีระวัฒนสุข

ระวีวรรณ แก้วอมตวงศ์

สุภารัตน์ จันท์เหลือง

รัฐิเดช ลีอดตระกูล

พรทิพย์ ไวกูต

กุสุมา จิตแสง

ธนวดี ปรีเปรม

สมหวัง จรรยาขันติกุล

จารุวรรณ ธนวิรุฬห์

คณะเภสัชศาสตร์

มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

พ.ศ. 2548

ชุดโครงการนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

หมวดเงินอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2545-2546

รหัสชุดโครงการ: 03009515-9517

ISBN 974-523-045-6



## A Research Report

# A Study on Chemical Property and Antioxidative Effect of Bacterial Siderophores

Nongnit Teerawatanasuk

Rawiwun Kaewamatawong	Suparat Chanluang
Thitidej Ruangtrakul	Pornthip Waiwut
Kusuma Jitsaeng	Thanawadee Preeprem
Somwang Junyakantikul	Charuwan Thanawirun

This Research was Financially Supported from The National Research Council of Thailand

In Fiscal Year, 2001-2002

Research Code: 03009515-9517

ISBN 974-523-045-6

### บทคัดย่อ

จากการศึกษา pathogenic gram-negative rod bacteria ใน Enterobacteriaceae 3 ชนิด ซึ่งได้มาจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยจากโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จ. อุบลราชธานี ได้แก่ *E. coli* 14 ตัวอย่าง, *Salmonella* spp. 4 ตัวอย่าง และ *K. pneumoniae* 25 ตัวอย่าง เพื่อค้นหาตัวอย่างที่สามารถผลิต siderophores ปริมาณสูง พบว่า ช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิต siderophores ใน *E. coli* คือ 18 ชั่วโมง *Salmonella* spp คือ 16 ชั่วโมง และ *K. pneumoniae* คือ 12 ชั่วโมง การตรวจกรองหา strain ของเชื้อ bacteria ที่ผลิต siderophores ปริมาณสูง พบว่าเชื้อที่สามารถสร้าง total siderophores ได้ปริมาณสูงสุดในแต่ละกลุ่ม คือ *E. coli* strain 896, *Salmonella* spp. strain 464 และ *K. pneumoniae* strain 957 จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณ *E. coli* strain 896, *Salmonella* spp. strain 464 และ *K. pneumoniae* strain 957 สกัดส่วนไลที่ไ้จากการเลี้ยงเชื้อด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate จะได้สารสกัดหยาบ siderophores ของตัวอย่างเชื้อทั้ง 3 ชนิด จากนั้นแยก siderophores ด้วยเทคนิค preparative TLC สามารถแยกสารที่แสดงคุณสมบัติของ siderophores เด่นชัด 3 ชนิดคือ จาก *E. coli* strain 896 2 ชนิด ให้ชื่อว่าสาร E-2 และ E-3 จาก *K. pneumoniae* strain 957 แยกได้ 1 ชนิดให้ชื่อว่า K-1 นอกจากนั้นยังแยกสารที่แสดงคุณสมบัติของ siderophores ไม่เด่นชัดได้อีก 2 ชนิด คือสารที่ชื่อว่า E-1 จาก *E. coli* strain 896 และสารชื่อ S-1 จาก *Salmonella* spp. strain 464 สารทุกชนิดที่แยกได้จะต้องมีการพิสูจน์เอกลักษณ์ต่อไป จากนั้นนำ siderophores ที่ได้จากเชื้อทั้งสองชนิดคือ สาร E-3 จาก *E. coli* strain 896 และสาร K-1 จาก *K. pneumoniae* strain 957 ไปทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยา oxidation โดยทำการศึกษาในเซลล์ HEK-293 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้อยู่ในภาวะ oxidative stress โดยใช้ lead acetate และ Fe-NTA แล้วประเมินขีดความสามารถในการเป็นแอนติออกซิแดนท์เทียบกับ ascorbic acid ทำการศึกษาใน 4 แนวทางคือ วัดความเป็นพิษต่อเซลล์ ผลของ siderophores ในการป้องกันการเกิด protein oxidation และ lipid peroxidation และ ผลของ siderophores ในการเพิ่ม glutathione peroxidase activity ผลการศึกษาพบว่า siderophores E-3 จาก *E. coli* และ K-1 จาก *K. pneumoniae* ไม่เป็นพิษต่อเซลล์โดยมีค่า  $IC_{50}$  สูง (40 และ 96.68  $\mu\text{g}/\text{m}$  ตามลำดับ) และที่ความเข้มข้น 2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  สารทั้งสองมีฤทธิ์ช่วยลดการเกิด protein oxidation และ lipid peroxidation ในเซลล์ได้ นอกจากนี้ยังมีผลเพิ่ม glutathione peroxidase activity เช่นเดียวกับผลที่ได้จาก ascorbic acid แต่มีฤทธิ์ค่อนข้างอ่อน

**คำสำคัญ:** Siderophores, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Klebsiella pneumoniae* ตัวจับเหล็ก, อนุมูลอิสระ, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

### Abstracts

The investigation of siderophores producing bacteria were performed in pathogenic gram-negative rod bacteria, enterobacteriaceae i.e. *Escherichia coli* (14 samples), *Salmonella* spp. (4 samples) and *Klebsiella pneumoniae* (25 samples) which isolated from patients in Sappasithiprasong hospital, Ubonratchathani. Determination of siderophores producing times in each species revealed that *E. coli*, *Salmonella* spp. and *K. pneumoniae* gave the highest amount of products in 18, 16 and 12 hours, respectively. The high-yield siderophores producing strains of each species were *E. coli* strain 896, *Salmonella* spp. strain 464 and *K. pneumoniae* strain 957. These potential strains were scaled up then harvested. Supernatants of each bacterial culture were extracted by partition with ethyl acetate. The crude siderophores extracts were purified by preparative TLC. The isolated compounds from *E. coli* strain 896, namely E-2, E-3 and compound K-1 from *K. pneumoniae* strain 957 were identified as siderophores but compound E-1 from *E. coli* strain 896 and S-1 from *Salmonella* spp. strain 464 showed inadequate results. The complete structures of all compounds will be elucidated in further study. The antioxidant activities of siderophores, compound E-3 and K-1, were performed. This study was performed in the HEK-293 cells which were induced by lead acetate and Fe-NTA to oxidative stress state, and then their antioxidant activities were evaluated compared with ascorbic acid. The evaluation study was performed in 4 different ways: cell toxicity, prevention for protein oxidation, prevention for lipid peroxidation, and enhancement of glutathione peroxidase activity. The result showed that siderophores E-3 and K-1 extracted from *E. coli* strain 896 and *K. pneumoniae* strain 957, respectively, are not toxic to cells with the high  $IC_{50}$  (40 and 96.68  $\mu\text{g/ml}$ , respectively). At the concentration of 2.5  $\mu\text{g/ml}$ , Those of siderophores were able to decrease the incidence of cellular protein oxidation and lipid peroxidation. Moreover, they also enhanced glutathione peroxidase activity as compare to ascorbic acid although they showed lower activity.

**Keywords:** Siderophores, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Klebsiella pneumoniae*,

Iron chelator, antioxidant, Free radical

## กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณะกรรมการเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่เชื้อเพื่อสถานที่  
สารเคมีและอุปกรณ์สำหรับทำวิจัย นอกจากนี้ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ประจำห้องปฏิบัติการที่  
อำนวยความสะดวกด้านอุปกรณ์และเครื่องมือ ตลอดจนทุกฝ่ายที่มีส่วนเกี่ยวข้องทำให้สารนิพนธ์  
ฉบับนี้สำเร็จ ลุล่วงด้วยดี

ขอขอบคุณ นายไชยา ความสวัสดิ์ นางสาว ปิยะมาศ อาระหง์ นางสาวขวัญใจ ประดา  
นางสาวชนม์ชนก วิสาการ นางสาวชนากานต์ ดีขาว นางสาวรัชฎา ชามงคลประดิษฐ์ นางกรชนก  
แก่นคำ และนางสาวแหว คงศิลา ที่ช่วยในการทำวิจัยบางส่วน

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่ให้ทุนในการดำเนินงานใน  
โครงการวิจัยจนเสร็จสิ้น

คณะผู้วิจัย

## สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูป.....	ช
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 ทบทวนความรู้	
2.1 แสดงถึงทฤษฎีหรือกรอบแนวความคิดและวิธีการเชื่อมโยงของโครงการวิจัย ย่อย ภายใต้ชุดโครงการวิจัย.....	4
2.2 ทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้องกับชุดโครงการวิจัย	
2.2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับ siderophores.....	5
2.2.2 การจำแนกกลุ่มของ siderophores.....	5
2.2.3 ความสำคัญของ siderophores ต่อเชื้อจุลินทรีย์.....	8
2.2.4 Enterobacteriaceae.....	9
2.2.5 Bacteria ใน Enterobacteriaceae ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย.....	10
2.2.6 การประยุกต์ใช้ Siderophores.....	11
2.2.7 อนุโมลลิสละ.....	14
2.2.8 สารแอนติออกซิแดนท์.....	17
2.2.9 กลูตาไรโอน.....	18
2.2.10 วิธีศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารแอนติออกซิแดนท์.....	20
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
3.1 อุปกรณ์ เครื่องมือ สารเคมี และแหล่งที่มาของแบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัย.....	22
3.2 วิธีการวิจัย.....	27

## สารบัญ (ต่อ)

บทที่ 4 ผลการวิจัย	
4.1 ผลการตรวจคัดและแยก siderophores จากแบคทีเรียให้บริสุทธิ์.....	44
4.2 ผลการศึกษาฤทธิ์ด้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของ siderophores.....	60
บทที่ 5 อภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	72
บทที่ 6 สรุปผลการวิจัย.....	78
เอกสารอ้างอิง.....	80
ภาคผนวก.....	90
ประวัติผู้วิจัย.....	100

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 แสดงเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถสร้าง siderophores.....	5
ตารางที่ 2.2 ชนิดของอนุมูลอิสระ (free radicals) และ reactive oxygen species.....	14
ตารางที่ 2.3 โรคต่างๆที่กลไกการเกิดหรือแสดงออกของโรคเกี่ยวข้องกับอนุมูลอิสระ.....	16
ตารางที่ 2.4 ชนิดของสารแอนติออกซิแดนท์ที่พบในร่างกาย.....	17
ตารางที่ 2.5 แสดงวิธีการต่างๆที่ใช้ในการตรวจวัดขีดความสามารถของ สารแอนติออกซิแดนท์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ.....	21
ตารางที่ 3.1 ชนิดของสารละลายและปริมาตรที่ใช้ในการวัด protein.....	37
ตารางที่ 3.2 ชนิดของสารละลายและปริมาตรที่ใช้ในการวัด lipid peroxidation.....	40
ตารางที่ 3.3 ชนิดของสารละลายและปริมาตรที่ใช้ในการวัด glutathione peroxidase activity .....	42
ตารางที่ 4.1 แสดงค่าการดูดกลืนแสง (OD <sub>550</sub> ) ของ <i>E. coli</i> strain 583 และ 609.....	44
ตารางที่ 4.2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับการผลิต siderophores ในเชื้อ <i>E. coli</i> strain 583.....	45
ตารางที่ 4.3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับการผลิต siderophores ในเชื้อ <i>E. coli</i> strain 609.....	46
ตารางที่ 4.4 ผลการตรวจสอบการสร้าง Siderophore ของ <i>E.coli</i> ตัวอย่างต่าง ๆ.....	47
ตารางที่ 4.5 แสดงค่าการดูดกลืนแสง (OD <sub>550</sub> ) ของ cell suspension <i>Salmonella</i> spp. strain 464 และ 562.....	49
ตารางที่ 4.6 แสดงค่าการดูดกลืนแสง (OD <sub>550</sub> ) ของ cell suspension <i>K. pneumoniae</i> strain 134 และ 506.....	50
ตารางที่ 4.7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับการผลิต Total siderophore ใน เชื้อ <i>Salmonella</i> spp strain 464 และ 562.....	52
ตารางที่ 4.8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับการผลิต Total siderophore ในเชื้อ <i>K. pneumoniae</i> strain 134 และ 506.....	52



## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ 4.9 ผลการตรวจสอบการสร้าง siderophores ของเชื้อ <i>Salmonella</i> spp.....	55
ตารางที่ 4.10 ผลการตรวจสอบการสร้าง siderophores ของเชื้อ <i>K. pneumoniae</i> .....	56
ตารางที่ 4.11 สารที่แยกได้จาก crude siderophores extracts ของเชื้อต่าง ๆ .....	59
ตารางที่ 4.12 ค่า $EC_{50}$ ของเซลล์แต่ละกลุ่มการทดลอง.....	62
ตารางที่ 4.13 ผลของ SE, SK และ AS ต่อ protein oxidation	64
ใน Lead acetate treated-HEK-293 cell line.....	
ตารางที่ 4.14 ผลของ SE, SK และ AS ต่อ protein oxidation	
ใน Fe-NTA treated-HEK-293 cell line.....	65
ตารางที่ 4.15 ผลของ SE, SK และ AS ต่อ lipid peroxidation	
ใน lead acetate และ Fe-NTA treated-HEK-293 cell line.....	68
ตารางที่ 4.16 ผลของ siderophore จาก <i>E.Coli</i> ที่ความเข้มข้นต่างๆ	
ต่อ Glutathione peroxidase (GPx) activity (U/mg protein).....	70
ตารางที่ 4.17 ผลของ siderophore จาก <i>E.coli</i> ที่ความเข้มข้น 2.5 $\mu$ g/ml	
ต่อ glutathione peroxidase activity (U/mg protein).....	71

## สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 2.1 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ siderophores.....	6
รูปที่ 2.2 แสดงการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเหล็กและ siderophores จากนั้นสารประกอบนี้จะถูกขนส่งเข้าสู่เซลล์โดยผ่าน receptor ที่ผิวเซลล์.....	8
รูปที่ 2.3 แสดงการเกิด membrane peroxidation โดยอนุมูลอิสระ X.....	17
รูปที่ 2.4 บทบาทของ glutathione ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึม.....	19
รูปที่ 2.5 หลักการหาขีดความสามารถของสารแอนติออกซิแดนทในการ เป็นตัวต้านอนุมูลอิสระ.....	20
รูปที่ 4.1 กราฟแสดงอัตราการเจริญของ <i>E.coli</i> .....	48
รูปที่ 4.2 กราฟแสดงเวลากับการผลิต siderophores ของ <i>E.coli</i> .....	48
รูปที่ 4.3 กราฟแสดงการผลิต Total siderophores ของ <i>E. coli</i> แต่ละตัวอย่าง.....	51
รูปที่ 4.4 กราฟแสดงอัตราการเจริญของ <i>Salmaonella</i> spp....	53
รูปที่ 4.5 กราฟแสดงอัตราการเจริญของ <i>K. pneumoniae</i> .....	53
รูปที่ 4.6 กราฟแสดงเวลากับการผลิต siderophores ของ <i>Salmaonella</i> spp.....	54
รูปที่ 4.7 กราฟแสดงเวลากับการผลิต siderophores ของ <i>K. pneumoniae</i> .....	54
รูปที่ 4.8 กราฟแสดงการผลิต Total siderophores ของ <i>Salmonella</i> spp.แต่ละตัวอย่าง	57
รูปที่ 4.9 กราฟแสดงการผลิต Total siderophores ของ <i>K. pneumoniae</i> แต่ละตัวอย่าง	58
รูปที่ 4.10 รูปแสดงการตรวจสอบสารที่แยกได้ด้วย UV 254 nm และ FeCl <sub>3</sub> solution....	59
รูปที่ 4.11 ผลของ siderophores ที่ได้จาก <i>E.coli</i> (SE) และ siderophores ที่ได้จาก <i>K. pneumoniae</i> (SK) ต่อการมีชีวิตของเซลล์ HEK-293.....	61
รูปที่ 4.12 ผลของ SE SK และ AS ต่ออัตราการมีชีวิตของ Lead acetate treated-HEK-293 cell line.....	62
รูปที่ 4.13 ผลของ SE, SK และ AS ต่ออัตราการมีชีวิตของ Fe-NTA treated-HEK-293 cell line.....	63
รูปที่ 4.14 ผลของ SE, SK และ AS ต่อ protein oxidation ใน Lead acetate treated-HEK-293 cell line.....	64

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ 4.15 ผลของ SE, SK และ AS ต่อ protein oxidation	
ใน Fe-NTA treated-HEK-293 cell line.....	66
รูปที่ 4.16 กราฟมาตรฐานของ TMP ในการหาปริมาณของ lipid peroxide.....	67
รูปที่ 4.17 ผลของ SE, SK และ AS ต่อ lipid peroxidation	
ใน lead acetate treated-HEK-293 cell line.....	68
รูปที่ 4.18 ผลของ SE, SK และ AS ต่อ lipid peroxidation	
ใน Fe-NTA treated-HEK-293 cell line.....	69
รูปที่ 4.19 Glutathione peroxidase activity (mean±SD.)	
เมื่อกระตุ้นด้วย siderophores ที่ได้จาก <i>E.coli</i> ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	70
รูปที่ 4.20 Glutathione peroxidase activity (mean±SD.)	71
เมื่อกระตุ้นด้วย siderophores SE, SK และ AS ที่ความเข้มข้น 2.5 µg/ml...	

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

Siderophores เป็นสารน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่สร้างและหลังจากเชื้อจุลินทรีย์ เช่น bacteria หรือรา เป็นต้น siderophores มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ สารนี้ถูกสร้างขึ้นและหลั่งออกมาเพื่อทำหน้าที่จับเหล็ก ( $Fe^{3+}$ ) ในสิ่งแวดล้อมเข้าสู่เซลล์เพื่อใช้ในกระบวนการชีวเคมีต่างๆของเซลล์ โดยเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเหล็กและ siderophores จากนั้นสารประกอบนี้จะถูกขนส่งเข้าสู่เซลล์โดยผ่าน receptor ที่ผิวเซลล์ ซึ่งกลไกนี้ถูกพัฒนาขึ้นในเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อที่จะสามารถนำเหล็กมาใช้ประโยชน์ กลไกดังกล่าวจัดเป็นกลไกที่มีความจำเพาะเจาะจงและมีประสิทธิภาพสูง (Telford and Raymond, 1997) จุลชีพจะสร้างและหลั่ง siderophores ออกมา เมื่อสภาพแวดล้อมมีปริมาณเหล็กต่ำ (Stintzi and Raymond, 2000) siderophores นอกจากมีผลต่อเชื้อจุลินทรีย์โดยตรงแล้ว สารนี้ยังเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของพืชที่ดองอาศัย *Rhizobium* spp. ด้วย (Neillands, 1995)

ในทางการแพทย์ desferrioxamine B ซึ่งเป็น siderophores ที่แยกได้จาก bacteria หลายชนิด เช่น *Actinomyces* species (Neillands, 1981), *Staphylococcus pilocus* (Neillands, 1995) ใช้เป็น iron antidote ในผู้ที่ได้รับเหล็กเกินจนเป็นพิษ และเป็นยาที่ใช้รักษาผู้ป่วยธาลัสซีเมีย ซึ่งมีอาการเหล็กเป็นพิษเนื่องจากเม็ดเลือดแดงถูกทำลาย (Olivier and Brittenham, 1997) โรคทางพันธุกรรมนี้พบ 1 ใน 4 ของประชากรไทย และเป็นพาหะประมาณ 40% นอกจากนั้น ยังพบว่า ferrichrome analogs ยังมีฤทธิ์ต้านเชื้อ malaria ชนิด *Plasmodium falciparum* (Shanzer et al, 1991)

ปัจจุบันพบว่ากลไกการเกิดโรคหลายชนิดเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา oxidation ที่เกิดขึ้นในร่างกาย เช่น โรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน โรคมะเร็ง หรือ โรค Alzheimer เป็นต้น (Pietta, 2000) โลหะหนัก เช่น เหล็กสามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยานี้ได้ จากการศึกษาหนึ่งพบว่า exochelin ซึ่งเป็น siderophores เป็น iron chelator ที่สามารถป้องกันความเสียหายของกล้ามเนื้อหัวใจหนูจากปฏิกิริยา oxidation (Horwitz et al, 1998) สาร azochelin จาก *Azobactor* spp. สามารถลดการเกิด hydroxyl radical จากปฏิกิริยา Fenton ได้ (Cornish and Page, 1998)

แบคทีเรียที่เป็นเชื้อก่อโรคทั่วไป เช่น *Escherichia coli* สามารถนำมาเลี้ยงเพื่อให้สร้าง siderophores ได้ โดยทั่วไปสามารถจำแนก siderophores ตามสูตรโครงสร้างทางเคมี เป็น 3 กลุ่ม (Zanninelli et al. 1997) คือ

1. Hydroxamate derivatives โมเลกุลของ siderophores ชนิดนี้จะประกอบด้วย hydroxamate หลายกลุ่มมาต่อกัน เช่น aerobactin, alcalicin, bisucaberin
2. Catecholate derivatives โครงสร้างของ siderophores นี้จะมี catechol ต่อกับ amine derivatives เช่น enterobactin, amonabactin T
3. Phenolate derivatives โครงสร้างของ siderophores นี้จะประกอบด้วย phenolic group ต่อกับ amine derivatives เช่น pyochelin

Siderophores ที่สร้างจากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ นั้นมีหลายชนิดและมีสูตรโครงสร้างทางเคมีแตกต่างกัน ดังนั้นในชุดโครงการวิจัยนี้จึงได้ศึกษาคัดกรองหาแบคทีเรีย ที่สามารถผลิต siderophores ในปริมาณสูง โดยเชื้อที่ศึกษาจะเป็น gram negative rod bacteria ได้แก่ *E. coli*, *K. pneumoniae* และ *Salmonella* spp. ตัวอย่างต่างๆ ที่แยกจากสิ่งคัดหลั่ง เช่น เลือด ปัสสาวะ ของผู้ป่วย โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จ. อุบลราชธานี หลังจากนั้นนำ siderophores ที่ผลิตได้ดังกล่าวมาทำการศึกษาประสิทธิภาพในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในหลอดทดลองและในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด HEK-293 (human embryonic kidney cell)

ในการทดลองจะใช้สารเคมี 2 ชนิดที่มีคุณสมบัติเหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลอิสระ ได้แก่ Ferric-nitritotriacetate (Fe-NTA) และ lead acetate จากนั้นได้ทำการประเมินประสิทธิภาพของ siderophores ในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันเทียบกับ ascorbic acid โดยประเมินจากตัวชี้วัดต่างๆ ดังนี้

- ความเป็นพิษต่อเซลล์
- วัดการทำปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระกับโปรตีนในเซลล์
- วัดการทำปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระกับไขมัน
- วัดผลของ siderophores ในการกระตุ้น glutathione peroxidase

การศึกษาข้างต้นทำให้ทราบกลไกที่แน่นอนของ siderophores ในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยคณะผู้วิจัยมีความคาดหวังว่าการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นแนวทางในการศึกษาวิจัยในสัตว์ทดลองและในมนุษย์ต่อไป รวมทั้งจะสามารถค้นหา siderophores ที่มีศักยภาพเพื่อจะพัฒนาไปใช้ประโยชน์เป็นยาในรูปแบบเภสัชภัณฑ์ต่างๆ ที่มีประสิทธิภาพและปลอดภัยต่อไปด้วย

## 1.2 วัตถุประสงค์

1. คัดกรองหาแบคทีเรียที่สามารถผลิต siderophores ปริมาณสูง โดยเชื้อที่ศึกษาจะเป็น gram negative rod bacteria ได้แก่ *E coli*, *K. pneumoniae* และ *Salmonella* spp. ตัวอย่างต่างๆ ที่แยกจากสิ่งคัดหลั่ง เช่น เลือด ปัสสาวะของผู้ป่วย โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จ. อุบลราชธานี
2. เพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกแล้วว่าผลิต siderophores ปริมาณสูง และทำการสกัดแยก siderophores
3. ศึกษาคุณสมบัติด้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (antioxidant) ของ siderophores ชนิดต่างๆ เพื่อประเมินคุณค่าในการนำมาใช้ประโยชน์

## 1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ:

1. ทราบชนิดของแบคทีเรียที่สามารถสร้างสาร siderophores ในปริมาณสูง
2. ทราบชนิดของ siderophores ที่มีประสิทธิภาพด้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นได้ดี

## 1.4 ขอบเขตของการวิจัย

โครงการวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาคัดกรองแบคทีเรียที่สามารถสร้างสาร siderophores ในปริมาณมาก และศึกษาฤทธิ์ด้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของ siderophores ซึ่งเป็นสารที่สกัดได้จากเชื้อแบคทีเรีย พบว่าปริมาณของ siderophores ที่ได้และทำให้บริสุทธิ์มีปริมาณน้อยมาก ทำให้ไม่สามารถศึกษาฤทธิ์ด้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นในรูปแบบต่างๆได้ เช่นศึกษาในสัตว์ทดลอง หลอดทดลอง เป็นต้น ในการวิจัยนี้ได้ศึกษาเฉพาะในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้จากไตของตัวอ่อนของคน เท่านั้น

## บทที่ 2

### ทบทวนวรรณกรรม

#### 2.1 แสดงถึงทฤษฎีหรือกรอบแนวคิดและวิธีการเชื่อมโยงของ โครงการวิจัยย่อยภายใต้ชุดโครงการวิจัย

เนื้อหาในการศึกษาของโครงการย่อย มีลำดับความต่อเนื่องและความสัมพันธ์กันดังนี้

โครงการวิจัยที่ 1 เป็นการตรวจคัดหาและแยก siderophores จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ และศึกษาถึงกรรมวิธีในการแยกให้ได้สารในสภาพบริสุทธิ์ในปริมาณที่เพียงพอ สำหรับการนำไปศึกษาโครงสร้างและคุณสมบัติทางเคมี

โครงการวิจัยที่ 2 เป็นการนำ siderophores ที่เตรียมได้จากโครงการวิจัยที่ 1 มาศึกษาคุณสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันซึ่งเกิดจากอนุมูลอิสระ โดยทำการศึกษาด้วยเทคนิควิธีต่างๆในหลอดทดลอง

#### 2.2 การทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้องกับชุดโครงการวิจัย

##### 2.2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับ siderophores

Siderophores เป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ น้ำหนักประมาณ 500-1000 daltons (Matzanke *et al*, 1984) เป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติชนิดหนึ่งแบบเมทาโบไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่จุลินทรีย์ทั้งเชื้อแบคทีเรียหรือราผลิตออกมา เมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่มีธาตุเหล็กหรือมีในปริมาณต่ำมาก ปกติแล้วจุลินทรีย์ที่ใช้ออกซิเจน และใช้ออกซิเจนได้บ้าง (aerobic and facultative anaerobic microorganism) สามารถผลิต siderophores ได้แทบทั้งสิ้น (Neilands *et al*, 1995) เชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถสร้าง siderophores ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แสดงเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถสร้าง siderophores

เชื้อ	Siderophore	เอกสารอ้างอิง
<i>Escherichia coli</i>	Enterobactin , Aerobactin	Harjai <i>et al</i> , 1990
<i>Klebsiella</i> spp.	Enterobactin , Aerobactin	Podschun <i>et al</i> , 1992
<i>Salmonella</i> spp.	Enterobactin , Aerobactin	Rabsch <i>et al</i> , 1987
<i>Proteus</i> spp.	Enterobactin , Aerobactin	Neilands, 1995
<i>Serratia</i> spp.	Enterobactin , Aerobactin	Leioff <i>et al</i> , 1994
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pyochelin, Pyoverdin	Ankenbauer <i>et al</i> , 1999
<i>Yersinia</i> spp.	Yersiniabactin	Peery <i>et al</i> , 1999
<i>Y. enterocolitica</i>	Yersinophore	Chambers and Sokol, 1994
<i>Rhodoturula pilimanane</i>	Rhodotorulic acid	Curtis <i>et al</i> , 1968
<i>Staphylococcus aureus</i>	Aurochelin	Coural <i>et al</i> , 1977
<i>Mycobacterium tubercubsis</i>	Exochelin, Mycobactin	Gobin <i>et al</i> , 1995
<i>Aeromonas hydrophilla</i>	Amonabactin	Telford and Raymond, 1998
<i>Streptomyces pilosus</i>	Desferroxamine B	Neilands, 1995
<i>Bordetella pertusis</i>	Alcalicin	Hou <i>et al</i> , 1998
<i>Alteromonas hydroplanktis</i>	Bisucaberin	Hou <i>et al</i> , 1998

## 2.2.2 การจำแนกกลุ่มของ siderophores

Siderophores มีโครงสร้างหลายลักษณะ ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ ดังนั้น siderophores ที่สร้างจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีสูตรโครงสร้างแตกต่างกัน และ จุลินทรีย์ชนิดหนึ่งๆสามารถสร้าง siderophores ได้หลายชนิด เช่น *Escherichia coli* (*E.coli*) สร้าง enterobactin และ aerobactin, *Pseudomonas aeruginosa* สร้าง pyochelin และ pyoverdin, *Klebsiella pneumoniae* สร้าง enterochelin และ aerobactin (Podschun, 1992), *Staphylococcus aureus* สร้าง aureochelin (Courcol, 1997) เป็นต้น ปัจจุบันสามารถทราบ ลักษณะโครงสร้างทางเคมีแล้วไม่น้อยกว่า 200 โครงสร้าง siderophores สามารถแบ่งตาม ลักษณะโครงสร้างทางเคมีออกเป็น 3 กลุ่มโดยมีสูตรโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 2.1 ได้แก่

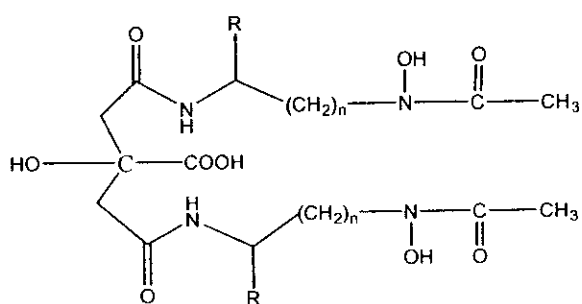


2.2.2.1 Hydroxamate derivatives โมเลกุลของ siderophores ชนิดนี้จะประกอบด้วย hydroxamate หลายกลุ่มมาต่อกัน เช่น aerobactin (1), alcalicin (2) , bisucaberin (3)

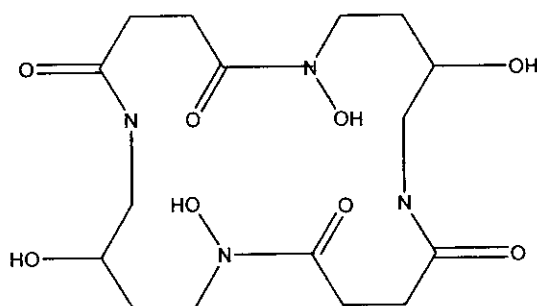
2.2.2.2 Catecholate derivatives โครงสร้างของ siderophores นี้จะมี catechol ต่อกับ amine derivatives เช่น enterobactin (4), amonabactin T (5)

2.2.2.3 Phenolate derivatives โครงสร้างของ siderophores นี้จะประกอบด้วย phenolic group ต่อกับ amine derivatives เช่น pyochelin (6)

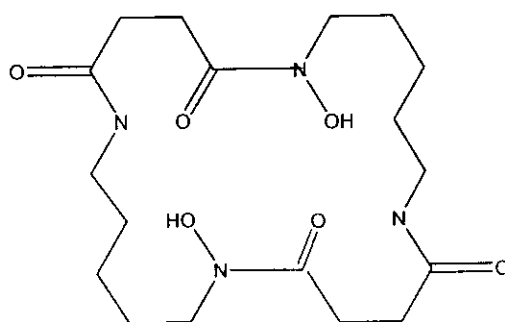
รูปที่ 2.1 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ siderophores



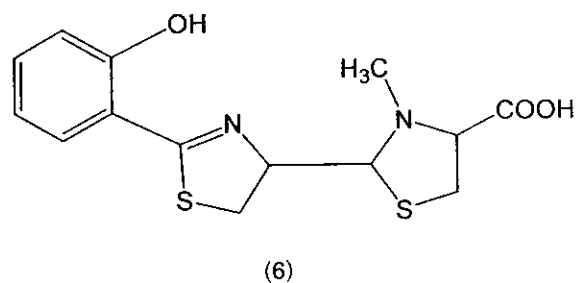
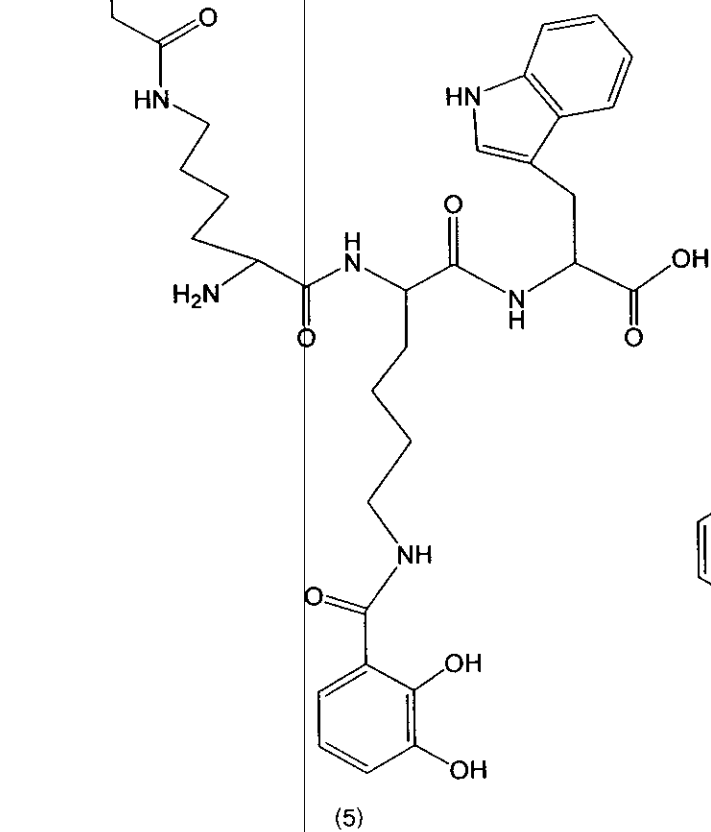
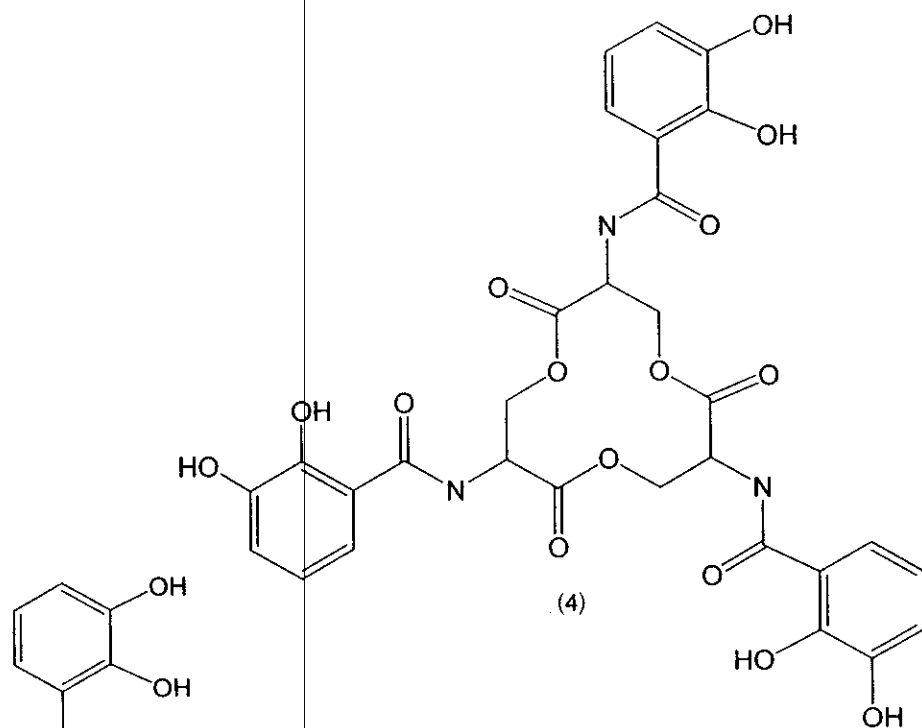
(1)



(2)



(3)

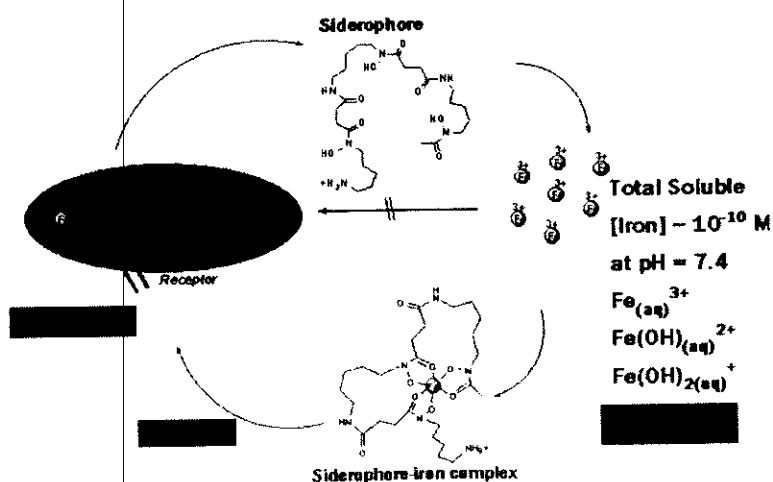


### 2.2.3 ความสำคัญของ siderophores ต่อเชื้อจุลินทรีย์

Siderophores เป็น chelating agents ที่จับเหล็กในรูป ferric iron ( $\text{Fe}^{3+}$ ) นอกจาก  $\text{Fe}^{3+}$  แล้วยังพบว่า siderophores สามารถจับกับโลหะหนักอื่นๆ ได้อีก เช่น  $\text{Cd}(\text{II})$ ,  $\text{Cu}(\text{II})$ ,  $\text{Ni}(\text{II})$ ,  $\text{Pb}(\text{II})$ ,  $\text{Zn}(\text{II})$  และขนส่งเข้าเซลล์ได้ (Neilands, 1995) จากการศึกษากลไกการควบคุมการสร้าง siderophores ใน *Azotobacter vinelandii* (Tindale *et al*, 2000) ซึ่งสร้าง siderophore 2 ชนิดคือ azobactin และ catecholate siderophores พบว่าเชื้อจะหยุดสร้าง azobactin เมื่อความเข้มข้นของเหล็กในสิ่งแวดล้อมมีมากพอ แต่จะยังคงสร้าง catecholate siderophores แม้ว่าความเข้มข้นของเหล็กในสิ่งแวดล้อมสูง สันนิษฐานว่าการสร้าง azobactin นี้ถูกควบคุมโดยภาวะ oxidative stress และ superoxide stress โดย siderophores ที่หลั่งออกมาจะจับกับเหล็ก ( $\text{Fe}^{3+}$ ) ในสิ่งแวดล้อม เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเหล็กและ siderophores จากนั้นสารประกอบนี้จะถูกขนส่งเข้าสู่เซลล์โดยผ่าน receptor ที่ผิวเซลล์ (Crosa, 1989, Neilands, 1993, Guerinot, 1994) ในธรรมชาติเหล็กส่วนใหญ่อยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ (ferric ion,  $\text{Fe}^{3+}$ ) ส่วนเหล็กที่ละลายน้ำและเซลล์นำไปใช้ประโยชน์ได้คือ ferrous ion ( $\text{Fe}^{2+}$ ) นั้นมีปริมาณน้อยและไม่เพียงพอต่อความต้องการของ จุลินทรีย์ ดังนั้นเพื่อความอยู่รอดจุลินทรีย์จึงต้องพัฒนากลไกต่างๆ เพื่อที่จะสามารถนำเหล็กมาใช้ประโยชน์ กลไกที่มีความจำเพาะเจาะจงและมีประสิทธิภาพสูงอันหนึ่งคือ การสร้างและหลั่ง siderophores ออกมานอกเซลล์เพื่อจับเหล็กและขนส่งเข้าเซลล์ (Crosa, 1989, Guerinot, 1994, Neiland, 1995) (รูปที่ 2.2)

รูปที่ 2.2 แสดงการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเหล็กและ siderophores จากนั้นสารประกอบนี้จะถูกขนส่งเข้าสู่เซลล์โดยผ่าน receptor ที่ผิวเซลล์

(ภาพจาก <http://www.chem.duke.edu/~alc/labgroup/tf.htm>)



ธาตุเหล็ก (Iron: Fe) มีบทบาทสำคัญหลายประการในการทำงานของเซลล์ อาทิ เป็นแหล่งให้พลังงานแก่เซลล์ และมีความจำเป็นต่อกระบวนการทางชีวภาพของจุลินทรีย์แทบทุกชนิด ยกเว้นแบคทีเรียพวก *Lactobacillus* บางสายพันธุ์ที่ไม่จำเป็นต้องใช้ธาตุเหล็กในการดำรงชีวิต ธาตุเหล็กพบมากเป็นอันดับ 4 ของธาตุทั้งหมด บนโลก มีค่า oxidation state เปลี่ยนแปลงในช่วง -2 ถึง +6 แต่พบว่า ค่า oxidation state +2 และ +3 เท่านั้นที่มีบทบาทสำคัญและจำเป็นต่อระบบทางชีวภาพ เช่น ขนส่งอิเล็กตรอน เป็นองค์ประกอบสำคัญของเลือด เป็นต้น นอกจากนี้ ธาตุเหล็กเป็น cofactor ของเอนไซม์ที่สำคัญต่างๆ เช่น cytochromes, succinyl dehydrogenase, catalase, peroxidase, ribotide reductase, nitrogenase เป็นต้น (Litwin, 1993) เอนไซม์เหล่านี้มีความสำคัญต่อกระบวนการทางชีวภาพและการเจริญเติบโตของเซลล์ นอกจากนี้เหล็กยังเกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีนบางชนิดของจุลินทรีย์ เช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับการนำเหล็กเข้าเซลล์และยีนที่สร้าง virulence factors ต่างๆ (Litwin, 1993, Braun, 1999)

นอกจากนั้น siderophores ยังสัมพันธ์กับการเป็นเชื้อก่อพยาธิสภาพได้รุนแรงของจุลินทรีย์ (virulence strains) โดยเมื่อเชื้อจุลินทรีย์บุกรุกเข้า host cell ซึ่งเหล็กของ host มักจะอยู่ในส่วนของ intracellular fluid แต่มีบางส่วนปริมาณน้อยอยู่ภายนอกเซลล์ในส่วนของ extracellular fluid โดยเหล็กจะจับกับ glycoprotein, transferrin ในซีรัม และ lactoferrin ในสารคัดหลั่ง (Neillands, 1995) จุลินทรีย์ที่มีการสังเคราะห์สารพวก siderophore จะสามารถใช้สารนี้แย่งจับ  $Fe^{3+}$  ใน transporting proteins ของ host ทำให้จุลินทรีย์สามารถเจริญใน host ต่อไปได้ (Coural *et al*, 1997)

## 2.2.4 Enterobacteriaceae

เป็น pathogenic gram negative rod bacteria ในคนและสัตว์ สามารถแบ่งย่อยได้เป็น 5 tribes ได้แก่ Escherichieae, Klebsiellae, Proteaeae, Yersineae และ Erwiniaceae

### 2.2.4.1 ลักษณะทางกายภาพของ enterobacteriaceae

- Cell Bacteria ในวงศ์นี้จะมี cell ยาว 2  $\mu m$  และเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.4  $\mu m$  บางชนิด motile และ encapsulate ทุกชนิดมี outer cell membrane เป็น polysaccharides
- Colony ลักษณะ colony จะเป็นแบบ circular, convex หรือ mucoid ในชนิดที่ไม่มี capsule ลักษณะ colony จะ flat, irregular และมี granule colony ของเชื้อในวงศ์นี้เกือบทุกชนิดไม่มีสี

#### 2.2.4.2 คุณสมบัติทางชีวเคมีที่เฉพาะสำหรับ enterobacteriaceae ที่สามารถใช้จำแนก bacteria วงศ์นี้ออกจากวงศ์อื่น ๆ ได้

- Glucose fermentation เป็นลักษณะเด่นของ bacteria ในวงศ์นี้ โดยทุกชนิดสามารถ ferment น้ำตาล glucose ได้ผลิตภัณฑ์คือ lactic, formic และ acetic acids บางชนิดสามารถสร้างก๊าซ  $H_2$  หรือ  $CO_2$  ได้

- Lactose fermentation สามารถใช้กระบวนการนี้แยก bacteria ใน enterobacteriaceae ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ lactose fermentors และ lactose nonfermentors โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อดังต่อไปนี้

- EMB agar ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ เฉพาะ lactose fermentors จะให้ colony สีม่วงถึงดำ

- MacConkey agar เฉพาะ lactose fermentors จะให้ colony สีส้มพุดถึงแดงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้

#### 2.2.5 Bacteria ใน Enterobacteriaceae ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

##### 2.2.5.1 *Escherichia coli*

เป็น gram negative rod bacteria ใน tribe escherichieae ขนาด 1.1-1.5 X 2.0-6.0  $\mu m$  พบในลักษณะเดี่ยวหรืออาศัยอยู่เป็นคู่อาจพบ capsules หรือ microcapsules ได้เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 37 °C โดยปกติมักพบอยู่ภายในลำไส้ของคน เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรค ทางเดินปัสสาวะอักเสบ (cystitis), อุจจาระร่วง (diarrhea) นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการติดเชื้อในกระแสโลหิต และการอักเสบของอวัยวะภายในต่างๆ ด้วย (Kingsbury and Wagner, 1990)

*E. coli* เมื่อเลี้ยงในสภาวะปราศจากเหล็ก หรือมีเหล็กในความเข้มข้นไม่เกิน  $10^{-8}$  M พบว่าสามารถสร้าง siderophores ได้ทั้งกลุ่ม hydroxamate และ catecholate ได้แก่ aerobactin และ enterobactin การควบคุมปริมาณเหล็กจะทำให้การสร้าง aerobactin และ enterobactin เพิ่มขึ้น 5 ถึง 10 เท่า (Harjai et al, 1990)

##### 2.2.5.2 *Klebsiella pneumoniae*

เป็น gram negative rod bacteria ใน tribe klebsiellae เป็น bacteria ที่เคลื่อนที่ไม่ได้ ไม่มี flagella มีคุณสมบัติเป็น facultative anaerobic bacteria คือสามารถเกิดกระบวนการเมตาบอลิซึมได้ทั้งภาวะใช้ออกซิเจน และไม่ใช้ออกซิเจน ทำให้เกิดปอดอักเสบ ในผู้ป่วยที่เป็นปอดเรื้อรัง มักพบเชื้อนี้ในทางเดินหายใจของคนปกติประมาณ 5 – 10 % นอกจากนี้ยังเป็นสาเหตุทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะได้อีกด้วย ความสามารถในการก่อโรคของเชื้อนี้เกิด

เนื่องมาจากการมี capsule ซึ่งเป็นสิ่งที่ช่วยป้องกันไม่ให้เชื้อถูกทำลายจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Hou et al, 1998)

เมื่อนำ *K. pneumoniae* มาเลี้ยงในอาหารที่ปราศเหล็กหรือมีปริมาณเหล็กในความเข้มข้นไม่เกิน  $10^{-8}$  M พบว่าเชื้อ *K. pneumoniae* สามารถสร้าง siderophores ได้ทั้งกลุ่ม hydroxamate และ catecholate ได้แก่ enterobactin และ aerobactin ตามลำดับ (Rabsch et al, 1987)

### 2.2.5.3 *Salmonella* spp.

เป็น gram negative rod bacteria ใน tribe escherichieae มีความสำคัญทางการแพทย์คือทำให้เกิดโรคท้องร่วงทั้งนี้เพราะ *Salmonella* spp. ประกอบไปด้วย serotypes ต่างๆ มากมายที่พบทั่วไปในคนและสัตว์นานาชนิด ดังนั้นการแพร่ของ *Salmonella* spp. จากสัตว์มาสู่คนจึงเป็นไปได้ง่ายโดยการรับประทานอาหารที่ไม่ค่อยสุก การจัดแบ่งกลุ่ม *Salmonella* spp. ทำได้ยากไม่สามารถแยกได้ชัดเจนด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมี ต้องใช้คุณสมบัติทางภูมิคุ้มกันวิทยาช่วย *Salmonella* spp. มี serotypes ต่างๆกว่า 1500 ชนิด แต่ละชนิดมีความหมายเหมือน 1 species

การแบ่ง *Salmonella* spp. ออกเป็นกลุ่มๆ ตามประเภทของ host (จันทรเพ็ญ วิวัฒน์และคณะ, 2536) เช่น

- กลุ่มที่ทำให้เกิดโรคในคน คือ *S. typhi*, *S. paratyphi* A, *S. paratyphi* B และ *S. paratyphi* C
- กลุ่มที่เกี่ยวข้องกับสัตว์บางชนิด เช่น *S. choeraesuis* ในหมู *S. pullorum* ในนกและ *S. dublin* ในวัวควายและอื่นๆ

กลุ่มที่มี host range กว้างซึ่งประกอบไปด้วย *Salmonella* spp. มากมายหลายชนิด โดยเฉพาะ *S. typhimurium* ซึ่งพบในสัตว์หลายชนิดติดต่อกันมาเป็นคน เป็นสาเหตุของท้องร่วง ที่แยกได้บ่อยที่สุด ในการทำให้เกิดโรคนั้น *Salmonella* spp. ทำให้เกิดโรค

### 2.2.6 การประยุกต์ใช้ Siderophores

เนื่องจาก siderophores มีคุณสมบัติที่สามารถจับกับเหล็กและโลหะหนักต่างๆได้ จึงเป็นที่สนใจที่จะพัฒนาสารกลุ่มนี้มาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น ด้านการแพทย์ ให้เป็นสารต้านพิษโลหะหนัก (antidote) เพื่อจับโลหะหนักที่เป็นพิษในร่างกาย ปัจจุบันมีการนำ siderophores มาใช้เป็นยาจับเหล็กคือ desferrioxamine หรือ deferoxamine (DFO, Desferal<sup>®</sup>) ซึ่งแยกได้จากเชื้อรา *Streptomyces pilosus* (Bickle et al, 1960) สารนี้ถูกนำมาใช้กับผู้ป่วยธาลัสซีเมีย

(Modell *et al.*, 1974, Modell, 1979) เพื่อกำจัดเหล็กจำนวนมาก (iron load burden) ซึ่งถูกปล่อยออกมาเมื่อเม็ดเลือดแดงแตกสลาย ในระยะเวลาที่สามสิบปีที่มีการใช้ DFO รักษาผู้ป่วยธาลัสซีเมีย พบว่ายาสามารถต้านพิษของเหล็กที่ก่อให้เกิดการทำลายอวัยวะต่างๆได้ เป็นผลให้ผู้ป่วยมีอายุยืนยาวขึ้น (Olivier and Brittenham, 1997, Bergeron *et al.*, 1998) แต่อย่างไรก็ตาม DFO มีข้อจำกัดหลายประการ (Peter *et al.*, 1983) กล่าวคือ ยาไม่ดูดซึมจากทางเดินอาหารทำให้ไม่สะดวกในการบริหารยา เพราะจะต้องฉีดเข้าหลอดเลือดดำ ประสิทธิภาพในการจับเหล็กค่อนข้างต่ำ คือจับเหล็กในร่างกายได้เพียงร้อยละ 5 ของปริมาณที่ให้เข้าไป และทำให้เกิดอาการข้างเคียงต่างๆ นอกจากนี้ยามีราคาแพงค่อนข้างแพง เนื่องจากข้อจำกัดดังกล่าวนี้ จึงยังมีความจำเป็นที่จะต้องคิดค้นและพัฒนายาใหม่ที่มีคุณสมบัติจับเหล็ก เพื่อนำมาใช้แทน DFO สารที่เคยมีการศึกษาวิจัย คือ deferiprone (Hider *et al.*, 1982) และ HBED (Bergeron *et al.*, 1998) แต่ผลทางคลินิกในระยะยาวพบว่า deferiprone มีประสิทธิภาพไม่ดีพอในการควบคุมระดับเหล็กในร่างกายของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย จึงทำให้บริษัทผู้ผลิต (APOTEX pharmaceuticals, Weston Canada) ยกเลิกการศึกษาวินิจฉัยยาในคนเมื่อปี ค.ศ.1996 ส่วน HBED นั้นยังไม่ได้มีการศึกษาทางคลินิก

เมื่อเรารู้ว่ามีรายงานผลการศึกษาวินิจฉัยจำนวนมากแสดงให้เห็นว่า DFO และ siderophores ชนิดอื่นๆ นอกจากจะมีคุณสมบัติจับกับเหล็กแล้ว ยังมีคุณสมบัติด้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Bailey and Reinke, 2000, Chen *et al.*, 2000, Chen and Sulik, 2000) โดยที่เหล็กมีบทบาทสำคัญในปฏิกิริยาทางชีวภาพต่างๆ ที่ก่อให้เกิดอนุมูลอิสระ (free radicals) ดังนั้นฤทธิ์ด้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของ siderophores จึงน่าจะเกิดจากการที่สารนี้ไปจับเหล็กไว้นั่นเอง อนุมูลอิสระเหล่านี้มีความสามารถสูงในการทำลายสารชีวโมเลกุล เช่นโปรตีน ไขมัน และดีเอ็นเอ จึงส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาการอักเสบ หรือการทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อ การที่ siderophores มีคุณสมบัติจับกับเหล็กและยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันนี้ จึงอาจจะมีประโยชน์ในการป้องกันเซลล์และเนื้อเยื่อมิได้รับอันตรายจากสารเคมีและรังสีซึ่งเหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลอิสระ ผลงานวิจัยที่ยืนยันสมมุติฐานนี้ ได้แก่ การศึกษาของ Zaragoza *et al.* (1999) ใน rat hepatocyte culture พบว่า deferoxamine สามารถป้องกันเซลล์ตับจากพิษของโคเคน (cocaine) ได้ และ การศึกษาของ Mansour (2000) ในหนูถีบจักร (mice) พบว่า deferoxamine สามารถปกป้องตับจากพิษของ carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) ได้ แสดงว่า deferoxamine และ deferoxamine สามารถป้องกันเซลล์ (cytoprotective) จากการทำลายของอนุมูลอิสระได้ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาวิจัยที่ทำในเซลล์เพาะเลี้ยงและอวัยวะอื่นๆของสัตว์ทดลองที่ยืนยันประสิทธิภาพของ siderophores ใน

การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันอันเกิดจากอนุมูลอิสระ Weingberg (1995) พบว่า siderophores สามารถป้องกันอันตรายจากอนุมูลอิสระที่หลั่งออกมาจากเม็ดเลือดขาวได้ การศึกษาทดลองในหนูโดยการให้ยา methamphetamine ซึ่งเหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลอิสระ พบว่า DFO สามารถป้องกันการทำลายเนื้อเยื่อสมองจากยานี้ได้ (Bryan et al, 1998)

นอกเหนือจาก DFO แล้ว พบว่า siderophores ชนิดอื่น เช่น exochelins ซึ่งสร้างจาก *Mycobacterium tuberculosis* ก็มีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้เช่นกัน (Horwitz et al, 1998) Cornish and Page (1998) รายงานว่า azotochelin และ protochelin สามารถลดการเกิด hydroxyl radical จากปฏิกิริยา Fenton ได้ อย่างไรก็ตามก็ดียังไม่ค่อยได้มีการศึกษาประสิทธิภาพในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน ของ siderophores ตัวอื่นๆ

Siderophores ได้รับความสนใจในการพัฒนาเพื่อนำไปใช้ในหลายด้าน ได้แก่ด้านการแพทย์ การเกษตร และด้านสิ่งแวดล้อม

#### 2.2.6.1. ด้านการแพทย์

กรณีผู้ป่วยมีธาตุเหล็กในร่างกายมากเกินไป (ในส่วนของฮีโมโกลบิน) โดยเฉพาะผู้ที่เป็นโรค b-thalassaemia นั้น ปัจจุบันวงการแพทย์สมัยใหม่ได้ทำการรักษาโรคนี้ด้วยการฉีดยาชนิดหนึ่งที่มีชื่อว่า Desferral ซึ่งเป็น trihydroxamates siderophore desferrioxamine-B แทนการถ่ายเลือด แต่ยังมีปัญหาและมีผลข้างเคียงอยู่บ้าง (Peter et al, 1983) ปัจจุบันพยายามหาไซเดอโรฟอร์ตัวใหม่มาใช้ทดแทน Desferral

#### 2.2.6.2. ด้านการเกษตร

สรุปแนวทางที่ไซเดอโรฟอร์มีอิทธิพลต่อวงจรชีวิตของพืชดังนี้

1. Siderophores มีบทบาทในดิน ทำให้เกิดการละลายและการขนส่งเหล็กเข้าสู่พืชได้ (Deshwal et al, 2003, Nienaber et al, 2001, Mirleau et al, 2000)
2. Siderophores จากจุลินทรีย์ที่ก่อโรคพืช ใช้ในการคาดคะเนปริมาณเหล็กในแหล่งที่อยู่อาศัย และปริมาณจุลินทรีย์ก่อโรคพืชที่ต้องการธาตุเหล็ก
3. Siderophores สามารถทำงานร่วมกับ antibiotic, ฮอริโมน และ lytic activities บริเวณรากพืช ทำให้มีการเร่งหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชได้ (Khandelwal et al, 2002, Barriuso et al, 2005, Kumar et al, 2005)

#### 2.2.6.3. ด้านสิ่งแวดล้อม

นอกจากไซเดอโรฟอร์จะจับกับเหล็กได้ดีแล้ว ( $K_f$  ประมาณ  $10^{18}$ - $10^{51}$ ) ยังมีความสามารถในการจับกับโลหะหนักอื่นๆ ได้ดีอีกด้วย เช่น นิกเกิล (Ni) สังกะสี (Zn) ทองแดง (Cu) อะลูมิเนียม (Al) โครเมียม (Cr) แกลเลียม (Ga) แมงกานีส (Mn) วานาเดียม (V) และโมลิบดีนัม



(Mo) เป็นต้น (Enyedy *et al*, 2004, Visca *et al*, 1992) ดังนั้นจึงอาศัยคุณสมบัติในข้อนี้นำมาใช้ในการลดความเป็นพิษของโลหะหนักบางชนิดที่ปนเปื้อนทั้งในน้ำและในดิน

## 2.2.7 อนุมูลอิสระ

### 2.2.7.1 อนุมูลอิสระคืออะไร

อนุมูลอิสระ (free radicals) คือ โมเลกุลหรืออิออนที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว อยู่รอบนอกและมีอายุสั้นมากประมาณ 1 หรือ  $10^{-3}$ - $10^{-10}$  วินาที จึงจัดว่าเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรและว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมี โดยสามารถตรวจวัดด้วย Electron Spin Resonance (ESR) โมเลกุลหรืออิออนชนิดนี้เป็นตัวก่อให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ ตัวอย่างของอนุมูลอิสระ (free radicals) และ reactive oxygen species (ROS) ดังในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ชนิดของอนุมูลอิสระ (free radicals) และ reactive oxygen species (ROS)

ชื่อ	สูตรโครงสร้าง
Superoxide anion radical	$O_2^{\cdot -}$
Hydroxyl radical	$HO^{\cdot}$
Peroxide radical	$ROO^{\cdot}$
Peroxyl radical	$LOO^{\cdot}$
Hydrogen peroxide	$H_2O_2$
Ozone	$O_3$
Singlet oxygen	$^1O_2$
Hydrogen radical	$H^{\cdot}$
Methyl radical	$CH_3^{\cdot}$

### 2.2.7.2 ชนิดของอนุมูลอิสระ สามารถแบ่งได้อย่างง่ายๆ คือ

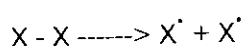
1. อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกาย ซึ่งเป็นผลมาจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของร่างกายเอง
2. อนุมูลอิสระจากภายนอกร่างกาย
  - การติดเชื้อ ทั้งจากแบคทีเรียและไวรัส
  - การอักเสบชนิดมีที่ทราบสาเหตุ (autoimmune diseases) เช่น ข้ออักเสบรูมาตอยด์ โรคเก๊าท์

- รังสี พบว่ารังสีที่มีความถี่ของพลังแม่เหล็กไฟฟ้าสูง เช่น รังสี UV, รังสี X และ รังสีแกมมา จะเกิดการถ่ายทอดพลังงาน ด้วยกลไกที่เรียกว่า photoionization และ high-energy ionization ซึ่งจะทำให้อะตอมของโมเลกุลธรรมดาเกิดเป็นอนุมูลอิสระได้

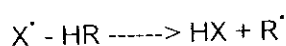
- สิ่งแวดล้อมที่เป็นมลพิษ เช่น ควันเสียและเขม่าจากเครื่องยนต์ ควันบุหรี่ ยาฆ่าแมลง

- การออกกำลังกายอย่างหักโหม  
โดยหลักการทางเคมีอนุมูลอิสระ และ ROS เกิดโดย

#### 1. ปฏิกริยาการแยกอย่างสมมาตร (symmetric separation)



#### 2. อนุมูลอิสระอื่นๆ



จากที่กล่าวมาแล้วว่าอนุมูลอิสระถูกสร้างขึ้นมาจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของร่างกายเองและในภาวะที่ผิดปกติ เช่น ภาวะของโรคหรือภาวะที่ร่างกายแวดล้อมด้วยมลพิษ โดยในภาวะที่ผิดปกติจะส่งผลให้ร่างกายเกิดการสะสมของอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นจำเป็นที่ร่างกายต้องหาทางป้องกันจากการโดนทำลายจากอนุมูลอิสระเหล่านั้น สิ่งที่ร่างกายสร้างขึ้นเพื่อปกป้องตัวเองก็คือระบบแอนติออกซิเจน (antioxidants) ซึ่งประกอบไปด้วยสารหรือเอนไซม์ต่างๆ ที่ความเข้มข้นต่ำๆ ซึ่งจะสามารถชะลอหรือป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชันของสาร (substrate) ที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา โดยสาร (substrate) เหล่านี้รวมถึงสารเกือบทุกชนิดในร่างกาย เช่น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต ดีเอ็นเอ แต่อย่างไรก็ตามมีบางภาวะที่ปริมาณอนุมูลอิสระมีมากเกินไปกว่าที่ระบบแอนติออกซิเจนจะจัดการได้ จะเกิดภาวะที่เรียกว่า oxidative stress ขึ้นมาซึ่งจะส่งผลกระทบต่อเซลล์สิ่งมีชีวิต เช่น การทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของดีเอ็นเอ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และเกิดการทำลายของกลุ่มโมเลกุลที่มีพันธะ S-H และเยื่อหุ้มเซลล์ ก่อให้เกิดผลเสียต่อเซลล์ และการทำลายเซลล์ ซึ่งเป็นสาเหตุ ของการแก่ (aging) และรุนแรงไปถึงการเกิดเป็นโรคภัยไข้เจ็บต่างๆ เช่น เส้นเลือดตีบ โรคเกี่ยวกับภูมิคุ้มกัน (autoimmune disease) โรคที่เกิดจากการที่เลือดกลับไปเลี้ยงอวัยวะที่เคยมีการตีบตันของเส้นเลือดในระยะสั้นๆ มาก่อน (reoxygenation injury, reperfusion injury) รวมไปถึงโรคมะเร็งเป็นต้น

อนุมูลอิสระสามารถก่อให้เกิดการทำลายเซลล์ มีผลต่อไขมัน โปรตีน และดีเอ็นเอของเซลล์ ดังนั้นอนุมูลอิสระจึงเป็นสาเหตุหรือมีส่วนร่วมในการเกิดหรือแสดงออกของโรคหลายชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 โรคต่างๆที่กลไกการเกิดหรือแสดงออกของโรคเกี่ยวข้องกับอนุมูลอิสระ

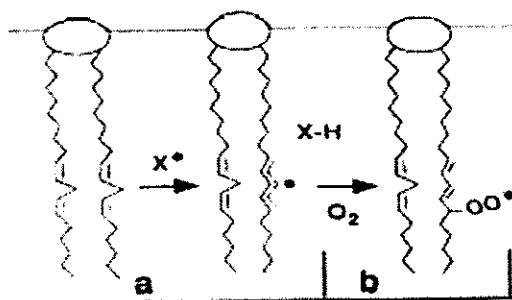
Inflammatory disorders	Reperfusion injury
Rheumatoid arthritis	Atherosclerosis
Alcoholism	Lung disorders
Iron overload	Tumor promotion
Certain blood disorders	Parkinson's disease
Retinopathy of prematurity	Porphyria
Toxic liver injury	

แม้จะยังไม่แน่ชัดว่าอนุมูลอิสระเป็นต้นเหตุของโรคดังกล่าวหรือแค่มีส่วนร่วมให้การแสดงออกของโรคมีความรุนแรงมากขึ้น อย่างไรก็ตาม มีการศึกษาที่พบว่าเซลล์ที่เป็นโรคมีโอกาสการเกิดอนุมูลได้สูงกว่าเซลล์ปกติมาก ซึ่งอนุมูลอิสระเหล่านี้อาจเป็นตัวการในการทำให้อาการของโรครุนแรงขึ้น

อนุมูลอิสระสามารถทำร้ายเซลล์ด้วยการทำปฏิกิริยากับเซลล์เมมเบรนหรือทำการเปลี่ยนแปลงระบบการทำงานของเอนไซม์ต่างๆภายในเซลล์ พบว่า phospholipids ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเซลล์เมมเบรนสามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระได้ดีที่ตำแหน่งของกรดไขมันไม่อิ่มตัว เรียกว่า ขบวนการ lipid peroxidation ซึ่งจะทำให้คุณสมบัติของเซลล์เมมเบรนเปลี่ยนไป รวมทั้งความสามารถในการซึมผ่านของสารต่างๆผ่านเซลล์เมมเบรนดังกล่าวจะเปลี่ยนไปด้วย ซึ่งนำไปสู่การบาดเจ็บและทำลายเซลล์ในที่สุด

การเกิดขบวนการ lipid peroxidation มักจะเริ่มที่อะตอม hydrogen ของ methylene group ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวบนเซลล์เมมเบรน ดังแสดงในรูปที่ 2.3

รูปที่ 2.3 แสดงการเกิด membrane peroxidation โดยอนุมูลอิสระ X



การทำลายโมเลกุลที่เป็นต้นเหตุการเกิดของอนุมูลอิสระนับเป็นกลไกการทำงานของระบบแอนติออกซิแดนซ์ที่สำคัญกลไกหนึ่ง ซึ่งเป็นการทำงานที่อาศัยเอนไซม์หรือไม่ก็ได้

### 2.2.8 สารแอนติออกซิแดนซ์

สารแอนติออกซิแดนซ์ คือสารที่สามารถทำลายอนุมูลอิสระโดยการจับกับอนุมูลอิสระ ลดการเกิดปฏิกิริยา ณ จุดตั้งต้นหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ สารแอนติออกซิแดนซ์ที่มีอยู่ด้วยกันหลายชนิดดังในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ชนิดของสารแอนติออกซิแดนซ์ที่พบในร่างกาย

#### สารแอนติออกซิแดนซ์ที่พบในร่างกายและจัดเป็นเอนไซม์ ได้แก่

Superoxide dismutase (SOD)	Catalase (CAT)
Glutathione peroxidase (GPX)	Glutathione reductase (GR)
Glutathione S-transferase (GST)	

#### ส่วนสารแอนติออกซิแดนซ์ที่พบในร่างกาย แต่ไม่จัดเป็นเอนไซม์ ได้แก่

Glutathione	Haptoglobin
Lipoic acid	Hemopexin
Ceruloplasmin	Uric acid
Albumin	Bilirubin
Transferrin	Cysteine

#### ส่วนสารแอนติออกซิแดนซ์ที่พบในอาหารและไม่จัดเป็นเอนไซม์ ได้แก่

Tocopherols	Thiols, Inosine, Taurine, Pyruvate
Carotenoids	Gallic acid, Flavonoids
Ascorbic acid, Steroids, Ubiquinones,	Trolox, BHT, BHA

### 2.2.9 กลูตาไธโอน

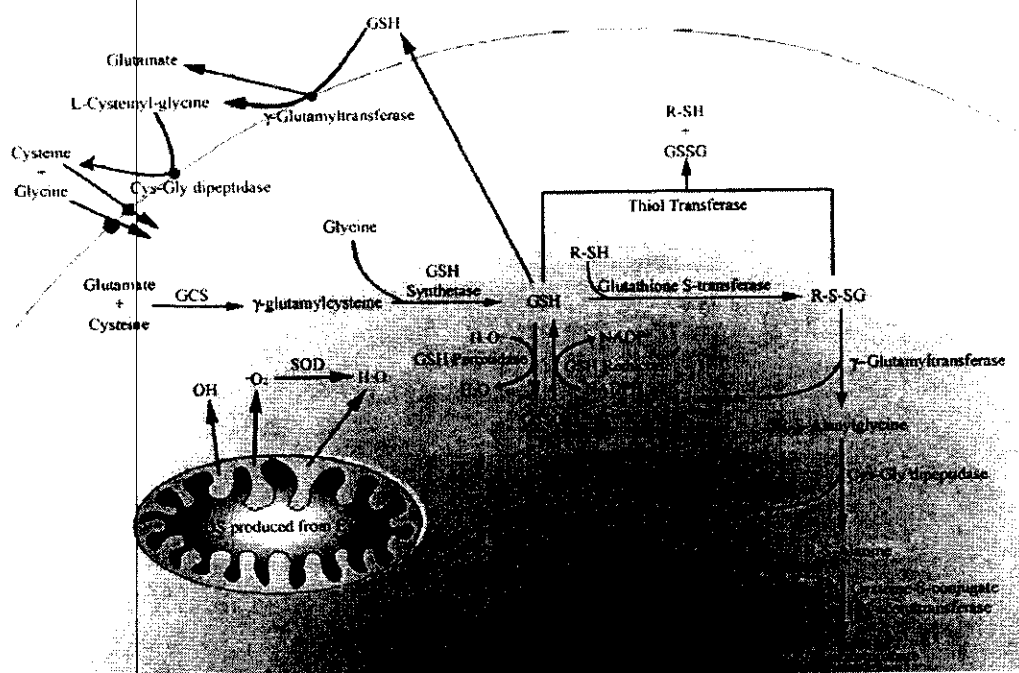
กลูตาไธโอน (glutathione, GSH) เป็นสารที่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบแต่มีโซ่สารพวกโปรตีน (nonprotein thiol compound) ที่พบได้มากที่สุดเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โครงสร้างประกอบด้วยเปปไทด์ 3 ตัว (tripeptide) ในรูปของ  $\gamma$ -L-Glu-L-Cys-Gly (Sies, 1999) นอกจากจะพบอยู่ในรูปของ GSH แล้ว ยังสามารถพบอยู่ในรูปรีดิวซ์ หรือ glutathione disulfide (GSSG) ได้อีกด้วย

GSH มีหน้าที่หลายประการ หน้าที่หลัก คือการช่วยกำจัดสารพิษภายในเซลล์โดยการเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ (scavenger) ส่วนหน้าที่อื่นๆ ได้แก่การรักษาระดับความแรงของ thiol redox ภายในเซลล์โดยการรีดิวซ์หมู่กำมะถันของโปรตีน การขนส่งและการเก็บกรดอะมิโน cysteine เป็นปัจจัยร่วม (cofactor) ในปฏิกิริยา isomerization หลายปฏิกิริยา (Meister, 1983, Dringent, 2000) ควบคุมกระบวนการเกิด apoptosis (Hall, 1999) และนอกจากนี้ยังพบว่า GSH ยังมีบทบาทในขบวนการต่างๆ ภายในเซลล์อีกหลายอย่าง เช่น ขบวนการเมแทบอลิซึมของ DNA, การสังเคราะห์โปรตีน, การกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์และการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันต่างๆ (Lomaestro *et al*, 1995)

#### 2.2.9.1 การควบคุมระดับ GSH ภายในเซลล์

ขบวนการสังเคราะห์ GSH แบบ *de novo* synthesis ซึ่งจะพบว่าประกอบไปด้วย 2 ขั้นตอนใหญ่ๆ ได้แก่การทำงานโดยเอนไซม์  $\gamma$ -glutamyl cysteine synthase (GCS) และ เอนไซม์ GSH synthase ปฏิกิริยาทั้ง 2 ขั้นตอนนี้เกิดขึ้นภายใน cytosol โดยมีขั้นตอนแรกเป็นขั้นกำหนดอัตราเร็วของปฏิกิริยา (rate-limiting step) นอกจากการสังเคราะห์ GSH โดยเอนไซม์ทั้งสองนี้แล้ว GSH ยังสามารถนำกลับมาใช้ได้ใหม่จาก GSSG โดยการทำงานของเอนไซม์ GSH reductase (GR) (Dringent, 2000) ระดับของ GSH ภายในเซลล์ลดลงในกรณีที่ GSH ถูกเปลี่ยนไปเป็น GSH-S conjugates โดยจะรวมกับ thiol-proteins โดยเอนไซม์ GSH-S-transferase (GST) (Salina *et al*, 1999) หรือกรณีที่ถูกเปลี่ยนเป็น GSSG โดยเอนไซม์ glutathione peroxidase (GPx) (Dringent, 2000) หรือแม้แต่การสูญเสีย GSH ไปกับการขนส่งออกนอกเซลล์ไปยังไมโทคอนเดรีย (Kaplowitz *et al*, 1996) รายละเอียดดังในรูปที่ 2.4

รูปที่ 2.4 บทบาทของ glutathione ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึม



### 2.2.9.2 Glutathione peroxidase GPx กับบทบาทการต้านอนุมูลอิสระ

เอนไซม์กลูตาไธโอน เปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase, glutathione :  $H_2O_2$  oxidoreductase, GPx, EC 1.11.1.9) มีโครงสร้างเป็นแบบ tetramer มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 100,000 (Takahashi et al. 1987) แต่ละ monomer ประกอบด้วย selenocysteine moiety ที่บริเวณ active site ของเอนไซม์ (Park et al, 2003) ซึ่งมีบทบาทให้การให้อิเลคตรอนแก่สารตั้งต้นพวก peroxide

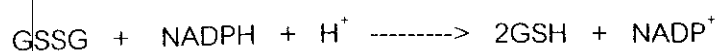
เอนไซม์นี้มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการต้านอนุมูลอิสระ โดยทำหน้าที่ทำลาย  $H_2O_2$  ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ ดังปฏิกิริยา

GSHPx



หลังจากนั้น GSSG จะถูกเปลี่ยนกลับให้เป็น GSH โดยอาศัยเอนไซม์ GR ดังปฏิกิริยา

GR

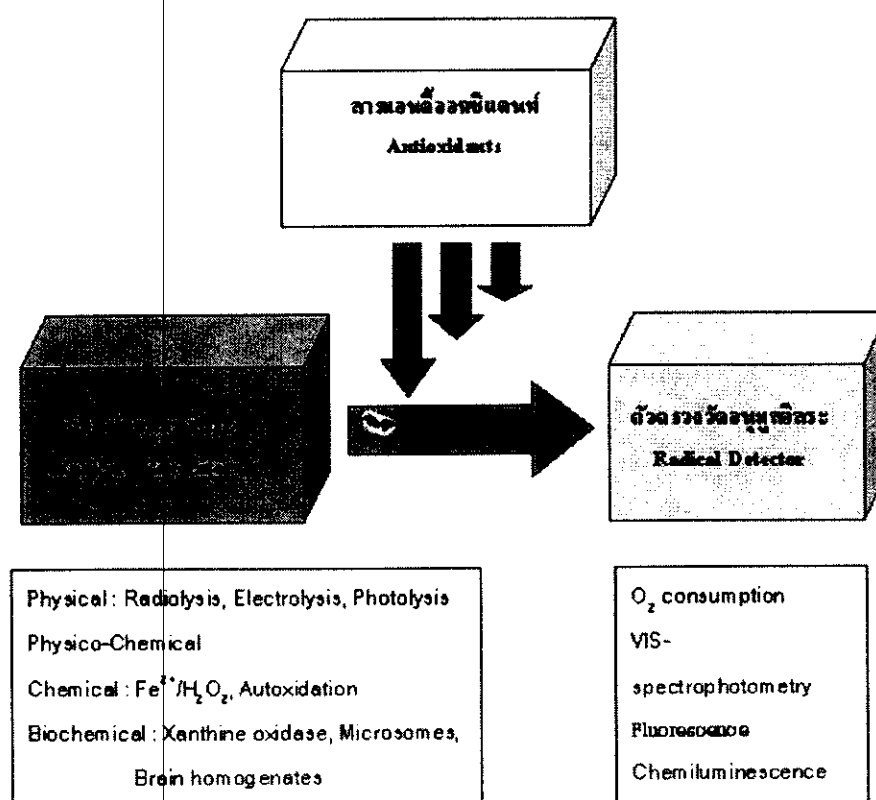


จากปฏิกิริยา จะพบว่าหากระดับของ GSH ลดลงจะทำให้เกิดภาวะ oxidative damage ได้ง่ายขึ้นโดยเฉพาะที่สมองซึ่งไวต่ออนุมูลอิสระ เนื่องจากเป็นอวัยวะที่มีอัตราการใช้ออกซิเจนสูง มีปริมาณเหล็กในเซลล์สูง และมีองค์ประกอบที่เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวในปริมาณสูงซึ่งอาจเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ได้ง่าย รวมไปถึงการที่มีระดับของ detoxifying enzyme ต่างๆ เช่น superoxide dismutase (SOD) catalase และ GR ในปริมาณที่ต่ำ (Bharath *et al*, 2002)

## 2.2.10 วิธีศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารแอนติออกซิแดนท์

การหาขีดความสามารถในการเป็นตัวต้านอนุมูลอิสระของสารแอนติออกซิแดนท์ส่วนใหญ่ทำโดยอาศัยหลักการดังรูปที่ 3 นั่นคือ ขั้นแรกจะเป็นสร้างอนุมูลอิสระขึ้นมาก่อน แล้วจึงเติมสารแอนติออกซิแดนท์ลงไป จากนั้นทำการตรวจวัดอนุมูลอิสระที่เหลือหลังจากการเกิดปฏิกิริยา ซึ่งหลักการนี้สามารถนำไปใช้ได้อย่างหลากหลาย ขึ้นอยู่กับการเลือกชนิดของตัวกำเนิดอนุมูลอิสระและชนิดของตัวตรวจวัดอนุมูลอิสระ โดยมีหลักการหาขีดความสามารถของสารแอนติออกซิแดนท์ในการเป็นตัวต้านอนุมูลอิสระ ดังในรูปที่ 2.5

รูปที่ 2.5 หลักการหาขีดความสามารถของสารแอนติออกซิแดนท์ในการเป็นตัวต้านอนุมูลอิสระ



วิธีการตรวจวัดขีดความสามารถของสารแอนติออกซิแดนซ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ดังแสดงในตารางที่ 2.5 เป็นวิธีการตรวจวัดขีดความสามารถของสารแอนติออกซิแดนซ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ซึ่งแตกต่างกันในเรื่องของตัวกำเนิดอนุมูลอิสระ วิธีจับหรือตรวจวัดอนุมูลอิสระ และระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจวัด ซึ่งวิธีดังกล่าวเหล่านี้เป็นวิธีที่มีการใช้อย่างแพร่หลายและรายงานไว้โดยนักวิจัยกลุ่มต่างๆ

ตารางที่ 2.5 แสดงวิธีการต่างๆที่ใช้ในการตรวจวัดขีดความสามารถของสารแอนติออกซิแดนซ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ

Author (ผู้แต่ง)	Radical generator (ตัวกำเนิดอนุมูลอิสระ)	Radical detector (วิธีตรวจวัดอนุมูลอิสระ)	Measuring time (เวลาที่ใช้)
Emanuel <i>et al.</i> , 1961	Methyl oleate + O <sub>2</sub>	Peroxide	12-16 h
Stocks <i>et al.</i> , 1974	Brain homogenate + O <sub>2</sub>	O <sub>2</sub> consumption	1 h
Frank <i>et al.</i> , 1982	Oil + O <sub>2</sub>	Electr. Conductivity	1-3 h
Wayner <i>et al.</i> , 1985	ABAP	O <sub>2</sub> consumption	30-60 min
Popov <i>et al.</i> , 1985/1999	Luminol + UV-A	Chemiluminescence	1-3 min
Niki <i>et al.</i> , 1985	ABAP	O <sub>2</sub> consumption	30-60 min
Klebanov <i>et al.</i> , 1988	Egg yolk + Fe <sup>2+</sup>	Chemiluminescence	10-20 min
Miller <i>et al.</i> , 1993 TEAC - Test	ABTS + Peroxidase + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	VIS spectrophotometry	5 min
Cao <i>et al.</i> , 1995 ORAC - Test	AAPH	Fluorescence, R/β-phycoerythrin	70 min/sample (12 parallel)
Nakano <i>et al.</i> , 1994	Meth-Hb	Luminescence, O <sub>2</sub>	20-40 min
Ghiselli <i>et al.</i> , 1995 TRAP - Test	ABAP	Fluorescence, R-phycoerythrin	20-40 min
Saramet <i>et al.</i> , 1996	Luminol + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Chemiluminescence	10-20 min

ABAP: 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropane)

ABTS: 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6 sulfonic acid)

AAPH: 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride

ABAP and AAPH are same substances



### บทที่ 3

## วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษากการตรวจกรองและแยก siderophores จากแบคทีเรียให้บริสุทธิ์แบ่งการศึกษาตามลำดับดังนี้

1. การศึกษาระยะเวลาเจริญเติบโตของแบคทีเรียแต่ละชนิด
2. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับการผลิต siderophores
3. การตรวจกรองหาแบคทีเรียที่สามารถผลิต siderophores ปริมาณสูง
4. การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียชนิดที่สามารถผลิต siderophores ปริมาณสูง
5. การสกัดและแยก siderophores จากแบคทีเรียแต่ละชนิด
6. การวิเคราะห์หาปริมาณ Total siderophores โดยวิธี CAS assay
7. การวิเคราะห์หาปริมาณ enterobactin ด้วยวิธี Arnow assay
8. การวิเคราะห์หาปริมาณ aerobactin ด้วยวิธี C'saky assay

และการศึกษาฤทธิ์ด้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของ siderophores แบ่งการศึกษาตามลำดับดังนี้

1. การเพาะเลี้ยง HEK 293
2. การศึกษาผลของ siderophores ต่อการมีชีวิตของเซลล์
3. การศึกษาผลของ siderophores ต่อ protein oxidation
4. การศึกษาผลของ siderophores ต่อ lipid peroxidation
5. การศึกษาผลของ siderophores ต่อ glutathione peroxidase activity

### 3.1 อุปกรณ์ เครื่องมือ สารเคมี และแหล่งที่มาของแบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัย

#### 3.1.1 อุปกรณ์

- Pipette
- Test tube
- อุปกรณ์ในการทำ TLC
- Erlenmeyer flask
- Centrifuge tube

- Microculture plate ขนาด 96 หลุม
- T-culture flask 25 cm<sup>3</sup>
- T-culture flask 75 cm<sup>3</sup>
- Petri disc
- Automatic pipette
- Serological pipette
- Pasture pipette
- Haemocytometer

### 3.1.2 เครื่องมือ

- Incubator
- Laminar flow biological cabinet
- Carbon dioxide incubator
- Light microscope
- Spectrophotometer
- Autoclave
- Microculture plate reader
- Analytic balance
- pH meter
- Centrifuge
- Ultraviolet light detector

### 3.1.3 สารเคมี

- Agar (Merck)
- NaCl
- CaCl<sub>2</sub>
- NH<sub>4</sub>Cl
- MgCl<sub>2</sub> (6H<sub>2</sub>O)
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

- Tris (trisma base)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM)
- Fetal Calf Serum (FCS)
- L-glutamine
- Penicillin/Streptomycin mixture 10,000 units/ml
- N-2-Hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulphonic acid (HEPES)
- Copper sulphate
- Folin & Ciocalteu's Phenol reagent
- 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)
- Triobarbituric acid (TBA)
- Butylated hydroxyl toluene (BHT)
- Phosphate buffer saline (PBS)
- Phosphoric acid
- n-butanol
- Tetramethoxypropane
- Dinitrophenyl hydrazine (DNPH)
- Guanidine hydrochloride
- Ethyl acetate commercial grade
- Trichloroacetic acid (TCA)
- Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ )
- Sodium carbonate
- Sodium hydroxide
- Sodium chloride
- Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)
- Acetic acid
- Ascorbic acid
- Glutathione peroxidase cellular activity assay kit
- MTT assay kit

### 3.1.4 แหล่งที่มาของแบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัย

เชื้อ *E. coli*, *Salmonella* spp. และ *K. pneumoniae* ตัวอย่างต่างๆจะแยกจากปัสสาวะ เลือด หรือ สิ่งส่งตรวจอื่น ๆ ของผู้ป่วยจากโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี

#### 3.1.1 *E. coli* 14 strain

Strain	แหล่งที่มา
355	blood
391	blood
443	blood
469	blood
526	urine
532	urine
583	urine
588	urine
590	urine
609	urine
637	urine
896	urine
899	urine

#### 3.1.2 *Salmonella* spp. 4 strain

Strain	แหล่งที่มาของเชื้อ
464	blood
489	-
562	blood
933	-

3.1.3 *K. pneumoniae* 25 strain

Strain	แหล่งที่มาของเชื้อ
10	urine
100	แผล
1000	pus
127	pus
134	pus
170	blood
194	pus from scrotum
240	blood
265	blood
398	urine
506	pus from gall bladder
585	blood
592	blood
598	blood
667	pus
724	urine
734	urine
767	blood
811	blood
823	-
927	urine
940	แผลใต้คาง
957	blood
965	pus ที่แก้ม
995	pus

## 3.2 วิธีการวิจัย

### 3.2.1 เทคนิคทั่วไป

#### 3.2.1.1 Analytical thin-layer chromatography (TLC)

Technique	: One dimension, ascending
Adsorbent	: Silica gel 60 F <sub>254</sub> (E. Merck) precoated plate (Aluminium sheet)
Layer thickness	: 0.2 mm
Distance	: 7 cm
Temperature	: room temperature (25-35 °C)
Detection	: 1. Ultraviolet light at 254 and 365 nm 2. FeCl <sub>3</sub> solution

#### 3.2.1.2 Preparative thin-layer chromatography (TLC)

Technique	: One dimension, ascending
Adsorbent	: Silica gel 60 F <sub>254</sub> (E. Merck) precoated plate (Glass plate)
Layer thickness	: 2 mm
Distance	: 20 cm
Temperature	: room temperature (25-35 °C)
Detection	: Ultraviolet light at 254 and 365 nm

### 3.2.2 วิธีวิจัยในการตรวจกรองและแยก siderophores

#### 3.2.2.1 การศึกษาอัตราการเจริญของ *E. coli*

1. นำ Nutrient slant agar ที่มีเชื้อ *E. coli* ที่เก็บไว้ ณ 4 °C มาทำการ subculture ลงบน nutrient slant agar
2. บ่มใน Incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. ใช้ T medium ที่เตรียมไว้ประมาณ 5 ml ขะล้าง colony บริเวณผิวหน้าของ nutrient slant agar
4. นำ T medium ที่มีเชื้อใส่ลงใน erlenmeyer flask ขนาด 250 ml ปรับปริมาตรให้ครบ 50 ml ด้วย T medium ปิดด้วยจุกที่ทำจากผ้าขาวบาง แล้วหุ้มอีกครั้งด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์

5. บ่มเชื้อที่ 37 °C และเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
6. ปิเปตเชื้อที่ปรับค่าการดูดกลืนแสงให้เท่ากับ Mcfaran 0.5 ปริมาณ 5 ml ลงใน erlenmeyer flask ขนาด 500 ml แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 200 ml ด้วย T medium ทำการทดลองตัวอย่างละ 2 flask
7. บ่มเชื้อที่ 37 °C และเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที
8. ทำการสู่วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตรเพื่อศึกษาการเจริญของเชื้อ โดยวัดที่เวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 28 และ 36 ชั่วโมง ด้วยการปิเปตเชื้อ 1.0 ml เจือจางด้วย M 9 medium 1 ml ผสมให้เข้ากันแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงทำการวัด flask ละ 3 ซ้ำ (triplicate)

### 3.2.2.2 การศึกษาความสัมพันธ์ของเวลาและการผลิต siderophores ของ *E.coli*

1. ทำการทดลองเหมือนขั้นตอน 1-7 ของ 3.2.2.1 โดยใช้ *E.coli* 2 strain
2. ทำการวิเคราะห์หา total siderophore, enterobactin, aerobactin ซึ่งจะทำให้การสู่วัดในช่วงเวลา 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 36 ชั่วโมง โดยปิเปตเชื้อมา 10 ml ใส่ลงใน centrifuge tube แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็ว 9,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำ supernatant มาทำการ วิเคราะห์หา total siderophores, enterobactin, aerobactin โดยทำ การวิเคราะห์หัด strain ละ 3 ซ้ำ (triplicate)

### 3.2.2.3 การตรวจกรองหา *E.coli* ที่สามารถผลิต siderophores ปริมาณสูง

1. นำ Nutrient slant agar ที่มี *E.coli* ทุกชนิดตัวอย่างทำการทดลองเหมือน 3.2.2.1 ขั้นตอนที่ 1-7
2. ทำการวิเคราะห์หา total siderophores, enterobactin, aerobactin ซึ่งจะทำให้การสู่วัดในช่วงเวลา 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 36 ชั่วโมง โดยปิเปตเชื้อ 10 ml ใส่ลงใน centrifuge tube แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็ว 9,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำ supernatant มาทำการวิเคราะห์หา total siderophores, enterobactin, aerobactin โดยทำการวิเคราะห์หัด strain ละ 3 ซ้ำ (triplicate)

### 3.2.2.4 การศึกษาอัตราการเจริญของ *Salmonella* spp. และ *K. pneumoniae*

1. นำ Nutrient slant agar ที่ *Salmonella* spp. และ *K. pneumoniae* ที่เก็บไว้ ณ 4 °C มาทำการ subculture ลงบน nutrient slant agar
2. บ่มใน Incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. นำเชื้อแต่ละชนิดอย่างละ 2 รหัสตัวอย่างที่เจริญใน nutrient slant agar แล้วใช้ M 9 medium ที่เตรียมไว้ประมาณ 5 ml ชะล้าง colony บริเวณผิวหน้าของ nutrient slant agar
4. นำ M 9 medium ที่มีเชื้อใส่ลงใน erlenmeyer flask ขนาด 250 ml จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 50 ml ด้วย M 9 medium ปิดด้วยจุกที่ทำจากผ้าขาวบาง แล้วหุ้มอีกครั้งด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์
5. บ่มเชื้อที่ 37 °C และเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
6. ปิเปตเชื้อที่ปรับค่าการดูดกลืนแสงให้เท่ากับ Mcfaran 0.5 ปริมาณ 5 ml ลงใน erlenmeyer flask ขนาด 500 ml แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 300 ml ด้วย M 9 medium ทำการทดลองตัวอย่างละ 2 flask
7. บ่มเชื้อที่ 37 °C และเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที
10. ทำการสู่วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 nm เพื่อศึกษาการเจริญของเชื้อ โดยวัดที่เวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 28 และ 36 ชั่วโมง ด้วยการปิเปตเชื้อ 1.0 ml เจือจางด้วย M 9 medium 1 ml ผสมให้เข้ากันแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงทำการวัด flask ละ 3 ซ้ำ (triplicate)

### 3.2.2.5 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและปริมาณการผลิต

siderophores ของ *Salmonella* spp. และ *K. pneumoniae*

1. ทำการทดลองเหมือนขั้นตอน 1-7 ของ 3.2.2.4 โดยใช้ เลือก *Salmonella* spp. และ *K. pneumoniae* มา 2 strain
2. ทำการวิเคราะห์ Total siderophores, enterobactin, aerobactin ซึ่งจะทำการสู่วัดในช่วงเวลา 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 36 ชั่วโมง โดยปิเปตเชื้อ 10 ml ใส่ลงใน centrifuge tube แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 °C ความเร็ว 9,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำ supernatant มาทำการวิเคราะห์ total siderophores, enterobactin, aerobactin ทำการวิเคราะห์รหัส strain ละ 3 ซ้ำ (triplicate)

### 3.2.2.6 การตรวจกรองหา *Salmonella* spp. และ *K. pneumoniae* ที่สามารถผลิต siderophores ปริมาณสูง

1. นำ Nutrient slant agar ที่มีเชื้อ *Salmonella* spp. และ *K. pneumoniae* ทุกรหัสตัวอย่างที่เก็บไว้ ณ 4 °C มาทำการ subculture ลงบน nutrient slant agar
2. บ่มใน Incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



3. ใช้ M 9 medium ที่เตรียมไว้ประมาณ 5 ml ชะล้าง colony บริเวณผิวหน้าของ nutrient slant agar
4. นำ M 9 medium ที่มีเชื้อใส่ลงใน erlenmeyer flask ขนาด 250 ml ปรับปริมาตรให้ครบ 50 ml ด้วย M 9 medium ปิดด้วยจุกที่ทำจากผ้าขาวบาง แล้วหุ้มอีกครั้งด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์
5. บ่มเชื้อที่ 37 °C และเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
6. เปิดเชื้อที่ปรับค่าการดูดกลืนแสงให้เท่ากับ Mcfaran 0.5 ปริมาณ 5 ml ลงใน erlenmeyer flask ขนาด 500 ml แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 300 ml ด้วย M 9 medium ทำการทดลอง strain ละ 2 flask
7. บ่มเชื้อที่ 37 °C และเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที
8. วิเคราะห์หา total siderophores โดยที่ *K. pneumoniae* สุ่มวัดที่ 12 ชั่วโมง *Salmonella* spp. จะทำการสุ่มวัดที่ 16 ชั่วโมง

### 3.2.2.7 การวิเคราะห์หาปริมาณ total siderophores โดยวิธี CAS assay

1. นำสารละลายส่วนบนที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็ว 9,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที มา 1.0 ml
  2. เติม CAS assay solution 1.0 ml ผสมให้เข้ากันในหลอดทดลอง
  3. เติม Shuttle solution 20 µl ในส่วนผสมข้อ 2 ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 2–3 นาที
  4. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากข้อ 4 มาคำนวณหาปริมาณ Total siderophores
- จากสมการ % Total siderophores =  $\frac{(OD_{ref} - OD_{sample}) \times 100}{OD_{ref}}$

### 3.2.2.8 การวิเคราะห์หาปริมาณ enterobactin ด้วยวิธี Arnow assay

1. นำสารละลายส่วนบนที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็ว 9,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที มา 1.0 ml
2. เติม 0.5 N HCl 1.0 ml ผสมให้เข้ากันในหลอดทดลอง
3. เติม Sodium nitrite-molybdate 1.0 ml ผสมให้เข้ากันในหลอดทดลอง
4. เติม NaOH 1.0 ml ผสมให้เข้ากันในหลอดทดลอง
5. นำสารผสมที่ได้ไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 510 nm

### 3.2.2.9 การวิเคราะห์หาปริมาณ aerobactin ด้วยวิธี C'saky assay

1. นำสารละลายส่วนบนที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็ว 9,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที มา 1 ml
2. เติม 6 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 ml ย่อยที่อุณหภูมิ 130 °C เป็นเวลา 30 นาที
3. เติม Sodium acetate solution 3 ml
4. เติม Sulfanilic acid solution 1 ml และ Iodine solution 0.5 ml ทิ้งไว้ 3-5 นาที
5. เติม Sodium asenite solution 1 ml
6. เติม  $\alpha$ -naphthylamine solution 1 ml ปรับปริมาตรให้ครบ 10 ด้วย DI water
7. นำสารผสมที่ได้ไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 526 nm

### 3.2.2.10 การเพาะเลี้ยง Bacteria แต่ละชนิดที่สามารถผลิต siderophores

#### ปริมาณสูง

1. นำ Nutrient slant agar ที่มีเชื้อ *E. coli* รหัส strain 896, *Salmonella* spp. รหัส strain 464 และ *K. pneumoniae* รหัส strain 957 ที่เก็บไว้ ณ 4 °C มาทำการ subculture ลงบน nutrient slant agar
2. บ่มใน Incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. ใช้ M 9 medium ที่เตรียมไว้ประมาณ 5 ml ชะล้าง colony บริเวณผิวหน้าของ nutrient slant agar
4. นำ M 9 medium ที่มีเชื้อใส่ลงใน erlenmeyer flask ขนาด 250 ml ปรับปริมาตรให้ครบ 50 ml ด้วย M 9 medium ปิดด้วยจุกที่ทำจากผ้าขาวบาง แล้วหุ้มอีกครั้งด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์
5. บ่มเชื้อที่ 37 °C และเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง *K. pneumoniae* 12 ชั่วโมง *Salmonella* spp. 16 ชั่วโมง และ *E. coli* 18 ชั่วโมง
6. เมื่อครบกำหนดเวลาการเพาะเลี้ยงของแต่ละเชื้อ นำ M 9 medium ทั้งหมดของเชื้อแต่ละชนิด centrifuge ที่ 4 °C ความเร็ว 9,200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที เอาเฉพาะส่วน supernatant เพื่อทำการสกัด siderophores ต่อไป

### 3.2.2.11 การสกัดและแยก siderophores จาก bacteria แต่ละชนิด

1. นำ supernatant ของเชื้อแต่ละชนิด มาปรับให้ได้ pH 1 ด้วย conc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> จากนั้น partition supernatant ของเชื้อแต่ละชนิดด้วย ethyl acetate 3 ครั้ง
2. รวบรวมชั้น ethyl acetate แล้วลดปริมาณด้วย rotary evaporator ล้างชั้น ethyl acetate ด้วย Tris buffer (pH 7) เพื่อกำจัดกรดที่อาจหลงเหลือ

3. ระเหยชั้น ethyl acetate จนแห้ง จะได้สารสกัด ชั้น ethyl acetate สีนํ้าตาลของ *E. coli*, *Salmonella* spp และ *K. pneumoniae*
4. ทาระบบ mobile phase ที่จะใช้แยก siderophores ของเชื้อแต่ละชนิดด้วยการ spot สารสกัดบน analytical TLC แล้วทดลอง develop ด้วยส่วนผสมของตัวทำละลายต่าง ๆ เช่น hexane, ethyl acetate, acetone
5. หลังจากที่ได้ mobile phase ที่เหมาะสมในการแยกสกัดแล้ว นำสารสกัดของเชื้อแต่ละชนิดละลายด้วย ethyl acetate จากนั้น spot ลงบน preparative TLC develop plate โดยใช้ mobile phase เป็น hexane: ethyl acetate : methanol :acetic acid (17:3:0.5:0.5) แล้ว develop plate ละ 3 ครั้ง
6. ทำการแยกเก็บ bands ที่ได้ของเชื้อแต่ละชนิด จากนั้นสกัด bands ที่ได้ด้วย ethyl acetate จนหมดจุด ระเหยให้แห้ง
7. ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแต่ละ bands ด้วยการใช analytical TLC ส่งดูการดูดกลืนแสง UV 254 nm และ spray ด้วย  $\text{FeCl}_3$  solution

### 3.2.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์

#### 3.2.3.1 วิธีการเลี้ยง HEK-293 cell line

HEK 293 เป็น transformed human embryonic kidney cell เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์จะแผ่เป็นชั้นเดียว (monolayer) ได้อย่างรวดเร็วบนผิวพลาสติกใน culture plate ภายใต้อุณหภูมิ  $37^\circ\text{C}$  ความชื้น 95% ในบรรยากาศที่มี  $5\%\text{CO}_2$  ทำการแบ่งเซลล์ (subculture) ทุก 1-2 วัน

##### 1. วิธีการแบ่งเซลล์ (subculture technique)

- เซลล์ที่เจริญเติบโตใน T-culture flask ได้ประมาณ 80-90% confluent
- ถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจนหมดและล้างเซลล์ด้วย PBS เพื่อกำจัดอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหลือค้าง
- เติม 1-2 ml ของ 0.25% trypsin ใน TD-EDTA ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องหรือ  $37^\circ\text{C}$  นาน 1-2 นาที
- เติม PBS ปริมาตร 5 ml ดูดขึ้นลงเพื่อให้เซลล์หลุดจากผิวพลาสติก

- แบ่งเซลล์มา 1 ml ใส่ใน T-culture flask และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ 9 ml ปิดฝาและแกว่งเบาๆเพื่อให้เซลล์กระจายตัวในอาหาร นำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37°C ความชื้น 95% ในบรรยากาศที่มี 5%CO<sub>2</sub>

## 2. การเก็บรักษาเซลล์

เป็นวิธีการเก็บเซลล์ไว้ใน liquid nitrogen ซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ -157 °C เพื่อเก็บเซลล์ไว้ในช่วงที่ยังไม่มีการทดลอง ทั้งนี้เพื่อเป็นการประหยัดสารต่างๆที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์จำนวนมากจะถูกเก็บใน freezing solution ปริมาตร 1 ml ประกอบด้วย 8% DMSO และ 92% FCS

## 3. วิธีการทำเซลล์แช่แข็ง

- ย่อยและเก็บเซลล์จาก T-culture flask เช่นเดียวกับวิธีการแบ่งเซลล์
- เก็บรวบรวมเซลล์ทั้งหมดลงในหลอดปั่นเหวี่ยง และนำไปปั่นที่ 2500 rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูดน้ำใสส่วนบนทิ้ง
- เติม freezing solution 1 ml ใช้ pasture pipette ดูดและเป่าเบาๆเพื่อกระจายเซลล์ให้ทั่ว
- ถ่ายของเหลวทั้งหมดลงใน cryotube แล้วเก็บใน liquid nitrogen

## 4. วิธีการนำเซลล์แช่แข็งออกมาใช้ (Thawing)

- นำ cryotube ออกจาก liquid nitrogen พักไว้ในน้ำแข็ง และอุ่นในอ่างน้ำ 37 °C หลังจากนั้นนำเข้าตู้ laminar flow
- ใช้ pasture pipette ดูด complete medium 1 ml ใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยง
- ใช้ pasture pipette ดูด ของเหลวใน cryotube ออกมารวมกับ complete medium ในข้อ 2 ผสมให้เข้ากัน
- ปั่นเหวี่ยงที่ 1500 rpm เป็นเวลา 5 นาที
- ดูดส่วนใดทิ้ง แล้วเติม complete medium ลงไปอีก 5 ml ผสมให้เข้ากันดี แล้วถ่ายใส่ T-culture flask บ่มไว้ใน 37 °C ความชื้น 95% ในบรรยากาศที่มี 5%CO<sub>2</sub>

### 3.2.2 การศึกษาผลของสารทดสอบต่อการมีชีวิตของเซลล์

ในการศึกษาผลของสารทดสอบต่างๆต่อการมีชีวิตของเซลล์ใช้ วิธี MTT cytotoxicity assay ซึ่งมีหลักการดังนี้ MTT หรือ 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide เป็นสารสีเหลืองที่สามารถผ่านเข้าเซลล์ได้ และจะถูกเปลี่ยนเป็น

สาร formazan ซึ่งเป็นสารสีม่วง โดยใช้เอนไซม์ mitochondrial succinate dehydrogenase ที่อยู่ใน mitochondria ของเซลล์ที่มีชีวิต ปริมาณของสาร formazan ที่เกิดขึ้นจะแปรผันตรงกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต

### 3.2.2.1 วิธีการทดลอง

#### 1. การเตรียมสารทดสอบชนิดต่างๆในอาหารเลี้ยงเซลล์

- สารทดสอบทุกชนิดคือ Fe-NTA, leadacetate, ascorbic acid, siderophore จาก *Klebsiella pneumoniae* (siderophore K-1, SK) siderophore จาก *Escherichia coli* (siderophore E-3, SE) ละลายใน PBS ให้ได้ความเข้มข้น 1 mg/ml

- เจือจางสารละลายแต่ละชนิดใน complete media ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายต่าง ๆ กันดังนี้คือ 2.5, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100  $\mu\text{g/ml}$

- ทุกขั้นตอนทำในตู้ lamina flow โดยเทคนิคปลอดเชื้อ เก็บรักษาไว้ที่ 4 °C

#### 2. การเตรียมเซลล์เพื่อใช้ในการศึกษา MTT cytotoxicity assay

- เซลล์เจริญใน T-culture flask จนได้ 80-90% confluent ให้เก็บเซลล์จาก T-culture flask เช่นเดียวกับวิธีการแบ่งเซลล์

- ถ่ายเซลล์ทั้งหมดลงในหลอดปั่นเหวี่ยง นำไปปั่นที่ความเร็ว 1500 rpm นาน 5 นาที

- ดูดส่วนใสทิ้ง แล้วเติม complete medium ลงไปอีก 5-10 ml (ขึ้นกับปริมาณเซลล์ที่มี) ผสมให้เข้ากันดี

- นับเซลล์โดยใช้ hemacytometer

- เตรียมเซลล์ให้มีความเข้มข้น  $1 \times 10^5$  cells/ml โดยใช้ complete medium

เป็นตัวเจือจาง

- ใส่ใน 96 well culture plate หลุมละ 100  $\mu\text{l}$  จะได้ปริมาณเซลล์  $10^4$

cells/well

- เก็บบ่มในตู้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปศึกษา

#### 3. วิธีการทดสอบ

- เตรียมที่เตรียมได้จากข้อ 2

- เติมหาอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารที่ต้องการทดสอบในความเข้มข้นต่างๆลงไป 100  $\mu\text{l/well}$  จะทำให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารที่ต้องการทดสอบลดลงครึ่งหนึ่ง

- กลุ่มควบคุมคือ complete medium

24 ชั่วโมง	- บ่ม 96 microculture plate ต่อที่ 37 °C ในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์เป็นเวลา
channel pipette	- เมื่อครบกำหนดให้ดูดเอาอาหารเลี้ยงเซลล์ออก 100 µl/well ด้วย multi-
ต่อที่ 37 °C ในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์เป็นเวลา 4 ชั่วโมง	- เติม MTT dye solution ปริมาณ 15 µl/well และบ่ม 96 microculture plate
ชั่วโมง	- เติม stop solution ปริมาณ 100 µl/well ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1
reader	- เมื่อครบกำหนดให้ผสมสารในแต่ละหลุมด้วย multi-channel pipette
ดั่งสมการ	- วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 และ 630 nm ด้วย microplate
	- คำนวณค่า % survival เทียบกับกลุ่มควบคุม โดยให้ % survival มีค่าเป็น 100
	$\% \text{ survival} = \frac{\text{mean OD of tested well} \times 100}{\text{mean OD of controlled well}}$

### 3.2.3 การศึกษาผลของ siderophores ต่อ protein oxidation

การศึกษามผลของ siderophores ต่อ protein oxidation มีหลักการดังนี้คือเมื่อเกิด protein damage จะมีการสร้าง carbonyl protein ขึ้นมา และ carbonyl protein จะทำปฏิกิริยากับ dinitrophenyl hydrazine (DNPH) ได้ผลิตภัณฑ์คือ dinitrophenyl hydrazone (DNP) ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 370 nm ปริมาณของ DNP ที่เกิดจะแปรผันตรงกับปริมาณของ protein damage (Labieniec and Gabryelak. 2005)

#### 3.2.3.1 วิธีการทดลอง

##### 1. การเตรียมสารทดสอบชนิดต่างๆในอาหารเลี้ยงเซลล์

- สารทดสอบทุกชนิดคือ Fe-NTA, leadacetate, ascorbic acid, siderophore ที่แยกได้จาก *K. pneumoniae* (siderophore K-1) siderophore จาก *E. coli* (siderophore E-3) ละลายใน PBS ให้ได้ความเข้มข้น 1 mg/ml
- เจือจางสารละลายแต่ละชนิดใน complete media ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย คือ 5 µg/ml

- ทุกขั้นตอนทำในตู้ lamina flow โดยเทคนิคปลอดเชื้อ เก็บรักษาไว้ที่ 4 °C

## 2. วิธีการเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มีสารทดสอบชนิดต่างๆ

- เตรียมเซลล์ให้ได้ความเข้มข้น  $1 \times 10^5$  cells/ml
- ใส่เซลล์ในข้อ 1 ใน T-culture flask จำนวน 5 ml เก็บบ่มในตู้

คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปศึกษา

- ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกให้หมดแล้วในแต่ละ flask ใส่สารทดสอบต่างๆดังข้างล่าง ซึ่งจะทำให้ได้ความเข้มข้นของสารละลายต่างๆลดลงครึ่งหนึ่ง

### ชุดที่เหนี่ยวนำด้วย Fe-NTA

Flask 1 = complete media 5 ml

Flask 2 = Fe-NTA (1 mg/ml) 2.5 ml + complete media 2.5 ml

Flask 3 = Fe-NTA (1 mg/ml) 2.5 ml + siderophore K (5 µg/ml) 2.5 ml

Flask 4 = Fe-NTA (1 mg/ml) 2.5 ml + siderophore E (5 µg/ml) 2.5 ml

Flask 5 = Fe-NTA (1 mg/ml) 2.5 ml + Ascorbic acid (5 µg/ml) 2.5 ml

### ชุดที่เหนี่ยวนำด้วย Leadacetate

Flask 1 = complete media 5 ml

Flask 2 = leadacetate (0.5 mg/ml) 2.5 ml + complete media 2.5 ml

Flask 3 = leadacetate (0.5 mg/ml) 2.5 ml + siderophore K (5 µg/ml) 2.5 ml

Flask 4 = Leadacetate (0.5 mg/ml) 2.5 ml + siderophore E (5 µg/ml) 2.5 ml

Flask 5 = Leadacetate (0.5 mg/ml) 2.5 ml + Ascorbic acid (5 µg/ml) 2.5 ml

- เก็บบ่มในตู้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปศึกษา

## 3. วิธีการเตรียมเซลล์เพื่อวัด protein oxidation

- ให้ใช้ pasture pipette ดูดอาหารออกจากเซลล์
- เติม PBS 2 ml ให้ pasture pipette ดูดขึ้นลงเพื่อให้เซลล์หลุดจากก้นพลาสติก

เพื่อทำการเก็บเซลล์ และถ่ายลงในหลอดปั่นเหวี่ยง

- นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1000 rpm นาน 30 นาที ที่ 4°C

- ดูดของเหลวทิ้งเก็บเซลล์ เติม homogenizing buffer 1 ml ดูดขึ้นลง ถ่าย

ของเหลวทิ้งหมดลงใน homogenizer เพื่อบดเซลล์ให้แตก จะได้สารละลายที่พร้อมทำการ

วิเคราะห์ต่อไป

#### 4. วิธีการวัด protein

การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Folin-Lowry (Lowry, 1951) อาศัยหลักการคือ สารละลาย  $\text{CuSO}_4$  ทำปฏิกิริยากับโปรตีน ภายใตสภาวะที่เป็นด่าง สารละลาย Folin ciocateu's phenol reagent จะปฏิกิริยากับ copper complex ให้เป็นสารละลายสีน้ำเงิน ซึ่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm วิธีการดังนี้

- เตรียมสารละลาย BSA stock ที่ความเข้มข้น 1mg/ml เพื่อใช้เป็นโปรตีน

มาตรฐานในการทำ standard curve

- เตรียมสารละลายปริมาตรต่างๆดังในตารางที่ 3.1
- นำปริมาณโปรตีนและค่า OD ที่ได้ ไปทำ standard curve
- หาปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่างโดยการลากจุดตัดจากกราฟ หรือการคำนวณ

จากสมการเส้นตรงที่ได้จาก standard curve

ตารางที่ 3.1 ชนิดของสารละลายและปริมาตรที่ใช้ในการวัด protein

STD/Sample ( $\mu\text{l}$ )	Water ( $\mu\text{l}$ )	Reagent D ( $\mu\text{l}$ )		1 N Folin-phenol solution ( $\mu\text{l}$ )	
BSA (1 mg/ml)					
0	100	2000	ตั้งไว้ที่ อุณหภูมิห้อง 10 นาที	200	ตั้งไว้ที่ อุณหภูมิห้อง 30 นาที วัด OD ที่ 600 nm
10	90	2000		200	
20	80	2000		200	
40	60	2000		200	
60	40	2000		200	
80	20	2000		200	
100	0	2000		200	
Sample					
100	0	2000		200	



## 5. การวัด Protein oxidation

การเกิด protein oxidation วัดด้วยวิธี protein carbonyl assay (Labieniec, 2005) มีขั้นตอนดังนี้

- ปิเปตตัวอย่างของแต่ละกลุ่มการทดลองจากข้อ 3 มา 500  $\mu$ l โดยกำหนดให้แต่ละกลุ่มการทดลองมีปริมาณโปรตีนเท่ากัน
- เติม 10 mM DNPH ใน 2 M HCl ลงไปในตัวอย่าง 500  $\mu$ l
- เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixer ทุก 10 นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- เติม 20 % (v/v) trichloroacetic acid 500  $\mu$ l เพื่อแยกอนุพันธ์ hydrazone
- นำไปปั่นเหวี่ยงที่แรงปั่นเหวี่ยง 12,000 g อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที
- ล้างตะกอนด้วย ethanol-ethyl acetate (1:1) 1 ml เพื่อกำจัด DNPH และไขมัน
- นำไปปั่นเหวี่ยงที่แรงปั่นเหวี่ยง 12,000 g อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที
- นำตะกอนที่ได้มาละลายใน 6 M guanidine hhydrochloride 1 ml
- อุ่นใน water bath พร้อมเครื่อง mixer เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้สารละลายเข้ากันได้ดี
- นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 370 nm
- คำนวณปริมาณ protein carbonyl จากสูตร

$$\text{Protein carbonyl (nmol/ml)} = \text{Absorbance}/0.022 \mu\text{M}^{-1}$$

$$\text{Carbonyl content (nmol/mg)} = \frac{(\text{Protein carbonyl nmol/ml})}{(\text{Protein mg/ml})}$$

### 3.2.4 การศึกษาผลของ siderophores ต่อ lipid peroxidation

การศึกษาผลของ siderophores ต่อ lipid peroxidation ในที่นี้ใช้วิธี MDA assay มีหลักการดังนี้คือ การเกิด lipid peroxidation จะทำให้ได้ lipid peroxide และ aldehyde เช่น malondialdehyde (MDA) เมื่อ MDA ทำปฏิกิริยากับ TBA (triobarbituric acid) ได้เป็น thiobarbituric acid reactive substances (TBRAS) ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 nm ปริมาณของ TBRAS ที่เกิดจะแปรผันตรงกับปริมาณของ lipid peroxidation

### 3.2.4.1 วิธีการทดลอง

#### 1. การเตรียมสารทดสอบต่างๆชนิดต่างๆในอาหารเลี้ยงเซลล์

สารทดสอบทุกชนิดคือ Fe-NAT, leadacetate, ascorbic acid, siderophore จาก *K. pneumoniae* (siderophore K-1) siderophore จาก *E. coli* (siderophore E-3) ละลายใน PBS ให้ได้ความเข้มข้น 1 mg/ml วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 1 ของ 3.2.3.1 ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายคือ 5 µg/ml

#### 2. วิธีการเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มีสารทดสอบชนิดต่างๆ

วิธีการเตรียมเซลล์ให้มีความเข้มข้น  $1 \times 10^5$  cells/ml เก็บบ่มในตู้คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นบ่มเซลล์กับสารที่ใช้เหนี่ยวนำให้เกิด lipid peroxidation เช่นเดียวกับการทดลองข้อ 2 ของ 3.2.3.1

#### 3. วิธีการเตรียมเซลล์เพื่อวัด lipid peroxidation

- ให้ใช้ pasture pipette ดูดอาหารออกจากเซลล์ที่จะหาปริมาณ lipid peroxidation ให้หมด
- เติมน้ำ PBS 2 ml ใช้ pasture pipette ดูดขึ้นลงเพื่อให้เซลล์หลุดจากก้นหลอดแก้ว
- เพื่อทำการเก็บเซลล์ และถ่ายลงในหลอดปั่นเหวี่ยง
- นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1500 rpm นาน 5 นาที
- ดูดของเหลวทิ้งและเติมน้ำ PBS 5 ml ใช้ pasture pipette ดูดขึ้นลงเพื่อล้างเซลล์ และนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ 1500 rpm นาน 5 นาที
- ดูดของเหลวทิ้งเก็บเซลล์ เติมน้ำ homogenizing buffer 200 µl ดูดขึ้นลง แล้วถ่ายของเหลวทั้งหมดลงใน homogenizer เพื่อบดเซลล์ให้แตก จะได้สารละลายที่พร้อมทำการวิเคราะห์ ปริมาณ lipid peroxidation ต่อไป

#### 4. วิธีการวัด protein

หาปริมาณโปรตีนในตัวอย่างโดยใช้วิธีของ Folin-Lowry เช่นเดียวกับการทดลองที่ 4 ของ 3.2.3.1

#### 5. วิธีการวัด lipid peroxidation

- ให้เติมสารต่างๆลงในหลอดทดลองขนาด 2 ml ที่มีฝาปิด ตามตารางที่ 3.1
- หลังจากนั้นให้ปิดฝาหลอด นำไปต้มในน้ำเดือด โดยใช้ heat box ปรับอุณหภูมิที่ 95 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะเห็นสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู และมีการตกตะกอนโปรตีน
- เมื่อครบกำหนดเวลา ทั้งให้เย็น หลังจากนั้นให้เติมน้ำ n-butanol หลอดละ 625 µl เขย่าเพื่อสกัดสารสีชมพูให้ออกมาอยู่ในชั้น n-butanol

- เมื่อครบกำหนดเวลา ทิ้งให้เย็น หลังจากนั้นให้เติม n-butanol หลอดละ 625  $\mu$ l เขย่าเพื่อสกัดสารสีชมพูให้ออกมาอยู่ในชั้น n-butanol
- นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3500 rpm นาน 15 นาที
- ดูดเก็บสารละลายสีชมพูชั้นบน เพื่อไปวัดหาปริมาณผลิตภัณฑ์ (TBRAS) ของ lipid peroxidation ที่ความยาวคลื่น 532 nm
- คำนวณหาปริมาณของ TBRAS ของตัวอย่างเทียบกับ standard curve

ตารางที่ 3.2 ชนิดของสารละลายและปริมาณที่ใช้ในการวัด lipid peroxidation

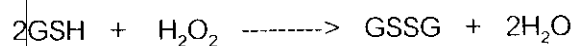
TMP (nmole)	Stock 100 nmol/ml( $\mu$ l)	DW ( $\mu$ l)	SDS	20 % Acetic acid	TBA		DW ( $\mu$ l)	n-butanol ( $\mu$ l)	
Blank	0	200	25	187.5	187.5	ต้ม ที่ 100 $^{\circ}$ C	25	625	ปั่น เหวี่ยง 3500 rpm 15 min
Standard							25	625	
1.0	10	190	25	187.5	187.5		25	625	
2.0	20	180	25	187.5	187.5		25	625	
3.0	30	170	25	187.5	187.5		25	625	
4.0	40	160	25	187.5	187.5		25	625	
Sample	200	0	25	187.5	187.5		25	625	

### 3.2.5 การศึกษาผลของ siderophores ต่อ glutathione peroxidase activity

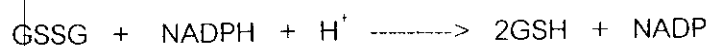
การศึกษาผลของ siderophores ต่อ glutathione activity ในที่นี้ใช้ Glutathione Peroxidase Cellular Activity Assay Kit ของบริษัท Sigma มีหลักการดังนี้คือ เป็นการวัดการทำงานของเอนไซม์โดยอาศัยสามารถในการเปลี่ยน hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) หรือ organic peroxide (R-OOH) ให้เป็น stable alcohol (R-OH)

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น คือ

GSHPx



GR



สารทดสอบทุกชนิดคือ ascorbic acid, siderophore จาก *Klebsiella pneumoniae* (siderophore K-1) siderophore จาก *Escherichia coli* (siderophore E-3) ละลายใน PBS ให้ได้ความเข้มข้น 1 mg/ml วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 1 ของ 3.2.3.1 แต่ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายคือ 2.5  $\mu\text{g/ml}$

## 2. วิธีการเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มีสารทดสอบชนิดต่างๆ

วิธีการเตรียมเซลล์ให้ได้ความเข้มข้น  $1 \times 10^5$  cells/ml เก็บบ่มในตู้คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นบ่มเซลล์กับสารที่เตรียมได้จากข้อ 1

## 3. วิธีการเตรียมเซลล์เพื่อวัด glutathione peroxidase activity

- ให้ใช้ pasture pipette ดูดอาหารออกจากเซลล์
- เติม PBS 2 ml ใช้ pasture pipette ดูดขึ้นลงเพื่อให้เซลล์หลุดจากก้นพลาสติกเพื่อทำการเก็บเซลล์ และถ่ายลงในหลอดปั่นเหวี่ยง
- นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1000 rpm นาน 30 นาที ที่  $4^\circ\text{C}$
- ดูดของเหลวทิ้งเก็บเซลล์ เติม homogenizing buffer 1 ml ดูดขึ้นลง ถ่ายของเหลวทั้งหมดลงใน homogenizer เพื่อบดเซลล์ให้แตก จะได้สารละลายที่พร้อมทำการวิเคราะห์ไป

## 4. วิธีการวัด protein

หาปริมาณโปรตีนในตัวอย่างโดยใช้วิธีของ Folin-Lowry เช่นเดียวกับการทดลองที่ 4 ของ 3.2.3.1

## 5. วิธีการวัด glutathione peroxidase activity

- ให้เติม glutathione peroxidase assay buffer ปริมาตรดังในตารางที่ 3.2 ลงใน quartz cuvet ขนาด 1.0 ml โดยควบคุมอุณหภูมิที่  $25^\circ\text{C}$
- หลังจากนั้นให้เติม NADPH assay reagent 50  $\mu\text{l}$  และ 50  $\mu\text{l}$  ของตัวอย่างผสมให้เข้ากันโดยการกลับไป-มา ปริมาตรสุดท้ายของสารละลายใน cuvet คือ 1.0 ml
- เริ่มการวัดโดยการเติม tert-butyl hydroperoxide 10  $\mu\text{l}$  ผสมให้เข้ากันโดยการกลับไป-มา
- วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 nm ซึ่งเป็นช่วงของการเปลี่ยน NADPH เป็น  $\text{NADP}^+$  โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงจะแสดงถึงการทำงานของเอนไซม์ GSHPx ที่เพิ่มขึ้นเนื่องจากขั้นตอนนี้เป็นขั้น rate-limiting factor ของ coupled reactions โดย 1 ตัวอย่างจะ

เพิ่มขึ้นเนื่องจากขั้นตอนนี้เป็นขั้น rate-limiting factor ของ coupled reactions โดย 1 ตัวอย่างจะอ่านค่าดูดกลืนแสง 6 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 10 วินาที และการอ่านครั้งแรกจะเริ่มหลังจากเติม tert-butyl hydroperoxide และผสมให้เข้ากันดีแล้ว 15 วินาที

- หลอดควบคุม (blank) ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับตัวอย่างแต่ใช้ แต่ใช้ glutathione peroxidase assay buffer ปริมาตร 50  $\mu$ l แทนตัวอย่างจากเซลล์

ตารางที่ 3.3 ชนิดของสารละลายและปริมาตรที่ใช้ในการวัด glutathione peroxidase activity

	Assay buffer ( $\mu$ l)	NADPH reagent ( $\mu$ l)	Sample ( $\mu$ l)	t-bBu-OOH ( $\mu$ l)
Blank tube	950	50	-	10
Sample tube	950	50	50	10

- แบ่งตัวอย่างเซลล์ส่วนหนึ่งไปหาปริมาณโปรตีน โดยใช้วิธีของ Folin-Lowry รายละเอียดดังแสดงในภาคผนวก
- การรายงานผลจะรายงานเป็น U/ $\mu$ g protein โดย 1 unit ของ GSHPx เท่ากับ ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการสร้าง NADP<sup>+</sup> ปริมาณ 1.0  $\mu$ mol จาก NADPH ต่อเวลาที่ pH 8.0 อุณหภูมิ 25 °C ในสภาวะที่มี reduced glutathione (GSSG), glutathione reductase (GR) และใช้ tert-butyl hydroperoxide เป็นสารตั้งต้น

$$\text{Activity per extract (U/mg protein)} = \frac{(-1) \times [\Delta\text{OD}_{\text{sample}} - \Delta\text{OD}_{\text{reagent blank}}]}{6.22 \times \text{amount of sample protein (mg)}}$$

## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

ผลการศึกษาการคัดกรองและแยก siderophores จากแบคทีเรียให้บริสุทธิ์ แบ่งการนำเสนอเป็นลำดับดังนี้

1. การศึกษาระยะเวลาเจริญเติบโตของ *E. coli*
2. ผลการศึกษความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับการผลิต siderophores
3. ผลการตรวจกรอง (screening) การผลิต siderophores ของ *E. coli*
4. การศึกษาอัตราการเจริญของ *Salmonella* spp. และ *K. pneumoniae*

ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับการผลิต siderophores ของ *Salmonella* spp. และ *K. pneumoniae*

5. ผลการศึกษความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับการผลิต siderophores ของ *Salmonella* spp. และ *K. pneumoniae*

6. ผลการตรวจกรองการผลิต siderophores ของ *Salmonella* spp. และ *K. pneumoniae* ตัวอย่างต่างๆ

7. การเพาะเลี้ยงเชื้อ *E.coli*, *Salmonella* spp. และ *K. pneumoniae* ตัวอย่างที่สามารถผลิต siderophores ปริมาณสูง และการสกัดแยก siderophores ให้บริสุทธิ์

ฤทธิ์ด้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของ siderophores ในการวิจัยนี้ ซึ่งเป็นการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง โดยเซลล์ที่ใช้เป็นเซลล์ไตของตัวอ่อนของมนุษย์ (Human embryo kidney cell line) จะแบ่งการนำเสนอเป็นหัวข้อดังต่อไปนี้คือ

1. ลักษณะทั่วไปของเซลล์ HEK-293
2. ผลของ siderophores ต่อการมีชีวิตของเซลล์
3. ผลของ siderophores ในการป้องกันการเกิด protein oxidation
4. ผลของ siderophores ในการป้องกันการเกิด lipid peroxidation
5. ผลของ siderophores ต่อ glutathione peroxidase activity ในเซลล์เพาะเลี้ยง

#### 4.1 ผลการตรวจคัดและแยก siderophores จากแบคทีเรียให้บริสุทธิ์

##### 4.1.1 การศึกษาระยะเวลาเจริญเติบโตของ *E. coli*

การศึกษากการเจริญเติบโตของ *E. coli* strain 583 และ 609 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำกัดปริมาณเหล็ก (iron-restricted minimal media, T medium) โดยทำการสุ่มตัวอย่างที่ช่วงเวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 28 และ 36 ชั่วโมง เพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 nm พบว่า *E. coli* strain 583 มีค่าการดูดกลืนแสง ( $OD_{550}$ ) ของ cell suspension สูงสุด เท่ากับ  $0.429 \pm 0.032$  ที่เวลา 16 ชั่วโมง และ strain 609 มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด เท่ากับ  $0.506 \pm 0.069$  ที่เวลา 18 ชั่วโมง ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงค่าการดูดกลืนแสง ( $OD_{550}$ ) ของ *E. coli* strain 583 และ 609

เวลา (ชั่วโมง)	<i>E. coli</i> strain 583	<i>E. coli</i> strain 609
0	$0.011 \pm 0.002$	$0.011 \pm 0.000$
2	$0.024 \pm 0.003$	$0.022 \pm 0.008$
4	$0.057 \pm 0.000$	$0.062 \pm 0.004$
6	$0.130 \pm 0.003$	$0.149 \pm 0.003$
8	$0.248 \pm 0.008$	$0.294 \pm 0.060$
10	$0.370 \pm 0.005$	$0.389 \pm 0.030$
12	$0.350 \pm 0.014$	$0.407 \pm 0.024$
14	$0.400 \pm 0.002$	$0.423 \pm 0.018$
16	$0.429 \pm 0.032$	$0.477 \pm 0.039$
18	$0.412 \pm 0.050$	$0.506 \pm 0.069$
20	$0.392 \pm 0.028$	$0.479 \pm 0.052$
22	$0.392 \pm 0.047$	$0.482 \pm 0.046$
24	$0.384 \pm 0.044$	$0.466 \pm 0.062$
28	$0.359 \pm 0.032$	$0.445 \pm 0.059$
36	$0.349 \pm 0.047$	$0.440 \pm 0.076$

#### 4.1.2 ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับการผลิต siderophores

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับการผลิต siderophores ปริมาณต่าง ๆ ของเชื้อ *E. coli* strain 583 และ 609 พบว่ามี % total siderophores สูงสุดที่เวลา 16 และ 18 ชั่วโมง ( $92.81 \pm 1.32$  และ  $93.80 \pm 0.28$  ตามลำดับ) ได้ผลดังตารางที่ 4.2 และ 4.3 และรูปที่ 4.2 เป็นกราฟแสดงเวลากับการผลิต siderophores ของ *E. coli* ทั้ง 2 ชนิด

ตารางที่ 4.2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับการผลิต siderophores ในเชื้อ *E. coli* strain 583

เวลา (ชั่วโมง)	% total siderophores	Enterobactin (OD <sub>510</sub> )	Aerobactin (OD <sub>526</sub> )
6	$34.27 \pm 0.84$	$0.018 \pm 0.001$	$0.097 \pm 0.011$
8	$62.03 \pm 3.09$	$0.026 \pm 0.002$	$0.120 \pm 0.006$
10	$66.23 \pm 7.30$	$0.006 \pm 0.001$	$0.247 \pm 0.084$
12	$87.44 \pm 0.40$	$0.035 \pm 0.008$	$0.197 \pm 0.117$
14	$91.57 \pm 0.76$	$0.060 \pm 0.033$	$0.593 \pm 0.410$
16	$92.81 \pm 1.32$	$0.033 \pm 0.019$	$0.301 \pm 0.064$
18	$92.03 \pm 1.09$	$0.053 \pm 0.012$	$0.838 \pm 0.329$
20	$91.46 \pm 0.61$	$0.031 \pm 0.003$	$0.908 \pm 0.200$
22	$91.07 \pm 0.27$	$0.038 \pm 0.001$	$0.715 \pm 0.089$
24	$92.23 \pm 0.23$	$0.053 \pm 0.002$	$0.374 \pm 0.004$
28	$77.51 \pm 4.91$	$0.035 \pm 0.009$	$0.541 \pm 0.158$
36	$88.92 \pm 1.69$	$0.019 \pm 0.008$	$0.495 \pm 0.020$



ตารางที่ 4.3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับการผลิต siderophores ในเชื้อ *E. coli* strain 609

เวลา (ชั่วโมง)	% total siderophores	Enterobactin (OD <sub>510</sub> )	Aerobactin (OD <sub>526</sub> )
6	38.03 ± 2.96	0.023 ± 0.003	0.109 ± 0.002
8	70.53 ± 8.58	0.038 ± 0.007	0.138 ± 0.032
10	77.44 ± 1.46	0.006 ± 0.001	0.219 ± 0.054
12	83.58 ± 3.11	0.044 ± 0.005	0.686 ± 0.004
14	90.71 ± 1.65	0.066 ± 0.001	0.501 ± 0.124
16	93.51 ± 0.25	0.019 ± 0.013	0.320 ± 0.028
18	93.80 ± 0.28	0.031 ± 0.010	0.814 ± 0.031
20	92.71 ± 1.97	0.044 ± 0.009	0.974 ± 0.087
22	90.56 ± 0.27	0.049 ± 0.009	0.432 ± 0.040
24	90.27 ± 3.89	0.057 ± 0.001	0.388 ± 0.019
28	83.73 ± 1.26	0.035 ± 0.002	0.538 ± 0.037
36	90.95 ± 0.30	0.020 ± 0.001	0.396 ± 0.134

#### 4.1.3 ผลการตรวจกรอง (screening) การผลิต siderophores ของ *E. coli* strain ต่างๆ

การตรวจสอบการผลิต siderophores ของ *E. coli* ที่ได้รับจากโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี จำนวน 14 ตัวอย่างเพื่อคัดเลือกเชื้อที่สร้าง siderophores มากที่สุด ที่เวลา 18 ชั่วโมง พบว่า strain 896 ให้ % total siderophores สูงที่สุด ( $94.31 \pm 2.55$ ) ผลการทดลองแสดงดังตาราง 4.4 และรูปที่ 4.3 แสดงกราฟเปรียบเทียบปริมาณการผลิต siderophores ของ *E. coli* แต่ละ strain

ตารางที่ 4.4 ผลการตรวจสอบการสร้าง siderophores ของ *E.coli* ตัวอย่างต่าง ๆ

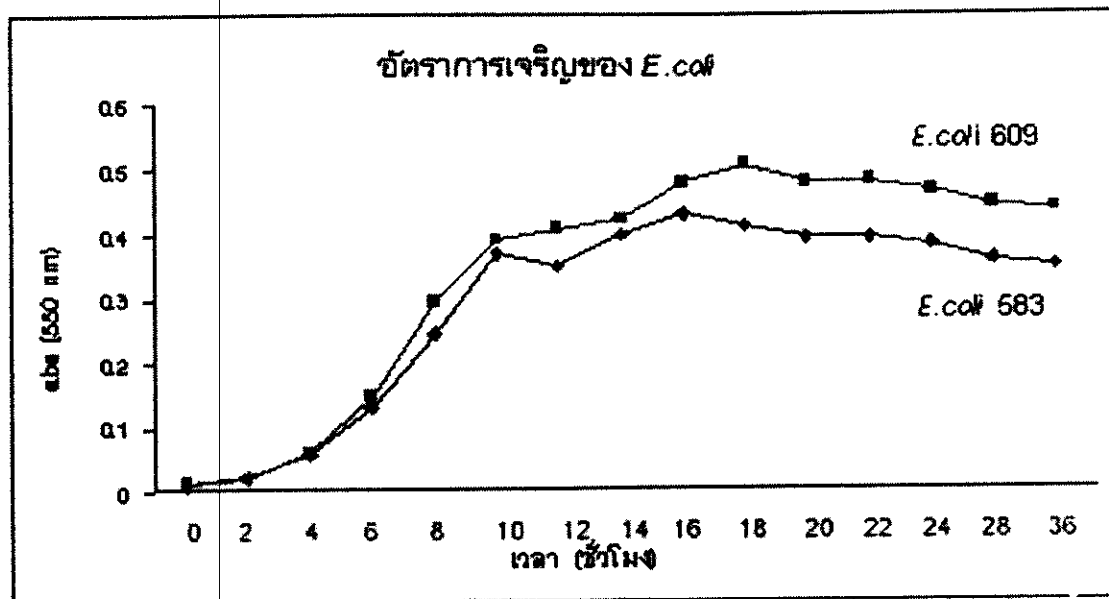
strain	แหล่งที่มา	% total siderophores	Enterobactin (OD <sub>510</sub> )	Aerobactin (OD <sub>526</sub> )
308	pus	31.38 ± 3.56	0.050 ± 0.001	0.001 ± 0.000
355	blood	23.23 ± 8.01	0.066 ± 0.022	0.012 ± 0.001
391	blood	13.53 ± 6.76	0.009 ± 0.008	-0.016 ± 0.003
443	blood	34.42 ± 1.55	0.080 ± 0.003	0.004 ± 0.001
469	blood	90.78 ± 2.62	0.108 ± 0.026	0.256 ± 0.011
526	urine	10.13 ± 2.78	0.014 ± 0.020	-0.018 ± 0.001
532	urine	7.44 ± 2.09	0.031 ± 0.007	-0.015 ± 0.004
583	urine	92.03 ± 1.09	0.043 ± 0.002	0.910 ± 0.017***
588	urine	84.70 ± 0.43	0.098 ± 0.029	0.097 ± 0.054
590	urine	47.14 ± 48.30	0.140 ± 0.124	0.047 ± 0.048
609	urine	93.80 ± 0.28	0.031 ± 0.010	0.817 ± 0.008
637	urine	25.15 ± 0.93	0.031 ± 0.008	0.015 ± 0.006
896	urine	94.31 ± 2.55*	0.143 ± 0.023**	0.159 ± 0.009
899	urine	6.57 ± 4.51	0.024 ± 0.012	-0.025 ± 0.007

\* เชื้อที่สร้าง Total siderophores ได้สูงที่สุด

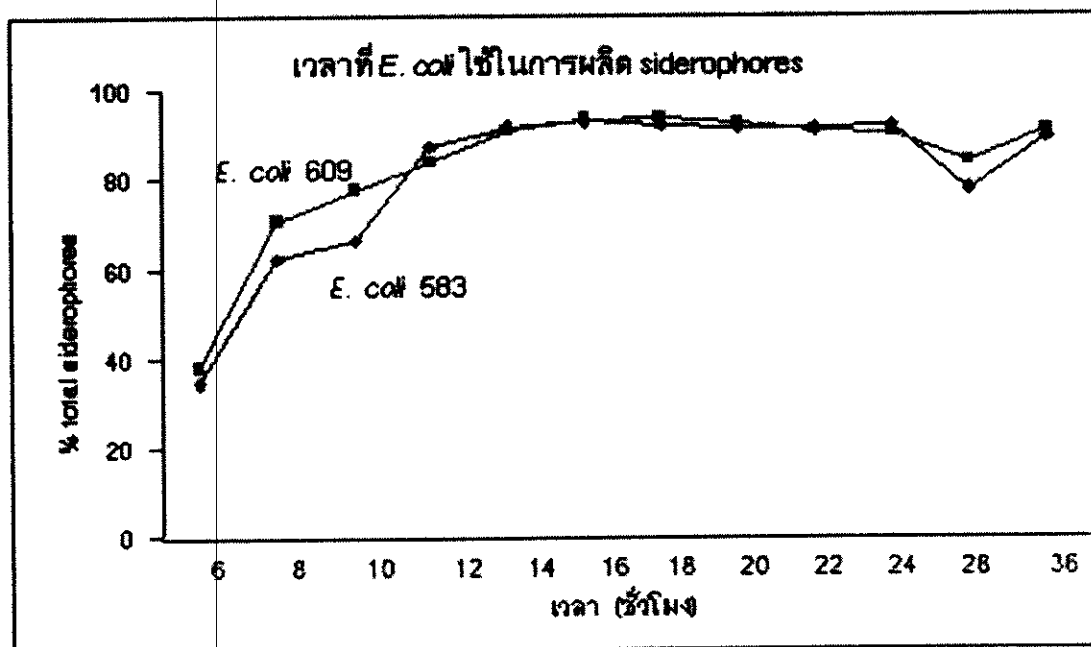
\*\* เชื้อที่สามารถสร้าง Enterobactin ได้สูงที่สุด

\*\*\* เชื้อที่สามารถสร้าง Aerobactin ได้สูงที่สุด

รูปที่ 4.1 กราฟแสดงอัตราการเจริญของ *E.coli*



รูปที่ 4.2 กราฟแสดงเวลาที่ใช้ในการผลิต siderophores ของ *E.coli*



#### 4.1.4 การศึกษาอัตราการเจริญของ *Salmonella* spp. และ *K. pneumoniae*

การศึกษาอัตราการเจริญของ *Salmonella* spp. (strain 464, 562) และ *K. pneumoniae* (strain 134, 506) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (M 9 medium) ที่จำกัดปริมาณเหล็ก ( $<10^{-8}$  M) ณ เวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 28 และ 36 ชั่วโมง โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 nm พบว่าเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นเชื้อจะมีปริมาณเพิ่มขึ้น จนถึงเวลาหนึ่งที่อัตราการเจริญของเชื้อจะลดลง โดย *Salmonella* spp. จะเริ่มเข้าสู่ stationary phase ที่เวลา 18 ชั่วโมง ดังตารางที่ 4.5 และแสดงกราฟอัตราการเจริญของเชื้อนี้ในรูปที่ 4.4 ส่วน *K. pneumoniae* จะเริ่มเข้าสู่ stationary phase ที่เวลา 12 ชั่วโมง ดังตารางที่ 4.6 และแสดงกราฟอัตราการเจริญของเชื้อนี้ในรูปที่ 4.5

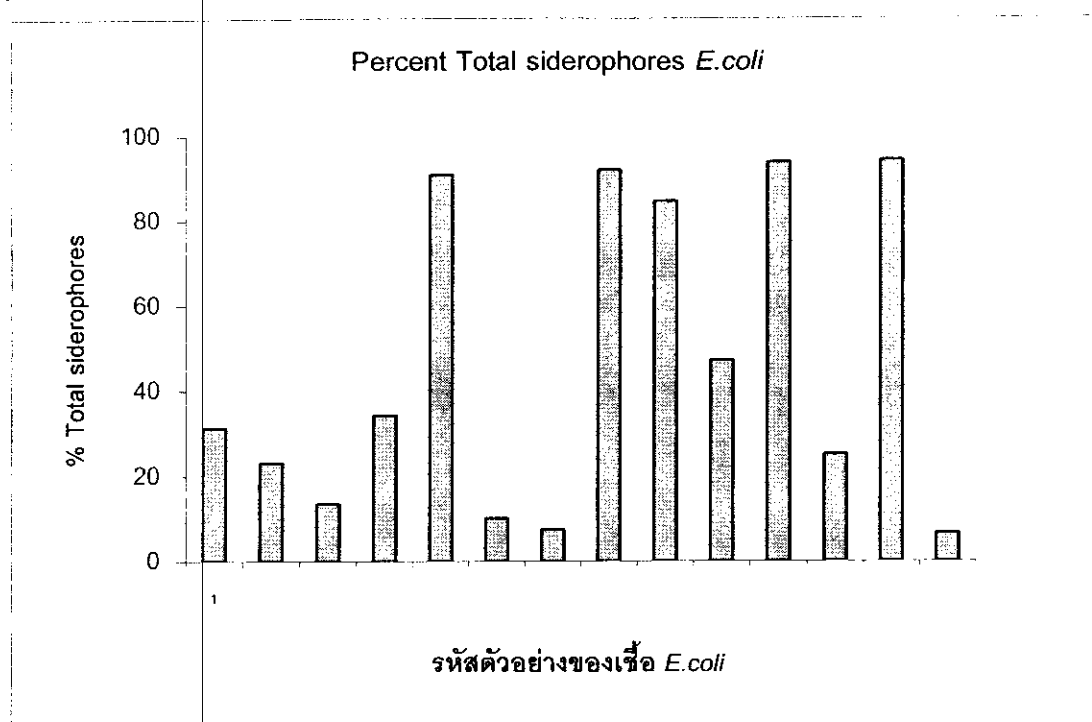
ตารางที่ 4.5 แสดงค่าการดูดกลืนแสง ( $OD_{550}$ ) ของ cell suspension *Salmonella* spp. strain 464 และ 562

เวลา (ชั่วโมง)	<i>Salmonella</i> spp. strain 464	<i>Salmonella</i> spp. strain 562
0	0.001 $\pm$ 0.001	0.001 $\pm$ 0.001
2	0.004 $\pm$ 0.001	0.004 $\pm$ 0.001
4	0.007 $\pm$ 0.003	0.010 $\pm$ 0.001
6	0.028 $\pm$ 0.002	0.029 $\pm$ 0.002
8	0.093 $\pm$ 0.005	0.096 $\pm$ 0.005
10	0.218 $\pm$ 0.011	0.220 $\pm$ 0.011
12	0.375 $\pm$ 0.011	0.386 $\pm$ 0.005
14	0.485 $\pm$ 0.001	0.495 $\pm$ 0.009
16	0.666 $\pm$ 0.039	0.695 $\pm$ 0.010
18	0.833 $\pm$ 0.071	0.794 $\pm$ 0.024
20	0.834 $\pm$ 0.009	0.805 $\pm$ 0.026
22	0.836 $\pm$ 0.003	0.796 $\pm$ 0.060
24	0.839 $\pm$ 0.008	0.801 $\pm$ 0.012
28	0.817 $\pm$ 0.018	0.760 $\pm$ 0.025
36	0.775 $\pm$ 0.018	0.718 $\pm$ 0.007

ตารางที่ 4.6 แสดงค่าการดูดกลืนแสง (OD<sub>550</sub>) ของ cell suspension *K. pneumoniae* strain 134 และ 506

เวลา (ชั่วโมง)	<i>K. pneumoniae</i> strain 134	<i>K. pneumoniae</i> strain 506
0	0.002±0.001	0.003±0.001
2	0.036±0.007	0.012±0.000
4	0.056±0.019	0.108±0.001
6	0.264±0.020	0.243±0.013
8	0.455±0.016	0.370±0.010
10	0.519±0.014	0.437±0.001
12	0.516±0.014	0.434±0.002
14	0.490±0.013	0.417±0.005
16	0.457±0.013	0.402±0.001
18	0.456±0.016	0.411±0.008
20	0.455±0.013	0.391±0.002
22	0.430±0.011	0.375±0.005
24	0.469±0.022	0.412±0.001
28	0.485±0.018	0.432±0.002
36	0.466±0.002	0.434±0.001

รูปที่ 4.3 กราฟแสดงการผลิต total siderophores ของ *E. coli* แต่ละ strain



#### 4.1.5 ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับการผลิต siderophores ของ *Salmonella* spp. และ *K. pneumoniae*

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลากับปริมาณการสร้าง Total siderophores ของ เชื้อต่างๆ ที่เวลา 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 และ 36 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่า *Salmonella* spp. strain 464 และ 562 มี % total siderophores สูงสุดเท่ากับ  $99.026 \pm 0.164$  และ  $98.028 \pm 0.683$  ตามลำดับ ที่เวลา 18 ชั่วโมง ดังตารางที่ 4.7 และกราฟแสดงเวลากับการผลิต siderophores ของเชื้อในรูปที่ 4.6

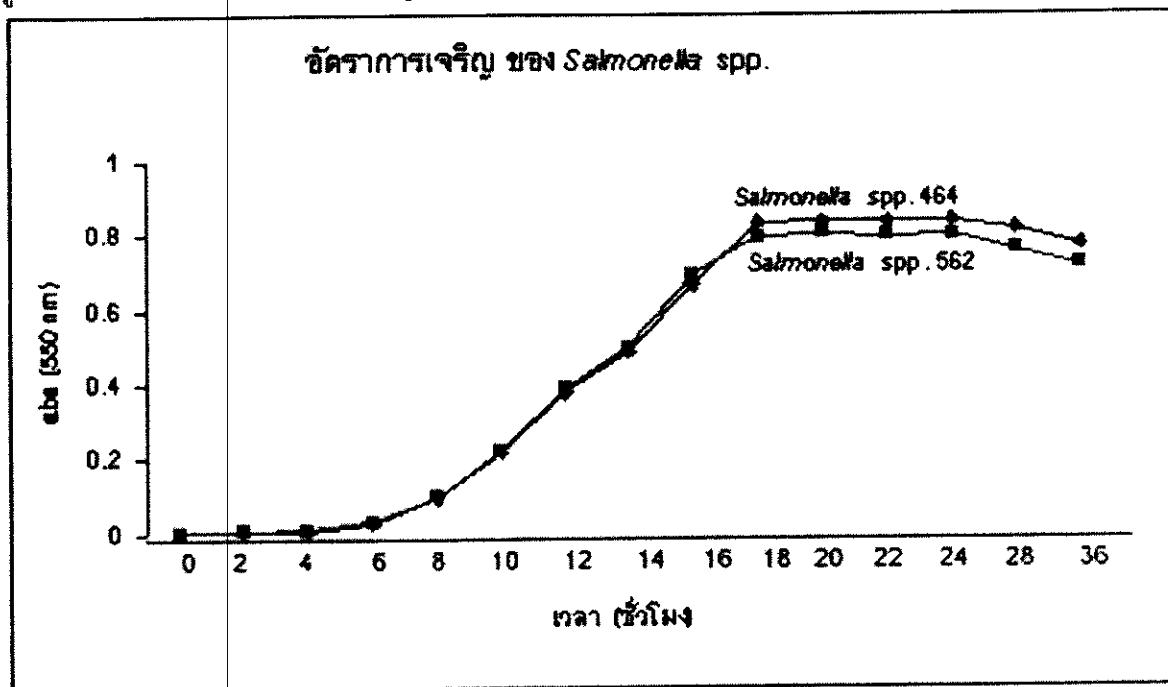
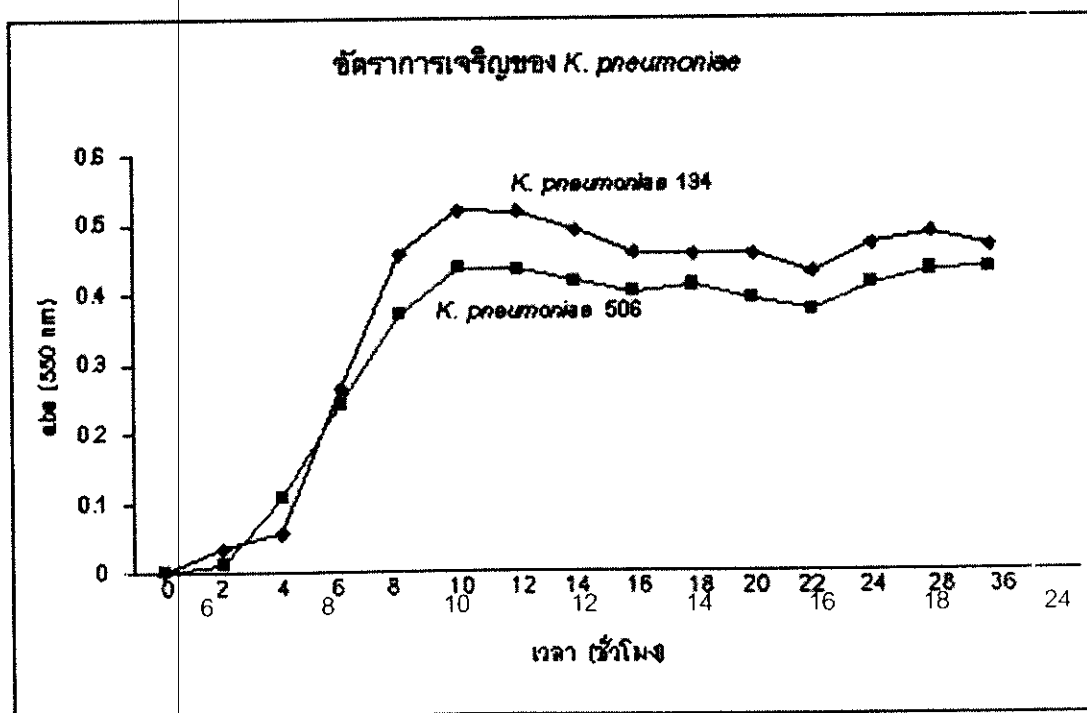
ส่วน *K. pneumoniae* strain 134 มี % total siderophores สูงสุดเท่ากับ  $51.737 \pm 0.604$  ที่เวลา 12 ชั่วโมง ขณะที่ strain 506 มี % total siderophores สูงสุดเท่ากับ  $50.342 \pm 2.499$  ที่เวลา 16 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.8 และรูปที่ 4.7)

ตารางที่ 4.7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับการผลิต Total siderophores ในเชื้อ *Salmonella* spp. strain 464 และ 562

เวลา (ชั่วโมง)	% total siderophores <i>Salmonella</i> spp strain 464	% total siderophores <i>Salmonella</i> spp strain 562
6	2.320±1.018	3.185±0.704
8	6.833±4.779	10.921±0.513
10	16.870±0.369	18.195±1.538
12	34.623±4.725	48.600±2.097
14	90.865±0.679	90.388±0.465
16	96.685±0.378	94.200±1.258
18	99.026±0.164*	98.028±0.683*
36	98.858±0.221	97.900±0.667

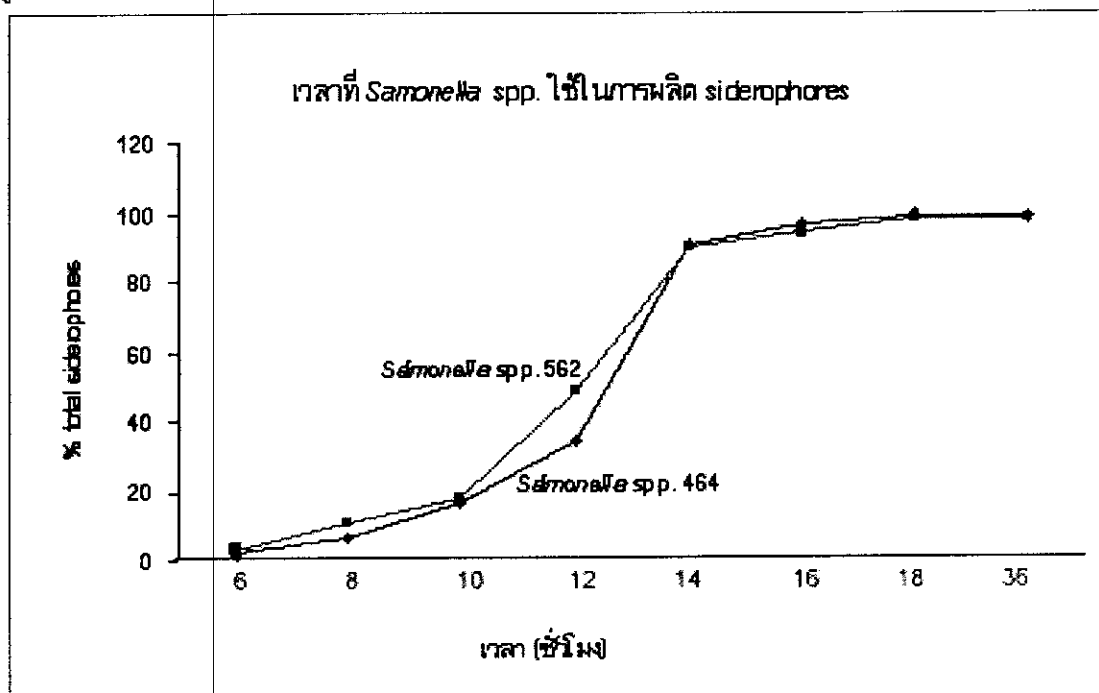
ตารางที่ 4.8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับการผลิต Total siderophores ในเชื้อ *K. pneumoniae* strain 134 และ 506

เวลา (ชั่วโมง)	% total siderophores <i>K. pneumoniae</i> strain 134	% total siderophores <i>K. pneumoniae</i> strain 506
6	13.067±0.038	22.837±1.127
8	37.612±1.813	37.412±1.205
10	42.852±2.131	48.147±2.938
12	51.737±0.604	45.532±4.310
14	47.067±4.953	44.217±0.442
16	43.337±5.476	50.342±2.499
18	46.610±1.166	47.750±0.120
36	45.160±8.053	29.013±2.379

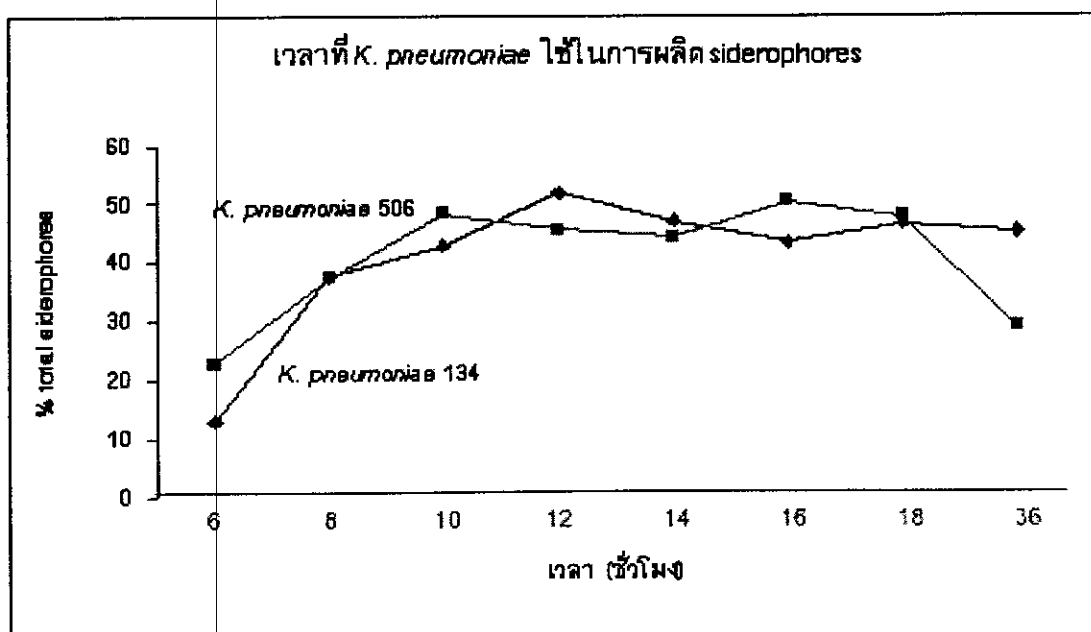
รูปที่ 4.4 กราฟแสดงอัตราการเจริญของ *Salmonella* spp.รูปที่ 4.5 กราฟแสดงอัตราการเจริญของ *K. pneumoniae*



รูปที่ 4.6 กราฟแสดงเวลากับการผลิต siderophores ของ *Salmonella* spp.



รูปที่ 4.7 กราฟแสดงเวลากับการผลิต siderophores ของ *K. pneumoniae*



#### 4.1.6 ผลการตรวจกรองการผลิต siderophores ของ *Salmonella* spp. และ *K. pneumoniae* strain ต่างๆ

จากการตรวจสอบการผลิต total siderophores ของ *Salmonella* spp. จำนวน 4 ตัวอย่าง และ *K. pneumoniae* จำนวน 25 ตัวอย่าง เพื่อคัดเลือกเชื้อที่สร้าง siderophores ปริมาณสูง พบว่าในกลุ่มของ *Salmonella* spp. ตัวอย่างที่ให้ % total siderophores สูงที่สุดคือ *Salmonella* spp. strain 464 เท่ากับ  $78.858 \pm 5.141$  และในกลุ่มของ *K. pneumoniae* ตัวอย่างที่สร้างได้มากที่สุดคือ strain 957 เท่ากับ  $74.956 \pm 2.392$  ซึ่งผลการตรวจสอบการสร้าง siderophores ของเชื้อ *Salmonella* spp. และ *K. pneumoniae* จะ แสดงในตารางที่ 4.9 และ 4.10 และแสดงเป็นกราฟในรูปที่ 4.8 และ 4.9

การตรวจสอบการผลิต enterobactin ของ *Salmonella* spp. และ *K. pneumoniae* ตัวอย่างต่างๆ พบว่ากลุ่มของ กลุ่มของ *Salmonella* spp. ตัวอย่างที่สร้างได้มากที่สุดคือ strain 464 เท่ากับ  $0.195 \pm 0.026$  และกลุ่มของ *K. pneumoniae* ตัวอย่างที่สร้างได้มากที่สุดคือ strain 957 สร้างได้เท่ากับ  $0.217 \pm 0.124$  (ตารางที่ 4.9 และ 4.10) ส่วนการสร้าง aerobactin ของ *Salmonella* spp. และ *K. pneumoniae* พบว่าในกลุ่มของ *Salmonella* spp. ตัวอย่างที่สร้างได้มากที่สุดคือ strain 933 เท่ากับ  $0.061 \pm 0.004$  และในกลุ่มของ *K. pneumoniae* ตัวอย่างที่สร้างได้มากที่สุดคือ strain 724 สร้างได้เท่ากับ  $0.335 \pm 0.020$

ตารางที่ 4.9 ผลการตรวจสอบการสร้าง siderophores ของเชื้อ *Salmonella* spp.

Strain	แหล่งที่มา	% total siderophores	Enterobactin (OD <sub>510</sub> )	Aerobactin (OD <sub>526</sub> )
464	blood	$78.858 \pm 5.141^*$	$0.195 \pm 0.026^{**}$	$0.057 \pm 0.006$
489	-	$17.558 \pm 3.169$	$0.050 \pm 0.002$	$0.049 \pm 0.003$
562	blood	$63.870 \pm 3.623$	$0.143 \pm 0.003$	$0.058 \pm 0.003$
933	-	$37.736 \pm 2.351$	$0.063 \pm 0.011$	$0.061 \pm 0.004^{***}$

\* เชื้อที่สร้าง Total siderophores ได้สูงที่สุด

\*\* เชื้อที่สามารถสร้าง Enterobactin ได้สูงที่สุด

\*\*\* เชื้อที่สามารถสร้าง Aerobactin ได้สูงที่สุด

- ไม่ระบุ

ตารางที่ 4.10 ผลการตรวจสอบการสร้าง siderophores ของเชื้อ *K. pneumoniae*

Strain	แหล่งที่มา	% total siderophores	Enterobactin (OD <sub>510</sub> )	Aerobactin (OD <sub>526</sub> )
10	urine	36.143±1.920	0.117±0.010	0.220±0.009
100	แผล	34.768±1.782	0.092±0.009	0.207±0.006
1000	pus	30.530±2.064	0.051±0.003	0.311±0.023
127	pus	71.691±2.718	0.167±0.010	0.181±0.014
134	pus	45.455±1.423	0.124±0.008	0.200±0.017
170	blood	55.393±1.074	0.072±0.004	0.131±0.009
194	pus from scrotum	17.653±1.125	0.055±0.014	0.198±0.002
240	blood	35.343±1.773	0.048±0.013	0.196±0.005
265	blood	27.835±2.960	0.195±0.137	0.171±0.031
398	urine	57.508±2.093	0.130±0.011	0.195±0.012
506	pus from gall bladder	15.583±1.109	0.053±0.003	0.223±0.017
585	blood	31.465±2.130	0.089±0.011	0.279±0.004
592	blood	21.826±5.580	0.067±0.011	0.240±0.014
598	blood	68.231±7.758	0.073±0.009	0.191±0.014
667	pus	11.253±1.659	0.068±0.014	0.254±0.018
724	urine	56.068±3.425	0.089±0.011	0.335±0.020***
734	urine	55.626±0.799	0.098±0.009	0.132±0.020
767	blood	38.658±4.254	0.088±0.001	0.231±0.006
811	blood	6.768±0.878	0.040±0.005	0.106±0.004
823	-	42.373±1.279	0.103±0.002	0.096±0.007
927	urine	74.586±3.020	0.079±0.020	0.226±0.012
940	แผลใต้คาง	39.116±0.775	0.098±0.001	0.088±0.006

ตารางที่ 4.10 (ต่อ)

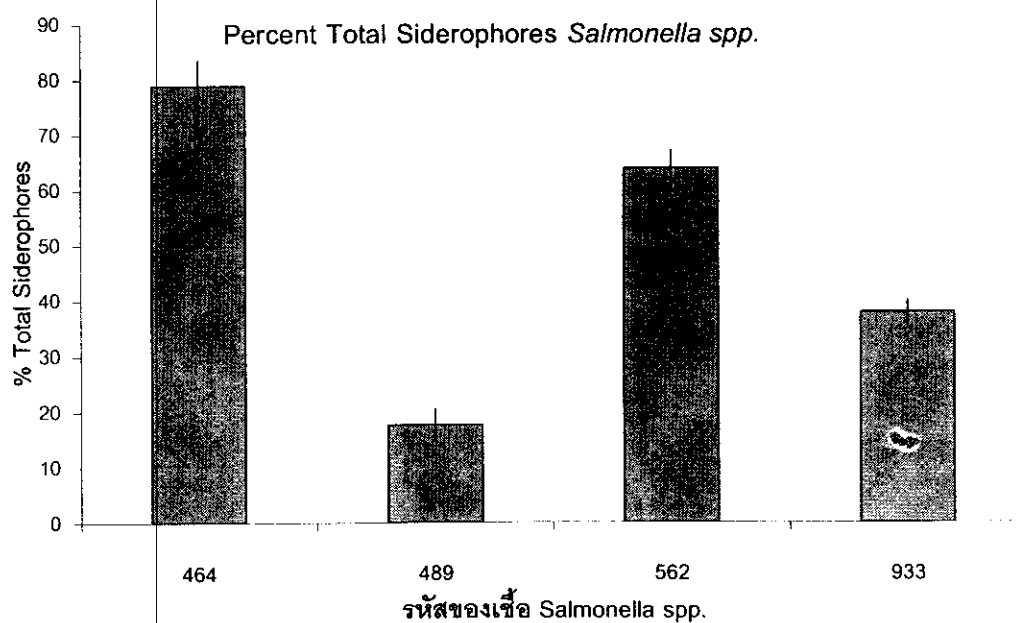
รหัส	แหล่งที่มา	% total siderophores	Enterobactin (OD <sub>510</sub> )	Aerobactin (OD <sub>526</sub> )
957	blood	74.956±2.392*	0.217±0.124**	0.223±0.016
965	pus ที่แก้ม	42.205±0.837	0.074±0.017	0.258±0.008
995	pus	44.443±3.529	0.097±0.012	0.086±0.008

\* เชื้อที่สร้าง Total siderophores ได้สูงที่สุด

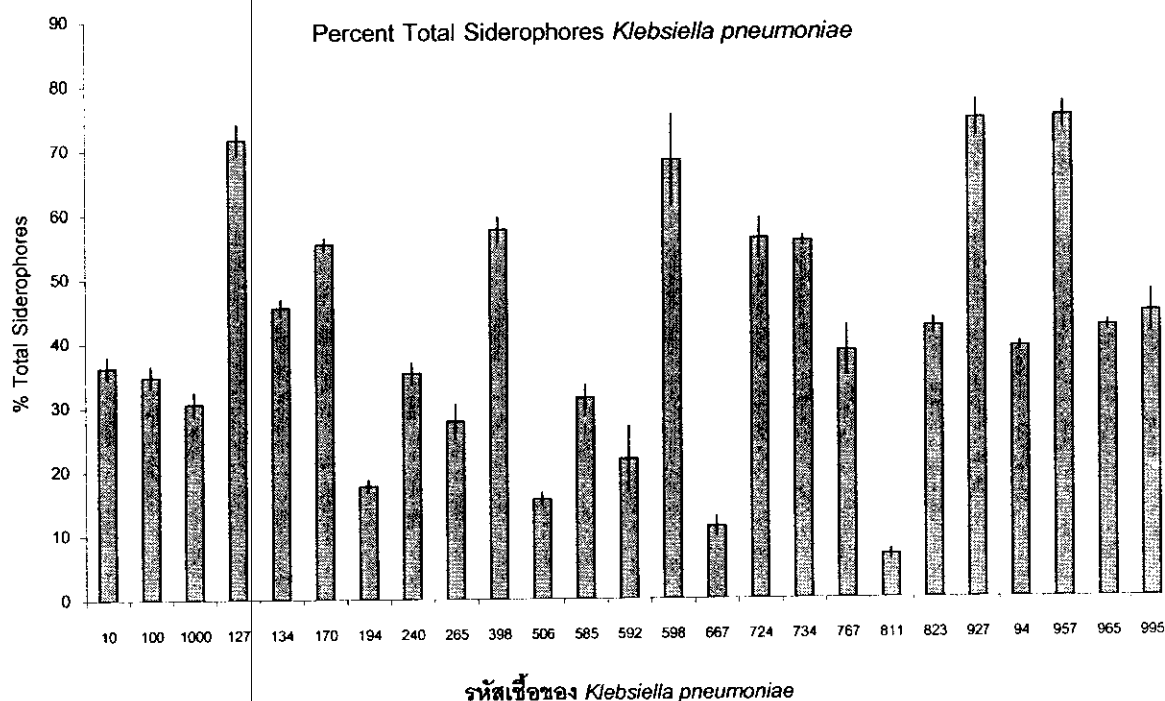
\*\* เชื้อที่สามารถสร้าง enterobactin ได้สูงที่สุด

\*\*\*เชื้อที่สามารถสร้าง aerobactin ได้สูงที่สุด

- ไม่ระบุ

รูปที่ 4.8 กราฟแสดงการผลิต total siderophores ของ *Salmonella* spp. แต่ละ strain

รูปที่ 4.9 กราฟแสดงการผลิต total siderophores ของ *K. pneumoniae* แต่ละ strain



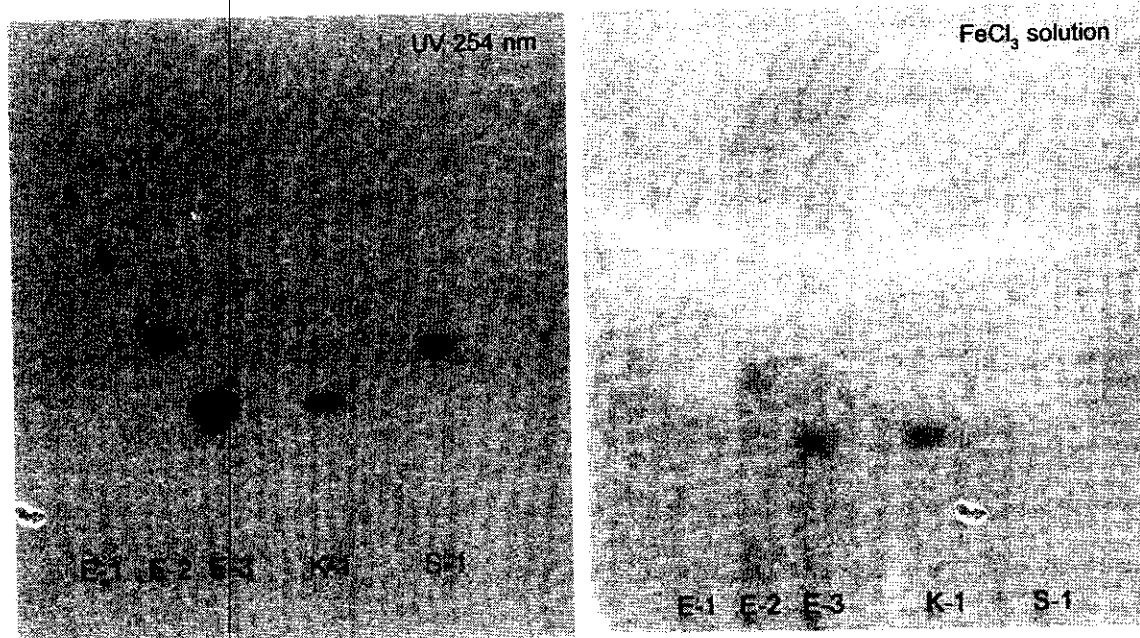
#### 4.1.7 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli*, *Salmonella* spp. และ *K. pneumoniae* strain ที่สามารถผลิต siderophores ปริมาณสูง และการสกัดแยก siderophores ให้บริสุทธิ์

จากการศึกษาข้างต้นพบว่า *E. coli* strain 896, *Salmonella* spp. strain 464 และ *K. pneumoniae* strain 957 ผลิต siderophores ปริมาณมากที่สุด จึงนำมาเพาะเลี้ยงจำนวน 9 ลิตรต่อเชื้อ ทำการสกัดด้วย ethyl acetate (1:1) ระเหยจนแห้ง จะได้สารสกัด ชั้น ethyl acetate สีน้ำตาล โดยที่จะได้สารสกัดของ *E. coli* 0.2253 g สารสกัดของ *Salmonella* spp. 0.3901 g และสารสกัดของ *K. pneumoniae* 0.2373 g จากนั้นทำการแยก siderophores จากเชื้อแต่ละชนิดโดย TLC ได้สารทั้งหมด 5 ชนิด ดังแสดงในตาราง 4.11 ส่วนรูปที่ 4.10 แสดงการตรวจสอบสารที่แยกได้ด้วย UV 254 nm และ  $\text{FeCl}_3$  solution

ตารางที่ 4.11 สารที่แยกได้จาก crude siderophores extracts ของเชื้อต่าง ๆ

เชื้อ	สารชื่อ	น้ำหนัก (g)	Rf value	UV 254 nm	FeCl <sub>3</sub> sol <sup>n</sup>
<i>E.coli</i> 896	E-1	0.0001	0.72	+	-
	E-2	0.1000	0.54	+	เทา
	E-3	0.0110	0.42	+	แดง
<i>Salmonella</i> spp. 464	S-1	0.0077	0.51	+	-
<i>K. pneumoniae</i> 957	K-1	0.0056	0.45	+	ม่วง

รูปที่ 4.10 แสดงการตรวจสอบสารที่แยกได้ด้วย UV 254 nm และ FeCl<sub>3</sub> solution



## 4.2 ผลการศึกษาฤทธิ์ด้านปฏิกริยาออกซิเดชันของ siderophores

### 4.2.1 ลักษณะทั่วไปของเซลล์ HEK 293

HEK-293 เป็น transformed human embryonic kidney cell เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์จะแผ่เป็นชั้นเดียว (monolayer) ได้อย่างรวดเร็วบนผิวพลาสติกใน culture plate ภายใต้ อุณหภูมิ 37 °C ความชื้น 95% ในบรรยากาศที่มี 5% CO<sub>2</sub> ทำการแบ่งเซลล์ (subculture) ทุก 1-2 วันเมื่อเซลล์เจริญเพิ่มจำนวนได้ประมาณ 80-90% confluent โดยอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์ HEK-293 คือ D-MEM ที่มี serum supplement

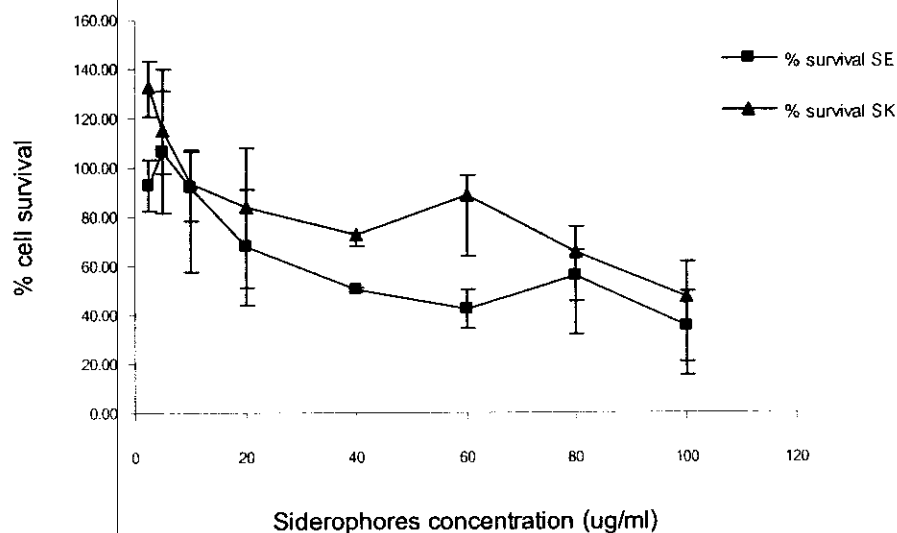
### 4.2.2 ผลของสารทดสอบต่อการมีชีวิตของเซลล์

การศึกษาผลของสารทดสอบในที่นี้คือ สาร E-3 ซึ่งเป็น siderophores ที่แยกได้จาก *E.coli* (SE) และ สาร K-1 ซึ่งเป็น siderophores ที่แยกได้จาก *K. pneumoniae* (SK), Fe-NTA และ lead acetate ต่อการมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง มีวัตถุประสงค์เพื่อหาความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงตายครึ่งหนึ่งเพื่อให้ได้ค่า IC<sub>50</sub> และเพื่อหาขนาดที่เหมาะสมที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป ในการศึกษาผลของสารทดสอบต่างๆต่อการมีชีวิตของเซลล์ใช้ วิธี MTT cytotoxicity assay ซึ่งใช้หลักการที่เซลล์ที่ยังมีชีวิตจะมี mitochondrial succinate dehydrogenase ที่สามารถเปลี่ยนสาร MTT หรือ 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide ให้เป็นสาร formazan ซึ่งเป็นสารสีม่วง ปริมาณของสาร formazan ที่เกิดขึ้นจะแปรผันตรงกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต

#### 4.2.2.1 ผลของ siderophores ต่อการมีชีวิตของเซลล์

Siderophores ทั้งที่ได้จาก *E.coli* (SE) และ siderophores ที่ได้จาก *K. pneumoniae* (SK) เมื่อนำมาทดลองหาความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายไป 50 % หรือ มีชีวิตรอด 50% (50% inhibitory concentration, IC<sub>50</sub> หรือ toxicity concentration, TC<sub>50</sub>) โดยการบ่มเซลล์เพาะเลี้ยง กับ SE และ SK ที่ความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่าค่า IC<sub>50</sub> ของ SE และ SK เท่ากับ 40.00 µg/ml และ 96.68 µg/ml ตามลำดับ ดังในรูปที่ 4.11 ขนาดของ siderophores ทั้งสองชนิดที่เลือกใช้ในการทดลองต่อไปคือ 2.5 µg/ml ของทั้ง SE และ SK ซึ่งเป็นขนาดที่ไม่ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์

รูปที่ 4.11 ผลของ siderophores ที่ได้จาก *E.coli* (SE) และ siderophores ที่ได้จาก *K. pneumoniae* (SK) ต่อการมีชีวิตของเซลล์ HEK-293

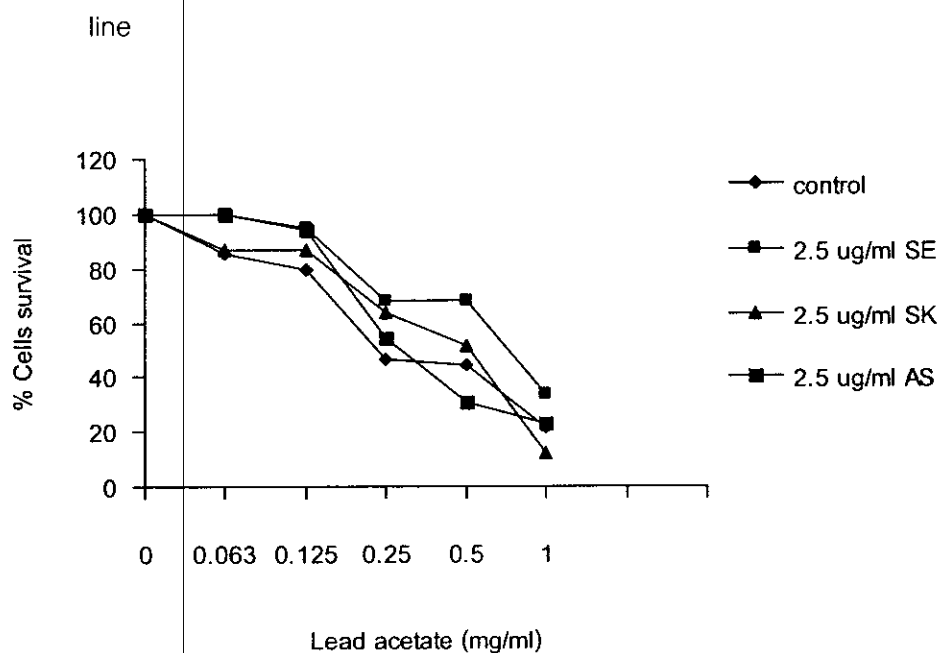


#### 4.2.2.2 ผลของ lead acetate และ Fe-NTA ต่อการมีชีวิตของเซลล์ HEK-293

ในการศึกษาผลของ SE และ SK ในขนาด 2.5  $\mu\text{g/ml}$  ต่ออัตราการมีชีวิตของเซลล์ HEK-293 ที่ได้รับ Lead acetate ในการเหนี่ยวนำให้เกิด oxidative stress ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 0 ถึง 1 mg/ml ผลการศึกษาดังแสดงรูปที่ 4.2 คือ SE สามารถลดอัตราการตายของเซลล์ที่เกิดจาก lead acetate ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) สำหรับ SK และ AS (ascorbic acid) สามารถลดอัตราการตายของเซลล์ได้แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) ค่า  $\text{EC}_{50}$  (Effective concentration at 50 % survival) แสดงในตารางที่ 4.12



รูปที่ 4.12 ผลของ SE SK และ AS ต่ออัตราการมีชีวิตของ lead acetate treated-HEK-293 cell

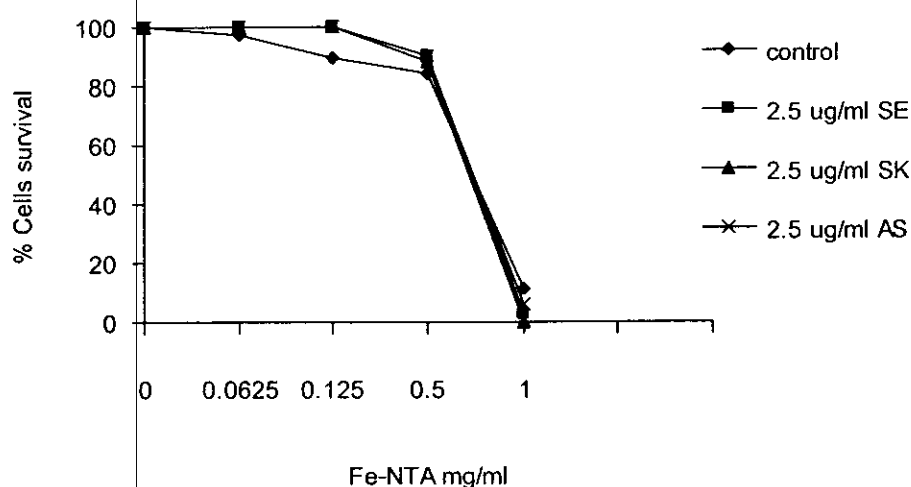


ตารางที่ 4.12 ค่า  $EC_{50}$  ของเซลล์แต่ละกลุ่มการทดลอง

กลุ่มการทดลอง	ค่า $EC_{50}$ (mg/ml)
Lead acetate	0.24
0.25 mg/ml lead acetate+ 2.5 µg/ml SE	0.28
0.25 mg/ml lead acetate+ 2.5 µg/ml SK	0.50
0.25 mg/ml lead acetate+ 2.5 AS µg/ml	0.75

ผลของ SE และ SK ต่ออัตราการมีชีวิตของเซลล์ HEK-293 ที่ได้รับ Fe-NTA ในการเหนี่ยวนำให้เกิด oxidative stress ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แสดงในรูปที่ 4.13 พบว่าแต่ละกลุ่มการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) มีค่า  $IC_{50}$  ใกล้เคียงกันคือ 0.54 mg/ml

รูปที่ 4.13 ผลของ SE, SK และ AS ต่ออัตราการมีชีวิตของ Fe-NTA treated-HEK-293 cell line



#### 4.2.3 ผลของ siderophores ในการป้องกันการเกิด protein oxidation

การศึกษาผลของ siderophores ทั้ง SE และ SK ต่อ protein oxidation ในเซลล์ HEK-293 ในที่นี้ใช้วิธีวัดปริมาณของ carbonyl protein ซึ่งเป็นผลผลิตจากการเกิด oxidation แล้วทำให้เกิด protein damage ผลการศึกษาพบว่า เมื่อบ่มเซลล์ HEK-293 ในอาหารที่มี SE หรือ SK ที่ความเข้มข้น 2.5  $\mu$ g/ml ร่วมกับ 0.25 mg/ml lead acetate ปริมาณ carbonyl protein ที่เกิดขึ้นในกลุ่มที่ได้รับเฉพาะ lead acetate มีปริมาณ carbonyl protein สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) และกลุ่มที่ได้รับ lead acetate ร่วมกับ SE มีปริมาณ carbonyl protein ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ lead acetate อย่างเดียว ( $p < 0.05$ ) สำหรับกลุ่มที่ได้รับ lead acetate ร่วมกับ SK และ lead acetate ร่วมกับ AS มีปริมาณ carbonyl protein ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ lead acetate อย่างเดียวแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่า SE และ SK มีผลยับยั้งปฏิกิริยา protein oxidation ในเซลล์ HEK-293 ดังแสดงในตารางที่ 4.13 และ รูปที่ 4.14

ตารางที่ 4.13 ผลของ SE, SK และ AS ต่อ protein oxidation ใน Lead acetate treated-HEK-293 cell line

Protein carbonyl (nmol/mg. protein)	
control	3.465±0.657 <sup>a</sup>
LA	9.995±0.431 <sup>b</sup>
LA + SE	5.56±0.282 <sup>c</sup>
LA + SK	6.06±2.404 <sup>d</sup>
LA + AS	3.32±2.503 <sup>e</sup>

ความแตกต่างระหว่างกลุ่ม a และ b, b และ c มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

ความแตกต่างระหว่างกลุ่ม b และ d, b และ e ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ )

Control= กลุ่มควบคุม

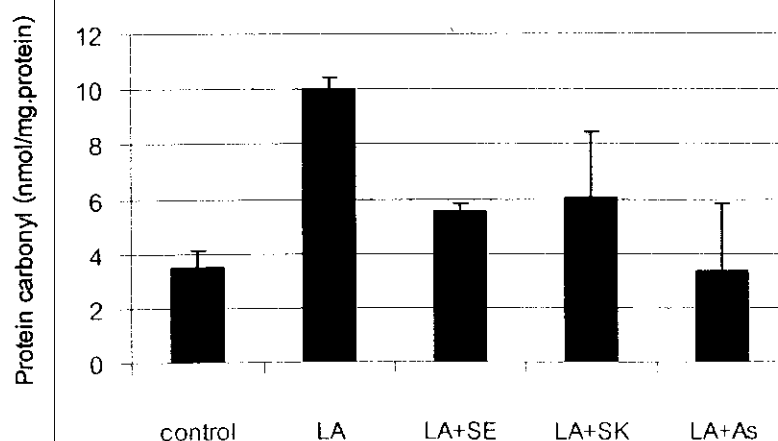
LA = เซลล์ที่ได้รับ 2.5 mg/ml lead acetate อย่างเดียว

LA+SE กลุ่มเซลล์ที่ได้รับ 2.5 mg/ml lead acetate ร่วมกับ 2.5  $\mu$ g/ml SE

LA+SK กลุ่มเซลล์ที่ได้รับ 2.5 mg/ml lead acetate ร่วมกับ 2.5  $\mu$ g/ml SK

LA+AS กลุ่มเซลล์ที่ได้รับ 2.5 mg/ml lead acetate ร่วมกับ 2.5  $\mu$ g/ml AS

รูปที่ 4.14 ผลของ SE, SK และ AS ต่อ protein oxidation ใน lead acetate treated-HEK-293 cell line (ค่าแสดงเป็น mean  $\pm$  SD., n=3)



เมื่อศึกษาผลของผลของ SE และ SK ที่ความเข้มข้น 2.5  $\mu\text{g/ml}$  ต่อ HEK-293 cell line ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิด oxidative stress โดย 0.5 mg/ml Fe-NTA โดยการบ่มเซลล์ HEK-293 กับ Fe-NTA เดี่ยวๆหรือร่วมกับ SE, SK หรือ AS ผลการศึกษาพบว่าปริมาณ carbonyl protein ที่เกิดขึ้น ในกลุ่มเซลล์ที่ได้รับ Fe-NTA อย่างเดียวนั้นมีปริมาณสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p<0.05$ ) และกลุ่มเซลล์ที่ได้รับ Fe-NTA ร่วมกับ SE มีปริมาณ carbonyl protein ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Fe-NTA ( $p<0.05$ ) สำหรับกลุ่มที่ได้รับ Fe-NTA ร่วมกับ SK มีปริมาณ carbonyl protein ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Fe-NTA แต่ไม่มีนัยสำคัญ ( $p>0.05$ ) ส่วนกลุ่มที่ได้รับ Fe-NTA ร่วมกับ AS ไม่มีผลยับยั้ง protein oxidation ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่า SE มีผลยับยั้งปฏิกิริยา protein oxidation ในเซลล์ HEK-293 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิด oxidative stress โดย Fe-NTA ดังแสดงในตารางที่ 4.14 และรูปที่ 4.15

ตารางที่ 4.14 ผลของ SE, SK และ AS ต่อ protein oxidation ใน Fe-NTA treated-HEK-293 cell line

Carbonyl protein (nmol/mg. Protein)	
control	3.475 $\pm$ 0.417 <sup>a</sup>
Fe-NTA	9.975 $\pm$ 3.061 <sup>b</sup>
Fe-NTA+SE	4.050 $\pm$ 1.414 <sup>c</sup>
Fe-NTA +SK	6.750 $\pm$ 1.697 <sup>d</sup>
Fe-NTA +As	10.390 $\pm$ 2.602 <sup>e</sup>

ความแตกต่างระหว่างกลุ่ม a และ b, b และ c มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P<0.5$ )

ความแตกต่างระหว่างกลุ่ม b และ d, b และ e ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P>0.5$ )

Control= กลุ่มควบคุม

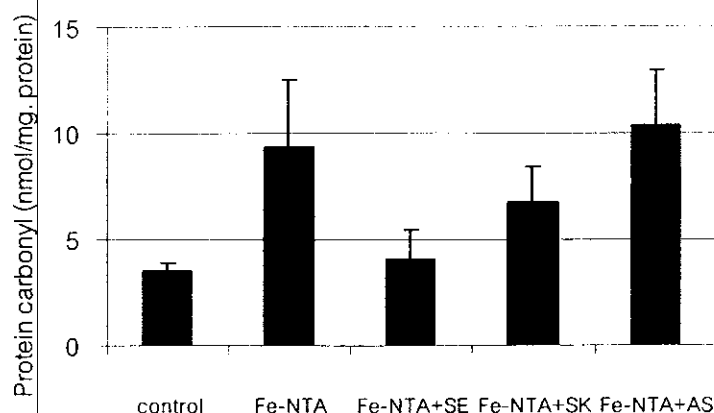
Fe-NTA = กลุ่มเซลล์ที่ได้รับ 0.5 mg/ml Fe-NTA อย่างเดียว

Fe-NTA+SE กลุ่มเซลล์ที่ได้รับ 0.5 mg/ml Fe-NTA ร่วมกับ 2.5  $\mu\text{g/ml}$  SE

Fe-NTA+SK กลุ่มเซลล์ที่ได้รับ 0.5 mg/ml Fe-NTA ร่วมกับ 0.5  $\mu\text{g/ml}$  SK

Fe-NTA+AS กลุ่มเซลล์ที่ได้รับ 0.5 mg/ml Fe-NTA ร่วมกับ 2.5  $\mu\text{g/ml}$  AS

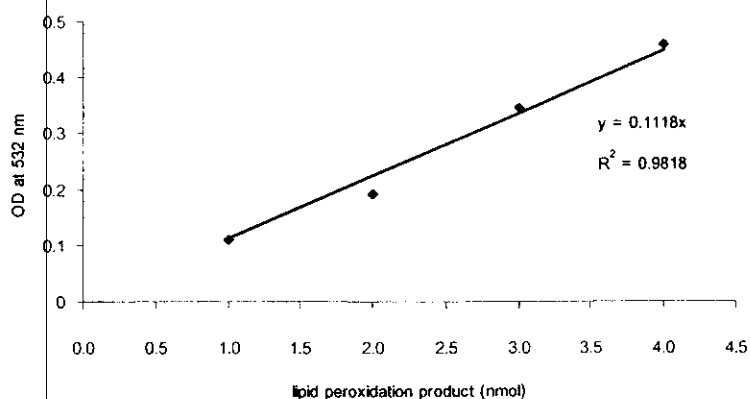
รูปที่ 4.15 ผลของ SE, SK และ AS ต่อ protein oxidation ใน Fe-NTA treated-HEK-293 cell line (ค่าแสดงเป็น mean  $\pm$  SD., n=3)



#### 4.2.4 ผลของ siderophores ในการป้องกันการเกิด lipid peroxidation

การศึกษาผลของ siderophores ในการป้องกันการเกิด lipid peroxidation ในที่นี้ใช้วิธี TMP assay โดยบ่มเซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีตัวเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation เดี่ยวๆ ในที่นี้คือ Fe-NTA และ lead acetate หรือร่วมกับสารทดสอบ คือ siderophores ที่สกัดได้จาก *E.coli* และ siderophores ที่สกัดได้จาก *K. pneumoniae* และ กับ ascorbic acid ที่ใช้เป็นสารแอนติออกซิแดนท์มาตรฐาน วิธีนี้เป็นการวัด lipid peroxidation product เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยา lipid peroxidation โดยการการเติมสารที่ทำปฏิกิริยากับ lipid peroxidation product แล้วเกิดสารมีสีชมพู ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 nm ปริมาณของสารมีสีชมพู ที่เกิดจะแปรผันตรงกับปริมาณของ lipid peroxidation product โดยใช้ TMP เป็นสารมาตรฐานในการหาปริมาณ lipid peroxidation product กราฟมาตรฐานเพื่อใช้ในการหาปริมาณของ lipid peroxide ดังแสดงในรูปที่ 4.16

รูปที่ 4.16 กราฟมาตรฐานของ TMP ในการหาปริมาณของ lipid peroxide



ผลการศึกษาพบว่า lead acetate และ Fe-NTA มีคุณสมบัติเป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ที่ดี จะเห็นได้จากปริมาณของ lipid peroxide ที่เกิดขึ้นในปริมาณที่สูงกว่ากลุ่มควบคุม และต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ดังแสดงในตารางที่ 4.15 และรูปที่ 4.17 และ 4.18

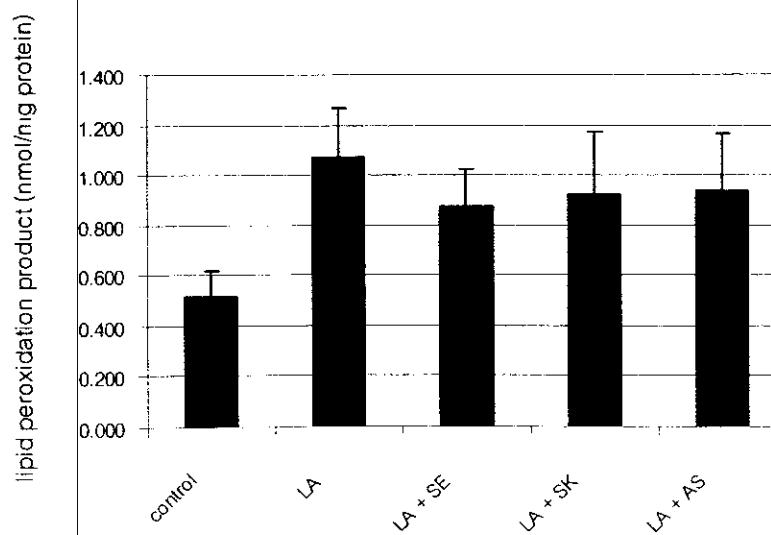
ปริมาณของ lipid peroxidation product ที่ได้จากเซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้รับ lead acetate ร่วมกับ ascorbic acid ซึ่งใช้เป็นสารแอนติออกซิแดนท์มาตรฐานมีค่าเท่ากับ  $0.936 \pm 0.233$  ต่ำกว่า เมื่อเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้รับ lead acetate เพียงอย่างเดียว ( $1.069 \pm 0.208$ ) แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ดังในรูปที่ 4.17 ผลการทดลองเป็นเช่นเดียวกันเมื่อใช้ Fe-NTA เป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิด lipid peroxidation โดยปริมาณของ lipid peroxidation product ที่ได้ในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ป้อนด้วย Fe-NTA ร่วมกับ ascorbic acid จะต่ำกว่าเซลล์ที่ได้รับ Fe-NTA อย่างเดียว แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ดังแสดงในตารางที่ 4-4 และรูปที่ 4.18

ปริมาณของ lipid peroxidation product ที่ได้จากเซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้รับ lead acetate ร่วมกับ siderophores ที่ได้จาก *E.coli* หรือ siderophores ที่ได้จาก *K. Pneumoniae* มีค่าเท่ากับ  $0.876 \pm 0.153$  และ  $0.924 \pm 0.251$  ตามลำดับซึ่งต่ำกว่าเซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้รับ lead acetate เพียงอย่างเดียว แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับที่ได้จากเซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้รับ lead acetate เพียงอย่าง และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้รับ lead acetate ร่วมกับ ascorbic acid ผลการทดลองเช่นเดียวกันเมื่อเหนี่ยวนำเซลล์ให้เกิด lipid peroxidation โดย Fe-NTA

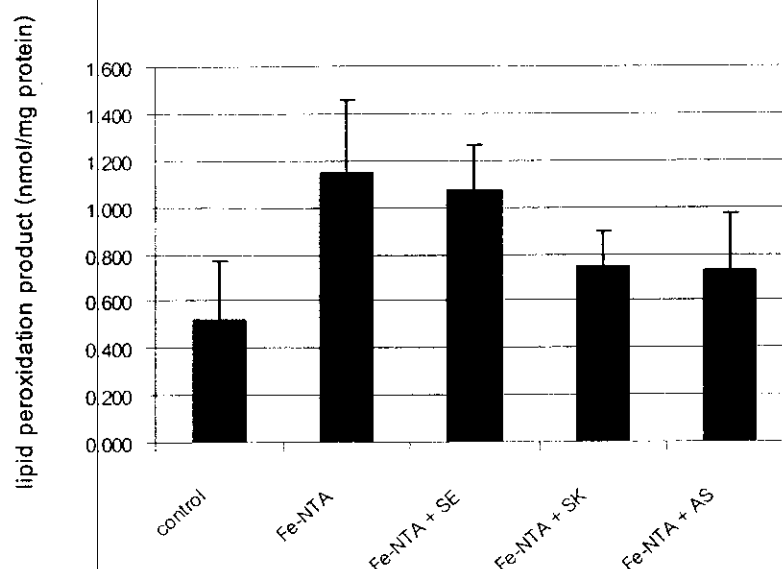
ตารางที่ 4.15 ผลของ SE, SK และ AS ต่อ lipid peroxidation ใน lead acetate และ Fe-NTA treated-HEK-293 cell line (ค่าแสดงเป็น mean  $\pm$  SD., n=3)

Treatments	Amount of lipid peroxidation product (nmol/mg protein)
Control	0.5204 $\pm$ 0.167
Lead acetate (0.25 mg/ml)	1.069 $\pm$ 0.208
Lead acetate (0.25 mg/ml) + SE (2.5 $\mu$ g/ml)	0.876 $\pm$ 0.153
Lead acetate (0.25 mg/ml) + SK (2.5 $\mu$ g/ml)	0.924 $\pm$ 0.251
Lead acetate (0.25 mg/ml) + AS (2.5 $\mu$ g/ml)	0.936 $\pm$ 0.233
Fe-NTA (0.5 mg/ml)	1.148 $\pm$ 0.313
Fe-NTA (0.5 mg/ml) + SE (2.5 $\mu$ g/ml)	1.072 $\pm$ 0.195
Fe-NTA (0.5 mg/ml) + SK (2.5 $\mu$ g/ml)	0.747 $\pm$ 0.154
Fe-NTA (0.5 mg/ml) + AS (2.5 $\mu$ g/ml)	0.732 $\pm$ 0.244

รูปที่ 4.17 ผลของ SE, SK และ AS ต่อ lipid peroxidation ใน lead acetate treated-HEK-293 cell line (ค่าแสดงเป็น mean  $\pm$  SD., n=3)



รูปที่ 4.18 ผลของ SE, SK และ AS ต่อ lipid peroxidation ใน Fe-NTA treated-HEK-293 cell line (ค่าแสดงเป็น mean  $\pm$  SD., n=3)



#### 4.2.5 ผลของ siderophores ต่อ glutathione peroxidase activity ในเซลล์เพาะเลี้ยง

การศึกษาผลของ siderophores ต่อ glutathione peroxidase activity นั้นทำโดยการบ่มเซลล์ HEK-293 กับ siderophores ที่สกัดได้จาก *E.coli* และ siderophores ที่สกัดได้จาก *K. pneumoniae* ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0.625, 1.25 และ 2.5  $\mu\text{g/ml}$  เทียบกับ ascorbic acid ที่ใช้เป็นสารแอนติออกซิแดนท์มาตรฐาน พบว่า siderophores จาก *E.coli* มีคุณสมบัติเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ glutathione peroxidase ทุกความเข้มข้นที่ใช้ทำให้ glutathione peroxidase activity สูงกว่ากลุ่มควบคุม แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่  $p < 0.05$  ดังแสดงในตารางที่ 4.16 และรูปที่ 4.19

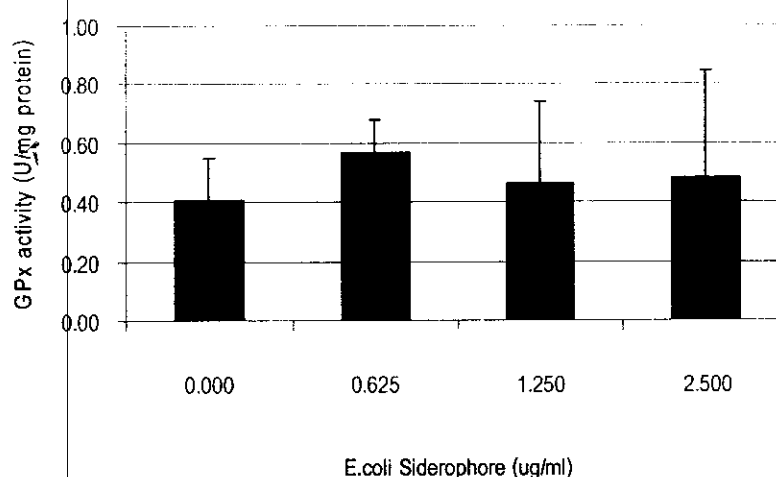


ตารางที่ 4.16 ผลของ siderophores จาก *E.coli* ที่ความเข้มข้นต่างๆต่อ glutathione peroxidase (GPx) activity (U/mg protein)

	<i>E.coli</i> Siderophores ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	0	0.625	1.250	2.500
GPx activity (U/mg protein)*	0.405 $\pm$ 0.145	0.570 $\pm$ 0.112	0.464 $\pm$ 0.276	0.482 $\pm$ 0.366

\* mean $\pm$ S.D. (n=2)

รูปที่ 4.19 Glutathione peroxidase activity (mean $\pm$ S.D.) เมื่อกระตุ้นด้วย siderophores ที่ได้จาก *E.coli* ที่ความเข้มข้นต่างๆ



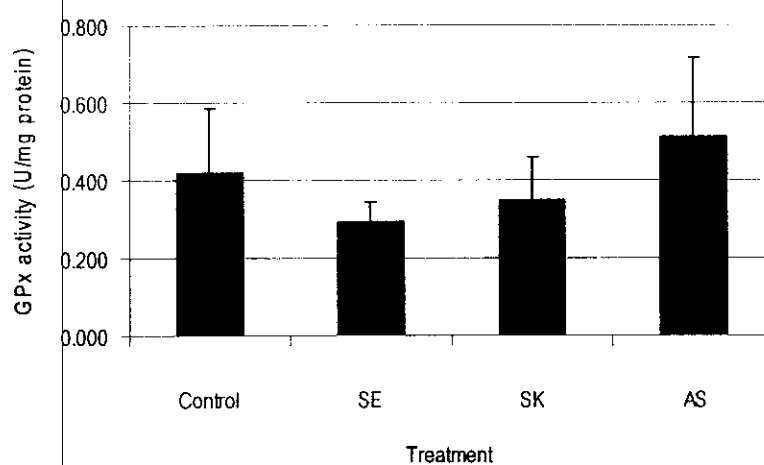
ผลจากการทดสอบการทำงานของเอนไซม์ glutathione peroxidase เมื่อกระตุ้นด้วยสารต่างๆ ได้แก่ siderophores จาก *E.coli* , siderophore จาก *K. pneumoniae* และ ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 2.5  $\mu\text{g/ml}$  (ตารางที่ 4.17 และรูปที่ 4.20) พบว่าค่า glutathione peroxidase activity แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติทั้งระหว่างกลุ่มทดสอบกับกลุ่มควบคุม และเมื่อเปรียบเทียบ glutathione peroxidase activity ระหว่างกลุ่มทดสอบด้วยกัน พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

ตารางที่ 4.17 ผลของ siderophores จาก E.coli ที่ความเข้มข้น 2.5  $\mu\text{g/ml}$  ต่อ glutathione peroxidase activity (U/mg protein)

	Treatment ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	control	SE	SK	AS
GPx activity (U/mg protein)*	0.418 $\pm$ 0.167	0.295 $\pm$ 0.049	0.347 $\pm$ 0.113	0.511 $\pm$ 0.204

\* mean $\pm$ S.D. (n=3)

รูปที่ 4.20 Glutathione peroxidase activity (mean $\pm$ SD.) เมื่อกระตุ้นด้วย siderophores SE, SK และ AS ที่ความเข้มข้น 2.5  $\mu\text{g/ml}$



## บทที่ 5

### อภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

#### 1. อภิปรายผลการวิจัย

การผลิต siderophores ของเชื้อจุลินทรีย์ จะเกี่ยวข้องกับปัจจัยเช่น ความสามารถของตัวอย่างเชื้อแต่ละชนิดในการผลิต siderophores และเงื่อนไขในการเลี้ยงเชื้อ เช่น ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมถึงเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงที่ทำให้เชื้อแต่ละชนิดผลิต siderophores ปริมาณสูง

จากผลการศึกษาอัตราเจริญของ pathogenic gram-negative rod bacteria ใน enterobacteriaceae 3 ชนิดได้แก่ *E. coli*, *Salmonella* spp. และ *K. pneumoniae* ที่ได้รับจากโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จ. อุบลราชธานี พบว่า *E. coli* (strain 583 และ 609) จะเจริญสูงสุดในช่วงเวลา 16 - 18 ชั่วโมง *Salmonella* spp. (strain 464 และ 551) เริ่มเข้าสู่ stationary phase เวลา 18 ชั่วโมง ในขณะที่ *K. pneumoniae* (strain 134 และ 506) เริ่มเข้าสู่ stationary phase ที่เวลา 12 -16 ชั่วโมง จากกราฟแสดงอัตราการเจริญของเชื้อทั้ง 3 ชนิด(รูปที่ 4.1, 4.4 และ 4.5) ปริมาณเชื้อจะสูงขึ้นตามระยะเวลาที่ในการเลี้ยง จากนั้นจะเจริญเติบโตสูงสุดที่ stationary phase แล้วจะคงที่ไม่มีการเพิ่มจำนวนอีก แม้จะมีการแบ่งตัวเพิ่มขึ้นแต่จะเท่ากับอัตราการตาย ทั้งนี้เนื่องจากสารอาหารถูกใช้ไปเกือบหมด และมีการขับของเสียที่เป็นพิษออกมาจากกระบวนการ metabolism

จากรายงานการศึกษาของ Harjai et al, 1990, Podschun et al, 1992, Rabsch et al, 1987 ทำให้ทราบเบื้องต้นว่า *E. coli*, *Salmonella* spp. และ *K. pneumoniae* สร้าง siderophores ได้ทั้ง hydroxamate และ catechol type การวิเคราะห์ total siderophores จะใช้วิธี CAS assay (Schwyn and Neilands, 1987) ซึ่งจะบอกความสามารถในการแย่งจับ  $Fe^{3+}$  ซึ่งเป็นส่วนประกอบใน reagent ที่ใช้ ส่วนการตรวจสอบ catechol siderophores จะใช้วิธี Arnow assay และการตรวจสอบ hydroxamate siderophore วิธี Csaky (Chamber and Sokol, 1994) ผลการศึกษาเวลาที่เชื้อแต่ละชนิดใช้ในการผลิต Total siderophores พบว่าเชื้อแต่ละชนิดจะสร้าง total siderophores ปริมาณสูงสุดในเวลาที่เชื้อกำลังเจริญมากที่สุดเช่นกัน จากตัวอย่างเชื้อทั้งหมดที่นำมาศึกษาพบว่า *E. coli* (strain 583 และ 609) มีการผลิต siderophores ปริมาณสูงสุดในช่วงเวลา 16-18 ชั่วโมง สอดคล้องกับการทดลองของ Young และ Gibson ซึ่งพบว่าเชื้อ

*E. coli* จะผลิต siderophores สูงสุดที่เวลาประมาณ 18 – 20 ชั่วโมง *Salmonella* spp. (strain 464 และ 551) มีการสร้าง total siderophores ได้สูงสุดที่เวลา 18 ชั่วโมง และ *K. pneumoniae* (strain 134 และ 506) มีการสร้าง total siderophores ได้สูงสุดที่เวลา 12-16 ชั่วโมง ดังนั้น siderophores จึงเป็นสารที่สัมพันธ์กับการเจริญของเชื้อ

เชื้อจุลินทรีย์จะมีการผลิต siderophores ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเหล็กปริมาณต่ำ อาหารเลี้ยงเชื้อที่เลือกใช้ คือ T-medium และ M 9 medium ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการทำให้เชื้อเจริญและผลิต siderophores ได้ (Young and Gibson, 1979) เมื่อนำมาใช้เลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิด พบว่ามีการเจริญและสร้าง siderophores ได้ siderophores แต่ละชนิดมาจากวิถีชีวกำเนิดต่างกัน เช่น catechol type siderophores ส่วนของ catechol ring จะมาจาก isochorismic acid ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จาก shikimic pathway จับกับส่วนที่มาจาก amino acid เช่น L-serine (Dewick, 2000). Hydroxamate type siderophores เช่น aerobactin จะมาจาก citrate เกิดปฏิกิริยา amide กับ  $\alpha$  - amino acid เช่น ornithine หรือ L-lysine (Winkelmann, 2001) ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์จะต้องนำสารที่จำเป็น เช่น glucose จากอาหารเลี้ยงเชื้อไปใช้สร้างสารตั้งต้น เหล่านั้นเพื่อนำไปใช้ในการผลิต siderophores ต่อไป

หลังจากได้เงื่อนไขที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อแล้ว ทำการตรวจกรองหาเชื้อที่สามารถผลิต siderophores ปริมาณสูง โดยศึกษาใน *E. coli* 14 ตัวอย่าง *Salmonella* spp. 4 ตัวอย่าง และ *K. pneumoniae* 25 ตัวอย่าง พบว่าเชื้อที่สามารถสร้าง total siderophores ได้สูงสุดในแต่ละกลุ่มคือ *E. coli* strain 896, *Salmonella* spp. strain 464 และ *K. pneumoniae* strain 957 สำหรับ enterobactin เชื้อที่สร้างได้สูงสุดในแต่ละกลุ่มคือ *E. coli* strain 896, *Salmonella* spp. strain 464 และ *K. pneumoniae* strain 957 ในขณะที่ aerobactin เชื้อที่สร้างได้สูงสุดในแต่ละกลุ่มคือ *E. coli* strain 583, *Salmonella* spp. strain 933 และ *K. pneumoniae* strain 724 นำตัวอย่างเชื้อที่ผลิต total siderophores ได้มากที่สุดมาขยายปริมาณ

นอกจากการจากการตรวจกรองหาเชื้อที่สามารถผลิต siderophores ปริมาณสูงและนำมาเพาะเลี้ยงแล้ว การศึกษานี้ยังต้องการสกัดและแยก siderophores จากเชื้อด้วยการสกัด supernatant ของเชื้อ *E. coli* strain 896, *Salmonella* spp. strain 464 และ *K. pneumoniae* strain 957 โดยใช้ ethyl acetate และแยกด้วย preparative TLC ได้สารจาก *E. coli* strain 896 3 ชนิด, *Salmonella* spp. strain 464 1 ชนิดและ *K. pneumoniae* strain 957 1 ชนิด สารทั้งหมดสามารถดูดกลืน UV 254 nm แสดงว่าสารทั้งหมดต้องมี unsaturated double bond ซึ่ง siderophores เป็นกลุ่มสารที่สามารถดูดกลืน UV 254 nm จากการพ่น TLC ด้วย  $\text{FeCl}_3$  เพื่อ

ตรวจสอบคุณสมบัติความเป็น iron-chelator พบว่าสาร E-2 และ E-3 ที่แยกได้จาก *E. coli* strain 896 และสาร K-1 จาก *K. pneumoniae* strain 957 สามารถทำปฏิกิริยากับ ferric ion แสดงคุณสมบัติการเป็น siderophores (Furrer *et al* , 2002) แต่สาร E-1 จาก *E. coli* strain 896 และสาร S-1 จาก *Salmonella* spp. strain 464 ไม่ให้ผลการตรวจสอบนี้ ซึ่งสาร E-1 และ S-1 อาจจะเป็น siderophores ที่สามารถจับกับโลหะอื่นจะไม่ให้ผลการตรวจสอบด้วยวิธีนี้หรืออาจเป็นสารชนิดอื่นซึ่งต้องพิสูจน์ต่อไป

การศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงทุกชนิด สิ่งสำคัญอย่างหนึ่งที่ต้องทำก่อนการทดลองอื่นๆคือการหาอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ ถึงแม้ว่าจะมีข้อมูลของเซลล์นั้นๆอยู่แล้ว แต่ปัจจัยแวดล้อมต่างๆที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์ รวมถึงการนำเซลล์ออกมาใช้ใหม่หลังจากการเก็บโดยการแช่แข็งเป็นเวลานานอาจทำให้เซลล์มีคุณสมบัติเปลี่ยนไปจากเดิม นอกจากนี้จำนวนของการ subculture ของเซลล์ไม่ควรจะมากเกินไป หรือต้องมีการตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์เป็นระยะๆเพื่อให้มั่นใจว่าเซลล์ที่ใช้ยังมีคุณสมบัติเหมือนเดิม

ในการศึกษาผลของ siderophores ในการป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการใช้เหนี่ยวนำให้เซลล์อยู่เกิดภาวะ oxidative stress ซึ่งสารทดสอบที่เลือกใช้คือ Fe-NTA และ lead acetate จากการทบทวนวรรณกรรมต่างๆพบว่าสารทั้งสองชนิดนี้นิยมใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิด oxidative stress ในเซลล์ (Iqbal *et al.* 1995, 1998) เพื่อจะได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมและไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ทดสอบ สารทุกชนิดจะต้องนำมาใช้ในการทดลองหาค่า  $IC_{50}$  (inhibitory concentration at 50% survival) หรือ  $ED_{50}$  (effective dose at 50% survival) ซึ่งค่าที่เลือกใช้จะต้องต่ำที่สุดที่ยังแสดงฤทธิ์และไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ เพราะถ้าที่ความเข้มข้นสูงถึงแม้จะใช้ในการศึกษาทดลองได้แต่ต้องคำนึงถึงการนำไปใช้จริงว่าขนาดยานั้นๆจะใช้ได้หรือไม่ และอีกปัจจัยหนึ่งที่ต้องระวังคือสารทดสอบที่ความเข้มข้นสูงๆอาจจะตกตะกอนในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้ซึ่งจะทำให้การทดลองล้มเหลว ในการศึกษานี้ได้เลือกความเข้มข้นของ siderophores ทั้งสองชนิดที่ 2.5  $\mu\text{g/ml}$  ซึ่งความเข้มข้นนี้จะต่ำกว่า  $IC_{50}$  ถึง 16 เท่า (siderophores E-3 จาก *E.coli*) และ 38 เท่า (siderophores K-1 จาก *K. Pneumoniae*) จึงถือว่าเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทดลองอื่นๆต่อไป

ในการศึกษาผลของ siderophores ต่อการป้องกันการเกิด protein oxidation นั้นพบว่า siderophores ทั้งสองชนิดรวมถึง ascorbic acid มีฤทธิ์ในการลดการเกิด protein oxidation ของเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ศึกษาได้ แต่ฤทธิ์ที่ได้ค่อนข้างอ่อน คือไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสารเหนี่ยวนำเพียงอย่างเดียวไม่ว่าจะเป็น Fe-NTA หรือ lead

acetate และไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่ม siderophores และ ascorbic acid ซึ่งใช้เป็น standard antioxidant เช่นเดียวกับผลการศึกษา siderophores ในการป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยใช้การป้องกันการเกิด lipid peroxidation ในเซลล์เพาะเลี้ยง เป็นรูปแบบในการศึกษานี้พบว่า siderophores ทั้งสองชนิดที่ได้จาก *E.coli* และ *K. pneumoniae* นี้ มีฤทธิ์ในการลดการเกิด lipid peroxidation ของเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ทดสอบได้ แต่ฤทธิ์ที่ได้ค่อนข้างอ่อน คือไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสารเหนี่ยวนำเพียงอย่างเดียวไม่ว่าจะเป็น Fe-NTA หรือ lead acetate แต่จะเห็นว่าฤทธิ์ในการลดการเกิด lipid peroxidation ของ ascorbic acid ซึ่งเป็น standard antioxidant ก็ค่อนข้างอ่อนเช่นเดียวกัน และพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติไม่ว่าจะเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสารเหนี่ยวนำเพียงอย่างเดียวหรือเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ siderophores จาก *E.coli* และ *K. pneumoniae* จากผลการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ glutathione peroxidase เมื่อทดสอบด้วย siderophores จาก *E.coli* ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า siderophores มีคุณสมบัติกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ glutathione peroxidase ถึงแม้ว่าจะผลที่ได้จะไม่มีความแตกต่างทางสถิติจากกลุ่มควบคุมและกลุ่ม standard antioxidant การวัดการทำงานของเอนไซม์นี้เมื่อกระตุ้นด้วยสารต่างๆ ที่ความเข้มข้น 2.5  $\mu\text{g/ml}$  พบว่าถึงแม้จะไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่ค่า activity ของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นเมื่อทดสอบด้วย ascorbic acid ที่ใช้เป็น standard antioxidant ซึ่งผลนี้อาจเกิดจากกลไกการเป็น radical scavenging ของ ascorbic acid เอง หรือกลไกการ up-regulation ของเอนไซม์ glutathione peroxidase ภายใต้ภาวะที่มีสาร antioxidant อื่นๆ อยู่ด้วย แต่เมื่อทดสอบด้วย siderophores จากแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ พบว่าค่า activity ของเอนไซม์มีแนวโน้มที่ลดลง ซึ่งอาจเกิดจากคุณสมบัติของ siderophores ในการทำให้เหล็กภายในสิ่งแวดล้อมการละลายได้มากขึ้นแล้วจึงเข้าจับและลำเลียงเหล็กจากสิ่งแวดล้อมเข้าสู่เซลล์เพื่อใช้ประโยชน์ต่อไป โดยปริมาณเหล็กที่มากขึ้นนี้จะไปกระตุ้นให้เกิดการสร้าง  $\cdot\text{OH}$  ผ่านทาง Fenton reaction (Crosa 1989, Neillands 1993, Guerinot 1994) ทำให้ค่า activity ของเอนไซม์ลดลงได้ การที่ผลการทดลองทั้ง 3 รูปแบบการทดลองที่ใช้เป็นเช่นนี้อาจจะมาจากหลายสาเหตุเช่น

1. ฤทธิ์ของ ascorbic acid ซึ่งเป็น standard antioxidant มีฤทธิ์อ่อนอาจเนื่องมาจากการที่ ascorbic acid สลายตัว ทั้งนี้เนื่องจาก ascorbic acid สลายตัวได้ง่ายเมื่อโดนแสง และเมื่อละลาย ascorbic acid ในอาหารเลี้ยงเซลล์ไว้เป็นเวลานานรวมกับระยะเวลาที่บ่มเพาะเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี ascorbic acid เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อาจทำให้เกิดการสลายตัวได้จึงทำให้ฤทธิ์ที่ได้ค่อนข้างอ่อน

2. เนื่องจากสาร siderophores ที่สกัดได้จากเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดยังไม่ได้ผ่านการแยกบริสุทธิ์จนได้สารสำคัญชนิดเดียว จึงเป็นไปได้ว่าปริมาณสารสำคัญที่ออกฤทธิ์มีน้อยมาก จึงทำให้ฤทธิ์ที่ได้ค่อนข้างอ่อน

3. เนื่องจากปริมาณของ siderophores ที่สกัดได้ปริมาณน้อยมาก ทำให้ไม่สามารถออกแบบการทดลองและทำการทดลองได้หลากหลาย จะเห็นว่าจำนวนครั้งของการทดลองค่อนข้างน้อย (2-3 ครั้ง/การทดลอง) เนื่องจาก siderophores จะถูกสร้างเมื่อจุลินทรีย์ได้ ferrous ion ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ปริมาณน้อยและไม่เพียงพอต่อความต้องการ ดังนั้นเพื่อความอยู่รอดจุลินทรีย์จึงต้องการสร้างและหลั่ง siderophores ออกมานอกเซลล์เพื่อจับเหล็กและขนส่งเข้าเซลล์ (Crosa 1989, Gueriot 1994, Neiland 1995) ทำให้ในสภาวะปกติจุลินทรีย์จะสร้าง siderophores ในปริมาณที่ต่ำมาก

4. ควรมีกุ่มควบคุมที่ทดสอบด้วย deferoxamine ซึ่งเป็นสารที่มีความสามารถในการจับกับเหล็ก ทั้งนี้เพื่อจะได้เปรียบเทียบฤทธิ์ของสารที่มีกลไกการออกฤทธิ์แบบเดียวกัน

5. เนื่องจากเอนไซม์ glutathione peroxidase เป็นเอนไซม์ที่ทำงานร่วมกับ catalase ในการกำจัดพิษในเซลล์ที่เกิดจาก hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) หรือ สาร organic hydroperoxide ต่างๆ ดังนั้นจึงควรทดสอบยืนยันผล catalase activity ร่วมด้วย

## 2. ข้อเสนอแนะ

UV และ  $\text{FeCl}_3$  detection เป็นวิธีการตรวจสอบ siderophores เบื้องต้น ดังนั้นการพิสูจน์สูตรโครงสร้างที่แท้จริงจะต้องอาศัยวิธีอื่น ๆ ร่วมด้วยเช่น spectroscopy ได้แก่ NMR, MS หรือ X-ray crystallography เป็นต้น ซึ่งจะต้องศึกษาต่อไป

ในการศึกษาผลของ siderophores ในการป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในครั้งต่อไป ควรเลือกใช้ standard antioxidant ที่มีกลไกการออกฤทธิ์หลายๆชนิดเช่น free radical scavenger, ion chelating agent, antioxidant enzyme stimulating agent เป็นต้น เพื่อจะได้ใช้เปรียบเทียบผลที่ได้ในแต่ละรูปแบบการทดลองที่เลือกใช้ว่ามีความเกี่ยวข้องกับกลไกใดของการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน นอกจากนี้หากเลือกใช้ ascorbic acid เป็น standard antioxidant จำเป็นอย่างยิ่งต้องเตรียมขึ้นใหม่สำหรับการใช้ทุกครั้ง

ในการศึกษาทดลองในเซลล์เพาะเลี้ยง มีปัจจัยต่างๆที่ต้องระมัดระวัง ทั้งนี้เพื่อให้ได้ผลการศึกษาที่ดีและมีความปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติงาน ดังนี้คือ

- การปนเปื้อนของสิ่งมีชีวิตอื่นๆเช่น แบคทีเรียและรา จะมีผลกระทบมากต่อการศึกษาดังกล่าวเกี่ยวกับเซลล์ โดยปกติจะไม่ให้เกิดการปนเปื้อนขึ้นเลย ดังนั้นการรักษาเซลล์เพาะเลี้ยงให้ปราศจากการปนเปื้อนโดยการตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ การสังเกตลักษณะของอาหารเลี้ยงเซลล์ จะช่วยให้ทราบปัญหาการปนเปื้อนได้และจัดการได้ทันเวลาที่
- ผู้ที่จะทำการทดลองโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงจะต้องมีความเข้าใจในหลักการทำเทคนิคปราศจากเชื้อ (aseptic technique) และปฏิบัติตามอย่างเคร่งครัด
- ห้องปฏิบัติการงานเพาะเลี้ยงเซลล์จะต้องมีมาตรการที่เคร่งครัดในการควบคุมความปลอดภัยของผู้ปฏิบัติงาน รวมถึงการป้องกันการแพร่กระจายของชีววัตถุออกสู่ภายนอก



## บทที่ 6

### สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการตรวจกรอง การสกัดและแยก siderophores จาก pathogenic gram-negative rod bacteria ใน enterobacteriaceae 3 ชนิดได้แก่ *E. coli* 14 ตัวอย่าง *Salmonella* spp. 4 ตัวอย่าง และ *K. pneumoniae* 25 ตัวอย่าง ที่ได้จากโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จ. อุบลราชธานี เชื่อที่สามารถสร้าง total siderophores ได้สูงสุดในแต่ละกลุ่มคือ *E. coli* strain 896, *Salmonella* spp. strain 464 และ *K. pneumoniae* strain 957 หลังจากนั้นเพิ่มปริมาณ siderophores โดยเลี้ยงเชื้อเหล่านี้เพิ่มขึ้น สามารถแยกสาร siderophores จาก *E. coli* strain 896 2 ชนิดคือสาร E-2, E-3 และจาก *K. pneumoniae* strain 957 1 ชนิดคือสาร K-1 ส่วนสาร E-1 จาก *E. coli* strain 896 และสาร S-1 จาก *Salmonella* spp. strain 464 สามารถดูดกลืน UV 254 nm แต่ไม่แสดงผลต่อ  $\text{FeCl}_3$  solution ดังนั้นสารทุกชนิดที่แยกได้จะต้องพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีที่แน่นอนต่อไป

ฤทธิ์ด้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของ siderophores ที่สกัดได้จากเชื้อจุลินทรีย์ 2 ชนิดคือ *E. coli* และ *K. pneumoniae* ซึ่งมีคุณสมบัติในการจับกับโลหะหนัก โดยทำการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง HEK-293 ประเมินขีดความสามารถในการเป็นแอนติออกซิแดนซ์ของ siderophores เทียบกับ ascorbic acid ซึ่งใช้เป็นสารแอนติออกซิแดนซ์มาตรฐาน และเหนี่ยวนำให้เซลล์อยู่ในภาวะ oxidative stress โดยให้ lead acetate และ Fe-NTA ทำการศึกษาใน 4 แนวทางคือ วัดความเป็นพิษต่อเซลล์ ศึกษาผลของ siderophores ในการป้องกันการเกิด protein oxidation และ lipid peroxidation และ ศึกษาผลของ siderophores ในการเพิ่ม glutathione peroxidase activity ผลการศึกษาพบว่า siderophores ที่สกัดได้จาก *E. coli* และ *K. pneumoniae* ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่ใช้ในการศึกษาโดยมีค่า  $\text{IC}_{50}$  สูง (40 และ 96.68  $\mu\text{g}/\text{m}$  ตามลำดับ) และที่ความเข้มข้น 2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ของ siderophores ทั้งสองชนิดเมื่อให้ร่วมกับ lead acetate และ Fe-NTA ที่ความเข้มข้นต่างๆตั้งแต่ 0-1 mg/ml พบว่าสามารถลดอัตราการตายของเซลล์ได้ และให้ค่า  $\text{IC}_{50}$  เพิ่มจาก 0.24 mg/ml (lead acetate) เป็น 0.28 mg/ml (SE) และ 0.50 mg/ml (SK) ตามลำดับ และเพิ่มค่า  $\text{IC}_{50}$  เล็กน้อยในกลุ่มที่ใช้ Fe-NTA ในการเหนี่ยวนำให้เกิด oxidative stress และที่ความเข้มข้น 2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  siderophores ทั้งสองชนิดมีฤทธิ์ช่วยลดการเกิด protein oxidation

และ lipid peroxidation ในเซลล์ได้ นอกจากนี้ยังมีผลในการเพิ่ม glutathione peroxidase activity เช่นเดียวกับผลที่ได้จาก ascorbic acid แต่มีฤทธิ์ค่อนข้างอ่อน

## เอกสารอ้างอิง

- จันทร์เพ็ญ วิวัฒน์ และคณะ. เกสัชจุลชีววิทยา. กรุงเทพมหานคร : อักษรบัณฑิต. 2531.
- จันทร์เพ็ญ วิวัฒน์ และคณะ. เกสัชจุลชีววิทยา. กรุงเทพมหานคร : อักษรบัณฑิต. 2536.
- พรงาม ลิ้มตระกูล. การศึกษาผลของ Tumeric oil และสาร Curcuminoid ในการต้านเซลล์มะเร็งในเซลล์เพาะเลี้ยง. เชียงใหม่: คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 2538.
- Aksaranugraha S. Free radicals-production of exercise. *Chula Med J.* 2003; 47(3): 139-148.
- Amaro, C., Aznar, R., Alcaide, E., Lemos, M. L. Iron-binding compounds and related outer membrane proteins in *Vibrio cholerae* non-O1 strains from aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 1990, 56, 2410-2416.
- Ankenbauer, R.G., Staley, A.L., Rinehart, K.L., Cox, C.D. Mutasynthesis of siderophore analogues by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991, 88:1878-1882.
- Atkin L.C. and Neilands, J.B. Rhodotorulic acid, a diketopiperazine dihydroxamic acid with Growth factor activity I. Isolation and characterization. *Biochemistry.* 1968, 7. 3734-9
- Autenrieth, I., Hantke, K., Heesemann, J. Immunosuppression of the host and delivery of iron to the pathogen: a possible dual role of siderophores in the pathogenesis of microbial infections?. *Med. Microbiol. Immunol.* 1991, 180: 135-141.
- Aznar, R., Alcaide, E. Siderophores and related outer membrane proteins produced by pseudomonads isolated from eels and freshwater. *FEMS Microbiol. Lett.* 1992, 77, 269-275.
- Baakza, A., Dave, B.P., Dube, H. C. Chemical nature, ligand denticity and quantification of fungal siderophores. *Indian J. Exp. Biol.* 2004, 42, 96-105.
- Bailey, S.M., Reinke, L.A. Antioxidants and gadolinium chloride attenuate hepatic parenchymal and endothelial cell injury induced by low flow ischemia and reperfusion in perfused rat livers. *Free Radic. Res.* 2000, 32:497-506.

- Barriuso, J., Pereyra, M.T., Garcia, J.A., Megias, M., Manero, F.J., Ramos, B. Screening for Putative PGPR to Improve Establishment of the Symbiosis *Lactarius deliciosus*-*Pinus* sp. *Microb. Ecol.* 2005.
- Ben-Shachar, D., Riederer, P., Youdim, M.B. Iron-melanin interaction and lipid peroxidation: implications for Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 1991, 57, 1609-1614.
- Ben-Shachar, D., Zuk, R., Glinka, Y. Dopamine neurotoxicity: inhibition of mitochondrial respiration. *J. Neurochem.* 1995, 64, 718-723.
- Bergeron, R.J., Wiegand, J., Brittenham, G.M. HBED: A potential alternative to deferoxamine for iron-chelating therapy. *Blood.* 1998, 91:1446-1452.
- Bharath, S., Hsu, M., Kaur, D., Rajagopalan, S., Andersen, J.K. Glutathione, iron and Parkinson's disease. *Biochem. Pharmacol.* 2002, 64, 1037-1048.
- Bickel, H., Hall, G.E., Keller-Schierlein, W., Prelog, V., Vischer, E., Wettstein, A. A metabolic products of actinomycetes: Ferrioxamine B. *Helv. Chim. Acta* 1960, 43:2129.
- Braun, V., Killmann, H. Bacterial solutions to the iron-supply problem. *TIBS.* 1999, 24: 104-109.
- Buyer, J.S., Wright, J.M., Leong, J. Structure of pseudobactin A214, a siderophore from a bean-deleterious *Pseudomonas*. *Biochemistry.* 1986, 25, 5492-5499.
- Carrano, C.J., Drechsel, H., Kaiser, D., Jung, G., Matzanke, B., Winkelmann, G., Rochel, N., brecht-Gary, A.M. Coordination Chemistry of the Carboxylate Type Siderophore Rhizoferrin: The Iron(III) Complex and Its Metal Analogs. *Inorg. Chem.* 1996, 35, 6429-6436.
- Chambers, C.E. and Sokol, P. A. Comparison of siderophore production and utilization in pathogenic and Environmental isolates of *Yersinia enterocolitica*. *J. Cli. Microb.* 1994, 32. 32-39
- Chambers, C.E., McIntyre, D.D., Mouck, M., Sokol, P.A. Physical and structural characterization of yersiniophore, a siderophore produced by clinical isolates of *Yersinia enterocolitica*. *Biometals* 1996, 9, 157-167.

- Chen, H.C., Guh, J.Y., Shin, S.J., Tsai, J.H., Lai, Y.H. Reactive oxygen species enhances endothelin-1 production of diabetic rat glomeruli in vitro and in vivo. *J. Lab. Clin. Med.* 2000, 135:309-315.
- Chen, S.Y., Sulik, K.K. Iron-mediated free radical injury in ethanol-exposed mouse neural crest cells. *J. Pharmacol Exp. Ther.* 2000, 294:134-140.
- Cohen, G.M., d'Arcy, D.M. Free radical mediated cell toxicity by redox cycling chemicals. *Br. J. Cancer Suppl* 1987, 8, 46-52.
- Cornish, A.S., and Page, W.J. The catecholate siderophore of *Azotobacter vinelandii* : their affinity for iron and role in oxygen stress management. *Micro.* 1998, 144:1747-54.
- Courcol, R.J., Trivier, D., Bissinger, M.C., Martin, G.R., Brown, M.R. Siderophore production by *Staphylococcus aureus* and identification of iron-regulated proteins. *Infect. Immun.* 1997, 65:1944-1948.
- Cox, C.D. Deferration of Laboratory Media and Assays for Ferric and Ferrous Ions. *Method Enzymol.* 1994, 235:315-329.
- Crosa, J.H. Genetics and molecular biology of siderophores-mediated iron transport in bacteria. *Microbiol. Reviews.* 1989, 53:517-530.
- Curtis, L. and Neiland, J.B. Rhodotorulic acid, a diketopiperazine dihydroxamic acid with growth factor activity. Isolation and characterization. *Biochemistry.* 1968, 7, 3734-39
- Derylo, M., Skorupska, A. Biological activity of rhizobial siderophore. *Acta Microbiol. Pol.* 1991, 40, 265-268.
- Deshwal, V.K., Pandey, P., Kang, S.C., Maheshwari, D.K. Rhizobia as a biological control agent against soil borne plant pathogenic fungi. *Indian J. Exp. Biol.* 2003, 41, 1160-1164.
- Dewick, P.M. Medicinal natural products. 2000. USA.
- Dringen, R. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog. Neurobiol.* 2000, 62, 649-671.

- Enyedy, E. A., Pocs, I., Farkas, E. Complexation of desferricoprogen with trivalent Fe, Al, Ga, In and divalent Fe, Ni, Cu, Zn metal ions: effects of the linking chain structure on the metal binding ability of hydroxamate based siderophores. *J. Inorg. Biochem.* 2004, 98, 1957-1966.
- Fadeev, E. A., Luo, M., Groves, J.T. Synthesis, structure, and molecular dynamics of gallium complexes of schizokinen and the amphiphilic siderophore acinetoferrin. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 12065-12075.
- Franza, T., Mahe, B., Expert, D. *Erwinia chrysanthemi* requires a second iron transport route dependent of the siderophore achromobactin for extracellular growth and plant infection. *Mol. Microbiol.* 2005, 55, 261-275.
- Gobin, J., Moore, C.H., Reeve, J.R. Iron acquisition by *Mycobacterium tuberculosis*: Isolation and characterization of a family of iron-binding exochelins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, 92:5189-5193.
- Graf, E., Mahoney, J.R., Bryant, R.G., Eaton, J.W. Iron-catalyzed hydroxyl radical formation. Stringent requirement for free iron coordination site. *J. Biol. Chem.* 1984, 259, 3620-3624.
- Guerinot, M.L. Microbial iron transport. *Annu. Rev. Microbiol.* 1994, 48:743-772.
- Hall, A.G. Review: The role of glutathione in the regulation of apoptosis. *Eur. J. Clin. Invest* 1999, 29, 238-245.
- Halliwell, B. Reactive Oxygen Species in Living Systems: Source, Biochemistry and Role in Human Disease. *Am. J. Med.* 1991, 91 (suppl 3C):14S-22S.
- Harjai, K., Saxena, M., Chhibber, S. and Sharma, S. In vitro growth of urinary. *Escherchia coli* related to siderophore production. *Folia Microbial (Praha)*. 1990, 35. 149 - 54
- Hassett, D.J., Sokol, P.A., Howell, M.L. et al. Ferric Uptake Regulator (Fur) Mutants of *Pseudomonas aeruginosa* demonstrate defective Siderophore-Mediate iron uptake, alter aerobic growth, and decrease Superoxide Dismutase and Catalase activity. *J. Bact.* 1996, 178:3996-4003.
- Hider, R.C., Kontoghiorghes, G.J., Silver, J. UK Patent: GB2118176, 1982.

- Horwitz, L.D., Sherman, N.A., Kong, Y., et al. Lipophilic siderophores of *Mycobacterium tuberculosis* prevent cardiac reperfusion injury. *Proc. Natl. Acad. Sc.* 1998, 95:5263-8.
- Hou, Z., Raymond, K.N., Sullivan, B.O. and Esker, T.W. Preorganized Siderophores: Thermodynamic and structural characterization of alcalicin and bisucaberin, microbial macrocyclic dihydroxamate chelating agent. *Inorg. Chem.* 1998, 37, 6630-37
- Hu, S.P., Felice, L.J., Sivanandan, V., Maheswaran, S.K. Siderophore production by *Pasteurella multocida*. *Infect. Immun.* 1986, 54, 804-810.
- Iqbal, M., Giri, U., Athar, M. Ferric Nitrotriacetate (Fe-NTA) Is a Potent Hepatic Tumor Promoter and Acts Through the Generation of Oxidative Stress *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1995, 212: 557-563.
- Iqbal, M., Rezazadeh, H., Ansar, S., Athar, M.  $\alpha$ -Tocopherol (vitamin-E) ameliorates ferric nitrotriacetate (Fe-NTA)-dependent renal proliferative response and toxicity: diminution of oxidative stress. *Human & Experimental Toxicology.* 1998, 17(3):163-171.
- Ismail, A. Siderophore production by *Salmonella typhi*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988, 150, 18-24.
- Ismail, A., Bedell, G.W., Lupan, D.M. Siderophore production by the pathogenic yeast, *Candida albicans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1985, 130, 885-891.
- Jalal, M.A., Mocharla, R. and Vander, H.D. Separation of ferrichrom and other hydroxamate siderophores of fungal origin by reverse-phase chromatography. *Chromatography.* 1984, 16, 247-52
- Kaplowitz, N., Fernandez-Checa, J.C., Kannan, R., Garcia-Ruiz, C., Ookhtens, M., Yi, J.R. GSH transporters: molecular characterization and role in GSH homeostasis. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 1996, 377, 267-273.
- Khandelwal, S.R., Manwar, A.V., Chaudhari, B.L., Chincholkar, S.B. Siderophoregenic *Bradyrhizobia* boost yield of soybean. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2002, 102-103, 155-168.

- Kim, C., Lorenz, W.W., Hoopes, J.T., Dean, J.F. Oxidation of phenolate siderophores by the multicopper oxidase encoded by the *Escherichia coli* yack gene. *J. Bacteriol.* 2001, 183, 4866-4875.
- Kingsbury, D.T. and Wagner, G. E. *Microbiology*. USA. 1990.
- Kumar, R. S., Ayyadurai, N., Pandiaraja, P., Reddy, A.V., Venkateswarlu, Y., Prakash, O., Sakthivel, N. Characterization of antifungal metabolite produced by a new strain *Pseudomonas aeruginosa* PUPa3 that exhibits broad-spectrum antifungal activity and biofertilizing traits. *J. Appl. Microbiol.* 2005, 98, 145-154.
- Labieniec, M, and Gabryelak, T. Measurement of DNA damage and protein oxidation after B14 Chinese hamster cells with chosen polyphenols. *Toxicology Letters*. 2005, 155, 15-25.
- Leioffe, S., Ghigo, J.M. and Wandersman, C. Iron acquisition from heme and hemoglobin by *Serratia marcescense* extracellular protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994, 91, 9876 - 80.
- Litwin, C.M., Calderwood, S.B. Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin. Microbiol. Rev.* 1993, 6: 137-149.
- Lomaestro, B.M., Malone, M. Glutathione in health and disease: pharmacotherapeutic issues. *Ann. Pharmacother.* 1995, 29, 1263-1273.
- Ma, X., Lu, C., Chen, H., Ling, H. [Purification and identification of siderophore from *Aeromonas hydrophila*]. *Wei Sheng Wu Xue. Bao.* 2000, 40, 91-94.
- Mansour MA. Protective effects of thymoquinone and desferrioxamine against hepatotoxicity of carbon tetrachloride in mice. *Life Sci.* 2000, 19: 2583-2591.
- Meister, A., Anderson, M.E. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* 1983, 52, 711-760.
- Mirleau, P., Delorme, S., Philippot, L., Meyer, J., Mazurier, S., Lemanceau, P. Fitness in soil and rhizosphere of *Pseudomonas fluorescens* C7R12 compared with a C7R12 mutant affected in pyoverdine synthesis and uptake. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2000, 34, 35-44.
- Modell, C.B. Advances in the use of iron-chelating agents for the treatment of iron overload. *Prog. Hematol.* 1979, 11:267-312.



- Modell, C.B., Beck, J. Long-term desferrioxamine therapy in thalassaemia. *Ann. NY Acad. Sci.* 1974, 232:201.
- Neilands, J.B. Perspectives in biochemistry and biophysics siderophores. *Arch. Biochem. Biophys.* 1993, 302: 1-3.
- Neilands, J.B. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 26723-26726.
- Nienaber, A., Hennecke, H., Fischer, H.M. Discovery of a haem uptake system in the soil bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Microbiol.* 2001, 41, 787-800.
- Okujo, N., Sakakibara, Y., Yoshida, T., Yamamoto, S. Structure of acinetoferrin, a new citrate-based dihydroxamate siderophore from *Acinetobacter haemolyticus*. *Biomaterials* 1994, 7, 170-176.
- Olivier, N.F., Brittenham, G.M. Iron-chelating agent therapy and the treatment of thalassemia. *Blood* 1997, 89:739-761.
- Olson, J.A. and Kobayashi, S. Antioxidants in Health and Disease: Overview (43428). *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.* 1992, 200:245-76.
- Papas, A.M. Determinants of antioxidant status in humans. In: Antioxidant status, diet, nutrition, and health. Edited by Papas A.M. New York: CRC Press, 1999, 21-36.
- Papas, A.M. Diet and antioxidant status. In: Antioxidant status, diet, nutrition, and health. Edited by Papas A.M. New York: CRC Press, 1999, 89-95.
- Park, Y. S., Koh, Y. H., Takahashi, M., Miyamoto, Y., Suzuki, K., Dohmae, N., Takio, K., Honke, K., Taniguchi, N. Identification of the binding site of methylglyoxal on glutathione peroxidase: methylglyoxal inhibits glutathione peroxidase activity via binding to glutathione binding sites Arg 184 and 185. *Free Radic. Res.* 2003, 37, 205-211.
- Patne, M., Niesel, W., Peixotto, S and Lawlor, M. Expression of Hydroxamate and Phenolate Siderophores by *Shigella flexneri*. *J. Bacteriol.* 1983; 949 –95.
- Payne, S.M. Synthesis and utilization of siderophores by *Shigella flexneri*. *J. Bacteriol.* 1980, 143, 1420-1424.

- Peery, R.D., Balbo, P.B., Jone, H.A., Fetherston, J.D. and Demoll, E. Yersiniabactin from *Yersinia pestis*: biochemistry characterization of the siderophore and its role in iron transport and regulation. *Microb.* 1999, 145. 1181- 90.
- Peter, H.H. [Iron chelation. Biological significance and medical application]. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 1983, 113, 1428-1433.
- Pietta, P-G. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* 2000, 63. 1035-42
- Podschun, R., Fischer, A., Ullmann, U. Siderophore production of Klebsiella species isolated from different sources. *Int. J. Med Microbiol. Virol. Parasitol. Infect. Dis.* 1992, 276:481-486.
- Pollack, J.R. and Neilands, J. E. Enterobactin an Iron transport compound from *Salmonella typhimurium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1970, 989-92
- Rabsch, W., Paul, P., Reissbrodt, R. A new hydroxamate Siderophore for iron supply of *Salmonella*. *Acta Microbial Hung.* 1987, 34. 85 – 92
- Sakurai, K. and Cederbaum. Oxidative stress and cytotoxicity Induced by Ferric-Nitrilotriacetate in HepG2 Cells that Express Cytochrome P450 2E1. *Mol. Pharmacol.* 1998, 54:1024-35.
- Salinas, A.E., Wong, M.G. Glutathione S-transferases--a review. *Curr. Med. Chem.* 1999, 6, 279-309.
- Schwyn, B. and Neilands, J. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophore. *Anal Biochem.* 1987, 160. 47 - 56
- Sharman, G.J., Williams, D.H., Ewing, D.F., Ratledge, C. Determination of the structure of exochelin MN, the extracellular siderophore from *Mycobacterium neoaurum*. *Chem. Biol.* 1995, 2, 553-561.
- Sharman, G.J., Williams, D.H., Ewing, D.F., Ratledge, C. Isolation, purification and structure of exochelin MS, the extracellular siderophore from *Mycobacterium smegmatis*. *Biochem. J.* 1995, 305 ( Pt 1), 187-196
- Sies H. Oxidative Stress: From Basic Research to Clinical Application. *Am. J. Med.* 1991, 91(suppl)3C: 13-38s.

- Sies, H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic. Biol. Med.* 1999, 27, 916-921.
- Simpson, L.M., Oliver, J.D. Siderophore production by *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.* 1983, 41, 644-649.
- Suzer, T., Coskun, E. and Dermis, S. et al. Lipid Peroxidation and glutathione levels after cortical injection of ferric chloride in rats: effect of trimezatidine and deferoxamine. *Res. Exp. Med.* 2000, 199(4):233-9.
- Takahashi, K., Avissar, N., Whitin, J., Cohen, H. Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* 1987, 256, 677-686.
- Teintze, M., Hossain, M. B., Barnes, C. L., Leong, J., van der, H.D. Structure of ferric pseudobactin, a siderophore from a plant growth promoting *Pseudomonas*. *Biochemistry* 1981, 20, 6446-6457.
- Telford, J.R. and Raymond, K.N. Coordination chemistry of the amonabactin, bis (catecholate) siderophores from *Aeromonas hydrophila*. *Inorg. Chem.* 1998, 37.4578-83
- Telford, A. and Raymond, K. Amonabactin: a family of novel siderophores from a pathogenic bacterium. *J. Biolchem.* 1997, 2. 750 - 61.
- Tindale, A.E., Mehrotra, M. and Ottem, D. Dual regulation of catecholate siderophore biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* by iron and oxidative stress. *Microb.* 2000, 146: 1617-26.
- Visca, P., Colotti, G., Serino, L., Verzili, D., Orsi, N., Chiancone, E. Metal regulation of siderophore synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* and functional effects of siderophore-metal complexes. *Appl. Environ. Microbiol.* 1992, 58, 2886-2893.
- Weinberg, E.D. and Weinberg, G.A. The role of iron in infection. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 1995, 8:164-169.
- Yamamoto, B. and Zhu, W. The Effect of Methamphetamine on the Production of Free Radicals and Oxidative Stress. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1998, 287(1):107-14.

- Yamamoto, S., Okujo, N., Sakakibara, Y. Isolation and structure elucidation of acinetobactin, a novel siderophore from *Acinetobacter baumannii*. *Arch. Microbiol.* 1994, 162, 249-254.
- Yang, C. C., Leong, J. Structure of pseudobactin 7SR1, a siderophore from a plant-deleterious *Pseudomonas*. *Biochemistry* 1984, 23, 3534-3540.
- Young, I.G. and Gibson, F. Isolation of enterochelin from *Escherichia coli*. *Methods in enzymol.* 1979, 394 - 98
- Zanninelli, G., Glickstein, H., Breuer, G.W. *et. al.* Chelation and mobilization of cellular iron by different classes of chelators. *Mol. Pharmacol.* 1997, 51:842-852.
- Zaragoza, A., Diez-Fernandez, C., Alvarez, A.M., Andres, D., Cascales. M. Effect of N-acetylcysteine and deferoxamine on endogenous antioxidant defense system gene expression in a rat hepatocyte model of cocaine cytotoxicity. *Biochim. Biophys Acta* 2000, 17:183-195.

## ภาคผนวก

### 1. เครื่องมือที่ใช้ในการตรวจกรองและแยก siderophores จากแบคทีเรีย

- Hot air oven, Hereus, D-63450 made in Germany, Type : T6200, 230V, 11.8 A2, 7Kw
- ตู้หม้อนึ่งฆ่าเชื้อขนาดความจุไม่ต่ำกว่า 10 l (Autoclave), ยี่ห้อ kokuson Enchiki Mod. H-88LL/Japan, บริษัท ไบโนแมกกรุ๊ป จำกัด
- ตู้ควบคุมอุณหภูมิสำหรับเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ (Incubator), ยี่ห้อ/รุ่น Hereaus/B7670/Germany, บริษัท สยามแอนดิโก(เวลด์โก้) จำกัด
- Spectrophotometer, เครื่องวัดปริมาณในสารละลาย, บริษัท Pharmacia Biotech
- กล้องจุลทรรศน์ชนิด 2 ตา พร้อมอุปกรณ์กำเนิดแสง, ยี่ห้อ/รุ่น/ประเทศ : Nikon/Alphaphoto 2 Japan, บริษัท ฮอลลิวูดอินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด
- ตู้เพาะและถ่ายเชื้อแบบไบโอฮาซาด, ยี่ห้อ/รุ่น/ประเทศ : Hollen Mod.HBB2460 Denmark, บริษัท ไฮแอนติฟิโกโปรโทชัน
- เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดปรับอุณหภูมิด้วยความเร็วสูงสุดไม่ต่ำกว่า 20,000 รอบ/นาที, Sorvall : E.I duPort de Nemous and company NYR
- Atomic absorption พร้อมอุปกรณ์, Perkin-Elmer/Analyst 100
- เครื่องวัดปริมาณยาในสารละลาย, ยี่ห้อ/รุ่น/ประเทศ : Miltonroy spectronic 301 Pharmacia Novas spec II, บริษัท เบคไทย กรุงเทพ

### 2. Nutrient slant agar (Merck)

- ชั่งสาร 20 g
- ปรับปริมาตรจนครบ 1000 ml ด้วยน้ำกลั่นทำให้ละลายด้วยความร้อนที่ 250 °C จนได้สารละลายใส
- บรรจุลงในหลอดทดลอง(ขนาด 16X100) ที่มีฝาเกลียว ๗ 7 ml
- นำเข้า Autoclave เพื่อ sterile ให้ปราศจากเชื้อ โดยไม่ต้องปิดฝาสนิท เป็นเวลา 15 นาที
- นำออกจาก Autoclave แล้ววางบนขอบลาดเพื่อให้เกิดความเอียง
- รอจน Agar แข็งตัว ปิดฝาให้สนิทจะได้ nutrient slant agar

### 3. การเตรียม T medium

NaCl (Merk)	5.8	g
KCl (Calo Erba)	3.7	g
CaCl <sub>2</sub> (Merk)	0.113	g
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O (Calo Erba)	0.1	g
NH <sub>4</sub> Cl (Merk)	1.1	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Fluck)	0.272	g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Carlo Erba)	0.142	g
Tris (trisima base)(Sigma)	12.1	g
Water to	1000	ml

เตรียมโดยการเติมสารตามลำดับและแยก CaCl<sub>2</sub> ไว้เติมท้ายสุดแล้วค่อยปรับ pH ให้ได้ 7.4 ด้วย conc. HCl จากนั้นนำไป Autoclave (121° C, 15 lb./inch<sup>2</sup>) แล้วเติม glucose และ nicotinic acid ให้ได้ความเข้มข้น 0.4 % และ 5 µg/ml ตามลำดับ จากนั้นนำไปและเติม glucose และให้ได้ความเข้มข้น 0.4 และ 5 ตามลำดับ จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณเหล็กโดยใช้ atomic absorption spectrophotometer โดยจำกัดปริมาณเหล็กได้ไม่เกิน 5 µM

### 4. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ M 9

#### สารเคมีและวิธีเตรียม

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6.0	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.0	g
NaCl	0.5	g
NH <sub>4</sub> Cl	1.0	g

- นำส่วนประกอบทั้งหมดละลายด้วย DI water 1000 ml
- ปรับ pH ให้ได้ pH 7.4 ด้วย NaOH
- นำสารละลายที่เตรียมได้ไปเข้า autoclave เพื่อ sterile
- เก็บไว้ใน cold room ที่ 4 °C เมื่อจะใช้จึงนำมาเติม

1 M MgSO <sub>4</sub>	2.0	ml
50 % glucose	4.0	ml
1 M CaCl <sub>2</sub>	0.1	ml

แล้วเติมสารที่ผ่านการกรอง ด้วยชุดกรองจุลชีพที่ผ่านการ sterile ดังต่อไปนี้

40 mg /ml Proline	2.01	ml
20 mg / ml Leucine	4.02	ml
10 mg / ml Tryptophan	8.05	ml
10 mg / ml Thiamin	4.02	ml

## 5. การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการหาปริมาณ Total siderophores : Chrome Azural

### S Liquid assay (CAS assay)

#### 5.1 CAS assay solution ประกอบด้วย

5.1.1 2 mM CAS stock : ชั่ง CAS (Sigma) 0.121 g ละลายและปรับปริมาตรจนครบ 100 ml ด้วยน้ำกลั่น

5.1.2 1 mM Fe stock solution : ชั่ง  $\text{FeCl}_3$  (Carlo Erba) 0.0162 g ละลายและปรับปริมาตรจนครบ 100 ml ด้วย 10 mM HCl

5.1.3 Piperazine buffer : ชั่ง piperazine (Fluka) 4.307 g ละลายและปรับปริมาตรจนครบ 30 ml ด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH ให้ได้ pH 5.6 ด้วยการเติม conc. HCl

5.1.4 HDTMA : ชั่ง HDTMA (Fluka) 0.0219 g ละลายและปรับปริมาตรจนครบด้วย 100 ml ด้วยน้ำกลั่น

#### วิธีเตรียม CAS assay solution

- ผสม  $\text{Fe}^{3+}$  stock solution ปริมาตร 1.5 ml กับ CAS stock solution 7.5 ml จากนั้นผสมรวมกับ HDTMA ในกระบอกตวงปริมาตร 100 ml

- เติม piperazine solution ปริมาตร 30 ml แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml ด้วยน้ำกลั่น

#### 5.2 Shuttle solution (0.2 M 5-Sulfosalicylic acid) (Fluka)

ชั่ง 5 – Sulfosalicylic acid 4.364 g ละลายและปรับปริมาตรจนครบ 100 ml ด้วยน้ำกลั่น

## 6. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ Aerobactin : C'saky assay

ประกอบด้วย

- Sulfanilic acid solution : ชั่ง Sulfanilic acid (Fluka) 1 g ละลายและปรับปริมาตรจนครบ 100 ml ด้วย 30 % v/v acetic acid
- Iodine solution : ชั่ง iodine (Carlo Erba) 1.3 g ละลายและปรับปริมาตรจนครบ 100 ml ด้วย glacial acetic acid
- Sodium Arsenate : ชั่ง sodium arsenate (Sigma) 2 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 ml
- Sodium acetate solution : ชั่ง sodium acetate (Merk) 35 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 ml
- $\alpha$ -Naphylamine : ชั่ง  $\alpha$ -Naphylamine (Fluka) 0.3 g ละลายและปรับปริมาตรจนครบ 100 ml ด้วย 30 % v/v acetic acid

## 7. วิธีเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ Enterobactin : Arnow's assay

- 0.5 N HCl
- Sodium Nitrite – Molybdate reagent : ผสม sodium nitrite 10 g และ sodium molybdate 10 g ละลายและปรับปริมาตรจนครบ 100 ml ด้วยน้ำกลั่น
- 1 N NaOH

## 8. วิธีการเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณโลหะเหล็ก ( $\text{Fe}^{3+}$ ) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ M 9 medium

### 8.1 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

- นำ M 9 medium ปริมาตร 100 ml เทลงใน Casserole (กรณี Blank จะใช้ DI water)
- เติม 69 %  $\text{HNO}_3$  จำนวน 3 ml นำไประเหยบน Hot plate (ทำใน Hood) จนมีปริมาตรประมาณ 10 ml
- เติม 69 – 72 %  $\text{HClO}_4$  จำนวน 2 ml (ค่อย ๆ เติม โดยใช้ dropper)
- นำไประเหยต่อจนมีปริมาตรประมาณ 10 ml
- กรองและปรับปริมาตรด้วย DI water จนครบ 50 ml ใน volumetric flask



## 8.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานเหล็ก ( $\text{Fe}^{3+}$ )

- เตรียม 4 ความเข้มข้น คือ 0.1, 0.3, 0.5 , 0.7 ppm
- ปิเปต Stock  $\text{Fe}^{3+}$  1000 ppm มา 1.0 ml ปรับปริมาตรให้ครบ 10 ml ด้วย DI water (10 ppm)
- ปิเปต มา 0.1ml ปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml ด้วย DI water เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 6 ppm ใช้ดู sensitivity check ของเครื่อง AA
- ปิเปตสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 6 ppm มา 1, 3, 5, และ 7 ml พร้อมปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml ด้วย DI water (จะได้สารละลายมาตรฐาน 4 ความเข้มข้น คือ 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 ppm)

## 9. วิธีการเตรียม Mcfarlan 0.5

นำ 1% barium chloride มา 0.5 ml ปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml ด้วย 1 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$

## 10. วิธีการเตรียมน้ำยาฆ่าเชื้อ Savlon 1:100

นำ Hibicet<sup>®</sup> (Chlorhexidine gluconate 1.5 % และ Cetrimide 15 %) มา 1 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำต้มสุกที่เย็นแล้วให้ครบ 100 ml

## 11. การเตรียม freezing solution

- ทำในตู้ laminar flow โดยกรอง DMSO ด้วยกระดาษกรองขนาด 0.2  $\mu\text{m}$
- ดูด FCS 9.2 ml ใส่ในหลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อ และเติม 0.8 ml ของ DMSO จากข้อ 1 ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

## 12. อาหารเลี้ยงเซลล์ D-MEM

### Incomplete medium

สูตร:

D-MEM	13.5	g
HEPES	3.57	g
$\text{NaCHO}_3$	3.7	g
Deionized distilled water qs.	1000	ml
Adjusted pH to be	7.2-7.4	

### วิธีการเตรียม

- ละลายผง D-MEM 1 ของ (13.5 g) ใน deionized distilled water ประมาณ 800 ml คนให้เข้ากัน
- เติม HEPES 3.57 g ลงไปคนให้เข้ากัน
- เติม  $\text{NaHCO}_3$  3.7 g ลงไปคนให้เข้ากัน
- ปรับ pH ให้ได้ 7.2-7.4 ด้วย 1 N HCl จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรด้วย deionized distilled water
- กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2  $\mu\text{m}$  ในตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) โดยใช้ suction filter
- แบ่ง incomplete medium ที่ได้ใส่ขวดปริมาตร 500 ml แล้วเก็บไว้ในตู้เย็น 4 °C

### Complete medium

#### สูตร:

Incomplete medium	89	ml
Pen/Strep stock	1	ml
FBS	10	ml

### วิธีการเตรียม

- เตรียมโดยเทคนิคปลอดเชื้อในตู้ laminar flow
- นำ incomplete medium มา 89 ml ใส่ขวดแก้วขนาด 100 ml ที่ล้างมาเชื้อแล้ว
- เติม Pen/Strep 1 ml ผสมให้เข้า
- เติม FCS 10 ml ผสมให้เข้า เก็บไว้ในตู้เย็น 4 °C

### 13. Phosphate buffer saline (PBS)

#### สูตร:

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.24	g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	1.44	g
NaCl	8	g
KCl	0.2	g
Distilled water qs	1000	ml
Adjust pH = 7.4		

#### 14. การเตรียมสารละลายสำหรับวัดปริมาณโปรตีน

การวัดปริมาณโปรตีนในที่นี้ใช้วิธีของ Folin-Lowry มี reagent ที่ต้องใช้ดังนี้

##### Reagent A

สูตร:

$\text{Na}_2\text{CO}_3$	10	g
NaOH	2	g
Distilled water qs	500	ml

##### วิธีการเตรียม

- ละลาย NaOH ในน้ำ 500 ml คนให้ละลาย
- เติม  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ผสมให้ละลาย

##### Reagent B (1 % Na-K tartate)

สูตร:

1 % Na-K tartate		
Na-K tartate	1	g
Distilled water qs	100	ml

##### วิธีการเตรียม

- ละลาย Na-K tartate ในน้ำ 100 ml คนให้ละลาย เก็บในขวด

##### Reagent C (0.5 % $\text{CuSO}_4$ )

สูตร:

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.5	g
Distilled water qs	100	ml

##### Reagent D (reagent A + reagent B + reagent C)

วิธีการเตรียม

- นำ reagent A มา 48 ส่วน reagent B มา 1 ส่วน และ reagent C 1 ส่วน
- ก่อนใช้ให้ผสมสารละลายทั้งสามเข้าด้วยกัน

##### Folin-Ciocalteu Phenol reagent 1 N

เจือจาง Folin-Ciocalteu Phenol reagent 2 N (จาก stock) ด้วยน้ำกลั่นในปริมาตรที่เท่ากัน

## 15. การเตรียมสารละลายสำหรับ lipid peroxidation assay

### 15.1 Homogenizing buffer (20 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4)

สูตร:

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.055 g

$\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.278 g

Distilled water qs 100 ml

Adjust pH = 7.4

#### วิธีการเตรียม

- คำนวณปริมาณของ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  และ  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ที่ใช้ในการเตรียม Homogenizing buffer ดังแสดงข้างล่าง

#### Calculation

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{(\text{I}) \text{ or } (\text{K}_2\text{HPO}_4)}{(\text{U}) \text{ or } (\text{KH}_2\text{PO}_4)}$$

$$= 6.8 + \log \text{I/U}$$

$$0.6 = \log \text{I/U}$$

$$\text{I/U} = 10^{0.6} = 3.981$$

$$\text{I} = 3.981\text{U}$$

$$\text{Total volume} = 100 \text{ ml}$$

$$3.981\text{U} + \text{U} = 100 \text{ ml}$$

$$4.981\text{U} = 100 \text{ ml}$$

$$\text{U} = 100/4.981 = 20.07$$

$$20 \text{ mM } \text{KH}_2\text{PO}_4 = 20.07 \text{ ml} \quad (\text{MW } 136.09)$$

$$20 \text{ mM } \text{K}_2\text{HPO}_4 = 79.93 \text{ ml} \quad (\text{MW } 174.18)$$

$$\text{KH}_2\text{PO}_4 = (20 \times 136.09 \times 20.07) / (1000 \times 1000) = 0.055 \text{ g}$$

$$\text{K}_2\text{HPO}_4 = (20 \times 174.18 \times 79.93) / (1000 \times 1000) = 0.278 \text{ g}$$

water q.s. 100 ml adjust pH to 7.4

- ชั่ง  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.055 g และ  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.278 g ละลายน้ำและปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 ml ปรับ pH ให้เป็น 7.4

15.2 TMP standard 100 nmol/ml (TMP (1,1,3,3-tetramethoxypropane or malondialdehyde bis dimethylacetal solution) (MW 164.2 and density = 1 g/ml)

**วิธีการเตรียม**

- Stock 10,000 nmol/ml

16.42  $\mu$ l TMP + water q.s. 10 ml

- Stock 100 nmol/ml

10  $\mu$ l TMP + water q.s. 1 ml

15.3 8.1% SDS (sodium dodecyl sulfate)

**สูตร:**

SDS 8.1 g

Distilled waeter qs. 100 ml

**วิธีการเตรียม**

- ชั่ง SDS 8.1 g

- เติมน้ำจนครบปริมาตร 100 ml

- ก่อนใช้ให้เขย่าและคนให้เข้ากัน

15.4 20% acetic acid : เจือจาง 20 ml acetic acid ด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml

15.5 0.8% TBA (thiobarbituric acid)

**สูตร:**

TBA 0.8 g

Distilled waeter qs. 100 ml

**วิธีการเตรียม**

- ชั่ง TBA 0.8 g

- ละลายในน้ำและปรับปริมาตรครบ 100 ml

15.6 n-butanol

16. ส่วนประกอบของสารละลายใน glutathione peroxidase cellular activity kit

1. Glutathione peroxidase assay buffer

50 mM Tris HCl, pH 8.0, containing 0.5 mM EDTA

2. NADPH assay reagent

5 mM NADPH, 42 mM reduced glutathione, and 10 units/ml of glutathione reductase

3. tert-Butyl hydroperoxidase, 70% aqueous solution

## ประวัติผู้วิจัย

ผู้อำนวยการชุดโครงการวิจัย: รศ.ดร.นงนิตย์ อีระวัฒนสุข

### โครงการวิจัยย่อยที่ 1

หัวหน้าโครงการวิจัย: ดร.ระวีวรรณ แก้วอมตวงศ์

ผู้ร่วมวิจัย:

1. นายจิตติเดช ลือตระกูล
2. นางสาวกุสุมา จิตแสง
3. นายสมหวัง จรรยาขรรติกุล

### โครงการวิจัยย่อยที่ 2

หัวหน้าโครงการวิจัย: ผศ.ดร.สุภาวัฒน์ จันทร์เหลือง

ผู้ร่วมวิจัย:

1. นางสาวพรทิพย์ ไวกูม
2. นางสาวธนวดี ปรีเปรม
3. ดร.จารุวรรณ ธนวิรุฬห์

### หน่วยงานที่คณะผู้วิจัยสังกัด

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อำเภอวารินชำราบ

จังหวัดอุบลราชธานี 34190

โทรศัพท์ 045-288382-3 โทรสาร 045-288384

### ประวัติผู้ดำเนินการชุดโครงการวิจัย

1. ชื่อ นางสาวนงนิตย์ นามสกุล อีระวัฒน์สุข  
Name Miss Nongnit Last name Teerawatanasuk
2. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์ ระดับ 9 กลุ่มวิชาชีวเภสัชศาสตร์  
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
3. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี  
อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี  
โทรศัพท์ 045-288382-3  
โทรสาร 045-288384

### 4. ประวัติการศึกษา

ปีจบการศึกษา	ระดับปริญญา	อักษรย่อ สาขา ปริญญา	สถาบันการศึกษา	ประเทศ
2541	เอก	Ph.D Pharmacology	Indiana University Indianapolis	USA
2533	โท	ภ.ม. เภสัชวิทยา	มหาวิทยาลัยมหิดล	ไทย
2525	ตรี	ภ.บ. เภสัชศาสตร์	มหาวิทยาลัยมหิดล	ไทย

### 5. สาขาวิชาที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ

### 6. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย:

6.1 การบริหารงานวิจัย : -

6.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว :

1. Teerawatanasuk, N., and Carr. L.G. CBF/NF-Y activates transcription of the human *tryptophan hydroxylase* gene through an inverted CCAAT box. *Molecular Brain Research* 55, 1998, 61-70.
2. Teerawatanasuk, N., Skalnik, D.G., and Carr. L.G. CCAAT displacement protei (CDP) negatively regulates transcription of the human *tryptophan hydroxylase* gene. *Journal of Neurochemistry* 72, 1999, 29-39.
3. Teerawatanasuk, N., Reed, G.E., Eichholtz, S., and Carr, L.G. The mouse *tryptophan hydroxylase* (mTHP) promoter interacts with members of the



steroid/thyroid hormone nuclear receptor superfamily. *Alcoholism* 21(197), 1997: 75A.

4. Teerawatanasuk, N., Reed, G.E., Eichholtz, S, and Carr, L.G. The mouse *tryptophanhydroxylase* (mTPH) promoter interacts with members of the steroid/thyroid hormone (manuscript in preparation)

### 6.3 งานวิจัยที่กำลังทำ

1. การเปลี่ยนแปลงเชิงปริมาณและลักษณะการกระจายตัวของ Integrin glycoprotein ในเนื้อเยื่อมะเร็งเยื่อบุท่อน้ำดี (หัวหน้าโครงการ)
2. การศึกษาฤทธิ์ต้านไวรัสของพืชผักท้องถิ่นในภาคอีสาน (หัวหน้าโครงการ)

### 7. เกียรติคุณและรางวัลที่ได้รับ:

1. Chancellor's Scholar at the Ph.D. Level Award, Indiana University-Purdue University at Indianapolis, Indiana, USA. 1998.
2. IUPUI Travel Fellowship Award to the Experimental Biology'98 Annual Meeting, San Francisco, California, USA. 1998.
3. K.K Chen Fellowship in Pharmacology & Toxicology, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, Indiana, USA. 1997.
4. Student Travel Grant Award to the 1997 American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics (ASPET) Annual Meeting, San Diego, California, USA. 1997.
5. First place in oral presentation competition, Seventh Annual Raymond Paradise Symposium, 1996. Department of Pharmacology & Toxicology, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, Indiana, USA.
6. First place in poster presentation competition, Sixth Annual Raymond Paradise Symposium, Department of Pharmacology & Toxicology, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, Indiana, USA.
7. เกียรติคุณอันดับหนึ่ง (เหรียญทอง) คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย

## 8. ประสบการณ์การทำงาน:

### ด้านบริหาร:

1. กรรมการสภามหาวิทยาลัยอุบลราชธานี พ.ศ. 2542-2544
2. กรรมการวิจัย มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี พ.ศ. 2541-ปัจจุบัน
3. รองประธานกรรมการในคณะกรรมการเตรียมการเพื่อให้มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีเป็นมหาวิทยาลัยในกำกับ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี พ.ศ. 2541-ปัจจุบัน
4. หัวหน้ากลุ่มงานชีวเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ พ.ศ. 2541-ปัจจุบัน
5. กรรมการและเลขานุการคณะกรรมการจัดทำโครงการจัดตั้งคณะเภสัชศาสตร์

มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี พ.ศ. 2534

### ด้านวิชาการ:

1. กรรมการและเลขานุการคณะกรรมการพัฒนาและปรับปรุงหลักสูตรเภสัชศาสตร์ พ.ศ. 2541-ปัจจุบัน
2. กรรมการและเลขานุการคณะกรรมการร่างและพิจารณาหลักสูตรเภสัชศาสตร์เภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี พ.ศ. 2534
3. Teaching assistant, Advanced Molecular Biology Methods, 1996-97, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Indiana University, School of Medicine, Indianapolis, Indiana, USA.

### ประวัติหัวหน้าโครงการวิจัยย่อยที่ 1

1. ชื่อ นางสาวระวีวรรณ นามสกุล แก้วอมตวงศ์  
Name Miss Rawiwun Last name Kaewamatawong
2. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ ระดับ 7  
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
3. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี  
อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี  
โทรศัพท์ 045-288382-3  
โทรสาร 045-288384

### 4. ประวัติการศึกษา

ปีจบการศึกษา	ระดับปริญญา	อักษรย่อ	สาขา	สถาบันการศึกษา	ประเทศ
			ปริญญา		
2545	เอก	วท.ด.	เภสัชเคมีและ ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ	จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย	ไทย
2540	โท	ภ.ม.	เภสัชเวท	จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย	ไทย
2537	ตรี	ภ.บ.	เภสัชศาสตร์	มหาวิทยาลัยรังสิต	ไทย

### 5. สาขาวิชาที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ (แตกต่างวุฒิการศึกษา)

Phytochemistry

### 6. ประสบการณ์ในงานวิจัย

#### 6.1 หัวหน้าโครงการวิจัย

- 1) The screening of free radical scavenging, antioxidative and tyrosinase inhibitory activities of Ubonratchathani medicinal plants

#### 6.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

- 1) การศึกษาฤทธิ์ของต้นน้ำเต้าลม
- 2) Free radical scavenging compounds from *Ochna integerrima*

### ประวัติผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ นาย จิตติเดช นามสกุล ลือตระกูล  
Name Mr. Thitidaj Last name Luetrakul
2. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ ระดับ 5  
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
3. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี  
อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี  
โทรศัพท์ 045-288382-3  
โทรสาร 045-288384

### 4. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา	อักษรย่อ	สาขา	สถาบันการศึกษา	ประเทศ
			ปริญญา		
2541	โท	ภ.ม.	ชีวเคมี	มหาวิทยาลัยมหิดล	ไทย
2539	ตรี	ภ.บ.	เภสัชศาสตร์	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	ไทย

### 5. สาขาวิชาที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) -

Medicinal chemistry, Southern and Western blot, tissue culture

### 6. ประสบการณ์ในงานวิจัย

#### 6.1 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

- Isolation and Characterization of Biologically active 30 KDa Proteins from the seed of *Mormodica charantia* L. cultivated in Thailand

## ประวัติผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ นางสาวกุสุมา นามสกุล จิตแสง  
Name Miss Kusuma Last name Jitsaeng
2. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ ระดับ 5  
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
3. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี  
อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี  
โทรศัพท์ 045-288382-3  
โทรสาร 045-288384

## 4. ประวัติการศึกษา

ปีจบการศึกษา	ระดับปริญญา	อักษรย่อ	สาขา	สถาบันการศึกษา	ประเทศ
			ปริญญา		
2541	โท	ภ.ม.	เภสัชเวท	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ไทย
2539	ตรี	ภ.บ.	เภสัชศาสตร์	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	ไทย

## 5. สาขาวิชาที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) -

## 6. ประสบการณ์ในงานวิจัย

## 6.1 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

- Secondary metabolites of mangrove *Streptomyces* sp. TRA 9839-2

## ประวัติผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ นายสมหวัง นามสกุล จรรยาขันติกุล  
Name Mr. Somwang Last name Janyakhantikul
2. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์  
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
3. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี  
อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี  
โทรศัพท์ 045-288382-3  
โทรสาร 045-288384

## 4. ประวัติการศึกษา

ปีจบการศึกษา	ระดับปริญญา	อักษรย่อ สาขา ปริญญา	สถาบันการศึกษา	ประเทศ
2545	โท	ภ.ม. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	มหาวิทยาลัยมหิดล	ไทย
2542	ตรี	ภ.บ. เภสัชศาสตร์	มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี	ไทย

## 5. สาขาวิชาที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)

PCR Technique

## 6. ประสบการณ์ในงานวิจัย

## 6.1 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

- PCR-Based Assays for detection of endotoxin genes from *Bacillus cereus*

## ประวัติหัวหน้าโครงการวิจัยย่อยที่ 2

1. ชื่อ นางสาวรัตน์ นามสกุล จันทรเหลือง  
Name Ms. Suparat Last name Chanluang
2. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ระดับ 7  
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
3. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้  
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี  
อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี  
โทรศัพท์ 045-288382-3  
โทรสาร 045-288384

## 4. ประวัติการศึกษา

ปีจบการศึกษา	ระดับปริญญา	ชื่อปริญญา	สาขา	สถาบันการศึกษา	ประเทศ
2546	เอก	ปร.ด.	สัตววิทยา	ม. มหิดล	ไทย
2538	โท	วท.ม.	เภสัชวิทยา	ม. มหิดล	ไทย
2536	ตรี	ภ.บ.	เภสัชศาสตร์	ม. ขอนแก่น	ไทย

## 5. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย

### 5.1 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว (แต่ไม่ได้ตีพิมพ์)

5.1.1 การศึกษาฤทธิ์กันชักของส่วนสกัดต่างๆจากเมล็ดชุมเห็ดไทย

5.1.2 ความรู้ด้านอาหารและยาของนักเรียนมัธยมศึกษาตอนปลายในจังหวัดอุบลราชธานี

### 5.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว (ตีพิมพ์) : ชื่อแผนงานวิจัยและชื่อโครงการวิจัย ปีที่พิมพ์เผยแพร่ และสถานภาพในการวิจัย

5.2.1 Khamdang S, Takeda M, Shimoda M, Noshiro R, Narikawa S, Huang XL, Enomoto A, Piyachaturawat P, Endou H. Interactions of human- and rat- organic anion transporters with pavastatin and cimetidine. J Pharmacol Sci. 2004; 94(2): 197-202.

5.2.2 Hasannejad H, Takeda M, Taki K, Shin HJ, Babu E, Jutapha P, Khamdang S, Aleboyeh M, Onazato ML, Tojo A, Enomoto A, Anzai N, Narikawa S, Huang XL, Niwa T, Endou H. Interactions of organic anion transporters with diuretics. J Pharmacol Exp Ther 2004; 308(3): 1021-9.

5.2.3 Aleboyeh M, Takeda M, Onazato ML, Tojo A, Noshiro R, Hasannejad H, Inatomi J, Narikawa S, Huang XL, **Khamdang S**, Anzai N, Endou H. Expression of human organic anion transporters in the choroid plexus and their interactions with neurotransmitter metabolites. *J Pharmacol Sci.* 2003; 93(4): 430-6.

5.2.4 **Khamdang S**, Takeda M, Babu E, Noshiro R, Onozato ML, Tojo A, Enomoto A, Huang XL, Narikawa S, Anzai N, Piyachaturawat P, Endou H. Interaction of human and rat organic anion transporter 2 with various cephalosporin antibiotics. *Eur J Pharmacol* 2003; 465(1-2): 1-7.

5.2.5 **Khamdang S**, Takeda M, Noshiro R, Enomoto A, Anzai N, Piyachaturawat P, Endou H. Interactions of human organic anion transporters and human organic cation transporters with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 303(2): 534-9.

5.2.6 Takeda M, **Khamdang S**, Narikawa S, Hosoyamada M, Cha SH, Sekine T, Endou H. Characterization of methotrexate transport and its drug interactions with human organic anion transporters. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 302(2): 666-71.

5.2.7 Enomoto A, Takeda M, Tojo A, Sekine T, Cha SH, **Khamdang S**, Takayama F, Aoyama I, Nakamura S, Endou H, Niwa T. Role of organic anion transporters in the tubular transport of indoxyl sulfate and the induction of its nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13(7): 1711-20.

5.2.8 Takeda M, **Khamdang S**, Narikawa S, Kimura H, Kobayashi Y, Yamamoto T, Cha SH, , Sekine T, Endou H. Human organic anion transporters and human organic cation transporters mediate renal antiviral transport. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 300(3): 918-24.

### 5.3 งานวิจัยที่กำลังทำอยู่

5.3.1 ทดสอบฤทธิ์เอสโตรเจนของสมุนไพรพื้นบ้านในจังหวัดอุบลราชธานี

5.3.2 ทดสอบพิษเฉียบพลันและกึ่งเรื้อรังของสมุนไพรที่มีฤทธิ์เอสโตรเจน

5.3.3 ทดสอบฤทธิ์แก้ปวด-อักเสบของสารสกัดว่านหมาว้อ



### ประวัติผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ นางสาวพรทิพย์ นามสกุล ไหววุฒิ  
Name Ms. Pornthip Last name Waiwut
2. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์  
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
3. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้  
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี  
อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี  
โทรศัพท์ 045-288382-3  
โทรสาร 045-288384

### 4. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบ การศึกษา	ระดับ ปริญญา	อักษรย่อ ปริญญา	สาขา	สถาบันการศึกษา	ประเทศ
2544	โท	วท.ม.	ชีวเคมี	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	ไทย
2540	ตรี	วท.บ	สัตวศาสตร์	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	ไทย

### 5. ผลงานตีพิมพ์

- 5.1 Waiwut P, Anuchapreeda S, and Limtrakul P. Curcumin Inhibit The P-glycoprotein Level in Carcinoma Cervix Cells (KB-carcinoma Cell Lines) Induced by Vinblastine. Chiang Mai Med Bull 2002; 41(3): 139-145.

## ประวัติผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ นางสาวธนวดี นามสกุล ปรีเปรม

Name Ms. Thanawadee Last name Preeprem

2. ตำแหน่งปัจจุบัน

อาจารย์

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

3. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี

โทรศัพท์ 045-288382-3

โทรสาร 045-288384

## 4. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบ	ระดับ	อักษรย่อ	สาขา	สถาบันการศึกษา	ประเทศ
การศึกษา	ปริญญา	ปริญญา			
2545	ตรี	ภ.บ.	เภสัชศาสตร์	มหาวิทยาลัยอุบลฯ	ไทย

### ประวัติร่วมผู้วิจัย

1. ชื่อ นางจรรวณ นามสกุล ธนวิรุฬห์  
Name: Ms. Charuwan Last name: Thanawiroon
2. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ระดับ 6  
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
3. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้  
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี  
อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี  
โทรศัพท์ 045-288382-3  
โทรสาร 045-288384

### 4. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบ การศึกษา	ระดับ ปริญญา	อักษรย่อ ปริญญา	สาขา	สถาบันการศึกษา	ประเทศ
2546	เอก	Ph.D	Medicinal and Natural Product Chemistry	University of Iowa	USA
2542	โท	M.S.	Medicinal and Natural Product Chemistry	University of Iowa	USA
2539	ตรี	ภ.บ.	เภสัชศาสตร์	มหาวิทยาลัยมหิดล	ไทย

### 5. ผลงานตีพิมพ์

1. "Enzymatic Preparation of Heparin Disaccharides as Building Blocks in Glycosaminoglycan Synthesis", Y.S. Kim, C. Thanawiroon, H.G. Bazin, R.J. Kerns, R.J. Linhardt, *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, **31**, 113-134, 2001.
2. "Capillary Electrophoresis for the Analysis of Glycosaminoglycans and Glycosaminoglycan-Derived Oligosaccharides", W.J. Mao, C. Thanawiroon, R.J. Linhardt, *Biomedical Chromatography*, **16**, 77-94, 2002.
3. "Analysis of Glycosaminoglycans by PAGE", W.J. Mao, C. Thanawiroon, R.J. Linhardt, in: *Analytical Chemistry: Analytical Techniques to Evaluate Structure and Function of Natural Polysaccharides and Glycosaminoglycans*, N. Volpi, ed., Research Signpost, Kerala, India, 53-78, 2002.

4. "Structural Studies on K-Carrageenan Derived Oligosaccharides", G. Yu, A. S. Ioanoviciu, S. A. Sikkander, **C. Thanawiroon**, J. K. Tobacman, T. Toida, R. J. Linhardt, *Carbohydrate Research*, 337, 433-440, 2002.
5. "Heparin Oligosaccharide Sequence and Size Essential for Inhibition of Pulmonary Artery Smooth Muscle Cell Proliferation", H.G. Garg, N. Cindhuchao, C. A. Hales, **C. Thanawiroon**, I. Capila, R. J. Linhardt, *Carbohydrate Research*, 337, 2359-2364, 2002.
6. "Characterization of Polysaccharide Interactions", **C. Thanawiroon**, W. Mao, R. J. Linhardt, in: *Affinity Capillary Electrophoresis in Pharmaceuticals and Biopharmaceutics*. R.H.H. Neubert, H.H. Rüttinger, eds., Marcel Dekker, New York, Chap. 11, pp 265-301, 2002.
7. "Separation of a Complex Mixture of Heparin-Derived Oligosaccharides Using Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography", **C. Thanawiroon**, R.J. Linhardt, *Journal of Chromatography A*, 1014, 215-223, 2003.
8. "LC/MS Sequencing of Highly Sulfated Heparin-Derived Oligosaccharides" **C. Thanawiroon**, K.G. Rice, R.J. Linhardt, *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 2608-2615, 2004.

#### **ผลงานที่เสนอในที่ประชุมวิชาการ**

1. Heparin: Structure and Function. Robert J. Linhardt, Melissa Fath, Ishan Capila, Nur Sibel Gunay, **Charuwan Thanawiroon**, Guangli Yu, Laurie LeBrun, Maria Hernaiz, 220<sup>th</sup> ACS National Meeting, Washington DC, August 20-24, 2000.
2. Structure, Sequencing and Synthesis of Sulfated Polysaccharides. Robert J. Linhardt, Nur Sibel Gunay, **Charuwan Thanawiroon**, Wen-Jun Mao, Tasneem Islam, Alexandra Ioanoviciu, Yi Wu, 222<sup>nd</sup> ACS National Meeting, Chicago, August 26-30, 2001.
3. Separation and Analysis of Heparin-Derived Oligosaccharides. **Charuwan Thanawiroon**, Robert J. Linhardt, 40<sup>th</sup> Annual MIKI Midwestern Medicinal Chemistry Meeting, Chicago, Illinois, April 2002.
4. Separation of a Complex Mixture of Heparin-Derived Oligosaccharides Using Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography. **Charuwan Thanawiroon**,

Robert J. Linhardt, 16<sup>th</sup> International Symposium on Microscale Separations and Analysis (HPCE 2003), Manchester Grand Hyatt, San Diego, California, January 18-23, 2003.

5. Structure Analysis of Sulfated Acidic Oligosaccharides. Lianli Chi, **Charuwan Thanawiroon**, Nur Sibel Gunay, Jin Xie, Stephen Goldman, Robert J. Linhardt, 41<sup>st</sup> Annual MIKI Midwestern Medicinal Chemistry Meeting, Lawrence, Kansas, March 2003.

6. Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Sequencing Approach for Highly Sulfated Heparin-Derived Oligosaccharides. **Charuwan Thanawiroon**, Robert J. Linhardt, 224<sup>th</sup> ACS National Meeting, New York, August 2003.