โรคผึ้งและการใช้ประโยชน์จากสารภูมิคุ้มกันของผึ้ง

Bee Pathogens and the Utilization of Bee Immune Substances

ทิติยา จิตติหรรษา[1/] ทิพาภรณ์ ทรัพย์สมบูรณ์ [2/]

Titiya Chittihunsa[1/] Tipaporn Subsomboon[2/]

ABSTRACT

Honey bees as well as other living organisms have to face with several pathogens, thus they have to develop immune to fight with the infecting microbes. the knowledge of bee immune has been normally, used to select some resistance strains of honey bees to some diseases which tremendously help the success in apiculture. This knowledge has been currently applied for several useful aspects such as the transfer of antibiotic producing genes form honey bee into some plants to make the GMO plants resist to some plant diseases. These target genes were transfered into yeasts to get some new antibiotics that were also transferred into some insect vectors. The mosquitoes were raised as an example a the vectors for malaria and hemorrhagic fever, so that the GMO insect can destroy or reduce the microbes pathogenicity. Some important bee diseases, factors that effect and types of bee immune system, antimicrobial peptides and their applications, the diversity of some genes involving in bee immune was summarized in this article.

Key words: honey bee immune system, antimicrobial peptide, antibiotics, genetic engineering organisms

บทคัดย่อ

ผึ้งก็เหมือนสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ที่ต้องเผชิญกับจุลินทรีย์ก่อโรคหลายชนิด ผึ้งจึงต้องสร้างภูมิคุ้มกันเพื่อต่อสู้กับเชื้อโรค องค์ความรู้เกี่ยวกับภูมิคุ้มกันในผึ้ง นอกจากจะถูกนำไปใช้ในการคัดเลือกผึ้งพันธุ์ที่

[1/] ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร อ.เมือง จ.นครปฐม 73000

[1/] Department of Biology, Faculty of Science, Silpakorn University Mueang district, Nakhon Pathom provice 73000

[2/] ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร อ.เมือง จ.นครปฐม 73000

[2/] Department of Biotechnology, Faculty of Engineering and Technology, Silpakorn University, Mueang district Nakhon Pathom provice 73000

ต้านทานต่อโรค ซึ่งมีส่วนช่วยให้อุตสาหกรรมการเลี้ยงผึ้งพันธุ์ประสบความสำเร็จ ปัจจุบันได้มีการนำองค์ความรู้ดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ในงานอีกหลายด้าน อาทิ การถ่ายโอนยีที่ควบคุมการสร้างสารต้านจุลชีพหลายชนิดจากผึ้งไปสู่พืช เพื่อสร้างพืชแปลงพันธุ์ที่สามารถต้านโรคพืชบางชนิด ยีนเป้าหมายดังกล่าวได้ถูกถ่ายโอนไปสู่ยีสต์ เพื่อให้ยีสต์แปลงพันธุ์สร้างยาต้านจุลชีพชนิดใหม่ๆ และยังได้ถูกถ่ายโอนไปสู่แมลงพาหะนำโรคบางชนิด เช่น ยุงที่เป็นพาหะของโรคมาลาเรีย ไข้เลือดออก เป็นต้น เพื่อให้แมลงพาหะสร้างสารภูมิคุ้มกันที่สามารถทำลาย หรือลดความรุนแรงของเชื้อโรค บทความนี้ได้กล่าวถึงโรคที่สำคัญในผึ้ง ปัจจัยที่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน ประเภทของระบบภูมิคุ้มกัน สารต้านจุลชีพประเภทเพปไทด์ โดยเน้นเรื่องการประยุกต์ใช้งานและแสดงความหลากหลายของยีนที่ควบคุมการสร้างสารต้านจุลชีพดังกล่าว

คำหลัก: ระบบภูมิคุ้มกันของผึ้ง สารต้านจุลชีพประเภทเพปไทด์ สารปฏิชีวนะ สิ่งมีชีวิตแปลงพันธุ์

คำนำ

เทคนิคด้านโปติโอมิคก้าวหน้าไปอย่างรวดเร็ว มีผลช่วยให้มนุษย์สามารถพัฒนาสารออกฤทธิ์ชีวภาพประเภทเพปไทด์ (peptide) โพลีเพปไทด์ (polypeptide) โปรตีน เพื่อใช้ประโยชน์ในหลายๆด้าน อาทิ เป็นสารต้านเชื้อโรคในมนุษย์ในสัตว์และในพืช หรือเป็นอาหารเสริมสุขภาพเพื่อสร้างภูมิคุ้มกันต่อความผิดปกติต่างๆในมนุษย์และในสัตว์ ในอดีตการศึกษาและแสวงหาสารออกฤทธิ์ชีวภาพโดยเฉพาะพวกสารปฏิชีวนะนิยมศึกษาจากพืชหรือจุลินทรีย์ ซึ่งสามารถเพิ่มจำนวนได้รวดเร็ว และสะดวกในการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ แต่เชื้อโรคหลายชนิดได้สร้างความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ ที่มีการใช้ติดต่อกันเป็นเวลานาน ปัจจุบันจำเป็นต้องศึกษาหาสารชนิดใหม่ๆ จากแหล่งอื่นมาทดแทน การศึกษาเรื่องภูมิคุ้มกันในผึ้งที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่ได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากมนุษย์มีเทคโนโลยีในการจัดการการเลี้ยงผึ้งได้ดีมากโดยเฉพาะผึ้งพันธุ์ *(Apis mellifera* L.) องค์ความรู้เกี่ยวกับเรื่องภูมิคุ้มกันของผึ้ง และความสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆได้มากขึ้น ย่อมมีผลช่วยส่งเสริมให้อุตสาหกรรมการเลี้ยงผึ้งขยายตัวได้อย่างรวดเร็วและเพิ่มความมั่นคง และยังช่วยเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์จากผึ้งในเชิงพาณิชย์ได้กว้างขวางขึ้นด้วย

1. โรคที่สำคัญในผึ้ง

ผึ้งเป็นแมลงสังคมอยู่รวมกันอย่างหนาแน่น น่าจะทำให้ผึ้งเกิดความเครียดซึ่งจะมีผลให้อ่อนแอติดโรคได้ง่าย แต่การอยู่ร่วมกันเป็นสังคมช่วยลดการติดโรคในผึ้งได้ เช่น การที่ผึ้งมีนิสัยเลียเพื่อทำความสะอาดตัวซึ่งกันและกัน ผึ้งงานบางสายพันธุ์สามารถทำความสะอาดรังสำรวจ และหมั่นขนสมาชิกที่ติดโรคออกไปทิ้งนอกรังก่อนจะเกิดการระบาดของโรค เป็นต้น (Evan, 2004) อย่างไรก็ตามเมื่อสภาวะภายใน

รังผึ้งไม่เหมาะสม ผึ้งจะติดโรคได้ง่าย และเชื้อโรคมักแพร่ระบาดได้รวดเร็วเนื่องจากผึ้งอยู่รวมกันเป็นสังคม และยังสามารถนำเชื้อโรคไปปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมบริเวณใกล้เคียง ขณะเดียวกันก็ติดเชื้อโรคจากแหล่งดังกล่าวนำกลับมาแพร่ระบาดในรังอีกด้วย

โรคสำคัญที่มักพบในผึ้ง โดยแบ่งตามชนิดของเชื้อโรค ได้แก่

1.1 โรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส

1.1.1 โรคออกถุงหรือโรคแซคบรูค เกิดจากไวรัสเรืองแสง (iridescent virus) พบในผึ้งโพรงที่เลี้ยงในประเทศไทย (ทิพวดี, 2526) ตัวอ่อนผึ้งที่ได้รับเชื้อมักไม่พัฒนาไปเป็นดักแด้ และที่บริเวณส่วนปลายของทางเดินอาหารมักบวมลักษณะคล้ายถุง ภายในบรรจุของเหลวสีขาวขุ่นที่เต็มไปด้วยเป็นอนุภาคของไวรัส (Figure 1)

1.1.2 โรคอัมพาตในผึ้ง เกิดจากไวรัสพวกที่ทำให้เกิดอาการอัมพาตแบบเฉียบพลันหรือแบบเรื้อรัง (acute or chronic bee paralysis virus) เนื่องจากไวรัสมักเข้าทำลายที่ระบบประสาท ตัวเต็มวัยที่ได้รับเชื้อในระยะแรกมักไม่แสดงอาการที่ชัดเจน ผึ้งที่ติดโรคนี้มักอ่อนแอและถูกรบกวนจากไรศัตรูผึ้งพวก *Varroa jacobsoni* (Oudemans) ได้ง่าย เนื่องจากไวรัสมีขนาดเล็กมาก ไม่สามารถตรวจพบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ การวินิจฉัยโรคนี้จึงทำได้ยาก ต้องใช้เทคนิคการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) (Tentcheva *et al.*, 2004)

1.2. โรคที่เกิดจากแบคทีเรีย

1.2.1 โรคหนอนเน่าอเมริกัน (American foul brood) เกิดจากเชื้อ *Paenibacillus larvae larvae* (Ash) พบการระบาดมากในทวีปอเมริกาและยุโรป แต่เชื้อชนิดนี้โชคดีที่ยังไม่มีรายงานการระบาดในประเทศไทย อาจก่อให้เกิดปัญหาได้ในอนาคต เนื่องจากมีการนำเข้ารังผลิตภัณฑ์และอุปกรณ์เกี่ยวกับการเลี้ยงผึ้ง จากประเทศที่มีการระบาดของโรคนี้ และมีปัจจัยต่างๆ เอื้ออำนวยให้เชื้อโรคเพิ่มจำนวน และก่อให้เกิดภาวะระบาดขึ้น โรคนี้เกิดเฉพาะในตัวอ่อนผึ้งอายุ 1-3 วัน ซากตัวอ่อนมีกลิ่นเน่า เมื่อใช้ก้านไม้แตะที่ซากหนอน แล้วค่อยๆดึงขึ้น จะมีเนื้อเยื่อลักษณะเหนียวยืดติดมากับก้านไม้ยาวประมาณ 2.5 ซม. (Figure 2a) ถ้าผึ้งตายหลังจากได้

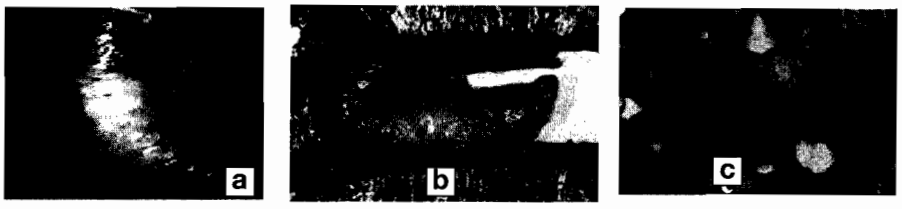

Figure 1. Symptom of sacbrood disease, the abdomen of infected bee larva swelled up because of viral particles (a) (Anon,2006a); sacbrood - side view of prepupa stage (b) (Anon, 2006e); dead brood will be found scattered among healthy brood (c) (Anon, 2006e)

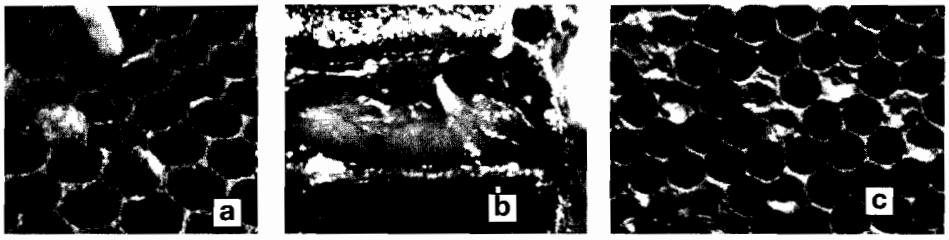

Figure 2. Symptom of bee larva infected by American foul brood, sticky thread like of infected bee larvae (a) (Anon, 2006a); laterally protrudes of proboscis in infected pupa (b) (Anon, 2006h); pepper-liked cover of infected cell (c) (Anon, 2006h)

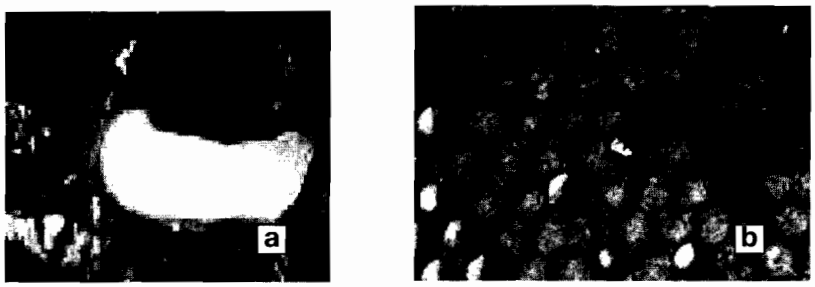

Figure 3. Symptom of bee larva infected by European foul brood (a) (and larvae with European foul brood in comb (b) (Anon, 2006b)

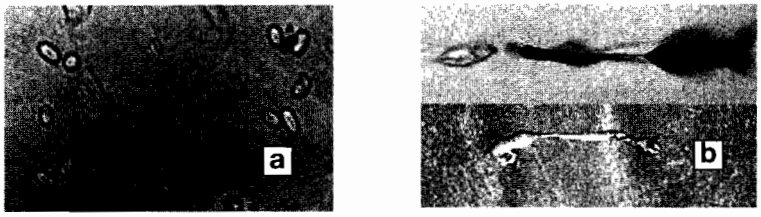

Figure 4. Spore of *Nosema apis* 400x (a) (Anon, 2006j) and infected gastro - intestinal tracts well up (bottom) in comparison to normal (top) (b) (Anon, 2006f)

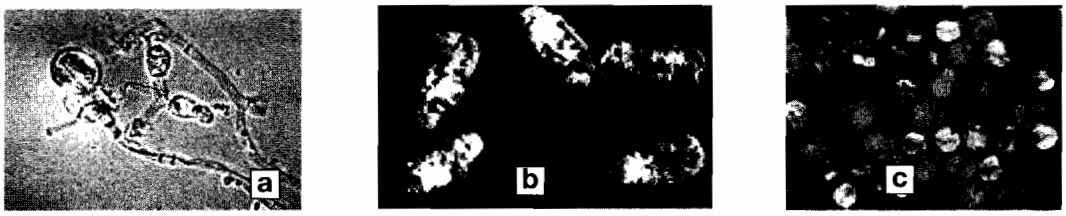

Figure 5. Mycelium an ascocarp of chalk brood disease projects/microbial/micro (a) (Anon, 2006i); mummified larvae:http://photo.bees.net/gallery/chalkbrood (b) (Huang, 2006) and On covering cell, containing infected bee larva (c) (Huang, 2006)

พัฒนาไปเป็นดักแด้แล้ว มักพบลิ้น (tongue or proboscis) ยื่นออกมาในลักษณะตั้งขวางหลอดรวง (Figure 2b) ฝาของหลอดรวง ที่มีตัวอ่อนติดเชื้อ ที่ถูกปิดฝาแล้วมักบุ๋มลงด้านใน จึงมีลักษณะของฝาหลอดรวง คล้ายถูกโรยด้วยเมล็ดพริกไทย (Figure 2c) (Hansen and Brodogaard, 1999)

1.2.2 โรคหนอนเน่ายุโรป (European foul brood) เกิดจากเชื้อ *Melissococcus pluton* (White) ทำให้ตัวอ่อนผึ้งมีอาการคล้ายคลึงกับที่เกิดในโรคหนอนเน่าอเมริกัน แต่มีข้อต่างคือ เมื่อใช้ไม้แตะซากที่เน่าจะไม่มีเนื้อเยื่อที่เหนียวยืดติดก้านไม้ขึ้นมา ดักแด้ที่ตายภายในหลอดรวงที่ถูกปิดจะไม่พบลิ้นที่ยื่นออกมาขวางรัง (Figures 3a,3b) ตัวเชื้อสร้างเอ็กโซสปอร์ ในขณะที่โรคหนอนเน่าอเมริกันสร้างเอ็นโดสปอร์ แม้ยังไม่มีรายงานการระบาดในประเทศไทย แต่อาจก่อให้เกิดปัญหาได้ในอนาคตด้วยปัจจัยต่างๆ ที่เอื้ออำนวยให้ในทำนองเดียวกันกับโรคหนอนเน่าอเมริกัน (Bailey, 1981)

1.3 โรคที่เกิดจากโปรโตซัว

โรคที่พบมากมักเกิดจากโนซีมา เอพิส (*Nosema apis* Zander) เป็นโรคที่เคยระบาดทั้งในทวีปอเมริกาเหนือและใต้ และในทวีปยุโรป สปอร์มีขนาด 2.5 – 5.0 ไมโครเมตร (Figure 4a) เมื่อผึ้งได้กินเชื้อเข้าไป เชื้อจะเจริญและเพิ่มจำนวนที่ทางเดินอาหารส่วนกลาง ทำให้ปล้องท้องยืดและบวมผิดปกติ มีสีขุ่นแตกต่างจากผึ้งปกติอย่างเห็นได้ชัด (Figure 4b) ผึ้งติดเชื้ออาจไม่ตาย แต่มักมีอายุสั้น อ่อนแอ ไม่กระฉับ กระเฉง และมีประชากรลดลง (Bailey, 1981)

1.4 โรคที่เกิดจากเชื้อรา

โรคที่พบมากและมักเป็นปัญหาที่สำคัญคือ โรคชอล์คบรูด (chalk brood disease) เป็นโรคที่ระบาดเป็นครั้งคราวในประเทศไทย แต่พบระบาดมากในทวีปยุโรป อเมริกา ออสเตรเลีย และเอเชียมานานกว่าครึ่งศตวรรษ เกิดจากเชื้อรา *Ascosphaera apis* (Claussen) (Figure 5a) ผึ้งได้รับเชื้อในระยะตัวอ่อนที่มีอายุไม่เกิน 4 วัน เมื่อตัวอ่อนกินสปอร์เข้าไปถึงทางเดินอาหารส่วนกลาง สปอร์จะงอกเป็นเส้นใย ทำลายเซลล์บุทางเดินอาหาร แย่งอาหารและน้ำ (parasitism) ตลอดจนทำลายเนื้อเยื่อบางชนิด ระยะตัวเต็มวัยที่แม้จะได้รับเชื้อแต่มักไม่แสดงอาการของโรค จึงเป็นพาหะแพร่กระจายโรคภายในรังและปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อม เมื่อสภาพแวดล้อมในตัวอ่อนผึ้งไม่เหมาะสม เช่น ขาดอาหาร เส้นใยราจะแทงทะลุผนังลำตัวของตัวอ่อนผึ้งออกมาภายนอกตัวหรือถูกขับออกพร้อมของเสีย มีผลให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อในรังมากยิ่งขึ้น (Tanada and Kaya, 1993) เส้นใยสีขาวที่เจริญคลุมลำตัวผึ้งมีลักษณะคล้ายฝุ่นชอล์คจึงเรียกโรคนี้ว่า โรคชอล์คบรูด ตัวอ่อนผึ้งที่ตายมีลำตัวเหี่ยวย่น แห้งกรัง ลักษณะคล้ายมัมมี่ (mummified larvae) (Figure 5b) และบางครั้งหลอดรวงที่ติดโรคจะไม่ถูกปิดฝา (Figure 5c)

2. ปัจจัยที่มีผลต่อระบบภูมิต้านทาน

2.1 พันธุกรรม (genetic)

เป็นที่ยอมรับอย่างกว้างขวางในวงการของผู้เลี้ยงผึ้งว่า ชนิดหรือสายพันธุ์ของผึ้ง มีบทบาทต่อการต้านทานโรค เช่น ผึ้งโพรง (*Apis cerana* (Fabricius) สามารถต้านทานโรคได้ดีกว่าผึ้งชนิดอื่นๆ Evans (2006) พบยีนต่างๆ ในผึ้งประมาณ 500 ยีน และรายงานว่ามีหลายสถาบันได้ทำงานวิจัยเกี่ยวกับยีนที่ควบคุมพฤติกรรมเกี่ยวกับสุขอนามัย(hygienic behaviour) ซึ่งมุ่งหวังจะใช้ยีนดังกล่าวเป็นยีนเครื่องหมาย (marker gene) ในการคัดเลือกสายพันธุ์ผึ้งที่ต้านทานต่อโรค ซึ่งจะช่วยลดต้นทุนเกี่ยวกับการบำบัดโรคติดเชื้อ และลดความเสียหายจากเหตุดังกล่าวในอุตสาหกรรมการเลี้ยงผึ้งได้อย่างมหาศาล (Evans *et al.* 2006)

2.2 กายวิภาค (Anatomical barrier)

2.2.1 ระบบกระดูกนอก ที่สำคัญมากที่สุดในการป้องกันผึ้งจากการรุกรานด้วยเชื้อโรค เนื่องจากประกอบด้วย ส่วนที่เป็นไขมัน (wax) และสารพวกซีเมนต์ที่ชั้นเอพิคิวทิเคิล (epicuticle) สารประกอบโปรตีน และไคตินที่ชั้นโปรคิวทิเคิล (procuticle)(Snodgrass, 1956)

2.2.2 ระบบทางเดินอาหาร เซลล์บุผิวรอบท่ออาหารส่วนหน้าและส่วนหลังของผึ้งพัฒนามาจากเนื้อเยื่อชั้นเอ็กโตเดิร์ม จึงมักมีส่วนของผนังหนากว่าเซลล์เยื่อบุผิวรอบทางเดินอาหารส่วนกลาง ซึ่งพัฒนามาจากชั้นเอ็นโดเดิร์ม เชื้อโรคส่วนมากที่ก่อโรคโดยการถูกกิน จึงเข้าทำลายผึ้งที่บริเวณทางเดินอาหารส่วนกลาง ผึ้งป้องกันบริเวณดังกล่าวโดยการสร้างชั้นเพอริโทรฟิคที่ประกอบด้วยสารพวกโปรตีน และไคติน ซึ่งมักประสานกันเป็นร่างแห หรือตะแกรงเคลือบตลอดความยาวของทางเดินอาหารส่วนกลาง เพื่อป้องกันการบุกรุกของเชื้อโรค (Snodgrass, 1956)

2.3 อายุของผึ้ง

อายุเกี่ยวข้องกับปัจจัยทางกายภาคและสรีระ เช่น ขณะที่ผึ้งอายุน้อยผนังที่ทางเดินอาหารส่วนกลาง ยังมีความหนาน้อย หรือยังสร้างไม่สมบูรณ์ จึงมักติดโรคที่ปนเปื้อนมากับอาหารได้ง่ายกว่าผึ้งที่มีอายุมาก (Chen *et al.*, 2000)

2.4 สภาพแวดล้อม และคุณภาพของอาหาร

ผึ้งอยู่ในอุณหภูมิหรือความชื้นที่ไม่เหมาะสม หรือขาดสารอาหาร มักชักนำให้ผึ้งเกิดความเครียดและติดโรคได้ง่าย (Gojmerac, 1980) สารอาหารที่ผึ้งได้รับมีผลต่อภูมิต้านทานของผึ้งมาก พืชอาหารบางชนิดมีน้ำมันหอมระเหย เช่น ตระไคร้ พืชวงศ์มะนาว และยูคาลิปตัส เป็นต้น สารอาหารจากต้นมานูคา (manuka) ซึ่งอุดมด้วยฟลาโวนอยด์ (flavonoid) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคหลายชนิดช่วยให้ตัวอ่อนผึ้งติดโรคน้อยลง (Davis and Wards, 2003) ข้อมูลเหล่านี้ผู้เลี้ยงผึ้งได้นำไปใช้ประโยชน์อย่างมาก ในการจัดสภาพแวดล้อมและคุณภาพของอาหาร ให้เหมาะสมกับความต้องการของผึ้ง ปรากฏว่าสามารถลดความเสียหายจากการติดโรคในประชากรผึ้งได้มาก และสารพวกฟลาโว

นอยด์ในน้ำผึ้ง ยังมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและเสริมสร้างภูมิต้านทานต่อเชื้อโรคหลายชนิดในมนุษย์ด้วย (Serra *et al.*, 2001)

2.5 ปัจจัยทางสรีระ

สภาพความเป็นกรด-ด่าง ในระบบทางเดินอาหาร และในระบบหมุนเวียนเลือด เป็นภูมิต้านทานที่สำคัญมากในการทำลายจุลินทรีย์หลายชนิด เนื่องจากระบบหมุนเวียนเลือด มีหน้าที่เกี่ยวข้องโดยตรงกับระบบภูมิต้านทานในผึ้ง (Snodgrass, 1956) ซึ่งจะขอนำเสนอในรายละเอียดต่อไป

3. ระบบหมุนเวียนเลือดที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน

ระบบหมุนเวียนเลือดในผึ้งเป็นระบบเปิด ดังนั้นในช่องว่างลำตัว (hemocoel) จึงเต็มไปด้วยน้ำเลือดและสารอื่นๆอีกมาก ระบบนี้ทำหน้าที่คล้ายคลึงกับระบบหมุนเวียนเลือดของสัตว์ชนิดอื่นๆ เช่น ลำเลียงสารอาหารและฮอร์โมน เป็นต้น แต่ในที่นี้จะนำเสนอเฉพาะบทบาทหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับ ระบบภูมิคุ้มกันเท่านั้น ซึ่งสามารถแบ่งเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนที่เป็นเม็ดเลือดและส่วนที่เป็นน้ำเลือด (Snodgrass, 1956)

3.1. ส่วนที่เป็นเม็ดเลือด

เม็ดเลือดมีบทบาทสำคัญในการต้านต่อเชื้อโรคได้แก่ พลาสโมไซท์ (plasmocyte) กรานูโลไซท์ (granulocyte) และโปรฮีโมไซท์ (prohemocyte) โดยทำหน้าที่ดังนี้

3.1.1 การกินและทำลายเชื้อโรค (phagocytosis) โดยการเข้าล้อมจับเชื้อโรค (trapping) โอบล้อมเพื่อกลืนกิน (engulfment) และย่อยทำลาย (destruction) (Figure 6a) โดยทั่วไปมักเป็นกระบวนการที่สำคัญในการกำจัดเชื้อโรคที่มีขนาดเล็ก เช่น ไวรัสและแบคทีเรีย แต่ละขั้นตอนอาจต้องอาศัยปัจจัยอื่นๆ เข้าช่วยเสริมประสิทธิภาพด้วย เช่น ต้องการสารเคมีที่มักพบในน้ำเลือด ได้แก่ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) เปอร์ออกซีไนไทรท์ (peroxynitrite) หรือทำงานร่วมกับเอนไซม์พวกโปรทิเอส (protease) ไลโซไซม์ (lysozyme) เป็นต้น หากเชื้อโรคมีปริมาณมากเกินไป หรือมีกลไกที่สามารถหลบหลีกการเข้าล้อมจับและทำลายของเม็ดเลือดได้ เชื้อโรคดังกล่าวยังต้องไปเผชิญกับภูมิต้านทานที่ถูกเหนี่ยวนำให้สร้างเพิ่มขึ้น เช่น สารพวกโพลีเพปไทด์ หรือไลโซไซม์ (lysozyme) เป็นต้น (Hoffman, 1995)

3.1.2 การสร้างปลอกหรือแคปซูล (encapsulation) กระบวนการนี้เกิดขึ้นเพื่อล้อมรอบเชื้อโรคไม่ให้แพร่กระจายสู่บริเวณอื่น ขนาด และองค์ประกอบของสารอาจแตกต่างกันตามชนิดของแมลงและชนิดของเชื้อโรค การเกิดแคปซูล เริ่มต้นจากการที่เม็ดเลือดจดจำเชื้อโรคได้ โดยมีส่วนตัวรับ (receptor site) ที่สามารถจับ (binding) กับส่วนของเชื้อโรค จากนั้นมีการปล่อยสาร ซึ่งบางชนิดมีลักษณะคล้ายเจลที่มีความเหนียว เช่น ฮีโมลิน (hemolin) เล็คติน (lectin) เพื่อทำให้เม็ดเลือดมารวมตัวกันบริเวณที่มีเชื้อโรคเม็ดเลือดบางชนิดสามารถขยายตัวใหญ่และยาวขึ้น มีลักษณะคล้ายไมโครทูบูล (microtubules) เข้าล้อมรอบสิ่งแปลกปลอมจนมีลักษณะเป็นแคปซูลกระบวนการนี้มักมีบทบาท

สำคัญมากในการกำจัดเชื้อรา และโปรโตซัว (Glinski and Buczek, 2003) (Figure 6b)

3.1.3 กลุ่มก้อนเซลล์หรือเนื้องอก (nodules or tumors formation) กระบวนการเหล่านี้เกิดจากการที่เซลล์พบและจดจำสิ่งแปลกปลอมได้ จึงส่งสารบางชนิดไปกระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดแบ่งตัวเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว (exaggerated cell) ในการเข้าล้อมรอบเชื้อโรค ก่อเกิดลักษณะเป็นกลุ่มก้อนขนาดใหญ่ เรียกว่า เนื้องอก (Glinski and Buczek, 2003)

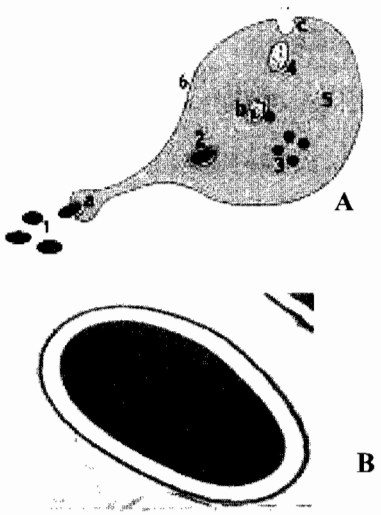

Figure 6. Blood cell trapped engulfed and destructed pathogen (a) (Anon, 2006c); encapsulation of body (b) (Kraaijeveld, 2006)

นอกจากกระบวนการของภูมิคุ้มกันทั้ง 3 แบบที่เกิดจากเม็ดเลือดแล้ว เม็ดเลือดยังป้องกันการบุกรุกของเชื้อโรคโดยการแข็งตัวของเม็ดเลือดพวกพลาสโมไซท์ และโคแอกกูโลไซท์ (coagulocyte) ทำงานร่วมกับสารบางชนิด ในน้ำเลือด เช่น โคแอกกูลิน (coagulin) ฮีโมลิน และเล็คติน ช่วยให้เม็ดเลือดรวมตัวกันที่บริเวณแผล แล้วเปลี่ยนรูปร่างแข็งตัวเป็นแผ่นปกคลุมบริเวณปากแผลเพื่อให้เลือดหยุดไหล และป้องกันการบุกรุกของเชื้อโรค

3.2. ส่วนที่เป็นน้ำเลือด

3.2.1 ประเภทเอนไซม์ซึ่งมีหลายชนิด และสามารถเหนี่ยวนำให้สร้างปริมาณมากขึ้นเมื่อผึ้งได้รับเชื้อโรค เอนไซม์ที่สำคัญได้แก่

- ฟีนอลออกซิเดส (phenol oxidase): เป็นเอนไซม์ที่สำคัญมากในการยับยั้งการเจริญหรือทำลายเชื้อโรค ในสภาพปกติมักอยู่ในรูปที่ยังไม่พร้อมจะทำงาน (prophenoloxidase) แต่เมื่อมีเชื้อโรคหรือสารแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย จะถูกกระตุ้นให้เปลี่ยนรูป พร้อมจะทำงานหลังจากทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น (substrate) จะได้สารฟีนอล (phenol) และพวกเปอร์ออกไซด์ (peroxide) ซึ่งเป็นอนุภาคที่สามารถยับยั้งการเจริญ หรือทำลายเชื้อโรคบางชนิด ผลผลิตที่ได้จะเปลี่ยนเป็นสารพวกควินโนน (quinone) หรือเมลานิน (melanin) โดยทั่วไปอาจใช้ปริมาณของฟีนอลออกซิเดส เป็นตัวชี้วัดระดับของภูมิต้านทานในแมลงได้หลายชนิด (Mucklow, 2004)

- โปรทิเอส (protease) เป็นเอนไซม์สำคัญที่ช่วยสลายโปรตีน โดยเฉพาะโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อโรคชนิดที่มีการศึกษามากคือเซรีนโปรทิเอส (serene protease) (Boman and Hulmark, 1987)

- ไลโซไซม์ เป็นเอนไซม์สำคัญที่ช่วยสลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งมีองค์ประกอบเป็นพวกเพปติโดไกลแคน (pepti-

doglycan) (Boman and Hulmark, 1987)

3.2.2 ประเภทที่ไม่ใช่เอนไซม์ ในน้ำเลือดผึ้งมีสารหลายชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคและอาจทำลายได้ด้วย เช่น

- ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นสารที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อโรคในน้ำผึ้ง และมักไม่ทนต่อความร้อนที่เคยถูกเรียกว่า อินฮิบีน (inhibine) (Sharquie and Najim, 2004)

- เปอร์ออกซีไนไทรท์ (peroxynitrite) ไนโทรโซเปอร์ออกซี่คาร์บอเนต (nitroso-peroxycarbonate) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) เช่น เกิดขบวนการของไทโรซีนไนเทรชั่น (tyrosine nitration) มีฤทธิ์ค่อนข้างกว้าง เนื่องจากสามารถยับยั้งเชื้อโรคบางชนิดที่ทำลายสมอง ไตและปอด จึงได้รับความสนใจเพื่อพัฒนาไปใช้ในการทำยารักษาโรคดังกล่าว (Olmos, 2002)

- ฟลาโวนอยด์ ไพโนเคมบริน (flavonoid pinocembrin) และฟลาโวนอยด์ไพโนสโตรบิน (flavonoid pinostrobin) พบในน้ำผึ้งและโพรพอลิสที่ได้จากพืชอาหารบางสกุล เช่น ต้นชา (tea tree oil) และ Buckwheat ปลูกกันมากในประเทศออสเตรเลีย และประเทศนิวซีแลนด์ และยังกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ที่มีผลยับยั้ง การเกิดมะเร็งบางชนิด ปัจจุบันน้ำหวาน ละอองเกสรผึ้งจากพืชดังกล่าวได้รับความนิยมมาก เนื่องจากเชื่อกันว่ามีสารดังกล่าวในปริมาณสูง และต่อต้านการรุกลามของมะเร็งบางชนิด (เป็นสารต้านอนุมูลอิสระประกอบด้วยฟีนอลหลายตัว) (Anon, 2005)

- เล็คติน พบในเลือดของผึ้ง เป็นสารที่ผึ้งได้จากพืชอาหาร เช่น ดอกของกระเทียมจีนหรือกระเทียมต้น (*Allium porrum* (Gay)) โปรตีนที่พบอาจสูงถึง 75% มีหลายไอโซเมอร์ (isomer) สามารถจับกับโมเลกุลของพวกคาร์โบไฮเดรตของเชื้อโรคโดยทำงานร่วมกับเอนไซม์เซรีนโปรทิเอส (serine protease) ผลของปฏิกิริยาดังกล่าว ช่วยกระตุ้นให้เกิดกระบวนการยึดเกาะและกินเชื้อโรคโดยกรานูโลไซท์ หรือพลาสโมไซท์ ได้เร็วและมากขึ้น แต่สารดังกล่าวมีฤทธิ์ไม่คงทนมักเปลี่ยนสภาพจนไม่มีฤทธิ์ ปัจจุบันมีการศึกษาเพื่อใช้ในวงการของแพทย์ ทางเลือกเพื่อใช้รักษาสมดุลการทำงานของระบบโลหิต (Zou *et al.*, 2006)

- ไลโปโฟริน (lipophorin) พบในน้ำเลือด มักทำหน้าที่เป็นตัวพาสารสำคัญต่างๆ และมีหน้าที่ป้องกันไม่ให้สารที่ถูกพา ซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพถูกทำลายโดยเอนไซม์ หรือโดยสภาพกรดด่าง หรือโดยสารเคมีอื่นๆ ในน้ำเลือด นอกจากนั้นการรวมตัวของไลโปโฟรินกับสารบางชนิด เช่น เล็คติน จะทำให้เกิดเป็นตะกอนเล็กๆ ล้อมรอบเซลล์หรือเนื้อเยื่อ ส่งผลให้เชื้อโรคไม่สามารถเกาะจับ จึงไม่ทำลายเซลล์ หรือเนื้อเยื่อ (Rhaman *et al.*, 2006) ข้อมูลเหล่านี้ได้ถูกนำไปใช้ประโยชน์อย่างมากในการจัดหาพืชอาหาร หรือจัดให้อาหารแก่ผึ้งที่มีคุณค่าตามความต้องการของผู้บริโภคหรือตลาด นอกจากจะทำให้ได้รับความนิยมจากผู้บริโภคผลิตภัณฑ์จากผึ้งแล้วยังสามารถจำหน่ายผลิตภัณฑ์ในราคาที่สูงขึ้นด้วย นอกจากนั้นยังสามารถลดความเสียหายจากการ

ติดโรคในประชากรผึ้งได้มากด้วย (Anon, 2005)

4. สารต้านจุลชีพประเภทเพปไทด์ในผึ้ง

Bulet และ stocklin (2005) รายงานว่าสารต้านจุลชีพประเภทเพปไทด์มักถูกสร้างจากเม็ดเลือด สารส่วนใหญ่มีประจุลบ (cationic) ละละลายน้ำได้บางส่วน (amphipathic) ส่วนมากมีโครงสร้างแบบพันกันเป็นเกลียวอัลฟาเฮลิก (α helic) หรือมีลักษณะเป็นเกลียวคู่ ซึ่งเกิดขึ้นโดยการสร้างห่วงแบบเบตาแฮร์พิน (β-hairpin) ซึ่งมีกลไกทำลายผนังเซลล์ และอาจรุนแรงจนทำให้เกิดรูที่ผนังเซลล์ของเชื้อโรค จนไม่สามารถทำหน้าที่ควบคุมการเข้าออกของสารต่างๆได้ เนื่องจากเทคโนโลยีปัจจุบันทำให้สามารถค้นพบยีนที่ควบคุมการสร้างสารต้านจุลชีพประเภทเพปไทด์ได้หลายชนิดทั้งในผึ้งและแมลงอื่นๆ จึงมีโครงการวิจัยเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ เกี่ยวกับด้านนี้มากขึ้น

สารต้านจุลชีพประเภทเพปไทด์ที่พบในผึ้งได้แก่

4.1 เอพิเดซิน (Apidaecin)

เอพิเดซินประกอบด้วย กรดอะมิโน 18 ตัว มีมวลโมเลกุลประมาณ 2 กิโลดัลตัน จัดอยู่ในกลุ่มโปรลีน (proline rich) มีถึง 17 แบบ มีฤทธิ์เสริมการทำงานของเอนไซม์พวกไลโซไซม์ ในการทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ สารเอพิเดซินสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้น้อยมาก ความสามารถในการทำลายแบคทีเรียแต่ละชนิด แต่ละสายพันธุ์ขึ้นกับไอโซเมอร์ ซึ่งมีกรดอะมิโนบางตำแหน่งแตกต่างกัน (Table 1) พบเอพิเดซิน ภายใน 4-6 ชม. หลังจากได้รับเชื้อแบคทีเรีย และมีความเข้มข้นสูงสุดหลังจากได้รับเชื้อ 36 ชม. จากนั้นความเข้มข้นจะลดลงเรื่อยๆ ในวันที่ 3-4 เนื่องจากฤทธิ์ในการทำลาย ไม่จำเพาะเจาะจงนัก จึงมีฤทธิ์เพียงยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบเท่านั้น เอพิเดซินมีโมเลกุลขนาดเล็ก จึงมีงานวิจัยค่อนข้างมากเกี่ยวกับความพยายามที่จะปรับเปลี่ยนสูตรโครงสร้างเพื่อให้ได้ไอโซเมอร์ ที่มีประสิทธิภาพสูงและปลอดภัยมากขึ้น ในการใช้ยาปฏิชีวนะต่อเชื้อโรคต่างๆที่พบในมนุษย์และสัตว์เลี้ยง (Casteels *et al*., 1994)

4.2 อะบีซิน (Abaecin)

มีมวลโมเลกุลประมาณ 4 กิโลดัลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโน 34 ตัว คือ YVPLPNVPQPGRRPFPTEPGOGPFNPKIK WPQGY จัดอยู่ในกลุ่มโปรลีน ประกอบด้วยโปรลีนตั้งแต่ 10 ตัวขึ้นไป Evans (2004) ใช้วิธี real time quantitative (RT-PCR) ด้วยไพรเมอร์ดังนี้คือ forward: CAGCATTCGCAT ACGTACCA/reward:GACCAGGAAA CGTTGGAAAA พบว่าในตัวอ่อนผึ้งที่ได้รับเชื้อ 24 ชม. มีอะบีซินเพิ่มขึ้น (แต่ไม่พบหลังจากได้รับเชื้อ 3 6 และ 12 ชม.) และความเข้มข้นไม่เปลี่ยนไปตามอายุของผึ้งซึ่งอาจเกิดจากปัจจัยอื่นๆ เช่น ปริมาณออกซิเจนที่เปลี่ยนไปในทางเดินอาหาร และทางเดินอาหารส่วนกลาง มีความแข็งแรงมากขึ้นทำให้เชื้อไม่สามารถเข้าไปกระตุ้นให้ผึ้งที่มีอายุมาก สร้างอะบีซินเพิ่มขึ้น Evans (2004) เสนอแนะว่าการใช้อะบีซินเป็น

Table 1. The isomers of apidaecin (Casteels *et al.*, 1994)

Types of isomers	Sequence of amino acid
Apidaecin Ia	GNNRPVYIPQPRPPHPRI
Apidaecin Ib	GNNRPVYIPQPRPPHPRL
Apidaecin II	GNNRPOYIPQPRPPHPRL
Apidaecin III	GNNRPVYISQPRPPHPRI

ตัวบ่งชี้ว่าตัวอ่อนผึ้งได้รับเชื้อโรคหนอนเน่าอเมริกันน่าจะดีกว่าการใช้สารพวกดีเฟนซิน (defensin) ซึ่งมีการตอบสนองในระดับความเข้มข้นที่ไม่แน่นอน แต่มีข้อสังเกตคือ ผึ้งบริบาล (nurse bee) แต่ละตัวที่ได้รับเชื้อโรคหนอนเน่าอเมริกันจะมีระดับของอะบีซิน และดีเฟนซินแตกต่างกัน ซึ่งอาจสูงถึงพันเท่า การทดลองจึงต้องใช้ผึ้งทดสอบจำนวนมากเพื่อลดความคลาดเคลื่อน ปัจจุบันสถาบันวิจัยผึ้งในประเทศสหรัฐอเมริกา (USDA; Bee Research Laboratory, Beltsville, MD) ได้พยายามศึกษา ความสามารถในการถ่ายทอดของยีนควบคุมการสร้างอะบีซินไปสู่ผึ้งรุ่นถัดไป เพื่อตรวจสอบว่า จะใช้ยีนดังกล่าวเป็นยีนเครื่องหมายในการคัดเลือกยีนต้านทานต่อโรคหนอนเน่าอเมริกัน ได้ดีหรือไม่

4.3 เอพิซิมีน (Apisimine)

เอพิซิมีนที่มักพบในนมผึ้ง เป็นพวก Serine-valine rich peptide (Billikova *et al.*, 2002) มีมวลโมเลกุล 5.54 กิโลดัลตัน ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน 54 ตัว ยีนที่ควบคุมการสร้างเพปไทด์ สามารถเพิ่มจำนวนและผลิตเอพิซิมีนในแบคทีเรียพวก *Eschericia coli* BL 21 (DE 3) สามารถถ่ายโอนยีนดังกล่าวในการสร้างยาสูบแปลงพันธุ์ได้สำเร็จ ผลผลิตที่ได้กำลังอยู่ระหว่างการศึกษาผลข้างเคียงด้านอื่นๆ ต่อสัตว์ทดลอง และ สิ่งมีชีวิตนอกเป้าหมาย (Shen *et al.*, 2007)

4.4 ดีเฟนซิน (Defencin)

ดีเฟนซินประกอบด้วยกรดอะมิโนมากกว่า 30 ตัวขึ้นไป ที่พบในผึ้ง มีมวลโมเลกุลประมาณ 4-6 กิโลดัลตัน จัดเป็นพวกที่มีกรดอะมิโนพวกซีสเทอีน (cysteine rich) หลายตัว มีพันธะของซัลเฟอร์ 2-3 ตำแหน่ง Evans (2004) พบว่าสามารถเพิ่มสารดังกล่าวให้มีปริมาณมากโดยใช้วิธี RT-PCR ซึ่งใช้คู่ของไพร์เมอร์ดังนี้คือ ดูผลลัพธ์ของการเรียงลำดับกรดอะมิโน (amino acid sequence) ที่ Genbank No. 5955 forward: TGCGC TGCTA ACTGT CTCAC reward: AATTG CACTT AACCG AAACC นอกจากนั้นเนื่องจากยีนที่ควบคุมการสร้างดีเฟนซินมีข้อมูลมาก และสามารถชักนำให้ผึ้งสร้างสารดังกล่าวให้มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นได้ในเวลารวดเร็วหลังจากที่ผึ้งได้รับเชื้อโรค และยังสามารถใช้ฆ่าเชื้อโรคในขณะที่เชื้อโรคมีปริมาณน้อยในสภาวะที่มีอิออนต่ำ (low of ionic strength) จึงได้รับความสนใจ และเป็นที่คาดหวังว่าจะสามารถนำมาใช้รักษาโรคติดเชื้อพวกแกรมบวก และแกรมลบบางชนิดที่กลายพันธุ์ และมีการพบสารชนิดนี้ในเมล็ดพืชพวกหัวผักกาด (*Raphanus sativus* L.) ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งทั้งการงอกของสปอร์และการเจริญของเส้นใยรา *Botytris*

cinerea (Javis) ที่ก่อโรคราสีเทาในพืช (Thevissen *et al.*, 2004) โดยทั่วไปดีเฟนซินมีฤทธิ์ทำลายผนังเซลล์ ทำให้โพแทสเซียมไหลออกจากเซลล์เชื้อรา จนเซลล์สูญเสียความสามารถในการรักษาสมดุลและเสียชีวิต นอกจากกำจัดเชื้อโรคแล้วสารดังกล่าว ยังมีบทบาทในการรักษาหรือควบคุมจุลินทรีย์ท้องถิ่นที่อาศัยร่วมกับสิ่งมีชีวิตให้มีกิจกรรมต่างๆเป็นไปโดยปกติด้วย ปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์ของดีเฟนซินออกจำหน่ายเพื่อใช้เป็นยาปฏิชีวนะ และใช้ในวงการแพทย์ทางเลือกเพื่อช่วยฟื้นฟูบาดแผลและเพิ่มภูมิต้านทานในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

4.5 ไฮมีนอปทีซิน (Hymenoptaecin)

ไฮมีนอปทีซินประกอบด้วยกรดอะมิโน 93 ตัว มีมวลโมเลกุลประมาณ 10 กิโลดัลตัน จัดอยู่ในกลุ่มไกลซีนตอบสนองต่อเชื้อโรคได้ช้าและถูกสร้างในปริมาณน้อยกว่าเอพิเดซิน มีผลิตภัณฑ์จำหน่ายเพื่อใช้ฆ่าแบคทีเรียทั้งแกรมลบและแกรมบวก ที่สิ่งมีชีวิตอื่นๆ โดยทำงานร่วมกันกับเอพิเดซิน (Casteels *et al.*, 1993)

4.6 เมลิติน (Melittin)

เมลิตินพบในเหล็กไนของผึ้ง (venom) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 26 ตัว สามารถทำลายเซลล์เมมเบรนของแบคทีเรียพวก *Staphylococcus aureus* (Rosenbach) Wachinge และคณะ (1998) รายงานว่าเมลิตินมีฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์กัวไนเลทไซเครส (guanylate cyclase) เป็นเอนไซม์ที่มีผลต่อการเพิ่มระดับ cGMP (cyclic guanosine monophosphase) ของเม็ดเลือด ช่วยให้เม็ดเลือดเพิ่มประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อโรคได้ดีขึ้น เนื่องจากเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก ปัจจุบันจึงสามารถสังเคราะห์เพื่อใช้ในวงการแพทย์ เช่น ใช้เป็นยาเสริม (adjuvant) เพื่อเสริมฤทธิ์ของวัคซีนป้องกันเชื้อบาดทะยักที่เกิดจาก *Bacillus tetanus* (Bergey) นอกจากนั้นยังนำมาใช้เป็นยาต้านไวรัสโรคเอดส์ type 1 (human immunodeficiency virus I) ปัจจุบันยังมีการใช้เหล็กไนรักษาโรคต่างๆ อีกมาก เช่น โรคปลอกหุ้มเส้นประสาทอักเสบ (multiple sclerosis) เนื่องจากเมลิตินสามารถกระตุ้นต่อมใต้สมองส่วนหน้า (pituitary gland) ให้ปล่อยฮอร์โมนอะดรีโนคอร์ติโคโทรฟิน (adrenocorticotrophin hormone) ที่ควบคุมการสร้างฮอร์โมนพวกคอร์ทิซอล (cortisol) ซึ่งควบคุมและเกี่ยวข้องกับระดับภูมิต้านทาน และระดับความเครียดของสัตว์ จึงเข้าใจว่าเมลิตินมีผลเพิ่มความต้านทานต่อเชื้อโรคในผึ้งได้ในลักษณะคล้ายคลึงกัน

4.7 รอยัลซิน (Royalsin)

รอยัลซินมีมวลโมเลกุลประมาณ 5.5 กิโลดัลตัน จัดอยู่ในประเภทเดียวกับดีเฟนซินคือมีกรดอะมิโนซีสเตอีนหลายตัว และมีพันธะชัลเฟอร์ 3 ตำแหน่ง พบในนมผึ้งมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก เช่น โรคหนอนเน่าอเมริกัน ยังไม่มีรายงานผลต่อแบคทีเรียแกรมลบ และยังสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา โรคพืชพวก *Botrytis cinerea* (Javis)ได้ด้วย (Bilikova *et al.*, 2001) เป็นที่คาดคะเนว่าน่าจะมีผลช่วยสร้างภูมิต้านทานในมนุษย์ แต่ก็มีรายงานว่าบางคนแพ้สารดังกล่าว การรับประทานนมผึ้งซึ่งประกอบ

ด้วยสารหลายชนิด จึงต้องระมัดระวังในการปรับความเข้มข้นให้เหมาะสมกับร่างกายของแต่ละบุคคล

สารต้านจุลชีพประเภทเปปไทด์อื่นๆ เนื่องจากความพยายามในการนำผลิตภัณฑ์จากผึ้งมาใช้ในทางรักษาโรคเริ่มเป็นที่แพร่หลายมากขึ้น และเทคโนโลยีใหม่ๆทำให้นักวิจัยสามารถตรวจพบสารออกฤทธิ์ชีวภาพชนิดใหม่ได้มากขึ้น สารดังกล่าวอาจจะมีปริมาณน้อยหรือไม่เสถียร แต่มีคุณค่าในการรักษาโรคมาก เช่น อะพัลมิน (apalmin) ซึ่งพบ 3 ไอโซเมอร์ และเจลไลเนส (jelleines) ซึ่งพบในนมผึ้ง เป็นต้น (Fontana *et al*., 2004)

นอกจากปัจจัยต่างๆ ดังกล่าวข้างต้นแล้ว จุลินทรีย์ที่อาศัยร่วมกับผึ้งหลายชนิดก็มบทบาทต่อระบบภูมิต้านทานของผึ้ง เช่น แบคทีเรียแกรมบวกในสกุล *Bacillus* ที่พบมากในรังหรือบริเวณที่เลี้ยงผึ้ง เช่น *B. circus* (Frankland) เป็นต้น สร้างสารบางชนิดที่ยับยั้งโรคชอล์คบรูดและโรคหนอนเน่าอเมริกันได้ (Evans and Armstrong, 2006)

5. ความหลากหลายของยีนสร้างสารเพปไทด์ต้านจุลชีพในผึ้ง

Evan และคณะ (2006) ได้แบ่งกลุ่มความหลากหลายของยีนที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างสารเพปไทด์ต้านจุลชีพ ไว้เป็น 3 ขั้นตอนคือ

5.1 กลุ่มของยีนที่สร้างสารบางชนิด (Pathogen recognition gene)

เป็นเพื่อไปกระตุ้นการทำงานของ signaling gene หลังจากที่สาร หรือองค์ประกอบบางส่วนของเชื้อโรค เช่น peptidoglycan ของแบคทีเรียแกรมบวกไปจับกับ peptidoglycan recognition site บนเม็ดเลือดที่เรียกว่า Toll-like receptor ซึ่งเป็น transmembrane protein ทำให้เกิดการรวมตัวกันเป็นโครงสร้างที่สามารถจับกับไซโทไคลน์โมเลกุลที่เรียกว่า สเปทเซิล (spaetzle) เกิดเป็น receptor complex ที่กระตุ้นยีนส่งสัญญาณซึ่งสร้างสารไปกระตุ้นให้ยีนควบคุมการสร้างสารเพปไทด์ต้านจุลชีพ ตัวอย่างของยีนในกลุ่มนี้ เช่น peptidoglycan และ b-glucan receptor protein เป็นต้น สารเพปไทด์ต้านจุลชีพที่สร้างโดยวิถีของยีนส่งสัญญาณแบบ Toll สามารถต้านการบุกรุกของแบคทีเรียแกรมบวก เช่น ดีเฟนซิน เอพิเดซิน พวกที่ต้านแบคทีเรียแกรมลบ เช่น อะบีซิน (Figure 7) เป็นต้น

5.2 ซิกแนลลิ่งยีน (Signaling gene)

ซิกแนลลิ่งยีนยีนในชุดนี้จะแสดงออกหลังจากได้รับสารจาก receptor complex จากข้อ 5.1 สารที่พบมากจากยีนในชุดนี้คือ เซรีนโปรทิเอส ทำหน้าที่ย่อยสลายโปรตีนของเชื้อโรค ตัวอย่างของยีนที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ เช่น cactus dorsal ซึ่งอยู่ในวิถีของยีนส่งสัญญาณแบบ Toll ที่แสดงให้เห็นว่าสัญญาณจากสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคมีการส่งต่อเป็นขั้นตอนที่ซับซ้อน (Figure 7) สารที่ผลิตอาจมีฤทธิ์เสริม (synergism) หรือหักล้าง (antagonism) ซึ่งกันและกัน การทราบวิถีของยีนส่งสัญญาณเป็นขั้นตอนหนึ่งที่มี

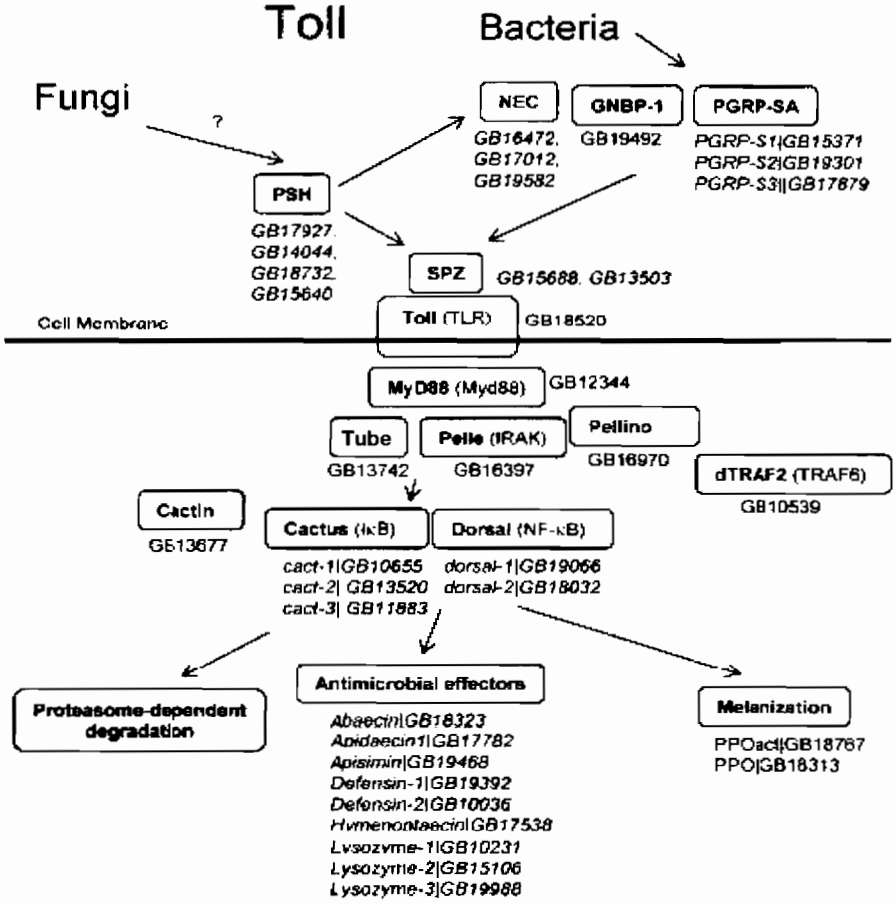

Figure 7. Demonstrated the Toll signaling path way (Evan *et al.*, 2006)

บทบาทมากในการจัดการ หรือควบคุมการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างสารเพปไทด์ต้านจุลชีพ

5.3 กลุ่มยีนที่ควบคุมการสร้างสารเปบไทด์ต้านจุลชีพ (Effector gene)

ยีนที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ เช่น กลุ่มยีนที่ควบคุมการสร้างสารโปรฟีนอลออกซิเดส ไลโซไซม์ ดีเฟนซิน เอพิเดซิน เป็นต้น นอกจากสารต้านจุลชีพที่ถูกสร้างในวิถีของยีนส่งสัญญาณแบบ Toll แล้ว ยังพบสารต้านจุลชีพบางชนิดที่สร้างในวิถีของยีนส่งสัญญาณแบบ Imd (Figure 8) ซึ่งยับยั้งหรือทำลายแบคทีเรียแกรมบวกและเชื้อราบางชนิด และพวกที่สร้างในวิถีของยีนส่งสัญญาณแบบ JAK/STAT สารที่สร้างในวิถีนี้มักเป็นสารที่ไปกระตุ้นให้เม็ดเลือดเพิ่มจำนวนมากขึ้น หรือทำให้เม็ดเลือดยึดตัวเพื่อโอบล้อม และกินเชื้อโรคได้รวดเร็วขึ้น (Figure 8)

สรุปผลการทดลอง

สารเคมีต่างๆที่ผึ้งสร้างขึ้น หรือถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นในระบบภูมิต้านทานเพื่อต่อสู้และป้องกันตัวเองจากเชื้อโรค มนุษย์สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้มากมายหลายด้าน และคาด

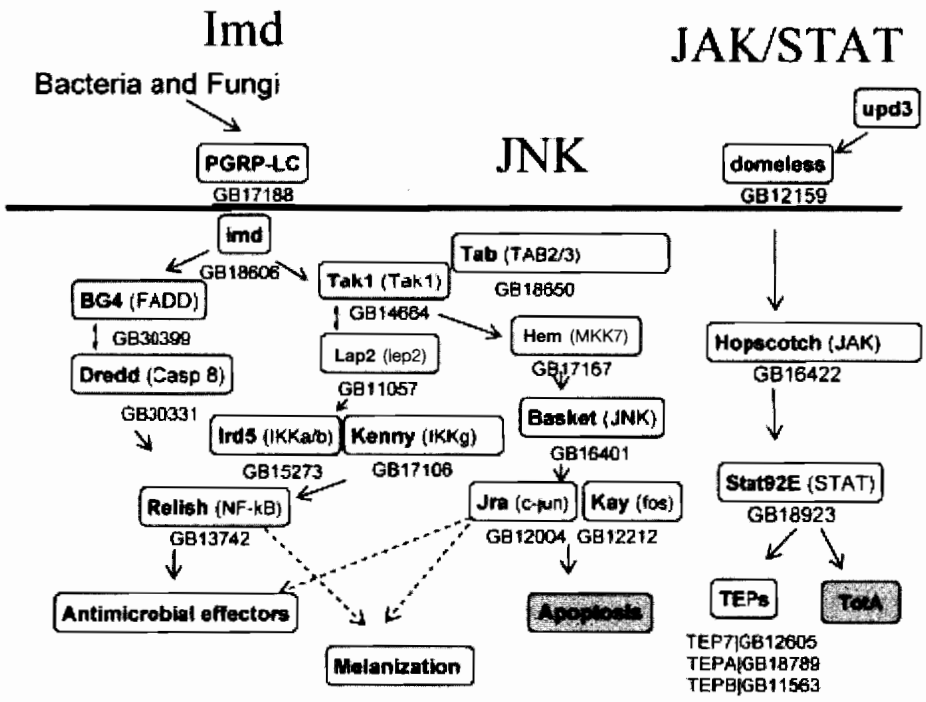

Figure 8. Demonstrated the Imd and JAK/STAT signaling path way (Evan *et al.*, 2006)

ว่าในอนาคตจะมีการนำมาใช้ได้มากยิ่งขึ้น เนื่องจากมีข้อมูลลึกถึงระดับยีนบางชนิดที่ควบคุมสารออกฤทธิ์ชีวภาพดังกล่าว ทำให้มนุษย์สามารถควบคุมการทำงานของยีนต่างๆดังกล่าวให้แสดงออกเพื่อผลิตสารและปริมาณของสารตามที่ต้องการ เช่น สร้างสารปฏิชีวนะตัวใหม่ในการรักษาโรค ใช้ผสมในอาหารเสริมสุขภาพและในเครื่องสำอาง ซึ่งอุตสาหกรรมดังกล่าวมีมูลค่าเพิ่มขึ้นอย่างมหาศาลในทุกๆปี นอกจากนั้นยังสามารถใช้เป็นยีนเครื่องหมายในการคัดเลือกพันธุ์ผึ้งที่ต้านทานต่อโรค ซึ่งจะช่วยทำให้อุตสาหกรรมการเลี้ยงผึ้งขยายตัวได้รวดเร็วและมีรายได้มั่นคงขึ้น

เอกสารอ้างอิง

ทิพวดี อรรถธรรม. 2526. เชื้อไวรัสสายพันธุ์ใหม่ของโรคออกถุงในผึ้งโพรง. หน้า 22. *ใน: บทคัดย่อการประชุมวิชาการสาขาพืช ครั้งที่ 21.* มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Anon. 2005. *FoodInfo Online FSTA Reports. 2005.* http://www.food,sciencecentral.com/fsc/ixid14182, 3/10/2006.

Anon. 2006a. *American Foulbrood (AFB),* www.beekeeping.com/vita/disease/american.htm. 21/2/ 2006.

Anon.2006b. *Biology and diagnosis,* www.medivet.ca/medivet/biodiagnos/foulbrood.htm., 21/9/2006.

Anon.2006c. *Encyclopedia. Wikipedi*, A happy macrophage ingesting not so happy pathogens. http://commons. wikimedia. org/wiki/Image: Phagocytosis.png., 13/10/2006.

Anon. 2006d. *European Foulbrood*, www. vita-europe.com/es/disease/ european.htm., 14/10/2006.

Anon.2006e. Photo by M. V. Smith, University of Guelph, Ontario.), outernode.pir. sa.gov.au/livestock/industries/..., accessed, 3/10/2006.

Anon.2006f. *Gesunde Bienen*, Nosema, www.gesundebienen.de/.../ Nosema.htm.,12/9/2006.

Anon.2006g. *OPC market*. Bee Propolis (http://opcmarket.com/cp-17-BeePropolis.html), 17/10/ 2006.

Anon. 2006h. *USDA, Entomology Department.* Ascosphaera www.hgsc.bcm. tmc.edu/projects/microbial/micro ..., 3/ 10/ 2006.

Anon. 2006i. *USDA, Product & Service/Viruses*. http://maarec.cas.psu.edu/pest and Disease/30.gif, 2/9/2006.

Anon. 2006j. *USDA, Entomology Department.* American Foulbrood, www.ent.uga. edu/.../ American__Foulbrood.htm., 3/2/2006.

Anon. 2006k. *USDA, Entomology Department.* Nosema, www.ent.uga.edu/Bees/ Disorders/Nosema.htm.,12/10/2006.

Bailey, L. 1981. *Honey Bee Pathology.* Academic Press. London. 123 p.

Billikova, K., G. Wo and J. Simuth. 2001. Isolation of a peptide fraction from honey bee royal jelly as apotential antifoulbrood factor. *Apidologi* 32 (2): 275-283.

Billikova, K., J. Hanes, E. Nordhoff, W. Saenger, J. Klaudiny and J. Simuth. 2002. Apisimin, a new serine- v a - line-rich peptide of honey bee (*Apis mellifera* L.) royal jelly: purification and molecular characterization. *J. FEBS.* 528(2): 125-129.

Boman, H.G. and D. Hulmark.1987. Cell-free immunity in insect. *Annu. Rev. Microbiol.* 41 (1): 103-126.

Bulet, P. and R. Stocklin. 2005. Insect antimicrobial peptides: structures properties and gene regulation. *Protein and Peptide* 12(1): 3-11.

Casteels, P., C. Ampe, F. Jacobs and P. Tempst.1993. Functional and chemical characterization of hynenoptericin, an antibacterial polypeptide that is infection-inducible in honey bee (*Apis mellifera*). *J. Biol. Chem.* 268(10): 7044-7054.

Casteels, P., J. Romagnolo, M. Castle, K. Casteels-Josson, H. Erdjument-

Bromage and P. Tempst. 1994. Biodiversity of apidaecin-type peptide antibiotics. *J. Biol. Chem.* 269(42): 26107-26115.

Chen, Y.W., G.Y. Hwang and K.K. Ho. 2000. Susceptibility of the Asian honey bee Apis cerana to American foulbrood Paenibacillus larvae larvae. *J. Apic. Res.* 39(1): 169-175.

Davis, C. and W. Ward. 2003. The control of chalkbrood disease with natural products. *J. Apic. Res.* 42(3bvg):1-23.

Evans, J.D. 2004. Transcriptional immune responses by honey bee larvae during invasion by bacterial pathogen, Paenibacillus larvae. *J. Invertebra. Pathol.* 85(2): 105 -111.

Evans, J.D., K. Aronstein, Y.P. Chen, D. Hultmark, C. Hetru, J.L. Imler, H. Jiang, M. Kanost, G.J. Thompson and Z. Zou. 2006. Immune pathway and defense mechanisms in honey bees *Apis mellifera Ins. Mol. Biol.* 15(5): 645-656.

Evans, J.D. and T.N. Armstrong. 2006. Antagonistic interaction between honey bee bacterial symbionts and implications for disease. *Bio. Med. Central Ecol.* 6(1):4-22.

Fontana, R., M.A. Mendes, B.M. de Souza, K. Konno, M.M. Cesar, O. Malaspina and M.S. Palma. 2004. Jelleines, a family of antimicrobial peptides from the royal jelly of honey bees (Apis mellifera). *Peptides* 25(6): 916-928.

Glinski, Z. and K. Buczek. 2003. Response of the apoidea to fungal infections. *Apia. Acta* 38(1):183-189.

Gojmerac, W.L. 1980. *Bee*, Beekeeping American foulbrood disease Available from http://www.beekeeping.co.nz., 3/9/2004.

Hansen, H. and C.J. Brodogaard. 1999. American foulbrood: review of its biology, diagnosis and control. *Bee World* 80(1): 5-23.

Hoffman, J. 1995. Innate immunity of insects. *Cur. Opin. Immunol.* 7(1): 4-10.

Kraaijeveld, A.R. 2006. Ecology and evolution of host-parasite interactions. www.sbs.soton.ac.ux/staff/ark/images/Micros1.JPG, 3/10/2006.

Mucklow, P.T. 2004. Variation in phenoloxidase activity and its relation to parasite resistance within and between populations of *Daphnia magna. Proc. Biol. Sci.* 271(15): 1175-1183.

Olmos, A. 2002. Drug modulating the biological effects of peroxynitrite and related nitrogen species. *J. Clinic. Investi.* 109 (3): 817-826.

Rahman, M.M., G. Ma, H.L.S. Roberts and O. Schmidt. 2006. Cell free immune

reaction in insects. *J. Ins. Physiol.* 52(7): 754-762.

Sharquie, K.E. and R.A. Najim. 2004. Embalming with honey. *Saudi. Med.* 25(11): 1755-1756.

Shen, L., L. Xing, Y. Yang and Q. Gao. 2007. Sequence analysis of functional apismine cDNA from royal jelly of Chinese honey bee and its expression in *Eschericia coli. Asia Pac. J. Clin.Nutr.16* (suppl. 1): 222-226.

Serra, B.J. Soliva, T.M. and L.E. Centelles, 2001. Evaluation of polyphenolic and flavonoid compounds in honeybee-collected pollen produced in Spain. *J. Agri. and Food Chem.* 49(4): 1848-1853.

Snodgrass, R.E. 1956. *The Anatomy of the Honey Bee*. Comstock Publishing Associates. Ithac, N.Y. 334 p.

Tanada, Y. and H. Kaya. 1993. *Insect Pathology*. Academic Press. Inc. San-Diego. 660 p.

Tentcheva, D., L. Gauthier, N. Zappulla, M. Bergoin, B. Dainat, F. Cousserans, M. Colin and M. Bergoin. 2004. Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in Apis melliferra and Vorroa destructor mite populations in France. *App. Environ. Microbiol.* 70(12): 7185-7191.

Thevissen, K., C. Dirk, I. Warnecke, E.J.A. Franqois, M. Leipelt, E. Heinz, C. Ott, H. Zahringer, P.H.J. Bart, K.A. Kathelijne and P.A. Bruno Cammue. 2004. The antifungal Dm-AMP1 protein from Dahlia merckil expressed in Solanum melongena is released in root exudates and differentially affects pathogenic fungi and mycorrhizal symbiosis. *J. Biol. Chem.* 279 (4): 3900-3905.

Wachinger, M., D. Winder, N. Pechmann and R. Brack-Werner, 1998. Antimicrobial peptides melittin and cecropin inhibit replication of human immunodeficiency virus 1 by suppressing viral gene expression. *J. Gen. Virol.* 79(2): 731-740.

Zachary Huang, Z.2006. Chalkbrood disease, http://photo.bees.net/gallery/chalkbrood., 3/10/ 2006.

Zou, Z., D.L. Lopez, M.R. Kanost, J.D. Evans and H. Jiang. 2006. Comparative analysis of serine protease related gene in the honey bee genome: possible involvement in embryonic development and innate immunity. *Ins. Molec. Biol.* 15(5): 603-614.