

การศึกษาผลของการปรับปรุงเปปไทด์ต้านจุลชีพด้วยเทคนิค cyclization
ที่มีต่อฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ ความคงทน ความเป็นพิษ และกลไกการออกฤทธิ์ต่อเชื้อบาซิลลัส ซีเรียส
Antimicrobial activity, stability, cytotoxicity and mechanism of action determination
of antimicrobial peptide against *Bacillus cereus* improved by cyclization

ณัฐภรณ์ กลับทวี*¹ และ พัชรินทร์ ขจรพิพัฒน์²

¹ สาขาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยปทุมธานี

² บัณฑิตศึกษา สาขาชีวเวชศาสตร์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

*ผู้รับผิดชอบบทความ: p.natthaporn.k@gmail.com

Natthaporn Klubthawee*¹ and Patcharin Khajornpipat²

¹ Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences,
Pathumthani University, Pathum Thani, Thailand

² Graduate Program in Biomedical Sciences, Faculty of Allied Health Sciences,
Thammasat University, Pathum Thani, Thailand

*Corresponding author: p.natthaporn.k@gmail.com

บทคัดย่อ

เชื้อบาซิลลัส ซีเรียส เป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารที่สามารถสร้างสปอร์และสารพิษที่ทนต่อความร้อนได้ และมีอัตราการดื้อต่อยาปฏิชีวนะและสารต้านจุลชีพสูงขึ้นในปัจจุบัน เปปไทด์ต้านจุลชีพเป็นสารอีกกลุ่มหนึ่งที่มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นสารต้านจุลชีพชนิดใหม่ เนื่องจากมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียได้อย่างกว้างขวางและก่อให้เกิดการดื้อยาลดลง อย่างไรก็ตาม เปปไทด์ต้านจุลชีพเหล่านี้ยังมีข้อจำกัดในเรื่องความคงทนต่อเอนไซม์ เกลือ ความร้อน รวมถึงความเป็นพิษ หนึ่งในกระบวนการเพิ่มความคงทนและลดข้อจำกัดเหล่านี้ของเปปไทด์ต้านจุลชีพ ได้แก่ การปรับปรุงโครงสร้างของเปปไทด์ต้านจุลชีพด้วยเทคนิค cyclization การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและความคงทนของเปปไทด์ต้านจุลชีพที่ปรับปรุงด้วยเทคนิค cyclization หรือ cyclic PA รวมถึงการศึกษาความเป็นพิษและกลไกการออกฤทธิ์ของเปปไทด์ ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี broth microdilution พบว่า เปปไทด์ cyclic PA มีฤทธิ์เทียบเท่ากับเปปไทด์ดั้งเดิมหรือเปปไทด์ PA โดยมีค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อบาซิลลัส ซีเรียส สายพันธุ์ ATCC11778 เท่ากับ 7.81 µg/mL จากการศึกษาความคงทนของเปปไทด์ในสภาวะต่างๆ พบว่าเปปไทด์ทั้งสองชนิดมีความคงทนต่อความร้อนถึง 100 °C อย่างไรก็ตาม เปปไทด์ cyclic PA มีความคงทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินและการแย่งจับของประจุของเกลือมากกว่าเปปไทด์

Received: 23 June 2022

Accepted: 28 June 2022

Online publication date: 11 July 2022

PA นอกจากนี้ เปปไทด์ cyclic PA ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ ในขณะที่เปปไทด์ PA แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเข้มข้น 31.25 µg/mL เป็นต้นไป เมื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของเปปไทด์ด้วยวิธี flow cytometry พบว่า เปปไทด์ PA และ cyclic PA สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียได้โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์ (depolarization) และการเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์ (permeabilization) เท่ากับ $97.89 \pm 2.73\%$ และ $99.50 \pm 0.56\%$ ที่ความเข้มข้น MIC ตามลำดับ จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า การปรับปรุงเปปไทด์ด้านจุลชีพด้วยเทคนิค cyclization สามารถเพิ่มความคงทนและลดความเป็นพิษของเปปไทด์ด้านจุลชีพได้ ซึ่งเปปไทด์ cyclic PA ที่ได้จากงานวิจัยนี้มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ดี มีความคงทนต่อเอนไซม์ เปปซิน เกลือ ความร้อน และมีความเป็นพิษต่ำ แสดงถึงคุณสมบัติที่เหมาะสมในการนำไปพัฒนาต่อเป็นสารต้านจุลชีพชนิดใหม่ได้ในอนาคต

คำสำคัญ: เปปไทด์ด้านจุลชีพ, cyclization, ความคงทน, ความเป็นพิษต่อเซลล์, กลไกการออกฤทธิ์

Abstract

Bacillus cereus is a food-borne pathogenic bacteria found in various food products that can produce heat-resistant endospores and toxins. Nowadays, the emergence of antibiotic resistance caused by *B. cereus* has increased. Because of their bioactive properties, broad-spectrum antimicrobial activities against a wide range of pathogenic bacteria and low propensity to induce drug-resistant development, antimicrobial peptides (AMPs) are considered a new source of potential candidates for the development of novel antimicrobial agents. However, there are some limitations for applications, including low stability due to proteolytic degradation, cation of salt impediment, and heat denaturation. These limitations can be overcome by peptide modification such as cyclization. The aim of this study, therefore, was to determine the antimicrobial activity, stability, cytotoxicity, and mechanism of action of peptides improved by cyclization (cyclic PA) compared with PA parental peptide. The antimicrobial activity was determined by broth microdilution and the results demonstrated that cyclic PA was as active as PA peptide against *Bacillus cereus* ATCC11778, with MIC and MBC values of 7.81 µg/mL. The results from the stability test demonstrated that both peptides showed strong heat stability even at 100 °C. However, cyclic PA showed more stability than PA against pepsin digestion and hindrance from cation salts. In addition, the cyclic PA exhibited no cytotoxicity at all tested concentrations, while the PA peptide showed statistically significant cytotoxicity at concentrations of ≥ 31.25 µg/mL. Flow cytometric analysis results indicated that PA and cyclic PA peptides induced high levels of membrane depolarization and permeabilization ($97.89 \pm 2.73\%$ and $99.50 \pm 0.56\%$, respectively) at their MICs. In conclusion, the modification of peptides by cyclization could be used to improve the stability and reduce the toxicity of AMPs. Our study

also highlighted the potential of cyclic PA peptide for the development of novel antimicrobial agents in the future.

Keywords: Antimicrobial peptides, Cyclization, Stability, Cytotoxicity, Mechanism of action

บทนำ

ปัจจุบันการแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรียดื้อยาเป็นปัญหาที่พบได้ทั่วโลกและมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น เชื้อบาซิลลัส ซีเรียส เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน (rod shape) สามารถสร้างสปอร์และสารพิษที่ทนต่อความร้อนได้ ซึ่งสามารถก่อโรคอาหารเป็นพิษได้ในมนุษย์ และพบว่าเชื้อนี้มีการดื้อยาปฏิชีวนะและสารต้านจุลชีพเพิ่มขึ้นอีกด้วย เชื้อบาซิลลัส ซีเรียส พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ได้แก่ อากาศ ดิน ฝุ่นละออง ผลิภัณฑ์จากพืช เช่น ข้าว ธัญพืช แป้ง ผลิภัณฑ์จากแป้ง เครื่องเทศ ผลิภัณฑ์จากสัตว์ และเครื่องปรุงแต่งรสต่างๆ (สถาบันอาหาร กระทรวงอุตสาหกรรม, 2565) ทำให้พบว่าการปนเปื้อนมากในอาหารจำนวนมาก อาจเนื่องจากคุณสมบัติของเชื้อที่สามารถสร้างสปอร์ซึ่งทนต่อความร้อนได้สูง ดังนั้นการวิจัยเพื่อหาสารต้านจุลชีพชนิดใหม่ที่มีคุณสมบัติต้านเชื้อแบคทีเรียได้ดี มีความคงทนต่อสภาวะแวดล้อมและความร้อนสูงจึงเป็นทางเลือกใหม่ที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง จากการศึกษาค้นพบว่า เปปไทด์ต้านจุลชีพ (antimicrobial peptides) มีความสามารถในการเลือกจับ (selectivity) สามารถทำลายเชื้อจุลชีพได้อย่างกว้างขวาง (broad-spectrum) และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Aoki & Ueda, 2013)

เปปไทด์ต้านจุลชีพเป็นโปรตีนสายสั้นๆ ประกอบด้วยกรดอะมิโนขนาดตั้งแต่ 10-100 กรดอะมิโน เป็นสารในระบบภูมิคุ้มกันแบบกำเนิด (innate immunity) ทำหน้าที่เป็นด่านป้องกันทางชีวภาพด่านแรกในการป้องกันเชื้อจุลชีพ เปปไทด์ต้านจุลชีพสามารถพบได้ตั้งแต่ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก เช่น แบคทีเรีย รา พืช สัตว์ ทั้งที่มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลังไปจนถึงสัตว์เลื้อยคลานด้วยนม (สมปอง คล้ายหนองสรวง, 2558; สมศักดิ์ อินทรสูตร, 2013) โดยทั่วไปเปปไทด์ต้านจุลชีพมีคุณสมบัติความชอบและไม่ชอบน้ำภายในโมเลกุล (amphipathicity) (Xu, Zhu, Tan, Li, & Shan, 2014) จากการศึกษาเกี่ยวกับกลไกการทำงานของเปปไทด์ต้านจุลชีพ สามารถเกิดได้ตั้งแต่บริเวณผิวเซลล์แบคทีเรีย เช่น การทำให้เกิดการสูญเสียความสมดุลหรือการเกิดรูรั่วที่เยื่อหุ้มเซลล์ จนกระทั่งถึงโมเลกุลต่าง ๆ ที่อยู่ภายในเซลล์แบคทีเรีย เช่น ดีเอ็นเอ หรือโปรตีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการรอดชีวิต และกระบวนการเจริญของเซลล์ เป็นต้น โดยเปปไทด์จะอาศัยคุณสมบัติความชอบและไม่ชอบน้ำภายในโมเลกุลในการออกฤทธิ์ ส่วนที่ชอบน้ำและมีประจุบวกในโครงสร้างของเปปไทด์จะทำปฏิกิริยา electrostatic interaction กับเยื่อหุ้มเซลล์หรือผนังเซลล์ของแบคทีเรียที่ประกอบด้วยไขมัน (lipid bilayers) ชนิดที่เป็นประจุลบ แบบไม่จำเพาะ ส่งผลให้เกิดการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์หรือผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียจนทำให้เชื้อจุลชีพตายในที่สุด โดยการเกิดรูบนผนังเซลล์แบคทีเรียจะมีลักษณะแตกต่างกันไปตามชนิดและโครงสร้างของเปปไทด์ ทำให้เกิดแบบจำลองของการเกิดรูแบบต่างๆ ได้แก่ แบบจำลอง barrel-stave, toroidal-pore, carpet และ aggregate channel (สมปอง คล้ายหนองสรวง, 2558) เนื่องด้วยกลไกการทำงานที่หลากหลายของเปปไทด์ต้านจุลชีพเป็นสาเหตุหนึ่งในการกระตุ้นให้เกิดการดื้อยาดังกล่าวยาปฏิชีวนะที่ใช้ในปัจจุบัน (Li, Xiang, Zhang, Huang, & Su, 2012)

แม้ว่าเปปไทด์ต้านจุลชีพจะมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียได้อย่างกว้างขวางและก่อให้เกิดการดื้อยาดำ อย่างไรก็ตามเปปไทด์เหล่านี้ยังคงมีข้อจำกัดในการนำมาใช้ประโยชน์ทั้งทางอุตสาหกรรมและทางคลินิก เนื่องจากมีความไวต่อการย่อยของเอนไซม์ภายในร่างกาย ไม่ทนต่อเกลือและถูกทำลายด้วยความร้อน รวมทั้งยังมีความเป็นพิษ

สูง ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการต้านเชื้อก่อโรคไม่ดีเท่าที่ควร ดังนั้นจึงมีการพัฒนาและปรับปรุงเปปไทด์ต้านจุลชีพให้มีประสิทธิภาพและความคงทนที่สูงขึ้น และทำให้ความเป็นพิษลดลง (Ong, Wiradharma, & Yang, 2014) ในปัจจุบันมีเทคนิคการปรับปรุงเปปไทด์ต้านจุลชีพในรูปแบบที่หลากหลาย เช่น terminal modification, truncation, substitution และ cyclization เป็นต้น กระบวนการ cyclization เป็นการปิดวงของสายเปปไทด์ทำให้มีความเสถียรมากขึ้น ทำได้โดยเชื่อมปลายด้าน C ที่เป็นหมู่คาร์บอกซิลกับปลายด้าน N ที่เป็นหมู่เอมิโนของสายเปปไทด์ด้วยพันธะเอไมด์ (amide bond) จากการศึกษาของ Molhoek และคณะ พบว่าการปรับปรุงเปปไทด์ด้วยเทคนิค cyclization มีผลทำให้เปปไทด์ต้านจุลชีพมีความคงทนต่อเอนไซม์โปรตีเอส และมีความเป็นพิษต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญ (Molhoek, van Dijk, Veldhuizen, Haagsman, & Bikker, 2011) คณะผู้วิจัยได้ออกแบบเปปไทด์ PA ซึ่งเป็นเปปไทด์ลูกผสมที่มีลักษณะเป็นเกลียวอัลฟาสายสั้น ได้จากการเชื่อมต่อกันของเปปไทด์ของ 2 ชนิด (hybridization) กล่าวคือ เชื่อมลำดับกรดอะมิโนแบบอนุรักษตำแหน่งที่ 1 ถึง 12 ของเปปไทด์กลุ่มแคสสิซินกับลำดับกรดอะมิโนแบบอนุรักษตำแหน่งที่ 1 ถึง 11 ของเปปไทด์กลุ่มอูเรอิน ที่ปลายด้าน N (Klubthawee, Adisakwattana, Hanpithakpong, Somsri, & Aunpad, 2020) ผลการวิจัยพบว่าเปปไทด์ PA มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแบบวงกว้าง แต่มีความเป็นพิษสูง และยังไม่ได้มีการศึกษาความคงทนของเปปไทด์ชนิดนี้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นการต่อยอดโดยทำการปรับปรุงเปปไทด์ PA ด้วยเทคนิค cyclization และศึกษาผลของการปรับปรุงที่มีต่อฤทธิ์ต้านจุลชีพ ความคงทน ความเป็นพิษ และกลไกการออกฤทธิ์ต่อเชื้อบาคิลลัส ซีเรียส เพื่อพัฒนาเป็นสารต้านจุลชีพชนิดใหม่ได้ในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของเปปไทด์ PA ที่ปรับปรุงด้วยเทคนิค cyclization หรือ cyclic PA ต่อเชื้อบาคิลลัส ซีเรียส สายพันธุ์ ATCC11778
2. เพื่อศึกษาความคงทนของเปปไทด์ PA ที่ปรับปรุงด้วยเทคนิค cyclization หรือ cyclic PA ต่อการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน การแย่งจับของประจุของเกลือ และความร้อน
3. เพื่อศึกษาความเป็นพิษต่อ human keratinocyte cell line ของเปปไทด์ PA ที่ปรับปรุงด้วยเทคนิค cyclization หรือ cyclic PA
4. เพื่อศึกษากลไกการทำงานของเปปไทด์ PA ที่ปรับปรุงด้วยเทคนิค cyclization หรือ cyclic PA ต่อเชื้อบาคิลลัส ซีเรียส ด้วยวิธี flow cytometry

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมเปปไทด์ต้านจุลชีพ

การปรับปรุงเปปไทด์ PA ด้วยเทคนิค cyclization ทำได้โดยการเชื่อมต่อปลายสองด้านของเปปไทด์ PA ด้วยพันธะเอไมด์ (head-to-tail cyclization via amide bond) เปปไทด์ทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ cyclic PA และ PA สังเคราะห์ขึ้นด้วยวิธีสังเคราะห์ของแข็ง (solid-phase peptide synthesis) โดยทำการควบรวมกับเอ็น-9-ฟลูออโรนิลเมทอกซีคาร์บอนิล (Fmoc) และกรดอะมิโนที่ต้องการเข้าด้วยกัน ทำให้เปปไทด์บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีเหลวความดันสูงแบบผันกลับ (reversed-phase high-performance liquid chromatography) จากนั้นนำไปหาลำดับกรดอะมิโนและทำการตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลที่แท้จริงด้วยวิธีอิเล็กโตรสเปรย์ไอออนไนเซชัน แมสสเปกโตรเมทรี (electrospray ionization mass spectrometry) ซึ่งเป็นการตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลต่อประจุของไอออนสาร

ตัวอย่างในสภาวะไอออนไนซ์ (ionization) จากนั้นนำเปปไทด์แต่ละชนิดมาละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water) ให้มีความเข้มข้น 10 mg/mL (stock peptide) แล้วแช่แข็งในอุณหภูมิ -20 °C ก่อนทำการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

2. การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

การเพาะเลี้ยงเชื้อบациลลัส ซีเรียส สายพันธุ์ ATCC11778 ทำได้โดยนำเชื้อแบคทีเรียเพาะเลี้ยงลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Trypticase soy agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อโคลนเดี่ยวจำนวน 1 โคลนไปเลี้ยงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Trypticase soy broth (TSB) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C และเขย่าที่ 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เพื่อนำไปใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อบациลลัส ซีเรียส สายพันธุ์ ATCC11778 ของเปปไทด์ต้านจุลชีพ

3.1 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี broth microdilution

การทดสอบทำได้โดยนำเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงใน TSB มาปั่นตกตะกอนด้วยความเร็วรอบ 2,000 g เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นปรับปริมาณเซลล์แบคทีเรียให้ได้ OD_{620nm} เท่ากับ 0.05 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mueller Hinton Broth (MHB) แล้วทำการผสมเชื้อแบคทีเรียที่ได้ปริมาตร 50 µL กับเปปไทด์ต้านจุลชีพที่เจือจางแบบ 2-fold serial dilution ให้มีความเข้มข้น 0.98-250 µg/mL ปริมาตร 50 µL ลงในเพลทเลี้ยงเชื้อ 96 หลุม (96-well plate) จากนั้นนำไปวางบนตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่ 220 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แปลผลโดยดูค่าความเข้มข้นต่ำสุดของเปปไทด์ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ด้วยตาเปล่า (สังเกตจากในหลุมใส) เรียกว่า Minimum Inhibitory Concentration หรือ MIC (Steinberg et al., 1997)

3.2 การทดสอบฤทธิ์การฆ่าเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีการนับโคโลนี (colony count assay)

การทดสอบทำได้โดยนำตัวอย่างจากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของเปปไทด์ทุกความเข้มข้นที่มีลักษณะใส หรือความเข้มข้นตั้งแต่ค่า MIC เป็นต้นไป ปริมาตร 50 µL มากระจาย (spread) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA โดยใช้แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยม แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง เพื่อหาความเข้มข้นของเปปไทด์ต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ เรียกว่า Minimum Bactericidal Concentration หรือ MBC แปลผลโดยสังเกตได้จากไม่มีโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แสดงถึงการไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (Andrews, 2001)

4. การทดสอบความเป็นพิษของเปปไทด์ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด human keratinocyte cell lines

การทดสอบความเป็นพิษของเปปไทด์ใช้วิธี 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay โดยทำการเลี้ยงเซลล์ชนิด human keratinocyte (HaCat) cell lines ในสภาพเลี้ยงเซลล์ที่มีอาหารชนิด DMEM ที่มีส่วนผสมของ 10% (v/v) fetal bovine serum (Gibco, UK), 1% (v/v) penicillin/streptomycin (Gibco, UK) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ในสภาวะ 5% CO₂ จนมีความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ 90% ของถาดเลี้ยงเซลล์ จากนั้นนำเซลล์ที่ได้มาเลี้ยงในถาดเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม โดยกำหนดให้มีจำนวนเซลล์ 1.5×10^4 เซลล์ต่อ 1 หลุม ปริมาตร 100 µL บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ในสภาวะ 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดดูดอาหารเลี้ยงเชื้อจากทุกหลุมการทดสอบทิ้ง และเติมสารละลายเปปไทด์ต้านจุลชีพที่เจือจางแบบ 2-fold serial dilution (0.98-62.5 µg/mL) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 100 µL เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 0.4 mg/mL (Invitrogen, USA) ปริมาตร 100 µL ลงในทุกหลุมการทดสอบ บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ซึ่งปฏิกิริยาจากเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีชีวิตจะทำให้เกิดผลึก formazan

แล้วเติมสาร DMSO ปริมาตร 100 μL เพื่อละลายผลึก formazan ดังกล่าว จากนั้นวัดการดูดกลืนแสงของสีที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 570 nm ด้วยเครื่อง Multiskan SkyHigh microplate reader (Thermo Scientific™, Singapore) โดยความเข้มของสีที่เกิดขึ้นจะแปรผันตามปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตในหลุมทดลอง ผลการทดสอบจะแสดงเป็น relative cell viability หรือ % ของเซลล์ที่มีชีวิตในกลุ่มทดสอบนั้นเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้ทดสอบกับสารใดๆ

5. การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของเปปไทด์ต้านจุลชีพที่ผนังเซลล์แบคทีเรีย (Mechanism of action at membrane-level)

การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของเปปไทด์ต้านจุลชีพในการทำลายเชื้อแบคทีเรียที่ผนังเซลล์ด้วยวิธี flow cytometry ทำได้โดยนำเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงใน TSB มาปั่นตกตะกอนด้วยความเร็วรอบ 2,000 g เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นปรับปริมาณเซลล์แบคทีเรียให้ได้ $\text{OD}_{620\text{nm}}$ เท่ากับ 0.05 ใน PBS จากนั้นทำการบ่มเซลล์แบคทีเรียร่วมกับเปปไทด์ต้านจุลชีพที่ความเข้มข้น $1 \times \text{MIC}$ (7.81 $\mu\text{g/mL}$) ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที แล้วทำการปั่นตกเซลล์แบคทีเรียที่ความเร็วยุโรป 10,000 g เป็นเวลา 10 นาที นำส่วน supernatant ที่มีเปปไทด์ส่วนเกินทิ้ง จากนั้นนำตะกอนเซลล์ที่ได้มาย้อมด้วยสียฟลูออเรสเซนต์ 2 ชนิด ได้แก่ Propidium iodide (PI) และ bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol (BOX) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ PI เป็น 40 ng/mL และ BOX เป็น 10 nM เป็นเวลา 15 นาที ในที่มืด แล้วทำการวิเคราะห์หรือตรวจหาสัญญาณเรืองแสงด้วยเครื่อง Flow cytometer (CytoFlex, Beckman Coulter) โดยใช้ excitation ที่ความยาวคลื่น 488 nm และ emission ที่ความยาวคลื่น 525/40 nm สำหรับสี Box และที่ความยาวคลื่น 620/30 สำหรับสี PI ตามลำดับ ผลการทดสอบจะแสดงเป็น relative membrane depolarization and permeabilization หรือ % ของเซลล์แบคทีเรียที่เกิดการเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์และการเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์

6. การทดสอบความคงทนของเปปไทด์ต้านจุลชีพ

6.1 การทดสอบความคงทนของเปปไทด์ต้านจุลชีพต่อการถูกย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินและทริปซิน

เตรียมสารละลายเปปไทด์ต้านจุลชีพที่เจือจางแบบ 2-fold serial dilution ให้มีความเข้มข้น 0.98-250 $\mu\text{g/mL}$ ในสารละลายเอนไซม์เปปซินและทริปซินที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 1 mg/mL และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำเปปไทด์ที่ได้แต่ละความเข้มข้นปริมาตร 50 μL ผสมกับสารละลายเชื้อแบคทีเรียที่มี $\text{OD}_{620\text{nm}}$ เท่ากับ 0.05 ปริมาตร 50 μL ลงในเพลทเลี้ยงเชื้อ 96 หลุม จากนั้นนำไปวางบนตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่ 220 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และหาค่า MIC และ MBC ดังที่กล่าวไว้ในข้อ 3.1 และ 3.2 ตามลำดับ

6.2 การทดสอบความคงทนของเปปไทด์ต้านจุลชีพต่อการแย่งจับของประจุของเกลือ

เตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรียให้มี $\text{OD}_{620\text{nm}}$ เท่ากับ 0.05 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MHB ที่มีเกลือในสภาวะจำลองของร่างกายมนุษย์ (physiological salts) ได้แก่ 150 mM NaCl, 2.5 μM CaCl_2 และ 4 μM FeCl_3 ตามลำดับ จากนั้นนำสารละลายเชื้อแบคทีเรียที่ได้ ปริมาตร 50 μL ผสมกับเปปไทด์ต้านจุลชีพที่เจือจางแบบ 2-fold serial dilution ให้มีความเข้มข้น 0.98-250 $\mu\text{g/mL}$ ปริมาตร 50 μL ลงในเพลทเลี้ยงเชื้อ 96 หลุม จากนั้นนำไปวางบนตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่ 220 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และหาค่า MIC และ MBC ดังที่กล่าวไว้ในข้อ 3.1 และ 3.2 ตามลำดับ

6.3 การทดสอบความคงทนของเปปไทด์ต้านจุลชีพต่อความร้อน

เตรียมสารละลายเปปไทด์ต้านจุลชีพให้มีความเข้มข้น $1 \times \text{MIC}$ และนำไปบ่มโดยการให้ความร้อน (pre-heated) ภายใต้อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ อุณหภูมิ 70°C และ 100°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนบ่มร่วมกับสารละลายเชื้อแบคทีเรียที่มี $\text{OD}_{620\text{nm}}$ เท่ากับ 0.05 ใน PBS เป็นเวลา 30 นาที แล้วทำการปั่นตกเซลล์แบคทีเรียที่ความเร็วรอบ 10,000 g เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นย้อมด้วยสี Propidium iodide (PI) และ bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol (BOX) แล้วทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง flow cytometer (CytoFlex, Beckman Coulter) เช่นเดียวกับการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของเปปไทด์ต้านจุลชีพที่ผนังเซลล์แบคทีเรีย ในข้อ 5 เพื่อเปรียบเทียบความสามารถของเปปไทด์ก่อนและหลังบ่มด้วยความร้อนที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์และการเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์

7. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการทดสอบจะรายงานเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ซึ่งเป็นผลจากการทดลอง 3 ซ้ำ กราฟและการวิเคราะห์ทางสถิติใช้โปรแกรม GraphPad prism 7.0 ซึ่งเปรียบเทียบหาความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบต่างๆ กับกลุ่มที่ไม่ได้ทดสอบกับสารใดๆ ด้วย One-way ANOVA และ Tukey's test โดยกำหนดให้ P-values < 0.05 จึงจะถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการวิจัย

1. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อบาซิลลัส ซีเรียส สายพันธุ์ ATCC11778 ของเปปไทด์ต้านจุลชีพ

เปปไทด์ PA และ cyclic PA มีคุณสมบัติประจุมรวมเป็นบวกและมีความไม่ชอบน้ำ 47% (ตารางที่ 1) มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพได้ดีเทียบเท่ากัน โดยที่ความเข้มข้นเพียง $7.81 \mu\text{g/mL}$ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและฆ่าเชื้อบาซิลลัส ซีเรียส สายพันธุ์ ATCC11778 ได้ (ตารางที่ 1)

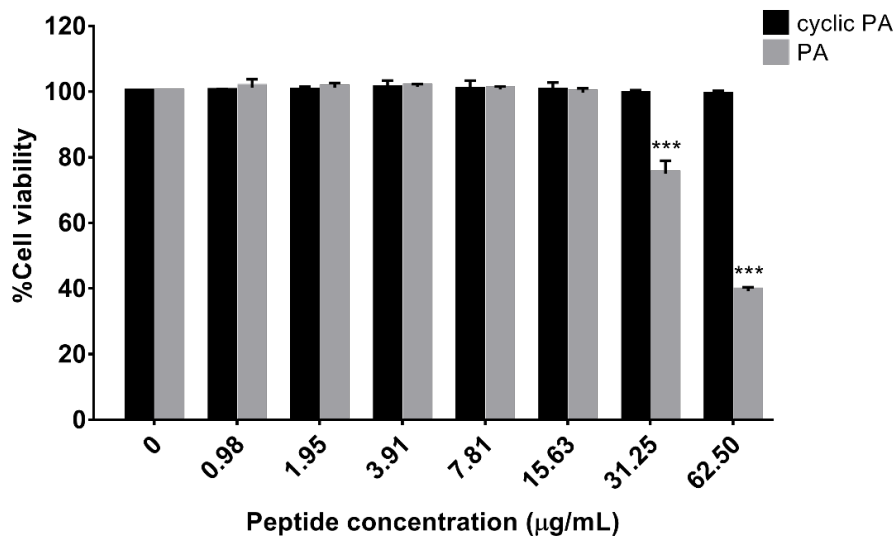
ตารางที่ 1 คุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ ได้แก่ ลำดับกรดอะมิโน ประจุมรวม และคุณลักษณะความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) ของเปปไทด์ และค่า MIC และ MBC ในหน่วย $\mu\text{g/mL}$ ของเปปไทด์ต่อเชื้อบาซิลลัส ซีเรียส สายพันธุ์ ATCC11778

เปปไทด์	ลำดับกรดอะมิโน	ประจุมรวม	ความไม่ชอบน้ำ (Hydrophobicity)	ค่า MIC ($\mu\text{g/mL}$)	ค่า MBC ($\mu\text{g/mL}$)
PA	KIAKRIWKILRRRLFRRVKKVAG-NH ₂	+11	47%	7.81	7.81
Cyclic PA	KIAKRIWKILRRRLFRRVKKVAG- 	+11	47%	7.81	7.81

2. การทดสอบความเป็นพิษของเปปไทด์ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด human keratinocyte cell lines

การทดสอบความเป็นพิษของเปปไทด์ PA และ cyclic PA ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด human keratinocyte cell lines ที่ความเข้มข้น 0.98 ถึง $62.5 \mu\text{g/mL}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเปปไทด์ cyclic PA ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ (% cell viability เท่ากับ 100) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ ในขณะที่เปปไทด์ PA แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเข้มข้น $31.25 \mu\text{g/mL}$ และ 62.50

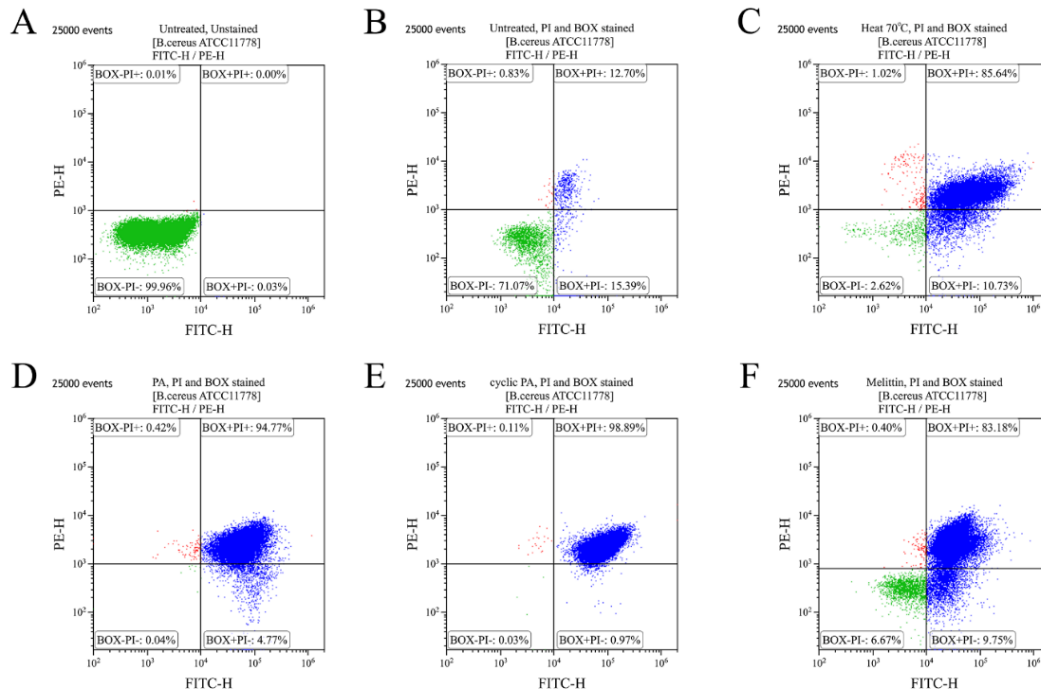
$\mu\text{g/mL}$ โดยมี % cell viability เท่ากับ 75.04 ± 3.92 และ 39.16 ± 1.24 ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 1 จะเห็นได้ว่า เปปไทด์ PA ที่ปรับปรุงด้วยเทคนิค cyclization หรือ cyclic PA มีความเป็นพิษต่ำกว่าเปปไทด์ดั้งเดิม



ภาพที่ 1 ความเป็นพิษของเปปไทด์ PA และ cyclic PA ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด human keratinocyte cell lines โดยทดสอบด้วยวิธี MTT assay; *** แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

3. การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของเปปไทด์ต้านจุลชีพที่ผนังเซลล์แบคทีเรีย

ผลการศึกษาการออกฤทธิ์ที่ผนังเซลล์แบคทีเรียของเปปไทด์ PA และ cyclic PA ด้วยวิธี flow cytometry พบว่าเชื้อบาสซิลลัส ซีเรียส สายพันธุ์ ATCC11778 ที่บ่มร่วมกับเปปไทด์ทั้งสองชนิด เกิดการ uptake สีฟลูออเรสเซนต์ทั้งสองชนิดคือ PI และ BOX ซึ่ง PI จะบ่งบอกถึงการเสียหายของเซลล์รวมถึงเยื่อหุ้มเซลล์และ/หรือมีการแตกของเซลล์ร่วมด้วย (membrane permeabilization/disruption) โดยสี PI จะสามารถเข้าไปจับกับ DNA ของแบคทีเรียได้ ในขณะที่สี BOX จะสามารถเข้าไปจับกับ lipid components ของเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงของความต่างศักย์ของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane depolarization) ดังนั้น การติดสีฟลูออเรสเซนต์ทั้งสองสีแสดงให้เห็นถึงสถานะของผนังเซลล์แบคทีเรียที่เกิดความเสียหาย จากผลการทดลองในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้บ่มร่วมกับสารใดๆ พบว่ามีจำนวนเซลล์อยู่ $12.91 \pm 1.24\%$ ที่มีติดสี PI และ BOX (ภาพที่ 2B) แสดงให้เห็นถึงลักษณะของเซลล์ที่ปกติ (intact cell membrane) ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียที่ถูกบ่มด้วยอุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 30 นาที (ภาพที่ 2C) พบว่ามีเซลล์แบคทีเรียที่เกิด membrane depolarization และ permeabilization อยู่ $82.33 \pm 4.28\%$ แสดงว่าความร้อนทำให้ผนังเซลล์แบคทีเรียเกิดความเสียหายได้ นอกจากนี้ เมื่อบ่มเซลล์แบคทีเรียร่วมกับเปปไทด์ PA และ cyclic PA ที่ความเข้มข้น $1 \times \text{MIC}$ เป็นเวลา 30 นาที พบว่าเปปไทด์ทั้งสองชนิดสามารถทำให้เกิด membrane depolarization และ permeabilization เท่ากับ $97.89 \pm 2.73\%$ และ $99.50 \pm 0.56\%$ แสดงดังภาพที่ 2D และ 2E ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าเปปไทด์ Melittin ($86.34 \pm 9.70\%$) ที่เป็น positive control ของการทดลองนี้ เนื่องจากเปปไทด์ชนิดนี้มีกลไกการออกฤทธิ์ที่ผนังเซลล์แบคทีเรีย ผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่ากลไกการออกฤทธิ์ของเปปไทด์ PA และ cyclic PA นั้นเกิดจากการทำให้ความต่างศักย์ของเยื่อหุ้มเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงและทำให้เกิดการเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์



ภาพที่ 2 ผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์และการเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane depolarization and permeabilization) ของเชื้อบาคิลลัส ซีเรียส สายพันธุ์ ATCC11778 ด้วยวิธี flow cytometry เมื่อบ่มร่วมกับเปปไทด์ต้านจุลชีพ (A) เชื้อแบคทีเรียที่ไม่ได้บ่มร่วมกับเปปไทด์และไม่ย้อมสี; (B) เชื้อแบคทีเรียที่ไม่ได้บ่มร่วมกับเปปไทด์และย้อมสี (negative control); (C) เชื้อแบคทีเรียที่ถูกบ่มด้วยความร้อน 70°C เป็นเวลา 30 นาที; เชื้อแบคทีเรียที่บ่มร่วมกับ (D) เปปไทด์ PA และ (E) cyclic PA ที่ความเข้มข้น 1xMIC เป็นเวลา 30 นาที ตามลำดับ และ (F) เชื้อแบคทีเรียที่บ่มร่วมกับเปปไทด์ Melittin (positive control) ที่ความเข้มข้น 1xMIC (3.91 µg/mL) เป็นเวลา 30 นาที

4. ผลการทดสอบความคงทนของเปปไทด์ต้านจุลชีพ

ผลการทดสอบความคงทนของเปปไทด์ PA และ cyclic PA ในสภาวะต่างๆ ได้แก่ เกลือ เอนไซม์ เปปซินและ ทริปซิน และความร้อน พบว่าเปปไทด์ที่ปรับปรุงด้วยเทคนิค cyclization หรือ cyclic PA มีความคงทนในสภาวะต่างๆ มากกว่าเปปไทด์ดั้งเดิม ในสภาวะเกลือที่มีประจุบวกของ Na^+ , Ca^{2+} และ Fe^{3+} ทั้งสองเปปไทด์ยังคงมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้ดี โดยเปปไทด์ cyclic PA มีฤทธิ์มากกว่าเปปไทด์ PA โดยเฉพาะในสภาวะที่มีเกลือ FeCl_3 แสดงดังตารางที่ 2 จากการทดสอบความคงทนของเปปไทด์ต่อการถูกย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินและทริปซินที่พบได้ในระบบย่อยอาหารของมนุษย์ พบว่า ทั้งสองเปปไทด์มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียลดลงเนื่องจากถูกย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินและทริปซิน แต่เปปไทด์ cyclic PA ยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและฆ่าเชื้อบาคิลลัส ซีเรียส สายพันธุ์ ATCC11778 ได้ที่ความเข้มข้น 125 µg/mL ในขณะที่เปปไทด์ PA ไม่สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียได้ในสภาวะที่มีเอนไซม์เปปซิน (ตารางที่ 2) แสดงถึงความคงทนต่อการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ของโครงสร้างเปปไทด์ที่ปรับปรุงด้วยเทคนิค cyclization อย่างไรก็ตาม การถูกย่อยด้วยเอนไซม์ขึ้นกับจำนวนและตำแหน่ง potential cleavage site บนลำดับกรดอะมิโนและโครงสร้างของเปปไทด์แต่ละชนิด จึงทำให้เปปไทด์มีความคงทนต่อเอนไซม์ที่แตกต่างกัน จากผลการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม PeptideCutter แสดงดังตารางที่ 3 จะเห็นว่าเอนไซม์เปปซินมี potential cleavage

site เพียงหนึ่งตำแหน่ง ในขณะที่เอนไซม์ทริปซินมี potential cleavage site ถึง 10 ตำแหน่ง ต่อลำดับกรดอะมิโนของทั้งสองเปปไทด์ ส่งผลให้เปปไทด์ทั้งสองชนิดไม่สามารถผ่านเชื้อแบคทีเรียได้ในสภาวะที่มีเอนไซม์ทริปซิน นอกจากนี้ ผลการทดสอบความคงทนของเปปไทด์ต่อความร้อนด้วยวิธี flow cytometry พบว่า ทั้งสองเปปไทด์มีความคงทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 70 °C และ 100 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์และการเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane depolarization and permeabilization) มากกว่า 95% (ภาพที่ 3) และพบว่าความสามารถในการทำให้เกิด membrane depolarization and permeabilization ของเปปไทด์ทั้งสองชนิด ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเปปไทด์ที่ไม่ได้ถูกบ่มด้วยความร้อน (non-heated peptide) แสดงดังภาพที่ 4 แสดงให้เห็นถึงความคงทนของเปปไทด์ต่อการถูกทำลายด้วยความร้อน

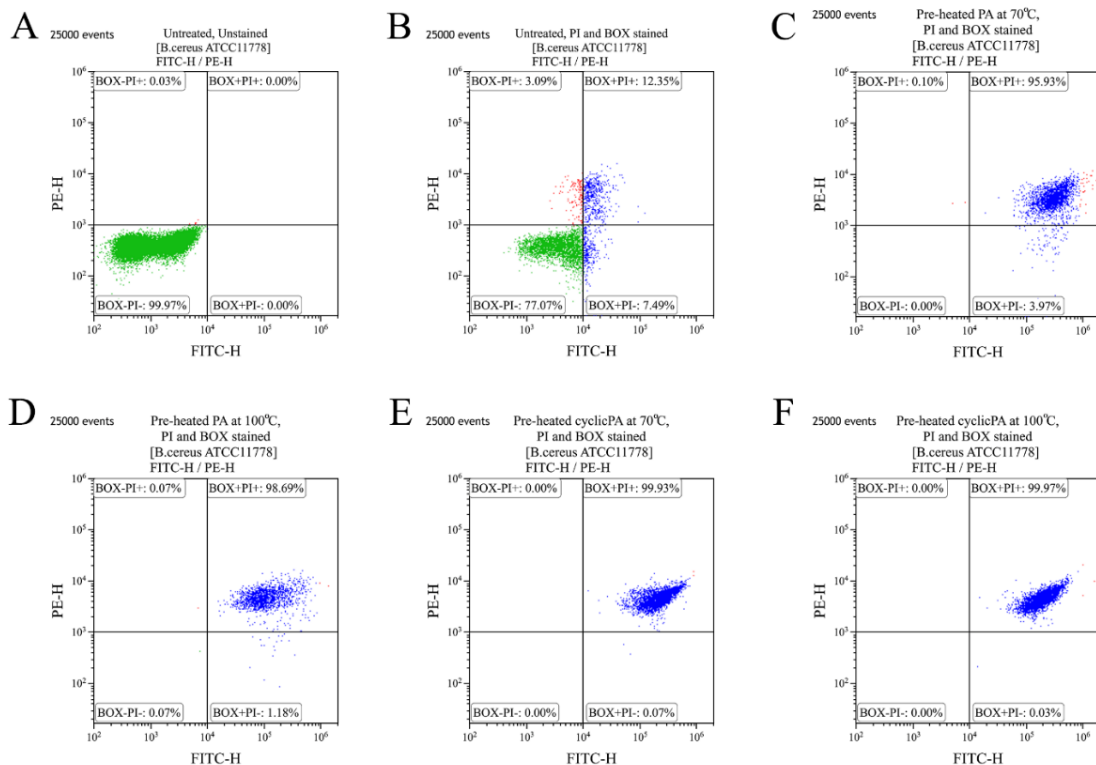
ตารางที่ 2 ค่า MIC(MBC) ในหน่วย µg/mL ของเปปไทด์ cyclic PA เปรียบเทียบกับเปปไทด์ PA ในสภาวะเกลือและเอนไซม์ ต่อเชื้อบราซิลเซียเรียส สายพันธุ์ ATCC11778

เปปไทด์	ชุดควบคุม	เกลือ			เอนไซม์	
		NaCl	CaCl ₂	FeCl ₃	เปปซิน	ทริปซิน
PA	7.81(7.81)	15.63(15.63)	7.81(7.81)	7.81(7.81)	>250(>250)	>250(>250)
cyclic PA	7.81(7.81)	15.63(15.63)	7.81(7.81)	3.91(3.91)	125(125)	>250(>250)

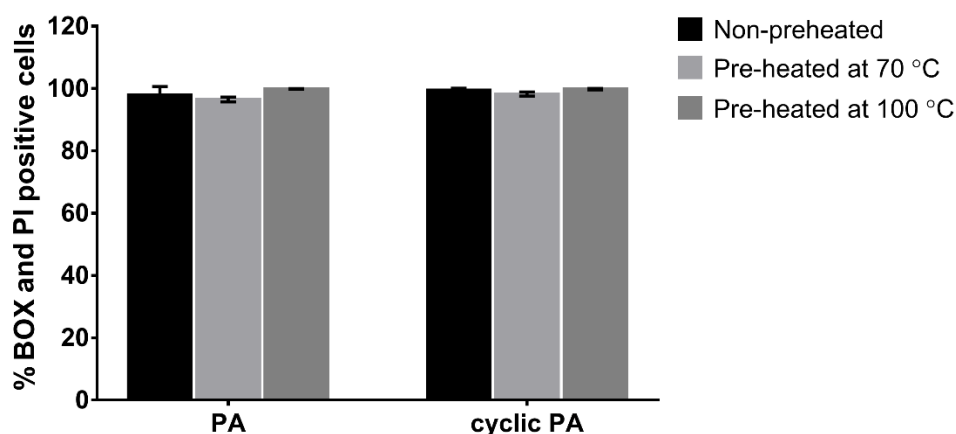
ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์จำนวนและตำแหน่ง potential cleavage site ของเปปไทด์ เมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินและ ทริปซิน จากโปรแกรม PeptideCutter*

เอนไซม์	จำนวนของ potential cleavage site	ตำแหน่งของ potential cleavage site	ลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ที่ได้หลังการตัด
เปปซิน	1	9	KIAKRIWKI และ LRRRLFRRVKKVAG
ทริปซิน	10	1, 4, 5, 8, 11, 13, 16, 17, 19, 20	K, IAK, R, IWK, ILR, RR, LFR, R, VK, K และ VAG

*https://web.expasy.org/peptide_cutter/



ภาพที่ 3 ผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์และการเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane depolarization and permeabilization) ของเชื้อบาคิลลัส ซีเรียส สายพันธุ์ ATCC11778 ด้วยวิธี flow cytometry เมื่อบ่มร่วมกับเปปไทด์ที่ถูกบ่มด้วยความร้อน (A) เชื้อแบคทีเรียที่ไม่ได้บ่มร่วมกับเปปไทด์และไม่ย้อมสี; (B) เชื้อแบคทีเรียที่ไม่ได้บ่มร่วมกับเปปไทด์และย้อมสี (negative control); เชื้อแบคทีเรียที่บ่มร่วมกับเปปไทด์ PA ที่ถูกบ่มด้วยความร้อน (C) 70 °C และ (D) 100 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตามลำดับ; เชื้อแบคทีเรียที่บ่มร่วมกับเปปไทด์ cyclic PA ที่ถูกบ่มด้วยความร้อน (E) 70 °C และ (F) 100 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตามลำดับ



ภาพที่ 4 การเปรียบเทียบการเกิดการเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์และการเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อบาคิลลัส ซีเรียส สายพันธุ์ ATCC11778 (%BOX and PI positive cells) ที่บ่มร่วมกับเปปไทด์ PA และ cyclic PA ที่ถูกบ่มด้วยความร้อน 70 °C และ 100 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และเปปไทด์ที่ไม่ได้ถูกบ่มด้วยความร้อน

อภิปรายผลการวิจัย

ในปัจจุบันเชื้อจุลชีพดื้อยาเป็นปัญหาที่พบได้ทั่วโลกและมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น เชื้อบาซิลลัส ซีเรียส เป็นเชื้อแบคทีเรียอีกหนึ่งสายพันธุ์ที่พบว่ามีฤทธิ์ดื้อยาปฏิชีวนะและสารต้านจุลชีพ อีกทั้งยังพบการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ในอาหารเป็นจำนวนมาก ซึ่งสามารถก่อโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจากสปอร์และสารพิษที่ทนต่อความร้อนของเชื้อในมนุษย์ได้ นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการติดเชื้อในตาและกระแสเลือดในผู้ป่วยภูมิคุ้มกันต่ำได้อีกด้วย (Kotiranta, Lounatmaa, & Haapasalo, 2000) จากการศึกษาของ Sornchuer และคณะ พบการปนเปื้อนเชื้อบาซิลลัส ซีเรียส ในอาหารจำพวกสลัด เนื้อสัตว์ และอื่นๆ ในจังหวัดปทุมธานี ประเทศไทย ประมาณ 21% โดยตรวจพบเชื้อใน 31 ตัวอย่างจากทั้งหมด 150 ตัวอย่าง อีกทั้งยังพบว่าเชื้อที่ปนเปื้อนดังกล่าวมีอัตราการดื้อยาปฏิชีวนะ ได้แก่ ampicillin, amoxicillin-clavulanic acid และ penicillin มากกว่า 95% (Sornchuer & Tiengtip, 2021) นอกจากนี้ การศึกษาของสิริยากรและคณะ พบการปนเปื้อนเชื้อสายพันธุ์นี้ในน้ำพริกพร้อมบริโภคในจังหวัดนครราชสีมา คิดเป็น 80% โดยตรวจพบเชื้อใน 24 ตัวอย่างจากทั้งหมด 30 ตัวอย่าง (สิริยากร แสนแก้ว และคณะ, 2564) ดังนั้นการวิจัยเพื่อหาสารต้านจุลชีพชนิดใหม่ที่มีคุณสมบัติต้านเชื้อแบคทีเรียได้ดีโดยเฉพาะต่อเชื้อบาซิลลัส ซีเรียส จึงมีความจำเป็นและน่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง ในวงการวิจัยเป็นที่ทราบกันดีว่าเปปไทด์ต้านจุลชีพ (antimicrobial peptides) สามารถทำลายเชื้อจุลชีพได้อย่างกว้างขวาง (broad-spectrum) และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Aoki & Ueda, 2013) ดังนั้นเปปไทด์ต้านจุลชีพจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจสำหรับนำมาใช้ในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค สามารถลดโอกาสในการกระตุ้นให้เชื้อแบคทีเรียเกิดการดื้อยาปฏิชีวนะซึ่งเป็นปัญหาที่กำลังเผชิญในปัจจุบัน แม้ว่า เปปไทด์ต้านจุลชีพจะมีคุณสมบัติที่เป็นประโยชน์มากมาย แต่ยังคงมีข้อจำกัดในการนำมาใช้ประโยชน์ทั้งทางอุตสาหกรรมและทางคลินิก เนื่องจากมีความไวต่อการย่อยของเอนไซม์ภายในร่างกาย ไม่ทนต่อเกลือและถูกทำลายด้วยความร้อน รวมทั้งยังมีความเป็นพิษสูง ดังนั้นการพัฒนาและปรับปรุงเปปไทด์ต้านจุลชีพให้มีประสิทธิภาพและความคงทนที่สูงขึ้น และทำให้ความเป็นพิษลดลงจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง

การปรับปรุงเปปไทด์ต้านจุลชีพทำได้ด้วยเทคนิคที่หลากหลาย (Ong et al., 2014) งานวิจัยนี้ได้ทำการปรับปรุงเปปไทด์ต้านจุลชีพด้วยเทคนิค cyclization เพื่อเพิ่มความคงทนและลดความเป็นพิษของเปปไทด์ โดยทำการปรับปรุงเปปไทด์ PA ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแบบวงกว้าง แต่มีความเป็นพิษสูง (Klubthawee et al., 2020) ด้วยการเชื่อมต่อปลายสองด้านด้วยพันธะเอไมด์ (head-to-tail cyclization via amide bond) ได้เปปไทด์อนุพันธ์เรียกว่า เปปไทด์ cyclic PA การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อบาซิลลัส ซีเรียส สายพันธุ์ ATCC11778 ใช้วิธี broth microdilution โดยเตรียมปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่ OD_{620nm} เท่ากับ 0.05 เนื่องจากหลังผสมกับสารละลายเปปไทด์แล้วจะได้ปริมาณเชื้อแบคทีเรียสุดท้าย (final concentration) ประมาณ $2-8 \times 10^5$ CFU/mL ตามมาตรฐาน National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) เพื่อให้เป็นมาตรฐานและสามารถเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านจุลชีพกับงานวิจัยอื่นได้ ผลการทดสอบพบว่าเปปไทด์ cyclic PA มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพได้ดีเทียบเท่ากับเปปไทด์ PA แสดงให้เห็นว่าการปรับปรุงโครงสร้างของเปปไทด์ให้เป็นแบบวงไม่ส่งผลต่อฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ อย่างไรก็ตาม หากเพิ่มหรือลดปริมาณเชื้อตั้งต้นอาจส่งผลให้ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพลดลงหรือเพิ่มขึ้น ตามลำดับ การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด human keratinocyte cell lines พบว่าเปปไทด์ cyclic PA ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ ในขณะที่เปปไทด์ PA แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเข้มข้น 31.25 μ g/mL และ 62.50 μ g/mL ตามลำดับ ดังนั้นการปรับปรุงเปปไทด์ต้านจุลชีพด้วยเทคนิค cyclization ช่วย

ลดความเป็นพิษของเปปไทด์ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงได้ ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยที่เคยมีการศึกษามาก่อนหน้านี้ งานวิจัยของ Molhoek และคณะ พบว่าเปปไทด์ F(2,5,12)W ที่ถูกปรับปรุงด้วยเทคนิค cyclization แบบ head-to-tail มีความเป็นพิษต่อ peripheral blood mononuclear cells ลดลงถึง 3.5 เท่า (Molhoek et al., 2011) กลไกการทำงานของเปปไทด์ต้านจุลชีพ สามารถเกิดได้ตั้งแต่บริเวณผิวเซลล์แบคทีเรียจนกระทั่งถึงโมเลกุลต่าง ๆ ที่อยู่ภายในเซลล์แบคทีเรีย ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงทำการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของเปปไทด์ PA และ cyclic PA ที่ผนังเซลล์ของเชื้อบาสิลลัส ซีเรียส สายพันธุ์ ATCC11778 ด้วยวิธี flow cytometry ผลการศึกษาพบว่าเปปไทด์ทั้งสองชนิดสามารถทำให้ความต่างศักย์ของเยื่อหุ้มเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงและทำให้เกิดการเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane depolarization and permeabilization) เท่ากับ $97.89 \pm 2.73\%$ และ $99.50 \pm 0.56\%$ ตามลำดับภายใน 30 นาที ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่มีรายงานว่ากลไกการทำงานของเปปไทด์ต้านจุลชีพหลายชนิดจะทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียซึ่งเป็นเป้าหมายหลักโดยทำให้เกิดช่องรู/ไอออน (pore/ion channels) จนทำให้เชื้อแบคทีเรียตายในที่สุด (Chou et al., 2019)

เนื่องจากกลไกการทำลายเชื้อของเปปไทด์ต้านจุลชีพขึ้นอยู่กับแรงดึงดูดระหว่างประจุ (electrostatic force) หรือการจับกันระหว่างเปปไทด์และผิวเซลล์ของเชื้อจุลชีพ โดยด้านประจุบวกของเปปไทด์ต้านจุลชีพเข้าจับกับประจุลบของไลโปโพลีแซคคาไรด์บนผิวเซลล์แบคทีเรียแกรมลบ หรือเข้าจับกับประจุของกรดไทโคอิกบนผิวเซลล์แบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งแรงดึงดูดระหว่างประจุนี้อาจถูกรบกวนด้วยประจุอื่น เช่น ประจุบวกของเกลือ (Friedrich, Scott, Karunaratne, Yan, & Hancock, 1999) งานวิจัยนี้ได้ทำการทดสอบความคงทนของเปปไทด์ในสภาวะเกลือที่มีประจุบวกของ Na^+ , Ca^{2+} และ Fe^{3+} ซึ่งพบได้ในร่างกายมนุษย์และสิ่งแวดล้อม ผลการวิจัยพบว่าเปปไทด์ทั้งสองชนิดยังคงมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้ดี แสดงถึงความคงทนต่อการแย่งจับของประจุเกลือ นอกจากนี้ เปปไทด์ที่ปรับปรุงด้วยเทคนิค cyclization หรือ cyclic PA มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียมากขึ้นในสภาวะที่มีเกลือ FeCl_3 อาจมีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรียสามารถดูดซึม (adsorb) ประจุ Fe^{3+} และเปลี่ยนเป็น Fe^{2+} ซึ่งมีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (Sun, Lu, & Gao, 2011) จึงเป็นการเพิ่มฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้อีกด้วย

การนำเปปไทด์ต้านจุลชีพไปใช้ทางคลินิกหรืออุตสาหกรรมอาหารอาจต้องผ่านกระบวนการต่างๆที่ใช้ความร้อน เช่น การนำไปพัฒนาเป็นสารกันเสียที่ผสมในอาหาร (food preservative) หรือสารต้านจุลชีพชนิดใหม่ ดังนั้นความคงทนต่อการถูกทำลายด้วยความร้อนจึงเป็นอีกหนึ่งคุณสมบัติที่มีความสำคัญต่อการนำเปปไทด์ต้านจุลชีพไปใช้ประโยชน์ งานวิจัยนี้จึงทำการบ่มเปปไทด์ PA และ cyclic PA ด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 70°C และ 100°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนทำการทดสอบกลไกการออกฤทธิ์เปรียบเทียบกับเปปไทด์ที่ไม่ได้ถูกบ่มด้วยความร้อน ผลการศึกษาดังกล่าวด้วยวิธี flow cytometry พบว่า ทั้งสองเปปไทด์มีความคงทนต่อการถูกทำลายด้วยความร้อนถึง 100°C โดยยังคงทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์และการเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane depolarization and permeabilization) ของเชื้อแบคทีเรียมากกว่า 95%

นอกจากนี้ เปปไทด์ต้านจุลชีพยังคงมีข้อจำกัดในการถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีเอสในระบบย่อยอาหารหรือกระเพาะอาหาร เช่น เปปซิน และทริปซิน เป็นต้น ผลการศึกษาคงทนต่อเอนไซม์ในงานวิจัยนี้ พบว่าทั้งสองเปปไทด์มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียลดลงเนื่องจากถูกย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินและทริปซิน แต่เปปไทด์ cyclic PA ยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและฆ่าเชื้อบาสิลลัส ซีเรียส สายพันธุ์ ATCC11778 ได้ที่ความเข้มข้น $125\text{ }\mu\text{g/mL}$ ในขณะที่เปปไทด์ PA ไม่สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียได้ในสภาวะที่มีเอนไซม์เปปซิน แสดงถึงความคงทนต่อการถูกย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินของโครงสร้างเปปไทด์ที่ปรับปรุงด้วยเทคนิค cyclization อย่างไรก็ตาม เปปไทด์ cyclic PA ยังคงไม่

สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียได้ในสภาวะที่มีเอนไซม์ทริปซิน เนื่องจากลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์มีความจำเพาะกับ cleavage site ของเอนไซม์ทริปซินหลายตำแหน่ง ทำให้มีโอกาสถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินมากกว่าเปปซินที่มีตำแหน่ง cleavage site เพียงหนึ่งตำแหน่ง แม้ว่าการปรับปรุงเปปไทด์ด้านจุลชีพด้วยเทคนิค cyclization สามารถเพิ่มความคงทนต่อการถูกย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน การแย่งจับของประจุของเกลือ และความร้อน รวมถึงลดความเป็นพิษของเปปไทด์ด้านจุลชีพได้ แต่การปรับปรุงเปปไทด์ร่วมกับเทคนิคอื่นเพิ่มเติม เช่น D-amino acid substitution หรือการแทนที่กรดอะมิโนชนิดแอล (L-enantiomers) ด้วยกรดอะมิโนชนิดดี (D-enantiomers) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่ไม่ถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตีเอส (Jia et al., 2017) อาจเป็นอีกหนึ่งวิธีในการปรับปรุงความไวต่อการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ของเปปไทด์ด้านจุลชีพให้ดียิ่งขึ้นและเหมาะสมในการนำไปพัฒนาต่อเป็นสารต้านจุลชีพชนิดใหม่เพื่อเป็นประโยชน์ในการนำไปใช้ในทางคลินิกหรืออุตสาหกรรมต่อไปในอนาคต

บทสรุป

การปรับปรุงเปปไทด์ด้านจุลชีพด้วยเทคนิค cyclization สามารถเพิ่มความคงทน ได้แก่ การถูกย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน การแย่งจับของประจุของเกลือ และความร้อน รวมถึงลดความเป็นพิษของเปปไทด์ด้านจุลชีพได้ แม้ว่าเปปไทด์ cyclic PA ที่ได้จากงานวิจัยนี้มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ดี มีความคงทนสูง และมีความเป็นพิษต่ำ แต่ยังคงถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินที่มีตำแหน่งของ potential cleavage site ต่อเปปไทด์ชนิดนี้มาก ดังนั้นการปรับปรุงเปปไทด์ชนิดนี้ร่วมกับเทคนิคอื่น เช่น D-amino acid substitution หรือการแทนที่ด้วยกรดอะมิโนชนิด D-enantiomers ซึ่งจะไม่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีเอส อาจเป็นการปรับปรุงความไวต่อการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ของเปปไทด์ด้านจุลชีพให้ดียิ่งขึ้นและเหมาะสมในการนำไปพัฒนาต่อเป็นสารต้านจุลชีพชนิดใหม่เพื่อเป็นประโยชน์ในการนำไปใช้ในทางคลินิกหรืออุตสาหกรรมต่อไปในอนาคต

บรรณานุกรม

- สมปอง คล้ายหนองสรวง. (2558). **เปปไทด์ด้านจุลชีพในสัตว์เลื้อยคลาน**. กรุงเทพฯ: อมรินทร์.
- สถาบันอาหาร กระทรวงอุตสาหกรรม. (2565). **จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค: Bacillus cereus**. 16 มิถุนายน 2565. http://fic.nfi.or.th/foodsafety/upload/damage/pdf/bacillus_cereus_2.pdf
- สิริยากร แสนแก้ว, วันชุลกพิลี หะยีตาหะ, ธัญญา ทิพย์อักษร และอรอุมา จันท์เสถียร. (2564). **การตรวจหาเชื้อบาซิลลัส ซีเรียส ในน้ำพริกพร้อมบริโภค**. การประชุมวิชาการระดับชาติ วิทยาลัยนครราชสีมา ครั้งที่ 8: สู่วิถีวิถีใหม่ ด้วยงานวิจัยทางสุขภาพและบริการ
- สรศักดิ์ อินทรสูตร (2013). **เปปไทด์ด้านจุลชีพ: โปรตีนจากธรรมชาติกับการประยุกต์ใช้เพื่อการรักษาโรคติดเชื้อ** ในอนาคต. วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่, 46, 2-14.
- Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48 Suppl 1, 5-16.
- Aoki, W., & Ueda, M. (2013). Characterization of antimicrobial peptides toward the development of novel antibiotics. *Pharmaceuticals (Basel)*, 6(8), 1055-1081.

- Chou, S., Wang, J., Shang, L., Akhtar, M. U., Wang, Z., Shi, B., Shan, A. (2019). Short, symmetric-helical peptides have narrow-spectrum activity with low resistance potential and high selectivity. **Biomaterials Science**, 7(6), 2394-2409.
- Friedrich, C., Scott, M. G., Karunaratne, N., Yan, H., & Hancock, R. E. (1999). Salt-resistant alpha-helical cationic antimicrobial peptides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 43(7), 1542-1548.
- Jia, F., Wang, J., Peng, J., Zhao, P., Kong, Z., Wang, K., Wang, R. (2017). D-amino acid substitution enhances the stability of antimicrobial peptide polybia-CP. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, 49(10), 916-925.
- Klubthawee, N., Adisakwattana, P., Hanpithakpong, W., Somsri, S., & Aunpad, R. (2020). A novel, rationally designed, hybrid antimicrobial peptide, inspired by cathelicidin and aurein, exhibits membrane-active mechanisms against *Pseudomonas aeruginosa*. **Scientific reports**, 10(1), 9117-9117.
- Kotiranta, A., Lounatmaa, K., & Haapasalo, M. (2000). Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. **Microbes and Infection**, 2(2), 189-198.
- Li, Y., Xiang, Q., Zhang, Q., Huang, Y., & Su, Z. (2012). Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application. **Peptides**, 37(2), 207-215.
- Molhoek, E. M., van Dijk, A., Veldhuizen, E. J., Haagsman, H. P., & Bikker, F. J. (2011). Improved proteolytic stability of chicken cathelicidin-2 derived peptides by D-amino acid substitutions and cyclization. **Peptides**, 32(5), 875-880.
- Ong, Z. Y., Wiradharma, N., & Yang, Y. Y. (2014). Strategies employed in the design and optimization of synthetic antimicrobial peptide amphiphiles with enhanced therapeutic potentials. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 78, 28-45.
- Sornchuer, P., & Tiengtip, R. (2021). Prevalence, virulence genes, and antimicrobial resistance of *Bacillus cereus* isolated from foodstuffs in Pathum Thani Province, Thailand. **Pharmaceutical Sciences Asia**, 48, 194-203.
- Steinberg, D. A., Hurst, M. A., Fujii, C. A., Kung, A. H., Ho, J. F., Cheng, F. C., Fiddes, J. C. (1997). Protegrin-1: a broad-spectrum, rapidly microbicidal peptide with *in vivo* activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 41(8), 1738-1742.
- Sun, H. Q., Lu, X. M., & Gao, P. J. (2011). The Exploration of the Antibacterial Mechanism of FE(3+) against Bacteria. *Brazilian journal of microbiology*. **Brazilian Society for Microbiology**, 42(1), 410-414.
- Xu, W., Zhu, X., Tan, T., Li, W., & Shan, A. (2014). Design of Embedded-Hybrid Antimicrobial Peptides with Enhanced Cell Selectivity and Anti-Biofilm Activity. **PLOS ONE**, 9(6), e98935.