บทปริทัศน์

การออกฤทธิ์และการใช้ประโยชน์เปปไทด์ต้านแบคทีเรีย

กุลวดี พรรณเชษฐ์

บทคัดย่อ

เปปไทด์ต้านแบคทีเรียสร้างโดยสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิดตั้งแต่แมลง ไปจนถึงสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม พบว่าเปปไทด์เหล่านี้สามารถทำลายเซลล์แบคทีเรียได้โดยอาศัยโครงสร้าง ประจุโดยรวมและกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของเปปไทด์นั้น โดยเริ่มจากการจับกับผิวเซลล์แบคทีเรียด้วยประจุที่ตรงกันข้าม หลังจากนั้นจะแทรกตัวเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ เปปไทด์บางชนิดจะก่อให้เกิดรูรั่วทำให้เซลล์ไม่สามารถคงสภาพได้ ส่งผลให้แบคทีเรียตาย ในขณะที่เปปไทด์อีกกลุ่มหนึ่งจะแทรกตัวผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปภายในไซโทพลาซึมและไปจับโมเลกุลเป้าหมายภายในเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงเมแทบอลิซึมทำให้แบคทีเรียตายในที่สุด การใช้เปปไทด์ต้านแบคทีเรียในทางการแพทย์เพื่อแก้ปัญหาการดื้อต่อยาปฏิชีวนะยังอยู่ในระยะเริ่มต้น ต้องมีการทำวิจัยเพื่อศึกษาข้อดีข้อเสียต่อไป

คำสำคัญ: เปปไทด์ต้านแบคทีเรีย, การดื้อต่อยาปฏิชีวนะ, การก่อรูรั่วที่เยื่อหุ้มเซลล์

บทนำ

การรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียด้วยยาปฏิชีวนะในปัจจุบันประสบปัญหาการดื้อยาของแบคทีเรีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อยาในกลุ่มเมธิซิลลิน (methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลแทบทุกแห่งทั่วโลก พบว่าในประเทศญี่ปุ่นและเกาหลีมีการเพิ่มขึ้นของ MRSA ถึงร้อยละ ๗๐ จากปี ค.ศ. ๑๙๘๐ ถึงค.ศ. ๒๐๐๒[๑] องค์การอนามัยโลกเล็งเห็นถึงความสำคัญของการดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียและได้เผยแพร่เอกสารแผนยุทธศาสตร์เพื่อควบคุมการดื้อต่อยาปฏิชีวนะโดยมีข้อแนะนำข้อหนึ่งคือ การลดการใช้ยาปฏิชีวนะที่ไม่เหมาะสม รวมถึงการส่งเสริมให้มียาปฏิชีวนะชนิดใหม่เพื่อลดการดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่มีใช้อยู่ในปัจจุบัน จึงทำให้มีความพยายามที่จะพัฒนายาปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพสูงชนิดใหม่ขึ้นมา กลวิธานของยาปฏิชีวนะที่ใช้โดยทั่วไปในปัจจุบัน คือการยับยั้งการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอ การสังเคราะห์โปรตีน หรือการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ยาปฏิชีวนะชนิดใหม่ไม่มีประสิทธิภาพที่สูง เนื่องจากมีข้อจำกัดที่โครงสร้างเคมียังมีความคล้ายคลึงกับยาปฏิชีวนะที่มีใช้อยู่ในปัจจุบันทำให้มีแนวโน้มของการดื้อต่อยาเหล่านี้เมื่อนำมาใช้ไม่นาน จึงได้มีความพยายามให้การหายาชนิดใหม่เพื่อแก้ปัญหาการดื้อยาของแบคทีเรีย มีรายงานวิจัยว่าพบเปปไทด์บางชนิดมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ซึ่งเปปไทด์นี้สามารถได้จากเลือด เม็ดเลือดขาว สารคัดหลั่งของสัตว์ตั้งแต่สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง สัตว์เลื้อยคลาน ไปจนถึงสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เปปไทด์ต้านแบคทีเรียนี้จะจับกับไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย ส่งผลให้เกิดรูรั่วที่เยื่อหุ้มเซลล์และส่งผลให้แบคทีเรียตายในที่สุด[๒,๓] นอกจากนี้เปปไทด์ต้านแบคทีเรียบางชนิดสามารถผ่านเข้าสู่เซลล์และไปจับกับ

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

เป้าหมายที่อยู่ภายในเซลล์ เช่น DNA RNA เอนไซม์ ส่งผลรบกวนเมทาบอลิซึมภายในเซลล์ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถอยู่รอดได้[๔] เปปไทด์ต้านแบคทีเรียที่มีประจุโดยรวมเป็นบวกจะไปจับกับไขมันที่มีประจุลบของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก ความจำเพาะของการจับกันเช่นนี้ ทำให้เปปไทด์ต้านแบคทีเรียมีข้อดีกว่ายาปฏิชีวนะโดยทั่วไป เนื่องจากถ้าแบคทีเรียจะเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกจะส่งผลต่อความอยู่รอดของแบคทีเรีย ด้วยกลไกนี้ การดื้อต่อเปปไทด์จะเป็นไปได้ยากและต้องใช้เวลานานที่แบคทีเรียจะสร้างกลไกในการดื้อต่อเปปไทด์ แม้ว่าในปัจจุบันจะพบว่าแบคทีเรียบางชนิดจะมีการดื้อต่อเปปไทด์แต่ก็เป็นแบคทีเรียจำนวนน้อยมาก และพบว่าเปปไทด์ต้านแบคทีเรียบางชนิดอาจจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอสเนื่องจากมีตำแหน่งจำเพาะที่สามารถจดจำได้โดยโปรติเอส แต่โดยทั่วไปพบว่าการใช้เปปไทด์ต้านแบคทีเรียมากกว่าหนึ่งชนิดเพื่อช่วยกันทำลายแบคทีเรีย ทำให้แม้ว่าจะมีเปปไทด์ต้านแบคทีเรียบางชนิดถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอสก็ยังมีเปปไทด์ชนิดอื่นอีกจึงไม่ส่งผลเสียใด[๕] ข้อดีประการสำคัญอีกข้อหนึ่งคือประสิทธิภาพของเปปไทด์ในทำลายเซลล์แบคทีเรียจำนวนมากในเวลาอันรวดเร็ว[๖] จากข้อได้เปรียบกว่าการใช้ยาปฏิชีวนะ จึงทำให้มีผู้ศึกษาและให้ความสนใจเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ของเปปไทด์ต้านแบคทีเรียและการนำไปใช้ในทางการแพทย์เป็นอย่างมาก

การจัดกลุ่มของเปปไทด์ต้านแบคทีเรีย

โดยทั่วไปเปปไทด์ต้านแบคทีเรียมีขนาดตั้งแต่ ๖ - ๕๘ กรดอะมิโน โดยมีสัดส่วนของกรดอะมิโนที่มีประจุและไม่มีประจุตั้งแต่ ๑:๑ ถึง ๑:๒ สำหรับเปปไทด์ที่มีประจุรวมเป็นลบจะมีกรดอะมิโน aspartic acid และ glutamic acid จำนวนมาก ส่วนเปปไทด์ที่มีประจุรวมเป็นบวกจะมีกรดอะมิโน lysine และ arginine มาก เปปไทด์ต้านแบคทีเรียมีโครงสร้างได้หลายแบบ ได้แก่ α-helices relaxed coils และ antiparallel β-sheets แต่พบว่าเปปไทด์ที่มีประสิทธิภาพสูงจะมีโครงสร้างแบบ amphipathic α-helix ซึ่งจะมีกรดอะมิโนด้านหนึ่งของเกลียวเป็นกรดอะมิโนที่ชอบน้ำส่วนอีกด้านของเกลียวมีกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ ทำให้เปปไทด์สามารถฝังตัวลงในเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียโดยใช้ด้านที่มีกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำและใช้กรดอะมิโนที่ชอบน้ำเป็นส่วนของรูที่มีสารละลายไหลผ่าน เปปไทด์ต้านแบคทีเรียถูกจัดแบ่งกลุ่มตามชนิดของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบและโครงสร้างของเปปไทด์ ได้เป็น ๔ กลุ่ม (ตารางที่ ๑) เปปไทด์ที่มีประจุโดยรวมเป็นลบ พบในสารคัดหลั่งทางเดินหายใจ ต้องการ zinc ion เป็นตัวช่วยในการออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย และสามารถต้านแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ[๗-๙] เปปไทด์ที่มีประจุโดยรวมเป็นบวกมีขนาดเล็ก มีกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบน้อยกว่า ๔๐ กรดอะมิโน เมื่ออยู่ในสารละลายที่มีน้ำจะมีโครงสร้างไม่แน่นอน แต่เมื่อแทรกตัวอยู่ในชั้นไขมันจะมีโครงสร้างแบบ α-helix พบว่าโครงสร้างเป็น α-helix สัมพันธ์กับการออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย และสามารถต้านแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ[๑๐] เปปไทด์ที่มีประจุโดยรวมเป็นบวกแต่มีกรดอะมิโนบางชนิดมีสัดส่วน มากกว่ากรดอะมิโนชนิดอื่น เช่น เปปไทด์ Bectenecins และ PR-๓๙ มีกรดอะมิโน proline ประมาณร้อยละ ๓๓ - ๔๘ และ arginine ร้อยละ ๑๓-๓๓ และเปปไทด์ Prophenin มี proline ร้อยละ ๕๗ และ phenylalanine ร้อยละ ๑๕[๑๑] เปปไทด์ที่มีประจุบวกและลบ มีโครงสร้างแบบ β-sheets เสถียรด้วยพันธะไดซัลไฟด์ ได้แก่ เปปไทด์ Protegrin สกัดจากเม็ดเลือดขาวของหมู และเปปไทด์ใน Defensin family กรดอะมิโน cyteine ที่อยู่ในเปปไทด์กลุ่มนี้สร้างพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างกันมีความสำคัญคือทำให้เปปไทด์ขนาดเล็กเหล่านี้เกิดโครงสร้าง β-sheets ที่มีความเสถียรได้

ตารางที่ ๑ การแบ่งกลุ่มของเปปไทด์ต้านแบคทีเรีย

กลุ่มของเปปไทด์ต้านแบคทีเรีย	ชื่อเปปไทด์ต้านแบคทีเรีย	สิ่งมีชีวิต
เปปไทด์ที่มีประจุโดยรวมเป็นลบ	- Maximin H5	สัตว์เลื้อยคลานมนุษย์
	- Dermicin	
เปปไทด์ที่มีประจุโดยรวมเป็นบวก	- Cecropin A, Andropin, Moricin, Ceratotoxin, Melittin	แมลง
	- Magainin 2, Dermaseptin, Bombinin, Brevinin-1	สัตว์เลื้อยคลาน
	- CAP18	กระต่าย
	- LL37	มนุษย์
เปปไทด์ที่มีประจุโดยรวมเป็นบวกและมีกรดอะมิโนบางชนิดมีสัดส่วนมาก		
- เปปไทด์ที่มี proline มาก	- Abaecin	น้ำผึ้ง
- เปปไทด์ที่มี proline และ arginine มาก	- Apidaecin	น้ำผึ้ง
	- Drosocin	แมลงหวี่
	- PR-39	หมู
- เปปไทด์ที่มี proline และ phenylalanine มาก	- Prophenin	หมู
- เปปไทด์ที่มี proline และ glycine มาก	- Coleoptericin, Holotricin	แมลงปีกแข็ง
- เปปไทด์ที่มี glycine มาก	- Hymenoptaecin	น้ำผึ้ง
- เปปไทด์ที่มี tryptophan มาก	- Indolicidin	วัวควาย
เปปไทด์ที่มีประจุบวกและลบ		
- ปปไทด์ที่มีพันธะไดซัลไฟด์ 1 พันธะ	- Brevinin	กบ
- เปปไทด์ที่มีพันธะไดซัลไฟด์ 2 พันธะ	- Protegrin	หมู
	- Tachyplesins	ปู
- เปปไทด์ที่มีพันธะไดซัลไฟด์ 3 พันธะ	- α-defensins, β-defensins, θ-defensins	สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม
- เปปไทด์ที่มีพันธะไดซัลไฟด์มากกว่า 3 พันธะ	- Drosomycin	แมลงวันผลไม้

ดัดแปลงจาก Brogden KA[๓๔]

กลไกการทำลายเซลล์แบคทีเรียของเปปไทด์ต้านแบคทีเรีย

เปปไทด์ต้านแบคทีเรียมีกลไกการทำลายเซลล์แบคทีเรีย ๒ กลไก ขึ้นอยู่กับชนิดของเปปไทด์ กลไกแรกคือการก่อให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย ส่วนกลไกที่สองคือการที่เปปไทด์ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปสู่ไซโตพลาสซึมและไปรบกวนขบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ อย่างไรก็ตามไม่ว่าจะใช้กลไกใด เปปไทด์จะต้องสามารถแยกแยะระหว่างเซลล์สัตว์และเซลล์แบคทีเรียได้โดยอาศัยความแตกต่างของเยื่อหุ้มเซลล์ส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะมีส่วนประกอบของฟอสโฟลิปิดที่อยู่ในแต่ละชั้นของ lipid bilayer ต่างกันโดยที่ด้านนอกของ lipid bilayer จะมีไขมันที่มีประจุเป็นกลางอยู่มากได้แก่ phosphatidylcholine และ sphingomyelin ซึ่งต่างจากในแบคทีเรียที่จะมีไขมันที่มีประจุลบเป็นส่วนใหญ่ ทำให้เปปไทด์ต้านแบคทีเรียแยกแยะชนิดเซลล์โดยจะจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีประจุลบทำให้มีความจำเพาะกับเซลล์แบคทีเรียมากกว่าเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม[๑๒] นอกจากนี้ที่เยื่อหุ้มเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมยังมีโคเลสเตอรอลที่เพิ่มความแข็งแรงในกับเยื่อหุ้มเซลล์ในขณะที่เซลล์แบคทีเรียไม่มีส่งผลในการแทรกตัวของเปปไทด์เพื่อก่อให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเกิดได้ง่ายกว่าอีกด้วย[๕] ตัวอย่างเช่น เปปไทด์ PGLa จากผิวหนังกบที่มีโครงสร้างแบบ α-helical มีประสิทธิภาพสูงในการทำลายเซลล์แบคทีเรียแกรมลบที่เยื่อ

หุ้มเซลล์มี phosphatidylglycerol ในปริมาณสูง[๑๓-๑๕] ในขณะที่การเปลี่ยนกรดอะมิโนที่มีประจุบวกที่ปลายคาร์บอกซีของเปปไทด์ NisinZ เป็นกรดอะมิโนกลูตาเมทที่มีประจุลบ จะทำให้ประสิทธิภาพของเปปไทด์ในการแทรกตัวเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ที่มี cardiolipin และ phosphatidylglycerol ที่มีประจุลบลดลงอย่างมาก[๑๖] ผลการวิจัยเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าการจับกันด้วยประจุตรงกันข้ามระหว่างประจุบวกของเปปไทด์ต้านแบคทีเรียกับไขมันที่มีประจุลบที่เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเป็นตัวกำหนดความจำเพาะและประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์แบคทีเรียของเปปไทด์ กลไกการทำลายเซลล์แบคทีเรียของเปปไทด์ต้านแบคทีเรียเริ่มจากการเกาะของเปปไทด์ที่ผิวเซลล์ (attraction and attachment) หลังจากนั้นเปปไทด์จะแทรกตัวทะลุลงไปในเยื่อหุ้มเซลล์ (insertion) หลังจากนั้นหากเป็นเปปไทด์ที่ใช้กลไกที่ทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ก็จะเกิดการแทรกตัวลงไปในเยื่อหุ้มเซลล์โดยเปปไทด์หลายโมเลกุลที่บริเวณเดียวกันจะร่วมกันทำให้เกิดรูทะลุบนผนังเซลล์แบคทีเรีย (transmembrane pore-formation) ทำให้มีการไหลออกของของเหลวภายในเซลล์ จนเซลล์ไม่สามารถคงสภาพและทำให้แบคทีเรียตายในที่สุด แต่หากเปปไทด์ใช้กลไกในการทำลายเซลล์โดยการรบกวนเมแทบอลิซึมของแบคทีเรีย (intracellular killing) เปปไทด์ก็จะผ่านเข้าสู่ ไซโทพลาซึมภายในเซลล์โดยไม่ทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ รายละเอียดของขั้นตอนของกลไกการทำลาย แบคทีเรียมีดังนี้

๑. การเกาะที่ผิวเซลล์ของเปปไทด์ต้านแบคทีเรีย

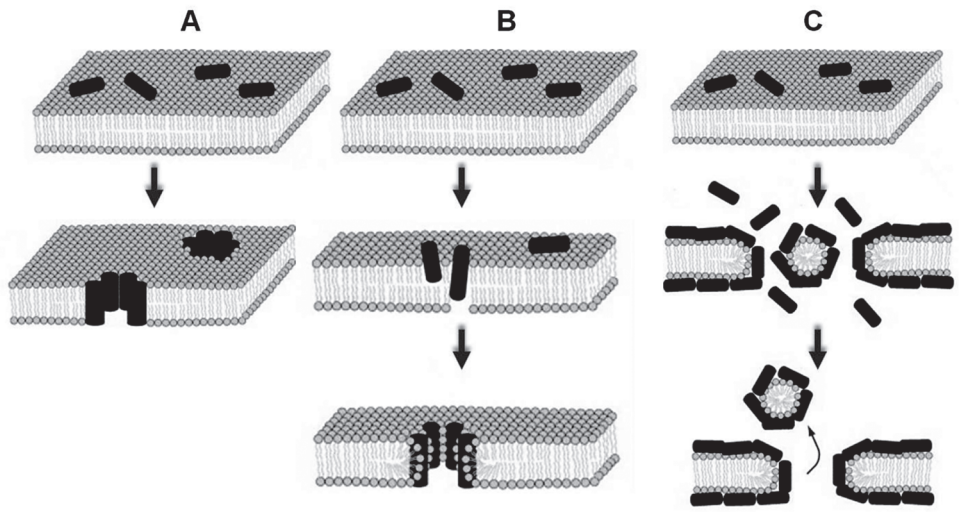
เปปไทด์ต้านแบคทีเรียจะเกาะที่ผิวเซลล์แบคทีเรียด้วยแรงดึงดูดระหว่างประจุที่ตรงกันข้ามระหว่างเปปไทด์กับของผนังเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งโดยส่วนใหญ่เปปไทด์จะมีประจุเป็นบวกและผิวเซลล์แบคทีเรียมีประจุเป็นลบ ทั้งนี้แบคทีเรียแบ่งออกได้เป็น ๒ กลุ่มตามองค์ประกอบของผนังเซลล์ทำให้มีการติดสีแกรมที่ต่างกันคือ แบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โดยผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกจะมีเยื่อหุ้มเซลล์และชั้นของเปปทิโดไกลแคนที่หนาและมี lipoteichoic acid ช่วยทำให้โครงสร้างมีความแข็งแรง ประจุลบของ teichoic acid ที่ยื่นออกไปที่ผิวเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกจะจับกับเปปไทด์ที่มีประจุบวก ในขณะที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบมีโครงสร้างที่ซับซ้อนกว่า ประกอบด้วยเยื่อหุ้มเซลล์ ๒ ชั้นคือเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกและเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นใน คั่นด้วยเปปทิโดไกลแคนที่บางกว่าในแบคทีเรียแกรมบวก เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกมี lipopolysaccharide หรือเรียกว่า endotoxin เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนี้ประกอบด้วยไขมันหลายชนิด ไขมันที่มีประจุลบ phosphatidylglycerol (PG), diphosphatidylglycerol และไขมันที่มีทั้งประจุบวกและประจุลบ cardiolipin, phosphatidylethanolamine (PE) ไขมันที่มีประจุลบเหล่านี้รวมถึงหมู่ฟอสเฟตของ lipopolysaccharide จะจับกับเปปไทด์ที่มีประจุบวก เปปไทด์หลายๆ โมเลกุลที่มาเกาะที่ผิวเซลล์นี้จะแทรกตัวลงสู่ผนังเซลล์ในขั้นตอนต่อไป

๒. การแทรกตัวของเปปไทด์ที่ผิวเซลล์แบคทีเรีย

เปปไทด์จะต้องแทรกตัวผ่านชั้นโพลิแซคคาไรด์ก่อนที่จะเข้าสู่ชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ สำหรับแบคทีเรียแกรมบวกเปปไทด์จะต้องผ่านชั้นหนาของเปปติโดไกลแคนที่มีโพลิแซคคาไรด์ teichoic acid และ lipoteichoic acid ส่วนแบคทีเรียแกรมลบจะต้องผ่านชั้น lipopolysaccharide เพื่อเข้าสู่ชั้น outer membrane ซึ่งกลไกในการผ่านชั้นโพลิแซคคาไรด์เหล่านี้ยังไม่ชัดเจน อย่างไรก็ตามหลังจากที่เปปไทด์ สามารถผ่านเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ได้แล้ว เปปไทด์ก็จะมีอันตรกิริยา (interaction) กับ lipid bilayer ตามด้วยการแทรกตัวเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์

๓. การเกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย

เมื่อมีจำนวนเปปไทด์มาเกาะที่ผิวเซลล์แบคทีเรียมากขึ้น เปปไทด์จะกลับตัวจากแนวขนานกับผิวเซลล์เป็นแนวดิ่งและแทรกตัวลงสู่ lipid bilayer ของเยื่อหุ้มเซลล์ เปปไทด์หลายโมเลกุลที่แทรกตัวจะเกิดอันตรกิริยากันเกิดเป็นรู รูปแบบการแทรกของเปปไทด์เพื่อก่อให้เกิดรูรั่วนี้อธิบายได้จากแบบจำลอง ๓ แบบคือ Barrel-stave model, Toroidal-pore model และ Carpet model[๑๗] (รูปที่ ๑)

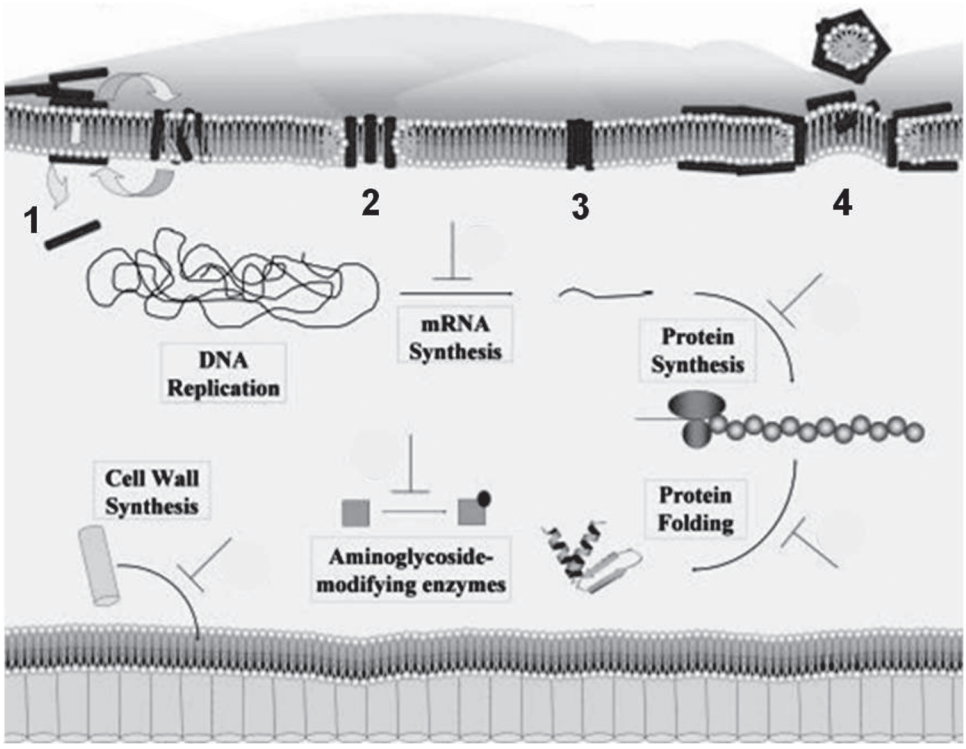


รูปที่ ๑ แบบจำลองการแทรกของเปปไทด์เพื่อก่อให้เกิดรูรั่ว Barrel-stave model (A), Toroidal-pore model (B) และ Carpet model (C) ที่มา Oren 1998[๑๗]

- Barrel-stave model เปปไทด์ที่มีโครงสร้างแบบ α-helix จะแทรกตัวลงในเยื่อหุ้มเซลล์และมารวมตัวกันประกอบกันคล้ายกับรูปถังกลม (barrel) โดยแต่ละเปปไทด์เสมือนกับเป็นแผ่นไม้ที่ประกอบกันคล้ายกับขอบของถัง ทำให้เกิดเป็นช่องกลวงตรงกลาง (รูปที่ ๑A) ตัวอย่างของเปปไทด์ที่ทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์โดยใช้แบบจำลองนี้คือ Alamethicin ผลจากการวิเคราะห์ของเปปไทด์ใน lipid bilayer ด้วยเทคนิค circular dichroism, neutron scattering และ x-ray scattering พบว่า Alamethicin มีโครงสร้างแบบ α-helix จะเกาะกลุ่มกันและจะหันเปปไทด์เอาด้านที่ไม่ชอบน้ำไปจับกับ lipid bilayer ทำให้ด้านที่ชอบน้ำของเปปไทด์จำนวน ๘ เปปไทด์มาประกอบกันเป็นรูที่ยอมให้ของเหลวไหลผ่านได้[๑๘-๒๐]

- Toroidal-pore model ในแบบจำลองนี้ระหว่างที่เปปไทด์แทรกตัวลงไปในเยื่อหุ้มเซลล์ถึงชั้นแรก (monolayer) ของ lipid bilayer เหนี่ยวนำให้ส่วนของ lipid head ที่มีประจุของไขมันบิดโค้งมาสัมผัสกับเปปไทด์ จนกระทั่งเปปไทด์แทรกตัวทะลุทั้งสองชั้นของ lipid bilayer ทำให้ขอบของรูที่เกิดขึ้นที่เยื่อหุ้มเซลล์นี้เกิดจากส่วนของเปปไทด์และส่วนของ lipid head ซึ่งต่างจาก Barrel-stave model ที่เกิดจากเฉพาะส่วนของเปปไทด์เท่านั้น (รูปที่ ๑ B) Magainin Protegrin และ Melittin เป็นเปปไทด์ที่ใช้กลไกนี้เพื่อทำลายเซลล์แบคทีเรีย โดยที่ Magainin ทำให้เกิดรูที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ ๓.๐ - ๕.๐ nm และหนึ่งรูเกิดจาก ๔ - ๗ โมเลกุลของ Magainin และประมาณ ๙๐ โมเลกุลของไขมัน[๑๕,๒๐,๒๑]

- Carpet model การเกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ในแบบจำลองนี้เกิดจากเปปไทด์จำนวนหลายเปปไทด์จับกับประจุลบของ phospholipid head ของไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ในแนวขนานเหมือนกับการปูพรมบนเยื่อหุ้มเซลล์ เนื่องจากมีเปปไทด์จำนวนมากจึงไปรบกวนความเสถียรของ lipid bilayer เปปไทด์จะแทรกลงไปในเยื่อหุ้มเซลล์แบบเดียวกับสารจำพวกดีเทอร์เจน ทำให้ไขมันถูกหุ้มด้วยเปปไทด์หลุดออกไปเป็นถุงเล็กๆ ของ micelle เซลล์ไม่สามารถรักษาสภาพได้ ทำให้เซลล์แบคทีเรียตายในที่สุด (รูปที่ ๑C) ตัวอย่างของเปปไทด์ที่ใช้กลไกนี้ได้แก่ Ovispirin[๑๗,๒๒,๒๓]



รูปที่ ๒ แบบจำลองกลไกการออกฤทธิ์ทำลายแบคทีเรียโดยเปปไทด์ต้านแบคทีเรีย การรบกวนเมแทบอลิซึมของเซลล์แบคทีเรีย (๑) และการก่อให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ทั้ง ๓ แบบ (๒, ๓ และ ๔) ที่มา Jenssen 2006[๒๔]

๔. การรบกวนเมแทบอลิซึมของเซลล์แบคทีเรีย

เปปไทด์บางชนิดไม่ได้ก่อให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ แต่จะแทรกตัวผ่านเข้าสู่ไซโทพลาซึม เปปไทด์เหล่านี้จะมีเป้าหมายต่างกันดังแสดงในรูปที่ ๒[๒๔] ได้แก่ รบกวนกระบวนการจำลองตัวเองของ DNA การสังเคราะห์ RNA การสังเคราะห์และการม้วนตัวของโปรตีน การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ และการยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ตัวอย่างของเปปไทด์ที่ทำลายเซลล์แบคทีเรียโดยอาศัยกลไกนี้ได้แก่ Buforin II ซึ่งเป็นเปปไทด์ขนาด ๒๑ กรดอะมิโน มีโครงสร้างเป็นแบบ α-helix พบว่ากรดอะมิโน proline ที่มีตำแหน่งอยู่ตรงกลาง α-helix มีความสำคัญในการแทรกตัวผ่านเยื่อหุ้มเซลล์[๒๕] จากนั้น Buforin II จะจับกับ DNA และ RNA ยับยั้งการสังเคราะห์ DNA RNA และโปรตีน[๒๖] พบว่า Tachyplesin PR-39 และ Pleurocidin ฆ่าเซลล์แบคทีเรียด้วยกลไกนี้ด้วย[๒๗-๒๙] เปปไทด์ในกลุ่มที่มีกรดอะมิโน proline สูงได้แก่ Pyrrhocoricin Drosocin และ Apidaecin จะจับอย่างจำเพาะกับ DnaK ซึ่งเป็น heat shock protein ทำหน้าที่ช่วยในการม้วนตัวของโปรตีน การจับกับ DnaK มีผลทำให้โปรตีนไม่สามารถม้วนตัวได้โครงสร้างที่ถูกต้องส่งผลให้เกิดความผิดปกติในการทำงานของโปรตีนของแบคทีเรีย[๓๐] เปปไทด์ชื่อ Mersacidin มีผลยับยั้งการสังเคราะห์เปปทิโดไกลแคนส่งผลต่อการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย[๓๑]

การใช้เปปไทด์ต้านแบคทีเรียในทางการแพทย์

ในปัจจุบันนี้พบว่ามีเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียมีจำนวนมากกว่า ๖๐๐ ชนิด การนำเปปไทด์เหล่านี้ไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์จำเป็นต้องมีการศึกษาถึงกลไกการทำงานของเปปไทด์เหล่านี้อย่างละเอียดรวมทั้งผลข้างเคียงของเปปไทด์เหล่านี้ด้วย ข้อดีของเปปไทด์ต้านแบคทีเรียที่เหนือกว่ายาปฏิชีวนะที่ใช้อยู่ในปัจจุบันคือ การดื้อต่อเปปไทด์ของแบคทีเรียเกิดในอัตราที่น้อยกว่ายาปฏิชีวนะมาก มีงานวิจัยเกี่ยวกับการดื้อยาของ *Pseudomonas aeruginosa* พบว่าใช้เปปไทด์ HB50, HB153, HBPM4, and HB71 หลังจาก 30 passages แล้วพบว่าดื้อต่อเปปไทด์เพียง ๒ - ๔ เท่า ในขณะที่มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ Gentamicin สูงถึง ๑๕๐ เท่า[๓๒,๓๓] ข้อดีอีกประการหนึ่งคือเปปไทด์ทำลายเซลล์แบคทีเรียแบบไม่จำเพาะเจาะจง ทำให้ออกฤทธิ์ฆ่าแบคทีเรียได้หลายหลายชนิดในคราวเดียวกันและออกฤทธิ์อย่างรวดเร็ว[๓๔] จากข้อมูลเกี่ยวกับโครงสร้างและกรดอะมิโน

ที่เป็นองค์ประกอบของเปปไทด์ ทำให้มีการดัดแปลงเปปไทด์ที่ได้จากสิ่งมีชีวิต หรือสังเคราะห์เปปไทด์ขึ้นโดยเลียนแบบเปปไทด์ต้านแบคทีเรียที่สร้างขึ้นจากสิ่งมีชีวิตเพื่อให้เปปไทด์มีคุณสมบัติตามที่ต้องการ เปปไทด์ที่กำลังเตรียมนำไปใช้ในทางการแพทย์ (preclinical) เพื่อรักษาการติดเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ Mersacidin(bateriocin), Plectasin (fungal defensin), CSA-13 (ceroganin), HB-50 (memitic of Cecropoin) และ HB-170 (fragment of Cepropin B)[๓๕] เห็นได้ว่าการใช้เปปไทด์ต้านแบคทีเรียในทางการแพทย์ยังอยู่ในระยะเริ่มต้น ต้องมีการศึกษาในด้านต่างๆ เช่น การค้นหาเปปไทด์ชนิดใหม่ๆ ที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเพื่อให้ได้ความหลากหลายมากขึ้น การศึกษาความเป็นพิษของเปปไทด์โดยใช้สัตว์ทดลอง การปรับปรุงให้เปปไทด์มีครึ่งชีวิตที่นานขึ้น[๓๖] รวมถึงการหาวิธีที่จะลดต้นทุนในการผลิตเปปไทด์เหล่านี้ เนื่องจากปัจจุบันนี้ต้นทุนในการผลิตของเปปไทด์ยังแพงมาก (๕๐-๔๐๐ ดอลลาร์สหรัฐต่อกรัม) เมื่อเทียบกับยาปฏิชีวนะ (เช่น aminoglycoside มีราคาประมาณ ๐.๘ ดอลลาร์สหรัฐต่อกรัม)[๓๗] และที่สำคัญที่สุดคือในปัจจุบันนี้พบว่าแบคทีเรียบางชนิดสร้างกลไกดื้อต่อเปปไทด์ต้านแบคทีเรีย เช่น การเปลี่ยนประจุที่ผิวเซลล์ เช่น *Staphylococcus aureus* มีกลไกในการขนส่งกรดอะมิโน D-alanine ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่ไม่มีประจุจากไซโตปลาสซึมไปที่ teichoic acid ที่ผิวเซลล์ เพื่อเป็นการลดประจุลบของ teichoic acid ทำให้เปปไทด์ที่มีประจุบวกไม่สามารถจับได้[๓๘] ในแบคเรียในจีนัส *Salmonella* มีกลไกในการเติมหมู่ aminoarabinose ที่หมู่ฟอสเฟตของ lipid A ทำให้ลดประจุลบลง นอกจากนี้ยังมีการเติม 2-hydroxy-myristate และ palmitate ที่ lipid A อีกด้วย ทำให้ลดระดับความไหลของเยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลรบกวนการแทรกตัวของเปปไทด์ให้เป็นไปได้ยากขึ้น[๓๙] นอกจากนี้ยังมีกลไกการขับเปปไทด์ออกจากเซลล์โดยใช้โปรตีนที่อยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) ในแบคทีเรียแกรมลบบางชนิด เช่น *Yersinia enterocolitica*[๔๐] รวมถึงกลไกการย่อยเปปไทด์ด้วยเอนไซม์โปรติเอส เช่น ในแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ที่ดื้อต่อเปปไทด์ LL-37 พบว่ามีการสร้างเอนไซม์ Aureolysin เพื่อย่อยเปปไทด์ LL-37 นี้[๔๑] ดังนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องหาวิธีป้องกันการดื้อต่อเปปไทด์โดยแบคทีเรียไม่ให้เหมือนกับการดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่สร้างปัญหาในปัจจุบันนี้

สรุป

จะเห็นได้ว่าการใช้เปปไทด์ต้านแบคเรียเพื่อแก้ปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากมีความปลอดภัยและมีความจำเพาะต่อเซลล์แบคทีเรีย อย่างไรก็ตามพบว่าประสิทธิภาพของเปปไทด์ต้านแบคทีเรียในการทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ขึ้นอยู่กับขนาด ลำดับกรดอะมิโน ประจุโดยรวม ความชอบน้ำ (hydrophilicity) และไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) และโครงสร้างของเปปไทด์ต้านแบคทีเรีย ในส่วนของแบคทีเรียถ้าหากแบคทีเรียนั้นมีไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์เป็นประเภท anionic phospholipid ก็จะไวต่อการถูกทำลายด้วยเปปไทด์ เนื่องจากพบว่ามีแบคทีเรียบางชนิดได้พัฒนากลไกดื้อต่อเปปไทด์ ดังนั้นยังคงต้องมีการวิจัยเพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพ รวมทั้งเปปไทด์ต้านแบคทีเรียยังมีราคาแพงอยู่ การหาเปปไทด์ชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียสูงและมีราคาถูก รวมถึงการหาวิธีป้องกันการดื้อต่อเปปไทด์โดยแบคทีเรีย ยังคงต้องมีการวิจัยต่อไป

เอกสารอ้างอิง

๑. Smith RD, Coast J. Antimicrobial resistance: a global response. Bull World Health Organ. 2002;80:126-33.

๒. Zeya HI, Spitznagel JK. Antibacterial and Enzymic Basic Proteins from Leukocyte Lysosomes: Separation and Identification. Science. 1963;142:1085-7.

๓. Friedberg D, Friedberg I, Shilo M. Interaction of Gram-Negative Bacteria with the Lysosomal Fraction of Polymorphonuclear Leukocytes II. Changes in the Cell Envelope of Escherichia coli. Infect Immun. 1970;1:311-8.

๔. Hale JD, Hancock RE. Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. Expert Rev Anti Infect Ther. 2007;5: 951-9.

๕. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. Nature. 2002;415:389-95.

๖. Boman HG. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. J Intern Med. 2003;254: 197-215.

๗. Brogden KA, Ackermann M, Huttner KM. Detection of anionic antimicrobial peptides in ovine bronchoalveolar lavage fluid and respiratory epithelium. Infect Immun. 1998;66: 5948-54.

๘. Brogden KA, De Lucca AJ, Bland J, Elliott S. Isolation of an ovine pulmonary surfactant-associated anionic peptide bactericidal for Pasteurella haemolytica. Proc Natl Acad Sci USA. 1996;93:412-6.

๙. Brogden KA, Ackermann MR, McCray PB, Jr., Huttner KM. Differences in the concentrations of small, anionic, antimicrobial peptides in bronchoalveolar lavage fluid and in respiratory epithelia of patients with and without cystic fibrosis. Infect Immun. 1999;67:4256-9.

๑๐. Gennaro R, Zanetti M. Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides. Biopolymers. 2000;55: 31-49.

๑๑. Otvos L, Jr. The short proline-rich antibacterial peptide family. Cell Mol Life Sci. 2002;59:1138-50.

๑๒. Lohner K, Latal A, Lehrer RI, Ganz T. Differential scanning microcalorimetry indicates that human defensin, HNP-2, interacts specifically with biomembrane mimetic systems. Biochemistry. 1997;36:1525-31.

๑๓. Latal A, Degovics G, Epand RF, Epand RM, Lohner K. Structural aspects of the interaction of peptidyl-glycylleucine-carboxyamide, a highly potent antimicrobial peptide from frog skin, with lipids. Eur J Biochem. 1997;248:938-46.

๑๔. Konovalov O, Myagkov I, Struth B, Lohner K. Lipid discrimination in phospholipid monolayers by the antimicrobial frog skin peptide PGLa. A synchrotron X-ray grazing incidence and reflectivity study. Eur Biophys J. 2002;31: 428-37.

๑๕. Matsuzaki K, Sugishita K, Harada M, Fujii N, Miyajima K. Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with outer and inner membranes of Gram-negative bacteria. Biochim Biophys Acta. 1997;1327:119-30.

๑๖. Breukink E, van Kraaij C, Demel RA, Siezen RJ, Kuipers OP, de Kruijff B. The C-terminal region of nisin is responsible for the initial interaction of nisin with the target membrane. Biochemistry. 1997;36:6968-76.

๑๗. Oren Z, Shai Y. Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. Biopolymers. 1998;47:451-63.

๑๘. Lee MT, Chen FY, Huang HW. Energetics of pore formation induced by membrane active peptides. Biochemistry. 2004;43:3590-9.

๑๙. Spaar A, Munster C, Salditt T. Conformation of peptides in lipid membranes studied by x-ray grazing incidence scattering. Biophys J. 2004;87:396-407.

๒๐. Yang L, Harroun TA, Weiss TM, Ding L, Huang HW. Barrel-stave model or toroidal

model? A case study on melittin pores. Biophys J. 2001;81:1475-85.

๒๑. Matsuzaki K, Sugishita K, Ishibe N, Ueha M, Nakata S, Miyajima K, et al. Relationship of membrane curvature to the formation of pores by magainin 2. Biochemistry. 1998;37:11856-63.

๒๒. Bechinger B. The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy. Biochim Biophys Acta. 1999;1462:157-83.

๒๓. Yamaguchi S, Huster D, Waring A, Lehrer RI, Kearney W, Tack BF, et al. Orientation and dynamics of an antimicrobial peptide in the lipid bilayer by solid-state NMR spectroscopy. Biophys J. 2001;81:2203-14.

๒๔. Jenssen H, Hamill P, Hancock RE. Peptide antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev. 2006; 19:491-511.

๒๕. Park CB, Yi KS, Matsuzaki K, Kim MS, Kim SC. Structure-activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: the proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II. Proc Natl Acad Sci USA. 2000;97:8245-50.

๒๖. Park CB, Kim HS, Kim SC. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. Biochem Biophys Res Commun. 1998; 244:253-7.

๒๗. Yonezawa A, Kuwahara J, Fujii N, Sugiura Y. Binding of tachyplesin I to DNA revealed by footprinting analysis: significant contribution of secondary structure to DNA binding and implication for biological action. Biochemistry. 1992;31:2998-3004.

๒๘. Boman HG, Agerberth B, Boman A. Mechanisms of action on Escherichia coli of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. Infect Immun. 1993;61:2978-84.

๒๙. Patrzykat A, Friedrich CL, Zhang L, Mendoza V, Hancock RE. Sublethal concentrations of pleurocidin-derived antimicrobial peptides inhibit macromolecular synthesis in Escherichia coli. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46:605-14.

๓๐. Otvos L, Jr., O I, Rogers ME, Consolvo PJ, Condie BA, Lovas S, et al. Interaction between heat shock proteins and antimicrobial peptides. Biochemistry. 2000;39:14150-9.

๓๑. Brotz H, Bierbaum G, Leopold K, Reynolds PE, Sahl HG. The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan synthesis by targeting lipid II. Antimicrob Agents Chemother. 1998;42: 154-60.

๓๒. Zhang L, Parente J, Harris SM, Woods DE, Hancock RE, Falla TJ. Antimicrobial peptide therapeutics for cystic fibrosis. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49:2921-7.

๓๓. Steinberg DA, Hurst MA, Fujii CA, Kung AH, Ho JF, Cheng FC, et al. Protegrin-1: a broad-spectrum, rapidly microbicidal peptide with in vivo activity. Antimicrob Agents Chemother. 1997;41:1738-42.

๓๔. Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? Nat Rev Microbiol. 2005;3:238-50.

๓๕. Zhang L, Falla TJ. Antimicrobial peptides: therapeutic potential. Expert Opin Pharmacother. 2006;7:653-63.

๓๖. Hancock RE, Sahl HG. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. Nat Biotechnol. 2006;24: 1551-7.

๓๗. Marr AK, Gooderham WJ, Hancock RE. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. Curr Opin Pharmacol. 2006;6:468-72.

๓๘. Peschel A, Otto M, Jack RW, Kalbacher H, Jung G, Gotz F. Inactivation of the dlt operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to

defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. J Biol Chem. 1999;274:8405-10.

๓๙. Groisman EA, Parra-Lopez C, Salcedo M, Lipps CJ, Heffron F. Resistance to host antimicrobial peptides is necessary for Salmonella virulence. Proc Natl Acad Sci USA. 1992;89:11939-43.

๔๐. Nikaido H. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. J Bacteriol. 1996;178:5853-9.

๔๑. Sieprawska-Lupa M, Mydel P, Krawczyk K, Wojcik K, Puklo M, Lupa B, et al. Degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus*-derived proteinases. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48:4673-9.

Abstract

Action and applications of antibacterial peptides

Kulwadee Phannachet

Biotechnology Department, Faculty of Science and Technology, Thammasat University

Antibacterial peptides are produced by various organisms from insects to mammals. Modes of action of these peptides for killing bacteria depend on their structures, charges and amino acid compositions. Attraction and attachment of peptides on surface of bacteria by charge-charge interaction followed by cell membrane insertion. Bacteria death is caused either by the transmembrane pore-forming or intracellular killing mechanisms. Therapeutic uses of antibacterial peptides especially for dealing with antibiotic resistance problem are still in the preclinical phase and needed the intensively study on the advantages and disadvantages.

Keywords: Antibacterial peptide, Antibiotic resistance, transmembrane pore-formation