
การประเมินผลเปปไทด์สังเคราะห์ต้านจุลินทรีย์ต่อ Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*

นวลฉวี เวชประสิทธิ์¹ จันทิมา จเรสิทธิกุลชัย² นฤมล เผื่อนกรบ² และสิทธิรักษ์ รอยตระกูล²

¹สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง หัวหมาก บางกะปิ กรุงเทพฯ 10240

²กลุ่มวิจัยส่วนผสมฟังก์ชันและนวัตกรรมอาหาร ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ คลองหลวง ปทุมธานี 12120

บทคัดย่อ การศึกษาครั้งนี้ได้คัดเลือกเปปไทด์จากฐานข้อมูลเปปไทด์ต้านจุลินทรีย์จำนวน 9 เส้น ที่มีขนาด 6–25 กรดอะมิโน มีประจุสุทธิเป็นบวก และ 40–83% hydrophobicity นำเปปไทด์ทั้งหมดไปสังเคราะห์และทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) DMST 20635, MRSA DMST 20637 และ MRSA DMST 20654 พบว่าเปปไทด์ KLKLLLLLKLK สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ทั้งหมด จากนั้นทำการดัดแปลงเปปไทด์เส้นนี้ ทำให้ได้เปปไทด์จำนวน 12 เส้น ที่มีค่าของ %hydrophobicity และประจุสุทธิแตกต่างจากเดิม ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของเปปไทด์สังเคราะห์ 12 เส้น พบว่าเปปไทด์ KLKLLKLLKLLK, LLLLLLKLK และ LLLLLLK มีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923, MRSA DMST 20635 และ MRSA DMST 20654 ได้สูงสุด โดยมีค่า IC_{50} 27.5–62.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) พบว่าทุกสายพันธุ์ของเชื้อ *S. aureus* มี Peptide barcode แตกต่างกัน จากผลการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า *S. aureus* ที่ดื้อยาเมทิซิลลินต่างกัน มีผลต่อ Peptide barcode ต่างกัน และการตอบสนองต่อเปปไทด์สังเคราะห์ก็แตกต่างกันด้วย อย่างไรก็ตามกลไกการทำงานของเปปไทด์ทั้ง 3 เส้น ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ MRSA ควรจะนำไปศึกษาเพื่อพัฒนาเป็นยารักษาโรค

คำสำคัญ : *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อยาเมทิซิลลิน, Peptide barcode, เปปไทด์สังเคราะห์

Corresponding author E-mail: nuanwee@yahoo.com

Received: 20 November 2019

Revised: 13 April 2020

Accepted: 13 May 2020

บทนำ

เปปไทด์ต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial peptides หรือ AMPs) เป็นสารที่สร้างขึ้นจากเซลล์ของสิ่งมีชีวิต และมีบทบาทในการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ในระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ AMPs มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวก และแกรมลบ มัยโคแบคทีเรีย ไวรัส เชื้อรา รวมทั้งเซลล์ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงไปจากปกติ⁽¹⁾ ตัวอย่างเช่น เปปไทด์ hepcidin ที่สามารถต้านเชื้อ *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* และ *Aspergillus niger*⁽²⁾ เปปไทด์ cathelicidin (LL-37) ต้านเชื้อก่อโรคผิวหนัง⁽³⁾ และเชื้อก่อโรคในท่อกระเพาะปัสสาวะ⁽⁴⁾ เป็นต้น ดังนั้น AMPs จึงมีบทบาทเป็นเหมือนยาปฏิชีวนะภายใน (endogenous antibiotics) ที่สร้างขึ้นมาเป็นระบบภูมิคุ้มกัน มีหน้าที่ซ่อมแซมบาดแผล และเป็น mediator ในระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ กระตุ้นให้เซลล์กำจัดสิ่งแปลกปลอม โดยหลั่งสารนำออกมา เช่น ไซโตไคน์ (cytokine) จากแมคโครฟาจ (macrophage) และนิวโทรฟิล (neutrophil)⁽⁵⁾ โดยทั่วไป AMPs ประกอบด้วยจำนวนกรดอะมิโน 12-50 ตัว ซึ่งมักมีกรดอะมิโนประจุบวกชนิดอาร์จินีน (arginine) ไลซีน (lysine) หรือฮิสติดีน (histidine) และกลุ่มของไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) ซึ่งมีสัดส่วนมากกว่า 50% ในโมเลกุล⁽⁶⁾ จากความแตกต่างทางลักษณะโครงสร้างทุติยภูมิและประจุสุทธิ ทำให้มีการแบ่ง AMPs ออกเป็นหลายกลุ่ม^(7, 8)

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) เป็นเชื้อก่อโรคที่พบได้ในโรงพยาบาล มีคุณสมบัติดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิด⁽⁹⁾ สามารถแพร่กระจายได้ง่าย การระบาดของเชื้อกลุ่ม MRSA จะพบในผู้ป่วยที่รักษาตัวในโรงพยาบาล โดยเฉพาะผู้สูงอายุ หรือผู้ป่วยหนัก หรือได้รับแผลจากการผ่าตัด และมักพบในพื้นที่ชุมชนแออัด การติดเชื้อ MRSA นอกโรงพยาบาลจะเป็นการติดเชื้อที่ผิวหนังและอาจมีอาการรุนแรงได้จากปัญหาเชื้อ MRSA ดื้อยาปฏิชีวนะนี้ ทำให้มีการพัฒนายาใหม่ๆ ที่ออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น แต่ยากลุ่มนี้มีจำนวนน้อยและก่อให้เกิดปัญหาดื้อยาอย่างรวดเร็ว กลไกการดื้อยาของเชื้อเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของส่วนประกอบที่บริเวณผนังเซลล์ เช่น กรดทีโคอิก (teichoic acids)⁽¹⁰⁾ ลิโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide)⁽¹¹⁾ หรือฟอสโฟโคลีน (phosphocholine)⁽¹²⁾ เป็นต้น ในปัจจุบันมีการตรวจหาความแตกต่างทางด้านจีโนไทป์ (genotype) ของสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย และสายพันธุ์ดื้อยาของแบคทีเรียในจีโนมและสปีชีส์เดียวกัน โดยการวิเคราะห์หลายพิมพ์เปปไทด์ (peptide mass fingerprint) หรือ Peptide barcode ด้วยเครื่อง matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) ซึ่งให้ผลการวิเคราะห์การแยกชนิด (typing) ของแบคทีเรียได้จำเพาะและดีกว่าการแยกฟีโนไทป์ (phenotype) ด้วยวิธีการทดสอบทางชีวเคมี (biochemical test)^(13, 14) จากการศึกษาวิจัยพบว่าแบคทีเรียที่มีการดื้อยาแตกต่างกัน จะมีลายพิมพ์เปปไทด์แตกต่างกัน⁽¹⁴⁾ ทำให้การตอบสนองต่อยาก็แตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ จากปัญหาการดื้อยาของแบคทีเรียทำให้มีการศึกษาและพัฒนา AMPs แทนยาปฏิชีวนะ เพื่อใช้เป็นยาชนิดใหม่สำหรับรักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียดื้อยา AMPs มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ความเข้มข้นต่ำเมื่อเทียบกับยาปฏิชีวนะทั่วไปและเชื่อไม่ดื้อยา สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้ทำงานไปพร้อมกับการทำงานของ AMPs ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้น AMPs จึงเป็นอีกทางเลือกที่จะนำไปพัฒนาเป็นยากลุ่มใหม่ที่จะใช้แทนหรือควบคู่ (combination therapy) กับยาอื่น ซึ่งมีรายงานการใช้เปปไทด์ LL-13 และ LL-17 (อนุพันธ์ของเปปไทด์ cathelicidin) ร่วมกับการใช้ยาแวนโคไมซิน (vancomycin) ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ที่สร้าง biofilm และดื้อยาแวนโคไมซิน⁽¹⁵⁾ นอกจากนี้ยังพบว่า AMPs บางชนิดมีผลทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดงหรือเซลล์เยื่อหุ้มต่างๆ ในสิ่งมีชีวิต⁽¹⁶⁾ จึงเป็นปัญหาในการนำไปพัฒนาหรือประยุกต์ใช้ทางคลินิก ดังนั้นจึงมีการศึกษาวิจัยดัดแปลงโครงสร้างเปปไทด์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของเปปไทด์ ซึ่งจะต้องคำนึงถึงปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเปปไทด์ เช่น สมบัติการเป็น amphipathicity (เป็นได้ทั้งไฮโดรฟิลิกและไฮโดรโฟบิก) สมบัติความเป็นประจุบวก (เป็นไฮโดรฟิลิก) สมบัติความเป็นไฮโดรโฟบิก ลำดับกรดอะมิโน (ควรเป็นกรดอะมิโน hydrophobic residue มากกว่า 50%) สมบัติการเกิดโครงสร้างเกลียว α -helix (helicity) สมบัติ self-association

(การม้วนพับโปรตีน) โครงสร้างแบบสายตรง (linear) เป็นวง (cyclic) เป็นต้น^(16, 17, 18, 19, 20) การปรับเปลี่ยนโครงสร้างของเปปไทด์ เช่น เป็นวงและเชื่อมต่อกับโมเลกุลไขมันทำให้มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย MRSA ได้ดีขึ้น^(21, 22) การศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้ออกแบบสายเปปไทด์สายสั้น ๆ และดัดแปลงโครงสร้างเพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ที่ดื้อยาเมทิซิลลิน เพื่อนำไปศึกษากลไกการออกฤทธิ์และพัฒนาเป็นยารักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียดื้อยาหลายชนิด (multidrug resistances) แทนการใช้ยาปฏิชีวนะที่มีใช้ในปัจจุบัน

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียก่อโรคในคน *S. aureus* ที่ไม่ดื้อยาและดื้อยาเมทิซิลลิน จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. aureus* ATCC 25923 (ไม่ดื้อยาเมทิซิลลินและเป็นเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน; American Type Culture Collection) MRSA DMST 20635, MRSA DMST 20637 และ MRSA DMST 20654 จากสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง และศูนย์รวบรวมสายพันธุ์แบคทีเรียทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (DMST Culture Collection) กระทรวงสาธารณสุข

เปปไทด์สังเคราะห์และยาปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย

เปปไทด์สังเคราะห์ที่ใช้ในการทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย มีจำนวนทั้งหมด 21 เส้น โดย MRSA1-MRSA9 เป็นเปปไทด์ที่คัดเลือกจากฐานข้อมูลเปปไทด์ต้านจุลินทรีย์ ส่วน MRSA10-MRSA21 เป็นเปปไทด์ที่ออกแบบและดัดแปลงจากเปปไทด์ MRSA1 สังเคราะห์โดยบริษัท China Peptide Co., Ltd., China, ยาปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ เพนิซิลลิน (penicillin) และออกซาซิลลิน (oxacillin) ของบริษัท Sigma-Aldrich, USA, แวนโคมัยซิน ของบริษัท Merck, Germany

การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

นำเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ATCC 25923, MRSA DMST 20635, MRSA DMST 20637 และ MRSA DMST 20654 ที่เก็บในตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง Tryptic Soy agar (Difco, Laboratories Inc., USA) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเชื้อเชื้อโคโลนีเดี่ยวจากอาหารแข็ง มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Tryptic Soy broth (Difco, Laboratories Inc., USA) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นำเชื้อมาเจือจางปรับความขุ่นด้วย 0.85% NaCl ให้เท่ากับ McFarland No. 0.5 โดยใช้เครื่องวัดความขุ่น (suspension turbidity detector; Biosan Ltd., Latvia)

การออกแบบและสังเคราะห์เปปไทด์สายสั้น ๆ

ทำการคัดเลือกสายเปปไทด์ที่มีรายงานว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ได้ดีจากฐานข้อมูล Antimicrobial Peptide Database (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) ได้แก่ เปปไทด์ MRSA1-MRSA9 หลังจากนั้นทำการปรับเปลี่ยนลำดับกรดอะมิโนของสายเปปไทด์ โดยออกแบบให้มีสมบัติการเป็น amphipathicity สมบัติความเป็นประจุบวก สมบัติความเป็นไฮโดรโฟบิก และสมบัติการเกิดโครงสร้างเกลียว α -helix หลากหลาย (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php> และ <https://pepcalc.com>) ได้เป็นเปปไทด์ MRSA10-MRSA21 (ตารางที่ 1) นำเปปไทด์ทั้งหมดไปสังเคราะห์

ตารางที่ 1 ลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์สังเคราะห์

ชื่อเปปไทด์	ลำดับกรดอะมิโนบนสายเปปไทด์
MRSA1	KLKLLLLLKLK
MRSA2	CGGGGGAGLPSSLLLLLEKSSKVKF
MRSA3	FFGSVLKLIPKIL
MRSA4	FFSLLPSLIGGLVSAIK
MRSA5	KIAKVALKAL
MRSA6	GFWGKLWEGVKSAI
MRSA7	NMLPKLLHA
MRSA8	LMLLRF
MRSA9	NLLLMLSSK
MRSA10	KLKLLLLLKLK
MRSA11	KLKLLLLLKLK
MRSA12	KLKLLLLLKLK
MRSA13	KLLLLLLLLLKLK
MRSA14	KLKLLKLLKLK
MRSA15	KLKLLKLLKLK
MRSA16	KLKLLKLLKLK
MRSA17	LKLLLLLKL
MRSA18	KLLLLLKL
MRSA19	LLLLLKLK
MRSA20	LLLLLKL
MRSA21	LLLLLKL

G = Glycine, A = Alanine, P = Proline, V = Valine, L = Leucine, I = Isoleucine, M = Methionine, S = Serine, T = Threonine, C = Cysteine, N = Asparagine, Q = Glutamine, D = Aspartate, K = Lysine, E = Glutamate, H = Histidine, R = Arginine, F = Phenylalanine, Y = Tyrosine, W = Tryptophan

การตรวจหา Peptide barcode ของเชื้อ *S. aureus* ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS

นำเซลล์แบคทีเรียจากอาหารแข็งมาผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 300 ไมโครลิตร และเอทานอลปริมาตร 900 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำไปปั่นเพื่อให้เซลล์แตกก่อน นำตะกอนเซลล์ผสมกับสารละลาย MALDI matrix (10 มิลลิกรัม ของ sinapinic acid ใน 1 มิลลิลิตร ของ 50% acetonitrile ที่ประกอบด้วย 2.5% trifluoroacetic acid) นำสารละลายสกัดปริมาตร 2 ไมโครลิตร หยดลงบน MALDI target (MTP384 ground steel, Bruker Daltonik, GmbH) ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง⁽¹⁴⁾ นำมาวิเคราะห์ด้วย Ultraflex III TOF/TOF (Bruker Daltonik, GmbH) ใช้ linear positive mode กับ mass range ที่ 2000-20000 Dalton แต่ละตัวอย่างทำการเก็บข้อมูลจากการยิงด้วยเลเซอร์ 500 shots ที่ 50 Hz โดยแต่ละตัวอย่างวิเคราะห์ 24 ซ้ำ (n=24) หลังจากเก็บข้อมูลลายพิมพ์เปปไทด์ ซึ่งจะเป็น Peptide barcode ของแต่ละตัวอย่าง นำข้อมูลมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลายพิมพ์เปปไทด์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีใน MALDI Biotyper 2.0 software package ข้อมูลลายพิมพ์เปปไทด์ที่ตรงกันกับฐาน

ข้อมูลจะคำนวณออกมาเป็นคะแนน (score) และวิเคราะห์ Principal Component Analysis (PCA) ของลายพิมพ์เปปไทด์ ด้วย MALDI Biotype 2.0 software package โดยใช้ลายพิมพ์เปปไทด์ของ *Escherichia coli* DH5α เป็น positive control และสารละลาย MALDI matrix เป็น blank

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี **Broth Microdilution**

การทดสอบหาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ที่ไม่ดื้อยาและดื้อยาเมทิซิลลิน โดยหาค่า half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) ด้วยวิธี microdilution ใน 96-well microtiter plate ที่ดัดแปลงวิธีการเล็กน้อย⁽²³⁾ นำเปปไทด์สังเคราะห์มาเตรียมเป็น stock solution ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นเจือจางเปปไทด์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Tryptic Soy broth นำเชื้อแบคทีเรีย (ความขุ่น 10^5 CFU/ml) ใส่ลงใน 96-well microtiter plate ปริมาตร 80 ไมโครลิตร หลังจากนั้นดูดสารละลายเปปไทด์ปริมาตร 20 ไมโครลิตรที่เจือจางแล้วใส่ลงใน 96-well microtiter plate ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของเปปไทด์ คือ 100, 75, 50, 40, 30, 20, 10, 5 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยทำ 3 ซ้ำ (triplicate) จากนั้นนำ microtiter plate เข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พร้อมเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ทำการวัดการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยวัดความขุ่นของเชื้อด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง microtiter plate reader (RT-2100C, Rayto) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ที่เวลา 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 และ 24 ชั่วโมง โดยใช้สารละลายเชื้อแบคทีเรียที่ไม่มีเปปไทด์เป็นตัวควบคุม (negative control) และใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวเป็น blank นำค่าการดูดกลืนแสง หรือ optical density (OD) ของการทดสอบเปปไทด์ทั้งหมด คำนวณหา %Growth inhibition ตามสูตรข้างล่าง และคำนวณหาความเข้มข้นต่ำสุด (minimum concentration หรือ lowest concentration) ของเปปไทด์ที่ทำให้เชื้อแบคทีเรียเจริญได้ 50% เมื่อเทียบกับ control ซึ่งจะเป็นค่า IC_{50}

$$\%Growth\ inhibition = 1 - [(OD_{peptide\ treated} - OD_{blank}) / (OD_{control} - OD_{blank})] \times 100$$

ในการทดสอบนี้ใช้ยาปฏิชีวนะเป็นสารควบคุมในการต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยนำยาปฏิชีวนะเพนิซิลลิน ออกซาซิลลิน และแวนโคมัยซิน เตรียมเป็น stock solution ที่ความเข้มข้น 5,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการเจือจางยาปฏิชีวนะด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อตามวิธีการข้างต้น ความเข้มข้นสุดท้ายของยาปฏิชีวนะ คือ 1,000, 800, 600, 400, 200, 150, 100, 50, 25, 10, 5 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ หลังจากนั้นคำนวณหา IC_{50} ของการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียตามวิธีที่กล่าวข้างต้น

ผล

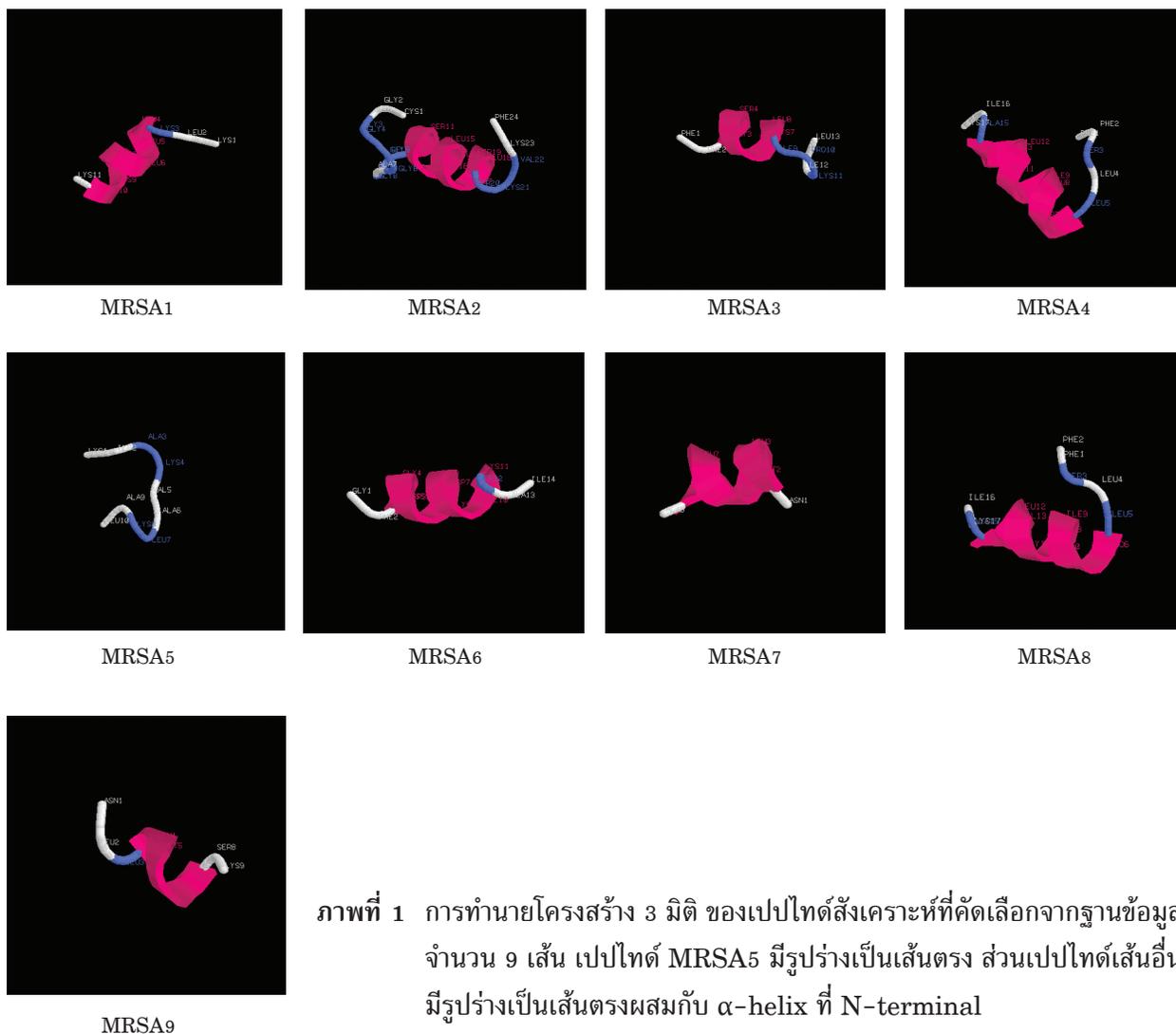
การออกแบบและสังเคราะห์เปปไทด์สายสั้น ๆ

ลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ได้จากฐานข้อมูลของ Antimicrobial Peptide Database (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) เปปไทด์ที่ออกแบบทั้งหมดนำมาคำนวณหาคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ (physico-chemical) เช่น น้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) ค่า pI เป็นต้น ด้วยโปรแกรม (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php> และ <https://pepcalc.com>) จำนวน 9 เส้น ได้แก่ เปปไทด์ MRSA1-MRSA9 แสดงในตารางที่ 2 เปปไทด์ทั้งหมดมีความยาวตั้งแต่ 6-25 กรดอะมิโน และมีความเป็น hydrophobicity ตั้งแต่ 40-83% และมีประจุสุทธิ (net charge) ตั้งแต่ +1 ถึง +4 ทำนายโครงสร้าง 3 มิติ (3-D structure) ด้วยโปรแกรม PEP-FOLD 2.0 (<http://mobyli.rpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin/portal.py#forms::PEP-FOLD>) จากโครงสร้าง 3 มิติ พบว่าเปปไทด์บางเส้นมีรูปร่างเป็นเส้นตรง บางเส้นเปปไทด์มีรูปร่างเป็นเส้นตรงผสมกับ α -helix ที่ N-terminal และไม่พบเส้นเปปไทด์ที่มีรูปร่าง β -pleated sheet (ภาพที่ 1)

ตารางที่ 2 ลำดับกรดอะมิโนและสมบัติทางเคมีกายภาพของเปปไทด์สังเคราะห์ที่คัดเลือกจากฐานข้อมูล

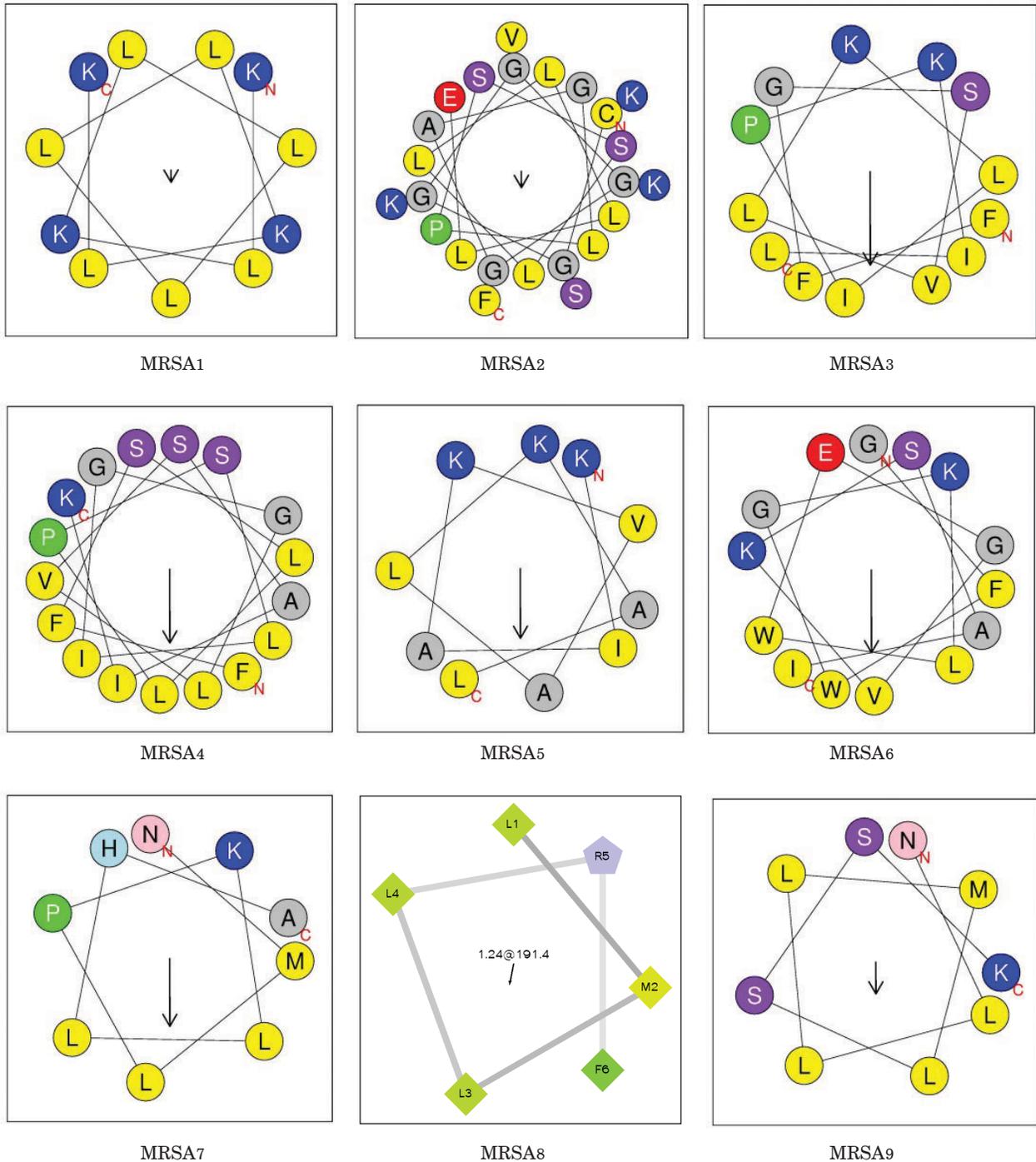
Peptides	Sequences	No. amino acids	MW	pI	Total net charge	% HB	Protein-binding potential (kcal/mol)
MRSA1	KLKLLLLLKLK	11	1322.82	11.15	+4	63	-1.11
MRSA2	CGGGGGAGLPSSLLLLLEKSSKVKF	25	2418.90	10.09	+2	40	-0.32
MRSA3	FFGSVLKLIPKIL	13	1474.87	10.69	+3	61	-1.61
MRSA4	FFSLLPSLIGGLVSAIK	17	1762.14	9.88	+2	58	-1.61
MRSA5	KIAKVALKAL	10	1054.37	10.98	+4	70	-0.75
MRSA6	GFWGLWEGVKSAL	14	1577.82	9.93	+2	50	-0.34
MRSA7	NMLPKLLHA	9	1036.31	9.70	+1	55	-0.23
MRSA8	LMLLRF	6	792.06	10.84	+1	83	-0.86
MRSA9	NLLMLSSK	9	1018.28	9.70	+1	55	-0.33

G = Glycine, A = Alanine, P = Proline, V = Valine, L = Leucine, I = Isoleucine, M = Methionine, S = Serine, T = Threonine, C = Cysteine, N = Asparagine, Q = Glutamine, D = Aspartate, K = Lysine, E = Glutamate, H = Histidine, R = Arginine, F = Phenylalanine, Y = Tyrosine, W = Tryptophan



ภาพที่ 1 การทำนายโครงสร้าง 3 มิติ ของเปปไทด์สังเคราะห์ที่คัดเลือกจากฐานข้อมูล จำนวน 9 เส้น เปปไทด์ MRSA5 มีรูปร่างเป็นเส้นตรง ส่วนเปปไทด์เส้นอื่น มีรูปร่างเป็นเส้นตรงผสมกับ α -helix ที่ N-terminal

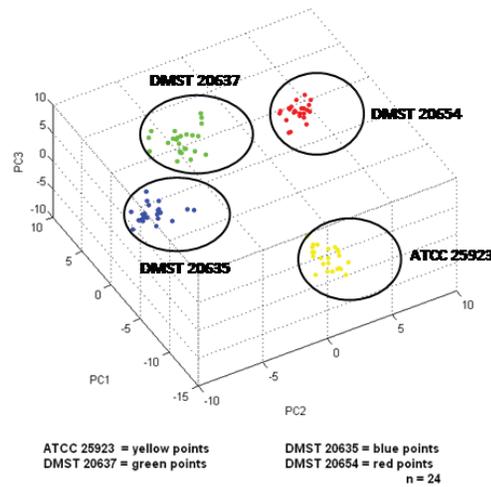
เมื่อวิเคราะห์รูปร่างของเปปไทด์ทั้ง 9 เส้น แบบ helical wheel ด้วยโปรแกรม heliquest (<http://heliquest.ipmc.cnrs.fr/>) พบว่ามีลักษณะดังแสดงในภาพที่ 2 เปปไทด์ MRSA1 มีลักษณะของโครงสร้างที่เป็นไฮโดรโฟบิก และไม่มีขั้ว (non-polar) เป็นครั้งแรกหนึ่งสมดุลง เมื่อเปรียบเทียบกับเปปไทด์เส้นอื่นๆ



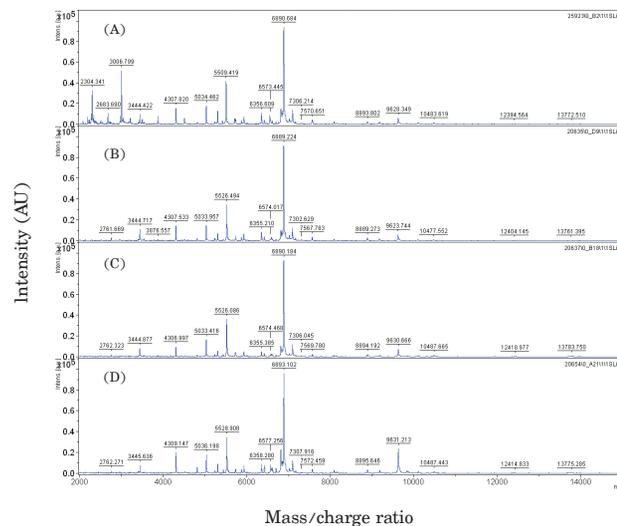
ภาพที่ 2 ลักษณะ helical wheel ของเปปไทด์สังเคราะห์ที่คัดเลือกจากฐานข้อมูล จำนวน 9 เส้น เปปไทด์ MRSA1 มีลักษณะของโครงสร้างที่เป็นไฮโดรโฟบิก และไม่มีขั้ว เป็นครั้งแรกหนึ่งสมดุลง เมื่อเปรียบเทียบกับเปปไทด์เส้นอื่นๆ

การตรวจหา Peptide barcode ของเชื้อ *S. aureus* ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS

ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการตรวจหา Peptide barcode โดยใช้ MALDI-TOF MS มาตรวจวิเคราะห์มวลโมเลกุลของเปปไทด์ในตัวอย่างของเชื้อแบคทีเรีย ผลวิเคราะห์ที่ได้จะเป็นลายพิมพ์เปปไทด์ซึ่งเป็นเอกลักษณ์เฉพาะของแต่ละชนิด และแต่ละสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย ลายพิมพ์เปปไทด์ที่ได้จะเป็นการตรวจพิสูจน์ยืนยันชนิดของเชื้อแบคทีเรียและความแตกต่างทางจีโนมโทป์ของสายพันธุ์แบคทีเรียในจีนัสและสปีชีส์เดียวกัน จากการนำเซลล์แบคทีเรีย *S. aureus* ที่ไม่ดื้อยาและดื้อยาเมทิซิลลิน จำนวน 4 สายพันธุ์ มาทำการสกัดเปปไทด์แล้ววิเคราะห์ลายพิมพ์เปปไทด์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS แล้วเปรียบเทียบลายพิมพ์เปปไทด์ที่ได้กับฐานข้อมูลลายพิมพ์เปปไทด์ของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดใน MALDI Biotyper 2.0 software package พบว่า *S. aureus* ที่ไม่ดื้อยาและดื้อยาเมทิซิลลินทั้ง 4 สายพันธุ์ มีค่า score มากกว่า 2.3 ตรงกับ *S. aureus* ในฐานข้อมูล แต่ทั้ง 4 สายพันธุ์ มีลายพิมพ์เปปไทด์ หรือ Peptide barcode แตกต่างกัน ซึ่งสามารถเห็นได้จากผลภาพ PCA และ MALDI-TOF MS Spectrum (ภาพที่ 3 และ 4) แสดงให้เห็นว่า *S. aureus* ที่นำมาใช้ทดสอบมีสายพันธุ์แตกต่างกันทั้ง 4 สายพันธุ์



ภาพที่ 3 3D PCA Scatter plot ของ *S. aureus* ที่ไม่ดื้อยาและดื้อยาเมทิซิลลิน จำนวน 4 สายพันธุ์ คือ *S. aureus* ATCC 25923, MRSA DMST 20635, MRSA DMST 20637 และ MRSA DMST 20654 โดยใช้โปรแกรม ClinPro Tools 2.2 software (Bruker Daltonik, GmbH, Bremen, Germany)



ภาพที่ 4 ลายพิมพ์เปปไทด์ของ *S. aureus* ที่ไม่ดื้อยาและดื้อยาเมทิซิลลิน จำนวน 4 สายพันธุ์ คือ (A) *S. aureus* ATCC 25923, (B) MRSA DMST 20635, (C) MRSA DMST 20637 และ (D) MRSA DMST 20654 ตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี **Broth Microdilution**

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* ที่ไม่ดื้อยาและดื้อยาเมทิซิลลินกับเปปไทด์สังเคราะห์

นำเปปไทด์สังเคราะห์ที่คัดเลือกจากฐานข้อมูลเปปไทด์ต้านจุลินทรีย์ จำนวน 9 เส้น มาทดสอบกับเชื้อ *S. aureus* ทั้ง 4 สายพันธุ์ ใน 96-well microtiter plate และทำการวัดการเจริญเติบโตที่ 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 และ 24 ชั่วโมง พบว่าเปปไทด์ MRSA1 (KLKLLLLLKLK) ซึ่งมี จำนวน 11 กรดอะมิโน ค่าประจุสุทธิเท่ากับ +4 และ %hydrophobicity เท่ากับ 63% มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ (%Growth inhibition) ได้ดีที่สุด โดยยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 มากกว่า 50% ยับยั้ง *S. aureus* (MRSA) DMST 20635 และ DMST 20637 มากกว่า 30% และยับยั้ง *S. aureus* (MRSA) DMST 20654 มากกว่า 14% ที่ความเข้มข้นของเปปไทด์ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนเปปไทด์เส้นอื่นๆ มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้น้อย โดยมีค่า %Growth inhibition ที่เวลา 16 ชั่วโมง (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* ที่ไม่ดื้อยาและดื้อยาเมทิซิลลินกับเปปไทด์สังเคราะห์ที่คัดเลือกจากฐานข้อมูลจำนวน 9 เส้น โดยใช้เปปไทด์ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 16 ชั่วโมง

Peptides	%Growth Inhibition			
	<i>S. aureus</i>	MRSA	MRSA	MRSA
	ATCC 25923	DMST 20635	DMST 20637	DMST 20654
MRSA1	52.39	35.95	32.78	14.21
MRSA2	12.77	29.09	23.54	1.62
MRSA3	9.5	33.57	25.04	0
MRSA4	13.24	31.54	26.03	0
MRSA5	11.2	34.91	23.04	0.61
MRSA6	17.07	39.05	32.40	0
MRSA7	15.30	35.59	24.41	0
MRSA8	14.23	34.67	23.16	11.77
MRSA9	5.47	39.05	26.03	7.61

จากการทดสอบเชื้อ *S. aureus* ทั้ง 4 สายพันธุ์ ด้วยยาปฏิชีวนะเพนิซิลลิน ออกซาซิลลิน และแวนโคมัยซินที่ใช้เป็นสารควบคุมในการต้านเชื้อแบคทีเรียโดยวิธีการทดลองเช่นเดียวกับเปปไทด์สังเคราะห์ พบว่ายาทั้ง 3 ชนิด มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ทุกสายพันธุ์ โดยยาแวนโคมัยซินมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุด มีค่า IC_{50} 3.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 4 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะเพิ่มจำนวน (exponential phase) ของเชื้อ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 การทดสอบฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะที่มีต่อเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ที่ไม่ดื้อยาและดื้อยาเมทิซิลลิน โดยวิธี Broth Microdilution ที่เวลา 4 ชั่วโมง

<i>S. aureus</i>	IC_{50} (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		
	เพนิซิลลิน	ออกซาซิลลิน	แวนโคมัยซิน
ATCC 25923	0.68	270	3.9
MRSA DMST 20635	500	>1000	3.9
MRSA DMST 20637	500	750	3.9
MRSA DMST 20654	500	>1000	3.9

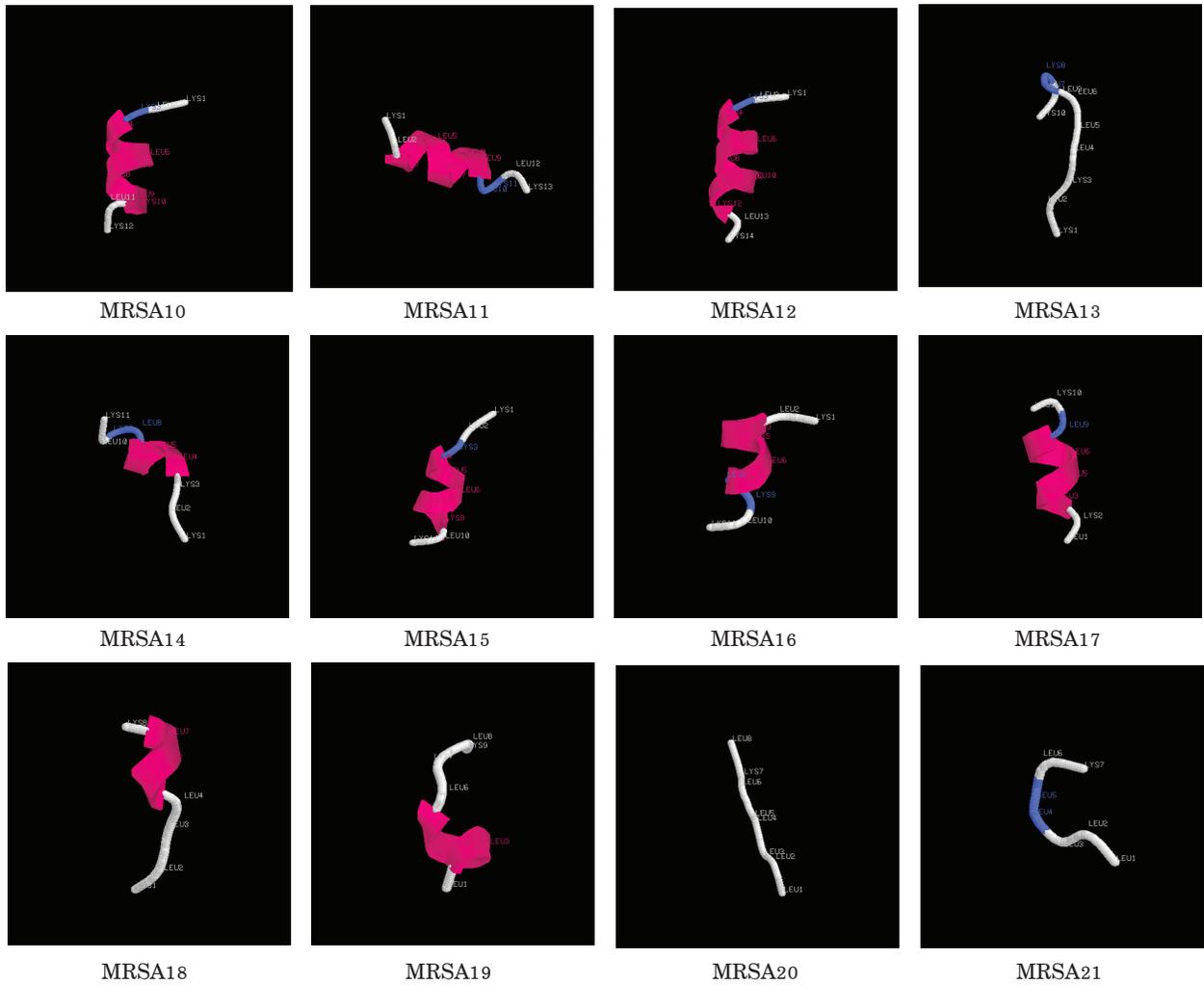
การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* ที่ไม่ดื้อยาและดื้อยาเมทิลลินกับเปปไทด์สังเคราะห์ที่ดัดแปลง

จากผลการทดสอบเปปไทด์คัดเลือกจากฐานข้อมูลจำนวน 9 เส้น (MRSA1-MRSA9) พบว่าเปปไทด์ MRSA1 มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* ทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้ดีที่สุดในที่สุด จึงทำการดัดแปลงเปปไทด์เส้นนี้ให้มีรูปร่าง ประจุสุทธิ และ hydrophobicity เปลี่ยนไป คุณสมบัติต่างๆ ของเปปไทด์ที่ดัดแปลงจำนวน 12 เส้น (MRSA10-MRSA21) แสดงในตารางที่ 5 ความยาวของเปปไทด์มีขนาดตั้งแต่ 7-14 กรดอะมิโน มีความเป็น hydrophobicity ตั้งแต่ 45-87% และมีประจุสุทธิตั้งแต่ +1 ถึง +6 จากการทำนายโครงสร้าง 3 มิติ ของเปปไทด์ พบว่า MRSA13, 20 และ 21 มีรูปร่างเป็นเส้นตรง ส่วนเส้นอื่นมีรูปร่างเป็นเส้นตรงผสมกับ α -helix ที่ N-terminal และไม่พบเส้นเปปไทด์ที่มีรูปร่าง β -pleated sheet (ภาพที่ 5) และการทำนายโครงสร้างในการเกาะจับของเปปไทด์กับเมมเบรน (membrane) โดยใช้โปรแกรม PPM 2.0 (https://opm.phar.umich.edu/ppm_server) พบว่าเปปไทด์ MRSA13, MRSA18, MRSA19, MRSA20 และ MRSA21 ไม่สามารถจับกับเมมเบรนได้ แต่เปปไทด์ MRSA1, MRSA10, MRSA11, MRSA12, MRSA14, MRSA15, MRSA16 และ MRSA17 ที่มีโครงสร้างเป็นเส้นตรงและมี α -helix ตรงปลาย N-terminal สามารถจับกับเมมเบรนได้ (ภาพที่ 6)

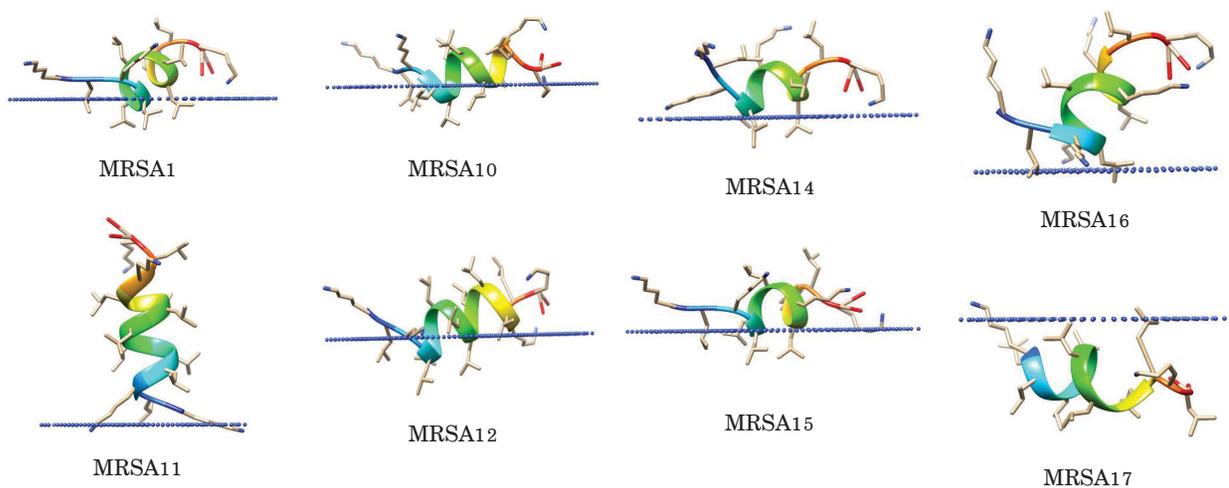
หลังจากนำเปปไทด์สังเคราะห์ที่ดัดแปลงโครงสร้าง จำนวน 12 เส้น มาทดสอบกับเชื้อ *S. aureus* ทั้ง 4 สายพันธุ์ ใน 96-well microtiter plate และทำการวัดการเจริญเติบโตที่เวลาต่างๆ พบว่าเปปไทด์ MRSA16 (KLKLLKLLK) ประกอบด้วย 11 กรดอะมิโน ประจุสุทธิ +6 และ 45% hydrophobicity เปปไทด์ MRSA19 (LLLLLLK) มี 9 กรดอะมิโน ประจุสุทธิ +2 และ 77% hydrophobicity และเปปไทด์ MRSA21 (LLLLLLK) มี 7 กรดอะมิโน ประจุสุทธิ +1 และ 85% hydrophobicity มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923, MRSA DMST 20635 และ MRSA DMST 20654 ได้ดี เมื่อเปรียบเทียบกับเปปไทด์ MRSA1 โดยมีค่า IC_{50} 27.5-62.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 6-8 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะเพิ่มจำนวนของเชื้อ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 5 ลำดับกรดอะมิโนและสมบัติทางเคมีกายภาพของเปปไทด์สังเคราะห์ที่ดัดแปลงจาก MRSA1

Peptides	Sequences	No. amino acids	MW	pI	Total net charge	%HB	Protein-binding potential (kcal/mol)
MRSA10	KLKLLLLLLK	12	1435.98	11.15	+4	66	-1.43
MRSA11	KLKLLLLLLK	13	1549.14	11.15	+4	69	-1.69
MRSA12	KLKLLLLLLK	14	1662.30	11.15	+4	71	-1.92
MRSA13	KLLLLLLLLK	11	1292.80	10.69	+2	81	-3.01
MRSA14	KLKLLKLLK	11	1337.83	11.28	+5	54	-0.16
MRSA15	KLKLLKLLK	11	1337.83	11.28	+5	54	-0.16
MRSA16	KLKLLKLLK	11	1352.84	11.37	+6	45	0.79
MRSA17	LKLLLLLLK	10	1179.64	10.73	+2	80	-2.82
MRSA18	KLLLLLLK	8	953.32	10.69	+2	75	-2.3
MRSA19	LLLLLLK	9	1066.48	10.73	+2	77	-2.59
MRSA20	LLLLLLK	8	938.31	10.12	+1	87	-3.61
MRSA21	LLLLLLK	7	825.15	10.12	+1	85	-3.42



ภาพที่ 5 แสดงการทำนายโครงสร้าง 3 มิติ ของเปปไทด์สังเคราะห์ที่ดัดแปลงจาก MRSA1 จำนวน 12 เส้น เปปไทด์ MRSA13, 20 และ 21 มีรูปร่างเป็นเส้นตรง ส่วนเปปไทด์เส้นอื่นมีรูปร่างเป็นเส้นตรงผสมกับ α -helix ที่ N-terminal



ภาพที่ 6 ไดอะแกรมโครงสร้าง 3 มิติ ของเปปไทด์สังเคราะห์ที่คัดเลือกจากฐานข้อมูล (MRSA1) และเปปไทด์สังเคราะห์ที่ดัดแปลงจาก MRSA1 (MRSA10, 11, 12, 14, 15, 16 และ 17) สามารถเกาะกับ เมมเบรนได้

ตารางที่ 6 ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* ที่ไม่ดื้อยาและดื้อยาเมทิซิลลินกับเปปไทด์ MRSA1 และเปปไทด์สังเคราะห์ที่ดัดแปลงจาก MRSA1 ที่เวลา 6-8 ชั่วโมง

Peptides	IC ₅₀ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)			
	<i>S. aureus</i>	MRSA	MRSA	MRSA
	ATCC 25923	DMST 20635	DMST 20637	DMST 20654
MRSA1	29.5	75	>100	>100
MRSA10	27.3	>100	>100	>100
MRSA11	27.3	>100	>100	75.5
MRSA12	>100	>100	>100	>100
MRSA13	>100	>100	>100	64.5
MRSA14	>100	>100	>100	>100
MRSA15	68.2	30.0	>100	>100
MRSA16	34.5	27.5	>100	>100
MRSA17	>100	>100	70.0	69.5
MRSA18	>100	>100	>100	>100
MRSA19	37.5	37.0	>100	49.5
MRSA20	27.0	39.5	>100	>100
MRSA21	30.0	62.5	>100	36.5

วิจารณ์

Staphylococcus aureus เป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญในมนุษย์ โดยเฉพาะ *S. aureus* ที่ดื้อยาเมทิซิลลิน เป็นสาเหตุของการเกิดโรครุนแรงและเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุข ดังนั้นเปปไทด์ต้านเชื้อจุลินทรีย์หรือ AMPs จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการรักษาโรคติดเชื้อที่มีการดื้อยา ในปัจจุบันได้มีการดัดแปลง เปลี่ยนโครงสร้าง และรูปร่างโมเลกุลของ AMPs เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการต้านจุลินทรีย์ให้มากขึ้น เช่น การเพิ่มประจุบวกด้วยกรดอะมิโนไลซีน^(24, 25) การเปลี่ยนเป็นไฮโดรโฟบิกด้วยกรดอะมิโนลิซีน⁽²⁶⁾ การเปลี่ยนเป็นไฮโดรโฟบิกและไฮโดรฟิลิกในโมเลกุลเดียวกัน⁽²⁷⁾ การเปลี่ยนรูปร่างเป็น α -helix และมีประจุบวกที่ปลายซี (C-terminal domain)⁽²⁸⁾ การเปลี่ยนรูปร่างเป็น α -helix และมีกรดอะมิโนไลซีนและลิซีนที่ปลายเอ็น (N-terminal domain)⁽²¹⁾ และการมีกรดอะมิโนจำพวกอาร์จินีน (arginine)⁽²⁹⁾ และโพรลีน (proline)⁽³⁰⁾ เป็นองค์ประกอบหลัก เป็นต้น จากรายงานการวิจัยพบว่าเปปไทด์ที่มีโครงสร้างเป็น α -helix และมีประจุสุทธิเป็นบวกสามารถที่จะจับกับเมมเบรนที่ยื่นออกมาของแบคทีเรียทั้งชนิดแกรมบวกและแกรมลบ^(31, 32) ในการวิจัยครั้งนี้ได้ดัดแปลงเปปไทด์ให้มีขนาด ประจุสุทธิ ความเป็นไฮโดรโฟบิก รูปร่าง และลำดับของกรดอะมิโนไลซีนและลิซีน ที่มีความแตกต่างกัน พบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSA แต่ละสายพันธุ์เปลี่ยนแปลงไปซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ได้มีการศึกษาไว้แล้ว⁽²¹⁾ จากการทำนายโครงสร้าง 3 มิติของเปปไทด์ MRSA1, MRSA16 และ MRSA19 พบว่ามีโครงสร้างเป็น α -helix และ MRSA21 มีโครงสร้างเป็นเส้นตรง เปปไทด์ทั้งหมดนี้มีขนาดเล็ก ความเป็นไฮโดรโฟบิกสูง และประจุสุทธิเป็นบวก ดังนั้นการต้านเชื้อของเปปไทด์อาจเกิดจากโครงสร้าง α -helix เข้าจับกับเมมเบรนซึ่งมีประจุสุทธิเป็นลบ จากนั้นส่วนที่ไม่ชอบน้ำของเปปไทด์จะเคลื่อนตัวเข้าไปในชั้นฟอสโฟลิปิดของเมมเบรน และรบกวนการจัดเรียงตัวของกรดไขมัน

มันที่เป็นองค์ประกอบของเมมเบรน ทำให้เซลล์แตกสารสามารถผ่านเข้าออกเมมเบรนได้^(7, 33) หรืออาจเกิดจากเปปไทด์ที่เป็นประจุบวกจับกับเมมเบรนที่เป็นประจุลบของไลโปโพลีแซคคาไรด์ โดยส่วนที่ไม่ชอบน้ำของเปปไทด์แทรกตัวเข้าไปในชั้นฟอสโฟลิปิดของเมมเบรน ทำให้เกิดรูบนเมมเบรนแล้วทำให้เซลล์แตก^(7, 34) มีรายงานการวิจัยพบว่าเปปไทด์สังเคราะห์ WR12 (ประกอบด้วย 12 กรดอะมิโน ที่มีกรดอะมิโนทริปโตเฟน (tryptophan) และอาร์จินีนเป็นองค์ประกอบ) และ D-IK8 (ประกอบด้วย 8 กรดอะมิโน โครงสร้าง β -pleated sheet) มีขนาดเล็กสามารถแทรกตัวเข้าไปในเมมเบรนได้ดีกว่าเปปไทด์ที่มีขนาดใหญ่ และสามารถยับยั้งเชื้อ MRSA ได้ดีกว่าเปปไทด์ cathelicidin ที่ประกอบด้วย 37 กรดอะมิโน⁽³⁵⁾ นอกจากนี้ยังมีการวิจัยพบว่าการสังเคราะห์เปปไทด์ดัดแปลงที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนไลซีนเพื่อให้โครงสร้างเป็นประจุบวกของเปปไทด์ AamAP1-Lysine มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้ถึง 10 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับเปปไทด์ AamAP1 จากพิษแมงป่อง⁽²⁴⁾ การเปลี่ยนลำดับกรดอะมิโนลิซีนในเปปไทด์ melittin ให้เป็น melittin diastereomer ที่มี D-amino acid ใน leucine zipper sequence ยังให้ผลในการเพิ่มประสิทธิภาพของการยับยั้งเชื้อแกรมบวกและแกรมลบได้มากขึ้น⁽³⁶⁾ การยับยั้งการเจริญของเชื้อนั้นขึ้นอยู่กับระยะเวลาการออกฤทธิ์ของเปปไทด์ การออกฤทธิ์ได้เร็วและมีประสิทธิภาพจะเป็นช่วงระยะเพิ่มจำนวนของเชื้อที่เวลา 4-6 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงเวลาการออกฤทธิ์ของยาตามหลักทางเภสัชจลนศาสตร์ (pharmacokinetic) และเภสัชพลศาสตร์ (pharmacodynamic) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า การยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSA ของเปปไทด์ MRSA1, MRSA16, MRSA19, MRSA21 และยาปฏิชีวนะ ได้ค่าการยับยั้งเชื้อแตกต่างกัน ในช่วงระยะเวลาการเพิ่มจำนวนของเชื้อที่เวลา 4-8 ชั่วโมง

จากผลการตรวจหา Peptide barcode ด้วย MALDI-TOF MS ของเชื้อ *S. aureus* ที่ไม่ดื้อยาและดื้อยาเมทิซิลลินทั้ง 4 สายพันธุ์ พบว่ามีลายพิมพ์เปปไทด์ที่แตกต่างกันซึ่งเกิดจากจีโนไทป์ของแบคทีเรียที่มีการแสดงออกหรือไม่แสดงออกของยีนในจีโนมและสปีชีส์เดียวกัน ทำให้สายพันธุ์ของ *S. aureus* ที่ใช้ทดสอบมีชนิดและปริมาณของเปปไทด์แตกต่างกัน ซึ่งลายพิมพ์เปปไทด์ หรือ Peptide barcode ที่แตกต่างกันของเชื้อจะเป็นเอกลักษณ์เฉพาะของเชื้อในแต่ละสายพันธุ์ ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า เปปไทด์ MRSA1, MRSA16, MRSA19 และ MRSA21 มีผลการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ทั้ง 4 สายพันธุ์ แตกต่างกัน แสดงว่าการเปลี่ยนแปลงลำดับของกรดอะมิโน ประจุความเป็นไฮโดรโฟบิก และความยาวของเส้นเปปไทด์ มีความจำเพาะต่อสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย ดังนั้น *S. aureus* ที่มีการดื้อยาเมทิซิลลินแตกต่างกันก็จะมีผลทำให้ Peptide barcode ของเชื้อแบคทีเรียเกิดความแตกต่างกัน และการตอบสนองต่อเปปไทด์ก็จะต่างกันด้วย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่มีการศึกษาเปปไทด์สังเคราะห์ BAMP-28 ที่สามารถยับยั้งกลุ่มเชื้อ Enterobacteriaceae ที่ดื้อยา carbapenam ได้ดีที่สุด และมีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อย เมื่อเปรียบเทียบกับเปปไทด์สังเคราะห์เส้นอื่นที่มีขนาด ลำดับกรดอะมิโน ประจุสุทธิ และความเป็นไฮโดรโฟบิกแตกต่างกัน โดยเชื้อดื้อยาที่ใช้ทดสอบทั้งหมด 72 สายพันธุ์ มีลายพิมพ์เปปไทด์แตกต่างกัน⁽¹⁴⁾

MRSA เป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในคนและมีการดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิด นอกจากนี้ยังพบว่าการดื้อต่อเปปไทด์ cathelicidin⁽³⁷⁾ การใช้ AMPs มาแทนยาปฏิชีวนะนั้นต้องมีการศึกษาวิจัยหา AMPs ตัวใหม่ๆ หรือสังเคราะห์ดัดแปลงโครงสร้างของเปปไทด์ เช่น การสังเคราะห์เปปไทด์สายสั้นๆ ให้มีความเป็นไฮโดรโฟบิกและมีประจุสุทธิเป็นบวก⁽²¹⁾ เปลี่ยนโครงสร้างเป็น amphiphatic helix และ β -pleated sheet⁽³⁵⁾ ดัดแปลงโครงสร้างแบบวง โดยเชื่อมต่อกับไขมัน⁽²⁰⁾ เป็นต้น การดัดแปลงโครงสร้างของเปปไทด์ทั้งหลายนี้ เพื่อให้ AMPs มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ MRSA ให้มีประสิทธิภาพได้มากขึ้น อย่างไรก็ตามการศึกษาวิจัย AMPs ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ MRSA จะเป็นประโยชน์ต่อการนำ AMPs มาใช้ในการรักษาโรค ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างมากโดยเฉพาะทางการแพทย์ ดังนั้นการดัดแปลงโครงสร้างของเปปไทด์จึงมีความสำคัญที่ทำให้เปปไทด์มีการออกฤทธิ์ได้ดีมากขึ้น และมีความจำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรียดื้อยาจากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ จะเป็นแนวทางในการนำไปสู่การพัฒนาประยุกต์ใช้เปปไทด์เพื่อประโยชน์ทางการแพทย์ในการรักษาผู้ป่วยในโรคติดเชื้อจุลินทรีย์ดื้อยา

สรุป

เปปไทด์สังเคราะห์ KLKLLLLLKLK สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923, MRSA DMST 20635, MRSA DMST 20637 และ MRSA DMST 20654 เมื่อดัดแปลงเปปไทด์เส้นนี้ให้มีขนาดประจุสุทธิ ความเป็นไฮโดรโฟบิก และรูปร่าง แตกต่างจากเดิม พบว่าเปปไทด์ KLKKLKKLK, LLLLLLKLK และ LLLLLLKLK มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *S. aureus* ATCC 25923, MRSA DMST 20635 และ MRSA DMST 20654 ได้ดีที่สุด จากการวิเคราะห์ Peptide barcode ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS พบว่าลายพิมพ์เปปไทด์ของแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ แตกต่างกัน จึงตอบสนองต่อเปปไทด์สังเคราะห์ที่ต่างกัน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยรามคำแหงและสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ ที่ให้การสนับสนุนงบประมาณแผ่นดินในการทำวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณนายวิรัตน์ แดงลาด ที่อำนวยความสะดวกเครื่องมือและอุปกรณ์ตลอดระยะเวลาการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. Lei J, Sun L, Huang S, Zhu C, Li P, He J, et al. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *Am J Transl Res* 2019; 11(7): 3919-31.
2. Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. Hecpudin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 2001; 276(11): 7806-10.
3. Ballardini N, Johansson C, Lilji G, Lindh M, Linde Y, Scheynius A, et al. Enhanced expression of the antimicrobial peptide LL-37 in lesional skin of adults with atopic eczema. *Br J Dermatol* 2009; 161(1): 40-7.
4. Chromek M, Slamova Z, Bergman P, Kovacs L, Podracka L, Ehren I, et al. The antimicrobial peptide cathelicidin protects the urinary tract against invasive bacterial infection. *Nat Med* 2006; 12(6): 636-41.
5. Fearon DT, Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 1996; 272(5258): 50-4.
6. Papagianni M. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. *Biotechnol Adv* 2003; 21(6): 465-99.
7. Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 2005; 3(3): 238-50.
8. Giuliani A, Pirri G, Nicoletto SF. Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Cent Eur J Biol* 2007; 2(1): 1-33.
9. Hartman BJ, Tomasz A. Low-affinity penicillin-binding protein associates with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 1984; 158(2): 513-6.
10. Peschel A, Otto M, Jack RW, Kalbacher H, Jung G, Götz F. Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J Biol Chem* 1999; 274(13): 8405-10.

11. Ernst RK, Yi EC, Guo L, Lim KB, Burns JL, Hackett M, et al. Specific lipopolysaccharide found in cystic fibrosis airway *Pseudomonas aeruginosa*. *Science* 1999; 286(5444): 1561-5.
12. Lysenko ES, Gould J, Bals R, Wilson JM, Weiser JN. Bacterial phosphorylcholine decreases susceptibility to the antimicrobial peptide LL-37/hCAP18 expressed in the upper respiratory tract. *Infect Immun* 2000; 68(3): 1664-71.
13. Stephan R, Cernela N, Ziegler D, Pfluger V, Tonolla M, Ravasi D, et al. Rapid species specific identification and subtyping of *Yersinia enterocolitica* by MALDI-TOF mass spectrometry. *J Microbiol Methods* 2011; 87(2): 150-3.
14. Arpornsuwan T, Paveenkittiporn W, Jaresitthikunchai J, Roytrakul S. BAMP-28 antimicrobial peptide against different MALDI biotype of Carbapenam resistant Enterobacteriaceae. *Int J Pept Res Ther* 2018; 25(3): 951-60.
15. Shurko JF, Galega RS, Li C, Lee GC. Evaluation of LL-37 antimicrobial peptide derivatives alone and in combination with vancomycin against *S. aureus*. *J Antibiot* 2018; 71(11): 971-4.
16. Huang Y, Huang J, Chen Y. Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: relationships of structure and function. *Protein Cell* 2010; 1(2): 143-52.
17. Jiang Z, Vasil AI, Hale JD, Hancock REW, Vasil ML, Hodges RS. Effects of net charge and the number of positively charged residues on the biological activity of amphipathic α -helical cationic antimicrobial peptides. *Biopolymers* 2008; 90(3): 369-83.
18. Gregory SM, Cavanaugh A, Journigan V, Pokorny A, Almeida PFF. A quantitative model for the all-or-none permeabilization of phospholipid vesicles by the antimicrobial peptide cecropin A. *Biophys J* 2008; 94(5): 1667-80.
19. Mika JT, Moiset G, Cirac AD, Feliu L, Bardaji E, Planas M, et al. Structural basis for the enhanced activity of cyclic antimicrobial peptides: the case of BPC194. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1808(9): 2197-205.
20. Tossi A, Sandri L, Giangaspero A. Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* 2000; 55(1): 4-30.
21. Alvarez-Bravo J, Kurata S, Natori S. Novel synthetic antimicrobial peptides effective against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biochem J* 1994; 302(Pt 2): 535-8.
22. Silverman JA, Perlmutter NG, Shapiro HM. Correlation of daptomycin bactericidal activity and membrane depolarization in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(8): 2538-44.
23. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard, CLSI document M7-A7. 7th ed. Wayne, Pennsylvania; CLSI; 2006.
24. Almaaytah A, Tarazi S, Abu-Alhajja A, Altall Y, Alshar'i N, Bodoor K, et al. Enhanced antimicrobial activity of AamAP1-Lysine, a novel synthetic peptide analog derived from the scorpion venom peptide AamAP1. *Pharmaceuticals* 2014; 7(5): 502-16.
25. Sato H, Feix JB. Lysine-enriched cecropin-mellitin antimicrobial peptides with enhanced selectivity. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(12): 4463-5.

26. Unubol N, Cinaroglu SS, Elmas MA, Akcelik S, Ildeniz ATO, Arbak S, et al. Peptide antibiotics developed by mimicking natural antimicrobial peptides. *Clin Microbiol* 2017; 6(4): 1-6.
27. Izadpanah A, Gallo RL. Antimicrobial peptides. *J Am Acad Dermatol* 2005; 52(3): 381-90.
28. Gutschmann T, Hagge SO, Larrick JW, Seydel U, Wiese A. Interaction of CAP18-derived peptides with membranes made from endotoxins or phospholipids. *Biophys J* 2001; 80(6): 2935-45.
29. Skerlavaj B, Romeo D, Gennaro R. Rapid membrane permeabilization and inhibition of vital functions of gram-negative bacteria by bactericins. *Infect Immun* 1990; 58(11): 3724-30.
30. 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(7): 2978-84.
31. Epand RM, Vogel HJ. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1462(1-2): 11-28.
32. Moerman L, Bosteels S, Noppe W, Willems J, Clynen E, Schoofs L, et al. Antibacterial and antifungal properties of alpha-helical, cationic peptides in the venom of scorpions from southern Africa. *Eur J Biochem* 2002; 269(19): 4799-810.
33. Gazit E, Boman A, Boman HG, Shai Y. Interaction of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 with phospholipids vesicles. *Biochemistry* 1995; 34(36): 11479-88.
34. Christensen B, Fink J, Merrifield RB, Mauzerall D. Channel-forming properties of cecropins and related model compounds incorporated into planar lipid membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85(14): 5072-6.
35. Mohamed MF, Abdelkhalek A, Seleem MN. Evaluation of short synthetic antimicrobial peptides for treatment of drug-resistant and intracellular *Staphylococcus aureus*. *Sci Rep* 2016; 6: 29707. (14 pages).
36. Zhu WL, Nan YH, Hahm KS, Shin SY. Cell selectivity of an antimicrobial peptide melittin diastereomer with D-amino acid in the leucine zipper sequence. *J Biochem Mol Biol* 2007; 40(6): 1090-4.
37. Ouhara K, Komatsuzawa H, Kawai T, Nishi H, Fujiwara T, Fujiue Y, et al. Increased resistance to cationic antimicrobial peptide LL-37 in methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61(6): 1266-9.



Evaluation of Synthetic Antimicrobial Peptides against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*

Nuanchawee Wetprasit¹ Janthima Jaresitthikunchai² Narumon Phaonakrop² and Sittiruk Roytrakul²

¹Department of Biotechnology, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University, Huamark, Bangkok, Bangkok 10240

²Functional Ingredients and Food Innovation Research Group, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency (NSTDA), Khlong Luang, Pathumthani 12120 Thailand.

Abstract In this study, nine peptides containing 6–25 amino acids residues with positive charge and 40–83% hydrophobicity were selected from an antimicrobial peptide database. All of them were chemically synthesized and evaluated for their antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) DMST 20635, MRSA DMST 20637 and MRSA DMST 20654. It was found that KLKLLLLLKLK had effective antibacterial activity against all *S. aureus*. This peptide was then modified and yielded twelve peptides with different hydrophobicity and charges. In the antibacterial assay with these twelve synthetic peptides, KLKCLKLKLK, LLLLLLKLK and LLLLLLK were found to have potent antibacterial activity against *S. aureus* ATCC 25923, MRSA DMST 20635 and MRSA DMST 20654 with IC₅₀ values of 27.5–62.5 µg/ml. Furthermore, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) analysis results showed that peptide barcodes of all *S. aureus* strains were significant different. The results from this study indicated that the different degree of methicillin-resistant *S. aureus* has an effect on difference in peptide barcode and difference in response to synthetic peptides. However, the antibiotic mechanism of these three modified peptides against MRSA should be further studied for development as therapeutic agents.

Keywords: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), Peptide barcode, Synthetic peptides

Corresponding author E-mail: nuanwee@yahoo.com

Received: 20 November 2019

Revised: 13 April 2020

Accepted: 13 May 2020