



แบบรายงานผลความก้าวหน้าในการดำเนินงานโครงการวิจัย

ประเภทอุดหนุนทั่วไป มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ประจำปีงบประมาณ 2555

1. บทนำ

เชื้อก่อโรคมามากมายที่มีอยู่ปัจจุบันเป็นปัญหาที่เกิดขึ้นได้กับทุกเพศ วัย ทุกสถานที่ไม่ว่าจะเป็นเชื้อก่อโรคในอาหาร, อากาศ, น้ำดื่ม เป็นต้น ซึ่งมีผลกระทบต่อผู้ติดเชื้อ เช่น ก่อให้เกิดภูมิแพ้ โรคผิวหนัง มีผลต่อระบบทางเดินอาหาร หรือแม้แต่มิมีผลกระทบภายในระบบของร่างกาย นักวิชาการหลายสาขาให้ความสนใจที่จะทำการศึกษา ออกแบบยา หรือสารปฏิชีวนะเพื่อใช้ในการทำลายเชื้อดังกล่าว แต่เมื่อเวลาผ่านไปเชื้อก่อโรคเหล่านี้สามารถต้านต่อยาหรือสารปฏิชีวนะได้ทำให้เป็นปัญหาอย่างมากต่อวงการแพทย์ที่จำเป็นต้องใช้ยาในการรักษาผู้ป่วย ด้วยเหตุนี้นักวิจัยจึงได้มุ่งเน้นการหายาหรือสารต้านเชื้อโรคชนิดใหม่ โดยหาสารทดแทนยาปฏิชีวนะที่สามารถทำลายหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้อย่างจำเพาะ มีประสิทธิภาพสูง ไม่ก่อให้เกิดผลรุนแรงต่อร่างกายมนุษย์และไม่ก่อให้เกิดการดื้อยา นักวิจัยหลายกลุ่มค้นพบสารต้านเชื้อก่อโรคที่เรียกกันทั่วไปว่า “เปปไทด์ต้านจุลชีพ” หรือ “Antimicrobial peptides” (AMPs) เปปไทด์เหล่านี้จัดว่ามีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (innate immunity) ของสิ่งมีชีวิตชั้นสูง ด้วยคุณสมบัติเฉพาะของเปปไทด์ต้านจุลชีพเหล่านี้ สามารถกำจัดเชื้อก่อโรค (pathogen) ได้หลากหลายชนิด เช่น แบคทีเรีย รา ไวรัส และปรสิต สามารถถูกพัฒนาไปเป็นสารทดแทนยาปฏิชีวนะและ/หรือสารชีวภาพที่สามารถประยุกต์ใช้ประโยชน์ได้ทั้งในแง่ของเกษตรกรรมและอุตสาหกรรมอีกด้วย (Leontiadou, Mark et al. 2006; Rossi, Rangasamy et al. 2008; Ajesh and Sreejith 2009)

ในการออกแบบเปปไทด์ต้านจุลชีพเพื่อให้มีฤทธิ์และคุณสมบัติที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้งานนั้น จำเป็นจะต้องทราบรายละเอียดของเปปไทด์ในระดับโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับกลไกการเข้าทำลายจุลินทรีย์ เปปไทด์ต้านจุลชีพมีกลไกการเข้าทำลายจุลินทรีย์อยู่สองแบบหากแบ่งตามการมีหรือไม่มีตัวรับบนผิวของผนังเซลล์ นั่นคือกลุ่มที่ใช้ตัวรับ (Receptor-mediated mode) และกลุ่มที่ไม่มีตัวรับบนผิวของผนังเซลล์ (Nonreceptor-mediated mode) กลุ่มของเปปไทด์ที่ไม่ใช้ตัวรับที่พบมากที่สุดคือเปปไทด์ประเภทที่มีประจุบวก (Cationic peptides) ซึ่งมีเป้าหมายเข้าจับกับประจุลบบนเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย เมื่อเปปไทด์ต้านจุลชีพสะสมอยู่บนผิวของเยื่อหุ้มจนถึงค่าความเข้มข้นที่เหมาะสม มันจะจัดเรียงโมเลกุลให้สามารถเกิดการสร้างรูบนเยื่อหุ้มทำให้เกิดการรั่วหรือเกิดการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย สารต่าง ๆ ในเซลล์จะออกมาภายนอกและส่งผลให้เซลล์ตายในที่สุด มีหลายแบบจำลองเพื่อใช้อธิบายกลไกการสร้างรูของเปปไทด์ต้านจุลชีพโดยเรียกตามรูปร่างของการเกิดรู แบบจำลองที่เป็นที่ยอมรับมากที่สุดมี 3 แบบคือ Barrel-stave model, Toroidal model, และ Carpet model (Oren and Shai 1998; Shai 2002; Park and Hahn 2005; Straus and Hancock 2006)



สคอร์โปน (Scorpine) เป็นกลุ่มของเปปไทด์ด้านจุลชีพที่สกัดได้จากน้ำพิษของแมงป่อง มีลำดับกรดอะมิโนในส่วน N-terminus คล้ายกับเปปไทด์ด้านจุลชีพกลุ่ม Cecropins และส่วน C-terminus คล้ายกับเปปไทด์ด้านจุลชีพกลุ่ม Defensins (Hadjicharalambous, Sheynis et al. 2008; Kouno, Mizuguchi et al. 2009) ด้วยลักษณะที่เป็นลูกผสมของสคอร์โปน ทำให้มันมีคุณสมบัติที่หลากหลาย ไม่ว่าจะเป็นการยับยั้งการส่งผ่านไอออนของช่องส่งผ่านโพแทสเซียม การยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรคที่เป็นทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ เชื้อรา และรวมไปถึงการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อพลาสโมเดียมซึ่งเป็นสาเหตุของโรคมาลาเรีย (Possani, Corona et al. 2002) ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดถึงคุณสมบัติของสคอร์โปนที่ทำให้มันสามารถกำจัดเชื้อโรคต่างๆได้หลายชนิด แต่ลักษณะของโครงสร้างในภาพรวมซึ่งมีประจุสุทธิเป็นบวก มีโครงสร้างทุติยภูมิแบบผสมทั้งสายแอลฟาและเบต้า และมีพันธะไดซัลไฟด์ 3 พันธะที่ปลาย C-terminus เพื่อช่วยรักษาความเสถียรของโครงสร้าง ทำให้นักวิทยาศาสตร์สามารถทำนายถึงกลไกการเข้าจับของสคอร์โปนกับเยื่อเซลล์ที่มีคุณสมบัติเป็นประจุลบ จากนั้นด้วยโครงสร้างที่เป็นทุติยภูมิแบบ amphipathic คือมีด้านที่เป็นประจุและด้านที่เป็นไฮโดรโฟบิกของสายเกลียวแอลฟา เมื่อสคอร์โปนวางตัวบนผิวของเยื่อเซลล์แล้วจะทำให้เกิดการแทรกตัวเข้าไปในช่องระหว่างเยื่อเซลล์ที่มีองค์ประกอบหลักเป็นฟอสโฟลิปิดได้

เฮเทอโรสคอร์โปน 1 (Heteroscorpine-1, HS-1) เป็นเปปไทด์ด้านจุลชีพที่ใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ สกัดได้จากน้ำพิษของแมงป่องช้างซึ่งเป็นสัตว์ท้องถิ่นในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เป็นเปปไทด์ในกลุ่มของสคอร์โปน ได้มีการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับ HS-1 ในห้องปฏิบัติการของ รศ.ดร. ศักดา ดาดวง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น พบว่า HS-1 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 76 กรดอะมิโน มีคุณสมบัติเป็นตัวยับยั้งการทำงานของช่องส่งผ่านโพแทสเซียมไอออน (K-channel blocker) ผลจากการทดลองคือเมื่อฉีด HS-1 เข้าสู่แมลงขนาดเล็ก เช่น จิ้งหรีด จะทำให้สัตว์เกิดเป็นอัมพาต นอกจากนี้ HS-1 ยังสามารถต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้หลายชนิด การค้นพบเบื้องต้นเหล่านี้ทำให้ผู้วิจัยเล็งเห็นถึงศักยภาพของ HS-1 ในการเป็นเปปไทด์ด้านจุลชีพหรือแม้แต่การเป็นสารชีวภาพเพื่อกำจัดเซลล์มะเร็งหรือกำจัดแมลงศัตรูพืช ยังไม่มีรายงานด้านกลไกการทำงานของ HS-1 ว่าเข้าทำลายเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้อย่างไร มีเพียงหลักฐานทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ว่า HS-1 ทำให้เซลล์เกิดลักษณะที่เรียกว่า blebbing ซึ่งเป็นลักษณะของการที่เยื่อเซลล์หลุดออกมาเป็นก้อนกลม ๆ เล็ก ๆ บนผิวเซลล์ (Uawonggul, Thammasirak et al. 2007)

ในการวิจัยต่อเนื่องนี้ได้วางแผนศึกษาต่อในเชิงลึกเพื่อให้ทราบกลไกการเข้าจับระหว่าง อนุพันธ์ของ HS-1 (HS-1 analogs ; ลำดับกรดอะมิโนในส่วน N-terminus คล้ายกับเปปไทด์ด้านจุลชีพกลุ่ม Cecropins และส่วน C-terminus คล้ายกับเปปไทด์ด้านจุลชีพกลุ่ม Defensins) ต่อเยื่อเซลล์จำลอง โดยจะเน้นเยื่อเซลล์ที่เป็นองค์ประกอบในเชื้อก่อโรคทั่วไป เช่น ตัวแทนเชื้อแบคทีเรีย แกรมบวก แกรมลบ อาศัยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์เป็นหลักในการวิจัย ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความละเอียดสูง (Zeineldin, Piyasena et al. 2008) ติดตามพฤติกรรมและโครงสร้างของสิ่งที่ต้องการศึกษาได้ โดยจะประยุกต์ใช้ฟอสโฟลิปิด ที่มีส่วนประกอบที่เป็นฟอสโฟลิปิดคล้ายกับที่พบในผนังเยื่อเซลล์แบคทีเรียซึ่งจะตรวจวัดสิ่งที่เกิดขึ้นต่อไปนี้ได้แก่ การทำให้เยื่อเซลล์



จำลองเกิดรูรั่ว หรือเกิดการซึมผ่านได้โดยการวัดสารเรืองแสงที่รั่วออกมา ศึกษาการจัดวางโมเลกุลของอนุพันธ์ของ HS-1 บนผิวของเยื่อเซลล์จำลอง ศึกษาโครงสร้างของอนุพันธ์ HS-1 ก่อนและหลังเข้าจับกับเยื่อเซลล์จำลอง ศึกษาการจับกันแน่นจากการการเกิดอันตรกิริยาระหว่างอนุพันธ์ HS-1 ต่อเยื่อเซลล์จำลองและวิเคราะห์ปัจจัยที่ส่งผลต่อการจับกันแน่นของอันตรกิริยาดังกล่าว (Abrunhosa, Faria et al. 2005; Straus and Hancock 2006; Lad, Birembaut et al. 2007; Arcidiacono, Soares et al. 2009)

2. วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ความสำคัญของการดื้อยาปฏิชีวนะ

การดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อจุลชีพโดยทั่วไปนั้นเกิดจากการที่เชื้อแบคทีเรียมีการปรับตัวต่อยา antibiotic ที่พัฒนาอย่างต่อเนื่อง โดยวิธีการต่างๆ เพื่อที่จะขัด หรือลดประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะเหล่านั้น การดื้อยานี้อาจเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติของเชื้อนั้น ๆ หรืออาจเกิดภายใต้ความกดดันจากหลายสภาวะของยาปฏิชีวนะ ทฤษฎีสำคัญที่อธิบายที่มาของการเกิดการดื้อยา (Mechanisms of resistance to antibiotics. Intensive Care Med 2000;26:s9-s13.)

- เชื้อแบคทีเรียได้รับ resistant gene มาจาก antibioticproducing organisms เช่น *Streptomyces spp.* ที่ใช้ผลิตยา penicillin
- Resistant gene เกิดจาก mutation ของ house keeping gene ของ clinical bacteria เอง โดย resistant gene จะสามารถ กระจายต่อไปได้อย่างรวดเร็วด้วยกลไกที่เรากล่าวต่อไป

นับตั้งแต่การค้นพบยาปฏิชีวนะชนิดแรก ได้แก่ penicillin ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยจากการติดเชื้อมีเพิ่มมากขึ้น แต่การดื้อยาปฏิชีวนะก็เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วเช่นเดียวกัน และที่สำคัญการเกิดการดื้อยาของเชื้อจุลชีพยังเกิดขึ้นเร็วยิ่งกว่าอัตราที่เราสามารถพัฒนายาใหม่ ๆ ขึ้นมาได้ทัน (แสดงดังตารางที่ 1) การดื้อยาของเชื้อจุลชีพเหล่านี้สามารถแพร่กระจายไปในทุกส่วนของโลก อาจกล่าวได้ว่าความสำคัญของการดื้อยาปฏิชีวนะ ในเวชปฏิบัติมีมากมายพอ ๆ กับความสำคัญของประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะเลยทีเดียว ปัจจุบันพบ multidrug resistance มากมายรวมถึง panresistance ซึ่งอยู่ในแบคทีเรียบางตัว และสิ่งเหล่านี้สามารถทำให้เกิดโรคติดเชื้อที่รักษาไม่ได้ ซึ่งจะเพิ่มทั้งอัตราการเจ็บป่วยและอัตราการตาย ส่งผลให้สิ้นเปลืองทั้งยาและบุคลากรทางการแพทย์ หากไม่สามารถที่จะคุม หรือชะลอการดื้อยาได้ ก็เหมือนจะย้อนไปสู่ยุคก่อนที่พบยาปฏิชีวนะ(pre-antibiotic era) อีกครั้ง (นลินี อัสวโกศิ. ภาวะวิกฤตของการดื้อยาปฏิชีวนะ. ประสบการณ์โรคติดเชื้อในประเทศไทย. กรุงเทพฯ: โฮลิสติก แพ็บลิชชิง; 2540; 63-85.)



ตารางที่ 1 การค้นพบยาปฏิชีวนะ และการดื้อยาปฏิชีวนะ(ข้อมูลจาก CIBA Foundation)

ยาปฏิชีวนะ	ปีที่ค้นพบ	ปีที่น่ามาใช้ทางคลินิก	ตรวจพบการดื้อยาครั้งแรก
Penicillin	1940	1943	1940 (methicillin 1956)
Streptomycin	1944	1947	1947
Tetracycline	1948	1952	1956
Erythromycin	1952	1955	1956
Vancomycin	1956	1972	1987
Gentamicin	1963	1967	1970

ระบาดวิทยาของการดื้อยาปฏิชีวนะ

ความชุก (Prevalence)

การดื้อยาปฏิชีวนะพบได้ในทุกส่วนของโลกในประเภท และอัตราที่ต่างกันไปสามารถแบ่ง เป็น 3 ระดับ (Livermore DM. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. Clin Infect Dis 2003; 36(Suppl 1): s11-s23.) คือ

ระดับท้องถิ่น (Local level) อัตราการดื้อยาในแต่ละชุมชนจะไม่เท่ากันโดยในโรงพยาบาลโรงเรียนแพทย์ หรือโรงพยาบาลศูนย์จะมากกว่าโรงพยาบาลชุมชน นอกจากโรงพยาบาลแล้ว long-term care facility ต่างๆ ยังเป็นแหล่งรวมของเชื้อดื้อยาชนิดต่างๆ อีกด้วย (Toubes E et al., 2003)

ระดับประเทศ (National level) ความชุกของการดื้อยาในแต่ละประเทศแตกต่างกัน (ขึ้นกับวิธีการในการสำรวจและความสามารถของห้องปฏิบัติการในการแยกเชื้ออีกด้วย) ในยุโรป และ อเมริกา การกระจายเป็นไปในทิศทางไปทางใต้ คือ จะมากที่สุดที่แถบเมดิเตอร์เรเนียน และ ละตินอเมริกา ตามลำดับในเอเชียจะพบมากในจีน และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

ระดับนานาชาติ (International level) การกระจายของเชื้อดื้อยา ที่ปรากฏขึ้นใหม่ (newly emerging resistant strains) ไปทั่วโลก เกิดจากการเดินทางของคนที่เป็นพาหะของเชื้อดื้อยานั้นปัจจุบันมีเชื้อดื้อยาหลายกลุ่มที่เป็นปัญหาทางคลินิก เช่น extended-spectrum beta-lactamases ใน gram-negative bacilli, MRSA, vancomycin resistant enterococci (VRE), quinolone-resistant *E. coli* เป็นต้น



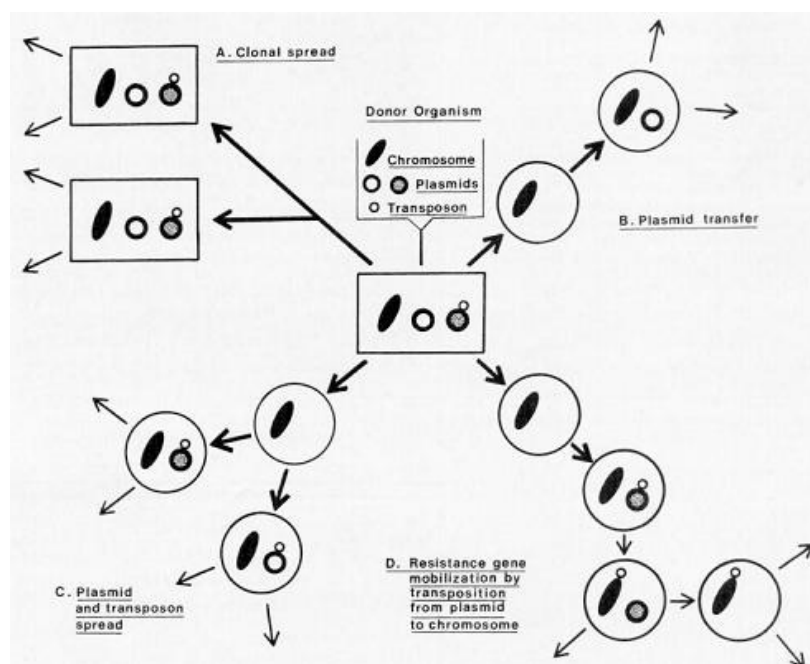
อณูพันธุศาสตร์ของการดื้อยาปฏิชีวนะ (molecular genetics of antibiotic resistance)

การเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมอื่นทำให้เกิดการดื้อยาอาจเกิดได้ใน 3 ระดับ7

Point mutation ซึ่งเปรียบเป็น micro evolutionary change ทางพันธุกรรม ตัวอย่างที่สำคัญทางคลินิก คือ การเปลี่ยนแปลงในตำแหน่งที่สำคัญเพียงตำแหน่งเดียวของ enzyme beta-lactamase ตัวเก่าทำให้ได้ extended-spectrum betalactamases ตัวใหม่ที่มีฤทธิ์มากขึ้น

- Whole-scale rearrangements of large segment of DNA มีการเรียงตัวใหม่ของ DNA ใน bacteria เปรียบเป็น macro evolution โดยกลไก inversions, duplications, insertions, deletions หรือ transposition ของ large sequences ของ DNA ระหว่าง chromosome หรือ plasmid ของ bacteria โดยมักเกิดการแลกเปลี่ยนผ่านทาง transposon (transposon เป็น organelle เล็กๆ ในแบคทีเรียซึ่งจะมียีนดื้อยาปฏิชีวนะอยู่และยีนเหล่านี้ สามารถเคลื่อนย้ายผ่านทาง transposon ระหว่าง plasmid หรือ chromosome ซึ่งอาจเกิดภายใน bacteria ชนิดเดียวกันหรือข้ามชนิดก็ได้) แสดงดังรูปที่ 1

- Acquisition of foreign DNA เชื้อแบคทีเรียได้รับ DNA ใหม่เข้ารวมตัวกับ DNA เก่าของแบคทีเรียโดย DNA ใหม่นี้อาจจะมากับ plasmid, bacteriophages, transposon หรือเป็น sequence ของ DNA โดดๆ (naked sequence of DNA)



ภาพที่ 1 แสดงตัวอย่างการแพร่กระจายของการดื้อยาปฏิชีวนะ (วงรีแทน chromosome วงกลมใหญ่แทน plasmid, วงกลมเล็กแทน transposon) Donor organisms มี 1 chromosome, 2 plasmid, และ 1 transposon [ภาพจาก Mandell ฉบับพิมพ์ครั้งที่ 6 บทที่ 16 - Opal SM et al., 2000]



การแพร่กระจายของการดื้อยาปฏิชีวนะเป็นไปได้ 4 แบบ คือ

A. Clonal spread: คือ การที่ organism เพิ่มจำนวนขึ้นซึ่งถ้ามันสามารถอยู่ได้ในสิ่งแวดล้อมนั้นๆ ก็จะเพิ่มเติมต่อไปเรื่อยๆ

B. Plasmid transform: เมื่อแบคทีเรีย species อื่นมาอยู่ใกล้กันก็สามารถจะถ่ายทอดยีนดื้อยาข้าม species กันได้ผ่านทาง plasmid C, D Transpose transfer: ยีนดื้อยาสามารถเคลื่อนย้ายผ่านทาง transposon ซึ่ง conjugate ไปกับ plasmid ซึ่งวิธีนี้สามารถถ่ายทอดข้าม species ได้ (C) นอกจากนี้ยังสามารถจะ integrate รวมกับ chromosome ของแบคทีเรียเป็น stable genetic element สามารถถ่ายทอดต่อไปเวลาที่ bacteria แปรตัว (D)

ปัจจัยเสี่ยง (Risk factors) ของการเกิดเชื้อดื้อยา

ปัจจัยเสี่ยงของการเกิดการดื้อยาของเชื้อเกิดผลต่างๆ กันไปขึ้นกับกลุ่มประชากร, เชื้อที่วิจัย และวิธีในการสำรวจ ได้แก่

- ยาปฏิชีวนะ ได้แก่ การใช้ยาปฏิชีวนะมาก่อนโดยเฉพาะยาปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์กว้าง, การอยู่โรงพยาบาล หรือ long-term care facilities มาก่อน, under/sub-therapeutic dosage of antibiotic
- สภาพของผู้ป่วย ได้แก่ ผู้ป่วยที่มีโรคประจำตัวรุนแรงต่างๆ (เบาหวาน, หัวใจวาย, โรคหลอดเลือดสมอง), ผู้ป่วยที่มี functional status ไม่ดี
- การติดเชื้อจากการรักษา ได้แก่ การใส่สายสวนต่าง ๆ หรือ การปนเปื้อนจากการดูแลของบุคลากรทางการแพทย์, กลไกการควบคุมการติดเชื้อที่ไม่ดีพอ

กลไกในการดื้อยา (Hawkey PM, 2000, Gordon LA et al., 2005) แบ่งได้เป็น

Intrinsic resistance ยาปฏิชีวนะบางชนิดไม่สามารถใช้ได้เนื่องจากกลุ่มตามธรรมชาติของการออกฤทธิ์ของ antibiotic เช่น vancomycin ใน gram negative bacilli หรือ aminoglycoside ใน anaerobic bacteria

Acquired resistance เป็นกลไกที่แบคทีเรียพัฒนาขึ้นมาเพื่อจะขัดหรือลดประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะโดยทั่วไปแบ่งได้เป็น 4 กลไกใหญ่ ซึ่งในเชื้อแต่ละชนิดอาจจะใช้หลายๆกลไกร่วมกันในการดื้อยา antibiotic แต่ละขนาน

Drug inactivation / modification เป็นกลไกที่พบมากที่สุด เกิดจากแบคทีเรียสร้าง enzyme มาทำลายหรือเปลี่ยนแปลงยาปฏิชีวนะ ตัวอย่างที่เราพบได้บ่อย ได้แก่ penicillinases, beta-lactamases, cephalosporinases

Alteration of target site โดยวิธีการนี้ยาจะสามารถเข้าไปในผนังเซลล์ไปถึง target site ได้แต่ไม่สามารถจับกับ target site ได้เพราะมีการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้าง molecule จึงทำให้ยาออกฤทธิ์ต่อไม่ได้



แบบรายงานผลความก้าวหน้า โครงการวิจัยประเภทอุดหนุนทั่วไป
: กรณีคณะบดีหรือผู้ที่คณะมอบหมายเป็นผู้ประเมิน

เช่นใน *S. pneumoniae* PBP (penicillin binding protein) จะเปลี่ยนโครงสร้างเป็น PBPX ทำให้เกิดการดื้อยาตามมา

Bypass pathways เชื้อที่ดื้อยาสร้าง alternative target ขึ้นมาใหม่ แล้วยาปฏิชีวนะจะมาจับกับ target อันใหม่แทน เช่น PBP2a ในกรณี MRSA

Decreased uptake แบคทีเรียมีกลไกป้องกันไม่ให้ยาเข้าไปในเซลล์ หรือมีการใช้ energy-requiring membrane efflux pump นำยาออกไป ตัวอย่าง เช่น ยา imipenam จำเป็นจะต้องอาศัย porin เฉพาะในการที่ยาจะเข้าเซลล์ได้ เมื่อ *P.aeruginosa* พัฒนาให้ไม่มี porin ชนิดนี้ก็จะสามารถดื้อต่อ imipenam ได้ หรือใน *Salmonella typhi* มีการเพิ่ม expression ของยีนที่สร้าง multidrug efflux pump จึงทำให้เกิดการดื้อยาหลายชนิดตามมา 10 กลไกการออกฤทธิ์ของการดื้อยาชนิดต่างๆ สรุปได้ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ยาปฏิชีวนะ กลไกการออกฤทธิ์และกลไกการดื้อยา (Gordon LA et al, 2005, Samaha-Kfoury JN et. al, 2003)

ยาปฏิชีวนะ	กลไกการออกฤทธิ์	กลไกการดื้อยาที่สำคัญ
β -lactams	Inhibit cell wall synthesis, Cell division	beta - lactamases, altered penicillin binding protein, altered GNB outer-membrane porins, active efflux
Glycopeptides (Vancomycin, cycloserine)	Inhibit cell wall division	Altered target site
Aminoglycosides	Inhibit protein synthesis (bind to 30s ribosome)	Aminoglycoside-modifying enzyme, Decreased membrane permeability, active efflux
Macrolides	Inhibit protein synthesis (bind to 50s ribosome)	Altered target, enzymatic inactivation, active efflux
Tetracycline	Inhibit protein synthesis (bind to 30s ribosome)	Efflux, altered target, enzymatic inactivation, decreased permeability
Chloramphenicol	Inhibit protein synthesis (bind to 50s ribosome) Inhibit DNA synthesis by inhibit	Chloramphenicol acetyltransferase, active efflux
Quinolones	DNA gyrase	Altered target, active efflux



Rifampin	Inhibits nucleic acid synthesis	Altered target, decreased permeability of membrane
Metronidazole	Inhibits nucleic acid synthesis	Not defined
Sulfonamides	Inhibit folic acid synthesis	Altered target
Trimethoprim	Inhibits folic acid synthesis	Altered target, decreased permeability of membrane
Polygene (nystatin, amphotericin B)	Cell membrane permeability	Ergosterol deficient mutants.

Antimicrobial Peptides

Antimicrobial Peptides (AMPs) เป็นเปปไทด์ที่ได้จากส่วนใดส่วนหนึ่งของสิ่งมีชีวิตในธรรมชาติ ไม่ว่าจะเป็นพืชหรือสัตว์ เป็นผลิตภัณฑ์ที่นักวิทยาศาสตร์พบว่า มีความสามารถในการทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น แบคทีเรีย รา ไวรัส หรือแม้กระทั่งปรสิต ยกตัวอย่างเช่น เปปไทด์ Defensin เป็นเปปไทด์ที่พบว่ามีความสามารถในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคจำพวกแบคทีเรีย พบว่าในโครงสร้างประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิด อาร์จินีน 25% และซิสเทอีน 3.5% สามารถทำลายแบคทีเรียแกรมลบชนิด *Escherichia coli* ซึ่งกลไกการทำลายอยู่ในบริเวณ cytoplasmic membrane ของเซลล์แบคทีเรีย โดยการทำให้เกิดลักษณะของรู (pore forming) cytoplasmic membrane ซึ่งจะทำให้เซลล์แบคทีเรียสูญเสียสมดุลการส่งเข้าออกของสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์และเกิดการตายในที่สุด Defensin เป็น AMPs ที่พบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดเช่น แมลง พืช สัตว์ และมนุษย์ เป็นต้น

สมบัติของ Antimicrobial peptides ที่มีความจำเพาะต่อการเข้าทำลายเชื้อก่อโรค

Conformation

เปปไทด์จำนวนมากที่มีสมบัติในการต้านเชื้อจุลินทรีย์มีความแตกต่างกันในส่วนของลำดับกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ พันธะเคมีที่เชื่อมต่อกันของกรดอะมิโนภายในโมเลกุล และแรงที่ปฏิสัมพันธ์กันกับโมเลกุลของสารที่ล้อมรอบ จึงทำให้เปปไทด์ต้านจุลินทรีย์นี้ถูกจัดออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่มีโครงสร้างแบบ α -helix และกลุ่มที่มีโครงสร้างแบบ β -sheet นอกจากนี้ยังสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยโดยอาศัยลักษณะของโครงสร้างได้อีก เช่น จำแนกตามการมีหมู่อะมิโนบางหมู่ที่มีความหนาแน่นมากกว่าหมู่อื่นๆภายในโมเลกุล เช่น การมีอะมิโน proline, arginine หรือ tryptophan เปปไทด์ที่มีโครงสร้างแบบ α -helix นั้นจะสามารถฟอร์มโครงสร้างได้เมื่ออยู่ในสิ่งแวดล้อมที่เป็น Hydrophobic หรือเกิดโครงสร้างที่ถูกเหนี่ยวนำมาจากคุณสมบัติของความเป็นประจุของผนังเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ ในกรณีของโครงสร้างแบบ β -sheet มีคุณสมบัติคล้ายกับ α -helix คือมีความเป็น amphiphatic ซึ่งจะมีความแตกต่างของสมบัติที่เป็นทั้ง Hydrophobic และ Hydrophilic ในโมเลกุล



Charge

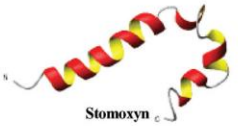
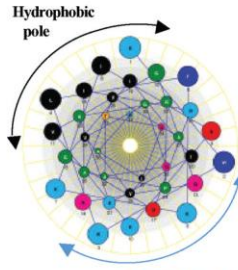
Antimicrobial peptides โดยทั่วไปจะมีประจุบวกอยู่ระหว่าง +2 ถึง +9 ซึ่งความสำคัญของประจุสุทธิที่มีส่วนช่วยให้เปปไทด์เข้าไปสร้างแรงดึงดูดทางไฟฟ้ากับเยื่อเซลล์ด้านนอกของเชื้อจุลชีพเฉพาะที่มีสมบัติเป็นลบ โดยเมมเบรนนั้น ๆ จะประกอบด้วยฟอสโฟลิปิดชนิด Phosphatidylglycerol (PG), Phosphatidylserine (Ps) และ Cardiolipin (CL) และสามารถสร้างแรงดึงดูดทางไฟฟ้ากับเซลล์เมมเบรนด้านนอกของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบเนื่องจากมี LPS และ Teichoic หรือ Teichuronic ซึ่งเรียกได้ว่าเป็นกลไกเริ่มต้นในการเข้าทำลายเชื้อแบคทีเรีย

Hydrophobic propertie

เปปไทด์ที่มีองค์ประกอบเป็นกรดอะมิโน R-side chain ขนาดยาว หรือมีหมู่อะมิโนที่มีความยาวเป็น aromatic ring จะมีความเป็น Hydrophobic ซึ่งสามารถเข้าไปยึดและเกาะกับผนังเซลล์ของเชื้อจุลชีพได้ดี

ตารางที่ 3 แสดงตัวอย่างเปปไทด์ที่มีการเข้าทำลายเชื้อจุลชีพ

(Bulet et al, AMPs from invertebrates to vertebrates, 2004)

	Origin	Organism	Name	Activity	Primary structure	3D structure
Invertebrates	Arthropods	Silk moth <i>Hyalophora cecropia</i>	Cecropin A	B	KWLFKKIEKVGQNIRDGIIKAGPAVAVVGQATQIAK*	 Stomoxyn  Hydrophobic pole Hydrophilic pole Typical amphipathic α-helix  Magainin
		Mosquito <i>Anopheles gambiae</i>	Cecropin A	B, F, Y	GRLKKLGKKIEGAGKRVFKAAEKALPVVAGVKAL*	
		Stable fly <i>Stomoxys calcitrans</i>	Stomoxyn	B, F, Y, T	RGFRKHFNKLVKVKHTISETAHVAKDTAVIAGSGAAVV AAT*	
		Fire ant <i>Pachycondylas goeldii</i>	Ponericin G1	B, H, I	GWKDWAKKAGWLKKKGPGMAKAAALKAAMQ	
		Termite <i>Pseudacanthotermes spiniger</i>	Spinigerin	B, F, Y	HVDKKVADKVLKQLRIMRLTRL	
		Spider <i>Oxyopes kitabensis</i>	Oxyopin 1	B, H, I	FRGLAKLLKIGLKSFAVLKVLKPAKAKAGKALA KSMADENAIRQQNQ	
		Spider <i>Cupiennius salei</i>	Cupiennin 1	B, H, I	GFGALFKFLAKKVAKTVAQAAKQGAQYVVNKQME*	
Vertebrates	Procordates	Ascidian <i>Styela clava</i>	Clavanin A	B	VFQFLGKI IHHVGNFVHGFSHFV*	
			Styelin D	B, H, C	GW ¹ LR ² K ² AAK ² SVGK ² FY ³ Y ³ K ² HK ⁴ Y ³ IK ⁴ AAWQIGKHAL*	
	Fishes	Sole <i>Pardachirus pavoninus</i>	Pardaxin P-I	B	GFFALIPKIISSPLFKTLSSAVGSALSSSGEQE	
		Mudfish <i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	Misgurin	B, F, Y	RQRVEELSKFSKKGAAARRRK	
		Flounder <i>Pleuronectes americanus</i>	Pleurocidin	B	GWGSFFKKAHVKGKVGKAAALTHYL	
		Catfish <i>Parasiburus asotus</i>	Parasin I	B, Y	KGRGKQGGKVRKAKTRSS	
		Rainbow trout <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Oncorhycin II	B	KAVAAKSPKKAKKATPKAAKSPKKVKKPAAAA KKAASPKKATKAAKPKAAKPKAAKAAKPKKK	
		White bass <i>Morone chrysops</i>	Moronecidin	B, F, Y	FFHHIFRGIVHVGKTIHKLVTG	
	Amphibians	Clawed frog <i>Xenopus laevis</i>	Magainin I	B, F	GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKS	
		Common frog <i>Rana temporaria</i>	Temporin A	B, F, H	FLPLIGRVLSGIL*	
	Mammals	Human <i>Homo sapiens</i>	Cathelicidin hCAT-18/LL-37	B, L	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES	
		Bovine <i>Bos taurus</i>	Indolicidin	B	ILPWKWPWWPWR*	

กลไกการตายของเซลล์โดยเปปไทด์ด้านเชื้อจุลชีพ

หลังจากที่เปปไทด์ได้ก่อให้เกิดความเสียหายและความผิดปกติต่าง ๆ ของเซลล์ เช่น การทำให้เกิดความเสียหายต่อผนังเยื่อเซลล์ เสีย Membrane fluidity ของเยื่อเซลล์ เสียสมดุลระหว่างไอออนต่างๆ



สูญเสียสารชีวเคมีต่าง ๆ ภายในเซลล์ โดยซึมผ่านออกนอกเซลล์ หรือเกิดการแตกของเซลล์ ทำให้เซลล์ตายในที่สุด

ในการออกแบบเปปไทด์ต้านเชื้อจุลชีพเพื่อให้มีฤทธิ์และคุณสมบัติที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้งานนั้น จำเป็นจะต้องทราบรายละเอียดของเปปไทด์ในระดับโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับกลไกการเข้าทำลายเชื้อจุลชีพ เปปไทด์ต้านเชื้อจุลชีพมีกลไกการเข้าทำลายเชื้อจุลชีพอยู่สองแบบหากแบ่งตามการมี หรือไม่มีตัวรับบนผิวของผนังเซลล์ นั่นคือกลุ่มที่ใช้ตัวรับ (Receptor-mediated mode) และกลุ่มที่ไม่มีตัวรับบนผนังเซลล์ (Nonreceptor-mediated mode) กลุ่มของเปปไทด์ที่ไม่ใช้ตัวรับ ที่พบมากที่สุดคือเปปไทด์ประเภทที่มีประจุบวก (Cationic peptides) ซึ่งมีเป้าหมายเข้าจับกับประจุลบบนเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อจุลชีพ เมื่อเปปไทด์สะสมและฟอร์มตัวจับกลุ่มกันอยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์จนถึงระดับหนึ่งที่ค่าความเข้มข้นเหมาะสม จะสามารถจัดเรียงตัวโมเลกุลให้สามารถเกิดการสร้างรูบนเยื่อหุ้ม ทำให้เกิดรูรั่ว หรือส่งผลเกิดการซึมผ่านได้ของเยื่อเซลล์จุลชีพ สารต่าง ๆ ในเซลล์จะสามารถรั่วออกมาภายนอกเซลล์ได้ และส่งผลให้เซลล์ตายในที่สุด แบบจำลองของการเกิดกลไกดังกล่าว นักวิทยาศาสตร์ได้ค้นพบ และเผยแพร่อยู่อย่างกว้างขวาง เพื่อใช้อธิบายกลไกการสร้างรูรั่วของเปปไทด์ต้านเชื้อจุลชีพโดยเรียกตามรูปร่างของการเกิดรู แบบจำลองที่เป็นที่ยอมรับมากที่สุด 3 แบบ คือ Barrel-Stave Model, Toroidal Pore Model และ Carpet Model (Oren and Shai 1998; Shai 2002; Park and Hahm 2005; Straus and Hancock 2006)

การทำให้เกิดรูรั่วของเยื่อเซลล์จุลชีพ สามารถอธิบายได้คร่าว ๆ ดังนี้ เริ่มต้นจากบริเวณภายนอกของเยื่อเซลล์จุลชีพ เปปไทด์จัดเรียงตัวในลักษณะสมมาตรระหว่างโมเลกุลเดี่ยว ๆ และโมเลกุลของเปปไทด์ที่ล่องลอยอยู่สภาวะไร้โครงสร้าง เมื่อเปปไทด์เหล่านี้จับกับเยื่อเซลล์จุลชีพ เปปไทด์จะม้วนพับและมีโครงสร้างในระดับทุติยภูมิที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ โดยเปปไทด์ส่วนใหญ่จะวางตัวขนานไปบนเยื่อเซลล์ในรูปของโมเลกุลเดี่ยว หรือในรูปแบบของกลุ่มโมเลกุล และเมื่อความเข้มข้นของเปปไทด์เพิ่มสูงขึ้นจนถึงอัตราส่วนของเปปไทด์ต่อลิปิด (องค์ประกอบของเยื่อหุ้ม) ที่เหมาะสม เปปไทด์เปปไทด์จะเริ่มวางตัวตั้งฉากกับเยื่อเซลล์ และแทรกตัวเข้าไปยังด้านในของเยื่อเซลล์ ยกตัวอย่าง เปปไทด์ Alamethicin ที่สามารถแทรกตัวผ่านเยื่อเซลล์ชั้นนอก เข้าไปสู่เยื่อเซลล์ชั้นในได้ โดยการจัดเรียงเปปไทด์หลาย ๆ โมเลกุลในอยู่ในลักษณะรูปถังน้ำ (Barrel-Stave structure) ซึ่งมีลักษณะตรงกลางเป็นรู และนอกจากนั้นยังมีเปปไทด์อีกหลายชนิด เช่น Magainin หรือ Melittins ที่สามารถเหนี่ยวนำให้เยื่อเซลล์เสียรูปร่างและมีการสร้างรูที่เกิดจากการเรียงตัวของเปปไทด์ที่ไร้ระเบียบในชนิด Toroidal Pore structure ส่วนที่มีรูในกรณีนี้เกิดจากส่วนหัวของลิปิด (Hydrophilic) กับเปปไทด์เรียงตัวไปด้วยกัน และการเพิ่มความเข้มข้นของเปปไทด์บางครั้งอาจจะนำไปสู่การสลายตัวของเยื่อเซลล์ให้หลุดออกเป็นลักษณะไมเซลล์เล็ก ๆ ซึ่งเรียกว่า กลไกแบบปูพรม Carpet Model (Bechinger and Lohner 2006) นอกจากการสร้างรูแล้ว เปปไทด์ต้านเชื้อจุลชีพบางชนิด เช่น Defensin สามารถแทรกผ่านเยื่อเซลล์และเข้าไปทำรบกวนและอันตรกิริยาบางอย่างกับสารภายในเซลล์ได้ เช่น โปรตีน หรือ ดีเอ็นเอ ภายในเซลล์ทำให้เกิดความผิดปกติในการทำงานของเซลล์ส่งผลให้เซลล์ตายในที่สุด (Hadjicharalambous and Sheynis et al., 2008; Kouno and Mizuguchi et al., 2009)



เพื่อเข้าใจการทำงานของเปปไทด์ด้านจุลชีพแต่ละตัวอย่างลึกซึ้ง และนำความรู้ดังกล่าวไปใช้ในการออกแบบเปปไทด์สังเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพในการด้านจุลชีพนั้น จำเป็นจะต้องทราบสถานะของเปปไทด์ทั้งที่เสถียรและไม่เสถียรในทางเทอร์โมไดนามิก ยกตัวอย่างเช่น สถานะของเปปไทด์ต่อคุณสมบัติของลิปิดของเยื่อเซลล์ หรือการเป็นโครงสร้างผสมระหว่างเปปไทด์และลิปิด (Toroidal pore) และต้องทราบปัจจัยที่ทำให้เกิดพลวัตร หรือการเปลี่ยนแปลงของสถานะของเปปไทด์อีกด้วย

กลไกการเข้าทำลายของเปปไทด์ด้านจุลชีพ

กลไกการเข้าทำลายเชื้อจุลชีพของ AMPs แบ่งออกเป็น 3 ระยะได้แก่

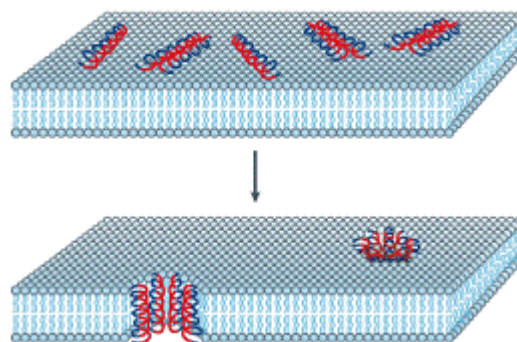
- Initial peptide interaction with membrane and membrane target

เกิดแรง Electrostatic interaction ระหว่าง cationic peptide ซึ่งมีประจุสุทธิเป็นบวกและ LPS ที่เยื่อหุ้มของเชื้อจุลชีพที่มีประจุสุทธิเป็นลบทำให้เกิดการเหนี่ยวนำให้เข้ามาหากันของทั้งสอง ในกระบวนการเกิดแรงระหว่างกันนี้จะต้องไม่มีอะไรมาขัดขวางการเข้ายึดกันระหว่างเปปไทด์ที่เยื่อเซลล์ด้วย

- Events subsequent initial membrane binding

ในขั้นนี้จะเกิดรูปแบบของกลไกการทำลายเชื้อจุลชีพใน 3 ลักษณะ คือ

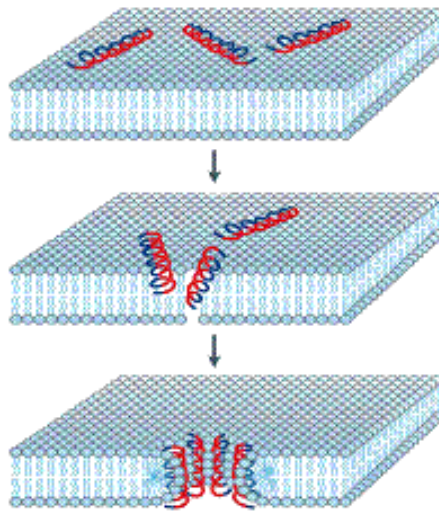
1. The Barrel-Stave Mechanism ซึ่งจะเกิดขึ้นหลังจากที่ α -helix หรือ β -sheet ของ peptide เกิดแรงยึดเหนี่ยวและอยู่บนผนังด้านนอกของเชื้อจุลชีพ จากนั้นจะใช้สมบัติของโมเลกุลที่มีสมบัติเป็น Hydrophobic แทรกผ่านชั้นเมมเบรนจากผนังด้านนอกเข้าสู่ส่วนเยื่อหุ้มด้านในของเชื้อจุลชีพ เนื่องจากผนังด้านในของเชื้อจุลชีพเหล่านี้จะมีส่วนประกอบที่เป็น Phosphatidylglycerol (PG), Phosphatidylserine (Ps) และ Cardiolipin (CL) จะเกิดอันตรกิริยาของแรงทางไฟฟ้าซึ่งช่วยยึดเปปไทด์ไว้บนเมมเบรน



ภาพที่ 2 การทำงานของเปปไทด์ด้านจุลชีพในรูปแบบ Barrel stave model บริเวณส่วน hydrophobic แสดงสีแดง และ ส่วนของ hydrophilic ของเปปไทด์แสดงสีน้ำเงิน ส่วนของ hydrophobic จะพอร์มตัวกันอยู่ด้านในของรู และส่วน hydrophobic จัดตำแหน่งอยู่บริเวณแกนของลิปิด (core of lipid) (Brogden Kim A., 2005)

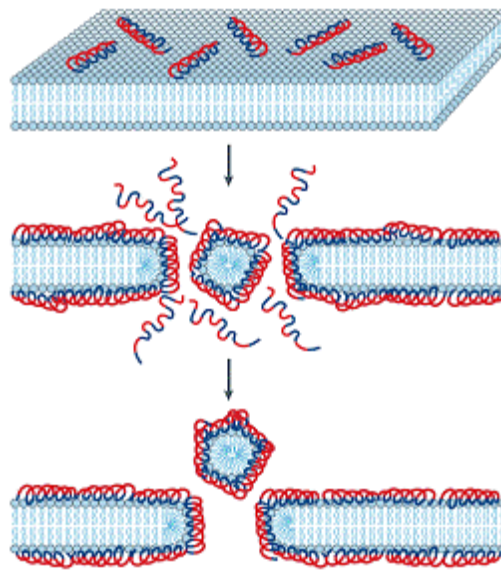


2. The Toroidal Pore or Wormhole Mechanism เกิดในลักษณะที่คล้ายกับ The Barrel-Stave Mechanism แต่จะแตกต่างกันตรงที่มีการรวมกลุ่มเป็น supramolecular หรือ toroidal pore complex จากนั้นจะเข้ายึดที่ผิวเยื่อหุ้มของเชื้อจุลชีพและใช้ความเป็น Hydrophobic ภายในโมเลกุลแทรกตัวเข้าไปยังชั้นในของเยื่อหุ้ม ในขณะเดียวกันก็จะเกิดการผลักกันระหว่างโมเลกุลของเปปไทด์ทำให้เกิดเป็นรู (pore) ที่เยื่อหุ้ม ลักษณะนี้จะเกิดบริเวณเยื่อหุ้มที่มี Trans membrane protein อยู่ค่อนข้างน้อย



ภาพที่ 3 การทำงานของเปปไทด์ต้านจุลชีพในรูปแบบ Toroidal pore model บริเวณส่วน hydrophobic แสดงสีแดง และ ส่วนของ hydrophilic ของเปปไทด์แสดงสีน้ำเงิน ส่วนของ hydrophobic จะพอร์มตัวกันอยู่ด้านในของรู และส่วน hydrophobic จัดตำแหน่งอยู่บริเวณแกนของลิพิด (core of lipid) (Brogden Kim A., 2005)

3. The Carpet Mechanism เป็นกลไกที่ไม่มีความจำเพาะ เมื่อโมเลกุลของเปปไทด์เกาะที่ผิวน้ำเยื่อหุ้มเซลล์ด้านนอกสะสมในลักษณะของการปูพรม แล้วจะเกิดการสอดแทรกของโมเลกุลเข้าสู่เยื่อหุ้มด้วยสมบัติของความเป็น Hydrophobicity ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ Membrane fluidity หรือขัดขวาง รบกวนการส่งสารผ่านเข้าออกเซลล์ ทำให้การทำงานของเซลล์ผิดปกติ



ภาพที่ 4 การทำงานของเปปไทด์ต้านจุลชีพในรูปแบบ Carpet model บริเวณส่วน hydrophobic แสดงสีแดง และ ส่วนของ hydrophilic ของเปปไทด์แสดงสีน้ำเงิน (Brogden Kim A., 2005)

ไลโปโซม หรือลิโฟโซม (Liposome)

ลิโฟโซม เป็นโครงสร้างของอนุภาค vesicle ขนาดนาโนเมตร (เส้นผ่าศูนย์กลางอยู่ที่ประมาณ 10-200 นาโนเมตร) ถูกค้นพบและนำมาใช้งานตั้งแต่ประมาณปี ค.ศ. 1970 เกิดจากการจัดเรียงตัวเป็นสองชั้น (Bilayer) ของโมเลกุลไขมันฟอสเฟต (Phospholipids) กรณีเมื่ออยู่ในน้ำ ลิโฟโซมที่มีอนุภาคขนาดเล็กมาก จะมีลักษณะเป็นถุงกลมๆ ของสารไขมันซึ่งส่วนใหญ่เป็นไขมันประเภท phospholipids ในสารละลายน้ำ โมเลกุลของสารไขมันประเภท phospholipids จะสามารถจัดเรียงตัวเป็นชั้นสลับกับชั้นโมเลกุลของน้ำในสารละลายน้ำได้ เพราะโครงสร้างของโมเลกุลประกอบด้วยทั้งส่วนมีขั้วและส่วนไม่มีขั้ว เมื่ออยู่ในน้ำจะจัดเรียงตัวโดยนำส่วนที่มีขั้วหรือมีประจุหันออกหาโมเลกุล น้ำ ในขณะที่เดียวกันจะเอาส่วนที่ไม่มีขั้วหันเข้าหาส่วนที่ไม่มีขั้วของโมเลกุลพวกเดียวกัน โดยจะอยู่ในลักษณะของการเรียงตัวเป็นแถวของโมเลกุลไขมันซ้อนกันเป็นสองชั้น หรือ lipid bilayer หากลิโฟโซมมี lipid bilayer เพียงชั้นเดียว จะจัดเป็นลิโฟโซมประเภท unilamellar หากลิโฟโซมมี lipid bilayer มากกว่าหนึ่งชั้น(โดยมีชั้นของสารละลายน้ำกั้นอยู่ระหว่างผนังสองชั้น) จัดเป็นลิโฟโซมประเภท multilamellar ซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 0.1 ไมโครเมตร (1000Å) สามารถนำมาเตรียมเป็นลิโฟโซมประเภท unilamellar ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยน้อยกว่า 0.1 ไมโครเมตร ได้ เนื่องจากลิโฟโซมมีส่วนประกอบและคุณสมบัติคล้ายคลึงกับ cell membrane ของสิ่งมีชีวิต ดังนั้นจึงมีการพัฒนาลิโฟโซมมาใช้เป็นตัวพาสารต่างๆ เช่น ยา เครื่องสำอาง เข้าสู่ร่างกาย อีกทั้งในด้านการวิจัยมีการสร้างแบบจำลองเยื่อเซลล์จากลิโฟโซม เพื่อใช้เป็นแบบจำลองแทนเซลล์จุลชีพมีชีวิตอีกด้วย ไม่ว่าจะเป็นในงานวิจัย

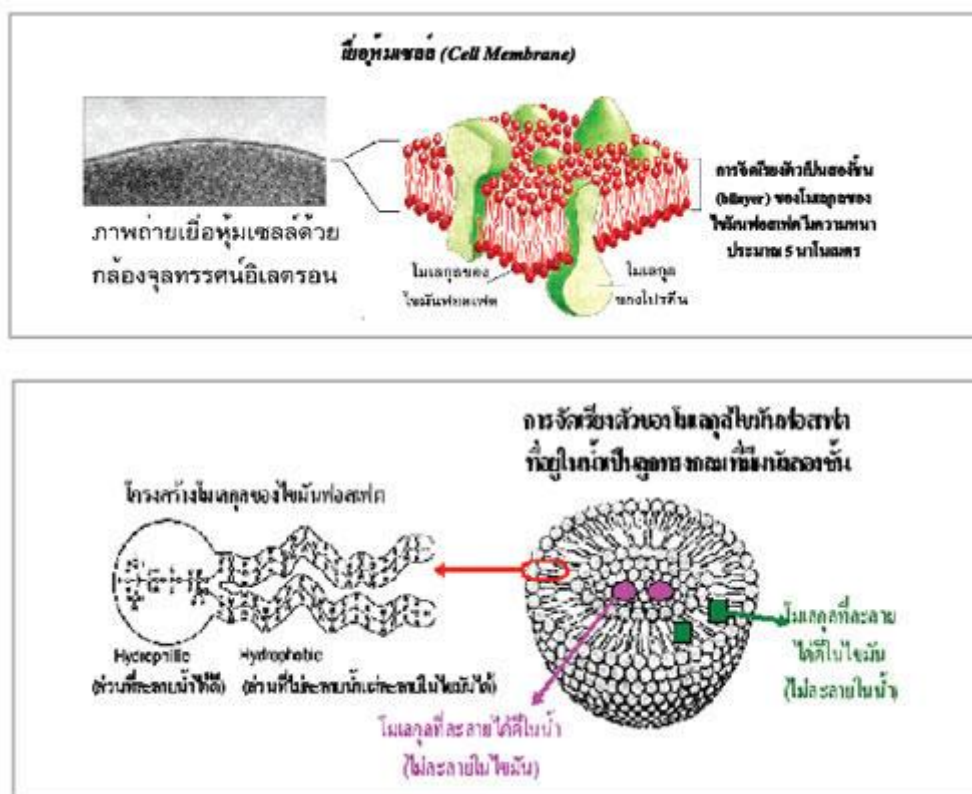


ทางด้านการศึกษากลไกการทำงานของสารตัวอย่าง การศึกษาผลทางเทอร์โมไดนามิคของสารตัวอย่างบนเยื่อเซลล์จำลอง เป็นต้น

ลิพโซมมีลักษณะได้หลายแบบ เช่น เป็นรูปทรงกลม ทรงรี ทรงลูกบาศก์ เป็นแผ่นพับไป-มา หรือรูปทรงหลายมิติ อาจจะประกอบด้วย bilayer ชั้นเดียว หรือหลายๆชั้น ขึ้นอยู่กับลักษณะของโมเลกุลไขมัน ฟอสเฟต อัตราส่วนของน้ำต่อไขมัน สารตัวเติม หรือวิธีการผลิตลิพโซม นอกจากนี้ ไขมันฟอสเฟตที่จะนำมาผลิตลิพโซมยังมีมากมายหลายร้อยชนิด ทั้งมีประจุเป็นบวก ประจุลบ และไม่มีประจุ อาจจะมีส่วนหางสายเดี่ยว สองหรือสามสาย และมีความสั้น-ยาวต่างๆ ดังนั้นเราจึงสามารถที่จะสร้างลิพโซมชนิดต่างๆ ให้เหมาะสมตามการใช้งาน

เยื่อหุ้มสังเคราะห์

เซลล์ชนิดต่าง ๆ ในร่างกายของคนหรือสัตว์จะมีเยื่อหุ้มเซลล์ (Cell membrane) เพื่อทำหน้าที่ปกป้องส่วนประกอบภายในเซลล์และเป็นทางผ่านสารเข้าออกของสารต่าง ๆ มีองค์ประกอบที่สำคัญคือ โมเลกุลของไขมันฟอสเฟตจัดเรียงตัวเป็นสองชั้น (Bilayer) คอเลสเตอรอล และโปรตีนที่แทรกอยู่ระหว่าง bilayer เพื่อทำหน้าที่เป็นประตูทางเข้าออกของสารต่าง ๆ รวมทั้งรับสัญญาณระหว่างเซลล์ตามธรรมชาติที่ไม่มีโปรตีนประกอบอยู่ด้วยนั่นเอง



ภาพที่ 5 ตัวอย่างลิพโซมชนิด bilayer ชั้นเดียว หรือ Unilamellar liposome มีการเรียงตัวของชั้นไขมันฟอสเฟตเป็นรูปทรงกลม

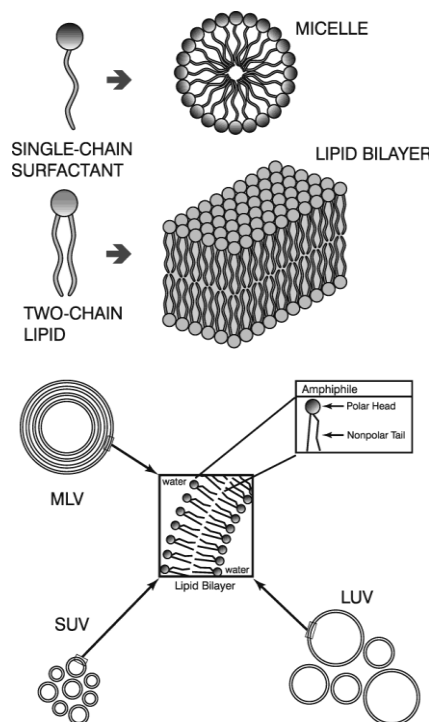


ประโยชน์และการใช้งานลิโปโซมต่องานวิจัย

ด้วยลักษณะและคุณสมบัติที่คล้ายเยื่อหุ้มเซลล์ตามธรรมชาตินี้เอง ส่งผลให้โมเลกุลของไขมันฟอสเฟตใน bilayer (ของทั้งลิโปโซมและเยื่อหุ้มเซลล์) สามารถเคลื่อนที่กลับไป-มา (flip-flop) ในระหว่างชั้นได้เอง ทำให้เกิดการแลกเปลี่ยน รวมตัว และพยายามจัดโครงสร้างใหม่ของโมเลกุลของไขมันฟอสเฟตที่เป็นองค์ประกอบของลิโปโซม จากคุณสมบัติหลายประการของลิโปโซม นักวิจัยส่วนมากจึงได้นำลิโปโซมมาใช้ในการงานวิจัย ไม่ว่าจะเป็น การนำลิโปโซมมาใช้ในการขนส่งสาร หรือขนส่งยาเข้าสู่ร่างกาย การนำมาใช้เป็นแบบจำลองในงานวิจัยโดยใช้เป็นตัวแทนของเยื่อเซลล์จุลชีพ เพื่อวิเคราะห์ และศึกษาการทำงานของสารตัวอย่าง เช่น การศึกษากลไกการเข้าทำลายบนเยื่อเซลล์ของเปปไทด์ต้านเชื้อจุลชีพ โดยในกรณีนี้ การเตรียมลิโปโซมจึงมีผลต่อการทำงานวิจัย ซึ่งขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของโมเลกุลฟอสเฟตที่ใช้ในการสร้างแบบเยื่อเซลล์จำลองด้วย

ข้อจำกัดของการใช้ลิโปโซม

ลิโปโซมจะมีความคงตัวค่อนข้างต่ำจึงเก็บรักษายาก และเปลี่ยนแปลงรูปร่างได้ง่ายเมื่อสิ่งแวดล้อมเปลี่ยนไป เนื่องจากไขมันฟอสเฟตแต่ละชนิดมีค่าอุณหภูมิในการเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้ว (Transition Temperature) ที่ไม่เท่ากัน และลักษณะที่เคลื่อนที่ไปมาตลอดเวลาของไขมันฟอสเฟต ทำให้ผลิตภัณฑ์ลิโปโซมมีราคาแพง



ภาพที่ 6 Hydration ของ Lipid Film/Cake (<http://www.avantilipids.com>)



3. แผนการดำเนินงานโครงการ

3.1 การเตรียมตัวอย่าง

ทำการวิจัยโดยสังเคราะห์เปปไทด์ได้แก่ HS-1 และอนุพันธ์ Cecropin like domain (CLD) และ Defensin like domain (DLD) จากบริษัท Pacific Science, USA แสดงลำดับกรดอะมิโนดังนี้

HS-1:

GWINEEKIQKKIDEKIGNNIGGMAKAVVHKLAKGEFQCVANIDTMGNCETHCQKTSGEKGFCHGKCKCGKPLSY

Cecropin like domain (CLD): GWINEEKIQKKIDEKIGNNIGGMAKAVVHKLAK

Defensin like domain (DLD): GEFQCVANIDTMGNCETHCQKTSGEKGFCHGKCKCGKPLSY(W)

หมายเหตุ*

จากการเตรียมเปปไทด์เพื่อใช้ในการทดลอง หลังจากการทำบริสุทธิ์โดยสกัดจากน้ำพิษของแมงป่อง ซึ่งในกระบวนการทำบริสุทธิ์เปปไทด์เกิดการสูญเสียปริมาณของเปปไทด์ ทำให้เปปไทด์ HS-1 มีปริมาณน้อยมาก ไม่เพียงพอต่อการนำมาทำการทดลอง ดังนั้นผู้วิจัยจึงแก้ปัญหาโดยการปรับเปลี่ยนการทดลอง โดยหันมาสนใจกลไกการทำงานของอนุพันธ์ทั้งสองส่วนของ HS-1 โดยทำการสังเคราะห์เปปไทด์ CLD และ DLD จากนั้นทำการทดลองโดยแสดงดังต่อไปนี้

3.2 Structural analysis of peptide

3.2.1 Circular dichroism (CD) (Monica S. Freitas et al, 2007; Narinder Sanghera et al, 2009.)

เตรียมเปปไทด์ (CLD และ DLD) ความเข้มข้น 20 μ M เปรียบเทียบใน 3 สภาวะ ได้แก่ 10 mM NaHPO₄ pH 7.4, 30% TFE และลิโปโซม 1 mg/ml DMPG/PC (50:50) ใช้ cuvette ชนิด silica cuvette ความกว้าง 0.1 mm ทำการวัดโครงสร้างในระดับทุติยภูมิด้วยเครื่อง J-715 spectropolarimeter ที่ความยาวคลื่น far-UV ในช่วง 190-260 nm, ความกว้างของ bandwidth 2 nm, 50 nm/min scan speed และควบคุมอุณหภูมิที่ 25 °C ทำการวิเคราะห์โครงสร้างระดับทุติยภูมิแต่ละชนิดของเปปไทด์ด้วย CD-Pro software (Vagt, T., O. Zschornig, et al. 2006)

3.3 การเตรียมเยื่อเซลล์จำลอง (Liposome preparation)

Large unilamellar vesicles (LUVs) สังเคราะห์จากฟอสโฟลิพิดที่เป็นองค์ประกอบหลักของเยื่อเซลล์จุลินทรีย์ ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของเยื่อเซลล์ทั่วไปของแบคทีเรีย (เนื่องจากเยื่อเซลล์พลาสมาเดียว (Eukaryote) มีความซับซ้อนมาก ไม่มีการวิจัยใดรองรับการเตรียมเยื่อเซลล์ในกลุ่มนี้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกที่จะศึกษากลไกเชิงลึกกับเยื่อเซลล์แบคทีเรีย) นำมาทำการสังเคราะห์ลิโปโซมด้วยวิธี Natural swelling lipid เป็นการเตรียม



ฟอสโฟลิพิดที่มีองค์ประกอบหลักของเยื่อเซลล์จุลินทรีย์ให้มีลักษณะการเรียงตัวเป็นแผ่นฟิล์มก่อน โดยใช้ nitrogen gas เพื่อกำจัดตัวทำละลาย ทำให้ฟอสโฟลิพิดอยู่ในลักษณะที่แห้งด้วย evaporator เป็นเวลาข้ามคืน เมื่อผ่านกระบวนการดังกล่าวจะ hydration ด้วย buffer เป็นมีลักษณะเป็น suspension (กรณีของการ trap fluorescence dye: ทำการนำ dye ที่ต้องการ trap ในลิโปโซมเดิมในขั้นตอนนี้) และผ่านกระบวนการ Freeze-Thaw ด้วย liquid nitrogen และ water bath เป็นจำนวน 4 ครั้ง เมื่อผ่านกระบวนการดังกล่าวเรียบร้อยแล้ว จะใช้เครื่องมือ Mini-extruder ในการทำให้เกิดจะได้ก้อนลิโปโซมเยื่อเซลล์สังเคราะห์ขนาด 100 nm - 10 μ m (LUVs) (Christoph Gelhaus et al. 2008)

3.4 การทดสอบการซึมผ่านได้ของเยื่อหุ้มเซลล์ (Membrane permeabilization)

การทดสอบการซึมผ่านได้ของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane permeabilization) นำลิโปโซมจำลอง (EYPG/PC (1:1)) ที่ทำการ trap ด้วยสารเรืองแสง calcein ที่มีคุณสมบัติทั่วไปคือ โมเลกุลของ calcein อยู่ใกล้กัน (ภายในก้อนลิโปโซม (LUV)) เมื่อถูกกระตุ้นด้วยคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า จะมีการให้พลังงานซึ่งกันและกัน ทำให้ไม่เกิดการเรืองแสง แต่หากก่อน LUV เกิดความผิดปกติจากการทำงานของเปปไทด์ และทำให้ calcein รั่วออกจากก้อน LUV และมีผลให้โมเลกุลของ calcein อยู่ห่างกัน ไม่สามารถให้พลังงานกันได้ calcein เมื่อถูกกระตุ้นจึงเกิดการเรืองแสงได้เนื่องจากมีพลังงานในโมเลกุลอยู่ ทำการนำ LUV ที่เตรียมแล้วลงในเอบเพนดอป วัดค่า Fluorescence ที่ Ex/Em 485/530 nm ที่นาที่ที่ 0 จากนั้นเติมเปปไทด์ CLD, DLD โดยมี Demaseptin เป็น positive control ที่ความเข้มข้น 20, 40 และ 80 μ l และวัดการซึมผ่านได้ของเยื่อเซลล์ด้วยเครื่อง Spectropolarimeter model J-715 (Jasco, Inc, USA) เปรียบเทียบการเกิด 100% leakage ด้วย 0.025% Triton X-100 วิเคราะห์ข้อมูลด้วยสมการ

$$\% \text{ calcein leakage} = 100 \times \left[\frac{F - F_0}{F_t - F_0} \right]$$

F = Average Intensity of peptides treat with liposome

F₀ = Average Intensity of liposome before treated by peptides

F_t = Average Intensity of liposome treat with TTX

เพื่อเป็นการศึกษากลไกในเชิงลึกของเปปไทด์มากขึ้น ผู้วิจัยได้เพิ่มเติมการทดลองบางส่วนให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์และสามารถอธิบายกลไกการทำงานของเปปไทด์ได้จริงด้วยการทดลองต่อไปนี้

3.5 Membrane fluidity โดย Fluorescence anisotropy

อาศัยคุณสมบัติของ Fluorescence dyes สองชนิด ได้แก่ DPH (Ex/Em 348/426 nm) และ TMA-DPH (Ex/Em 340/430 nm) ซึ่ง DPH มีคุณสมบัติคือ สามารถเข้าไปเป็นส่วนหนึ่งของชั้น hydrophobic ใน



ลิโปโซมของเยื่อเซลล์ได้ และ TMA-DPH สามารถจับอยู่บริเวณส่วนหัวของฟอสโฟลิปิดที่มีประจุเป็นบวก ซึ่งขั้นตอนการทดลองแสดงดังต่อไปนี้

เตรียม 500 μM DMPG/PC ซึ่งมี DPH หรือ TMA-DPH ในอัตราส่วน 10:500 จากนั้นนำตัวอย่างไปบ่มในที่มืด อย่างน้อย 1 ชั่วโมง ต่อมาทำการเติมเปปไทด์ที่ความเข้มข้นที่ต้องการเปรียบเทียบ (5, 10, 15, 20, 25, 30 μM) วัดค่า fluorescent intensity ด้วยเครื่อง fluorometer (Jasco-FP-6500, Tokyo, Japan) ทำการคำนวณค่า fluorescence anisotropy ดังสมการ

$$r = (I_{VV} - GI_{VH}) / (I_{VV} + 2GI_{VH})$$

ซึ่ง I_{VV} และ I_{VH} คือ fluorescence intensities ของแนว vertical และ horizontal ตามลำดับ ค่า G หรือ G factor คือ I_{HV}/I_{HH} (grating correction factor)

3.6 Isothermal Titration Calorimetry (ITC)

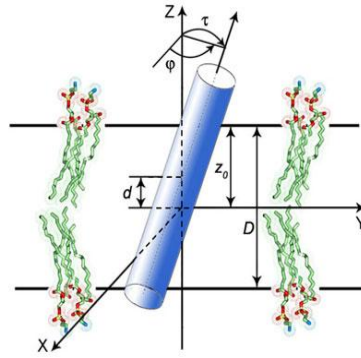
การทดสอบหาค่าการจับแน่นของเปปไทด์บนเยื่อเซลล์ลิโปโซม เป็นการวิเคราะห์หาค่าการจับแน่นของเปปไทด์โดยใช้เครื่อง ITC (nano-ITC2G, TA instruments) เพื่อวิเคราะห์พารามิเตอร์ทางเทอร์โมไดนามิก ซึ่งในที่นี้ ได้แก่ ค่า ΔH (reaction enthalpy), และ ค่า K_a (affinity constant) เป็นการทดลองเพื่อพิสูจน์ และวิเคราะห์เปรียบเทียบการทำงานของเปปไทด์ในเชิงเทอร์โมไดนามิก ซึ่งแสดงการทดลองดังต่อไปนี้

เตรียมเปปไทด์ความเข้มข้น 35 μM ปริมาณ 500 μl สำหรับ syringe และเตรียม SUVs (0.1mM DMPG/PC) ปริมาณ 1.8 ml สำหรับ sample cell ทำการ Inject เปปไทด์จาก syringe ลงไปในลิโปโซม (sample cell) 25 injections โดยการไทเทรตลงครั้งแรก 1.14 μl และครั้งต่อไปครั้งละ 10 μl (โดยกำหนดพารามิเตอร์ของเครื่อง ITC) วิเคราะห์ผลทางเทอร์โมไดนามิกด้วย Nano analyze software

3.7 ศึกษาและทำนายการเกิดกลไกจากเข้าทำลายเยื่อเซลล์ของเปปไทด์ด้วย Peptide simulation

เป็นการวิเคราะห์และศึกษาการทำงานของเปปไทด์บนเยื่อเซลล์เมมเบรนโดยโปรแกรม และข้อมูลทางคอมพิวเตอร์ ซึ่งเริ่มจากการเปรียบเทียบความเหมือนของเปปไทด์ (Peptide homology) จาก protein data bank เพื่อวิเคราะห์หาโครงสร้างที่ใกล้เคียงจากนั้นอาศัยข้อมูลของโครงสร้างต้นแบบในการทำนายลักษณะที่เกิดขึ้นบนเมมเบรน

ในขั้นตอนของการวิเคราะห์กลไกการทำงานของเปปไทด์ทั้งสอง ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Henry I. Mosberg และ Dr. Andrei L. Lomize จาก College of Pharmacy, University of Michigan ในการใช้โปรแกรมของทางกลุ่มวิจัยเพื่อวิเคราะห์ molecular modeling และ structural models จาก OPM data base ของ University of Michigan ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ ทำนายกลไกการทำงานของเปปไทด์ จะประกอบด้วยพารามิเตอร์ในการอธิบายผลดังต่อไปนี้



ภาพที่ 7 พารามิเตอร์ peptide simulation (Henry I. Mosberg, Dr. Andrei L.Lomize)

d , shift along the bilayer normal : ระยะห่างของจุดศูนย์กลางของ bilayer และจุดศูนย์กลางของเปปไทด์ในแกน Z

D , hydrophobic thickness ($D=2z_0$): ระยะความลึกของเปปไทด์ที่แทรกตัวลงไปบนเยื่อเมมเบรน

ϕ , rotation angle : ขนาดมุมที่เกิดขึ้นจากการแทรกตัวของเปปไทด์บนเยื่อเมมเบรน

T , tilt angle : ขนาดมุมของการโน้มเอียงของเปปไทด์เมื่อวางตัวอยู่บนเยื่อเมมเบรนตัดกับแกน Z



4. ผลการดำเนินงาน

ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ของเปปไทด์ (HS-1 N- and C-termini) ในส่วนที่มีคุณสมบัติคล้าย defensin และส่วนของ cecropin ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนดังนี้

Cecropin like domain (CLD): GWINEEKIQKKIDEKIGNNILGGMAKAVVHKLAK

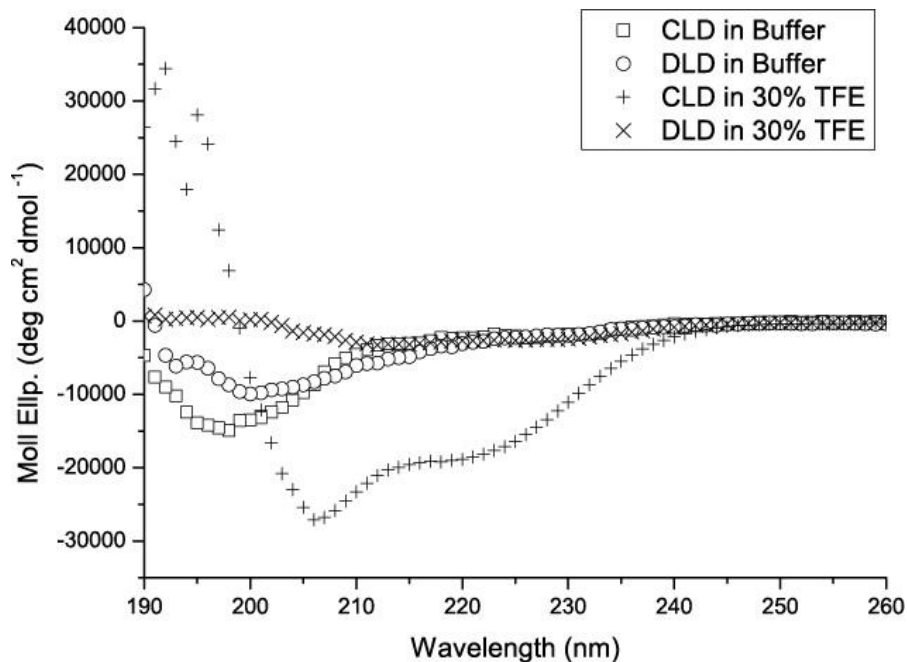
Defensin like domain (DLD): GEFQCVANIDTMGNCETHCQKTSGEKGFCHGKCKCGKPLS

จากนั้นทดสอบสมบัติทางโครงสร้างของ synthetic peptides ทั้งสอง แสดงผลการทดลองดังต่อไปนี้

4.1 Structural analysis of peptide

4.1.1 ศึกษาโครงสร้างระดับทุติยภูมิของเปปไทด์ (Circular dichroism)

จากการทดลองวิเคราะห์โครงสร้างระดับทุติยภูมิของเปปไทด์ทั้งสอง ในสภาวะที่แตกต่างกัน แสดงดังภาพที่ 8



ภาพที่ 8 กราฟแสดงผล Circular dichroism ของเปปไทด์ CLD และ DLD เปรียบเทียบใน 2 สภาวะ ได้แก่ สภาวะ 10 mM NaHPO₄ pH 7.4 และสภาวะเลียนแบบเยื่อเซลล์ 30% TFE ที่ 25 °C ทำการวัดค่า spectra ด้วยเครื่อง Jasco J-715 spectropolarimeter ในช่วง far-UV (190-260 nm)

ในสภาวะที่เป็นบัฟเฟอร์ (10 mM NaHPO₄ pH 7.4) เปปไทด์แสดงโครงสร้างระดับทุติยภูมิในลักษณะ β -sheet ทั้งใน CLD และ DLD ที่ตำแหน่งความยาวคลื่น 195-196 nm ในสภาวะจำลองเลียนแบบเยื่อเซลล์จุลชีพ (30% TFE) จากภาพพบว่า เปปไทด์ CLD มีลักษณะโครงสร้างระดับทุติยภูมิเป็น α -helix ที่ตำแหน่งความยาวคลื่น 208 และ 220 nm สำหรับเปปไทด์ DLD พบว่าไม่มีโครงสร้างใด ๆ



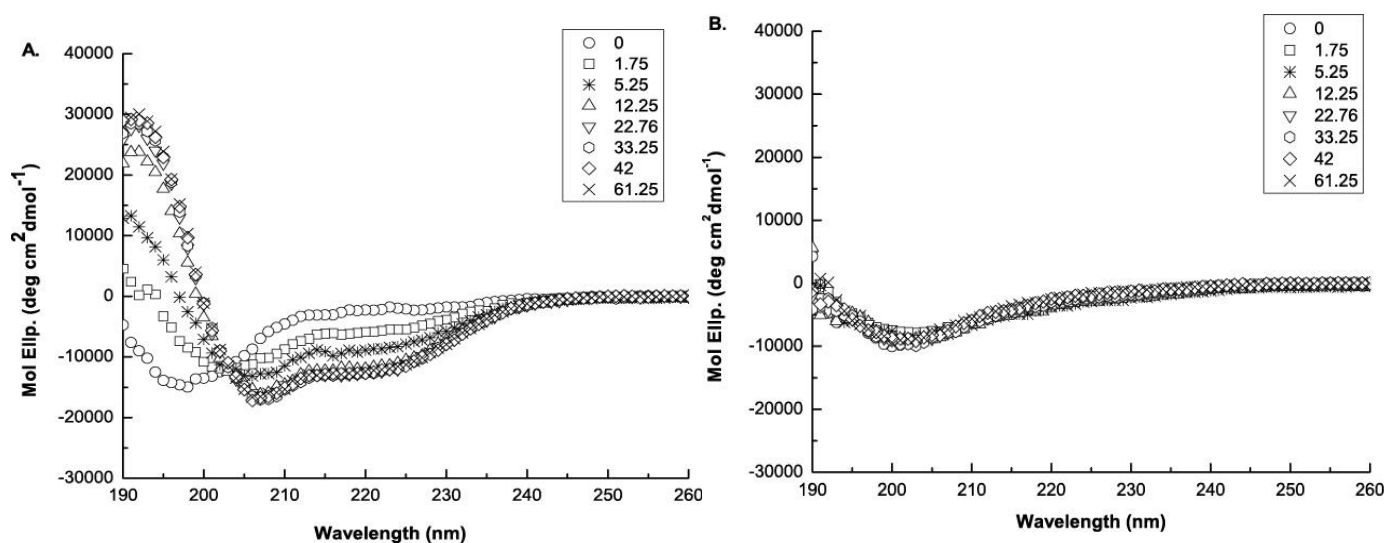
ตารางที่ 4 แสดงการวิเคราะห์ค่าเปอร์เซ็นต์โครงสร้างของเปปไทด์ CLD และ DLD ด้วยโปรแกรม CONTIN-LL program เปรียบเทียบในสภาวะ 10 mM NaHPO₄ pH 7.4 และสภาวะเลียนแบบเยื่อเซลล์ 30% TFE ที่ 25 °C ทำการวัดค่า spectra ด้วยเครื่อง Jasco J-715 spectropolarimeter ในช่วง far-UV (190-260 nm)

Condition	α -Helix	β -Sheet	Turn	Unordered
CLD in Buffer	6.4	31.2	23.4	39
DLD in Buffer	16.8	30.6	22.7	29.9
CLD in TFE	56	4.7	13.1	26.2
DLD in TFE	5.8	39.7	22.2	32.3

วิเคราะห์ปริมาณโครงสร้างระดับทุติยภูมิด้วย CONTIN-LL program จาก CD spectra แสดงผลดังตารางที่ 4 พบว่าเปปไทด์ CLD และ DLD ในสภาวะบัฟเฟอร์ มีโครงสร้าง β -Sheet มากที่สุด คือ 31.2% และ 30.6% กรณีที่เปปไทด์ CLD และ DLD อยู่ในสภาวะเลียนแบบเยื่อเซลล์ 30% TFE พบว่า CLD ประกอบด้วยโครงสร้างของ α -Helix ถึง 56% และพบว่า DLD มีโครงสร้างแบบ β -Sheet 39.7% เมื่ออยู่ใน 30% TFE จากผลการวิเคราะห์ปริมาณโครงสร้าง ซึ่งให้เห็นว่าเปปไทด์ CLD มีปริมาณโครงสร้างระดับทุติยภูมิแบบ α -Helix ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองภาพที่ 8 และเปปไทด์ DLD มีปริมาณโครงสร้างระดับทุติยภูมิแบบ β -Sheet

4.1.2 การเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเปปไทด์ด้วย CD titration assay

ทำการทดสอบโครงสร้างระดับทุติยภูมิของเปปไทด์ก่อนและหลังเกิดอันตรกิริยากับลิพโซม ด้วยเทคนิค Circular dichroism Titration ด้วยการ Titrate ลิพโซม (SUVs) DMPG/PC (50:50) เพื่อวิเคราะห์ผลของ anionic phospholipids (ลิพิดที่มีประจุลบ) ต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างที่มีผลต่อการทำงานของเปปไทด์ แสดงผลการทดลองดังภาพ

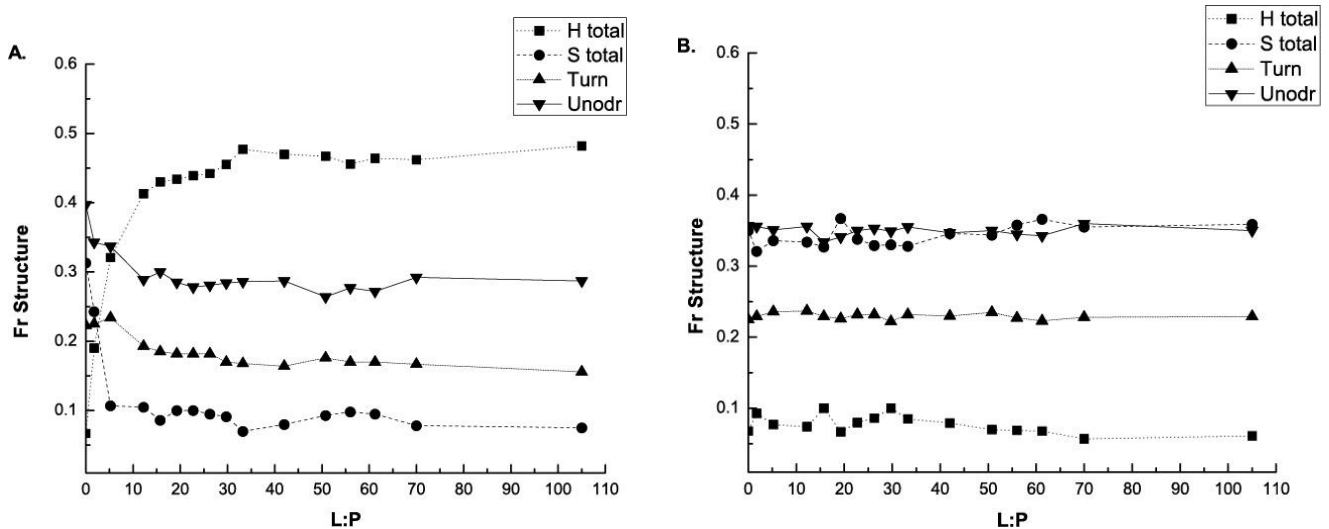


ภาพที่ 9 กราฟแสดงผล Circular dichroism titration ด้วย SUVs ลิโปโซม DMPG/PC (50:50) ของเปปไทด์ CLD (A) และ DLD (B) ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 20 μM ที่ 25 $^{\circ}\text{C}$ ทำการวัดค่า spectra ด้วยเครื่อง Jasco J-715 spectropolarimeter ในช่วง far-UV (190-260 nm)

ผลการทดลองพบว่า เปปไทด์ที่ความเข้มข้น 20 μM (L:P= 0) แสดงโครงสร้างระดับทุติยภูมิเป็น β -sheet ทั้งใน CLD และ DLD ที่ตำแหน่งความยาวคลื่น 195-196 nm เมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของ anionic phospholipids จากกราฟแสดงผล พบว่า เปปไทด์ CLD แสดงโครงสร้างทุติยภูมิในลักษณะ α -helix ที่ตำแหน่งความยาวคลื่น 208 และ 220 nm มากขึ้น ตามความเข้มข้นของลิพิดที่เพิ่มขึ้น (L:P เพิ่มขึ้น) แต่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงใด ๆ เกิดขึ้นในเปปไทด์ DLD จากผลการทดลอง แสดงให้เห็นว่า เปปไทด์ CLD เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง โดยการถูกเหนี่ยวนำโดย anionic phospholipids จากโครงสร้างลักษณะ β -sheet ไปเป็นโครงสร้างแบบ α -helix ซึ่งเป็นโครงสร้างที่เหมาะสมต่อการเข้าทำลายเยื่อเซลล์เมมเบรน (มีฟอสโฟลิพิดที่มีองค์ประกอบเยื่อเซลล์เป็นประจุลบ) เรียกได้ว่าเป็นขั้นตอนหนึ่งของการเข้าทำลายเยื่อเซลล์ของเปปไทด์ CLD ซึ่งไม่พบในเปปไทด์ DLD จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า anionic phospholipids สามารถเหนี่ยวนำให้เปปไทด์ CLD เปลี่ยนแปลงโครงสร้างจาก β -sheet ไปเป็นโครงสร้างแบบ α -helix ได้ แต่ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงใด ๆ กับเปปไทด์ DLD

4.1.3 Secondary structure composition

วิเคราะห์ปริมาณโครงสร้างระดับทุติยภูมิแต่ละชนิด ด้วยโปรแกรม CONTINLL เพื่อเปรียบเทียบลักษณะโครงสร้างของเปปไทด์ CLD และ DLD จากการทดลอง Circular dichroism Titration แสดงผลดังภาพ



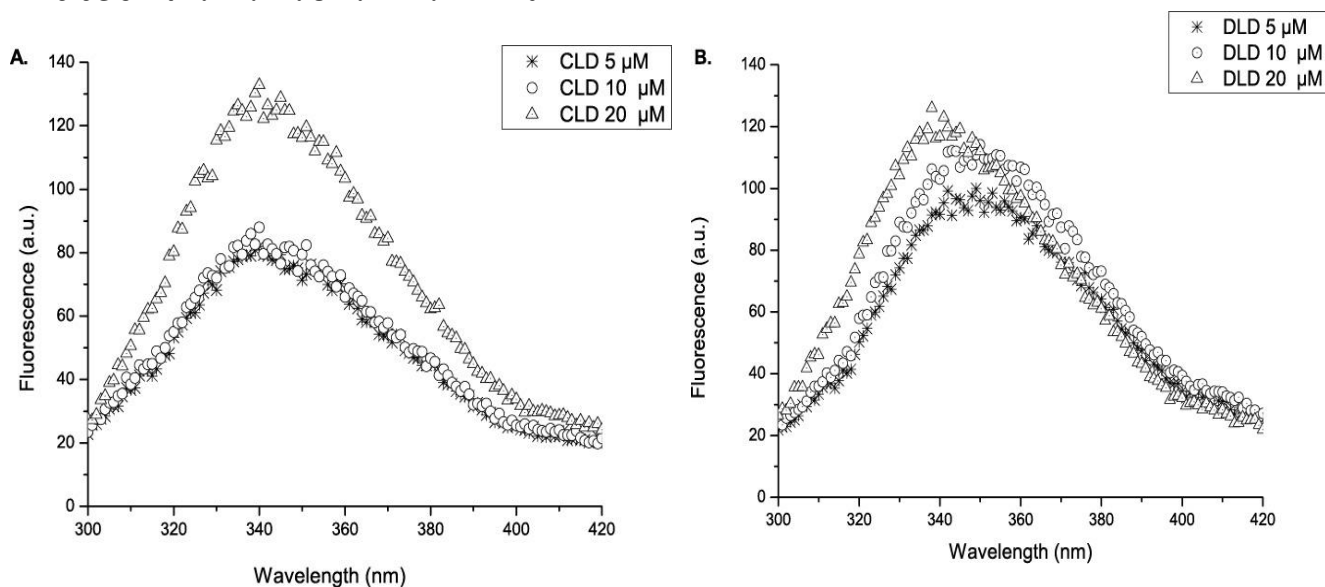
กราฟที่ 1 กราฟแสดงผล Secondary structure composition ด้วยโปรแกรม CONTINLL จากการไทเทรต SUVs ลิโปโซม DMPG/PC (50:50) พล็อตระหว่างร้อยละของโครงสร้าง ต่ออัตราส่วนความเข้มข้นของ L:P เปปไทด์ CLD (A) และ DLD (B) ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 20 μ M อุณหภูมิ 25 $^{\circ}$ C วัดค่า spectra ด้วยเครื่อง Jasco J-715 spectropolarimeter ช่วง far-UV (190-260 nm); α -Helical (H total), β -sheet (S total), β -turn (Turn), และ random coil (Unodr)

จากกราฟผลการทดลอง พบว่าเปปไทด์ CLD ที่ความเข้มข้นของ anionic phospholipids เป็น 0 (L:P = 0) มีลักษณะของโครงสร้างแบบ β -sheet สูงที่สุดที่ 40% และมี 10% α -Helical และเมื่อมีการไทเทรต anionic phospholipids เพิ่มขึ้น ค่า L:P เพิ่มขึ้น พบว่า เปปไทด์ CLD มีร้อยละของโครงสร้างระดับทุติยภูมิแบบ α -Helical เพิ่มขึ้นถึง 50% (L:P = 33) สำหรับเปปไทด์ DLD พบว่า ที่ค่าอัตราส่วน L:P = 0 ค่าร้อยละของโครงสร้างในระดับทุติยภูมิที่ β -sheet (S total) และ random coil มีค่าใกล้เคียงกัน อยู่ที่ 35% และ เมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของ anionic phospholipids ไม่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างใด ๆ ในสภาวะดังกล่าว จากผลการทดลอง แสดงให้เห็นว่า เปปไทด์ CLD เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง โดยการถูกเหนี่ยวนำโดย anionic phospholipids จาก β -sheet ไปเป็นโครงสร้างแบบ α -helix ซึ่งเป็นโครงสร้างที่เหมาะสมต่อการเข้าทำลายเยื่อเซลล์เมมเบรน (มีฟอสโฟลิปิดที่มีองค์ประกอบเยื่อเซลล์เป็นประจุลบ) เรียกได้ว่าเป็นขั้นตอนหนึ่งของการเข้าทำลายเยื่อเซลล์ของเปปไทด์ CLD ซึ่งไม่พบในเปปไทด์ DLD



4.2 Tryptophan blue shift assay

ทดสอบการหาค่าการเกิดการ Shift ของ Fluorescence intensity ของ Intrinsic fluorescence dye, Tryptophan (W) ที่มีคุณสมบัติพิเศษที่สามารถเรืองแสง Fluorescence เมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่เป็น hydrophobic environment ได้ที่ค่า excitation 280 nm และ emission ที่ 350 nm ผู้วิจัยได้นำคุณสมบัติพิเศษของ Intrinsic fluorescence dye นี้มาใช้ในการทดลองเพื่อวิเคราะห์ว่า เปปไทด์ Cecropin-like domain และ Defensin-like domain ที่มีกรดอะมิโน W เป็นองค์ประกอบ หากอยู่ในสภาวะ hydrophobic (มิลิโพโซม PG:PC / 1:1 เป็นองค์ประกอบ) จะเกิดการเปลี่ยนแปลงของค่า Fluorescence intensity โดยการทดลองจะกำหนดสองสภาวะเพื่อเปรียบเทียบการเกิดปรากฏการณ์ จาก red-shift ไปเป็น blue-shift ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 10



ภาพที่ 10 แสดง Fluorescence intensity ของเปปไทด์ CLD และ DLD เมื่ออยู่ในสภาวะที่ hydrophobic (PG:PC/ 1:1)

ตารางที่ 5 แสดงค่า Fluorescence intensity ที่วัดได้จากเครื่อง Spectrofluorometer เพื่อวิเคราะห์การเกิดTryptophan Blue-shift assay

Domain	HEPES buffer (nm)	Concentration of Peptide		
		in DOPG:DOPC		
		5 μ M	10 μ M	20 μ M
CLD	350	333 (17)	334 (16)	330 (20)
DLD	350	338 (12)	344 (6)	352 (2)



จากตารางแสดงค่า Fluorescence intensity ที่วัดได้เปรียบเทียบกับสถานะที่มี เฉพาะ buffer กับ peptide และสถานะที่มีลิโปโซม PC:PG/ 1:1 กับ peptide พบว่า สถานะที่มีเฉพาะ buffer กับ peptide ค่าของ Fluorescence intensity อยู่ที่ 350 และสถานะที่มีลิโปโซม PC:PG/ 1:1 กับ peptide ค่า Fluorescence intensity แสดงดังตารางที่ 5 ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงจาก 350 buffer ซึ่งขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเปปไทด์ แสดงให้เห็นว่าเมื่อสิ่งแวดล้อมเปลี่ยน อันตรกิริยาระหว่างเปปไทด์กับสิ่งแวดล้อมนั้น ๆ จะเปลี่ยนแปลงตามไปด้วย จากผลการทดลองพบว่าเกิดการ Shift จากค่า Fluorescence intensity red-shift ไปเป็น blue-shift ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเปปไทด์เมื่ออยู่ในสิ่งแวดล้อมที่เป็น Hydrophilic (buffer) จะแสดงค่า Fluorescence intensity ที่เป็น Red-shift แต่เมื่อเปปไทด์อยู่ในสิ่งแวดล้อมที่เป็นลิโปโซม เปปไทด์จะแสดงค่า Fluorescence intensity ไปในทางที่ลดลง หมายถึงเป็น blue-shift แสดงว่าเปปไทด์ อยู่ในสถานะที่เป็น Hydrophobic จากการทดลองชี้ให้เห็นว่า เปปไทด์ CLD และ DLD เกิดการเปลี่ยนแปลงค่า blue-shift ได้เมื่ออยู่ในสิ่งแวดล้อมที่เป็นลิโปโซม แสดงให้เห็นว่าเปปไทด์แสดงอันตรกิริยากับลิโปโซม PG:PC ตัวแทนเยื่อเซลล์จำลองได้

4.3 Calcein leakage assay

ผู้วิจัยได้ทดสอบการเกิดการรั่วของสารเรืองแสงจากผลของเปปไทด์ cecropin (CLD) และ defensin-like domain (DLD) โดยทำการสร้าง liposome ที่มีลักษณะและองค์ประกอบของเยื่อเซลล์คล้ายกับเยื่อเซลล์แบคทีเรียทั่วไป จากการศึกษาข้อมูลเพื่อทำการจำลองเยื่อเซลล์แบคทีเรียผู้วิจัยได้อาศัยคุณสมบัติของไขมัน หรือ phospholipid ในการจับและรวมตัวกัน ให้มีลักษณะเป็นก้อนกลม ขนาด $0.2\mu\text{m} - \sim 1\mu\text{m}$ (LUV: Large Unilamellar Vesicle) และ trap สารเรืองแสง (calcein) ไว้ภายใน โดยกระบวนการของการเตรียมถูกประยุกต์มาจาก Christoph Gelhaus และคณะ ปี 2008 ผลการทดลองแสดงดังต่อไปนี้

ทำการจำลองเยื่อเซลล์แบคทีเรีย ชนิด LUV ขนาด $\sim 1\mu\text{m}$ ซึ่งทำการ trap สารเรืองแสง (calcein) ไว้ภายในจากนั้นนำไปทดสอบกับเปปไทด์ โดยเติมเปปไทด์ความเข้มข้นต่างๆ และทำการวัดค่าความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence intensity) โดยอาศัยคุณสมบัติของสารเรืองแสง calcein ซึ่งเมื่อ โมเลกุลของ calcein อยู่ใกล้กัน (ภายในก้อน LUV) จะมีการให้พลังงานซึ่งกันและกัน เมื่อถูกกระตุ้นทำให้ไม่เกิดการเรืองแสง แต่หากก้อน LUV เกิดความผิดปกติ จากการทำงานของเปปไทด์ และทำให้ calcein รั่วออกจากก้อน LUV และมีผลให้โมเลกุลของ calcein อยู่ห่างกัน ไม่สามารถให้พลังงานกันได้ เมื่อ calcein ถูกกระตุ้นจึงเกิดการเรืองแสงได้เนื่องจากมีพลังงานในโมเลกุลอยู่ ซึ่งการทดสอบ แบบจำลองเยื่อเซลล์แบคทีเรีย LUV ที่ trap สารเรืองแสง (calcein) เรียกว่า Permeabilization assay ผลการทดลองแสดงดังกราฟ

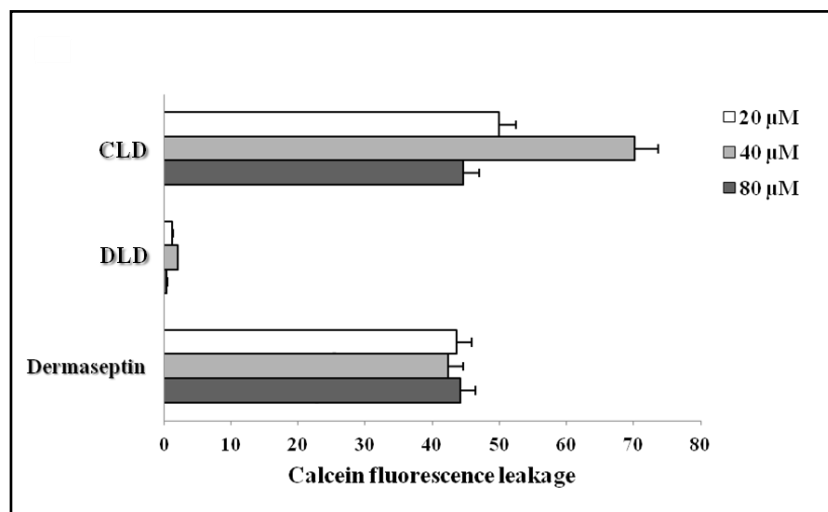
ภาพแสดงผลการวัด fluorescence intensity LUVs trap calcein ของ DLD ที่ความเข้มข้น 20, 40 และ $80\mu\text{M}$ เปรียบเทียบกับ 100% positive control TritonX100



เพื่อเป็นการเปรียบเทียบที่เห็นได้ชัดเจน ผู้วิจัยได้ทำการคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ calcein leakage โดยเปรียบเทียบผลของ CLD, DLD และ Dermaseptin โดยใช้ TritonX100 เป็น 100% positive control จากสูตร

$$\% \text{ calcein leakage} = 100 \times \left\{ \frac{F - F_0}{F_t - F_0} \right\}$$

F = Average Intensity of peptides treat with liposome
 F_0 = Average Intensity of liposome before treated by peptides
 F_t = Average Intensity of liposome treat with TTX



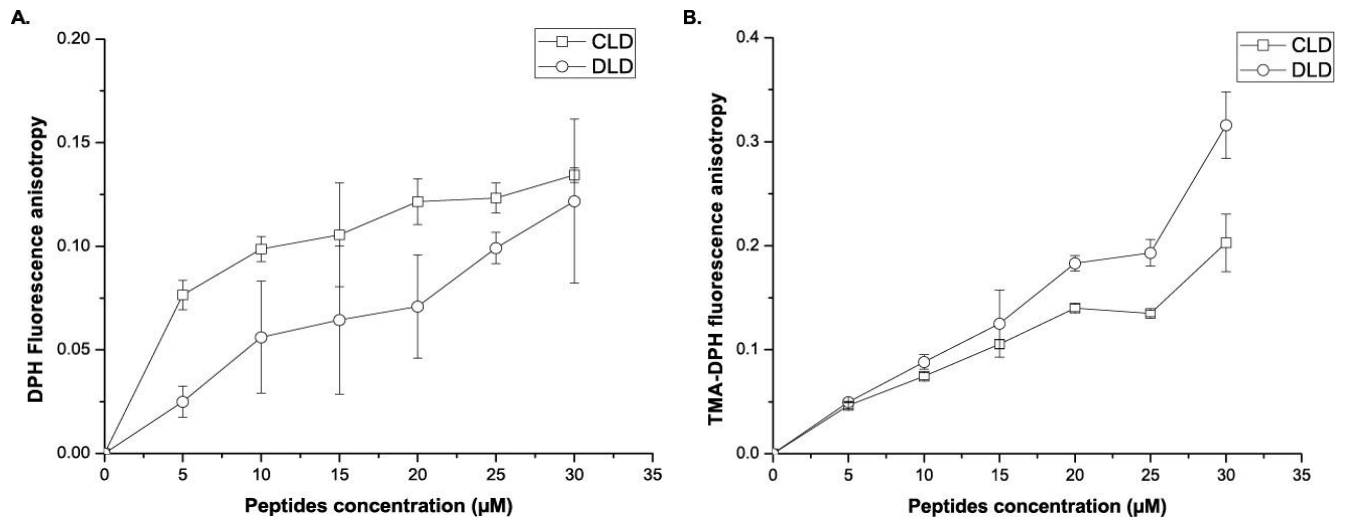
ภาพที่ 11 ผลการวิเคราะห์ % การรั่วของ calcein จาก LUV

จากกราฟพบว่า CLD มีผลต่อการเกิด Permeabilization ได้มากกว่า DLD ที่ความเข้มข้นของเปปไทด์ CLD 20, 40 และ 80 μM เกิดการซึมผ่านของแคลซิน 50%, 75% และ 45% ตามลำดับ ในขณะที่ DLD ที่ความเข้มข้น 20, 40 และ 80 μM เกิดการซึมผ่านของแคลซิน <10% แสดงให้เห็นว่าที่ความเข้มข้นเดียวกัน เปปไทด์ CLD สามารถทำให้เกิดการซึมผ่านได้ของเยื่อเซลล์จำลองมากกว่าเปปไทด์ DLD ซึ่งการทดลองเป็นไปตามที่สมมุติฐานที่ตั้งไว้ทางด้านโครงสร้างของทั้ง CLD และ DLD ที่สัมพันธ์กับหน้าที่และการทำงานของเปปไทด์ งานวิจัยก่อนหน้านี้ งานวิจัยของ ดร. รินา ภัทรมานนท์และคณะ ปี 2010 พบว่า CLD มีโครงสร้างที่เป็น α -helix ที่เหมาะสมต่อการม้วนพับของโครงสร้างเพื่อการเข้าทำลายเยื่อเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ ตรงข้ามกับ DLD ที่มีโครงสร้างส่วนใหญ่เป็น β -sheet และมีความเป็น α -helix น้อยกว่า CLD มาก จึงส่งผลให้ทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้น้อยกว่า ทั้งใน living cell bacteria และในแบบจำลองเยื่อเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์



4.4 Fluorescence anisotropy/ Membrane fluidity

ศึกษาการเกิดการเปลี่ยนแปลงของเยื่อเซลล์เมมเบรนจำลอง โดยการทดสอบความสามารถในการไหลของเมมเบรน (Membrane fluidity) จากการเหนี่ยวนำของเปปไทด์ ซึ่งผลการทดลองแสดงดังภาพ



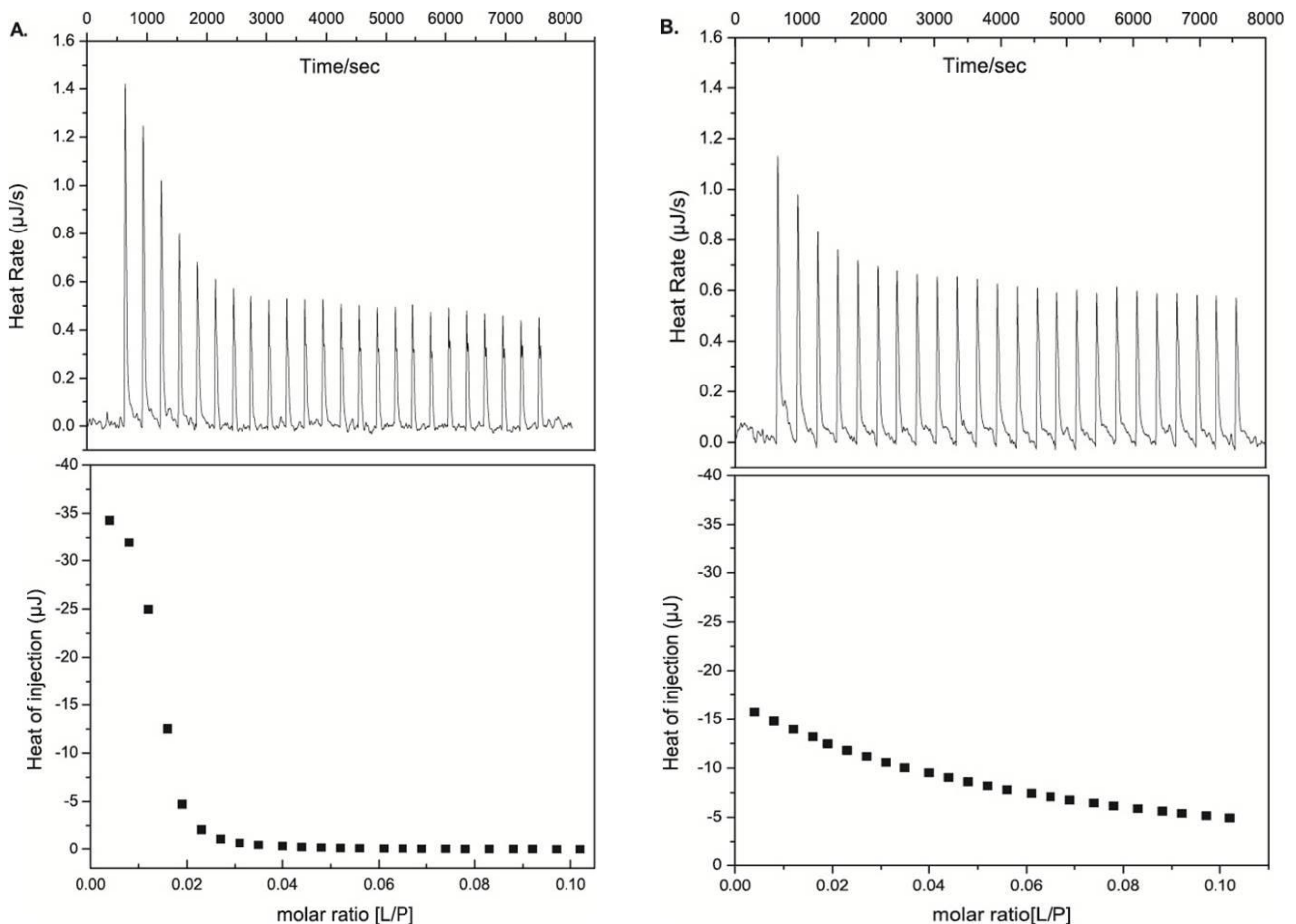
กราฟที่ 1 กราฟแสดงผล Fluorescence anisotropy โดยการเหนี่ยวนำด้วยเปปไทด์ที่ความเข้มข้น 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 μM CLD และ DLD ที่ 500 μM DMPG/PC (50:50) และ 10 μM DPH (A) ผลของการไหลของเมมเบรนบริเวณ hydrophobic membrane (interior region) และ TMA-DPH (B) ผลของการไหลของเมมเบรนบริเวณผิวของเมมเบรน (interface region)

DPH fluorescence anisotropy: เปปไทด์ CLD มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของค่า fluorescence anisotropy เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเปปไทด์ เช่นเดียวกันกับเปปไทด์ DLD แต่ค่า Fluorescence anisotropy ที่ถูกเหนี่ยวนำโดยเปปไทด์ CLD มีค่ามากกว่า DLD กรณีของ TMA-DPH fluorescence anisotropy: เปปไทด์ DLD มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของค่า fluorescence anisotropy เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเปปไทด์ เช่นเดียวกันกับเปปไทด์ CLD แต่ค่า Fluorescence anisotropy ที่ถูกเหนี่ยวนำโดยเปปไทด์ DLD มีค่ามากกว่า CLD จากผลการทดลอง ชี้ให้เห็นว่า เปปไทด์ CLD มีผลต่อการเกิด Membrane fluidity ของเยื่อเซลล์ลิพโซมจำลองบริเวณ hydrophobic membrane และ เปปไทด์ DLD มีผลต่อการเกิด Membrane fluidity ของเยื่อเซลล์ลิพโซมจำลองบริเวณผิวเมมเบรน



4.5 การจับแน่นของเปปไทด์บนเยื่อเซลล์จุลชีพจำลอง (Isothermal titration calorimetry)

ทำการทดสอบหาค่าพารามิเตอร์ทางเทอร์โมไดนามิกเพื่อเปรียบเทียบการทำงานของเปปไทด์ CLD และ DLD ต่อการเข้าทำลายเยื่อเซลล์เมมเบรน ด้วยเครื่อง ITC (nano-ITC2G, TA instruments) แสดงผลดังภาพ



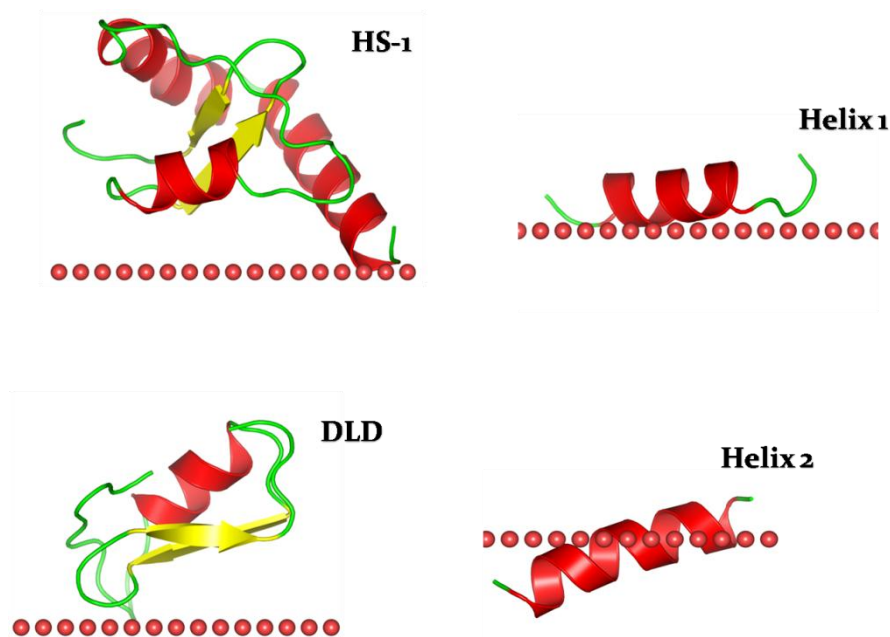
ภาพที่ 12 กราฟแสดงผล ITC ของเปปไทด์ 35 μM CLD (A) และ DLD (B) ใน 0.1 mM DMPG/PC (50:50)

จากกราฟผลการทดลอง และการวิเคราะห์ผลจากโปรแกรม Nano analyze พบว่าค่า เปปไทด์ CLD ค่า K_a 2.4×10^7 , ΔH -103 และ n 0.012 ซึ่ง DLD มีค่า K_a 5.9×10^4 , ΔH -1999 และ n 0.004 จากค่าพารามิเตอร์ทางเทอร์โมไดนามิกดังกล่าว พบว่า เปปไทด์ CLD มีค่า affinity constant มากกว่า DLD นั้นหมายความว่า เปปไทด์ CLD มีค่าการจับกับเยื่อเซลล์เมมเบรนได้มากกว่า เป็นเหตุผลให้ สามารถเข้าทำลายเยื่อเซลล์ของเชื้อจุลชีพได้มากกว่า



4.6 แบบจำลองกลไกการเข้าทำงานของเปปไทด์ (Peptide Simulation)

จากการทดลอง วิเคราะห์ทางด้านโครงสร้าง ค่าพารามิเตอร์ทางเทอร์โมไดนามิกของเปปไทด์ ทำให้ทราบได้ว่า เปปไทด์ CLD มีกลไกการทำงานเพื่อเข้าทำลายเยื่อเซลล์จุลชีพได้ดีกว่า DLD ด้วยผลดังกล่าว ผู้วิจัยต้องการที่จะทำนายลักษณะการเข้าทำงานของเปปไทด์ทั้งสอง โดยอาศัยศาสตร์ทางด้านการทำนายโครงสร้างด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ โดยอ้างอิงจากฐานข้อมูลของเปปไทด์ (peptides data base) ผลการทดลอง แสดงดังภาพที่ 13 และตารางที่ 6



ภาพที่ 13 แบบจำลองการทำงานของเปปไทด์ HS-1 (full sequence) เปปไทด์ CLD (helix1, helix2) และเปปไทด์ DLD

ตารางที่ 6 ค่าการจัดวางตัวของเปปไทด์บนเยื่อเซลล์จุลชีพ แสดงค่าพารามิเตอร์ทาง Simulation ของเปปไทด์ HS-1, CDL (helix-1 และ helix-2) และ DLD

Peptides	Depth/Hydrophobic Thickness (°A)	$\Delta G_{\text{transfer}}$ (kcal/mol)	Tilt Angle
HS-1	4.2 $\pm$ 2.8	-4.1	59 $\pm$ 11
CLD (helix1)	2.1 $\pm$ 1.6	-5.2 (-1.3)	85 $\pm$ 19
CLD (helix2)	8.5 $\pm$ 4.0	-9.1 (-3.4)	65 $\pm$ 12
DLD	0.9 $\pm$ 2.3	-2.1	57 $\pm$ 28



จากภาพและตารางประกอบแสดงการทำงานของเปปไทด์บนเยื่อเซลล์โดยกระบวนการ Simulation ด้วย โปรแกรมคอมพิวเตอร์ พร้อมค่าพารามิเตอร์ของ protein transmembrane สามารถอธิบายได้ว่า CLD (helix1) มีค่าของระยะความลึกของเปปไทด์ที่แทรกตัวลงไปในเยื่อเมมเบรน (Depth/Hydrophobic Thickness (°A)) ค่า $\Delta G_{transfer}$ มากที่สุด ที่ 8.5 ± 4.0 °A และ -9.1 (-3.4) (kcal/mol) ตามลำดับ และพบว่า HS-1 มีค่าพารามิเตอร์ protein transmembrane สูงกว่า DLD หมายความว่า HS-1 สามารถทำลายเยื่อเซลล์ได้มากกว่า DLD

5 สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์และกลไก เปปไทด์ Heteroscorpine-1 และอนุพันธ์ในส่วนของ N- และ C-terminal domain โดยทำการแยกออกเป็นส่วนของการศึกษาสมบัติโครงสร้างทางกายภาพของเปปไทด์ (Structure Characterization) และการศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพของเปปไทด์บนเยื่อเซลล์จำลอง liposome (Functional Characterization) เพื่อเป็นต้นแบบองค์ความรู้พื้นฐาน ต่อยอดการพัฒนาศาสตร์ด้าน เชื้อจุลินทรีย์ต่อไปในอนาคต

การเตรียมเปปไทด์ HS-1 ไม่สามารถทำบริสุทธิ์เปปไทด์ HS-1 ได้เนื่องจากในขั้นตอนของการทำบริสุทธิ์ทำให้การสูญเสียปริมาณของเปปไทด์ พบว่าได้ปริมาณของเปปไทด์ HS-1 มีน้อยเกินไป ไม่เพียงพอต่อการนำมาวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไปได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงแก้ปัญหาโดยการหันมาสนใจเปปไทด์ที่เป็นอนุพันธ์ของ HS-1 ซึ่งได้แก่ Cecropin like domain (CLD) และ Defensin like domain (DLD)

จากการศึกษาค้นคว้าโดยการทำการสังเคราะห์เปปไทด์ 2 ชนิดที่เป็นอนุพันธ์ของเปปไทด์ Heteroscorpine-1 หรือ HS-1 ซึ่งเปปไทด์ HS-1 นี้จัดเป็นหนึ่งในกลุ่มของเปปไทด์ที่ถูกผสม โดยมีลำดับกรดอะมิโนในส่วนของ C-Terminal domain คล้ายกับเปปไทด์ในกลุ่ม Cecropin (Cecropin like domain: CLD) คือ GWINEEKIQKKIDEKIGNNIGGMAKAVVHKLAK และมีลำดับกรดอะมิโนในส่วนของ N-Terminal domain คล้ายกับเปปไทด์ในกลุ่ม Defensin (Defensin like domain: DLD) คือ GEFQCVANIDTMGNCETHCQKTSGEKGFCHGKCKCGKPLSY จากการวิเคราะห์คุณสมบัติทางด้าน โครงสร้างของเปปไทด์ CLD และ DLD ทำการวิเคราะห์โครงสร้างของเปปไทด์ด้วยเทคนิค Circular dichroism พบว่า เมื่ออยู่ในสถานะที่เป็น buffer เปปไทด์ทั้งสองแสดงโครงสร้างแบบ β -sheet เมื่ออยู่ในสถานะที่เป็นสารละลายเยื่อเซลล์ (30% TFE) เปปไทด์ CLD มีโครงสร้างระดับทุติยภูมิแบบ เป็นแบบ α -helix แต่ไม่พบโครงสร้างใดในเปปไทด์ DLD และเมื่อทำการทดสอบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเปปไทด์ด้วยการเหนี่ยวนำโดย phospholipid (เยื่อเซลล์จำลอง: liposome) ที่มีคุณสมบัติเป็นประจุลบ พบว่า เปปไทด์ CLD เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจาก random coil ไปเป็น α -helix แต่ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างใด ๆ ใน เปปไทด์ DLD ซึ่งให้เห็นว่า เปปไทด์ CLD มีโครงสร้างระดับทุติยภูมิแบบ α -helix ที่เอื้อต่อการเข้าทำลายเยื่อเซลล์ได้มากกว่า เปปไทด์ DLD



จากนั้นผู้วิจัยได้ทำการศึกษากลไกเชิงลึกของเปปไทด์ CLD และ DLD โดยติดตามกรดอะมิโนทริปโตแพนบนสายเปปไทด์ ด้วยการวัด Tryptophan Blue-shift assay เพื่อที่จะศึกษาการแทรกตัวลงไปได้ลึกของเปปไทด์ โดยจากการศึกษาพบว่าเปปไทด์ CLD สามารถแทรกตัวเข้าไปยังส่วนของ phospholipid ของเยื่อหุ้มเซลล์ได้ดีกว่า DLD

ผลการวิเคราะห์กลไกการเข้าทำลายเยื่อเซลล์ โดยทำการจำลองเยื่อเซลล์ลิโปโซมที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อเซลล์ปกติที่เรีย และทดสอบผลของเปปไทด์ต่อการเกิดการซึมผ่านได้ของเยื่อเซลล์ด้วยวิธี Calcein leakage assay โดยใช้ฟลูออเรสเซนต์ calcein ที่มีคุณสมบัติของการเป็น self quenching กล่าวคือเมื่อโมเลกุลของ calcein อยู่ใกล้ชิดกันจะเกิดการส่งผ่านพลังงานไปยังโมเลกุลข้างเคียง ทำให้เมื่อถึงเวลากระตุ้นด้วยคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (excitation) จะไม่เกิดการปลดปล่อยพลังงานใด ๆ (emission) โมเลกุลของ calcein จะไม่เกิดการเรืองแสง ดังนั้นจึงทำการ trap calcein ไว้ภายใน liposome หากเปปไทด์ส่งผลต่อการเกิดการซึมผ่านของเยื่อเซลล์ได้ โมเลกุลของ calcein จะปล่อยลอยออกจาก Liposome เมื่อมีการกระตุ้นด้วย Ex ค่าหนึ่ง calcein จะแสดงค่าการเรืองแสงได้ ผลการทดลองพบว่า เปปไทด์ CLD มีผลต่อการเกิดการซึมผ่านของเยื่อเซลล์ได้มากกว่าเปปไทด์ DLD ที่ค่าความเข้มข้น 20-40 μM พบว่าเกิดการรั่วของ calcein 50-70% และที่ความเข้มข้นสูง (80 μM) พบว่าเปปไทด์ทำงานได้ไม่ต่างกัน อันเนื่องมาจากการเกิดการ aggregate ของเปปไทด์ ส่งผลต่อการทำงานที่ไม่มีประสิทธิภาพของเปปไทด์

ผลของเปปไทด์ต่อการเกิด Membrane fluidity ของลิโปโซมโดยอาศัย Fluorescence anisotropy และคุณสมบัติของ Fluorescence dye 2 ชนิดได้แก่ DPH และ TMA-DPH พบว่าเปปไทด์ CLD สามารถแทรกตัวผ่านเข้าไปยังชั้น Hydrophobic ของเยื่อเซลล์ได้ และส่วนเปปไทด์ DLD จะเกิดการวางตัวอยู่บนบริเวณผิวของเยื่อเซลล์จำลอง ทั้งนี้เนื่องมาจากการที่เปปไทด์ทั้งสองมีโครงสร้างที่ต่างกัน เปปไทด์ CLD มีโครงสร้างในลักษณะ α -helix เอื้อต่อการเข้าทำลายเยื่อเซลล์และแทรกตัวผ่านเข้าไปยังด้านในของเยื่อเซลล์จำลองได้มากกว่าเปปไทด์ DLD การศึกษาค่าพารามิเตอร์ทางเทอร์โมไดนามิคของการทดสอบด้วยเครื่อง ITC แสดงผลของการจับแน่นของเปปไทด์ทั้งสอง พบว่า CLD (K_d 2.4×10^7) มีค่าการจับแน่นบนเยื่อเซลล์มากกว่า DLD (K_d 5.9×10^4) ที่ระดับความเข้มข้นของเปปไทด์เท่ากัน ซึ่งให้เห็นว่า เปปไทด์ CLD มีผลต่อการเข้าทำลายเยื่อเซลล์มากกว่าเปปไทด์ DLD และจากการทำนายการเกิดอันตรกิริยาของเปปไทด์ทั้งสองบนเยื่อเซลล์ด้วยวิธี Peptide Simulation พบว่า ส่วนโครงสร้างที่เป็น α -helix ของ CLD สามารถแทรกตัวผ่านเข้าไปยังเยื่อเซลล์ของแบบจำลองได้มากกว่าเปปไทด์ DLD จากการทดลองทั้งหมดนี้สามารถสรุปได้ว่า การทำหน้าที่เป็น Antimicrobial peptide ที่ดีของ HS-1 มี domain ที่สำคัญที่ทำให้เกิด activity ดังกล่าว คือ ส่วนของ cecropin like domain เนื่องจากลำดับกรดอะมิโนที่ส่งผลให้เกิดโครงสร้างระนาบทุติยภูมิชนิด α -helix ที่เอื้อต่อการแทรกตัวผ่านเยื่อเซลล์จำลอง หรือเยื่อเซลล์จุลชีพ ส่งผลให้เกิดความผิดปกติของเยื่อเซลล์ และเซลล์ตายได้



6 บรรณานุกรม

1. Leontiadou H, Mark AE, Marrink SJ. Antimicrobial peptides in action. *Journal of the American Chemical Society*. 2006 Sep;128(37):12156-61.
2. Ajesh K, Sreejith K. Peptide antibiotics: An alternative and effective antimicrobial strategy to circumvent fungal infections. *Peptides*. 2009 May;30(5):999-1006.
3. Rossi LM, Rangasamy P, Zhan J, Qiu XQ, Wu GY. Research advances in the development of peptide antibiotics. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008 Mar;97(3):1060-70.
4. Oren Z, Shai Y. Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers*. 1998 Nov;47(6):451-63.
5. Park Y, Hahm KS. Antimicrobial peptides (AMPs): Peptide structure and mode of action. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 2005 Sep;38(5):507-16.
6. Shai Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers*. 2002;66(4):236-48.
7. Straus SK, Hancock REW. Mode of action of the new antibiotic for Gram-positive pathogens daptomycin: Comparison with cationic antimicrobial peptides and lipopeptides. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*. 2006 Sep;1758(9):1215-23.
8. Bechinger B, Lohner K. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*. 2006 Sep;1758(9):1529-39.
9. Hadjicharalambous C, Sheynis T, Jelinek R, Shanahan MT, Ouellette AJ, Gizeli E. Mechanisms of alpha-Defensin Bactericidal Action: Comparative Membrane Disruption by Cryptdin-4 and Its Disulfide-Null Analogue. *Biochemistry*. 2008 Nov;47(47):12626-34.
10. Kouno T, Mizuguchi M, Aizawa T, Shinoda H, Demura M, Kawabata S, et al. A Novel beta-Defensin Structure: Big Defensin Changes Its N-Terminal Structure To Associate with the Target Membrane. *Biochemistry*. 2009 Aug;48(32):7629-35.
11. Possani LD, Corona M, Zurita M, Rodriguez MH. From noxiustoxin to scorpine and possible transgenic mosquitoes resistant to malaria. *Archives of Medical Research*. 2002 Jul-Aug;33(4):398-404.



12. Carballar-Lejarazu R, Rodriguez MH, Hernandez-Hernandez FD, Ramos-Castaneda J, Possani LD, Zurita-Ortega M, et al. Recombinant scorpine: a multifunctional antimicrobial peptide with activity against different pathogens. *Cell Mol Life Sci*. 2008 Oct;65(19):3081-92.
13. Yeka A, Achan J, D'Alessandro U, Talisuna AO. Quinine monotherapy for treating uncomplicated malaria in the era of artemisinin-based combination therapy: an appropriate public health policy? *Lancet Infectious Diseases*. 2009 Jul;9(7):448-52.
14. Silvestro L, Axelsen PH. Membrane-induced folding of cecropin A. *Biophysical Journal*. 2000 Sep;79(3):1465-77.
15. Uawonggul N, Thammasirirak S, Chaveerach A, Arkaravichien T, Bunyatratchata W, Ruangjirachuporn W, et al. Purification and characterization of Heteroscorpine-1 (HS-1) toxin from *Heterometrus laoticus* scorpion venom. *Toxicon*. 2007 Jan;49(1):19-29.
16. Zeineldin R, Piyasena ME, Sklar LA, Whitten D, Lopez GP. Detection of membrane biointeractions based on fluorescence superquenching. *Langmuir*. 2008 Apr;24(8):4125-31.
17. Abrunhosa F, Faria S, Gomes P, Tomaz I, Pessoa JC, Andreu D, et al. Interaction and lipid-induced conformation of two cecropin-melittin hybrid peptides depend on peptide and membrane composition. *Journal of Physical Chemistry B*. 2005 Sep;109(36):17311-9.
18. Arcidiacono S, Soares JW, Meehan AM, Marek P, Kirby R. Membrane permeability and antimicrobial kinetics of cecropin P1 against *Escherichia coli*. *Journal of Peptide Science*. 2009 Jun;15(6):398-403.
19. Lad MD, Birembaut F, Clifton LA, Frazier RA, Webster JRP, Green RJ. Antimicrobial peptide-lipid binding interactions and binding selectivity. *Biophysical Journal*. 2007 May;92(10):3575-86.
20. HARRINGTON JM, CHOU H-T, GUTSMANN T, GELHAUS C, STAHLBERG H, LEIPPE M, et al. Membrane pore formation by pentraxin proteins from *Limulus*, the American horseshoe crab. *Biochemistry Journal*. 2008;413:305-13.
21. Loh B, Grant C, Hancock RE. Use of the fluorescent probe 1-N-phenylnaphthylamine to study the interactions of aminoglycoside antibiotics with the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1984;26(4):546-51.
22. Russell AL, Kennedy AM, Spuches AM, Venugopal D, Bhonsle JB, Hicks RP. Spectroscopic and thermodynamic evidence for antimicrobial peptide membrane selectivity. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2005;163(6):488-97.



23. Christiaens B, Symoens S, Verheyden S, Engelborghs Y, Joliot A, Prochiantz A, et al. Tryptophan fluorescence study of the interaction of penetratin peptides with model membranes. Eur J Biochem. 2002;269(12):2918-26.
24. Caputo GA, London E. Using a novel dual fluorescence quenching assay for measurement of tryptophan depth within lipid bilayers to determine hydrophobic alpha-helix locations within membranes. Biochemistry Journal. 2003;42(11):3265-74.