

เปปไทด์ต้านจุลชีพ

อนาคตใหม่ของการรักษาโรคติดเชื้อ



สรศักดิ์ อินทรสุต

คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ประวัติและผลงาน

ผศ.ดร.กนพ. สรศักดิ์ อินทรสุด



แขนงวิชาจุลชีววิทยาคลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
E-mail: sorasak.in@cmu.ac.th, isorasak@hotmail.com

ประวัติการศึกษา:

- ปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- ปริญญาโท วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (อนุพันธุศาสตร์-พันธุวิศวกรรมศาสตร์) สถาบันอณูชีววิทยาและพันธุศาสตร์ (สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล ในปัจจุบัน) มหาวิทยาลัยมหิดล
- ปริญญาเอก ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (เภสัชศาสตร์ชีวภาพ) คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ตำแหน่งปัจจุบัน:

- อาจารย์ประจำแขนงวิชาจุลชีววิทยาคลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- หัวหน้าหน่วยวิจัยโรคติดเชื้อ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ขอบเขตงานวิจัยที่ทำอยู่ในปัจจุบัน

- การค้นหาเปปไทด์ต้านจุลชีพชนิดใหม่ในพืชโดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา
- การสังเคราะห์เปปไทด์ต้านจุลชีพในแบคทีเรียโดยอาศัยรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอเทคโนโลยี
- การทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อจุลชีพของสารหรือเปปไทด์ต่างๆ
- การพัฒนาและประยุกต์ใช้เปปไทด์ต้านจุลชีพในทางการแพทย์
- การวิจัยและพัฒนาเปปไทด์ต้านจุลชีพเพื่อใช้ในการรักษาโรค
- การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยาสมัยใหม่

เปปไทด์ต้านจุลชีพ

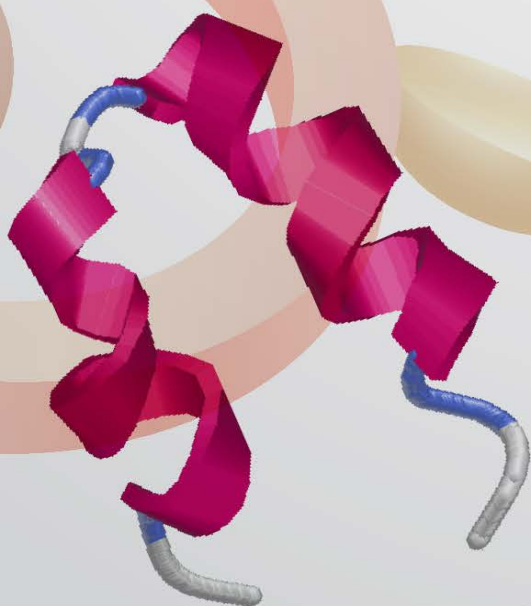
อนาคตใหม่ของการรักษาโรคติดเชื้อ

ตัวอย่าง

สรศักดิ์ อินทรสุด

ภาควิชาเทคนิคการแพทย์

คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่



แปปไทด์ต้านจุลชีพ

อนาคตใหม่ของการรักษาโรคติดเชื้อ

บรรณาธิการบริหาร: กรกฎ งานวงศ์พาณิชย์
ISBN (e-Book) : 978-616-398-614-6
ผู้แต่ง: สรศักดิ์ อินทรสุต
เจ้าของและผู้จัดพิมพ์: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
สำนักงานบริหารงานวิจัย สำนักงานมหาวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 50200
โทรศัพท์: 0 5394 3603-4
โทรสาร: 0 5394 3600
<https://cmupress.cmu.ac.th>
E-mail: cmupress.th@gmail.com

พิมพ์ครั้งแรก: กันยายน 2564
ราคา: 326 บาท

ออกแบบและจัดรูปเล่ม: สมลิบ คราพท์

หนังสือเล่มนี้ ผ่านการประเมินเพื่อตรวจสอบและรับรองการเผยแพร่ผลงานทางวิชาการประเภท หนังสือ ตำรา ซึ่งจัดพิมพ์โดยสำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่เรียบร้อยแล้ว
©สงวนลิขสิทธิ์ พ.ศ. 2537 ห้ามลอกเลียนแบบ ทำซ้ำ ดัดแปลง ส่วนหนึ่งส่วนใดของหนังสือเล่มนี้ รวมทั้งการจัดเก็บถ่ายทอดไม่ว่ารูปแบบหรือวิธีการใด ๆ ด้วยกระบวนการทางอิเล็กทรอนิกส์ การถ่ายภาพ การบันทึกหรือวิธีการอื่นใดโดยไม่ได้รับอนุญาต

คำนิยม

องค์ความรู้ด้านเปปไทด์ในปัจจุบันมีความสำคัญมาก เนื่องจากมีบทบาทในหลายด้าน ไม่ว่าจะเป็นการวินิจฉัยหรือการรักษาโรค หนังสือเรื่อง “เปปไทด์ด้านจุลชีพอนาคตใหม่ของการรักษาโรคติดเชื้อ” โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สรศักดิ์ อินทรสุด คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่เล่มนี้ เป็นหนังสือที่อัดแน่นไปด้วยเนื้อหาทางวิชาการ เริ่มตั้งแต่ประวัติการค้นพบเปปไทด์ คุณสมบัติทั่วไปและฤทธิ์ของเปปไทด์ด้านจุลชีพ เทคนิคและวิธีการสำหรับการค้นหาเปปไทด์ด้านจุลชีพ กระบวนการการสังเคราะห์เปปไทด์ด้านจุลชีพในเชื้อจุลชีพโดยอาศัยรีคอมบิแนนท์ ดีเอ็นเอเทคโนโลยี การนำไปรู้จักเปปไทด์ด้านจุลชีพชนิดต่าง ๆ จากพืช การใช้เปปไทด์ด้านจุลชีพกับโรคติดเชื้ออุบัติใหม่และอุบัติซ้ำ รวมถึงการประยุกต์ใช้เปปไทด์ด้านจุลชีพทางคลินิก

หนังสือเล่มนี้ได้เขียนขึ้นมาจากประสบการณ์การทำงาน การสอน และการทำวิจัย ของผู้แต่งอย่างแท้จริง ผู้แต่งได้นำเสนอเป็นรูปแบบหนังสือที่อ่านได้ง่าย มีรูปประกอบให้เข้าใจได้ มีการใช้ภาษาที่ถูกต้อง นอกจากนั้น หนังสือเล่มนี้ยังได้ผ่านการประเมินจากผู้ทรงคุณวุฒิในสาขาวิชาแล้ว อันเป็นการช่วยยืนยันถึงความถูกต้องทางวิชาการของหนังสือ นับว่าเป็นหนังสือวิชาการที่มีคุณค่าอีกเล่มหนึ่งที่สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่รู้สึกยินดีที่ได้มีโอกาสเป็นผู้ดำเนินการพิมพ์และจัดจำหน่าย

กรกฎ งานวงศ์พาณิชย์

บรรณาธิการบริหารสำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

คำนำ

ปัจจุบันโรคติดเชื้ออุบัติใหม่และอุบัติซ้ำกลายเป็นปัญหาหลักด้านสุขภาพของประชากรโลก หนึ่งในโรคติดเชื้ออุบัติใหม่ที่ยังคงเป็นปัญหาวิกฤตอยู่ ณ ปัจจุบัน ได้แก่ โรคติดเชื้อโควิด-19 ซึ่งยังไม่มียาต้านไวรัสที่จำเพาะและวัคซีนก็ยังอยู่ในระหว่างการพัฒนา หลายชนิดของโรคติดเชื้ออุบัติซ้ำเกิดจากการดื้อยาของเชื้อโรค โดยมีการประมาณการณ์ว่าหากยังไม่มียาหรือแนวทางในการแก้ไขปัญหาการดื้อยา ในอีก 30 ปีข้างหน้าเชื้อดื้อยาอาจเป็นสาเหตุคร่าชีวิตของผู้ป่วยที่ติดเชื้อได้ถึง 10 ล้านคนต่อปี การค้นหายาต้านจุลชีพชนิดใหม่เพื่อใช้รักษาโรคเหล่านี้จึงมีความจำเป็นอย่างเร่งด่วน เปปไทด์ต้านจุลชีพนั้นมีการค้นพบมาอย่างต่อเนื่องยาวนานกว่า 50 ปี แต่การศึกษาวิจัยอย่างจริงจังเกิดขึ้นเมื่อประมาณ 2 ทศวรรษที่ผ่านมา ทำให้นักวิทยาศาสตร์มีความรู้ ความเข้าใจเกี่ยวกับเปปไทด์ต้านจุลชีพเพิ่มมากขึ้นทั้งในด้านโครงสร้าง หน้าที่ ตลอดจนกลไกการออกฤทธิ์ จนนำไปสู่การทดสอบทางคลินิก ดังนั้นเปปไทด์ต้านจุลชีพจึงอาจเป็นทางเลือกและอนาคตใหม่ของการรักษาโรคติดเชื้อและเชื้อดื้อยา

หนังสือเรื่อง “เปปไทด์ต้านจุลชีพ: อนาคตใหม่ของการรักษาโรคติดเชื้อ” เล่มนี้จัดทำขึ้นจากการรวบรวมองค์ความรู้ที่ได้รับทั้งจากการค้นคว้าหาความรู้และงานวิจัยของผู้พันธ์เกี่ยวกับเปปไทด์ต้านจุลชีพ ซึ่งผู้พันธ์ให้ความสนใจมากกว่า 8 ปี โดยมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อเผยแพร่องค์ความรู้ที่ได้รับเหล่านี้ให้กับนักศึกษา นักวิจัย คณาจารย์ ตลอดจนบุคคลทั่วไปที่มีความสนใจเกี่ยวกับเปปไทด์ต้านจุลชีพ ซึ่งภายในประกอบด้วยเนื้อหาเกี่ยวกับประวัติการค้นพบ คุณสมบัติทั่วไปและฤทธิ์ของเปปไทด์ต้านจุลชีพ เทคนิคและวิธีการต่าง ๆ ที่ใช้ในการค้นหา เปปไทด์ต้านจุลชีพ การสังเคราะห์เปปไทด์ต้านจุลชีพในเชื้อจุลชีพโดยอาศัยรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอเทคโนโลยี เปปไทด์ต้านจุลชีพชนิดต่าง ๆ จากพืช เปปไทด์ต้านจุลชีพกับโรคติดเชื้ออุบัติใหม่และอุบัติซ้ำและการประยุกต์ใช้เปปไทด์ต้านจุลชีพทางคลินิก

ผู้พันธ์หวังเป็นอย่างยิ่งว่าหนังสือเล่มนี้จะมีประโยชน์และเป็นแนวทางให้ผู้ที่สนใจสามารถนำความรู้ไปประยุกต์ใช้ทั้งในงานด้านการแพทย์และงานที่เกี่ยวข้องได้ต่อไป

สรศักดิ์ อินทรสุต

1 มีนาคม 2564

“

คุณงามความดีทั้งหมดที่เกิดขึ้นจากหนังสือเล่มนี้
ขออุทิศให้แด่ บิดา มารดา และครูบาอาจารย์ทุกท่าน
ที่ให้ความรักและได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาแก่ข้าพเจ้า

และขอขอบคุณภรรยาและลูกทั้งสองคน

ที่เป็นแรงผลักดันอันยิ่งใหญ่

จนทำให้หนังสือเล่มนี้เกิดขึ้น

”

สารบัญ

คำนิยาม	I
คำนำ	II
สารบัญ	IV
สารบัญภาพ	X
สารบัญตาราง	XI

บทที่ 1	ประวัติการค้นพบ คุณสมบัติทั่วไป และฤทธิ์ของเปปไทด์ต้านจุลชีพ	1
----------------	---	----------

1.1	บทนำ	2
1.2	ประวัติการค้นพบเปปไทด์ต้านจุลชีพ	3
1.3	คุณสมบัติทั่วไปของเปปไทด์ต้านจุลชีพ	5
1.4	โครงสร้างทุติยภูมิของเปปไทด์ต้านจุลชีพ	5
1.4.1	เปปไทด์ที่มีโครงสร้างเกลียวแอลฟา-เฮลิคัล (alpha-helical peptides)	5
1.4.2	เปปไทด์ที่มีโครงสร้างชีต-ชีต (beta-sheet peptides)	7
1.4.3	เปปไทด์ที่มีโครงสร้างสายตรง (extended peptides)	8
1.4.4	เปปไทด์ที่มีโครงสร้างผสม (alpha-helix and beta-sheet peptides)	8
1.5	กลไกการออกฤทธิ์ของเปปไทด์ในการฆ่าเชื้อจุลชีพผ่านทางการทำลาย เซลล์เมมเบรน	9
1.6	แบบจำลองการทำลายเชื้อของเปปไทด์ต้านจุลชีพผ่านเซลล์เมมเบรน	10
1.6.1	แบบจำลองถังไม้ (barrel-stave model)	10
1.6.2	แบบจำลองพรม (carpet model)	10
1.6.3	แบบจำลองรูหนอน (toroid หรือ wormhole model)	10
1.7	กลไกการออกฤทธิ์ของเปปไทด์ในการฆ่าเชื้อจุลชีพผ่านทาง สารชีวโมเลกุลภายในเซลล์	12

สารบัญ

1.8	การเลือกจับของเปปไทด์ด้านจุลชีพ	14
1.9	ฤทธิ์ของเปปไทด์ด้านจุลชีพนอกเหนือจากการทำลายเชื้อก่อโรค	14
1.9.1	การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง	14
1.9.2	การลดชีวพิษซึ่งเกิดจากแบคทีเรีย	16
1.9.3	การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม	17
1.9.4	การกระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันและควบคุมระบบภูมิคุ้มกัน	19
1.9.5	การกระตุ้นการสร้างหลอดเลือดใหม่และการสมานแผล	19
1.9.6	การยับยั้งสเปิร์มโดยเปปไทด์ด้านจุลชีพ	21
1.10	บทสรุป	24
	เอกสารอ้างอิง	25

บทที่ 2

เทคนิคในการค้นหาเปปไทด์ด้านจุลชีพ

35

2.1	บทนำ	36
2.2	เทคนิคที่ใช้ในการค้นหาเปปไทด์ด้านจุลชีพ	36
2.2.1	การค้นหาเปปไทด์ด้านจุลชีพด้วยเทคนิคสปอต-ออน-ลawn (spot-on-lawn assay)	36
2.2.2	การค้นหาเปปไทด์ด้านจุลชีพด้วยเทคนิคดิฟฟิวชัน (diffusion method)	37
2.2.3	การค้นหาเปปไทด์ด้านจุลชีพด้วยเทคนิคอะการ-โอเวอร์เลย์ (agar-overlay assay)	39
2.2.4	การตรวจหาเปปไทด์ด้านจุลชีพโดยอาศัยคุณสมบัติของ เอนไซม์บีตา-ดี-กาแลคโตซิเดส (beta-D- galactosidase)	41
2.2.5	การตรวจหาเปปไทด์ด้านจุลชีพด้วยเทคนิคฟาจดิสเพลย์ (phage display) ร่วมกับการใช้แม่เหล็กสังเคราะห์จาก แบคทีเรีย (bacterial magnetic particles)	43

สารบัญ

2.2.6	การตรวจหาเปปไทด์ด้านจุลชีพด้วยการใช้หนอนตัวกลม <i>Caenorhabditis elegans</i>	44
2.2.7	การตรวจหาเปปไทด์ด้านจุลชีพด้วยการใช้โครมาโตกราฟีแบบ เยื่อบาง (thin-layer chromatography) ร่วมกับการทดสอบ กับเชื้อจุลชีพโดยตรง (direct bioautography)	46
2.2.8	การตรวจหาเปปไทด์ด้านจุลชีพด้วยการใช้เทคนิคสปอต (SPOT)	49
2.3	บทสรุป	52
	เอกสารอ้างอิง	53

บทที่ 3 การใช้รีคอมบิแนนต์ดีเอ็นเอเทคโนโลยีในการสังเคราะห์ เปปไทด์ด้านจุลชีพ 57

3.1	บทนำ	58
3.2	เชื้อจุลชีพ	60
3.3	กลยุทธ์ในการออกแบบเปปไทด์ด้านจุลชีพเพื่อให้มีการแสดงออก ในแบคทีเรีย	61
3.3.1	การแสดงออกของเปปไทด์ด้านจุลชีพโดยตรง	61
3.3.2	การแสดงออกของเปปไทด์ด้านจุลชีพโดยอาศัยการใช้โคดอน ที่เหมาะสม (codon usage)	62
3.3.3	การแสดงออกของเปปไทด์ด้านจุลชีพหลายชิ้นเรียงต่อกัน	64
3.3.4	การแสดงออกของเปปไทด์ด้านจุลชีพแบบลูกผสม (hybrid antimicrobial peptide)	64
3.3.5	การแสดงออกของเปปไทด์ด้านจุลชีพโดยให้มีการนำส่งออก นอกเซลล์แบคทีเรีย	65
3.3.6	การแสดงออกของเปปไทด์ด้านจุลชีพโดยอาศัยเปปไทด์หรือ โปรตีนเชื่อมต่อ	66

สารบัญ

3.3.7 การใช้ตัวเชื่อมต่อเพื่อส่งเสริมให้มีการแสดงออก ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ	69
3.3.8 การใช้ตัวเชื่อมต่อเพื่อส่งเสริมให้มีการแสดงออกในรูปละลายน้ำ	69
3.3.9 การใช้ตัวเชื่อมต่อที่สามารถตัดแยกเปปไทด์ด้านจุลชีพออกได้เอง	70
3.3.10 การใช้ตัวเชื่อมต่อที่สามารถตรวจสอบการแสดงออก ของเปปไทด์ด้านจุลชีพ	73
3.4 บทสรุป	76
เอกสารอ้างอิง	77

บทที่ 4 เปปไทด์ด้านจุลชีพจากพืช 83

4.1 บทนำ	84
4.2 เปปไทด์ด้านจุลชีพในพืช	85
4.2.1 ไทโอนิน	85
4.2.2 ดีเฟนซิน	87
4.2.3 พเปปไทด์คล้ายเฮเวออิน	90
4.2.4 นีอิตินและไซโครไทด์	95
4.2.5 แอลฟา-แฮพทิน	100
4.2.6 สเนกิน	102
4.2.7 โปรตีนนำส่งไขมัน	102
4.2.8 เปปไทด์ด้านจุลชีพอื่น ๆ ในพืช	104
4.3 บทสรุป	106
เอกสารอ้างอิง	106

สารบัญ

บทที่ 5 เปปไทด์ต้านจุลชีพกับโรคติดเชื้ออุบัติใหม่และอุบัติซ้ำ 113

5.1	บทนำ	114
5.2	โรคติดเชื้ออุบัติใหม่และอุบัติซ้ำ	115
5.2.1	เปปไทด์ต้านจุลชีพกับโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (โควิด-19)	115
5.2.2	เปปไทด์ต้านจุลชีพกับวัณโรค	117
5.2.3	เปปไทด์ต้านจุลชีพกับไข้หวัดใหญ่	120
5.2.4	เปปไทด์ต้านจุลชีพกับไข้ซิกา	121
5.3	บทสรุป	123
	เอกสารอ้างอิง	123

บทที่ 6 การประยุกต์ใช้เปปไทด์ต้านจุลชีพทางคลินิก 129

6.1	บทนำ	130
6.2	การจัดแบ่งระดับการทดสอบทางคลินิก	131
6.2.1	การทดสอบก่อนคลินิก (pre-clinical trial)	131
6.2.2	การทดสอบทางคลินิกระยะที่ 0 (clinical trial phase 0)	131
6.2.3	การทดสอบทางคลินิกระยะที่ 1 (clinical trial phase 1)	131
6.2.4	การทดสอบทางคลินิกระยะที่ 2 (clinical trial phase 2)	132
6.2.5	การทดสอบทางคลินิกระยะที่ 3 (clinical trial phase 3)	132
6.2.6	การทดสอบทางคลินิกระยะที่ 4 (clinical trial phase 4)	132
6.3	เปปไทด์ต้านจุลชีพที่อยู่ในช่วงการทดสอบก่อนคลินิก	132
6.3.1	เอ็มยู 1140	132
6.3.2	อะรีนิซิน	133
6.3.3	เอชบี 1345	133

สารบัญ

6.4	เปปไทด์ต้านจุลชีพที่อยู่ในช่วงการทดสอบทางคลินิกระยะที่ 1	134
6.4.1	แลกโตเพอริซิน 1-11	134
6.4.2	ดับเบิลยูเอพี-8294 เอ 2	134
6.5	เปปไทด์ต้านจุลชีพที่อยู่ในช่วงการทดสอบทางคลินิกระยะที่ 2	135
6.5.1	แอลแอล-37	135
6.5.2	โนเวคซาติน	135
6.5.3	พีเอซี-113	136
6.5.4	โอเพบาแคน	136
6.5.5	ซี 16 จี 2	137
6.5.6	เมลิมีน	137
6.6	เปปไทด์ต้านจุลชีพที่อยู่ในช่วงการทดสอบทางคลินิกระยะที่ 3	138
6.6.1	ไอเซกาแนน	138
6.6.2	โอมิกาแนน	138
6.6.3	เพคซิกาแนน	139
6.6.4	ซูโรโตมัยซิน	139
6.6.5	ดัสควอไทด์	140
6.7	บทสรุป	141
	เอกสารอ้างอิง	144

ผลงานวิชาการประกอบการเขียนหนังสือ	153
ดัชนี/INDEX	155

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1.1	โครงสร้างหุติยภูมิชนิดแอลฟา-เฮลิคซ์ของเปปไทด์ด้านจุลชีพบางชนิด	6
ภาพที่ 1.2	โครงสร้างหุติยภูมิชนิดบีตา-ชีตของเปปไทด์ด้านจุลชีพบางชนิด	7
ภาพที่ 1.3	โครงสร้างหุติยภูมิผสมของเปปไทด์ด้านจุลชีพบางชนิด	8
ภาพที่ 1.4	แบบจำลองการออกฤทธิ์ผ่านเซลล์เมมเบรนของเชื้อจุลชีพโดยเปปไทด์ด้านจุลชีพ	11
ภาพที่ 1.5	กลไกการออกฤทธิ์ของเปปไทด์ด้านจุลชีพโดยอาศัยโมเลกุลเป้าหมายภายในเซลล์ของจุลชีพ	13
ภาพที่ 2.1	การตรวจกรองหาเปปไทด์ด้านจุลชีพด้วยเทคนิคสปอต-ออน-ลอน และเทคนิคอะการเวลดิฟฟิวชัน	39
ภาพที่ 2.2	การตรวจกรองหาเปปไทด์ด้านจุลชีพด้วยเทคนิคอะการ-โอเวอร์เลย์	41
ภาพที่ 2.3	หลักการการตรวจกรองหาเปปไทด์ด้านจุลชีพโดยอาศัยเอนไซม์บีตา-ดี-กลูเตมิเนส	43
ภาพที่ 2.4	ขั้นตอนการตรวจหาเปปไทด์ด้านจุลชีพชนิดใหม่ด้วยฟาจติสเพลย์ร่วมกับการใช้ผงแม่เหล็กสังเคราะห์จากแบคทีเรีย	45
ภาพที่ 2.5	ขั้นตอนการตรวจหาเปปไทด์ด้านจุลชีพด้วยการใช้หนอนตัวกลม <i>C. elegans</i>	47
ภาพที่ 2.6	ขั้นตอนการตรวจหาเปปไทด์ด้านจุลชีพด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบเยื่อ บางร่วมกับการทดสอบกับเชื้อจุลชีพโดยตรง	48
ภาพที่ 2.7	ปฏิกิริยาการเรืองแสงโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ลูซิเฟอเรสในแบคทีเรีย	50
ภาพที่ 2.8	ขั้นตอนการตรวจคัดกรองเพื่อหาเปปไทด์ด้านจุลชีพด้วยเทคนิคสปอต	51
ภาพที่ 3.1	การนำส่งยีนที่สนใจเข้าสู่พลาสมิดเพื่อให้มีการแสดงออกของโปรตีนที่ต้องการในเซลล์ของแบคทีเรียโดยอาศัยรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอเทคโนโลยี	59

สารบัญภาพ

ภาพที่ 3.2	กลยุทธ์ต่าง ๆ ในการแสดงออกของเปปไทด์ด้านจุลชีพในเชื้อแบคทีเรีย	63
ภาพที่ 3.3	พลาสมิด pTXB1 ซึ่งมียีนที่ถอดรหัสเป็นเปปไทด์ด้านจุลชีพเอแอล 32-พี 113 เชื่อมต่อกับโปรตีนอินทรีน-ซีพีดี	72
ภาพที่ 3.4	พลาสมิด pET28a ซึ่งมียีนที่ถอดรหัสเป็นโปรตีนเฮกซะฮิสติดีน-บีซีซีพี เชื่อมต่อกับเปปไทด์ด้านจุลชีพ	74
ภาพที่ 3.5	ผลการตรวจสอบการแสดงออกของเปปไทด์ด้านจุลชีพด้วยเทคนิคอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ผ่านตัวเชื่อมต่อบีซีซีพี	75
ภาพที่ 4.1	ผลการเทียบเคียงลำดับกรดอะมิโน ของเปปไทด์ไทโอนินในพืชชนิดต่าง ๆ	86
ภาพที่ 4.2	โครงสร้างทุติยภูมิของเปปไทด์ด้านจุลชีพไทโอนินในพืชบางชนิด	
ภาพที่ 4.3	ผลการเทียบเคียงลำดับกรดอะมิโนและแสดงตำแหน่งของพันธะไดซัลไฟด์ของเปปไทด์ดีเฟนซินจากพืชชนิดต่าง ๆ	87 91
ภาพที่ 4.4	การทดสอบฤทธิ์ของเปปไทด์จาวานซินกับเชื้อรา <i>Cryptococcus neoformans</i>	92
ภาพที่ 4.5	โครงสร้างทุติยภูมิของเปปไทด์ดีเฟนซินในพืชบางชนิด	
ภาพที่ 4.6	โครงสร้างทุติยภูมิของเปปไทด์เฮเวอีนและเปปไทด์คล้ายเฮเวอีนในพืชบางชนิด	93 94
ภาพที่ 4.7	องค์ประกอบของไซโครไต์ตั้งต้น (precursor protein) ในพืชวงศ์ต่าง ๆ	
ภาพที่ 4.8	กระบวนการเกิดโครงสร้างวงปิดสมบูรณ์ของไซโครไต์	97
ภาพที่ 4.9	โครงสร้างทุติยภูมิของเปปไทด์น็อทตินและไซโครไต์ในพืชบางชนิด	98
ภาพที่ 4.10	โครงสร้างทุติยภูมิของเปปไทด์แอลฟา-เฮพินินในพืชบางชนิด	99
ภาพที่ 4.11	โครงสร้างทุติยภูมิของเปปไทด์สเนกิน-1	100
ภาพที่ 4.12	โครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนนำส่งไขมันในข้าวบาร์เลย์	101 105
ภาพที่ 5.1	การขาดวิตามิน ดี และมลพิษทางอากาศส่งผลต่อการแสดงออกและการทำงานของเปปไทด์แอลแอล-37	117

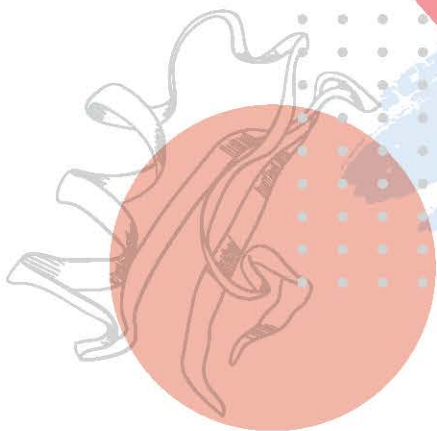
สารบัญตาราง

ตารางที่ 1.1	ลำดับกรดอะมิโนและฤทธิ์ของเปปไทด์ต้านจุลชีพบางชนิด	22
ตารางที่ 3.1	สายพันธุ์และคุณสมบัติของเชื้อ <i>E. coli</i> ที่นิยมใช้ในการแสดงออกของเปปไทด์ ต้านจุลชีพ	61
ตารางที่ 3.2	ตัวเชื่อมต่อที่ใช้สำหรับการแสดงออกของเปปไทด์ต้านจุลชีพในแบคทีเรีย	67
ตารางที่ 3.3	สารเคมีและเอนไซม์ที่ใช้ในการตัดแยกตัวเชื่อมต่อออกจากเปปไทด์ต้านจุลชีพและตำแหน่งจุดจำ (cleavage sites)	68
ตารางที่ 4.1	กลไกการออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยเปปไทด์ดีเพนซินในพืชชนิดต่าง ๆ	89
ตารางที่ 5.1	เปปไทด์ต้านจุลชีพที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i>	119
ตารางที่ 5.2	เปปไทด์ต้านจุลชีพที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งหรือป้องกันการติดเชื้อไวรัสเซหวัดใหญ่สายพันธุ์ เอ	121
ตารางที่ 6.1	เปปไทด์ต้านจุลชีพที่อยู่ในการทดสอบทางคลินิกระยะก่อนคลินิก - การทดสอบทางคลินิกระยะที่ 3	142

01

บทที่ 1

ประวัติการค้นพบ
คุณสมบัติทั่วไป
และฤทธิ์ของ
เปปไทด์ต้านจุลชีพ



1.1 บทนำ

เปปไทด์ต้านจุลชีพเป็นโปรตีนขนาดเล็ก ถูกค้นพบมากกว่า 50 ปี โดยทั่วไปประกอบไปด้วยกรดอะมิโนประมาณ 12-50 ตัว และส่วนใหญ่มีประจุเป็นบวก สามารถพบได้ทั้งในสิ่งมีชีวิตจำพวกโปรคาริโอต (prokaryote) และยูคาริโอต (eukaryote) เปปไทด์เหล่านี้เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (innate immunity) โดยพบว่าเปปไทด์ต้านจุลชีพถูกสร้างขึ้นเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย เช่น เชื้อจุลชีพ เปปไทด์บางชนิดสามารถฆ่าเชื้อจุลชีพกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งได้อย่างจำเพาะ ในขณะที่บางชนิดสามารถทำลายเชื้อจุลชีพได้แบบกว้าง (broad-spectrum) การศึกษาในปัจจุบันพบว่ากลไกการออกฤทธิ์ของเปปไทด์ต้านจุลชีพนั้นโดยส่วนใหญ่เกิดขึ้นที่เซลล์เมมเบรนของเชื้อจุลชีพ อย่างไรก็ตามเปปไทด์หลายชนิดสามารถผ่านผนังเซลล์และเซลล์เมมเบรนของเชื้อจุลชีพเข้าไปจับกับสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์รวมถึงสารพันธุกรรมของเชื้อจุลชีพ ส่งผลให้มีการสังเคราะห์สารชีวโมเลกุลบางชนิดลดลงหรือทำให้สูญเสียหน้าที่ไปจากเดิม ซึ่งนำไปสู่การตายของเชื้อจุลชีพในที่สุด นอกเหนือจากการเป็นสารทำลายเชื้อก่อโรคร้ายอย่างเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส และปรสิตแล้ว เปปไทด์ต้านจุลชีพยังเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญหรือฆ่าเซลล์มะเร็ง ยับยั้งสเปิร์ม (sperm) ซึ่งอาจนำไปใช้ในการคุมกำเนิดได้ในอนาคต บางชนิดสามารถฆ่าแมลงศัตรูพืช ลดการเกิดชีวพิษ (toxin neutralization) ที่สร้างจากเชื้อจุลชีพ เช่น สารไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide; LPS) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์และมีคุณสมบัติเป็นเอนโดท็อกซิน (endotoxin) ยับยั้งการสร้างสารไบโอฟิล์ม (antibiofilm activity) สามารถกระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันและควบคุมระบบภูมิคุ้มกัน (chemotactic and immunomodulating activities) และยังพบว่าเปปไทด์ต้านจุลชีพบางชนิดเกี่ยวข้องกับการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) และการซ่อมแซมบาดแผล (wound repairing) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการทำให้แผลที่ติดเชื้อหายได้เร็วขึ้นด้วย ซึ่งบทบาทของเปปไทด์ต้านจุลชีพนอกเหนือจากการทำลายเชื้อจุลชีพจะได้กล่าวต่อไป

1.2 ประวัติการค้นพบเปปไทด์ต้านจุลชีพ

ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันมีรายงานการค้นพบเปปไทด์ต้านจุลชีพมากกว่า 2,800 ชนิด ซึ่งส่วนใหญ่พบในสัตว์ (2,159 ชนิด) และพืช (343 ชนิด) ตามลำดับ⁽¹⁾ ข้อมูลจากฐานข้อมูลของ antimicrobial peptide database (<http://aps.unmc.edu/AP/>) ล่าสุดในปี พ.ศ. 2563 พบเปปไทด์ต้านจุลชีพมีรายงานทั้งหมด 3,240 ชนิด⁽²⁾ ซึ่งเปปไทด์โดยส่วนใหญ่สามารถยับยั้งหรือฆ่าเชื้อจุลชีพโดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรีย แม้เปปไทด์ต้านจุลชีพจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย แต่ก็พบว่าแบคทีเรียซึ่งเป็นโปรคาริโอตหลากหลายสายพันธุ์รวมถึงกลุ่มของอาร์เคีย (archaea) สามารถสร้างเปปไทด์ต้านจุลชีพได้เช่นเดียวกัน ซึ่งเรียกเปปไทด์ต้านจุลชีพที่สร้างโดยแบคทีเรียเหล่านี้ว่า แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) โดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มคือ แลนติไบโอติก (lantibiotics) และนอน-แลนติไบโอติก (non-lantibiotics)⁽³⁾ ซึ่งเปปไทด์กลุ่มแลนติไบโอติกสัณฐานมักพบกรดอะมิโนที่ไม่พบในธรรมชาติเป็นองค์ประกอบ เช่น แลนไทโอนิน (lanthionine) เมทิลแลนไทโอนิน (methyllanthionine) ดีไฮโดรอะลานีน (dehydroalanine) และมักมีการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) ภายในสายของเปปไทด์ การค้นพบเปปไทด์ต้านจุลชีพในเชื้อแบคทีเรียเริ่มในปี พ.ศ. 2482 เมื่อ Hotchkiss และ Dubos แยกสกัดเปปไทด์ชนิดหนึ่งได้จาก *Bacillus brevis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียในดินและตั้งชื่อเปปไทด์ดังกล่าวว่าแกรมซิดิน (gramicidin) โดยพบว่าเปปไทด์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและสามารถป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus pneumoniae* ในหนูทดลองได้⁽⁴⁾ และแกรมซิดินเป็นเปปไทด์ต้านจุลชีพตัวแรกที่ผลิตเป็นยาปฏิชีวนะในการรักษาโรคติดเชื้อ⁽⁵⁾ ต่อมาในปี พ.ศ. 2484 นักวิทยาศาสตร์ได้ค้นพบเปปไทด์ไทโรซิไดน (tyrocidine) จากแบคทีเรีย *Brevibacillus parabrevis* โดยเปปไทด์นี้มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ อย่างไรก็ตามพบว่าเปปไทด์นี้มีผลทำให้เม็ดเลือดแดงแตก ทำให้ไม่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อในมนุษย์^(6,7) ต่อมาในปี พ.ศ. 2490 ได้มีการแยกเปปไทด์ต้านจุลชีพนินซิน (nisin) ซึ่งเป็นเปปไทด์กลุ่มแลนติไบโอติกส์ มีกรดอะมิโนยาว 34 ตัว ได้จากแบคทีเรีย *Lactococcus lactis*^(3,8) เนื่องจากเปปไทด์นี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอื่น ๆ ได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ประกอบกับเปปไทด์สามารถถูกย่อยด้วยเอนไซม์ในร่างกายมนุษย์ เช่น ทริปซิน (trypsin) แพนเครียติน (pancreatin) และแอลฟา-คัลโมทริปซิน (alpha-chymotrypsin)⁽⁹⁾ และพบว่าเปปไทด์นินซินถูกเปลี่ยนเป็นกรดอะมิโนก่อนการดูดซึมเข้าสู่เซลล์ของร่างกาย^(10,11) จึงทำให้เปปไทด์มีความปลอดภัยต่อการบริโภค เปปไทด์นินซินจึงถูกนำมาใช้ในขบวนการถนอมอาหาร (food preservative) มายาวนานกว่า 50 ปี⁽⁸⁾ จากนั้นก็มีการค้นพบเปปไทด์ต้านจุลชีพในเชื้อจุลชีพเรื่อยมาจนถึงปัจจุบัน ซึ่งมีหลากหลายชนิด เช่น

เปปไทด์ไซยาโนแบคทีน (cyanobactins) ซึ่งเป็นเปปไทด์ที่สังเคราะห์ได้จากไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria)⁽¹²⁾ แม้ในปัจจุบันจะยังไม่ทราบเหตุผลที่ชัดเจนเกี่ยวกับสร้างเปปไทด์ด้านจุลชีพในแบคทีเรีย แต่มีข้อสันนิษฐานว่าแบคทีเรียชนิดหนึ่งจะสร้างเปปไทด์ด้านจุลชีพไปยังแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ เพื่อแย่งสารอาหารจากธรรมชาติ

ในยูคาริโอต Alexander Fleming ได้รายงานการค้นพบไลโซไซม์ (lysozyme) ซึ่งจัดเป็นเปปไทด์ด้านจุลชีพเป็นครั้งแรกในปี พ.ศ. 2465 โดยเปปไทด์ที่มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์แยกได้จากสารคัดหลั่งต่าง ๆ เช่น น้ำตา น้ำนมมารดา โดยไลโซไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะระหว่างน้ำตาลเอ็น-อะซิทิล กลูโคซามีน (N-acetylglucosamine) และกรดเอ็น-อะซิทิลมูรามินิก (N-acetylmuraminic acid) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรีย⁽¹³⁾ ต่อมาในปี พ.ศ. 2485 ได้มีการแยกสกัดเปปไทด์ด้านจุลชีพพิวโรไทโอนิน (purothionin) จากส่วนของเอนโดสเปิร์ม (endosperm) ของข้าวสาลี (*Triticum aestivum*)^(14,15) โดยพบว่าเปปไทด์ดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดที่ก่อโรคในพืช เช่น *Pseudomonas solanacearum* และ *Xanthomonas campestris*⁽¹⁶⁾ การค้นพบเปปไทด์ด้านจุลชีพในสัตว์อื่น ๆ เริ่มขึ้นในปี พ.ศ. 2505 โดย Kiss และ Micht ได้แยกเปปไทด์บอมบินิน (bombinin) จากผิวหนังของกบ (*Bombina variegata*)⁽¹⁷⁾

นอกจากนี้ ในเวลาใกล้เคียงกันได้มีการค้นพบเปปไทด์แลคโตเฟอริน (lactoferrin) จากน้ำนม⁽¹⁸⁾ รวมถึงเปปไทด์ด้านจุลชีพที่แยกได้จากเซลล์เม็ดเลือดขาว เช่น เปปไทด์แอลฟา-ดีเฟนซิน (alpha-defensin) จากกระต่าย^(19,20) ในปี พ.ศ. 2524 มีรายงานการค้นพบเปปไทด์ด้านจุลชีพที่มีโครงสร้างทุติยภูมิเป็นแบบแอลฟา-เฮลิคซ์ (alpha-helix) เป็นครั้งแรกในฮีโมลิมป์ (hemolymph) ของผีเสื้อกลางคืน (*Hyalophora cecropia*) โดยพบว่าเปปไทด์เซคโครบิน (cecropin) มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลชีพแบบกว้างทั้งแบคทีเรีย แกรมบวก แกรมลบและเชื้อรา^(21,22) ต่อมาจึงมีการค้นพบเปปไทด์ด้านจุลชีพในสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ อีกหลายชนิด เช่น เปปไทด์มาโกนิน (magainins) จากผิวหนังของกบ (*Xenopus laevis*)⁽²³⁾ เปปไทด์บีตา-ดีเฟนซิน (beta-defensin) และเดลต้า-ดีเฟนซิน (delta-defensin) จากเซลล์เม็ดเลือดขาวของโค⁽²⁴⁾ และลิง⁽²⁵⁾ ตามลำดับ

1.3 คุณสมบัติทั่วไปของเปปไทด์ต้านจุลชีพ

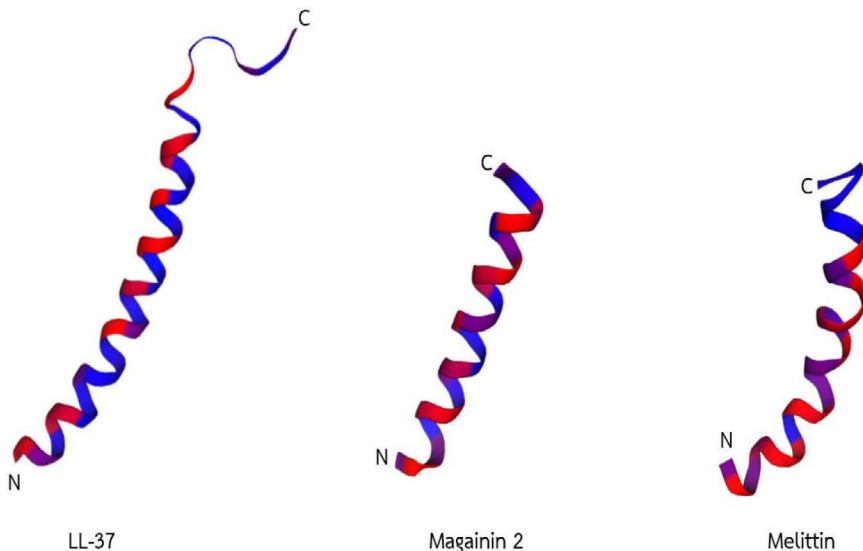
เปปไทด์ต้านจุลชีพเป็นโปรตีนขนาดเล็กประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 12-50 ตัว เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด ภายในสายของเปปไทด์นั้นประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีประจุบวก (positively charge amino acids) เช่น อาร์จินีน (arginine) ไลซีน (lysine) และกรดอะมิโนชนิดไม่มีขั้ว (hydrophobic amino acids) เช่น อะลานีน (alanine) ฟีนีลอะลานีน (phenylalanine) ทริปโตฟาน (tryptophan) และ ไทโรซีน (tyrosine) มากกว่าร้อยละ 50 ซึ่งการมีกรดอะมิโนที่มีประจุบวกจำนวนมากนั้นส่งเสริมให้เปปไทด์ต้านจุลชีพมีคุณสมบัติในการเลือกจับกับแบคทีเรียผ่านประจุลบของฟอสโฟไลปิด (phospholipid) ที่เซลล์เมมเบรนของเชื้อร่วมกับสารบางชนิดที่เชื่อมสร้างขึ้น เช่น กรดเทโคอิก (teichoic acid) ของแบคทีเรียแกรมบวกหรือสารไลโปโพลีแซคคาไรด์ของแบคทีเรียชนิดแกรมลบ⁽²⁶⁻²⁸⁾ แม้เปปไทด์สามารถจับกับเชื้อจุลชีพผ่านประจุไฟฟ้า แต่รายงานหลายฉบับพบว่า โครงสร้างทุติยภูมิของเปปไทด์มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ในการยับยั้งหรือฆ่าเชื้อ ซึ่งจะได้กล่าวต่อไป

1.4 โครงสร้างทุติยภูมิของเปปไทด์ต้านจุลชีพ

จากการศึกษาวิจัยพบว่าเปปไทด์ต้านจุลชีพมีคุณสมบัติเป็นแอมฟิพาธิซิตี (amphipathicity) กล่าวคือเป็นโมเลกุลที่ด้านหนึ่งมีประจุส่วนอีกด้านหนึ่งไม่มีขั้ว (hydrophobicity) ซึ่งส่วนของโมเลกุลที่มีประจุนี้มีความสำคัญและเกี่ยวข้องกับการจับกับเซลล์เมมเบรนของเชื้อจุลชีพ นำไปสู่การแทรกตัวของเปปไทด์โดยอาศัยส่วนที่ไม่มีขั้วและทำลายเชื้อได้ต่อไป⁽²⁹⁻³²⁾ ปัจจุบันเปปไทด์ต้านจุลชีพสามารถแบ่งเป็นกลุ่มโดยอาศัยคุณสมบัติต่าง ๆ เช่น ลำดับกรดอะมิโนภายในสายของเปปไทด์ (amino acid sequence) กลไกการออกฤทธิ์ (mechanism of action) และโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) ซึ่งการแบ่งกลุ่มโดยอาศัยโครงสร้างทุติยภูมิสามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม⁽¹⁾ ดังนี้

1.4.1 เปปไทด์ที่มีโครงสร้างเกลียวแอลฟา-เฮลิคัล (alpha-helical peptides)

เปปไทด์ที่มีโครงสร้างเกลียวแอลฟา-เฮลิคัลเป็นลักษณะโครงสร้างเกลียวเวียนขวา อาจสั้นหรือยาวขึ้นกับความยาวของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ ตัวอย่างของเปปไทด์ต้านจุลชีพในกลุ่มนี้ เช่น เปปไทด์มาไคนิน ออรีน (aurein) เบรวินิน (brevinin) ซึ่งแยกได้จากผิวหนังของสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำจำพวกกบ เปปไทด์ เมลิตติน (melittin) จากสารพิษที่ผึ้งปล่อยออกมา (bee venom)

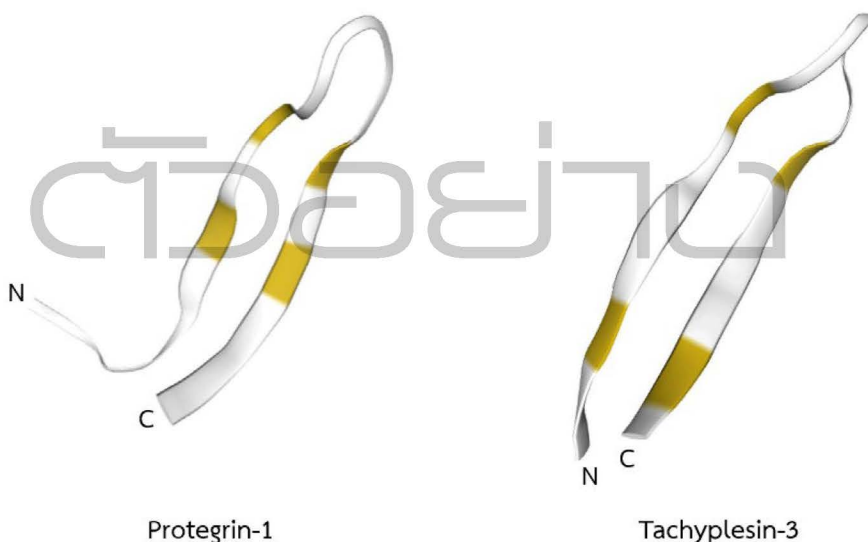


รูปที่ 1.1 โครงสร้างทุติยภูมิชนิดแอลฟา-เฮลิคซ์ของเปปไทด์ต้านจุลชีพบางชนิด เกลียวเวียนขวาแสดงโครงสร้างแอลฟา-เฮลิคซ์ สีแดงแสดงส่วนของกรดอะมิโนชนิดไม่มีขั้ว สีน้ำเงินแสดงส่วนของกรดอะมิโนชนิดที่มีขั้ว (polar amino acids) N และ C แสดงปลายด้านเอ็นและซีของเปปไทด์ โครงสร้างทุติยภูมิของเปปไทด์แต่ละชนิดสร้างโดยใช้เว็บไซต์สาธารณะ SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) โครงสร้างของเปปไทด์แอลแอล-37 (LL-37) มาโกนิน 2 (magainin 2) และ เมลิตติน (melittin) มาจากฐานข้อมูล UniprotKB (<https://www.uniprot.org/peptidesearch/>) หมายเลข: J3KNB4, P11006 และ P01501 ตามลำดับ

เปปไทด์เซโครปินจากผึ้งเสือกกลางคืนและเปปไทด์แอลแอล-37 (LL-37) ซึ่งเป็นโปรตีนภายในเซลล์เม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิล (neutrophil) ของมนุษย์ เปปไทด์ต้านจุลชีพที่มีโครงสร้างเป็นเกลียวแอลฟา-เฮลิคซ์แสดงดังรูปที่ 1.1

1.4.2 เปปไทด์ที่มีโครงสร้างบีตา-ชีต (beta-sheet peptides)

เปปไทด์ที่มีโครงสร้างบีตา-ชีตโดยส่วนใหญ่ประกอบด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) ซึ่งเกิดจากการต่อมีโนซิสเตอีนอย่างน้อย 2 ตัว (อย่างน้อย 1 พันธะ) ในการคงรูปร่าง ตัวอย่างของเปปไทด์ ด้านจุลชีพในกลุ่มนี้ เช่น โปรเทกริน (protegrins) ซึ่งสร้างจากเซลล์เม็ดเลือดขาวของสุกร เทชีเพลซิน (tachypleins) และโพลีเพลมิวซิน (polyplemusins) ซึ่งแยกได้จากฮีโมไซต์ (hemocyte) ของแมงดาทะเล (horseshoe crab) แอลฟา- และบีตา-ดีเฟนซินจากเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์ เปปไทด์ด้านจุลชีพที่มีโครงสร้างบีตา-ชีตแสดงดังรูปที่ 1.2



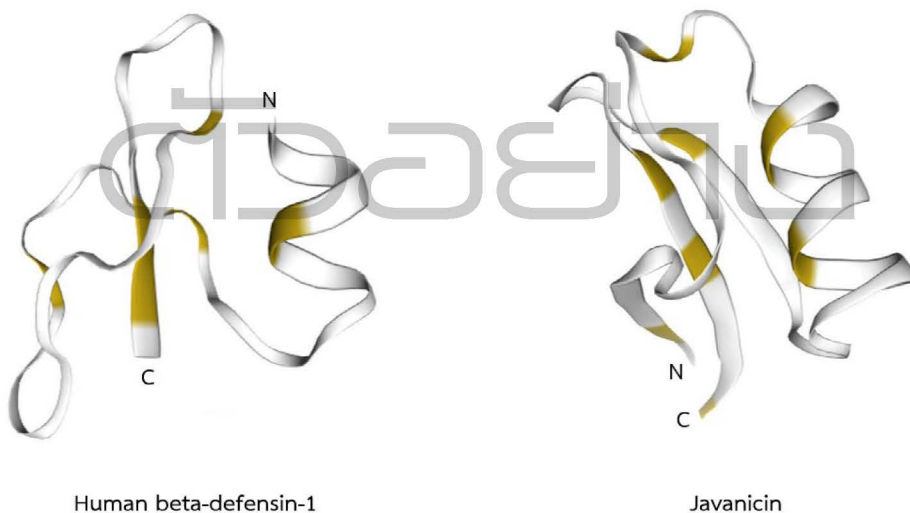
รูปที่ 1.2 โครงสร้างทุติยภูมิชนิดบีตา-ชีตของเปปไทด์ด้านจุลชีพบางชนิด โครงสร้างบีตา-ชีต (beta-sheet) ของเปปไทด์ด้านจุลชีพ สีเหลืองแสดงตำแหน่งของกรดอะมิโนซิสเตอีน (cysteine amino acids) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการคงรูปร่างโดยอาศัยพันธะไดซัลไฟด์ N และ C แสดงปลายด้านเอ็นและซีของเปปไทด์ โครงสร้างทุติยภูมิของเปปไทด์สร้างโดยใช้เว็บไซต์สาธารณะ SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) โครงสร้างของเปปไทด์โปรเทกริน-1 (protegrin-1) และเทชีเพลซิน-3 (tachyplein-3) มาจากฐานข้อมูล UniprotKB (<https://www.uniprot.org/peptidesearch/>) หมายเลข: P32194 และ P18252 ตามลำดับ

1.4.3 เปปไทด์ที่มีโครงสร้างสายตรง (extended peptides หรือ random coil)

ตัวอย่างของเปปไทด์ด้านจุลชีพที่มีโครงสร้างสายตรง เช่น อินโดลิซินิน (indolicidin) จาก โค ฟีอาร์-39 (PR-39) จากสกุรและเปปไทด์ซีเอ็น-เอเอ็มพี 1 (Cn-AMP1) ซึ่งแยกสกัดได้จากน้ำมะพร้าว (*Cocos nucifera*)

1.4.4 เปปไทด์ที่มีโครงสร้างผสม (mixed structure peptides)

เปปไทด์กลุ่มนี้ประกอบด้วยโครงสร้างเกลียวแอลฟา-เฮลิกซ์เป็นลักษณะโครงสร้างเกลียวเวียนขวาร่วมกับโครงสร้างบีตา-ชีต ตัวอย่างของเปปไทด์ในกลุ่มนี้ เช่น เปปไทด์พิวโรไทโอนินและเปปไทด์ บีตา-ดีเฟนซินจากพืช เปปไทด์ด้านจุลชีพที่มีโครงสร้างผสมแสดงดังรูปที่ 1.3



รูปที่ 1.3 โครงสร้างทุติยภูมิผสมของเปปไทด์ด้านจุลชีพบางชนิด โครงสร้างผสมระหว่างอัลฟาเฮลิกซ์และบีตา-ชีต ในเปปไทด์ด้านจุลชีพบางชนิด สีเหลืองแสดงตำแหน่งของกรดอะมิโนซิสเตอีนซึ่งเกี่ยวข้องกับการคงรูปโครงสร้างโดยอาศัยพันธะไดซัลไฟด์ N และ C แสดงปลายด้านเอ็นและซีของเปปไทด์ โครงสร้างทุติยภูมิของเปปไทด์สร้างโดยใช้เว็บไซต์สาธารณะ SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) โครงสร้างของเปปไทด์บีตา-ดีเฟนซิน-1 ในมนุษย์ (human beta-defensin-1) มาจากฐานข้อมูล UniprotKB (<https://www.uniprot.org/peptidesearch/>) หมายเลข: P60022 ส่วนโครงสร้างทุติยภูมิของเปปไทด์จาวานิน (javanicin) ได้จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์จาวานินกับเปปไทด์ในฐานข้อมูล จากนั้นทำนายโครงสร้างโดยอาศัยเปปไทด์ในฐานข้อมูลเป็นแม่พิมพ์ ซึ่งเปปไทด์แม่พิมพ์ได้แก่ ดีเฟนซินจากถั่วเขียว (*Vigna radiata*) UniprotKB หมายเลข Q8W434 โดยพบว่าเปปไทด์จาวานินเหมือนกับเปปไทด์ดีเฟนซินจากถั่วเขียวถึงร้อยละ 89.36

1.5 กลไกการออกฤทธิ์ของเปปไทด์ในการฆ่าเชื้อจุลชีพผ่าน ทางการทำลายเซลล์เมมเบรน

เนื่องจากเปปไทด์ต้านจุลชีพนั้นมีหลากหลายชนิดและมีเป้าหมายในการยับยั้งการเจริญหรือฆ่าเชื้อจุลชีพที่แตกต่างกัน บางชนิดเข้าไปมีผลยับยั้งการทำงานของโปรตีน เอนไซม์ กรดนิวคลีอิก หรือสารภายในเซลล์ อย่างไรก็ตามส่วนใหญ่มีเป้าหมายอยู่ที่การทำลายเซลล์เมมเบรน ซึ่งขั้นตอนในการทำลายจุลชีพของเปปไทด์ต้านจุลชีพและแบบจำลองการทำลายเซลล์มีอยู่หลายแบบดังจะได้กล่าวต่อไป^(33,34) ขั้นตอนในการทำลายเชื้อจุลชีพของเปปไทด์ผ่านทางเซลล์เมมเบรนของเชื้อนั้นเริ่มจากการดึงดูดหรือเหนี่ยวนำระหว่างเปปไทด์ต้านจุลชีพและตัวเชื้อ (cell attraction) โดยอาศัยแรงขั้วไฟฟ้า (electrostatic interaction) ซึ่ง เปปไทด์ต้านจุลชีพมีประจุเป็นบวก ในขณะที่เซลล์เมมเบรนของเชื้อจุลชีพและองค์ประกอบของสารบนผิวของเซลล์แบคทีเรียมีประจุเป็นลบ เช่น สารไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบหรือกรดเทโคอิกของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก จากนั้นเปปไทด์ต้านจุลชีพจะจับตัวเชื้อ (attachment) และแทรกตัวผ่านผนังเซลล์เข้าไปยึดเกาะกับประจุลบของฟอสโฟไลปิดในชั้นลิพิดไบเลเยอร์ (lipid bilayer) ของเซลล์ โดยเปปไทด์จะใช้ส่วนที่ไม่มีขั้ว (hydrophobic core) เข้าไปในส่วนของชั้นลิพิดไบเลเยอร์ เมื่อมีการสะสมเปปไทด์ที่ผิวของชั้นลิพิดไบเลเยอร์มากพอ เปปไทด์จะจัดเรียงตัวในแนวตั้งฉากและแทรกตัวเข้าสู่เซลล์เมมเบรน ส่งผลทำให้เกิดรู (pore) ที่เซลล์เมมเบรนจำนวนมาก เกิดการเพิ่มเมมเบรนเพอร์มิอะบิลิตี (membrane permeability) และทำให้เกิดการรั่วไหลของสารต่าง ๆ และไอออนจากภายในเซลล์ออกสู่ภายนอก ทำให้เชื้อจุลชีพสูญเสียการควบคุมแรงดันออสโมติก (osmotic regulation) ภายในเซลล์ ซึ่งจะส่งผลให้เชื้อจุลชีพตายในที่สุด^(34,35) แบบจำลองของการเกิดรูจากเปปไทด์แต่ละชนิดจะได้กล่าวต่อไป