

ประสิทธิภาพของสารสกัดมิวทาซิน 1140 ในการต้านเชื้อสเตรปโตค็อกคไคในช่องปาก

ฉัตรปรีชา ปาลกะวงษ์ ณ อยุธยา* สมเกียรติ เหลืองไพรินทร์*,** วีระพงศ์ ลูลิตานนท์*,***

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดมิวทาซิน 1140 ในการยับยั้งและฆ่าสเตรปโตค็อกคไคกลุ่มมิวแทนส์และกลุ่มที่ไม่ใช่มิวแทนส์ โดยการสกัดมิวทาซิน 1140 จากอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงสเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ เจเอส 1140 และแยกบริสุทธิ์ด้วยคอลโรฟอร์ม วัดปริมาณโปรตีนของสารสกัดมิวทาซิน 1140 โดยการวัดความเข้มข้นของสีที่เกิดจากปฏิกิริยากับกรดโบชินโคนิก วัดค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดมิวทาซิน 1140 ในการยับยั้งและฆ่าแบคทีเรีย 6 สปีชีส์ (ได้แก่ สเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ สเตรปโตค็อกคัส โซบรินัส สเตรปโตค็อกคัส ไมติส สเตรปโตค็อกคัส กอร์ดอนนีโอ สเตรปโตค็อกคัส แซงควินิส และ สเตรปโตค็อกคัส ซาลิวาเรียส) ด้วยวิธีบรอร์ ไมโครโดลูชั่น หาค่าเวลาที่ใช้ในการฆ่าแบคทีเรียแต่ละชนิด โดยใช้สารสกัดมิวทาซิน 1140 ที่ระดับความเข้มข้นสำหรับการฆ่าสเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าสารสกัดมิวทาซิน 1140 มีฤทธิ์ยับยั้งและฆ่าสเตรปโตค็อกคไคกลุ่มที่ไม่ใช่มิวแทนส์ได้ดีกว่ากลุ่มมิวแทนส์ นอกจากนี้ สเตรปโตค็อกคัส โซบรินัสมีความไวต่อฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดมิวทาซิน 1140 มากกว่า สเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ เวลาที่ใช้ในการทำลายเชื้ออย่างสมบูรณ์สำหรับแบคทีเรียที่มีความไวมากกว่าและน้อยกว่า เท่ากับ 30 และ 60 นาที ตามลำดับ โดยสรุป สเตรปโตค็อกคไคในช่องปากชนิดอื่น ทั้งหมดที่นำมาทดสอบในการศึกษานี้มีความไวต่อฤทธิ์ในการยับยั้งและฆ่าเชื้อของสารสกัดมิวทาซิน 1140 มากกว่า สเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ ด้วยเหตุนี้ การศึกษานี้จึงแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของการศึกษาวิจัยต่อไปในด้านระบบนำส่งยาสู่เป้าหมาย เชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตค็อกคไค เพื่อการควบคุมโรคฟันผุ

คำไชรหัส: มิวทาซิน 1140/ เปปไทด์ต้านจุลชีพ/ สเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์/ โรคฟันผุ

บทนำ

สเตรปโตค็อกคไค (Streptococci) เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญอย่างมากต่อสุขภาพช่องปาก โดยเป็นแบคทีเรียกลุ่มแรกในกระบวนการสร้างคราบจุลินทรีย์ (Plaque) หรือไบโอฟิล์ม (Biofilm) ในระยะเริ่มต้น¹ ลักษณะของเชื้อเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม เรียงตัวเป็นสายยาว พบได้ทั้งในไบโอฟิล์มเนื้อเยื่อและใต้เหงือก โดยจัดอยู่ในกลุ่มสีเหลือง (Yellow complex)² สเตรปโตค็อกคัส ไมติส (*Streptococcus mitis*) และสเตรปโตค็อกคัส ซาลิวาเรียส (*Streptococcus salivarius*) เป็นแบคทีเรียชนิดแรกๆ ที่สามารถตั้งถิ่นฐานในช่องปากของมนุษย์ได้โดยการยึดเกาะกับเซลล์เยื่อผิวในช่องปาก ส่วนสเตรปโตค็อกคไคชนิดอื่นมักตรวจพบได้หลังจากที่มีฟันขึ้นมาสู่ช่องปากแล้ว^{3,4} สเตรปโตค็อกคัส แซงควินิส (*Streptococcus sanguinis*) และสเตรปโตค็อกคัส กอร์ดอนนีโอ (*Streptococcus gordonii*) สามารถยึดเกาะและสร้างไบโอฟิล์มบนผิวฟันได้⁵ แต่

ในภาวะที่มีน้ำตาลซูโครส สเตรปโตค็อกคไคกลุ่มมิวแทนส์ (Mutans streptococci) ได้แก่ สเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ (*Streptococcus mutans*) และ สเตรปโตค็อกคัส โซบรินัส (*Streptococcus sobrinus*) ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของโรคฟันผุในมนุษย์^{6,7} สามารถยึดเกาะและสร้างไบโอฟิล์มบนผิวฟันได้ดียิ่งขึ้น โดยใช้น้ำตาลซูโครสในการสร้างเมทริกซ์ภายนอกเซลล์ (Extracellular matrix) เป็นโครงสร้างของไบโอฟิล์มที่เอื้อต่อการดื้อยาหรือสารต้านจุลชีพ การได้มาซึ่งอาหารจากภายนอก การสำรอกอาหาร และการสร้างกรดที่ก่อให้เกิดโรคฟันผุ⁸⁻¹⁰

แบคทีเรียมีกลไกในการแข่งขันกับแบคทีเรียชนิดอื่นในกระบวนการสร้างไบโอฟิล์มและในการควบคุมจำนวนประชากรของแบคทีเรียด้วยกันเองเมื่อไบโอฟิล์มมีความหนาแน่นของเซลล์สูง โดยการสร้างแบคทีริโอซิน (Bacteriocin) ซึ่งเป็นเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ (Antimicrobial peptide) และหลั่งออกมาฆ่าเชื้อหลายสปีชีส์ (Species) ทั้งชนิดอื่น

* กลุ่มวิจัยไบโอฟิล์ม ศูนย์วิจัยและบริการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อระบบทางเดินหายใจ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น

** ภาควิชาชีววิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น

*** ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น

และชนิดเดียวกันหรือใกล้เคียง¹¹ แบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยสเตรปโตค็อกคัสไมวแทนส์ มีชื่อเรียกเฉพาะว่า มิวทาซิน (Mutacin)¹² การศึกษาของฮิลล์แมนและคณะ (Hillman et al.) ในปี ค.ศ. 1984¹³ แสดงให้เห็นว่า มิวทาซินที่ผลิตโดยสเตรปโตค็อกคัส ไมวแทนส์ สายพันธุ์ เจเอช 1000 (*S. mutans* JH1000) สามารถฆ่าสเตรปโตค็อกคัส ไมวแทนส์ 123 สายพันธุ์จาก 124 สายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ และแบคทีเรียแกรมบวกชนิดอื่น รวมถึงเชื้อก่อโรคฟันผุกลุ่มแอคตินอมัยเซส (*Actinomyces*) และแลคโตบาซิลไล (*Lactobacilli*) ด้วยเช่นกัน แต่ไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบและเชื้อรา ต่อมาในปี ค.ศ. 1998 ฮิลล์แมนและคณะ¹⁴ สามารถคัดแยกสายพันธุ์ เจเอช 1140 (JH1140) ซึ่งเกิดขึ้นเองจากการผ่าเหล่าตามธรรมชาติ (Spontaneous mutation) ของสเตรปโตค็อกคัส ไมวแทนส์ สายพันธุ์ เจเอช 1000 โดยสามารถผลิตมิวทาซินได้สูงขึ้น 3 เท่า เมื่อทำการสกัดและแยกบริสุทธิ์ (Purification) เพื่อศึกษาลำดับของกรดอะมิโนและโครงสร้างของเปปไทด์ พบว่า เป็นมิวทาซินชนิดใหม่ จึงได้ตั้งชื่อว่า มิวทาซิน 1140 ซึ่งถูกจัดอยู่ในกลุ่มแลนติไบโอติก (Lantibiotic) ที่มีกระบวนการดัดแปลงหลังการแปลรหัส (Post-translational modification) ทำให้โครงสร้างมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อม ได้แก่ ความร้อนและสภาวะที่เป็นกรด¹⁵

การนำมิวทาซิน 1140 มาประยุกต์ใช้ในการกำจัดสเตรปโตค็อกคัสไมวแทนส์จึงเป็นแนวทางหนึ่งในการป้องกันรักษาโรคฟันผุที่ควรทำการศึกษาวิจัยต่อไป โดยประเด็นสำคัญที่จำเป็นต้องคำนึงถึงก่อนคือ การศึกษาผลข้างเคียงต่อแบคทีเรียชนิดอื่นโดยเฉพาะอย่างยิ่งสเตรปโตค็อกคัสไมวแทนส์ที่ไม่ใช่ไมวแทนส์ว่าจะได้รับผลกระทบมากน้อยเพียงใด แม้ว่าได้มีการศึกษาเกี่ยวกับประเด็นนี้บ้างแล้ว แต่การศึกษาที่ผ่านมาเน้นทำการทดสอบด้วยวิธีการซ้อนทับ (Overlay technique) รุ่นที่มีแบคทีเรียเป้าหมายลงบนรุ่นที่มีแบคทีเรียที่ผลิตมิวทาซิน 1140¹³ และวิธีการแพร่ผ่านวุ้น (Agar diffusion)¹⁴ ซึ่งเป็นวิธีการที่นิยมใช้กันมากที่สุดเนื่องจากสะดวก ประหยัด และใช้เวลาน้อย อย่างไรก็ตาม เป็นเพียงการทดสอบเชิงคุณภาพ นอกจากนี้การรายงานผลมุ่งเน้นแต่เพียงเพื่อแสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบนั้น มี (+) หรือ ไม่มี (-) ความไว (Sensitivity)

ต่อฤทธิ์ยับยั้งและฆ่าเชื้อของสารสกัดมิวทาซิน 1140 เท่านั้น ดังนั้นการศึกษาที่ผ่านมาจึงยังไม่สามารถระบุความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียที่ให้ผลบวกเช่นกันว่าชนิดใดมีความไวมากกว่ากันเท่าไร การศึกษานี้จึงทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดมิวทาซิน 1140 ในการยับยั้งและฆ่าสเตรปโตค็อกคัสไมวแทนส์และกลุ่มที่ไม่ใช่ไมวแทนส์ ด้วยวิธีการทดสอบเชิงปริมาณ ได้แก่ วิธีบร็อธไมโครไดลูชัน (Broth microdilution assay) และวิธีไทม์ คิลล์ (Time-kill assay) ทำให้ทราบความแตกต่าง (จำนวนเท่า) ของความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดมิวทาซิน 1140 ในการยับยั้งและฆ่าแบคทีเรียที่เป็นตัวแทนของแต่ละสปีชีส์ในทั้ง 2 กลุ่ม และเวลาในการฆ่าเชื้อแต่ละชนิดหากใช้สารสกัดมิวทาซิน 1140 ที่ความเข้มข้นเพียงพอสำหรับการกำจัดสเตรปโตค็อกคัส ไมวแทนส์ ข้อมูลเหล่านี้จะเป็นแนวทางเบื้องต้นในการศึกษาเพื่อพัฒนาการใช้มิวทาซิน 1140 ในการควบคุมโรคฟันผุต่อไป

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

การผลิตสารสกัดมิวทาซิน 1140

การผลิตมิวทาซิน 1140 รวมถึงการสกัดและแยกบริสุทธิ์ทำตามวิธีการของฮิลล์แมนและคณะ¹⁴ โดยใช้เข็มเย็บสเตรปโตค็อกคัสไมวแทนส์ เจเอช 1140 ซีดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อทออดด์ ฮิววิตต์ (Todd Hewitt) ชนิดกึ่งแข็งเป็น 4 ระบายก่อนนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในตู้บ่มก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 (Shel Lab™ CO₂ incubator, Sheldon Manufacturing, OR, USA) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อจากโคโลนีเดี่ยวที่แยกได้โดยการย้อมสีแกรม แล้วสังเกตลักษณะและการเรียงตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Eclipse E200, Nikon Corporation, Tokyo, Japan) เพาะเลี้ยงโคโลนีที่แยกได้บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ลอกแผ่นอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ในขวดทนแรงดันเหวี่ยงสูง นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วนำออกมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-4 ชั่วโมงหรือจนกว่าน้ำแข็งละลาย นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Sorvall™ RC 6 Plus

centrifuge, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) ที่อุณหภูมิห้องที่ความเร็ว 4,000 จี (จำนวนเท่าของแรงโน้มถ่วงโลก หรือ g) เป็นเวลา 60 นาที 1 รอบและที่ความเร็ว 8,000 จี เป็นเวลา 30 นาที อีก 1 รอบ จากนั้นดูดเฉพาะส่วนของเหลว (Supernatant) มากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman® No.1) ขนาดรูพรุน 11 ไมโครเมตรตามด้วยฟิลเตอร์ขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร เพื่อกำจัดเศษเซลล์และวุ้นเลี้ยงเชื้อออก เดิมคลอโรฟอร์มลงในของเหลวที่ผ่านการกรองแล้วให้มีความเข้มข้นเท่ากับร้อยละ 3.33 คนให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนสารละลาย (HS10 Series Analog, Torrey Pines Scientific, CA, USA) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วตั้งทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิห้อง เก็บตะกอนสีขาวขุ่นในชั้นคลอโรฟอร์มที่ก้นขวดมาปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้องที่ความเร็ว 2,500 จี เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนของเหลวทิ้ง ล้างตะกอนด้วยคลอโรฟอร์ม 10 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 จี เป็นเวลา 1 นาที ดูดสารละลายสีเหลืองใสออกให้หมด ทำขั้นตอนการล้างซ้ำอีกรอบ แล้วนำตะกอนไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยใช้เครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบแห้ง (Accublock™ digital dry bath, Labnet, NJ, USA) ในตู้ปลอดเชื้อ (Forma® class II type A/B3 biological safety cabinet, Forma Scientific, OH, USA) เก็บสารสกัดมีวาซิน 1140 ในตู้ดูดความชื้น (Nikko desiccator cabinet, Nikko, Japan) จนกว่าจะใช้งาน

การวัดปริมาณโปรตีนของสารสกัดมีวาซิน 1140

เตรียมสารสกัดมีวาซิน 1140 ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 (มวลต่อปริมาตร) ในตัวทำละลายเอทิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้นร้อยละ 50 วัดปริมาณโปรตีนโดยการวัดความเข้มของสีที่เกิดจากปฏิกิริยากับกรดไบซินโคนิค (Thermo Scientific™ Pierce™ BCA protein assay kit, Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตรโดยใช้เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (Thermo Scientific™ Varioskan™ Flash Multimode Reader, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างกับกราฟมาตรฐานค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่มีปริมาณแตกต่างกัน

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดมีวาซิน 1140 ในการยับยั้งและฆ่าแบคทีเรีย

สเตรปโตค็อกคัสที่ใช้ในการทดสอบประกอบด้วย เชื้อกลุ่มมีวาแทนส์ ได้แก่ สเตรปโตค็อกคัส มีวาแทนส์ ยูเอ 159 (*S. mutans* UA159) และสเตรปโตค็อกคัส โซบรินัส เอทีซีซี 33478 (*S. sobrinus* ATCC 33478) และเชื้อกลุ่มที่ไม่ใช่มีวาแทนส์ ได้แก่ สเตรปโตค็อกคัส ไมติส เอทีซีซี 49456[†] (*S. mitis* ATCC 49456[†]) สเตรปโตค็อกคัส กอร์ดอนนีไอ เอทีซีซี 10558[†] (*S. gordonii* ATCC 10558[†]) สเตรปโตค็อกคัส แซงควินัส เอทีซีซี 10556 (*S. sanguinis* ATCC 10556) และสเตรปโตค็อกคัส ซาโลวาเรียส เอทีซีซี 7073[†] (*S. salivarius* ATCC 7073[†])

เตรียมแบคทีเรียแต่ละชนิดโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อทอเดต ฮีวิตต์ ชนิดเหลวที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ปรับความเข้มข้นของเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อทอเดต ฮีวิตต์ ชนิดเหลว ให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.1 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (DU730 spectrophotometer, Beckman Coulter, CA, USA) แล้วจึงเจือจางความเข้มข้นของเชื้อลงทีละ 2 เท่า ดูดตัวอย่างเชื้อไปทำการนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนจานเลี้ยงเชื้อโดยนับเฉพาะจานที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 30 – 300 โคโลนี คัดเลือกอัตราส่วนการเจือจางที่เหมาะสม แล้วจึงทำการเตรียมแบคทีเรียแต่ละชนิดใหม่ตั้งแต่ต้นให้ได้จำนวนเชื้อประมาณ 5×10^5 หน่วยก่อรูปเป็นโคโลนี (Colony forming unit) ต่อ มิลลิลิตร เพื่อใช้ในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดมีวาซิน 1140

หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (Minimum inhibitory concentration, MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration, MBC) ด้วยวิธีบรอดไมโครไดลูชัน ตามวิธีการของสถาบันมาตรฐานทางคลินิกและห้องปฏิบัติการ (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)¹⁶ โดยการผสมสารสกัดมีวาซิน 1140 ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อทอเดต ฮีวิตต์ ชนิดเหลวในถาดไมโครเพลทชนิด 96 หลุม (96-well plate) ที่มีลักษณะก้นหลุมรูปถ้วย (Costar 3595, Corning Inc., Corning,

NY, USA) ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นของสารสกัดเท่ากับ 160 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีความเข้มข้นลดลงทีละ 2 เท่าในหลุมถัดไป ปริมาตรในแต่ละหลุมเท่ากับ 50 ไมโครลิตร จากนั้นเติมแบคทีเรียที่เตรียมไว้ลงไปหลุมละ 50 ไมโครลิตร แล้วใช้ปิเปตดูดขึ้นลงเพื่อผสมให้เข้ากัน หลุมควบคุมประกอบด้วย หลุมที่มีเฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อเท่านั้น หลุมที่มีแบคทีเรียแต่ละชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ และหลุมที่มีสารสกัดมิวทาซิน 1140 ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลการทดสอบโดยการสังเกตตะกอนสีขาวขุ่นของแบคทีเรียที่กันหลุมซึ่งขนาดของตะกอนแปรผันตามการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย อ่านค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแต่ละชนิดจากค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดมิวทาซิน 1140 ในหลุมที่ไม่พบตะกอนของแบคทีเรีย จากนั้นดูดตัวอย่างจากหลุมที่มีความเข้มข้นของสารสกัดมิวทาซิน 1140 มากกว่าเท่ากับ และครึ่งหนึ่งของค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียไปทดสอบความมีชีวิตของเชื้อด้วยวิธีการหยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อทอดด์ ฮิววิตต์ ชนิดกึ่งแข็ง แล้วนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง อ่านค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าแบคทีเรียแต่ละชนิดจากค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดมิวทาซิน 1140 ที่ไม่พบโคโลนีของแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการทดสอบที่เป็นอิสระต่อกัน 3 ครั้ง

หาเวลาในการฆ่าแบคทีเรียด้วยวิธีไทม์ คิลล์¹⁷ โดยใช้สารสกัดมิวทาซิน 1140 ความเข้มข้นเท่ากับค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าสเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ ยูเอ 159 ทำการทดสอบกับแบคทีเรียแต่ละชนิดที่มีปริมาตร 2 มิลลิลิตร สุ่มดูดตัวอย่างของเชื้อจำนวน 100 ไมโครลิตร ที่เวลา 0 15 30 60 120 180 และ 360 นาที ตามลำดับ แล้วทำการเจือจางทันทีด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อทอดด์ ฮิววิตต์ ชนิดเหลวให้มีความเข้มข้นลดลงทีละ 10 เท่า จากนั้นดูดตัวอย่างที่เจือจางแล้วปริมาตร 10 ไมโครลิตรไปทดสอบความมีชีวิตของเชื้อด้วยวิธีการหยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อทอดด์ ฮิววิตต์ ชนิดกึ่งแข็ง แล้วนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ

37 องศาเซลเซียสในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง อ่านค่าเวลาในการฆ่าแบคทีเรียแต่ละชนิดจากเวลาน้อยสุดที่ไม่พบโคโลนีของแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการทดสอบที่เป็นอิสระต่อกัน 3 ครั้ง

ผล

การผลิตมิวทาซิน 1140 จากอาหารเลี้ยงเชื้อทอดด์ ฮิววิตต์ชนิดกึ่งแข็งที่ใช้เพาะเลี้ยงสเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ เจเอช 1140 โดยการสกัดและแยกบริสุทธิ์ด้วยคอลโรฟอร์ม พบว่า สามารถผลิตสารสกัดมิวทาซิน 1140 ที่มีลักษณะเป็นผงแห้งสีขาวขุ่น โดยมีน้ำหนักเฉลี่ยจากการผลิตที่เป็นอิสระต่อกัน 5 ครั้ง เท่ากับ 6.58 ± 0.79 มิลลิกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 ลิตร

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดมิวทาซิน 1140 ในการยับยั้งและฆ่าสเตรปโตค็อกคัสในช่องปาก ด้วยวิธีบรอดไมโครไดลูชัน พบว่า สารสกัดมิวทาซิน 1140 สามารถยับยั้งและฆ่าสเตรปโตค็อกคัสทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบทั้งในกลุ่มมิวแทนส์และกลุ่มที่ไม่ใช่มิวแทนส์ โดยสารสกัดมิวทาซิน 1140 มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งและฆ่าแบคทีเรียกลุ่มมิวแทนส์ สูงกว่า กลุ่มที่ไม่ใช่มิวแทนส์ ทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ สมาชิกของเชื้อในกลุ่มมิวแทนส์ และกลุ่มที่ไม่ใช่มิวแทนส์ที่มีค่าดังกล่าวสูงสุด ได้แก่ สเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ ยูเอ 159 และ สเตรปโตค็อกคัส แซงกวินัส เอทีซีซี 10556 ตามลำดับ ในทางกลับกันสมาชิกของเชื้อทั้งสองกลุ่มที่มีค่าดังกล่าวต่ำสุด ได้แก่ สเตรปโตค็อกคัส โซบรินัส เอทีซีซี 33478 และ สเตรปโตค็อกคัส ไมติส เอทีซีซี 49456¹⁸ ตามลำดับ การเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดมิวทาซิน 1140 ในการยับยั้งและฆ่าเชื้อระหว่างแบคทีเรียสองกลุ่ม โดยภาพรวม พบว่า เชื้อกลุ่มมิวแทนส์มีค่าดังกล่าว เท่ากับหรือสูงกว่า เชื้อกลุ่มที่ไม่ใช่มิวแทนส์ (1 - 8 เท่า) โดยสารสกัดมิวทาซิน 1140 มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อ สูงกว่า ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อ ประมาณ 2 เท่า (ตารางที่ 1)

การหาเวลาในการฆ่าแบคทีเรียด้วยวิธีไทม์ คิลล์ โดยใช้สารสกัดมิวทาซิน 1140 ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นที่เพียงพอสำหรับการฆ่าสเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ พบว่า สามารถฆ่าสเตรปโต

คือคัส ไมติส เอทีซีซี 49456^T สเตريبโตค็อกคัส ซาโลวา แสงกวินัส เอทีซีซี 10556 และสเตريبโตค็อกคัส มิวแทนส์ เรียส เอทีซีซี 7073^T สเตريبโตค็อกคัส กอร์ดอนนีโอ เอทีซีซี ยูเอ 159 ได้ภายในเวลา 60 ± 0 นาที (ตารางที่ 2) 10558^T และสเตريبโตค็อกคัส โซบรินัส เอทีซีซี 33478 ได้ภายในเวลา 30 ± 0 นาที แต่สามารถฆ่าสเตريبโตค็อกคัส

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดมิวทาซิน 1140 ในการยับยั้งและฆ่าสเตريبโตค็อกคัส ในช่องปาก (จำนวนตัวอย่างต่อกลุ่มเท่ากับ 3)

Table 1 Mean and standard deviation of minimum inhibitory and bactericidal concentrations of mutacin 1140 extract against oral streptococci (3 samples per group)

Group	Strain	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)
Mutans streptococci	<i>S. mutans</i> UA159	10.00 ± 0.00	16.67 ± 5.77
	<i>S. sobrinus</i> ATCC 33478	5.00 ± 0.00	10.00 ± 0.00
Non-mutans streptococci	<i>S. sanguinis</i> ATCC 10556	4.17 ± 1.44	8.33 ± 2.89
	<i>S. gordonii</i> ATCC 10558 ^T	2.50 ± 0.00	5.00 ± 0.00
	<i>S. salivarius</i> ATCC 7073 ^T	1.67 ± 0.72	3.33 ± 1.44
	<i>S. mitis</i> ATCC 49456 ^T	1.25 ± 0.00	2.50 ± 0.00

MIC = Minimum inhibitory concentration

MBC = Minimum bactericidal concentration

ATCC = American Type Culture Collection

UA = University of Alabama

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเวลาในการฆ่าสเตريبโตค็อกคัสในช่องปากโดยใช้สารสกัดมิวทาซิน 1140 ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (จำนวนตัวอย่างต่อกลุ่มเท่ากับ 3)

Table 2 Mean and standard deviation of time to kill oral streptococci by using 20 µg/ml of mutacin 1140 extract (3 samples per group)

Group	Strain	Killing time (minute)
Mutans streptococci	<i>S. mutans</i> UA159	60 ± 0
	<i>S. sobrinus</i> ATCC 33478	30 ± 0
Non-mutans streptococci	<i>S. sanguinis</i> ATCC 10556	60 ± 0
	<i>S. gordonii</i> ATCC 10558 ^T	30 ± 0
	<i>S. salivarius</i> ATCC 7073 ^T	30 ± 0
	<i>S. mitis</i> ATCC 49456 ^T	30 ± 0

ATCC = American Type Culture Collection

UA = University of Alabama

บทวิจารณ์

จากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดมิวทาซิน 1140 ในการยับยั้งและฆ่าสเตรปโตค็อกคัสในช่องปากทั้งในกลุ่มมิวแทนส์และกลุ่มที่ไม่ใช่มิวแทนส์ ด้วยวิธีบรอด ไมโครไดลูชันที่พบว่า สามารถยับยั้งและฆ่าแบคทีเรียทั้งหมดที่นำมาทดสอบ ซึ่งเป็นตัวแทนของแบคทีเรียแตกต่างกัน 6 สปีชีส์แสดงให้เห็นว่า สารสกัดมิวทาซิน 1140 มีขอบเขตในการออกฤทธิ์กว้าง (Broad spectrum) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของฮิลล์แมนและคณะ^{13,14} แม้ว่าแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษานี้มีสายพันธุ์แตกต่างจากการศึกษาดังกล่าว

การเปรียบเทียบผลจากการศึกษานี้กับผลการศึกษาของฮิลล์แมนและคณะ¹⁴ ซึ่งทดสอบความไวต่อฤทธิ์ของสารสกัดมิวทาซิน 1140 ในการยับยั้งเชื้อ ด้วยวิธีการแพร่ผ่านวุ้น โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) ของเชื้อแต่ละชนิด พบว่า สเตรปโตค็อกคัส ไมติส และ สเตรปโตค็อกคัส ซาโลวาเรียส มีความไวมากกว่า (ขนาดบริเวณยับยั้งใหญ่กว่า) สเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ ซึ่งสอดคล้องกับผลจากการศึกษานี้ แต่กลับพบว่า สเตรปโตค็อกคัส แซงกวินิส และสเตรปโตค็อกคัส โซบรินัส มีความไวเท่ากับหรือน้อยกว่า สเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ ซึ่งไม่สอดคล้องกับผลจากการศึกษานี้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของทั้งสายพันธุ์ของเชื้อและวิธีการที่ใช้ในการทดสอบ นอกจากนี้ การศึกษาดังกล่าวอาจมีปัจจัยกวนจากคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพที่แตกต่างกันของไบโอฟิล์มของเชื้อที่เจริญเติบโตบนวุ้นเลี้ยงเชื้อ ซึ่งส่งผลต่อการอัตราการแพร่ผ่านของมิวทาซินจากเซลล์ที่ผลิต¹⁸

การศึกษานี้ใช้วิธีการสกัดและแยกบริสุทธิ์ด้วยคลอโรฟอร์มในการสกัดมิวทาซิน 1140 ซึ่งเพียงพอสำหรับการหาความแตกต่างของความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งและฆ่าแบคทีเรียได้ แต่ถ้าต้องการเพิ่มความถูกต้องในการวัดน้ำหนักของมิวทาซิน 1140 จำเป็นต้องเพิ่มขั้นตอนการแยกบริสุทธิ์ ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวแรงดันสูงแบบวิภาคย้อนกลับ (Reversed-phase high-pressure liquid chromatography, RP-HPLC) ซึ่งจะให้ความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งและฆ่าเชื้อมีค่าลดลง และมีความถูกต้องมากขึ้น¹⁹

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างกลุ่มของสเตรปโตค็อกคัสในช่องปาก พบว่า กลุ่มที่ไม่ใช่ มิวแทนส์ทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบมีความไวต่อฤทธิ์ในการยับยั้งและ

ฆ่าเชื้อของสารสกัดมิวทาซิน 1140 มากกว่ากลุ่มมิวแทนส์ทุกสายพันธุ์ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของฮิลล์แมนและคณะ¹⁴ ที่พบว่า มิวทาซิน 1140 เป็นแลนติไบโอติก ซึ่งเป็นเปปไทด์ต้านจุลชีพที่มีฤทธิ์ด้านแบคทีเรียแกรมบวกหลากหลายชนิดมากกว่ามิวทาซินที่ไม่ใช่แลนติไบโอติก ทำให้แบคทีเรียที่ผลิตแลนติไบโอติกมีความได้เปรียบในการแข่งขันกับเชื้ออื่น ๆ เพื่อแย่งชิงที่อยู่อาศัยในบริเวณเดียวกัน²⁰ บนผิวฟัน สเตรปโตค็อกคัส ไมติส สเตรปโตค็อกคัส กอร์ดอนนิไอ และสเตรปโตค็อกคัส แซงกวินิส สามารถตั้งรกรากได้ก่อน เจริญเติบโตได้เร็วกว่า ผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และทนต่ออนุมูลอิสระได้ดีกว่า สเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์²¹⁻²⁴ สเตรปโตค็อกคัสในช่องปากกลุ่มที่ไม่ใช่มิวแทนส์เหล่านี้จึงมีบทบาทในการควบคุมเชื้อก่อโรคฟันผุกลุ่มมิวแทนส์²⁵ การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าหากใช้สารสกัดมิวทาซิน 1140 ที่ระดับความเข้มข้นที่สามารถฆ่าสเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ได้ อาจทำให้แบคทีเรียที่มีประโยชน์เหล่านี้ถูกกำจัดออกไปก่อนบางส่วนหรือทั้งหมดเพราะมีความไวมากกว่า

การหาเวลาในการฆ่าแบคทีเรียแต่ละชนิด ด้วยวิธีไทม์ คิลล์ พบว่า โดยภาพรวม มีความสอดคล้องกับค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งและฆ่าแบคทีเรีย ยกเว้นสเตรปโตค็อกคัส โซบรินัส ถูกฆ่าได้หมดภายในเวลา 30 นาที ทั้งที่น่าจะใช้เวลา 60 นาที เช่นเดียวกับสเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ ซึ่งปรากฏการณ์นี้สอดคล้องกับการศึกษาของควิเวย์ (Quivey) และคณะ²⁶ ที่พบว่า สเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ สามารถปรับเปลี่ยนกรดไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ (Cell membrane fatty acids) ในการเจริญเติบโตภายใต้สภาวะความเป็นกรด ในขณะที่พบการเปลี่ยนของกรดไขมันเพียงเล็กน้อยเท่านั้นที่เยื่อหุ้มเซลล์ของสเตรปโตค็อกคัส โซบรินัส ซึ่งมีความสามารถในการปรับตัวน้อย สเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ สามารถเปลี่ยนแปลงกรดไขมันส่วนใหญ่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ได้ในเวลา 20 นาที²⁷ ความสามารถนี้มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการอยู่รอดในสภาพแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์เป็นเป้าหมายหลักของยาหรือสารต้านจุลชีพหลายชนิด รวมถึงมิวทาซิน 1140 ด้วย ซึ่งมีกลไกในการออกฤทธิ์โดยการจับกับลิพิดชนิดที่ 2 (Lipid II) ที่เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมาย แม้ว่าจะไม่ทำให้เกิดรู (Pore) บนเยื่อหุ้มเซลล์ แต่

สามารถยับยั้งและฆ่าแบคทีเรียโดยการขัดขวางกระบวนการสร้างผนังเซลล์ (Cell wall)²⁸⁻³⁰

สเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ มักสร้างมิวทาซินหลายชนิด จากการศึกษาจีโนม (Genome) ของ สเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ เจเอส 1140 พบว่า ด้านข้างของโอเปอเรอรอน (Operon) ของจีน (Gene) ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์มิวทาซิน 1140 ยังมีจีนแลนติไบโอติกอีกสองกลุ่ม กลุ่มแรกมีจีนที่สร้างเอสเอ็มบี (Smb) ส่วนอีกกลุ่มสร้างแลนติไบโอติกที่คล้ายกับนูกาซิน (Nukacin) อย่างไรก็ตาม ยังไม่เคยมีการแยกสกัดแลนติไบโอติกทั้งสองชนิดนี้จากสเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ เจเอส 1140 ได้เลย³¹

ปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้แบคทีเรียโอซินให้เกิดประโยชน์ในหลากหลายรูปแบบทั้งทางด้านอุตสาหกรรมอาหารและด้านการแพทย์^{32,33} โดยนิซิน (Nisin) ที่ผลิตจากแลคโตค็อกคัส แลคติส (*Lactococcus lactis*) เป็นแลนติไบโอติกชนิดแรกที่ถูกค้นพบตั้งแต่ปี ค.ศ. 1928³⁴ และถูกใช้ในการถนอมอาหารเพื่อควบคุมการติดเชื้อมาก่อนโรคที่เกิดจากอาหารเป็นสื่อ (Food-borne pathogens) มานานกว่า 50 ปี³⁵ ส่วนการนำแลนติไบโอติกชนิดอื่นรวมถึงมิวทาซิน 1140 มาใช้ในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกนั้น กำลังได้รับความสนใจ โดยอยู่ในระยะการศึกษารวบรวมข้อมูลเพื่อสนับสนุนประสิทธิภาพและความปลอดภัยของการนำไปทดสอบทางคลินิกในมนุษย์^{36,37} การเปรียบเทียบประสิทธิภาพโดยใช้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกระหว่างมิวทาซิน 1140 กับยาปฏิชีวนะอื่น ได้แก่ แวนโคไมซิน (Vancomycin) พบว่ามิวทาซิน 1140 มีประสิทธิภาพต่ำกว่าและสูงกว่ายาปฏิชีวนะที่นำมาเปรียบเทียบ เมื่อทดสอบกับเชื้อที่ไวต่อยาและที่ดื้อต่อยา ตามลำดับ ดังนั้น นอกเหนือจากเชื้อก่อโรคฟันผุแล้ว มิวทาซิน 1140 ยังมีศักยภาพสูงในการนำไปประยุกต์ใช้รักษาผู้ป่วยติดเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด (Multidrug-resistant bacteria) เช่น สเตรปโตค็อกคัส นิวโมเนียอี (*Streptococcus pneumoniae*) สแตฟิโลค็อกคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) สเตรปโตค็อกคัส พัยโอจีเนส (*Streptococcus pyogenes*) เอนเทอโรค็อกคัส ฟีคาลิส (*Enterococcus faecalis*) และคลอสตริเดียม ดิฟฟิไซล์ (*Clostridium difficile*) เป็นต้น โดยไม่พบว่าการพัฒนาการดื้อต่อมิวทาซิน 1140 ของเชื้อเหล่านี้¹⁷

ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจาก ลิพิดชนิดที่ 2 ซึ่งเป้าหมายในการออกฤทธิ์ของมิวทาซิน 1140 นั้น เป็นส่วนประกอบที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางเคมี (Chemically conserved part) ในกระบวนการสร้างผนังเซลล์³⁸ อย่างไรก็ตาม ความไวของแบคทีเรียแกรมบวกต่อฤทธิ์ของมิวทาซิน 1140 ที่แตกต่างกันยังอาจสัมพันธ์กับการจับของมิวทาซิน 1140 กับโปรตีนอีกด้วย^{39,40}

แนวทางการพัฒนาการประยุกต์ใช้มิวทาซิน 1140 ในการฆ่าเชื้อก่อโรคฟันผุมี 2 รูปแบบหลักๆ แบบแรกคือการใช้สายพันธุ์ผู้ผลิต (Effector strain) ที่สร้างขึ้นจากสเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ เจเอส 1140 โดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมปรับปรุงสายพันธุ์ให้ไม่สามารถผลิตกรดแลคติก เพื่อใช้ในการรักษาโรคฟันผุแบบแทนที่ (Replacement therapy) โดยสายพันธุ์ที่สร้างขึ้นนี้สามารถผลิตมิวทาซิน 1140 ออกมาฆ่าและแทนที่สเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ประจำถิ่นที่อาศัยอยู่ในช่องปากมาก่อน⁴¹ และได้มีการพัฒนาสายพันธุ์ต่อมาให้สามารถถูกกำจัดออกได้เพื่อให้ความปลอดภัยมากขึ้นในการทดสอบทางคลินิกในมนุษย์⁴² แบบที่สองคือการใช้ในรูปของเปปไทด์บริสุทธิ์ ซึ่งมีขั้นตอนในการผลิตที่ค่อนข้างยุ่งยาก ส่งผลให้การขยายระดับการผลิตทำได้ลำบาก ปัจจุบันจึงได้มีการพัฒนาเทคโนโลยีในการผลิตมิวทาซิน 1140 โดยการสังเคราะห์ ซึ่งมีชื่อเรียกเฉพาะว่า เอ็มยู 1140 (MU1140)⁴³ การศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า การใช้มิวทาซิน 1140 ในการกำจัดการติดเชื้อก่อโรคฟันผุกลุ่มมิวแทนส์อาจส่งผลกระทบต่อแบคทีเรียแกรมบวกชนิดอื่นซึ่งเป็นเชื้อประจำถิ่นในช่องปาก ได้แก่ สเตรปโตค็อกคัสกลุ่มที่ไม่ใช้มิวแทนส์ที่มีความไวต่อฤทธิ์ในยับยั้งและฆ่าเชื้อของมิวทาซิน 1140 มากกว่า ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาวิจัยและพัฒนาเพิ่มเติมเกี่ยวกับระบบนำส่งยาที่มีความจำเพาะกับเซลล์แบคทีเรียเป้าหมายเพื่อหลีกเลี่ยงความเสี่ยงหรือผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นได้จากการสูญเสียสมดุลของระบบนิเวศในช่องปาก และการติดเชื้อฉวยโอกาส

บทสรุป

สารสกัดมิวทาซิน 1140 มีฤทธิ์ในยับยั้งและฆ่าสเตรปโตค็อกคัสในช่องปากที่นำมาทดสอบได้ทุกสายพันธุ์ทั้งในกลุ่มมิวแทนส์และกลุ่มที่ไม่ใช้มิวแทนส์ โดยสารสกัด

มิวทาซิน 1140 มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งและฆ่าเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ เท่ากับหรือสูงกว่า เชื้อกลุ่มที่ไม่ใช่มิวแทนส์ทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ (1-8 เท่า) ซึ่งความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อมีค่า สูงกว่า ความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อ ประมาณ 2 เท่า สเตริบโตค็อกคัส ในช่องปากชนิดอื่นทั้งหมดที่นำมาทดสอบในการศึกษานี้ มีความไวต่อฤทธิ์ในยับยั้งและฆ่าแบคทีเรียของสารสกัดมิวทาซิน 1140 มากกว่า สเตริบโตค็อกคัส มิวแทนส์ โดยสารสกัดมิวทาซิน 1140 สามารถฆ่าเชื้อทั้งหมดได้ภายในเวลา 30 ถึง 60 นาที

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากศูนย์วิจัยและบริการตรวจวินิจฉัยโรคติดต่อเชื้อโรคใหม่ และกลุ่มวิจัยไบโอฟิล์ม มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

- Palmer RJ Jr, Gordon SM, Cisar JO, Kolenbrander PE. Coaggregation-mediated interactions of streptococci and actinomyces detected in initial human dental plaque. *J Bacteriol* 2003;185(11):3400-09.
- Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol* 2000 2005;38:135-187.
- Smith DJ, King WF, Taubman MA. Salivary IgA antibody to oral streptococcal antigens in preterm infants. *Oral Microbiol Immunol* 1990;5(2):57-62.
- Smith DJ, Anderson JM, King WF, van Houte J, Taubman MA. Oral streptococcal colonization of infants. *Oral Microbiol Immunol* 1993;8(1):1-4.
- Rosan B, Lamont RJ. Dental plaque formation. *Microbes Infect* 2000;2(13):1599-607.
- Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev* 1980;44(2):331-84.
- Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev* 1986;50(4):353-80.
- Gibbons RJ, Cohen L, Hay DI. Strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* attach to different pellicle receptors. *Infect Immun* 1986;52(2):555-61.
- Koga T, Asakawa H, Okahashi N, Hamada S. Sucrose-dependent cell adherence and cariogenicity of serotype c *Streptococcus mutans*. *J Gen Microbiol* 1986;132(10):2873-83.
- Kreth J, Zhu L, Merritt J, Shi W, Qi F. Role of sucrose in the fitness of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol* 2008;23(3):213-19.
- Hojo K, Nagaoka S, Ohshima T, Maeda N. Bacterial interactions in dental biofilm development. *J Dent Res* 2009;88(11):982-90.
- Hamada S, Ooshima T. Inhibitory spectrum of a bacteriocinlike substance (mutacin) produced by some strains of *Streptococcus mutans*. *J Dent Res* 1975;54(1):140-45.
- Hillman JD, Johnson KP, Yaphe BI. Isolation of a *Streptococcus mutans* strain producing a novel bacteriocin. *Infect Immun* 1984;44(1):141-44.
- Hillman JD, Novak J, Sagura E, Gutierrez JA, Brooks TA, Crowley PJ et al. Genetic and biochemical analysis of mutacin 1140, a lantibiotic from *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* 1998;66(6):2743-49.
- Neeti D, Noel C, Dayna E, Shi-En L, Leif S. Optimization of the Production of the Lantibiotic Mutacin 1140 in Minimal Media. *Process Biochem* 2010;45(7):1187-91.
- Espinell-Ingroff A, Fothergill A, Ghannoum M, Manavathu E, Ostrosky-Zeichner L, Pfaffler M et al. Quality control and reference guidelines for CLSI broth microdilution susceptibility method (M 38-A document) for amphotericin B, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. *J Clin Microbiol* 2005;43(10):5243-46.
- Ghobrial OG, Derendorf H, Hillman JD. Pharmacodynamic activity of the lantibiotic MU1140. *Int J Antimicrob Agents* 2009;33(1):70-74.
- Chan C, Burrows LL, Deber CM. Helix induction in antimicrobial peptides by alginate in biofilms. *J Biol Chem* 2004;279(37):38749-54.
- Chen S, Wilson-Stanford S, Cromwell W, Hillman JD, Guerrero A, Allen CA, et al. Site-directed mutations in the lanthipeptide mutacin 1140. *Appl Environ Microbiol* 2013;79(13):4015-23.
- Daly KM, Cotter PD, Hill C, Ross RP. Lantibiotic production by pathogenic microorganisms. *Curr Protein Pept Sci* 2012;13(6):509-23.
- Mei L, Ren Y, Busscher HJ, Chen Y, van der Mei HC. Poisson analysis of streptococcal bond-strengthening on saliva-coated enamel. *J Dent Res* 2009;88(9):841-45.
- Harper DS, Loesche WJ. Growth and acid tolerance of human dental plaque bacteria. *Arch Oral Biol* 1984;29(10):843-48.

23. Kreth J, Merritt J, Shi W, Qi F. Competition and coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the dental biofilm. *J Bacteriol* 2005;187(21): 7193–203.
24. Kreth J, Zhang Y, Herzberg MC. Streptococcal antagonism in oral biofilms: *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii* interference with *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* 2008;190(13):4632–640.
25. Caufield PW, Dasanayake AP, Li Y, Pan Y, Hsu J, Hardin JM. Natural history of *Streptococcus sanguinis* in the oral cavity of infants: evidence for a discrete window of infectivity. *Infect Immun* 2000;68(7):4018–023.
26. Quivey RG, Jr., Faustoferri R, Monahan K, Marquis R. Shifts in membrane fatty acid profiles associated with acid adaptation of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol Lett* 2000;189(1):89–92.
27. Fozo EM, Quivey RG, Jr. Shifts in the membrane fatty acid profile of *Streptococcus mutans* enhance survival in acidic environments. *Appl Environ Microbiol* 2004;70(2):929–36.
28. Smith L, Zachariah C, Thirumoorthy R, Rocca J, Novak J, Hillman JD, et al. Structure and dynamics of the lantibiotic mutacin 1140. *Biochemistry* 2003;42(35):10372–84.
29. Smith L, Hasper H, Breukink E, Novak J, Cerkasov J, Hillman JD, et al. Elucidation of the antimicrobial mechanism of mutacin 1140. *Biochemistry* 2008;47(10):3308–14.
30. de Kruijff B, van Dam V, Breukink E. Lipid II: a central component in bacterial cell wall synthesis and a target for antibiotics. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2008;79(3–5):117–21.
31. Escano J, Deng P, Lu SE, Smith L. Draft Genome Sequence of Oral Bacterium *Streptococcus mutans* JH1140. *Genome Announc* 2016;4(3).
32. Bali V, Panesar PS, Bera MB, Kennedy JF. Bacteriocins: Recent Trends and Potential Applications. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2016;56(5):817–34.
33. Yang SC, Lin CH, Sung CT, Fang JY. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Front Microbiol* 2014;5:241.
34. Rogers LA, Whittier EO. Limiting Factors in the Lactic Fermentation. *J Bacteriol* 1928;16(4):211–29.
35. Gharsallaoui A, Oulahal N, Joly C, Degraeve P. Nisin as a Food Preservative: Part 1: Physicochemical Properties, Antimicrobial Activity, and Main Uses. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2016;56(8):1262–74.
36. Fox JL. Antimicrobial peptides stage a comeback. *Nat Biotechnol* 2013;31(5):379–82.
37. Dischinger J, Basi Chipalu S, Bierbaum G. Lantibiotics: promising candidates for future applications in health care. *Int J Med Microbiol* 2014;304(1):51–62.
38. Chugunov A, Pyrkova D, Nolde D, Polyansky A, Pentkovsky V, Efremov R. Lipid-II forms potential “landing terrain” for lantibiotics in simulated bacterial membrane. *Sci Rep* 2013;3:1678.
39. Ghobrial O, Derendorf H, Hillman JD. Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of the lantibiotic MU1140. *J Pharm Sci* 2010;99(5):2521–28.
40. Ghobrial O, Derendorf H, Hillman JD. Human serum binding and its effect on the pharmacodynamics of the lantibiotic MU1140. *Eur J Pharm Sci* 2010;41(5):658–64.
41. Hillman JD, Brooks TA, Michalek SM, Harmon CC, Snoep JL, van Der Weijden CC. Construction and characterization of an effector strain of *Streptococcus mutans* for replacement therapy of dental caries. *Infect Immun* 2000;68(2): 543–49.
42. Hillman JD, Mo J, McDonell E, Cvitkovitch D, Hillman CH. Modification of an effector strain for replacement therapy of dental caries to enable clinical safety trials. *J Appl Microbiol* 2007;102(5):1209–19.
43. Sandiford SK. Perspectives on lantibiotic discovery – where have we failed and what improvements are required? *Expert Opin Drug Discov* 2015;10(4):315–20.

ผู้รับผิดชอบบทความ

สมเกียรติ เหลืองไพรินทร์

ภาควิชาชีววิทยาช่องปาก

คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40002

โทรศัพท์: 0 4320 2405 #45275

โทรสาร: 0 4320 2862

จดหมายอิเล็กทรอนิกส์: som_lue@kku.ac.th

Antimicrobial Efficiency of Mutacin 1140 Extract on Oral Streptococci

Chatpreechaya Palakawong na Ayudhya^{*} Somkiat Luengpailin^{***} Viraphong Lulitanond^{***}

ABSTRACT

The present study aimed to determine the efficiency of mutacin 1140 extract in inhibiting and killing mutans and non-mutans streptococci. Mutacin 1140 was prepared from the culture medium of *Streptococcus mutans* JH1140 by extraction and purification with chloroform. Protein concentration of mutacin 1140 extract was determined by colorimetric detection with the bicinchoninic acid assay. Minimum inhibitory and bactericidal concentrations of mutacin 1140 extract against six bacterial species (i.e., *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. mitis*, *S. gordonii*, *S. sanguinis* and *S. salivarius*) were determined by using broth microdilution assay. The time-kill assay for each bacteria was performed at the bactericidal concentration of mutacin 1140 extract for *S. mutans*. The results showed that mutacin 1140 extract had greater inhibitory and bactericidal activities against non-mutans streptococci than mutans streptococci. In addition, *S. sobrinus* were more sensitive than *S. mutans* to the antimicrobial activity of mutacin 1140 extract. The times required for complete eradication of more sensitive and less sensitive bacteria were 30 and 60 minutes, respectively. In conclusion, all other oral streptococci tested in this study are more susceptible than *S. mutans* to the inhibitory and bactericidal activities of mutacin 1140 extract. Hence, this study warrants further research into drug delivery systems targeting mutans streptococci for dental caries control.

Keywords: Mutacin 1140/ Antimicrobial peptide/ *Streptococcus mutans*/ Dental caries

Corresponding author

Somkiat Luengpailin
Department of Oral Biology,
Faculty of Dentistry, Khon Kaen University,
Amphur Muang, Khon Kaen, 40002.
Tel.: +66 4320 2405 #45275
Fax: +66 4320 2862
E-mail: som_lue@kku.ac.th

^{*} Biofilm Research Group, Research and Diagnostic Center for Emerging Infectious Diseases, Khon Kaen University, Amphur Muang, Khon Kaen.

^{**} Department of Oral Biology, Faculty of Dentistry, Khon Kaen University, Amphur Muang, Khon Kaen.

^{***} Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Amphur Muang, Khon Kaen.