

Review article

Antimicrobial peptides: The natural proteins and the future application for treatment of infectious diseases

Sorasak Intorasoot*

Division of Clinical Microbiology, Department of Medical Technology,
Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, 50200, Thailand

* Corresponding author (Email: isorasak@hotmail.com)

Abstract

Infectious diseases caused by microorganisms are involved in life-threatening worldwide. Of these, bacteria is the major cause of morbidity and mortality. During the decade, an increasing of the prevalence of antibiotic resistance pathogens has been reported. The resistant ability of microorganisms is studied and defined to be associated with over-used drugs, inappropriate treatment and prolonged therapy of infected patients. Although new antibiotics are continuously discovered, global trends of multi-drug resistant infection still remained. Antimicrobial peptides (AMPs) are small cationic peptides which produced by broad range of organisms from invertebrate to vertebrate. Due to the fact that AMPs have high positive charge, they prefer to react with the negatively charge of microbial membrane and represent antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria, virus, fungi as well as parasites. Modes of AMPs action are explained and models of microbial membrane disruption by AMPs are illustrated. Five potent AMPs consisting of cathelicidin, defensins, histatins, protegrins and magainins are selectively reviewed. Cathelicidins, defensins and histatins are human short polypeptides that mostly found in various kinds of cells, tissues and body fluids whereas protegrins and magainins are synthesized in porcine leukocytes and skin of *Xenopus laevis*, an African clawed frog, respectively. *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activities testing of these peptides are over-viewed. Others actions of these peptides such as endotoxin neutralization, immunomodulatory activities, angiogenesis and wound healing are included. In addition, the application in clinical trials and trends of AMPs research are discussed. ***Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2013; 46(1): 1-19***

นิพนธ์ปริทรรศน์

เปปไทด์ต้านจุลชีพ: โปรตีนจากธรรมชาติกับการประยุกต์ใช้เพื่อการรักษาโรคติดเชื้อในอนาคต

สรศักดิ์ อินทรสุด*

แขนงวิชาจุลชีววิทยาคลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

* ผู้รับผิดชอบบทความ (Email: isorasak@hotmail.com)

บทนำ

โรคติดเชื้อแบคทีเรีย รา และไวรัส นั้นยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญในทุกภูมิภาคของประเทศทั่วโลก โดยพบว่า การติดเชื้อในมนุษย์ส่วนใหญ่นั้นเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย ปัจจุบันพบอัตราการดื้อยาปฏิชีวนะในเชื้อแบคทีเรียเพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง ตัวอย่างของเชื้อแบคทีเรียดื้อยา เช่น เชื้อ *Staphylococcus aureus* ซึ่งดื้อต่อยาในกลุ่ม beta-lactam (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* หรือ MRSA) เชื้อ *Enterococcus faecalis* และ *E. faecium* ซึ่งดื้อต่อยา vancomycin (vancomycin-resistant Enterococci หรือ VRE) เป็นต้น แม้จะมีการค้นพบยาปฏิชีวนะชนิดใหม่รวมถึงความพยายามที่จะสังเคราะห์ยาชนิดใหม่ซึ่งมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อที่ดื้อขึ้นเพื่อนำมาทดแทนยาปฏิชีวนะเดิม แต่เชื้อแบคทีเรียก็ยังคงสามารถเกิดการดื้อยาขึ้นได้อีก เปปไทด์ต้านจุลชีพ (antimicrobial peptides หรือ host-defense peptides) นั้นเป็นสารชีวโมเลกุลขนาดเล็ก ถูกค้นพบมากกว่า 30 ปี สามารถพบได้ทั้งในสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กอย่างเชื้อแบคทีเรีย รา พืช สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังไปจนถึงเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยพบว่าสารเหล่านี้มักเป็นสารในระบบภูมิคุ้มกันแบบกำเนิด (innate immunity) มีความสามารถในการเลือกจับ (selectivity) สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียได้กว้าง (broad-spectrum) ซึ่งบางชนิดอาจมีฤทธิ์ครอบคลุมถึงการทำลายเชื้อรา ไวรัสชนิดมีเปลือก (enveloped viruses) ปรสิต และอาจมีผลในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งได้อีกด้วย

วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2556; 46(1): 1-19

คุณสมบัติทั่วไปของเปปไทด์ต้านจุลชีพ

ในปัจจุบันพบเปปไทด์ต้านจุลชีพมากกว่า 1,000 ชนิด มีความยาวของกรดอะมิโนตั้งแต่ 12-100 ตัว ซึ่งภายในสายของเปปไทด์นั้นมักจะประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีประจุบวก (positively charge amino acids) เช่น อาร์จินีน (arginine) ไลซีน (lysine) รวมถึง ฮิสติดีน (histidine) ในสภาวะที่เป็นกรด และกรดอะมิโนชนิดไม่มีขั้ว (hydrophobic amino acids) เช่น อะลานีน (alanine) ฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) ทริปโตฟาน (tryptophan) และ ไทโรซีน (tyrosine) มากกว่า 50% ซึ่งการมีกรดอะมิโนที่มีประจุบวกจำนวนมากนั้นส่งเสริมให้เปปไทด์ต้านจุลชีพมีคุณสมบัติในการเลือกจับกับเซลล์แบคทีเรียผ่านประจุลบของฟอสโฟไลปิด (phospholipid) ที่เซลล์เมมเบรน

ของเชื้อพร้อมกับสารบางชนิดที่เชื้อสร้างขึ้น เช่น กรด Teichoic ของแบคทีเรียชนิดแกรมบวก หรือ สาร lipopolysaccharide (LPS) ของแบคทีเรียชนิดแกรมลบ เป็นต้น¹⁻³

โครงสร้างทุติยภูมิของเปปไทด์ต้านจุลชีพ

จากการศึกษาวิจัยพบว่าเปปไทด์ต้านจุลชีพมีคุณสมบัติเป็น amphipathicity กล่าวคือเป็นโมเลกุลที่ด้านหนึ่งมีประจุส่วนอีกด้านหนึ่งไม่มีขั้ว (hydrophobicity) ซึ่งส่วนของโมเลกุลที่มีประจุส่วนนี้มีความสำคัญและเกี่ยวข้องกับการจับกับเซลล์เมมเบรนของเชื้อจุลชีพ นำไปสู่การแทรกตัวของเปปไทด์และทำลายเชื้อได้ต่อไป³⁻⁵

ปัจจุบันเปปไทด์ต้านจุลชีพสามารถแบ่งโดยอาศัย

โครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) ได้เป็น 4 ชนิด ดังแสดงในรูปที่ 1 คือ

1. โครงสร้าง alpha-helix เป็นลักษณะโครงสร้างเกลียวเวียนขวา ตัวอย่างของเปปไทด์โครงสร้างดังกล่าว เช่น magainins ซึ่งแยกได้จากผิวหนังของสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำจำพวกกบ, melittin จากสารพิษที่ผึ้งปล่อยออกมา (bee venom) และ LL-37 ซึ่งเป็นโปรตีนภายในไลโซซิมของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล (neutrophil) ของมนุษย์ เป็นต้น

2. โครงสร้าง beta-sheet หรือ beta-strand เป็นโครงสร้างซึ่งประกอบด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) อย่างน้อย 2 พันธะในการคงรูปร่าง ตัวอย่างของเปปไทด์ซึ่งมีโครงสร้างเป็น beta-sheet เช่น protegrin-1 ซึ่งสร้างจากเซลล์เม็ดเลือดขาวของสุกร, alpha- และ beta-defensins จากเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์ เป็นต้น

3. โครงสร้าง beta-hairpin หรือ loop structure ประกอบด้วยพันธะไดซัลไฟด์ในการคงรูปร่างของเปปไทด์

เพียงพันธะเดียว ตัวอย่างเช่น lactoferricin ซึ่งพบทั้งในน้ำนมจากวัวและมนุษย์ thanatin จากแมลงจำพวกมวน (*Podisus maculiventris*) เป็นต้น

4. โครงสร้าง extended ซึ่งเป็นโครงสร้างสายตรง ตัวอย่างเช่น indolicidin จากวัว PR-39 จากสุกร เป็นต้น

ขั้นตอนและกลไกในการทำลายเชื้อจุลชีพของเปปไทด์ด้านจุลชีพ

เนื่องจากเปปไทด์ด้านจุลชีพมีหลายชนิดและมีเป้าหมายในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่แตกต่างกัน บางชนิดมีผลยับยั้งการทำงานของโปรตีน เอนไซม์ กรดนิวคลีอิก หรือสารภายในเซลล์ (รูปที่ 2) อย่างไรก็ตามส่วนใหญ่มักมีเป้าหมายอยู่ที่การทำลายเซลล์ผ่านทางเซลล์เมมเบรน ซึ่งขั้นตอนในการทำลายจุลชีพของเปปไทด์ด้านจุลชีพและแบบจำลองการทำลายเซลล์มีอยู่หลายแบบดังนี้⁵⁻⁷

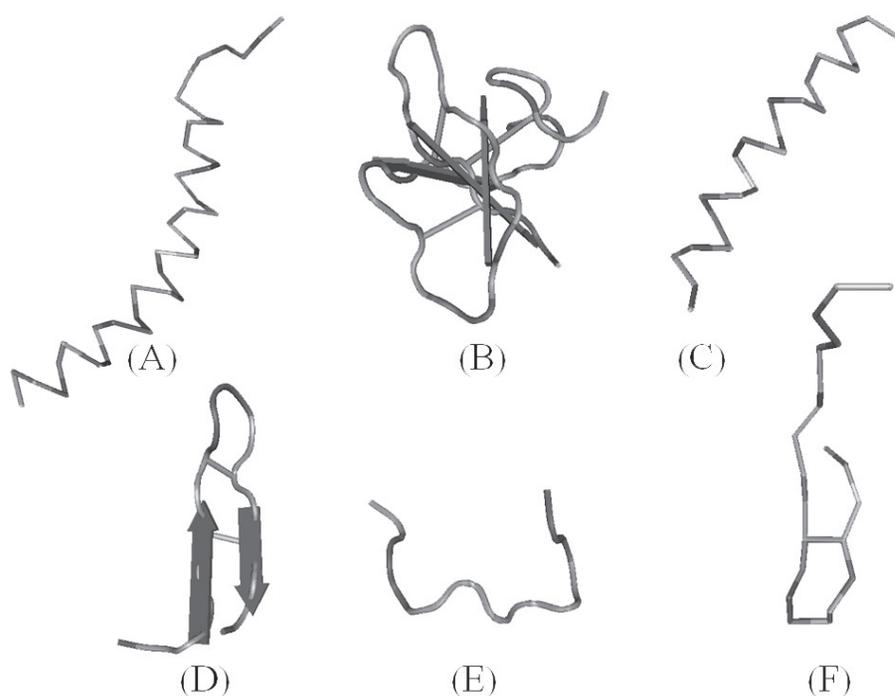


Figure 1 The secondary structure of antimicrobial peptides

Several secondary structures of antimicrobial peptides are illustrated for example alpha-helical structure of LL-37 (A) and magainins (C), beta pleated sheet structure of beta-defensin-2 (B) and protegrin-1 (D), extended of indolicidin (E) and loop structure of thanatin (F). The three-dimensional structures of these peptides are prepared by Cn3D public software (www.ncbi.nlm.nih.gov/structure). The reference accession number of antimicrobial peptides LL-37, beta-defensin-2, magainins, protegrin-1, indolicidin and thanatin are MMDB ID: 66825, 16324, 74736, 73760, 74222 and 12286. Arrows indicated the direction of beta-sheet structure.

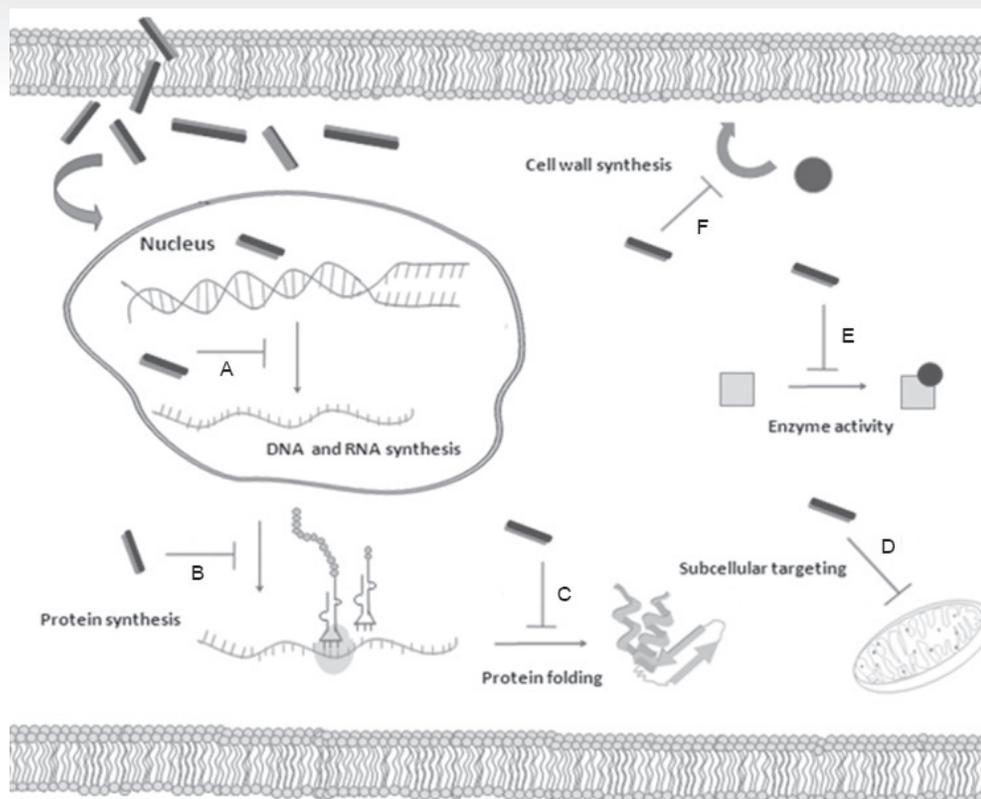


Figure 2 Modes of action of antimicrobial peptides

Modes of action of antimicrobial peptides are depicted in panel A-F. Various intracellular targets of peptides are demonstrated including the inhibition of DNA or RNA biosynthesis (A), blockage of protein synthesis (B), inhibition of protein folding (C), targeting to subcellular organelles such as mitochondria (D), binding to cellular enzymes and inhibit enzymes function (E) and blockage of structural components associated with cell wall synthesis (F).

ขั้นตอนการทำลายเชื้อของเปปไทด์ต้านจุลชีพ

1. การดึงดูดระหว่างเปปไทด์ต้านจุลชีพและเซลล์จุลชีพ (cell attraction) การดึงดูดหรือเหนี่ยวนำระหว่างเซลล์จุลชีพและเปปไทด์ต้านจุลชีพอาศัยแรงขั้วไฟฟ้าหรือแรง electrostatic ซึ่งเซลล์เมมเบรนของเชื้อจุลชีพและองค์ประกอบของสารบนผิวของเซลล์ เช่น lipopolysaccharide ของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบหรือกรด Teichoic ของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกนั้นมีประจุรวมเป็นลบ ในขณะที่เปปไทด์ต้านจุลชีพมีประจุเป็นบวก

2. การจับกับเซลล์เมมเบรน (attachment)
 ขั้นตอนนี้เกิดขึ้นหลังจากการเหนี่ยวนำระหว่างเซลล์แบคทีเรียและเปปไทด์ต้านจุลชีพ โดยเปปไทด์ต้านจุลชีพซึ่งมีประจุบวกจะแทรกตัวผ่านผนังเซลล์เข้าไปยึดเกาะกับประจุลบของฟอสโฟไลปิดในชั้นลิพิดไบเลเยอร์ (lipid bilayer) ของเซลล์

3. การสอดแทรกเปปไทด์ผ่านชั้นลิพิดไบเลเยอร์ (penetration)

ขั้นตอนนี้เป็นการสอดแทรกเปปไทด์ต้าน hydrophobic core เข้าไปในเซลล์เมมเบรนทำให้เกิด membrane permeability มากขึ้น เกิดรู (pore) ที่เซลล์เมมเบรน แล้วทำให้เกิดการรั่วไหลของสารจากภายในเซลล์ออกสู่ภายนอกเซลล์ ส่งผลให้เชื้อจุลชีพตายในที่สุด ซึ่งมีแบบจำลองของการเกิดรูจากเปปไทด์แต่ละชนิดที่แตกต่างกันดังนี้

แบบจำลองกลไกการทำลายเซลล์ของเปปไทด์ต้านจุลชีพ

1. แบบจำลอง barrel-stave

แบบจำลองนี้อาศัยคุณสมบัติความเป็น amphipathicity ของเปปไทด์ต้านจุลชีพ ซึ่งส่วนใหญ่มีโครงสร้างทุติยภูมิเป็น alpha-helix โดยเปปไทด์จะใช้ส่วนของกรดอะมิโนไม่ชอบน้ำ (hydrophobic amino acids) จับกับส่วนนอกของ head group lipid bilayer จากนั้นใช้ส่วนของกรดอะมิโนที่ชอบน้ำ (hydrophilic amino acids) หรือมีประจุบวกแทรกตัวผ่านชั้นลิพิดไบเลเยอร์ของเซลล์แบคทีเรีย การจำลองตัวดังกล่าว

อาศัยโครงสร้าง alpha-helix จำนวน 3-11 แท่งเรียงต่อกัน เป็นวงกลมคล้ายถังไม้ นำไปสู่การเกิดรู และเกิดการรั่วไหลของสารน้ำออกสู่ภายนอก ทำให้เซลล์ตายในที่สุด

2. แบบจำลอง carpet

เป็นแบบจำลองที่อาศัยการสะสมของเปปไทด์ด้านจุลชีพจำนวนมากบนชั้นลิปิดไบเลเยอร์ของเซลล์แบคทีเรีย การสะสมเปปไทด์ดังกล่าวทำให้มีรูปร่างคล้ายกับผืนพรม เปปไทด์จะเรียงตัวขนานไปกับผิวของเซลล์แบคทีเรียโดยอาศัยแรง electrostatic จากนั้นทำให้เกิดการห่อหุ้มโครงสร้างของลิปิดไบเลเยอร์ของเซลล์แบคทีเรียจนมีลักษณะคล้ายกับไมเซลล์ (micelles) และหลุดออกจากเซลล์เมมเบรนซึ่งผลดังกล่าวทำให้เกิดรูที่ผิวเซลล์แบคทีเรียเช่นเดียวกัน

3. แบบจำลอง toroid หรือ wormhole

แบบจำลอง toroid หรือเรียกในช่วงแรกตามชื่อผู้ตั้งสมมติฐานแบบจำลองว่า Shai-Matsuzaki-Huang model มีลักษณะคล้ายกับแบบจำลอง barrel stave คือ เปปไทด์จับที่ผิวของเซลล์เมมเบรนโดยอาศัยกรดอะมิโนส่วนไม่ชอบน้ำ จากนั้นสอดแทรกส่วนของกรดอะมิโนที่ชอบน้ำเข้าไป แล้วกระตุ้นให้เกิดโครงสร้างลิปิดโมโนเลเยอร์ (lipid monolayer) ขึ้น โดยลิปิดโมโนเลเยอร์จะถูกขนาบข้างด้วยเปปไทด์ที่สอดแทรกเข้าไปจำนวน 3-6 เปปไทด์เกิดเป็นรูเกิดขึ้น แบบจำลองการเกิดรูของเปปไทด์บนผิวเซลล์เมมเบรนของแบคทีเรียแสดงในรูปแบบที่ 3

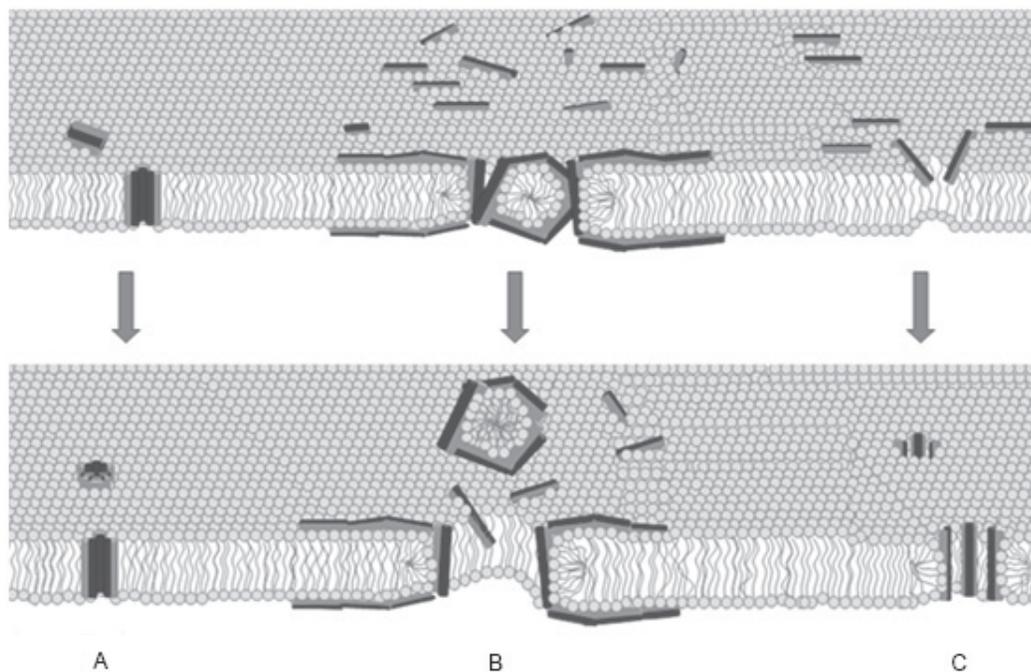


Figure 3 Models of membrane permeabilization of antimicrobial peptides (modified from Jenssen et al.³). Three models of pore formation mechanism consisting of barrel stave (A) carpet (B) and toroidal model (C) are illustrated.

การเลือกจับของเปปไทด์ด้านจุลชีพ

มีรายงานว่าเปปไทด์ด้านจุลชีพสามารถทำลายแบคทีเรียผ่านทางกลไกอื่นๆ หรือจับกับโปรตีนอื่นๆ ภายในเซลล์ของจุลชีพ แต่ส่วนใหญ่มีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อจุลชีพผ่านทาง การเกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ (membrane permeabilization) โดยพบว่า มีปัจจัยหลายประการที่เกี่ยวข้องกับการเลือกจับของเปปไทด์ด้านจุลชีพต่อเซลล์ของแบคทีเรียมากกว่าเซลล์เจ้าบ้าน เช่น ความแตกต่างขององค์ประกอบไขมัน (lipid composition) ของเซลล์แบคทีเรียและเซลล์ยูคาริโอต โดยที่ลิปิดไบเลเยอร์ด้านนอกของเซลล์ยูคาริโอตมีประจุเป็นกลาง (zwitterionic phospholipid) แต่แบคทีเรียมีประจุ

เป็นลบ (negatively charge phospholipid) จำนวนมากทั้งด้านนอกและด้านในของเมมเบรนลิปิดไบเลเยอร์ (membrane lipid bilayer) และร่วมกับการมีคุณสมบัติความเป็นกรด (acidic character) ที่ด้านนอกของเซลล์เมมเบรนของแบคทีเรียจึงทำให้สามารถจับกับประจุบวกของเปปไทด์ด้านจุลชีพได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้การไม่มีโมเลกุลของโคเลสเตอรอล (cholesterol) ในเซลล์เมมเบรนของแบคทีเรียซึ่งเป็นปัจจัยในการป้องกันการทำลายเซลล์ของยูคาริโอตจากเปปไทด์ด้านจุลชีพ ตลอดจนการมี negative transmembrane potential จำนวนมากภายในเซลล์แบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียง่ายต่อการเลือก

จับโดยเปปไทด์ด้านจุลชีพเกิด pore formation และ destabilization นำไปสู่การเกิด ion channels formation ตามมาได้ นอกจากนี้การเป็นสารทำลายเชื้อก่อโรค เช่น แบคทีเรีย รา ไวรัส รวมถึง ปรสิตรแล้วเปปไทด์ด้านจุลชีพยังเกี่ยวข้องกับการลดการเกิดพิษ (endotoxin neutralization)⁸⁻¹⁰ สามารถกระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันและควบคุมระบบภูมิคุ้มกัน (chemotactic and immunomodulating activities)¹¹⁻¹³ และยังพบว่าเปปไทด์ด้านจุลชีพบางชนิดเกี่ยวข้องกับการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis)¹⁴⁻¹⁶ และการซ่อมแซมบาดแผล (wound repairing)^{17,18} ซึ่งเกี่ยวข้องกับการทำให้แผลติดเชื้อมาได้เร็วขึ้น ในบทความนี้ผู้ประพันธ์จะมุ่งเน้นไปที่เปปไทด์ด้านจุลชีพที่สำคัญในมนุษย์ 3 ชนิด คือ cathelicidins, defensins และ histatins นอกจากนี้ยังได้ยกตัวอย่างเปปไทด์ด้านจุลชีพจากสัตว์ซึ่งมีการศึกษาวิจัยอย่างแพร่หลายจนพัฒนาไปสู่การทดสอบระดับ clinical trials 2 ชนิด คือ protegrin-1 และ magainins

1. Cathelicidins

Cathelicidins เป็นกลุ่มของเปปไทด์ด้านจุลชีพที่พบได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด การจัดจำแนกอาศัยความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน (conserved region) ด้าน N-terminus ประมาณ 100 ตัว เรียกบริเวณนี้ว่า cathelin domain โดยมีความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนทางด้าน C-terminus ในสัตว์แต่ละชนิด เปปไทด์ชนิดนี้ถูกสร้างเป็นโปรเปปไทด์ (pro-peptide) ซึ่งจำเป็นต้องอาศัยเอนไซม์ protease ย่อยเพื่อให้อยู่ในรูปที่สามารถออกฤทธิ์ได้ต่อไป^{19,20}

LL-37 เป็นเปปไทด์ด้านจุลชีพในกลุ่ม cathelicidins ที่แยกได้จากเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์หลายชนิด เช่น B-cells, monocytes, mast cells และ NK cells เป็นต้น^{21,22} เปปไทด์ชนิดนี้มีโครงสร้างทุติยภูมิเป็น alpha-helix ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนจำนวน 37 ตัว มีกรดอะมิโนลิซีน (leucine) และ ไลซีน (lysine) เป็นองค์ประกอบหลักถึง 27% และเป็นกรดอะมิโนส่วนสำคัญที่ทำให้มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อจุลชีพ งานวิจัยหลายฉบับกล่าวถึงความสามารถในการต้านเชื้อจุลชีพของเปปไทด์ LL-37 โดยพบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งในกลุ่มแกรมบวก (Gram-positive bacteria) และแกรมลบ (Gram-negative bacteria) เช่น *S. epidermidis*, *S. aureus*, methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), *Streptococcus pyogenes*, vancomycin-resistant *E. faecalis*, vancomycin-resistant *E. faecium*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris* และ *Stenotrophomonas maltophilia* เป็นต้น^{23, 24} อย่างไรก็ตาม

พบว่าเปปไทด์ LL-37 มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อบางชนิดต่ำหรือไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้เช่นกัน เช่น เชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia cepacia* และเชื้อยีสต์ *Candida albicans* กลไกหรือปัจจัยที่ส่งเสริมการต้านฤทธิ์ของเชื้อดังกล่าวยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด นอกจากนี้ยังพบว่าในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียม คลอไรด์สูงสามารถทำให้ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อของเปปไทด์ LL-37 ลดลงได้²⁴

ปัจจุบันมีการศึกษาถึงความสำคัญในการสร้างไบโอฟิล์ม (biofilm) ของเชื้อจุลชีพมากขึ้น ซึ่งไบโอฟิล์มส่วนใหญ่เป็นสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตที่สร้างและปล่อยออกมาจากเชื้อจุลชีพมีคุณสมบัติสำคัญในการช่วยปกป้องเชื้อจุลชีพจากการถูกทำลายโดยยาปฏิชีวนะหรือสารยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพ รายงานวิจัยพบว่า เปปไทด์ LL-37 สามารถลดการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* สายพันธุ์ ATCC 35984 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถสร้างและหลั่งสไลม์ (slime หรือ extracellular polymeric substance) ออกมาปกคลุมตัวเชื้อได้สูงถึง 91.2% โดยเปปไทด์เกี่ยวข้องในการยับยั้งการยึดเกาะของเซลล์แบคทีเรียกับพื้นผิวที่จะนำไปสู่การรวมตัวของเชื้อเป็นกลุ่มก้อน²⁵ นอกจากนี้ยังพบว่าเปปไทด์ LL-37 สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. aeruginosa* ได้ อย่างไรก็ตาม พบว่ามีกลไกในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มที่แตกต่างไปจากเชื้อ *S. epidermidis* โดยเปปไทด์มีผลกระตุ้นให้เชื้อเกิดการเคลื่อนที่ (twitching motility) ไม่ยึดเกาะ และลดการแสดงออกของยีน *rhlAB* ที่เกี่ยวข้องกับการระดมการสังเคราะห์ rhamnolipids ในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อจุลชีพ²⁶

จากการศึกษาลำดับกรดอะมิโนที่มีความสำคัญเกี่ยวข้องกับการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียภายในเปปไทด์ LL-37 โดยสังเคราะห์เปปไทด์ขนาดต่างๆ กัน ตั้งแต่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 13-31 และเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกับเปปไทด์ LL-37 โดยทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia thailandensis* พบว่าเปปไทด์สามารถคงคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อได้ไม่แตกต่างจากเปปไทด์ต้นแบบ (native peptide) แม้จะตัดกรดอะมิโนส่วนปลายด้าน N- และ C-terminus ออกไปจำนวน 12 ตัวและ 6 ตัว ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่ากรดอะมิโนช่วงกลางของสายเปปไทด์ LL-37 น่าจะมีความสำคัญในคงรูปร่างและจำเป็นต่อการออกฤทธิ์ทำลายเชื้อแบคทีเรีย²⁷ อย่างไรก็ตาม ทดสอบนี้กระทำกับเชื้อแบคทีเรียเพียงชนิดเดียว นอกจากนี้การออกฤทธิ์ของเปปไทด์ยังขึ้นกับหลายปัจจัยจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

จากรายงานการศึกษาในหนูทดลองที่รบกวนการ

แสดงออกของเปปไทด์ cathelin-related antimicrobial peptide (CRAMP) โดยการทำน็อกเอาต์ (knockout) ยีน กำหนดการสร้างเปปไทด์ CRAMP ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเปปไทด์ LL-37 พบว่าหนูในกลุ่มนี้มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อที่ผิวหนังมากกว่าหนูในกลุ่มควบคุม²⁸ เมื่อตรวจวัดปริมาณเปปไทด์ LL-37 ในของเหลวภายในปอด (airway fluids) ของมนุษย์ในสภาวะปกติ พบว่ามีค่าเฉลี่ยประมาณ 2 และ 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในผู้ใหญ่และเด็กทารก ตามลำดับ อย่างไรก็ตามพบว่าปริมาณของเปปไทด์ LL-37 อาจเพิ่มขึ้น 2-3 เท่าเมื่อมีการติดเชื้อในปอด²⁹ และอาจพบปริมาณของเปปไทด์มากขึ้นถึง 750 เท่า (1.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เมื่อมีอาการอักเสบที่ผิวหนังแบบเฉียบพลันในผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน (psoriasis)³⁰ ดังนั้นการตรวจหาปริมาณเปปไทด์ LL-37 จึงอาจเป็นตัวบ่งชี้ (marker) ที่สำคัญในการวินิจฉัยผู้ป่วยที่สงสัยจะเป็นโรคสะเก็ดเงินได้ นอกเหนือจากการประเมินอาการทางคลินิกของโรคดังกล่าว

นอกจากนี้ Ramos และคณะ (2011) พบว่าเปปไทด์ LL-37 เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ (Angiogenesis) โดยสามารถกระตุ้นการแบ่งเซลล์ของเซลล์หลอดเลือดสองชนิดในหลอดทดลอง (*in vitro*) คือ human microvascular endothelial cells (HMECs) และ human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) และยังพบว่าเปปไทด์ LL-37 เกี่ยวข้องกับการรักษาบาดแผล (wound healing) โดยทำให้เกิดกระบวนการสร้างผิวเซลล์ใหม่ (re-epithelialization) ซึ่งสัมพันธ์กับการสร้างหลอดเลือดใหม่ นำไปสู่การรักษาบาดแผลที่รวดเร็วขึ้นด้วย³¹

2. Defensins

Defensins เป็นกลุ่มเปปไทด์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งสามารถพบได้ทั้งในพืช แมลง สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง และสัตว์มีกระดูกสันหลัง defensins ในมนุษย์สร้างจากเซลล์หลายชนิด ส่วนใหญ่พบภายในแกรนูล (azurophilic granules) ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล และ มาโครฟาจ (macrophages) โดยเปปไทด์จะถูกสร้างและนำส่งเข้าไปทำลายเชื้อจุลินทรีย์ภายในถุง vacuoles กลุ่มของเปปไทด์ defensins สร้างจากกลุ่มยีนบนโครโมโซมที่ 6, 8 และ 20 ในรูปของโปรเปปไทด์ที่ไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ภายในเซลล์ มีกรดอะมิโนประมาณ 93-95 ตัว และมีกรดอะมิโนด้าน N-terminus ประมาณ 40-45 ตัว ทำหน้าที่เป็น signaling sequence³²

Defensins แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มคือ alpha-defensins และ beta-defensins กลุ่ม alpha-defensins มีกรดอะมิโนประมาณ 29-35 ตัว สมาชิกภายในกลุ่มมี 6

ชนิด ได้แก่ HNP-1 ถึง -4 และ HD-5 และ -6 ซึ่ง 4 ชนิดแรกพบในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล นอกจากนี้ยังสามารถพบ HNP-1 ถึง-3 ได้ในเซลล์เม็ดเลือดขาวอื่นๆ ด้วย เช่น B-lymphocytes และ NK cells เป็นต้น ส่วน HD-5 และ -6 นั้นพบภายในแกรนูลของเซลล์ paneth ในส่วนของลำไส้เล็กและเยื่อผิวภายในอวัยวะสืบพันธุ์เพศหญิง โดยเปปไทด์ทั้งสองชนิดนี้นอกจากมีส่วนช่วยในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคจากภายนอกแล้วยังสันนิษฐานว่าเกี่ยวข้องกับกระบวนการควบคุมสมดุลของเชื้อประจำถิ่นในบริเวณดังกล่าวด้วย³³ เปปไทด์ต้านเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม beta-defensins ประกอบด้วยกรดอะมิโนตั้งแต่ 35 ถึงมากกว่า 100 ตัว ปัจจุบันมีสมาชิกภายในกลุ่ม 33 ชนิดคือ HBD-1 ถึง -33 โดยแบ่งย่อยออกได้เป็น beta-defensins ที่จำเพาะกับเซลล์ของหลอดเก็บสเปิร์ม (epididymis) และอัณฑะ (testis) เช่น HBD-5, HBD-19 ถึง HBD-21 เป็นต้นและ beta-defensins ชนิดอื่นๆ ซึ่งพบการแสดงออกในเซลล์หลายชนิด เช่น เปปไทด์ HBD-1 พบได้ในเซลล์ร่างกายที่สัมผัสกับสิ่งแวดล้อมโดยตรง เช่น เซลล์เยื่อทางเดินหายใจ (epithelial cells of respiratory tract) เซลล์เยื่ออวัยวะสืบพันธุ์ (epithelial cells of urogenital tract) เซลล์เยื่อช่องปาก (buccal mucosa) เป็นต้น และ HBD-7 ถึง HBD-14 พบในเซลล์ gingival tissues และ keratinocytes เป็นต้น^{34,35} ภายหลังจากการถูกกระตุ้นด้วยเชื้อจุลินทรีย์หรือสารที่เชื้อจุลินทรีย์สร้างขึ้น เช่น LPS เปปไทด์ defensins จะถูกตัดย่อยด้วยเอนไซม์ protease หรือ metalloproteinase ได้เป็นส่วนที่สามารถออกฤทธิ์ด้าน C-terminus มีขนาดเพียง 29-42 กรดอะมิโน และมีโครงสร้างทุติยภูมิเป็นแบบ beta-sheet โดยอาศัยพันธะไดซัลไฟด์จากกรดอะมิโนซิสเตอีน (cysteine) จำนวน 6 ตัว ในการคงรูปร่าง โดยที่ซิสเตอีนตัวที่ 1 สร้างพันธะกับซิสเตอีนตัวที่ 6 ซิสเตอีนตัวที่ 2 สร้างพันธะกับซิสเตอีนตัวที่ 4 และซิสเตอีนตัวที่ 3 สร้างพันธะกับซิสเตอีนตัวที่ 5 (รูปที่ 1) น้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์นั้นอยู่ระหว่าง 3.5-6 กิโลดาลตัน (kDa)³⁶

รายงานวิจัยพบว่า defensins ทั้งสองกลุ่มสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งในกลุ่มแกรมบวกและแกรมลบเช่นเดียวกับ LL-37 นอกจากนี้ยังสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียดื้อยาหลายชนิด เช่น *S. aureus* สายพันธุ์ดื้อยา methicillin (MRSA) และ *E. faecalis* สายพันธุ์ดื้อยา vancomycin (VRE), *Burkholderia cepacia* รวมถึงเชื้อจุลินทรีย์ดื้อยาหลายชนิดอย่าง multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* เป็นต้น^{37, 38}

นอกจากนี้เปปไทด์ defensins ยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์ เช่น *C. albicans*, *C. tropicalis*,

C. parapsilosis และราเส้นสาย (mold) ซึ่งก่อให้เกิดโรคผิวหนังบางชนิด เช่น *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes* และ *Epidermophyton floccosum* ได้³⁹ เนื่องจากลำดับกรดอะมิโน และการจัดเรียงของพันธะไดซัลไฟด์ รวมถึงประจุสุทธิที่แตกต่างกันของเปปไทด์ defensins ทำให้ฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ในแต่ละกลุ่มแตกต่างกันด้วย จากการศึกษากฎเกณฑ์ในการต้านเชื้อ *C. albicans* ของ HBD-1 ถึง-3 พบว่า HBD-3 มีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อได้ดีและกว้างกว่าอีกสองชนิด จากการศึกษาระเบียบภายในสายของเปปไทด์ทั้งสามชนิดที่ใช้ทดสอบโดยอาศัยการคำนวณกรดอะมิโนที่มีประจุบวกอย่างกรดอะมิโนไลซีน และ อาร์จินีน พบว่า HBD-3 มีมากถึง +11 ในขณะที่ HBD-1 และ -2 มีเพียง +4 และ +6 ตามลำดับ ซึ่งผลของประจุดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการมีประจุบวกมากสามารถเหนี่ยวนำให้จับกับประจุลบของผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ได้ดีขึ้น³⁵ จากการวิจัยของ Vylkova และคณะ (2007) พบว่ากลไกการทำลายเชื้อของ HBD-1 และ -2 จำเป็นต้องอาศัยกระบวนการหายใจของเซลล์ (cellular respiration) โดยเมื่อทดสอบเปปไทด์กับเชื้อในสภาวะที่ได้รับสารยับยั้งกระบวนการสร้างพลังงานของเซลล์ เช่น สาร carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) และ sodium azide พบว่าฤทธิ์ของเปปไทด์ทั้งสองถูกยับยั้งและทำให้ยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้ตามปกติ ในขณะที่ HBD-3 ยังคงสามารถฆ่าเชื้อได้ดี นอกจากนี้ยังพบว่าในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์สูง หรือมีสาร divalent cation บางชนิด เช่น $MgCl_2$ และ $CaCl_2$ สามารถส่งผลให้ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อของเปปไทด์ลดลงได้เช่นเดียวกับกับเปปไทด์ LL-37⁴⁰ นอกจากนี้ Routsias และคณะ (2010) ยังพบว่าพันธะไดซัลไฟด์ซึ่งใช้ในการคงรูปร่างของเปปไทด์มีผลต่อความสามารถในการฆ่าเชื้อเช่นกัน โดยหากทำลายพันธะดังกล่าวหรือสังเคราะห์กรดอะมิโนอื่นแทนกรดอะมิโนซิสเตอีนจะส่งผลให้ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อลดลงถึง 7 เท่า³⁸ เมื่อนำเปปไทด์ HBD-3 ไปทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์ดื้อยาหลายชนิด เช่น *S. aureus*, *E. faecium*, *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* และ *A. baumannii* พบว่าสามารถฆ่าเชื้อได้อย่างรวดเร็วภายในเวลา 90 นาที อย่างไรก็ตามเมื่อนำเปปไทด์ไปทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์ในสภาวะที่มีสาร biological fluids เช่น ซีรัมซึ่งผ่านการ inactivate ด้วยความร้อน พบว่าประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อลดลงอย่างเห็นได้ชัด แสดงให้เห็นว่าสารบางชนิดในซีรัมอาจมีผลยับยั้งการทำงานของเปปไทด์⁴¹ เมื่อศึกษาถึงการแสดงออกของเปปไทด์ beta-defensins ภายหลังจากได้รับเชื้อจุลินทรีย์ *Helicobacter pylori* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการอักเสบและแผลในกระเพาะ

อาหาร โดยจำลองการติดเชื้อในหลอดทดลองด้วยการบ่มเชื้อจุลินทรีย์พร้อมกับเซลล์ของเยื่อบุกระเพาะอาหาร 2 ชนิด คือ gastric epithelial cell line (MKN45) และ gastric cancer cell line (ASG) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นตรวจวัดการแสดงออกของเปปไทด์ beta-defensins ผ่านการวัดปริมาณของ mRNA พบว่ามีการแสดงออกของเปปไทด์ beta-defensins เพิ่มมากขึ้น เมื่อจำนวนแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อต่อหนึ่งเซลล์ (multiplicity of infection; MOI) มีมากขึ้น เมื่อทดสอบเซลล์กับเชื้อจุลินทรีย์ MOI มีค่าเท่ากับ 100 พบว่าการแสดงออกของเปปไทด์ HBD-2 เพิ่มขึ้นภายหลังจากบ่มร่วมกับเชื้อแบคทีเรียเป็นเวลาเพียง 3-4 ชั่วโมง ในขณะที่เปปไทด์ HBD-1 นั้นจะเพิ่มขึ้นหลังจากที่มีการติดเชื้อไปแล้วประมาณ 8 ชั่วโมง และเปปไทด์ทั้งสองมีการแสดงออกของปริมาณ mRNA เพิ่มขึ้นสูงสุดที่ประมาณ 12 ชั่วโมง โดยพบว่าการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของเปปไทด์ดังกล่าวนั้นถูกกระตุ้นผ่านทาง proinflammatory cytokine ชนิดหนึ่ง คือ interleukin-1 (IL-1) ในระหว่างที่เซลล์เริ่มมีการติดเชื้อ⁴² นอกจากนี้เปปไทด์ defensins จะมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อราและแบคทีเรียแล้วยังพบว่ามีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อไวรัสด้วย จากการวิจัยของ Crack และคณะ (2012) ได้นำเชื้อไวรัส Varicella zoster virus (VZV) ไปทำให้เกิดการติดเชื้อในเซลล์ human keratinocytes (HaCaT cells) และ human B-lymphocytes แล้วตรวจติดตามปริมาณไวรัสที่เวลาต่าง ๆ หลังจากได้รับเปปไทด์ HBD-2 พบว่าปริมาณเชื้อไวรัสลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเปปไทด์⁴³ นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณของ HBD-2 ยังเกี่ยวข้องกับกรดอะมิโนในผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินเช่นเดียวกับ LL-37 อีกด้วย⁴⁴ เมื่อศึกษาถึงปริมาณการแสดงออกของ alpha-defensin ภายใต้อิมมูโนโกลบูลิน CD8⁺ lymphocyte และ พลาสมาในผู้ป่วยติดเชื้อไวรัส HIV-1 พบว่าปริมาณ alpha-defensin ในผู้ติดเชื้อไวรัสมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมซึ่งไม่ติดเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งกลุ่มผู้วิจัยได้ให้ข้อสรุปว่าการเพิ่มขึ้นของปริมาณ alpha defensin เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัส HIV-1 เรื้อรัง เนื่องจากการติดเชื้อดังกล่าวเป็นการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายตลอดเวลาจึงทำให้ร่างกายสร้างเปปไทด์ออกมาตลอดเวลาเช่นเดียวกัน⁴⁵ จากการศึกษาของ Bevins และ Salzman (2011) พบว่าการขาดหรือลดการสร้างเปปไทด์ alpha-defensin (HD-5 และ HD-6) ซึ่งสร้างจากเซลล์ Paneth เกี่ยวข้องกับโรคโครห์น (Crohn's disease) ซึ่งเป็นการอักเสบของลำไส้แบบเรื้อรัง (chronic inflammatory bowel disease)⁴⁶ และจากการศึกษาต่อมาพบว่าเปปไทด์ HD-5 มีส่วนสำคัญในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในลำไส้^{47,48} ส่วน HD-6 พบว่าไม่มีฤทธิ์ใน

การฆ่าเชื้อโดยตรงแต่เปปไทด์สามารถประกอบกันเป็นโครงร่างตาข่าย (nanonets) ห่อหุ้มตัวเชื้อจุลชีพไว้และป้องกันการแทรกตัว (invade) ของเชื้อผ่านเนื้อเยื่อเข้าไปติดเชื้อในชั้นลึกต่อไป⁴⁹ จากผลการวิจัยเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าเปปไทด์ defensins นั้นมีส่วนเกี่ยวข้องในการยับยั้งการเจริญและป้องกันการติดเชื้อโดยจุลชีพจากภายนอกในร่างกาย นอกจากนี้ยังพบว่าเปปไทด์ defensins ซึ่งเกี่ยวข้องกับการอักเสบ สามารถกระตุ้นการแบ่งเซลล์ และสามารถดึงดูดเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันเข้าไปยังบริเวณที่ติดเชื้อ (chemoattractant) ได้⁵⁰⁻⁵²

3. Histatins

Histatins เป็นเปปไทด์ต้านจุลชีพซึ่งสร้างจากเซลล์หลายชนิดภายในร่างกายของมนุษย์ เช่น เม็ดเลือดขาว อ่อนตะ และต่อมน้ำลาย⁵³ ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 7-38 ตัว และมีกรดอะมิโน histatin เป็นองค์ประกอบหลัก มีโครงสร้างทุติยภูมิแบบ alpha-helix สามารถแยกได้เป็น 12 ชนิด (histatin-1 ถึง histatin-12) โดยมี histatins หลักเพียงสามชนิดคือ histatin-1, -3 และ -5 โดย histatin-1 และ -3 เป็นเปปไทด์ที่ถูกสร้างขึ้นจากยีน *HTN1* และ *HTN3* ตามลำดับ histatin-2 เป็นโปรตีนที่ถูกตัดย่อยจาก histatin-1 ส่วน histatins ชนิดอื่น ๆ เป็นโปรตีนที่ถูกตัดย่อยออกมาจาก histatin-3 ปัจจุบันพบว่า histatin-5 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพได้ดีที่สุด⁵⁴ histatin-5 ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 24 ตัว ซึ่งมีกรดอะมิโนฮีสติดีนเป็นองค์ประกอบประมาณ 29% หรือประมาณหนึ่งในสามของกรดอะมิโนทั้งหมดภายในสายของเปปไทด์ เปปไทด์ชนิดนี้มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดี⁵⁵ นอกจากนี้ยังพบว่าเปปไทด์ชนิดนี้มีกลไกการทำลายเชื้อแตกต่างจากเปปไทด์อื่น ๆ ที่อาศัยการเกิดรูที่ผิวเซลล์ เมมเบรน โดย histatin-5 สามารถจับกับเซลล์เมมเบรนและแทรกตัวเข้าไปเพื่อไปออกฤทธิ์ทำลายไมโทคอนเดรีย ซึ่งเป็นออร์แกเนลล์ที่สำคัญและเกี่ยวข้องในการสร้างพลังงานภายในเซลล์ให้กับสิ่งมีชีวิต ส่งผลทำให้เกิดการรั่วไหลของสารต่าง ๆ ภายในไมโทคอนเดรีย เช่น cytochrome C, ATP, potassium ions เกิด G1 cell cycle arrest และเกิดการสะสมของสาร reactive oxygen species (ROS) นำไปสู่การตายของเซลล์ในที่สุด^{56, 57}

มีรายงานวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ของ histatin-5 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. albicans*, *C. glabrata* ทั้งสายพันธุ์ต้นแบบ (wild type) และสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาในกลุ่ม azole, *Cryptococcus neoformans* ทั้งสายพันธุ์ต้นแบบและสายพันธุ์ที่ดื้อต่อ

ยา amphotericin B เชื้อ *C. krusei* และ *Saccharomyces cerevisiae*⁵⁸ และพบว่าประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อยีสต์ *C. albicans* ที่ดื้อต่อยาในกลุ่ม azole ลดลงประมาณ 8 หรือ 18 เท่า เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ตำแหน่งที่ 14 และ 15 จาก ฟีนีลอะลานีน (phenylalanine) และฮีสติดีนเป็นอะลานีนทั้งสองตำแหน่งหรือเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 18 และ 19 จากฮีสติดีนทั้งสองตำแหน่งเป็นอะลานีนทั้งสองตำแหน่ง แสดงให้เห็นว่ากรดอะมิโนฟีนีลอะลานีนและฮีสติดีนในตำแหน่งดังกล่าวน่าจะมีความสำคัญต่อการคงรูปร่างและการออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อจุลชีพ⁵⁹

จากการทดสอบฤทธิ์ของเปปไทด์ histatin-5 ในการต้านเชื้อ *C. albicans* ที่เวลาต่าง ๆ พบว่าประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อแปรผันตามระยะเวลา โดยเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการบ่มเชื้อกับเปปไทด์จะมีผลทำให้เชื้อ *C. albicans* มีอัตราการตายเพิ่มขึ้นด้วย เมื่อศึกษาทางด้านโปรตีโอมิกส์ (proteomics) ของเชื้อ *C. albicans* ภายหลังจากการบ่มร่วมกับ histatin-5 ที่เวลาต่าง ๆ พบว่ามีการเพิ่มปริมาณของโปรตีนหลายชนิดภายในไมโทคอนเดรีย และเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการถอดรหัสพันธุกรรม เช่น elongation factor-1 alpha, ribosomal proteins รวมทั้งมีการเพิ่มขึ้นของ histones ซึ่งเป็นโปรตีนที่จับกับสายของดีเอ็นเอเพื่อคงสภาพดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรียไว้ ในขณะที่โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมและกระบวนการสร้างพลังงานนั้นมีการแสดงออกที่ลดลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหายใจภายในเซลล์และวัฏจักรเครปส์ (Krebs' cycle) เช่น ATP synthase gamma chain, malate dehydrogenase เป็นต้น⁶⁰ ซึ่งจากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเปปไทด์ histatins มีผลโดยตรงต่อไมโทคอนเดรียของเชื้อยีสต์ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียไม่มีไมโทคอนเดรีย จึงทำให้ histatins มีประสิทธิภาพน้อยในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย

ในการศึกษาด้านจุลศาสตร์ของเปปไทด์ histatin-5 กับเชื้อ *C. albicans* ที่อุณหภูมิต่าง ๆ พบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส การเพิ่มความเข้มข้นของเปปไทด์ในระดับต่าง ๆ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์ทั้งในรูปของ germ tube และ blastoconidia ได้ดีขึ้น นอกจากนี้การเพิ่มระยะเวลาที่เชื้อได้รับเปปไทด์เป็นการเพิ่มโอกาสให้เปปไทด์เข้าไปสะสมของภายในเซลล์ได้มากขึ้นและทำลายเชื้อได้ดีขึ้นเช่นกัน ในขณะที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เชื้อยีสต์ยังคงมีการเจริญเติบโตตามปกติที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของเปปไทด์ อย่างไรก็ตามเมื่อทดสอบโดยการนำเชื้อยีสต์ที่บ่มร่วมกับเปปไทด์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที

ไปบ่มต่อที่ 37 องศาเซลเซียส และตรวจติดตามเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ยีสต์พบว่ามีความลดลงจาก 90% เป็น 22% นอกจากนี้เมื่อบ่มเชื้อร่วมกับ sodium azide ซึ่งเป็นสารที่มีผลในการยับยั้งกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์พบว่าเปปไทด์มีความสามารถในการทำลายเชื้อลดลงแม้มีการเพิ่มความเข้มข้นของ histatin-5 ข้อมูลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าการออกฤทธิ์ของเปปไทด์ histatin-5 นั้นจำเป็นต้องอาศัยกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์เข้ามาเกี่ยวข้อง⁶¹ ในปี 2008 Torres และคณะ ได้ศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเปปไทด์ Histatin-5 กับการเกิดกระบวนการ colonization ของเชื้อราในช่องปาก ในน้ำลายของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัส HIV-1 เปรียบเทียบกับกลุ่มคนปกติ พบว่าผู้ป่วยมีโอกาสเกิดกระบวนการ colonization ของเชื้อ *C. albicans* ในช่องปากได้ถึง 45% ในขณะที่พบเพียง 17% ในคนปกติเท่านั้น และเมื่อทดสอบหาความเข้มข้นของ Histatin-5 ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัส HIV-1 ด้วยวิธี Enzyme linked immunosorbent assay หรือ ELISA พบว่ามีค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของเปปไทด์น้อยกว่าความเข้มข้นที่พบในคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยาต้านไวรัสในกลุ่ม protease inhibitor (PI) มีปริมาณความเข้มข้นของเปปไทด์ histatin-5 น้อยกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับยากลับ reverse transcriptase inhibitors (RTI) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่ายาในกลุ่ม PI อาจมีผลยับยั้งเอนไซม์ proteases ในร่างกายที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า histatin-5 ในน้ำลายมีบทบาทสำคัญในการป้องกันการเกิดกระบวนการ colonization ของเชื้อยีสต์ในช่องปาก⁶²

4. Protegrins

Protegrins เป็นเปปไทด์ด้านจุลชีพประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 16-18 ตัว ในธรรมชาติสร้างขึ้นในเซลล์เม็ดเลือดขาวของสุกร ปัจจุบันพบมี 5 ชนิด คือ protegrin-1 ถึง -5 โดยมีความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน (amino acid sequence similarity) ภายในกลุ่มมากกว่า 77% เนื่องจากมีคุณสมบัติในการทำลายเชื้อจุลชีพที่ดีกว่าชนิดอื่น protegrin-1 จึงถูกนำมาเพื่อศึกษาวิจัยมากกว่าชนิดอื่น โดยพบว่าประมาณ 1 ใน 3 ของกรดอะมิโนทั้งหมดภายในสายของเปปไทด์ protegrin-1 เป็นกรดอะมิโนอาร์จินีน จากการศึกษาคโครงสร้างของ protegrin-1 ที่สังเคราะห์ขึ้นด้วย NMR spectroscopy พบว่าการคงรูปร่างของโครงสร้างทุติยภูมิเป็นแบบ beta-hairpin โดยอาศัยการสร้างพันธะไดซัลไฟด์จากกรดอะมิโนซิสเตอีน 4 ตัว โดยที่ซิสเตอีนตำแหน่งที่ 6 สร้างพันธะกับซิสเตอีนตำแหน่งที่ 15 และ ซิสเตอีนตำแหน่งที่ 8 สร้างพันธะกับซิสเตอีนตำแหน่งที่ 13⁶³ นอกจากนี้เมื่อศึกษาโครงสร้างและกลไกในการฆ่าเชื้อจุลชีพของ protegrin-1 โดยทดสอบกับสารสังเคราะห์ palmitoyl-oleoylphosphatidyl ethanolamine (POPE) และ palmitoyl-oleoylphosphatidyl glycerol (POPG) ซึ่งมีคุณสมบัติคล้ายชั้นของเซลล์เมมเบรนด้วย NMR spectroscopy พบว่าเปปไทด์สามารถแทรกตัวเข้าไปในสารที่คล้ายชั้นของเซลล์เมมเบรนโดยการสานกันของเปปไทด์ 2 โมเลกุล (dimer) ในรูปแบบของ N-C terminus 1 โมเลกุลและ C-N terminus อีก 1 โมเลกุลเกิดเป็นโครงสร้าง NC-CN structure โดยอาศัยพันธะไฮโดรเจนระหว่างเปปไทด์ทั้งสอง แล้วใช้จำนวน 4-5 ชั้นของ dimer (octameric หรือ decameric) ในการสร้างรูที่ผิวเซลล์ (beta-barrel pore) ซึ่งรูที่เกิดขึ้นขนาดประมาณ 21 อังสตรอม จำนวน 10-100

Table 1 Amino acid sequence and secondary structure of some antimicrobial peptides

Antimicrobial peptide	No. of amino acids	Amino acid sequence	The secondary structure
LL-37	37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES	Alpha-helix
Alpha-defensin-1	30	ACYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRLWAFCC	Beta-sheet
Beta-defensin-1	36	DHYNCVSSGGQCLYSACPIFTKIQGTCTYRGKAKCCK	Beta-sheet
Histatin-5	24	DSHAKRHHGYKRFHEKHSHRGY	Alpha-helix
Protegrin-1	18	RGGRLCYCRRRFCVCGVR	Beta-sheet
Magainin-1	23	GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKS	Alpha-helix
Magainin-2	23	GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMNS	Alpha-helix

รู่ ทำให้เกิดการรั่วของสารน้ำและโปรตีนต่าง ๆ ภายในเซลล์ ออกสู่ภายนอกและส่งผลให้เซลล์แบคทีเรียตายในที่สุด^{64, 65}

รายงานวิจัยหลายฉบับได้ทำการทดสอบ ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของ protegrin-1 ทั้งในหลอดทดลอง (*in vitro*) และในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) พบว่ามีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เป็นแบบกว้าง โดยสามารถฆ่าหรือยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งในกลุ่มแกรมบวกและแกรมลบ เช่นเดียวกับกับ LL-37 และ defensins เช่น สามารถฆ่าเชื้อ *L. monocytogenes*, *E. coli*, และ *Neisseria gonorrhoeae* รวมถึงเชื้อแบคทีเรียดื้อยาอย่าง methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) เชื้อยีสต์ *C. albicans* และไวรัสชนิดมีเปลือกอย่าง HIV-1 โดยทั่วไปมีค่าความเข้มข้นในการยับยั้งเชื้ออยู่ระหว่าง 1-10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร⁶⁶ และจากรายงานวิจัยของ สรศักดิ์ อินทรสุด และคณะ (2011; unpublished) ซึ่งได้ทดสอบฤทธิ์ของ protegrin-1 สังเคราะห์ (ความบริสุทธิ์มากกว่า 95%) กับการยับยั้งหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ หลายสายพันธุ์ทั้งที่เป็นสายพันธุ์มาตรฐานและที่แยกได้จาก ผู้ติดเชื้อ (clinical isolates) เช่น *S. aureus* ATCC 25923,

Bacillus subtilis, *E. coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae*, *P. mirabilis*, *Enterobacter aerogenes*, *S. Typhi*, *S. Enteritidis*, *Shigella flexneri*, *S. sonnei*, *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *P. aeruginosa* รวมถึงเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ซึ่งดื้อยาผ่านการสร้างเอนไซม์ beta-lactamase (extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *E. coli*) และเชื้อแบคทีเรีย *A. baumannii* ที่ดื้อต่อยาหลายชนิด (pan drug resistant) โดยวิธี standard broth macrodilution และใช้ยาปฏิชีวนะ gentamicin เป็นตัวควบคุม การวิจัยพบว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดเฉลี่ยที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (MIC) นั้นอยู่ระหว่าง 0.39-9.37 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ตารางที่ 2) สอดคล้องกับการวิจัยที่เคยรายงานมาก่อนกับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ๆ⁶⁶ อย่างไรก็ตาม จากผลการวิจัยครั้งนี้พบว่าเชื้อ *P. mirabilis* สามารถทนต่อเปปไทด์ protegrin-1 ได้ดีโดยมีค่าของความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้มากกว่า 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร กระบวนการต้านทานต่อเปปไทด์ของเชื่อดังกล่าวนั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่อาจเกิดจากหลายปัจจัย เช่น ส่วน

Table 2 *In vitro* antimicrobial activity testing of protegrin-1 peptide and gentamicin

Bacteria	Protegrin-1		Gentamicin	
	MIC ¹ (µg/ml)	MBC ² (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	3.12	12.50	0.70	5.00
ESBL ³ producing <i>Escherichia coli</i>	9.37	25.00	0.62	0.62
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6.25	25.00	2.50	5.00
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	3.12	12.50	0.31	1.25
<i>Bacillus subtilis</i>	9.37	12.50	0.46	0.93
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3.12	4.68	0.23	0.31
<i>Acinetobacter baumannii</i>	6.25	12.50	> 40	ND ⁴
<i>Proteus mirabilis</i>	> 25	ND	1.25	3.75
<i>Enterobacter aerogenes</i>	4.68	15.62	0.46	0.46
<i>Salmonella</i> Typhi	1.17	2.34	0.07	0.23
<i>Salmonella</i> Enteritidis	1.17	2.34	0.62	1.25
<i>Shigella flexneri</i>	1.56	2.34	1.25	2.50
<i>Shigella sonnei</i>	6.25	6.25	1.25	1.25
<i>Vibrio cholerae</i>	3.12	6.25	1.25	1.25
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0.39	3.90	0.70	1.25

¹ MIC = Mean of minimal inhibitory concentration

² MBC = Mean of minimal bactericidal concentration

³ ESBL = Extended spectrum beta-lactamase

⁴ ND = Not determination

ประกอบของสารในชั้นของเซลล์เมมเบรนโดยธรรมชาติของเชื้อ *P. mirabilis* แตกต่างจากเชื้อแบคทีเรียอื่นหรือเชื้อที่มีการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของเซลล์เมมเบรน (bacterial cell envelope components) เช่น มีกรดอะมิโนที่มีประจุบวกอย่างไลซีนใน phosphatidylglycerol⁶⁷ ซึ่งทำให้เปปไทด์แทรกตัวเข้าไปในชั้นของเซลล์เมมเบรนไม่ได้หรือได้ไม่ดี หรือกลไกอื่น ๆ เช่น การสร้าง outer membrane proteases⁶⁸ หรือการสร้าง efflux pumps เพื่อกำจัดเปปไทด์ด้านจุลชีพออกไป⁶⁹ เป็นต้น

นอกจากนี้ยังพบว่าเปปไทด์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อที่รวดเร็วโดยสามารถทำให้จำนวนเชื้อแบคทีเรีย MRSA และ *P. aeruginosa* ลดลงมากกว่า 3 log₁₀ ภายในเวลาเพียง 15 นาที และเมื่อทดสอบผลของการติดต่อยาปฏิชีวนะโดยนำเชื้อแบคทีเรียไปเพาะเลี้ยงร่วมกับยาปฏิชีวนะหรือเปปไทด์ที่ความเข้มข้น 0.5 เท่าของความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (0.5 minimal inhibitory concentration; MIC) แล้วเพาะเลี้ยงต่อไปจำนวนมากกว่า 10 ครั้ง พบว่าค่าของความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้หรือ MIC มีค่าสูงขึ้นมากกว่า 10 เท่าในการเพาะเลี้ยงร่วมกับยาปฏิชีวนะ ในขณะที่ผลไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อทดสอบกับเปปไทด์ protegrin-1⁷⁰ จากผลการวิจัยดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเปปไทด์ด้านจุลชีพยังคงสามารถใช้ในการรักษาได้ในระยะยาวโดยไม่ทำให้เกิดการดื้อยาในเชื้อจุลชีพ นอกจากนี้ Qu และคณะ (1997) ได้ทำการเปรียบเทียบเปปไทด์สังเคราะห์หลายชนิดที่มีกรดอะมิโนคล้ายกับเปปไทด์ protegrin-1 แต่เปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในบางตำแหน่งรวมถึงตัดบางส่วนของกรดอะมิโนทั้งปลายด้าน N-terminus และด้าน C-terminus กับ protegrin-1 เดิม พบว่าฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียมีความหลากหลายอย่างไรก็ตามเปปไทด์ที่สั้นที่สุดที่ยังคงสามารถยับยั้งเชื้อจุลชีพได้ไม่แตกต่างจาก protegrin-1 เดิมคือ เปปไทด์ขนาด 12 กรดอะมิโน (LTYCRRRFCVTV) ซึ่งเกิดจากการตัดกรดอะมิโนด้าน N-terminus 4 ตัวแรกและด้าน C-terminus 2 ลำดับสุดท้ายออกไป และปรับให้มีการสร้างพันธะไดซัลไฟด์เพียงพันธะเดียวระหว่างกรดอะมิโนซิสเตอีนตำแหน่งที่ 8 และ 13 นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้ยังพบว่าการการขาดหายไปของกรดอะมิโนซิสเตอีนตำแหน่งที่ 8 และ 13 แต่ยังคงมีกรดอะมิโนซิสเตอีนตำแหน่งที่ 6 และ 15 ส่งผลให้การสร้างพันธะไดซัลไฟด์ไม่คงตัวและไม่มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย⁷¹ ผลดังกล่าวสรุปได้ว่ากรดอะมิโนช่วงกลางของเปปไทด์ protegrin-1 มีส่วนเกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพในการยับยั้งหรือฆ่าเชื้อจุลชีพและพันธะไดซัลไฟด์ซึ่งเกิดจากกรดอะมิโนซิสเตอีน ตำแหน่งที่ 8 และ 13 มีความสำคัญในการ

คงรูปร่างและเกี่ยวข้องกับกรอกฤทธิ์ของเปปไทด์

5. Magainins

เปปไทด์ magainins แยกได้จากเซลล์ผิวหนังและลำไส้ของกบแอฟริกัน (African clawed frog หรือ *Xenopus laevis*) มีกรดอะมิโน 21-26 ตัว แต่มักพบใน 2 รูปแบบ (active forms) คือ magainin-1 และ -2 ซึ่งทั้งสองชนิดนี้มีกรดอะมิโนจำนวน 23 ตัวเท่ากัน แต่มีความแตกต่างของกรดอะมิโนภายในสายเปปไทด์เพียง 2 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่ 10 และ 22 magainin-1 เป็นกรดอะมิโนไกลซีนและไลซีน แต่ magainin-2 เป็นกรดอะมิโนไลซีนและแอสปาราจินตามลำดับ มีโครงสร้างทุติยภูมิเป็น alpha-helix และมีเส้นผ่าศูนย์กลางของ helix ประมาณ 10-12 อังสตรอม⁷² จากการศึกษาเปปไทด์ magainins ทั้งสองชนิดในรูปที่แยกได้จากธรรมชาติและรูปร่างที่สังเคราะห์ขึ้นพบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลชีพเป็นแบบกว้างผ่านกลไกของการทำให้เกิดรูที่เซลล์เมมเบรนตามแบบจำลอง toroid⁷³ โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งกลุ่มแกรมบวกและแกรมลบ เช่น *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes*, *E. faecalis*, Family Enterobacteriaceae เช่น *E. coli*, *E. cloacae*, *C. freundii*, *K. pneumoniae*, *S. Typhimurium*, *S. flexneri*, *A. calcoaceticus*, *H. pylori*, *B. cepacia* รวมถึงเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม anaerobe เช่น *Bacteroides fragilis*, *Clostridium difficile*, *Peptostreptococcus* spp., *Propionibacterium* spp. เป็นต้น^{74, 75} จากการศึกษาโดย Darveau และคณะ (1991) ถึงผลการรักษาโรคติดเชื้อซึ่งเกิดจากแบคทีเรีย *E. coli* ในหนูทดลองที่ทำให้เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลต่ำ (neutropenic mice) โดยการกระตุ้นด้วย cyclophosphamide พบว่าเปปไทด์ magainin-2 ให้ผลของการฆ่าเชื้อแบคทีเรียเสริมฤทธิ์กับยา cefepime เมื่อทดสอบร่วมกัน ในขณะที่ให้ผลในการฆ่าเชื้อได้เพียงเล็กน้อยเมื่อใช้ยาปฏิชีวนะเพียงอย่างเดียวหรือไม่สามารถฆ่าเชื้อได้เมื่อทดสอบกับเปปไทด์หรือสาร phosphate buffer saline เพียงอย่างเดียว ซึ่งผลการศึกษาสอดคล้องกับการใช้เปปไทด์ร่วมกับยาปฏิชีวนะ cefaloridine ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่ม cephalosporins หรือ imipenem ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่ม carbapenems และทั้งสองมีกลไกการออกฤทธิ์ผ่านทางกรยับยั้งการสร้างสาร peptidoglycan ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย อย่างไรก็ตามไม่พบการออกฤทธิ์เสริมกันเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งใช้เปปไทด์ magainin-2 ร่วมกับยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ผ่านกลไกอื่น ๆ เช่น เปปไทด์ร่วมกับยาปฏิชีวนะ ciprofloxacin ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะกลุ่ม fluoroquinolone และออกฤทธิ์ผ่านกลไกการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

DNA gyrase ซึ่งจำเป็นต่อการกระบวนการแบ่งเซลล์ หรือเปปไทด์ร่วมกับยาปฏิชีวนะ amikacin ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะกลุ่ม aminoglycoside และออกฤทธิ์ผ่านกลไกการยับยั้งการทำงานของไลโปโซมซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนของจุลชีพ จากผลดังกล่าวกลุ่มผู้วิจัยตั้งสมมติฐานว่ายาปฏิชีวนะอาจมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของผนังเซลล์แล้วทำให้เปปไทด์มีประสิทธิภาพในการแทรกตัวผ่านผนังเซลล์ได้มากขึ้น นำไปสู่การทำลายเชื้อจุลชีพในที่สุด และกระบวนการกำจัดเชื้อจุลชีพในสิ่งมีชีวิตนั้นจำเป็นต้องอาศัยเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันอย่างเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลร่วมด้วย⁷⁶ นอกจากนี้เมื่อทดสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อของเปปไทด์ใน biological fluids เช่น ซีรัม โดยกำจัดคอมพลีเมนต์ C8 ออกไปจากซีรัมพบว่าประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อของเปปไทด์ลดลงอย่างมาก แสดงให้เห็นว่ากลไกการฆ่าเชื้อของเปปไทด์ต้องอาศัยคอมพลีเมนต์ช่วยในปฏิกิริยา⁷⁷ Fox และคณะ (2012) ได้สังเคราะห์เปปไทด์ลูกผสม (hybrid peptides) โดยนำบางส่วนของเปปไทด์ที่เกี่ยวข้องกับการออกฤทธิ์ของ LL-37 (ลำดับกรดอะมิโนที่ 17-29) มารวมกับบางส่วนของเปปไทด์ magainin-2 (ลำดับกรดอะมิโนที่ 1-12) หรือนำบางส่วนที่จำเป็นต่อการออกฤทธิ์ของเปปไทด์ cecropin A ซึ่งเป็นเปปไทด์ต้านเชื้อจุลชีพที่แยกได้จากแมลง silk moths (ลำดับกรดอะมิโนที่ 1-8) มารวมกับเปปไทด์ magainin-2 (ลำดับกรดอะมิโนที่ 1-12) แล้วนำไปทดสอบกับเชื้อก่อโรครุนแรงทั้ง 4 ชนิด คือ *B. anthracis* ทั้งตัวเชื้อและสปอร์ของเชื้อ, *B. cepacia*, *Francisella tularensis* และ *Yersinia pseudotuberculosis* พบว่าเปปไทด์ลูกผสมมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีกว่าการใช้เปปไทด์ชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงอย่างเดียว อย่างไรก็ตามเมื่อนำเปปไทด์ลูกผสมทั้งสองชนิดไปทดสอบกับเม็ดเลือดแดงของมนุษย์พบว่าทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกที่ความเข้มข้นต่ำกว่าการทดสอบโดยใช้เปปไทด์ชนิดใดชนิดหนึ่ง (wildtype peptide) ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเปปไทด์อาจทำให้ประสิทธิภาพในการเลือกจับลดลง⁷⁸ นอกจากการยับยั้งเชื้อจุลชีพแล้ว ปัจจุบันยังพบว่าเปปไทด์ magainin-2 มีฤทธิ์ในการฆ่าหรือยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งผิวหนัง (melanoma) มะเร็งเต้านม มะเร็งปอด มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด lymphomas และ leukemia และมะเร็งในถุงน้ำดี (bladder tumor cells) เป็นต้น^{79, 80} และจากการศึกษาของ Edelstein และคณะ (1991) แสดงให้เห็นว่าเปปไทด์ magainins มีฤทธิ์ในการฆ่าสเปิร์ม (spermicide) ด้วย โดยเปปไทด์มีผลทำให้สเปิร์มเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและการทำงานเสียไปจึงทำให้เกิด

แนวคิดที่จะนำเปปไทด์ magainins มาผลิตเป็นยาคุมกำเนิดอีกด้วย⁸¹

การประยุกต์ใช้ของเปปไทด์ต้านจุลชีพ

ปัจจุบันมีการค้นพบเปปไทด์ต้านเชื้อจุลชีพจำนวนมากในสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิด และจากการศึกษาวิจัยอย่างต่อเนื่องเกี่ยวกับโครงสร้างของเปปไทด์ ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลชีพ ความคงตัว และความปลอดภัยเมื่อทดสอบกับเซลล์มนุษย์ ทำให้เปปไทด์หลายชนิดถูกเลือกเพื่อพัฒนาจนนำไปสู่การทดสอบในระดับ clinical trials ระยะต่าง ๆ เช่น Pexiganan ซึ่งเป็นชื่อทางการค้าของเปปไทด์ต้านเชื้อจุลชีพชนิดแรกที่มีการพัฒนาขึ้นในปี 1987 โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้ในการรักษาโรคแผลติดเชื้อที่เท้า (foot ulcers) องค์ประกอบหลักของกรดอะมิโนใน Pexiganan คล้ายกับ magainin-2⁸², Iseganan เป็นชื่อทางการค้าของเปปไทด์สังเคราะห์ protegrin-1 ถูกพัฒนาขึ้นในรูปแบบสเปรย์ชนิดฉีดพ่น (aerosolized Iseganan) เพื่อใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจหรือผู้ป่วยโรค cystic fibrosis ที่ติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจและโรคติดเชื้อในช่องปาก (oral mucositis)⁸³ P113 เป็นน้ำยาบ้วนปากซึ่งมีกรดอะมิโนในส่วนที่เกี่ยวข้องกับการออกฤทธิ์ของเปปไทด์ histatins จำนวน 12 ลำดับถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการรักษาโรคเชื้อราในช่องปาก (oral candidiasis) ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัส HIV-1⁸⁴ และ Omiganan ซึ่งเป็นชื่อทางการค้าของเปปไทด์ indolicidin โดยแยกได้ครั้งแรกจากเซลล์เม็ดเลือดขาวของวัว และพบว่ามีความสัมพันธ์ในการฆ่าเชื้อจุลชีพแบบกว้างรวมถึงเชื้อโปรโตซัวและเชื้อไวรัส HIV-1 เปปไทด์ดังกล่าวอยู่ในระหว่างการจดสิทธิบัตรเพื่อใช้เป็นสารเคลือบสายสวนเพื่อลดการติดเชื้อในผู้ป่วยต่อไป⁸⁵ ตัวอย่างของเปปไทด์ต้านจุลชีพซึ่งอยู่ระหว่างการทดสอบในระดับ clinical trial ดังแสดงในตารางที่ 3

บทสรุป

งานวิจัยในปัจจุบันของเปปไทด์ต้านจุลชีพนั้นมีความหลากหลาย โดยส่วนใหญ่มุ่งเน้นไปในด้านการค้นหาเปปไทด์ชนิดใหม่จากสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ การหาตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องกับการออกฤทธิ์ของเปปไทด์ที่ค้นพบแล้ว การทดสอบฤทธิ์ของเปปไทด์นอกเหนือจากเชื้อราและแบคทีเรีย เช่น การทดสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อปรสิต เชื้อไวรัส รวมถึงประสิทธิภาพในการฆ่าเซลล์มะเร็ง และการตรวจวัดปริมาณและคุณภาพของเปปไทด์ต้านจุลชีพในผู้ที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อเปรียบเทียบกับคนปกติ เพื่อหาความสัมพันธ์ของโรค อย่างไรก็ตามเนื่องจากการ

Table 3 Current status for clinical development of antimicrobial peptides⁸³

Antimicrobial peptide	Therapeutic uses	Clinical trial	Inventor
Pexiganan (A synthetic 22-amino acid analogue of magainin-2)	Diabetic foot ulcers	Phase III	Genaera, USA
Isegranin (A synthetic protegrin-1)	Oral mucositis and respiratory infection	Phase III	Intrabiotic Pharmaceuticals, USA
Omiganan (A synthetic analogue of indolicidin)	Venous catheter-related bloodstream infections	Phase III	Microbiologix Biotech, Canada
MBI 594 AN (A Indolicidin-like peptide)	Acne associated with <i>Propionibacterium acne</i>	Phase IIb	Microbiologix Biotech, Canada
P113 (A12-amino acid based on histatins)	Oral candidiasis	Phase III	Demegen, USA
XMP.629 (A 9-amino acid of bactericidal/permeability-increasing protein; BPI)	Acne associated with <i>P. acne</i>	Phase I	Xoma, USA

สังเคราะห์เปปไทด์เพื่อให้ได้ปริมาณมากนั้นยังมีราคาสูง หลายกลุ่มวิจัยจึงได้เลือกให้มีการสร้างและแสดงออกของเปปไทด์ในแบคทีเรียหรือยีสต์เพื่อให้ได้เปปไทด์ที่มีปริมาณมาก และมีราคาถูก นอกจากนี้จากการศึกษาขององค์ประกอบของกรดอะมิโนและโครงสร้างทุติยภูมิของเปปไทด์ด้านจุลชีพหลายชนิดในปัจจุบันทำให้ทราบตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องในการออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อ ซึ่งผลการวิจัยดังกล่าวนำไปสู่การสังเคราะห์เปปไทด์ลูกผสมชนิดใหม่โดยนำส่วนของกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการออกฤทธิ์ของเปปไทด์หลายชนิดมาเชื่อมต่อกัน โดยมุ่งหวังให้มีการออกฤทธิ์สนับสนุนกัน (synergistic activity) และสามารถฆ่าเชื้อได้กว้างกว่าการใช้เปปไทด์เพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง

จากข้อมูลดังกล่าวมารวมถึงรายละเอียดในเปปไทด์ด้านจุลชีพแต่ละชนิดแสดงให้เห็นว่าเปปไทด์เหล่านี้มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อจุลชีพที่ดีและยังสามารถฆ่าเชื้อได้แม้เป็นเชื้อจุลชีพที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ เปปไทด์หลายชนิดยังมีความเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันและช่วยทำให้ระบบภูมิคุ้มกันทำงานได้ดีขึ้น ซึ่งข้อมูลเหล่านี้นำไปสู่การพัฒนาหรือการประยุกต์ใช้เพื่อการรักษาโรคติดเชื้อในผู้ป่วยโดยอาจใช้เปปไทด์โดยตรงหรือใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะหรือยาต้านไวรัสเพื่อให้มีประสิทธิภาพสูงสุดในการรักษาได้

ต่อไป อย่างไรก็ตามแม้เปปไทด์จะมีความเลือกจับที่ดี แต่หลายการวิจัยพบว่าหากใช้ในความเข้มข้นที่สูงเกินไปอาจส่งผลให้เกิดการจับอย่างไม่จำเพาะและมีผลต่อการทำลายเซลล์เจ้าบ้านได้เช่นเดียวกัน นอกจากนี้เปปไทด์บางชนิดแม้จะมีประสิทธิภาพดีมากในการฆ่าเชื้อจุลชีพแต่เปปไทด์เหล่านี้ได้จากสัตว์ซึ่งถือเป็นโปรตีนแปลกปลอมและอาจกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันวิทยาที่ไม่พึงประสงค์ตามมาได้เช่นกัน ดังนั้นหากจะนำไปพัฒนาเพื่อประยุกต์ใช้ในมนุษย์ จึงจำเป็นต้องหาปริมาณที่เหมาะสมและมีการทดสอบความปลอดภัยก่อนนำไปใช้เพื่อรักษาโรคต่อไป ปัจจุบันมีเชื้อก่อโรคหลายชนิดเกิดขึ้นใหม่ (emerging diseases; โรคอุบัติใหม่) หรือกลับมาทำให้เกิดโรคใหม่ (re-emerging diseases; โรคอุบัติซ้ำ) และเชื้อหลายชนิดมีการเปลี่ยนแปลงและปรับตัวตลอดเวลาเพื่อให้สามารถดำรงชีวิตต่อไป ซึ่งเชื่อดังกล่าวหลายชนิดเกิดการดื้อยา และหลายชนิดยังไม่มียารักษาให้หายขาดได้ เปปไทด์ด้านจุลชีพจึงน่าจะเป็นทางเลือกใหม่ในอนาคตซึ่งสามารถใช้รักษาหรือใช้ร่วมในการรักษาโรคติดเชื้อต่าง ๆ ตลอดจนเชื้อจุลชีพดื้อยา โรคติดเชื้อไวรัส ปรสิต รวมถึงโรคมะเร็งได้ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Mangoni ML. Host-defense peptides: from biology to therapeutic strategies. *Cell Mol Life Sci* 2011; 68: 2157-9.
2. Zaiou M. Multifunctional antimicrobial peptides: therapeutic targets in several human diseases. *J Mol Med* 2007; 85: 317-29.
3. Jenssen H, Hamill P, Hancock REW. Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19: 491-511.
4. Llobet E, Tomas J M, Bengoechea JA. Capsule polysaccharide is a bacterial decoy for antimicrobial peptides. *Microbiology* 2008; 154: 3877-86.
5. Oyston PCF, Fox MA, Richards SJ, Clark GC. Novel peptide therapeutics for treatment of infections. *J Med Microbiol* 2009; 58: 977-87.
6. Andreu D, Rivas L. Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers* 1998; 47: 415-33.
7. Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 2005; 3: 238-50.
8. Japeli B, Pristovsek P, Majerle A, Jerala R. Structural origin of endotoxin neutralization and antimicrobial activity of a lactoferrin-based peptide. *J Biol Chem* 2005; 280: 16955-61.
9. Rosenfeld Y, Sahl HG, Shai Y. Parameters involved in antimicrobial and endotoxin detoxification activities of antimicrobial peptides. *Biochemistry* 2008; 47: 6468-78.
10. Bhattachariya S. De novo designed lipopolysaccharide binding peptides: structure based development of antiendotoxic and antimicrobial drugs. *Curr Med Chem* 2010; 17: 3080-93.
11. Bowdish DME, Davidson DJ, Scott MG, Hancock REW. Immunomodulatory activities of small host defense peptides. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 1727-32.
12. Chen DYQ, Schmidt AP, Anderson GM, et al. LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophil, monocytes, and T cells. *J Exp Med* 2000; 192: 1069-74.
13. Niyonsaba F, Iwabuchi K, Someya A, et al. A cathelicidin family of human antibacterial peptide LL-37 induces mast cell chemotaxis. *Immunology* 2002; 106: 20-6.
14. Koczulla R, von Degenfeld G, Kupatt C, et al. An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. *J Clin Invest* 2003; 111: 1665-72.
15. Nishikawa T, Nakagami H, Maeda A, et al. Development of a novel antimicrobial peptide, AG-30, with angiogenic properties. *J Cell Mol Med* 2009; 13: 535-46.
16. Frantz S, Vincent KA, Feron O, Kelly RA. Innate immunity and angiogenesis. *Circ Res* 2005; 96: 15-26.
17. Sorensen OE, Cowland JB, Theilgaard-Monch K, Liu L, Ganz T, Borregaard N. Wound healing and expression of antimicrobial peptides/polypeptides in human keratinocytes, a consequence of common growth factors. *J Immunol* 2003; 70: 5583-9.
18. Radek KA, Gallo RL. Amplifying healing: The role of antimicrobial peptides in wound repair. *Inflammation* 2010; 1: 223-9.
19. Zanetti M. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. *J Leuk Biol* 2004; 75: 39-48.

20. Hancock RE, Diamond G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol* 2000; 8: 402-10.
21. Cowland JB, Johnsen AH, Borregaard N. hCAP-18, a cathelin/pro-bactenecin-like protein of human neutrophil specific granules. *FEBS Lett* 1995; 368: 173-6.
22. Gudmundsson GH, Agerberth B, Odeberg J, Bergman T, Olsson B, Salcedo R. The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes. *Eur J Biochem* 1996; 238: 325-32.
23. Dorschner RA, Pestonjamas VK, Tamakuwala S, et al. Cutaneous injury induces the release of cathelicidin anti-microbial peptides active against group A Streptococcus. *J Invest Dermatol* 2001; 117: 91-7.
24. Turner J, Cho Y, Dinh NN, Waring AJ, Lehrer RI. Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 2206-14.
25. Hell E, Giske CG, Nelson A, Romling U, Marchini G. Human cathelicidin peptide LL-37 inhibits both attachment capability and biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Lett Appl Microbiol* 2010; 50: 211-5.
26. Dean SN, Bishop BM, van Hoek ML. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm to alpha-helical peptides: D-enantiomer of LL-37. *Front Microbiol* 2011; 2: 128.
27. Kanthawong S, Bolscher JG, Veerman EC, et al. Antimicrobial activities of LL-37 and its truncated variants against *Burkholderia thailandensis*. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 36: 447-52.
28. Nizet V, Ohtake T, Lauth X, et al. Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature* 2001; 414: 454-7.
29. Schaller-Bals S, Schulze A, Bals R. Increased levels of antimicrobial peptides in tracheal aspirates of newborn infants during infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 992-5.
30. Ong PY, Ohtake T, Brandt C, et al. Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N Engl J Med* 2002; 347: 1151-60.
31. Ramos R, Silva JP, Rodrigues AC, et al. Wound healing activity of the human antimicrobial peptide LL-37. *Peptides* 2011; 32: 1469-76.
32. Crovella S, Antcheva N, Zelezetsky I, et al. Primate beta-defensins: structure, function and evolution. *Curr Protein Pept Sci* 2005; 6: 7-21.
33. Shi J. Defensins and paneth cells in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 10: 1284-92.
34. Yamaguchi Y, Nagase T, Makita R, et al. Identification of multiple novel epididymis-specific beta-defensin isoforms in humans and mice. *J Immunol* 2002; 169: 2516-23.
35. Pazgier M, Hoover DM, Yang D, Lu W, Lubkowski J. Human beta-defensins. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63: 1294-313.
36. Lehrer RI. Primate defensins. *Nat Rev Microbiol* 2004; 9: 727-38.
37. Yanagi S, Ashitani J, Ishimoto H, et al. Isolation of human beta-defensin-4 in lung tissue and its increase in lower respiratory tract infection. *Respir Res* 2005; 6: 130.

38. Routsias JG, Karagounis P, Parvulesku G, Legakis NJ, Tsakris A. In vitro bactericidal activity of human beta-defensin 2 against nosocomial strains. *Peptides* 2010; 31: 1654-60.
39. Fritz P, Beck-Jendroschek V, Brasch J. Inhibition of dermatophytes by the antimicrobial peptides human beta-defensin-2, ribonuclease 7 and psoriasin. *Med Mycol* doi:10.3109/13693786.2012.660203.
40. Vylkova S, Nayyar N, Li W, Edgerton M. Human beta-defensins kill *Candida albicans* in an energy-dependent and salt-sensitive manner without causing membrane disruption. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 154-61.
41. Maisetta G, Batoni G, Esin S, et al. In vitro bactericidal activity of human beta-defensin 3 against multidrug-resistant nosocomial strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 806-9.
42. Bajaj-Elliott M, Fedeli P, Smith G, Domizio P, Maher L, Ali R. Modulation of host antimicrobial peptide (defensins1 and 2) expression during gastritis. *Gut* 2002; 51: 356-61.
43. Crack LR, Jones L, Malavige GN, Patel V, Ogg GS. Human antimicrobial peptides LL-37 and human beta-defensin-2 reduce viral replication in keratinocytes infected with *Varicella zoster* virus. *Clin Exp Dermatol* 2012 doi: 10.1111/j.1365-2230.2012.04305.x.
44. Jansen PAM, Rodijk-Olthuis D, Hollox EJ, et al. B-Defensin-2 protein is a serum biomarker for disease activity in psoriasis and reaches biologically relevant concentrations in lesional skin. *Plos One* 2009; 4: 1-9.
45. Dagostino C, Lichtner M, Mastroianni CM, et al. In vivo release of alpha-defensins in plasma, neutrophils and CD8-lymphocytes of patients with HIV infection. *Curr HIV Res* 2009; 7: 650-5.
46. Bevins CL, Salzman NH. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat Rev Microbiol* 2011; 9: 346-68.
47. Porter EM, van Dam E, Valore EV, Ganz T. Broad-spectrum antimicrobial activity of human intestinal defensin 5. *Infect Immun* 1997; 65: 2396-401.
48. Salzman NH, Ghosh D, Huttner KM, Paterson Y, Bevins CL. Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin. *Nature* 2003; 422: 522-6.
49. Chu H, Pazgier M, Jung G, et al. Human alpha-defensin 6 promotes mucosal innate immunity through self-assembled peptide nanonets. *Science*; 337: 477-81.
50. Lee S, Bake D. Antibacterial and neutralizing effect of human beta-defensins on *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecalis* lipoteichoic acid. *Biology* 2011. doi:10.1016/j.jioen.2011.12.026
51. Murphy CJ, Foster BA, Mannis MJ, Selsted ME, Reid TW. Defensins are mitogenic for epithelial cells and fibroblasts. *J Cell Physiol* 1993; 155: 408-13.
52. Nishimura M, Abiko Y, Kurashige Y, et al. Effect of defensin peptides on eukaryotic cells: primary epithelial cells, fibroblasts and squamous cell carcinoma cell lines. *J Dermatol Sci* 2004; 36: 87-95.
53. MacKay BJ, Pollock JJ, Iacono VJ, Baum BJ. Isolation of milligram quantities of a group of histidine-rich polypeptides from human parotid saliva. *Infect Immun* 1984; 44: 688-94.
54. Sabatini LM, Azen EA. Histatins, a family of salivary histidine-rich proteins, are encoded by at least two loci (HIS1 and HIS2). *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 160: 495-502.

55. Pollock JJ, Denepitiya L, MacKay BJ, Iacono VJ. Fungistatic and fungicidal activity of human parotid salivary histidine-rich polypeptides on *Candida albicans*. *Infect Immun* 1984; 44: 702-7.
56. Helmerhorst EJ, Breeuwer P, van't Hof W, et al. The cellular target of histatin 5 on *Candida albicans* is the energized mitochondrion. *J Biol Chem* 1999; 274: 7286-91.
57. Koshlukova SE, Araujo MW, Baev D, Edgerton M. Released ATP is an extracellular cytotoxic mediator in salivary histatin 5-induced killing of *Candida albicans*. *Infect Immun* 2000; 68: 6848-56.
58. Tsai H, Bobek L. Studies of the mechanism of human salivary histatin-5 candidacidal activity with histatin-5 variants and azole-sensitive and -resistant *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 2224-8.
59. Situ H, Bobek LA. In vitro assessment of antifungal therapeutic potential of salivary histatin-5, two variants of histatin-5, and salivary mucin (MUC7) domain 1. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1485-93.
60. Komatsu T, Salih E, Helmerhorst EJ, Offner GD, Oppenheim FG. Influence of histatin 5 on *Candida albicans* mitochondrial protein expression assessed by quantitative mass spectrometry. *J Proteome Res* 2011; 10: 646-55.
61. Gyurko C, Lendenmann U, Helmerhorst EJ, Troxler RF, Oppenheim FG. Killing of *Candida albicans* by histatin 5: cellular uptake and energy requirement. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2001; 79: 297-309.
62. Torres SR, Garzino-Demo A, Meiller TF, Meeks V, Jabra-Rizk MA. Salivary histatin-5 and oral fungal colonisation in HIV+ individuals. *Mycoses* 2008; 52: 11-5.
63. Aumelas A, Mangoni M, Roumestand C, et al. Synthesis and solution structure of the antimicrobial peptide protegrin-1. *Eur J Biochem* 1996; 237: 575-83.
64. Mani R, Cady SD, Tang M, Waring AJ, Lehrer RI, Hong M. Membrane-dependent oligomeric structure and pore formation of a beta-hairpin antimicrobial peptide in lipid bilayers from solid-state NMR. *Proc Natl Acad Sci* 2006; 103: 16242-7.
65. Bolintineanu D, Hazrati E, Ted Davis H, Lehrer RI, Kaznessis YN. Antimicrobial mechanism of pore-forming protegrin peptides: 100 pores to kill *E. coli*. *Peptides* 2010; 31: 1-8.
66. Steinberg BA, Hurst MA, Fujii CA, et al. Protegrin-1: a broad-spectrum, rapidly microbial peptide with in vivo activity. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 1738-42.
67. Peschel A. How do bacteria resist human antimicrobial peptides. *Trends Microbiol* 2002; 10: 179-86.
68. Resnick NM, Maloy WL, Guy HR, Zasloff M. A novel endopeptidase from *Xenopus* that recognizes alpha-helical secondary structure. *Cell* 1991; 66: 541-54.
69. Shafer WM, Qu X, Waring AJ, Lehrer RI. Modulation of *Neisseria gonorrhoeae* susceptibility to vertebrate antibacterial peptides due to a member of the resistance/nodulation/division efflux pump family. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 1829-33.
70. Kokryakov VN, Harwig SSL, Panyutich EA, et al. Protegrins: leukocyte antimicrobial peptides that combine features of corticostatic defensins and tachyplesins. *FEBS Lett* 1993; 327: 231-6.
71. Qu XD, Harwig SSL, Shafer WM, Lehrer R. Protegrin structure and activity against *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun* 1997; 65: 636-9.

72. Zasloff M. Magainin, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: Isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc Natl Acad Sci* 1987; 87: 5449-53.
73. Bechinger B. Structure and function of channel-forming peptides: Magainins, cecropins, melittin and alamethicin. *J Membrane Biol* 1997; 156: 197-211.
74. Zasloff M, Martin B, Chen HC. Antimicrobial activity of synthetic magainin peptides and several analogues. *Proc Natl Acad Sci* 1988; 85: 910-3.
75. Oh H, Hedberg M, Wade D, Edlund C. Activities of synthetic hybrid peptides against anaerobic bacteria: Aspects of methodology and stability. *Antimicrob agents Chemother* 2000; 44: 68-72.
76. Darveau RP, Cunningham MD, Seachord CL, et al. Beta-lactam antibiotics potentiate magainin 2 antimicrobial activity in vitro and in vivo. *Antimicrob agents Chemother* 1991; 35: 1153.
77. Vaara M, Vaara T. Sensitization of gram-negative bacteria to antibiotics and complement by a nontoxic oligopeptide. *Nature* 1983; 303: 526-8.
78. Fox MA, Thwaite JE, Ulaeto DO, Atkins TP, Atkins HS. Design and characterization of novel hybrid antimicrobial peptides based on cecropin A, LL-37 and magainin II. *Peptides* 2012; 33: 197-205.
79. Baker MA, Maloy WL, Zasloff M, Jacob LS. Anticancer efficacy of magainin 2 and analogue peptides. *Cancer Res* 1993; 53: 3052-7.
80. Lehmann J, Retz M, Sidhu SS, et al. Antitumor activity of the antimicrobial peptide magainin I against bladder cancer cell lines. *Eur Urol* 2006; 50: 141-7.
81. Edelstein MC, Gretz JE, Bauer TJ, Fulqham DL, Alexander NJ, Archer DF. Studies on the in vitro spermicidal activity of synthetic magainins. *Fertil Steril* 1991; 55: 647-9.
82. Ge Y, Macdonald DL, Holroyd KJ, Thornsberry C, Wexler H, Zasloff M. In vitro antimicrobial properties of Pexiganan, an analog of magainin. *Antimicrob agents Chemother* 1999; 43: 782-8.
83. Gordon YJ, Romanowski EG. A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs. *Curr Eye Res* 2005; 30: 505-15.
84. Kavanagh K, Dowd S. Histatins: Antimicrobial peptides with therapeutic potential. *J Pharm Pharmacol* 2004; 56: 285-9.
85. Giuliani A, Pirri G, Nicoletto SF. Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Cent Eur J Biol* 2007; 2, 1-33.