ผลของสารสกัดเส้นใยเชื้อรา *Polycephalomyces nipponicus* ต่อการเปลี่ยนแปลงรูปแบบโปรตีนของเชื้อ methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*

วินิตา เฝ้าสันเทียะ[1] กุสาวดี แสงดี[1] อภิเดช แสงดี[2]
[1]คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
[2]คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

Received: September 24, 2021
Revised: November 29, 2022
Accepted: January 19, 2022

บทคัดย่อ

Polycephalomyces nipponicus เป็นเชื้อราก่อโรคในแมลงซึ่งมีสรรพคุณด้านยาและมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่นิยมนำมาใช้ในการบำรุงรักษาสุขภาพและใช้เป็นยาทางการแพทย์ รวมถึงมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อมาลาเรีย และยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค โดยจากการศึกษา พบว่าสารสกัดเส้นใยเชื้อรา *P. nipponicus* มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทั้งแบคทีเรียแกรมลบ และแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิด รวมทั้งเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาเมทิซิลิน (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) แต่กลไกในการออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคยังไม่ทราบแน่ชัด เพื่อศึกษาถึงวิถีเมแทบอลิสมหรือโปรตีนของแบคทีเรีย MRSA ที่เป็นเป้าหมายของเชื้อรา *P. nipponicus* แบคทีเรีย MRSA สายพันธุ์ DMST 20651 และ DMST 20654 ถูกเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดเส้นใยเชื้อรา *P. nipponicus* Cod-MK1201 ที่ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร หรือ 0.5 เท่าของค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ยับยั้งการเจริญเป็นเวลา 18 ชั่วโมง โปรตีนจากเซลล์ของแบคทีเรียจะถูกนำออกจากเซลล์โดยการ sonication จากนั้นนำมาวิเคราะห์แยกบนเจลด้วยกระแสไฟฟ้าแบบสองมิติ รูปแบบของโปรตีนที่ได้จากแบคทีเรียทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัด ถูกนำมาเปรียบเทียบการแสดงออกโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ ImageMaster 2D platinum จากนั้นเลือกจุดโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกมาเพื่อวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยวิธี Liquid chromatography-tandem mass spectrometry โดยพบว่า จุดโปรตีนจำนวน 22 จุดที่มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกแตกต่างจากกลุ่มควบคุม (เพิ่มขึ้นหรือลดลงมากกว่า 1.5 เท่า) ถูกนำมาวิเคราะห์ชนิดของโปรตีน โดยในแบคทีเรีย MRSA ทั้งสองสายพันธุ์ พบการแสดงออกลดลงของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิสมของคาร์โบไฮเดรต กระบวนการการสร้างพลังงานภายในเซลล์ และการลดลงของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแปลรหัส ในขณะที่โปรตีนที่ทำหน้าที่ในการตอบสนองต่อสภาวะเครียด (stress protein) มีการแสดงออกของโปรตีนที่เพิ่มขึ้น การศึกษาครั้งนี้ตั้งสมมติฐานได้ว่า สารสกัดเส้นใยเชื้อรา *P. nipponicus* ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย MRSA โดยการยับยั้งกระบวนการเมแทบอลิสม สร้างพลังงาน และการแปลรหัส

<u>คำสำคัญ:</u> สแตปฟิโลคอคคัส ออเรียสที่ดื้อยาเมทิซิลิน โพลีเซฟาโลมายซิส นิบโพนิคัส โปรติโอม

<u>ผู้นิพนธ์ประสานงาน:</u>
วินิตา เฝ้าสันเทียะ
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
79/99 ตำบลตลาด อำเภอเมืองมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม 44000
อีเมล: winita.f@msu.ac.th

Effects of *Polycephalomyces nipponicus* extract on protein profiles of methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*

Winita Fowsantear[1], Kusavadee Sangdee[1], Aphidech Sangdee[2]
[1]Faculty of Medicine, Mahasarakham University
[2]Faculty of Science, Mahasarakham University

Abstract

The entomopathogenic fungus *Polycephalomyces nipponicus* has been reported to have both antibacterial and antimalarial activities. Previous studies have shown that the crude mycelial extract is active against several Gram-negative and Gram-positive bacteria, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). However, the mechanism underlying this antibacterial activity has yet to be elucidated. This study sought to determine which bacterial metabolic pathways or proteins *P. nipponicus* might be targeting by examining the *in vitro* effects of crude mycelial extract on MRSA using a gel-based proteomic approach. The MRSA strains DMST 20651 and DMST 20654 were treated with a sub-inhibitory concentration of *P. nipponicus* Cod-MK1201 mycelium extract (1.5 mg/ml or 0.5 MIC) for 18 hours. The protein extracts were then obtained from the MRSA cells by sonication, and the proteins were separated by 2D polyacrylamide gels. After this, the protein expression profiles of untreated control and extract-treated cells were analyzed by Image Master 2D platinum software for any significant differences. Protein spots of interest were extracted from the gels and identified by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). A total of 22 protein spots that were significantly changed in protein expression with a greater than 1.5-fold increase or decrease relative to the control cells were identified. The analysis of the protein profiles showed a general decrease in the expression of proteins related to carbohydrate metabolism and energy production in both strain DMST 20651 and strain DMST 20654. The proteins related to translation were also present at lower levels in both strains, while the expression of stress response proteins was increased. It was postulated that *P. nipponicus* mycelial extract exerted its antibacterial effects by disrupting energy metabolism and/or translation.

Keywords: Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*, *Polycephalomyces nipponicus*, proteomes

Corresponding Author:
Winita Fowsantear
Faculty of Medicine, Mahasarakham University
79/99 Talat, Muang Mahasarakham District, Maha Sarakham 44000, Thailand.
E-mail: winita.f@msu.ac.th

บทนำ

การใช้ยาปฏิชีวนะอย่างแพร่หลายในปัจจุบันนำไปสู่การกระตุ้นให้เกิดการดื้อยาและการแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ซึ่งนับเป็นปัญหาที่สำคัญในทางการแพทย์ *Staphylococcus aureus* จัดเป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่เป็นสาเหตุการติดเชื้อทางผิวหนังเนื้อเยื่อ เช่น ฝี (abscesses, boils, furuncles) โรคเนื้อเยื่ออักเสบ (cellulites) โรคผิวหนังและรูขุมขนอักเสบ (folliculitis) โรคผิวหนังชนิดเป็นตุ่มพุพอง (impetigo) ฝีฝักบัว (carbuncles) และโรค scalded skin syndrome อีกทั้งตัวเชื้อยังสามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อที่รุนแรง เช่น การติดเชื้อในกระแสเลือด (bacteremia) โรคปอดบวม (pneumonia) เยื่อบุหัวใจอักเสบเฉียบพลัน (acute endocarditis) และเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (meningitis) ตลอดจนโรคแทรกซ้อนอื่นๆ โดยมักจะแทรกซ้อนในผู้ป่วยที่ติดเชื้อทำให้มีอาการรุนแรงขึ้น[1] โดยทั่วไป *S. aureus* มักตรวจพบได้จากการติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infections) แต่มีรายงานว่าสามารถตรวจพบได้ในชุมชนทั่วไป และจากงานวิจัยต่างๆ ตลอดจนรายงานทางการแพทย์พบว่าเชื้อ *S. aureus* มีการดื้อยาเพิ่มมากขึ้น และมีการวิวัฒนาการสายพันธุ์ทำให้มีคุณสมบัติในการต้านยาปฏิชีวนะได้หลายชนิด โดยชนิดที่สำคัญ ได้แก่ methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) โดยมีการตรวจพบเชื้อ MRSA ในหลายประเทศรวมทั้งประเทศไทยด้วย ซึ่งเชื้อ MRSA นี้ทำให้เกิดอาการติดเชื้อรุนแรง รักษาหายได้ยาก เนื่องจากเชื้อเกิดการดื้อยาและทำให้ผู้ป่วยมีอัตราเสี่ยงต่อการเสียชีวิตสูง ดังนั้น ในการรักษาอาจจะต้องใช้ยาที่มีประสิทธิภาพสูง เช่น fosfomycin หรือ vancomycin ซึ่งอาจมีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วย นอกจากนี้ ยังพบว่าการนำยา vancomycin มาใช้ในการรักษาการติดเชื้อ MRSA กลับทำให้เชื้อแบคทีเรียมีการกลายพันธุ์จาก MRSA เป็นสายพันธุ์ใหม่ คือ vancomycin intermediate *S. aureus* (VISA) และ vancomycin resistant *S. aureus* (VRSA) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ดื้อยา vancomycin และก่อให้เกิดปัญหาเชื้อดื้อต่อยาปฏิชีวนะเพิ่มขึ้น[2,3] จากสาเหตุที่กล่าวมาข้างต้นทำให้กลุ่มนักวิจัยในหลายประเทศทั่วโลก เริ่มสนใจค้นคว้ายาใหม่ๆ เพื่อนำมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียกลุ่มนี้ โดยมุ่งเน้นไปที่ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ ทั้งสารสกัดจากพืชสมุนไพร เห็ด หรือแม้กระทั่งจากจุลินทรีย์ ทั้งในกลุ่มแบคทีเรีย และเชื้อรา

Cordyceps เป็นเชื้อราในวงศ์ *Clavicitaceae* ที่พบได้ทั่วโลกประมาณ 400 สายพันธุ์ เชื้อรานี้ก่อให้เกิดโรคในแมลงหลายชนิด เช่น ผึ้ง ต่อ แตน แมงมุม เพลี้ย สปอร์ของเชื้อ *Cordyceps* จะสร้างสารที่ทำปฏิกิริยากับไขมันบนผิวลำตัวของแมลงเจ้าบ้าน ซึ่งจะกระตุ้นให้เกิดการงอกของสปอร์ หลังจากนั้นเชื้อราจะเริ่มสร้างเส้นใย (mycelium) และผลิตไคติเนสเพื่อสลายไคตินที่ผิวของแมลง เพื่อให้เส้นใยของเชื้อราเจริญผ่านกระจายทั่วร่างของแมลงและใช้แมลงนั้นเป็นแหล่งอาหารในการเจริญ ในระหว่างการเจริญดำรงชีวิต เชื้อราจะผลิตทั้งสารปฐมภูมิ (primary metabolites) และสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) โดยสารทุติยภูมิที่เชื้อรา *Cordyceps* spp. ผลิตออกมาบางชนิดมีคุณสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compound) เช่น cordycepin, ergosterol polysaccharides, mannitol และ adenosine[4,5] และมีการรายงานถึงฤทธิ์ของสารจากเชื้อรา *Cordyceps* ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเชื้อราสาเหตุโรคพืชบางชนิดได้[6,7,8] ข้อมูลดังกล่าวข้างต้นจะเห็นได้ว่าเชื้อราก่อโรคแมลงกลุ่ม *Cordyceps* spp. เป็นจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหรือสารปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายชนิด

Polycephalomyces nipponicus หรือ *Cordyceps nipponica* (ชื่อเดิม) เป็นเชื้อราก่อโรคแมลงอีกตัวหนึ่งซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค จากการศึกษาพบว่าเชื้อราก่อโรคแมลง *P. nipponicus* สายพันธุ์ Cod-MK1201 ซึ่งแยกได้จากซากจักจั่นในจังหวัดมหาสารคาม มีฤทธิ์

ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทั้งแบคทีเรียแกรมลบ และแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิด รวมทั้งเชื้อ *S. aureus* ทั้งสายพันธุ์ที่ไวและดื้อต่อยาเมทิซิลิน[9] แต่หากว่าข้อมูลในด้านของกลไกการออกฤทธิ์ หรือผลของสารสกัดจากเส้นใยเชื้อราที่มีต่อการเจริญของแบคทีเรียยังมีข้อมูลไม่มากนัก การศึกษาเพิ่มเติมถึงโปรตีนเป้าหมายที่สารสกัดเส้นใยเชื้อราเข้าไปมีผลโดยตรง และทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจะเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการนำสารสกัดเส้นใยเชื้อรานี้มาใช้ในด้านการรักษาโรคติดเชื้อจากเชื้อ *S. aureus* ในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของรูปแบบโปรตีนในแบคทีเรียก่อโรค MRSA DMST 20651 และ DMST 20654 ตอบสนองต่อสารสกัดจากเส้นใยเชื้อรา *P. nipponicus* Cod-MK1201 ด้วยวิธีการแยกโปรตีนบนเจลด้วยกระแสไฟฟ้าสองมิติ

2. เพื่อตรวจวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนของแบคทีเรียที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปแบบการแสดงออกเมื่อได้รับสารสกัดจากเส้นใยเชื้อรา เพื่อให้ทราบถึงโปรตีนเป้าหมายที่สารสกัดเส้นใยเชื้อราเข้าไปมีผลโดยตรง

วิธีการศึกษา

การเตรียมเส้นใย และการสกัดสารจากเส้นใยเชื้อรา

เชื้อรา *P. nipponicus* Cod-MK1201 เลี้ยงในอาหาร induced medium บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส 20 วัน จากนั้นกรองและทำให้แห้งก่อนนำไปบดละเอียด นำผงเส้นใยราที่ได้ผสมกับเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 50% นำไปทำให้เซลล์แตก ด้วยเครื่อง high intensity ultrasonic processor เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 4,100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำน้ำใสส่วนบนมากรองผ่านกระดาษกรองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตร เก็บสารละลายเส้นใยที่กรองแล้วไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

นำเชื้อแบคทีเรีย MRSA มาเพาะเลี้ยงในอาหาร Mueller-Hinton agar (MHA) เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นใช้ลูปเขี่ยเชื้อ 2-5 โคโลนีใส่ลงในอาหารเหลว MHB แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง และปรับความเข้มข้นของกล้าเชื้อ ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 หน่วย McFarland โดยการวัดด้วยเครื่องวัดความขุ่น

การประเมินความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ใช้ทดสอบ (Minimal inhibitory concentration, MIC) ด้วยวิธี Broth microdilution

เจือจางสารสกัดเส้นใยเชื้อราใน 96-well microtiter plate แบบ serial 2-fold dilution ในช่วงความเข้มข้น 3.125 - 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นเติมเชื้อทดสอบความเข้มข้นสุดท้ายประมาณ $1x10^4$ CFU/ml ปริมาณ 10 ไมโครลิตร ลงไปในหลุม microtiter plate แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง อ่านค่า MIC จากหลุมที่มีสารสกัดความเข้มข้นน้อยที่สุดที่สังเกตไม่เห็นการเจริญ ด้วยการดูจากความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวผสมเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวผสมยาเตตราไซคลิน (ความเข้มข้น 0.25-256 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และเชื้อทดสอบเป็นตัวควบคุมบวก ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง การหาค่า Minimum bactericidal concentration (MBC) ทำได้โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากหลุมที่ดูแล้วว่าไม่มีการเจริญของเชื้อทดสอบ มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง ตรวจผลดูการเจริญเติบโตของเชื้อ ค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดซึ่งสามารถทำลายเชื้อทดสอบให้ลดลง

ไม่น้อยกว่า 99.9% ถือว่าเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายเชื้อทดสอบ (MBC)

การทดสอบผลของสารสกัดต่อรูปแบบโปรตีนของเชื้อแบคทีเรีย

การสกัดและการเตรียมโปรตีนของเชื้อแบคทีเรีย เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 20 มิลลิลิตร ในจานอาหาร โดยแบ่งเป็นสองกลุ่มการทดลองคือ กลุ่มอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมสารสกัดเส้นใยเชื้อรา และกลุ่มอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารสกัดเส้นใยเชื้อราที่ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่มีอายุ 12 ชั่วโมง ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ความเข้มข้นของเชื้อ 10^4 CFU/ml จากนั้นนำจานอาหารทั้งหมดไปบ่มในตู้บ่ม อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง หลังจากนั้น ทำการเก็บเซลล์ทั้งสองกลุ่มโดยการปั่นเหวี่ยงที่ 10,000xg ที่ 4 องศาเซลเซียส 20 นาที ล้างตะกอนเซลล์ด้วย 0.85% NaCl และละลายตะกอนเซลล์ใน PBS เซลล์แบคทีเรียจะถูกทำให้แตกด้วยเครื่อง Ultrasonic processor ที่ 30% amplitude 15 นาที บนน้ำแข็ง จากนั้นเติม lysis solution ลงในแต่ละหลอด เซลล์ที่ผ่านการย่อยแล้วจะนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10000xg ที่ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บสารละลายโปรตีนแบคทีเรียที่ได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การหาปริมาณโปรตีน ปริมาณของโปรตีนที่ได้จากเชื้อแบคทีเรียถูกวัดโดยใช้เครื่อง NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

วิธีการแยกโปรตีนบนเจลด้วยกระแสไฟฟ้าสองมิติ (two-dimensional gel electrophoresis: 2DE) เตรียมโปรตีนตัวอย่าง 100 ไมโครกรัม เพื่อใช้แยกตามค่า pI (isoelectric point) บน immobiline dry strip ที่ช่วง pH 4-7 ใน โดยตั้งค่าเครื่อง ettan IPGphor ให้ rehydration นาน 12 ชั่วโมง ที่ 20 องศาเซลเซียส จากนั้นแยกโดยใช้กระแสไฟฟ้าขั้นที่ 1 ความต่างศักย์ 200 โวลต์ต่อชั่วโมง นาน 1 นาที ขั้นที่ 2 ความต่างศักย์ 200-3,500 โวลต์ต่อชั่วโมง นาน 90 นาทีและขั้นที่ 3 ความต่างศักย์ 3,500 โวลต์ต่อชั่วโมง นาน 3 ชั่วโมง เมื่อครบขั้นตอน แช่ immobiline dry strip ใน dithiothreitol equilibration buffer และ iodoacetamide equilibration buffer ครั้งละ 30 นาที จากนั้นนำ immobiline dry strip ไปแยกโปรตีนตามน้ำหนักโมเลกุลบน Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) ใช้กระแสไฟฟ้า 10 มิลลิแอมแปร์และความต่างศักย์ 75 โวลต์ นาน 60 นาที และเปลี่ยนเป็นกระแสไฟฟ้า 20 มิลลิแอมแปร์และความต่างศักย์ 150 โวลต์ นาน 160 นาที นำแผ่นเจลที่ได้ย้อมด้วย coomassie brilliant blue G-250 นาน 12 ชั่วโมง แล้วล้างเจลจนเห็นจุดโปรตีนชัดเจน โดยตัวอย่างในแต่ละกลุ่มจะทำ 3 ครั้ง

การเปรียบเทียบรูปแบบของโปรตีนในเจล บันทึกภาพเจลที่ได้ด้วยเครื่องสแกนเจล และตรวจวิเคราะห์ความเข้มของจุดโปรตีนในแต่ละแผ่นเจลโดยใช้โปรแกรม imageMaster 2D platinum เพื่อหาจุดโปรตีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกัน ระหว่างแบคทีเรียกลุ่มควบคุม และแบคทีเรียกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเส้นใยเชื้อรา

ตรวจวิเคราะห์ชนิดของโปรตีน ตัดจุดโปรตีนที่สนใจเพื่อนำไปวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนโดยเทคนิค Liquid chromatography–mass spectrometry/mass spectrometry (LC-MS/MS) และเปรียบเทียบชนิดโปรตีนโดยใช้ฐานข้อมูลโปรตีนแบคทีเรียใน NCBI ผ่าน MASCOT MS/MS Ion (www.matrixscience.com) โดยศูนย์เครื่องมือคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ผลการศึกษา

การประเมินค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญ (MIC) ของเชื้อแบคทีเรีย MRSA ด้วยวิธี Broth microdilution

จากการทดสอบความไวของเชื้อ MRSA สายพันธุ์ DMST 20651 และ DMST 20654 ต่อสารสกัดจากเส้นใยเชื้อรา *P. nipponicus* Cod-MK1201 พบว่า สารสกัดจากเส้นใยเชื้อรา *P. nipponicus* มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSA ทั้งสองสายพันธุ์ โดยค่า MIC เท่ากับ 3.125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ ค่า MBC เท่ากับ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ส่วน MIC และ MBC ต่อยาเตตราไซคลินของเชื้อแบคทีเรียนี้ มีค่าเท่ากับ 0.07 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ 0.15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

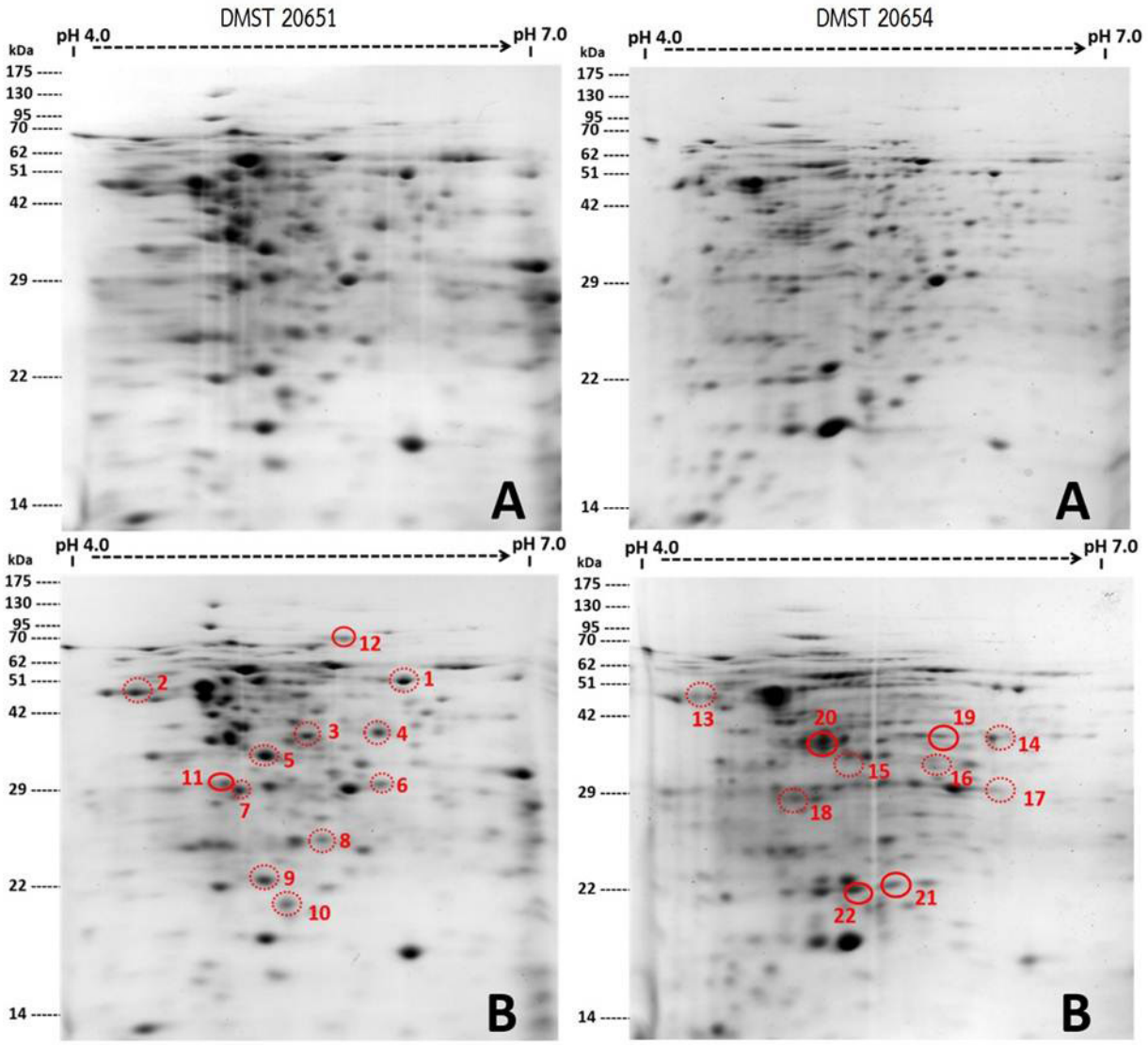
การทดสอบผลของสารสกัดต่อรูปแบบโปรตีนของเชื้อแบคทีเรีย

โปรตีนของแบคทีเรีย MRSA สายพันธุ์ DMST 20651 และ DMST 20654 ถูกแยกบนเจลด้วยกระแสไฟฟ้าสองมิติ ความแตกต่างของรูปแบบโปรตีนระหว่างแบคทีเรียทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเส้นใยเชื้อราถูกตรวจวิเคราะห์ความเข้มของจุดโปรตีนในแต่ละแผ่นเจลโดยใช้โปรแกรม ImageMaster 2D platinum เพื่อหาจุดโปรตีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกัน พบว่าในแบคทีเรีย MRSA สายพันธุ์ DMST 20651 มีจุดโปรตีนที่มีความเข้มแตกต่างกันระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเส้นใยเชื้อราจำนวน 283 จุด โดยเป็นจุดโปรตีนที่มีความเข้มเพิ่มขึ้นมากกว่า 1.5 เท่า จำนวน 61 จุด และเป็นจุดโปรตีนที่มีความเข้มลดลงมากกว่า 1.5 เท่า จำนวน 47 จุด เมื่อเปรียบเทียบกับจุดโปรตีนในกลุ่มควบคุม

แบคทีเรีย MRSA สายพันธุ์ DMST 20654 มีจุดโปรตีนที่มีความเข้มแตกต่างกันระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเส้นใยเชื้อราจำนวน 304 จุด โดยเป็นจุดโปรตีนที่มีความเข้มเพิ่มขึ้นมากกว่า 1.5 เท่า จำนวน 46 จุด และเป็นจุดโปรตีนที่มีความเข้มลดลงมากกว่า 1.5 เท่า จำนวน 57 จุด เมื่อเปรียบเทียบกับจุดโปรตีนในกลุ่มควบคุม

จากนั้น 12 จุดโปรตีนจากแบคทีเรีย MRSA สายพันธุ์ DMST 20651 และ 10 จุดโปรตีนจาก DMST 20654 ที่มีการแสดงออกแตกต่างกันระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเส้นใยเชื้อรามากกว่า 1.5 เท่า ได้ถูกคัดเลือกเพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนโดยเทคนิค Liquid chromatography–mass spectrometry/mass spectrometry (LC-MS/MS) และเปรียบเทียบชนิดโปรตีนโดยใช้ฐานข้อมูลโปรตีนใน MASCOT โดยจาก 22 จุดโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงพบว่า มี 16 จุดโปรตีนที่มีการลดการแสดงออกลง และ 6 จุดโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับสารสกัดเส้นใยเชื้อรา โดยวัดจากความเข้มของจุดโปรตีนเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ตำแหน่งและหมายเลขของจุดโปรตีนดังแสดงในรูปที่ 1

โปรตีนที่ได้จากการวิเคราะห์ชนิดโดยใช้ฐานข้อมูลโปรตีนใน MASCOT จำนวน 22 จุด กลุ่มโปรตีนดังกล่าวเกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่สำคัญหลายอย่างในเซลล์แบคทีเรีย ดังแสดงในตารางที่ 1



รูปที่ 1 แบบแผนโปรตีนเปรียบเทียบที่ได้จากเชื้อแบคทีเรีย MRSA สายพันธุ์ DMST 20651 และ DMST 20654 โดยใช้วิธี 2DE; (A) แบคทีเรียกลุ่มควบคุม (B) แบคทีเรียกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเส้นใยเชื้อราความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร วงกลมระบุตำแหน่งจุดโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกแตกต่างจากกลุ่มควบคุม โดยวงกลมเส้นปะคือจุดโปรตีนที่มีการแสดงออกลดลง วงกลมเส้นทึบคือจุดโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น

ตารางที่ 1 ชนิดและคุณสมบัติของจุดโปรตีนจำนวน 22 จุด ที่ผ่านการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS และสืบค้นในฐานข้อมูลโปรตีน MASCOT

Spot No.	Protein identification	Accession	Mass (Da)	MASCOT Score	Fold change	COGs Functional classification
1	IMP dehydrogenase	WP_031808136.	52946	1017	1.66 ↓	Nucleotide metabolism and transport
2	Enolase	PAJ00584.1	47173	457	2.33 ↓	Carbohydrate metabolism and transport
3	Aspartate aminotransferase	WP_052999368.1	43689	576	1.98 ↓	Amino Acid metabolism and transport
4	Citrate synthase	WP_000829165.1	42666	734	1.63 ↓	Energy production and conversion
5	Elongation factor Ts	WP_061740457.1	32646	738	2.48 ↓	Translation
6	30S Ribosomal protein S2	ABD30333.1	27772	477	3.12 ↓	Translation
7	Fructose-bisphosphate aldolase class 1	EFG56585.1	33240	727	2.25 ↓	Carbohydrate metabolism and transport
8	(S)-acetoin forming diacetyl reductase	WP_000002746.1	27284	557	2.16 ↓	Energy production and conversion
9	Superoxide dismutase	WP_000863555.1	22755	445	1.67 ↓	Inorganic ion transport and metabolism
10	Hypothetical protein SACOL1020	WP_000600392.1	19314	365	2.08 ↓	Hypothetical protein SACOL1020
11	Protein deglycase HchA	WP_000076396.1	32226	170	1.96 ↑	Post-translational modification, protein turnover, chaperone functions
12	Pyruvate kinase	WP_031896168.1	63292	921	1.71 ↑	Carbohydrate metabolism and transport
13	Enolase	PAJ00584.1	47173	457	5.32 ↓	Carbohydrate metabolism and transport
14	Citrate synthase	WP_000829168.1	42679	350	1.68 ↓	Energy production and conversion
15	Elongation factor Ts	WP_061740457.1	32646	738	1.60 ↓	Translation
16	Succinate--CoA ligase subunit alpha	PNZ57977.1	31756	368	2.27 ↓	Energy production and conversion
17	30S Ribosomal protein S2	ABD30333.1	27772	477	1.90 ↓	Translation
18	Fructose-bisphosphate aldolase class 1	EFG56585.1	33240	727	1.69 ↓	Carbohydrate metabolism and transport

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Spot No.	Protein identification	Accession	Mass (Da)	MASCOT Score	Fold change	COGs Functional classification
19	Ornithine aminotransferase	WP_064126199.1	43676	735	6.05 ↑	Amino Acid metabolism and transport
20	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1	EUV10690.1	35660	691	1.63 ↑	Carbohydrate metabolism and transport
21	Hypothetical protein	WP_063652486.1	22344	452	1.62 ↑	Hypothetical protein SAV1854
22	Alkyl hydroperoxide reductase subunit C	WP_000052781.1	21135	433	1.64 ↑	Defense mechanism

อภิปรายผล

P. nipponicus เป็นเชื้อราก่อโรคแมลงอีกตัวหนึ่งซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ เพื่อศึกษาเพิ่มเติมถึงกลไกของสารสกัดเส้นใยเชื้อราในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โปรตีนของแบคทีเรีย MRSA สายพันธุ์ DMST 20651 และ DMST 20654 ที่เจริญในภาวะที่ได้รับสารสกัดเส้นใยเชื้อรา *P. nipponicus* ที่ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร หรือ 0.5 เท่าของค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ใช้ทดสอบ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่พิจารณาแล้วว่าแบคทีเรียทดสอบจะยังมีชีวิตอยู่และสร้างโปรตีนในปริมาณที่เพียงพอที่จะนำมาวิเคราะห์เพื่อหารูปแบบของโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไปโดยใช้วิธีการแยกโปรตีนบนเจลด้วยกระแสไฟฟ้าแบบสองมิติ

เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนของแบคทีเรีย MRSA สายพันธุ์ DMST 20651 และ DMST 20654 ระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเส้นใยเชื้อราที่ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบว่าสารสกัดเส้นใยเชื้อรา ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนในแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ เมื่อตัดจุดโปรตีนดังกล่าวนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS และข้อมูล mass spectrometry spectrum ของโปรตีนที่ได้นำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีนใน MASCOT พบว่า 22 จุดโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปแบบการแสดงออกนั้น มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสำคัญต่างๆ ภายในเซลล์แบคทีเรีย โดยผลจากการวิเคราะห์ชนิดโปรตีนพบว่าเป็นโปรตีนในกลุ่มการสร้างพลังงานภายในเซลล์ (energy production and conversion) ได้แก่ citrate synthase, (S)-acetoin forming diacetyl reductase และ succinate CoA ligase subunit alpha โปรตีนในกลุ่มกระบวนการแปลรหัส (translation) ได้แก่ elongation factor Ts และ 30S ribosomal protein S2 โปรตีนในกลุ่มการขนส่งอิออนอนินทรีย์ (inorganic ion transport and metabolism) ได้แก่ superoxide dismutase โปรตีนในกลุ่มกระบวนการเมแทบอลิสมและการขนส่งคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate metabolism and transport) ได้แก่ enolase, fructose-bisphosphate aldolase class 1, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase โปรตีนในกลุ่มกระบวนการและการขนส่งกรดอะมิโน (amino acid metabolism and transport) ได้แก่ aspartate aminotransferase และ ornithine aminotransferase และโปรตีนที่ทำหน้าที่ในกระบวนการเมแทบอลิสมและการขนส่งของนิวคลิโอไทด์ (nucleotide metabolism and transport) ได้แก่ IMP dehydrogenase โดยโปรตีน

เหล่านี้มีการแสดงออกของโปรตีนลดลงตอบสนองต่อการได้รับสารสกัดเส้นใยเชื้อรา *P. nipponicus* โดยเฉพาะ citrate synthase, enolase, fructose-bisphosphate aldolase class 1, elongation factor Ts และ 30S ribosomal protein S2 ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้พบการแสดงออกของจุดโปรตีนดังกล่าวลดลงในแบคทีเรีย MRSA ทั้งสองสายพันธุ์

ไกลโคไลซีส (glycolysis) เป็นกระบวนเมแทบอลิสมที่เกิดในเซลล์ของแบคทีเรีย มีการย่อยสลายกลูโคสที่เกิดขึ้นให้ได้เป็นพลังงานใช้ภายในเซลล์ enolase และ fructose-bisphosphate aldolase class 1 เป็นโปรตีนที่ทำงานเกี่ยวข้องในกระบวนไกลโคไลซีส และกระบวนสร้างกลูโคส (gluconeogenesis) โดย enolase จะทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยนกลับ 2- phosphoglycerate เป็น phosphoenolpyruvate ซึ่งจำเป็นสำหรับการสลายคาร์โบไฮเดรตผ่านกระบวนไกลโคไลซีส ส่วน fructose-bisphosphate aldolase class 1 ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ในการเปลี่ยนกลับ fructose-1,6-bisphosphate เป็น dihydroxyacetone-phosphate และ glyceraldehyde 3-phosphate การลดลงของโปรตีนกลุ่มดังกล่าวส่งผลกับการสร้างพลังงานภายในเซลล์ของแบคทีเรีย โดยจากการศึกษาการลดลงของการผลิต enolase ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* และทำให้เชื้อมีความไวต่อยา phosphomycin เพิ่มมากขึ้น[10] Sianglum และคณะ[11] ได้ทดสอบฤทธิ์ของสารโรโดไมรโทน (rhodomyrtone) ในการต้านการเจริญของเชื้อ MRSA พบว่าสารโรโดไมรโทน ส่งผลยับยั้งการสังเคราะห์ enolase และ fructose-bisphosphate aldolase รวมถึงเอนไซม์หลายชนิดที่ทำงานในวิถีไกลโคไลซีส ทำให้แบคทีเรียหยุดการเจริญ

การลดลงของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างพลังงานภายในเซลล์ เช่น fructose-bisphosphate aldolase class 1 และ class 2, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase และ enolase ซึ่งทำหน้าที่ในไกลโคไลซีส และ citrate synthase, succinyl-CoA ligase subunit alpha, sumarate reductase flavoprotein subunit, aconitate hydratase, isocitrate dehydrogenase ซึ่งเกี่ยวข้องในวัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก (tricarboxylic acid cycle) ได้ถูกรายงานในการศึกษาผลของยาปฏิชีวนะ chlortetracycline ต่อเชื้อ *Escherichia coli* และจากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า chlortetracycline มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการทำงานของกระบวนการสร้างพลังงานภายในเซลล์[12]

การวิจัยเพื่อศึกษาผลของ cisplatin ซึ่งเป็นยาต้านมะเร็งต่อเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* โดยใช้เทคนิคโปรตีโอมิกส์ พบว่า ยา cisplatin ส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงรูปแบบโปรตีนไม่เพียงแค่ในกลุ่ม cellular stress response แต่มีผลรบกวนถึงกระบวนการสร้างพลังงานภายในเซลล์ ทั้งไกลโคไลซีสและวัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก โดยโปรตีนที่ทำหน้าที่หลักในกระบวนการนี้ เช่น fructose-bisphosphate aldolase class 2, phosphoglycerate kinase, 2-oxoglutarate dehydrogenase E1component, citrate synthase, aconitate hydratase 1 และ 2 มีการแสดงออกของโปรตีนลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งมีผลยับยั้งกระบวนการเมแทบอลิสมหลักและขัดขวางการสร้างพลังงาน[13] นอกจากนี้ การศึกษาใน *Listeria monocytogenes* พบว่าน้ำมันกานพลูมีกลไกในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ โดยลดการทำงานของสามเอนไซม์หลักในวัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก ได้แก่ isocitrate dehydrogenase, citrate synthase และ alpha-ketoglutarate dehydrogenase ส่งผลต่อการสร้างพลังงานในกระบวนการหายใจของแบคทีเรีย[14] จากข้อมูลข้างต้น การลดลงของโปรตีนดังกล่าวอาจส่งผลต่อการสร้างพลังงานภายในเซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียลดการเจริญได้

การแปลรหัสโปรตีน (protein translation) เป็นอีกหนึ่งกระบวนการที่มีความสำคัญอย่างมากในการดำรงชีวิตของแบคทีเรีย และเป็นกระบวนการที่มี

การสงวนไว้ (highly conserved) ระหว่างแบคทีเรียในสปีชี่ส์ต่างๆ[15] ribosomal protein S2 เกี่ยวข้องกับการแปลรหัสในขั้นตอนการเริ่มต้น (initiation) โดย ribosomal protein S1 ต้องการ ribosomal protein S2 ในการจับกับ 30S subunit และการสร้าง translation initiation complex ซึ่งจะมีการจับกันของ mRNA และองค์ประกอบอื่นๆ ของไรโบโซม[16] elongation factor Ts เป็นโปรตีนที่ทำงานร่วมกับ elongation factor Tu ในการเชื่อมต่อสาย nascent polypeptide ในขั้นตอนการต่อสาย (elongation) ของกระบวนการแปลรหัสในแบคทีเรีย[17] การลดลงของโปรตีน ribosomal protein S2 และ elongation factor Ts อาจส่งผลถึงการลดการทำงานของกระบวนการแปลรหัสโปรตีนของเซลล์ *S. aureus* มีผลต่อการอยู่รอด และการเจริญของแบคทีเรีย ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานทดสอบฤทธิ์ของ junglone ซึ่งเป็นสารอินทรีย์จากพืชที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* พบการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีนแบคทีเรียหลายกลุ่ม โดยพบการแสดงออกที่ลดลงของ elongation factor EF-Tu ร่วมกับกลุ่มโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนตัวอื่นๆ[18] นอกจากนั้น ในการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพร *Melastoma candidum* ต่อการต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *E. coli* และ *S. aureus* ยังพบการลดลงของระดับโปรตีน elongation factor EF-Tu ในกลุ่มแบคทีเรียที่ได้รับสารสกัดสมุนไพร ซึ่งอาจเกิดเนื่องจาก *M. candidum* มีผลต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียผ่านทางการยับยั้งโปรตีนที่จำเป็นในกระบวนการแปลรหัสโปรตีน[19]

IMP dehydrogenase หรือ inositol-monophosphate dehydrogenase เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ในกระบวนการเมแทบอลิสมและการขนส่งของนิวคลิโอไทด์ โดยเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยน inosine 5'-phosphate (IMP) เป็น xanthosine 5'-phosphate (XMP) ซึ่งเป็นขั้นตอนในการสังเคราะห์ guanine nucleotides จึงมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการเจริญของเซลล์[20] การศึกษาในเชื้อ *Salmonella enterica* serovar Typhimurium แสดงให้เห็นว่า การขาดหรือไม่มีโปรตีน inosine 5'-monophosphate dehydrogenase มีผลอย่างมากในการยับยั้งการเจริญและลดความสามารถในการก่อความรุนแรงของโรคของแบคทีเรีย[21] ในการศึกษาครั้งนี้ พบการลดลงของโปรตีน IMP dehydrogenase จากผลของสารสกัดเส้นใยเชื้อรา *P. nipponicus* ซึ่งอาจจะเป็นกลไกหนึ่งที่ช่วยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย นอกจากนั้นการศึกษาคุณลักษณะเชื้อรา *Cordyceps* พบว่าเชื้อรามีความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในกลุ่ม nucleoside analogues ซึ่งมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ เช่น cordycepsin (3'-deoxyadenosine), adenine และ adenosine[22] และ *P. nipponicus* ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้สามารถใช้ในการผลิตสารกลุ่ม nucleoside analogues คือ adenosine และ adenine ได้เช่นกัน[23] ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่มีผลต่อการสังเคราะห์สายนิวคลิโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรีย

ในทางตรงกันข้าม โปรตีนที่ทำหน้าที่ในกลุ่มการปรับแต่ง การเปลี่ยนแปลงและจัดการทำงานของโปรตีน (post-translational modification, protein turnover, chaperone functions) เช่น deglycase hchA โปรตีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการเมแทบอลิสมของคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate metabolism and transport) เช่น glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase และ pyruvate kinase และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันเซลล์ (defense mechanism) เช่น alkyl hydroperoxide reductase subunit C ถูกพบว่ามีการแสดงออกของโปรตีนเพิ่มขึ้นในการตอบสนองต่อการได้รับสารสกัดเส้นใยเชื้อรา เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ในสภาวะปกติภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตจะมีโปรตีนจำพวกหนึ่งที่เรียกว่า แชเพอโรน (chaperones) ทำหน้าที่ช่วยให้โปรตีนอื่นๆ ที่เซลล์สร้างขึ้นมา

มีรูปแบบและการทำงานตามหน้าที่ของโปรตีนแต่ละชนิดอย่างเหมาะสม ซึ่งแชเพอโรนเหล่านี้จะทำหน้าที่ควบคุมสมดุลภายในเซลล์เมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิต เช่น ได้รับความร้อน (heat shock) โลหะหนัก แอลกอฮอล์หรือกระทั่งการเกิดออกซิเดชันมากขึ้นภายในเซลล์ (oxidative stress) เป็นต้น เซลล์จะมีการตอบสนองต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมเหล่านั้นโดยการสร้างโปรตีนแชเพอโรนชนิดต่างๆ เพิ่มขึ้นเพื่อทำให้เซลล์สามารถดำรงชีวิตต่อไปได้ในสภาวะแวดล้อมนั้น[24,25]

โปรตีนแชเพอโรน deglycase hchA ทำหน้าที่ซ่อมแซม methylglyoxal- และ glyoxal-glycated proteins มีบทบาทในกระบวนการเชื่อมสายข้ามโมเลกุล (glycation) ป้องกันการเกิด schiff bases และ advanced glycation endproducts (AGE) รวมถึงมีบทบาทสำคัญในการป้องกันเซลล์และสารพันธุกรรมจากภาวะ carbonyl stress[26]

glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase และ pyruvate kinase เป็นโปรตีนที่ทำงานในกระบวนการไกลโคไลซีส โดย glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ทำหน้าที่ในการ oxidative phosphorylation เปลี่ยน glyceraldehyde 3-phosphate (G3P) เป็น 1,3-bisphosphoglycerate (BPG) ในกระบวนการไกลโคไลซีส ซึ่งเอนไซม์นี้พบว่าจะอยู่ในสภาพไม่ทำหน้าที่ (inactive form) ภายใต้สภาวะเครียด (stress) ซึ่งส่งผลให้เซลล์มีการสร้าง nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) ซึ่งเป็นโคแฟคเตอร์เพิ่มมากขึ้นเพื่อใช้ใน antioxidant systems[27] การศึกษาโปรติโอมของแบคทีเรีย *Lactobacillus brevis* NCL912 ภายใต้สภาวะ acid stress ได้รายงานถึงการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีน 25 ชนิด โดยพบว่า กลุ่มโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นได้แก่โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมสายดีเอ็นเอ การสังเคราะห์โปรตีน และไกลโคไลซีส โดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีนตัวหลักคือ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ซึ่งจากการศึกษาสรุปว่าในภาวะ acid stress ในขั้นต้นจะรบกวนการทำงานของกระบวนการไกลโคไลซีส ทำให้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น[28]

pyruvate kinase เป็นโปรตีนที่ทำงานในกระบวนการไกลโคไลซีส โดยเป็นตัวเร่งการเปลี่ยน phosphoenolpyruvate เป็น pyruvate และให้หมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) แก่ adenosine diphosphate (ADP) เพื่อเป็น Adenosine triphosphate (ATP) อย่างไรก็ตาม การแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ pyruvate kinase ของแบคทีเรียแกรมบวก ได้ถูกรายงานร่วมกับการตอบสนองต่อภาวะ stress ในหลายกลุ่มงานวิจัย[29,30,31]

alkyl hydroperoxide reductase (peroxiredoxin) มีบทบาทสำคัญในการป้องกันเซลล์จาก reactive oxygen species และสัมพันธ์กับวัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก และกระบวนการหายใจโดยรีดิวซ์ peroxides ให้เป็นน้ำหรือแอลกอฮอล์ นอกจากนี้แล้วเอนไซม์นี้ยังช่วยให้เกิดภาวะสมดุลของปฏิกิริยาออกซิเดชันรีดักชัน[32,33] การเพิ่มขึ้นของ alkyl hydroperoxide reductase สอดคล้องกับการศึกษากลไกของสารสกัด *Andrographis paniculata* ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* โดยผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เมื่อได้รับสารสกัดจาก *A. paniculata* แบคทีเรียมีการแสดงออกของโปรตีน superoxide dismutase ลดลง ในขณะที่ catalase และ alkyl hydroperoxide reductase C มีการแสดงออกของโปรตีนและการทำงานเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเกิดเนื่องจากการตอบสนองต่อ oxidative stress ที่เกิดขึ้นจากฤทธิ์ของสารสกัด โดยการลดการทำงานของ superoxide dismutase อาจจะเป็นกลไกหนึ่งที่สารสกัด *A. paniculata* ใช้ในการต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย[34] ดังนั้น การเพิ่มขึ้นของโปรตีน deglycase, pyruvate kinase และ alkylhydroperoxide reductase C ที่พบในการ

ศึกษาครั้งนี้ อาจเกิดขึ้นเนื่องจากการเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่มีสารสกัดเส้นใยเชื้อรา ซึ่งไปกระตุ้นให้แบคทีเรียอยู่ในสภาวะเครียด เป็นผลให้กลุ่มโปรตีนที่ตอบสนองต่อภาวะเครียด (stress response protein) มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเพื่อให้แบคทีเรียสามารถอยู่รอดได้

สรุปผล

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า สารสกัดจากเส้นใยเชื้อรา *P. nipponicus* สายพันธุ์ Cod-MK1201 มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* สายพันธุ์ DMST 20651 และ 20654 โดยส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของรูปแบบโปรตีนที่ทำหน้าที่สำคัญภายในเซลล์หลายกลุ่ม โดยเฉพาะกลุ่มโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงานการทำงานและการสังเคราะห์โปรตีน โปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์นิวคลิโอไทด์ รวมถึงกลุ่มโปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ โดยกลไกที่สารสกัดเส้นใยเชื้อรา *P. nipponicus* ใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* น่าจะเกี่ยวกับการที่สารสกัดมีผลยับยั้งการทำงานของกระบวนการเมแทบอลิสมและสร้างพลังงานภายในเซลล์ รวมถึงการแปลรหัสของแบคทีเรีย

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาครั้งนี้เป็นการทดลองเบื้องต้นในห้องปฏิบัติการ และยังต้องการการศึกษาเพิ่มเติมในด้านคุณสมบัติทางพิษวิทยาของสารสกัดนี้ และฤทธิ์ต้านจุลชีพใน *in vivo* เพื่อยืนยันถึงความปลอดภัยในการนำสารสกัดเส้นใยเชื้อรา *P. nipponicus* มาใช้ในการรักษาในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ปีงบประมาณ 2562

เอกสารอ้างอิง

1. Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, et al. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. JAMA 2007;298:1763-71.
2. Chang S, Sievert DM, Hageman JC, et al. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the vanA resistance gene. N Engl J Med 2003;348:1342-7.
3. Hiramatsu K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: A new model of antibiotic resistance. Lancet Infect Dis 2001;1:147-55.
4. Yue K, Ye M, Zhou Z, et al. The genus Cordyceps: a chemical and pharmacological review: A review of *Cordyceps*. J Pharm Pharmacol 2013;65:474-93.
5. Tuli HS, Sharma AK, Sandhu SS, et al. Cordycepin: a bioactive metabolite with therapeutic potential. Life Sci 2013;93: 863-9.
6. Yeon SH, Kim A, Y J. Comparison of growth-inhibiting activities of *Cordyceps militaris* and *Paecilomyces japonica* cultured on *Bombyx mori* pupae towards human gastrointestinal bacteria. J Sci Food Agric 2007;87:54-9.
7. Xiao JH, Xiao DM, Sun ZH, et al. Chemical compositions and antimicrobial property of three edible and medicinal *Cordyceps* species. J Food Agric Environ 2009;7: 91-100.
8. Imtiaj A, Lee TS. Screening of antibacterial and antifungal activities from Korean wild mushrooms. WJAS 2007;3:316-21.

9. Sangdee K, Nakbanpote W, Sangdee A. Isolation of the entomopathogenic fungal strain Cod-MK1201 from a cicada nymph and assessment of its antibacterial activities. Int J Med Mushrooms 2015;17: 51-63.
10. Yu X, Zheng L, Yang J, et al. Characterization of essential enolase in *Staphylococcus aureus*. World J Microbiol Biotechnol 2011;27:897-905.
11. Sianglum W, Srimanote P, Wonglumsom W, et al. Proteome analyses of cellular proteins in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* treated with rhodomyrtone, a novel antibiotic candidate. PLoS One 2011;6:e16628.
12. Lin X, Kang L, Li H, et al. Fluctuation of multiple metabolic pathways is required for *Escherichia coli* in response to chlortetracycline stress. Mol Biosyst 2014;10:901-8.
13. Stefanopoulou M, Kokoschka M, Sheldrick WS, et al. Cell response of *Escherichia coli* to cisplatin-induced stress. Proteomics 2011;11:4174-88.
14. Cui H, Zhang C, Li C, et al. Antimicrobial mechanism of clove oil on *Listeria monocytogenes*. Food Control 2018; 94:140-6.
15. Myasnikov AG, Simonetti A, Marzi S, et al. Structure-function insights into prokaryotic and eukaryotic translation initiation. Curr Opin Struct Biol 2009;19:300-9.
16. Moll I, Grill S, A. G, et al. Effects of ribosomal proteins S1, S2 and the DeaD/ CsdA DEADbox helicase on translation of leaderless and canonical mRNAs in *Escherichia coli*. Mol Microbiol 2002; 44:1387-96.
17. Palmer SO, Rangel EY, Montalvo AE, et al. Cloning and characterization of EF-Tu and EF-Ts from *Pseudomonas aeruginosa*. Biomed Res Int 2013;2013:585748.
18. Wang J, Wang Z, Wu R, et al. Proteomic analysis of the antibacterial mechanism of action of juglone against *Staphylococcus aureus*. Nat Prod Commun 2016;11:825-7.
19. Wong FC, Yong AL, Sim KM, et al. Proteomic analysis of bacterial expression profiles following exposure to organic solvent flower extract of *Melastoma candidum* D Don (*Melastomataceae*). Trop J Pharm Res 2014;13:1085-92.
20. Hedstrom L, Liechti G, Goldberg JB, et al. The antibiotic potential of prokaryotic IMP dehydrogenase inhibitors. Curr Med Chem 2011;18:1909-18.
21. Turner AK, Barber LZ, Wigley P, et al. Contribution of proton-translocating proteins to the virulence of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium, Gallinarum, and Dublin in chickens and mice. Infect Immun 2003;71:3392-401.
22. Ng TB, Wang HX. Pharmacological actions of *Cordyceps*, a prized folk medicine. J Pharm Pharmacol 2005;57:1509-19.

23. Sangdee A, Sangdee K, Seephonkai P, et al. Colony characteristics, nucleoside analog profiles, and genetic variations of medicinal fungus *Polycephalomyces nipponicus* (ascomycetes) isolates from northeast Thailand. Int J Med Mushrooms 2017;19:445-55.
24. Haslbeck M. sHsps and their role in the chaperone network. Cell Mol Life Sci 2002;59:1649-57.
25. Tadtong S. Heat Shock Protein 90: Target for Cancer Therapy. Thai Pharm Health Sci 2009;4.
26. Abdallah J, Mihoub M, Gautier V, et al. The DJ-1 superfamily members YhbO and YajL from *Escherichia coli* repair proteins from glycation by methylglyoxal and glyoxal. Biochem Biophys Res Commun 2016;470:282-6.
27. Ralser M, Wamelink MM, Kowald A, et al. Dynamic rerouting of the carbohydrate flux is key to counteracting oxidative stress. J Biol 2007;6:10.
28. Huang G, Li C, Cao Y. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in Lactobacillus brevis NCL912 under acid stress: Differentially expressed proteins under acid stress. FEMS Microbiol Lett 2011;318:177-82.
29. Zhai Z, Douillard FP, An H, et al. Proteomic characterization of the acid tolerance response in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CAUH1 and functional identification of a novel acid stress-related transcriptional regulator Ldb0677. Environ Microbiol 2014;16:1524-37.
30. Len ACL, Harty DWS, Jacques NA. Proteome analysis of *Streptococcus mutans* metabolic phenotype during acid tolerance. Microbiology 2004;150: 1353-66.
31. Budin-Verneuil A, Pichereau V, Auffray Y, et al. Proteomic characterization of the acid tolerance response in *Lactococcus lactis* MG1363. Proteomics 2005;5: 4794-807.
32. Nishiyama Y, Massey V, Takeda K, et al. Hydrogen peroxide-forming NADH oxidase belonging to the peroxiredoxin oxidoreductase family: existence and physiological role in bacteria. J Bacteriol 2001;183:2431-8.
33. Seib KL, Wu H-J, Kidd SP, et al. Defenses against oxidative stress in *Neisseria gonorrhoeae:* a system tailored for a challenging environment. Microbiol Mol Biol Rev 2006;70:344-61.
34. Hussain RM, Razak ZNRA, Saad WMM, et al. Mechanism of antagonistic effects of *Andrographis paniculata* methanolic extract against *Staphylococcus aureus*. Asian Pac J Trop Med 2017;10:685-95.