เอนไซม์เปบทิโดไกลแคน ไฮโดรเลส กับความจำเพาะ และศักยภาพในการกำจัดเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค

พนิดา ธัญญศรีสังข์
อาจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ถนนอังรีดูนังต์ ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
โทรศัพท์/โทรสาร: 02-218-8680
อีเมล: tpanida@gmail.com

บทคัดย่อ

โรคฟันผุเกิดจากการสูญเสียแร่ธาตุบริเวณผิวเคลือบฟันในปริมาณมากกว่าการดูดซึมแร่ธาตุกลับคืน การสูญเสียนี้เป็นผลจากการสะสมของกรดที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายสารอาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรตของเชื้อแบคทีเรียในแผ่นคราบจุลินทรีย์ โดยมีหลายการศึกษาพิสูจน์ให้เห็นว่ามิวแทนส์ สเตรปโตคอคไคเป็นกลุ่มเชื้อหลักที่แสดงบทบาทสำคัญนี้ ด้วยเหตุดังกล่าวการกำจัดเชื้อในกลุ่มนี้จึงเป็นกลยุทธหนึ่งที่ได้รับความสนใจในการนำมาใช้ป้องกันการเกิดโรคฟันผุ อย่างไรก็ตาม สารต้านจุลชีพที่มีใช้กันอยู่ในปัจจุบันออกฤทธิ์ในวงกว้าง ไม่ได้จำเพาะต่อเชื้อใดเชื้อหนึ่งซึ่งนำไปสู่การติดเชื้อฉวยโอกาสได้ ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าหาสารต้านจุลชีพที่ออกฤทธิ์จำเพาะกับเชื้อก่อโรคฟันผุจึงได้รับความสนใจอย่างกว้างขวาง เอนไซม์เปปทิโดไกลแคน ไฮโดรเลสเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายเปบทิโดไกลแคนอันเป็นโครงสร้างหลักในผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียโดยเฉพาะกลุ่มแกรมบวก แต่เป็นโครงสร้างที่ไม่พบในเซลล์ของมนุษย์ด้วยประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียซึ่งรวมถึงกลุ่มที่ดื้อยาปฏิชีวนะทำให้เอนไซม์กลุ่มนี้ได้รับการศึกษาอย่างมากในช่วงหลายปีที่ผ่านมา ออโตมิวตะโนไลซิน เป็นเอนไซม์เปปทิโดไกลแคน ไฮโดรเลสที่ผลิตจากเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ ความน่าสนใจของเอนไซม์นี้เกิดจากความจำเพาะในการย่อยสลายเชื้อเฉพาะกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค ยิ่งไปกว่านั้นการศึกษาที่ผ่านมายังแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของเอนไซม์ในการทำลายเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยในรูปแบบของไบโอฟิลม์ได้อีกด้วย จากข้อมูลทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ที่ออโตมิวตะโนไลซินจะถูกพัฒนาให้เป็นอีกทางเลือกในการป้องกันการเกิดโรคฟันผุที่มีประสิทธิภาพมากขึ้นในอนาคต

บทนำ

โรคฟันผุเป็นโรคที่มีสาเหตุมาจากหลายปัจจัยด้วยกัน ไม่ว่าจะเป็นแผ่นคราบจุลินทรีย์ อาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรต เวลา และโฮสต์ (host)[1] โดยรอยโรคนั้นเกิดขึ้นจากการสะสมของกรดที่เชื้อแบคทีเรียในแผ่นคราบจุลินทรีย์สร้างขึ้นจากการย่อยสลายอาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรตไปทำลายผิวเคลือบฟันจนเกิดเป็นรูผุขึ้น เป็นเวลานานมาแล้วที่การควบคุมโรคฟันผุให้ความสำคัญกับการบูรณะฟัน (restoration) เป็นหลัก แต่ด้วยข้อจำกัดไม่ว่าจะเป็นค่ารักษาที่ค่อนข้างสูง การกระจายตัวของบุคลากรทางทันตกรรม รวมถึงสถานให้บริการ ทำให้ประชาชนบางกลุ่มไม่สามารถเข้าถึงการรักษาได้ซึ่งส่งผลให้โรคนี้ยังคงเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุข และจากรายงานการสำรวจสภาวะสุขภาพช่องปากระดับประเทศครั้งที่ 6 พ.ศ. 2549 - 2550

แสดงให้เห็นถึงสถานการณ์การเกิดโรคฟันผุว่ายังอยู่ในระดับที่น่าเป็นห่วง โดยพบว่าในทุกกลุ่มช่วงอายุที่มีการสำรวจมีฟันผุอยู่ในระดับที่ต้องการการรักษาอยู่เป็นจำนวนมาก ไม่ว่าจะเป็นการอุดการรักษารากฟัน หรือแม้กระทั่งการถอนฟัน รายงานนี้สะท้อนให้เห็นว่าวิธีต่าง ๆ ซึ่งใช้ในการควบคุมการเกิดโรคฟันผุที่มีอยู่ในปัจจุบันยังมีประสิทธิภาพไม่เพียงพอ ถึงแม้ในช่วงหลายปีมานี้การควบคุมการเกิดโรคจะมุ่งให้ความสำคัญกับการป้องกันทั้งในระดับบุคคล และระดับชุมชนมากขึ้นก็ตาม[2,3] การกำจัดแผ่นคราบจุลินทรีย์เป็นแนวทางในการควบคุมการเกิดโรคฟันผุที่ได้รับความสนใจมานาน ดังจะเห็นได้จากการนำยาปฏิชีวนะ หรือสารต้านจุลชีพต่าง ๆ มาใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ทางทันตกรรมอย่างไรก็ดีวิธีการเหล่านี้มีผลในการกำจัดเชื้อไม่เฉพาะกับเชื้อก่อโรคฟันผุเท่านั้น แต่กระทบกับเชื้อจุลชีพประจำถิ่นด้วย ทำให้โอกาสที่จะเกิดการติดเชื้อฉวยโอกาส เช่น แคนดิดา อัลบิแคนส์ (*Candida albicans*) เพิ่มมากขึ้น[4] นอกจากนี้ความยากในการกำจัดเชื้อที่อยู่ในแผ่นคราบจุลินทรีย์ หรือไบโอฟิล์ม (biofilm) ก็เป็นอีกข้อจำกัดที่สำคัญ ดังนั้นจึงมีความพยายามค้นหาแนวทางใหม่ ๆ ที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยให้ผลเฉพาะเจาะจงกับเชื้อก่อโรค และมีผลข้างเคียงต่อโฮสต์น้อยที่สุด

มิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค (mutans streptococci) เป็นกลุ่มเชื้อที่หลาย ๆ การศึกษายืนยันว่ามีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคฟันผุ โดยเฉพาะสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ (*Streptococcus mutans*) เป็นสายพันธุ์หลักที่มีบทบาทในมนุษย์เนื่องด้วยเชื้อนี้มักจะแยกได้จากรอยโรคฟันผุ สามารถทำให้เกิดฟันผุในสัตว์ทดลองที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารหวานได้ เชื้อนี้มีความสามารถในการสร้างกรด (acidogenicity) และทนอยู่ในสภาวะที่เป็นกรด (aciduricity) ได้ดี และสามารถสร้างสารที่ช่วยในการยึดเกาะของเชื้อกับผิวฟัน หรือกับเชื้อด้วยกันเองได้[5,6] นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่บ่งชี้ให้เห็นว่ายิ่งมีเชื้อสร้างอาณานิคม (colonization) บนผิวฟันมากขึ้นเท่าไร ยิ่งเพิ่มความเสี่ยงในการพัฒนาเป็นรอยโรคฟันผุในบริเวณดังกล่าวมากขึ้นเท่านั้น[7,8] ด้วยเหตุนี้หากเราสามารถกำจัด หรือลดปริมาณเชื้อเหล่านี้ลงได้ก็เท่ากับเป็นการลดโอกาสการเกิดโรคฟันผุได้ดียิ่งขึ้น หากแต่ในปัจจุบันยังไม่มีสารต้านจุลชีพใดที่ถูกพัฒนามาใช้ต้านเชื้อกลุ่มนี้อย่างเฉพาะเจาะจง

เปบทิโดไกลแคน ไฮโดรเลส (peptidoglycan hydrolase) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายเปบทิโดไกลแคน ซึ่งเป็นโครงสร้างที่พบได้ในผนังเซลล์ของแบคทีเรียทั่วไป โดยเฉพาะกลุ่มแกรมบวก แต่ไม่พบในมนุษย์ เอนไซม์นี้มีบทบาทสำคัญต่อการเติบโตของแบคทีเรีย โดยจะเกี่ยวข้องกับการแบ่ง และแยกตัวของเซลล์ และทำหน้าที่ในการซ่อมแซมเปบทิโดไกลแคน[9] ด้วยประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลล์แบคทีเรีย และไม่กระทบต่อโฮสต์เซลล์นี้เอง ทำให้เอนไซม์นี้ได้รับความสนใจในการนำมาใช้รักษาโรคติดเชื้อ ในยุคที่มีอัตราการดื้อยาปฏิชีวนะสูงขึ้น[10] ในบทความนี้ได้กล่าวถึงเอนไซม์เปบทิโดไกลแคนไฮโดรเลสที่ผลิตจากเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ ความสำคัญของเอนไซม์นี้คือ ความสามารถในการเลือกย่อยสลายเฉพาะเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคฟันผุโดยไม่กระทบกับเชื้ออื่นๆในช่องปาก มากกว่านั้นเอนไซม์นี้ยังแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยในรูปของไบโอฟิลม์อีกด้วย[11] จากข้อมูลดังกล่าวนี้นำไปสู่ความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาเอนไซม์นี้มาใช้ในการป้องกันการเกิดโรคฟันผุได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นในอนาคต

โรคฟันผุ และเชื้อแบคทีเรียที่เกี่ยวข้อง

โรคฟันผุเป็นโรคที่เกิดจากการมีปฏิสัมพันธ์ที่ซับซ้อนระหว่างแบคทีเรียที่ผลิตกรด อาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรต เวลา และปัจจัยต่าง ๆ ของโฮสต์ ไม่ว่าจะเป็นลักษณะของฟัน พฤติกรรมในการบริโภคอาหาร การดูแลสุขภาพช่องปาก การได้รับฟลูออไรด์ รวมถึงคุณสมบัติต่าง ๆ ของน้ำลาย เช่น องค์ประกอบ ความสามารถในการเป็นบัฟเฟอร์ และอัตราการไหลของน้ำลาย การเกิดโรคฟันผุจะเกิดขึ้นเมื่อแร่ธาตุบริเวณผิวฟันถูกย่อยสลายออกไปมากเกินกว่าปริมาณแร่ธาตุที่สะสมกลับคืนสู่ผิวฟัน ซึ่งการสลายของแร่ธาตุนี้เป็นผลมาจากการสะสมเป็นเวลานานของกรดที่เกิดจากการย่อยสลายอาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรตของเชื้อที่อยู่ในแผ่นคราบจุลินทรีย์นั่นเอง[2,12]

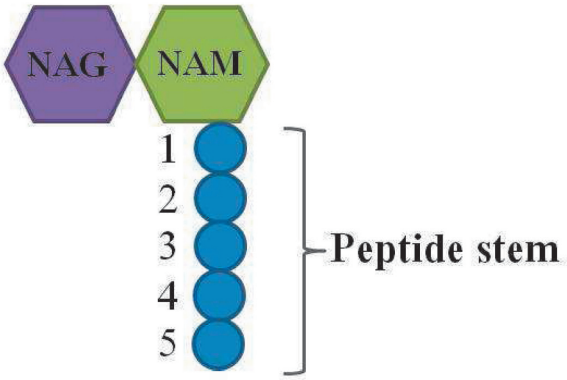
เชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค โดยเฉพาะเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ และเชื้อสเตรปโตคอคคัส ซอบรินัส (*Streptococcus sobrinus*) เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ถูกกล่าวถึงมากที่สุดในแง่ของความสัมพันธ์กับการเกิดโรคฟันผุในมนุษย์[12] ถึงแม้จะยังไม่สามารถพิสูจน์ได้ชัดเจนว่าเชื้อกลุ่มนี้เป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคก็ตามแต่จากการศึกษาระยะแรกในสัตว์ทดลองพบความสัมพันธ์ระหว่างการเกาะกลุ่มของมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไคกับการเกิดรอยโรคจุดขาว (white spot lesion) มากไปกว่านั้นการศึกษาในมนุษย์หลายการศึกษาก็แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ไปในทำนองเดียวกัน[13,14] ดังเช่นในการศึกษาของ Phattarataratip และคณะ[15] ได้นำเสนอให้เห็นว่าในกลุ่มตัวอย่างที่มีฟันผุอยู่ (active caries) พบจำนวนเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตรปโตคอคไค รวมถึงสัดส่วนของเชื้อกลุ่มนี้ต่อเชื้อ

ทั้งหมดในแผ่นคราบจุลินทรีย์ในปริมาณที่มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มตัวอย่างที่ไม่มีฟันผุเลย (caries-free) คุณสมบัติสำคัญที่ทำให้เชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ถูกพิจารณาว่ามีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคประกอบไปด้วย 1) ความสามารถในการย่อยสลายสารอาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรต และให้ผลผลิตเป็นกรดอินทรีย์ชนิดอ่อน โดยเฉพาะกรดแลคติค (acidogenicity) ซึ่งกรดอินทรีย์นี้จะส่งผลให้ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ในช่องปากลดต่ำลง และหากลดต่ำกว่าค่าความเป็นกรดด่างวิกฤต (critical pH = 5.2-5.5) ก็จะส่งผลให้เกิดการละลายของแร่ธาตุในฟันได้ (demineralization) 2) ความสามารถในการทนอยู่ และเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่เป็นกรด (aciduricity) 3) ความสามารถในการสร้างเอ็กซ์ตร้าเซลลูลาร์โพลีแซคคาไรด์ (extracellular polysaccharide) ซึ่งมีความสำคัญในการยึดเกาะของเชื้อกับผิวฟันหรือกับเชื้อด้วยกันเอง และ 4) ความสามารถในการสร้างอินตร้าเซลลูลาร์โพลีแซคคาไรด์ (intracellular polysaccharide) ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานสำรอง และเมื่อนำมาใช้จะทำให้มีการผลิตกรดได้นานขึ้นส่งผลให้สภาวะความเป็นกรดในแผ่นคราบจุลินทรีย์ยาวนานขึ้นอันเป็นปัจจัยที่ส่งเสริมให้เกิดรอยโรคฟันผุได้ง่ายขึ้น[16,17]

เปบทิโดไกลแคน

เปบทิโดไกลแคน (peptidoglycan) เป็นองค์ประกอบสำคัญที่พบในผนังเซลล์ของแบคทีเรีย และเป็นโครงสร้างที่มีผลให้การติดสีแกรม (gram staining) ของเชื้อแบ่งออกเป็นสองกลุ่ม โดยกลุ่มที่มีเปบทิโดไกลแคนที่หนาจะติดสีแกรมบวก (gram positive bacteria) ในขณะที่กลุ่มที่มีเปบทิโดไกแคนบางจะติดสีแกรมลบ (gram negative bacteria) หน้าที่สำคัญของเปบทิโดไกลแคน คือการคงรูปร่างของเซลล์ และเป็นโครงสำหรับการยึดเกาะขององค์ประกอบอื่นๆที่พบบนผิวแบคทีเรียเซลล์ เช่น โปรตีน และกรดทีโคอิก (teichoic acid) ด้วย หากโครงสร้างนี้ถูกทำลายก็มีจะผลให้เซลล์แบคทีเรียทนต่อแรงดันออสโมซิสภายในไซโตพลาสซึม (osmotic pressure of the cytoplasm) ไม่ไหว และทำให้เกิดการแตกสลายได้ในที่สุด (cell lysis)[18,19] ด้วยความที่เปบทิโดไกลแคนพบเฉพาะในแบคทีเรีย และการทำลายโครงสร้างนี้นำไปสู่การแตกของเซลล์แบคทีเรีย โดยไม่กระทบกับโฮสต์เซลล์เลยนั้น[20] จึงทำให้มีการศึกษาวิจัยโครงสร้างนี้มากขึ้น โดยมีความหวังว่าความรู้ที่ได้จะนำไปสู่วิธีการใหม่ ๆ ที่มีประสิทธิภาพมากขึ้นในการกำจัดเชื้อ และมีความปลอดภัยสำหรับโฮสต์เซลล์

สำหรับเปบทิโดไกลแคนของเชื้อในกลุ่มมิวแทนส์สเตรปโตคอคไค ถึงแม้จะยังไม่มีรายงานการศึกษาโดยตรง แต่ก็มีการศึกษามากมายที่กล่าวถึงโครงสร้างนี้ในเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกชนิดอื่น ๆ โดยทั่วไปแล้วเปบทิโดไกลแคน ประกอบขึ้นจากสายไกลแคนที่มีแขนงของเปบไทด์สายสั้น ๆ (peptide stem) ยื่นออกมา โดยที่สายไกลแคนเกิดจากการเรียงตัวสลับกันระหว่างเอ็น-อะซิทิลกลูโคซามีน (N-acetylglucosamine, NAG) และกรดเอ็น-อะซิทิลมิวรามิค (N-acetylmuramic acid, NAM) ซึ่งโครงสร้างในส่วนนี้มีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยในแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ แต่ในขณะที่สายเปบไทด์ที่ยื่นออกมาจากกรดเอ็น-อะซิทิลมิวรามิคพบว่า มีความแตกต่างกันของกรดอะมิโนในตำแหน่งต่าง ๆ ระหว่างแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ โดยเฉพาะกรดอะมิโนในตำแหน่งที่สาม (รูปที่ 1)



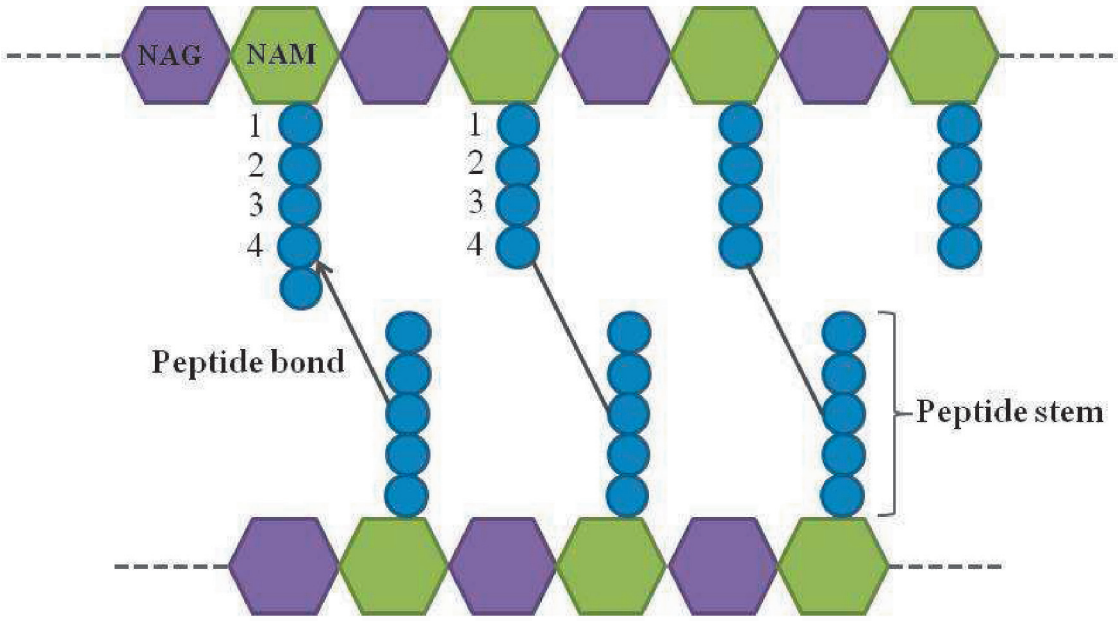
รูปที่ 1 *โครงสร้างหนึ่งหน่วยของเปบทิโดไกลแคน (peptidoglycan monomer) ประกอบไปด้วยสายไกลแคน ซึ่งเกิดจากการเรียงตัวสลับกันระหว่างเอ็น-อะซิทิลกลูโคซามีน (N-acetylglucosamine, NAG) และกรดเอ็น-อะซิทิลมิวรามิค (N-acetylmuramic acid, NAM) โดยมีสายเปบไทด์ (peptide stem) ยื่นออกมาจากกรดเอ็น-อะซิทิลมิวรามิค*

Fig. 1 *Peptidoglycan monomer consists of glycan chain of repeating two sugar units, N-acetylglucosamine (NAG) and N-acetylmuramic acid (NAM) and a peptide chain bound to N-acetylmuramic acid*

โครงสร้างหนึ่งหน่วยนี้จะมาเชื่อมต่อกับอีกหน่วยได้โดยตรงหรือผ่านทางเปปไทด์สายสั้นทำให้ในที่สุดก็จะมีลักษณะเป็นโครงสร้างคล้ายร่างแห (รูปที่ 2) คลุมแบคทีเรียเซลล์ไว้[18,21]

เอนไซม์เปปทิโดไกลแคน ไฮโดรเลส (Peptidoglycan hydrolase)

เอนไซม์เปปทิโดไกลแคน ไฮโดรเลสเป็นเอนไซม์ที่พบได้ในแบคทีเรียเกือบทุกชนิดมีหน้าที่ในการย่อยสลายเปปทิโดไกลแคน โดยที่เอนไซม์จะตัดในตำแหน่งที่จำเพาะบนร่างแหเปปทิโดไกลแคน เกิดการย่อยสลายเปปทิโดไกลแคน ซึ่งนำไปสู่การแตกสลายของแบคทีเรียเซลล์ในที่สุด เนื่องด้วยความสามารถในการย่อยสลายนี้แบคทีเรียจึงมีการควบคุมการสร้าง และทำงานของเอนไซม์อย่างเข้มงวด ในสภาวะปกติเอนไซม์จะมีบทบาทสำคัญเวลาที่แบคทีเรียมีการแบ่งตัว (cell division) การแยกเซลล์ (cell separation) การปรับปรุงโครงสร้างของผนังเซลล์ (restructuring of cell wall) แต่ในบางกรณีที่แบคทีเรียอยู่ในสภาวะที่ไม่พึงประสงค์ ก็จะมีการสร้างเอนไซม์ออกมาในปริมาณมากพอที่จะเกิดการย่อยสลายตัวเองได้ (autolysis) การทำงานของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับสองโดเมนที่สำคัญ โดยในตอนแรกโดเมนที่จับกับผนังเซลล์ (cell wall binding domain) ซึ่งมักจะพบลักษณะเฉพาะคือ การมีชุดซ้ำของโดเมน (tandem repeat domain) จะไปจับกับตำแหน่งที่จำเพาะบนผนังเซลล์[22] หลังจากนั้นจะใช้คาตาไลติกโดเมน (catalytic domain) ทำการตัดพันธะเคมีที่จำเพาะบนสายเปปทิโดไกลแคน จากตำแหน่งการตัดที่จำเพาะนี้เอง สามารถแบ่งเอนไซม์เปปทิโดไกลแคน ไฮโดรเลสออกเป็น 5 ชนิด ได้แก่ เอ็น-อะซิทิลมิวรามินิเดส (N-acetylmuraminidases) เอ็น-อะซิทิลกลูโคซามินิเดส (N-acetylglucosaminidases) เอ็น-อะซิทิลมิวรามิล แอล-อะลานีน อะมิเดส (N-acetylmuramyl-L-alanine



รูปที่ 2 *เปปทิโดไกลแคนแต่ละหน่วยเชื่อมต่อสายไกลแคนเป็นสายยาว และจะมีการเชื่อมกันของสายเปปไทด์จากกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 4 กับกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 3 ของสายเปปไทด์ที่อยู่ใกล้กันโดยตรง หรือผ่านพันธะเปปไทด์สายสั้น ๆ*

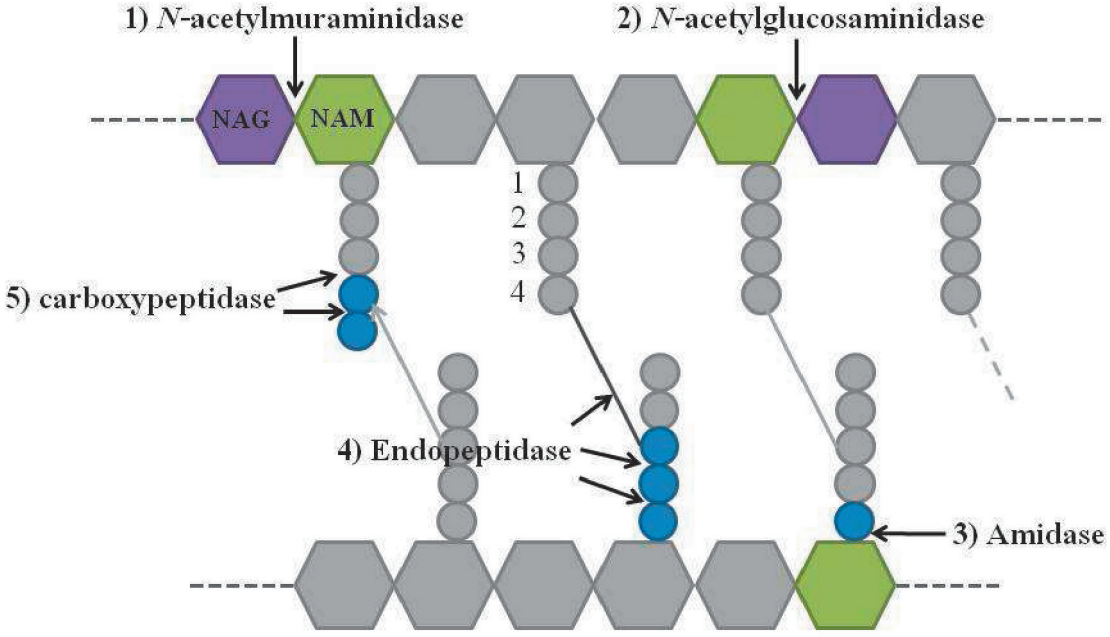
Fig. 2 *Glycan stand of each monomer are linked together. Then peptide stems are connected from amino acid at position 4 of one peptide to amino acid at position 3 of the other peptide, either directly or through a short peptide bridge*

amidases) เอนโดเปบทิเดส (endopeptidases) และคาร์บอกซีเปบทิเดส (carboxypeptidases) (รูปที่ 3)[9]

เนื่องด้วยประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อจุลชีพ โอกาสเกิดการดื้อยาที่ต่ำ และความปลอดภัยต่อโฮสต์เซลล์ เอนไซม์เปบทิโดไกลแคนไฮโดรเลสจึงได้รับความสนใจในการนำมาใช้เป็นทางเลือกในการรักษาโรคติดเชื้อในยุคที่มีวิกฤตการณ์การดื้อยาปฏิชีวนะ เอนไซม์ไลโซสเตฟิน (lysostaphin) เป็นตัวอย่างที่เห็นได้ชัด เอนไซม์นี้ผลิตจากเชื้อสแตฟฟิโลคอคคัส สิมูแลนซ์ (*Staphylococcus simulans*) เป็นเอนไซม์ชนิดเอนโดเปบทิเดส ด้วยความสามารถในการกำจัดเชื้อสแตฟฟิโลคอคคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) ซึ่งเป็นสาเหตุของการติดเชื้อที่ผิวหนัง อาหารเป็นพิษ และเป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในโรงพยาบาล (hospital acquired infection) เอนไซม์นี้ได้รับความสนใจมากยิ่งขึ้นเมื่อพบว่า สามารถแม้กระทั่งกำจัดเชื้อสแตฟฟิโลคอคคัส ออเรียสสายพันธุ์ที่ดื้อยาปฏิชีวนะเมธิซิลลิน (Methicillin-resistant Staphylococcusaureus, MRSA) ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญที่พบบ่อยมากขึ้นได้[23] จากความสามารถนี้เองทำให้เอนไซม์นี้อยู่ในระหว่างการพัฒนาออกมาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อใช้ในการรักษาต่อไป[24]

ออโตมิวตะโนไลซิน (Automutanolysin)

เอนไซม์เปบทิโดไกลแคน ไฮโดรเลสที่สร้างขึ้นโดยเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ถูกค้นพบในเวลาใกล้เคียงกันโดยกลุ่มวิจัยสองกลุ่มคือ กลุ่มของ Yoshimura[25] และ Shibata[26] โดยได้ตั้งชื่อที่แตกต่างกันว่า ออโตมิวตะโนไลซิน หรือย่อว่า เอเอ็มแอล (Aml) และเอทีแอลเอ (AtlA) ตามลำดับ ซึ่งจากการศึกษาของทั้งสองกลุ่มพบว่า เอนไซม์นี้เป็นโปรตีนที่ประกอบขึ้นด้วยกรดอะมิโนจำนวน 979 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 104 กิโลดาลตัน และเมื่ออยู่ในรูปสมบูรณ์ (mature form) จะมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 90 กิโลดาลตัน กลไกที่เกี่ยวข้องกับการเกิดรูปสมบูรณ์ยังรอการศึกษาเพิ่มเติม แต่เอนไซม์ทั้งในรูปก่อนตัด (uncleaved form) และรูปสมบูรณ์ (mature form) มีความสามารถในการย่อยสลายเปบทิโดไกลแคนได้ทั้งคู่ โครงสร้างของเอเอ็มแอลประกอบไปด้วยสองโดเมน ได้แก่ คาตาไลติกโดเมน อยู่ปลายด้านหมู่คาร์บอกซิล (C-terminal catalytic domain) ซึ่งมีบทบาทในการย่อยสลายเปบทิโดไกลแคน และอีกโดเมนอยู่ปลายด้านหมู่อะมิโน (N-terminus) ยังไม่ทราบหน้าที่แน่ชัด แต่คาดว่าน่าจะทำหน้าที่ใน



รูปที่ 3 *เอนไซม์เปบทิโดไกลแคน ไฮโดรเลสถูกแบ่งออกเป็น 5 ชนิดตามพันธะที่เอนไซม์เข้าไปย่อยซับสเตรท ได้แก่ 1) เอ็น-อะซิทิลมิวรามินิเดส (N-acetylmuraminidases) 2) เอ็น-อะซิทิลกลูโคซามินิเดส (N-acetylglucosaminidases) 3) เอ็น-อะซิทิลมิวรามิล แอล-อะลานีน อะมิเดส (N-acetylmuramyl-L-alanine amidases) 4) เอนโดเปบทิเดส (endopeptidases) และ 5) คาร์บอกซีเปบทิเดส (carboxypeptidases)*

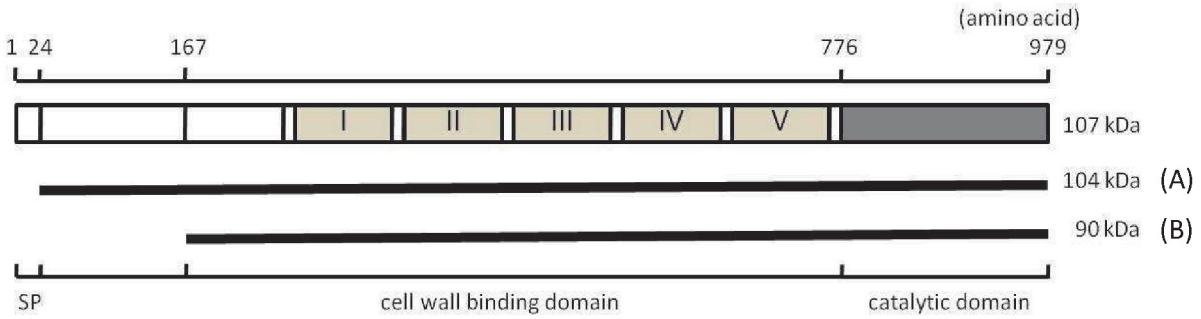
Fig. 3 *Peptidoglycan hydrolases are classified into 5 categories according to the chemical bond of substrate that are digested. They are 1) N-acetylglucosaminidase, 2) N-acetylmuraminidase, 3) N-acetymuramyl-L-alanine-amidase, 4) endopeptidase and 5) carboxypeptidase*

การจับกับผนังเซลล์ เนื่องจากพบลักษณะชุดซ้ำของโดเมนที่มักจะพบในโดเมนที่จับกับผนังเซลล์ของเอนไซม์เปปทิโดไกลแคนไฮโดรเลสอื่น ๆ (รูปที่ 4) เอเอ็มแอลเป็นเอนไซม์ชนิด เอ็น-อะซิทิลมิวรามินิเดส ซึ่งจะตัดพันธะเคมีระหว่างกรดเอ็น-อะซิทิลมิวรามิค และเอ็น-อะซิทิลกลูโคซามีน[25-27]

ความน่าสนใจของเอเอ็มแอลเกิดขึ้นมาจากการที่พบว่าเชื้อสเตรปโตคอคไคอื่น ๆ ในช่องปาก (oral streptococci) สามารถผลิตเอนไซม์เปปทิโดไกลแคน ไฮโดรเลสออกมาเช่นกัน แต่มีเพียงเอเอ็มแอลเท่านั้นที่สามารถย่อยสลายเปปทิโดไกลแคนของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ และเชื้อสเตรปโตคอคคัสซอบรินัสได้ดี และไม่พบการย่อยสลายเชื้อสเตรปโตคอคไคตัวอื่นที่พบในช่องปาก[25,26] และเมื่อมีการศึกษาเพิ่มกับเชื้อทั้งสองตัวนี้ที่แยกได้มาจากผู้ป่วย(clinical strains) พบว่าในสภาวะที่เชื้ออยู่ในลักษณะล่องลอย (planktonic form) เอนไซม์ยังคงมีความสามารถในการย่อยสลายเชื้อจากผู้ป่วยแต่ละคนได้ดี แต่ก็มีความไวในการย่อยสลายที่แตกต่างกัน และในสภาวะที่เชื้ออยู่ในรูปไบโอฟิล์ม (biofilm form) ซึ่งเชื้อจะมีความต้านทานต่อการทำลายจากสิ่งอันตรายต่างๆ ได้ดี แต่ก็พบว่าเอเอ็มแอลสามารถที่จะแทรกตัวเข้าไปย่อยสลายเชื้อที่ฝังตัวอยู่ในเอ็กซ์ตร้าเซลลูลาร์โพลีแซคคาไรด์ได้เช่นกัน[11] นอกจากนี้ยังพบว่าประสิทธิภาพ ในการย่อยของเอนไซม์ สามารถส่งเสริมให้ดียิ่งขึ้นได้โดยการทำงานร่วมกับ ไตรตอน เอ็กซ์ 100 (triton X-100) ซึ่งเป็นนอนไอออกนิกเซอร์แฟกแตนท์ (non-ionic surfactant) อาจจะมาจากสารนี้ไปมีผลต่อกรดทิโคอิกที่เกาะอยู่กับร่างแหเปปทิโดไกลแคนที่เคยมีรายงานว่ามีบทบาทในการไปขัดขวางการทำงานของเอนไซม์เปปทิโดไกลแคน ไฮโดรเลส[11,28] อย่างไรก็ดี เป็นที่น่าสนใจว่าไลโซไซม์ (lysozyme) และมิวตะโนไลซิน (mutanolysin) ซึ่งเป็นเอนไซม์ชนิดเดียวกันกับเอเอ็มแอล กลับมีความแตกต่างกันในความจำเพาะต่อซับสเตรต (substrate specificity) โดยไลโซไซม์ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่นำมาใช้กันอย่างกว้างขวางในทางเภสัชกรรมเอนไซม์นี้สามารถย่อยเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ส่วนใหญ่ แต่กลับแทบจะไม่มีผลต่อเชื้อสเตรปโตคอคไคในช่องปาก[10,25] ส่วนมิวตะโนไลซินถึงแม้จะย่อยสลายเชื้อ สเตรปโตคอคคัส ซาริวาเรียส (Streptococcus salivarius) ได้ดี แต่ก็มีผลเพียงเล็กน้อยกับเชื้อสเตรปโตคอคไคตัวอื่นๆ ในช่องปาก[25] ด้วยเหตุนี้ความจำเพาะของเอเอ็มแอลต่อเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ และเชื้อสเตรปโตคอคคัส ซอบรินัส จึงเป็นการจุดประเด็นความคิดที่จะนำเอเอ็มแอลมาใช้ประโยชน์ในการป้องกันการเกิดโรคฟันผุ นอกจากนี้จากการศึกษาของ Yoshimura และคณะ ยังได้แสดงให้เห็นว่าเอเอ็มแอลทำงานได้ดีในช่วงความเป็นกรดด่างระหว่าง 6 ถึง 7 รวมถึงการมีแคลเซียมไอออนเป็นตัวส่งเสริมให้เกิดการย่อยสลายที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น ซึ่งสภาวะดังกล่าวนี้ก็สอดคล้องกับสภาวะปกติในช่องปาก[25]

บทวิจารณ์

กลวิธีในป้องกันการเกิดโรคฟันผุที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันมีอยู่มากมาย หากแต่ละวิธีก็ยังมีข้อจำกัดอยู่พอสมควร เช่น การใช้ฟลูออไรด์ถึงแม้จะเป็นที่ยอมรับถึงความสามารถในการลดอัตราการเกิดโรคฟันผุ แต่ความสามารถนี้ก็ต้องขึ้นกับการได้รับฟลูออไรด์ในปริมาณที่เหมาะสม ถ้าได้รับมากเกินไปก็เป็นสาเหตุของการเกิดฟันตกกระ หรือถ้าได้น้อยเกินไปก็ไม่มีประสิทธิภาพมากพอ[29] การ



รูปที่ 4 *ออโตมิวตะโนไลซิน ประกอบไปด้วยสองโดเมน ได้แก่ คาตาไลติกโดเมน (catalytic domain) และโดเมนที่จับกับผนังเซลล์ (cell wall binding domain) (A) รูปก่อนตัดของเอเอ็มแอลขนาด 104 กิโลดาลตัน และ (B) รูปสมบูรณ์ของเอเอ็มแอลขนาด 90 กิโลดาลตัน SP หมายถึง ซิกแนลเปปไทด์ (signal peptide)*

Fig. 4 *Automutanolysin is composed of two domains. One is catalytic domain and the other is cell wall binding domain. (A) Uncleaved form of Aml 104 kDa and (B) mature form of Aml 90 kDa. SP represents signal peptide*

ใช้สารเคมีหรือสารสกัดจากธรรมชาติซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลชีพ เช่น การใช้คลอเฮกซิดีน ซึ่งเป็นที่ยอมรับถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ และการสร้างไบโอฟิล์ม แต่รสชาติที่ไม่พึงประสงค์ การเปลี่ยนสีของฟัน วัสดุอุด หรือฟันปลอม รวมถึงการเกิดการหลุดลอกของเยื่อเมือกช่องปาก (desquamation of the oral mucosa) ก็ยังเป็นจุดที่ต้องได้รับการปรับปรุง[30] ไตรโคซานก็เป็นสารอีกตัวซึ่งนิยมนำมาใช้ในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคฟันผุ โรคปริทันต์ และการมีกลิ่นปาก[31] แต่ก็มีรายงานถึงการดื้อต่อสารชนิดนี้ซึ่งอาจนำไปสู่การดื้อต่อยาต้านจุลชีพอื่น ๆ ได้ด้วย[32] สารสกัดจากธรรมชาติ เช่น พืชสมุนไพรก็เป็นอีกแนวทางที่กำลังได้รับความสนใจกันอย่างกว้างขวาง ไม่ว่าจะเป็นสารสกัดจากชาเขียว น้ำผึ้งมานูก้า (manuka honey) และทีทรีออยล์ (tea tree oil) ซึ่งมีการนำมาใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์บ้างแล้ว อย่างไรก็ตามฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลชีพของสารสกัดจากธรรมชาติเหล่านี้มีผลไม่เฉพาะต่อเชื้อที่ก่อโรคฟันผุ แต่มีผลไปถึงเชื้อประจำถิ่นด้วย ทำให้ความเสี่ยงในการติดเชื้อฉวยโอกาสเพิ่มมากขึ้น[4] การใช้น้ำตาลทดแทน เช่น ไซลิทอล (xylitol) ก็ยังเป็นที่ถกเถียงกันถึงปริมาณที่เหมาะสมต่อการต้านการเกิดฟันผุได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวมถึงความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียค่อนข้างด้อยกว่าสารต้านจุลชีพอื่น ๆ ดังจะเห็นได้จากผลิตภัณฑ์ที่มีไซลิทอลเป็นส่วนประกอบที่มีอยู่มากมายในท้องตลาด ให้ความสำคัญไปที่การเป็นสารให้ความหวานที่ไม่ก่อให้เกิดฟันผุ ไม่ใช่ในแง่ของการป้องกันการเกิดโรคฟันผุ

ด้วยเหตุนี้ความสามารถในการเลือกกำจัดเฉพาะเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคฟันผุของเอเอ็มแอล โดยไม่กระทบเชื้ออื่น ๆ ศักยภาพในการกำจัดเชื้อในรูปของไบโอฟิลม์ได้ รวมถึงเอนไซม์สามารถทำงานได้ดีในสภาวะปกติของช่องปาก จึงเป็นการจุดประกายความคิดที่จะพัฒนาเอเอ็มแอลให้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่นำมาใช้ในการกำจัดเชื้อ หรือนำมาเสริมประสิทธิภาพของวิธีการต่าง ๆ ข้างต้น เพื่อนำไปสู่การป้องกันการเกิดโรคฟันผุให้ได้ประสิทธิผลที่ดียิ่งขึ้นในอนาคต แต่อย่างไรก็ดี การที่จะนำมาใช้จริงในช่องปากที่มีปัจจัยอื่น ๆ มาเกี่ยวข้องมากขึ้นเช่นเชื้อจุลชีพที่มีความหลากหลาย หรือการคงระดับความเข้มข้นของเอนไซม์ให้การออกฤทธิ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เป็นต้น ทำให้ยังคงต้องมีศึกษาเพิ่มเติมในสัตว์ทดลอง รวมถึงการศึกษาเพิ่มเติมให้เข้าใจในกลไกการเลือกซับสเตรตของเอเอ็มแอล ก็น่าจะเป็นข้อมูลสำคัญในการพัฒนาประสิทธิภาพการทำงานของเอเอ็มแอลให้ดียิ่งขึ้นได้

บทสรุป

การป้องกันโรคฟันผุมีอยู่ด้วยกันหลายวิธี การใช้ยาต้านจุลชีพก็เป็นวิธีการหนึ่งที่ได้รับความนิยม แต่ยาต้านจุลชีพที่มีใช้กันอยู่ในปัจจุบันออกฤทธิ์กว้างจึงมีผลให้เกิดการติดเชื้อฉวยโอกาสได้ง่าย จากผลการศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการนำเอเอ็มแอล มาใช้ประโยชน์ในการป้องกันการเกิดโรคฟันผุ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร. อรนาฎ มาตังคสมบัติ และอาจารย์ ทันตแพทย์หญิง ณัฐนันท์ โกวิทวัฒนา สำหรับคำแนะนำที่มีประโยชน์อย่างมากต่อการเขียนบทความนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Reisine S, Litt M. Social and psychological theories and their use for dental practice. Int ***Dent J*** 1993;43:279-87.
2. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. ***Lancet*** 2007;369:51-9.
3. National oral health survey of Thailand report. Nonthaburi: Dental Health Division, Department of Health, Ministry of Public Health 2002.
4. Soysa NS, Samaranayake LP, Ellepola AN. Antimicrobials as a contributory factor in oral candidosis—a brief overview. ***Oral Dis*** 2008;14:138-43.
5. Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of Streptococcus mutans. ***Microbiol Rev*** 1980;44:331-84.
6. Loesche WJ. Role of Streptococcus mutans in human dental decay. ***Microbiol Rev*** 1986;50:353-80.
7. Seow WK. Biological mechanisms of early childhood caries. ***Community Dent Oral Epidemiol*** 1998;26:8-27.
8. Berkowitz RJ. Acquisition and transmission of mutans streptococci. ***J Calif Dent Assoc*** 2003;31:135-8.
9. Vollmer W, Joris B, Charlier P, Foster S. Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. ***FEMS Microbiol Rev*** 2008;32:259-86.

10. Parisien A, Allain B, Zhang J, Mandeville R, Lan CQ. Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. ***J Appl Microbiol*** 2008;104:1-13.
11. Thanyasrisung P, Komatsuzawa H, Yoshimura G, Fujiwara T, Yamada S, Kozai K, et al. Automutanolysin disrupts clinical isolates of cariogenic streptococci in biofilms and planktonic cells. ***Oral Microbiol Immunol*** 2009;24:451-5.
12. Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. ***J Dent Res*** 2011;90:294-303.
13. Lamont RJ, Jenkinson HF. Oral microbiology at a glance. Chichester, West Sussex, U.K. ; Ames, Iowa: Wiley-Blackwell; 2010.
14. Fejerskov O, Kidd EAM. Dental caries : the disease and its clinical management. Oxford ; Malden, MA: Blackwell; 2008.
15. Phattarataratip E, Olson B, Broffitt B, Qian F, Brogden KA, Drake DR, et al. Streptococcus mutans strains recovered from caries-active or caries-free individuals differ in sensitivity to host antimicrobial peptides. ***Mol Oral Microbiol*** 2011;26:187-99.
16. Young DA, Fontana M, Wolff MS. Current concepts in cariology. Preface. ***Dent Clin North Am*** 2010;54:xiii-xv.
17. Busuioc M, Mackiewicz K, Buttaro BA, Piggot PJ. Role of intracellular polysaccharide in persistence of Streptococcus mutans. ***J Bacteriol*** 2009;191:7315-22.
18. Vollmer W, Blanot D, de Pedro MA. Peptidoglycan structure and architecture. ***FEMS Microbiol Rev*** 2008;32:149-67.
19. Cabeen MT, Jacobs-Wagner C. Bacterial cell shape. ***Nat Rev Microbiol*** 2005;3:601-10.
20. Clatworthy AE, Pierson E, Hung DT. Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. ***Nat Chem Biol*** 2007;3: 541-8.
21. Scheffers DJ, Pinho MG. Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. ***Microbiol Mol Biol Rev*** 2005;69:585-607.
22. Sugai. M. Peptidoglycan hydrolases of the *Staphylococci*. ***J Infect Chemother*** 1997;3:113-27.
23. Kumar JK. Lysostaphin: an antistaphylococcal agent. ***Appl Microbiol Biotechnol*** 2008;80:555-61.
24. Clardy J, Fischbach MA, Walsh CT. New antibiotics from bacterial natural products. ***Nat Biotechnol*** 2006;24:1541-50.
25. Yoshimura G, Komatsuzawa H, Hayashi I, Fujiwara T, Yamada S, Nakano Y, et al. Identification and molecular characterization of an N-Acetylmuraminidase, Aml, involved in Streptococcus mutans cell separation. ***Microbiol Immunol*** 2006;50:729-42.
26. Shibata Y, Kawada M, Nakano Y, Toyoshima K, Yamashita Y. Identification and characterization of an autolysin-encoding gene of Streptococcus mutans. ***Infect Immun*** 2005;73: 3512-20.
27. Jung CJ, Zheng QH, Shieh YH, Lin CS, Chia JS. Streptococcus mutans autolysin AtlA is a fibronectin-binding protein and contributes to bacterial survival in the bloodstream and virulence for infective endocarditis. ***Mol Microbiol*** 2009;74:888-902.
28. Ohta K, Komatsuzawa H, Sugai M, Suginaka H. Triton X-100-induced lipoteichoic acid release is correlated with the methicillin resistance in Staphylococcus aureus. ***FEMS Microbiol Lett*** 2000;182:77-9.
29. Petersen PE, Kwan S, Zhu L, Zhang BX, Bian JY. Effective use of fluorides in the People's Republic of China—a model for WHO Mega Country initiatives. ***Community Dent Health*** 2008;25:257-67.
30. Autio-Gold J. The role of chlorhexidine in caries prevention. ***Oper Dent*** 2008;33:710-6.
31. Haraszthy VI, Zambon JJ, Sreenivasan PK. Evaluation of the antimicrobial activity of dentifrices on human oral bacteria. ***J Clin Dent*** 2010;21:96-100.
32. Yazdankhah SP, Scheie AA, Hoiby EA, Lunestad BT, Heir E, Fotland TO, et al. Triclosan and antimicrobial resistance in bacteria: an overview. ***Microb Drug Resist*** 2006;12:83-90.

Review Article

Substrate Specificity and Antibacterial Ability of Peptidoglycan Hydrolase Against Mutans Streptococci

Panida Thanyasrisung
Lecturer
Department of Microbiology
Faculty of Dentistry,
Chulalongkorn University
Henry-Dunant Road, Patumwan,
Bangkok 10330
Tel./Fax.: 02-218-8680
E-mail: tpanida@gmail.com

Abstract

Dental caries is occurred due to an imbalance between demineralization and remineralization. The mineral loss has resulted from acids produced by bacteria in biofilms. Several studies showed that mutans streptococci are predominant bacteria playing in this important role. Therefore, removal of these bacteria is one of the caries prevention strategies. Current antimicrobial agents have broad-spectrum activity. They are effective against wide-range of bacteria leading to opportunistic infections. This fact prompts an interest in searching a new approach that selectively eliminates cariogenic bacteria. Peptidoglycan hydrolase is an enzyme that degrades peptidoglycan, the major component of the cell wall of gram positive bacteria. With potential to eliminate bacteria including antibiotic resistant strains, the enzymes have been studied by several research groups. Automutanolysin is a peptidoglycan hydrolase produced by *Streptococcus mutans*. The enzyme has been interesting because it shows substrate specificity against mutans streptococci. Moreover, the previous study showed that the enzyme has ability to lyse clinical isolations in biofilm form. All data together indicates the possibility in developing automutanolysin as an alternative approach in caries prevention.

Key words: bacteriolytic enzyme; caries prevention; Mutans streptococci; peptidoglycan hydrolase; substrate specificity