บทฟื้นฟูวิชาการ • Review Article

แบคเทอริโอเฟจและการประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์

นิตยา ค้าคุ้ม, อุมาพร ยอดประทุม, รสนา วงศ์รัตนชีวิน
ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ และศูนย์วิจัยโรคเมลิออยโดสิส มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น ประเทศไทย

Bacteriophages and their Medical Applications

Nittaya Khakhum, Umaporn Yordpratum, Rasana Wongratanacheewin
Department of Biochemistry, Faculty of Medicine and Melioidosis Research Center, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

แบคเทอริโอเฟจ (bacteriophage) หรือ เฟจ (phage) เป็นไวรัสของแบคทีเรียที่พบอยู่มากมายในธรรมชาติ โดยพบร่วมกับแบคทีเรียที่เป็นโฮสต์ที่จำเพาะ สามารถจำแนกเป็นกลุ่มได้ตามชนิดของกรดนิวคลีอิก (DNA หรือ RNA) และรูปร่างลักษณะได้เป็น 13 แฟมิลี่ (families) เฟจมีวงจรชีวิต 2 แบบ คือ lytic (virulent phage) ที่ทำลายแบคทีเรียหลังเพิ่มจำนวนเพื่อปลดปล่อยอนุภาคออกจากเซลล์ และ lysogenic (temperate phage) ที่จะแทรกสารพันธุกรรมเข้าไปอยู่ในสารพันธุกรรมของโฮสต์โดยไม่เกิดการทำลายแบคทีเรีย เนื่องจากเฟจมีความจำเพาะกับแบคทีเรียสูง จึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้ในหลายด้าน เช่น การใช้เฟจเป็นเครื่องมือในการตัดต่อพันธุกรรม การจัดจำแนกกลุ่มของแบคทีเรีย หรือการตรวจติดตามการระบาดของแบคทีเรียก่อโรค ในด้านอุตสาหกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพใช้เฟจในการควบคุมแบคทีเรียในอาหารและพืชผักผลไม้ (bio-control) ส่วนทางด้านการแพทย์สามารถใช้เฟจหรือเอนไซม์ endolysin ที่เฟจใช้ในการทำลายแบคทีเรียมาใช้ในการรักษาแบคทีเรียดื้อยา ซึ่งสามารถใช้ทำลายผนังเซลล์ของทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โครงสร้างของเอนไซม์ดังกล่าวประกอบด้วยส่วนทำปฏิกิริยา (catalytic domain) และส่วนที่จับกับผนังเซลล์ (binding domain) แต่กลไกในการทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียทั้งสองประเภทมีความแตกต่างกัน เนื่องจากส่วนประกอบของผนังเซลล์ต่างกัน เมื่อนำเอนไซม์ของเฟจมาพัฒนาโดยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมให้เป็นลูกผสม (chimeric) พบว่าสามารถเปลี่ยนแปลงความจำเพาะของการทำงาน และการนำเอนไซม์จากเฟจ 2 ชนิดมาใช้ร่วมกัน ก็สามารถเพิ่มประสิทธิภาพโดยมีผลเสริมฤทธิ์กัน (synergistic effect) ในการทำลายแบคทีเรีย ด้วยความจำเพาะและประสิทธิภาพในการทำลายแบคทีเรียของเฟจนี้จึงทำให้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ให้เป็นประโยชน์ได้อย่างมากมายในอนาคต

Bacteriophages or phages are virus of bacteria which can be found enormously in nature together with their specific hosts. They can be classified by their type of nucleic acid (DNA or RNA) and morphology of phage particle into 13 families. There are two forms of life cycle which are lytic (virulent phage) that causes bacterial lysis after complete the phage propagation to release the progeny and lysogenic (temperate phage) that integrate phage genome into bacterial genome without causing cell lysis. According to their specificity of infection, they can be used as a genetic engineering tool for cloning, phage typing to classify pathogenic bacterial strain, bio-control in food and biotechnology and also phage therapy which used phage itself or its endolysin enzyme for medical treatment especially for antibiotic resistance bacteria. The endolysins structure in general consists of catalytic domain and binding domain. They act differently to lyse Gram-positive and Gram-negative bacteria because of the different in cell wall compositions. When chimeric enzymes were used, they could provide killing activity with new host specificity. Additionally, researcher found the synergistic therapeutic effect when combined different phage enzymes for bacterial killing. With the specificity of bacteriophages to their host and efficiency of lysis mechanism, their applications could be enormous and we should be able to obtain a great benefit from them in the near future.

Correspondence : Rasana Wongratanacheewin, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine and Melioidosis Research Center, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand. E-mail: rasana@kku.ac.th

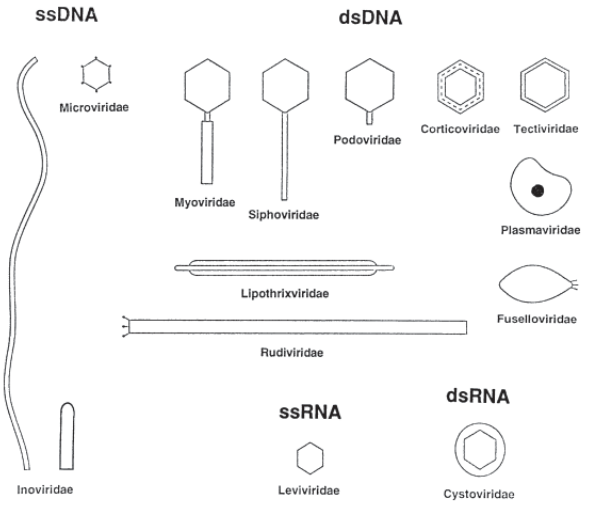
ศรีนครินทร์เวชสาร 2553; 25(1): 47-53 • Srinagarind Med J 2010; 25(1): 47-53.

บทนำ

แบคเทอริโอเฟจ (bacteriophage) หรือ เฟจ (phage) เป็นไวรัสของแบคทีเรียซึ่งสามารถใช้แบคทีเรียเป็นโฮสต์ในการเพิ่มจำนวน โดยมีอยู่มากมายและหลากหลายในธรรมชาติ phage ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1915 โดย Twort พบว่ามีสารบางอย่างที่เปลี่ยนโคโลนีของเชื้อ *Micrococcus* ให้มีลักษณะใส ซึ่งเกิดจากการทำลายเซลล์แบคทีเรียโดยสิ่งที่ทำให้เกิดปรากฏการณ์ดังกล่าวน่าจะเป็นไวรัส ต่อมา Felix D'Herelle รายงานว่าสิ่งที่สามารถทำให้เซลล์ของ *Shigella* sp. ที่เลี้ยงในอาหารเหลว (broth) แตกนั้นคือไวรัสของแบคทีเรีย และเรียกว่า bacteriophage[1] ซึ่งมีอยู่เป็นจำนวนมากและมีความจำเพาะสูง โดยพบว่าเฟจแต่ละชนิดมีความจำเพาะกับแบคทีเรียเพียงชนิดเดียว หรือจำเพาะกับแบคทีเรียสองถึงสามชนิดเท่านั้น นอกจากนี้ bacteriophage จัดเป็น obligate parasite สามารถเพิ่มจำนวนของอนุภาคเฉพาะภายในเซลล์ของแบคทีเรียเท่านั้น ดังนั้น จึงมีผู้นำ bacteriophageไปใช้เป็นเครื่องมือพื้นฐานสำหรับการพัฒนาด้านชีววิทยาระดับโมเลกุล (molecular biology) เพื่อนำยีนที่สนใจใส่เข้าไปในแบคทีเรีย นอกจากนี้ด้วยความจำเพาะของเฟจต่อแบคทีเรียจึงมีการนำมาประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ เช่น การจำแนกแบคทีเรีย (phage typing) การควบคุมทางชีววิทยา (biocontrol) และการใช้เพื่อรักษา (phage therapy) เนื่องจากเอนไซม์ที่สำคัญของเฟจคือ endolysin[2] ซึ่งเฟจใช้ในการทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียเมื่อจะปลดปล่อยประชากรของเฟจที่เพิ่มจำนวนอยู่ในเซลล์แบคทีเรียออกสู่ภายนอก เป็นทางเลือกใหม่ที่น่าสนใจสำหรับการรักษาโรคติดเชื้อ (infectious disease) ที่เกิดจากแบคทีเรียที่มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ หรือแบคทีเรียที่สร้าง biofilm ซึ่งยากต่อการรักษา บทความนี้จะกล่าวถึงลักษณะของ bacteriophage และการประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์

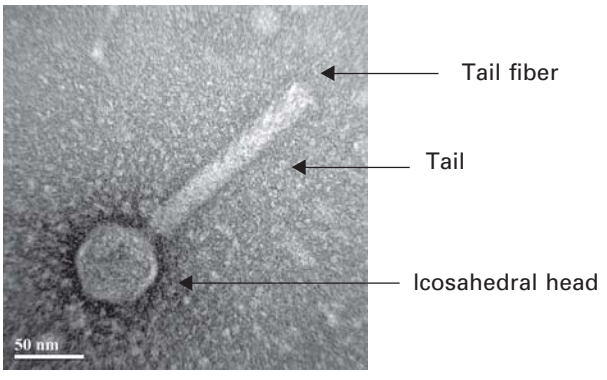
การจำแนกชนิดของแบคเทอริโอเฟจ (bacteriophage classification)

เฟจทุกชนิดประกอบด้วยจีโนม (genome) ซึ่งหุ้มล้อมด้วยโปรตีน (capsid) โดย genome นั้นอาจจะเป็น double-stranded DNA, single-stranded DNA, double-stranded RNA หรือ single-stranded RNA ซึ่งมีทั้งที่เป็นสายตรง (linear) และวงกลม (circular) capsid ของเฟจมีรูปร่างได้หลายแบบ เช่น hexagonal ขนาดเล็ก filamentous หรือรูปร่างซับซ้อนที่ประกอบด้วยส่วนหัว และส่วนหาง (รูปที่ 1) ปัจจุบัน International Committee for Taxonomy of Viruses (ICTV) ได้จัดจำแนกเฟจออกเป็น 1 order 13 families และ 30 genera[3] ตามชนิดของกรดนิวคลีอิก (nature of nucleic acid) และรูปร่างลักษณะ (particle morphology) โดยเฟจจำนวนมากกว่าร้อยละ 96 เป็น tailed phage และส่วนใหญ่มี dsDNA เป็นสารพันธุกรรม[4]



รูปที่ 1 รูปร่างลักษณะ order และ families ของ major phage groups (จากเอกสารอ้างอิงลำดับที่ 3)

เฟจมีขนาดต่างๆ กันโดยเฉลี่ยประมาณ 20-200 นาโนเมตร เฟจที่รู้จักกันดีอยู่ในกลุ่ม tailed phages ซึ่งเป็นเฟจที่เก่าแก่ที่สุด โดยมีกำเนิดมาก่อนที่จะมีการแยก Eubacteria ออกจาก Euryarchaeota (3.5 พันล้านปี) ซึ่งโครงสร้างประกอบด้วยส่วนหัว และส่วนหาง (รูปที่ 2) ซึ่งเป็นรูปของ bacteriophage ST70 ที่มีจีโนมเป็น dsDNA ที่จำเพาะกับ *Burkholderia pseudomallei* แบคทีเรียแกรมลบ ที่ทำให้เกิดโรคเมลิออยโดสิส



รูปที่ 2 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของ phage ST70s ที่จำเพาะต่อ *Burkholderia pseudomallei* แสดงให้เห็นส่วนหัวที่เป็นรูปหกเหลี่ยม และส่วนหาง

นิเวศวิทยาของเฟจ (phage ecology)

Bacteriophage สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติโดยประมาณกันว่ามีจำนวนและความหลากหลายสูงที่สุดในโลกของสิ่งมีชีวิตและพบได้ทั่วไปในน้ำ อุจจาระ ดิน และแม้แต่น้ำทะเล โดยพบว่าจำนวนของเฟจและโฮสต์จะมีความไม่แน่นอน สามารถเปลี่ยนแปลงตามฤดูกาล นอกจากนี้ยังพบว่าเฟจในทะเล (marine phage) ยังมีบทบาทในโยงสัมพันธ์ชนิดอาหาร (food web) โดยการไปทำลายเซลล์โฮสต์ให้แตกออกทำให้สารอาหารต่างๆ ถูกปล่อยออกมาหรือมีการเปลี่ยนแปลงเป็นรูปอื่นซึ่งเป็นประโยชน์ต่อสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ต่อไป[5]

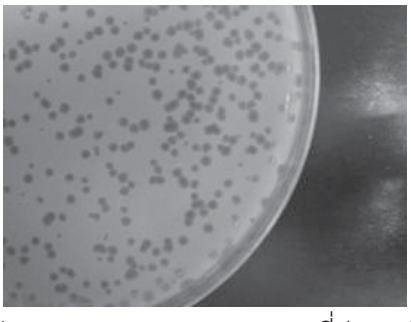
ความจำเพาะของเฟจ

เฟจสามารถพบได้ในแบคทีเรียกว่า 140 genera และยังพบในสิ่งมีชีวิตจำพวก archaea และ eubacteria และมีการศึกษามากมายกว่า 1,500 ชนิดโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน เฟจมีความจำเพาะกับโฮสต์ในระดับหนึ่ง โดยเฟจจะจับกับโมเลกุลที่ปรากฏบนผิวเซลล์แบคทีเรียได้หลายชนิด ได้แก่ teichoic acid, lipoteichoic acid, flagella, capsule, lipopolysaccharide และ porin เป็นต้น[5]

วงจรชีวิต (Phage life cycle)[6]

เฟจแบ่งออกเป็น 2 ชนิดตามวงจรชีวิตในแบคทีเรีย คือ

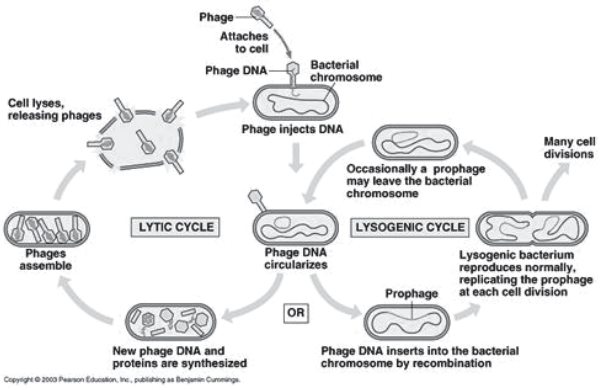
1. Lytic phage หรือ virulent phage หมายถึง เฟจที่เมื่อเข้าสู่แบคทีเรียแล้วมีการเพิ่มจำนวนเกิดขึ้นภายในเซลล์โดยใช้สารต่างๆ จากโฮสต์ในการสร้างโปรตีนและจีโนม จากนั้นจะประกอบส่วนต่างๆ เข้าเป็น phage progeny แล้วทำให้แบคทีเรียแตกออกเพื่อให้ progeny ออกมาเพื่อเข้าสู่เซลล์อื่นต่อไป เมื่อเลี้ยงเฟจร่วมกับแบคทีเรียแล้วผสมวุ้นราดลงบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อจะสังเกตเห็นแบคทีเรียถูกทำลายเป็นวงใส เรียกว่าพล้าค (plaque) (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 ลักษณะของ plaque จาก ST70s ที่ปรากฏผิวอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแบคทีเรีย *Burkholderia pseudomallei*

2. Lysogenic phage หรือ temperate phage หมายถึง เฟจที่เข้าสู่แบคทีเรียแล้วไม่มีการสร้าง phage progeny แต่จีโนมของเฟจจะสอดแทรกเข้าไปอยู่กับโครโมโซมของแบคทีเรีย โดย genetic recombination เรียกจีโนมของเฟจระยะนี้ว่า prophage เมื่อโครโมโซมของแบคทีเรียแบ่งตัว prophage ก็จะแบ่งตัวไปพร้อมกันเหมือนกับเป็นส่วนหนึ่งของโครโมโซม แบคทีเรียเซลล์ใหม่ที่เกิดขึ้นก็จะมี prophage แฝงอยู่ด้วย กระบวนการนี้เรียกว่า lysogenization แบคทีเรียที่มี prophage แฝงอยู่เรียกว่า lysogen หรือ lysogenic bacteria แต่ก็มี prophage ชนิดที่จีโนมของเฟจไม่ได้อยู่ในสภาพสอดแทรกรวมกับโครโมโซมของแบคทีเรีย แต่อยู่เป็นอิสระในไซโตพลาสซึม (รูปที่ 4) การอยู่ร่วมกันระหว่างโฮสต์และ lysogenic phage สามารถทำให้เกิดวิวัฒนาการร่วมกัน (coevolution) โดยเป็นเสมือน mobile genetic element ในการย้ายยีนระหว่างสิ่งมีชีวิตผ่านทาง lateral หรือ horizontal gene transfer ปรากฏการณ์นี้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกับโฮสต์ได้มากมาย เช่น เปลี่ยนแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรค (nonpathogenic strain) เป็นแบคทีเรียที่ก่อโรค (virulent strain) ตัวอย่างเช่น เชื้อ *Salmonella* spp. เมื่อถูก lysogenize ด้วยเฟจ ε จะมีลักษณะของ somatic O antigen เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งตรวจพบได้ด้วยแอนติบอดี (antibody) ที่จำเพาะ สำหรับเชื้อ *Corynebacterium diphtheriae* ซึ่งสร้าง diphtheria toxin ที่ทำให้เกิดโรคคอตีบนั้นพบว่าแบคทีเรียสร้าง toxin ได้เพราะมี β phage เข้าไป lysogenize อยู่ สายพันธุ์ของ *C. diphtheriae* ที่ไม่ถูก lysogenize ด้วย β phage จะไม่สร้าง toxin และไม่ทำให้เกิดโรค นอกจากนี้แล้วยังพบว่า การสร้าง toxin จาก *Clostidium botulinum* ซึ่งทำให้เกิดอาหารเป็นพิษ (botulism) และ toxin จาก β-hemolytic Streptococcus group A ซึ่งทำให้เกิดผื่นในโรคไข้อีดำอีแดง (scarlet fever) ถูกควบคุมโดยยีนของ lysogenic phage เช่นกัน[7] นอกจากนี้เฟจยังช่วยป้องกันไม่ให้โฮสต์ถูกทำลายจากเฟจอื่นได้อีกด้วย

อย่างไรก็ตามวงจรชีวิตของเฟจทั้งสองประเภท สามารถที่จะเปลี่ยนแปลงระหว่างกันและกันได้ (interchangeable) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น สภาพแวดล้อม สารอาหารภายในโฮสต์[5] เป็นต้น



รูปที่ 4 วงจรชีวิตของเฟจแบบ lytic (ซ้าย) และ lysogenic (ขวา) รวมทั้งเฟจ genome ที่อยู่เป็นอิสระในเซลล์ (circularize) (จาก www.niles-hs.k12.il.us/jacnau/chpt184.gif)

กลไกของ lytic phage ในการทำลายแบคทีเรีย

กลไกการทำงานของ lytic phage ในการทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียจนกระทั่งเกิดการแตกของเซลล์ประกอบด้วยโปรตีนที่ทำงานร่วมกัน 2 ชนิดคือ holin และ endolysin โดย holin เป็น hydrophobic proteins ขนาดเล็ก ซึ่งจะสอดแทรก holin monomer เข้าไปในผนังเซลล์ของแบคทีเรียจากทางด้านในของเซลล์แล้วประกอบเป็น holin oligomers ทำให้เกิดรูบริเวณผนังเซลล์หลังจากนั้น endolysin ซึ่งเป็นเอนไซม์สามารถผ่านเข้าไปย่อยทำลายชั้น peptidoglycan ทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกและปลดปล่อย phage ออกมา

เนื่องจากแบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive bacteria) และแบคทีเรียแกรมลบ (Gram-negative bacteria) มีผนังเซลล์ที่แตกต่างกัน ทำให้การออกฤทธิ์ของเอนไซม์แตกต่างกันด้วย โดยผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกประกอบด้วยชั้น peptidoglycan ที่หนาและอยู่ด้านนอกสุด ดังนั้น endolysin จึงสามารถทำงานเป็น exolysins ได้ด้วยเพื่อทำลายแบคทีเรียจากทางด้านนอก รวมถึงมี teichoic acid และ lipoteichoic acid เป็นสารตั้งต้นที่จำเพาะสำหรับเอนไซม์ในการจดจำ โดยใช้ส่วนของ binding domain แต่สำหรับผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบมีผนังเซลล์ด้านนอก (outer membrane) ที่กันไม่ให้เอนไซม์ทำงานจากด้านนอก แต่เมื่อชั้น lipopolysaccharide ถูกทำลายด้วยการใช้ ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) หรือ detergents ก็สามารถถูกทำลายจากภายนอกได้ด้วยเอนไซม์ endolysin[2]

โครงสร้างพื้นฐานและการทำงานของ endolysin

Endolysin หรือ phage lysozyme เป็นเอนไซม์ของเฟจที่ประกอบด้วย 2 ส่วนหลัก (รูปที่ 5) โดย C-terminal binding domain หรือ substrate recognition ทำหน้าที่ในการจดจำและจับกับ substrate ที่จำเพาะบริเวณผนังเซลล์ของแบคทีเรีย และ N-terminal catalytic domain หรือ enzymatic hydrolysis ทำหน้าที่ในการตัดพันธะหลัก (major bond) บริเวณชั้นของ peptidoglycan ของแบคทีเรียให้แยกออก[8] ส่วน L คือ linker ซึ่งเป็นเปปไทด์สายสั้นๆ เชื่อมระหว่างโครงสร้างหลักทั้งสองให้สามารถขยับได้

รูปที่ 5 แสดงโครงสร้างพื้นฐานของ endolysin โดย N (N-terminal) คือด้านที่ทำหน้าที่ตัด C (C-terminal) คือด้านที่จับอย่างจำเพาะ และ L คือ linker (จากเอกสารอ้างอิงลำดับที่ 8)

การประยุกต์ใช้เฟจในด้านต่างๆ (phage applications)

ปัจจุบันได้มีการนำเฟจมาประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ มากมาย ไม่ว่าจะเป็นทางด้านพันธุวิศวกรรม อุตสาหกรรม เกษตรกรรม เทคโนโลยีชีวภาพ รวมถึงด้านการแพทย์ ดังต่อไปนี้

1. **Genetic engineering** เป็นการนำเฟจมาเป็น genetic tool เพื่อการตัดต่อพันธุกรรมโดยตัดบางส่วนที่ไม่จำเป็นสำหรับเฟจออกแล้วใช้เป็น cloning vector ที่สามารถใส่ชิ้น DNA ขนาดใหญ่ได้ถึงประมาณ 25 กิโลเบสเข้าไปแทน เช่น λ phage ที่มีขนาด genome ประมาณ 49 กิโลเบส เป็น temperate phage ของ *E.coli* เมื่อตัดต่อยีนที่ต้องการเข้าไปใน λ DNA จะได้เป็น DNA สายผสม (recombinant DNA) จากนั้นนำเข้าสู่โฮสต์เซลล์แบคทีเรีย เฟจจะนำ DNA สายผสมแทรกเข้าไปใน genome ของแบคทีเรียและใช้กลไกของโฮสต์เพื่อสร้างโปรตีนของเฟจรวมทั้งโปรตีนจาก DNA ที่ใส่เข้าไป

2. **Phage typing** เป็นการจัดจำแนกแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ที่อยู่ในจีนัส (genus) และสปีชีส์ (species) เดียวกันออกเป็นกลุ่มตามความไวต่อการติดเชื้อเฟจ โดยมักใช้เฟจชนิดต่างๆ รวมกันเป็นชุด (panel) ในการศึกษา ทั้งนี้อาศัยความจำเพาะระหว่างการเกาะติดของเฟจกับที่รับบนผนังเซลล์ของแบคทีเรีย เมื่อเกิดการ lysis ของแบคทีเรียจะสังเกตเห็น plaque หรือ clear zone เกิดขึ้นกับแบคทีเรียที่เป็นวงใสเล็กๆ บนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ (agar surface) (รูปที่ 3) เป็นประโยชน์สำหรับงานทางระบาดวิทยาในการสืบหาเชื้อต้นเหตุของการระบาด ตัวอย่างเช่น เมื่อพบการระบาดของ *Vibrio cholera* ที่ทำให้เกิดโรคอหิวาตกโรคในสองพื้นที่ หากต้องการทราบว่ามีแหล่งที่มาเดียวกันหรือไม่ สามารถทำได้โดยนำแบคทีเรียที่แยกได้จากสองที่มาทดสอบความไวต่อชุดของเฟจ หากเชื้อจากสองสถานที่มีความไวต่อชุดของเฟจเหมือนกันแสดงว่าการระบาดน่าจะเกิดจากแหล่งเดียวกัน นอกจากนี้ยังใช้ประโยชน์ในการจำแนกเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ๆ เช่น จำแนกเชื้อ *Salmonella typhi* ออกเป็น strain ที่มีความรุนแรงในการก่อโรค และ strain ที่ก่อโรคไม่รุนแรง โดยอาศัยคุณสมบัติของเฟจที่จะทำลายเฉพาะ *S. typhi* ที่มี Vi antigen ซึ่งสร้างจากเฟจที่อยู่ในแบคทีเรียและทำให้ *S. typhi* ก่อโรคที่รุนแรงได้[7]

3. **Bio-control tool** จากคุณสมบัติที่จำเพาะของ endolysin ซึ่งเป็นเอนไซม์จากเฟจที่สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียได้อย่างจำเพาะ จึงได้มีการนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร (food industry) เพื่อทำลายเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ต้องการและแบคทีเรียที่ก่อโรค (pathogenic bacteria) ที่อาจปนมาในอาหารและผลิตภัณฑ์ที่ยังไม่สุก โดยไม่มีผลต่อ

สิ่งมีชีวิตอื่นๆ เช่น เชื้อประจำถิ่น (normal flora) นอกจากนี้แล้วยังใช้ในการเร่งให้เนยแข็งเกิดการเปลี่ยนแปลงเร็วขึ้น[9-10] สำหรับทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพมีการใช้เฟจในการสร้างพืชจำลองพันธุ์ (transgenic plant) ซึ่งมี phage endolysin gene เพื่อต่อต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในพืช (phytopathogenic bacteria) เช่น การใช้ T4 lysozyme ในมันฝรั่งเพื่อป้องกันการทำลายจากเชื้อก่อโรคพืช *Erwinia carotovora*[11] และนอกจากนี้ยังมีการใช้ lysozyme จาก *E. amylovora phage* ซึ่งสร้างในแบคทีเรีย *E.coli* เพื่อฉีดพ่นและเป็นการยับยั้งเชื้อที่ก่อโรคในพืชบนผิวของลูกแพร์[12] เป็นต้น

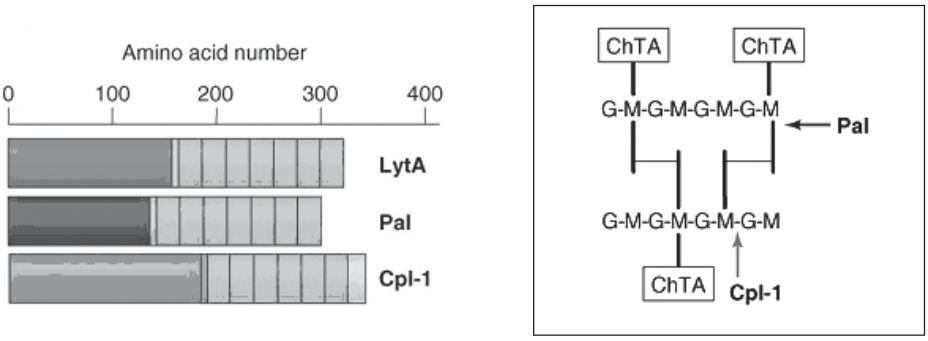
4. Phage therapy ในอดีตได้มีการนำเฟจ ซึ่งสามารถทำลายแบคทีเรียมาใช้ในการรักษาโรค แต่เมื่อมีการค้นพบยาปฏิชีวนะที่ฆ่าเชื้อได้กว้างกว่า จึงทำให้ความสนใจในการใช้เฟจลดความสำคัญลง แต่ในประเทศรัสเซียได้มีการพัฒนาการใช้มาอย่างต่อเนื่อง ในปัจจุบันด้านการแพทย์ได้นำ endolysin บริสุทธิ์มาใช้เป็น therapeutic agent โดยอาจใช้เพียงอย่างเดียวหรือใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะ เพื่อทำลายแบคทีเรียดื้อยา (antibiotic-resistant bacteria) หรือแบคทีเรียที่สร้าง biofilm ซึ่งยากในการกำจัด เนื่องจากเอนไซม์มีประสิทธิภาพสูงและมีความจำเพาะในการทำลายแบคทีเรียที่ก่อโรค สิ่งที่น่าสนใจคือเฟจเป็นเครื่องมือที่สามารถใช้ในการควบคุมแบคทีเรียที่ใช้เป็นอาวุธชีวภาพ (bio-warfare) เช่น lytic enzyme (PlyG) ซึ่งแยกได้จาก gamma phage มีความจำเพาะในการฆ่า *Bacillus antracis*[13] นอกจากนี้แล้ว phage enzyme ยังสามารถใช้ในการควบคุมและทำลายแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อแบคทีเรียในเลือด (bacteremia) เช่น *Streptococcal pneumoniae* ได้อีกด้วย[14, 15]

การพัฒนาเอนไซม์จาก phage เพื่อนำไปใช้ประโยชน์

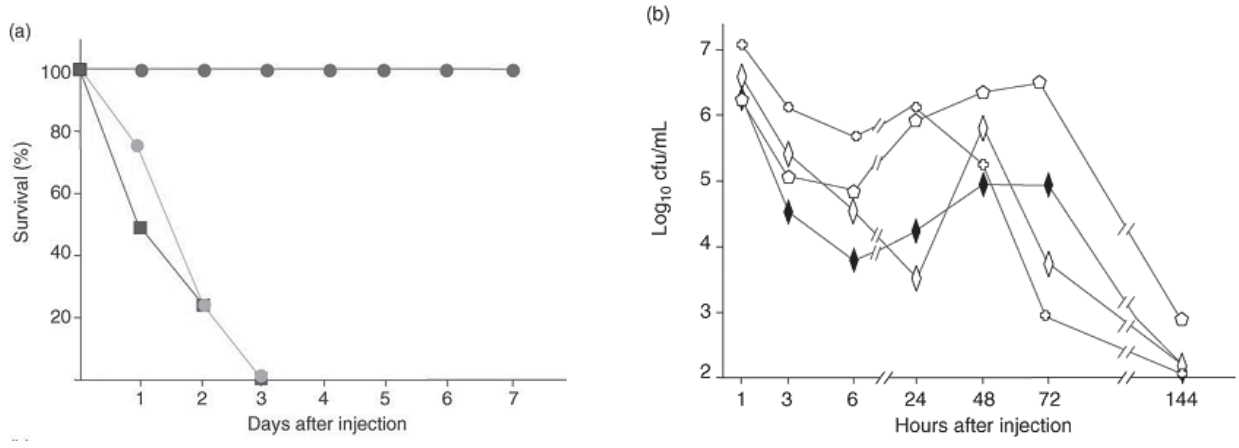
จากคุณสมบัติที่จำเพาะของ phage enzyme ทำให้มีนักวิทยาศาสตร์พยายามที่จะสร้าง chimeric enzyme ซึ่งเป็นการนำ catalytic domain และ binding domain มาจากเอนไซม์ต่างชนิดกัน ทำให้มีประสิทธิภาพในการทำลายสูงขึ้น เช่น งานของ López และคณะ[16] ในการสร้าง chimeric enzyme โดยการใช้ *lytA* gene ของ *Streptococcal pneumoniae* ซึ่งสร้างเอนไซม์ lytA (รูปที่ 6a) ที่มี binding domain (ด้านขวา) จำเพาะกับ choline บนผนังเซลล์แบคทีเรียเอง โดยใช้ทำลายผนังเซลล์ของตัวเองในช่วงการแบ่งตัว และ *Cpl-7* gene ซึ่งเป็น lysozyme จาก Pneumococcal bacteriophage ซึ่งมี binding domain ที่ต่างกันจึงทำงานโดยไม่จำเพาะกับ choline เมื่อนำยีนส่วน catalytic (ด้านซ้าย) ของ *Cpl-7* มาต่อกับ binding ของ *lytA* จะได้เป็น lysozyme ที่จำเพาะกับ choline ได้ นอกจากนี้ยังมีการนำเอนไซม์จากเฟจมาใช้ร่วมกันเพื่อทดสอบการป้องกันการติดเชื้อ *S. pneumoniae* ในหนูทดลอง โดยนำ *Cpl-1* lysozyme และ Pal amidase จากเฟจของ *S. pneumoniae*[17] ที่จับทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียโดยตัดที่ตำแหน่งต่างกัน (รูปที่ 6b) แต่มี binding domain คล้ายกันและจับได้กับ choline บน *S. pneumoniae* (รูปที่ 6a) จากนั้นนำทั้ง *Cpl-1* และ Pal มาทดสอบในหนู โดยฉีดเชื้อ *S. pneumoniae* ให้หนู mice ทางช่องท้อง (intraperitoneal) จากนั้นหนึ่งชั่วโมงต่อมาฉีด Pal ผสมกับ *Cpl-1* (combine enzyme)ให้กับหนูกลุ่มแรก, Pal ให้กับหนูกลุ่มที่สอง และ *Cpl-1* ให้กับหนูกลุ่มที่สาม จากนั้นสังเกตการรอดชีวิตของหนู mice ที่เวลาต่างๆ ผลการทดลองแสดง (รูปที่ 7a) พบว่าหนูที่ถูกฉีดด้วย Pal หรือ *Cpl-1* สามารถมีชีวิตรอดได้ไม่เกินวันที่สาม ในขณะที่หนูที่ได้รับการฉีดด้วย enzyme สองชนิด (combine enzyme) มีชีวิตรอดถึงร้อยละ 100 นอกจากนี้ เมื่อทำให้หนู 4 ตัวติดเชื้อทางกระแสเลือด (bacteremia) แล้ว 1 ชั่วโมง เมื่อนำมาฉีดด้วย combine enzyme ระหว่าง Pal และ *Cpl-1* จากนั้นทำการเจาะเลือดหนูเพื่อนับจำนวนของเชื้อแบคทีเรีย (bacterial count) ในหน่วย cfu/ml ในช่วงเวลาต่างๆ (รูปที่ 7b) พบว่าจำนวนเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือดลดลงตามระยะเวลาหลังการฉีดด้วย combine enzyme โดยเชื้อจะหมดไปในเวลาประมาณ 6 วัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการ combine enzyme ของ phage สองชนิดที่ตัดพันธะต่างกันในชั้น peptidoglycan บนผนังเซลล์ของเชื้อ *S. pneumoniae* (รูปที่ 6b) สามารถเสริมฤทธิ์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือดได้หมดในเวลาอันสั้น

สรุป

Bacteriophage เป็นไวรัสของแบคทีเรียที่พบอยู่มากมายในโลกของสิ่งมีชีวิต lysogenic phage สามารถมีวิวัฒนาการร่วมกับโฮสต์ โดยเป็นเสมือนตัวกลางในการแลกเปลี่ยนหรือขนย้ายข้อมูลทางพันธุกรรมระหว่างโฮสต์ ส่วนจำพวก lytic phage สามารถทำลายแบคทีเรียได้อย่างจำเพาะโดยใช้เอนไซม์จึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ ทั้งการเป็น vector ในการตัดต่อ DNA และใช้เพื่อควบคุมเชื้อแบคทีเรียก่อโรคพืช แบคทีเรียที่ปนเปื้อนในกระบวนการผลิตอาหาร และที่สำคัญคือการควบคุมแบคทีเรียดื้อยาหรือสร้าง biofilm ในทางการแพทย์ ปัจจุบันมีการค้นพบเฟจใหม่ๆ มากมายเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ดังนั้นการพัฒนาความรู้เกี่ยวกับเฟจจึงช่วยให้สามารถนำเฟจมาใช้ให้เป็นประโยชน์ทางด้านการแพทย์ได้มากขึ้นและมีประสิทธิภาพ



รูปที่ 6 เอนไซม์ที่ใช้และบริเวณที่เอนไซม์ตัดโครงสร้างของ peptidoglycan ซึ่งเป็นผนังเซล์ของแบคทีเรีย a) เอนไซม์ LytA จากแบคทีเรีย *S. pneumoniae* ที่มีส่วน C-terminal (ขวา) จำเพาะต่อ choline ของ *S. pneumoniae*, Pal และ Cpl-1 เป็นเอนไซม์จาก phage ที่ทำเป็น chimeric ให้มี C-terminal เช่นเดียวกัน b) บริเวณของ peptidoglycan ที่ตัดโดย Pal และ Cpl-1 (ดัดแปลงจากเอกสารอ้างอิงลำดับที่ 16)



รูปที่ 7 ผลการใช้เอนไซม์ เพื่อป้องกันการติดเชื้อ *S. pneumoniae* ในหนูทดลอง a) การอยู่รอดของหนูทดลองที่ได้รับ combine Pal และ Cpl-1 (●), Pal (●) หรือ Cpl-1 (■) หนึ่งชั่วโมงหลังจากได้รับ เชื้อ *S. pneumoniae* ทางช่องท้อง (intraperitoneal) b) ผลของการใช้ combined therapy (Pal และ Cpl-1) ในหนูที่มีแบคทีเรียในกระแสเลือด (bacteremia) จำนวน 4 ตัว โดยเส้นกราฟแต่ละเส้นคือจำนวนเชื้อในเลือดของหนูแต่ละตัว(จากเอกสารอ้างอิงลำดับที่ 16)

เอกสารอ้างอิง

1. Ackermann HW. Felix d'Herelle-decouvreur des bacteriophages. Med Sci 1997; 8:3-6.
2. Loessner MJ. Bacteriophage endolysins—current state of research and applications. Curr Opin Microbiol 2005; 8:480-7.
3. Ackermann HW. Bacteriophage observations and evolution. Res Microbiol 2003; 154:245-51.
4. Ackermann HW. Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. Arch Virol 2001; 46:843-57.
5. Kutter E, Sulakvelidze A. Bacteriophages: biology and applications. 2005. USA : CRC Press, 2005.
6. Abedon ST. Bacteriophages ecology, population growth, evolution and impact of bacterial viruses. UK : Cambridge University press, 2008.
7. Brussow HW, Canchaya C, Hardt WD. Phages and the evolution of bacterial pathogens. Microbiol Mol Biol Rev 2004; 68:560-602.
8. Fischetti VA. Bacteriophage lytic enzymes: novel anti-infectives. Trends in Microbiology 2005; 13:491-6.
9. De Ruyter PGGA, Kuipers OP, Meijer WC, de Vos WM. Foodgrade controlled lysis of *Lactococcus lactis* for accelerated cheese ripening. Nat Biotechnol 1997; 15:976-79.

10. Tuler TR, Callanan MJ, Klaenhammer TR. Overexpression of peptidases in *Lactococcus* and evaluation of their release from leaky cells. J Dairy Sci 2002; 85:2438-50.
11. De Vries J, Harms K, Broer I, Kriete G, Mahn A, Du ring K, et al. The bacteriolytic activity in transgenic potatoes expression a chimeric T4 lysozyme gene and the effect of T4 lysozyme on soil- and phytopathogenic bacteria. Syst Appl Microbiol 1999; 22:280-6.
12. Kim WS, Salm H, Geider K. Expression of bacteriophage phiEa1h lysozyme in Escherichia coli and its activity in growth inhibition of Erwinia amylovora. Microbiology 2004; 150:2707-14.
13. Watanabe T. The fine structure and the protein composition of g phage of *Bacillus anthracis*. Can J Microbiol 1975; 21:1889-92.
14. Garcia P. Modular organization of the lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages. Gene 1990; 86:81-8.
15. Loeffler JM, Djurkovic S, Fischetti VA. Phage lytic enzyme Cpl-1 as a novel antimicrobial for pneumococcal bacteremia. Infect Immun 2003; 71:6199-204
16. López R, García E, García P. Therapeutic Strategies: Enzymes for anti-infective therapy: phage lysins. Drug Discovery Today 2004; 1:469-74.
17. Jado I, López R, García E, Fenoll A, Casal J, García P. Phage lytic enzymes as therapy of antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* infection in a murine sepsis model. J Antimicrob Chemother 2003; 52:967-73.