



รายงานการวิจัย

การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของพลาสมาจากจระเข้พันธุ์ไทย
ต่อแบคทีเรียดื้อยา

(The antibacterial activity of plasma from the Thai crocodile
(*Crocodylus siamensis*) on drug resistant bacteria)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของพลาสมาจากจระเข้พันธุ์ไทย ต่อแบคทีเรียดื้อยา

(The antibacterial activity of plasma from the Thai crocodile
(*Crocodylus siamensis*) on drug resistant bacteria)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภก. ดร. เกรียงศักดิ์ เอี่ยมเก็บ

สาขาวิชาเภสัชวิทยา

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

นางสาวนิตยา โรจน์ทินกร

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2553-2554

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มิถุนายน 2557

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยเรื่องการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของพลาสมาจากจระเข้พันธุ์ไทยต่อแบคทีเรีย
ดีด้า ในครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2553-
2554 ทำให้งานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และขอขอบคุณ คุณยศพงษ์ เต็มศิริพงศ์ ที่ให้
ความอนุเคราะห์เลือดจระเข้ รศ.ศพญ.ดร. ศจีรา คุปพิทยานันท์ รศ.ดร.สมปอง ธรรมศิริรักษ์ และ
ผศ.ดร. ทวีศักดิ์ จิรวัดนตระกูล ที่กรุณาให้คำปรึกษาและแนะนำ งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จ คุณสุพัชรี
ศิริวงศ์ คุณโยธิน ดีไธสง คุณไปรดา เขยประทับ คุณ นงลักษณ์ อยู่แท้กุล และคุณศิณีวันย์ พิทักษ์
ทิม ที่ได้ช่วยการทำวิจัยครั้งนี้ด้วยความทุ่มเท รวมไปถึงคุณอาทิตย์ แพงมา ที่ช่วยให้ความสะดวก
และให้คำปรึกษาในเรื่องการทำ SDS-PAGE คุณอนุชิต เรืองวิทยานนท์ ที่ช่วยอำนวยความสะดวก
และให้คำปรึกษาการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และ
เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่อนุเคราะห์ทั้งอุปกรณ์และสถานที่ในการทำวิจัยจน
ประสบผลสำเร็จ

บทคัดย่อภาษาไทย

การดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียเป็นปัญหาสำคัญของโลกรวมถึงประเทศไทย ผู้ป่วยหนักที่โรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมา เช่น ผู้ป่วยเด็กแรกเกิด เด็กทารก เด็กโต และผู้ใหญ่มีภาวะแทรกซ้อนจากการติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยาซึ่งทำให้อัตราการเสียชีวิตและค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลเพิ่มขึ้นทำให้ต้องใช้ยาต้านแบคทีเรียขนานใหม่ที่มีราคาแพงมากขึ้นและรุ่นที่สูงขึ้น ดังนั้นวัตถุประสงค์หลักของการศึกษาวิจัยในปัจจุบันจึงให้ความสำคัญไปที่สารที่ได้มาจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียดื้อยาหรือสารที่สามารถเพิ่มการออกฤทธิ์ยาปฏิชีวนะเดิมให้มีประสิทธิภาพสามารถใช้ต้านเชื้อแบคทีเรียดื้อยาได้ ดังนั้น วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าเพื่อทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียดื้อยาของโปรตีนสกัดจากพลาสมาจระเข้ น้ำจืดไทยเมื่อใช้เดี่ยวๆ และใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะกลุ่มบีตาแลกแทม พลาสมาของจระเข้ถูกทำให้บริสุทธิ์เพื่อที่จะได้ 5 แฟรคชัน (พี 1 พี 2 พี 3 พี 4 และ พี 5) โดยใช้คอลัมน์ โครมาโทกราฟี ค่ายับยั้งต่ำสุดของ พี 1 พี 2 พี 3 พี 4 และพี 5 ด้านเชื้อแบคทีเรีย เอนเทอโรแบคเตอร์ โคลเอเช ที่ดื้อต่อยาเซฟตาซิม คีเอ็ม เอสที 21394 (ซีอาร์อีเอนซี 21394) มีค่า 1024, >1024, >1024, >1024 และ 1024 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ขณะที่ค่ายับยั้งต่ำสุดของทั้งห้าแฟรคชันในการต้านเชื้อ สแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส ที่ดื้อต่อยา เมทิซิลิน คีเอ็มเอสที 20651 (เอ็มอาร์เอสเอ 20651) คือ 1024 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งค่ายับยั้งต่ำสุดดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดมีการดื้อยาในระดับสูงต่อแฟรคชันดังกล่าว นอกจากนั้นทั้งเชื้อ ซีอาร์อีเอนซี 21394 และ เอ็มอาร์เอสเอ 20651 มีการดื้อต่อยา เซฟตาซิมหรือยาออกซาซิลลินในระดับที่สูงเช่นเดียวกัน (ค่ายับยั้งต่ำสุดทั้งสอง >1024) ผลจากการศึกษาด้วยวิธี เซกเกอร์บอร์ด พบค่าดัชนี เอฟไอซี ของพี 1 หรือ พี 5 ผสมกับยาเซฟตาซิมต้านเชื้อซีอาร์อีเอนซี 21394 ซึ่งทั้งสองมีการเสริมฤทธิ์เท่ากันที่ 0.062 ขณะที่ทั้ง พี 1 หรือ พี 2 ผสมกับยาคลอกซาซิลลินซึ่งทั้งสอง มีการเสริมฤทธิ์ที่ 0.375 ด้านเชื้อเอ็มอาร์เอสเอ การศึกษาการมีชีวิตรอดของเชื้อได้ยืนยันให้เห็นว่าสารผสมทั้งพี 1 และพี 5 ผสมกับยาเซฟตาซิมหรือยาคลอกซาซิลลินเป็นสาเหตุให้เชื้อ ซีอาร์อีเอนซีและเอ็มอาร์เอสเอมีการลดลงอย่างเห็นได้ชัดในช่วง 6 ชั่วโมงและตลอดช่วง 24 ชั่วโมง จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านพบว่าเซลล์ของเชื้อแสดงให้เห็นว่าผลของสารผสมระหว่างผสมกับทั้งพี 1 หรือพี 5 ต่อเชื้อซีอาร์อีเอนซี แสดงให้เห็นว่าขนาดของเซลล์มีขนาดเล็กลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุม ($P < 0.05$ และ $P < 0.01$) อีกทั้งเซลล์มีรูปร่างบิดเบี้ยวและเยื่อหุ้มเซลล์ได้รับความเสียหาย นอกจากนั้นผลของการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกและชั้นในพบว่าทั้ง พี 1 และ พี 5 เดี่ยวๆ หรือผสมกับยาเซฟตาซิมมีผลทำให้การซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกและชั้นในของเชื้อซีอาร์อีเอนซี เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน ($P < 0.01$)

ผลจากการศึกษาด้วยเอสดีเอส-เพจแสดงให้เห็นแถบโปรตีนของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับเยื่อหุ้มชั้นนอกเพปติโดไกลแคน (โอเอ็มพีจี) ที่น้ำหนักโมเลกุล 25 กิโลดาลตันของทั้งยาเซฟตาซิมเดียวาหรือผสมกับพี 1 มีแถบจางกว่าแถบอื่นๆ เล็กน้อย เช่นเดียวกับ ที่น้ำหนักโมเลกุล 35 และ 45 กิโลดาลตันของแถบโปรตีนโอเอ็มพีจีของยาเซฟตาซิมผสมกับทั้งพี 1 หรือ พี 5 มีความเข้มข้นน้อยกว่าแถบควบคุมเล็กน้อย ผลจากการศึกษาการทำงานของเอนไซม์พบว่าสารผสมระหว่างยาเซฟตาซิมผสมกับทั้งพี 1 หรือพี 5 ได้แสดงให้เห็นว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์บีตา แลคแทมเมส ชนิดที่ 4 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P < 0.01$) จากผลนี้สามารถสรุปได้ว่าสารผสมทั้ง พี 1 หรือพี 5 ผสมกับยาเซฟตาซิมมีการเสริมฤทธิ์เสริมกันอย่างมากในการต้านเชื้ออีอาร์อีเอนซี ผลการศึกษานี้เป็นหลักฐานให้เห็นว่าสารผสมดังกล่าวสามารถเปลี่ยนเชื้อที่ดื้อยาให้กลายเป็นเชื้อที่ไวต่อยาปฏิชีวนะที่เคยใช้ในการรักษา กล่าวโดยสรุปการออกฤทธิ์และการเสริมฤทธิ์ของแฟรคชันเมื่อใช้เดี่ยวๆ และใช้ร่วมกับยาเซฟตาซิมอาจจะมีกลไกในการออกฤทธิ์ 3 กลไก 1) แฟรคชันจากพลาสมาแสดงการเสริมฤทธิ์กับยาเซฟตาซิม และอาจจะยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ซึ่งนำไปสู่การบิดเบี้ยวของรูปร่างเซลล์และผนังเซลล์ให้ได้รับความเสียหาย 2) การซึมผ่านของเยื่อหุ้มชั้นนอกและชั้นในของเชื้อชนิดนี้เพิ่มขึ้น 3) ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บีตาแลคแทมเมส นอกจากนี้อาจรบกวนการสังเคราะห์โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับเพปติโดไกลแคนและเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกซึ่งทำให้ปรากฏแถบของโปรตีนที่ น้ำหนักโมเลกุล 35 และ 45 กิโลดาลตันค่อนข้างจางกว่ากลุ่มควบคุม ดังนั้นแฟรคชันจากพลาสมาเลือดกระเข้มน้ำจืดอาจจะถูกเสนอให้เป็นสารที่มีคุณสมบัติที่ดีสำหรับพัฒนาสารผสมร่วมกับเซฟตาซิมเพื่อเป็นยาตัวใหม่ในการต้านเชื้อ อี โคไลเอเซ ซึ่งในปัจจุบันคือต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในทางปฏิบัติเกือบทั้งหมด อย่างไรก็ตามทดสอบความเป็นพิษในสัตว์ทดลองหรือในมนุษย์มีความจำเป็น ถ้าเป็นไปได้ระดับของยาในเลือดและในเนื้อเยื่อควรจะอยู่ในระดับที่สามารถออกฤทธิ์เสริมกัน

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

The resistance of bacteria is a major problem in the world including Thailand. Intensive care patients at Maharat Nakhon Ratchasima Hospital such as newborns, infants, children and adults patients have complicated from drug resistant bacteria infection lead to increasing the morbidity, mortality and cost of medical care. So, more expensive, newer and higher generation antibacterial agents have been increasing. Thus, the main purpose of current research is emphasized on naturally-derived substances, which have antibacterial activity against drug resistant bacteria or enhance the effectiveness of existing antibiotics. The objective of this study was to investigate the activity of separated fractions from Siamese crocodile (*Crocodylus siamensis*) plasma against drug resistant bacteria, when use alone and in combination with β -lactams antibiotic. The crocodile plasma was sequentially separated to give five fractions (P1, P2, P3, P4 and P5) using column chromatography. The MICs of P1, P2, P3, P4 and P5 against clinical isolates of Ceftazidime-resistant *Enterobacter cloacae* DMST 21394 (CREnC 21394) revealed 1024, >1024, >1024, >1024 and 1024 mg/mL, respectively, while MICs for Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* DMST 20651 (MRSA 20651) displayed 1024 mg/mL for all fractions. These MICs show high resistant of both strains to these fractions. Furthermore, both CREnC 21394 and MRSA 20651 were also high resistant to ceftazidime and cloxacillin (both MICs >1024 μ g/mL), respectively. The checkerboard results displayed that the FICs index of ceftazidime plus either P1 or P5 against CREnC 21394 revealed synergistic effects both equal value at 0.062, besides either P1 or P5 plus cloxacillin demonstrated synergistic effects both equal value at 0.375 against MRSA strain. The killing curves confirmed that both P1 and P5 in combination with either ceftazidime or cloxacillin caused markedly decrease of CREnC or MRSA cells, respectively within 6 h and throughout 24 h period. The TEM study exhibited that the effect of the combination of ceftazidime plus either P1 or P5 on CREnC revealed dramatically significant smaller cell size than control cells ($p < 0.01$), cell shape distortion and cell envelope damage in about 70-80% of these cells. In addition, the OM and CM permeabilization results demonstrated that either P1 and P5 alone or in combination with ceftazidime steadily increased the OM and CM permeability of this strain compared to control ($p < 0.01$). The SDS-PAGE results revealed that the 35 and 45 kDa protein bands of outer membrane and peptidoglycan (OMPG) associated protein of this strain after exposure to ceftazidime plus either P1 or P5 were slightly paler than control. The

results of enzyme assay indicated that the combination of ceftazidime plus either P1 or P5 exhibited β -lactamase type IV inhibition activity compared to others ($p < 0.01$). These results can be concluded that the combination of ceftazidime plus either P1 or P5 showed strong synergistic activity against CREnC strain. These findings provide evidence that ceftazidime plus P1 or P5 can reverse resistance strain to be susceptible to its primary antibiotic. In conclusion, antibacterial and synergistic activities of these fractions when used alone and in combination with ceftazidime may involve three primary mechanisms of actions. Firstly, these plasma fractions show synergistic effect with ceftazidime and may exert to inhibit cell wall synthesis leads to cell shape distortion and cell envelope damage. Secondly, increase in OM and CM permeability of this strain. Thirdly, β -lactamase inhibition. Furthermore, the OMPG associated protein synthesis may be interfered. So, the fractions from Siamese crocodile serum would be offered as a good candidate for the development of a novel valuable adjunct to ceftazidime against *E. cloacae*, which currently almost resistant to practically antibiotics. However, toxicity test in vivo and humans are required. If possible, blood and tissue levels would be achievable to work synergistically.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ขอบเขตของการวิจัย	3
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	3
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	
เอกสารและผลงานที่เกี่ยวข้อง.....	4
แหล่งที่มาของข้อมูล	12
วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล	13
บทที่ 3 ผลการวิจัย	
การสกัดแยกเปปไทด์จากพลาสมาของกระชี่น้ำจืดไทย	21
Bacterial suspensions viable absorption standard curve.....	23
MIC determination.....	26
Checkerboard determination.....	28
Killing curve determinations.....	34
กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM).....	36
การซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (Outer membrane permeability).....	45
การซึมผ่านเยื่อหุ้มชั้นใน (Inner membrane permeability).....	48
Electrophoresis และ SDS-PAGE.....	50
Enzyme assay.....	51
บทที่ 4 อภิปรายและสรุปผลการวิจัย	
การวิเคราะห์และอภิปรายผลการวิจัย	54
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	58

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บรรณานุกรม	59
ภาคผนวก	
ประวัตินักวิจัย	67

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
ตาราง 2.1 การถ่ายทอด genetic material ของแบคทีเรีย.....	10
ตาราง 3.1 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต (MIC)	27
ตาราง 3.2 สรุปค่า FIC ที่ได้จากการทดสอบด้วยวิธี Checkerboard	32

สารบัญภาพ

รูปภาพ	หน้า
รูป 2.1 จระเข้น้ำจืดไทย	4
รูป 2.2 2 จระเข้น้ำเค็ม	4
รูป 2.3 โครงสร้างของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ.....	6
รูป 2.4 โครงสร้างทางเคมีของยา cloxacillin.....	9
รูป 2.5 โครงสร้างทางเคมีของยา ceftazidime.....	9
รูป 2.6 โครงสร้างทางเคมีของยา cefalexin.....	10
รูป 2.7 Bacterial conjugation.....	11
รูป 2.8 การถ่ายทอดสารพันธุกรรมของแบคทีเรีย	12
รูป 3.1 ผล Ion exchange chromatography ของพลาสมาจากจระเข้น้ำจืดไทย	21
รูป 3.2 ผลการทดสอบยืนยันน้ำหนักโมเลกุลของโดยใช้ SDS-PAGE.....	22
รูป 3.3 Standard curve for suspensions of CREnC 21394.....	23
รูป 3.4 Standard curve for suspensions of CREC 20662.....	24
รูป 3.5 Standard curve for suspensions of CSEC 25922.....	24
รูป 3.6 Standard curve for suspensions of MRSA 20651	25
รูป 3.7 Standard curve for suspensions of MSSA 292135.....	25
รูป 3.8 Standard curve for suspensions of <i>Staphylococcus epidermidis</i> DMST 15505	26
รูป 3.9 Isobologram แสดงการออกฤทธิ์เสริมกันระหว่างยา cloxacillin ผสมกับ separated fraction P1 ด้านเชื้อ MRSA 20651.....	29
รูป 3.10 Isobologram แสดงการออกฤทธิ์เสริมกันระหว่างยา cloxacillin ผสมกับ separated fraction P5 ด้านเชื้อ MRSA 20651.....	30
รูป 3.11 Isobologram แสดงการออกฤทธิ์เสริมกันระหว่างยา cloxacillin ผสมกับ separated fraction P1 ด้านเชื้อ CREnC 21394.....	31

สารบัญภาพ (ต่อ)

รูปภาพ	หน้า
รูป 3.12 Isobologram แสดงการออกฤทธิ์เสริมกันระหว่างยา cloxacillin ผสมกับ separated fraction P5 ต้านเชื้อ MRSA 20651.....	32
รูป 3.13 Killing curve of CREnC 21394.....	35
รูป 3.14 Killing curve of MRSA 20651.....	36
รูป 3.15 Ultrathin sections of CREnC 21394 grown in absence of antibacterial agent	37
รูป 3.16 Ultrathin sections of CREnC 21394 grown with P1 (512 mg/mL).	38
รูป 3.17 Ultrathin sections of CREnC 21394 grown with P5 (512 mg/mL).....	39
รูป 3.18 Ultrathin sections of CREnC 21394 grown with Ceftazidime (16 µg/mL)..	40
รูป 3.19 Ultrathin sections of CREnC 21394 grown with Ceftazidime (16 µg/mL) plus P1 (32mg/mL).....	41
รูป 3.20 Ultrathin sections of CREnC 21394 grown with Ceftazidime (16 µg/mL) plus P5 (32mg/mL).....	42
รูป 3.21 21 การเปรียบเทียบขนาดเซลล์ของเชื้อ CREnC 21394.....	44
รูป 3.22 การซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของเชื้อ CREnC 21394.....	46
รูป 3.23 การซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นในของเชื้อ CREnC 21394.....	49
รูป 3.24 ผล SDS-PAGE ที่ได้แสดงโปรตีนที่สัมพันธ์กับ peptidoglycan และเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรีย	51
รูป 3.24 การออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บีต้าแลคเทมเมส ชนิด IV.....	52

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

การแพร่กระจายของเชื้อจุลินทรีย์ (microorganism) ที่ดื้อยาปฏิชีวนะเป็นปัญหาสำคัญทั่วโลก (Liu et al., 2000) ซึ่งเชื้อแบคทีเรียที่พบว่าการดื้อยาบ่อยที่สุด คือ เชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อยา methicillin (Methicillin-resistant *S. aureus*; MRSA) เชื้อกลุ่ม Enterococci ที่ดื้อยา vancomycin (Vancomycin-resistant Enterococci; VRE) รวมไปถึงแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่งที่สามารถสร้างเอนไซม์ บีต้าแลคแทมเมสชนิดขยาย (Extended β -lactamases (ESBL)-producing gram negative rod) ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่าเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวเป็นปัญหาที่สำคัญในระบบสาธารณสุขและมีอุบัติการณ์การดื้อยาของเชื้อดังกล่าวเพิ่มมากขึ้นทั่วโลกในช่วงปีที่ผ่านมา (Emori and Gaynes, 1993; Leclercq and Courvalin, 1997; Moellering, 1998; 2009; Vonberg et al., 2008) สำหรับสถานการณ์การดื้อยาด้านจุลินทรีย์ในปัจจุบันของประเทศไทยพบว่าการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (Chokejindachai, 2007) โรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมาเป็นโรงพยาบาลที่ใหญ่ที่สุดในจังหวัดนครราชสีมาและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยซึ่งพบปัญหาแบคทีเรียดื้อยาในระดับสูงในหลายๆ ภาคส่วนของโรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมา อาทิ หออภิบาลผู้ป่วยหนักสำหรับผู้ป่วยผ่าตัด (Surgical Intensive care unit) พบร้อยละ 90 และหออภิบาลผู้ป่วยหนักสำหรับผู้ป่วยเด็กและเด็กคลอดก่อนกำหนดพบร้อยละ 80 (Maharat Nakhonratchasima hospital, 2012)

เชื้อ MRSA เชื้อ *Escherichia coli* เชื้อ *Staphylococcus epidermidis* เชื้อ *Enterobacter cloacae* และเชื้อ *Enterococcus faecium* เป็นเชื้อก่อโรคที่พบได้บ่อยที่สุด สำหรับเชื้อ MRSA เป็นสาเหตุหลักของการติดเชื้อที่ระบบทางเดินปัสสาวะ (Urinary tract infection) ติดเชื้อบริเวณแผลผ่าตัด ผิวน้ำ และการติดเชื้อที่ระบบทางเดินอาหาร (Isogai et al., 2001; Sundaram et al., 1983; Wang et al., 2003) สำหรับเชื้อ *E. coli* เป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อที่ระบบทางเดินปัสสาวะ โรคลำไส้อักเสบในเด็ก โรคอุจจาระร่วงในผู้ที่เดินทางไปต่างถิ่น (Traveller's diarrhea) และการติดเชื้อในโรงพยาบาล (Nosocomial infection) ในเด็กแรกเกิด (Thammasirak et al., 2006) ในทางเดียวกันการติดเชื้อดื้อยาในโรงพยาบาลในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง ผู้ป่วยโรคเอดส์และผู้ป่วยโรคมะเร็งจะมีความยากลำบากในการรักษาเพิ่มขึ้นอย่างมาก การติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยาหลายขนาน (Multi-drug resistant bacteria) เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งปัจจุบันนี้ทำให้มีต้นทุนสูงในการรักษาโรคติดเชื้อ ดังนั้นการค้นหาด้านจุลินทรีย์ตัวใหม่ เช่น การค้นหาสารต้านจุลินทรีย์ตัวใหม่จากพืชหรือสัตว์ ซึ่งมีความจำเป็นอย่างมากและเป็นจุดประสงค์การวิจัยที่มีความสำคัญและได้รับความนิยมในปัจจุบันเพื่อที่จะนำมาใช้รักษาการติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยา

จระเข้ที่อาศัยอยู่ตามธรรมชาติจะมีการต่อสู้กันสูงทำให้มีอัตราการได้รับบาดเจ็บสูงตามมาแต่กลับพบว่าแผลติดเชื้อแบคทีเรียในสัตว์เหล่านี้พบได้เพียงเล็กน้อยซึ่งสารออกฤทธิ์ที่ด้านการติดเชื้อแบคทีเรียที่มีอยู่ในจระเข้ได้มีรายงานจากการศึกษาจำนวนมากในช่วงปีที่ผ่านมาบางการศึกษาพบว่าเนื้อเยื่อจากปอดและต่อมหมวกไตของจระเข้ *Crocodylians miloticus* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Micrococcus luteus* (Shaharabany et al., 1999) เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Merchant et al. (2003) ที่พบว่าซีรัมจาก American alligator (*Alligator mississippiensis*) มีสเปกตรัมในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบกว้างกว่าซีรัมของมนุษย์อย่างมาก อีกทั้งซีรัมจาก alligator มีฤทธิ์ปานกลางในการยับยั้งเชื้อไวรัสซึ่งสามารถต้านเชื้อไวรัสก่อโรคเริม (Herpes simplex virus type 1; HSV-1) เชื้อไวรัสก่อโรคเอดส์ (Human immunodeficiency virus type 1; HIV-1) เชื้อ West Nile virus (WNV) (Merchant et al., 2005a) การออกฤทธิ์ด้านแบคทีเรียดังกล่าวบางส่วนอาจเนื่องมาจาก complement ของจระเข้จะกระตุ้นการตอบสนองของ Humoral immune response ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Merchant et al., 2006b; Merchant et al., 2005c) แม้ว่าจะมีรายงานว่าซีรัมจาก alligator ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงของแกะแตกตัวแต่การแตกตัวของเม็ดเลือดดังกล่าวสามารถถูกยับยั้งด้วย EDTA, salicydoxime, ammonium hydroxide, methylamine (Merchant et al., 2009a; Merchant et al., 2010; Merchant et al., 2009b; Merchant et al., 2005c) นอกจากนี้ยังพบว่าเปปไทด์จากจระเข้น้ำจืดไทย (*Crocodylus siamensis*) มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในการยับยั้งเชื้อ *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Vibrio cholerae* (Preecharram et al., 2010; Thammasirirak and Daduang, 2004) ยิ่งไปกว่านั้นเซลล์เม็ดเลือดขาวจาก alligator มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา (Antimycotic activity) ซึ่งสามารถต้านได้ถึง 6 ใน 8 สปีชีส์ของเชื้อ *Candida* และมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย 10 ใน 12 ของกลุ่มแบคทีเรีย ผลในการต้านจุลชีพดังกล่าวเป็นผลมาจาก cationic peptides จากเม็ดเลือดขาวมีบทบาทสำคัญในการต้านจุลชีพ (Kommanee et al., 2012; Merchant et al., 2006a; Pata, 2009) นอกจากนั้น สาร nisin ที่เป็นสารต้านจุลชีพในกลุ่ม peptide ดัดใช้เป็นสารถนอมอาหารหลายชนิด จะมีประจุเป็นบวกที่ pH > 7 (Rollet et al., 1995) อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับผลในการต้านแบคทีเรียของพลาสมาจากจระเข้น้ำจืดไทยต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อต่อยาปฏิชีวนะกลุ่มบีต้าแลคแทม เช่น เชื้อ MRSA เชื้อ *S. epidermidis* เชื้อ *E. coli* เชื้อ *E. cloacae* และ *E. faecium* ผู้วิจัยจึงสนใจสาร peptide ที่มีประจุบวกจากพลาสมาจระเข้ดังกล่าว

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรียของ plasma fractions จากจระเข้น้ำจืดไทย (*Crocodylus siamensis*) ในการต้านเชื้อแบคทีเรียคือเมื่อใช้เดี่ยวๆ
2. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรียของ plasma fractions จากจระเข้น้ำจืดไทย

(*Crocodylus siamensis*) เมื่อใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะกลุ่มบีต้าแลคแทมในการต้านเชื้อแบคทีเรียคือ

3. เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์เบื้องต้นของ plasma fractions จากจระเข้ น้ำจืดไทย

(*Crocodylus siamensis*) เมื่อใช้เดี่ยวๆและร่วมกับยาปฏิชีวนะกลุ่มบีต้าแลคแทมในการต้านเชื้อแบคทีเรีย คือ โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscopy:TEM) ศึกษาการซึมผ่านเยื่อหุ้มชั้นนอกและชั้นในของเซลล์แบคทีเรีย วิธี electrophoresis และศึกษาความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์บีต้าแลคแทมเมส (Enzyme assay)

ขอบเขตของการวิจัย

1. Plasma fractions ของจระเข้ น้ำจืดไทย (*Crocodylus siamensis*) ได้รับมาจาก ศรีราชา โมด้า ฟาร์ม อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี ประเทศไทย
2. เชื้อ MRSA เชื้อ *E. cloacae* เชื้อ *S. epidermidis* และเชื้อ *Escherichia coli* (*E. coli*) ที่ได้แยกทางคลินิกได้รับมาจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ สถาบันสุขภาพแห่งชาติ กระทรวงสาธารณสุข ประเทศไทย
3. ยา cloxacillin ยา ceftazidime และยา cephalixin สั่งซื้อมาจากบริษัท Sigma, Bristol-Myers
4. ค่า FIC index ที่คำนวณได้จาก checkerboard assay ที่มีค่าต่ำที่สุดจะถูกเลือกนำมาศึกษาต่อไป เช่น การนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิต (viable count) กล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน การซึมผ่านของเยื่อหุ้มชั้นนอกและชั้นใน การศึกษาด้วย electrophoresis และการศึกษาความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ (Enzyme assay).

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. ได้รับข้อมูลทางวิทยาศาสตร์เพิ่มเติมเกี่ยวกับการเสริมฤทธิ์กัน (synergism) ในการต้านจุลชีพของสารผสมระหว่างเปปไทด์จาก plasma fractions ของจระเข้ น้ำจืดไทย (*Crocodylus siamensis*) และยาปฏิชีวนะเพื่อต้านแบคทีเรียคือยา
2. ได้ทราบความรู้ใหม่ที่สามารถนำไปศึกษาต่อเพิ่มเติม เช่น กลไกการออกฤทธิ์ของเปปไทด์จาก plasma fractions ของจระเข้ น้ำจืดไทย (*Crocodylus siamensis*) ต้านแบคทีเรียคือยาในสัตว์และมนุษย์
3. ผลจากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับการพัฒนายาสู่สูตรผสมขนานใหม่เพื่อต้านเชื้อแบคทีเรียคือยา
4. ผลของการศึกษาจะเป็นประโยชน์กับแพทย์และผู้ป่วยที่ติดเชื้อแบคทีเรียคือยาที่รุนแรงโดยการนำยาสูตรผสมขนานใหม่นี้ไปใช้ในการรักษา

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 เอกสารและผลงานที่เกี่ยวข้อง

ในประเทศไทยมีจระเข้ทั้งหมด 3 สปีชีส์ แต่มีเพียง 2 สปีชีส์เท่านั้นที่มีการนำมาเพาะเลี้ยงในฟาร์ม ได้แก่ จระเข้แม่น้ำจืดไทย (*Crocodylus siamensis*) (รูป. 2.1) และจระเข้แม่น้ำเค็ม หรือ Estuarine crocodile (*Crocodylus porosus*) (รูป. 2.2) จระเข้แม่น้ำจืดไทยเป็นจระเข้ที่อาศัยอยู่ในประเทศอินโดนีเซีย บรูไน มาเลเซียทางตะวันออก ลาว กัมพูชา พม่า ไทย และเวียดนาม เป็นจระเข้ที่ดุร้ายและเป็นอันตรายเคลื่อนที่ช้า อาศัยอยู่ตามหนองน้ำ แม่น้ำ และทะเลสาบบางแห่ง ขนาดตัวโตเต็มที่จะมีความยาวไม่เกิน 3 เมตร (10 ฟุต) แต่สำหรับสายพันธุ์ลูกผสมนั้นจะมีขนาดใหญ่กว่ามาก การล่าและการสูญเสียถิ่นที่อยู่อาศัยจำนวนมากส่งผลให้จระเข้สายพันธุ์นี้มีความดุร้าย ประชากรของจระเข้สายพันธุ์นี้ที่อาศัยอยู่ตามธรรมชาติมีอยู่ประมาณน้อยกว่า 5,000 ตัว



รูป 2.1 จระเข้แม่น้ำจืดไทย

ที่มา: ศรีราชา โมคำ ฟาร์ม อ. ศรีราชา จ.ชลบุรี



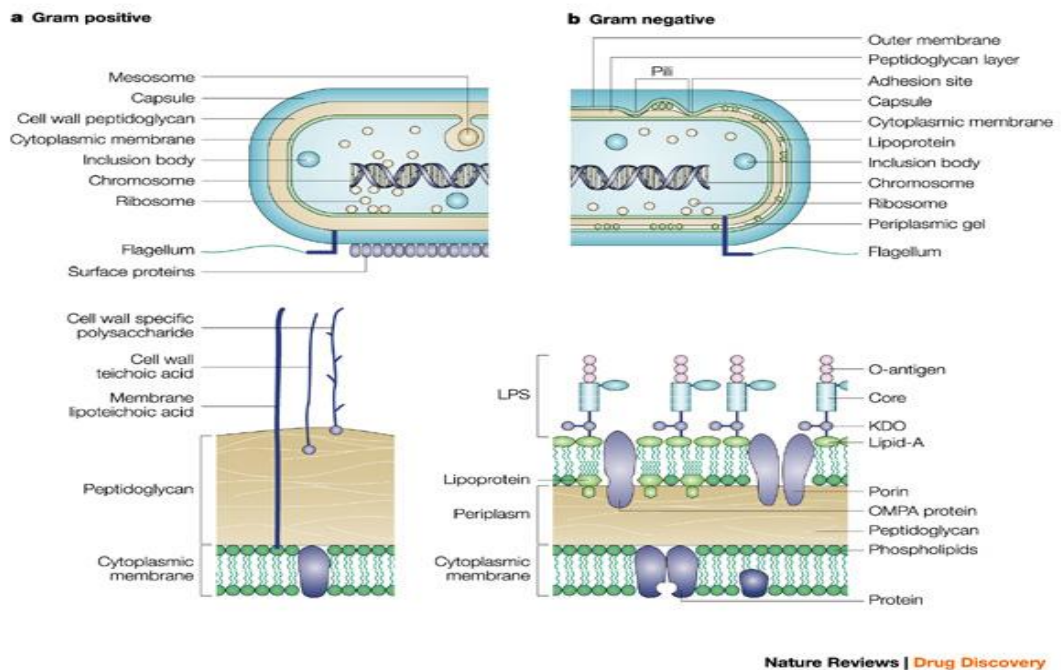
รูป 2.2 จระเข้แม่น้ำเค็ม

ที่มา: <http://www.itsnature.org>

จระเข้ยังจะมีการต่อสู้กันบ่อยทำให้ได้รับบาดเจ็บที่รุนแรงแต่แผลบาดเจ็บดังกล่าวดูเหมือนจะไม่มีอาการติดเชื้อเกิดขึ้นแม้ว่าได้ต่อสู้กันในพื้นที่สกปรก การค้นพบที่ผ่านมามีรายงานว่าจระเข้มีระบบภูมิคุ้มกันที่แข็งแกร่งอย่างมากที่สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียที่เรียกว่า เชื้อ MRSA ด้วยเหตุนี้เนื้อเยื่อจากจระเข้จึงอาจมีความสำคัญทางการแพทย์ที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อในมนุษย์ การศึกษาของ Merchant et al. (2003) พบว่าสเปกตรัมในการต้านแบคทีเรียของซีรัมจาก alligator กว้างกว่าซีรัมของมนุษย์ และการศึกษาต่อมาพบว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้สกัดแยกจาก alligator มีความสามารถในการต้านเชื้อรา เชื้อไวรัส และเชื้อแบคทีเรียโดยการกระตุ้นระบบ complement ผ่านทาง alternative pathway ซึ่งเป็นการตอบสนองเบื้องต้นในการออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย (Merchant et al., 2006a; Merchant et al., 2005a; Merchant et al., 2005b) จากการศึกษาของ Leelawongtawon et al. (2010)

พบว่าซีรัมปกติและซีรัมที่ถูกทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dried) จากกระเจี๊ยบเขียวไทยมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบหลายตัว อาทิ เชื้อ *E. coli* เชื้อ *Klebsiella pneumoniae* เชื้อ *Enterobacter aerogenes* เชื้อ *Salmonella typhimurium* และเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ขณะเดียวกัน Preecharram et al. (2008) ได้รายงานสเปกตรัมในการดักจับแบคทีเรียของ Crocosin VI ที่ได้สกัดแยกและทำให้บริสุทธิ์จากพลาสมาของกระเจี๊ยบเขียวไทยด้วยวิธี membrane filter และ reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) ผลการศึกษาพบว่า Crocosin VI มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Salmonella typhi* และ *S. aureus* นอกจากนี้จากการศึกษาของ Pata (2009) พบว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวสกัดจากกระเจี๊ยบเขียวไทยมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและต้านเชื้อราซึ่งได้สอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาที่พบว่าเปปไทด์จากกระเจี๊ยบเขียวไทยมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. typhi* เชื้อ *K. pneumoniae* เชื้อ *S. aureus* เชื้อ *S. epidermidis* เชื้อ *E. coli* เชื้อ *P. aeruginosa* และเชื้อ *Vibrio cholerae* ผลในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชืวดังกล่าวอาจเนื่องมาจากเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุล (MW) ระหว่าง 5-75 kDa (Preecharram et al., 2008; Thammasirirak and Daduang, 2004)

โครงสร้างหลักของแบคทีเรียที่สำคัญประกอบด้วย 1) เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นใน (cytoplasmic or inner membrane) เป็นส่วนประกอบที่พบทั้งในแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบซึ่งประกอบด้วยโปรตีนไขมัน ฟอสโฟลิพิด และคาร์โบไฮเดรต ทำหน้าที่เป็นตัวกั้นการเข้าออกของสาร การทำงานของไซโตโครม ช่วยในการขนส่งสาร และสร้างแรงในการขับเคลื่อนที่ของโปรตรอน (proton motive force) อีกทั้งยังเป็นที่อยู่ของเอนไซม์ transpeptidase และ carboxypeptidase ที่ทำหน้าที่เป็นตัวตั้งต้นและทำให้เกิดการ crosslink ของ peptidoglycan (รูป 2.3) 2) Periplasm เป็นช่องว่างระหว่างเยื่อหุ้มชั้นนอกและเยื่อหุ้มชั้นในของแบคทีเรียแกรมลบซึ่งผนังเซลล์จะอยู่ในส่วนนี้ ขณะเดียวกัน periplasm ยังเป็นที่อยู่ของเอนไซม์บีต้าแลคแทมเมสซึ่งสามารถทำลายยาปฏิชีวนะกลุ่มบีตาแลคแทม และมีโปรตีนที่สำคัญที่ช่วยในการขนส่งสารเข้าออกเซลล์ 3) ชั้น Peptidoglycan จะมี teichoic acid และ lipoteichoic acid แทรกอยู่ (สำหรับแกรมลบไม่มี teichoic acid และ lipoteichoic acid) ซึ่งช่วยให้เซลล์คงรูปและช่วยควบคุมแรงดันออสโมติกให้คงที่ แบคทีเรียแกรมบวกจะมีชั้น Peptidoglycan หนากว่าแบคทีเรียแกรมลบ 4) เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (Outer membrane) จะพบเฉพาะในแบคทีเรียแกรมลบเท่านั้นซึ่งจะมี porins และโปรตีนที่มีคุณสมบัติคล้าย porins ที่ทำหน้าที่ยอมให้เฉพาะบางโมเลกุลหรือจำกัดเฉพาะบางโมเลกุลในการผ่านเข้า-ออก ทั้งนี้องค์ประกอบที่มีความสำคัญทางคลินิกอย่างมาก คือ เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกที่เรียกว่า lipopolysaccharide (LPS) ซึ่งจะทำให้เกิด endotoxin (รูป 2.3) (Walker, 1999)



รูป 2.3 โครงสร้างของแบคทีเรียแกรมบวก (a) และแกรมลบ (b)

การวิจัยครั้งนี้ได้ทดสอบประสิทธิภาพของ plasma fractions จากกระเจ้าน้ำจืดไทยต่อเชื้อ *E. cloacae* เชื้อ *S. aureus* เชื้อ *S. epidermidis* และเชื้อ *E. coli* สำหรับเชื้อ *E. cloacae* เป็นแบคทีเรียแกรมลบอยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae สามารถเจริญได้ทั้งที่มีและไม่มีออกซิเจนและสามารถใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อ *E. cloacae* เป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญที่สุดตัวหนึ่งที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในโรงพยาบาล (Nosocomial infection) และอุบัติการณ์การติดเชื้อตัวนี้เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องโดยเฉพาะในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องหรือผู้ที่ร่างกายอ่อนแอ เชื้อ *E. cloacae* เป็นเชื้อฉวยโอกาสในผู้ที่มีแผล แผลไฟไหม้ และเป็นสาเหตุของการติดเชื้อที่ระบบทางเดินปัสสาวะ และบางครั้งเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในกระแสเลือดและเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (Shimeld and Rodgers, 1999) ตั้งแต่มีได้เริ่มนำยา piperacillin มาใช้ในโรงพยาบาลเพื่อรักษาการติดเชื้อ *E. cloacae* ก็พบว่าเชื้อตัวนี้มีการดื้อต่อยา piperacillin (Jang and Nishijima, 1990; Namavar et al., 1997) การดื้อยาของเชื้อ *E. cloacae* ต่อยาปฏิชีวนะกลุ่มบีต้าแลคแทมมีสาเหตุหลักมาจากการสร้างเอนไซม์บีต้าแลคแทมเมสจาก chromosome encoding ampC gene ซึ่งยีนนี้ถูกควบคุมโดย ampR และ ampD region ซึ่งการกลายพันธุ์ที่ ampD region จะทำให้มีการสร้างเอนไซม์บีต้าแลคแทมเมสเพิ่มมากขึ้น (Huber, 2002)

เชื้อ *S. aureus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลมอยู่ในวงศ์ Staphylococcaceae เป็นเชื้อที่สำคัญที่สุดตัวหนึ่งทางด้านสาธารณสุขทั่วโลกและเป็นสาเหตุทำให้เกิดอาหารเป็นพิษ โดยปกติเชื้อ *S. aureus* เป็นเชื้อประจำถิ่นที่อาศัยอยู่บริเวณผิวหนังและในเยื่อเมือกบริเวณ nasopharynx ของมนุษย์ (Genigeorgis, 1989) เชื้อ *S. aureus* เป็นสาเหตุให้เกิดแผลติดเชื้อและเป็นหนอง (Suppuration) รวมไปถึงแผลที่ผิวหนัง

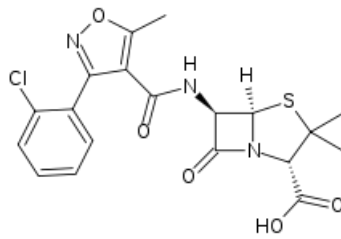
ปอดอักเสบ (pneumonia) เต้านมอักเสบ (mastitis) หลอดเลือดดำอักเสบ (phlebitis) เชื้อหุ้มสมองอักเสบ (meningitis) การติดเชื้อที่ระบบทางเดินปัสสาวะ โรคกระดูกอักเสบ (osteomyelitis) และเชื้อหุ้มหัวใจอักเสบ (endocarditis) เชื้อ *S. aureus* เป็นสาเหตุหลักของการติดเชื้อในโรงพยาบาลและการติดเชื้อที่มาจากร่างกายมนุษย์ ปัจจุบันพบว่าเชื้อตัวนี้คือตัวยากลุ่ม penicillin เช่น คีโตยา methicillin ซึ่งเกิดจากยีน *mecA* ที่สร้าง penicillin binding protein ทำให้ความสามารถในการจับของยาปฏิชีวนะกลุ่มบีต้าแลคแทมกับ penicillin binding protein ของแบคทีเรียลดลง (Hiramatsu et al., 2001)

เชื้อ *S. epidermidis* เป็นเชื้อประจำถิ่นที่อาศัยอยู่ตามผิวหนังของคนปกติแต่อย่างไรก็ตามก็เป็นสาเหตุที่สำคัญของการติดเชื้อในโรงพยาบาลเป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อในกระแสเลือด การติดเชื้อที่ระบบหัวใจและหลอดเลือดรวมถึงการติดเชื้อที่ตา หู จมูก และคอ เชื้อ *S. epidermidis* มักจะเป็นเชื้อก่อโรคในผู้ป่วยที่มีร่างกายอ่อนแอ เช่น ผู้ติดสารเสพติด และผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ (ผู้ป่วยที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน ผู้ป่วยโรคเอดส์ และเด็กที่คลอดก่อนกำหนด) การติดเชื้อตัวนี้มักเข้าสู่ร่างกายผ่านทางสายสวนภายในหลอดเลือดดำ (intravascular catheter) (Lim and Webb, 2005) การดื้อยาของเชื้อ *S. epidermidis* พบว่ามีการดื้อยาปฏิชีวนะที่ใช้อยู่ในปัจจุบันเป็นจำนวนมากรวมถึงยา methicillin การดื้อยาดังกล่าวเกิดจากยีน *mecA* และตัวควบคุมของมันที่อยู่บนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เรียกว่า *Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec)* สำหรับตัวกำหนดการดื้อยา methicillin นั้นเกิดจาก *SCCmec* จะขนส่งชุดของ recombinases และชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สามารถเคลื่อนที่ได้ (mobile DNA element) เช่น transposons และการแทรกลำดับเบสหรือการไปรวมกับพลาสมิด (Kozitskaya et al., 2004) ปัจจุบันมี *SCCmec* 5 ชนิดที่สามารถระบุได้ซึ่งมีขนาดอยู่ในช่วง 21-67 KDa การศึกษาล่าสุดเกี่ยวกับการกระจายของ *SCCmec* พบว่าเชื้อ *S. epidermidis* มี *SCCmec* ทุกชนิด (Wisplinghoff et al., 2003) ยิ่งไปกว่านั้นพบว่า *SCCmec* สามารถถ่ายทอดระหว่างสปีชีส์ *Staphylococcal* ได้ นอกจากนั้นยังพบว่าเชื้อ *S. epidermidis* สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ซึ่งเป็นสาเหตุที่สำคัญที่ทำให้เกิดการดื้อยาและทำให้การรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อตัวนี้มีความยากลำบากมากขึ้น (Ziebuhr et al., 2006)

เชื้อ *E. coli* เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่งอยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae แบคทีเรียชนิดนี้สามารถเจริญได้ทั้งที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) เป็นแบคทีเรียที่มีการศึกษามากที่สุดตัวหนึ่งอีกทั้งยังมีสปีชีส์ที่หลากหลายและเด่นชัดเนื่องจากเชื้อ *E. coli* บางสายพันธุ์อาศัยอยู่แบบพึ่งพาอาศัยกันในลำไส้ของสัตว์โดยไม่เป็นอันตรายต่อสัตว์ ขณะที่บางสายพันธุ์ก่อให้เกิดโรคเกี่ยวกับลำไส้ โรคเลือดออกในลำไส้ สร้างพิษที่มีผลต่อลำไส้ ซึ่งแบคทีเรียสายพันธุ์นี้เป็นตัวก่อโรคที่สำคัญในมนุษย์ เช่น ท้องเสีย การติดเชื้อที่ระบบทางเดินปัสสาวะ การติดเชื้อระบบทางเดินหายใจและในกระแสเลือด เชื้อ *E. coli* บางสายพันธุ์สามารถนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อนของน้ำ สำหรับเชื้อ *E. coli* ที่อาศัยอยู่นอกลำไส้จะเป็นกลุ่มที่เป็นอันตรายต่อชีวิต (Hooton and Stamm, 1997) เชื้อ *E. coli* เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นของลำไส้ส่วนล่างของสัตว์เลือดอุ่นโดยปกติเชื้อชนิดนี้จะเข้าอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารของเด็กทารก

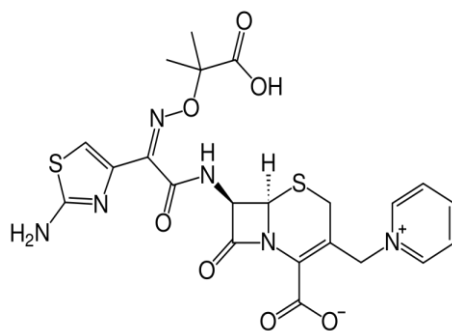
ภายใน 40 ชั่วโมงหลังคลอดซึ่งจะมาพร้อมกับอาหารหรือน้ำหรือมาพร้อมกับคนที่สัมผัสกับเด็กโดยจะไปที่เกาะที่เยื่อเมือกของผนังลำไส้ใหญ่โดยปกติแล้วเชื้อ *E. coli* จะไม่ก่อโรคแต่ถ้าได้รับปัจจัยต่างๆ ที่ทำให้เชื้อชนิดนี้ก่อโรคจะทำให้เกิดลำไส้อักเสบ การติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ และเยื่อหุ้มสมองอักเสบในเด็กทารก และบางโรคที่พบได้ไม่บ่อย เช่น haemolytic-uremic syndrome (HUS) เยื่อช่องท้องอักเสบ ต้านมอักเสบ ติดเชื้อในกระแสเลือด ปอดอักเสบ สำหรับยาปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli* ได้แก่ ยากลุ่ม sulfonamides ยา ampicillin ยากลุ่ม cephalosporins ยา chloramphenicol ยากลุ่ม tetracyclines และยากลุ่ม aminoglycosides นอกจากนี้ยา sulfamethoxazole-trimethoprim และยา ciprofloxacin จะมีประสิทธิภาพอย่างมากในการรักษาการติดเชื้อในระยะเริ่มต้น (Shimeld and Rodgers, 1999) อย่างไรก็ตามมีรายงานการดื้อยาของเชื้อ *E. coli* พบว่าเชืวดังกล่าวมีการดื้อต่อยากลุ่ม penicillins และยากลุ่ม cephalosporins เช่น ยา ceftazidime (Maharat Nakhonratchasima hospital, 2012) การดื้อยากลุ่ม fluoroquinolones ของเชื้อ *E. coli* นั้นเกิดจากการสร้างเอนไซม์บีต้าแลคแทมเมสชนิดขยาย (Extended-spectrum β -lactamase) และการดื้อยาหลายขนานของเชืวดังนี้กำลังกลายเป็นปัญหาที่ต้องตระหนักและให้ความสำคัญ (Garau et al., 1999)

ยาปฏิชีวนะกลุ่มบีต้าแลคแทมเป็นยาต้านจุลชีพที่ถูกนำมาใช้กันอย่างกว้างขวางในทางคลินิก เพราะมีประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรียสูงโดยออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ peptidoglycan ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ (Laurence et al., 2006) โครงสร้างพื้นฐานของยาปฏิชีวนะกลุ่มบีต้าแลคแทมประกอบด้วย 5-membered thiazolidine ring เชื่อมติดกับ β -lactam ring ยาปฏิชีวนะแต่ละตัวในกลุ่มนี้จะมีความแตกต่างกันที่ side chain (R-group) (Tenover, 2006) ยาปฏิชีวนะกลุ่มบีต้าแลคแทมประกอบด้วย 4 กลุ่มย่อย ได้แก่ กลุ่ม penicillin กลุ่ม cephalosporins กลุ่ม carbapenems และกลุ่ม monobactams สำหรับยากลุ่ม penicillin เป็นยาปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพครอบคลุมมากที่สุดและมีความเป็นพิษน้อยที่สุดขนานหนึ่ง อาการไม่พึงประสงค์ที่สำคัญที่เกิดจากการใช้ยากลุ่ม penicillins คือ การแพ้ยา ยาที่ถูกจัดในกลุ่มนี้จะมีความแตกต่างกันที่ side chain ที่เกาะกับ 6-aminopenicillanic acid residue ซึ่งความแตกต่างของ side chain นี้จะส่งผลให้ความสามารถในการออกฤทธิ์ของยาที่ครอบคลุมเชื้อต่างๆ ความคงทนต่อกรดในกระเพาะอาหาร และความไวต่อการถูกทำลายจากเอนไซม์บีต้าแลคแทมเมสมีความแตกต่างกัน ด้วย ยา cloxacillin เป็นยาที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม penicillin ซึ่งถูกนำมาใช้รักษาการติดเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Staphylococci ที่สามารถผลิตเอนไซม์บีต้าแลคแทมเมส ยา cloxacillin จะออกฤทธิ์ขัดขวางการสังเคราะห์ผนังเซลล์โดยจับกับ penicillin binding protein ที่อยู่ด้านในผนังเซลล์ของแบคทีเรียซึ่งยาจะยับยั้งในระยะที่ 3 และระยะสุดท้ายของการสังเคราะห์ผนังเซลล์ส่งผลให้เซลล์แตกตัว



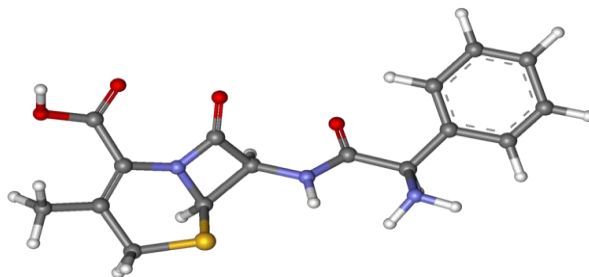
รูป 2.4 โครงสร้างทางเคมีของยา cloxacillin

ยาในกลุ่ม cephalosporins มีคุณสมบัติคล้ายกับยาในกลุ่ม penicillins แต่มีความคงทนต่อเอนไซม์บีต้าแลคแทมเมสได้หลายชนิดมากกว่า และออกฤทธิ์ครอบคลุมมากกว่ากลุ่ม penicillins อย่างไรก็ดีตามเชื้อ *E. coli* และเชื้อ *Klebsiella* ที่สามารถสร้างเอนไซม์บีต้าแลคแทมเมสชนิดขยาย (extended-spectrum β -lactamases) ที่มีความรุนแรงกว่าเอนไซม์บีต้าแลคแทมเมสทั่วไปซึ่งสามารถทำลายยาในกลุ่ม cephalosporins และเอนไซม์ชนิดนี้กำลังกลายเป็นปัญหาสำคัญในปัจจุบัน ยาในกลุ่ม cephalosporins ไม่สามารถออกฤทธิ์ต้านเชื้อ enterococci และ *L. monocytogenes* (Katzung, 2006) ยา ceftazidime เป็นยาในกลุ่ม cephalosporins รุ่นที่ 3 ซึ่งเป็นยาทั้งสังเคราะห์ที่ออกฤทธิ์ครอบคลุมเชื้อหลายตัวและเป็นยาสำหรับฉีดมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (bactericidal activity) โดยยับยั้งเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์ผนังเซลล์ซึ่งมีฤทธิ์ครอบคลุมทั้งแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก รวมไปถึงแบคทีเรียที่ดื้อต่อยา gentamicin และกลุ่ม aminoglycosides ตัวอื่นๆ ยา ceftazidime มีความคงทนต่อเอนไซม์บีต้าแลคแทมเมสอย่างมากและสามารถออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ดื้อต่อยา ampicillin และยาในกลุ่ม cephalosporins ตัวอื่นๆ ได้เช่นเดียวกัน อีกทั้งยา ceftazidime สามารถต้านเชื้อ *Pseudomonas* และเชื้อในวงศ์ Enterobacteriaceae ซึ่งการออกฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Pseudomonas* เป็นจุดเด่นของยา ceftazidime ที่แตกต่างจากยาในกลุ่ม cephalosporins ตัวอื่นๆ ยา ceftazidime มีฤทธิ์ในการฆ่าแบคทีเรียโดยการยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์โดยการจับกับ penicillin-binding proteins (PBPs) (Brunton et al., 2011) สำหรับโครงสร้างทางเคมีของยา ceftazidime แสดงในรูป 2.5



รูป 2.5 โครงสร้างทางเคมีของยา ceftazidime

ยา cefalexin หรือ cephalixin (รูป 2.6) เป็นยาในกลุ่ม cephalosporins รุ่น 1 เป็นยาปฏิชีวนะที่ถูกนำมาใช้บ่อยที่สุดตัวหนึ่งโดยมักจะนำมาใช้รักษาการติดเชื้อที่ผิวหนังที่เป็นผลมาจากภาวะแทรกซ้อนจากแผลหรือแผลฉีกขาด ยา cefalexin จะมีประสิทธิภาพในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก

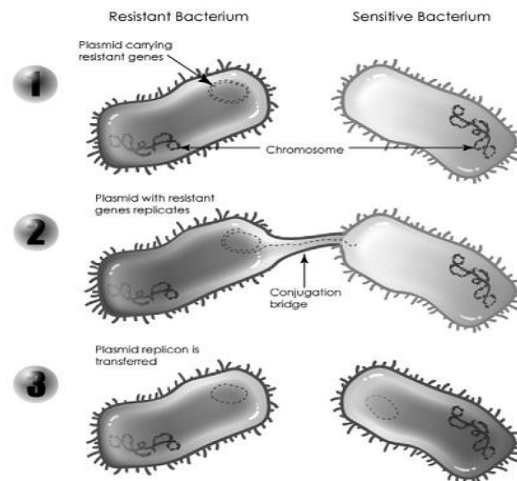


รูป 2.6 โครงสร้างทางเคมีของยา cefalexin

อย่างไรก็ตามยาปฏิชีวนะกลุ่มบีต้าแลคแทมไม่สามารถฆ่าหรือยับยั้งแบคทีเรียได้ทุกชนิดเพราะแบคทีเรียมีกลไกหลายที่ต่อต้านดังกล่าว เช่น มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ penicillin binding proteins (PBPs) ซึ่งเป็นเป้าหมายของยาในกลุ่มบีต้าแลคแทม นอกจากนั้นแบคทีเรียที่ไวต่อยาปฏิชีวนะอาจจะพัฒนา PBPs ให้มีน้ำหนักโมเลกุลสูงขึ้นเพื่อให้การจับกับยาปฏิชีวนะลดลง (Brunton et al., 2011) แบคทีเรียมีการป้องกันตนเองจากยาปฏิชีวนะทำให้ไม่ตอบสนองต่อยาปฏิชีวนะ การดื้อยาเบื้องต้นนี้เกิดจากการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติซึ่งเหตุการณ์นี้เกิดขึ้นน้อยและการดื้อยาอาจจะถูกถ่ายทอดไปยังลูกหลาน อย่างไรก็ตามแบคทีเรียมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ดังนั้นลูกหลานของแบคทีเรียที่ดื้อยาจะได้รับการถ่ายทอดยีนดื้อยา สำหรับการดื้อยาขั้นที่สองจะต้องถ่ายทอดสารพันธุกรรมระหว่างแบคทีเรียชนิดเดียวกันหรือต่างชนิดกันผ่านกระบวนการ transduction, transformation และ conjugation (ตาราง 2.1) การแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมจะมีการสร้าง conjugation bridge จากแบคทีเรียชนิดเดียวกันหรือต่างชนิดกัน (รูป 2.7) สำหรับยีนดื้อยาในพลาสมิด หรือ transposons อาจมีการถ่ายทอดยีนดื้อยาหลายขนาน (multidrug resistance) หรือยีนที่ทำให้ดื้อต่อยาตัวหนึ่งแล้วทำให้ดื้อต่อยาตัวอื่นด้วย (cross-resistance)

ตาราง 2.1 การถ่ายทอด genetic material ของแบคทีเรีย Roe (2008)

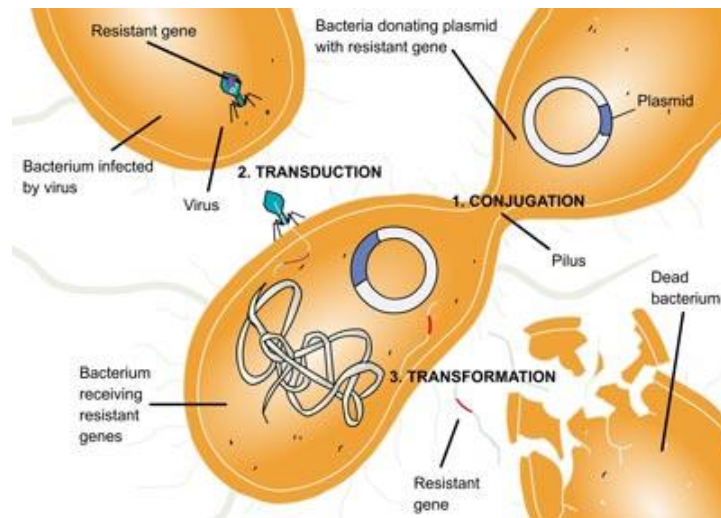
การถ่ายทอด genetic material ของแบคทีเรีย	
Transduction	ไวรัสเป็นตัวพา genetic material จากแบคทีเรียตัวหนึ่งไปยังแบคทีเรียอีกตัวหนึ่ง
Transformation	แบคทีเรียได้รับ genetic material จากการกินแบคทีเรียที่ตายแล้ว
Conjugation (most common)	แบคทีเรียแลกเปลี่ยนและถ่ายทอด genetic material ผ่านทาง plasmid



รูป 2.7 Bacterial conjugation. (Roe, 2008)

การดื้อยาของแบคทีเรียอาจเกิดขึ้นโดย 9 กลไกที่สำคัญ ดังนี้ 1) แบคทีเรียมีการเอนไซม์ขึ้นมาเพื่อทำลายยา เช่น เอนไซม์บีต้าแลคแทมเมส ที่สามารถทำลายวงบีต้าแลคแทม (β -lactam ring) ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่แบคทีเรียดื้อต่อยากลุ่ม penicillins และยากลุ่ม cephalosporins การตรวจสอบหาเอนไซม์ดังกล่าวทำได้โดยการศึกษาลำดับยีนหรือการเรียงสายโปรตีน (Livermore and Brown, 2001) 2) การปรับเปลี่ยนไรโบโซมโดยการหม่เมทิลเพื่อให้ยาปฏิชีวนะไม่สามารถจับกับไรโบโซมได้ (Tenover, 2006) 3) การตัดแปลงโปรตีน เช่น ยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ที่เอนไซม์ DNA gyrase แบคทีเรียอาจจะทำให้การทำงานของเอนไซม์ gyrase เปลี่ยนไปและทำให้แบคทีเรียไม่มีความจำเพาะต่อยาปฏิชีวนะ นอกจากนี้ Penicillin-binding protein (PBPs) ที่เกิดขึ้นในผนังเซลล์ของแบคทีเรียซึ่งมีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์ peptidoglycan โดยปกติยาปฏิชีวนะกลุ่มบีต้าแลคแทมจะจับกับ PBPs ของแบคทีเรียได้เป็นอย่างดีแต่ยาปฏิชีวนะจะจับกับ PBPs ของเชื้อ MRSA ได้ลดลงเนื่องจากมียีน *mecA* ที่สามารถสร้าง PBP2a (Tenover, 2006) 4) การตัดแปลงกระบวนการเมทาบอลิซึมซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของการดื้อยา โดยเฉพาะยา กลุ่ม sulfonamides ซึ่งออกฤทธิ์ขัดขวางเอนไซม์ที่มีหน้าที่สร้างกรดโฟลิก การดื้อยาในกลุ่มนี้เกิดขึ้นได้โดยเปลี่ยนแปลงเอนไซม์เพื่อป้องกันการจับของยา sulfonamide ทำให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ (Tenover, 2006) 5) แบคทีเรียมีการสร้างปั๊มเพื่อเอายาปฏิชีวนะออกนอกเซลล์ (Efflux pumps) ซึ่งเป็นกลไกที่สำคัญอย่างมากในการดื้อยาของแบคทีเรียเพราะว่าปั๊มจะจดจำสารต่างๆ ได้หลากหลาย ซึ่งกลไกเหล่านี้พบในแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญๆ และกลไกนี้สามารถเกิดขึ้นร่วมกับกลไกการดื้อยาอื่นได้เช่นกัน (Moreira et al., 2004) ตัวอย่างเช่น เชื้อแบคทีเรีย *enterococci* สามารถปั๊มยา tetracyclin ออกนอกเซลล์ได้ การปั๊มยาออกชนิดนี้ออกเรียกว่า efflux phenomenon (Tenover, 2006) 6) แบคทีเรียได้รับยีนดื้อยาอันใหม่จากแบคทีเรียดื้อยาชนิดอื่นๆ ซึ่งกระบวนการนี้ว่า *Horizontal evolution* และอาจจะเกิดขึ้นระหว่างสปีชีส์และต่างสปีชีส์หรือต่างสกุล (genera) การแลกเปลี่ยนยีนประกอบด้วย

conjugation, transduction และ transformation (รูป 2.8) ทำให้แบคทีเรียที่ได้รับยีนนั้นกลายเป็นแบคทีเรียที่ต่อต้านยาปฏิชีวนะหลายขนาน (Roe, 2008; Tenover, 2006)



รูป 2.8 การถ่ายทอดสารพันธุกรรมของแบคทีเรีย (<http://www.wiley.com/college/>)

2.2 แหล่งที่มาของข้อมูล

2.2.1 พลาสมาของจระเข้ (Crocodile plasma)

เลือดจากจระเข้แม่น้ำจืดไทย (*Crocodylus siamensis*) ได้รับมาจากศรีราชา โมด้า ฟาร์ม อ. ศรีราชา จ. ชลบุรี ประเทศไทย จำนวน 40 ตัว ทั้งเพศผู้และเพศเมียซึ่งมีสุขภาพดีน้ำหนักประมาณ 25 กิโลกรัม อายุระหว่าง 2-4 ปี และได้รับการพิสูจน์ว่าเป็นจระเข้แม่น้ำจืดไทย (*Crocodylus siamensis*) โดยสัตวแพทย์ชำนาญการประจำศรีราชา โมด้า ฟาร์ม ซึ่งได้ขึ้นทะเบียนเป็นสถาบัน Commercial captive breeding institution with Convention on International Trade in Endangered Species (CITES) เพื่อที่เพาะพันธุ์จระเข้แม่น้ำจืดไทย สำหรับขั้นตอนการทดลองกับสัตว์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้รับการอนุมัติตามแนวปฏิบัติสำหรับการใช้และการดูแลสัตว์ทดลองโดยคณะกรรมการใช้และการดูแลสัตว์ทดลอง (ACUC) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (เลขที่ใบอนุญาต 30/2553)

2.2.2 แบคทีเรียที่นำศึกษา

แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษานี้ประกอบด้วย เชื้อ *E. cloacae* ที่ต่อต้านยา ceftazidime DMST 21394 (ceftazidime-resistant *E. cloacae*; CREnC) เชื้อ *E. coli* ที่ต่อต้านยา ceftazidime DMST 20662 (ceftazidime-resistant *E. coli*; CREC) เชื้อ *E. coli* ATCC 25922 เชื้อ MRSA DMST 20651 เชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 และเชื้อ *S. epidermidis* DMST 15505 เชื้อดังกล่าวได้รับมาจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ สถาบันสุขภาพแห่งชาติ กระทรวงสาธารณสุข ประเทศไทย และรับมาจาก the American Type Culture Collection (ATCC) ประเทศสหรัฐอเมริกา

สำหรับการเตรียมและเก็บรักษา stock culture ซึ่งเตรียมโดยการเลี้ยงแบคทีเรียดังกล่าวในหลอดที่มีอาหาร nutrient agar และบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C หลังจากนั้นนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C ซึ่งเชื้อแบคทีเรียทุกตัวจะเตรียมและต่อเชื้อใหม่ ทุกๆ 3-4 สัปดาห์ (Eumkeb, 1999)

1. ยาปฏิชีวนะกลุ่มเบต้าแลคแทมที่ศึกษา

ยา ceftazidime ยา cloxacillin และยา cefalexin ได้รับมาจาก Sigma, Bristol-Myers

2. อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ

อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในการศึกษครั้งนี้ประกอบด้วย Nutrient agar, Mueller-Hinton broth และ Mueller-Hinton agar ซึ่งอาหารดังกล่าวได้สั่งซื้อมาจากบริษัท Oxoid

2.3 วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล

2.3.1 การสกัดแยกโปรตีนจากพลาสมาของจระเข้บ้านจืดไทย

เลือดจระเข้บ้านจืดไทยถูกเก็บด้วยการดูดจากเส้นเลือดดำ paravertebral จาก anterior dorsal sinus ประมาณ 40 มล. และถูกย้ายไปที่หลอด EDTA และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ทั้งไว้ทั้งคืนหลังจากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 4000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้ได้พลาสมาและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 °C จนกระทั่งนำมาทดสอบ

นำพลาสมาที่ได้มาสกัดแยกด้วยวิธี Ion exchange chromatography โดยการเจือจางพลาสมา (1:3) ใน Tris-HCl ที่ความเข้มข้น 15 mM pH 8.1 และกรองด้วย membrane filter ขนาด 0.45 μ m หลังจากนั้นนำไปแยกด้วย Econo-Column chromatography 1 x 50 ซม. ร่วมกับ Q sepharose fast flow column ที่ได้ปรับความเที่ยงตรง (equilibration) ด้วย Tris-HCl ที่ความเข้มข้น 15 mM pH 8.1 แล้วชะล้าง (elution) ด้วย NaCl ตามความชัน หลังจากนั้นกำจัดเกลือออกโดยใช้ dialysis membrane (pore 6 , หนา 38 มม. และเส้นผ่านศูนย์กลาง 24 มม.) ทำให้ได้ protein fractions แล้วนำไปวัด spectrophotometer ที่ 280 นาโนเมตร และทดสอบน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้ SDS-PAGE

นำ protein fraction ที่ได้จาก Ion exchange chromatography มาสกัดแยกด้วยวิธี Gel filtration chromatography โดยการนำโปรตีนที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียมาเทรวมกันแล้วนำไปทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Lyophilized) นำตัวอย่างที่ถูกทำให้แห้งไปละลายในน้ำ 1 มล. แล้วนำไปใส่ใน Sephadex G-50 gel filtration column (Superfine, Amersham Bio-sciences, 2.5 x 100 ซม.) ปรับความเที่ยงตรงด้วย 0.1 % trifluoroacetic acid (TFA) แล้วชะล้างด้วย 60% acetonitrile ใน 0.1 % TFA นำ blue dextran และ bromophenol blue มาใช้เป็นตัวบ่งชี้ (Indicator) เพื่อเลือก fraction ที่มีขนาดเล็กแล้วนำไปวัดด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ 280 นาโนเมตร หลังจากนั้นกำจัดเกลือด้วย dialysis membrane เพื่อให้ได้ separated fractions (Thammasirak and Daduang, 2004)

2.3.2. การเตรียมสารและเตรียมเชื้อที่ทดสอบ

ยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ประกอบด้วย cloxacillin ยา ceftazidime และยา ceflexin ซึ่งเตรียมโดยการละลายในน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (sterile water) สำหรับการเตรียมสารละลาย separated fraction P1, P2, P3, P4 และ P5 จากพลาสมาของจระเข้ น้ำจืดไทยเตรียมโดยการละลายในน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อและเจือจางด้วยวิธี two fold dilution เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการใช้ในการศึกษา

นำแบคทีเรียที่ศึกษาไปเพาะเลี้ยงในอาหาร nutrient broth 100 มล. เป็นเวลา 18 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 °C นำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงแล้วไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที และนำส่วนที่ตกตะกอน (pellets) มาล้างด้วยน้ำเกลือ หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงและ suspend เซลล์อีกครั้งด้วยน้ำเกลือ ปรับความเข้มข้นของเซลล์ด้วยน้ำเกลือเพื่อให้ได้ความเข้มข้น 5×10^8 CFU/mL โดยใช้กราฟเทียบมาตรฐาน (calibration curve) ที่ 500 นาโนเมตร (Liu et al., 2000)

2.3.3 Bacterial suspension standard curve

การทำ bacterial suspension standard curve เพื่อให้ทราบปริมาณที่แน่นอนของแบคทีเรียที่มีชีวิตโดยมีขั้นตอน ดังนี้

นำแบคทีเรียแต่ละชนิดมาเพาะเลี้ยงในอาหาร Mueller-hinton broth 100 มล. แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำเซลล์แบคทีเรียไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 rpm และนำส่วนที่ตกตะกอนไปล้างสองครั้ง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ 4,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้น suspend เซลล์ด้วย 0.9 % NaCl 50 มล. และเจือจางแบคทีเรียเพื่อให้สามารถวัดค่า O.D. โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ในช่วงการดูดกลืนแสง (Absorbance) อยู่ระหว่าง 0.05-0.25 ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร การนับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของแต่ละช่วงการดูดกลืนแสงทดสอบโดยใช้วิธี Overdried agar plate counting method และทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง (Eumkeb, 1999; Richards et al., 1993)

2.3.4 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (MICs)

Broth dilution method ถูกนำมาใช้เมื่อต้องการทดสอบแบคทีเรียจำนวนไม่มาก หรือเมื่อต้องการหาค่า MIC ที่แม่นยำ การทำให้ความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะลดลงทีละสองเท่า (two-fold dilution) ถูกนำมาใช้เพื่อเตรียมปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อและปริมาณเชื้อที่เหมาะสม (โดยทั่วไป 100,000 เซลล์แบคทีเรีย) ใส่ลงไปในแต่ละหลอด หลังจากนั้นนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับจุดสุดท้ายที่นำมาพิจารณาเป็นค่า MICs ของยานั้นคือจุดที่ไม่เห็นความขุ่น สำหรับหลอดที่ไม่มีเชื้อ มีเฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อร่วมกับยาปฏิชีวนะและมีเฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างเดียวถูกนำมาใช้เป็นหลอดควบคุม ขณะเดียวกันหลอดที่มีเชื้อแบคทีเรียแต่ไม่มียาปฏิชีวนะถูกนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้การมีชีวิตของเชื้อแบคทีเรียในกรณีที่มีการอ่านจุดที่ไม่มีความขุ่นผิดพลาด (Greenwood, 2000)

การหาค่า MICs โดยใช้วิธี broth microdilution method โดยใช้ 96-well microplates เริ่มโดยการเขี่ยเชื้อจาก stock culture แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบน Mueller Hinton broth และปั่นที่อุณหภูมิ 37 °C

เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นเตรียม bacterial suspension โดยปรับความหนาแน่นของเซลล์ด้วยน้ำเกลือ (0.9 % NaCl) ให้ได้ประมาณ 1×10^8 CFU/mL โดยใช้การคำนวณการคูณแสงเปรียบเทียบกับ bacterial suspension standard curve หลังจากนั้นเตรียมความเข้มข้นของ separated fractions โดยให้คอลัมน์แรก ของ 96-well plates มีความเข้มข้นสูงสุดและอาหาร Cation-adjusted Mueller Hinton Broth (CAMHB) และเจือจางให้ความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะลดลงทีละสองเท่า (Two-fold dilution) ในแต่ละหลุม (well) จะมีปริมาตรรวมทั้งหมด 200 ไมโครลิตร สำหรับหลุมที่ไม่มียาปฏิชีวนะหรือ separated fractions จาก พลาสมาของจระเข้จะถูกใช้เป็นตัวควบคุมผลบวก (positive control) ขณะที่หลุมที่ไม่มีเชื้อจะใช้เป็น ตัว ควบคุมผลลบ (negative control) และความเข้มข้นสุดท้ายของเชื้อหรือความเข้มข้นในแต่ละหลุมจะอยู่ ประมาณ 10^5 CFU/mL หลังจากนั้นปิดด้วย perforated plate seal (TREK Diagnostic system Inc., Cleveland, OH) และค่า MIC ของ separated fraction และ ยาปฏิชีวนะจะอ่านผลหลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ค่า MIC คือค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ไม่เห็นการเจริญเติบโตของเชื้อ แบคทีเรียใน 96-well plates (Clinical Laboratory Standards Institute, 2013; Jiang, 2011)

2.3.5 Checkerboard determination

การใช้ยาด้านจุลชีพร่วมกันมากกว่า 1 ตัวได้ถูกเลือกมาใช้ด้วยเหตุผลหลายประการ เช่น ช่วยลดความเป็นพิษของยาจากการลดขนาดของยาด้านจุลชีพลงและช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์แต่ไม่ก่อให้เกิดพิษ หรือลดการพัฒนาไปเป็นการดื้อต่อยา (Swan and Manivannan, 2002) วิธี checkerboard เป็นวิธีที่ง่ายและสะดวกในการทำและใช้เวลาทดสอบเพียงแค่ 24 ชั่วโมงเท่านั้น การเจือจางยาด้านจุลชีพอาจจะใช้ความเข้มข้นที่ทดสอบต่ำกว่าระดับที่ไม่สามารถทำให้เกิดการเสริมฤทธิ์ได้ (Eumkeb, 1999; Lorian, 1999)

ในการใช้ยาปฏิชีวนะร่วมกันโดยใช้วิธี checkerboard ได้ทำตามวิธีของ Sabath (1967) และมีการปรับเปลี่ยนเล็กน้อย (Eumkeb, 1999) ยาด้านจุลชีพ “A” และยาด้านจุลชีพ “B” ถูกทำให้เจือจางลง $\frac{1}{2}$ ของ MICs ของมัน วิธี checkerboard ได้ทำโดยใช้วิธี broth microdilution ใน 96-well microplates ซึ่งมี ขั้นตอนดังนี้ นำแบคทีเรียที่ได้เพาะเลี้ยง 18 ชั่วโมงมาปรับ bacterial suspension ด้วยน้ำเกลือ (0.9 % NaCl) ให้ได้ประมาณ 1×10^8 CFU/mL โดยใช้การคำนวณการคูณแสงเปรียบเทียบกับ bacterial suspension standard curve สำหรับการทดสอบความไวของยาปฏิชีวนะในการต้านเชื้อแบคทีเรียใน 96-well microplates ได้เตรียมโดยการเตรียมสารละลาย separated fractions จากพลาสมาจระเข้ที่มีความเข้มข้นสูงสุด (2048 มก./มล.) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และอาหารเลี้ยงเชื้อ CAMHB 100 ไมโครลิตรใส่ ลงไปในคอลัมน์แรกของ 96-well microplates แล้วเจือจางสารละลาย separated fractions จากพลาสมา ของจระเข้โดยการคูณ separated fractions 100 ไมโครลิตรจากคอลัมน์แรกไปยังคอลัมน์ที่สองและทำ แบบนี้ไปยังคอลัมน์ถัดไปเรื่อยๆ โดยในแต่ละหลุมจะมีอาหาร CAMHB 100 ไมโครลิตร หลังจากนั้น เติมยาปฏิชีวนะ 50 ไมโครลิตรที่มีความเข้มข้นต่างๆ ในแต่ละหลุมของ microplates แล้วเติม bacterial

suspension 50 ไมโครลิตรลงไปในแต่ละหลุม (ความเข้มข้นสุดท้ายของเชื้อ 5×10^5 CFU/mL) ดังนั้น ปริมาตรรวมในแต่ละหลุมคือ 200 ไมโครลิตร สำหรับ 2 คอลัมน์สุดท้ายใช้เป็นตัวควบคุมผลบวก (positive control) (มีเฉพาะเชื้อแต่ไม่มียาปฏิชีวนะหรือ separated fractions) และตัวควบคุมผลลบ (negative control) (ไม่มีเชื้อ) ตามลำดับ หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง โดยทำซ้ำ 3 ครั้ง หาค่า MICs ของยาที่ผสมกันแต่ละอันแล้วนำไปสร้างกราฟ isobolograms สำหรับการคำนวณหาดัชนี FIC สำหรับยาที่ผสมกันแต่ละอันสามารถคำนวณได้ตามสมการดังต่อไปนี้

$$FIC = \frac{\text{Conc.of A in MIC of A+B}}{\text{MIC of A alone}} + \frac{\text{Conc.of B in MIC of A+B}}{\text{MIC of B alone}}$$

FIC (A+B)	≤ 0.5	เสริมฤทธิ์กัน
FIC (A+B)	$> 0.5-4.0$	ไม่มีปฏิกริยาระหว่างยา
FIC (A+B)	> 4.0	ต้านฤทธิ์กัน

(Johnson et al., 2004; Odds, 2003)

2.3.6 Killing curve determinations

การนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเพื่อทำเป็น killing curve ได้ทำตามวิธีที่ได้อธิบายไว้ก่อนหน้านี้ โดย Richards et al. (1993) และมีการดัดแปลงเล็กน้อย (Eumkeb, 1999) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 100 มล. จากนั้นให้เชื้อแบคทีเรียคือยา (5×10^5 CFU/mL) สัมผัสกับยาปฏิชีวนะหรือ separated fractions เดี่ยวๆ และยาปฏิชีวนะผสมกับ separated fractions ที่ความเข้มข้น $\frac{1}{4}$ ของ MICs หลังจากสัมผัสสารเป็นเวลา 0, 0.5, 1, 2, 4, 6 และ 24 ชั่วโมง แล้วดื่มน้ำออกมา 0.1 มล. ในแต่ละช่วงเวลาลงไปเลี้ยงบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร Mueller-Hinton agar จำนวน 4 จานต่อหนึ่งช่วงเวลาและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นนับจำนวนเซลล์ที่เจริญเติบโต ค่าที่ต่ำสุดที่สามารถนับได้คือ 10^3 CFU/mL เซลล์และความเข้มข้นของตัวทำละลายที่ใกล้เคียงกันถูกนำมาใช้เป็นตัวควบคุมผลบวก (positive control) (Iain et al. 2000)

2.3.7 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electronmicroscopy; TEM)

การศึกษาผลของ separated fractions (P1 และ P5) เมื่อใช้เดี่ยวๆ หรือใช้ร่วมกับยา ceftazidime ด้านเชื้อ *E. cloacae* DMST 21394 ที่ดื้อต่อยา ceftazidime (Ceftazidime-resistant *E. cloacae* DMST 21394; CREnC 21394) โดยทำตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

นำเชื้อ CREnC 21394 ไปเพาะเลี้ยงในอาหาร Mueller-Hinton broth 10 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำเชื้อที่บ่ม 2 มล. ไปเพาะเลี้ยงต่อในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton broth 98 มล. แล้วนำไปวางในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบสั่น (water bath shaking) ที่อัตรา

แกว่ง 100 ครั้ง/นาที่ อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบ/นาที่ เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วย 0.9% NaCl หลังจากนั้นนำเชื้อที่มีความเข้มข้น 5×10^7 CFU/mL ปริมาณ 10 มล. ใน 0.9 % NaCl ไปเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ซึ่งแต่ละขวดจะมีอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-hinton broth และยาต้านแบคทีเรียรวมกัน 90 มล. โดยความเข้มข้นของยาต้านแบคทีเรียที่ใช้คือ $\frac{1}{4}$ MICs ของ separated fractions (P1 และ P5) เดี่ยวๆ และใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะทำให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของเซลล์แบคทีเรียประมาณ 5×10^6 CFU/mL สำหรับขวดที่มีเชื้อ CREnC 21394 อย่างเดียวโดยไม่มียาต้านแบคทีเรียใช้เป็นตัวควบคุม นำแต่ละขวดไปปั่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบสั่นที่อุณหภูมิ 37 °C และอัตราการแกว่ง 100 ครั้ง/นาที่ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง (Richards and Xing, 1994; Richards et al., 1993) หลังจากนั้นนำ CREnC 21394 ไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C และเทส่วน supernate ที่ยังเหลว (fix) ส่วน pellets ด้วย glutaraldehyde 8% v/v ใน phosphate buffer 0.1 M (pH 7.2) เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 °C และนำไปตรึงต่อใน glutaraldehyde 4% v/v ใน phosphate buffer 0.1 M (pH 7.2) เป็นเวลา 4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 °C ล้างด้วย buffer แล้ว suspend แบคทีเรียใน osmium tetroxide (OsO_4) (Emscope, Watford) 1% w/v เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องจากนั้นล้าง 3 ครั้ง โดยการปั่นเหวี่ยงและ resuspend ในน้ำกลั่น สำหรับ pellet ที่ได้ครั้งสุดท้ายจะถูกระงับใน agarose อุณหภูมิ 2 % w/v แล้วเทลงบนแผ่นสไลด์ที่วางไว้ให้เย็นต่อไปนำชิ้นเล็กๆ ของเจลที่มีเซลล์แบคทีเรียและดึงน้ำออก (dehydrated) ด้วยลำดับความเข้มข้นของเอทานอล หลังจากนั้นนำไปฝังในเรซินแล้วตัดด้วยมีดเพชร (diamond knife) ด้วยเครื่อง RMC ultramicrotome model MTX แล้วนำไปย้อมด้วย uranyl acetate และ lead citrate สุดท้ายตรวจสอบโครงสร้างของแบคทีเรียโดยใช้ JEOL, JEM 2010 electron microscope ที่ 80-100 kV (Eumkeb, 1999; Richards et al., 1993)

2.3.8 การซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกและเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึม

การซึมผ่านของเยื่อหุ้มชั้นนอก (Outer membrane permeability)

เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของ separated fractions (P1 และ P5) ทั้งใช้เดี่ยวๆ หรือใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะต่อการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกในการควบคุมการซึมผ่านของสารซึ่งมีขั้นตอนการศึกษา ดังนี้ นำเซลล์แบคทีเรียไปเพาะเลี้ยงในอาหาร MHB 100 มล. ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดแบคทีเรียที่ได้เพาะเลี้ยงมา 1 มล. ไปใส่ในขวดที่มีอาหาร MHB 9 มล. แล้วนำไปใส่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบสั่นที่อุณหภูมิ 37 °C และอัตราการแกว่ง 100 ครั้ง/นาที่ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำเชื้อแบคทีเรียที่ได้ปรับความเข้มข้น 5×10^6 CFU/mL) ปริมาณ 1 มล. ใส่ลงไปในขวดรูปชมพู่ ที่มีอาหาร MHB 9 มล. และ separated fractions P1 และ P5 ทั้งใช้เดี่ยวๆ หรือใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะ ที่ความเข้มข้น $\frac{1}{4}$ MICs ของแต่ละตัวจะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของเชื้อแบคทีเรียประมาณ 5×10^5 CFU/mL เก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 4700 รอบ/นาที่ เป็นเวลา 1 นาที และ

suspend ใน HEPES buffer แล้ววัด O.D. ที่ 600 นาโนเมตร ละลาย separated fractions ใน HEPES buffer สำหรับการเตรียมสารละลายมาตรฐาน (stock solution) ของ Nitrocefin (NCF) เตรียมโดยการละลาย NCF 1 มก. ใน DMSO และเจือจางด้วย HEPES buffer เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 60 ไมโครกรัม/มล. การทดสอบการซึมผ่านของเยื่อหุ้มได้ทดสอบใน 96-well microtitre plates โดยเติม selected fractions P1 หรือ P5 ทั้งใช้เดี่ยวๆ หรือผสมกับยาปฏิชีวนะปริมาณ 50 ไมโครลิตร และเติม NCF ปริมาณ 50 ไมโครลิตรและเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบ 50 ไมโครลิตร ทำให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ NCF เท่ากับ 20 ไมโครกรัม/มล. NCF ถูกนำมาใช้เป็น substrate ของเอนไซม์บีต้าแลคแทมเมสที่อยู่ใน periplasm ของแบคทีเรียซึ่งโดยปกติจะถูกห่อหุ้มออกจากชั้น lipopolysaccharide ของเชื้อ CREnc 21394 สำหรับค่า EC50 ของ separated fractions ต่อการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกหาได้จากกราฟ dose-response curve จากความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ได้รับเปปไทด์จากพลาสมาจะเข้มน้ำจืดไทย และเซลล์ที่ไม่ได้รับเปปไทด์หลังจาก 5 นาที ที่ 500 นาโน (Eumkeb and Chukrathok, 2013; Junkes et al., 2008)

การซึมผ่านเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึม (Cytoplasmic membrane permeability)

การซึมผ่านเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึมหรือเยื่อหุ้มชั้นในทดสอบโดยการวัดความสามารถของเปปไทด์ที่ทำให้เกิดการ ทำงานของเอนไซม์ β -galactosidase ในแบคทีเรียโดยใช้ ortho-nitrophenylgalactoside (ONPG) เป็น substrate สำหรับขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างได้ถูกเตรียมเช่นเดียวกับการทดสอบการซึมผ่านเยื่อหุ้มชั้นนอก สำหรับ ONPG เตรียมโดยการละลายใน HEPES buffer ให้ได้ความเข้มข้น 300 ไมโครกรัม/มล. ONPG สามารถถูกย่อยด้วยเอนไซม์ β -galactosidase ที่อยู่ในไซโตพลาสซึมและปกติจะไม่สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ออกมาได้ ในการทดสอบการซึมผ่านเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึมทดสอบโดยการเติม separated fraction ที่ได้เลือกมาศึกษา คือ P1 และ P5 ทั้งใช้เดี่ยวๆ หรือผสมกับยาปฏิชีวนะปริมาณ 50 ไมโครลิตร ลงใน 96-well microtiter plates แล้วเติมสารละลาย ONPG ปริมาณ 50 ไมโครลิตร เติมเชื้อแบคทีเรียที่ได้ปรับความเข้มข้นแล้วปริมาณ 50 ไมโครลิตร ทำให้ความได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ ONPG 100 ไมโครกรัม/มล. หลังจากได้อุ่นที่อุณหภูมิ 37 °C แล้วนำ plate ไปวางใน plate reader ที่อุณหภูมิ 37 °C และการวัดทำงานของ β -galactosidase ในการทำปฏิกิริยากับ ONPG ด้วยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร โดยใช้ polymyxin B ขนาด 5 mM เป็นตัวควบคุมผลบวก (positive control) สำหรับค่า EC50 ของ separated fractions ต่อการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกได้จากกราฟ dose-response curve จากความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ได้รับเปปไทด์จากพลาสมาจะเข้มน้ำจืดไทยและเซลล์ที่ไม่ได้รับเปปไทด์หลังจาก 40 นาที ที่ 420 นาโน (Eumkeb and Chukrathok, 2013; Junkes et al., 2008)

2.3.9 Electrophoresis

การสกัดโปรตีนที่สัมพันธ์กับ peptidoglycan และเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก

การทดสอบฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียของ separated fraction P1 และ P5 ทั้งใช้เดี่ยวๆ และใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะต่อโปรตีนที่สัมพันธ์กับ peptidoglycan และเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรีย (Outer membrane and peptidoglycan associated protein; OMPG) ซึ่งมีขั้นตอนในการทดสอบดังนี้ เพาะเลี้ยงเชื้อ CREnc 21394 ในอาหาร MHB 100 มล. และบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเชื้อปริมาณ 8.0 มล. ไปเพาะเลี้ยงต่อในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร MHB 192 มล. แล้วนำไปวางในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบสั่นที่มีอัตราการแกว่ง 100 ครั้ง/นาที เป็นเวลา 4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 °C หลังจากนั้นนำเชื้อที่ทดสอบ (5×10^6 CFU/mL) ปริมาณ 100 มล. ไปเพาะเลี้ยงต่อในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร MHB ผสมกับ separated fraction P1 และ P5 ที่ความเข้มข้น $\frac{1}{4}$ MICs ทั้งใช้เดี่ยวๆ หรือใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะปริมาณ 100 มล. สำหรับขวดที่มีเฉพาะอาหาร MHB 100 มล. โดยไม่มียาต้านแบคทีเรียถูกนำมาใช้เป็นตัวควบคุม หลังจากนั้นนำแต่ละขวดไปใส่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบสั่นที่มีอัตราการแกว่ง 100 ครั้ง/นาที เป็นเวลา 4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 °C (Eumkeb, 1999; Richards and Xing, 1994; Richards et al., 1993) เก็บเซลล์แบคทีเรียที่ได้เพาะเลี้ยงดังกล่าว 200 มล. และนำไปปั่นเหวี่ยง 6,000 g เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C และล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วย N-2-hydroxyethyl piperazine-N-ethanesulphonic acid (HEPES) buffer (10 mM, pH 6.8) จากนั้น resuspend เซลล์แบคทีเรียด้วยน้ำกลั่น 10 มล. และทำให้เซลล์แตกโดยการ sonication (3 x 60s with 30s cooling period between each burst) ที่อุณหภูมิ 4 °C เซลล์ที่ไม่แตกจะถูกเอาออกโดยการปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 g เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C และเอาส่วนที่ตกตะกอน (pellet) ที่ทิ้ง แล้วนำเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียและ peptidoglycan ออกมาโดยการปั่นเหวี่ยงที่ 40,000 g เป็นเวลา 60 นาที แล้วล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วยน้ำกลั่นที่ประกอบด้วย phenyl methyl sulphonyl fluoride (PMSF) 2 มก./มล. จากนั้นนำ OMPG ที่น้ำหนักเท่ากันที่สกัดได้จากจาก CREnc 21394 ไป resuspend ในน้ำกลั่นที่มี PMSF 0.5 มล. (น้ำกลั่น + PMSF 2 มล.) ดังนั้นปริมาณสารสกัดที่เท่ากัน (50 มก./มล.) ที่สกัดได้จากจาก CREnc 21394 สามารถนำไปศึกษาได้ โปรตีนที่สกัดได้ดังกล่าวจะถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 °C (Eumkeb, 1999; Richards and Xing, 1994; Richards et al., 1993)

Bovine serum albumin (จาก Sigma) ถูกนำมาใช้เป็นโปรตีนมาตรฐาน สำหรับโปรตีนที่สกัดได้จะถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 °C และทำให้เจือจางอีกครั้งใน buffer ก่อนที่จะมาแยกโปรตีนด้วย SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) โปรตีนที่สกัดได้มีความคงทนมากกว่า 2 เดือน ถ้าถูกเก็บไว้ภายใต้สภาวะดังกล่าว (Eumkeb, 1999)

SDS-PAGE

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ถูกนำมาใช้ในระบบเจลที่มี stacking gel 4 % และมี separating gel 15% สำหรับ OMPG ที่สกัดได้จะนำไปผสมกับ sample buffer ที่

มี Tris-HCL buffer 0.125 M, pH 6.8, 0.04 M Na₂EDTA (Sigma), 4% (w/v) SDS, 10% (w/v) β -mercaptoethanol 20% (v/v) glycerol and 0.1% (w/v) bromophenol blue (Sigma) และต้มให้เดือดเป็นเวลา 5 นาที ขณะเดียวกันการทำ Electrophoresis จะทำที่ 8 mA/เจล สำหรับ stacking gel ส่วน separating gel ทำที่ 15 mA/เจล เพื่อเพิ่มความคมชัดบริเวณ subtyping areas หลังจากทำ electrophoresis จะย้อม separating gel ด้วย Coomassie Brilliant Blue เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องและผสมให้เข้ากันเบาๆ หลังจากนั้นเริ่มต้นการถอดสีที่ย้อม (destaining) ด้วย ethanol 45% และสารละลาย acetic acid 10% (v/v) ตามด้วยการถอดสีสุดท้ายด้วย สารละลาย acetic acid 7% สำหรับโปรตีนมาตรฐานที่ถูกนำมาใช้เป็น molecular mass makers ได้แก่ myoglobin (17,200), carbonic anhydrase (30,000), ovalbumin (42,700), albumin (66,250) and ovotransferrin (76,000-78,000) (Eumkeb, 1999)

2.3.10 Enzyme assay

เพื่อทดสอบความสามารถของ separated fractions P1 และ P5 ทั้งใช้เดี่ยวๆ หรือใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บีต้าแลคแทมเมส ชนิดที่ IV ที่ได้แยกมาจากเชื้อ *E. cloacae* (β -lactamase type IV of *E. cloacae*) ที่ได้สั่งซื้อมาจากบริษัท Sigma-Aldrich การทดสอบการทำงานของเอนไซม์บีต้าแลคแทมเมสทดสอบโดยใช้ benzylpenicillin เป็น substrate และความเข้มข้นของเอนไซม์ที่นำมาใช้ศึกษานั้นได้มาจากความเข้มข้นที่สามารถย่อย benzylpenicillin 100 ไมโครกรัม/มล. ให้เหลือประมาณ 50-60 % ใน 5 นาที นำ separated fractions P1 และ P5 ทั้งที่ใช้เดี่ยวๆ หรือใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะผสมกับเอนไซม์ใน 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) เป็นเวลา 5 นาที ก่อนที่จะเติม benzylpenicillin โดยใช้ methanol/acetic acid (100/1) เป็นตัวหยุดปฏิกิริยา (stopping reagent) หลังจากนั้นวิเคราะห์ปริมาณ benzylpenicillin ที่เหลือด้วย reverse-phase HPLC โดยใช้ acetonitrile/ammonium acetate (25:75) เป็น mobile phase การทดสอบการทำงานของเอนไซม์ด้วย HPLC เป็นวิธีที่สามารถวัดความทนทานของยาปฏิชีวนะต่อเอนไซม์บีต้าแลคแทมเมส ซึ่งจะฉีดตัวอย่างครั้งละ 20 ไมโครลิตรในช่วงเวลาต่างๆ เช่น 5 10 15 และ 20 นาที และล้างคอลัมน์ก่อนการฉีดตัวอย่างต่อไปด้วย sodium phosphate buffer ที่ความเข้มข้น 50 mM (pH 7.0)

2.3.11 การวิเคราะห์ข้อมูล (Statistic analysis)

การซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกและเยื่อหุ้มชั้นในและ enzyme assay ได้ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง และอย่างน้อย 10 เซลล์ของแต่ละกลุ่มรักษาจากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านได้ถูกนำมาวัดเพื่อวิเคราะห์ขนาดเซลล์ การแสดงข้อมูลได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย (mean) $\pm$ ความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (Standard error of mean; SEM) สำหรับความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างแต่ละกลุ่มรักษาวิเคราะห์โดยใช้ one-way ANOVA และค่า $p < 0.05$ และ $p < 0.01$ จากการทดสอบด้วย Tukey's HSD post hoc test จะถูกพิจารณาว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

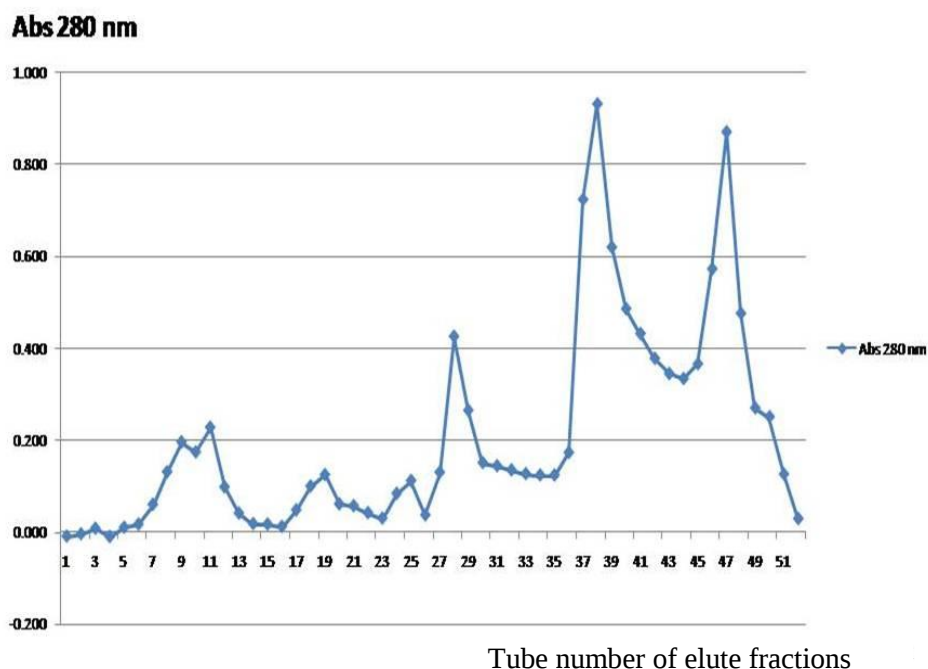
บทที่ 3

ผลการวิจัย

3.1 การแยก fraction จากพลาสมาของกระแตน้ำจืดไทย

3.1.1 Ion exchange chromatography

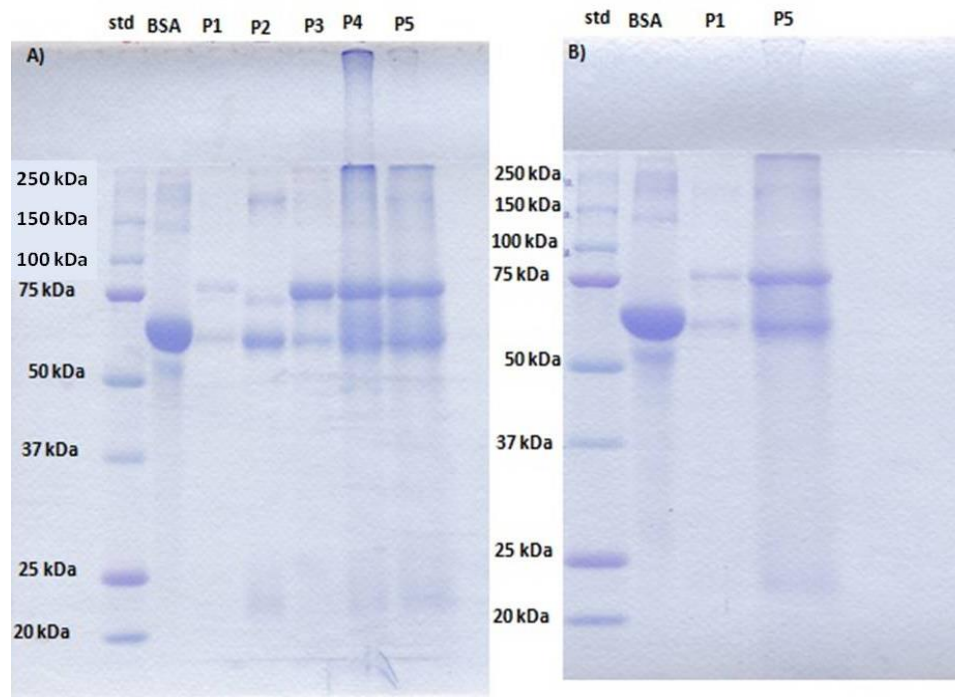
พิกของ fraction จากพลาสมาของกระแตน้ำจืดไทยที่ได้แยกด้วย ion exchange chromatography โดยใช้คอลัมน์ Q sepharose ทั้ง 5 พิกแสดงในรูป 3.1 การแยกด้วยวิธี ion exchange chromatography โดยใช้คอลัมน์ Q sepharose เพื่อที่จะคัดเลือกเอาเฉพาะ โปรตีนที่มีประจุบวก (Cationic proteins) โดยใช้ Tris-HCL 25 mM เป็น mobile phase และลำดับความเข้มข้นของ NaCl ที่ pH 8.1 (0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 M) ถูกนำมาใช้เป็น elution buffer ผลที่ได้พบว่า O.D. ของโปรตีนที่มีประจุบวกของแต่ละ fraction ที่ได้เทรวมกัน (Pooled fraction) มีความแตกต่างกันซึ่งเป็นผลมาจากความเข้มข้นของ NaCl ที่แตกต่างกัน โปรตีนที่มีประจุบวกหลอดที่ 1 - 10 เป็น fraction 1 (F1) หลอดที่ 11-20 เป็น fraction 2 (F2) หลอดที่ 21-30 เป็น fraction 3 (F3) หลอดที่ 31-40 เป็น fraction 4 (F4) และหลอดที่ 41-50 เป็น fraction 5 (F5)



รูป 3.1 Ion exchange chromatography ของพลาสมาจากกระแตน้ำจืดไทยโดยใช้คอลัมน์ Q Sepharose ซึ่งมี fraction ที่ได้เทรวมกัน (Pooled fraction) ทั้งหมด 5 fractions จากการชะล้าง (elution) ด้วย NaCl ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 สำหรับ F1, F2, F3, F4 และ F5 ตามลำดับ) โดยใช้ Tris-HCl เป็น mobile phase ที่ pH 8.1

3.1.2 Gel filtration chromatography

นำแต่ละ fraction ที่ได้จาก ion exchange chromatography มาแยกต่อด้วย gel filtration chromatography โดยใช้คอลัมน์ Sephadex G-50 (Superfine, Amersham Bio-Sciences, 2.5 x 100 ซม.) วิธีนี้ทำเพื่อแยกและคัดเลือกโปรตีนที่มีประจุบวกขนาด 0-250 kDa ทำให้ได้ separated fraction ทั้งหมด 5 fraction; P1, P2, P3, P4 และ P5 และได้ทดสอบยืนยันน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้ SDS-PAGE ซึ่งผลที่ได้แสดงในรูป 3.2 A และ 3.2 B ผลจาก SDS-PAGE พบว่า P1 มีแถบโปรตีน 2 แถบ คือ ที่ 67 และ 80 kDa, P2 พบแถบโปรตีนทั้งหมด 4 แถบ ที่ 23, 67, 70 และ 160 kDa, P3 มีแถบโปรตีนทั้งหมด 2 แถบที่ 67 และ 75 kDa, P4 ปรากฏแถบโปรตีนทั้งหมด 3 แถบที่ 23, 67, และ 75 kDa และ P5 พบแถบโปรตีนทั้งหมด 4 แถบที่ 23, 67, 75 และ 160 kDa (3.2 A) ซึ่งแถบโปรตีนที่พบในการศึกษาครั้งนี้ส่วนใหญ่ค่อนข้างแตกต่างจากการศึกษาที่ผ่านมา ทั้งนี้ Threenet และคณะ (2011) ได้ศึกษารูปแบบแถบโปรตีนของซีรัมจากกระชี่น้ำจืดไทยด้วย SDS-PAGE พบว่ามีแถบโปรตีนปรากฏทั้งหมด 6 แถบที่น้ำหนักโมเลกุล 225, 121, 67, 62, 45 และ 25 kDa ตามลำดับ ผลดังกล่าวอาจอธิบายได้ว่าการศึกษานี้ใช้ separated fraction ที่ได้สกัดแยกจากพลาสมาของกระชี่น้ำจืดไทย อย่างไรก็ตามช่วงน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 23-160 kDa จากการศึกษานี้เปรียบเทียบกับ 25-225 kDa อาจจะเป็นไปได้ว่ามีความคล้ายคลึงกัน



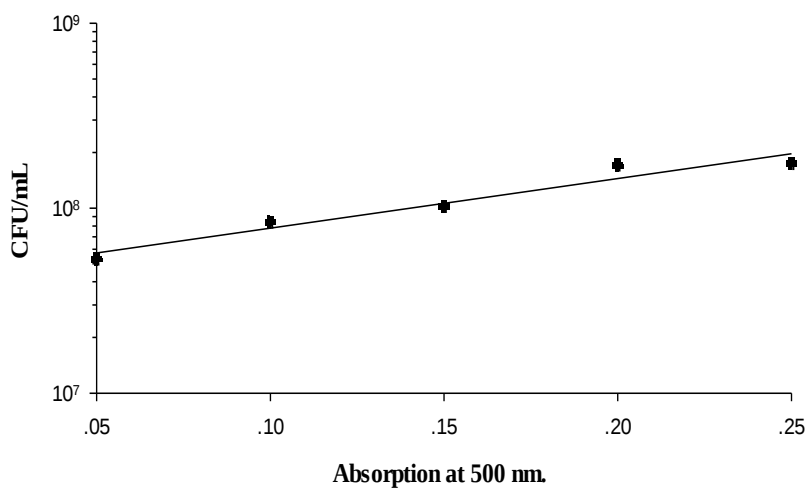
รูป 3.2 การทดสอบยืนยันน้ำหนักโมเลกุลของ separated P1, P2, P3, P4 และ P5 ด้วย SDS-PAGE; P1= separated fraction P1 (0.757 mg/mL), P2 = separated fraction P2 (1.757 mg/mL), P3 = separated fraction P3 (1.958 mg/mL), P 4= separated fraction P4 (3.914 mg/mL), P5 = separated fraction P5 (2.613 mg/mL), std; molecular weight marker proteins (kDa) and BSA; bovine serum albumin

3.2 Bacterial suspensions viable count absorption standard curve

Bacterial suspensions viable count absorption standard curve ได้ทำขึ้นเพื่อที่จะได้ทราบปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตที่แน่นอนซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาสำหรับเชื้อ *E. cloacae* ที่คือต่อยา ceftazidime DMST 21394 (Ceftazidime-resistant *E. cloacae* DMST 21394; CREnC 21394) เชื้อ *E. coli* ที่คือต่อยา ceftazidime DMST 20662 (Ceftazidime-resistant *E. coli* DMST 20662; CREC 20662) เชื้อ *S. aureus* ที่คือต่อยา methicillin DMST 20651 (Methicillin-resistant *S. aureus* DMST 20651; MRSA 20651) เชื้อ *S. aureus* ที่ไวต่อยา methicillin ATCC 29213 (Methicillin-sensitive *S. aureus*; MSSA 29213) เชื้อ *E. coli* ที่ไวต่อยา ceftazidime ATCC 25922 (Ceftazidime-sensitive *E. coli* ATCC 25922; CSEC 25922) และเชื้อ *S. epidermidis* DMST 15505 ได้แสดงในรูป 3.3-3.8 ตามลำดับ

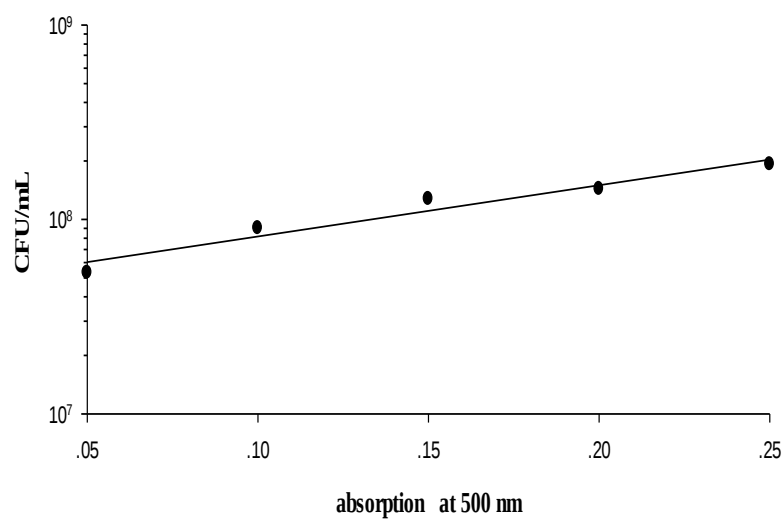
รูป 3.3-3.8 แสดงค่าดูดกลืนแสง (Absorbance) ของเชื้อ CREnC 21394 เชื้อ CREC 20662 เชื้อ MRSA 20651 เชื้อ MSSA 29213 เชื้อ CSEC 25922 และเชื้อ *S. epidermidis* 15505 ที่ 500 โนโมเมตรที่ความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 1×10^8 CFU/mL มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 0.19, 0.15, 0.14, 0.12 และ 0.10 ตามลำดับ

Absorption of bacterial suspension viable count
standard curve of *E. cloacae* DMST 21394



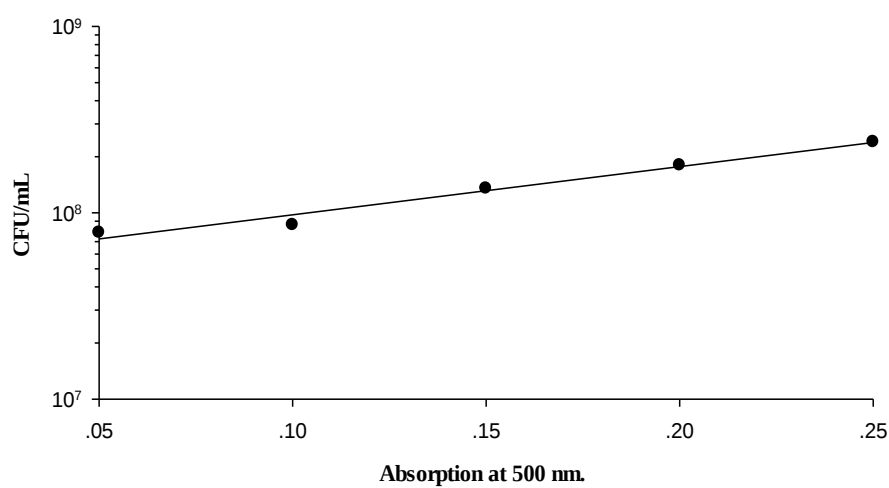
รูป 3.3 Standard curve for suspensions of ceftazidime-resistant *Enterobacter cloacae* DMST 21394

Absorption of bacterial suspension viable count
Standard curve *E. coli* DMST 20662



3.4 Standard curve for suspensions of ceftazidime-resistant *Escherichia coli* DMST 20662

Absorption of bacterial suspension viable count
standard curve of *E. coli* ATCC 25922



3.5 Standard curve for suspensions of ceftazidime-sensitive *Escherichia coli* ATCC 25922

Absorption of bacterial suspension viable count
Standard curve of *S. aureus* DMST 20651

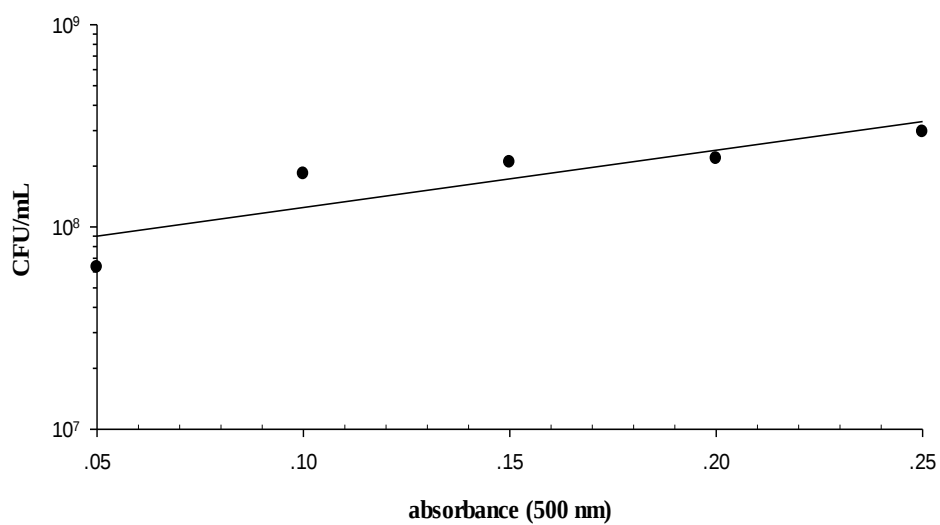


Figure 3.6 Standard curve for suspensions of methicillin-resistant *S. aureus* DMST 20651

Absorption of bacterial suspension viable count
standard curve of *S. aureus* ATCC 29213

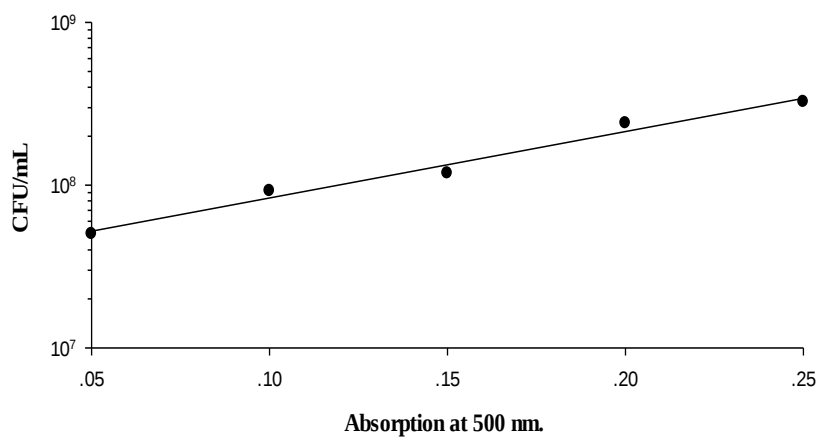
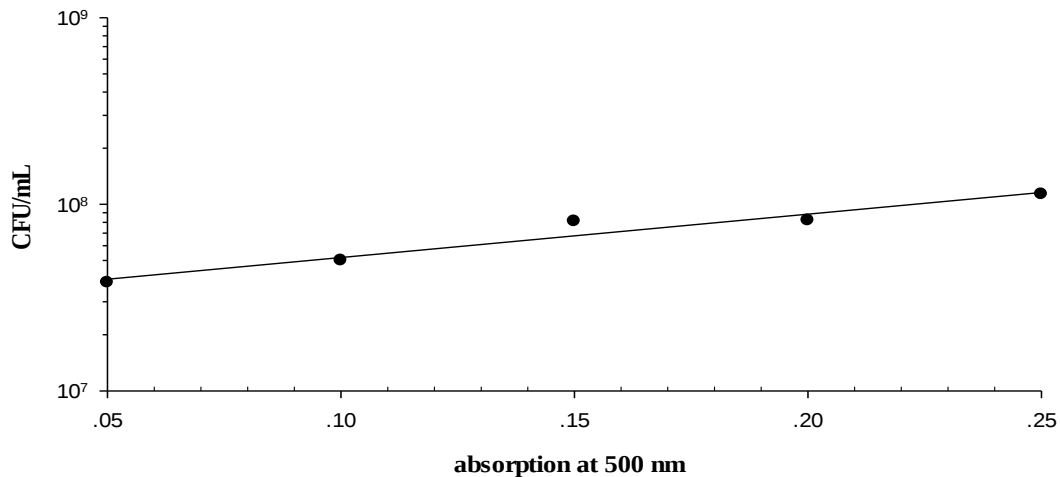


Figure 3.7 Standard curve for suspensions of Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

Absorption of bacterial suspension viable count
Standard curve *S. epidermidis* DMST 15505



รูป 3.8 Standard curve for suspensions of *Staphylococcus epidermidis* DMST 15505

3.3 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (MICs)

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (MICs) ของ separated fraction P1, P2, P3, P4 และ P5 จากพลาสมาของจระเข้แม่น้ำจืดไทย และ MICs ของยาปฏิชีวนะที่นำมาศึกษา (ยา ceftazidime ยา cloxacillin และยา cephalexin) ด้านเชื้อ CREnc 21394 เชื้อ CREC 20662 เชื้อ MRSA 20651 เชื้อ MSSA 29213 เชื้อ CSEC 25922 และเชื้อ *S. epidermidis* 15505 ได้ทดสอบด้วยวิธี broth microdilution ซึ่งผลการศึกษาก็ได้แสดงในตาราง 3.1 ยา ceftazidime เดี่ยวๆ พบว่าไม่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในการยับยั้งเชื้อ CREnc 21394 ที่ MIC มากกว่า 1024 ไมโครกรัม/มล. ขณะที่ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในการยับยั้งเชื้อ CREC 20662 เชื้อ CSEC 25922 และเชื้อ *S. epidermidis* 15505 ที่ MIC 32, 8 และ 512 ไมโครกรัม/มล. ตามลำดับ อีกทั้งยังพบว่ายา cloxacillin ไม่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในการยับยั้งเชื้อ MRSA 20651 ที่ MIC มากกว่า 1024 ไมโครกรัม/มล. เช่นเดียวกัน แต่ยาตัวนี้ยังคงมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียยับยั้งเชื้อ MSSA 29213 ที่ MIC 32 ไมโครกรัม/มล. ผลที่ได้จากการศึกษานี้ก็อ้างอิงตามแนวปฏิบัติของ CLSI พบว่าเชื้อ *E. cloacae* ที่ใช้ในการศึกษานี้มีการดื้อต่อยา ceftazidime ในระดับที่สูง ขณะที่เชื้อที่ได้นำมาเป็นเชื้ออ้างอิง (reference strain) คือเชื้อ CSEC 25922 ยังคงไวต่อยา ceftazidime ที่ MIC 8 ไมโครกรัม/มล. (Clinical Laboratory Standards Institute, 2013)

Separated fraction or β - lactam	Minimum inhibitory concentration (MIC)					
	<i>E. cloacae</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
	DMST	DMST	ATCC	DMST	ATCC	DMST
	21394	20662	25922	20651	29213	15505
				(MRSA)		
P1 (mg/mL)	1024	512	512	1024	8	512
P2 (mg/mL)	>1024	512	256	1024	64	512
P3 (mg/mL)	>1024	512	1024	1024	128	512
P4(mg/mL)	>1024	512	512	1024	128	512
P5(mg/mL)	1024	512	512	1024	256	512
Ceftazidime (μ g/mL)	>1024	32	8	-	-	512
Cloxacillin (μ g/mL)	-	-	-	>1024	32	-
Cephalexin (μ g/mL)	-	-	-	-	-	32

ตาราง 3.1 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต (MIC) ของยาปฏิชีวนะกลุ่มบีต้าแลคแทม (μ g/mL) และ separated fraction จากพลาสมาของจระเข้บ้านจืดไทย P1, P2, P3, P4 และ P5 (mg/mL) ด้านเชื้อ *E. cloacae* ที่คือต่อยา ceftazidime เชื้อ *E. coli* ที่คือต่อยา ceftazidime เชื้อ *E. coli* ที่ไวต่อยา ceftazidime เชื้อ *S. aureus* ที่คือต่อยา methicillin (MRSA) เชื้อ *S. aureus* ที่ไวต่อยา methicillin และเชื้อ *S. epidermidis* ซึ่งได้ทดสอบด้วยวิธี broth microdilution และทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง

สำหรับค่า MIC ของ separated fraction P1, P2, P3, P4 และ P5 ด้านเชื้อ CREnC 21394 มีค่า 1024, >1024, >1024, 1024 และ 1024 มก./มล. ตามลำดับ ขณะที่ค่า MIC ของ separated fraction ทั้งหมดในการต้านเชื้อ CREC 20662 และเชื้อ *S. epidermidis* 15505 มีค่าเท่ากันที่ 512 มก./มล. นอกจากนี้ยังพบว่าค่า MIC ของ separated fraction P1, P2, P3, P4 และ P5 ด้านเชื้อ CSEC 25922 มีค่า 512, 256, 1024, 512 และ 512 มก./มล. ตามลำดับ ขณะที่ด้านเชื้อ MRSA 20651 มีค่าเท่ากันที่ 1024 มก./มล. และค่า MIC ในการต้านเชื้อ MSSA มีค่า 8, 64, 128, 128 และ 256 มก./มล. สำหรับ separated fraction P1, P2, P3, P4 และ P5 ตามลำดับ ผลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าเมื่อใช้ separated fraction P1, P2, P3, P4 และ P5 เดี่ยวๆ มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเล็กน้อยในการยับยั้งเชื้อ CREC 20662 และ *S. epidermidis* 15505 แต่ไม่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในการยับยั้งเชื้อ MRSA 20651 และ CREnC 21394 และที่น่าสนใจ separated fraction P1 มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียมากกว่ายา cloxacillin ในการยับยั้งเชื้อ MSSA 29213

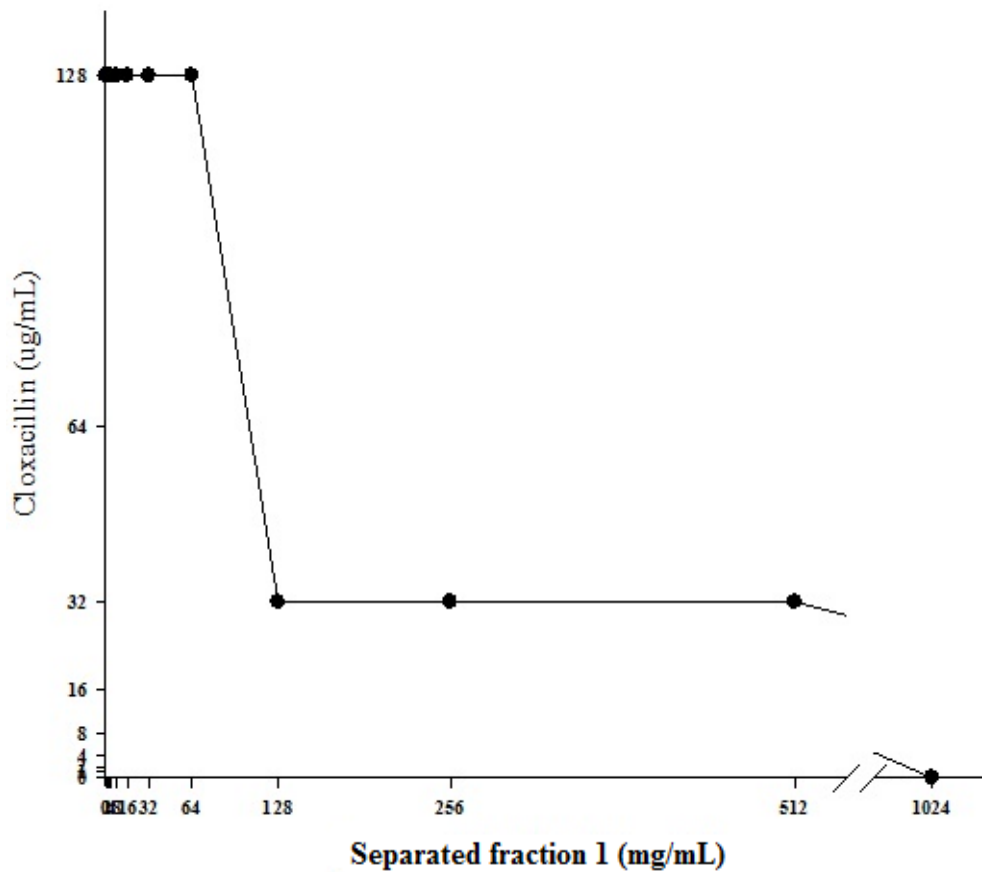
การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าพลาสมาจากจระเข้บ้านจืดไทย (*Crocodylus siamensis*) มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Salmonella typhi* เชื้อ *Klebsiella pneumoniae* เชื้อ *S. aureus* เชื้อ *P. aeruginosa* และเชื้อ *Vibrio cholera* (Kommanee et al., 2012; Preecharram et al., 2008;

Thammasirirak and Daduang, 2004) และจากการศึกษาของ Preecharram et al. (2010) พบว่า Crocosin ที่ได้สกัดแยกจากพลาสมาของจะเข้ น้ำจืดไทยมีฤทธิ์ด้านแบคทีเรียในการยับยั้งเชื้อ *S. typhi* และ *S. aureus* ซึ่งกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบของทั้ง hydrolyzed และ non-hydrolyzed crocosin มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 525-796 Da ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* ที่ 10 ชั่วโมง นอกจากนี้การศึกษาที่ผ่านมาได้ศึกษาฤทธิ์ด้านแบคทีเรียของซีรัมจาก *American misissippiensis* พบว่าเชื้อ *E. coli* ที่ได้รับซีรัมจาก *A. misissippiensis* มีอัตราการรอดชีวิตน้อยกว่าได้รับซีรัมของมนุษย์ 10 เท่า อีกทั้งมีสเปกตรัมในการด้านแบคทีเรียกว้างกว่าซีรัมของมนุษย์เช่นเดียวกัน (Merchant et al., 2003) ขณะเดียวกันงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าเปปไทด์ Leucrocins I-IV ที่ได้สกัดแยกจากเซลล์เม็ดเลือดขาวของจะเข้ น้ำจืดไทยมีค่า MIC อยู่ระหว่าง 0.66-25 ไมโครกรัม/มล. ด้านเชื้อ *S. epidermidis* (Pata et al., 2011) ในทางเดียวกันผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า separated fraction P1, P2, P3, P4 และ P5 จากพลาสมาของจะเข้ น้ำจืดไทยมีฤทธิ์ด้านแบคทีเรียเล็กน้อยในการยับยั้งเชื้อ CREC 20662 เชื้อ CSEC 25922 เชื้อ MSSA 29213 และเชื้อ *S. epidermidis* 15505 ซึ่งค่า MIC ของ fraction ด้านเชื้อที่ยังคงไวต่อยาปฏิชีวนะดังกล่าวมีค่าค่อนข้างต่ำกว่าเชื้อที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ สำหรับผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สนับสนุนสมมติฐานที่ว่าสารออกฤทธิ์ด้านแบคทีเรียของ separated fraction จากพลาสมาของจะเข้ น้ำจืดไทยอาจเป็นไปได้ว่าเป็นฤทธิ์ของกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบของโพลีเปปไทด์ที่หนักกว่าและยาวกว่า crocosin (Preecharram et al., 2010)

3.4 Checkerboard determination

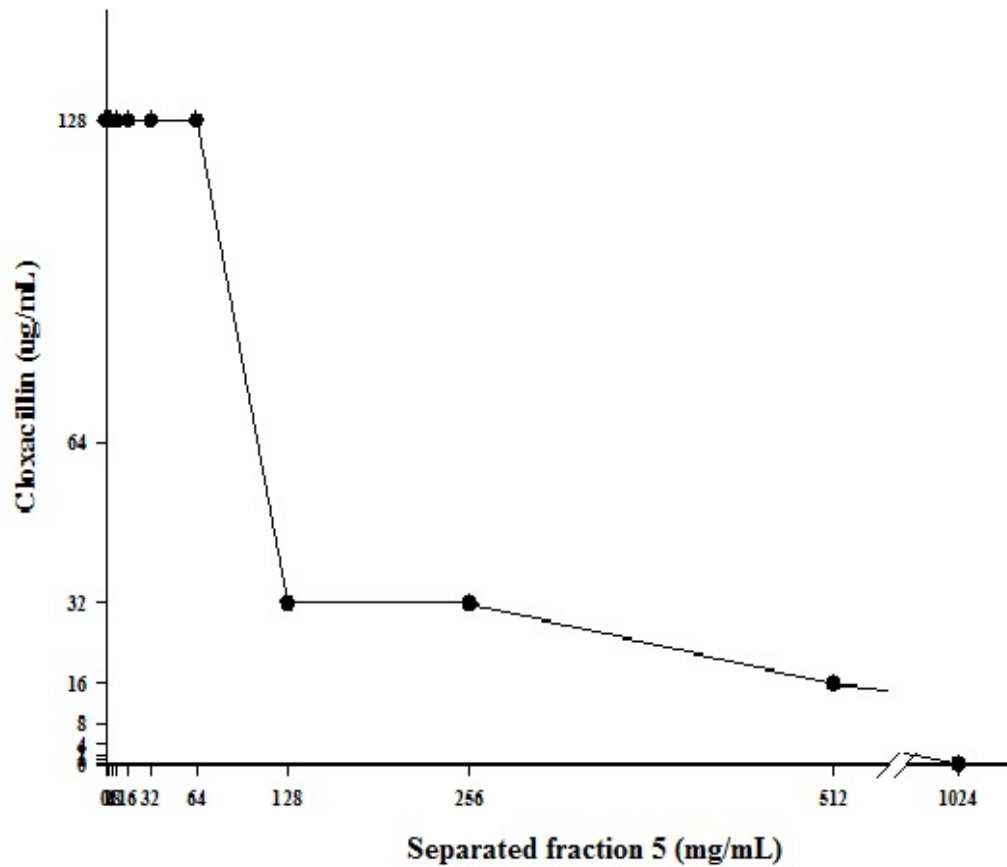
การทดสอบการออกฤทธิ์เสริมกันในการด้านแบคทีเรียของ separated fraction จากพลาสมาของจะเข้ น้ำจืดไทยและยาปฏิชีวนะได้ศึกษาด้วยวิธี Checkerboard โดย separated fraction ที่ได้เลือกนำมาศึกษาการออกฤทธิ์เสริมกันกับยา ceftazidime และยา cloxacillin ได้แก่ P1 และ P5 ในการด้านเชื้อ CREnC 21394 เชื้อ CREC 20662 และเชื้อ MRSA 20651 ยาผสมแต่ละคู่ที่มีการเสริมฤทธิ์กันจะถูกนำมาสร้างเป็นกราฟ isobolograms ดังที่ได้แสดงในรูป 3.9-3.12 และข้อมูลที่ได้จากการทดสอบด้วยวิธี checkerboard ได้สรุปไว้ในตาราง 3.2 ปฏิกริยาระหว่าง separated fraction P1 และ P5 จากพลาสมาของจะเข้ น้ำจืดไทยและยา ceftazidime หรือ cloxacillin อธิบายโดยใช้ค่าดัชนี fraction inhibitory concentration (ดัชนี FIC) ซึ่งได้คำนวณและแปลผลตามคำอธิบายของ Odds's ดังต่อไปนี้ ถ้าค่าดัชนี FIC ≤ 0.5 หมายถึงมีการเสริมฤทธิ์ (Synergism) ถ้าดัชนี FIC $> 0.5-4.0$ หมายถึงไม่มีปฏิกริยาระหว่างยา (No interaction) และถ้าดัชนี FIC > 4.0 หมายถึงการต้านฤทธิ์ (Antagonism) (Johnson et al., 2004; Odds, 2003) รูป 3.9 และ 3.10 แสดงการออกฤทธิ์เสริมกันระหว่าง separated fraction ทั้ง P1 หรือ P5 จากพลาสมาของจะเข้ น้ำจืดไทยผสมกับยา cloxacillin ด้านเชื้อ MRSA 20651 (FICI ≤ 0.5) เช่นเดียวกับสารผสมระหว่าง separated fraction P1 หรือ P5 และยา ceftazidime มีการเสริมฤทธิ์กันด้านเชื้อ CREnC 21394 ที่ FICI ≤ 0.5 ดังแสดงในรูป 3.11 และ 3.12

Cloxacillin against MRSA 20651

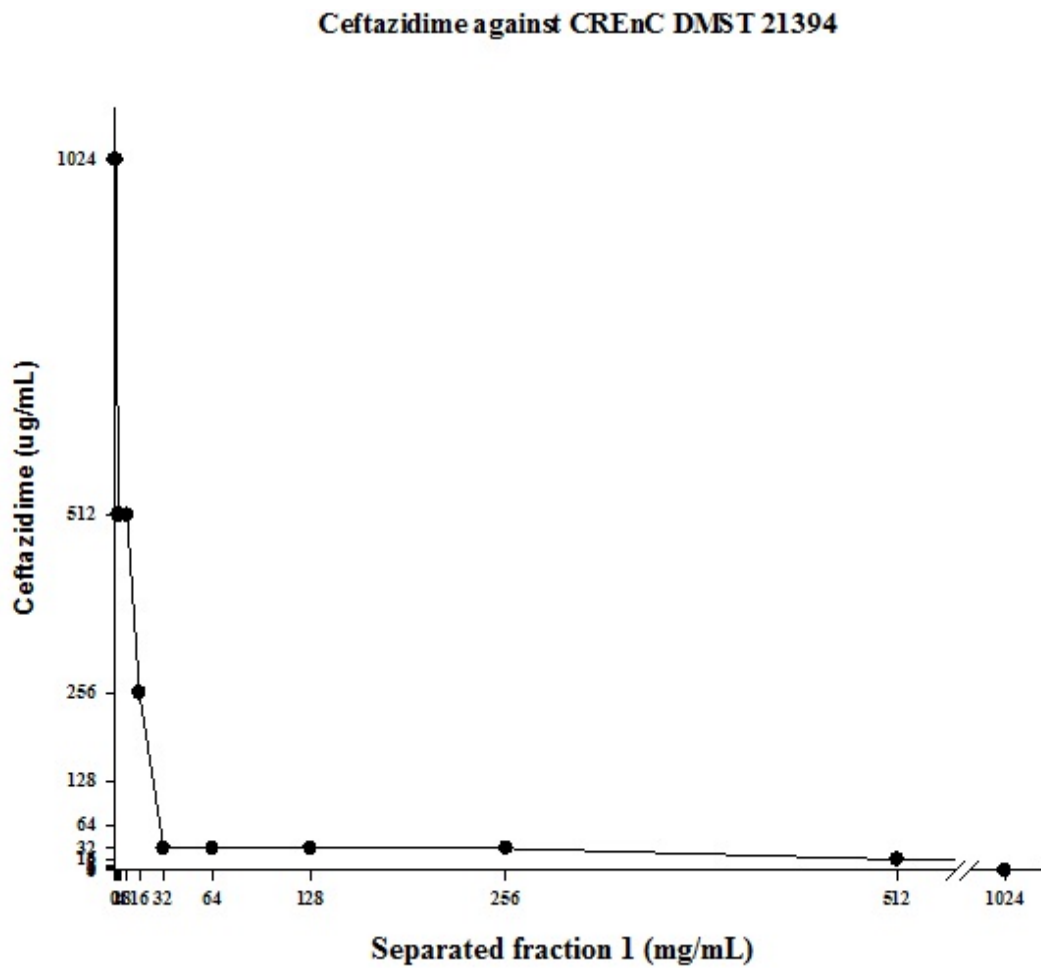


รูป 3.9 Isobologram สร้างจากข้อมูลที่ได้จากการทดสอบปฏิริยาระหว่างยาด้วยวิธี checkerboard ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการออกฤทธิ์เสริมกันระหว่างยา cloxacillin ผสมกับ separated fraction P1 ด้านเชื้อ *S. aureus* DMST 20651 (MRSA 20651)

Cloxacillin against MRSA 20651

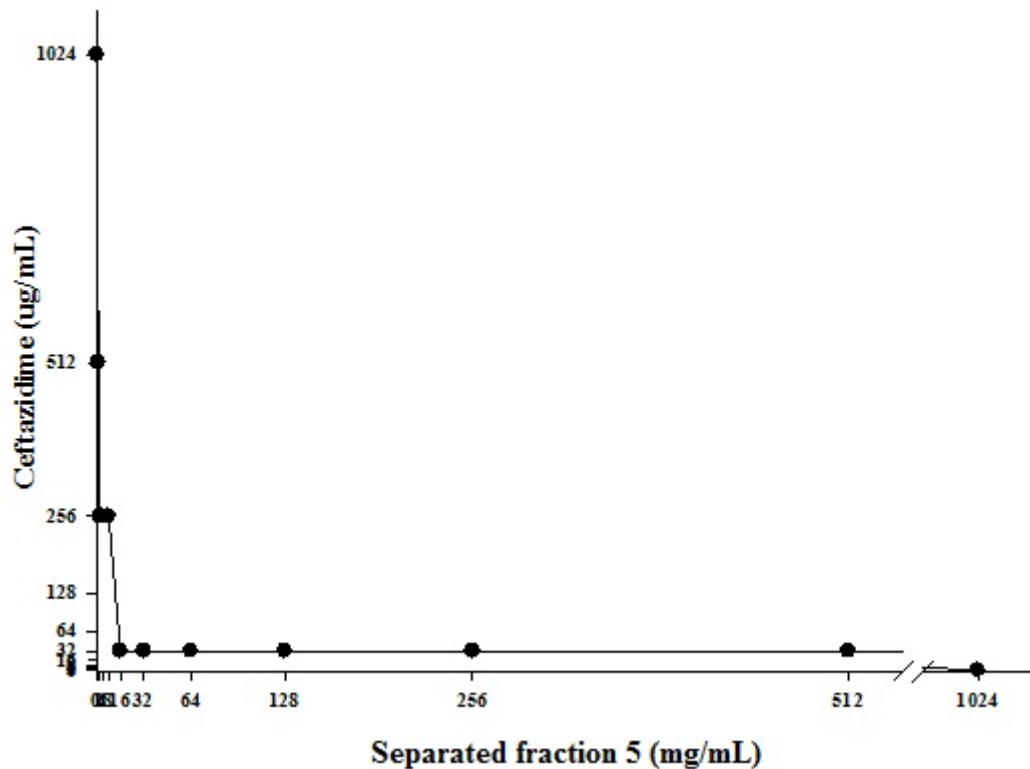


รูป 3.10 Isobologram สร้างจากข้อมูลที่ได้จากการทดสอบปฏิกริยาระหว่างยาด้วยวิธี checkerboard ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการออกฤทธิ์เสริมกันระหว่างยา cloxacillin ผสมกับ separated fraction P5 ด้านเชื้อ *S. aureus* DMST 20651



รูป 3.11 Isobologram สร้างจากข้อมูลที่ได้จากการทดสอบปฏิกริยาระหว่างยาด้วยวิธี checkerboard ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการออกฤทธิ์เสริมกันระหว่างยา cloxacillin ผสมกับ separated fraction P1 ด้านเชื้อ *E. cloacae* ที่ดื้อต่อยา ceftazidime DMST 21394 (CREnC 21394)

Ceftazidime against CREnC DMST 21394



รูป 3.12 Isobologram สร้างจากข้อมูลที่ได้จากการทดสอบปฏิริยาระหว่างยาด้วยวิธี checkerboard ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการออกฤทธิ์เสริมกันระหว่างยา cloxacillin ผสมกับ separated fraction P5 ด้านเชื้อ *E. cloacae* ที่คือตัวยา ceftazidime DMST 21394 (CREnC 21394)

ค่า MIC ของ separated fraction P1 และ P5 เมื่อผสมกับยา ceftazidime มีค่าลดลงอย่างเห็นได้ชัดจาก MIC ของ P1 และ P5 เท่ากันที่ > 1024 มก./มล. ผสมกับ ceftazidime 1024 ไมโครกรัม/มล. ลดลงเหลือ 32 มก./มล. ($1/32$ MIC) สำหรับ P1 และ P5 และ 32 ไมโครกรัมสำหรับยา ceftazidime ($1/32$ MIC) ด้านเชื้อ CREnC 21394 นอกจากนี้ MIC ของ separated fraction P1 และ P5 เมื่อผสมกับยา cloxacillin มีค่าลดลงอย่างเห็นได้ชัดเช่นเดียวกันซึ่งค่า MIC ของ P1 และ P5 ลดลงจาก >1024 มก./มล. เป็น 128 มก./มล. ($1/8$ MIC) และความเข้มข้นของยา cloxacillin ลดลงจาก 128 ไมโครกรัม/มล. เป็น 32 ไมโครกรัม/มล. ($1/4$ MIC) ในการยับยั้งเชื้อ MRSA 20651 อีกทั้งยังพบว่าค่า MIC ของ separated fraction P1 และ P5 เมื่อผสมกับยา ceftazidime ด้านเชื้อ CREC 20662 มีค่าลดลงเช่นเดียวกันโดยที่ค่า MIC ของ P1 และ P5 ลดลงจาก 512 มก./มล. เป็น 256 และ 128 มก./มล. ตามลำดับ ขณะที่ MIC ของยา ceftazidime เมื่อใช้ร่วมกับ P1 ลดลงจาก 32 ไมโครกรัม/มล. เป็น 1 ไมโครกรัม แต่ MIC ของยา ceftazidime ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อใช้ร่วมกับ P5

การเสริมฤทธิ์ของสารผสมระหว่าง separated fraction ทั้ง P1 และ P5 ผสมกับยา ceftazidime ด้านเชื้อ CREnc 21394 ที่ดัชนี FIC เท่ากันที่ 0.062 และมีการเสริมฤทธิ์ของสารผสมระหว่าง separated fraction ทั้ง P1 และ P5 ผสมกับยา cloxacillin ด้านเชื้อ MRSA 20651 อย่างไรก็ตามไม่พบการทำงานแบบเสริมฤทธิ์ของสารผสมระหว่าง P1 และ P5 ผสมกับยา ceftazidime ด้านเชื้อ EREC 20662 ที่ดัชนี FIC 0.531 และ 1.24 ตามลำดับ (ตาราง 3.2) โดยทั่วไปค่าดัชนี FIC ที่มีค่าต่ำกว่า 0.5 ได้รับการยอมรับกันอย่างกว้างขวางว่ามีการเสริมฤทธิ์ระหว่างยาต้านจุลชีพ 2 ชนิด (Johnson et al., 2004; Odds, 2003) ดังนั้นผลจากการศึกษาครั้งนี้เป็นหลักฐานที่ยืนยันว่ามีการเสริมฤทธิ์กันอย่างมากระหว่าง separated fraction P1 และ P5 เมื่อใช้ร่วมกับยา ceftazidime หรือยา cloxacillin ด้านเชื้อ CREnc 21394 และ MRSA 20651 ตามลำดับ

ตาราง 3.2 สรุปค่า FIC ที่ได้จากการทดสอบด้วยวิธี Checkerboard ของยาปฏิชีวนะกลุ่มบีต้าแลคแทมเมื่อใช้เดี่ยวๆ หรือใช้ร่วมกับ separated fraction P1 และ P5 จากพลาสมาของจระเข้น้ำจืดไทยด้านแบคทีเรียคือยา

Test bacteria	Combination of agents	MIC (/mL)	MIC (A+B)	FIC index	Type of interaction
CREnc 21394	Ceftazidime (µg)	>1024	32	0.062	synergism
	P1 (mg)	>1024	32		
	Ceftazidime (µg)	>1024	32	0.062	synergism
	P5 (mg)	>1024	32		
MRSA 20651	Cloxacillin (µg)	128	32	0.375	synergism
	P1 (mg)	1024	128		
	Cloxacillin (µg)	128	32	0.375	synergism
	P5 (mg)	1024	128		
<i>E. coli</i> 20662	Ceftazidime (µg)	32	1	0.531	no interaction
	P1 (mg)	512	256		
	Ceftazidime (µg)	32	32	1.25	no interaction
	P5 (mg)	512	128		

หนึ่งในแนวทางการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียคือยาคือการให้ยาสูตรผสมโดยให้ยาด้านจุลชีพ 2 ชนิดหรือมากกว่าซึ่งแนวทางการรักษานี้จะช่วยลดอุบัติการณ์การดื้อยาของแบคทีเรีย ลดความเป็นพิษ หรือผลข้างเคียงของยาจากการให้ยาในขนาดที่สูงซึ่งการให้ยาสูตรผสมจะสามารถช่วยลดความเข้มข้นหรือขนาดของยาได้ และการให้ยาสูตรผสมจะมีประสิทธิภาพในการรักษาการติดเชื้อจุลชีพหลายชนิด (polymicrobial infections) กลไกการออกฤทธิ์ของการให้ยาด้านจุลชีพร่วมกันในการรักษาการติดเชื้อจุล

ชีพนั่นออกฤทธิ์ผ่าน 4 กลไกบนพื้นฐานการศึกษาทางด้านเภสัชจลนศาสตร์ ชีวโมเลกุล และการศึกษาทางด้านคลินิก 1) การเสริมฤทธิ์และมีเป้าหมายการออกฤทธิ์หลายตำแหน่ง 2) ผลทางด้านเภสัชจลนศาสตร์โดยเพิ่มการละลาย อัตราการดูดซึมและเพิ่มชีวปริมาณการออกฤทธิ์ (Bioavailability) 3) ทำปฏิกิริยากับกลไกการดื้อยาของแบคทีเรีย 4) ช่วยกำจัดหรือช่วยลดผลข้างเคียงของยา (Wagner and Ulrich-Merzenich, 2009) เปปไทด์ที่เป็นประจวบเหมาะได้มีรายงานว่ามีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบและพบว่าการเสริมฤทธิ์กันระหว่างเปปไทด์ (Yan and Hancock, 2001) นอกจากนี้งานวิจัยที่ผ่านมาได้ศึกษาปฏิกิริยาระหว่างยาปฏิชีวนะและเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ด้านแบคทีเรียในการยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* พบว่าการออกฤทธิ์เสริมกันในการยับยั้งเชื้อดังกล่าว (ดัชนี $FIC \leq 0.5$) (Naghmouchi et al., 2012) พลาสมาของจระเข้ น้ำจืดไทยที่ได้นำมาศึกษาในครั้งนี้ประกอบด้วยเปปไทด์ที่เป็นประจวบเหมาะซึ่งพบว่ามีสารผสมระหว่าง separated fraction จากพลาสมาของจระเข้ น้ำจืดไทยและยาปฏิชีวนะกลุ่มบีต้าแลคแทมมีการเสริมฤทธิ์ด้านแบคทีเรียซึ่งผลที่ได้นี้สอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมา

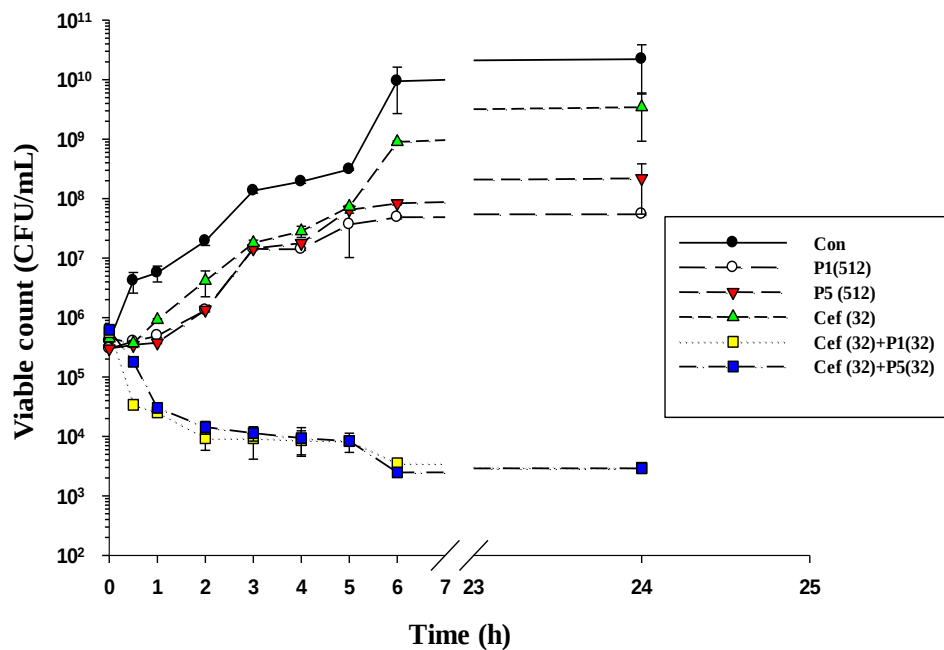
3.5 Killing curve determinations

ปริมาณการมีชีวิตของแบคทีเรียหลังจากได้รับ separated fraction ทั้งเดี่ยวๆ หรือใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะได้ถูกนำมาสร้างเป็นกราฟ killing curve เพื่อยืนยันการออกฤทธิ์ด้านแบคทีเรียและการเสริมฤทธิ์ของ separated fraction P1 และ P5 จากพลาสมาของจระเข้ น้ำจืดไทยเมื่อใช้เดี่ยวๆ และใช้ร่วมกับยา ceftazidime ด้านเชื้อ CREnc 21394 หรือใช้ร่วมกับยา cloxacillin ด้านเชื้อ MRSA 20651 รูป 3.13 แสดงผลของ separated fraction ทั้ง P1 (512 มก./มล.) P5 (512 มก./มล.) และยา ceftazidime (32 ไมโครกรัม/มล.) เมื่อใช้เดี่ยวๆ หรือใช้ร่วมกันเพื่อในการยับยั้งเชื้อ CREnc 21394 ขณะที่ผลของยา cloxacillin (64 ไมโครกรัม/มล.) P1 (512 มก./มล.) และ P5 (512 มก./มล.) เมื่อใช้เดี่ยวหรือใช้ร่วมกันด้านเชื้อ MRSA 20651 ได้แสดงในรูป 3.14

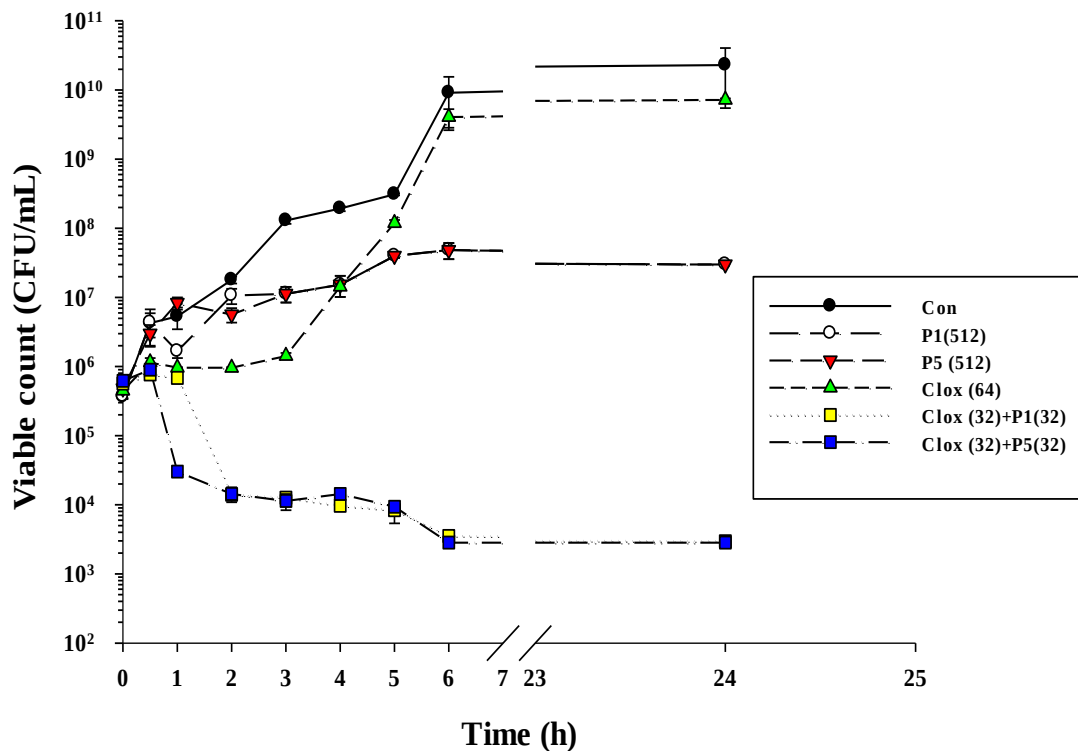
เชื้อ CREnc 21394 ที่ไม่ได้รับสารด้านแบคทีเรีย (ควบคุม) พบว่ามีจำนวนโคโลนีแบคทีเรียที่มีชีวิตเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอด 24 ชั่วโมง ขณะที่เซลล์ที่ได้รับ separated fraction P1 และ P5 จากพลาสมาของจระเข้ น้ำจืดไทยและยา ceftazidime เดี่ยวๆ มีจำนวนโคโลนีแบคทีเรียที่มีชีวิตค่อยๆ เพิ่มขึ้นตลอดช่วง 24 ชั่วโมง แต่เพิ่มขึ้นน้อยกว่าเซลล์ควบคุมและที่น่าสังเกตสารผสมระหว่างยา ceftazidime และ separated fraction ทั้ง P1 และ P5 ทำให้จำนวนโคโลนีของเชื้อ CREnc 21394 ลดลงอย่างชัดเจนจาก 5×10^5 CFU/mL เหลือ 10^3 CFU/mL ภายใน 6 ชั่วโมงและคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 24 (รูป 3.13) ผลดังกล่าวพิสูจน์ให้เห็นว่า separated fraction ทั้ง P1 (32 มก./มล.) หรือ P5 (32 มก./มล.) จากพลาสมาของจระเข้ น้ำจืดไทยเมื่อใช้ร่วมกับยา ceftazidime (32 ไมโครกรัม/มล.) มีการเสริมฤทธิ์กันอย่างมากในการด้านเชื้อ CREnc 21394 ขณะเดียวกันผลการศึกษารุ่นนี้ค่อนข้างสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาที่พบว่า

ยา ceftazidime ผสมกับฟลาโวนอยด์ทำให้จำนวนโคโลนีของเชื้อ MRSA ลดลงเหลือ 5×10^3 CFU/mL ภายใน 6 ชั่วโมงและไม่มีโคโลนีเพิ่มขึ้นจนถึงชั่วโมงที่ 24

สำหรับเชื้อ MRSA 20651 ที่ไม่ได้รับสารต้านแบคทีเรีย (ควบคุม) พบว่าไม่มีการลดลงของจำนวนโคโลนีแบคทีเรียตั้งแต่เริ่มต้นการทดสอบจนถึงชั่วโมงที่ 24 และพบว่าสารผสมระหว่าง separated fraction ทั้ง P1 และ P5 ผสมกับยา cloxacillin มีผลทำให้จำนวนโคโลนีของเชื้อ MRSA 20651 ลดลงอย่างต่อเนื่องจาก 5×10^5 CFU/mL เหลือเพียง 10^3 ภายใน 6 ชั่วโมงและไม่มีการเปลี่ยนแปลงจนถึงชั่วโมงที่ 24 (รูป 3.14) ผลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า separated fraction P1 และ P5 จากพลาสมาของจระเข้ น้ำจืดไทยเมื่อใช้ร่วมกับยา cloxacillin มีการเสริมฤทธิ์ต้านแบคทีเรียอย่างมากในการยับยั้งเชื้อ MRSA 20651 ซึ่งผลที่ได้ดังกล่าวสามารถยืนยันผลการออกฤทธิ์เสริมกันใน checkerboard ได้เช่นเดียวกัน



รูป 3.13 ผลของ separated fraction ทั้ง P1 (512 มก./มล.) P5 (512 มก./มล.) และยา ceftazidime (32 ไมโครกรัม/มล.) เมื่อใช้เดี่ยวๆ หรือใช้ร่วมกันต้านเชื้อ *E. cloacae* ที่ดื้อต่อยา ceftazidime DMST 21394 (CREnC 21394) ค่าที่ได้นำมาสร้างเป็นกราฟเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง และแถบในแนวดิ่ง (vertical bars) แสดงถึงความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (Standard error of mean; SEM) Con= แบคทีเรียที่ไม่ได้รับยาหรือ separated fraction (ควบคุม) P1(512)= P1 ที่ความเข้มข้น 512 มก./มล. P5(512) = P5 ที่ความเข้มข้น 512 มก./มล. Cef(32)=ยา ceftazidime ที่ความเข้มข้น 32 ไมโครกรัม/มล. P1(32)+Cef(32) = P1 ที่ความเข้มข้น 32 มก./มล + ยา ceftazidime ที่ความเข้มข้น 32 ไมโครกรัม/มล. และ P5(32)+Cef(32) = P5 ที่ความเข้มข้น 32 มก./มล + ยา ceftazidime ที่ความเข้มข้น 32 ไมโครกรัม/มล.

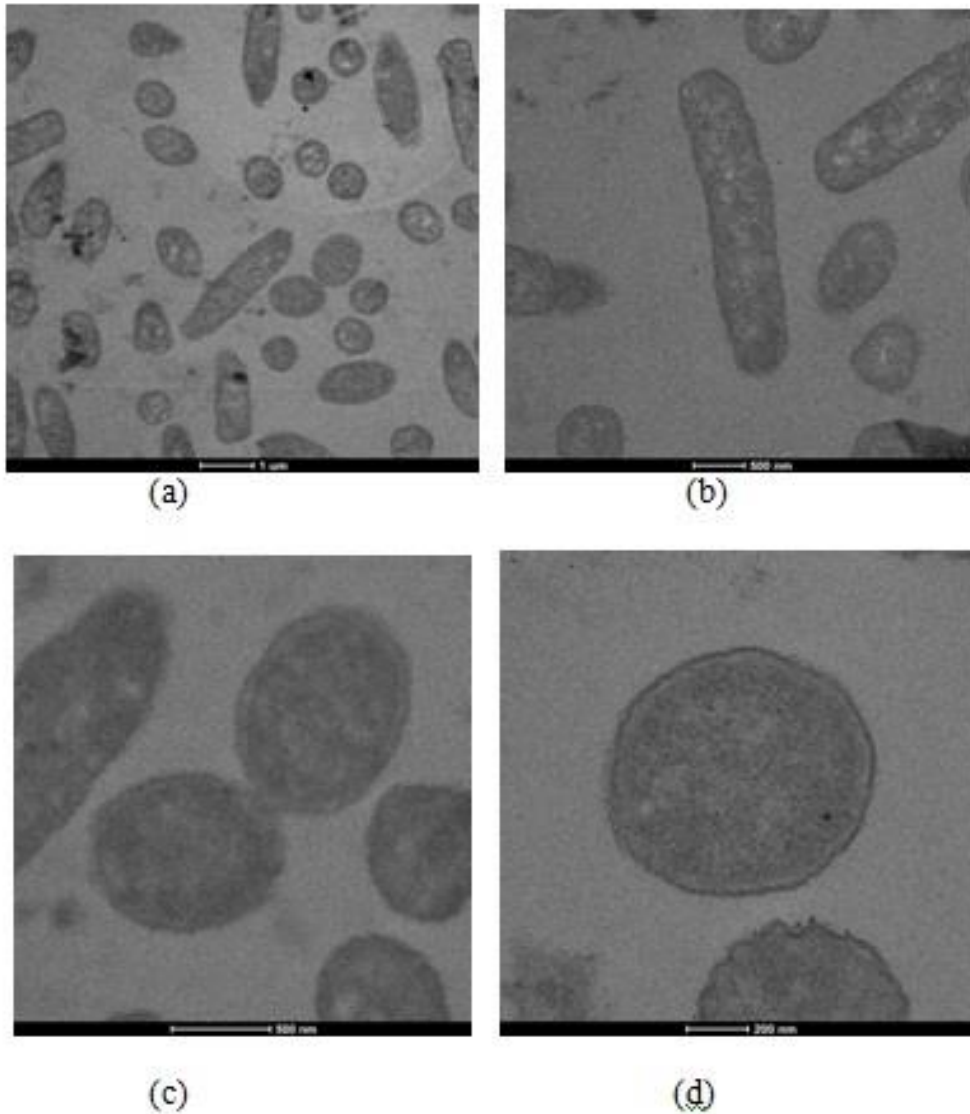


รูป 3.14 ผลของ separated fraction ทั้ง P1 (512 มก./มล.) P5 (512 มก./มล.) และยา cloxacillin (64 ไมโครกรัม/มล.) เมื่อใช้เดี่ยวๆ หรือใช้ร่วมกันต้านเชื้อ *S. aureus* ที่ดื้อต่อยา methicillin DMST 20651 (MRSA 20651) ค่าที่ได้นำมาสร้างเป็นกราฟเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง และแถบในแนวดิ่ง (vertical bars) แสดงถึงความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (Standard error of mean; SEM) Con= แบคทีเรียที่ไม่ได้รับยาหรือ separated fraction (ควบคุม) P1(512)= P1 ที่ความเข้มข้น 512 มก./มล. P5(512) = P5 ที่ความเข้มข้น 512 มก./มล. Clox(64)=ยา cloxacillin ที่ความเข้มข้น 64 ไมโครกรัม/มล. P1(32)+Clox(32) = P1 ที่ความเข้มข้น 32 มก./มล + ยา cloxacillin ที่ความเข้มข้น 32 ไมโครกรัม/มล. และ P5(32)+Clox(32) = P5 ที่ความเข้มข้น 32 มก./มล + ยา cloxacillin ที่ความเข้มข้น 32 ไมโครกรัม/มล.

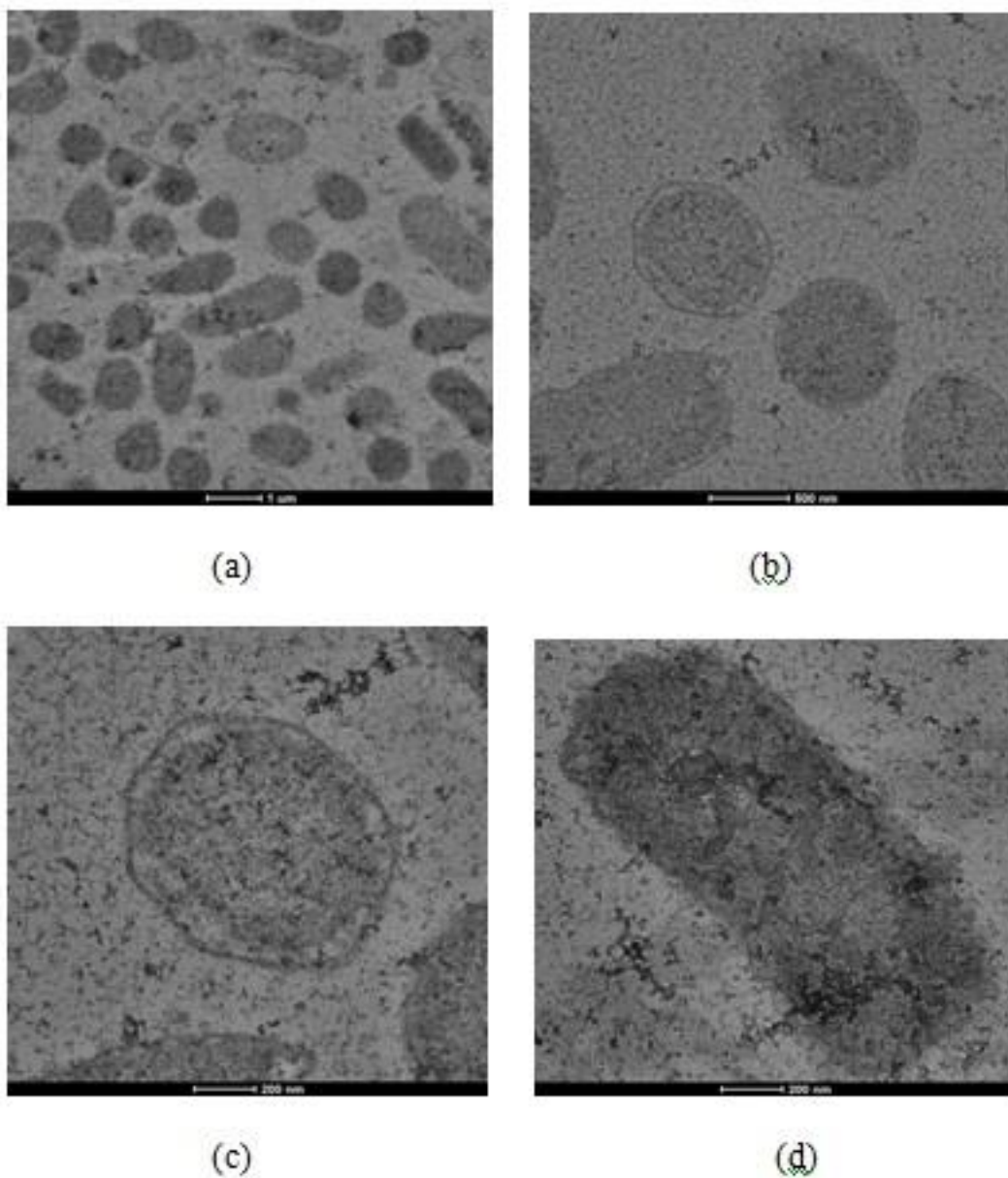
3.6 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

สารผสมระหว่าง separated fraction P1 หรือ P5 ผสมกับยา ceftazidime ด้านเชื้อ CREnc 21394 ซึ่งมีค่าดัชนี FIC ต่ำสุดได้ถูกเลือกมาทดสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน (transmission electron microscope; TEM) เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเชื้อที่ได้รับสารด้านแบคทีเรียทั้งใช้เดี่ยวๆ หรือใช้ร่วมกัน ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารผสมระหว่างยา ceftazidime และ separated fraction ทั้ง P1 หรือ P5 ส่งผลให้โครงสร้างระดับจุลภาค (ultrastructure) ของเชื้อ CREnc 21394 ได้รับ

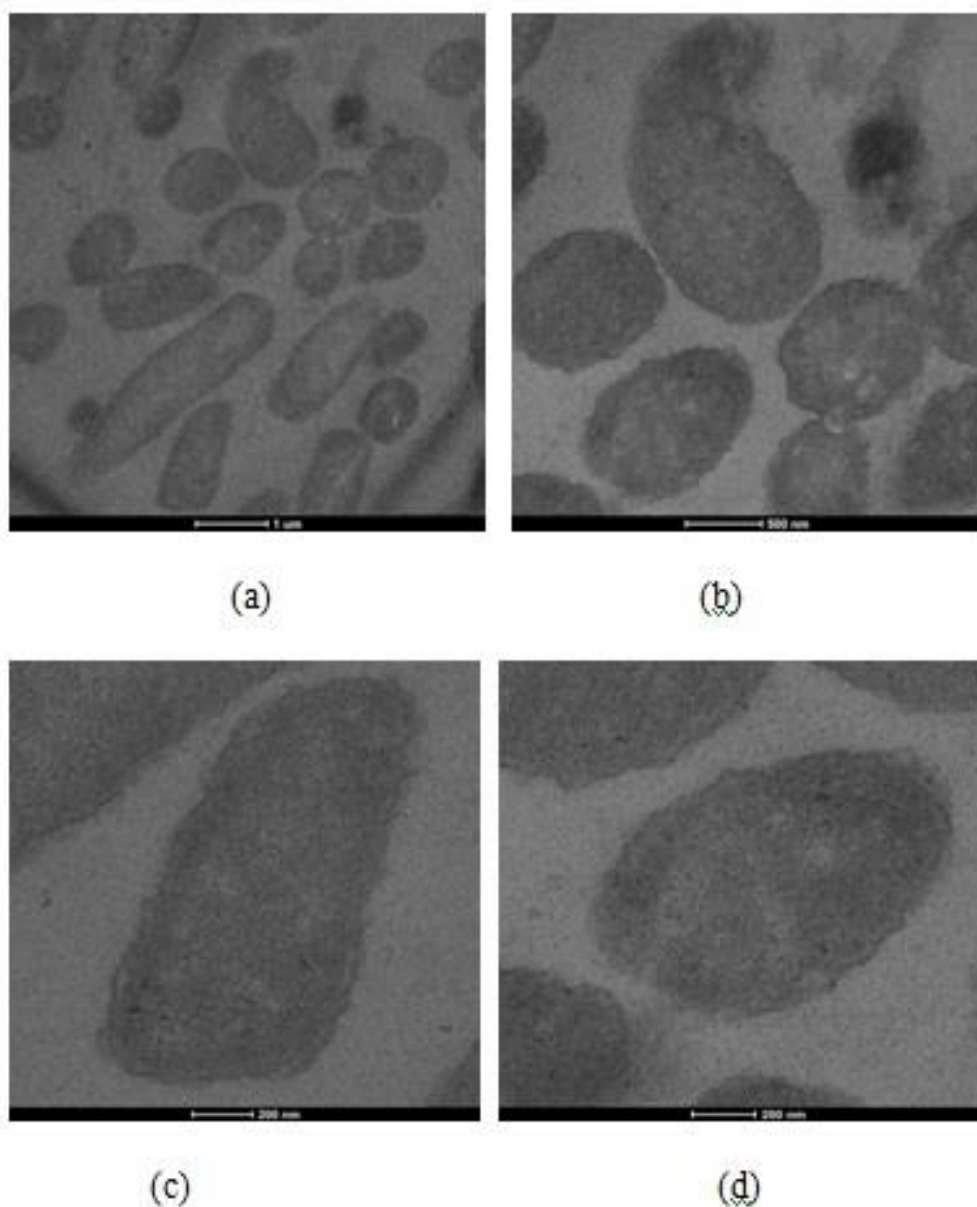
ความเสียหาย ผลจากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่านได้แสดงในรูป 3.15-3.20 และการเปรียบเทียบขนาดของเซลล์แบคทีเรีย (≥ 10 เซลล์) ได้คำนวณโดย ความกว้าง x ความยาวของเซลล์ (ตารางนาโนเมตร; nm^2) ซึ่งได้แสดงในรูป 3.21



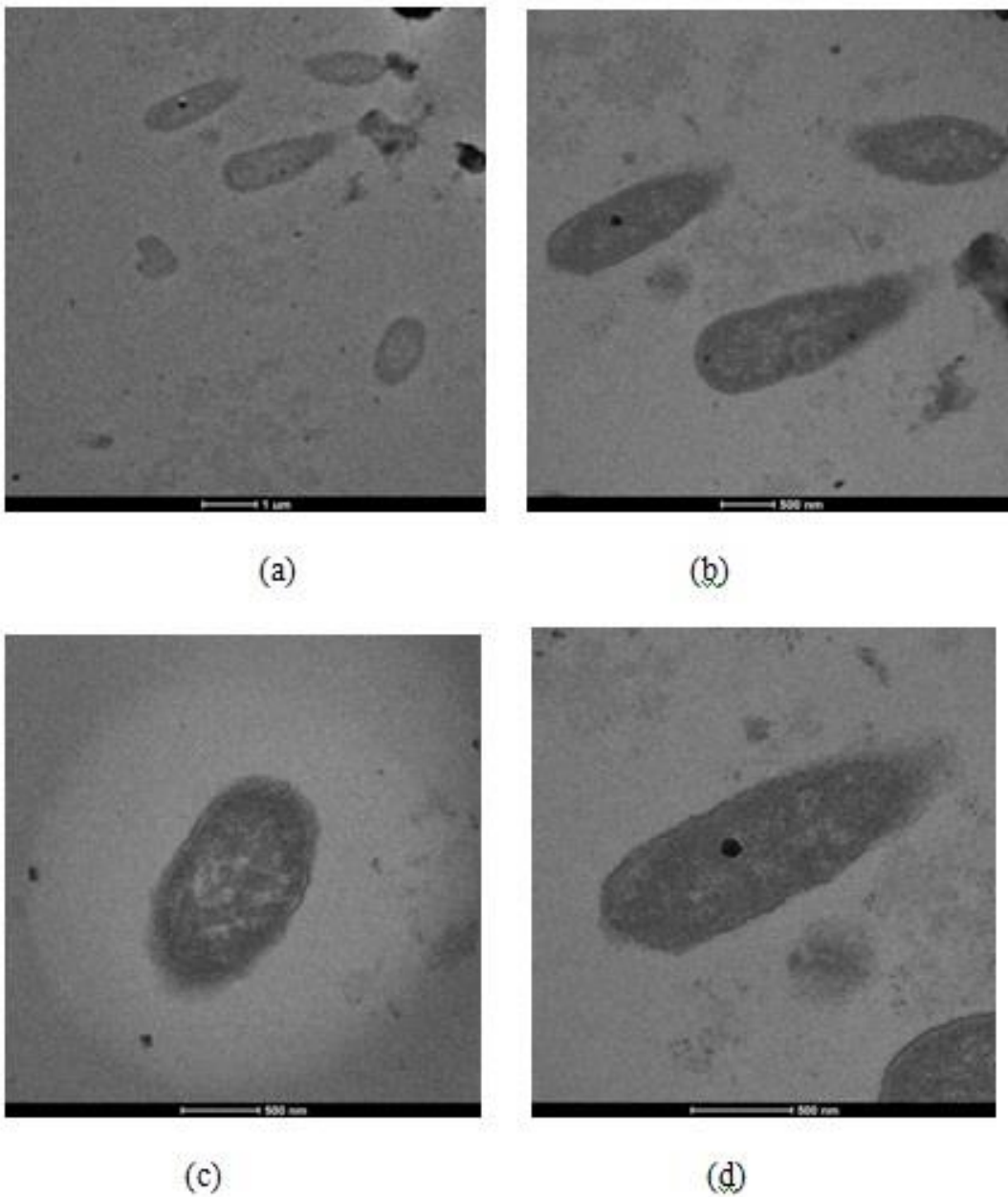
รูป 3.15 เชื้อ *E. cloacae* ที่ดื้อต่อยา ceftazidime DMST 21394 (CREnC 21394) ระยะ log phase ที่ได้เจริญในอาหาร Mueller-Hinton broth เป็นเวลา 4 ชั่วโมงที่ได้ถูกตัดให้บางระดับจุลภาค (Ultrathin section): (a), (b), (c) และ (d) คือเซลล์ที่ไม่ได้รับสารต้านแบคทีเรีย (ควบคุม) x5,000, bar=11 μm (a); x 9,900, bar = 500 nm (b); x 19,500, bar = 500 nm (c); x29,900, bar = 200 nm (d)



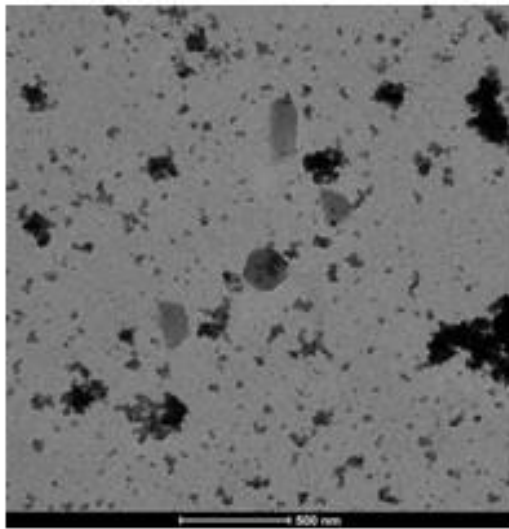
รูป 3.16 เชื้อ *E. cloacae* ที่ดื้อต่อยา ceftazidime DMST 21394 (CREnC 21394) ระยะ log phase ที่ได้เจริญในอาหาร Mueller-Hinton broth เป็นเวลา 4 ชั่วโมงที่ได้ถูกตัดให้บางระดับจุลภาค (Ultrathin section) (a), (b), (c) และ (d) คือเซลล์ที่ได้รับ separated fraction P1 ที่ความเข้มข้น 512 มก./มล.: x5,000, bar = 1 μm (a); x15,000, bar = 500 nm (b); x29,000, bar = 200 nm (c); x29,000, bar = 200 nm (d)



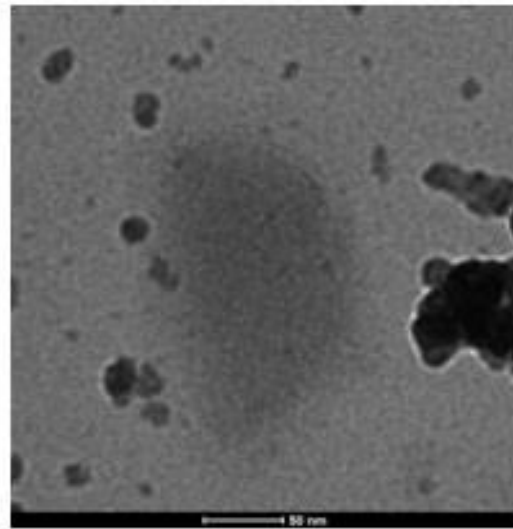
รูป 3.17 เชื้อ *E. cloacae* ที่ดื้อต่อยา ceftazidime DMST 21394 (CREnC 21394) ระยะ log phase ที่ได้เจริญในอาหาร Mueller-Hinton broth เป็นเวลา 4 ชั่วโมงที่ได้ถูกตัดให้บางระดับจุลภาค (Ultrathin section) (a), (b), (c) และ (d) คือเซลล์ที่ได้รับ separated fraction P5 ที่ความเข้มข้น 512 มก./มล.: x5,000, bar = 1 μm (a); x15,000, bar = 500 nm (b); x29,000, bar = 200 nm (c); x29,000, bar = 200 nm (d)



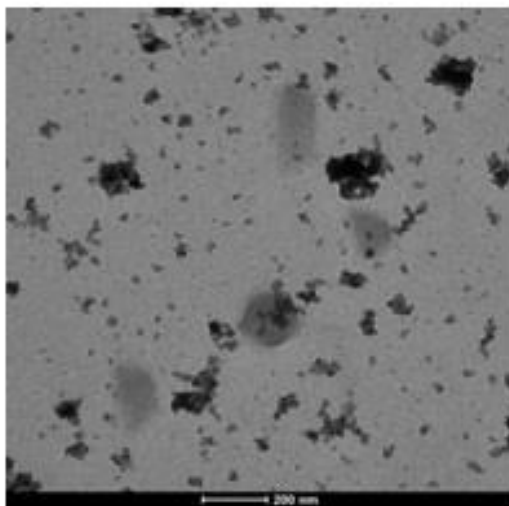
รูป 3.18 เชื้อ *E. cloacae* ที่ดื้อต่อยา ceftazidime DMST 21394 (CREnC 21394) ระยะ log phase ที่ได้เจริญในอาหาร Mueller-Hinton broth เป็นเวลา 4 ชั่วโมงที่ได้ถูกตัดให้บางระดับจุลภาค (Ultrathin section) (a), (b), (c) และ (d) คือเซลล์ที่ได้รับยา ceftazidime ที่ความเข้มข้น 16 ไมโครกรัม/มล.: x5,000, bar = 1 μm (a); x9,900, bar = 500 nm (b); x15,000, bar = 500 nm (c); x19,500, bar = 500 nm (d)



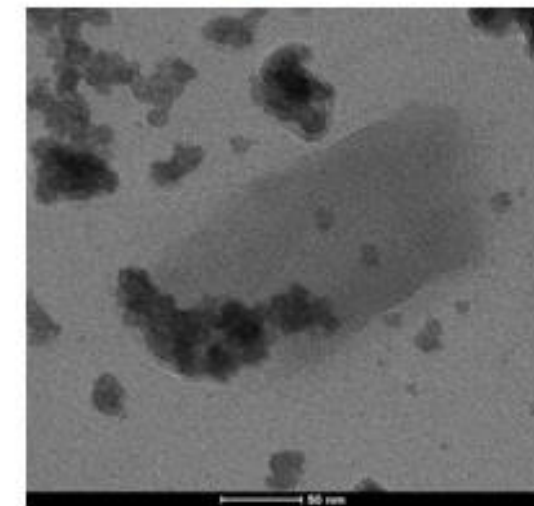
(a)



(b)

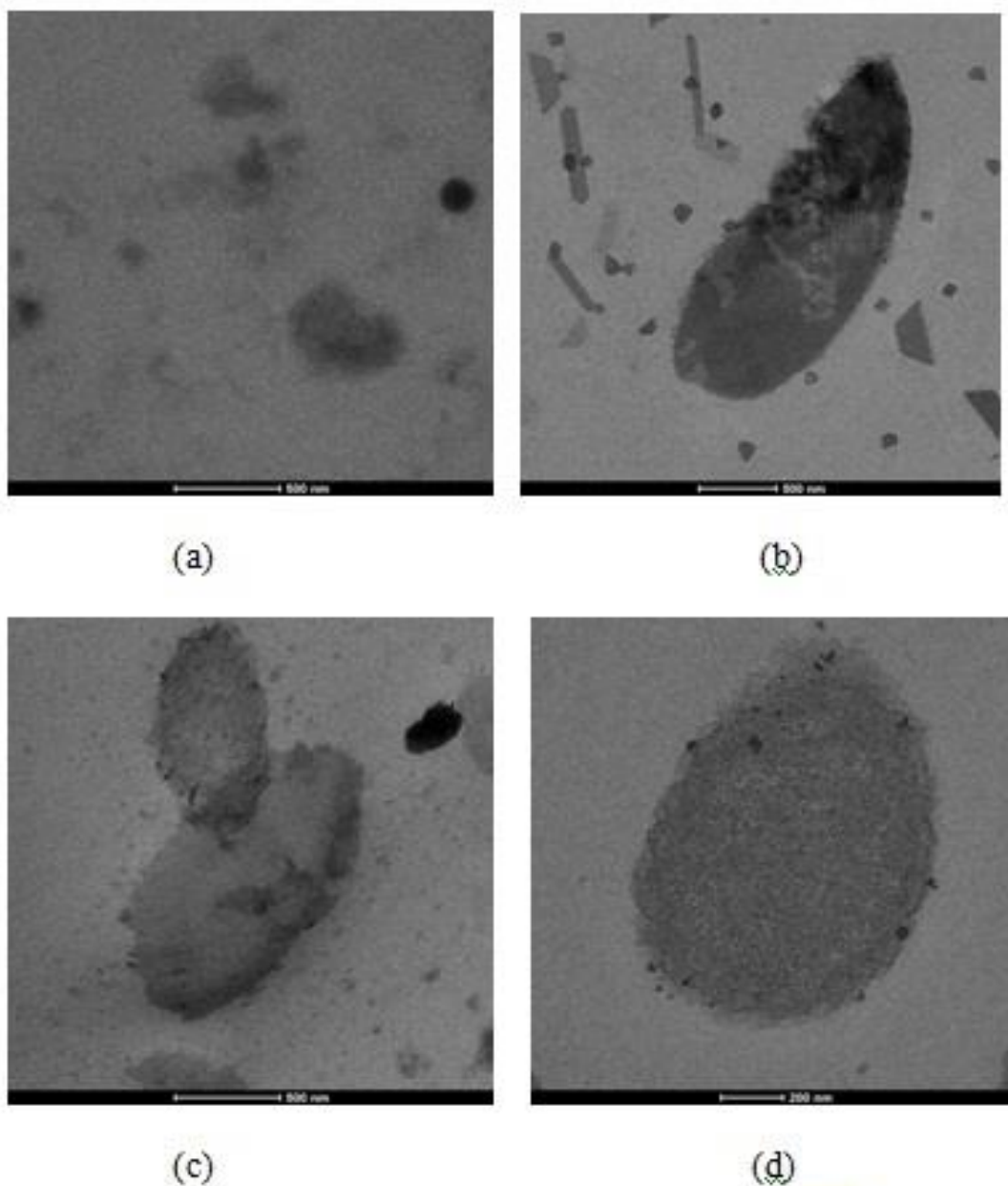


(c)



(d)

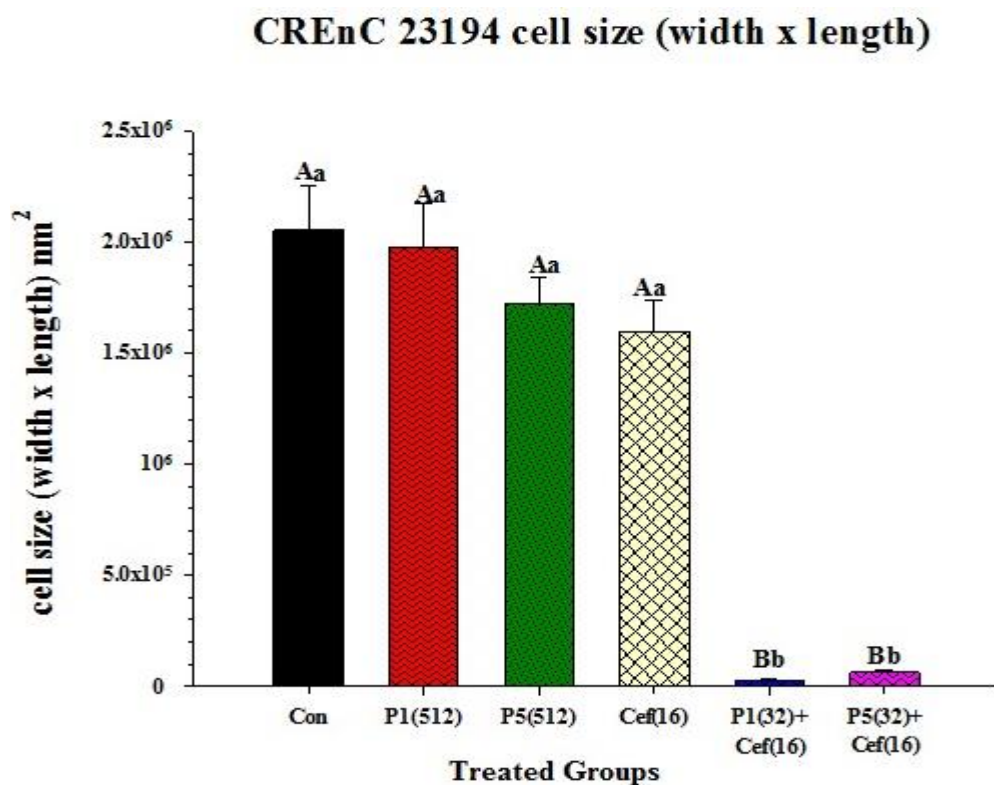
รูป 3.19 เชื้อ *E. cloacae* ที่ดื้อต่อยา ceftazidime DMST 21394 (CREnC 21394) ระยะ log phase ที่ได้เจริญในอาหาร Mueller-Hinton broth เป็นเวลา 4 ชั่วโมงที่ได้ถูกตัดให้บางระดับจุลภาค (Ultrathin section) (a), (b), (c) และ (d) คือเซลล์ที่ได้รับยา ceftazidime ที่ความเข้มข้น 16 ไมโครกรัม/มล.ผสมกับ separated fraction P1 ที่ความเข้มข้น 32 มก./มล.: x5,000, bar = 1 μm (a); x14,500, bar = 50 nm (b); x29,000, bar = 200 nm (c); x14,500, bar = 50 nm (d)



รูป 3.20 เชื้อ *E. cloacae* ที่ติดเชื้อยา ceftazidime DMST 21394 (CREnC 21394) ระยะ log phase ที่ได้เจริญในอาหาร Mueller-Hinton broth เป็นเวลา 4 ชั่วโมงที่ได้ถูกตัดให้บางระดับจุลภาค (Ultrathin section) (a), (b), (c) และ (d) คือเซลล์ที่ได้รับยา ceftazidime ที่ความเข้มข้น 16 ไมโครกรัม/มล.ผสมกับ separated fraction P5 ที่ความเข้มข้น 32 มก./มล.: x19,500, bar = 200 nm (a); x15,000, bar = 500 nm (b); x19,500, bar = 500 nm (c); x29,000, bar = 200 nm (d)

สัณฐานวิทยาของเชื้อ CREnC 21394 ที่ไม่ได้รับสารต้านแบคทีเรีย (ควบคุม) ได้แสดงในรูป

3.15 ซึ่งพบว่าผนังเซลล์และเยื่อหุ้มชั้นในสามารถจำแนกความแตกต่างได้อย่างชัดเจน การศึกษาประสิทธิภาพของ separated fraction P1 ที่ความเข้มข้น 512 มก./มล. ด้านเชื้อ CREnC 21394 ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่าส่วนที่ห่อหุ้มเซลล์ (cell envelope) ได้รับความเสียหายเล็กน้อยและประมาณร้อยละ 40-50 ของเซลล์ที่ได้รับ P1 เดียวๆ ก่อนข้างจะมีช่อง periplasm กว้างกว่ากลุ่มควบคุม (รูป 3.16) ขณะเดียวกันรูปร่างของเชื้อ CREnC 21394 ประมาณร้อยละ 80-90 ที่ได้รับ separated fraction P1 ที่ความเข้มข้น 512 มก./มล. มีรูปร่างบิดเบี้ยวเล็กน้อยและผนังเซลล์และเยื่อหุ้มชั้นนอกของเซลล์ดังกล่าวประมาณร้อยละ 60-70 ได้รับความเสียหาย (รูป 3.17) สำหรับผลของยา cefatazidime เดียวๆ ที่ความเข้มข้น 16 ไมโครกรัม/มล. ด้านเชื้อ CREnC 21394 ได้แสดงในรูป 4.18 ซึ่งพบว่าประมาณร้อยละ 10-20 ของเซลล์ดังกล่าวมีรูปร่างบิดเบี้ยวและผนังเซลล์และเยื่อหุ้มชั้นนอกได้รับความเสียหายเช่นเดียวกัน นอกจากนี้เชื้อ CREnC 21394 ที่ได้รับสารผสมระหว่าง separated fraction P1 (32 มก./มล.) และยา ceftazidime (16 ไมโครกรัม/มล.) พบว่าประมาณร้อยละ 70-80 ของเซลล์ที่ได้รับสารผสมดังกล่าวมีรูปร่างเซลล์บิดเบี้ยวอย่างมากและส่วนที่ห่อหุ้มเซลล์ได้รับความเสียหายอย่างชัดเจนอีกทั้งประมาณร้อยละ 50-60 ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างเยื่อหุ้มชั้นนอกและเยื่อหุ้มชั้นในได้ชัดเจน (รูป 4.19) ผลของสารผสมดังกล่าวคล้ายคลึงกับผลของสารผสมระหว่าง separated fraction P5 (32 มก./มล.) และยา ceftazidime แต่ดูเหมือนว่ามีประสิทธิภาพน้อยกว่าสารผสมระหว่าง separated fraction P1 และยา ceftazidime (รูป 4.20) นอกจากนี้ขนาดของเซลล์ดังกล่าวที่ได้จากกล้องจุลทรรศน์ (≥ 10 เซลล์/การรักษาคำนวณได้จาก ความกว้าง (นาโนเมตร) x ความยาวของเซลล์ (นาโนเมตร) เพื่อยืนยันผลของสารดังกล่าวต่อขนาดของเซลล์ทั้งใช้เดี่ยวหรือใช้ร่วมกัน ผลที่ได้จากการคำนวณและเปรียบเทียบขนาดเซลล์ได้แสดงในรูป 3.21 ซึ่งผลที่ได้พบว่าขนาดเซลล์ของเชื้อ CREnC 21394 ที่ไม่ได้รับสารต้านแบคทีเรียใดๆ (ควบคุม) ($2054421.77 \pm 197082 \text{ nm}^2$) ก่อนข้างจะมีขนาดเซลล์ใหญ่กว่าเซลล์ที่ได้รับ separated fraction ทั้ง P1 ($1972789.116 \pm 201178 \text{ nm}^2$) และ P5 ($1724561.40 \pm 120169 \text{ nm}^2$) และยา ceftazidime ($1597959.18 \pm 139628 \text{ nm}^2$) เดียวๆ แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) อย่างไรก็ตามเชื้อ CREnC 21394 ที่ได้รับสารผสมระหว่างยา ceftazidime ผสมกับ P1 ($27182.24 \pm 5841.26 \text{ nm}^2$) หรือ P5 ($63045.07 \pm 10754.59 \text{ nm}^2$) มีขนาดเซลล์เล็กลงอย่างเห็นได้ชัดและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุม separated fraction P1 และ P5 และยา ceftazidime เดียวๆ ($p < 0.01$)



รูป 3.21 การเปรียบเทียบขนาดเซลล์ของเชื้อ CREnC 23194 ที่เจริญใน separated fraction P1 (512 มก./มล.) P5 (512 มก./มล.) และยา ceftazidime (16 ไมโครกรัม/มล.) เดี่ยวๆ หรือใช้ร่วมกัน ข้อมูลที่ได้แสดงในรูปค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ยของเซลล์ที่ได้รับการรักษาในแต่ละกลุ่ม ($n \geq 10$) กราฟได้แสดงพื้นที่ของเซลล์ที่คำนวณได้จาก ความกว้าง x ความยาวของเซลล์ (ตารางนาโนเมตร; nm²) และตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติซึ่งได้เปรียบเทียบโดยใช้สถิติ one-way ANOVA และ Tukey's HSD Post-hoc test และตัวพิมพ์เล็กหมายถึง $p < 0.05$ ตัวพิมพ์ใหญ่หมายถึง $p < 0.01$ Con= แบคทีเรียที่ไม่ได้รับยาหรือ separated fraction (ควบคุม) P1(512)= P1 ที่ความเข้มข้น 512 มก./มล. P5(512) = P5 ที่ความเข้มข้น 512 มก./มล. Cef(16)=ยา ceftazidime ที่ความเข้มข้น 16 ไมโครกรัม/มล. P1(32)+Cef(16) = P1 ที่ความเข้มข้น 32 มก./มล + ยา ceftazidime ที่ความเข้มข้น 16 ไมโครกรัม/มล. และ P5(32)+Cef(16) = P5 ที่ความเข้มข้น 32 มก./มล + ยา ceftazidime ที่ความเข้มข้น 16 ไมโครกรัม/มล.

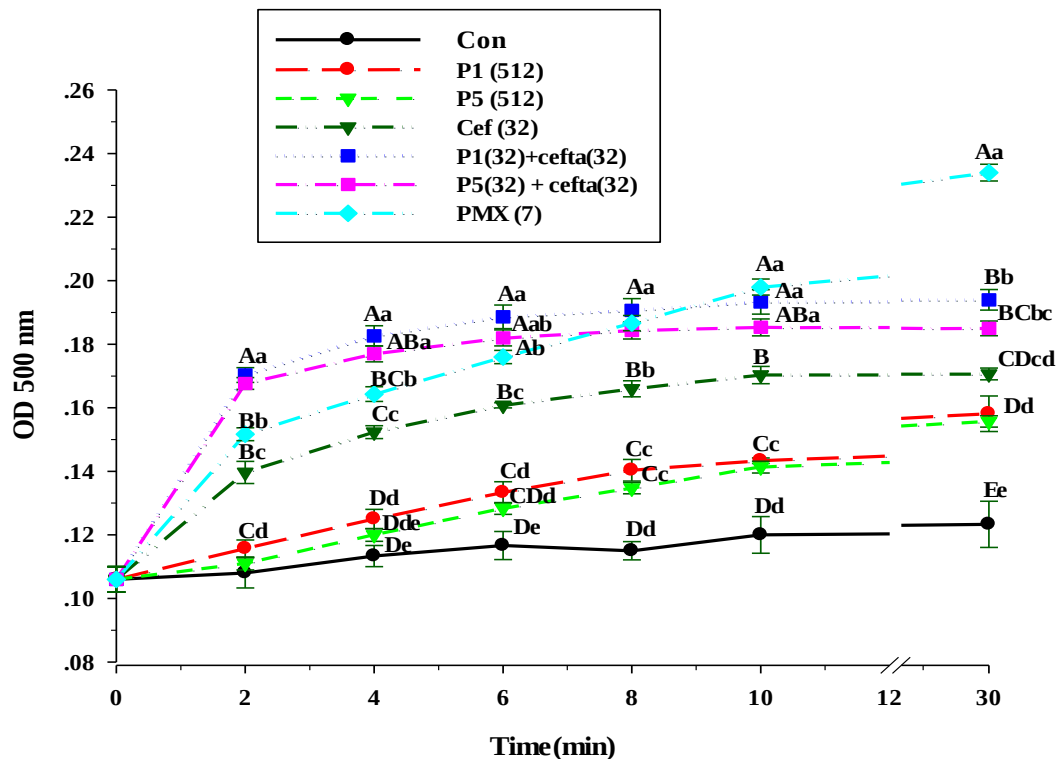
ผลของภาพระดับจุลภาค (micrograph) และขนาดเซลล์ที่ได้จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านชี้ให้เห็นว่ายา ceftazidime เดี่ยวๆ ไม่มีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์และขนาดเซลล์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งผลที่ได้ดังกล่าวเป็นหลักฐานที่ชี้ให้เห็นว่าเชื้อ CREnC 21394 ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้มีการดื้อต่อยา ceftazidime ในระดับที่สูง นอกจากนี้งานวิจัยที่ผ่านมาได้รายงานว่ายาน ceftazidime เดี่ยวๆ ไม่มีผลต่อโครงสร้างระดับจุลภาค (ultrastructure) ของเชื้อ *E. cloacae* ที่ดื้อต่อยา ceftazidime ขณะที่สารผสมระหว่าง apigenin และยา ceftazidime มีผลทำให้โครงสร้างระดับจุลภาคของเชื้อดังกล่าวได้รับความเสียหายอย่างรุนแรง (Eumkeb and Chukrathok, 2013) ขณะเดียวกันมีงานวิจัยที่สำคัญที่ได้สนับสนุนผลของพลาสมาจากจระเข้น้ำจืดไทย (*Crocodylus siamensis*) ต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อ *S. typhi* และ *S. aureus* ที่ได้ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope) ซึ่งพบว่าพลาสมาและ fraction จากพลาสมาของจระเข้น้ำจืดไทยมีผลให้เยื่อหุ้มเซลล์มีลักษณะขรุขระและสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ที่หดแฟบ (membrane blebbing) (Preecharram et al., 2010) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Kommanee et al. (2012) ที่พบว่าพลาสมาของจระเข้น้ำจืดไทย (*C. siamensis*) สามารถชักนำให้เกิดการฉีกขาดของเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อ *S. aureus* เชื้อ *S. typhi* เชื้อ *E. coli* เชื้อ *V. cholera* เชื้อ *P. aeruginosa* และเชื้อ *S. epidermidis* ดังนั้นจะเห็นได้ว่าพลาสมาของจระเข้น้ำจืดไทยมีฤทธิ์ด้านแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบโดยออกฤทธิ์ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย ผลการศึกษาที่ผ่านมาดังกล่าวค่อนข้างสอดคล้องกับผลที่ได้จากการศึกษารุ่นนี้ที่พบว่า separated fraction จากพลาสมาของจระเข้น้ำจืดไทยมีฤทธิ์ด้านแบคทีเรียเล็กน้อยและมีการเสริมฤทธิ์กับยา ceftazidime อย่างมากในการต้านเชื้อ CREnC 21394 ซึ่งจะเห็นว่า separated fraction จากพลาสมาของจระเข้น้ำจืดไทยสามารถเปลี่ยนแบคทีเรียที่ดื้อยาให้กลายเป็นแบคทีเรียที่ไวต่อยาปฏิชีวนะดั้งเดิมของมัน

3.7 การซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (Outer membrane permeability)

ผลของ Separated fraction P1 และ P5 ที่ชักนำให้การซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของเชื้อ CREnC 21394 เพิ่มขึ้นได้ทดสอบด้วยวิธี Nitrocefin assay ผลที่ได้จากการทดสอบด้วยวิธีนี้ได้แสดงในรูป 3.22 การซึมผ่านเยื่อหุ้มชั้นนอกของเชื้อ CREnC 21394 ได้ทดสอบกับยา ceftazidime และ separated fraction P1 และ P5 เมื่อใช้เดี่ยวๆ ที่ความเข้มข้น 32 ไมโครกรัม/มล, 512 มก./มล. และ 512 มก./มล. ตามลำดับ ขณะที่ใช้ร่วมกันได้ใช้ความเข้มข้นของยา ceftazidime ที่ 32 ไมโครกรัม/มล. ผสมกับ P1 ที่ความเข้มข้น 32 มก./มล. หรือ P5 ความเข้มข้น 32 มก./มล. สำหรับยา polymixin B (PMX) ที่ความเข้มข้น 7 ไมโครกรัม/มล. ถูกนำมาใช้เป็น permeabilizing probe และ Nitrocefin ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม/มล. ถูกนำมาใช้เป็น substrate ของเอนไซม์บีต้าแลคแทมเมสที่อยู่ใน periplasm ของแบคทีเรีย ผลจากการทดสอบพบว่า separated fraction ทั้ง P1 และ P5 และยา ceftazidime เดี่ยวๆ ทำให้

การซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของเชื้อ CREnC 21394 เปลี่ยนแปลงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p<0.01$)

Outer membrane permeabilization of CREnC 21394



รูป 3.22 การซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของเชื้อ *E. cloacae* ที่คือต่อยา ceftazidime DMST 21394 (CREnC 21394) ด้วย separated fraction P1 (512 มก./มล.) P5 (512 มก./มล.) และยา ceftazidime (32 ไมโครกรัม/มล.) ทั้งใช้เดี่ยวๆ และใช้ร่วมกัน โดยใช้ polymyxin B (PMX) 7 ไมโครกรัม/มล. เป็น permeabilizing probe และ nitrocefin (NCF) 20 ไมโครกรัม/มล. เป็น substrate สำหรับเอนไซม์บีต้าแลคแทมเมส ข้อมูลทั้งหมดที่ได้จากการทดสอบซ้ำ 3 ครั้งแสดงในรูปค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติซึ่งได้เปรียบเทียบโดยใช้สถิติ one-way ANOVA และ Tukey's HSD Post-hoc test และตัวพิมพ์เล็กหมายถึง $p<0.05$ ตัวพิมพ์ใหญ่หมายถึง $p<0.01$ Con= แบคทีเรียที่ไม่ได้รับยาหรือ separated fraction (ควบคุม) P1(512)= P1 ที่ความเข้มข้น 512 มก./มล. P5(512) = P5 ที่ความเข้มข้น 512 มก./มล. Cef(32)=ยา ceftazidime ที่ความเข้มข้น 32 ไมโครกรัม/มล. P1(32)+Cef(32) = P1 ที่ความเข้มข้น 32 มก./มล + ยา ceftazidime ที่ความเข้มข้น 32 ไมโครกรัม/มล. และ P5(32)+Cef(32) = P5 ที่ความเข้มข้น 32 มก./มล + ยา ceftazidime ที่ความเข้มข้น 32 ไมโครกรัม/มล.

ผลของ P1 (512 มก./มล.) P5 (512 มก./มล.) และยา ceftazidime (32 ไมโครกรัม/มล.) ที่ได้ใช้เดี่ยวๆ หรือใช้ร่วมกันพบว่าการซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของเชื้อ CREnC 21394 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.01$) ยิ่งไปกว่านั้นสารผสมระหว่าง P1 (32 มก./มล.) และยา ceftazidime (32 ไมโครกรัม/มล.) ทำให้การซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของเชื้อ CREnC 21394 เพิ่มขึ้นมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ P1 P5 และยา ceftazidime ที่ได้ใช้เดี่ยวๆ ($p < 0.01$) แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับสารผสม P5 (32 มก./มล.) ที่ได้ใช้ร่วมกับยา ceftazidime (32 ไมโครกรัม/มล.) ($p > 0.01$) อย่างไรก็ตามการซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของเชื้อ CREnC 21394 หลังจากได้รับ PMX (7 ไมโครกรัม/มล.) เพิ่มขึ้นมากกว่าเซลล์ที่ได้รับ P1 P5 และ ceftazidime เดี่ยวหรือใช้ร่วมกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) (รูป 3.22) ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ค่อนข้างสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านซึ่งพบว่าสารผสมระหว่าง apigenin และยา ceftazidime มีผลทำให้การซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของเชื้อ *E. cloacae* ที่ดื้อต่อยา ceftazidime เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (Eumkeb and Chukrathok, 2013) และสารผสมระหว่าง Peptide-Peptide nucleic acid (Eriksson et al., 2002) ทั้งนี้ผลของ separated fraction จากพลาสมาของจระเข้ น้ำจืดไทยที่ทำให้การซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของเชื้อ CREnC 21394 เพิ่มขึ้นน่าจะเป็นผลมาจากเปปไทด์ประจุบวกที่เป็นส่วนประกอบของ separated fraction ที่อาจทำปฏิกิริยาของส่วนที่ชอบน้ำ (Hydrophilic interaction) กับ polysaccharide core ของ lipopolysaccharide หรืออาจเกิดจาก electrostatic interaction ที่ส่งผลรบกวนบริเวณที่มีขั้วของเยื่อหุ้มเซลล์และรบกวนปฏิกิริยาระหว่าง saccharide กับ saccharide ด้วยกัน (Eriksson et al., 2002; Junkes et al., 2011; Junkes et al., 2008) สำหรับกลไกการออกฤทธิ์ของ PMX และเปปไทด์ประจุบวกอื่นๆ จะออกฤทธิ์เป็นตัวแข่งขันกับแมกนีเซียมไอออนบริเวณ binding site ที่อยู่ภายในชั้น LPS ส่งผลให้การซึมของเยื่อหุ้มเซลล์ผิดปกติ (Hancock, 1997) ซึ่งคล้ายคลึงกับ cyclic antimicrobial peptide ที่มีส่วนที่ชอบไขมัน (lipophilic) และส่วนที่ชอบน้ำ (Hydrophilic) เป็นองค์ประกอบจะออกฤทธิ์โดยไปจับกับ Lipid A และรบกวนการทำงานของ LPS (Cardoso et al., 2007) นอกจากนี้จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเปปไทด์ Leucrosin I และ Leucrosin II ที่ได้สกัดแยกจากเซลล์เม็ดเลือดขาวของจระเข้ น้ำจืดไทยมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* เชื้อ *S. typhi* และเชื้อ *V. cholera* โดยเพิ่มการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (Pata et al., 2011) ซึ่ง separated fraction จากพลาสมาของจระเข้ น้ำจืดไทยที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้สกัดแยกด้วยวิธี ion exchange และ gel infiltration ทำให้ได้เฉพาะเปปไทด์ที่มีประจุบวกและเปปไทด์นี้อาจจะมีบทบาทที่สำคัญที่ทำให้การซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกเพิ่มขึ้นอีกทั้งการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า separated fraction ทั้งใช้เดี่ยวๆ หรือใช้ร่วมกับยา ceftazidime มีผลต่อการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของเชื้อ CREnC 21394 และอาจเป็นหนึ่งในหลายๆ กลไกการออกฤทธิ์ที่สำคัญที่ทำให้เซลล์ตาย

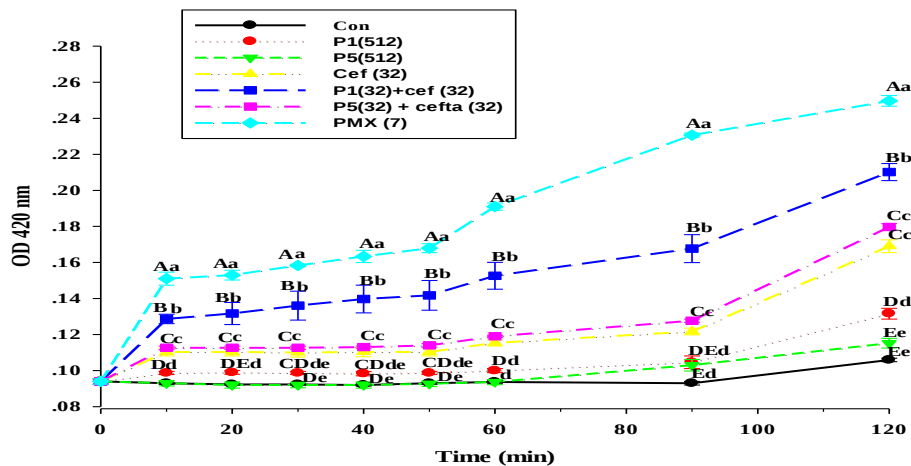
3.8 การซึมผ่านเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึม (Cytoplasmic membrane (CM) permeability)

ผลของ Separated fraction P1 และ P5 ที่ชักนำให้การซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ไซโตพลาสซึมหรือเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นในของเชื้อ CREnC 21394 เพิ่มขึ้นได้ทดสอบโดยการวัดการเข้าไปในไซโตพลาสซึมของ Ortho-Nitrophenyl- β -Galactoside (ONPG) ดังที่ได้อธิบายในบทที่ 2 ผลที่ได้จากการทดสอบด้วยวิธีนี้ได้แสดงในรูป 3.23 การทดสอบการซึมผ่านเยื่อหุ้มในของเชื้อ CREnC 21394 ได้ทดสอบกับยา ceftazidime และ separated fraction ทั้ง P1 และ P5 เมื่อใช้เดี่ยวๆ ที่ความเข้มข้น 32 ไมโครกรัม/มล. 512 มก./มล. และ 512 มก./มล. ตามลำดับ ขณะที่เมื่อใช้ร่วมกันได้ใช้ยา ceftazidime ความเข้มข้น 32 ไมโครกรัม/มล. ผสมกับ P1 ที่ความเข้มข้น 32 มก./มล. และยา ceftazidime ความเข้มข้น 32 ไมโครกรัม/มล. ผสมกับ P5 ที่ความเข้มข้น 32 มก./มล. สำหรับ PMX ที่ความเข้มข้น 7 ไมโครกรัม/มล. ถูกนำมาใช้เป็น permeabilizing probe และ ONPG 100 ไมโครกรัม/มล. ได้นำมาใช้เป็น substrate สำหรับเอนไซม์ β -galactosidase ซึ่งปกติจะมีอยู่ในเฉพาะไซโตพลาสซึม สำหรับในเซลล์ปกติ ONPG จะไม่สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นในเข้าไปได้ แต่อย่างไรก็ตามถ้าเซลล์ได้รับความเสียหาย ONPG สามารถเข้าไปยังไซโตพลาสซึมและสามารถถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ β -galactosidase ผลจากการศึกษาการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นในของเชื้อ CREnC 21394 พบว่า separated fraction P1 หรือ ceftazidime เดี่ยวๆ มีผลทำให้การซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นในของเชื้อ CREnC 21394 เปลี่ยนแปลงไป ขณะที่การซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นในของเชื้อ CREnC 21394 หลังจากได้รับ separated fraction P5 ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p>0.01$, $p>0.05$)

ผลของยา ceftazidime ผสมกับ separated fraction P1 หรือ P5 พบว่าการซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นในของเชื้อ CREnC 21394 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนั้นยังพบว่า ยา ceftazidime และ P1 เมื่อใช้เดี่ยวๆ มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมเช่นเดียวกัน ($p<0.01$) แต่เชื้อ CREnC 21394 ที่ได้รับ P5 เดี่ยวๆ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม สำหรับการซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นในของเชื้อ CREnC 21394 ที่ได้รับ PMX พบว่ามีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) (รูป 3.23) การซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นในที่เพิ่มขึ้นที่เกิดจาก separated fraction อาจเนื่องมาจากการรบกวนของไอออนและสูญเสียส่วนประกอบอื่นๆ ของเซลล์รวมไปถึงสูญเสียโปรตีนที่อยู่ภายในเซลล์อย่างมากส่งผลให้เซลล์ตายในที่สุด ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านที่ได้ศึกษาด้วย crystal violet assay พบว่า eugenol มีผลทำให้การซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อ *S. typhi* เพิ่มขึ้นจากการเล็ดรูลของโมเลกุลใหญ่ (macromolecules) ที่อยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ (Devi et al., 2010) และสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาที่พบว่าการซึมผ่านเยื่อหุ้มชั้นในของเชื้อ *E. cloacae* ที่ดื้อต่อยา ceftazidime มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญหลังจากได้รับสารผสมระหว่างยา ceftazidime และ apigenin (Eumkeb and Chukrathok, 2013) และระหว่าง Peptide-Peptide nucleic acid (Eriksson et al., 2002) ในทางเดียวกันได้มีรายงานจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเปปไทด์ Leucrosin I และ

Leucrosin II ที่ได้แยกจากเซลล์เม็ดเลือดขาวของจระเข้น้ำจืดไทย (*C. siamensis*) มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* เชื้อ *S. typhi* และเชื้อ *V. cholerae* โดยออกฤทธิ์ที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อ ดังกล่าวและส่งผลให้การซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นในเพิ่มขึ้น (Pata et al., 2011) สำหรับ separated fraction จากพลาสมาของจระเข้ที่นำมาศึกษาครั้งนี้ได้สกัดแยกด้วยวิธี ion exchange และ gel infiltration ทำให้ได้ เปปไทด์ที่มีเฉพาะประจุบวกซึ่งเปปไทด์ที่ได้นี้อาจจะมีบทบาทสำคัญที่ทำให้การซึมการของเยื่อหุ้มเซลล์ ชั้นในเพิ่มขึ้นซึ่งคล้ายกับผลของการศึกษาที่ผ่านมา ดังนั้นผลการศึกษานี้ทำให้เราเชื่อว่า separated fraction ทั้งใช้เดี่ยวๆ หรือใช้ร่วมกับยา ceftazidime มีผลทำให้การซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นในของเชื้อ CREnC 21394 เพิ่มขึ้นเพราะ separated fraction อาจจะทำให้ออกฤทธิ์ผ่านหนึ่งในหลายกลไกการออกฤทธิ์ที่สำคัญและส่งผลให้เซลล์ตายในที่สุด

Cytoplasmic membrane permeabilization of CREnC 21394

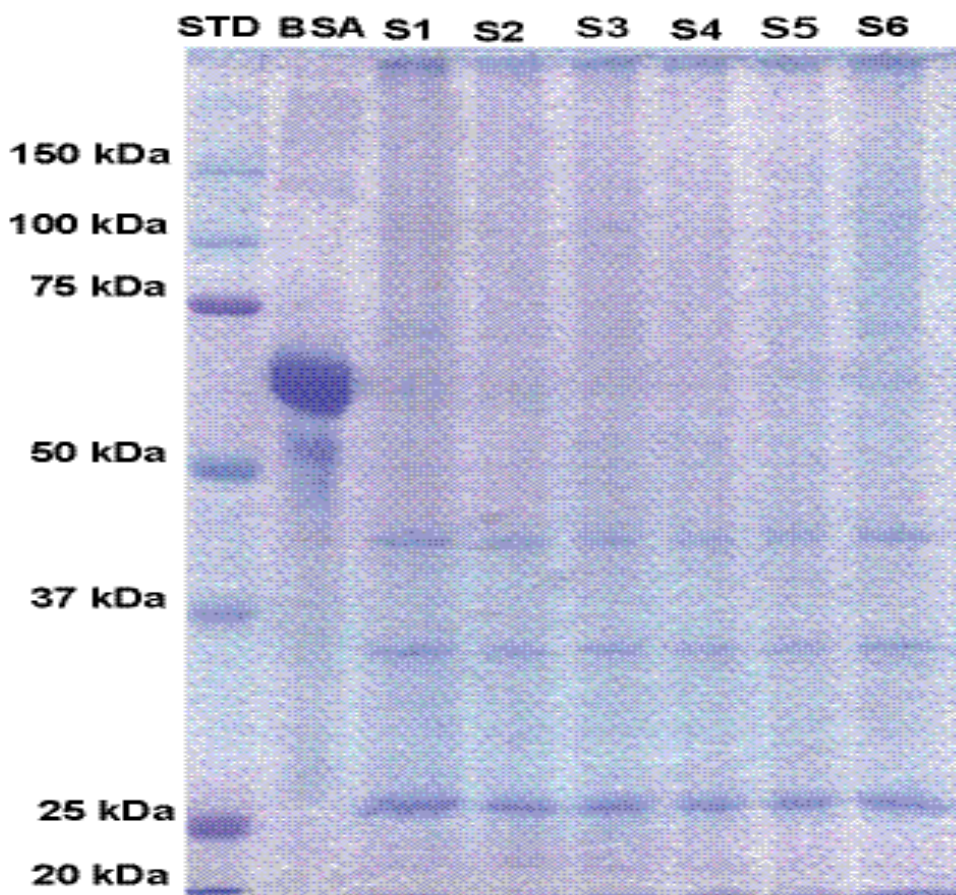


รูป 3.23 การซึมผ่านเยื่อหุ้มไซโตพลาสมิกหรือเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นในของเชื้อ *E. cloacae* ที่คือต่อยา ceftazidime DMST 21394 (CREnC 21394) หลังจากได้รับ separated fraction P1 (512 มก./มล.) P5 (512 มก./มล.) และยา ceftazidime (32 ไมโครกรัม/มล.) ทั้งใช้เดี่ยวๆ หรือใช้ร่วมกัน โดยใช้ polymyxin B (PMX) 7 ไมโครกรัม/มล. เป็น permeabilizing probe และ ONPG 100 ไมโครกรัม/มล. เป็น substrate สำหรับเอนไซม์ β -galactosidase ข้อมูลทั้งหมดได้จากการทดสอบซ้ำ 3 ครั้งแสดงในรูปค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติซึ่งได้เปรียบเทียบโดยใช้สถิติ one-way ANOVA และ Tukey's HSD Post-hoc test และตัวพิมพ์เล็กหมายถึง $p < 0.05$ ตัวพิมพ์ใหญ่หมายถึง $p < 0.01$ Con= แบคทีเรียที่ไม่ได้รับยาหรือ separated fraction (ควบคุม) P1(512)= P1 ที่ความเข้มข้น 512 มก./มล. P5(512) = P5 ที่ความเข้มข้น 512 มก./มล. Cef(32)=ยา ceftazidime ที่ความเข้มข้น 32 ไมโครกรัม/มล. P1(32)+Cef(32) = P1 ที่ความเข้มข้น 32 มก./มล + ยา ceftazidime ที่ความเข้มข้น 32 ไมโครกรัม/มล. และ P5(32)+Cef(32) = P5 ที่ความเข้มข้น 32 มก./มล + ยา ceftazidime ที่ความเข้มข้น 32 ไมโครกรัม/มล.

3.9 Electrophoresis

การทดสอบ SDS-PAGE ได้ทดสอบเพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรียของ separated fraction P1 และ P5 ทั้งใช้เดี่ยวๆ หรือใช้ร่วมกับยา ceftazidime ต่อโปรตีนที่สัมพันธ์กับ peptidoglycan และเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรีย (Outer membrane and peptidoglycan (OMPG) associated protein) ผลที่ได้จากการทดสอบด้วย SDS-PAGE ได้แสดงในรูป 3.24

แถบโปรตีน OMPG ของเชื้อ CREnC 21394 หลังจากได้รับ separated fraction จากพลาสมาของ จระเข้ น้ำจืดไทย และยา ceftazidime เดี่ยวๆ และกลุ่มที่ไม่ได้รับสารต้านแบคทีเรียใดๆ (ควบคุม) ซึ่ง ปรากฏแถบโปรตีนหลักที่น้ำหนักโมเลกุล (MW) 25 kDa ในเลน S1-S6 อย่างไรก็ตามยา ceftazidime เดี่ยวๆ หรือใช้ร่วมกับ P1 มีแถบโปรตีนปรากฏค่อนข้างจางกว่ากลุ่มอื่นๆ และที่แถบโปรตีนที่ MW 35 และ 45 kDa ของเชื้อที่ได้รับ ceftazidime ผสมกับ P1 หรือ P5 ค่อนข้างจางกว่ากลุ่มควบคุมเช่นเดียวกัน ผลจาก SDS-PAGE ของการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารผสมระหว่างยา ceftazidime และ P1 หรือ P5 อาจะรบกวนการสังเคราะห์โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกและ peptidoglycan อีกทั้งผลที่ได้ ดังกล่าวอาจสามารถเปรียบเทียบกับได้กับงานวิจัยที่ผ่านมาที่พบว่าฟลาโวนอยด์ที่ได้สกัดแยกมาจากข่าเล็ก (small galangal) ผสมกับยา amoxicillin รวมไปถึงสารผสมระหว่างยา ceftazidime และ apigenin มีความสามารถในการยับยั้งการสังเคราะห์ peptidoglycan ของเชื้อ *E. coli* ที่คือต่อยา amoxicillin และเชื้อ *E. cloacae* ที่คือต่อยา ceftazidime ตามลำดับ (Eumkeb and Chukrathok, 2013; Eumkeb et al., 2012)

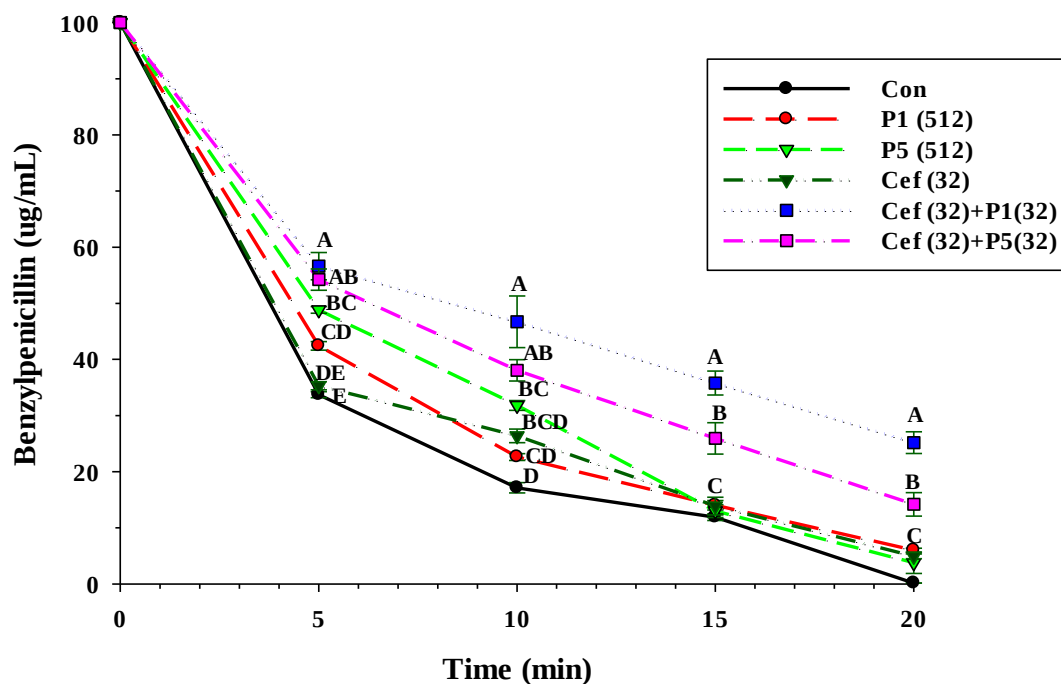


รูป 3.24 ผล SDS-PAGE ที่ได้แสดงโปรตีนที่สัมพันธ์กับ peptidoglycan และเชื้อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรีย (Outer membrane and peptidoglycan (OMPG) associated protein) ของเชื้อ *E. cloacae* ที่ต่อต้าน ceftazidime DMST 21394 (CREnC 21394) ที่เจริญโดยไม่มีสารต้านแบคทีเรีย (ควบคุม; เลน S1, 1.103 มก./มล.) ให้เจริญพร้อมกับ separated fraction P1 512 มก./มล. (เลน S2, 0.816 มก./มล.) เจริญพร้อมกับ separated fraction P5 512 มก./มล. (เลน S3, 0.017 มก./มล.) เจริญพร้อมกับยา ceftazidime 16 ไมโครกรัม/มล. (เลน S4, 0.366 มก./มล.) เจริญพร้อมกับยา ceftazidime 16 ไมโครกรัม/มล. ผสมกับ P1 32 มก./มล. (เลน S5, 0.654 มก./มล.) และเจริญพร้อมกับยา ceftazidime 16 ไมโครกรัม/มล. ผสมกับ P5 32 มก./มล. (เลน S6, 0.632 มก./มล.) สำหรับ BSA คือ standard bovine serum albumin และ std คือ molecular weight marker proteins (kDa)

3.10 Enzyme assay

ความสามารถของ separated fraction P1 และ P5 จากพลาสมาของจระเข้ น้ำจืดไทยเมื่อใช้เดี่ยวๆ หรือใช้ร่วมกับยา ceftazidime เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บีต้าแลคแทมเมส ชนิด IV (β -lactamase type IV) ที่ได้แยกมาจากเชื้อ *E. cloacae* ได้ทดสอบกับยา ceftazidime และ separated fraction P1 และ P5 เมื่อใช้เดี่ยวๆ ที่ความเข้มข้น 32 ไมโครกรัม/มล. 512 มก./มล. และ 512 มก./มล. ตามลำดับ และทดสอบกับสารผสมระหว่างยา ceftazidime (32 ไมโครกรัม/มล.) ผสมกับ separated fraction P1 (32 มก./มล.)

หรือ P5 (32 มก./มล.) รูป 3.25 แสดงให้เห็นว่าสารผสมระหว่าง separated fraction ทั้ง P1 หรือ P5 ผสมกับยา ceftazidime สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บีต้าแลคแทมเมส ชนิด IV อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมรวมไปถึงกลุ่มที่ได้รับ separated fraction P1 และ P5 และยา ceftazidime เดี่ยวๆ ($p<0.01$) นอกจากนี้ยังพบว่าสารผสมระหว่าง separated fraction P1 และยา ceftazidime มีความสามารถสูงสุดในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บีต้าแลคแทมเมส ชนิด IV อย่างไรก็ตามพบว่ามีความแตกต่างเพียงเล็กน้อยระหว่างกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับ separated fraction P1 และ P5 และ ยา ceftazidime เดี่ยวๆ ($p>0.01$)



รูป 3.25 การออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บีต้าแลคแทมเมส ชนิด IV ที่ได้แยกจากเชื้อ *E. cloacae* ในการสลาย benzylpenicillin ของ separated fraction P1 P5 และยา ceftazidime เมื่อใช้เดี่ยวๆ หรือใช้ร่วมกัน ข้อมูลทั้งหมดได้จากการทดสอบซ้ำ 3 ครั้งแสดงในรูปค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติซึ่งได้เปรียบเทียบโดยใช้สถิติ one-way ANOVA และ Tukey's HSD Post-hoc test และตัวพิมพ์เล็กหมายถึง $p<0.05$ ตัวพิมพ์ใหญ่หมายถึง $p<0.01$ Con= แบคทีเรียที่ไม่ได้รับยาหรือ separated fraction (ควบคุม) P1(512)= P1 ที่ความเข้มข้น 512 มก./มล. P5(512) = P5 ที่ความเข้มข้น 512 มก./มล. Cef(32)=ยา ceftazidime ที่ความเข้มข้น 32 ไมโครกรัม/มล. P1(32)+Cef(32) = P1 ที่ความเข้มข้น 32 มก./มล + ยา ceftazidime ที่ความเข้มข้น 32 ไมโครกรัม/มล. และ P5(32)+Cef(32) = P5 ที่ความเข้มข้น 32 มก./มล + ยา ceftazidime ที่ความเข้มข้น 32 ไมโครกรัม/มล.

เอนไซม์บีต้าแลคแทมเมสได้มีรายงานว่าเป็นหนึ่งในกลไกที่สำคัญของแบคทีเรียที่ทำให้ดื้อต่อยาปฏิชีวนะกลุ่มบีต้าแลคแทม (Tenover, 2006) สำหรับการศึกษาครั้งนี้เป็นหลักฐานที่สำคัญที่ชี้ให้เห็นว่าสารผสมระหว่างยา ceftazidime และ P1 หรือ P5 มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บีต้าแลคแทมเมส ชนิด IV ที่ได้แยกมาจากเชื้อ *E. cloacae* ขณะเดียวกันสารผสมดังกล่าวสามารถนำมาเป็นตัวเลือกในการพัฒนาเป็นสูตรยาตัวใหม่เพื่อด้านแบคทีเรียคือยาซึ่งการใช้ยาต้านแบคทีเรียอย่างน้อย 2 ตัวผสมกันได้รับการพิสูจน์จากนักวิจัยหลายๆ ท่านแล้วว่าเป็นแนวทางที่น่าสนใจที่ควรนำมาใช้รักษาแบคทีเรียคือยา (Eumkeb and Chukrathok, 2013; Eumkeb et al., 2010; Eumkeb et al., 2012; Wagner, 2011; Worthington and Melander, 2013) กลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บีต้าแลคแทมเมสของ separated fraction จากพลาสมาของจระเข้ น้ำจืดไทยที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ นั้นอาจเนื่องมาจาก separated fraction ไปจับกับเอนไซม์บีต้าแลคแทมเมสแล้วรวมกันเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (complex) ส่งผลให้เอนไซม์บีต้าแลคแทมเมสไม่สามารถทำงานได้ สำหรับการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์บีต้าแลคแทมเมสนี้ อาจจะเป็นหนึ่งในกลไกการออกฤทธิ์ที่สำคัญของ separated fraction ในการต้านเชื้อ CREnC

บทที่ 4

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

การวิเคราะห์และอภิปรายผลการวิจัย

การดื้อยาปฏิชีวนะหลายขนานในจุลชีพได้เพิ่มจำนวนขึ้นอย่างน่าตกใจและเป็นหนึ่งในภัยคุกคามทางด้านสุขภาพที่สำคัญที่สุดของมนุษย์ทั่วโลก ด้วยเหตุนี้การพัฒนายาต้านจุลชีพตัวใหม่และพัฒนาแนวทางการรักษาใหม่ๆ เพื่อที่จะต่อสู้กับจุลชีพที่ดื้อยาปฏิชีวนะหลายขนานจึงมีความจำเป็นอย่างเร่งด่วน ทั้งนี้เชื่อที่พบว่าการดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่พบได้บ่อยที่สุด คือ เชื้อ *S. aureus* ที่ดื้อยา methicillin (MRSA) เชื้อ *Enterococci* ที่ดื้อต่อยา vancomycin (Vancomycin-resistant *Enterococci*; VRE) และการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่งที่สร้างเอนไซม์บีต้าแลคแทมเมสชนิดขยาย (Extended spectrum β -lactamase (ESBL)-producing gram negative rod) (Emori and Gaynes, 1993; Leclercq and Courvalin, 1997; Moellering, 2009; Vonberg et al., 2008) สำหรับการดื้อยาปฏิชีวนะของจุลชีพในประเทศไทย พบว่ามีอุบัติการณ์การดื้อยาของจุลชีพเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด เช่น มีการดื้อยาในระดับสูงในหลายๆ แผนกของโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยราชภัฏวชิรเวศน์ จังหวัดนครราชสีมา ประเทศไทย (Chokejindachai, 2007; Maharat Nakhonratchasima hospital, 2012) อีกทั้งยังพบว่า เชื้อ MRSA เชื้อ *E. coli* เชื้อ *S. epidermidis* เชื้อ *E. cloacae* และเชื้อ *E. faecium* เป็นจุลชีพที่เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อและการดื้อยาปฏิชีวนะที่พบได้บ่อยที่สุดในโรงพยาบาลส่งผลให้ยาปฏิชีวนะที่นำมาใช้ทางในปฏิบัติเพื่อรักษาการติดเชื้อที่จากแบคทีเรียดังกล่าวไม่สามารถใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Maharat Nakhonratchasima hospital, 2012) ดังนั้นการค้นหาและพัฒนายาต้านจุลชีพตัวใหม่ๆ เพื่อนำมาใช้รักษาการติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยาเป็นสิ่งที่จำเป็นอย่างมาก หนึ่งในแนวทางที่น่าสนใจคือการค้นหาสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากธรรมชาติ เช่น พืชหรือสัตว์ ขณะเดียวกันแนวทางการใช้ยาหรือใช้สารต้านแบคทีเรียอย่าง 2 ตัวร่วมกันเพื่อให้เกิดการเสริมฤทธิ์กันในการต้านแบคทีเรียก็เป็นแนวทางหนึ่งที่กำลังเป็นที่นิยมและอีกทั้งได้รับการพิสูจน์จากหลายๆ การศึกษาว่าสามารถเอาชนะแบคทีเรียดื้อยาได้ ตัวอย่างเช่น สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่ได้สกัดแยกมาจากข่าเล็ก (small galangal) ผสมกับยา amoxicillin ด้านเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อต่อยา amoxicillin รวมไปถึงสาร galangin ผสมกับยา ceftazidime ด้านเชื้อ *S. aureus* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะกลุ่มบีต้าแลคแทม และสารผสมระหว่างยา ceftazidime และ apigenin ด้านเชื้อ *E. cloacae* ที่ดื้อต่อยา ceftazidime (Eumkeb and Chukrathok, 2013; Eumkeb et al., 2010; Eumkeb et al., 2012) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่พบว่าสารจากจระเข้ที่อาศัยอยู่ตามธรรมชาติ เช่น ชีรุมจาก American alligator (*A. mississippiensis*) มีสเปกตรัมในการต้านแบคทีเรียกว้างสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบรวมไปถึงเชื้อไวรัสก่อโรคเริม (herpes simplex virus type-1) เชื้อ HIV และเชื้อ West Nile virus (Merchant et al., 2004; Merchant et al., 2005a) และมีงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าเปปไทด์จากจระเข้น้ำจืดไทย (*C. siamensis*) มีฤทธิ์

ด้านแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. typhi* เชื้อ *K. pneumoniae* เชื้อ *S. aureus* เชื้อ *S. epidermidis* เชื้อ *E. coli* เชื้อ *P. aeruginosa* และเชื้อ *V. cholerae* (Preecharram et al., 2008; Thammasirirak and Daduang, 2004) อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับผลของพลาสมาจากจระเข้น้ำจืดไทยต่อแบคทีเรียคือยา เช่น เชื้อ MRSA เชื้อ *E. coli* และเชื้อ *E. cloacae* ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาวิจัยครั้งนี้คือเพื่อศึกษาการออกฤทธิ์ด้านแบคทีเรียของพลาสมาจากจระเข้น้ำจืดไทย (*C. siamensis*) ด้านเชื้อแบคทีเรียคือยาดังกล่าวทั้งใช้เดี่ยวๆ และใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะกลุ่มบีต้าแลคแทม

พลาสมาของจระเข้น้ำจืดไทยได้ถูกสกัดแยกด้วยวิธี ion exchange chromatography โดยใช้คอลัมน์ Q-Sepharose และวิธี gel filtration chromatography โดยใช้คอลัมน์ Sephadex G-50 ทำให้ได้ separated fraction ทั้งหมด 5 fractions (P1-P5) และแต่ละ fraction ได้ถูกนำไปทดสอบยับยั้งน้ำหนักรโมเลกุล (Molecular weight; MW) โดยใช้ SDS-PAGE ผลที่ได้พบว่าแถบโปรตีนของ separated fraction P1-P5 มี MW อยู่ระหว่าง 23-160 kDa ซึ่งผลที่ได้นี้ค่อนข้างสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาที่พบว่าแถบโปรตีนจากซีรัมของจระเข้น้ำจืดไทยมี MW อยู่ระหว่าง 23-160 kDa (Threenet et al., 2011)

ผล MIC ได้แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *E. cloacae* ที่คือต่อยา ceftazidime DMST 21394 และเชื้อ *S. aureus* ที่คือต่อยา methicillin DMST 20651 (MRSA 20651) มีการคือต่อยา ceftazidime และยา claxacillin ในระดับที่สูงที่สุดโดยมีค่า MIC มากกว่า 1024 ไมโครกรัม/มล. ตามลำดับ ขณะที่ separated fraction ทั้งหมดมีฤทธิ์ด้านแบคทีเรียเพียงเล็กน้อยในการยับยั้งเชื้อที่ได้นำมาศึกษา (MICs 8 - >1024 มก./มล.) ผลดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาที่พบว่าพลาสมาของจระเข้น้ำจืดไทย (*C. siamensis*) มีฤทธิ์ด้านเชื้อ *S. aureus* เชื้อ *S. epidermidis* และเชื้อ *E. coli* ซึ่งมีค่า MIC อยู่ระหว่าง 10.4-50.0 ไมโครกรัม/มล. และมีเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone ประมาณ 5 มม. (Kommanee et al., 2012; Preecharram et al., 2008; Thammasirirak and Daduang, 2004) ผลในการด้านแบคทีเรียของ separated fraction ดังกล่าวอาจเกิดจากโพลีเปปไทด์ที่อยู่ในพลาสมาของจระเข้น้ำจืดไทย (Preecharram et al., 2010) สำหรับผลจาก checkerboard ที่ศึกษาการเกิดปฏิริยาระหว่างยาปฏิชีวนะและ separated fraction พบว่าสารผสมระหว่าง P1 หรือ P5 และยา ceftazidime มีการเสริมฤทธิ์กันอย่างมากในการด้านเชื้อ *E. cloacae* ที่คือต่อยา ceftazidime (CREnC 21394) ที่ดัชนี FIC 0.062 รวมไปถึงสารผสมระหว่าง P1 หรือ P5 และยา cloxacillin มีการเสริมฤทธิ์ด้านเชื้อ *S. aureus* ที่คือต่อยา methicillin (MRSA 20651) อย่างมากเช่นเดียวกันที่ดัชนี FIC 0.375 การศึกษาที่ผ่านได้ศึกษาเปปไทด์ที่เป็นประจวบจากจระเข้น้ำจืดไทยพบว่ามียาที่สำคัญในการด้านแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ (Preecharram et al., 2008; Thammasirirak and Daduang, 2004) และยังพบว่าการเสริมฤทธิ์ด้านแบคทีเรียระหว่างเปปไทด์ (Yan and Hancock, 2001) สารผสมระหว่างเปปไทด์และยาปฏิชีวนะมีการเสริมฤทธิ์กันในการการด้านเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* (ดัชนี FIC 0.5) (Naghmouchi et al., 2012) สำหรับผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ทำให้เราเชื่อว่า separated fraction จากพลาสมาของจระเข้น้ำจืดไทยประกอบด้วยเปปไทด์ที่เป็นประจวบ

บวกซึ่งแสดงบทบาทสำคัญในการออกฤทธิ์เสริมกันกับยาปฏิชีวนะกลุ่มบีต้าแลคแทมด้านเชื้อแบคทีเรียคือยาที่ได้นำมาศึกษาครั้งนี้ซึ่งอาจออกฤทธิ์คล้ายคลึงกับการศึกษาที่ผ่านมา (Naghmouchi et al., 2012)

หลังจากได้ทดสอบหาค่า MIC และดัชนี FIC ขั้นตอนต่อมาศึกษาจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตโดยได้สร้างเป็นกราฟแสดงการรอดชีวิตของแบคทีเรีย (Killing curve) ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่ามีการเสริมฤทธิ์ด้านแบคทีเรียของสารผสมระหว่าง separated fraction P1 หรือ P5 ผสมกับยา ceftazidime ด้านเชื้อ CREnC 21394 รวมไปถึงสารผสมระหว่าง separated fraction P1 หรือ P5 ผสมกับยา cloxacillin ด้านเชื้อ MRSA 20651 ซึ่งพบว่าจำนวนโคโลนีของเชื้อดังกล่าวลดลงอย่างชัดเจนจาก 5×10^5 CFU/มล. เหลือ 10^3 CFU/มล. ภายใน 6 ชั่วโมงและคงที่ต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 24 ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาที่พบว่าสารผสมระหว่างฟลาโวนอยด์และยา ceftazidime มีการเสริมฤทธิ์ด้านเชื้อ *E. cloacae* ที่คือต่อยา ceftazidime ทำให้จำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตลดลงอย่างเห็นได้ชัด (Eumkeb and Chukrathok, 2013)

สารผสมระหว่าง separated fraction P1 หรือ P5 ผสมกับยา ceftazidime ด้านเชื้อ CREnC 21394 มีค่าดัชนี FIC ต่ำสุดได้ถูกเลือกมาศึกษากลไกการออกฤทธิ์ด้านแบคทีเรียซึ่งได้ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน การซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกและชั้นใน การเปลี่ยนโปรตีนที่สัมพันธ์กับ peptidoglycan และเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรียโดยใช้ SDS-PAGE และศึกษาความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บีต้าแลคแทมเมส (enzyme assay) ผลจากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านพบว่าประมาณร้อยละ 40-50 ของแบคทีเรียที่ได้รับ P1 และร้อยละ 80-90 ของแบคทีเรียที่ได้รับ P5 มีช่อง periplasm กว้างกว่ากลุ่มควบคุมและผนังเซลล์ได้รับความเสียหายเล็กน้อยสำหรับแบคทีเรียประมาณร้อยละ 70-80 ที่ได้รับสารผสมระหว่างยา ceftazidime และ P1 มีรูปร่างของเซลล์บิดเบี้ยวและส่วนที่ห่อหุ้มเซลล์ได้รับความเสียหายอย่างมาก อีกทั้งยังพบว่าเยื่อหุ้มชั้นนอกและเยื่อหุ้มชั้นในไม่สามารถแยกได้ชัดเจน ขณะเดียวกันพบว่าสารผสม ceftazidime และ P1 มีฤทธิ์น้อยกว่าสารผสม ceftazidime และ P5 นอกจากนี้ผลจากการคำนวณและเปรียบเทียบขนาดของเซลล์ของเชื้อ CREnC 21394 พบว่าเซลล์ที่ได้รับสารผสมระหว่างยา ceftazidime และ separated fraction ทั้ง P1 หรือ P5 มีขนาดเซลล์ลดลงอย่างเห็นได้ชัดและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารด้านแบคทีเรียเดี่ยวๆ ($p < 0.01$) ผลที่ได้จากการศึกษานี้ค่อนข้างสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาของ Preecharram et al. (2010) และ Kommanee et al. (2012) ที่พบว่าพลาสมาของจระเข้ น้ำจืดไทย (*C. siamensis*) มีผลทำให้ผนังเซลล์ของเชื้อ *S. aureus* เสื่อมรูปและมีผิวไม่เรียบและมีการสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ห่อหุ้ม (membrane blebbing formation) จากผลที่ได้ดังกล่าวทำให้เราเชื่อว่า separated fraction อาจมีผลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียได้รับความเสียหายขณะที่สารผสมระหว่าง separated fraction และยา ceftazidime มีการเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งการสังเคราะห์ peptidoglycan และทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียส่งผลให้เซลล์เสียรูปร่างและส่วนที่ห่อหุ้มเซลล์ได้รับความเสียหาย

สมมติฐานเบื้องต้นจากผลการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านว่า Separated fraction P1 และ P5 และยา ceftazidime ทั้งใช้เดี่ยวและใช้ร่วมกันมีผลทำให้เชื้อหุ้มเซลล์ได้รับความเสียหายซึ่งผลดังกล่าวได้ทดสอบยืนยันด้วยการทดสอบการซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกและชั้นในซึ่งพบว่าเชื้อ CREnC 21394 ที่ได้รับ P1 และ P5 เดี่ยวๆ มีการซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกและชั้นในเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและที่สำคัญสารผสมระหว่าง separated fraction กับยา ceftazidime มีผลทำให้การซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกและชั้นในของเชื้อ CREnC 21394 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารต้านแบคทีเรียเดี่ยวๆ ($p < 0.01$) ผลดังกล่าวค่อนข้างไปในทางเดียวกันกับการศึกษาที่ผ่านมาที่พบว่าสารผสมระหว่าง peptide-peptide nucleic acid มีผลทำให้การซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อ *E. coli* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (Eriksson et al., 2002) ด้วยเหตุนี้ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้เป็นหลักฐานที่สำคัญที่ชี้ให้เห็นว่า separated fraction P1 และ P5 ทั้งใช้เดี่ยวๆ หรือใช้ร่วมกันกับยา ceftazidime มีผลทำให้การซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อ CREnC 21394 เพิ่มขึ้นและอาจเป็นหนึ่งในกลไกที่สำคัญที่ทำให้แบคทีเรียตาย

การเปลี่ยนแปลงแถบโปรตีนที่สัมพันธ์กับ peptidoglycan และเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (Outer membrane and peptidoglycan (OMPG) associated protein) ของเชื้อ CREnC 21394 ได้ศึกษาด้วย SDS-PAGE พบว่าแถบโปรตีนของเชื้อที่ได้รับสารผสมระหว่างยา ceftazidime และ P1 หรือ P5 มีแถบโปรตีนที่ MW 35 และ 45 kDa จางกว่ากลุ่มควบคุมซึ่งผลดังกล่าวบ่งชี้ให้เห็นว่าสารผสมระหว่าง separated fraction และยา ceftazidime อาจมีผลไปรบกวนการสังเคราะห์โปรตีนที่สัมพันธ์กับ OMPG

ผลจากการศึกษาความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บีต้าแลคแทมเมส ชนิด IV ที่ได้แยกมาจากเชื้อ *E. cloacae* ของ separated fraction ทั้งใช้เดี่ยวๆ และใช้ร่วมกันกับยา ceftazidime พบว่าสารผสมระหว่าง separated fraction ทั้ง P1 หรือ P5 ผสมกับยา ceftazidime สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บีต้าแลคแทมเมสได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและยังพบว่าสารผสม P1 และยา ceftazidime มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว ($p < 0.01$) ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์อาจเนื่องมาจากการสร้างสารประกอบเชิงซ้อน (complex) กับเอนไซม์บีต้าแลคแทมเมสส่งผลให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้และนี้อาจเป็นหนึ่งในกลไกการออกฤทธิ์ที่สำคัญในการยับยั้งเชื้อ CREnC 21394

แม้ว่ามีข้อมูลที่จำกัดเกี่ยวกับน้ำหนักโมเลกุลของพลาสมาหรือ fraction จากพลาสมาของกระชี่น้ำจืดไทยที่เป็นเป็นตัวออกฤทธิ์ยังเชื่อแบคทีเรียแต่ยังมีข้อมูลที่ได้รายงานว่าน้ำหนักโมเลกุลที่น้อยกว่า 1 kDa จากพลาสมาของกระชี่น้ำจืดไทยเป็นตัวออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย (Preecharram et al., 2008) สำหรับเปปไทด์ Crocosin ที่ได้สกัดแยกมาจากพลาสมาของกระชี่น้ำจืดไทยที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียยังไม่ได้มีการระบุน้ำหนักโมเลกุลที่ออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแต่มีเฉพาะลำดับกรดอะมิโนเท่านั้นที่ได้รายงานไว้ (Preecharram et al., 2008) ผลจากการศึกษาครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นว่าสารผสมระหว่าง P1 และยา

ceftazidime มีการเสริมฤทธิ์ด้านแบคทีเรียมากกว่าสารผสมระหว่าง P5 และยา ceftazidime ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้เป็นหลักฐานสำคัญที่ชี้ให้เห็นว่าโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 67 และ/หรือ 80 kDa ของ separated fraction P1 อาจมีบทบาทที่สำคัญในการต้านเชื้อ CREnC 21394 ขณะที่โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 80 kDa ซึ่งไม่ได้ปรากฏใน P5 ด้วยเหตุนี้อาจเป็นไปได้ว่าการออกฤทธิ์ด้านแบคทีเรียของ P5 อาจเป็นผลมาจากโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 23 kDa และ/หรือโปรตีนตัวอื่นๆ

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การออกฤทธิ์ด้านแบคทีเรียและการเสริมฤทธิ์ของ separated fraction จากพลาสมาของจระเข้ น้ำจืดไทยเมื่อใช้ร่วมกับยา ceftazidime อาจเกี่ยวข้องกับกลไกการออกฤทธิ์เบื้องต้น 3 กลไก 1) พลาสมาของจระเข้ น้ำจืดไทยมีการเสริมฤทธิ์กับยา ceftazidime และออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ทำให้เซลล์มีรูปร่างบิดเบี้ยวและส่วนที่ห่อหุ้มเซลล์ได้รับความเสียหาย 2) การซึมผ่านเยื่อหุ้มชั้นนอกและชั้นในเพิ่มขึ้น และ 3) ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บีต้าแลคแทมเมส นอกจากนี้ อาจมีการรบกวนการสังเคราะห์โปรตีนที่สัมพันธ์กับ peptidoglycan และเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกทำให้ปรากฏแถบของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 35 และ 45 kDa ก่อนข้างจางกว่ากลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตาม separated fraction P1 และ P5 จากพลาสมาของจระเข้ น้ำจืดไทยที่ความเข้มข้นดังกล่าวอาจมีความปลอดภัยเพียงพอสำหรับนำมาใช้ในการรักษาด้วยเหตุนี้พลาสมาของจระเข้ น้ำจืดไทยจึงมีคุณสมบัติที่ดีที่ควรนำมาพัฒนาเป็นยาสูตรผสมกับยา ceftazidime เพื่อต้านเชื้อ *E. cloacae* ซึ่งปัจจุบันพบว่าการดื้อต่อยาปฏิชีวนะนำมาใช้รักษาในทางปฏิบัติเกือบทั้งหมด อย่างไรก็ตามการทดสอบความเป็นพิษและประสิทธิภาพของสารผสมดังกล่าวในเลือดหรือในระดับเนื้อเยื่อในสัตว์ทดลองหรือในมนุษย์ยังคงมีความจำเป็น

บรรณานุกรม

- Brunton, L. L., Chabner, B. A., & Knollmann, B. C. (2011). Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics (12 ed.). USA: McGraw-Hill Professional.
- Cardoso, L. S., Araujo, M. I., Goes, A. M., Pacifico, L. G., Oliveira, R. R., & Oliveira, S. C. (2007). Polymyxin B as inhibitor of LPS contamination of *Schistosoma mansoni* recombinant proteins in human cytokine analysis. Microb Cell Fact. 6. 1.
- Chokejindachai, W. (2007). Current situation of antimicrobial resistance in Thailand: A review. Bangkok: Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University.
- Clinical Laboratory Standards Institute. (2013). Method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. In A. W. Matthew, Franklin, R.C., William, A.C., Micheal, N.D., George, M.E., David W.H. Janet, F.H., Mary, J.F., Jana, M.S., Donal, E.L., Danie, J.S., Fred, C.T., John, D.T., Melvin, P.W., & Barbara, L.Z. (Ed.), *CLSI document M7-A7, Seventh Edition* (Vol. 26, pp. 14-34). Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute
- Devi, K. P., Nisha, S. A., Sakthivel, R., & Pandian, S. K. (2010). Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. Journal of Ethnopharmacology. 130(1). 107-115.
- Emori, T. G., & Gaynes, R. P. (1993). An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. Clinical Microbiology Reviews. 6(4). 428-442.
- Eriksson, M., Nielsen, P. E., & Good, L. (2002). Cell permeabilization and uptake of antisense peptide-peptide nucleic acid (PNA) into *Escherichia coli*. J Biol Chem. 277(9). 7144-7147.
- Eumkeb, G. (1999). *Investigation of the effect of antifolates on Escherichia coli* 1810. (Ph. D. Dissertation), The Robert Gordon University, United Kingdom.
- Eumkeb, G., & Chukrathok, S. (2013). Synergistic activity and mechanism of action of ceftazidime and apigenin combination against ceftazidime-resistant *Enterobacter cloacae*. Phytomedicine. 20(3-4). 262-269.
- Eumkeb, G., Sakdarat, S., & Siri Wong, S. (2010). Reversing β -lactam antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* with galangin from *Alpinia officinarum* Hance and synergism with ceftazidime. Phytomedicine. 18(1). 40-45.

- Eumkeb, G., Siriwong, S., Phitaktim, S., Rojtinnakorn, N., & Sakdarat, S. (2012). Synergistic activity and mode of action of flavonoids isolated from smaller galangal and amoxicillin combinations against amoxicillin-resistant *Escherichia coli*. Journal of applied microbiology. 112(1). 55-64.
- Garau, J., Xercavins, M., Rodriguez-Carballeira, M., Gomez-Vera, J. R., Coll, I., Vidal, D., . . . Ruiz-Bremon, A. (1999). Emergence and dissemination of quinolone-resistant *Escherichia coli* in the community. Antimicrob Agents Chemother. 43(11). 2736-2741.
- Genigeorgis, C. A. (1989). Present state of knowledge on staphylococcal intoxication. Int J Food Microbiol. 9(4). 327-360.
- Greenwood, D. (2000). Antimicrobial Chemotherapy (4th ed.). New York: Oxford University Press.
- Hancock, R. E. (1997). The role of fundamental research and biotechnology in finding solutions to the global problem of antibiotic resistance. Clin Infect Dis. 24 Suppl 1. S148-150.
- Hiramatsu, K., Cui, L., Kuroda, M., & Ito, T. (2001). The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol. 9(10). 486-493.
- Hooton, T. M., & Stamm, W. E. (1997). Diagnosis and treatment of uncomplicated urinary tract infection. Infect Dis Clin North Am. 11(3). 551-581.
- Huber, T. W. (2002). Growth of cell-wall-deficient variants of *Enterobacter cloacae* facilitates beta-lactamase derepressed mutants. International journal of antimicrobial agents. 19(5). 397-404.
- Isogai, E., Isogai, H., Hirose, K., Hayashi, S., & Oguma, K. (2001). In vivo synergy between green tea extract and levofloxacin against enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 infection. Current Microbiology. 42(4). 248-251.
- Jang, E. B., & Nishijima, K. A. (1990). Identification and attractancy of bacteria associated with *Dacus dorsalis* (Diptera:Tephritidae). Environmental Entomology. 19(6). 1726-1731.
- Jiang, L. (2011). *Comparison of disk diffusion, agar dilution, and broth microdilution for antimicrobial susceptibility testing of five chitosans*. (Degree of Master of Science), Fujian Agricultural and Forestry University, China.
- Johnson, A. P., Mushtaq, S., Warner, M., & Livermore, D. M. (2004). Activity of daptomycin against multi-resistant Gram-positive bacteria including enterococci and *Staphylococcus aureus* resistant to linezolid. Int J Antimicrob Agents. 24(4). 315-319.

- Junkes, C., Harvey, R. D., Bruce, K. D., Dolling, R., Bagheri, M., & Dathe, M. (2011). Cyclic antimicrobial R-, W-rich peptides: the role of peptide structure and E. coli outer and inner membranes in activity and the mode of action. European biophysics journal 40(4). 515-528.
- Junkes, C., Wessolowski, A., Farnaud, S., Evans, R. W., Good, L., Bienert, M., & Dathe, M. (2008). The interaction of arginine- and tryptophan-rich cyclic hexapeptides with Escherichia coli membranes. J Pept Sci. 14(4). 535-543.
- Katzung, B. G. (Ed.). (2006). *Basic & Clinical Pharmacology* (10 ed.). New York: McGraw-Hill.
- Kommanee, J., Preecharram, S., Daduang, S., Tamsiripong, Y., Dhiravisit, A., Yamada, Y., & Thammasirirak, S. (2012). Antibacterial activity of plasma from crocodile (*Crocodylus siamensis*) against pathogenic bacteria. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 11. 22.
- Kozitskaya, S., Cho, S. H., Dietrich, K., Marre, R., Naber, K., & Ziebuhr, W. (2004). The bacterial insertion sequence element IS256 occurs preferentially in nosocomial *Staphylococcus epidermidis* isolates: association with biofilm formation and resistance to aminoglycosides. Infect Immun Infection and immunity. 72(2). 1210-1215.
- Leclercq, R., & Courvalin, P. (1997). Resistance to glycopeptides in Enterococci. Clinical Infectious Diseases. 24. 545-556.
- Leelawongtawon, R., Siruntawinetti, J., Chaeychomsri, W., & Sattaponpan, C. (2010). Antibacterial and antifungal activities from Siamese crocodile blood. J Med Assoc Thai. 93 Suppl 7. S58-64.
- Lim, S. M., & Webb, S. A. (2005). Nosocomial bacterial infections in Intensive Care Units. I: Organisms and mechanisms of antibiotic resistance. Anaesthesia. 60(9). 887-902.
- Liu, I. X., Durham, D. G., & Richards, R. M. (2000). Baicalin synergy with beta-lactam antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other beta-lactam-resistant strains of *S. aureus*. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 52(3). 361-366.
- Livermore, D. M., & Brown, D. F. (2001). Detection of beta-lactamase-mediated resistance. J Antimicrob Chemother. 48 Suppl 1. 59-64.
- Lorian, V. (1999). Antibiotics in Laboratory Medicine (4th ed.). New York: Williams&Wilkins.
- Maharat Nakhonratchasima hospital. (2012). Microbiology Report: Antibiotic Resistance Profile and Prevalence of Isolated Organisms. Nakhon Ratchasima, Thailand: Department of Clinical Pathology, Maharat Nakhon Ratchasima hospital.

- Merchant, M., Kinney, C., & Sanders, P. (2009). Differential protein expression in alligator leukocytes in response to bacterial lipopolysaccharide injection. Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics. 4(4). 300-304.
- Merchant, M., McFatter, J., Mead, S., McAdon, C., & Wasilewski, J. (2010). Identification and characterization of serum complement activity in the American crocodile (*Crocodylus acutus*). Veterinary immunology and immunopathology. 133(2-4). 165-169.
- Merchant, M., Thibodeaux, D., Loubser, K., & Elsey, R. M. (2004). Amoebacidal effects of serum from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). J Parasitol. 90(6). 1480-1483.
- Merchant, M., Williams, S., & Hardy, R. (2009). Production of superoxide ions by leukocytes of the American alligator (*Alligator mississippiensis*). Comparative Biochemistry and Physiology. 152(1). 67-71.
- Merchant, M. E., Leger, N., Jerkins, E., Mills, K., Pallansch, M. B., Paulman, R. L., & Ptak, R. G. (2006). Broad spectrum antimicrobial activity of leukocyte extracts from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). Vet Immunol Immunopathol Veterinary immunology and immunopathology. 110(3-4). 221-228.
- Merchant, M. E., Mills, K., Leger, N., Jerkins, E., Vliet, K. A., & McDaniel, N. (2006). Comparisons of innate immune activity of all known living crocodylian species. Comparative Biochemistry and Physiology. 143(2). 133-137.
- Merchant, M. E., Pallansch, M., Paulman, R. L., Wells, J. B., Nalca, A., & Ptak, R. (2005). Antiviral activity of serum from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). Antiviral Res. 66(1). 35-38.
- Merchant, M. E., Roche, C., Elsey, R. M., & Prudhomme, J. (2003). Antibacterial properties of serum from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). Comparative Biochemistry and Physiology. 136(3). 505-513.
- Merchant, M. E., Roche, C. M., Thibodeaux, D., & Elsey, R. M. (2005). Identification of alternative pathway serum complement activity in the blood of the American alligator (*Alligator mississippiensis*). Comparative Biochemistry and Physiology. 141(3). 281-288.

- Merchant, M. E., Verret, B., & Elsey, R. M. (2005). Role of divalent metal ions in serum complement activity of the American alligator (*Alligator mississippiensis*). Comparative Biochemistry and Physiology. 141(3). 289-293.
- Moellering, R. C. (1998). Vancomycin-resistant Enterococci. Clinical Infectious Diseases. 26. 1196-1199.
- Moellering, R. C. (2009). New treatments for multiply drug-resistant Gram-positive bacteria. J Infect. 59 Suppl 1. S1-3.
- Moreira, M. A. S., Souza, E. C. d., & Moraes, C. A. d. (2004). Multidrug efflux systems in Gram-negative bacteria. Brazilian Journal of Microbiology. 35. 19-28.
- Naghmouchi, K., Le Lay, C., Baah, J., & Drider, D. (2012). Antibiotic and antimicrobial peptide combinations: synergistic inhibition of *Pseudomonas fluorescens* and antibiotic-resistant variants. Research in Microbiology. 163(2). 101-108.
- Namavar, F., Verboom, T., van de Klundert, J. A., van Gestel, M. H., Zaal, J., & Maclarena, D. M. (1997). Mechanisms of resistance to piperacillin of *Enterobacter cloacae* strains differ by antibiotic prescription policy. International journal of antimicrobial agents. 8(3). 205-208.
- Odds, F. C. (2003). Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. Journal Antimicrobial Chemotherapy. 52(1). 1.
- Pata, S. (2009). *Study of antibacterial and antifungal from leukocyte of crocodile (Crocodylus siamensis)*. (Ph.D. Dissertation), Khon Kaen University, Thailand.
- Pata, S., Yaraksa, N., Daduang, S., Tamsiripong, Y., Svasti, J., Araki, T., & Thammasirirak, S. (2011). Characterization of the novel antibacterial peptide Leucrocine from crocodile (*Crocodylus siamensis*) white blood cell extracts. Dev Comp Immunol. 35(5). 545-553.
- Preecharram, S., Daduang, S., Bunyatratchata, W., Araki, T., & Thammasirirak, S. (2008). Antibacterial activity from Siamese crocodile (*Crocodylus siamensis*) serum. African Journal of Biotechnology. 7. 3121-3128.
- Preecharram, S., Jeeranaiprepame, P., Daduang, S., Tamsiripong, Y., Somdee, T., Fukamizo, T., . . . Thammasirirak, S. (2010). Isolation and characterisation of crocosin, an antibacterial compound from crocodile (*Crocodylus siamensis*) plasma. Anim Sci J. 81(3). 393-401.

- Richards, E. M., & Xing, D. K. (1994). Separation and quantification of murein and precursors from *Enterobacter cloacae* after treatment with trimethoprim and sulphadiazine. J Pharm Pharmacol. 46(8). 690-696.
- Richards, R. M., Xing, J. Z., Gregory, D. W., & Marshall, D. (1993). An electronmicroscope study of the effect of sulphadiazine and trimethoprim on *Enterobacter cloacae*. Journal of Medical Microbiology. 38(1). 64-68.
- Roe, V. A. (2008). Antibiotic resistance: a guide for effective prescribing in women's health. Journal Midwifery Womens Health. 53(3). 216-226.
- Rollema, H. S., O. P. Kuipers, P. Both, W. M. de Vos and R. J. Siezen (1995). Improvement of solubility and stability of the antimicrobial peptide nisin by protein engineering. Appl Environ Microbiol 61(8): 2873-2878.
- Sabath, L. D. (1967). Synergy of antibacterial substances by apparently known mechanisms. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 7. 210-217.
- Shaharabany, M., Gollop, N., Ravin, S., Golomb, E., DeMarco, L., Ferreira, P. C., . . . Friedman, E. (1999). Naturally occurring antibacterial activities of avian and crocodile tissues. Journal of Antimicrobial and Chemotherapy. 44(3). 416-418.
- Shimeld, L. A., & Rodgers, A. T. (1999). Essentials of diagnostic microbiology. New York: Delmar publishers.
- Sundaram, B. M., Gopalakrishnan, C., Subramanian, S., Shankaranarayanan, D., & Kameswaran, L. (1983). Antimicrobial activities of *Garcinia mangostana*. Planta Medica. 48(1). 59-60.
- Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. The American Journal of Medicine. 119(6, Supplement 1). S3-S10.
- Thammasirirak, S., & Daduang, S. (2004). *Antibacterial peptides from Siamese crocodile (Crocodylus siamensis)* Retrieved from http://ora.kku.ac.th/res_kku/.
- Thammasirirak, S., Ponkham, P., Preecharram, S., Khanchanuan, R., Phonyothee, P., Daduang, S., . . . Svasti, J. (2006). Purification, characterization and comparison of reptile lysozymes. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. 143(2). 209-217.

- Threenet, E., Siruntawinetti, J., and Chaeychomsri, W. (2011). Proteins profiles of Siamese crocodile blood. Proceeding of 49th Kasetsart University annual conference: Science. Kasetsart University, Thailand.
- Vonberg, R. P., Wolter, A., Chaberny, I. F., Kola, A., Ziesing, S., Suerbaum, S., & Gastmeier, P. (2008). Epidemiology of multi-drug-resistant gram-negative bacteria: data from an university hospital over a 36-month period. International Journal of Hygiene and Environmental Health. 211(3-4). 251-257.
- Wagner, H. (2011). Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. Fitoterapia. 82(1). 34-37.
- Wagner, H., & Ulrich-Merzenich, G. (2009). Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. Phytomedicine. 16(2-3). 97-110.
- Wang, M., Tran, J. H., Jacoby, G. A., Zhang, Y., Wang, F., & Hooper, D. C. (2003). Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in Clinical Isolates of Escherichia coli from Shanghai, China. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 47(7). 2242-2248.
- Wisplinghoff, H., Rosato, A. E., Enright, M. C., Noto, M., Craig, W., & Archer, G. L. (2003). Related Clones Containing SCCmec Type IV Predominate among Clinically Significant Staphylococcus epidermidis Isolates. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 47(11). 3574-3579.
- Worthington, R. J., & Melander, C. (2013). Combination approaches to combat multidrug-resistant bacteria. Trends in Biotechnology. 31(3). 177-184.
- Yan, H., & Hancock, R. E. (2001). Synergistic interactions between mammalian antimicrobial defense peptides. Antimicrob Agents Chemother. 45(5). 1558-1560.
- Ziebuhr, W., Hennig, S., Eckart, M., Kranzler, H., Batzilla, C., & Kozitskaya, S. (2006). Nosocomial infections by Staphylococcus epidermidis: how a commensal bacterium turns into a pathogen. Int J Antimicrob Agents. 28 Suppl 1. S14-20.

ภาคผนวก

Output ที่ได้จากโครงการ

Conference Proceedings:

Rojtinnakorn, N., Kupittayanant, S., Tamsiripong, Y., & **Eumkeb, G.** (2014, May 6-8, 2014).

Antibacterial activity of plasma fractions from Siamese crocodile (Crocodylus siamensis) on Cefotaxime-resistant Enterobacter cloacae Paper presented at the The 5th International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO 5), Moevenpick Resort & Spa Karon Beach Phuket, Thailand.

ประวัติผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

1. **Name and Rank:** Assistant Professor Dr. Griangsak Eumkeb
2. **Department / School:** School of Biology, Institute of Science
3. **University:** Suranaree University of Technology
4. **Degree:**

Degree	Field	Date	Institute / Country
Awarded			
Ph.D.	Pharmacology	1999	The Robert Gordon University, United Kingdom
B.Sc.	Pharmacy	1989	Chulalongkorn University, Thailand

5. **Experiences:**

5.1 Administration Experience:

Period	Position	Institution / Firm
2004-present	Assistant Professor	Institute of Science, Suranaree University of Technology (SUT)
2002-2005	Assistant Center for Scientific and Suranaree University of Technology	Director of Center for Scientific and Technology equipment, Technology equipment
1999-2002	Lecturer	School of Biology, Inst. of Science, SUT.
1989-1994	Pharmacist	MaharatNakhonRatchasima Hospital, Thailand

6. **Current Professional Field Registration:**

Pharmacology and toxicology, Medicinal plant, Clinical Pharmacy

7. **Members:**

1. Thai society of toxicology
2. Thai society of pharmacist
3. Thai pharmacy council
4. The alumni association of Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University.

8. **Research Grants Awarded:**

2011- The Royal Golden Jubilee Ph.D. Program Advisorships (1 **Grant**): The Thailand Research Fund, Thailand

2006-2008: Research Career Development Grant (**Metheevijai**): The Thailand Research Fund, Thailand

2003-2004: Research Grant for New Scholar : The Thailand Research Fund-Commission on Higher Education

2004-2011: Research Grants (9 **Grants**): National Research Council of Thailand/Institute of Research and Development, Suranaree University of Technology, Thailand

2011:The Royal Golden Jubilee Ph.D. Program Advisorships (1 **Grants**): The Thailand Research Fund, Thailand

9. **Award :**

2013 : Outstanding alumnus, Nonkipittakom school, Burirum, Thailand

2011 : Renowned deed in athletics leader, Suranaree University of Technology

2010 : Renowned deed in athletics manager, Suranaree University of Technology

2008 : Outstanding alumnus, Nonkipittakom school, Burirum, Thailand

1994-1999: The Royal Thai Government Scholarship, MUA, to study Ph.D.
in U.K. for 4 years.

1985-1988: Boonrod - Brewery Scholarship for 4 years, Chulalongkorn University,

1983-1984: Bangkok-Bank Scholarship for 2 years, Mahidol University

10. Scientific Publications :

Referred articles:

Richards, R.M.E., **Eumkeb, G.** and Marshall, D. (1997). Is the ultrastructural damage caused by subinhibitory concentrations of trimethoprim and sulphadiazine part of their normal mechanism of action? *Microbios*, 92, 183 - 197.

Eumkeb, G. and Richards, R.M.E. (2005). Reversing beta-lactam antibiotic resistance with flavonoids in Gram positive Bacteria. *Acta Horticulturae*. Vol 4: 678: 171-178.

Jirawan Oonmetta-aree, Tomoko Suzuki, Piyawan Gasaluck and **Griangsak Eumkeb.** (2006). Antimicrobial Properties and Action of Galangal (*Alpinia galanga* Linn.) on *Staphylococcus aureus*. *LWT Food Science and Technology*. 39: 1214-1220.

(IF 2012 = 2.546)

Punopas, K., **Eumkeb, G.**, Chitsomboon, B. and Nakkiew, P. (2004). The study of antibacterial activity of some medicinal plant in Lamiaceae family. *Suranaree J. Sci. Technol.* 11:52-59.

Eumkeb, G. and Richards R.M.E. (2004). Reversing β -Lactam Antibiotic Resistance in Gram-positive bacteria by Some Flavonoids. *Suranaree J. Sci. Technol.* 11:143-150.

Eumkeb, G., Sakdarat, S and Siriwong, S. (2010). "Reversing [beta]-lactam antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* with galangin from *Alpinia officinarum* Hance and synergism with ceftazidime." *Phytomedicine* **18**(1): 40-45.

(Impact Factor 2012 = 2.972)

Eumkeb, G. and Duangkham A. (2011). "Subacute Toxicity Test of Galangin and ceftazidime in Mice." *Thai Journal of Toxicology* **26**(1): 5-13.

Eumkeb, G., Siriwong, S., Phitaktim, S., Rojtinnakorn, N., Sakdarat, S. (2012). "Synergistic activity and mode of action of flavonoids isolated from smaller galangal and amoxicillin combinations against amoxicillin-resistant *Escherichia coli*." J. Appl. Microbiol. 112, 55-64.

(Impact Factor 2012 = 2.196)

Munglue, P., **Eumkeb, G.**, Wray, S., Kupittayanant, S., 2013. The Effects of Watermelon (*Citrullus lanatus*) Extracts and L-Citrulline on Rat Uterine Contractility. Reproductive Sciences. 20, 437-448.

(Impact Factor 2012 = 2.064)

Eumkeb, G., Siriwong, S., Thumanu, K., 2012. Synergistic activity of luteolin and amoxicillin combination against amoxicillin-resistant *Escherichia coli* and mode of action. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 117, 247-253.

(Impact Factor 2012 = 3.11)

Eumkeb, G., Chukrathok, S., 2013. Synergistic activity and mechanism of action of ceftazidime and apigenin combination against ceftazidime-resistant *Enterobacter cloacae* Phytomedicine. 20, 262-269.

(Impact Factor 2012 = 2.972).

Patent

The combination of flavonoids and drugs against *Staphylococcus aureus* and *Enterobacter cloacae* : patent asking no: 0601001839 , 2006

Conference Proceedings:

Griangsak Eumkeb, Nichayanan Chaisena, Nitaya Rojtinnakorn, Supatcharee Siriwong, Aphai Duangkham. (2008). P14 Reversing β -Lactam Antibiotic Resistant Bacteria with Flavonoids. In : Proceeding of 30th Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand Meeting. 27-28 March 2008. *Thai Journal of Pharmacology*. Vol 29: No I: 117-126. Bangkok: Ruen Kaew Press.

Siriwong S, Thumanu K, **Eumkeb G.** (2010). Using FT-IR microspectroscopy to investigate biochemical change of drugs-resistance *Escherichia coli* treated with amoxicillin and apigenin. In: Proceeding of the 36th Congress on Science and Technology of Thailand (STT36). Abstract Book (Oral presentation, B2_0051/pp70.) 26-28 October 2010, Bangkok, Thailand: Bangkok International Trade & Exhibition Centre (BITEC), Thailand.

Munglue, P., **Eumkep, G.**, Wray, S., Kupittayanant, S., (2012). Uterine Relaxant Effects of Watermelon (*Citrullus lanatus*) Extracts. , in: The Physiology Society, (Ed.), Physiology 2012. The Physiology Society, Edinburgh International Conference Center, Edinburgh, EH3 8EE, United Kingdom., 27, pp. PC364.

Siriwong, S., **Eumkeb, G.**, 2012. Synergistic effect of penicillin with apigenin and kaempferol against Penicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*, in: Manosroi, A., Manosroi, J. (Ed.), NATPRO 4, Natural Products for Health and Beauty, The Fourth International Conference on Natural Products for Health and Beauty. Sangreeya Publishing Co.,, Chiang Mai, Thailand, pp. 368-372.

Naknarong, W., **Eumkeb, G.**, 2012. The effects of Red Kwao Kru (*Butea superba* Roxb.) extract on reproductive system of male mice, in: Manosroi, A., Manosroi, J. (Ed.), NATPRO 4, Natural Products for Health and Beauty, The Fourth International Conference on Natural Products for Health and Beauty. Sangreeya Publishing Co, Chiang Mai, Thailand, pp. 193-197.

Eumkeb, G., Phitaktim, S. and Teethaisong, Y. (2013). "Antibacterial Activity of α -Mangostin from the Pericarp Extract of *Garcinia mangostana* L. against Drug Resistant Bacteria." Proceedings of the 30th Annual Research Conference in Pharmaceutical Sciences. Thai J. Pharm. Sci. 38 (Suppl): 83-87.

Eumkeb, G., Naknarong, W. and Sirichaiwetchakoon, K. (2013). "The effects of Red Kwao krue (*Butea superba* Roxb.) extract on reproductive system of male mice." Proceedings of the 30th Annual Research Conference in Pharmaceutical Sciences. Thai J. Pharm. Sci. **38**(Suppl): 120-123.

Siriwong S, Krubphachaya P., Thumanu K, **Eumkeb G.** (2013). "Synergy effect of ceftazidime with flavonoids against *Streptococcus pyogenes*." Proceedings of the 30th Annual Research Conference in Pharmaceutical Sciences. Thai J. Pharm. Sci. **38**(Suppl): 115-118.

Autarkool, N., Teethaisong, Y., Kupittayanant, S., & **Eumkeb, G.** (2014, May 6-8, 2014). *Antibacterial activity of Staphania suberosa extract against methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Paper presented at the The 5th International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO 5), Moevenpick Resort & Spa Karon Beach Phuket, Thailand.

Rojtinnakorn, N., Kupittayanant, S., Tamsiripong, Y., & **Eumkeb, G.** (2014, May 6-8, 2014). *Antibacterial activity of plasma fractions from Siamese crocodile (Crocodylus siamensis) on Ceftazidime-resistant Enterobacter cloacae* Paper presented at the The 5th International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO 5), Moevenpick Resort & Spa Karon Beach Phuket, Thailand.

Eumkeb, G., Duangkham, A., & Hengpratom, T. (2014, May 6-8, 2014). *Subchronic toxicity test of quercetin and cloxacillin in mice*. Paper presented at the The 5th International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO 5), Moevenpick Resort & Spa Karon Beach Phuket, Thailand.

Teethaisong, Y., Autarkool, N., & **Eumkeb, G.** (2014, May 6-8, 2014). *Synergistic antibacterial activity of Boesenbergia rotunda extract and β -lactam antibiotic combination against multidrug-resistant bacteria*. Paper presented at the The 5th International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO 5), Moevenpick Resort & Spa Karon Beach Phuket, Thailand.

Cheypratub, P., LEEANANSAKSIRIB, W., & EUMKEB, G. (2014, May 6-8, 2014). *Antibacterial activity of Cyperus rotundus extract against Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Paper presented at the The 5th International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO 5), Moevenpick Resort & Spa Karon Beach Phuket, Thailand

Research reports:

Eumkeb, G. and Jinakoon, N. (2003). The study of medicinal plants and supplement food for health of community in NakhonRatchasima province

Technical articles (บทความทางวิชาการ)

Eumkeb, G., 2014. Galangal, From the kitchen to the pharmacy, The Siam Magazine. Siam I Am Co., Ltd., Nakhon Ratchasima, pp. 42-47.

Conference Abstracts:

Eumkeb, G. and Richards, R.M.E. (2003). Reversing beta-lactam antibiotic resistance with flavonoids in Gram positive Bacteria. In The 3rd World Congress on Medicinal and Aromatic Plant for Human Welfare (WOCMAP III) From Biodiversity through Science and Technology, Trade and Industry to Sustainable Use, **Abstracts Book** (Poster presentation, PP04 -59, pp. 450). 3-7 February 2003, Chiangmai, Thailand : Chiangmai University

Eumkeb, G. and Richards, R.M.E. (2004). Reversing beta-lactam antibiotic resistance in Gram positive Bacteria with some flavonoids. In :The 20th FAPA Congress 2004 : Emerging Science and Profession in Pharmacy , **Abstracts Book** (Oral presentation, PP-O-01, pp. 160). 30 Nov – 3 Dec 2004, Bangkok, Thailand : The Pharmaceutical Association of Thailand under Royal Patronage, Bangkok.

Eumkeb, G. (2005). Investigation of the effect of Some Flavonoids on some β - lactam antibiotics resistant bacteria. In :The Thai research Fund meeting : Senior Thai research Fund researchers meet

Junior Thai research Fund researchers, **Abstracts Book** (Poster presentation, MRG168/p225, pp. 214.). 14-16 January 2005, Kanchanaburee, Thailand : The Thai Research Fund and The higher education commission, Bangkok.

Eumkeb, G. (2005). Investigation of the effect of Some Flavonoids on some beta - lactam antibiotics resistant bacteria. In :The Thai research Fund meeting : Senior Thai research Fund researchers meet Junior Thai research Fund researchers, **Abstract Book** (Oral presentation, 13-R1-S1-MRG4680168/p227, pp. 1). 13-15 October 2005, Petchaburi, Thailand : The Thai Research Fund and The higher education commission, Bangkok.

Eumkeb, G. Chukratok. S., Suttajit. M. and Ruangrunsi. N. (2005). Investigation of the effect of Some Flavonoids on some beta-lactam antibiotics resistant bacteria. In :The 1st International Conference on Natural products for Health and Beauty; From local wisdom to global marketplace. **Abstract Book** (Oral presentation, O4-1/p232, pp. 124). 17-21 October 2005, Mahasarakham, Thailand : Mahasarakham University, and the higher education commission, Thailand.

Eumkeb, G., Wongkamsound, K (2007). Flavonoids synergy with beta-lactam antibiotics against beta-lactam-resistant bacteria. In :The Thai research Fund meeting : Senior Thai research Fund researchers meet Junior Thai research Fund researchers **7th, Abstract Book** (Poster presentation, P-PHY-B06-RSA4980004 /p26 , pp. 26). 11-13 October 2007, Pattaya, Chonburee, Thailand : The Thai Research Fund and The higher education commission, Bangkok

Eumkeb, G., Wongkamsound, K. (2008). Flavonoids synergy with β -lactam antibiotics against β -lactam-resistant bacteria. The Thai research Fund meeting : Senior Thai research Fund researchers meet Junior Thai research Fund researchers, **Abstract Book** (Poster presentation, PS-BIO-E20). 16-18 October 2008, Cha-am, Petchaburi, Thailand, Thailand research fund and Commission on higher education: p. 144.

Eumkeb, G., Phitaktim, S., Rojtinakorn, N., Siriwong, S., Duangkham, A.,

Naknarong, W., Wisansawat, J. (2009). Flavonoids synergy with β -lactam antibiotics against β -lactam-resistant bacteria. The Thai research Fund meeting : Senior Thai research Fund researchers meet Junior Thai research Fund researchers, **Abstract Book** (Poster presentation, PS-BIO-B24). 15-17 October 2009, Cha-am, Petchaburi, Thailand, Thailand research fund and Commission on higher education: p. 105.

ผลงานตีพิมพ์ทางหนังสือพิมพ์และสื่ออินเทอร์เน็ต (บางส่วน)

เกรียงศักดิ์ เอื้อมเก็บ พัฒนาศาสกัต"ข้า"สู่ยาปฏิชีวนะสูตรใหม่ ขับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดหนอง
สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย วันที่ 14 มกราคม 2548

เกรียงศักดิ์ เอื้อมเก็บ วิจัยพบ"ข้า"ยาปฏิชีวนะสูตรใหม่ ผู้จัดการออนไลน์ วันที่ 15 มกราคม 2548 เวลา
12:39 น. <http://www.manager.co.th/>

เกรียงศักดิ์ เอื้อมเก็บ เร่งวิจัย"ข้า"เป็นยาปฏิชีวนะสูตรใหม่ ด้านเชื้อหนองคื้อยาหนังสือพิมพ์บ้านเมือง
ประจำวันจันทร์ที่ 17 มกราคม 2548

เกรียงศักดิ์ เอื้อมเก็บ "ข้า"สยบเชื้อคื้อยา เล็งวิจัยสูตรใหม่ ผสมสารสมุนไพร หนังสือพิมพ์กรุงเทพ
ธุรกิจ ประจำวันอังคารที่ 18 มกราคม 2548

เกรียงศักดิ์ เอื้อมเก็บ วิจัย"ข้า"ทำยาปราบเชื้อแบคทีเรียจอมคื้อ หนังสือพิมพ์ผู้จัดการรายวัน
ประจำวันศุกร์ที่ 21 มกราคม 2548 หน้า 43.

เกรียงศักดิ์ เอื้อมเก็บ พัฒนาศาสกัตจาก"ข้า"แทนยาปฏิชีวนะสมัยใหม่ ขับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้
เกิดหนอง หนังสือพิมพ์สยามรัฐ ประจำวันศุกร์ที่ 28 มกราคม 2548

เกรียงศักดิ์ เอื้อมเก็บ สาสกัต"ข้า"ส่วนผสมยาปฏิชีวนะสูตรใหม่ ด้านเชื้อหนองคื้อยา หนังสือพิมพ์
โพสต์ทูเดย์ ประจำวันอาทิตย์ที่ 13 กุมภาพันธ์ 2548 หน้า B5.

ประวัตินักวิจัย

Name	Miss. Nitaya Rojtinnakorn
Date of Birth	August 28, 1961
Place of Birth	PrathumThani, Thailand
Education	
1980-1983	B.N.S. (Nursing Science), Boromrajonni College of Nursing, Nakhomratchasima, Nakhon Ratchasima, Thailand
1987-1989	B.P.H. (Public Health Administration), Sukhothai Thammathirat Open University, Bangkok, Thailand
1992-1993	M.N.S. (Medical and Surgical Nursing), Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

Publications

1. Eumkeb, G., Chaisena, N., **Rojtinnakorn, N.**, Siri Wong, S., and Aphai Duangkham, A. (2008). Reversing β -Lactam Antibiotic Resistant Bacteria with Flavonoids. Proceeding of the 36th Congress on Science and Technology of Thailand. Chulalongkorn University, Thailand.
2. Eumkeb, G., Siri Wong, S., Phitaktim, S., **Rojtinnakorn, N.**, and Sakdarat, S. (2011). Synergistic activity and mode of action of flavonoids isolated from smaller galangal and amoxicillin combinations against amoxicillin-resistant *Escherichia coli*. **Journal of Applied Microbiology**. 55-64 : 112.
3. **Rojtinnakorn, N.**, Kupittayanantb, S., Temsiripong, Y., & Eumkeb, G. (2014, May 6-8, 2014). *Antibacterial activity of plasma fractions from Siamese crocodile (Crocodylus siamensis) on Cefazidime-resistant Enterobacter cloacae* Paper presented at the The 5th International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO 5), Moevenpick Resort & Spa Karon Beach Phuket, Thailand.