บทคัดย่อภาษาไทย

การดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียเป็นปัญหาสำคัญของโลกรวมถึงประเทศไทย ผู้ป่วยหนักที่โรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมา เช่น ผู้ป่วยเด็กแรกเกิด เด็กทารก เด็กโต และผู้ใหญ่มีภาวะแทรกซ้อนจากการติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยาซึ่งทำให้อัตราการเสียชีวิตและค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลเพิ่มขึ้นทำให้ต้องใช้ยาต้านแบคทีเรียขนานใหม่ที่มีราคาแพงมากขึ้นและรุ่นที่สูงขึ้น ดังนั้นวัตถุประสงค์หลักของการศึกษาวิจัยในปัจจุบันจึงให้ความสำคัญไปที่สารที่ได้มาจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียดื้อยาหรือสารที่สามารถเพิ่มการออกฤทธิ์ยาปฏิชีวนะเดิมให้มีประสิทธิภาพสามารถใช้ต้านเชื้อแบคทีเรียดื้อยาได้ ดังนั้น วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เพื่อทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียดื้อยาของโปรตีนสกัดจากพลาสมาจระเข้น้ำจืดไทยเมื่อใช้เดี่ยวๆ และใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะกลุ่มบีตาแลคแทม พลาสมาของจระเข้ถูกทำให้บริสุทธิ์เพื่อที่จะได้ 5 แฟรคชัน (พี 1 พี 2 พี 3 พี 4 และ พี 5) โดยใช้คอลัมน์ โครมาโทกราฟฟี ค่ายับยั้งต่ำสุดของ พี 1 พี 2 พี 3 พี 4 และพี 5 ต้านเชื้อแบคทีเรีย เอนเทอโรแบคเตอร์ โคลเอเซ ที่ดื้อต่อยาเซฟตาซิดีม ดีเอ็มเอสที 21394 (ซีอาร์อีเอนซี 21394) มีค่า 1024, >1024, >1024, >1024 และ 1024 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ขณะที่ค่ายับยั้งต่ำสุดของทั้งห้าแฟรคชันในการต้านเชื้อ สแตปฟิโลคอคคัส ออเรียส ที่ดื้อต่อยา เมทิซิลิน ดีเอมเอสที 20651 (เอมอาร์เอสเอ 20651) คือ 1024 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งค่ายับยั้งต่ำสุดดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดมีการดื้อยาในระดับสูงต่อแฟรคชันดังกล่าว นอกจากนั้นทั้งเชื้อ ซีอาร์อีเอนซี 21394 และ เอมอาร์เอสเอ 20651 มีการดื้อต่อยา เซฟตาซิดีมหรือยาออกซาซิลลินในระดับที่สูงเช่นเดียวกัน (ค่ายับยั้งต่ำสุดทั้งสอง >1024) ผลจากการศึกษาด้วยวิธี เชคเกอร์บอร์ด พบค่าดัชนี เอฟไอซี ของพี 1 หรือ พี 5 ผสมกับยาเซฟตาซิดีมต้านเชื้อซีอาร์อีเอนซี 21394 ซึ่งทั้งสองมีการเสริมฤทธิ์เท่ากันที่ 0.062 ขณะที่ทั้ง พี 1 หรือ พี 2 ผสมกับยาคลอกซาซิลินซึ่งทั้งสอง มีการเสริมฤทธิ์ที่ 0.375 ต้านเชื้อเอมอาร์เอสเอ การศึกษาการมีชีวิตรอดของเชื้อได้ยืนยันให้เห็นว่าสารผสมทั้งพี 1 และพี 5 ผสมกับยาเซฟตาซิดีมหรือยาคลอกซาซิลลินเป็นสาเหตุให้เชื้อ ซีอาร์อีเอ็นซีและเอมอาร์เอสเอมีการลดลงอย่างเห็นได้ชัดในช่วง 6 ชั่วโมงและตลอดช่วง 24 ชั่วโมง จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่านพบว่าเซลล์ของเชื้อแสดงให้เห็นว่าผลของสารผสมระหว่างผสมกับทั้งพี1 หรือพี 5 ต่อเชื้อซีอาร์อีเอนซี แสดงให้เห็นว่าขนาดของเซลล์มีขนาดเล็กลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุม (พี<0.05 และ พี< 0.01) อีกทั้งเซลล์มีรูปร่างบิดเบี้ยวและเยื่อหุ้มเซลล์ได้รับความเสียหาย นอกจากนั้นผลของการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกและชั้นในพบว่าทั้ง พี1 และ พี 5 เดี่ยวๆ หรือผสมกับยาเซฟตาซิดีมมีผลทำให้การซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกและชั้นในของเชื้อซีอาร์อีเอนซี เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน (พี < 0.01)

ผลจากการศึกษาด้วยเอสดีเอส-เพจแสดงให้เห็นแถบโปรตีนของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับเยื่อหุ้มชั้นนอกเพปทิโดไกลแคน (โอเอมพีจี) ที่น้ำหนักโมเลกุล 25 กิโลดาลตันของทั้งยาเซฟตาซิดีมเดี่ยวๆ หรือผสมกับพี 1 มีแถบจางกว่าแถบอื่นๆ เล็กน้อย เช่นเดียวกับ ที่น้ำหนักโมเลกุล 35 และ 45 กิโลดาลตันของแถบโปรตีนโอเอมพีจีของยาเซฟตาซิดีมผสมกับทั้งพี 1 หรือ พี 5 มีความเข้มน้อยกว่าแถบควบคุมเล็กน้อย ผลจากการศึกษาการทำงานของเอ็นไซม์พบว่าสารผสมระหว่างยาเซฟตาซิดีมผสมกับทั้งพี 1 หรือพี 5 ได้แสดงให้เห็นว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์บีตา แลคแทมเมส ชนิดที่ 4 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (พี<0.01) จากผลนี้สามารถสรุปได้ว่าสารผสมทั้ง พี 1 หรือพี 5 ผสมกับยาเซฟตาซิดีมมีการเสริมฤทธิ์เสริมกันอย่างมากในการต้านเชื้อซีอาร์อีเอนซี ผลการศึกษาครั้งนี้เป็นหลักฐานให้เห็นว่าสารผสมดังกล่าวสามารถเปลี่ยนเชื้อที่ดื้อยาให้กลายเป็นเชื้อที่ไวต่อยาปฏิชีวนะที่เคยใช้ในการรักษา กล่าวโดยสรุปการออกฤทธิ์และการเสริมฤทธิ์ของแฟรคชันเมื่อใช้เดี่ยวๆ และใช้ร่วมกับยาเซฟตาซิดีมอาจจะมีกลไกในการออกฤทธิ์ 3 กลไก 1) แฟรคชันจากพลาสมาแสดงการเสริมฤทธิ์กับยาเซฟตาซิดีม และอาจจะยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ซึ่งนำไปสู่การบิดเบี้ยวของรูปร่างเซลล์และผนังเซลล์ให้ได้รับความเสียหาย 2) การซึมผ่านของเยื่อหุ้มชั้นนอกและชั้นในของเชื้อชนิดนี้เพิ่มขึ้น 3) ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บีตาแลคแทมเมส นอกจากนี้อาจรบกวนการสังเคราะห์โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับเพปทิโดไกลแคนและเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกซึ่งทำให้ปรากฏแถบของโปรตีนที่ น้ำหนักโมเลกุล 35 และ 45 กิโลดาลตันค่อนข้างจางกว่ากลุ่มควบคุม ดังนั้นแฟรคชันจากพลาสมาเลือดจระเข้น้ำจืดอาจจะถูกเสนอให้เป็นสารที่มีคุณสมบัติที่ดีสำหรับพัฒนาสารผสมร่วมกับเซฟตาซิดีมเพื่อเป็นยาตัวใหม่ในการต้านเชื้อ อี โคลเอเซ ซึ่งในปัจจุบันดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในทางปฏิบัติเกือบทั้งหมด อย่างไรก็ตามทดสอบความเป็นพิษในสัตว์ทดลองหรือในมนุษย์มีความจำเป็น ถ้าเป็นไปได้ระดับของยาในเลือดและในเนื้อเยื่อควรจะอยู่ในระดับที่สามารถออกฤทธิ์เสริมกัน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

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 μg/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.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี