

สมนึก ชูกระโทก : การตรวจสอบฤทธิ์ของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่คัดเลือกต่อแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่มเบตาแลคแทม (INVESTIGATION OF THE EFFECT OF SELECTED FLAVONOIDS ON β -LACTAM ANTIBIOTIC RESISTANT BACTERIA) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เกศจักร ดร. เกรียงศักดิ์ เอี่ยมเก็บ, 156 หน้า.

ทุกวันนี้แบคทีเรียชนิด *S. aureus* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะเมทิซิลินและแบคทีเรียชนิด *E. cloacae* ที่ดื้อต่อยาเซฟตาซิมมีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิดมากขึ้นเรื่อยๆ ทำให้เพิ่มความเสี่ยงต่อชีวิตของผู้ป่วยและผู้ให้การดูแลในโรงพยาบาลที่จะถูกคุกคาม งานวิจัยที่จะหาสารต้านแบคทีเรียใหม่ๆที่ทำให้ยาต้านเชื้อแบคทีเรียชนิดเบตาแลคแทมเหล่านั้นนำกลับมาใช้ได้เหมือนเดิมจึงเป็นเป้าหมายที่สำคัญและความต้องการอย่างเร่งด่วน งานวิจัยนี้ได้ทำการตรวจสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียของฟลาโวนอยด์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติ โดยเมื่อใช้ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน คลอกซาซิลิน และเซฟตาซิมร่วมกับไบคาลินที่ปริมาณ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะทั้งสามข้างต้นในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากการคัดแยกทางคลินิกที่ดื้อต่อยาเมทิซิลินชนิด *S. aureus* ลดลงจาก 100 มากกว่า 1,000 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในยาทั้งสามชนิดข้างต้น และยิ่งไปกว่านั้นแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะเซฟตาซิมชนิด *E. cloacae* ที่ได้จากการคัดแยกทางคลินิกที่มีค่าการยับยั้งของยาเซฟตาซิมต่ำสุดมากกว่า 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กลับมาไวต่อยาปฏิชีวนะดังกล่าว เมื่อใช้ร่วมกับเอพิจีนินหรือลูทิโอลิน 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยค่าการยับยั้งของยาเซฟตาซิมต่ำสุดลดลงเหลือ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากการตรวจนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อแบคทีเรียชนิด MRSA เมื่อใช้ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินหรือคลอกซาซิลินในปริมาณ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรร่วมกับไบคาลิน 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรพบว่ามีฤทธิ์เสริมกัน เซฟตาซิม 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรผสมกับไบคาลินหรือเคอเซดิน 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาเมทิซิลินชนิด *S. aureus* ให้อยู่ในระดับต่ำสุดที่สามารถนับได้ (10^3 CFU/ml) ในช่วงเวลาดังแต่ 6 ชั่วโมงและมากกว่า ส่วนแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะเซฟตาซิมชนิด *E. cloacae* เหลืออยู่ในระดับต่ำสุดในช่วงเวลา 6 ถึง 24 ชั่วโมง จากการใช้ยาเซฟตาซิม 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรร่วมกับลูทิโอลินหรือเอพิจีนิน 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน เห็นอย่างชัดเจนว่าเมื่อใช้ไบคาลิน 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรร่วมกับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของแอมพิซิลินหรือคลอกซาซิลิน และเซฟตาซิม 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรผสมกับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของไบคาลิน

หรือกาแลนจินหรือเคอเซดิน ทำให้เกิดการทำลายโครงสร้างของแบคทีเรียที่คือต่อยามทีลินชนิด *S. aureus* ให้เกิดการสูญเสีย เมื่อใช้เซฟตาซิม 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรร่วมกับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรของเอพิจีนินหรือลูทิโอลิน สามารถทำลายรูปร่างและโครงสร้างของแบคทีเรียที่คือต่อยาปฏิชีวนะเซฟตาซิมชนิด *E. cloacae* จนสูญเสียโครงสร้างอย่างเห็นได้ชัด โดยผลดังกล่าวสามารถยืนยันโดยแคลิฟลารี อิเล็กโทรโฟเรซิส การวิเคราะห์ด้วยวิธีเอ็นไซม์ชี้ให้เห็นว่าไบคาลิน เคอเซดินหรือกาแลนจินเมื่อผสมกับเซฟตาซิมมีผลยับยั้งต่อเอ็นไซม์เบตาแลคแทมเมส I ของแบคทีเรียชนิด *B. cereus* เอพิจีนินและเคอเซดินเมื่อผสมกับเซฟตาซิมสามารถยับยั้งเอ็นไซม์เพนิซิลินเอส IV ของแบคทีเรียชนิด *E. cloacae* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

จากการศึกษานี้สรุปได้ว่าไบคาลิน กาแลนจินหรือเคอเซดินมีประสิทธิภาพในการทำให้แบคทีเรียชนิด *S. aureus* ที่คือต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่มเบตาแลคแทมกลับมาไวต่อยาดังกล่าวได้ดั้งเดิม ลูทิโอลินหรือเอพิจีนินเมื่อใช้ร่วมกับเซฟตาซิมมีประสิทธิภาพในการเสริมฤทธิ์กันเพื่อทำลายแบคทีเรียชนิด *E. cloacae* ที่คือต่อยาปฏิชีวนะเซฟตาซิม เมื่อมองในแง่ความเป็นพิษที่ต่ำของสารฟลาโวนอยด์เหล่านี้แล้ว สารที่มีคุณค่าเหล่านี้ควรถูกนำมาพัฒนาเป็นสารที่นำมาใช้ร่วมกับยากุ่มเบตาแลคแทม เพื่อเป็นยารักษาโรคที่เกิดจากแบคทีเรียที่คือต่อยาปฏิชีวนะเหล่านี้ที่ไม่สามารถรักษาได้ในปัจจุบัน

สาขาวิชาชีววิทยา

ปีการศึกษา 2549

ลายมือชื่อนักศึกษา _____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม _____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม _____

SOMNUK CHUKRATHOK : INVESTIGATION OF THE EFFECT OF
SELECTED FLAVONOIDS ON β -LACTAM ANTIBIOTIC RESISTANT
BACTERIA. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. GRIANGSAK EUMKEB,
Ph.D. 156 PP.

ANTIBACTERIAL ACTIVITY/ β -LACTAM ANTIBIOTICS/MINIMUM
INHIBITORY CONCENTRATION (MIC)/METHICILLIN-RESISTANT
STAPHYLOCOCCUS AUREUS (MRSA)/CEFTAZIDIME-RESISTANT
ENTEROBACTER CLOACAE (CREnC)

Today, strains of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) and ceftazidime-resistant *Enterobacter cloacae* (CREnC) are usually multiply resistant to many antibiotics and pose life-threatening risks to the hospitalised patients and their care givers. The search for new antibacterial agents and compounds that can reverse the resistance to β -lactam antibiotics are research objectives of far reaching importance and urgently needed. In this study, we have examined the antibacterial action of naturally occurring flavonoids. When combined ampicillin, cloxacillin or ceftazidime with baicalein 5 $\mu\text{g/ml}$, minimum inhibitory concentrations (MICs) of these drugs against clinical isolates of MRSA were reduced from 100, > 1,000 and 50 $\mu\text{g/ml}$ to 5, 5 and 5 $\mu\text{g/ml}$ respectively. Furthermore, clinical isolates of CREnC with MICs of ceftazidime >1,000 $\mu\text{g/ml}$ had their resistance to these drugs reversed by apigenin 5 $\mu\text{g/ml}$ or luteolin 5 $\mu\text{g/ml}$ to MICs of ceftazidime 5 $\mu\text{g/ml}$. Viable counts showed that the killing of MRSA cells by 10 $\mu\text{g/ml}$ ampicillin or cloxacillin was potentiated by 10

$\mu\text{g/ml}$ baicalein. Ceftazidime $10 \mu\text{g/ml}$ in combination with $10 \mu\text{g/ml}$ of baicalein or quercetin also reduced the CFU/ml of MRSA to low level (1×10^3 CFU/ml) over 6 h. The killing curve of CREnC were also maintained at low level from 6 to 24 h by $10 \mu\text{g/ml}$ ceftazidime in combination with $10 \mu\text{g/ml}$ of luteolin or apigenin. Electronmicroscopy clearly showed that the combination of $10 \mu\text{g/ml}$ baicalein with $10 \mu\text{g/ml}$ of ampicillin or cloxacillin and $10 \mu\text{g/ml}$ ceftazidime with $10 \mu\text{g/ml}$ of baicalein or galangin or quercetin caused damage to the ultrastructure of MRSA. Ceftazidime $10 \mu\text{g/ml}$ in combination with $10 \mu\text{g/ml}$ of luteolin or apigenin also caused marked morphological damage for CREnC. These results were also confirmed by capillary electrophoresis. Enzymes assays indicated that baicalein, quercetin or galangin plus ceftazidime had inhibitory activity against β -lactamase I from *B. cereus*. Moreover, the combination of ceftazidime plus apigenin and quercetin showed efficiently inhibitory activity against penicillinase type IV from *Enterobacter cloacae*.

From the study, it was concluded that baicalein, galangin or quercetin have the potential to reverse bacterial resistance to β -lactam antibiotics against MRSA. Luteolin or apigenin have synergistic effect with ceftazidime against CREnC. In view of their limited toxicity, these tested flavonoids offer for the development of a valuable adjunct to β -lactam treatments against otherwise resistant strains of currently almost untreatable microorganisms.

School of Biology

Student' Signature _____

Academic Year 2006

Advisor' Signature _____

Co-advisor's Signature _____

Co-advisor's Signature _____