รหัสโครงการ SUT1-104-48-24-08

รายงานการวิจัย

ฤทธิ์ของกาแลนจินในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียบางชนิด ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่มเบตาแลคแทม

(Investigation of the effect of galangin on some β-lactam antibiotics resistant bacteria)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT1-104-48-24-08

รายงานการวิจัย

ฤทธิ์ของกาแลนจินในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียบางชนิด ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่มเบตาแลคแทม

(Investigation of the effect of galangin on some β-lactam antibiotics resistant bacteria)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภก. ดร. เกรียงศักดิ์ เอื้อมเก็บ

สาขาวิชาเภสัชวิทยา

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

นายสมนึก ฉู่กระโทก

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2548-2549

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

สิงหาคม 2555

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยเรื่องฤทธิ์ของกาแลนจิน ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียบางชนิด ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่มเบตาแลคแทม ในครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2548-2549 ทำให้งานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และขอขอบคุณ คุณกาญจนา วงศ์คำซาว คุณสุพัชรี ศิริวงศ์ ที่ช่วยการทำวิจัยในครั้งนี้ด้วยความทุ่มเท คุณจารุกรณ์ วิศาลสวัสดิ์ ที่ช่วยอนุเคราะห์ข้อมูลเชื้อที่ดื้อยา รองศาสตราจารย์ ดร. นิจศิริ เรืองรังสีและศาสตราจารย์ ดร. ไมตรี สุทธจิตต์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา กลุ่มแบคทีเรียวิทยาทางการแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่อนุเคราะห์เชื้อในการวิจัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่อนุเคราะห์ทั้งอุปกรณ์และสถานที่ในการทำวิจัยจนประสบผลสำเร็จ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อภาษาไทย

การดื้อต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่มเบตาแลคแทมเป็นปัญหาของโลกในปัจจุบัน ปัจจุบันเชื้อในกลุ่มสแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส และอีโคไล โดยปกติจะดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิดและเป็นอันตรายต่อสุขภาพสำหรับผู้ป่วยที่นอนในโรงพยาบาลและบุคคลากรที่ให้การรักษา ฉะนั้นการค้นหายาปฏิชีวนะใหม่ๆและสารประกอบที่สามารถยับยั้งการดื้อยาปฏิชีวนะในกลุ่มเบตาแลคแทมจึงเป็นเป้าหมายที่สำคัญและเร่งด่วนที่ต้องรีบดำเนินการ การศึกษาวิจัยครั้งนี้เราได้ทดสอบฤทธิ์ในการเป็นสารปฏิชีวนะของสารฟลาโวนอยด์ที่เกิดขึ้นในพืชที่มีในธรรมชาติได้แก่ กาแลนจิน การวิจัยพบว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้ออีโคไล ดีเอ็มเอสที 20662 ของอะมอกซีซิลลินและกาแลนจิน เท่ากับ >1,000 และ 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อสแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส ดีเอ็มเอสที 20651 ของเซพตาซีดีมและกาแลนจิน เท่ากับ 50 และ 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ผลจากการทดสอบเชคเกอร์บอร์ด แสดงให้เห็นว่า ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้ออีโคไล ดีเอ็มเอสที 20662 ของยาผสมกับกาแลนจิน ลดลงได้แก่ อะมอกซีซิลลิน 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ผสมกับกาแลนจิน 40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ยิ่งไปกว่านั้นค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อสแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส ดีเอ็มเอสที 20651 ของเซพตาซีดีม ผสมกับกาแลนจิน ลดลงเป็น 10 และ 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ผลการนับเชื้อที่ยังรอดชีวิตจากกราฟการเจริญเติบโตของเชื้อพบว่า กราฟการเจริญของเชื้อ อีโคไล ดีเอ็มเอสที 20662 ถูกยับยั้งการเจริญเมื่อใส่สารผสมระหว่างอะมอกซีซิลลิน 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรและกาแลนจิน 40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร กราฟการเจริญเติบโตของสแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส ดีเอ็มเอสที 20651 ก็ถูกยับยั้งให้อยู่ในระดับต่ำสุดในช่วงตั้งแต่ 6 ชั่วโมงเป็นต้นไป เมื่อได้รับสารผสมระหว่างเซฟตาซิดีม 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร กับกาแลนจิน 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นอกจากนั้นแล้ว ผลการวิจัยจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนยังพบว่า สารผสมของเซฟตาซิดีม 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร กับกาแลนจิน 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทำให้รูปลักษณะทางสัณฐานของเชื้อสแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส ดีเอ็มเอสที 20651 ถูกทำให้เสียหายอย่างมาก ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนของเชื้อ อีโคไล ดีเอ็มเอสที 20662 เมื่อได้รับยา ระหว่างอะมอกซีซิลลิน 8 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรและกาแลนจิน 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทำให้เซลล์ได้รับความเสียหายอย่างมาก รวมถึงการแยกออกของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกด้วย ซึ่งอาจจะเนื่องมาจากการที่เปบทิโดไกลแคนที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกได้รับความเสียหาย บางเซลล์ของแบคทีเรียสูญเสียไรโบโซมไปจากไซโทพลาสซึม เซลล์ของแบคทีเรียจำนวนมากมีขนาดยาวกว่ากลุ่มควบคุม การวิเคราะห์ทางเอนไซม์พบว่า กาแลนจินามารถยับยั้งเบตาแลคแทมเมสจากเชื้อแบซิลลัส ซีเรียส ได้ ในขณะที่เทคโทไคลซินและ 6-คลอโร-7-เมททิลฟลาโวนแสดงการยับยั้งเพนนิซิลลินเนส ไทป์4 จากเชื้อเอนเทอโรแบคเตอร์ โคลเอเซ ผลจากการทดลองนี้บ่งชี้ว่า กาแลนจินนอกจากจะยับยั้งที่บริเวณโครงสร้างของเซลล์และการแบ่งตัวของเซลล์แล้ว ยังยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เบตาแลคแทม เมสด้วย

จากการศึกษานี้ สามารถสรุปได้ว่า กาแลนจิน มีศักยภาพที่จะยับยั้งเชื้อเชื่ออีโคไล ดีเอ็มเอสที 20662 และสแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส ดีเอ็มเอสที 20651 ที่ดื้อต่อยาอะมอกซีซิลลินและเซพตาซิดีมตามลำดับ เมื่อ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Resistance to β-lactam antibiotics is a global problem. Today strains of *Staphylococus aureus (S. aureus)* and *Escherichia coli* (*E. coli*) 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 galangin, the naturally occurring flavonoids. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of amoxicillin and galangin alone against *E. coli* DMST 20662 were >1,000 and 500 μg/ml respectively. The MICs of ceftazidime and galangin against *S. aureus* DMST 20651 were 50 and 300 μg/ml respectively. The results of checkerboard assay showed that MICs of amoxicillin in combination with galangin were reduced to amoxicillin 10 μg/ml plus galangin 40 μg/ml against this *E. coli* strain. In addition, the MICs of ceftazidime plus galangin against *S. aureus* DMST 20651 were reduced to 10 plus 5 μg/ml respectively. Viable counts showed that the killing curves of *E. coli* DMST 20662 cells by 10 μg/ml amoxicillin were potentiated by galangin 40 μg/ml. Ceftazidime 5 μg/ml in combination with 5 μg/ml of galangin also reduced the CFU/ml of *S. aureus* DMST 20651 to low levels ($1x10^{3}$ CFU/ml) over 6 h. Electronmicroscopy clearly showed that the combination of ceftazidime 5 μg/ml with 5 μg/ml of galangin caused marked morphological damage for *S. aureus* DMST 20651. Also, electronmicrographs of thin sections of log phase *E. coli* DMST 20662 grown for 4 h in the presence of amoxicillin 8 μg/ml plus galangin 30 μg/ml indicated that the combination at these concentrations caused marked morphological damage to the cells. The damage included loosening or detachment of the outer membrane which may have resulted from damage to the peptidoglycan layer internal to the OM. Some of the bacteria exhibited electron-transparent areas devoid of ribosomes in the cytoplasm. Most of the treated bacteria were considerably larger and longer than the control bacteria. Enzyme assay indicated that galangin had an inhibitory activity against β-lactamaseI from *B. cereus*. Galangin had some activity and tectochrysin and 6-chloro-7-methylflavone showed greater activity against penicillinase type IV from *E. cloacae*. These results indicated that in addition to the direct effect on cell structure and cell division, the resistance reversing activity of galangin against bacteria might also include inhibition of β-lactamase activity.

From the study, it was concluded that galangin has the potential to reverse bacterial resistance to amoxicillin and ceftazidime against *E. coli* DMST 20662 and *S. aureus* DMST 20651 respectively. In view of their limited toxicity, galangin offers for the development of a valuable adjunct to β-lactam treatments against otherwise resistant strains of currently almost untreatable microorganisms

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ ……………………………………………………………….	ก
บทคัดย่อภาษาไทย ……………………………………………………….………	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ …………………………………………………..……….	ง
สารบัญ …………………………………………………………………………….	จ
สารบัญตาราง …………………………………………………………………….	ฉ
สารบัญภาพ ……………………………………………………………………….	ช
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย ………..…………………………….	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย ……………………..…………………………..	2
ขอบเขตของการวิจัย ………………..…………..……………………………. 2	
ข้อตกลงเบื้องต้น ………...……………………..………………………..	3
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย ………...……………..……………..…….	3
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	
แหล่งที่มาของข้อมูล ………………………………………………..………….	4
วิธีดำเนินการวิจัย …………………………………………………………..	4
วิธีวิเคราะห์ข้อมูล …………………………………………..…………………….	6
บทที่ 3 ผลการวิจัย	
อภิปรายผลการวิจัย ……………………..……………………………………….	7
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง	
ผลการวิจัยเปรียบเทียบ ....……………………………………………………..	16
วิเคราะห์และวิจารณ์ผลการทดลอง………………………………………..	17
สรุปผลการวิจัย	19
บรรณานุกรม ………………………………………………………………..	20
ภาคผนวก ……………………………………………………………………………	22
ประวัติผู้วิจัย ………………………………………………………………………..	27

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

ตาราง 1 ค่า Minimum inhibitory concentrations (MICs), fractional inhibitory concentrations (FICs) และ FIC indexes จากการทำ checkerboard assays ของ ceftazidime, amoxicillin, galangin เดี่ยวๆ และส่วนผสมของ ceftazidime, amoxicillin และ galangin ต้านเชื้อดื้อยาชนิดต่างๆ **..** 10

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

รูปที่ **หน้า**

รูปที่ 1. โครงสร้างของ ceftazidime, amoxicillin, clavulanic acid, และ galangin ที่ใช้ในการวิจัย 7

รูปที่ 2. กราฟการหาจำนวนแบคทีเรีย จากวิธี Bacterial suspension standard curve ของเชื้อ Ceftazidime-resistant *Staphylococcus aureus* DMST 20651 (CRSA) โดยการวัด O.D. 8

รูปที่ 3. กราฟการหาจำนวนแบคทีเรีย จากวิธี Bacterial suspension standard curve ของเชื้อ Amoxicillin-resistant *Escherichia coli* DMST 20662 (AREC) โดยการวัด O.D....... 8

รูปที่ 4. กราฟการหาจำนวนแบคทีเรีย จากวิธี Bacterial suspension standard curve ของเชื้อ Ceftazidime-resistant *Enterobacter cloacae* DMST 21394 (CREC) โดยการวัด O.D. 9

รูปที่ 5. กราฟการหาจำนวนแบคทีเรีย จากวิธี Bacterial suspension standard curve ของเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 โดยการวัด O.D. 9

รูปที่ 6. กราฟการหาจำนวนแบคทีเรีย จากวิธี Bacterial suspension standard curve ของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 โดยการวัด O.D. 10

รูปที่ 7 กราฟแสดงผลของ ceftazidime, galangin เดี่ยวๆ และผสม ต่อการเจริญของเชื้อ *S. aureus* DMST 20651. —○— ceftazidime (20) หมายถึง ceftazidime at 20 μg/ml.; ค่าที่ได้บนกราฟมาจากการทดลอง 4 ซ้ำ , และ vertical bars แสดง standard errors of the means. 11

รูปที่ 8 กราฟแสดงผลของ amoxicillin, galangin เดี่ยวๆ และผสม ต่อการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* DMST 20662 (AREC). —▽— amoxicillin(200) หมายถึง amoxicillin at 200 μg/ml.; ค่าที่ได้บนกราฟมาจากการทดลอง 4 ซ้ำ , และ vertical bars แสดง standard errors of the means. 12

รูปที่ 9 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนของ log phase *S. aureus* DMST 20651 ใน cation-adjusted Mueller-Hinton (MH) broth โดยในภาพ: **a**, ปราศจากยา (control); **b**, 25 μg/ml ceftazidime ; **c**, 50 μg/ml galangin; **d**, สารผสม 5 μg/ml ceftazidime และ 5 μg/ml galangin (**a, b, c, d**, original magnification, x 17,480; bar, 1 μm; *Inset*, **a, b, d,** original magnification, x 42,800; **c**, x 32,500; bar, 0.25 μm). 13

รูปที่ **หน้า**

รูปที่ 10 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนของ log phase *E. coli* DMST 20662 ใน cation-adjusted Mueller-Hinton (MH) broth โดยในภาพ: **a**, ปราศจากยา (control); **b**, 200 μg/ml amoxicillin; **c**, 100 μg/ml galangin; **d**, สารผสม 8 μg/ml amoxicillin และ 30 μg/ml galangin; Bar = 0.5 μm (b,c,d); 1 μm (a). …………………………….. 14

รูปที่ 11 ผลของ flavonoids ชนิดต่างๆ ต่อการยับยั้ง penicillinase ในการสลาย benzylpenicillin. **a**. penicillinase จาก *B. cereus*; สัญลักษณ์ flavonoids (200 μg/ml); ◆, control (without flavonoids); ■, galangin; ▼, 6-chloro-7-methylflavone; ●, tectochrysin. **b**. β-lactamase จาก *E. cloacea*; สัญลักษณ์ แสดงความเข้มข้นต่างๆกัน (μg/ml) ของ galangin; ●, 100 หมายถึง 100 μg/ml ของ galangin. ตัวอักษร superscript ที่ต่างกันแสดงถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Tukey's HSD, $p < 0.01$). ………………………………………………………………. 15

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

จากปัญหาสำคัญเรื่องสถานการณ์การดื้อยาของเชื้อในโรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมา เราพบว่า มีเชื้อที่ดื้อต่อยาในกลุ่ม β - lactam antibiotics ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะที่มีการใช้เป็นมูลค่าหลายพันล้านบาทต่อปีในประเทศไทย ตัวอย่างของเชื้อที่ดื้อยาในโรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมาที่ทำการทดสอบความไวต่อยาในหน่วยจุลชีววิทยา กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลีนิค ได้แก่ เชื้อ Methicillin resistant *Staphylococcus aureus (MRSA)* มีการดื้อยาในตึกผู้ป่วย ไอซียูศัลยกรรม (85%) ไอซียูเด็ก (65%) Premature (88 %) และ Sepsis (74 %) เชื้อที่ดื้อต่อยา Ceftazidime ซึ่งเป็นยาที่มีราคาแพงมาก และเป็นยาใหม่ ในกลุ่ม Cephalosporin (Third generation) ที่พบได้แก่ Ceftazidime-resistant *Escherichia coli* (CREC) มีอัตราการดื้อยาเกือบ 100% ในทุกตึกผู้ป่วย เชื้อ Ceftazidime-resistant *Enterobacter cloacae* (CREC) มีอัตราการดื้อยานี้ถึง 100 % ในหลายตึกผู้ป่วย และเชื้อ Methicillin-resistant *S. epidermidis* มีอัตราการดื้อยานี้มากกว่า 50% ในหลายตึกผู้ป่วย รวมถึงมีการดื้อยาของเชื้อ *Enterococcus faecium* และ *Enterococcus faecalis* ในอัตราที่สูงมากขึ้น เชื้อเหล่านี้ก่อให้เกิดการติดเชื้อกับป่วยที่นอนในโรงพยาบาลในอัตราที่สูงและเป็นจำนวนมาก (Maharat, 2011) โดยจะพบได้ในเลือดและสิ่งคัดหลั่งจากผู้ป่วยเช่น เสมหะ, น้ำมูก, น้ำลาย, ปัสสาวะ และอุจจาระ เป็นต้น จากปัญหานี้เอง นับเป็นปัญหาสำคัญของจังหวัดนครราชสีมาและของประเทศ ที่ต้องสูญเสียเงินค่ารักษาพยาบาลไปกับการใช้ยาที่มีราคาแพงเหล่านี้ แต่ใช้ไม่ได้ผล เนื่องจากการดื้อยาของเชื้อ ทำให้คนไข้ต้องสูญเสียเงินเป็นจำนวนมาก และอาจเป็นอันตรายถึงชีวิตจากการดื้อยาที่มากขึ้นของเชื้อเหล่านี้มาก ประเทศไทยของเราต้องสูญเสียเงินตรานำยาเหล่านี้เข้ามาจากต่างประเทศเป็นมูลค่าหลายพันล้านบาทต่อปี

เพื่อที่จะหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถมาทดแทนยาในกลุ่ม β - lactam antibiotics ที่เชื้อเกิดการดื้อยาขึ้นแล้ว หรือใช้เพื่อเสริมฤทธิ์กับยาในกลุ่มนี้แล้วทำให้เชื้อไม่ดื้อต่อยาในกลุ่มนี้ ได้มีงานวิจัยบางชิ้นพบว่า Baicalin ซึ่งเป็นสารสกัดในกลุ่ม Flavonoids จากพืชสมุนไพรที่รับประทานได้ชื่อ *Scutellaria amoena* C. H. Wright สามารถ ออกฤทธิ์เสริมกับยาในกลุ่ม β - lactam antibiotics เพื่อต่อต้านเชื้อในกลุ่ม MRSA และ Penicillin-resistant *Staphylococcus aureus* บางตัวได้เป็นอย่างดี (Liu et al., 2000) และจากการทำวิจัยเบื้องต้น พบว่า สารสกัดจากสมุนไพรไทย ได้แก่ พืชตระกูลข่า [*Alpinia galanga* (L) Willd, *Alpinia nigra* (Gaertn) Burtt. และ *Alpinia officinarum* Hance.] ซึ่งสามารถนำมาสกัดเอาสารกลุ่ม Flavonoids ได้แก่ Galagin (Li and Tian, 2003; Luo et al., 1998) สามารถมีฤทธิ์เสริมกับยาบางตัวในกลุ่ม β-lactam antibiotics เพื่อยับยั้งเชื้อที่ดื้อต่อยาในกลุ่มนี้ เช่น MRSA ได้ในเบื้องต้น (Eumkeb, 2004)

ดังนั้นในการค้นหายาตัวใหม่จากสมุนไพรไทย เพื่อนำมาทดแทนยาในกลุ่ม β-lactam หรือใช้เพื่อเสริมฤทธิ์กับยาในกลุ่มนี้ เพื่อให้ยาในกลุ่มนี้สามารถใช้ได้กับเชื้อเหล่านี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเชื้อเกิดการดื้อยาขึ้นแล้วในจังหวัดนครราชสีมา และยังเป็นปัญหาการดื้อยาทั้งในระดับประเทศและระดับนานาชาติ

ข้าพเจ้าและทีมงานจึงได้ทำการวิจัยโครงการวิจัยย่อยที่เกี่ยวข้องกับ "ชุดโครงการวิจัย" ภายใต้ชุดโครงการวิจัย "ประสิทธิผลและประโยชน์ของพืชบางชนิดในท้องถิ่น" โดยการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร Galangin ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม Flavonoids ซึ่งสามารถสกัดได้จากพืชสมุนไพรไทยตระกูลข่าและพืชสมุนไพรไทยอื่นๆอีกหลายชนิดดังกล่าวข้างต้น ต่อเชื้อที่ดื้อยาในกลุ่ม β-lactam antibiotics ซึ่งเป็นปัญหาของทั้งจังหวัดนครราชสีมา ของประเทศไทย และของโลกดังกล่าว เพื่อจะได้ทราบว่าสาร Galangin นี้มีฤทธิ์ต่อเชื้อที่ดื้อต่อยาในกลุ่มβ-lactam antibiotics ในโรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมาหรือไม่เมื่อใช้เดี่ยวๆและผสมกับยาอื่นๆดังกล่าว เพื่อดูการเสริมฤทธิ์กับยาในกลุ่มนี้ ข่าเป็นพืชที่คนไทยบริโภคเป็นอาหารเป็นประจำอยู่แล้ว และมีการนำมาใช้เป็นยาสมุนไพรในการต้านเชื้อตั้งแต่โบราณ ผู้วิจัยจึงต้องการพิสูจน์โดยวิธีทางวิทยาศาสตร์ โดยข้อเสนอโครงการเช่นนี้ไม่มีผู้ใดทำมาก่อนในประเทศไทย และข้าพเจ้ามีทีมงานและศักยภาพที่จะทำงานได้อย่างต่อเนื่อง จากเริ่มต้นจนถึงการจดสิทธิบัตร และพัฒนาสู่อุตสาหกรรมยาที่สามารถทดแทนหรือใช้ร่วมกับยาในกลุ่ม β-lactam antibiotics ที่มีราคาแพงมาก และเชื้อเกิดการดื้อยาขึ้นแล้ว เพื่อเป็นการผลิตยาตัวใหม่หรือยาสูตรผสมใหม่ภายในประเทศ ลดการนำเข้ายามูลค่าแพงเหล่านี้ โดยสารสกัดจากพืชสมุนไพรตระกูลข่าและพืชสมุนไพรที่ให้สาร Galangin ดังกล่าวไม่น่าจะเป็นพิษต่อร่างกาย โดยเฉพาะข่าเป็นพืชที่มนุษย์ใช้บริโภคเป็นอาหารในชีวิตประจำวันอยู่แล้ว อย่างไรก็ตามจะได้ทำการวิจัยทดสอบพิษของสารตัวนี้ในสัตว์ทดลองเพื่อจะได้ทราบว่าสารนี้เป็นพิษต่ออวัยวะต่างๆของสัตว์ทดลองบ้างหรือไม่ และเพื่อให้ประเทศไทยสามารถผลิตยาใหม่ๆหรือยาสูตรผสมใหม่ๆได้และเป็นยาที่สามารถส่งออกต่างประเทศได้ในที่สุด

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสาร Galangin ต่อเชื้อที่ดื้อยาในกลุ่ม β-lactam antibiotics
2. เพื่อทดสอบหาการเสริมฤทธิ์ร่วมกันระหว่างสาร Galangin เมื่อให้ร่วมกับยาในกลุ่ม β-lactam antibiotics ต่อเชื้อที่ดื้อยาในกลุ่ม β-lactam antibiotics
3. เพื่อหากลไกการออกฤทธิ์เบื้องต้นของสาร Galangin เมื่อให้เดี่ยวๆและให้ร่วมกับยาในกลุ่ม β-lactam antibiotics ต่อเชื้อที่ดื้อยาในกลุ่ม β-lactam antibiotics โดยวิธีการดู morphology ของเชื้อด้วย Transmission Electron Microscope (TEM), enzyme assay.

ขอบเขตของการวิจัย

เชื้อ Ceftazidime-resistant *Staphylococcus aureus* DMST 20651, Ceftazidime-resistant *Enterobacter cloacae* DMST 21394 (CREC), Amoxicillin-resistant *Escherichia coli* DMST 20662 (AREC) ได้รับจากหน่วยจุลชีววิทยา กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิก โรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมา *S. aureus* ATCC 29213 และ *E. coli* ATCC 25922 ได้รับจาก American Type Culture Collection (ATCC), USA

สาร Galangin ได้จากบริษัท INDOFINE Chemical Company, USA

ยา Amoxicillin และ Ceftazidime ได้จากบริษัทยาผู้แทนจำหน่ายภายในประเทศไทย ได้แก่ บริษัท Sigma

ข้อตกลงเบื้องต้น

ภายหลังจากได้ค่าการยับยั้งต่ำสุด (MIC) ของยาและสาร galangin เดี่ยวๆ ต่อเชื้อแล้ว จะนำยาและสาร galangin มาหาฤทธิ์เสริมกันในการยับยั้งเชื้อโดยวิธี checkerboard assay เฉพาะยาและสาร galangin ที่ออกฤทธิ์เสริมกันเท่านั้น ที่จะถูกเลือกมาทำ Viable count และหากลไกเบื้องต้นโดยวิธี Transmission Electronmicroscopy (TEM) และ enzyme assay ต่อ

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ เช่น Phytomedicine, Journal of Applied Microbiology และวารสารในประเทศดังแสดงในภาคผนวก

เตรียมจดสิทธิบัตรในการใช้สาร Galangin ได้ โดย มทส. จะสามารถช่วยเหลือภาคอุตสาหกรรมการผลิตยาซึ่งเป็นการสนับสนุน ภารกิจหลักและยุทธศาสตร์การพัฒนา มทส.

สามารถเป็นองค์ความรู้ในการวิจัยขั้นต่อไป เช่น การหากลไกการออกฤทธิ์ เพื่อพัฒนาเป็นยาได้ในที่สุด

จากโครงการวิจัยร่วมหาวิธีที่เหมาะสมในการสกัดสาร Galangin จากข่า จะสามารถนำไป ผลิตเชิงพาณิชย์ ได้ในอนาคต เนื่องจากสารนี้มีประโยชน์ในทางยา ในหลายกลไก เช่น การทำวิจัยสารนี้ในแง่การเป็นสาร anticancer

เป็นประโยชน์ต่อประเทศไทยในแง่การคิดค้นยาใหม่ๆ ที่ปราบเชื้อที่ดื้อต่อยาที่มีราคาแพงได้ และลดการ
นำเข้ายาจากต่างประเทศ ที่มีราคาแพงได้

เป็นประโยชน์ต่อแพทย์และผู้ป่วยทำให้สามารถได้ยาใหม่ๆ มาปราบเชื้อที่ดื้อยา โดยเฉพาะยาในกลุ่ม β-lactam antibiotics

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

1. แหล่งที่มาของข้อมูล

เชื้อ Ceftazidime-resistant *Staphylococcus aureus* DMST 20651, Ceftazidime-resistant *Enterobacter cloacae* DMST 21394 (CREC), Amoxicillin-resistant *Escherichia coli* DMST 20662 (AREC) ได้รับจากหน่วยจุลชีววิทยา กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิก โรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมา *S. aureus* ATCC 29213 และ *E. coli* ATCC 25922 ได้รับจาก American Type Culture Collection (ATCC), USA

สาร Galangin ได้จากบริษัท INDOFINE Chemical Company, USA

ยา Amoxicillin และ Ceftazidime ได้จากบริษัทยาผู้แทนจำหน่ายภายในประเทศไทย ได้แก่ บริษัท Sigma

2. วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 Bacterial suspension standard curve ได้ทำสำหรับเชื้อ Ceftazidime-resistant *Staphylococcus aureus* DMST 20651 (CRSA), Ceftazidime-resistant *Enterobacter cloacae* DMST 21394 (CREC), Amoxicillin-resistant *Escherichia coli* DMST 20662 (AREC), *S. aureus* ATCC 29213 และ *E. coli* ATCC 25922 โดยทำตามวิธีของ Liu et al. (Liu et al., 2000) อธิบายโดยย่อ ภายหลังจากการบ่มเชื้อที่ 37 ºC เป็นเวลา 18 ชั่วโมงแล้ว จะนำมาปั่นล้างด้วย 0.9% NaCl ที่ 4000 r.p.m เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำเซลล์ที่ได้ไปใส่ใน 0.9% NaCl จากนั้น นำเซลล์ที่กระจายอยู่ในน้ำเกลือเหล่านี้ไปวัด OD ที่ความยาวคลื่น 500 nm ให้ได้ค่าประมาณ 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 และ 0.25 จากนั้นนำเซลล์เหล่านี้ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ agar plates บ่มไว้ที่ 37 ºC เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนโคโลนีทั้งหมด แล้วนำมาสร้างกราฟระหว่างจำนวนเชื้อในแกน Y และค่า OD ในแกน X เพื่อให้สามารถนับจำนวนเชื้อได้ โดยการวัดค่า OD

2.2 MICs ของยา Amoxicillin ได้ทำสำหรับเชื้อ Amoxicillin-resistant *Escherichia coli* DMST 20662, *E. coli* ATCC 25922 ของยา Ceftazidime ทำสำหรับเชื้อ Ceftazidime-resistant *Staphylococcus aureus* DMST 20651, Ceftazidime-resistant *Enterobacter cloacae* DMST 21394 และ *S. aureus* ATCC 29213 ส่วน MICs ของสาร Galangin ทำสำหรับทุกเชื้อที่กล่าวมาทั้งหมด โดยทำตามวิธีของ Liu et al. (Liu et al., 2000) และ CLSI (Clinical, 2006) กล่าวโดยย่อได้แก่ ทำโดยวิธี Broth macrodilution โดยนำยาหรือสาร galangin ที่ความเข้มข้นต่างๆกันจากน้อยไปมาก มาใส่ในขวดที่มีเชื้อนับได้จำนวน $5x10^5$ cfu/ml ใน Cation adjustment of Mueller-Hinton Broth (CAMHB) นำมาบ่มไว้ที่ 37 ºC เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยค่า MIC ดูได้จากขวดที่ไม่มีเชื้อเจริญขึ้นมาใน CAMBH

2.3 Checkerboard assay ของ Galangin ผสมกับ Amoxicillin ทำสำหรับเชื้อ Amoxicillin-resistant *Escherichia coli* DMST 20662 ของ Galangin + Ceftazidime ทำสำหรับเชื้อ Ceftazidime-resistant *Staphylococcus aureus* DMST 20651, Ceftazidime-resistant *Enterobacter cloacae* DMST 21394 โดยทำตามวิธีของ Liu et al. (2000) และ CLSI (2006) กล่าวโดยย่อได้แก่ ทำโดยวิธี Broth macrodilution โดยนำยาและสาร galangin ที่ความเข้มข้นต่างๆกันจากน้อยไปมากโดยเริ่มจากค่า MICs มาใส่ในขวดเดียวกันที่มีเชื้อนับได้จำนวน $5x10^5$ cfu/ml ใน Cation adjustment of Mueller-Hinton Broth (CAMHB) นำมาบ่มไว้ที่ 37 ºC เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยค่า MIC ดูได้จากขวดที่ไม่มีเชื้อเจริญขึ้นมาใน CAMBH จากนั้นนำมาคำนวณค่า FIC index โดยเมื่อคำนวณได้ FIC index $\leq$ 0.5 เรียกว่า เสริมฤทธิ์กัน (Synergy), FIC index > 0.5-4.0 เรียกว่า No interaction, FIC index > 4.0 เรียกว่า Antagonism

2.4 Killing curve determinations (Viable counts) ดู Viable counts ของเชื้อเมื่อ treated เชื้อต่อไปนี้ด้วย (ที่เวลา 1,2,3,4,6 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ)

- AREC ด้วย Amoxicillin, Galangin, Amoxicillin + Galangin (มี control)
- CRSA ด้วย Ceftazidime, Galangin, Ceftazidime + Galangin (มี control)

โดยทำตามวิธีของ Richards and Xing (1993) อธิบายโดยย่อได้แก่ ผสมยาและ/หรือ galangin ที่ความเข้มข้นเมื่อใช้ยาหรือ galangin เดี่ยวๆ ประมาณ ½-3/4 MIC และที่ค่า ¾-1MIC เมื่อใช้ยาผสมกับ galangin ใส่ลงไปใน flask ที่มีเชื้อประมาณ $5x10^5$ cfu/ml ใน CAMHB จากนั้นนำไปเขย่าบน shaking water bath ที่ 37 ºC และนำเชื้อมานับที่เวลา 0, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h และ 24 h ตามลำดับ นำไป plot graph โดยแกน Y เป็น จำนวนเชื้อ และแกน X เป็นเวลา

2.5 Transmission Electronmicroscopy (TEM) method เลือกเชื้อ AREC, CRSA นำมา treated ด้วย ยา Amoxicillin, Ceftazidime, Galangin เดี่ยวๆ และ Galangin ผสมยา Amoxicillin หรือ Ceftazidime โดยมี Control แล้วนำไปเตรียมเพื่อดูด้วย TEM. เพื่อดู Morphology เบื้องต้น โดยทำตามวิธีของ Richards et al. (1995). กล่าวโดยย่อ แบคทีเรียที่ถูกทดสอบด้วยยา, galangin ทั้งเดี่ยวๆและผสมใน CAMHB ใน flask ที่ถูกเขย่าใน shaking water bath ที่ 100 oscillation/min, 37 ºC จนครบเวลา 4 h จากนั้นจะนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6000 xg เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4°C นำเฉพาะเซลล์ที่ตกตะกอนมาดำเนินการต่อ นำเซลล์ที่ได้มา fixed ใน glutaraldehyde 8 % v/v ใน 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) เป็นเวลา 1 h, และ fixed ต่อโดย glutaraldehyde 4 % v/v in 0.1 M phosphate buffer (pH 7-2) ที่ 4°C เป็นเวลา 4 h จากนั้นล้างเซลล์โดย 0.1 M phosphate buffer (pH 7-2) และนำเซลล์ที่ได้ไปใส่ใน Osmium tetroxide (OsO_4) (Emscope, Watford) 1 % w/v เป็นเวลา 1 h ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นจะล้าง Osmium tetroxide ออกโดยน้ำกลั่นโดยการปั่นที่ 2000 x g, 5 min จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นนำเซลล์ไปใส่ใน 2% w/v agarose ที่อุ่นอยู่ จากนั้นเท agarose ลงบน slide ทิ้งไว้จนเย็นและตัดให้เป็นสี่เหลี่ยมชิ้นเล็กๆ ต่อจากนั้นนำไปขจัดน้ำออก (dehydrate) โดย ใส่ในขวดที่มี % ethanol สูงขึ้นเป็นลำดับจาก 20-100% และตั้งทิ้งไว้ครั้งละประมาณ 10 นาที จากนั้นจึงนำเซลล์ไปฝังใน Araldite (Agar Scientific Ltd, Stansted, Essex) และนำไปตัดเป็นชิ้นบางๆด้วย diamond knife on a Reichert

2.6 Enzyme assay เอนไซม์ penicillinase จาก *Bacillus cereus* (*B. cereus*) และ β-lactamase ของ *Enterobacter cloacae* (*E. cloacae*) ได้รับจาก Sigma (Poole, England). Enzymes activities โดยทำตามวิธีของ Richards et al. (1995). อธิบายโดยย่อ เอนไซม์ β-lactamases จาก *Bacillus cereus* (*B. cereus*) และ *Enterobacter cloacae* (*E. cloacae*) ได้รับมาจาก Sigma, Poole, England. ความเข้มข้นของเอนไซม์ถูกปรับให้สามารถ hydrolyse 50-60% Benzylpenicillin ในเวลา 5 นาที ฟลาโวนอยด์ชนิดต่างๆ ถูกผสมอยู่กับเอนไซม์ และนำไปอุ่นใน 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) ที่ 37 °C เป็นเวลา 5 นาที ก่อนที่จะใส่ Benzylpenicillin ลงไป จากนั้นนำ Benzylpenicillin ไปวิเคราะห์หาปริมาณที่เหลือที่เวลาต่างๆ โดย reverse-phase HPLC (Reading, 1983) โดยใช้ acetronitrile/acetate เป็น mobile phase จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย methanol/acetic acid (100:1).

2.7 สถานที่ที่ทำการทดลอง

สถานที่ที่จะใช้ทำการวิจัย ได้แก่ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และกลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิก โรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมา

วิธีวิเคราะห์ข้อมูล

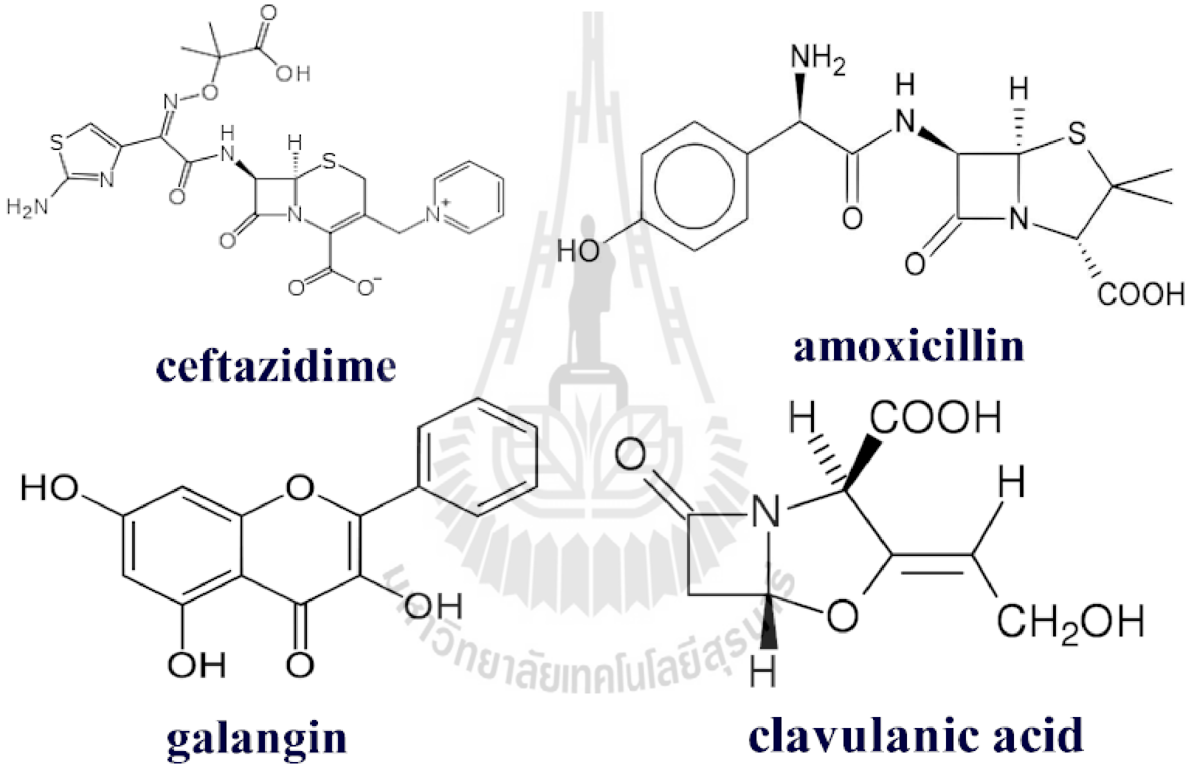
ผลการวิจัยที่ได้จาก enzyme assay การลดลงของ benzylpenicillin จาก flavonoids ชนิดต่างถูกนำมาเปรียบเทียบค่าทางสถิติโดย ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของการลดลงที่เวลาใดเวลาหนึ่งอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ที่เวลาหนึ่งๆโดย Tukey’s HSD post hoc test ที่ p value < 0.01 และ p value < 0.05 โดยโปรแกรม IBM SPSS 19.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3
ผลการวิจัย

1. โครงสร้างสารที่ทำการวิจัย

โครงสร้างสารที่ใช้ในการทำวิจัย ดังแสดงในรูปที่ 1



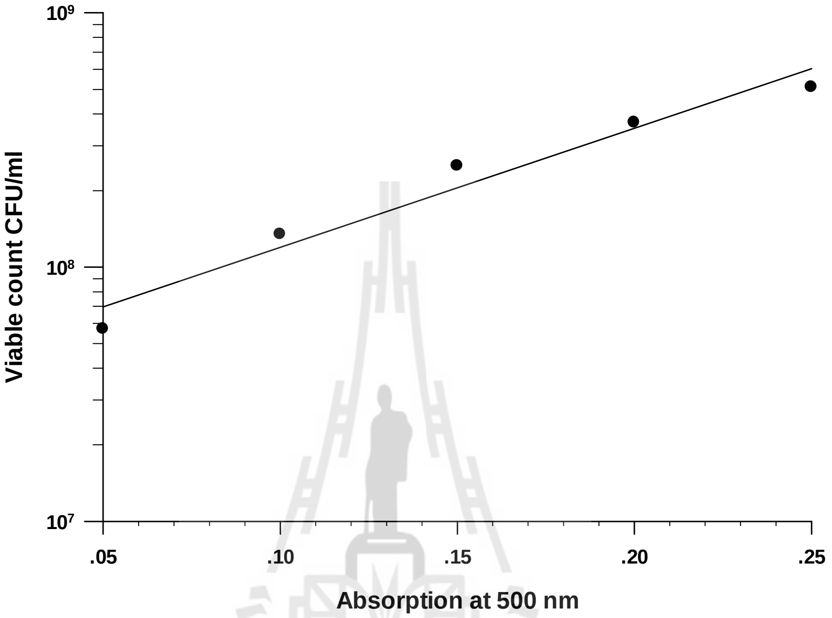
รูปที่ 1 โครงสร้างของ ceftazidime, amoxicillin, clavulanic acid, และ galangin ที่ใช้ในการวิจัย

ผลการทดลองจากการทำ Bacterial suspension standard curve, Minimum inhibitory concentrations (MICs), Checkerboard assay, Viable counts, TEM และ Enzyme assay ได้ผลดังต่อไปนี้

2. Bacterial suspension standard curve

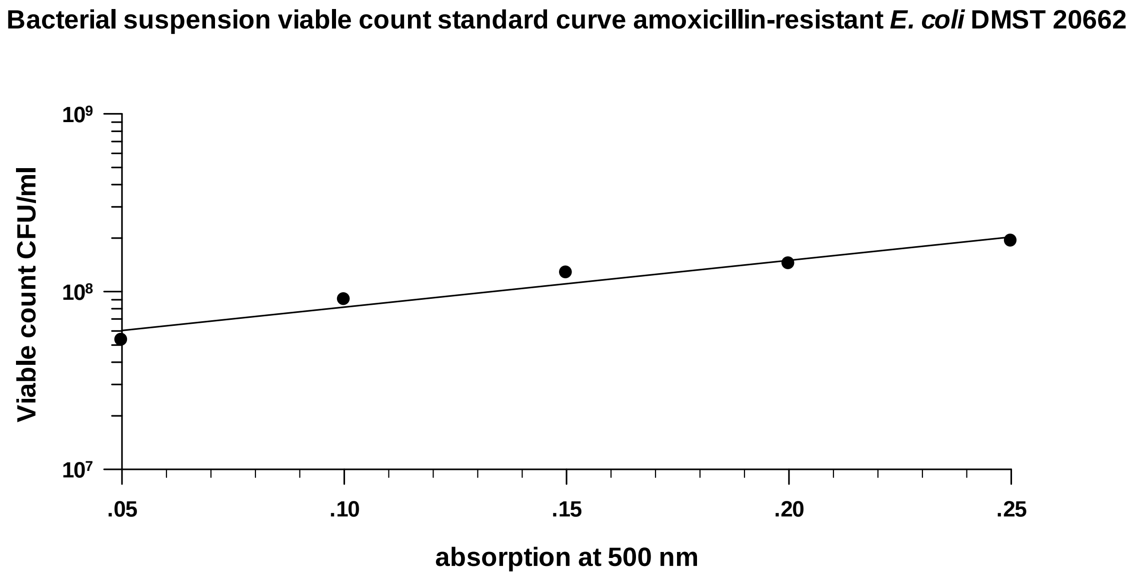
2.1 Bacterial suspension standard curve ของเชื้อ Ceftazidime-resistant *Staphylococcus aureus* DMST 20651 (CRSA)

Bacterial suspension viable count standard curve of ceftazidime-resistant *S. aureus* DMST 20651



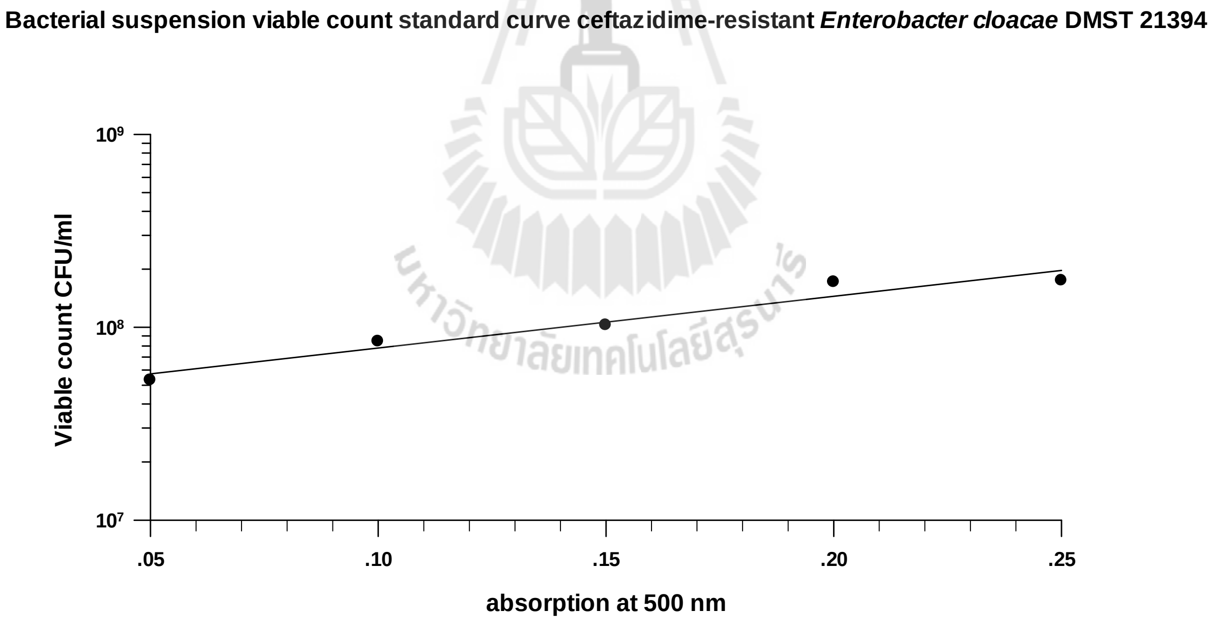
รูปที่ 2. กราฟการหาจำนวนแบคทีเรีย จากวิธี Bacterial suspension standard curve ของเชื้อ Ceftazidime-resistant *Staphylococcus aureus* DMST 20651 (CRSA) โดยการวัด O.D.

2.2 Bacterial suspension standard curve ของเชื้อ Amoxicillin-resistant *Escherichia coli* DMST 20662 (AREC)



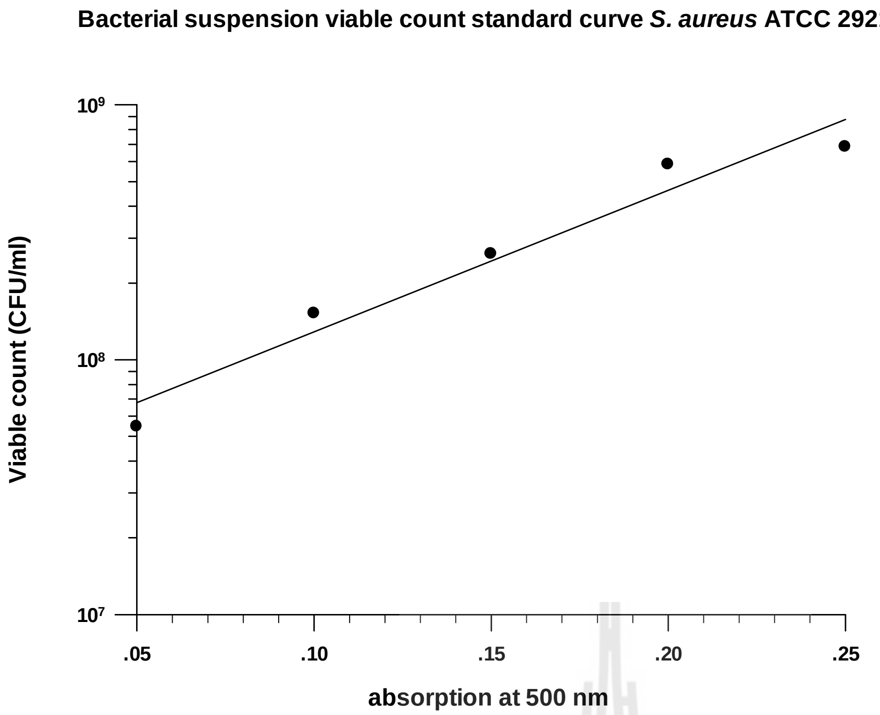
รูปที่ 3. กราฟการหาจำนวนแบคทีเรีย จากวิธี Bacterial suspension standard curve ของเชื้อ Amoxicillin-resistant *Escherichia coli* DMST 20662 (AREC) โดยการวัด O.D.

2.3 Bacterial suspension standard curve ของเชื้อ Ceftazidime-resistant *Enterobacter cloacae* DMST 21394 (CREC)



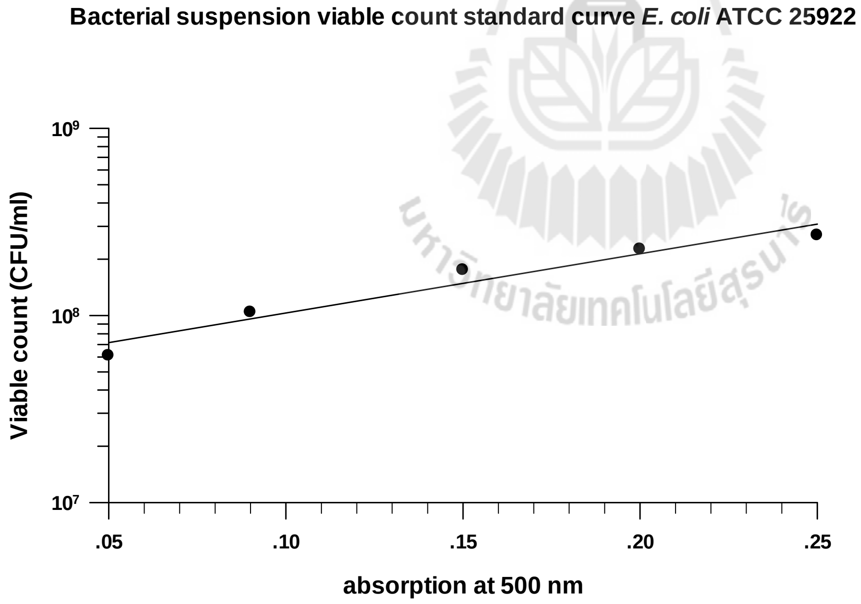
รูปที่ 4. กราฟการหาจำนวนแบคทีเรีย จากวิธี Bacterial suspension standard curve ของเชื้อ Ceftazidime-resistant *Enterobacter cloacae* DMST 21394 (CREC) โดยการวัด O.D.

2.4 Bacterial suspension standard curve ของเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213



รูปที่ 5. กราฟการหาจำนวนแบคทีเรีย จากวิธี Bacterial suspension standard curve ของเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 โดยการวัด O.D.

2.5 Bacterial suspension standard curve ของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922



รูปที่ 6. กราฟการหาจำนวนแบคทีเรีย จากวิธี Bacterial suspension standard curve ของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 โดยการวัด O.D.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3. Minimum inhibitory concentrations (MICs) and checkerboard assay

ผลของการหาค่า MICs ของยาและ galangin ต่อเชื้อต่างๆ และการทำ checkerboard assay ได้ผลดังตารางที่ 1

ตาราง 1 ค่า Minimum inhibitory concentrations (MICs), fractional inhibitory concentrations (FICs) และ FIC indexes จากการทำ checkerboard assays ของ ceftazidime, amoxicillin, galangin เดี่ยวๆ และส่วนผสมของ ceftazidime, amoxicillin และ galangin ต้านเชื้อดื้อยาชนิดต่างๆ

Strains	**MIC (μg/ml)**				**FIC (μg/ml)**				**FIC index**			
	cef	amx	gal	cla	cef+gal	amx+gal	cef+cla	amx+cla	cef+gal	amx+gal	cef+cla	amx+cla
S. aureus DMST 20651	50	-	300	>128	10+5	-	50+>128	-	0.22	-	2.0	-
E. coli DMST 20662	-	>1,000	500	>128	-	10+40	-	>1,000+>128	-	<0.09	-	2.0
E. cloacae DMST 21354	100	-	80	>128	60+50	-	100+>128	-	1.23	-	2.0	-
S. aureus ATCC 29213[a]	0.12	-	100	4	N/D	-	-	-	N/D	-	N/D	-
E. coli ATCC 25922[b]	-	4.0	100	16	-	N/D	-	N/D	-	N/D	-	N/D

S. aureus ATCC 29213[a] และ *E. coli* ATCC 25922 [b] ใช้เป็น positive control

cef = ceftazidime, amx = amoxicillin, gal = galangin, cla = clavulanic acid

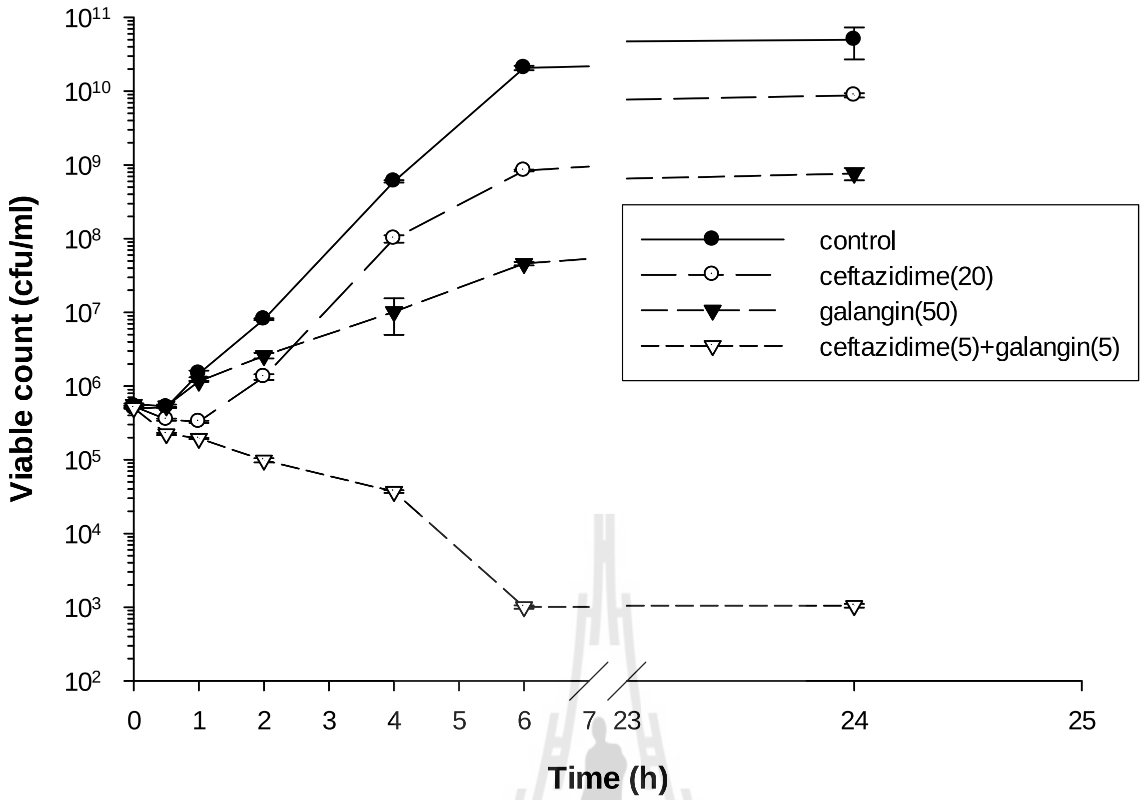
N/D, ไม่ต้องหาค่า (not determined)

แต่ละค่าที่ได้มาจากการทดลอง 3 ซ้ำ

จากผลการทดลองที่ได้ สารผสมที่มีฤทธิ์เสริมกันเนื่องจากมีค่า FIC index $\leq$ 0.5 (Johnson, 2004; Te Dorsthorst et al., 2004) ได้แก่ ceftazidime ผสม galangin ต้านเชื้อ *S. aureus* DMST 20651 (FIC index = 0.22) และ amoxicillin ผสม galangin ต้านเชื้อ *E. coli* DMST 20662 (FIC index = 0.22) จึงเลือกส่วนผสมของสารดังกล่าวและเชื้อมาทำการทดลองโดยวิธี Viable count และ Tramsmission electronmicroscopy (TEM) ต่อ

4. Killing curve determination หรือ Viable counts

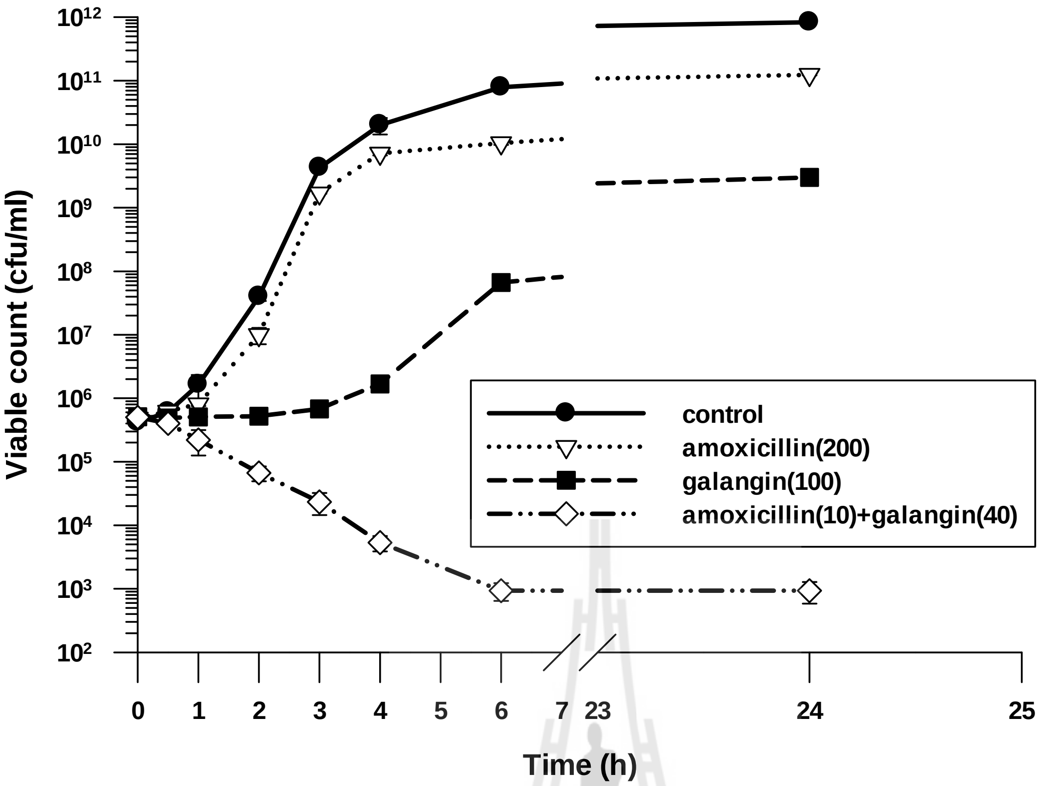
4.1 Viable count ของเชื้อ Ceftazidime-resistant *Staphylococcus aureus* DMST 20651 (CRSA)



รูปที่ 7 กราฟแสดงผลของ ceftazidime, galangin เดี่ยวๆ และผสม ต่อการเจริญของเชื้อ *S. aureus* DMST 20651. ceftazidime (20) หมายถึง ceftazidime at 20 μg/ml.; ค่าที่ได้บนกราฟมาจากการทดลอง 4 ซ้ำ , และ vertical bars แสดง standard errors of the means.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.2 Viable count ของเชื้อ Amoxicillin-resistant *Escherichia coli* DMST 20662 (AREC)

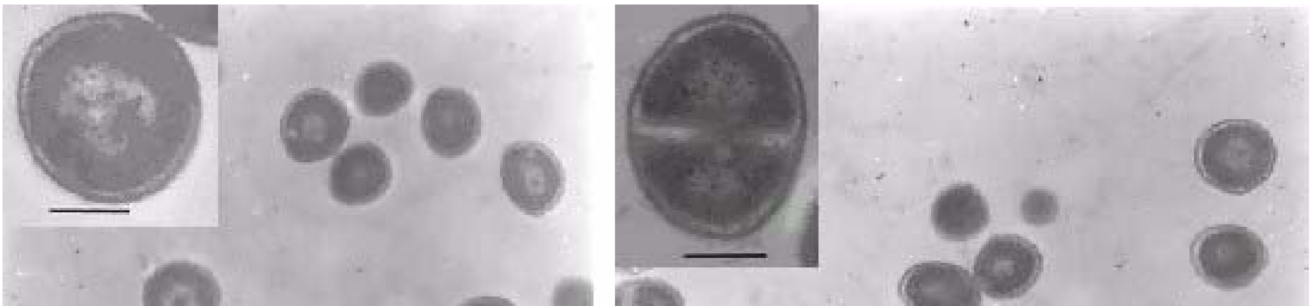


รูปที่ 8 กราฟแสดงผลของ amoxicillin, galangin เดี่ยวๆ และผสม ต่อการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* DMST 20662 (AREC). amoxicillin(200) หมายถึง amoxicillin at 200 μg/ml.; ค่าที่ได้บนกราฟมาจากการทดลอง 4 ซ้ำ , และ vertical bars แสดง standard errors of the means.

5. Transmission electronmicroscopy (TEM)

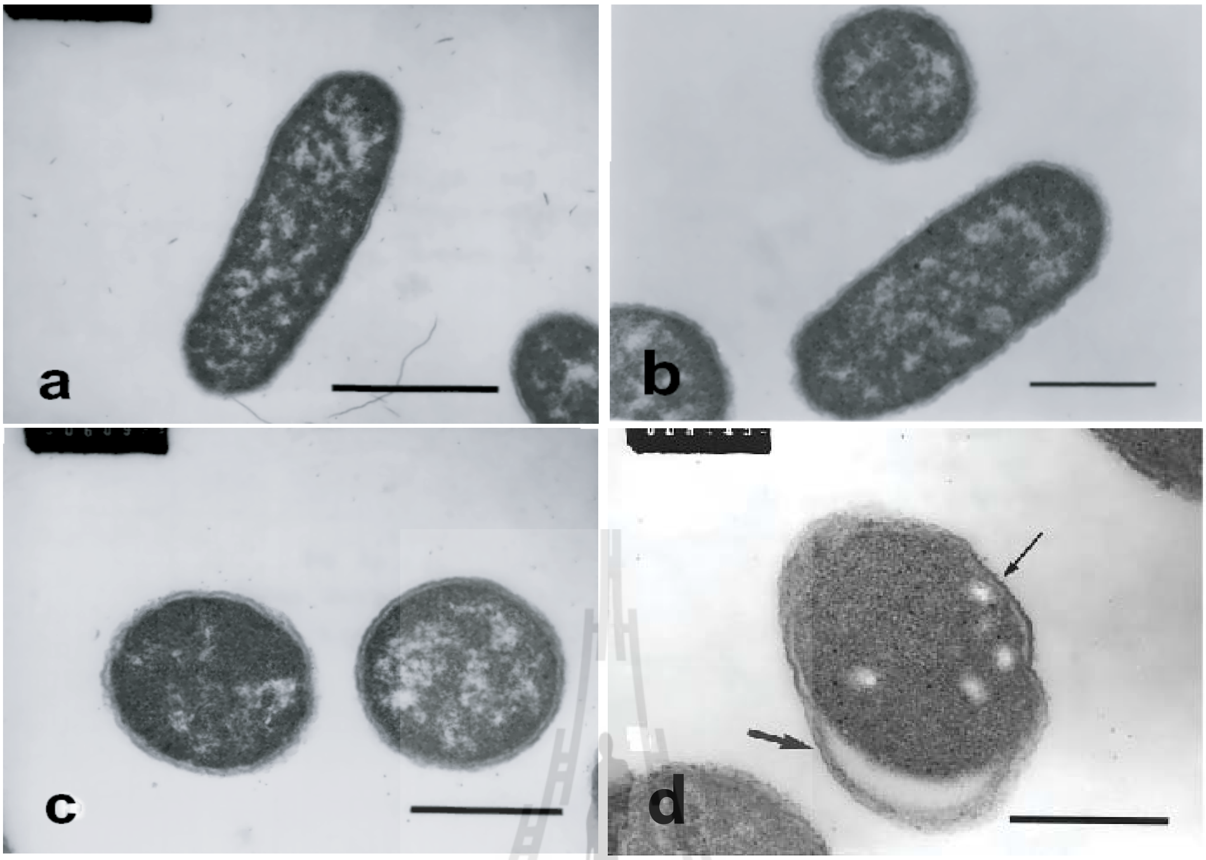
สารผสมที่มีฤทธิ์เสริมกัน ได้แก่ ceftazidime ผสม galangin ต้านเชื้อ *S. aureus* DMST 20651 (FIC index = 0.22) และ amoxicillin ผสม galangin ต้านเชื้อ *E. coli* DMST 20662 (FIC index = 0.22) จึงเลือกส่วนผสมของสารดังกล่าวและเชื้อมาทำการทดลองโดยวิธี Tramsmission electronmicroscopy (TEM) ได้ผลดังต่อไปนี้

5.1 TEM ของเชื้อ ceftazidime-resistant *S. aureus* DMST 20651



รูปที่ 9 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนของ log phase *S. aureus* DMST 20651 ใน cation-adjusted Mueller-Hinton (MH) broth โดยในภาพ: **a**, ปราศจากยา (control); **b**, 25 μg/ml ceftazidime ; **c**, 50 μg/ml galangin; **d**, สารผสม 5 μg/ml ceftazidime และ 5 μg/ml galangin (**a, b, c, d**, original magnification, x 17,480; bar, 1 μm; *Inset*, **a, b, d,** original magnification, x 42,800; **c**, x 32,500; bar, 0.25 μm).

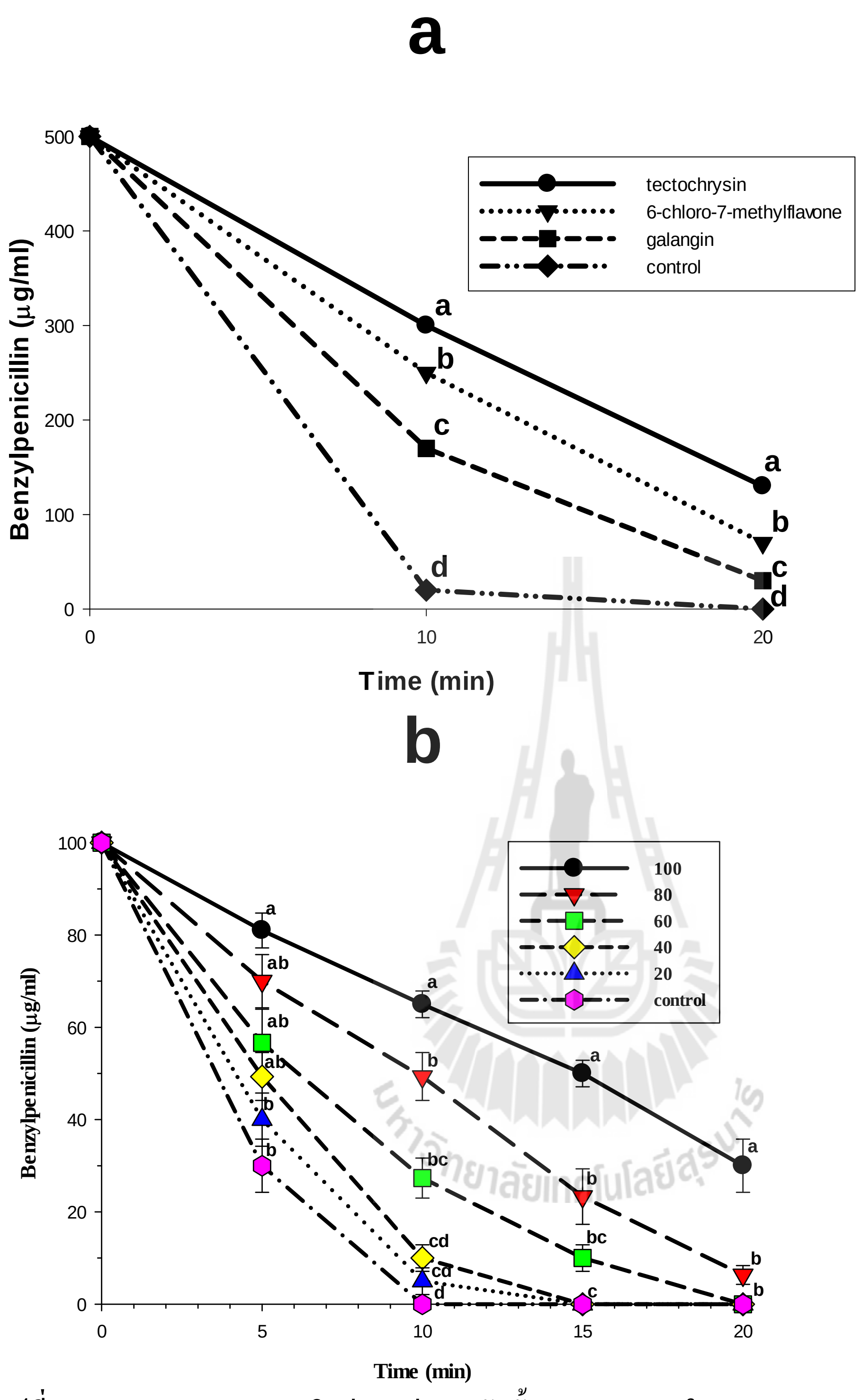
5.2 TEM ของเชื้อ amoxicillin-resistant *E. coli* DMST 20662



รูปที่ 10 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนของ log phase *E. coli* DMST 20662 ใน cation-adjusted Mueller-Hinton (MH) broth โดยในภาพ: **a**, ปราศจากยา (control); **b**, 200 μg/ml amoxicillin; **c**, 100 μg/ml galangin; **d**, สารผสม 8 μg/ml amoxicillin และ 30 μg/ml galangin; Bar = 0.5 μm (b,c,d); 1 μm (a).

6. Enzyme assay

เอนไซม์ penicillinase จาก *Bacillus cereus* (*B. cereus*) ถูกนำมาทดสอบการยับยั้งโดย flavonoids ชนิดต่างๆ โดยดูจำนวน benzylpennicillin ที่เหลืออยู่ และ β-lactamase ของ *Enterobacter cloacae* (*E. cloacae*) ถูกนำมาทดสอบการยับยั้งโดย galagin ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน โดยดูจำนวน benzylpennicillin ที่เหลืออยู่ ผลที่ได้ดังนี้



รูปที่ 11 ผลของ flavonoids ชนิดต่างๆ ต่อการยับยั้ง penicillinase ในการสลาย benzylpenicillin. **a**. penicillinase จาก *B. cereus*; สัญลักษณ์ flavonoids (200 µg/ml); ◆, control (without flavonoids); ■, galangin; ▼, 6-chloro-7-methylflavone; ●, tectochrysin. **b**. β-lactamase จาก *E. cloacea*; สัญลักษณ์แสดงความเข้มข้นต่างๆกัน (µg/ml) ของ galangin; ●, 100 หมายถึง 100 µg/ml ของ galangin. ตัวอักษร superscript ที่ต่างกันแสดงถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Tukey's HSD, $p < 0.01$).

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

สรุปผลการวิจัย

4.1 ผลจาก MICs and checkerboard determinations

ผลของการทำ MICs สำหรับ ceftazidime, amoxicillin และ galangin สำหรับเชื้อทั้ง 5 ชนิด สรุปได้ดังตาราง 1 โดยสรุปได้ว่า เชื้อที่ดื้อต่อ ceftazidime ได้แก่ *S. aureus* DMST 20651, *E. cloacae* DMST 21354 โดยมีค่า MICs เท่ากับ 50, 100 μg/ml, ตามลำดับ. ขณะที่เชื้อที่ดื้อต่อ amoxicillin ได้แก่ *E. coli* DMST 20662 โดยมีค่า MICs > 1,000 μg/ml (CLSI, 2006). ผลการทดลองที่ได้บ่งชี้ว่า ส่วนผสมของ ceftazidime 10 μg/ml กับ galangin 5 μg/ml และ amoxicillin 10 μg/ml กับ galangin 40 μg/ml ออกฤทธิ์เสริมการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* DMST 20651 และ *E. coli* DMST 20662 โดยมี FIC index ที่ 0.22 และ <0.09 ตามลำดับ (Johnson, 2004; Odds, 2003; Te Dorsthorst et al., 2004).

4.2 ผลจาก Killing curve determinations (Viable counts)

ผลการทดลองทำ viable counts ของเชื้อ *S. aureus* DMST 20651 แสดงให้เห็นว่า ceftazidime 20 μg/ml, 50 μg/ml galangin ลดกราฟการเจริญของเชื้อลงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่ ceftazidime 5 μg/ml ผสมกับ 5 μg/ml galangin ลดกราฟการเจริญของเชื้อลงที่ $5x10^3$ cfu/ml ที่ 6 ชม. และอยู่ในระดับนี้ตลอด 24 ชม. ในทำนองเดียวกัน (รูป 7). Viable counts ของเชื้อ *E. coli* DMST 20662 แสดงให้เห็นว่า amoxicillin 200 μg/ml, 100 μg/ml galangin ลดกราฟการเจริญของเชื้อลงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่ ส่วนผสมของ amoxicillin 10 μg/ml กับ 40 μg/ml galangin ลดกราฟการเจริญของเชื้อลงที่ $1x10^3$ cfu/ml ที่ 6 ชม. และอยู่ในระดับนี้ตลอด 24 ชม (รูป 8).

4.3 ผลการทดลอง Transmission electron microscopy (TEM)

ผลการทดลองผลของสารผสม ceftazidime และ galangin ต่อเชื้อ *S. aureus* DMST 20651 นั้น บ่งชี้ว่าสารผสมดังกล่าวทำให้เซลล์แบคทีเรียได้รับความเสียหายอย่างมาก การแบ่งตัวถูกยับยั้ง ผนังเซลล์ถูกทำลายและขนาดเซลล์โตขึ้นอย่างเห็นได้ชัด (รูป 9d) ในขณะที่ผลของ galangin 50 μg/mL เดี่ยวๆ ทำให้ผนังเซลล์หนาขึ้นและยับยั้งการแบ่งเซลล์ ในขณะที่ ceftazidime 25 μg/ml เดี่ยวๆ ไม่มีผลต่อผนังเซลล์ของเชื้อนี้ (รูป 9) สำหรับผลของสาร amoxicillin และ galangin เดี่ยวๆและผสมต่อเซลล์ *E. coli* DMST 20662 นั้น บ่งชี้ว่าสาร 200 μg/ml amoxicillin หรือ 100 μg/ml galangin เดี่ยวๆ ต่อเชื้อนี้ที่เจริญใน cation-adjusted mueller-hinton broth (CAMHB) จะเห็นว่า cell wall และ cytoplasmic membrane สามารถเห็นชัดเจนและแยกแยะได้ สามารถเห็น ribosomes ใน cytoplasm เป็นจำนวนมากโดยไม่แตกต่างไปจากกลุ่มควบคุม (รูป 10a,b,c). ในขณะที่ส่วนผสมของ 8 μg/ml amoxicillin และ 30 μg/ml galangin สามารถทำให้เซลล์แบคมีเรียได้รับ

4.4 Enzyme assays

ผลของ flavonoids ในการยับยั้งเอนไซม์ penicillinase และ β-lactamases ในหลอดทดลองนั้น มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จากผลการทดลองจะเห็นว่า galangin สามารถยับยั้ง penicillinase I จาก *B. cereus*. ไม่ให้ทำลาย benzylpennicillin ที่ 10 และ 20 นาทีได้อย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เมื่อเทียบผลการยับยั้งใน flavonoids ด้วยกันแล้วจะเห็นว่าฤทธิ์ในการยับยั้ง pennicillinase I โดยตรงเรียงลำดับดังนี้ tectochrysin > 6-chloro-7-methylflavone > Galangin ตามลำดับ (รูป 11a) เมื่อดูผลของความเข้มข้นของ galangin ในการยับยั้ง penicillinase (β–lactamase) type IV จาก *E. cloacae* แล้วจะเห็นว่า ผลของการยับยั้งขึ้นกับความเข้มข้น โดยที่ 200 μg/ml ยับยั้งได้ดีกว่าความเข้มข้นที่ต่ำลงมาตามลำดับ ผลนี้บ่งชี้ว่านอกจาก galangin จะมีผลโดยตรงต่อโครงสร้างของเซลล์และการแบ่งตัวของเซลล์แล้ว ยังอาจมีผลในการยับยั้งเอนไซม์ penicillinase ของเชื้อด้วย.

4.5 วิเคราะห์และวิจารณ์ผลการทดลอง (Discussion)

ผลการทดลองหาค่า MICs ของ galangin ต่อ *S. aureus* DMST 20651 และ *E. coli* DMST 20662 สอดคล้องกับผลการทดลองของ Pepeljnjak and Kosalec (2004) ที่แสดงให้เห็นว่า galangin แยกได้จาก propolis มีค่า MIC 160±30 μg/ml ต่อเชื้อ clinical isolates of MRSA strains. ผลการทดลองนี้ยังสอดคล้องกับ Drago *et al*. (2007) ที่พบว่า MIC ของ galangin ใน Actichelated® propolis ต้าน *E. coli* มีค่า 168-334 mg/l. ในทำนองเดียวกัน flavonol ที่สกัดจาก *Salvia pisidica* สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* ATCC 25922 ที่ความเข้มข้น 13g/100ml (Ozkan Gucan, 2010). งานวิจัยก่อนหน้านั้นพบว่า galangin จาก propolis สามารถยับยั้ง *E. coli* และ Gram-negative bacteria อื่นๆ (Castaldo, 2002).

ผลของ checkerboard และ viable counts ของ *S. aureus* DMST 20651 แสดงถึงการเกิด synergistic effects ระหว่าง galangin และ ceftazidime ในการยับยั้งเชื้อนี้ ในขณะที่ส่วนผสมนี้ไม่เกิด synergistic effects ต่อเชื้อ *E. cloacae* DMST 21354 (ค่า FIC index = 1.23) ในทำนองเดียวกับส่วนผสมของ galangin และ amoxicillin ในการต้านเชื้อ *E. coli* DMST 20662 ผลนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Hemaiswarya et al., (2008) ที่พบว่า flavonoids และ synthetic drugs เสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งแบคทีเรีย นอกจากนั้นแล้ว การวิจัยอื่นพบว่า galangin ผสม gentamicin ออกฤทธิ์เสริมกันในการยับยั้งเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* KCMM 40501 and DPS-1 strains (Lee et al., 2008). ผลการทดลองนี้คล้ายผลการทดลองการเสริมฤทธิ์กันของ galangin ผสม ceftazidime ในการต้านเชื้อ penicillin-resistant *S. aureus* (Eumkeb et al., 2010).

ผลจาก enzyme assay อาจสามารถอธิบายได้ว่า galangin มีปฏิสัมพันธ์กับ penicillinase. ส่งผลให้ benzylpenicillin อิสระที่เหลืออยู่สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ ผลนี้สอดคล้องกับผลของ Denny et al., (2002)

ผลการวิจัยนี้บ่งชี้ว่า galangin นอกจากจะมีฤทธิ์อ่อนๆด้วยตัวเองในการต้านเชื้อ S. aureus และ E. coli ที่ดื้อต่อ β-lactam แล้ว ยังมีความสามารถที่จะยับยั้งการดื้อยาของแบคทีเรีย โดยทำให้ยากลุ่ม β-lactam ที่เชื้อเคยดื้อแล้ว กลับมาใช้ปราบเชื้อได้เช่นเดิมในขนาดที่เคยใช้รักษา ทั้งนี้จากงานวิจัยนี้ อาจเนื่องมาจากอย่างน้อย 2 กลไกที่สำคัญได้แก่ อย่างแรกมีผลต่อ the integrity of the cell wall และ on septum formation prior to cell division อาจเนื่องมาจากผลการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน รวมถึงการมีผลต่อตำแหน่ง penicillin-binding protein 2a (PBP 2a). กลไกที่สองเนื่องมาจาก การมีปฏิสัมพันธ์ในการยับยั้ง penicillinase enzyme ทำให้ไม่สามารถทำลายยาได้ ยังไม่พบว่า galangin มี cross-resistance กับ 4-quinolone drugs (Cushnie and Lamb, 2006).

ได้มีงานวิจัยก่อนหน้านี้รายงานว่า clavulanate, ซึ่งมี lactam ring เหมือน β-lactam antibiotics, สามารถทำให้แบคทีเรียสร้าง β-lactamase มากขึ้น (Stapleton, 1995; Tzouvelekis, 1997). ผลการวิจัยนี้ชี้แนะว่า β-lactamase inhibitors เหล่านี้ (รวมถึง clavulanic acid) สามารถถูกทำลายได้โดยกลไกที่เหมือนกับ β-lactam antibiotics. งานวิจัยชิ้นนี้เป็นการค้นพบที่สำคัญที่ชี้ให้เห็นว่า galangin ซึ่งในโครงสร้างไม่มี β-lactam structure (รูป 1) สามารถยับยั้งการดื้อยา β-lactams ของแบคทีเรียผ่านหลายกลไก เนื่องจากในโครงสร้างของ galangin ไม่มี β-lactam ring เหมือน clavulanic acid ทำให้ galangin ไม่เหนี่ยวนำให้แบคทีเรียเพิ่มการผลิต β-lactamase. จากผลการวิจัยนี้บ่งชี้ว่า clavulanic acid ซึ่งเป็น β-lactamase inhibitors, ต่างจาก galangin ซึ่งเป็น flavonoids, ไม่สารถยับยั้งหรือลดการดื้อต่อยาในกลุ่ม β-lactams ของเชื้อ *S. aureus* DMST 20651 และ *E. coli* DMST 20662 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีการติดเชื้อมากและอันตรายมากที่สุดได้ (ตาราง 1) Galangin อาจใช้เป็นส่วนผสมของยาสูตรใหม่เพื่อต้านเชื้อทั้ง 2 strains ดังกล่าว ซึ่งไม่สามารถรักษาได้โดยยา ceftazidime และ amoxicillin โดยงานวิจัยที่ทำควบคู่กับงานวิจัยนี้ โดยฉีดกาแลนจินเดี่ยวๆ ในขนาด 10, 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม(น้ำหนักตัว)ต่อวัน เข้าในช่องท้องของหนูถีบจักรในกลุ่มที่ 1 และ 2 ตามลำดับ ส่วนกลุ่มที่ 3 และ 4 ฉีดกาแลนจินผสมกับเซพทาซิดีนขนาด 10+160 และ 20+320 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม(น้ำหนักตัว)ต่อวัน ตามลำดับ โดยแบ่งฉีดวันละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 14 วัน ผลการวิจัยพบว่า น้ำหนักสัมพัทธ์และน้ำหนักของอวัยวะสำคัญ(ต่อน้ำหนักตัว)ของหนูทดลอง ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม จุลกายวิภาคของตับ ม้าม หัวใจ ไต และกระเพาะอาหาร ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ค่าทางเคมีในเลือดไม่มีความแตกต่างระหว่างก่อนและหลังฉีดกาแลนจินเดี่ยวๆ และ/หรือ ผสมกับเซพทาซิดีน ในทุกๆกลุ่มของหนูทดลอง ยกเว้นระดับของฮีมาโทคริตในหนูที่ได้รับการฉีดสารดังกล่าว มีการลดลงอย่างสัมพันธ์กับขนาดของสารทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (Eumkeb, 2011) อย่างไรก็ตามขนาดกาแลนจินที่ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน เท่ากับ 10,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งเป็นขนาดที่สูงมากๆ อย่างไรก็ตามต้องทดสอบพิษและประสิทธิภาพในมนุษย์ โดยระดับยาในเลือดต้องอยู่ในระดับที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียดังกล่าวได้

4.6 สรุปผลการวิจัย (Conclusion)

จากผลการวิจัยนี้ สรุปได้ว่า galangin มีคุณสมบัติที่สามารถลดการดื้อยาในกลุ่ม β-lactam antibiotics ของเชื้อ *S. aureus* DMST 20651 และ *E. coli* DMST 20662. เนื่องจากสารนี้มีในผักที่เรารับประทานเป็นอาหารกอร์ปกับขนาดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียมีความปลอดภัยในสัตว์ทดลอง จึงอาจสามารถนำสารนี้มาผสมกับยาในกลุ่ม β-lactam เพื่อรักษาการติดเชื้อที่ดื้อต่อยากล่มนี้ได้ในอนาคต อย่างไรก็ตามต้องมีการทดลองประสิทธิภาพในสัตว์ทดลองและในอาสาสมัครด้วย

บรรณานุกรม

Castaldo, S., and Capasso, F., 2002. Propolis, an old remedy used in modern medicine. Fitoterapia. 73, S1-S6.

Clinical and Laboratory Standards Institute (C.L.S.I.), 2006. Method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, in: Matthew, A.W., 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 Clinical and Laboratory Standards Institute Wayne, Pennsylvania, pp. 14-34.

Cushnie, T.P. and Lamb, A.J., 2006. Assessment of the antibacterial activity of galangin against 4-quinolone resistant strains of *Staphylococcus aureus*. Phytomedicine. 13, 187-91.

Denny, B.J., Lambert, P.A. and West, P.W.J., 2002. The flavonoid galangin inhibits the L1 metallo-β-lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia.* FEMS Microbiology Letters. 208, 21-24.

Drago, L., De Vecchi, E., Nicola, L. and Gismondo, M.R., 2007. In vitro antimicrobial activity of a novel propolis formulation (*Actichelated propolis*). Journal of Applied Microbiology. 103, 1914-1921.

Eumkeb, G., Duangkham, A., 2011. Subacute Toxicify Test of Galangin and ceftazidime in Mice. Thai Journal of Toxicology. 26, 5-13.

Eumkeb, G., Sakdarat, S. and Siriwong, S., 2010. Reversing β-lactam antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* with galangin from *Alpinia officinarum* Hance and synergism with ceftazidime. Phytomedicine. 18, 40-45.

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

Hemaiswarya, S., Kruthiventi, A.K. and Doble, M., 2008. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. Phytomedicine. 15, 639-652.

Johnson, M.D., MacDougall, C., Ostrosky-Zeichner, L., Perfect, J.R., Rex, J.H.,, 2004. Combination antifungal therapy. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 48, 693-715.

Lee, S.Y., Shin, Y.W. and Hahm, K.B., 2008. Phytoceuticals: Mighty but ignored weapons against *Helicobacter pylori* infection. Journal of Digestive Diseases. 9, 129-139.

Li, B.H. and Tian, W.X., 2003. Presence of fatty acid synthase inhibitors in the rhizome of *Alpinia officinarum* hance. J Enzyme Inhib Med Chem. 18, 349-56.

Liu, I.X., Durham, D.G. and Richards, R.M.E., 2000. Baicalin synergy with β-lactam antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other β-lactam-resistant strains of *S. aureus*. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 52, 361-366.

Luo, H., Cai, C., Zhang, J. and Mo, L., 1998. [Study on the chemical components of *Alpinia officinarum*]. Zhong Yao Cai. 21, 349-51.

Maharat Nakhonratchasima Hospital., 2011. Microbiology Report: Antibiotic Resistance Profile and Prevalence of Isolated Organisms by Site, Department of Clinical Pathology, in: Maharat Nakhonratchasima Hospital (Ed.). Aksonkit, Nakhonratchasima., pp. 1-2.

Odds, F.C., 2003. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 52, 1.

Ozkan, G., Osman, S., Suleyman, G., Orhan, U., Sevil, A., 2010. Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extract from *Salvia pisidica*. LWT - Food Science and Technology. 43, 186-190.

Pepeljnjak, S. and Kosalec, I., 2004. Galangin expresses bactericidal activity against multiple-resistant bacteria: MRSA, *Enterococcus* spp. and *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiology Letters. 240, 111-116.

Reading, C., Farmer, T., , 1983. Antibiotics: Assessment of Antimicrobial Activity and Resistance, Academic Press, London.

Richards, R.M. and Xing, D.K., 1993. In vitro evaluation of the antimicrobial activities of selected lozenges. J Pharm Sci. 82, 1218-20.

Richards, R.M., Xing, J.Z., Gregory, D.W. and Marshall, D., 1995. Mechanism of sulphadiazine enhancement of trimethoprim activity against sulphadiazine-resistant *Enterococcus faecalis.* J Antimicrob Chemother. 36, 607-18.

Stapleton, P., Wu, P.J., King, A., Shannon, K., French, G., & Phillips, I., 1995. Incidence and mechanisms of resistance to the combination of amoxicillin and clavulanic acid in *Escherichia coli*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 39, 2478-2483.

Te Dorsthorst, D.T., Verweij, P.E., Meis, J.F., Punt, N.C. and Mouton, J.W., 2004. In vitro interactions between amphotericin B, itraconazole, and flucytosine against 21 clinical Aspergillus isolates determined by two drug interaction models. Antimicrob Agents Chemother. 48, 2007-13.

Tzouvelekis, L.S., Zissis, N. P., Gazouli, M., Tzelepi, E., Legakis, N. J., 1997. In vitro comparative assessment of [beta]-lactamase inhibitors and their penicillin combinations against selected enterobacteria. International Journal of Antimicrobial Agents. 8, 193-197.

Zhao, W.H., Hu, Z.Q., Hara, Y., & Shimamura, T., 2002. Inhibition of penicillinase by epigallocatechin gallate resulting in restoration of antibacterial activity of penicillin against penicillinase-producing *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 46, 2266-2268.

ภาคผนวก

Output ที่ได้จากโครงการ

Referred articles:

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 2011 = 2.545)

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 2011 = 3.268)

Eumkeb, G. and Duangkham A. (2011). "Subacute Toxicify 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 2011 = 2.337)

Patent

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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

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 36^{th} 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.

Research reports:

Conference Abstracts:

Eumkeb, G. and Richards, R.M.E. (2003). Reversing beta-lactam antibiotic resistance with flavonoids in Gram positive Bacteria. In The 3^{rd} 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 20^{th} 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 Ruangrungsi. 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., Rojtinnakorn, 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.

ผลงานตีพิมพ์ทางหนังสือพิมพ์และสื่ออินเตอร์เนต (บางส่วน)

เกรียงศักดิ์ เอื้อมเก็บ พัฒนาสารสกัด"ข่า"สู่ยาปฏิชีวนะสูตรใหม่ ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดหนอง **สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย** วันที่ 14 มกราคม 2548

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

เกรียงศักดิ์ เอื้อมเก็บ เร่งวิจัย"ข่า"เป็นยาปฏิชีวนะสูตรใหม่ ต้านเชื้อหนองดื้อยา **หนังสือพิมพ์บ้านเมือง** ประจำวันจันทร์ที่ 17 มกราคม 2548

เกรียงศักดิ์ เอื้อมเก็บ "ข่า"สยบเชื้อดื้อยา เล็งวิจัยสูตรใหม่ ผสมสารสมุนไพร **หนังสือพิมพ์กรุงเทพธุรกิจ** ประจำวันอังคารที่ 18 มกราคม 2548

เกรียงศักดิ์ เอื้อมเก็บ วิจัย"ข่า"ทำยาปราบเชื้อแบคทีเรียจอมดื้อ **หนังสือพิมพ์ผู้จัดการรายวัน** ประจำวันศุกร์ที่ 21 มกราคม 2548 หน้า 43.

เกรียงศักดิ์ เอื้อมเก็บ พัฒนาสารสกัดจาก"ข่า"แทนยาปฏิชีวนะสมัยใหม่ ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดหนอง **หนังสือพิมพ์สยามรัฐ** ประจำวันศุกร์ที่ 28 มกราคม 2548

เกรียงศักดิ์ เอื้อมเก็บ สารสกัด"ข่า"ส่วนผสมยาปฏิชีวนะสูตรใหม่ ต้านเชื้อหนองดื้อยา **หนังสือพิมพ์โพสต์ทูเดย์** ประจำวันอาทิตย์ที่ 13 กุมภาพันธ์ 2548 หน้า B5.

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 Awarded	Institute / Country
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	Director of Center for Scientific and Technology equipment,
	Center for Scientific and Suranaree University of Technology	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.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

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** :

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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

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 2011 = 2.545)

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 2011 = 3.268)

Eumkeb, G. and Duangkham A. (2011). "Subacute Toxicify 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 2011 = 2.337)

Munglue, P., **Eumkep, G.**, Wray, S., Kupittayanant, S., 2012. The Effects of Watermelon (*Citrullus lanatus*) Extracts and L-Citrulline on Rat Uterine Contractility. Reproductive Sciences. is accepted.

(Impact Factor 2011 = 2.444)

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. is accepted

(Impact Factor 2011 = 2.814).

Eumkeb, G., Chukrathok, S., 2012. Synergistic activity and mechanism of action of ceftazidime and apigenin combination against ceftazidime-resistant *Enterobacter cloacae* Phytomedicine. is accepted,

(Impact Factor 2011 = 3.268).

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.

Research reports:

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

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 Ruangrungsi. 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., Rojtinnakorn, 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.

ผลงานตีพิมพ์ทางหนังสือพิมพ์และสื่ออินเตอร์เนต (บางส่วน)

เกรียงศักดิ์ เอื้อมเก็บ พัฒนาสารสกัด"ข่า"สู่ยาปฏิชีวนะสูตรใหม่ ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดหนอง **สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย** วันที่ 14 มกราคม 2548

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

เกรียงศักดิ์ เอื้อมเก็บ เร่งวิจัย"ข่า"เป็นยาปฏิชีวนะสูตรใหม่ ต้านเชื้อหนองดื้อยา **หนังสือพิมพ์บ้านเมือง** ประจำวันจันทร์ที่ 17 มกราคม 2548

เกรียงศักดิ์ เอื้อมเก็บ "ข่า"สยบเชื้อดื้อยา เล็งวิจัยสูตรใหม่ ผสมสารสมุนไพร **หนังสือพิมพ์กรุงเทพธุรกิจ** ประจำวันอังคารที่ 18 มกราคม 2548

เกรียงศักดิ์ เอื้อมเก็บ วิจัย"ข่า"ทำยาปราบเชื้อแบคทีเรียจอมดื้อ **หนังสือพิมพ์ผู้จัดการรายวัน** ประจำวันศุกร์ที่ 21 มกราคม 2548 หน้า 43.

เกรียงศักดิ์ เอื้อมเก็บ พัฒนาสารสกัดจาก"ข่า"แทนยาปฏิชีวนะสมัยใหม่ ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดหนอง **หนังสือพิมพ์สยามรัฐ** ประจำวันศุกร์ที่ 28 มกราคม 2548

เกรียงศักดิ์ เอื้อมเก็บ สารสกัด"ข่า"ส่วนผสมยาปฏิชีวนะสูตรใหม่ ต้านเชื้อหนองดื้อยา **หนังสือพิมพ์โพสต์ทูเดย์** ประจำวันอาทิตย์ที่ 13 กุมภาพันธ์ 2548 หน้า B5.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติผู้วิจัย

ผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นาย สมนึก นามสกุล ฉู่กระโทก (ดร.)

   (ภาษาอังกฤษ) Mr. Somnuk Chukrathok Ph.D.

2. รหัสประจำตัวนักวิจัยแห่งชาติ (ถ้ามี)
3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยนักวิจัย / นักศึกษาปริญญาเอก มทส.
4. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้พร้อมเบอร์โทรศัพท์และโทรสาร

   สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

   111 ถ. มหาวิทยาลัย ต. สุรนารี อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000.

   โทร : 044-22 3275, 044-22 4633 **โทรสาร**: 0-44 22- 3315

5. ประวัติการศึกษา

   2529 : ครุศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา) วิทยาลัยครูนครราชสีมา

   2539 : วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยศิลปากร

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

   Microbiology, Medicinal Plants

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

   7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : -

   7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย :

   7.2.1 Investigation of the effect of Some Flavonoids on some β - lactam antibiotics resistant bacteria..

   7.3 ผู้ร่วมวิจัย

   7.3.1 The study of antibacterial activity of some medicinal plants in Lamiaceae Family

   7.4 งานวิจัยที่ทำสำเร็จแล้ว : -

   7.5 งานวิจัยที่กำลังทำ : -

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี