

สุพัชรี ศิริวงศ์ : การเสริมฤทธิ์ของสารฟลาโวนอยด์และยาปฏิชีวนะต่อเชื้อแบคทีเรียค็อกซ์ยา  
ในกลุ่มบีตาแลคแทม (SYNERGISTIC EFFECTS OF FLAVONOIDS AND  
ANTIBIOTICS ON BETA-LACTAM ANTIBIOTIC RESISTANT BACTERIA)  
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เกศจักร ดร.เกรียงศักดิ์ เอี่ยมเก็บ,  
128 หน้า.

การใช้ยาปฏิชีวนะในกลุ่มบีตาแลคแทมอย่างแพร่หลายในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรีย  
นำไปสู่การดื้อยาของเชื้อเพิ่มขึ้น ซึ่งทำให้การรักษายากขึ้นและนำไปสู่การเสียชีวิตของผู้ป่วย  
เชื้อสแตปฟีโลคอคคัส อีฟิเดอมิดิสและสเตรปโตคอคคัส พายโอจีเนส เป็นเชื้อที่ก่อโรคในมนุษย์  
โดยเชื้อเหล่านี้สามารถพัฒนาให้ดื้อต่อยาปฏิชีวนะได้หลายชนิดรวมถึงยาปฏิชีวนะในกลุ่ม  
บีตาแลคแทม รายงานวิจัยหลายฉบับกล่าวถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค  
ของสารฟลาโวนอยด์ที่สกัดได้จากพืช อย่างไรก็ตาม การวิจัยเกี่ยวกับการเสริมฤทธิ์กันและกลไก  
การออกฤทธิ์ของสาร ฟลาโวนอยด์ต่อแบคทีเรียค็อกซ์ยายังมีค่อนข้างน้อย วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้  
เพื่อทดสอบความสามารถของสารฟลาโวนอยด์และการเสริมฤทธิ์ของสารฟลาโวนอยด์กับยา  
ปฏิชีวนะในกลุ่มบีตาแลคแทมในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสแตปฟีโลคอคคัส อีฟิเดอมิดิส  
ดีเอ็มเอสที 15505 ค็อกซ์ยามีออกซิซิลลิน (เออาร์เอสอี) และเชื้อสเตรปโตคอคคัส พายโอจีเนส  
ดีเอ็มเอสที 30653 (เอสพี) วิธีบรอทมาโครไดลูชันและเชกเกอร์บอร์ดถูกใช้ในการทดสอบความไว  
ของสารฟลาโวนอยด์และยาปฏิชีวนะต่อแบคทีเรีย ได้ค่าเอ็มไอซีของยาอะม็อกซิซิลลินและสาร  
ฟลาโวนอยด์ ลูทีโอลิน ไบคาลินและเคอเซดิน เมื่อใช้เดี่ยวๆ ในการยับยั้งเชื้อเออาร์เอสอี เท่ากับ 16  
32 32 และ 256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และค่าครรชนีเอฟไอซีเท่ากับ >1 1 และ 0.25  
ตามลำดับ และได้ค่าเอ็มไอซี ของยาเซฟตาซิมและสารฟลาโวนอยด์ ลูทีโอลิน ไบคาลินและ  
เคอเซดิน เมื่อใช้เดี่ยวๆ ในการยับยั้งเชื้อเอสพีเท่ากับ 0.25 128 >256 และ 128 ไมโครกรัมต่อ  
มิลลิลิตรตามลำดับ และค่าครรชนีเอฟไอซีเท่ากับ 0.625 <0.625 และ 0.531 ตามลำดับ แสดงให้เห็น  
ว่าเมื่อใช้ยาปฏิชีวนะร่วมกับสารฟลาโวนอยด์เกิดการเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อเออาร์เอสอีและ  
เอสพีได้ ผลการทดสอบการดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร แสดงให้เห็นว่า  
ภายหลังที่เชื้อเออาร์เอสอีและเอสพีถูกเลี้ยงกับสารผสมของฟลาโวนอยด์และยาปฏิชีวนะ  
การดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่นนี้ เพิ่มขึ้นจาก 0-0.02 เป็น 0.3-0.8 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม  
ซึ่งแสดงให้เห็นถึงเชื้อหุ้มเซลล์ชั้นใน (ซีเอ็ม) ถูกทำลาย ผลการทดสอบการยับยั้งการทำงานของ  
เอนไซม์บีตาแลคแทมเอสของสารฟลาโวนอยด์ เปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะ พบว่าสารฟลาโวนอยด์  
มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บีตาแลคแทมเมสมากกว่ายาปฏิชีวนะ ผลจาก

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านแสดงให้เห็นว่า เซลล์แบคทีเรียภายหลังจากที่ถูกเลี้ยงกับ สารผสมของฟลาโวนอยด์และยาปฏิชีวนะพบว่า ทำให้สัญญาณวิทยาของเซลล์ได้รับความเสียหาย อย่างเห็นได้ชัด เปปติโดไกลแคนและเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นในได้รับความเสียหายและขนาด (พื้นที่) โดย เฉลี่ยของเซลล์เปลี่ยนแปลงไป ผลจากเอฟพีไออาร์แสดงให้เห็นว่า เมื่อใช้เคอเซดินผสมกับ อะม็อกซิซิลลิน และเคอเซดินหรือไบคาตินผสมกับเซพตาซิมต่อเซลล์ของเออาร์เอสอีและเอสพี ทำให้กรดไขมันและกรดนิวคลีอิกลดลงในขณะที่โปรตีนเอไมด์เพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ดังนั้นการค้นพบนี้เป็นรายงานชิ้นแรกที่พบว่าสารฟลาโวนอยด์เหล่านี้ออกฤทธิ์เสริมกับยา ปฏิชีวนะในกลุ่มบีตาแลคแทม ด้านแบคทีเรียเออาร์เอสอีและเอสพีให้กลับไปไวต่อยาปฏิชีวนะ เหมือนเดิม โดยผ่านกลไกการออกฤทธิ์สี่แบบ ได้แก่ยับยั้งการสังเคราะห์เปปติโดไกลแคน ยับยั้ง การออกฤทธิ์ของเอนไซม์บีตาแลคแทมเมส เพิ่มการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นใน และทำให้สาร ชีวโมเลกุลภายในเซลล์เปลี่ยนแปลง สารฟลาโวนอยด์เหล่านี้มีศักยภาพเด่นชัดที่จะพัฒนาเป็นสาร ชนิดใหม่ที่ใช้ผสมกับยาปฏิชีวนะในกลุ่มบีตาแลคแทมในการยับยั้งแบคทีเรียเหล่านี้ งานวิจัยใน อนาคต ควรทดสอบประสิทธิภาพและพิษในสัตว์ทดลองและมนุษย์ ในทำนองเดียวกันการเสริมฤทธิ์กัน ในเลือดและเนื้อเยื่อควร ได้รับการทดสอบว่าถึงระดับที่ออกฤทธิ์ได้



สาขาวิชาเภสัชวิทยา

ปีการศึกษา 2557

ลายมือชื่อนักศึกษา \_\_\_\_\_

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา \_\_\_\_\_

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม \_\_\_\_\_

SUPATCHAREE SIRIWONG : SYNERGISTIC EFFECTS OF  
FLAVONOIDS AND ANTIBIOTICS ON BETA-LACTAM ANTIBIOTIC  
RESISTANT BACTERIA. THESIS ADVISOR : ASST. PROF.  
GRIANGSAK EUMKEB, Ph.D. 128 PP.

FLAVONOIDS/QUERCETIN/BETA-LACTAM/MECHANISM OF  
ACTION/RESISTANT BACTERIA/FT-IR MICROSPECTROSCOPY

The wide use of  $\beta$ -lactam antibiotic in the treatment of bacterial infections has led to the emergence and spread of resistant strains. This evidence has increased risk of worse clinical outcomes and death. *Staphylococcus epidermidis* and *Streptococcus pyogenes* are bacterial pathogens of human and have developed resistance to most antibiotics and  $\beta$ -lactam antibiotics. Many researchers reported that some flavonoids isolated from plants could efficiently inhibited some pathogenic bacteria. However, little works have investigated the synergistic effect and modes of action of flavonoids against drug-resistant bacteria. The objectives of this study were to test the inhibitory effect of flavonoids and synergistic effect of flavonoids plus  $\beta$ -lactam antibiotic against amoxicillin resistant *S. epidermidis* DMST 15505 (ArSE) and *S. pyogenes* DMST 30653 (SP). The broth macrodilution and checkerboard assay were used for antibacterial susceptibility testing. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of amoxicillin, luteolin, baicalein and quercetin alone against ArSE were 16, 32, 32 and 256  $\mu\text{g/ml}$ , respectively, and the fraction inhibitory concentration (FIC) indices were  $>1$ , 1 and 0.25, respectively. The MICs of ceftazidime, luteolin, baicalein and quercetin alone against SP were 0.25, 128,  $>256$  and 128  $\mu\text{g/ml}$ , respectively, and the

FIC indices were 0.625, <0.625 and 0.531, respectively. These results proposed that  $\beta$ -lactam antibiotic in combination with flavonoids showed a synergistic effect against both ArSE and SP. The results from OD<sub>260</sub> UV-VIS spectroscopy showed that after treatment, the OD<sub>260</sub> of both ArSE and SP cells treated with a combination of flavonoids plus  $\beta$ -lactam antibiotic were increased from 0-0.02 to 0.3-0.8. These results suggest that cytoplasmic membrane (CM) was damaged. The effect of these flavonoids on  $\beta$ -lactamase enzyme activity compared to that of  $\beta$ -lactam antibiotic showed that these flavonoids had higher inhibitory effect than  $\beta$ -lactam antibiotic. The transmission electron microscopy (TEM) results exhibited the morphological, peptidoglycan and CM damage and average cell areas were changed of the cells treated with the combination. Fourier transform infrared (FT-IR) microspectroscopy revealed that the combination of quercetin plus amoxicillin and quercetin or baicalein plus ceftazidime on ArSE and SP cells cause the decrease in fatty acid and nucleic acid whereas protein amide was shown to increase compared to controls. These findings are the first report that these flavonoids have the synergistic effect with  $\beta$ -lactam antibiotic against ArSE and SP to its original susceptibility *via* four modes of actions, inhibit peptidoglycan synthesis, restrain  $\beta$ -lactamases activity, increase CM permeability and cause biomolecules change in these cells. These flavonoids have the dominant potentiality to be a new agent for synergistic use with  $\beta$ -lactam antibiotic to treat these bacteria. Future work should focus on the efficacy and toxicity in animals and in humans, as well as, the synergistic effect on blood and tissue.

School of Pharmacology

Student's Signature \_\_\_\_\_

Academic Year 2014

Advisor's Signature \_\_\_\_\_

Co-advisor's Signature \_\_\_\_\_