นิตยา โรจน์ทินกร : ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของพลาสมาจากจระเข้น้ำจืดไทย (*CROCODYLUS SIAMENSIS*) ต่อแบคทีเรียดื้อยา (ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF PLASMA FROM SIAMESE CROCODILE (*CROCODYLUS SIAMENSIS*) ON DRUG RESISTANT BACTERIA) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เกรียงศักดิ์ เอื้อมเก็บ, 124 หน้า.

การดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียเป็นปัญหาที่สำคัญของโลกรวมถึงผู้ป่วยหนักที่โรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมา ประเทศไทย ปัญหาดังกล่าวทำให้อัตราการเสียชีวิตและค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลเพิ่มขึ้น อีกทั้งต้องใช้ยาต้านแบคทีเรียขนานใหม่ที่มีราคาแพงและรุ่นที่สูงขึ้นตามมา ดังนั้นวัตถุประสงค์หลักของการศึกษาวิจัยในปัจจุบันจึงให้ความสำคัญไปที่สารต้านจุลชีพที่ได้จากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียดื้อยาหรือสารที่สามารถเพิ่มการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะดั้งเดิมให้มีประสิทธิภาพสามารถใช้ต้านเชื้อแบคทีเรียดื้อยาได้ ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้ได้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียดื้อยาของโปรตีนสกัดจากพลาสมาจระเข้น้ำจืดไทยเมื่อใช้เดี่ยว ๆ และใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะกลุ่มบีตาแลคแทม พลาสมาของจระเข้ถูกแยกเพื่อที่จะได้ 5 แฟรคชัน (พี 1 พี 2 พี 3 พี 4 และพี 5) โดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟฟี ค่ายับยั้งต่ำสุดของ พี 1 และ พี 5 มีค่า 1024 สำหรับ พี 2 พี 3 และพี 4 มีค่า >1024 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย เอนเทอโรแบคเตอร์ โคลเอเซ ที่ดื้อต่อยาเซฟตาซิดีม ดีเอ็มเอสที 21394 (ซีอาร์อี-เอนซี 21394) ขณะที่ค่ายับยั้งต่ำสุดของทั้งห้าแฟรคชันในการต้านเชื้อสแตปฟิโลคอคคัส ออเรียสที่ดื้อต่อยาเมทิซิลิน ดีเอมเอสที 20651 (เอมอาร์เอสเอ 20651) คือ 1024 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่ายับยั้งต่ำสุดของยาเซฟตาซิดีมหรือยาออกซาซิลลินต้านเชื้อซีอาร์อีเอนซี 21394 และเอมอาร์เอสเอ 20651 พบว่ามีการดื้อยาในระดับที่สูง (ค่ายับยั้งต่ำสุดทั้งสอง >1024 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ผลจากการศึกษาด้วยวิธีเชคเกอร์บอร์ดแสดงให้เห็นการเสริมฤทธิ์ที่ดัชนี เอฟไอซี 0.062 สำหรับสารผสม พี 1 หรือ พี 5 ผสมกับยาเซฟตาซิดีมต้านเชื้อซีอาร์อีเอนซี 21394 และที่ 0.375 สำหรับสารผสมพี 1 หรือ พี 5 กับยาออกซาซิลลินในการต้านเชื้อเอมอาร์เอสเอ 20651 กราฟการตายของเชื้อได้ยืนยันให้เห็นว่าเชื้อซีอาร์อีเอนซี 21394 และเชื้อเอมอาร์เอสเอ 20651 ที่มีชีวิตลดลงอย่างชัดเจนมากภายใน 6 ชั่วโมงและตลอดถึงชั่วโมงที่ 24 หลังจากได้รับสารผสมทั้งพี 1 และพี 5 ผสมกับทั้งยาเซฟตาซิ-ดีมหรือยาคลอกซาซิลลิน ตามลำดับ จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่านพบว่าเชื้อซีอาร์อีเอนซีที่ได้รับสารผสมระหว่างยาเซฟตาซิดีมกับพี 1 หรือพี 5 มีขนาดของเซลล์เล็กลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุม (พีน้อยกว่า 0.01) อีกทั้งเซลล์ส่วนใหญ่มีรูปร่างบิดเบี้ยวและเยื่อหุ้มเซลล์ได้รับความเสียหาย นอกจากนั้นสารผสมระหว่าง พี 1 หรือ พี 5 กับยาเซฟตาซิดีม มีผลให้การซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกและชั้นในเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน (พีน้อยกว่า

0.01) ผลจากการศึกษาแถบโปรตีนของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับเยื่อหุ้มชั้นนอกเพปทิโดไกลแคน (โอเอมพีจี) ด้วยเอสดีเอส-เพจแสดงให้เห็นว่าที่น้ำหนักโมเลกุล 35 และ 45 กิโลดาลตันของแถบโปรตีนสารผสมระหว่างยาเซฟตาซิดีมผสมกับทั้งพี 1 หรือ พี 5 จางกว่าแถบโปรตีนควบคุมเล็กน้อย การทำงานของเอ็นไซม์บีตา แลคแทมเมส ชนิดที่ 4 ถูกยับยั้งโดยสารผสมระหว่างยาเซฟตาซิดีมผสมกับทั้งพี 1 หรือพี 5 เมื่อเทียบกับกลุ่มอื่น ๆ (พีน้อยกว่า 0.01) ผลการศึกษาดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่าสารผสมทั้ง พี 1 หรือพี 5 ผสมกับยาเซฟตาซิดีมมีการเสริมฤทธิ์เสริมกันอย่างมากในการต้านเชื้อซีอาร์อีเอนซี และสามารถเปลี่ยนเชื้อที่ดื้อยาให้กลายเป็นเชื้อที่ไวต่อยาปฏิชีวนะที่เคยใช้ในการรักษา สำหรับกลไกการออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเบื้องต้นนั้นอาจจะเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการสังเคราะห์เปปทิโดไกลแคน การซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกและชั้นในของเชื้อชนิดนี้เพิ่มขึ้น และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บีตาแลคแทมเมส นอกจากนั้นอาจรบกวนการสังเคราะห์โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับเพปทิโดไกลแคนและเยื่อหุ้มชั้นนอก ดังนั้นสารผสมดังกล่าวควรได้รับการพัฒนาไปเป็นเภสัช-ภัณฑ์ขนานใหม่ในการต้านเชื้ออี โคลเอเซ ซึ่งในปัจจุบันดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในทางปฏิบัติเกือบทั้งหมด อย่างไรก็ตามการทดสอบความประสิทธิภาพและความเป็นพิษในสัตว์ทดลองหรือในมนุษย์ยังคงมีความจำเป็น

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเภสัชวิทยา ลายมือชื่อนักศึกษา _____

ปีการศึกษา 2556 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____

NITAYA ROJTINNAKORN : ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF PLASMA FROM SIAMESE CROCODILE (*CROCODYLUS SIAMENSIS*) ON DRUG RESISTANT BACTERIA. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. GRIANGSAK EUMKEB, Ph.D., 124 PP.

CROCODYLUS SIAMENSIS/PLASMA/DRUG RESISTANT BACTERRIA/ *β*-LACTAM ANTIBIOTIC/SYNERGISTIC ACTIVITY

The resistance of bacteria is a major problem in the world, including intensive care patients at MaharatNakhonRatchasima Hospital, Thailand. This problem leads to increasing the morbidity, mortality and cost of medical care. The more expensive, newer and higher generation antibacterial agents have subsequently been rising. So, the current research is emphasized on naturally-derived antimicrobials against drug resistant bacteria or enhancing the effectiveness of existing antibiotics. Thus, this study aimed to investigate the activity of the separated fractions from Siamese crocodile (*Crocodylus siamensis*) plasma against drug resistant bacteria, when use alone and in combination with *β*-lactam antibiotics. The crocodile plasma was separated to give five fractions (P1, P2, P3, P4, and P5) using column chromatography. The MICs of P1 and P5 were 1024, and >1024 mg/mL for P2, P3, and P5 against clinical isolates of Ceftazidime-resistant *Enterobacter cloacae* DMST 21394 (CREnC 21394), whereas displayed at 1024 mg/mL for all fractions against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* DMST 20651 (MRSA 20651). These strains, both CREnC 21394 and MRSA 20651, showed high resistance to both ceftazidime and cloxacillin with equal MICs at >1024 µg/mL. Checkerboard results revealed synergistic effects at FIC index 0.062 for either P1 or P5 plus ceftazidime against CREnC 21394 and at 0.375 for P1 or P5 plus

oxacillin against MRSA 20651. The killing curves exhibited marked decrease of CREnC 21394 and MRSA 20651 viability within 6 h and throughout 24 h after exposure to both P1 and P5 in combination with either ceftazidime or cloxacillin, respectively. The TEM study exhibited that the combination of ceftazidime plus either P1 or P5 on CREnC revealed a significantly smaller in cell size than the control cells ($p<0.01$), cell shape and cell envelope damage in most of these cells. In addition, either P1 or P5 in combination with ceftazidime showed steady increase the OM and CM permeability ($p<0.01$). The outer membrane and peptidoglycan (OMPG) associated protein band from SDS-PAGE of this strain revealed that the bands at 35 and 45 kDa of ceftazidime plus either P1 or P5 were slightly paler than control. Enzyme assay indicated that β-lactamase type IV activity were inhibited by P1 or P5 either alone or in combination with ceftazidime compared to controls ($p<0.01$). These results can be concluded that the combination of either P1 or P5 plus ceftazidime showed strong synergistic activity against CREnC 21394 and capable to reverse resistance to be susceptible to its primary antibiotic. The three elementary mechanisms of action may be involved; inhibition of peptidoglycan synthesis, increase OM and CM permeability, and β-lactamase inhibition. Moreover, the OMPG associated protein synthesis may be interfered. So, these combinations may be developed as a novel pharmaceutical agent against *E. cloacae*, which currently almost resistant to practically antibiotics. However, the confirmation of its efficacy and toxicity test *in vivo* and humans is required.

School of Pharmacology Student's Signature_____

Academic Year 2013 Advisor's Signature_____