บทคัดย่อภาษาไทย

การดื้อต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่มเบตาแลคแทมเป็นปัญหาของโลกในปัจจุบัน ปัจจุบันเชื้อในกลุ่มเอนเทอโรแบคเตอร์ โคลเอเซ และอีโคไล โดยปกติจะดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิดและเป็นอันตรายต่อสุขภาพสำหรับผู้ป่วยที่นอนในโรงพยาบาลและบุคคลากรที่ให้การรักษา ฉะนั้นการค้นหายาปฏิชีวนะใหม่ๆและสารประกอบที่สามารถยับยั้งการดื้อยาปฏิชีวนะในกลุ่มเบตาแลคแทมจึงเป็นเป้าหมายที่สำคัญและเร่งด่วนที่ต้องรีบดำเนินการ การศึกษาวิจัยครั้งนี้เราได้ทดสอบฤทธิ์ในการเป็นสารปฏิชีวนะของสารฟลาโวนอยด์ที่เกิดขึ้นในพืชที่มีในธรรมชาติ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้ออีโคไล ดีเอ็มเอสที 20662 ของอะมอกซีซิลลิน กาแลนจิน ลูทีโอลิน และเอพิเจนิน เท่ากับ >1,000, 500, 200 และ 150 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อเอนเทอโรแบคเตอร์ โคลเอเซ ดีเอ็มเอสที 21394 ของเซฟตาซีดีม และเอพิเจนิน เท่ากับ 100, และ 180 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ผลจากการทดสอบเชคเกอร์บอร์ด แสดงให้เห็นว่า ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้ออีโคไล ดีเอ็มเอสที 20662 ของยาผสมกับฟลาโวนอยด์ ลดลงได้แก่ อะมอกซีซิลลิน 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ผสมกับกาแลนจิน 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, อะมอกซีซิลลิน 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ผสมกับลูทีโอลิน 90 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ อะมอกซีซิลลิน 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ผสมกับเอพิเจนิน 90 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ยิ่งไปกว่านั้นค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อเอนเทอโรแบคเตอร์ โคลเอเซ ดีเอ็มเอสที 21394 ของเซฟตาซีดีม ผสมกับเอพิเจนินลดลงเป็น 20 และ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ผลการนับเชื้อที่ยังรอดชีวิตจากกราฟการเจริญเติบโตของเชื้อพบว่า กราฟการเจริญของเชื้อ อีโคไล ดีเอ็มเอสที 20662 ถูกยับยั้งการเจริญเมื่อใส่สารผสมระหว่างอะมอกซีซิลลิน 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรและกาแลนจิน 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, ลูทีโอลิน 90 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรและเอพิเจนิน 90 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร กราฟการเจริญเติบโตของเอนเทอโรแบคเตอร์ โคลเอเซ ดีเอ็มเอสที 21394 ก็ถูกยับยั้งให้อยู่ในระดับต่ำสุดในช่วงตั้งแต่ 6 ชั่วโมงเป็นต้นไป เมื่อได้รับสารผสมระหว่างเซฟตาซิดีม 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร กับลูทีโอลินหรือเอพิเจนิน 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นอกจากนั้นแล้ว ผลการวิจัยจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนยังพบว่า สารผสมของเซฟตาซิดีม 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร กับลูทีโอลินหรือเอพิเจนิน 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทำให้รูปลักษณะทางสัณฐานของเชื้อเอนเทอโรแบคเตอร์ โคลเอเซ ดีเอ็มเอสที 21394 ถูกทำให้เสียหายอย่างมาก ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนของเชื้อ อีโคไล ดีเอ็มเอสที 20662 เมื่อได้รับยา ระหว่างอะมอกซีซิลลิน 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และเอพิเจนิน 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทำให้เซลล์ได้รับความเสียหายอย่างมาก รวมถึงการแยกออกของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกด้วย ซึ่งอาจจะเนื่องมาจากการที่เปบทิโดไกลแคนที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกได้รับความเสียหาย บางเซลล์ของแบคทีเรียสูญเสียไรโบโซมไปจากไซโทพลาสซึม เซลล์ของแบคทีเรียจำนวนมากมีขนาดยาวกว่ากลุ่มควบคุม เมื่อทำการสกัดโปรตีนจากเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของเชื้อ อีโคไล ดีเอ็มเอสที 20662 ภายหลังได้รับยาอะมอกซีซิลลิน 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรผสมกับเอพิเจนิน 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และนำไปทดสอบกับเจล อีเลคโทรโฟเรซิส พบว่าแบนที่เกิดขึ้น มีความแตกต่างจากเซลล์ที่ไม่ได้รับยา โดยแบน

จากการศึกษานี้ สามารถสรุปได้ว่า กาแลนจิน ลูทีโอลิน และ เอพิเจนิน มีศักยภาพที่จะยับยั้งเชื้อเชื่ออีโคไล ดีเอ็มเอสที 20662 ที่ดื้อต่อยาอะมอกซีซิลลินเมื่อให้ผมกับยานี้ ในทำนองเดียวกันเชื้อเอนเทอโรแบคเตอร์ โคลเอเซ ดีเอ็มเอสที 21394 ก็ถูกยับยั้งได้ดีจากการเสริมฤทธิ์กันของสารผสมระหว่างเซฟตาซิดีม กับลูทีโอลินหรือเอพิเจนิน เมื่อดูถึงความปลอดภัยในการในการบริโภคพืชที่มีสารฟลาโวนอยด์ต่างๆ เหล่านี้อยู่แล้ว สารฟลาโวนอยด์เหล่านี้น่าจะได้รับการวิจัยและพัฒนามาผสมกับยาในกลุ่มเบตาแลคแทมในการยับยั้งเชื้อที่ดื้อยาและคุกคามชีวิตมนุษย์อยู่ในขณะนี้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Resistance to β-lactam antibiotics is a global problem. Today strains of *Enterobacter cloacae* (*E. cloacae*) 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 naturally occurring flavonoids. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of amoxicillin, galangin, luteolin and apigenin alone against *E. coli* DMST 20662 were >1,000, 500, 200 and 150 μg/ml respectively. The MICs of ceftazidime and apigenin against *E. cloacae* DMST 21394 were 100 and 180 μg/ml respectively. The results of checkerboard assay showed that MICs of amoxicillin in combination with these flavonoids were reduced to amoxicillin 30 μg/ml plus galangin 100 μg/ml, amoxicillin 30 μg/ml plus luteolin 90 μg/ml and amoxicillin 20 μg/ml plus apigenin 90 μg/ml against this *E. coli* strain. In addition, the MICs of ceftazidime plus apigenin against *E. cloacae* strain were reduced to 20 plus 10 μg/ml respectively. Viable counts showed that the killing curves of *E. coli* DMST 20662 cells by 20 μg/ml amoxicillin were potentiated by galangin 100 μg/ml, luteolin 90 μg/ml and apigenin 90 μg/ml. Ceftazidime 20 μg/ml in combination with 10 μg/ml of either apigenin or luteolin also reduced the CFU/ml of *E. cloacae* DMST 21394 to low levels ($1x10^3$ CFU/ml) over 6 h. Electronmicroscopy clearly showed that the combination of ceftazidime 10 μg/ml with 10 μg/ml of either luteolin or apigenin caused marked morphological damage for *E. cloacae* DMST 21394. Electronmicrographs of thin sections of log phase *E. coli* DMST 20662 grown for 4 h in the presence of amoxicillin 10 μg/ml plus apigenin 20 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. The OM-PG associated protein bands of *E. coli* DMST 20662 cells grown in a combination of amoxicillin 10 μg/ml plus apigenin 20 μg/ml showed further differences from those of the control cells. Several of the high MW protein bands were absent but darker bands of lower MW proteins were observed. These are similar darker bands to those from cells treated with either amoxicilin or apigenin alone. Synergism between amoxicillin and apigenin reduced the total number of cells present and the total amount of OM-PG associated proteins. This resulted in the absence of several of the medium and high MW proteins and the accumulation of low MW proteins. 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*, apigenin showed marked inhibitory activity but none of other flavonoids tested showed appreciable activity. These results indicated that in addition to the direct effect on cell structure and cell division, the resistance reversing activity of flavonoids against bacteria might also include inhibition of β-lactamase activity. The result of OM permeability showed that the effect of 10 μg/ml amoxicillin and 20 μg/ml apigenin against *E. coli* DMST 20662 altered the OM permeability when they were used alone and in combination. The effect of the amoxicillin plus apigenin would seem to be greater than either amoxicillin or apigenin when used singly against this organism. The effect of 10 μg/ml amoxicillin and 20 μg/ml apigenin on the cytoplasmic membrane, was investigated using the cytoplasmic enzyme β-galactosidase. The result showed that there was no increase in β-galactosidase activity with increasing time in the presence of amoxicillin, apigenin and amoxicillin plus apigenin. It can be concluded that it is unlikely that amoxicillin, apigenin and amoxicillin plus apigenin alter the permeability of the cytoplasmic membrane of *E. coli* DMST 20662.

From the study, it was concluded that galangin, luteolin and apigenin have the potential to reverse bacterial resistance to amoxicillin against *E. coli* DMST 20662. Apigenin and luteolin have synergistic effect with ceftazidime against *E. cloacae* DMST 21394. 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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี