การศึกษาผลของสารสกัดจากสมุนไพรต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ดื้อยาโดยวิธี Flow cytometry

Study on the effect of medicinal plant extracts on cytoplasmic membrane of multidrug resistance bacteria by flow cytometry

วิสาตรี คงเจริญสุนทร[1*] จินตนา จิรถาวร[2] และวิภาพร ใจเกื้อ[1]

[1]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

[2]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้ทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรจันทน์แดง จันทน์เทศ และจันทน์ชะมดต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียดื้อยาทั้ง 2 สายพันธุ์ คือ *Acinetobacter baumannii* และ Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* โดยวิธี Flow cytometry การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสมุนไพรช่วยทำให้ ethidium bromide ผ่านเข้าเซลล์ของแบคทีเรียดื้อยาได้ดีขึ้น โดยใช ethidium bromide ซึ่งเป็นสีย้อมเรืองแสงเข้าไปจับกับกรดนิวคลิอิกของแบคทีเรียแล้วทำให้เกิดการเรืองแสง จึงสามารถติดตามการผ่านเข้าออกของสมุนไพรในเซลล์แบคทีเรียดื้อยาด้วย FACscan flow cytometry จากการทดลองพบว่าสารสกัดสมุนไพรทั้งสามชนิดที่นำมาศึกษาสามารถพบว่าสารสกัดจันทน์แดง จันทน์เทศ และจันทน์ชะมด ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ มีฤทธิ์ทำให้ ethidium bromide ผ่านเข้าเซลล์ของแบคทีเรียดื้อยาทั้งสองสายพันธุ์ได้ดีขึ้นเมื่อเติมสมุนไพรที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ค่าความเข้นข้นที่ต่ำที่สุดของจันทน์แดงและจันทน์เทศ และจันทน์ชะมดที่สามารถนำพา ethidium bromide เข้าเซลล์ของ *A. baumannii* สายพันธุ์ดื้อยาคือ น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.01, 0.01 และ 0.1 มก./มล. ตามลำดับ นอกจากนี้สารสกัดจันทน์แดงและจันทน์เทศที่ระดับต่ำที่สุดที่สามารถช่วยนำพา Ethidium bromide เข้าเซลล์ MRSA คือ 0.05 มก./มล. เท่ากันตามลำดับ

คำสำคัญ : flow cytometry, *A. baumannii*, MRSA, จันทน์แดง, จันทน์เทศ, จันทน์ชะมด

Abstract

The *Dracaena loureiri* Gapnep.. *Myristica fragrans* Houtt. and *Mansonia gagei* Drumm. were investigated for their abilities to enhance bacterial permeability of resistant bacteria including *Acinetobacter baumannii* and Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by flow cytometry. This experiment exhibited enhancement of medicinal plant extracts to disrupt the cytoplasmic membrane of living bacterial cells. The membrane - impermeant nucleic acid stain of ethidium bromide of *A. baumannii* and MRSA were tested by FACscan flow cytometry. The varied concentration of medicinal plant extracts were tested theirs ability to enhance permeability of multidrug resistant bacteria. The results indicated that herb extracts could promote intracellular accumulation of ethidium bromide in both strains of multidrug resistant bacteria. In the treatment of crude extracts to *A. baumannii* the lowest concentration of *D. loureiri* Gapnep., *M. fragrans* Houtt. and *M. gagei* Drumm. that showed the brighter signal and uniformly fluorescent were ≤ 0.01, 0.01 and 0.1 mg/ml. respectively. Also. the treatment with 0.05 mg/ml of both *D. loureiri* Gapnep. and *M. fragrans* Houtt. enhance bacterial permeability of ethidium bromide into MRSA.

Keywords : flow cytometry. *A. baumannii*. MRSA. *D. loureiri* Gapnep.. *M. fragrans* Houtt.. *M. gagei* Drumm.

* **Corresponding author.** E-mail address: wisatre@bucc4.buu.ac.th

บทนำ

ในแต่ละปีจะพบอุบัติการณ์ของการดื้อยาจากแบคทีเรียเพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็วเนื่องจากการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างพร่ำเพรื่อและแพร่หลายแต่ขาดการควบคุมเท่าที่ควร ดังนั้นแบคทีเรียจึงปรับตัวเพื่อที่จะพัฒนากลไกการต้านยาปฏิชีวนะเพื่อความอยู่รอดและสืบพันธุ์ การปรับตัวเหล่านี้ได้แก่ สร้างเอ็นไซม์ทำลายยา เปลี่ยนแปลงผิวเซลล์เมมเบรนเพื่อลดการนำเข้ายาสู่ภายในเซลล์ เปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนเป้าหมายที่ยาเข้าไปออกฤทธิ์สร้างโปรตีนขับยาออกนอกเซลล์เป็นต้น (Nikaido, 1994; Walsh, 2000) ทำให้ต้องพัฒนาหายาปฏิชีวนะชนิดใหม่มารักษาโรคติดเชื้อที่เกิดจากแบคทีเรียดื้อยาเพื่อทดแทนยาปฏิชีวนะที่ใช้ไม่ได้ผล การนำสมุนไพรเข้ามาใช้ในการรักษาอาจเป็นทางเลือกใหม่เพื่อใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะที่รักษาไม่ได้ผล เช่น การเพิ่มการนำเข้ายาเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียโดยไปรบกวน การผ่านเข้าเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย (Walsh, 2000; Wright & Sutherland, 2007) ปัจจุบันมีการศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรด้านต่างๆ เช่น ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Fukai *et al.*, 2005; Nuding *et al.*, 2006; Tsuchiya *et al.*, 1996) ฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Chung *et al.*, 2006) การต้านอนุมูลอิสระ (Pietta, 2000) สารกลุ่ม stilbenoids ในจันทน์แดงสามารถยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 (Likhitwitayawuid *et al.*, 2002) สาร Mansonone C ในจันทน์ชะมดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราคือ *Cladosporium cucumerinum* และ *Candida albicans* (Tiew *et al.*, 2003) มีรายงานอีกมากมายที่ศึกษาฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกและลบของจันทน์แดง (Narasimhan & Dhake, 2006) ยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ HepG2 cells (Gebhardt, 2003) ส่วนสารออกฤทธิ์สำคัญในจันทน์แดง จันทน์เทศ และจันทน์ชะมด ได้แก่ coumarins, neolignans, mansoxetane, mansonones, elemicin, caffeic acid, catechin, eugunol (Tiew *et al.*, 2002; Tiew *et al.*, 2003; Chung, 2006) นอกจากนี้ยังพบว่าสารออกฤทธิ์ที่สำคัญกลุ่ม sesquiterpenoids เช่น nerolidol, farnesol, bisabolol และ apritone สามารถเพิ่มการนำพา ethidium bromide เข้าเซลล์ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* เนื่องจากสารประกอบดังกล่าวมีฤทธิ์ไปทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเหล่านี้ (Brihm & Johnson, 2003)

เทคนิค Flow cytometry สามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่างเซลล์ต่างชนิดออกจากกันได้ โดยอาศัยคุณสมบัติทางฟิสิกส์ของเซลล์ กล่าวคืออนุภาคที่ประกอบเป็นตัวเซลล์ ซึ่งเมื่อถูกกระตุ้นด้วยพลังงานแล้วอะตอมภายในโมเลกุลของจุลินทรีย์หรือเซลล์จะดูดกลืนพลังงานและเรืองแสงออกมาในรูปพลังงานที่มีความยาวคลื่นต่างๆ การที่เซลล์แต่ละเซลล์คายพลังงานต่างชนิดกันสามารถบอกถึงคุณสมบัติที่ต่างกันของแต่ละเซลล์ได้ (สุรางค์ นุชประยูร และคณะ, 2546) นอกจากนี้ถ้านำหลักการคายพลังงานและการนำสีย้อมเรืองแสงมาติดฉลากอนุภาคต่างๆ ในเซลล์ หรือเชื่อมกับแอนติบอดี้ที่มีความจำเพาะกับโมเลกุลบนพื้นผิวของเซลล์จะสามารถจำแนกชนิดของเซลล์ต่างๆ ได้ เช่น การแยกเซลล์ที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อเอดส์โดยติดสี fluorescence คือ DiI และ DiO (Jorio *et al.*, 2005) นอกจากนี้ยังสามารถใช้ flow cytometry ศึกษากลไกการเข้าเซลล์ของยาต้านจุลินทรีย์บางชนิด เช่น defensins (Nuding *et al.*, 2006) หรือศึกษาผลของ yuccasaponin ในเซลล์ *Leishmania* spp. โดยใช้ $DiBAC_4$ เป็นตัวติดตามดูการนำ $DiBAC_4$ เข้าเซลล์เมมเบรน (Plock *et al.*, 2001)

Methicillin-Resistant *S. aureus* (MRSA) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่เป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในโรงพยาบาล MRSA เป็นเชื้อที่ทนต่อความร้อนและความแห้ง ได้ดี เชื้อนี้สามารถปนเปื้อนจากบุคคลหนึ่งไป

ยังอีกคนหนึ่งได้โดยการสัมผัสโดยตรงหรือทางอากาศ ปกติ MRSA อาศัยอยู่ตามร่างกายของคนได้โดยไม่ก่อให้เกิดโรค แต่เมื่อใดก็ตามที่ร่างกายเกิดความผิดปกติ เช่น ระบบภูมิคุ้มกันบกพร่อง หรือมีบาดแผล เชื้อที่อาศัยอยู่เหล่านี้ก็จะก่อโรคได้ทันที โดยสามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อที่ผิวหนังและเนื้อเยื่อต่างๆ ทั่วร่างกาย (Mutoh. 2007; Pesavento *et al.*, 2005) เช่นเดียวกับ *Acinetobacter baumannii* ซึ่งเป็นแอโรบิคแบคทีเรียแกรมลบ สามารถพบได้ทั่วไปตามธรรมชาติในน้ำและดิน เชื้อ *A. baumannii* สามารถก่อให้เกิดโรคต่างๆ ได้อย่างมากมายทั้งการติดเชื้อในกระแสโลหิต ทางเดินปัสสาวะ และเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (Fulnecky *et al.*, 2005; Paul *et al.*, 2005) ปัจจุบันมีรายงานวิจัยการใช้สมุนไพรและยาต้านจุลินทรีย์ชนิดใหม่เพื่อใช้รักษาโรคซึ่งเกิดจากการติดเชื้อ *A. baumannii* และ MRSA มากมายเนื่องจาก ดื้อต่อยาปฏิชีวนะมากขึ้น (Nitzan *et al.*, 1999; Paul *et al.*, 2005; Tsuchiya *et al.*, 1996)

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรจันทน์แดง จันทน์เทศ และจันทน์ชะมดต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของ *A. baumannii* และ MRSA โดยวิธี Flow cytometry ซึ่งเทคนิคนี้สามารถใช้ศึกษาผลของสมุนไพรต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ เพราะ ethidium bromide ไปสอดแทรก (intercalate) เข้ากับ double-strand DNA แล้วทำให้เกิดการเรืองแสง จึงสามารถติดตามการผ่านเข้าออกของสมุนไพร ผ่านทางการตรวจจับปริมาณการเรืองแสงของ ethidium bromide ที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม

วิธีการทดลอง

การเลี้ยงแบคทีเรีย

แบคทีเรียดื้อยาที่นำมาทดสอบคือ *A. baumannii* และ MRSA แยกได้จากห้องปฏิบัติการภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงใน MHA นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง

การเตรียมสารสกัดสมุนไพร

ชั่งผงสมุนไพรจันทน์เทศ จันทน์แดง และจันทน์ชะมด จำนวน 500 กรัม ละลายลงใน methanol:H_2O (80:20) ปริมาณ 2000 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นกรองสมุนไพรด้วยผ้าขาวบางแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปกรองต่อด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 แล้วนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบลดความดัน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ได้สารสกัดหยาบ จากนั้นนำสารสกัดสมุนไพรทั้งสามชนิดมาชั่งและละลายใน dimethyl sulfoxide (DMSO) 100% ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นคือ 5 มก./มล. จากนั้นนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2.5 มก./มล. ตามลำดับ

วิธีการติดตามผลของสมุนไพรต่อการผ่านเข้าออกของ ethidium bromide ด้วย flow cytometry (Brehm & Johnson, 2003)

ทำการเลี้ยงเชื้อโดยการคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวๆ ของเชื้อ A. baumannii และ MRSA มาเพาะในอาหาร MHB (2.5 ml) แล้วนำเชื้อไปบ่มด้วยเครื่อง incubator shaker ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 19 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเชื้อมาปรับเทียบความขุ่นด้วยน้ำเกลือ โดยใช้ McFarland No. 05 (1.5 x 10^8 โคโลนี /มล.) เป็นตัวเทียบเพื่อความแม่นยำในการปรับเทียบความขุ่นแล้วจึงมาเจือจางด้วย Phosphate buffer pH 7.0 ให้เป็น 1 x 10^7 โคโลนี /มล. เพื่อการทดสอบโดยวิธี flow cytometry ต่อไป เตรียมหลอดที่เป็น positive control ให้ใส่เชื้อแบคทีเรียดื้อยา 1 x 10^7 โคโลนี /มล. แล้วไปบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 นาที เพื่อทำให้เซลล์เมมเบรนของแบคทีเรียเสื่อมสภาพ จากนั้นจึงเติม ethidium bromide 15 ไมโครลิตร ส่วนหลอดที่เป็น Negative control เติม DMSO 100% จำนวน 5 ไมโครลิตร ไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 นาที แล้วเติม ethidium bromide 15 ไมโครโมล ในหลอดที่มีเชื้อ *A. baumannii*

และ *S. aureus* ดื้อยาจำนวน 1 x 10^7 โคโลนี /มล. ส่วนการตรวจสอบผลของสมุนไพร 3 ชนิด คือ จันทน์แดง จันทน์เทศ และจันทน์ชะมดต่อการนำพา ethidium bromide ทำโดยเติมสมุนไพร ความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2.5, และ 5 มก./มล. ในเชื้อแบคทีเรีย 1 x 10^7 โคโลนี /มล. จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 40 นาที แล้วจึงเติม ethidium bromide จำนวน 15 ไมโครโมล แล้วจึงนำมาเจือจางด้วย phosphate buffer pH 7.0 เพื่อให้เป็น 1 x 10^6 โคโลนี /มล. วัดเปอร์เซ็นต์สัญญาณเรืองแสงของ ethidium bromide โดยนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี Flow cytometry ใช้เครื่องชนิด FC500 flow cytometer (Deckmancoulter, USA) ที่ใช้แหล่งกำเนิดแสงเป็นชนิดเลเซอร์ความยาวคลื่น 488 นาโนเมตร และตรวจจับเซลล์ที่ไหลเข้าเครื่องจำนวน 10,000 เซลล์ต่อหนึ่งครั้ง จากนั้นเข้าเครื่องตรวจวิเคราะห์สัญญาณเรืองแสงของ ethidium bromide โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์แล้วนำมาเขียนกราฟ histogram โดยมีการกำหนดพารามิเตอร์ให้แกน x แสดงความเข้มของสัญญาณแสงและแกน y แสดงจำนวนของเซลล์ จากนั้นทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นนำไปคำนวณค่าทางสถิติด้วย paired T test โดยโปรแกรม SPSS version 11 วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของสารสกัดจันทน์แดง จันทน์เทศ และจันทน์ชะมดกับเปอร์เซ็นต์การเรืองแสงของ ethidium bromide ในการนำพา ethidium bromide เข้าเซลล์ *A. baumannii* และ MRSA สายพันธุ์ดื้อยา

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

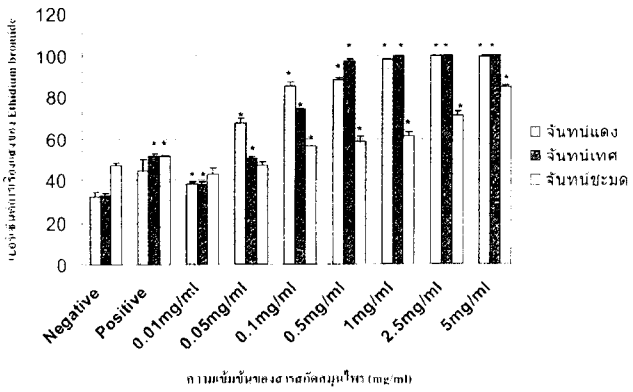
A. baumannii เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ที่มีผนังเซลล์บางกว่าแบคทีเรียแกรมบวก แต่จะมีส่วนประกอบทางเคมีและโครงสร้างซับซ้อนมากกว่าของแบคทีเรียแกรมบวก ประกอบด้วยเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก ซึ่งเป็นสารประกอบพวก phospholipid lipopolysaccharide และ lipoprotein และชั้นของ peptidoglycan (Jim, 2006) การศึกษานี้เป็นการศึกษาการเข้าของสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบสายพันธุ์ดื้อยา โดยทำการทดสอบขณะที่เซลล์ยังมีชีวิตอยู่ โดยติดตามการผ่านเข้าเซลล์ของ ethidium bromide ซึ่งเป็นสารเรืองแสง ผลของสารสกัดสมุนไพรที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการสะสมของ ethidium bromide ในเซลล์ของ *A. baumannii* แสดงเป็นเปอร์เซ็นต์การเรืองแสง ของ ethidium bromide ดังแสดงใน ภาพที่ 1 และ 2

ก

ข

ค

ภาพที่ 1 ผลของสารสกัดจันทน์แดง (รูป ก) จันทน์เทศ (รูป ข) และจันทน์ชะมด (รูป ค) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการผ่านเข้าเซลล์ของ *A. baumannii* สายพันธุ์ดื้อยา แสดงเป็นค่าเปอร์เซ็นต์การเรืองแสงของ ethidium bromide



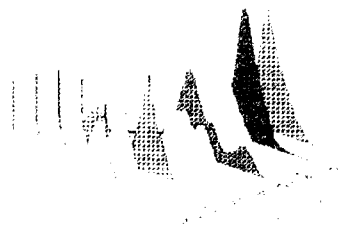
ภาพที่ 2 เปรียบเทียบผลของสารสกัดจันทน์แดงจันทน์เทศและจันทน์ชะมดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (แกน x) ต่อการผ่านเข้าเซลล์ของ ethidium bromide แสดงเป็นเปอร์เซ็นต์การเรืองแสง (แกน y) ของ *A. baumannii* สายพันธุ์ดื้อยา Negative คือ *A. baumannii* สายพันธุ์ดื้อยาที่เติม DMSO Positive คือ *A. baumannii* สายพันธุ์ดื้อยาที่นำไปบ่ม ที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 นาที

* คือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของเปอร์เซ็นการเรืองแสงของ ethidium bromide

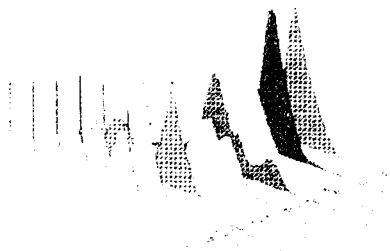
พบว่า เมื่อให้สารสกัดจันทน์แดง จันทน์เทศ และจันทน์ชะมดขนาด 0.01 มก./มล. ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การเรืองแสงของ ethidium bromide ที่สะสมในเซลล์ *A. baumannii* สายพันธุ์ดื้อยาคิดเป็น 38.17±1.17, 37.70±1.50 และ 47.07±1.70 ตามลำดับ และเมื่อให้สารสกัดจันทน์แดง จันทน์เทศ และจันทน์ชะมดปริมาณมากขึ้นคือ 0.05, 0.1, 0.5, 1 และ 2.5 มก./มล. ตามลำดับ พบว่าเปอร์เซ็นต์การเรืองของ ethidium bromide ในการเข้าเซลล์ *A. baumannii* สายพันธุ์ดื้อยา มีค่าเพิ่มขึ้นตามลำดับ และจันทน์แดง จันทน์เทศ และจันทน์ชะมดปริมาณขนาด 5 มก./มล. ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การเรืองแสงของ ethidium bromide มีค่าสูงสุดเท่ากับ 99.53±0.55, 100±0.00 และ 84.77±0.76 ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดจันทน์แดง จันทน์เทศ และจันทน์ชะมด มีผลทำให้ ethidium bromide ผ่านเข้าเซลล์เพิ่มมากขึ้น

นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาผลของสมุนไพรสามชนิดในการเพิ่มการผ่านเข้าของ ethidium bromide ในเซลล์ MRSA ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก โดยปกติผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกจะมีไขมันน้อยมากหรือเกือบจะไม่มีเลย แต่จะมีส่วนประกอบของ amino sugar ในโมเลกุลของ peptidoglycan เป็นจำนวนมาก (Jim, 2006) ทำให้คาดว่า การผ่านเข้าเซลล์ของ ethidium bromide ในแบคทีเรียแกรมบวกแตกต่างจากในแบคทีเรียแกรมลบ ในภาพที่ 3 และ 4 แสดงผลของสมุนไพรต่อการผ่านเข้าของ ethidium bromide ในเซลล์ MRSA พบว่าสารสกัดจันทน์แดง และจันทน์เทศ ขนาด 0.01 มก./มล. ให้เปอร์เซ็นต์การเรืองแสง ของ ethidium bromide คิดเป็น 54.83±2.14 และ 60.5±1.71 ตามลำดับ และเมื่อให้สารสกัดจันทน์แดง และจันทน์เทศขนาดความเข้มข้นสูงขึ้นคือ 0.05, 0.1, 0.5, 1 และ 2.5 มก./มล. ตามลำดับ พบว่าเปอร์เซ็นต์การเรืองของ ethidium bromide ของเซลล์ MRSA มีค่าเพิ่มขึ้นตามลำดับ และสารสกัดจันทน์แดง และจันทน์เทศ ขนาด 5 มก./มล. ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การเรืองแสงของ ethidium bromide สูงสุดคือ 99.67±0.06 และ 100 ตามลำดับผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของจันทน์แดงและจันทน์เทศ มีผลให้ ethidium bromide สามารถผ่านเข้าเซลล์ MRSA ได้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นเดียวกับผลการทดสอบ ในเซลล์ *A. baumannii* สายพันธุ์ดื้อยา

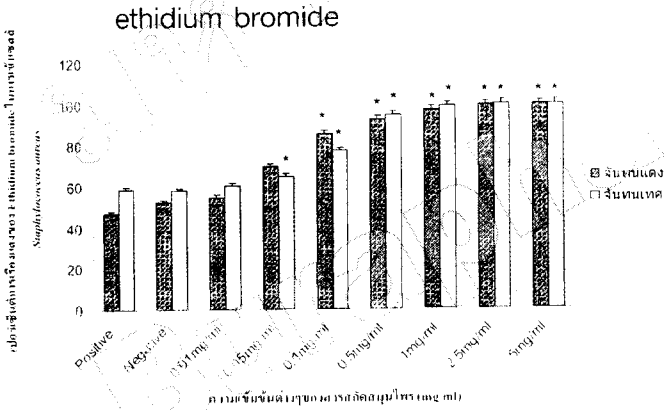
ก



ข



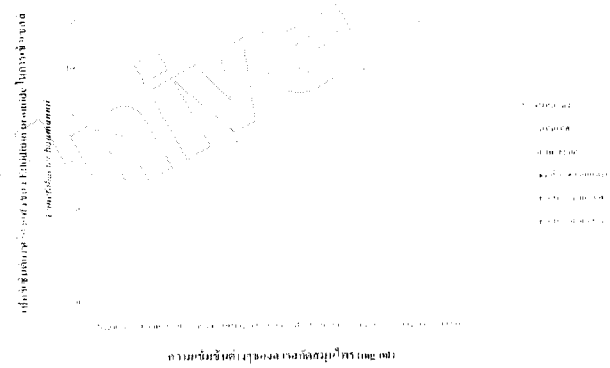
ภาพที่ 3 ผลของสารสกัดจันทน์แดง (รูป ก) และจันทน์เทศ (รูป ข) ที่ระดับ ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการผ่านเข้าเซลล์ของ MRSA สายพันธุ์ดื้อยา แสดงเป็นค่าเปอร์เซ็นต์การเรืองแสงของ ethidium bromide



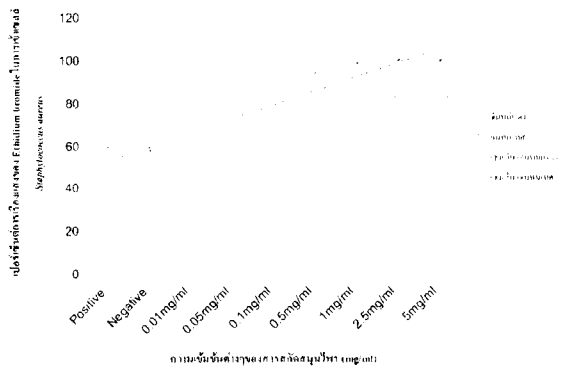
ภาพที่ 4 เปรียบเทียบผลของสารสกัดจันทน์แดงและจันทน์เทศ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (แกน x) ต่อการผ่านเข้าเซลล์ของ ethidium bromide แสดงเป็นเปอร์เซ็นต์การเรืองแสง (แกน y) ของ *S. aureus* สายพันธุ์ดื้อยา Negative คือ *S. aureus* สายพันธุ์ดื้อยาที่เติม DMSO Positive คือ *S. aureus* สายพันธุ์ดื้อยาที่นำไปบ่ม ที่ 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 นาที

* คือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของเปอร์เซ็นการเรืองแสงของ ethidium bromide

สามารถเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสมุนไพรแต่ละชนิดที่ส่งผลต่อการผ่านเข้าเซลล์ของ ethidium bromide ได้จากค่าความชันกราฟเส้นตรงในภาพที่ 5 แสดงการเปรียบเทียบ ประสิทธิภาพของสมุนไพรสามชนิดในเซลล์ของ *A. baumannii* สายพันธุ์ดื้อยา พบว่าจันทน์แดง จันทน์เทศ และจันทน์ชะมด มีค่าความชันของกราฟ 9.3202, 9.7450 และ 4.2961 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจันทน์เทศมีประสิทธิภาพดีที่สุดรองลงมาคือจันทน์แดงและจันทน์ชะมด ตามลำดับ เช่นเดียว กับกราฟความชันของ MRSA ในภาพที่ 6 พบว่าจันทน์เทศ มีประสิทธิภาพดีกว่าจันทน์แดงในการที่ส่งผลให้ ethidium bromide ผ่านเข้าเซลล์แบคทีเรีย (ค่าความชันของจันทน์เทศ และจันทน์แดง คือ 7.627 และ 6.608 ตามลำดับ ส่วนของจันทน์ชะมดไม่ได้ทำการทดสอบ)



ภาพที่ 5 ความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างสารสกัดจันทน์แดง จันทน์เทศ และจันทน์ชะมดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (แกน x) กับเปอร์เซ็นต์การเรืองแสงของ ethidium bromide (แกน y) ในการผ่านเข้าเซลล์ *A. baumannii* สายพันธุ์ดื้อยา ค่าความชันมากแสดงถึงประสิทธิของการนำ ethidium bromide เข้าสู่เซลล์



ภาพที่ 6 ความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างสารสกัดจันทน์แดงและจันทน์เทศที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (แกน x) กับเปอร์เซ็นต์การเรืองแสงของ ethidium bromide (แกน y) ในการผ่านเข้าเซลล์ *S. aureus* สายพันธุ์ดื้อยา ค่าความชันมากแสดงถึงประสิทธิของการนำ ethidium bromide เข้าสู่เซลล์

การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าจันทน์แดง จันทน์เทศ และจันทน์ชะมดมีฤทธิ์ในการส่งเสริม ethidium bromide ผ่านเข้าเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ดื้อยาได้ดีขึ้นทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ จึงอาจมีความเป็นไปได้ที่จะนำสมุนไพรมาใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะเพื่อช่วยให้ยาปฏิชีวนะผ่านเข้าเซลล์ได้ดีขึ้นทั้งนี้เพื่อแก้ปัญหาโรคติดเชื้อที่เกิดจากแบคทีเรียดื้อยา การทดลองนี้ได้ช่วยอธิบายกลไกการทำงานของสมุนไพรคือ สมุนไพรอาจเข้าไปทำลายหรือรบกวนการทำงานบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียทำให้ไม่สามารถทำงานได้อย่างปกติ หรือไปช่วยส่งเสริมสารอื่นให้เข้าเซลล์แบคทีเรียได้ดียิ่งขึ้น หรือทำให้แบคทีเรียเสียสมดุลย์ของการนำสารเข้าออกจากเยื่อหุ้มเซลล์ และการที่เยื่อหุ้มเซลล์สูญเสียสภาพการทำงานนี้เองจะทำให้ของเหลวที่อยู่ภายในเยื่อหุ้มเซลล์ไหลออกสู่ภายนอกทำให้เซลล์แบคทีเรียตายได้ (Brehm & Johnson, 2003) รายงานที่ผ่านมามีการศึกษาฤทธิ์ของสารกลุ่ม sesquiterpenoids คือ nerolidol, farnesol bisabolol และ apritone ในการยับยั้ง *S. aureus* และ *Escherichia coli* โดยวิธี Flow cytometry พบว่าการใช้ nerolidol, bisabolol หรือ apritone ที่ความเข้มข้นต่ำ (0.5-2 มิลลิโมล) ช่วยส่งเสริมการผ่านของ ethidium bromide เข้าเซลล์แบคทีเรียและการใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะ ciprofloxacin, clindamycin, erythromycin, gentamicin tetracycline และ vancomysin สามารถยับยั้ง *S. aureus* และการใช้ nerolidol และ farnesol ร่วมกับยาปฏิชีวนะ polymyxin B สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* นอกจากนี้รายงานของ Nuding *et al.* (2006) ได้พิสูจน์กลไกการทำงานของ defensins ซึ่งเป็นยาต้านจุลินทรีย์ชนิดใหม่ด้วยวิธี Flow cytometry ซึ่ง defensins สามารถเข้าไปยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยผ่านทางเยื่อหุ้มเซลล์เมื่อ ใช้ $DiBAC_4$ ติดตามดูการเข้าออกของ defensins ผ่านเซลล์จุลินทรีย์ โดยดูจากเปอร์เซ็นต์การเรืองแสงของแบคทีเรีย พบว่า defensins สามารถยับยั้งการทำงานของแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดยให้ค่าเป็นเปอร์เซ็นต์การเรืองแสงเท่ากับ 17.0 - 97.2 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เชื่อว่าสารสกัดสมุนไพรสามารถยังยั้งการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียและยูคาริโอตชนิดอื่น เช่น การนำวิธี Flow cytometry ไปศึกษาหาผลของสมุนไพร ต่อโปรโตซัว *Leishmania* spp. โดยใช้ $DiBAC_4$ เป็นตัวติดตามดูการเข้าออกของ yuccasaponin MC 3 พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มล. มีเปอร์เซ็นต์การเรืองแสงของ $DiBAC_4$ เข้าเซลล์สูงสุดคือ 96.9% (Plock *et al.*, 2001)

ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของจันทน์แดง จันทน์เทศ และจันทน์ชะมดต่อเซลล์แบคทีเรียควบคู่กับยาปฏิชีวนะต่างๆ เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียดื้อยาด้วยกลไกแบบต่างๆ นอกจากนี้ควรทำการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารประกอบชนิดต่างๆ ในจันทน์แดง จันทน์เทศ และจันทน์ชะมดต่อเซลล์แบคทีเรียในระดับลึกต่อไป เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์และการเปลี่ยนแปลงของออร์กาแนลภายในเซลล์แบคทีเรียชนิดอื่นๆ และ

ทางไบโอฟิสิกส์ ในอนาคตอาจจะใช้สารสกัดจากสมุนไพรซึ่งเป็นสารที่ได้จากธรรมชาติและมีผลข้างเคียงต่อร่างกายมนุษย์น้อยมากมาช่วยรักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียดื้อยา เพื่อลดปัญหาของการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างพร่ำเพื่อและขาดการควบคุม นำมาซึ่งปัญหาการดื้อยาต่อไป

สรุปผลการทดลอง

จากการตรวจวิเคราะห์เซลล์แบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบดื้อยาขณะที่มีชีวิตด้วยวิธี Flow cytometry พบว่าสารสกัดจันทน์แดง จันทน์เทศ และจันทน์ชะมดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆมีฤทธิ์ทำให้ethidium bromideผ่านเข้าเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ดื้อยาได้ดีขึ้นที่ระดับความเข้มข้นต่ำที่สุดของจันทน์แดง จันทน์เทศ และจันทน์ชะมด ที่มีผลต่อ *A. baumannii* ดื้อยา คือมากกว่าหรือเท่ากับ 0.01, 0.01 และ 0.1 มก./มล. ตามลำดับ และจันทน์แดง และจันทน์เทศมีผลต่อ MRSA ที่ค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดในการเข้าเซลล์แบคทีเรีย คือ 0.05 มก./มล. เท่ากัน ตามลำดับ

กิตติกรรมประกาศ

ผู้ดำเนินการวิจัยขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรียที่นำมาศึกษา ขอขอบคุณ ผ.ศ. ดร. วารี เนื่องจำนงค์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่อง rotary evaporator ขอขอบคุณสภาวิจัยแห่งชาติ ที่ให้ทุนอุดหนุนการทำวิจัยประจำปีงบประมาณ 2549 โดยงานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งในโครงการวิจัยเรื่องการศึกษาคุณสมบัติการต้านจุลินทรีย์ดื้อยาและการต้านมะเร็งของสารสกัดจากสมุนไพรไทยบางชนิด

เอกสารอ้างอิง

สุรางค์ นุชประยูร, จินตนา จิรถาวร และณัฏฐิยา หิรัญกาญจน์. (2546). *เวชศาสตร์โมเลกุล*. กรุงเทพฯ: เท็กแอนด์เจอร์นัล.

Brehm, S.B.F., & Johnson, E.A. (2003). Sensitization of Staphylococcus aureus and Escherichia coli to Antibiotics by the Sesquiterpenoids Nerolidol, Farnesol, Bisabolol and Apritone. *Antimicrobial Agents and Chemothera. 47*(10). 3357-3360.

Chung, J.Y., Choo, J.H., Lee, M.H., & Wang, K. (2006). Anticariogenic activity of macelignan isolated from Myristica fragrans (nutmeg) against Streptococcus mutans. *Phytomedicine. 13*(4). 261-266.

Fukai, T., Kiyoshi, K., & Terada, S. (2005). Antimicrobial activity of 2-arylbenzofurans from Morus species against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Fitoterapia. 76*. 708-711.

Fulnecky, E.J., Wright, D., Scheld, W.M., Kanawati, L., & Shoham, S. (2005). Amikacin and colistin for treatment of *Acinetobacter baumannii* meningitis. *Journal of Infection. 51*. 249-251.

Gebhardt, R. (2003). Antioxidative, antiproliferative and biochemical effects in HepG2 cells of a homeopathic remedy and its constituent plant tinctures tested separately or in combination. *Arzneimittel-Forschung. 53*(12). 823-830.

Jim, S., (2006). *Cell Model Bacterial cell structure*. Retrieved Febuary 15, 2007, from http://www.cellsalive.com/cells/bactcell.

Jorio, H., Tran, R., Meghrous, J., Bourget, L., & Kamen, A. (2005). Analysis of baculovirus aggregates using flow cytometry. *Journal of Virological Methods, 134*, 8-14.

Likhitwitayawuid, K., Sawasdee, K., & Kirtikara, K. (2002). Flavonoids and stilbenoids with COX-1 and COX-2 inhibitory activity from *Dracaena loureiri*. *Planta medica, 68*(9), 841-843.

Mutoh, T., Adachi, O., Tsuji, K., Okunaka, M., & Sakagami, M. (2007). Efficacy of mastoidectomy on MRSA-infected chronic otitis media with tympanic membrane perforation. *Auris, nasus, larynx, 34*(1), 9-13.

Narasimhan, B., & Dhake, A.S. (2006). Antibacterial principles from *Myristica fragrans* seeds. *Journal of medicinal food, 9*(3), 395-399.

Nikaido, H. (1994). Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science, 264*, 382-388.

Nitzan, Y., Pechatnikov, L., Bar-El, D., & Wexler, H. (1999). Isolation and Characterization of Heat-Modifiable Proteins From the outer membrane of *Porphyromonas Asaccharolytica* and *Acinetobacter baumannii*. *Anaerobe, 5*, 43-50.

Nuding, S., Fellermann, K., Wehkamp, J., Mueller, H.A.C., & Starge, F.F. (2006). A flow cytometric assay to monitor antimicrobial activity of defensins and cationic tissue extracts. *Journal of Microbiological Methods, 65*, 335-345.

Paul, M., Weinberger, M., Siegman-Igra, Y., Lazarovitch, T., Ostfeld, I., Boldur, I., Samra, Z., Shula, H., Carmeli, Y., Rubinovitch, B., & Pitlik, S. (2005). *Acinetobacter baumannii*: emergence and spread in Israeli hospital 1997-2002. *Journal of Hospital Infection, 60*, 256-260.

Pietta, P.G. (2000). Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products, 63*, 1035-1042.

Plock, A., Kohler, W. S., & Presber, W. (2001). Application of flow cytometry and microscopical methods to characterize the effect of herbal drugs on *Leishmania* spp. *Experimental Parasitology, 97*, 141-153.

Tiew, P., Ioset, J.R., Kokpol, U., Chavasiri, W., & Hostettmann, K. (2003). Antifungal, antioxidant and larvicidal activities of compounds isolated from the heartwood of *Mansonia gagei*. *Phytotherapy research, 17*(2), 190-193.

Gebhardt, R. (2003). Antifungal, antioxidant and larvicidal activities of compounds isolated from the heartwood of *Mansonia gagei*. *Phytotherapy research, 17*(2), 190-193.

Tiew, P., Puntumchai, A., Kokpol, U., & Chavasiri, W. (2002). Coumarins from heartwoods of *Mansonia gagei Drumm*. *Phytochemistry, 60*, 773-776.

Tiew, P., Takayama, H., Kitajima, M., Aimi, N., Kokpol, U., & Chavisiri, W. (2003). A novel neolignan, mansoxetane, and two new sesquiterpenoids, mansonones R and S, from *Mansonia gagei*. *Tetrahedron Letters, 44*, 6759-6761.

Tsuchiya, H., Sato, M., Miyazaki, T., Fujiwara, S., Tanigaki, S., Ohyama, M., Tanaka, T., & Linuma, M. (1996). Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology, 50*, 27-34.

Walsh, C. (2000). Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature, 406*, 775-781.

Wright, G.D., & Sutherland, A.D. (2007). New strategies for combating multidrug-resistant bacteria. *Trends in Molecular Medicine*, *13*(6), 260-267.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University