



โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การทดสอบการเป็นยาปฏิชีวนะของสารสังเคราะห์ควิโนโลน
Antibacterial Activities of Synthetic Alkyl Quinolones

ชื่อบิสิต นางสาวคณิตตา มานาดี รหัสประจำตัวบิสิต 5932304323

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อโครงการ

การทดสอบการเป็นยาปฏิชีวนะของสารสังเคราะห์ควิโนโลน

โดย

นางสาวคณิตดา มานาดี เลขประจำตัวนิต 5932304323

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

อาจารย์ ดร. สริสา ณ ป้อมเพ็ชร

ปีการศึกษา

2562

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับโครงการฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงการวิทยาศาสตร์

..... หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

คณะกรรมการสอบโครงการ

..... อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ
(อาจารย์ ดร. สริสา ณ ป้อมเพ็ชร)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. อรุทัย ภิญญาคง)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล สื่อพร้อมชัย)

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ

การทดสอบการเป็นยาปฏิชีวนะของสารสังเคราะห์ควิโนโลน
Antibacterial Activities of Synthetic Alkyl Quinolones

อาจารย์ที่ปรึกษาในโครงการ

อาจารย์ ดร.สรินา ณ ป้อมเพ็ชร

นิสิตในโครงการ

นางสาวคณิตตา มานาดี เลขประจำตัวนิสิต 5932304323

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2562

ชื่อโครงการ: การทดสอบการเป็นยาปฏิชีวนะของสารสังเคราะห์ควิโนโลน
นิสิตในโครงการ: นางสาวคณิตตา มานาดี
เลขประจำตัวนิสิต 5932304323
อาจารย์ที่ปรึกษา: อาจารย์ ดร.สรริสา ณ ป้อมเพ็ชร
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2562

บทคัดย่อ

ตั้งแต่ปีคริสต์ศักราช 1960 มีการพัฒนาตัวยาปฏิชีวนะประเภทควิโนโลนอย่างกว้างขวาง ไม่ว่าจะเป็ยยาปฏิชีวนะควิโนโลนรุ่นแรก ได้แก่ nalidixic acid และ oxolinic acid ยาปฏิชีวนะฟลูออโรควิโนโลนยุคก่อน เช่น norfloxacin หรือจะเป็นยาปฏิชีวนะฟลูออโรควิโนโลนสมัยใหม่ ได้แก่ ciprofloxacin และ moxifloxacin ในงานวิจัยนี้ได้ทำการทดสอบความสามารถในการเป็นยาปฏิชีวนะของสารสังเคราะห์ควิโนโลนทั้งหมด 12 สาร ที่ได้รับมาจากภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยใช้วิธี resazurin microdilution assay ในการหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (Minimum Inhibition Concentration; MIC) และนำผลจาก MIC ไป Streak ลงบนอาหารแข็งที่ไม่มียาปฏิชีวนะเพื่อดูความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ทำให้แบคทีเรียตาย (Minimum Bactericidal Concentration; MBC) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสาร KKAJ-A35 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Escherichia coli* (ATCC 25922) ได้ ณ ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรแต่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารแข็งที่ไม่มียาปฏิชีวนะได้ เชื้อ *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P) ถูกยับยั้งด้วยสาร KKAJ-A51 และ KKAJ-A52 ณ ความเข้มข้นปานกลางที่ 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและในความเข้มข้นนี้ *S. aureus* สามารถเจริญเติบโตบนอาหารแข็งที่ไม่มียาปฏิชีวนะได้หลังจากให้สารทั้งสอง แต่ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นไปไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *S. aureus* ได้ ผลการทดสอบสุดท้ายแสดงให้เห็นว่าสารทั้งหมดไม่มีผลยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)

คำสำคัญ: อัลคิลควิโนโลน, ยาปฏิชีวนะ, ควิโนโลน, ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย, วิธี resazurin microdilution assay

Project title: Antibacterial Activities of Synthetic Alkyl Quinolones

Investigator: Miss Kanitta Manadee

Student ID 5932304323

Advisor: Sarisa Na Pompejra, Ph.D.

Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University Academic Year 2019

Abstract

Since 1960s, antibiotics of quinolone class have been developed and widely used such as first generation quinolones (nalidixic acid and oxolinic acid), early fluoroquinolones (norfloxacin) and modern fluoroquinolones such as ciprofloxacin and moxifloxacin. In this study, we tested antibacterial activity of 12 newly developed alkyl quinolone compounds received from Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University. Resazurin microdilution assay was used to determine Minimum Inhibition Concentration (MIC) that is defined as the lowest inhibitory concentration of an alkyl quinolone solution. The samples from MIC results were streaked on drug-free nutrient agar to determine Minimum Bactericidal Concentration (MBC), which is the lowest concentration of antibacterial agents required to kill bacteria. The result showed that KKAJ-A35 could inhibit the growth of *Escherichia coli* (ATCC 25922) at concentration 1000 µg/ml but failed to kill bacteria. *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P) was inhibited by KKAJ-A51 and KKAJ-A52 at medium concentration (125, 250 and 500 µg/ml) and again at this concentration, *S. aureus* could grow on drug-free agar after the treatment of both alkyl quinolone, KKAJ-A51 and KKAJ-A52, suggesting bacteriostatic effect rather than bactericidal activity. Interestingly, at high concentration of the compounds, the inhibition was ineffective. The last test showed that all of synthetic alkyl quinolone compounds did not display antibacterial activity against *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

Keywords: alkyl quinolone, antibiotic, quinolone, antibacterial activities, resazurin microdilution assay

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยความอนุเคราะห์จาก อาจารย์ ดร.สรริสา ณ ป้อมเพ็ชร อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ซึ่งท่านได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการทำวิจัย อีกทั้งยังช่วยแก้ปัญหาต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างการดำเนินงาน ทางผู้จัดทำโครงการขอกราบขอบพระคุณด้วยความเคารพอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่ได้ถ่ายทอดความรู้อันเป็นประโยชน์สำหรับการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.ธนธรณ์ ขอทวีวัฒนา อาจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และพี่ ๆ ในห้องปฏิบัติการของอาจารย์ ที่คอยให้ความช่วยเหลือในการเตรียมสารต่าง ๆ และคอยให้คำปรึกษาในการทำงานวิจัยครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่คอยช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกแก่ผู้วิจัยในการดำเนินงาน รวมถึงให้การสนับสนุนด้านเครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณทุนโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ จากงบประมาณภาควิชาจุลชีววิทยา ขอขอบคุณเพื่อนร่วมห้องปฏิบัติการ 1804/13 นางสาวเมษศิริรินทร์ คนแรง และ นายฉัตรวรเชษฐ์ แซ่โกว ที่คอยช่วยเหลือ คอยรับฟัง ช่วยกันดูแลห้องปฏิบัติการ คอยให้กำลังใจและพยายามไปด้วยกัน

ขอขอบคุณกลุ่ม We bare bear feat. Nom Nom เพื่อน ๆ รุ่นที่ 43 รวมถึง พี่ ๆ น้อง ๆ ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกคนที่คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจ จนผู้วิจัยดำเนินงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ญาติพี่น้อง ที่ให้การสนับสนุน ช่วยเหลือและให้กำลังใจเสมอมาจนผู้วิจัยสามารถทำโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

คณิตตา มานาคี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
Abstract	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตารางและกราฟ	จ
สารบัญรูปภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
- แบคทีเรีย (Bacteria)	1
- ยาปฏิชีวนะกับแบคทีเรีย	3
- ยาปฏิชีวนะควิโนโลนและกลไก	4
- สารสังเคราะห์อัลคิลควิโนโลน 12 สารจากภาควิชาเคมี วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	8
- Resazurin microdilution assay	10
บทที่ 2 เครื่องมือ วัสดุ เคมีภัณฑ์	11
บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง	15
บทที่ 4 ผลการทดลอง	18
บทที่ 5 สรุปและวิเคราะห์ผลการทดลอง	28
เอกสารอ้างอิง	30
ภาคผนวก	33
ภาคผนวก ก	34
ภาคผนวก ข	36
ภาคผนวก ค	38

สารบัญตารางและกราฟ

	หน้า
ตารางที่ 1.1 ตารางแสดงโครงสร้างและน้ำหนักโมเลกุล (กรัม/โมเลกุล) ของสารทั้งหมด 12 สาร	8
กราฟที่ 4.1 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซลล์ <i>E. coli</i> (ATCC 25922) ในหนึ่งมิลลิลิตรและค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร	18
กราฟที่ 4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซลล์ <i>S. aureus</i> (ATCC 6538P) ในหนึ่งมิลลิลิตรและค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร	19
กราฟที่ 4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซลล์ <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853) ในหนึ่งมิลลิลิตรและค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร	19

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1.1 รูปแสดงโครงสร้างของแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive)	2
รูปที่ 1.2 รูปแสดงโครงสร้างของแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative)	2
รูปที่ 1.3 รูปการแพร่กระจายของแบคทีเรียที่ติดต่อยาปฏิชีวนะ	3
รูปที่ 1.4 รายงานถึงการตัดแต่งในแต่ละตำแหน่งนั้นมีผลต่อแบคทีเรียแกรมบวกและลบแตกต่างกัน	4
รูปที่ 1.5 รูปตำแหน่งที่ควิโนโลนเข้ายับยั้งหรือทำให้เอนไซม์โทโปไอโซเมอเรส II (topoisomerase II) เป็นพิษ	5
รูปที่ 1.6 แสดงโครงสร้างของยาปฏิชีวนะควิโนโลนรุ่นแรก (first generation quinolone)	5
รูปที่ 1.7 แสดงโครงสร้างของยาปฏิชีวนะฟลูออโรควิโนโลนสมัยใหม่ (modern fluoroquinolone)	6
รูปที่ 1.8 แสดงโครงสร้างของยาปฏิชีวนะฟลูออโรควิโนโลนยุคแรก (early fluoroquinolone);	6
รูปที่ 1.9 แสดงกลไกการฆ่าแบคทีเรียของยาปฏิชีวนะควิโนโลน	7
รูปที่ 1.10 แสดงการเปลี่ยนแปลงของสาร resazurin เมื่อเกิดปฏิกิริยารีดักชัน (reduction)	10
รูปที่ 4.1 ชุดควบคุมในการทดสอบร่วมกับ <i>E. coli</i> (ATCC 25922)	20
รูปที่ 4.3 แสดงผลการทดสอบสาร KKAJ-A25-P4, KKAJ-A29-P1, KKAJ-A31-P1 และ KKAJ-A35 กับ <i>E. coli</i> (ATCC 25922)	21
รูปที่ 4.4 แสดงผลการทดสอบสาร KKAJ-A36, KKAJ-A50, KKAJ-A51 และ KKAJ-A52 กับ <i>E. coli</i> (ATCC 25922)	21
รูปที่ 4.5 แสดงผลการทดสอบความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ทำให้แบคทีเรียตาย (MBC) กับ <i>E. coli</i> (ATCC 25922)	22
รูปที่ 4.6 ชุดควบคุมในการทดสอบร่วมกับ <i>S. aureus</i> (ATCC 6538P)	23
รูปที่ 4.7 แสดงผลการทดสอบสาร KKAJ-A16, KKAJ-A15, KKAJ-A24-P1 และ KKAJ-A25-P3 กับ <i>S. aureus</i> (ATCC 6538P)	23
รูปที่ 4.8 แสดงผลการทดสอบสาร KKAJ-A25-P4, KKAJ-A29-P1, KKAJ-A31-P1 และ KKAJ-A35 กับ <i>S. aureus</i> (ATCC 6538P)	24
รูปที่ 4.9 แสดงผลการทดสอบสาร KKAJ-A36, KKAJ-A50, KKAJ-A51 และ KKAJ-A52 กับ <i>S. aureus</i> (ATCC 6538P)	24

รูปที่ 4.10 แสดงผลการทดสอบความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ทำให้แบคทีเรียตาย (MBC) กับ <i>S. aureus</i> (ATCC 6538P) หลังจากให้ด้วยสาร KKAJ-A51 ความเข้มข้น 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	25
รูปที่ 4.11 แสดงผลการทดสอบความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ทำให้แบคทีเรียตาย (MBC) กับ <i>S. aureus</i> (ATCC 6538P) หลังจากให้ด้วยสาร KKAJ-A52 ความเข้มข้น 125, 250, 500 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	25
รูปที่ 4.12 ชุดควบคุมในการทดสอบร่วมกับ <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	26
รูปที่ 4.13 แสดงผลการทดสอบสาร KKAJ-A16, KKAJ-A15, KKAJ-A24-P1 และ KKAJ-A25-P3 กับ <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	26
รูปที่ 4.14 แสดงผลการทดสอบสาร KKAJ-A25-P4, KKAJ-A29-P1, KKAJ-A31-P1 และ KKAJ-A35 กับ <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	27
รูปที่ 4.15 แสดงผลการทดสอบสาร KKAJ-A36, KKAJ-A50, KKAJ-A51 และ KKAJ-A52 กับ <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	27

บทที่ 1

บทนำ

1. แบคทีเรีย (Bacteria)

1.1 สัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย

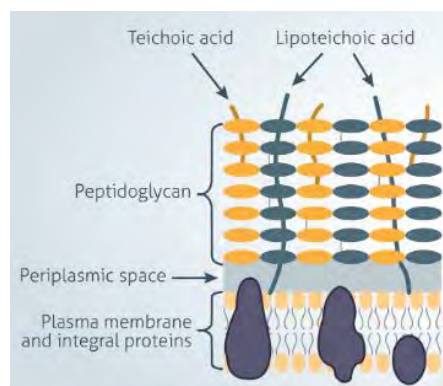
แบคทีเรียเป็นเซลล์โพรคาริโอต (prokaryote cell) อยู่ในอาณาจักรยูแบคทีเรีย (eubacteria) มีลักษณะที่เล็กมากโดยเฉลี่ยแล้วแบคทีเรียมีขนาด 0.2-10 ไมโครเมตร แบคทีเรียส่วนมากจะมีขนาดความยาวน้อยกว่า 5 ไมโครเมตรแต่หากมีลักษณะเซลล์ที่เป็นเกลียวจะมีขนาดได้ถึง 100 ไมโครเมตร สิ่งที่สำคัญสิ่งหนึ่งของเซลล์โพรคาริโอต (prokaryote cell) คือมีอัตราส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตรในปริมาณที่สูงกว่าสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ผิวของเซลล์จะสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมโดยตรง มีเมแทบอลิซึม (metabolism) ภายในเซลล์ ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียสและเยื่อหุ้มออกแกเนล

แบคทีเรีย (bacteria) นั้นมาจากภาษากรีก (Greek) ที่เรียกว่าแบคทีรียอน (bakterion) ที่แปลว่าแท่งขนาดเล็ก แต่ในความจริงแล้วแบคทีเรียมีรูปร่างที่หลากหลาย โดยลักษณะพื้นฐานมี 3 ลักษณะ ได้แก่ รูปร่างกลม (cocci) แท่ง (bacilli) และเกลียว (spiral) (Heritage, J. et al., 1996)

1.2 โครงสร้างของแบคทีเรีย

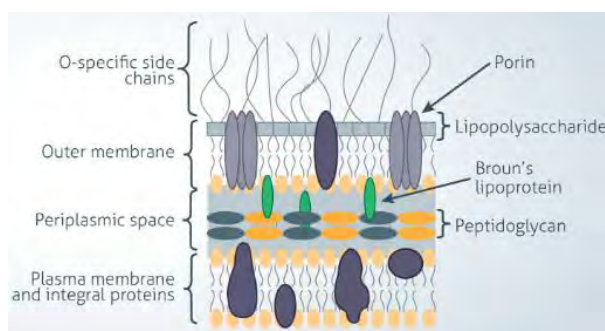
เซลล์แบคทีเรียนั้นสามารถอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรืออยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่น ด้วยโครงสร้างที่ธรรมดาทำให้สามารถปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ได้เป็นอย่างดีและเหมาะสมต่อการดำรงชีวิตอยู่ในสภาพแวดล้อมนั้น ๆ ผนังเซลล์ของแบคทีเรียนั้นมีเพื่อปกป้องเซลล์จากสิ่งแวดล้อมภายนอก โดยอาณาจักรยูแบคทีเรียนั้นสามารถจำแนกแบคทีเรียออกได้ 2 แบบ แยกได้โดยใช้วิธีการย้อมสีแกรม (gram staining) (Heritage, J. et al., 1996) ได้แก่

-กลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก (gram positive) มีองค์ประกอบส่วนใหญ่ของผนังเซลล์คือเปปทิโดไกลแคน (peptidoglycan) ดังแสดงในรูปที่ 1.1 และกรดไทโคอิก (teichoic acid) แทรกผ่านชั้นเปปทิโดไกลแคนและเชื่อมติดเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยพันธะโควาเลนต์ อีกทั้งกรดไทโคอิกเป็นแอนติเจน (antigen) ของแบคทีเรียแกรมบวก ตัวอย่างของแบคทีเรียในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* sp., *Micrococcus luteus* และ *Bacillus* sp. เป็นต้น



รูปที่ 1.1 รูปแสดงโครงสร้างของแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive)
(Immunology & microbiology from technical network, 2019)

-กลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative) โครงสร้างนั้นซับซ้อนกว่าแกรมบวก โดยผนังเซลล์ชั้นในเป็นชั้นเปปทิโดไกลแคนบาง ๆ ดังแสดงในรูปที่ 1.2 และมีเยื่อหุ้มชั้นนอก (outer membrane) เป็นชั้นไขมัน ประกอบด้วย ฟอสโฟลิพิด (phospholipids) ลิโปโพลิแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide) และลิโปโปรตีน (lipoprotein) ตัวอย่างของแบคทีเรียกลุ่มนี้ เช่น *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, *Enterobacter sp.* และ *Pseudomonas aeruginosa* เป็นต้น



รูปที่ 1.2 รูปแสดงโครงสร้างของแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative)
(Immunology & microbiology from technical network, 2019)

แบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กและไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า สามารถอาศัยอยู่ตามแหล่งต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็นในน้ำ ดิน อากาศ เป็นต้น มีทั้งก่อโรคแก่มนุษย์และไม่ก่อโรคต่อมนุษย์ จุลินทรีย์ก่อโรค (pathogens) คือสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรีย เชื้อรา ปรสิทหรือไวรัส ซึ่งสามารถก่อให้เกิดโรคหรืออาจจะทำให้เกิดการเจ็บป่วยต่อเจ้าบ้าน (host) (NIH, 2006) ดังนั้นจึงมีการคิดค้นสารบางอย่างเพื่อทำลายจุลินทรีย์โดยที่ไม่ทำให้เจ้าบ้านโดนผลกระทบหรือเกิดผลกระทบต่อเจ้าบ้านน้อยที่สุด สิ่งที่ใช้ทำลายเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคนั้นเราเรียกว่ายาปฏิชีวนะ (antibiotics)

2. ยาปฏิชีวนะกับแบคทีเรีย

ในปี ค.ศ. 1910 Paul Ehrlich ค้นพบยาชื่อว่า Salvarsan ซึ่งสามารถใช้รักษา โรคซิฟิลิส (Syphilis) เป็นโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดหนึ่งได้ ในปี ค.ศ. 1928 มีการค้นพบ เพนนิซิลลิน (Penicillin) ซึ่งถูกผลิตจากเชื้อรา *Penicillium notatum* ค้นพบโดย Alexander Fleming พบว่ายาเพนนิซิลลินสามารถรักษาการติดเชื้อจากแบคทีเรียได้หลากหลายชนิด และในปัจจุบันนี้ก็ยังมีการพัฒนา ยาปฏิชีวนะอย่างต่อเนื่องเพื่อให้เหมาะสมต่อการทำลายแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ (Kerr, J. R., 2005) แต่ในหลายปีมานี้พบว่ามีแบคทีเรียที่สามารถทนต่อยาปฏิชีวนะและสามารถอยู่รอดต่อไปได้หรือที่เรียกกันว่า การดื้อยาปฏิชีวนะ

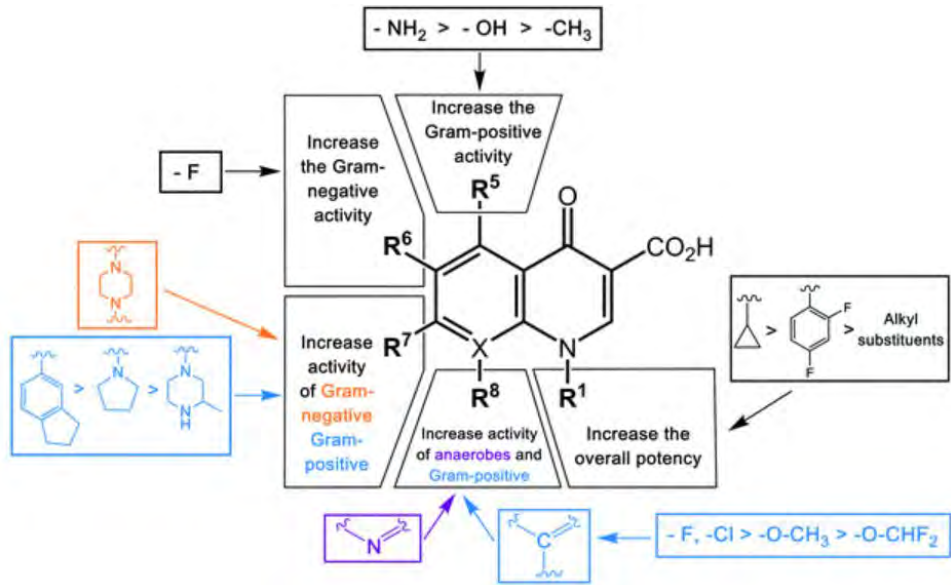
การดื้อยาปฏิชีวนะ (Antibiotics resistance) นั้นเกิดขึ้นเมื่อแบคทีเรียนั้นสามารถปรับตัวและเปลี่ยนแปลงตอบสนองให้ทนต่อยาปฏิชีวนะ ทำให้ยาปฏิชีวนะนั้นไม่สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียนั้นได้ แบคทีเรียที่ดื้อยานั้นสามารถที่จะอยู่รอด เจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนได้เป็นจำนวนมากและยังสามารถกระจายสู่ห่วงโซ่อาหารหรือสิ่งแวดล้อมได้อีกด้วย ดังที่แสดงในรูปที่ 1.3 จากเหตุนี้เองทำให้ปัญหานี้เป็นปัญหาสำคัญต่อหน่วยงานสาธารณสุขทั่วโลกเพราะก่อให้เกิดปัญหาต่าง ๆ ตามมาอย่างมากมาย ไม่ว่าจะเป็น การรักษาที่ต้องใช้เวลานานขึ้น ราคาค่าใช้จ่ายในการรักษาที่เพิ่มสูงขึ้น ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีการศึกษา ค้นคว้า วิจัย ในการพัฒนาหายาปฏิชีวนะชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพที่ดีกว่าเดิม เพื่อต่อต้านกับเชื้อแบคทีเรียดื้อยาเหล่านี้ (World Health Organization, 2018)



รูปที่ 1.3 รูปการแพร่กระจายของแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (World Health Organization, 2018)

3. ยาปฏิชีวนะควิโนโลนและกลไก

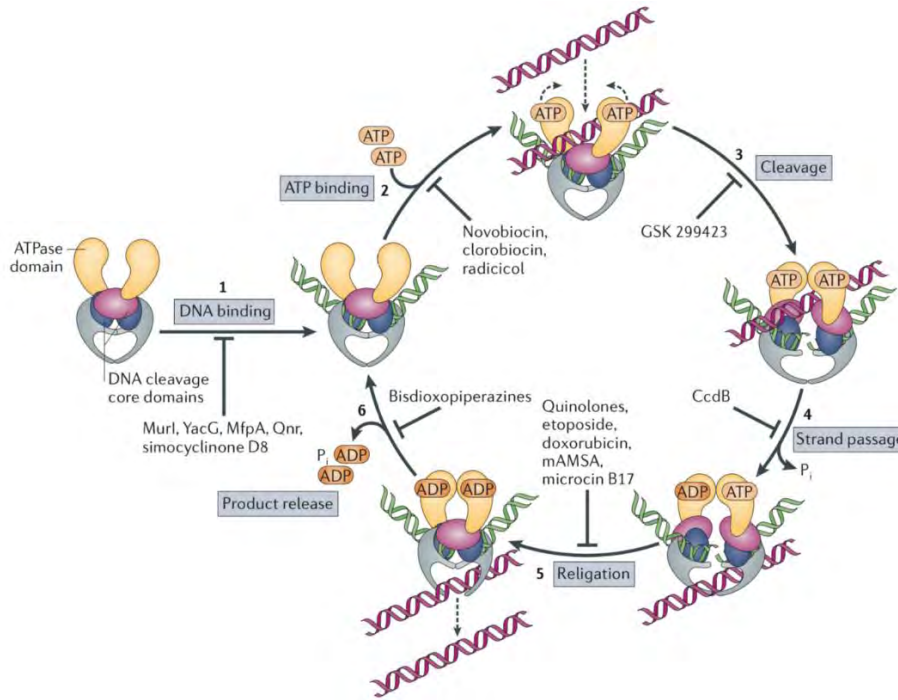
สารในกลุ่ม Quinolone ถูกค้นพบว่าเป็นยาปฏิชีวนะได้ตั้งแต่ก่อนปี ค.ศ. 1960 ทำให้เป็นที่สนใจของนักวิจัยทั่วโลกในการศึกษาหายาปฏิชีวนะชนิดใหม่ เนื่องจากมีคุณสมบัติการเป็นยาปฏิชีวนะที่ดีมาก เกิดการออกฤทธิ์ที่รุนแรงต่อเชื้อแบคทีเรีย สามารถออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรียได้อย่างกว้างขวางหลากหลายชนิด โครงสร้างของยาปฏิชีวนะควิโนโลนมีโครงสร้างหลักเป็นวง 2 วงติดกัน (bicyclic ring) มีการพัฒนาโดยการปรับเปลี่ยนโครงสร้างพื้นฐานของ Quinolone อย่างหลากหลายโดยการเติมหมู่ต่าง ๆ เข้าที่วง 2 วง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียในลักษณะที่แตกต่างกันออกไป เช่น เพิ่มความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและลบได้แตกต่างกันออกไปในตำแหน่งที่ดัดแปลง ดังแสดงในรูปที่ 1.4 สารส่วนมากในกลุ่ม Quinolone มักถูกใช้ในผู้ที่มีการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ รวมไปถึงการติดเชื้อที่ลุกลามไปทั่วทั้งร่างกาย (Heeb, et al., 2012; Andwesson, et al., 2003; Sheehan, G. & Chew, N. S. Y., 2003; Pham, T. D. M., et al., 2019)



รูปที่ 1.4 รายงานถึงการดัดแปลงในแต่ละตำแหน่งนั้นมีผลต่อแบคทีเรียแกรมบวกและลบแตกต่างกัน (Pham, T. D. M., et al., 2019)

กลไกในการฆ่าแบคทีเรียคือยับยั้งการเพิ่มจำนวน (replication) และการถอดรหัส (transcription) โดยการเข้าจับกับเอนไซม์โทโปไอโซเมอเรส II (topoisomerase II) ซึ่งทำให้แบคทีเรียหยุดเจริญเติบโตและยังทำให้ดีเอ็นเอเกิดความเสียหายอีกด้วย เนื่องจากมีการตัดเพื่อคลายปมแต่ไม่มีการเชื่อมดีเอ็นเอ (DNA) กลับเข้าหากัน ดังในรูปที่ 1.5 มีรายงานถึงกลไกการยับยั้งแบคทีเรีย 2 กลไกหลัก (Pham, T. D. M., et al., 2019) ได้แก่

1. ยับยั้งดีเอ็นเอ (DNA inhibition) ไม่ว่าจะเป็นการสังเคราะห์หรือเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ
2. ทำให้แบคทีเรียนั้นเกิดความเครียดและผลิตสารอนุมูลอิสระ (Stress response)

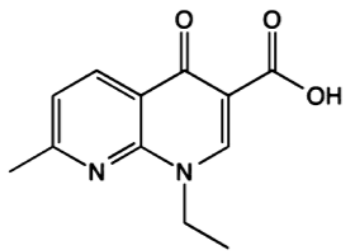


รูปที่ 1.5 รูปตำแหน่งที่ควิโนโลนเข้ายับยั้งหรือทำให้เอนไซม์โทโปไอโซเมอเรส II (topoisomerase II) เป็นพิษ (Vos, S. M., et al., 2011)

กลไกของยาปฏิชีวนะประเภทควิโนโลนถูกแบ่งตามประเภทของยาได้ดังนี้ (Hong, Y., et al., 2020)

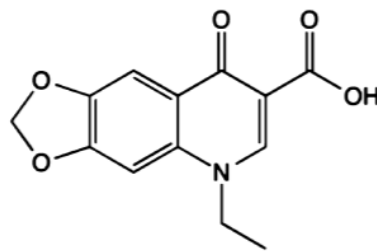
-กลไก A คือกลไกของยาปฏิชีวนะควิโนโลนรุ่นแรก (first generation quinolone) ตัวอย่างคือกรटनाลิดิซิก (nalidixic acid) และกรดออกโซลินิก (oxolinic acid) ดังโครงสร้างที่แสดงในรูปที่ 1.6 เป็นยาปฏิชีวนะที่จะทำการฆ่าเซลล์ก็ต่อเมื่อเซลล์นั้นสังเคราะห์โปรตีนและมีกิจกรรมภายในเซลล์

a)



Nalidixic acid

b)



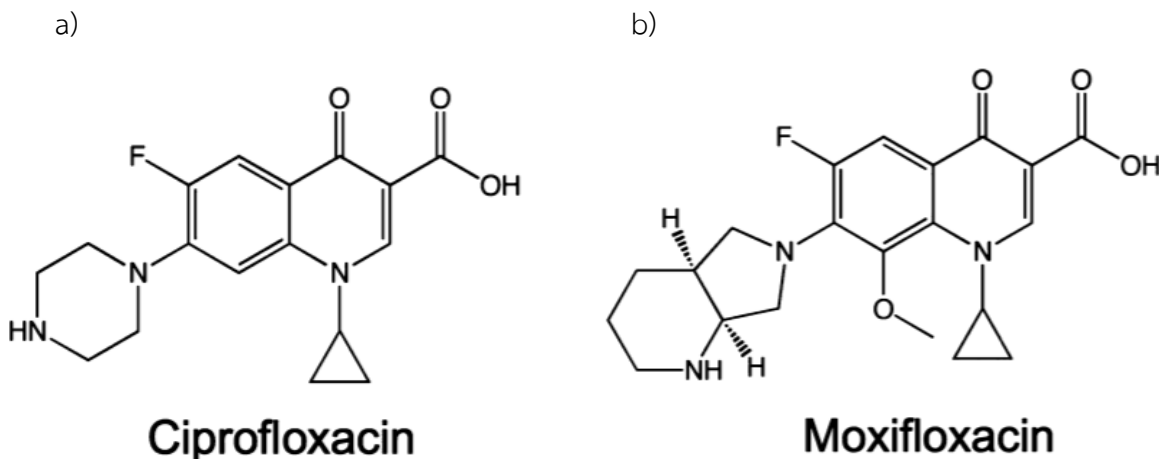
Oxolinic acid

รูปที่ 1.6 แสดงโครงสร้างของยาปฏิชีวนะควิโนโลนรุ่นแรก (first generation quinolone)

a) กรटनाลิดิซิก (nalidixic acid) และ b) กรดออกโซลินิก (oxolinic acid)

(Aldred, K. J. et al., 2014)

-กลไก B คือกลไกของยาปฏิชีวนะฟลูออโรควิโนโลนสมัยใหม่ (modern fluoroquinolone) ตัวอย่างได้แก่ยาไซโปรฟลอกซาซิน (ciprofloxacin) และ มอกซิฟลอกซาซิน (Moxifloxacin) ดังโครงสร้างที่แสดงในรูปที่ 1.7 เป็นกลไกที่เซลล์ไม่จำเป็นต้องมีการสังเคราะห์โปรตีนหรือมีกิจกรรมภายในเซลล์เข้ามาเกี่ยวข้องในการฆ่าเซลล์

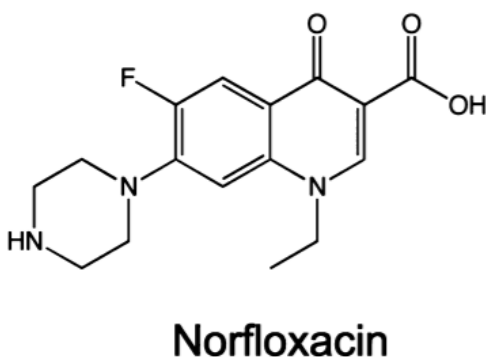


รูปที่ 1.7 แสดงโครงสร้างของยาปฏิชีวนะฟลูออโรควิโนโลนสมัยใหม่ (modern fluoroquinolone)

a) ยาไซโปรฟลอกซาซิน (ciprofloxacin) และ b) มอกซิฟลอกซาซิน (Moxifloxacin)

(Aldred, K. J. et al., 2014)

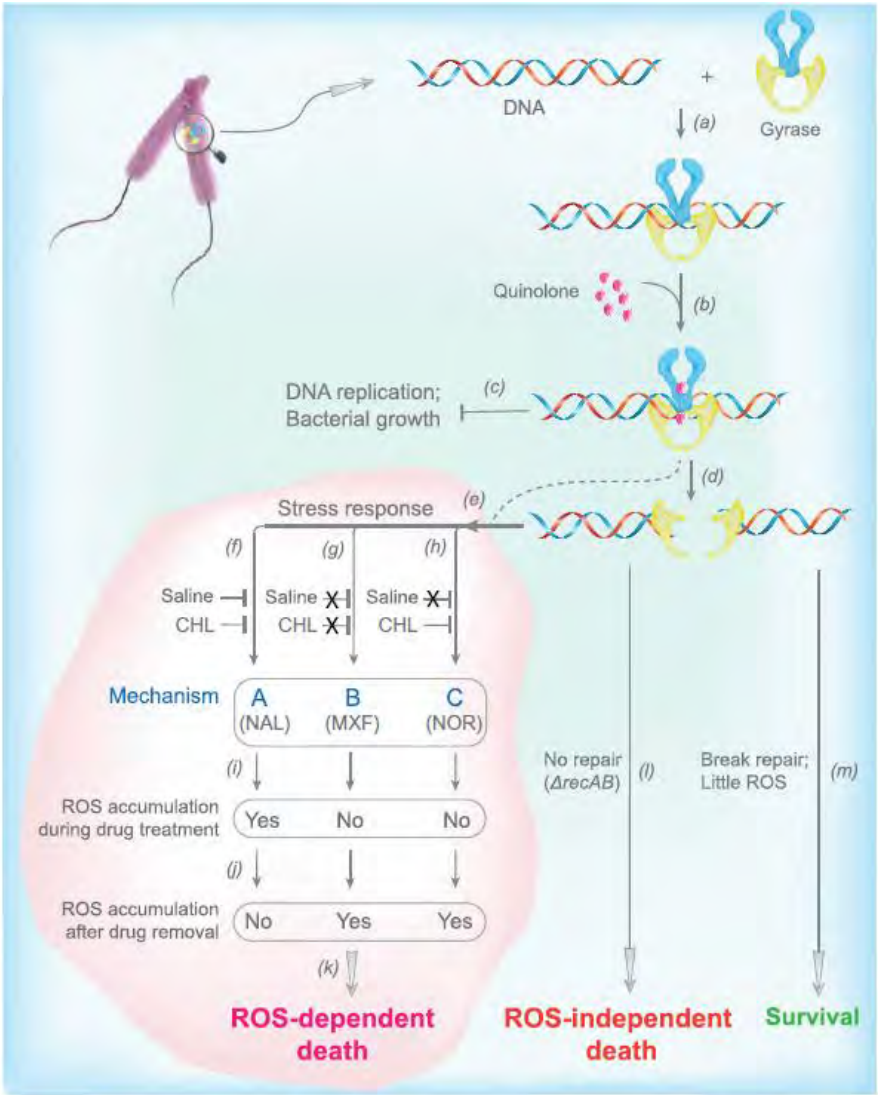
-กลไก C คือกลไกของยาปฏิชีวนะฟลูออโรควิโนโลนยุคแรก (early fluoroquinolone) ตัวอย่างคือยานอฟลอกซาซิน (norfloxacin) ดังโครงสร้างที่แสดงในรูปที่ 1.8 เป็นกลไกที่เซลล์จำเป็นต้องมีการสังเคราะห์โปรตีนเข้ามาเกี่ยวข้องในการฆ่าเซลล์แต่ไม่จำเป็นต้องมีกิจกรรมภายในเซลล์



รูปที่ 1.8 แสดงโครงสร้างของยาปฏิชีวนะฟลูออโรควิโนโลนยุคแรก (early fluoroquinolone);

ยานอฟลอกซาซิน (norfloxacin) (Aldred, K. J. et al., 2014)

โดยในทุก ๆ กลไกที่กล่าวมามีความเกี่ยวข้องกับการฆ่าแบคทีเรียโดยสะสมสารอนุมูลอิสระที่เรียกว่า ROS-dependent death แต่ช่วงเวลาที่เกิดการสะสมสารอนุมูลอิสระนั้นต่างกันดังที่แสดงในรูปที่ 1.9 จากสรุปสรุปกลไกการฆ่าเซลล์แบคทีเรียของยาปฏิชีวนะประเภทควิโนโลน สรุปได้ว่าเมื่อยาปฏิชีวนะควิโนโลน 2 โมเลกุลเข้าจับกับดีเอ็นเอไจเรส (DNA gyrase) ส่งผลให้ดีเอ็นเอเสียหาย หากซ่อมแซมได้ทันแบคทีเรียจะสามารถรอดชีวิตได้ แต่หากไม่สามารถซ่อมแซมได้ทัน เช่น ยีนที่เกี่ยวกับการซ่อมแซมทำงานบกพร่อง แบคทีเรียจะตายได้เลยโดยไม่ได้อาศัยสารอนุมูลอิสระ (ROS-independent death) อีกกรณีคือเมื่อยาปฏิชีวนะควิโนโลน 2 โมเลกุลเข้าไปจับกับเอนไซม์ดีเอ็นเอไจเรส (DNA gyrase) เป็นระยะเวลาหนึ่งส่งผลให้แบคทีเรียเกิดความเครียดและตอบสนองโดยผลิตสารอนุมูลอิสระและสะสมเพิ่มมากขึ้นจนทำให้แบคทีเรียตาย (ROS-dependent death) (Hong, Y., et al., 2020)

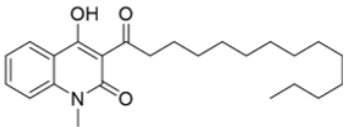
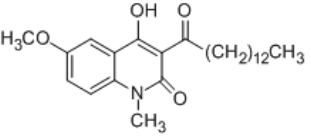
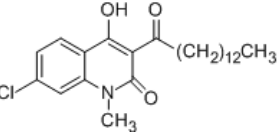
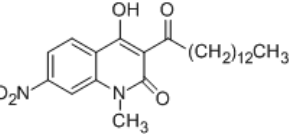
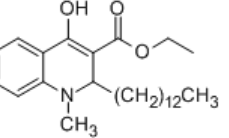


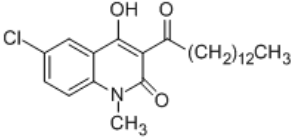
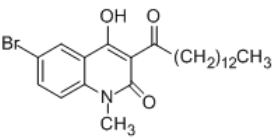
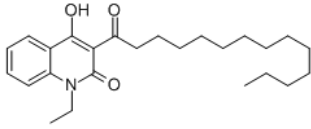
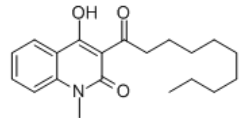
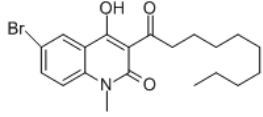
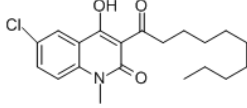
รูปที่ 1.9 แสดงกลไกการฆ่าแบคทีเรียของยาปฏิชีวนะควิโนโลน (Hong, Y., et al., 2020)

4. สารสังเคราะห์อัลคิลควิโนโลน 12 สารจากภาควิชาเคมี วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ห้องปฏิบัติการของ อาจารย์ ดร. ธนธรรม ขอทวีวัฒนา ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้สังเคราะห์สารทั้งหมด 12 สารและคาดว่าจะเป็ยยาปฏิชีวนะได้ เนื่องจากสารที่สังเคราะห์นั้นเป็นสารในกลุ่มอัลคิลควิโนโลนโดยสารและโครงสร้างทั้งหมดแสดงให้เห็นในตารางที่ 1.1

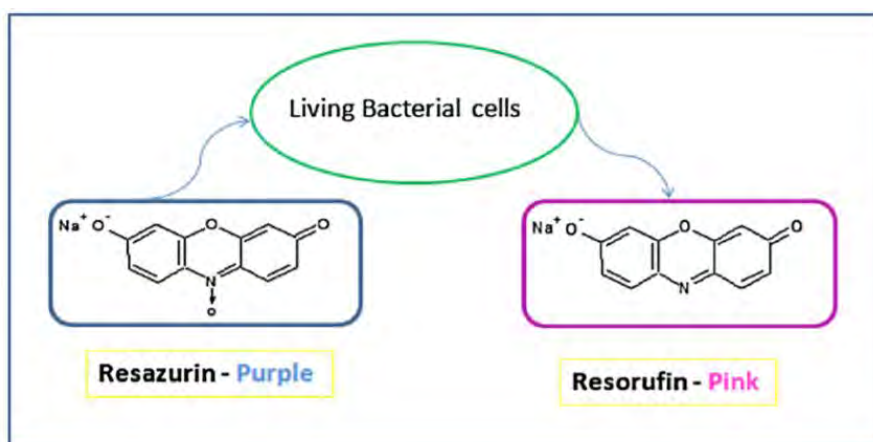
ตารางที่ 1.1 ตารางแสดงโครงสร้างและน้ำหนักโมเลกุล (กรัม/โมเลกุล) ของสารทั้งหมด 12 สาร

ลำดับที่	เลขและสัญลักษณ์ที่กำกับกับสาร	โครงสร้าง	น้ำหนักโมเลกุล (กรัม/โมเลกุล)
1	TKK-I-002 (KKAJ-A16)		385.55
2	KKAJ-A15-P1		415.57
3	KKAJ-A24-P1		419.98
4	KKAJ-A25-P3		430.54
5	KKAJ-A25-P4		415.61

ลำดับที่	เลขและสัญลักษณ์ ที่กำกับมาภิสาร	โครงสร้าง	น้ำหนักโมเลกุล (กรัม/โมเลกุล)
6	KKAJ-A28-P1		419.98
7	KKAJ-A31-P1		464.44
8	KKAJ-A35	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล
9	KKAJ-A36		399.57
10	KKAJ-A50		329.20
11	KKAJ-A51		407.11
12	KKAJ-A52		363.88

5. Resazurin microdilution assay

วิธีที่ใช้ในการประเมินผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่เลือกใช้คือวิธี Resazurin microdilution assay โดยทำในเพลทที่มี 96 หลุม (96-well plate) และใส่ resazurin เพื่อวัดผลและสังเกตสีที่เปลี่ยนไป วิธีการดูผลแสดงในรูปที่ 1.10 โดยแสดงให้เห็นว่าหากแบคทีเรียมีชีวิตจะสามารถเกิดปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) กับสาร resazurin ซึ่งเป็นสารละลายสีน้ำเงินม่วงให้กลายเป็น resorufin ที่มีสีชมพู แต่หากแบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้จะทำให้ resazurin ไม่ถูกเปลี่ยนเป็น resorufin ซึ่งจะได้สารละลายสีน้ำเงินม่วงเช่นเดิม จึงสามารถใช้วิธีนี้ในการหาค่าความเข้มข้นของสารที่ต่ำที่สุดที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Minimum Inhibition Concentration; MIC) โดยสังเกตสีที่เปลี่ยนแปลงไป (Elshikh, M., et al., 2016)



รูปที่ 1.10 แสดงการเปลี่ยนแปลงของสาร resazurin เมื่อเกิดปฏิกิริยารีดักชัน (reduction)
(Elshikh, M., et al., 2016)

วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อทดสอบและประเมินผลความสามารถของสารสังเคราะห์อัลคิลควิโนโลนที่ทางภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้สังเคราะห์ทั้ง 12 ชนิดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P) และ *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)

บทที่ 2

เครื่องมือ วัสดุ เคมีภัณฑ์

เครื่องมือ

1. กรวยแก้ว
2. กระบอกตวงปริมาตร 100 และ 500 มิลลิลิตร
3. แท่งแก้ว spreader
4. ขวดใส่สารเคมี ขนาด 500 ml และ 1000 ml ของบริษัท DWK Life Science ประเทศเยอรมัน
5. เครื่องชั่งหยาบ แบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น PG 2002-s ของบริษัท Metler Toledo ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
6. เครื่องชั่งหยาบขนาดเล็ก ของบริษัท Camry
7. เครื่องอบฆ่าเชื้อขนาดเล็ก (Autoclave) รุ่น ES-215 ของบริษัท TOMY Seiko ประเทศญี่ปุ่น
8. เครื่องอบฆ่าเชื้อขนาดใหญ่ (Autoclave) รุ่น ES-315 ของบริษัท TOMY Seiko ประเทศญี่ปุ่น
9. เครื่องทำความร้อนชนิดตั้งโต๊ะ (heat plate) รุ่น MS-H280-Pro ของบริษัท Scilogex ประเทศสหรัฐอเมริกา
10. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscopy) รุ่น CH30RF200 ของบริษัท Olympus ประเทศญี่ปุ่น
11. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrometer) รุ่น Genesys 20 ของบริษัท Thermo Spectronic ประเทศสหรัฐอเมริกา
12. ตู้เขี่ยเชื้อ (ISSCO laminar flow) รุ่น HT-122.5 บริษัท International Scientific Supply ประเทศสหรัฐอเมริกา
13. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ -80 องศาเซลเซียส รุ่น MDF-U71V ของบริษัท Sanyo Electric Co. ประเทศญี่ปุ่น
14. ตู้อบแห้ง (hot air oven) ของบริษัท Contherm Digital Series ประเทศนิวซีแลนด์
15. ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (incubator) ของบริษัท Memmert ประเทศเยอรมัน
16. ไมโครปิเปตต์ ปริมาตร 10 100 และ 1000 ไมโครลิตร ของบริษัท Capp Bravo ประเทศเยอรมัน
17. Automatic pipette ของบริษัท DLAB Levo Plus
18. เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) รุ่น K-550 GE ของบริษัท Scientific Industries ประเทศสหรัฐอเมริกา
19. เครื่องเขย่าสารใช้เสียงความถี่สูง (Ultrasonic sonicator) ของบริษัท Elma ประเทศเยอรมัน

วัสดุ

1. เพลตพลาสติก (plastic plate) ของบริษัท Bioscan
2. ทิปขนาดเล็ก (pipette tip) ขนาด 10 100 และ 1000 ไมโครลิตร ของบริษัท Kirgen
3. microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ของบริษัท Kirgen
4. ปิเปตพลาสติก (plastic pipette) ขนาด 5, 10 และ 25 มิลลิลิตร ของบริษัท SPL LifeScience
5. ฟิวเตอร์ขนาด 0.2 ไมครอน (filter) ของบริษัท GE Healthcare
6. หลอดฉีดยา 5 มิลลิลิตร (syringe) ของบริษัท Nipro ประเทศไทย

เคมีภัณฑ์

1. 85% กลีเซอรอล (85% glycerol) ของบริษัท Himedia
2. ผงอาหารเลี้ยงแบคทีเรียสำเร็จรูป (nutrient broth) ของบริษัท Himedia
3. ผงอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย มุลเลอร์ฮินตันสำเร็จรูป (Muller-Hinton) ของบริษัท Himedia
4. ผงวุ้น (agar) ของบริษัท Himedia
5. ยาปฏิชีวนะ ciprofloxacin
6. DMSO ของบริษัท RCI Labscan ประเทศไทย
7. Resazurin ของบริษัท Tokyo Chemical Industry UK Ltd. (TCI-UK) ประเทศอังกฤษ

สารสังเคราะห์อัลคิลควิโนโลนที่ใช้สำหรับการทดลอง 12 สารจากห้องปฏิบัติการ อาจารย์ ดร.ธนธรณ์ ขอทวี
วัฒนา ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. KKAJ-A16
2. KKAJ-A15-P1
3. KKAJ-A24-P1
4. KKAJ-A25-P3
5. KKAJ-A25-P4
6. KKAJ-A28-P1
7. KKAJ-A31-P1
8. KKAJ-A35
9. KKAJ-A36
10. KKAJ-A50
11. KKAJ-A51
12. KKAJ-A52

น้ำ

1. น้ำสำหรับเตรียม cell free filtrate คือ น้ำบริสุทธิ์ชนิดที่ 1 (purified water type I)
2. น้ำสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ น้ำบริสุทธิ์ชนิดที่ 2 (purified water type II)

แบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองคือ *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P) และ *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) โดยเชื้อทั้งหมดนี้ได้มาจาก The American Type Culture Collection (ATCC) ประเทศสหรัฐอเมริกา

1. *Escherichia coli* (ATCC 25922)

Kingdom Bacteria

Phylum Proteobacteria

Class Gamma Proteobacteria

Order Enterobacteriales

Family Enterobacteriaceae

Genus *Escherichia*

Species *Escherichia coli*

2. *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P)

Kingdom Bacteria

Phylum Firmicutes

Class Bacilli

Order Bacillales

Family Staphylococcaceae

Genus *Staphylococcus*

Species *Staphylococcus aureus*

3. *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)

Kingdom Bacteria

Phylum Proteobacteria

Class Gamma Proteobacteria

Order Pseudomonadales

Family *Pseudomonadaceae*

Genus *Pseudomonas*

Species *Pseudomonas aeruginosa*

บทที่ 3

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การเตรียมเชื้อเพื่อใช้ในการศึกษา

1.1 การทำ Collection culture

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้คือ *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P) และ *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) โดยเชื้อทั้งหมดถูกเก็บรักษาไว้ในกลีเซอรอล 25% ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส โดยวิธีการเก็บรักษาเริ่มจากนำแบคทีเรียซึ่งเป็นเซลล์แห้งที่ได้จาก The American Type Culture Collection (ATCC) ประเทศสหรัฐอเมริกา มาใส่ในอาหารเหลว Nutrient Broth (NB) 5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำอาหารเหลว Nutrient Broth (NB) ปริมาตร 500 ไมโครลิตรที่มีกลีเซอรอลเป็นส่วนประกอบใส่ในหลอด Cryotube ใส่แบคทีเรียที่เตรียมไว้ตามลงไปปริมาตร 500 ไมโครลิตร เก็บหลอด Cryotube ที่เสร็จเรียบร้อยแล้วในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

1.2 การทำ Standard Curve

เชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P) และ *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) ทำการทดลองเช่นเดียวกันในเชื้อทุกตัว นำแบคทีเรียจากตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มา Streak ลงบนอาหารแข็ง Nutrient Agar (NA) และบ่ม 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารแข็ง Nutrient Agar (NA) จำนวน 1 โคโลนีใส่ลงในอาหารเหลว Nutrient Broth (NB) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร และบ่ม 37 องศาเซลเซียส, 200 rpm หลังจากบ่มเป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง นำเชื้อที่เพาะเลี้ยงจำนวน 2 มิลลิลิตร ไปเจือจางในอัตราส่วน 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และนำเชื้อที่เพาะเลี้ยงจากส่วนที่เหลือจำนวน 100 ไมโครลิตรไปเจือจางให้ได้ 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6} 10^{-7} 10^{-8} และ 10^{-9} เท่า นำค่าเจือ 10^{-3} ถึง 10^{-9} เท่าไป Spread ลงบนอาหารแข็ง Nutrient Agar (NA) นำไปบ่ม 37 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง นับโคโลนีและคำนวณกลับเป็นความเข้มข้นเซลล์ ในหน่วยจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร (CFU/ml) นำข้อมูลความเข้มข้นเซลล์และค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้ ไปสร้างกราฟและเส้นสมการของเส้นกราฟ ($y = mx + C$)

2. การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียของสารสังเคราะห์ควิโนโลน

วิธีการทดสอบที่ใช้ในการทดลองนี้ปรับปรุงมาจาก The Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing, American Society of Microbiology (Cavalier., et al, 2005) โดยนำแบคทีเรีย *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P) และ *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) จากตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส Streak ลงบนอาหารแข็ง Nutrient Agar (NA) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นำแบคทีเรียจากที่ Streak บนอาหารแข็ง Nutrient Agar (NA) จำนวน 3-5 โคลนีมาเลี้ยงในอาหารเหลว Mueller-Hinton Broth (MHB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มใน 37 องศาเซลเซียส, 200 rpm เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง

ระหว่างนั้นนำสารทั้งหมดซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ประเภท Alkyl quinolone 12 สาร ได้แก่ KKAJ-A16, KKAJ-A15-P1, KKAJ-A24-P1, KKAJ-A25-P3, KKAJ-A25-P4, KKAJ-A28-P1, KKAJ-A31-P1, KKAJ-A35, KKAJ-A36, KKAJ-A50, KKAJ-A51 และ KKAJ-A52 มาเจือจางด้วยอาหารเหลว Mueller-Hinton (Mueller-Hinton) 2 เท่าตามลำดับส่วนในเพลท 96 หลุม (96 well-plate) ทั้งหมด 6 ความเข้มข้นได้แก่ 1000, 500, 250, 125, 62.5 และ 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($\mu\text{g/ml}$) ความเข้มข้นละ 50 ไมโครลิตร 3 ซ้ำ โดยมีชุดควบคุมผลลบ (Negative control) แบบไม่ใส่แบคทีเรีย 50 ไมโครลิตร 3 ซ้ำ, ชุดควบคุมผลลบ (Negative control) แบบใส่แบคทีเรีย 50 ไมโครลิตร 3 ซ้ำและชุดควบคุมผลบวก (Positive control) ciprofloxacin 50 ไมโครลิตร ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

เมื่อครบ 3-5 ชั่วโมงนำแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรโดยใช้เครื่อง Spectrophotometer นำค่าไปคำนวณหาความเข้มข้นเซลล์ในหน่วยจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร (CFU/ml) ในสมการเส้นกราฟของแบคทีเรียแต่ละชนิด และปรับความเข้มข้นของแบคทีเรียด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 1.15×10^6 CFU/ml ก่อนใส่แบคทีเรียลงในหลุมที่มีสารที่ต้องการทดสอบและชุดควบคุมอยู่ โดยใส่ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ดังนั้นสุดท้ายแล้วจะมีปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นแต่ละหลุม 5.75×10^5 CFU/ml ปิดฝา 96 well-plate และพันด้วยพาราฟิิน นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 ชั่วโมง

3. ตรวจสอบความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (Minimum Inhibition Concentration; MIC) โดยใช้ Resazurin

ใส่ 0.015% Resazurin ปริมาตร 30 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ถ้าแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ Resazurin จะถูกเปลี่ยนจากสีน้ำเงินอมม่วงเป็นสีชมพู เรียกว่า Resorufin หากแบคทีเรียไม่สามารถเจริญเติบโตได้จะมีสีน้ำเงินอมม่วงเช่นเดิม โดยค่า MIC ดูได้จากความเข้มข้นต่ำที่สุดที่มีสีของสารละลายเช่นเดียวกับผลในชุดควบคุมบวก (สีน้ำเงิน)

4. ตรวจสอบความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถทำให้แบคทีเรียตายได้ (Minimum Bactericidal Concentration; MBC)

นำความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้มา Streak ลงบนอาหารแข็ง Nutrient Agar (NA) และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมงและตรวจผล โดยค่า MBC ดูได้จากความเข้มข้นที่แบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Nutrient Agar (NA)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

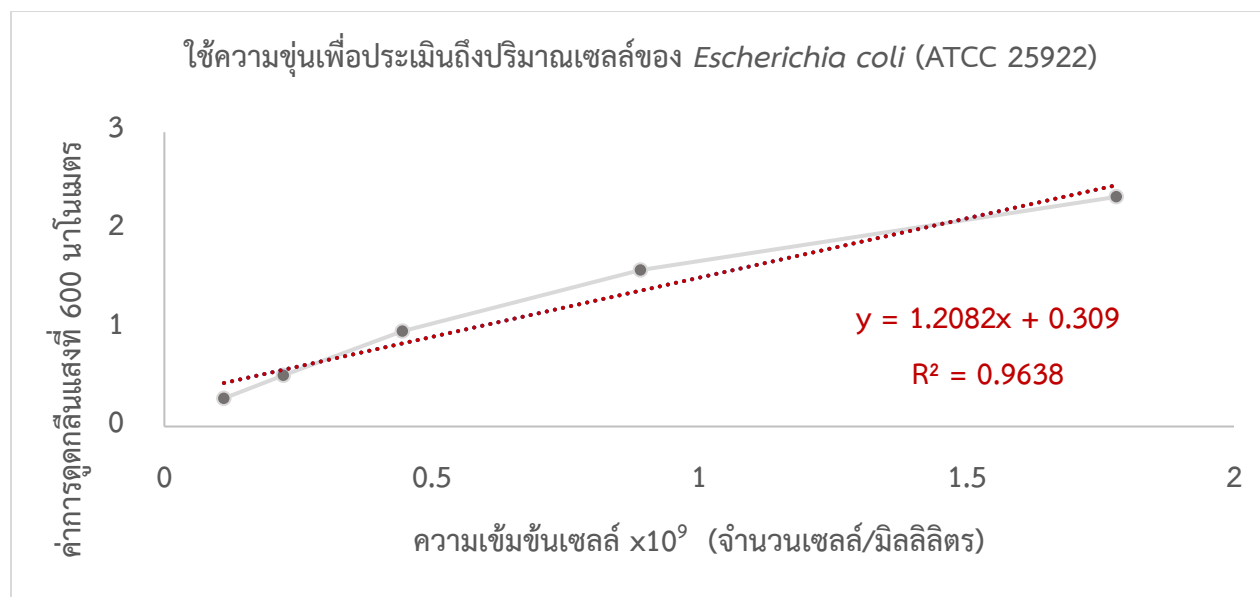
4.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

จากการเลี้ยงเชื้อ *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P) และ *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) จาก The American Type Culture Collection (ATCC) ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Nutrient (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง พบว่าโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ของ *Escherichia coli* (ATCC 25922) นั้นมีสีขาวเหลือง ส่วน *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P) มีลักษณะโคโลนีเป็นสีเหลือง และ *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) ในตอนแรกมีลักษณะโคโลนีเป็นสีขาวแต่เมื่อทิ้งไว้สักพักจะมีสีเขียวจากการสร้างเม็ดสี (pigment)

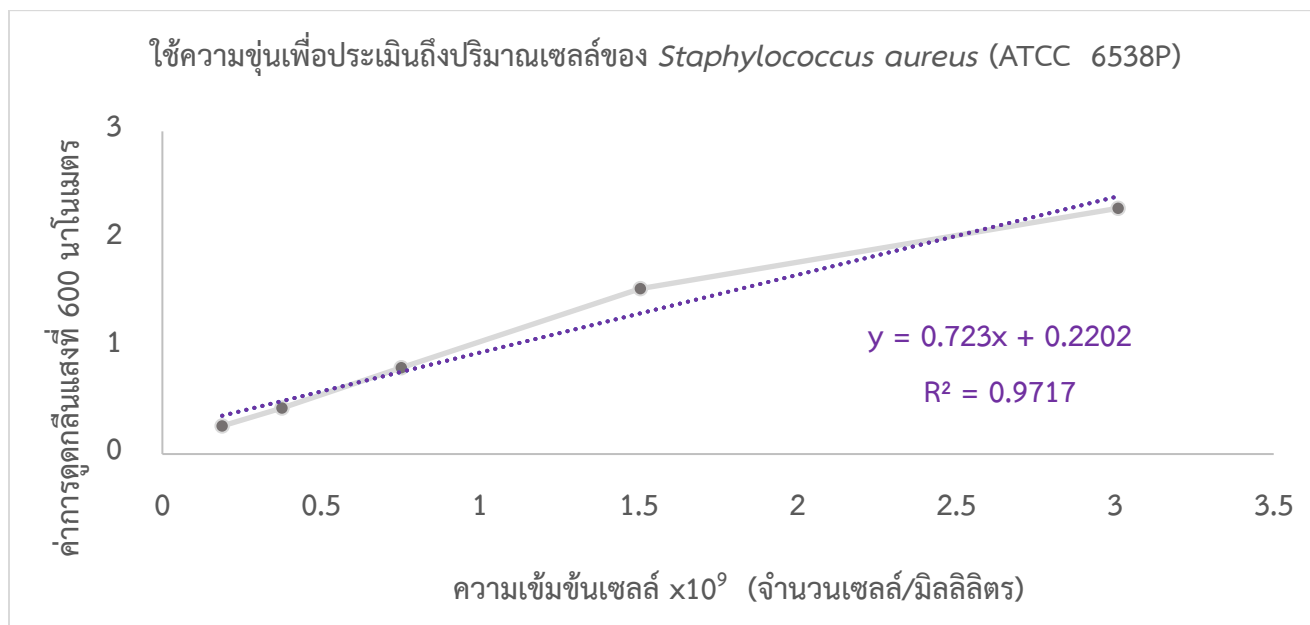
4.2 การทำ Standard Curve

จากการหาปริมาณเซลล์แบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ *E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 6538P) และ *P. aeruginosa* (ATCC 27853) โดยในแต่ละเชื่อนั้นมีกระบวนการทำที่เหมือนกัน เมื่อนำข้อมูล CFU/ml และค่า O.D.600 ที่วัดได้ ทำกราฟ สร้างสมการของเส้นกราฟ ($y = mx + C$) ของเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด ได้ผลดังที่แสดงใน กราฟที่ 4.1-4.3

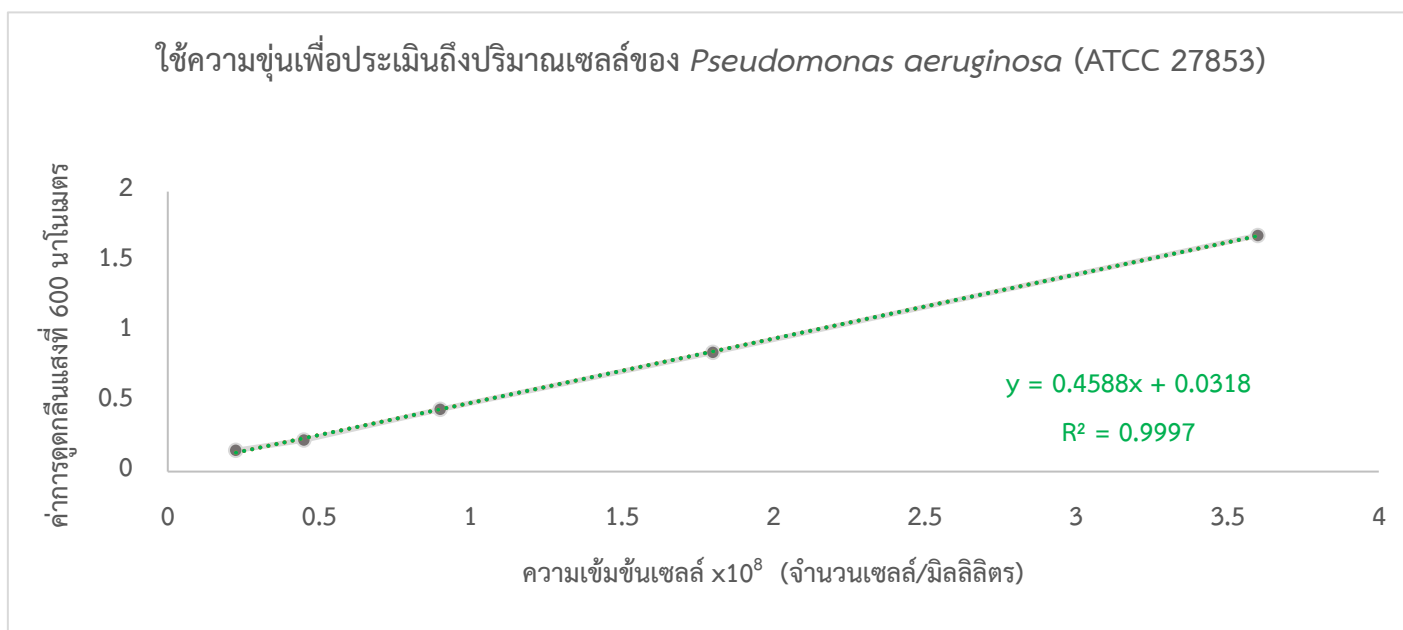
กราฟที่ 4.1 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซลล์ *E. coli* (ATCC 25922) ในหนึ่งมิลลิลิตรและค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร



กราฟที่ 4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซลล์ *S. aureus* (ATCC 6538P) ในหนึ่งมิลลิลิตรและค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร

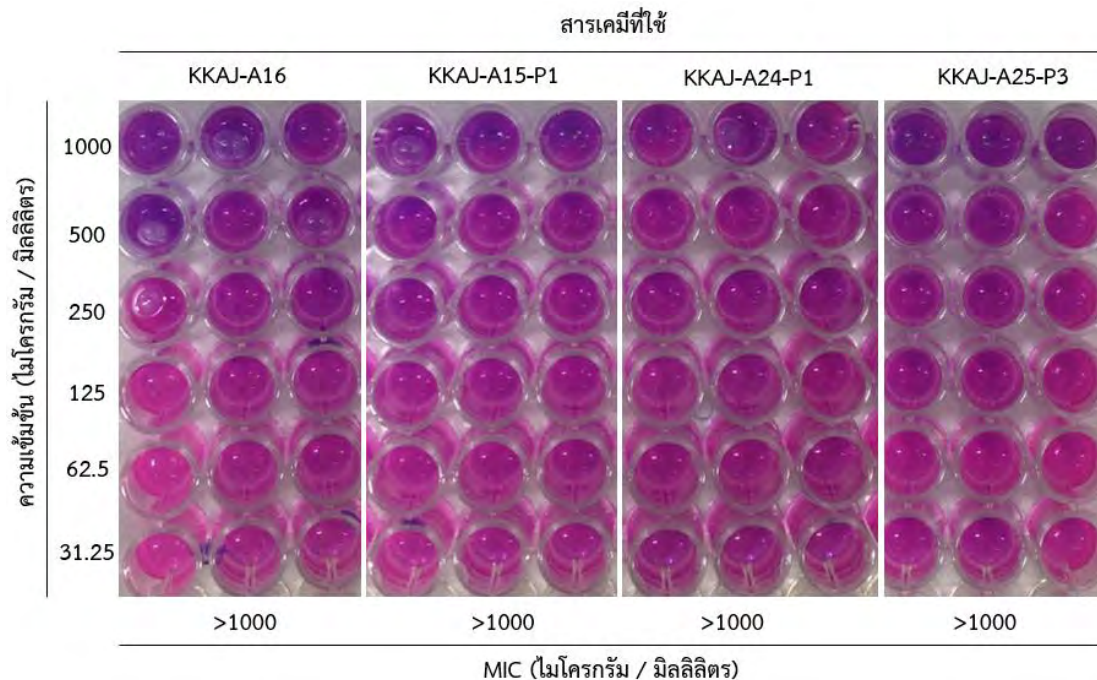
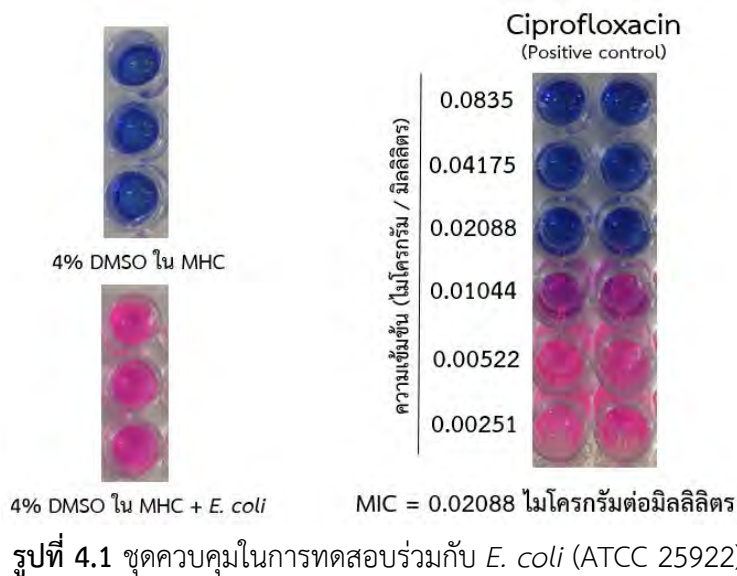


กราฟที่ 4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซลล์ *P. aeruginosa* (ATCC 27853) ในหนึ่งมิลลิลิตรและค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร

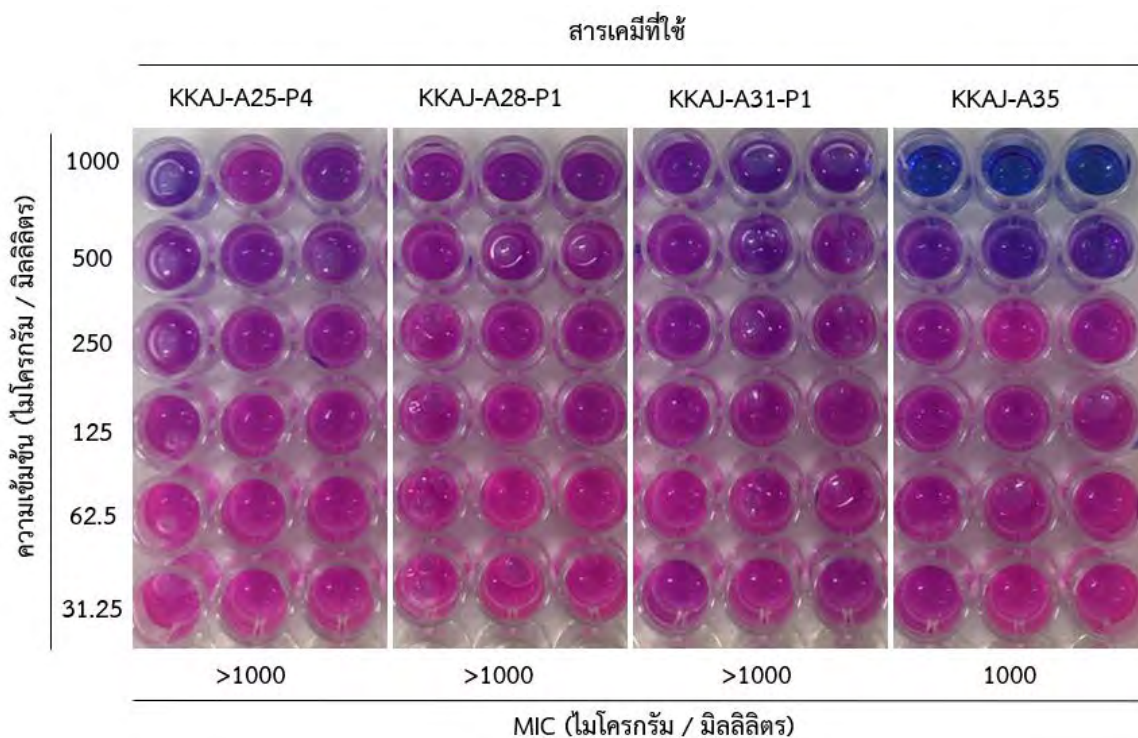


4.3 ผลการทดสอบสารสังเคราะห์อัลคิลควิโนโลน 12 ชนิดกับเชื้อ *E. coli* (ATCC 25922)

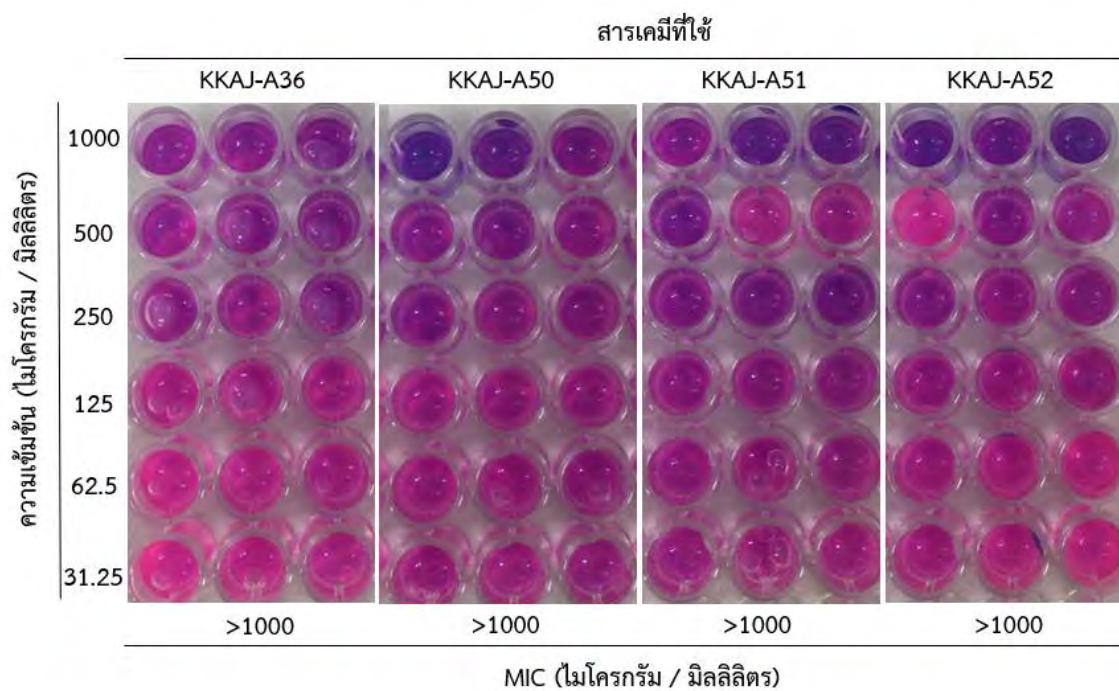
จากการทดสอบสารทั้ง 12 ชนิดกับเชื้อ *E. coli* (ATCC 25922) โดยใช้วิธี Resazurin microdilution assay เพื่อดูความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญ (Minimum Inhibition Concentration; MIC) แสดงดังรูปที่ 4.2-4.4 และชุดควบคุมในรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.2 แสดงผลการทดสอบสาร KKAJ-A16, KKAJ-A15, KKAJ-A24-P1 และ KKAJ-A25-P3 กับ *E. coli* (ATCC 25922)



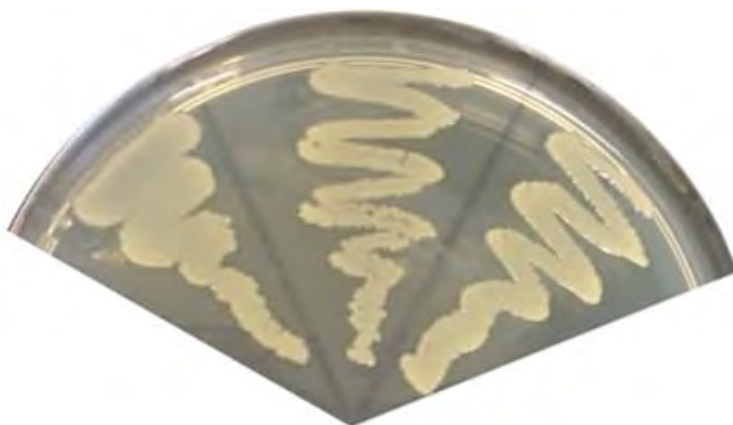
รูปที่ 4.3 แสดงผลการทดสอบสาร KKAJ-A25-P4, KKAJ-A29-P1, KKAJ-A31-P1 และ KKAJ-A35 กับ *E. coli* (ATCC 25922)



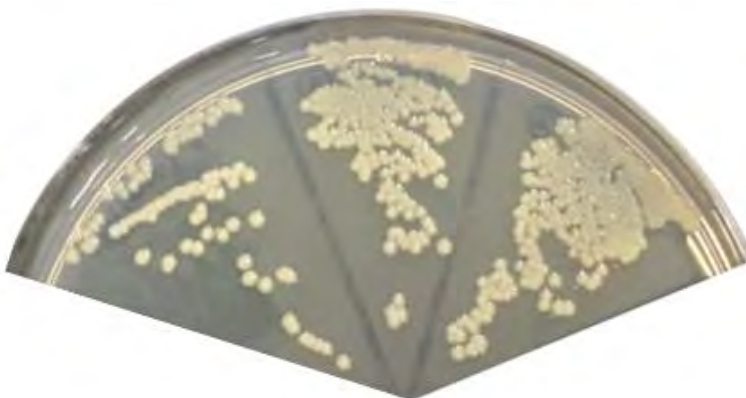
รูปที่ 4.4 แสดงผลการทดสอบสาร KKAJ-A36, KKAJ-A50, KKAJ-A51 และ KKAJ-A52 กับ *E. coli* (ATCC 25922)

ผลการทดลองเมื่อนำหลุมที่มีสีน้ำเงินม่วง รวมถึงความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญ (MIC) ของแบคทีเรียได้ มา Streak ลงบนอาหารแข็ง Nutrient Agar (NA) เพื่อดูผลความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ทำให้แบคทีเรียตาย (Maximum Bactericidal Concentration; MBC) ในรูปที่ 4.5 แสดงผลการ Streak ของ สาร KKAJ-A35 ความเข้มข้น 500 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

a)



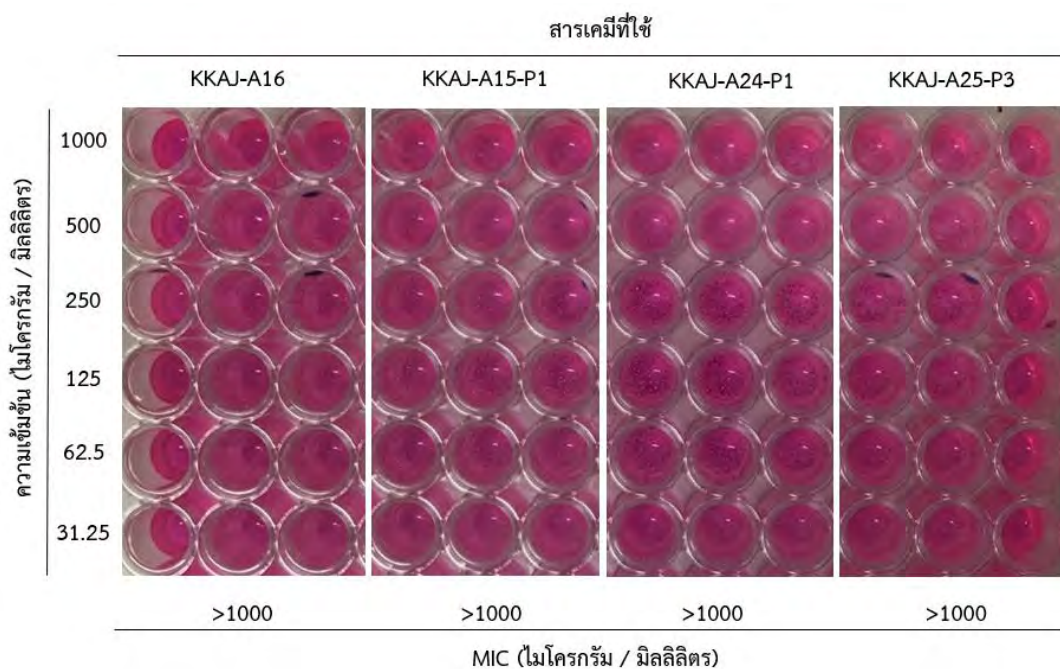
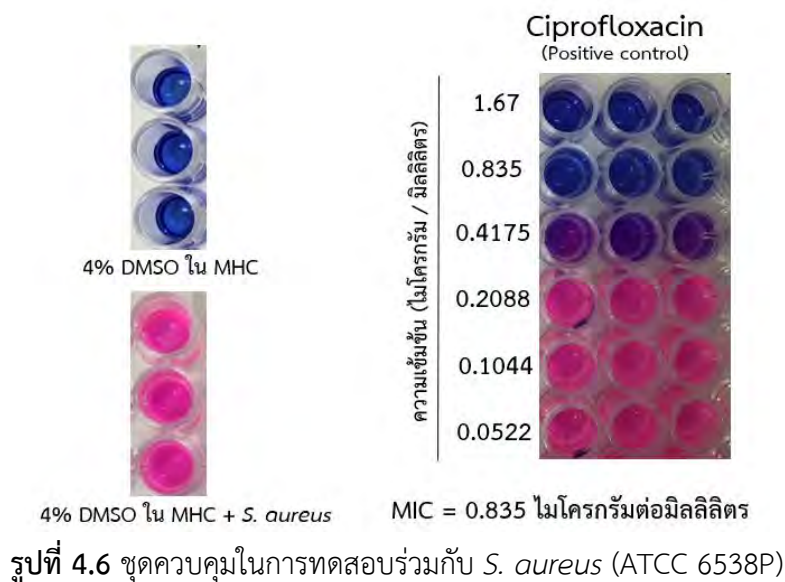
b)

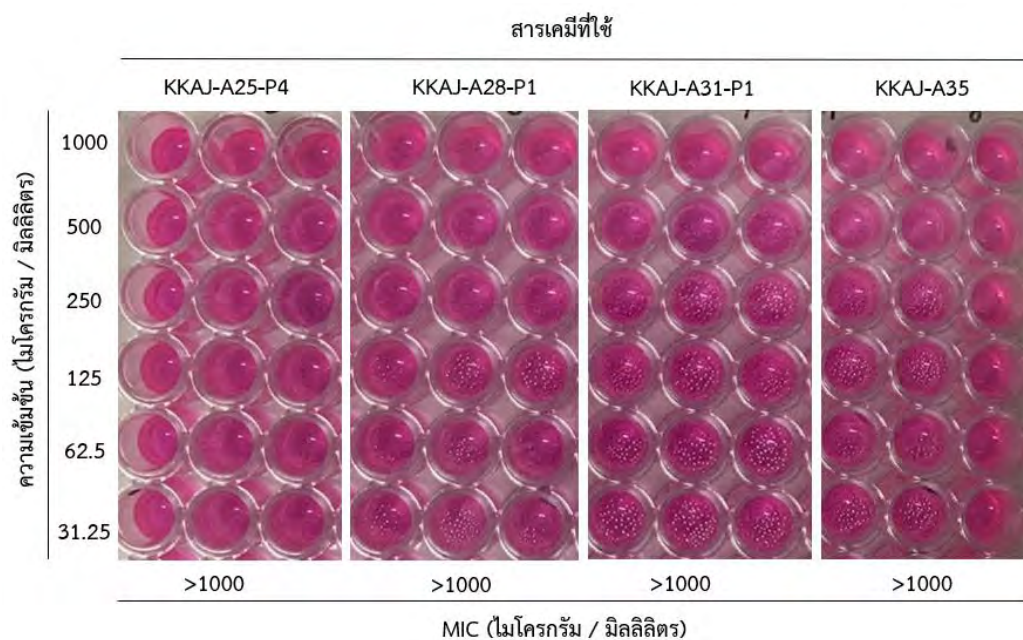


รูปที่ 4.5 แสดงผลการทดสอบความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ทำให้แบคทีเรียตาย (MBC) กับ *E. coli* (ATCC 25922) หลังจากให้ด้วยสาร KKAJ-A35
a) ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและ b) 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

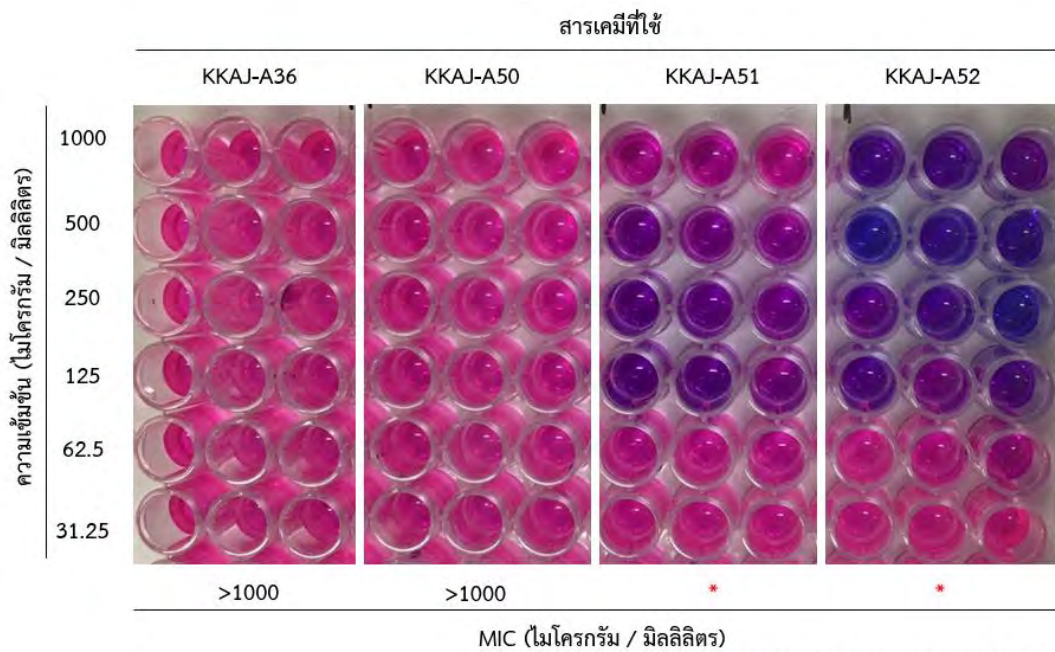
4.4 ผลการทดสอบสารสังเคราะห์อัลคิลควิโนโลน 12 ชนิดกับเชื้อ *S. aureus* (ATCC 6538P)

จากการทดสอบสารทั้ง 12 ชนิดกับเชื้อ *S. aureus* (ATCC 6538P) โดยใช้วิธี Resazurin microdilution assay เพื่อดูความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญ (Minimum Inhibition Concentration; MIC) ของแบคทีเรียชนิดนี้ได้แสดงดังรูปที่ 4.7-4.9 และชุดควบคุมในรูปที่ 4.6





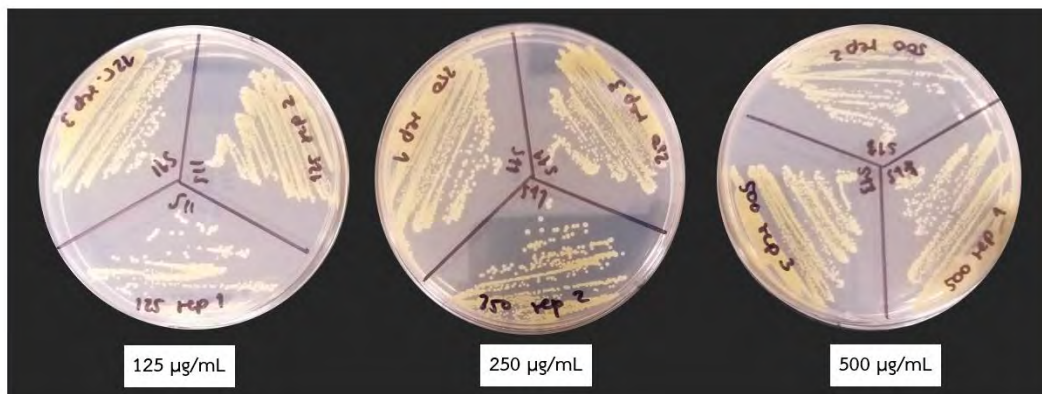
รูปที่ 4.8 แสดงผลการทดสอบสาร KKAJ-A25-P4, KKAJ-A29-P1, KKAJ-A31-P1 และ KKAJ-A35 กับ *S. aureus* (ATCC 6538P)



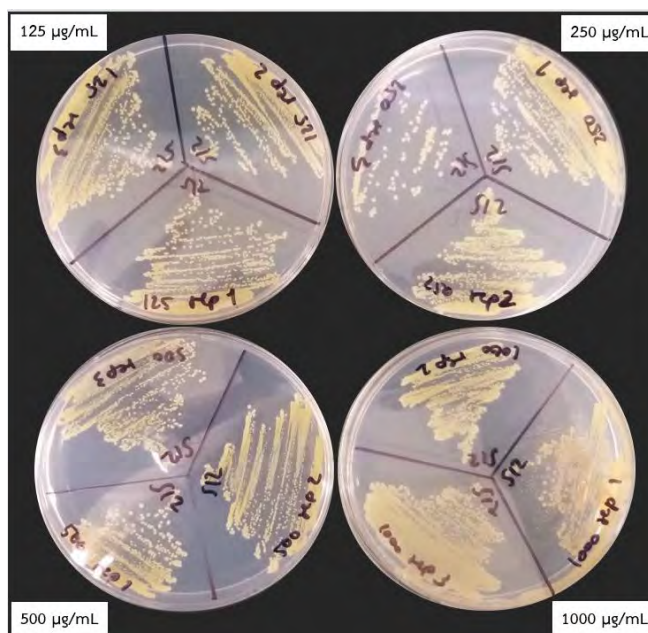
*จากผลยังไม่สามารถสรุปค่า MIC ได้

รูปที่ 4.9 แสดงผลการทดสอบสาร KKAJ-A36, KKAJ-A50, KKAJ-A51 และ KKAJ-A52 กับ *S. aureus* (ATCC 6538P)

ผลการทดลองเมื่อนำหลุมที่มีสีน้ำเงินม่วงมา Streak ลงบนอาหารแข็ง Nutrient Agar (NA) เพื่อดูผล ความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ทำให้แบคทีเรียตาย (Maximum Bactericidal Concentration; MBC) ในรูปที่ 4.10 แสดงผลการ Streak ของ สาร KKAJ-A51 ความเข้มข้น 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและ รูปที่ 4.11 สาร KKAJ-A52 ความเข้มข้น 125, 250, 500 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



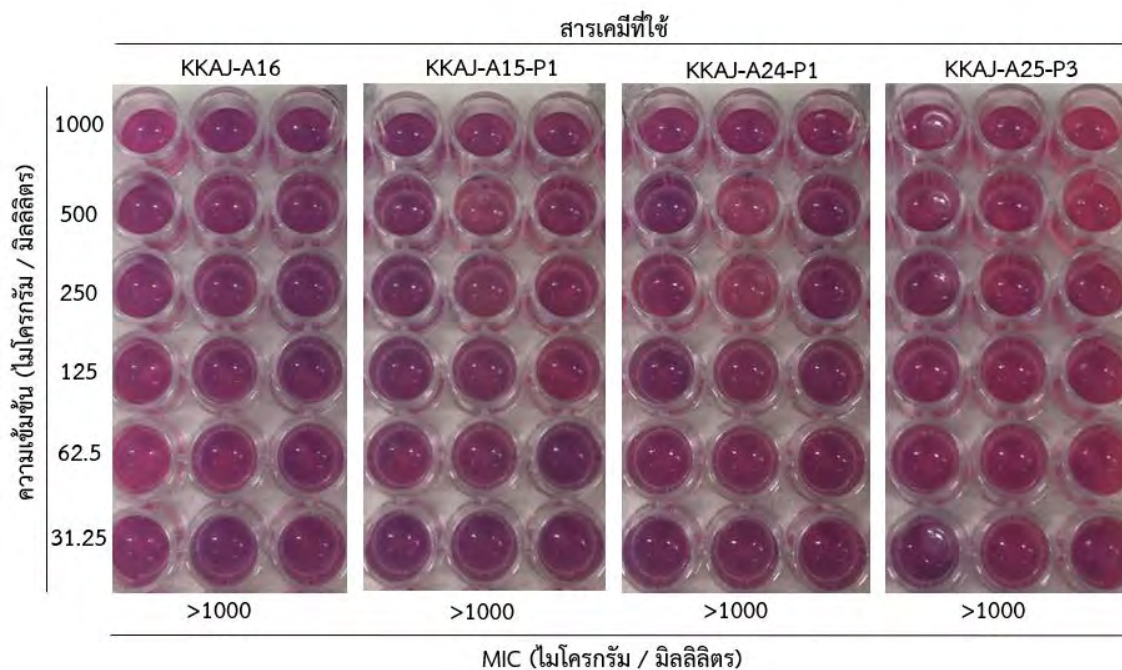
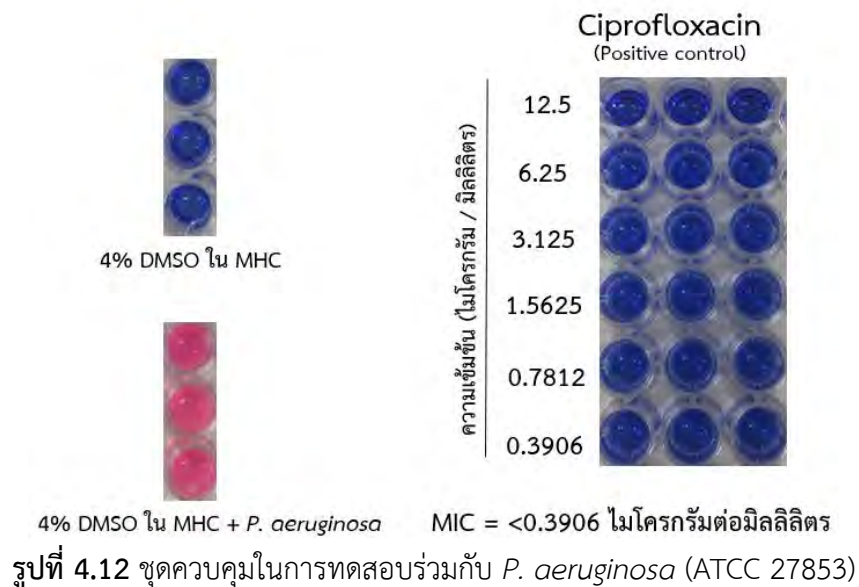
รูปที่ 4.10 แสดงผลการทดสอบความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ทำให้แบคทีเรียตาย (MBC) กับ *S. aureus* (ATCC 6538P) หลังจากให้ด้วยสาร KKAJ-A51 ความเข้มข้น 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



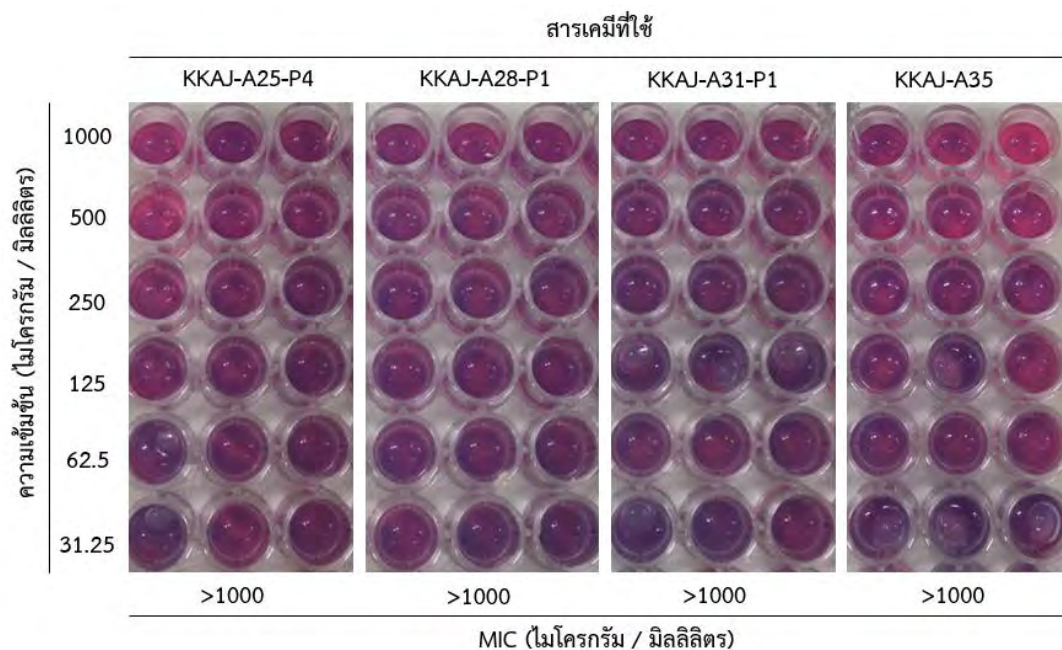
รูปที่ 4.11 แสดงผลการทดสอบความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ทำให้แบคทีเรียตาย (MBC) กับ *S. aureus* (ATCC 6538P) หลังจากให้ด้วยสาร KKAJ-A52 ความเข้มข้น 125, 250, 500 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.5 ผลการทดสอบสารสังเคราะห์อัลคิลควิโนโลน 12 ชนิดกับเชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC 27853)

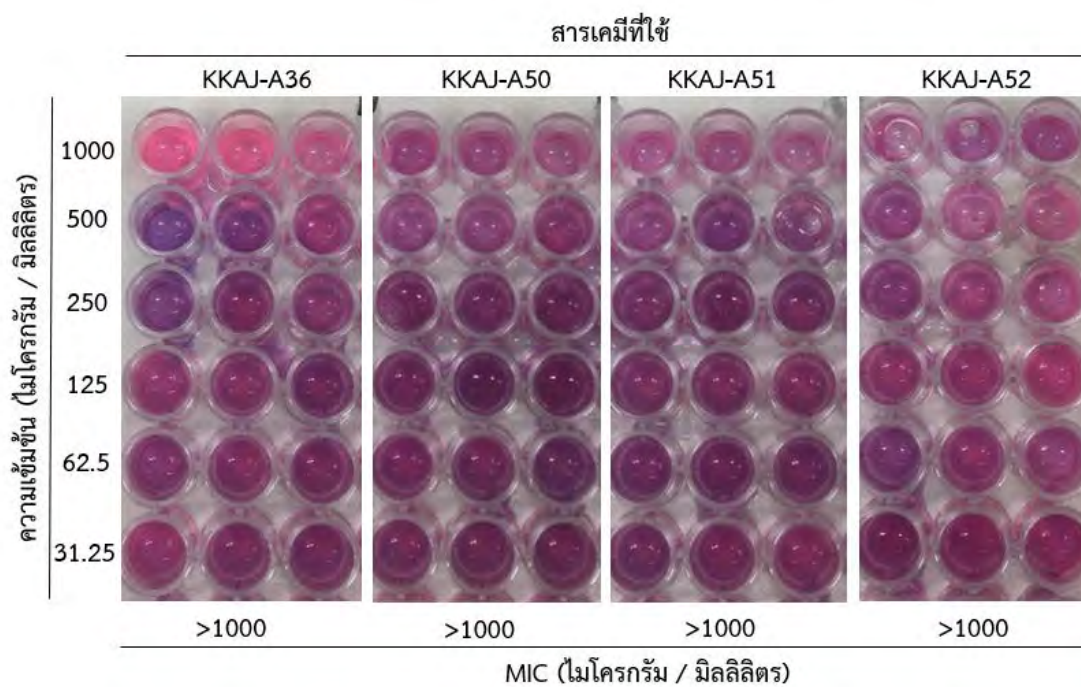
จากการทดสอบสารทั้ง 12 ชนิดกับเชื้อ *P. aeruginosa* (ATCC 27853) โดยใช้วิธี Resazurin microdilution assay เพื่อดูความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญ (Minimum Inhibition Concentration; MIC) แสดงดังรูปที่ 4.13-4.15 และชุดควบคุมในรูปที่ 4.12



รูปที่ 4.13 แสดงผลการทดสอบสาร KKAJ-A16, KKAJ-A15, KKAJ-A24-P1 และ KKAJ-A25-P3 กับ *P. aeruginosa* (ATCC 27853)



รูปที่ 4.14 แสดงผลการทดสอบสาร KKAJ-A25-P4, KKAJ-A29-P1, KKAJ-A31-P1 และ KKAJ-A35 กับ *P. aeruginosa* (ATCC 27853)



รูปที่ 4.15 แสดงผลการทดสอบสาร KKAJ-A36, KKAJ-A50, KKAJ-A51 และ KKAJ-A52 กับ *P. aeruginosa* (ATCC 27853)

บทที่ 5

สรุปและวิเคราะห์ผลการทดลอง

ผลการทดลองของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดแบ่งออกเป็นผลการสร้างสมการเส้นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซลล์แบคทีเรียในหนึ่งมิลลิลิตร (แกน X) และค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (แกน Y) และผลทดสอบแบคทีเรียแต่ละชนิดร่วมกับสารสังเคราะห์อัลคิลควิโนโลน 12 ชนิด โดยใช้วิธี Resazurin microdilution assay เพื่อดูความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญ (Minimum Inhibition Concentration; MIC) และใช้วิธีการ Streak ความเข้มข้นที่คาดว่าจะยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ลงบนอาหารแข็ง Nutrient Agar (NA) เพื่อดูผลความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ทำให้แบคทีเรียตาย (Maximum Bactericidal Concentration; MBC)

ผลการทดลองของเชื้อ *Escherichia coli* (ATCC 25922) ได้สมการเส้นกราฟ คือ $y = 1.2082x + 0.309$ โดยมีค่า R-square (R^2) = 0.9638 เมื่อนำแบคทีเรียมาทดสอบร่วมกับสารสังเคราะห์อัลคิลควิโนโลน 12 ชนิด พบว่าสารทั้งหมดนั้นมี MIC มากกว่า 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยกเว้นสาร KKAJ-A35 ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้ง 3 ซ้ำ นั้นมีสีน้ำเงินซึ่งคาดว่าเป็นความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญเติบโต (MIC) ของ *E. coli* จึงได้นำความเข้มข้น 500 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไปทำ MBC ผลพบว่าทั้ง 2 ความเข้มข้นนั้น *E. coli* สามารถเจริญเติบโตบนอาหารแข็ง Nutrient Agar ได้ นั้นเพราะยาปฏิชีวนะควิโนโลนเป็นยาปฏิชีวนะที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (Bacteriostatic) ไม่ได้ทำให้แบคทีเรียตายได้ทั้งหมด เมื่อนำแบคทีเรียที่เคยถูกให้ยาเพื่อยับยั้งมาเลี้ยงบนอาหารแข็งที่ไม่มียาปฏิชีวนะควิโนโลน ส่งผลให้แบคทีเรียสามารถเจริญต่อไปได้ (Drlica, K., et al., 2008)

ผลการทดลองของเชื้อ *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P) ได้สมการเส้นกราฟ คือ $y = 0.723x + 0.2202$ โดยมีค่า R-square (R^2) = 0.9717 เมื่อนำแบคทีเรียมาทดสอบร่วมกับสารสังเคราะห์อัลคิลควิโนโลน 12 ชนิด พบว่าสารทั้งหมดนั้นมี MIC มากกว่า 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยกเว้นสาร KKAJ-A51 และ KKAJ-A52 ที่ยังไม่สามารถสรุป MIC ได้ โดยจะเห็นได้ว่าสาร KKAJ-A51 ความเข้มข้น 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรทั้ง 3 ซ้ำนั้นยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้แต่ไม่ทั้งหมดโดยจะเห็นว่าสีของหลุมเป็นสีม่วง แต่ความเข้มข้นที่ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสีค่อนข้างจะเป็นสีชมพู (ไม่ยับยั้งการเจริญ) ส่วนสาร KKAJ-A52 ความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *S. aureus* ได้คือ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรกลับพบว่าสีของหลุมเป็นสีที่ค่อนข้างจะม่วง (ยับยั้งไม่ได้ทั้งหมด) มีงานวิจัยรายงานถึงความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะควิโนโลนว่าที่ความเข้มข้นสูงจะไม่สามารถยับยั้งการเจริญ (paradoxical effect) ของแบคทีเรียได้ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสะสมสารอนุมูลอิสระที่ลดลงเมื่อมีการให้ยาความเข้มข้นสูงขึ้น (Luan, G., et al., 2018) เนื่องจากการสะสมสารอนุมูลอิสระเป็นกลไกสำคัญของยาปฏิชีวนะประเภทควิโนโลน เมื่อการสะสมของสารอนุมูลอิสระลดลงทำให้การตายของแบคทีเรียลดลงด้วยเช่นกัน และเมื่อนำหลุมที่กล่าวมาข้างต้นไป Streak ลง

บนอาหารแข็ง Nutrient Agar (NA) เพื่อดูผลความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ทำให้แบคทีเรียตาย (Maximum Bactericidal Concentration; MBC) ผลพบว่า *S. aureus* สามารถเจริญเติบโตบนอาหารแข็ง Nutrient Agar ได้

ผลการทดลองของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) ได้สมการเส้นกราฟคือ $y = 0.4588x + 0.0318$ โดยมีค่า R-square (R^2) = 0.9997 เมื่อนำแบคทีเรียมาทดสอบร่วมกับสารสังเคราะห์ อัลคิลควิโนโลน 12 ชนิด พบว่าสารทั้งหมดนั้นมีค่า MIC มากกว่า 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อาจจะเป็นเนื่องจากวิธี Resazurin microdilution assay ไม่เหมาะต่อการทดสอบยาปฏิชีวนะกับ *P. aeruginosa* เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว จะเกิดการรวมตัวของเซลล์และผลิตไบโอฟิล์ม (biofilm) ซึ่งการผลิตไบโอฟิล์มนี้ก็เป็นอีกเหตุผลที่ทำให้เกิดการดื้อยาของเชื้อ *P. aeruginosa* (Ahmed, M. N., et al., 2018)

โดยสรุปแล้วพบว่าสาร KKAJ-A35 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *E. coli* (ATCC 25922) ได้ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สาร KKAJ-A52 สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* (ATCC 6538P) ได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และจากที่สังเกตได้จากวิธี Resazurin microdilution plate ไม่เหมาะจะนำมาใช้ทดสอบ *P. aeruginosa* (ATCC 27853) กับสารสังเคราะห์อัลคิลควิโนโลนทั้ง 12 ชนิด เนื่องจากมีการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ ทำให้ไม่สามารถสังเกตผลได้อย่างชัดเจน

จากงานวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นว่าสารสังเคราะห์อัลคิลควิโนโลนสาร KKAJ-A35 และสาร KKAJ-A52 นั้นสามารถยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. aureus* ได้ตามลำดับ แต่ไม่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ อีกทั้งผลการทดลองยังชี้ให้เห็นว่าที่ความเข้มข้นของสารที่สูงเกินอาจจะส่งผลให้ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียลดน้อยลง ซึ่งอาจจะเป็นปัญหาสำคัญในการนำสารนี้มาเป็นยาปฏิชีวนะในอนาคต โดยเฉพาะอย่างยิ่งเรื่องความเข้มข้นของยานอกจากนี้อุปสรรคที่พบในการทดลองคือ Resazurin microdilution assay แม้จะเป็นวิธีที่ใช้สังเกตผลการเปลี่ยนแปลงได้ง่ายและสามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่า แต่อาจมีข้อจำกัดในการดูผลการทดลองในกลุ่มแบคทีเรียที่สร้างไบโอฟิล์ม (biofilm) ได้ ซึ่งการวัดจำนวนเซลล์แบคทีเรียตามเวลาจริง (real time) ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาไมโครเพลท (microplate reader) เพื่อดูผลการเจริญเติบโตของแบคทีเรียเมื่อทดสอบด้วยสารสังเคราะห์อัลคิลควิโนโลน อาจให้ผลที่ละเอียดและสามารถวิเคราะห์ผลได้ถูกต้องและแม่นยำมากกว่า ดังนั้นการทดสอบขั้นต่อไปคือการนำสารสังเคราะห์อัลคิลควิโนโลน KKAJ-A35 และ KKAJ-A52 ไปทดสอบความสามารถในการเป็นยาปฏิชีวนะในวิธีอื่น ๆ เพื่อให้ได้ผลการยับยั้งแบคทีเรียที่ชัดเจนมากยิ่งขึ้น รวมถึงทดสอบความปลอดภัยในการใช้สารสังเคราะห์นี้ต่อสิ่งมีชีวิต สำหรับการทดสอบสารปฏิชีวนะกับแบคทีเรียที่ผลิตไบโอฟิล์มนั้นอาจมีการใช้อินนุคานาโนช่วยในการนำสารปฏิชีวนะให้เข้าถึงตัวเซลล์ที่อยู่ชั้นในของไบโอฟิล์ม เพื่อแก้ปัญหาในการเข้าถึงเซลล์ได้อย่างทั่วถึงมากยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

หนังสือ

Heritage, J., Evans, E. G. V., & Killington, R. A. (1996). *Introductory microbiology*. The Press Syndicate of the University of Cambridge, The Pitt Building, Trumpington Street, Cambridge, United Kingdom.

National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID). *Understanding Microbes in Sickness and in Health*. NIH Publication No. 09-4941. 2006.

Sheehan G. & Chew N. S. Y. (2003). *The history of quinolones*. Birkhauser Verlag, Basel, Boston, Berlin.

Cavalieri, S. J., Harbeck, R. J., McCarter, Y. S., Ortez, J. H., Rankin, I. D., Sautter, R. L., Sharp, S. E., & Spiegel, C. A. Clinical Reference Laboratories. (2005). *The Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing*. American Society of Microbiology.

เว็บไซต์

Immunology & microbiology from technical network (2019). *Gram positive vs Gram negative*. Retrieved May 11, 2020. From <https://www.technologynetworks.com/immunology/articles/gram-positive-vs-gram-negative-323007>

World Health Organization (2018). *Antibiotic resistance*. Retrieved Jan 28, 2020. From <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>

งานวิจัย

Ahmed, M. N., Porse, A., Sommer, M. O, A., Høiby, N., & Ciofu, O. (2018). Evolution of Antibiotic Resistance in Biofilm and Planktonic *Pseudomonas aeruginosa* Populations Exposed to Subinhibitory Levels of Ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother*, 62(8). doi: 10.1128/AAC.00320-18.

- Aldred, K. J., Robert, J., Kerns, R. J., & Osheroff, N. (2014). Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry* 53(10): 1565-1574. doi: 10.1021/bi5000564
- Andersson, M. I., & MacGowan, A. P. (2003). Development of the quinolones. *J Antimicrob Chemother*, 51, 1-11. doi:10.1093/jac/dkg212
- Chow, R. T., Dougherty, T. J., Framow, H. S., Bellin EY, & Miller M. H. (1988). Association between early inhibition of DNA synthesis and the MICs and MBCs of carboxyquinolone antimicrobial agents for wild-type and mutant [*gyrA nfxB(ompF) acrA*] *Escherichia coli* K-12. *Antimicrob Agents Chemother*, 32(8). 1113–1118. doi: 10.1128/aac.32.8.1113
- Drlica, K., Malik, M., Kerns, R. J., & Zhao X. (2008). Quinolone-mediated bacterial death. *Antimicrob Agents Chemother*, 52(2), 385-392. doi: 10.1128/AAC.01617-06
- Elshikh, M., Ahmed, S., Funston, S., Dunlop, P., McGaw, M., Marchant, R., & Banat, I. M. (2016). Resazurin- based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. *Biotechnol Lett*, 38(6), 1015-1019. doi: 10.1007/s10529-016-2079-2.
- Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M. H., Itoh, T., & Tomizawa, J. (1977). Nalidixic acid resistance: a second genetic character involved in DNA gyrase activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74(11), 4772–4776. doi: 10.1073/pnas.74.11.4772
- Heeb, S., Fletcher, M. P., Chhabra, S. R., Diggle, S. P., Williams, P., & Cámara, M. (2011). Quinolones: from antibiotics to autoinducers. *FEMS Microbiol Rev*, 35(2), 247-274. doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00247.x
- Hong, Y., Li, Q., Gao, Q., Xie, J., Huang, H., Drlica, K., & Zhao, X. (2020). Reactive oxygen species play a dominant role in all pathways of rapid quinolone-mediated killing. *J Antimicrob Chemother*, 75(3), 576-585. doi: 10.1093/jac/dkz485.
- Kerr, J. R. (2005). Antibiotic treatment and susceptibility testing. *J Clin Pathol*, 58(8), 786-787. doi:10.1136/jcp.2005.030411

- Luan, G., Hong, Y., Drlica, K., & Zhao, X. (2018). Suppression of reactive oxygen species accumulation accounts for paradoxical bacterial survival at high quinolone concentration. *Antimicrob Agents Chemother*, *62*(3). doi: 10.1128/AAC.01622-17.
- Pham, T. D. M., Ziora, Z. M. & Blaskovich, M. A. T. (2019) *Med Chem Commun*, *10*, 1719-1739. doi: 10.1039/c9md00120d
- Snyder, M., & Drlica, K. (1979). DNA gyrase on the bacterial chromosome: DNA cleavage induced by oxolinic acid. *J Mol Biol*, *131*(2), 287–302. doi: 10.1016/0022-2836(79)90077-9
- Sugino, A., Peebles, C. L., Kreuzer, K. N., & Cozzarelli, N. R. (1977). Mechanism of action of nalidixic acid: purification of Escherichia coli nalA gene product and its relationship to DNA gyrase and a novel nicking-closing enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA*, *74*(11), 4767-4771. doi: 10.1073/pnas.74.11.4767
- Vos, S. M., Tretter, E. M., Schmidt B. H., & Berger, J. M. (2011). All tangled up: how cells direct, manage and exploit topoisomerase function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *12*, 827–841. doi: 10.1038/nrm3228

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Nutrient broth (NB)

เปปโทน	5.0 กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5.0 กรัม
สารสกัดจากเนื้อ	1.5 กรัม
สารสกัดจากยีสต์	1.5 กรัม
ค่าความเป็นกรด-ด่าง (25 °C)	7.2 ± 0.2

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Nutrient agar (NA)

เปปโทน	5.0 กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5.0 กรัม
สารสกัดจากเนื้อ	1.5 กรัม
สารสกัดจากยีสต์	1.5 กรัม
ผงวุ้น	15 กรัม
ค่าความเป็นกรด-ด่าง (25 °C)	7.2 ± 0.2

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทใส่จานเพาะเชื้อ

3. อาหารเหลว Muller-Hinton broth (MHB)

ผงอาหารสำเร็จรูป Muller-Hinton	21.0 กรัม
ค่าความเป็นกรด-ด่าง (25 °C)	7.3 ± 0.1

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารแข็ง Muller-Hinton agar (MHA)

ผงอาหารสำเร็จรูป Muller-Hinton 21.0 กรัม

ผงวุ้น 15.0 กรัม

ค่าความเป็นกรด-ด่าง (25 °C) 7.3 ± 0.1

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทใส่จานเพาะเชื้อ

ภาคผนวก ข

วิธีการเตรียมสารเคมี

1. ยาปฏิชีวนะ Ciprofloxacin

0.33 และ 3.33 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

นำ Ciprofloxacin 1 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 3 มิลลิลิตร จะให้ความเข้มข้นเท่ากับ 0.33 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (333 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นนำไปเจือจางให้มีความเข้มข้นเป็น 0.33 และ 3.33 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับใช้ในชุดควบคุมผลบวกของการทดสอบกับ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ตามลำดับ สุกท้ายแล้วทำให้ปราศจากเชื้อโดยนำมากรองผ่านตัวกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร

25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

นำ Ciprofloxacin 1 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 1 มิลลิลิตร จะให้ความเข้มข้นเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) นำไปเจือจางให้มีความเข้มข้นเป็น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับใช้ในชุดควบคุมผลบวกของการทดสอบกับ *Pseudomonas aeruginosa* สุกท้ายแล้วทำให้ปราศจากเชื้อโดยนำมากรองผ่านตัวกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร

2. การเตรียมสารสังเคราะห์อัลคิลควิโนโลนเพื่อใช้ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

เตรียมสารให้มีความเข้มข้น 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($\mu\text{g/ml}$) โดยมีตัวทำละลายคือ 4% DMSO ของปริมาตรตัวทำละลายทั้งหมด ก่อนนำไปละลายด้วยเครื่องเขย่าสารใช้เสียงความถี่สูง หลังจาก ที่สารละลายได้แล้ว ใส่ น้ำกลั่น 96% ของปริมาตรตัวทำละลายทั้งหมด ปิดขวดสารและพันด้วยพาราฟิน เก็บเข้าตู้เย็นที่มีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ชุดควบคุมที่เป็นผลลบ (Negative control) เตรียม 4% DMSO ในอาหารเหลว Mueller-Hinton broth (Mueller-Hinton broth) ในส่วนชุดควบคุมที่เป็นผลบวก (Positive control) เตรียม Ciprofloxacin ใน น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ โดยมีค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (Minimum inhibition concentration; MIC) ของยาปฏิชีวนะ Ciprofloxacin ในแต่ละแบคทีเรียมีค่าดังนี้ *E. coli* ที่ความเข้มข้น 0.039 $\mu\text{g/ml}$, *S. aureus* ที่ความเข้มข้น 0.625 $\mu\text{g/ml}$ และ *P. aeruginosa* ที่ความเข้มข้น 2.5 $\mu\text{g/ml}$

3. เตรียม 0.015% Resazurin

เตรียม 0.015% Resazurin โดยใช้ Resazurin sodium salt ปริมาณ 3 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตร 20 มิลลิลิตรและทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านไส้กรอง 0.2 ไมโครเมตร

ภาคผนวก ค
การคำนวณปริมาณเซลล์

1. ทำให้แบคทีเรียมีความเข้มข้น 1.15×10^6 CFU/ml

เมื่อได้ปริมาณแบคทีเรียเป็น CFU/ml จากการเปรียบเทียบกับสมการเส้นกราฟ ทำให้แบคทีเรียมีความเข้มข้น 1.15×10^6 CFU/ml และให้ได้ปริมาตรตามที่ต้องการได้จากการ

คำนวณในสูตร $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$

C_1 = ปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นใน 1 มิลลิลิตร (CFU/ml)

V_1 = ปริมาตรที่ต้องนำไปใส่ใน V_2 (ml)

C_2 = ปริมาณแบคทีเรียที่ต้องการใน 1 มิลลิลิตร (CFU/ml) คือ 1.15×10^6 CFU/ml

V_2 = ปริมาตรที่ต้องการ (ml)