



รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารออกฤทธิ์ที่สกัด
จากพืชสมุนไพรไทยต่อการต้านเชื้อ *Candida*
albicans สายพันธุ์ก่อโรค

โดย อาจารย์ ดร. เอนก ภูทอง

พฤษภาคม 2556

สัญญาเลขที่ MRG 5280131

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารออกฤทธิ์ที่สกัด
จากพืชสมุนไพรไทยต่อการต้านเชื้อ *Candida albicans*
สายพันธุ์ก่อโรค

โดย อาจารย์ ดร. เหนก ภูทอง

ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

สนับสนุนโดย

สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ที่ให้การสนับสนุนทุนการวิจัยในครั้งนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณ ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่สนับสนุนการทำวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณ อ. ดร. สุวรรณา โควะวิหนทวีวัฒนา ผู้เป็นทั้งอาจารย์และกัลยาณมิตรที่ให้งำลังใจตลอดการวิจัย และขอขอบพระคุณ ศ. ดร. ประมวล เทพหัสดิน ณ อยุธยา นักวิจัยที่ปรึกษา มา ณ โอกาสนี้

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: 5280131

ชื่อโครงการ: การศึกษาการออกฤทธิ์ของสารสำคัญของพืชสมุนไพรไทยต่อ *Candida albicans* สายพันธุ์ก่อโรค

ชื่อนักวิจัย: อาจารย์ ดร. เอนก ภูทอง ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

E-mail: tae0047@gmail.com

ระยะเวลาโครงการ: 16/03/2552 – 15/03/2554

Candidiasis เป็นโรคติดเชื้อ *Candida albicans* ที่พบได้บ่อยในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง และปัจจุบันพบว่ามีแนวโน้มการดื้อยา fluconazole ของ *C. albicans* มากขึ้น การศึกษาตัวยาชนิดใหม่สำหรับนำมาใช้ในการรักษาการติดเชื้อราดังกล่าวโดยเฉพาะจากสมุนไพรจึงเป็นที่น่าสนใจยิ่ง ดังนั้นงานวิจัยนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของ cinnamaldehyde จากอบเชยต่อการเจริญและปัจจัยความรุนแรงในการก่อโรคของ *C. albicans* จากการศึกษาพบว่า cinnamaldehyde มีค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ต่อ *C. albicans* เท่ากับ 125 µg/ml โดยมีการออกฤทธิ์เป็นแบบ fungicidal activity และที่ sub-inhibitory concentration cinnamaldehyde สามารถยับยั้งการสร้างท่องอก proteinase และ phospholipase activity รวมทั้ง การเกาะติดเซลล์ของ *C. albicans* โดยมีฤทธิ์แปรผันตามความเข้มข้น (dose-dependent manner) การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า cinnamaldehyde จากอบเชยมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและปัจจัยความรุนแรงในก่อโรคที่สำคัญของ *C. albicans* ในหลอดทดลองได้

คำสำคัญ: *Candida albicans* สมุนไพร ปัจจัยความรุนแรงในการก่อโรค ฤทธิ์ยับยั้ง

Abstract

Project Code: 5280131

Project Title: The inhibitory effect of active ingredient derived from Thai medicinal plant against pathogenic *C. albicans*

Investigator: Anek Pootong, Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University.

E-mail: tae0047@gmail.com

Project Period: 16/03/2009-15/03/2011

Candidiasis caused by *Candida albicans* is one of the common infectious diseases found in immunocompromised patients. Azole group is a common drug used for treatment, leading to develop drug resistance. Thus, new-developing drugs, including those from natural products such as medicinal plant are necessary. In this study, we evaluated the inhibitory effects of cinnamaldehyde on pathogenic *C. albicans*. The results revealed that the cinnamaldehyde possessed antifungal activities against *C. albicans*. The minimum inhibitory concentration (MIC) of cinnamaldehyde was 125 µg/ml with fungicidal activity. At sub-inhibitory concentration, cinnamaldehyde reduced germ tube formation, proteinase and phospholipase activities and cell adhesion of *C. albicans* with dose dependent manner. This study showed that cinnamaldehyde has a potent *in vitro* activity against *C. albicans* and can inhibit the activities of virulence factors.

Keyword: *Candida albicans*, Medicinal plant, Cinnamaldehyde, Virulence factor, Inhibitory effect

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	1
บทคัดย่อ	2
สารบัญ	4
สารบัญตาราง	5
สารบัญรูป	6
บทนำ	7
ทบทวนวรรณกรรม	8
วิธีดำเนินการวิจัย	14
ผลการวิจัย	18
สรุปผลและวิจารณ์ผลการวิจัย	26
เอกสารอ้างอิง	28
ผลิตผลจากโครงการ	32
ภาคผนวก	33

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 Minimum inhibitory concentration (MIC) และ Minimum fungicidal concentration (MFC) ของสารสกัดหยาบจากกระชายและน้ำมันหอมระเหยจากอบเชย	19
ตารางที่ 2 องค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากอบเชยที่วิเคราะห์ด้วยวิธี GC/MS	20
ตารางที่ 3 การทดสอบการสร้างท่ออกของ <i>C. albicans</i> (n=22) ในสภาวะที่มี Cinnamaldehyde ที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี Crystal violet based method (Abe et. al., 1994)	22
ตารางที่ 4 Phospholipase activity (Pz) ของ <i>C. albicans</i> ที่เพาะบน EYA-T ที่มี Cinnamaldehyde ที่ความเข้มข้นต่างๆ	24
ตารางที่ 5 Proteinase activity ของ <i>C. albicans</i> ที่เพาะบน BSA-T ที่มี Cinnamaldehyde ที่ความเข้มข้นต่างๆ	25
ตารางที่ 6 การเกาะติดเซลล์เยื่อของ <i>Candida albicans</i> ที่ผ่านการบ่มในสภาวะที่ Cinnamaldehyde ที่ความเข้มข้นต่างๆ	26

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 การเจริญของ <i>C. albicans</i> ATCC 10231 ใน SDB-T ที่มี Cinnamaldehyde ที่ความเข้มข้นต่างๆ	21
รูปที่ 2 Germ tube formation of <i>C. albicans</i> in the presence of 0 (a), 31.25 (b) and 62.5 mg/ml Cinnamaldehyde (c)	22
รูปที่ 3 Phospholipase activity of <i>C. albicans</i> in the presence of 0 µg/ml (a), 31.25 µg/ml (b) and 62.5 µg/ml (c) cinnamaldehyde	23
รูปที่ 4 Proteinase activity of <i>C. albicans</i> in the presence of 0 µg/ml (a), 31.25 µg/ml (b) and 62.5 µg/ml (c) cinnamaldehyde	24
รูปที่ 5 การเกาะติดเซลล์เยื่อของ <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 ที่ผ่านการบ่มในสภาวะที่ Cinnamaldehyde ที่ความเข้มข้น เท่ากับ 0 (a). และ 31.25 mg/ml (b)	25
รูปที่ 6 SDS-PAGE gel ของโปรตีนที่สกัดแยกจาก <i>C. albicans</i> ATCC 10231 ที่บ่มไว้ในภาวะที่มี Cinnamaldehyde ที่ความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งย้อมด้วยสี Coomassie Brilliant Blue R250	27
รูปที่ 7 Western blot analysis ของโปรตีนที่สกัดแยกจากเซลล์ <i>C. albicans</i> ATCC 10231 ที่บ่มไว้ในภาวะที่มี Cinnamaldehyde ที่ความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งวิเคราะห์ด้วย polyclonal anti- <i>C. albicans</i> antiserum	28

บทนำ

Candida albicans เป็นยีสต์ที่พบเป็นเชื้อประจำถิ่น (Normal flora) ตามส่วนต่างๆ ของร่างกายมนุษย์ สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อได้ เช่น การติดเชื้อบริเวณเยื่อเมือกในช่องปากและลำคอ (Oropharyngeal candidiasis) ช่องคลอด (Vaginal candidiasis) และหลอดอาหาร (Esophageal candidiasis) ในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง นอกจากนี้ ยังสามารถแพร่กระจายสู่ระบบหมุนเวียนเลือดก่อให้เกิดการติดเชื้อในกระแสโลหิต (Candidemia) และเข้าสู่อวัยวะภายใน ก่อให้เกิด Systemic candidiasis ซึ่งเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตในผู้ป่วยได้

ในปัจจุบัน Amphotericin B เป็นยารักษาโรคติดเชื้อราที่มีประสิทธิภาพ แต่มีผลข้างเคียง (side effect) ต่อไตและระบบเลือด โดยอาจทำให้เกิดภาวะหัวใจเต้นผิดจังหวะ และเกิดอาการแพ้อย่างรุนแรงได้ จึงนิยมยาในกลุ่ม Azole โดยเฉพาะ Fluconazole ในการรักษา แต่ด้วยข้อจำกัดของยาที่มีอย่างจำกัด อุบัติการณ์การดื้อยาของ *C. albicans* ต่อ Azole จึงสูงมากยิ่งขึ้น ดังนั้น การศึกษาค้นคว้าสารต้าน *C. albicans* ชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพและสามารถนำไปพัฒนาเป็นยาได้จึงมีความสำคัญ

ดังนั้น การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรและฤทธิ์ของสารสำคัญของสมุนไพรไทยต่อการเจริญและปัจจัยการก่อโรคของ *C. albicans*

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

1 *Candida albicans*

Candida albicans เป็นเชื้อรา (fungi) ประเภทยีสต์ (yeast) พบเป็นเชื้อประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารของคนปกติตั้งแต่ปาก หลอดอาหารจนถึงลำไส้ใหญ่ นอกจากนี้ยังพบในช่องคลอดของสตรีได้อีกด้วย อย่างไรก็ตาม พบว่าเชื้อ *C. albicans* สามารถก่อโรคได้ *C. albicans* จัดอยู่ในวงศ์ Cryptococcaceae โดยยีสต์สกุล *Candida* จะมีรูปร่างกลมหรือรี เซลล์มีขนาดประมาณ 2-3 x 1-4 ไมโครเมตร เพิ่มจำนวนด้วยการแตกหน่อ (budding) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อ คือ ที่ 37 องศาเซลเซียส เซลล์ยีสต์จะอยู่แบบโดดเดี่ยวหรือเป็นสายและสามารถสร้างได้ทั้งสายราแท้ (hyphae) และสายราเทียม (pseudohyphae) ซึ่งบางครั้งอาจเรียกว่า yeast-like fungi เชื้อ *Candida albicans* สามารถแบ่งจำแนกได้เป็นหลายสายพันธุ์ย่อย (subtype) ที่พบได้บ่อยคือสายพันธุ์ย่อย 153 157 และ 357

1.1 การก่อโรคของ *Candida albicans*

C. albicans สามารถก่อโรคตามส่วนต่างๆ ของร่างกาย โดยมีอาการที่แตกต่างออกไปขึ้นกับการติดเชื้อนั้นเกิดกับส่วนใดของร่างกาย การติดเชื้อบริเวณเยื่อเมือกในช่องปากและลำคอ (Oropharyngeal infection) เป็น candidiasis ที่พบได้บ่อย อาการโดยทั่วไปจะรู้สึกไม่สบายในช่องปากและลำคอร้อน การรับรสแปลกไปและปรากฏเยื่อขาวๆหรือเหลืองอ่อน (pseudomembranous) เกาะติดบริเวณลิ้นและกระพุ้งแก้มเรียกว่า ซาง (thrush) สามารถลอกออกได้แต่อาจจะทำให้เลือดออก นอกจากนี้แล้วอาจมีอาการของการอักเสบเป็นรอยแดงๆ (erythematous form) ในผู้ป่วยบางรายอาจปรากฏรอยแตกบริเวณมุมปากและมีการอักเสบร่วมด้วย (angular cheilitis) บางครั้งเชื้อ *C. albicans* จะลุกลามลึกเข้าไปถึงผิวของชั้นมีวคัส (mucous membrane) ทำให้เห็นเป็นปื้นสีขาวๆ (leukoplakia-like) ซึ่งไม่สามารถลอกออกได้ อีกรูปแบบหนึ่งของรอยโรคคือเป็นแผล (ulcerative lesion) ซึ่งมักเป็นแบบเรื้อรัง Oropharyngeal candidiasis นี้พบได้บ่อยในผู้ป่วยเอดส์ที่มีจำนวน CD4+ T lymphocytes ต่ำกว่า 100 (Klein *et al.*, 1984) และอาการติดเชื้อลักษณะดังกล่าวจะทำการรักษายากขึ้นเมื่อมีระดับ CD4+ T lymphocytes น้อยกว่า 10

การติดเชื้อ *C. albicans* ที่บริเวณช่องคลอด ก่อให้เกิด Vaginal candidiasis เมื่อมีการติดเชื้อจะปรากฏอาการที่เรียกว่า ตกขาวขึ้น โดยมีกลิ่นและเมือกขาวออกมาก ผู้ป่วยมักมีรู้สึกคันและคันที่อวัยวะเพศ ปัสสาวะบ่อย เมื่อมีเพศสัมพันธ์จะเจ็บมากและเป็นสิ่งบ่งชี้แรกเริ่มของการมีระบบภูมิคุ้มกันถดถอย ในกลุ่มของผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องจะมีอาการค่อนข้างรุนแรงและพบได้สม่ำเสมอ (Rhoads *et al.*, 1987) แต่ในกลุ่มคนปกติ จะพบเป็นครั้งคราว (sporadic) และอาการไม่รุนแรงเพียงพอแต่ก่อให้เกิดความรำคาญ นอกจากนี้ยังพบว่า vaginal candidiasis มักจะเกิดกับคนใน

กลุ่มสตรีตั้งครรภ์ ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องกับการขาดธาตุเหล็ก หรือสตรีปกติในช่วงระยะสุดท้ายของรอบเดือน

C. albicans สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อบริเวณผิวหนัง ขาหนีบ รักแร้ ไตเต้านม หรือตามรอยพับของผิวหนัง ซึ่งจะปรากฏรอยผื่นแดงอย่างชัดเจน อาจจะมีลักษณะคล้ายรอยผื่นที่เชื้อราลุกลามเข้าไปผสมกับเยื่อเมือกสีขาวในผู้ชายที่มีการติดเชื้อบริเวณขาหนีบมักจะมีอาการลุกลามไปถึงผิวหนังของถุงอัณฑะ นอกจากนี้ จะพบการติดเชื้อ *Candida* ที่บริเวณซอกเล็บ โดยเฉพาะในผู้ที่ต้องสัมผัสน้ำเป็นประจำ เช่น แม่ค้า คนล้างจาน ทำให้บริเวณดังกล่าวเปื่อยขึ้นตลอดเวลา

การติดเชื้อ *C. albicans* ที่หลอดอาหาร (esophageal candidiasis) เป็นภาวะที่รุนแรงกว่า และมักพบได้ในผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่อง โดยผู้ป่วยจะรู้สึกเจ็บมาก การกลืนอาหารเป็นไปด้วยความลำบาก เจ็บหน้าอกและคลื่นไส้ เกิดเมือกขาว (pseudomembrane) ที่เกิดจากเชื้อ *C. albicans* ขึ้น ซึ่งอาจจะทำให้มีการอุดตันของทางเดินหลอดอาหารได้ เชื้อ *C. albicans* ยังสามารถแพร่กระจาย ลงไปถึงกระเพาะอาหารและลำไส้ ซึ่งพบได้ไม่บ่อยนัก โดยก่อให้เกิดแผลขึ้นที่ mucous membrane การติดเชื้อบริเวณนี้การวินิจฉัย esophageal candidiasis นั้นทำได้ค่อนข้างลำบาก จึงทำให้ผู้ป่วยมักไม่ค่อยได้รับการรักษาและการกลืนยากนี้ทำให้ผู้ป่วยรับประทานอาหารได้น้อย ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ผู้ป่วยมีน้ำหนักตัวลดลง (Wilcox and Karowe, 1994; Lopez *et al.*, 1992)

ส่วน Systemic candidiasis เป็นการติดเชื้อ *C. albicans* ของอวัยวะภายในของร่างกาย เช่น ที่ระบบประสาท หัวใจ ตับและข้อต่อ โดยเชื้อเข้ามาถึงอวัยวะภายในได้สองทางคือการรับเชื้อ *C. albicans* เข้ากระแสโลหิตโดยตรงผ่านทางเข็มฉีดยาที่ไม่สะอาด ซึ่งมักพบในผู้ป่วยที่มีประวัติการฉีดยาเสพติดและผ่านทาง การแพร่กระจาย (disseminate) จากรอยโรคที่มีอยู่ก่อนแล้วหรือมาจากอุปกรณ์สอดใส่ เช่น Foley catheter หากเชื้อยีสต์สามารถแพร่กระจายไปถึงไต และทำให้เกิดภาวะไตอักเสบ อย่างไรก็ตาม ไม่ว่าเชื้อ *C. albicans* จะแพร่กระจายมาจากทางใด การติดเชื้อของอวัยวะภายในดังกล่าวนับเป็นการคุกคามต่อชีวิตของผู้ติดเชื้อโดยตรง

1.2 Virulence factors of *C. albicans*

เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคทุกชนิดจะมีการพัฒนากลไกต่างๆ เพื่อใช้ในการสร้างนิคม (colonization) การก่อให้เกิดการติดเชื้อ (infection) รวมทั้งเพื่อใช้ในการหลบหนีระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ สำหรับการก่อโรคของเชื้อ *C. albicans* นั้น ปัจจัยที่มีผลต่อรูปแบบการแสดงออกของปัจจัยความรุนแรงจะขึ้นอยู่กับชนิดของการติดเชื้อ ตำแหน่งที่ก่อโรค และปฏิกิริยาตอบสนองทางธรรมชาติของตัวโฮสต์เอง โดยในการก่อโรคนั้นชนิดใดชนิดหนึ่ง อาจต้องอาศัยใช้หลายๆ ปัจจัยความรุนแรงร่วมกัน ในขณะที่ปัจจัยความรุนแรงชนิดใดชนิดหนึ่งก็ไม่จำเป็นสำหรับทุกๆ ประเภทของโรค Candidiasis โดยปัจจัยความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อ *C. albicans* ที่สำคัญ คือ 1) cell adhesion 2) morphogenesis และ 3) extracellular hydrolytic enzyme production

-Cell adhesion

การเกาะของเชื้อ *C. albicans* กับเซลล์ของโฮสต์นับเป็นจุดเริ่มของการก่อโรค candidiasis และนับเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญในการก่อโรคของเชื้อ *C. albicans* (Calderone and Braun, 1991) จากการศึกษาพบว่าเชื้อก่อโรค *C. albicans* ที่เพาะแยกได้จากผู้ป่วย จะสามารถเกาะกับเซลล์เยื่อเมือกได้ดีกว่าเชื้อ *C. albicans* ที่เพาะแยกจากคนติดเชื้อที่ไม่แสดงอาการ การเกาะติดกับเซลล์เยื่อเมือกของเชื้อ *C. albicans* นั้นเกิดจากการจับกันอย่างจำเพาะของ candidal adhesin (agglutinin-like sequence; ALS, hypha-specific cell wall protein; Hwp1p, integrin; INT1 และ α -1,2-mannosyltransferase gene; MNT1) กับ extracellular matrix proteins (ECM) ของเซลล์โฮสต์ เช่น fibronectin (FN), laminin, fibrinogen และ collagen type I, IV ปัจจัยเช่น fungal cell surface hydrophobicity, the phenotype of *C. albicans*, pH, temperature, pregnancy, diabetes และ oral contraceptive usage ล้วนมีผลต่อการเกาะติดของเชื้อ *C. albicans* ทั้งสิ้น

- Morphogenesis

Morphogenesis หมายถึงการเปลี่ยนรูปร่างเซลล์ จากรูปหนึ่งไปอีกรูปหนึ่ง (yeast cell $\leftrightarrow$ filamentous shape) ซึ่งเชื้อ *C. albicans* จัดเป็นเชื้อราที่มีคุณสมบัติดังกล่าว โดยเซลล์ยีสต์จะเปลี่ยนรูปไปเป็นทั้งสายราแท้หรือสายราเทียมขึ้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง ความสมบูรณ์ของแหล่งอาหาร เป็นต้น เชื้อ *C. albicans* สามารถเจริญได้ ทั้งในรูปของเซลล์และสายราแท้ รวมทั้งลักษณะเซลล์ที่ก้ำกึ่ง ซึ่งก็คือ เซลล์ราเทียม (psuedohyphae) และยังพบว่าเชื้อสามารถเปลี่ยนไปเป็น Chlamydospore ได้อีกด้วย ลักษณะ Morphogenesis ของเชื้อนี้ พบว่าเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อความสามารถในการก่อโรคของเชื้อ *C. albicans* (Whiteway and Bachewich, 2007) โดยเชื้อ *C. albicans* ที่อยู่ในรูปของสายราแท้จะมีความสามารถในการเกาะเซลล์เยื่อเมือกและก่อโรคได้ดีกว่า (Lo *et al.*, 1997) แต่ในขณะที่เซลล์ยีสต์จะทนต่อการถูกทำลายโดยระบบภูมิคุ้มกันและมีบทบาทสำคัญที่ทำให้เชื้อมีการกระจายตัวจากหลอดเลือดเข้าสู่อวัยวะภายในได้

-Extracellular hydrolytic enzyme production

Secreted aspartyl proteinase (SAP)

Secreted aspartyl proteinases หรือ SAP เป็น extracellular proteinases สามารถแบ่งออกได้เป็น 10 ชนิดคือ SAP 1 ถึง SAP 10 ถูกควบคุมการแสดงออกโดย multi *sap* gene family (Monod *et al.*, 1994) SAPs เป็นโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 35 ถึง 50 kDa โดยพบว่า Sap1 to Sap6 สามารถทำงานได้ในสภาวะความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในช่วง 2.0 - 7.0 คือ Sap1 ถึง Sap3 เหมาะที่ pH values แต่ Sap4 ถึง Sap6 ทำงานได้ในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรดด่างที่สูงกว่า ซึ่งน่าจะเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ *C. albicans* สามารถดำรงชีพและก่อให้เกิดพยาธิสภาพในหลายระบบ เช่น เนื้อเยื่อเมือก ผิวหนัง และในอวัยวะภายในได้ นอกจากนี้ยังพบว่า SAPs สามารถตัดพันธะโปรตีน (peptide bonds) ในตำแหน่งที่แตกต่างกัน (Fusek *et al.*, 1994)

SAP สามารถย่อยโปรตีนของโฮสต์ได้หลายชนิดนอกจากจะนำไปใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนแล้วยังพบว่าทำให้เชื้อสามารถเกาะติดเซลล์และลูกกลมเนื้อเยื่อของโฮสต์ได้ง่ายขึ้น เช่น SAP2 สามารถย่อยโปรตีนมิวซิน (mucin) ที่อยู่บนผิวเยื่อเมือก (Colina *et al.*, 1996) และ secretory immunoglobulin A (IgA) (Ruchel, 1986) extracellular matrix เช่น keratin, collagen และ vimentin ช่วยให้เชื้อสามารถลูกกลมและแพร่กระจายเข้าสู่กระแสเลือดได้ SAP ยังสามารถสลาย salivary lactoferrin, lactoperoxidase, เอ็นไซม์ cathepsin D ที่พบในเม็ดเลือดขาว และโปรตีน complement เพื่อหลบหนีระบบการป้องกันตัวเองของโฮสต์ (Kaminishi *et al.*, 1995) รวมทั้ง α 2-macroglobulin และ cystatin A ซึ่งเป็นโปรตีนที่ยับยั้งการทำงานของ proteinase อีกด้วย นอกจากนี้ SAP2 ยังสามารถกระตุ้นให้ร่างกายของโฮสต์เกิดการอักเสบ โดยการกระตุ้นให้มีสลายตัวของโมเลกุลตั้งต้นของ interleukin-1 β ให้เป็น interleukin-1 β มากขึ้น และสามารถกระตุ้นการทำงานของ Hageman factor ซึ่งเป็นเอ็นไซม์ชนิด serine proteinase ทำให้มีกระตุ้นโปรตีน bradykinin ในระบบ inflammatory kinin system สูงขึ้น ส่งผลให้เกิดการอักเสบและมี vascular permeability สูงขึ้นตามมา (Kaminishi *et al.*, 1990) นอกจากนี้พบว่าโปรตีน SAPs ยังแสดงบทบาทสำคัญร่วมกับปัจจัยความรุนแรงอื่นๆ เช่น adhesion และ morphogenesis เป็นต้น

Phospholipase (PL)

ฟอสโฟไลเปส (Phospholipase) จัดเป็นกลุ่มของเอ็นไซม์ที่สามารถสลาย (hydrolyze) พันธะเอสเทอร์ในโมเลกุลกลีเซอโรฟอสโฟไลปิด (glycerophospholipid) เอ็นไซม์ Phospholipase สามารถแบ่งได้ออกเป็นกลุ่มๆ เช่น A, B, C, และ D ซึ่งแบ่งตามตามความสามารถในการสลายพันธะเอสเทอร์ที่ตำแหน่งจำเพาะที่ต่างกัน จากการทบทวนวรรณกรรม พบว่าเอ็นไซม์ Phospholipase ที่สร้างโดยเชื้อ *C. albicans* ที่สำคัญคือ candidal phospholipase B (caPLB) (Leidich *et al.*, 1998) ซึ่งสามารถสลายพันธะเอสเทอร์ได้ทั้งแบบ lysophospholipase (Lyso-PL) และ lysophospholipase-transacylase (LPTP) (Takahashi *et al.*, 1991)

จากการศึกษาความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อ *C. albicans* ในเซลล์เยื่อเยาะเพียงพบว่าเชื้อ *C. albicans* ที่มีการสร้างเอ็นไซม์ Phospholipase ในปริมาณสูงจะมีความสามารถในการเกาะติดและทำลายเซลล์ได้มากกว่า (Barrett-Bee *et al.*, 1985) และพบว่า น้ำเลี้ยงเชื้อดังกล่าว (supernatant) มีความสามารถในการทำลายเซลล์เยื่อเยาะได้ดีกว่าน้ำเลี้ยงเชื้อจากเชื้อที่ไม่มีสร้างเอ็นไซม์ PLB นอกจากนี้การศึกษาเปรียบเทียบการลุกล้ำเซลล์ (cell penetration) กับเชื้อที่ไม่มีสร้างเอ็นไซม์ดังกล่าว พบว่า เชื้อ *C. albicans* ที่สร้าง PLB สามารถทำลายเซลล์และมีการลุกล้ำได้ดีกว่าอย่างชัดเจน โดยการทำลายผนังเซลล์เยื่อเยาะเป็นผลให้เซลล์ได้รับความเสียหาย (Leidich *et al.*, 1998) จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่า caPLB มีส่วนช่วยให้เชื้อสามารถเกาะ ลุกล้ำและทำลายเซลล์ของโฮสต์ แต่อย่างไรก็ดีจะพบว่าเชื้อที่เพาะแยกจากเลือด (hematogenous dissemination) ของผู้ป่วยสร้าง caPLB ได้มากกว่า (Ibrahim *et al.*, 1995) แม้ว่าทั้งเซลล์ยีสต์และราแท้ของเชื้อ *C. albicans* จะสามารถสร้าง caPLB ได้ก็ตาม แต่เซลล์ราแท้ของเชื้อจะสามารถสร้าง caPLB ได้ในปริมาณที่มากกว่า

ซึ่งจะสัมพันธ์กับความรุนแรงในการก่อโรค ที่พบว่าเซลล์สายราแท้ของเชื้อ *C. albicans* สามารถก่อโรคได้รุนแรงกว่าเซลล์ยีสต์

นอกจากนี้ ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการสลายโมเลกุลกลีเซอโรฟอสโฟไลปิด (glycerophospholipid) ของ caPLB เช่น lipid และ สารอนุพันธ์ lipid สามารถกระตุ้นการทำงานของ protein kinase C ซึ่งส่งผลในการกระตุ้นขบวนการ cell signaling และมีผลต่อ physiology ของเซลล์โฮสต์ (Oishi *et al.*, 1988) นอกจากนี้ยังพบว่า candidal phospholipase สามารถกระตุ้นขบวนการอักเสบได้อีกด้วย

1.3 การรักษาโรค candidiasis

เนื่องจาก candidiasis ปรากฏอาการได้ค่อนข้างกว้าง และระดับความรุนแรงแตกต่างกันไป ดังนั้นการรักษาจึงมีแนวทางมุ่งไป 2 รูปแบบ คือ การรักษาแบบเฉพาะที่ (local) และ การรักษาทั้งระบบทั่วร่างกาย (systemic)

การรักษาแบบเฉพาะที่ เป็นทางเลือกแรกที่ใช้กับ candidiasis บริเวณ ช่องคลอด ผิวหนัง ช่องปากและลำคอ โดยยาที่ใช้มีทั้งในรูป ยาบ้วนปาก ยาเม็ดอม ยาเหน็บและครีม ตัวยาออกฤทธิ์ที่ใช้มีด้วยกันหลายชนิด เช่น nystatin, clotrimazole, econazole, ketoconazole และ amphotericin B ยาเม็ดอมใช้สำหรับอมให้ละลายในปากอย่างช้าๆ 3-5 ครั้งต่อวัน ยาอมที่มีส่วนประกอบของ clotrimazole อาจจะทำให้ระดับเอ็นไซม์ SGOT สูงขึ้นประมาณ 15 % อาการข้างเคียงอื่นที่อาจพบได้ เช่น มีการระคายเคืองในช่องปาก คลื่นไส้ ส่วนครีมหรือยาทาเฉพาะที่เหมาะสมสำหรับผู้ที่มีรอยโรคที่ผิวหนัง สามารถใช้ทาบริเวณมุมปาก ผิวหนัง เพดานในช่องปาก (palate) โดยอาจอาการข้างเคียงที่พบได้หลังทายา เช่น ผู้ป่วยรู้สึกร้อน ระคายเคือง เป็นผื่นและผิวหนังลอก เป็นต้น ครีมบางชนิดมีส่วนประกอบ ของ corticosterol ร่วมด้วยเพื่อลดการอักเสบ อาจจะทำให้มีอาการคันและผิวหนังแห้งร่วมด้วย

การรักษาแบบทั้งระบบทั่วร่างกาย จะใช้กับผู้ป่วย candidiasis บริเวณหลอดอาหาร และที่แพร่กระจายไปตามอวัยวะภายในต่างๆ หรือในกรณีที่การให้การรักษาแบบเฉพาะที่แล้วไม่ได้ผล ยาที่ใช้ได้แก่ ketoconazole, fluconazole ซึ่งให้ผลการรักษาที่ดีกว่า แต่ในปัจจุบันพบว่า มีแนวโน้มการดื้อยา fluconazole สูงขึ้น (Baily *et al.*, 1994)

2 สมุนไพรกับการรักษาโรค candidiasis

สมุนไพร หมายถึง พืชที่ใช้ทำเป็นเครื่องยาในการรักษาอาการอันผิดปกติของร่างกาย ซึ่งมีการใช้กันมาตั้งแต่อดีตกาลจนปัจจุบัน ชีวิตประจำวันของคนไทยนั้นผูกพันกับสมุนไพรอยู่เสมอเพราะนอกจากจะใช้สมุนไพรเป็นยาแล้ว สมุนไพรหลายชนิดยังใช้เป็นอาหารประจำวันด้วยเช่น ขิง ข่า กระเทียม ตะไคร้ กระเพรา เป็นต้น ส่วนของพืชสมุนไพรที่นำมาใช้ (ราก ลำต้น ใบ ดอก และผล)

อาจจะมีคุณสมบัติหรือสรรพคุณในการรักษาที่แตกต่างกันไป และการใช้พืชสมุนไพรพบว่ามีผลข้างเคียงหรือตกค้างน้อยมาก เนื่องจากเป็นสารที่ได้จากธรรมชาติ

เนื่องจากอุบัติการณ์ของเชื้อจุลินทรีย์รวมถึง *C. albicans* ที่เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะที่เพิ่มสูงขึ้น (Boken *et al.*, 1993) อีกทั้งอาการข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์จากการใช้ยาปฏิชีวนะ จึงทำให้มีการศึกษาค้นคว้ายาชนิดใหม่ๆ จากพืชสมุนไพรเพิ่มสูงขึ้นและพบว่าสมุนไพรหลายชนิดมีผลในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ ซึ่งในประเทศไทยได้มีการนำสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรามาใช้เป็นยาทาภายนอกหรือครีมสำหรับแผลในช่องปากเพื่อใช้รักษาโรคที่เกิดจากเชื้อ *C. albicans* บางแล้ว (ชญาธิศ ศรชัยธวัชวงศ์ และคณะ, 2006) แต่ยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ของสมุนไพรที่มีผลต่อการแสดงออกของปัจจัยก่อโรคของเชื้อ *C. albicans* แต่อย่างใด ดังนั้นงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ของสมุนไพรที่ในการยับยั้งปัจจัยก่อโรคของเชื้อ *Candida* จึงก่อให้เกิดประโยชน์เพื่อใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการใช้สมุนไพรในการรักษาโรค candidiasis และเป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อใช้ในการศึกษาสารออกฤทธิ์จากสมุนไพรต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

สมุนไพร

สมุนไพรที่ใช้ในการศึกษานี้มีรายงานการศึกษาระบุถึงฤทธิ์ยับยั้งในการเจริญของ *C. albicans* ประกอบด้วย กระเจี๊ยบแดง กระชาย ชะเอม ขมิ้นชันและอบเชย (Banerjee *et al.*, 1978; Quale *et al.*, 1996; Yaya *et al.*, 2008; Phongpaichit *et al.*, 2005) โดยทำการเตรียมตัวอย่างสมุนไพรตามการศึกษาก่อนหน้านี้ โดยเตรียมสารสกัดหยาบกระเจี๊ยบแดง กระชายและชะเอม ทำโดยนำพืชสมุนไพรที่ผ่านการตากแห้ง มาบดด้วยโกร่ง จากนั้นเติม 95% ethanol ปริมาตรเป็น 2 เท่าของน้ำหนักสมุนไพร (mg/ml) และเก็บในขวดสีชาที่มีฝาปิดสนิท บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นกรองกากออกโดยใช้กระดาษกรอง Whatman No. 3 แล้ว นำสารละลายดังกล่าวไปการอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 42°C เก็บสารสกัดหยาบดังกล่าวไว้ในขวดที่มีฝาปิดที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้ และทำการเจือจางสารสกัดหยาบดังกล่าวด้วย Dimethylsulfoxide (DMSO) ให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ สำหรับ ขมิ้นและอบเชย ใช้สารสกัดในรูปของน้ำมันหอมระเหย (บริษัท ทรอปิก้าไลฟ์ จำกัด ประเทศไทย)

C. albicans

C. albicans ที่ใช้ในการศึกษาเป็นเชื้อที่เพาะแยกได้จากตัวอย่างเลือด (Blood culture/Hemoculture) จำนวน 20 สายพันธุ์ และเชื้อ *C. albicans* ATCC 10231 และ 90028 รวมจำนวนทั้งสิ้น 22 ตัวอย่าง ทำการพิสูจน์แยกชนิดโดยใช้ การทดสอบการสร้างท่อออก (Germ tube test) การทดสอบสีโคโลนีของ Candida บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Chromogenic Candida Agar การทดสอบการใช้สารประกอบคาร์บอนในสภาวะที่มีออกซิเจน (Carbon assimilation test) และการจำแนกชนิด *Candida* ด้วยเทคนิค PCR-RFLP ตามวิธีของ Mirhendi และคณะ (2006) และเพาะเลี้ยงเชื้อบน Sabouraud dextrose agar (Oxoids, USA) (แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนนำไปทดสอบ และเพาะเลี้ยงไว้เป็นเวลา 1 อาทิตย์ โดย sub-culture ทุกๆ 3 วัน

การทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* ด้วยวิธี Agar disc diffusion

กระจาย *C. albicans* ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ McFarland No. 0.5 (1×10^6 cfu/ml) บนอาหารแข็ง SDA ด้วยไม้พ่นสำลีปราศจากเชื้อ จากนั้นวางแผ่น Sterilized paper disc ขนาด 6 mm ที่มีสารสกัดสมุนไพรและสารสำคัญ (active ingredients) ปริมาณ 5 mg และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง อ่านผลโดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ Inhibition zone ที่เกิดขึ้น

การทดสอบความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. albicans* (Minimal inhibition concentration; MIC) และความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อ *C. albicans* (Minimal fungicidal concentration; MFC) ของสารสกัดสมุนไพรและสารสำคัญ

เชื้อจากสารสกัดสมุนไพรและสารสำคัญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Sabouraud dextrose broth ที่มี 0.02% Tween-20 (SDB-T) ให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี serial two-fold dilution หลังจากเติมเชื้อ *C. albicans* ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 5×10^3 CFU/ml ปริมาตร 0.5 ml แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยทำ cell control และ media control ควบคู่ เพื่อใช้เปรียบเทียบความขุ่นและควบคุมการปราศจากเชื้อ (sterility) ตามลำดับ อ่านผลค่า MIC ของสารสกัดสมุนไพรและสารสำคัญ (mg/ml) จากหลอดที่มีความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่อาหารเลี้ยงเชื้อที่ยังคงใสอยู่ และเพื่อหาค่า MFC ของสารสกัดสมุนไพรและสารสำคัญ นำหลอดทดลองที่อาหารเลี้ยงเชื้อยังใสม่มาปั่นตกตะกอนที่ $2,000 \times g$ 10 นาที (Hettich zentrifugen, ROTOFIX 32, Germany) เทส่วนใสทิ้งและกระจายตะกอนบน SDA ด้วย sterile spreader บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง อ่านค่า MFC ได้จากหลอดทดสอบที่มีความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารสกัดสมุนไพรและสารสำคัญที่ไม่พบการเจริญของเชื้อ ทำการทดสอบแบบควบคุม (duplicate) ในแต่ละครั้งและทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยด้วย Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยโดยใช้ Gas chromatography mass spectrometer (GC/MS) ที่มีคอลัมน์ชนิด capillary HP5MS (length 30 m $\times$ I.D. 0.25 mm $\times$ film thickness 0.25 μ m) ทำการฉีดเข้าเครื่องแบบ direct injection ปริมาตร 0.4 μ l แบบ split mode (split ratio, 100:1 v/v) อุณหภูมิ injection เท่ากับ 250 °C ใช้ฮีเลียมเป็นตัวพา และ ionization voltage 70 eV ใช้ mass range ตั้งแต่ 50-500 m/z อุณหภูมิ detector 250 °C แปรผลโดย เทียบกับ library ของ Wiley 275 ที่มี quality match มากกว่าร้อยละ 85

การทดสอบ Antifungal killing time

ทำการทดสอบ Antifungal killing time ตามวิธีของ Cantón และคณะ (2004) โดยเฉพาะ *C. albicans* ATCC 10231 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 5×10^4 cfu/ml ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SDB-T ที่มี Cinnamaldehyde ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 ถึง 250 μ g/ml บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C จากนั้น ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 10 μ l ที่ชั่วโมง 0, 1, 2, 4, 6, 12, 24 และ 48 แล้วกระจายบนอาหารแข็ง SDA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวน Colony ที่เกิดขึ้นและนำค่าไปคำนวณหาความเข้มข้นของเชื้อในหน่วย cfu/ml โดยทำการทดสอบแบบควบคุม (duplicate) ในแต่ละครั้งและทำการทดสอบซ้ำ 2 ครั้ง

การทดสอบฤทธิ์ของ Cinnamaldehyde ต่อการสร้างท่ออกของ *C. albicans*

ทำการเพาะ *C. albicans* ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 5×10^4 cfu/ml ลงในหลุมของ 96-flat-microtiter plate ที่มี Fetal bovine serum (Gibco BRL, USA) และ Cinnamaldehyde ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0 (control), 0.25 และ $0.5 \times \text{MIC}$ หลังจากบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้ว นำไปย้อมด้วย Crystal violet ตามวิธี Abe (Abe *et. al.*, 1994) โดยมีรายละเอียดดังนี้ หลังจากเทสารละลายทิ้งและล้างหลุมทดสอบด้วย 70% ethanol ปริมาตร 100 μl แล้ว ล้างเซลล์ยีสต์ที่ไม่สร้างท่อออกออกด้วย 0.25% Sodium dodecyl sulfate (SDS; Ajax Finechem, Australia) ปริมาตร 200 μl จำนวน 1 ครั้ง และล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นจำนวน 3 ครั้ง ย้อมเซลล์ที่สร้างท่ออกที่เกาะติดบนหลุมทดสอบด้วย 0.01% Crystal violet (Sigma, USA) ปริมาตร 100 μl เป็นเวลา 15 นาที จากนั้น กำจัดสีและล้างหลุมทดสอบด้วยน้ำกลั่น และ 0.25% SDS จำนวน 3 และ 2 ครั้ง ตามลำดับ นำไปล้างอีก 2 ครั้งด้วยน้ำกลั่น หลังจาก ตากหลุมทดสอบให้แห้งแล้ว ทำการชะสีด้วย Isopropanol ที่มี 0.04 N HCl เป็นองค์ประกอบ ปริมาตร 200 μl จากนั้น เติม 0.25% SDS ปริมาตร 50 μl ถ่ายสารละลายลง Microtiter well ใหม่ นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ด้วยเครื่อง ELISA reader (Dyner, USA) โดยทำการทดสอบแบบควบคุม (duplicate) ในแต่ละครั้งและทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง

การทดสอบฤทธิ์ของ Cinnamaldehyde ต่อ Proteinase และ Phospholipase activity

ทดสอบฤทธิ์ของ Cinnamaldehyde ต่อ Proteinase และ Phospholipase activity โดยดัดแปลงวิธีการของ Baboni และคณะ (2009) โดยใช้ Bovine serum albumin agar-0.02% Tween-80 (BSA-T) และ Egg yolk agar-0.02% Tween-80 (EYA-T) ตามลำดับ หยอด *C. albicans* ที่ความเข้มข้นประมาณ 10^6 cfu/ml ปริมาตร 5 μl ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Cinnamaldehyde ที่ความเข้มข้น 0 (control), 0.25 และ $0.5 \times \text{MIC}$ จากนั้น บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 และ 5 วัน สำหรับการทดสอบ Proteinase และ Phospholipase activity ตามลำดับ อ่านผล Activity ได้จาก Precipitation zone (Pz) ซึ่งเป็นอัตราส่วนของเส้นผ่าศูนย์กลางของวงฝ้ารอบโคโลนี (Opaque zone) ต่อเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี ทำการทดสอบซ้ำ 2 ครั้งโดยเป็นอิสระต่อกัน

การทดสอบฤทธิ์ของ Cinnamaldehyde ต่อการเกาะติดเซลล์เยื่อของ *C. albicans* ด้วย Epithelium cell adhesion assay

การทดสอบฤทธิ์ของ Cinnamaldehyde ต่อการเกาะติดเซลล์เยื่อของ *C. albicans* ด้วย Epithelium cell adhesion assay กระทำโดยดัดแปลงวิธีการทดสอบของ Taweekaisupapong และคณะ (2005) โดยเพาะ *C. albicans* ATCC 10231 และ 25922 ภายใต้สภาวะที่มี Cinnamaldehyde ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการปั่นล้างเซลล์ยีสต์ด้วย Sterile

0.85% NaCl จำนวน 2 ครั้งแล้วปรับความเข้มข้นเซลล์ยีสต์กับ HEC ร่วมกับ (อัตราส่วน HEC : yeast เท่ากับ 1:100) โดยเขย่าเซลล์ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างเอา *C. albicans* ที่ไม่เกาะเซลล์เยื่อออกโดยใช้เยื่อกรอง 12 μ m Pore size (Millipore, USA) และน้ำเกลือปราศจากเชื้อ ปริมาตร 50 ml จากนั้น ถ่ายเซลล์ลงบนสไลด์แก้วและปล่อยให้แห้ง ทำการ Fix ด้วย Methanol หลังจากย้อมตัวอย่างด้วยสีแกรมแล้ว นับเซลล์ยีสต์ที่เกาะอยู่บนเซลล์เยื่อ บู 100 เซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทำการทดสอบแบบควบคู่ (duplicate) ในแต่ละครั้งและทำการทดสอบซ้ำ 2 ครั้ง รายงานผลเป็น ค่าเฉลี่ยของจำนวนเชื้อ *C. albicans* ที่เกาะอยู่บนเซลล์ต่อเซลล์เยื่อ บู 100 เซลล์

การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรต่อการแสดงออกของโปรตีน (in vivo expression) ของเชื้อ *C. albicans*

ทำการบ่มเพาะเชื้อ *C. albicans* ATCC 10231 ที่ความเข้มข้น 5×10^4 cfu/ml ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SDB ที่มี Cinnamaldehyde ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0, 0.25 และ 0.5xMIC บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเกี่ยวเซลล์ยีสต์ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 x g เป็นเวลา 10 นาที และทำการปั่นล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วย NSS หลังจากเจือจางเซลล์ยีสต์ใน PBS, pH 7.4-0.5% tween 20 แล้ว ทำให้เซลล์ยีสต์แตกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง นำไปตกตะกอนเศษเซลล์ออกด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายส่วนใสด้านบน (supernatant) ไปทดสอบหาความเข้มข้นของโปรตีนโดยใช้ Bradford's solution โดยเปรียบเทียบความเข้มข้นกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแล้ว จากนั้นนำ supernatant ดังกล่าวผสมกับ sample loading reducing buffer ที่ประกอบด้วย sodium dodecyl sulfate (SDS) และ β -mercaptoethanol หลังจาก incubated ที่ 95°C เป็นเวลา 5 นาที ปั่นแยกส่วนผสมดังกล่าวที่ 12,000 x g เป็นเวลา 5 นาทีเพื่อกำจัดส่วนที่ไม่ละลายออกไป จากนั้นใส่และแยกโปรตีนแต่ละตัวอย่าง ปริมาณ 5 ไมโครกรัมในแต่ละหลุมของ 12% SDS-polyacrylamide gel หลังจากนั้นแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE แล้ว gel ส่วนหนึ่งนำไปย้อมแถบโปรตีนบน gel ด้วยสี Coomassie Brilliant Blue R250 โดยอีกส่วนหนึ่งทำการถ่ายโอนแถบโปรตีนลงบน nitrocellulose membrane (NC) ทำการวิเคราะห์แถบโปรตีนด้วย polyclonal antiserum ที่จำเพาะกับเชื้อ *C. albicans* โดยบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้าง NC ดังกล่าวด้วย PBS, pH 7.4-0.05% Tween-20 แล้วย้อม ด้วย diluted-goat anti-mouse immunoglobulin ที่ติดฉลากด้วย horseradish peroxidase (HRP) ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้าง NC ด้วย PBS, pH 7.4-0.05% Tween-20 แล้วเติม substrate ของ HRP คือ 0.03% H₂O₂ ใน 2,6-dichloroindophenol (DCIP) ใช้เวลา 3-5 นาทีในการทำปฏิกิริยาและหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ดังกล่าวโดยการล้าง NC หลาย ๆ ครั้งด้วยน้ำกลั่น จากนั้นเปรียบเทียบแถบโปรตีนทั้งบน SDS-PAGE และ Western blot analysis ของ *C. albicans* ที่บ่มเพาะ

เชื้อภายใต้ภาวะที่มี Cinnamaldehyde ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อสำรวจความแตกต่างในการแสดงออกโปรตีนของเชื้อดังกล่าวภายใต้ทั้งสองสภาวะที่แตกต่างกัน

การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical analysis)

เปรียบเทียบการสร้างท่อออก Phospholipase และ Proteinase activity ของ *C. albicans* ในภาวะที่มี Cinnamaldehyde ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วย Wilcoxon Signed Rank test และวิเคราะห์ผลของ Cinnamaldehyde ต่อการเกาะติดเซลล์เยื่อของ *C. albicans* ด้วย Friedman ranks test โดยกำหนดความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ $p < 0.05$

ผลการทดลอง

ความสามารถของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญและการฆ่า *C. albicans*

หลังจาก ทำการวางแผ่นกระดาษกรองเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มม. ที่มีสารสกัดสมุนไพร ปริมาณ 5 mg ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่กระจายเชื้อ *C. albicans* ทั้ง 22 สายพันธุ์ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า ไม่เกิด Clear zone รอบ disc ที่มีสารสกัดหยาบจากกระเจี๊ยบแดง ชะเอม และ น้ำมันหอมระเหยจากขมิ้นชัน แต่พบว่าการเกิด Clear zone รอบ disc ที่มีสารสกัดหยาบจากกระชายและ น้ำมันหอมระเหยจากอบเชยโดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยเท่ากับ 10 ± 0.5 และ 17.4 ± 1.0 mm ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจากกระชายและอบเชยมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. albicans* ได้ จากการทดสอบความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. albicans* (Minimal inhibitory concentration; MIC) ของสารสกัดสมุนไพรด้วย Broth dilution method พบว่าสารสกัดหยาบจากกระชายและน้ำมันหอมระเหยจากอบเชยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. albicans* ได้ โดยมีค่า MIC เท่ากับ 2 และ 1 mg/ml และ MFC เท่ากับ 2 และ 1 mg/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 Minimum inhibitory concentration (MIC) และ Minimum fungicidal concentration (MFC) ของสารสกัดหยาบจากกระชายและน้ำมันหอมระเหยจากอบเชย

สารสกัด	MIC (mg/ml)	MFC (mg/ml)
กระชาย	2	2
อบเชย	1	1

ผู้วิจัยได้คัดเลือกน้ำมันหอมระเหยจากอบเชยสำหรับทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งปัจจัยการก่อโรคของ *C. albicans* ต่อไป

องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากอบเชย

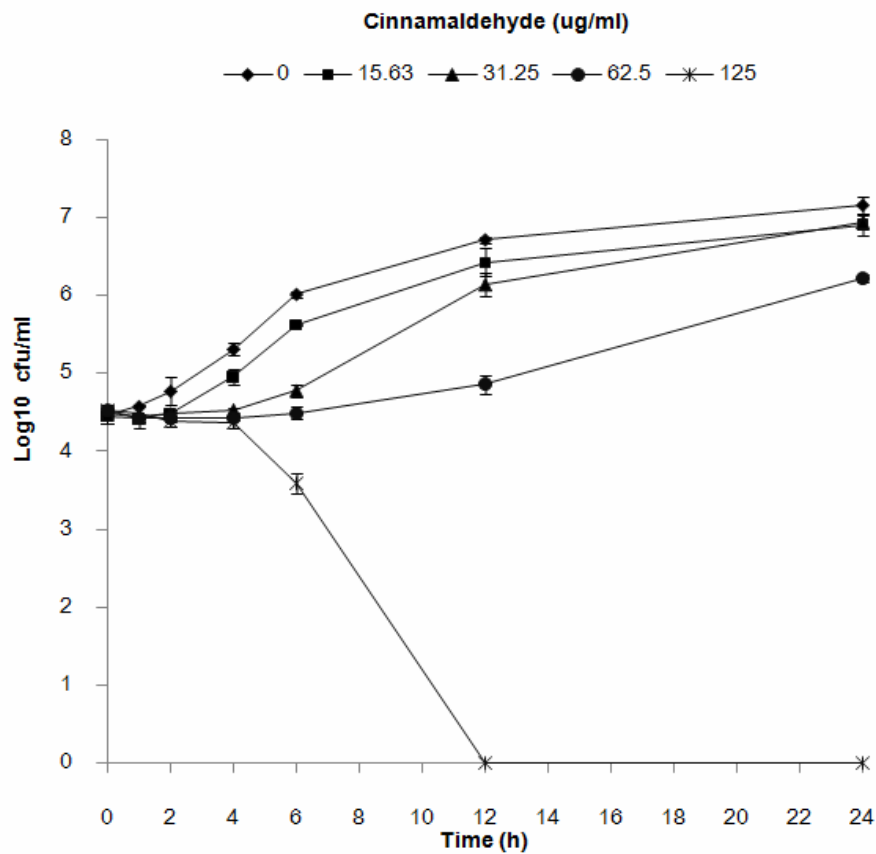
การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากอบเชย ด้วยเทคนิค GC-MS พบว่า Cinnamaldehyde เป็นสารประกอบหลักประมาณ 87 % สำหรับสารประกอบชนิดอื่นๆ ตรวจพบได้ในปริมาณน้อย ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 องค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากอบเชยที่วิเคราะห์ด้วยวิธี GC/MS

รายการ	ผลการทดสอบ		
	Retention time (RT)	% Area	% Match
2-propanal, 3-phenyl	23.24	87.11	98
α -Copaene	28.33	2.38	99
Trans- α -bergamotene	30.78	0.27	91
Trans-caryophyllene	30.99	1.43	99
Naphthalene, 1,2,4a,5,6,8a-hexahydro	37.81	0.52	95
4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-, (1. α - ,4a α -,8a α)			
δ -Cadiene	39.59	1.12	99
Naphthalene, 1,2,4a,7-hexahydro-1,6- dimethyl-4-(1-methylethyl)	47.30	0.52	92
Hexadecanoic acid, trimethylsilylester	59.6	0.32	98

ความสามารถของ Cinnamaldehyde ในการยับยั้งการเจริญและการฆ่า *C. albicans*

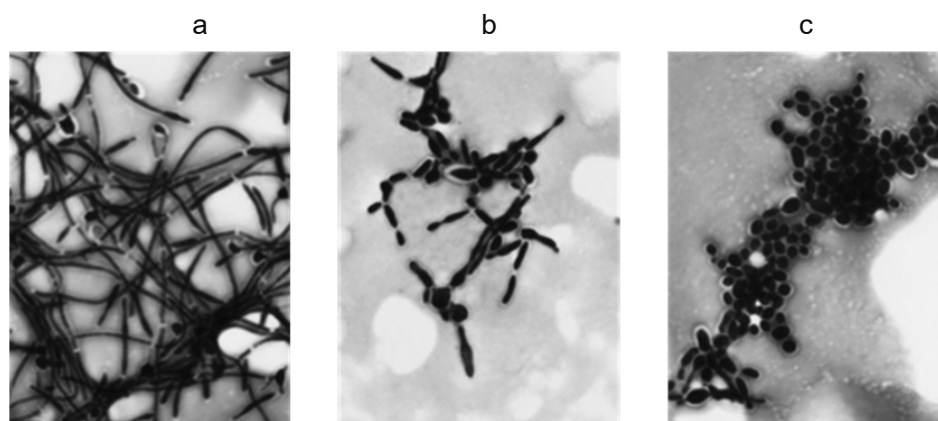
จากการทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของ Cinnamaldehyde (Sigma, USA) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. albicans* ด้วยวิธี Agar disc diffusion method พบว่า Cinnamaldehyde สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. albicans* ทั้ง 22 ตัวอย่างได้ และด้วยวิธี broth dilution method พบว่า Cinnamaldehyde มีค่า MIC และ MFC เท่ากับ 125 $\mu\text{g/ml}$ จากการเพาะเลี้ยง *C. albicans* ATCC 10231 ที่ความเข้มข้น 5×10^4 cfu/ml ในอาหาร SDB-T ที่มี Cinnamaldehyde ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 ถึง 0.125 mg/ml พบว่า ที่ความเข้มข้น เท่ากับ MIC (125 $\mu\text{g/ml}$) Cinnamaldehyde สามารถฆ่า *C. albicans* ได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า Cinnamaldehyde มีการออกฤทธิ์แบบ Fungicidal activity ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 การเจริญของ *C. albicans* ATCC 10231 ใน SDB-T ที่มี Cinnamaldehyde ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ฤทธิ์ของ Cinnamaldehyde ต่อการสร้างท่ออกของ *C. albicans*

จากการทดสอบความสามารถของ Cinnamaldehyde ในการยับยั้งการสร้างท่ออก (germ tube formation) ของ *C. albicans* โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อ *C. albicans* ในสภาวะที่มี Cinnamaldehyde ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0, 31.25 และ 62.5 µg/ml ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0, 0.25 และ 0.5xMIC ตามลำดับ พบว่า Cinnamaldehyde ที่ความเข้มข้นน้อยกว่า MIC สามารถยับยั้งการสร้างท่ออกได้ ดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 Germ tube formation of *C. albicans* in the presence of 0 (a), 31.25 (b) and 62.5 mg/ml Cinnamaldehyde (c)

เมื่อทำการทดสอบการสร้างท่ออกด้วย Crystal violet based method พบว่า *C. albicans* ทั้ง 22 สายพันธุ์ ที่เพาะใน Cinnamaldehyde ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0, 31.25 และ 62.5 $\mu\text{g/ml}$ สร้างท่ออกได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) โดยมี OD 570 nm ได้เฉลี่ยประมาณ 0.45 (Range: 0.25-0.62) 0.30 (Range: 0.14-0.44) และ 0.18 (Range: 0.11-0.25) ตามลำดับ (ตารางที่ 2) แสดงให้เห็นว่า Cinnamaldehyde ยับยั้งการสร้างท่ออกของ *C. albicans* โดยแปรผันตามความเข้มข้น (Dose-dependent manner)

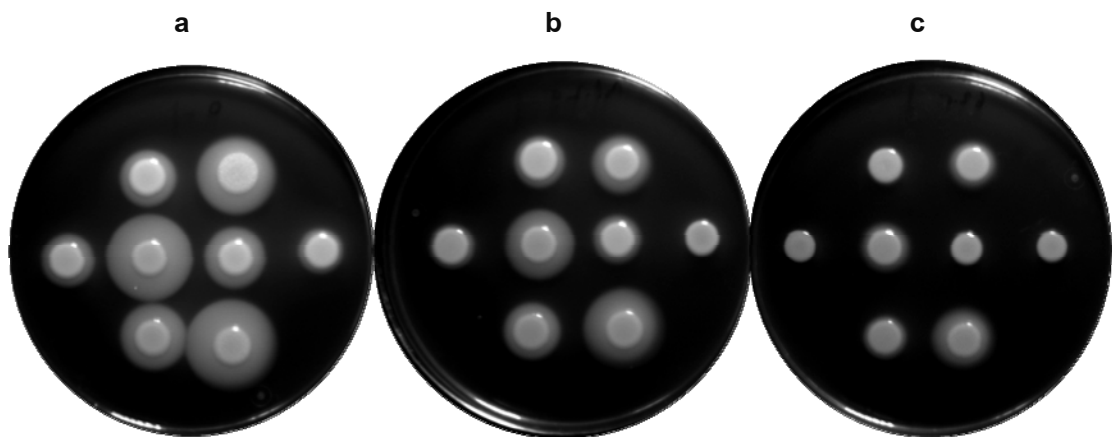
ตารางที่ 3 การทดสอบการสร้างท่ออกของ *C. albicans* (n=22) ในสถานะที่มี Cinnamaldehyde ที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี Crystal violet based method (Abe *et. al.*, 1994)

Cinnamaldehyde ($\mu\text{g/ml}$)	OD ₅₇₀	
	Mean $\pm$ SD	Range
0	0.45 $\pm$ 0.11	(0.25-0.62)
31.25	0.30 $\pm$ 0.09*	(0.14-0.44)
62.5	0.18 $\pm$ 0.04*	(0.11-0.25)

* $p < 0.01$

ฤทธิ์ของ Cinnamaldehyde ต่อ Phospholipase และ Proteinase activity

จากการทดสอบความสามารถในการสร้าง Phospholipase และ Proteinase ของเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ พบว่า *C. albicans* จากสิ่งส่งตรวจ จำนวน 14 สายพันธุ์ และสายพันธุ์อ้างอิง สามารถสร้าง Phospholipase และ Proteinase ได้ ดังนั้นในการทดสอบฤทธิ์ของ Cinnamaldehyde ต่อ Phospholipase และ Proteinase activity จึงใช้เชื้อในการทดสอบทั้งสิ้น 16 สายพันธุ์ เมื่อเพาะ *C. albicans* บนอาหาร EYA-T ที่ไม่มี Cinnamaldehyde พบมี Opaque zones เกิดขึ้นรอบโคโลนี (รูปที่ 3) โดยมี Phospholipase activity (Pz) เฉลี่ย 1.98 (Range: 1.17-2.48) ในขณะที่ *C. albicans* ที่เพาะบนอาหารที่มี Cinnamaldehyde ที่ความเข้มข้น 31.25 และ 62.5 µg/ml มี Phospholipase activity เท่ากับ 1.65 (Range: 1.00-2.50) และ 1.40 (Range: 1.00-2.00) ตามลำดับ โดย Activity ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) (ตารางที่ 4)



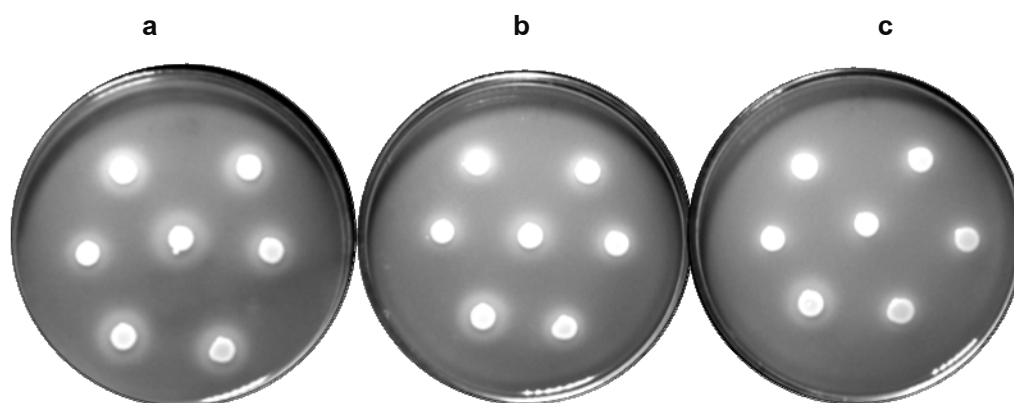
รูปที่ 3 Phospholipase activity of *C. albicans* in the presence of 0 µg/ml (a), 31.25 µg/ml (b) and 62.5 µg/ml (c) cinnamaldehyde

ตารางที่ 4 Phospholipase activity (Pz) ของ *C. albicans* ที่เพาะบน EYA-T ที่มี Cinnamaldehyde ที่ความเข้มข้นต่างๆ

Cinnamaldehyde (µg/ml)	Phospholipase activity (n=16)	
	Mean ± SD	Range
0	1.98 ± 0.46	(1.17-2.48)
31.25	1.65 ± 0.49*	(1.00-2.50)
62.5	1.40 ± 0.38*	(1.00-2.00)

* $p < 0.01$

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ของ Cinnamaldehyde ต่อ Proteinase activity ของ *C. albicans* พบว่า *C. albicans* ที่เพาะบนอาหารที่มี Cinnamaldehyde ที่ความเข้มข้น 0, 31.25 และ 62.5 µg/ml มี Opaque zones เกิดขึ้นรอบโคโลนี (รูปที่ 4) โดยมี Activity (Pz) เฉลี่ย เท่ากับ 2.17 (Range: 1.80-2.45), 1.93 (Range: 1.64-2.27) และ 1.45 (Range: 1.00-2.10) ตามลำดับ ซึ่ง Activity ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.1$) (ตารางที่ 6)



รูปที่ 4 Proteinase activity of *C. albicans* in the presence of 0 µg/ml (a), 31.25 µg/ml (b) and 62.5 µg/ml (c) cinnamaldehyde

ตารางที่ 5 Proteinase activity ของ *C. albicans* ที่เพาะบน BSA-T ที่ Cinnamaldehyde ที่ความเข้มข้นต่างๆ

Cinnamaldehyde ($\mu\text{g/ml}$)	Proteinase activity (n=16)	
	Mean $\pm$ SD	Range
0	2.17 $\pm$ 0.21	(1.80-2.45)
31.25	1.92 $\pm$ 0.17*	(1.64-2.27)
62.5	1.45 $\pm$ 0.27*	(1.00-2.10)

* $p < 0.01$

การทดสอบฤทธิ์ของ Cinnamaldehyde ต่อการเกาะติดเซลล์เยื่อบุด้วย Epithelium cell adhesion assay

หลังจากทำการทดสอบการเกาะติดเซลล์เยื่อบุของ *C. albicans* ATCC 10231 และ 90028 โดยบ่ม HEC กับ *C. albicans* ที่ผ่านการเพาะใน Cinnamaldehyde ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0, 31.25 และ 62.5 $\mu\text{g/ml}$ แล้ว พบว่า *C. albicans* ATCC 10231 และ 90028 ที่เกาะอยู่บนเซลล์เยื่อบุ 100 เซลล์จำนวนลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 6)



รูปที่ 5 การเกาะติดเซลล์เยื่อบุของ *Candida albicans* ATCC 10231 ที่ผ่านการบ่มในสภาวะที่ Cinnamaldehyde ที่ความเข้มข้น เท่ากับ 0 (a). และ 31.25 $\mu\text{g/ml}$ (b)

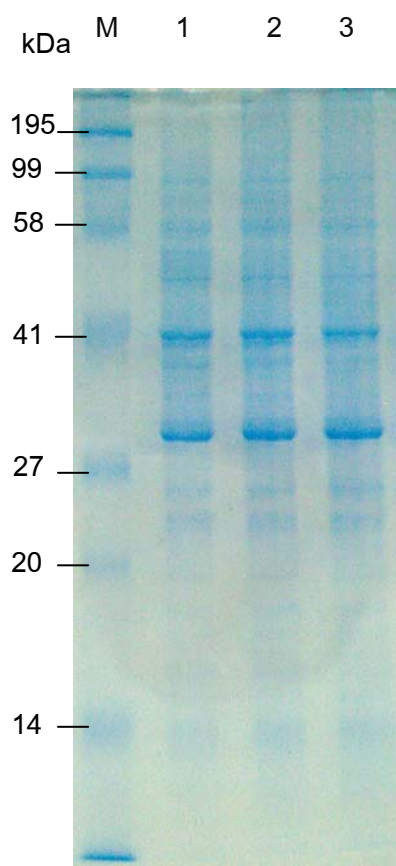
ตารางที่ 6 การเกาะติดเซลล์เยื่อของ *Candida albicans* ที่ผ่านการบ่มในสภาวะที่ Cinnamaldehyde ที่ความเข้มข้นต่างๆ

Cinnamaldehyde ($\mu\text{g/ml}$)	Yeast cell / 100 HEC (Mean $\pm$ SD)	
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>C. albicans</i> ATCC 90028
0	226 $\pm$ 8.49	57 $\pm$ 4.24
31.25	68 $\pm$ 4.24*	34 $\pm$ 5.66*
62.5	16.5 $\pm$ 2.12*	9 $\pm$ 1.41*

การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับฤทธิ์ของ Cinnamaldehyde ต่อที่มีการแสดงออกของโปรตีน (*in vivo expression*) ของ *C. albicans*

หลังบ่มเพาะเชื้อ *C. albicans* ATCC 10231 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SDB-T ที่มีและไม่มี Cinnamaldehyde หลังจากเก็บเกี่ยวเซลล์ สกัดแยกโปรตีนของเชื้อ *C. albicans* และทำการแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE แล้ว ส่วนหนึ่งทำการย้อมสีแถบโปรตีน โดยอีกส่วนหนึ่งทำการถ่ายโอนแถบโปรตีนลงบน nitrocellulose membrane เพื่อวิเคราะห์แถบโปรตีนด้วย polyclonal antiserum ที่จำเพาะกับ *C. albicans* ATCC 10231 ด้วยเทคนิค Western blot analysis จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า จำนวนและความเข้มของแถบโปรตีนบน SDS-PAGE gel ของเชื้อ *C. albicans* ATCC 10231 ในภาวะที่มีและไม่มี Cinnamaldehyde ไม่มีความแตกต่างกัน (รูปที่ 6) นอกจากนี้ จากการวิเคราะห์แถบโปรตีนด้วยเทคนิค Western blot โดยใช้ polyclonal anti-*C. albicans* antiserum ซึ่งก็ไม่พบความแตกต่างเช่นกัน (รูปที่ 7)

รูปที่ 6 SDS-PAGE gel ของโปรตีนที่สกัดแยกจาก *C. albicans* ATCC 10231 ที่บ่มไว้ใน
 ภาวะที่มี Cinnamaldehyde ที่ความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งย้อมด้วยสี Coomassie
 Brilliant Blue R250



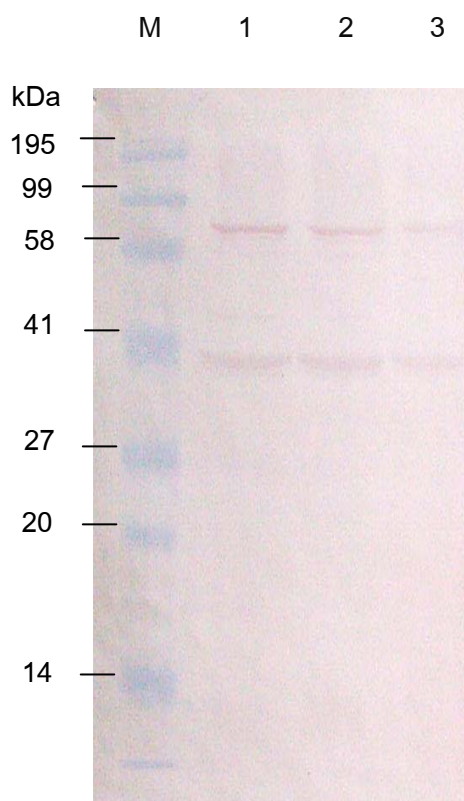
M; Standard protein marker

Lane 1; โปรตีนจากเซลล์ในภาวะที่ไม่มี Cinnamaldehyde

Lane 2; โปรตีนจากเซลล์ในภาวะที่มี Cinnamaldehyde ที่ความเข้มข้น 62.5 µg/ml

Lane 3; โปรตีนจากเซลล์ในภาวะที่มี Cinnamaldehyde ที่ความเข้มข้น 31.25 µg/ml

รูปที่ 7 Western blot analysis ของโปรตีนที่สกัดแยกจากเซลล์ *C. albicans* ATCC 10231 ที่บ่มไว้ในภาวะที่มี Cinnamaldehyde ที่ความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งวิเคราะห์ด้วย polyclonal anti-*C. albicans* antiserum



M; Standard protein marker

Lane 1; โปรตีนจากเซลล์ในภาวะที่ไม่มี Cinnamaldehyde

Lane 2; โปรตีนจากเซลล์ในภาวะที่มี Cinnamaldehyde ที่ความเข้มข้น 62.5 µg/ml

Lane 3; โปรตีนจากเซลล์ในภาวะที่มี Cinnamaldehyde ที่ความเข้มข้น 31.25 µg/ml

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า Cinnamaldehyde สามารถยับยั้งการเจริญของ *Candida* spp. รวมทั้งแบคทีเรียและราชนิดต่าง ๆ ได้ (Unlu *et. al.*, 2011; Shreaz *et. al.*, 2011) จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า Cinnamaldehyde มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญและฆ่า *C. albicans* ได้ โดยมีค่า MIC และ MFC เท่ากับ 125 µg/ml และจากการทดสอบ Antifungal killing time พบว่า Cinnamaldehyde มีการออกฤทธิ์เป็นแบบ Fungicidal ขณะที่ยาในกลุ่ม Azole ยับยั้งการเจริญแต่ไม่สามารถฆ่า *C. albicans* ได้ (Fungistatic activity) (Hawser *et. al.*, 1999) ซึ่งมีผลทำให้เชื้อสามารถพัฒนากลไกการดื้อยาทั้งแบบจำเพาะต่อยาค้นนั้นๆ และแบบไม่จำเพาะ (specific and cross-resistance) ได้ในที่สุด (Parks *et. al.*, 1996)

การเกาะติดเซลล์ การสร้างท่ออกและการสร้าง hydrolytic enzyme เป็น Virulence factor ที่สำคัญของ *C. albicans* โดยการเกาะติดเซลล์ของโฮสต์ของ *C. albicans* เกิดจากการจับกันอย่างจำเพาะของ Candidal adhesin ชนิดต่างๆ กับ extracellular matrix proteins (ECM) ของเซลล์โฮสต์เป็นจุดเริ่มของการก่อโรค candidiasis การสร้างท่ออกเป็นการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเชื้อจากเซลล์ยีสต์เดี่ยว (Unicellular yeast form) เป็นสายรา (Filamentous form) หรือที่เรียกว่า Morphogenesis มีความสำคัญต่อความสามารถในการเกาะติดเยื่อ (Adhesion) (Kimura *et. al.*, 1980) และการลุกลามของเชื้อเข้าไปในเนื้อเยื่อ (Mechanical invasion) และสำหรับ Phospholipase และ aspartyl proteinases มีบทบาทสำคัญในการลุกลามของเชื้อ โดยทำลายเนื้อเยื่อและผนังเซลล์เยื่อส่งผลให้เซลล์ได้รับความเสียหาย (Leidich *et. al.*, 1998) ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า Cinnamaldehyde ที่ Sub-inhibitory concentration สามารถยับยั้งการเกาะติดเซลล์ การสร้างท่ออก และการสร้าง Phospholipase และ Proteinases ของ *C. albicans* ในหลอดทดลองได้ ดังนั้น Cinnamaldehyde อาจช่วยลดโอกาสการติดเชื้อและการแพร่กระจายของเชื้อดังกล่าวไปสู่ผู้ป่วยหรือระบบต่างๆ ในผู้ติดเชื้อได้

Cinnamaldehyde และสารอนุพันธ์สามารถยับยั้งการทำงานของ Plasma membrane-ATPase (PM-ATPase) ของ *C. albicans* ได้ จึงทำให้เกิดการคั่งของ H^+ ภายในเซลล์ ทำให้มีความเป็นกรดต่างภายในเซลล์ (Intracellular pH) ลดลง ส่งผลให้ผนังเซลล์ได้รับความเสียหาย และการทำงานของ PM-ATPase ที่ลดลง (Shreaz *et. al.*, 2010; 2011) อาจส่งผลให้มีการหลั่ง Phospholipase และ Proteinase ออกสู่ภายนอกเซลล์ที่ต้องอาศัยการทำงานของ PM-ATPase ลดลงได้ นอกจากนี้ *Candida* sp. ที่เพาะในสภาวะที่มี Cinnamaldehyde และสารอนุพันธ์นั้น มีรูปแบบของ Sterol ในผนังเซลล์ (Cell membrane) เปลี่ยนแปลงไป โดยมีสัดส่วนของ Ergosterol ลดลง จึงคาดว่า Cinnamaldehyde และสารอนุพันธ์ออกฤทธิ์โดยการยับยั้งการสังเคราะห์ Ergosterol (Ergosterol biosynthesis) ของเชื้อ แต่ไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด (Shreaz *et. al.*, 2011; Rajput and

Karuppayil, 2013) Cell surface hydrophobicity (CSH) มีความสำคัญต่อความสามารถในการเกาะติดเซลล์โฮสต์ของ *C. albicans* จากการศึกษานี้ของ Khan และ Ahmed (2012) พบว่า Cinnamaldehyde ส่งผลให้ *C. albicans* มี CSH ลดลง อาจเป็นเหตุให้ *C. albicans* ที่ผ่านการบ่มใน Cinnamaldehyde สามารถในการเกาะติดกับเซลล์เยื่อลดลง ($p < 0.05$) ได้

จากการศึกษาความพิษของ Cinnamaldehyde ต่อเซลล์ H9c2 rat cardiac myoblasts ในหลอดทดลอง พบว่า Cinnamaldehyde ที่ความเข้มข้นเท่ากับ MIC มีความเป็นพิษไม่แตกต่างจาก Fluconazole (Shreaz *et. al.*, 2011) และจากการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากอบเชยและ Cinnamaldehyde ในการรักษาโรค Oral candidiasis ในสัตว์ทดลอง การป้ายบริเวณที่ติดเชื้อมีแผลทั้งที่มีสารสกัดจากอบเชยและ Cinnamaldehyde สามารถลดการติดเชื้อ *C. albicans* ในช่องปากได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Taguchi *et. al.*, 2011) แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของ Cinnamaldehyde ในการพัฒนาหรือนำไปประยุกต์เป็น Anticandida agent ได้ในอนาคต อย่างไรก็ตาม กลไกการออกฤทธิ์ของ Cinnamaldehyde จากอบเชยต่อปัจจัยความรุนแรงในการก่อโรคนั้นได้กล่าวไปแล้วนั้น ยังต้องมีการศึกษาต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Abe S, Satoh T, Tokuda Y, Tansho S, Yamaguchi H. A rapid colorimetric assay for determination of leukocyte-mediated inhibition of mycelial growth of *Candida albicans*. Microbiol Immunol. 1994; 38: 385-8
2. Baboni FB, Barp D, Izidoro AC, Samaranayake LP, Rosa EA. Enhancement of *Candida albicans* virulence after exposition to cigarette mainstream smoke. Mycopathologia. 2009; 168: 227-35.
3. Baily GG, Perry FM, Denning DW, Mandal BK. Fluconazole-resistant candidosis in an HIV cohort. AIDS. 1994; 8: 787-92.
4. Banerjee A, Nigam SS. Antimicrobial efficacy of the essential oil of *Curcuma longa*. Indian J Med Res 1978; 68: 864-6.
5. Barrett-Bee K, Hayes Y, Wilson RG, Ryley JF. A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. J Gen Microbiol 1985; 131: 1217-21.
6. Boken DJ, Swindells S, Rinaldi MG. Fluconazole-resistant *Candida albicans*. Clin Infect Dis 1993; 17: 1018-21.
7. Calderone R, Braun P. Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. Microbiol Rev. 1991; 55: 1-20.
8. Colina AR, Aumont F, Deslauriers N, Belhumeur P, de Repentigny L. Evidence for degradation of gastrointestinal mucin by *Candida albicans* secretory aspartyl proteinase. Infect Immun 1996; 64:4514-9.
9. Cantón E, Pemán J, Gobernado M, Viudes A, Espinel-Ingroff A. Patterns of amphotericin B killing kinetics against seven *Candida* species. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48: 2477-82.
10. Fusek M, Smith EA, Monod M, Dunn BM, Foundling SI. Extracellular aspartic proteinases from *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, and *Candida parapsilosis* yeasts differ substantially in their specificities. Biochemistry 1994; 33:9791-9.
11. Hawser S, Islam K. Comparisons of the effects of fungicidal and fungistatic antifungal agents on the morphogenetic transformation of *Candida albicans*. J Antimicrob Chemother. 1999; 43: 411-3.

12. Ibrahim AS, Mirbod F, Filler SG, Banno Y, Cole GT, Kitajima Y, Edwards JE, Nozawa Y, Ghannoum MA. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect Immun* 1995; 63:1993–8.
13. Kaminishi H, Miyaguchi H, Tamaki T, Suenaga N, Hisamatsu M, Mihashi I, Matsumoto H, Maeda H, Hagihara Y. Degradation of humoral host defense by *Candida albicans* proteinase. *Infect Immun* 1995; 63:984–8.
14. Kaminishi H, Tanaka M, Cho T, Maeda H, Hagihara Y. Activation of the plasma kallikrein-kinin system by *Candida albicans* proteinase. *Infect Immun* 1990; 58:2139–43.
15. Khan MA, Ahmad I. *In vitro* influence of certain essential oils on germ tube formation, cell surface hydrophobicity, and production of proteinase and hemolysin in *Candida albicans*. *J Nat Pharm* 2012; 3: 110-7
16. Kimura LH, Pearsall NN. Relationship between germination of *Candida albicans* and increased adherence to human buccal epithelial cells. *Infect Immun* 1980; 28: 464–8.
17. Klein RS, Harris CA, Small CB, Moll B, Lesser M, Friedland GH Oral candidiasis in high-risk patients as the initial manifestation of the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1984; 311: 354–8.
18. Leidich SD, Ibrahim AS, Fu Y, Koul A, Jessup C, Vitullo J, Fonzi W, Mirbod F, Nakashima S, Nozawa Y, Ghannoum MA. Cloning and disruption of *caPLB1*, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*. *J Biol Chem* 1998. 273:26078–86.
19. Lo HJ, Kohler JR, DiDomenico B, Loebenberg D, Cacciapuoti A, Fink GR. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* 1997; 90:939–49.
20. Lopez Dupla M, Mora Sanz P, Pintado Garcia V, Valencia Ortega E, Uriol PL, Khamashta MA, *et al.* Clinical, endoscopic, immunologic and therapeutic aspects of oropharyngeal and esophageal candidiasis in HIV infected patients: a survey of 114 cases. *Am J Gastroenterol* 1992; 87:1771-6.
21. Mirhendi H, Makimura K, Khoramizadeh M, Yamaguchi H. A one-enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically important *Candida* species. *J Med Mycol*. 2006; 47: 225-9.
22. Monod M, Togni G, Hube B, Sanglard D. Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species. *Mol Microbiol* 1994; 13:357–68.

23. Oishi K, Raynor RL, Chapp PA, Kuo JF. Regulation of protein kinase C by lysophospholipids. Potential role in signal transduction. J Biol Chem 1988; 263:6865–1.
24. Parks L.W. and Casey W.M. Fungal Sterols. In: Prasad R, Ghannoum MA, eds. Lipids of pathogenic fungi. Boca Raton, FL: CRC Press, 1996: 63–82.
25. Phongpaichit S, Subhadhirasakul S, Wattanapiromsakul C. Antifungal activities of extracts from Thai medicinal plants against opportunistic fungal pathogens associated with AIDS patients. Mycoses 2005; 48: 333–8
26. Quale JM, Landman D, Zaman MM, Burney S, Sathe SS. *In vitro* activity of *Cinnamomum zeylanicum* against azole resistant and sensitive *Candida* species and a pilot study of cinnamon for oral candidiasis. Am J Chin Med 1996; 24: 103-9.
27. Rajput SB, Karuppayil SM. Small molecules inhibit growth, viability and ergosterol biosynthesis in *Candida albicans*. Springerplus. 2013; 2: 26.
28. Rhoads JL, Wright DC, Redfield RR, Burke DS. Chronic vaginal candidiasis in women with human immunodeficiency virus infection. JAMA 1987; 257:3105–7.
29. Ruchel R. Cleavage of immunoglobulins by pathogenic yeasts of the genus *Candida*. Microbiol Sci 1986. 3:316–9.
30. Shreaz S, Bhatia R, Khan N, Muralidhar S, Basir SF, Manzoor N, Khan LA. Spice oil cinnamaldehyde exhibits potent anticandidal activity against fluconazole resistant clinical isolates. Fitoterapia. 2011; 82: 1012-20.
31. Shreaz S, Sheikh RA, Bhatia R, Neelofar K, Imran S, Hashmi AA, Manzoor N, Basir SF, Khan LA. Antifungal activity of **C**-methyl trans cinnamaldehyde, its ligand and metal complexes: promising growth and ergosterol inhibitors. Biometals. 2011; 24: 923-33.
32. Taguchi Y, Hayama K, Okada M, Sagawa T, Arai R, Abe S. Therapeutic effects of cinnamaldehyde and potentiation of its efficacy in combination with methylcellulose on murine oral candidiasis. Med Mycol J. 2011; 52: 145-52.
33. Takahashi M, Banno Y, Nozawa Y. Secreted *Candida albicans* phospholipases: purification and characterization of two forms of lysophospholipase-transacylase. J Med Vet Mycol 1991; 29:193–204

34. Taweechaisupapong S, Choopan T, Singhara S, Chatrchaiwiwatana S, Wongkham S. In vitro inhibitory effect of *Streblus asper* leaf-extract on adhesion of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells. J Ethnopharmacol. 2005; 96: 221-6.
35. Unlu M, Ergene E, Unlu GV, Zeytinoglu HS, Vural N. Composition, antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). Food Chem Toxicol. 2010; 48): 3274-80.
36. Wilcox CM, Karowe MW. Esophageal infections: etiology, diagnosis and management. Gastroenterologist 1994; 2:188-206.
37. Yaya R; Shim JS; Hwang JK. Screening of Thai medicinal plants for anticandidal activity. Mycoses 2008; 51 : 308-12
38. ชญานิศ ศรีชัยราชวงศ์, ฤทธิ์ วัฒนชัยยิ่งเจริญ, รัตนา เจนยุทธนา, ชัยวัฒน์ อนันตสิทธิ์สกุล. การเตรียมตำรับเจลสมุนไพรสำหรับรักษาการติดเชื้อแคนดิดาในปาก. Thai Pharmaceutical and Health Science Journal. 2006; 1(3): 204-8

ผลิตผลจากโครงการวิจัยที่ได้รับทุน

1. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- นำองค์ความรู้ที่ได้จากการวิจัยไปใช้ในการเรียนการสอน รายวิชา ทน. 401 จุลชีววิทยา ระดับโมเลกุลและการประยุกต์ใช้ หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)

2. อื่นๆ

- Pootong A, Khantisitthiporn O and Cowawintaweewat S. Identification of clinical isolated *Candida* using ITS PCR-RFLP method. Thai Sci Tech J. 2012; 20: 202-10.

- Pootong A, Sam-angsri J, Thongmalila N, Khantisitiporn O and Cowawintaweewat S. The effect of lemongrass volatile oil on pathogenic *Candida albicans*. Thai Sci Tech J. 2012; 20: 293-301.

ภาคผนวก

The study of antifungal activities of Cinnamaldehyde against pathogenic *Candida albicans*

Abstract

Candidiasis caused by *Candida albicans* is one of the common infectious diseases found in immunocompromised patients. Azole group is a common drug used for treatment, leading to develop drug resistance. Thus, new-developing drugs, including those from natural products are necessary. In this study, we evaluated the antifungal effects of cinnamaldehyde on pathogenic *C. albicans*. The results revealed that the cinnamaldehyde possessed antifungal activities against *C. albicans*. The minimum inhibitory concentration (MIC) of cinnamaldehyde was 125 µg/ml with fungicidal activity. At sub-inhibitory concentration, cinnamaldehyde reduced germ tube formation, proteinase and phospholipase activities with dose dependent manner. This study showed that cinnamaldehyde has a potent *in vitro* activity against *C. albicans* and can inhibit the activities of virulence factors.

Keyword: *Candida albicans*, cinnamaldehyde, Virulence factors

Introduction

C. albicans, a yeast-like fungus, was found as normal flora of mucous tissue in healthy persons. However, it is also found as an opportunistic pathogen able to cause a variety of infections, ranging from superficial to life threatening in case of septicemia.

Candidiasis was still cause of morbidity and mortality with unacceptably high rates. The major reasons are the limited number of antifungal drugs and also used widespread to treat infections, leading to the development of drug-resistance. (White *et. al.*, 1998) Thus, the search of new and effective natural products showing antifungal activity against *C. albicans* is likely to overcome this problem.

Cinnamon is a spice that has been used since ancient times for medicinal purposes. The benefits of cinnamon have been determined. Previous study demonstrated that cinnamon could reduce serum glucose and lipids in people with type 2 diabetes. (Khan *et. al.*, 2003) and also suppress cancer proliferation by induce cell death through regulating pro-apoptotic molecule. (Kwon *et. al.*, 2010) Cinnamon extract exhibit the antimicrobial activity such bacteria, virus and also fungi. (Mastura *et. al.*, 1999; Premanathan *et. al.*, 2000; Shan *et. al.*, 2007) Cinnamaldehyde, a major active ingredient of cinnamon, have immense medical

potential. In this study, we have tested the antifungal activities of cinnamaldehyde against the growth and virulence factors of pathogenic *C. albicans*.

Material and Methods

***C. albicans* strain**

Twenty clinical isolates of *C. albicans* from blood culture and 2 reference stains (ATCC 10231 and 90028) were used in this study. The strains were cultured on Sabouraud dextrose agar (SDA: 2% peptone, 4% dextrose, 1.5% agar) and incubated at 37°C for 48 h before use.

Cinnamaldehyde

Cinnamaldehyde was purchased from Sigma (USA).

Determination of anti-candidal activity of cinnamaldehyde by agar disc diffusion

The antifungal activity of cinnamaldehyde against *C. albicans* was performed on SDA. A 0.5 McFarland suspension of *C. albicans* in sterile 0.85% NSS was swabbed in three directions on SDA. These inoculated plates were left to dry for 5 min. Then, sterilized paper disc (6 mm diameter) with 5 mg of cinnamaldehyde were placed on the plates. The plate was incubated at 37°C for 48 h. Zone diameters (in millimeters) for the zone of complete inhibition were determined.

Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) of cinnamaldehyde

MIC and MFC of cinnamaldehyde against *C. albicans* were determined by the broth macrodilution technique. Briefly, cinnamaldehyde solution was two-fold serially diluted with Sabouraud-dextrose broth with Tween-80 (SDB-T: 2% peptone, 4 % dextrose, 0.02% Tween 80). An equal volume of yeast suspension (1×10^4 cfu/ml) was added and the suspensions were incubated at 37°C for 48 h. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined visually and defined as the lowest concentration of the cinnamaldehyde that inhibit growth of yeast cells, as indicated by the absence of turbidity. Sub-culturing from the optically clear tubes was performed to determine the MFC. All experiments were repeated on three independent experiments with duplicate determinations.

Time kill analysis of cinnamaldehyde

Time-kill analysis of cinnamaldehyde was conducted as previously described. (Cantón *et. al.*, 2004) Briefly, *C. albicans* ATCC 10231 was added to SDB-T containing

cinnamaldehyde to final concentration at 5×10^5 cfu/ml. The suspensions were incubated at 37°C and the viability of yeast cell was determined at 0, 1, 2, 4, 6, 12, 24 and 48 h by colony count method. The experiments were repeated on two separate occasions with duplicate.

Anti-candidal activity of cinnamaldehyde on germ tube formation of *C. albicans* by crystal violet based technique

To determine the effect of cinnamaldehyde on germ tube formation, a cell suspension (1×10^5 cfu/ml) of *C. albicans* isolates was prepared and 0.1 ml was added to the wells of 96-flat-microtiter plate containing fetal bovine serum (Gibco BRL, USA) and cinnamaldehyde to final concentration at 10% and 0 (control), 1/4, 1/2 and 1×MIC, respectively. The wells without yeast cell were set up as blank. After incubation at 37°C for 2 h, plate was processed as described elsewhere. (Abe *et. al.*, 1994) Briefly, the medium in the wells was discarded and washed once with 100 µl of 70% ethanol. Yeast cell without germ tube were removed by washing once with 200 µl of 0.25% sodium dodecyl sulfate (SDS; Ajax Finechem, Australia) and three times with distilled water. Germ tubes forming cell attached to the wells were stained with 100 µl of 0.01% crystal violet (Sigma, USA) for 15 min. The dye solution was removed and the plate was washed three times with water, once with 0.25% SDS, and twice more with water. After the plates were dried, 200 µl of Isopropanol containing 0.04 N HCl and 50 µl of 0.25% SDS were added to the wells and mixed briefly. The absorbance at 570 nm was determined by using an ELISA reader (Dynex, USA). The experiments were repeated on three separate occasions with duplicate.

Anti-candidal activity of cinnamaldehyde on proteinase and phospholipase activities

Effect of cinnamaldehyde on proteinase and phospholipase activities of *C. albicans* were determined by using modified method of Baboni. (2009) A cell suspension (1×10^6 cfu/ml) was prepared and 5 µl was spotted on bovine serum albumin agar and egg yolk agar containing 0.02% Tween-80 with either 0 (control), 1/4, 1/2 or 1×MIC of cinnamaldehyde. Inoculated plates were incubated in moist chamber at 37°C for 2 and 5 days, respectively. Proteinase and phospholipase activity were determined as Pz, when Pz was ratio of the diameter of precipitation zone with colony to the colony diameter. The experiment was repeated on two separate occasions.

Statistic analysis

Germ tube formation, phospholipase and proteinase activity of *C. albicans* in presence of 0.025 and 0.5× MIC of cinnamaldehyde were analyzed using Wilcoxon Signed Rank test. A probability value < 0.05 was considered significant.

Results

Antifungal activity of cinnamaldehyde against *C. albicans*

By disc diffusion method, cinnamaldehyde exhibited the anti-candidal activity with the average zone of inhibition of 60 mm at 5 mg/disc. The MIC and MFC of cinnamaldehyde against *C. albicans* were 125 µg/ml.

Killing time

Within 2 h of incubation at 37°C, cinnamaldehyde at the MIC had no effect on the viability of the yeast cell. But it was proved to be rapidly fungicidal within 12 hours because of the viability decreased more than 3 of log₁₀ (cfu/ml). While at 1/2×MIC (62.5 µg/ml) was fungistatic (Figure 1).

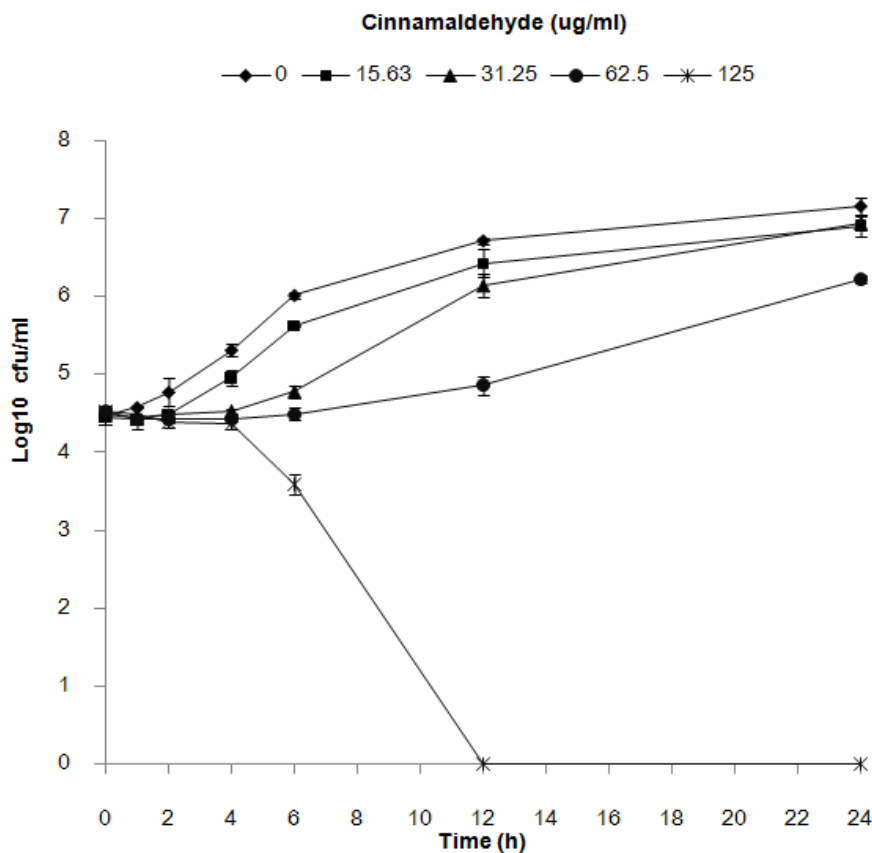


Figure 1 The killing time plot of *C. albicans* incubated in SDB-T containing several concentration of cinnamaldehyde

Effect of cinnamaldehyde on germ tube formation of *C. albicans*

Germ tube formation of *C. albicans* yeast cell treated with several concentration of cinnamaldehyde was determined by microscopy (Figure 2) and crystal violet based method. *C. albicans* incubated in fetal bovine serum contain cinnamaldehyde resulted in a significant decrease ($p < 0.01$) in OD₅₇₀ from 0.45 (Range: 0.25-54.3) of control to 0.30 (Range: 0.14-0.44) and 0.18 (Range: 0.11-0.25) at 31.25 and 62.5 µg/ml, respectively. Inhibitory effect of cinnamaldehyde was dose-dependent manner (Table 1).

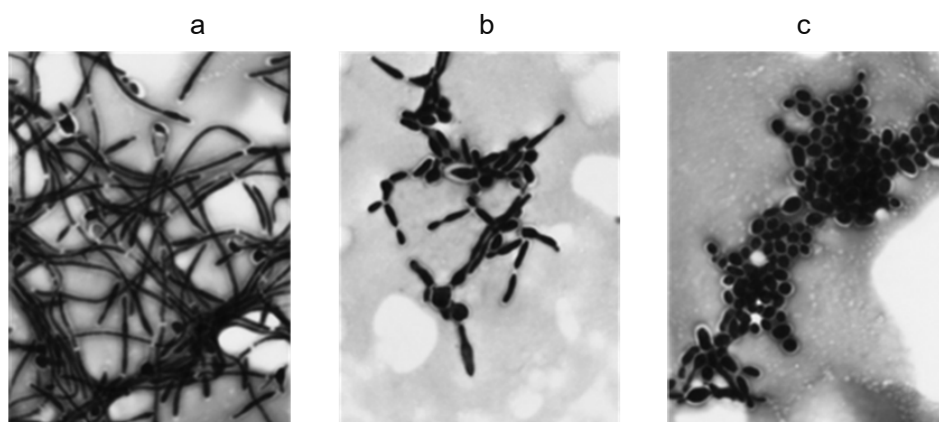


Figure 2 Germ tube formations of *C. albicans* in the presence of 0 (a), 31.25 (b) and 62.5 mg/ml cinnamaldehyde (c)

Table 1 Inhibitory effect of cinnamaldehyde on germ tube formation of *C. albicans* determined by crystal violet based method (Abe *et. al.*, 1994)

Cinnamaldehyde (µg/ml)	OD ₅₇₀	
	Mean ± SD	Range
0	0.45 ± 0.11	(0.25-0.62)
31.25	0.30 ± 0.09*	(0.14-0.44)
62.5	0.18 ± 0.04*	(0.11-0.25)

* $p < 0.01$

Effect of cinnamaldehyde on proteinase and phospholipase activities

The antifungal activity of cinnamaldehyde on proteinase and phospholipase activities of *C. albicans* was determined by spotting the yeast cell on BSA and EYA containing several concentration of cinnamaldehyde. The average of proteinase and phospholipase activity (Pz) of *C. albicans* (n=16) unexposed to cinnamaldehyde was 2.17 (Range: 1.80-2.45) and 1.98 (Range: 1.17-2.48), respectively. While, activities of yeast exposed to cinnamaldehyde at 31.25 and 62.5 µg/ml were 2.17 (Range: 1.80-2.45) and 1.93 (Range: 1.64-2.27) for proteinase and 1.65 (Range: 1.00-2.50) and 1.40 (Range: 1.00-2.00) for phospholipase,

respectively. It reveals that cinnamaldehyde could reduce the activities of proteinase and phospholipase of *C. albicans* with dose dependent manner ($p < 0.01$). (Table 2)

Table 2 Proteinase and phospholipase activity (Pz) of *C. albicans* (n=16) in presence of cinnamaldehyde

Cinnamaldehyde ($\mu\text{g/ml}$)	Proteinase activity (n=16)		Phospholipase activity (n=16)	
	Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD	Range
0	2.17 $\pm$ 0.21	1.98 $\pm$ 0.46	1.98 $\pm$ 0.46	(1.17-2.48)
31.25	1.92 $\pm$ 0.17*	1.65 $\pm$ 0.49*	1.65 $\pm$ 0.49*	(1.00-2.50)
62.5	1.45 $\pm$ 0.27*	1.40 $\pm$ 0.38*	1.40 $\pm$ 0.38*	(1.00-2.00)

* $p < 0.01$

Discussion

Cinnamon was used as spice and food preservative due to it was safe when consumed and it could inhibit the growth of molds, yeast and bacteria. Moreover, cinnamon extract exert a blood glucose-suppressing effect. (Khan *et. al.*, 2003) Thus, it was used as diabetic supplement for diabetic mellitus patients. Cinnamaldehyde was completely inhibiting both sensitive and resistant strain of *Helicobacter pylori* and reported to exhibit antibacterial activity against *Pseudomonas aeruginosa* by damaging the cellular membrane leading to cell death. (Bouhdid *et. al.*, 2010) In this study, Broth dilution method and killing time analysis showed that MIC of cinnamaldehyde was fungicidal. Fungicidal activity is considered as a desirable quality for antifungal agents as it causes killing, as compared with arrest of the growth by fungistatic agents. While, most of azole drugs are fungistatic that fail to completely eliminate yeast, leading acquired resistance of *C. albicans* to azole. (Parks and Casey, 1996)

Previous studies revealed that the exposure to sub-inhibitory concentrations of garlic extract, date extract and *Streblus asper* leaf-extract inhibited *Candida* germination. (Ghannoum, 1990; Abu-Elteen, 2000; Taweechaisupapong *et. al.*, 2005) In this study, sub-inhibitory concentration of cinnamaldehyde could also reduce germ tube formation of *C. albicans*. Since, germ tube formation and hydrolytic enzyme including phospholipase and proteinase were important virulence factors for tissue adhesion and invasion of *C. albicans*

(Leidich *et. al.*, 1998; Whiteway *et. al.*, 2007) Thus, the inhibition of those virulence factors by cinnamaldehyde might reduce the severity of the Candidiasis.

According to results of previously study, cinnamaldehyde was found as the major component of cinnamon oil and also exhibit antimicrobial activity against human bacteria and fungi (Unlu *et. al.*, 2011; Shreaz *et. al.*, 2011) Moreover, it was purposed that cinnamaldehyde has effect the ergosterol biosynthetic pathway and cause cell membrane damage. (Shreaz *et. al.*, 2011; Rajput and Karuppayil, 2013) However, the certain mechanism is needed to be studied.

Conclusion

Cinnamaldehyde exhibited the rapidly fungicidal activity and could inhibit the hyphal form growth and hydrolytic enzyme secretion of pathogenic *C. albicans*, indicating that cinnamaldehyde has potential to use as antifungal therapy.

Acknowledgement

This research work is financially supported by research grant from Thailand Research Fund (TRF) and Higher Education Commission (MRG5280131).

References

1. Abe S, Satoh T, Tokuda Y, Tansho S, Yamaguchi H. A rapid colorimetric assay for determination of leukocyte-mediated inhibition of mycelial growth of *Candida albicans*. Microbiol Immunol. 1994; 38: 385-8
2. Abu-Elteen KH. Effects of date extract on adhesion of *Candida* species to human buccal epithelial cells in vitro. J Oral Pathol Med. 2000; 29: 200-5
3. Baboni FB, Barp D, Izidoro AC, Samaranayake LP, Rosa EA. Enhancement of *Candida albicans* virulence after exposition to cigarette mainstream smoke. Mycopathologia. 2009; 168: 227-35.
4. Bouhdid S, Abrini J, Amensour M, Zhiri A, Espuny MJ, Manresa A. Functional and ultrastructural changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Cinnamomum verum* essential oil. J Appl Microbiol. 2010; 109: 1139-49.

5. Cantón E, Pemán J, Gobernado M, Viudes A, Espinel-Ingroff A. Patterns of amphotericin B killing kinetics against seven *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48: 2477-82.
6. Ghannoum MA. Inhibition of *Candida* adhesion to buccal epithelial cells by an aqueous extract of *Allium sativum* (garlic). *J Appl Bacteriol.* 1990;68:163-9.
7. Khan A, Safdar M, Ali Khan MM, Khattak KN, Anderson RA. Cinnamon improves glucose and lipids of people with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2003;26(12):3215-8.
8. Leidich SD, Ibrahim AS, Fu Y, Koul A, Jessup C, Vitullo J, Fonzi W, Mirbod F, Nakashima S, Nozawa Y, Ghannoum MA. Cloning and disruption of *caPLB1*, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*. *J Biol Chem* 1998. 273:26078–86.
9. Mastura M, Nor Azah MA, Khozirah S, Mawardi R, Manaf AA. Anticandidal and antidermatophytic activity of *Cinnamomum* species essential oils. *Cytobios.* 1999; 98: 17–23.
10. Parks L.W. and Casey W.M. Fungal Sterols. In: Prasad R, Ghannoum MA, eds. *Lipids of Pathogenic fungi*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1996: 63–82.
11. Premanathan M, Rajendran S, Ramanathan T, Kathiresan K, Nakashima H, Yamamoto N. A survey of some Indian medicinal plants for anti-human immunodeficiency virus (HIV) activity. *Indian J Med Res.* 2000; 112: 73–7.
12. Rajput SB, Karuppayil SM. Small molecules inhibit growth, viability and ergosterol biosynthesis in *Candida albicans*. *Springerplus.* 2013; 2: 26.
13. Shan B, Cai YZ, Brooks JD, Corke H. Antibacterial properties and major bioactive components of cinnamon stick (*Cinnamomum burmannii*): activity against foodborne pathogenic bacteria. *J Agric Food Chem.* 2007;55: 5484-90.
14. Shreaz S, Bhatia R, Khan N, Muralidhar S, Basir SF, Manzoor N, Khan LA. Spice oil cinnamaldehyde exhibits potent anticandidal activity against fluconazole resistant clinical isolates. *Fitoterapia.* 2011; 82: 1012-20.
15. Shreaz S, Sheikh RA, Bhatia R, Neelofar K, Imran S, Hashmi AA, Manzoor N, Basir
16. Taweechaisupapong S, Choopan T, Singhara S, Chatrchaiwiwatana S, Wongkham S. In vitro inhibitory effect of *Streblus asper* leaf-extract on adhesion of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells. *J Ethnopharmacol.* 2005; 96: 221-6.

17. Unlu M, Ergene E, Unlu GV, Zeytinoglu HS, Vural N. Composition, antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). *Food Chem Toxicol.* 2010; 48: 3274-80.
18. White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1998; 11: 382-402.
19. Whiteway M, Bachewich C. Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol* 2007; 61: 529-53.