

บทคัดย่อ

Acinetobacter baumannii เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญต่อการเกิดโรคและการเสียชีวิตในโรงพยาบาล การดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียชนิดนี้ส่งผลให้เกิดความขาดแคลนยาทางเลือกในการรักษาโรคทำให้อัตราการเสียชีวิตยิ่งเพิ่มสูงขึ้น ปัจจุบันจึงมีแนวคิดหนึ่งทำการศึกษาวิจัยโดยใช้กลไกการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชร่วมกับยาปฏิชีวนะ เพื่อเป็นทางเลือกในการป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียดื้อยา จากการทดลองใช้สารสกัดจำนวน 51 สารสกัดเตรียมจากพืชสมุนไพรไทยจำนวน 44 ชนิด เป็นสารลดการดื้อยา (resistance modifying agent; RMA) ของ novobiocin ในการยับยั้ง *A. baumannii* ATCC 19606 โดยใช้วิธี growth inhibition assay ในขั้นตอนแรกของการคัดเลือกพบว่า ที่ความเข้มข้น 250 µg/ml ซึ่งสารสกัดทดสอบมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียได้น้อย สารสกัดจากสมุนไพร 6 ชนิด คือ โมกหลวง (*Holarrhena antidysenterica*) ทับทิม (*Punica granatum*) เล็บมือนาง (*Quisqualis indica*) สมอพิเภก (*Terminalia bellirica*) สมอไทย (*Terminalia chebula*) และสมอเทศ (*Terminalia* sp.) สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียของ novobiocin (1/8xMIC) .ในพืชจำนวน 6 ชนิดที่คัดเลือกมานี้พบว่าโมกหลวงซึ่งมี alkaloids, condensed tannins และ triterpenoids เป็นองค์ประกอบทางพฤกษเคมี ทำหน้าที่เป็นสารลดการดื้อยาได้ดีที่สุด โดยพบว่าร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้ออยู่ระหว่างร้อยละ 72 ถึง ร้อยละ 96 ที่ความเข้มข้นระหว่าง 7.8 ถึง 250 µg/ml ในการต้าน *A. baumannii* ATCC 19606 นอกจากนี้ยังพบว่าโมกหลวงยังมีความสามารถในการยับยั้ง *A. baumannii* ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยซึ่งเป็น multidrug resistant *A. baumannii* (MDRAB) และ extensively drug resistant *A. baumannii* (XDRAB). ได้อีกด้วย

จากการศึกษาเพิ่มเติมพืชสมุนไพรอีกจำนวน 17 ชนิดซึ่งอยู่ในวงศ์ Apocynaceae เช่นเดียวกับโมกหลวงและมีความสามารถในการต้านแบคทีเรียโดยธรรมชาติได้น้อย โดยใช้ร่วมกันกับยาปฏิชีวนะในกลุ่มต่าง ๆ จำนวน 16 ชนิดพบว่า จาก 272 ชุดของการใช้ร่วมกันที่มีการทดสอบมีเพียงร้อยละ 5 และร้อยละ 8 ที่มีการเสริมฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย และ เสริมฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้บางส่วน ในขณะที่ร้อยละ 86

ไม่พบการเสริมฤทธิ์ โดยยาปฏิชีวนะที่สมุนไพรสามารถเสริมฤทธิ์ได้ดีที่สุดคือ rifampicin และ cefazolin ซึ่งเมื่อทดลองใช้โมกหลวงร่วมกับยา rifampicin พบว่าสามารถเสริมฤทธิ์ต้าน MDRAB และ XDRAB ได้ร้อยละ 66 และ ร้อยละ 70 ของสายพันธุ์ที่ทดสอบ ตามลำดับ

จากการศึกษากลไกการออกฤทธิ์เบื้องต้น ในการเป็นสารลดการดื้อยาของสารสกัดจากโมกหลวง และสารเคมีองค์ประกอบ conessine โดยศึกษาผลต่อการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียของ *A. baumannii* ATCC 19606 และสายพันธุ์ non-MDRAB และ XDRAB จากผู้ป่วย โดยใช้สารสี N-phenyl-1-naphthylamine (NPN) และ ศึกษาความสามารถในการยับยั้งกลไก efflux pumps โดยใช้สารสี ethidium bromide และ pyronin Y พบว่า สารสกัดจากโมกหลวงและ conessine เพิ่มการสะสมของ pyronin Y ในเซลล์ของแบคทีเรียทั้ง 3 กลุ่มที่ทดสอบ แต่สารทดสอบทั้ง 2 ชนิดนี้ไม่ส่งผลต่อการเพิ่มการสะสมของ ethidium bromide ในเซลล์ของแบคทีเรียทั้ง 3 กลุ่มที่ทดสอบ นอกจากนี้ยังพบว่าการเติม สารสกัดจากโมกหลวงและ conessine ลงไปในเซลล์ทดสอบ จะไม่ส่งผลต่อการเพิ่มการนำเข้า NPN ของเยื่อหุ้มเซลล์ แต่การที่เซลล์เจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมสารสกัดจากโมกหลวงนั้นส่งผลให้เกิดการเพิ่มการนำเข้า NPN ของเยื่อหุ้มเซลล์ของ *A. baumannii* ATCC 19606

การวิจัยครั้งนี้จึงสามารถสรุปได้ว่า สารสกัดจากโมกหลวงสามารถลดการดื้อต่อยาปฏิชีวนะคือ novobiocin และ rifampicin ของ *A. baumannii* ทั้งสายพันธุ์มาตรฐาน และสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วย ซึ่งประกอบด้วยกลุ่มที่ดื้อยาปฏิชีวนะและกลุ่มที่ยังไวต่อยาปฏิชีวนะ โดยความสามารถในการลดการดื้อยาอาจเกิดจากกลไกการยับยั้งการขับยาออก (efflux pump inhibitor) และสารสำคัญในโมกหลวงที่ส่งผลต่อกลไกดังกล่าวคือ conessine

คำสำคัญ: *Acinetobacter baumannii*, สารลดการดื้อยา, โมกหลวง, การเสริมฤทธิ์, กลไกการขับยาออก, เยื่อหุ้มเซลล์

ABSTRACT

Acinetobacter baumannii is well-recognized as an important nosocomial pathogen. However, due to their intrinsic resistance to several antibiotics, treatment options are limited. Synergistic effects between antibiotics and medicinal plants, particularly their active components, have intensively been studied as alternative approaches. Fifty-one ethanol extracts obtained from 44 different selected medicinal plant species were tested for resistance modifying agents (RMAs) of novobiocin against a model isolate, *A. baumannii* ATCC 19606 using growth inhibition assay. At 250 µg/ml, *Holarrhena antidysenterica*, *Punica granatum*, *Quisqualis indica*, *Terminalia bellirica*, *Terminalia chebula*, and *Terminalia* sp. that possessed low intrinsic antibacterial activity significantly enhanced the activity of novobiocin at 1 µg/ml (1/8xminimum inhibitory concentration) against this pathogen. *Holarrhena antidysenterica* at 7.8 µg/ml demonstrated remarkable resistant modifying ability against *A. baumannii* in combination with novobiocin. The phytochemical study revealed that constituents of this medicinal plant contain alkaloids, condensed tannins, and triterpenoids.

The use of *Holarrhena antidysenterica* (Apocynaceae) in combination with novobiocin provides an effective alternative treatment for multidrug resistant *A. baumannii* (MDRAB) and extensively drug resistant *A. baumannii* (XDRAB). The efficacy of 17 ethnomedicinal plants belonging to Apocynaceae family used in combination with 16 conventional antibiotics against clinically isolated non-MDRAB, MDRAB, and XDRAB was further evaluated. Antibacterial activity and resistance modifying ability of 272 combinations was determined by growth inhibition assays and confirmed by time kill assay. Among the combinations of the antibiotics with Apocynaceae ethanol extracts on this pathogen, 15 (5%) had synergistic effects, 23 (8%) had partial synergistic effects, and 234 (86%) had no effects. Synergistic activity was observed mostly when the Apocynaceae extracts were combined

with rifampicin or cefazolin. Interestingly, 10 out of 17 combinations between the extracts and rifampicin displayed synergistic or partial synergistic behaviors. *Holarrhena antidysenterica* extract was additionally tested to restore rifampicin activity against clinical isolates of MDR and XDR *A. baumannii*. With respect to total or partial synergy, 70% was XDR *A. baumannii* isolates and 66% was MDR *A. baumannii* isolates.

Effects of *Holarrhena antidysenterica* and a steroid alkaloid, conessine on outer membrane permeability and efflux pumps of the pathogen were conducted to preliminary elucidate their mechanisms of actions. Although, there was no effect of the extract and its main constituent on the accumulation of ethidium bromide of the treated cells, *Holarrhena antidysenterica* extract and conessine dramatically caused an enhancement of the accumulation of pyronin Y. Thus, inhibition of efflux pump that transport pyronin Y could be a possible mechanism of potentiation of novobiocin and rifampicin activity by *Holarrhena antidysenterica* and conessine. *Holarrhena antidysenterica* extract additionally weakened the outer membrane of the pathogen as indicated by an increase in the *N*-phenyl-1-naphthylamine (NPN) uptake, but enhancement of the NPN accumulation of was not observed after treated with conessine.

In conclusion, our results suggested that *Holarrhena antidysenterica* ethanol extract clearly demonstrated the ability to restore the antibiotic activity against both *A. baumannii* ATCC19606 and clinically isolated *A. baumannii*. The plant extract primarily interrupts membrane permeability and inhibits efflux pump should be further investigated as a promising resistant modifier for *A. baumannii*.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, Resistance modifying agents, *Holarrhena antidysenterica*, Synergistic effect, Efflux pump, Membrane permeability