บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG60800019

ชื่อโครงการ: บทบาทของตำรับยาแผนไทย “ยาสมานแผล” ในการรักษาแผลเบาหวานที่เกิดการติดเชื้อจากไบโอฟิล์ม

ชื่อนักวิจัยและสถาบัน: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศศิธร ชูศรี และ ศาสตราจารย์ ดร.ศุภยางค์ วรวุฒิคุณชัย (นักวิจัยที่ปรึกษา) มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

อีเมล์: sasitorn.chu@psu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: วันที่ 3 เมษายน พ.ศ. 2560 ถึงวันที่ 2 เมษายน พ.ศ. 2562

ไบโอฟิล์มของแบคทีเรียเป็นสิ่งที่บ่งบอกถึงโรคติดเชื้อที่รักษาได้ยาก เนื่องจาก ไบโอฟิล์มมีความต้านทานต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายและการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะสูงกว่าแบคทีเรียในสภาวะปกติ ดังนั้น การจัดการกับโรคติดเชื้อแบคทีเรียโดยการยับยั้งและทำลายไบโอฟิล์มของแบคทีเรียจึงเป็นความท้าท้ายที่สำคัญในทางการแพทย์ วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านไบโอฟิล์มของยาสมานแผลและเปลือกมังคุดซึ่งเป็นสมุนไพรองค์ประกอบในยาสมานแผลต่อไบโอฟิล์มของ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC10145 และ *Staphylococcus epidermidis* ATCC35984 สารที่ใช้ในการทดสอบประกอบด้วยยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรแห้ง ยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรสด น้ำมันสกัดเปลือกมังคุดแห้ง และน้ำมันสกัดเปลือกมังคุดสด

การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มบนพื้นผิวไฮโดรโฟบิก (โพลีสไตรีน) ทดสอบด้วยวิธี crystal violet (CV) assay สาหรับพื้นผิวไฮโดรฟิลิก (แก้ว) ทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดและกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม จากการศึกษาพบว่าสารทดสอบทั้งสี่ชนิดที่ความเข้มข้น 50-0.78% (v/v) สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มบนพื้นผิวโพลีสไตรีนได้ทั้ง *P. aeruginosa* และ *S. epidermidis* และยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* ได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) หลังจากทดสอบด้วยยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรแห้ง ยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรสด และน้ำมันสกัดเปลือกมังคุดสดที่ความเข้มข้น

0.78% (v/v) โดยไม่มีผลต่อการเจริญเติบโต กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดถูกนำมาใช้เพื่ออธิบายลักษณะของไบโอฟิล์มหลังจากได้รับการทดสอบ ในขณะที่กล้องจุลทรรศน์แรงอะตอมใช้เพื่อศึกษาค่าเฉลี่ยความสูงของไบโอฟิล์ม ค่าจุดสูงสุดของไบโอฟิล์ม และค่าความแตกต่างระหว่างจุดสูงสุดและจุดต่ำสุดของไบโอฟิล์ม แม้ว่าสารทดสอบทั้งสี่ชนิด (50% v/v) มีผลยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้ทั้ง *P. aeruginosa* และ *S. epidermidis* ดังภาพถ่ายที่ได้จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แต่มีเพียงยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรแห้ง และน้ำมันสกัดเปลือกมังคุดแห้งที่มีผลต่อค่าเฉลี่ยความสูงของไบโอฟิล์มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

เนื่องจากมีความจำเป็นเร่งด่วนในการค้นหาแนวทางการรักษาซึ่งมุ่งไปที่การหยุดยั้งการพัฒนาไบโอฟิล์ม ดังนั้นจึงได้ประเมินประสิทธิภาพของสารทดสอบต่อการทำลายไบโอฟิล์ม โดย *P. aeruginosa* และ *S. epidermidis* ถูกพัฒนาไบโอฟิล์มเป็นเวลา 3 วัน ทั้งบนพื้นผิวไฮโดรโฟบิก (โพลีสไตรีน) และพื้นผิวไฮโดรฟิลิก (แก้ว) ซึ่งเป็นไบโอฟิล์มที่อยู่ในระยะการเจริญเติบโตโดยสมบูรณ์ การทำลายไบโอฟิล์มบนพื้นผิวโพลีสไตรีนทดสอบด้วยวิธี MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) tetrazolium reduction assay พบว่า ยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรแห้งสามารถทำลายไบโอฟิล์มของแบคทีเรียทั้งสองชนิดประมาณ 40-70% หลังจากทดสอบเป็นเวลา 3-9 ชั่วโมง โดยในระยะเวลาทดสอบเดียวกันนี้ น้ำมันสกัดเปลือกมังคุดแห้งสามารถทำลายไบโอฟิล์มได้เฉพาะของ *P. aeruginosa* จากการทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอลชนิดที่ใช้เลเซอร์ในการสแกน โดยการย้อมสีไบโอฟิล์มด้วย LIVE/DEAD viability staining หลังจากทดสอบเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ไม่ปรากฏเซลล์ตายในไบโอฟิล์มของ P. aeruginosa ที่อยู่ในระยะการเจริญเติบโตโดยสมบูรณ์ แต่สารทั้งสี่ชนิดมีผลต่อค่ามวลชีวภาพ ความหนาเฉลี่ย ความหนาสูงสุดของไบโอฟิล์ม และอัตราส่วนพื้นที่ผิวต่อปริมาตร ในทางตรงกันข้ามพบเซลล์ตายในไบโอฟิล์มของ *S. epidermidis* หลังจากทดสอบด้วยยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรแห้งและน้ำมันสกัดเปลือกมังคุดแห้ง แต่ไม่มีผลต่อค่ามวลชีวภาพของไบโอฟิล์ม

การแสดงฤทธิ์ต้านไบโอฟิล์มของยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรแห้ง และน้ำมันสกัดเปลือกมังคุดแห้งมีแนวโน้มที่น่าสนใจในการนาไปศึกษาต่อและการพัฒนาการเตรียมเป็นสารต้านไบโอฟิล์ม โดยเฉพาะการใช้รักษาบาดแผล ดังนั้นจึงมีการศึกษาต่อเนื่องเพื่อประเมินฤทธิ์สมานแผลในระดับสัตว์ทดลองของตำรับยาสมานแผลในรูปแบบยาน้ำมัน โดยในการประเมินฤทธิ์สมานแผลนั้นจะดำเนินการทั้งในหนูทดลองปกติ (Wistar rats) และหนูเบาหวานชนิดที่ 2 (type 2 diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats) โดยพบกว่ายาสมานแผลในรูปแบบยาน้ำมันสามารถทำให้การหายของแผลทั้งในหนูปกติและหนูเบาหวานเกิดขึ้นได้สมบูรณ์และเร็วกว่ากลุ่มควบคุม (vehicle control) ที่มีน้ำมันมะพร้าวเพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และผลการสมานแผลของยาน้ำมัน T-YaSP ให้ผลการสมานแผลไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมบวก (positive control) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ยาน้ำมันแผนโบราณสำหรับใส่แผลที่มีขายในท้องตลาด โดยในการสมานแผลพบว่าความสมบูรณ์ของโครงสร้างของแผล การผลิตคอลลาเจน และการลดระดับการอักเสบเกิดขึ้นได้ดีกว่ากลุ่มควบคุมและให้ผลการรักษาที่ไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมบวก นอกจากนี้ยังพบว่า ยาน้ำมัน T-YaSP สามารถลดการอักเสบที่อาจจะนำไปสู่ภาวะการเกิดแผลเรื้อรังในผู้ที่มีภาวะเบาหวานได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสารสำคัญที่ตรวจพบใน ยาน้ำมัน T-YaSP ได้แก่ arecoline, bisdemethoxycurcumin, demethoxycurcumin, curcumin, curcumenol และ alpha-mangostin สามารถนำมาประกอบในการใช้เป็นสารบ่งชี้ฤทธิ์ทางชีวภาพของยาน้ำมัน T-YaSP เพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ในอนาคต

คำหลัก: ไบโอฟิล์ม, ยาสมานแผล, ตำรับยาแผนไทย, ฤทธิ์สมานแผล

ABSTRACT

Project Code: MRG60800019

Project Title: Roles of Thai traditional herbal medicine, Ya-Samarn-Phlae, on bacterial biofilm-related infections in diabetic wounds

Investigators: Assistant Professor Dr.Sasitorn Chusri and Professor Dr.Supayang Voravuthikunchai, Prince of Songkla University

Email Address: sasitorn.chu@psu.ac.th

Project Period: 3rd April 2017-2nd April 2019

Bacterial biofilms are responsible for several difficult-to-cure infectious diseases. Biofilm is more resistant to the host immune system as well as to antibiotic treatments more than planktonic cells. Therefore, combating bacterial infections by inhibiting or eradicating biofilm formation of the bacterium is a medically important challenge. The aim of this study was to investigate the anti-biofilm activity of Ya-Sa-Marn-Phlae and its effective herbal component, Garcinia mangostana against biofilm producers, Pseudomonas aeruginosa ATCC10145 and Staphylococcus epidermidis ATCC35984. The herbal preparations include hot oil extractions of Ya-Sa-Marn-Phlae prepared from dried (D-YSMP) and fresh herbal materials (F-YSMP) and hot oil extractions of dried (D-GM) and fresh Garcinia mangostana pericarp (F-GM).

Inhibitions of biofilm development on hydrophobic (polystyrene) surface were tested by crystal violet (CV) assay and hydrophilic (glass) surface was observed by scanning electron (SEM) and atomic force (AFM) microscopes. Tested herbal preparations displayed anti-biofilm development activity of P. aeruginosa and S. epidermidis on the polystyrene surface at the tested concentrations of 50-0.78% (v/v). Significantly reduction in biofilm formation of P. aeruginosa on this surface was found after treatment with D-YSMP, F-YSMP and F-GM at 0.78% (v/v), whereas there is no the growth inhibition effect of the planktonic cells was observed at this concentration. SEM was used to furnish images of biofilm reduction after the treatment, while AFM was used for characterizing roughness averages, peak height, and peak-valley height

of the treated biofilms. Even though, treatments with all herbal preparations (50% v/v) resulted in the reduction of both P. aeruginosa and S. epidermidis biofilm formation by SEM images, only D-YSMP and D-GM significantly affected the roughness averages of the treated biofilms.

As there is an urgent need to identify therapeutic strategies that are directed toward the inhibition of bacterial preformed biofilm, the eradication potency of the preparations was additionally evaluated. Static P. aeruginosa and S. epidermidis biofilms were grown for three days on both hydrophobic (polystyrene) and hydrophilic (glass) surfaces and then directly treated with the preparations. The eradication of mature biofilm on hydrophobic surface was tested by MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) tetrazolium reduction assay. Reductions in the bacterial metabolic activity in the preformed biofilms of both pathogens were seen approximately 40-70% after exposure to D-YSMP form 3 to 9 h, while treatment with D-GM only caused a remarkable eradication of a 3-day-old biofilm of P. aeruginosa. Following an 18-h treatment with the preparations, CLSM combined with LIVE/DEAD viability staining revealed that bacterial cell death did not occur in P. aeruginosa maturing biofilms, however remarkable reductions in biomass, average thickness, maximum thickness, and surface to volume ratio were noted. In contrast with S. epidermidis biofilm, CLSM images disclosed that treatment with D-YSMP and D-GM caused bacterial cell death in maturing biofilms, but there is no reduction in biomass of the biofilms.

Promising anti-biofilm activity was displayed by D-YSMP and D-GM suggesting further investigation in order to explore the possible utilization and development of the preparation as an anti-biofilm agent, especially for wound treatment. This present study therefore aimed to evaluate in vivo wound healing activity in both non-diabetic and diabetic rats and reveal the possible mechanism of enhancing wound healing. T-YaSP significantly accelerated the wound healing process in both non-diabetic Wistar rats and type 2 diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats, evidenced by the faster rate of wound construction, collagenation, and decreased the level of inflammatory markers compared to the vehicle control group. T-YaSP potently inhibited several oxidative stress and pro-inflammatory markers including MDA, NO, MPO, TNF-beta, COX-2 and iNOS in carrageenan-induced paw edema model. The presence of arecoline (*A. catechu*), bisdemethoxycurcumin, demethoxycurcumin, curcumin, curcumenol (*C. longa*)

and alpha-mangostin (*G. mangostana*) might be responsible for its wound healing potency and anti-inflammatory activity.

Keywords: Biofilm, YaSP, Traditional medicine, Wound healing