รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง ฤทธิ์ในการยับยั้งและทำลายเชื้อราของอนุพันธ์ของไคโตแซน ; การศึกษาทางหลอดทดลอง

Fungicidal properties of the derivative of chitosan ; an in vitro study

81	รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์	615.36 ส239ร

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร.สมชาย สันติวัฒนกุล
ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

งบประมาณแผ่นดิน
ประจำปี 2537

615.36
ส239ร

615.36
ส 2395

ฤทธิ์ในการยับยั้งและทำลายเชื้อราของอนุพันธ์ของไคโตแซน; การศึกษาทางหลอดทดลอง

สมชาย สันติวัฒนกุล, PhD (Microbiology)

บทคัดย่อ ได้ทำการทดลองยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคผิวหนัง (Dermatophytes) โดยใช้อนุพันธ์ของ chitosan ชนิด N,O-carboxymethyl chitosan (NOCC) ในระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 1-4% พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 2% NOCC สามารถที่จะยับยั้งการเจริญเติบโตและฆ่าเชื้อ *Epidermophyton floccosum* และ *Microsporum canis* และที่ระดับความเข้มข้น 3% NOCC สามารถที่จะยับยั้งการเจริญเติบโตและฆ่าเชื้อ *Microsporum gypseum* และ *Trichophyton mentagophytes* แต่ NOCC ที่ระดับความเข้มข้น 2-3% ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Trichophyton rubrum* แม้จะเพิ่มความเข้มข้นของ NOCC เป็น 4% ก็ตาม

-2 ส.ค. 2544

#187893

Abstract Fungicidal properties of the derivative of chitosan; an in vitro study

Somchai Santiwatanakul, PhD (Microbiology)*

In vitro study of the fungicidal property of the derivative of chitosan, the N,O-carboxymethyl chitosan (NOCC), at 1 to 4 % concentrations was investigated with various genus and species of dermatophytes. The results showed that NOCC at the concentration of 2% resulted in inhibitory and fungicidal activity against the *Epidermophyton floccosum* and *Microsporum canis* and at the concentration of 3% resulted in inhibitory and fungicidal activity against the *Microsporum gypseum* and *Trichophyton mentagophytes*. However, it failed to demonstrate the fungicidal property against the *Trichophyton rubrum* at up to 4% concentrations.

* ผู้ช่วยศาตราจารย์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

* Assistant Professor, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University.

INTRODUCTION

Dermatophytosis เป็นโรคเชื้อราบริเวณผิวหนัง ขน ผม และเล็บ รอยโรคที่ผิวหนังพบลักษณะเป็นขุย ๆ หรือมีการอักเสบเป็นวง มีสะเก็ดบางๆ จึงอาจเรียกโรคนี้ได้อีกชื่อหนึ่งว่า ring worm ซึ่งตรงกับภาษาไทยว่า "กลาก" หรือ "ขี้กลาก" โรคติดเชื้อกลุ่มนี้ไม่ทำอันตรายต่อคนถึงชีวิต แต่มักเป็นโรคที่ก่อให้เกิดความรำคาญและทำลายสุขลักษณะของบุคคลตลอดจนคุณภาพชีวิตให้ลดน้อยลง อุบัติการของโรคพบประมาณร้อยละ 70-80 ของผู้ป่วยโรคติดเชื้อราทั้งหมด[1] สาเหตุของโรคเกิดจากการติดเชื้อราในกลุ่ม Dermatophytes ซึ่งประกอบด้วย 3 genera ได้แก่ *Trichophyton* ซึ่งก่อให้เกิดโรคทั้งผิวหนัง ขน ผม และเล็บ[1-7] *Microsporum* ก่อให้เกิดโรคเฉพาะผม ขน และผิวหนัง[2,4-7] และ *Epidermophyton* ก่อให้เกิดโรคเฉพาะ ผิวหนังในร่มผ้า และเล็บ[5-7] เชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคกลากที่สำคัญในประเทศไทย ได้แก่ *T. rubrum* และ *T. mentagrophytes* รองลงมาได้แก่ *E. floccosum*, *M. gypseum*, *M. audouinii* และ *M. canis* เชื้อที่พบได้น้อยได้แก่ *T. schoenlienii* และ*T. concentricum* พยาธิกำเนิดของเชื้อกลุ่มนี้มีคุณสมบัติย่อยสลาย keratin elastin และ collagen ทำให้สามารถอาศัยอยู่บริเวณผิวหนัง ขน ผม และเล็บได้ นอกจากนี้ยังพบน้ำย่อยที่ย่อยสารจำพวก phospholipid ของเยื่อบุเซลล์ ทำให้เชื้อเข้าไปในเซลล์ได้[8,9] และพบว่าเชื้อบางสายพันธุ์สามารถทำให้เกิด sulfitolysis โดยการทำลายคุณสมบัติตามธรรมชาติของ keratin และทำให้น้ำย่อยโปรตีนย่อยสลายต่อไปได้ ซึ่งน่าจะเป็นส่วนช่วยในการดำรงชีพในสิ่งแวดล้อมที่เชื้อเข้าไปอาศัย[10] ยาที่ใช้ในการรักษาโรคกลากที่ได้ผลมีหลากชนิด[1,4,5] มีทั้งชนิดรับประทานและใช้ทาภายนอกโดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคกลากบริเวณผมและเล็บจำเป็นต้องใช้ยารับประทานซึ่งได้แก่ griseofulvin, ketoconazole สำหรับยาทาบริเวณอื่น ๆ นอกเหนือจากบริเวณผม และเล็บได้แก่ miconazole, cotrimazole, salicylic acid, tolnaftate, imidazoles, haloprigin, และ ciclopiroxolamine

เนื่องจากในปัจจุบันมีผู้หันมาใช้ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในชีวิตประจำวันมากขึ้น อย่างไรก็ตามมีผู้พบว่า[11] chitosan หรือ chitin ซึ่งเป็นสารที่สกัดได้จากเปลือกกุ้ง มีคุณสมบัติในการป้องกันการติดเชื้อจาก *Candida albicans* ในหนู mice นอกจากนี้สารอนุพันธุ์ของ chitosan หลายชนิด เช่น N-sulfonated และ N-sulfobenzoyl chitosan[12] มีผลต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย และ N-carboxybutyl chitosan[13] มีผลเป็นทั้ง bactericidal และ candidacidal นอกจากนี้มีสารอนุพันธ์ชนิด N,O-carboxymethyl chitosan (NOCC) เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีคุณสมบัติในการลด adhesion หลังการผ่าตัด[14-16] เนื่องจากอนุพันธ์ต่างๆ ที่กล่าวมาข้างต้นมีผลต่อการยับยั้งหรือฆ่าเชื้อ แต่ยังไม่เคยมีรายงานเกี่ยวกับการฆ่าเชื้อราในกลุ่ม dermatophytes ของ NOCC ดังนั้นจุดประสงค์ในการทดลองครั้งนี้เพื่อหาระดับความเข้มข้นของอนุพันธ์ chitosan ชนิด NOCC ในการ

ยับยั้งและฆ่าเชื้อรา ซึ่งจะทำให้เราได้ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติในรูปแบบต่างๆ เพื่อนำมาใช้ในการรักษาและป้องกันเชื้อราต่อไป

MATERIALS AND METHODS

Culture collection

เชื้อรากลุ่ม Dermatophytes ที่ใช้ในการทดลองเก็บได้จากสิ่งส่งตรวจตามผิวหนังจากโรงพยาบาลรามาธิบดี และสถาบันโรคผิวหนัง และ stock culture จาก Virginia Tech (USA) โดยการ isolate ใน Sabouraud dextose agar (SDA) ที่เติม chloramphenicol และ cycloheximide และ identify ด้วยวิธี Slide culture[17] เชื้อที่ได้จะ subculture ใน SDA ซึ่งมีดังนี้คือ *T. rubrum* 40 ตัวอย่าง, *T. mentagrophytes* 35 ตัวอย่าง, *E. floccosum* 30 ตัวอย่าง, *M. gypseum* 30 ตัวอย่าง, และ *M. canis* 30 ตัวอย่าง

Preparation of media base

ละลาย 6.7 กรัม yeast nitrogen base และ 10 กรัม น้ำตาลกลูโคส ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อ (sterilization) โดยกรองผ่าน celluloae membrane filter ขนาด 0.45 ไมครอน ซึ่งจะเป็น yeast nitrogen base glucose (YNBG) และเก็บไว้ที่ 4°C ก่อนนำมาใช้ต้องเตรียมเป็น working YBNG ในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อด้วยอัตราส่วน 1:10

Preparation of N,O-carboxymethyl chitosan (NOCC) solution

เตรียม stock solution ของ NOCC โดยการละลาย 5% (W/V) ของ NOCC ในน้ำกลั่น แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ที่ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

Preparation of inoculum of dermatophytes[18]

เลี้ยงเชื้อ Dermatophytes ที่ต้องการทดสอบบน SDA นานประมาณ 7 วัน ผสมเชื้อราที่ได้ลงใน 0.05% Tween 80 ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จากนั้นปรับความขุ่นของเชื้อราด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 530 nm ให้ได้ 90%T ซึ่งจะได้เชื้อประมาณ 1×10^6 colony forming unit (CFU)/ml

Fungicidal effect of NOCC to Dermatophytes

เจือจาง stock NOCC solution ด้วย working YBNG ให้ได้ความเข้มข้นดังนี้คือ 4%, 3%, 2%, และ 1% (ตารางที่ 1) และมี positive control ในแต่ละความเข้มข้น โดยแทนที่จะใส่ NOCC ก็ใส่ น้ำกลั่นแทน นอกจากนี้ยังมี negative control และ medium control (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงการเตรียม NOCC ในความเข้มข้นต่าง ๆ พร้อม control

หลอดทดลองที่	1	2	3	4	Negative control	Medium control
Stock NOCC solution (ml)	1.6	1.2	0.8	0.4	0.0	1.2
Working TNBG (ml)	0.4	0.8	1.2	1.6	2.0	0.8
NOCC concentration (%)	4	3	2	1	0	3

ใส่เชื้อราที่เตรียมไว้ (1×10^6 CFU/ml) ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลองที่ 1 ถึง 4 และ positive control ของแต่ละความเข้มข้น ส่วน negative และ medium control จะเติม 0.05% ของ Tween 80 หลอดละ 50 ไมโครลิตร แทน จากนั้นนำทุกหลอดไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25 °C นานประมาณ 2-3 สัปดาห์ โดยเปรียบเทียบความขุ่นจาก positive control ของความเข้มข้นนั้น หากพบว่ามีความขุ่นเกิดขึ้นที่หลอด positive control ใด ก็ให้อ่านผลความขุ่นของความเข้มข้นนั้น โดยที่หลอด negative control จะต้องไม่ขุ่น ให้บันทึกผลหลอดสุดท้ายที่ไม่ขุ่น ซึ่งถือเป็นค่า Minimum inhibition concentration (MIC) และให้นำหลอดที่ไม่เกิดความขุ่นมา subculture ใน SDA แล้วอบเพาะเชื้อที่ อุณหภูมิ 25 °C นาน 2 สัปดาห์ เพื่อดูว่าความเข้มข้นของ NOCC ระดับใดมีค่าเป็น Minimum fungicidal concentration (MFC)

RESULTS

ผลของการเลี้ยงเชื้อ Dermatophytes ในความเข้มข้นต่าง ๆ ของ NOCC (ตารางที่ 2) พบว่า ที่ความเข้มข้น 2% สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Epidermophyton floccosum* และ *Microsporum canis* และ ที่ความเข้มข้น 3% สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Microsporum gypseum* และ *Trichophyton mentagophytes* แต่เชื้อ *Trichophyton rubrum* สามารถเจริญได้ดีแม้ในระดับความเข้มข้น 4% ดังนั้นค่าระดับ MIC ของ *Epidermophyton floccosum* และ *Microsporum canis* จะอยู่ที่ 2% และ MIC ของ *Microsporum gypseum* และ *Trichophyton mentagophytes* จะอยู่ที่ 3%

ตารางที่ 2 แสดงการเจริญของเชื้อ Dermatophytes ใน NOCC ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

Dermatophytes	% of Growth of Dermatophytes in			
	1%NOCC	2%NOCC	3%NOCC	4%NOCC
Epidermophyton floccosum (n=30)	100	0	0	0
Microsporum canis (n=30)	100	0	0	0
Microsporum gypseum (n=30)	100	100	0	0
Trichophyton mentagophytes (n=35)	100	100	0	0
Trichophyton rubrum (n=40)	100	100	100	100

ในการหาระดับค่า MFC โดยการนำหลอดทดลองที่ไม่มีการเจริญของเชื้อ Dermatophytes มาทำการเพาะเชื้อใน SDA พบว่า ค่าระดับ MBC ของ *Epidermophyton floccosum* และ *Microsporum canis* จะอยู่ที่ 2% และ MBC ของ *Microsporum gypseum* และ *Trichophyton mentagophytes* จะอยู่ที่ 3%

DISCUSSION

อนุพันธ์ของ chitosan หลายชนิดได้ถูกนำมาใช้ในการยับยั้งและฆ่าเชื้อชนิดต่าง ๆ Chen และคณะ[12] พบว่า N-sulfonate และ N-sulfobenzol chitosan มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Shigella dysenteriae, Aeromonas hydrophila, Salmonella typhimurium, และ Bacillus cereus* นอกจากนี้ Muzzarelli และคณะ[13] พบว่า N-Caboxybutyl chitosan ซึ่งเป็น modified chitin ของกลุ่ม crustacean สามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราชนิด *Candida* ได้ และในการทดลองครั้งนี้ผู้ทดลองพบว่า N,O-carboxymethyl chitosan (NOCC) ซึ่งเป็น modified chitin ของเปลือกกุ้งสามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อรากลุ่ม Dermatophytes ชนิด *Epidermophyton floccosum, Microsporum canis, Microsporum gypseum* และ *Trichophyton mentagophytes* ได้ที่ระดับความเข้มข้นที่ 2-3% แต่อย่างไรก็ตามที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวไม่สามารถใช้ยับยั้งและฆ่าเชื้อ *Trichophyton rubum* ได้แม้จะใช้ในระดับความข้นที่ 4% ก็ตาม แต่การทดลองนี้ไม่สามารถเพิ่มความเข้มข้นเป็นระดับ 5% ขึ้นไปได้เนื่องจาก stock NOCC มีความเข้มข้น 5% อยู่แล้วและไม่มีสารอาหารสำหรับให้เชื้อราเจริญได้ และไม่อาจจะเตรียม stock ให้สูงเกินกว่า 5% ได้เพราะมีความหนืดสูงมาก

ยังไม่เป็นที่แน่ชัดว่าอนุพันธ์ chitosan สามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อได้อย่างไร Muzzarelli และคณะ[13] พบว่าเมื่อศึกษารูปร่างของเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อ *Candida* ที่เลี้ยงใน N-Carboxybutyl chitosan ด้วย electron microscope พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างอย่างมาก

ซึ่งอาจจะเป็นสาเหตุที่ทำให้เชื้อไม่สามารถเจริญได้ ในทำนองเดียวกัน NOCC ซึ่งเป็นอนุพันธ์ชนิดหนึ่งของ chitosan อาจทำให้เชื้อรากลุ่ม Dermatophytes เปลี่ยนรูปร่างจนไม่สามารถเจริญได้เช่นกัน

จากผลของการศึกษาอนุพันธ์ chitosan ชนิด NOCC อาจนำมาพัฒนาใช้เป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเพื่อป้องกันหรือรักษาเชื้อรา อันจะเป็นทางเลือกใหม่อีกชนิดหนึ่งทางธรรมชาติโดยอาศัยเทคโนโลยีที่ไม่ซับซ้อนมาประยุกต์

ACKNOWLEDGEMENT

การทดลองนี้ได้รับเงินสนับสนุนจากงบประมาณโครงการวิจัยปีงบประมาณ 2537 ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

H 187493

REFERENCES

1. เมระนี เทียรประสิทธิ์ : โรคเชื้อราที่ผิวหนัง. โครงการตำรา-ศิริราช คณะแพทยศาสตร์ ศิริราช พยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ, 2527 : 51 - 97.
2. Nevesb H. Mycological study of 519 cases of ring worm infections in Portugal. Mycopathologia 1960 ; 13 : 121 - 132.
3. English MP. Tinea pedis as a public health problem. Br J Dermatol 1969 ; 81 : 705 - 707.
4. Conant NF, Smith DT, Baker RD, Callaway JL. Manual of clinical mycology. Philadelphia : W.B. Saunders, 1971 ; 548 - 586.
5. Rippon J. Medical mycology. 2 rd ed. Philadelphia : W.B. Saunders, 1982 ; 140 - 428.
6. Ajello L, Padhy AA. Dermatophytes and the agents of superficial mycoses. In : Lennette EH, Balow A, Hausler Jr, Shadomy HJ, eds. Manual of Clinical Microbiology. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1985 ; 514-525.
7. ศมนีย์ ศุขรุ่งเรือง. ความสัมพันธ์ของเชื้อรา การก่อโรค และการต้านโรค, เชื้อราก่อโรค และโรคเชื้อรา. พิมพ์ครั้งที่ 1. บริษัทสารมวลชน จำกัด, 2529.
8. Rippon JW. Elastase : production by ringworm fungi. Science 1967 ; 157 : 947.
9. Rippon JW, Lorincz AL. Collagenase activity of *Streptomyces (Nocardia) madurae*. J Invest Dermatol 1964 ; 43 : 483 - 486.
10. Ruffin P, Andrieu S, Bislrte G, Biguet J. Sulfitolysis in keratinalysis. Biochemical proof. Sabouraudia 1976 ; 14 : 181 - 184.
11. Suzuki K, Okawa Y, Hashimoto K, Suzuki S, Suzuki M. Protecting effect of chitin and chitosan on experimentally induced murine candidiasis. Microbiol Immunol 1984 ; 28 : 903 - 912.
12. Chen CS, Liau WY, Tsai CJ. Antibacterial effects of N-sulfobenzoyl chitosan and application to oyster preservation. J Food Prot 1998 ; 61 : 1124 - 1128.
13. Muzzarelli R, Tarsi R, Filippini O, Giovanetti E, Biagini G, Varaldo PE. Antimicrobial properties of N-carboxybutyl chitosan. Antimicrob Agents Chemother 1990 ; 34 : 2019 - 2023.

14. Krause TJ, Goldsmith NK, Ebner S, Zazanis GA, McKinnon RD. An inhibitor of cell proliferation associated with adhesion formation is suppressed by N,O-carboxymethyl chitosan. J Invest Surg 1998 ; 11 : 105 - 113.
15. Costain DJ, Kennedy R, Ciona C, McAlister VC, Lee TD. Prevention of postsurgical adhesions with N,O-carboxymethyl chitosan : examination of the most efficacious preparation and the effect of N,O-carboxymethyl chitosan on postsurgical healing. Surgery 1997 ; 121 : 314 - 319.
16. Kennedy R, Costain DJ, McAlister VC, Lee TD. Prevention of experimental postoperative peritoneal adhesions by N,O-carboxymethyl chitosan. Surgery 1996 ; 120 : 866 - 870.
17. Weitzman J, Kane J, Summerbell RC. *Trichophyton, Microsporum, Epidermophyton,* and Agents of superficial mycoses. In : Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1995 ; 791 - 808.
18. Evan EGV, Richardson MD. Medical mycology : practical approach. IRL press 1989 ; 235 - 239.