วารสาร เทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่

BULLETIN OF CHIANG MAI ASSOCIATED MEDICAL SCIENCES

VOLUME 13 SEPTEMBER NUMBER III

สำนักวิทยบริการ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่
Bulletin of Chiang Mai Associated Medical Sciences

VOLUME 13 SEPTEMBER NUMBER 3

CONTENTS

การเสริมฤทธิ์กันระหว่าง Carbenicillin **และ** Tobramycin **หรือ** Amikacin **ต่อเชื้อ** Pseudomonas aeruginosa **ในห้องปฏิบัติการ** 149

อัญชลี คงฟู ภ.บ., M.S. (Microbiology)

ปานเทพ อิทธิสวัสดิ์พันธุ์ วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)

การเสริมฤทธิ์กันของยาต้านจุลชีพเพื่อรักษาโรคติดเชื้อ Proteus mirabilis **ที่ทำให้เกิดขึ้นในสัตว์ทดลอง** 169

อัญชลี คงฟู ภ.บ., M.S. (Microbiology)

เชื้อโรคหนองในและความไวของเชื้อหนองในต่อยาปฏิชีวนะ 189

วิไลวรรณ เชงวิทยากุล, วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)

เนตร สุวรรณคฤหาสน์ วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)

บทฟื้นฟูวิชาการ ; ความก้าวหน้าในการศึกษาวิจัยพันธุกรรมของฮีโมโกลบิน 197

สุรพร มาตระกูล วท.บ. (เทคนิคการแพทย์), วท.ม. (ชีวเคมี)

ผลของสารสกัดจากมะระจีนต่อการรวมตัวของ ^{3}H thymidine **เข้าไปใน** DNA **ของ** Bacillus subtilis 219

บุญยืน สาริกะภูติ, Ph.D.

นฤมล วิสารทะ, M.Sc.

และ วิชัย วงค์ไชย, Ph.D.

ย่อและรีวิวเอกสาร 227

ข่าวในวงการ 231

คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เจ้าของ

สำนักงาน : สำนักงานคณบดี คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

โทรศัพท์ 221829

บรรณาธิการ

นายแพทย์ชัยโรจน์ แสงอุดม

ผู้ช่วยบรรณาธิการ

ปกรณ์ ไทยานันท์

กองบรรณาธิการ

อุดมศักดิ์ เห่วซึ่งเจริญ
ดำรงค์ พิณคานนท์
สุชาติ ศิริทูล
สุรภา เดชะ
จิตติพร เขียนประสิทธิ์
พรทิพย์ ธีระสวัสดิ์
ยุพา จิวิริยะวัฒน์
ขวัญชัย รัตนเสถียร
มาลินี เชาวพันธุ์
มารศรี ไกรโรจนานันท์
สัชล สงค์ศิริ
กนกวรรณ อุโมษกิจ
สร้อยสุดา วิทยากร
ธวัชชัย สุภาจารุพันธุ์

เหรัญญิก

ศุภร สุตะพาหะ

ผู้จัดการ

ปราโมทย์ เตียวศิริ

ผู้ช่วยผู้จัดการ

รัตนา สาคร

ที่ปรึกษาวิชาการ

นายแพทย์ตะวัน กังวานพงศ์
นายแพทย์บริบูรณ์ พรพิบูลย์
นายแพทย์สนาน สิมารักษ์
นายแพทย์วิชาญ วิทยาศัย
นายแพทย์ดำรี ดำรงศักดิ์
นายแพทย์ประยุทธ ฐิตะสุต
นายแพทย์กัมพล พนัศอำพล
นายแพทย์มุนี แก้วปลัง
นายแพทย์ปัญจะ กุลพงษ์
นายแพทย์เทอดชัย ชีวะเกตุ
นายแพทย์กอสิน อมาตยกุล

กำหนดออก : ราย ๔ เดือน (มกราคม, พฤษภาคม กันยายน)

สำนักพิมพ์ : พระลิงห์การพิมพ์ ถนนสามล้าน ซอย ๑ เชียงใหม่

นายประทวน ศักดิ์ทวนชัย ผู้พิมพ์ผู้โฆษณา

BULLETIN OF
THE FACULTY OF ASSOCIATED MEDICAL SCIENCES
CHIANG MAI UNIVERSITY, CHIANGMAI, THAILAND

EDITOR

Dr. Chairoj Saeng-Udom

ASSISTANT EDITOR

Pakorn Thaiyanan

BOARD OF EDITORS

Audomsark	Haesungcharern	Kwanchai	Ratanasthien
Damrong	Pinthanond	Malinee	Chaovapan
Suchart	Siritool	Marasri	Krairojananan
Surapa	Decha	Sichon	Songsiri
Jittiporn	Keanprasit	Kanokwan	Ukoskit
Porntip	Dheerasawat	Sroysuda	Wittayakorn
Yupa	Jiviriyawat	Thavutchai	Suparjarupun

TREASURER

Suporn Sutapaha

BUSINESS MANAGER

Pramoat Teowsiri

ASSISTANT BUSINESS MANAGER

Ratana Sacorn

BOARD OF ADVISORS

Dr. Tawan Kungvanpong	Dr. Prayuth Thitasut
Dr. Boriboon Pornphibool	Dr. Kampol Panas-ampol
Dr. Saman Simarak	Dr. Muni Keoplung
Dr. Vicharn Vithayasai	Dr. Panja Kulapongs
Dr. Damri Dumrongsak	Dr. Thoedchai Jivacate

Dr. Kosin Amatayakul

Published : TERTIALLY (January, May, September)

ข้อแนะนำสำหรับเรื่องส่งตีพิมพ์

ในวารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่

1. เป็นผลงานวิจัย, เรื่องวิชาการ หรือสาระดีทางการแพทย์ ที่ไม่เคยตีพิมพ์ในวารสารอื่นมาก่อน
2. ลิขสิทธิ์ของเรื่องที่ส่งตีพิมพ์เป็นของวารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่เท่านั้น
3. ส่งเรื่องที่จะตีพิมพ์ถึงบรรณาธิการวารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่โดยตรง
4. ภาษาที่ใช้ควรเป็นภาษาไทย พร้อมทั้งย่อเรื่องเป็นภาษาอังกฤษ หรือใช้ภาษาอังกฤษพร้อมกับย่อเรื่องเป็นภาษาไทย
5. ชื่อเรื่องไม่ควรยาวจนเกินไป ถ้าเนื้อเรื่องเป็นภาษาไทยให้ใช้ชื่อเรื่องเป็นภาษาไทย
6. ชื่อผู้เขียนและคณะ ให้ใช้ภาษาเดียวกันกับที่เขียนเรื่อง พร้อมตำบลที่อยู่ หรือสถาบันที่ทำงาน
7. ต้นฉบับต้องเป็นต้วพิมพ์คิด พิมพ์หน้าเดียว และต้องส่งให้บรรณาธิการ 2 ชุด
8. แผนภาพประกอบเรื่อง ควรเป็นลายเส้นขาวดำ พร้อมคำอธิบาย
9. เจ้าของเรื่องจะได้รับสำนานพิมพ์ตอบแทน 30 ชุด
10. การจัดลำดับภายในเรื่องควรประกอบ ด้วยโครงร่างดังนี้ :

    บทคัดย่อ ไม่ควรเกินกว่า 100 คำ

    บทนำ

    วัตถุและวิธีการ

    ผลการทดลอง

    วิจารณ์

    ย่อเรื่อง (ถ้าเรื่องเป็นภาษาไทยให้ย่อเรื่องเป็นภาษาอังกฤษ ถ้าเรื่องเป็นภาษาอังกฤษให้ย่อเรื่องเป็นภาษาไทย)

    เอกสารอ้างอิง

11. เอกสารอ้างอิงให้เรียงตามลำดับตัวเลขในเนื้อเรื่อง การอ้างวารสารจัดลำดับดังนี้ ชื่อผู้แต่ง (ชื่อสกุล ชื่อต้น) ชื่อเรื่อง ชื่อย่อของวารสาร ปีที่ หน้า ปี เช่น

    Cho. CH., Fenje P, and Sparkes, J.D. : Antibody and immunoglobulin response to antirabies vaccination in man, Infect. Immunity 6 : 483–486, 1972

    การอ้างหนังสือจัดลำดับดังนี้

    Johnston, D.F. : Essentials of communicable disease. Ed. 2. Mosby, Saint Louis, p. 55, 1968.

NOTES ON MANUSCRIPTS

Original research articles, review-type papers and case reports will be considered for publication in the Bulletin of Chiang Mai Associated Medical Sciences. All manuscripts must be original and should have preferably not been previously submitted to any other publication. Preference is given to material which is of general to medical practitioners and research workers in clinical medicine.

Manuscripts must be as concise as possible and should be typed in English with double line spacing. They should be forwarded to the editor, Bulletin of Chiang Mai Associated Medical Sciences, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand. The title should be limited to a maximum of 10 words and the article broken up with suitable subtitles. Black and white photographs may also be submitted and under special circumstances, colour may be accepted.

All accepted manuscripts are subject to copy editing 30 reprints are returned to the author with free of charge.

Manuscripts should be arranged in this form.

- An abstract of not more than 100 words containing a brief outline of the paper must accompany the manuscript.
- Introduction.
- Materials and methods.
- Results of experiment.
- Discussion and comment.
- Abstract in Thai.
- References.

ใบบอกรับเป็นสมาชิก

วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่

ที่ _____

วันที่ _____

ถึง บรรณาธิการวารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่

ข้าพเจ้ายินดีบอกรับเป็นสมาชิก วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่ โปรดจัดส่งวารสารถึงข้าพเจ้า ดังนี้

นาม _____ สำนักงาน _____

_____ บ้านเลขที่ _____ ถนน _____ ตำบล _____

อำเภอ _____ จังหวัด _____ ค่าบำรุงสมาชิกตลอดชีพ

ข้าพเจ้าได้ส่งเงินจำนวน _____ บาท สำหรับเป็นค่าบำรุงสมาชิก _____ สั่งจ่ายในนามของบรรณาธิการวารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ มาพร้อมกับแบบฟอร์มนี้แล้ว

ลงชื่อ _____

หมายเหตุ ค่าบำรุงสมาชิกรายปี 30 บาท

ค่าบำรุงสาชิกตลอดชีพ 300 บาท

ใบโฆษณา

วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่

ที่ _____

วันที่ _____

ถึง บรรณาธิการ วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่

ข้าพเจ้า_____

ผู้จัดการ_____

ยินดีลงโฆษณากิจการของข้าพเจ้า ในวารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่

จำนวน_____หน้า มีกำหนด 1 ปี (3 ฉบับ)

ในอัตราโฆษณาเป็นเงิน_____บาท

(_____) พร้อมนี้ได้มอบบล็อค_____ชิ้น

ข้อความ_____ชิ้น มาด้วยแล้ว

ลงชื่อ_____

(_____)

อัตราค่าโฆษณาในระยะเวลา 1 ปี

เต็มหน้า	800.00 บาท
ปกหน้าด้านในเต็มหน้า	1400.00 บาท
ปกหลังด้านในเต็มหน้า	1200.00 บาท
ปกหลังด้านนอกเต็มหน้า	1800.00 บาท
ใบแทรก	1000.00 บาท

วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่
Bulletin of Chiang Mai Associated Medical Science

Vol. 13 No. 3
September 1980

การเสริมฤทธิ์กันระหว่าง Carbenicillin และ Tobramycin หรือ Amikacin ต่อเชื้อ Pseudomonas aeruginosa ในห้องปฏิบัติการ

อัญชลี คงฟู ภบ., M.S. (Microbiology)*
ปานเทพ อิทธิสวัสดิ์พันธุ์ วท.บ(เทคนิคการแพทย์)

บทคัดย่อ

เชื้อ Pseudomonas aeruginosa ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจต่างๆ ของผู้ป่วยที่เข้ามารับการตรวจรักษาที่โรงพยาบาล นครเชียงใหม่ จำนวน ๑๒ strains ได้นำมาทำการทดสอบการเสริมฤทธิ์กันระหว่างยา Penicillin, Carbenicillin หรือ Ampicillin กับยาพวก Aminoglycosides เช่น Gentamicin, Tobramycin และ Amikacin โดยอาศัยวิธีการต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ ๓ วิธีการ เพื่อศึกษาเปรียบเทียบการเสริมฤทธิ์กันระหว่างยาต้านจุลชีพคู่ต่างๆ เหล่านี้ ต่อเชื้อ P.aeruginosa strains ต่างๆ ซึ่งพบว่าวิธีการทั้งสามให้ผลสัมพันธ์กันมากต่อยาคู่ที่ให้ผลเสริมฤทธิ์กันอย่างแท้จริง โดยพบว่า Carbenicillin ซึ่งเป็นยาที่ค่อนข้าง effective ต่อ Pseudomonas มากที่สุดนั้น จะให้ผลเสริมฤทธิ์กันอย่างเห็นได้ชัดเจนมากที่สุด กับยา Tobramycin ซึ่งอย่างน้อยพบในเชื้อถึง ๑๐ strains (๘๓.๓๓%)หรือถึง ๑๑ strains (๙๑.๖๖%) ที่แสดงการเสริมฤทธิ์กันต่อการใช้ยาคู่นี้ นอกจากนี้ยังพบการเสริมฤทธิ์ระหว่าง Carbenicillin กับ Amikacin ได้ในเชื้อ Pseudomonas ถึง ๗ (๕๘.๓๓%) หรือ ๘ strains (๖๖.๖๖%) แต่ไม่พบการต้านฤทธิ์ระหว่าง Carbenicillin กับ Aminoglycosides ทั้งสามเลย ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาอื่นๆ ที่ได้ทำทั้งในห้องปฏิบัติการ และในสัตว์ทดลอง ต่อเชื้อ P.aeruginosa เช่นเดียวกัน ฉะนั้นพอที่จะกล่าวได้ว่า การใช้ยา Carbenicillin ร่วมกับ Tobramycin หรือ Amikacin สามารถเสริมฤทธิ์กันได้อย่างแท้จริงต่อเชื้อ P. aeruginosa จึงเป็นประโยชน์เพื่อนำเอายาต้านจุลชีพคู่ต่างๆ เหล่านี้มาใช้รักษาผู้ป่วยที่เกิด infection ด้วยเชื้อนี้ต่อไป

* ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บทนำ

ในปัจจุบันนี้การรักษาผู้ป่วยที่เกิด infection ด้วยเชื้อ Pseudomonas กำลังมีปัญหาอย่างมาก เนื่องจากเชื้อนี้เริ่มดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิดที่เคยใช้รักษาได้ผลดี [๑-๓] และยาต้านจุลชีพเหล่านี้ก็เป็นพิษต่อผู้ป่วยด้วย [๔-๖] เช่น สมัยก่อนเคยใช้ยาพวก polymyxin B รักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อ Pseudomonas aeruginosa แต่พบว่ายานี้มีพิษต่อไต และระบบประสาท [๖] จึงได้เลิกใช้ยานี้ หันมาใช้ยาพวก Penicillins หรือ Aminoglycosides เพิ่มมากยิ่งขึ้น แต่ก็พบว่ามีเชื้อ เริ่มดื้อต่อยาต้านจุลชีพเหล่านี้ ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อ Pseudomonas สามารถผลิตเอ็นไซม์ที่ใช้ในปฏิกริยา Phosphorylation, acetylation หรือ adenylation มาทำลายฤทธิ์ของยาได้ ฉะนั้นจึงได้มีผู้นำเอายาต้านจุลชีพสองชนิดมาใช้ร่วมกัน เพื่อจุดประสงค์ให้เกิดการเสริมฤทธิ์กัน [๒,๗-๑๑] ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการรักษาผู้ป่วยได้อย่างมีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้ยาต้านจุลชีพเพียงชนิดเดียว ส่วนใหญ่ได้มีการศึกษาถึงการเสริมฤทธิ์กันระหว่างยา Carbenicillin และ Gentamicin ต่อเชื้อ Pseudomonas ในห้องปฏิบัติการ [๒,๗-๑๑] และเร็วๆนี้ ได้มีผู้ศึกษาในสัตว์ทดลอง [๑๒]

สำหรับการศึกษาครั้งนี้ จะเป็นการ confirm ให้มั่นใจยิ่งขึ้นว่า การร่วมกันระหว่างยาพวก Penicillins กับ Aminoglycosides สามารถเสริมฤทธิ์กันได้อย่างแท้จริงต่อเชื้อ Pseudomonas aeruginosa strains ต่างๆที่แยกได้จากผู้ป่วยที่มารับการรักษาที่โรงพยาบาลนครเชียงใหม่ โดยอาศัยวิธีการต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ ๓ วิธีการ เพื่อใช้ศึกษาเปรียบเทียบกัน ซึ่งได้เคยนำเอาวิธีการเหล่านี้มาใช้ศึกษาการเสริมฤทธิ์กันระหว่างยาต้านจุลชีพพวก Penicillins และ Aminoglycosides ในเชื้อ Proteus species ต่างๆในห้องปฏิบัติการแล้ว และพบว่าวิธีการทั้งสามให้ผลสัมพันธ์กันมาก ฉะนั้นจึงได้นำเอาวิธีเหล่านี้มาใช้ศึกษาอีกครั้งหนึ่งกับเชื้อ Pseudomonas aeruginosa โดยศึกษาการร่วมกันระหว่างยาต้านจุลชีพพวก Penicillins เช่น penicillin, ampicillin และ carbenicillin ร่วมกับพวก Aminoglycosides เช่น gentamicin, tobramycin และ amikacin

วัตถุและวิธีการ

เชื้อแบคทีเรีย. เชื้อ Pseudomonas

aeruginosa ทั้งหมด ๑๒ strains ได้แยกจากผู้ป่วยที่เข้ามารับการตรวจ รักษาที่โรงพยาบาลนครเชียงใหม่ โดยแยกจากสิ่งส่งตรวจบัสสาวะ หนองแผล และ Exudates ซึ่งเชื้อทั้งหมดนี้เป็นพวก Gram-negative bacilli และให้คุณสมบัติทางชีวเคมีดังนี้: ให้ผลบวกต่อ citrate, OF glucose, nitrate reduction, motility และเจริญในอาหาร Brain heart infusion broth ที่ ๔๒° ซ, ไม่ ferment น้ำตาลในTSI (Triple Sugar Iron Agar)และให้ผลลบต่อ OF maltose เชื้อนี้ทุก strainsสามารถผลิต pigment สีเขียวได้

ยาต้านจุลชีพ. สำหรับพวก Penicillins ได้แก่ penicillin G sodium (องค์การเภสัชกรรม), ampicillin sodium (IBI)และ Carbenicillin sodium (Pyopen:Beecham) ซึ่งเตรียม solution ใหม่ๆ ใน sterile phosphate buffer pH 6.5ส่วนพวก Aminoglycosides ได้แก่ Gentamicin (Garamycin: Schering), Tobramycin (Nebcin:Eli Lilly) และ Amikacin (Amikin : Bristol)ซึ่งเตรียม solution ในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อและเก็บไว้ได้นานโดยการ freeze,Disks ของ Penicillin (10 u), Ampicillin (10 ug),และ Gentamicin (10 ug) เตรียมขึ้นใช้เอง ส่วน Disks ของ Tobramycin (30 ug) และ Amikacin (30 ug)ได้จาก BBL และ Carbenicillin (50 ug) ได้จาก Pfizer

อาหารเลี้ยงเชื้อ. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการศึกษานี้ คือ Mueller-Hinton Agar (MHA) และ Mueller-Hinton Broth(MHB) ได้จาก BBL

การทดสอบการเสริมฤทธิ์กันของยาต้านจุลชีพในห้องปฏิบัติการ. วิธีการที่นำมาใช้ศึกษาเปรียบเทียบกัน มี ๓ วิธีการ[๑๓] โดยการใช้แต่ละวิธีการหาฤทธิ์ของยาต้านจุลชีพทุกชนิดทั้งแบบเดี่ยวๆ และแบบผสมกันทั้งหมด ๙ คู่ ต่อ Pseudomonas aeruginosa ทั้ง ๑๒ strains

วิธีที่ ๑. Agar Triple Layer Technique[๑๔] โดยนำเอา Culture ของเชื้อ P. aeruginosa แต่ละ Strain ที่เพาะเลี้ยงค้างคืนในอาหาร MHB มาทำให้เจือจางจนได้ความเข้มข้นของเชื้อประมาณ $๑๐^{๕}$ เซลล์/มล. (เทียบกับ McFarland No. 1)แล้วจึง inoculate เชื้อจำนวน $๑๐^{๖}$ เซลล์/มล.ลงไปใน ๑๐ มล. ของ MHA ที่หลอมเหลวแล้ว (ใช้ Standard loop ขนาด ๔ มม. ซึ่งจุsolution

ได้ ๐.๐๑ มล.) แล้วเทลงจานอาหาร ตั้งทิ้งไว้จน Agar แข็ง ใช้เป็นชั้นล่างสุด (ชั้นที่ ๑) จากนั้นเท ๑๐ มล. ของ MHA ที่หลอมเหลวแล้วเช่นกัน ทับลงไปอีกชั้นหนึ่ง (ชั้นที่ ๒) แต่ก่อนที่ Agar ในชั้นที่ ๒ นี้จะแข็ง ให้ใช้ forcep คีบเอา Disks ยาต้านจุลชีพ ๒ ชนิด (คู่ที่ต้องการศึกษา) จุ่มผ่าน Agar ในชั้นที่ ๒ ลงไป แล้ววางลงบนผิวหน้าของ Agar ชั้นที่ ๑ (ดังแสดงในรูปที่ ๑) โดยวาง Disks ของยาทั้งสองให้ห่างกันประมาณครึ่งหนึ่งของผลรวมของ Inhibition zones ของยาทั้งสอง ที่รายงานไว้โดย Bauer และผู้ร่วมงาน[๑๕] หลังจากที่ตั้งจานอาหารทิ้งไว้จน Agar แข็งตัวดีแล้ว จึงนำเข้า incubate ที่ ๓๗ °ซ เป็นเวลา ๕ ชั่วโมง จากนั้นจึงนำเอาจานอาหารออกมาเททับด้วยชั้นที่ ๓ ซึ่งประกอบด้วย ๑๐ มล. ของ MHA ที่หลอมเหลวที่ ๔๕ °ซ. ก่อน และก่อนเทให้นำมาผสมด้วย ๐.๗๕ มล. Penicillinase (Difco ,๑ มล. มี Potency ๒๐,๐๐๐ Levy Units) เมื่อตั้งทิ้งไว้จน Agar ในชั้นที่ ๓ แข็งตัวดีแล้วจึงนำเข้า incubate ๓๗ °ซ. ค้างคืน และแปลผลการทดสอบนี้ ตามรูปที่แสดงไว้ (รูปที่ ๒)

วิธีที่ ๒. Microtiter Broth Dilution Method. สำหรับ Microtitration plastic plates (๙๖-U bottomed wells ขนาดจุ ๐.๐๒๕ มล.) ได้นำมาทำความสะอาดโดยการแช่ใน ๙๕% Ethyl alcohol เป็นเวลา ๓ ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ๒ ครั้ง สลัดน้ำออกให้แห้ง และทำให้ปราศจากเชื้อด้วยแสงอุลตราไวโอเล็ต จากนั้นเตรียม ๒-fold dilution ของยาต้านจุลชีพแต่ละชนิด ทั้งแบบเดี่ยวๆ และแบบผสมกันทั้ง ๙ คู่ ในหลุมแต่ละหลุม โดยใช้อาหาร MHB สำหรับทำ dilution ของยาเหล่านี้ให้ได้ Solution ในหลุมแต่ละหลุม ๐.๐๒๔ มล. แล้วจึงใช้ Microdropper หยดเชื้อ Pseudomonas ที่เพาะเลี้ยงค้างคืนและได้เจือจางไว้ได้เชื้อ ประมาณ ๑๐^{๕} เซลล์/มล.ลงไปในหลุมทุกหลุม หลุมละ ๐.๐๒๕ มล. ซึ่งความเข้มข้นของ Penicillins ทั้ง ๓ ชนิด ในหลุมแรกและหลุมสุดท้าย เป็น ๒,๐๐๐ และ ๑.๙๕ ยูนิต หรือไมโครแกรม/มล., ตามลำดับ ส่วนความเข้มข้นของ Aminoglycosides ในหลุมแรกและหลุมสุดท้าย เป็น ๕๐๐ และ ๐.๔๙ ไมโครแกรม/มล.,ตามลำดับแล้วนำเพลทเข้า incubate ที่ ๓๗ °ซ. เป็นเวลา ๑๘ชั่วโมง จึงนำเพลทออกมาอ่านผลเพื่อหาค่า MIC (Minimal Inhibitory Concentration) ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดของยาต้านจุลชีพในหลุมที่

สามารถระงับการเจริญของเชื้อได้ แล้วจึง sub-culture จากหลุมที่ไม่มีเชื้อเจริญเหล่านี้ โดย spot ลงบนอาหาร MHA plate (ใช้ Standard loop ขนาด ๑ มม.) หลังจากที่นำจานอาหารเข้า incubate ที่ ๓๗ °ซ ค้างคืนแล้ว จึงหาค่า MBC (Minimal Bactericidal Concentration) ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดของยาต้านจุลชีพที่สามารถฆ่าเชื้อให้ตายได้

การแปลผล. โดยแปลผลว่า เสริมฤทธิ์กัน (Synergism) เมื่อนำเอายาต้านจุลชีพทั้งสองมาผสมกัน แล้วพบว่า activity ในการทำลายเชื้อของยาต้านจุลชีพแต่ละชนิดเพิ่มขึ้นมากกว่า ๔ เท่า (๒ dilution) เมื่อเทียบกับ activity ของยาต้านจุลชีพแต่ละชนิดที่ให้ออกฤทธิ์ตามลำพังเมื่อยังไม่ได้นำมาผสมกัน หรือแปลผลว่า เสริมฤทธิ์กันบางส่วน (Partially synergism) เมื่อ activity ของยาต้านจุลชีพตัวหนึ่งเพิ่มขึ้น ๔ เท่าในขณะที่ activity ของยาต้านจุลชีพอีกตัวหนึ่งเพิ่มขึ้นเพียง ๒ เท่า และแปลผลว่า ไม่มีการเสริมฤทธิ์กัน (No synergism) เมื่อ activity ของยาต้านจุลชีพแต่ละชนิด เพิ่มขึ้นเพียง ๒ เท่า เมื่อเทียบกับ activity ของยาต้านจุลชีพแต่ละชนิดตามลำพังเมื่อยังไม่ได้ผสมกัน

วิธีที่ ๓. Inocula-Replicating Method. โดยเตรียม ๒-fold dilution ของยาต้านจุลชีพแต่ละชนิดทั้งแบบเดี่ยวๆและแบบผสมกันทั้ง ๔ คู่ ในอาหาร MHA ซึ่งความเข้มข้นของยา Penicillins หรือ Aminoglycosides ในจานอาหารจานแรก ถึงจานสุดท้ายนั้น เป็นแบบเดียวกับความเข้มข้นของยาทั้ง ๒ พวก ที่ใช้ในวิธีที่ ๒ แล้วนำเอาเชื้อ P.aeruginosa ทั้ง ๑๒ strains ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร MHB ค้างคืน มาทำให้เจือจางจนได้เชื้อประมาณ $๑๐^{๔}$ เซลล์/มล. แล้วจึง inoculate เชื้อทุกstrains พร้อมๆกันลงบนจานอาหารแต่ละจานโดยใช้เครื่อง Inocula Replicator ของ Steers[๑๖] ซึ่งประกอบด้วย Pronge ที่ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการจุ่ม ๙๕% แอลกอฮอลล์ และเผาในเปลวไฟ เมื่อเย็นลงจึงนำมาจุ่มในหลุมของเชื้อทั้งหมด ซึ่งจะได้ solution ของเชื้อติดมาประมาณ ๐.๐๐๑ มล. (หรือ $๑๐^{๕}$ เซลล์/มล.) แล้วนำมา spot ลงบนจานอาหารที่ผสมยาต้านจุลชีพ ในความเข้มข้นต่างๆ กัน ให้เริ่ม spot จากจานอาหารที่มีความเข้มข้นของยาต่ำสุดมายังจานอาหารที่มีความเข้มข้นของยาสูงสุดตามลำดับ ซึ่งจะได้ spot ของเชื้อแต่ละ strain บนผิวหน้าอาหารกว้างประมาณ ๖ มม. นำจานอาหารเข้า incubate ที่ ๓๗ °ซ. ค้างคืน แล้วอ่านผลเพื่อหาค่า

ตารางที่ ๑. Percentage ของเชื้อ Pseudomonas aeruginosa จำนวน ๑๒ strains ที่แสดงการเสริมฤทธิ์กันระหว่างยาต้านจุลชีพ Penicillins และ Aminoglycosides โดยวิธี Agar Triple Layer Technique.

เชื้อ (Strain No.)	การร่วมกันระหว่างยาต้านจุลชีพคู่ต่างๆ								
	P+G	P+Tb	P+AK	AM+G	AM+Tb	AM+AK	CB+G	CB+Tb	CB+AK
1	0	0	0	0	+	0	0	+	0
2	+	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	+	0	0	+	0	+	+
4	0	0	0	0	0	+	0	+	+
5	0	0	0	0	0	0	+	+	0
6	0	0	0	0	0	0	0	+	0
7	+	0	0	0	+	+	0	+	0
8	0	+	0	0	0	0	+	+	+
9	0	0	+	0	+	+	0	+	+
10	0	0	0	0	0	0	0	+	+
11	0	0	0	0	0	0	+	+	+
12	+	+	0	+	+	0	0	+	+
จำนวน	3	2	2	1	4	4	3	11	7
%	25	16.66	16.66	8.33	33.33	33.33	25	91.66	58.33

+ = Synergism 0 = No synergism, P = Penicillin, AM = Ampicillin,
CB = Carbenicillin G = Gentamicin, Tb = Tobramycin, AK = Amikacin

ตารางที่ ๒. Percentage ของเชื้อ Pseudomonas aeruginosa จำนวน ๑๒ strains ที่แสดงการเสริมฤทธิ์กันระหว่างยาต้านจุลชีพ Penicillins และ Aminoglycosides โดยวิธี Microtiter Broth Dilution Method.

เชื้อ Strain No.	การร่วมกันระหว่างยาต้านจุลชีพคู่ต่างๆ								
	P+G	P+Tb	P+AK	AM+G	AM+Tb	AM+AK	CB+G	CB+Tb	CB+AK
1	0	ϴ	ϴ	+	+	0	0	+	+
2	ϴ	0	0	+	0	+	+	0	0
3	ϴ	0	ϴ	0	+	0	+	+	+
4	0	ϴ	ϴ	0	+	0	0	ϴ	0
5	0	ϴ	0	0	0	ϴ	0	ϴ	+
6	0	0	0	0	0	0	0	ϴ	0
7	0	ϴ	0	0	ϴ	0	0	ϴ	0
8	0	0	ϴ	0	0	0	0	ϴ	ϴ
9	0	0	0	0	0	ϴ	ϴ	ϴ	+
10	0	0	0	0	0	0	0	ϴ	ϴ
11	0	0	0	0	0	0	ϴ	0	0
12	0	ϴ	0	0	0	0	ϴ	ϴ	ϴ
จำนวน	2	5	4	2	4	3	5	10	7
%	16.66	41.66	33.33	16.66	33.33	25	41.66	83.33	58.33

+ = Synergism, ϴ = Partially synergism, 0 = No synergism

ตารางที่ ๓. Percentage ของเชื้อ Pseudomonas aeruginosa จำนวน ๑๒ strains ที่แสดงการเสริมฤทธิ์กัน ระหว่างยาต้านจุลชีพ Penicillins และ Aminoglycosides โดยวิธี Inocula-Replicating Method.

เชื้อ Strain No.	การร่วมกันระหว่างยาต้านจุลชีพคู่ต่างๆ								
	P+G	P+Tb	P+AK	AM+G	AM+Tb	AM+AK	CB+G	CB+Tb	CB+AK
1	0	◐	0	0	◐	0	0	+	0
2	◐	0	◐	0	0	◐	0	◐	+
3	0	◐	◐	0	◐	0	0	◐	◐
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	◐	0
6	0	0	0	0	0	0	0	◐	◐
7	0	◐	◐	0	◐	◐	◐	+	◐
8	0	+	0	0	0	0	0	+	0
9	0	0	0	0	0	◐	0	◐	◐
10	◐	0	0	0	0	0	◐	◐	+
11	0	◐	0	0	◐	0	0	◐	◐
12	◐	0	◐	◐	0	◐	◐	◐	◐
จำนวน	3	5	4	1	4	4	3	11	8
%	25	41.66	33.33	8.33	33.33	33.33	25	91.66	66.66

+ = Synergism, ◐ = Partially synergism, 0 = No synergism

ตารางที่ ๔. เปรียบเทียบ Percentage ของเชื้อ Pseudomonas aeruginosa จำนวน ๑๒ strains ที่แสดงการเสริมฤทธิ์กันระหว่างยาต้านจุลชีพ Penicillins และ Aminoglycosides โดยวิธีการในห้องปฏิบัติการทั้ง ๓ วิธีการ.

วิธีการ \ เปอร์เซนต์	การร่วมกันระหว่างยาต้านจุลชีพคู่ต่างๆ								
	P+G	P+Tb	P+AK	AM+G	AM+Tb	AM+AK	CB+G	CB+Tb	CB+AK
1. Agar triple layer technique	25.00	16.66	16.66	8.33	33.33	33.33	25.00	91.66	58.33
2. Microtiter broth dilution Method	16.66	41.66	33.33	16.66	33.33	25.00	41.66	83.33	58.33
3. Inocula-replicating Method	25.00	41.66	33.33	8.33	33.33	33.33	25.00	91.66	66.66

วิจารณ์

สำหรับเชื้อ Pseudomonas aeruginosa ทั้ง ๑๒ strains ที่เลือกนำมาศึกษาครั้งนี้ เป็นเชื้อที่ค่อนข้างไวต่อยาต้านจุลชีพ Aminoglycosides ทั้ง ๓ ชนิดที่ใช้ศึกษามากแต่ค่อนข้างดื้อต่อยาพวก Penicillins โดยเฉพาะ Penicillin G ซึ่งไม่ถือว่าเป็นยาที่เลือกใช้สำหรับรักษาโรคติดเชื้อ Gram-negative bacilli แต่เชื้อ Pseudomonas หลาย strains ยังคงไวต่อยา Carbenicillin มาก อย่างไรก็ตามยาต้านจุลชีพทั้ง ๒ พวกนั้น ค่อนข้างมีพิษสูงมากต่อผู้ป่วย ถ้าต้องใช้ Dose ของยาขนาดสูงมากๆ หรือถ้าใช้รักษาผู้ป่วยเป็นเวลานานๆ โดยผู้ป่วยในรายที่แพ้ Penicillins อาจเกิดอาการผื่นแดง คันหรือลมพิษ และอาจเกิด Anaphylactic shock ได้ ส่วนยาพวก Aminoglycosides แทบทุกชนิดมีพิษสูงอย่างมากต่อผู้ป่วย โดยจะมีพิษต่อไต และ Nitrogen retention และต่อประสาทหู อาจทำให้ผู้ใช้ยาเหล่านี้หูหนวกได้ ถ้าต้องรักษาด้วยขนาดของยาสูง หรือรักษาเป็นเวลานานๆ ฉะนั้นถ้ายาทั้งสองพวกดังกล่าวนี้สามารถที่จะเสริมฤทธิ์กันได้ โดยทำให้ขนาดของยาแต่ละชนิดที่ใช้รักษาได้ผลดีนั้นลดลงไป เมื่อนำเอายาผสมกัน ก็จะเป็นการแก้ไขพิษของยาพวกนี้ให้ลดน้อยลงไปได้เช่นกัน

ผลจากการทดสอบการเสริมฤทธิ์กัน โดยวิธีการทั้งสามในห้องปฏิบัติการนี้ พบว่า เชื้อ Pseudomonas aeruginosa แต่ละ strain ให้ผลค่อนข้างแปรผันอย่างมาก เมื่อใช้วิธีการทดสอบการเสริมฤทธิ์แบบต่างๆ กัน โดยเชื้อ strain หนึ่งอาจให้ผลเสริมฤทธิ์กันต่อยาคู่หนึ่ง เมื่อทดสอบโดยวิธีแรก แต่กลับไม่เสริมฤทธิ์กันเลยเมื่อทดสอบโดยวิธีที่ ๒ หรือ ๓ ก็ได้ แต่อย่างไรก็ตามก็มีเชื้อ Pseudomonas ถึงอย่างน้อย ๑๐ strains (๘๓.๓๓%) ที่แสดงการเสริมฤทธิ์กันระหว่างยา Carbenicillin กับ Tobramycin ซึ่งผลที่ได้นี้สอดคล้องกันทั้ง ๓ วิธี ดังแสดงผลสรุปไว้ในตารางที่ ๔ แสดงว่ามีการเสริมฤทธิ์กันอย่างแท้จริงระหว่างยาคู่นี้ในห้องปฏิบัติการ จึงน่าจะนำเอายาคู่นี้มาใช้รักษา infection ที่เกิดด้วยเชื้อ Pseudomonas aeruginosa ในผู้ป่วยได้ เพราะมีผู้รายงานหลายคน ว่าการเสริมฤทธิ์กันระหว่างยาต้านจุลชีพคู่หนึ่ง เช่น Carbenicillin กับ Gentamicin ต่อเชื้อ Pseudomonas ในห้องปฏิบัติการ (In vitro) นั้น สามารถนำมาใช้รักษาผู้ป่วย โดยเกิดการเสริมฤทธิ์ในผู้ป่วย (In vivo) ได้เช่นกัน สำหรับในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าการร่วมกัน

ระหว่าง Carbenicillin กับ Gentamicin ให้ผลเสริมฤทธิ์กันในเชื้อ Pseudomonas เพียง ๓ strains (๒๕%) เมื่อทดสอบโดยวิธีแรก และวิธีที่ ๓ ส่วนวิธีที่ ๒ ให้ผลการเสริมฤทธิ์กันระหว่างยาคู่นี้ในเชื้อเพียง ๕ strains (๔๑.๖๖%) ซึ่งผลจากวิธีการทั้งสามนี้ใกล้เคียงกันเช่นกัน ฉะนั้นการใช้ยาต้านจุลชีพ Carbenicillin ร่วมกับ Gentamicin เพื่อรักษาผู้ป่วยด้วยโรคติดเชื้อ Pseudomonas นั้นอาจให้ผลการรักษาได้ไม่ดีเท่าที่เคยมาก่อน

อย่างไรก็ตาม เชื้อแบคทีเรียค่อนข้างแปรผันต่อการทดสอบการร่วมกันระหว่างยาต้านจุลชีพมาก เชื้อแบคทีเรียแม้อยู่ใน species เดียวกัน แต่คนละ strains อาจให้ผลการทดสอบการเสริมฤทธิ์ระหว่างยาคู่หนึ่งแตกต่างกันไป มีผู้รายงานว่า ยา Carbenicillin อาจให้ผลต้านฤทธิ์ต่อยา Gentamicin หรือ aminoglycosides ตัวอื่นๆ ได้[๑๗,๑๘] ซึ่งขึ้นกับเวลา อุณหภูมิ และความเข้มข้นของยาต้านจุลชีพที่ใช้ และนอกจากนี้ยังขึ้นกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบด้วย Gentamicin ที่ถูกต้านฤทธิ์โดย Carbenicillin ใน in vivo นั้น อาจเกิดขึ้นเนื่องจาก นำเอายาต้านจุลชีพ ๒ ชนิด มาผสมกันก่อน แล้วจึงฉีดเข้าเส้นเลือด (IV) อย่างช้าๆ หรืออาจ เนื่องจากระบบการขับถ่ายที่ไตของผู้ป่วยเกิดขัดข้อง[๑๗-๑๙] อย่างไรก็ตามการถูกต้านฤทธิ์ของ Gentamicin โดย ยา Carbenicillin ในทาง in vitro นั้น ต้องใช้เวลานานหลายชั่วโมงถึงจะเกิดผลต้านฤทธิ์ขึ้น[๑๗-๑๙] ซึ่ง Riff และ Jackson[๑๙] กล่าวว่า การถูกต้านฤทธิ์ของ Aminoglycosides โดย Carbenicillin นั้น เป็นคุณสมบัติทาง Physicochemical property ที่น่าสนใจ เกิดขึ้นได้ในห้องปฏิบัติการ และมีความสำคัญทาง Clinical เมื่ออยู่ในสภาวะพิเศษเท่านั้น

สำหรับในการศึกษานี้ ไม่พบการต้านฤทธิ์ระหว่าง Carbenicillin กับ Tobramycin หรือยาต้านจุลชีพ Aminoglycosides อื่นๆ เลย แต่พบการเสริมฤทธิ์มากที่สุดระหว่าง Carbenicillin กับ Tobramycin และรองลงมาคือ Carbenicillin กับ Amikacin ส่วน Ampicillin ร่วมกับ Gentamicin ให้ผลเสริมฤทธิ์กันน้อยมาก โดยพบใน Pseudomonas เพียง ๑ หรือ ๒ strains จากจำนวนที่ศึกษา ๑๒ strains แสดงว่ายาคู่นี้ไม่เกิดการเสริมฤทธิ์กันอย่างแท้จริง อย่างไรก็ตาม การศึกษาครั้งนี้ เป็นเพียงการหาการเสริมฤทธิ์ระหว่างยาต้านจุลชีพในห้องปฏิบัติการ (In vitro) เท่านั้น ซึ่งควรจะได้นำเอาเชื้อ Pseudomonas

นี้มาทดสอบเทียบกันไปด้วยกับวิธีการในสิ่งที่มีชีวิต (In vivo) เช่นในสัตว์ทดลอง หรือในผู้ป่วยโดยการหา Antibiotic serum level ในผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพทั้งแบบเดี่ยวๆ และแบบผสมกัน เพื่อจะดูว่ามีการเสริมฤทธิ์ระหว่าง Carbenicillin กับ Tobramycin อย่างแท้จริงในผู้ป่วยหรือไม่ แต่อย่างไรก็ตามได้มีผู้นำเอายา Carbenicillin มาศึกษาร่วมกับ Gentamicin และ Tobramycin โดยศึกษาในสัตว์ทดลอง คือหนูขาว ซึ่งทำให้เกิดการติดเชื้ออย่างรุนแรงด้วยเชื้อ Pseudomonas aeruginosa ซึ่งพบว่ามีการเสริมฤทธิ์กันเกิดขึ้นอย่างแท้จริงระหว่าง Carbenicillin ที่ใช้ร่วมกับ Gentamicin หรือ Tobramycin โดยสามารถทำให้หนูมีชีวิตเหลือรอดอยู่มากกว่าการใช้ยาต้านจุลชีพชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงตามลำพังชนิดเดียว และนอกจากนี้ยังสามารถขจัดเชื้อออกไปจากบริเวณที่ฉีดเชื้อเข้าหนู (ช่องท้อง)หรือจากเลือดในหัวใจหนูด้วย และผลเหล่านี้ก็สัมพันธ์กับผลที่ทดสอบได้ในห้องปฏิบัติการด้วย โดยไม่พบการต้านฤทธิ์ระหว่างยาทั้ง ๒ คู่เลย [๑๒] ซึ่งผลที่ได้ก็สอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้มาก เพียงแต่ Carbenicillin เมื่อใช้ร่วมกับ Gentamicin ให้ผลการเสริมฤทธิ์ได้น้อยกว่า แต่เมื่อใช้ Carbenicillin ร่วมกับ Tobramycin จะให้ผลเสริมฤทธิ์กันอย่างเด่นชัดมากต่อเชื้อ Pseudomonas aeruginosa ฉะนั้นจึงน่าเป็นแนวทางใช้ยาต้านจุลชีพคู่นี้รักษาผู้ป่วยที่เกิดการติดเชื้อนี้ต่อไป.

เอกสารอ้างอิง

1. Lowbury, E.J.L., Kidson, A., Lilly, H.A., Ayliffe, G.A.J., Jones, R.J. Sensitivity of Pseudomonas aeruginosa to antibiotics: emergence of strains highly resistant to carbenicillin. Lancet. 2:448-452, 1969.
2. Andriole, V.T. Synergy of Carbenicillin and gentamicin in experimental infection with Pseudomonas. J. Infect. Dis. 124 (Suppl.): S46-S55, 1971.
3. Curtin, J.A., Petersdorf,R.G., Bennett, I.L., Jr. Pseudomonas bacteremia : review of ninety-one cases. Ann. Intern. Med. 54:1077-1107, 1961.
4. Wersäll, J., Lundquist, P.G., Bjorkroth, B. Ototoxicity of Gentamicin. J. Infect. Dis.

119:410-416,1969.

5. Lyons, R.W., Thornton, G.F., Andriole, V.T. Carbenicillin: clinical and laboratory studies. J.Infect. Dis. 122 (Suppl.): S104-S113,1970.
6. Lindesmith, L.A., Baines, R.D., Jr., Bigelow, D.B., Petty, T.L. Reversible respiratory paralysis associated with polymyxin therapy. Ann. Intern. Med. 68:318-327, 1968.
7. Sonne, M., Jawetz, E. Combined action of carbenicillin and gentamicin on Pseudomonas aeruginosa in vitro. Appl. Microbiol. 17: 893-896,1969.
8. Smith, C.B., Dans, P.E., Wilfert, J.N, Finland, M. Use of gentamicin in combinations with other antibiotics. J. Infect. Dis.119: 370-377,1969.
9. Eickhoff, T.C. In vitro effects of carbenicillin combined with gentamicin or polymyxin B against Pseudomonas aeruginosa. Appl. Microbiol. 18:469-473,1969.
10. Bulger, R.J., Kirby, W.M.M. Gentamicin and ampicillin: synergism with other antibiotics. Am. J. Med. Sci. 246:717-726,1963.
11. Brumfitt, W., Percival, A., Leigh, D.A. Clinical and laboratory studies with carbenicillin. A new penicillin active against Pseudomonas pyocyanea. Lancet. 1:1289-1293,1967.
12. Andriole, V.T. Antibiotic synergy in experimental infection with Pseudomonas. II. the effect of carbenicillin, cephalothin, or cephanone combined with tobramycin or gentamicin. J. Infect. Dis. 129:124-133, 1974.
13. Kongfoo, U. In vitro studies for demonstrating synergy of penicillins and aminoglycosides

against Proteus species. Chiang Mai Med. Bull. 1981. (in pressed).

14. Yourassowsky, E., and Vanderlinden, M.P. A rapid, simple method for demonstrating synergy of amikacin and penicillin against various microorganisms. J. Infect. Dis. 134 (Suppl.):S275-S279,1976.
15. Bauer, A.W., Kirby, W.M.M.,Sherris, J.C., Turck, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol. 45:493-496,1966.
16. Steers, E., Foltz, E.L., and Graves, B.S. Inocula replicating apparatus for routine testing for bacterial susceptibility to antibiotics. Antibiotic Chemother. 9:307-311,1959.
17. McLaughlin, J.E., Reeves,D.S. Clinical and laboratory evidence for inactivation of gentamicin by carbenicillin. Lancet.1:261-264,1971
18. McLaughlin, J.E., Reeves, D.S. Gentamicin plus carbenicillin. Lancet. 1:864-865,1971.
19. Riff, L., and Jackson, G.G. Gentamicin plus carbenicillin. Lancet. 1:592,1971.

Vol.13 No.3 September 1980

SUMMARY OF THE PRECEDING ARTICLE

SYNERGISM OF CARBENICILLIN AND TOBRAMYCIN OR AMIKACIN ON PSEUDOMONAS AERUGINOSA IN VITRO

Unchalee Kongfoo B.Sc (Pharmacy), M.S.*

Pantep Eidtisawadpan B.Sc. (Med. Tech.)

Synergism between penicillin and aminoglycoside antibiotics was studied by three techniques in vitro in 12 strains of Pseudomonas aeruginosa isolated from clinical materials. These three techniques were in accordance in 10 or 11 instances with the combination of carbenicillin and tobramycin, and also in 7 or 8 instances with the combination of carbenicillin and amikacin. Thus, these results of the present study indicated that true synergy between carbenicillin and either tobramycin or amikacin could be achieved in vitro, and suggested that combined therapy with carbenicillin and either tobramycin or amikacin might be useful for certain Pseudomonas infection in humans.

* Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University

ล่าสุดจากโอลิมปัส Model BH

สร้างขึ้นเพื่องานวิจัยโดยเฉพาะ:
ระบบ Modular พร้อมอุปกรณ์ครบครัน
(Complete System)
ราคาที่นักวิจัยทุกท่าน
สามารถเป็นเจ้าของได้

รัชมอร์

111 ทองหล่อซอย5 สุขุมวิท55 กรุงเทพฯ
โทร. 913143, 924100

ผู้แทนจำหน่ายและบริการ แต่ผู้เดียวในประเทศไทย

วารสารเภสัชกรรมเพาษ์ เชียงใหม่
Bulletin of Chiang Mai Associated Medical Science

Vol. 13 No. 3
September 1980

การเสริมฤทธิ์กันของยาต้านจุลชีพเพื่อรักษาโรคติดเชื้อ *Proteus mirabilis* ที่ทำให้เกิดขึ้นในสัตว์ทดลอง

อัญชลี ดงฟู ภบ., M.S. (Microbiology)*

บทคัดย่อ

การเสริมฤทธิ์กันระหว่างยาต้านจุลชีพ Penicillins และ Aminoglycosides สามารถสังเกตเห็นได้ในสิ่งมีชีวิต เช่น หนูขาว ที่ทำให้เกิดการติดเชื้อ *Proteus mirabilis* อย่างรุนแรงขึ้น แล้วจึงรักษาต่อมาด้วยยาต้านจุลชีพแบบเดียวๆ ๖ ชนิด และแบบที่ผสมกัน ๔ คู่ ได้พบการเสริมฤทธิ์กันระหว่างยาต้านจุลชีพอย่างชัดเจนมาก ในยาต้านจุลชีพ ๔ คู่ที่ศึกษาคือ Carbenifillin + kanamycin, carbenicillin + amikacin, amipicillin + kanamycin, และ ampicillin + amikacin ส่วนยาต้านจุลชีพอีก ๔ คู่ ให้ผลการเสริมฤทธิ์กันน้อย โดยผลที่ได้อาจเป็นเพียง Additive เท่านั้น อย่างไรก็ตามไม่พบการต้านฤทธิ์กันระหว่างยาต้านจุลชีพทั้งสองพวกเลย ฉะนั้นการใช้ยาต้านจุลชีพร่วมกันจึงให้ผลในการรักษาโรคติดเชื้อ Proteus ได้ดีกว่าการใช้ยาต้านจุลชีพชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงลำพังชนิดเดียว

บทนำ

ปัจจุบันนี้พบว่าเชื้อใน *Family Enterobacteriaceae* ทำให้เกิดการติดเชื้อในผู้ป่วยได้บ่อยมากที่สุด และเชื้อเหล่านี้เริ่มดื้อต่อยาต้านจุลชีพที่นำมาใช้รักษาเป็นอย่างมากด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อ Proteus เริ่มดื้อต่อยาต้านจุลชีพ Aminoglycosides ที่เคยใช้รักษาได้ผลดีมาก่อน ซึ่งระหว่าง species ต่างๆ ของ Proteus พบว่า *Proteus mirabilis* เป็น species ที่แยกได้บ่อยมากที่สุด เช่น จากปัสสาวะของผู้ป่วยที่เข้ามารับการตรวจรักษาที่โรงพยาบาลนครเชียงใหม่[1] ซึ่งเชื้อนี้มีผู้รายงานว่าเริ่มดื้อต่อยา Gentamicin และ Kanamycin เพิ่มบ่อยมากยิ่งขึ้น[2,3] ทั้งนี้เนื่องจากมีการสะสม R-plasmids ในเชื้อ จึงเป็นสาเหตุให้ต้องสังเคราะห์หายาต้านจุลชีพใหม่ๆ มาใช้อยู่เรื่อย แต่วิธีการแก้ไขการดื้อของเชื้อต่อยาที่ให้ผลเป็นที่น่าพอใจอีกวิธีหนึ่ง คือการใช้ยา

* ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ร่วมกัน โดยเฉพาะการร่วมกันระหว่างยาพวก Penicillins และ Aminoglycosides ซึ่งจะให้ผลเสริมฤทธิ์กันต่อเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด[4,5,6]

เนื่องจากผลที่เกิดขึ้นจากการร่วมกันของยาต้านจุลชีพ ๒ ชนิด มีได้หลายแบบ เช่น Indifference, addition, synergism หรือ antagonism ซึ่งผลเหล่านี้สามารถสังเกตเห็นได้ทั้งในการทดสอบในห้องปฏิบัติการ (In vitro tests)หรือในสิ่งมีชีวิต (In vitro tests) แต่ไม่มีใครสามารถทำนายโดยอาศัยหลักทฤษฎีได้ก่อนว่า ถ้านำยาต้านจุลชีพมาใช้ร่วมกัน ผลที่ได้ควรเป็นอย่างไร แต่อย่างไรก็ตามฤทธิ์ที่ต้องการให้เกิดขึ้นในการรักษา Infection คือ การเสริมฤทธิ์กัน หรือ Addition และหลีกเลี่ยงการต้านฤทธิ์กัน (Antagonism) ระหว่างยาต้านจุลชีพทั้งสอง ฉะนั้นวัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาถึง effects ต่างๆ โดยเฉพาะการเสริมฤทธิ์กันระหว่างยาต้านจุลชีพ Penicillins และ Aminoglycosides ต่อเชื้อ Proteus mirabilis ที่ทำให้เกิด infection ขึ้นในสัตว์ทดลอง และศึกษาถึงกลไกในการเสริมฤทธิ์กันระหว่างยาต้านจุลชีพทั้ง ๒ พวกนั้น

วัตถุและวิธีการ

เชื้อแบคทีเรีย . การศึกษาในสัตว์ทดลองนี้ได้เลือกใช้เชื้อ Proteus mirabilis (Indol-negative) ซึ่งแยกได้จากปัสสาวะของผู้ป่วยที่เข้ามารับการตรวจรักษาที่โรงพยาบาลนครเชียงใหม่ ซึ่งจากการทดสอบความไวโดยวิธี Single disk method[7] พบว่าเชื้อนี้ค่อนข้างไวต่อยาต้านจุลชีพต่างๆ หลายชนิด โดยเฉพาะ Penicillins และ Aminoglycosides ที่ศึกษา ซึ่งเชื้อนี้ได้เก็บสต๊อกไว้บนอาหาร Mueller-Hinton Agar Slant (BBL) ที่ ๔°ซ และนำมา streak ลงบนอาหาร Blood Agar เพื่อให้แน่ใจว่าได้ Pure culture ก่อนการทดสอบทุกครั้ง จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงต่อใน Mueller-Hinton Broth (MHB) เพาะเลี้ยงค้างคืนที่ ๓๗°ซ. และนำมาทำให้เจือจางด้วย MHB เพื่อปรับให้ได้จำนวนเชื้อประมาณ ๑-๒ $\times$ $๑๐^{๗}$ เซลล์/มล. (เท่ากับ ๗ เท่าของ LD_{50} ของเชื้อ strain นี้) ซึ่งเมื่อฉีดจำนวนเชื้อนี้เข้าช่องท้องหนูขาวประมาณ ๑ มล. จะทำให้หนูขาวทั้งหมดที่ไม่ได้รับการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพตายภายใน ๑๒ ชั่วโมง แต่ถ้าให้การรักษาด้วย ๒,๐๐๐ ยูนิตของ Penicillin G/Kg จะทำให้หนูขาวจำนวน ๑๐-๒๐% มีชีวิตรอดอยู่ได้อีกนาน

ยาต้านจุลชีพ . Sodium penicillin

G (Merck Sharp & Dohme), ampicillin sodium (Dumex), carbenicillin sodium (Beecham), gentamicin sulfate (Schering), kanamycin sulfate (Meiji), และ amikacin sulfate (Bristol) ถูกเตรียมขึ้นใช้ใหม่ๆ โดยใช้ Sterile phosphate buffer pH 6.5 สำหรับละลายยาพวก Penicillins และใช้น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อสำหรับละลายยาพวก Aminoglycosides

สัตว์ทดลอง. ใช้หนูขาวที่ปราศจากโรคโดยเลือกหนูขาวตัวเมีย ที่มีอายุขนาด และน้ำหนักใกล้เคียงกัน ประมาณ ๒๕-๓๐ กรัม ($\pm$๒ กรัม) เพื่อใช้สำหรับการทดสอบแต่ละครั้ง

การทำให้เกิด infection ในหนูขาว โดยแบ่งหนูขาวออกเป็นกลุ่มๆ ละ ๒๐ ตัว แต่ละกลุ่มจะได้รับการฉีดด้วยเชื้อ Proteus mirabilis ที่เตรียมไว้ เข้าช่องท้องหนูขาวทุกตัวก่อนในปริมาณ ๑ มล. และในเวลา ๒ ชม. ต่อมา จึงรักษาหนูขาวด้วยยาต้านจุลชีพ แบบเดี่ยวๆหรือผสมกัน ๒ ชนิด

การรักษาหนูขาวด้วยยาต้านจุลชีพ หลังจากทำให้หนูเกิด infection ด้วยเชื้อ Proteus เป็นเวลา ๒ ชั่วโมงแล้ว จึงรักษาหนูแต่ละกลุ่มด้วยยาต้านจุลชีพเดี่ยวๆ ๖ ชนิด คือ Penicillin, ampicillin, carbenicillin, gentamicin, kanamycin, และ amikacinและแบบผสมกัน ๔ คู่ คือ Penicillin ผสมกับ gentamicin, หรือ kanamycin หรือ amikacin; Ampicillin ผสมกับ gentamicin, หรือ kanamycin หรือ amikacin และ Carbenicillin ผสมกับ gentamicin, หรือ kanamycin หรือ amikacin โดยหนูแต่ละกลุ่มจะได้รับการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพเพียง ๑ ชนิด หรือ ๑ คู่เท่านั้น โดยเลือกใช้ขนาดของยา (Dose) ที่ต่ำที่สุด ซึ่งเมื่อฉีดยาต้านจุลชีพเดี่ยวๆ แต่ละชนิดเข้าหนูที่เกิด infection กลุ่มหนึ่งแล้วจะทำให้หนูนั้นมีชีวิตเหลือรอดอยู่เพียง ๑๐-๒๐% ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้พบว่า Dose ของยาต้านจุลชีพแต่ละชนิดเป็นดังนี้: Penicillin G, ๒๐,๐๐๐ units/Kg; Ampicillin, ๓๐,๐๐๐ ug/Kg; Carbenicillin, ๑๕,๐๐๐ ug/Kg; Gentamicin, ๘๐๐ ug/Kg; Kanamycin, ๑,๖๐๐ ug/Kg; และ Amikacin, ๘๐๐ ug/Kg โดยการฉีดยาแต่ละชนิดเดี่ยวๆ เข้ากล้ามเนื้อของหนูในปริมาณ ๐.๕ มล. และสำหรับการใช้ยา ๒ ชนิดเพื่อรักษาหนูนั้นให้ฉีดยาทั้งสองพร้อมกันโดยฉีดเข้ากล้ามเนื้อขาหลังของหนู ข้างละชนิดๆ ละ ๐.๒๕ มล. และในการทดลองแต่ละครางได้ทำ

control เทียบไปด้วย โดยนำหนูกลุ่ม control จำนวน ๒๐ ตัวมาทำให้เกิด infection ด้วยเชื้อ Proteus เช่นเดียวกัน แล้วฉีด ๐.๕ มล. ของ ๐.๘๕% NaCl เข้ากล้ามเนื้อของหนูกลุ่มนั้นแทนการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพ แล้วสังเกตการมีชีวิตหรือการตายของหนูแต่ละกลุ่ม เป็นเวลา ๒ วัน และบันทึก Mortality rate หรือ Survival rate ที่เวลา ๖, ๑๒, ๒๔, ๓๖ และ ๔๘ ชั่วโมง ตามลำดับ

<u>การหาเชื้อจากช่องท้องและจากเลือดในหัวใจหนู</u> เพื่อเป็นการหาว่าการใช้ยาต้านจุลชีพ ๒ ชนิดร่วมกัน จะช่วยทำให้เชื้อถูกทำลายไปอย่างรวดเร็วจากบริเวณที่ฉีดเชื้อเข้าหนู (ช่องท้อง) และจากเลือดในหัวใจหนูหรือไม่ ให้ใช้หนูขาวที่มีอายุ ขนาด และน้ำหนักใกล้เคียงกันเช่นกันจำนวนประมาณ ๒๐๐ ตัว แบ่งออกเป็นกลุ่มๆ ละ ๑๒ ตัว ซึ่งหลังจากเวลา ๒ ชั่วโมงที่ฉีดเชื้อ Proteus เข้าช่องท้องหนูจำนวน ๑-๒ $\times$ 10^{7} เซลล์แล้ว หนูแต่ละกลุ่มจะได้รับการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพ๑ ชนิด หรือ ๒ ชนิด พร้อมกัน หรือไม่ได้รับการรักษา (โดยฉีด ๐.๘๕%) NaCl เป็น control) จากนั้นนำเอาหนูแต่ละกลุ่มออกมาครั้งละ ๓ ตัว ที่เวลา ๒, ๖, ๑๐ และ ๒๔ ชั่วโมง หลังจากให้การรักษาแล้ว ตามลำดับ นำหนูที่เลือกไว้ออกมาฆ่าโดยให้ดม Ether แล้วผ่าหนูเพื่อดูดเอาน้ำจากช่องท้องและเลือดจากหัวใจหนูออกมา นำมาทำการ culture หา Viable count โดยการทำ Serial dilution ก่อน แล้วจึง pour plate กับอาหาร Trypticase soy agar และนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารหลังจากเพาะเลี้ยงที่ ๓๗°ซ. เป็นเวลา ๒๔-๔๘ ชั่วโมง ให้ทำกับหนูทุกกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพเดียวๆ ๖ ชนิด แบบผสมกัน ๙ คู่ และกลุ่มที่ได้รับน้ำเกลือแทนยาต้านจุลชีพเพื่อเป็น control

<u>ผลการทดลอง</u>

การที่เลือกใช้เชื้อ <u>Proteus mirabilis</u> เพื่อศึกษาการเสริมฤทธิ์กันในสัตว์ทดลอง เนื่องจากเชื้อ Proteus species นี้ เป็น species ที่แยกได้บ่อยมากจากปัสสาวะของผู้ป่วยที่มารับการตรวจรักษาที่โรงพยาบาลนครเชียงใหม่นอกจากนี้จากการทดสอบความไวทางห้องปฏิบัติการโดยวิธี Single disk method[๗] พบว่าเชื้อนี้ไวต่อยาต้านจุลชีพ Penicillin และ Aminoglycosides ทุกตัวที่ศึกษาและจากการทดสอบการร่วมกันระหว่างยา ๒ พวกนี้ ต่อเชื้อ Proteus strain นี้ในห้องปฏิบัติการ (In vitro) พบว่าให้ผลเสริมฤทธิ์กันเห็นได้อย่างชัดเจน ฉะนั้นจึงได้เลือกเชื้อ strain นี้ เพื่อศึกษาการ

เสริมฤทธิ์กันของยาต้านจุลชีพ ๒ พวกในสัตว์ทดลอง (In vivo)ด้วย นอกจากนี้เชื้อนี้ยังเหมาะสมตรงที่ให้คุณสมบัติต่างๆ ทั้งทาง Physiological และ Biochemical properties ที่ค่อนข้าง typical ไม่เปลี่ยนแปลงคุณสมบัติ ยังคง stable อยู่ได้นาน โดยจะให้ผลลบต่อการทดสอบ Indol, lysine decarbeoxylase, แต่ให้ผลบวกต่อ urease, phenyl alanine deaminase และ citrate utilization เชื้อนี้สามารถเคลื่อนที่ได้ เพราะมี Perttrichous flagella และมีการเจริญแบบแผ่ (swarming) บนอาหาร Blood agar

สำหรับรูปที่ ๑ แสดง Percentage ของ Mortality rate ของหนูแต่ละกลุ่มที่ถูก challenge ด้วย P.mirabilis แล้ว ๒ ชั่วโมงและรักษาต่อมาด้วยยาต้านจุลชีพเดี่ยวๆ หรือ ๒ ชนิดร่วมกัน หรือไม่ได้รับการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพเลย โดยสังเกตการตายของหนูแต่ละกลุ่มที่เวลา ๔, ๘, ๑๒, ๒๔ และ ๔๘ ชั่วโมง หลังจากที่ได้ challenge ด้วยเชื้อแล้วตามลำดับ ซึ่งพบว่าถ้าใช้ยาต้านจุลชีพไม่ว่า Penicillin หรือ Aminoglycosides ให้ตามลำพังเดี่ยวๆ เพื่อรักษาหนูที่เกิด infection นั้น จะได้ Mortality rate ไม่แตกต่างกันมากนัก เช่น Mortality rate ของหนูที่รักษาด้วยยา penicillin, ampicillin, carbenicillin, gentamicin kanamycin, amikacin หรือน้ำเกลือ จะเป็น ๙๓, ๘๖, ๘๐, ๗๕, ๘๐, ๗๓ หรือ ๑๐๐% ตามลำดับ ทั้งนี้เพราะได้เลือกใช้ dose ยาแต่ละชนิดที่เป็นขนาดต่ำที่สุด ซึ่งเมื่อฉีดเข้าหนูแล้ว จะรักษาหนูให้มีชีวิตเหลือรอดอยู่เพียง ๑๐-๒๐% เท่านั้น แต่ในทางตรงกันข้ามพบว่า หนูทั้งหมดที่ได้รับการรักษาด้วยยา carbenicillin + kanamycin หรือ carbenicillin + amikacin จะมีชีวิตรอดหมดทุกตัว (๑๐๐%) และถ้าใช้ยา ampicillin + kanamycin หรือ ampicillin + amikacin จะรักษาหนูให้มีชีวิตรอดอยู่ถึง ๙๐% ในขณะที่ยา ampicillin + gentamicin จะทำให้หนูมีชีวิตรอดอยู่ถึง ๖๐% เท่านั้น นอกจากนี้พบว่า ถ้ารักษาหนูด้วย penicillin + gentamicin, penicillin + kanamycin หรือ carbenicillin + gentamicin จะทำให้หนูครึ่งหนึ่งยังคงมีชีวิตเหลือรอดอยู่ (๕๐%) ส่วนการใช้ยา penicillin + amikacin จะเสริมฤทธิ์กันน้อยมาก จึงรักษาหนูให้มีชีวิตเหลือรอดอยู่เพียง ๔๐% เท่านั้น ซึ่งทั้งหมดนี้ต้องใช้เวลาสังเกตถึง ๒ วัน หลังจากที่ฉีดเชื้อและให้การรักษาด้วยยาต้านจุลชีพแล้ว

การชะจัดเชื้อจากช่องท้องและจากเลือดในหัวใจหนู. ผลจากการทำ Viable count เพื่อหาจำนวนของเชื้อ P.mirabilis จากน้ำช่องท้องหนู (Peritoneal fluid) และจากเลือด

ในหัวใจหนู (Aorta blood) ที่เวลาต่างๆ กัน หลังจากให้การรักษาด้วยยาต้านจุลชีพ ๑ ชนิด, หรือ ๒ ชนิดร่วมกัน หรือไม่ได้รับการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพเลย (ให้น้ำเกลือแทน) ได้แสดงไว้ในรูปที่๒ และ ๓ ตามลำดับ ซึ่งพบว่าจำนวนของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำช่องท้องหนูจากกลุ่มต่างๆ เช่น กลุ่ม control กลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยยา ๑ ชนิด, หรือกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยยำ ๒ ชนิด ระหว่าง penicillin + gentamicin, penicillin + kanamycin, penicillin + amikacin, carbenicillin + gentamicin และ ampicillin + gentamicin จะพบเชื้ออยู่ในช่วง $๑๐^{๗}$ ถึง มากกว่า $๑๐^{๙}$ เซลล์/มล. หลังจากที่ฉีดเชื้อเข้าไปแล้ว ๑๘-๒๔ ชม. ในทางตรงกันข้ามหนูกลุ่มที่รักษาด้วยยา carbenicillin + kanamycin, carbenicillin + amikacin, ampicillin + kanamycin หรือ ampicillin + amikacin จะพบเชื้อในช่องท้องน้อยกว่า $๑๐^{๗}$ เซลล์/มล. หลังจากที่ challenge ด้วยเชื้อไปแล้ว ๑๘ ชม. และจำนวนจะค่อยๆ ลดลงตามลำดับจากเวลา ๒๔ ชม. โดยเฉพาะกับการรักษาด้วยยา carbenicillin + kanamycin หรือ carbenicillin + amikacinซึ่งจะตรวจพบเชื้อแบคทีเรียในช่องท้องหนูเพียง $๑๐^{๒}$ เซลล์/มล. เท่านั้น

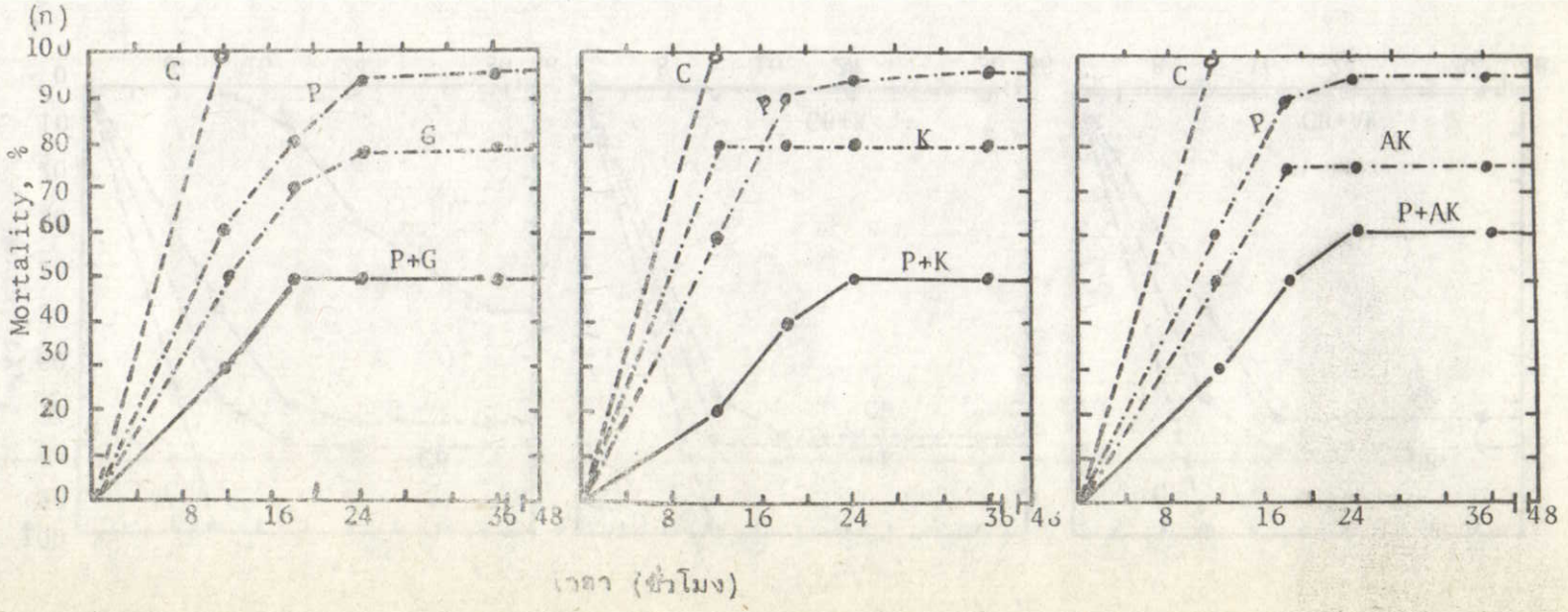
สำหรับรูปที่ ๓ แสดงจำนวนของเชื้อ P. mirabilis ที่แยกได้จากเลือดในหัวใจหนูจากกลุ่มต่างๆ หลังจากที่ได้ challenge ด้วยเชื้อไปแล้ว ๒ ชั่วโมง และเก็บคราวเดียวกันกับการเก็บน้ำจากช่องท้องหนู หลังจากให้การรักษาด้วยยาต้านจุลชีพแบบต่างๆ ซึ่งพบว่าจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากเลือดในหัวใจหนูจากกลุ่มต่างๆ คือ กลุ่ม control กลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพเดี่ยวๆ ทั้ง ๖ ชนิด หรือกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยยา ๒ ชนิดร่วมกัน ระหว่าง penicillin + gentamycin, penicillin + kanamycin, penicillin + amikacin, carbenicillin + gentamicin หรือ ampicillin + gentamicinจะพบจำนวนเชื้ออยู่ในช่วง ๑×๑๐^{๓} - ๕×๑๐^{๕} เซลล์/มล. หลังจากที่ได้ challenge ด้วยเชื้อไปแล้ว ๑๘ ชม. ในทางตรงกันข้ามหนูกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยยา carbenicillin + kanamycin, carbenicillin + amikacin, ampicillin + kanamycin หรือ ampicillin + amikacin จะพบเชื้อในเลือดจากหัวใจหนูลดน้อยลงมาก หรือ พบน้อยกว่า ๕×๑๐^{๒} เซลล์/มล. หลังจากที่ได้ challenge ด้วยเชื้อไปแล้ว ๑๘ ชั่วโมง.

รูปที่ ๑. แสดง Mortality rate ของหนูที่ถูกทำให้ติดเชื้อ Proteus mirabilis และรักษาต่อมาด้วยยาต้านจุลชีพ ๑ ชนิด,หรือ ๒ ชนิดผสมกัน หรือไม่ได้รักษา (ใช้น้ำเกลือเป็น Control)

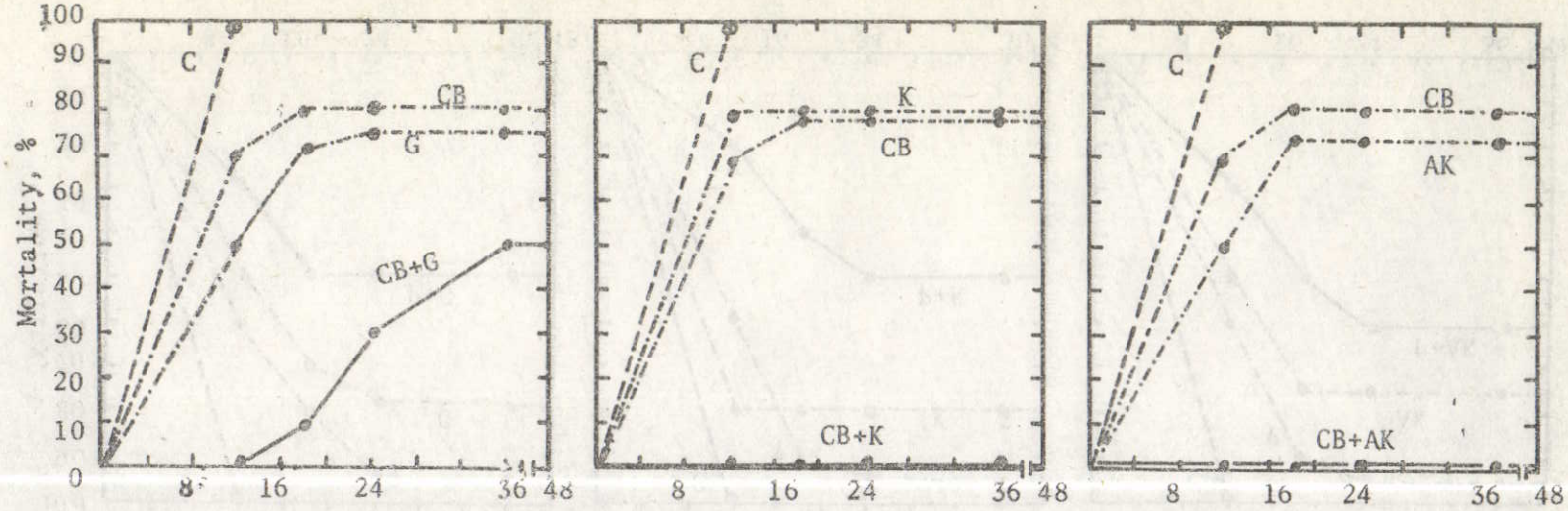
(ก) Mortality rate ของหนูที่รักษาด้วยยาต้านจุลชีพแบบเดี่ยวๆ : Penicillin (P), gentamicin (G), kanamycin (K), และ amikacin (AK); และแบบผสมกัน : P+G, P+K,และ P+AK และ Control (C)

(ข) Mortality rate ของหนูที่รักษาด้วยยาต้านจุลชีพแบบเดี่ยวๆ : Carbenicillin (CB), gentamicin (G), kanamycin (K), และ amikacin (AK);และแบบผสมกัน : CB+G, CB+K, และCB+AK, และ Control

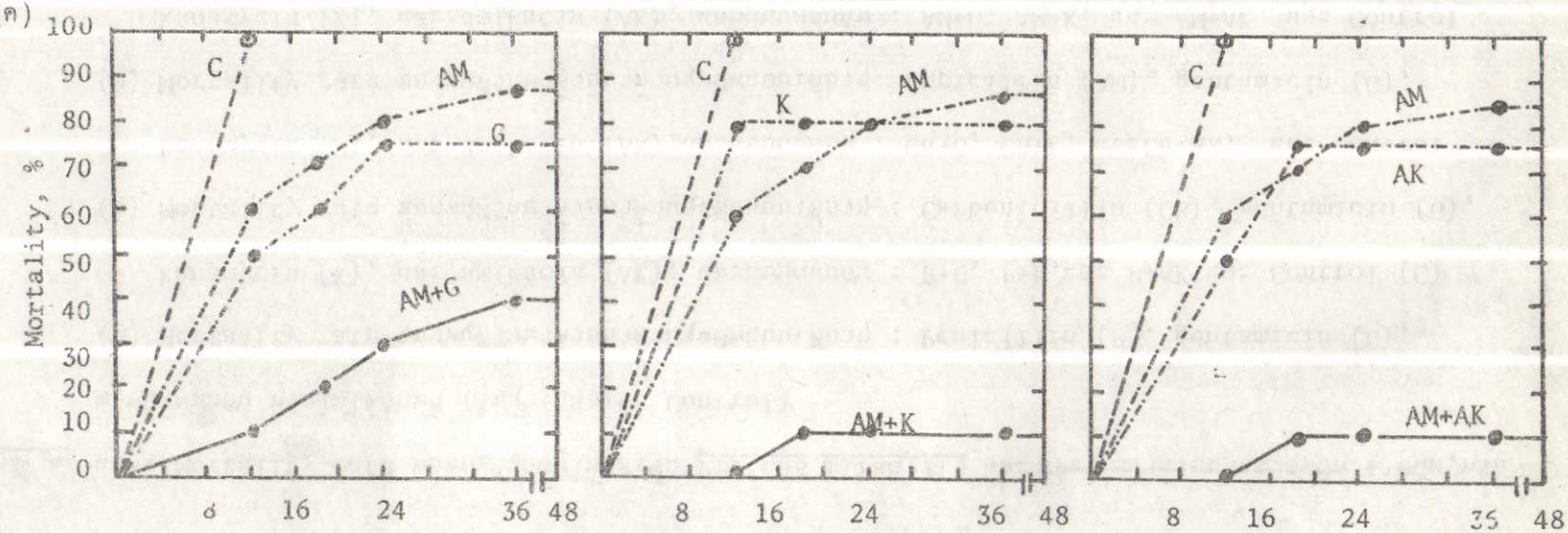
(ค) Mortality rate ของหนูที่รักษาด้วยยาต้านจุลชีพแบบเดี่ยวๆ: Ampicillin (AM), gentamicin (G), kanamycin (K), และ amikacin (AK); และแบบผสมกัน : AM+G, AM+K, และ AM+AK, และ Control



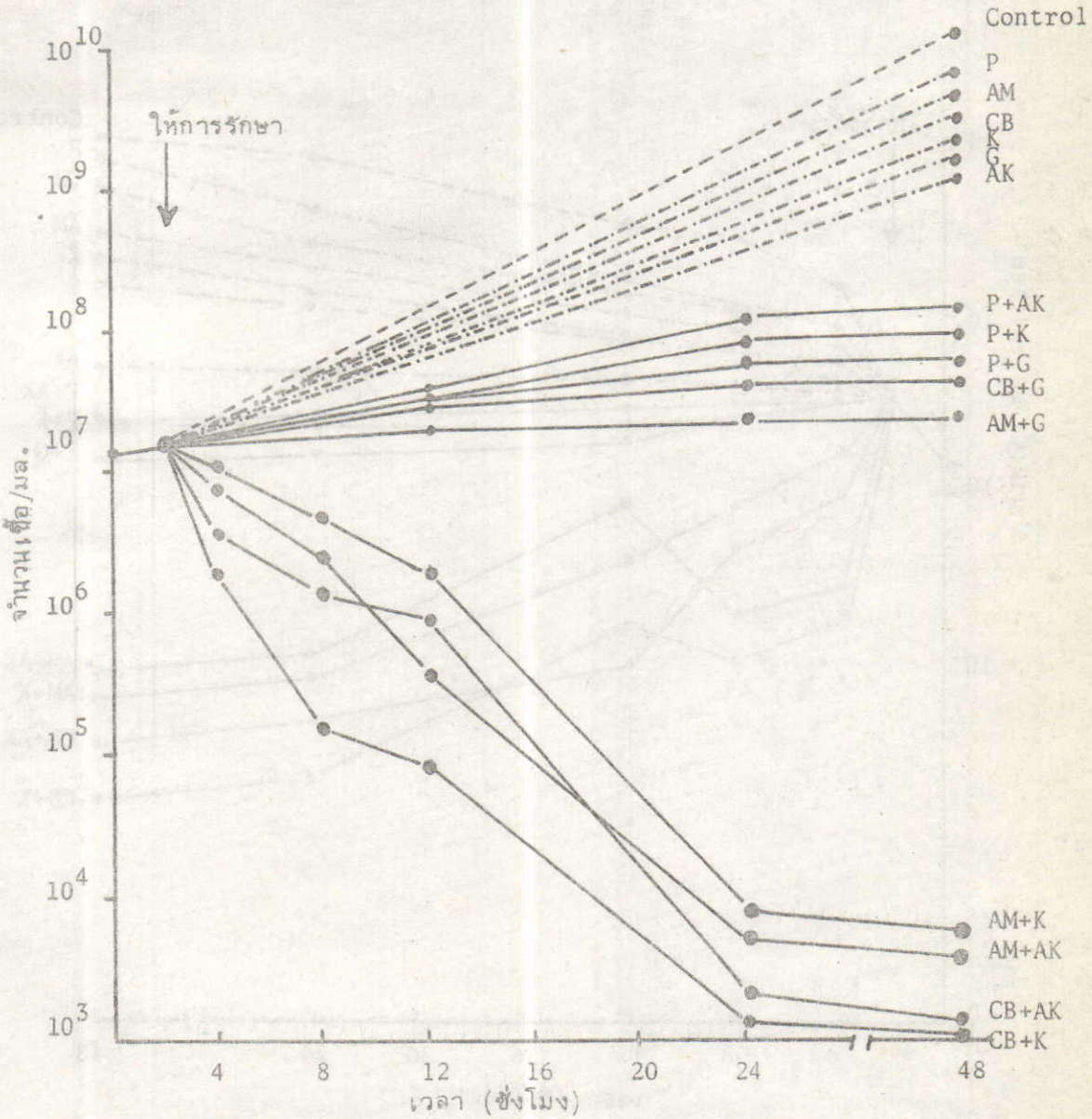
(ข)


Mortality, %
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
C
CB
G
CB+G
K
CB+K
AK
CB+AK
8
16
24
36
48

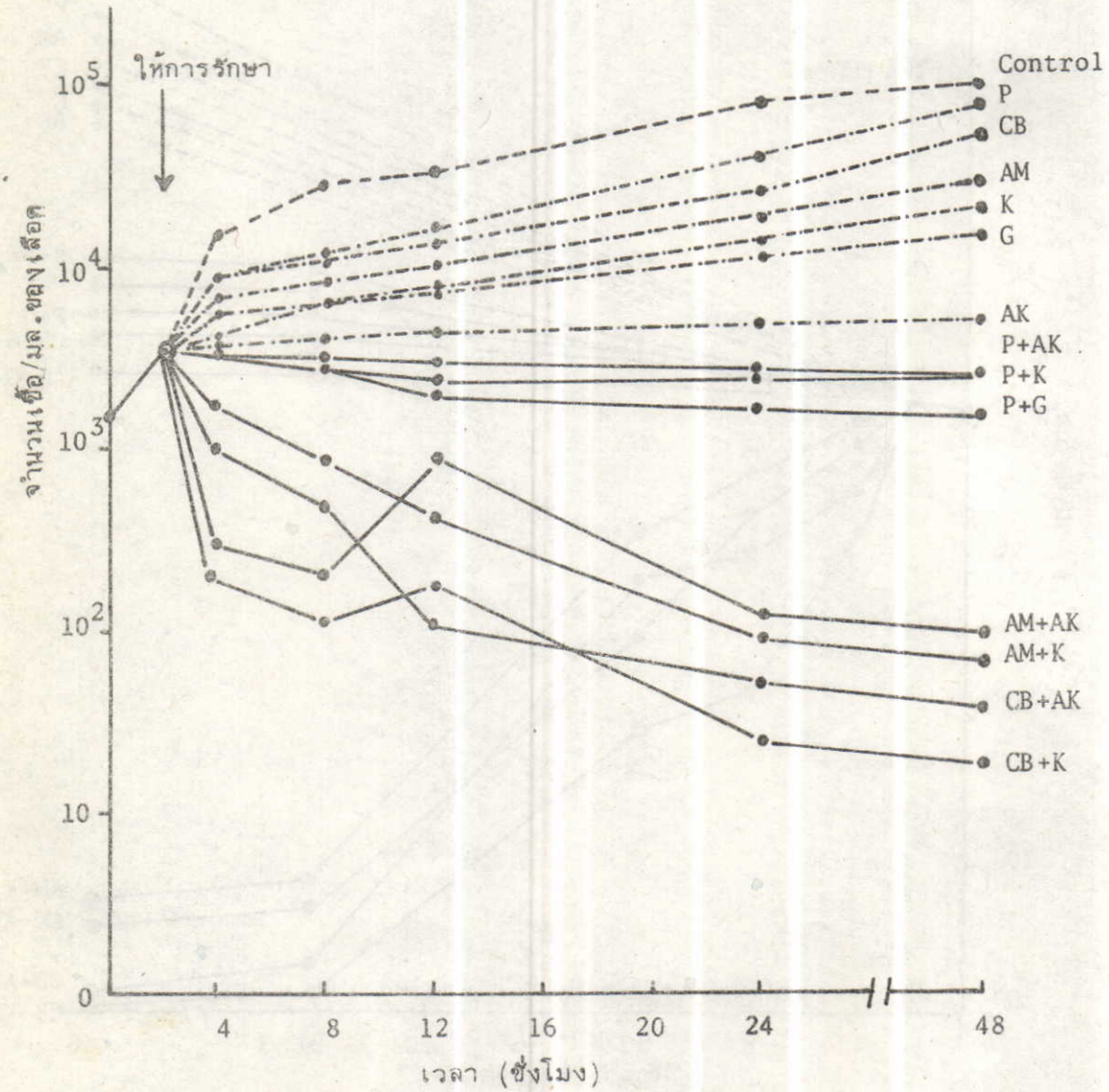
(ค)


Mortality, %
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
C
AM
G
AM+G
K
AM+K
AK
AM+AK
8
16
24
36
48
เวลา (ชั่วโมง)

รูปที่ ๒. แสดงจำนวนของเชื้อ Proteus mirabilis ที่แยกได้จากน้ำในช่องท้องหนู ที่เวลาต่างๆ กัน หลังจากที่ได้ฉีดเชื้อเข้าช่องท้องหนู และอีก ๒ ชั่วโมงต่อมา จึงรักษาหนูด้วยยาต้านจุลชีพทั้งแบบเดี่ยวๆ หรือผสมกัน และหนูกลุ่ม Control ได้รับน้ำเกลือแทน



รูปที่ ๓. แสดงจำนวนของเชื้อ Proteus mirabilis ที่แยกได้จากเลือดในหัวใจหนู ที่เวลาต่างๆ กัน หลังจากที่ได้ฉีดเชื้อเข้าช่องท้องหนู และอีก ๒ ชั่วโมงต่อมา จึงรักษาหนูด้วยยาต้านจุลชีพทั้งแบบเดี่ยวๆ, หรือผสมกัน ส่วนหนูกลุ่ม Control ได้รับน้ำเกลือแทน

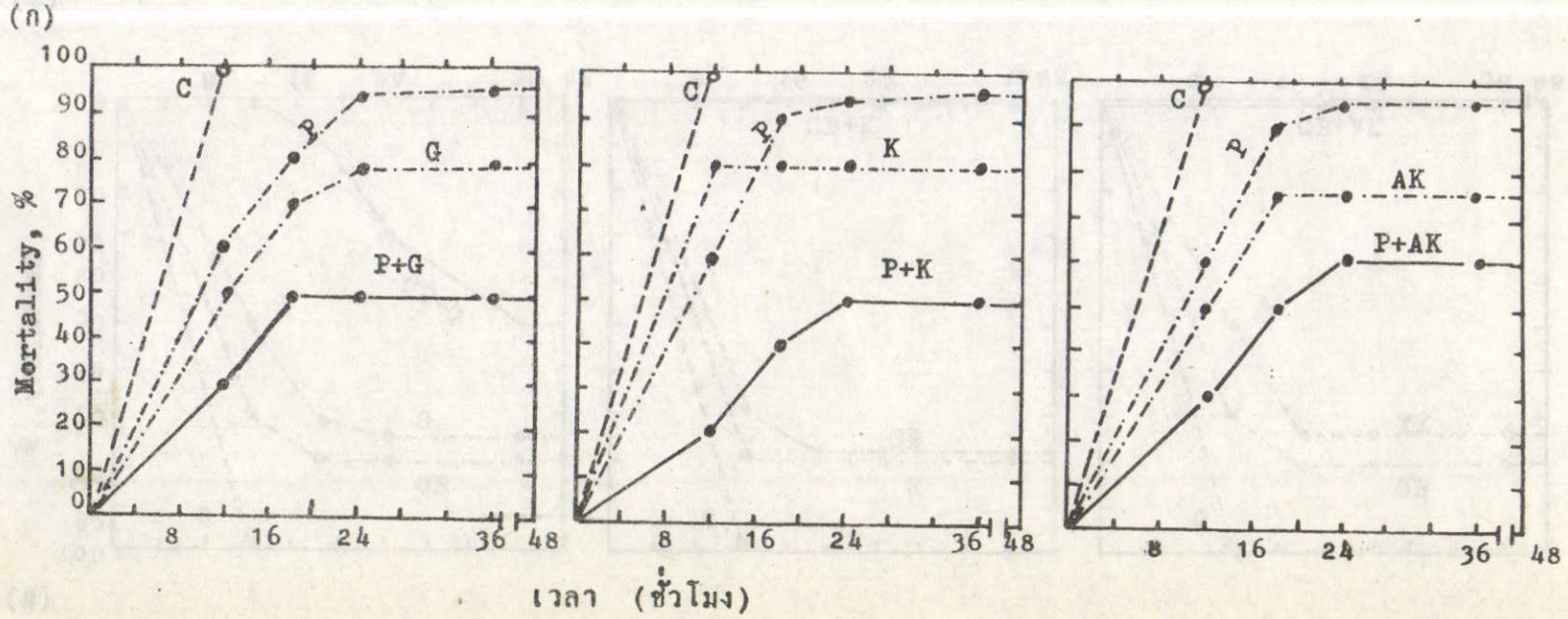


รูปที่ 1. แสดง Mortality rate ของหนูที่ถูกทำให้ติดเชื้อ Proteus mirabilis และรักษาต่อมาด้วยยาต้านจุลชีพ 1 ชนิด, หรือ 2 ชนิดผสมกัน หรือไม่ได้รักษา (ใช้น้ำเกลือเป็น Control)

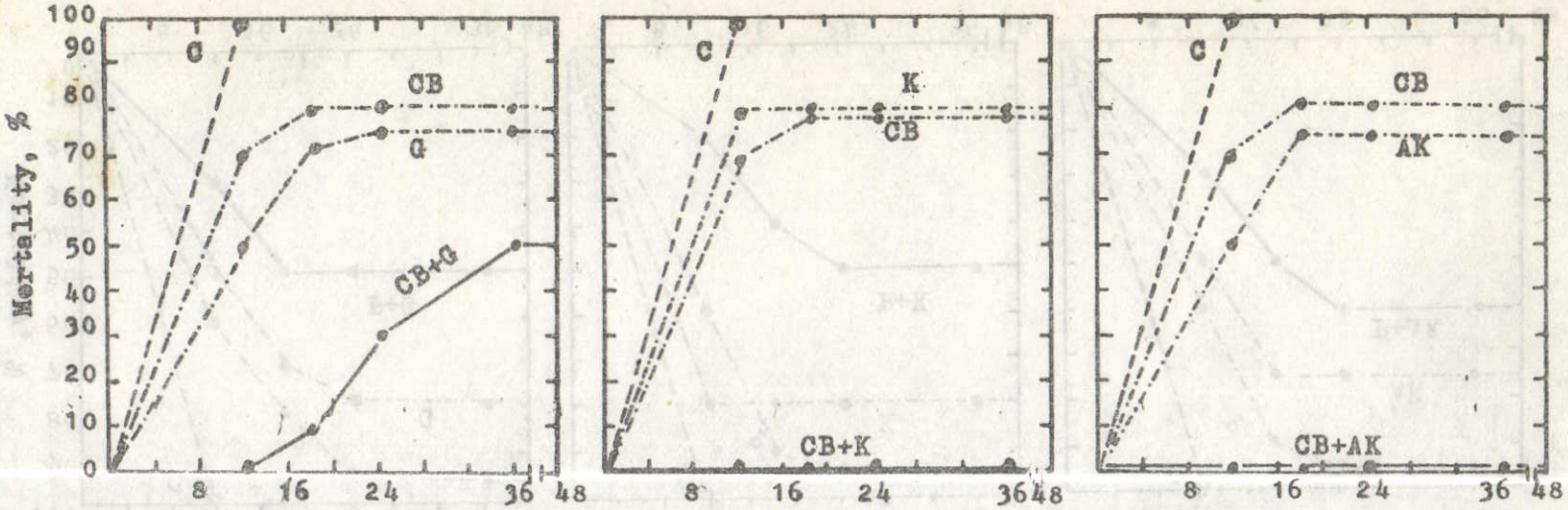
(ก) Mortality rate ของหนูที่รักษาด้วยยาต้านจุลชีพแบบเดี่ยว ๆ : Penicillin (P), gentamicin (G), kanamycin (K), และ amikacin (AK); และแบบผสมกัน : P+G, P+K, และ P+AK และ Control (C)

(ข) Mortality rate ของหนูที่รักษาด้วยยาต้านจุลชีพแบบเดี่ยว ๆ : Carbenicillin (CB), gentamicin (G), kanamycin (K), และ amikacin (AK); และแบบผสมกัน : CB+G, CB+K, และ CB+AK, และ Control

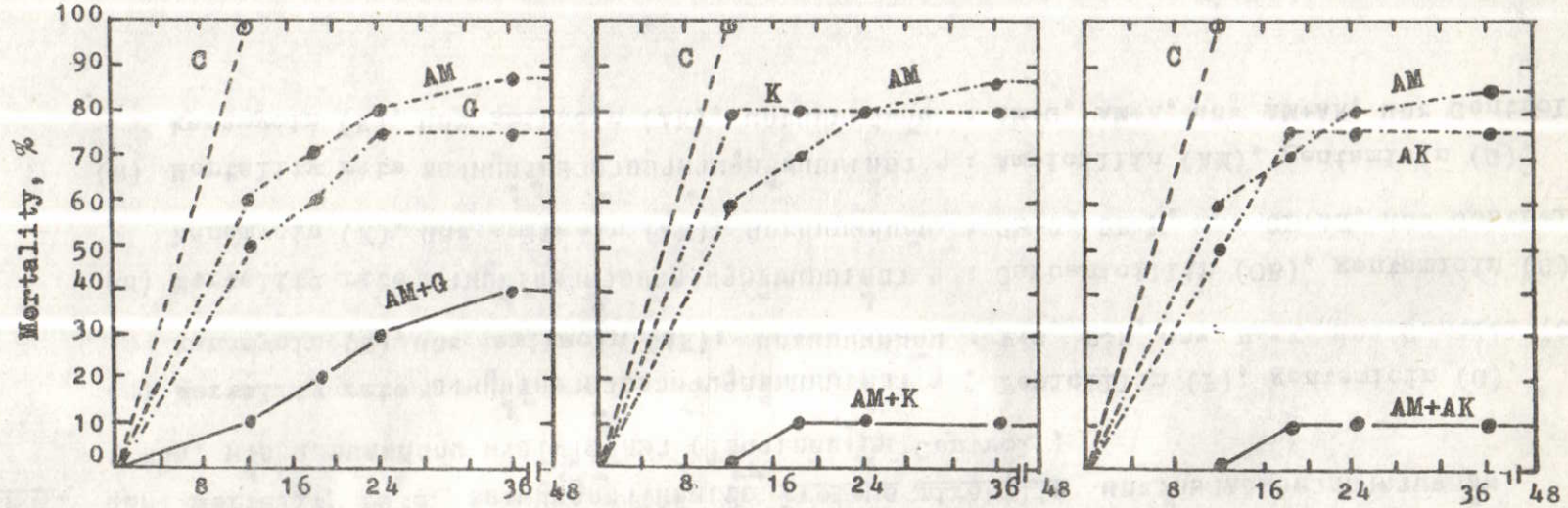
(ค) Mortality rate ของหนูที่รักษาด้วยยาต้านจุลชีพแบบเดี่ยว ๆ : Ampicillin (AM), gentamicin (G), kanamycin (K), และ amikacin (AK); และแบบผสมกัน : AM+G, AM+K, และ AM+AK, และ Control



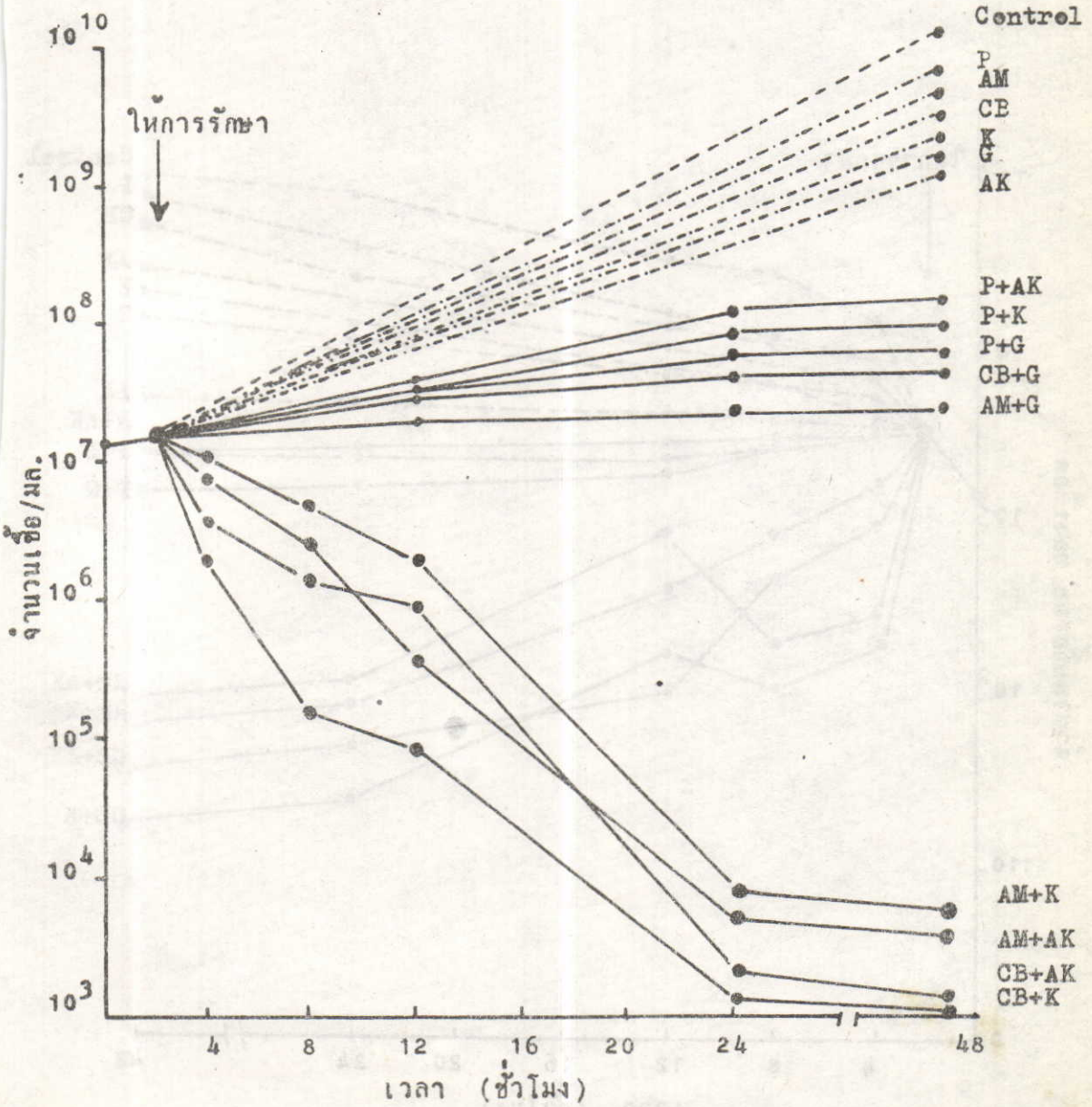
(ง)


Mortality, %
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
C
CB
G
CB+G
K
CB+K
AK
CB+AK
8
16
24
36
48

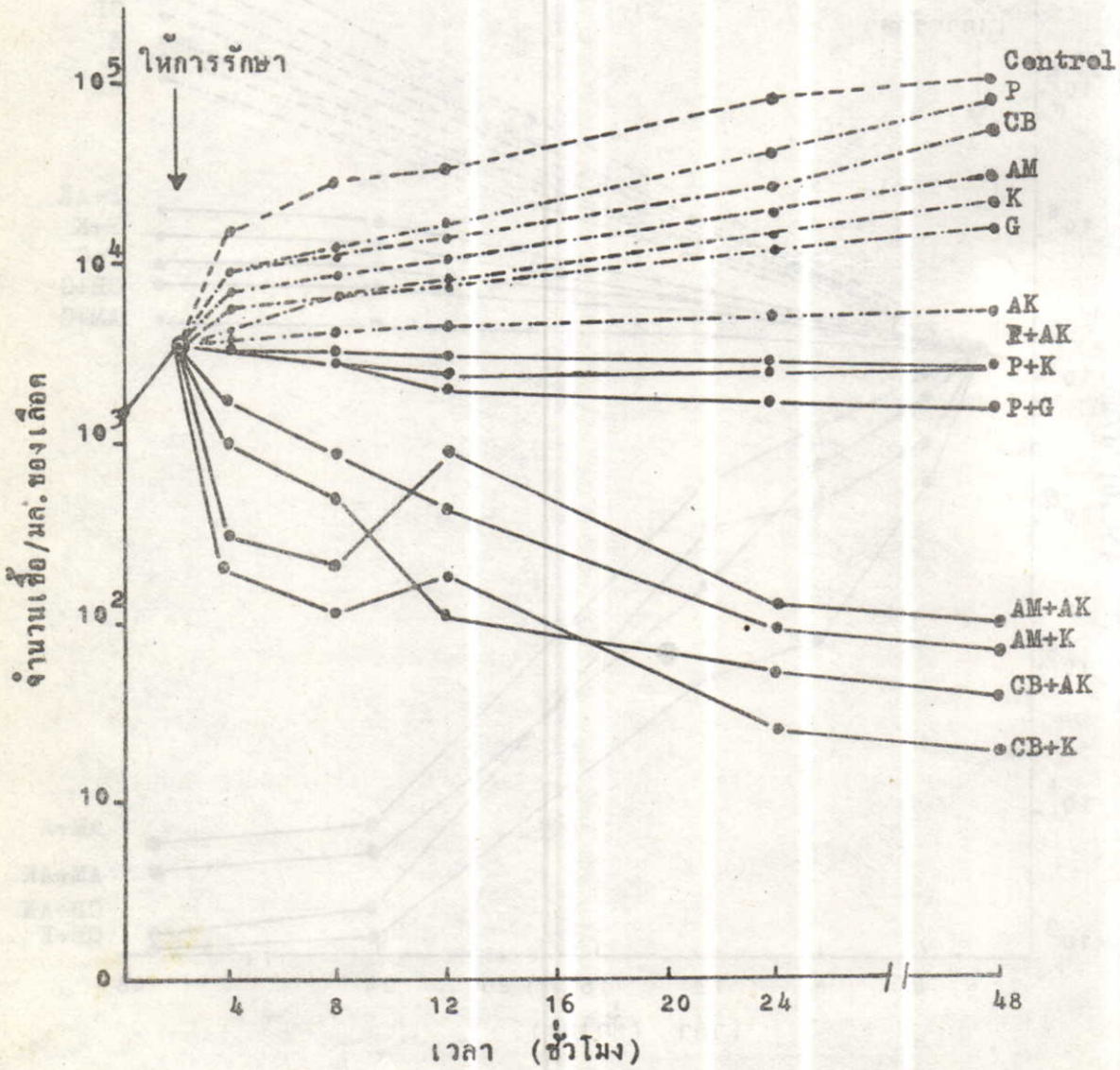
(จ)


Mortality, %
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
C
AM
G
AM+G
K
AM+K
AK
AM+AK
8
16
24
36
48
เวลา (ชั่วโมง)

รูปที่ 2 . แสดงจำนวนของเชื้อ Proteus mirabilis ที่แยกได้จากน้ำในช่องท้องหนู ที่เวลาต่าง ๆ กัน หลังจากที่ได้ฉีดเชื้อเข้าช่องท้องหนู และอีก 2 ชั่วโมงต่อมา จึงรักษาหนูด้วยยาต้านจุลชีพทั้งแบบเดี่ยว ๆ หรือผสมกัน และหนูกลุ่ม Control ได้รับน้ำเกลือแทน



รูปที่ 3. แสดงจำนวนของเชื้อ Proteus mirabilis ที่แยกได้จากเลือดในหัวใจหนู ที่เวลาต่าง ๆ กัน หลังจากที่ได้ฉีดเชื้อเข้าช่องท้องหนู และอีก 2 ชั่วโมงต่อมา จึงรักษาหนูด้วยยาต้านจุลชีพทั้งแบบเดี่ยว ๆ , หรือผสมกัน ส่วนหนูกลุ่ม Control ได้รับน้ำเกลือแทน



บทวิจารณ์

การพิสูจน์ถึงประสิทธิภาพของยาต้านจุลชีพโดยเฉพาะเพื่อหาการเสริมฤทธิ์กันของยาต้านจุลชีพ ๒ ชนิดในสิ่งมีชีวิต เช่น คนเรา เพื่อใช้รักษาโรคติดเชื้อในปัจจุบันค่อนข้างเป็นไปได้ยาก เนื่องจากขาดบุคคลที่จะมาเป็นอาสาสมัครเพื่อการศึกษาทดลองต่างๆ เช่นการทำให้เกิด infectionด้วยเชื้อที่ศึกษาในคนและการรักษาต่อมาด้วยยาต้านจุลชีพเดี่ยวๆ หรือยาต้านจุลชีพ ๒ ชนิดผสมกัน เพื่อดูการเสริมฤทธิ์กัน หรือ อาจมีฤทธิ์อื่น ๆ ที่ เกิดขึ้นได้ เช่น การต้านฤทธิ์กัน (Antagonism) ซึ่งเป็นการเสี่ยงมาก ฉนั้นวิธีการศึกษาในสิ่งมีชีวิตที่ง่ายที่สุด คือ ศึกษาในสัตว์ทดลอง เช่น ใช้หนูขาว เป็นต้น

ในการศึกษาครั้งนี้ ได้อธิบายถึงวิธีการทดลอง เพื่อทำให้เกิดการติดเชื้อ Proteus ขึ้นในหนูขาวก่อน แล้วจึงหาคุณค่าในการรักษาต่อมาด้วยยาต้านจุลชีพพวก Penicillins และ Aminoglycosides ทั้งแบบเดี่ยวๆ และแบบที่นำมาผสมกัน โดยการหา Mortalaity rate หรือ Survival rat ของหนูที่รักษาด้วยยาต้านจุลชีพ ที่เวลาต่างๆ กัน หลังจากที่ challenge ด้วยเชื้อ Proteus แล้ว จากผลการศึกษานี้พบว่าการใช้ยาต้านจุลชีพ ๒ ชนิดผสมกันระหว่าง Penicillin และ Aminoglycoside เพื่อรักษา infection ด้วย Proteus ที่ทำให้เกิดในสัตว์ทดลองนั้น จะให้ผลได้ดีกว่าการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงอย่างเดียว โดยทำให้ Survival rate ของหนูที่รักษาด้วยยาต้านจุลชีพ ๒ ชนิดร่วมกันนั้นสูงมากกว่าที่จะใช้ยาต้านจุลชีพเดี่ยว ๆ เพื่อรักษาตามลำพัง เพราะในขณะที่ยาต้านจุลชีพเดี่ยวๆ แต่ละชนิดใน dose ต่ำสุดที่ เลือกใช้รักษานั้น มีหนูเพียง ๑๐-๒๐% เท่านั้น ที่มีชีวิตรอด แต่ถ้าใช้ยาต้านจุลชีพ ๒ ชนิด ร่วมกันโดยใช้ dose ของยาแต่ละชนิดลดลงไปครึ่งหนึ่ง พบว่า Survival rate เพิ่มสูงขึ้น อย่างน้อยที่สุดก็มีหนูถึง ๔๐% เหลือรอด และพบ Survival rate ได้สูงมากที่สุดถึง ๙๐-๑๐๐%โดยเฉพาะเมื่อใช้ยา Carbenicillin ร่วมกับ Kanamycin หรือ Amikacin ซึ่งจะเกิดการเสริมฤทธิ์กันอย่างเห็นได้ชัดในสิ่งมีชีวิตที่เกิดการติดเชื้อ Proteus อย่างรุนแรง โดยทำให้หนูมีชีวิตรอดหมดทุกตัว (๑๐๐%) หรือมีชีวิตรอดถึง ๙๐% เมื่อใช้ยา Ampicillin ร่วมกับ Kanamycin หรือ Amikacin จากการร่วมกันระหว่างยาต้านจุลชีพทั้ง ๔ คู่ ดังกล่าว คือ carbenicillin

+ Kannamycin, Carbenicillin + Amikacin, Ampicillin + Kanamycin, หรือ Ampicillin + Amikacin นี้เอง ยังช่วยขจัดเอาเชื้อ Proteus ออกไปจากบริเวณช่องท้องของหนูซึ่งเป็นบริเวณที่ infect เชื้อเข้าไป ภายในเวลา ๒๔-๔๘ ชั่วโมงได้ ทำให้หนูมี Survial rate ได้สูงมากที่สุด (๔๐-๑๐๐%) แม้จะ infect ด้วย Proteus จำนวนมากถึง ๗ เท่าของ LD50 ของ strain นี้ก็ตาม แต่ในทางตรงกันข้ามหนูที่รักษาด้วยยาต้านจุลชีพเดี่ยวๆ กลับพบจำนวนเชื้อ Proteus แบ่งตัวเพิ่มขึ้นมากมายตรงบริเวณที่ infect ด้วยเชื้อ และพบหนูตายหลังจาก ๔๘ ชั่วโมง

สำหรับยาต้านจุลชีพคู่อื่นอีก ๔ คู่ที่ศึกษา ให้ผลการเสริมฤทธิ์กันน้อยมาก มีหนูเพียง ๔๐-๖๐% ที่ยังคงมีชีวิตรอยอยู่เท่านั้น และไม่สามารถขจัดเชื้อออกจากบริเวณช่องท้องที่infectเชื้อเข้าในหนูได้ จำนวนเชื้อที่พบที่นี่จึงใกล้เคียงกับจำนวนเชื้อที่รักษาด้วยยาต้านจุลชีพเดี่ยวๆ นอกจากนี้ยังพบเชื้อ Proteus ได้จำนวนมากจากเลือดในหัวใจหนูหลังจากที่ infect ด้วยเชื้อแล้ว แสดงว่าเชื้อนี้ทำให้เกิด Bacteremia ซึ่งจากการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพเดี่ยวๆ ที่ใช้ Dose ขนาดต่ำสุดที่ไม่พอเพียงแก่การรักษาแล้ว จึงพบเชื้อได้จากเลือดในหัวใจหนู แต่จำนวนเชื้อที่พบน้อยกว่าจำนวนเชื้อที่พบน้อยกว่าจำนวนเชื้อจากบริเวณช่องท้องหนู และจากการใช้ยาต้านจุลชีพ ๒ ชนิด เพื่อรักษาหนูพร้อมๆ กันโดยเฉพาะกับยาต้านจุลชีพ ๔ คู่ดังกล่าวที่ให้ผลเสริมฤทธิ์กันโดยทำให้ Survial rate เพิ่มสูงมากนั้น นอกจากจะทำให้เชื้อที่ตรวจจากบริเวณช่องท้องหนูลดจำนวนลงอย่างมากแล้ว ยังตรวจพบเชื้อจากหัวใจหนูลดน้อยลงไปด้วย มีจำนวนเชื้อไม่เกิน ๑๐๐ เซลล์/มล. เท่านั้นที่ตรวจพบได้

นอกจากได้ศึกษาในสัตว์ทดลองแล้ว ยังได้นำ Proteus strain นี้มาศึกษาโดยวิธีการในห้องปฏิบัติการด้วย และพบการเสริมฤทธิ์กันระหว่างยา Penicillin และ Aminoglycosides เช่นกัน โดยเฉพาะกับ ๔ คู่ดังกล่าว สำหรับวิธีการทดสอบการเสริมฤทธิ์กันระหว่างยาต้านจุลชีพ ๒ ชนิดในสัตว์ทดลองนี้ค่อนข้างยุ่งยาก ไม่สามารถทดสอบกับ Proteus ได้หลาย strains เพราะมีขีดจำกัดหลายประการ เช่น ต้องใช้หนูทดลองจำนวนมากมาย เพื่อศึกษากับยาต้านจุลชีพทั้งแบบเดี่ยวๆ ๖ชนิด และแบบผสมกันถึง ๔ คู่ หรืออย่างน้อยต้องศึกษากับยาต้านจุลชีพถึง ๑๔ การทดลอง และยังต้องทำ control โดยใช้น้ำเกลือแทนการใช้ยาต้านจุลชีพด้วย ซึ่งแต่ละการทดลองต้องใช้หนูขาวอย่างน้อย ๒๐ ตัว และเพื่อศึกษาหาจำนวนเชื้อจากบริเวณที่

infect ด้วยเชื้อ หรือเพื่อศึกษาหาจำนวนเชื้อที่ทำให้เกิด Bacteremia หลังจากให้การรักษาด้วยยาต้านจุลชีพ ๑ ชนิด, หรือ ๒ ชนิด, หรือไม่ให้การรักษาก็ตาม จะต้องทำการทดลอง โดยการใช้หนูขาวจำนวนมากเช่นเดียวกัน ฉะนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงใช้หนูจำนวนมาก อย่างน้อยถึง๖๐๐ ตัว

ฉะนั้นในการศึกษาการใช้ยาร่วมกันระหว่าง Penicillin กับ Aminoglycosides เพื่อดูการเสริมฤทธิ์กัน หรือดู effects อื่นๆ นั้น จึงควรศึกษาโดยวิธีในห้องปฏิบัติการด้วย เพื่อเทียบผลการทดลองกับเชื้อ Proteus หลายๆ strainsเพราะ effects ที่เกิดขึ้นเมื่อใช้ยาต้านจุลชีพ ๒ ชนิดร่วมกันนั้นอาจเปลี่ยนแปลงเป็นแบบใดก็ได้ ซึ่งนอกจากจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของยาต้านจุลชีพแต่ละชนิดที่นำมาใช้ร่วมกันแล้ว ยังขึ้นกับ species หรือ strains ของเชื้อที่นำมาทดสอบหรือขึ้นกับจำนวนเชื้อและสภาพแวดล้อมเพื่อทำให้เชื้อเจริญเติบโต และขึ้นกับDegree ของการไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพแต่ละชนิดที่ศึกษาด้วย[๕] ฉะนั้นจึงยากแก่การทำนายโดยอาศัยหลักทฤษฎีได้ว่าเมื่อใช้ยาร่วมกัน ๒ ชนิด effect ที่เกิดขึ้นควรเป็นอย่างไร และเพื่อหลีกเลี่ยงการต้านฤทธิ์กัน จึงต้องทำการทดสอบการร่วมกันของยาต้านจุลชีพก่อนที่จะให้การรักษาแก่ผู้ป่วย โดยการหาวิธีการทดสอบที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งง่าย สดวก รวดเร็ว ประหยัดค่าใช้จ่าย และให้ผลสัมพันธ์กับผลทางการรักษาอย่างแท้จริง ซึ่งควรศึกษาในผู้ป่วยที่เกิด infection ด้วยเชื้อ Proteus ด้วยเชื้อ Proteus ด้วย โดยประสิทธิภาพของการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพแบบเดี่ยวๆ หรือแบบผสมกันนั้น หาได้จากการ Assay หา serum level ในผู้ป่วยหลังจากให้การรักษาด้วยยาต้านจุลชีพแล้ว

สำหรับกลไกการเสริมฤทธิ์กันระหว่างยาพวก Penicillin และ Aminoglycoside ต่อเชื้อ Proteus species หรือเชื้อ Gram-negative enteric bacilli อื่นๆ ในสัตว์ทดลองหรือในห้องปฏิบัติการนั้น ยังไม่มีผู้ใดอธิบายได้อย่างชัดเจนนัก - จากการทดลองนี้บอกได้ว่ามีการเสริมฤทธิ์กันระหว่างยาต้านจุลชีพทั้ง ๒ พวกขึ้น โดยเฉพาะพวก B-lactam antibiotics เช่น Ampicillin หรือ Carbenicillin กับพวก Aminoglycosides เช่น Kanamycin หรือ Amikacin ซึ่งเสริมฤทธิ์กันอย่างเห็นได้ชัดมากต่อเชื้อ Proteus mirabilis ที่ทำให้เกิด infection ในสัตว์ทดลอง โดยยาพวก B-lactam antibiotics สามารถระงับการสร้าง cell wall ของเชื้อแบคทีเรียได้ เพราะยาต้านจุล-

จุลชีพเหล่านี้ไม่มีผลขัดขวางต่อฤทธิ์ยาของ transpeptidase enzyme จึงทำให้การ Cross linkage ของ Mucopeptide chains เกิดขึ้นไม่ได้ เชื้อจึงไม่สามารถสร้าง cell wall ได้ เมื่อเชื้อขาด cell wall จึงทำให้การผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์ของยา Aminoglycoside เป็นไปได้ง่ายยิ่งขึ้น โดยเฉพาะเชื้อที่ไวต่อยา Aminoglycosides จะถูกระงับการสร้างโปรตีนอันเป็นส่วนประกอบสำคัญภายในโปรโตปลาสซึมของเชื้อได้ เช่น Amikacinซึ่งมีกลไกออกฤทธิ์เช่นเดียวกับ Kanamycin โดยไปจับกับ 30 S Subunit ของ Ribosome ของเชื้อ เกิด Misreading ของ mRNA ทำให้ Code ในการสร้างโปรตีนของเชื้อเปลี่ยนไปจากเดิม จึงมีผลทำให้ได้ Nonfunctional protein ซึ่งเมื่อเชื้อขาดโปรตีนที่สำคัญ จะทำให้เชื้อตายได้ ฉะนั้นยาทั้ง ๒ พวกจึงออกฤทธิ์เสริมกันเพื่อช่วยทำลายเชื้อให้ตายง่ายยิ่งขึ้น

คำขอบคุณ

สำหรับการศึกษาครั้งนี้ ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก China Medical Board, U.S.A. (CMB Grant No. 73-315) ซึ่งทำให้การศึกษานี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี.

เอกสารอ้างอิง

1. Kongfoo, U. A three-year study of susceptibilities of urinary pathogens to various antimicrobial drugs, Chiang Mai Med, Bull 18:75-84, 1979.
2. Snelling, C.F.T., Ronald, A.A., Cates, C.Y., and Forsyth, W.C., Resistance of gram-negative bacilli to gentamicin. J. Infect. Dis 124 (Supple.) : S264-S270, 1971.
3. Price, K.E., DeFuria, M.D., and Pursiano, T.A. Amikacin, an aminoglycoside with marked activity against antibiotic resistant clinical isolates. J. Infect. Dis. 134 (Suppl.): S249-S261, 1976.
4. Andriole, V.T. Antibiotic synergy in experimental in fection with Pseudomonas, J. Infect, Dis 129:124-133, 1974.

5. Bulger, R.J., and Kirby, W.M.M. Gentamicin and ampicillin: Synergism with other antibiotics, Amer. J. Med. Sci. 246:717-726, 1963.

6. Durack, D.T., Pelletier. L.L., Peters dorf, R.G. Chemotherapy of experimental streptococcal endocarditis. II. Synergism between penicillin and streptomycin against penciillin-sensitive streptococci. J. Clin Invest. 53:829-833, 1974.

7. Bauer, A.W., Kirby, W.M.M.,Sherris, J.C., and Turck, M.Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol. 45:493-496, 1966.

8. Hobby, G.L., and Dawson, M.H. The effect of sulfonamides on the action of penicillin. J. Bact. 51:447, 1946.

ABSTRACT

ANTIBIOTIC SYNERGY IN THE TREATMENT OF EXPERIMENTAL PROTEUS MIRABILIS INFECTION

UNCHALEE KONGFOO B.Sc.(PHARM.), MS.(MICROBIOLOGY)*

The in vivo synergistic effect of various combinations of antibiotics was tested in an experimental model of lethal infection with Proteus mirabilis. Two hours after intraperitoneal infection, mice were treated with penicillin, ampicillin, carbenicillin, gentamicin, kanamycin or amikacin singly or in various combinations fo two of these drugs. Carbenicillin in combination with kanamycin or amikacin, and ampicillin in combination with kanamycin or amikacin significantly reduced mortality and cleared Proteus mirabilis from the blood stream and the challenge site. Survival rate of animals treated with penicillin plus either gentamicin or kanamycin or amikacin, and carbenicillin plus gentamicin, and ampicillin plus gentamicin was about 40-60 %. No antagonism was observed between these pairs of antibiotics. These studies indicate true in vivo synergy against this strain of P. mirabilis when carbenicillin or ampicillin is combined with kanamycin or amikacin as therapy for serious Proteus infections, and suggest that combined therapy with these pairs of antibiotics may be useful for certain Proteus infections in humans.

* Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University.

วารสารเภสัชกรรมแพทย์ เชียงใหม่
Bulletin of Chiang Mai Associated Medical Science

Vol. 13 No. 3
September 1980

เชื้อโรคหนองในและความไวของเชื้อหนองในต่อยาปฏิชีวนะ

วิไลวรรณ เองวิทยากุล, วท.บ (เทคนิคการแพทย์)
เนตร สุวรรณคฤหาสน์, วท.บ (เทคนิคการแพทย์)

จากการสุ่มตัวอย่างผู้ป่วยที่มารับการรักษาที่ศูนย์ควบคุมกามโรค เขต ๕ จังหวัดเชียงใหม่ จำนวนทั้งหมด ๒๘๔ ราย พบเชื้อหนองใน ๑๐๙ ราย (๓๘.๒%)และได้ทดสอบกับยาปฏิชีวนะ ๒ ชนิด คือ เพนิซิลลิน และเทอร์ราไมซิน ปรากฏผลว่า เชื้อหนองในไวต่อ เพนิซิลลิน ร้อยละ ๒๗.๖ ไวปานกลาง ร้อยละ ๖๐.๔ ต้านยาเพนิซิลลิน ร้อยละ ๑๑.๙ สำหรับเทอร์ราไมซินพบว่า ไวต่อยาร้อยละ ๕๓.๙ ไวปานกลางร้อยละ ๔๖.๑ และไม่ปรากฏว่า เชื้อหนองในต้านยาเทอร์ราไมซินเลย

บทนำ

โรคหนองในยังคงเป็นกามโรคที่พบในอัตราค่อนข้างสูง จากรายงานประจำปี ๑๙๗๖ พบว่ามีผู้ป่วยด้วยโรคหนองในถึง ๑๔๐ ล้านคน (๑) สำหรับประเทศไทยจากสถิติของกามโรคในปีเดียวกันพบว่า มีผู้ป่วยถึง ๑๔๑,๕๗๖ ราย (๒) นอกจากนี้ยังพบว่า มีผู้ป่วยด้วยโรคนี้เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ อย่างเช่นในสหรัฐอเมริกา ปี ค.ศ. ๑๙๖๙ พบว่ามีอยู่ ๑.๕ ล้านคน ที่เป็นโรค จนกระทั่งในปี ๑๙๗๕ มีผู้ป่วยเพิ่มขึ้นอีกถึง ๑๐%

นอกจากปัญหาในเรื่องจำนวนผู้ป่วยแล้ว ยังมีปัญหาในเรื่องการรักษาอีกด้วย ในสมัยก่อนใช้ยา sulfonamide แต่ภายหลังเกิดมี Sulfonamide resistant strains ของเชื้อหนองในขึ้น จนกระทั่งเมื่อมีการค้นพบ Penicillin จึงใช้ยาตัวนี้แทน ซึ่งให้ effect ที่สูงกว่าเรื่อยมาจนถึงปัจจุบัน ซึ่งตอนนี้ก็พบปัญหาเช่นเดียวกัน คือ เชื้อดื้อต่อยาเพิ่มขึ้น ไม่ว่าจะเป็นในสหรัฐอเมริกา, อังกฤษ และโดยเฉพาะในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ก็พบว่ามี case ของ PPNG (Penicillinase-producing N.gonorrhea) สูงขึ้นถึง ๔๐%(๓) ส่วนในประเทศไทยนั้นพบว่าเชื้อหนองในมีความต้านทานต่อ Penicillin เพิ่มขึ้นตามลำดับ ในปี ๑๙๗๑ พบ Less sensitive strain มีอัตรา ๓๗.๗๙% แต่ในปี ๑๙๗๕ มีอัตราสูงถึง ๘๖.๖๓%(๔) นอกจากนี้

solution ก่อนนำมาใช้ให้นำมาทดสอบก่อนว่ามี concentration ดังกล่าวจริง และทดสอบประสิทธิภาพของยาว่าไม่เปลี่ยนแปลง โดยการทำ Serial tube dilution method ดูว่า MIC เท่ากับ standard หรือไม่ เมื่อทดสอบแล้ว ก็นำยา antibiotic มาเตรียมให้มี concentration ต่างๆ ดังนี้

Penicillin G sodium 0.75, 1.5, 32, 64 µg/ml

Terramycin 2, 4, 12, 24 µg/ml

Antibiotic plate ใช้ GC agar base วิธีเตรียมเช่นเดียวกันกับข้อ ๑ แต่เติม Antibiotic ที่เราต้องการใน concentration ต่างๆ กันแทนการเติม VCN การเติม Antibiotic ควรทำหลังจากที่อาหารเลี้ยงเชื้อเย็นลงเหลือประมาณ ๕๐°ซี และปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อควรมีประมาณ 25ml/plate

การเก็บตัวอย่างและการแปลผล

เก็บ discharge จาก Urethra มาทำ direct smear ย้อม gram stain และ Culture เชื้อใน MTM โดย incubate ใน Candle jar ซึ่งมี CO_2 ประมาณ 3-10% 30°C อ่านผล 24 ชม. ถ้ามีเชื้อหนองในขึ้น ก็นำไปทดสอบทางปฏิกิริยาชีวเคมีโดยการทดสอบOxidase test จะให้ผลบวก จากนั้นก็นำไปทดสอบการใช้น้ำตาล ๓ ชนิดคือ Glucose, Sucrose และ Maltose เชื้อหนองในจะให้ผลบวกเฉพาะน้ำตาล Glucose จากนั้นก็นำเชื้อไปหา Antibiotic susceptibility test โดยการนำเชื้อไป culture บน Chocolate agar ก่อน ไม่ควรใช้เชื้อจาก Primary Isolation มาทดสอบ เพราะ MTM มี Antibiotic อยู่แล้ว เมื่อ culture เชื้อได้แล้วก็นำไป culture ใหม่บน Antibiotic plate concentration ต่างๆ เพื่อหาความไวของเชื้อต่อยาต่อไป

สำหรับการแปลผลจะพิจารณาจากประวัติผู้ป่วย ผล Direct smear ร่วมกับการเพาะเชื้อ ในกรณีที่ผู้ป่วยให้ผลบวกเฉพาะ Direct smear แต่ผล culture เชื้อไม่ขึ้น จะพิจารณาประวัติผู้ป่วยย้อนหลัง เช่นผู้ป่วยมารับการตรวจก่อนหน้านี้ และมีการวินิจฉัยว่าป่วยด้วยโรคหนองใน (ผลจากฝ่ายชันสูตรของศูนย์ควบคุมกามโรคเขต ๕ จังหวัดเชียงใหม่ร่วมกับการวินิจฉัยของแพทย์) ได้รับการรักษาด้วยยามาก่อน การเพาะเชื้อจึงไม่ขึ้น ในกรณีนี้จะถือว่าผู้ป่วยติดเชื้อหนองในด้วย

การอ่านผล Antibiotic plate นั้น Control plate (Chocolate agar plate ที่ไม่มี antibiotic) จะต้องมีเชื้อขึ้น ส่วน Antibiotic plate ถ้ามีเชื้อขึ้นถือว่าเชื้อ resist ต่อยาที่ standard concentration ดังนี้

Approximate MIC correlates(7,8)

	Resist	Susceptable
Penicillin	≥32 µg/ml	≤1.5 µg/ml
Tetracyclines (or Terramycin)	≥12 µg/ml	≤ 4 µg/ml

ผลการทดลอง

๑. จากการเก็บสิ่งส่งตรวจจากท่อปัสสาวะของผู้ป่วยที่มารับการตรวจที่ศูนย์ควบคุมกามโรค เขต ๕ จังหวัดเชียงใหม่

จำนวนทั้งหมด ๒๘๕ ราย

ชาย ๒๔๓ ราย

หญิง ๔๒ ราย

ให้ผลดังนี้คือ

ตรวจพบเชื้อหนองใน ๑๐๔ ราย คิดเป็น ๓๘.๒%

แยกเป็นชาย ๑๐๔ ราย คิดเป็น ๔๒.๘%

หญิง ๕ ราย คิดเป็น ๑๑.๙%

๒. การทดสอบความไวของเชื้อหนองในจากผู้ป่วยต่อยา Antibiotic จำนวน ๗๖ ราย

ตารางที่ ๑ Penicillin

Concentration inhibition	Case	Percentage
0.75 µg/ml	12	27.6
1.5 µg/ml	9	
32 µg/ml	46	60.5
64 µg/ml	7	11.9
> 64 µg/ml	2	

๑. เชื้อ GC ที่ถูก Inhibit การเจริญที่ Concentration ของยา 1.5 µg/ml หรือต่ำกว่า ถือว่าเชื้อ sensitive ต่อยาจากตารางจำนวน case ที่ sensitive 27.6 %

๒. เชื้อ GC ที่ถูก Inhibit การเจริญที่ Concentration ของยาที่สูงกว่า 1.5 µg/ml แต่ไม่เกิน 32 µg/ml ถือว่าเป็น less sensitive strain จากตารางจำนวน case GC ที่ less sensitive 60.5%

๓. เชื้อ GC ที่ถูก Inhibit การเจริญที่ concentration ของยาที่ 32 µg/ml หรือสูงกว่า ถือว่าเชื้อ resist ต่อยาจากตารางจำนวน case ของ GC ที่ resist 11.9%

ตารางที่ ๒ Terramycin

Concentration inhibition	Case	Percentage
2 µg/ml	22	53.9
4 µg/ml	19	
12 µg/ml	35	46.1
24 µg/ml	-	-

๑. เชื้อ GC ที่ถูก inhibit การเจริญที่ concentration ของยา Terramycin 4 µg/ml หรือต่ำกว่า ถือว่าเชื้อ sensitive ต่อยาจากตารางจำนวน case ของ GC ที่ sensitive 53.9%

๒. เชื้อ GC ที่ถูก inhibit การเจริญที่con

centration ของยา Terramycin ที่สูงกว่า 4 µg/ml แต่ไม่เกิน 12 µg/ml ถือว่าเป็น less sensitive strain จากตารางจำนวน case ของ GC ที่ less sensitive 46.1%

๓. เชื้อ GC ที่ถูก Inhibit การเจริญที่ concentration ของยา Terramycin ที่ 12 µg/ml หรือสูงกว่าถือว่าเชื้อ Resist ต่อยา จากตารางไม่พบ Case ของ GC ที่ Resistant ต่อยา

วิจารณ์

จากผลของการสุ่มตัวอย่าง พบว่าผู้ป่วยด้วยโรคหนองในอยู่ ๓๘.๒% แยกเป็นชาย ๔๒.๘% หญิง ๑๑.๙% เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลของศูนย์ควบคุมกามโรคเขต ๕ จังหวัดเชียงใหม่ ปี พ.ศ. ๒๕๒๑ ตรวจพบเชื้อหนองในจากผู้ป่วยชาย ๓๙.๘% หญิง ๑๑.๙% ปี พ.ศ. ๒๕๒๒ ตรวจพบเชื้อหนองในจากผู้ป่วยชาย ๓๓.๘% หญิง ๑๐.๑% พบว่า case ของ Gonorrheal infection ยังคงสูงอยู่ในระดับเดิม ดังนั้น Gonorrhea จึงยังคงเป็นปัญหาที่สำคัญ สิ่งที่ควรคำนึงถึง คือ ทำอย่างไรจึงจะควบคุมและลดจำนวนผู้ป่วยลงได้ นอกจากในด้านการรักษาที่ต้องอาศัยความร่วมมือจากหลายฝ่าย ทั้งฝ่ายชันสูตร แพทย์ ตลอดจนผู้ป่วยเอง และสิ่งที่ควรทำควบคู่กันไป ก็คือการป้องกันโรค

สำหรับการทำ Antibiotic susceptibility ของเชื้อหนองในที่แยกได้จากผู้ป่วยจำนวน ๗๖ ราย ดังรายละเอียดในตารางที่ ๑ และที่ ๒ จะเห็นว่า ผลรวมของพวก Less sensitive และ Resistant ต่อยา Penicillin ค่อนข้างสูง จึงเป็นสิ่งที่แพทย์ควรคำนึงถึงในการที่จะเลือกเอา Penicillin เป็น Drug of choice ทุกครั้งไป เพราะพิจารณาจากข้อมูล จะเห็นว่า ในรายที่ให้ผล Less sensitive และ Resistant การรักษาด้วยยาในขนาดปกติ หรือใช้ยาชนิดนั้น ย่อมไม่สามารถรักษาผู้ป่วยให้หายขาดได้ แสดงว่าผู้ป่วยที่มารับการรักษา ๑๐๐ รายโอกาสที่จะหายขาดโรคนี้มีเพียง ๒๗.๖ ราย ส่วนที่เหลือย่อมเป็นปัญหาในการที่จะรักษา สิ่งที่ควรทำ คือ ในการที่ตรวจพบเชื้อหนองใน น่าจะมีการทำ sensitivity ของเชื้อทุกครั้งไป เพราะการให้ยาไม่ถูกขนาดย่อมทำให้เชื้อดื้อต่อยามากขึ้น อันจะเป็นปัญหาในการรักษาต่อไปภายหน้า ส่วน Terramycin นั้น ไม่พบ case ที่มี Resistant ต่อยา และจะเห็นว่า case ที่ sensitive ต่อยา Terramycin ยังสูงกว่า Penicillin ปัญหาในการรักษาจึงไม่มากเท่ากับ Penicillin แต่ก็ต้องมีการระมัดระวังในเรื่องการใช้ยา เพื่อไม่ให้มีการเพิ่มของรายที่มี Less sensitive และ Resistant เกิดขึ้น โดยที่ยาในกลุ่ม

ของ Tetracyclines เป็นยาที่ชาวบ้านนิยมใช้กันมาก ถ้าหากปล่อยให้ใช้กันอย่างผิดๆแล้ว การรักษาย่อมไม่หายขาด ผลที่ตามมาคือ ปัญหาเกี่ยวกับการดื้อต่อยามากขึ้น ดังนั้นควรจะมีการควบคุมการใช้ยาให้ถูกต้อง โดยชี้ให้เห็นโทษของการซื้อยารักษาเอง มีการควบคุมร้านขายยา ตลอดจนการเผยแพร่ความรู้ในเรื่องการป้องกันโรค

เอกสารอ้างอิง

1. Carpenter, P.L. Microbiology, 4th edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1977.
2. การอภิปรายเรื่องโรคหนองใน จุฬาลงกรณเวชสาร, ปีที่ ๒๒ ฉบับที่ ๔ ตุลาคม ๒๕๒๑
3. Stamm, W.E., Update on Managing Sexually Transmitted Disease, J. Modern Medicine of Asia, 16:21-29, 1980.
4. วารสารชมรมแพทย์ทางกามโรค, ชมรมแพทย์ทางกามโรค ร.พ.บางรัก กรุงเทพฯ ๒๕๒๐
5. Spence, M.R., Changing Penicillin Resistance to Gonococcus in Thailand, J. of American Venereal Disease Associated, 3:32-34,1976.
6. Pollock, H.M., Evaluation of Method for the Rapid Identification of N. Gonorrhoeae in a Routine Clinical laboratory, J.Clin. Microbiol., 4:19-21, 1976.
7. Lennette, E.H., et.al., Manual of Clinical Microbiology, 2nd edition, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1974.
8. Barry, A.E., The Antimicrobic Susceptibility test, Lea & Febiger, Philadelphia, 1976.

ABSTRACT

Gonorrheal Infection

And

Their Susceptibility to Antibiotics

Wilaiwan Hengwithayakul B.Sc (Med. Tech)

Netr Suwankrughasn B.Sc (Med. Tech)*

Out of 285 specimens obtained from the patients who suspected urethritis at the V.D. Sub Regional Center 5, Chiang Mai, 109 (38.2 %) were found that positive for GC. After testing 76 patients infected with GC for their susceptibility with two antibiotics, Penicillin and Terramycin, it has been obtained that 27.6 % and 60.5 % ware sensitive and less sensitive respectively, whereas 11.9 % was resistant to penicillin. In addition, it was apparent that 53.9 % and 46.1 % were sensitive and less sensitive to terramycin, accordingly.

---

* Department of Clinical Microbiology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University.

BEC THAI

บริษัท เบคไทย กรุงเทพอุปกรณ์เคมีภัณฑ์ จำกัด
Becthai Bangkok Equipment & Chemical Co. Ltd.

1017 – 1019 ถนนพหลโยธิน กรุงเทพฯ 4 TEL 278-5123, 278-5569, 279-2903
1017 – 1019 PHAHOLYOTHIN RD., BANGKOK 4, THAILAND CABLE BECTHAI

We deals Various Instrument and Supplies products below

1.	Arthur H. Thomas Company, U.S.A.	-General Scientific Apparatus
2.	Büchi Laboratory Techniques Ltd., Switzerland	-Rotary Evaporators -Fraction Collector -Water Stills
3.	Chemtrix, Inc. U.S.A.	-pH meter
4.	Du Pont Instrument, U.S.A.	-Automatic Clinical Analyzer -Liquid Chromatographs, HPLC -Mass Spectrometers, GC/MS
5.	Forma Scientific, Inc. U.S.A.	-Baths and Circulators -Environmental Rooms -Incubator and CO_2 Incubators
6.	JEOL, Japan	-Analytical Instruments -Electron Microscopes -Industrial Equipments
7.	LKB Produkter AB, Sweden	-Amino Acid Analyzers -Nuclear Instruments -Ultramicrotomy Instruments
8.	Spectra-Physics, U.S.A.	-Lasers -Optics
9.	Turtox/Cambosco, Macmillan Science Co. Inc. U.S.A.	-Living Materials -Preserved Materials -Microscope Slides
10.	Boeckel & Co., Export W.Germany	-Laboratory & Hospital Supply
11.	Brand, W.Germany	-Laboratory Glassware
12.	EDU-MED International, U.S.A.	-Living Material -Models and demonstration materials
13.	Andreas Hettich, W.Germany	-Small Centrifuges -Universal and laboratory Centrifuges
14.	Hirayama Manufacturing Corp. Japan	-Autoclaves -Hot Air Sterilizers

We are also the representative of Various Chemicals

Chemical * Glasswares * Scientific equipments * Hospital and laboratory supplies

วารสารเภสัชกรรมแพทย์ เชียงใหม่
Bulletin of Chiang Mai Associated Medical Science

Vol. 13 No. 3
September 1980

บทฟื้นฟูวิชาการ ; ความก้าวหน้าในการศึกษาวิจัยพันธุกรรมของฮีโมโกลบิน

สุรพร มาตระกูล* วท.บ (เทคนิคการแพทย์)
วท.ม (ชีวเคมี)

ในอดีตที่ผ่านมา ฮีโมโกลบินได้ถูกใช้เป็นตัวอย่างสำคัญในการศึกษาโปรตีนในแง่ของโครงสร้าง คุณสมบัติ หน้าที่ ตลอดจนกลไกในการสังเคราะห์ ต่อมา ฮีโมโกลบินก็ยังมีบทบาทอีกไม่น้อยสำหรับการศึกษาถึงกลไกการทำงานของยีนส์ ปัจจุบันเราได้ความรู้เพิ่มขึ้นมากมายเกี่ยวกับพันธุกรรมของฮีโมโกลบินทั้งในสภาวะปกติและผิดปกติ ทำให้เข้าใจถึงหน่วยงานของยีนส์ซึ่งเป็นศูนย์ควบคุมทุกสิ่งทุกอย่างของชีวิตดีขึ้นอีกมาก ทั้งนี้สืบเนื่องมาจากผลของการคิดค้นเทคนิคใหม่ๆ ขึ้นมา อาทิ DNA-cDNA hybridization และ gene mapping ซึ่งนับเป็นผลพลอยได้จากงานค้นพบที่สำคัญอันได้รางวัลโนเบลสองอัน คือ Viral reverse transcriptase และ DNA restriction enzymes. โดยเทคนิคต่างๆดังกล่าวรวมตลอดจนการประยุกต์เอาวิธีการบางอย่างเข้าร่วมด้วย ทำให้สามารถพิสูจน์ความบกพร่องพื้นฐานและสาเหตุที่แท้จริงของโรคกรรมพันธุของฮีโมโกลบินได้หลายอย่างทีเดียว ประโยชน์ที่ตามติดมาก็คือสามารถทำ prenatal diagnosis ของโรคความผิดปกติเหล่านี้ได้ เพียงแต่นำเอา amniotic fluid มาเพาะเลี้ยง แล้ววิเคราะห์ยีนส์ของ cultured cells เหล่านั้นโดยตรง ยิ่งกว่านั้น ในขณะนี้เขากำลังแยกเอา pure globin gene ออกมาใส่เป็น plasmid ให้กับโรงงานของแบคทีเรีย เพื่อตั้งความหวังต่อไปถึงการรักษาโรคทางพันธุกรรม โดย genetic therapy ในอนาคต

* ภาควิชาคลินิคัลไมครอสโคปี คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บทนำ

ภายในรอบสองปีที่ผ่านมา นับได้ว่างานวิจัยในเรื่องพันธุกรรมขั้นมูลฐานของโรคที่เกี่ยวกับการสร้างฮีโมโกลบินได้เจริญรุดหน้าไปอย่างรวดเร็วมาก แทบจะกล่าวได้ว่าอยู่ในขั้นแนวหน้าทีเดียวในแง่การศึกษาธรรมชาติของพันธุกรรม ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าโรคที่เกิดจากความผิดปกติของการสร้างฮีโมโกลบินมีอุบัติการสูง และเป็นปัญหาใหญ่อันหนึ่งของสาธารณสุขชุมชนซึ่งไม่มีวิธีรักษาให้หายได้ และนี่น่าจะถือเป็นเหตุจูงใจอันสำคัญที่นักวิจัยทั้งฝ่ายแพทย์ทางโลหิตวิทยา และทางฝ่ายนักชีวเคมี ได้พยายามศึกษาค้นคว้ากันมาก ถึงธาตุแท้ของความผิดปกติในระดับยีนส์ เสาะหาวิธีการเพื่อที่จะเป็นทางป้องกันหรือแก้ไขโรคอันเป็นปัญหานี้ให้ได้ โรคที่สำคัญเกี่ยวกับความผิดปกติของการสร้างฮีโมโกลบินมีทั้งแบบที่เกิดจาก qualitative abnormality ได้แก่พวกที่มีฮีโมโกลบินผิดปกติทั้งหลาย เช่น Sickle cell disease, unstable hemoglobins และ methemoglobins และแบบที่เกิดจาก quantitative abnormality ได้แก่โรค Thalassemia ชนิดต่างๆ

พันธุกรรมของฮีโมโกลบิน

เช่นเดียวกับเอนไซม์หรือโปรตีนชนิดอื่นๆ ฮีโมโกลบินหรือส่วนของโปรตีนที่เรียกว่าโกลบินนั้นถูกควบคุมการสร้างโดยยีนส์เฉพาะของมันแต่เนื่องจากฮีโมโกลบินของคนมีหลายชนิด (heterogeneity) ยีนส์ซึ่งควบคุมการสร้างแต่ละชนิดของโกลบินจึงมีอยู่แยกจากกัน ฮีโมโกลบินในผู้ใหญ่นั้นกว่า ๙๕% จะเป็น Hb A ซึ่งประกอบด้วยสายโกลบินชนิด α สองสาย และชนิด β สองสาย ($\alpha_2 \beta_2$) และส่วนน้อยประมาณ ๓% เป็น Hb A_2 ($\alpha_2 \delta_2$) ในเด็กแรกคลอดนั้นมี Hb A น้อยมาก แต่จะเป็น Hb F ($\alpha_2 \gamma_2$) เป็นส่วนใหญ่ซึ่งจะถูกแทนที่โดย Hb A ไปเรื่อยๆ จนเหลือไม่เกิน ๑% ในขวบปีแรก ความจริงในธรรมชาติของมนุษย์ ยังพบโกลบินชนิดอื่นๆ อีก แต่ไม่ค่อยมีความสำคัญและไม่ได้ศึกษากันมากนั้น ได้แก่ โกลบินสาย ε และ ζ ซึ่งพบเฉพาะในระยะต้นๆ ของชีวิตในครรภ์ ทั้งสาย β, γ และ δ นั้นมีส่วนประกอบของกรดอะมิโนคล้ายๆกัน จำนวน ๑๔๖ ตัว ส่วนสาย α มีกรดอะมิโนน้อยกว่าคือ ๑๔๑ ตัว สายโกลบินทั้ง ๔ ชนิดนี้เราทราบส่วนประกอบของมันทั้งหมด

หลักฐานจาก การศึกษาในประชากรต่างๆ พบว่า ส่วนใหญ่มียีนส์ของ α โกลบินเป็นจำนวนถึง ๒ คู่ (Double locus) นั่นคือมี ๒ ยีนส์ต่อ ๑ haploid chromosome ความเข้าใจอันนี้มีมานานแล้วโดยใช้เหตุผลจากการที่พบว่า เมื่อมีความ

ผิดปกติของฮีโมโกลบินเกิดขึ้นบนสาย α ก็มักจะพบปริมาณของ variant hemoglobin เป็นประมาณ ๑ ใน ๔ ของฮีโมโกลบินทั้งหมดแทนที่จะเป็นครึ่งต่อครึ่งดังเช่น β-chain variants และความรุนแรงถึง ๔ ระดับของ α-thalassemia ก็เป็นเหตุผลสนับสนุนอีกอันหนึ่ง Duplicated gene ของ α โกลบินนี้ได้รับการพิสูจน์แน่นอนโดยการวิเคราะห์ยีนส์ของโกลบินโดยตรงเมื่อเร็วๆนี้เอง (๑,๒) และยังพบอีกว่ายีนส์ของ α โกลบินทั้งสองอยู่ห่างกันราว ๒,๗๐๐ นิวคลีโอไทด์ หรือ ๒.๗ Kilobases บนโครโมโซมคู่ที่ ๑๖[๓] สำหรับยีนส์ของโกลบินชนิดที่เป็น non-α นั้น ปรากฏว่าเรียงกันอยู่ที่โครโมโซมคู่ที่ ๑๑[๔] ตามลำดับ $^{G}\gamma\ ^{A}\gamma\ \delta\ \beta$ ยีนส์ของ γ โกลบินก็มี ๒ คู่ ซึ่งนำการสร้างโกลบินที่ต่างกันเพียงแห่งเดียวคือ glycine หรือ alanine ตำแหน่งที่ ๑๓๖ Hb A ในเด็กแรกคลอดเป็นชนิด $^{G}\gamma : ^{A}\gamma$ =3:1ค่านี้กลับกันถ้าเป็น Hb F ในผู้ใหญ่ แม้เราจะแน่ใจได้ว่ายีนส์สำหรับ γ-chain ทั้งสองนี้มีอยู่แยกจากกันแต่ก็ไม่ทราบกุลไกในการควบคุมการสร้างของมันที่แท้จริง และสำหรับเรื่องของ γ-chain genes นี้ดูจะยิ่งสับสนขึ้นไปอีก โดยที่ในระยะหลังๆนี้ มีการค้นพบHb F ตัวใหม่คือ γ- โกลบินที่มี threonine แทนที่ isolucine ในตำแหน่งที่ ๗๕ มีปริมาณสูงถึง ๑๐% ในประชากร ๒ ใน ๕ คนของเด็กแรกคลอดและอาจสูงกว่านี้ในโรคของการสร้างฮีโมโกลบิน(๕) จนถึง ๔๐% ใน β- thalassemia (๖) เด็กในครรภ์ก็พบว่ามีเปอร์เซนต์การสร้าง $^{T}\gamma$ มากกว่าเด็กหลังคลอด (๗) การที่พบ $^{T}\gamma$-Hb F เป็นปริมาณสูงในประชากรจำนวนมากอย่างนี้ ทำให้คิดว่า γ-chain gene คงจะไม่ใช่เป็นสองอันเสียแล้ว แต่ก็ยังมีเสียงแย้งว่า $^{T}\gamma$ - chain อาจจะเป็นเพียงผลของ polymorphism ในสายใช่ของ $^{T}\gamma$ -globin gene มากกว่า (๘) หรือเป็นเพียง γ-variant ตัวหนึ่งเหมือน Hb F Sardinia (๙,๑๐) อีกประการหนึ่งผลการศึกษาของ Little และพวก (๑๑) โดย Restriction mapping analysis (จะกล่าวถึงรายละเอียดในตอนหลัง)ก็บ่งบอกถึงการมี γ - chain lociเพียง ๒อันเท่านั้น ซึ่งอยู่ห่างกันประมาณ ๓.๕ Kilobases ดังนั้นหลักฐานเกี่ยวกับ $^{T}\gamma$ - gene ยังไม่เพียงพอที่จะเปลี่ยนแปลงอะไรเกี่ยวกับจำนวน γ - gene ตามที่ได้กล่าวมาแล้ว จนกว่าจะได้ความรู้ที่แน่ชัดกว่านี้

<u>ความบกพร่องของการสังเคราะห์ และความผิดปกติของโครงสร้างส่วนใหญ่เกิดเนื่องจากยีนส์ที่ผิดปกติ</u>

การสร้างฮีโมโกลบินที่ผิดปกติจำแนกได้เป็น ๓ ลักษณะคือ อันแรก ทำให้เกิดความผิดปกติที่โครงสร้าง (Structural Abnormality) อันที่จริงโดยส่วนใหญ่แล้วความผิดปกติก็เป็นที่จุดเดียวในกว่าร้อยสี่สิบจุดบนสายโกลบิน ที่กรดอะมิโนตัวหนึ่ง อาจถูกเปลี่ยนไปเป็นอีกตัวหนึ่ง ทั้งนี้ก็จากสาเหตุดั้งเดิมคือนิวคลีโอไทด์บนยีนส์เปลี่ยนไป นอกเหนือจากการแทนที่ของกรดอะมิโน โครงสร้างของฮีโมโกลบินอาจผิดปกติได้จากสาเหตุอื่นเช่น กรดอะมิโนหนึ่งตัว หรือหลายตัวหายไปเฉยๆ (Deletion) หรือเพิ่มขึ้นมา (Addition) หรือมีเกินในทางปลาย (Elongation) หรือเกิดจากการที่มี Crossing over ของคู่ยีนส์เมื่อโครโมโซมทั้งสองข้างเกิดเยื้องไปจากกัน (Unequal crossing over) ในขณะที่มีขบวนการแบ่งตัวไมโอสิส ความผิดปกติต่างๆเหล่านี้อาจยังผลให้เกิดโมเลกุลของฮีโมโกลบินที่ด้อยคุณภาพ เช่นมี high oxygen affinity ทำให้เป็น polycythemia หรือด้อยเสถียรภาพ (unstable hemoglobins) ทำให้เกิด hemolytic anemia หรือ variants ที่ทำให้มีคุณสมบัติทางฟิสิกบางอย่างเปลี่ยนไปจากเดิม เช่น Hb S ทำให้เกิด Sickle cell anemia ตลอดจนพวก Hb Ms ที่ทำให้เกิด methemoglobinemia เป็นต้น ในบรรดาความผิดปกติรูปแบบดังกล่าวมานี้ สาเหตุจาก single amino acid substitution เป็นแบบที่พบมากที่สุดคือกว่า ๓๐๐ ตัว ในจำนวนนี้จะเป็นของ β- chain เสียประมาณสองในสาม ฮีโมโกลบินผิดปกติที่เราวิเคราะห์ได้เองในประเทศไทยก็เช่น Hb Siam, Hb Thailand, Hb Anantharaj, Hb Suan-Dok และ Hb Doi Suthep I สามตัวแรกจากตึกอานันทราช ร.พ. ศิริราช และสองตัวหลังจากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลักษณะอันที่สอง ทำให้มีการสร้างน้อยลงสำหรับโกลบินบางสาย (Imbalance Synthesis) เป็นเหตุให้ขาดความสมดุลย์ในการที่จะมาจับคู่กันเป็นฮีโมโกลบิน เกิดเป็นโรค thalassemias ชนิดต่างๆ แล้วแต่ว่าโกลบินชนิดไหนลดหรือหยุดการสร้าง เช่น α- thalassemia, β - thalassemia, $\delta\beta$-thalassemia ประเทศไทยนับได้ว่าเป็นแหล่งที่มีอุบัติการของทั้ง α- และ β- thalassemia สูงมากที่เดียวในแทบทุกภาคของประเทศ

ลักษณะความบกพร่องแบบที่สามคือเกิดกรณีที่ไม่มีการสับเปลี่ยนจากการสร้าง Fetal Hb ไปเป็นการสร้าง adult Hb แทนเมื่อพ้นจาก-

ชีวิตในครรภ์ (Disorder of hemoglobin switching) ทำให้มีการสร้าง Hb F ต่อไปเรื่อยๆ จนเติบใหญ่ ซึ่งเรียกว่า Hereditary Persistance of Fetal Hemoglobin(HPFH)

ความผิดปกติที่เป็นกรรมพันธ์ทั้ง ๓ แบบเป็นที่รู้จักกันมานานทีเดียว มีอุบัติการกระจายอยู่แทบทุกส่วนของโลกก็ว่าได้ โดยเฉพาะ thalassemia ซึ่งทำให้เป็นปัญหาใหญ่ทางด้านการแพทย์ เดิมทีเดียวโรคนี้ชื่อว่า Cooley's anemia และ Mediteranian anemia พบมากในหมู่ประชากรแถบเมดิเตอร์เรเนียนแถวกรีซ ไซปรัส อิตาลีและตุรกี ต่อมาพบว่าโรคนี้มีมากในแถบภาคพื้นตะวันออกเฉียงใต้ ในคนจีน และในทวีปอัฟริกากว่าครึ่งทวีปด้วย แต่พบน้อยมากในหมู่คนชาวยุโรปตอนเหนือๆ ส่วนโรคของ hemoglobinopathies นั้น แม้จะพบรายงานกว่า ๓๐๐ ชนิด แต่ส่วนใหญ่ก็เป็นแบบพบในครอบครัว ซึ่งคิดว่าเกิดจาก point mutaion มากกว่าที่จะพบในกลุ่มประชากร และมักไม่ก่อให้เกิดปัญหาหรือโรคร้ายแรงอะไร มีเพียงไม่กี่ตัวเท่านั้นที่พบมีอุบัติการสูง เช่น Hb E ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และ Hb S ที่มีระบาดกันในหมู่ชนอัฟริกาบางภาค และแม้แต่ในตะวันออกกลาง สำหรับภาวะของ HPFH นั้นมีหลายแบบในกลุ่มคนต่างๆ เช่น แบบที่พบในชนผิวดำเป็นลักษณะของการขาดการสร้าง β-chain และ δ-chain โดยสมบูรณ์ ทำให้มีการสร้าง γ-chain ในระดับสูงในผู้ใหญ่ ลักษณะการกระจายของ Hb F ในเม็ดเลือดแดงจะเท่าๆ กันทุกเม็ด (โดยการย้อม Hb F หรือ Acid elution staining) จากการตรวจโดยวิธี hybridization ระหว่าง β mRNA กับ β-globin structural gene ผลปรากฏว่าไม่มี β mRNA อยู่ใน reticulocyte เลย (๑๒,๑๓)และเมื่อดูลึกลงไปกว่านั้นอีกด้วยการวิเคราะห์ยีนส์โดยตรงก็พบว่า ทั้ง β และ δ structural genes หายไปทั้งหมด (๒,๑๔) ส่วน HPFH อีกหลายแบบซึ่งมีพบบ้างในกลุ่มชนอื่นๆ นอกเหนือจากคนผิวดำนั้นไม่เกี่ยวข้องกับ β-globin gene deletion (๑๕) ทำให้ยังมีการสร้าง HbA อยู่บ้างร่วมกับมีระดับของ Hb F สูงๆ

ห้องปฏิบัติการทั่วๆไป อาจตรวจหาความผิดปกติของฮีโมโกลบิน เพื่อการวินิจฉัยโรคเหล่านี้ได้ภายในขอบเขตที่กว้างขวางพอสมควรทีเดียว และด้วยวิธีการที่ไม่ยากจนเกินไปนัก วิธีการตรวจเบื้องต้นดังกล่าวประกอบด้วย การทำ Electrophoresis ที่ alkaline และ acid

pH ซึ่งอันนี้จะทำให้สามารถดูได้ว่า นอกจาก Hb A แล้วยังมี Hb ผิดปกติอื่นหรือไม่ Hb A_2 สูงไหมมี Hb H หรือ Hb Bart's หรือเปล่า การทำ acid elution test เป็นวิธีการที่ง่ายมาก เพียงแต่จุ่มสไลด์เลือดที่เตรียมใหม่ๆ และทิ้งให้แห้งลงใน ๘๐% ethyl alcohol ๒ นาที และย้ายไปจุ่มอีก ๒ นาทีใน ๐.๑% Amido black β ใน ๘๐% alcohol ซึ่งปรับ pH เป็น ๑.๕ ล้างด้วยน้ำก๊อก เลือดของใครมี fetal cell ปรากฏอยู่มากกว่า ๐.๑% ขึ้นไปแสดงว่ามีความผิดปกติเกิดขึ้นเกี่ยวกับการสร้างฮีโมโกลบินแล้ว โดยเฉพาะเป็นตัวบ่งบอกที่ดีมากสำหรับ β-thalassemia และ HPFH สำหรับ heterogygote β thalassemia นั้น มีการตรวจที่บอกได้แน่นอนคือระดับของ Hb A_2 ซึ่งสูงขึ้นจาก ๓% ในคนปกติถึง ๕-๘% วิธีการหา Hb A_2 ก็ทำได้ง่ายโดย microcolumn chromatography ดังเคยเสนอรายละเอียดแล้วในวารสารเล่มนี้ (๑๖) การตรวจดู Inclusion bodies เป็นอีกหนึ่งที่ควรจะทำด้วยเพื่อช่วยในการวินิจฉัย α-thalassemia และยังช่วยบอกถึงการมี unstable hemoglobin อื่นได้ด้วยเมื่อปรากฏมีก้อนตกตะกอนอยู่ในเม็ดเลือดแดง

จุดแห่งปัญหาและหนทางนำไปสู่การแก้ปัญหา

โรคที่ถ่ายทอดได้ทางกรรมพันธุ์ เป็นโรคที่มีปัญหามาก ทั้งนี้เพราะเราไม่สามารถจะรักษาให้หายจากโรคได้ โรคกรรมพันธุ์ส่วนใหญ่นั้น ตั้งแต่เป็นเด็กเล็กๆ ก็ต้องอาศัยการประคบประหงมเป็นพิเศษจากบิดามารดาและแพทย์ซึ่งก็ได้แต่รักษาตามอาการ หรือช่วยป้องกันความรุนแรงของโรคเพื่อให้มีชีวิตที่สบายขึ้น และอยู่รอดต่อไปได้จนถึงที่สุด ถ้าผู้ป่วยรับยีนส์เสียมาเพียงข้างเดียว (heterozygote) ก็อาจจะค่อยยังชั่วหน่อย พยาธิสภาพส่วนนั้นอาจถูกบดบังหรือทดแทนได้ด้วยอีกข้างที่ดี แต่เขาก็ยังเป็นพาหะของโรคนั้นถ่ายทอดไปสู่ลูกสู่หลานต่อไปอีกได้ไม่มีวันสิ้นสุด เคยคิดกันว่าโรคทางกรรมพันธุ์มีทางแก้โดยการป้องกัน ภายใต้วิธีการที่เรียกว่า "Genetic Councelling" โดยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญทางด้านพันธุศาสตร์ ให้คำปรึกษาแนะนำ คู่แต่งงานเกี่ยวกับโรคเหล่านี้และหนทางที่จะถ่ายทอดไปยังบุตร อย่างไรก็ตาม genetic councelling ก็มีปัญหามากในทางปฏิบัติ ไม่สามารถจะถือเป็นการแก้ได้ เพียงแต่อาจลดอุบัติการของโรคได้บ้างถ้าทำได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ถึงแม้จะมีคนเคยพูดไว้ว่าสิ่งลึกลับที่สุดของ

ชีวิตก็คือยีนส์ หน่วยเล็กๆ ที่ฝังตัวอยู่ในโครโมโซม ซึ่งเป็นเสมือนตัวกำกับบท และควบคุมทุกสิ่งทุกอย่าง ตั้งแต่ลักษณะทางกายภาพ ชีวภาพ ตลอดจนพฤติกรรมของสิ่งมีชีวิต แต่สิ่งลึกลับอันนี้กำลังถูกเปิดเผยออกมาทีละน้อยๆ ทั้งนี้ก็ด้วยความอุตสาหะวิริยะของบรรดานักค้นคว้าวิจัย นักสืบเสาะหาความลับของธรรมชาติ ไม่ว่าเขาเหล่านั้นจะตั้งความหวังเพื่อให้ได้ความรู้อย่างเดียวหรือจะตั้งความหวังเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ การสาธารณสุขก็ตาม แต่อย่างน้อยผลพลอยได้ที่ตามมาก็คือประโยชน์อันมหาศาล ทำให้เริ่มมองเห็นหนทางไปสู่จุดแห่งการป้องกัน หรือแก้ไขโรคของกรรมพันธุ์บางอย่างได้

ก่อนอื่นขอให้ท่านทบทวนความทรงจำเกี่ยวกับเหตุการณ์บางอย่างภายในเซลล์ บนโครโมโซม ซึ่งอยู่ในส่วนของนิวเคลียสของเซลทุกๆ เซลนั้นเป็นที่อยู่ของยีนส์นับได้เป็นจำนวนล้านๆ ยีนส์ จากยีนส์แต่ละยีนส์จะมีข่าวสารจาก DNA ส่งออกจากนิวเคลียส์ไปยังไซโตปลาสซึมโดย mRNA ซึ่งพิมพ์ข่าวสารมาจาก DNA structural gene ตัว mRNA เองก็เลยทำหน้าที่เป็นแม่พิมพ์ในการสังเคราะห์โปรตีนชนิดที่จำเพาะ ซึ่งรับมาจาก specific gene นั้นๆ กลไกของ DNA→RNA→protein นับเป็นจุดกลางอันสำคัญของชีวโมเลกุล โรคทางกรรมพันธุ์หลายอย่างเกิดจาก point mutation บน DNA จึงส่งผลให้เกิดความผิดปกติบนโปรตีน ทำให้ทำงานไม่ได้หรือไม่ดี หรือมีคุณสมบัติบางอย่างเปลี่ยนไป ชีวิตที่น่าจะเป็นปกติสุขของมนุษย์ก็ต้องเปลี่ยนไปเป็นโรคต่างๆ ไปด้วย

โรคทางกรรมพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างฮีโมโกลบิน นับเป็นกลุ่มใหญ่กลุ่มหนึ่ง และมีอุบัติการสูงที่สุดกว่าโรคกรรมพันธุ์ชนิดอื่นๆ และมีการศึกษาค้นคว้าวิจัยมากที่สุด ความผิดปกติมีทั้งในแง่คุณภาพ (Hemoglobinopathies) และในแง่ปริมาณ (Thalassemias) ดังได้กล่าวมาแล้ว การศึกษาวิจัยที่เคยทำมาในระยะก่อนๆ จะเป็นการวิเคราะห์ผลผลิตตอนปลายมือ ฮีโมโกลบิน หรือลึกเข้าไปอีกหน่อยคือ วิเคราะห์ mRNA ในเม็ดเลือดแดงตัวอ่อน (reticulocyte) ทำให้คาดคิดลักษณะความผิดปกติของยีนส์ได้บ้าง แต่เพื่อให้ได้ความเข้าใจที่ถูกต้องสมบูรณ์ เขาจึงจำเป็นต้องหาวิธีวิเคราะห์ที่ยีนส์โดยตรง

<u>บทบาทของ Reverse transcriptase ต่อการศึกษา Globin gene.</u>

เป็นที่ทราบกันดีว่า จำนวนยีนส์สำหรับโปรตีน และเอนไซม์ต่างๆ ของสิ่งมีชีวิตชั้นสูงอย่างมนุษย์นั้น มีจำนวนและชนิดนับไม่ถ้วนการที่จะดึงเอาเฉพาะ globin genes ออกจากโครโมโซมมาศึกษา ถ้าไม่มีวิธีการก็เหมือนกับ

จะหาหยดน้ำที่จำเพาะหยดหนึ่งจากทะเลมหาสมุทรทีเดียว เมื่อก่อนหน้านั้น เขาใช้วิธีแยกเอา specific globin DNA ออกจาก genes ต่างๆ โดย indirect method กล่าวคือ เริ่มต้นด้วยการเตรียม mRNA โดยการใช้ affinity colum chromatography (๑๗) เนื่องจากglobin mRNA มี poly A nucleotides ทางปลาย ๓' จึงใช้ poly U-sepharose หรือ oligo Td-cellulose เป็นตัวจับ Globin mRNA อาจแยกจาก reticulocyte โดยอาศัยขนาดซึ่งมี M.W. ประมาณ ๒๖๕,๐๐๐ (๑๘) หลังจากนั้นต้องอาศัยเอนไซม์ที่สำคัญตัวหนึ่งจากไวรัส คือ RNA dependent DNA polymerase หรือ Reverse transcriptase (๑๙) พิมพ์เอาDNA sequence กลับจาก mRNA โดยที่ในเวลาเดียวกันก็ใช้นิวคลีโอไทด์ที่ติดฉลากสารรังสีเอาไว้ด้วย Nucleotide sequence ที่เขาสังเคราะห์ขึ้นได้ใหม่นี้เรียกว่า complementary DNA หรือcopy DNA (cDNA) โดยวิธีนี้เขาจะเตรียม cDNA ของ α- โกลบินได้โดยใช้ mRNA จาก reticulocyte ของคนไข้ β thalassemia homozygote และเตรียม cDNA ของ β-โกลบินได้โดยใช้ mRNA จากคนไข้ Hydrops fetalis (α-thalassemia homozygote) ซึ่ง chain specific mRNA นี้ทดสอบได้โดย cell-free protein synthesis system ใน wheat germ (๒๐) สำหรับ globin specific cDNA ที่เตรียมได้นี้ได้เคยถูกนำไปใช้เป็นตัวตรวจหา mRNA ในโรค thalassemia ชนิดต่างๆ อย่างได้ผลมาแล้ว ตัวอย่างเช่นการวิเคราะห์ total cell mRNA โดย cDNA/mRNA hybridization ทำให้ทราบว่า β-thalassemia บางรายไม่มี β-chain mRNA อยู่ในไซโตปลาสซึมเลย (๒๑,๒๒) ในขณะที่บางรายมีพบเป็น β-chain mRNA ที่ผิดปกติ (๒๒,๒๓) cDNA นี้อีกเช่นกันที่เขานำไปใช้ตรวจสอบ DNA ของ globin gene โดยวิธีการ DNA/cDNA Hybridization (๒๔,๒๕) โดยใช้หลักง่ายๆ คือทำให้สายคู่ของ DNA จากเซลที่จะทำการตรวจคลายตัวออกจากกันด้วยความร้อนหรือ high salt solution ขณะเดียวกันก็ใส่ cDNA probe เข้าไปแล้วจึงทำให้เย็นลง cDNA จะเข้าไปจับคู่ (reanneal) กับ specific DNA ที่ complementary กัน จากนั้นสายคู่และสายเดี่ยวของ DNA จะถูกแยกจากกันโดย hydroxy apatite ใน column chromatography จากการตรวจ

วัดด้วย annealed และ unannealed cDNA probe เขาก็สามารถหาปริมาณของ globin gene ได้ โดยเทคนิคอันนี้เขาสามารถพิสูจน์ออกมาได้ว่า α- thalassemia เป็นโรคที่เกิดจากการขาดหายไปของ α-globin gene (๒๕) ต่างจากส่วนใหญ่ของ β thalassemia ซึ่งพบว่ามี β-globin gene อยู่แน่ (๒๖)

บทบาทของ Restriction endonuclease กับการทำ Gene mapping.

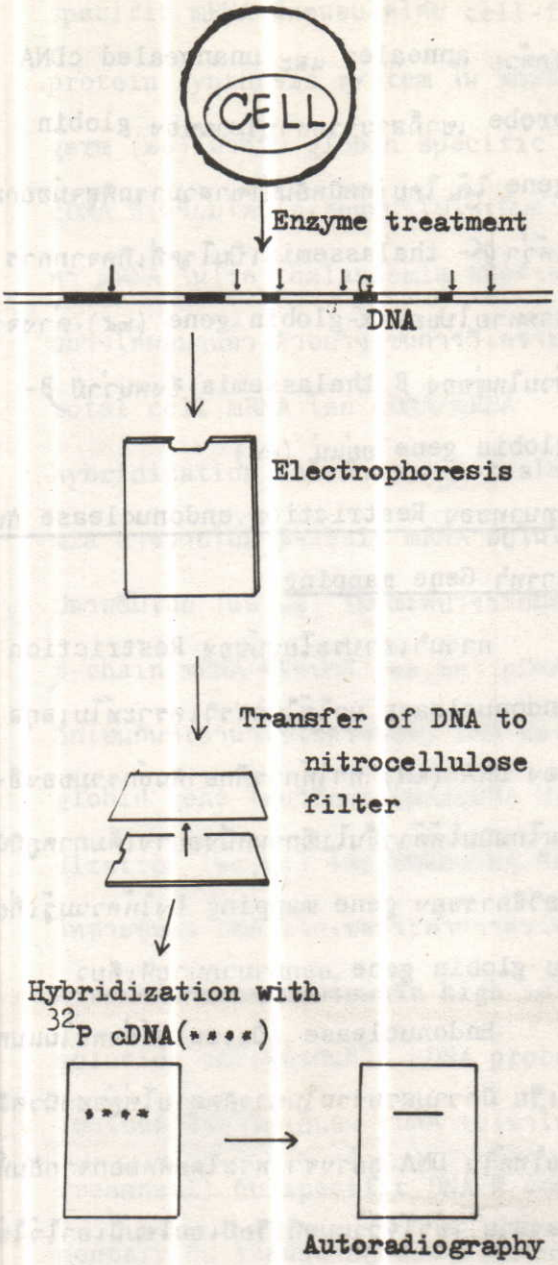
การนำเอาประโยชน์ของ Restriction endonuclease มาใช้ในการวิเคราะห์โมเลกุลของ DNA (๒๗) ทำให้การศึกษาพันธุ์กรรมของฮีโมโกลบินได้ก้าวขึ้นไปอีกขั้นหนึ่งอย่างเต็มภาคภูมินั่นคือวิธีการของ gene mapping ซึ่งให้ความรู้เกี่ยวกับ globin gene ออกมามากมายทีเดียว

Endonuclease เป็นเอนไซม์ซึ่งพบในแบคทีเรีย มีความสามารถในการตัดสายโซ่คู่ของนิวคลีโอไทด์ใน DNA อย่างจำเพาะโดยตัดออกจากกันทั้งสองสาย เข้าใจว่าแบคทีเรียมีเอนไซม์นี้เอาไว้ใช้สำหรับป้องกันตัวเองจากไวรัส และตัวแบคทีเรียเองจะป้องกัน DNA ของมันไว้โดย methylation ที่ susceptible site เสีย Restriction enzymes มีมากมายหลายตัวจากแบคทีเรียชนิดต่างๆ แต่ละตัวก็อาจมีความจำเพาะในการย่อยลำดับของนิวคลีโอไทด์บน DNA แตกต่างกันไปทำงานคล้ายกับ specific proteolytic enzyme สำหรับ site specific endonuclease นี้ ถูกค้นพบตั้งแต่ปี ๑๙๗๐ จากนั้นก็มีคนประยุกต์เอาเอนไซม์เหล่านี้มาใช้ในการวิเคราะห์ viral genome โดยทันที (๒๘) ต่อมาเมื่อมีการค้นพบเอนไซม์ตัวใหม่ๆมากขึ้น จึงเริ่มมีการทำ chromosome mapping, วิเคราะห์ nucleotide sequence ของ DNA, แยกยีนส์ต่างๆ ออกมา ตลอดจนการต่อโครงสร้างของ DNA nucleotides ขึ้นใหม่ (๒๗)

ขั้นตอนการทำ Globin gene map:-

DNA ของเซลเมื่อให้ถูกย่อยโดย restriction enzyme หนึ่งๆแล้ว อาจได้ชิ้นส่วนของ DNA ขนาดต่างๆ กันออกมามากมายนับจำนวนพันได้ชิ้น ส่วนเหล่านี้จะถูกนำมาแยกโดย electrophoresis บน agarose gel ซึ่งอาศัยหลักความแตกต่างกันของขนาด โดยที่ชิ้นส่วนที่เล็กจะวิ่งไปไกลกว่าชิ้นส่วนที่ใหญ่ เมื่อสามารถแยก DNA ทั้งหมดของเซลออกมาเป็นส่วนๆ อยู่บน slap gel อย่างนี้แล้ว ขั้นต่อไปก็คือ หาตำแหน่งของ globin gene ซึ่งก็ต้องใช้คุณสมบัติของ DNA/cDNA hybridization อีก โดยเตรียม radioactive cDNA(*cDNA) ของ globin gene เพื่อ

เข้าไปหา α- หรือ β-globin gene ใน electrophoregramดังกล่าว วิธีการทำจริงๆ เขาไม่สามารถจะทำ hybridization ในเนื้อเยลซึ่งชิ้นส่วนของ DNA ต่างๆ ฝังอยู่ได้ จะต้องนำมาซับลงบน absorbent filter แล้วจึง hybridize กับ cDNA probe เสร็จแล้วจับภาพเข้ากับแผ่นฟิลม์ X-ray เพื่อให้ได้ radioautograph ของสารรังสี cDNA อีกทอดหนึ่ง โดยวิธีการย้ายถ่ายเทเป็นกระบวนตามที่ได้กล่าวมาแล้วนี้ จะได้ผลขั้นสุดท้ายออกมาเป็นภาพ (map)ที่ประณีต ถูกต้อง และแน่นอนของ globin gene ลักษณะของภาพนี้จะจำเพาะสำหรับการย่อย DNA ด้วย restriction enzyme ตัวหนึ่งๆ ในตอนแรก



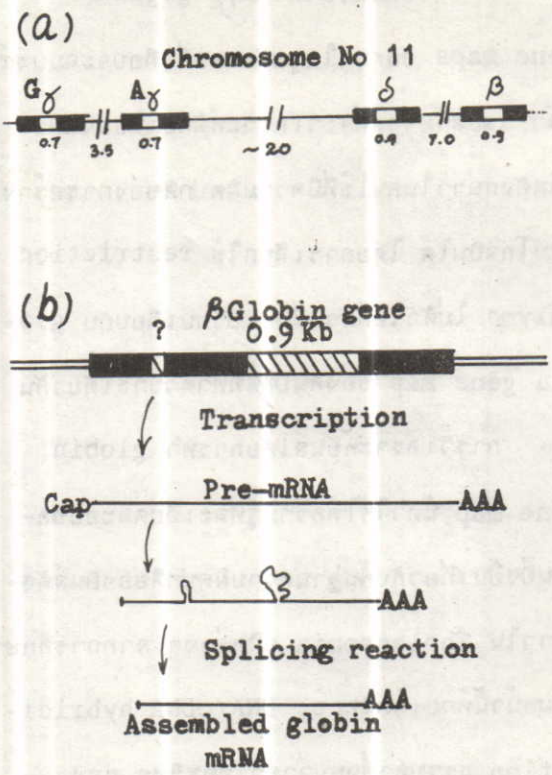
รูปที่ ๑ แสดงวิธีการในการทำ Globin gene map โดยการย่อยของ Restriction endonuclease ในขั้นต้น จนกระทั่งได้ auto radiograph ของ globin gene map. G หมายถึง globin gene

ขณะนี้เขาทำ α,β-globin gene maps ออกมาในรูปลักษณะที่เกือบจะสมบูรณ์แล้ว และสามารถที่จะวิเคราะห์ลักษณะของแผนภาพดังกล่าวในคนไข้ที่มีความผิดปกติของการสร้างฮีโมโกลบินได้ โดยการเลือกใช้ restriction enzyme ไม่ตัวใดก็ตัวหนึ่ง เปรียบเทียบกับ globin gene map ของคนปกติที่ทำด้วยวิธีเดียวกัน

การวิเคราะห์ยีนส์โดยการทำ globin gene map นี้ทำให้ได้ความรู้ที่ละเอียดละออชัดเจนยิ่งขึ้นเกี่ยวกับพื้นฐานความผิดปกติของยีนส์ดังกล่าวใน Thalassemia ชนิดต่างๆ จากการศึกษาก่อนหน้านี้ด้วยเทคนิคของ DNA/cDNA hybridization ธรรมดาซึ่งพบว่าสาเหตุจริงๆ ของ thalassemias นั้นไม่เป็นไปในลักษณะเดียวกันหมด (มี heterogeneity) เช่น HPFH เกิดจากการขาดหายไปของ β-globin gene (๑๒,๑๓) δβ-Thalassemia เกิดจากการขาดหายไปเป็นบางส่วนของδและ β-globin coding sequences (๒๙,๓๐) ใน β-thalassemia ส่วนใหญ่ β-globin gene ยังมีอยู่เป็นปกติ (๒๖) แต่โดยที่ mRNA หายไปหรือมีปริมาณน้อยลง (๒๒) บางรายงานก็บอกว่า mRNA มีเป็นปกติในนิวเคลียส์ แต่ไม่มีในไซโตปลาสซึมของ erythroid cells (๓๑) และบางรายงานก็ว่าพบ mRNA ที่ผิดปกติโดยที่ coding sequence ทางด้านปลาย ๓' ขาดหายไป (๒๒) ความรู้เหล่านี้ได้รับการตรวจพิสูจน์โดย globin gene map หลายรายการแล้ว (๒,๑๔) β thalassemia ในบางคนพบว่าเป็นผลจาก gene mutation (๓๒) ส่วน α- thalassemiaก็ได้รับการพิสูจน์ว่าส่วนใหญ่เกิดจากการขาดหายไปของ α-chain gene หนึ่งอัน หรือสองอันซึ่งอาจเป็นผลจาก unequal crossing over (๓๓) แต่ก็ยังมีส่วนน้อยซึ่งพบว่าไม่ใช่ gene deletion (๓๔,๓๕) ซึ่งอาจเป็น defective α-loci (๓๖) เมื่อมาถึงตอนนี้จะมองเห็นได้อย่างชัดเจนถึง heterogeneity ของสาเหตุพื้นฐานของ thalassemias ความแตกต่างอันนี้เป็นจริงแม้แต่ใน thalassemia ชนิดเดียวกัน ในเผ่าพันธุ์เดียวกัน จนยากที่เราจะบอกให้ชัดเจนไปเสียว่า thalassemia ชนิดนั้นเกิดจาก gene deletion แน่นอนหรือไม่ จนกว่าจะได้ทำในจำนวนประชากรชาว thalassemias ให้มากกว่านี้ทั้งนี้เพราะวิธีการวิเคราะห์นั้นมีอยู่อย่างดีแล้วตามที่ได้กล่าวมาข้างต้น

อย่างไรก็ตาม ผลที่ได้จากการใช้วิธีการ

ที่สลับซับซ้อน และชาญฉลาดในการทำ Restriction mapping ทำให้พบสิ่งที่น่าทึ่งอย่างหนึ่งใน globin gene คือเขาพบว่า globin genes ไม่ได้เป็นสายโซ่นิวคลีโอไทด์ที่ต่อเนื่องกันไปตลอดในแต่ละยีน แต่ถูกคั่นไว้ด้วยช่วงของ DNA อย่างอื่นเป็น intervening sequence (๓๗) ซึ่งเขาให้ชื่อว่า inserts หรือ introns ในขนาดความยาวถึงหลายร้อย base pairs ขณะนี้ยังไม่มีใครทราบหน้าที่ของ inserts เหล่านี้ เข้าใจว่าอาจมีสอดแทรกอยู่ในยีนส์อื่นๆด้วย การค้นพบอันนี้ทำให้อดคิดไม่ได้ว่า ในขณะที่เกิด transcription ในตอนแรกมันคงจะ transcribe ให้ mRNA สายยาว ซึ่งอาจเรียกว่าเป็น pre-mRNA ก่อนแล้วจึงมีการตัดและต่อใหม่ (๓๗) เพื่อให้ได้ mRNA ของ globin protein อีกทีก่อนที่จะถูกส่งไปยังไซโตปลาสซึม



รูปที่ ๒ (a) แสดงแผนภาพของ non α-globin gene loci ซึ่งอยู่บน chromosome ที่ ๑๑ ช่องว่างใน gene คือ introns ที่พบ ซึ่งมีขนาดความยาวเป็น kilobase pairs (Kb)ตามตัวเลขที่กำกับอยู่

(b) แสดงให้เห็นลักษณะการตัดตอนเอา intervening sequence ออกหลังจาก transcription ได้ mRNA สายยาว (pre-mRNA) โดยมี cap structure ของ globin mRNA ทางปลาย ๕' ส่วน AAA หมายถึง poly-adenylic acid ทางปลาย ๓'

ถ้าข้อสันนิฐานอันนี้เป็นจริงเราก็น่าจะกล่าวได้อย่างเต็มปากเต็มคำว่า ในจุดของการตัดต่อmRNA นี้ โอกาสที่จะเกิดการผิดพลาดเป็นไปได้หลายแห่ง และหลายลักษณะอย่างไม่มีข้อสงสัย ทำให้ศึกษาไปอีกว่าสาเหตุของความผิดปกติในการสร้างฮีโมโกลบินในแง่ของ thalassemias และ hemoglobinopathies บางอัน อาจเกิดที่จุดนี้ได้โดยเฉพาะพวกที่มี globin gene อยู่ครบ

สำหรับกรณีของ thalassemia ที่พบยีนส์ปรากฏอยู่ แต่ไม่มีการสร้างโกลบินนี้ เขาได้ลองศึกษาดูว่า ถ้าสามารถใส่เอาชิ้นส่วนของ DNA ที่มี globin gene ต่างๆ ดังกล่าว เข้าไปใน bacterial plasmid (๓๘,๓๙) หรือแม้แต่ใน Erythroleukemia cells ของหนู (๔๐)จากนั้นก็จะแยกเอาเฉพาะ clone ที่มี globin gene มาเลี้ยงต่อให้ได้ปริมาณมากพอที่จะนำมาตรวจวิเคราะห์ sequence ของ globin gene เพื่อดูความผิดปกติ หรือเพื่อให้ได้ globin gene ที่บริสุทธิ์ในปริมาณมากๆทำเป็น c DNA probe ความพยายามในขั้นนี้ เขาได้ทำมาถึงแล้ว โดยมีนักวิจัยทางด้านนี้หลายท่านได้ประสบผลสำเร็จในการเพาะ human globin gene แล้วจากทั้งคนปกติและผู้ป่วยโรค thalassemia กลไกของความผิดปกติต่างๆ ที่ยังไม่ทราบกำลังถูกเปิดเผยออกมากขึ้นๆ ขณะที่เขียนบทความนี้ก็มีรายงานผลการตรวจ β thalassemia gene และα thalassemia gene ด้วยเทคนิคดังกล่าวตีพิมพ์ออกมาแล้ว (๔๑,๔๒)

ประโยชน์ในด้านการแพทย์

เป็นที่ทราบดีว่าโรคของกรรมพันธุ์นั้น รักษาให้หายขาดไม่ได้เลย จะเป็นได้ก็แต่เพียงในแง่ของการป้องกันไม่ให้เกิดขึ้นเท่านั้น สำหรับThalassemia นอกจากโดยวิธีการของ genetic counselling แล้ว ก็มีวิธีทำ prenatal diagnosis ขึ้นมาช่วยอีกแรงหนึ่ง ซึ่งในตอนแรกเขาใช้วิธีตรวจวัดอัตราการสร้าง globin chain ของเลือดเด็กในครรภ์ในระยะ Mid trimester (๔๓,๔๔) วิธีการอันนี้ค่อนข้างจะยุ่งยากทั้งฝ่ายสูติแพทย์ และวิธีการทำในห้องปฏิบัติการ อีกทั้งผลที่ได้ก็ไม่ชัดเจนทำให้ตัดสินใจยาก

หลังจากที่มีเทคนิคของ DNA/cDNA hybridization และ globin gene mapping เกิดขึ้น สู่ทางของการทำ prenatal diagnosis ของโรคดังกล่าวก็เป็นไปได้ง่ายขึ้นมากเพราะเพียงแต่เจาะเอาน้ำคร่ำมาวิเคราะห์โดยผ่านการทำ amniotic cell culture เพื่อให้ได้ปริมาณของ DNA มากพอ DNA นี้จะเป็นตัวแทนพันธุกรรมของตัวเด็กในครรภ์ เทคนิคอันนี้

มีใช้ทำกันแล้วในระดับของปฏิบัติการวินิจฉัย (๔๕, ๔๖)

Globin gene map ที่ Orkin และเพื่อนร่วมงานของเขาทำครั้งแรกในการวินิจฉัย β-thalassemia ในระยะอยู่ในครรภ์นั้น เขาใช้ Restriction endonuclease ๒ ตัว คือ Eco RI ซึ่งตัด GAATTC และ Hing III ซึ่งตัด AAGCTT; Eco RI จะย่อย DNA ของคนปกติได้ ๔ fragments ที่มี β globin gene sequance เขาพบว่า ๓ ใน ๔ fragments นี้หายไปใน β-thalassemia และ HPFH ถ้าใช้ Hind III จะย่อยปกติได้ ๓ fragment ที่มี globin gene sequence ดังกล่าว และ ๒ fragments ในนี้จะหายไปใน β thalassemia homozygote (๒)

นอกจาก thalassemia แล้ว การทำ prenatal diagnosis ยังเป็นไปได้สำหรับ hemoglobinopathies บางอันด้วย (๔๗) ตัวอย่างเช่น Hb O Arabia (β^{121} glu⟶lys) เกิดจาก mutation ใน DNA sequence จาก GAATTC ไปเป็น AAATTC ซึ่งทำให้ Eco RI ตัดไม่ได้ก็เลยได้ fragment ใหญ่แทน ๒ fragments เล็กตามปกติบน globin gene map หรือโรคของ Sickle cell ซึ่งเกิดจาก Hb S (β^{6} glu⟶val) เป็นการเปลี่ยนแปลงของ GAGGAG ไปเป็น GTGGAG ก็มีโอกาสที่จะทำ prenatal diagnosis ได้เมื่อพบเร็วๆนี้ว่าเอ็นไซม์ Mnl I ซึ่งสกัดได้จาก Moraxella non liquifaciens สามารถตัด nucleotide sequence GAGG ได้ ความหวังสำหรับprenatal diagnosis ของ Sickle cell disease นี้ Kan และ Dozy ได้ทำเป็นผลสำเร็จแล้ว (๔๘)

นับได้ว่าเป็นระยะเวลาเพียงสองปีเท่านั้นที่มีการนำเอาประโยชน์จากผลงานวิจัยขั้นพื้นฐานของ molecular genetics มาใช้อย่างเป็นจริงเป็นจังได้ ในระดับของการแพทย์วินิจฉัย

ความฝันสำหรับอนาคต

ความเจริญก้าวหน้าในด้านการทำ Human gene mapping ได้เป็นไปอย่างรวดเร็วมากในรอบปีที่ผ่านมา เชื่อแน่ว่าในไม่ช้านี้ เราจะเข้าใจถึงพื้นฐานความผิดปกติของการสร้างฮีโมโกลบินอีกหลายๆอย่างที่ยังเหลืออยู่ และถ้าเรามีความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกการทำงานของ globin gene ได้ลึกซึ้งยิ่งขึ้นแล้วก็คงจะหาคำตอบได้ว่าการสร้างโกลบินแต่ละชนิด มีการแทนที่กันได้อย่างไร และด้วยปัจจัยอะไรกระตุ้นในระหว่างการเจริญในช่วงของทารกในครรภ์และหลังคลอด

(Hemoglobin Switching) ตลอดจนในภาวะที่มีการกระตุ้นให้มีการสร้าง fetal hemoglobin อีกในชีวิตหลังทารก จวบจนปัจจุบันนี้เรายังมีความรู้น้อยมากเกี่ยวกับปัจจัยและกลไกที่เกี่ยวข้องในการควบคุมการสับเปลี่ยนการสร้างฮีโมโกลบินชนิดต่างๆ และโดยเฉพาะอย่างยิ่ง $\gamma \rightarrow \beta$ chain switch ได้รับความสนใจเป็นพิเศษ (๔๙) โดยเฉพาะในแง่ที่จะนำมาใช้ประโยชน์กระตุ้น γ-gene ในผู้ใหญ่เพื่อผลในทางคลินิค ตัวอย่างเช่น ถ้าหากเราสามารถจะสร้างภาวะคล้าย HPFH ในคนไข้ Sickle cell disease หรือ β thalassemia ได้แล้ว ก็จะช่วยลดความรุนแรงของอาการในโรคดังกล่าวได้ (๕๐) อันนี้จะนับได้เป็นก้าวใหม่อันหนึ่งในการรักษาโรคของพันธุกรรม

นอกจากนี้ ความสามารถในการแยก globin gene ออกมาเลี้ยงให้บริสุทธิ์ใน bacterial plasmid หรือ erythroleukemia cell ดังได้กล่าวมาแล้ว อาจเป็นช่องทางให้เราได้มีโอกาสที่จะนำไปใส่ให้กับคนไข้ที่ globin gene ขาดหายไปหรือที่ globin gene ไม่ทำงาน ซึ่งถ้ามองตามหลักการแล้วก็ไม่น่าจะเกินขอบเขตของความเป็นไปได้ แต่อย่างไรก็ตาม เรื่องของพันธุกรรมเป็นเรื่องที่มีความสลับซับซ้อนและละเอียดอ่อนมาก ความยากและปัญหาต่าง จะมองข้ามไม่ได้เลย แม้ว่าเขาจะสามารถใส่ globin gene เข้าไปใน genome ของเซลได้หลายชนิด จนกระทั่งทำให้มันสังเคราะห์โกลบินได้ก็ตาม แต่เขาก็ยังต้องเดินทางอีกไกลทีเดียวที่จะก้าวไปถึงขั้นที่จะเรียกว่า Gene Therapy ที่แท้จริง ยกตัวอย่างปัญหาที่เห็นได้ง่ายๆ เช่น globin gene ดังกล่าวจะใส่เข้าไปที่เซลไหน ถ้าท่านรู้จัก hemopoietic cells ก็อาจจะตอบว่า stem cell ไงเล่าเพราะเป็นตัวแม่ของ hemopoietic cell ทั้งปวง แต่จะมีใครบอกได้แน่นอนว่า stem cell อยู่ที่ไหน มีรูปร่างอย่างไร และถึงแม้จะหา stem cell พบและสอดใส่ globin gene ให้ได้จริงแล้ว ก็จะต้องมาเผชิญกับปัญหาในการขจัด hemopoietic cell line ที่ผิดปกติของตัวคนไข้อีกเพื่อให้เหลือเฉพาะ cell line ใหม่ที่แก้ไขแล้ว นี่เป็นเพียงตัวอย่างปัญหาที่คาดคิดกันได้ในขณะนี้เท่านั้นมันยังจะมีปัญหาตามมาอีกมากมายทีเดียวเมื่อลงมือทำกันจริงๆ อย่างไรก็ตามไม่มีใครกล้าพูดได้อย่างเต็มปากว่า ความฝันอันนี้เป็นไปไม่ได้ Inshaallah วันหนึ่งข้างหน้าสิ่งที่เราเรียกว่ายากในวันนี้ อาจจะกลายเป็นง่ายไปได้เมื่อเวลานั้นมาถึง ดังคำกล่าวที่ว่า"What seemed distant to us years ago is now at our threshold".

เอกสารอ้างอิง

1. Kan, Y.W., Dozy, A.M. Varmus,H.E., et al. Deletion of α-globin genes in Haemoglobin-H disease demonstrates multiple α-globin stuctuctural loci, Nature 255: 255, 1975.

2. Orkin, S.H., Alter, B.P., Altay, C., et al, Application of endonuclease mapping to the analysis and prenatal diagnosis of thalassemias caused by globin gene deletion. New Engl. J. Med. 299:166, 1978.

3. Deisseroth, A., Nienhuis, A., Turner, P., et al. Localization of the human α-globin structural gene to chromosome 16 in somatic cell hybrids by molecular hybridization assay. Cell 12: 205, 1977.

4. Deisseroth, A., Nienhuis, A., Lawrence, J., et al. Chromosomal localization of human globin gene on human chromosome 11 in somatic cell hybrids. Proc.Natl. Acad. Sci. 75:1456, 1978.

5. Huisman, T.H.J., Schroeder, W.A., Reese, A., et al. The Tγ-chain of human fetal hemoglobin at birth and in several abnormal hematological conditions. Ped. Res. 11: 1102, 1977.

6. Ricco, G., Mazza, U., Turi, R.M., et al. Significance of a new type of human foetal haemoglobin carrying a replacement isoleucine →threonine at position 75(E 19) of the chain. Hum. Genet. 32: 305, 1976.

7. Saglio, G., Mazza, U., Camascella, C., et al. Composition of the γ-chains of human fetal hemoglobin at birth and during intrauterine life. Acta Haematol. 62:45, 1979.

8. Schroeder, W.A., Huisman,T.H.J.

Efremov, G.D., et al. Further studies of the frequency and significance of the $^{G}\gamma$T-chain of human fetal hemoglobin. J. Clin. Invest. 63:268, 1979.

9. Grifoni, V., Kamuzura, H., Lehmann, H., and Charlesworth, D., A new Hb variant: Hb F Sardinia 75 (E 19) isoleucine-threonine found in a family with Hb G Philadelphia, β-chain deficiency and a Lepore-like haemoglobin indistinguishable from Hb A_2. Acta Haematol. 53:347, 1975.
10. Saglio, G., Ricco, G., Mazza,U., et al. Human T-γ globin chain is a variant of A-γ chain (A-γ Sardinia). Proc. Natl. Acad. Sci. 76:3420, 1979.
11. Little, P.F.R., Flavell, R.A., Kooter, J.M., et al. The structure of the human foetal globin gene locus. Nature 278:227, 1979.
12. Kan, Y.W., Holland, I.P., and Dozy, A.M., et al. Deletion of the β-globin structure gene in hereditary persistance of foetal hemoglobin. Nature 258:162, 1975.
13. Forget, B.G., Hillman, D.G. Lazarus, H.H., et al. Absence of messenger RNA and gene DNA for β-globin chains in hereditary persistence of fetal hemoglobin. Cell 7:323, 1976.
14. Mears, J.G., Ramirez, F., Leibowitz, D., et al. Changes in restricted human cellular DNA fragments containing globin gene sequences in thalassemias and related disorders. Proc. Natl. Acad. Sci. 75:1222, 1978.
15. Weatherall, D.J., Clegg, J.B., The Thalassemia Syndromes, 2nd ed. Oxford Blackwell Scientific Publications 1972, p. 1-374.

16. Teosiri, P., Chaonua, P., Matra-goon, S., et al. Simple determination of hemoglobin A_2 for detection of beta-thalassemia heterozygote. Bull. Chiang Mai Ass. Med. Sci. 10:17, 1977.

17. Aviv, H., and Leder, P., Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidyl acid-cellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. 69 :1408, 1972.

18. Kacian, D.L., Gambino, R., Dow, L.W., et al. Decreased globin messenger RNA in thalassemia detected by molecular hybridization. Proc. Natl. Acad. Sci. 70:1886, 1973.

19. Kacian, D.L., Watson, K.F., Burny, A., and Spiegelman, S., Purification of the DNA polymerase of avian myeloblastosis virus. Biochim. Biophys. Acta 246:365, 1971.

20. Pritchard, J., Longley, J.,Clegg, D.J., and Weatherall, D.J.,Assay of thalassemic messenger RNA in the wheat germ system. Brit. J. Haematol. 32:473, 1976.

21. Forget, B.G., Benz, E.J.JR., Skoultchi. A., et al. Absence of messenger RNA for beta globin chain in β°-thalassemia. Nature 247:379, 1974.

22. Old. J.M., Proudfoot, N.J.,Wood, W.G., et al. Characterization of β globin mRNA in the β° thalassemias. Cell 14:289, 1978.

23. Kan, Y.W., Holland, J.P., Dozy, A.M., and Varmus, H.G., Demonstration of non functional β-globin mRNA in homozygous β°-thalassemia. Proc. Natl.Acad. Sci. 72:5140, 1975.

24. Gambino, R., Kacian, D., O'Donnell, J., et al. A limited number of globin genes in human DNA. Proc. Natl. Acad. Sci.,

71:3966, 1974.

25. Taylor, J.M., Dozy, A., Kan,Y.W. et al. Genetic lesion in homozygous alpha thalassemia (hydrops fetalis) Nature 251:392, 1974.
26. Tolstoshev, P., Mitchell. J., Lanyon, G., et al. Presence of gene for β globin in homozygous βo thalassemia. Nature 259:95, 1976.
27. Nathans, D., and Smith, H.O., Restriction endonuclease in the analysis and restructuring of DNA molecules. Ann. Rev. Biochem. 44:273, 1975.
28. Danna, K.J., Nathan, D., Specific cleavage of simain virus 40 DNA by restriction endonuclease of Hemophilus influenzae. Proc. Natl. Acad. Sci. 68:2913, 1971.
29. Ottolenghi, S., Comi, P., Giglioni, B., et al. δβ-thalassemia is due to a gene deletion. Cell 9:71, 1976.
30. Ramirez, F., O'Donnell, J.V., Marks, P.A., et al. Abnormal or absent beta mRNA in beta^{o} Ferrara and gene deletion in delta beta thalassemia Nuture 263:471, 1976.
31. Comi, P., Giglioni, B.,Barbarano, L., et al. Transcriptional and post-transcriptional defects in β^{o} thalassemia. Eur. Biochem. 79:617, 1977.
32. Chang, J.C., and Kan, Y.W., β^{o} thalassemia, a nonsense mutation in man. Proc. Natl. Acad. Sci. 76:2886, 1979.
33. Phillips III, J.A., Vik, T.A., Scott, A.F., et al. Unequal crossing over: A common basis of single globin genes in Asians and American Blacks with Hemoglobin-H Disease. Blood: 55:1066, 1980.
34. Kan, Y.W., Dozy A.M., Trecartin, R., Todd, D., Identification of

a non deletion defect in α-thalassemia. New Engl. J. Med. 297:1081, 1977.

35. Embury, S.H., Lebo, R.V., Dozy, A.M., and Kan, Y.W., Organization of the α-globin genes in the Chinese α-thalassemia syndromes. J. Clin. Invest. 63:1307, 1979.
36. Orkin, S.H., Old, J. Lazarus, H., et al. The molecular basis of α-thalassemias: Frequent occurrence of dysfunctional α loci among non-Asian with Hb H disease. Cell 17:33, 1979.
37. Leder, P. Discontinous genes. New Engl. J. Med. 298:1079,1978.
38. Wilson, J.T., Forget, B.G.,Wilson, L.B., and Weissman, S.M., Human globin messenger RNA: Importance of cloning for structural analy sis. Sci. 196:200, 1977.
39. Wilson, J.T., Wilson, L.B., De Tiel, J.K., et al. Insertion of synthetic copies of human globin genes into bacterial plasmids. Nucl. Acids Res. 5:563, 1978.
40. Deisseroth, A., Hendrick, D., Human alpha globin gene expression following chromosomal dependent gene transfer into mouse erythroleukemia cells. Cell 15:55, 1978.
41. Orkin, S.H., Kolookner, R., Michelson, A., and Husson, T., Cloning and direct examination of a structurally abnormal human β o-thalassemia globin gene. Proc. Natl. Acad. Sci. 77:3558, 1980.
42. Deisseroth, A,. Bode, U.,Lebo, R., et al. Isolation of hybrid cell clones that contain deletion and non-deletion defects of alpha-thalassemia in man. Blood 55: 992, 1980.
43. Kan, Y.W., Golbus, M.S., Trecartin, R., et al. Prenatal diagnosis of homozygous

β-thalassemia. Lancet 2:790, 1975.

44. Alter, B.P., Friedman, S., Hobbins, J.C., et al. Prenatal diagnosis of sickle cell anemia and alpha G-Philadelphia. New Engl. J. Med. 294:1040, 1976.

45. Koenig, H.M., Commander (MC) U.S.N., Vedvick, T.S., et al. Prenatal diagnosis of hemoglobin H disease. J. Ped. 92:278, 1978.

46. Kan, Y.W., Golbus, M.S., and Dozy, A.M., Prenatal diagnosis of α-thalassemia, clinical application of molecular hybridization. New Engl. J. Med. 295: 1165, 1976.

47. Little, P.F.R., Whitelaw, A.G., Williamson, A.R., et al. The detection and use of hemoglobin mutants in the direct analysis of human globin genes. Blood 55:1060, 1980.

48. Kan, Y.W., and Dozy, A.M., Polymorphism of DNA sequence adjacent to the human β-globin structural gene, its relation to the sickle mutation. Proc. Natl. Acad. Sci. 75:5631, 1978.

49. Nienhuis, A.W., and Stamatoyannapoulos, G., Hemoglobin Switching. Cell 15:307, 1978.

50. May, A., The mechanism and prevention of sickling. Brit. Med. Bull. 32:223, 1976.

อภินันทนาการ

จาก

บริษัท บางกอกโนเวลตี จำกัด

๑๐๕ ถนนราชดำริ กรุงเทพมหานคร

ผู้แทนจำหน่าย

- เคมีภัณฑ์ สำหรับใช้ในห้องทดลอง และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ทุกชนิด
- น้ำยาเคมีภัณฑ์ ทำความสอาดพื้น-เบาะ-ห้องน้ำ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ จากประเทศเยอรมันนี

ขอขอบคุณที่ท่านได้อุดหนุนบริษัทด้วยดีตลอดมา

โทร. ๒๕๒๕๗๔๐, ๒๕๒๒๕๑๙

วารสารเภสัชกรรมแพทย์ เชียงใหม่
Bulletin of Chiang Mai Associated Medical Science

Vol. 13 No. 3
September 1980

ผลของสารสกัดจากมะระจีนต่อการรวมตัวของ ^{3}H thymidine เข้าไปใน DNA ของ Bacillus subtilis

บุญยืน สาริกะภูติ, Ph.D.*
นฤมล วิสารทะ, M.Sc.
และ วิชัย วงค์ไชย, Ph.D.*

บทคัดย่อ

มะระจีนมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า Momordica charantia ได้เคยมีผู้ศึกษาว่ามะระขี้นกมีสมบัติฆ่าเชื้อบักเตรีได้ แต่สำหรับมะระจีนยังมิได้มีผู้ศึกษา ในรายงานนี้แสดงผลของสารที่สกัดได้จากมะระจีนที่มีต่อการรวมตัวของ ^{3}H thymidine เข้าสู่ DNA ของ Bacillus subtilis ผลปรากฏว่าสารสกัดจากมะระจีนข้น 1, 0.5 และ 0.25 มก./มล. สามารถยับยั้งการรวมตัวคิดเป็นร้อยละของการยับยั้งได้เท่ากับ 11.4, 5.9 และ 4.6% ตามลำดับ การทดลองนี้ยืนยันให้เห็นจริงว่าสารสกัดจากมะระจีนยับยั้งการเจริญเติบโตของบักเตรีได้เช่นเดียวกับแอคติโนมัยซินดี และแอมพิซิลิน

บทนำ

มะระจีนเป็นพืชในตระกูล Momordica มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า Momordica charantia มะระขี้นกเป็นพืชในตระกูลเดียวกัน ซึ่งมีสมบัติฆ่าบักเตรีได้ และยับยั้งการเจริญเติบโตของ B. subtilis, S. aureus, E. coli, P. aeruginosa, S. dysenteriae และ S. typhi (Disyaboot, 1975) มีผู้นำมะระขี้นกมาปรุงยารักษาโรคผิวหนังและยาเขียวแก้ไข้ ซึ่งเป็นยาพื้นบ้านที่ใช้กันอยู่โดยทั่วไป

Thacker และคณะ (1962) ได้ศึกษาส่วนประกอบต่าง ๆ ในมะระขี้นก และพบว่าในผลของมะระขี้นก มีน้ำ 83.2% โปรตีน 2.9% ไขมัน 1% คาร์โบไฮเดรต 9.8% ไฟเบอร์ 1.7% แร่ธาตุต่าง ๆ 1.4% คัลเซี่ยม 0.05% ฟอสฟอรัส 0.14% เหล็ก 0.0094% คาโรตีน 210 หน่วยสากล (international unit, IU) ไธอามีน 0.000072% กรดนิโคตินิค 0.0005% ไรโบฟลาวิน 0.00009% กรดแอสคอร์บิคหรือไวตามินซี 0.088% โปตัสเซียม 0.28% ทองแดงมีเล็กน้อย ชาแรนติน (Charantin) มี 0.15% (Lotlikar และ Rao, 1963)

Thacker และคณะ (1962) พบว่าในเมล็ดของมะระมีน้ำมันกึ่งแห้ง 26.5% และ unsaponifying matter 0.7%

Francisco (1945) พบว่าในใบมะระ

* ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

มีอัลคาลอยด์ 0.008%, light coloured oil 0.16%, resin 0.11%

Airan และคณะ (1950) พบว่าในรากมะระที่แห้งให้ขี้เถ้าจากรากและผลประกอบด้วยเหล็ก ฟอสฟอรัส และคัลเซี่ยม

ส่วนประกอบที่สำคัญในมะระคือซาแรนติน ซึ่งเป็นสารลดระดับน้ำตาล (Lotlikar และ Rao, 1963) Sucrow (1963) เสนอว่าซาแรนตินน่าจะประกอบด้วย Beta-sitosterol glycoside และ 5,25 stigmastadien -3 beta-ol glycoside ด้วยปริมาณเท่ากัน การที่จะนำมะระมารักษาโรคเบาหวานนั้น เป็นเรื่องที่ต้องศึกษากันต่อไป

ส่วนประกอบต่าง ๆ ในมะระจีนยังไม่มีผู้รายงานไว้แต่คาดว่าน่าจะใกล้เคียงกับมะระขี้นก สารสกัดจากมะระจีนคาดว่าจะมีสมบัติคล้ายคลึงกับมะระขี้นก คือยับยั้งการเจริญเติบโตของบักเตรีได้ จากการทดลองโดยใช้ filtered disc diffusion method พบว่าสารสกัดจากมะระนี้ฆ่าเชื้อบักเตรีได้ และเชื่อว่ากลไกในการต้านเชื้อเกิดจากการเปลี่ยนแปลงการซึมเข้าไปในเซลล์ซึ่งเป็นผลให้เซลล์แตกตัว (นฤมล วิสารทะ และ มาลิน อังสุรังษี 1979)

สำหรับรายงานนี้มีจุดประสงค์เพื่อยืนยันให้เห็นว่า มะระจีนมีสารซึ่งยับยั้งการเจริญเติบโตของบักเตรีโดยดูจาก การที่สารสกัดจากมะระจีนขัดขวางการรวมตัวของ ^{3}H thymidine เข้าสู่ DNA ใน B. subtilis

วัสดุและวิธีการ

วิธีสกัดสารออกจากมะระจีนโดยใช้แอลกอฮอล์

ผลมะระจีนซื้อจากตลาด มีลักษณะเขียวสด นำมาล้างให้สะอาด ผ่าเอาเมล็ดออกแล้วนำมาสับให้ละเอียด อบให้แห้งในตู้อบ40° ถึง 50°ซ. หลังจากนั้นนำมาปั่นให้เป็นผงโดยใช้เครื่องบดไฟฟ้า การสกัดสารในมะระจีนทำตามวิธีของ Claniyi (1975) แต่ดัดแปลงเล็กน้อย โดยใช้ผงป่นของมะระจีน 600 กรัม มาสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ในเครื่องสกัดแบบซ็อกเลต 40° - 60°ซ. นำส่วนที่สกัดได้ด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์มาทำให้แห้งโดยการลดความดันแล้วนำส่วนที่แห้งนี้มาสกัดด้วยเมธานอลที่ 70°ซ. ในเครื่องสกัดแบบซ็อกเลตแล้วไปทำให้ข้นโดยการลดความดันต่อไปสกัดด้วย 95% เอธานอลประมาณ 100 มิลลิลิตร ทำให้เป็นด่างด้วยสารละลายอิ่มตัวของ KOH ในแอลกอฮอล์ pH9 เก็บผลที่ได้ใส่ไว้ในตู้เย็นอย่างน้อย 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ หลังจากนั้นเทเอาของเหลวใสส่วนบนออกมาทำให้แห้งภายใต้ความดันต่ำ ซึ่งจะไล่แอลกอฮอล์ออกไปจนหมด

บักเตรี

บักเตรีที่ใช้คือ Bacillus subtilis ATCC 6633 ได้รับความเอื้อเฟื้อจากกระทรวงสาธารณสุข

^{3}H-thymidine (^{3}H TdR)

^{3}H thymidine ผลิตภัณฑ์ของ Radiochemical Centre, Amersham, Buckinghamshire, England

การรวมตัวของ ^{3}H thymidine เข้าสู่บักเตรี

การรวมตัวของ ^{3}H thymidine เข้าสู่ DNA บักเตรีทำตามวิธีของ Bodmer และ Grether (1965) การเตรียม DNA ทำโดยวิธีของ Fangman และ Novick (1966) นำเอาเชื้อ

ของ B. subtilis ATCC 6633 ซึ่งอยู่ในระยะ log phase จำนวน 500 มิลลิลิตร มาปั่นแยกด้วยแรงเหวี่ยงใช้ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ก้อนตะกอนที่ได้นำไปทำสารละลายแขวนลอยใหม่ใน nutrient broth ซึ่งเติม 0.1% อัลบูมินซีรั่มวัว และ 20% ซูโครสลงไปจำนวนเซลล์มีประมาณ 7 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำสารละลายแขวนลอยของเซลล์มาแบ่งเป็น 20 ส่วน ๆ ละ 10 มิลลิลิตร การทดลองทำเป็นคู่ใช้ 2 ส่วนเป็น control คือไม่เติมสารใดลงไป 6 ส่วนนำมาทดลองโดยเติมสารสกัดจากมะระจีนลงไปให้มีความเข้มข้น 1, 0.5 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อีก 6 ส่วนนำมาเติมแอมพิซิลิน (บริษัทดูเมกซ์) ให้ความเข้มข้น 1, 0.5 และ 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และอีก 6 ส่วนนำมาเติมแอคติโนมัยซินดี (Calbiochem, La.Jolla, Cal. U.S.A.) ให้ความเข้มข้น 1, 0.5 และ 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ หลังจากนั้น 30 นาที จึงเติม ^3H thymidine ลงไป 0.5 ไมโครคูรีทุกหลอด รวมทั้งหลอดที่เป็น control ด้วยการเติมสารต่าง ๆ รวมทั้ง ^3H thymidine ทำด้วยวิธีปลอดเชื้อนำหลอดทั้งหมดไปเขย่าที่ 37°ซ. เป็นเวลา 19 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำ broth culture ไปปั่นแยกด้วยแรงเหวี่ยงใช้ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที แยกเอาน้ำใสส่วนบนนำไปวัดกัมมันตภาพรังสีเพื่อดูปริมาณ ^3H thymidine ที่เหลือจากการรวมตัว ส่วนเซลล์ที่อยู่ในก้อนตะกอนนำมาสกัดเอา DNA ออกมาโดยเติมสารละลายเกลือแกงข้น 0.15 โมลาร์ 5 มิลลิลิตร ใน 0.1 โมลาร์ EDTA, pH8 เขย่าเซลล์ให้เข้ากันกับสารละลายเกลือแกง เป็นเวลา 2 นาที แล้วเติม 10% กรดไตรคลอโรอะซิติคแช่เย็น 10 มิลลิลิตร เขย่าแล้วแช่แข็งที่ -20° ซ. เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที ปั่นแยกด้วยแรงเหวี่ยงใช้ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งส่วนที่เป็นน้ำใสส่วนบน นำตะกอนมาล้าง 2 ครั้งด้วยอะซิโตนแช่เย็น 4 มิลลิลิตร อบตะกอนให้แห้งในตู้อบ 80°ซ. เป็นเวลา 30 นาที แล้วแช่ให้เย็นลงถึงอุณหภูมิของห้อง นำตะกอนนี้ไปละลายในบัฟเฟอร์ยูเรียฟอสเฟต pH 7.2 หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิของห้องเป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง นำสารละลายไปใส่ขวด วัดกัมมันตภาพรังสีเติมน้ำยาสำหรับการตรวจนับลงไป ล้างหลอดที่ใส่สารละลายด้วยน้ำยาสำหรับการตรวจนับ 2 ครั้ง เพื่อให้แน่ใจว่ากัมมันตภาพรังสีลงมาอยู่ในขวดทั้งหมด ปริมาณของน้ำยาสำหรับการตรวจนับรวมทั้งหมด 5 มิลลิลิตร วัดกัมมันตภาพรังสีด้วยเครื่องมือ Packard Tri-Carb Scintillation Spectrometer Model 3320 ประสิทธิภาพของการวัด ^3H เท่ากับ 10% การวัดทำเป็นคู่ การรวมตัวของ ^3H thymidine ใน DNA ของ B. subtilis วัดเป็นจำนวนนับต่อนาที (count per minute, cpm)

การเตรียมบัฟเฟอร์ยูเรียฟอสเฟต pH 7.2 ใช้ 0.0026 โมลาร์ Na_2HPO_4, pH 7.2 หรือ 0.7691 กรัม ของ Na_2HPO_4 ละลายในยูเรีย 8 โมลาร์ จำนวน 1 ลิตร แล้วปรับ pH ให้เป็น 7.2 ด้วย 10%

การเตรียมสารละลาย 8 โมลาร์ยูเรียใช้ยูเรีย 480.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร แล้วเติม 2-mercaptoethanol (East-

ดี ซึ่งทราบกันดีว่าขัดขวางการสังเคราะห์ DNA โตของบักเตรีได้เช่นเดียวกับมะระขี้นก การที่

man Kodak Co.) 3.5 มิลลิลิตร กรองสารผสมทั้งหมดด้วย Whatman filter paper No. 2 แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปให้ครบ 1 ลิตร

การเตรียมน้ำยาสำหรับการตรวจนับใช้ PPO (Packard) 5.5 กรัม, POPOP (Packard) 0.1 กรัม, Triton X-100 (Packard) 333 มิลลิลิตร แล้วเติมโทลูอิน (Fisher Scientific Co.) 667 มิลลิลิตร (ปริมาตรของเหลวทั้งหมดเป็น 1 ลิตร) เขย่าให้ของผสมเหล่านี้ละลายเข้าด้วยกัน

ผลการทดลอง

จำนวน ^{3}H TdR ที่ใส่ลงไปในแต่ละหลอด เมื่อวัดได้ 126, 181 cpm ซึ่งคิดเป็น 100% ในหลอดที่เป็น control ซึ่งไม่ใส่สารที่เป็นตัวขัดขวางลงไป การรวมตัว วัดได้ 11,697 cpm ซึ่งการรวมตัวเท่ากับ 93% เมื่อใส่สารสกัดจากมะระจีนลงไป 10, 5 และ 2.5 มิลลิกรัม ปรากฏว่าการรวมตัวเป็น 10,362, 11,010 และ 11,160 cpm ซึ่งการรวมตัวเท่ากับ 8.2, 8.7 และ 8.9% และการขัดขวางเท่ากับ 11.4, 5.2 และ 4.6% ตามลำดับ จากผลนี้แสดงให้เห็นว่าสารที่สกัดได้จากมะระจีนลดการรวมตัวของ ^{3}H TdR เข้าสู่ DNA ของ B. subtilis ดังนั้นมะระจีนจึงมีผลช่วยลดการเจริญเติบโตของบักเตรี

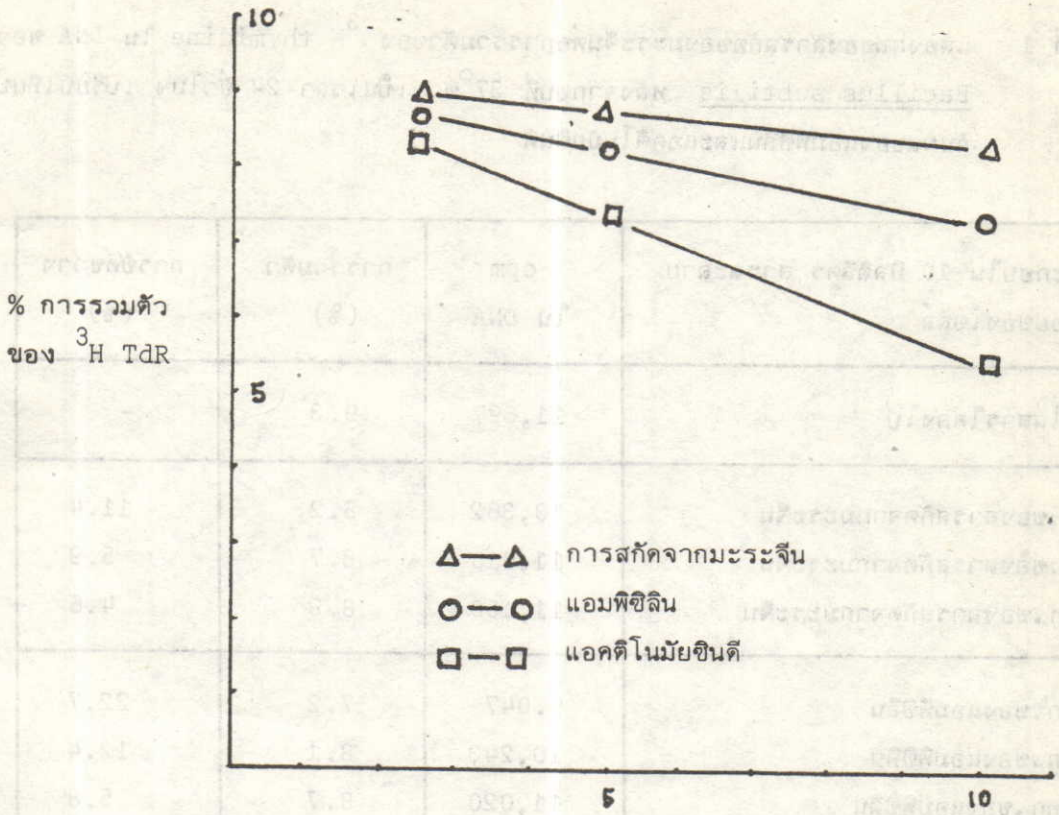
นอกจากนี้ยังได้นำยาแอมพิซิลินซึ่งเป็นยาที่ขัดขวางการเจริญเติบโตของบักเตรีโดยขัดขวางการสร้างผนังเซลล์ (Martin, 1963) มาใส่ในหลอด 10, 5 และ 2.5 ไมโครกรัม ปรากฏว่าการรวมตัวเป็น 9,047, 10,243 และ 11,020 cpm ซึ่งการรวมตัวเท่ากับ 7.2, 8.1 และ 8.7% และการขัดขวางเท่ากับ 22.7, 12.4 และ 5.8% ตามลำดับ

แอคติโนมัยซินดี ซึ่งเป็นยาที่ขัดขวางการสร้าง DNA ในบักเตรี (Kirk, 1960) ได้นำมาทดลองใส่ในหลอด 10, 5 และ 2.5 ไมโครกรัม เช่นเดียวกันปรากฏว่าการรวมตัวเป็น 6,520, 9,227 และ 10,551 cpm ซึ่งคิดเป็นการรวมตัวเท่ากับ 5.2, 7.3 และ 8.4% และการขัดขวางเท่ากับ 44.3, 21.1 และ 9.8% ตามลำดับ (ดูตารางที่ 1) เมื่อเขียนกราฟระหว่างเปอร์เซนต์การรวมตัวของ ^{3}H TdR กับปริมาณสารที่สกัดได้จากมะระจีนคิดเป็นมิลลิกรัม ได้กราฟเป็นเส้นตรงแสดงว่าการขัดขวางการเจริญเติบโตของบักเตรีเป็นอัตราส่วนกับความเข้มข้นของสาร ทำนองเดียวกันเมื่อเขียนกราฟจำนวนไมโครกรัมของแอมพิซิลิน และแอคติโนมัยซินดีกับเปอร์เซ็นต์การรวมตัวของ ^{3}H TdR ได้กราฟเป็นเส้นตรง (ดูรูปที่ 1)

บทวิจารณ์

การที่เลือก B. subtilis ซึ่งเป็น gram positive bacteria มาทำการทดลองนั้นเพราะการทดลองในเบื้องต้นแสดงให้เห็นว่า B. subtilis ไวต่อสารสกัดจากมะระจีนได้ดีกว่าบักเตรีอื่น ๆ ทั้งนี้โดยใช้ filtered disc diffusion method

จากการทดลองนี้การรวมตัวของ ^{3}H thymidine เข้าสู่ DNA ของ B. subtilis มีค่าเท่ากับ 9.3% ซึ่งสอดคล้องกับผลของ Bodmer และ Grether (1965) สารที่สกัดได้จากมะระจีน ขัดขวางการรวมตัวมากขึ้นตามความเข้มข้นของสารที่เติมลงไป ซึ่งเป็นการช่วยยืนยัน



รูปที่ 1 แสดงผลของสารสกัดจากมะระจีน, แอมพิซิลิน และแอคติโนมัยซินดีต่อการรวมตัวของ ^{3}H TdR เข้าใน DNA ของ B. subtilis หลังจากอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ 37°ซ.

และสนับสนุนการทดลองเบื้องต้น โดยใช้ filter disc diffusion method ที่แสดงว่าสารสกัดจากมะระจีนยับยั้งการเจริญเติบโตของบักเตรี

แอมพิซิลินซึ่งเป็นสารที่ขัดขวางการเจริญเติบโตของบักเตรี โดยขัดขวางการสร้างผนังเซลล์ สามารถลดการรวมตัวของ ^{3}H thymidine เข้าสู่ B. subtilis ได้เช่นเดียวกัน ทั้งนี้เพราะเมื่อเซลล์ไม่เจริญเติบโต การสังเคราะห์ DNA ย่อมลดลงด้วย ส่วนแอคติโนมัยซินดี ซึ่งทราบกันดีว่าขัดขวางการสังเคราะห์ DNA ในบักเตรีลดการรวมตัวของ ^{3}H thymidine เข้าสู่ DNA ในบักเตรีได้มากกว่าแอมพิซิลิน จากผลการทดลองจะเห็นว่าแอคติโนมัยซินดี เมื่อใส่ลงไป 10 ไมโครกรัม ขัดขวางการรวมตัวได้ถึง 44.3% ส่วนแอมพิซิลินเมื่อใส่ลงไป 10 ไมโครกรัม ขัดขวางการรวมตัวได้เพียง 22.7% สำหรับความเข้มข้นที่ต่ำกว่านี้ ยาแอคติโนมัยซินดี คงขัดขวางการรวมตัวได้ดีกว่าแอมพิซิลิน

สารสกัดจากมะระจีนยับยั้งการเจริญเติบโตของบักเตรีได้เช่นเดียวกับมะระขี้นก การที่

ตารางที่ 1 แสดงผลของสารสกัดของมะระจีนต่อการรวมตัวของ ^{3}H thymidine ใน DNA ของ Bacillus subtilis หลังจากอบที่ 37°ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับผลของแอมพิซิลินและแอคติโนมัยซินดี

ส่วนประกอบใน 10 มิลลิลิตร สารละลายแขวนลอยของเซลล์	cpm ใน DNA	การรวมตัว (%)	การขัดขวาง (%)
เมื่อไม่ใส่สารใดลงไป	11,697	9.3	-
10 มก.ของสารสกัดจากมะระจีน	10,362	8.2	11.4
5 มก.ของสารสกัดจากมะระจีน	11,010	8.7	5.9
2.5 มก.ของสารสกัดจากมะระจีน	11,160	8.9	4.6
10 มคก.ของแอมพิซิลิน	9.047	7.2	22.7
5 มคก.ของแอมพิซิลิน	10,243	8.1	12.4
2.5 มคก.ของแอมพิซิลิน	11,020	8.7	5.8
10 มคก.ของแอคติโนมัยซินดี	6,520	5.2	44.3
5 มคก.ของแอคติโนมัยซินดี	9,227	7.3	21.1
2.5 มคก.ของแอคติโนมัยซินดี	10,551	8.4	9.8

สารสกัดจากมะระจีนขัดขวางการรวมตัวของ ^{3}H thymidine เข้าสู่ DNA ใน B.subtilis ช่วยยืนยันให้เห็นชัดเจนว่าสารสกัดในมะระจีนยับยั้งการเจริญเติบโตของบักเตรีได้จริง สารในมะระจีนจะขัดขวางการเจริญเติบโตของบักเตรีโดยขัดขวางการสร้าง DNA หรือการสร้างผนังเซลล์นั้น เป็นเรื่องที่ต้องศึกษาต่อไป

อนึ่ง สารที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของบักเตรีในมะระจีนจะเป็นสารใดและกลไกการต้านเชื้อจะเกิดจากการที่สารสกัดไปทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการซึมเข้าไปในเซลล์ และทำให้เซลล์แตกตัวหรือไม่นั้น เป็นเรื่องที่ต้องศึกษาต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Airan, J.W., et al. Carilla Seed Oil Gel, J. Uni. Bombay., 18, Sect, A. Sci. No. 27, 1950 : Chem. Abstr. 48, 10355, 1954.

2. Bodmer, W.F. and Grether. S., Uptake and incorporation of thymine, thymidine, uracil, uridine and 5-fluorouracil into the nucleic acids of B.subtilis, J. Bacteriol. 89 : 1011, 1965.
3. Claniyi A.A., A neutral constituent of Monoridca footida, Iloydia, 38, 361, 1975.
4. Disyaboot, P., Screening of antibacterial properties in certain Thai medicinal plants., A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for the degree of Master of Science in Pharmacy, Department of Pharmacognosy, Chulalongkorn University, 1975.
5. Fangman, W.L. and Novick, A., Mutant bacteria showing efficient utilization of thymidine, J. Bacteriol., 91, 2390, 1966.
6. Francisco, V.S. : Additional note on the antimalarial Cundeamor, Rev. Farm. (Buenos), Chem. Abstr., 39 : 2623, 1945.
7. Kirk, J.W. : The mode of action of actinomycin D, Biochem. Biophy. Acta., 42, 167, 1960.
8. Lotlikar, M.M. and RAO, M.R.R.: Note on hypoglycemic principle isolate from the fruits of Momordica charantia L., J.Uni. Bombay, 29 : 233, 1961, Chem. Abstr., 58 : 9537, 1963.
9. Martin, H.H., Bacterial protoplasts, A review, J.Theoret. Biol, 5, 1, 1963.
10. นฤมล วิสารทะ และ มาลิน อังสุรังษี "ฤทธิและกลไกการต้านเชื้อบักเตรีของสารสกัดจากมะระขี้นก" บทคัดย่อจากการประชุมวิชาการ 2522 โดยสมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์ ร่วมกับสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ บางแสน บริษัทสารมวลชนจำกัด กรุงเทพฯ. 81, 2522.
11. Sucrow, W., Uber Steringlucoside undien neues Stigmastadienol aus Momordica Charantia., Tetrahedron. Lett., 26 : 2217, 1965.
12. Thacker, M.S., et al. Momordica Linn (Cucurbitaceae), The Wealth of India, VI. L-M, 408, 1962.
12. Watt and BrandWij, B., Momordica Charantia L., Cucurbitaceal, Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa., 2, 363, 1962.

Abstract

Effect of the Extract from Mara Chean on the Incorporation of ^{3}H-Thymidine (^{3}H-TdR) into DNA of Bacillus subtilis

Boonyun Sarikabhuti, Ph.D.*
Narumole Visarata, M.Sc.
Vichai Wongchai, Ph.D.*

Mara chean is the plant in Genus Momordica. The scientific name is Momordica charantia. Momordica plants are herbaceous climbing with simple and forked tendrils. The unripe fruit is green. Momordica charantia has been studied for medical use. The antimicrobial action of M.Charantia was supported by many workers. This report aims to study the effect of the extract from the big unripe fruit of M. charantia on the incorporation of ^{3}H thymidine (^{3}H-TdR) into DNA of Bacillus subtilis. The results showed that the addition of M. charantia extract to a final concentration of 1, 0.5 and 0.25 mg/ml. inhibited the incorporation 11.4, 5.9 and 4.6% respectively. The extract decreased the incorporation nearly to the same extent as ampicillin and adtinomycin D.

* Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University.

ย่อและรีวิวเอกสาร

The Raji Cells Radioimmune Assay for Detecting Immune Complexes in Human sera

Argyrios N. theofilopoulos, Custis B.Wilson, and Frank J.Dixon. J.Clin Invest 57:169-182, 1976

เป็นวิธีการที่ง่ายและมี sensitivity สูง ในการตรวจและหาปริมาณ circulating immune complex (CIC) ใน serum ของผู้ป่วย อาศัย Raji cells ซึ่งเป็น Lymphoblastoid cell line ที่ culture จากผู้ป่วย Burkitt's lymphoma cell นี้มี receptors สำหรับ IgG Fe, C3b, C3d และ C-proteins อื่นๆ สามารถ bind กับ 7S LgG และ aggregated human IgG (AHG)โดยพบว่า AHG และ 7S LgG จับกัน cell ที่ IgG Fe receptor แต่ถ้า AHG ที่มี C- จับอยู่ก่อนแล้ว จะ bind กับ cell โดยใช้ C-receptor การทดลองแบบ in vitro โดยใช้ AHG เป็น model วัดปริมาณการ uptake บน cell โดยใช้ ^{125}I-antihuman IgG พบว่ามี sensitivity 6 ug AHG/ml serum ความสามารถในการ uptake จะมากน้อยขึ้นกับปริมาณของ ^{125}I- antihuman IgG, ขนาดของ aggregates และปริมาณของ free complement ใน serum ที่มากเกินไป inhibit การ uptake ของ complement fixed AHG การหาปริมาณ CIC ใน serum ของผู้ป่วยมีวิธีการเช่นกันคือ incubate serum กับ Rajicells จากนั้นย้อมกับด้วย ^{125}I-antihuman IgG แล้ว count หาปริมาณรังสีบนผิว cells นำผลที่ได้เทียบกับ Standard curve ซึ่งสร้างจากการวัดปริมาณรังสีบนผิว cells เมื่อ incubate cell กับ sera ที่มี AHG รวมอยู่ในปริมาณต่างๆ วิธีการนี้ใช้ตรวจหาปริมาณ CIC ในผู้ป่วยด้วยโรค serum hepatitis, SLE, vasculitis, DHF, Malignancies และ subacute sclerosing ข้อเสียสำหรับวิธีการนี้คือ ไม่สามารถหลีกเลี่ยง positive reaction ที่เกิดจาก 7S IgG ที่มีอยู่ใน serum ไปจับบน IgG Fc receptor ได้ ซึ่งก็กำลังมีการศึกษาถึงวิธีการนี้อยู่

ปริยานาถ วงศ์จันทร์ วท.บ

Precipitin Reaction of the C1q Component of Complement with Aggregated γ-Globulin and Immune Complexes in Gel diffusion

Agnello, V., R.J. Winchester, and H.G. Kunkel Immunology 19:909-919, 1970

อาศัยคุณสมบัติของ aggregated human gG (AHG) และ circulating Immune complexes (CIC) ที่สามารถจับกับ C1q compoment และทำให้เกิด precipitin line โดยวิธี Gel diffusion จากการทดลองโดยใช้ AHG และ C1q component พบว่า optimal condition เป็น0.6% agarose ใน 0.01 MEDTA, pH 7.2 และ ionic strength 0.9 แต่สำหรับ CIC ใน serum จะมี optimal pH ที่ 8.6 condition อื่นคงเดิม วิธีการนี้ใช้ตรวจและหาปริ-

มาณ immune complex ได้จาก serum ผู้ป่วย SLE และ joint fluid ของผู้ป่วย Rheumatoid Arthritis ซึ่งมี complement ระดับต่ำ. Reduction และ Alkylation ของ aggregates หรือ complexes จะลดความสามารถในการทำให้เกิด Precipitin Reaction.

ปริยานาถ วงศ์จันทร์ วท.บ

Detection of circulating soluble immune complexes in Patient with various renal diseases

W.D. Stuhtinger, P.J. Verroust & Liliane Morel - Maroger
Immunology 30:43-47, 1976.

Circulating Immune complex (CIC) มีคุณสมบัติในการยับยั้งและลดการ uptake ของ guinea pig peritoneal Macrophase ที่มีต่อ Aggregated nyman IgG การทดลองใน Polystyrene tube ที่ coat ด้วย Fetal calf serum เพื่อลด non-specific binding ของ ^{125}I-AHG โดย incubate IC ของ numan serum albumin (HSA) - anti HSA กับ Macrophage ที่ induced โดยฉีด sterile paraffin oil เข้าใน peritoneal cavity ของ guinea pig แล้ว incubate ต่อด้วย ^{125}I-AHG วัด uptake inhibition โดยนำ count ทั้งหมด ไป count หาปริมาณรังสี แล้วนำไปคำนวณหา percent uptake inhibition เทียบกับ Maximum uptake ของ Macropnage ในภาวะที่ไม่มี immune complex อยู่ พบว่าสามารถหาปริมาณของ HSA-anti HSA ได้ถึง 40 mg. โดยใช้วิธีการนี้และนำไปใช้ได้กับการหาปริมาณ immune complexes ใน serum ผู้ป่วยด้วยโรคทาง glomerulonephritis ชนิดต่างๆ เช่น membranous GN ฯลฯ นอกจากนี้ยังมีโรคอื่น เช่น SLE, NS.

ปริยานาถ วงศ์จันทร์ วท.บ

Eosinophilic leukemia : Morphological, cytochemical and electron microscope studies

Presentey B. และคณะ J.Clin Patnol 32+3 (261-271) 1979

ในการนำบัดเลือดขาวชนิด Eosinophil ของคนไข้ที่เป็น eosinophilic - leukemia มาศึกษาโดยวิธีดู morphology และวิธีทาง cytochemistry รวมทั้งหมด ๑๓ วิธี โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ ทั้งชนิดธรรมดา และ electron microscope โดย eosinophil ได้มาจากไตกระดูก และที่ circulate อยู่ในกระแสโลหิต พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงทั้งทางด้าน morphology และทาง chemical ในทาง morphology พบว่าการแก่ตัวของ nucleus และ cytoplasm ไม่เป็นไปด้วยกัน ขนาดของ specific granules เปลี่ยนไป และมีจำนวนน้อยลง จนบางเซลมี granule เหลืออยู่เพียง ๒-๓ เม็ดเท่านั้น ส่วนการเปลี่ยนแปลงทางเคมีพบว่า เมื่อย้อม PAS จะให้ผลบวกชัดเจนมาก แสดงว่าในเซลมีจำนวน glyeogan มากในขณะเดียวกัน ปฏิกริยาของ acid phosphatase ก็ให้ผล

บวกมากด้วย รวมทั้งมีการตรวจหา aryl sulfatase และ coenzyme Q ทั้งนี้ได้มีการ confirm โดยใช้ electron microscope ก็พบว่าให้ผลเช่นเดียวกับปฏิกริยาทางเคมี คือ ภายในเซลล์มี glycogum และ acid phosphatase สูง ส่วนปฏิกริยา Peroxidase นั้น การตรวจด้วย electron microscope พบว่าเป็นไปตามปกติของเซลล์เมื่อมี maturation.

มาลินี เชาวพันธ์ วท.บ

Spectrophotometric Measurement of Carboxyhemoglobin and Methemoglobin in Blood

Rodkey F.L., Hill T.A., Pitts L.L. and Robertson R.F. Clin. Chem 25/8 1388-1393 (1979)

กรรทดลองนี้ได้กล่าวถึงการวัดปริมาณของ carboxyhemoglobin (COHb) และ methemoglobin (Met Hb) ในเลือดโดยใช้ spectrophotometer และด้วยเลือดที่เจือจางได้ถึงประมาณ ๑,๐๐๐ เท่า

ในการหาปริมาณ COHb นั้น diluent ประกอบด้วย sodium hydrosulfite ซึ่งจะทำให้เกิด 2 component system คือ COHb และ Hb แล้ววัด absorbance ที่ 420 และ 432 nm. โดย sodium hydrosulfite จะป้องกันไม่ให้ O_2 ไปทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ COHb สำหรับ Met Hb ใน diluent ประกอบด้วย KCN และ CO เพื่อให้เกิด 2 component system คือ COHb และ CN Met Hb แล้ววัด absorbance ที่ 420 nm.ก่อนและหลังการเติม sodium hydrosulfite ในเลือดที่มี cyanide และ nitrite ก็สามารถนำมาหาค่าที่แน่นอนของ total Met Hb ที่มีอยู่ได้ ในการทำแต่ละครั้งใช้เลือดประมาณ 3 ML เท่านั้น และผลที่ได้จากวิธีนี้เป็นที่ยอมรับ เมื่อทำเปรียบเทียบกับวิธีอื่น ซึ่งใช้ปริมาณเลือดมากกว่าและวิธีทำยุ่งยากกว่า.

มาลินี เชาวพันธ์ วท.บ

อภินันทนาการ

จาก

ร้านรัตนผล

110 – 112 ถนนท่าแพ เชียงใหม่

จำหน่าย และ ผู้แทนจำหน่าย

อุปกรณ์และเครื่องใช้ในสำนักงานทุกชนิด

รับงานพิมพ์ด้วยระบบออฟเซท

« ข่าวในวงการ »

อาจารย์ที่สำเร็จการศึกษาและสำเร็จการฝึกอบรม ดูงาน ณ ต่างประเทศ

๑. อาจารย์สุมาลัย วังวรรณรัตน์ ภาควิชารังสีเทคนิค ได้สำเร็จการฝึกอบรมทางด้าน Advanced Radiographic Technique ณ. ประเทศสิงคโปร์ (ทุนรัฐบาลสิงคโปร์ ภายใต้แผนโคลัมโบ) กลับมาปฏิบัติราชการ ที่คณะเทคนิคการแพทย์ ตั้งแต่วันที่ ๗ พฤศจิกายน ๒๕๒๓

๒. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สิชล สงค์ศิริ ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิค ได้สำเร็จการฝึกอบรมทางด้านเทคนิคการวิจัย ณ.มหาวิทยาลัยอิลลินอยส์ ประเทศสหรัฐอเมริกา (ทุน National Institutes of Health) และกลับมาปฏิบัติราชการ ที่คณะเทคนิคการแพทย์ ตั้งแต่วันที่ ๒๔ พฤศจิกายน ๒๕๒๓

๓. อาจารย์อรพรรณ วิญญูวรรธน์ โครงการจัดตั้งสาขาวิชาอาชีวบำบัด ซึ่งได้รับทุนรัฐบาลไทย ตามความต้องการของหมาวิทยาลัยเชียงใหม่ ไปศึกษาต่อขั้นปริญญาโท ณ. Texas's Woman University ประเทศสหรัฐอเมริกา และได้รับอนุมัติให้ลาดูงานทางด้านการบริหารโรงเรียนและด้านอาชีวบำบัดสำหรับผู้ป่วยเด็ก ณ. Waisman Center University of Wisconsin, Madison ขณะนี้สำเร็จการศึกษาและดูงาน กลับมาปฏิบัติราชการที่ คณะเทคนิคกรรแพทย์ ตั้งแต่วันที่ ๑ ธันวาคม ๒๕๒๓

การเปิดพิธีอาคารปฏิบัติการกลาง

คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จะได้ประกอบพิธีเปิดอาคารปฏิบัติการกลาง ในวันที่ ๑ มกราคม ๒๕๒๔ ซึ่งเป็นวันเดียวกันกับวันสถาปนาคณะเทคนิคการแพทย์ มีหมายกำหนดการดังนี้

เวลา ๐๙.๓๐ น. มีพิธีทางศาสนา
เวลา ๑๑.๓๐ น. ถวายอาหารเพล
เวลา ๑๒.๐๐ น. ประกอบพิธีเปิดอาคารปฏิบัติการกลาง คณะเทคนิคการแพทย์
เวลา ๑๒.๓๐ น. เชิญรับประทานอาหาร
เวลา ๑๓.๐๐ น. สนุกสนานในวันขึ้นปีใหม่ โดยการจับฉลากของขวัญซึ่งนำมาแลกเปลี่ยนกัน

มอบเงินสมทบกองทุนส่งเสริมการศึกษาและวิชาการ

ประธานชมรมเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่ แจ้งให้ประธานกองทุนฯ ทราบว่า ในวันที่ ๑ มกราคม ๒๕๒๔ ซึ่งเป็นวันสถาปนาของคณะฯ ทางชมรมเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่ จะมอบเงินจำนวน ๑,๕๐๐ บาท เพื่อสมทบกองทุนส่งเสริมการศึกษาและวิชาการ ของคณะเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่

ประชุมวิชาการประจำปี ๒๕๒๔

สมาคมเทคนิคการแพทย์ แห่งประเทศไทย จะได้จัดประชุมวิชาการทางเทคนิคการแพทย์ ครั้งที่ ๕ ขึ้นที่ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในวันที่ ๒๑-๒๓ เมษายน ๒๕๒๔ ซึ่งทางสมาคมได้รับความร่วมมือร่วมใจจากชมรมเทคนิคการแพทย์อิสาน ในฐานะเป็นเจ้าภาพอย่างดี

ในการประชุมครั้งนี้ได้รับอนุมัติจากคณะรัฐมนตรี พนักงานรัฐวิสาหกิจ ร่วมการประชุมวิชาการ โดยไม่ถือเป็นวันลา และมีสิทธิเบิกค่าใช้จ่ายได้ตามระเบียบของทางราชการ.

อภินันทนาการจาก

ห้างหุ้นส่วนจำกัด เอส. เค. เทรดดิ้ง

S. K. TRADING LTD, PART.

เลขที่ 13–15 ถนนช้างคลาน ใกล้สี่แยกอุปคุต

เชียงใหม่ โทรศัพท์ 234048

โฆษณาในเล่ม

๑. ห้างหุ้นส่วนจำกัด รัชมอร์ จำหน่ายกล้องและอุปกรณ์ โอลิมปัส
๑๑๑ ทองหล่อ ซอย๕ สุขุมวิท๕๕ กรุงเทพฯ
โทร.๓๙๑-๖๑๒๒

๒. ห้างเคมีกิจ จำหน่ายและรับสั่งอุปกรณ์วิทยาศาสตร์และเคมีภัณฑ์
๓๕/๒๐ ถนนพญาไท (ใกล้สี่แยกพญาไท) กรุงเทพฯ๔
โทร.๒๔๕๔๑๗๒-๔

๓. บริษัทเบคไทย กรุงเทพ จำหน่ายเครื่องมือและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ทางการแพทย์
๑๐๑๗-๑๐๑๙ ถนนพหลโยธิน กรุงเทพฯ๔
โทร.๒๗๘-๕๑๒๓, ๒๗๘-๕๕๖๗, ๒๗๙-๒๙๐๓

๔. บริษัทบางกอกโนเวลตี จำกัด จำหน่ายเคมีภัณฑ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ทุกชนิด
๑๐๕ ถนนราชดำริ กรุงเทพฯ
โทร.๒๕๒๕๗๕๐, ๒๕๒๒๕๑๘

๕. ห้างหุ้นส่วนจำกัดวีระชัยพลาย จำหน่ายอุปกรณ์โสตทัศนศึกษาทุกชนิด
๘๑-๘๓ ถนนเฉลิมเขตร์๑ สวนมะลิ กรุงเทพฯ
โทร.๒๒๓๑๘๖๔, ๒๒๓๙๑๒๒

๖. ร้านรัตนผล จำหน่ายอุปกรณ์และเครื่องใช้ในสำนักงานทุกชนิด
๑๑๐-๑๑๒ ถนนท่าแพ เชียงใหม่

๗. ห้างหุ้นส่วนจำกัด เอส เค เทรดดิ้ง จำหน่ายเคมีภัณฑ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ทุกชนิด
๑๓-๑๕ ถนนช้างคลาน ใกล้สี่แยกอุปคุต เชียงใหม่
โทร.๒๓๔๐๔๘

ห้างหุ้นส่วนจำกัด วีระชัพพลาย

ผู้แทนจำหน่าย

อุปกรณ์โสตทัศนศึกษาทุกชนิด

สำนักงาน ๘๑–๘๓ ถนนเฉลิมเขตร์ ๑
สวนมะลิ กรุงเทพ ฯ ๑
โทร. ๒๒๓๔๘๖๔, ๒๒๓๙๑๒๒