บทที่ 5

การอภิปรายผล

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

การหาวิธีสำหรับทดสอบสารสังเคราะห์

การทดลองทดสอบประสิทธิภาพในการระงับการเจริญของบักเตรีด้วยวิธีที่นิยมทำกัน 3 วิธี คือ broth test tube dilution method, agar plate dilution method, และ paper disc diffusion method ปรากฏว่าใช้ 2 วิธีแรกไม่ได้ผล เพราะสารเกิดขุ่นเป็นตะกอนเมื่อใส่ลงในอาหารเหลว เนื่องจากสารละลายน้ำได้น้อยมาก ทำให้เป็นอุปสรรคในการตรวจผล ถึงแม้ broth test tube dilution method จะเป็นวิธีที่ให้ผลดีที่สุดสำหรับสารอื่น ๆ ในการหาค่า MIC ก็ตาม แต่วิธีนี้ใช้กับสารสังเคราะห์ที่ใช้ในการวิจัยนี้ไม่ได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงต้องใช้ paper disc diffusion method เพราะใช้ได้ดีกับสารสังเคราะห์ทั้ง 7 ตัว ที่ใช้ในการทดลองมากกว่าอีก 2 วิธีที่กล่าวข้างต้น

การทดสอบประสิทธิภาพในการต่อต้านบักเตรีของสารสังเคราะห์

จากผลการทดลองที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2 จะเห็นได้ว่าสารสังเคราะห์ 7 ตัว มีอยู่ 5 ตัวคือ R-1, R-2, R-3, R-4 และ R-5 ที่มีผลในการระงับการเจริญเติบโตของบักเตรี และระงับได้เฉพาะบักเตรีพวกแกรมบวกเท่านั้น ไม่มีผลต่อแกรมลบเลย ทั้งนี้อาจเป็นเพราะ

1. การซึมของสารสังเคราะห์ผ่านผนังเซลล์ (cell wall) เข้าสู่เซลล์ของบักเตรีชนิดแกรมบวกได้ดีกว่า ชนิดแกรมลบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้ากลไกการออกฤทธิ์เกิดขึ้นภายในเซลล์ เพราะผนังเซลล์ของบักเตรีพวกแกรมบวกและแกรมลบมีส่วนประกอบต่างกัน

2. สารสังเคราะห์ทั้ง 5 ตัว ผ่านเข้าผนังเซลล์ของบักเตรีพวกแกรมบวกและแกรมลบได้เท่า ๆ กัน แต่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ได้ต่างกัน โดยที่สารสังเคราะห์ผ่านเข้าเยื่อเซลล์ของบักเตรีพวกแกรมลบไม่ได้หรือได้น้อยมากจนความเข้มข้นน้อยเกินกว่าที่จะระงับการเจริญหรือฆ่าบักเตรีได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความสัมพันธ์ระหว่างประจุของเยื่อหุ้มเซลล์กับประจุของสารสังเคราะห์อาจเกิดปฏิกริยาแล้วทำให้หมู่ ion ต่าง ๆ บนเยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนแปลงไปทำให้สารสังเคราะห์เข้าสู่เซลล์ไม่ได้ หรือเข้าได้ในปริมาณที่น้อยเกินกว่าจะแสดงฤทธิ์ได้

3. ส่วน R-6 และ R-7 ไม่มีผลในการระงับการเจริญเติบโตของบักเตรีเลย ไม่ว่าจะเป็นพวกแกรมบวกหรือแกรมลบนั้น อาจเนื่องมาจากสูตรโครงสร้างของสารสังเคราะห์ 2 ตัวนี้ ซึ่งจะเห็นได้ว่า R-6 และ R-7 มีสูตรโครงสร้างไม่เหมือน R-1, R-2, R-3, R-4 และ R-5 โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารสังเคราะห์ 5 ตัวแรก (R-1 ถึง R-5) มีกลุ่มที่ดึงอีเล็คตรอน (electron withdrawing group) เกาะติดอยู่กับ phenyl ring แต่ R-6 และ R-7 มีกลุ่มที่ปล่อยอีเล็คตรอน (electron releasing group) เกาะอยู่ กลุ่มที่แตกต่างกันนี้อาจจะมีอิทธิพลต่อปฏิกริยาระหว่างสารกับรีเซปเตอร์ (receptor) ในเซลล์ของบักเตรีเพื่อให้เกิดฤทธิ์ยาก็ได้

อีกประการหนึ่งผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปริมาณของสารที่สามารถระงับการเจริญเติบโตของบักเตรีนั้นน้อยมาก ดังแสดงในตารางที่ 2 และเนื่องจากการละลายน้ำของสารก็ไม่ดีเพราะฉะนั้นย่อมแสดงว่าประสิทธิภาพของสารสังเคราะห์จะต้องสูงมาก เพราะปริมาณแพร่ไปรอบ ๆ แผ่นกระดาษ เพื่อไประงับการเจริญของบักเตรีนั้นย่อมน้อยกว่าปริมาณที่แสดงในตารางที่ 2 มาก

<u>เปรียบเทียบสารสังเคราะห์กับยาปฏิชีวนะ</u>

การทดลองซึ่งได้แสดงผลในตารางที่ 3นั้นเป็นการทดลองเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสังเคราะห์และยาปฏิชีวนะทั้ง 4 ชนิด พบว่าสารบางอย่างสามารถระงับ

การเจริญของบักเตรีได้ดีกว่ายาปฏิชีวนะบางอย่างก็ด้อยกว่ายาปฏิชีวนะ ดังแสดงในตารางที่ 3 อย่างไรก็ตาม ถ้ามองโดยส่วนรวมแล้วจะเห็นได้ว่ายาปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดลองให้ผลดีกว่าสารสังเคราะห์ และพบว่าเพ็นนิซิลลินให้ผลดีที่สุด คือสารสังเคราะห์ทุกตัวด้อยกว่าเพ็นนิซิลลิน ทั้งนั้น อย่างไรก็ตาม จากการทดลองพบว่า เตตราไซคลินมีประสิทธิภาพดีกว่าเพ็นนิซิลลินในการระงับการเจริญของ B. subtilis ATCC 6633 การที่ยาปฏิชีวนะดีกว่าสารสังเคราะห์อาจเป็นเพราะว่า

1. ยาปฏิชีวนะมีสูตรโครงสร้างที่ดีกว่า เหมาะกว่าในการที่จะออกฤทธิ์ในการระงับการเจริญของบักเตรีที่ใช้ในการทดลอง

2. สารสังเคราะห์อาจเข้าสู่เซลล์ของบักเตรีได้ยาก และน้อยกว่ายาปฏิชีวนะ จึงทำให้เห็นว่ายาปฏิชีวนะมีประสิทธิภาพดีกว่าสารสังเคราะห์

3. ถ้ามองในแง่การละลายน้ำแล้ว ยาปฏิชีวนะก็ละลายน้ำได้ดีมาก แต่สารสังเคราะห์เกือบไม่ละลายน้ำ ดังนั้นปริมาณของยาปฏิชีวนะที่ไประงับการเจริญของบักเตรีย่อมมากกว่าสารสังเคราะห์ แม้จะบรรจุในกระดาษรูปกลมเท่า ๆ กันก็ตาม ซึ่งคุณสมบัติในเรื่องการละลายน้ำได้น้อยจึงทำให้โรดานีนไม่ถูกนำไปใช้ดังที่ Leonard ได้รายงานไว้ว่าโรดานีนละลายน้ำได้น้อยมาก และยังไม่ค่อยมีประสิทธิภาพ ถ้าให้โดยการรับประทาน (Leonard, 1921) นอกจากนี้ Buck และผู้ร่วมงานยังได้กล่าวถึงอนุพันธ์ตัวหนึ่งของโรดานีนคือ 3-(p-arylethyl) rhodanine ว่ามีคุณสมบัติในการระงับการเจริญของจุลชีพดี แต่ไม่ถูกนำมาใช้ เพราะละลายน้ำไม่ดี

คุณสมบัติของสารสังเคราะห์ต่อการเจริญของบักเตรี

จากผลการทดลองพบว่าสารสังเคราะห์ทั้ง 5 ตัวที่มีผลในการระงับการเจริญเติบโตของบักเตรีนั้น มีผลระงับการเจริญของบักเตรีเพียงชั่วคราวเท่านั้น (bacteriostatic) เมื่อสารสังเคราะห์เหล่านี้เจือจางลง หรือพ้นไปจากการสัมผัสเซลล์บักเตรี แล้วบักเตรีก็สามารถ

เจริญเติบโตแบ่งเซลล์ต่อไปได้ ซึ่งก็สนับสนุนผลงานที่มีผู้เสนอไว้ เช่น Weiniawski และผู้ร่วมงาน พบว่า 3,5-dimethyl และ 3-ethyl-5-methyl rhodanine ระงับการเจริญของบักเตรีชั่วคราว (Weiniawski, et al,1958)และ Taniyama และผู้ร่วมงานก็ได้รายงานไว้ว่า 4-thiazolidinones ระงับการเจริญของ Mycobacterium tuberculosis ชั่วคราวเท่านั้น (Taniyama, et al, 1954)

ความเป็นพิษ (toxicity)ของR-2 และ R-3

Dyban ได้รายงานไว้ว่า หนู (rat) ที่ได้รับโรดานีนในปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักหนู 100 กรัม โดยได้รับ 3 ครั้งติดต่อกันจะตาย (Dyban, 1954) Zlakowska ได้รายงานว่าโรดานีนมีพิษถึงทำให้สัตว์ทดลองตายได้ แต่ใช้เวลานานโดยมิได้กล่าวว่านานเท่าไร (Zlakowska, 1958) การทดลองนี้ก็สนับสนุน Dyban และ Zlakowska ที่ว่าสัตว์ทดลองตายได้เนื่องจากความเป็นพิษของโรดานีน แต่ระยะเวลาของการตายหลังฉีดสารมิได้เป็นไปอย่างที่ Zlakowska กล่าวไว้คือ หนูขาวจากการทดลองนี้ตายภายใน 4 ชั่วโมงหลังจากฉีด R-2 และ R-3 เข้าทางช่องท้องโดยค่า LD_{50} ของR-2 และ R-3 เท่ากับ 354.0 และ 81.6 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักหนูขาว 1 กิโลกรัม การที่หนูตายเร็วมากอาจเนื่องจาก R-2 และ R-3 แพร่กระจายในร่างกายได้ดี และเร็วมาก ซึ่งอาจเป็นผลมาจากสภาพที่เหมาะสมภายในร่างกาย เช่น ความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ และเกลือแร่ต่าง ๆ เป็นต้น ซึ่งเหมาะต่อการกระจายของสารเหล่านี้ไปยังส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย โดยปกติสารที่ละลายได้ดีในไขมันจะกระจายตัวในร่างกายได้เร็ว ดังนั้นสาร R-2 และ R-3 อาจจะละลายในไขมันได้ดีก็ได้จึงแพร่กระจายได้เร็ว และที่น่ากล่าวถึงคือ หนูขาวที่ตายเนื่องจากได้รับการฉีด R-2 และ R-3 นั้น อาการก่อนตายของสัตว์ทดลองทุกตัวจะชักกระตุก ทำให้คิดว่าสาร R-2 และR-3 อาจไปมีผลต่อเซลล์ประสาท (nerve cell) หรือมีผลต่อหัวใจทำให้เลือดไปเลี้ยงสมองไม่เพียงพอก็ได้

เมื่อเปรียบเทียบความเป็นพิษระหว่าง R-2 กับ R-3 โดยดูจากค่า LD_{50} พบว่า R-2 มีค่า LD_{50} เท่ากับ 354.0 มิลลิกรัมต่อหนูขาวหนัก 1 กิโลกรัม และ R-3 มีค่า LD_{50} เท่า 81.6 มิลลิกรัมต่อหนูขาวหนัก 1 กิโลกรัม จะเห็นได้ว่า R-3 มีความเป็นพิษสูงกว่า R-2 แสดงให้เห็นว่าสารสังเคราะห์อนุพันธ์ที่มีกลุ่มคลอโร (chloro group) เกาะอยู่ มีความเป็นพิษสูงกว่าสารสังเคราะห์อนุพันธ์ที่มีกลุ่มไนโตร (nitro group) เกาะอยู่ ซึ่งความรู้อันนี้มีประโยชน์ในการนำสารอนุพันธ์ R-3 ไปปรับปรุงเพื่อให้ความเป็นพิษน้อยลง เพื่อจะได้ใช้ให้เป็นประโยชน์ได้มากขึ้น

การทำให้หนูขาวเป็นหนองโดยเชื้อ S. aureus

Davis ได้รายงานไว้ว่าเชื้อ S. aureus ที่ได้จากหนองของสัตว์หรือคน ถ้านำไปใช้เพื่อทำให้สัตว์ทดลองเกิดเป็นหนองขึ้นจะเห็นผลชัดเจนกว่าเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยทั่วไป (Davis, 1970)

ในการทดลองขั้นแรก ผู้วิจัยได้ใช้เชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB แล้ว เตรียมเชื้อให้ได้ความขุ่นตามต้องการในน้ำเกลือที่มีความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซนต์ แล้วฉีดเข้าหนูขาว ผลปรากฏว่าเปอร์เซนต์การเป็นหนองของหนูขาวต่ำมาก ต่อมาจึงเปลี่ยนวิธีใหม่โดยใช้เชื้อที่เตรียมตามลำดับขั้น ดังแสดงในแผนผังที่ 1 โดยยึดรายงานของ Davis เป็นหลัก ก็พบว่าเปอร์เซนต์การเป็นหนองของหนูขาวเพิ่มขึ้น 2 เท่า ดังแสดงในตารางที่ 6 ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อที่ทำให้เกิดโรค (pathogen) ไม่ว่าจะเป็นจุลชีพชนิดใด การเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง (in vitro) จะทำให้ความรุนแรง (virulency) ของเชื้อลดลงเรื่อย ๆ แต่ถ้าเพาะเลี้ยงในสัตว์ทดลอง (in vivo) แล้วเชื้อนั้นจะยังคงมีความรุนแรงเหมือนเดิมหรืออาจเพิ่มขึ้น ซึ่งผลจากการทดลองนี้สนับสนุนผลงานของ Davis ดังกล่าว

การใช้ R-2 และ R-3 รักษาหนูขาวที่เป็นหนอง

ในขั้นแรกได้ทดลองฉีด R-2 และ R-3 เข้ากล้ามเนื้อหนูขาวที่เป็นหนองแล้วด้วยเชื้อ S. aureus เพื่อรักษา แต่ปรากฏว่าสารสังเคราะห์ทั้ง R- 2 และ R -3 ไม่สามารถรักษาอาการเป็นหนองของหนูขาว ไม่ว่าจะฉีดให้หนูขาวด้วยความถี่ 1 ครั้งตลอดการทดลอง ทุก ๆ 4 วัน หรือ ทุก ๆ 2 วันก็ตาม ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่า

1. สารสังเคราะห์ R-2 และ R-3 ในปริมาณที่ใช้ไม่มีประสิทธิภาพในการรักษาสัตว์ทดลองในการออกฤทธิ์ที่จะต้องผ่านระบบของร่างกาย (systemic effect) อันเนื่องจากคุณสมบัติทางเคมีและฟิสิคส์ เช่น การละลาย การดูดซึม ฯลฯ เป็นต้น

2. ให้สาร R-2 และ R -3 แก่สัตว์ทดลองผิดทาง (route) ก็ได้ จึงทำให้ดูเหมือนว่าสารสังเคราะห์ไม่มีผลในการรักษา

ดังนั้น จึงได้ทดลองให้สารสังเคราะห์ R- 2 และ R- 3 แก่หนูขาวที่เป็นหนองแล้วโดยการฉีดเข้าบริเวณที่เป็นหนองโดยตรง เพื่อทดสอบฤทธิ์ยาเฉพาะแห่ง (local effect) ในปริมาณที่เท่ากับ ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ เพื่อที่จะเปรียบเทียบกันได้ โดยแบ่งความถี่ของการฉีดเหมือนการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ เมื่อเลี้ยงสัตว์ทดลองต่อไปพบว่า สัตว์ทดลองกลุ่มที่ได้รับการฉีด R-2 และ R- 3 ทุก ๆ 2 วัน หายจากการเป็นหนองเร็วกว่ากลุ่มอื่น ๆ ดังแสดงในตารางที่ 8 ดังนั้นข้อสันนิษฐานดังกล่าวข้างต้น จึงน่าจะเป็นไปได้ทั้งสองประการ กล่าวคือ สารที่ใช้ในการทดลองตามปริมาณที่ใช้มีผลแก้อาการหนองที่เกิดจาก S. aureus ได้โดยการออกฤทธิ์แบบเฉพาะแห่ง (local effect) เท่านั้น ทั้งนี้เป็นไปได้ว่า

1. สารสังเคราะห์ที่ฉีดเข้ากล้ามเนื้อจะกระจายไปตามส่วนต่าง ๆ ของร่างกายโดยไปตามเลือดหรือน้ำเหลือง ดังนั้น กว่าจะไปถึงบริเวณแผลก็จะเจือจางลงไปมากจนไม่สามารถระงับการเจริญเติบโตของบักเตรีได้ จึงทำให้ไม่ได้ผลในการรักษาอาการเป็นหนองของหนูขาว

2. สารสังเคราะห์ R-2และ R-3 อาจถูกแปรสภาพไปเมื่อเข้าสู่ร่างกายหนูขาว ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงภายในร่างกาย (metabolism) ทำให้สาร R-2 และR-3 อยู่ในสภาพที่ไม่สามารถออกฤทธิ์ระงับการเจริญเติบโตของบักเตรีได้ (inactive substance)

ส่วนการทดลองที่ฉีดสาร R-2 และR-3 เข้าบริเวณที่เป็นหนองโดยตรงนั้น การที่หนูขาวหายจากการเป็นหนองเร็วเมื่อได้รับสารในความถี่ที่เหมาะสม คือ ทุก ๆ2 วัน ดังแสดงในตารางที่ 8 นั้นย่อมแสดงว่าสารสังเคราะห์มีประสิทธิภาพในการรักษาออกฤทธิ์เฉพาะแห่ง (local effect) และต้องให้สารด้วยความถี่ที่เหมาะสมด้วย การให้สารสังเคราะห์แก่หนูขาวตรงบริเวณที่เป็นหนองโดยตรงนั้น ทำให้ปริมาณสารที่เข้าต่อต้านการเจริญของบักเตรีเป็นปริมาณเดียวกับที่ฉีดเข้าไป ซึ่งก็ย่อมจะมากกว่าการที่จะต้องผ่านเข้าสู่กระแสโลหิตหรือน้ำเหลืองไปสู่บริเวณที่เป็นหนองอย่างที่ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ดังนั้นการระงับการเจริญของบักเตรีจึงได้ผลเป็นที่น่าพอใจ

ถ้าเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการรักษาระหว่าง R-2 กับ R-3 แล้วจะเห็นได้ว่า R-3 มีประสิทธิภาพดีกว่า R-2 ถึงแม้ R-3 จะมีความเป็นพิษสูงกว่า R-2 ดังแสดงในตารางที่ 5 ก็ตามแต่ปริมาณสารที่ใช้ในการรักษาก็มีใช่ปริมาณที่ทำให้สัตว์ทดลองตายและที่กล่าวว่า R-3 ดีกว่า R-2 ด้วยเหตุผล 2 ประการคือ

1. ใช้ R-3เพื่อรักษาอาการหนองของหนูขาวในปริมาณที่น้อยกว่า R-2 ถึง 10 เท่า

2. หนูขาวที่เป็นหนองและได้รับการฉีด R-3 ทุก ๆ 2วัน หายจากอาการหนองเร็วกว่าหนูขาวที่ได้รับการฉีด R-2 ทุก ๆ 2 วัน ประมาณ 5 วัน

จากเหตุผล 2 ประการจะเห็นได้ว่า R-3 น่าสนใจกว่า R-2 และถ้าหากมีการเปลี่ยนแปลงสูตรโครงสร้างให้ R-3 มีความเป็นพิษน้อยลง แต่การละลายน้ำดีขึ้นกว่าเดิมก็อาจทำให้ R-3 มีคุณสมบัติที่น่าจะนำมาใช้ในการรักษามากยิ่งขึ้น และปริมาณ R-3 ที่จะใช้ในการรักษาก็จะน้อยกว่านี้อีกด้วย