



การศึกษาศักยภาพและการประยุกต์ใช้ทางคลินิกของสารบริสุทธิ์ rhodomyrtone  
สำหรับรักษาสิว

**Investigation and Clinical Application of Rhodomyrtone for Acne Treatment**

สุทธิวรรณ วุ่นหนู

**Suttiwan Wunnoo**

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา  
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of  
Master of Science in Microbiology**

**Prince of Songkla University**

**2559**

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การศึกษาศักยภาพและการประยุกต์ใช้ทางคลินิกของสารบริสุทธิ์ rhodomyrtone  
สำหรับรักษาสิว

ผู้เขียน นางสาวสุทธิวรรณ วุ่นหนู

สาขาวิชา จุลชีววิทยา

---

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....  
(ศาสตราจารย์ ดร.ศุภยางค์ วรวุฒิคุณชัย)

.....ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธนกร อำนวยกิจ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....กรรมการ  
(ศาสตราจารย์ ดร.ศุภยางค์ วรวุฒิคุณชัย)

.....  
(ดร.จกกล สายสิงห์)

.....กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.เนติ วรรณุช)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน  
หนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

.....  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ .....

(ศาสตราจารย์ ดร.ศุภยางค์ วรรณคุณชัย)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ .....

(ดร.จنگล สายสิงห์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ลงชื่อ .....

(นางสาวสุทธีวรรณ วุ่นหนู)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และ  
ไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ .....

(นางสาวสุทธีวรรณ วุ่นหนู)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	การศึกษาศักยภาพและการประยุกต์ใช้ทางคลินิกของสารบริสุทธิ์ rhodomyrtonone สำหรับรักษาสิว
ผู้เขียน	นางสาวสุทธิวรรณ วุ่นหนู
สาขาวิชา	จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา	2558

### บทคัดย่อ

สิวเป็นโรคผิวหนังอักเสบเรื้อรัง ซึ่งมีสาเหตุสำคัญประการหนึ่งมาจากเชื้อแบคทีเรีย โดยเฉพาะ *Propionibacterium acnes* ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ของ rhodomyrtonone สารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบกระทุ่ต่อการยับยั้งการสร้างเอนไซม์และ biofilms ที่เป็นสาเหตุก่อความรุนแรงในเชื้อ *P. acnes* ที่แยกได้จากรอยสิว รวมถึงเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน DMST 14916 ผลการหาค่า MIC และ MBC ของ rhodomyrtonone และ clindamycin ซึ่งเป็นยาที่นิยมใช้รักษาสิว อยู่ในช่วง 0.125 - 0.5 µg/mL และ 8 - 256 µg/mL ตามลำดับ ผลการทดสอบฤทธิ์ของ rhodomyrtonone ต่อการยับยั้งการสร้าง lipase และ protease ของเชื้อ *P. acnes* พบว่าภายหลังการทดสอบด้วย rhodomyrtonone เชื้อแบคทีเรียมีการสร้างเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดลดลง และผลการทดสอบการยับยั้ง biofilms ของเชื้อ *P. acnes* ด้วย rhodomyrtonone พบว่าที่ความเข้มข้น 1/16MIC และ 1/8MIC สามารถยับยั้งการสร้าง biofilms ได้โดยไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ นอกจากนี้ rhodomyrtonone มีฤทธิ์ในการลดอัตราการรอดชีวิตของเชื้อภายใน mature biofilms โดยเฉพาะที่ 4MIC และ 8MIC สามารถลดอัตราการรอดชีวิตของเชื้อ *P. acnes* ทุกสายพันธุ์ อยู่ในช่วง 40.8% - 84.8% และ 39.3% - 75.8% ตามลำดับ นอกจากนี้การศึกษาศักยภาพทางคลินิกของ liposomal rhodomyrtonone serum พบว่าจำนวนสิวจึงหมดลดลงในทุกกลุ่มการรักษา โดยเริ่มเห็นการลดลงได้ชัดเจนตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 จนถึงสัปดาห์ที่ 8 ( $p < 0.05$ ) การเปลี่ยนแปลงของจำนวนสิวจึงไม่อักเสบเริ่มแสดงการลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับจำนวนสิวจึงในช่วงสัปดาห์ที่ 2 ของการรักษา สำหรับสิวจึงไม่อักเสบสามารถเห็นการลดลงของจำนวนสิวจึงได้ในทุกกลุ่มการรักษา โดยการลดลงอย่างมีนัยสำคัญเริ่มตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 ของการรักษา ( $p < 0.05$ ) และการลดลงของจำนวนสิวจึงอักเสบเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนสิวจึงเริ่มต้น และพบว่าในทุกกลุ่มการรักษา มีจำนวนสิวจึงอักเสบลดลงอย่างมีนัยสำคัญในสัปดาห์ที่ 8 โดยร้อยละการลดลงของจำนวนสิวจึงอักเสบในกลุ่มผู้ใช้ liposomal rhodomyrtonone serum เท่ากับ 36.36 กลุ่มผู้ใช้ clindamycin gel เท่ากับ

34.70 และกลุ่มผู้ใช้ liposome serum base เท่ากับ 43.13 ( $p < 0.05$ ) ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า rhodomyrtone มีฤทธิ์ในการยับยั้งปัจจัยในการก่อความรุนแรงของเชื้อ *P. acnes* และสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นผลิตภัณฑ์ทางเลือกในการรักษาสิวได้ ซึ่งมีประสิทธิภาพที่ดีในการลดจำนวนการเกิดสิว โดยเฉพาะสิวก้อนเสบที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรียเทียบเคียงได้กับ clindamycin gel

<b>Thesis Title</b>	Investigation and clinical application of rhodomirtone for acne treatment
<b>Author</b>	Miss Suttiwan Wunnoo
<b>Major Programme</b>	Microbiology
<b>Academic Year</b>	2016

### ABSTRACT

*Propionibacterium acnes*, a Gram-positive pathogenic bacterium is considered as a major causative agent of acne vulgaris, a chronic inflammatory skin disease. Virulence enzymes and biofilms play crucial role in the pathogenesis of the organism. In the present study, the effect of rhodomirtone, a pure compound identified from *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk. leaves extract was evaluated against enzyme production and biofilm formation production by *P. acnes* isolated from acne lesions. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration values of rhodomirtone and a standard drug, clindamycin against *P. acnes* isolates were ranged from 0.125 - 0.5 µg/mL and 8 - 256 µg/mL, respectively. Degree of hydrolysis by lipase and protease produced by *P. acnes* was decreased upon treated with the compound. Rhodomirtone at 1/16MIC and 1/8MIC were able to reduce biofilm formation of the clinical strains without causing considerable effect on bacterial growth. Furthermore, the viability of *P. acnes* within mature biofilms upon treated with the compound at 4MIC and 8MIC were ranged between 40.8% - 84.8% and 39.3% - 75.8%, respectively. In addition, clinical study of liposomal rhodomirtone serum was investigated in acne treatment. Significant reduction in total numbers of acne lesions was observed in all treatment groups during week 2 to week 8 ( $p < 0.05$ ). For non-inflammatory lesions, reduction in total acne counts was observed in all treatment groups. Significant differences in acne numbers, compared with baseline were evidenced at week 2 onwards ( $p < 0.05$ ). Volunteers received rhodomirtone serum demonstrated improvement for inflammatory lesions with reference to baseline within 2 weeks. During week 8, total inflamed acne counts in rhodomirtone serum treated group were significantly reduced by 36.36%, comparable with 34.70% in clindamycin gel and 43.13% in

serum base treated group ( $p < 0.05$ ). Liposomal rhodomyrtone serum has been demonstrated to be effective for treating acne lesions, especially inflammatory lesions, with comparable efficacy to clindamycin. Results demonstrated that the compound exhibited a remarkable bioactivity on *P. acnes* and could possibly be used as therapeutic agents for the treatment of acne vulgaris.



## กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.ศุภยงค์ วรวิจิตรคุณชัย ที่ปรึกษา  
วิทยานิพนธ์หลัก ดร.จกมล สายสิงห์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม และ รองศาสตราจารย์.พญ.  
เสาวรัตน์ เอื้อเพิ่มเกียรติ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ ช่วยเหลือ ให้ความไว้วางใจและเอาใจใส่  
เป็นอย่างดีในเรื่องการศึกษา ค้นคว้าวิจัย และเขียนวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ชนกร อำนวยกิจ ประธานกรรมการ  
สอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ เรื่องการศึกษา ค้นคว้าวิจัย การเขียนวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.เนติ วรรณุช กรรมการผู้แทนจาก  
บัณฑิตวิทยาลัยผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกมหาวิทยาลัยที่ให้ความกรุณาในการแนะนำ ตรวจสอบแก้ไข  
วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องเสร็จสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่คอยให้กำลังใจและ  
สนับสนุนเรื่องการศึกษามาโดยตลอด ขอขอบคุณพี่และเพื่อนร่วมรุ่น พี่ ๆ ในห้องปฏิบัติการทุกคนที่  
คอยให้ความช่วยเหลือ ให้กำลังใจ และคำปรึกษาที่ดี ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยาทุก  
ท่าน รวมถึงบุคคลอื่น ๆ ที่ไม่ได้เอ่ยนามที่ให้ความช่วยเหลือที่ดีมาตลอดจนการทำวิทยานิพนธ์  
สำเร็จลุล่วงด้วยดี

งานวิจัยนี้ได้รับทุน โครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ และทุนสนับสนุนจาก  
สถานวิจัยความเป็นเลิศด้านผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สุทธิวรรณ ภู่นหนู

## สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(10)
รายการตาราง	(11)
รายการรูป	(12)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(14)
บทที่	
1. บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	17
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	
วัสดุ	18
อุปกรณ์	19
วิธีการทดลอง	20
3. ผลการวิจัย	33
4. วิจัย	56
5. สรุป	62
รายการเอกสารอ้างอิง	63
ภาคผนวก	72
ประวัติผู้เขียน	76

## รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1. Investigation's Global Assessment (IGA)	31
2. Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of rhodomyrone and clindamycin against clinical isolates of <i>Propionibacterium acnes</i> from acne lesions (n = 9)	34
3. Lipase and protease enzyme production in <i>Propionibacterium acnes</i> isolated from acne lesions (n = 16)	35
4. Biofilm production in <i>Propionibacterium acnes</i> isolated from acne lesions (n = 16)	38
5. Baseline volunteers characteristic	50
6. Quantity of acne lesions and Investigation's Global Assessment (IGA)	51
7. Investigator's Global Assessment (IGA) scale	53

## รายการรูป

รูปที่	หน้า
1. แสดงลักษณะสีทางคลินิก	7
2. ลักษณะ โคลิโคนีของเชื้อ <i>Propionibacterium acnes</i>	11
3. ลักษณะการย้อมติดสีแกรมบวกและรูปร่างของเชื้อ <i>Propionibacterium acnes</i>	12
4. แสดงลักษณะต้นกระทู	14
5. โครงสร้างทางเคมีของ rhodomyrton	16
6. ลักษณะผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการทดสอบทางคลินิก	28
7. Effects of rhodomyrton at sub-minimal inhibitory concentrations on lipase (A) and protease (B) activities of <i>Propionobacterium acnes</i> clinical isolates. The results are calculated as degree of hydrolysis. The value indicates the means $\pm$ SD for three independent experiments performed in triplicate. * Significant difference between treatment and control ( $p < 0.05$ )	37
8 Effects of rhodomyrton at sub-minimal inhibitory concentrations on biofilm formation (A) and bacterial growth (B) of <i>Propionibacterium acnes</i> clinical isolates. The value indicates the means $\pm$ SD for three independent experiments performed in triplicate. * Significant difference between treatment and control ( $p < 0.05$ )	40
9. Effects of clindamycin at sub-minimal inhibitory concentrations on biofilm formation (A) and bacterial growth (B) of <i>Propionibacterium acnes</i> clinical isolates. The value indicates the means $\pm$ SD for three independent experiments performed in triplicate. * Significant difference between treatment and control ( $p < 0.05$ )	41
10. Scanning electron micrographs of <i>P. acnes</i> biofilms treated with rhodomyrton at 500X and 10,000X magnification. (A and C) control; (B and D) 72 h biofilms treated with 1/8MIC (0.03 $\mu$ g/mL) rhodomyrton	43
11. Viability of <i>Propionibacterium acnes</i> within established biofilms after treatment with various concentrations of rhodomyrton (A) and clindamycin (B). The value indicates the means $\pm$ SD for three independent experiments performed in triplicate. * Significant difference between treatment and control ( $p < 0.05$ )	45

## รายการรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
<p>12. Transmission electron micrographs of <i>P. acnes</i> at 14,000X and 20,000X magnification. Arrows indicate cell wall, cytoplasmic membrane, cytoplasm, nucleoid, and vacuole; (A) untreated <i>P. acnes</i> (control), (B) treated <i>P. acnes</i> with rhodomertone at 8MIC (2 µg/mL), and (C) clindamycin at 8MIC (128 µg/mL)</p>	47
<p>13. Percentage reduction in mean number of acne lesions after treatment with rhodomertone serum, clindamycin gel, and serum base at week 2, 4, and 8, compared with baseline. Total acne lesions (A), non-inflammatory acne lesions (B), and inflammatory acne lesions (C). Number of subjects in each group 30 (n = 30). * Statistically different between baseline and each time of treatments were statistically significant at <math>p &lt; 0.05</math></p>	52
<p>14. Case study: twenty three years old female with mild severity of acne vulgaris at the baseline (IGA scale = 2, some non-inflammatory lesions with no more than a few inflammatory lesion). By week 8 following treatment with rhodomertone serum twice daily, the severity change to almost clear of acne vulgaris (IGA scale = 1, rare non-inflammatory with no more than one small inflammatory lesion)</p>	54
<p>15. Case study: twenty one years old female with moderate severity of acne vulgaris at the baseline (IGA scale = 3, up to many non-inflammatory lesions and may have some inflammatory lesions). By week 8 following treatment with rhodomertone serum twice daily, the severity change to mild severity of acne vulgaris (IGA scale = 2, some non-inflammatory lesions with no more than a few inflammatory lesion)</p>	55

**ตัวย่อและสัญลักษณ์**

cm	=	centimeter
CFU	=	colony forming unit
DMST	=	Department of Medical Sciences Thailand
°C	=	degree Celsius
g	=	gram
µg	=	microgram
µL	=	microliter
µm	=	micrometer
µmol	=	micromole
m	=	meter
mm	=	millimeter
mg	=	milligram
mL	=	milliliter
nm	=	nanometer
%	=	percent
rpm	=	round per minute
w	=	weight

## บทนำ

### บทที่ 1

#### บทนำต้นเรื่อง

สิวเป็นโรคอักเสบเรื้อรังที่รูขุมขนและต่อมไขมัน มักพบบริเวณใบหน้า หน้าอก และส่วนบนของลำตัว (Hsieh and Chen, 2011) การก่อตัวของสิวก่อเกิดจากความผิดปกติของรูขุมขน (hair follicle) และต่อมไขมัน (sebaceous follicle, sebaceous glands, และ sebaceous ducts) รวมเรียกว่า pilosebaceous unit เนื่องจากการเพิ่มการผลิตไขมันหัวหน้ (sebum) ของต่อมไขมันร่วมกับการเพิ่มจำนวนอย่างผิดปกติของเคราตินภายใน pilosebaceous unit แล้วมีการรวมตัวกันของเซลล์ผิวหนังชั้น stratum corneum ที่อยู่บริเวณรูเปิดของต่อมไขมัน ทำให้เกิดการอุดตันแน่นจนโป่งเป็นตุ่มนูนที่เรียกว่า microcomedone ที่สามารถพัฒนาไปเป็นสิหัวปิด (closed comedone) และสิหัวเปิด (open comedone) นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรีย *Propionibacterium acnes* เป็นเชื้อที่อาศัยอยู่ในรูขุมขน ซึ่งเป็นอีกสาเหตุหลักที่ส่งผลให้เกิดความรุนแรงในการเกิดสิว เมื่อเกิดการอุดตันของรูขุมขนจะทำให้มีสภาวะเหมาะสมแก่การเจริญของเชื้อ จากนั้นเชื้อ *P. acnes* จะผลิต lipase ไปย่อย sebum triglycerides ได้กรดไขมันที่สามารถก่อให้เกิดความระคายเคืองต่อผิว (Patil *et al.*, 2012) และยังมีเอนไซม์ protease, hyaluronidase และ chemotactic factors ที่สามารถกระตุ้นการสร้าง pro-inflammatory cytokines เช่น IL-6, IL-8 และ TNF- $\alpha$  ของ monocyte (Batubara *et al.*, 2014 และ Beylot *et al.*, 2014) นำไปสู่การระคายเคืองและเกิดกระบวนการอักเสบ จนกลายเป็นสิวอักเสบขึ้นในที่สุด นอกจากนี้การสร้าง biofilms ของเชื้อ *P. acnes* เป็นอีกปัจจัยสำคัญที่ทำให้เชื้อเกิดการดื้อต่อยาที่ใช้ในการรักษา (Coenye *et al.*, 2007)

การใช้ยารักษาสิว เช่น triclosan, benzoyl peroxide, retinoid, tetracycline, erythromycin และ clindamycin เป็นต้น พบว่าเชื้อ *P. acnes* มีความดื้อต่อยาเหล่านี้ (Tony *et al.*, 2012) และผลข้างเคียงด้านการระคายเคืองต่อผิวหนังเมื่อใช้ยาทารักษาสิว เช่น ยากลุ่ม retinoids หรือ benzoyl peroxide ติดต่อกันเป็นระยะเวลาานทำให้มีอาการลอก คัน แสบแดง แผล แผล แผล จึงมีความพยายามคิดหาสารสกัดจากพืชสมุนไพรเพื่อที่จะนำมาใช้เป็นทางเลือกหนึ่งในการรักษาสิว

จากรายงานการวิจัยสารสกัดจากเปลือกมังคุด ซึ่งให้เห็นว่าสารสกัดจากเปลือกมังคุดมีฤทธิ์ดีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus epidermidis* และ *P. acnes* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 3.91 และ 15.63  $\mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ (Poithirat *et al.*, 2010) และมีประสิทธิภาพสูงในการเป็น antioxidant สามารถยับยั้งการสร้าง pro-inflammatory cytokines ที่เกิดจากการกระตุ้นของเชื้อ *P. acnes* (Chomnawang *et al.*, 2007) และมีงานศึกษาวิจัยเกี่ยวกับสาร chlorophyllin (CHL) ซึ่งเป็นสารสีเขียวที่สกัดได้จากพืชหรือสาหร่ายคลอเรลลา พบว่าสาร CHL มีค่า MIC เท่ากับ 100  $\mu\text{mol}$  และมีฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยยับยั้ง IL-8 และ monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) ของ THP-1 cell ที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *P. acnes* (Kang *et al.*, 2013) จากงานวิจัยการทดสอบประสิทธิภาพทางคลินิกของเจลโพลที่มีน้ำมันไพลเข้มข้น 1% โดยเปรียบเทียบกับยาหลอกสำหรับรักษาผิวหนังเล็กน้อยถึงปานกลาง พบว่าอาสาสมัครกลุ่มที่ได้รับเจลโพลความเข้มข้น 1% มีร้อยละของการลดลงของจำนวนผิวหนังทั้งหมดสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับยาหลอกและไม่พบรายงานผลข้างเคียง (Limwattananon *et al.*, 2008) ผู้วิจัยได้ศึกษางานวิจัยเกี่ยวกับสารสกัดจากใบกระทุง (*Rhodomyrtus tomentosa*) ซึ่งพบว่ามีสารในกลุ่ม triterpenoids และ steroids (Hui *et al.*, 1975) และสามารถแยกสารในกลุ่ม tannins, flavones glycosides, และ ellagitannin ได้จากใบ (Liu *et al.*, 1998; Hou *et al.*, 1999) การสกัดสารด้วย ethyl acetate จากใบกระทุงสามารถแยกได้สาร rhodomyrtone จัดอยู่ในกลุ่ม acylphloroglucinols จากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดด้วย ethanol จากใบกระทุง พบว่าสารสกัดสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค (Voravuthikunchai *et al.*, 2007) และพบว่ามีฤทธิ์ antioxidant (Lavanya *et al.*, 2012) และฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Jeong *et al.*, 2013) มีรายงานวิจัยสารสกัดด้วย ethanol จากใบกระทุง และ rhodomyrtone ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. acnes* พบว่ามีค่า MIC<sub>90</sub> เท่ากับ 32 และ 0.5  $\mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ และสารสกัดจากใบกระทุงมีความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังต่ำ (Saising and Voravuthikunchi, 2012) นอกจากนี้คณะผู้วิจัยได้พัฒนาสูตรตำรับที่มี rhodomyrtone เป็นส่วนประกอบ โดยนำ liposome เข้ามาช่วยนำในการนำส่ง rhodomyrtone ให้สามารถซึมผ่านเข้าสู่ผิวหนังได้ดีขึ้น จากการศึกษาฤทธิ์ของสูตรตำรับ liposome rhodomyrtone serum ต่อเชื้อ *Streptococcus aureus* และ *S. epidermidis* มีค่า MIC เท่ากับ 1 - 4  $\mu\text{g/mL}$  และ ค่า MBC 4 - 64  $\mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ (Chorachoo *et al.*, 2013) การวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของ rhodomyrtone ที่แยกได้จากใบกระทุงในการยับยั้งปัจจัยที่ทำให้เกิดก่อความรุนแรงของเชื้อ *P. acnes* และประสิทธิภาพของสูตรตำรับ liposome rhodomyrtone serum สำหรับใช้ในการรักษาผิวเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะที่มีใช้ในปัจจุบัน



## บทตรวจเอกสาร

### 1. สิว

สิวเป็นปัญหาที่ส่วนใหญ่พบในวัยรุ่น โดยประมาณร้อยละ 80 ของการเกิดสิว จะเกิดในกลุ่มวัยรุ่นที่มีช่วงอายุ 15 - 19 ปี (Tasoula *et al.*, 2012) และร้อยละ 85 จะเป็นสิวนชนิดไม่รุนแรง มีเพียงร้อยละ 15 เท่านั้นที่เป็นสิวงรุนแรง (ศรีสุภลักษณ์, 2552) การเกิดสิวเป็นอาการอักเสบเรื้อรังที่รูขุมขนและต่อมไขมัน พบได้บ่อยโดยเฉพาะที่บริเวณใบหน้า หน้าอก และส่วนบนของลำตัว (Hsieh and Chen, 2011) ซึ่งเกิดจากความผิดปกติของ pilosebaceous units สิวเกิดขึ้นเนื่องจากการเพิ่มการผลิตไขมัน (sebum) ของต่อมไขมันร่วมกับการเพิ่มจำนวนอย่างผิดปกติของเคราตินภายใน pilosebaceous units ทำให้เกิดการอุดตันจนนำไปเป็นตุ่มนูนที่เรียกว่า microcomedones ก่อให้เกิดสภาพเป็นสิหัวปิด (closed comedones หรือ white head) หากเกิดการดันและแตกของท่อต่อมไขมันสู่ผิวหนังส่วนนอก จะกลายเป็นสิหัวเปิด (opened comedones) เซลล์เยื่อภายในท่อเมื่อถูกแสงจะทำให้สาร melamin มีสีคล้ำลงเห็นเป็นสิหัวดำ (blackhead) นอกจากนี้เชื้อ *P. acnes* ภายใน pilosebaceous units มีการสร้าง lipase ไปย่อย sebum triglycerides เกิดเป็นกรดไขมันและยังมีการหลั่ง protease, hyaluronidase และ low molecular weight chemotactic factor ซึ่งทำให้ต่อมไขมันระคายเคืองและเกิดกระบวนการอักเสบขึ้น (Batubara *et al.*, 2014) หากเกิดการอุดตันของท่อต่อมไขมัน ภายใน pilosebaceous units แรกออกแล้วปลดปล่อยกรดไขมันสู่เนื้อเยื่อรอบ ๆ ทำให้เกิดการบวมและมีเซลล์เม็ดเลือดขาวมาสะสม เกิดเป็นสิอักเสบ เป็นตุ่มแดง (papules) ตุ่มหนอง (pustules) สิวหัวช้าง (nodulocystic acne) และ cyst หรือฝี (abscess) การติดเชื้อระหว่างที่เป็นสิหัวปิดอยู่ และผนังของ comedones แตกลงสู่ชั้นหนังกำพร้าด้านล่าง ชั้นหนังแท้เกิดเป็นกระเปาะนูนใหญ่ เรียกว่า สิวหัวช้าง (nodulocystic acne) หากสิวมมีการอักเสบรุนแรงเพิ่มขึ้นจะเกิดเป็นหนอง ซึ่งการอักเสบของสิวในแต่ละบุคคลมีความแตกต่างกัน การรักษาจึงมีความจำเป็นในรายที่มีความกังวลหรือเป็นสิอักเสบรุนแรงส่วนใหญ่สิวจะหายขาดเมื่อพ้นวัยรุ่น ถ้าหากเป็นสิวระดับรุนแรงจะทิ้งรอยแผลเป็นไว้ให้เห็น การรักษาสิวมักจะต้องใช้ระยะเวลาประมาณ 6 เดือนจึงเห็นผล จากการศึกษาพบผลกระทบของสิวต่อวัยรุ่นพบว่าการเกิดสิวมีผลต่อคุณภาพชีวิตทั้ง

ทางด้านอารมณ์ จิตใจ และสังคม ทำให้สูญเสียความมั่นใจในตนเอง เกิดความเครียดและวิตกกังวลได้ (ศรีศุภลักษณ์, 2552)

### 1.1 พยาธิกำเนิดของสิว (จินตนา, 2551)

พยาธิกำเนิดของสิวมียาเหตุสำคัญร่วมกัน 4 ประการ คือ

1.1.1 ต่อมไขมันสร้าง sebum เพิ่มขึ้น การที่ระดับของ sebum สูงขึ้นกว่าปกติ อาจเนื่องมาจาก

- การสร้างฮอร์โมน androgen เพิ่มขึ้น ซึ่งจะหลั่งมากในช่วงวัยรุ่น ส่งผลให้มีการกระตุ้นต่อมไขมันให้มีการสร้าง sebum เพิ่มมากขึ้น โดยทั่วไปความรุนแรงของสิวะจะแปรตามอัตราการสร้าง sebum ที่ผิวหนัง

- ฮอร์โมน androgen อิสระเพิ่มขึ้น มีสาเหตุจากการขาด sex hormone binding globulin (SHBG)

- ต่อมไขมันมีความไวต่อการกระตุ้นเพิ่มขึ้น เนื่องจากการออกฤทธิ์ของ 5 alpha-reductase เปลี่ยน testosterone เป็นสารที่มีฤทธิ์มากกว่า คือ 5 alpha-dihydrotestosterone ภายในเซลล์ของต่อมไขมัน

#### 1.1.2 ความผิดปกติในการสร้างเคราตินภายในรูขุมขนและต่อมไขมัน

ภายในรูขุมขนและต่อมไขมันของผู้ที่เป็นสิวะมีการสร้างเคราตินเพิ่มขึ้น จนเกิดเป็นสิวะหัวขาวและสิวะหัวดำ ซึ่งมีหลายปัจจัยที่ส่งเสริมให้มีการสร้างเคราตินเพิ่มขึ้น ตัวอย่างเช่น ความผิดปกติในการสร้างเคราติน ผลโดยตรงของฮอร์โมน androgen ต่อ corneocyte เป็นต้น เมื่อต่อมไขมันสร้าง sebum เพิ่มมากขึ้น ปริมาณของกรด linoleic ซึ่งเป็นกรดไขมันจำเป็นที่เป็นส่วนประกอบของไขมันในรูขุมขนจะลดลง ก่อให้เกิด hyperkeratosis และหน้าที่ในการปกป้องของหนังกำพร้าลดลงด้วยเช่นกัน ทำให้สารก่อการอักเสบสามารถซึมผ่านผนังของ comedones ได้ง่ายขึ้น

#### 1.1.3 บทบาทของจุลินทรีย์ซึ่งอาศัยอยู่ที่ผิวหนังและภายในรูขุมขน

เชื้อจุลินทรีย์ที่ตรวจพบส่วนใหญ่ คือ

### 1.1.3.1 *Propionibacterium acnes* มีส่วนเกี่ยวข้องกับพยาธิกำเนิดของสิว

(Lwin *et al.*, 2014) คือ

- การอักเสบเกิดโดย *P. acnes* ในต่อมไขมันหลัง lipase ไปย่อยไขมันกลายเป็นกรดไขมันอิสระ (free fatty acid) และสาร chemotactic factors ซึ่งมีคุณสมบัติกระตุ้นการรวมตัวกันของเม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil โดยสารทั้ง 2 ชนิดนี้สามารถแพร่ผ่านต่อมไขมันไปสู่หนังกำพร้าแล้วรวมกับแอนติเจนและคอมพริเมนต์จากน้ำเหลือง ทำให้เกิดการสร้าง hydrolytic ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้จะย่อยเคราตินและเส้นขน ทำให้เกิดการอักเสบ

- การผลิต lipase ที่สามารถสลาย sebum triglycerides ในไขผิวหนังให้เป็น free fatty acid เช่น linoleic acid ซึ่งมีฤทธิ์ก่อให้เกิดการระคายเคือง ทำให้เกิด comedones และการอักเสบ นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียสามารถหลั่งเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ ได้แก่ phosphatase, lecithinase, deoxyribonuclease, hyaluronidase, protease, neuraminidase และสารแอนติเจนหรือสารเคมีที่กระตุ้นเม็ดเลือดขาวให้มารวมตัวกันมากขึ้นส่งผลให้เกิดการอักเสบ

### 1.1.3.2 *Staphylococcus epidermidis* และ *Staphylococcus aureus*

Staphylococci เป็นเชื้อประจำถิ่นบนผิวหนังและเยื่อเมือกของมนุษย์ บางชนิดเป็นสาเหตุของการเกิดฝีหนอง และการติดเชื้อต่าง ๆ พวกที่ก่อโรคร่วมใหญ่จะสลายเม็ดเลือดแดง ทำให้พลาสมาเกิดการรวมกลุ่มกัน และยังสามารถสร้างเอนไซม์รวมทั้งสารพิษต่าง ๆ ที่หลั่งออกมานอกเซลล์ได้ staphylococci สามารถหลั่ง lipase และ protease ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดสิว อีกทั้งยังสร้าง biofilms ที่เป็นสาเหตุการติดต่อยาปฏิชีวนะ (Saising *et al.*, 2012)

## 1.2 ลักษณะสิทางคลินิก (ศรีศุภลักษณ์, 2552)

โดยส่วนใหญ่แล้วคนที่มีสภาพผิวหนังมักจะเป็นสิได้ง่าย ซึ่งความมันบนใบหน้าจะสัมพันธ์กับความรุนแรงของสิวแต่ก็ไม่แน่นอนเสมอไป สิวมีลักษณะรอยโรคหลายรูปแบบ และร่องรอยที่หลงเหลือหลังจากการยุบตัวของสิว เช่น รอยแดง รอยดำ รอยบวม หรือ

รอยนูน การแบ่งแยกลักษณะต่าง ๆ ของสิว เพื่อที่จะบอกความรุนแรงของสิวในการรักษาและติดตามการรักษา โดยทั่วไปสิวแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ

### 1.2.1 สิวไม่อักเสบ (non-inflammatory acne) แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ

- สิวหัวปิดหรือสิวหัวขาว (closed or white head comedones) จะเห็นเป็นตุ่มนูน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.1 - 0.3 mm มีสีเดียวกับผิวหนัง ท่อเปิดของต่อมไขมันที่ตุ่มเหล่านี้แทบจะมองไม่เห็นด้วยตาเปล่า ร้อยละ 75 ของสิวนชนิดนี้สามารถพัฒนาเป็นสิวอักเสบ

- สิวหัวเปิดหรือสิวหัวดำ (open or black head comedones) เป็นตุ่มนูน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.1 - 0.3 mm มีจุดดำอยู่ตรงกลาง ซึ่งเกิดจากการขยายตัวของท่อไขมัน และมีสารสีดำอุดแน่นอยู่ภายใน ซึ่งเกิดจากการ oxidize ของ melamin

### 1.2.2 สิวอักเสบ (inflammatory acne) แบ่งเป็น 4 ชนิด คือ

- Papules เป็นสิวมุ่มนูนแดงแข็ง มีขนาดแตกต่างกันออกไป ร้อยละ 50 ของสิวนชนิดนี้เกิดจากสิวมองไม่เห็น (microcomedone) อีกร้อยละ 50 เกิดจากสิวหัวเปิดร้อยละ 25 และสิวหัวปิดร้อยละ 25

- Pustules สิวหนอง มี 2 ลักษณะ คือ สิวหนองชนิดตื้นและสิวหนองชนิดลึก มีได้หลายขนาด โดยสิวหนองชนิดตื้นมักจะหายได้เร็วกว่าสิวมุ่มนูนแดง ส่วนสิวหนองชนิดลึกจะมีอาการเจ็บและมักพบในคนที่เป็นสิवरุนแรง

- Nodules สิวอักเสบเป็นตุ่มนูน มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 8 mm ขึ้นไป หลังจากสิวยุบตัวอาจเกิดแผลเป็นตามมาได้

- Cysts สิวขนาดใหญ่เป็นถุงใต้ผิวหนัง ภายในจะมีหนองหรือสารเหลว ๆ คล้ายเนย เมื่อหายแล้วมักมีแผลเป็นหลงเหลืออยู่ สิวชนิดนี้พบได้ไม่บ่อยนัก

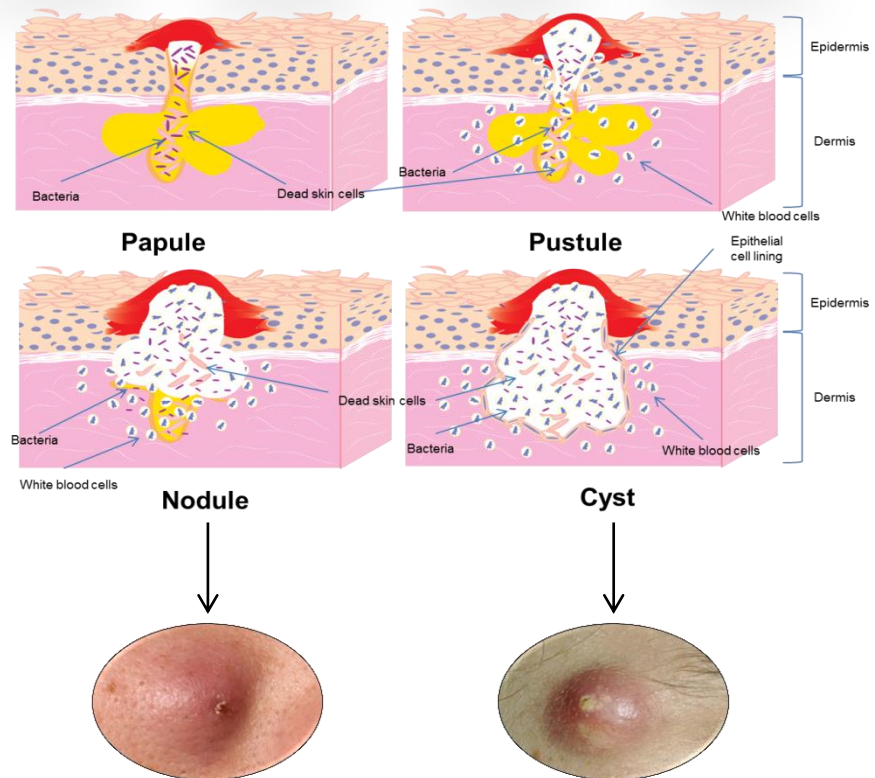
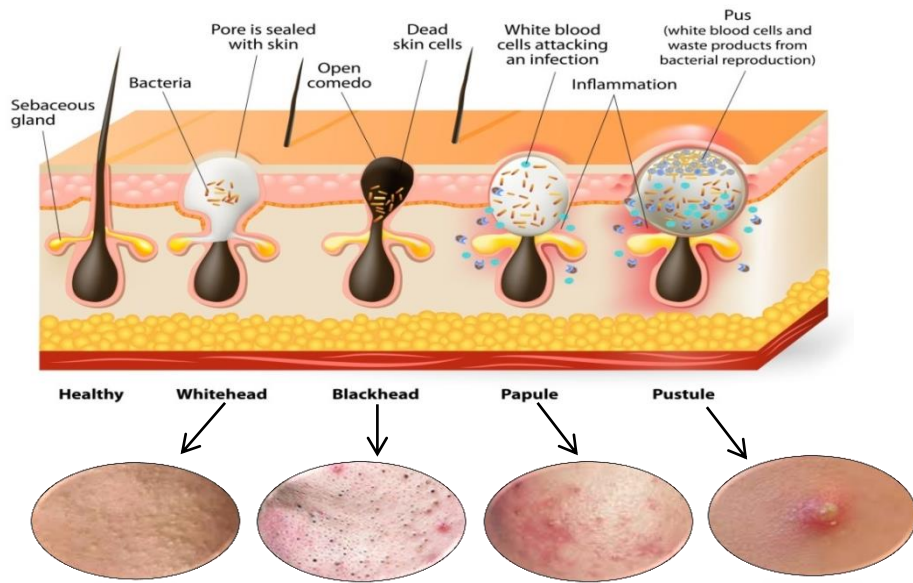
### 1.3 รอยโรคที่หลงเหลือจากการเป็นสิว

- รอยสีน้ำตาลดำ (post inflammatory pigmentation) พบได้บ่อยในคนผิวคล้ำและจะปรากฏให้เห็นนานหลายเดือนกว่าจะจางไป

- รอยแผลเป็นชนิดนูน (hypertrophic scar/keloid)

- รอยแผลเป็นชนิดบุ๋ม (ice-pick scar/depress fibrotic scar)

รอยแผลเป็น 2 ชนิดหลังนี้ มักพบในคนที่เป็นสิवरุนแรง โดยรอยแผลเป็นชนิดนูนจะพบได้บ่อยที่บริเวณมุมของกรามล่างและที่ลำตัวช่วงบน



รูปที่ 1 แสดงลักษณะผิวหนังทางคลินิก (<http://www.vox.com/2015/2/24/8099409/acne-pimples> และ <http://healthfavo.com/cystic-acne-diagram.html>)

#### 1.4 ยาที่ใช้ในการรักษาสิว (ศรีศุภลักษณ์, 2552)

ยาสำหรับใช้รักษามี 2 กลุ่ม คือ

1.4.1 กลุ่มยาทารักษาสิว ส่วนใหญ่จะออกฤทธิ์หลักที่กลไกหนึ่งของการเกิดสิวนั้น และออกฤทธิ์รองที่กลไกอื่น ๆ เช่น ยาในกลุ่ม retinoid จะออกฤทธิ์หลักโดยลดการอุดตันของรูขุมขน ทำให้เยื่อรูขุมขนหลุดออก แต่ไม่สามารถลดจำนวนเชื้อ *P. acnes* ได้ การรักษาจึงจำเป็นต้องใช้ยาหลายชนิดร่วมกัน

1.4.1.1 Retinoids กลไกการออกฤทธิ์เป็น anticomedogenic และ comedolytic แต่ไม่มีฤทธิ์ลดการสร้าง sebum ไม่มีผลต่อการฆ่าเชื้อ *P. acnes* มีฤทธิ์ต้านการอักเสบเพียงเล็กน้อย ใช้รักษาสิวทุกประเภท ยกเว้น สิวที่กำลังมีการอักเสบรุนแรง และใช้ในการป้องกันการเกิด microcomedone ยาในกลุ่ม retinoid ได้แก่

- Tretinoin (Retin A<sup>®</sup>, Stieva<sup>®</sup> 0.025%, 0.05%, 0.1%) เป็นยาตัวแรกที่นำมาใช้รักษาสิว มีผลข้างเคียงคือ ระคายเคืองผิวหนัง น้ำแดง แสบแห้ง ลอก คัน แพ้แสง
- Isotretinoin (Isotrex<sup>®</sup> 0.05% gel) มีฤทธิ์ลดการทำงานของต่อมไขมัน ใช้รักษาได้ทั้งสิวไม่อักเสบและอักเสบที่ไม่รุนแรง
- Adapalene (Differin<sup>®</sup> 0.1% gel) ช่วยลดการสร้าง comedone และมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ

1.4.1.2 Benzoyl peroxide (2.5%, 4%, 5%, และ 10%) การออกฤทธิ์ที่เหมาะสมแก่การใช้รักษาสิวอักเสบที่ไม่รุนแรงถึงรุนแรงปานกลาง มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. acnes* ลดการอักเสบ แต่ไม่มีฤทธิ์ลดการสร้าง comedone สามารถใช้ร่วมกับยาทา tretinoin หรือ topical antibiotics ได้ มีผลข้างเคียงคือ หน้าแดง แสบ หน้าแห้งเป็นขุย

1.4.1.3 Azelaic acid (20% cream, Skinoren<sup>®</sup>) เป็น calcium dicarboxylic acid มีฤทธิ์เป็น bacteriostatic ต่อ *P. acnes* และยังมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ลดการสร้าง comedone ใช้รักษาทั้งสิวก่อนอักเสบและไม่อักเสบ สามารถช่วยลดรอยจากสิวได้ ผลข้างเคียงคือ อากาการคัน ผื่นแดง และลอก

1.4.1.4 Topical antibiotics ประกอบด้วยยาในกลุ่ม tetracycline, erythromycin และ clindamycin มีฤทธิ์ในการลดจำนวนของเชื้อ *P. acnes* และมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยไปลดการทำงานของ leucocyte chemotaxis ใช้ในการรักษาสิวก่อนอักเสบที่ไม่รุนแรง ผลข้างเคียงคือ ระคายเคือง แห้ง ลอก คันจากอาการแพ้ ทำให้เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะ

1.4.1.5 ยาทาอื่น ๆ เช่น salicylic acid (1 - 3%) อยู่ในรูป acne lotion ออกฤทธิ์เป็น comedolytic และมีฤทธิ์ต้านการอักเสบได้เล็กน้อย ใช้รักษาสิวที่ไม่รุนแรง

1.4.2 ยารับประทานรักษาสิว เป็นยาปฏิชีวนะชนิดรับประทาน ใช้ในการรักษาสิวอักเสบชนิดรุนแรงปานกลางถึงรุนแรงมาก โดยจะนำมาใช้รักษากับกรณีที่ใช้ยาทาปฏิชีวนะไม่ได้ผล มีโอกาสเกิดเป็นแผลเป็นหรือคีลอยด์ กลไกในการออกฤทธิ์ของยาในกลุ่มนี้ คือ ออกฤทธิ์ต้านการอักเสบ เป็น immunomodulator ลดปริมาณ *P. acnes* ยับยั้งการสร้าง lipase ทำให้ลดการสร้าง free fatty acid

การเลือกใช้อาปฏิชีวนะชนิดรับประทานในการรักษาสิว มีดังนี้

- ใช้ยาปฏิชีวนะชนิดรับประทานเฉพาะผู้ป่วยที่มีสิวอักเสบชนิดรุนแรงปานกลางถึงมาก
- หลีกเลี่ยงการใช้ยาปฏิชีวนะเพียงอย่างเดียวในการรักษาสิว ควรใช้ร่วมกับ topical retinoid หรือ topical benzoyl peroxide
- หลีกเลี่ยงการใช้ยาปฏิชีวนะชนิดทาภายนอกและชนิดรับประทานในกลุ่มเดียวกัน
- ควรเริ่มต้นด้วยยาปฏิชีวนะที่ความเข้มข้นสูงก่อนนาน 6 - 8 สัปดาห์ แล้วจึงค่อย ๆ ลดขนาดความเข้มข้นของยาลง

ยาปฏิชีวนะที่ใช้ได้แก่

1.4.2.1 Tetracycline เป็น first line drug ยามีความปลอดภัยและราคาถูก ใช้ได้ผลดี ใช้ในการรักษาสิวอักเสบ แต่มีผลข้างเคียงคือ คลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง แพ้แสง การติดเชื้อราในช่องคลอด และห้ามใช้ในเด็กที่อายุต่ำกว่า 12 ปี เพราะมีผลข้างเคียงต่อกระดูกและฟัน

1.4.2.2 Doxycycline เป็น new generation ของ tetracycline ซึ่งได้ผลดี ดูดซึมเข้าสู่ต่อมไขมันได้ดี มีผลข้างเคียงเช่นเดียวกับ tetracycline

1.4.2.3 Minocycline เป็นยาในกลุ่ม tetracycline ได้ผลดีในการลดปริมาณของสิวกอักเสบและไม่ทำให้เกิดการดื้อยา ยานี้ไม่ควรใช้เป็น first line drug ในการรักษาสิว มีผลข้างเคียงคือ เวียนศีรษะ lupus-like syndrome และ blue grey cutaneous pigmentation

1.4.2.4 Erythromycin ใช้ได้ผลดีในการรักษาสิว แต่จะมีปัญหาหากใช้เป็นเวลานาน โดยทำให้เกิดการดื้อยา ผลข้างเคียงคือ คลื่นไส้ อาเจียน มี drug interaction ร่วมกับยาอื่น ๆ เช่น carbamazepine เป็นต้น

1.4.2.5 Trimethoprim / sulfamethoxazole เป็นยาที่ได้ผลดีในการรักษาสิวและมีราคาถูก แต่ไม่ควรใช้เป็น first line drug เนื่องจากมีผลข้างเคียงสูง คือ มีผื่นแพ้ยา Stevens-Johnson syndrome และ toxic epidermal necrolysis

1.4.2.6 Isotretinoin (13 cis-retinoic acid, Roaccutane®) ใช้รักษาสิवरุนแรงหรือ nodulocystic acne หรือสิวที่มีแผลเป็น ยานี้จะออกฤทธิ์ทุกจุดของการเกิดสิว ได้แก่ ลดการสร้าง sebum ลดการเกิด comedone ยับยั้ง *P. acnes* และมีฤทธิ์ลดการอักเสบ ผลข้างเคียงคือ ปากแห้ง (75 - 95%) ผื่นแดงทั่วหน้า (30 - 50%) ผิวแห้ง (30 - 50%) ตาแห้ง (30%) และทำให้ระดับ cholesterol และ triglycerides สูงขึ้น ผลข้างเคียงระยะยาวได้แก่ ความผิดปกติของกระดูก (hyperostosis) premature epiphyseal closure ถ้าใช้ในหญิงตั้งครรภ์เด็กจะพิการ (teratogenicity) เนื่องจากเป็นยาที่มีผลข้างเคียงสูง การใช้ยาควรอยู่ในความดูแลของแพทย์ผิวหนังเท่านั้น

ปัจจุบันมียารักษาสิวตัวชนิดใหม่ในกลุ่ม retinoids ที่ได้รับการพัฒนาสูตรใหม่เพื่อลดการระคายเคือง ได้แก่ tretinoin microsphere, tazarotene และ retinaldehyde เป็นต้น ซึ่งยากลุ่มนี้มีผลข้างเคียงน้อยกว่า

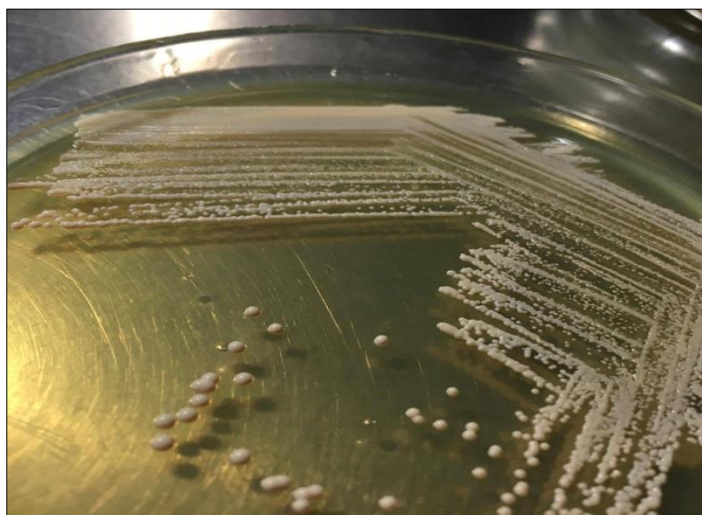
## 2. *Propionibacterium acnes*

เชื้อ *Propionibacterium* sp. จัดอยู่ในแฟมิลี Propionibacteriaceae โดยปกติเป็นเชื้อประจำถิ่นที่อาศัยในช่องปากและบนผิวหนัง อาจพบได้ในเยื่อตาและระบบสืบพันธุ์เพศหญิง ในการจัดกลุ่มมีสมาชิกอย่างน้อย 11 สปีชีส์ สปีชีส์ที่สำคัญคือ *P. acnes* และ *P. propionicum* ในส่วนของเชื้อ *P. acnes* พบอาศัยอยู่ได้ในรูขุมขนหรือต่อมไขมันที่ผิวหนัง และเป็นสาเหตุสำคัญของการก่อให้เกิดสิวกักเสบ (acne vulgaris) การติดเชื้อ *P. acnes* มีรายงานถึงความสัมพันธ์กับการทำหัตถการทางการแพทย์ และการใส่สิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย เช่น สายให้สารน้ำทางเส้นเลือด ซึ่งทำให้เชื้อสามารถเข้าสู่กระแสเลือด อาจนำไปสู่การติดเชื้อที่อวัยวะต่าง ๆ เช่น ลิ้นหัวใจอักเสบ ฝีในสมอง เป็นต้น ส่วนเชื้อ *P. propionicum* พบว่าก่อให้เกิดฝีหนองที่ชั้นเนื้อเยื่อและก่อโรค actinomycosis ร่วมกับเชื้อแบคทีเรียอื่น ๆ (ภัทรชัย, 2549)

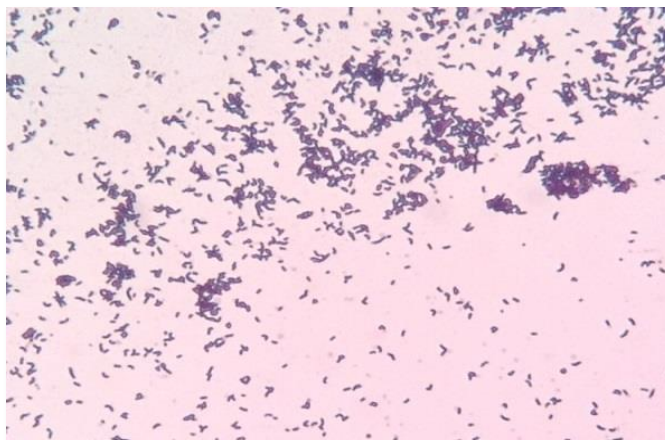


## 2.1 ลักษณะทั่วไปของเชื้อ *Propionibacterium acnes*

จัดอยู่ในกลุ่ม obligate anaerobe เป็นเชื้อที่ย้อมติดสีแกรมบวก มีลักษณะรูปร่างได้หลายแบบ (pleomorphism) เช่น แท่งสั้น ๆ คล้ายรูปกลมหรือรูปไข่ หรือแท่งสั้นมีหัวท้ายโตไม่เท่ากัน (club shaped) ซึ่งส่วนใหญ่มีลักษณะคล้ายกับเชื้อ *Corynebacterium* sp. ขนาดรูปร่างประมาณ  $0.3 - 1.3 \times 1 - 10 \mu\text{m}$  การเรียงตัวอาจพบเป็นสาย อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม หรืออาจอยู่อย่างไม่เป็นระเบียบ ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ไม่มีการสร้างสปอร์ เจริญเติบโตค่อนข้างช้า โดยจะใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงอย่างน้อย 72 ชั่วโมง การเพาะเลี้ยงต้องทำในสภาพที่ไร้ออกซิเจน เช่น ตู้ไร้ออกซิเจน (anaerobic chamber) หรือใช้ anaerobic jar ที่มีการแทนที่อากาศด้วย  $\text{N}_2$  85%,  $\text{H}_2$  10% และ  $\text{CO}_2$  5% เป็นเชื้อที่สามารถหมักน้ำตาลได้ การย่อยน้ำตาลจะได้ propionic acid และ acetic acid ซึ่งเป็นผลผลิตหลักจากการหมักน้ำตาล และสามารถผลิต catalase มีรายงานการทดสอบพบว่าเชื้อ *P. acnes* สามารถทนต่อสภาวะที่มีออกซิเจนได้นานเป็นชั่วโมง และอยู่รอดในเนื้อเยื่อที่มีออกซิเจนต่ำได้ (Aubin *et al.*, 2014) ยาปฏิชีวนะที่มีรายงานการใช้ในการรักษา เช่น ยาในกลุ่ม penicillin, carbapenems และ clindamycin ส่วนการใช้ยาในกลุ่ม erythromycin, tetracycline และ cephalosporins อาจให้ผลที่ไม่แน่นอน เชื้อมีความสามารถในการดื้อต่อยา metronidazole และ fosfomycin (Aubin *et al.*, 2014) จากการศึกษากลุ่มผู้ป่วยที่เป็นสิวจำนวน 215 ราย พบว่าแยกได้เชื้อ *P. acnes* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะได้ร้อยละ 9 (Toyne *et al.*, 2012)



รูปที่ 2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Propionibacterium acnes*



รูปที่ 3 ลักษณะการย้อมติดสีแกรมบวกและรูปร่างของเชื้อ *Propionibacterium acnes*

## 2.2 การทำให้เกิดสิว

ต้นเหตุของการเกิดสิวเริ่มจากการอุดตันของรูขุมขนที่เกิดจากผิวหนังที่ตายแล้วไม่ยอมหลุดออกไป จับตัวกันแน่นอยู่ในรูขุมขน เมื่อรวมกับเชื้อ *P. acnes* และไขมันที่ต่อมไขมันบริเวณรูขุมขนขับออกมา กลายเป็นก้อนอุดตันขึ้น ต่อมาเชื้อ *P. acnes* จะมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและสามารถย่อยไขมัน ซึ่งปกติไขมันเหล่านี้จะไม่มีปฏิกิริยาต่อผิวหนัง จนกลายเป็นกรดไขมันไปรบกวนผิวหนัง ในการเกิดการอักเสบของสิวเชื้อจะมีการหลั่ง lipase, chemotactic factor, metalloproteases และ porphyrins ซึ่งมีผลต่อการกระตุ้น oxygen generating toxic, reduced oxygen species และ free radicals เป็นสาเหตุให้เกิดความเสียหายที่ keratinocyte (Beylot *et al.*, 2014) ทำให้เกิดการอักเสบขึ้นในต่อมไขมันและแตกออกเป็นแผล

## 2.3 ปัจจัยความรุนแรงของเชื้อ *P. acnes* ต่อการเกิดสิว

### 2.3.1 เอนไซม์

เมื่อบริเวณรูขุมขนมีการเพิ่มจำนวนเชื้อ *P. acnes* จนทำให้เกิดการหลั่งสารและเอนไซม์ต่าง ๆ เช่น lipase, metalloprotease, porphyrins และ chemotactic factors เป็นต้น ออกมานอกเซลล์ และมีผลช่วยเพิ่มการทำงานของ reactive oxygen species (ROS) และ free radical ที่เป็นสาเหตุทำให้ keratinocyte ถูกทำลาย และกระตุ้น proinflammatory cytokines เช่น IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12 และ TNF- $\alpha$  ที่ทำให้เกิดการอักเสบ (Kim, 2005) เอนไซม์ที่มีความสำคัญของเชื้อ *P. acnes* คือ lipases ที่สามารถย่อยสลาย sebum triglyceride ได้เป็น free fatty acid เช่น oleic, palmitic และ lauric acids (Nakatsuji *et al.*, 2010) โดย free fatty acid

เหล่านี้จะมีผลต่อการกระตุ้นโมเลกุลบน Toll-like receptors และเพิ่มการผลิตของ human beta-defensin-2 ส่งผลให้เกิดการอักเสบ และ proteases จะถูกกระตุ้นผ่าน proteinase-activated receptor-2 (PAR-2) ใน keratinocyte ซึ่งทำให้เกิดการเหนี่ยวนำ pro-inflammatory cytokines, antimicrobial peptides และ matrix metalloproteinases มีรายงานการวิจัยที่ชี้ให้เห็นว่าเมื่อนำเชื้อ *P. acnes* มาเพาะเลี้ยงด้วย  $Ca^{2+}$  signaling in immortalized keratinocytes (HaCaT) พบว่า protease activity และ PAR-2 มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับ HaCaT ที่ไม่มีเชื้อ *P. acnes* (Lee *et al.*, 2010)

### 2.3.2 Biofilms

การสร้าง biofilms ของเชื้อ *P. acnes* มีส่วนช่วยส่งเสริมการเจริญของเชื้อ เนื่องจากช่วยให้สร้าง extracellular matrix, polysaccharide และ โปรตีน (Lwin *et al.*, 2014) มีรายงานวิจัยที่ศึกษาตัวอย่างต่อมรูขุมขนจากกลุ่มผู้เป็นสิ่ว พบว่าภายในต่อมรูขุมขนที่มีอาการสิ่วอักเสบนั้นมีการสร้าง biofilms ของเชื้อ *P. acnes* ขึ้นหนาแน่นเมื่อเทียบกับกลุ่มที่มีต่อมรูขุมขนปกติ (Jahns *et al.*, 2012) จากการศึกษาเกี่ยวกับการสร้าง biofilms ของเชื้อ *P. acnes* แสดงให้เห็นว่าเชื้อสามารถสร้าง biofilms ได้มากบนวัสดุชีวภาพที่หลากหลาย (Ramage *et al.*, 2003) การสร้าง biofilms ยังเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เชื้อ *P. acnes* มีอัตราการติดต่อยาปฏิชีวนะเพิ่มมากขึ้นและยังช่วยเพิ่มการแสดงออกของ virulence factors ที่สำคัญ เช่น การหลั่ง lipase (Lwin *et al.*, 2014) นอกจากนี้การสร้าง biofilms ของเชื้อ *P. acnes* ยังเปรียบเสมือนกับ กาว ที่ช่วยในการยึดติดระหว่างเซลล์ผิวหนังที่ตายแล้วเข้ากับรูเปิดของรูขุมขน ทำให้เกิดเป็น keratinaceous plug ซึ่งพัฒนาเป็น comedone ที่ใหญ่ขึ้นจนทำให้ต่อมไขมันเกิดการแตกออก (Burkhart and Burkhart, 2007) การสร้าง biofilms ยังมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เนื่องจากสามารถกระตุ้นการผลิตของ human beta-defensin-2, cytokines และ chemokines

### 3. กระทู

ชื่อวิทยาศาสตร์	: <i>Rhodomyrtus tomentosa</i> (Aiton) Hassk.
วงศ์	: Myrtaceae
ชื่อสามัญ (ไทย)	: กระทู ทุ พรวด
ชื่อสามัญ (อังกฤษ)	: downy myrtle, downy rose myrtle, rose myrtle, hill gooseberry, hill guava, isenbery bush, ceylon hill
ชื่ออื่น	: กาทู ง้าย ชวด ไร่ย



#### รูปที่ 4 แสดงลักษณะต้นกระทู

(<https://floraofsingapore.wordpress.com/2010/08/10/rhodomyrtus-tomentosa/> )

#### 3.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ต้นกระทู เป็นไม้พุ่มเขียวช่อทั้งปี สูงประมาณ 2 - 3 m

ใบ เป็นใบเดี่ยวเรียงตรงข้ามรูปไข่ปลายมน (elliptic-oval) ขนาดยาวประมาณ 5 - 8 cm กว้างประมาณ 1.5 - 4 cm หน้าใบเป็นมันสีเขียวเข้ม ส่วนด้านหลังใบมีสีนวลมีขน

ละเอียดปกคลุม เส้นใบนูนมี 3 เส้น ประกอบด้วย เส้นกลาง 1 เส้น และเส้นขอบใบ 2 เส้น ก้านใบยาวประมาณ 5 mm เป็นสี่เหลี่ยมมีขน

ดอก มีดอกเดี่ยวหรือเป็นช่อกระจุกช่อบริเวณง่ามใบหรือปลายกิ่ง ฐานรองดอกรูปถ้วย โคนกลีบเลี้ยงเชื่อมต่อกันเป็นรูปกรวย ปลายแยก 5 แฉก ผิวมีขนนุ่มหนาแน่น กลีบดอกมี 5 กลีบ รูปรีแกมรูปไข่ขนาด 1.5 - 2 cm เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 - 3 cm สีชมพู ด้านนอกมีขนสีขาว กลีบดอกชั้นเดียวมีสีชมพูอ่อนถึงแก่ในช่อเดียวกัน

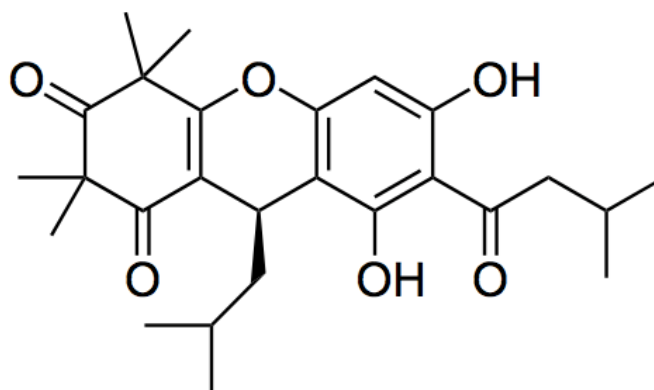
ผล ลักษณะกลมถึงเกือบกลม ขนาด 9 - 10 mm ผิวมีขนคล้ายกำมะหยี่หนาแน่น ผลอ่อนจะมีสีเขียวแล้วจะค่อย ๆ สุกจนกลายเป็นสีแดง จนสุกจัดสีจะเปลี่ยนเป็นสีม่วงดำ เนื้อผลมีสีชมพูแดง ภายในมีเมล็ดจำนวนมาก เมล็ดเป็นรูปไต สีน้ำตาลอ่อน ผลรับประทานได้มีรสหวาน (กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช, 2548)

กระทูเป็นไม้ท้องถิ่นทางเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมทั้งประเทศไทย ซึ่งพบได้บ่อยบนดินทรายบริเวณชายฝั่งทะเลทั้งสองด้านของไทยและจังหวัดในภาคตะวันออกเฉียง การศึกษาความเป็นกรดต่างของดินที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ที่ 4 - 10 มีค่าเฉลี่ยคือ 5.8 (Winotai *et al.*, 2005) กระทูสามารถทนความเค็มและเกลือน้ำแข็งได้ ทนอุณหภูมิได้ถึง  $-7^{\circ}\text{C}$  และยังสามารถปรับตัวกับไฟป่า อีกทั้งยังเจริญได้ดีหลังเกิดไฟป่า การปลูกกระทูนั้น ขณะนี้ยังไม่มีการปลูกเพื่อการค้า มีเพียงการปลูกไว้เพื่อเป็นการเก็บรวบรวมพันธุ์และตกแต่งสถานที่ ในมลรัฐฮาวาย รัฐฟลอริดาในสหรัฐอเมริกาและประเทศมาเลเซียกระทูถือว่าเป็นวัชพืชหลักหรือวัชพืชที่มีความร้ายแรง (principal or noxious weed)

สารสำคัญ การศึกษาและการแยกสารประกอบต่าง ๆ ที่ได้จากการสกัดใบกระทู เป็นสารในกลุ่ม triterpenoids และ steroids ได้แก่ lupeol, beta-amyrin, beta-amyrnonol, botulin, friedelin, alpha-amylin และ taraxerol (Hui *et al.*, 1975) ต่อมาได้มีการค้นพบสารใหม่ 2 ชนิด ซึ่งอยู่ในกลุ่ม triterpenoids คือสาร hopenediol และ oleananolides (Hui and Li, 1976) นอกจากนี้สามารถแยกได้สารในกลุ่ม tomentosin เป็นสารในกลุ่ม tannins (Liu *et al.*, 1997) ได้มีการศึกษาและสามารถแยกได้สารในกลุ่ม tannins จากใบและรากของกระทูได้ 4 ชนิด คือ สาร pedunculagin, casuariin, castalagin และ tomentosin (Liu *et al.*, 1998) และสามารถแยกสาร flavone glycosides และ ellagitannin ได้จากใบ (Hou *et al.*, 1999) การนำใบกระทูมาสกัดโดยใช้ ethyl acetate ทำให้แยกได้สาร rhodomyrone ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม acylphloroglucinols (Salni *et al.*, 2002)

จากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดด้วย ethanol จากใบกระทูต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค แสดงให้เห็นว่าสารสกัดสามารถยับยั้งแบคทีเรีย เช่น *Bacillus cereus*,

*Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *S. mutans* และ *Streptococcus pyogenes* (Voravuthikunchai *et al.*, 2007) และสามารถยับยั้งการเจริญ การสร้าง biofilms ของ เชื้อ coagulase-negative staphylococci และ coagulase-positive staphylococci ซึ่งมีค่า MIC<sub>50</sub> และ MIC<sub>90</sub> ต่อเชื้อดังกล่าวอยู่ในช่วง 64 - 512 µg/mL (Saising *et al.*, 2008; 2012) นอกจากนี้ การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *S. pyogenes* โดยใช้สารสกัดหยาบ dichloromethane, acetone, methanol และ ethanol จากใบกระทุงให้ผลค่า MIC และค่า MBC ของสารสกัดจาก dichloromethane, acetone และ ethanol ต่อเชื้อ *S. pyogenes* อยู่ในช่วง 0.015 - 0.062 mg/mL และ 0.125 - 1.0 mg/mL ตามลำดับ ส่วนสารสกัดหยาบจาก methanol มีค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อ *S. pyogenes* มากกว่า 1.0 mg/mL (อาอีเซาะส์, 2550) มีรายงานแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพ ของสารสกัดจากใบกระทุงต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อในกลุ่ม streptococci (Limsuwan *et al.*, 2011; 2012) นอกจากนี้ได้มีการศึกษาฤทธิ์ของ rhodomyrtonone ซึ่งพบว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Escherichia coli* และ *S. aureus* (Salni *et al.*, 2002) จากการศึกษาฤทธิ์ของ rhodomyrtonone พบว่า มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *S. epidermidis* clinical isolates โดยมีค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อ *S. aureus* และ *S. epidermidis* clinical isolates อยู่ในช่วง 0.25 - 2 mg/mL ยิ่งไปกว่านั้น สามารถยับยั้งการสร้าง biofilms และทำลาย mature biofilms ของเชื้อดังกล่าวได้ (Saising *et al.*, 2011)



รูปที่ 5 โครงสร้างทางเคมีของ rhodomyrtonone (Hiranrat A. and Mahabusarakam W., 2008)

## วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของ rhodomyrtone ในการยับยั้งเชื้อ *P. acnes* ที่แยกได้จาก รอยสิว
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของ rhodomyrtone ในการยับยั้งการสร้าง lipase และ protease ที่มีผลต่อการก่อสิวของเชื้อ *P. acnes* ที่แยกได้จากรอยสิว
3. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของ rhodomyrtone ในการยับยั้งการสร้าง biofilms ของเชื้อ *P. acnes* ที่แยกได้จากรอยสิว
4. ศึกษาประสิทธิผลทางคลินิกในการรักษาสิวด้วยสูตรตำรับ liposomal rhodomyrtone serum เปรียบเทียบกับยาที่ใช้รักษาสิวในปัจจุบัน

## บทที่ 2

### วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

#### วัสดุ

##### 1. เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

1.1 *Propionibacterium acnes* เป็นเชื้อที่แยกได้จากรอยสิ่ว

จำนวน 16 สายพันธุ์

1.2 *P. acnes* DMST 14916 แบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานเป็นเชื้อ

ควบคุมคุณภาพของการทดสอบ จำนวน 1 สายพันธุ์

##### 2. ยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดลอง

2.1 Clindamycin

##### 3. สารเคมี

3.1 Casein

3.2 Crystal violet

3.3 Dimethylsulphoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich)

3.4 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide  
(MTT)

3.5 95% ethanol (Merck)

3.6 Glucose

3.7 Sodium chloride (Merck)

3.8 Tributyrin



#### 4. อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 4.1 Brian heart infusion broth
- 4.2 Brian heart infusion agar
- 4.3 Blood agar
- 4.4 Chocolate agar

#### อุปกรณ์

- 1. Autoclave (Tony, ES 315)
- 2. Beaker (Pyrex)
- 3. Centrifuge (Biofugo pico)
- 4. CO<sub>2</sub> incubator HEPA Class 100 (Thermo Electron Corporation)
- 5. Duran bottle (Duran)
- 6. Hot air oven (Binder, T410340)
- 7. Incubator (Heraeus, B 5100E)
- 8. Laminar air flow cabinet (Gelman, HB 143AS)
- 9. Light microscope (Olympus, CX31RBSFA)
- 10. Micropipette ขนาด 1-10  $\mu$ L 20-200  $\mu$ L และ 100-1000  $\mu$ L (Eppendorf)
- 11. Microplate reader
- 12. Microtube ขนาด 1.5 mL (Axygen, INC.)
- 13. Microtiter plate แบบ 96 well (Nunc<sup>TM</sup>)
- 14. Microtiter plate แบบ 24 well (Nunc<sup>TM</sup>)
- 15. Pipet tip ขนาด 250  $\mu$ L และ 1000  $\mu$ L
- 16. Test tube (Pyrex)
- 17. Vortex mixer (Vortex Genie 2, G 560E)
- 18. Water bath (Julabo, TW 20)

## วิธีการทดลอง

1. การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimal Inhibitory Concentration (MIC)) และ ความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimal Bactericidal Concentration (MBC)) ของ rhodomyrtone ต่อเชื้อ *P. acnes* โดยวิธี broth macrodilution (CLSI, 2007)

### 1.1 การเตรียมเชื้อ

นำเชื้อ *P. acnes* เพาะเลี้ยงบน brain heart infusion (BHI) agar ที่เติม 1% glucose และ 0.5% yeast extract บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 วัน ในสภาพไร้ออกซิเจน จากนั้นเลือกเชื้อ 3 - 5 โคลโลนี มาเลี้ยงใน BHI broth ที่เติม 1% glucose และ 0.5% yeast extract นาน 24 ชั่วโมง ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับ McFarland no. 0.5 ด้วย 0.85% NaCl แล้วเจือจางต่อให้มีเชื้อประมาณ  $2.0 \times 10^6$  CFU/mL ด้วย BHI broth ที่เติม 1% glucose และ 0.5% yeast extract

### 1.2 การเตรียม rhodomyrtone และ clindamycin

เตรียมสารให้ได้ความเข้มข้นเป็น 10 เท่า ของความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการ ด้วย BHI broth ที่เติม 1% glucose และ 0.5% yeast extract

### 1.3 การทดสอบหาค่า MIC

ทำการเจือจางสารแบบลำดับสองด้วย BHI broth ที่เติม 1% glucose และ 0.5% yeast extract ให้มีความเข้มข้นตามที่กำหนดใน plate แบบ 24 หลุม (24 well plate) ให้มีปริมาตรหลุมละ 500  $\mu$ L คูณเชื้อจากข้อ 1.1 ใส่ลงในแต่ละหลุม หลุมละ 500  $\mu$ L เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในสภาพไร้ออกซิเจน

การอ่านผล บันทึกความเข้มข้นต่ำสุดของ rhodomyrtone และ clindamycin ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (control) เป็นค่า MIC

### 1.4 การทดสอบหาค่า MBC

นำแต่ละหลุมที่ไม่มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากการทดสอบหาค่า MIC มาเพาะเลี้ยงบน BHI agar ที่เติม 1% glucose และ 0.5% yeast extract บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในสภาพไร้ออกซิเจน

การอ่านผล บันทึกความเข้มข้นต่ำสุดของ rhodomyrtone และ clindamycin ที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้เป็นค่า MBC

## 2. การคัดเลือกหาสายพันธุ์ที่สร้าง lipase และ protease ของเชื้อ *P. acnes* (Saising *et al.*, 2012)

นำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบเพาะเลี้ยงบน BHI agar ที่เติม 1% glucose และ 0.5% yeast extract บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 วัน ในสภาพไร้ออกซิเจน ให้ได้โคโลนีเดี่ยว ๆ เชื้อเชื้อที่ต้องการทดสอบป้ายลงบนอาหาร BHI agar ที่เติม 1% glucose และ 0.5% yeast extract ซึ่งเติม 1% tributyrin และ 2% casein สำหรับการทดสอบ lipase และ protease ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เชื้อที่สามารถสร้าง lipase ได้จะเกิดวงใสรอบโคโลนี ส่วนเชื้อที่สามารถสร้าง protease ได้จะเกิดวงขุ่นรอบโคโลนี

## 3. การทดสอบประสิทธิภาพของ rhodomyrtone ต่อการยับยั้งการสร้าง lipase และ protease ของเชื้อ *P. acnes* (Saising *et al.*, 2012)

### 3.1 การเตรียมเชื้อ

นำเชื้อ *P. acnes* เพาะเลี้ยงบน BHI agar ที่เติม 1% glucose และ 0.5% yeast extract บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 วัน ในสภาพไร้ออกซิเจน เลือกโคโลนีเดี่ยว ๆ 3 - 5 โคโลนี เลี้ยงใน BHI broth ที่เติม 1% glucose และ 0.5% yeast extract เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

### 3.2 การเตรียม rhodomyrtone และ clindamycin

เตรียมสารให้ได้ความเข้มข้นเป็น 10 เท่า ของความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการ (1/4MIC และ 1/2MIC) ด้วย BHI broth ที่เติม 1% glucose และ 0.5% yeast extract

### 3.3 การทดสอบการยับยั้งการสร้าง lipase

ผสมสารจากข้อ 3.2 กับ BHI agar ที่เติม 1% glucose และ 0.5% yeast extract ซึ่งเติม 1% tributyrin จากนั้นนำเชื้อจากข้อ 3.1 ปริมาตร 10  $\mu$ L หยดลงบนอาหารที่เตรียมไว้ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 72 ชั่วโมง ในสภาพไร้ออกซิเจน

การอ่านผล วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสรอบโคโลนีและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี กำหนดความสามารถในการย่อยสลาย (degree of hydrolysis) ซึ่งเท่ากับเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสหารด้วยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี

### 3.4 การทดสอบผลการยับยั้งการสร้าง protease

ผสมสารจากข้อ 3.2 กับ BHI agar ที่เติม 1% glucose และ 0.5% yeast extract ซึ่งเติม 2% casein จากนั้นนำเชื้อ 10  $\mu$ L จากข้อ 3.1 หยดลงบนอาหารที่เตรียมไว้ ป่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 72 ชั่วโมง ในสภาพไร้ออกซิเจน

การอ่านผล วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงชุ่นรอบโคโลนีและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี คำนวณหา degree of hydrolysis ซึ่งเท่ากับ เส้นผ่านศูนย์กลางของวงชุ่นหารด้วยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี ดังแสดง

$$\text{Degree of hydrolysis} = \frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของ zone ที่เกิดขึ้น}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี}}$$

### 4. การคัดเลือกหาเชื้อ *P. acnes* สายพันธุ์ที่สร้าง biofilms (Karaolis *et al.*, 2005)

นำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบเพาะเลี้ยงบน BHI agar ที่เติม 1% glucose และ 0.5% yeast extract ป่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 วัน ในสภาพไร้ออกซิเจน เลือกเชื้อ 3 - 5 โคโลนี เลี้ยงใน BHI broth ที่เติม 1% glucose และ 0.5% yeast extract นาน 24 ชั่วโมง ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับ McFarland no. 0.5 ด้วย 0.85% NaCl แล้วเจือจางต่อให้มีเชื้อประมาณ  $2.0 \times 10^6$  CFU/mL ด้วย BHI broth ที่เติม 1% glucose และ 0.5% yeast extract จากนั้นดูดเชื้อใส่ใน 24 well plate 500  $\mu$ L เติม BHI broth ที่เติม 1% glucose และ 0.5% yeast extract ปริมาตร 500  $\mu$ L ป่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในสภาพไร้ออกซิเจน ล้างเซลล์ด้วย phosphate buffered saline (PBS) 1 mL 2 ครั้ง เขย่าเบา ๆ เพื่อเอาแบคทีเรียที่ไม่มีการเกาะติดออก ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ย้อมสี biofilms โดยการเติม 0.1% crystal violet ปริมาตร 1 mL ทิ้งไว้ 30 นาที ล้างออกด้วยน้ำและทิ้งไว้ให้แห้ง 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม DMSO ลงไป 1 mL เขย่าเบา ๆ เก็บในที่มืด 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Optical Density - OD) ที่ 570 nm ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ใช้ BHI broth ที่เติม 1% glucose และ 0.5% yeast extract เป็น negative control พิจารณาความสามารถในการสร้าง biofilms ของเชื้อ *P. acnes* โดยการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อ กับค่าการดูดกลืนแสงของ negative control (OD<sub>c</sub>) ซึ่งแบ่งเป็น 4 ระดับ ดังนี้

1.  $OD < OD_c$  ไม่มีการสร้าง biofilms (non-biofilm production)
2.  $OD_c < OD \leq 2OD_c$  มีการสร้างเล็กน้อย (weak biofilm production)
3.  $2OD_c < OD \leq 4OD_c$  มีการสร้างปานกลาง (moderate biofilm production)
4.  $4OD_c < OD$  มีการสร้างมาก (strong biofilm production)

## 5. การทดสอบประสิทธิภาพของ rhodomyrtone ต่อการยับยั้งการสร้าง biofilms ของเชื้อ *P. acnes* โดยวิธี crystal violet binding assay (Karaolis *et al.*, 2005)

### 5.1 การเตรียมเชื้อ

นำเชื้อ *P. acnes* เพาะเลี้ยงบน BHI agar ที่เติม 1% glucose และ 0.5% yeast extract บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 วัน ในสภาพไร้ออกซิเจน จากนั้นเลือกเชื้อ 3 - 5 โคลนที่เลี้ยงใน BHI broth ที่เติม 1% glucose และ 0.5% yeast extract นาน 24 ชั่วโมง ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับ McFarland no. 0.5 ด้วย 0.85% NaCl แล้วเจือจางต่อให้มีเชื้อประมาณ  $2.0 \times 10^6$  CFU/mL ด้วย BHI broth ที่เติม 1% glucose และ 0.5% yeast extract

### 5.2 การเตรียม rhodomyrtone และ clindamycin

เตรียมสารให้ได้ความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการ (1/16, 1/8, 1/4 และ 1/2MIC) ด้วย BHI broth ที่เติม 1% glucose และ 0.5% yeast extract

### 5.3 การทดสอบผลการยับยั้งการสร้าง biofilms

ดูดสารจากข้อ 5.2 แต่ละความเข้มข้นใส่ลงใน 24 well plate ปริมาตร 500  $\mu$ L และเติมเชื้อจากข้อ 5.1 ปริมาตร 500  $\mu$ L บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในสภาพไร้ออกซิเจน นำมาวัดการเจริญของเชื้อ *P. acnes* โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 nm จากนั้นนำ plate มาล้างด้วย PBS ปริมาตร 1 mL 2 ครั้ง เช้าเบา ๆ 24 well plate เพื่อเอาแบคทีเรียที่ไม่มีการเกาะติดออก เท PBS ที่ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ย้อมสี biofilms โดยการเติม 0.1% crystal violet ปริมาตร 1 mL ทิ้งไว้ 30 นาที ล้างออกด้วยน้ำและทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นเติม DMSO ลงไป 1 mL เช้าเบา ๆ เก็บในที่มืด 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งใช้ 1% DMSO

วิเคราะห์ความแตกต่างความสามารถในการสร้าง biofilms ของเชื้อเมื่อทดสอบกับ rhodomyrtone และ clindamycin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เทียบกับชุดควบคุมโดยใช้ one-way ANOVA ( $p < 0.05$ )

## 6. การศึกษาผลของ rhodomyrtonone ต่อการยับยั้งการสร้าง biofilms ของเชื้อ *P. acnes* ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscopy (SEM))

### 6.1 การเตรียมเชื้อ

นำเชื้อ *P. acnes* เพาะเลี้ยงบน BHI agar ที่เติม 1% glucose และ 0.5% yeast extract บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 วัน ในสภาพไร้ออกซิเจน จากนั้นเลือกเชื้อ 3 - 5 โคโลนีเลี้ยงใน BHI broth ที่เติม 1% glucose และ 0.5% yeast extract นาน 24 ชั่วโมง ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับ McFarland no. 0.5 ด้วย 0.85% NaCl แล้วเจือจางต่อให้มีเชื้อประมาณ  $2.0 \times 10^6$  CFU/mL ด้วย BHI broth ที่เติม 1% glucose และ 0.5% yeast extract

### 6.2 การเตรียม rhodomyrtonone

เตรียมสารให้ได้ความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการ (1/16MIC และ 1/8MIC) ด้วย BHI broth ที่เติม 1% glucose และ 0.5% yeast extract

### 6.3 การทดสอบผลการสร้าง biofilms

ดูดสารจากข้อ 6.2 แต่ละความเข้มข้นปริมาตร 500  $\mu$ L ใส่ลงใน 24 well plate ที่มีแผ่นสไลด์ให้ biofilms เกาะติดบรรจุอยู่ แล้วเติมเชื้อจากข้อ 6.1 ปริมาตร 500  $\mu$ L บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในสภาพไร้ออกซิเจน ล้างด้วย PBS ปริมาตร 1 mL 2 ครั้ง นำแผ่นสไลด์ไปคงสภาพตัวอย่าง โดยนำตัวอย่างไป fix ด้วย 2.5% glutaraldehyde ( $C_6H_8O_2$ ) ใน 0.2 N PBS เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบตามกำหนดเวลาให้ล้างด้วย PBS 2 - 3 ครั้ง จากนั้นขจัดน้ำออกจากตัวอย่างโดยใช้ alcohol series (50% - 100%) จากความเข้มข้นต่ำไปจนถึงความเข้มข้นสูง ความเข้มข้นละ 2 ครั้ง นำตัวอย่างไปทำให้แห้ง ด้วยวิธี critical point drying แล้วจึงติดบนแท่นวางตัวอย่าง (stub) โดยใช้เทปกาว 2 หน้า, carbon tape, และ น้ำยาทาเล็บ ใช้ carbon paint หรือ silver paint เป็นตัวยึด จากนั้นนำตัวอย่างไปเคลือบทอง ด้วยเครื่อง sputter coater แล้วศึกษาลักษณะ biofilms ด้วยเครื่อง SEM (Quanta 400 FEG; FEI)

## 7. การทดสอบประสิทธิภาพของ rhodomyrtone ต่อการยับยั้งเชื้อ *P. acnes* ภายใน biofilms โดยวิธี tetrazolium salt assay (MTT assay) (Kužma *et al.*, 2007)

### 7.1 การเตรียมเชื้อ

นำเชื้อ *P. acnes* เพาะเลี้ยงบน BHI agar ที่เติม 1% glucose และ 0.5% yeast extract บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 วัน ในสภาพไร้ออกซิเจน จากนั้นเลือกเชื้อ 3 - 5 โคโลนี เพาะเลี้ยงใน BHI broth ที่เติม 1% glucose และ 0.5% yeast extract นาน 24 ชั่วโมง ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับ McFarland no. 0.5 ด้วย 0.85% NaCl แล้วเจือจางต่อให้มีเชื้อประมาณ  $2.0 \times 10^6$  CFU/mL ด้วย BHI broth ที่เติม 1% glucose และ 0.5% yeast extract

### 7.2 การเตรียม rhodomyrtone และ clindamycin

เตรียมสารเพื่อให้ได้ความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการ (MIC, 2MIC, 4MIC และ 8MIC) ด้วย BHI broth ที่เติม 1% glucose และ 0.5% yeast extract

### 7.3 การทดสอบการยับยั้งเชื้อ *P. acnes* ภายใน biofilms

ดูดเชื้อจากข้อ 7.1 ใส่ลงใน 24 well plate ปริมาตร 500  $\mu$ l บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 7 วัน ในสภาพไร้ออกซิเจน เทอาหารเลี้ยงเชื้อออก จากนั้นเติมสารจากข้อ 7.2 ลงใน 24 well plate ที่มีการสร้าง biofilms หลุมละ 1 mL บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาพไร้ออกซิเจน เทส่วนที่เป็นของเหลวออก เติม PBS ปริมาตร 800  $\mu$ L และ MTT ปริมาตร 200  $\mu$ L บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในสภาพไร้ออกซิเจน เท MTT solution ออก ละลาย biofilms ที่ย้อมติดสี MTT ด้วย DMSO ปริมาตร 1 mL เก็บไว้ในที่มืด 30 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งใช้ 1% DMSO เป็นชุดควบคุมในการทดลอง

วิเคราะห์ความแตกต่างความสามารถในการยับยั้งเชื้อภายใน biofilms ของเชื้อเมื่อทดสอบกับ rhodomyrtone และ clindamycin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เทียบกับชุดควบคุมโดยใช้ one-way ANOVA ( $p < 0.05$ )

## 8. การศึกษาผลของ rhodomyrtonone ต่อลักษณะรูปร่างของเชื้อ *P. acnes* ด้วย กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscopy (TEM))

### 8.1 การเตรียมเชื้อ

นำเชื้อ *P. acnes* เพาะเลี้ยงบน BHI agar ที่เติม 1% glucose และ 0.5% yeast extract บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 วัน ในสภาพไร้ออกซิเจน จากนั้นเลือกเชื้อ 3 - 5 โคโลนี เพาะเลี้ยงใน BHI broth ที่เติม 1% glucose และ 0.5% yeast extract นาน 24 ชั่วโมง ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับ McFarland no. 0.5 ด้วย 0.85% NaCl แล้วเจือจางต่อให้มีเชื้อประมาณ  $2.0 \times 10^6$  CFU/mL ด้วย BHI broth ที่เติม 1% glucose และ 0.5% yeast extract แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

### 8.2 การเตรียม rhodomyrtonone และ clindamycin

เตรียมสารให้ได้ความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการ (8MIC) ด้วย BHI broth ที่เติม 1% glucose และ 0.5% yeast extract

### 8.3 การทดสอบ

ดูดเชื้อปริมาตร 500  $\mu$ L จากข้อ 8.1 ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีสารจากข้อ 8.2 อยู่ 500  $\mu$ L บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาพไร้ออกซิเจน นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอนที่ได้ด้วย PBS ปริมาตร 1 mL 2 ครั้ง คงสภาพตัวอย่างโดยนำตะกอนไป fix ด้วย 2.5% glutaraldehyde ( $C_6H_8O_2$ ) นำมาขจัดน้ำออกโดยใช้ alcohol series (50% - 100%) นำมาแทนที่ด้วยพลาสติก (embedding and polymerization) และทำให้เป็นแท่ง ตัดให้เป็นชิ้นบาง ๆ ด้วยเครื่อง ultramicrotome แล้วศึกษาลักษณะรูปร่างของเชื้อ *P. acnes* ด้วยเครื่องมือ TEM



## 9. การเตรียมสูตรตำรับ liposomal rhodomyrtone serum (Chorachoo *et al.*, 2013)

### 9.1 การเตรียม liposome encapsulated rhodomyrtone

แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือส่วนไขมัน เตรียมโดยชั่ง rhodomyrtone และไขมัน (ที่ความเข้มข้น 60  $\mu\text{mol}$  โดยมี phosphatidylcholine และ cholesterol ในอัตราส่วน 4 : 1) ใส่ขวดแก้ว นำมาละลายด้วย ethanol และส่วนน้ำเตรียมโดยใช้ mili Q water ใส่ขวดให้มีปริมาตรเท่ากับ ethanol จากนั้นนำไป sonication เป็นเวลา 30 นาที วางในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนไขมันและน้ำผสมกัน นำส่วนที่ผสมเข้ากันดีแล้วมาระเหย ethanol ออกให้หมด จะได้ liposome encapsulated rhodomyrtone นำไปเก็บที่อุณหภูมิห้อง

### 9.2 การเตรียมส่วน serum base

ผสม Dow corning<sup>®</sup> RM 2051 และ Dow corning<sup>®</sup> 9045 silicone เติม mili Q water ลงไปผสมให้เข้ากัน และเติม uniphen P 23 คนให้เข้ากัน นำมาพักไว้ที่อุณหภูมิห้อง

### 9.3 การเตรียมสูตรตำรับ liposomal rhodomyrtone serum

นำส่วน liposome encapsulated rhodomyrtone มา 10% (w/w) เติมลงใน serum base ผสมสองส่วนให้เป็นเนื้อเดียวกัน (คนไปในทิศทางเดียวกันตลอด เป็นเวลา 30 นาที) พักไว้ที่อุณหภูมิห้องก่อนนำมาบรรจุ

**10. การศึกษาประสิทธิผลทางคลินิกในการรักษาสิวด้วย liposomal rhodomyrtone serum เปรียบเทียบกับยาที่ใช้รักษาสิวในปัจจุบัน**

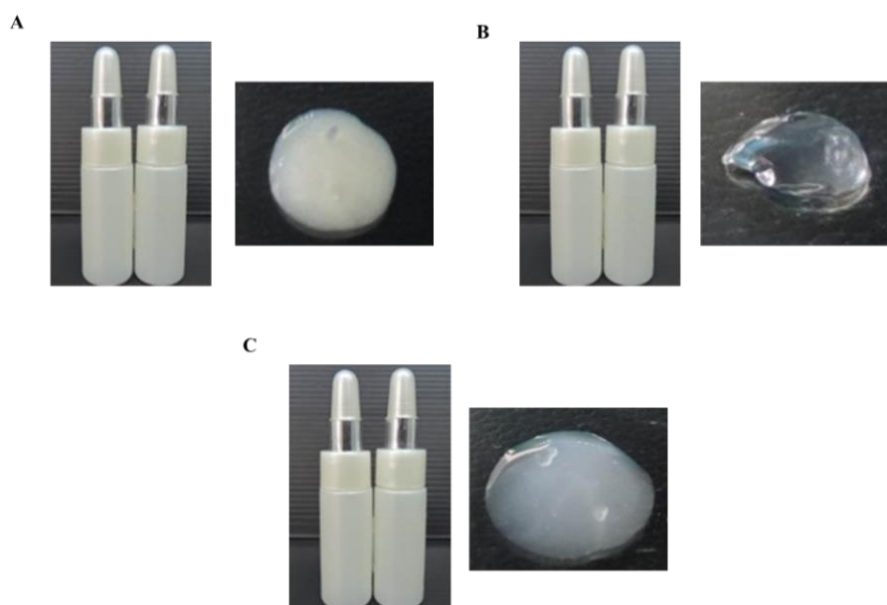
**10.1 การแบ่งกลุ่มอาสาสมัคร**

แบ่งกลุ่มอาสาสมัครออกเป็น 3 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 ได้รับสูตรตำรับ liposomal rhodomyrtone serum แสดงในรูปที่ 6A

กลุ่มที่ 2 ได้รับ clindamycin gel โดย 1 g ของเจล มี clindamycin phosphate equivalent อยู่ 10 mg (1% clindamycin) แสดงในรูปที่ 6B

กลุ่มที่ 3 ได้รับ liposome serum base โดยมี liposome ที่ไม่มี rhodomyrtone เป็นส่วนประกอบ ผสมกับ serum base แสดงในรูปที่ 6C



**รูปที่ 6** ลักษณะผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการทดสอบทางคลินิก

## 10.2 การออกแบบการศึกษา

การศึกษาประสิทธิภาพและความปลอดภัยของสูตรตำรับ liposomal rhodomyrton serum เทียบกับ clindamycin gel แบบ randomized, double-blind control trial ทำการเก็บข้อมูลที่สถานวิจัยความเป็นเลิศด้านผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติ (Natural Products Research Center of Excellence) การเตรียมขวดบรรจุผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิด ใช้ขวดบรรจุที่มีลักษณะ ขนาด และสีที่เหมือนกัน ติดฉลากหมายเลขที่ขวดบรรจุผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิด แบบสุ่ม การแจกผลิตภัณฑ์ให้กับอาสาสมัครเป็นไปตามลำดับหมายเลขที่ขวดบรรจุ ใช้ผลิตภัณฑ์เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ ลำดับหมายเลขที่ขวดบรรจุจะถูกเปิดเผยหลังจากการเก็บข้อมูลในอาสาสมัครเสร็จสิ้น ขั้นตอนการรักษาดำเนินตามคำแนะนำของหลักการทางจริยธรรมตามที่กำหนดใน Declaration of Helsinki and Good Clinical Practices ซึ่งโครงการได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการตรวจสอบจากโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ (หมายเลขโครงการ 56-329-05-1)

## 10.3 การคัดเลือกอาสาสมัคร

จำนวนอาสาสมัครทั้งหมดที่เข้าร่วมโครงการ 90 คน แบ่งเป็นกลุ่มเพศหญิง 45 คน และเพศชาย 45 คน โดยมีอายุอยู่ในช่วง 18 - 25 ปี ที่มีลักษณะรอยสิ่วอยู่ในกลุ่มเล็กน้อยถึงปานกลางโดยระหว่างการเข้าร่วมโครงการอาสาสมัครทุกคนต้องงดใช้ยาปฏิชีวนะสำหรับรักษาสิ่วทั้งแบบชนิดทาหรือรับประทานจนเสร็จสิ้นตามกำหนดเวลาที่เข้าร่วม เกณฑ์การยกเว้นในการเข้าร่วมเป็นอาสาสมัครมีดังนี้

- ต้องไม่เป็นโรคผิวหนังหรืออยู่ในช่วงที่ต้องใช้ยาปฏิชีวนะทั้งชนิดยาทาหรือรับประทาน

- ต้องไม่มีสภาพผิวหนังดังต่อไปนี้ คือ รอยแดง ผิวแห้งกร้าน คัน และผิวลอก

- ต้องไม่มีโรคประจำตัว โรคเรื้อรัง ตึงเครียด และ hyperandrogenism

- ไม่มีสิ่วอักเสบชนิดรุนแรง (nodule cyst และ sinus tract) มากกว่า 5 รอยขึ้นไป

- ไม่มีประวัติการใช้ผลิตภัณฑ์ในกลุ่มรักษาสิ่ว

- ไม่มีการใช้ยาปฏิชีวนะใด ๆ ในการรักษาตัว หรือถ้าเคยใช้ต้องหยุดใช้ก่อนเข้าร่วมโครงการเป็นเวลาอย่างน้อย 4 สัปดาห์

- ต้องไม่มีประวัติการใช้สอร์โอมินเป็นเวลาอย่างน้อย 3 เดือน ก่อนเข้าร่วมโครงการ

- ต้องไม่มีประวัติการแพ้ clindamycin หรือสารที่ใช้เป็นส่วนประกอบในการทำผลิตภัณฑ์

10.3.1 อาสาสมัครทุกคนจะได้รับฟังคำชี้แจงรายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัย และมีการลงนามในหนังสือยินยอมก่อนเข้าร่วมโครงการ

10.3.2 ทำการทดสอบอาการแพ้ โดยการป้ายผลิตภัณฑ์ใต้ท้องแขนของอาสาสมัครทุกคนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนเริ่มการใช้ผลิตภัณฑ์ หากเกิดอาการแพ้อาสาสมัครสามารถถอนตัวออกจากการเข้าร่วมโครงการได้

10.3.3 อธิบายขั้นตอนการใช้ผลิตภัณฑ์ คือ หลังล้างหน้าให้แต้มผลิตภัณฑ์บริเวณที่มีรอยสิว เช้า - เย็น เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

#### 10.4 การประเมินประสิทธิภาพ

ทำการประเมินตั้งแต่ครั้งแรก (สัปดาห์ที่ 0) ที่อาสาสมัครเข้าร่วมโครงการ จากนั้นจะมีการนัดมาทำการประเมินทุกสัปดาห์ที่ 2, 4 และ 8 โดยการนับจำนวนเม็ดสิวแบ่งเป็น สิวไม่อักเสบ (สิิวหัวขาว และสิิวหัวดำ) และสิิวอักเสบ (ตุ่มแดงไม่มีหนอง ตุ่มแดงมีหนองที่หัว และตุ่มบวมใต้ผิวหนัง) แล้วนำมาเปรียบเทียบระดับความรุนแรงตาม Investigation's Global Assessment (IGA) (U.S. FAD, 2005) ดังนี้

### ตารางที่ 1 Investigation's Global Assessment

Grade	Description
0	Clear skin with no inflammatory or non-inflammatory lesions
1	Almost clear; rare non-inflammatory with no more than one small inflammatory lesion
2	Mild severity; greater than Grade 1; some non-inflammatory lesions with no more than a few inflammatory lesion (papules/pustules only; no active nodulo - cystic lesions)
3	Moderate severity; greater than Grade 2; up to many non-inflammatory lesions and may have some inflammatory lesions, but no more than one active small nodular lesion
4	Severe; greater than Grade 3; up to many non-inflammatory and inflammatory lesions, but no more than a few active nodular lesion

ประเมินผลประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์ดำเนินการโดยคำนวณร้อยละการลดลงของสิวไม่อักเสบและสิวอักเสบ

#### 10.5 การประเมินความปลอดภัย

ประเมินความปลอดภัยในการใช้ผลิตภัณฑ์ โดยทำการประเมินในเรื่องการเกิดผื่นคัน อาการแดง อาการแสบ และอาการคัน โดยอาสาสมัครจะได้รับการประเมินทุกครั้งของการนัดพบ กำหนดความรุนแรงเป็น 4 ระดับ คือ

0 = ไม่มีอาการ

1 = แสดงอาการเล็กน้อย

2 = แสดงอาการในระดับปานกลาง

3 = มีการแสดงอาการในระดับรุนแรง

การประเมินระดับความพึงพอใจเป็นไปตามการตอบสนองต่อการรักษาของอาสาสมัคร ซึ่งการตอบสนองต่อความพึงพอใจจะถูกบันทึกตามระดับดังนี้

1 = ไม่พึงพอใจ

2 = มีความพึงพอใจเล็กน้อย

3 = มีความพอใจปานกลาง

4 = มีความพอใจมาก

นอกจากนั้น บันทึกการเปลี่ยนแปลงโดยการถ่ายภาพใบหน้าของอาสาสมัคร  
จะทำทุกครั้งของการนัดพบ

#### 10.6 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ลักษณะพื้นฐานของอาสาสมัครเปรียบเทียบกันระหว่างกลุ่มและ  
จำนวนรอยสิ่วแต่ละชนิดตั้งแต่จุดเริ่มต้นตลอดจนถึงสิ้นสุดการรักษาด้วยผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิด ใช้  
one-way ANOVA ในการวิเคราะห์ การเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของจำนวนสิ่วแต่ละชนิด  
ภายในกลุ่มการใช้ผลิตภัณฑ์ ใช้ paired t-test ในการหาค่าความแตกต่าง ส่วนการเปรียบเทียบ  
ระหว่างกลุ่มใช้ covariance (ANCOVA) แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่  $p < 0.05$

### บทที่ 3

#### ผลการวิจัย

##### 1. การทดสอบหาค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimal Bactericidal Concentration (MBC) ของ rhodomyrtonone และ clindamycin

ค่า MIC และ MBC ของ rhodomyrtonone และ clindamycin ต่อเชื้อ *P. acnes* ที่แยกได้จากรอยสิวจำนวน 9 สายพันธุ์ และ *P. acnes* DMST 14916 สายพันธุ์มาตรฐานจำนวน 1 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่า ค่า MIC ของ rhodomyrtonone ต่อเชื้อ *P. acnes* อยู่ในช่วง 0.125 - 0.25  $\mu\text{g/mL}$  และ ค่า MBC ของ rhodomyrtonone ต่อเชื้อ *P. acnes* อยู่ในช่วง 0.25 - 0.5  $\mu\text{g/mL}$  สำหรับค่า MIC ของ clindamycin ต่อเชื้อ *P. acnes* ที่อยู่ในช่วง 8 - 16  $\mu\text{g/mL}$  และ ค่า MBC ของ clindamycin ต่อเชื้อ *P. acnes* อยู่ในช่วง 128 - 256  $\mu\text{g/mL}$  เมื่อทำการทดสอบกับเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *P. acnes* DMST 14916 พบว่าค่า MIC และ MBC ของ rhodomyrtonone เท่ากับ 0.25 และ 0.5  $\mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ และ ค่า MIC และ MBC ของ clindamycin เท่ากับ 8 และ 128  $\mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ เชื้อสายพันธุ์มาตรฐานนี้จะใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาความสามารถของ rhodomyrtonone และ clindamycin ต่อการยับยั้งการสร้าง lipase, protease และ biofilms

ตารางที่ 2 Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of rhodomertone and clindamycin against clinical isolates of *Propionibacterium acnes* from acne lesions (n = 9)

<i>Propionibacterium acnes</i> isolates	MIC/MBC ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	Rhodomertone	Clindamycin
NPRC 008	0.25/0.5	16/128
NPRC 021	0.25/0.5	16/256
NPRC 031	0.25/0.5	8/256
NPRC 032	0.125/0.25	16/256
NPRC 034	0.25/0.5	16/256
NPRC 035	0.25/0.5	16/256
NPRC 036	0.25/0.5	16/128
NPRC 039	0.25/0.5	8/128
NPRC 040	0.125/0.5	16/128
DMST 14916	0.125/0.25	16/256



## 2. การคัดเลือกเชื้อ *P. acnes* สายพันธุ์ที่สร้าง lipase และ protease

จากการทดสอบการสร้าง lipase และ protease ของเชื้อ *P. acnes* ที่แยกได้จาก รอยสิวทั้งหมด 16 สายพันธุ์ โดยการสร้าง lipase สังเกตได้จากการเกิดวงใสรอบ ๆ โคลินิที่เชื้อ มีการเจริญ ในขณะที่การสร้าง protease สังเกตจากการสร้างวงขุ่นรอบ ๆ โคลินิของเชื้อที่มีการเจริญ ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดของเชื้อ *P. acnes* ดังแสดงในตารางที่ 3 พบว่าเชื้อ *P. acnes* ที่แยกได้จากรอยสิวทั้งหมด 16 สายพันธุ์ สามารถสร้าง lipase ได้ทั้งหมด (100%) ในส่วนของการสร้าง protease นั้นพบว่ามีเพียง 6 สายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถสร้างได้ คิดเป็นร้อยละ 37.5

ทำการคัดเลือกเชื้อ *P. acnes* สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการสร้าง lipase ได้ สูงสุดมา 5 สายพันธุ์คือ NPRC 008, NPRC 021, NPRC 031, NPRC 032 และ NPRC 036 ส่วน เชื้อ *P. acnes* สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการสร้าง protease ได้สูงสุดมา 5 สายพันธุ์คือ NPRC 008, NPRC 021, NPRC 032, NPRC 034 และ NPRC 040 รวมถึงเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *P. acnes* DMST 14916 เพื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพของ rhodomyrone ต่อการยับยั้งการ สร้าง lipase และ protease ต่อไป

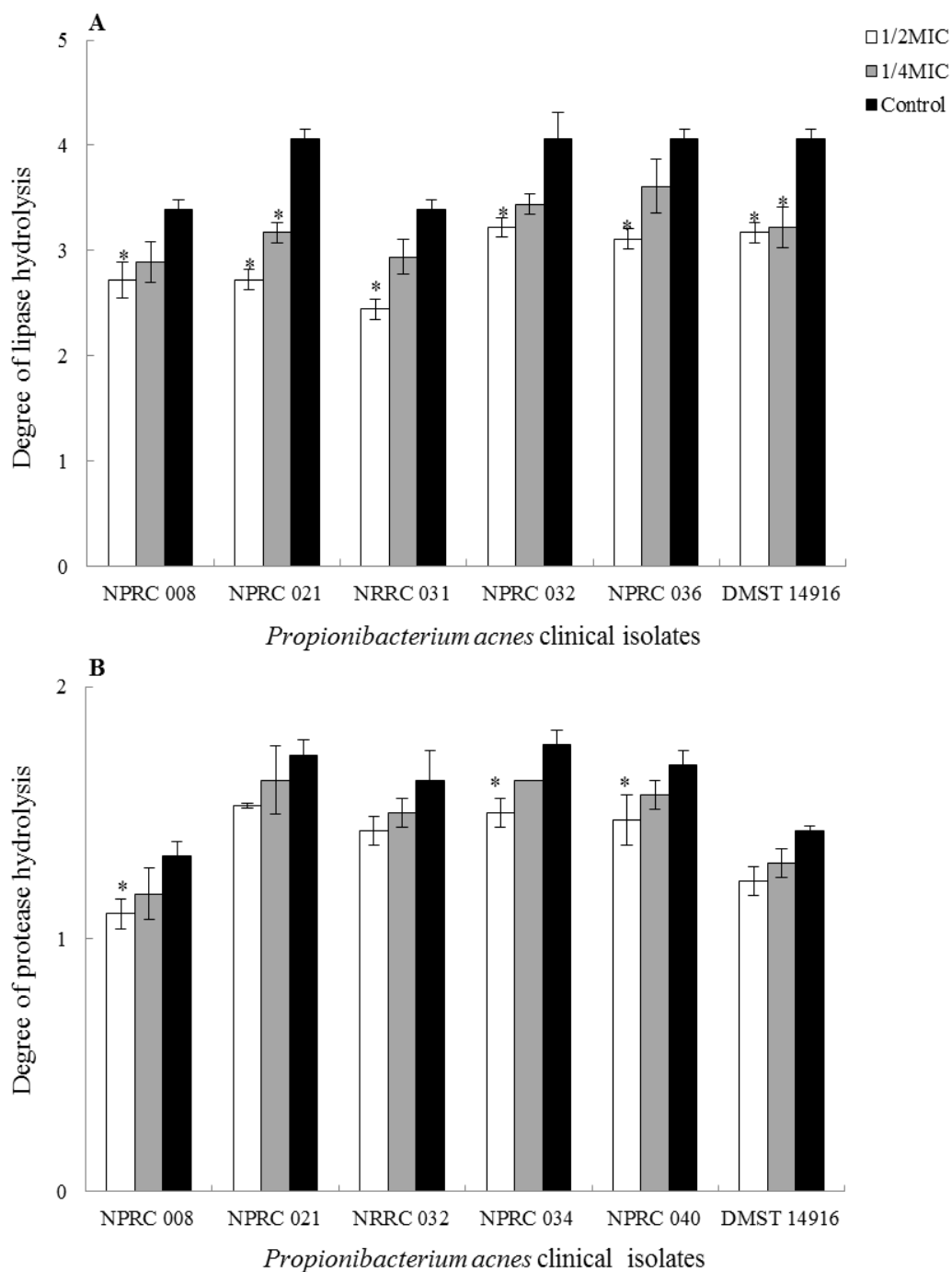
ตารางที่ 3 Lipase and protease enzyme production in *Propionibacterium acnes* isolated from acne lesions (n = 16)

Enzymes	Number of enzyme producing isolates (%)
Lipase	100
Protease	37.5

### 3. การทดสอบประสิทธิภาพของ rhodomyrtone ต่อการยับยั้งการสร้าง lipase และ protease ของเชื้อ *P. acnes*

นำเชื้อ *P. acnes* ทั้ง 5 สายพันธุ์คือ NPRC 008, NPRC 021, NPRC 031, NPRC 032 และ NPRC 036 ที่สร้าง lipase และ NPRC 008, NPRC 021, NPRC 032, NPRC 034 และ NPRC 040 ที่สร้าง protease มาทำการทดสอบผลของ rhodomyrtone และ clindamycin ที่ความเข้มข้น 1/4MIC และ 1/2MIC ต่อการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด โดยศึกษาจากค่า degree of hydrolysis ที่นำไปเปรียบเทียบกับค่า degree of hydrolysis ของชุดควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 7

ผลการทดสอบพบว่า rhodomyrtone สามารถยับยั้งการสร้าง lipase และ protease โดย rhodomyrtone ที่ความเข้มข้น 1/2MIC สามารถยับยั้งการสร้าง lipase ของเชื้อ *P. acnes* ทุกสายพันธุ์ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ( $p < 0.05$ ) ในขณะที่ rhodomyrtone ที่ความเข้มข้น 1/4MIC แสดงการยับยั้งการสร้าง lipase ได้อย่างมีนัยสำคัญต่อเชื้อ *P. acnes* สายพันธุ์ NPRC 021 และเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน DMST 14916 (รูปที่ 7A) ในส่วนของการทดสอบการยับยั้งการสร้าง protease พบว่า rhodomyrtone ที่ความเข้มข้น 1/2MIC สามารถยับยั้งการสร้างของเอนไซม์ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ( $p < 0.05$ ) คิดเป็นร้อยละ 50 (รูปที่ 7B) เมื่อทำการทดสอบการยับยั้งการสร้าง lipase และ protease ด้วย clindamycin ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่า clindamycin ที่ความเข้มข้น 1/4MIC และ 1/2MIC สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. acnes* ได้ทุกสายพันธุ์ ทำให้เชื้อไม่สามารถสร้างเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดได้



**Figure 7** Effects of rhodomlyrtone at sub-minimal inhibitory concentrations on lipase (A) and protease (B) activities of *Propionibacterium acnes* clinical isolates. The results are calculated as degree of hydrolysis. The value indicates the means  $\pm$  SD for three independent experiments performed in triplicate. \* Significant difference between treatment and control ( $p < 0.05$ )

#### 4. การคัดเลือกเชื้อ *P. acnes* สายพันธุ์ที่สร้าง biofilms

จากการทดสอบหาเชื้อ *P. acnes* สายพันธุ์ที่สามารถสร้าง biofilms จากทั้งหมด 16 สายพันธุ์ ผลการทดสอบแสดงในตารางที่ 4 พบว่าเชื้อทั้ง 16 สายพันธุ์ สามารถสร้าง biofilms ได้ทั้งหมด ซึ่งสามารถแบ่งตามระดับการเกาะติดได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีการเกาะติดน้อยมีทั้งหมด 2 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 12.5 กลุ่มที่มีการเกาะติดปานกลางมี 6 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 37.5 และกลุ่มที่มีการเกาะติดมากมี 8 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 50 ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าเชื้อ *P. acnes* ส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มที่สามารถสร้าง biofilms ที่เกาะติดได้มาก สำหรับเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *P. acnes* DMST 14916 มีการสร้าง biofilms อยู่ในระดับที่มีการเกาะติดมาก

ทำการคัดเลือกเชื้อ *P. acnes* สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการสร้าง biofilms ได้สูงสุดมา 5 สายพันธุ์ คือ NPRC 034, NPRC 035, NPRC 036, NPRC 039 และ NPRC 040 รวมถึงเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *P. acnes* DMST 14916 เพื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพของ rhodomyrone ต่อการยับยั้งการสร้าง biofilms ต่อไป

ตารางที่ 4 Biofilm production in *Propionibacterium acnes* isolated from acne lesions (n = 16)

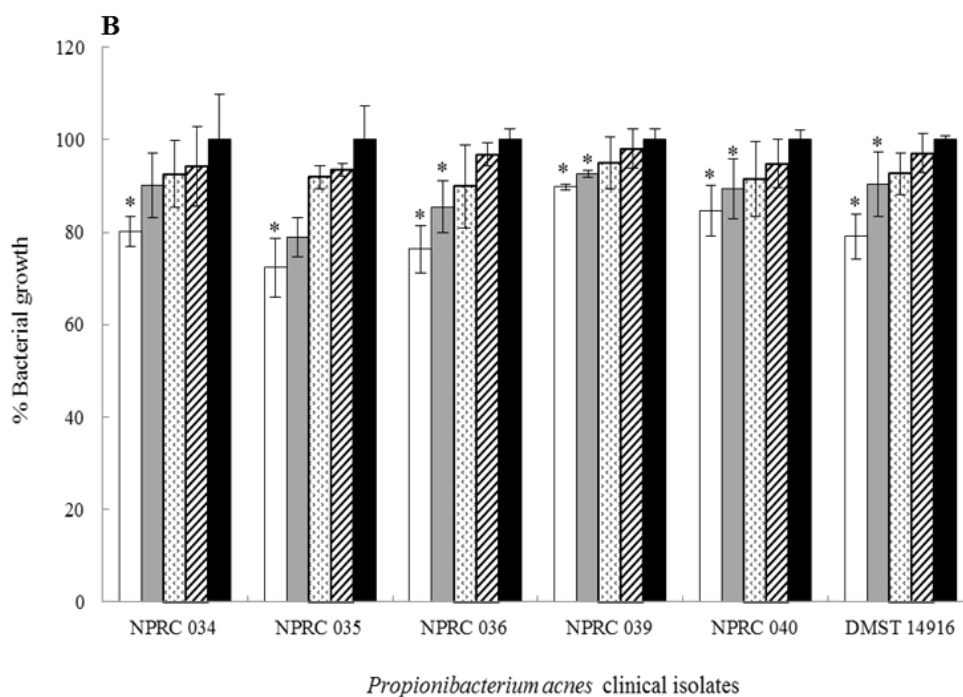
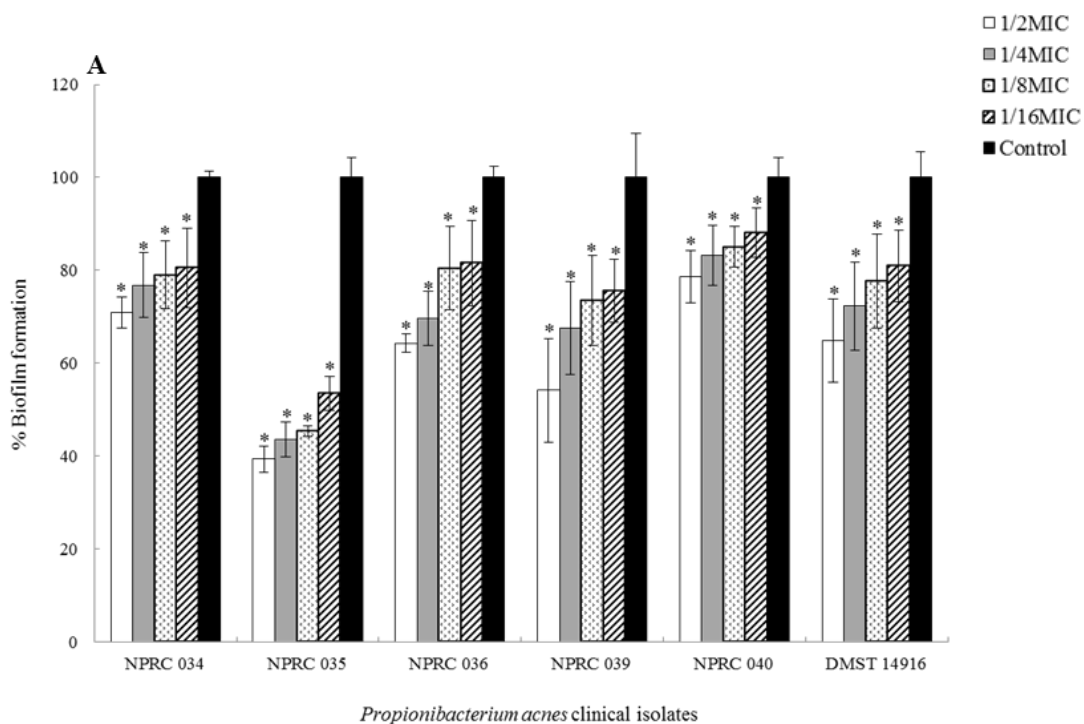
Biofilm production	Number of biofilm producing isolates (%)
Weak	12.5
Moderate	37.5
Strong	50

## 5. การทดสอบประสิทธิภาพของ rhodomyrton ต่อการยับยั้งการสร้าง biofilms ของเชื้อ

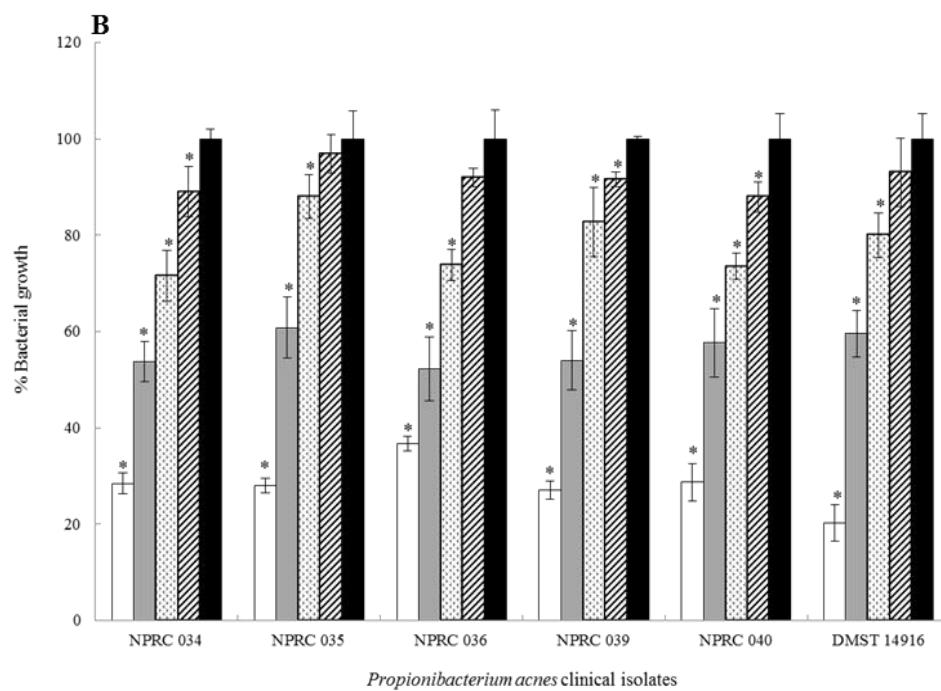
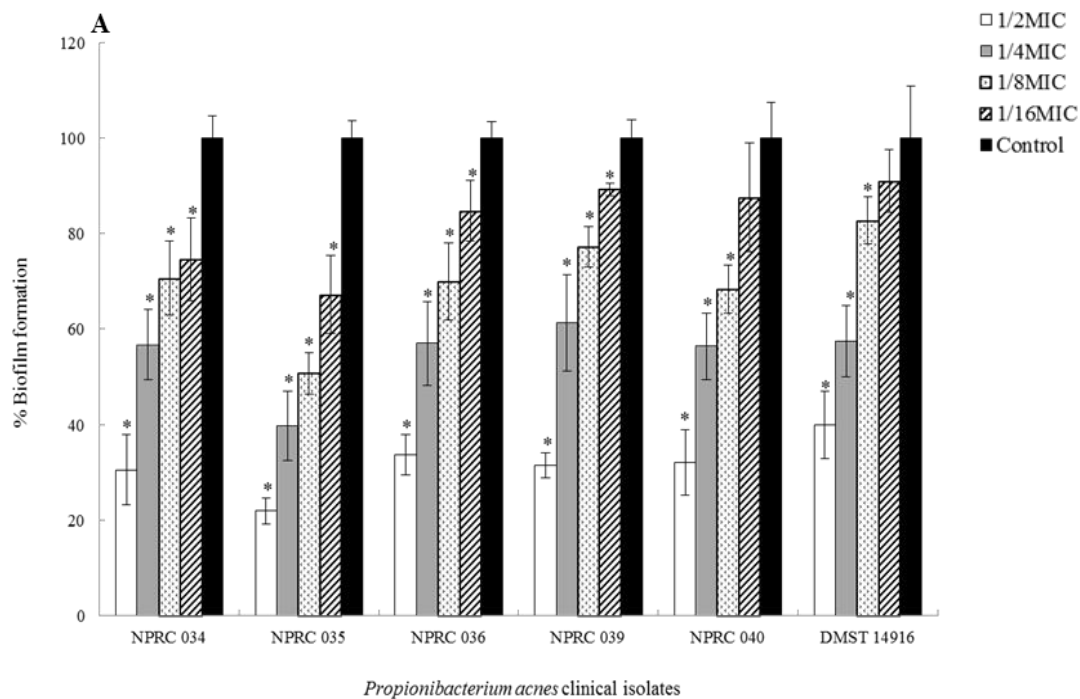
### *P. acnes*

จากการคัดเลือกเชื้อ *P. acnes* ทั้ง 5 สายพันธุ์มาทำการทดสอบผลของ rhodomyrton และ clindamycin ที่ความเข้มข้น 1/16MIC, 1/8MIC, 1/4MIC และ 1/2MIC ต่อการสร้าง biofilms

ผลการทดสอบพบว่า rhodomyrton สามารถยับยั้งการสร้าง biofilms ได้ในทุกสายพันธุ์ที่นำมาทำการทดสอบ รวมทั้งเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน ผลการทดสอบชี้ให้เห็นว่า rhodomyrton ทุกความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบสามารถยับยั้งการสร้าง biofilms ของเชื้อ *P. acnes* ทั้ง 6 สายพันธุ์รวมถึงเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ( $p < 0.05$ ) (รูปที่ 8A) การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. acnes* ด้วย rhodomyrton พบว่าที่ความเข้มข้น 1/4MIC และ 1/2MIC มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้ออย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ( $p < 0.05$ ) โดย rhodomyrton ที่ความเข้มข้น 1/4MIC สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. acnes* สายพันธุ์ NPRC 036, NPRC 039, NPRC 040 และ DMST 14916 ที่ความเข้มข้น 1/2MIC สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ทุกสายพันธุ์ ในขณะที่ rhodomyrton ที่ความเข้มข้น 1/16MIC และ 1/8MIC ไม่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้ออย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ( $p < 0.05$ ) (รูปที่ 8B) สำหรับผลการทดสอบของ clindamycin ต่อการสร้าง biofilms ของเชื้อ *P. acnes* พบว่า clindamycin ทุกความเข้มข้นสามารถยับยั้งการสร้าง biofilms ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ( $p < 0.05$ ) ยกเว้นที่ความเข้มข้น 1/16MIC ไม่สามารถยับยั้งการสร้าง biofilms ของเชื้อ *P. acnes* สายพันธุ์ NPRC 040 และ DMST 14916 ได้อย่างมีนัยสำคัญ ( $p > 0.05$ ) (รูปที่ 9A) ผลการยับยั้งการเจริญของ clindamycin ต่อเชื้อ *P. acnes* แสดงให้เห็นว่า clindamycin ทุกความเข้มข้นสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ทุกสายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ( $p < 0.05$ ) ยกเว้นเชื้อ *P. acnes* สายพันธุ์ NPRC 035, NPRC 036 และ DMST 14916 ที่ทดสอบด้วย clindamycin ความเข้มข้น 1/16MIC ไม่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญอย่างมีนัยสำคัญ ( $p > 0.05$ ) (รูปที่ 9B)



**รูปที่ 8** Effects of rhodomlyrtone at sub-minimal inhibitory concentrations on biofilm formation (A) and bacterial growth (B) of *Propionibacterium acnes* clinical isolates. The value indicates the means  $\pm$  SD for three independent experiments performed in triplicate. \* Significant difference between treatment and control ( $p < 0.05$ )



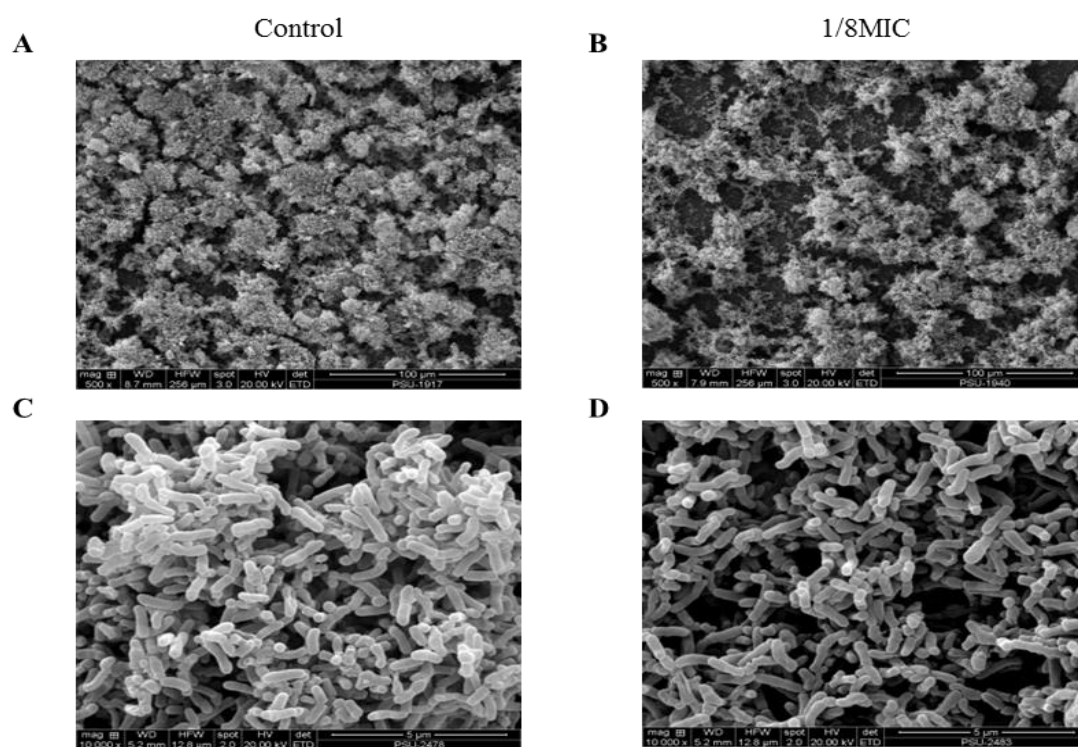
**រូបភាព ៩** Effects of clindamycin at sub-minimal inhibitory concentrations on biofilm formation (A) and bacterial growth (B) of *Propionibacterium acnes* clinical isolates. The value indicates the means  $\pm$  SD for three independent experiments performed in triplicate. \* Significant difference between treatment and control ( $p < 0.05$ )

## 6. การศึกษาประสิทธิภาพของ rhodomyrton ต่อการยับยั้งการสร้าง biofilms ของเชื้อ *P. acnes* ด้วย scanning electron microscopy (SEM)

จากผลการศึกษาความสามารถของ rhodomyrton ต่อการยับยั้งการสร้าง biofilms ของเชื้อ *P. acnes* ได้คัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ NPRC 035 มาศึกษาประสิทธิภาพของ rhodomyrton ที่ความเข้มข้น 1/16MIC และ 1/8MIC ต่อการทำลาย biofilms ของเชื้อ *P. acnes* ด้วย SEM

ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า rhodomyrton สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มกันของเชื้อ *P. acnes* ได้เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยการเกาะติดของ biofilms บนแผ่นสไลด์ในชุดควบคุมนั้นมีอยู่อย่างหนาแน่น (รูปที่ 10A) ในขณะที่การเกาะติดของ biofilms ที่ทดสอบด้วย rhodomyrton ที่ความเข้มข้น 1/8MIC ลักษณะการเกาะติดจะหนาแน่นน้อยกว่า สังเกตได้จากพื้นที่ว่างระหว่างกลุ่มเซลล์ที่จับกลุ่มกัน แสดงในรูปที่ 10B และเมื่อทำการศึกษาลงไปในแต่ละกลุ่มเซลล์ที่จับตัวกัน พบว่าการจับกันของเชื้อ *P. acnes* ที่ถูกทดสอบด้วย rhodomyrton มีการจับกันเป็นกลุ่มของเชื้อ *P. acnes* น้อยลง (รูปที่ 10D) ซึ่งในชุดควบคุมแสดงให้เห็นการจับกันเป็นกลุ่มก้อนของเชื้ออย่างเห็นได้ชัดเจน (รูปที่ 10C) ผลการทดสอบที่ได้นี้มีความสอดคล้องกันกับการทดสอบการยับยั้งการสร้าง biofilms ที่ชี้ให้เห็นอย่างชัดเจนว่า rhodomyrton มีประสิทธิภาพในการยับยั้งและทำลาย biofilms ของเชื้อ *P. acnes* แม้จะใช้ความเข้มข้นต่ำ



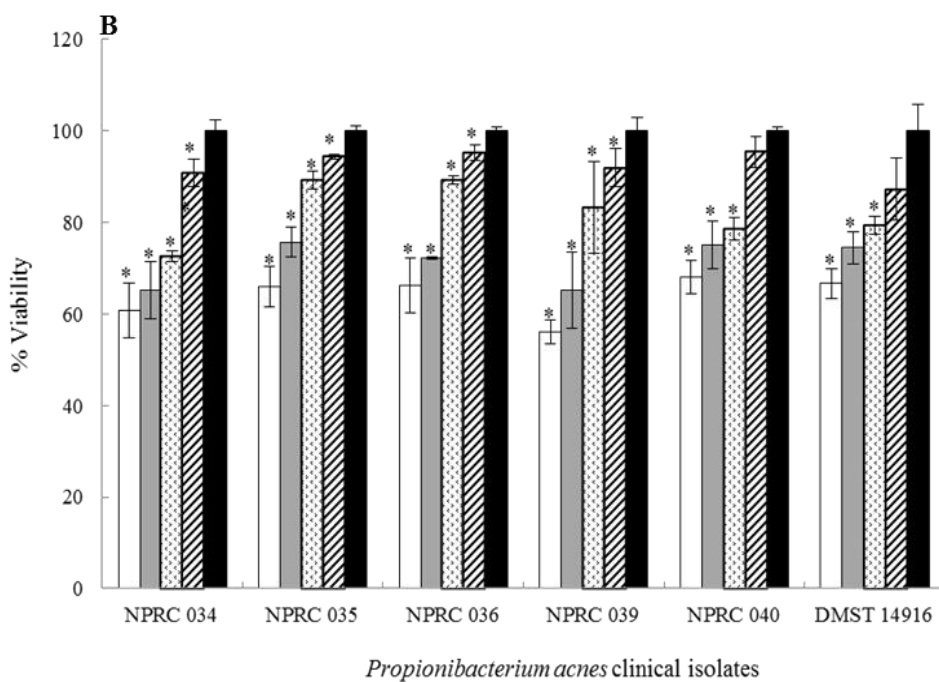
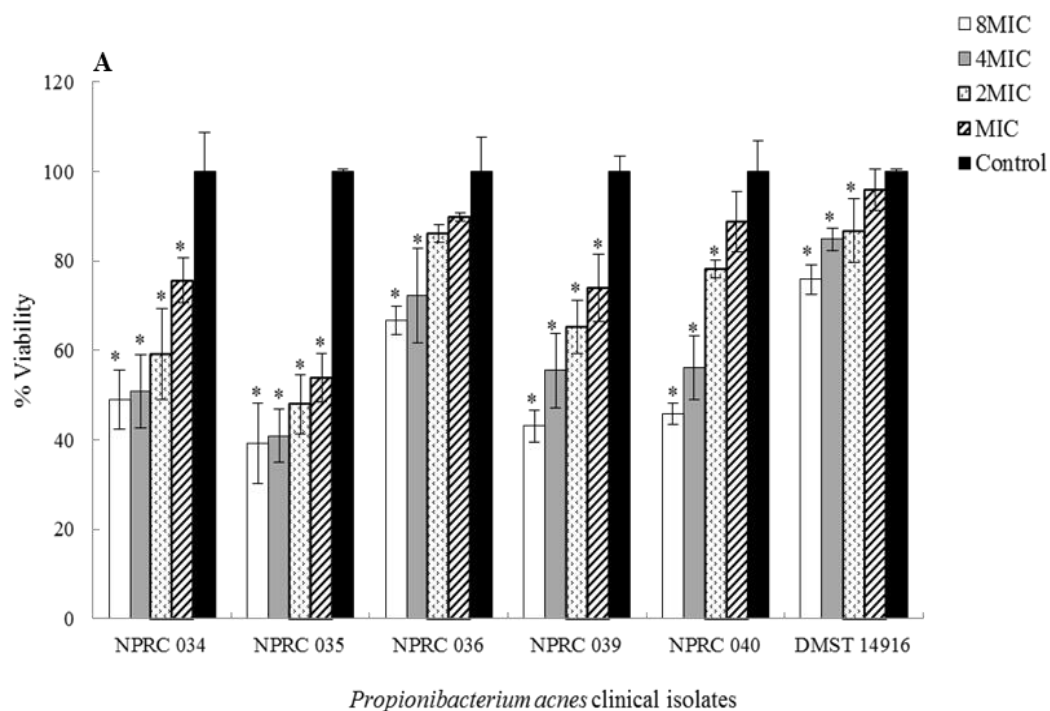


**រូបភាព 10** Scanning electron micrographs of *P. acnes* biofilms treated with rhodomertone at 500X and 10,000X magnification. (A and C) control; (B and D) 72 h biofilms treated with 1/8MIC (0.03 μg/mL) rhodomertone

## 7. การทดสอบประสิทธิภาพของ rhodomyrton ต่อการยับยั้งเชื้อ *P. acnes* ภายใน biofilms

นำเชื้อ *P. acnes* ทั้ง 5 สายพันธุ์มาทำการทดสอบผลของ rhodomyrton และ clindamycin ที่ความเข้มข้น MIC, 2MIC, 4MIC และ 8MIC ต่อการยับยั้งเชื้อ *P. acnes* ภายใน biofilms โดยศึกษาจากจำนวนเซลล์ของเชื้อ *P. acnes* ที่สามารถมีชีวิตรอดหลังจากการทดสอบกับสารทั้ง 2 ชนิด ดังแสดงในรูปที่ 11

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ rhodomyrton ต่อการยับยั้งเชื้อภายใน biofilms แสดงให้เห็นว่า rhodomyrton ทุกความเข้มข้นที่นำมาใช้ทดสอบมีผลทำให้จำนวนเชื้อ *P. acnes* ที่ยังมีชีวิตรอดลดลง โดยเมื่อความเข้มข้นของ rhodomyrton สูงขึ้น อัตราการรอดชีวิตของเชื้อจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) (รูปที่ 11A) rhodomyrton ที่ความเข้มข้น 4MIC และ 8MIC สามารถยับยั้งการมีชีวิตรอดของเชื้อ *P. acnes* ทุกสายพันธุ์ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ( $p < 0.05$ ) โดยการมีชีวิตรอดอยู่ในช่วงร้อยละ 40 - 84 และ 39 - 75 ตามลำดับ ในขณะที่ความเข้มข้น 2MIC ไม่สามารถยับยั้งการมีชีวิตรอดของเชื้อ *P. acnes* NPRC 036 ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ( $p > 0.05$ ) ส่วนอีก 5 สายพันธุ์ถูกยับยั้งได้อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ซึ่งการมีชีวิตรอดอยู่ในช่วงร้อยละ 47 - 86 และ rhodomyrton ที่ความเข้มข้น MIC สามารถยับยั้งการมีชีวิตรอดของเชื้อ *P. acnes* NPRC 034, NPRC 035 และ NPRC 039 ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ( $p < 0.05$ ) การมีชีวิตรอดอยู่ในช่วงร้อยละ 53 - 95 ในทำนองเดียวกันกับการทดสอบด้วย clindamycin พบว่า อัตราการรอดชีวิตของเชื้อ *P. acnes* ภายหลังจากการทดสอบด้วย clindamycin ทุกความเข้มข้นลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ( $p < 0.05$ ) ยกเว้นเชื้อสายพันธุ์ NPRC 040 และ DMST 14916 ที่ทดสอบด้วยความเข้มข้น MIC ไม่สามารถยับยั้งการมีชีวิตรอดของเชื้อได้อย่างมีนัยสำคัญ ( $p > 0.05$ ) โดยค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเชื้อ *P. acnes* ที่ MIC, 2MIC, 4MIC และ 8MIC อยู่ในช่วงร้อยละ 87 - 95, 72 - 89, 65 - 75 และ 56 - 68 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 11B

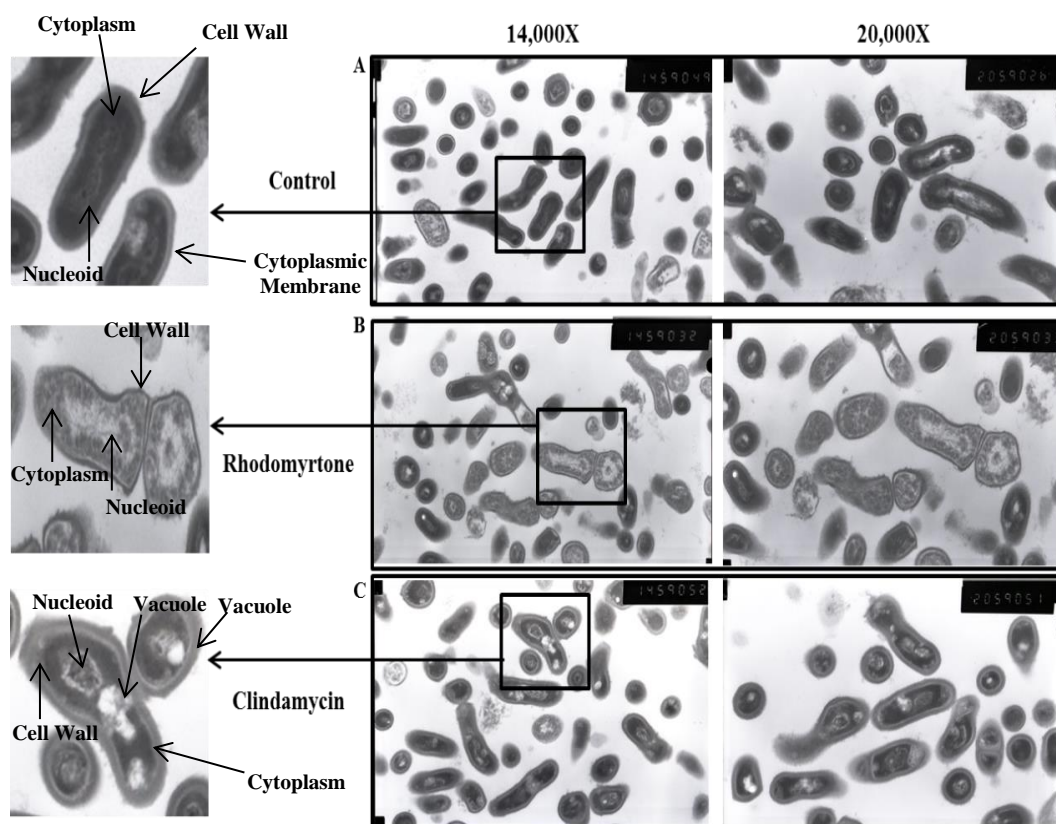


**រូបភាព 11** Viability of *Propionibacterium acnes* within established biofilms after treatment with different concentrations of rhodomlyrtone (A) and clindamycin (B). The value indicates mean  $\pm$  SD from three independent experiments performed in triplicate. \* Significant difference between treatment and control ( $p < 0.05$ )

## 8. การศึกษาประสิทธิภาพของ rhodomyrtone ต่อลักษณะรูปร่างของเชื้อ *P. acnes* ด้วย transmission electron microscopy (TEM)

จากผลการศึกษาความสามารถของ rhodomyrtone ต่อการยับยั้งเชื้อ *P. acnes* ภายใน biofilms ได้คัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ NPRC 035 มาศึกษาประสิทธิภาพของ rhodomyrtone และ clindamycin ที่ความเข้มข้น 8MIC ต่อการทำลายลักษณะรูปร่างของเชื้อ *P. acnes* โดยใช้การตรวจดูด้วยเครื่อง TEM ดังแสดงในรูปที่ 12

ผล TEM แสดงให้เห็นโครงสร้างที่แข็งแรงและสมบูรณ์ของเชื้อ *P. acnes* ซึ่งประกอบด้วย cell wall, cytoplasmic membrane, cytoplasm และ nucleoid (รูปที่ 12A) ขณะที่เชื้อ *P. acnes* ที่ทดสอบด้วย rhodomyrtone พบว่า cell wall ของเชื้อมีลักษณะบางลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม และ cytoplasm มีการจับตัวกันและตกตะกอน (รูปที่ 12B) ส่วนเชื้อ *P. acnes* ที่ทดสอบด้วย clindamycin มีการเปลี่ยนแปลงของ cytoplasm และ nucleoid โดยเกิดการขดด้วยรวมกันแน่น จนทำให้เกิดช่องว่างขึ้นภายในเซลล์ (รูปที่ 12C)



រូបភាព 12 Transmission electron micrographs of *P. acnes* at 14,000X and 20,000X magnification. Arrows indicate cell wall, cytoplasmic membrane, cytoplasm, nucleoid, and vacuole; (A) untreated *P. acnes* (control), (B) treated *P. acnes* with rhodomlyrtone at 8MIC (2 µg/mL), and (C) clindamycin at 8MIC (128 µg/mL)

## 9. การศึกษาประสิทธิผลทางคลินิกในการรักษาสิวด้วย liposomal rhodomyrtone serum เปรียบเทียบกับยาที่ใช้รักษาสิวในปัจจุบัน

ผลการศึกษาทางคลินิกในอาสาสมัครทั้งหมด 90 ราย โดยแบ่งเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มผู้ใช้ liposomal rhodomyrtone serum จำนวน 30 ราย กลุ่มผู้ใช้ clindamycin gel จำนวน 30 ราย และกลุ่มผู้ใช้ liposome serum base จำนวน 30 ราย ทำการวิเคราะห์ข้อมูลเบื้องต้นของอาสาสมัครทุกราย พบว่าอาสาสมัครมีลักษณะพื้นฐานทางประวัติที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p > 0.05$ ) คือ อาสาสมัครทั้งหมดเป็นนักศึกษาในมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์มีอายุโดยเฉลี่ยเท่ากับ 21 ปี อายุที่เริ่มเป็นสิวโดยเฉลี่ยเท่ากับ 15 ปี มีประวัติครอบครัวเป็นสิวลิดเป็นร้อยละ 77.88 เคยมีประวัติในการรักษาสิวย้อยละ 63.33 แบ่งเป็นการรักษาสิวลิดที่คลินิก 36.67 ซึ่พยายามรักษาสิวงเองร้อยละ 41.11 และเคยรักษาสิวลิดทั้ง 2 วิธีร้อยละ 14.44 อาสาสมัครทั้งหมดมีประวัติการใช้ผลิตภัณฑ์ล้างหน้าแบบทั่วไปร้อยละ 81.11 ใช้ผลิตภัณฑ์ล้างหน้าสำหรับสิวย้อยละ 3.33 และใช้สบู่ในการล้างหน้าร้อยละ 15.56 นอกจากนี้ยังมีการใช้ครีมบำรุงผิวหน้าร้อยละ 57.78 ใช้ครีมกันแดดร้อยละ 56.67 และมีการใช้ครีมสำหรับทาหน้าขาวร้อยละ 2.22 (ตารางที่ 5) สำหรับการสำรวจจำนวนสิวลิดเริ่มต้นก่อนการรักษาในอาสาสมัครทุกราย แบ่งเป็นสิวลิดไม่อักเสบและสิวลิดอักเสบ ผลการวิเคราะห์ข้อมูลแสดงให้เห็นว่าจำนวนสิวลิดเริ่มต้นในอาสาสมัครทั้ง 3 กลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p > 0.05$ ) และผลการประเมินระดับความรุนแรงของการเกิดสิวลิดโดยใช้ IGA scale เป็นเกณฑ์ในการแบ่งระดับความรุนแรง พบว่าอาสาสมัครมีระดับความรุนแรงของการเกิดสิวลิดในช่วงเริ่มต้นก่อนการรักษาที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p > 0.05$ ) ในทุกกลุ่มการรักษา โดยส่วนใหญ่ระดับความรุนแรงของการเกิดสิวลิดอยู่ที่ระดับที่ 2 คิดเป็นร้อยละ 54.44 รองลงมาคือความรุนแรงระดับที่ 3 ร้อยละ 37.78 ส่วนอาสาสมัครที่มีระดับความรุนแรงของการเกิดสิวลิดในระดับที่ 1 และ 4 คิดเป็นร้อยละ 6.67 และ 1.11 ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

การประเมินผลข้างเคียงของผลิตภัณฑ์ในกลุ่มอาสาสมัครทุกราย ไม่พบการเกิดอาการแพ้ ผื่นแดง และอาการแสบ การลดลงของจำนวนสิวลิดภายหลังการใช้ผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิด เป็นเวลา 8 สัปดาห์ แสดงในรูปที่ 13 โดยการศึกษาแสดงให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิดสามารถลดจำนวนการเกิดสิวลิดได้ใกล้เคียงกัน จำนวนสิวลิดทั้งหมดในทุกกลุ่มการรักษาพบว่ามีจำนวนลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ( $p < 0.05$ ) กลุ่มผู้ใช้ liposomal rhodomyrtone serum แสดงร้อยละการลดลงอย่างชัดเจนของสิวลิดทั้งหมดอย่างในสัปดาห์ที่ 4

และ 8 ในขณะที่กลุ่มผู้ใช้ clindamycin gel และกลุ่มผู้ใช้ liposome serum base แสดงการลดลงของสิ่วทั้งหมดเริ่มที่สัปดาห์ที่ 2 ถึงสัปดาห์ที่ 8 (รูปที่ 13A) สำหรับจำนวนสิ่วไม่อักเสบ (รูปที่ 13B) การลดลงของจำนวนสิ่วไม่อักเสบนั้นพบได้ในทั้ง 3 กลุ่มการรักษา โดยกลุ่มผู้ใช้ liposomal rhodomyrton serum มีร้อยละการลดลงอย่างมีนัยสำคัญในสัปดาห์ที่ 4 ส่วนกลุ่มผู้ใช้ clindamycin gel และกลุ่มผู้ใช้ liposome serum base สามารถสังเกตร้อยละการลดลงของจำนวนสิ่วไม่อักเสบได้ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 เป็นต้นไป ( $p < 0.05$ ) แต่กลุ่มผู้ใช้ liposome serum base ไม่แสดงร้อยละการลดลงของจำนวนสิ่วไม่อักเสบอย่างมีนัยสำคัญที่สัปดาห์ที่ 8 ( $p > 0.05$ ) และอาสาสมัครแสดงให้เห็นร้อยละของการลดลงของสิ่วอักเสบอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ( $p < 0.05$ ) ในสัปดาห์ที่ 8 ซึ่งกลุ่มอาสาสมัครที่ใช้ liposomal rhodomyrton serum มีอัตราการลดลงร้อยละ 36.36 กลุ่มที่ได้รับ clindamycin gel และ liposome serum base มีการลดลงของสิ่วอักเสบร้อยละ 34.70 และ 43.13 ตามลำดับ (รูปที่ 13C) ในส่วนของผลการประเมินระดับความรุนแรงของการเกิดสิ่วในแต่ละสัปดาห์ที่ได้ทำการนัดพบอาสาสมัคร(ตารางที่ 7) พบว่าการเปลี่ยนแปลงของค่า IGA scale ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในทุกกลุ่มการรักษา ( $p > 0.05$ ) อย่างไรก็ตามอาสาสมัครที่ได้รับการรักษาสิ่วด้วย liposomal rhodomyrton serum ที่ประสบความสำเร็จนั้นมีอยู่จำนวนมาก โดยตัวอย่างกรณีศึกษาในอาสาสมัครที่เห็นการลดลงของจำนวนสิ่วได้อย่างชัดเจน คือ อาสาสมัครที่มีระดับความรุนแรงของการเกิดสิ่วเริ่มต้นก่อนการรักษาอยู่ที่ระดับ 2 ภายหลังจากการใช้ liposomal rhodomyrton serum พบการลดลงของสิ่วอยู่ที่ระดับความรุนแรงระดับที่ 1 (รูปที่ 14) และอีกหนึ่งกรณีศึกษาในอาสาสมัครที่มีระดับความรุนแรงของการเกิดสิ่วเริ่มต้นก่อนการรักษาอยู่ที่ระดับที่ 3 ภายหลังจากการใช้ liposomal rhodomyrton serum ระดับความรุนแรงของการเกิดสิ่วลดลงอยู่ที่ระดับที่ 2 (รูปที่ 15)

ตารางที่ 5 Baseline volunteers characteristic

Clinical parameter	Total (n = 90)	Rhodomlytone serum (n = 30)	Clindamycin gel (n = 30)	Serum base (n = 30)	P-values
Age (year)	21.23 ± 2.08 <sup>a</sup>	21.10 ± 2.02	21.37 ± 2.17	20.93 ± 1.52	0.683
Age starts having acne (year)	15.38 ± 2.75	15.03 ± 1.90	15.73 ± 3.40	15.03 ± 1.22	0.418
Family with history of acne	71 (78.88) <sup>b</sup>	23 (76.66)	23 (76.66)	25 (83.33)	0.772
Patient history of acne treatment					
Used to	57 (63.33)	19 (63.33)	19 (63.33)	19 (63.33)	1.000
See doctor for acne treatment	33 (36.67)	11 (36.67)	10 (33.33)	12 (40.00)	0.870
Use commercial drug	37 (41.11)	14 (46.67)	13 (43.33)	10 (33.33)	0.560
Use both	13 (14.44)	6 (20.00)	4 (13.33)	3 (10.00)	0.542
Use facial cleanser					
Ordinary facial cleanser	73 (81.11)	23 (76.67)	26 (86.67)	24 (80.00)	0.610
Acne facial cleanser	3 (3.33)	1 (3.33)	2 (6.67)	0	0.364
Soap	14 (15.56)	6 (20.00)	2 (6.67)	6 (20.00)	0.265
Use other product					
Facial skin care	52 (57.78)	20 (66.67)	18 (60.00)	14 (46.67)	0.286
Sunscreen	51 (56.67)	19 (63.33)	18 (60.00)	14 (46.67)	0.395
Facial skin whitening	2 (2.22)	1 (3.33)	0	1 (3.33)	0.608

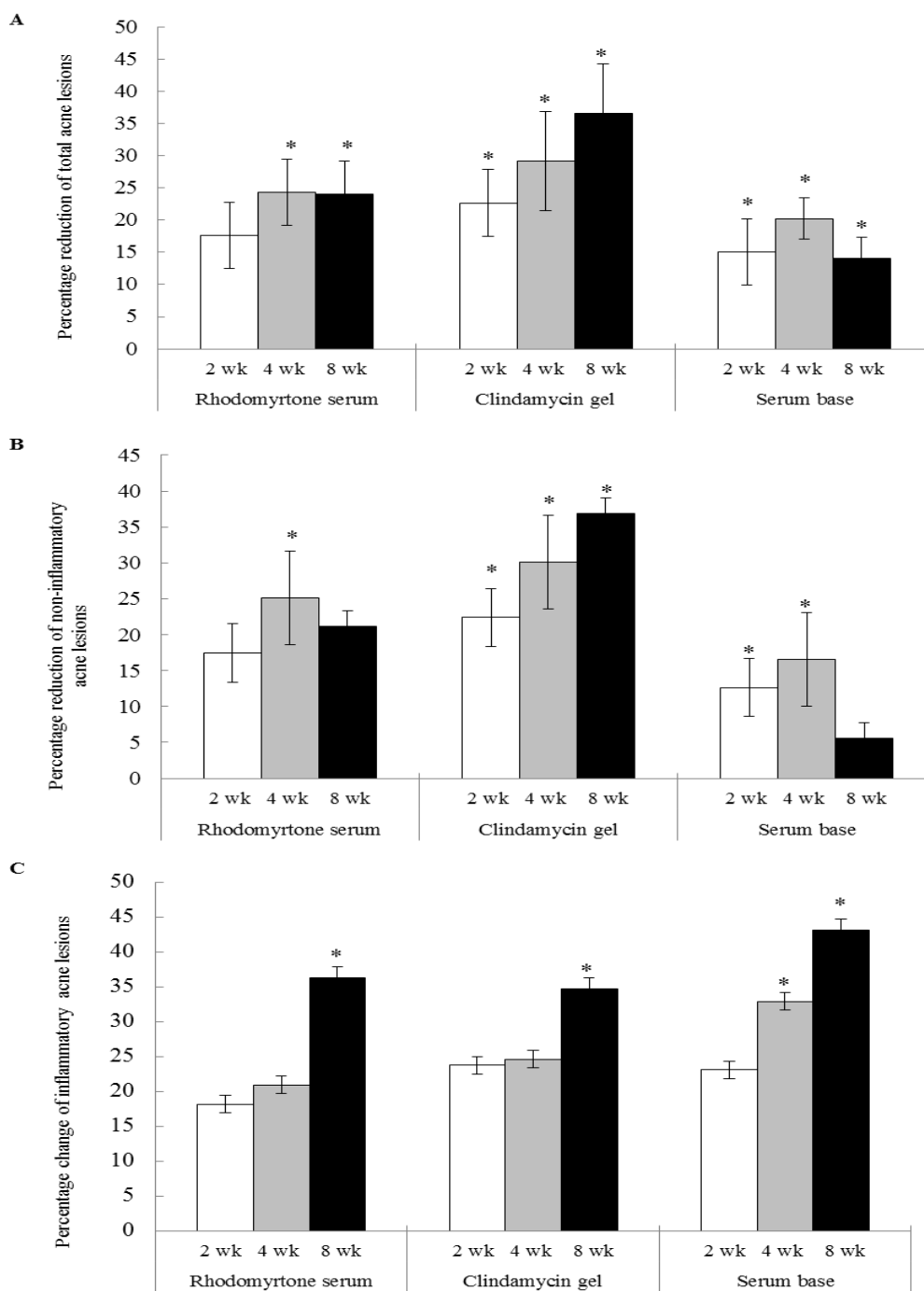
<sup>a</sup> Values in the same row are means ± SD in each group; <sup>b</sup> Numbers of patients (percentage)



**ตารางที่ 6** Quantity of acne lesions and Investigator's Global Assessment (IGA)

Number of acne lesions at beginning	Total (n = 90)	Rhodomyltone serum (n = 30)	Clindamycin gel (n = 30)	Serum base (n = 30)	P-values
Total acne lesions	43.92 ± 26.54 <sup>a</sup>	45.03 ± 33.77	49.00 ± 26.40	37.73 ± 16.01	0.251
Non-inflammatory acne lesions	35.43 ± 23.09	36.60 ± 29.85	40.47 ± 22.91	29.23 ± 12.38	0.161
Open comedone	3.24 ± 5.36	4.03 ± 6.76	4.27 ± 5.83	1.43 ± 2.03	0.076
Closed comedone	32.19 ± 20.58	32.57 ± 25.48	36.20 ± 20.95	27.80 ± 12.43	0.282
Inflammatory acne lesions	8.49 ± 8.11	8.43 ± 8.48	8.53 ± 7.14	8.50 ± 8.90	0.999
Papule	7.24 ± 6.71	6.67 ± 6.26	7.83 ± 7.01	7.24 ± 6.71	0.800
Pustule	1.21 ± 2.60	1.73 ± 3.30	0.7 ± 1.29	1.20 ± 2.78	0.311
Nodule	0.03 ± 0.23	0.03 ± 0.18	0	0.07 ± 0.37	0.551
<b>Investigator's Global Assessment (IGA)</b>					
1	6 (6.67) <sup>b</sup>	1 (3.33)	4 (13.33)	1 (3.33)	
2	49 (54.44)	18 (60.00)	12 (40.00)	19 (63.33)	
3	34 (37.78)	11 (36.67)	14 (46.67)	9 (30.00)	
4	1 (1.11)	0	0	1 (3.33)	
IGA scale	2.33 ± 0.62	2.33 ± 0.55	2.33 ± 0.71	2.33 ± 0.61	0.100

<sup>a</sup> Values in the same row are means ± SD in each group; <sup>b</sup> Numbers of patients (percentage)



**រូបភាព 13** Percentage reduction in mean number of acne lesions after treatment with rhodomyrtone serum, clindamycin gel, and serum base at week 2, 4, and 8, compared with baseline. Total acne lesions (A), non-inflammatory acne lesions (B), and inflammatory acne lesions (C). Number of subjects in each group 30 ( $n = 30$ ). \* Statistically different between baseline and each time of treatments were statistically significant at  $p < 0.05$

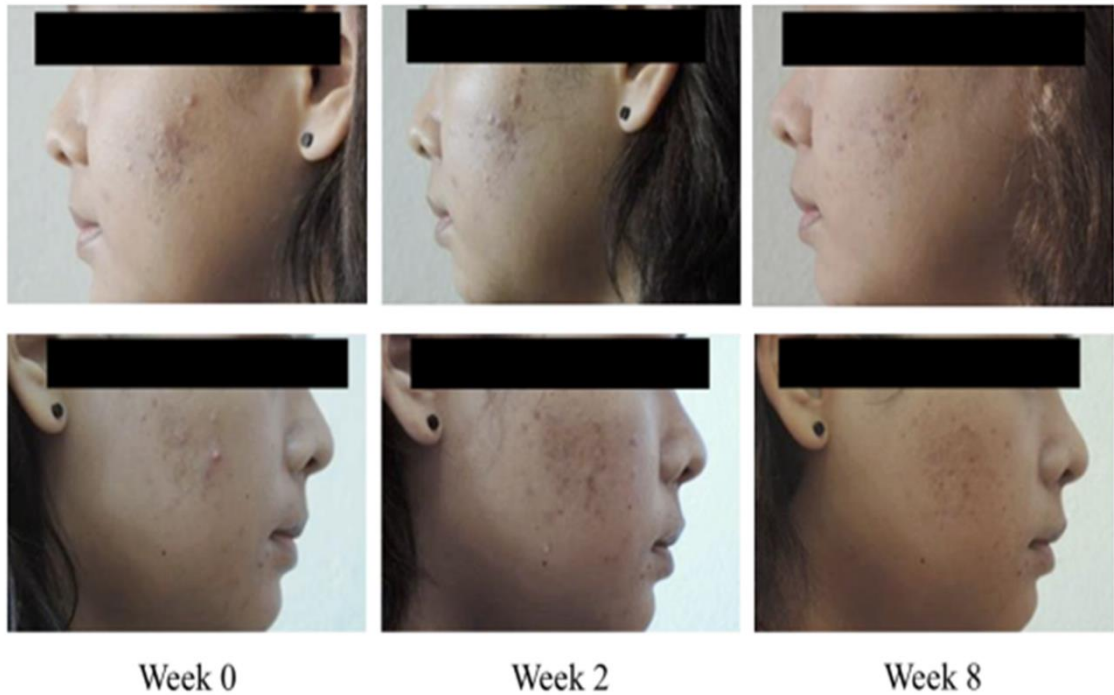
ตารางที่ 7 Investigator's Global Assessment (IGA) scale

	IGA scale	Numbers of volunteers (%)			
		Week 2	Week 4	Week 8	
Rhodomyrtonone serum	deteriorated (2 score)	0	0	0	
	deteriorated (1 score)	3 (10.00)	3 (10.00)	2 (6.67)	
	no change	19 (63.33)	23 (76.67)	21 (70.00)	
	improved (1 score)	8 (26.67)	3 (10.00)	6 (20.00)	
	improved (2 score)	0	1 (3.33)	1 (3.33)	
Clindamycin gel	deteriorated (2 score)	0	0	0	
	deteriorated (1 score)	3 (10.00)	4 (13.33)	4 (13.33)	
	no change	22 (73.33)	18 (60.00)	15 (50.00)	
	improved (1 score)	5 (16.67)	8 (26.67)	9 (30.00)	
	improved (2 score)	0	0	2 (6.67)	
Serum base	deteriorated (2 score)	0	0	0	
	deteriorated (1 score)	2 (6.67)	5 (16.67)	1 (3.33)	
	no change	19 (63.33)	18 (60.00)	22 (73.33)	
	improved (1 score)	9 (30.00)	7 (23.33)	7 (23.33)	
	improved (2 score)	0	0	0	
P-value (between groups)		0.608	0.793	0.883	

<sup>a</sup>Numbers of patients (percentage)



**รูปที่ 14** Case study: twenty three years old female with mild severity of acne vulgaris at the baseline (IGA scale = 2, some non-inflammatory lesions with no more than a few inflammatory lesion). By week 8 following treatment with rhodomirtone serum twice daily, the severity change to almost clear of acne vulgaris (IGA scale = 1, rare non-inflammatory with no more than one small inflammatory lesion)



**รูปที่ 15** Case study: twenty one years old female with moderate severity of acne vulgaris at the baseline (IGA scale = 3, up to many non-inflammatory lesions and may have some inflammatory lesions). By week 8 following treatment with rhodomirtone serum twice daily, the severity change to mild severity of acne vulgaris (IGA scale = 2, some non-inflammatory lesions with no more than a few inflammatory lesion)

## บทที่ 4

### วิจารณ์

การเกิดสิวเป็นโรคผิวหนังอักเสบเรื้อรังที่พบได้มากในกลุ่มวัยรุ่น ซึ่งมีสาเหตุจากการระคายเคืองของต่อมไขมันทำให้ผิวหนังชั้น corneum หนาตัวขึ้น มีการผลิตไขมันบนใบหน้ามากขึ้น และการเพิ่มจำนวนของเชื้อแบคทีเรียในรูขุมขน (Gollnick *et al.* 2003) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *P. acnes* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรีย Gram-positive pathogen ที่เป็นสาเหตุหลักในการเกิดสิว โดยปัจจัยที่ทำให้เชื้อ *P. acnes* สามารถก่อความรุนแรง คือ เชื้อ *P. acnes* สามารถผลิต digestive enzymes หลายชนิดออกมานอกเซลล์ เช่น lipase, protease และ hyarulonidase เป็นต้น ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้มีผลทำให้เกิดสิวอักเสบและทำให้เซลล์ผิวหนังถูกทำลาย (Heymann, 2006 และ Holland *et al.* 2010) และเชื้อมีการสร้าง biofilms ที่ประกอบด้วย extracellular matrix ช่วยในการเกาะติดภายในรูขุมขน (Burkhart and Burkhart, 2007) นอกจากนี้แบคทีเรียที่เจริญภายใน biofilms มีความทนต่อการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ รวมไปถึงการถูกทำลายด้วยภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Coenye *et al.* 2007) การศึกษาครั้งนี้ทำการทดสอบเชื้อ *P. acnes* ที่แยกได้จากรอยสิพบว่าเชื้อแบคทีเรียทุกตัวสามารถสร้าง lipase ในขณะที่เชื้อที่มีการสร้าง protease ได้มีเพียงร้อยละ 37.5 และสามารถสร้าง biofilms ได้ทุกสายพันธุ์ โดยมีกลุ่มของเชื้อที่มีการสร้าง biofilms มากคิดเป็นร้อยละ 50 รองลงมาคือกลุ่มของเชื้อที่มีการสร้าง biofilms ปานกลางคิดเป็นร้อยละ 37.5 และกลุ่มที่มีการสร้าง biofilms เล็กน้อยคิดเป็นร้อยละ 12.5

จากการคัดเลือกเชื้อ *P. acnes* ที่แยกได้จากรอยสิสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการสร้าง lipase, protease และ biofilms ได้ดี รวมถึงเชื้อ *P. acnes* สายพันธุ์มาตรฐาน DMST 14916 มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญและการฆ่าเชื้อแบคทีเรียด้วย rhodomyrtone พบว่าค่า MIC และ MBC ของ rhodomyrtone ต่อเชื้อ *P. acnes* ที่แยกได้จากรอยสิเท่ากับ 0.125 - 0.25  $\mu\text{g/mL}$  และ 0.25 - 0.5  $\mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ จากรายงานก่อนหน้านี้นี้มีการศึกษาการใช้สารบริสุทธิ์ที่ได้จากธรรมชาติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. acnes* เช่น การศึกษาสาร sargafuran ที่แยกได้จากสาหร่ายสีน้ำตาล *Sargassum macrocarpum* ต่อการยับยั้งเชื้อ *P. acnes* พบว่ามีค่า MIC เท่ากับ 15  $\mu\text{g/mL}$  (Kamei *et al.* 2009) และสาร anacardic acid analogue แยกได้จาก *Syzygium jambos* ซึ่งเป็นพืชในตระกูล Myrtaceae เช่นเดียวกับกระทุง สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. acnes* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 7.9  $\mu\text{g/mL}$  (Sharma *et al.* 2013) จะเห็นได้ว่า rhodomyrtone มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *P. acnes* ดีเมื่อเทียบกับสารที่ได้กล่าวมา

นอกจากนี้แล้ว rhodomyrtone มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุสำคัญในการก่อสิว คือ *S. aureus* และ *S. epidermidis* ที่แยกได้จากรอยสิวมียาค่า MIC อยู่ในช่วง 0.25 - 2  $\mu\text{g/mL}$  และ ยังมีความสามารถในการยับยั้งการสร้าง biofilms ของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้ด้วย (Saising *et al.* 2011 และ Saising *et al.* 2015) ผลการทดสอบ clindamycin ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้สำหรับรักษาสิว ต่อการยับยั้งการเติบโตของเชื้อ *P. acnes* ที่แยกได้จากรอยสิว พบว่ามีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 8 - 16  $\mu\text{g/mL}$  และ 128 - 256  $\mu\text{g/mL}$  จากผลการทดลองเห็นได้ว่า rhodomyrtone มีฤทธิ์ที่ดีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. acnes* จึงน่าจะมีความเป็นไปได้ในการนำ rhodomyrtone มาศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งปัจจัยที่เป็นสาเหตุก่อความรุนแรงของเชื้อ *P. acnes*

ความรุนแรงของเชื้อ *P. acnes* มีสาเหตุสำคัญมาจากความสามารถของเชื้อในการสร้าง lipase และ protease ซึ่งเป็นปัจจัยที่ส่งเสริมความรุนแรงในการก่อสิว (Patil *et al.* 2012 และ Lanter and Davies, 2015) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง free fatty acid ที่ได้จากการย่อย sebum triglycerides ด้วย lipase ของเชื้อเป็นสาเหตุให้เกิดการอักเสบบนผิวหนัง (Higaki, 2003) นอกจากนี้การผลิต protease ของเชื้อสามารถกระตุ้น Nod-like receptors นำไปสู่การผลิต IL- $\beta$  ขึ้นใน sebocytes (Li *et al.* 2014) เช่นเดียวกับการแสดงออกของ protease-activated-receptor-2 (Lee *et al.* 2010) สาเหตุดังกล่าวส่งผลทำให้เนื้อเยื่อผิวหนังถูกทำลายและเกิดภาวะอักเสบ จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการสร้าง lipase และ protease ด้วย rhodomyrtone พบว่าเชื้อ *P. acnes* ทุกสายพันธุ์ มีการสร้าง lipase และ protease ลดลงหลังจากทดสอบด้วยสารบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น sub-MIC โดยที่ความเข้มข้น 1/2MIC มีผลยับยั้งการสร้าง lipase ได้ทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ ในขณะที่ความเข้มข้น 1/4MIC มีผลยับยั้งการสร้าง lipase ได้เพียงบางส่วน ผลการยับยั้งการสร้าง protease พบว่า rhodomyrtone ที่ความเข้มข้น 1/2MIC สามารถยับยั้งการสร้างเอนไซม์ของเชื้อได้เพียง 3 สายพันธุ์เท่านั้น สำหรับการทดสอบการยับยั้งการสร้าง lipase และ protease ของเชื้อ *P. acnes* ด้วย clindamycin พบว่าเชื้อไม่มีการเจริญเติบโต และการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ จากการศึกษาก่อนหน้านี้เกี่ยวกับสารบริสุทธิ์จากธรรมชาติ แสดงให้เห็นว่า gallic acid และ terchebulin ที่แยกได้จาก *Terminalia laxiflora* (Muddathir *et al.* 2013) และ brazilin ที่แยกจาก *Caesalpinia sappan* (Batubara *et al.* 2010) แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้ง lipase ของเชื้อ *P. acnes* เช่นเดียวกับ rhodomyrtone โดยการยับยั้งการสร้าง lipase ทำให้การผลิต free fatty acid น้อยลง เนื่องจากเชื้อไม่สามารถย่อย sebum triglycerides ได้ตามปกติและการยับยั้ง protease ส่งผลให้การกระตุ้น pro-inflammatory cytokines ของเชื้อลดลง การอักเสบของผิวหนังโดยรอบและการเกิดสิวจึงลดลงตามไปด้วย

การศึกษาครั้งนี้ได้แสดงผลสอดคล้องกับการศึกษาที่พบว่าการยับยั้งการสร้าง lipase ของเชื้อ *P. acnes* มีผลทำให้ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อและลดความสามารถในการก่อโรค (Strauss and Peter, 1965 และ Muddathir *et al.* 2013) อีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เชื้อ *P. acnes* คือต่อการรักษา คือ การสร้าง biofilms ซึ่งประกอบด้วย extracellular polymeric substance ทำหน้าที่เป็นชั้นปกป้องแบคทีเรียที่อยู่ภายในจากยาปฏิชีวนะ จนนำไปสู่การื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย ยิ่งไปกว่านั้น biofilms สามารถป้องกันเชื้อแบคทีเรียจากการทำลายที่เกิดจากการตอบสนองของภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Lazar, 2011 และ Jahns *et al.* 2012) ดังนั้นการยับยั้งการสร้าง biofilms ของเชื้อ *P. acnes* จึงเป็นอีกทางหนึ่งที่จะช่วยลดความรุนแรงต่อการก่อตัวได้ จากการทดสอบฤทธิ์ของ rhodomyrtone ในการยับยั้งการสร้าง biofilms ของเชื้อ *P. acnes* ที่แยกได้จากรอยสิว และเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน DMST 14916 พบว่า rhodomyrtone ที่ความเข้มข้น sub-MIC มีผลต่อการยับยั้งการสร้าง biofilms ของเชื้อ *P. acnes* ได้ทุกสายพันธุ์ โดย rhodomyrtone ที่ความเข้มข้น 1/16MIC และ 1/8MIC สามารถการยับยั้งการสร้าง biofilms ของเชื้อได้ทุกสายพันธุ์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่พบว่าความเข้มข้นที่ 1/16MIC และ 1/8MIC นั้นไม่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. acnes* ทุกสายพันธุ์ ในขณะที่ rhodomyrtone ที่ความเข้มข้น 1/4MIC และ 1/2MIC สามารถยับยั้งการสร้าง biofilms แต่ความเข้มข้นดังกล่าวมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. acnes* สำหรับการทดสอบด้วย clindamycin ที่ความเข้มข้น sub-MIC นั้นการยับยั้งการสร้าง biofilms เป็นผลมาจากความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ในการศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่า สารบริสุทธิ์ icariin แยกได้จาก *Epimedium brevicornum*, resveratrol แยกได้จาก *Polygonum cuspidatum* และ salidroside ที่แยกได้จาก *Rhodiola crenulata* (Coenye *et al.* 2012) และ myrtacin ที่แยกได้จาก *Myrtus communis* ซึ่งเป็นพืชตระกูล Myrtaceae เช่นเดียวกับกระทู (Feuillolay *et al.* 2015) สามารถลดการก่อตัวของ biofilms ของเชื้อ *P. acnes* เช่นเดียวกับ rhodomyrtone นอกจากนี้การวิเคราะห์ลักษณะ biofilms ด้วย SEM เพื่อประเมินผลกระทบของ rhodomyrtone ที่ความเข้มข้น 1/8MIC ต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะการสร้าง biofilms ของเชื้อ *P. acnes* ในกรณีที่ไม่ได้ทดสอบด้วย rhodomyrtone จะเห็นได้ว่าเชื้อแบคทีเรียจับกันเป็นกลุ่มก้อนอย่างหนาแน่น ซึ่งตรงข้ามกับการจับกลุ่มกันของเชื้อ *P. acnes* ที่ผ่านการทดสอบด้วย rhodomyrtone มีการจับกันแบบหลวม ๆ และมีความหนาแน่นของเชื้อน้อยกว่า นอกจากการสร้างและเจริญภายใน mature biofilms ของเชื้อ *P. acnes* ยังส่งผลให้เชื้อมีความรุนแรงเพิ่มขึ้น



แล้วนั้น ยังพบว่าการติดเชื้อ *P. acnes* ที่บริเวณอื่น ๆ เช่น บริเวณข้อต่อกระดูก เชื้อสามารถเจริญ พร้อมทั้งสร้าง biofilms ฟังตัวลึกลงไปในเนื้อเยื่อทำให้การรักษายากขึ้นและเชื้อเกิดการดื้อยา (Achermann *et al.* 2014 และ Achermann *et al.* 2015) จากการทดสอบศักยภาพของ rhodomyrtonone ที่ supra-MIC ต่อการมีชีวิตรอดของเชื้อ *P. acnes* ภายใน mature biofilms จะเห็นว่าความเข้มข้นของ rhodomyrtonone มีผลต่อการลดลงของจำนวนเชื้อที่รอดชีวิต โดย rhodomyrtonone ที่ความเข้มข้น 8MIC แสดงอัตราการอยู่รอดของเชื้อ *P. acnes* ทุกสายพันธุ์อยู่ในช่วงร้อยละ 39 - 75 ที่ความเข้มข้น 2MIC และ 4MIC สามารถยับยั้งการมีชีวิตรอดของเชื้อ *P. acnes* ได้ร้อยละ 40 - 86 สำหรับการมีชีวิตรอดของเชื้อ *P. acnes* ภายใน mature biofilms ภายหลังจากทดสอบด้วย clindamycin พบว่ามีอัตราการอยู่รอดในช่วงร้อยละ 56 - 95 จากผลการทดลองพบว่า rhodomyrtonone มีประสิทธิภาพในการลดอัตราการมีชีวิตรอดของเชื้อ *P. acnes* ภายใน mature biofilms ได้ที่ความเข้มข้นต่ำ (1 - 2  $\mu\text{g/mL}$ ) ซึ่งมีความเข้มข้นน้อยกว่าความเข้มข้นของ clindamycin (64 - 128  $\mu\text{g/mL}$ ) ประมาณ 64 เท่า ผลการทดลองนี้พิสูจน์ให้เห็นว่า rhodomyrtonone มีศักยภาพในการลดอัตราการมีชีวิตรอดของเชื้อ *P. acnes* ได้ดี เมื่อเทียบกับ clindamycin ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้รักษาสิว ผลการวิเคราะห์ลักษณะของเชื้อด้วย TEM แสดงให้เห็นว่า rhodomyrtonone สามารถเข้าไปมีผลต่อโครงสร้างภายในเซลล์ของเชื้อ *P. acnes* ในขณะที่ clindamycin ที่ทำให้ส่วนของนิวคลีออยด์เกิดการจับตัวกันแน่นขึ้น จนทำให้เกิดช่องว่างภายในเซลล์ จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า rhodomyrtonone มีประสิทธิภาพที่ดีในการยับยั้งการเจริญและปัจจัยที่เป็นสาเหตุก่อให้เกิดความรุนแรงของเชื้อ *P. acnes* จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะนำ rhodomyrtonone มาประยุกต์เป็นผลิตภัณฑ์ใช้ภายนอกสำหรับรักษาแต้มสิว โดยเฉพาะสิวกักเสบที่มีสาเหตุหลักมาจากเชื้อแบคทีเรีย เพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาสิว

สิวเป็นโรคผิวหนังที่เกิดจากความผิดปกติบริเวณรูขุมขนร้อยละ 80 - 95 ของผู้ที่ เป็นสิวล้วนส่วนใหญ่คือกลุ่มวัยรุ่น (Kapoor *et al.* 2011) การเกิดสิวเป็นโรคที่ไม่ร้ายแรงแต่อาจ ก่อให้เกิดความวิตกกังวลในตัวเองและมีภาวะความซึมเศร้าได้ การรักษาสิวลักษณะรุนแรงเล็กน้อย นิยมใช้ยาทารักษาเฉพาะที่ เช่น benzoyl peroxide, retinoic acid และยาปฏิชีวนะ สำหรับการ รักษาสิวลักษณะรุนแรงปานกลางมีการตอบสนองดีต่อการรักษาร่วมกันระหว่างยาทาและยา ปฏิชีวนะแบบรับประทาน รวมถึงการใช้ยาเม็ดคุมกำเนิด (Zheng *et al.* 2013) เนื่องจากการ รักษาต้องใช้ระยะเวลานาน ทำให้ปัจจุบันต้องเผชิญปัญหาการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียและ ผลข้างเคียงจากการใช้สารเคมี ส่งผลให้การรักษาสิวลักษณะรุนแรง ด้วยเหตุนี้ทำให้มี การศึกษาเกี่ยวกับการนำสารสกัดที่ได้จากธรรมชาติมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ทางเลือกที่ใช้

สำหรับรักษาสิว เช่น การศึกษาประสิทธิภาพของสาร anthraquinones ที่แยกได้จาก *Rubia cordifolia* (Khan *et al.* 2012) และ tea tree oil ที่สกัดได้จาก *Melaleuca alternifolia* (Hammer *et al.* 2015) ในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ยับยั้งการเกิดสิว สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ เป็นการศึกษาทางคลินิกเพื่อทดสอบประสิทธิภาพและความปลอดภัยของสูตรตำรับ liposomal rhodomyrtone serum ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนประกอบของ rhodomyrtone ที่แยกได้จากใบ กระทุในการรักษาสิวนิครุนแรงเล็กน้อยถึงปานกลาง แบบ randomized, double-blind จากการศึกษาพบว่าอาสาสมัครทั้ง 90 คน มีพื้นฐานทางประวัติ จำนวนสิวเริ่มต้น และระดับความรุนแรงของการเกิดสิวเริ่มต้นที่ไม่แตกต่างกัน ผลการทดสอบอาการแพ้ก่อนการใช้ผลิตภัณฑ์ และการติดตามผลตลอดระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าอาสาสมัครไม่แสดงอาการแพ้จนถึงสิ้นสุด ระยะเวลาการรักษา ผลการประเมินจำนวนสิวทั้งหมดในอาสาสมัครที่ได้รับผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 กลุ่ม สามารถลดจำนวนการเกิดสิวได้ใกล้เคียงกัน โดยสิวทั้งหมดในทุกกลุ่มการรักษามีจำนวนลดลงในช่วงสัปดาห์ที่ 2 ถึงสัปดาห์ที่ 8 อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนสิว ณ จุดเริ่มต้นการรักษา การลดลงของจำนวนสิวไม่อีกเสพบได้ทั้ง 3 กลุ่มการรักษา โดยการลดลงอย่างมีนัยสำคัญ สามารถสังเกตได้ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 เป็นต้นไป และพบว่าการลดลงของจำนวนสิวอีกเสบของกลุ่มผู้ใช้ผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 กลุ่ม มีความสามารถในการลดการเกิดสิวอีกเสบได้ดีใกล้เคียงกัน จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของสูตรตำรับ liposomal rhodomyrtone serum ได้รับการพิสูจน์แล้วว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิวดีกว่ายาที่นิยมใช้รักษาสิวที่มีในท้องตลาด (Chorachoo *et al.* 2013) มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับ phospholipid พบว่าสามารถช่วยรักษาความชุ่มชื้นให้กับผิวและสามารถทำหน้าที่เป็นสารลดการอักเสบในการเกิดสิวได้ (Treede *et al.* 2007, Treede *et al.* 2009 และ Hoogevest *et al.* 2013) ซึ่งในสูตรตำรับ liposomal rhodomyrtone serum และ liposom serum base ที่คณะผู้วิจัยได้พัฒนาขึ้นมีไขมันชนิดนี้เป็นองค์ประกอบอยู่ ส่งผลให้ช่วยเพิ่มความชุ่มชื้นให้แก่ผิวและช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการรักษาสิวในอาสาสมัคร นอกจากการติดตามอาการและเก็บข้อมูลผลการศึกษาทางคลินิกผู้วิจัยได้มีการสอบถามเพิ่มเติมถึงสาเหตุที่ทำให้อาสาสมัครบางรายมีการแสดงการลดลงของสิวที่ไม่สม่ำเสมอ พบว่าสาเหตุที่ทำให้การรักษาสิวเกิดความล้มเหลวมี 3 สาเหตุหลัก คือ ความเครียด การนอนดึกและอาหารที่รับประทาน โดยเฉพาะอาหารที่มีน้ำตาลสูงและอาหารมัน ผลการวิจัยครั้งนี้มีความสอดคล้องกับรายงานการวิจัยอื่น ๆ ที่แสดงให้เห็นว่าประวัติของคนในครอบครัว อาหารที่รับประทาน สอร์โมน เพศ และการใช้ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ปัจจัยทั้งหมดเหล่านี้มีผลกระทบต่อการเพิ่มจำนวนของการเกิดสิว (Munawar *et al.* 2009, Bowe *et al.* 2010, Landro *et al.* 2012 และ Kokandi, 2013) ถึงแม้ว่าการออกแบบ

การศึกษาครั้งนี้ได้มีการกำหนดขึ้นมาอย่างรอบคอบแต่ก็ยังมีปัจจัยที่เหนี่ยวนำให้การรักษาสิว  
ในอาสาสมัครเป็นเรื่องยากที่จะควบคุมได้ และจากการสังเกตพฤติกรรมของอาสาสมัครตลอด  
ระยะเวลาของการศึกษาสามารถบอกได้ว่าปัจจัยที่ได้กล่าวมาก่อนหน้านี้มีอิทธิพลต่อ  
ผลการรักษาสิว อย่างไรก็ตามผลจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า liposomal rhodomyrtone serum  
มีประสิทธิภาพที่ดีในการลดจำนวนการเกิดสิวมี่สาเหตุมาจากแบคทีเรีย แต่การศึกษาครั้งนี้ไม่  
สามารถชี้ให้เห็นได้อย่างชัดเจนถึงผลกระทบที่เกิดจากปัจจัยที่ไม่สามารถควบคุมได้

## บทที่ 5

### สรุป

1. Rhodomyrtone มีฤทธิ์ดีในการยับยั้งการเจริญและฆ่าเชื้อ *P. acnes* ที่แยกได้จากรอยสิ่ว โดยมีค่า MIC และค่า MIB อยู่ในช่วง 0.125 - 0.25  $\mu\text{g/mL}$  และ 0.25 - 0.5  $\mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ
2. Rhodomyrtone มีความสามารถยับยั้งการสร้าง lipase และ protease
3. Rhodomyrtone ที่ความเข้มข้น 1/16MIC และ 1/8MIC มีศักยภาพในการยับยั้งการสร้าง biofilms ของเชื้อ *P. acnes* ที่แยกได้จากรอยสิ่ว
4. Rhodomyrtone ที่ความเข้มข้น MIC, 2MIC, 4MIC และ 8MIC สามารถยับยั้งการรอดชีวิตของเชื้อ *P. acnes* ที่อยู่ภายใน mature biofilms
5. Liposomal rhodomyrtone serum มีประสิทธิภาพในการลดการเกิดสิ่วโดยเฉพาะอย่างยิ่งสิ่วอักเสบ ซึ่งมีประสิทธิภาพเทียบเคียงได้กับ clindamycin gel

## รายการเอกสารอ้างอิง

- กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช กองคุ้มครองสัตว์ป่า และพืชตามอนุสัญญา, 2548. คู่มือศึกษาพันธุ์พืชป่า เล่มที่ 2. ชุมการเกษตรแห่งประเทศไทย: กรุงเทพมหานคร.
- จินตนา ลือสุวรรณกิจ. 2551. การเตรียมและประเมินผลผลิตกัณเฑาะและขาน้ำใสรักษาผิวจากพืชสมุนไพร. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ภัทรชัย กิรติสิน. 2549. ตำราวิทยาศาสตร์การแพทย์ (Textbook of medical bacteriology). พิมพ์ครั้งที่ 1: 570-577.
- ศรีศุภลักษณ์ สิงคาลวณิช. 2552. Update management of acne in adolescent. กุมารเวชสาร 3: 180-187.
- อาอิเซาะลี ยานนา. 2550. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของใบโทะ. โครงการทางเคมี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา.
- Achermann Y., Goldstein E. J., Coenye T. and Shirliff M. E. 2014. *Propionibacterium acnes*: from commensal to opportunistic biofilm-associated implant pathogen. Clinical Microbiology Review 27: 419-440.
- Achermann Y., Tran B., Kang M., Harro J. M. and Shirliff M.E. 2015. Immunoproteomi identification of *in vivo*-produced *Propionibacterium acnes* proteins in a rabbit biofilm infection model. Clinical Vaccine Immunology 22: 467-476.
- Aubin G. G., Portillo M. E., Trampuz A. and Corvec S. 2014. *Propionibacterium acnes*, an emerging pathogen: from acne to implant-infections, from phylotype to resistance. Médecine et Maladies Infectieuses 44: 241-250.
- Batubara I., Kuspradini H., Muddathir M. A. and Mitsunaga T. 2014. *Intsia palembanica* wood extracts and its isolated compounds as *Propionibacterium acnes* lipase inhibitor. Journal of Wood Science 60: 4611-4663.
- Batubara I., Mitsunaga T. and Ohashi H. 2010. Brazilin from *Caesalpinia sappan* wood as an antiacne agent. Journal of Wood Science 56: 77-81.

- Beylot C., Auffret N., Poli F., Claudel P. J., Leccia T. M., Del Giudice P. and Dreno B. 2014. *Propionibacterium acnes*: an update on its role in the pathogenesis of acne. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 28: 271-278.
- Bowe W. P., Joshi S. S. and Shalita A. R. 2010. Diet and acne. *Journal of the American Academy of Dermatology* 63: 124-141.
- Burkhart C. G. and Burkhart C. N. 2007. Expanding the microcomedone theory and acne therapeutics: *Propionibacterium acnes* biofilm produces biological glue that holds corneocytes together to form plug. *Journal of the American Academy of Dermatology* 57: 722-724.
- Chomnawang T. M., Surassmo S., Nukoolkarn S. V. and Gritsanapan W. 2007. Effect of *Garcinia mangostana* on inflammation caused by *Propionibacterium acnes*. *Fitoterapia* 78: 401-408.
- Chorachoo J., Amnuaiakit T. and Voravuthikunchai S. P. 2013. Liposomal encapsulated rhodomymrtone: a novel antiacne drug. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*: Article ID 157635.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2007. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Clinical and Laboratory Standards Institute approved standard M11-A7*. 7th ed. Wayne, PA, USA.
- Coenye T., Brackman G., Rigole P., De Witte E., Honraet K., Rossel B. and Nelis H. J. 2012. Eradication of *Propionibacterium acnes* biofilms by plant extracts and putative identification of icariin, resveratrol and salidroside as active compounds. *Phytomedicine* 19: 409-412.
- Coenye T., Peeters E. and Nelis J. H. 2007. Biofilm formation by *Propionibacterium acnes* is associated with increased resistance to antimicrobial agent and increased production of putative virulence factors. *Research in Microbiology* 158: 386-392.
- Feuillolay C., Pecastaings S., Le Gac C., Fiorini-Puybaret C., Luc J., Joulia P. and Roques C. 2015. A *Myrtus communis* extract enriched in myrtucummulones and ursolic acid reduces resistance of *Propionibacterium acnes* biofilms to antibiotics used in acne vulgaris. *Phytomedicine* 23: 307-315.

- Gollnick H., Cunliffe W., Berson D., Dreno B., Finlay A., Leyden J. J., Shalita A. R. and Thiboutot D. 2003. Management of acne: a report from a global alliance to improve outcomes in acne. *Journal of the American Academy of Dermatology* 49: 1-37.
- Hammer K. A. 2015. Treatment of acne with tea tree oil (melaleuca) products: a review of efficacy, tolerability and potential modes of action. *International Journal of Antimicrobial Agents* 45: 106-110.
- Heymann W. R. 2006. Toll-like receptors in acne vulgaris. *Journal of the American Academy of Dermatology* 55: 691-692.
- Higaki S. 2003. Lipase inhibitors for the treatment of acne. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 22: 377-384.
- Hiranrat A. and Mahabusarakam W. 2008. New acylphloroglucinols from the leaves of *Rhodomyrtus tomentosa*. *Tetrahedron* 64: 11193-11197.
- Holland C., Mak T. N., Zimny-Arndt U., Schmid M., Meyer T. F., Jungblut P. R. and Brüggemann H. 2010. Proteomic identification of secreted proteins of *Propionibacterium acnes*. *BMC Microbiology*. 10: 230.
- Hoogevest P.V., Prusseit B. and Wajda R. 2013. Phospholipids: natural functional ingredients and actives for cosmetic products. *SOFW Journal* 139: 8-14.
- Hou A. J., Wu Y. J. and Liu Y. Z. 1999. Flavones glycoside and ellagitannin from downy rose myrtle (*Rhodomyrtus tomentosa*). *Zhongcaoyao* 3: 645-648.
- Hsieh M. F. and Chen C. H. 2011. Review: delivery of pharmaceutical agents to treat acne vulgaris: current status and perspective. *Journal of Medical and Biological Engineering* 4: 215-224.
- Hui W. H. and Li M. M. 1976. Two new triterpenoids from *Rhodomyrtus tomentosa*. *Phytochemistry* 15 1741-1743.
- Hui W. H., Li M. M. and Luk K. 1975. Triterpenoids and steroids from *Rhodomyrtus tomentosa*. *Phytochemistry* 14: 833-834.

- Jahns A. C., Lundskog B., Ganceviciene R., Palmer R. H., Golovleva L., Zouboulis C. C., McDowell A., Patrick S. and Alexeyev O. A. 2012. An increased incidence of *Propionibacterium acnes* biofilms in acne vulgaris: a case-control study. *Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 167: 50-58.
- Jeong D., Yang W. S., Yang Y., Nam G., Kim J. H., Yoon d. H., Noh H. J., Lee S., Kim T. W. and Sung G. H. 2013. *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory effect of *Rhodomyrtus tomentosa* methanol extract. *Journal of Ethnopharmacology* 146: 205-213.
- Kamei Y., Sueyoshi M., Hayashi K. I., Terada R., and Nozaki H. 2009. The novel anti-*Propionibacterium acnes* compound, Sargafuran, found in the marine brown alga *Sargassum macrocarpum*. *Journal of Antibiotics*, 62: 259-263.
- Kang S. M., Kim H. J., Shin A. B., Lee C. H., Kim S. Y., Lim S. H. and Oh S. J. 2013. Inhibitory effect of chlorophyllin on the *Propionibacterium acnes* induced chemokine expression. *Journal of Microbiology* 51: 844-849.
- Karaolis D. K., Rashid M. H., Chythanya R., Luo W., Hyodo M. and Hayakawa Y. 2005. c-di GMP (3'-5'-cyclic diguanylic acid) inhibits *Staphylococcus aureus* cell-cell interactions and biofilm formation. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 49: 1029-1038.
- Kapoor S. and Saraf S. 2011. Topical herbal therapies an alternative and complementary choice to combat acne. *Research Journal of Medicinal Plant* 5: 650-669.
- Khan K., Karodi R., Siddiqui A., Thube S. and Rub A. R. 2012. Development of anti-acne gel formulation of anthraquinones rich fraction from *Rubia cordifolia* (Rubiaceae). *International Journal of Applied Research in Natural Product* 4: 28-36.
- Kim J. 2005. Review of the innate immune response in acne vulgaris: activation of Toll-like receptor 2 in acne triggers inflammatory cytokine responses. *Dermatology* 211: 193-198.
- Kokandi A. A. 2013. Acne flares among university female students: the role of perceived factors. *Journal of Cosmetics Dermatology Sciences and Applications* 3: 26-29.



- Kužma L., Różalski M., Walencka E., Różalska B. and Wysokińska H. 2007. Antimicrobial activity of diterpenoids from hairy roots of *Salvia sclarea* L.: salvipisone as a potential anti-biofilm agent active against antibiotic resist staphylococci. *Phytomedicine* 14: 31-35.
- Landro A. D., Cazzaniga S., Parazzini F., Ingordo V., Cusano F., Atzori L., Cutri F. T., Musumeci M. L., Zinetti C., Pezzarossa E. and Bettoli V. 2012. Family history, body mass index, selected dietary factors, menstrual history, and risk of moderate to severe acne in adolescents and young adults. *Journal of the American Academy of Dermatology* 67: 1129-1135.
- Lanter B. B. and Davies D. G. 2015. *Propionibacterium acnes* recovered from atherosclerotic human carotid arteries undergoes biofilm dispersion and releases lipolytic and proteolytic enzymes in response to norepinephrine challenge in vitro. *Infection and Immunity* 83: 3960-3971.
- Lavanya G., Voravuthikunchai S. P. and Towatana N. H. 2012. Acetone extract from *Rhodomyrtus tomentosa*: a potent natural antioxidant. *Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*: Article ID 535479.
- Lazar V. 2011. Quorum sensing in biofilms—how to destroy the bacterial citadels or their cohesion/power?. *Anaerobe* 17: 280-285.
- Lee S. E., Kim J. M., Jeong S. K., Jeon J. E., Yoon H. J., Jeong M. K. and Lee S. H. 2010. Protease-activated receptor-2 mediates the expression of inflammatory cytokines, antimicrobial peptides, and matrix metalloproteinases in keratinocytes in response to *Propionibacterium acnes*. *Archives of Dermatological Research* 10: 745-756.
- Leejae S., Taylor P. W. and Voravuthikunchai S. P. 2013. Antibacterial mechanisms of rhodomyrtone against important hospital-acquired antibiotic-resistant pathogenic bacteria. *Journal of Medical Microbiology* 62: 78-85.
- Li Z. J., Choi D. K., Sohn K. C., Seo M. S., Lee H. E., Lee Y., Seo Y. J., Lee Y. H., Shi G., Zouboulis C. C. and Kim C. D. 2014. *Propionibacterium acnes* activates the NLRP3 inflammasome in human sebocytes. *Journal of Investigative Dermatology* 134: 2747-2756.

- Limsuwan S., Hesselting-Meinders A., Voravuthikunchai S. P., Van Diji J. M. and Kayser O. 2011. Potential antibiotic and anti-infection effects of rhodomyrtone from *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk. on *Streptococcus pyogenes* as revealed by proteomics. *Phytomedicine* 18: 934-940.
- Limsuwan S., Kayser O. and Voravuthikunchai S. P. 2012. Antibacterial activity of *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk. leaf extract against clinical isolates of *Streptococcus pyogenes*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*: Article ID 697183.
- Limwattananon C., Rattanachotphanit T., Cheawchanwattana A., Waleekhachonloet O., Giwanon R., Choonhakarn C., Sripanidkulchai B. and Sakolchai S. 2008. Clinical efficacy of plai gel containing 1% plai oil in the treatment of mild to moderate acne vulgaris. *Isan Journal of Phamaceutical Sciences* 4: 121-133.
- Liu Y. Z., Hou A. J., Ji C. R. and Wu. Y. J. 1998. Isolation and structure of hydrolysable tannins from *Rhodomyrtus tomentosa*. *Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa* 10: 14-19.
- Lwin S. M., Kimber I. and McFadden J. P. 2014. Acne; quorum sensing and danger. *Clinical and Experimental Dermatology* 39: 162-167.
- Muddathir A. M., Yamauchi K. and Mitsunaga T. 2013. Anti-acne activity of tannin-related compounds isolated from *Terminalia laxiflora*. *Journal of Wood Science* 59: 426-431.
- Munawar S., Afzal M., Aftab M., Rizvi F. and Muhammad A. C. 2009. Precipitating factors of acne vulgaris in females. *Annals of PIMS-Pakistan Institute of Medical Science* 5: 104-107
- Nakatsuji T., Kao M. C., Zhang L., Zouboulis C. C., Gallo R. L. and Huang C. M. 2010. Sebum free fatty acids enhance the innate immune defense of human sebocytes by upregulating beta-defensin-2 expression. *Journal of Investigative Dermatology* 130: 985-994.
- Patil V., Bandivadekar A. and Debjani D. 2012. Inhibition of *Propionibacterium acnes* lipase by extracts of Indian medicinal plants. *International Journal of Cosmetic Science* 34: 234-239.
- Pothitirat W., Chomnawang T. M. and Gritsanapan W. 2009. Anti-ance-inducing bacterial

- activity of mangosteen fruit rind extracts. *Medical Principles and Practice* 19: 281-286.
- Ramage G., Tunney M. M., Patrick S., Gorman S. P. and Nixon J. R. 2003. Formation of *Propionibacterium acnes* biofilms on orthopaedic biomaterials and their susceptibility to antimicrobials. *Biomaterials* 24: 3221-3227.
- Saising J., Götz F., Dube L., Ziebandt A. K. and Voravuthikunchai S. P. 2015. Inhibition of staphylococcal biofilm-related gene transcription by rhodomyrtone, a new antibacterial agent. *Annals Microbiology* 65: 659-665.
- Saising J., Hiranrat A., Mahabusarakam W., Ongsakul M. and Voravuthikunchai S. P. 2008. Rhodomyrtone from *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk. as a natural antibiotic for staphylococcal cutaneous infections. *Journal of Health Science* 54: 589-595.
- Saising J., Ongsakul M. and Voravuthikunchai S. P. 2011. *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk. ethanol extract and rhodomyrtone: a potential strategy for the treatment of biofilm-forming staphylococci. *Journal of Medical Microbiology* 60: 1793-1800.
- Saising J., Singdam S., Ongsakul M. and Voravuthikunchai S. P. 2012. Lipase, protease, and biofilm as the major virulence factors in staphylococci isolated from acne lesions. *BioScience Trends* 6: 160-164.
- Saising J. and Voravuthikunchai S. P. 2012. Anti *Propionibacterium acnes* activity of rhodomyrtone, an effective compound from *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk. leaves. *Anaerobe* 18: 400-404.
- Salni D., Sargent M. V., Skelton B. W., Soediro I., Sutisna M., White A. H. and Yulinah E. 2002. Rhodomyrtone, an antibiotic from *Rhodomyrtus tomentosa*. *Australian Journal of Chemistry* 55: 229-232.
- Sharma R., Kishore N., Hussein A. and Lall N. 2013. Antibacterial and anti-inflammatory effects of *Syzygium jambos* L.(Alston) and isolated compounds on acne vulgaris. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13: 1.
- Strauss J. S. and Peter E.P. 1965. Intracutaneous injection of sebum and comedones: histological observations. *Archives of Dermatology* 92: 443-456.

- Tasoula E., Gregoriou S., Chalikias J., Lazarou D., Danopoulou I., Katsambas A. and Rigopoulos D. 2012. The impact of acne vulgaris on quality of life and psychic health in young adolescents in Greece. results of a population survey. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 87: 862-869.
- Treede I., Braun A., Jeliaskova P., Giese T., Füllekrug J., Griffiths G., Stremmel W. and Eehalt R. 2009. TNF- $\alpha$ -induced up-regulation of pro-inflammatory cytokines is reduced by phosphatidylcholine in intestinal epithelial cells. *BMC Gastroenterology* 9: 1-11.
- Treede I., Braun A., Sparla R., Kühnel M., Giese T., Turner J. R., Anes E. Kulaksiz H., Füllekrug J., Stremmel W. and Griffiths G. 2007. Anti-inflammatory effects of phosphatidylcholine. *Journal of Biological Chemistry* 282: 27155-27164.
- Toyne H., Webber C., Collignon P., Dwan K. and Kljakovic M. 2012. *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) resistance and antibiotic use in patients attending Australian general practice. *Journal of Dermatology* 53: 106-111.
- U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. 2005. Guidance for Industry, acne vulgaris: developing drugs for treatment (draft guidance). 1-14. Available at: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM071292.pdf> (last accessed 4 November 2015).
- U. S. food and drug administration CfD, (CDER). EaR. Guidance for industry. 2005. Acne vulgaris: developing drug foe treatment; Available at: <http://www.fda.gov/cder/guidance/6499dft.pdf>.
- Voravuthikunchai S. P., Limsuwan S. and Chusri S. 2007. New perspectives on herbal medicines for bacterial infection: natural products II. (Govil, J.N., Singh, V.K. and Siddqui, N.T., Eds.), Studium Press, LLC, USA: 41-101.
- Winotai A., Wright T. and Goolsby J. A. 2005. Herbivores in Thailand on *Rhodomyrtus tomentosa* (Myrtaseae), an invasive weed in Florida. *Florida Entmologist* 88: 104-105.

Zheng Y., Wan M., Chen H., Ye C., Zhao Y., Yi J., Xia Y. and Lai W. 2013. Clinical evidence on the efficacy and safety of an antioxidant optimized 1.5% salicylic acid (SA) cream in the treatment of facial acne: an open, baseline-controlled clinical study. *Skin Research Technology* 19: 125-130.

**ภาคผนวก**

ตารางที่ 1 Lipase and protease enzyme production in *Propionibacterium acnes* isolated from acne lesions

<i>Propionibacterium acnes</i> isolates	Enzymes	
	Lipase	Protease
NPRC 002	+	-
NPRC 003	+	-
NPRC 004	+	-
NPRC 006	+	+
NPRC 008	+	+
NPRC 019	+	-
NPRC 021	+	+
NPRC 022	+	-
NPRC 030	+	-
NPRC 031	+	-
NPRC 032	+	+
NPRC 034	+	+
NPRC 035	+	-
NPRC 036	+	-
NPRC 039	+	-
NPRC 040	+	+

+ = Enzyme production; - = No

ตารางที่ 2 Biofilm production in *Propionibacterium acnes* isolated from acne lesions

<i>Propionibacterium acnes</i> isolates	Biofilm production
NPRC 002	Moderate
NPRC 003	Moderate
NPRC 004	Weak
NPRC 006	Moderate
NPRC 008	Strong
NPRC 019	Moderate
NPRC 021	Moderate
NPRC 022	Moderate
NPRC 030	Weak
NPRC 031	Strong
NPRC 032	Strong
NPRC 034	Strong
NPRC 035	Strong
NPRC 036	Strong
NPRC 039	Strong
NPRC 040	Strong



## การเตรียมอาหารเก็บเชื้อและสารเคมี

### 1. อาหารสำหรับเก็บเชื้อ *Propionibacterium acnes* (100 mL)

Tryptone	1 g
Sodium chloride	0.5 g
Beef extract	0.3 g
Yeast extract	0.5 g
Cysteine	0.04 g
Glucose	0.1 g
Disodium phosphate	0.4 g
Glycerol	15 mL
Distilled water	85 mL

### 2. Phosphate buffer (pH 7.4)

Sodium chloride	8 g
Potassium chloride	0.2 g
Disodium phosphate	1.15 g
Dipotassium phosphate	0.2 g
Distilled water	1,000 mL

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวสุทธีวรรณ วุ่นหนู

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5610220153

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2555

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ทุนโครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Thanaporn Amnuait, Sauvarat Auepemie, Suttiwan Wunoo and Supayang P. Voravuthikunchai. Randomized, double-blind clinical trials for topical treatment of acne vulgaris: the comparison among three groups of 1% rhodomyrtone liposome serum, liposome serum base and marketing product of 1% clindamycin gel<sup>®</sup>. Dermatology. (submitted, 201606010)

Suttiwan Wunoo, Jongkon Saising, Supayang Piyawan Voravuthikunchai. Rhodomyrtone inhibits virulence factor production, biofilm formation, and disorganizes established biofilm in *Propionibacterium acnes*. (prepared)