



เชียงใหม่สัตวแพทยสาร

Chiang Mai Veterinary Journal

ISSN: 1685-9502 (print) 2465-4604 (online)

Website: www.vet.cmu.ac.th/cmvi



บทความต้นฉบับ

ฤทธิ์สารสกัดขมิ้นชันในการรักษาผิวหนังอักเสบในกระต่าย

ชรินญา พิมพ์สอน¹ หนึ่งฤทัย ฝาระภรณ์¹ พัชรภรณ์ นันทเพชร¹
จิรัฐติ ธรรมศิริ² เนตรดารา จันทร์อุตสาห์³ พิษานิกา ซอบจิตต์⁴

¹สาขาวิทยาศาสตร์สุขภาพสัตว์ คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์ จ.กาฬสินธุ์ 46000

²สาขาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์ จ.กาฬสินธุ์ 46000

³สาขาวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์ จ.กาฬสินธุ์ 46000

⁴คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จ.สกลนคร 47210

บทคัดย่อ เคอร์คูมินเป็นสารสกัดจากขมิ้นชัน มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ด้านอนุมูลอิสระ ซ้ำเชื้อแบคทีเรียโดยเฉพาะ เชื้อสแตฟิโลค็อกคัส ออเรียส การศึกษานี้ได้ทดสอบคุณสมบัติต้านการอักเสบและการลดอนุมูลอิสระของเคอร์คูมินในกระต่ายที่เหนียวน้ำให้ติดเชื้อแบคทีเรียสแตฟิโลค็อกคัส ออเรียส ที่ผิวหนัง กระต่าย 15 ตัว แบ่งเป็น 5 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีแผลแต่ไม่ติดเชื้อ กลุ่มที่มีแผลติดเชื้อแต่ไม่ทายา กลุ่มที่มีแผลติดเชื้อที่ทาครีมที่มีส่วนผสมของขมิ้นชันร้อยละ 5 และ 10 และครีมทารักษาผิวหนังอักเสบที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะ สังเกตรอยโรคที่ผิวหนังเป็นเวลา 7 วันและให้คะแนนลักษณะของแผล วัดสมรรถนะของเอนไซม์ในระบบต้านอนุมูลอิสระ ระดับของกลูต้าไธโอนรวม และระดับลิปิโดเปอร์ออกซิเดชัน บ่งชี้ถึงปริมาณอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้นบนผิวหนัง จากการศึกษาพบว่าสมรรถนะของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระและระดับลิปิโดเปอร์ออกซิเดชันที่ลดลงเมื่อทาด้วยครีมเคอร์คูมินความเข้มข้นร้อยละ 10 บ่งชี้ถึงปริมาณอนุมูลอิสระที่ลดลง ในขณะที่ระดับกลูต้าไธโอนรวมเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ จากการศึกษาสามารถพัฒนาการใช้สารสกัดขมิ้นชันเป็นยารักษาโรคผิวหนังอักเสบจากเชื้อแบคทีเรียสแตฟิโลค็อกคัส ออเรียสในกระต่าย เพื่อเป็นทางเลือกในการรักษาและลดโอกาสเกิดการติดต่อทางด้านจุลชีพในอนาคต

คำสำคัญ โรคผิวหนังอักเสบในกระต่าย, ขมิ้นชัน, ด้านอนุมูลอิสระ

* ผู้รับผิดชอบบทความ ชรินญา พิมพ์สอน สาขาวิทยาศาสตร์ คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์ จ.กาฬสินธุ์ 46000 โทรศัพท์ 0945244615 อีเมล: sine.charin@gmail.com

ข้อมูลบทความ วันที่ได้รับบทความ 25 ตุลาคม พ.ศ.2560 วันที่ได้รับการตีพิมพ์ 30 พฤศจิกายน พ.ศ.2560 วันที่ตีพิมพ์ออนไลน์ 15 มกราคม พ.ศ.2561

Original Article

The treatment of *Curcuma longa* on rabbit dermatitis

Charinya Pimson^{1,*}, Nuengruethai Parakhan¹, Patcharaporn Nantapet¹
Jiratti Thammasiri², Natedara Chanutsa³, Peechanika Chopjitt⁴

¹Department of animal health science, Faculty of Agro-industrial technology, Kalasin University, Kalasin, 46000

²Department of Animal Production Technology, Faculty of Agro-industrial technology, Kalasin University,
Kalasin, 46000

³Department of science and mathematics, Faculty of Agro-industrial technology, Kalasin University, Kalasin, 46000

⁴Faculty of public health, Kasetsart University Chalermprakiat, Sakon Nakorn province Campus,
Sakon Nakorn, 47210

Abstract Curcumin is one of the major components of *Curcuma longa* that has been reported to anti-inflammation, antioxidants, and anti-bacterial, especially *Staphylococcus aureus*. This study examines the anti-inflammatory and antioxidant effect of Curcumin against bacterial infection on rabbit skin. Fifteen rabbits were randomly divided into five groups as follows: un-infection and un-treatment with scarification, infection without treatment, treatments with 5% and 10% *Curcuma longa* creams and Tetracycline cream. Skin lesion of the rabbits was monitored for a week. The activities of antioxidant enzyme, level of total glutathione and lipid-peroxidation were examined to finally detect the oxidative stress. This study found that the activities of antioxidant systems and the level of lipid peroxidation was significantly reduced when we treated with *Curcuma longa* cream while level of total glutathione were gradually increased in skin rabbit. 10% *Curcuma longa* cream is the most effective. These findings imply that the effort of developing Curcumin into a therapeutic antibacterial skin and anti-resistant agent is reasonable.

Keywords: rabbit dermatitis, *Curcuma longa*, antioxidant

*Corresponding author: Charinya Pimson Department of animal health science, Faculty of Agro-industrial technology, Kalasin University, Kalasin 46000.

Tel: 0945244615 E-mail address: sine.charin@gmail.com

Article history: received manuscript: 25 October 2017, accepted manuscript: 30 November 2017, published online: 15 January 2018

บทนำ

โรคผิวหนังอักเสบ (dermatitis) ในกระต่าย เกิดจากหลายสาเหตุ รอยโรคมักพบบริเวณเนื้อเยื่ออ่อน และมีความชุ่มชื้นสูง เช่น ผิวหนังบริเวณใต้ท้อง รอบปาก อวัยวะเพศ เท้า เต้านม หรือผิวหนังที่ได้รับบาดเจ็บ ลักษณะรอยโรคมักพบอาการ บวม แดง มีตุ่มน้ำใส (vesicular) รุนแรงจนเกิดแผลหลุม (ulcer) สร้างความเจ็บปวดให้กระต่าย และนำไปสู่ภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด (Curtis et al., 1991; Garibaldi et al., 1990; Meulemans et al., 2007) ส่งผลกระทบสุขภาพและการผลิตกระต่ายในเชิงพาณิชย์ แบคทีเรียสแตฟีโลค็อกคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) เป็นสาเหตุที่สำคัญที่ทำให้เกิดโรค เมื่อมีการติดเชื้อบริเวณเนื้อเยื่อชั้นหนังกำพร้า (epidermis) ลูกกลามจนเกิดการอักเสบ เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ แลงเกอร์ฮานเซลล์ (Langerhans cells) เดนไดรติกเซลล์ (dendritic cells) เซลล์แมคโครฟาจ เม็ดเลือดขาวชนิดบีและชนิดที (B and T cells) พลาสมาเซลล์ (plasma cells) และเนทเชอรอล คิลเลอร์เซลล์ (natural killer cells ; NK cells) ถูกหลั่งออกมาเพื่อมาต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย ร่วมกับกระบวนการหลังเคโมไคน์ (chemokines) โดยการกระตุ้น IL-1 α และ IL-1 β การสร้าง IL-17 จากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที มีผลกระตุ้นนิวโทรฟิลด์ (neutrophils) ให้ทำลายแบคทีเรีย (Nestle et al., 2009) ควบคู่กับกระบวนการผลิตไซโตไคน์ (cytokines) ที่กระตุ้น Toll-like receptor 2 เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (Kupper et al., 2004; Kobayashi et al., 2015) ซึ่งกระบวนการเหล่านี้ส่งผลให้เกิดการเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระ (free radical) นำไปสู่การลดลงของสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ในเซลล์ผิวหนัง ความไม่สมดุลนี้นำไปสู่ภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) (Swindle et al., 2015)

ปัจจุบันเน้นรักษาโดยการให้ยาปฏิชีวนะ (antibiotic) ในกลุ่มเพนนิซิลินและอนุพันธ์ (Rayner and Munckhof, 2005) ซึ่งพบข้อจำกัดของการรักษาโดยวิธีการกิน (oral route) คือมีการทำลายแบคทีเรียชนิดดีในทางเดินอาหารของกระต่าย ส่งผลให้กระต่ายเกิดภาวะท้องเสีย หรือลำไส้อักเสบ (Mapara et al., 2012; Cheng et al., 2014) หากให้ในรูปแบบทาเฉพาะที่ กลับพบรายงานการดื้อต่อยา แบคซิทรากิน (bacitracin) นีโอไมซิน (neomycin) เจนตามัยซิน (gentamicin) และ มิวพิโรซิน (mupirocin) มากขึ้น (Bessa et al., 2016) การศึกษาหาสารสกัดจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิดนี้จึงเป็นที่แพร่หลายมากขึ้น

ขมิ้นชัน (*Curcuma longa*) ซึ่งเป็นพืชล้มลุกในวงศ์ขิง มีถิ่นกำเนิดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เนื้อในเหง้ามีสีเหลือง น้ำมันหอมระเหย (volatile oil) เป็นสารประกอบสำคัญทำให้ขมิ้นชันมีกลิ่นเฉพาะตัว และยังมีสรรพคุณในการรักษาการ เน้น จุกเสียด ปวดท้อง ท้องอืด สารสีเหลืองส้มในเหง้าขมิ้นชันคือสารเคอร์คูมิน (curcumin) มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ต้านอนุมูลอิสระ ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา ลดอาการอักเสบ เพิ่มภูมิคุ้มกันอิมมูโนโกลบูลินชนิดจี (IgG) (Afrose et al., 2015; Gupta et al., 2015) จากสรรพคุณที่หลากหลายของขมิ้นชันจึงเป็นที่มาในการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรขมิ้นชันในการรักษาโรคผิวหนังอักเสบในกระต่าย เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาศักยภาพของสารสกัดจากพืชสมุนไพรต่อยอดเป็นยาชะลอการ พัฒนาการของโรคผิวหนังอักเสบในกระต่ายที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย ยืนยันผลการทดลองในห้องปฏิบัติการ รวมถึงสามารถหาขนาดของยาที่ใช้ในการรักษาและทราบความเป็นพิษของยาเมื่อใช้เป็นยาทาเฉพาะที่ นำมาประยุกต์ใช้ในงานทางด้านสัตวแพทย์ ในการผลิตยาชนิดใหม่ในการใช้รักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียที่ผิวหนังได้ในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

การเหนี่ยวนำการเกิดผิวหนังอักเสบในกระต่าย

กระต่ายสายพันธุ์นิวซีแลนด์ไวท์กระต่ายผลิตจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล อ. ศาลายา จ.นครปฐม เลี้ยงและดูแลโดยได้รับอาหารและน้ำดื่มอย่างเพียงพอตลอดเวลา การศึกษาในสัตว์ทดลองอยู่ภายใต้การกำกับดูแลของสัตวแพทย์และได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยบรรณและมาตรฐานการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (AEKKU 55/2556) กระต่ายถูกแบ่งเป็น 5 กลุ่ม จำนวน 3 ตัวต่อกลุ่ม คือ กลุ่มที่มีแผลแต่ไม่ได้ติดเชื้อ (No infection) กลุ่มที่มีแผลและมีการติดเชื้อแต่ไม่ทายา (No treatment) กลุ่มที่มีแผลติดเชื้อที่ทาครีมที่มีส่วนผสมของขมิ้นชันร้อยละ 5 (5% *Curcuma longa*) และ 10 (10% *Curcuma longa*) และครีมทารักษาผิวหนังอักเสบที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะเตตราไซคลิน (TC-Mycin Ointment; Vesco Pharmaceutical Co., Ltd. Bangkok, Thailand) หรือกลุ่ม Tetracyclin cream กระต่ายถูกทำให้สลบโดย zoletil® (Virbac, United Kingdom) 100 mg จากนั้นใช้เข็มกรีดผิวหนังให้เป็นแผลขนาดประมาณ 2-2.5 เซนติเมตร บริเวณ lumbosacral ทั้งซ้ายและขวาข้างละ 2 แผล ทำการติดเชื้อแบคทีเรียสแตปไฟโลค็อกคัส ออเรียส (ATCC 6538) 1×10^6 colony-forming units/ml บนแผลที่ผิวหนัง ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 วันเพื่อประสิทธิภาพของการติดเชื้อ โดยพัฒนาขั้นตอนและวิธีการเหนี่ยวนำจาก Dai et al., 2011; Montgomery et al., 2013; Prabhakara et al., 2013 และ Malachowa et al., 2016

วันที่ 2 ของการทดลอง จัดบันทึกรอยโรค ลักษณะของแผล และเริ่มถ่ายรูปแผลเพื่อประเมินคะแนนแผล จากนั้นวันที่ 3 ของการทดลอง เริ่มทาน้ำกลั่นในกลุ่ม No infection และ No treatment ในส่วนของครีมทากระต่ายกลุ่ม 5, 10% *Curcuma longa* และ

Tetracyclin cream วันละ 3 ครั้งคือ 07.00-08.00 13.00-15.00 และ 19.00-20.00 น. จนถึงวันที่แผลหายสนิทหรือวันสุดท้ายของการทดลอง

ติดตามดูแผลที่ผิวหนังอย่างต่อเนื่องแล้วประเมินประสิทธิภาพของสารสกัดเทียบกับกลุ่มควบคุม คะแนนรอยโรคถูกแบ่งเป็น คะแนน 0 คือ no lesion คะแนน 1 คือ erythematous swelling คะแนน 2 คือ vesicles or moist lesion in local region คะแนน 3 คือ erosion คะแนน 4 คือ ulceration in local region คะแนน 5 คือ cellulitis lesion คะแนน 6 คือ purulent lesion คะแนน 7 คือ necrotic lesion คะแนน 8 คือ fascia คะแนน 9 คือ severe lesion and sepsis คะแนน 10 คือ death (Sunderkötter and Becker, 2015)

วันที่ 5 ของการทดลอง ทำการวางยาสลบกระต่ายทุกกลุ่มเพื่อทำการตัดชิ้นเนื้อขนาด 0.5x0.5 เซนติเมตรบริเวณแผลที่ผิวหนังด้านขวาบนของกระต่ายเพื่อศึกษาระดับลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน และทำการรักษาแผลที่ผิวหนังต่อไป จากนั้นวันที่ 10 ของการทดลองทำการการารุณยฆาต (euthanasia) กระต่ายเพื่อเก็บชิ้นเนื้อที่แผลทั้งหมด ด้วย pentobarbital sodium (Nembutal®, Ceva, Belgium) และเก็บตัวอย่างโดยตัดชิ้นเนื้อบริเวณแผลที่ผิวหนังขนาด 1.5 x 1.5 เซนติเมตรใส่ใน transport media และเก็บที่ -80 องศาเซลเซียสเพื่อตรวจวิเคราะห์ต่อไป

การเตรียมครีมสารสกัดขมิ้นชัน

สารสกัดจากขมิ้นชันถูกเตรียมขึ้นที่ภาคจุลชีวินวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยเหง้าขมิ้นชันถูกนำมาอบแห้งและบดหยาบ จากนั้นแช่ด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 เป็นเวลา 7 วัน กรองด้วยกระดาษกรองแล้วจึงนำไประเหยด้วยเครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศ (Rotary Evaporator R-II, Buchi, Switzerland) ทำการหมักซ้ำ 3 รอบ แล้วนำสารละลายที่ได้ทั้งหมดทำให้แห้งด้วยเครื่องทำให้แห้ง

ด้วยความเย็นและสูญญากาศ (Freeze dryer- lyolab, Thermo Scientific, USA) ซึ่งนำน้ำหนักสารและคำนวณหาปริมาณเนื้อสารสกัดที่ได้ จากนั้นวัดปริมาณสารที่ได้ด้วยวิธี HPLC พบว่า ประกอบไปด้วยสารเคอร์คูมิน (curcumin) ร้อยละ 93.6 จากนั้นเตรียมเคอร์คูมินครีม โดยการผสมสารสกัดความเข้มข้นร้อยละ 5 และ 10 กับเบสครีมซึ่งมีส่วนผสมของ polysorbate 80 (5w/v), Isopropyl myristate, stearyl alcohol (20v/v), liquid white paraffin (15v/v), purified water (100 ml), methylparaben (0.18 w/w) และ propylparaben (0.02w/w)

การวิเคราะห์ระดับการทำงานของเอนไซม์ Catalase (CAT), Superoxide dismutase (SOD) และ Glutathione peroxidase (GPx) และระดับ Total Glutathione ในตัวอย่างผิวหนังกระต่าย

ขึ้นเนื่องจากผิวหนังถูกนำมาบดในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เจือจางให้เป็น 300 เท่า นำไปวิเคราะห์สมรรถนะการทำงานของเอนไซม์ SOD โดยการวัดอัตราการยับยั้งฟอร์มาซาน (formazan) ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง xanthine และ xanthine oxidase และทำให้เกิดสีด้วย nitrotetrazolium blue chloride (NBT) จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน SOD การวิเคราะห์สมรรถนะของเอนไซม์ CAT โดยใช้ H_2O_2 เป็นสารตั้งต้นทำปฏิกิริยากับแอมโมเนียมโมลิบเดต (ammonium molybdate) ได้สารประกอบสีเหลือง เดิม ตัวอย่างผิวหนังกระต่ายลงในปฏิกิริยาและเปรียบเทียบการยับยั้งปฏิกิริยากับหลอดควบคุม คำนวณสมรรถนะของ CAT เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน CAT จากนั้นวิเคราะห์สมรรถนะของเอนไซม์ GPx โดยวัดอัตราการเปลี่ยนแปลง GSH ไปเป็น GSSG ในปฏิกิริยาที่ประกอบไปด้วย H_2O_2 ในส่วนของการตรวจวัดปริมาณ reduced glutathione (GSH) จากการเปลี่ยน xanthine ในภาวะที่มี glutathione reductase (GR) จากนั้นใช้ 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) หรือ DTNB ทำ

ปฏิกิริยากับผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน GSH ในขณะที่การตรวจวัดปริมาณ oxidized glutathione (GSSG) ทำได้โดยการเติม 4-vinyl pyridine (4-VP) ในตัวอย่าง จากนั้นทำการทดสอบเช่นเดียวกับการตรวจวัดปริมาณ GSH และเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ GSSG (Pimson et al., 2014)

การตรวจวัดระดับลิปิดเปอร์ออกซิเดชันในตัวอย่างผิวหนังกระต่าย

เพื่อศึกษาความแตกต่างของระดับลิปิดเปอร์ออกซิเดชันซึ่งบ่งชี้ถึงการเกิดอนุมูลอิสระในผิวหนังกระต่ายเปรียบเทียบกับช่วงเวลาของการติดเชื้อ ทำการเก็บตัวอย่างผิวหนังกระต่ายเป็น 2 ช่วงเวลาคือวันที่ 5 และวันที่ 9 ของการทดลอง จากนั้นบดตัวอย่างผิวหนังกระต่ายแล้วนำไปป่มพร้อมสารมาตรฐาน standard malondialdehyde (MDA) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมน้ำผสมที่ประกอบด้วยกรดไตรคลอโรอะซิติก (trichloroacetic acid), 2-thiobarbituric acid (TBA) และกรดอะซิติก และแช่ในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนแล้วนำไปวัดอัตราการดูดกลืนแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 551 นาโนเมตร และ 528 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน MDA (Pimson et al., 2014)

การทดสอบทางสถิติ

แสดงผลเป็นค่า mean \pm SD และทำการวิเคราะห์สถิติด้วยโปรแกรม SPSS version 17.1 โดยวิธี ANOVA ร่วมกับการทดสอบด้วย Tukey ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$

ผลการศึกษา

ลักษณะรอยโรคที่พบหลังการเหนี่ยวนำผิวหนังอักเสบในกระต่าย

สังเกตรอยโรคที่เกิดขึ้น (Table 1) และการหายของแผล (Figure 1) จากนั้นให้คะแนนแผลที่เกิดขึ้นในแต่ละกลุ่ม (Figure 2) พบว่าผลการทดลองในกระต่ายกลุ่ม No treatment คะแนนรอยโรคสูงกว่ากลุ่ม No infection เมื่อระยะเวลาของการทดลองนาน

ขึ้น แผลค้อยแห้งแต่ยังปรากฏรอยโรคเหลืออยู่ในวันที่ 7 ผลคะแนนอยู่ที่ 1 คะแนน ในขณะที่กระต่ายกลุ่ม 5% และ 10% curcuma longa พบว่าลักษณะของแผลค้อยลดความรุนแรงลงหลังจากการติดเชื้อวันแรก

Table 1 Lesion of dermatitis on rabbit skin was infected by *Staphylococcus aureus*

Group	Lesion
No infection	Day 3 rd : Erythematous swelling and mild exudate Day 4 th -5 th : Maceration with purulent discharge and crust Day 6 th -9 th : Wound contraction, epithelization and scar formation
No treatment	Day 3 rd : Erythematous swelling, more exudate, moist wound Day 4 th -5 th : Ulceration Day 6 th -7 th : Maceration with purulent discharge and severe crust Day 8 th -9 th : Wound contraction, epithelization and scar formation
5% Curcuma longa	Day 3 rd : Erythematous swelling, more exudate, moist wound Day 4 th : Cellulitis and ulceration Day 5 th -7 th : Maceration with purulent discharge and severe crust Day 8 th : Wound contraction, epithelization and scar formation No lesion in Day 9 th
10% Curcuma longa	Day 3 rd : Erythematous swelling, more exudate, moist wound Day 4 th : Cellulitis and ulceration Day 5 th : Maceration with purulent discharge, severe crust, wound contraction, epithelization and scar formation No lesion in Day 6 th
Tetracyclin cream	Day 3 rd : Erythematous swelling, more exudate, moist wound Day 4 th : Cellulitis and ulceration Day 5 th -7 th : Maceration with purulent discharge and severe crust Day 8 th -9 th : Wound contraction, epithelization and scar formation

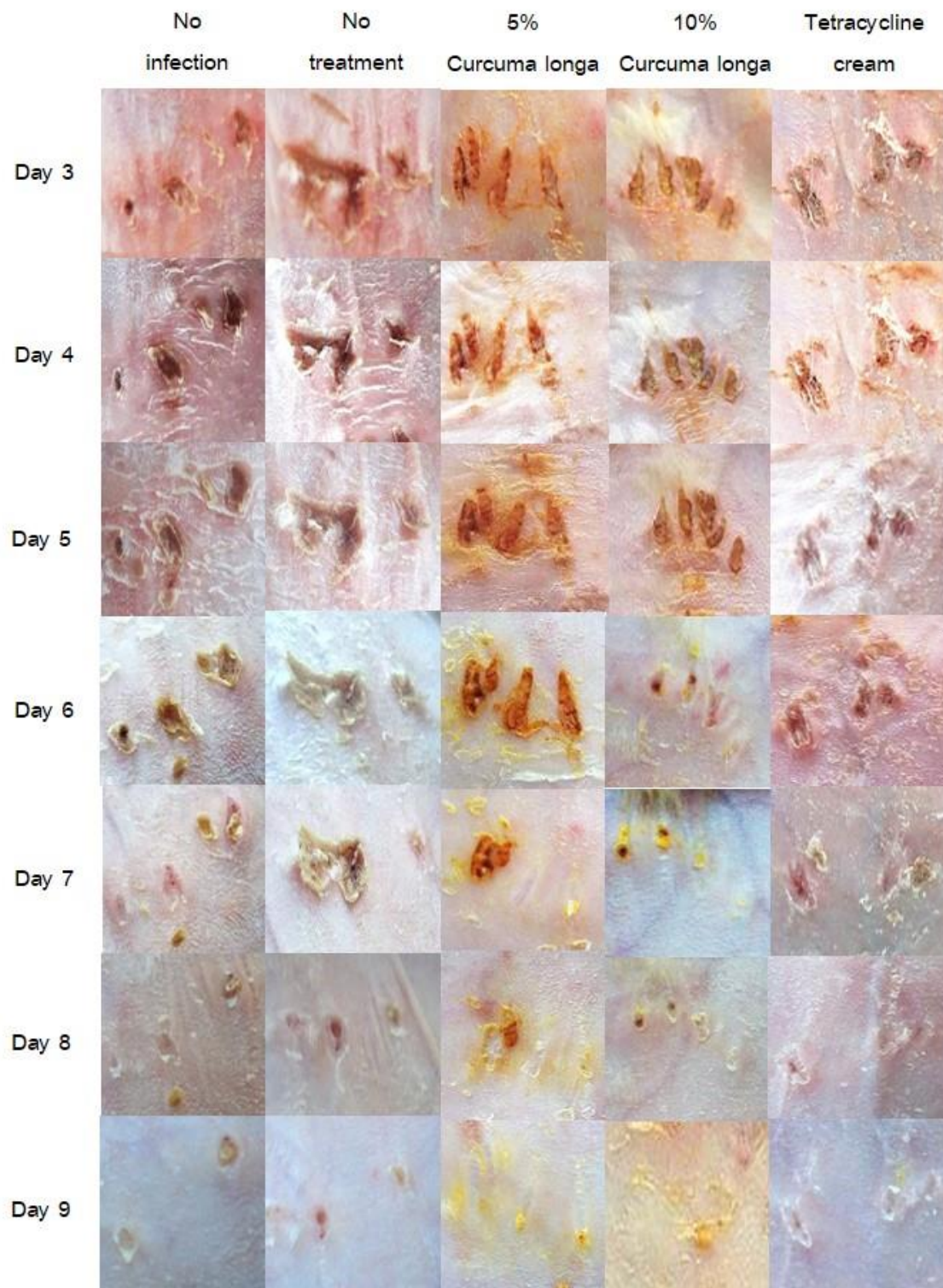


Figure 1 The lesion of rabbit skin as follow: No infected is the un-infection and un-treatment with scarification group, No treatment is the bacterial infection with scarification group, 5% Curcuma longa, 10% Curcuma longa and Tetracycline cream are the infection wound with the treatments

และเริ่มดีขึ้นอย่างเห็นได้ชัดในวันที่ 3 ของการติดเชื้อ และวันที่ 7 ของการทดลองแผลหายดีโดยไม่เหลือรอยโรค คะแนนแผลอยู่ที่ 0 ซึ่งดีกว่าการทาด้วยยา tetracycline (Figure 2) เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง กระจ่ายกลุ่ม 5% และ 10% curcuma longa พบว่า กระจ่ายที่ได้รับการทาด้วย สารสกัดขมิ้นชันความเข้มข้นร้อยละ 10 มีประสิทธิภาพต่อการหายของแผลได้ดีกว่า และการหายของแผลใกล้เคียงกับกลุ่ม No infection

สมรรถนะของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างผิวหนังของกระจ่าย

ผิวหนังของกระจ่ายกลุ่ม No treatment มีการเพิ่มขึ้นของ CAT, SOD และ GPx อย่างมีนัยสำคัญ (Figure 3) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม No infection เมื่อรักษาแผลที่ติดเชื้อด้วยสารสกัดขมิ้นชันความเข้มข้นร้อยละ 5 และ 10 พบว่าสามารถลดสมรรถนะของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะ กระจ่ายกลุ่ม 10% Curcuma longa ตัวยาสามารถลดสมรรถนะการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระได้ใกล้เคียงกับกระจ่ายกลุ่ม No infection โดยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

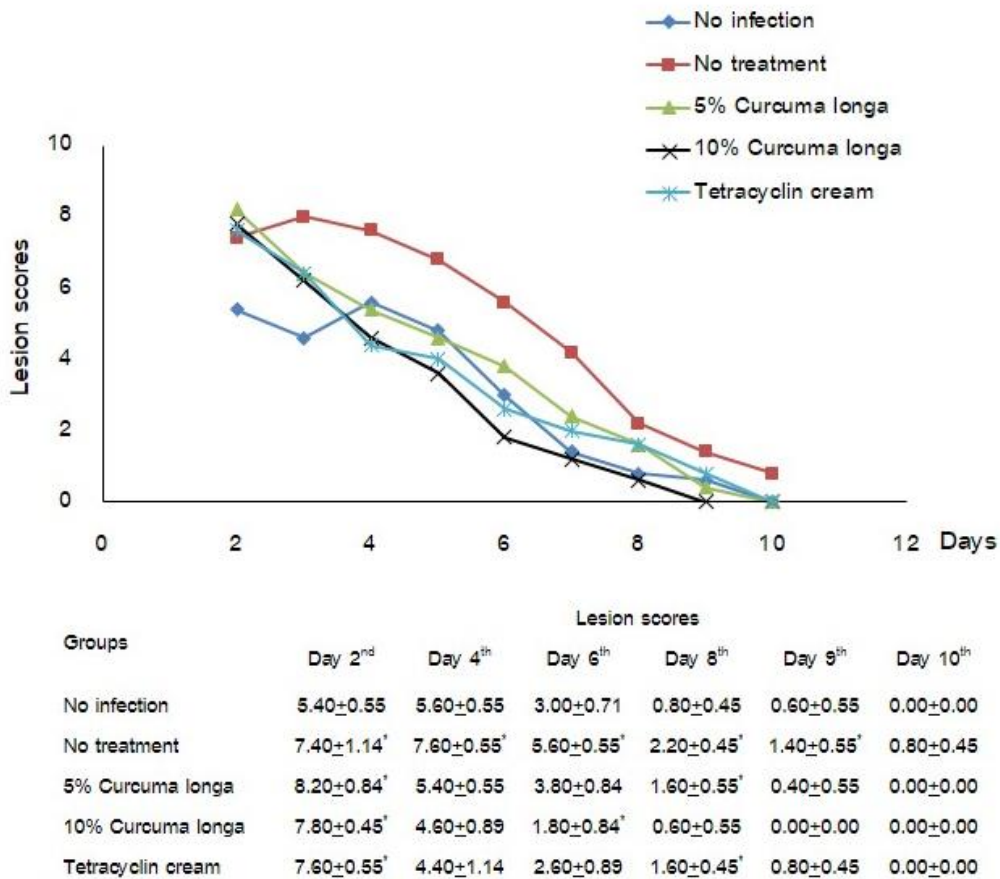


Figure 2 The comparison of average dermatitis lesion scores in rabbit skin across the time periods (days). The asterisk “ * ” is the statistic significant compared with No infection groups (P <0.05).

ระดับ Total glutathione และอัตราส่วนของ GSH/GSSG ในตัวอย่างผิวหนังของกระต่าย

การเปลี่ยนแปลงของระดับ Total glutathione และอัตราส่วนของ GSH/GSSG ในผิวหนังของกระต่ายกลุ่ม No infection ซึ่งมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อทาด้วย 5 และ 10% Curcuma longa cream

พบว่าระดับของกลูต้าไธโอนรวมเพิ่มขึ้นส่งผลให้อัตราส่วนของ GSH/GSSG เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะ 10% Curcuma longa ที่เพิ่มระดับ total glutathione จนใกล้เคียงกับกระต่ายกลุ่ม No infection (Table 2)

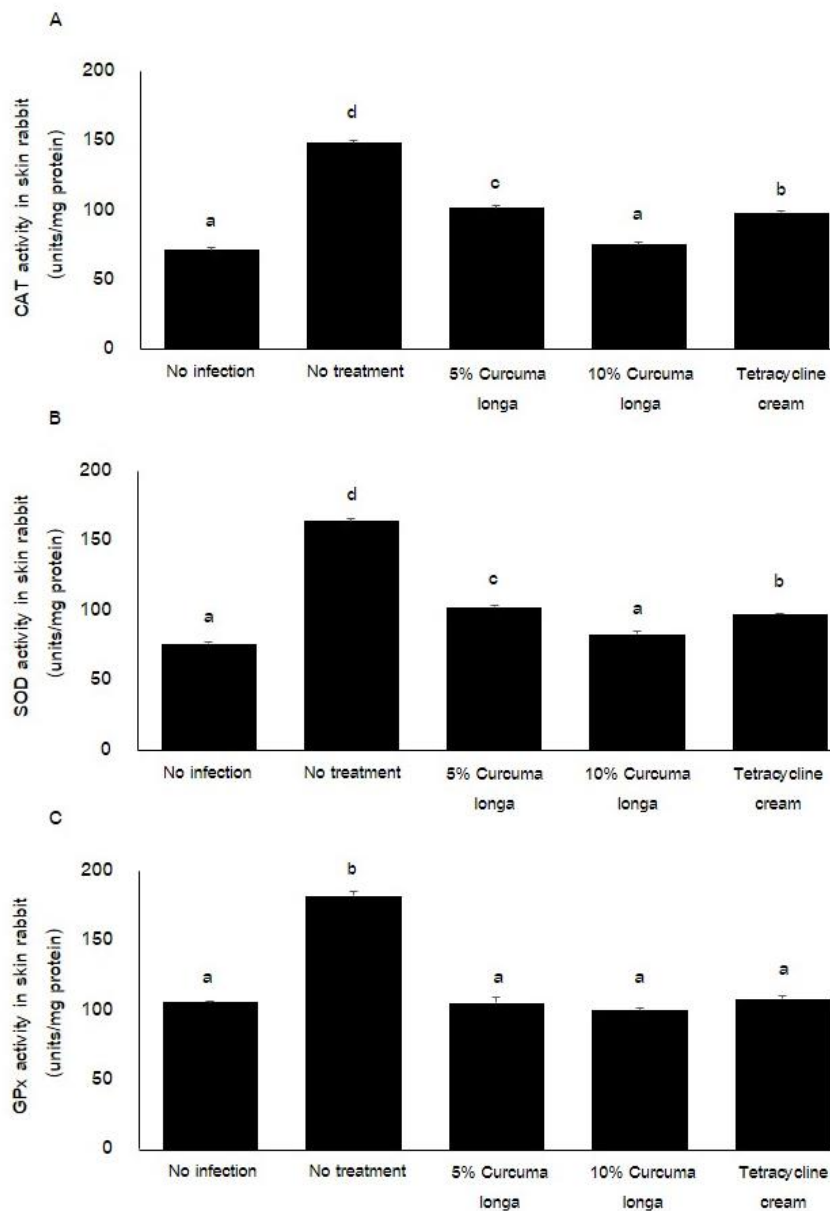


Figure 3 The antioxidant enzyme activity of dermatitis rabbit skins given 5%, 10% Curcuma longa and Tetracycline cream. The data are presented as the mean \pm SD (n = 5). Different lower-case letters indicate a significant difference among different precipitation levels (P < 0.05).

ระดับลิปิดเปอร์ออกซิเดชันในตัวอย่างผิวหนังของกระต่าย

หลังเหนี่ยวนำให้เกิดผิวหนังอักเสบแล้วมีการเพิ่มขึ้นของระดับลิปิดเปอร์ออกซิเดชันที่บ่งชี้ถึงการเกิดอนุมูลอิสระในผิวหนังกระต่ายกลุ่ม No treatment แต่เมื่อทาด้วยสารสกัดขมิ้นชันความเข้มข้นร้อยละ 5 และ 10

พบว่า ระดับของลิปิดเปอร์ออกซิเดชันลดลงอย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะกระต่ายกลุ่ม 10% curcuma longa ที่ระดับลิปิดเปอร์ออกซิเดชันลดลงเทียบเท่ากับกลุ่ม No infection ทั้งในวันที่ 3 และวันที่ 7 ของการทดลอง (Figure 4)

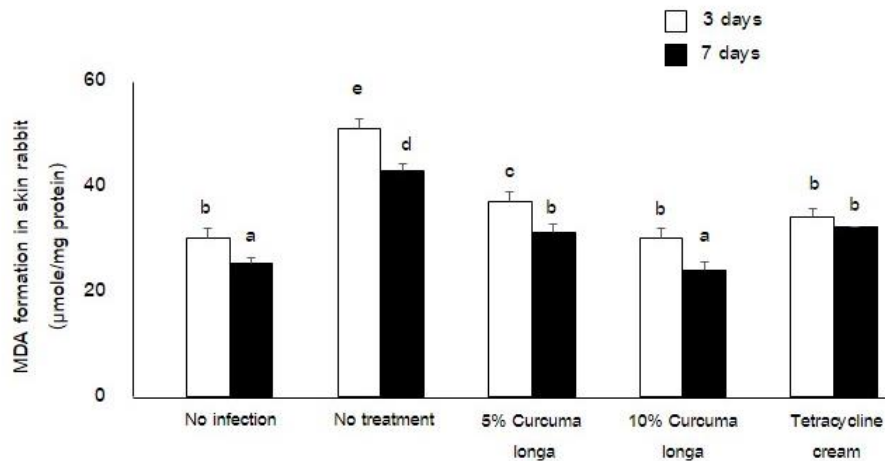


Figure 4 The lipid peroxidation of dermatitis rabbit skins given 5%, 10% Curcuma longa and Tetracycline cream. The skins were collected 3 and 7 days (the last treatment) after infection. The data are presented as the mean \pm SD (n = 5). Different lower-case letters indicate a significant difference among different precipitation levels (P < 0.05).

Table 2 The total glutathione, ratio of GSH/GSSG of dermatitis rabbit skins given 5%, 10% Curcuma longa and Tetracycline cream.

Group	Total glutathione (nmoles/mg protein)	Ratio GSH/GSSG
Un-infection	14.16 \pm 0.27 ^a	3.71 \pm 0.66 ^a
Infection untreated	7.12 \pm 0.156 ^b	1.43 \pm 0.17 ^b
5% Curcuma longa	12.16 \pm 0.42 ^c	2.79 \pm 0.05 ^c
10% Curcuma longa	13.76 \pm 0.07 ^a	3.66 \pm 0.61 ^a
Tetracyclin cream	10.64 \pm 0.24 ^d	2.19 \pm 0.10 ^d

The data are presented as the mean \pm SD (n = 5). Different lower-case letters indicate a significant difference among different precipitation levels (P < 0.05).

วิจารณ์

แบคทีเรียสแตปไฟโลค็อกคัส ออเรียส ไม่เพียงแต่ก่ออาการที่ผิวหนังจนเกิดการอักเสบเท่านั้น แต่ยังกระตุ้นให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน ส่งผลกระทบต่อการกลับมาเป็นซ้ำ (recurrent) การกำเริบของโรค (exacerbation) และลดความสามารถในการทำงานของระบบต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย (Ji and Li, 2016) โดยเพิ่มปริมาณอนุมูลอิสระซึ่งสามารถวัดได้จากปริมาณของ malondialdehyde (MDA) ที่พบในผิวหนัง ปริมาณของอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้สมรรถนะของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น CAT, SOD, GPx ต้องทำงานเพิ่มมากขึ้นด้วย สอดคล้องกับผลการศึกษาที่พบการเพิ่มขึ้นของสมรรถนะของเอนไซม์ SOD, CAT และ GPx ในกระต่ายที่เหนียวหน้าผิวหนังอักเสบ ผลของระบบต้านอนุมูลอิสระนี้เกิดขึ้นเพื่อตอบสนองและทำลายอนุมูลอิสระในร่างกายสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมซึ่งจะพบการทำงานของ SOD เป็นอันดับแรก ตามด้วย CAT ที่ทำงานร่วมกับ GPx อย่างเป็นระบบ (Devi et al., 2000)

เมื่อพิจารณา Total glutathione และอัตราส่วนของ GSH/GSSG ที่ลดลงในผิวหนังกระต่ายที่ถูกเหนียวหน้าผิวหนังอักเสบ จะเห็นได้ว่าสอดคล้องกับสมรรถนะของเอนไซม์ GPx กล่าวคือสมรรถนะของเอนไซม์ GPx จะแปรผกผันกับอัตราส่วนของ GSH/GSSG เนื่องจาก เอนไซม์ GPx เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการเปลี่ยน GSH ให้กลายเป็น GSSG ดังนั้นหากสมรรถนะของเอนไซม์ GPx เพิ่มมากขึ้น ปริมาณของ GSSG จะเพิ่มมากขึ้นด้วย ส่งผลให้อัตราส่วน GSH/GSSG ลดลง ผลการศึกษาครั้งนี้สนับสนุนความเป็นไปได้ของการเหนียวภาวะผิวหนังอักเสบจากเชื้อแบคทีเรียสแตปไฟโลค็อกคัส ออเรียส ในกระต่าย เพื่อใช้เป็นตัวแบบสัตว์ทดลองที่ทำได้ง่ายและใช้ระยะเวลาไม่นานมากนัก และสามารถตรวจพบความสัมพันธ์ของภาวะเครียดออกซิเดชันที่เปลี่ยนแปลงในเชิงลบในผิวหนัง

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันต่อการรักษานี้ผิวหนังอักเสบจากการติดเชื้อแบคทีเรียสแตปไฟโลค็อกคัส ออเรียส สอดคล้องกับการศึกษาของ Teow et al. (2016) ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันในการยับยั้งเชื้อนี้ในหนูเมาส์ โดยเคอร์คูมิน (curcumin) ซึ่งเป็นสารสกัดจากขมิ้นชันจะจับกับโปรตีน FtsZ (Prokaryotic homologue of eukaryotic cytoskeletal protein tubulin) ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวของแบคทีเรีย โดยไปยับยั้งการทำงานของ FtsZ ส่งผลให้เกิดการยับยั้งกระบวนการสร้างและแบ่งตัวของเซลล์แบคทีเรีย (Rai et al., 2008) ยับยั้งการแสดงออกของยีน *mecA* ทำให้เกิดการลดการทำงานของโปรตีน PBP2 α มีผลในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Tyagi et al., 2015) อีกทั้งเคอร์คูมินยังจับกับเพปทิโดไกลแคน (peptidoglycan) บนผนังเซลล์ของแบคทีเรีย มีผลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์และผนังเซลล์ของแบคทีเรียแตกออกได้

นอกจากฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียแล้ว ยังพบรายงานการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของเคอร์คูมินอีกด้วย (Al-Rubaei et al., 2014; Daverey and Agrawal, 2016) สอดคล้องกับผลการทดลองนี้ที่ปริมาณอนุมูลอิสระลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ส่งผลให้ผลการศึกษสมรรถนะการทำงานของระบบต้านอนุมูลอิสระทำงานลดลงอย่างมากเมื่อทาด้วยสารสกัดขมิ้นชัน โดยเฉพาะขมิ้นชันความเข้มข้นร้อยละ 10 ที่พบว่ามีประสิทธิภาพมากที่สุด จนไม่แตกต่างจากกระต่ายกลุ่มที่ไม่ได้ติดเชื้อ

สรุป

โรคผิวหนังอักเสบจากการติดเชื้อแบคทีเรียสแตปไฟโลค็อกคัส ออเรียส ไม่เพียงแต่เป็นโรคที่มีความสำคัญทางด้านสัตวแพทย์ นอกจากพบการติดเชื้อในกระต่ายแล้วยังพบได้ในสัตว์ชนิดอื่นๆ เช่น สุัข แมว ม้า สุกร โค แกะ เป็นต้น ในกระต่ายเมื่อมีการติดเชื้อมัก

เกิดการอักเสบ ก่ออวัยวะและความเจ็บปวดเป็นอย่างมาก การรักษาโดยใช้ยาทาเฉพาะที่นอกจากส่งผลต่อความเป็นพิษหากกระต่ายได้รับโดยการเลียหรือแตะ เล็มขนแล้ว ยังพบรายงานการติดต่อยาต้านจุลชีพแบบทาเฉพาะที่อีกด้วย จากผลการทดลองนี้พบว่าสารสกัดขมิ้นชันความเข้มข้นร้อยละ 10 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อแบคทีเรียสแตปฟีโลค็อกคัส ออเรียส และลดการเกิดพยาธิสภาพได้ดีกว่าการรักษาด้วย Tetracycline cream ซึ่งเป็นยาที่ถูกสังเคราะห์เพื่อใช้รักษาการติดเชื้อแบคทีเรียที่ผิวหนังแบบเฉพาะที่ อีกทั้งยังมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ ทำให้แผลหายเร็ว จึงสามารถใช้สารสกัดขมิ้นชันนี้เป็นยาในการรักษาผิวหนังอักเสบแบบเฉพาะที่ในกระต่ายทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะได้ในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

Afrose, R., Saha, S.K., Banu, L.A., Ahmed, A.U., Shahidullah, A.S., Gani, A., Sultana, S., Kabir, M.R., Ali, M.Y., 2015. Antibacterial Effect of *Curcuma longa* (Turmeric) Against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Mymensingh Med. J.* 24, 506-515.

Al-Rubaei, Z.M., Mohammad, T.U., Ali, L.K. 2014. Effects of local curcumin on oxidative stress and total antioxidant capacity in vivo study. *Pak. J. Biol. Sci.* 17, 1237-1241.

Bessa, G.R., Quinto, V.P., Machado, D.C., Lipnharski, C., Weber, M.B., Bonamigo, R.R., D'Azevedo, P.A., 2016. *Staphylococcus aureus* resistance to topical antimicrobials in atopic dermatitis. *An. Bras. Dermatol.* 91, 604-610.

Cheng, G., Hao, H., Xie, S., Wang, X., Dai, M., Huang, L., Yuan, Z., 2014. Antibiotic alternatives: the substitution of antibiotics in animal husbandry? *Front. Microbiol.* 5, 217.

Curtis, S.K., 1991. Diagnostic exercise: moist dermatitis on the hind quarters of a rabbit. *Lab. Anim. Sci.* 41, 623-624.

Dai, T., Kharkwal, G.B., Tanaka, M., Huang, Y.Y., Bil de Arce, V.J., Hamblin, M.R., 2011. Animal models of external traumatic wound infections. *Virulence.* 2, 296-315.

Daverey, A., Agrawal, S.K. 2016. Curcumin alleviates oxidative stress and mitochondrial dysfunction in astrocytes. *Neuroscience.* Doi, 10.1016/j.neuroscience.2016.07.012.

Devi, G.S., Prasad, M.H., Saraswathi, I., Raghu, D., Rao, DN., Reddy PP. 2000. Free radicals antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different types of leukemias. *Clin. Chim. Acta.* 293, 53-62.

Garibaldi, B.A., Fox, J.G., Musto, D.R., 1990. Atypical moist dermatitis in rabbits. *Lab. Anim. Sci.* 40, 652-653.

Gupta, A., Mahajan, S., Sharma, R., 2015. Evaluation of antimicrobial activity of *Curcuma longa* rhizome extract against *Staphylococcus aureus*. *Biotechnol. Rep. (Amst).* 6, 51-55.

Ji, H., Li, X.K. 2016. Oxidative Stress in Atopic Dermatitis. *Oxid. Med. Cell. Longev.* doi, 10.1155/2016/2721469.

Kobayashi, S.D., Malachowa, N., DeLeo, F.R., 2015. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* abscesses. *Am. J. Pathol.* 185, 1518-1527.

Kupper, T.S., Fuhlbrigge, R.C., 2004. Immune surveillance in the skin: Mechanisms and clinical consequences. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 211-222.

Malachowa, N., Kobayashi, S.D., Porter, A.R., Braughton, K.R., Scott, D.P., Gardner, D.J., Missiakas, D.M., Schneewind, O., DeLeo, F.R., 2016. Contribution of *Staphylococcus aureus* Coagulases and Clumping Factor A to Abscess Formation in a Rabbit Model of Skin and Soft Tissue Infection. *PLoS One.* 11(6):e0158293.

Mapara, M., Thomas, B.S., Bhat, K.M., 2012. Rabbit as an animal model for experimental research. *Dent. Res. J. (Isfahan).* 9, 111-118.

- Meulemans, L., Hermans, K., Duchateau, L., Haesebrouck, F., 2007. High and low virulence *Staphylococcus aureus* strains in a rabbit skin infection model. *Vet. Microbiol.* 125, 333-340.
- Montgomery, C.P., Daniels, M.D., Zhao, F., Spellberg, B., Chong, A.S., Daum, R.S., 2013. Local inflammation exacerbates the severity of *Staphylococcus aureus* skin infection. *PLoS One.* 8(7):e69508.
- Nestle, F.O., Di Meglio, P., Qin, J.Z., Nickoloff, B.J., 2009. Skin immune sentinels in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 679-691.
- Pimson, C., Chatuphonprasert, W., Jarukamjorn, K., 2014. Improvement of antioxidant balance in diabetes mellitus type 1 mice by glutathione supplement. *Pak. J. Pharm. Sci.* 27, 1731-1737.
- Prabhakara, R., Foreman, O., De Pascalis, R., Lee, G.M., Plaut, R.D., Kim, S.Y., Stibitz, S., Elkins, K.L., Merkel, T.J., 2013. Epicutaneous model of community-acquired *Staphylococcus aureus* skin infections. *Infect. Immun.* 81, 1306-1315.
- Rai, D., Singh, J.K., Roy, N., Panda, D., 2008. Curcumin inhibits FtsZ assembly: an attractive mechanism for its antibacterial activity. *Biochem. J.* 410, 147-155.
- Rayner, C., Munckhof, W.J., 2005. Antibiotics currently used in the treatment of infections caused by *Staphylococcus aureus*. *Intern. Med. J.* 35, S3-S16.
- Sunderkötter, C., Becker, K., 2015. Frequent bacterial skin and soft tissue infections: diagnostic signs and treatment. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* 13, 501-524.
- Swindle, E.J., Brown, J.M., Rådinger, M., DeLeo, F.R., Metcalfe, D.D., 2015. Interferon- γ enhances both the anti-bacterial and the pro-inflammatory response of human mast cells to *Staphylococcus aureus*. *Immunology.* 146, 470-485.
- Teow, S.Y., Liew, K., Ali, S.A., Khoo, A.S.B., Peh, S.C., 2016. Antibacterial Action of Curcumin against *Staphylococcus aureus*: A Brief Review. *J. Trop. Med.* 2016, 2853045.
- Tyagi, P., Singh, M., Kumari, H., Kumari, A., Mukhopadhyay, K., 2015. Bactericidal activity of curcumin I is associated with damaging of bacterial membrane. *PLoS One.* 10, e0121313.