ฤทธิ์ในการยับยั้ง *Candida* sp. ของ Cinnamaldehyde ร่วมกับ Fluconazole ในหลอดทดลอง

In Vitro Antifungal Effect of Cinnamaldehyde in Combination with Fluconazole Against *Candida* sp.

กนกวรรณ วงศ์เดช, ฐิตาพร ช่างเรือ และเอนก ภู่ทอง*

ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Kanokwan Wongdech, Thitaporn Changrua and Anek Pootong*

Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University,

Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งราของซินนามอลดีไฮด์ (cinnamaldehyde) ร่วมกับฟลูโคนาโซล (fluconazole) ต่อ *Candida* sp. ในหลอดทดลอง โดยทดสอบหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) และ minimum fungicidal concentration (MFC) ของ cinnamaldehyde และ fluconazole ต่อ *C. tropicalis* U624/10, *C. glabata* U71/11, *C. parapsilosis* ATCC 22019 และ *C. albicans* U821/10 และทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อของ cinnamaldehyde ร่วมกับ fluconazole ด้วย chequerboard microtiter technique จากการศึกษาพบว่าค่า MIC ของ fluconazole ต่อ *C. tropicalis* U624/10, *C. glabata* U71/11, *C. parapsilosis* ATCC 22019 และ *C. albicans* U821/10 เท่ากับ 128, 128, 1 และ 0.25 µg/ml ตามลำดับ ขณะที่ cinnamaldehyde สามารถยับยั้ง *Candida* ทั้ง 4 สายพันธุ์ มีค่า MIC และ MFC เท่ากับ 125 µg/ml จากการทดสอบด้วย chequerboard microtiter technique พบว่า cinnamaldehyde ไม่มีผลต่อการออกฤทธิ์ (indifferent) ของ fluconazole ในการยับยั้งการเจริญของ *C. glabata* U71/11, *C. parapsilosis* ATCC 22019 และ *C. albicans* U821/10 แต่กับ *C. tropicalis* U624/10 พบว่า cinnamaldehyde ต้านฤทธิ์ (antagonistic activity) ของ fluconazole ผลการศึกษาในครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่า cinnamaldehyde ไม่สามารถเสริมฤทธิ์ของ fluconazole ในการยับยั้งการเจริญของ *Candida* sp. ในหลอดทดลอง

คำสำคัญ : ซินนามอลดีไฮด์; ฟลูโคนาโซล; *Candida* sp.

Abstract

The aim of this study was to determine the antifungal effect of cinnamaldehyde with fluconazole against *Candida* sp. *in vitro.* The minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** anek.p@allied.tu.ac.th

fungicidal concentrations (MFC) of cinnamaldehyde and fluconazole against *C. tropicalis* U624/10, *C. glabata* U71/11, *C. parapsilosis* ATCC 22019 and *C. albicans* U821/10 were determined. The effect of cinnamaldehyde in combination with fluconazole against *Candida* sp. was evaluated by chequerboard microtiter technique. The MIC of fluconazole against *C. tropicalis* U624/10, *C. glabata* U71/11, *C. parapsilosis* ATCC 22019 and *C. albicans* U821/10 were 128, 128, 1 and 0.25 μg/ml, respectively. The MIC and MFC for cinnamaldehyde against 4 stains of *Candida* sp. were 125 μg/ml. By using chequerboard microtiter technique, the combination of cinnamaldehyde with fluconazole against *C. glabata* U71/11, *C. parapsilosis* ATCC 22019 and *C. albicans* U821/10 showed indifferent. While, antagonistic activity was observed against *C. tropicalis* U624/10. It can be concluded that cinnamaldehyde was failed to synergize with fluconazole against *Candida* spices *in vitro.*

Keywords: cinnamaldehyde; fluconazole; *Candida* sp.

1. บทนำ

Candida sp. เป็นยีสต์ที่พบเป็นเชื้อประจำถิ่นในคนปกติ [1] แต่สามารถก่อโรคได้ ตั้งแต่การติดเชื้อบริเวณผิวหนัง เยื่อเมือกบุในบริเวณช่องปาก ช่องคลอดและหลอดอาหารไปจนถึงการติดเชื้อที่อวัยวะภายในและในกระแสเลือด ซึ่งการติดเชื้อ *Candida* หรือที่เรียกว่า candidiasis พบได้บ่อยในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ หรือผู้ป่วยมะเร็งที่ได้รับการรักษาด้วยเคมีและรังสีบำบัด [2] เชื้อก่อโรคที่พบมากที่สุด คือ *C. albicans* ตามมาด้วย *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* และ *C. grabata* [3] ปัจจุบันยาที่เลือกใช้เป็นตัวแรกในการรักษา (drug of choice) คือ amphotericin B และ fluconazole แม้ว่า amphotericin B จะสามารถกำจัดเชื้อได้ดี แต่การใช้ยาดังกล่าวในการรักษาก็มีข้อจำกัด เนื่องจากผลข้างเคียงของยาที่มีความเป็นพิษสูงทั้งต่อไตและตับ (nepho- and hepatotoxicity) [4] จึงใช้ amphotericin B ในการรักษาเฉพาะกรณีที่ติดเชื้อที่มีความรุนแรงเท่านั้น โดยการรักษาด้วย fluconazole จึงเป็นที่นิยมและแพร่หลายมากกว่าเพราะมีความเป็นพิษที่ต่ำ ละลายน้ำและสามารถแพร่กระจายไปตามเนื้อเยื่อต่าง ๆ ได้ดีกว่า อย่างไรก็ตาม การรักษาด้วย fluconazole ก็อาจล้มเหลวได้เนื่องจาก *Candida* บางชนิดดื้อต่อยา fluconazole โดยธรรมชาติ (intrinsic resistance) และในปัจจุบัน *C. albicans* ก็มีอุบัติการณ์การดื้อต่อยาดังกล่าวเพิ่มสูงขึ้น [5] ดังนั้นเพื่อแก้ไขปัญหาที่มาจากชนิดของยาต้านราที่มีอยู่อย่างจำกัด ความเป็นพิษของยาที่ใช้ และการดื้อต่อสารต้านจุลชีพ วิธีการรักษา candidiasis ในรูปแบบทางเลือก (alternative approach) จึงได้รับการศึกษามากยิ่งขึ้น ซึ่งการใช้ยาสูตรผสม (combination drug) ค่อนข้างได้รับความนิยม เพราะวิธีการดังกล่าวใช้ยาปริมาณที่น้อยลง จึงสามารถลดความเป็นพิษที่มาจากยา และยังสามารถลดอุบัติการณ์ของการเกิดเชื้อดื้อยาได้อีกด้วย [6]

การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า cinnamaldehyde ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ (active ingredient) ที่พบได้มากในอบเชย มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Candida* sp. ได้ [7,8] และที่ความเข้มข้นน้อยกว่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (sub-minimum inhibition concentration, sub-MIC) cinnamaldehyde สามารถยับยั้งการสร้างท่องอก การสร้างเอนไซม์ phospholipase และ secreted

aspartyl proteinase (Sap) รวมถึงการเกาะติดกับเซลล์เยื่อบุที่เป็นปัจจัยในการก่อโรคที่สำคัญของ *C. albicans* ได้ [8] อีกทั้งเมื่อนำไปทดสอบความเป็นพิษใน H9c2 rat cardiac myoblast cells พบว่า cinnamaldehyde มีความเป็นพิษต่ำกว่า fluconazole ที่ความเข้มข้นในระดับเดียวกัน [7] cinnamaldehyde จึงมีความน่าสนใจที่อาจนำไปพัฒนาเป็นสารต้านจุลชีพสำหรับการรักษา candidiasis ในอนาคต โดยเฉพาะในรูปแบบสูตรผสมกับยาที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้ง *Candida* sp. ของ cinnamaldehyde ร่วมกับ fluconazole ในหลอดทดลอง

2. วิธีการศึกษา

2.1 *Candida* sp.

การศึกษาในครั้งนี้ใช้ *Candida* sp. จำนวน 4 สายพันธุ์ ประกอบด้วย เชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน 1 สายพันธุ์ คือ *C. parapsilosis* ATCC 22019 และเชื้อที่เพาะแยกได้จากสิ่งส่งตรวจ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *C. tropicalis* U624/10, *C. glabrata* U71/1 และ *C. albicans* U821/10 ที่เก็บรักษาในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มี 15 % glycerol ที่อุณหภูมิ -80 ˚C ณ ห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ เพาะเชื้อดังกล่าวบนอาหารแข็ง Saboraud dextrose agar (SDA) (Oxiod, USA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 ˚C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 ˚C ไม่เกิน 2 สัปดาห์ สำหรับใช้เป็น working culture หลังจากนั้น subculture เชื้อดังกล่าวลงบน SDA บ่มที่อุณหภูมิ 37 ˚C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำเชื้อมาใช้ในการทดสอบทุกครั้ง

2.2 การทดสอบค่า minimum inhibition concentration (MIC) และ minimum fungicidal concentration (MFC) ของ cinnamaldehyde และ fluconazole ต่อ *Candida* sp.

หาค่า MIC ของ fluconazole และ cinnamaldehyde (Sigma-Aldrich, USA) ต่อ *Candida* sp. ด้วย broth microdilution technique ตามวิธีของ EUCAST (EDef 7.1) [9] โดยเจือจางเชื้อที่ป้ายจาก 5 โคโลนี ด้วย swab ใน sterile 0.85 % NaCl แล้วปรับความขุ่นให้เทียบเท่ากับ 0.5 McFarland หลังจากนับจำนวนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วย hemochamber เพื่อหาความเข้มข้นแล้ว ปรับความเข้มข้นของเชื้อที่ประมาณ 2.5×10^5 CFU/ml ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

เจือจาง fluconazole และ cinnamaldehye ในอาหาร double-strength RPMI-1640 (Biochrom AG, Germany) ที่มี 4 % glucose และ 2 % DMSO (2x RPMI-4G2D) ให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 16-512 และ 16-1,000 µg/ml ตามลำดับ ใน micro-titer well plate ปริมาตร 100 µl เติมเชื้อที่เตรียมไว้ (2.5×10^5 CFU/ml) ปริมาณ 100 µl ลงในหลุมทดสอบ ซึ่งทำให้ 2x RPMI-4G2D มีความเข้มข้นลดลงไปสองเท่าเป็น 1x RPMI-1640, 2 % glucose, 1 % DMSO โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายของ fluconazole และ cinnamaldehye เท่ากับ 8-256 และ 8-500 µg/ml t ตามลำดับ และมีความเข้มข้นสุดท้ายของเชื้อทดสอบที่ 1.25×10^5 CFU/ml ทั้งนี้ มีหลุมที่ใส่ 2x RPMI-4G2D กับน้ำกลั่นปราศจากเชื้อและใส่ 2x RPMI-4G2D พร้อมเชื้อทดสอบเป็นหลุม sterile และ growth control ในการทดสอบ หลังจากนำ micro-titer well plate ไปบ่มที่ 37 ˚C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้ว วัดความขุ่น (turbidity) จากค่าการดูดกลืนแสง (optical density, OD) ที่ความยาวคลื่นแสง 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA leader (Dynex, USA) โดยค่า MIC_{50} สำหรับ fluconazole พิจารณาจากหลุมทดสอบที่มีความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่มีค่า $OD_{450} \leq 50$ % เมื่อเทียบกับหลุม growth control ในขณะที่ค่า

MIC สำหรับ cinnamaldehye พิจารณาจากหลุมทดสอบที่มีความเข้มข้นของสารที่น้อยที่สุดที่อาหารเลี้ยงเชื้อยังคงใสอยู่ จากนั้นถ่ายสารละลายปริมาตร 5 µl จากหลุมที่อาหารเลี้ยงเชื้อยังใสอยู่หยดลงบน SDA บ่มที่ 37 ˚C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลค่า MFC จากหลุมทดสอบที่มีความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่มีเชื้อเจริญ $\leq$ 5 โคโลนี ในแต่ละครั้งของทุกการทดลอง ทดสอบแบบควบคู่ (duplicate) และทดสอบซ้ำทั้งสิ้น 3 ครั้ง

2.3 การทดสอบผลของ cinnamaldehyde ต่อการออกฤทธิ์ของ fluconazole ในการยับยั้งการเจริญของ *Candida* sp.

ทดสอบผลของ cinnamaldehyde ต่อการออกฤทธิ์ของ fluconazole ในการยับยั้งการเจริญของ *Candida* sp. โดย checkerboard microtiter plate assay เพื่อหาค่า fractional inhibitory concentrations index (FICI) ตามวิธีการของ Vitale และคณะ [10] ทดสอบโดยใส่ fluconazole ที่เจือจางใน 2x RPMI-4G2D และมีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.0625-512 µg/ml ปริมาตร 50 µl ของแต่ละความเข้มข้นลงในหลุมตามแนวนอน ในขณะที่เติม 50 µl ของ cinnamaldehyde ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 31.2-2,000 µg/ml ลงในหลุมทดสอบตามแนวตั้ง ทำให้ได้ส่วนผสมของ fluconazole กับ cinnamaldehyde ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จากนั้นใส่เชื้อที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 2.5×10^5 CFU/ml หลุมละ 100 µl ซึ่งความเข้มข้นสุดท้ายของ fluconazole และ cinnamaldehye ในหลุมทดสอบนั้นลดลงเป็น 4 เท่า และความเข้มข้นสุดท้ายของเชื้อ 1.25×10^5 CFU/ml โดยมีหลุมที่ใส่ 2x RPMI-4G2D กับน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ และ 2x RPMI-4G2D พร้อมเชื้อทดสอบเป็นหลุมควบคุม หลังจากนั้นนำไปบ่มที่ 37 ˚C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้ว วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสงเท่ากับ 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA leader (Dynex, USA) แล้วบันทึกค่า MIC และนำค่า MIC มาวิเคราะห์ค่า fractional inhibitory concentration index (FICI) ตามสูตรดังนี้

FICI = (MIC_C of fluconazole/MIC_A of fluconazole) + (MIC_C of cinnamaldehye/MIC_A of cinnamaldehye)

เมื่อ MIC_C และ MIC_A คือ ค่า MIC ของสารในรูปแบบผสม (combination) และรูปแบบเดียว (alone) โดยหากค่า FICI $\leq$ 0.5 แสดงว่าสารทั้งสองชนิดนั้นมีเสริมฤทธิ์กัน (synergy), 0.5 < FICI $\leq$ 4.0 แสดงว่ามีฤทธิ์ไม่แตกต่างจากการใช้สารตัวเดียว (indifference) และ FICI > 4.0 แสดงว่า มีฤทธิ์ต้านกัน (antagonist)

3. ผลการศึกษาและวิจารณ์

3.1 minimum inhibition concentration (MIC) และ minimum fungicidal concentration (MFC) ของ cinnamaldehyde และ fluconazole ต่อ *Candida* sp.

การทดสอบค่า minimum inhibition concentration (MIC) ของ cinnamaldehyde และ fluconazole ต่อ *Candida* sp. ด้วยวิธี broth microdilution technique (EUCAST EDef 7.1) พบว่า fluconazole สามารถยับยั้งการเจริญของ *C. tropicalis* U624/10, *C. glabrata* U71/11 *C. parapsilosis* ATCC 22019 และ *C. albicans* U821/10 โดยมีค่า MIC เท่ากับ 128, 128, 1และ 0.25 µg/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 1) MIC ของ fluconazole ต่อ *C. parapsilosis* ATCC 22019 ซึ่งเป็นเชื้อควบคุมคุณภาพของการทดสอบ broth microdilution technique อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ตามแนวทางของ EUCAST EDef 7.1 (acceptable range: 0.5-2.0 mg/l or µg/ml) ดังนั้นจึงแปลผลการทดสอบความไวต่อ fluconazole ของเชื้อต่าง ๆ ได้ดังนี้ *C. tropicalis* U624/10 และ *C. glabrata* U71/11 เป็นเชื้อดื้อต่อ fluconazole

(fluconazole resistant strain) ในขณะที่ *C. albicans* U821/10 และ *C. parapsilosis* ATCC 22019 เป็นเชื้อไวต่อ fluconazole (fluconazole susceptible strain) fluconazole ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Candida* เป็นแบบ fungistatic โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 14-alpha demethylase มีผลให้การสร้าง ergosterol จาก lanosterol ที่เป็นองค์ประกอบผนังเซลล์ลดลงและมีการสะสม toxic-intermediate sterols เพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์มี permeability สูงขึ้นซึ่งมีผลต่อการแบ่งตัวและเจริญของเชื้อในที่สุด [11] จากการศึกษาพบการเจริญเติบโตของ *Candida* แม้ว่าอยู่ในสภาวะที่มี fluconazole ที่ความเข้มข้นสูงขึ้น ลักษณะที่พบดังกล่าวนี้เรียกว่า trailing phenomenon [12] ทำให้ไม่สามารถหาค่า MFC ของ fluconazole ได้

ตารางที่ 1 Minimum inhibition concentration (MIC) และ minimum fungicidal concentration (MFC) ของ cinnamaldehyde และ fluconazole ต่อ *Candida* sp.

Microorganism	MIC		MFC
	fluconazole (μg/ml)	cinnamaldehyde (mg/ml)	cinnamaldehyde (mg/ml)
C. tropicalis U624/10	128	0.125	0.125
C. glabata U71/11	128	0.125	0.125
C. parapsilosis ATCC 22019	1	0.125	0.125
C.albicans U821/10	0.25	0.125	0.125

การศึกษานี้พบว่า cinnamaldehyde มีค่า MIC และ MFC ต่อ *Candida* ทั้ง 4 สายพันธุ์เท่ากัน คือ 125 μg/ml (ตารางที่ 1) แสดงให้เห็นว่า cinnamaldehyde สามารถยับยั้งการเจริญของ *Candida* ได้หลาย species ซึ่งจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า cinnamaldehyde สามารถยับยั้ง *C. albicans* ได้ทั้งชนิดที่ดื้อและไม่ดื้อต่อ fluconazole [13] และยังพบว่าสามารถฆ่าเชื้อดังกล่าวได้ (fungicidal effect) [8,13] โดย cinnamaldehyde มีกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ plasma membrane ATPase ของ *Candida* มีผลให้การทำงานของ ATPase-mediated proton pump ลดลง จึงเกิดการคั่งของ H^+ ในเซลล์และก่อให้เกิดภาวะความเป็นกรดภายในเซลล์สูงขึ้น ส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์ได้รับความเสียหาย [14] นอกจากนี้ยังพบว่า cinnamaldehyde ยังออกฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการสร้าง ergoserol ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของผนังเซลล์อีกทางหนึ่งด้วย

3.2 ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Candida* sp. ของ cinnamaldehyde ร่วมกับ fluconazole

การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Candida* sp. ทั้ง 4 สายพันธุ์ ของ cinnamaldehyde ร่วมกับ fluconazole ด้วยวิธี checkerboard microtiter plate assay พบว่าเมื่อผสม cinnamaldehyde กับ fluconazole เข้าด้วยกันแล้วสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยค่า MIC_C ของ cinnamaldehyde ลดลง 2 เท่า จาก 125 เป็น 62.5 μg/ml สำหรับค่า MIC_C ของ fluconazole ต่อ *C. parapsi-*

losis ATCC 22019 และ *C. albicans* U821/10 ซึ่งเชื้อทั้ง 2 ชนิด เป็น fluconazole susceptible strain พบว่าลดลง 4 เท่า และไม่เปลี่ยนแปลง ตามลำดับ ในขณะที่ค่า MIC_C ของ fluconazole ต่อ *C. tropicalis* U624/10 และ *C. glabrata* U71/11 ที่เป็น fluconazole resistant strain เพิ่มสูงขึ้น 4 และ 2 เท่า ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ค่า FICI ของ cinnamaldehyde และ fluconazole ต่อ *C. tropicalis* U624/10, *C. glabrata* U71/11 *C. parapsilosis* ATCC 22019 และ *C. albicans* U821/10 พบว่ามีค่า 4.5, 2.5, 0.8 และ 1.5 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) แสดงว่า cinnamaldehyde ไม่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของ fluconazole ต่อ *C. glabrata* U71/11 *C. parapsilosis* ATCC 22019 และ *C. albicans* U821/10 ยกเว้นกับ *C. tropicalis* U624/10 ที่ cinnamaldehyde ต้านฤทธิ์ของ fluconazole (antagonism) โดยการศึกษาแสดงให้เห็นว่าส่วนใหญ่ cinnamaldehyde ไม่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของ fluconazole ต่อ *Candida* sp. ผลการศึกษาครั้งนี้สนับสนุนรายงานการศึกษาของ Khan และคณะ ที่พบว่าโดยส่วนใหญ่แล้ว cinnamon oil และ cinnamaldehyde ไม่มีผลต่อการออกฤทธิ์ (indifferent) ของ fluconazole ในการยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* [13]

ตารางที่ 2 ผลของ cinnamaldehyde ต่อการออกฤทธิ์ของ fluconazole ในการยับยั้ง *Candida* sp.

Microorganism	Agent	MIC_A	MIC_C	FICI	Interpretation
C. tropicalis U624/10	cinnamaldehyde (μg/ml)	125	62.5	4.5	An
	fluconazole (μg/ml)	128	512		
C. glabata U71/11	cinnamaldehyde (μg/ml)	125	62.5	2.5	Ind
	fluconazole (μg/ml)	128	256		
C. parapsilosis ATCC 22019	cinnamaldehyde (μg/ml)	125	62.5	0.8	Ind
	fluconazole (μg/ml)	1	0.25		
C. albicans U821/10	cinnamaldehyde (μg/ml)	125	62.5	1.5	Ind
	fluconazole (μg/ml)	0.25	0.25		

MIC_A = MIC of agent alone, MIC_C = MIC of agent in combination, Ind = indifference, An = antagonism, Syn = synergism

4. สรุปผลการวิจัย

cinnamaldehyde สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและฆ่า *Candida* ได้หลากหลายชนิด แต่ส่วนใหญ่ไม่สามารถเสริมฤทธิ์ของ fluconazole ในการยับยั้งการเจริญของ *Candida* sp. ในหลอดทดลองได้ นอกจากนี้ ใน *Candida* sp. ที่ดื้อต่อ fluconazole บางสายพันธุ์ cinnamaldehyde อาจต้านการออกฤทธิ์ของ fluconazole ได้ ดังนั้น cinnamaldehyde อาจไม่เหมาะที่จะนำไปใช้ในรูปแบบยาผสมกับ fluconalzole ในการรักษา candidiasis ได้

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คุณสมโภชน์ ประจันทร์ และคุณเบญจา นรพงษ์ สำหรับการอำนวยความสะดวกในการ

ทดลองและเก็บรวบรวมข้อมูล งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

6. รายการอ้างอิง

[1] Ganguly, S. and Mitchell, A.P., 2011, Mucosal biofilms of *Candida albicans*, Curr. Opin. Microbiol. 14: 380-385.

[2] Pappas, P.G., Rex, J.H., Sobel, J.D., Filler, S.G., Dismukes, W.E., Walsh, T.J., Edwards, J.E. and Infectious Diseases Society of America, 2004, Guidelines for treatment of candidiasis, Clin. Infect. Dis. 38: 161-189.

[3] Papon, N., Courdavault, V., Clastre, M., Richard, J. and Bennett, R.J., 2013, Emerging and emerged pathogenic *Candida* species: Beyond the *Candida albicans* paradigm, PLoS Pathogens 9: 1-4

[4] Groll, A.H. and Kolve, H., 2004, Antifungal agents: *In vitro* susceptibility testing, pharmacodynamics, and prospects for combination therapy, Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 23: 256-270.

[5] Pfaller, M.A., Pappas, P.G. and Wingard, J.R., 2006, Invasive fungal pathogens: Current epidemiological trends, Clin. Infect. Dis. 43: S3-S14.

[6] Ahmad, I., Khan, M.S.A., Zahin, M., Owais, M., Shahid, M., Mehmood, Z. and Pant, A.B., 2010, Combinational Antifungal Therapy and Recent Trends in Drug Discovery, pp. 213-240, In Ahmad, I., Owais, M., Shahid, M. and Aqil, F., Combating Fungal Infections: Problems and Remedy, Springer, New York.

[7] Shreaz, S., Bhatia, R., Khan, N., Muralidhar, S., Basir, S.F., Manzoor, N. and Khan L.A., 2011, Spice oil cinnamaldehyde exhibits potent anticandidal activity against fluconazole resistant clinical isolates, Fitoterapia 82: 1012-1020.

[8] Pootong, A., Norrapong, B. and Cowawintaweewat, S., 2017, Antifungal activity of cinnamaldehyde against *Candida albicans*, Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 48: 150-158.

[9] Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), 2008, Definitive document EDef 7.1: Method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts, Clin. Microbiol. Infect. 14: 398-405.

[10] Vitale, R.G., Afeltra, J. and Dannaoui, E., 2005, Antifungal combinations, Meth. Mol. Med. 118: 143-152.

[11] Ghannoum, M.A. and Rice, L.B., 1999, Antifungal agents: Mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance, Clin. Microbiol. Rev. 12: 501-517.

[12] Marcos-Zambrano, L.J., Escribano, P., Sánchez-Carrillo, C., Bouza, E. and Guinea, J., 2016, Scope and frequency of

fluconazole trailing assessed using EUCAST in invasive *Candida* spp. Isolates, Med. Mycol. 54: 733-739.

[13] Khan, M.S., Malik, A. and Ahmad, I., 2012, Anti-candidal activity of essential oils alone and in combination with amphotericin B or fluconazole against multi-drug resistant isolates of *Candida albicans*, Med. Mycol. 50: 33-42.

[14] Shreaz, S., Bhatia, R., Khan, N., Muralidhar, S., Manzoor, N. and Khan, L.A., 2013, Influences of cinnamic aldehydes on H^+ extrusion activity and ultrastructure of *Candida*, J. Med. Microbiol. 62: 232-240.