

สารบัญ

	หน้า
หลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต	
สาขาวิชาชีวเวชศาสตร์	
ผลของยาไอบูโพรเฟน นาพรอกเซนและโคโคฟีแนคต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์เพาะเลี้ยง มะเร็งท่อน้ำดี	1
ผู้วิจัย: กมลรส กำแพงนิล	
การตรวจหายีนก่อมะเร็งของเชื้อฮิวแมนปาปิลโลมาไวรัสชนิด 16 และ 18 โดยใช้เทคนิค ลูบมิติเอตต์ไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชันร่วมกับเลเทอร์รอลโฟวดีฟสติก	4
ผู้วิจัย: กฤษฎา กฤษกระพัน	
ฤทธิ์ของสารสกัดหมาก มะขาม และควาตอง ที่มีผลต่อการเคลื่อนไหวของพยาธิใบไม้ตับ <i>OPISTHORCHIS VIVERRINI</i>	7
ผู้วิจัย: จารวี วรรณชาติ	
ความชุกของธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติในชนเผ่าที่อาศัยอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ตอนล่างของประเทศไทย	9
ผู้วิจัย: รุ่งนลิน บัณฑุพานิชย์	
ความชุกของเชื้อวงศ์ <i>Enterobacteriaceae</i> ที่ผลิตเอนไซม์ carbapenemase (CPE) จากโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ และการเปรียบเทียบการตรวจหา CPE โดยวิธี modified hodge test, modified carbapenem inactivation method และ multiplex PCR	12
ผู้วิจัย: ศิระประภา มินาผล	
การทดสอบความเป็นไปได้ของไตรเปปไทด์สังเคราะห์ pERW และ pEKW ในการใช้เป็นยาชนิดใหม่ เพื่อต่อต้านเมทัลโลโปรตีนเนสของพิษงู	16
ผู้วิจัย: ศิริพร พงษ์สระพัง	

บทคัดย่อ

เรื่อง : ผลของยาไอบูโพรเฟน นาพรอกเซนและไดโคลฟีแนคต่อการเพิ่มจำนวนของ เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี

ผู้วิจัย : กมลรส กำแพงนิล

ชื่อปริญญา : วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต

สาขาวิชา : ชีวเวชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รัตนา เล็กสมบูรณ์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กาญจนา แสงจิตต์
: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ลติพร อุดมสุข

คำสำคัญ : มะเร็งท่อน้ำดี, การเพิ่มจำนวนเซลล์, ไอบูโพรเฟน, นาพรอกเซน, ไดโคลฟีแนค

มะเร็งท่อน้ำดีเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญ มีอุบัติการณ์ที่ทำให้เกิดการตายสูงสุดในกลุ่มประเทศลุ่มแม่น้ำโขงโดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย เมตาบอลิซึมของลิปิดสำคัญต่อการเกิดมะเร็ง การเปลี่ยนแปลงเมตาบอลิซึมของลิปิดทำให้เพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าแอสไพรินสามารถลดความเสี่ยงโรคมะเร็งท่อน้ำดีเนื่องจากมีฤทธิ์ต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์และฤทธิ์ต้านการอักเสบ ซึ่งเป็นกลไกที่สำคัญในการต้านการเกิดมะเร็ง แอสไพรินสามารถยับยั้งการสังเคราะห์ลิปิดในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์มะเร็ง และลดการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี งานวิจัยนี้จึงสนใจยาไอบูโพรเฟน นาพรอกเซน และไดโคลฟีแนค ซึ่งเป็นยากลุ่มต้านการอักเสบชนิดไม่ใช่สเตียรอยด์ เช่นเดียวกับแอสไพรินแต่มีผลข้างเคียงน้อยกว่าแอสไพริน มาใช้ในการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการสังเคราะห์ลิปิด โดยทำการเพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี (KKU-M139, KKU-M214) ทดสอบประสิทธิภาพต้านการเพิ่มจำนวนเซลล์โดยวิธี MTT assay และศึกษาการยับยั้งการสังเคราะห์ลิปิดในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ด้วยการย้อมสี Oil red O นอกจากนี้ทำการศึกษาโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ลิปิด Acyl-coA synthetase long chain (ACSL5) ด้วยวิธี western blot และสังเกตลักษณะที่เปลี่ยนแปลงของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีภายใต้กล้อง SEM และ TEM ผลการศึกษาพบว่ายาไอบูโพรเฟน นาพรอกเซนและไดโคลฟีแนค สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีโดย MTT assay และจากการสังเกตลักษณะของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีภายใต้กล้อง SEM และ TEM แต่จากการย้อมสี Oil red O พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างชัดเจนในการติดสีของหยดไขมัน นอกจากนี้ยังไม่พบการแสดงออกของโปรตีน ACSL5 ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์ลิปิดภายในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีทั้งสองชนิด

ABSTRACT

TITLE : EFFECT OF IBUPROFEN NAPROXEN AND DICLOFENAC ON THE
 PROLIFERATION OF CHOLANGIOCARCINOMA CELL LINE

AUTHOR : KAMONROT KUMPANGNIL

DEGREE : MASTER OF SCIENCE

MAJOR : BIOMEDICAL SCIENCES

ADVISOR : ASST. PROF. RATANA LEKSOMBOON, Ph.D.

CO-ADVISORS : ASST. PROF. KANJANA PANGJIT, Ph.D.
 : ASST. PROF. LATIPORN UDOMSUK, Ph.D.

KEYWORDS : CHOLANGIOCARCINOMA, PROLIFERATION, IBUPROFEN, NAPROXEN,
 DICLOFENAC

Cholangiocarcinoma (CCA) is a major public problem. It is the highest incidence of morbidity in the Greater Mekong Sub-region countries, especially in the Northeast of Thailand. Lipid metabolism is a hallmark of tumorigenesis. Hence, the alteration of lipid metabolism enhances the proliferation of tumor cells. Previously, aspirin was reported to reduce the risk of CCA due to its anti-proliferative and anti-inflammatory effects which are anti-tumorigenesis. Aspirin can inhibit lipid synthesis in CCA, therefore it suppresses the production of cell membrane components of cancer cells and decrease CCA cell proliferation. Ibuprofen, naproxen and diclofenac are non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) that are in the same group as aspirin. However, they have less side effects than aspirin.. In this study, the effects of Ibuprofen, naproxen and diclofenac against human CCA cells proliferation, KKU-M139 and KKU-M214 were studied. Cell proliferation was measured using MTT assay while lipid synthesis was determined using oil red O staining. In addition, the expression of protein involved in the lipid synthesis was measured by using a western blot analysis. The change of characteristics in CCA cells were observed using a scanning electron microscope (SEM) and a transmission electron microscope (TEM). The results showed that Ibuprofen, naproxen and diclofenac suppressed the viability of the CCA KKU-M139 and KKU-M214 cells' cultures by MTT assay. The morphological changes of the cells were observed

by using SEM and TEM. However, for the oil red O staining, there was no obvious effect on the lipid synthesis. Moreover, the expression of ACSL5 was not found in both of KKU-M139 and KKU-M214 cells.

บทคัดย่อ

- เรื่อง : การตรวจหายีนก่อมะเร็งของเชื้อฮิวแมนปาปิลโลมาไวรัสชนิด 16 และ 18 โดยใช้เทคนิคลูมิเนตเอด์ไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชันร่วมกับเลเทอร์รอลโฟว์ดิฟฟัสติก
- ผู้วิจัย : กฤษฎา กฤษกระพัน
- ชื่อปริญญา : วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
- สาขาวิชา : ชีวเวชศาสตร์
- อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรีดา ปราการภานันท์
- อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรศักดิ์ แวนรัมย์
- คำสำคัญ : ฮิวแมนปาปิลโลมาไวรัส, มะเร็งปากมดลูก, แลมป์, เลเทอร์รอลโฟว์ดิฟฟัสติก

การติดเชื้อ Human papillomavirus (HPV) ชนิดความเสี่ยงสูงเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดมะเร็งปากมดลูก โดยเฉพาะอย่างยิ่งชนิด 16 และ 18 และเป็นมะเร็งที่ส่งผลให้เกิดการเสียชีวิตในผู้หญิงมากที่สุด ถึงแม้ว่าจะมีวัคซีนในการป้องกัน แต่การตรวจหาชนิดของเชื้อ HPV ในห้องปฏิบัติการนั้นยังคงมีความสำคัญอย่างยิ่งสำหรับการวินิจฉัยและการรักษาได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ โดยในปัจจุบัน เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) เป็นเทคนิคมาตรฐานในการตรวจหาชนิดของเชื้อ HPV แต่เทคนิคนี้จะค่อนข้างใช้เวลานานและเป็นเครื่องมือที่มีราคาสูงที่มีใช้บางห้องปฏิบัติการเท่านั้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการตรวจหาเชื้อ HPV ชนิด 16 และ HPV ชนิด 18 โดยใช้เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ร่วมกับ Lateral flow dipstick (LFD) LAMP เป็นเทคนิคในการเพิ่มปริมาณ DNA ภายใต้อุณหภูมิที่คงที่และใช้เวลาเพียง 60 นาที นอกจากนี้ยังสามารถตรวจสอบผล LAMP products ได้จาก LFD ซึ่งให้ผลที่ไม่แตกต่างจากการที่ตรวจสอบด้วยเจลและความขุ่น รวมถึงยังใช้เวลาที่สั้นกว่าเจลและมีความแม่นยำกว่าความขุ่น จากผลการศึกษาพบว่าเทคนิค LAMP ในการตรวจหาเชื้อ HPV ชนิด 16 และ 18 มีความไวถึง 100 viral copy number และไม่พบปฏิกิริยาข้ามระหว่างชนิดกับเชื้อ HPV ชนิดอื่น และเมื่อทำการศึกษาในตัวอย่างทางคลินิกพบว่ามีความไวร้อยละ 91 และความจำเพาะร้อยละ 100 สำหรับ HPV ชนิด 16 และมีความไวร้อยละ 82 ความจำเพาะร้อยละ 100 สำหรับ HPV ชนิด 18 แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของการใช้เทคนิค LAMP ร่วมกับ LFD สำหรับการตรวจหาเชื้อ HPV และยังส่งผลเพื่อพัฒนาไปสู่การตรวจ point-of-care ได้ต่อไป

ABSTRACT

TITLE : DETECTION OF ONCOGENIC HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 16 AND 18 USING LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION COMBINED WITH LATERAL FLOW DIPSTICK

AUTHOR : KRISADA KRITKRAPHAN

DEGREE : MASTER OF SCIENCE

MAJOR : BIOMEDICAL SCIENCES

ADVISOR : ASST. PROF. PREEDA PRAKRANKAMANANT, Ph.D.

CO-ADVISOR : ASST. PROF. SURASAK WANRAM, Ph.D.

KEYWORDS : HUMAN PAPILLOMAVIRUS, CERVICAL CANCER, LAMP, LATERAL FLOW DIPSTICK

High-risk human papillomavirus (HPV) infection is the most common factor for the development of cervical cancer, especially type 16 and 18. This cancer is the highest incidence of death in women cancer. Although there is a vaccine to prevent the cancer, it remains important to analyze HPV type detection in laboratories to ensure accuracy of diagnosis and treatment. Currently, the Polymerase Chain Reaction (PCR) is a standard technique used for detecting the types of HPV. The technique, however, is time-consuming. In addition, its instruments are expensive and only available in some laboratories. The aim of this study was to detect HPV-16 and HPV-18 using the Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) together with the Lateral Flow Dipstick (LFD). LAMP was used to amplify DNA under isothermal condition with a reaction time of 60 minutes. LAMP products were examined by LFD. The experimental results were not different from the agarose gels and the turbidity assay.

However, the LAMP technique performed at a shorter time than that of the agarose. It also provided greater accuracy than that of the turbidity. The results demonstrated that the sensitivity of HPV type 16 and 18 detection using the LAMP technique produced 100 viral copy numbers and presented no cross-reaction with other HPV types. When examining the sensitivity and specificity of HPV type 16 and 18 in the clinical samples, it was shown that the sensitivity and specificity of HPV type 16 was

91% and 100% while HPV type 18 was 82% and 100%, respectively. The data indicates that the LAMP technique combined with LFD is effective to detect HPV types and can be used for further point-of-care diagnostic development.

บทคัดย่อ

เรื่อง : ฤทธิ์ของสารสกัดหมาก มะขาม และควาตอง ที่มีผลต่อการเคลื่อนไหวของ พยาธิใบไม้ตับ *OPISTHORCHIS VIVERRINI*

ผู้วิจัย : จารวี วรรณชาติ

ชื่อปริญญา : วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต

สาขาวิชา : ชีวเวชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัตนา เล็กสมบูรณ์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นงนุช กัณหารัตน์
: ดร.นันทยา กระสวยทอง

คำสำคัญ : *Opisthorchis viverrini*, การเคลื่อนไหว, สารสกัด

โรคพยาธิใบไม้ตับ เกิดจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* ซึ่งยังเป็นปัญหาที่สำคัญทางสาธารณสุข โดยเฉพาะภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ปัจจุบันมีการนำสมุนไพรมาใช้เพื่อรักษาโรคต่างๆ กันอย่างกว้างขวาง การศึกษานี้จึงมุ่งศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากหมาก มะขาม และควาตอง ซึ่งคาดว่าจะมีผลต่อการทำงานของกล้ามเนื้อและส่งผลต่อการเคลื่อนไหวของพยาธิใบไม้ตับระยะตัวอ่อนและระยะตัวเต็มวัย ทั้งในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง โดยการประเมินค่าร้อยละการเคลื่อนไหวของพยาธิใบไม้ตับระยะตัวอ่อนในหลอดทดลอง ซึ่งผลการศึกษาพบว่าสารสกัดหมากและควาตอง ให้ผลดีในการลดการเคลื่อนไหวของพยาธิใบไม้ตับระยะตัวอ่อน จึงนำผลไปสู่การศึกษาในสัตว์ทดลอง โดยศึกษาการออกไข่ของพยาธิใบไม้ตับ ด้วยวิธี Modified Formalin Technique และตรวจนับจำนวนของพยาธิใบไม้ตับระยะตัวเต็มวัยที่ได้จากสัตว์ทดลอง ศึกษาปริมาณของสารสื่อประสาท ด้วยเครื่อง High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) และศึกษาการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยา ด้วยเครื่อง Scanning Electron Microscopy (SEM) จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า สารสกัดหมากสามารถลดการออกไข่ที่ปนออกมากับอุจจาระ และสามารถลดจำนวนของพยาธิใบไม้ตับระยะตัวเต็มวัยที่นับได้จากตับสัตว์ทดลองได้ดีที่สุด เมื่อวิเคราะห์หาปริมาณของสารสื่อประสาทจากพยาธิใบไม้ตับกลุ่มที่ได้รับสารสกัดควาตอง พบปริมาณของสาร Dopamine มากกว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดหมาก ส่วน Acetylcholine พบในปริมาณที่น้อยมาก การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาพบว่าขนาดตัวและการเปลี่ยนแปลงของผิวพยาธิใบไม้ตับไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเนื่องจากสารสกัดที่ใช้ทดสอบทั้งหมดนี้ยังไม่ทราบถึงสารประกอบและกลไกที่มีผลต่อพยาธิเป็นที่แน่ชัด จึงควรจะต้องมีการศึกษาต่อไปในอนาคต

ABSTRACT

TITLE : THE EFFECT OF *ARECA CATECHU* L., *TAMARINDUS INDICA* LINN. AND *HOUTTUYNIA CORDATA* THUNB. EXTRACTS ON MOTILITY OF *OPISTHORCHIS VIVERRINI*

AUTHOR : CHARAWI WANNACHAT

DEGREE : MASTER OF SCIENCE

MAJOR : BIOMEDICAL SCIENCE

ADVISOR : ASST. PROF. RATANA LEKSOMBOON, Ph.D.

CO-ADVISORS : ASST. PROF. NONGNUCH KANHARAT, Ph.D.
: NANTAYA KRASUAYTHONG, Ph.D.

KEYWORDS : *OPISTHORCHIS VIVERRINI*, MOTILITY, EXTRACT

Opisthorchiasis caused by *O. viverrini* is a serious public health problem in the northeastern part of Thailand. Nowadays, Thai medicinal plants are used in the prevention and treatment of several diseases. In this study, *in vitro* and *in vivo* effects of crude extracts from *A. catechu* L., *T. indica* Linn. and *H. cordata* Thunb possibly affecting the motility of *O. viverrini* were investigated. *In vitro* experiments revealed the exposure of the newly excysted juvenile (NEJ) *O. viverrini* on relative motility (RM) assay. Results showed that mean RM values of *A. catechu* L., and *H. cordata* Thunb treated groups in NEJ of *O. viverrini* were the most effective.. Therefore, these results led to an animal model. Egg laying of *O. viverrini* using a modified formalin technique was studied and the amount of adult worms was counted. The amount of neurotransmitters by HPLC and a surface of adult *O. viverrini* via SEM were studied. The results showed that *A. catechu* L., decreased egg per gram of feces and correlated with worm burden from infected hamsters. Dopamine found in *H. cordata* Thunb was higher than in the *A. catechu* L. treated group while only a small amount of Acetylcholine was found in liver flukes. The body size of worms and damaged tegument surface of liver flukes were not significantly different. For all tested crude extracts, their compounds and mechanisms affecting the worms were unclear. Therefore, further studies are required.

บทคัดย่อ

เรื่อง : ความชุกของธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติในชนเผ่าที่อาศัยอยู่ใน
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่างของประเทศไทย

ผู้วิจัย : รุ่งนลิน บัณฑุพาณิชย์

ชื่อปริญญา : วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต

สาขาวิชา : ชีวเวชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รสริน การเพียร

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กาญจนา แพงจิตต์

คำสำคัญ : ธาลัสซีเมีย, ฮีโมโกลบินที่ผิดปกติ, ชนเผ่า, ความชุก, ความถี่ของยีน

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยเป็นหนึ่งในพื้นที่ที่มีปัญหาเรื่องธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติ การศึกษาความชุกของธาลัสซีเมียในกลุ่มชาติพันธุ์หรือชนเผ่าโดยเฉพาะตอนล่างของภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีจำนวนน้อยมาก การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความชุกของธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติในกลุ่มชาติพันธุ์ สี่ชนเผ่า ได้แก่ ลาว เขมร ส่วย และเยอ ที่อาศัยอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่างของประเทศไทย ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาคือชนเผ่าลาว จำนวน 165 คน เขมร จำนวน 145 คน ส่วย จำนวน 134 คน และเยอ จำนวน 101 คน ตามลำดับ ผลการศึกษาพบกลุ่มชาติพันธุ์ที่มีความชุกของฮีโมโกลบินอีสูง (มากกว่าร้อยละ 50) ได้แก่ เขมร ส่วย และเยอ เขมรเป็นกลุ่มชาติพันธุ์ที่พบความชุกของอัลฟาธาลัสซีเมีย 2 (3.7 kb deletion) มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 48.28 อัลฟาธาลัสซีเมีย 2 ชนิด 4.2 kb deletion พบเฉพาะในกลุ่มชาติพันธุ์เยอ ฮีโมโกลบินคอนแอสเทนท์สปริงและฮีโมโกลบินปากเซ พบได้สูงในเยอและส่วย จากการศึกษาที่พบอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 ในความชุกที่สูง (ร้อยละ 7.46) ในกลุ่มชาติพันธุ์ส่วย ดังนั้นคู่สมรสที่เป็นกลุ่มชาติพันธุ์ส่วยควรได้รับการตรวจคัดกรองก่อนวางแผนการตั้งครรภ์เพื่อป้องกันและควบคุมโรคฮีโมโกลบินบาร์ทสไฮดรอปฟีทาลิส การศึกษานี้ไม่พบอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 ชนิด THAI deletion และเบต้าธาลัสซีเมีย ข้อมูลแผนภูมิย่อยของธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะมีประโยชน์ในด้านการให้คำปรึกษาทางพันธุกรรมและการณรงค์ให้ความรู้ซึ่งควรทำโดยใช้ภาษาที่เหมาะสม และจัดในระดับหมู่บ้าน ทั้งนี้เพื่อประโยชน์ระยะยาวในการดำเนินงานเพื่อลดปัญหาโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงในพื้นที่

ABSTRACT

TITLE : PREVALENCE OF THALASSEMIA AND HEMOGLOBINOPATHIES
 AMONG MINORITY IN THE LOWER NORTHEASTERN THAILAND

AUTHOR : ROONGNALIN BUNTHUPANICH

DEGREE : MASTER OF SCIENCE

MAJOR : BIOMEDICAL SCIENCES

ADVISOR : ASST. PROF. ROSSARIN KARNPEAN, Ph.D.

CO-ADVISOR : ASST. PROF. KANJANA PANGJIT, Ph.D.

KEYWORDS : THALASSEMIA, HEMOGLOBINOPATHIES, MINORITY, PREVALENCE,
 GENE FREQUENCY

The Northeast (NE) of Thailand is one of the burden areas of thalassemia and hemoglobinopathies. The surveys of prevalence among minorities within the region, especially in the lower parts, have been limited. This study aimed to survey for thalassemia and hemoglobinopathies by taking ethnicity into account. People from four ethnic groups (Laos, Khmer, Suay and Yer) inhabiting the lower region of NE Thailand were selected as the study population. Subjects from each ethnic group were recruited for the study with the following numbers: Laos (165), Khmer (145), Suay (134) and Yer (101). The results demonstrated that there was an extremely high prevalence of Hb E (>50%) in the Khmer, Suay and Yer ethnic groups. The Khmer ethnic group had the highest prevalence of α^+ -thalassemia (3.7 kb deletion) for 48.28%. α^+ -Thalassemia (4.2 kb deletion) was restricted in the Yer ethnic group. Yer and Suay had a high incidence of Hb Constant Spring as well as Hb Paksé. As the prevalence α^0 -thalassemia is relatively high in Suay (7.46%), couples who are members of the Suay ethnic population should be recommended to take a haematological screening prior to planning for a pregnancy in order to control the Hb Bart's hydrops fetalis. No occurrence of α^0 -thalassemia (THAI deletion) and β -thalassemia were observed in this study. The

micromapping of thalassemia and hemoglobinopathies herein will be helpful for genetic counseling and public education campaigns. It should be carried out in the appropriate languages for each organized village. This information will benefit the long-term effort to reduce the burden of severe thalassemia disease in the region.

บทคัดย่อ

- เรื่อง : ความชุกของเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่ผลิตเอนไซม์ carbapenemase (CPE) จากโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ และการเปรียบเทียบการตรวจหา CPE โดยวิธี modified hodge test, modified carbapenem inactivation method และ multiplex PCR
- ผู้วิจัย : ศิระประภา มินาผล
- ชื่อปริญญา : วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
- สาขาวิชา : ชีวเวชศาสตร์
- อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาวนา พนมเขต
- อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มารุตพงศ์ ปัญญา
- คำสำคัญ : *Enterobacteriaceae*, CRE, CPE, Modified Hodge Test, modified Carbapenem Inactivation Method

แบคทีเรียวงศ์ *Enterobacteriaceae* เป็นแบคทีเรียแกรมลบทรงแท่ง สามารถก่อโรคได้ทั้งในชุมชนและโรงพยาบาล เป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ การติดเชื้อในกระแสเลือด และการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ เป็นต้น ปัจจุบันพบรายงานแบคทีเรียวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems ได้หลายกลไก โดยเฉพาะกลไกการผลิตเอนไซม์ carbapenemase เนื่องจากสามารถถ่ายทอดยีนดื้อยาที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ ผ่านทางพลาสมิดไปยังแบคทีเรียอื่นๆ ก่อให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาในวงกว้าง กลายเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศต่าง ๆ ทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย งานวิจัยนี้ได้ศึกษาหาความชุกของแบคทีเรียวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems (carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* CRE) และการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase หรือ carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) ด้วยการทดสอบทางพีโนไทป์ที่แนะนำโดย Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2017 แบคทีเรียวงศ์ *Enterobacteriaceae* จำนวน 454 ตัวอย่าง ที่แยกได้จากผู้ป่วยเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ ตั้งแต่เดือนกันยายน ค.ศ. 2016 ถึงเดือนกันยายน ค.ศ. 2018

เมื่อทดสอบด้วยแผ่นยา ertapenem ตามเกณฑ์ CLSI เป็นเชื้อ CRE 265 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 58.4 ให้ผลบวกต่อการคัดกรองเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ carbapenemase (CPE) ให้ผลบวกกับการตรวจคัดกรองตามเกณฑ์ European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) 2017 โดยวิธี ertapenem disk diffusion test จำนวน 341 ตัวอย่าง ร้อยละ

75.1 และแบคทีเรียวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่มียีนกำหนดการสร้างเอนไซม์ carbapenemases ร้อยละ 55.1 (250/454) ซึ่งมีค่า MIC ต่อยา meropenem, ertapenem, imipenem และ biapenem อยู่ระหว่าง 0.125 - >128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($\mu\text{g}/\text{mL}$) มีค่า MIC_{50} ต่อยา meropenem, ertapenem และ imipenem เท่ากับ 4, 32 และ 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ตามลำดับ และมีค่า MIC_{90} เท่ากับ 64, >128, 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ตามลำดับ เชื้อเหล่านี้นำมาทดสอบหาการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ด้วยวิธีทางพีโนไทป์ วิธี modified hodge test (MHT) และ modified carbapenem inactivation method (mCIM) วิธี MHT มีความไวร้อยละ 93.2 ความจำเพาะ ร้อยละ 97.8 และวิธี mCIM มีความไวร้อยละ 100 ความจำเพาะ ร้อยละ 97.8 การตรวจหายีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ด้วยวิธี multiplex polymerase chain reaction (multiplex PCR) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน พบความชุกของ CPE ร้อยละ 55.1 (250/454) พบยีน bla_{NDM} เป็นยีนที่กำหนดเอนไซม์ carbapenemase ที่ตรวจพบทั่วไป ร้อยละ 40.3 (183/454) รองลงมาพบยีน $bla_{\text{OXA-48-like}}$ ร้อยละ 29.3 (133/454) ยีนร่วมกัน 2 ชนิด คือ bla_{NDM} ร่วมกับ $bla_{\text{OXA-48-like}}$ ร้อยละ 14.8 (67/454) และ bla_{KPC} ร้อยละ 0.2 (1/454) การศึกษานี้พบความชุกของ CPE ที่เป็นสาเหตุของการดื้อยา carbapenems และการกระจายของยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ carbapenemase

ดังนั้น การให้ความสนใจต่อข้อมูลเชื้อดื้อยาทางการแพทย์ จึงมีความสำคัญต่อบุคลากรทางการแพทย์ในการเลือกใช้ยาต้านจุลชีพที่เหมาะสมในการรักษาผู้ป่วย นำมาสู่การควบคุมและป้องกันการแพร่กระจายของโรคติดเชื้อและลดปัญหาเชื้อดื้อยาในโรงพยาบาล

ABSTRACT

TITLE : PREVALENCE OF CARBAPENEMASE-PRODUCING
ENTEROBACTERIACEAE (CPE) CLINICAL ISOLATES FROM
 SUNPASITTHIPRASONG HOSPITAL AND COMPARISON OF CPE BY
 MODIFIED HODGE TEST, MODIFIED CARAPENEM INACTIVATION
 METHOD AND MULTIPLEX PCR

AUTHOR : SIRAPRAPA MINAPHOL

DEGREE : MASTER OF SCIENCE

MAJOR : BIOMEDICAL SCIENCES

ADVISOR : ASST. PROF. PAWANA PANOMKET, PH.D.

CO-ADVISOR : ASST. PROF. MARUTPONG PANYA, PH.D.

KEYWORDS : *ENTEROBACTERIACEAE*, CRE, CPE, MODIFIED HODGE TEST,
 MODIFIED CARBAPENEM INACTIVATION METHOD

Enterobacteriaceae are rod-shaped Gram-negative bacteria, which are both community and hospital-acquired infections and the most common cause of urinary tract infections, bloodstream infections and respiratory tract infections. Recently, it has been reported that *Enterobacteriaceae* is resistant to carbapenems in various mechanisms, especially in carbapenemase production. The carbapenemase genes can spread their resistant determinants to Gram-negative bacteria through plasmid-mediated. As a result, it can become widespread in certain parts of the world and cause major public health problems globally, including Thailand. The aims of this study were to investigate the prevalence of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) and to detect the carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) using phenotypic tests recommended by Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2017. A total of 454 isolates of *Enterobacteriaceae* from patients admitted to Sunpasithiprasong Hospital from September 2016 to September 2018 were obtained. The Ertapenem Disk Diffusion Test, which followed the CLSI criteria, found 265 CRE isolates (58.4%). Moreover, the CPE Screening Disk Diffusion Method, recommended by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) 2017, found 341 isolates

of CPE screening positive (75.1%) and 250 isolates of *Enterobacteriaceae* carrying carbapenemase genes (55.1%). The range of MIC for the CPE isolates was 0.125->128 µg/mL of meropenem, ertapenem, imipenem and biapenem. MIC₅₀ of meropenem, ertapenem and imipenem were 4, 32 and 2 µg/mL and MIC₉₀ were 64, >128, 64 µg/mL, respectively. These isolates were phenotypically tested for the production of carbapenemases using the modified hodge test (MHT) and the modified carbapenem inactivation method (*mCIM*). The MHT had the sensitivity of 93.2% and the specificity of 97.8%. The *mCIM* had the sensitivity of 100% and the specificity of 97.8%. For the detection of carbapenemase genes by multiplex polymerase chain reaction (multiplex PCR) used as the gold standard, the result found the CPE prevalence of 55.1% (250/454), the *bla*_{NDM}, the most common carbapenemase genes of 40.3% (183/454), followed by 29.3% (133/454) of the *bla*_{OXA-48-like}, 14.8% (67/454) of the coexistence of *bla*_{NDM} and *bla*_{OXA-48-like} and 0.2% (1/454) of *bla*_{KPC}. This study revealed that the prevalence of CPE causes resistance to the carbapenems and the spread of CPE encoding genes.

Therefore, antimicrobial resistance data should be focused among medical personnel in order to select the *appropriate antibiotic treatment for patients. This will lead to the control and the prevention of the spread of infectious diseases as well as the reduction of antimicrobial resistance problems in hospitals.*

บทคัดย่อ

เรื่อง : การทดสอบความเป็นไปได้ของไตรเปปไทด์สังเคราะห์ pERW และ pEKW
ในการใช้เป็นยาชนิดใหม่เพื่อต่อต้านเมทัลโลโปรตีเนสของพิษงู

ผู้วิจัย : ศิริพร พงษ์สระพัง

ชื่อปริญญา : วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต

สาขาวิชา : ชีวเวชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษา : ดร.อนุวัตร ภิญญะชาติ

คำสำคัญ : ไตรเปปไทด์, ตัวยับยั้งเมทัลโลโปรตีเนสของพิษงู

สถิติผู้ป่วยที่ถูกรักษาในประเทศไทยปี พ.ศ. 2560 จำนวน 4,203 ราย พิษงูที่กัด มักพบบ่อยที่สุดคือ พิษงูต่อระบบโลหิต โดยเฉลี่ยแล้วน้ำพิษงูระบบโลหิตประกอบด้วยกลุ่มเอนไซม์เมทัลโลโปรตีเนสในสัดส่วนประมาณร้อยละ 32 ของน้ำพิษทั้งหมดเอนไซม์และเอนไซม์เซอรินโปรตีเอสในสัดส่วนประมาณร้อยละ 20 ของน้ำพิษทั้งหมด เอนไซม์เซอรินโปรตีเอสของพิษงูมีฤทธิ์ต่ออาการเชิงระบบ เช่น ระบบการแข็งตัวของเลือดผิดปกติ ย่อยไฟบริโนเจนและเกิดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด ส่งผลให้มีเลือดออกตามอวัยวะ เอนไซม์เมทัลโลโปรตีเนสของพิษงูมีฤทธิ์ต่ออาการเฉพาะที่ เช่น ย่อยโปรตีนแมทริกซ์ที่อยู่นอกเซลล์ส่งผลให้เนื้อตายเฉพาะที่ ในปัจจุบันอาการเชิงระบบสามารถรักษาด้วยเซรุ่มแก้พิษงูต่ออาการเฉพาะที่ไม่สามารถรักษาด้วยเซรุ่มแก้พิษงูได้ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ไตรเปปไทด์สังเคราะห์ pyro-glutamate-arginine-tryptophan (pERW) และ pyro-glutamate-lysine-tryptophan (pEKW) สามารถยับยั้งการย่อยสลายไฟบริโนเจนและเจลาตินในหลอดทดลองได้โดยศึกษาในเมทัลโลโปรตีเนสของพิษงูแมวเซาพบว่า ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบไตรเปปไทด์สังเคราะห์ pERW และ pEKW ในการยับยั้งเมทัลโลโปรตีเนสของพิษงู ด้วยวิธี Fibrinogenolytic activity และวิธี Gelatinolytic activity ในหลอดทดลอง ผลการทดลองวิธี Fibrinogenolytic activity พบว่า ไตรเปปไทด์สังเคราะห์ pERW และ pEKW สามารถยับยั้งพิษงูเขียวหางไหม้ท้องเหลือง พิษงูกะปะและพิษงูแมวเซาในการย่อยไฟบริโนเจนของมนุษย์ได้ ผลการทดลองวิธี Gelatinolytic activity ในหลอดทดลองพบว่า ไตรเปปไทด์สังเคราะห์ pERW และ pEKW สามารถยับยั้งพิษงูเขียวหางไหม้ท้องเหลืองในการย่อยคอลลาเจนจากผิวหนังสุกรในหลอดทดลองได้ คิดเป็นไตรเปปไทด์ต่อพิษงูร้อยละ 1 ต่อ 14 โดยมวลและร้อยละ 1 ต่อ 17 โดยมวล ตามลำดับ สรุปได้ว่า pERW และ pEKW สามารถยับยั้งพิษงูเขียวหางไหม้ท้องเหลืองของการย่อยไฟบริโนเจนและคอลลาเจนในหลอดทดลอง สำหรับการศึกษาต่อไปในอนาคต pERW อาจนำมาประยุกต์ใช้ในการ

รักษาสำหรับผู้ป่วยที่ถูกรักษาต่อระบบโลหิตกัดโดยอาจใช้ร่วมกันหรืออาจใช้ทดแทนการรักษาด้วยเซรุ่ม
แก้พิษงู

ABSTRACT

TITLE : POTENTIAL OF SYNTHETIC TRIPEPTIDES, pERW AND pEKW, TO BE A
NEW THERAPEUTIC AGENT OF SNAKE VENOME
METALLOPROTEINASES

AUTHOR : SIRIPORN PHONGSRAPHANG

DEGREE : MASTER OF SCIENCES

MAJOR : BIOMEDICAL SCIENCES

ADVISOR : ANUWAT PINYACHAT, Ph.D.

KEYWORDS : TRIPEPTIDES, SNAKE VENOME METALLOPROTEINASE INHIBITOR

In 2017, there were 4,203 snakebite patients in Thailand. The most common category of snakes that bit the patients were hermatotoxic. On average, majority of Thai hematotoxic snake venom comprises of snake venom metalloproteinases (SVMPs) of 32% per total toxic enzymes and serine protease (SVSP) of 20% per total toxic enzymes. Serine proteases induce a blood coagulation system in fibrinolysis and platelet aggregation resulting in internal bleeding. SVMPs can digest extracellular matrix (ECM) proteins. The ECM causes local effects such as local tissue damages. Presently, the systemic effects of a hemotoxic snakebite can be treated by antivenom but it cannot prevent the local effects. Previous reports found that tripeptides, pyroglutamate-arginine-tryptophan (pERW) and pyroglutamate-lysine-tryptophan (pEKW) can inhibit a gelatinolytic activity and a fibrinogenolytic induced by SVMPs in Myanmar Russell's viper venom. This study aims to test the ability to inhibit synthetic tripeptides, pERW and pEKW into Thai venomous snake venoms using fibrinogenolytic and gelatinolytic activity *in vitro*. The results of fibrinogenolytic activity showed that tripeptides, pERW and pEKW can inhibit *Trimeresurus albolabris*, *Calloselasma rhodostoma*, and *Daboia russelii* venoms in human fibrinogen digestion. For the gelatinolytic activity, it was shown that both pERW and pEKW can inhibit *T. albolabris* venom in the digestion of porcine skin collagen at the ratio of 1:14 w/w and 1:17 w/w, respectively. In conclusion, pERW and pEKW can inhibit *T. albolabris* venom in the digestion of fibrinogen and collagen *in vitro*. These experimental results should be

considered for further studies *in vivo*. pERW may be a new therapeutic agent for hematotoxic snakebite patients to treat with or without antivenom in the future.