

ความแตกต่างของรูปแบบ เอนไซม์ใน Opisthorchis viverrini



นาย อติรัฐ ปิยะบุตร

วิทยานิพนธ์นี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
—
ภาควิชาชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2530

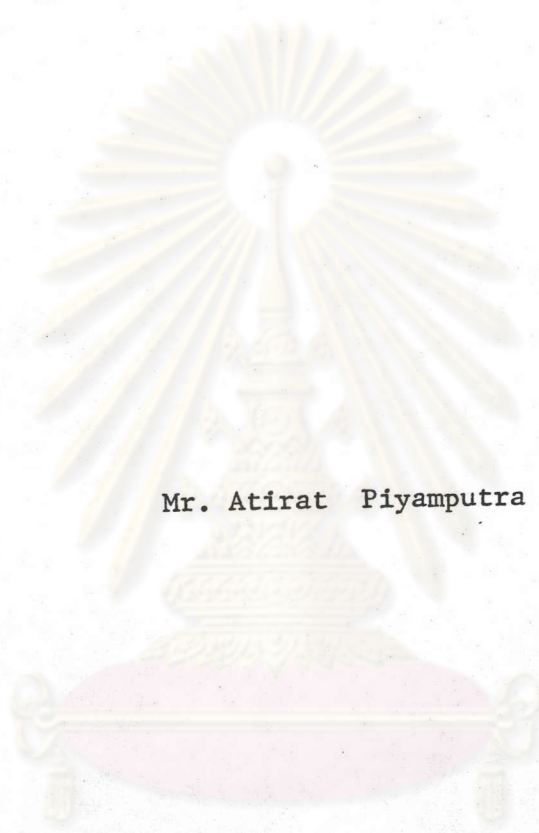
ISBN 974-568-164-4

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

012943

i 10293218

VARIATION OF ENZYME PATTERNS IN OPISTHORCHIS VIVERRINI



Mr. Atirat Piyamputra

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

Department of Zoology

Graduate School

Chulalongkorn University


1987

ISBN 974-568-164-4

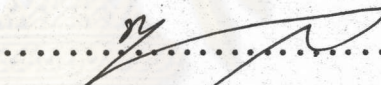
หัวข้อวิทยานิพนธ์ ความแตกต่างของรูปแบบเอนไซม์ใน Opisthorchis viverrini
โดย นาย อติรัฐ ปิยะมบุตร
ภาควิชา ชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ สดศรี ไทยทอง
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์แพทย์หญิง ธาดา สืบหลินวงศ์

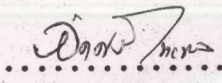


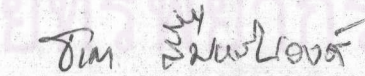
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของ
การศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบัณฑิต

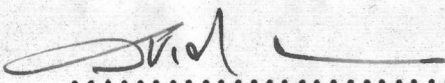

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วิชาภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


.....ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร.ม.ร.ว.พุดพิงศ์ วรรณดี)


.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ สดศรี ไทยทอง)


.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์แพทย์หญิง ธาดา สืบหลินวงศ์)


.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุชาติ ปริยานนท์)

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ความแตกต่างของรูปแบบแอนไซม์ใน <u>Opisthorchis viverrini</u>
ชื่อนิพนธ์	นาย อติรัฐ ปิยะบุตร
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ สดศรี ไทยทอง
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์แพทย์หญิง ธาดา สืบหลินวงศ์
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2529

บทคัดย่อ



พยาธิใบไม้ตับ Opisthorchis viverrini เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคพยาธิใบไม้ตับ (opisthorchiasis) ในประชาชนทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย เพื่อจะดูว่ามีความแตกต่างในประชากรของพยาธิ เหล่านี้หรือไม่ จึงได้ศึกษาความแตกต่างของรูปแบบไอโซไซม์ของแอนไซม์ กลูโคสฟอสเฟต ไอโซเมอเรส (GPI), ฟอสโฟกลูโคมิวเตส (PGM) และกลูโคส-6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส (G-6PD) ในพยาธิชนิดนี้ ซึ่งได้จากตับของศพที่ถูกผ่าเพื่อชันสูตร และจากน้ำดีภายในตับของผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัด ณ โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น จำนวน 109 ตัว และได้จากตับของแฮมสเตอร์ที่ถูกทำให้ติดเชื้อพยาธิชนิดนี้ 59 ตัว รวมทั้งสิ้น 168 ตัว โดยวิธี เซลลูโลส อะซีเตท อิมัลชันโครมโทริซีส พบว่าแอนไซม์ทั้งสามตัวในพยาธิชนิดนี้มีรูปแบบไอโซไซม์หลายรูปแบบ และรูปแบบไอโซไซม์ในแอนไซม์กลูโคสฟอสเฟต ไอโซเมอเรส ที่พบมีทั้งหมด 8 รูปแบบ คือ GPI₁, GPI₂, GPI₃, GPI₄, GPI₅, GPI₆, GPI₇ และ GPI₈ ในแอนไซม์ฟอสโฟกลูโคมิวเตส มีความแตกต่างของรูปแบบไอโซไซม์ 5 รูปแบบคือ PGM₁, PGM₂, PGM₃, PGM₄ และ PGM₅ และพบความแตกต่างของรูปแบบไอโซไซม์ 3 รูปแบบคือ G-6PD₁, G-6PD₂ และ G-6PD₃ ในแอนไซม์กลูโคส-6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส จากความแตกต่างของรูปแบบไอโซไซม์ที่พบดังกล่าวในการศึกษาคั้งนี้ สามารถจำแนกพยาธิทั้ง 168 ตัว ออกเป็นโทพ์ย่อยได้ 47 โทพ์ โดยอาศัยรูปแบบไอโซไซม์ของแอนไซม์ทั้งสามชนิดที่พบในพยาธิแต่ละตัว

9

Thesis Title Variation of Enzyme Patterns in Opisthorchis viverrini
Name Mr. Atirat Pitamputra
Thesis Advisor Associate Professor Sodsri Thaithong
 Associate Professor Tada Sueblinvong, M.D.
Department Biology
Academic Year 1986

Abstract

Opisthorchis viverrini is the cause of opisthorchiasis among the people in northeast Thailand. Isozyme analysis was carried out on the adult worms collected from livers of autopsies, operate patients at Srinakarin Hospital, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen Province, Thailand, and from the livers of infected golden hamsters to see whether this technique could detect the differences in the population of these parasites. A total of 109 worms from the human livers and 59 worms from infected hamsters were electrophoresed by cellulose acetate electrophoresis and stained for 3 enzymes : glucosephosphate isomerase (GPI), phosphoglucomutase (PGM), and glucose-6-phosphate dehydrogenase. All of enzymes studied showed polymorphism. Eight different patterns of GPI₁, GPI₂, GPI₃, GPI₄, GPI₅, GPI₆, GPI₇ and GPI₈ were found in glucose-phosphate isomerase. Five patterns of PGM₁, PGM₂, PGM₃, PGM₄ and PGM₅ and three patterns of G-6PD₁, G-6PD₂ and G-6PD₃ were found in phospho-glucomutase and glucose-6-phosphate dehydrogenase respectively.

According to the variation of enzyme patterns obtained in this study 168 worms could then be classified into forty-seven type which was based on the isozyme patterns of three enzymes studied found in individual worm.



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาของ รองศาสตราจารย์ สดศรี ไทยทอง อาจารย์ที่ปรึกษา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ธาดา สืบหลินวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องตั้งแต่แรกเริ่มจนประสบผลสำเร็จ รวมทั้งผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุชาติ ปริยานนท์ ภาควิชาปาราสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ได้กรุณาให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างพยาธิ เพื่อมาทำการศึกษาค้างนี้ เป็นอย่างมาก ทั้งยังกรุณาตรวจแก้ไขข้อบกพร่องวิทยานิพนธ์ด้วย ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณท่านอาจารย์ทั้งสามอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.ม.ร.ว.พุดพิงศ์ วรวิมล ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาร่วมแก้ไขข้อบกพร่องวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลงด้วยดี

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์ พิสิฐรุฑ์ สัตย์พิทักษ์ ภาควิชาพยาธิวิทยา ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์ วิรัตน์ วงศ์แสงนาค ภาควิชาศัลยศาสตร์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วิชิต พิพิธกุล ภาควิชาปาราสิตวิทยา และอาจารย์ วีระพงษ์ จุลิตานนท์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ตลอดจนคณาจารย์ท่านอื่น ๆ ในภาควิชาที่ได้กล่าวแล้ว ที่ได้กรุณาให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างพยาธิ เพื่อทำการศึกษาค้างนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชา พยาธิวิทยา ศัลยศาสตร์ ปาราสิตวิทยา และ จุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ได้ให้ความร่วมมืออย่างดียิ่งในการเก็บตัวอย่างพยาธิ

ขอขอบคุณโรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ในการเก็บตัวอย่างพยาธิ

ขอขอบคุณคุณ สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน ที่ได้คำแนะนำในการเลี้ยงพยาธิเพื่อทำการศึกษาในครั้งนี้

ขอขอบคุณอาจารย์และเจ้าหน้าที่ ศูนย์วิจัยมาลาเรียร่วมองค์การอนามัยโลก เพื่อการศึกษา คุณสมบัติของ เชื้อมาลาเรีย สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ และคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาแนะนำเทคนิคการศึกษาด้วยวิธีเซลลูโลส อะซีเตท อีเล็ก-
โทรฟอริซิส เพื่อใช้ในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้เอื้อเพื่อ
สถานที่ทำการศึกษา

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่แผนกโสตทัศนศึกษา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ที่ให้ความช่วยเหลือในการถ่ายรูป แบนสไลด์ ผลการศึกษา

ขอขอบคุณ คุณ สุัทตรา ธรรมฉวี ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการพิมพ์วิทยานิพนธ์
จนสำเร็จด้วยความ เรียบร้อย

ขอขอบคุณทุนการศึกษาพระมหิตลathi เบสร์ อุดุลยเดชวิกรม พระบรมราชชนกที่ได้ให้
ทุนอุดหนุนการวิจัยครั้งนี้

และสุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ บิดา-มารดา เป็นอย่างสูง ที่ได้กรุณาให้กำลังใจ
สนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้จนสำเร็จ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญตาราง	ฅ
สารบัญแผนภาพ	ฉ
สารบัญรูป	ฉ
คำย่อ	ฐ
บทที่	
1. บทนำ	1
2. สอบสวน เอกสาร	6
3. วัสดุและอุปกรณ์ในการศึกษา	20
4. วิธีการศึกษา	24
5. ผลการศึกษา	37
6. วิจารณ์ผลการศึกษา	65
7. สรุปผลการศึกษาและข้อ เสนอแนะ	72
เอกสารอ้างอิง	74
ประวัติผู้เขียน	84

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. แสดงผลการศึกษารูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ กลูโคสฟอสเฟต ไอโซเมอเรส (GPI) ในพยาธิใบไม้ตับ <u>O.viverrini</u> จากตับคนและตับแฮมสเตอร์	41
2. แสดงผลการศึกษารูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ฟอสโฟกลูโคมิวเตส (PGM) ในพยาธิใบไม้ตับ <u>O.viverrini</u> จากตับคนและตับแฮมสเตอร์	44
3. แสดงการศึกษารูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ กลูโคส-6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส (G-6PD) ในพยาธิใบไม้ตับ <u>O.viverrini</u> ที่ได้จากตับคนและตับแฮมสเตอร์	46
4. แสดงเปอร์เซ็นต์การพบรูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ กลูโคส-ฟอสเฟต ไอโซ-เมอเรส (GPI) ฟอสโฟกลูโคมิวเตส (PGM) และกลูคอส-6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส (G-6PD) ในพยาธิใบไม้ตับ <u>O.viverrini</u> รวม 168 ตัว จากตับคน และตับแฮมสเตอร์	50
5. แสดงการจำแนกไทป์ของพยาธิใบไม้ตับ <u>O.viverrini</u> โดยอาศัยรูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์กลูโคสฟอสเฟต ไอโซเมอเรส (GPI) ฟอสโฟกลูโคมิวเตส (PGM) และ กลูโคส-6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส (G-6PD) ที่พบในพยาธิจากตับคนและตับแฮมสเตอร์ รวม 168 ตัว	55
6. แสดงไทป์ของพยาธิใบไม้ตับ <u>O.viverrini</u> ที่ได้จากตับศพที่ถูกฆ่าเพื่อชันสูตร รายที่ 1 (33 ตัว)	57
7. แสดงไทป์ของพยาธิใบไม้ตับ <u>O.viverrini</u> ที่ได้จากตับศพที่ถูกฆ่าเพื่อชันสูตร รายที่ 2 (11 ตัว) และรายที่ 3 (1 ตัว)	58
8. แสดงไทป์ของพยาธิใบไม้ตับ <u>O.viverrini</u> ที่ได้จากน้ำดีที่ดูดจากตับของผู้ป่วย รายที่ 1 (20 ตัว)	59
9. แสดงไทป์ของพยาธิใบไม้ตับ <u>O.viverrini</u> ที่ได้จากน้ำดีที่ดูดจากตับของผู้ป่วย รายที่ 2 (15 ตัว)	60

ตารางที่

หน้า

10.	แสดงโทพของโยธาธิโบไม้ดัม <u>O.viverrini</u> ที่ได้จากน้ำคั้นที่คูดจากคัมของผู้ป่วย รายที่ 3 (29 ตัว)	61
11.	แสดงโทพของพยาธิโบไม้ดัม <u>O.viverrini</u> ที่ได้จากคัมแฮมสเตอร์ตัวที่ 1 (11 ตัว) และตัวที่ 2 (16 ตัว)	63
12.	แสดงโทพของพยาธิโบไม้ดัม <u>O.viverrini</u> ที่ได้จากคัมแฮมสเตอร์ตัวที่ 3 (16 ตัว) และตัวที่ 4 (16 ตัว)	64



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญแผนภาพ

แผนภาพที่	หน้า
1. แสดงวงจรชีวิตของ <u>Opisthorchis viverrini</u>	10
2. แสดงการเกิดฟอรัมมาซานโดยปฏิกิริยาของ MTT	31
3. แสดงปฏิกิริยาการเกิดฟอรัมมาซานในการย้อม เอนไซม์กลูโคสฟอสเฟต ไอโซ- เมอเรส	32
4. แสดงปฏิกิริยาการเกิดฟอรัมมาซานในการย้อม เอนไซม์ฟอสโฟกลูโคมิวเตส . .	33
5. แสดงปฏิกิริยาการเกิดฟอรัมมาซานในการย้อม เอนไซม์กลูโคส-6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส	34
6. แสดงรูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ กลูโคสฟอสเฟต ไอโซเมอเรส (GPI) ฟอสโฟกลูโคมิวเตส (PGM) และกลูโคส-6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส (G-6PD) ที่พบในพยาธิใบไม้ตับ <u>O.viverrini</u> 168 ตัว จากตับคนและตับแฮมสเตอร์	47

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1. แสดงภาพถ่ายลักษณะตัวโตเต็มวัยของพยาธิใบไม้ตับ <u>Opisthorchis viverrini</u> (ขนาดขยาย 10 เท่า)	7
2. แสดงภาพถ่ายของซิสต์ระยะ เมตาเซอคาเรียของพยาธิใบไม้ตับ <u>Opisthorchis viverrini</u> (ขนาดขยาย 400 เท่า)	9
3. แสดงภาพถ่ายตับของคนที่เป็นโรคพยาธิใบไม้ตับอาการรุนแรง	27
4. แสดงภาพถ่ายพยาธิระยะโตเต็มวัยที่ได้จากตับศพที่ถูกผ่าเพื่อชันสูตร และ เลียงไว้ใน น้ำเลี้ยง BME	27
5-8 แสดงภาพถ่ายรูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ กลูโคสฟอสเฟต ไอโซเมอเรส (GPI) รูปแบบที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8.	48
9-10 แสดงภาพถ่ายรูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ฟอสโฟกลูโคมิวเตส (PGM) รูปแบบที่ 1, 2, 3, 4 และ 5	49
11 แสดงภาพถ่ายรูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ กลูโคส-6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส (G-6PD) รูปแบบที่ 1, 2 และ 3	49
12 แสดงภาพถ่ายรูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ กลูโคสฟอสเฟต ไอโซเมอเรส ในพยาธิ ใบไม้ตับ <u>O.viverrini</u> ที่ตายแล้วจากตับคน	70

คำย่อ

มก.	คำย่อ	มิลลิกรัม
มม.	"	มิลลิเมตร
มล.	"	มิลลิลิตร
ซม.	"	เซนติเมตร
BME	"	Basal Medium Eagle
°C	"	องศาเซลเซียส
CAE	"	Cellulose acetate electrophoresis
NSS	"	0.85 % Sodium Chloride solution
PAGE	"	Polyacrylamide gel electrophoresis

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย