

ความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนของเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ในช่องปากของผู้ป่วยเอดส์
และผลของยาต้านเชื้อราต่อการย่อยสลายโปรตีนของเชื้อ

นางสาวพรพรรณ ยวงนาค



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเวชศาสตร์ช่องปาก ภาควิชาเวชศาสตร์ช่องปาก

คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2543

ISBN 974-346-325-9

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THE PROTEOLYTIC POTENTIAL OF ORAL CANDIDA ALBICANS FROM AIDS PATIENTS AND THE
EFFECT OF ANTIFUNGAL AGENTS ON ITS PROTEOLYSIS

Miss Pornpan Youngnak

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

Department of Oral Medicine

Faculty of Dentistry

Chulalongkorn University

Academic Year 2000

ISBN 974-346-325-9

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนของเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ใน
ช่องปากของผู้ป่วยเอดส์และผลของยาต้านเชื้อราต่อการย่อยสลายโปร
ตีนของเชื้อ

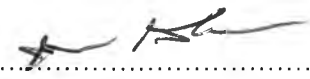
โดย นางสาว พรพรรณ ยวงนาค

ภาควิชา เวชศาสตร์ช่องปาก

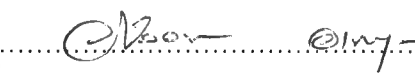
อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ลัดดา เหลืองจามีกร

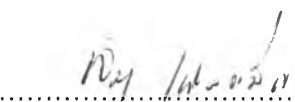
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร. มโน คุรัตน์

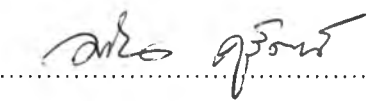
คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทมหาบัณฑิต

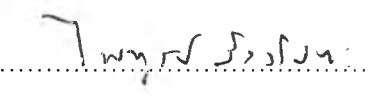

.....คณบดีคณะทันตแพทยศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ สุธสิทธิ์ เกียรติพงษ์สาร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง วิไลวรรณ อเนกสุข)


.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ลัดดา เหลืองจามีกร)


.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร. มโน คุรัตน์)


.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร. ไพฑูรย์ สังวรินทะ)

พรพรรณ ยวงนาค : ความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนของเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ในช่องปากของผู้ป่วยเอดส์และผลของยาต้านเชื้อราต่อการย่อยสลายโปรตีนของเชื้อ (THE PROTEOLYTIC POTENTIAL OF ORAL CANDIDA ALBICANS FROM AIDS PATIENTS AND THE EFFECT OF ANTIFUNGAL AGENTS ON ITS PROTEOLYSIS) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ทพญ. ลัดดา เหลืองจามีกร, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ผศ. ทพ. ดร. มโน คุรัตน์; 92 หน้า. ISBN 974-346-325-9.

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาเปรียบเทียบถึงความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนในห้องปฏิบัติการของเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ที่แยกจากช่องปากของผู้ป่วยเอดส์กับผู้ที่ไม่ติดเชื้อเอชไอวี โดยวิธีทดสอบการย่อยสลายอัลบูมินจากซีรัมของวัว และศึกษาถึงความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนในห้องปฏิบัติการหลังจากที่ผสมยาต้านเชื้อรานิสตาตินและยามิโคนาโซลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วนำมาทดสอบการย่อยสลายอัลบูมินจากซีรัมของวัวเช่นเดียวกัน

กลุ่มตัวอย่าง คือ กลุ่มที่เป็นโรคเอดส์และกลุ่มที่ไม่ติดเชื้อเอชไอวี จำนวนกลุ่มละ 25 คน โดยกลุ่มที่เป็นโรคเอดส์จะต้องได้รับการวินิจฉัยยืนยันว่าติดเชื้อเอชไอวีโดยวิธี ELISA, มีจำนวนลิมโฟซัยท์ชนิดซีดี 4⁺ น้อยกว่า 200 เซลล์/มม³, เป็นพาหะของเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ โดยไม่มีรอยโรคทางคลินิกของการติดเชื้อราในช่องปากในขณะที่ทำการเก็บเชื้อ และไม่ได้รับยาต้านเชื้อราในช่วง 1 เดือนก่อนการเก็บเชื้อจากช่องปาก ส่วนกลุ่มที่ไม่ติดเชื้อเอชไอวีจะต้องมีผลลบต่อแอนติบอดีของเชื้อเอชไอวี, เป็นพาหะของเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์, ไม่มีโรคทางระบบ และไม่ได้รับยาปฏิชีวนะ ยกดระบบภูมิคุ้มกันหรือยาต้านเชื้อราในช่วง 1 เดือนก่อนการเก็บเชื้อ การเก็บตัวอย่างเชื้อใช้สำลีพันปลายไม้ที่เย็บอุณิวช่องปาก และนำมาแยกเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์โดยพิจารณาจากลักษณะโคโลนี, การสร้างแคลมิดโคโคเนียมและการทดสอบการใช้น้ำตาล หลังจากนั้นนำมาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนก่อนและหลังการใช้ยาต้านเชื้อรานิสตาตินและยามิโคนาโซลความเข้มข้น 1/4 และ 1/16 ของความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (MIC) โดยทดสอบการย่อยสลายอัลบูมินจากซีรัมของวัว 5 วัน และย้อมสีด้วยสียละลายคูแมสซี บริลเลียนท์ บลู อาร์ แล้วนำมาคำนวณค่าความสามารถในการย่อยสลายโปรตีน (Pr₀ value) ในวันที่ 5 ของการล้างสีคูแมสซี บริลเลียนท์ บลู อาร์ ผลการวิจัย พบว่า ความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนก่อนใช้ยาต้านเชื้อราระหว่าง 2 กลุ่มตัวอย่างไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) และเมื่อพิจารณาผลของยาต้านเชื้อราต่อความสามารถในการย่อยสลายโปรตีน พบว่า เชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์จากทั้ง 2 กลุ่มตัวอย่างมีความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.001) หลังจากใช้ยาต้านเชื้อราทั้งยานิสตาตินและยามิโคนาโซลทั้งความเข้มข้น 1/4 และ 1/16 ของความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างเชื้อ 2 กลุ่ม พบว่า ความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนที่ลดลงเนื่องจากผลของยาต้านเชื้อราทั้ง 2 ชนิดนี้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) นอกจากนี้ พบว่ายามิโคนาโซลความเข้มข้น 1/4 ของความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้สามารถลดความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนได้มากที่สุด รองลงมาได้แก่ ยานิสตาตินความเข้มข้น 1/4, ยามิโคนาโซลความเข้มข้น 1/16 และยานิสตาตินความเข้มข้น 1/16 ของความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ ตามลำดับทั้ง 2 กลุ่ม

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า ความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนโดยเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์จากผู้ป่วยเอดส์ในระยะที่ไม่มียาต้านเชื้อราในช่องปากไม่มีความแตกต่างกับเชื้อที่ได้จากผู้ที่ไม่ติดเชื้อเอชไอวี และการใช้ยาต้านเชื้อรานิสตาตินหรือยามิโคนาโซลต่อเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ในระยะนี้ สามารถลดความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนได้ทั้ง 2 กลุ่มในลักษณะที่ขึ้นกับปริมาณยา โดยที่ยามิโคนาโซลมีประสิทธิภาพในการลดความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนได้ดีกว่ายานิสตาติน

ภาควิชา เวชศาสตร์ช่องปาก
สาขาวิชา เวชศาสตร์ช่องปาก
ปีการศึกษา 2543

ลายมือชื่อนิสิต..... *Wissad Uboma*
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... *(Signature)*
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... *(Signature)*

PORNPAN YOUNGNAK : THE PROTEOLYTIC POTENTIAL OF ORAL CANDIDA ALBICANS FROM AIDS PATIENTS AND THE EFFECT OF ANTIFUNGAL AGENTS ON ITS PROTEOLYSIS. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. LAKANA LUANGJARMEKORN, THESIS CO-ADVISOR : ASSIST. PROF. MANO KURATANA; 92 pp. ISBN 974-346-325-9.

This study was designed to investigate *in vitro* proteolytic potential of oral *Candida albicans* (*C. albicans*) isolated from AIDS patients and healthy subjects by bovine serum albumin (BSA) assay. Also, the effect of antimycotic agents on *in vitro* proteolytic potential was examined after exposing the fungus to nystatin or miconazole for 18 hours.

Two groups of proteolytic oral *C. albicans* isolated from AIDS patients and healthy subjects (25 isolates in each group) were used in the study. All of the AIDS patients must have the following qualifications: HIV-positive as confirmed by ELISA; their CD4⁺ cell counts were less than 200 cells/mm³; no oral lesions of fungal infection were remarked at the time specimen collecting; and no antifungal agents were taken during the period of one month before the study. The healthy subjects were all HIV-negative, had no systemic diseases, and did not take any antibiotics, immunosuppressive drugs, or antifungal agents during 1 month period before the study. *C. albicans* were collected from the oral mucosa, then isolated and identified as *C. albicans* due to their colony morphology, chlamydoconidium formation, and sugar fermentation. The proteolytic potential (Pr_d) of the fungus before and after exposure to 1/4 or 1/16 sub-MICs of nystatin or miconazole was investigated by BSA assay and the protein was subsequently stained with 0.25% coomassie brilliant blue R. The proteolytic zone was assessed on the day 5 of the stain decolorization and the Pr_d value was then examined. With no exposure to antifungal agents, the mean Pr_d values were shown to have no significant differences between the 2 groups (p>0.05). Pre-exposure of *C. albicans* to 1/4 or 1/16 sub-MICs of nystatin or miconazole resulted in a significant decrease of Pr_d values in all isolates tested (p<0.001). However, no significant difference (p>0.05) in the reduction of proteolytic potential affected by the antifungal agents was seen when the two groups were compared. Exposure to 1/4 sub-MIC of miconazole appeared to result in the greatest reduction of Pr_d value, followed by 1/4 sub-MIC of nystatin, 1/16 sub-MIC of miconazole and 1/16 sub-MIC of nystatin respectively in both groups.

These findings suggested that the proteolytic potential of oral *C. albicans* either isolated from AIDS patients or healthy subjects was not different. Miconazole and nystatin could reduce the proteolytic potential of *C. albicans* in a dose-dependent manner in both groups; however, miconazole seemed to be more effective than nystatin.

Department Oral Medicine
Field of study Oral Medicine
Academic year 2000

Student's signature.....*Pornpan Youngnak*.....
Advisor's signature.....*L. Luangjarnekorn*.....
Co-advisor's signature.....*Mano Kuratana*.....



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยได้รับความช่วยเหลือจากผู้มีพระคุณ ซึ่งผู้ทำวิทยานิพนธ์ขอขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ รศ.ทพญ.ลัดดา เหลืองจามีกร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ผศ.ทพ.ดร.มโน คุรัตน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ให้คำแนะนำที่มีคุณค่าและเป็นประโยชน์ในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ผศ.นพ.เกียรติ รักษาธรรม อาจารย์ประจำภาควิชาอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้คำแนะนำและส่งต่อผู้ป่วยโรคเอดส์

ขอขอบพระคุณ อ.ทพญ.พัชรา พิพัฒน์โกวิท ที่ได้คำแนะนำเกี่ยวกับการเลี้ยงเชื้อและแยกเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์

ขอขอบพระคุณ รศ.ภญ.อิงอร มันทรานนท์, บริษัท Janssen Pharmaceutica Ltd. และบริษัท Squibb Manufacturing Inc. ที่เอื้อเฟื้อยามีโคนาโซลและยานิสตาตินในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ คุณเจริญ บุญจัตรัส ที่ให้ความช่วยเหลือในการตรวจเลือดกลุ่มผู้ไม่ติดเชื้อเอชไอวี

ขอขอบพระคุณ ภาควิชาจุลชีววิทยา, ภาควิชาชีวเคมี, ภาควิชาเวชศาสตร์ช่องปาก, ศูนย์วิจัยชีววิทยา ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องมือในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ป่วยโรคเอดส์ทุกคนและผู้ป่วยทันตกรรมและบุคลากรคณะทันตแพทยศาสตร์ ที่ให้ความร่วมมือในการเก็บตัวอย่างน้ำลายและการตรวจเลือด เพื่องานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ทุกท่าน ที่ได้ให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ อ.ทพญ.จิตรา ลิ้มทรง, ทพ.อภิยศ พิบูลย์รัตนกิจ, ทพ.พิศลย์ เสนาวงษ์ และ อ.ทพ.อาทิพันธุ์ พิมพ์ขาวขำ ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ

คุณความดีและประโยชน์อันพึงได้รับจากการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยขอขอบแต่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

พรพรรณ ยวงนาค

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ฉ
สารบัญแผนภาพ.....	ค
บทที่ 1 บทนำ.....	1
หลักการและเหตุผล.....	1
คำถามของการวิจัย.....	4
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	5
สมมติฐานของการวิจัย.....	5
ขอบเขตของการวิจัย.....	5
ประเภทของการวิจัย.....	5
ข้อตกลงเบื้องต้น.....	6
ปัญหาด้านจริยธรรม.....	7
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัยนี้.....	7
บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	8
โรคแคนติเดียซิสในช่องปาก.....	8
ปัจจัยที่ก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคแคนติเดียซิส.....	8
ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อโรคแคนติเดียซิส.....	23
การจำแนกการติดเชื้อแคนติดาในช่องปาก.....	27
วิธีทางห้องปฏิบัติการในการแยกเชื้อแคนติดา อัลบิแคนส์.....	30
ความสัมพันธ์ของโรคเอดส์กับโรคแคนติเดียซิส.....	33
การใช้ยาต้านเชื้อราในการรักษาโรคแคนติเดียซิส.....	38
สี่คูแมสซี บริลเลียนท์ บลู อาร์.....	46

	หน้า
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย.....	48
ตัวอย่างศึกษา, วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย.....	48
วิธีดำเนินการวิจัย.....	50
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	55
บทที่ 5 การวิจารณ์และสรุปผลการทดลอง.....	71
รายการอ้างอิง.....	79
ประวัติผู้เขียน.....	92

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1	แสดงข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับเพศ, อายุ, โรคทางระบบ, และประวัติการใช้ยาของ.....57 กลุ่มตัวอย่างโรคเอดส์และกลุ่มที่ไม่ติดเชื้อเอชไอวี
2	แสดงประวัติโรคติดเชื้อมวยโอกาสและอาการที่เกี่ยวข้องกับโรคเอดส์ที่พบใน.....57 กลุ่มตัวอย่างโรคเอดส์จำนวน 25 คน
3	แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณ.....59 ที่มีการย่อยสลายโปรตีนในแต่ละวันของการล้างสีคูแมสซี บริลเลียนท์ บลู อาร์ เป็นเวลา 7 วัน
4	แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณ.....59 ที่มีการย่อยสลายโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไปในช่วงเวลา 1 วันขณะล้างสีคูแมสซี บริลเลียนท์ บลู อาร์ จากวันที่ 1 ถึงวันที่ 7
5	แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณ.....61 ที่มีการย่อยสลายโปรตีนเมื่อวัดก่อนย้อมสีคูแมสซี บริลเลียนท์ บลู อาร์และใน วันที่ 5 หลังการล้างสีคูแมสซี บริลเลียนท์ บลู อาร์ และการทดสอบนัยสำคัญทางสถิติ
6	แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณ.....63 ที่มีการย่อยสลายโปรตีนเมื่อใช้เชื้อจากตัวอย่างเดียวกัน แต่ต่างความเข้มข้นของ เชื้อ และการทดสอบนัยสำคัญทางสถิติ
7	แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าความสามารถในการย่อยสลาย.....64 โปรตีนของเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ก่อนใช้ยาเมื่อแยกตามเพศในกลุ่มตัวอย่าง โรคเอดส์และกลุ่มที่ไม่ติดเชื้อเอชไอวี โดยเปรียบเทียบระหว่างเชื้อที่แยกจากเพศ ชายและเพศหญิงทั้งในแต่ละกลุ่มตัวอย่างและระหว่างกลุ่มตัวอย่างเมื่อเลี้ยงใน อาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด
8	แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าความสามารถในการย่อยสลาย.....67 โปรตีนของเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ก่อนใช้ยา โดยเปรียบเทียบระหว่างสภาวะ 88 ที่ เลี้ยงเชื้อในแซบูโร เด็กซ์โตรส บรอก และในสภาวะที่เลี้ยงเชื้อในอีสต์ ไนโตรเจน เบส และเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มตัวอย่างโรคเอดส์และกลุ่มที่ไม่ติดเชื้อเอชไอวี โดยไม่แยกเพศ

ตารางที่

- 9 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าความสามารถในการย่อยสลาย.....68
โปรตีนก่อนและหลังการใช้ยาต้านเชื้อรา ในกลุ่มตัวอย่างโรคเอดส์และกลุ่มที่ไม่
ติดเชื้อเอชไอวี
- 10 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าความสามารถในการย่อยสลาย.....69
โปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไปหลังใช้ยาต้านเชื้อราระหว่างกลุ่มตัวอย่างโรคเอดส์และ
กลุ่มที่ไม่ติดเชื้อเอชไอวี

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่	
1 แสดงตัวอย่างของบริเวณที่มีการย่อยสลายโปรตีนของเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์.....60 ก่อนการย้อมสีคูแมสซี บริลเลียนท์ บลู อาร์	
2 แสดงตัวอย่างของบริเวณที่มีการย่อยสลายโปรตีนของเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์.....60 ในวันที่ 5 หลังการล้างสีคูแมสซี บริลเลียนท์ บลู อาร์	

สารบัญแผนภาพ

หน้า

แผนภาพ

- 1 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานและการทดสอบความแตกต่างของค่า.....70
ความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไปหลังให้ยาต้านเชื้อรา ภาย
ในกลุ่มตัวอย่างทั้ง 2 กลุ่ม