ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ผลของยา Albendazole, Quinine และ Artemeter ต่อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจี๊ด (Spirurida: Gnathostomatidae) ในหลอดทดลอง

ชื่อผู้เขียน นางสาวปิยนาถ ขาวละออ

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาปรสิตวิทยา

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ผศ.ดร.นพ. คม	สุคนธสรรพ์	ประธานกรรมการ
รศ.ดร. อุดม	ชัยทอง	กรรมการ
รศ.ดร. ปราโมทย์	วณิตย์ธนาคม	กรรมการ
อ.ดร. กาบแก้ว	สุคนธสรรพ์	กรรมการ
อ.ดร. อำนาจ	โรจนไพบูลย์	กรรมการ

บทคัดย่อ

โรคพยาธิตัวจี๊ดเป็นโรคที่เกิดจากการไชของตัวอ่อนระยะที่ 3 ขั้นปลายของพยาธิตัวจี๊ด (*Gnathostoma spinigerum*) โดยมีอาการบวมเคลื่อนที่ไปในอวัยวะต่างๆ ซึ่งในปัจจุบันยังไม่มียาที่จะสามารถรักษาโรคนี้อย่างได้ผลดี แต่ก็มีรายงานว่ายา quinine และ albendazole สามารถทำให้อาการบวมของผู้ป่วยลดน้อยลง นอกจากนี้มีรายงานว่ายา albendazole ในขนาดที่สูงมากต่อสัตว์ทดลองที่มีพยาธิดังกล่าวจะทำให้จำนวนของตัวอ่อนของพยาธิลดลงได้ แต่ไม่มีรายงานการศึกษาผลของยาในขนาดที่ให้ในคนต่อตัวอ่อนของพยาธิตัวจี๊ด การศึกษาครั้งนี้จึงกำหนดให้เป็นการศึกษาผลของขนาดของยา quinine และ albendazole sulfoxide ซึ่งเป็น active metabolite ของยา albendazole ในขนาดยาที่น่าจะพบในผู้ป่วยที่ได้รับยาเหล่านี้ นอกจากนี้ยังได้ทดสอบยา artemeter ซึ่งเป็นยาที่สามารถรักษาได้ทั้งเชื้อมาลาเรียและพยาธิใบไม้โลหิต แต่ยังไม่มีรายงานผลของยาชนิดนี้ต่อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจี๊ด ในการทดลองได้มีการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนระยะที่ 3 ขั้นปลายของพยาธิตัวจี๊ดที่ได้จากตับของปลาไหล (*Fluta alba*) โดยเพาะเลี้ยง

ตัวอ่อนระยะที่ 3 ขั้นปลายของพยาธิตัวจี๊ด 20 ตัวใน petri dish ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 35 มม. มีปริมาณน้ำยาเลี้ยงเชื้อ 2 มล. ประกอบด้วย RPMI-1640 และ 10% fetal calf serum ที่อุณหภูมิ 37^{o}C ใน 5% CO_2 แต่เนื่องจากยาทั้ง 3 ชนิดต้องละลายด้วยสารละลายที่ประกอบด้วย 5% methanol ดังนั้นในกลุ่มควบคุมจึงจำเป็นต้องมีจำนวน 2 กลุ่มคือกลุ่มที่ 1 เพาะเลี้ยงตัวอ่อนระยะที่ 3 ขั้นปลายของพยาธิตัวจี๊ดในน้ำยาเลี้ยงเชื้อที่ได้กล่าวไว้ ส่วนกลุ่มที่ 2 ใช้น้ำยาเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับกลุ่มแรกแต่จะเติม 5% methanol จำนวน 10 มคล. สำหรับในกลุ่มที่มีการทดสอบยามีทั้งสิ้น 4 กลุ่มในแต่ละกลุ่มทำการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจี๊ดเช่นเดียวกับกลุ่มควบคุมที่ 1 และมีการเติมสารละลายของยาในขนาด 10 มคล. เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของยาดังต่อไปนี้ กลุ่มทดสอบที่ 1 เติมสารละลายของยา quinine hydrochloride ทำให้เกิดความเข้มข้นของยา 20 มคก. ต่อน้ำยาเลี้ยงเชื้อ 1 มล. กลุ่มทดสอบที่ 2 เติมสารละลายของยา artemeter ทำให้เกิดความเข้มข้นของยา 0.5 มคก. ต่อน้ำยาเลี้ยงเชื้อ 1 มล. กลุ่มทดสอบที่ 3 เติมสารละลายของยา albendazole sulfoxide ทำให้เกิดความเข้มข้นของยา 1 มคก. ต่อน้ำยาเลี้ยงเชื้อ 1 มล. และกลุ่มทดสอบที่ 4 เติมสารละลายของยา albendazole sulfoxide ทำให้เกิดความเข้มข้นของยา 2 มคก. ต่อน้ำยาเลี้ยงเชื้อ 1 มล. โดยมีปริมาณของตัวอ่อนระยะที่ 3 ขั้นปลายของพยาธิตัวจี๊ดจำนวน 20 ตัวต่อกลุ่ม น้ำยาเลี้ยงเชื้อและสารละลายของยาทำการเปลี่ยนใหม่ทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลานาน 21 วัน พบว่า ตัวอ่อนระยะที่ 3 ขั้นปลายของพยาธิตัวจี๊ด ในกลุ่มควบคุมทั้งสองกลุ่ม, กลุ่มที่สัมผัสกับยา quinine และกลุ่มที่สัมผัสกับยา artemeter มีการเคลื่อนไหวเช่นเดิมตลอดระยะเวลาการทดลอง ส่วนในกลุ่มที่สัมผัสกับยา albendazole ในขนาดความเข้มข้นของยา 1 และ 2 มคก. ต่อน้ำยาเลี้ยงเชื้อ 1 มล. มีการเคลื่อนไหวลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.05$)เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมเมื่อสัมผัสกับยานาน 11 และ 9 วันตามลำดับ อย่างไรก็ตามไม่พบว่ามีพยาธิในกลุ่มใดตายเมื่อสัมผัสกับยาครบ 21 วัน เมื่อนำตัวอ่อนระยะที่ 3 ขั้นปลายของพยาธิตัวจี๊ดในกลุ่มควบคุมที่เพาะเลี้ยงครบ 21 วัน และ กลุ่มที่สัมผัสกับยาเป็นเวลา 21 วัน มาทำการตรวจสอบผิวภายนอกของพยาธิด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด โดยทำให้คงสภาพ (fixed) เป็นเวลา 24 ชม. ใน 2.5% glutaraldehyde ที่อุณหภูมิ 4 ^{0}C หลังจากนั้นทำให้คงสภาพใน 1% osmium tetroxide เป็นเวลา 1 ชม. ตามด้วยการดึงน้ำ

ออกจากตัวอย่างโดยใช้ ethanol ความเข้มข้นต่างๆกันและทำการตรวจสอบผิวภายนอกของพยาธิด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด พบพยาธิสภาพเกิดขึ้นเฉพาะในกลุ่มที่มีการสัมผัสกับยา albendazole sulfoxide เท่านั้น การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเมื่อสัมผัสกับยาในขนาดความเข้มข้น 1 และ 2 มคก. ต่อน้ำยาเลี้ยงเชื้อ 1 มล. ไม่แตกต่างกัน โดยพบว่ามีการหลุดลอกของผิวนอกส่วนคอของพยาธิ รูปร่างของหนามเปลี่ยนไปโดยที่ปลายหนามไม่แหลม และมีการเรียงตัวของหนามไม่เป็นระเบียบ แต่สำหรับในส่วนหัวและส่วนท้ายของตัวพยาธิไม่พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญ การเปลี่ยนแปลงในส่วนคอของพยาธิจากการสัมผัสกับยา albendazole sulfoxide อาจทำให้พยาธิมีการเคลื่อนไหวได้น้อยลงและทำให้ผู้ป่วยมีอาการบวมลงลงได้ การที่ตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิสัมผัสกับยา albendazole sulfoxide เป็นระยะเวลา 21 วันไม่ทำให้พยาธิตายได้ในช่วงเวลาดังกล่าว แต่จากที่มีพยาธิสภาพที่รุนแรงในส่วนคอของพยาธิและการเคลื่อนไหวที่ลดลงมากขึ้น ยา albendazole sulfoxide อาจทำให้พยาธิอ่อนกำลังลงและตายในเวลาต่อมาได้

Thesis Title	*In vitro* effect of Albendazole, Quinine and Artemeter on Advanced Third-Stage Larvae of *Gnathostoma Spinigerum* (Spirurida: Gnathostomatidae)	
Author	Miss. Piyanat Khawla-or	
M.S.	Parasitology	
Examining committee.	Assistant Prof. Kom Sukontason, M.D., Ph.D.	Chairman
	Associate Prof. Udom Chaithong, Ph.D.	Member
	Associate Prof. Pramote Vanitthanakom, Dr.rer.nat.	Member
	Kabkaew Sukontason, Ph.D.	Member
	Amnat Rojanapaibul, Ph.D.	Member

Abstract

Gnathostomiasis is the disease caused by the migration of third-stage larva of *Gnathostoma spinigerum* through human subcutaneous tissue and internal organs. To date, there is no appropriate treatment of this disease, however, quinine and albendazole may be able to reduce the migratory swelling in patients. Moreover, albendazole at very high dose were proved to reduce the worm load in animal model. This study were investigated by using *in vitro* study to prove the efficacy of these two drugs to the third-stage larvae of this parasite in the concentration nearly the same as in patients. Albendazole sulfoxide, the only active metabolite of albendazole, was used instead of albendasole itself. Artemether, the antimalarial and anthelmintic of schistosomiasis, were also studied. Twenty third-stage larvae of *G. spinigerum* collected from the liver of fresh water eel (*Fluta alba*) were cultured in two 35 mm diameter sterile petri dish (20 larvae per dish) with 2 mL of culture medium of RPMI-1640 with 10% fetal calf serum set at 37°C under 5% CO_2 in air. In the second control group (20 larvae per dish for 2 dishes), 10 µL of 5% methanol were added in the culture medium for the sake of all tested drugs must be dissolved in this solvent. In four experimental groups, the same amount of larvae were used and the stock solvent of tested drugs were added instead of 5% methanol in the culture medium. The concentration of drugs in the first to fourth experimental groups are quinine hydrochloride 20 µg/mL, artemeter 0.5 µg/mL, and

albendazole sulfoxide 1 and 2 μg/mL, respectively. The culture medium and tested drugs were changed every 24 hours for 21 consecutive days at the same time of larval movement recording. The third-stage larvae of *G. spinigerum* in both control groups, quinine group and artemether group moved actively for all 21 days. In albendazole 1 and 2 μg/mL groups, the movement were significantly reduced after 11 and 9 days exposed to the drugs, respectively ($P< 0.05$), however, no larvae died. After 21 day exposed to the drugs, all larvae were fixed with 2.5 % glutaraldehyde at $4^{\circ}C$ for 24 hours and postfixed with osmium tetroxide for 1 hours and dehydrated in the gradual concentration of ethyl alcohol. All specimens were restudied under scanning electron microscope. Only the larvae in albendazole sulfoxide groups showed the marked changes on the surface morphology especially at the neck of the larvae. The tip of spines were blunted and the arrangement were not the same as normal pattern. The changes after exposed to these two concentrations of albendazole sulfoxide were nearly the same. In addition, there was not significant change in the other part of parasite. The changes at the neck would reduce the movement of parasites and also may reduce the swelling in patients. The exposure to albendazole sulfoxide of 1 and 2 μg/mL for consecutive 21 days could not kill the parasite, furthermore, they might be exhausted and dead after this period of time.