

การศึกษากลไกการทำลายไตของพิษและสารแยกส่วนจากพิษงูแมวเซา



นางสาวรัชยา สวัสดิ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PATHOPHYSIOLOGY OF KIDNEY INJURY INDUCED BY RUSSELL'S VIPER  
VENOM AND FRACTIONS



Miss Ratchaya Sawatdee

ศูนย์วิทยุทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Medical Science

Faculty of Medicine

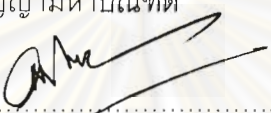
Chulalongkorn University

Academic Year 2010


Copyright of Chulalongkorn University

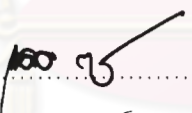
|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| หัวข้อวิทยานิพนธ์               | การศึกษากลไกการทำลายไตของพิษและสารแยกส่วนจาก<br>พิษงูแมวเซา |
| โดย                             | นางสาวรัชยา สวัสดิ์   |
| สาขาวิชา                        | วิทยาศาสตร์การแพทย์   |
| อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก | รองศาสตราจารย์นายแพทย์ เถลิงศักดิ์ กาญจนบุษย์               |
| อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม | นางนฤมล พักมณี  |

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน  
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

  
..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ อดิศร ภัทราดุลย์)

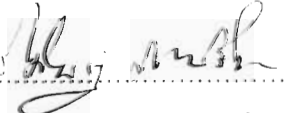
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

  
..... ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิงวิไล ชินธเนศ)

  
..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ เถลิงศักดิ์ กาญจนบุษย์)

  
..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(นางนฤมล พักมณี)

  
..... กรรมการ  
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. ณรงค์ศักดิ์ ชัยบุตร)

  
..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ วิศิษฎ์ สิตปรีชา)

รัชยา สวัสดิ์ : การศึกษากลไกการทำลายไตของพิษและสารแยกส่วนจากพิษงูแมวเซา.  
(PATHOPHYSIOLOGY OF KIDNEY INJURY INDUCED BY RUSSELL'S VIPER  
VENOM AND FRACTION.) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รองศาสตราจารย์  
นายแพทย์ เถลิงศักดิ์ กาญจนบุษย์, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : นางนฤมล พักมณี,  
78 หน้า.

ปัญหาการถูกกัดเป็นปัญหาที่พบได้บ่อยในแถบประเทศเขตร้อนเขตรึ่งร้อนซึ่งประกอบไปด้วยประเทศไทย ปัญหาที่สำคัญที่สุดในผู้ถูกงูแมวเซากัดคือการเกิดภาวะไตวายเฉียบพลัน ทั้งนี้ยังไม่ทราบสาเหตุการเกิดที่แน่ชัด ซึ่งสันนิษฐานว่ามีความสัมพันธ์มาจากผลของพิษงูแมวเซาที่มีต่อร่างกาย แต่อย่างไรก็ตามในการศึกษาทดลองครั้งนี้มุ่งเน้นการศึกษาผลของพิษงูแมวเซาโดยตรงต่อการเป็นพิษต่อไตโดยใช้ HK-2 ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์จากเซลล์บุท่อไตเป็นต้นแบบ

ทดสอบขนาดของพิษงูแมวเซาและระยะเวลาที่เซลล์บุท่อไตได้รับพิษ ในการศึกษาการเป็นพิษของพิษงูแมวเซาต่อเซลล์บุท่อไต โดยตรวจสอบจากการบาดเจ็บ การตายของเซลล์บุท่อไต ตลอดจนการเกิด necrosis cell ของเซลล์บุท่อไต ด้วยวิธี trypan blue exclusion assay, การหั่งเอนไซม์ lactate dehydrogenase (LDH), propidium iodide assay, และ Annexin V/propidium iodide-labeling flow cytometry ศึกษาการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ด้วย transmission electron microscopy และศึกษา sodium/hydrogen exchanger ด้วย western blot analysis หลังจากนั้นตรวจสอบผลของสารแยกส่วนของพิษงูแมวเซาเปรียบเทียบกับพิษงูแมวเซา ที่มีต่อเซลล์ด้วยเทคนิคการวัดระดับเอนไซม์ LDH และ sodium/hydrogen exchanger ผลปรากฏว่า HK-2 cell มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปลี่ยนแปลงไป เซลล์มีอัตราการตายมากขึ้นเมื่อได้รับพิษที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่มากขึ้น โดยการตายเป็นแบบ necrosis และผลจากการทดสอบสารแยกส่วนจากพิษงูแมวเซาเปรียบเทียบกับพิษงูแมวเซา พบว่าสารแยกส่วนที่สองซึ่งมีปฏิกิริยาของเอนไซม์ phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) สูงที่สุด ให้ผลการทดสอบที่มีค่าใกล้เคียงกับพิษงูแมวเซามากที่สุด

พิษงูแมวเซามีผลต่อการบาดเจ็บของเซลล์บุท่อไตที่ dose และ time dependence จากการศึกษาทดลองนี้ PLA<sub>2</sub> ให้ผลทดสอบที่คล้ายกับพิษงูแมวเซา แต่อย่างไรก็ตามควรจะยืนยันผลการทดลองด้วยอาการทางคลินิกว่า PLA<sub>2</sub> มีผลทำให้เกิดอาการไตวายเฉียบพลันเช่นเดียวกับการได้รับพิษงูแมวเซาหรือไม่

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ .....ลายมือชื่อ.....  
ปีการศึกษา 2553 .....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....  
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

## 5074868030 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS : RUSSELL'S VIPER VENOM / *DABOIA RUSSELLII SIAMENSIS* / RENAL EPITHELIAL CELLS

RATCHAYA SAWATDEE : PATHOPHYSIOLOGY OF KIDNEY INJURY INDUCED BY RUSSELL'S VIPER VENOM AND FRACTION. ADVISOR : ASSOCIATE PROFESOR TALERNGSAK KANJANABUCH, CO-ADVISOR : NARUMOL PAKMANEE, 82 pp.

Snakebite remains a common health problem in Topical region, including Thailand. The most serious complication of Russell's snakebite is acute renal failure (ARF). The pathogenesis of ARF is not clearly understood but seems to be related with systemic effect of the venom. Therefore, this study aimed to address the direct nephrotoxicity of the Russell's venom in HK-2, a human tubular, cell line.

HK-2 cell were subjected to injury by the Russell's viper venom (RVV) with time and dose variations. Cell injury, death, and necrosis were assessed by trypan blue exclusion assay under light microscopy, by lysosomal dehydrogenase (LDH) analysis in both supernatants and cell pellets, staining with propidium iodide (PI), and by annexin V/propidium iodide-labeling flow cytometry respectively. Detection of ultra-morphology changes by transmission electron microscopy (TEM) and sodium/hydrogen exchanger expression by western blot analysis. To characterize the particular cause of cell affect, the cell was exposure with toxin fractions. Cell injury and sodium transcellular were assessed. RVV caused tubular cell morphological changes by dose and time dependent. The toxins also caused tubular cell necrosis even at a very low dose. The highest phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) fraction showed the greatest effect similarly to crude venom.

RVV directly injured the tubular cells with dose and time dependent fashions. PLA<sub>2</sub> seems likely to cause major effect, however, it needs to be confirmed clinically whether it causes acute renal failure.

Field of Study : ..... Medical Science .....

Academic Year : ..... 2010 .....

Student's Signature *Ratchaya Sawatdee*

Advisor's Signature *Talerngsak Kanjanabuch*

Co-advisor's Signature *Narumol Pakmanee*

## กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณ รศ.นพ.เถลิงศักดิ์ กาญจนบุษย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้โอกาสในการศึกษาระดับมหาบัณฑิต พร้อมทั้งกรุณาให้คำแนะนำ คำปรึกษาอันมีประโยชน์ต่องานวิจัยนี้

ผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณนฤมล พัทมณี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ คำปรึกษาอันมีค่าต่อการศึกษาวิจัยในงานวิจัยชิ้นนี้ และตลอดจนให้ความกรุณาตรวจสอบแก้ไข ข้อบกพร่องเล่มวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ ประสาทวิชาความรู้ให้แก่ผู้วิจัย จนบรรลุวัตถุประสงค์ในการศึกษาวิจัยระดับปริญญา มหาบัณฑิต ในครั้งนี้

ขอขอบคุณทุนสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี ภายใต้โครงการสร้างกำลังคนเพื่อพัฒนาอุตสาหกรรมระดับปริญญาโท (สกว.- สสว.) และทุนจกกลนี้ จากมูลนิธิจกกลนี้นิธิ ที่ให้เงินสนับสนุนในการศึกษาวิจัยงานชิ้นนี้

ขอขอบคุณ คุณอรวรรณ แซ่โค้ว เจ้าหน้าที่สถานเสาวภา สภากาชาดไทย ที่กรุณาเอื้อเฟื้อ ให้คำแนะนำในการศึกษาวิจัยในผลงานแยกส่วนพิษงูแมวเซา

ขอขอบคุณ อ.ดร.สุภางค์ มณีศรี เลอกรวงศ์ ห้องปฏิบัติการกล้องอิเล็กตรอน และคุณ ปรีชา เรืองเวชวรชัย หัวหน้าห้องปฏิบัติการ ภาคพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย สำหรับคำแนะนำและกำลังใจตลอดระยะเวลาที่ผ่านมา

ขอขอบคุณเพื่อน พี่ น้อง ในศูนย์วิจัยโรคไตและความผิดปกติทางเมตาบอลิซึมอันได้แก่ คุณพรทิพย์สวรรค์ นวลทอง, คุณสิริกกุล กาญจนบุษย์, คุณพรเพ็ญ พนมวัลย์, คุณนัญญรี คำเกษ, คุณวศิน มนุษุประเสริฐ, คุณชวัญตา เพชรเผือก, คุณจตุพร ไทยเย็นวงศ์, คุณมารศรี พันธุ์ไพศาล, คุณวิไลพร อัมพวรรณ, คุณมัตติกา เกียรติวระโท และคุณศิริพร ตำราเรียง ที่คอยช่วยเหลือ ให้ กำลังใจ ชี้คิดทั้งในชีวิตและในงานวิจัยชิ้นนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในศูนย์วิจัยอปร. ชั้น 10 คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการปฏิบัติงานวิจัยชิ้นนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ทุกท่าน ที่กรุณาช่วยเหลือให้ คำแนะนำด้านทะเบียน และประมวลผลการศึกษาดังแต่แรกเข้าศึกษาจนกระทั่งสำเร็จการศึกษา สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณครอบครัว ที่เป็นทุกสิ่งทุกอย่างให้ในชีวิตเสมอมา

## สารบัญ

|   | หน้า |
|---|------|
| บทคัดย่อภาษาไทย.....                        | ง    |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....                     | จ    |
| กิตติกรรมประกาศ.....                        | ฉ    |
| สารบัญ.....                                 | ช    |
| สารบัญตาราง.....                            | ฌ    |
| สารบัญภาพ.....                              | ญ    |
| คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....              | ฎ    |
| บทที่ 1 บทนำ.....                           | 1    |
| ความสำคัญและที่มาของปัญหา.....              | 1    |
| คำถามงานวิจัย.....                          | 2    |
| วัตถุประสงค์งานวิจัย.....                   | 2    |
| สมมติฐานการวิจัย.....                       | 2    |
| ขอบเขตของงานวิจัย.....                      | 3    |
| ข้อตกลงเบื้องต้น.....                       | 4    |
| ข้อจำกัดของงานวิจัย.....                    | 4    |
| คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....            | 4    |
| คำสำคัญ.....                                | 5    |
| ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....              | 5    |
| วิธีดำเนินการวิจัย.....                     | 5    |
| ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลงานวิจัย.....        | 6    |
| บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... | 7    |
| แนวคิดและทฤษฎี.....                         | 7    |
| เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....         | 12   |
| บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....             | 14   |
| รูปแบบการวิจัย.....                         | 14   |
| เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....             | 14   |
| วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย.....        | 16   |
| สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....                | 17   |

| บทที่  | หน้า |
|--|------|
| วิธีดำเนินการวิจัย.....  | 20   |
| ขั้นตอนการหาค่า Median lethal dose (LD50) ของ lyophilized Russell's viper venom..... | 20   |
| ขั้นตอนการแยก Protein fraction.....  | 21   |
| ขั้นตอนการตรวจสอบ fraction ที่แยกได้.....  | 21   |
| การเพาะเลี้ยงเซลล์บู่ท่อไต.....  | 25   |
| ศึกษาการบาดเจ็บและการตายของเซลล์จากพิษงูแมวเซา ที่ Dose และ Time dependence .....    | 27   |
| การศึกษาผลของพิษงูแมวเซาที่ผลต่อระดับ minute injury .....                            | 30   |
| การเก็บรวบรวมข้อมูล.....   | 35   |
| การวิเคราะห์ข้อมูล.....  | 35   |
| บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....  | 36   |
| ผลการหาค่า Median lethal dose (LD50) ของ lyophilized Russell's viper venom.....      | 36   |
| ผลการแยก fraction.....   | 37   |
| ขั้นตอนการตรวจสอบ fraction.....  | 39   |
| ผลการเลี้ยง HK-2 cell.....   | 40   |
| ผลการบาดเจ็บและการตายของเซลล์จากพิษงูแมวเซาที่ Dose และ Time dependence .....        | 41   |
| ผลการศึกษาดose dependence.....   | 41   |
| ผลการศึกษา time dependence.....  | 47   |
| ผลการศึกษาผลของพิษงูแมวเซาที่ผลต่อระดับ minute injury .....                          | 53   |
| ผลการศึกษา Fraction ของพิษงูแมวเซา.....  | 61   |
| บทที่ 5 สรุปผลและวิจารณ์ผลการวิจัย.....  | 62   |
| สรุปผลการวิจัย.....  | 62   |
| อภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....  | 65   |
| รายการอ้างอิง.....   | 68   |
| ภาคผนวก.....   | 74   |
| ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....  | 82   |



## สารบัญตาราง

| ตารางที่ | หน้า  |
|----------|---|
| 1        | แสดง Scientific classification ของงูแมวเซา..... 8   |
| 2        | แสดงข้อมูลเฝ้าระวังโรค จากสำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข..... 9  |
| 3        | แสดงกลุ่มอายุประชากรที่ถูกรุกัดสูงสุด 3 ลำดับแรก..... 9   |
| 4        | แสดงอาชีพของประชากรที่ถูกรุกัดสูงสุด..... 9   |
| 5        | แสดงจังหวัดที่มีอัตราป่วยต่อแสนประชากรสูงสุด 5 ลำดับแรก..... 10   |
| 6        | แสดงภาคที่มีอัตราป่วยต่อแสนประชากรสูงสุด..... 10  |
| 7        | แสดงการเตรียมสารมาตรฐานในการทดสอบปฏิกิริยา protease enzyme..... 22  |
| 8        | แสดงการเตรียมสารตัวอย่างในการทดสอบปฏิกิริยา protease enzyme..... 23   |
| 9        | แสดงจำนวนหนูตายหลังจากได้รับพิษงูแมวเซาความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้ dilution factor=1.2..... 36  |
| 10       | แสดงปริมาณโปรตีนของแต่ละ fraction ด้วยวิธี Bradford protein assay .... 38   |
| 11       | แสดงผลการทดสอบปฏิกิริยาของ Protease & Metalloproteinase ในพิษงูแมวเซาแยกส่วน..... 39  |
| 12       | แสดงผลการทดสอบปฏิกิริยาของ Phospholipase A <sub>2</sub> ในพิษงูแมวเซาแยกส่วน..... 40  |
| 13       | แสดงปริมาณโปรตีน β-actin ที่ปรากฏขึ้น เมื่อใช้ sample ที่มีโปรตีนปริมาณ 150 µg และแสดงปริมาณโปรตีน NHE 3 ที่ปรากฏขึ้น เมื่อใช้ sample ที่มีโปรตีนปริมาณ 500 µg โดยใช้ค่า raw volume ที่คำนวณจาก Gene snap software (Gene Tools; Syngene, MD, USA) เป็นตัวเปรียบเทียบการมีปริมาณมากหรือน้อยของโปรตีน..... 57 |

## สารบัญภาพ

| ภาพที่   | หน้า |
|--|------|
| 1 แสดงขอบเขตของการวิจัย.....   | 3    |
| 2 แสดงภาพของงูแมวเซาสยาม ( <i>D. russelii siamensis</i> ).....   | 7    |
| 3 แสดงโครมาโตแกรม (chromatogram) ของพิษงูแมวเซา 100 mg ซึ่งแยกโดยการผ่าน Sephadex G-75 (superfine).....  | 38   |
| 4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD กับปริมาณกรดอะมิโนมาตรฐาน Tyrosine โดยวิธี Sigma's Non-specific Protease Activity Assay – Casein as a Substrate .....  | 39   |
| 5 แสดง HK-2 cell ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วย DMEM supplemented with 10% FBS, 100 IU/ml of penicillin/streptomycin เพาะเลี้ยงในตู้บัพ 37 ° C ที่มี water vapor saturated 5% CO <sub>2</sub> /95% air ซึ่งโตประมาณ 90% ก่อนนำมาทดสอบกับพิษงูแมวเซา.....              | 41   |
| 6 แสดงการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เพาะเลี้ยง HK-2 cell เมื่อทดสอบด้วยพิษงูแมวเซาที่ความเข้มข้น 10, 50, 100, 500 และ 1,000 µg/ml บ่มเพาะเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค Trypan blue staining โดยการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ (light microscope; X200).....         | 42   |
| 7 แสดงปริมาณการตายของเซลล์เพาะเลี้ยง HK-2 cell เมื่อทดสอบด้วยพิษงูแมวเซาที่ความเข้มข้น 10, 50, 100, 500 และ 1,000 µg/ml บ่มเพาะเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค Propidium iodide staining โดยการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent microscope; X200)..... | 43   |
| 8 กราฟแสดงอัตราการตายของเซลล์เพาะเลี้ยง HK-2 cell เปรียบเทียบระหว่างการย้อมสี trypan blue และ propidium iodide ของ dose dependence.....  | 44   |
| 9 กราฟแสดงค่า lactate dehydrogenase (LDH) หลังจากเซลล์เพาะเลี้ยง HK-2 cell ได้รับการบ่มเพาะด้วยพิษงูแมวเซาที่มีความเข้มข้น 10, 50, 100, 500 และ 1,000 µg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เปรียบเทียบระหว่าง supernatant และ sediment.....                       | 45   |
| 10 กราฟแสดงอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์เพาะเลี้ยง HK-2 cell หลังจากเซลล์ได้รับการบ่มเพาะด้วยพิษงูแมวเซาที่มีความเข้มข้น 10, 50, 100, 500 และ 1,000 µg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....  | 46   |

| ภาพที่   | หน้า |
|--|------|
| 11 กราฟแสดงลักษณะการตายของเซลล์เพาะเลี้ยง HK-2 cell หลังจากเซลล์ได้รับการบ่มเพาะด้วยพิษงูแมวเซาที่มีความเข้มข้น 10, 50, 100, 500 และ 1,000 µg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....  | 46   |
| 12 แสดงการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เพาะเลี้ยง HK-2 cell เมื่อทดสอบด้วยพิษงูแมวเซาเข้มข้น 1,000 µg/ml บ่มเพาะที่เวลา 6, 8, 10, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค Trypan blue staining โดยการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ (light microscope; X200).....          | 47   |
| 13 แสดงปริมาณการตายของเซลล์เพาะเลี้ยง HK-2 cell เมื่อทดสอบด้วยพิษงูแมวเซาเข้มข้น 1,000 µg/ml บ่มเพาะที่เวลา 6, 8, 10, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค Propidium iodide staining โดยการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescent microscope; X200) ..... | 49   |
| 14 กราฟแสดงอัตราการตายของเซลล์เพาะเลี้ยง HK-2 cell เปรียบเทียบระหว่างการย้อมสี trypan blue และ propidium iodide ของ time dependence.....   | 50   |
| 15 กราฟแสดงค่า lactate dehydrogenase (LDH) หลังจากเซลล์เพาะเลี้ยง HK-2 cell ได้รับการบ่มเพาะด้วยพิษงูแมวเซาที่มีความเข้มข้น 100 µg/ml ณ เวลา 0, 3, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เปรียบเทียบระหว่าง supernatant และ sediment.....                     | 51   |
| 16 กราฟแสดงการมีชีวิตรอดของเซลล์ หลังจากเซลล์ได้รับการบ่มเพาะด้วยพิษงูที่มีความเข้มข้น 500 µg/ml ณ เวลา 0, 3, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง.....  | 52   |
| 17 กราฟแสดงลักษณะการตายของเซลล์ หลังจากเซลล์ได้รับการบ่มเพาะด้วยพิษงูที่มีความเข้มข้น 500 µg/ml ณ เวลา 0, 3, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง.....   | 52   |
| 18 แสดงการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เพาะเลี้ยง HK-2 cell ด้วย transmission electron microscopy เมื่อใช้พิษงูแมวเซาเข้มข้น 100 µg/ml บ่มเพาะนาน 15 นาที.....   | 54   |
| 19 แสดงการปรากฏของโปรตีนของเซลล์เพาะเลี้ยง HK-2 cell เมื่อทดสอบด้วยพิษงูแมวเซาที่มีความเข้มข้นต่างๆ บ่มเพาะนาน 24 ชั่วโมง ต่อแอนติบอดี β-actin และ NHE 3.....  | 56   |
| 20 กราฟแสดงค่า raw volume ที่คำนวณจาก Gene snap software (Gene Tools; Syngene, MD, USA) เป็นตัวเปรียบเทียบการมีปริมาณมากหรือน้อยของโปรตีน.....   | 58   |

| ภาพที่  | หน้า |
|---|------|
| 21 กราฟแสดง ratio เปรียบเทียบปริมาณโปรตีน $\beta$ -actin และ NHE 3 ที่ปรากฏขึ้นเมื่อทดสอบกับพิษงูแมวเซา.....  | 59   |
| 22 กราฟแสดงค่า lactate dehydrogenase (LDH) เมื่อเซลล์เพาะเลี้ยง HK-2 cell ได้รับการบ่มเพาะด้วย crude และ fractions ของพิษงูแมวเซา ที่มีความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ นาน 24 ชั่วโมง คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เปรียบเทียบระหว่าง supernatant และ sediment..... | 60   |



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

| คำย่อ              | ความหมาย   |
|--------------------|--|
| APS                | Ammonium Persulfate  |
| BSA                | Bovine serum albumin   |
| ddH <sub>2</sub> O | Double distilled water   |
| DMEM               | Dulbecco's modified eagle medium with 4,500 mg/l glucose and L-glutamin, without sodium bicarbonate, powder, cell culture tested |
| DMSO               | Dimethyl sulfoxide   |
| EDTA               | Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dehydrate  |
| FBS                | Fetal bovine serum   |
| FITC               | Fluorescein isothiocyanate   |
| HK-2 cell          | Human kidney proximal tubular cell   |
| K-SFM              | Keratinocyte complete media  |
| LDH                | Lactase dehydrogenase  |
| MMC                | Mitomycin C  |
| NHE3               | Sodium/hydrogen exchanger 3  |

|                  |                                       |
|------------------|---------------------------------------|
| OD               | Optical density                       |
| PBS              | Phosphate buffered saline             |
| PTC              | Proximal tubular cell                 |
| PI               | Propidium iodide                      |
| PLA <sub>2</sub> | Phospholipase A <sub>2</sub>          |
| PVDF membrane    | Polyvinylidene fluoride membrane      |
| RVV              | Russell's viper venom                 |
| SDS              | Sodium dodecyl sulphate               |
| TBS              | Tris-buffered saline                  |
| TBS-T            | 0.1% Tween-20 in Tris-buffered saline |
| TCA              | Trichloroacetic acid reagent          |
| TEM              | Transmission electron microscope      |

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 1

## บทนำ

### ความสำคัญและที่มาของปัญหา (Background and Rationale)

ปัญหาพิษกัดยังเป็นปัญหาที่สำคัญทางสาธารณสุขของประเทศไทย ซึ่งเป็นประเทศเกษตรกรรม งูแมวเซา (Russell's viper, *Daboia russelii siamensis*) เป็นปัญหาต่อชาวไร่ชาวนาโดยตรง พิษของงูแมวเซาทำให้เกิดความผิดปกติแบบทั่วร่างกาย (systemic effect) และแบบเฉพาะที่ (local effect) เป็นพิษต่อระบบการไหลเวียนโลหิตซึ่งได้แก่หลอดเลือดและหัวใจ ก่อให้เกิดเลือดไม่แข็งตัว เม็ดเลือดแดงแตก ไตวายเฉียบพลัน เป็นต้น พยาธิสภาพที่สำคัญของผู้ถูกงูแมวเซากัดที่นำไปสู่การเสียชีวิตคือ ภาวะไตวายชนิดเฉียบพลัน

งูแมวเซาเป็นงูพิษในกลุ่ม Viperidae น้ำพิษมีลักษณะสีเหลืองใส ประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิด อย่างน้อย 26 ชนิดเป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติของเอนไซม์ เช่น เอนไซม์โปรตีนเอส (protease), ฟอสโฟไลเปส เอช<sub>2</sub> (phospholipase A<sub>2</sub>), ฟอสโฟไดเอสเทอเรส (phosphodiesterase), ฟอสโฟโมโนเอสเทอเรส (phosphomonoesterase), อะดีโนซีนไตรฟอสฟาเตส (adenosine triphosphatase), แอล-อะมิโนออกซิเดส (L-amino acid oxidase) และนิวคลีโอไซด์ (5-nucleosidase) เป็นต้น ผู้ถูกงูแมวเซากัดส่วนใหญ่จะมีอาการเลือดออกผิดปกติ เนื่องจากเอนไซม์ของพิษงูแมวเซามีคุณสมบัติเป็น thromboplastin-like กล่าวคือ กระตุ้น factor X และเปลี่ยน prothrombin ให้กลายเป็น thrombin ใน common pathway ของการแข็งตัวของเลือด (coagulation cascade) สาร thrombin ที่เกิดขึ้นจะเปลี่ยน fibrinogen ให้เป็น fibrin และไปกระตุ้น factor XIII เพื่อก่อให้ไฟบรินที่เกิดขึ้นเชื่อมรวมตัวกันอย่างแน่นหนา (cross-linked fibrin) นำมาซึ่งการเกิดเป็นลิ่มเลือดทั่วร่างกายของผู้ถูกกัด การที่เลือดแข็งตัวเป็นลิ่มนี้ยังส่งผลให้ปริมาณปัจจัยการจับลิ่ม โดยเฉพาะอย่างยิ่ง factor II,V,X และเกล็ดเลือดในร่างกายของผู้ถูกกัดถูกใช้ไปจนหมด จนก่อให้เกิดภาวะเลือดออกผิดปกติ

ภาวะไตวายชนิดเฉียบพลันเป็นพยาธิสภาพที่พบได้บ่อยและเป็นต้นเหตุสำคัญที่ทำให้ผู้ที่ถูกงูแมวเซากัดสูญเสียชีวิต เชื่อว่าพยาธิกำเนิดของไตวายเฉียบพลันเป็นผลทางอ้อมจากการที่ผู้ที่ถูกงูกัดสูญเสียเลือดหรือมีความดันโลหิตตก อย่างไรก็ตามพบว่าผู้ป่วยเป็นจำนวนไม่น้อยที่มีภาวะไตวายเฉียบพลันโดยที่ไม่มีการสูญเสียเลือดและความดันโลหิตเป็นปกติ และจากการศึกษาในระยะเบื้องต้นของกลุ่มพบว่าพิษงูสามารถทำลายเซลล์บุท่อไตของสัตว์ทดลองได้โดยตรง ดังนั้น

การศึกษาพยาธิกำเนิดในเชิงลึก และการศึกษาความเป็นพิษในเซลล์บุท่อไตของมนุษย์จะนำมาซึ่งหนทางในการป้องกันไม่ให้ผู้ที่ถูกงูแมวเซากัดเกิดภาวะไตวายเฉียบพลัน และการสูญเสียชีวิต

### คำถามงานวิจัย (Research questions)

#### คำถามหลัก (Primary research question)

ส่วนใดของพิษงูแมวเซาที่มีส่วนในการทำลายเซลล์บุท่อไต

### วัตถุประสงค์ของงานวิจัย (Objectives)

1. ศึกษาลักษณะการทำลายเซลล์บุท่อไตจากพิษของงูแมวเซา
2. ศึกษาลักษณะการทำลายเซลล์บุท่อไตจากสารแยกส่วนจากงูแมวเซา

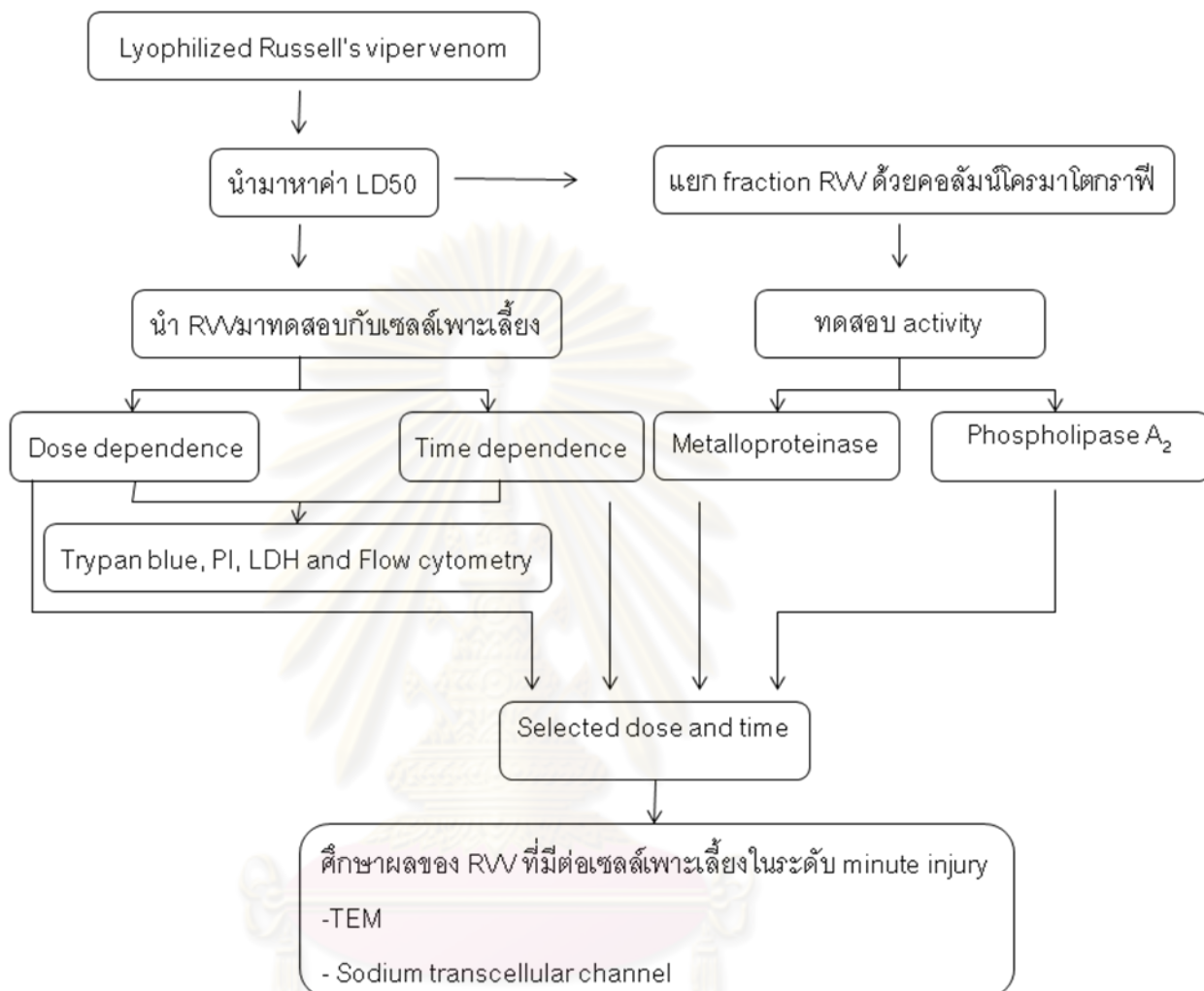
### สมมติฐานการวิจัย (Hypothesis)

การที่เซลล์ไตได้รับบาดเจ็บนั้นมาจากสารพิษแยกส่วนบางชนิดในพิษของงูแมวเซา เช่น เอนไซม์เมทัลโลโปรตีนเนส (metalloproteinase) และฟอสโฟไลเปส เอทู (phospholipase A<sub>2</sub>)

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ขอบเขตของการวิจัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 1 แสดงขอบเขตของการวิจัย

## ข้อตกลงเบื้องต้น

ไม่มี

## ข้อจำกัดของการวิจัย

เนื่องจากพิษงูแมวเซาแห้งได้มาจากการรีดพิษจากงูหลายตัวมารวมกันแล้วนำมาทำให้แห้งพร้อมกันในครั้งเดียว ทำให้เป็นพิษรุ่นการผลิตเดียวกัน เพื่อให้มีองค์ประกอบของพิษเหมือนกันทั้งหมด ในการทดลองครั้งนี้ต้องการใช้พิษงูเป็นปริมาณมาก ดังนั้นจึงต้องใช้จำนวนงูเป็นจำนวนหลายตัว โดยงูแต่ละตัวให้น้ำพิษต่อการรีดแต่ละครั้ง 1-2 มิลลิลิตร และในขณะที่ขอความอนุเคราะห์ทางสถานเสาวภา สภากาชาดไทย ให้ช่วยทำการผลิตพิษงูให้ นั้น ทางสถานเสาวภา มีปริมาณงูแมวเซาไม่เพียงพอต่อการผลิตพิษงูแมวเซาแห้ง จึงต้องใช้ระยะเวลาในการทำการผลิตพิษที่เป็นจำนวนรุ่นเดียวกัน และอีกประการหนึ่งคือเนื่องจากโครงการวิจัยนี้ใช้เซลล์เพาะเลี้ยงชนิดเฉพาะ คือเซลล์บุท่อไตเป็นหลัก เซลล์เพาะเลี้ยงชนิดนี้เมื่อสัมผัสถูกพิษจะลอกหลุดออกจากกัน ดังนั้นจึงต้องทำการทดลองครั้งละไม่มากต่อการทดลอง มิฉะนั้นจะให้ค่าที่ไม่ถูกต้อง เนื่องจากมีจำนวนเซลล์หลุดหายไป ทำให้มีค่าต่างที่วัดมีค่าน้อยกว่าความเป็นจริง

## คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

พิษงูแมวเซา หมายถึง น้ำพิษของงูแมวเซา มีลักษณะสีเหลืองใส ประกอบไปด้วยเอนไซม์หลายชนิด

สารพิษแยกส่วนจากพิษงูแมวเซา หมายถึง ส่วนของโปรตีนหลายชนิดอย่างน้อย 26 ชนิด เป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติของเอนไซม์ เช่น เอนไซม์เมทัลโลโปรตีนเอส (metalloproteinase) และ ฟอสโฟไลเปส เอทู (phospholipase A<sub>2</sub>)

เซลล์ไลน์ HK-2 cell หมายถึง เซลล์เพาะเลี้ยงที่ดัดแปลงมาจากเซลล์ไตของมนุษย์ส่วน proximal tubular cell (PTC) ให้ไม่มีวันตายด้วยการ transduction ยีน HPV 16 E6/E7

## คำสำคัญ

Russell's viper venom

*Daboia russelii siamensis*

Renal epithelial cells

## ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ข้อมูลเกี่ยวกับกลไกการทำลายไตของพิษและสารแยกส่วนจากงูแมวเซา
2. ได้ความรู้และข้อมูลซึ่งนำไปสู่การยาตัวใหม่ที่มีคุณสมบัติป้องกันไม่ให้ไตบาดเจ็บจากพิษงูแมวเซา

## วิธีดำเนินการวิจัย

1. พิษงูแมวเซาชนิดผงแห้ง (Crude venom)
2. สกัดแยกองค์ประกอบของพิษงูแมวเซาที่ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี
3. ทำการเพาะเลี้ยง HK-2 cell (human proximal cell)
4. ทดลองความเป็นพิษของพิษงูแมวเซาโดยพิจารณาจากปริมาณ cell injury โดยวิธี LDH assays, cell necrosis และ apoptosis ที่ตรวจนับด้วยวิธี Annexin V-labeling flow cytometry เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงขนาดของพิษ (0-1,000 µg/ml) และระยะเวลาในการสัมผัสพิษ (0-24 hours)
5. ศึกษาความเป็นพิษของพิษงูแมวเซาในระดับความเข้มข้นที่มีผลต่อเซลล์เพาะเลี้ยง โดยตรวจลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์อย่างละเอียด (minute injury) ด้วยเทคนิค transmission electron microscopy และ sodium transcellular
6. ศึกษาหากกลไกการบาดเจ็บของพิษงูต่อเซลล์บุท่อไต โดยใช้ protein fraction (metalloproteinase และ phospholipase A<sub>2</sub>) ที่ได้จากการสกัดจาก crude venom
8. รวบรวมข้อมูล
9. วิเคราะห์ข้อมูลโดยการวิเคราะห์ทางสถิติ
10. สรุปและจัดทำรายงานผลการวิจัย

### ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

1. ศึกษาความพิษของพิษงูแมวเซาที่มีต่อเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยการวัดระดับการบาดเจ็บของเซลล์ด้วยการหั่งเอนไซม์ lactase dehydrogenase การตายของเซลล์แบบ necrosis และ apoptosis ด้วยการตรวจนับด้วยวิธี Annexin V-labeling flow cytometry และระดับของ sodium transcellular channel ด้วยวิธี western blot analysis
2. ศึกษาความเป็นพิษของ protein fraction (metalloproteinase และ phospholipase A<sub>2</sub>) ที่ได้จากการสกัดจากพิษงูแมวเซาที่มีต่อเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยการวัดระดับการบาดเจ็บของเซลล์ด้วยการหั่งเอนไซม์ lactase dehydrogenase และระดับของ sodium transcellular channel ด้วยวิธี western blot analysis



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### แนวคิดและทฤษฎี

##### ลักษณะของงูแมวเซา

เป็นงูบก หัวสามเหลี่ยม ลำตัวอ้วนสั้น หางสั้น เวลาตกใจมักขดตัวเตรียมสู้และระวังตัว พร้อมทั้งทำเสียงขู่คล้ายแมวแทนที่จะเลื้อยหนี เป็นงูที่ฉกกัดได้รวดเร็วแทบไม่ทันรู้ตัวทั้ง ๆ ที่ขดตัวอยู่ในลักษณะปกติ เป็นงูสีน้ำตาลอ่อนอมเทา มีเกล็ดสีชมพูแซมบริเวณสีข้าง มีลายลักษณะทรงกลมสีน้ำตาลเข้มตลอดทั้งตัว เป็นงูพิษทางระบบโลหิต [8]



รูปที่ 2 แสดงภาพของงูแมวเซาสยาม (*D. russellii siamensis*) [3]

##### ถิ่นอาศัย, อาหาร

พบมากที่ ธนบุรี นนทบุรี สระบุรี ออยุธยา อ่างทอง สมุทรปราการ ลพบุรี สิงห์บุรี และนครสวรรค์

งูแมวเซากินหนู กบ เขียด จิ้งเหลน กิ้งก่า แย้ [8]

##### พฤติกรรม, การสืบพันธุ์

ชอบอยู่ตามที่ราบแห้ง ๆ เขิงเขาที่เป็นดินปนทราย ตามที่ดอน บางทีพบตามซอกหิน โพงดิน ใต้กอหญ้าใหญ่ ๆ ไม่ชอบย้ายที่อยู่บ่อย ๆ ปกติไม่เลื้อยขึ้นต้นไม้ ออกหากินไม่ไกลจากที่อยู่ เชื่องช้าไม่ปราดเปรียว ดู ไม่ชอบน้ำส่วนใหญ่ออกหากินเวลากลางคืน แต่ในที่เย็น ๆ กลางวันก็ออกหากินด้วย

งูแมวเซาออกลูกเป็นตัว ครั้งละประมาณ 20-30 ตัว [8]

ตารางที่ 1 แสดง Scientific classification ของงูแมวเซา [3]

| Scientific classification ของงูแมวเซา |                              |
|---------------------------------------|------------------------------|
| Kingdom                               | Animalia                     |
| Phylum                                | Chordata                     |
| Subphylum                             | Vertebrata                   |
| Class                                 | Reptilia                     |
| Order                                 | Squamata                     |
| Suborder                              | Serpentes                    |
| Family                                | Viperidae                    |
| Subfamily                             | Viperinae                    |
| Genus                                 | <i>Daboia</i>                |
| Species                               | <i>D. russelii</i>           |
| Subspecies                            | <i>D. russelii siamensis</i> |

### ส่วนประกอบของน้ำพิษงูแมวเซา

ประกอบด้วยน้ำร้อยละ 80-90 มีสีเหลืองของ flavin compound, โปรตีนและอนุพันธ์ของโปรตีน, carbohydrates, glycoproteins, lipids, biogenic amines, อีออนของโลหะบางชนิด และกรดอะมิโนอิสระอื่น

งูแมวเซาจัดว่าเป็นงูพิษที่มีค่าความรุนแรงของพิษสูง โดยมีค่า Lethal doses (LD50) สูงถึง 0.03 mg/kg mouse โดยเฉลี่ย

### อุบัติการณ์โรค

งูกัดเป็นปัญหาที่พบได้ทั่วโลก แต่พบบ่อยในประเทศเขตร้อน จำนวนผู้ที่ได้รับพิษประมาณ 421,000 คน และมีผู้เสียชีวิตจากงูกัดประมาณ 20,000 คนต่อปี แต่นักวิจัยได้คาดการณ์ว่าสามารถมีผู้ที่ได้รับพิษสูงถึง 1,841,000 คน และสามารถมีผู้เสียชีวิตได้สูงถึง 94,000 คน โดยเฉพาะพื้นที่บริเวณทะเลทรายซาฮารา ทวีปแอฟริกา เอเชียใต้และเอเชียตะวันออกเฉียง

เฉียดได้ และประเทศอินเดียเป็นประเทศที่คาดการณ์ว่ามีอัตราผู้ที่ได้รับพิษและเสียชีวิตมากที่สุดในโลก (www.who.int)

ข้อมูลจากสำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข ข้อมูลเฝ้าระวังโรค ปี 2551 และ 2552 ดังแสดงในตารางที่ 2-6 [6], [7]

ตารางที่ 2 แสดงข้อมูลเฝ้าระวังโรค จากสำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข

| ข้อมูลเฝ้าระวังโรค        | ปี 2551 | ปี 2552 |
|---------------------------|---------|---------|
| จำนวนผู้ป่วย (คน)         | 7,835   | 6,772   |
| อัตราป่วย (ต่อแสนประชากร) | 12.43   | 10.74   |
| จำนวนผู้เสียชีวิต (คน)    | 2       | 1       |

ตารางที่ 3 แสดงกลุ่มอายุประชากรที่ถูุกงักัดสูงสุด 3 ลำดับแรก

| กลุ่มอายุ (ปี) | ปี 2551 (ต่อแสนประชากร) | ปี 2552 (ต่อแสนประชากร) |
|----------------|-------------------------|-------------------------|
| ลำดับที่ 1     | 35-44 ปี (18.62%)       | 35-44 ปี (18.02%)       |
| ลำดับที่ 2     | 45-54 ปี (16.78%)       | 45-54 ปี (17.81%)       |
| ลำดับที่ 3     | 25-34 ปี (14.77%)       | 25-34 ปี (13.76%)       |

ตารางที่ 4 แสดงอาชีพของประชากรที่ถูุกงักัดสูงสุด

| อาชีพ (ร้อยละ) | ปี 2551 | ปี 2552 |
|----------------|---------|---------|
| เกษตรกรรม      | 31.1    | 31.3    |
| รับจ้าง        | 30.3    | 29.0    |
| ไม่ทราบอาชีพ   | 13.9    | 14.9    |

ตารางที่ 5 แสดงจังหวัดที่มีอัตราป่วยต่อแสนประชากรสูงสุด 5 ลำดับแรก

| จังหวัด    | ปี 2551 (ต่อแสนประชากร) | ปี 2552 (ต่อแสนประชากร) |
|------------|-------------------------|-------------------------|
| ลำดับที่ 1 | ประจวบคีรีขันธ์ (83.30) | ประจวบคีรีขันธ์(64.70)  |
| ลำดับที่ 2 | สมุทรสงคราม (64.36)     | สมุทรสงคราม (49.43)     |
| ลำดับที่ 3 | ตรัง (56.20)            | ตรัง (47.84)            |
| ลำดับที่ 4 | กระบี่ (53.82)          | ชัยนาท (38.86)          |
| ลำดับที่ 5 | สิงห์บุรี (49.15)       | สิงห์บุรี (38.49)       |

ตารางที่ 6 แสดงภาคที่มีอัตราป่วยต่อแสนประชากรสูงสุด

| ภาค        | ปี 2551 (ต่อแสนประชากร)      | ปี 2552 (ต่อแสนประชากร)      |
|------------|------------------------------|------------------------------|
| ลำดับที่ 1 | ภาคเหนือ (16.37)             | ภาคเหนือ (14.85)             |
| ลำดับที่ 2 | ภาคใต้ (15.59)               | ภาคใต้ (12.63)               |
| ลำดับที่ 3 | ภาคกลาง (8.92)               | ภาคกลาง (10.45)              |
| ลำดับที่ 4 | ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (7.99) | ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (7.99) |

### อาการไตวายเฉียบพลันหลังถูกงูพิษกัด

ความผิดปกติของไตจากงูกัดที่มีรายงานประกอบด้วยการตรวจพบโปรตีนในปัสสาวะ ปัสสาวะเป็นเลือด และไตวายเฉียบพลัน โปรตีนในปัสสาวะอาจมากถึง nephritic range งูพิษกัดทำให้เกิดไตวายเฉียบพลันได้ตั้งแต่ 5.5-26% งูพิษที่ทำให้เกิดไตวายเฉียบพลันประกอบด้วย งูทะเล, งูแมวเซา, งูหางกระดิ่ง, งูเขียวหางไหม้, งูเสียด, งู saw scale viper, งู puff adder, งู Bothrops jararaca, งู Ankirodon hypnale, งู boomslang, งู dugite, งู gwadar, และ งู Cryptophis nigrescens, งูพิษในตระกูล Viper กัดเป็นสาเหตุของไตวายเฉียบพลันที่พบบ่อยที่สุด การเกิดไตวายเฉียบพลันขึ้นอยู่กับปริมาณพิษงูที่ได้รับ ระยะเวลาตั้งแต่ถูกกัดจนถึงการได้รับเซรุ่มแก้พิษงู และการดูแลรักษาทั่วไป [9]



## อาการทางคลินิก

โดยทั่วไปอาการไตวายเฉียบพลันเกิดขึ้นในเวลา 24-72 ชั่วโมงหลังถูกงูกัด แต่อาจเกิดขึ้นเร็วภายใน 2-3 ชั่วโมงได้ พิษงู viper ทำให้เกิด intravascular hemolysis และ disseminated intravascular coagulation ในผู้ป่วยที่ถูกงู viper กัด และมีไตวายเฉียบพลันจะมีระดับ fibrin degradation products ในปัสสาวะสูงกว่าผู้ป่วยที่ถูกงู viper กัด และไตทำงานปกติ 50% ของผู้ป่วยไตวายเฉียบพลันจะเป็นชนิดปัสสาวะมากกว่า 400 มล./วัน อาการปัสสาวะน้อยอาจดำเนินไปเป็นระยะเวลาสั้นได้ถ้าเป็นผู้ป่วยสูงอายุ หรือไตมีพยาธิสภาพแบบ acute interstitial nephritis, extracapillary proliferative glomerulonephritis หรือ cortical necrosis โดยทั่วไปการทำงานของไตมักจะฟื้นกลับมาเป็นปกติ ยกเว้นในรายที่มี cortical necrosis หรือมี tubular necrosis อย่างรุนแรง ร่วมกับการเปลี่ยนแปลงอย่างมากของ interstitium [9]

การรักษาที่สำคัญสำหรับงูพิษกัด คือ การให้เซรุ่มแก้พิษงูและการให้น้ำให้พอเพียง การทำให้ปัสสาวะเป็นด่างอาจช่วยป้องกันไตวายเฉียบพลัน ถ้ามีภาวะ myoglobinuria หรือ hemoglobinuria ร่วมด้วย มีรายงานที่น่าสนใจว่าการฟอกเลือดด้วยเครื่องไตเทียมสามารถลดอาการทางกล้ามเนื้อในผู้ป่วยที่ถูกงูทะเลกัดได้ การทำ exchange blood transfusion มีประโยชน์ในการรักษาผู้ป่วยซึ่งถูกงูแมวเซากัดที่มี intravascular hemolysis อย่างรุนแรง และมีความดันโลหิตต่ำ [9]

## พยาธิสภาพ

พยาธิสภาพของไตที่พบบ่อยที่สุดในไตวายเฉียบพลันจากงูกัด คือ acute tubular necrosis พยาธิสภาพอื่นที่พบบ่อยคือ diffuse proliferative glomerulonephritis, extracapillary proliferative glomerulonephritis, arteritis, acute interstitial nephritis, cortical necrosis และ renal infarction [9]

## พยาธิกำเนิด

งูพิษกัดทำให้เกิดไตวายเฉียบพลันโดยผ่านทางกลไกการเปลี่ยนแปลงของ renal hemodynamic ซึ่งเกิดจากปัจจัยต่างๆ คือ vasoactive mediators, intravascular hemolysis, disseminated intravascular coagulation, การเพิ่มขึ้นของ blood viscosity, การตกเลือด, การรบกวนการทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจและ rhabdomyolysis พิษงู viper ต่อระบบเลือดทำให้เกิดการกระตุ้น factor II, V, X และ complement, มีฤทธิ์คล้าย thrombin

(thrombin-like action) ทำให้เกิด fibrinolysis และ hemolysis ซึ่งมีผลทำให้เลือดไปเลี้ยงไตลดลง ดังนั้นไตวายเฉียบพลันจึงพบได้บ่อยในงูตระกูล viper กัด การศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่า การให้พิษขนาด sublethal ฉีดเข้าหลอดเลือดดำ ทำให้เกิด systemic vasodilatation และการเกิด renal vasoconstriction โดยไม่ทำให้เกิดพิษต่อระบบเลือด ดังกล่าว cardiac output ลดลงในระยะแรกและเพิ่มขึ้นภายหลัง การเปลี่ยนแปลงทาง hemodynamics คล้ายกับการเปลี่ยนแปลงในภาวะ sepsis และพบว่า มี vasoactive mediators หลายตัวเกี่ยวข้อง เช่น kinins, prostaglandins, catecholamines และ angiotensin II จากการศึกษาในสัตว์ทดลอง โดย Chugh พบว่า การให้พิษในขนาด lethal ไม่ทำให้เกิดพยาธิสภาพที่ไต แต่พิษในขนาด sublethal ทำให้เกิด tubular necrosis การศึกษาโดยวิธี isolate renal perfusion พบว่า พิษแมวทำให้ glomerular filtration rate ลดลง และเพิ่ม fractional excretion ของโซเดียม การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับขนาดของพิษ การศึกษาไตของ Triturus โดยวิธี isolate renal perfusion พบว่า พิษแมวทำให้ potential difference across membrane ของ proximal tubular cell ลดลง ซึ่งบ่งว่าพิษแมวมีผลต่อไตโดยตรง พิษงู viper น่าจะมีผลต่อ glomeruli และหลอดเลือดโดยตรง [9]

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาผลพิษในประเทศไทย 5 ชนิดได้แก่ พิษงูกะปะ พิษแมวเขา พิษงูเห่า พิษงูจงอาง และพิษงูสามเหลี่ยม ต่อ blood coagulation, fibrinolysis และ platelet aggregation พบว่าในพิษแมวเขาพบ factor X และมีพิษงูกะปะเพียงชนิดเดียวที่สามารถยับยั้งการเกิด platelet aggregation ได้

เอนไซม์ PLA<sub>2</sub> จะเปลี่ยน lecithin ซึ่งเป็น phospholipid ให้เป็น lysolecithin สารนี้มีผลทำให้ผนังเซลล์เม็ดเลือดแดง และผนังเซลล์ของเนื้อเยื่ออื่นๆ ในร่างกายถูกทำลายเมื่อทำงานร่วมกับเอนไซม์ protease จะไปทำลายผนังเซลล์เส้นเลือดฝอยซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งซึ่งทำให้เกิดอาการตกเลือดเกิดการพองและการตายของเนื้อเยื่อ เชื่อว่ากลไกการเกิดลิ่มเลือด (blood coagulation) โดยพิษแมวเขานั้นเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ผู้ป่วยถึงแก่ความตาย ซึ่งเกิดจากการกระทำของ factor X activator ที่มีอยู่ในพิษแมวเขาไปกระตุ้น factor X ทำให้เกิด active factor X (Xa) ซึ่งจะเปลี่ยน prothrombin ให้เป็น thrombin แล้ว thrombin จะไปเปลี่ยน fibrinogen ให้เป็น fibrin เป็นสาเหตุให้เกิดลิ่มเลือดขึ้นในร่างกาย ลิ่มเลือดนี้จะไปขัดขวางการไหลเวียนของโลหิต เป็นผลให้อวัยวะต่างๆขาดเลือด ขาดออกซิเจนเกิดภาวะไม่ทำงานที่สำคัญคือไต ผลของการเกิดลิ่มเลือดนี้ทำให้ปัจจัยการแข็งตัวของเลือดถูกใช้ไปโดยเฉพาะอย่างยิ่ง fibrinogen และแผ่น

เลือดลดต่ำลง ทำให้เกิดภาวะเลือดออกอย่างรุนแรง นอกจากนี้ยังพบอาการป่วยอื่นๆ ต่อไปอีกด้วย ตั้งแต่กลุ่มเส้นเลือดที่บริเวณส่วนต้นของไตอักเสบ (glomerulonephritis), เส้นเลือดอักเสบ (vasculitis), เกิดการตายของเนื้อเยื่อท่อไต (tubular necrosis), การตายของเนื้อเยื่อหุ้มไต (cortical necrosis), หลอดโลหิตที่ไตอุดตัน ทำให้เนื้อเยื่อบริเวณนั้นตาย (renal infraction) และเกิดภาวะไตวายในที่สุด (acute renal failure, ARF) ซึ่งทำให้ผู้ป่วยถึงแก่ความตาย

Ratcliffe และคณะได้แสดงให้เห็นว่าพิษงูแมวเซามีพิษต่อไตโดยตรงใน isolated profused rat kidney (IPRK) แต่ไม่ได้ทำการวิเคราะห์ด้านการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ profused kidney [42]

Willinger และคณะได้ทำการศึกษาเพื่อให้ได้ข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับผลพิษงูแมวเซาต่อเนื้อเยื่อไต โดยออกแบบการศึกษาที่ผนวกบทบาทหน้าที่กับรูปร่างใน IPRK และเสริมด้วยการศึกษาใน renal epithelial cell และ mesangial cell culture จากการศึกษาพบว่าพิษงูแมวเซามีความเป็นพิษกับไตและความเข้มข้นพิษงูที่ใช้มีปริมาณสูง (>600 µg/ml) จึงจะทำให้โครงสร้างของเซลล์ถูกทำลาย [61]

ส่วนประกอบในน้ำพิษของงูมีโปรตีนที่สำคัญที่สามารถทำให้เกิดอันตรายต่อเซลล์อยู่หลายชนิด แต่มีโปรตีนที่มีความโดดเด่นมากอยู่ 2 ชนิดคือเมทัลโลโปรตีนเนส (metalloproteinase) และฟอสโฟไลเปส เอ<sub>2</sub> (phospholipase A<sub>2</sub>) ซึ่งโปรตีนทั้งสองชนิดนี้ได้รับการพิสูจน์แล้วว่ามีส่วนต่อการทำให้เซลล์บาดเจ็บได้จริง

เมทัลโลโปรตีนเนสนั้นเป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำลายการประสานตัวของไซโตสเกเลตัน (cytoskeleton) นำไปสู่การทำให้เซลล์บาดเจ็บ เกิดการตายของเซลล์ทั้งแบบ apoptosis และ necrosis และทำลายแรงยึดเหนี่ยวระหว่างเซลล์ทำให้ membrane แตกสลาย

ฟอสโฟไลเปสเอ<sub>2</sub>ในพิษงูเป็นโปรตีนที่มีขนาดเล็กประมาณ 13-15 กิโลดาลตัน [45] ซึ่งมีบทบาทเกี่ยวกับความเป็นพิษหลายด้าน เช่น เป็นสารต้านการแข็งตัวของเลือด ทำลายเม็ดเลือดเป็นตัวชักนำทำให้เกิดการบวม ยับยั้งการรวมตัวของเกร็ดเลือด ทำลายระบบประสาทและกล้ามเนื้อ ย่อยสลาย membrane เพราะงูมีเอาไว้ใช้ในการย่อยเหยื่อ

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### รูปแบบการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการวิจัยแบบ experiment study แต่ไม่ต้องทำการขอพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Chulalongkorn University Ethics Committee) เนื่องจากได้ทำการทดลองกับเซลล์ไลน์ และสารที่ใช้ (พิษงู) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากตัวของสัตว์ โดยการนำสารดังกล่าวมาใช้ไม่เป็นอันตรายต่อสัตว์นั้นๆ

#### เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

##### 1. เครื่องมือทั่วไป

- 1.1 Orbital shaker (BIOSAN: model os-10)
- 1.2 Refrigerate centrifuge (Eppendorf: model 5415 R, BOECO U-32R)
- 1.3 pH meter (Fisher scientific: model AB15)
- 1.4 Hot pate stirrer (LabTech®: model LMS-100)
- 1.5 Spindown centrifuge (BIOSAN: model Multi-Spin)
- 1.6 Analytical balance (Precia: model XB2200C, Ohaus: model AR2140)
- 1.7 Vortex (Labnet: VX100)
- 1.8 Microwave (Electrolux)
- 1.9 Ultrasonic bath (Power sonic 420)
- 1.10 Refrigerator (Panasonic)
- 1.11 Deep freeze (Thermo)
- 1.12 Autoclave (Hirayama)
- 1.13 Oven (Binder: model B28)
- 1.14 Hot air oven (Memmert)
- 1.15 Fume hood
- 1.16 Spectrophotometer (BECKMAN COULTER DU® 650)

##### 2. เครื่องมือที่ใช้การแยก protein fraction

- 2.1 Pharmacia Biotech (RediFrac)

3. **เครื่องมือที่ใช้การเพาะเลี้ยงเซลล์**
  - 3.1 Laminar flow (Thermo electron corporation: model SAFE 2010)
  - 3.2 CO<sub>2</sub> Incubater (Nuaire)
  - 3.3 Shaking water bath (Memmert: model M22)
  - 3.4 Vacuum pump
  - 3.5 Hemocytometer counting chamber
  - 3.6 Liquid Nitrogen Tank
4. **เครื่องมือที่ใช้ในการวัด Lactase dehydrogenase**
  - 4.1 Microplate Reader: Multiskan EX (Thermo Labssystem)
5. **เครื่องมือที่ใช้ในการตรวจนับการตายของเซลล์ Annexin V-labeling flow cytometry**
  - 5.1 Flowcytometer (BD: model FACSCalibur)
6. **เครื่องมือที่ใช้ในการทำ Transmission electron microscope**
  - 6.1 Transmission electron microscope
  - 6.2 Microtome (Leica)
7. **เครื่องมือที่ใช้ในการทำ Western blot**
  - 7.1 Ultrasonic sonicator (Ultrasonic: model VC/VCX 500)
  - 7.2 Spectrophotometer (Bio-RAD SmartSpec™ 3000)
  - 7.3 Heat block (BIOSAN: model TDB-120)
  - 7.4 Gel electrophoresis (Bio-RAD)
  - 7.5 Electroblotting (Bio-RAD)
  - 7.6 PowerPac Universal Power Supply (Bio-RAD)
  - 7.7 Chemiluminescent detection (Syngene)
8. **กล้องจุลทรรศน์และจอถ่ายภาพ**
  - 8.1 Light microscope (Olympus)
  - 8.2 Inverted microscope (Nikon)
  - 8.3 Camera Capture Monitor (Nikon)
  - 8.4 Fluorescent microscope (Olympus)

## วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. Autopipette: size 10, 200, 1,000  $\mu$ l (Gilson)
2. Tip (Axygen)
3. Pipette boy
4. Pipette (Conning)
5. Transfer pipette
6. Conical tube: size 15, 50 ml (Conning)
7. Micro tube (Axygen)
8. Cryotube (Nunc)
9. Beaker (Pyrex)
10. Erlenmeyer flask (Pyrex)
11. Cylinder (Pyrex)
12. Bottle (Pyrex)
13. Glass vacuum filtration unit (Gibco)
14. Stirring rod
15. Needle
16. Syringe
17. Syringe filter
18. Filter paper (Whatman)
19. Magnetic Bar
20. Tissue culture flask: size T25, T75 (Nunc)
21. 6, 12, 24, 96-well plate (Nunc)
22. Petri disk (Conning)
23. Coplin Jar
24. Glass slide
25. Cover glass
26. Forcept
27. Moising chamber
28. Rack
29. Copper grid

30. PVDF membrane
31. Whatman 3mm filter paper
32. Saphadex G-75

### สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

#### 1. สารเคมีทั่วไป

- 1.1 Hydrochloric acid, ACS reagent, 37% (HCl)
- 1.2 100 M NaOH
- 1.3 50, 70, 80, 95, 99.9% Ethanol (Merck)
- 1.4 PBS (phosphate buffered saline, pH=7.2)
- 1.5 Double distilled water (ddH<sub>2</sub>O)

#### 2. สารเคมีที่ใช้วัดปริมาณโปรตีน

- 2.1 Bradford reagent (SIGMA-ALDRICH®)
- 2.2 Lowry protein reagent (Thermo scientific)

#### 3. สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบปฏิกิริยา Protease

- 3.1 0.15 M TBS pH=8.0
- 3.2 4% Casein solution (casein)
- 3.3 5% Trichloroacetic acid reagent (TCA)
- 3.4 20% Folin
- 3.5 500 mM Sodium carbonate solution (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) pH=8.0
- 3.6 1.1 mM L-Tyrosine standard (Std Soln.)

#### 4. สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบปฏิกิริยา Metalloproteinase

- 4.1 60 mM EDTA

#### 5. สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบปฏิกิริยา Phospholipase A<sub>2</sub> ( PLA<sub>2</sub> )

- 5.1 10 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl; pH 8.0
- 5.2 Substrate [4-nitro-3-(octanoyloxy)benzoic acid, 3.0 mM in acetonitrile]
- 5.3 2.5% Triton X-100 in H<sub>2</sub>O

## 6. สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์

- 6.1 Dulbecco's modified eagle medium with 4,500 mg/l glucose and L-glutamin, without sodium bicarbonate, powder, cell culture tested [DEME] (SIGMA-ALDRICH, product number D5648)
- 6.2 Sodium bicarbonate (SIGMA-ALDRICH®)
- 6.3 Fetal bovine serum [FBS] (Gibco)
- 6.4 Penicillin-streptomycin (Gibco)
- 6.5 Keratinocyte serum free media [K-SFM] (Gibco)
- 6.6 Collagen I, rat tail, for cell culture (Gibco, cat. No. A10483-01)
- 6.7 Trypsin, Type II-S, From Porcine Pancreas (SIGMA-ALDRICH®)
- 6.8 Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dehydrate (EDTA), approx. 99% titration
- 6.9 Trypan blue Solution (Fluka Analytical)
- 6.10 DMSO (Merck)
- 6.11 Bovine serum albumin [BSA] (SIGMA-ALDRICH®)

## 7. สารเคมีใช้ในการวัด Lactase dehydrogenase (LDH)

- 7.1 Cyto Tox 96® non-radioactive cytotoxicity assay kit (Promega corporation, cat. No. G1780)
- 7.2 0.8% Triton X

## 8. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจนับการตายของเซลล์ด้วย Annexin V/Propidium iodide-labeling flow cytometry

- 8.1 Trypsin, Type II-S, From Porcine Pancreas (SIGMA-ALDRICH®)
- 8.2 Mitomycin C; MMC (SIGMA-ALDRICH®)
- 8.3 Recombinant human annexin V, FITC Conjugated (Invitrogen™)
- 8.4 Propidium iodide/RNase A staining buffer (Invitrogen™)

## 9. สารเคมีที่ใช้ในการทำ Transmission electron microscope (TEM)

- 9.1 2% Glutaraldehyde
- 9.2 2% Osmium tetroide
- 9.3 100% Propylene oxide
- 9.4 Resin
- 9.5 Epoxy



9.6 Toluidine blue

9.7 Uranyl acetate

9.8 Lead citate

#### 10. สารเคมีที่ใช้ในการทำ Western blot

10.1 40% acrylamide 29:1 (Bio-RAD)

10.2 Tris base (Merck)

10.3 1.5 M Tris/HCl pH=8.8

10.4 1.0 M Tris/HCl pH=6.8

10.5 SDS (Bio-RAD)

10.6 10% Ammonium Persulfate (SIGMA-ALDRICH®)

10.7 TEMED (Bio-RAD)

10.8 Running buffer

10.9 Sample Buffer

10.10 Transfer Buffer

10.11 Methanol (Merck)

10.12 Glacial acetic acid (Merck)

10.13 Tween-20 (SIGMA-ALDRICH®)

10.14 TBS (Tris-buffered saline)

10.15 TBS-T (0.1% Tween-20 in Tris-buffered saline)

10.16 5% Nonfat dry milk (Bio basic inc.)

10.17 Antibody  $\beta$ -actin (Santa Cruz Biotechnology)

10.18 Antibody sodium/hydrogen exchanger 3 ; NHE3 (Abcam, ab72729)

10.19 Protein Marker (Thermo scientific: Pierce® Chemiluminescent Blue Prestained Peroxidase-Labeled Protein Molecular Weight Marker, Product No. 26651)

10.20 Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution (Bio-RAD)

10.21 Destain buffer I, II

10.22 Chemiluminescent substrate (Thermo scientific: SuperSignal® West Pico Substrate, Product No. 34080)

10.23 Stripping buffer

## วิธีการดำเนินการวิจัย

### 1. การหาค่า Median lethal dose (LD50) ของ lyophilized Russell's viper venom [53]

เป็นขั้นตอนที่ดำเนินการในสัตว์ทดลองเพื่อหาค่าความรุนแรงของพิษงูแมวเซาแห่งที่ผลิตมาจากสวนงู สภากาชาดไทย

1. ในการทดลองนี้ใช้หนูสายพันธุ์ swiss albino คละเพศ น้ำหนัก 18-20 กรัม ใช้จำนวนหนูที่ระดับความเข้มข้นของพิษระดับเดียวกัน 3 ตัว
2. ฉีดพิษงูเข้าทางเส้นเลือดดำ (intravenous injection) ที่บริเวณหางหนู ปริมาณ 0.2 ml
3. ติดตามผลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
4. เลือกความเข้มข้นของพิษงูที่ทำให้หนูมีอัตราการตายสามระดับ คือ ตายทั้งหมด ตายบางส่วน และรอดทั้งหมด นำค่าความเข้มข้นของพิษนั้นมาคำนวณหาค่า LD50
5. เป็นไปได้ว่าในการทดสอบพิษรอบแรก อาจจะได้ไม่ได้อัตราการตายของหนูทั้งสามระดับภายในครั้งเดียว จึงต้องทำการนำค่าความเข้มข้นของพิษที่ทำให้หนูรอดทั้งหมด ค่าแรก มาหา dilution factor ใหม่ ให้มีค่าน้อยลง เพื่อให้มีอัตราการตายของหนูทั้งสามระดับ

#### การคำนวณ

$$\text{Log LD50} = \log Da - (\text{proportional distance}) (\log df)$$

df = dilution fraction

Da = venom dose which obtained percent death next above 50%

$$\text{Proportional distance} = \frac{y - c}{y - x}$$

c = constant 50% death of animals

y = percent death of animals at the venom dose with obtained percent death next above 50%

x = percent death of animals at the venom dose with obtained percent death next below 50%

## 2. การแยก Protein fraction

เนื่องจากพิษงูแมวเซาประกอบไปด้วยโปรตีนและอนุพันธ์ของโปรตีนหลายชนิด ซึ่งมีทั้งส่วนที่มีพิษและไม่มีพิษประกอบกันเป็น complex solution พิษงูที่นำมาทดลองได้มาจากการรีดน้ำพิษจากงูหลายตัวมารวมกัน จากนั้นนำมาผ่านกระบวนการทำให้เป็นแห้ง โดยพิษงูแมวเซาที่นำมาใช้ทดลองในครั้งนี้มีลักษณะเป็นผงสีขาว ผลิตมาจากสวนงู สภากาชาดไทย ซึ่งโดยตามธรรมชาติแล้วงูแต่ละตัวจะมีสัดส่วนองค์ประกอบของพิษไม่เท่ากัน ดังนั้นจึงทำให้ผงพิษที่ผลิตได้ในแต่ละครั้งนั้นมีองค์ประกอบไม่เท่ากันเช่นเดียวกัน

### ขั้นตอนการแยก Protein fraction [51]

1. ผงพิษงูแมวเซาแห้ง 100 mg ละลายใน 10 mM TBS buffer pH 7.4 ปริมาณ 1 ml นำมาปั่นที่ 5,000 rpm นาน 10 นาที ดูดสารละลายส่วนที่ใสออกมาทำการแยก protein fraction
2. แยก protein fraction ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี คอลัมน์ขนาด 2.5 x 29 cm ชนิด Sephadex G-75 (superfine)
3. ดูดสารละลาย ค่อยๆ เติมลงไปคอลัมน์ ระวังอย่าให้เกิดฟอง
4. ตั้งอัตราการไหลของสารภายในคอลัมน์เป็น 9.47 ml/hr สารที่ใช้ในการ elute คือ 10 mM TBS buffer pH 7.4
5. ปริมาณการเก็บสารตัวอย่าง 2 ml ต่อ 1 tube
6. นำสารที่เก็บได้ไปวัด OD ที่ 280 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer
7. นำค่าที่ได้ไป plot กราฟ เก็บสารภายใต้ peak เดียวกัน มารวมเป็นสารแต่ละ fraction
8. วัดความเข้มข้นโปรตีนของแต่ละ fraction ด้วยวิธี Bradford protein assay

## 3. การตรวจสอบ fraction ที่แยกได้

### 3.1 การทดสอบปฏิกิริยา Protease: Sigma's Non-specific Protease Activity Assay – Casein as a Substrate [17]

Principle: Casein + H<sub>2</sub>O → Amino acid

ในการทดสอบวิธีนี้ใช้ casein เป็น substrate โดย protease ที่ทดสอบจะย่อย casein ได้กรดอะมิโนอิสระ และเมื่อกรดอะมิโนเหล่านี้ทำปฏิกิริยากับ Folin's reagent จะให้สารสีน้ำเงิน

ออกมา ทำการเปรียบเทียบค่ากับ standard curve ที่ได้จากสารมาตรฐาน tyrosine ทำการย่อย casein ได้กรดอะมิโนอิสระ แล้ววัด OD ที่ 660 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer

Condition: T = 37°C, pH = 8.0,  $A_{660\text{nm}}$  Light path = 1 cm

Method: Colorimetric

Procedure:

1. Pipette สารลงหลอดทดลอง ดังนี้

|  | <u>Test</u>       | <u>Blank</u>      |
|--|-------------------|-------------------|
| 4% casein in 0.15 M TBS pH=8.0   | 500 $\mu\text{l}$ | 550 $\mu\text{l}$ |
| - รอจนสารละลายมีอุณหภูมิ 37°C แล้วจึงเติม<br>Protease enzyme solution ( sample ) | 50 $\mu\text{l}$  | -                 |
| - ผสม แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°C 1 ชั่วโมง  |                   |                   |
| 5% TCA   | 500 $\mu\text{l}$ | 500 $\mu\text{l}$ |
| - Centrifuge ที่ 5,000 rpm นาน 10 นาที   |                   |                   |
| - Pipette สารที่ได้ออกมา 400 $\mu\text{l}$                                       |                   |                   |

2. Color development

Standard curve

เตรียม standard curve โดย pipette สารลงหลอดทดลอง ตามตารางที่ 7 ดังนี้

ตารางที่ 7 แสดงการเตรียมสารมาตรฐานในการทดสอบปฏิกิริยา protease enzyme

| Solution  | Std Blank<br>(0 $\mu\text{M}$ ) | Std 1<br>(0.011 $\mu\text{M}$ ) | Std 2<br>(0.022 $\mu\text{M}$ ) | Std 3<br>(0.044 $\mu\text{M}$ ) | Std 4<br>(0.088 $\mu\text{M}$ ) |
|---|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Std soln. ( $\mu\text{l}$ )                       | 0                               | 10                              | 20                              | 40                              | 80                              |
| H <sub>2</sub> O ( $\mu\text{l}$ )                | 400                             | 390                             | 380                             | 360                             | 320                             |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ( $\mu\text{l}$ ) | 1,000                           | 1,000                           | 1,000                           | 1,000                           | 1,000                           |
| Folin ( $\mu\text{l}$ )                           | 200                             | 200                             | 200                             | 200                             | 200                             |
| Total ( $\mu\text{l}$ )                           | 1,600                           | 1,600                           | 1,600                           | 1,600                           | 1,600                           |

### Sample

เตรียม sample โดย pipette สารลงหลอดทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงการเตรียมสารตัวอย่างในการทดสอบปฏิกิริยา protease enzyme

| Solution                             | Sample | Blank |
|--------------------------------------|--------|-------|
| Sample (μl)                          | 400    | -     |
| H <sub>2</sub> O (μl)                | -      | 400   |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (μl) | 1,000  | 1,000 |
| Folin (μl)                           | 200    | 200   |
| Total (μl)                           | 1,600  | 1,600 |

- ผสม แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°C 30 นาที
- วัด OD ที่ 660 nm

### 3. Calculations

Standard curve:

$$\Delta A_{660\text{nm}} \text{ Standard} = A_{660\text{nm}} \text{ Standard} - A_{660\text{nm}} \text{ Standard Blank}$$

Plot the  $\Delta A_{660\text{nm}} \text{ Standard}$  vs μmoles of Tyrosine

Sample Determination:

$$\Delta A_{660\text{nm}} \text{ Sample} = A_{660\text{nm}} \text{ Test} - A_{660\text{nm}} \text{ Sample Blank}$$

Determination μmoles of Tyrosine equivalents liberated using the standard curve.

$$\text{Unit/ml enzyme} = \frac{(\mu\text{moles Tyrosine equivalents released})}{(1)(10)(12)} \quad (11)$$

11 = Total volume ( in milliliters ) to assay

10 = Time of assay ( in minutes ) as per the Unit Definition

1 = Volume of enzyme ( in milliliters ) of enzyme used

2 = Volume ( in milliliters ) used in Colorimetric Determination

$$\text{Units/mg solid} = \frac{\text{units/ml enzyme}}{\text{mg solid/ml enzyme}}$$

$$\text{Units/mg protein} = \frac{\text{units/ml enzyme}}{\text{mg protein/ml enzyme}}$$

Unit definition: 1 unit ที่ได้จากการ hydrolyze casein จะผลิตสี่เท่ากับ 1.0  $\mu\text{mole}$  (181  $\mu\text{g}$ ) ของสาร tyrosine ต่อเวลาที่ pH 8.0 อุณหภูมิ 37°C

### 3.2 การทดสอบปฏิกิริยา Metalloproteinase [17], [37]

ทำตามวิธีทดสอบเดียวกับการทดสอบปฏิกิริยา protease วิธีทดสอบนี้เป็นการหา metalloproteinase ด้วยวิธีทางอ้อม โดยการนำสารตัวอย่างไปยับยั้งปฏิกิริยา (inhibit) กับ 60 mM EDTA

1. Pipette sample 100  $\mu\text{l}$  ผสมกับ 60 mM EDTA ปริมาณ 20  $\mu\text{l}$  บ่มที่อุณหภูมิ 37°C 10 นาที
2. ใช้สารในข้อ 1. แทน protease enzyme solution แล้วดำเนินการทดสอบปฏิกิริยา metalloproteinase ตามวิธีการทดสอบปฏิกิริยา protease

### 3.3 การทดสอบปฏิกิริยา Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) [34]

1. นำ 10 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl; pH 8.0 buffer ปริมาณ 500  $\mu\text{l}$  มาผสมกับ PLA<sub>2</sub> enzyme solution (sample) ปริมาณ 50  $\mu\text{l}$  (0.05 ml) นำไปวางในกล่องน้ำแข็ง
2. เติม substrate [4-nitro-3-(octanoyloxy)benzoic acid, 3.0 mM in acetonitrile] ปริมาณ 50  $\mu\text{l}$  (0.05 ml) ผสมให้เข้ากันด้วย vortex
3. บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 20 นาที
4. เติม stopper reaction (2.5% Triton X-100 in H<sub>2</sub>O) ปริมาณ 50  $\mu\text{l}$  ในกล่องน้ำแข็ง
5. ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-10 นาที
6. นำไปวัด OD ที่ 425 nm

#### การคำนวณ

$$\text{OD } 425 \text{ nm} \times 25.8 = A \text{ ----- ( 1 )}$$

$$\text{Fraction conc.} \times \text{sample volume (0.05 ml)} = B \text{ ----- ( 2 )}$$

$$A/B = \text{PLA}_2 \text{ conc. (nm/mg)}$$

Unit definition: การเปลี่ยนของค่า absorbance 0.1 AU ที่ความยาวคลื่น 425 nm ของ substrate จะมีค่าเท่ากับ 25.8 nmoles ของ chromophore ที่ถูกปลดปล่อยออกมา

#### 4. การเพาะเลี้ยงเซลล์บุท่อไต [1], [43]

HK-2 cell เป็นเซลล์เยื่อบุผิว (epithelium cell) ซึ่งมีลักษณะของการเชื่อมต่อระหว่างเซลล์ ทำให้เซลล์เรียงตัวชิดติดกันเป็น monolayer

HK-2 cell คือ proximal tubular cell (PTC) line ซึ่งได้มาจากไตปกติ นำมาดัดแปลงให้ไม่มีการตายโดยการเติม human papilloma virus 16 (HPV-16) E6/E7 genes เข้าไป แต่คงมีคุณสมบัติหลายประการเหมือน proximal tubular cell, HK-2 cell จึงเป็นเซลล์ต้นแบบที่ดีในการนำมาศึกษาทดลองลักษณะที่ต้องการตรวจสอบกับ proximal tubular cell ได้เป็นอย่างดี

HK-2 cell ที่ได้นำมาใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ ได้ซื้อมาจากบริษัท ATCC® number CRL-2190™ และระยะเวลาของเซลล์ที่นำมาใช้มีอายุที่ 20-29 passages

#### ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเซลล์บุท่อไต [1]

1. เพาะเลี้ยง HK-2 cell ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยส่วนประกอบของอาหารคือ DMEM supplemented with 10% FBS, 100 IU/ml of penicillin/streptomycin เพาะเลี้ยงในตู้บ 37 °C ที่มี water vapor saturated 5% CO<sub>2</sub>/95% air
2. เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2 วัน
3. เมื่อเซลล์เพาะเลี้ยงโตประมาณ 90% จะทำการ subculture ให้เซลล์มีชีวิตอยู่ต่อไปด้วย 0.25% trypsin-EDTA หรือนำเซลล์ไปใช้ทดสอบกับพิษงูแมวเซาตามความเข้มข้นและระยะเวลาที่ใช้ในแต่ละการทดลอง

#### วิธีการ subculture [1]

1. นำอาหารเลี้ยงเซลล์ (complete media), PBS และ 0.25% trypsin-EDTA มาอุ่นที่ 37°C ประมาณ 10-15 นาที ก่อนใช้งาน
2. ใช้ pipette ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออกจากภาชนะเลี้ยงเซลล์ flast T-25 ให้หมด
3. ล้างด้วย PBS 2 ครั้ง
4. เติม trypsin ลงไป 1-2 ml นำไปอุ่นในตู้ incubator เพื่อช่วยเร่งปฏิกิริยาของ trypsin ประมาณ 3 นาที

5. ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ ถ้าเซลล์เริ่มหลุดออกจากกันแล้ว ให้ดูด trypsin ออกจากภาชนะให้หมด
6. เติมหอาหารเลี้ยงเซลล์ ลงไปประมาณ 3-5 ml ใช้ pipette ดูดขึ้น-ลง เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากภาชนะ (ห้ามเคาะเซลล์) แล้วถ่ายใส่ conical tube size 15 ml
7. นำเซลล์ไปปั่นล้างที่ 1,500 rpm อุณหภูมิ 25°C นาน 5 นาที
8. เทอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งไป เหลือแต่ส่วนที่เป็นเซลล์
9. เติมหอาหารเพาะเลี้ยงลงไปใหม่ 1 ml และเคาะให้เซลล์กระจายตัว
10. ทำการนับเซลล์เพื่อให้มีจำนวนเซลล์เท่ากันในแต่ละการทดลอง หรือ pipette เซลล์มา 200  $\mu$ l ลงไปในภาชนะเลี้ยงเซลล์ใบใหม่ (ภาชนะที่ใช้เลี้ยงเซลล์ flask T-25) ที่มีอาหารเพาะเลี้ยงเติมอยู่ 4 ml

#### การนับเซลล์โดย hemocytometer counting chamber [1]

1. ดูดสารแขวนลอยที่มีเซลล์กระจายอยู่มา 10  $\mu$ l ผสมกับ trypan blue 10  $\mu$ l ที่ทิ้งไว้อย่างน้อย 1 นาที
2. นำไปนับเซลล์ด้วย hemocytometer counting chamber

#### วิธีการคำนวณ

ช่องตารางสี่เหลี่ยมจตุรัสของ hemocytometer counting มีปริมาตร

$$= 1 \text{ mm (ข้าง)} \times 1 \text{ mm (ข้าง)} \times 0.1 \text{ mm (ลึก)}$$

$$= 0.1 \text{ mm}^3$$

$$\text{ดังนั้น ปริมาตร } 0.1 \text{ mm}^3 = 10^{-4} \text{ mm}^3$$

เพราะฉะนั้น dilution factor = 10,000

#### ตัวอย่างการคำนวณ

สมมติว่า มีสารแขวนลอย 5 ml นับจำนวนเซลล์ได้ 80 เซลล์ =  $5 \times 80 \times 10^4$

เพราะฉะนั้นในสารจะแขวนลอย 5 ml มีเซลล์ทั้งหมด =  $400 \times 10^4$

$$= 4 \times 10^6 \text{ เซลล์}$$



## 5. ศึกษาการบาดเจ็บและการตายของเซลล์จากพิษงูแมวเซา ที่ Dose และ Time dependence

### 5.1 การศึกษาการตายของเซลล์ด้วยการย้อม Trypan blue exclusion assay [28]

เพาะเลี้ยงเซลล์ใน 12 well plate, ปริมาณเซลล์  $5 \times 10^6$  เซลล์, ใช้สารที่ทดสอบ ปริมาณ 300  $\mu\text{l}$ / well

การศึกษา dose dependence ใช้พิษงูแมวเซาที่ความเข้มข้น 0, 10, 50, 100, 500 และ 1,000  $\mu\text{g/ml}$  บ่มเพาะเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนเซลล์ตายจากการติดสีย้อมเซลล์ของ trypan blue

การศึกษา time dependence ใช้พิษงูแมวเซาที่ความเข้มข้น 1,000  $\mu\text{g/ml}$  บ่มเพาะเซลล์เป็นเวลา 6, 8, 10, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนเซลล์ตายจากการติดสีย้อมเซลล์ของ trypan blue

#### วิธีการย้อม Trypan blue

1. ล้างเซลล์ด้วย PBS อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  2 ครั้ง
2. เติม trypan blue 250  $\mu\text{l}$  ให้ท่วมเซลล์ที่ทำการย้อม นาน 5 นาที
3. ล้างสีส่วนเกินด้วย PBS อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  อีก 2 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที
4. นำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ light microscope

ผลการย้อม เซลล์มีชีวิตไม่ติดสี

เซลล์ตายติดสีฟ้า

### 5.2 การศึกษาการตายของเซลล์ด้วย Propidium iodide assay [36]

เพาะเลี้ยงเซลล์ใน 12 well plate, ปริมาณเซลล์  $5 \times 10^6$  เซลล์, ใช้สารที่ทดสอบ ปริมาณ 300  $\mu\text{l}$ / well

การศึกษา dose dependence ใช้พิษงูแมวเซาที่ความเข้มข้น 0, 10, 50, 100, 500 และ 1,000  $\mu\text{g/ml}$  บ่มเพาะเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนเซลล์ตายจากการติดสีย้อมเซลล์ของ propidium iodide

การศึกษา time dependence ใช้พิษงูแมวเซาที่ความเข้มข้น 1,000  $\mu\text{g/ml}$  บ่มเพาะเซลล์เป็นเวลา 6, 8, 10, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนเซลล์ตายจากการติดสีย้อมเซลล์ของ propidium iodide



4.2 แยก supernatant กับ pellet ออกจากกัน

4.3 วัดปริมาณ supernatant ที่เหลือ

#### ขั้นตอนการตรวจวัด LDH

ขั้นตอนตามชุดตรวจวัด CytoTox 96<sup>®</sup> non-radioactive cytotoxicity assay kit

(Promega corporation, cat. No. G1780)

1. ปิเปตสารตัวอย่าง 50 µl ลงใน 96 well plate
2. เติม substrate mix 50 µl ป่ม 30 นาที ในที่มืด
3. เติม stop solution 50 µl
4. วัดที่ OD 492 nm ด้วยเครื่อง microplate reader

#### ขั้นตอนการหาเปอร์เซ็นต์ LDH

นำค่า LDH ที่ได้จากการวัด OD 492 nm ด้วยเครื่อง microplate reader ของ supernatant และ sediment มาคูณกับปริมาณสารของตัวเอง จากนั้นนำไปคิดสัดส่วน LDH release จาก supernatant ต่อ total LDH

### 5.4 การตรวจวัดการตายของเซลล์ด้วย Annexin V/Propidium iodide-labeling flow cytometry [15]

เพาะเลี้ยงเซลล์ใน 12 well plate, ปริมาณเซลล์  $5 \times 10^6$  เซลล์, ใช้สารที่ทดสอบ ปริมาณ 300 µl/well plate

ทำการย้อมเซลล์ด้วย annexin V/propidium iodide นับจำนวนเซลล์ที่ติดสีด้วยเครื่อง flow cytometry เมื่อป่มเพาะด้วยพิษงูแมวเซา โดยในการศึกษา dose dependence ใช้ความเข้มข้นของพิษงูแมวเซา 0, 10, 50, 100, 500 และ 1,000 µg/ml ป่มเพาะเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และในการศึกษา time dependence ใช้ความเข้มข้นของพิษงูแมวเซา 500 µg/ml ป่มเพาะเป็นเวลา 0, 3, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ

#### วิธีการย้อม Annexin V/Propidium iodide

1. ล้างเซลล์ด้วย PBS คู่ๆ ปริมาณ 1 ml 2 ครั้ง
2. Trypsinized 100 µl อุณหภูมิ 37°C นาน 5 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ 200 µl
3. ปั่นล้างด้วย PBS เย็น 1,500 rpm อุณหภูมิ 4°C นาน 5 นาที

4. ย้อมด้วย annexin V 2.5  $\mu$ l นาน 15 นาที ในที่มืด
- 5.ปั่นล้างด้วย PBS เย็น 1,500 rpm อุณหภูมิ 4°C นาน 5 นาที 2 ครั้ง
6. ย้อมด้วย PI 50  $\mu$ l นาน 30 นาที
7. ปั่นล้างด้วย PBS เย็น 1,500 rpm อุณหภูมิ 4°C นาน 5 นาที 2 ครั้ง
8. Transfer ลง tube flow
9. ตรวจวัดด้วย flow cytometry ภายในหนึ่งชั่วโมง

## 6. การศึกษาผลของพิษงูแมวเซาที่ผลต่อระดับ minute injury

### 6.1 ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงส่องผ่าน (Transmission electron microscopy; TEM) [59]

#### ชนิดของตัวอย่าง

Control sample: normal HK-2 cell

Treated sample: HK-2 cell ที่ทดสอบกับพิษงูแมวเซาความเข้มข้น 100  $\mu$ g/ml นาน 15 นาที

#### ขั้นตอนการ Fixative

1. นำเซลล์เพาะเลี้ยง ล้างด้วย media free serum หรือ PBS คู่ 2 ครั้งทำการเก็บเซลล์เพาะเลี้ยงด้วย scarpet แล้วย้ายเซลล์ลงใน micro tube ปั่นด้วยความเร็ว 2,000 rpm นาน 5 นาที ดูด supernatant ทิ้งไปด้วย pipette
2. Prefixed ด้วย 2% gluteraldehyde ในอาหารเพาะเลี้ยงที่ไม่เติมส่วนผสมอื่น นาน 2 ชั่วโมง ปั่นทิ้งที่ 2,000 rpm นาน 5 นาที
3. ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ปั่นล้างที่ 2,000 rpm นาน 5 นาที
4. Postfixed ด้วย 2% osmium tetroxide นาน 1 ชั่วโมง ปั่นทิ้งที่ 14,000 rpm นาน 5 นาที
5. ล้างด้วย PBS 1 ครั้ง ปั่นล้างที่ 14,000 rpm นาน 5 นาที

#### ขั้นตอนการ Dehydration

1. ดึงน้ำออกจากเซลล์ด้วย ethanal series 50%, 70%, 80%, 95% 2 ครั้ง, 100% 3 ครั้ง นาน 5 นาที ปั่นทิ้งที่ 14,000 rpm นาน 5 นาที
2. ดึงน้ำออกจากเซลล์ด้วย 100% propylene oxide 2 ครั้ง นาน 5 นาที ปั่นทิ้งที่ 14,000 rpm นาน 5 นาที

### ขั้นตอนการ Infiltration

1. เติม 100% propylene oxide : resin 1:1 นาน 3 ชั่วโมง ดูด supernatant ทิ้งไป ด้วย dropper
2. เติม 100% resin นาน 18 ชั่วโมง

### ขั้นตอน Embedding และ Polymerization

1. วาง specimen ลงในแม่พิมพ์พลาสติก ติดกระดาษ label ที่มีรายละเอียดของ ตัวอย่าง เติม epoxy ประมาณ  $\frac{1}{2}$  -  $\frac{3}{4}$  ของแม่พิมพ์
2. นำไปอบใน incubator อุณหภูมิ 60°C นาน 2 วัน

### ขั้นตอน Sectioning

#### *Thick section*

1. เมื่อได้บล็อกตัวอย่างแล้วนำไป trim พลาสติกส่วนเกินด้วยใบมีดโกน
2. ตัด section ให้มีความหนาประมาณ 0.5  $\mu\text{m}$  ด้วยเครื่อง ultramicrotome
3. นำ section ที่ได้ไปย้อมด้วย Toluidine blue แล้วนำไปตรวจดูภายใต้ light microscope เพื่อเลือกบล็อกตัวอย่างที่ต้องการนำไปย้อมเพื่อตรวจดูภายใต้ electron microscope
4. เมื่อได้บล็อกและบริเวณที่ต้องการแล้ว นำบล็อกไปตัดให้หน้าบล็อกเป็นรูปสี่เหลี่ยมคางหมู เพื่อให้การตัด section เป็น series section ได้ง่ายขึ้น

#### *Thin section*

1. ตัด section ให้มีความหนา 60-90 nm ด้วยมีดเพชร
2. นำ section ที่ได้วางบน copper grid, air dye

### ขั้นตอนการ Stain

1. คว่ำ copper grid ด้านที่มี section ลงบนหยด uranyl acetate ที่หยดบน paraffilm ครอบด้วยฝา petridish เพื่อป้องกันการ contaminate บ่มนาน 30 นาที
2. ฉีดล้างด้วยกระบอฉีด copper grid ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นจุ่มล้างในน้ำกลั่นใน ปีกเกอร์อีก 2 ครั้ง แล้วนำไปแกว่งล้างน้ำกลั่นใน petridish อีก 1 ครั้ง
3. ซับ copper grid ให้แห้งด้วยกระดาษกรอง

4. คว่ำ copper grid ด้านที่มี section ลงบนหยด lead citate ที่หยดบน paraffilm วางผลึก NaOH ลงข้าง copper grid เพื่อช่วยดูความขุ่น ครอบฝาด้วย petridish เพื่อป้องกันการ contaminate บ่มนาน 30 นาที ในที่มืด
  5. ล้างน้ำกลั่นด้วยขั้นตอนเดิม
- ทำการตรวจสอบด้วยกล้องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงส่องผ่าน

## 6.2 การศึกษา sodium transcellular ด้วยเทคนิค western blot [56]

เพาะเลี้ยงเซลล์ใน 6 well plate, ปริมาณเซลล์  $10 \times 10^6$  เซลล์, ใช้สารที่ทดสอบ ปริมาณ 500  $\mu\text{l}$ /well plate

ทำการทดสอบเซลล์ด้วยพิษงูแมวเซาที่เข้มข้นของพิษงูแมวเซา 0, 10, 50, 100, 500 และ 1,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ณ เวลา 24 ชั่วโมง

ปริมาณโปรตีนที่ใช้ในการทดลองคือ 150 และ 500  $\mu\text{g}$

:

### วิธีการสกัดโปรตีนจาก cell sediment

1. ทิ้ง media ออกไป แล้วล้างเซลล์ใน plate ด้วย PBS เย็น 2 ครั้ง
2. สกัดโปรตีนด้วย lisa buffer : protease (50:1) ปริมาณ 200  $\mu\text{l}$ /1 well in 6 well plate วางในกล่องน้ำแข็ง เขย่า plate นาน 30 นาที
3. ดูดสารละลายเก็บใน microtube
4. นำไปปั่นที่ 14,000 rpm  $4^{\circ}\text{C}$  นาน 10 นาที
5. เก็บ supernatant นำไปหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry method

### วิธีการทำ Western blot

1. Gel electrophoresis (mini gel)
  - 1.1 ประกอบชุด cast gel ตามวิธีของแต่ละชุด cast gel
  - 1.2 ผสม separating gel solution โดยเติม running gel solution ลงไป
 

ประมาณสองในสามของแซนวิชเจล (sandwich gel)

❖ Running gel solution (for 7.5% gel. 2 pieces)

|                              |                     |
|------------------------------|---------------------|
| 30% Acrylamide 29:1 Bis..... | 2.25 ml             |
| 1.5 M Tris/HCl pH=8.8.....   | 3.0 ml              |
| dH <sub>2</sub> O .....      | 6.65 ml             |
| 10% SDS .....                | 46.66 $\mu\text{l}$ |

10% Ammonium persulfate ..... 46.66  $\mu$ l  
 TEMED .....13.34  $\mu$ l

หล่อหน้าเจลด้วยน้ำกลั่น เพื่อให้หน้าเจลเรียบเสมอกัน รอให้ gel polymerize ประมาณ 45-60 นาที จากนั้นจึงเติม stracking gel solution

❖ Stacking gel solution (for 4% gel. 2 pieces)

30% Acrylamide 29:1 Bis.....0.6 ml  
 1.0 M Tris/HCl pH=6.8.....1.5 ml  
 dH<sub>2</sub>O .....3.72 ml  
 10% SDS .....60  $\mu$ l  
 10% Ammonium persulfate ..... 60  $\mu$ l  
 TEMED .....6  $\mu$ l

ใส่ comb ลงในแท่นวิซเจล รอให้ gel polymerize ประมาณ 30-45 นาที

1.3 นำ comb ออกภายใต้ running buffer ระวังอย่าให้ well บิดเบี้ยวหรือขาดออกจากกัน จากนั้นล้างเศษเจลออกจาก well ให้หมด เพื่อให้ band ที่เกิดขึ้น มีลักษณะเรียบตรง

1.4 ผสมโปรตีนที่ความเข้มข้น 150 และ 500  $\mu$ g กับ sample buffer heat 95°C นาน 5 นาที load ลงไปใน well ของ acrylamide gel - SDS page

1.5 Run gel, constant volt 120 Volt นานประมาณ 1.30 ชั่วโมง

1.6 แกะเจล แล้วนำเจลที่ run เสร็จแล้ว ไป transfer สู่มembrane PVDF membrane ต่อไป

## 2. Transfer

2.1 นำเจลมาแช่ใน transfer buffer

2.2 ตัดแผ่น PVDF membrane 1 ชิ้น, และ Whatman 3mm filter paper 2 ชิ้น ให้มีขนาดเท่าเจล

2.3 ล้างแผ่น PVDF membrane ด้วย methanol 10 วินาที แล้วนำไปล้างในน้ำกลั่น 10 นาที จากนั้นนำไปแช่ใน transfer buffer

2.4 แช่ whatman 3mm filter paper และ scotch-brite pads ลงใน transfer buffer

## 2.5 เรียงลำดับจากซ้ายลบบไปขวามวก ดังนี้

- 1) ซ้ำลบบ
- 2) Scotch-Brite pads
- 3) Whatman 3mm filter paper
- 4) แผ่นเจล
- 5) PVDF membrane
- 6) Whatman 3mm filter paper
- 7) Scotch-Brite pads
- 8) ขั้วมวก

2.6 Transfer ใน transfer buffer, constant amp 300 mA. นาน 2 ชั่วโมง

2.7 เมื่อครบเวลา นำเจลที่ผ่านการ transfer แล้ว ไปย้อมใน coomassie brilliant blue R-250 staining solution เพื่อตรวจสอบว่ามีโปรตีนเหลืออยู่หรือไม่ และนำแผ่น PVDF membrane ไปย้อมอิมมูโนต่อไป

## 3. Immunodetection

3.1 นำแผ่น membrane ไปล้างด้วย TBS buffer 3 x 10 นาที ใน shaking

3.2 Block non-specific protein ด้วย 5% nonfat dry milk นาน 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

3.3 นำแผ่น membrane ไปล้างด้วย TBS-T buffer 3 x 10 นาที

3.4 ปุ่มด้วย primary antibody (NHE3) overnight ที่อุณหภูมิ 4°C

3.5 นำแผ่น membrane ไปล้างด้วย TBS-T buffer 3 x 10 นาที

3.6 ปุ่มด้วย secondary antibody (anti-mouse) นาน 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

3.7 นำแผ่น membrane ไปล้างด้วย TBS-T buffer 3 x 10 นาที

3.8 ปุ่มด้วย chemiluminescent substrate นาน 10 นาที

3.9 ตรวจสอบด้วย chemiluminescent detection

## 4. Reprobe western blot

4.1 แช่แผ่น membrane ใน stripping buffer ที่อุณหภูมิ 50°C นาน 30 นาที บน shaker 200 rpm.

4.2 ล้างด้วย TBS-T buffer 3 x 10 นาที

4.3 Block non-specific protein ด้วย 5% nonfat dry milk นาน 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

4.4 ปุ่มด้วย primary antibody ( $\beta$ -actin) overnight ที่อุณหภูมิ 4°C



- 4.5 นำแผ่น membrane ไปล้างด้วย TBS-T buffer 3 x 10 นาที
- 4.6 ปุ่มด้วย secondary antibody (anti-mouse) นาน 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง
- 4.7 นำแผ่น membrane ไปล้างด้วย TBS-T buffer 3 x 10 นาที
- 4.8 ปุ่มด้วย chemiluminescent substrate นาน 10 นาที
- 4.9 ตรวจด้วย chemiluminescent detection

#### การเก็บรวบรวมข้อมูล

ผู้วิจัยเป็นผู้รวบรวมข้อมูลการทดลองและบันทึกผลการทดลองด้วยการจดบันทึก โดยมีอาจารย์ที่ปรึกษาเป็นผู้ควบคุมและให้คำปรึกษา

#### การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้จากการทดลองบันทึกค่าเป็น mean  $\pm$  SEM ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่างโดยใช้ paired t-test กำหนดให้มีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 4

### ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

#### ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

##### 1. ผลการหาค่า Median lethal dose (LD50) ของ lyophilized Russell's viper venom

ผลการฉีดพิษงูแมวเซาที่บริเวณหลอดเลือดดำที่หางหนู (intravenous injection) โดยเลือกปริมาณความเข้มข้นของพิษงูแมวเซาจากค่าความเป็นพิษที่มีรายงานไว้ (จากสถานเสาวภา สภากาชาดไทย) มาเป็นเกณฑ์ในการเจือจางพิษงูแมวเซาให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ ที่เหมาะสมสำหรับการวัดความเป็นพิษของพิษงูแมวเซา โดยติดตามผลการตายของหนูเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 9 แสดงจำนวนหนูตายหลังจากได้รับพิษงูแมวเซาความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้

dilution factor = 1.2

| Conc. of RVV<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | จำนวน<br>หนูที่ใช้ | จำนวน<br>หนูตาย | Accumulative |         | Mortality |       | Dose/mouse<br>( $\mu\text{g/mouse}$ ) |
|--------------------------------------|--------------------|-----------------|--------------|---------|-----------|-------|---------------------------------------|
|                                      |                    |                 | die          | survive | ratio     | %     |                                       |
| 37.5                                 | 3                  | 3               | 5            | 0       | 5/5       | 100   | 7.5                                   |
| 31.25                                | 3                  | 2               | 2            | 1       | 2/3       | 66.67 | 6.25                                  |
| 26.04                                | 3                  | 0               | 0            | 4       | 0/4       | 0     | 5.21                                  |

เมื่อได้ค่าที่ครอบคลุมอัตราการตายของหนู 3 ค่า คือ จำนวนหนูตายทั้งหมด หนูตายบางส่วน และ หนูรอดชีวิตทั้งหมดมาแล้ว จะนำค่าของหนูตายบางส่วนมาคำนวณ ดังนี้

#### การคำนวณ

$$\text{Log LD50} = \text{log Da} - (\text{proportional distance}) (\text{log df})$$

Da = 6.25 [ venom dose which obtained percent death next above 50% ]

df = 1.2 [ dilution factor ]

$$\text{Proportional distance} = \frac{y - c}{y - x}$$

$c = 50$  [ constant 50% death of animals ]

$y = 66.67$  [ percent death of animals at the venom dose with obtained percent death next above 50% ]

$x = 0$  [ percent death of animals at the venom dose with obtained percent death next below 50% ]

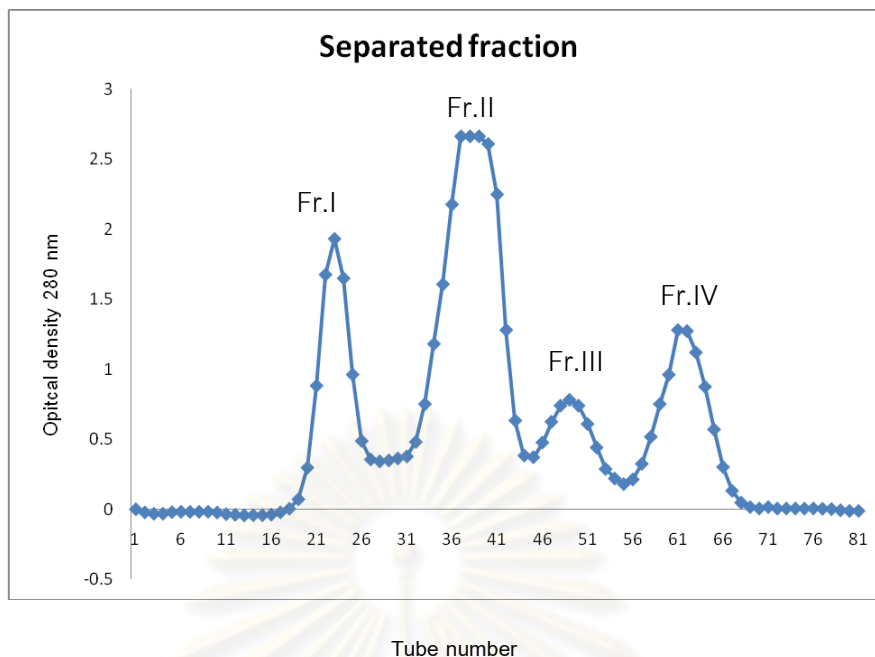
$$\begin{aligned} \text{Proportional distance} &= \frac{66.67 - 50}{66.67 - 0} \\ &= \frac{16.67}{66.67} \\ &= 0.25 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Log LD50} &= \log 6.25 - (0.25) (\log 1.2) \\ &= 0.79588 - (0.25) (0.0791812) \\ &= 0.79588 - 0.0197953 \\ &= 0.7760847 \\ \text{LD50} &= 5.98 \end{aligned}$$

ดังนั้นพิษงูแมวเซาแห่งรณรงค์การผลิตนี้ มีค่า median lethal dose (LD50) ประมาณ 5.98  $\mu\text{g}/\text{mouse}$

## 2. ผลการแยก Protein fraction

จากการแยกพิษงูแมวเซา 100 mg/ml จำนวน 1 ml ด้วย Sephadex G-75 (superfine) คอลัมน์ขนาด 2.5 x 29 cm แล้วชะด้วย 10 mM TBS buffer pH 7.4 พบว่าได้แยกพิษงูแมวเซาได้ 4 fractions



รูปที่ 3 แสดงโครมาโตแกรม (chromatogram) ของพิษงูแมวเซา 100 mg ซึ่งแยกโดยการผ่าน Sephadex G-75 (superfine) column ขนาด 2.5 x 29 cm ซะด้วย 10 mM TBS buffer pH 7.4 เก็บสารละลายจากคอลัมน์หลอดละ 2 ml; Fr.I=fraction I, Fr.II=fraction II, Fr.III=fraction III และ Fr.IV=fraction IV

จากนั้นทำการเก็บ product ภายใต้อัตโนมัติแต่ละ peak มา pool รวมกันเป็น fraction แล้วนำแต่ละ fraction ที่เก็บได้มาหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford protein assay วัด OD ที่ 595 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer หาสัดส่วนแต่ละ fraction เป็นเปอร์เซ็นต์เปรียบเทียบกับ crude venom ความเข้มข้น 100 mg/ml ซึ่งเป็นปริมาณสารตั้งต้นที่ใช้ในการแยก fraction ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี

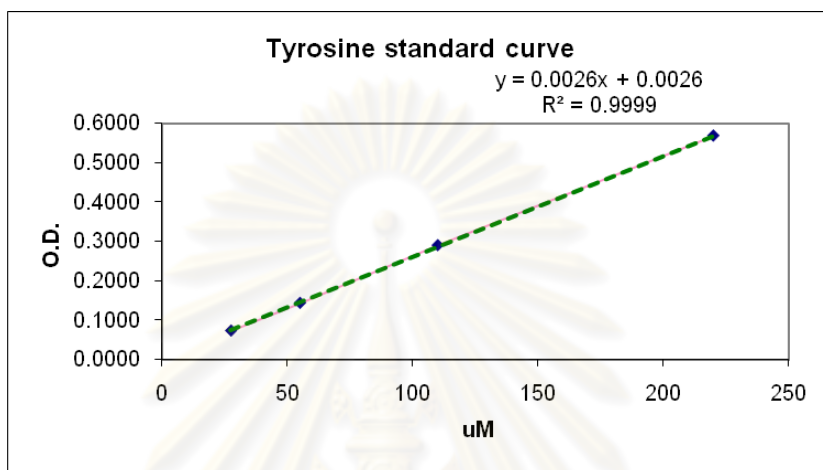
ตารางที่ 10 แสดงปริมาณโปรตีนของแต่ละ fraction ด้วยวิธี Bradford protein assay

| Fraction              | Tube position<br>(No.) | Total volumes<br>(ml) | Protein conc.<br>(ug/ml) | Total protein<br>(ug) | Percent<br>(%) |
|-----------------------|------------------------|-----------------------|--------------------------|-----------------------|----------------|
| Fraction I            | 28-36                  | 18                    | 669.80                   | 12,056.40             | 20.51          |
| Fraction II           | 41-53                  | 26                    | 1,538.00                 | 39,988.00             | 68.04          |
| Fraction III          | 54-64                  | 22                    | 96.70                    | 2,127.40              | 3.62           |
| Fraction IV           | 65-76                  | 24                    | 36.30                    | 871.20                | 1.48           |
| Crude venom 100 mg/ml | -                      | -                     | 58,770.00                | 58,770.00             | 100.00         |

### 3. ขั้นตอนการตรวจสอบ fraction ที่แยกได้

#### 3.1 ผลการทดสอบปฏิกิริยา Protease & Metalloproteinase

จากผลการทดสอบปฏิกิริยาของ protease และ metalloproteinase ในพิษงูแมวเซา เมื่อเปรียบเทียบกับกราฟของสารมาตรฐาน tyrosine ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 11



รูปที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD กับปริมาณกรดอะมิโนมาตรฐาน Tyrosine โดยวิธี Sigma's Non-specific Protease Activity Assay – Casein as a Substrate

ตารางที่ 11 แสดงผลการทดสอบปฏิกิริยาของ Protease & Metalloproteinase ในพิษงูแมวเซา แยกส่วน

| RVV     | EDTA | OD 660 nm | uM    | U/ml solid | U/mg protein |
|---------|------|-----------|-------|------------|--------------|
| Fr. I   | -    | 0.1562    | 59.08 | 51.69      | 59.03        |
|         | +    | 0.1314    | 49.54 | 43.35      | 49.50        |
| Fr. II  | -    | 0.1283    | 48.35 | 42.30      | 21.80        |
|         | +    | 0.1337    | 50.42 | 44.12      | 22.73        |
| Fr. III | -    | 0.1399    | 52.81 | 46.21      | 91.27        |
|         | +    | 0.1700    | 64.38 | 56.34      | 111.28       |
| Fr. IV  | -    | 0.1216    | 45.77 | 40.05      | 61.49        |
|         | +    | 0.1352    | 51.00 | 44.63      | 68.51        |

ผลจากตารางที่ 11 บ่งชี้ว่า fraction I มีปริมาณ protease enzyme มากที่สุด และเมื่อเติม EDTA เพื่อยับยั้งปฏิกิริยาของ metalloproteinase พบว่าปฏิกิริยาของ protease enzyme ลดลง แสดงว่าเป็นอนุพันธ์ของ protease enzyme ในกลุ่มของ metalloproteinase

### 3.2 ผลการทดสอบปฏิกิริยา Phospholipase A<sub>2</sub>

จากผลการทดสอบปฏิกิริยาของ Phospholipase A<sub>2</sub> เมื่อเปรียบเทียบกับค่าเปลี่ยนของค่า absorbance 0.1 AU ที่ความยาวคลื่น 425 nm ของ substrate จะมีค่าเท่ากับ 25.8 nmoles ของ chromophore ที่ถูกปลดปล่อยออกมา ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 12

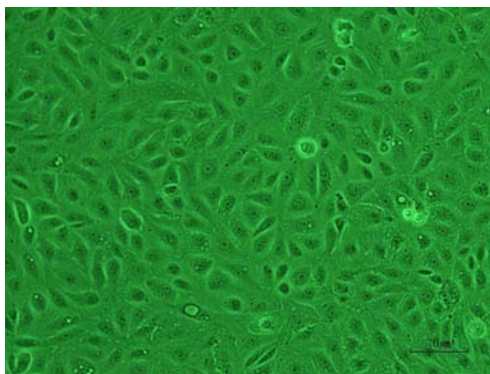
ตารางที่ 12 แสดงผลการทดสอบปฏิกิริยาของ Phospholipase A<sub>2</sub> ในพินูแมวเซาแยกส่วน

| Fraction | OD 425 nm | nm/mg       |
|----------|-----------|-------------|
| Fr. I    | 0.01970   | 11.60593792 |
| Fr. II   | 1.36170   | 361.9606037 |
| Fr. III  | 0.05815   | 59.25798654 |
| Fr. IV   | 0.01635   | 12.95045529 |

ผลจากตารางที่ 12 พบว่า fraction II มีปฏิกิริยาของเอนไซม์ phospholipase A<sub>2</sub> มากที่สุด

### 4. ผลการเพาะเลี้ยง HK-2 cell

เซลล์ HK-2 cell ที่โตประมาณ 90% ก่อนนำมาทดสอบกับพินูแมวเซาโดยส่วนประกอบของอาหารคือ DMEM supplemented with 10% FBS, 100 IU/ml of penicillin/streptomycin เพาะเลี้ยงในตู้บับ 37 °C ที่มี water vapor saturated 5% CO<sub>2</sub>/95% air (รูปที่ 5)

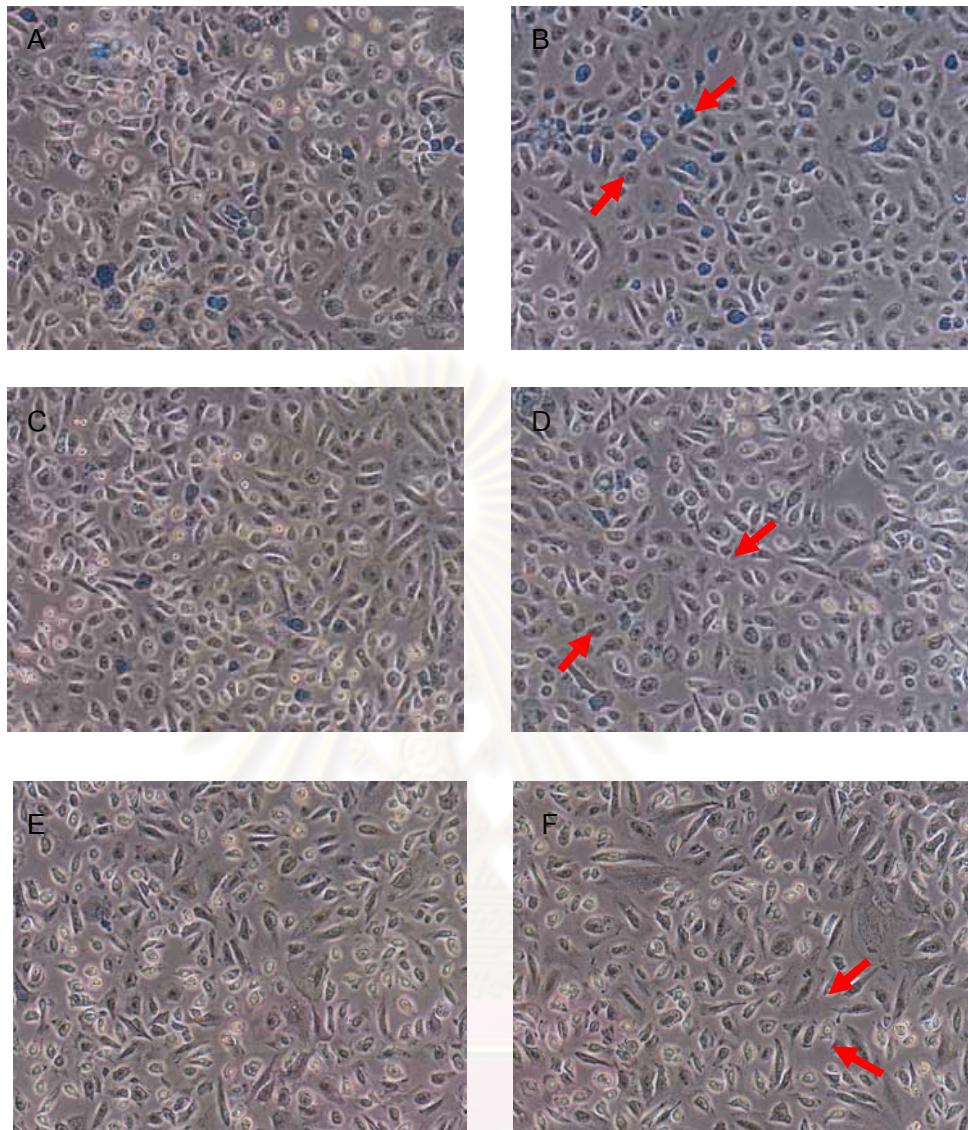


รูปที่ 5 แสดง HK-2 cell ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วย DMEM supplemented with 10% FBS, 100 IU/ml of penicillin/streptomycin เพาะเลี้ยงในตู้บัพ 37°C ที่มี water vapor saturated 5% CO<sub>2</sub>/95% air ซึ่งโตประมาณ 90% ก่อนนำมาทดสอบกับพิษงูแมวเซา

## 5. ศึกษาการบาดเจ็บและการตายของเซลล์จากพิษงูแมวเซาที่ Dose และ Time dependence

### 5.1 ผลการศึกษา dose dependence

ก) การศึกษาอัตราการตายด้วยวิธี *Trypan blue exclusion method* ทำการศึกษาอัตราการตายของ HK-2 cell โดยการทดสอบกับพิษงูแมวเซาที่ความเข้มข้น 10, 50, 100, 500 และ 1,000 µg/ml และบ่มเพาะเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 6 พบว่า control cell ที่ไม่ได้ใส่พิษงูมีอัตราการตายน้อยกว่าร้อยละ 1 ส่วนกลุ่ม treated cell ที่ทดสอบด้วยพิษงูที่ความเข้มข้น 10, 50, 100, 500 และ 1,000 µg/ml มีอัตราการตายน้อยละ 7 ขึ้นไป เมื่อสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์พบว่าเซลล์มีการหดตัว (ดังแสดงตามรูปลูกศรชี้ในรูปที่ 6D) ทำให้เกิดช่องว่างระหว่างเซลล์ (ดังแสดงตามรูปลูกศรชี้ในรูปที่ 6F) นอกจากนี้เซลล์ยังมีลักษณะเปื่อยยุ่ยมากขึ้นเมื่อเซลล์ถูกทดสอบกับพิษงูที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น เซลล์ตายจะติดสีฟ้าของ trypan blue (ดังแสดงตามรูปลูกศรชี้ในรูปที่ 6B)



รูปที่ 6 แสดงการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เพาะเลี้ยง HK-2 cell เมื่อทดสอบด้วย พิษงูแมวเซาที่มีความเข้มข้น 10, 50, 100, 500 และ 1,000  $\mu\text{g/ml}$  บ่มเพาะเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค Trypan blue staining โดยการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ (light microscope; X200)

A=Control cell (ไม่ได้เติมพิษงูแมวเซา),

B=Treated cell RVV dose 10  $\mu\text{g/ml}$ ,

C=Treated cell RVV dose 50  $\mu\text{g/ml}$ ,

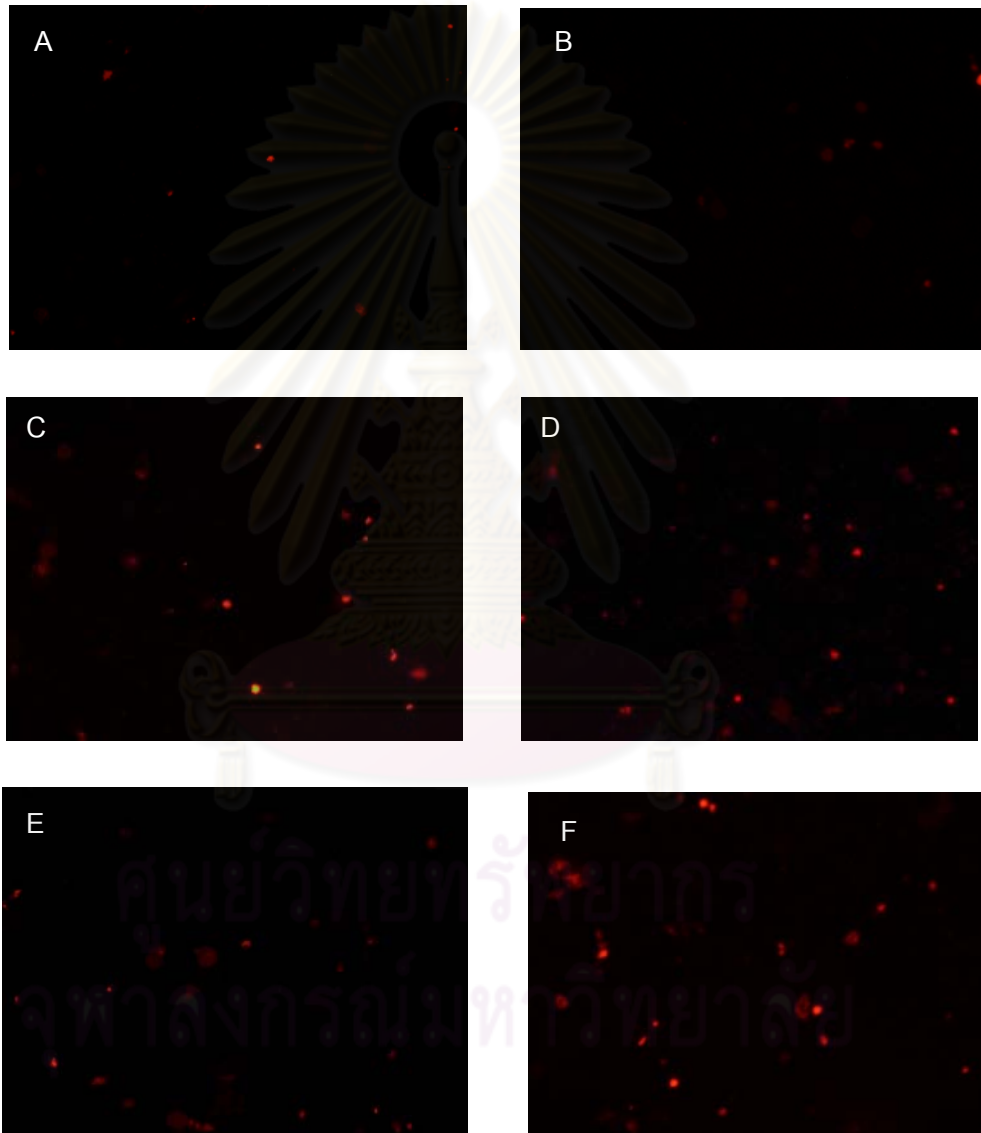
D=Treated cell RVV dose 100  $\mu\text{g/ml}$ ,

E=Treated cell RVV dose 500  $\mu\text{g/ml}$ ,

และ F=Treated cell RVV dose 1,000  $\mu\text{g/ml}$



ข) การศึกษาอัตราการตายด้วยการย้อม *Propidium iodide (PI)* ทำการศึกษาอัตราการตายของ HK-2 cell โดยการทดสอบกับพิษงูแมวเซาที่ความเข้มข้น 10, 50, 100, 500 และ 1,000  $\mu\text{g/ml}$  และบ่มเพาะเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า control cell ที่ไม่ได้ใส่พิษงูมีอัตราการตายน้อยกว่าร้อยละ 1 ส่วนกลุ่ม treated cell ที่ทดสอบด้วยพิษงูที่ความเข้มข้น 10, 50, 100, 500 และ 1,000  $\mu\text{g/ml}$  มีอัตราการตายน้อยกว่าร้อยละ 11 ขึ้นไป ดังแสดงในรูปที่ 7



รูปที่ 7 แสดงปริมาณการตายของเซลล์เพาะเลี้ยง HK-2 cell เมื่อทดสอบด้วยพิษงูแมวเซาที่ความเข้มข้น 10, 50, 100, 500 และ 1,000  $\mu\text{g/ml}$  บ่มเพาะเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค Propidium iodide staining โดยการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์

(fluorescent microscope; X200)

A=Control cell (ไม่ได้เติมพิษงูแมวเซา),

B=Treated cell RVV dose 10  $\mu\text{g/ml}$ ,

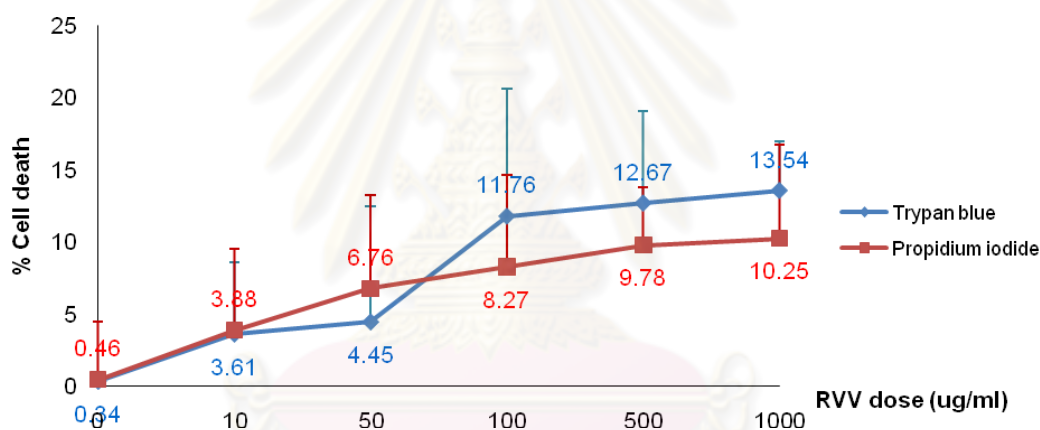
C=Treated cell RVV dose 50  $\mu\text{g/ml}$ ,

D=Treated cell RVV dose 100  $\mu\text{g/ml}$ ,

E=Treated cell RVV dose 500  $\mu\text{g/ml}$ ,

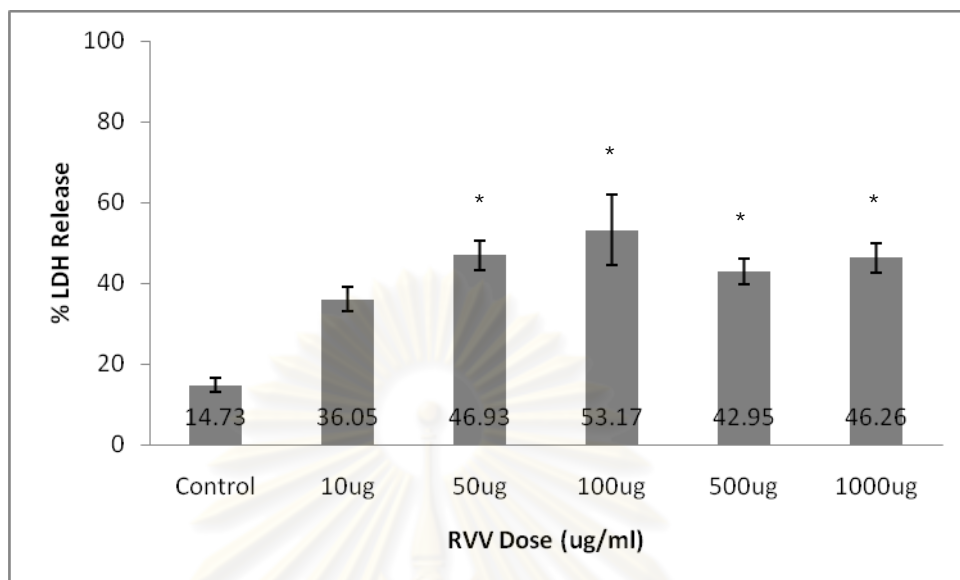
และ F=Treated cell RVV dose 1,000  $\mu\text{g/ml}$

เมื่อนับจำนวนการตายของ HK-2 cell เปรียบเทียบกันระหว่างการย้อมสี trypan blue และ propidium iodide พบว่ามีอัตราการตายเป็นไปในทิศทางเดียวกัน ดังแสดงในรูปที่ 8



รูปที่ 8 กราฟแสดงอัตราการตายของเซลล์เพาะเลี้ยง HK-2 cell เปรียบเทียบระหว่างการย้อมสี trypan blue และ propidium iodide ของ dose dependence

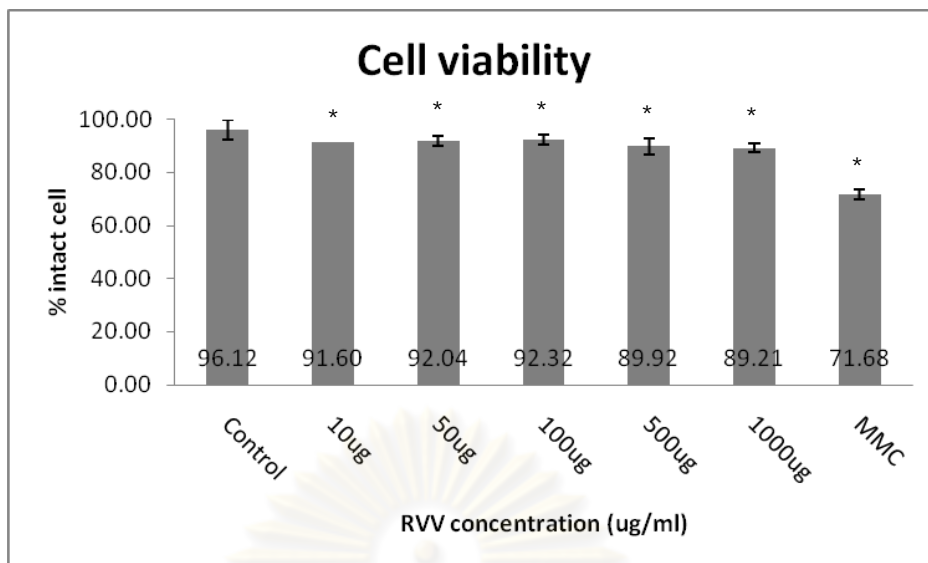
ค) การศึกษาการบาดเจ็บของเซลล์ภายหลังการทดสอบด้วยพิษงู การวัดอัตราการบาดเจ็บด้วยการวัดระดับ LDH ทำการวัดใน control cell และวัด treated cell ที่ทำการทดสอบกับพิษงูแมวเซาที่ความเข้มข้น 10, 50, 100, 500 และ 1,000  $\mu\text{g/ml}$  ณ เวลา 24 ชั่วโมง คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เปรียบเทียบ supernatant ต่อ sediment พบว่าความเข้มข้นของพิษงูแมวเซาที่ทำให้เซลล์มีการปล่อย LDH ออกมามากขึ้นที่สุด คือ 100  $\mu\text{g/ml}$  (รูปที่ 9)



\* Value significantly different from control group,  $P < 0.05$

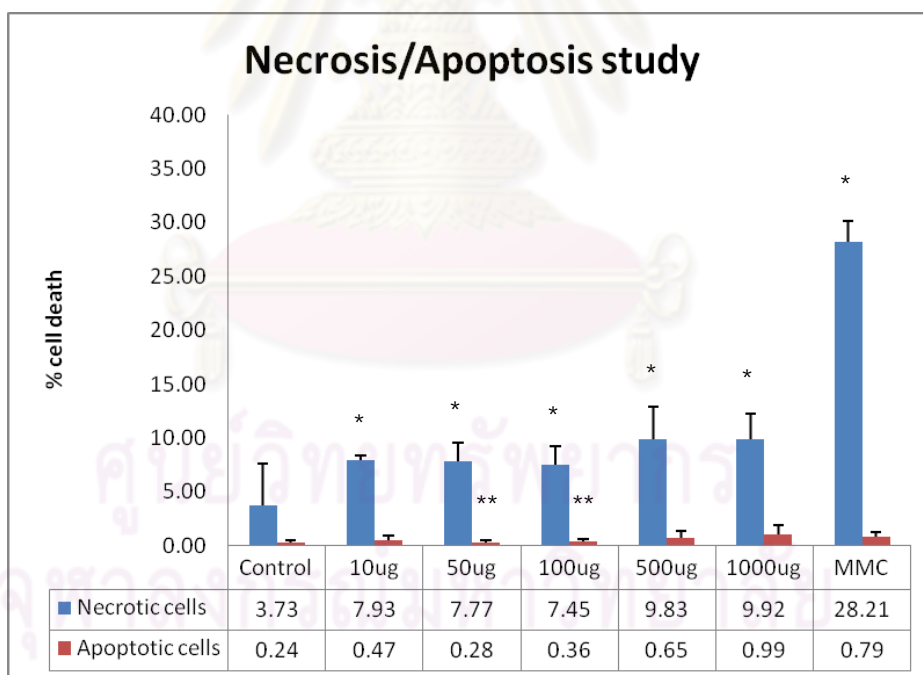
รูปที่ 9 กราฟแสดงค่า lactate dehydrogenase (LDH) หลังจากเซลล์เพาะเลี้ยง HK-2 cell ได้รับการบ่มเพาะด้วยพิษงูแมวเซาที่มีความเข้มข้น 10, 50, 100, 500 และ 1,000  $\mu\text{g/ml}$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เปรียบเทียบระหว่าง supernatant และ sediment

ง) การศึกษาลักษณะการตายของเซลล์ การศึกษาการตายของเซลล์ด้วย Annexin V/Propidium iodide-labeling flow cytometry ภายหลังจากทดสอบด้วยพิษงูแมวเซาที่มีความเข้มข้น 10, 50, 100, 500 และ 1,000  $\mu\text{g/ml}$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้สาร Mitomycin C (MMC) เป็น positive control พบว่าเซลล์มีอัตราการรอดชีวิตลดลงเมื่อบ่มด้วยพิษงูที่มีความเข้มข้นมากขึ้น (รูปที่ 10) และชนิดการตายของเซลล์เป็นแบบ necrotic cell (รูปที่ 11)



\* Value significantly different from control group,  $P < 0.05$

รูปที่ 10 กราฟแสดงอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์เพาะเลี้ยง HK-2 cell หลังจากเซลล์ได้รับการบ่มเพาะด้วยพิษงูแมวเซาที่มีความเข้มข้น 10, 50, 100, 500 และ 1,000  $\mu\text{g/ml}$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



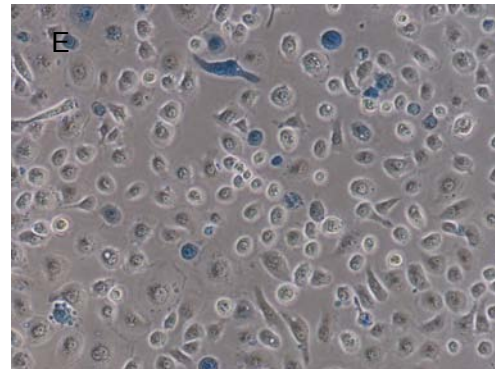
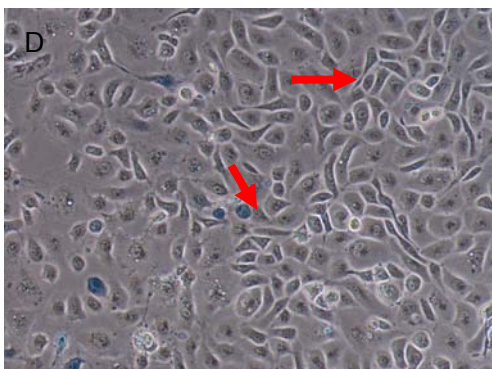
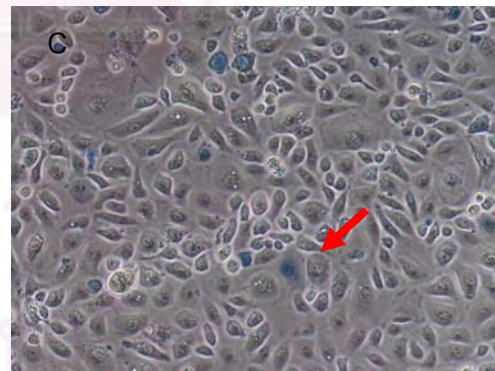
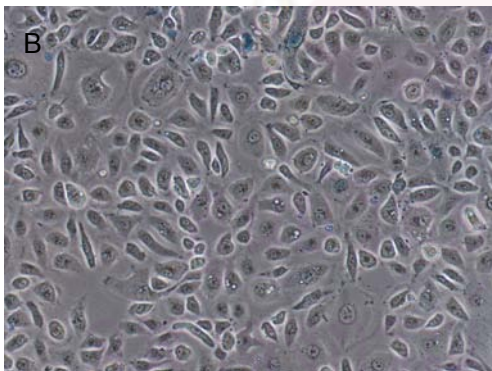
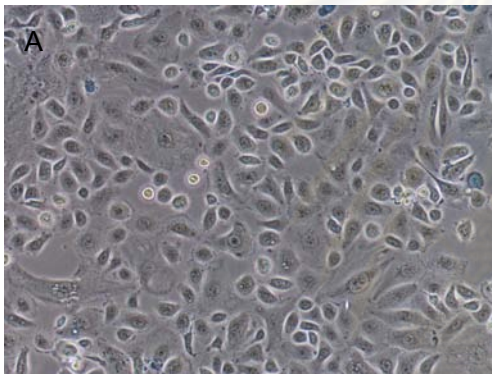
\* Value significantly different from control group,  $P < 0.05$ ; Necrotic cells group

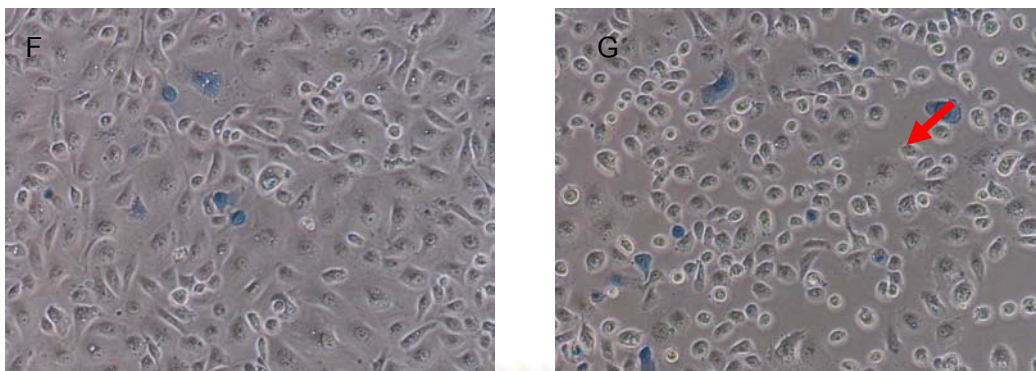
\*\* Value significantly different from control group,  $P < 0.05$ ; Apoptotic cells group

รูปที่ 11 กราฟแสดงลักษณะการตายของเซลล์เพาะเลี้ยง HK-2 cell หลังจากเซลล์ได้รับการบ่มเพาะด้วยพิษงูแมวเซาที่มีความเข้มข้น 10, 50, 100, 500 และ 1,000  $\mu\text{g/ml}$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

## 5.2 ผลการศึกษา time dependence

ก) การศึกษาอัตราการตายด้วยวิธี *Trypan blue exclusion method* ทำการศึกษาอัตราการตายของ HK-2 cell โดยการทดสอบกับพิษงูแมวเซาที่ความเข้มข้น 1,000  $\mu\text{g/ml}$  เป็นเวลา 6, 8, 10, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 12 พบว่า control cell ที่ไม่ได้ใส่พิษงูมีอัตราการตายน้อยกว่าร้อยละ 1 ส่วนกลุ่ม treated cell ที่มีอัตราการตายน้อยละ 1 ขึ้นไป ที่เวลา 6, 8, 10, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง เซลล์มีอัตราการตายมากขึ้นตามลำดับ เมื่อสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์พบว่าเซลล์มีการหดตัว (ดังแสดงตามรูปลูกศรชี้ในรูปที่ 12D) ทำให้เกิดช่องว่างระหว่างเซลล์ (ดังแสดงตามรูปลูกศรชี้ในรูปที่ 12G) นอกจากนี้เซลล์ยังมีลักษณะเปื่อยยุ่ยมากขึ้นเมื่อเซลล์ถูกทดสอบกับพิษงูที่ระยะเวลาที่มากขึ้น เซลล์ตายจะติดสีฟ้าของ trypan blue (ดังแสดงตามรูปลูกศรชี้ในรูปที่ 12C)





รูปที่ 12 แสดงการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เพาะเลี้ยง HK-2 cell เมื่อทดสอบด้วย พิษงูแมวเซาเข้มข้น 1,000  $\mu\text{g/ml}$  บ่มเพาะเป็นเวลา 6, 8, 10, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง ด้วย เทคนิค Trypan blue staining โดยการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ (light microscope; X200)

A=Control cell 24 hours (ไม่ได้เติมพิษงูแมวเซา),

B=Treated cell 6 hours,

C=Treated cell 8 hours,

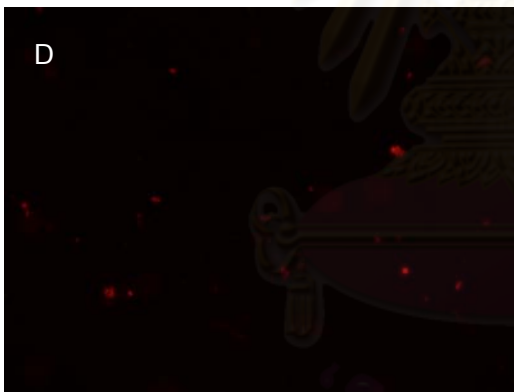
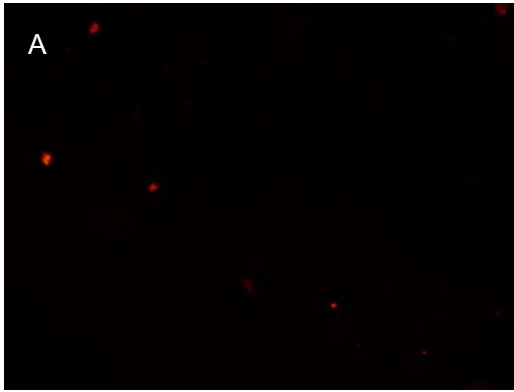
D=Treated cell 10 hours,

E=Treated cell 12 hours,

F=Treated cell 18 hours,

และ G=Treated cell 24 hours

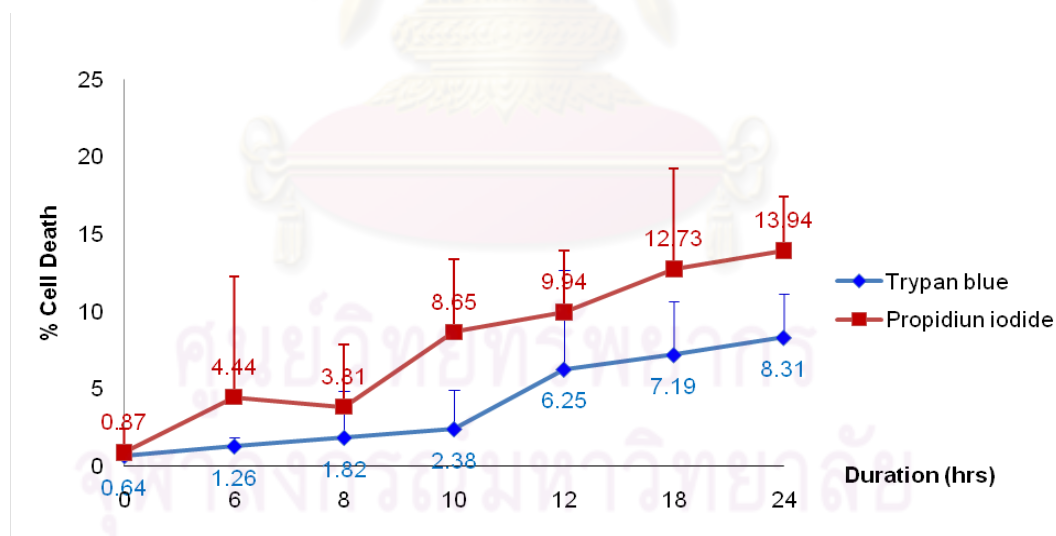
ข) การศึกษาอัตราการตายด้วยการย้อม *Propidium iodide* (PI) ทำการศึกษาอัตราการตายของ HK-2 cell โดยการทดสอบกับพิษงูแมวเซาที่ความเข้มข้น 1,000  $\mu\text{g/ml}$  โดย นิวเคลียสย้อมติดสีของ PI เป็นสีแดงเนื่องจากดูดกลืนแสงสีเขียว ด้วยกล้อง fluorescent พบว่า nucleus ของ control cell ที่ไม่ได้ใส่พิษงูมีการติดสีของ PI มีอัตราการตายน้อยกว่าร้อยละ 1 ส่วนกลุ่ม test มีอัตราการตายน้อยละ 4 ขึ้นไป และมีอัตราการตายสูงขึ้นตามลำดับ ที่เวลา 6, 8, 10, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 13



รูปที่ 13 แสดงปริมาณการตายของเซลล์เพาะเลี้ยง HK-2 cell เมื่อทดสอบด้วยพิษงูแมวเซา เข้มข้น 1,000 µg/ml บ่มเพาะที่เวลา 6, 8, 10, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค Propidium iodide staining โดยการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent microscope; X200)

A=Control cell 24 hours (ไม่ได้เติมพิษงูแมวเซา),  
 B=Treated cell 6 hours,  
 C=Treated cell 8 hours,  
 D=Treated cell 10 hours,  
 E=Treated cell 12 hours,  
 F=Treated cell 18 hours,  
 และ G=Treated cell 24

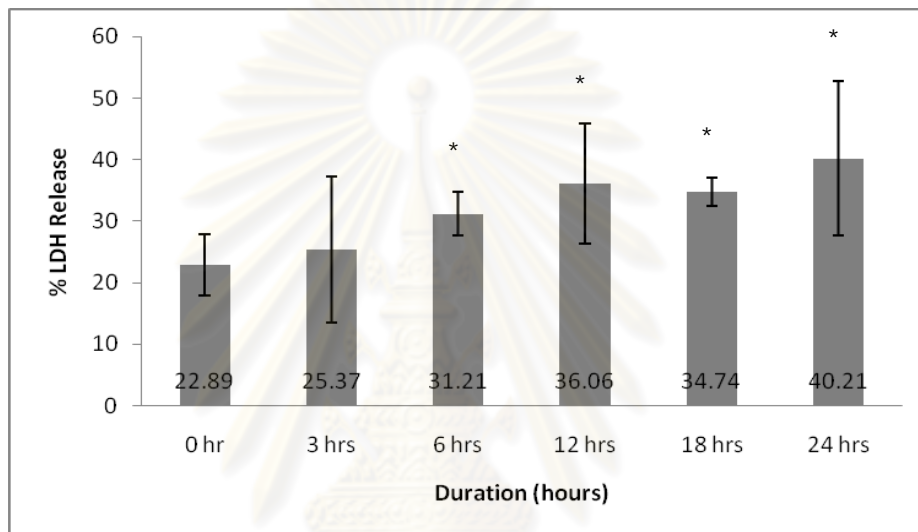
เมื่อเปรียบเทียบอัตราการตายของ HK-2 cell ระหว่างการย้อมสี trypan blue และ propidium iodide พบว่ามีอัตราการตายเป็นไปในทิศทางเดียวกัน ดังแสดงในรูปที่ 14



รูปที่ 14 กราฟแสดงอัตราการตายของเซลล์เพาะเลี้ยง HK-2 cell ที่เวลา 6, 8, 10, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง เมื่อบ่มเพาะกับพิษงูแมวเซาความเข้มข้น 1,000 µg/ml โดยการย้อมสีเซลล์ด้วย trypan blue และ propidium iodide



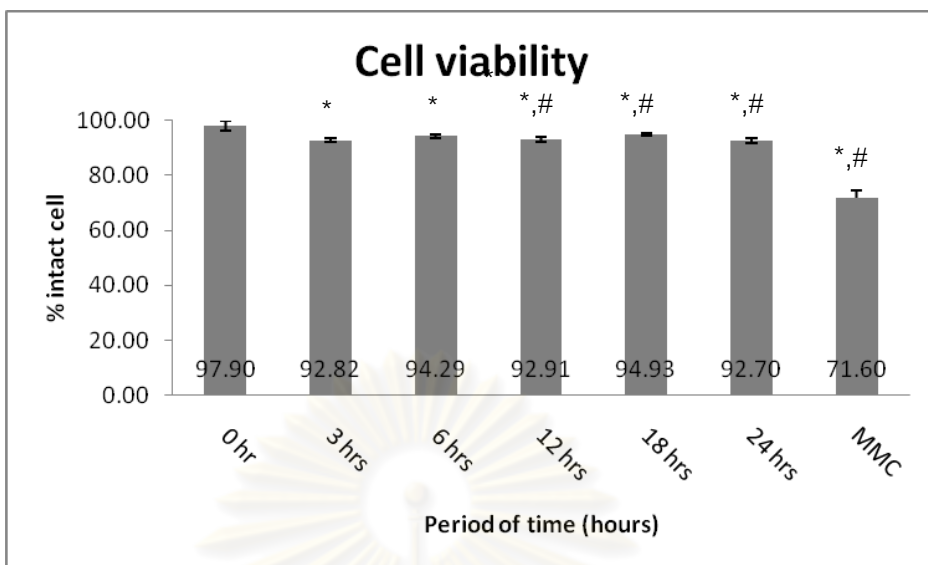
ค) การศึกษาการบาดเจ็บของเซลล์ภายหลังการทดสอบด้วยพิษงู ทำการวัดอัตราการบาดเจ็บของเซลล์ด้วยการวัดความเข้มข้นของ LDH ที่ปลดปล่อยออกมาจากเซลล์เมื่อบ่มเพาะด้วยพิษงูแมวเซา ความเข้มข้น 100  $\mu\text{g/ml}$  ณ เวลา 0, 3, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง โดยค่าความเข้มข้น 100  $\mu\text{g/ml}$  ของพิษงูแมวเซาได้มาจากค่าที่สูงที่สุดในการปลดปล่อย LDH จากการศึกษาการบาดเจ็บของเซลล์ที่ทำการทดสอบกับพิษงูด้วยความเข้มข้นต่างๆ กัน คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เปรียบเทียบกับ supernatant ต่อ sediment พบว่า HK-2 cell หลัง LDH สูงที่สุดที่เวลา 24 ชั่วโมง (รูปที่ 15)



\* Value significantly different from control group,  $P < 0.05$

รูปที่ 15 กราฟแสดงค่า lactate dehydrogenase (LDH) หลังจากเซลล์เซลล์เพาะเลี้ยง HK-2 cell ได้รับการบ่มเพาะด้วยพิษงูแมวเซาที่มีความเข้มข้น 100  $\mu\text{g/ml}$  ณ เวลา 0, 3, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เปรียบเทียบระหว่าง supernatant และ sediment

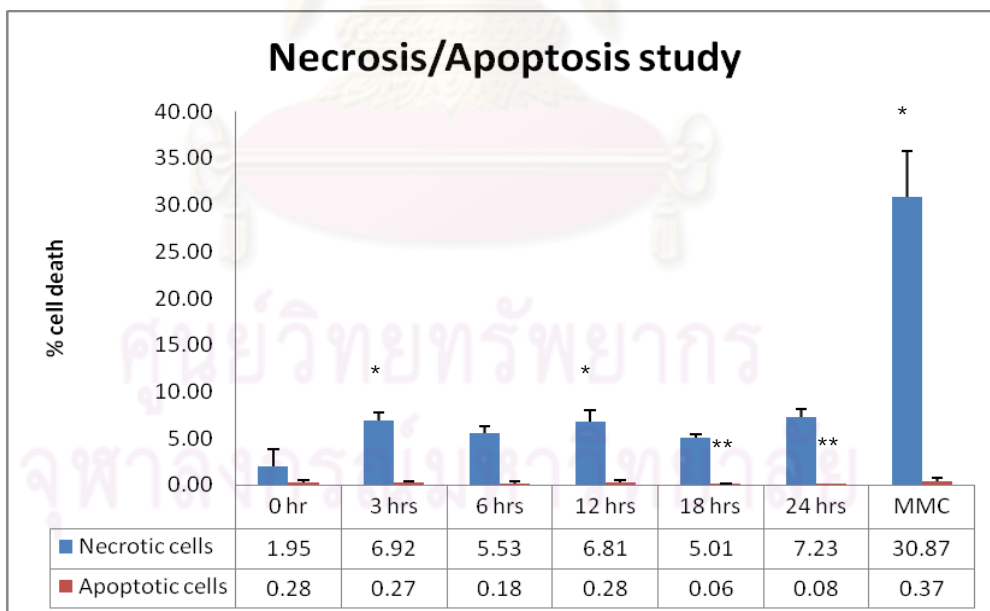
ง) การศึกษาลักษณะการตายของเซลล์ การศึกษาการตายของเซลล์ด้วย Annexin V/Propidium iodide-labeling flow cytometry ภายหลังการทดสอบด้วยพิษงูแมวเซาที่มีความเข้มข้น 500  $\mu\text{g/ml}$  ณ เวลา 0, 3, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง โดยค่าความเข้มข้นของพิษงูแมวเซาที่มีค่าสูงที่สุดในการศึกษาการตายของเซลล์ด้วย Annexin V/Propidium iodide-labeling flow cytometry คือ 1,000  $\mu\text{g/ml}$  แต่ที่ความเข้มข้นของพิษระดับนี้มีผลทำให้เซลล์อ่อนแออย่างรุนแรงเมื่อนำไปปั่นล้างตามกระบวนการย้อมสี annexin V และ propidium iodide มีผลทำให้เซลล์มีอัตราการตายเพิ่มมากขึ้นจากกระบวนการดังกล่าว ดังนั้นจึงเลือกใช้ความเข้มข้นที่มีอัตราการตายสูงรองลงมาคือ ความเข้มข้น 500  $\mu\text{g/ml}$  มาทำการทดสอบกับเซลล์ พบว่าเซลล์มีอัตราการรอดชีวิตไม่แตกต่างกัน (รูปที่ 16) ชนิดการตายของเซลล์เป็นแบบ necrotic cell (รูปที่ 17)



\* Value significantly different from control group,  $P < 0.05$

# Value significantly different from 6 hours,  $P < 0.05$

รูปที่ 16 กราฟแสดงการมีชีวิตรอดของเซลล์ หลังจากเซลล์เพาะเลี้ยง HK-2 cell ได้รับการบ่มเพาะด้วยพิษงูแมวเซาที่มีความเข้มข้น 500 µg/ml ณ เวลา 0, 3, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง



\* Value significantly different from control group,  $P < 0.05$ ; Necrotic cells group

\*\* Value significantly different from control group,  $P < 0.05$ ; Apoptotic cells group

รูปที่ 17 กราฟแสดงลักษณะการตายของเซลล์ หลังจากเซลล์เพาะเลี้ยง HK-2 cell ได้รับการบ่มเพาะด้วยพิษงูแมวเซาที่มีความเข้มข้น 500 µg/ml ณ เวลา 0, 3, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง

## 6. การศึกษาผลของพิษงูแมวเซาที่ผลต่อระดับ minute injury

### 6.1 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ (ultrastructure cell morphology) โดยเทคนิค transmission electron microscopy (TEM)

นำ HK-2 cell มาทดสอบกับพิษงูแมวเซาความเข้มข้น 100 µg/ml นาน 15 นาที แล้วนำมา process ตามขั้นตอนการเตรียม specimen สำหรับตรวจด้วยกล้อง transmission electron microscopy ดังแสดงในรูปที่ 18

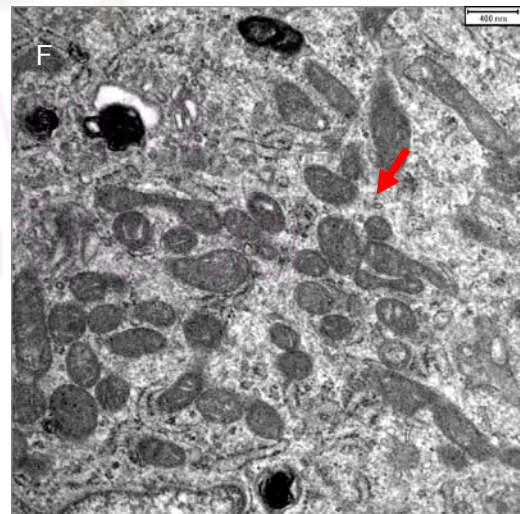
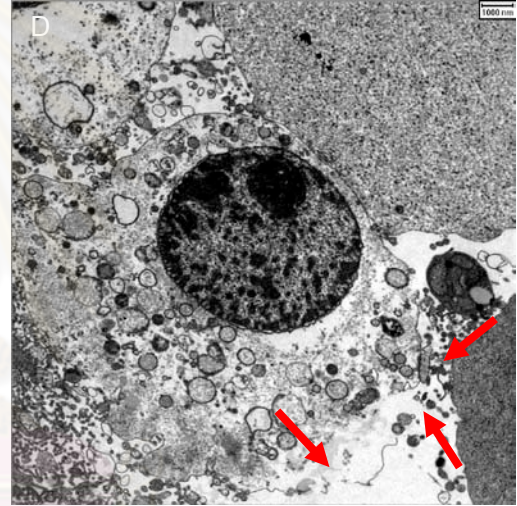
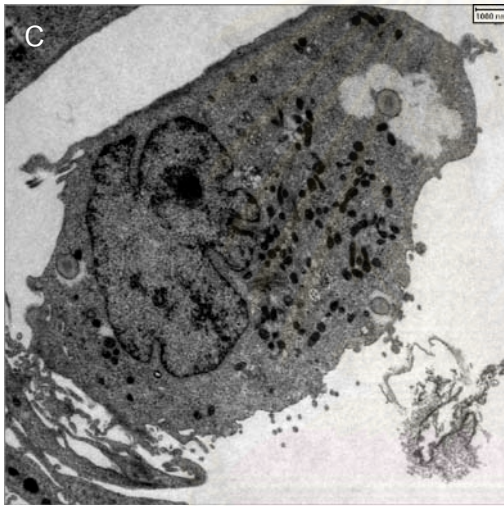
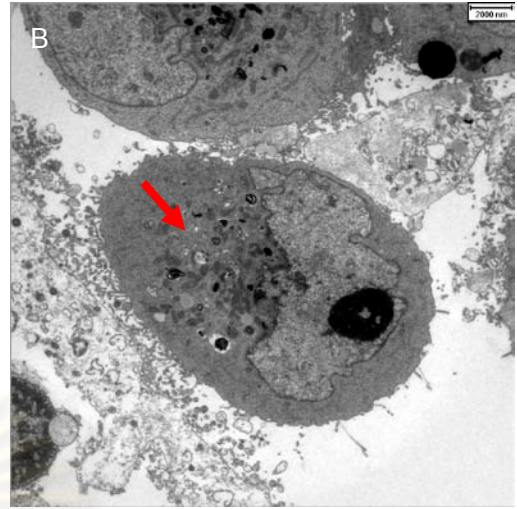
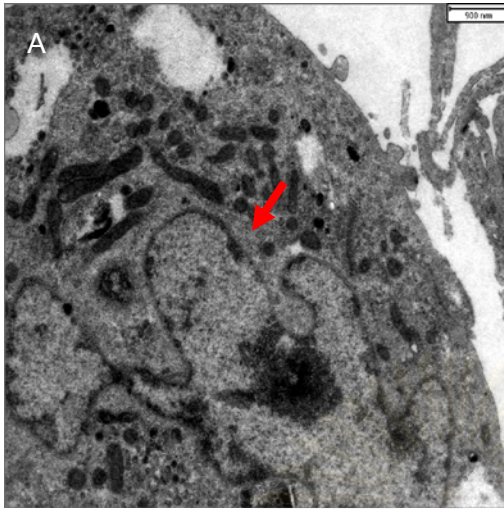
เมื่อตรวจสอบชนิดการตายของเซลล์ พบว่าเซลล์มีการตายทั้งสองลักษณะ คือแบบ apoptosis (รูปที่ 18A แสดงการตายแบบ apoptotsis ในระยะ eary state) และแบบ necrosis (รูปที่ 18B) แต่มีการตายแบบ necrosis มากกว่า โดยการตายแบบ apoptosis เซลล์จะมีลักษณะหดตัวเล็กลง (cell shrinkage) โครมาตินหนาตัวขึ้น ดีเอ็นเอแตกเบีท่อน ต่อมานิวเคลียสแตกออกเป็นชิ้นๆ (nuclear fragmentation) เยื่อหุ้มเซลล์ปูด พองมีลักษณะเป็นถุงเล็กๆ (membrane blebbing) และในที่สุดเซลล์แตกออกเป็นชิ้นส่วน (cell fragmentation), ส่วนการตายแบบ necrosis เซลล์จะมีลักษณะการบวมของเซลล์ การย่อยสลายโครมาติน และการเสื่อมสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มออร์แกเนลล์ ในระยะต่อมาจะเกิดการย่อยสลายดีเอ็นเอ การเกิดช่องว่าง (vacuolation) ของเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (endoplasmic reticulum) การสลายของออร์แกเนลล์ และเกิดการสลายเซลล์ หลังจากเยื่อหุ้มเซลล์แตกสลายจะมีการปล่อยองค์ประกอบภายในเซลล์ซึ่งทำให้เกิดการอักเสบ

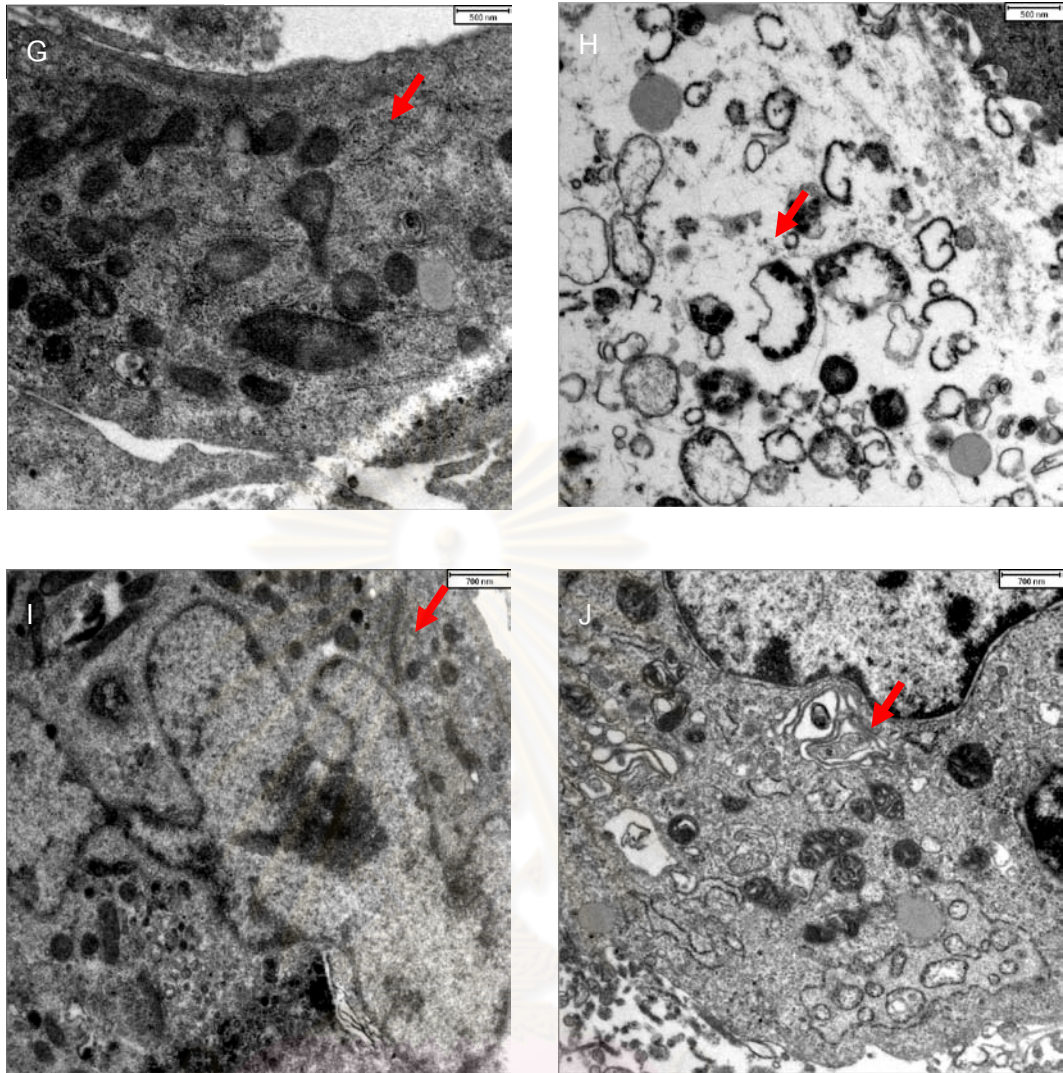
ผนังเซลล์ (cell wall) ของ treated cell มีการฉีกขาด (ดังแสดงตามรูปลูกศรชี้ในรูปที่ 18D) ในขณะที่ control cell ผนังเซลล์มีลักษณะปกติ ไม่พบการฉีกขาด (รูปที่ 18C)

Mitochondria ของ treated cell มีการบวมพองออกอย่างเห็นได้อย่างชัดเจน cistre มีการแตกหักออก จน mitochondria ไส้มากขึ้น (รูปที่ 18F) ไม่เห็นเป็นสีเข้มเมื่อเปรียบเทียบกับ control cell (รูปที่ 18E)

Endoplasmic reticulum ของ treated cell มีการบวมพอง โป่งออกอย่างเห็นได้อย่างชัดเจน (รูปที่ 18H) เมื่อเปรียบเทียบกับ control cell (รูปที่ 18G)

Golgi apparatus ของ treated cell มีการบวมพองออก ไม่จัดเรียงตัวเป็นชั้นอย่างเป็นระเบียบ (รูปที่ 18J) เมื่อเปรียบเทียบกับ control cell (รูปที่ 18I)



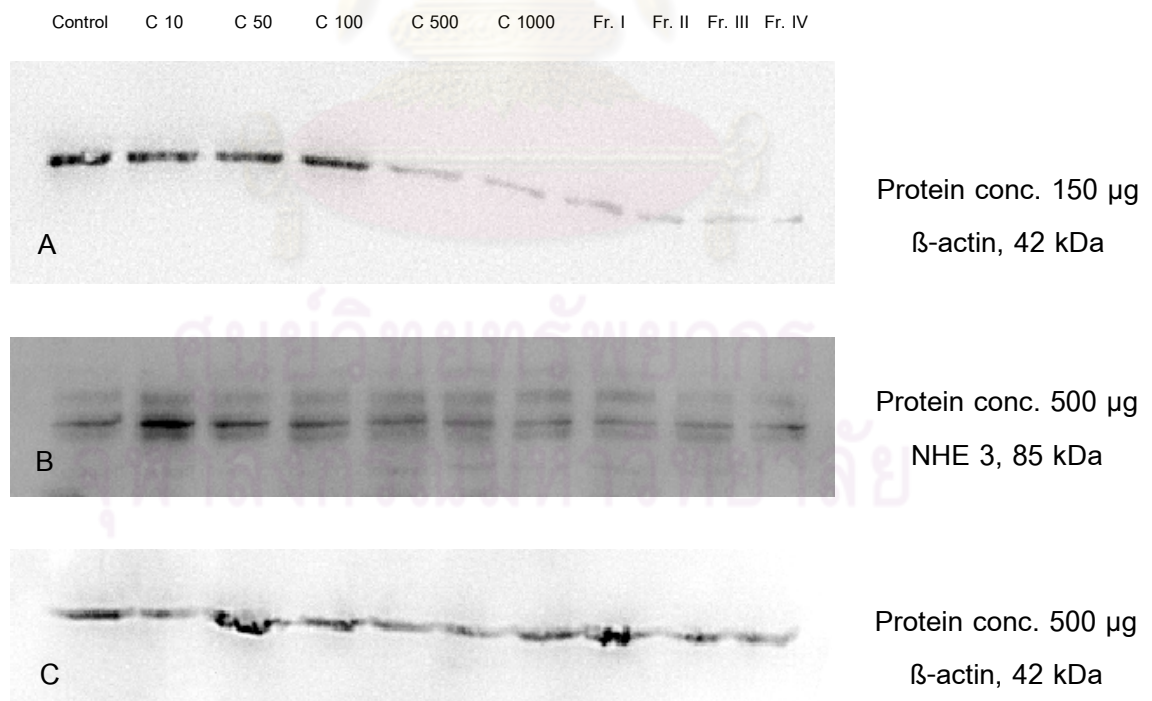


รูปที่ 18 แสดงการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เพาะเลี้ยง HK-2 cell ด้วย transmission electron microscopy เมื่อใช้พิษงูแมวเซาเข้มข้น 100  $\mu\text{g/ml}$  บ่มเพาะนาน 15 นาที;  
 A=แสดงการตายแบบ apoptosis, B=แสดงการตายแบบ necrosis,  
 C=Control cell แสดงลักษณะของผนังเซลล์ปกติ,  
 D=Treated cell แสดงลักษณะของผนังเซลล์ที่มีการฉีกขาด,  
 E=Control cell แสดงลักษณะของ mitochondria ปกติ,  
 F=Treated cell แสดงลักษณะของ mitochondria ที่ผิดปกติ,  
 G=Control cell แสดงลักษณะของ endoplasmic reticulum ปกติ,  
 H=Treated cell แสดงลักษณะของ endoplasmic reticulum ที่ผิดปกติ,  
 I=Control cell แสดงลักษณะของ golgi apparatus ปกติ,  
 และ J=Treated cell แสดงลักษณะของ golgi apparatus ปกติ

## 6.2 ผลการศึกษา sodium transcellular ด้วยเทคนิค western blot

sodium/hydrogen exchange 3 (NHE 3) เป็นโปรตีนที่พบบริเวณ apical membrane ของไต มีหน้าที่ในการควบคุมปริมาณโซเดียมและปริมาณการไหลผ่านของน้ำ

ผลการศึกษาการปรากฏของโปรตีน NHE 3 ขนาด 85 kDa และ  $\beta$ -actin ขนาด 42 kDa โดยใช้ HK-2 cell lysed solution (sample) ที่มีความเข้มข้นโปรตีน 150  $\mu$ g มาจับกับ แอนติบอดีของ NHE 3 และ  $\beta$ -actin พบว่าไม่มีการปรากฏขึ้นของโปรตีน NHE 3 (ไม่แสดงผลการทดลอง) ส่วนการปรากฏของโปรตีน  $\beta$ -actin มีปริมาณลดลงเป็นสองช่วง คือช่วงที่ HK-2 cell ถูกทดสอบกับพิษงูแมวเซาที่มีความเข้มข้น 10-100  $\mu$ g/ml และ 500-1,000  $\mu$ g/ml โดยในช่วงแรกโปรตีน  $\beta$ -actin จะลดลงเล็กน้อย และในช่วงที่สองโปรตีน  $\beta$ -actin มีปริมาณลดลงอย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 19 A และตารางที่ 13) และเมื่อใช้ HK-2 cell lysed solution ที่มีความเข้มข้นโปรตีน 500  $\mu$ g การปรากฏของโปรตีน NHE 3 มีปริมาณลดลงเมื่อทดสอบกับพิษงูที่มีความเข้มข้นมากขึ้น และเมื่อทดสอบกับ fraction ของพิษงู พบว่าการปรากฏของโปรตีน NHE 3 มีปริมาณไม่แตกต่างกันในแต่ละ fraction (รูปที่ 19 B และตารางที่ 13) การปรากฏของโปรตีน  $\beta$ -actin มีปริมาณมากจนไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่าง sample ได้ (รูปที่ 19 C)



รูปที่ 19 แสดงการปรากฏของโปรตีนของเซลล์เพาะเลี้ยง HK-2 cell เมื่อทดสอบด้วยพิษงูแมวเซา ที่ความเข้มข้นต่างๆ บ่มเพาะนาน 24 ชั่วโมง ต่อแอนติบอดี  $\beta$ -actin เมื่อใช้ sample ที่มี

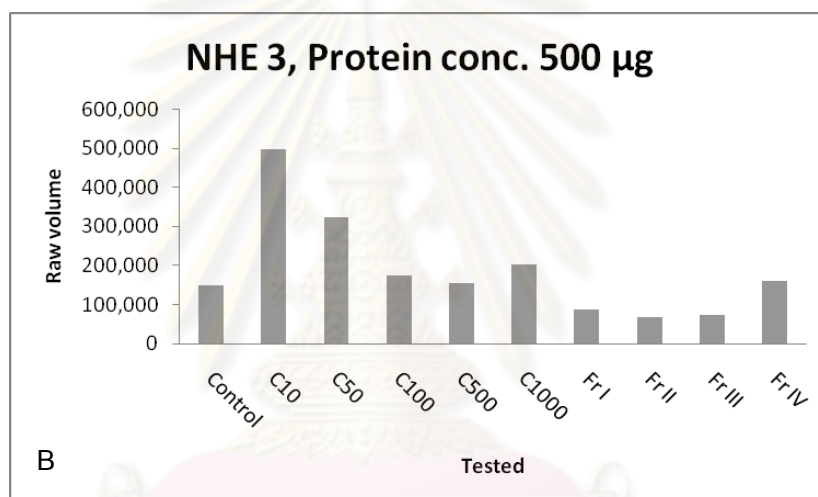
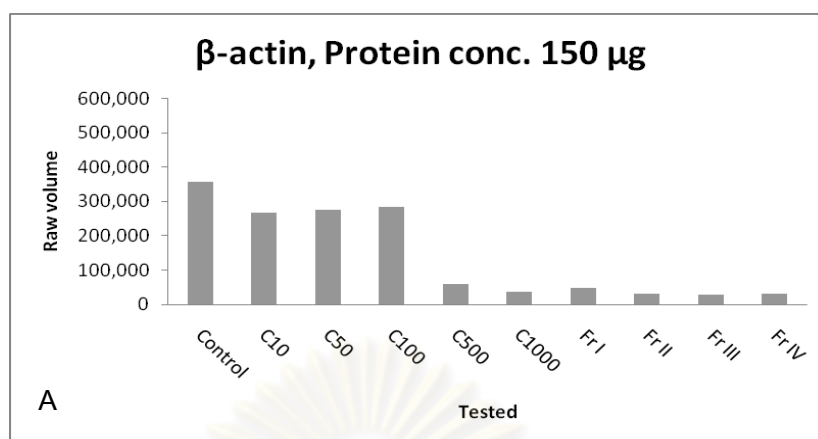
โปรตีนปริมาณ 150  $\mu\text{g}$  (A), ต่อแอนติบอดี sodium/hydrogen exchanger 3 [NHE 3] เมื่อใช้ sample ที่มีโปรตีนปริมาณ 500  $\mu\text{g}$  (B) และต่อแอนติบอดี  $\beta$ -actin เมื่อ reprobe ซ้ำในแผ่นที่ใช้ sample ที่มีโปรตีนปริมาณ 500  $\mu\text{g}$  (C);

Control= เซลล์ควบคุม, C10 = พิษงูแมวเซาเข้มข้น 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,  
 C50 = พิษงูแมวเซาเข้มข้น 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , C100 = พิษงูแมวเซาเข้มข้น 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,  
 C500 = พิษงูแมวเซาเข้มข้น 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , C1,000 = พิษงูแมวเซาเข้มข้น 1,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,  
 Fr.I = fraction I, Fr.II = fraction II,  
 Fr.III = fraction III และ Fr.IV = fraction IV

ตารางที่ 13 แสดงปริมาณโปรตีน  $\beta$ -actin ที่ปรากฏขึ้น เมื่อใช้ sample ที่มีโปรตีนปริมาณ 150  $\mu\text{g}$  และแสดงปริมาณโปรตีน NHE 3 ที่ปรากฏขึ้น เมื่อใช้ sample ที่มีโปรตีนปริมาณ 500  $\mu\text{g}$  โดยใช้ค่า raw volume ที่คำนวณจาก Gene snap software (Gene Tools; Syngene, MD, USA) เป็นตัวเปรียบเทียบการมีปริมาณมากหรือน้อยของโปรตีน;

Control= เซลล์ควบคุม, C10 = พิษงูแมวเซาเข้มข้น 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,  
 C50 = พิษงูแมวเซาเข้มข้น 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , C100 = พิษงูแมวเซาเข้มข้น 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,  
 C500 = พิษงูแมวเซาเข้มข้น 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , C1,000 = พิษงูแมวเซาเข้มข้น 1,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,  
 Fr.I = fraction I, Fr.II = fraction II,  
 Fr.III = fraction III และ Fr.IV = fraction IV

| Raw volume | Protein conc. ( $\mu\text{g}$ ) | Lane1<br>Control | Lane2<br>C 10 | Lane3<br>C 50 | Lane4<br>C 100 | Lane5<br>C 500 | Lane6<br>C 1,000 | Lane7<br>Fr. I | Lane8<br>Fr. II | Lane9<br>Fr. III | Lane10<br>Fr. IV |
|------------|---------------------------------|------------------|---------------|---------------|----------------|----------------|------------------|----------------|-----------------|------------------|------------------|
| B-actin    | 150                             | 357,069          | 268,194       | 275,874       | 283,963        | 60,123         | 36,603           | 47,053         | 30,474          | 28,206           | 30,442           |
| NHE 3      | 500                             | 148,244          | 496,906       | 323,630       | 174,950        | 154,539        | 203,316          | 86,273         | 67,924          | 73,078           | 160,082          |



รูปที่ 20 กราฟแสดงค่า raw volume ที่คำนวณจาก Gene snap software (Gene Tools; Syngene, MD, USA) เป็นตัวเปรียบเทียบการมีปริมาณมากหรือน้อยของโปรตีน โดยปริมาณโปรตีน  $\beta$ -actin ที่ปรากฏขึ้น เมื่อใช้ sample ที่มีโปรตีนปริมาณ 150  $\mu$ g ดังรูป (A) และแสดงปริมาณโปรตีน NHE 3 ที่ปรากฏขึ้น เมื่อใช้ sample ที่มีโปรตีนปริมาณ 500  $\mu$ g ดังรูป (B);

Control= เซลล์ควบคุม,

C10 = พิษงูแมวเซาเข้มข้น 10  $\mu$ g/ml,

C50 = พิษงูแมวเซาเข้มข้น 50  $\mu$ g/ml, C100 = พิษงูแมวเซาเข้มข้น 100  $\mu$ g/ml,

C500 = พิษงูแมวเซาเข้มข้น 500  $\mu$ g/ml, C1,000 = พิษงูแมวเซาเข้มข้น 1,000  $\mu$ g/ml,

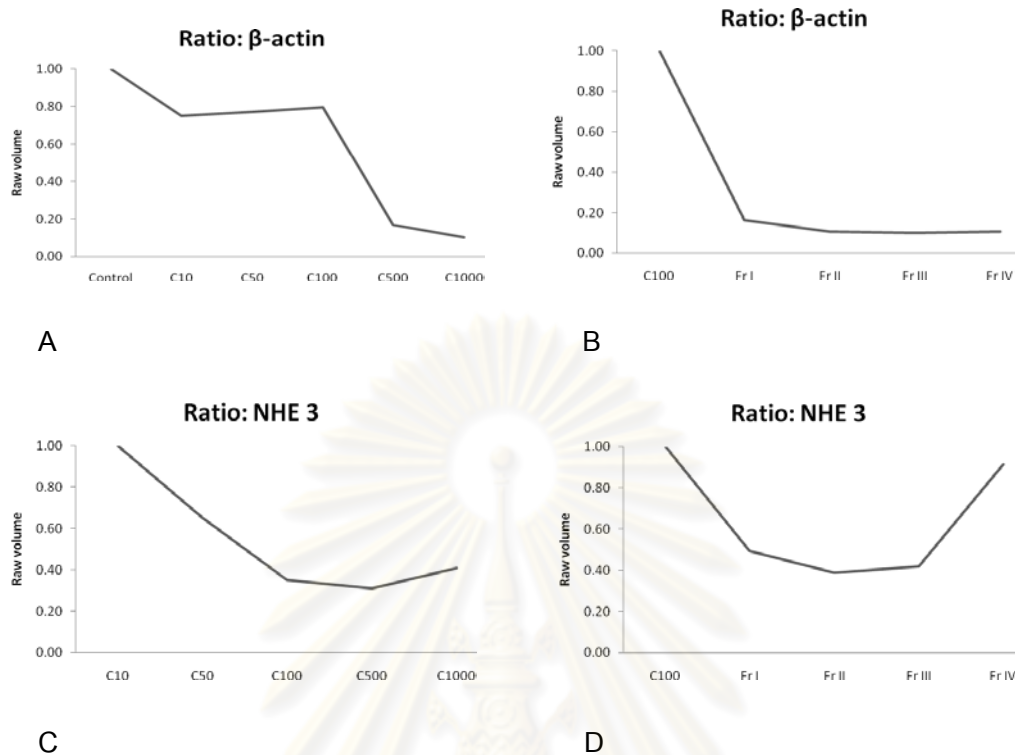
Fr.I = fraction I,

Fr.II = fraction II,

Fr.III = fraction III

และ Fr.IV = fraction IV





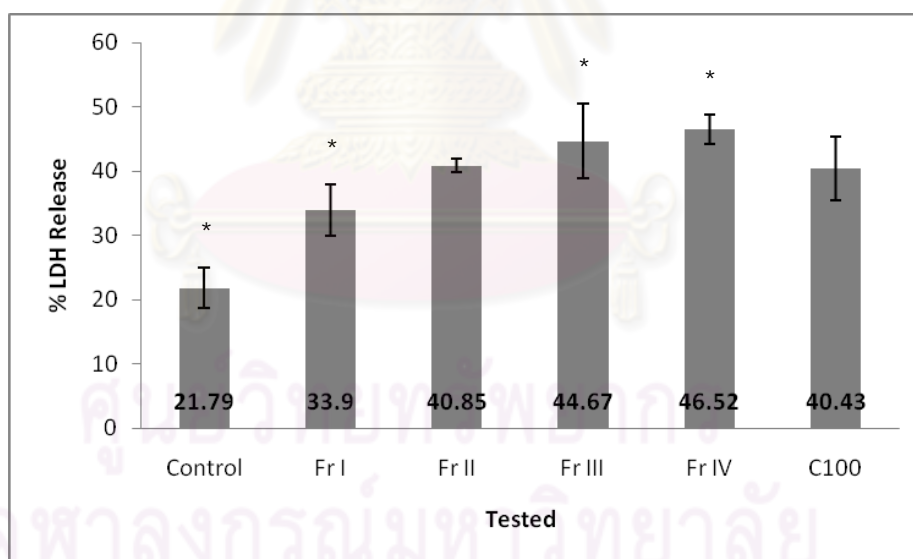
รูปที่ 21 กราฟแสดง ratio เปรียบเทียบปริมาณโปรตีน  $\beta$ -actin ที่ปรากฏขึ้น เมื่อใช้ sample ที่มีโปรตีนปริมาณ 150  $\mu$ g (A, B) โดย (A) เป็น ratio เปรียบเทียบเซลล์ควบคุมกับเซลล์ที่ทดสอบกับพืชสมุนไพรที่มีความเข้มข้นต่างๆ, (B) เป็น ratio เปรียบเทียบเซลล์ที่ทดสอบกับพืชสมุนไพรที่มีความเข้มข้น 100  $\mu$ g/ml กับเซลล์ที่ทดสอบกับสารแยกส่วนของพืชสมุนไพร, และแสดงปริมาณโปรตีน NHE 3 ที่ปรากฏขึ้น เมื่อใช้ sample ที่มีโปรตีนปริมาณ 500  $\mu$ g (C, D) โดย (C) เป็น ratio เปรียบเทียบเซลล์ควบคุมกับเซลล์ที่ทดสอบกับพืชสมุนไพรที่มีความเข้มข้นต่างๆ, (D) เป็น ratio เปรียบเทียบเซลล์ที่ทดสอบกับพืชสมุนไพรที่มีความเข้มข้น 100  $\mu$ g/ml กับเซลล์ที่ทดสอบกับสารแยกส่วนของพืชสมุนไพร;

Control = เซลล์ควบคุม, C10 = พืชสมุนไพรเข้มข้น 10  $\mu$ g/ml,  
 C50 = พืชสมุนไพรเข้มข้น 50  $\mu$ g/ml, C100 = พืชสมุนไพรเข้มข้น 100  $\mu$ g/ml,  
 C500 = พืชสมุนไพรเข้มข้น 500  $\mu$ g/ml, C1,000 = พืชสมุนไพรเข้มข้น 1,000  $\mu$ g/ml,  
 Fr.I = fraction I, Fr.II = fraction II,  
 Fr.III = fraction III และ Fr.IV = fraction IV

## 7. ผลการศึกษา Fractions ของพิษงูแมวเซา

### 7.1 ผลการศึกษากการบาดเจ็บของเซลล์ภายหลังการทดสอบด้วย fractions ของพิษงูแมวเซา ด้วยการวัดอัตราการบาดเจ็บด้วยการวัดระดับ LDH

ทำการวัดปริมาณของ LDH ที่ปลดปล่อยออกมาจากเซลล์เมื่อบ่มเพาะด้วยสารแยกส่วนพิษงูแมวเซา โดย fraction I ใช้ความเข้มข้น 20.51 µg/ml, fraction II ใช้ความเข้มข้น 68.04 µg/ml, fraction III ใช้ความเข้มข้น 3.62 µg/ml และ fraction IV ใช้ความเข้มข้น 1.48 µg/ml บ่มเพาะเป็นเวลา 24 ชั่วโมง คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เปรียบเทียบ supernatant ต่อ sediment พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ของ LDH แตกต่างกันในแต่ละ fraction เล็กน้อย โดยใน fraction II มีค่าการปลดปล่อย LDH ใกล้เคียงกับใน crude ของพิษงูมากที่สุด และเมื่อทำการวัดค่าทางสถิติ พบว่ามีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่  $p < 0.05$ , ขณะที่ fraction IV มีค่าการปลดปล่อย LDH มากที่สุด, fraction I มีค่าการปลดปล่อย LDH น้อยที่สุด ซึ่งเมื่อทำการวัดค่าทางสถิติ พบว่ามีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่  $p < 0.05$  (รูปที่ 22)



\* Value significantly different from crude 100 µg/ml group,  $P < 0.05$

รูปที่ 22 กราฟแสดงค่า lactate dehydrogenase (LDH) เมื่อเซลล์เพาะเลี้ยง HK-2 cell ได้รับการบ่มเพาะด้วย crude และ fractions ของพิษงูแมวเซา ที่มีความเข้มข้น 100 µg/ml นาน 24 ชั่วโมง คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เปรียบเทียบระหว่าง supernatant และ sediment; Control=เซลล์ควบคุม, Fr.I=fraction I, Fr.II=fraction II, Fr.III=fraction III, Fr.IV=fraction IV และ C100=Crude 100 µg/ml

## 7.2 ผลการศึกษา sodium transcellular ภายหลังการทดสอบด้วย fraction ของพิษงู แมวเซา ด้วยเทคนิค western blot

ผลการศึกษาการปรากฏของโปรตีน  $\beta$ -actin ขนาด 42 kDa เมื่อทดสอบกับ fraction ของพิษงู พบว่ามีปริมาณโปรตีน  $\beta$ -actin มีปริมาณไม่แตกต่างกันในแต่ละ fraction (รูปที่ 19 A, รูปที่ 20 A, รูปที่ 21 A,B และตารางที่ 13)

ผลการศึกษาการปรากฏของโปรตีน NHE 3 ขนาด 85 kDa พบว่ามีปริมาณลดลงเมื่อทดสอบกับ fraction ของพิษงู พบว่ามีปริมาณโปรตีน NHE 3 มีปริมาณไม่แตกต่างกันในแต่ละ fraction (รูปที่ 19 B รูปที่ 20 B, รูปที่ 21 C,D และตารางที่ 13)



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 5

### สรุปผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

#### สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาวิจัยผลของพิษและสารแยกส่วนจากพิษงูแมวเซาในการทดลองนี้สามารถสรุปผลการทดลองได้ดังต่อไปนี้

พิษงูแมวเซา (lyophilized Russell's viper venom) รุ่นการผลิตนี้ ซึ่งใช้ตลอดการวิจัย มีค่า median lethal dose (LD50) 5.98  $\mu\text{g}/\text{mouse}$

ผลการแยก protein fraction ของพิษงูแมวเซารุ่นการผลิตนี้ ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี Sephadex G-75 (superfine) คอลัมน์ขนาด 2.5 x 29 cm แล้วชะด้วย 10 mM TBS buffer pH 7.4 เก็บแยกส่วนพิษงูที่ชะผ่านคอลัมน์หลอดละ 2 ml แยกได้ 4 fractions คือ fraction I, II, III และ IV ตามลำดับ โดย fraction I มีปฏิกิริยาของ protease enzyme สูงที่สุด และเมื่อนำมาทำปฏิกิริยากับสาร chelating agents เช่น EDTA แสดงให้เห็นว่ามีการถูกยับยั้งปฏิกิริยาเกิดขึ้นเนื่องจาก metalloproteinases มี zinc อิศระ (zinc-dependent) สาร chelating agents จะไปจับกับ zinc มีผลทำให้เอนไซม์ถูกยับยั้งปฏิกิริยาจึงสรุปว่า protease enzyme นี้เป็นชนิด metalloproteinases และจากผลการทดสอบปฏิกิริยาของ phospholipase A<sub>2</sub> enzyme สรุปว่า fraction II มีค่าปฏิกิริยาของ phospholipase A<sub>2</sub> สูงที่สุด แต่สารทั้งสอง fractions นี้ยังมีสารอื่นเป็นส่วนประกอบรวมอยู่ด้วย และใน fraction III และ fraction IV ก็ยังมีปฏิกิริยาของ protease และ phospholipase A<sub>2</sub> อยู่เช่นกัน เพียงแต่มีเป็นปริมาณที่น้อยกว่าใน fraction I และ fraction II ตามลำดับ

จากผลการศึกษา dose dependence พบว่าอัตราการตายของ HK-2 cell โดยการทดสอบกับพิษงูแมวเซาที่ความเข้มข้น 10, 50, 100, 500 และ 1,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ณ เวลา 24 ชั่วโมง เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี trypan blue exclusion assay และ propidium iodide assay พบว่า control cell ที่ไม่ได้ใส่พิษงูมีอัตราการตายไม่ถึงร้อยละ 1 และ treated cell ที่ทดสอบด้วยพิษงูที่ความเข้มข้น 10, 50, 100, 500 และ 1,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  มีอัตราการตายสูงขึ้นตามลำดับ และมีอัตราการตายมากที่สุดที่ความเข้มข้นของพิษงู 1,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  โดยเทคนิค trypan blue exclusion assay มีอัตราการตายร้อยละ 13.54 และเทคนิค propidium iodide assay มีอัตราการตายร้อยละ 10.25 ซึ่งทั้งสองวิธีนี้ให้ผลในทิศทางเดียวกัน

จากผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์จากเทคนิคการย้อม trypan blue exclusion assay พบว่าเซลล์มีการหดตัว และเกิดช่องว่างระหว่างเซลล์มากขึ้นเมื่อเซลล์ถูกทดสอบกับพิษงูที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น

อย่างไรก็ตาม วิธี trypan blue exclusion method และ propidium iodide assay มีข้อจำกัด คือการนับเซลล์ตายต้องนับเซลล์เป็นจำนวนมาก ซึ่งต้องอาศัยระยะเวลาและอาจจะทำให้เกิดความผิดพลาดในการวัดผลได้ ดังนั้นจึงมีการใช้เทคนิคอื่น เช่น annexin V/propidium iodide-labeling flow cytometry มาทำการศึกษาปริมาณการตายของเซลล์ซึ่งอาจได้ผลชัดเจนขึ้น

การศึกษาการบาดเจ็บของเซลล์ภายหลังการทดสอบด้วยพิษงูแมวเซาโดยทำการวัดระดับเอนไซม์ Lactate Dehydrogenase (LDH) พบว่า treated cell ที่ทำการทดสอบกับพิษงูแมวเซาที่ความเข้มข้น 10, 50, 100, 500 และ 1,000  $\mu\text{g/ml}$  บ่มเพาะเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าที่ความเข้มข้นของพิษงู 50, 100, 500 และ 1,000  $\mu\text{g/ml}$  ค่า LDH แตกต่างจาก control cell (ความเข้มข้นพิษ 0  $\mu\text{g/ml}$ ) อย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) เซลล์มีการปลดปล่อย LDH ออกมามากที่สุดเมื่อใช้ความเข้มข้นของพิษงูที่ 100  $\mu\text{g/ml}$  ซึ่งสรุปได้ว่า ความเข้มข้นของพิษงูที่ 100  $\mu\text{g/ml}$  เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการนำไปหาค่าการปลดปล่อย LDH ที่ time dependence

การศึกษาการตายของเซลล์ด้วย annexin V/propidium iodide-labeling flow cytometry ภายหลังการทดสอบด้วยพิษงูแมวเซาที่ความเข้มข้น 10, 50, 100, 500 และ 1,000  $\mu\text{g/ml}$  บ่มเพาะเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มีอัตราการรอดชีวิตลดลงตามลำดับความเข้มข้นของพิษงู โดยทุกความเข้มข้นมีค่าแตกต่างจาก control cell (ความเข้มข้นพิษ 0  $\mu\text{g/ml}$ ) อย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) และมีการตายของเซลล์แบบ necrosis มากกว่าแบบ apoptosis ที่ความเข้มข้นของพิษงูแมวเซา 10, 50 และ 100  $\mu\text{g/ml}$  มีค่าใกล้เคียงกัน และจะมีอัตราการตายเพิ่มขึ้นที่ความเข้มข้นของพิษงูแมวเซา 500 และ 1,000  $\mu\text{g/ml}$  โดยลักษณะการตายแบบ necrosis ที่ทุกความเข้มข้นของพิษงูมีค่าแตกต่างจาก control cell (ความเข้มข้นพิษ 0  $\mu\text{g/ml}$ ) อย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ )

การศึกษา time dependence พบว่าอัตราการตายของ HK-2 cell ภายหลังการทดสอบด้วยพิษงูแมวเซาเข้มข้น 1,000  $\mu\text{g/ml}$  ที่ระยะเวลา 0, 6, 8, 10, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี trypan blue exclusion assay และ propidium iodide assay ทำการนับจำนวนเซลล์ตายพบว่า control cell (ความเข้มข้นพิษ 0  $\mu\text{g/ml}$ ) มีอัตราการตายไม่ถึงร้อยละ 1 และ treated cell ที่ทดสอบด้วยพิษงูที่ระยะเวลาดังกล่าว พบว่าเซลล์มีอัตราการตายเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่มากขึ้น ณ เวลาที่ 24 ชั่วโมง มีอัตราการตายมากที่สุด เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค trypan blue exclusion assay มีอัตราการตายร้อยละ 8.31 และเทคนิค propidium iodide assay มีอัตราการตายร้อยละ 13.94 ซึ่งทั้งสองวิธีนี้ให้ผลในทิศทางเดียวกัน

จากผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์จากเทคนิค trypan blue exclusion assay พบว่าเซลล์มีการหดตัว และเกิดช่องว่างระหว่างเซลล์มากขึ้นเมื่อเซลล์ถูกทดสอบกับพิษงูที่ระยะเวลาที่มากขึ้น

การศึกษาการบาดเจ็บของเซลล์ภายหลังการทดสอบด้วยพิษงูแมวเซาเมื่อทำการวัดระดับเอนไซม์ Lactate Dehydrogenase (LDH) พบว่า treated cell ที่ทำการทดสอบกับพิษงูแมวเซาเข้มข้น 100 µg/ml ณ เวลา 0, 3, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง พบว่าค่า LDH มีค่าเพิ่มมากขึ้นตามระยะที่มากขึ้น เซลล์มีการปลดปล่อย LDH ออกมามากที่สุด ณ เวลา 24 ชั่วโมง ค่า LDH แตกต่างจาก control cell (ณ เวลา 0 ชั่วโมง) อย่างมีนัยสำคัญ ( $P<0.05$ )

การศึกษาการตายของเซลล์ด้วย annexin V/propidium iodide-labeling flow cytometry ภายหลังการทดสอบด้วยพิษงูแมวเซาเข้มข้น 500 µg/ml ณ เวลา 0, 3, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มีอัตราการรอดชีวิตที่ระยะเวลาต่างๆไม่แตกต่างกัน โดยทุกความเข้มข้นมีค่าแตกต่างจาก control cell (ความเข้มข้นพิษ 0 µg/ml) อย่างมีนัยสำคัญ ( $P<0.05$ ) ซึ่งอาจต้องใช้ระยะเวลาในการทดสอบนานมากกว่า 24 ชั่วโมง จึงจะสามารถเห็นค่าการเปลี่ยนแปลงของการตายด้วยเทคนิคการตรวจสอบนี้ และชนิดการตายของเซลล์แบบ necrosis มากกว่าแบบ apoptosis โดยลักษณะการตายแบบ necrosis ที่ทุกความเข้มข้นของพิษงูมีค่าแตกต่างจาก control cell (ความเข้มข้นพิษ 0 µg/ml) อย่างมีนัยสำคัญ ( $P<0.05$ )

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ด้วย transmission electron microscopy (TEM) เนื่องจากการตรวจสอบเซลล์ด้วย light microscope ไม่สามารถให้ผลที่ชัดเจนทางสัณฐานวิทยาของเซลล์โดยละเอียดได้ โดยใช้พิษงูแมวเซาเข้มข้น 100 µg/ml ระยะเวลา 15 นาที พบการเปลี่ยนแปลงภายใน HK-2 cell ทุก organelle ที่สำคัญอย่างชัดเจน โดย organelle ต่างๆ มีลักษณะบวมพอง ปริแตกออก และพบการตายทั้งแบบ necrosis และ apoptosis โดยเป็นการตายแบบ necrosis มากกว่า apoptosis

การศึกษา sodium transcellular จากการปรากฏของโปรตีน sodium/hydrogen exchanger 3 และ โปรตีน β-actin ด้วยเทคนิค western blot ค่าของโซเดียมค่อยๆ มีปริมาณลดลงไปตามความเข้มข้นของพิษงูที่มากขึ้น ส่วน β-actin มีปริมาณลดลงตามความเข้มข้นของพิษงูทั้งสองระดับ ที่ความเข้มข้นของพิษงูช่วงแรกคือ 0-100 µg/ml จะมีค่า β-actin ลดลงที่เล็กน้อย และที่ความเข้มข้นของพิษงูช่วงที่สองคือ 500-1,000 µg/ml จะมีค่า β-actin ลดลงแตกต่างจากช่วงแรกมาก

การศึกษาการบาดเจ็บของเซลล์ภายหลังการทดสอบด้วย fractions ของพิษงูแมวเซาด้วยการวัดระดับเอนไซม์ LDH ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ที่บาดเจ็บเมื่อทดสอบด้วย fraction ของพิษงูแมวเซา โดย fraction I ใช้ความเข้มข้น 20.51 µg/ml, fraction II ใช้ความเข้มข้น 68.04 µg/ml, fraction III ใช้ความเข้มข้น 3.62 µg/ml และ fraction IV ใช้ความเข้มข้น 1.48 µg/ml เปรียบเทียบกับการทดสอบด้วย crude ของพิษงูแมวเซาที่ความเข้มข้น 100 µg/ml ณ เวลา 24 ชั่วโมง พบว่า

fraction II มีการปลดปล่อยเอนไซม์ LDH ใกล้เคียงกับ crude ของพิษงูแมวเซา เนื่องจาก fraction II มีปฏิกิริยา phospholipase A<sub>2</sub> สูงที่สุด แต่ fraction IV มีค่าการปลดปล่อย LDH มากที่สุด

### อภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ในพิษงูแมวเซาประกอบไปด้วยเอนไซม์หลายชนิดอย่างน้อย 26 ชนิด แต่เอนไซม์ที่เชื่อว่ามีผลทำให้เกิดอาการไตวายคือ metalloproteinases และ phospholipase A<sub>2</sub> [48] โดยในการวิจัยครั้งนี้ทำการแยกส่วนพิษงูแมวเซาด้วย Sephadex G-75 (superfine) ซึ่งมีความสามารถในการแยก fraction ได้ตั้งแต่ขนาด 3-80 kDa เนื่องจากในการศึกษาครั้งนี้มุ่งเน้นการศึกษาเอนไซม์ metalloproteinases ซึ่งมีขนาด ประมาณ 60 kDa [60] และ phospholipase A<sub>2</sub> มีขนาด ประมาณ 13-15 kDa [45] ใช้คอลัมน์ขนาด 2.5 x 29 cm แล้วชะด้วย 10 mM TBS buffer pH 7.4 เก็บหลอดละ 2 ml ผลการแยกได้ 4 fractions แต่จากการทดลองของ Huang H.C. และ Lee C.Y. ในปี 1983 ที่ประเทศไต้หวัน ใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี Sephadex G-75 คอลัมน์ขนาด 2.5 x 72 cm แล้วชะด้วย 30 mM ammonium acetate buffer pH 6.5 เก็บหลอดละ 3 ml แยกได้ 5 fractions และจากการทดลองของ Aye-Kyaw และคณะ ในปี 1994 ที่ประเทศพม่า ใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี Sephadex G-75 (superfine) คอลัมน์ขนาด 2.5 x 58 cm แล้วชะด้วย 20 mM TBS buffer pH 7.0 แยกได้ 5 fractions จะเห็นว่าในการทดลองนี้ใช้คอลัมน์ขนาดยาวเพียง 29 cm ซึ่งสั้นกว่าคอลัมน์ที่นักวิจัยอื่นๆใช้อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้แยกพิษงูแมวเซาได้เพียง 4 fractions จึงควรพิจารณาเลือกใช้คอลัมน์ให้มีขนาดยาวมากขึ้นสำหรับการทดลองต่อไป ทั้งนี้เพื่อลดปัญหาดังกล่าว นอกจากนี้เนื่องจากงูจากแต่ละสภาพภูมิศาสตร์มีสัดส่วนขององค์ประกอบในน้ำพิษแตกต่างกัน ดังนั้นจากผลการทดลองในครั้งนี้แยกส่วนพิษงูแมวเซาของไทยได้ออกเป็น 4 fractions อาจเป็นข้อมูลที่เชื่อถือได้ แต่อย่างไรก็ตามควรจะใช้ขนาดของคอลัมน์ให้ยาวมากขึ้นเพื่อเป็นพิสูจน์สมมติฐานจากผลการทดลองในครั้งนี้ต่อไป

Metalloproteinases คือ protease ชนิดหนึ่งที่มีธาตุ zinc อิสระ (zinc-dependent) เมื่อนำมาทำปฏิกิริยากับสาร chelating agents เช่น EDTA จะไปจับกับ zinc มีผลทำให้เอนไซม์ถูกยับยั้งปฏิกิริยา protease เป็นเอนไซม์ที่ทำให้เกิด tissue damage หลังจากถูกงูในตระกูล viper กัด อย่างไรก็ตาม protease ก็ไม่มีความเป็นพิษโดยตรงต่อ endothelial cells แต่ก็มีรายงานว่าถ้าได้รับในปริมาณที่มากจะเป็นสาเหตุ direct damage ได้ [33] ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่า fraction I ซึ่งมีคุณสมบัติของเอนไซม์ protease ที่แยกได้จากพิษงูแมวเซารุ่นการผลิตนี้มีค่าต่ำจึงอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ค่าการปลดปล่อย LDH น้อยกว่า fraction อื่น แสดงให้เห็นว่าเซลล์บาดเจ็บ

ด้วย fraction I น้อยกว่า fractions อื่นส่วน fraction II มีปฏิกิริยาของ phospholipase A<sub>2</sub> สูงที่สุด และเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ในพิษงูแมวเซาแห่งรุ่นการผลิตนี้ คือ 68.04% เซลล์ที่ถูกทดสอบด้วย fraction II มีค่าการปลดปล่อย LDH ใกล้เคียงกับเซลล์ที่ทดสอบด้วย crude venom ที่มีความเข้มข้น 100 µg/ml มากที่สุด โดยมีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) แสดงว่า phospholipase A<sub>2</sub> น่าจะเป็นสารหลักที่ทำให้เซลล์ท่อไตบาดเจ็บ, phospholipase A<sub>2</sub> มีความเป็นพิษโดยตรงต่อ endothelial cells แต่ก็ไม่เสมอไปที่ในพิษงูจะมี phospholipase A<sub>2</sub> ในปริมาณที่มากพอในการทำลายเซลล์, phospholipase A<sub>2</sub> มีความสามารถในการสลายพันธะไฮโดรเจน (hydrolysis) ของ glycerophospholipid membranes จึงเป็นสารที่สามารถทำลายเซลล์ได้ จากการตรวจสอบด้วยเทคนิคกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) พบว่าชนิดการตายหลักของเซลล์คือ necrosis และจากการทดลองของ Somnath M. และ Debasish B. พบว่า phospholipase A<sub>2</sub> เป็นส่วนประกอบของพิษงูแมวเซาที่เหนี่ยวนำให้เซลล์เกิด necrosis เหมือนกับที่เกิดในอาการของ tubular necrosis ซึ่งเป็นสาเหตุของอาการไตวายเฉียบพลัน [50] เนื่องจากแบบการตายของเซลล์ชนิด necrosis เป็นการตายหลักของเซลล์เมื่อเซลล์ได้รับบาดเจ็บโดยฉับพลัน อาการเริ่มต้นของ necrosis cell คือการที่ mitochondria บวมพองออกจนทำหน้าที่ของตัวเองไม่ได้ หลังจากนั้นอวัยวะก็จะล้มเหลวตามเซลล์ไปในที่สุด [53] ซึ่งเป็นผลของพิษงูทาง direct effect ที่มีต่อเซลล์ท่อไต [53] แต่จากการทดลองของ Gamal A.S. และคณะ พบว่า phospholipase A<sub>2</sub> นั้นไม่ได้มีความสัมพันธ์เกี่ยวกับการทำให้สิ่งมีชีวิตตายได้ [20]

sodium/hydrogen exchanger (NHE) เป็นโปรตีนที่พบใน nephon ของไต ซึ่งเป็นกลุ่มโปรตีนที่ทำหน้าที่ควบคุมปริมาณของโซเดียม มีหลายกลุ่ม (classify) ด้วยกัน โดย sodium/hydrogen exchanger 3 (NHE 3) เป็นกลุ่มที่ปรากฏอยู่ใน proximal tubular [10] ค่าของโซเดียมค่อยๆ มีปริมาณลดลงไปตามความเข้มข้นของพิษงูที่มากขึ้น ส่วน β-actin มีปริมาณลดลงตามความเข้มข้นของพิษงูที่สองระดับ ที่ความเข้มข้นของพิษงูช่วงแรกคือ 0-100 µg/ml จะมีค่า β-actin ลดลงทีละน้อย และที่ความเข้มข้นของพิษงูช่วงที่สองคือ 500-1,000 µg/ml จะมีค่า β-actin ลดลงแตกต่างจากช่วงแรกมาก β-actin เป็นโปรตีนโครงสร้างหลักของเซลล์ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าต้องใช้ความเข้มข้นของพิษงูปริมาณมากจึงจะสามารถทำลายโครงสร้างของเซลล์ได้อย่างชัดเจน การได้รับพิษงูทำให้ proximal และ postproximal tubule ควบคุมโซเดียมและน้ำลดลงด้วยการทำให้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาหลายส่วนเปลี่ยนแปลงไป จากการศึกษาพบว่า พิษงูเป็นสาเหตุที่ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของ glomerular filtration rate และ urine flow และลด sodium transport ซึ่งเป็นผลมาจาก PLA<sub>2</sub> [32]

การศึกษาการบาดเจ็บของเซลล์โดยการวัดระดับเอนไซม์ LDH ภายหลังการทดสอบด้วย fraction ของพิษงูแมวเซา พบว่า fraction II ซึ่งมีปฏิกิริยา phospholipase A<sub>2</sub> สูงที่สุดมีการ



ปลดปล่อยเอนไซม์ LDH ใกล้เคียงกับ crude ของพิษงูแมวเซา แต่ fraction IV ซึ่งยังไม่ได้ทำการหาว่ามีปฏิกิริยาของเอนไซม์ใดสูงที่สุด กลับมีค่าการปลดปล่อย LDH มากที่สุด จากการศึกษาในครั้งนี้จึงยังไม่สามารถสรุปได้ว่า phospholipase A<sub>2</sub> เป็นสารที่ทำให้เกิดอาการไตวายเฉียบพลัน แต่เป็นที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งว่า phospholipase A<sub>2</sub> อาจมีผลต่อการทำให้เกิดอาการไตวายเฉียบพลัน ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องศึกษาเพิ่มเติมเปรียบเทียบระหว่าง phospholipase A<sub>2</sub> และ crude venom ต่อไป และควรตรวจสอบคุณสมบัติของ fraction IV ว่ามีคุณสมบัติของเอนไซม์ชนิดใดเป็นหลัก หรือมีปริมาณของ phospholipase A<sub>2</sub> ปนอยู่ในปริมาณเท่าใด



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## รายการอ้างอิง

- [1] กัลยาณี จิรศรีพงศ์พันธ์. ความรู้พื้นฐานการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์, นครปฐม: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยศิลปากร, 2550.
- [2] จุล กาญจนเจตน์. งูแมวเซา. ว.เจ้าพระยาอภัยภูเบศร 3(2) (2529):1-6.
- [3] มุลนิธิวิกิมีเดีย. งูแมวเซา. [ออนไลน์], 2551. แหล่งที่มา:  
<http://th.wikipedia.org/wiki/%E0%B8%87%E0%B8%B9%E0%B9%81%E0%B8%A1%E0%B8%A7%E0%B9%80%E0%B8%8B%E0%B8%B2>[2551]
- [4] เสาวพัทธ์ร์ ฮิ้นจ้อย. ใน สรุปรายงานการเฝ้าระวังโรค 2543. กองระบาดวิทยา สำนักงานปลัดกระทรวง กระทรวงสาธารณสุข.กรุงเทพมหานคร, 2544.
- [5] สัณห์ พณิชยกุล. การศึกษาการแยกพิษงูแมวเซาออกเป็นส่วนๆเพื่อการศึกษาเอนไซม์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, สาขาวิชาชีวเคมี, บัณฑิตวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2510.
- [6] สำนักระบาด กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. รายงานโรคในระบบเฝ้าระวัง [ออนไลน์], 2551. แหล่งที่มา: [http://203.157.15.4/surdata/506wk/y52/d56\\_4852.pdf](http://203.157.15.4/surdata/506wk/y52/d56_4852.pdf) [2551]
- [7] สำนักระบาด กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. รายงานโรคในระบบเฝ้าระวัง. [ออนไลน์], 2552. แหล่งที่มา: [http://203.157.15.4/surdata/506wk/y53/d56\\_4953.pdf](http://203.157.15.4/surdata/506wk/y53/d56_4953.pdf) [2552]
- [8] สนวนสัตว์ดุสิต. สัตว์เลื้อยคลาน. งูแมวเซา [ออนไลน์], 2553. แหล่งที่มา:  
<http://www.zoothailand.org/index.php/th/-animal-encyclopedia/2009-11-08-22-26-55/item/39> [2553]
- [9] วิศิษฐ์ สิตปรีชา และ ไศภณ นภารร. โรคไต กลไกพยาธิสรีรวิทยา การรักษา พิมพ์ครั้งที่ 1. คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. โรงพิมพ์ชวนพิมพ์, 2538.
- [10] Akhter, S. et al. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 3 is in large complexes in the center of the apical surface of proximal tubule-derived OK cells. Am J Physiol Cell Physiol 283 (2002): 927-940.
- [11] Bell, R.D., Mandal, A.K., and Parker, D.E. The Effect of Splenectomy on renal Function in Epinephrine-induced Renal Failure. PSEBM 167(11) (1981): 12-14.
- [12] Chaiyabutr, N., and Sitprijia, V. Effect of Russell's Viper Venom on Renal Functions. JNT 8(3) (1999): 351-58.

- [13] Chaiyabutr, N., and Sitprijia, V. Renal Function Following Russell's Viper Venom Administration in Dogs Treated with an  $\alpha$ -Adrenergic Receptor Blocker Inhibitors of Converting Enzyme and Thromboxane Synthetase. JNT 5(3) (1996): 389-99.
- [14] Chopra, Lieut-Colonel R.N., and Chowhan, J.S. Action of Indian Daboia (*Vipera Russell*) Venom on the Circulatory System. Indian J Med Res. 21(3) (1934): 439-505.
- [15] Choudhury, S.R., Saha, A., Mishra, R., Giri, B., Biswas, A.K., Debnath, A., and Gomes, A. A heat stable protein toxin (*drCT-I*) from the Indian Viper (*Daboia russelli russelli*) venom having antiproliferative, cytotoxic and apoptotic activities. Toxicon 49(1) (2007): 46-56.
- [16] Clemens, R. et al. Therapeutic Effect of Antivenom Supplemented by Antithrombin III in Rats Experimentally Envenomated with Russell's Viper (*Daboia Russell Siamensis*) venom. Toxicon 33(1) (1995): 77-82.
- [17] Cupp-Enyard, C. Sigma's Non-specific Protease Activity Assay - Casein as a Substrate. J Vis Exp 19 (2008): 899.
- [18] De hass, G.H., Postema N.M., Nieuwenhuizen, W., and Deenen, L.L.M. Purification and properties of phospholipase A from porcine pancreas. Biochim Biophys Acta. 159 (1968): 103-117.
- [19] Dubourdieu, D.J., Kawaguchi, H., and Shier, W.T. Molecular Weight Variations in the Diversity of Phospholipase A<sub>2</sub> forms in Reptile Venom. Toxicon 25(3) (1987): 333-343.
- [20] Gamal, A.S. et al. Fractionation and characterization of Cerastes cerastes cerastes snake venom and the antitumor action of its lethal and non-lethal fractions. Toxicon 42 (2003): 207-215.
- [21] Gutierrez, J.M. , Avila, C., Rojas, E., and Cerdas, L. An alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. Toxicon 26 (1988): 411-413.
- [22] Huang, H.C. Effects of phospholipases A<sub>2</sub> from Vipera russelli snake venom on blood pressure, plasma prostacyclin level and renin activity in rats. Toxicon 22(2) (1984): 253-264.
- [23] Huang, H.C. Release of Slow Reacting Substance from the Guinea-Pig Lung by

- Phospholipase A<sub>2</sub> of *Vipera russelli* Snake Venom. Toxicon 22(3) (1984): 359-372.
- [24] Kanjanabuch, T., and Sitprija, V. Snakebite nephrotoxicity in Asia. Semin Nephrol 28(4) (2008): 363-72.
- [25] Kohli, H.S., and Sakhuja, V. Snake Bites and Acute Renal Failure. Saudi J Kidney Dis Transplant 14(2) (2003): 165-176.
- [26] Kunitz, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor-II. General properties. J Gen Physiol 30 (1947): 291-310.
- [27] Lee, C.Y. Snake Venoms Vol. 52. pp. 148-152. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: Germany, 1979.
- [28] Lee, H.T., and Emala, C.W. Adenosine attenuates oxidant injury in human proximal tubular cells via A1 and A2a adenosine receptors. Am J Physiol Renal Physiol 282 (2002): 844-852.
- [29] Lomonte, B., Gutiérrez. J.M., Borkow, G., Ovidia. M., Tarkowski, A., and Hanson, L.A. Activity of hemorrhagic metalloproteinase BaH-1 and myotoxin II from *Bothrops asper* snake venom on capillary endothelial cells in vitro. Toxicon 32(4) (1994): 505-10.
- [30] Huang, H.C., and Lee, C.Y. Isolation and Pharmacological Properties of Phospholipase A<sub>2</sub> from *Vipera Russelli* Snake Venom. Toxicon.1984 ; 22(2) : 207-217.
- [31] Omori-Satoh, T. et al. Purification and Characterization of cytotoxic factors in the venom of the Okinawa habu (*Trimeresurus flavoviridis*). Toxicon 24(11-12) (1989): 1045-1053.
- [32] Martins, A.M., Lima, A.A., Toyama, M.H., Marangoni, S., Fonteles, M.C., and Monteiro, H.S. Renal effects of supernatant from macrophages activated by *Crotalus durissus cascavella* venom: the role of phospholipase A2 and cyclooxygenase. Pharmacol Toxicol 92(1) (2003): 14-20.
- [33] Masuda, S., Araki, S., Yamamoto, T., Kaji. K., and Hayashi, H. Purification of a vascular apoptosis-inducing factor from hemorrhagic snake venom. Biochem Biophys Res Commun 235 (1) (1997): 59-63.
- [34] Matthew, H., and Stephen, P. M. An aqueous endpoint assay of snake venom

- phospholipase A<sub>2</sub>. Toxicon 34(10) (1996): 1149-1155.
- [35] Mitrakul, C. Effect of five Thai snake venoms on coagulation, fibrinolysis and platelet aggregation. Southeast Asian J trop. Med. Pub. Hlth 10(2) (1979): 266-275.
- [36] Molecular Probes, Inc. Product Information, 17 May 1999. Propidium Iodide Nucleic Acid Stain.
- [37] Omori-Satoh, T., Yamakawa, Y., Nagaoka, Y., and Mebs, D. Hemorrhagic principles in the venom of *Bitis arietans*, a viperous snake. I. Purification and characterization Biochim Biophys Acta 1246(1) (1995): 61-66.
- [38] Omran, M. A. A., Fabb, S. A., and Dickson, G. Biochemical and morphological analysis of cell death induced by Egyptian cobra (*Naja haje*) venom on cultured cells. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis 10 (3) (2004): 219-241.
- [39] Pe, T., Cho, K.A., and Myint, A.A. Amount of venom - injected by Russell's viper. (*Vipera rtssalfi*) in killing prey. The Snake 23 (1991): 71-74.
- [40] Pe, T., and Cho, K.A. Amount of Venom Injected by Russell's Viper (*Vipera Russellii*). Toxicon 24(7) (1986): 730-733.
- [41] Promega, Technical Bulletin, Mar 2006, CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay Instructions for use of product.
- [42] Ratcliffe, P.J., Pukrittayakamee, S., and Ledingham, J.G.G. Direct Nephrotoxicity of Russell's Viper Venom Demonstrated in the Isolated Perfused Rat Kidney. Am J Trop Med Hyg. 40(3) (1989): 312-319.
- [43] Ryan, M.J., Johnson, G., Kirk, J., Fuerstenberg, S.M., Zager, R.A., Torok-Storb, B. HK-2: An immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney. Kidney Int 45(1) (1994 ): 48-57.
- [44] Sakuragawa, N. et al. Studies on Coagulation-Fibrinolytic Activity of Snake Venoms. The Snake 11 (1979): 176-183.
- [45] Sai-Ngam, A., Phongtananant, S., and Nuchprayoon, I. Phospholipase A2 genes and their expressions in Thai Russell's viper venom glands. Toxicon 52 (2008): 395-399.
- [46] Sarangi ,A. et al. Renal Involvement in Viperine Snake Bite. Indian J Med Res. 71 (1980): 918-923.
- [47] Shastry, J.C.M. et al. Renal Failure Following Snake Bite. A Clinicopathological

- Study of nineteen Patients. Am J Trop Med Hyg. 26(5) (1977): 1032-1038.
- [48] Sitprija, V. Snakebite nephropathy. Nephrology 11 (2006): 442-448.
- [49] Soe, S., Than, T., and Han, K.E. The Nephrotoxic Action of Russell's Viper (*Vipera Russellii*) Venom. Toxicon 28 (1990): 461-467.
- [50] Somnath, M., and Debasish, B. Ability of a small, basic protein isolated from Russell's viper venom (*Daboia russelli russelli*) to induce renal tubular necrosis in mice. Toxicon 50 (2007): 236-250.
- [51] Suwansrinon, K., Khaw, O., Mitmoonpitak, C., Daviratanasilpa, S., Chaiyabutr, N., and Sitprija, V. Effects of Russell's viper venom fractions on systemic and renal hemodynamics. Toxicon 49 (2007): 82-88.
- [52] Tan, N.H., and Ponnudurai, G. A comparative study of the biological properties of venoms of some old world vipers (subfamily viperinae). Int J Biochem 24(2) (1992): 331-336.
- [53] Theakston, R. D. G., and Reid, H. A. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venom. Bull World Health Organ 61(6) (1983): 949-956.
- [54] Thein, K. et al. Establishment of Solid-Phase Immunoradiometric Assay for Quantification of Russell's Viper (*Vipera Russellii Siamensis*) in Burma. Br J Haematol 69 (1988): 513-520.
- [55] Tokumine, J. et al. Effect of Trimeresurus Flavoviridis Venom Basic Phospholipase A<sub>2</sub> without Enzymatic Activity on Erythrocyte Shape. The Snake 24 (1992): 23-33.
- [56] Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A 76(9) (1979): 4350-4354.
- [57] Tungthanathanich, P., Chaiyabutr, N., and Sitprija, V. Effect of Russell's Viper (*Vipera Russellii Siamensis*) Venom on Renal Hemodynamics in Dogs. Toxicon 24(4) (1986): 365-371.
- [58] Vadas, P. Elevated Plasma Phospholipase A<sub>2</sub> Levels: Correlation with the Hemodynamic and Pulmonary Changes in Gram-Negative Septic Shock. J Lab Clin Med 104(6) (1984): 873-881.
- [59] Wang, C., Wu, X., Chen, M., Duan, W., Sun, L., Yan, M., and Zhang, L. Emodin

induces apoptosis through caspase 3-dependent pathway in HK-2 cells. Toxicology 231(2-3) (2007): 120-128.

- [60] Wijeyewickrema, L.C., Gardiner, E.E., Shen, Y., Berndt, M.C., and Andrews, R.K. Fractionation of snake venom metalloproteinases by metal ion affinity: a purified cobra metalloproteinase, Nk, from *Naja kaouthia* binds Ni<sup>2+</sup>-agarose. Toxicon 50 (2007): 1064-1072.
- [61] Willinger, C., Thamaree, S., Schramek, H., Gstrauchaler, G., and Pfaller, W. In vitro nephrotoxicity of Russell's viper venom. Kidney Int. 47 (1995): 518-528.
- [62] Win, T. et al. Effectiveness of intramuscular Antivenom Therapy in Russell's Viper(*Vipera Russellii*) Envenomed Rats. The snake 23 (1991): 55-58.
- [63] Walsh, K.A., and Wilcox, P.E. Serine proteases. Meth. Enzymol 19 (1970): 31-41.
- [64] Yang, C.C. et al. Lysine Modification in Snake Venom Phospholipase A<sub>2</sub>. The Snake 14 (1982): 110-118.
- [65] Xu, X., Wang, X., Xi, X., Lin, J., Huang, J., and Lu, Z. Purification and partial characterization of hyaluronidase from five pace snake (*Agkistrodon acutus*) venom. Toxicon 20 (1982): 973-981.



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## ภาคผนวก

### การเตรียมสารเคมี

#### 1. การเตรียม 1 X Buffer Phosphate Buffer Saline (PBS) 1 ลิตร

|   |       |
|---|-------|
| NaCl  | 40 g  |
| KCl   | 1 g   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | 1 g   |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 4.6 g |

เทสารทั้งสามรวมกันในบีกเกอร์ 1 ลิตร เติมน้ำกลั่น 0.5 ลิตร คนให้ละลายแล้วปรับ pH = 7.2 โดยใช้ pH meter วัด pH ปรับ pH ให้สูงโดยใช้สารละลาย NaOH และปรับ pH ให้ลดลงโดยใช้สารละลาย HCl หลังจากนั้นเทใส่ขวดปริมาตร 1 ลิตร ปรับให้มีปริมาตร 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อใน autoclave ก่อนใช้ เก็บที่อุณหภูมิ 4°C หรืออุณหภูมิห้อง

#### 2. การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์

##### 2.1 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์

|   |         |
|---|---------|
| Dulbecco's modified eagle medium with 4,500 mg/l glucose and L-glutamin, without sodium bicarbonate, powder, cell culture tested (DEME) (SIGMA-ALDRICH, product number D5648) | 1 ขวด   |
| Sodium bicarbonate  | 3.7 g/L |
| Distilled water   | 1 L     |

ละลายสารเข้าด้วยกันในบีกเกอร์ ปรับ pH = 7.2 โดยใช้ pH meter กรองด้วย syringe filter เก็บเป็น stock ในขวดกันแสง ที่อุณหภูมิ 4°C

Fetal bovine serum (FBS) นำไป heat inactivated ที่อุณหภูมิ 56°C นาน 30 นาที กรองด้วย glass vacuum filtration เก็บเป็น stock เก็บที่อุณหภูมิ -20°C

|                                  |     |
|----------------------------------|-----|
| Stock DEMEM                      | 89% |
| FBS                              | 10% |
| 10,000 U Penicillin-streptomycin | 1%  |

ละลายสารเข้าด้วยกันในบีกเกอร์ ปรับ pH = 7.2-7.4 โดยใช้ pH meter กรองด้วย syringe filter เก็บในขวดกันแสง ที่อุณหภูมิ 4°C  
 ที่อุณหภูมิ 37°C ใน water bath นาน 15 นาที ก่อนนำมาใช้

## 2.2 การเตรียม 0.25% Trypsin-EDTA 100 มิลลิลิตร

|   |         |
|---|---------|
| Trypsin, Type II-S, From Porcine Pancreas | 0.25 g  |
| Na <sub>2</sub> EDTA                      | 0.038 g |
| PBS                                       | 100 ml  |

ละลายสารเข้าด้วยกันในบีกเกอร์ ปรับ pH = 7.2-7.4 โดยใช้ pH meter กรองด้วย syringe filter เก็บที่อุณหภูมิ -20°C

## 2.3 การเตรียม Freezing media

|                                      |      |
|--------------------------------------|------|
| อาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ K-SFM (Gibco) | 50%  |
| FBS                                  | 40%  |
| DMSO                                 | 10%  |
| Total                                | 100% |
| เก็บที่อุณหภูมิ -20°C                |      |

## 3. การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทำ western blot

### 3.1 การเตรียม 1.5 M Tris/HCl pH=8.8 500 มิลลิลิตร

|                 |         |
|-----------------|---------|
| Tris base       | 91.10 g |
| deionized water | 500 ml  |

ปรับ pH ด้วย conc HCl ให้มีค่าเท่ากับ 8.8

นำไป autoclave เก็บที่อุณหภูมิห้อง

### 3.2 การเตรียม 1.0 M Tris/HCl pH=6.8 500 มิลลิลิตร

|                 |         |
|-----------------|---------|
| Tris base       | 60.55 g |
| deionized water | 500 ml  |

ปรับ pH ด้วย conc HCl ให้มีค่าเท่ากับ 6.8

นำไป autoclave เก็บที่อุณหภูมิห้อง

### 3.3 การเตรียม 10% SDS 100 มิลลิลิตร

|   |      |
|---|------|
| Sodium dodecyl sulphate (SDS)   | 10 g |
| เติมลงใน deionized water 50 มิลลิลิตร ละลายจนหมด เติมน้ำให้ครบ 100 มิลลิลิตร นำไป autoclave เก็บที่อุณหภูมิห้อง |      |

### 3.4 การเตรียม 10% Ammonium persulfate (10% APS) 1 มิลลิลิตร

|                     |       |
|---------------------|-------|
| Ammonium persulfate | 0.1 g |
| ddH <sub>2</sub> O  | 1 ml  |
| Total               | 1 ml  |
| เตรียมก่อนใช้       |       |

### 3.5 การเตรียม Sample buffer 5x 10 มิลลิลิตร

|                                  |          |
|----------------------------------|----------|
| 1M Tris/HCl pH = 6.8             | 3.125 ml |
| SDS powder                       | 1 g      |
| Glycerol                         | 2.5 ml   |
| Bromophenol Blue (2% in ethanol) | 75 µl    |
| 2-mercaptoethanol                | 0.5 µl   |
| เติมน้ำจนครบ 10 มิลลิลิตร        |          |
| เก็บที่อุณหภูมิ 4°C              |          |

### 3.6 การเตรียม Running buffer 1 ลิตร

|                     |        |
|---------------------|--------|
| Glycine             | 14.4 g |
| Tris base           | 3 g    |
| SDS                 | 1 g    |
| water               | 1 L    |
| Total               | 1 L    |
| เก็บที่อุณหภูมิห้อง |        |

### 3.7 การเตรียม 1x Transfer buffer 1 ลิตร

|           |        |
|-----------|--------|
| Glycine   | 14.4 g |
| Tris base | 3.02 g |
| Methanol  | 100 ml |

ddH<sub>2</sub>O 800 ml

ละลาย tris base กับ glycine เข้าด้วยกันในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร เติมน methanol ลงไป แล้วจึงปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร  
เก็บที่อุณหภูมิ 4°C

### 3.8 การเตรียม 1x Tris-buffered saline (TBS) pH 7.6 1 ลิตร

|                    |       |
|--------------------|-------|
| Tris base          | 6.1 g |
| NaCl               | 8.8 g |
| ddH <sub>2</sub> O | 1 L   |
| Total              | 1 L   |

ปรับ pH ด้วย conc HCl ให้มีค่าเท่ากับ 7.6

เก็บที่อุณหภูมิห้อง เก็บที่อุณหภูมิ 4°C จะเก็บไว้ได้นาน

### 3.9 การเตรียม 0.1% Tween Tris-buffered saline (TBS-T) 1 ลิตร

|          |        |
|----------|--------|
| 1x TBS   | 999 ml |
| Tween-20 | 1 ml   |
| Total    | 1 ml   |

เก็บที่อุณหภูมิ 4°C จะเก็บไว้ได้นาน

### 3.10 การเตรียม 5% nonfat dry milk 100 มิลลิลิตร

|                |        |
|----------------|--------|
| Nonfat drymilk | 5 g    |
| TBS-T          | 100 ml |
| Total          | 100 ml |

เก็บที่อุณหภูมิ 4°C

### 3.11 การเตรียม แอนติบอดีต่อ $\beta$ -actin 1:1,000 5 มิลลิลิตร

|                         |           |
|-------------------------|-----------|
| 5% nonfat dry milk      | 5 ml      |
| $\beta$ -actin antibody | 5 $\mu$ l |
| Total                   | 5 ml      |

เก็บที่อุณหภูมิ 4°C

3.12 การเตรียม แอนติบอดีต่อ sodium/hydrogen exchanger 3 (NHE 3)

(abcam, ab72729) ความเข้มข้น 5 µg/ml 5 มิลลิลิตร

|                    |         |
|--------------------|---------|
| 5% nonfat dry milk | 5 ml    |
| NHE3               | 12.5 µl |
| Total              | 5 ml    |

เก็บที่อุณหภูมิ 4°C

3.13 การเตรียม Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution 1 ลิตร

|                     |          |
|---------------------|----------|
| Coomassie           | 1 g      |
| Glacial acetic acid | 100 ml   |
| Methanol            | 400 ml   |
| ddH <sub>2</sub> O  | 500 ml   |
| Total               | 1,000 ml |

เก็บที่อุณหภูมิห้อง

3.14 การเตรียม Destain buffer I for coomassie 0.5 ลิตร

|                    |        |
|--------------------|--------|
| ddH <sub>2</sub> O | 200 ml |
| Methanol           | 250 ml |
| Acetic acid        | 50 ml  |
| Total              | 500 ml |

เก็บที่อุณหภูมิห้อง

3.15 การเตรียม Destain buffer II for coomassie 0.5 ลิตร

|                    |        |
|--------------------|--------|
| ddH <sub>2</sub> O | 440 ml |
| Methanol           | 25 ml  |
| Acetic acid        | 35 ml  |
| Total              | 500 ml |

เก็บที่อุณหภูมิห้อง

### 3.16 การเตรียม Stripping buffer 50 มิลลิลิตร

|   |              |
|---|--------------|
| Tris base                                 | 0.38 g       |
| SDS                                       | 1.00 g       |
| 400 mM $\beta$ -mercaptoethanal           | 87.5 $\mu$ l |
| เติมน้ำให้ครบ 50 มิลลิลิตร                |              |
| ปรับ pH ด้วย conc HCl ให้มีค่าเท่ากับ 6.8 |              |
| ควรเตรียมใหม่ทุกครั้ง                     |              |

## 4. การเตรียมสารเคมีที่ใช้ทดสอบปฏิกิริยา Protease

### 4.1 0.15 M TBS pH=8.0 1 ลิตร

|                    |         |
|--------------------|---------|
| Tris base          | 0.915 g |
| NaCl               | 1.32 g  |
| ddH <sub>2</sub> O | 1 L     |
| Total              | 1 L     |

ปรับ pH ด้วย conc HCl ให้มีค่าเท่ากับ 8.0

เก็บที่อุณหภูมิห้อง

### 4.2 4% Casein solution (casein) 100 มิลลิลิตร

|                   |        |
|-------------------|--------|
| Casine            | 4 g    |
| 0.15 M TBS pH=8.0 | 100 ml |

นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 80-85°C อย่านำให้เดือด นาน 10 นาที แกว่งจนละลายเป็นเนื้อ

เดียวกัน

เตรียมก่อนใช้

### 4.3 5% Trichloroacetic acid reagent (TCA)

|                               |        |
|-------------------------------|--------|
| Trichloroacetic acid solution | 5 ml   |
| ddH <sub>2</sub> O            | 95 ml  |
| Total                         | 100 ml |

เก็บที่อุณหภูมิห้อง

## 4.4 20% Folin

|                 |       |
|-----------------|-------|
| Folin           | 2 ml  |
| deionized water | 8 ml  |
| Total           | 10 ml |

เก็บที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด

4.5 500 mM Sodium carbonate solution ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 100 มิลลิลิตร

|                    |          |
|--------------------|----------|
| Sodium carbonate   | 52.995 g |
| ddH <sub>2</sub> O | 100 ml   |
| Total              | 100 ml   |

เก็บที่อุณหภูมิห้อง

## 4.6 1.1 mM L-Tyrosine standard (Std. Soln.) 100 มิลลิลิตร

|                    |        |
|--------------------|--------|
| L-Tyrosine         | 20 mg  |
| ddH <sub>2</sub> O | 100 ml |

นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 80-85°C อย่านำให้เดือด นาน 10 นาที แกว่งจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

5. การเตรียมสารเคมีที่ใช้ทดสอบปฏิกิริยา Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)5.1 10 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl; pH 8.0 100 มิลลิลิตร

|                         |          |
|-------------------------|----------|
| 1 mM Tris-HCl           | 1 ml     |
| 10 mM CaCl <sub>2</sub> | 0.11 g   |
| 100 mM NaCl             | 0.5844 g |

เติมน้ำจนครบ 100 มิลลิลิตร

ปรับ pH ด้วย 1 M HCl ให้มีค่าเท่ากับ 8.0

เก็บที่อุณหภูมิห้อง

5.2 2.5% Triton X-100 in H<sub>2</sub>O 5 มิลลิลิตร

|              |          |
|--------------|----------|
| Triton X-100 | 0.125 ml |
|--------------|----------|

เติมน้ำจนครบ 5 มิลลิลิตร

เก็บที่อุณหภูมิห้อง

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวรัชชา สวัสดิ์

(ภาษาอังกฤษ) Miss Ratchaya Sawatdee

สัญชาติ ไทย เชื้อชาติ ไทย ศาสนา พุทธ

สถานภาพ โสด

สถานที่เกิด โรงพยาบาลเมือง จังหวัดราชบุรี

ที่อยู่ปัจจุบัน 4/4 หมู่ 3 ตำบลบางพรม อำเภอบางคนที จังหวัดสมุทรสงคราม 75120

ประวัติการศึกษา

ระดับปริญญาตรี สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี (วท.บ.) สาขาชีววิทยา

จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ ปีการศึกษา 2544

ระดับปริญญาโท เข้าศึกษาต่อระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต หลักสูตรวิทยาศาสตร

การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ.2550



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย