รายงานผลการวิจัย

ทุนวิจัยสมเด็จพระนิเทศาธิเบศร อดุลยเดชวิกรม บรมชนกนารถ

การเพิ่มประสิทธิภาพของการเป็นแอนติเจนของพิษงูเห่า

โดย

กาญจนา จันทองจีน

พ
วท ๑๕
๑๐๘๕๑

2514

จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

เงินทุนวิจัยสมเด็จพระมหิตลาธิเบศร อดุลยเดชวิกรม บรมชนกนารถ

16 พ.ย. 2521

รายงานผลการวิจัย

การเพิ่มประสิทธิภาพของการเป็นแอนติเจนของพิษงูเห่า

โดย

กาญจนา จันทองจีน

มกราคม ๒๕๒๑

068998

เลขหมู่ รฟ
วท 15
เลขทะเบียน 000401
วัน.เดือน.ปี 16 พ.ย 21

ชื่อโครงการวิจัย การเพิ่มประสิทธิภาพของการเป็นแอนติเจนของพิษงูเห่า

ชื่อผู้วิจัย อาจารย์ กาญจนา จันทองจีน

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ มกราคม ๒๕๒๑

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้ได้พยายามแยกโปรตีนส่วนที่ไม่มีพิษออกจากพิษงูเห่าไทย (Naja naja siamensis) โดยใช้วิธีให้ความร้อน ๘๐° เซลเซียส เป็นเวลา ๒๐ นาที ในขณะที่สารละลายพิษงูอยู่ในสภาพเป็นกรดมี pH = 5.8 มีโปรตีนที่ถูกทำลายโดยความร้อนตกตะกอนลงมาเป็นจำนวน ๓๕ % ส่วนน้ำใส (supernatant) หรือเรียกว่า heated toxin มีโปรตีนเหลืออยู่ประมาณ ๖๕ % และส่วนนี้มีความเป็นพิษสูงกว่าพิษงูเห่าธรรมชาติ คือมีค่า LD_{50} = 0.167 มิลลิกรัมต่อหนู ๑ กิโลกรัม (พิษงูเห่าธรรมชาติมีค่า LD_{50} = 0.126 มิลิกรัมต่อหนู ๑ กิโลกรัม) แต่มีจำนวน LD_{50} ในพิษงูส่วนนี้ลดลงไป ๑๖.๗ % อาจเนื่องจากมีการสูญเสียโปรตีนพิษไปในระหว่างขบวนการแยกโปรตีน จำนวน LD_{50} หรือความเป็นพิษที่ได้กลับคืนมา ๘๓.๓% แล้วนำโปรตีนส่วนนี้ไปทำให้เป็นโพลิเมอร์ โดยใช้ glutaraldehyde และเปรียบเทียบกับพิษงูธรรมชาติ (unheated toxin) ที่อยู่ในรูปโพลิเมอร์ โดยใช้ glutaraldehyde เช่นเดียวกัน พบว่าโพลิเมอร์ของ heated toxin และ unheated toxin ไม่มีความเป็นพิษ แต่จากการทำ neutralization ในหลอดทดลองพบว่าโพลิเมอร์ของ heated toxin สามารถกระตุ้นให้หนู (Wistar Strain Rat) สร้างแอนติบอดี้ต่อพิษงูได้ และซีรั่มหนู ๑ มิลลิลิตรสามารถทำลายพิษงูเห่าได้ 13.42 LD_{50} ส่วนหนูที่ฉีดโพลิเมอร์ของ unheated toxin พบว่าสร้างแอนติบอดี้ได้ระดับต่ำมากจนไม่สามารถคำนวณค่าการทำลายพิษงูได้ และจากการทำ neutralization ในสัตว์ทดลองพบว่าหนูที่ฉีดด้วยโพลิเมอร์ของ heated toxin ทนพิษงูได้ 8 LD_{50} ส่วนหนูที่ฉีดด้วยโพลิเมอร์ของ unheated toxin ไม่สามารถทนพิษงูจำนวน 3 LD_{50} ได้แต่การตายช้าลง

Project Title Method in Increasing Antigenic Potency of Cobra Venom

Name of the Investigator Mrs. Kanchana Juntongjin

Year 1978

Abstract

To isolate the non-toxic protein., we heated the suspension of Thai cobra venom in acidic condition (pH 5.8) at 80°C for 20 min. The 35 % precipitating protein was removed, and the rest 65 % supernatant contained partially purified heat-stable toxin as named "heated toxin". Subsequently, the heated toxin was polymerized by 2.5 % qlutaraldehyde.

The heated toxin had higher toxicity than natural venom, having LD_{50} = 0.167 mg/kg of mice (natural venom have LD_{50} = 0.216 mg/kg of mice). The percentage of recovery of toxicity of heated toxin was 83.3 and 16.7 % lost in the heating procedure. The polymer of heated toxin was found to be non-toxic, and induced considerable anti-toxin anti body titer in Wistar Strain Rat. The polymer of unheated (natural) toxin was tested to be non-toxic, but induced very low anti-toxin anti body titer.

In vitro neutralization show that 1 ml of serum from rats immunized with polymer of heated toxin neutralized maximally 13.42 LD_{50} of cobra venom. While LD_{50} value was not calculable when immunized polymer of unheated toxin. In vivo neutralization, the group of rats immunized with heated toxin polymer withstood 8 LD_{50}, while those immunized with unheated toxin polymer could not withstand 3 LD_{50}, but the death was delayed.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล ที่ให้คำปรึกษาและแนะนำตลอดการวิจัยนี้ และขอขอบพระคุณ แพทย์หญิง คุณหญิงศรีประไพ ผ่องอักษร ผู้อำนวยการสถานเสาวภา เกี่ยวกับการให้ความสดวกในเรื่องการซื้อพิษงูเห่าและให้คำแนะนำ ศาสตราจารย์ ดร.ม.ร.ว.พุฒิพงศ์ วรวุฒิ หัวหน้าแผนกชีววิทยา ที่กรุณาให้ใช้สถานที่เลี้ยงสัตว์ทดลองและให้ความสดวกในการใช้เครื่องปั่นแยกสาร รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง คุณหญิงศรีจิตรา บุนนาค หน่วยต่อมไร้ท่อและเมตตาบอลิสม แผนกอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาฯที่กรุณาให้ใช้ห้องปฏิบัติการในการแยกพิษงูระยะต้น และนายแพทย์ วิศาล เยาวพงศิริ ผู้ให้คำแนะนำอันเป็นแนวทางของการวิจัยนี้ งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลือจากท่านที่กล่าวนามมาแล้วข้างต้นนี้

หอสมุดกลาง
จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ช

กิตติกรรมประกาศ ..... ญ

รายการตารางประกอบ ..... ฐ

รายการรูปประกอบ ..... ฑ

รายการแผนผังประกอบ ..... ฒ

บทที่

1 บทนำ 1

2 การวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5

3 วิธีการทดลอง 18

การลดปริมาณของโปรตีนที่ไม่มีพิษซึ่งปนอยู่ในพิษที่รีดจากงูเห่า 18

การขจัดโปรตีนส่วนที่ไม่มีพิษออกจากพิษงูเห่าโดยใช้ความร้อน 18

การหาปริมาณโปรตีนใน heated toxin 19

การหาความเป็นพิษของพิษงู 20

การทำให้โมเลกุลของพิษอยู่ในรูปโพลิเมอร์พิษงู 20

การหาคุณสมบัติของการเป็นแอนติเจนของโพลิเมอร์พิษงู 22

4 ผลการทดลอง 27

ความเป็นพิษของพิษงูเห่าไทย 27

บทที่ หน้า

ผลของการขจัดโปรตีนที่ไม่มีพิษด้วยความร้อน 27

ผลของการคำนวณหาค่าของความเป็นพิษที่ได้กลับคืนมาหลังจากการขจัดโปรตีนที่ไม่มีพิษบางส่วนออกโดยคิดตามค่า LD_{50} (Percentage of of Recovery Toxin) 31

ผลการทำพิษงูให้อยู่ในรูปโพลิเมอร์ 32

ผลการทดสอบความเป็นของโพลิเมอร์ 33

การกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อพิษงูเห่าในหนู (Wistar Strain Rat) 34

ผลการทดสอบหาภูมิคุ้มกันต่อพิษงูเห่าในหนูโดยการฉีดพิษงูเข้าในตัวหนู (in vivo test) 45

5 การอภิปรายผล 47

6 ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ 55

เอกสารอ้างอิง 57

รายการตารางประกอบ

ตารางที่ หน้า

1 แสดงการแยก neurotoxin ออกจากพิษงูเห่า Genus Naja 8

2 แสดงผลของการขจัดโปรตีนที่ไม่มีพิษออกจากพิษงูโดยใช้สารละลายพิษงูที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน 28

3 แสดงการเปรียบเทียบความเป็นพิษของพิษงูที่ได้ตามธรรมชาติ (unheated toxin) และพิษงูที่ใช้ความร้อนแยกโปรตีนออกบางส่วน (heated toxin) 30

4 แสดงค่าความเป็นพิษของพิษงูที่สูญเสียไปในขบวนการขจัดโปรตีนที่ไม่มีพิษ 32

5 แสดงผลการหาระดับของแอนติบอดี้ในซีรั่มของหนู (Wistar Strain Rat) หลังจากฉีดโพลิเมอร์ของ heated toxin ในระยะเวลาต่าง ๆ 35

6 แสดงผลการหาระดับของแอนติบอดี้ในซีรั่มของหนูหลังจากฉีดโพลิเมอร์ของ unheated toxin ในระยะเวลาต่าง ๆ 40

7 เปรียบเทียบระดับของแอนติบอดี้ในซีรั่มหนูกลุ่มที่ได้รับการฉีดโพลิเมอร์ของ heated toxin และหนูกลุ่มที่ได้รับการฉีดโพลิเมอร์ของ unheated toxin 48

8 แสดงการเปรียบเทียบความต้านทานต่อพิษงูในหนู 2 กลุ่ม ที่ถูก immunize ด้วยโพลิเมอร์ของ heated toxin และ unheated toxin (in vivo test) 46

รายการรูปประกอบ

รูปที่ หน้า

1 แผนภูมิแสดงระดับแอนติบอดี้ในหนูหลังจากฉีดโพลิเมอร์ heated toxin 38

รายการแผนผังประกอบ

แผนผังที่ หน้า

1 แสดงการฉีดพิษงูและเจาะเลือดในหนู (Wistar Strain Rat) 24

บทที่ 1

บทนำ

ในประเทศไทยมีงูพิษมากมายหลายชนิด เฉพาะพวกที่มีพิษร้ายแรงมากมีอยู่ 7 ชนิดคือ งูเห่า (Cobra), งูจงอาง(King cobra), งูสามเหลี่ยม (Banded Krait), งูแมวเซา (Russell's Viper), งูกัปปะ (Malayan Pit Viper), งูเขียวหางไหม้ (Green Pit Viper) และงูทะเล (Sea Snakes) ใน 7 ชนิดนี้งูเห่าเป็นงูพิษที่มีมากที่สุดและมีอยู่ทั่วไปในประเทศไทย

ในปีหนึ่ง ๆ มีประชากรของประเทศไทยจำนวนไม่น้อยที่ได้รับอันตรายจากการถูกงูพิษกัด ประชากรเหล่านี้จะรอดชีวิตได้ก็ต่อเมื่อได้รับการฉีด ซีรุ่มแก้พิษงู(anti-venom serum) ชนิดที่กัดนั้นด้วยปริมาณเพียงพอและทันท่วงที ในปัจจุบันคนที่ถูกงูกัดจะได้รับการฉีด ซีรั่ม แก้พิษงูเป็นจำนวนมากๆ การฉีดซีรั่มที่ผลิตโดยสัตว์เข้าไปในคนในปริมาณมาก ๆ อาจจะทำให้เกิดอันตรายขึ้นได้ในภายหลังคือ อาจจะเกิดโรค serum sickness หรือโรคแพ้ซีรุ่มขึ้นได้ ปัญหาของการเกิดโรคแพ้ซีรุ่ม อาจขจัดออกไปได้โดยการใช้ซีรั่มที่มีประสิทธิภาพสูง แต่ปริมาณน้อย ดังนั้นการผลิต ซีรุ่มที่มีประสิทธิภาพสูงคือมีความเข้มข้นของแอนติบอดี้ต่อพิษงูสูง จึงเป็นสิ่งที่มีประโยชน์อย่างยิ่งต่อมนุษยชาติ สมควรที่จะได้รับความสนใจและมีการศึกษาอย่างจริงจัง

ปัจจุบันการผลิต ซีรุ่มให้มีจำนวนเพียงพอและมีประสิทธิภาพสูงยังคงเป็นปัญหาอยู่ เนื่องจาก

1. พิษงูหรือสารที่จะฉีดเข้าไปในสัตว์เพื่อกระตุ้นให้เกิดแอนติบอดี้ต่อพิษงูนั้นมีพิษร้ายแรงมาก ดังนั้นในการฉีดแต่ละครั้งต้องใช้ปริมาณน้อย ซึ่งอาจจะเป็นปริมาณที่ต่ำกว่า optimal dose ของแอนติเจน จึงทำให้สัตว์สร้างแอนติบอดี้ได้น้อย

2. พิษงูเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก ดังนั้นจึงมีประสิทธิภาพในการเป็นแอนติเจน (antigenic potency) ต่ำ คือไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดแอนติบอดี้

ได้ในระดับที่สูง

3. พิษงูที่ได้มาไม่ใช่พิษงูบริสุทธิ์ เพราะมีโปรตีนและสารอื่น ๆ ที่ไม่เกี่ยวข้องกับความเป็นพิษปะปนอยู่ สารเหล่านี้เมื่อฉีดเข้าไปในสัตว์ก็จะกระตุ้นให้สัตว์สร้างแอนติบอดี้ต่อมันด้วย แอนติบอดี้ต่อสารเหล่านี้ไม่มีประโยชน์ต่อร่างกายเมื่อฉีดเข้าไปเพราะจะไม่ช่วยทำลายพิษ แต่กลับจะให้โทษกับร่างกายภายหลังได้เช่น ทำให้เกิดการแพ้

การวิจัยที่จะรายงานต่อไปนี้เป็นการวิจัยเพื่อแก้ปัญหาทั้ง 3 ข้อที่กล่าวข้างต้น โดยการขจัดโปรตีนที่ไม่ใช่สารพิษออกจากพิษงูไปส่วนหนึ่ง แล้วทำให้พิษงูอยู่ในรูปโพลิเมอร์ซึ่งทำให้โมเลกุลใหญ่ขึ้นและความเป็นพิษหมดไป

<u>วัตถุประสงค์และขอบเขตของการวิจัย</u>

1. ในการวิจัยนี้ได้เลือกใช้พิษงูเห่าไทย (<u>Naja naja Siamensis</u>) เนื่องจากงูเห่าเป็นงูพิษที่มีอยู่เป็นจำนวนมากและมีอยู่ทั่วไปในประเทศไทย ดังนั้นจึงมีคนที่จะได้รับอันตรายจากงูพิษชนิดนี้เป็นจำนวนมากด้วย การวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อประชากรเหล่านี้อย่างยิ่ง

2. เพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมในการขจัดโปรตีนที่มิใช่ส่วนที่เป็นพิษออกด้วยวิธีที่ง่ายและประหยัดทั้งเวลาและทุนทรัพย์ เพื่อที่จะทำให้ซีรั่มที่ผลิตได้มีแอนติ-บอดี้ต่อส่วนของโปรตีนที่ไม่เกี่ยวข้องกับความเป็นพิษอยู่เป็นจำนวนน้อย ซึ่งเป็นผลให้ซีรั่มที่ได้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น

3. มุ่งที่จะหาวิธีทำให้พิษงูที่ได้ตามข้อ 2 ข้างต้น มีความเป็นพิษ (toxicity) ลดลง โดยไม่ทำให้คุณสมบัติของการเป็นแอนติเจนของส่วนที่เป็นพิษนี้เสียไป

4. เพื่อหาวิธีทำให้โมเลกุลของพิษงูซึ่งมีขนาดเล็ก ๆ จับรวมตัวกันอย่างถาวรให้มีขนาดโมเลกุลใหญ่ขึ้น (polymerize โดยการจับกันด้วยสารชนิดหนึ่งเป็น

ตัวเชื่อม) และให้โพลิเมอร์ (polymer) ที่ได้มีคุณสมบัติของการเป็นแอนติเจน (antigenicity) เหมือนพิษงูเดิม และการที่ทำให้โมเลกุลใหญ่ขึ้นก็จะทำให้ประสิทธิภาพในการเป็นแอนติเจน (antigenic potency) สูงขึ้นด้วย

5. ศึกษาคุณสมบัติของการเป็นแอนติเจนของพิษงูที่อยู่ในรูปโพลิเมอร์ในหนู (Wistar Strain Rat) เหตุผลที่ใช้หนูชนิดนี้เนื่องจากเป็นสัตว์ทดลองชนิดเดียวที่เป็น inbred strain ที่พอจะหาได้ในประเทศไทย การใช้ inbred strain ก็เพื่อที่จะขจัดปัญหาในเรื่องความแตกต่างทางลักษณะทางกรรมพันธุ์ของหนูแต่ละตัว ซึ่งจะทำให้ผลการวิจัยแน่นอนขึ้น เพราะความสามารถในการตอบสนองต่อแอนติเจนของสัตว์นั้นเป็นลักษณะทางกรรมพันธุ์ด้วย

ประโยชน์จากการวิจัย

การวิจัยนี้มุ่งที่จะหาวิธีการที่จะผลิต ซีรั่มแก้พิษงูที่มีประสิทธิภาพดีขึ้น ดังนั้นผลการวิจัยนี้จะเป็นแนวทางสำหรับการค้นคว้าและวิจัยขั้นต่อ ๆ ไปในสัตว์ทดลองขนาดใหญ่ขึ้นเพื่อผลิตเซรุ่มแก้พิษงูจำนวนมาก ๆ และมีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อมนุษยชาติอย่างยิ่ง

แผนการดำเนินการวิจัย

1. หาวิธีขจัดโปรตีนส่วนที่ไม่เป็นพิษออกให้มากที่สุด ด้วยวิธีการง่ายๆ แต่มิได้มุ่งที่จะทำให้ได้ส่วนที่เป็นพิษบริสุทธิ์จริง ๆ เพราะจะเป็นวิธีที่ยุ่งยากและไม่เหมาะที่จะนำมาใช้เป็นประจำในการผลิต ซีรั่มแก้พิษงู

2. นำโปรตีนส่วนที่เป็นพิษที่ได้จากข้อ 1 ไปทำให้มีความเป็นพิษลดลงและมีประสิทธิภาพของการเป็นแอนติเจนดีขึ้น โดยใช้วิธีทำให้โมเลกุลของส่วนที่เป็นพิษนี้ต่อกันเป็นโพลิเมอร์ (polymer) ด้วย glutaraldehyde

3. ศึกษาคุณสมบัติของการเป็นแอนติเจนของโพลิเมอร์ในการกระตุ้น

ให้เกิด antibody ต่อพิษงูเห่าในหนู (Wistar Strain Rat) โดยการฉีดโพ-
สิเมอร์เข้าในหนูเพื่อให้สร้างภูมิต้านทานขึ้นในร่างกาย (immunization) ภูมิต้าน
ทานที่สร้างขึ้นนี้คือแอนติบอดี้ที่อยู่ใน ซีรั่ม ของหนู นำ ซีรั่ม ของหนูไปทด
สอบเพื่อตรวจหาประสิทธิภาพในการทำลายพิษงูเห่า (neutralization test)

บทที่ 2

การวิจัยที่เกี่ยวข้อง

งูเห่าที่พบมากที่สุดในประเทศไทยคือ sub-species Naja naja siamensis และมี sub - species อื่นที่พบรองลงมาคือ Naja naja kaouthia และ Naja naja atra (Lee, 1971)

ส่วนประกอบของพิษงูเห่าโดยทั่วไป

พิษงูที่รีดออกมาจากงูเห่าโดยทั่วไปรวมทั้งงูเห่าไทยประกอบด้วยสารหลายชนิดมีโปรตีน 90 - 92% นอกจากนั้นเป็นสารอื่น ๆ รวมทั้งอนินทรีย์สารด้วย (Lo, et al, 1966)

สารประกอบพวกโปรตีน แบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มคือ

1. โปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็นพิษได้แก่ neurotoxin, cardiotoxin, cobramines, Direct Lytic Factor (DLF), toxin r และ cytotoxin (Devi, 1968)

2. โปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ โปรตีนส่วนใหญ่ในพิษงูจะอยู่ในกลุ่มนี้ เอนไซม์ที่พบมีมากกว่า 10 ชนิด ที่สำคัญมี hyaluronidase, L-ophio-amino acid oxidase, cholinesterase, phosphodiesterase และพวก proteolytic enzymes อีกหลายชนิด (Zeller, 1948, 1951)

3. ส่วนของโปรตีนที่ยังไม่ทราบคุณสมบัติที่แน่นอน

สารประกอบที่ไม่เป็นโปรตีนแบ่งออกได้ดังนี้

1. อินทรีย์สารได้แก่ adenosine, inosine, cholesterol free lecithin และ protein-bounded lecithin (Lo, et al.,1966)

2. อนินทรียสาร ประกอบด้วยธาตุสังกะสีเป็นจำนวนค่อนข้างสูง (Lo, et al, 1966) นอกจากนี้ใน Formosan cobra venom ยังมีรายงานว่าพบธาตุและสารอื่น ๆ ในเถ้าที่ได้จากการเผาพิษงูได้แก่ แมกนีเซี่ยม, แคลเซี่ยม, โซเดี่ยม, คลอรีน, สารประกอบซัลเฟต และสารประกอบฟอสฟอรัสเพนตาออกไซด์(Lee, 1971)

ในบรรดาส่วนประกอบต่าง ๆ ของพิษงูที่กล่าวมาแล้ว neurotoxin เป็นส่วนประกอบที่มีความสำคัญและสมควรที่จะได้รับการศึกษาและวิจัยมากที่สุด เพราะเป็นสาเหตุของการตาย (Yang, et al, 1959, 1960; Yang, 1960; Lee และ Peng, 1961; Vick et al, 1965)

Neurotoxin ในพิษงูเห่าทั่วไป

neurotoxin เป็นสารในพิษงูที่เป็นสาเหตุสำคัญของการตาย โดยที่ neurotoxinนี้จะไปจับกับ acetyl choline receptor ที่อยู่บน motor end plate ที่กระบังลม อันเป็นผลให้เกิดอัมมะพาตที่ระบบหายใจ (peripheral respiratory paralysis) (Yang, et al; 1959, 1960; Yang,1960; Lee และ Peng, 1961; Vick, et al, 1965)

คุณสมบัติของ Neurotoxin

1. เป็น polypeptides เล็ก ๆ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 7,000 - 8,000 ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 60 - 70 โมเลกุล(Yang, 1974)

2. ทนความร้อนได้ดีในสภาวะที่เป็นกรด สามารถทนความร้อนได้ถึง 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ในสภาวะเช่นนี้โปรตีนอื่นเช่น cardiotoxin, hemolysin, cholinesterase จะสูญเสียคุณสมบัติหมด (Devi, 1968; Yang, 1965)

3. มี isoelectric pointที่ pH สูงกว่า 9.4(Devi ,1968)

4. โมเลกุลมีประจุเป็นบวก (Yang, 1974)

5. มีคุณสมบัติของการเป็นแอนติเจนที่เลวหรือมี antigenic potency ต่ำ (Jimenez - Porras, 1968; Chang & Yang, 1969)

neurotoxin นี้แบ่งออกเป็น 2 พวกใหญ่ ๆ ตามความยาวของสาย polypeptide คือ

1. toxin ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 60 - 62 โมเลกุลและภายในสายเดียวกัน cross-linked ด้วย 4 disulfide bridges มีชื่อว่า short neurotoxin (Karlson et al, 1972)

2. toxin ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 71 - 74 โมเลกุลและ cross - linked ด้วย 5 disulfide bridges ภายในแต่ละสายเรียกว่า long neurotoxin (Yang, 1974)

ทั้ง short และ long neurotoxin จะมีความสามารถในการทำให้เกิดการตายได้เหมือนกัน โดยที่ neurotoxin ทั้งสองประเภทนี้จะจับกับ acetyl choline receptorบน motor end plate ที่กระบังลม (Lee,et al, 1967; Tseng, et al, 1968)

<u>การแยก neurotoxin ออกจากสารอื่น(Purification of neurotoxin)</u>

เนื่องจาก neurotoxin มีความสำคัญ ดังนั้นจึงได้มีผู้พยายามแยก neurotoxin ออกจากพิษงูเห่าหลายชนิด ด้วยวิธีการต่าง ๆ กัน โดยมีจุดประสงค์ที่จะนำ neurotoxin บริสุทธิ์มาศึกษาและวิจัยเพื่อหาวิธีการสำหรับช่วยผู้ถูกงูพิษกัดที่ดีที่สุด

การแยก neurotoxin มีวิธีต่าง ๆ และทำในพิษงูเห่าชนิดต่าง ๆ กัน ดังปรากฏในตารางที่ 1

ตารางที่ ๑

แสดงการแยก Neurotoxin ออกจากพิษงูเห่า Genus Naja

Species หรือ Subspeciesของ	ชื่อทั่วไป	ถิ่นที่อยู่	ชื่อ Neurotoxinที่แยกได้	วิธีการแยก	ผู้ทดลองและวิจัย
Naja naja atra	Taiwan cobra	Taiwan	cobrotoxin (62)*	Amm. sulfate fractionation and carboxymethyl-cellulose chromatography	Yang (1965)
N. nigricolis	Black neck spitting cobra	Southern Africa	Toxin α (61)	ion exchange chromatography ด้วย Amberlite IRC - 50	Karlsson,et.al. (1966)
N. haje haje	Egyptian cobra	Nile Valley Egypt	Toxinα (61)	gradient chromatography ด้วย Amberlite CG-50 และทำSephadex G-50 gel filtration	Botes and Strydon (1969)
(N. haje annulifera)			Toxin I (61)		Miranda,et al.(1970)
			Toxin II (61)		Miranda,et al.(1970)
(N. haje anchietae	Ethiopian cobra	Ethiopia	Toxin II (61)		Miranda,et al.(1970)
			Toxin III(71)		Miranda,et al.(1970)
N. nivea	Cape cobra	South Africa	Toxinα (71)	ion exchange chromatography ด้วย Amberlite CG-50 และทำCM-cellulose chromatography และ Sephadex G-50 gel filtration	Botes,et al. (1971)
			Toxin B (61)		
			Toxin δ (61)		
N. naja kaouthia	Monocellate cobra	India	Toxin (71)	ion exchange chromatography ด้วย Bio. Rex 70 ใน volatile amm. acetate buffer แล้วตามด้วย Sephadex G-50 gel filtration	Karlsson and Eaker (1972)
N. naja siamensis	Monocellate Thai cobra (regular type and light phase)	Thai	Toxin 3 (71)	ใช้วิธีแยกเช่นเดียวกับ N. naja kaouthia	Karlsson,et al.(1971)
			Toxin 5 (61)		
			Toxin 3 c(62)		
			Toxin 7 c(62)		
N. naja naja	Indian spectacled cobra	India	Toxin 3 (71)		Karlsson,et al.(1971)
			Toxin 4 (71)		
N. naja naja	black cobra	West Pakistan	Toxin (71)	ใช้วิธีแยกเช่นเดียวกับ N. naja kaouthia	Karlsson and Eaker (1972)
N. naja oxiana		Iran	Oxiana toxin (61)		Karlsson and Eaker (1972)

หมายเหตุ *ตัวเลขที่แสดงในวงเล็บคือจำนวนกรดอะมิโนที่พบต่อ ๑ โมเลกุลของ Neurotoxin ที่แยกได้

Neurotoxin ในพิษงูเห่าไทย

งูเห่าไทยประกอบด้วย neurotoxin ประมาณ 25% ของน้ำหนักแห้ง (Karlsson และ Eaker,1972) และจากการแยกด้วยเทคนิค exchange chromatograph โดยใช้ Bio - Rex 70 และ volatile ammonium acetate buffers แล้วตามด้วยการแยกโดย gel filtration บน Sephadex G 50 พบว่า neurotoxin ของงูเห่าไทยแยกออกได้เป็น 2 ส่วน (Karlsson, et al, 1971)

1. principal toxins คือส่วนของ neurotoxin ที่เรียกว่า toxin siamensis 3 neurotoxinชนิดนี้เป็นสารพวก polypeptide ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน 71 โมเลกุล จึงจัดไว้เป็นพวก long neurotoxin ในแต่ละสายของ polypeptide จะมี disulfide bond เชื่อมโยงกรดอะมิโนภายในสายเข้าด้วยกันถึง 5 ตำแหน่ง neurotoxin ส่วนใหญ่ที่มีอยู่ในพิษงูเห่าไทยเป็นพวก long neurotoxin

2. minor toxins neurotoxin ชนิดนี้มีอยู่เป็นส่วนน้อยในพิษงูเห่าไทย มีประมาณ 1% หรือน้อยกว่านี้ประกอบด้วย 3 components คือ

toxin siamensis 5 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 61 โมเลกุล

toxin siamensis 3 c ประกอบด้วยกรดอะมิโน 62 โมเลกุล

toxin siamensis 7 c ประกอบด้วยกรดอะมิโน 62 โมเลกุล

ภายในแต่ละสาย polypeptide ของ neurotoxin เหล่านี้จะมี disulfide bond เชื่อมโยงกรดอะมิโนภายในสายเข้าด้วยกัน 4 ตำแหน่ง neurotoxin นี้จัดเป็นพวก short neurotoxin.

ทั้ง principal toxins และ minor toxins มีคุณสมบัติที่ทำให้เกิดการตายได้เช่นเดียวกัน (Karlsson, et al; 1971)

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

ส่วนประกอบของ toxin siamensis 3 (principal toxins) ของงูเห่าไทย

toxin siamensis 3 ของงูเห่าไทยเป็น polypeptide ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 7820 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 71 โมเลกุล (Karlsson, et al, 1971) มีกรดอะมิโน Isoleucine อยู่ทาง N - terminal และกรดอะมิโน Proline อยู่ทาง C - terminal ชนิดและจำนวนของกรดอะมิโนที่ประกอบเป็นสาย peptide มีดังนี้

Aspatic acid	9	โมเลกุล	Isoleucine	5	โมเลกุล
Threonine	9	"	Leucine	1	"
Serine	3	"	Thenylalanine	3	"
Glutamic acid	1	"	Lysine	5	"
Proline	6	"	Histidine	1	"
Glycine	4	"	Arginine	5	"
Alanine	3	"	Tryptophan	1	"
Half - cystine	10	"	Tyrosine	1	"
Valine	4	"			

(Karlsson, et al; 1971)

หน้าที่ของกรดอะมิโนบนสาย polypeptide ของ neurotoxin ที่มีในพิษงูเห่าทั่วไป

Yang (1974) ได้แบ่งกรดอะมิโนบนสาย polypeptide ของ neurotoxin ออกเป็น 2 พวกตามหน้าที่ (biological function) ดังนี้

1. functionally essential groups เป็นพวกที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับความเป็นพิษคือ เป็นกรดอะมิโนกลุ่มที่อยู่ตรง active site ของโมเลกุลซึ่งเป็นตำแหน่งที่จะจับกับ receptor ของเซลล์เป้าหมาย (target cell) ถ้าเปลี่ยนแปลงส่วนนี้อาจจะทำให้ความเป็นพิษของ neurotoxin ลดลงหรือหมดไป

เนื่องจากไม่สามารถจับกับ receptor บนเซลล์เป้าหมายได้เหมือนเดิม

2. structurally essential groups เป็นกรดอะมิโนพวกที่ทำหน้าที่รักษาโครงสร้างของโมเลกุลของสาย polypeptides ของ toxin แต่ไม่เกี่ยวกับการจับบนเซลล์เป้าหมาย

จะเห็นได้ว่าถ้ากรดอะมิโนในพวกแรกถูกเปลี่ยนแปลงก็จะทำให้ความเป็นพิษเปลี่ยนไปด้วย แต่ถ้ากรดอะมิโนในพวกที่สองถูกเปลี่ยนไปก็จะทำให้โครงสร้างของโมเลกุลเปลี่ยนและอาจมีผลทำให้ antigenic property เปลี่ยนไปด้วย ดังนั้นถ้าเราสามารถเปลี่ยนแปลงตรง functionally essential groups โดยไม่เปลี่ยนตรง structurally essential groups ก็จะได้โมเลกุลของ toxin ที่ปราศจากพิษแต่มีโครงสร้างเหมือนเดิมหรือใกล้เคียงของเดิมมากที่สุด

<u>การเปลี่ยนแปลงโมเลกุลของ neurotoxin เพื่อลดความเป็นพิษ</u>

จากการทราบว่า neurotoxin เป็นส่วนสำคัญในพิษงูเห่าที่ทำให้เกิดการตาย ทำให้มีผู้พยายามหาวิธีลดความเป็นพิษ โดยการเปลี่ยนแปลงโมเลกุลของ toxin ให้อยู่ในรูปของสารที่ไม่มีพิษหรือมีพิษลดลงแต่ให้มีโครงสร้างหรือ antigenic property คงเดิมมากที่สุด

จากผลงานของ Yang(1974) ที่กล่าวมาแล้วข้างต้น จะเห็นได้ว่าการทำให้ neurotoxin หมดสภาพการเป็นสารพิษโดยที่โครงสร้างของโมเลกุลยังคงเดิมนั้นน่าจะกระทำได้ โดยการเลือกเปลี่ยนแปลงเฉพาะโมเลกุลของกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องกับความเป็นพิษโดยไม่ให้มีผลต่อกรดอะมิโนที่ควบคุมโครงสร้างเลย ได้มีผู้พยายามเปลี่ยนแปลง neurotoxin เพื่อให้ได้โมเลกุลของ neurotoxin ที่มีคุณสมบัติดังกล่าวข้างต้นด้วยวิธีการต่าง ๆ กันดังนี้ คือ

1. <u>เปลี่ยนแปลงโดยเปลี่ยนตรงส่วนกรดอะมิโน tryptophan</u>

เนื่องจากกรดอะมิโน tryptophan ที่อยู่บนโมเลกุลของ short

neurotoxin ของพิษงูเห่า Naja naja atra ซึ่งเรียกว่า cobrotoxin และบนโมเลกุลของ toxin ในพิษงูทะเลอีกหลายชนิดเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้โมเลกุลมีพิษ คือ เป็นกรดอะมิโนที่จัดอยู่ในพวก functionally essential group(Chang และ Hayashi, 1969;Chang และ Yang,1973; Seto,et al, 1970; Tu และ Hong, 1971; Tu,et al,1971; Tu และ Toom, 1971) ดังนั้น Chang และ Yang(1973) จึงได้เปลี่ยนแปลงโมเลกุลของ short neurotoxin โดยเปลี่ยนแปลงตรงส่วนของกรดอะมิโน tryptophan ด้วยวิธีการ 3 วิธีคือ

ก. โดยเปลี่ยน tryptophanให้เป็นสาร N-formylkyneurenine โดยวิธี ozonization ใน formic acid

ข. โดย oxidized tryptophan ให้เป็น oxindole derivative ด้วย N - bromosuccinimide

ค. เปลี่ยนแปลงโมเลกุลของ tryptophane โดยให้ทำปฏิกริยากับ 2 - hydroxy - 5 - nitrobenzyl bromide(HNB - bromide) หรือ 2 - nitrophenyl sulfenyl chloride

ผลการทดลองพบว่า การเปลี่ยนแปลงโมเลกุลของ cobrotoxin ซึ่งเป็น short neurotoxinด้วยวิธีดังกล่าวทั้ง 3 วิธี ทำให้ความเป็นพิษหมดไป แต่ immunological property ยังคงเดิมคือยังทำปฏิกริยากับ antibody ต่อ cobrotoxin ได้ และสามารถกระตุ้นให้กระตายสร้าง antibody ต่อ cobrotoxin ได้

กรดอะมิโนที่ทำหน้าที่เป็น functionally essential group ในโมเลกุลของพิษชนิดหนึ่งอาจจะไม่ทำหน้าที่เดิมในโมเลกุลของพิษอีกชนิดหนึ่ง สำหรับพิษงูเห่าไทย toxin siamensis 3 ซึ่งเป็น long neurotoxin ได้ถูกนำมาเปลี่ยน

แปลงโดย Karlsson และ Eaker(1972) โดยเปลี่ยนกรดอะมิโน trypto-phan บนโมเลกุลของ toxin นี้ด้วย HNB- bromide และพบว่าโมเลกุลของ toxin siamensis 3 ที่เปลี่ยนไปนี้จะ polymerize ได้ ถ้าtoxin อยู่ในรูป trimer หรือโมเลกุลใหญ่กว่านี้จะไม่มีพิษเหลือ แต่ถ้าอยู่ในรูป dimer จะมีความเป็นพิษเล็กน้อย แต่ถ้าอยู่ในรูป monomer คือไม่ polymerize จะมีพิษเหลืออยู่ประมาณ 20% - 50% ดังนั้นเฉพาะการเปลี่ยนแปลงโมเลกุลของ tryptophan ไม่ได้เป็นการทำให้ความเป็นพิษหมดไปอย่างสิ้นเชิง จึงดูเสมือนว่า tryptophan อาจจะไม่ได้ทำหน้าที่เป็น functionally essential group โดยตรงแต่มีส่วนช่วยในการทำงานของ functionally essential group ในโมเลกุลของ toxin siamensis 3

2. เปลี่ยนแปลงโดยเปลี่ยนตรงส่วนกรดอะมิโน tyrosine

ได้มีการเปลี่ยนแปลงโดยใช้ Cobrotoxin จากงูเห่า N. naja atra ทำปฏิกริยากับ tetranitromethane ผลการทดลองพบว่า cobrotoxin ซึ่งมีกรดอะมิโน tyrosine 2 โมเลกุลคือตำแหน่งที่ 39 ซึ่งอยู่รอบนอกของ toxin และตำแหน่งที่ 25 ซึ่งฝังอยู่ข้างใน การเปลี่ยนแปลงตรงตำแหน่งที่ 39 จะไม่ทำให้ความเป็นพิษและโครงสร้างของ toxin เปลี่ยนแปลง แต่ถ้าเปลี่ยนแปลงตรงตำแหน่งที่ 25 จะทำให้ความเป็นพิษและโครงสร้างเสียไป การเปลี่ยนแปลงที่ทำให้โครงสร้างเสียนี้เป็นผลให้ antigenic property เปลี่ยนไปด้วย (Chang et al,1971) ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่งกรดอะมิโน tyro-sine จึงเป็นวิธีการที่ไม่เหมาะ

3. เปลี่ยนแปลงตรงส่วนกรดอะมิโน histidine

Huang, et al (1972) เปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน histidine บนโมเลกุลของ cobrotoxin ของงูเห่า N. naja atra โดยวิธี Photo -

oxidation พิษงูชนิดนี้มีกรดอะมิโน histidine 2 โมเลกุล การเปลี่ยนแปลงด้วยวิธีดังกล่าวจะเกิดปฏิกริยาได้ดีกับ histidine ตำแหน่งที่ 32 แต่ไม่เกิดกับตำแหน่งที่ 4 หลังจากเปลี่ยนแปลงแล้วความเป็นพิษและ antigenic property ของ toxin เสียไปหมด ดังนั้นการเปลี่ยนตำแหน่งนี้จึงใช้ไม่ได้

4. เปลี่ยนแปลงตรงส่วนกรดอะมิโน arginine

ใน cobrotoxin ของงูเห่า N.naja atra มีกรดอะมิโน arginine ที่ตำแหน่ง 28,30,37,40,43 และ 65 บนโมเลกุล Yang, et al. (1973) ได้ใช้ phenyl glyoxal ทำปฏิกริยากับ toxin นี้ พบว่าเมื่อกรดอะมิโน arginine 4 โมเลกุลถูกเปลี่ยนแปลง ความเป็นพิษจะลดลง แต่ antigenic property ก็เสียไปด้วย การเปลี่ยนแปลงตรงกรดอะมิโน arginine จึงไม่เหมาะสม

5. เปลี่ยนแปลงตรงส่วน free carboxyl group

Chang, et al. (1971) ได้ทดลองกับ cobrotoxin เช่นเดียวกับการทดลองที่แล้ว โมเลกุลของ toxin นี้ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มี free carboxyl group 7 โมเลกุลคือ glutamic acid 4 โมเลกุล aspartic acid 2 โมเลกุล และ asparagine 1 โมเลกุล โดยการ activate toxin นี้ด้วย water - soluble carbodiimide แล้วใช้ glycine methyl ester เข้าทำปฏิกริยากับ free carboxyl group ของกรดอะมิโนพบว่าเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงตรง free carboxyl group ของกรดอะมิโนทั้ง 7 โมเลกุลแล้ว toxin จะสูญเสียความเป็นพิษและ anti genic property โดยสิ้นเชิง นั่นคือโครงสร้างของโมเลกุลของ toxin ได้ถูกทำลาย ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงตรงส่วนนี้จึงใช้ไม่ได้

6. เปลี่ยนแปลงตรงส่วน free amino group

Yang, et al. (1967) ได้เปลี่ยนแปลง cobrotoxin ด้วยวิธี

fluorescine thiocarbamylation ตรงส่วน free amino groups ของกรดอะมิโน Lysine บนโมเลกุลของ toxin นี้ พบว่าความเป็นพิษของ toxin สูญเสียไปโดยไม่มีผลต่อ antigenic property ของ toxin เลย ซึ่งแสดงว่า free amino group มีความสำคัญต่อการทำงานของ active site ของ toxin นี้ Chang (1970) ได้ทดสอบ antigenic property ของ toxin ที่เปลี่ยนแปลงด้วยวิธีดังกล่าวโดยทำ precipitin reactions, immunodiffusion และ immunoelectrophoresis และพบว่า toxin ที่เปลี่ยนด้วยวิธีนี้ไม่มีการเปลี่ยนทาง antigenic property เลย

การเปลี่ยนแปลง neurotoxin โดยเปลี่ยนตรงโมเลกุลของกรดอะมิโนตำแหน่งต่าง ๆ บนสาย polypeptide นี้ จะทำได้ผลดีโดยให้มีความเป็นพิษลดลงแต่มี antigenic property คงเดิม กรดอะมิโนที่ถูกเปลี่ยนแปลงจะต้องเป็นกรดอะมิโนที่อยู่ใน functionally essential group แต่ไม่ควรจะอยู่ใน structurally essential group

การเปลี่ยนแปลง neurotoxin ด้วยวิธีต่าง ๆ ดังกล่าวมาแล้วมีทั้งที่ให้ผลดีนั่นคือ ทำให้ความเป็นพิษลดลงแต่สามารถทำให้สัตว์สร้างแอนติบอดี้ต่อ toxin ได้ และที่ให้ผลไม่ดีคือความเป็นพิษลดลง แต่ไม่สามารถกระตุ้นให้สัตว์สร้างแอนติบอดี้ต่อ toxin ได้

เนื่องจากในระยะ 8 - 9 ปีมานี้ ได้มีนักวิทยาศาสตร์นำสาร glutaraldehyde มาใช้ในการ polymerize โปรตีนต่าง ๆ มากขึ้น และพบว่าโพลิเมอร์ที่ได้นั้นยังมี activity คงเดิม จึงทำให้ผู้วิจัยสนใจที่จะลองนำ glutaraldehyde มาทำให้พิษงูอยู่ในรูปโพลิเมอร์

<u>การเชื่อมต่อโมเลกุลของโปรตีนด้วย glutaraldehyde</u>

glutaraldehyde เป็นสารที่แต่เดิมมีผู้นำมาใช้เป็น tanning agent และต่อมาไม่นานนี้ได้ถูกนำไปใช้เป็น cell fixative สำหรับใช้กับกล้องจุลทัศน์ชนิดอีเล็คตรอน ซึ่งได้ผลดีเนื่องจากเอนไซม์ต่าง ๆ ที่อยู่ภายในเซลล์

ยังคงอยู่ในสภาพดี (Avrameas, 1969).

ได้มีผู้นำสารนี้ไปใช้กับโปรตีนหลายชนิดเพื่อเชื่อมต่อโมเลกุลของโปรตีนเหล่านั้นเข้าด้วยกัน เช่น การเชื่อมต่อโปรตีน Ig G ของคนเพื่อให้อยู่ในสภาพ insoluble , เชื่อมต่อ Bovine Serum Albumin เข้ากับเอ็นไซม์ peroxidase, เชื่อมต่อโปรตีนเข้ากับเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ เป็นต้น (Avrameas และ Ternynck, 1969; Avrameas, 1969) การใช้ glutaraldehyde เชื่อมต่อโมเลกุลของโปรตีนเข้าด้วยกันนั้นไม่ทำให้เสีย Immunological properties ของโปรตีนนั้น ๆ Avrameas และ Ternynch(1969) พบว่า antigenic determinants ของแอนติเจนหรือ antibody activities ของแอนติเจนและแอนติบอดี้ที่อยู่ในรูปโพลิเมอร์อันเกิดจาก glutaraldehyde polymerization นั้นยังคงอยู่ในสภาพเดิม หรืออาจเปลี่ยนไปเพียงส่วนน้อยเท่านั้น และนอกจากนี้ glutaraldehyde ยังมีประสิทธิภาพและความเหมาะสมที่สุดในการทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนของเอ็นไซม์และโปรตีน (enzyme - protein complexes) ซึ่งสารประกอบเชิงซ้อนนี้ยังคงไว้ซึ่งส่วนของ enzymatic และ immunological specificity ได้อย่างดีที่สุด (Avrameas, 1969)

การทำงานของ Glutaraldehyde ในการเชื่อมต่อโมเลกุลของโปรตีนเข้าด้วยกันนี้ เกิดขึ้นจากปฏิกริยาระหว่าง Glutaraldehyde กับกรดอะมิโนที่มี free amino groups ที่อยู่ภายในโมเลกุลของโปรตีนนั้น ๆ และพบว่า lysine เป็นกรดอะมิโนตัวเดียวที่เกี่ยวข้องกับปฏิกริยานี้ (Quicho and Richards, 1966) โปรตีนที่มีโมเลกุลเชื่อมต่อกันนี้จะอยู่ในสภาพ insoluble protein ปฏิกริยาระหว่าง glutaraldehyde กับ free-amino group ของกรดอะมิโน lysine นี้เกิดขึ้นโดยมีกลไกเป็นไปตามแบบของ Schiff base formation (Quicho & Richards, 1966) นั่นคือเมื่อ glutaraldehyde

ทำปฏิกริยากับกรดอะมิโนที่มี free ammino group กรดอะมิโนจะถูกเปลี่ยนเป็นสารที่เรียกว่า Schiff base ก่อนแล้วจะมีการเชื่อมต่อกันระหว่าง Schiff base 2 ตัว ทำให้โมเลกุลของโปรตีนที่มี Schiff base มาต่อกันกลายเป็นโปรตีนโมเลกุลใหญ่และอยู่ในสภาพ insoluble

เนื่องจาก principal neurotoxin ของงูเห่าไทยคือ toxin siamensis 3 ประกอบด้วยกรดอะมิโน lysine 5 โมเลกุลใน 1 สาย polypeptide ดังนั้นจึงคาดว่าการเชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลของ neurotoxin นี้ด้วย glutaraldehyde สามารถจะทำได้และทำให้ toxin มีโมเลกุลใหญ่ขึ้น หรืออาจจะมีการเปลี่ยนโครงสร้างตรง active site ด้วย ทำให้การจับของ toxin กับเซลล์เป้าหมายเกิดขึ้นไม่ได้เป็นการลดความเป็นพิษของ toxin ส่วน antigenic property ของ toxin จะสูญเสียไปด้วยหรือไม่นั้นคาดว่าอาจจะไม่สูญเสียไปมาก เนื่องจากคุณสมบัติของ glutaraldehyde ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

การวิจัยที่จะกล่าวต่อไป ได้มุ่งที่จะทำให้พิษงูเห่าไทยอยู่ในรูปโพลิเมอร์ โดยการใช้ glutaraldehyde และทดสอบ antigenic property ของโพลิเมอร์โดยการพิสูจน์ถึงความสามารถในการทำให้เกิดแอนติบอดี้ต่อพิษงูเห่าในหนูขาว.

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การลดปริมาณของโปรตีนที่ไม่มีพิษ (non-toxic protein) ซึ่งปนอยู่ในพิษที่รีดจากงูเห่า

พิษงูเห่าที่นำมาใช้ในการทดลองเป็นพิษงูเห่าไทย (Naja naja siamensis) จากสถานเสาวภาพ สภากาชาดไทย กรุงเทพฯ พิษงูนี้ได้มาโดยการรีดจากต่อมพิษในปากงูเห่า ดังนั้นจึงมีสารอื่น ๆ ซึ่งไม่ใช่สารพิษเช่น โปรตีนจากน้ำลายปะปนอยู่เป็นจำนวนมาก รวมทั้งเอนไซม์ต่าง ๆ ด้วย การทดลองนี้มีจุดประสงค์ที่จะทดลองกับสารพิษ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องขจัดสารอื่นหรือโปรตีนที่ไม่ใช่สารพิษออกไปให้มากที่สุดที่จะทำได้โดยวิธีง่าย ๆ แต่มิได้มุ่งหวังที่จะทำให้ได้สารพิษที่บริสุทธิ์จริง ๆ เนื่องจากวิธีการทำให้บริสุทธิ์จริง ๆ นั้นเป็นวิธีการที่ยุ่งยากไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการผลิตซีรั่มแก้พิษงูปริมาณมาก ๆ เป็นประจำ

การขจัดโปรตีนที่ไม่มีพิษออกจากพิษงูที่รีดมานั้น ผู้วิจัยได้ทดลองใช้หลายวิธีด้วยกันได้แก่วิธี dialyse ผ่าน dialysing membrane, วิธี heat แล้วตามด้วย ammonium sulfate fractionation วิธี ammonium sulfate fractionation โดยใช้ ammonium sulfate ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน แต่พบว่าการขจัดโปรตีนที่ไม่เป็นพิษโดยการใช้ความร้อนและ buffer ที่เป็นกรดนั้นเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุด

2. การขจัดโปรตีนส่วนที่ไม่มีพิษออกจากพิษงูเห่าโดยใช้ความร้อน

2.1. พิษงูเห่า

ใช้พิษงูเห่าไทย (Naja naja siamensis) จากสถานเสาวภา สภากาชาดไทย กรุงเทพฯ เป็นพิษงูเห่าหลาย ๆ ตัวรวมกัน แล้วนำมาทำให้แห้ง

ด้วยวิธี freeze drying ก่อนใช้นำไปบด (homogenized) ด้วยโกร่งบดยาที่อบฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อให้พิษงูแห้งที่เป็นเกล็ดขนาดต่าง ๆ ผสมปนเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเก็บไว้ในขวดที่ป้องกันความชื้นได้สำหรับใช้ในการทดลองนี้ตลอดไป

2. 2. buffer

ใช้ 0.9% sodium chloride in 0.005 M sodium acetate buffer pH 5.8 เป็น buffer สำหรับละลายพิษงู

2.3. การทดลอง

ชั่งพิษงูที่บด (homogenized) แล้วด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าชนิดละเอียด แล้วละลายใน buffer ดังกล่าวข้างต้น ให้พิษงูมีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน 4 อย่างคือ 1%, 1.5%, 2% และ 2.5% ทั้งนี้เพื่อเปรียบเทียบดูว่าที่ความเข้มข้นใดจะสามารถใช้ความร้อนขจัดโปรตีนพิษออกได้มากที่สุดและไม่ทำให้สารพิษถูกขจัดออกไปด้วย ปรับอ่างน้ำร้อน (water bath) ให้มีอุณหภูมิคงที่คือ 80 องศาเซลเซียส นำพิษงูที่ละลายดีแล้วแต่ละความเข้มข้น แช่ลงในน้ำร้อนเป็นเวลา 20 นาที โดยกวนอยู่ตลอดเวลาที่แช่อ่างน้ำร้อน (ใช้ magnetic stirer) โปรตีนในพิษงูบางส่วนจะตกตะกอน ตั้งทิ้งไว้จนเย็น นำไปปั่นเพื่อแยกตะกอนออกโดยใช้ความเร็ว 6000 rpm 30 นาที ที่อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส แยกส่วนน้ำใส (supernatant หรือสารละลายพิษงู)ออกจากตะกอน สารละลายพิษงูที่ได้หลัง heat เรียกว่า "heated toxin" นำสารพิษส่วนนี้ไปหาปริมาณโปรตีนที่เหลือ, หาค่า LD_{50} ในหนู (ปริมาณสารพิษที่ทำให้หนูตาย 50%) และนำไปทำให้เป็นโพลิเมอร์ของพิษงูต่อไป

3. การหาปริมาณของโปรตีนใน heated toxin

ใช้วิธีของ Lowrey (Lowrey, et al., 1951) ในการหาปริมาณโปรตีนใน heated toxin และในพิษงูเห่าที่ไม่ได้ heat โดยใช้ BSA

(Bovine Serum Albumin) เป็นโปรตีนมาตรฐาน BSA ที่ใช้มีความเข้มข้นต่างๆ กันคือ 10 ไมโครกรัม, 20 ไมโครกรัม, 40 ไมโครกรัม, 60 ไมโครกรัม และ 80 ไมโครกรัม และสารละลายพิษงูที่ใช้ก็ทำให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันด้วย หยด Lowrey reagent ลงในโปรตีนแต่ละหลอดตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาทีแล้วหยด Folin phenol reagent ลงไปตั้งทิ้งไว้ 30 นาที วัด Optical Density ที่ความยาวคลื่น 750 มิลลิไมครอน เปรียบเทียบค่า Optical Densityของสารละลายพิษงูกับ BSA มาตรฐาน โดยการ plot graph เปรียบเทียบแล้วคำนวณหาปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ในสารละลายพิษงูทั้งหมด

4. การหาความเป็นพิษ (toxicity) ของพิษงู

4.1. สัตว์ทดลอง

ใช้หนูขาว (Swiss mice) น้ำหนัก 20 - 25 กรัม ไม่จำกัดเพศเลี้ยงด้วยอาหารหนู (mouse pellets) ของบริษัท เอฟ อี ซิลลิก(กรุงเทพฯ) จำกัด ตลอดการทดลอง

4.2. วิธีทดลอง

นำพิษงูที่ต้องการหาความเป็นพิษมาทำให้มีความข้มข้นต่าง ๆ กัน 5 อย่างโดยใช้ 2 - fold dilution นำพิษงูที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันไปฉีดเข้าในหนูขาว (Swiss mice) โดยแต่ละความเข้มข้นจะฉีดหนู 5 ตัว และฉีดตัวละ 0.1 มิลลิลิตร เข้าทางช่องท้อง (intraperitoneal) แล้วดูจำนวนหนูที่ตายและอยู่รอดภายใน 24 ชั่วโมง นำผลที่ได้ไปคำนวณหา LD_{50} (ปริมาณสารพิษที่ทำให้หนูตาย 50 เปอร์เซนต์) โดยใช้วิธีของ Reed & Muench (1938)

5. การทำให้โมเลกุลของพิษอยู่ในรูปของโพลิเมอร์

5.1. สารเคมี

ใช้ glutaraldehyde เป็นตัวทำให้เกิดโพลิเมอร์ glutaraldehyde

ที่ใช้เป็น 2.5% pure glutaraldehyde ของบริษัท Electron Microscopy Science (EMS) Fort Washington, PA. 19034 เวลาใช้นำมาทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นเป็น 2.5 เปอร์เซนต์

5 2. วิธีทดลอง

Avrameas, 1969 ได้ใช้ Glutaraldehyde เป็นตัวเชื่อมระหว่างโมเลกุลของโปรตีนกับเอนไซม์หรือระหว่างโปรตีนกับโปรตีนหลายชนิด ผู้วิจัยได้ทดลองนำวิธีของท่านผู้นี้มาใช้แต่ได้เปลี่ยนแปลงวิธีทำไปบ้าง เนื่องจากโปรตีนที่ใช้เป็นคนละชนิดกันและเพื่อความเหมาะสมสำหรับโปรตีนในพิษงูด้วย การทำโพลิเมอร์ของพิษงูเห่าที่มีขั้นตอนในการทำดังนี้

5.2.1 . การทำให้ heated toxin อยู่ในรูปของโพลิเมอร์ ใช้ heated toxin ที่ทราบปริมาณโปรตีนแน่นอนแล้ว นำมาปรับให้มี ใกล้เคียงกับ isoelectric pH ของ neurotoxin โดยใช้ pH 9.25 (Devi, 1968) ด้วย 0.1 N. NaOH แล้วค่อย ๆ หยด 2.5% glutaraldehyde ลงไปทีละหยดพร้อมกับคนตลอดเวลาด้วย magnetic stirer การหยด glutaraldehyde แบ่งออกเป็น 2 ตอนคือ หยด 2.5% glutaraldehyde ลงไปปริมาตรที่หยดกิดเป็นปริมาณglutaraldehyde ร้อยละ 30 ของปริมาณโปรตีนทั้งหมด แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15 นาที จะมีตะกอนสีขุ่นเกิดขึ้น แยกตะกอนกับ supernatant ออกจากกัน แล้วหยด 2.5% glutaraldehyde ลงไปใน supernatant อีกเพื่อให้โปรตีนที่อาจยังเหลืออยู่ตกตะกอนอีกให้หมด แล้วจึงนำไป dialyse เพื่อแยกเอา glutaraldehyde ที่เหลือออกโดยใช้ 0.85% sodium chloride (physiological saline) นำตะกอนทั้ง 2 ครั้งรวมกันเพื่อใช้เป็นแอนติเจนในการกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อไป

ในการ dialyse เพื่อแยก glutaraldehyde ส่วนเกินออกจากพิษงูที่เป็นโพลิเมอร์แล้วนั้น ใช้ถุงสำหรับ dialyse ใส่พิษงูที่มี glutaraldehyde ปนอยู่ แล้วแช่ลงใน sterile 0.85% sodium chloride ตั้งไว้ค้างคืนที่ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยน sterile 0.85% sodium chloride 4 - 5

ครั้ง นำพิษงูออกจากถุงสำหรับ dialyse วัดปริมาตรที่แน่นอนของน้ำและตะกอนในถุง dialyse ไว้ แบ่งส่วนที่เป็นน้ำไปทดสอบความเป็นพิษ โดยฉีดเข้าไปในหนูขาว (Swiss mice) 3 ตัว ๆ ละ 1 มิลลิเมตร เข้าทางช่องท้อง (intraperitoneal) ปริมาตรที่ฉีดนี้เป็นปริมาตรที่มากกว่าที่จะใช้ immunized หนูมาก ถ้าหนูไม่ตายแสดงว่าไม่มีความเป็นพิษเหลืออยู่ ต่อจากนั้นนำพิษงูที่เป็นโพลิเมอร์นี้ไปทดสอบหาคุณสมบัติของการเป็นแอนติเจน

5.2.2 การทำพิษงูเห่าที่ได้ตามธรรมชาติ (unheated toxin หรือ natural toxin) ให้อยู่ในรูปโพลิเมอร์ ใช้วิธีเดียวกับ heated toxin ดังที่กล่าวมาแล้วในข้อ 5.2.1

6. การหาคุณสมบัติของการเป็นแอนติเจนของโพลิเมอร์พิษงู

6.1. การฉีดเพื่อให้เกิดภูมิคุ้มกันในหนู

6.1.1. สัตว์ทดลอง

ใช้หนู (Wistar Strain Rat) น้ำหนักประมาณ 180 กรัมไม่จำกัดเพศ เลี้ยงด้วยอาหารหนู (mouse pellets) ของบริษัทเอฟ อี ซิลลิก (กรุงเทพฯ) จำกัด ตลอดการทดลอง

6.1.2. วิธีทดลอง

หลังจาก dialyse เอา glutaraldehyde ส่วนเกินออก และทดสอบความเป็นพิษของส่วนที่เป็นน้ำของโพลิเมอร์แล้ว นำโพลิเมอร์จาก heated toxin และ unheated toxin ซึ่งเป็นตะกอนสีส้มมาทำให้ตะกอนซึ่งจับกันอยู่แตกออกจากกันโดยใช้กระบอกฉีดยาและเข็มฉีดยาหมายเลข 21 ฉีดตะกอนที่ละลายปนกับน้ำเข้าในหนูครั้งละ 2 - 3 มิลลิกรัม ปริมาตรที่ฉีด 0.5 มิลลิลิตร โดยฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous injection) ที่ขาซ้ายและขาขวาสลับกันในแต่ละครั้งด้วยเข็มฉีดยาหมายเลข 21 หนูที่ฉีดแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มดังนี้คือ

กลุ่มที่ 1 ใช้หนู 7 ตัว ฉีดด้วยโพลิเมอร์ของพิษงูที่แยกเอาโปรตีนที่ไม่มีพิษบางส่วนออกไปแล้ว (โพลิเมอร์ของ heated toxin)

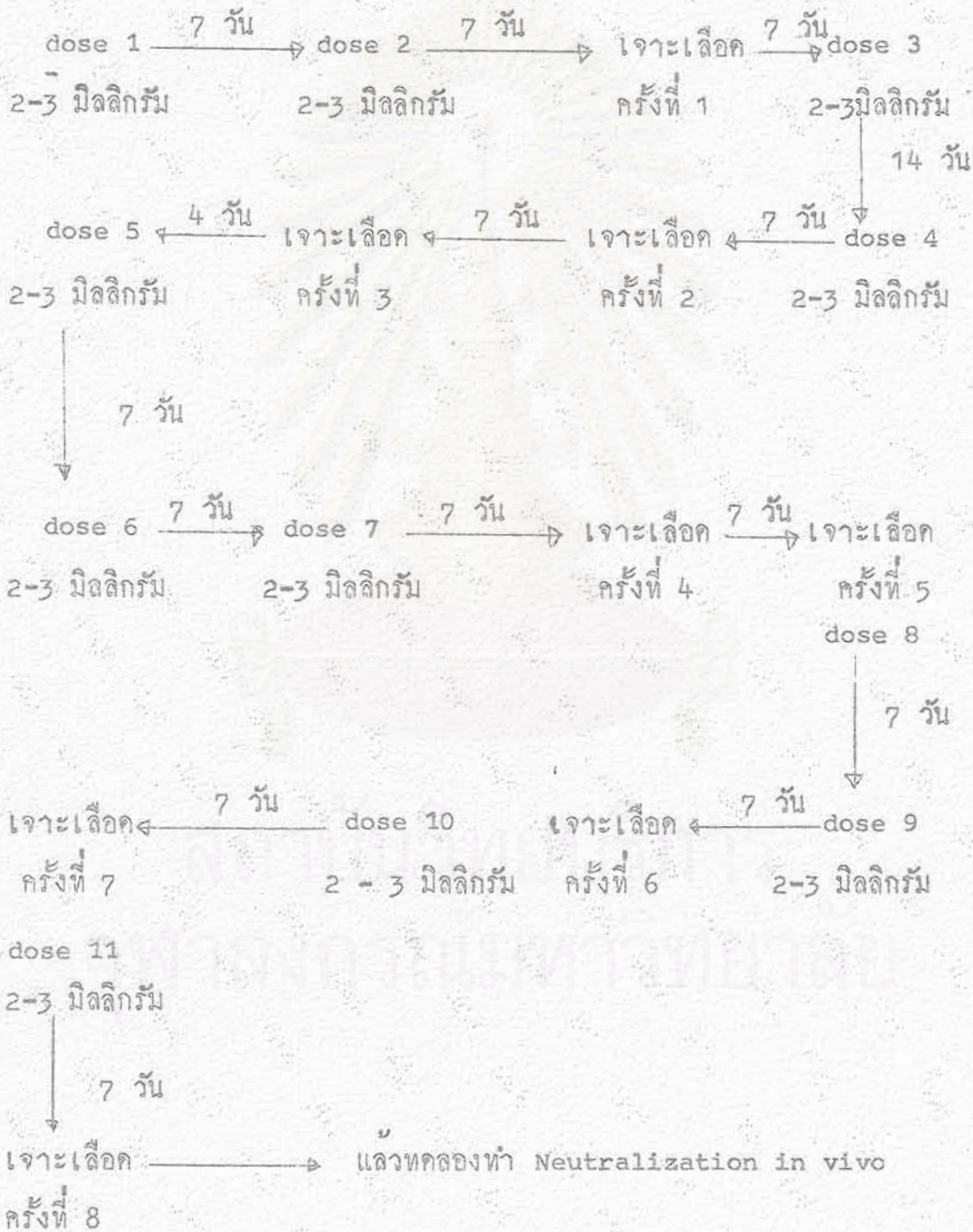
กลุ่มที่ 2 ใช้หนู 7 ตัว ฉีดด้วยโพลิเมอร์ของพิษงูที่ได้ตามธรรมชาติ (unheated toxin)

กลุ่มที่ 3 ใช้หนู 5 ตัว ฉีดด้วยพิษงูที่มิได้ทำให้อยู่ในรูปโพลิเมอร์ (Unpolymerized toxin) และมิได้แยกเอาโปรตีนส่วนใดออก

ช่วงระยะเวลาของการฉีดเพื่อให้เกิดความคุ้มกันในหนูทั้ง 3 กลุ่ม กำหนดเป็นระยะเวลาพร้อมกับการเจาะเลือดเพื่อนำมาใช้หาปริมาณแอนติบอดี้ (ซึ่งจะกล่าวในข้อ 6.2) ดังแผนผังที่ 1 คือ

แผนผังที่ 1

แสดงการฉีดพิษงูและเจาะเลือดในหนู (Wistar Strain Rat)



6.2 การหาระดับของแอนติบอดี้ที่ถูกสร้างขึ้นในหนู

6.2.1 สัตว์ทดลอง

ใช้หนูขาว (Swiss mice) น้ำหนัก 20 - 25 กรัม ไม่จำกัดเพศเช่นเดียวกับที่ใช้ในการหาความเป็นพิษและเลี้ยงด้วยอาหารชนิดเดียวกัน

6.2.2 วิธีทดลอง

แบ่งออกเป็นขั้นต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

6.2.2.1 เจาะเลือดหนูที่ได้ immunize ไว้ 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 (กลุ่มที่ 3 ตายหมดตั้งแต่ฉีดด้วย dose ที่ 1) โดยเจาะกลุ่มละ 5 ตัวจากหนูทั้งหมด 7 ตัว ตามแผนผังที่แสดงไว้ในรูปที่ 1 ให้หนูดมยาสลบ(Diethyl ether) พอหมดความรู้สึกจึงนำมาเจาะเลือดโดยใช้หลอด Capillary ปลายตรงและคมเจาะตรงเส้นเลือดบริเวณหัวตา (Ophthalmic Venous Plexus) ใช้หลอดแก้ว centrifuse ที่อบฆ่าเชื้อแล้วรองรับเลือดที่ปลายหลอด Capillary อีกด้านหนึ่ง เก็บเลือดตัวละ 1 - 2 มิลลิลิตร ใส่รวมในหลอดเดียวกันทั้ง 5 ตัว

6.2.2.2 เก็บหลอดแก้วใส่เลือดจากหนูทั้ง 2 กลุ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 6 - 7 ชั่วโมง แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นต่ออีกประมาณ 17 - 18 ชั่วโมง เพื่อให้เลือดแข็งตัวและมีซีรั่มแยกออกมาได้มากขึ้น นำแต่ละหลอดไป centrifuse ด้วยความเร็วประมาณ 2500 rpm เวลา 30 นาที ใช้ capillary pipette ค่อย ๆ ดูดซีรั่มแยกออกใส่หลอดทดลองที่อบฆ่าเชื้อแล้วเพื่อใช้ทดสอบต่อไป

6.2.2.3 ทำ Neutralization ของพิษงูในหลอดทดลอง โดยดูดซีรั่มจากหนูแต่ละกลุ่มลงในหลอดทดลองที่อบฆ่าเชื้อแล้ว ซีรั่มจาก 1 กลุ่มจะแบ่งออกดังนี้

หลอดที่ 1 ดูดซีรั่มใส่ 1 มิลลิลิตร

หลอดที่ 2 ดูดซีรั่ม 0.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นที่อบฆ่าเชื้อแล้ว 0.5

มิลลิลิตร จะเป็นการทำให้เจือจาง 1 : 2

หลอดที่ 3 ดูดซีรั่ม 0.25 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นที่อบฆ่าเชื้อแล้ว 0.75 มิลลิลิตร เป็นการทำให้เจือจาง 1 :4

เติมพิษงูที่ละลายในน้ำกลั่นลงในหลอดทั้ง 3 หลอดๆ ละ 1 มิลลิลิตร ความเข้มข้นของพิษงูที่เติมคือ 8 LD_{50} ต่อ 1 มิลลิลิตร (1 LD_{50} = 0.216 มิลลิกรัมต่อหนูหนัก 1 กิโลกรัม) เขย่าให้เข้ากัน แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที

6.2.2.4 นำพิษงูที่ผสมกับซีรั่มแล้วไปฉีดในหนูขาว 1 หลอด ฉีดหนู 3 ตัว ตัวละ 0.5 มิลลิลิตร ใช้เข็ม tuberculin ฉีดเข้าทางช่องท้อง แล้วดูผลว่าหนูตายหรืออยู่รอดเป็นจำนวนเท่าไรภายใน 24 ชั่วโมง นำผลการทดลองนี้ไปคำนวณหาว่า ซีรั่ม 1 มิลลิลิตรจะทำลายพิษงูได้กี่ LD_{50}

เลือดที่เจาะทั้งหมด 8 ครั้ง นำมาหาปริมาณของ Neutralizing antibody ทุกครั้งด้วยวิธีดังกล่าวนี้เหมือนหมด แล้วดูว่าในระยะใดมีแอนติบอดี้สูงที่สุด โดยดูจากจำนวน LD_{50} ที่ซีรั่มทำลายได้

6.2.2.5 หลังจากเจาะเลือดครั้งที่ 8 และทราบผลระดับของแอนติบอดี้จากการทำ Neutralization แล้วทดลองฉีดพิษงูที่มิได้มีการเปลี่ยนแปลง (Unpolyperized toxin) เข้าในหนูที่ถูก immunize แล้วทั้ง 2 กลุ่ม โดยฉีดด้วยจำนวนน้อยดูก่อนแล้วจึงเพิ่มมากขึ้นต่อมาดังต่อไปนี้

ครั้งที่ 1 (หลังเจาะเลือดครั้งที่ 8 แล้ว 1 วัน) ฉีด 3 LD_{50}

ครั้งที่ 2 (หลังฉีดครั้งที่ 1 แล้ว 2 วัน) ฉีด 5 LD_{50}

ครั้งที่ 3 (หลังฉีดครั้งที่ 2 แล้ว 2 วัน) ฉีด 8 LD_{50}

แต่ละครั้งดูผลว่าหนูมีอาการไม่สบายหรือตายภายใน 24 ชั่วโมงหรือไม่

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. ความเป็นพิษ (toxicity) ของพิษงูเห่าไทย

พิษงูเห่าที่ใช้ตลอดการทดลองได้จากสถานเสาวภา สภากาชาดไทย เป็นพิษงูที่ทำให้แห้งในอุณหภูมิต่ำ (lyophilization) จากการหาความเป็นพิษของพิษงูเห่าไทยที่ใช้ทดลองคือ lot ที่ 32 - 1627 และ lot ที่ 31.8635 โดยการหาค่า LD_{50} ด้วยวิธีของ Reed และ Muench (Reed and Muench, 1938) พบว่า

พิษงูเห่า lot ที่ 32.1627 มีค่า LD_{50} = 0.214 มิลลิกรัมต่อหนูหนัก 1 กิโลกรัม

พิษงูเห่า lot ที่ 31.8635 มีค่า LD_{50} = 0.218 มิลลิกรัมต่อหนูหนัก 1 กิโลกรัม

ผลการทดลองหาค่า LD_{50} ของพิษงูเห่าไทยทั้ง 2 lot จะเห็นได้ว่าค่า LD_{50} ใกล้เคียงกันมาก ดังนั้นจากผลการทดลองที่ทำมาอาจจะสรุปได้ว่าค่า LD_{50} ของพิษงูเห่าไทยมีค่าประมาณ 0.216 มิลลิกรัมต่อหนูหนัก 1 กิโลกรัม

2. ผลของการขจัดโปรตีนที่ไม่มีพิษ (non - toxic protein) ด้วยความร้อน

ได้นำพิษงูเห่าแห้งมาละลายใน acetate buffer pH 5.8 โดยให้สารละลายพิษงูมีความเข้มข้น 10, 15, 20, 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ต่อจากนั้นนำไปแช่ในอ่างน้ำร้อนที่ 80° เซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วแยกเอาส่วนน้ำใส (supernatant) มาหาปริมาณโปรตีน ผลการทดลองได้แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2

แสดงผลของการขจัดโปรตีนที่ไม่มีพิษออกจากพิษงู โดยใช้สารละลายพิษงูที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

ความเข้มข้นของพิษงู		ทำการทดลองครั้งที่	โปรตีนที่เหลือในส่วนน้ำใส (%)		โปรตีนที่ตกตะกอน (%)		ความเป็นพิษของโปรตีนส่วนที่เหลือเป็น LD_{50} มก/หนูหนัก ๑ กก.	
มก./มล.	(%)		ค่าจากการทดลอง	ค่าเฉลี่ย	ค่าจากการทดลอง	ค่าเฉลี่ย	ค่าจากการทดลอง	ค่าเฉลี่ย
10	1.0	1	64.50	68.55	35.50	31.45	0.175	0.177
		2	72.60		27.40		0.178	
15	1.5	1	60.50	64.52	39.50	35.48	0.161	0.196
		2	68.53		31.47		0.231	
20	2.0	1	63.30	65.20	36.70	34.80	0.173	0.192
		2	67.10		32.90		0.211	
25	2.5	1	64.80	67.95	35.20	32.05	0.167	0.172
		2	71.10		28.90		0.176	

ตามตารางที่ 2 จะเห็นได้ว่า ความเข้มข้นของสารละลายพิษงูที่ทดลองทั้ง 4 ค่านั้นไม่ได้มีผลต่อปริมาณของโปรตีนที่ตกตะกอนหรือของโปรตีนที่ประสงค์จะแยกออกไปเลย ปริมาณของโปรตีนที่เหลือในส่วนน้ำใสซึ่งมีโปรตีนพิษปนอยู่ในปริมาณที่สูงนั้นมีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 64 ถึง 68 ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้ความเข้มข้นของสารละลายพิษงู 2.5 เปอร์เซนต์ เพื่อจะได้สารละลายพิษงูที่มีความเข้มข้นพอเหมาะที่จะใช้ทดลองต่อไปได้

ในการทดลองต่อไปได้เตรียมสารละลายพิษงูทั้ง 2 lot ให้มีความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซนต์แล้วแยกเอาโปรตีนที่ไม่มีพิษออกโดยใช้ความร้อนตามวิธีที่กล่าวมาแล้วในบทที่ 3 ข้อ 2.3 หลังจากแยกตะกอนออกไปแล้วได้หาปริมาณโปรตีนในน้ำใสที่ได้พบว่า มีปริมาณโปรตีนเหลืออยู่ประมาณร้อยละ 65 โปรตีนพิษส่วนใหญ่จะอยู่ในน้ำใสนี้ นอกจากนั้นยังมีโปรตีนอื่น ๆ ที่ทนความร้อนปนอยู่ด้วย นำไปหาค่าความเป็นพิษพบว่ามีค่า LD_{50} = 0.167 มิลลิกรัมต่อหนูหนัก 1 กิโลกรัม ส่วนโปรตีนที่ตกตะกอนจะเป็นค่าโปรตีนส่วนที่หายไปจากน้ำหนักพิษงูแห้งทั้งหมดคือร้อยละ 35 ได้เปรียบเทียบค่าความเป็นพิษของพิษงูที่แยกโปรตีนบางส่วนออกไปแล้วนี้กับพิษงูเห่าธรรมชาติ ดังแสดงในตารางที่ 3

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3

แสดงการเปรียบเทียบความเป็นพิษของพิษงูที่ได้ตามธรรมชาติ(unheated toxin) และพิษงูที่ใช้ความร้อนแยกโปรตีนบางส่วนออก (heated toxin)

พิษงูเห่า	หนูทดลองกลุ่มที่ (กลุ่มละ 5 ตัว)	ปริมาณโปรตีนที่ฉีด (ไมโครกรัม/หนู 1 ตัว)	จำนวนหนูตาย / จำนวนหนูที่ฉีด	LD_{50} (มก./หนู 1 กก.)	จำนวน LD_{50} ในพิษงู 1 มก.
พิษงูเห่าที่ได้ตามธรรมชาติ	1	36.096	5/5	0.216	202.9
	2	18.048	5/5		
	3	9.024	5/5		
	4	4.512	0/5		
	5	2.256	0/5		
พิษงูเห่าที่แยกโปรตีนบางส่วนออกโดยใช้ความร้อน	1	13.952	5/5	0.167	260.4
	2	6.976	5/5		
	3	3.488	0/5		
	4	1.744	0/5		
	5	0.872	0/5		

จากตารางที่ 3 จะเห็นว่าค่าความเป็นพิษของพิษงูเห่าที่แยกโปรตีนบางส่วนออกไปแล้วมีค่า LD_{50} = 0.167 มิลลิกรัมต่อหนูหนัก 1 กิโลกรัม ส่วนพิษงูเห่าธรรมชาติมีค่า LD_{50} = 0.216 มิ ลลิกรัมต่อหนูหนัก 1 กก. แสดงว่าหลังจากแยกโปรตีนบางส่วนออกไปแล้วจะทำให้พิษงูมีความเป็นพิษสูงขึ้นและโปรตีนที่แยกออกไปนั้น ส่วนใหญ่จะเป็นโปรตีนที่ไม่มีพิษ แต่โปรตีนส่วนนี้ไม่สามารถจะนำมาหาค่าความเป็นพิษได้เนื่อง จากเป็นโปรตีนที่ถูกทำลายโดยความร้อนมีลักษณะ เป็นตะกอนชิ้นใหญ่ขนาดต่าง ๆ กัน ไม่สามารถฉีดเข้าในหนูเพื่อหาค่า LD_{50} ได้

3. <u>ผลของการคำนวณหาค่าของความเป็นพิษที่ได้กลับคืนมาหลังจากการขจัดโปรตีนที่ไม่มีพิษบางส่วนออก โดยคิดตามค่า LD_{50} (Percentage of Recovery Toxin)</u>

เริ่มการทดลองใช้พิษงูเห่าหนัก 500 มิลลิกรัม

จำนวน LD_{50} ในพิษงู 500 มิลลิกรัม = $\frac{500}{0.214}$ = 2336.5 LD_{50}

หลังจากแยกโปรตีนบางส่วนออกแล้ว เหลือพิษงูอีก 65% = $65 \times \frac{500}{100}$ = 325 มก.

จำนวน LD_{50} ในพิษที่เหลือ 325 มิลลิกรัม = $\frac{325}{0.167}$ = 1946.1 LD_{50}

เพราะฉะนั้นปริมาณพิษงู (toxin) โดยคิดตามจำนวน LD_{50} ที่หายไปหลังจากแยกโปรตีนบางส่วนออกไปแล้ว = 2336.5 − 1946.1

= 390.4 LD_{50}

จำนวน LD_{50} ที่หายไปคิดเป็นร้อยละ $\frac{390.40 \quad 100}{2336.5}$ = 16.7

จากการคำนวณข้างต้นจะเห็นว่า จำนวน LD_{50} ในพิษงูดั้งต้น 500 มิลลิกรัม จะลดลงหลังจากนำพิษงูนั้นไปให้ความร้อน แสดงว่าความเป็นพิษของพิษงูได้สูญเสียไปบางหลังจากแยกโปรตีนบางส่วน ซึ่งอยู่ในรูปตะกอนออกไปแล้ว ความเป็นพิษที่หายไปประมาณร้อยละ 16.7 นั้น อาจเนื่องจาก

โมเลกุลของโปรตีนพิษบางส่วนเกาะติดกับตะกอน หรือส่วนพิษที่หายไปนั้นได้สูญเสียไปตามขั้นตอนของการทดลอง ได้แสดงสรุปค่าที่คำนวณได้ในตารางที่ 4

ตารางที่ 4

แสดงค่าความเป็นพิษของพิษงูที่สูญเสียไปในขบวนการขจัดโปรตีนที่ไม่มีพิษ

ปริมาณพิษงูที่ใช้ในการทดลองตั้งต้น (มิลลิกรัม)	หลังจากให้ความร้อนมีปริมาณพิษงูเหลืออยู่ (มิลลิกรัม)	จำนวน LD_{50} ในพิษงูตั้งต้น	จำนวน LD_{50} ในพิษงูหลังจากให้ความร้อน	จำนวน LD_{50} ที่หายไปหลังจากให้ความร้อน	จำนวน LD_{50} ที่หายไป (ร้อยละ)
500	325	2336.5	1946.1	390.4	16.7

จากค่าที่แสดงในตารางที่ 4 จะเห็นว่าค่าความเป็นพิษซึ่งคิดเป็น LD_{50} ของพิษงูหลังจากให้ความร้อนแล้วลดลงร้อยละ 16.7 ดังนั้นพิษงูที่ให้ความร้อนแล้วจะมีความเป็นพิษที่ได้กลับคืนมาคิดเป็นร้อยละ 83.3

4. ผลการทำพิษงูให้อยู่ในรูปโพลิเมอร์

ได้ทำโพลิเมอร์ของพิษงูทั้ง 2 ชนิดคือ heated toxin และ unheated toxin ตามวิธีการที่กล่าวแล้วในบทที่ 3 ข้อ 5.2.1 โดยหยด glutaraldehyde เป็น 2 ขั้นตอนผลที่ได้มีดังนี้คือ

ขั้นที่ 1 หลังจากหยด glutaraldehyde ลงไปในสารละลายพิษงูปริมาณ 30 เปอร์เซนต์ โดยคิดตามน้ำหนัก (weight by weight) จะเกิดตะกอนขึ้น ตะกอนที่ได้จากสารละลายพิษงูมีลักษณะเป็นตะกอนสีส้ม เป็นตะกอนหนักและมีปริมาณมาก

ขั้นที่ 2 หลังจากหยด glutaraldehyde ลงในส่วนน้ำใสที่แยกได้จากขั้นที่ 1 ปริมาณเกินพอ (excess) โดยใส่ glutaraldehyde ลงไปปริมาตรเท่ากับปริมาตรของส่วนน้ำใสที่แยกได้ ตะกอนที่เกิดขึ้นมีสีส้มอ่อนเป็นตะกอนเบาและมีปริมาณน้อย ขนาดตะกอนเล็กกว่าตะกอนในขั้นที่ 1

นำตะกอนทั้ง 2 ครั้งรวมทั้งน้ำใสที่ได้ในขั้นที่ 1 มารวมกันแล้ว dialyse เพื่อเอา glutaraldehyde ออกก่อนที่จะนำไปใช้ฉีดสัตว์ ในการทำโพลิเมอร์นั้นได้ทดลองทำทั้งโพลิเมอร์ของ heated toxin และ unheated toxin แต่ไม่เห็นความแตกต่างกันระหว่างโพลิเมอร์ทั้ง 2 ชนิด นำโพลิเมอร์ที่ได้จากการเตรียมข้างต้นไป immunize สัตว์

5. <u>ผลการทดสอบความเป็นพิษ (toxicity) ของโพลิเมอร์</u>

หลังจากได้โพลิเมอร์ซึ่งอยู่ในรูป suspension จากการเตรียมดังกล่าวในบทที่ 3 ข้อ 5.2.1 และข้อ 5.2.2 แล้ว ก่อนที่จะนำโพลิเมอร์ไป immunize หนู (rat) ได้ทำการทดสอบความเป็นพิษของโพลิเมอร์ที่เตรียมได้ก่อนโดยฉีดเข้าไปในช่องท้องของหนูขาว (Swiss mice) จากการทดลองที่ไม่ได้รายงานในที่นี้โดยการใช้ glutaraldehyde ปริมาณต่ำกว่า 30 เปอร์เซนต์พบว่าตะกอนที่เกิดขึ้นไม่มีพิษเหลืออยู่ แต่พิษงูยังคงเหลืออยู่ในส่วนน้ำใส (supernatant) ดังนั้นการทดสอบความเป็นพิษหลังจากที่พิษงูอยู่ในรูปโพลิเมอร์แล้วจึงทดสอบเฉพาะความเป็นพิษของส่วนน้ำใส หลังจากเตรียมโพลิเมอร์ดังกล่าวในข้อ 5.2.1 และข้อ 5.2.2 แล้ว ได้ทดสอบความเป็นพิษที่เหลืออยู่ในน้ำใส โดยฉีดน้ำใส 1 มิลลิลิตรเข้าทางช่องท้องของหนูขาว ผลการทดลองพบว่า หนูขาวที่ได้รับการฉีดน้ำใสทั้ง 3 ตัวไม่แสดงอาการอย่างใดเลย ปริมาตรของส่วนน้ำใสที่ฉีดหนู (mice) นี้มีปริมาตรสูงกว่าปริมาตรของส่วนน้ำใสที่ปนอยู่กับโพลิเมอร์พิษงูที่จะ immunize ในหนู (rat) ถึง 20 เท่า (โดยเทียบปริมาตรกับน้ำหนักของหนูที่ฉีด)

6. การกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อพิษงูเห่าในหนู (Wistar Strain Rat)

6.1 ผลการฉีดโพลิเมอร์พิษงูเพื่อให้เกิดภูมิคุ้มกันในหนู

ได้ทำการทดลองโดยแบ่งหนูออกเป็น 3 กลุ่มคือ

กลุ่มที่ 1 จำนวนหนู 7 ตัว ได้รับการฉีดโพลิเมอร์ของ heated toxin ตัวละ 2 – 3 มิลลิกรัม ผลการทดลองพบว่า หนูไม่แสดงอาการเจ็บป่วยใด ๆ และอยู่ครบทั้ง 7 ตัว

กลุ่มที่ 2 จำนวนหนู 7 ตัว ได้รับการฉีดโพลิเมอร์ของ unheated toxin ตัวละ 2 – 3 มิลลิกรัมเช่นเดียวกับกลุ่มแรก ผลการฉีดพบว่า หนูไม่แสดงอาการเจ็บป่วยใด ๆ เช่นเดียวกับหนูกลุ่มที่ 1

กลุ่มที่ 3 จำนวนหนู 5 ตัว ได้รับการฉีดพิษงูเห่าธรรมชาติตัวละ 2 – 3 มิลลิกรัม ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงกว่าค่า LD_{50} ที่หาในหนู (mice) ถึง 50 – 70 เท่า (การที่ใช้ปริมาณนี้เพื่อต้องการให้ปริมาณแอนติเจนเท่ากับที่ฉีดในกลุ่มที่ 1 และ 2) ผลการฉีดพบว่าหนูตายหมดทั้ง 5 ตัว

ผลการทดลองแสดงให้เห็นได้ชัดเจนว่า เราไม่สามารถใช้พิษงูธรรมชาติมากระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันในหนูได้ เพราะพิษงูจะฆ่าหนูตายหมด ดังนั้นผลการทดลองต่อไปนี้จึงเป็นผลการทดลองที่ทำกับหนูกลุ่มที่ 1 และ 2 ซึ่งจะได้รับพิษงูที่อยู่ในรูปโพลิเมอร์เท่านั้น

6.2 ระดับของแอนติบอดี้ที่สร้างขึ้นในหนู (Wistar Strain Rat)

6.2.1 ระดับของแอนติบอดี้ที่เกิดจากการฉีดโพลิเมอร์ของ heated toxin

ซีรั่ม ที่เจาะได้แต่ละครั้งหลังการฉีดโพลิเมอร์ ได้นำมาหาระดับของแอนติบอดี้โดยดูประสิทธิภาพในการ neutralize พิษงูเห่าที่ได้ตามธรรมชาติด้วยวิธีการตามข้อ 6.2.2 ในบทที่ 3 ผลการทดลองปรากฏในตารางที่ 5 และรูปที่ 1

ตารางที่ 5

แสดงผลการหาระดับของแอนติบอดี้ในซีรั่มของหนู (Wistar Strain Rat) หลังจากฉีดโพลิเมอร์ของ heated toxin ในระยะเวลาต่าง ๆ

เจาะเลือดครั้งที่	ระยะเวลาในการเจาะเลือดเพื่อหาระดับแอนติบอดี้	ปริมาณที่ฉีดเข้าในหนู (Swiss mice) 1 ตัว		จำนวนหนูรอด / จำนวนหนูที่ถูกฉีด	ปริมาณพิษงูที่ซีรั่ม 1 มล. ทำลายได้
		ซีรั่ม (มิลลิลิตร)	พิษงูธรรมชาติ (มิลลิกรัม)		
1	หลังจากฉีด dose ที่ 2 แล้ว 7 วัน	0.25	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	0 LD_{50}
		0.125	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	
		0.0625	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	
2	หลังจากฉีด dose ที่ 4 แล้ว 7 วัน	0.25	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	11.30LD_{50}
		0.125	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	
		0.0625	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	
3	หลังจากฉีด dose ที่ 4 แล้ว 14 วัน	0.25	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	0 LD_{50}
		0.125	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	
		0.0625	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	

068898

ตารางที่ 5 (ต่อ)

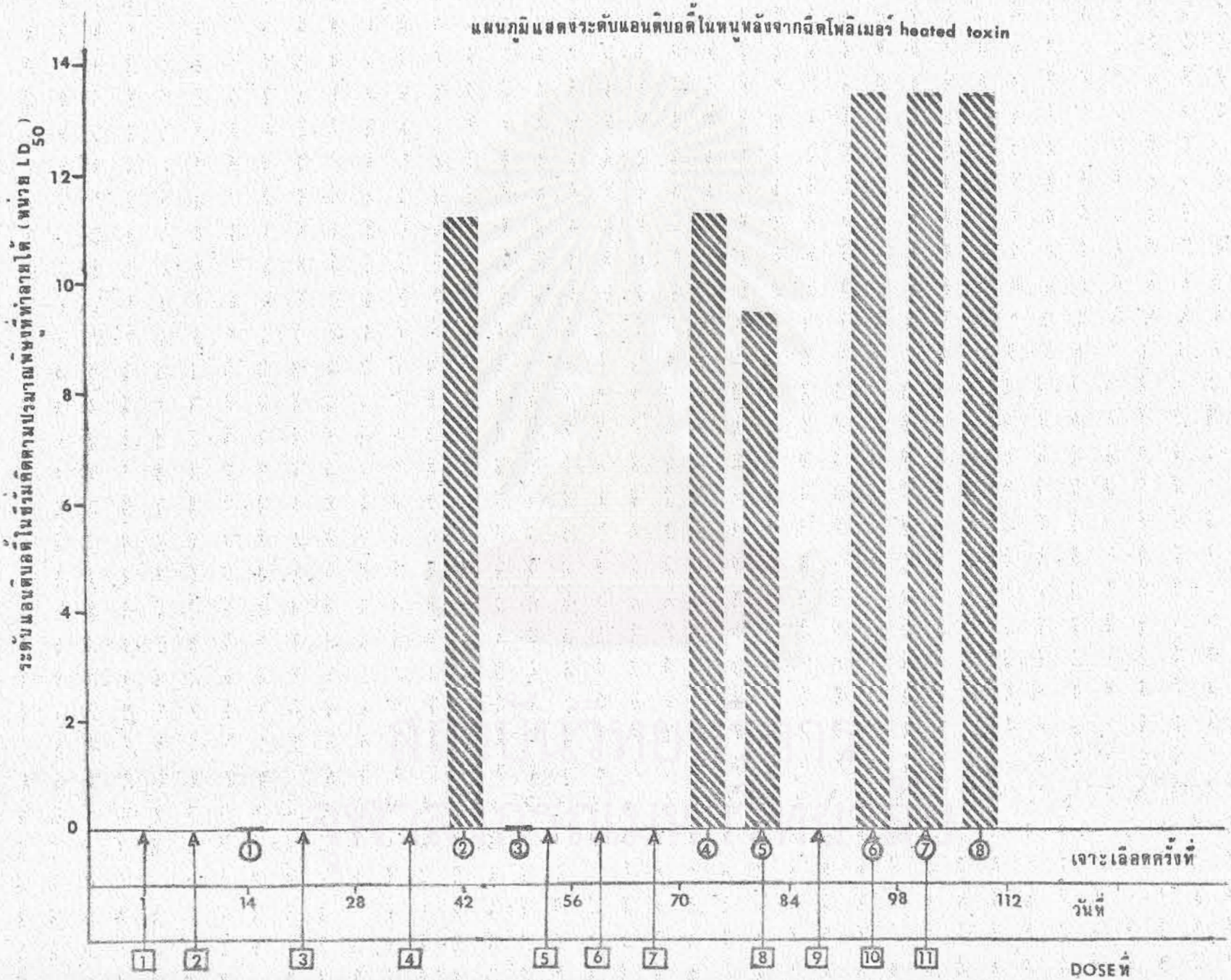
เจาะเลือดครั้งที่	ระยะเวลาในการเจาะเลือดเพื่อหาระดับแอนติบอดี้	ประมาณที่ฉีดเข้าในหนู (Swiss mice) 1 ตัว		จำนวนหนูรอด / จำนวนหนูที่ถูกฉีด	ปริมาณพิษงูที่ซีรั่ม 1 มิลลิลิตรทำลายได้
		ซีรั่ม (มิลลิลิตร)	พิษงูธรรมชาติ (มิลลิกรัม)		
4	หลังจากฉีด dose ที่ 7 แล้ว 7 วัน	0.25	0.0098 ($2LD_{50}$)	3/3	11.30LD_{50}
		0.125	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	
		0.0625	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	
5	หลังจากฉีด dose ที่ 7 แล้ว 14 วัน	0.25	0.0098 ($2LD_{50}$)	2/3	9.50 LD_{50}
		0.125	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	
		0.0625	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	
6	หลังจากฉีด dose ที่ 9 แล้ว 7 วัน	0.25	0.0098 ($2LD_{50}$)	3/3	13.42LD_{50}
		0.125	0.0098 ($2LD_{50}$)	1/3	
		0.0625	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	
7	หลังจากฉีด dose ที่ 10 แล้ว 7 วัน	0.25	0.0098 ($2LD_{50}$)	3/3	13.42LD_{50}
		0.125	0.0098 ($2LD_{50}$)	1/3	
		0.0625	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	

ตารางที่ 5 (ต่อ)

เจาะเลือดครั้งที่	ระยะเวลาในการเจาะเลือดเพื่อหาระดับแอนติบอดี้	ปริมาณที่ฉีดเข้าในหนู (Swiss mice) 1 ตัว		จำนวนหนูรอด / จำนวนหนูที่ถูกฉีด	ปริมาณพิษงูที่ซีรั่ม ๑ มิลลิลิตร ทำลายได้
		ซีรั่ม (มิลลิลิตร)	พิษงูธรรมชาติ (มิลลิกรัม)		
8	หลังจากฉีด dose ที่ 11 แล้ว 7 วัน	0.25	0.0098 ($2LD_{50}$)	3/3	$13.42LD_{50}$
		0.125	0.0098 ($2LD_{50}$)	1/3	
		0.0625	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	

รูปที่ 1

แผนภูมิแสดงระดับแอนติบอดี้ในหนูหลังจากฉีดโพลิเมอร์ heated toxin



จากตารางที่ 5 จะเห็นได้ว่าหลังจากฉีดโพลิเมอร์ของ heated toxin แล้ว 2 dose ยังตรวจไม่พบระดับของแอนติบอดี้ในหนูตามวิธีดังกล่าวข้างต้น แต่เมื่อฉีดโพลิเมอร์ถึง dose ที่ 4 แล้วระดับของแอนติบอดี้ได้สูงขึ้นโดยที่ซีรั่มหนู 1 มิลลิลิตรสามารถทำลายพิษงูได้ 11.30 LD_{50} แต่ถ้าตรวจแอนติบอดี้หลังจากฉีดพิษงูแล้ว 14 วันระดับแอนติบอดี้จะลดลง และถ้าฉีด dose ต่อ ๆ ไปติดต่อกันอีก 3 dose จนถึง dose ที่ 7 จะพบว่าระดับแอนติบอดี้จะสูงขึ้นมาเท่าเดิม คือซีรั่ม 1 มิลลิลิตรสามารถทำลายพิษงูได้ 11.30 LD_{50} และเมื่อทดสอบหลังจากฉีด dose ที่ 7 แล้ว 14 วัน ระดับแอนติบอดี้ลดลงแต่ไม่มากคือซีรั่ม 1 มิลลิลิตรสามารถทำลายพิษงูได้ 9.50 LD_{50}

ต่อมาเมื่อฉีด dose ที่ 8, dose ที่ 9 แล้วทดสอบหลังจากฉีด dose ที่ 9 แล้ว 7 วัน พบว่าระดับแอนติบอดี้สูงขึ้นกว่าเดิมอีกคือ ซีรั่ม 1 มิลลิลิตรสามารถทำลายพิษงูได้ 13.42 LD_{50} และต่อมาเมื่อทำการทดสอบหลังจากฉีด dose ที่ 10 และ dose ที่ 11 แล้ว 7 วัน ทั้ง 2 dose พบว่าระดับแอนติบอดี้ยังคงสูงเท่าเดิมคือซีรั่ม 1 มิลลิลิตรสามารถทำลายพิษงูได้ 13.42 LD_{50}

จากแผนภูมิในรูปที่ 1 อาจสรุปได้ว่า ระดับของแอนติบอดี้จะสูงมากในวันที่ 7 หลังจากที่ immunize แล้ว และจะค่อย ๆ ลดลง ถ้าตรวจดูหลังจาก immunize แล้ว 14 วัน ระดับจะลดต่ำลง แต่ถ้า immunize ติดต่อกันทุกสัปดาห์(คือ dose ที่ 5,6,7) แล้วตรวจดูระดับแอนติบอดี้ภายหลัง 2 สัปดาห์พบว่าระดับของแอนติบอดี้ลดลงเล็กน้อย หลังจากการ immunize ด้วย dose ที่ 9 แล้ว ระดับของแอนติบอดี้สูงขึ้นคือ neutralize ได้ 13.42 LD_{50} ระดับของแอนติบอดี้นี้คงที่หลังจากให้ dose ที่ 10 และ 11 คือไม่สูงขึ้นอีกเลย

6.2.2 <u>ระดับของแอนติบอดี้ที่เกิดจากการฉีดโพลิเมอร์ของ unheated toxin</u>

ได้ทดลองกระตุ้นภูมิคุ้มกันพิษงูเห่าในหนู โดยการฉีดโพลิเมอร์ของ unheated toxin พบว่าระดับของแอนติบอดี้ที่ neutralize พิษงูเห่า

ตารางที่ 6

แสดงผลการหาระดับของแอนติบอดี้ในซีรั่มของหนู (Wistar Strain Rat) หลังจากฉีดโพลิเมอร์ของ unheated toxin ในระยะเวลาต่าง ๆ

เจาะเลือดครั้งที่	ระยะเวลาในการเจาะเลือดเพื่อหาระดับแอนติบอดี้	ปริมาณที่ฉีดเข้าในหนู (Swiss mice) 1 ตัว		จำนวนหนูรอด / จำนวนหนูที่ถูกฉีด	ปริมาณพิษที่ซีรั่ม ๑ มิลลิลิตรทำลายได้
		ซีรั่ม (มิลลิลิตร)	พิษธรรมชาติ (มิลลิกรัม)		
1	หลังจากฉีด dose ที่ 2 แล้ว 7 วัน	-	-	-	-
2	หลังจากฉีด dose ที่ 4 แล้ว 7 วัน	0.25	0.0098 ($2LD_{50}$)	1/3	ระดับแอนติบอดี้ต่ำมากไม่สามารถหาค่าได้
		0.125	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	
		0.0625	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	
3	หลังจากฉีด dose ที่ 4 แล้ว 14 วัน	0.25	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	0 LD_{50}
		0.125	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	
		0.0625	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	

ตารางที่ 6 (ต่อ)

เจาะเลือดครั้งที่	ระยะเวลาในการเจาะเลือดเพื่อหาระดับแอนติบอดี้	ปริมาณที่ฉีดเข้าในหนู (Swiss mice) 1 ตัว		จำนวนหนูรอด / จำนวนหนูที่ถูกฉีด	ปริมาณพิษงูที่ซรั่ม 1 มิลลิลิตรทำลายได้
		ซีรั่ม (มิลลิลิตร)	พิษงูธรรมชาติ (มิลลิกรัม)		
4	หลังจากฉีด dose ที่ 7 แล้ว 7 วัน	0.25	0.0098 ($2LD_{50}$)	1/3	ระดับแอนติบอดี้ต่ำมากไม่สามารถหาค่าได้
		0.125	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	
		0.0625	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	
5	หลังจากฉีด dose ที่ 7 แล้ว 14 วัน	-	-	-	-
6	หลังจากฉีด dose ที่ 9 แล้ว 7 วัน	0.25	0.0098 ($2LD_{50}$)	1/3	ระดับแอนติบอดี้ต่ำมากไม่สามารถหาค่าได้
		0.0125	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	
		0.0625	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	
7	หลังจากฉีด dose ที่ 10 แล้ว 7 วัน	0.25	0.0098 ($2LD_{50}$)	1/3	ระดับแอนติบอดี้ต่ำมากไม่สามารถหาค่าได้
		0.125	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	
		0.0625	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	
8	หลังจากฉีด dose ที่ 11 แล้ว 7 วัน	0.25	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	0 LD_{50}
		0.125	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	
		0.0625	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	

ไม่สูงเท่ากับการฉีดโพลิเมอร์ของ heated toxin ระดับของแอนติบอดี้ในหนูที่ถูกกระตุ้นโดยโพลิเมอร์ของ unheated toxin ปรากฏในตารางที่ 6

จากตารางที่ 6 หลังจากเจาะเลือดครั้งที่ 1 และครั้งที่ 5 แล้วไม่ได้นำซีรั่มไปทำ neutralization เนื่องจากการสังเกตดูระดับซีรั่มในช่วงนี้ของหนูกลุ่มที่ฉีดโพลิเมอร์ของ heated toxin แล้วพบว่าในช่วงนี้ระดับแอนติบอดี้ไม่สูงและจากการเปรียบเทียบกันพบว่าหนูกลุ่มนี้สร้างแอนติบอดี้ได้ไม่ดีเหมือนกลุ่มที่ฉีดด้วยโพลิเมอร์ของ heated toxin จากตารางที่ 6 จะเห็นได้ว่าระดับแอนติบอดี้ไม่ขึ้นสูงเลย มีบางช่วงที่ซีรั่ม 1 มิลลิลิตรเมื่อใส่รวมกับพิษงู 8 LD_{50} แล้วฉีดหนู ผลปรากฏว่าหนูอยู่รอดเพียงตัวเดียวจากทั้งหมด 3 ตัว จึงทำให้หาค่าระดับของแอนติบอดี้ที่ neutralize พิษงูไม่ได้ หลังจากฉีดโพลิเมอร์ของ unheated toxin นี้จนครบ 11 dose แล้วระดับของแอนติบอดี้ก็ยังไม่สูงขึ้นเลย

6.2.3 <u>การเปรียบเทียบระดับแอนติบอดี้ในหนูกลุ่มที่ฉีดโพลิเมอร์ของ heated toxin กับหนูกลุ่มที่ฉีด unheated toxin</u>

ผลการเปรียบเทียบระดับแอนติบอดี้ที่ neutralize พิษงูเห่าในหนูทั้ง 2 กลุ่ม ได้แสดงไว้ในตารางที่ 7

ตารางที่ 7

เปรียบเทียบระดับของแอนติบอดี้ในซีรั่มหนูกลุ่มที่ได้รับการฉีดโพลิเมอร์ของ heated toxin และหนูกลุ่มที่ได้รับการฉีดโพลิเมอร์ของ unheated toxin

ระยะเวลาในการเจาะเลือดเพื่อหาระดับแอนติบอดี้	จำนวนซีรั่มที่นำมาทดสอบ (มิลลิลิตร	ซีรั่มที่ได้จากการฉีดโพลิเมอร์ของ heated toxin		ซีรั่มที่ได้จากการฉีดโพลิเมอร์ของ unheated toxin	
		จำนวนหนูรอด จำนวนหนูที่ถูกฉีด	ซีรั่ม ๑ มิลลิลิตร ทำลายพิษงูได้	จำนวนหนูรอด จำนวนหนูที่ถูกฉีด	ซีรั่ม ๑ มิลลิลิตร ทำลายพิษงูได้
หลังจากฉีด dose ที่ 4 แล้ว 7 วัน	1	3/3	11.30 LD_{50}	1/3	ระดับแอนติบอดี้ต่ำมากไม่สามารถหาค่าได้
	0.5	0/3		0/3	
	0.25	0/3		0/3	
หลังจากฉีด dose ที่ 4 แล้ว 14 วัน	1	0/3	0 LD_{50}	0/3	0 LD_{50}
	0.5	0/3		0/3	
	0.25	0/3		0/3	
หลังจากฉีด dose ที่ 7 แล้ว 7 วัน	1	3/3	11.30 LD_{50}	1/3	ระดับแอนติบอดี้ต่ำมากไม่สามารถหาค่าได้
	0.5	0/3		0/3	
	0.25	0/3		0/3	

ตารางที่ 7 (ต่อ)

ระยะเวลาในการเจาะเลือดเพื่อหาระดับแอนติบอดี้	จำนวนซีรั่มที่นำมาทดสอบ (มิลลิลิตร)	ซีรั่มที่ได้จากการฉีดโพลิเมอร์ของ heated toxin		ซีรั่มที่ได้จากการฉีโพลิเมอร์ของ unheated toxin	
		จำนวนหนูรอด จำนวนหนูที่ฉีด	ซีรั่ม ๑ มิลลิลิตร ทำลายพิษงูได้	จำนวนหนูรอด จำนวนหนูที่ถูกฉีด	ซีรั่ม ๑ มิลลิลิตร ทำลายพิษงูได้
หลังจากฉีด dose ที่ 9 แล้ว 7 วัน	1 0.5 0.25	3/3 1/3 0/3	13.42 LD_{50}	3/3 0/3 0/3	ระดับแอนติบอดี้ต่ำมากไม่สามารถหาค่าได้
หลังจากฉีด dose ที่ 10 แล้ว 7 วัน	1 0.5 0.25	3/3 1/3 0/3	13.42 LD_{50}	1/3 0/3 0/3	ระดับแอนติบอดี้ต่ำมากไม่สามารถหาค่าได้
หลังจากฉีด dose ที่ 11 แล้ว 7 วัน	1 0.5 0.25	3/3 1/3 0/3	13.42 LD_{50}	0/3 0/3 0/3	ซีรั่มไม่สามารถทำลายพิษงูได้

มาไม่นานก็ตายทั้งหมดครบ 7 ตัว การตายของหนูกลุ่มนี้ช้ากว่าหนูที่ถูกฉีดด้วยพิษงูเห่าโดยที่หนูไม่เคยถูก immunized มาก่อนเลยเพราะหนูที่ไม่เคยได้รับการกระตุ้นให้สร้างภูมิคุ้มกันจะตายในเวลาไม่ถึง 2 ชั่วโมงหลังจากที่ฉีด แสดงว่าโพลเมอร์ของ unheated toxin ก็สามารถทำให้หนูสร้างแอนติบอดี้ต่อพิษงูได้บ้าง แต่ไม่สูงมากพอที่จะทำให้หนูอยู่รอดหลังจากที่ฉีดพิษงูจำนวน 3 LD_{50}

ผลการทดลองฉีดพิษงูเข้าในหนูทั้ง 2 กลุ่มได้นำมาเปรียบเทียบกันดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8

แสดงการเปรียบเทียบความต้านทานต่อพิษงูในหนู 2 กลุ่มที่ถูก immunize ด้วยโพลิเมอร์ของ unheated toxin และ unheated toxin (in vivo test)

จำนวนพิษงูเห่าที่ฉีดเข้าในหนู 1 ตัว	หนูกลุ่มที่ฉีดด้วยโพลิเมอรของ heated toxin	หนูกลุ่มที่ถูกฉีดด้วยโพลิเมอร์ของ unheated toxin
3 LD_{50}	อยู่ครบทั้ง 7 ตัวและไม่แสดงอาการเจ็บป่วยใด ๆ	มีอาการเจ็บป่วยและตายในเวลาต่อมา แต่ตายช้ากว่าหนูที่ไม่เคยถูกฉีดเพื่อให้เกิดภูมิคุ้มกันมาก่อน
5 LD_{50}	อยู่ครบทั้ง 7 ตัวและไม่แสดงอาการเจ็บป่วยใด ๆ	—
8 LD_{50}	2 ตัวมีอาการไม่สบายและตายในเวลาต่อมา อีก 5 ตัวมีอาการไม่สบาย แต่ยังคงอยู่รอด	—

บทที่ 5

การอภิปรายผล

ในการแยกโปรตีนส่วนที่เป็นพิษหรือ neurotoxin ออกจากพิษงูเห่า เพื่อให้ได้โปรตีนพิษที่ค่อนข้างบริสุทธิ์นั้น ได้มีผู้ทดลองแล้วหลายท่าน Kabara และ Fischer (1972) ได้รายงานว่าสามารถแยก neurotoxin โดย dialyse ผ่าน dialysing bag ออกมาได้ เพราะโปรตีนพิษนี้มีขนาดโมเลกุลเล็กพอที่จะผ่านเยื่อบาง ๆ ของถุงสำหรับ dialyse ที่ Kabara และ Fischer ใช้ในการทดลอง ผู้วิจัยจึงได้ทดลองใช้วิธีนี้โดยคาดว่าจะได้โปรตีนพิษแยกออกมาอยู่นอกถุงที่ใช้ในการ dialyse ส่วนสารอื่นและโปรตีนอื่นที่โมเลกุลใหญ่จะคงอยู่ภายในถุง แต่ผลการทดลองปรากฏว่า พบโปรตีนออกมานอกถุงที่ใช้ในการ dialyse ปริมาณหนึ่ง ซึ่งตรวจได้โดยการวัด Optical Density ที่ความยาวคลื่น 280 มิลลิไมครอน แต่โปรตีนมีความเจือจางและไม่สามารถนำไปหาค่าความเป็นพิษหรือ LD_{50} ได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงไม่สามารถใช้วิธีดังกล่าวในการทำให้พิษงูบริสุทธิ์ต่อไป การที่ผลการทดลองไม่เป็นไปตามที่คาดคิดไว้อาจเป็นเพราะถุงสำหรับ dialyse ที่ใช้อาจจะมีขนาดของรูต่างกับที่ Kabara และ Fischer ใช้ แต่ในรายงานที่ทั้ง 2 ท่านเขียนไว้ไม่ได้กล่าวละเอียดถึงชนิดของถุง dialyse นอกจากนี้เครื่องมือที่ Kabara และ Fischer ใช้ได้ประดิษฐ์อย่างซับซ้อนเกินที่ผู้วิจัยจะทำตามได้

Yang (1965) ได้ใช้วิธี ammonium sulfate fractionation แยก neurotoxin ออกมาจากพิษงูเห่าชื่อ Naja naja atra ได้ ผู้วิจัยได้ทดลองใช้วิธีนี้กับงูเห่าไทยพบว่า ปริมาณโปรตีนพิษที่แยกออกมาได้มีปริมาณน้อยมากคิดเป็นผลผลิตร้อยละ 1.434 ของพิษงูที่ใช้ทั้งหมด และคิดเป็นร้อยละ 5.736 ของโปรตีนพิษที่มีอยู่ ดังนั้นจึงมีการสูญเสียโปรตีนพิษไปในระหว่างการทดลองถึงร้อยละ 94.264 ของโปรตีนพิษทั้งหมด ซึ่งนับว่าไม่คุ้มค่ากับการลงทุนทำ วิธีนี้มีข้อดีตรงที่

โปรตีนพิษมีความบริสุทธิ์สูง มีค่า LD_{50} = 0.072 มิลลิกรัมต่อหนูหนัก 1 กิโลกรัม แต่มีข้อเสียตรงที่มีการสูญเสียโปรตีนพิษในระหว่างการทดลองแต่ละขั้นมาก

การวิจัยที่มิได้รายงานในที่นี้ ผู้วิจัยได้ทดลองแยกโปรตีนพิษโดยใช้วิธี ammonium sulfate fractionation หลายครั้งและใช้ความเข้มข้นของ ammonium sulfate ต่าง ๆ กัน แต่ผลการทดลองได้ผลไม่ดีเพราะโปรตีนพิษได้กระจายไปอยู่ตาม fraction ต่าง ๆ ไม่รวมอยู่ใน fraction ใด fraction หนึ่งเป็นส่วนใหญ่ ถึงแม้ว่าผู้วิจัยจะได้พยายามใช้พิษงูสด (พิษงูก่อนทำให้แห้ง) ก็ตาม ผลก็ยังไม่ดีขึ้น

<u>การใช้ความร้อนแยกโปรตีนบางส่วนออกจากพิษงู</u>

โดยที่โปรตีนพิษสามารถทนความร้อนได้สูง Yang และ Devi ได้รายงานว่าโปรตีนพิษจากพิษงู<u>Naja naja atra</u>เป็นสารที่ทนความร้อนใน pH ที่เป็นกรด คือถ้าละลายใน buffer pH 5.8 และแช่ในอ่างน้ำอุณหภูมิ 80° เซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีจะไม่สูญเสียคุณสมบัติเลย (Yang, 1965 และ Devi,1968) ผู้วิจัยจึงได้ทดลองใช้อุณหภูมิ 80° เซลเซียสเป็นเวลา 20 นาทีกับพิษงูเห่าไทย เพื่อทำให้โปรตีนส่วนที่ไม่ทนความร้อนซึ่งเป็นโปรตีนที่ไม่มีพิษตกตะกอนแล้วแยกส่วนนี้ออก โปรตีนส่วนที่เหลืออยู่นี้พบว่ามีปริมาณโปรตีนร้อยละ 65 ของปริมาณพิษงูที่นำมาแยกทั้งหมด และมีความเป็นพิษสูงขึ้นกว่าพิษงูเห่าธรรมชาติ ดังผลการทดลองในข้อ 2 บทที่ 4 และจากการคำนวณในข้อ 3 บทเดียวกันนี้จะเห็นได้ว่า ค่าจำนวน LD_{50} ในพิษงูเห่าทั้งหมดได้สูญเสียไปในระหว่างแยกด้วยความร้อน = 16.7 เปอร์เซนต์ ดังนั้นโปรตีนที่ได้จากการแยกโปรตีนบางส่วนออกไปแล้วจะมีค่าจำนวน LD_{50} กลับคืนมาร้อยละ 83.3

การสูญเสียส่วนที่เป็นพิษของพิษงูในระหว่างการทดลองนี้อาจเนื่องมาจาก

1. ส่วนที่เป็นพิษซึ่งสูญหายไปนั้นอาจจะสูญเสียไปในระหว่างขั้นตอนของการ

ทดลองเช่น อาจจะถูกเอนไซม์พวกที่ย่อยโปรตีนซึ่งอยู่ในพิษงูเองเป็นตัวมาทำลาย หรือโปรตีนพิษติดไปกับเครื่องใช้บ้าง ทำให้สูญเสียไปบางส่วน

2. โปรตีนพิษบางส่วนอาจเกาะติดกับโปรตีนที่ตกตะกอน จึงทำให้พิษสูญเสียไปบ้าง

3. การตายของสัตว์หรือคนด้วยพิษงูเห่านั้น ได้มีรายงานว่าเนื่องมาจากโปรตีนหรือ neurotoxin(Yang, et al., 1959, 1960) เป็นส่วนใหญ่ แต่โปรตีนอื่นหรือสารชนิดอื่นก็อาจมีผลต่อการตายด้วย ซึ่งอาจจะไม่มีผลโดยตรงแต่จะมีผลในแง่ที่ไปมีปฏิกริยาร่วมกับโปรตีนหรือสารอื่น หรือแม้แต่โปรตีนพิษเอง แล้วทำให้เกิดการตายขึ้น ถ้าโปรตีนหรือสารนี้ถูกทำลายด้วยความร้อนก็อาจมีผลทำให้ความเป็นพิษ (จำนวน LD_{50}) ของพิษงูส่วนที่เหลือลดลงกว่าเดิม

<u>การทำพิษงูให้อยู่ในรูปโพลิเมอร์</u>

จากการทดลองในข้อ 5.2.1 บทที่ 3 จะเห็นว่าผู้วิจัยมิได้ระบุปริมาณที่แน่นอนของ glutaraldehyde ที่หยดลงไปในพิษงูที่จะทำให้เป็นโพลิเมอร์ ตามที่ Avrameas (1969) ได้ใช้ glutaraldehyde เชื่อมโมเลกุลของเอ็นไซม์เข้ากับโมเลกุลของโปรตีนเช่นเชื่อมโมเลกุลของเอ็นไซม์ peroxidase เข้ากับโมเลกุลของโปรตีน immunoglobulin G ของคน เป็นต้น Avarameas ได้รายงานว่าปริมาณ glutaraldehyde 10 เปอร์เซนต์ของจำนวนโปรตีนที่จะนำมาเชื่อมโมเลกุลเข้าด้วยกันเป็นปริมาณที่เหมาะสมที่สุด ผู้วิจัยได้ทดลองใช้ glutaraldehyde ปริมาณนี้แต่พบว่า โมเลกุลของโปรตีนพิษในพิษงูมาจับกันเป็นโพลิเมอร์ไม่หมด จึงได้ทดลองเพิ่มปริมาณ glutaraldehyde ขึ้นจนถึง 30% ของจำนวนโปรตีนพิษงู แต่พิษงูก็ยังเป็นโพลิเมอร์ไม่หมดยังมีส่วนที่เป็นพิษละลายอยู่ในส่วนน้ำใส (supernatant) อยู่ จึงได้แยกน้ำใสมาแล้วหยด glutaraldehyde ลงไปเป็นจำนวนมาก ปริมาตรที่หยดเท่า ๆ กับปริมาตรของส่วนน้ำใสที่มีพิษอยู่ พบว่า

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

ส่วนน้ำใสนี้หมดความเป็นพิษ เมื่อนำไปฉีดหนูขาว (Swiss mice) หนูไม่ตาย การทดลองนี้จึงไม่สามารถรายงานปริมาณของ glutaraldehyde ได้ว่าใช้เป็นกี่เปอร์เซนต์ของปริมาณโปรตีนพิษงู เพราะไม่ทราบแน่ว่ามีโปรตีนในน้ำใสเท่าใด

การที่ต้องใช้ glutaraldehyde จำนวนมากนี้ ผู้วิจัยคาดว่าเนื่องจากพิษงูประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิดและมีขนาดโมเลกุลต่าง ๆ กัน ตั้งแต่โมเลกุลใหญ่มากเช่น เอ็นไซม์บางชนิดไปจนถึงสารที่มีโมเลกุลที่เล็กขนาดเป็นสาย peptide สั้น ๆ เช่น cardiotoxin, cytotoxin, neurotoxin เป็นต้น ในการทำโพลิเมอร์พิษงูด้วยสาร glutaraldehyde จึงต้องใช้ปริมาณที่แตกต่างจากที่ Avarameas (1969) ได้ทำการทดลอง ซึ่งใช้โมเลกุลของโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลต่างกันเพียง 2 ชนิดมาต่อกัน ทั้งนี้เนื่องมาจากโปรตีนในพิษงูมีขนาดของโมเลกุลที่แตกต่างกัน และเป็นโปรตีนหลายชนิดซึ่งประกอบด้วยโปรตีนที่มีจำนวน free amino group ที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ประจุบนโมเลกุลของโปรตีนก็แตกต่างกันออกไปด้วย ความแตกต่างกันของโปรตีนที่มาเชื่อมต่อกันนี้จึงเป็นสาเหตุใหญ่ในการที่ทำให้ไม่สามารถใช้ปริมาณ glutaraldehyde ได้เท่ากับที่มีผู้เคยทดลองทำมาแล้ว แต่อย่างไรก็ดีการปรับ pH ของสารละลายพิษงูได้ทำให้ใกล้เคียงกับ isoelectric pH ของโปรตีนพิษ ก็จะเป็นการช่วยได้มากในการทำให้โมเลกุลของโปรตีนพิษที่มีขนาดเล็กมาจับกันเป็นโพลิเมอร์

<u>ความเป็นพิษของโพลิเมอร์พิษงู</u>

จากผลการทดลองข้อที่ 5 บทที่ 4 แสดงให้เห็นว่าไม่มีความเป็นพิษเหลืออยู่ในโพลิเมอร์ทั้งส่วนที่เป็นน้ำใสและส่วนที่เป็นตะกอน และจากผลที่ได้ฉีดโพลิเมอร์เพื่อให้เกิดภูมิคุ้มกันในหนู (Wistar Strain Rat) นั้น ปริมาณโพลิเมอร์พิษงูที่ฉีดพบว่าสูงกว่าค่า LD_{50} ของหนูนั้นถึง 50 - 70 เท่า ปรากฏว่าหนูที่ถูก immunize นั้นไม่ตายดังผลการทดลองข้อ 6.1 เป็นเครื่องแสดงว่าโพลิเมอร์พิษงูไม่มีความเป็นพิษเหลือเลย ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการ immunize สัตว์

เพื่อให้สร้างภูมิคุ้มกัน เพราะในการทำนี้จะต้องใช้แอนติเจนปริมาณมากพอที่จะทำให้สัตว์นั้นสร้างภูมิคุ้มกันได้ ซึ่งถ้าใช้พิษงูเห่าธรรมชาติเราจะไม่สามารถใช้ปริมาณนี้มา immunize สัตว์ได้ เพราะจะทำให้สัตว์นั้นตาย

โพลิเมอร์พิษงูจึงเป็นพิษงูที่ถูกเปลี่ยนแปลงแล้วทำให้ความเป็นพิษหมดไป แต่ถ้าจะนำไปใช้ประยชน์ในการทำซีรั่มแก้พิษงูคือ นำไป immunize สัตว์ พิษงูนี้จะต้องมีคุณสมบัติของการเป็นแอนติเจน (antigenic property) เหมือนกับพิษงูธรรมชาติ หรือใกล้เคียง นั่นคือพิษงูที่เปลี่ยนแปลงนี้จะสามารถทำให้สัตว์สร้างแอนติบอดี้ที่สามารถทำลายพิษงูเห่าธรรมชาติได้ จากผลการทดลองในข้อ 6.2.1 บทที่ 4 จะเห็นได้ว่าโพลิเมอร์ของ heated toxin สามารถให้ภูมิคุ้มกันพิษงูเห่าในหนูได้

<u>ระดับแอนติบอดี้ที่ถูกสร้างขึ้นในหนูโดยโพลิเมอร์ของ heated toxin</u>

จากผลการทดลองข้อ 6.2.1 บทที่ 4 จะเห็นว่าระดับแอนติบอดี้ในซีรั่มหนูมีปริมาณสูงขึ้นหลังจากที่ฉีดโพลิเมอร์ของ heated toxin แล้ว 1 สัปดาห์ ถ้าหลังจากนั้นแล้วถึง 2 สัปดาห์จะลดลงดังเช่น ระดับของแอนติบอดี้หลัง dose ที่ 4 และ dose ที่ 7 เป็นเวลา 14 วัน แต่ระดับแอนติบอดี้ในช่วง 14 วันหลัง dose ที่ 7 ลดต่ำลงไม่มากเท่าช่วง 14 วันหลัง dose ที่ 4 ที่เป็นเช่นนี้ผู้วิจัยมีความเห็นว่าเนื่องจากได้ฉีดโพลิเมอร์ dose ที่ 5, 6 และ 7 ติดต่อกันทุก 7 วัน รวมทั้งหนูได้รับการฉีดโพลิเมอร์มาก่อนจนถึง dose ที่ 4 ด้วย จึงทำให้ระดับแอนติบอดี้หลัง dose ที่ 7 แล้ว 14 วันยังไม่ลดลงต่ำ จึงเป็นแนวทางที่ทำให้คิดต่อไปว่า ถ้าเราสามารถให้โพลิเมอร์หลาย ๆ dose ติดต่อกันทุก 7 วัน ระดับแอนติบอดี้อาจจะคงระดับเดิมต่อไปได้นานเกิน 14 วันก็ได้

จากการที่ระดับแอนติบอดี้ยังคงที่เมื่อฉีด dose ที่ 11 แล้ว 7 วัน ทำให้ผู้วิจัยเข้าใจว่าถ้าฉีด dose ต่อ ๆ ไปอีกระดับแอนติบอดี้อาจจะไม่สูงไปกว่านี้

อีก แต่เนื่องจากต้องการทดสอบโดยการฉีดพิษงูเข้าไปในตัวหนูที่มีภูมิคุ้มกันนี้โดยตรง จึงไม่ได้รอตรวจว่าระดับแอนติบอดี้จะลดลงเมื่อใด และนอกจากนี้การเจาะเลือกจากเส้นเลือดที่ตาของหนูบ่อยครั้งทำให้เกิดแผลเป็นทำให้การเจาะยากขึ้น และหนูออนแอลง เนื่องจากยาสลบบ่อยครั้งด้วย ผู้วิจัยเกรงว่าถ้าเจาะเลือดต่อไปจะทำให้การทดสอบโดยวิธีฉีดพิษงูเข้าในหนูโดยตรงนี้ทำได้ยาก จากผลการทดลองในข้อ 6.2.1 บทที่ 4 นี้ อาจสรุปได้ว่า สำหรับสัตว์ทดลองที่ใช้คือหนู (Wistar Strain Rat) การสร้างแอนติบอดี้ต่อโพลิเมอร์พิษงูอาจจะสามารถทำได้เพียงระดับนี้ แต่ถ้าเป็นสัตว์ชนิดอื่นหรือสัตว์ที่ใหญ่กว่านี้เช่น แกะ ม้า อาจจะสามารถสร้างภูมิคุ้มกันต่อพิษงูได้ดีกว่าก็เป็นได้ ดังนั้นการวิจัยโดยการพยายามหาสัตว์ที่ใหญ่กว่านี้มาทำการทดลองจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจอย่างยิ่ง และนอกจากนี้ในการวิจัยนี้ได้ทดลองใช้ปริมาณของโพลิเมอร์ที่ immunize หนูเท่ากันหมดโดยตลอด เนื่องจากไม่สามารถหาหนูจำนวนมากมาทำการทดลองใช้ปริมาณต่าง ๆ กันได้ รวมทั้งพิษงูที่มีอยู่ก็มีปริมาณจำกัด ดังนั้นระดับแอนติบอดี้ที่สร้างขึ้นอาจจะสูงได้มากที่สุดเพียงเท่านี้ คือ ซีรั่ม 1 มิลลิลิตรทำลายพิษงูได้ 13.40 LD_{50} สำหรับการ immunize ด้วยปริมาณโพลิเมอร์เท่าที่กล่าวมาแล้ว แต่ถ้าสามารถทำการวิจัยต่อไปโดยทดลองใช้ปริมาณโพลิเมอร์ต่าง ๆ กัน ก็อาจจะหาปริมาณที่เหมาะสมที่จะทำให้ระดับของแอนติบอดี้สูงขึ้นกว่าการทดลองนี้ได้

<u>ระดับแอนติบอดี้ที่ถูกสร้างขึ้นในหนูโดยโพลิเมอร์ของ unheated toxin</u>

จากผลการทดลองข้อ 6.2.2 บทที่ 4 จะเห็นว่าระดับแอนติบอดี้ที่สร้างขึ้นในหนูโดยโพลิเมอร์ของ unheated toxin อยู่ในระดับต่ำมากจนไม่สามารถคำนวณหาจำนวนพิษงูที่ซีรั่มทำลายได้ ถึงแม้ว่าจะ immunize หนูด้วยโพลิเมอร์นี้จนถึง dose ที่ 11 ระดับแอนติบอดี้ก็ยังไม่สูงขึ้น จึงเข้าใจว่า unheated toxin มีโปรตีนอื่นที่ไม่มีใน unheated toxin ปนอยู่ โปรตีนส่วนนี้คือโปรตีนส่วนที่ตกตะกอนโดยใช้ความร้อน 80° เซลเซียส ซึ่งอาจจะมีอิทธิพลต่อการเกิดโพลิเมอร์

ของโปรตีนพิษหรืออาจจะรวมกับโปรตีนพิษจนทำให้เสีย คุณสมบัติของการเป็นแอนติเจน ได้

การทดสอบหาภูมิคุ้มกันในหนูโดยฉีดพิษงูเข้าในตัวหนู (in vivo test)

จากผลการทดลองข้อ 7 บทที่ 4 จะเห็นว่า หนูกลุ่มที่ถูก immunize ด้วยโพลิเมอร์ของ heated toxin สามารถทนต่อพิษงูได้ 8 LD_{50} ซึ่งที่จริงแล้วหนูควรจะทนพิษงูได้มากกว่านี้ เพราะภายในตัวหนูจะมีแอนติบอดี้อยู่เป็นจำนวนมาก สาเหตุที่ทำให้หนูทนได้ไม่มากนี้ผู้วิจัยเข้าใจว่าเกิดจาก

1. อาจเป็นเพราะหนูได้รับการฉีดพิษงูจำนวน 3 LD_{50} และ 5LD_{50} มาก่อน จึงอาจทำให้โมเลกุลของแอนติบอดี้ต่อพิษงูในซีรั่มในตัวหนูถูกใช้ไปจำนวนหนึ่งก่อนที่จะได้รับพิษงูจำนวน 8 LD_{50}

2. จากสาเหตุข้อ 1 และการเจาะเลือดหนูเป็นระยะเวลานาน ๆ ทำให้หนูมีสุขภาพเลวลง รวมทั้งการที่ถูกฉีดยาสลบบ่อยครั้งด้วย จึงทำให้หนูสร้างความต้านทานได้ไม่ดี

3. การฉีดพิษงูปริมาณที่สูง ๆ เข้าในร่างกายสัตว์ ถึงแม้ว่าสัตว์นั้นจะมีแอนติบอดี้ต่อพิษงูระดับสูงก็ตาม แต่ด้วยความเป็นพิษที่สูงของพิษงู แอนติบอดี้อาจจะเข้าทำลายพิษงูไม่ทันมีพิษบางส่วนที่รอดไปจับกับเซลล์เป้าหมาย ทำให้สัตว์นั้นเจ็บป่วยและตายเพราะส่วนที่เป็นพิษของพิษงูมีความร้ายแรงมากด้วยปริมาณเพียงเล็กน้อยก็ทำให้สัตว์นั้นตายได้

ส่วนการฉีดพิษงูเข้าในหนูกลุ่มที่ immunize ด้วยโพลิเมอร์ของ unheated toxin พบว่าการตายช้าลงเมื่อฉีดพิษงูจำนวน 3 LD_{50} แสดงว่ามีแอนติบอดี้ต่อพิษงูอยู่ในเลือดบ้าง แต่น้อยมากจนไม่สามารถจะทำลายพิษงูจำนวน 3 LD_{50} ให้หมดไปได้ จึงมีพิษบางส่วนเหลืออยู่และไปทำให้หนูตาย

การวิธีนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการผลิตซีรั่มแก้พิษงู ซึ่งจะต้องใช้พิษงูฉีดเข้าในตัวม้า การฉีดพิษงูนี้จะไม่สามารถใช้ปริมาณที่สูงเพราะจะทำให้ม้าตาย ทำให้การสร้างแอนติบอดี้เกิดได้ไม่มาก แต่ถ้าเราสามารถทำพิษงูให้หมดความเป็นพิษโดยทำให้อยู่ในรูปโพลิเมอร์ ก็จะสามารถฉีดแอนติเจนนี้ได้จำนวนมากขึ้นในจำนวนที่พอเหมาะสำหรับให้ม้าสร้างภูมิคุ้มกันได้ดี และการทำโพลิเมอร์จะเป็นการเพิ่มขนาดโมเลกุลของโปรตีนพิษ เนื่องจากโปรตีนพิษในพิษงูตามธรรมชาตินอกจากจะมีพิษแล้วยังมีขนาดโมเลกุลเล็ก (ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 70 โมเลกุล) ซึ่งสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กเพียงนี้ย่อมมีประสิทธิภาพในการเป็นแอนติเจนต่ำกว่าสารที่โมเลกุลใหญ่ ดังนั้นการทำโพลิเมอร์ย่อมทำให้คุณสมบัติของการเป็นแอนติเจนของพิษงูดีขึ้น วิธีการนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการผลิตซีรั่มแก้พิษงูอย่างยิ่งและนอกจากนี้วิธีทำพิษงูให้อยู่ในรูปของโพลิเมอร์โดยใช้วิธีนี้ยังเป็นวิธีสดวก ไม่ยาก ไม่เปลืองเวลา และไม่เปลืองทุนทรัพย์ในการทำด้วย

บทที่ 6

ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ

ในการแยกโปรตีนบางส่วนออกจากพิษงูเห่าไทย (Nája naja siamensis) ได้ทดลองใช้ความร้อน 80° เซลเซียส เป็นเวลา 20 นาทีแก่สารละลายพิษงูเห่าที่อยู่ในสภาพเป็นกรด pH 5.8 โปรตีนส่วนที่เหลืออยู่ในสภาพสารละลายมีปริมาณร้อยละ 65 ของพิษงูทั้งหมดและมีความเป็นพิษสูงขึ้นคือมีค่า LD_{50} = 0.167 มิลลิกรัมต่อหนูหนัก 1 กิโลกรัม (พิษงูเห่าธรรมชาติมีค่า LD_{50} = 0.216 มิลลิกรัมต่อหนูหนัก 1 กิโลกรัม) โปรตีนส่วนที่เหลือนี้จึงเป็นโปรตีนส่วนที่มีพิษ และพบว่าในโปรตีนส่วนนี้มีส่วนที่เป็นพิษสูญเสียไปบางในระหว่างขบวนการแยกโปรตีน โดยคิดจากจำนวน LD_{50} ที่เหลืออยู่ จำนวน LD_{50} ที่หายไปมีประมาณร้อยละ 16.7 ของจำนวน LD_{50} ทั้งหมด ดังนั้นส่วนที่เป็นพิษที่เหลือกลับคืนมาจะมีร้อยละ 83.3

ได้ทดลองนำพิษงูส่วนนี้หรือ heated toxin และพิษงูเห่าธรรมชาติหรือ unheated toxin ไปทำให้โมเลกุลของโปรตีนพิษมาเชื่อมต่อกันโดยใช้ 2.5% glutaraldehyde พบว่าโพลิเมอร์ของพิษงูทั้งสองไม่มีความเป็นพิษเหลืออยู่ และโพลิเมอร์ของ heated toxin สามารถกระตุ้นให้หนู (Wistar Strain Rat) สร้างแอนติบอดี้ที่ทำลายพิษงูเห่าได้ ซีรัมจากหนูกลุ่มที่ฉีดโพลิเมอร์ของ heated toxin จำนวน 1 มิลลิลิตร สามารถทำลายพิษงูเห่าได้ 11.30 LD_{50} ภายหลังจาก immunize หนูด้วยโพลิเมอร์ 4 dose ในระยะเวลา 5 สัปดาห์และหลังจาก immunize dose ที่ 9 ระดับแอนติบอดี้ก็เพิ่มขึ้น ซีรัม 1 มิลลิลิตรสามารถทำลายพิษงูเห่าได้ 13.42 LD_{50} และต่อจากนั้นระดับแอนติบอดี้ก็คงที่ไปจนถึง immunize dose ที่ 11 ซึ่งเป็น dose สุดท้าย และจากการทดสอบโดยใช้พิษงูฉีดเข้าไปในตัวหนูที่ถูก immunize ด้วยโพลิเมอร์ของ heated toxin นี้ พบว่าหนูสามารถ

ทนปริมาณพิษงูได้ 8 LD_{50} ส่วนโพลิเมอร์ของพิษงูเห่าธรรมชาติหรือ unheated toxin นั้นสามารถกระตุ้นให้หนูสร้างแอนติบอดี้ได้แต่น้อยมาก จนไม่สามารถหาค่าที่ซีรั่มหนูทำลายพิษงูได้ และเมื่อทดสอบโดยฉีดพิษงูเข้าในตัวหนูปริมาณ 3 LD_{50} ปรากฏว่าหนูตายหมด แต่ตายช้าลงกว่าหนูที่ไม่ได้ถูก immunize มาก่อน

การวิจัยนี้จะมีประโยชน์ในการผลิตซีรั่มแก้พิษงู โดยที่สามารถใช้โพลิเมอร์ของ heated toxin นี้แทนพิษงูเห่าธรรมชาติในการที่จะกระตุ้นให้ม้าสร้างแอนติบอดี้ต่อพิษงูเห่า ซึ่งจะเป็นการทำให้ม้าไม่ได้รับอันตรายจากพิษงู และยังสามารถใช้ปริมาณได้สูงกว่าใช้พิษงูธรรมชาติถึง 50 – 70 เท่า ซึ่งอาจจะทำให้สามารถผลิตซีรั่มแก้พิษงูได้อย่างรวดเร็ว เนื่องจากไม่ต้องค่อยๆ ใช้ dose ของพิษงูที่ต่ำในช่วงแรก นอกจากนี้การวิจัยนี้ยังมีประโยชน์ในแง่ที่จะเป็นแนวทางให้ทำการวิจัยต่อไปเพื่อให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์ยิ่งขึ้น เช่น

1. ทดลองใช้สัตว์ชนิดอื่นเช่น กระต่าย แกะ ม้า เป็นต้น ในการ immunize ด้วยโพลิเมอร์พิษงู ซึ่งอาจจะได้แอนติบอดี้ที่ระดับสูงกว่าในหนู

2. หา dose ขนาดที่เหมาะสมในการที่จะทำให้สัตว์ชนิดนั้นๆ สร้างแอนติบอดี้ได้ดีขึ้น

3. พยายามทำโปรตีนพิษให้มีความบริสุทธิ์สูงขึ้น แล้วจึงนำมาทำโพลิเมอร์สำหรับ immunize สัตว์จะได้ซีรั่มแก้พิษงูที่มีประสิทธิภาพดีขึ้น

เอกสารอ้างอิง

Avrameas,S. "Coupling of Enzymes to Proteins with Glutaraldehyde. Use of the Conjugates for the Detection of Antigens and Antibodies." Immunochemistry 6(1969) : 43 - 52.

Avrameas, S., and Ternynck, T. "The Cross - linking of Proteins with Glutaraldehyde and Its Use for the Preparation of Immunoadsorbents." Immunochemistry 6(1969):53-66.

Botes, D.P., and Strydom, D.J. "A Neurotoxin, Toxin α , from Egyptian Cobra (Naja haje haje) Venom. I Purification, Properties and Complete Amino Acid Sequence." J.Biol Chem. 244 (1969) : 4147 - 4148.

Botes, D.P., et al. "Snake Venom Toxins. Purification and Properties of Three Toxins from Naja nivea (Linnaeus) (Cape Cobra) Venom and the Amino Acid Sequence of Toxin 8." J.Biol.Chem. 246(1971) : 3132 - 3135.

Chang, C.C. "Immunochemical Studies on Fluoresceinthiocarbamyl and Reduced S - carboxymethylated Cobrotoxin." J.Biochem., Tokyo 67(1970) : 343 through Yang, C.C. "Chemistry and Evolution of Toxins in Snake Venoms" Toxicon 12(1974) : 1 - 42.

Chang,C.C., and Hayashi, K. "Chemical Modification of the Tryptophan Residue in Cobrotoxin." Biochem.Biophys. Res.Commun. 37(1969):841 through Yang,C.C "Chemistry

and Evolution of Toxins in Snake Venoms." Toxicon 12(1974) : 1 - 42.

Chang,C.C., and Yang,C.C. "Immunochemical Studies of Cobrotoxin." J. Immuno. 102(1969) : 1437 - 1443.

Chang,C.C., et al. "Studies on the Status of Tyrosyl Residues in Cobrotoxin." Biochem.Biphys. Acta 236(1971):164-166.

Chang,C.C., et al. "Studies on the Status of Free Amino and Carboxyl Groups in Cobrotoxin." Biochem.Biophys.Acta 251(1971) : 334 - 338.

Chang,C.C., and Yang,C.C. "Immunochemical Studies on the Tryptophan Modified Cobrotoxin." Biochem.Biophys. Acta 295(1973) : 595 - 597.

Devi,A . "The Protein and Non Protein Constituents of Snake Venoms." Venomous Animals and Their Venoms. Vol.1, pp. 119 - 160. Edited by W.Bücherl, et al, New York: Academic Press, 1968.

Huang, J.S., et al. "Photooxidation of Cobrotoxin." J.Formosan Med.Ass. 71(1972) : 383 through Yang,C.C. "Chemistry and Evolution of Toxins in Snake Venoms." Toxicon 12(1974) : 1 - 42.

Jiménez - Porras, J.M. "Pharmacology of Peptides and Proteins in Snake Venoms." Reprinted from Annual Review of Pharmacology 8(1968) : 299 - 312.

Kabara, J.J., and Fischer, G. " Methodology for the Isolation of Low Molecular Weight toxins from Snake Venoms." Toxicon 10 (1972) : 227 - 232.

Karlsson, E., Eaker, D.L., and Porath, J. "Purification of a Neurotoxin from the Venom of Naja nigricollis." Biochem. Biophys. Acta 127 (1966) : 505 - 520.

Karlsson, E., Arnberg, H., and Eaker, D. "Isolation of the Principal Neurotoxins of two Naja naja Subspecies." Eur. J. Biochem. 21 (1971) : 1 through Yang, C.C. " Chemistry and Evolution of Toxins in Snake Venoms." Toxicon 12 (1974) : 1 - 42.

Karlsson, E., and Eaker, D. " Isolation of the Principal Neurotoxins of Naja naja Subspecies from the Asian Mainland. " Toxicon 10 (1972) : 217 - 221.

Lee, C.Y. "Mode of Action of Cobra Venom and Its Purified Toxins. "Collected Paper on Snake Venoms. pp.17 - 35. Taiwan : National Taiwan Univ. Illus., 1971.

Lee, C.Y., and Peng, M.T. " An Analysis of the Respiratory Failure Produced by the Formosan Elapid Venoms." Archo Int. Pharmacodyn. Thér. 133 (1961) : 180 through Yang, C.C. "Chemistry and Evolution of Toxins in Snake Venoms. "Toxicon 12 (1974) : 1 - 42.

Lee, C.Y., Tseng, L.F., and Chin, T.H. "Influence of Denervation of Localization of Neurotoxins from Elapid Venoms in Rat Diaphragm." Nature, Lond. 215 (1967) 1177.

Lo, T.B., Chen, Y.H., and Lee, C.Y. "Chemical Studies on Formosan Cobra (Naja naja atra) venom : Part I. Chromatographic Separation of Crude Venom on CM - Sephadex and Preliminary Characterization of Its Components. "J. Chin. Chem. Soc., Taipei 13 (1966) : 25 through Yang, C.C. "Chemistry and Evolution of Toxins in Snake Venoms." Toxicon 12 (1974) : 1 - 42.

Lowry, O.H., etal. "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. "J. Biol. Chem. 193 (1951) : 265.

Miranda, F., etal. "Purification of Animal Neurotoxins Isolation and Characterization of Four Neurotoxins from Two Different Sources of Naja haje Venom." Eur. J. Biochem. 17 (1970) : 477 through Yang, C.C. "Chemistry and Evolution of Toxins in Snake Venoms." Toxicon 12 (1974) : 1 - 42.

Quiocho, F.A., and Richards, F.M. "The Enzymic Behavior of Carboxy peptidase - A in the Solid State." Biochemistry Vol.5, No. 12 (1966) : 4062 - 4075.

Reed, L.J., and Muench, H. H. Am. J. Hyg. 27 (1938) : 493 through Davis, B.D., etal. Microbiology. P. 649-650.

Harper International Edition. New York, Evanston, and London : Harper & Row Publishers, 1967.

Russell, F.E. " The Biochemistry and Pharmacology of Snake Venoms." Toxins of Animal and Plant Origin. Vol. 2, pp.643-652. N.Y., London, Paris : Gordon and Breach Science Publishers, 1972.

Seto, A., Sato, S., and Tamiya, N. "The Properties and Modification of Tryptophan in a Sea Snake Toxin, Erabutoxin a." Biochem. Biophys. Acta 214 (1970):483 through Yang, C.C. "Chemistry and Evolution of toxins in Snake Venoms." Toxicon 12 (1974) : 1 - 42.

Tseng , L.F., Chiu, T.H., and Lee, C.y. "Absorption and Distribution of ^{131}I - labilled Cobra Venom and Its Purified Toxins." Toxic. Appl. Pharmac. 12 (1968) :526 through Yang, C.C. "Chemistry and Evolution of Toxins in Snake Venoms." Toxicon 12 (1974) : 1 - 42.

Tu, A.T., and Hong, B.S. "Purification and Chemical Studies of a Toxin from the Venom of Lapemis hardwickii (Hardwick's Sea Snake)." J. Biol. Chem. 246 (1971) 2772. through Yang, C.C. "Chemistry and Evolution of Toxins in Snake Venoms." Toxicon 12 (1974) : 1 - 42.

Tu, A.T., Hong, B.S., and Solic, T.N. "Characterization and Chemical Modifications of Toxins Isolated from the

Venoms of the Sea Snake. Laticauda Semifasciata, from Philippines." Biochemistry 10 (1971) : 535-536.

Tu, A.T., and Toom, P.M. "Isolation and Characterization of the Toxic Component of Enhydrina schistosa (Common Sea Snake) venom." J. Biol. Chem. 246 (1971) : 1012 - 1013.

Vick, J.A., Ciuchta, H.P., and Polley, E.H. "The Effect of Cobra Venom on the Respiratory Mechanism of Dog." Archs Int. Pharmacodyn. Thér. 153 (1965) : 424 through Yang, C.C. "Chemistry and Evolution of toxins in Snake Venoms." Toxicon 12 (1974) : 1 - 42.

Yang, C.C. "The Toxicity of Snake Venom and Enzyme Activities." J. Formosan Med. Ass. 59 (1960) : 1326 through Yang, C.C. "Chemistry and Evolution of Toxins in Snake Venoms." Toxicon 12 (1974) : 1 - 42.

Yang, C.C. "Crystallization and Properties of Cobrotoxin from Formosan Cobra Venom." J. Biol. Chem. 240 (1965) : 1616 - 1618.

Yang, C.C. "Chemistry and Evolution of Toxins in Snake Venoms." Toxicon 12 (1974) : 1 - 42.

Yang, C.C., Chen, C.J., and Su,C.C. "Biochemical Studies on the Formosan Snake Venoms. IV. The Toxicity of Formosan Cobra Venom and Enzyme Activities."

J. Biochem. 46 (1959) : 1201 - 1202

Yang, C.C., Chiu, W.C., and Kao, K.C. "Biochemical Studies on the Snake Venoms. VII. Isolation of Venom Cholinesterase by Zone Electrophoresis." J. Biochem. 48 (1960) : 706.

Yang, C.C., Chang, C.C., and Wei, H.C. "Studies on Fluorescent Cobrotoxin." Biochem.Biophys.Acta 147 (1967) : 600 -602

Yang, C.C., Chang, C.C., and Liu, I.F. "Studies on the Status of Arginine Residues in Cobrotoxin." 9th. Int.Congr. Biochem., Stockholm Colloquium D.Abs. (1973) : 455 through Yang, C.C. "Chemistry and Evolution of Toxins in Snake Venoms." Toxicon 12 (1974) : 1 - 42

Zeller, E.A. "Enzymes of Snake Venoms and Their Biological Signifieance." Advance in Enzymology 8 (1948) : 459 through Yang, C.C. "Chemistry and Evolution of Toxins in Snake Venoms." Toxicon 12 (1974) : 1 - 42.

Zeller, E.A. "Enzymes as Essential Components of Bacterial and Animal toxins."The Enzymes 1 (1951) : 986 through Yang C.C. "Chemistry and Evolution of Toxins in Snake Venoms." Toxicon 12 (1974) : 1 - 42.