การศึกษาความเป็นพิษและการศึกษาเอนไซม์ในพิษงูแมวเซา

นายชัยฤทธิ์ โพธิสุข

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

แผนกวิชาชีวเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. ๒๕๑๕

รับพิจารณาวิทยานิพนธ์ เมื่อ 14 มิ.ย. 2515

TOXICITY AND ENZYMATIC STUDIES OF RUSSELL'S VIPER VENOM

Mr. Chairit Potisook

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

1972

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการตรวจวิทยานิพนธ์ .....ประธานกรรมการ

.....กรรมการ

.....กรรมการ

.....กรรมการ

อาจารย์ผู้ควบคุมการวิจัย (อาจารย์สรรเสริญ ทรัพย์ไพบูลย์)

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การศึกษาความเป็นพิษและการศึกษาเอนไซม์ในพิษงูแมวเซา

ชื่อ นายชัยฤทธิ์ โพธิสุข แผนกวิชา ชีวเคมี

ปีการศึกษา ๒๕๑๕

บทคัดย่อ

การศึกษาพิษงูแมวเซา ซึ่งได้ศึกษามาเป็นเวลานาน ทำให้เข้าใจว่าส่วนประกอบที่เป็นพิษของพิษงูแมวเซานาจะเป็นเอนไซม์มากกว่าจะเป็นโปลีเปปไทด์ทอกซินอย่างไรก็ดี ผลที่ได้จากการศึกษาความเป็นพิษและเอนไซม์ของพิษงูแมวเซา ได้จากการศึกษาโดยใช้พิษงูที่ยังไม่แยก หรือจากพิษงูที่เพียงกำจัดส่วนประกอบบางชนิดออกไปโดยใช้ความร้อนหรือการตกตะกอน มีรายงานการค้นคว้าจำนวนน้อยเหลือเกินที่แสดงผล ซึ่งได้จากการศึกษาส่วนประกอบที่แยกออกมาจากพิษงูแมวเซา การศึกษาครั้งนี้ได้ทดลองแยกพิษงูแมวเซาออกเป็นส่วน ๆ แล้วศึกษาความเป็นพิษและเอนไซม์ของพิษงูแต่ละส่วนที่แยกได้เทียบกับพิษงูที่ยังไม่แยก พบว่า โปรตีนที่ได้จากการโครมาโตกราฟีพิษงูแมวเซาด้วยไดเอธิลามิโนเอธิล เซลลูโลสคอลัมน์ แบ่งออกเป็น ๖ ส่วน ให้ชื่อว่าพิษงูส่วนที่ I, II, III, IV, V และ VI ตามลำดับ ได้วัดคุณสมบัติของเอนไซม์ในพิษงูแต่ละส่วนที่แยกได้ และในพิษงูที่ยังไม่แยก ได้แก่ นอนสเปซิฟิค อัลคาไลน์ โมโนฟอสฟาเทส 5'- นิวคลีโอไทเดส เอกโซนิวคลีเอส คีออกซีไรโบนิวคลีเอส ฟอสโฟไลเปส เอ ฟอสโฟไลเปส บี อะมิโนแอซิดเอสเทอเรส โปรตีเนส เปปไทเดส อะมิโนแอซิดออกซิเดส และไฮยาลูโรไนเดส และได้วัดความเป็นพิษของพิษงูกับหนู โดยวัดความสามารถในการทำให้หนูตายหลังจากฉีดพิษงูเข้าเส้นเลือด พบว่าพิษงูทุกส่วนที่แยกได้ยังคงมีความเป็นพิษอยู่ พิษงูส่วนที่ II มีความเป็นพิษสูงสุด และพิษงูส่วนนี้ แทบจะไม่มีคุณสมบัติของเอนไซม์ใด ๆ อยู่เลย พิษงูอีก ๓ ส่วน ที่มีความเป็นพิษรองลงมาก็อ พิษงูส่วนที่ I, III และ IV ต่างก็มีค่าของเอนไซม์ ฟอสโฟไลเปส เอ คีออกซีไรโบนิวคลีเอส และเอกโซนิวคลีเอส สูง เข้าใจว่า ความ

เป็นพิษของพิษงูส่วนที่ I,III และ IV อาจมีความสัมพันธ์กับผลการกระทำของเอนไซม์ทั้งสามนี้ และพบว่า พิษงูส่วนที่ V แสดงคุณสมบัติของอะมิโนแอซิดเอส-เทอเรส สูงมาก ในขณะที่พิษงูที่แยกได้ ส่วนอื่นเกือบไม่แสดงคุณสมบัติของเอนไซม์นี้เลย เอนไซม์ที่พบว่ามีมากในพิษงูแมวเซา คือ ฟอสโฟไลเปส เอ ดีออกซีไรโบนิว-คลีเอส 5'-นิวคลีโอไทเดส และเอกโซนิวคลีเอส ได้วิจารณ์ความสำคัญของส่วนประกอบที่เป็นพิษกับปริมาณของสารนั้นในด้านความสัมพันธ์กับความเป็นพิษของพิษงูแมว-เซา และความสัมพันธ์ระหว่างเอนไซม์กับความเป็นพิษของพิษงูแมวเซาไว้ด้วย ได้เสนอแนะว่า ควรลด pH ของบัฟเฟอร์ที่ใช้ละลายพิษงูก่อนจะแยกให้เหลือประมาณ ๗.๔ หรือต่ำกว่า เพื่อให้พิษงูที่ใช้แยกละลายในบัฟเฟอร์ได้มากขึ้น และเพิ่มอัตราการไหลของสารที่รองจากคอลัมน์ เพื่อให้ส่วนตาบเกี่ยวระหว่างพิษงูส่วนที่ I และ II ลดลงกว่าผลการทดลองนี้ และอีกสิ่งหนึ่งที่ควรจะทำก็คือ การวัด optical density ของสารที่รองจากคอลัมน์ทุกหลอด และของพิษงูแต่ละส่วนที่แยกได้รวมทั้งพิษงูที่ยังไม่แยก ที่ความยาวคลื่น ๒๖๐ และ ๒๘๐ nanometer ซึ่งอาจจะช่วยให้เข้าใจสมบัติของพิษงูส่วนต่าง ๆ ได้ดียิ่งขึ้น.

Thesis Title Toxicity and Enzymatic Studies of Russell's Viper Venom.

Name Mr. Chairit Potisook Department Biochemistry

Academic Year 1972.

ABSTRACT

The toxicity of Russell's viper venom has long been suggested to be due to some enzymes rather than polypeptide toxins. Hundreds of reports on the study of enzymes and toxicity of the venom have been published. Most of those reports, however, dealed with the crude venom or the whole venom after some components were destroyed by heat or precipitation. Only a few dealed with the fractionated components of the venom. This investigation is another attempt to study the toxicity and enzyme activities of the fractionated parts of the venom. Venom of Russell's viper of Thailand was chromatographed on DEAE-cellulose column and eluted with 2-amino-2-hydroxymethyl propane -1, 3-diol (tris) buffer. This resulted in 6 peaks, namely fraction I, II, III, IV, V and VI respectively. Crude and fractionated venom were determined for the following enzyme activities :- nonspecific alkaline monophosphatase, 5'-nucleotidase, exonuclease, deoxyribonuclease, phospholipase A, phospholipase B, aminoacid esterase, proteinase, peptidase, L-amino-acid oxidase and hyaluronidase. Toxicity (median lethal dose) of crude and fractionated venom was also determined by intravenous injection into mice. It was found that all venom fractions

were toxic. Fraction II, almost void of all enzyme activities, had the most lethal effect. Three other fractions of the next lethality :- fraction I, II and IV were associated with phospholipase A, deoxyribonuclease and exonuclease activities. It is therefore suggested that their lethality might be correlated to the actions of these enzymes. Nearly all aminoacid esterase activity of the crude venom was recovered in fraction V. The crude venom was found to be rich in aminoacid esterase, phospholipase A, deoxyribonuclease, 5'-nucleotidase and exonuclease. Discussion on the possible relationship of toxicity of Russell's viper venom with the lethal effect, content of the lethal components and some enzyme activities was made. It was suggested that the tris buffer of lower pH (below 7.4) should yield a better dissolution of the venom used in the fractionation and increasing of flow rate of the effluent to 120 ml/h should result in a better separation between fraction I and II. It was also suggested that measurement of optical density of the crude venom solution, the effluent and the dialysed fractionated venom at 260 and 280 nanometer would give some knowledge of the nature of the venom.

คำขอบคุณ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ สรรเสริญ ทรัพยโกษก แผนกวิชาชีวเคมี จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย ที่ได้ให้กำลังใจ แนวความคิด และความช่วยเหลือต่าง ๆ ในการทดลอง รวมทั้งการตรวจแก้วิทยานิพนธ์ อาจารย์สัณห์ พลิชยกุล ผู้ริเริ่มและช่วยวางแผนการทดลอง ผู้เขียนรู้สึกซาบซึ้งในความช่วยเหลือที่ได้รับจากอาจารย์ปรีดา อันประเสริฐ แผนกวิชาชีวเคมี จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาช่วยวัดปริมาณฟอสโฟไลเปสของพิษงูแมวเซา แพทย์หญิง ชมนาด ถิรพัฒน์ และคุณ สุทธินัย เจียมสวัสดิ์-พันธุ์ แผนกคลินิก สถานเสาวภา สภากาชาดไทย ที่ได้กรุณาช่วยวัดความเป็นพิษของพิษงูแมวเซา และแพทย์หญิงทัศนยานี จันทนยิ่งยง คลังเลือด โรงพยาบาลศิริราช ที่กรุณาจัดหาปลาสมา สำหรับใช้ในการทดลองวัดคุณสมบัติของพิษงูในการช่วยให้เลือดแข็งตัว สิ่งที่จะเว้นเสียมิได้คือ ผู้เขียนขอแสดงความซาบซึ้งในพระคุณของ ผู้ช่วย-ศาสตราจารย์ กำจัด มงคลกุล แผนกวิชาชีวเคมี จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย ในการจัดหาสถานที่ อุปกรณ์ และสารทดลอง การแนะแนวิธีทำการทดลองต่าง ๆ ตลอดเวลา รวมทั้งการตรวจแก้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้

การวิจัยเรื่องนี้ใช้เงินทุนส่วนใหญ่ของสภาวิจัยแห่งชาติ ค่าใช้จ่ายบางส่วนได้รับจากเงินทุนของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย พิษงูแมวเซาและหนูทดลองได้รับเป็นอภินันทนาการจาก แพทย์หญิง คุณหญิงศรีประไพ ผองอักษร ผู้อำนวยการสถานเสาวภา สภากาชาดไทย สถานที่แยกพิษงูใช้ห้องเย็นของแผนกวิชาพยาธิวิทยา จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย ผู้เขียนขอขอบคุณสภาวิจัยแห่งชาติ สถานเสาวภา สภากาชาด-ไทย บัณฑิตวิทยาลัยจุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย และแผนกวิชาพยาธิวิทยา จุฬาลงกรณมหา-วิทยาลัย เป็นอย่างยิ่ง.

สารบาญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ
คำขอบคุณ..... ฉ
สารบาญ..... ฌ
รายการตารางประกอบ..... ฑ
รายการภาพประกอบ..... ฒ
บทนำ..... ๑
วิธีทำการทดลอง..... ๑๙
วัสดุและเคมีภัณฑ์..... ๑๙
เครื่องมือ..... ๑๙
การแยกพิษงูแมวเซาโดยเซลลูโลสคอลัมน์..... ๒๐
การเตรียมคอลัมน์..... ๒๐
การเตรียมพิษงู..... ๒๑
การทำกอลัมน์โครมาโตกราฟี..... ๒๑
การวัด optical density ๒๓
การหาปริมาณโปรตีน..... ๒๓
การเก็บพิษงู..... ๒๔
การวัดความเป็นพิษของพิษงู..... ๒๔
การวัดมีเดียนลีธัลโดส..... ๒๔
การหาความเป็นพิษรวม..... ๒๕

หน้า

การวัด activity ของเอนไซม์..... ๒๖

การวัด activity ของนอนสเปซิฟิคอัลคาไลน์โมโนฟอสฟาเทส ๒๖

การวัด activity ของ5'- นิวคลีโอไทเคส..... ๒๗

การวัด activity ของ เอกโซนิวคลีเอส..... ๒๘

การวัด activity ของ คีออกซีไรโบนิวคลีเอส..... ๒๘

การวัด activity ของ ฟอสโฟไลเปส เอ..... ๒๙

การวัด activity ของ ฟอสโฟไลเปส บี..... ๓๐

การวัด activity ของ อะมีโนแอซิด เอสเทอเรส..... ๓๐

การวัด activity ของ เปปไทเคส..... ๓๑

การวัด activity ของ โปรตีเนส..... ๓๒

การวัด activity ของ อะมิโนแอซิดออกซิเคส..... ๓๒

การวัด activity ของ ไฮยาลูโรไนเคส..... ๓๓

การวัด activity ของการชวยให้เลือดแข็งตัว..... ๓๔

ผลการทดลอง..... ๓๖

การแยกพิษงูแมวเซาโดยเซลลูโลส คอลัมน์..... ๓๘

การวัดความเป็นพิษ..... ๓๙

การวัด activity ของ นอนสเปซิฟิคอัลคาไลน์โมโนฟอสฟาเทส. ๘๑

การวัด activity ของ 5'- นิวคลีโอไทเคส..... ๘๓

การวัด activity ของ เอกโซนิวคลีเอส..... ๔๖

การวัด activity ของ คีออกซีไรโบนิวคลีเอส..... ๔๘

การวัด activity ของ ฟอสโฟไลเปส เอ..... ๕๐

การวัด activity ของ ฟอสโฟไลเปส บี..... ๕๒

การวัด activity ของ อะมีโนแอซิด เอสเทอเรส..... ๕๔

หน้า

การวัด activity ของ เปปไทเคส..... ๕๖
การวัด activity ของ โปรตีเนส..... ๕๙
การวัด activity ของ อะมิโนแกซิดออกซิเคส..... ๖๑
การวัด activity ของ ไฮยาลูโรไนเคส..... ๖๓
การวัด activity ของการช่วยให้เลือดแข็งตัว..... ๖๕

การวิจารณ์แผลการทดลอง..... ๗๐

ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ..... ๗๒

เอกสารอ้างอิง..... ๘๔

ภาคผนวก..... ๙๖

ประวัติการศึกษา..... ๑๐๐

รายการตารางประกอบ

ตารางที่ หน้า

๑ ปริมาณโปรตีน ซึ่งคำนวณจากค่า OD_{280} ของพิษงูแต่ละส่วนที่แยกโดยเซลลูโลสคอลัมน์..... ๗๘

๒ ความเป็นพิษของพิษงูแต่ละส่วนที่แยกได้และพิษงูที่ยังไม่แยก.. ๘๐

๓ activity ของ นอนสเปซิฟิกอัลคาไลน์โมโนฟอสฟาเทส.. ๘๒

๔ activity ของ 5'- นิวคลีโอไทเคส..... ๘๔

๕ activity ของ เอกโซนิวคลีเอส..... ๘๗

๖ activity ของ ดีออกซีไรโบนิวคลีเอส..... ๘๙

๗ activity ของ ฟอสโฟไลเปส เอ..... ๙๑

๘ activity ของ ฟอสโฟไลเปส บี..... ๙๓

๙ activity ของ อะมิโนแอซิด เอสเทอเรส..... ๙๕

๑๐ activity ของ โปรตีเนส..... ๖๐

๑๒ activity ของ อะมิโนแอซิดออกซิเดส..... ๖๒

๑๓ activity ของ ไฮยาลูโรไนเดส..... ๖๔

๑๔ activity ของ การช่วยให้เลือดแข็งตัว..... ๖๖

๑๕ เปรียบเทียบปริมาณและคุณสมบัติของพิษงูแต่ละส่วนที่แยกได้ คิดเป็นหน่วยของ activity ต่อน้ำหนักของพิษงู..... ๖๘

๑๖ เปรียบเทียบ recovery ของคุณสมบัติต่าง ๆ..... ๖๙

รายการรูปประกอบ

รูปที่		หน้า
๑	รูปงูแมวเซาของประเทศไทย.....	๙
๒	กลไกการช่วยให้เลือดแข็งตัวของพิษงูแมวเซา.....	๑๔
๓	ผลการแยกพิษงูด้วย DEAE-cellulose คอลัมน์.....	๓๗
๔	กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณฟอสเฟต.....	๔๔
๕	กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณ β -naphthylamine.....	๕๘
๖	กราฟมาตรฐานสำหรับคำนวณหา activity การช่วยให้เลือดแข็งตัว.....	๖๗