๔. การวิจารณ์ผลการทดลอง

Chromatographic pattern ที่ได้จากการแยกพิษงูแมวเซาด้วย DEAE-cellulose คอลัมน์ และแยกพิษงูออกได้ ๖ ส่วน ตามรูปที่ ๓ นั้น กล้ายกับ pattern ที่ได้จากการแยกพิษงูแมวเซา โดยวิธีเดียวกันของ Williams and Esnouf (1962) และสัณห์ (๒๕๑๐) ต่างกันเพียง variation ส่วนน้อย โดย สัณห์แยกพิษงูได้ ๗ ส่วน และ Williams and Esnouf แยกพิษงูออกได้ ๕ ส่วน variation ที่ต่างออกไปจาก pattern ที่ได้ของการทดลองนี้ คือ สัณห์ แยก trailing ท้ายพิษงูส่วนที่III ออกเป็นอีกส่วนหนึ่งต่างหาก จึงแยกได้ ๗ ส่วน และ Williams and Esnouf แยกพิษงูส่วนที่ I ออกเป็น ๒ ส่วน แยก trailing ท้ายพิษงูส่วนที่ III ออกเป็นส่วนหนึ่งต่างหาก กับแยก plateau ระหว่างส่วนที่ V และVI ออกเป็นอีกส่วนหนึ่ง รวมเป็นแยกพิษงูได้ทั้งหมด ๙ ส่วน การที่แยกพิษงูแมวเซาได้ต่างกัน อาจเป็นเพราะว่า พิษงูแมวเซาที่ต่าง subspecies กัน อาจมีส่วนประกอบบางอย่างต่างกันออกไป (Zeller, 1948) หรืออาจจะเป็นไปได้ว่า แม้พิษงูแมวเซา batch เดียวกัน เมื่อแยกโดยใช้ DEAE-cellulose คนละชนิด วิธีการบรรจุคอลัมน์แตกต่างกัน ปริมาณพิษงูที่ใช้ต่างกัน หรือขนาดของคอลัมน์แตกต่างกัน ซึ่งสิ่งต่าง ๆ ที่กล่าวมาข้างต้นนี้ อาจเป็นสาเหตุให้ผลการแยกพิษงูต่างกันได้ทั้งสิ้น ซึ่งการแยกพิษงูแมวเซาที่ต่าง subspecies กัน โดยใช้คอลัมน์อันเดียวกัน ปริมาณพิษงูเท่ากัน และวิธีการแยกอันเดียวกัน อาจจะทำให้ทราบถึงสาเหตุที่ทำให้ผลการแยกต่างกันนี้ Dimitrov and Kankonkar (1968 b) พบว่า แม้แยกพิษงูแมวเซาด้วยคอลัมน์เดียวกัน ถ้าปริมาณพิษงูที่ใช้แยกต่างกัน จะทำให้ chromatographic pattern บางส่วนต่างกันออกไป อย่างไรก็ดี การแยกพิษงูแมวเซาด้วย DEAE-cellulolose คอลัมน์ก็นับว่าเป็นวิธีดีวิธีหนึ่งสำหรับแยกส่วนประกอบของพิษงูแมวเซา ออกเป็นหลายส่วน ซึ่งมีความเป็นพิษ และ activity ของเอนไซม์ต่างกันออกไป โดยเฉพาะอย่างยิ่ง สามารถแยกส่วนประกอบที่ช่วยการแข็งตัวของเลือด

ไปอยู่ในพิษงูส่วนที่ V (โปรดดูตารางที่ ๑๔) ซึ่งตรงกับส่วนที่ VII ของ Williams and Esnouf (1962) และส่วนที่ VI ของสัณห์ (๒๕๑๐) activity ของเอนไซม์บางชนิดในพิษงูส่วนต่าง ๆ ที่แยกได้คล้ายกัน เช่น สามารถแยกเอกโซ-นิวคลีเอส ของพิษงูออกเป็น ๒ ส่วนใหญ่ ๆ คือ ส่วนที่ II และ VI ของ Williams and Esnouf (1962) ซึ่งตรงกับส่วนที่ I และ V ของสัณห์ และส่วนที่ I และ IV ของการทดลองนี้

การศึกษาความเป็นพิษของพิษงูที่แยกได้ โดยทั่ว ๆ ไปมักจะพิจารณาจากค่า มีเดียนลีธัลโดส (LD_{50}) คือ พิจารณาเพียงว่า พิษงูส่วนใดที่มีค่า LD_{50} ต่ำ จะมีค่าความเป็นพิษสูง และ ถือว่าพิษงูส่วนที่มีค่าความเป็นพิษสูงนั้น เป็นส่วนที่เป็นพิษร้ายแรงที่สุดของพิษงู แต่ผลการทดลองที่ได้จากการแยกพิษงูแมวเซา ตามตารางที่ ๒ นั้น จะเห็นได้ว่าพิษงูแต่ละส่วนมีปริมาณแตกต่างกันมาก พิษงูส่วนที่มีความเป็นพิษสูงสุด คือ ส่วนที่II มีปริมาณน้อยกว่าส่วนอื่น ๆ ตรงข้ามกับพิษงูส่วนที่V และIV มีปริมาณมากกว่าพิษงูส่วนอื่น ๆ การจะพิจารณาว่าพิษงูที่แยกได้ ส่วนใดส่วนหนึ่งเป็นส่วนที่เป็นพิษร้ายแรงของพิษงู โดยอาศัยหลักว่า พิษงูส่วนนั้น มีค่าความเป็นพิษสูง อาจถูกต้องเพียงบางส่วนเท่านั้น เพราะความเป็นพิษของพิษงูอาจเกิดจากองค์ประกอบบางชนิดที่มีค่าความเป็นพิษต่ำ แต่การที่สารนั้นมีปริมาณมากมายในพิษงูเมื่อเทียบกับองค์ประกอบอื่น ๆ ก็อาจทำให้ส่วนประกอบที่กล่าวถึงนี้ เป็นส่วนที่เป็นพิษร้ายแรงของพิษงูได้ ดังนั้น การศึกษาความเป็นพิษของพิษงูแต่ละส่วนที่แยกได้ในการทดลองนี้ จึงได้นำการวัดจำนวน LD_{50} ของพิษงูแต่ละส่วนที่แยกได้ ของ Kochwa et al (1960)มาใช้คำนวณความเป็นพิษรวมของพิษงูส่วนต่าง ๆ ซึ่งผลตามตารางที่ ๒ จะเห็นได้ว่า ส่วนประกอบที่เป็นพิษร้ายแรงของพิษงูส่วนต่าง ๆ ที่แยกได้ คือ ส่วนที่ IV และ V แม้ว่า ความเป็นพิษของพิษงูทั้ง ๒ ส่วนนี้ ต่างก็มีค่าต่ำกว่าพิษงูส่วนที่ II ก็ตาม ข้อที่น่าสังเกตในการวัดความเป็นพิษก็คือ การวัดความเป็นพิษของพิษงูในสัตว์พวก หนู กระต่าย นก หรือแกะ ค่าที่ได้มักแตกต่างกันทุกการทดลอง ทั้งนี้ เนื่องจากการใช้สัตว์ทดลองกลุ่มละไม่กี่ตัว เช่น การทดลองนี้ใช้หนูทดลองกลุ่มละ ๕ ตัว ซึ่งนับว่าน้อย ควรใช้สัตว์ทดลอง

กลุ่มใหญ่กว่านี้ เช่น ๑๕–๒๕ ตัว เป็นต้น ซึ่งการหาสัตว์ที่อยู่ในสภาพเดียวกัน และมีน้ำหนักใกล้เคียงกัน เป็นเรื่องยุ่งยากพอควร และค่าความเป็นพิษ หรือ LD_{50} ของพิษงูแต่ละส่วนที่แยกได้ ของแต่ละการทดลอง เป็นสิ่งที่เทียบกันไม่ได้ เพราะสัตว์ทดลองที่เรา control ให้อยู่ในสภาพต่างกัน จะมีอำนาจต้านทานต่อพิษงูไม่เหมือนกัน

สิ่งหนึ่งที่ควรจะกล่าวถึงในการแยกพิษงูโดยวิธีนี้ก็คือ การละลายของพิษงูแมวเซาในทริสฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เพราะพิษงูที่ใช้แยกเริ่มต้นของการทดลองนี้ ใช้ละลายในทริสฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH ๘.๕ แล้วทิ้งพิษงูส่วนที่ไม่ละลายโดยการนำไปเซนตริฟิวจ์ ซึ่งผลที่ได้ของการทดลองนี้ รวมทั้งการทดลองของ Williams and Esnouf (1962) และสัณห์ (๒๕๑๐) ก็คือ พิษงูส่วนหนึ่งไม่ละลาย แต่เมื่อนำพิษงูไปละลายใน ๐.๑๕ M โซเดียมคลอไรด์ เพื่อใช้ในการศึกษา activity ต่าง ๆ นั้น ปรากฏว่าพิษงูละลายใน ๐.๑๕ M โซเดียมคลอไรด์ได้ดีกว่าใน ทริสบัฟเฟอร์มาก ตะกอนพิษงูส่วนที่ไม่ละลายและทิ้งไป อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับความเป็นพิษและส่วนประกอบต่าง ๆ ของพิษงูแมวเซาบ้างไม่มากก็น้อย Kochalaty and Ashley (1966) ได้ศึกษาการละลายของพิษงูแมวเซาใน ทริสบัฟเฟอร์ พบว่า พิษงูแมวเซาละลายใน ทริสบัฟเฟอร์ pH ต่ำ ได้มากกว่า ทริสบัฟเฟอร์ pH สูง และละลายในน้ำได้ดีกว่าในทริสบัฟเฟอร์ ผู้เขียนเห็นว่า ถ้าจะมีการทดลองแยกพิษงูแมวเซาโดยใช้ DEAE-cellulose และใช้ทริสฟอสเฟต เป็น eluant ตามวิธีการแยกของ Williams and Esnouf (1962) นี้ ควรจะได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการละลายของพิษงูแมวเซาในทริสบัฟเฟอร์ให้ละเอียดเสียก่อนว่า พิษงูแมวเซาละลายในทริสบัฟเฟอร์ที่ pH ใดมากที่สุด แล้วจึงใช้บัฟเฟอร์นี้ละลายพิษงูที่ใช้สำหรับแยก หรืออาจทดลองโดยใช้ eluant อื่น เช่น แอซิเตต บัฟเฟอร์ pH ต่าง ๆ กัน หรือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เป็นต้น ซึ่งการแยกพิษงูโดยใช้ eluant ต่าง ๆ กันอาจทำให้สามารถแยกส่วนประกอบบางส่วนของพิษงูออกต่างหากจากส่วนประกอบอื่น ๆ ได้ ต่างไปจากการ elute ด้วย ทริสบัฟเฟอร์ ของการทดลองวิธีนี้

ผลของการศึกษาความเป็นพิษของพิษงูและส่วนที่แยกได้ ตามตารางที่ ๒ จะเห็นได้ว่า พิษงูส่วนที่ II มีความเป็นพิษสูงสุด รองลงมาคือส่วนที่ IV ซึ่งต่างออกไปจากการทดลองของสัณห์ (๒๕๑๐) คือ พิษงูส่วนที่ IV (ตรงกับส่วนที่ V ของสัณห์) มีความเป็นพิษสูงสุด และส่วนที่ III (ตรงกับส่วนที่ III และ IV ของสัณห์) ไม่มีพิษ ซึ่งสัณห์ (๒๕๑๐) ก็ได้ให้ข้อสังเกตว่า พิษงูส่วนที่ I และ II แยกจากกันเพียงบางส่วนเท่านั้น และ activity ของเอนไซม์ต่าง ๆ ที่พบในพิษงูส่วนที่ II ก็ไม่สูงพอที่จะทำให้เป็นพิษ เมื่อเทียบกับ activity ของเอนไซม์นั้น ๆ ในพิษงูส่วนอื่น ๆ ที่แยกได้ ทำให้สัณห์เสนอว่า ความเป็นพิษของพิษงูส่วนที่ II นาจะเกิดจากสารบางอย่างที่ยังไม่ได้ศึกษาในการทดลองนั้น สำหรับผลการแยกพิษงูของการทดลองนี้ พิษงูส่วนที่ I และ II แยกออกจากกันเป็นส่วนมาก ความแตกต่างของความเป็นพิษของพิษงูส่วนที่ II ของผลการทดลองนี้ และสัณห์ คงเนื่องจากการกลบเกลื่อนระหว่างพิษงูส่วนที่ I และที่ II ของทั้งสองการทดลอง สำหรับการทดลองนี้ ได้เคยแยกพิษงูแมวเซาโดยใช้อัตราการไหลสูงกว่านี้ คือ ประมาณ ๑๐๐ มล./ชม. พบว่า ส่วนกลบเกลื่อนของพิษงูที่แยกได้ ส่วนที่ I และ II มีน้อยลง แสดงว่าส่วนกลบเกลื่อนบางส่วนของพิษงูทั้งสองส่วนนี้เป็นผลจากการแพร่ (diffusion) ผู้เขียนมีความเห็นว่า การแยกพิษงูที่ใช้ในการทดลองนี้ ถ้าใช้อัตราไหลสูงขึ้น คือ ประมาณ ๑๒๐ มล./ชม. อาจทำให้พิษงูส่วนที่ I และ II ของการทดลองนี้ แยกจากกันได้มากกว่านี้ เพราะการทดลองนี้ใช้อัตราการไหลเพียง ๗๕ มล./ชม. เท่านั้น และการที่พิษงูส่วนที่ III ของการทดลองนี้เป็นพิษ พิษงูส่วนที่ III และ IV ของสัณห์ (ตรงกับส่วนที่ III ของการทดลองนี้) ไม่เป็นพิษ อาจเป็นเพราะว่า สัณห์ ต้องแบ่งพิษงูส่วนที่ III นี้ออกเป็น ๒ ส่วน (คือ ส่วนที่ III และ IV) ซึ่งเมื่อนำไปวัดความเป็นพิษกับหนู พิษงูทั้งสองส่วนนี้ อาจมีความเข้มข้นน้อยจนไม่เพียงพอจะทำให้หนูตาย หรือเกิดจากส่วนประกอบบางชนิดของพิษงูแมวเซาในพิษงูส่วนที่แยกได้นี้แตกต่างกันก็อาจเป็นไปได้

ผลจากการศึกษาความเป็นพิษ ของพิษงูแต่ละส่วนที่แยกได้ตามตารางที่ ๒ จะเห็นได้ว่า ความเป็นพิษของพิษงูส่วนต่าง ๆ เหล่านั้น มีค่าต่ำกว่าพิษงูเดิมที่ยังไม่แยกทั้งสิ้น และความเป็นพิษรวมของพิษงูทุกส่วนที่แยกได้รวมกันแล้วมีค่าเพียง ๒๑.๑ % ของความเป็นพิษทั้งหมดของพิษงูที่ใช้แยก ซึ่งเหมือนกับผลการทดลอง แยกพิษงูวิธีเดียวกันของสัณห์ (๒๕๑๐) หรือความเป็นพิษที่วัดจากการแยกพิษงูโดยวิธีอื่น ๆ เช่น อีเลก-โตรฟอรีซีส (Master and Rao, 1951) และเจลฟิลเตรชั่น (Dimitrov and Kankonkar; 1968 a and b) ซึ่งยังไม่มีผู้ใดสามารถจะอธิบายได้ว่า เพราะเหตุใดความเป็นพิษของพิษงูที่แยกได้จึงสูญหายไปมากเช่นนี้ จนกว่าจะได้มีการศึกษาลึกลงไปให้ละเอียด อาจเป็นไปได้ว่า ส่วนประกอบที่เป็นพิษบางส่วนเป็นสารไดอะไลส์ได้ ซึ่ง Dimitrov and Kankonkar (1968 b) ได้แยกพิษงูแมวเซาโดยใช้วิธีเจลฟิลเตรชั่น ปรากฏว่า พิษงูส่วนหนึ่งที่แยกได้ (ส่วนที่ V) เป็นส่วนที่ไดอะ-ไลส์ได้ และความเป็นพิษของพิษงูส่วนอื่นอีก ๔ ส่วน หลังจากนำไปไดอะไลส์แล้ว มีความเป็นพิษต่ำกว่าพิษงูที่ยังไม่แยกมาก และพิษงูส่วนที่ไดอะไลส์ได้นี้ มีอัตราส่วนของ OD_{260}/OD_{280} มากกว่า ๑ แสดงว่า พิษงูส่วนนี้มีส่วนประกอบของนิวคลีโอ-ไซด์หรือนิวคลีโอไทด์สูง ผู้เขียนเห็นว่า ในการแยกพิษงูแมวเซาของการทดลองนี้ สิ่งหนึ่งที่ควรจะศึกษาก็อ การวัดทั้ง OD_{280} และ OD_{260} ของพิษงูที่แยกได้ทุกหลอด รวมทั้งของพิษงูแต่ละส่วนที่แยกได้ ภายหลังนำไปไดอะไลส์แล้ว ซึ่งเป็นวิธีง่ายที่สุดที่เราจะตรวจสมบัติของพิษงูแต่ละส่วนที่แยกได้ รวมทั้งจะได้ทราบว่า พิษงูส่วนใดเป็นส่วนที่ไดอะไลส์ได้ และไดอะไลส์ไปเท่าใด การที่ความเป็นพิษของพิษงูที่แยกได้จำ-นวนมากสูญหายไป อาจเกิดจากสาเหตุอื่น เช่น ส่วนประกอบเป็นพิษบางส่วนเป็นสาร thermolabile หรือส่วนประกอบเป็นพิษ บางส่วนยังคงค้างอยู่ในคอลัมน์ไม่ถูก elute ออกมา หรือส่วนประกอบที่เป็นพิษ อาจจะเป็นส่วนที่เราไม่ได้นำมาศึกษา เพราะส่วนประกอบนี้มีปริมาณน้อยมาก และไม่ตรงกับ peak ของโปรตีน ซึ่งได้จากการวัดค่า OD_{280} ของ effluent หรือส่วนที่เป็นพิษของพิษงู เกิดจากการรวมของส่วนสำคัญ ๒ ส่วน คือ ส่วนที่เป็นพิษ กับ activator หรือ cofactor

ซึ่งผลการรวมจะทำให้ความเป็นพิษสูงขึ้น และการแยกพิษงูโดยวิธีนี้เป็นการแยก cofactor หรือ activator ออกไปอยู่ในพิษงูส่วนหนึ่งต่างหาก หรือการไดอะไลส์ พิษงู เป็นการแยก cofactor หรือ activator ซึ่งเป็นสารที่ไดอะไลส์ไดออกไป หรือส่วนที่เป็นพิษของพิษงู เป็นผลจากกริยาของสารที่มีพิษน้อยตั้งแต่ ๒ ชนิดขึ้นไป และ synergistic action ของ สารที่เป็นพิษน้อยเหล่านั้น จะทำให้ความเป็นพิษสูงกว่าเดิมมาก หรืออาจมีสาเหตุอื่น ๆ อีก ซึ่งไม่ได้กล่าวไว้ในที่นี้ และการศึกษาให้ละเอียดครอบคลุมปัญหาต่าง ๆ ข้างบนนี้ เพื่อที่จะทราบถึงสาเหตุที่ทำให้ความเป็นพิษของพิษงูที่แยกไดสูญหายไป อาจต้องใช้เวลานาน และต้องศึกษาหลายด้าน เช่น ศึกษาให้ละเอียดถึงความเป็นพิษของพิษงูก่อนและหลังไดอะไลส์ ศึกษาความเป็นพิษของน้ำที่ใช้ไดอะไลส์พิษงู หลังจากไดอะไลส์พิษงูแล้ว หรือศึกษาสมบัติต่าง ๆ ของ diffusate ในพิษงูว่า อาจจะเป็น cofactor หรือ activator ของพิษงูส่วนที่นำไปไดอะไลส์แล้วหรือไม่ หรือศึกษาความเป็นพิษของพิษงูที่ได้จากการแยกโดยรวม effluent ที่ได้ทุกหลอดเทียบกับความเป็นพิษของพิษงูรวมก่อนแยก และความเป็นพิษของพิษงูรวมก่อนแยก แต่นำไปไดอะไลส์แล้ว เป็นต้น

วิธีที่ใช้กันมากในการศึกษาถึงสาเหตุของการที่ความเป็นพิษของพิษงูแมวเซาที่แยกได้สูญหายไปคือ การพยายามรวมพิษงูบางส่วนที่แยกได้เข้าด้วยกันอีกครั้งหนึ่ง โดยใช้อัตราส่วนของส่วนประกอบต่าง ๆ ของพิษงูที่แยกได้ ตามอัตราส่วนของส่วนประกอบที่แยกได้จากการทดลองนั้น (Master and Rao, 1961) หรือ โดยการพยายามหาอัตราส่วนที่เหมาะสม (Dimitrov and Kankonkar, 1968 a and b) ของส่วนประกอบบางส่วน และพบว่าความเป็นพิษของพิษงูที่นำมารวมกันมีค่าสูงกว่าความเป็นพิษของพิษงูเดิมส่วนต่าง ๆ ที่แยกได้เล็กน้อย ไม่ได้เป็นข้อยืนยันว่า จะเป็นการรวม cofactor หรือ activator เข้ากับส่วนประกอบที่เป็นพิษ หรือไม่เป็นข้อแสดงว่าเอนไซม์อันหนึ่งอันใดของพิษงูบางส่วน มี synergistic action กับเอนไซม์อื่นของพิษงูอีกส่วนหนึ่ง เพราะทราบกันดีจากผลงานของ Master and Rao (1965)

แล้วว่า พิษงูแมวเซาเมีส่วนประกอบที่เป็นพิษกับกระต่ายที่ทดลองถึง ๑๒–๑๓ ชนิด และเป็นที่ทราบกันทั่วไปว่า พิษงูแสดงผลหลายด้านต่อสัตว์ทดลอง การวัดความเป็นพิษจากการตายของสัตว์ทดลองเป็นผล in vivo ซึ่งความเป็นพิษที่เกิดขึ้นอาจจะไม่ใช่ผลบวกของความเป็นพิษขององค์ประกอบแต่ละส่วนที่เป็นพิษ กล่าวอีกนัยหนึ่งก็คือ ค่าความเป็นพิษรวมของพิษงูที่แยกได้ ซึ่งได้จากการรวมค่าความเป็นพิษของพิษงูแต่ละส่วนที่แยกได้ อาจเป็นค่าที่ไม่ถูกต้อง และยังไม่เคยมีผู้ใดหาความสัมพันธ์ระหว่างความเป็นพิษรวมกับความเป็นพิษขององค์ประกอบที่เป็นพิษย่อย ๆ แต่ละส่วนเหล่านั้น

ผลจากการศึกษา activity ของเอนไซม์ในพิษงูแต่ละส่วน พบว่า activity ของเอนไซม์บางชนิดมีค่าสูงในพิษงูหลายส่วน เช่น activity ของเอกโซนิวกลีเอส มีค่าสูงในพิษงูส่วนที่ I,III และ IV (ตามตารางที่ ๕) หรือนอนสเปซิฟิก อัลคาไลน์ ไมโนโมโนเอสเทส มีอยู่ในพิษงูหลายส่วน (ตามตารางที่ ๓) มิได้หมายความว่า DEAE-cellulose คอลัมน์ ไม่มีผลในการแยกเอนไซม์นี้ หรือพิษงูมี isoenzyme หลายชนิด Boman and Kaletta (1957) ได้แยกพิษงู rattle ด้วย DEAE-cellulose คอลัมน์ได้ เอกโซนิวกลีเอส ๓ ชนิด แต่เมื่อแยกพิษงูชนิดเดียวกัน โดยนำพิษงูที่จะใช้แยกนั้น ไปแช่แข็งทันที หลังจากที่รีดออกมา จากต่อมพิษของงู ปรากฏว่าได้เอกโซนิวกลีเอส ชนิดเดียว ทำให้ Boman and Kaletta เสนอว่า เอกโซนิวกลีเอส มี ๓ ชนิด เนื่องจากการกระทำของโปรตีเนสในพิษงูนั้น และ Dimitrov (1971) ศึกษา activity ของเอนไซม์บางชนิดในพิษงูแมวเซาส่วนต่าง ๆ ที่แยกได้ พบว่า activity ของเอนไซม์นั้น ๆ ในพิษงูแต่ละส่วนที่แยกได้ มีค่าเป็นอัตรากงที่ และการที่ Dimitrov พบว่า activity ของโปรตีเนสในพิษงูแมวเซามีค่าต่ำมาก ทำให้เขาเสนอว่า เอนไซม์ของพิษงูแมวเซา อาจจะรวมเป็น complex กับโปรตีน น้ำหนักโมเลกุลมาก บางชนิด ซึ่งอาจจะเป็น monomer dimer trimer หรือ polymer ของเอนไซม์กับโปรตีนในพิษงู

การพิจารณาค่า total recovery ของ activity ของเอนไซม์หรือคุณสมบัติอื่น ๆ ของพิษงู โดยทั่ว ๆ ไป ค่าที่ได้ควรจะน้อยกว่า activity ของพิษงูที่ใช้แยก ตามตารางที่ ๑๖ จะเห็นได้ว่า activity ของเอนไซม์หลายชนิดเป็นไปตามที่กล่าวนี้คือ อะมิโนแอซิด เอสเทอเรส เอกไซนิวคลีเอส ดีออกซีไรโบนิวคลีเอส เป็นต้น แต่มีข้อยกเว้น เช่น recovery ของ 5'- นิวคลีโอไทเดส สูงถึง ๔๗๒.๔% ฟอสโฟไดเปส บี ๑๘๖.๘% และ activity ของการช่วยให้เลือดแข็งตัว ๒๓๘.๕% ของ activity รวมของพิษงูที่ใช้แยก ปรากฏการณ์เช่นนี้ อาจพบได้ในการศึกษาเอนไซม์ของพิษงู (Mohammed, Kamel and Ayobe, 1969) ซึ่งอาจเป็นเพราะว่า พิษงูมี inhibitor บางชนิด ซึ่งถูกกำจัดออกโดยการไดอะไลส์ หรือถูกกำจัดออกโดยวิธีทางโครมาโตกราฟี หรือเอนไซม์บางชนิดของพิษงู เมื่อแยกส่วนประกอบบางส่วนออกไป คือ อยู่เป็นเอนไซม์บริสุทธิ์ ทำให้เอนไซม์นั้น stable กว่าพิษงูเดิมที่ยังไม่แยก หรืออาจเป็นเพราะสภาพของการวัด activity ของเอนไซม์นั้น ๆ เป็น optimum condition ของเอนไซม์ในพิษงูส่วนต่าง ๆ ที่แยกได้ แต่ไม่ใช่ optimum condition ของเอนไซม์ของพิษงูที่ยังไม่แยก Bjork (1964) พบว่า optimum pH เอนไซม์ในพิษงู กับเอนไซม์ชนิดเดียวกันนี้ แต่แยกออกมาจากพิษงูแล้ว มีค่าต่างกัน Williams and Esnouf (1962) ได้วัด activity ของการช่วยให้เลือดแข็งตัวของพิษงูแมวเซาที่แยกโดยใช้ DEAE-cellulose คอลัมน์ พบว่า พิษงูส่วนหนึ่งมี recovery เกือบ ๑ ใน ๒ ของปริมาณพิษงูที่ใช้แยก และ activity ของพิษงูส่วนนี้สูงถึง ๑๒ เท่าของพิษงูที่ยังไม่แยก แสดงว่า recovery ของ activity ในการช่วยให้เลือดแข็งตัวมีมากกว่า ๕๐๐% ซึ่งทำให้ Williams and Esnouf เสนอว่า activity ของการช่วยให้เลือดแข็งตัวของพิษงูแมวเซา เป็นผลรวมของการกระทำของสารช่วยการแข็งตัวและสารต้านการแข็งตัว ซึ่งสารทั้ง ๒ นี้มีอยู่ในพิษงูแมวเซา และการที่ recovery ของการช่วยให้เลือดแข็งตัวมีค่ามากกว่า ๕๐๐% นี้ เป็นผลของการกำจัดสารต้านการแข็งตัวออกไปจากพิษงู ส่วนต่าง ๆ ที่แยกได้ Hartel (1963)

ก็สนับสนุนข้อเสนอของ Williams and Esnouf เขากล่าวว่า พิษงูแมวเซามีสาร ต้านการแข็งตัวอย่างน้อยก็ ๒ ชนิด ชนิดหนึ่งไป inactivate ธรอมโบปลาสติน และอีกชนิดหนึ่งไป inactivate แฟคเตอร์ซึ่งจำเป็นในการแข็งตัวของเลือดและ แฟคเตอร์นี้อยู่ในปลาสมา อาจจะเป็น แฟคเตอร์ V ก็ได้ และ Denson (1969) ก็ได้สรุปว่า สารต้านการแข็งตัวของเลือดชนิดหนึ่งในพิษงูคือ ฟอสโฟไลเปส เอ สำหรับการที่ผลการทดลองนี้ได้ค่า recovery ของ activity ในการช่วยให้ เลือดแข็งตัว ๒๓๘.๕% ในขณะที่ recovery ของ อะมิโนแอซิด เอสเทอเรส ๗๘.๑% และ recovery ของฟอสโฟไลเปส เอ มีเพียง ๒๘.๒% อาจอธิบายได้ โดยใช้ข้อเสนอของ Williams and Esnouf และ Denson คือ recovery ของสารต้านการแข็งตัวของเลือดลดลง แต่ recovery ของสารช่วยการแข็งตัว ของเลือดไม่ลดลงเมื่อเทียบกัน เป็นผลให้ recovery ของสารช่วยการแข็งตัว ของเลือดมีค่าสูงกว่า ๑๐๐% ซึ่งเป็นการสนับสนุนข้อเสนอของ Denson

สำหรับการศึกษาเอนไซม์ในการทดลองนี้ ควรจะเรียกว่าเป็นขั้นเตรียม การเพื่อจะเริ่มศึกษาเท่านั้น คือ เพียงแต่วัด activity ของเอนไซม์ต่าง ๆ ที่ เข้าใจว่ามีในพิษงูแมวเซา และ activity นั้น ๆ ไปอยู่ในพิษงูส่วนใดที่แยกได้ โดยวัด activity ของเอนไซม์ที่ pH ต่าง ๆ ตามที่ผู้เคยทดลองไว้ หรือมีผู้ รายงานว่า ที่ pH นั้น ๆ เป็น pH-optimum ของเอนไซม์ในพิษงู เช่น วัด activity ของโปรตีเนส ที่ pH ๗.๐ (Ghosh and De, 1936) ซึ่งเป็น pH-optimum ของโปรตีเนสของพิษงูแมวเซา แต่บางคนอาจจะพบ pH-optimum ของโปรตีเนสในพิษงูแมวเซา ต่างออกไปจากค่านี้ เช่น Shanta and Rao (1957) พบว่า โปรตีเนสของพิษงูแมวเซา มี pH-optimum ๒ ค่า คือ pH ๙.๐ และ ๓.๖ เป็นต้น ซึ่งการศึกษาเอนไซม์ที่ควรจะกระทำในขั้นต่อไปก็คือ ควรศึกษาสมบัติ ของเอนไซม์ ในพิษงูบางส่วนที่แยกได้ และมี activity ของเอนไซม์นั้น ๆ สูง เช่น อะมิโนแอซิดเอสเทอเรส ของพิษงูส่วนที่ V เอกโซนิวคลีเอส ของพิษงูส่วนที่ I และ IV หรือ 5'- นิวคลีโอไทเดส ของส่วนที่ V, I และ VI เป็นต้น

หรืออาจจะใช้พิษงูส่วนต่าง ๆ ที่แยกได้ในการทดลองนี้ เป็นสารเริ่มต้น เพื่อเตรียมเอนไซม์บริสุทธิ์จากพิษงู โดยใช้วิธีทางโครมาโทกราฟี เช่น เจลฟิลเตรชัน หรือยิเลกโตรฟอรีซิส ต่อไปอีก และนำเอนไซม์บริสุทธิ์ที่แยกได้จากพิษงูนี้ไปใช้ในการศึกษาสมบัติทางเคมีต่าง ๆ หรือสมบัติในการเป็นพิษ และถ้ามีเอนไซม์มากพอ อาจศึกษาเลยไปถึงโครงสร้างของเอนไซม์ เพื่อให้เข้าใจสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์นั้น ๆ ได้ดียิ่งขึ้น

ในการพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างความเป็นพิษและเอนไซม์ในพิษงูแต่ละส่วนที่แยกได้ ตามตาราง ๒ – ๑๖ จะเห็นได้ว่า activity ของเอนไซม์บางตัวมีค่าต่ำในพิษงู ส่วนที่มีความเป็นพิษสูง และมี activity สูงในพิษงูส่วนที่มีความเป็นพิษต่ำ ซึ่งแสดงว่า เอนไซม์เหล่านี้คงไม่มีความสัมพันธ์กับความเป็นพิษของพิษงูแมวเซา เอนไซม์พวกนี้ ได้แก่ นอนสเปซิฟิก อัลคาไลน์ โมโนฟอสฟาเทส 5'-นิวคลีโอ-ไทเดส ฟอสโฟไลเปส บี เปปไทเดส โปรตีเนส อะมิโนแอซิดออกซิเดส และไฮยาลูโรไนเดส สำหรับพิษงูส่วนที่ III, IV และ I ซึ่งมีค่าความเป็นพิษสูงนั้น ส่วนมี activity ของเอนไซม์ ดีออกซีไรโบนิวคลีเอส ฟอสโฟไลเปส เอ และเอกโซนิวคลีเอส สูงทั้งสิ้น ถ้าความเป็นพิษของพิษงูแมวเซา มีส่วนสัมพันธ์กับ activity ของเอนไซม์ทั้งสามนี้ ความเป็นพิษของพิษงูส่วนที่ III ,IV และ I น่าจะเกิดจากผลของการทำงานร่วมกันของทั้ง ๓ เอนไซม์ ในการทำให้เกิดอาการหมดสติ (Meldrum, 1965) คือ ดีออกซีไรโบนิวคลีเอส เป็นตัวทำลาย DNA และ RNA ซึ่งเป็น natural substrate ให้กลายเป็น โปลีนิวคลีโอไทด์ เอกโซนิวคลีเอส ก็จะทำลายนิวคลีโอไทด์ ที่เกิดขึ้นนี้ให้เป็น AMP ซึ่ง AMP นี้เป็นสารลดความดันเลือด (Angelakos and Glassman, 1965) ขณะเดียวกัน เอกโซนิวคลีเอส ก็ยังช่วยเปลี่ยน ATP และ ADP ให้กลายเป็น AMP ด้วย (Razzel and Khorana, 1959) ส่วน ฟอสโฟไลเปส เอ ก็ทำลายฟอสโฟไลปิด ของเซลเมม-เบรน ปลาสมา และเฟลตเลต ทำให้เกิดไลโซเลซิธิน ขึ้น และไลโซเลซิธินก็เป็นสารลดความดันเลือดชนิดหนึ่ง (Phillips and Middleton, 1965) ความดันเลือด

ที่ลดลงเนื่องจาก AMP และ ไลโซเลซิธิน อันเป็นผลจากปฏิกริยาของเอนไซม์ทั้งสาม อาจทำให้สัตว์ที่ถูกงูแมวเซากัด เกิดอาการหมดสติและตายทันที (fatal shock) ได้

พิษงูส่วนที่ II มี activity ของเอนไซม์ต่าง ๆ ต่ำ เมื่อเทียบกับพิษงูส่วนอื่น ๆ แต่ความเป็นพิษของพิษงูส่วนนี้ มีค่าสูงสุด ดังนั้น ความเป็นพิษน่าจะเกิดจากสารบางอย่าง ซึ่งไม่ใช่เอนไซม์ที่ศึกษาในการทดลองนี้ อาจเป็นโปรตีเปปไทด์ทอกซิน บางชนิด แต่ไม่ใช่นิวโรทอกซิน เพราะ Master and Rao (1961) ได้รายงานว่า ไม่พบนิวโรทอกซิน ของพิษงูแมวเซาที่แยกโดยวิธีอีเลกโทรฟอรีซิส

พิษงูส่วนที่ V มีความเป็นพิษต่ำกว่า พิษงูทั้ง ๔ ส่วน ที่กล่าวมาข้างต้น และพิษงูส่วนนี้ ก็มี activity ในการช่วยให้เลือดแข็งตัวสูงเช่นกัน activity ของเอนไซม์อื่น ๆ ในพิษงูส่วนนี้มีค่าต่ำมาก ซึ่งเป็นการสนับสนุนผลงานของ Esnouf and Williams (1962) ที่กล่าวว่า สารช่วยการแข็งตัวของเลือดในพิษงูคือ อะมิโนแอซิดเอสเทอเรส เข้าใจว่าความเป็นพิษของพิษงูส่วนที่ V เกิดจากผลของการทำให้เลือดแข็งตัว ของอะมิโนแอซิดเอสเทอเรสนี้ นอกจากนี้ เอนไซม์นี้ยังสามารถเปลี่ยนแบรดิไคนินโนเจน ให้เป็นแบรดิไคนิน ซึ่งสารนี้ทำให้เส้นเลือดขยายตัว อาจเป็นผลให้ความดันเลือดลดลงได้ (Suzuki, 1966) มีรายงานว่า พิษงูแมวเซามีผลในการทำให้เส้นเลือดขยายตัว และมีเลือดแข็งตัวในเส้นเลือดฝอยและหลอดเลือดดำ (Tu et al, 1968)

พิษงูส่วนที่ VI มีความเป็นพิษต่ำสุด และ activity ของเอนไซม์ต่าง ๆ ในพิษงูส่วนนี้ มีค่าต่ำมาก ยกเว้น 5'-นิวคลีโอไทเดส และเปปไทเดส เข้าใจว่าความเป็นพิษของพิษงูส่วนนี้คงจะเนื่องจากโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของพิษงูส่วนนี้มากกว่าเอนไซม์ทั้งสอง

แท้จริงความสัมพันธ์ระหว่างความเป็นพิษของพิษงูที่แยกได้ทั้ง ๖ ส่วนกับ

เอนไซม์ หรือสารซึ่งไม่ใช่เอนไซม์ที่เป็นองค์ประกอบในพิษงูส่วนต่าง ๆ เหล่านั้น เป็นเพียงข้อเสนออันหนึ่งเท่านั้น ซึ่งการที่จะพิสูจน์ความสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบต่าง ๆ ของพิษงูกับความเป็นพิษ ก็คือ ต้องพยายามแยกองค์ประกอบนั้น ๆ ออกมาเป็นสารบริสุทธิ์ต่างหากจากสารอื่น แล้วก็ศึกษาสมบัติทางเภสัชขององค์ประกอบนั้น ๆ ซึ่งการศึกษาเรื่องนี้ ต้องการเวลานาน อีกวิธีหนึ่งที่ใช้ในการหาความสัมพันธ์ระหว่างความเป็นพิษกับองค์ประกอบของพิษงูก็คือ การเปรียบเทียบผลการแยกพิษงูของการทดลองคล้าย ๆ กัน เช่น Dimitrov and Kankonkar (1968 b) พบว่า พิษงูแมวเซาสีเหลืองมีโปรตีเนสสูงกว่า พิษงูแมวเซาสีขาว และพิษงูแมวเซาสีเหลืองมีสมบัติในการทำให้เกิดอาการตกเลือกได้ ทำให้ Dimitrov and Kankonkar เสนอว่า โปรตีเนสของพิษงูแมวเซา น่าจะเป็นสารที่ทำให้เกิดอาการตกเลือด เป็นต้น ถ้าจะใช้หลักนี้ เป็นการพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างเอนไซม์และความเป็นพิษของพิษงูแมวเซา โดยการเทียบผลการทดลองของสัณห์ (๒๕๑๐) และการทดลองนี้ จะเห็นได้ว่า ความแตกต่างที่เห็นชัด ก็คือ activity ของฟอสโฟไลเปส เอ ซึ่งพบมากในพิษงูส่วนที่ IV (ตรงกับส่วนที่ V ของสัณห์) แต่ผลจากการทดลองนี้ จากตารางที่ ๗ จะเห็นได้ว่า activity ของฟอสโฟไลเปส เอ กระจายอยู่ในพิษงูส่วนที่ I, II, III และ IV และความแตกต่างของความเป็นพิษในพิษงูส่วนต่าง ๆ ที่แยกได้ของทั้ง ๒ การทดลองนี้ คือ ความเป็นพิษของพิษงูส่วนที่ IV ของการทดลองนี้ ต่ำกว่าส่วนที่ IV (ตรงกับส่วนที่ V) ที่แยกได้โดยสัณห์ ส่วนความเป็นพิษของพิษงูส่วนที่มี activity ของฟอสโฟไลเปส เอ ของการทดลองนี้ มีค่าสูงกว่าพิษงูส่วนต่าง ๆ ค่าดับเดียวกับที่แยกโดยสัณห์ อาจเป็นไปได้ว่า ฟอสโฟไลเปส เอ มีส่วนสัมพันธ์อย่างใกล้ชิด กับความเป็นพิษของพิษงู และการศึกษาสมบัติต่าง ๆ ของฟอสโฟไลเปส เอ บริสุทธิ์ ซึ่งแยกจากพิษงูนี้ เท่านั้น ที่จะช่วยชี้ปัญหานี้ได้