

การศึกษาองค์ประกอบกรดอะมิโนของโปรตีนที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อ
เฉพาะบริเวณจากพิษงูเห่าไทย

ปริญญานิพนธ์
ของ
เพ็ญศรี กิตติเจริญรัตน์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ
พฤษภาคม 2543
ลิขสิทธิ์เป็นของ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การศึกษาองค์ประกอบกรดอะมิโนของโปรตีนที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อ
เฉพาะบริเวณจากพิษงูเห่าไทย

21 ส.ธ. 2543

บทคัดย่อ
ของ
เพ็ญศรี กิตติเจริญรัตน์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ
พฤษภาคม 2543

เพ็ญศรี กิตติเจริญรัตน์. (2543), การศึกษาองค์ประกอบกรดอะมิโนของโปรตีนที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณจากพิษงูเห่าไทย. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (เคมีชีวภาพ). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: ดร. สายสนม ธรรมพิทักษ์ , อ. นฤมล พักมณี , รองศาสตราจารย์ ดร. สุภาลักษณ์ ปรัชญาสิทธิกุล

พิษงูเห่าไทยประกอบด้วยโปรตีนที่มีความเป็นพิษร้ายแรงมากชนิดหนึ่งในกลุ่มโปรตีนพิษจากสัตว์ ผู้ที่ถูกงูเห่าไทยกัดมักเกิดแผลเนื้อเยื่อตายบริเวณที่ถูกกัดแม้จะรอดชีวิตโดยการฉีดยาแอนติบอดีแก้พิษแล้วก็ตาม แผลรักษายากส่วนใหญ่จะใช้วิธีตัดเนื้อเยื่อส่วนอื่นของร่างกายมาปะแทน ดังนั้นจึงน่าสนใจที่จะศึกษาสมบัติและองค์ประกอบกรดอะมิโนของโปรตีนที่ทำให้เกิดเนื้อเยื่อตาย งานวิจัยนี้แยกโปรตีนของพิษงูเห่าไทยด้วยวิธี Ion Exchange Chromatography โดยใช้ Bio - Rex 70 แยกได้ 13 ส่วน โปรตีนส่วนที่ XIII มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อสูงสุดและทำให้คลื่นไฟฟ้าหัวใจผิดปกติที่บ่งชี้ว่าเกิดพยาธิสภาพกับกล้ามเนื้อหัวใจ เช่นเดียวกับผลการทดสอบสมบัติความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 2 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว P388 และ เซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa มีค่า ED₅₀ ที่ 1.47 และ 4.3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อทำการแยกโปรตีนส่วนที่ XIII ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Gel Filtration Chromatography โดยใช้ Sephadex G - 50 แล้วแยกต่อด้วยวิธี Ion Exchange Chromatography ที่ใช้ Bio - Rex 70 แยกได้ 4 ส่วน คือ XIII B - 1 , XIII B - 2 , XIII B - 3 และ XIII B - 4 ตรวจความบริสุทธิ์ด้วย PAGE และ SDS - PAGE พบว่าโปรตีนทั้ง 4 ส่วน มีแถบเดียวแสดงว่าแยกได้โปรตีนที่บริสุทธิ์ จากการหาน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้ SDS - PAGE และ MS พบว่าที่ใช้วิธี SDS - PAGE น้ำหนักโมเลกุลอยู่ที่ประมาณ 6500 - 8000 และที่ใช้ MS มีน้ำหนักโมเลกุล 7574 , 7575 , 6711 และ 6692 ดาลตัน ตามลำดับ โปรตีนส่วนที่ XIII B - 3 และ XIII B - 4 ที่มีแอกติวิตีต่อการตายของเซลล์และเนื้อเยื่อสูง ประกอบด้วยกรดอะมิโน 60 ตัว 15 ชนิด มี 4 disulfide bridge ไม่พบกรดอะมิโน Glutamic acid , Histidine และ Tryptophan แต่มี Lysine และ Aspartic acid สูง เป็นต้น เมื่อเปรียบเทียบกับองค์ประกอบกรดอะมิโนคล้ายกับสารพิษ cardiotoxin จากพิษงูเห่าชนิดต่าง ๆ ที่ได้มีการศึกษาแล้ว จากการศึกษาคูณสมบัติต่าง ๆ และองค์ประกอบกรดอะมิโนของโปรตีนที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อจากพิษงูเห่าไทย สามารถสรุปได้ว่าเป็นสารพิษ cardiotoxin หรือ cytotoxin

A STUDY ON THE AMINO ACID COMPOSITION OF LOCAL TISSUE NECROTIC
EFFECTING PROTEINS FROM SIAMESE COBRA
(*Naja kaouthia*) VENOM

AN ABSTRACT
BY
PENSRI KITTICHAROENRAT

Presented in partial fulfillment of the requirements
for the Master of Science degree in Biological Chemistry
May 2000

Pensri Kitticharoenrat. (2000). *A Study on the Amino Acid Composition of Local Tissue Necrotic Effecting Proteins from Siamese Cobra (Naja kaouthia) Venom*. Master Thesis, M.Sc. (Biological Chemistry). Bangkok : Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Dr. Saisanom Thampitak, Narumol Pakmanee, Assoc. Prof. Dr. Supaluk Prachayasittikul.

Cobra venom is one of the most toxic protein mixture from animals. Usually the victims bitten by cobra face the problem of local tissue necrosis ,although they received antibody for neutralization the venom ,mostly tissue graft has to be operated to repair the damaged tissue. The purpose of this study was to investigate the amino acid composition and some properties of the proteins that caused tissue necrosis from siamese cobra venom. Crude venom was separated using Ion Exchange Chromatography on Bio - Rex 70. Thirteen protein fractions were obtained and tested for cytotoxicity. Fraction XIII exhibited the highest local tissue necrotic effect as well as inducing ECG abnormalities ,which indicated myocardial malfunction. The protein fraction XIII was also tested for cytotoxicity toward two cancer cell lines of P388 and HeLa cells : ED₅₀ was 1.47 and 4.3 µg/ml respectively. Further purification of fraction XIII by Gel Filtration on Sephadex G – 50 and Ion Exchange Chromatography using Bio – Rex 70 released four protein subfractions , namely : XIII B – 1 , XIII B – 2 , XIII B – 3 and XIII B – 4. Purity of the protein was checked using PAGE and SDS – PAGE. The molecular weight of each protein band was determined by SDS – PAGE to be about 6500 – 8000 ,and was also determined using Mass Spectrometry to be 7574 , 7575 , 6711 and 6692 respectively. The 60 amino acid composition of XIII B – 3 and XIII B – 4 retained high tissue necrotic effect which was similar to the composition of cardiotoxin earlier isolated from other cobra venoms for example *Naja naja* , *Naja atra* , containing 60 – 61 residues ,15 amino acids : devoid of Glutamic acid , Histidine and Tryptophan but high Lysine and Aspartic acid. Based on the similar of properties and amino acid composition, it can be concluded that the necrotic effecting proteins are cardiotoxins or cytotoxins.

ปริญญานิพนธ์

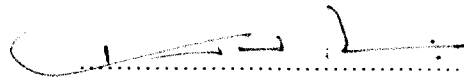
เรื่อง

การศึกษาองค์ประกอบกรดอะมิโนของโปรตีนที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อ
เฉพาะบริเวณจากพิษงูเห่าไทย

ของ

นางสาว เพ็ญศรี กิตติเจริญรัตน์

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

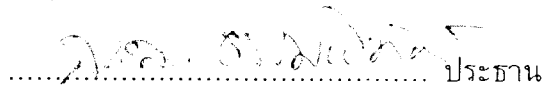


คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

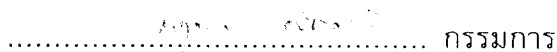
(ศาสตราจารย์ ดร. เสริมศักดิ์ วิศาลาภรณ์)

วันที่ 16 เดือน พฤศจิกายน พ.ศ. 2543

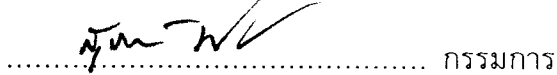
คณะกรรมการสอบปริญญานิพนธ์

 ประธาน

(อาจารย์ ดร. สายสนม ธรรมพิทักษ์)

 กรรมการ

(อาจารย์ นฤมล พักmani)

 กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุภาลักษณ์ ปรรัชชญาสิทธิกุล)

 กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พรพวรรณ เลิศทวีสินธุ์)

 กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนันต์ พุทธิพิทยาสาพร)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จด้วยดีโดยความช่วยเหลือ แนะนำ และให้ความอนุเคราะห์อย่างดียิ่งจาก ดร. สายสนม ธรรมพิทักษ์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร อ. นฤมล พักมณี หัวหน้าฝ่ายวิจัยและพัฒนา สถานเสาวภา สภากาชาดไทย และ รศ. ดร. สุภาลักษณ์ ปรัชญาสิทธิกุล ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ผู้วิจัยขอขอบคุณ ผศ. พรพรรณ เลิศทวีสินธุ์ และ ผศ. ดร. อนันต์ พุทธิยาสถาพร ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ที่กรุณาตรวจแก้ไขปริญญานิพนธ์เรื่องนี้พร้อมทั้งร่วมเป็นกรรมการสอบ

ผู้วิจัยขอขอบคุณผู้อำนวยการสถาบันมะเร็งแห่งชาติและโดยเฉพาะอย่างยิ่ง ดร. พรทิพา พิชา หัวหน้าฝ่ายวิจัยสารบำบัดมะเร็งที่อนุเคราะห์ให้ใช้สถานที่และเครื่องมือในการวิจัย พร้อมทั้งให้คำแนะนำ ช่วยเหลือ สอนวิธีทดสอบสมบัติความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง นอกจากนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายวิจัยสารบำบัดมะเร็งทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลืออย่างดี

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ผศ. ดร. ศุภสร วณิชรุ่งเรือง ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือตรวจวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนพิษงูด้วยวิธี Mass Spectrometry

ผู้วิจัยขอขอบคุณ อ. สุรีย์พันธ์ บุญวิสุทธิ์ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและสถานที่ในการวิเคราะห์หาองค์ประกอบกรดอะมิโนของโปรตีน

ผู้วิจัยขอขอบคุณ รศ. ภักตร์เพ็ญ ทิพยมนตรี ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ที่กรุณา อ่าน ตรวจสอบการแปลผล และให้คำแนะนำเกี่ยวกับคลื่นไฟฟ้าหัวใจ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณพงษ์พัฒน์ เวชสิทธิ์ ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ที่ให้ความช่วยเหลือในการทดสอบเกี่ยวกับคลื่นไฟฟ้าหัวใจและด้านอื่น ๆ

ผู้วิจัยขอโน้มรำลึกถึงพระคุณ บิดาและมารดา รวมทั้งญาติพี่น้อง ที่ให้การสนับสนุนในการศึกษาครั้งนี้ และขอบคุณเพื่อน ๆ ทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือและกำลังใจด้วยดีมาตลอดการทำปริญญานิพนธ์

เพ็ญศรี กิตติเจริญรัตน์

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	5
ความสำคัญของการวิจัย	5
ขอบเขตของการวิจัย.....	5
นิยามศัพท์เฉพาะ	6
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	7
ลักษณะทั่วไปของงูเห่าไทย	7
อาการของผู้ถูกงูเห่าไทยกัด	9
อาการเฉพาะที่	9
อาการทั่วไป	9
คุณสมบัติทางเภสัชวิทยาของพิษงูเห่า	11
ส่วนประกอบของพิษงูเห่า	11
โปรตีนส่วนที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์	11
โปรตีนส่วนที่เป็นพิษ	13
Neurotoxin	13
Cardiotoxin	15
การตายของเซลล์และเนื้อเยื่อจากพิษงู	18
Necrosis	19
การแยกโปรตีนของพิษงูให้บริสุทธิ์และหาองค์ประกอบกรดอะมิโน	22
3 วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้า.....	24
แนวทางดำเนินการศึกษาค้นคว้า	24
การแยกพิษงูเห่าไทยด้วยเทคนิค ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY ตามวิธีของ วรณา ธรรมพาลีศ (2534)	27
การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี BRADFORD	28
การกำจัดเกลือ	28

สารบัญ(ต่อ)

บทที่		หน้า
3(ต่อ)	การตรวจสอบความเป็นพิษต่อกล้ามเนื้อหัวใจของพิษงูเห่าไทย โดยการวัดคลื่นไฟฟ้าหัวใจ	29
	การวัดแอกติวิตีของพิษงูในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก ตามวิธีของคาร์ลสันและคณะ (1971)	30
	การตรวจสอบสมบัติความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (CYTOTOXIC TEST)	31
	การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนจากพิษงูเห่าที่แยกได้	37
	การแยกส่วนประกอบของพิษงูเห่า ส่วนที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อ โดยเทคนิค GEL FILTRATION	39
	การแยกโปรตีนที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อให้บริสุทธิ์ โดยวิธี ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY โดยใช้ BIO - REX 70	39
	การหามวลโมเลกุลของโปรตีนพิษงูด้วย MASS SPECTROMETRY	40
	การหาลำดับประเภทยของกรดอะมิโนในโปรตีน ที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณ	41
	การวิเคราะห์ข้อมูล	42
4	ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	43
	ผลการแยกโปรตีนของพิษงูเห่าไทยด้วย ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY โดยใช้ BIO - REX 70	43
	ผลการหาปริมาณโปรตีนแต่ละส่วนที่แยกได้จากพิษงูเห่า	44
	ผลการหาแอกติวิตีของพิษงูในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก	45
	ผลการตรวจวิเคราะห์พิษงูเห่าส่วนที่ XIII โดย polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)	45
	ผลการตรวจสอบความเป็นพิษต่อกล้ามเนื้อหัวใจของพิษงูเห่าส่วนที่ XIII โดยวัดคลื่นไฟฟ้าหัวใจ (ECG)	45
	ผลการทดสอบสมบัติความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง โดยหาค่า ED ₅₀	49
	ผลการแยกส่วนประกอบพิษงูเห่าไทยที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อ ส่วนที่ XIII ด้วยเทคนิค GEL FILTRATION CHROMATOGRAPHY	56
	ผลการหาปริมาณโปรตีนของส่วนที่แยกได้จากพิษงูเห่าส่วนที่ XIII	57

สารบัญ(ต่อ)

บทที่	หน้า
4(ต่อ)	
ผลการหาแอมพลิจูดของพิษงูส่วนต่าง ๆ ที่แยกได้จากพิษงูเห่าส่วนที่	
XIII ต่อการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก	57
ผลการตรวจวิเคราะห์พิษงูส่วนที่ XIII B โดย polyacrylamide gel	
electrophoresis	58
ผลการแยกโปรตีนส่วนที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อส่วน XIII B ด้วย	
เทคนิค ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY	59
ผลการหาปริมาณโปรตีนของพิษงูเห่าส่วนที่แยกได้จากพิษงูส่วนที่	
XIII B	60
ผลการหาแอมพลิจูดของพิษงูในการทำไมโครอิเล็กโตรโฟรีซิส.....	50
ผลการตรวจวิเคราะห์พิษงูส่วนต่าง ๆ ที่แยกได้จากพิษงูส่วน XIII B	
ด้วย polyacrylamide gel electrophoresis และ SDS -	
polyacrylamide gel electrophoresis	62
ผลการวิเคราะห์โปรตีนพิษงูเห่าที่แยกได้ด้วย Mass Spectrometry	66
ผลการวิเคราะห์หาองค์ประกอบกรดอะมิโนในโปรตีนที่มีผลต่อการตายของ	
เนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณ	68
5	
สรุปผล อภิปราย และข้อเสนอแนะ.....	70
สรุปและอภิปรายผล.....	70
ข้อเสนอแนะ	77
บรรณานุกรม	78
ภาคผนวก.....	90
ประวัติย่อผู้วิจัย	117

บัญชีตาราง

ตาราง		หน้า
1	จำนวนผู้ถูกงูเห่ากัด ประเทศไทย พ. ศ. 2530 – 2539	3
2	ปริมาณโปรตีนของส่วนต่าง ๆ ที่แยกได้จากพิษงูเห่าไทย ด้วย Bio – Rex 70 Ion Exchange Chromatography	44
3	แอคติวิตีการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกของพิษงูเห่าไทยยังไม่แยก พิษงูส่วนที่ I และ XIII	45
4	ผลของพิษงูเห่าส่วนที่ XIII ต่ออัตราการเต้นของหัวใจของหนู (rat) ที่สลบ ที่ ขนาดพิษระดับต่าง ๆ	48
5	ผลของพิษงูเห่าส่วนที่ XIII ในการแสดงผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะ คลื่นไฟฟ้าหัวใจของหนูที่สลบ	48
6	เปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู P388 ในสารละลายพิษงูเห่าไทยที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	51
7	เปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa ในสารละลาย พิษงูเห่าไทยที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	54
8	ปริมาณโปรตีนของส่วนต่าง ๆ ที่แยกได้จากพิษงูเห่าส่วนที่ XIII ด้วย Gel Filtration Chromatography	57
9	แอคติวิตีการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกของพิษงูที่แยกจากพิษงูส่วนที่ XIII ด้วย Sephadex G – 50	57
10	ปริมาณโปรตีนของส่วนต่าง ๆ ที่แยกได้จากพิษงูส่วนที่ XIII B ด้วย Bio – Rex 70	60
11	แอคติวิตีการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกของพิษงูส่วนที่แยกได้จาก พิษงูส่วนที่ XIII B	61
12	แสดงมวลโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน	65
13	องค์ประกอบกรดอะมิโนของโปรตีนจากพิษงูเห่าไทยที่มีผลต่อการตายของ เนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณ	69
14	หมู่ที่มีประจุของตัวแลกเปลี่ยนไอออน	92
15	ตัวกลางเจลที่ใช้ใน Gel Filtration Chromatography	94
16	องค์ประกอบกรดอะมิโนในโปรตีนของสารพิษ neurotoxin แบบ long – chain postsynaptic neurotoxin	100

บัญชีตาราง(ต่อ)

ตาราง	หน้า
17 องค์ประกอบกรดอะมิโนในโปรตีนของสารพิษ neurotoxin แบบ short – chain postsynaptic neurotoxin.....	101
18 องค์ประกอบกรดอะมิโนในโปรตีนของสารพิษ cardiotoxin	102
19 ข้อมูลเกี่ยวกับ Cardiovascular และคลื่นไฟฟ้าหัวใจของหนู (rat) ปกติ	108
20 แสดงปริมาณสารละลายต่าง ๆ ที่ใช้ในการหาปริมาณโปรตีน (มิลลิลิตร).....	111

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 ลักษณะแผลเนื้อเยื่อตายจากพิษงูเห่า	4
2 ลักษณะแผลเนื้อตายจากพิษงูกลุ่มงูเขียวหางไหม้	4
3 การกระจายของงูเห่าในทวีปเอเชีย	8
4 ลักษณะของงูเห่าไทย	8
5 อาการเฉพาะที่ บริเวณที่ถูกกัดมักจะเกิดแผลเนื้อตาย	10
6 แสดงปฏิกิริยาของเซลล์ที่ตอบสนองต่ออันตราย ทั้งประเภทที่ทำให้ไม่ถึงตาย (sublethal injury) และทำให้ถึงตาย (lethal injury).....	18
7 แผนผังการดำเนินงานวิจัย	26
8 แผนผังขั้นตอนการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง HeLa.....	36
9 กราฟแสดงผลการแยกพิษงูเห่าไทยด้วยวิธี Ion Exchange Chromatography โดยใช้ Bio – Rex 70.....	43
10 ผลของพิษงูเห่าส่วนที่ XIII ต่อคลื่นไฟฟ้าหัวใจ ความดันเลือด และ การหายใจของหนู (rat) ที่สลบ	47
11 แอคติวิตีสมบัตความเป็นพิษของพิษงูเห่าไทยยังไม่แยกและพิษงูส่วนที่ XIII ต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู P388.....	50
12 กราฟแสดงค่า ED ₅₀ และเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของพิษงูเห่าไทยยังไม่แยกและพิษงูเห่าไทยส่วนที่ XIII	52
13 แอคติวิตีสมบัตความเป็นพิษของพิษงูเห่าไทยยังไม่แยกและพิษงูเห่าไทยส่วนที่ XIII ต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa	53
14 กราฟแสดงค่า ED ₅₀ และเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของพิษงูเห่าไทยยังไม่แยกและพิษงูเห่าไทยส่วนที่ XIII.....	55
15 กราฟแสดงการแยกพิษงูเห่าส่วนที่ XIII ด้วย Sephadex G – 50 Gel Filtration Chromatography	56
16 รูปแบบของโปรตีนในพิษงูเห่าที่แยกได้ ที่วิเคราะห์ด้วย PAGE	58
17 กราฟแสดงการแยกพิษงูเห่าส่วนที่ XIII B โดยใช้ Bio – Rex 70 Ion Exchange Chromatography.....	59

บัญชีภาพประกอบ(ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
18 กราฟแสดงแอกติวิตีการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกของพิษงูเห่าที่ยังไม่แยก พิษงู ส่วนที่ XIII และพิษงูส่วนที่ XIII B – 4 ในการหาค่า HD ₅₀ และ HD ₁₀₀	61
19 รูปแบบของโปรตีนในพิษงูเห่าส่วนที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อที่ตรวจ วิเคราะห์โดย PAGE	62
20 รูปแบบของโปรตีนในพิษงูเห่าไทยที่วิเคราะห์โดยวิธี SDS – PAGE	64
21 กราฟมาตรฐานโปรตีนจากการวิเคราะห์ SDS – PAGE	65
22 สเปกตรัมแสดงมวลโมเลกุลของโปรตีนพิษงูส่วนที่ XIII B – 1 , XIII B – 2 , XIII B – 3 และ XIII B – 4 ที่วิเคราะห์โดย ESI – MS	67
23 ภาพการแยกโปรตีนออกจากกันโดยวิธี Ion Exchange Chromatography	91
24 ภาพการแยกโปรตีนออกจากกันโดยวิธี Gel Filtration Chromatography	93
25 อิเล็กโตรโฟรีซิสแบบ Discontinuous gel.....	96
26 การแยกสารโมเลกุลใหญ่ออกจากสารโมเลกุลเล็ก ๆ โดยวิธีไดอะลิซิส (dialysis).....	97
27 ภาพการแยกกรดอะมิโนออกจากกันด้วย Cation Exchange Chromatography	98
28 แสดงถึงส่วนประกอบต่าง ๆ ของระบบเหนี่ยวนำไฟฟ้าของหัวใจ (conducting system).....	103
29 คลื่นไฟฟ้าหัวใจของหนู (rat) ปกติ.....	105
30 เครื่องบันทึกคลื่นไฟฟ้าหัวใจ	106
31 กระดาษบันทึกคลื่นไฟฟ้าหัวใจที่ขยายใหญ่	106
32 วิธีนับจำนวนเซลล์ด้วย Haemocytometer.....	109
33 วิธีวัดอัตราการเจริญของเซลล์มะเร็ง HeLa โดยการหาปริมาณโปรตีนของ เซลล์ที่มีชีวิต.....	111

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

ด้วยสภาพแวดล้อมทางภูมิประเทศและภูมิอากาศของประเทศไทยซึ่งเหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของสัตว์เลื้อยคลานนานาชนิด ดังนั้นประเทศไทยจึงเป็นประเทศหนึ่งที่มีงูชุกชุม โดยมีอยู่มากถึง 180 ชนิด ในจำนวนนี้มี 46 ชนิด เป็นงูพิษ โดยแบ่งเป็นงูพิษที่อาศัยอยู่บนบก 24 ชนิด และเป็นงูพิษในทะเล 22 ชนิด (กองวิทยาศาสตร์ สภาวิทยาศาสตร์ 2540 : 2) งูพิษอันตราย (Dangerous venomous snakes) หรืองูที่มีความสำคัญทางการแพทย์ (Snakes of medical importance) หมายถึงงูที่มีกลไกของพิษและน้ำพิษที่รุนแรงทำอันตรายต่อร่างกายหรือชีวิตของมนุษย์หรือสัตว์ได้ กลไกของพิษประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ที่สำคัญคือ ต่อมพิษ (Venom gland) น้ำพิษ (Venom) ท่อน้ำพิษ (Venom duct) และเขี้ยวพิษ (Venom fangs) (ไพบูลย์ จินตกุล และ ลาวัญญ์ จันทรโสม. 2539 : 1 – 3) เมื่องูพิษกัดเขี้ยวจะฝังเข้าไปในเนื้อ กล้ามเนื้อรอบ ๆ ต่อมน้ำพิษ จะหดตัวบีบต่อมน้ำพิษ ทำให้น้ำพิษไหลมาตามท่อ และออกทางปลายเขี้ยว เห็นรอยเขี้ยวเป็นรอยจุด 2 จุด ชัดเจน สำหรับงูไม่มีพิษจะไม่มีเขี้ยว มีแต่ฟัน เมื่อถูกกัดจึงเห็นเป็นรอยถลอกหรือรอยถากไปเท่านั้น (มุกดา ดุญฉนวนันท์ และคณะ. 2522 : 1 – 2)

งูพิษกลุ่มสำคัญ ๆ ในประเทศไทย แบ่งตามอำนาจทำลายของน้ำพิษต่อระบบของร่างกาย ดังนี้

พวกที่มีพิษทางระบบประสาท ได้แก่ งูเห่าไทยและงูเห่าพ่นพิษ งูจงอาง กลุ่มงูสามเหลี่ยม

พวกที่มีพิษทางระบบโลหิต ได้แก่ งูแมวเซา งูกะปะ กลุ่มงูเขี้ยวหางไหม้

พวกที่มีพิษทางระบบกล้ามเนื้อ ได้แก่ กลุ่มงูทะเล

จากสถิติของกองระบาดวิทยา สำนักงานปลัดกระทรวง กระทรวงสาธารณสุข ประเทศไทย แต่ละปีมีผู้ถูกงูพิษกัด ประมาณ 7,000 ราย แต่สามารถบอกชนิดงูที่กัดได้น้อยกว่าร้อยละ 30 สำหรับงูพิษที่คนไทยถูกกัดมากที่สุดคือ งูกะปะ รองลงมาคือ กลุ่มงูเขี้ยวหางไหม้ อันดับสามคือ งูเห่า ถัดไปเป็น งูแมวเซา งูสามเหลี่ยม และงูพิษชนิดอื่น ๆ เช่น งูทะเลและงูจงอาง ซึ่งมีเพียงไม่กี่ราย แต่ถ้าเปรียบเทียบงูพิษที่ทำให้คนไทยเสียชีวิตมากที่สุดคือ งูเห่า รองลงมาคือ งูแมวเซา (ไพบูลย์ จินตกุล และ ลาวัญญ์ จันทรโสม. 2539 : 3)

งูเห่าเป็นงูพิษชนิดที่มีความสำคัญมากเพราะมีพิษร้ายแรง ทำให้ผู้ถูกกัดเสียชีวิตอย่างรวดเร็ว และยังมีชุกชุมมากพบได้ทุกภาคของประเทศไทย ตามสถิติในปีหนึ่ง ๆ มีผู้ถูกงูเห่ากัดเป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะในช่วงฤดูฝน ดังข้อมูลที่แสดงในตาราง 1 ผู้ถูกงูเห่ากัดนอกจากเสียชีวิตอย่างรวดเร็วได้แล้ว แม้แต่ผู้ที่ได้รับการฉีดเซรุ่มป้องกันพิษแล้วก็ตาม มักจะเกิดปัญหาเมื่การตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณ (Local tissue necrosis) ที่บริเวณแผลถูกกัด (Warrell, et al.

1976 : 1 – 32) หลังจากถูกกัดภายใน 1 – 32 ชม. พบได้ประมาณร้อยละ 50 ถ้าไม่ได้รับการรักษาที่ถูกต้อง แผลจะค่อย ๆ ขยายกว้างขึ้นไปเรื่อย ๆ เกิดการเน่าเป็นแผลกว้างใหญ่ และค่อยกินลึกถึงชั้นกล้ามเนื้อ การรักษาทำได้ยากและใช้เวลานาน ต้องนำเนื้อเยื่อผิวหนังส่วนอื่นมาปะแทน รูปภาพประกอบ 1 ฝูงกลุ่มที่มีพิษทางระบบโลหิตจะไม่พบเนื้อตายลักษณะนี้ แต่อาจจะพบการตายของปลายนิ้วมือ นิ้วเท้าของผู้ถูกกัด ทำให้นิ้วที่ถูกกัดหลุดไปเป็นข้อ ๆ ได้ ภาพประกอบ 2 (กองวิทยาศาสตร์ สภาอากาศไทย. 2540 : 16 ; ชาญ โพชนุกูล. 2531 : 28) ได้มีการศึกษาแล้วว่าการตายของเนื้อเยื่อ เนื่องจากถูกเห่ากัดเป็นผลจากพิษงู ไม่ได้เกิดจากการติดเชื้อจุลินทรีย์ โดยที่พิษงูส่วนใหญ่มีส่วนประกอบเป็นโปรตีน ถึงร้อยละ 80 – 90 ดังนั้นการศึกษาถึงโปรตีนที่มีผลทำให้เกิดเนื้อเยื่อตายในผู้ที่ถูกงูเห่ากัด จึงน่าสนใจที่จะศึกษาค้นคว้าให้ละเอียดต่อไป ในการศึกษาลักษณะของโปรตีน นอกจากศึกษาแอกติวิตีต่าง ๆ ของโปรตีนแล้ว การศึกษาหาองค์ประกอบและการเรียงลำดับของกรดอะมิโนในโปรตีนก็เป็นอีกแนวทางหนึ่ง สำหรับการหาองค์ประกอบของกรดอะมิโนในโปรตีนที่ศึกษา สามารถทำได้ง่ายและรวดเร็วกว่าการหาการเรียงลำดับของกรดอะมิโนของโปรตีน ซึ่งองค์ประกอบกรดอะมิโนในโปรตีนทั้งชนิดและปริมาณสามารถที่จะใช้เป็นแนวทางในการเปรียบเทียบโปรตีนชนิดต่าง ๆ ได้ ว่าโปรตีนที่มีผลทำให้เกิดเนื้อเยื่อตายที่เกิดจากพิษงูเห่ากับพิษงูชนิดอื่น หรือจากพิษงูเห่าเหมือนกันแต่ต่างสายพันธุ์กันที่มีผลทำให้เกิดเนื้อเยื่อตาย ว่าเป็นผลมาจากโปรตีนที่มีลักษณะเหมือนหรือแตกต่างกันอย่างไร เป็นโปรตีนกลุ่มไหน และยังสามารถใช้เป็นแนวทางในการเข้าใจความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและหน้าที่ทางชีวภาพของโปรตีน และกลไกบางอย่างที่เป็นสาเหตุของการเกิดเซลล์และเนื้อเยื่อตายซึ่งสามารถนำไปศึกษาค้นคว้าในขั้นต่อไป เพื่อนำไปเป็นแนวทางในการศึกษาป้องกันและรักษาแผลเนื้อเยื่อตายต่อไป โดยเฉพาะในการผลิตแอนติบอดีแก้พิษงูเห่าที่จำเพาะต่อโปรตีนที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อ

นอกจากนี้ยังอาจนำโปรตีนส่วนที่มีผลทำให้เกิดเนื้อเยื่อตายที่แยกจากพิษงูเห่าไทย ที่ได้แยกส่วนที่เป็นพิษร้ายแรง เช่น พิษต่อระบบประสาทออกไป นำไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์อย่างอื่นต่อไปได้ เป็นต้นว่า นำไปพัฒนาสำหรับใช้เป็นสารทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อส่วนที่ร่างกายไม่ต้องการและเป็นอันตราย เช่น เซลล์มะเร็ง เป็นต้น

ตาราง 1 จำนวนผู้ถูกขู่เห่ากั๊ด ประเทศไทย พ.ศ. 2530 – 2539

พ.ศ.	จำนวนผู้ถูกขู่เห่ากั๊ด (ราย) *
2530	165
2531	197
2532	252
2533	294
2534	300
2535	264
2536	272
2537	335
2538	374
2539	243

ที่มา: สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข. กองระบาดวิทยา. (2530 – 2539). “รายงานการเฝ้าระวังโรค”

* มีรายงานผู้ถูกขู่เห่ากั๊ดจำนวนมากแต่ที่ทราบชนิดของขู่มีเพียงร้อยละ 20 – 30 เท่านั้น ดังนั้นจำนวนของผู้ถูกขู่เห่ากั๊ดอาจมีจำนวนมากกว่าที่แสดงในตารางนี้



ภาพประกอบ 1 ลักษณะแผลเนื้อเยื่อตายจากพิษงูเห่า (มุกดา ตฤษณานันท์ และคณะ. 2522)



ภาพประกอบ 2 ลักษณะแผลเนื้อตายจากพิษกลุ่มงูเขียวหางไหม้ (Tu. 1991)

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อแยกและศึกษาส่วนประกอบของพิษงูเห่าไทย ที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณ
2. เพื่อแยกโปรตีนจากพิษงูเห่าไทยส่วนที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อให้บริสุทธิ์และหาองค์ประกอบกรดอะมิโน
3. เพื่อศึกษาความเป็นพิษของโปรตีนที่แยกได้ต่อเซลล์มะเร็ง

ความสำคัญของการวิจัย

1. เพื่อให้ทราบถึงองค์ประกอบของกรดอะมิโนของโปรตีน ที่เป็นสาเหตุของการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณเมื่อถูกงูเห่าไทยกัด ซึ่งเป็นข้อมูลที่มีประโยชน์ในการนำไปศึกษาชีววิทยาระดับโมเลกุล (Molecular Biology) ต่อไป
2. เพื่อให้ทราบถึงสมบัติของโปรตีนในพิษงูเห่าไทย ที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อ
3. เพื่อเป็นแนวทางในการผลิตแอนติบอดีแก้พิษงูเห่าไทยที่จำเพาะต่อโปรตีนที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อ สำหรับยับยั้งการตายของเนื้อเยื่อในผู้ป่วยที่ถูกงูเห่าไทยกัด
4. เพื่อเป็นข้อมูลประกอบในการพัฒนาโปรตีนที่มีฤทธิ์ทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อ เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ต่อไป

ขอบเขตของการวิจัย

1. ศึกษาเฉพาะพิษงูเห่าไทยในส่วนของโปรตีนที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อสูง
2. ศึกษาเฉพาะองค์ประกอบของกรดอะมิโนในโปรตีนที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อ
3. พิษงูเห่าไทยที่นำมาศึกษาอยู่ในรูป Lyophilized venom จากสถานเสาวภา สภากาชาดไทย

นิยามศัพท์เฉพาะ

ED₅₀ (Effective Dose 50)

หมายถึง ความเข้มข้นของสารทดสอบเป็น ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลงเป็นครึ่งหนึ่ง เมื่อเปรียบเทียบกับส่วนควบคุม

(Dose level in $\mu\text{g} / \text{ml}$ at 50 % inhibition of growth of cells is observed against control)

HD₅₀ (Hemolysis Dose 50)

หมายถึง ความเข้มข้นของสารทดสอบเป็นไมโครกรัมโปรตีน ที่สามารถทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกเป็นครึ่งหนึ่ง เมื่อเปรียบเทียบกับส่วนของเม็ดเลือดแดงที่กำหนดให้แตกตัวเป็น 100 เปอร์เซ็นต์

HD₁₀₀ (Hemolysis Dose 100)

หมายถึง ความเข้มข้นของสารทดสอบเป็นไมโครกรัมโปรตีน ที่สามารถทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกเท่ากับส่วนของเม็ดเลือดแดงที่กำหนดให้แตกตัวเป็น 100 เปอร์เซ็นต์

บทที่ 2

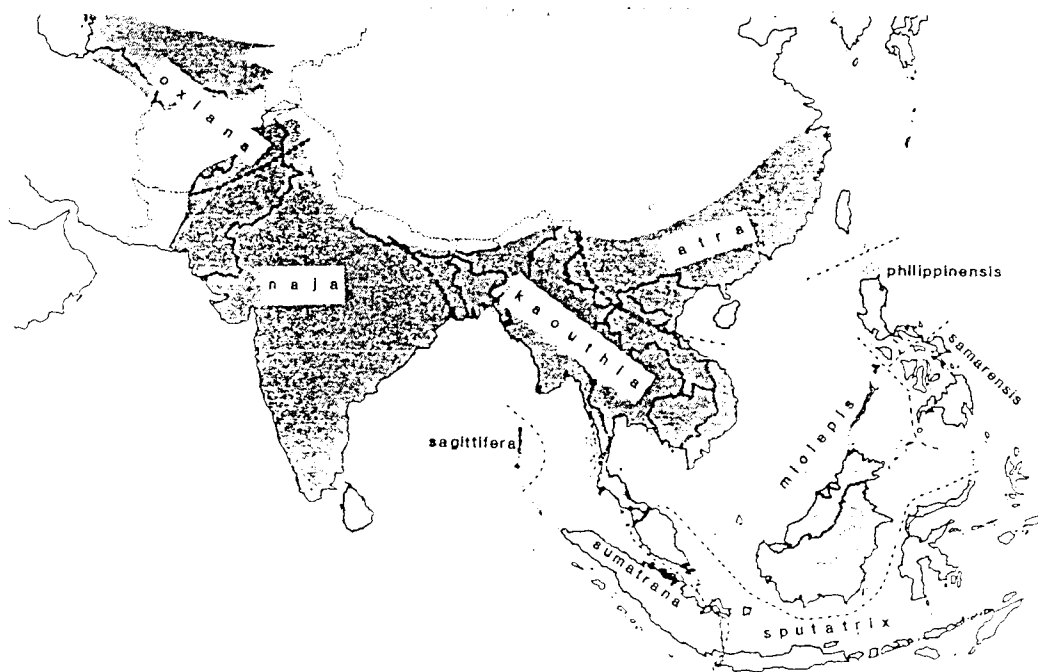
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ลักษณะทั่วไปของงูเห่าไทย

งูเห่าไทย (Siamese cobra หรือ Monocellated cobra) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Naja kaouthia* จัดอยู่ใน Class Reptilia , Order Squamata , Suborder Serpentes , Family Elapidae , Subfamily Bungarinae สกุลเดียวกับงูเห่าชนิดอื่น ๆ รวมทั้งงูจงอางและงูสามเหลี่ยม (ไพบูลย์ จินตกุล และลาวัญญ์ จันทรโสม. 2539 : 4,58 – 61) งูเห่าไทยเป็นงูพิษที่มีอันตรายมากชนิดหนึ่ง ชอบอาศัยอยู่ตามพื้นที่เกษตรกรรม ตามป่าและบริเวณที่อยู่อาศัยของคน (มุกดา ตฤษณานันท์ และคณะ. 2522 : 21) ชอบอาศัยตามที่ลุ่มชื้น นอนตามรู โพงรง ชอบออกหากินในเวลาพลบค่ำ เลื้อยออกหากินทั้งบนบก ในน้ำ ขึ้นต้นไม้ได้ งูเห่าไทยมีซุกซมแทบทุกภาคของประเทศไทย นอกจากนี้ยังพบในพม่า กัมพูชา ลาว เวียดนาม มาเลเซีย (บุณเธิ่น ทุมวิภาต และวิโรจน์ นุตพันธ์. 2525 : 65 ; Merel. 1991) แคว้นเบงกอลของอินเดีย บังกลาเทศ เนปาล และสิกขิม (ดูภาพประกอบ 3) อาหารของงูเห่าไทย ได้แก่ หนู กบ เขียด นก ลูกเป็ด ลูกไก่ เป็นต้น สืบพันธุ์โดยการวางไข่ครั้งละ 15 – 30 ฟอง (ไพบูลย์ จินตกุล และลาวัญญ์ จันทรโสม. 2539 : 59 – 69) งูเห่าเป็นงูที่สามารถพ่นลมออกทางรูจมูก เป็นเสียงขู่ดังฟู่ จึงได้ชื่อว่า งูเห่า

งูเห่าไทยเป็นงูพิษขนาดกลางค่อนข้างใหญ่ ตัวโตเต็มที่ยาวประมาณ 1 เมตร ตัวยาวเรียว หางเรียว มีหัวป้อมมน เกล็ดบนหัวมีขนาดใหญ่ ลูกตาดำ(pupil)กลม เกล็ดทั่วไปมักเป็นชนิดเกล็ดเรียบ เกล็ดกลางสันหลัง (Hexagonal) มักใหญ่ มีความแตกต่างเรื่องสีตัวมากแต่ส่วนใหญ่แล้วมักมีสีน้ำตาลออกเป็นสีเหลืองหรือเป็นสีนวล (บุณเธิ่น ทุมวิภาต และวิโรจน์ นุตพันธ์. 2525 : 64 – 65) มีเขี้ยวพิษอยู่ด้านหน้าของขากรรไกรบน เขี้ยวพิษยึดแน่นกับขากรรไกรบน พับงอไม่ได้ เขี้ยวพิษไม่ยาว มีร่องตามยาวอยู่ทางด้านหน้าของเขี้ยว 1 ร่อง สำหรับให้น้ำพิษไหลผ่าน ซึ่งจากลักษณะของเขี้ยวพิษของงูเห่าลักษณะนี้ จึงถูกจัดแบ่งตามลักษณะเขี้ยวพิษให้อยู่ในกลุ่ม Proteroglypha (ไพบูลย์ จินตกุล และลาวัญญ์ จันทรโสม. 2539 : 30) งูเห่าสามารถชูส่วนคอและหัวขึ้นแล้วแผ่กางส่วนคอให้ขยายกว้างออกไป ที่เรียกว่าการแผ่แม่เบี้ย ที่ทำเช่นนี้ได้เป็นเพราะมีกระดูกซี่โครงในช่วงต้นของลำตัวตั้งแต่ส่วนคอลงมาค่อนข้างยาว มีหนังคอดที่ยึดตัวได้มาก พฤติกรรมนี้ทำเพื่อข่มขู่ศัตรูเพราะทำให้ดูตัวใหญ่ขึ้น บริเวณหลังคอดที่แผ่แม่เบี้ยจะเห็นลายที่เรียกว่า ลายดอกจัน (Hood marking) สำหรับงูเห่าไทยส่วนใหญ่จะเห็นลายเป็นรูปวงกลมหรือวงแหวนวงเดียว(monocellate type) แต่อาจมีลายดอกจันที่แผ่แปรออกไปเป็นรูปแบบที่แตกต่างไป (ดูภาพประกอบ 4) งูเห่าจัดเป็นงูพิษต่อระบบประสาท พิษมีความรุนแรงสูงมาก ปริมาณโปรตีนจากพิษที่ทำให้คนตาย 18 – 45 มิลลิกรัม (www.Livenet.net/cobra2cob3.htm.)

งูเห่าสามารถปล่อยพิษครั้งละ 150 – 350 มิลลิกรัม (น้ำหนักแห้ง) ผู้เสียชีวิตเพราะงูพิษกัดในประเทศไทยส่วนใหญ่เนื่องจากถูกงูเห่าไทยกัด



ภาพประกอบ 3 การกระจายของงูเห่าในทวีปเอเชีย (Wuster & Thorpe. 1991)



ภาพประกอบ 4 ลักษณะของงูเห่าไทย

อาการของผู้ถูกงูเห่าไทยกัด

ผู้ถูกงูเห่ากัด บริเวณที่ถูกกัดมักจะเป็นแขนหรือขา เห็นรอยเขียวหนึ่งจุดหรือสองจุด มีเลือดออก (มุกดา ตฤษณานันท์ และคณะ. 2522 : 24) มีอาการเฉพาะที่และอาการทั่วไปที่สำคัญ ดังนี้

อาการเฉพาะที่

จะมีอาการเจ็บ ปวด บวม บริเวณรอยเขียวจะมีสีคล้ำขยายกว้างขึ้น หลังจากนั้นจะมีตุ่มใสขึ้นตรงขอบที่มีสีคล้ำ แล้วขยายใหญ่ขึ้นกลายเป็นรอยพอง มีน้ำอยู่ข้างในสีดำปนแดง ต่อจากนั้นตุ่มพองจะแตกออก ผิวหนังและเนื้อเยื่อใต้ผิวหนังจะตายและหลุดไป ทำให้เกิดแผลเนื้อตาย (Necrotic tissue) ถ้าปล่อยทิ้งไว้จะเน่าลุกลามกลายเป็นแผลกว้างใหญ่ และถ้าเกิดการติดเชื้ออาจลามถึงชั้นกล้ามเนื้อและกระดูกได้ (Cambell. 1979 : 900 – 901 ; มุกดา ตฤษณานันท์ และคณะ. 2522 : 24 – 25 ; บุญเย็น ทุมวิภาต และวิโรจน์ นุตพันธ์. 2525 : 69) ถ้าแผลลุกลามมากอาจต้องตัดอวัยวะที่ถูกกัดออก ทำให้พิการได้ (นราทร ธรรมบุตร, สมใจ เจริญประยูร และผ่องพรรณ นันทาพิสุทธิ์. 2527 ; รัญญู เพ็ญชาติ. 2531) จากรายงานการศึกษาของวาร์เรลล์และคณะ ผู้ป่วยที่ถูกงูเห่ากัด 47 ราย จะเกิดแผลเนื้อตาย 20 ราย หรือร้อยละ 43 (Warrel, et al. 1976) ซึ่งสอดคล้องกับการสำรวจของวูสเตอร์และโทรเปว่าผู้ถูกงูเห่าไทย *Naja kaouthia* กัดมักเกิดแผลเนื้อตาย 30 – 44 % (Wuster & Thorpe. 1991 : 205 – 209) การรักษาแผลบริเวณรอยเขียวต้องทำความสะอาดให้ดี เนื่องจากมีการเน่าเปื่อยของแผลที่ถูกงูเห่ากัด ควรใช้น้ำเกลือเช็ดแผลให้สะอาด ตัดเนื้อที่เน่าเสียทิ้ง และใช้ผ้าก๊อซชุบด้วยยาต้านจุลชีพซับแผลไว้ ในรายที่รุนแรงมีแผลกว้างต้องทำ skin graft ผ่าตัดเอาผิวหนังส่วนอื่นมาปะ เพื่อให้แผลหายเร็วขึ้น โดยทั่วไปจะใช้เวลาเป็นเดือน (Cambell. 1979 : 917 ; มุกดา ตฤษณานันท์ และคณะ. 2522 : 82 – 83 ; ชาญ โพชนุกูล. 2531 : 30) ภาพประกอบ 5

อาการทั่วไป

พิษโดยทั่วไปเป็นพิษต่อระบบประสาท จะเกิดอัมพาตของกล้ามเนื้อต่าง ๆ มักจะเริ่มจากบริเวณหน้าและกล้ามเนื้อเกี่ยวกับการกลืน ทำให้ลิ้นตาไม่ขึ้น ดาพรา ขากรรไกรแข็ง พูดไม่ชัด อ้าปากไม่ได้ กลืนน้ำลายไม่ได้ อ่อนเพลีย แขนขาไม่มีแรง เกิดอัมพาตของกล้ามเนื้อทุกส่วนในร่างกาย อึดอัด หายใจลำบาก ในที่สุดจะหยุดหายใจและเสียชีวิต อาการตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงหยุดหายใจอาจกินเวลาประมาณ 1 – 3 ชั่วโมง ทั้งนี้แล้วแต่ปริมาณพิษงูเห่าที่เข้าไปในร่างกาย การรักษาโดยการให้เซรุ่มแก้พิษงูเห่าและใช้เครื่องช่วยหายใจในรายที่มีอาการรุนแรงผู้ป่วยกำลังจะหยุดหายใจ (Cambell. 1979 : 901 – 907 ; มุกดา ตฤษณานันท์ และคณะ. 2522 : 26 – 33 ; บุญเย็น ทุมวิภาต และวิโรจน์ นุตพันธ์. 2525 : 70 – 74 ; ชาญ โพชนุกูล. 2531 : 28 – 31)



ก

ก. แสดงแผลเนื้อมตายที่ยังไม่ได้รับการรักษา



ข

ข. แสดงแผลเนื้อมตายที่รักษาแล้ว

ภาพประกอบ 5 อาการเฉพาะที่ บริเวณที่ถูกกัดมักจะเกิดแผลเนื้อมตาย

คุณสมบัติทางเภสัชวิทยาของพิษงูเห่า

พิษงูเห่าแสดงความเป็นพิษต่อสัตว์ต่าง ๆ มีค่า LD₅₀ ในหนู (mouse) ประมาณ 0.25 – 0.7 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ขึ้นกับชนิดของงูเห่า สาเหตุการตายของสัตว์ต่าง ๆ เนื่องจากระบบการหายใจล้มเหลว กล้ามเนื้อเกี่ยวกับการหายใจเป็นอัมพาต พิษงูเห่าถูกดูดซึมผ่านทางกระแสเลือดและสามารถขับออกทางไต พิษงูเห่าคุณสมบัติที่เด่นชัดจัดเป็นพิษต่อระบบประสาท โดยแสดงผลกับส่วน neuromuscular junction ซึ่งเป็นส่วนต่อระหว่างเซลล์ประสาทและเซลล์กล้ามเนื้อ จัดเป็น postsynaptic neurotoxins และที่ความเข้มข้นสูงสามารถทำให้กล้ามเนื้อลายเกิด fibrillation และหดตัว บวม สามารถกระตุ้นกล้ามเนื้อทั้งกล้ามเนื้อเรียบและกล้ามเนื้อลายและทำให้เกิดอัมพาต แสดงผลต่อระบบไหลเวียนโลหิต เป็นพิษต่อหัวใจทำให้หัวใจทำงานผิดปกติ ต้นช้าลงจนหยุดเต้น ทำให้คลื่นไฟฟ้าหัวใจเปลี่ยนแปลง ความดันเลือดผิดปกติ นอกจากนี้พิษงูเห่ายังทำให้เกิดการระคายเคือง การบวม และการเกิดเนื้อตาย ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก มีสารที่มีคุณสมบัติ anticoagulant ป้องกันไม่ให้เลือดแข็งตัว พิษงูเห่าแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ทั้งเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็งทั้ง in vitro และ in vivo (Lee. 1973 : 32 – 56) จากการที่พิษงูเห่ามีคุณสมบัติต่าง ๆ ดังกล่าว เป็นผลมาจากส่วนประกอบต่าง ๆ ที่มีอยู่หลากหลายชนิดในพิษงูเห่า

ส่วนประกอบของพิษงูเห่า

พิษงูมีสีเหลืองอ่อน ประกอบด้วยน้ำร้อยละ 80 – 90 ส่วนที่เหลือเป็นสารผสมเชิงซ้อน ในส่วนของสารผสมเชิงซ้อนส่วนใหญ่เป็นสารจำพวกโปรตีนถึงร้อยละ 90 – 95 และส่วนประกอบที่ไม่ใช่โปรตีน เช่น กลีโอฟินทรีน กรดอะมิโนและเปปไทด์ขนาดเล็ก นิวคลีโอไทด์ คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และ Biogenic Amine เป็นต้น (Tu. 1977 : 5 – 16 ; บุญเย็น ทุมวิภาต และ วิโรจน์ นุตพันธ์. 2525 : 45) ในพิษงูเห่า อีออนของโลหะที่พบได้แก่ Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+ , Mn^{2+} โดยอีออนของโลหะที่พบมากที่สุดคือ Na^+ รองลงมาคือ K^+ สารอนินทรีย์อย่างอื่นที่พบคือ SO_4^{2-} , Cl^- และ P_2O_5 ซึ่งโลหะ divalent ต่าง ๆ ทำหน้าที่เป็น cofactor ของเอนไซม์ต่าง ๆ ในพิษงู (Tu. 1977 : 6 – 9) สำหรับส่วนประกอบที่เป็นโปรตีน แบ่งเป็น 2 ส่วนใหญ่ ๆ คือ โปรตีนที่แสดงคุณสมบัติเป็นพิษ (Proteins with toxic properties) และโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ (Proteins with enzymic activities) นอกจากนี้ยังมีโปรตีนชนิดอื่น ๆ จำนวนเล็กน้อยที่ยังไม่ทราบหน้าที่ทางชีวภาพ (Proteins with no known biological activities)

โปรตีนส่วนที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์

โดยทั่วไปเอนไซม์ที่พบในพิษงู มีความสำคัญ 3 อย่าง คือ 1) ทำให้ capillary permeability เพิ่มขึ้นและเกิดการทำลายของเซลล์ 2) ทำให้การแข็งตัวของเลือดผิดปกติ 3) ทำให้มีการปล่อยสารบางชนิดออกมา เช่น histamine เอนไซม์ที่พบในพิษงูมีมากกว่า 20 ชนิด

ที่พบในงูทุกกลุ่มมี 12 ชนิด ได้แก่ L- Amino acid oxidase(1.4.3.2) , Phosphodiesterase (3.1.4.1) , 5'- Nucleotidase(3.1.3.5) , Phosphomonoesterase(3.1.3.2) , Deoxyribonuclease(3.1.4.6) , Ribonuclease(2.7.7.16) , Adenosine triphosphatase(3.6.1.8) , Hyaluronidase(4.2.99.1) , NAD-nucleosidase(3.2.2.5) , Peptidase , Phospholipase A₂ (3.1.1.4) และ Arylamidase เอ็นไซม์ที่พบส่วนใหญ่เป็นพวก hydrolases (Hider , Karlsson & Namiranian. 1991 : 1 – 2 ; Lee, et al. 1979 : 61 – 64) ในงูกลุ่ม Elapidae พิษงูประกอบด้วยโปรตีนที่เป็นเอ็นไซม์ประมาณร้อยละ 25 – 70 (Meb. 1969 : 247 – 253) ส่วนในงูกลุ่ม Viperidae และ Crotalidae พบมากถึงร้อยละ 80 – 90 ของน้ำหนักแห้ง ดังนั้นพิษที่สำคัญของงูกลุ่มนี้จึงเป็นพวกเอ็นไซม์ สำหรับเอ็นไซม์ชนิดที่พบเฉพาะในงูกลุ่ม Elapidae ได้แก่ Glycerophosphatase , Phospholipase B(3.1.1.5) และ Acetylcholinesterase ซึ่งเป็นเอ็นไซม์ ที่แสดงความเป็นพิษต่อระบบประสาทของเหยื่อ โดยจะไฮโดรไลซ์ acetylcholine เป็น Choline และ acetic acid ทำให้ส่งสัญญาณประสาทไม่ได้ เกิดอัมพาตของอวัยวะต่าง ๆ (Lee, et al. 1973 : 26 – 29) เอ็นไซม์ Acetylcholinesterase มีมวลโมเลกุลประมาณ 130,000 ดาลตัน มี 2 หน่วยย่อย (Tu. 1977 : 97 – 107) เอ็นไซม์ต่าง ๆ ที่พบในพิษงูเห่าที่มีผลทำให้เกิดพิษโดยตรง เช่น เอ็นไซม์ L-amino acid oxidase มีผลเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อโดยการสร้างสารที่มีประสิทธิภาพสูงในการออกซิไดซ์ คือ Hydrogen peroxide ช่วยเสริมในการย่อยเหยื่อ เป็น Glycoprotein มีมวลโมเลกุล 100,000 – 130,000 ดาลตัน มีการศึกษาแล้วว่าเอ็นไซม์ชนิดนี้สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์แก่ตาย (Apoptosis) กับเซลล์ต่าง ๆ เช่น L1210 cell (mouse lymphocyte leukemia) , MOLT (human T-cell leukemia) เอ็นไซม์ L-amino acid oxidase แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยการจับกับผิวเซลล์ แล้วสร้างสาร Hydrogen peroxide (H₂O₂) ความเข้มข้นสูงเฉพาะบริเวณ เหนี่ยวนำให้เกิดการทำลายเซลล์ (Suhr & Kim. 1996 : 134 – 139) เอ็นไซม์ Hyaluronidase ออกฤทธิ์ในการไฮโดรไลซ์ hyaluronic acid gel ที่อยู่ระหว่างเซลล์และไฟเบอร์โดยเฉพาะในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน(connective tissue) ทำให้พิษงูแผ่ซ่านเข้าไปยังเนื้อเยื่อต่าง ๆ และยังมีส่วนช่วยเสริมอาการบวมให้มากขึ้น (Lee. 1979 : 65 ; Hider, Karlsson & Namiranian. 1991 : 1 – 2) เอ็นไซม์ Phospholipase A₂ เป็นเอ็นไซม์ที่มีลักษณะเป็นโพลีเปปไทด์สายเดี่ยว ประกอบด้วยกรดอะมิโน 110 – 120 หน่วย และที่มีลักษณะเป็น complex ของโพลีเปปไทด์ 2 – 4 สาย ทั้งชนิดเป็น acidic และ basic proteins เอ็นไซม์นี้แสดงผลในการทำลายฟอสโฟไลปิด (α lecithin) ที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ต่าง ๆ โดยเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ทำลายพันธะเอสเทอร์ของฟอสโฟไลปิด เปลี่ยนฟอสโฟไลปิดเป็นไลโซฟอสโฟไลปิด ซึ่งสารนี้จะทำให้ผนังเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือดแดงแตกหรือผนังเซลล์ของเนื้อเยื่ออื่นในร่างกายถูกทำลาย Phospholipase A₂ แสดงความเป็นพิษต่อระบบประสาท (neurotoxic) คือ เป็น pre - synaptic neurotoxin ที่เป็นพิษต่อกล้ามเนื้อ คือ Myotoxin หรือ ทำลายเซลล์และเนื้อเยื่ออื่น ๆ (Lee. 1979 ; Davidson & Dennis. 1991 : 107 – 145 ; Harris. 1991 :

91 – 129) เอนไซม์ Phospholipase A₂ มีหลายรูปแบบ (Tan & Tan. 1987 : 1249 – 1253) ทั้งชนิดไม่เป็นพิษและชนิดเป็นพิษ ซึ่งเอนไซม์ Phospholipase A₂ ชนิดเป็น Acidic polypeptide จะแสดงความเป็นพิษน้อยกว่า Basic polypeptide ดังจากการศึกษาเอนไซม์นี้ในพิษงูเห่า พ่นพิษแอฟริกา *Naja mossambica mossambica* พบหลายแบบแบ่งได้เป็น 2 พวก คือ CM I (acidic) CM II (basic non-toxic) และ CM III (basic toxic) (Ahmad & Lawrence. 1993 : 1279 – 1291) สำหรับพิษงูเห่า เอนไซม์ Phospholipase A₂ สามารถเพิ่มศักยภาพในการออกฤทธิ์มากขึ้นโดยออกฤทธิ์ร่วมกับ cytotoxic polypeptide เช่น cardiotoxin หรือ cytotoxin จากงานวิจัยของคอนเดรียและคณะ เอนไซม์ Phospholipase A₂ จากพิษงูเห่าอินเดีย *Naja naja* แสดงคุณสมบัติในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก (Hemolysis) โดยไฮโดรไลซ์ phospholipid ของเม็ดเลือดแดงเป็น lysophospholipid และเมื่อทำงานร่วมกับ Direct lytic factor (cardiotoxin หรือ cytotoxin) สามารถแสดงแอกติวิตีในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกเพิ่มมากขึ้น (Condrea, et al. 1964 : 60 – 73) เอนไซม์ชนิดนี้ในพิษงูเห่ายังแสดงคุณสมบัติเป็นพิษต่อกล้ามเนื้อ ทำให้กล้ามเนื้อเกิด necrosis ดังจากการศึกษาของแบทและเกาดาแสดงว่าเอนไซม์ Phospholipase A₂ ชนิด basic polypeptide – NN-XIII-PLA จากพิษงูเห่าอินเดีย *N. naja naja* ทำให้เกิดกล้ามเนื้อตาย (Bhat & Gowda. 1989 : 861 – 873) นอกจากนี้เอนไซม์ชนิดนี้ยังสามารถ depolarized กล้ามเนื้อลายได้ (Chang, et al. 1972 : 752 – 764) สำหรับเอนไซม์ Phospholipase A₂ ในพิษงูเห่าไทยที่มีผู้ศึกษาไว้ประกอบด้วยกรดอะมิโน 119 หน่วย เป็นชนิด acidic polypeptide คือ CM II และ CM III มีค่า LD₅₀ 10±3 และ 4.4±0.8 ไมโครกรัม/กรัม น้ำหนักหนู ตามลำดับ แต่ยังพบอีกหลายชนิดแต่ยังไม่ได้ศึกษา (minor peak) (Joubert & Toljaard. 1980 : 493 – 499)

โปรตีนส่วนที่เป็นพิษ

ในพิษงูเห่ามีด้วยกันหลายชนิด ชนิดที่สำคัญ ได้แก่

Neurotoxin

เป็นส่วนที่เป็นพิษที่เป็นสาเหตุสำคัญ ที่ทำให้ผู้ถูกงูเห่ากัดเสียชีวิตอย่างรวดเร็ว โดยออกฤทธิ์ต่อระบบประสาท neurotoxin สามารถแบ่งตามคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ presynaptic neurotoxin และ postsynaptic neurotoxin ตามตำแหน่งที่ออกฤทธิ์ต่อ motor end plate ของระบบประสาท (ชาญ โพนกุล. 2531 : 24) โดยที่พิษงูเห่าส่วนใหญ่จะมีพิษแบบ postsynaptic neurotoxin

Postsynaptic neurotoxin หรือ α neurotoxin จะออกฤทธิ์ที่บริเวณ neuromuscular junction โดยการจับกับ Nicotinic acetylcholine receptor (AChR) ใน postsynaptic membranes ของกล้ามเนื้อลายอย่างแน่นหนาเป็นเหตุให้ acetyl choline ซึ่งเป็นสารสื่อประสาท

ไม่สามารถรวมตัวกับ receptor site ได้ เซลล์กล้ามเนื้อติดต่อกับเซลล์ประสาทไม่ได้ จึงไม่ถูกกระตุ้นทำงานไม่ได้ ทำให้เป็นอัมพาตเคลื่อนไหวอวัยวะต่าง ๆ ไม่ได้ (Endo & Tamiya. 1991 :165) สาเหตุที่ผู้ถูกงูเห่ากัดตายอย่างรวดเร็ว เนื่องมาจากกล้ามเนื้อที่กระบังลมและกล้ามเนื้อซี่โครงไม่ทำงาน ทำให้หยุดหายใจ (Jimenez. 1970 : 389 ; Ratanabanangkoon. 1978 : 61 – 63 ; Karlsson. 1979 : 159 – 212) ในพิษงูเห่า neurotoxin แบบนี้แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ short chain neurotoxin และ long chain neurotoxin ทั้ง 2 ชนิด เป็น basic protein ขนาดเล็ก มีการทำงานทางชีวภาพเหมือนกัน สำหรับ short chain neurotoxins ประกอบด้วยกรดอะมิโน 60 – 62 หน่วย 15 ชนิด มี 4 disulfide bridges มีน้ำหนักโมเลกุล 6,500 – 7,000 ดาลตัน neurotoxin ชนิดนี้ มักจะไม่พบกรดอะมิโน alanine , phenylalanine และ methionine หรือ leucine มี glutamic acid มาก แต่ valine น้อย ส่วน long chain neurotoxin ประกอบด้วยกรดอะมิโน 71 – 74 หน่วย มีกรดอะมิโนเกือบทุกชนิดยกเว้น methionine มีบางชนิดที่มี alanine 2 – 5 หน่วย phenylalanine 1 – 3 หน่วย มี glutamic acid น้อย แต่มี valine มาก และประกอบด้วย 5 disulfide bridges มีน้ำหนักโมเลกุล 7,500 – 8,000 ดาลตัน ดูตารางสรุป amino acid composition ของ neurotoxin ที่ภาคผนวก postsynaptic neurotoxin นอกจากพบในกลุ่มงูเห่าแล้วยังพบในงูทะเล (Yang. 1974 : 1 – 43) สำหรับงูเห่าไทย คาร์ลสันและคณะ ได้แยกพิษชนิดนี้ให้บริสุทธิ์และหาองค์ประกอบกรดอะมิโนได้ 2 กลุ่ม คือ long chain neurotoxin ได้แก่ Toxin 3 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 71 หน่วย 5 disulfide bridge น้ำหนักโมเลกุล 7,820 ดาลตัน เป็นสารพิษ neurotoxin หลักที่พบในพิษงู มีค่าความเป็นพิษ LD₁₀₀ 100 ไมโครกรัม/กิโลกรัม หนู และ short chain neurotoxin ที่พบปริมาณเล็กน้อยอีก 3 ชนิด ได้แก่ Toxin 5 , Toxin 3C และ Toxin 7C ประกอบด้วยกรดอะมิโน 61 , 62 และ 62 หน่วย ตามลำดับ มี 4 disulfide bridge มีน้ำหนักโมเลกุล 6,875 , 6,793 และ 6,985 ตามลำดับ มีค่าความเป็นพิษ LD₁₀₀ ที่ 100 ไมโครกรัม/กิโลกรัม หนู (Karlsson. 1971 : 1 – 16) โดย long chain neurotoxin ของพิษงูเห่าไทย ได้มีการหาการเรียงลำดับของกรดอะมิโนของ Toxin 3 โดยอาร์นเบอร์กและคณะ ในปี 1973 (Yang. 1974 : 13) ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับพิษ neurotoxin นี้ โดยละเอียด ทั้งโครงสร้างทางเคมี การทำงาน สาเหตุการทำให้เกิดพิษ การออกฤทธิ์ต่ออวัยวะเป้าหมาย ส่วนของโครงสร้างที่ทำให้เกิดพิษ ลักษณะโครงสร้างของ receptor เป็นต้น (Endo & Tamiya. 1991 : 165 – 222 ; Atassi. 1991 : 53 – 83) ได้มีการศึกษาการผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อพิษชนิดนี้ต่าง ๆ เรื่อยมาเพื่อพัฒนาให้การรักษาได้ผลดี แก่พิษได้อย่างรวดเร็ว

Presynaptic neurotoxin แบ่งออกเป็น 2 พวก คือ 1) β -neurotoxin ซึ่งมีแอคติวิตีของเอนไซม์ Phospholipase A₂ เป็นส่วนประกอบ พบในกลุ่ม Elapidae บางชนิด Crotalidae และ Viperidae 2) presynaptic facilitatory neurotoxins พิษแบบนี้ไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์ พบในงู Dendroaspis สำหรับ β -neurotoxin แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มย่อย คือ

1.1) single – chain β -neurotoxin เป็น polypeptide สายเดี่ยว มีมวลโมเลกุล 13 – 14 KDa มีการเรียงลำดับของกรดอะมิโนคล้ายกับ Phospholipase A₂ จากตับอ่อนของสัตว์เลื้อยคลานด้วยนม ทั้งแบบมีพิษและไม่มีพิษ ได้แก่ notexin จาก Australian tiger snake , agkistrodotoxin จากพิษของงู *Agkistrodon halys* เป็นต้น 1.2) Multichain β -neurotoxin ประกอบด้วยโพลีเปปไทด์ 2 – 4 สาย ซึ่งมีอย่างน้อย 1 หน่วยย่อย ที่เป็น Phospholipase A₂ ได้แก่ Crotoxin จาก South american rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) 1.3) β -neurotoxin จาก Taiwan banded krait (*Bungarus multicinctus*) ประกอบด้วยโพลีเปปไทด์ 2 สาย ที่เชื่อมกันด้วย 1 disulfide bridge โดยสาย A มีกรดอะมิโน 120 หน่วย (PLA₂ activity) สาย B มีกรดอะมิโน 60 หน่วย β -neurotoxin ออกฤทธิ์โดยไปขัดขวาง neuro – muscular transmission โดยการไปจับกับ receptor ปลายประสาท ทำให้ acetylcholine หลั่งออกมาไม่ได้ หรือทำลาย acetylcholine vesicle ทำให้ทำงานไม่ได้ จึงส่งกระแสประสาทไม่ได้ ทำให้กล้ามเนื้อเป็นอัมพาต เมื่อกล้ามเนื้อที่เกี่ยวข้องกับระบบหายใจไม่ทำงานจึงทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิต ส่วน facilitatory neurotoxins ได้แก่ 2.1) dendrotoxin จากพิษงู *Dendroaspis angusticeps* ออกฤทธิ์โดย block a voltage – sensitive K⁺ channel ในเยื่อหุ้มเซลล์ประสาท และเพิ่มจำนวนการปล่อย acetylcholine โดยการกระตุ้นประสาทที่ neuromuscular junction dendrotoxins เป็นโพลีเปปไทด์สายเดี่ยว ประกอบด้วยกรดอะมิโน 57 – 60 หน่วย 3 disulfide bonds มีลักษณะการเรียงลำดับกรดอะมิโนคล้าย kunitz – type protease inhibitor จากตับอ่อนของสัตว์เลื้อยคลานด้วยนม 2.2) Anticholinesterase toxins หรือ fasciculins แสดงแอกติวิตีเป็น anticholinesterase (Hawgood & Bon. 1991 : 3 – 52)

Cardiotoxin

เป็นสารพิษที่พบในพิษงูเห่า ประมาณร้อยละ 25 – 55 ที่มีผลโดยตรงต่อหัวใจและเซลล์ มีชื่อเรียกต่าง ๆ กันออกไป เช่น Direct lytic factor (Condrea, et al. 1964 : 60 – 74) cytotoxin (Braganca, et al. 1967 : 508 – 520) cobramine (Larsen & Woff. 1968 : 2003 : 159 – 212) และ membranotoxin (Muzskat, et al. 1984 : 4913 – 4920) เป็นต้น Harvey ใช้คำว่า “cardiotoxin” สำหรับสารพิษชนิดนี้ ซึ่งเขาให้เหตุผลว่าเป็นเพราะตามประวัติที่มีการค้นพบสารนี้เป็นครั้งแรก สารนี้แสดงฤทธิ์ต่อหัวใจ และในงานวิจัยเมื่อไม่นานนี้ พบว่าสารพิษส่วนนี้มีผลต่อเนื้อเยื่อหัวใจอย่างชัดเจน และมีการเรียกชื่อนี้กันมากกว่า (Harvey. 1991 : 85 – 86) แต่สำหรับตัฟตันและไฮเดอร์ มีความเห็นว่าควรใช้ชื่อว่า “cytotoxin” เพราะไม่เจาะจงเกินไปเนื่องจากพิษชนิดนี้แสดงฤทธิ์ต่อเซลล์ต่าง ๆ (Dufton & Hider. 1991 : 259) สำหรับในที่นี้จะใช้คำว่า “cardiotoxin” แทนสารพิษชนิดนี้ สารพิษชนิดนี้มีคุณลักษณะเป็น โพลีเปปไทด์สายเดี่ยวที่แสดงคุณสมบัติเป็นเบสสูง (strongly basic polypeptide) ประกอบด้วยกรดอะมิโน

60 – 62 หน่วย มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 6,000 – 7,000 ดาลตัน cardiotoxin เป็นโพลีเปปไทด์ ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 15 – 17 ชนิด มี 4 disulfide bonds ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่แตกต่างจากลักษณะของ neurotoxin คือ 1) มีกรดอะมิโน lysine สูง (8 – 12 หน่วย) และมี arginine ต่ำ (1 – 2 หน่วย) 2) ไม่พบกรดอะมิโน tryptophan , histidine และ glutamic acid ซึ่งแตกต่างจาก short chain neurotoxin ที่ไม่พบ methionine , alanine และ phenylalanine 3) ประกอบด้วยกรดอะมิโนพวก hydrophobic สูง เช่น valine และ leucine ในขณะที่มีกรดอะมิโน threonine , serine และ glycine น้อย (Lee. 1973 : 78) (ดูตาราง amino acid composition ของ cardiotoxin ที่ภาคผนวก) cardiotoxin มีการค้นพบครั้งแรกโดย ชาร์เกอร์ (1947) จากพิษงูเห่า *Naja naja* โดยการตกตะกอนโปรตีน (sequential precipitation) ด้วย Na_2SO_4 และ NaCl ซึ่งโปรตีนชนิดนี้ทำให้หัวใจของคางคกและแมวเต้นช้าลงจนหยุดเต้นจึงเรียกว่า cardiotoxin แม้ไม่มีแคลเซียมก็ออกฤทธิ์ภายนอก สารพิษชนิดนี้ก็ยังแสดงแอกติวิตีได้ แสดงว่ามีผลโดยตรงต่อกล้ามเนื้อหัวใจ (Harvey. 1991 : 86) ต่อมาก็ได้มีการแยก cardiotoxin ให้บริสุทธิ์ ห่องค์ประกอบด้วยกรดอะมิโน และการเรียงลำดับของกรดอะมิโนของโปรตีน และโครงสร้างชั้นสูงขึ้นไป รวมทั้งศึกษาแอกติวิตีต่าง ๆ ของ cardiotoxin

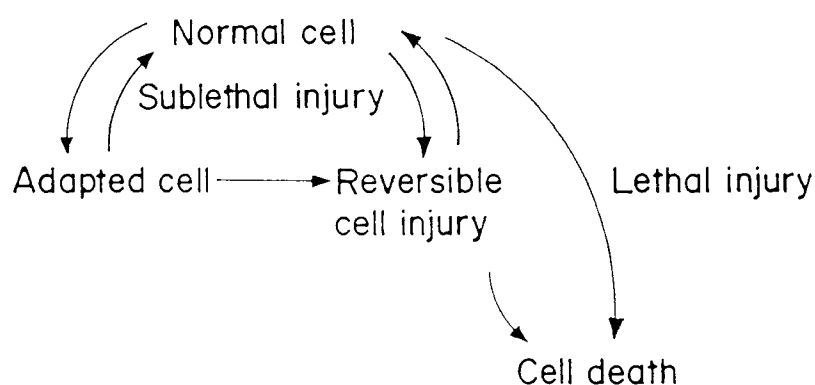
คุณสมบัติทางเภสัชวิทยาของ cardiotoxin มีค่าความเป็นพิษปานกลาง LD_{50} ประมาณ 1 ไมโครกรัม/กรัม น้ำหนักสัตว์ทดลอง ที่ฉีดเข้าทางเส้นเลือดดำ (Harvey. 1991 : 85) สาเหตุการตายเนื่องจาก cardiac arrest สารพิษ cardiotoxin มีผลต่อหัวใจและระบบไหลเวียนโลหิต จากการศึกษาในแมว cardiotoxin มีผลทำให้ความดันเลือดลดลงเนื่องจากเกิดพยาธิสภาพกับหัวใจ ดังจากมีลักษณะผิดปกติของคลื่นไฟฟ้าหัวใจ เช่น ช่วง P – R interval ยาวขึ้น amplitude ของคลื่น QRS complex ลดลง S – T segment และ T wave เปลี่ยนแปลง เกิด A – V block อย่างสมบูรณ์ และ idioventricular rhythm เป็นต้น (TU. 1977 : 302) และจากการศึกษาในหนู (rat) cardiotoxin ที่แยกจากพิษงูเห่าจีนตอนใต้ (Southern chinese cobra) *Naja naja atra* มีผลแสดงความเป็นพิษต่อหัวใจ โดยเปรียบเทียบกับ crude venom โดยฉีดเข้าทางเส้นเลือดดำ ซึ่งทั้ง crude venom และ cardiotoxin fraction มีผลทำให้ความดันเลือดลดลง จังหวะการเต้นของหัวใจผิดปกติ และลักษณะคลื่นไฟฟ้าหัวใจผิดปกติเห็นชัดเจน คือ มีช่วง P – R interval ยาว (แสดงว่ามี atrio – ventricular block เกิดขึ้น) ช่วงคลื่น QRS complex กว้าง นอกจากนี้ยังได้ศึกษาในหลอดทดลองโดยศึกษาจาก Isolated right และ left atria จากหนู rat ด้วยจากการทดลองแสดงถึงแอกติวิตีของ cardiotoxin ต่อเนื้อเยื่อหัวใจ (Sun & Walker. 1986 : 233 – 245) (รายละเอียดเกี่ยวกับคลื่นไฟฟ้าหัวใจดูคำอธิบายที่ภาคผนวก) สารพิษชนิดนี้นอกจากออกฤทธิ์ต่อเนื้อเยื่อหัวใจ ยังมีผลทำลายเซลล์และเนื้อเยื่ออื่น เช่น มีฤทธิ์ในการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก (Hemolysis) โดยแสดงผลโดยตรงในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก แลนคิสซ์ และคณะ ได้แยก Direct lytic factor (cardiotoxin) จาก *Naja naja* ที่ปราศจาก Phospholipase

A₂ เพื่อนำมาทดสอบการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกที่ระดับความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกน้อยกว่า 40 % ภายในเวลา 40 นาที แต่เมื่อเติม PLA₂ สามารถทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกได้ 100 % (Lankisch. 1971 : 267 – 272) cardiotoxin แสดงแอกติวิตีในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกไม่สูงมาก แต่เมื่อให้ทำงานร่วมกับ PLA₂ โดยเติมปริมาณเล็กน้อย ทำให้มีฤทธิ์เพิ่มขึ้นสูงมาก (Condrea. 1974 : 121 – 126 ; Louw & Visser. 1978 : 163 – 171 ; Harvey, Hider & Khada. 1983 : 215 – 221) นอกจากนี้ปัจจัยที่มีผลต่อการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงโดยcardiotoxin ยังขึ้นกับชนิดและอายุของเม็ดเลือดแดง (Harvey. 1991 : 88) ความเข้มข้นของสารพิษ cardiotoxin เมื่อความเข้มข้นสูงขึ้นก็ทำให้มีการแตกตัวมากขึ้น ระยะเวลาในการบ่ม อุณหภูมิในการบ่ม (ที่เหมาะสม 37 °ซ) pH (ที่เหมาะสม 7.5 – 8.5) และ Divalent ion เช่น Ca²⁺ และ PO₄³⁻ (Zusman, et al. 1844 : 629 – 636 ; Jiang, Fletcher & Smith. 1989 : 247 – 257 ; Jiang, Fletcher & Smith. 1989 : 1297 – 1305 ; Vernon & Rogers. 1992 : 701 – 709) นอกจากเซลล์เม็ดเลือดแดงแล้ว cardiotoxin จากพิษงูยังแสดงฤทธิ์ในการทำลายเซลล์อื่น ๆ ทั้งเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็ง บรรากันคำได้แยก cardiotoxin จากพิษงูเห่าอินเดีย *Naja naja* โดย cardiotoxin ที่แยกได้แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อเซลล์ Yoshida sarcoma สูงกว่าเซลล์ชนิดอื่น ๆ ที่ศึกษา (Braganca. 1967 : 508 – 520) cardiotoxin D จาก *Naja naja siamensis* แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ T- lymphocytes มากกว่าเซลล์ B – lymphocyte และเซลล์ macrophages ซึ่งทำให้เซลล์แตกโดยอาจทำลายเยื่อหุ้มเซลล์โดยตรง (Hinman, et al. 1987 : 1011 – 1014) โทซิงและคณะได้ศึกษาการจับของ cardiotoxin จากพิษงูเห่าอียิปต์ (*Naja haje annulifera*) ต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์หัวใจโดยติดฉลาก cardiotoxin ด้วย S³⁵ การจับระหว่าง cardiotoxin ที่ติดฉลากกับเยื่อหุ้มเซลล์อยู่ในสภาวะอิมมัตว์และสามารถแทนที่ได้ด้วย cardiotoxin ไม่ติดฉลากแต่ neurotoxin ไม่สามารถจับแทนที่ได้ (Tonsing, et al. 1983 : 283 – 288) การจับของ cardiotoxin ที่ติดฉลากด้วย I¹²⁵ ที่อุณหภูมิ 37 °ซ. ต่อเซลล์ Fetal lung เป็นการจับแบบไม่สามารถย้อนกลับได้ (irreversible binding) (Takechi, Tanaka & Hayashi. 1986 143 – 146) จากการวิจัยทั้งสองแสดงให้เห็นว่า cardiotoxin สามารถจับอย่างแน่นหนากับเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ต่าง ๆ แต่กลไกการทำลายเซลล์ยังไม่ทราบแน่ชัด cardiotoxin แสดงแอกติวิตีในการทำให้เซลล์แตกต่อเซลล์มะเร็งสูงกว่าเซลล์ปกติหลายเท่า (Iwagushi, Takechi & Hayashi. 1985 : 343 – 349 ; Zaheer, & Braganca. 1980 : 41 – 46 ; Gasanov, et al. 1997 : 133 – 142) ลีกล่าววว่า cardiotoxin สามารถทำให้เกิดการระคายเคืองเฉพาะบริเวณขึ้น (Lee. 1968) นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ในการทำให้เกิดการหดเกร็งของกล้ามเนื้อลาย เนื่องจาก irreversible depolarization ของเยื่อหุ้มเซลล์ (Harvey, et al. 1982, 1983 ; Fletcher & Iizzo. 1987 : 1003 – 1010) ทำให้กล้ามเนื้อสูญเสียความสามารถในการตอบสนองต่อการหดตัวจากการกระตุ้นตามปกติ สาร cardiotoxin ยังสามารถกระตุ้นการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ และมีผลไปยังยัง peripheral

nerve (Lee. 1973) การที่ cardiotoxin แสดงคุณสมบัติต่าง ๆ ดังกล่าว น่าจะมีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับโครงสร้างของ cardiotoxin ซึ่งจะต้องศึกษาถึงความสัมพันธ์นี้ และเข้าใจกลไกการทำงานของสารพิษชนิดนี้ต่อไป

การตายของเซลล์และเนื้อเยื่อจากพิษงู

เซลล์เป็นองค์ประกอบพื้นฐานของชีวิต ประกอบด้วย เยื่อหุ้มเซลล์ ไซโตพลาสซึม ออร์แกเนลล์ต่าง ๆ ในไซโตพลาสซึม และ นิวเคลียส เซลล์แต่ละชนิดมีลักษณะแตกต่างกันโดยขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม หน้าที่ และองค์ประกอบภายในเซลล์ ในสภาวะปกติเซลล์มีกระบวนการต่าง ๆ มากมายดำเนินอยู่อย่างต่อเนื่อง ไม่ได้หยุดนิ่งและมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา เพื่อปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนไป การเปลี่ยนแปลงของเซลล์อยู่ในขอบเขตหนึ่งซึ่งถือว่าเป็นภาวะปกติของเซลล์คือเซลล์อยู่ในเสถียรภาพของเซลล์ (cellular homeostasis) เมื่อเกิดภัยอันตราย (injury) ไปรบกวนเสถียรภาพของเซลล์ เซลล์จะมีปฏิกิริยาตอบสนองต่อภัยอันตรายเหล่านั้นโดยขึ้นอยู่กับ ชนิด ระยะเวลา และความรุนแรงของภัยอันตราย รวมทั้งสภาพของตัวเซลล์เอง ปฏิกิริยาของเซลล์ที่เกิดขึ้นมีดังนี้ (ภาพประกอบ 6)



ภาพประกอบ 6 แสดงปฏิกิริยาของเซลล์ที่ตอบสนองต่อภัยอันตราย ทั้งประเภทที่ทำให้ไม่ถึงตาย (sublethal injury) และทำให้ถึงตาย (lethal injury) (วิญญู มิตรานันท์. 2535)

1. Adaptation เมื่อเซลล์ได้รับภยันตรายประเภทไม่ทำให้ถึงตาย เซลล์มีการปรับตัวให้เข้ากับภยันตรายได้โดยการเปลี่ยนระดับความสมดุลในเซลล์ขึ้นใหม่ เมื่อขจัดสาเหตุออกไปเซลล์ก็จะคืนกลับสู่สภาพเดิม
2. Reversible cell injury เซลล์ไม่มีการตอบสนองในการปรับตัวต่อภยันตราย เป็นผลนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงในทางเสื่อม แต่สามารถคืนสู่สภาพเดิมได้ทั้งหน้าที่และโครงสร้างเมื่อได้ขจัดสาเหตุออกไป
3. Cell death ถ้าหากภยันตรายชนิด reversible injury ยังดำเนินต่อไป ในที่สุดจะเกิดการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่จุดไม่กลับคืน หรือเซลล์ได้รับภยันตรายประเภททำให้ถึงตาย ซึ่งมีความรุนแรงต่อเซลล์ จนเซลล์ไม่สามารถคืนกลับสู่สภาวะปกติได้ และมีผลทำให้เซลล์ตาย (วิญญู มิตรานันท์. 2535 : 33 – 34 ; โซติ ชิตรานนท์. 2530 : 39 – 43)

Necrosis คือ การตายของเซลล์และเนื้อเยื่อ ณ ที่ใดที่หนึ่งของร่างกาย ภายหลังจากที่เซลล์ได้รับบาดเจ็บรุนแรง ไม่สามารถกลับคืนสู่สภาวะปกติได้ (เวคิน นพินิตย์. 2523 ; Walter & Israel. 1987) และต้องมีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่เกิดขึ้นภายหลังจากเซลล์ตาย ในขณะที่ยังมีชีวิตอยู่ (วิญญู มิตรานันท์. 2535 : 45 ; โซติ ชิตรานนท์. 2530 : 68) การตายของเซลล์และเนื้อเยื่อมี 2 ประเภท คือ การตายของเซลล์และเนื้อเยื่อเฉพาะที่ (local necrosis) ภายในร่างกายที่ยังมีชีวิตอยู่ และการตายทั่วร่างกาย (death)

ลักษณะทั่วไปของเซลล์และเนื้อเยื่อที่ตาย โดยกลไกการเปลี่ยนแปลงที่พบได้คือ mitochondria บวมเต่งมากขึ้น รวมทั้งส่วน cristae ด้วย เยื่อหุ้มเซลล์เกิดการฉีกขาด เซลล์จะบวมทึบแสงและซีด lysosome บวม มีการรั่วไหลของโปรตีน เอ็นไซม์ และ metabolite ต่าง ๆ ออกไปนอกเซลล์ มี permeability ของ lysosomal membrane เพิ่มขึ้น มีการรั่วไหลของเอ็นไซม์ใน lysosome สู่ไซโตพลาสซึม ทำให้มีการย่อยสลายองค์ประกอบของเซลล์ ที่เรียกว่า autolysis นอกจากนั้นเซลล์ที่ตายจะทำให้เกิดมีการอักเสบ เม็ดเลือดขาวจากพลาสมาซึ่งเรียกว่า เซลล์อักเสบ (inflammatory cell) เคลื่อนมายังบริเวณที่เซลล์ตาย เซลล์เม็ดเลือดขาวปล่อยเอ็นไซม์จาก lysosome ออกมาย่อยเซลล์และเนื้อเยื่อที่ตาย การย่อยสลายด้วยวิธีนี้เรียกว่า heterolysis และเกิดการเปลี่ยนแปลงของนิวเคลียส (Robbins & Kurmar. 1987 : 13 – 15 ; Phillips & Murray. 1995 : 15 – 17 ; วิญญู มิตรานันท์. 2535 : 45 ; โซติ ชิตรานนท์. 2530 : 68 ; เวคิน นพินิตย์. 2523) ทางใดทางหนึ่งของสองทาง คือบางเซลล์นิวเคลียสหดตัวเล็กลงเห็นเป็นก้อนเล็ก ๆ เรียกว่า pyknosis แล้วค่อยสลายไปเนื่องจากการย่อยของเอ็นไซม์ที่หลังจาก lysosome บางเซลล์หลังการเกิด pyknosis แล้วต่อมานิวเคลียสแตกออกเป็นชิ้นเล็กชิ้นน้อย (วิญญู มิตรานันท์. 2535 : 45) necrosis เกิดจากการตายของเซลล์จำนวนมาก จะยังเห็นโครงร่างของเนื้อเยื่อที่บอกลักษณะของอวัยวะนั้นได้ แต่ลักษณะของเซลล์โดยละเอียดไม่เหลืออยู่ จากการย่อยสลาย เซลล์ที่ตายจะติดสีย้อมของนิวเคลียส ไซโตพลาสซึมผิดปกติ

สาเหตุการตายของเซลล์และเนื้อเยื่อมีหลายสาเหตุ เช่น อวัยวะขาดเลือดมาหล่อเลี้ยง ติดเชื้อจุลินทรีย์ ถูกสารพิษ การตายของเซลล์และเนื้อเยื่อจากพิษงูเกิดได้จากพิษงูหลายชนิด เช่น งูเห่า งูแมวเซา งูทะเล งูกะปะ และ งูเขียวหางไหม้ เป็นต้น ซึ่งจะมีลักษณะที่แตกต่างกันออกไป สำหรับพิษงูเห่าสามารถทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณ จากบริเวณที่ถูกกัด ดังนี้

เรตได้ทดลองฉีดพิษงูเห่าที่ปราศจากเชื้อเข้าใต้ผิวหนังของสุนัข ปรากฏว่าทำให้เกิดเนื้อเน่าได้ แสดงว่าการที่เกิดเนื้อเน่าไม่ได้เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย และในรายที่ตรวจพบเชื้อแบคทีเรียที่แผลแม้ว่าจะใช้ยาต้านจุลชีพที่มีประสิทธิภาพฆ่าเชื้อแล้วก็ไม่สามารถทำให้แผลหายได้เร็ววัน คงกินเวลานานเช่นเดิม (Reid. 1964)

ได้มีการศึกษา Cytotoxic activity ของพิษงูกลุ่มต่าง ๆ ได้แก่กลุ่ม Elapidae (*naja sp.*) Crotalidae (*Crotalus sp.*) และ Viperidae (*Vipera sp.*) ต่อ Melanoma B16F10 Chondrosarcoma cell กลุ่ม Elapidae แสดง cytotoxic activity สูงสุด ทั้งการศึกษาในหลอดทดลองและในสิ่งมีชีวิต ลักษณะการเกิดพิษต่อเซลล์มีลักษณะที่แตกต่างกันในงูพิษแต่ละกลุ่ม (Matyas & Ovada. 1978 : 1601 – 1607)

พิษงูเห่าสามารถทำให้เกิด necrosis ในกล้ามเนื้อลาย โดยสทริงเกอร์และคณะ ได้ทดลองฉีดพิษงูเห่า *Naja naja kaouthia* เข้ากล้ามเนื้อลายของหนูและมีการศึกษาโครงสร้างละเอียดของเซลล์กล้ามเนื้อในการเกิด necrosis ผลปรากฏว่าพิษงูเห่า 15 ไมโครกรัม/กรัม หนูเป็นสาเหตุทำให้เกิด necrosis ในกล้ามเนื้อลายในหนู (Stringger, et al. 1971 : 442 – 450)

ประไพ พงษ์ประสิทธิ์ และคณะ ได้ศึกษาอาการเฉพาะที่ของแผลงูเห่ากัด ทางพยาธิสภาพหลังการได้รับการรักษาด้วยเซรุ่มแก้พิษงูเห่าไทย ปรากฏว่ามีพยาธิสภาพเกิดการเน่าตายของเซลล์ชั้นผิวหนังเป็นหย่อม ๆ มีการเสื่อมสภาพของต่อมเหงื่อ และเนื้อเยื่อคอลลาเจน มีการอักเสบของหลอดเลือด (ประไพ พงษ์ประสิทธิ์ และคณะ. 1988 : 475 – 480)

การศึกษาพยาธิสภาพของการตายของผิวหนังเฉพาะบริเวณ (local skin necrosis) จากพิษของงูเห่าฟันพิษแอฟริกาตะวันออก (spitting cobra , *Naja nigricollis*) ที่ฉีดเข้าใต้ผิวหนังของหนู ปรากฏว่าพิษของงูเห่าชนิดนี้ทำให้เกิดการตายของผิวหนังอย่างมากจากบริเวณที่ฉีดเข้าไป (Iddon , et al. 1987 : 665 - 672)

ในปริญาณิพนธ์ของ วรณา ธรรมพาลเลิศ ได้ศึกษาแล้วว่าพิษงูเห่าไทยและส่วนประกอบของพิษงูเห่าไทยส่วนที่ 1 และ 13 จากการแยกด้วย Ion Exchange Chromatography Bio – Rex 70 ทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณโดยการทดสอบฉีดเข้าใต้ผิวหนังของกระต่ายและตรวจเนื้อเยื่อทางพยาธิวิทยา ซึ่งชี้ให้เห็นว่ามีส่วนประกอบของพิษงูเห่าไทย ที่เป็นพิษต่อเซลล์และเนื้อเยื่อ ทำให้เซลล์และเนื้อเยื่อตาย (วรณา ธรรมพาลเลิศ. 2534)

พิษงูเห่าแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ ทำให้เซลล์และเนื้อเยื่อตาย แต่ส่วนประกอบชนิดใดของพิษงูเห่าที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดเซลล์และเนื้อเยื่อตาย จากการอ้างอิงในตอนต้นเรื่อง ส่วนประกอบของพิษงู โปรตีนที่เป็นพิษมีฤทธิ์ในการทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อ ได้แก่ เอนไซม์บางชนิดและโปรตีนพิษพวก cardiotoxin หรือ cytotoxin ที่แสดงฤทธิ์โดยตรงต่อเซลล์ต่าง ๆ อาจจะเป็นสาเหตุของการตายของเซลล์และเนื้อเยื่อจากพิษงูเห่า ดังจากการศึกษาต่อไปนี้

โออรอนและคณะ ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเซลล์ WEHI – 3B Leukemia หลังจากได้รับสาร cytotoxin P₄ จากพิษงูเห่าพิษแอฟริกาตะวันออก *Naja nigricollis nigricollis* โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ที่ช่วงระยะเวลาในการบ่มต่าง ๆ กัน ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (2.5×10^{-7} M) เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารพิษ ผลปรากฏว่า หลังจาก 1 ชั่วโมง เซลล์มีการเปลี่ยนแปลง ชั้นแรก เกิดที่ mitochondria ซึ่งจะบวม เมมเบรนข้างนอกฉีกขาด และ cristae แตกกระจาย หลังจาก 2 ชั่วโมง เกิด vacuol ในไซโตพลาสซึม เกี่ยวพันกับการเพิ่มจำนวน lysosome หลังจาก 4 ชั่วโมง mitochondria เสียหาย และ endoplasmic reticulum เปลี่ยนรูปเป็น microsome เยื่อหุ้มเซลล์ฉีกขาด เซลล์แตกปล่อยสิ่งที่บรรจุอยู่นอกเซลล์ (Oron, et al. 1992 : 1122 – 1126)

จากผลการวิจัยของโอนบีและคณะ แสดงว่า Cardiotoxin 1 จากพิษงูเห่าจีนตอนใต้ *Naja naja atra* เป็นสาเหตุทำให้กล้ามเนื้อตาย (myonecrosis) ในสิ่งมีชีวิต โดยการฉีดพิษ Cardiotoxin 1 เข้าในหนูทางกล้ามเนื้อ กล้ามเนื้อลายจะเกิดการตายภายใน 30 นาที หลังจากฉีดพิษ โดยการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และจะเกิดอาการเพิ่มมากขึ้นเมื่อถึง 24 ชม.และยังได้ทดสอบแอกติวิตีของเอนไซม์ phospholipase A₂ ที่บริสุทธิ์ ต่อการทำให้เกิดกล้ามเนื้อตายโดยใช้ความเข้มข้นเท่ากันและเพิ่มขึ้นเป็นสิบเท่าที่คิดว่าอาจจะปนเปื้อนกับ cardiotoxin ในการแยก cardiotoxin จากพิษงูเห่า ปรากฏว่าไม่สามารถทำให้เกิดกล้ามเนื้อตายได้ ดังนั้น แสดงว่า cardiotoxin จากพิษงูเห่าจีนตอนใต้ *Naja naja atra* เป็นสาเหตุให้เกิดการตายของเซลล์กล้ามเนื้อในสิ่งมีชีวิต แต่จะมีประสิทธิภาพมากขึ้นเมื่อร่วมกับเอนไซม์ phospholipase A₂ (Ownby, et al. 1993 : 397 - 709)

จากรายงานเมื่อไม่นานนี้ ได้มีการศึกษาผลของ Ca²⁺ ภายนอกเซลล์ ต่อสารพิษ cardiotoxin ที่แยกจากพิษงูเห่าจีนตอนใต้ *Naja naja atra* ที่เป็นพิษต่อเซลล์ ในการทำให้เซลล์ตาย (cell death หรือ cell necrosis) โดยได้ศึกษาจาก aortic endothelial cells ของกระต่าย ผลสรุปว่า cardiotoxin ทำให้เกิดการตายของเซลล์อย่างมาก เมื่อมีความเข้มข้นของ Ca²⁺ ในระดับสรีรวิทยา (1.2 mM.) ถ้าไม่มี Ca²⁺ ภายนอกเซลล์ ความสามารถในการทำให้เซลล์ตายจะลดลง แต่จะป้องกันการทำลายเซลล์ของ cardiotoxin ได้ เมื่อมีความเข้มข้นสูงมาก (7 - 10 mM.) (Ou , et al. 1997 : 29 - 38)

การแยกโปรตีนของพิษงูให้บริสุทธิ์และหาค่าประกอบกรดอะมิโน

วิธีการที่จะศึกษาว่าโปรตีนชนิดใดแสดงสมบัติอย่างไรนั้น จะต้องทำการแยกโปรตีนชนิดนั้นออกมาจาก crude เพื่อป้องกันการรบกวนของโปรตีนหรือสารอื่น ๆ ที่อาจส่งผลต่อการทดสอบ แล้วทำการศึกษาแอกติวิตีต่าง ๆ ประกอบกับการศึกษาโครงสร้างของโปรตีนชนิดนั้น การที่สันนิษฐานว่าโปรตีนที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดเนื้อเยื่อตายจากพิษงูเห่าไทย อาจเป็นสารพวก cardiotoxin หรือ cytotoxin ดังนั้นจึงจะต้องทำการแยกโปรตีนที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อจากพิษงูเห่า ศึกษาแอกติวิตี และองค์ประกอบของโปรตีน เช่น การหาค่าประกอบกรดอะมิโนของโปรตีน เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบกับ

วิธีการแยกโปรตีนมีหลายวิธีแต่การแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์เพียงขั้นตอนเดียวทำได้ยาก ถึงแม้วิธีนั้น จะมีความสามารถในการแยกสูง (high resolving powers) ก็ตาม โดยทั่วไปมักจะใช้หลาย ๆ วิธีร่วมกัน เช่น Electrophoresis Gel Filtration Chromatography Ion Exchange Chromatography Reverse – phase high pressure liquid chromatography (Hider, 1991 : 3) การตกตะกอนด้วยเกลือต่าง ๆ เป็นต้น เมื่อได้โปรตีนที่บริสุทธิ์ สามารถนำไปหาค่าประกอบกรดอะมิโนและการเรียงลำดับของกรดอะมิโนในโปรตีนต่อไป สำหรับตัวอย่างวิธีการแยกพิษงูเห่ามีผู้ศึกษาวิจัยไว้ดังตัวอย่างต่อไปนี้

สำหรับการแยกพิษงูเห่า ในปี 1971 คาร์ลสันและคณะได้ทำการแยก neurotoxin จากงูเห่า 2 สายพันธุ์ คือ *Naja naja siamensis* และ *Naja naja naja* ขั้นแรกทำการแยกโดยใช้เทคนิค Ion Exchange Chromatography ด้วย cation exchanger resin - Bio - Rex 70 ใน 0.2 โมลาร์ แอมโมเนียมอะซิเตต pH 6.5 ทะพิษงูจากคอลัมน์ด้วย 0.09 โมลาร์ แอมโมเนียมอะซิเตต และตามด้วย gradient ของแอมโมเนียมอะซิเตต ระหว่างความเข้มข้น 0.14 กับ 1.4 โมลาร์ แล้วชะต่อด้วย 1.4 โมลาร์ สามารถแยกพิษงูเห่าไทยได้ 13 ส่วน คือ A, B, C และ 1 - 10 จากการแยกครั้งนี้พบว่าส่วน A, B และ C มีแอกติวิตีของเอนไซม์ phospholipase A₂ และมีแอกติวิตีในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก ส่วนที่ 10 มีแต่แอกติวิตีการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกและมีค่าสูงมาก สำหรับส่วนอื่น ๆ ไม่มีแอกติวิตีทั้งสองนี้ จากส่วนที่ 10 นี้ คาร์ลสันและคณะ คาดว่าน่าจะเป็นสารพิษพวก cardiotoxin เพราะว่ามีแอกติวิตีในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกสูงมาก ไม่มีแอกติวิตีของเอนไซม์ phospholipase A₂ และมีค่า LD₅₀ ปานกลาง ประมาณ 1,000 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ของหนู ที่ฉีดเข้าทางเส้นเลือดดำ (Karlsson, Amberg & Eaker, 1971 : 1 - 16)

วรรณ ธรรมพาลเลิศ ได้แยกพิษงูเห่าไทย *Naja kaouthia* ด้วยเทคนิค Ion Exchange Chromatography โดยใช้ Bio - Rex 70 ตามวิธีของคาร์ลสันและคณะ สามารถแยกพิษงูเห่าไทยได้ 13 ส่วน ได้ทดสอบสมบัติต่าง ๆ ของพิษงูส่วนต่าง ๆ ที่แยกได้ โดยเฉพาะได้ทดสอบการตายของเนื้อเยื่อ (tissue necrosis) และตรวจดูเนื้อเยื่อทางพยาธิวิทยา โดยฉีดเข้า

ได้ผิวหนังของกระต่าย เปรียบเทียบกับพิษงูที่ยังไม่แยก พบว่าพิษงูที่ยังไม่แยก พิษงูที่แยก ส่วนที่ 1 และ ส่วนที่ 13 มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อ โดยส่วนที่ 13 เกิดการตายของเนื้อเยื่อ มาก ส่วนที่ 1 เกิดน้อย และพิษงูที่ยังไม่แยกเกิดการตายของเนื้อเยื่อมากที่สุด วรรณายังได้ ทดสอบหาแอกติวิตีของเอนไซม์ phospholipase A₂ ซึ่งตรวจพบในส่วนที่ 1 แต่ไม่พบในส่วนที่ 13 จากปริญญานิพนธ์นี้ ชี้ว่าโปรตีนส่วนที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อ อยู่ในส่วนที่ 1 และ 13 โดยเฉพาะส่วนที่ 13 มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่ออย่างมาก ซึ่งส่วนที่ 13 ที่แยกได้นี้ตรงกับส่วน ที่ 10 ของคาร์ลสัน ที่แนะนำว่าจะเป็นสารพิษพวก cardiotoxin (วรรณ ธรรมพาลเลิศ. 2534)

โบกิสและคณะ ได้แยกพิษงูเห่าแอฟริกาพันธุ์ *Naja mossambica mossambica* เพื่อแยก cardiotoxin ให้บริสุทธิ์ โดยผ่านพิษงูลงใน Sephadex G - 50 – Gel Filtration ใน 0.1 โมลาร์ แอมโมเนียมอะซิเตด pH 8.5 แล้วแยกด้วย Amberlite CG – 50 ใน 0.45 โมลาร์ แอมโมเนียมอะซิเตด pH 7.3 สามารถแยกได้ cardiotoxin 4 ชนิด ซึ่งได้นำไปหากรดอะมิโน ต่อไป (Bougis. 1981 : 4915 - 4920)

เช่นเดียวกับการแยก cardiotoxin จากงูเห่ากัมพูชา (cambodian cobra) โดยใช้ Sephadex G - 75 แล้วเลือกส่วนที่มีแอกติวิตีของ cardiotoxin มาแยกต่อด้วย Bio - Rex 70 ใน 0.2 โมลาร์ แอมโมเนียมอะซิเตดบัฟเฟอร์ pH 7.3 โดยทำ gradient ระหว่างความเข้มข้น 0.11 - 1.5 โมลาร์ แอมโมเนียมอะซิเตด (Fryklund & Eaker. 1969 : 2860 - 2868)

ฮาร์เวย์และคณะ ได้แยก cardiotoxin จากพิษงูเห่าไทย *Naja naja siamensis* โดยใช้ Bio - Rex 70 - Ion Exchange Chromatography วิธีแยกเช่นเดียวกับวิธีการแยกของ คาร์ลสัน (1979) ได้นำส่วนสุดท้ายมาแยกต่อด้วย Gel Filtration - Sephadex G – 50 เพื่อ กำจัด dimer จากการ lyophilized แล้วนำไปแยกต่อด้วย Bio - Rex 70 ในแอมโมเนียมอะซิเตดบัฟเฟอร์ pH 7.3 โดยทำ gradient ระหว่างความเข้มข้น 0.2 - 1.4 โมลาร์ แยกได้ cardiotoxin 4 ชนิด (Harvey, Marchall & Karlsson. 1982 : 379 - 396)

การ purify cardiotoxin จากพิษงูเห่าชนิดต่าง ๆ ตามวิธีของฮอดเกสและคณะ แยกพิษงูเห่าชนิดต่าง ๆ ด้วย Sephadex G - 50 ในแอมโมเนียมอะซิเตด 0.1 โมลาร์ pH 5.4 แล้วตามด้วย SP Sephadex C 25 - Cation exchange column จากนั้นนำส่วนที่มีแอกติวิตี ของ cardiotoxin มาแยกด้วย C8 Radial-pak reverse-phase HPLC แล้วนำ cardiotoxin ที่ได้ ไปหาองค์ประกอบกรดอะมิโน (Hodges, Agbaji & Hider. 1987 : 373 - 383)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้า

แนวทางดำเนินการศึกษาค้นคว้า

ในการทำปริญญานิพนธ์เรื่อง “ การศึกษาองค์ประกอบกรดอะมิโนของโปรตีน ที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณจากพิษงูเห่าไทย ” สรุปแนวทางในการดำเนินงานวิจัยตามแผนผังการดำเนินงาน ที่แสดงในภาพประกอบ 7 ซึ่งมีขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

ขั้นที่ 1 นำพิษงูเห่าไทย (ในรูป lyophilized venom) มาแยกด้วยวิธี Ion Exchange Chromatography ซึ่งใช้ Bio - Rex 70 cation exchanger resin ในสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 6.5 ตามวิธีของคาร์ลสันและคณะ (1971) และ วรรณ ธรรมพาลเลิศ (2534) พิษงูเห่าจะแยกออกเป็นส่วน(fraction) ต่าง ๆ ทดสอบหาปริมาณโปรตีนของแต่ละส่วน และทดสอบหาส่วนที่มีผลต่อการตายของเซลล์และเนื้อเยื่อ โดยการหาแอกติวิตีการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก แล้วเลือกส่วนที่มีแอกติวิตีสูงที่สุดในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก ไปทำการแยกต่อไป

ขั้นที่ 2 นำส่วนที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อสูง แบ่งส่วนหนึ่งไปทดสอบการตายของกล้ามเนื้อหัวใจ ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนด้วย Electrophoresis (PAGE) ส่วนที่เหลือนำมาแยกต่อด้วย Gel Filtration Chromatography โดยใช้ Sephadex G - 50 ในสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตต 0.2 โมลาร์ pH 6.5 หาปริมาณโปรตีนของแต่ละส่วนที่แยกได้ เลือกส่วนที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อ จากการหาแอกติวิตีการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก นำโปรตีนไปแยกต่อในขั้นต่อไป

ขั้นที่ 3 นำส่วนที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อจากขั้นที่ 2 มาทำการแยกต่อด้วย Ion Exchange Chromatography โดยใช้ Bio - Rex 70 ที่ชะด้วย gradient ของสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตต ระหว่างความเข้มข้น 0.15 - 1.5 โมลาร์ pH 7.3 สารละลายพิษงูเห่าจะแยกออกเป็นส่วนต่าง ๆ หาปริมาณโปรตีน ตรวจสอบ และเลือกส่วนที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อ ด้วยการหาแอกติวิตีในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก

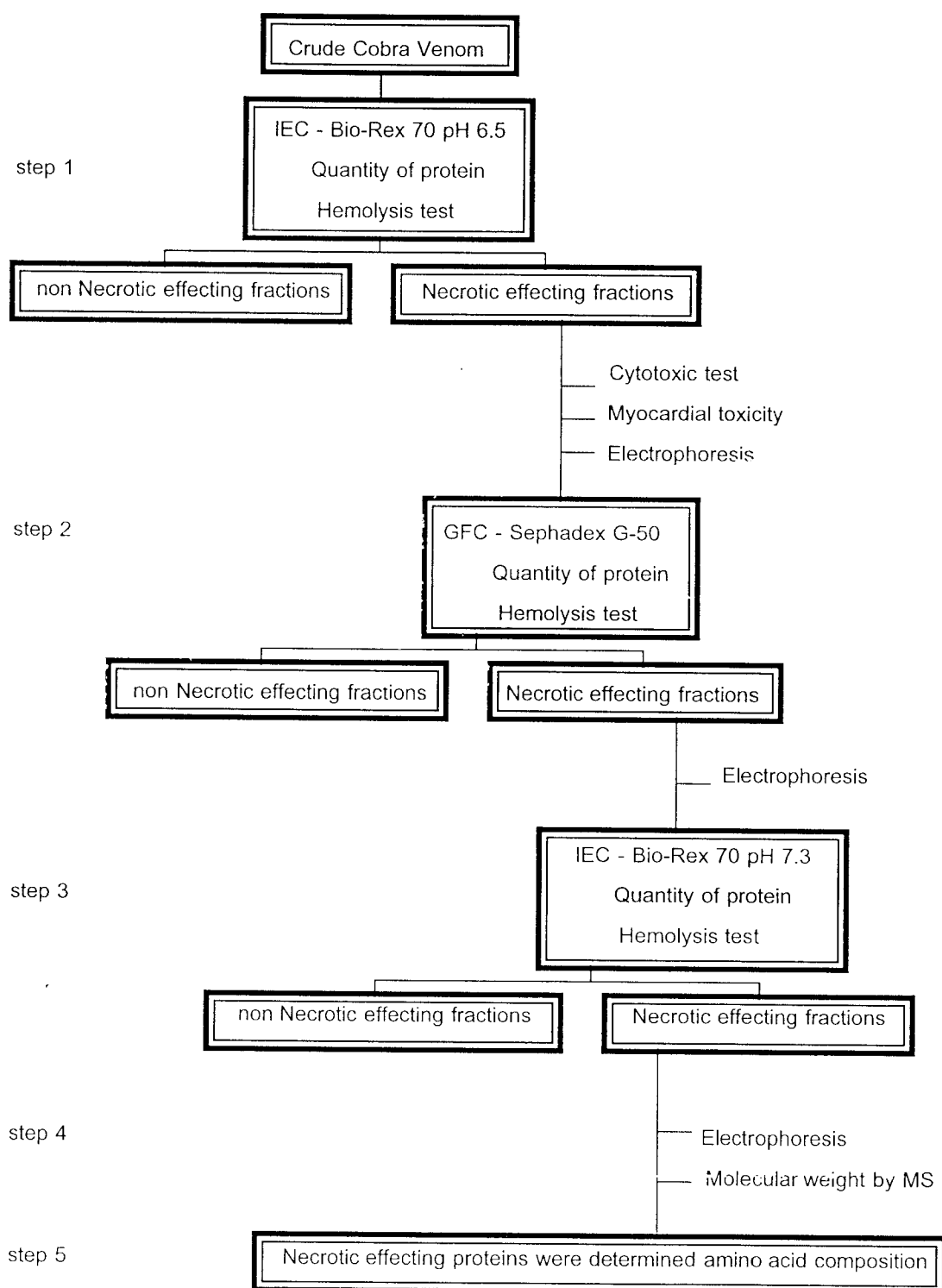
ขั้นที่ 4 ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนของแต่ละส่วน ที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อด้วย Electrophoresis (PAGE และ SDS – PAGE) จนแน่ใจว่าได้โปรตีนที่บริสุทธิ์ พร้อมทั้งตรวจสอบหามวลโมเลกุลด้วย Mass Spectrometry และ SDS - PAGE

ขั้นที่ 5 เมื่อได้โปรตีนที่บริสุทธิ์ นำโปรตีนแต่ละชนิดไปหาองค์ประกอบกรดอะมิโนในโปรตีน ต่อไป

ขั้นที่ 6 เปรียบเทียบ การทำงานทางชีวภาพและองค์ประกอบกรดอะมิโนของโปรตีนแต่ละชนิด ที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อ

โดยที่ก่อนนำโปรตีนแต่ละส่วนไปทดสอบหรือแยกในขั้นต่อไป ต้องกำจัดเกลือและทำ
แห้งก่อน

Flowchart of Experimentation



ภาพประกอบ 7 แผนผังการดำเนินงานวิจัย

รายละเอียดวิธีดำเนินงานศึกษา มีขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

การแยกพิษงูเห่าไทยด้วยเทคนิค Ion Exchange Chromatography ตามวิธีของ คาร์ลสัน และคณะ (1971) และ วรรณา ธรรมพาลเลิศ (2534)

วัสดุและสารเคมี

1. พิษงูเห่าไทย
2. Cation exchanger - Bio - Rex 70 resin
3. สารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมอะซิเตด ความเข้มข้น 0.09 0.20 0.14 และ 1.4 โมลาร์ pH 6.5

อุปกรณ์

1. คอลัมน์ ขนาด 2.6×30 เซนติเมตร
2. เครื่องเก็บแยกส่วน (Fraction collector) และ ปั๊ม (pump) ของ BIO-RAD
3. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ของ SHIMAZU รุ่น UV 1200
4. ชุดอุปกรณ์สำหรับทำ concave salt gradient

วิธีดำเนินการ

เตรียมคอลัมน์ที่บรรจุด้วย Bio - Rex 70 resin ในสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตด บัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ pH 6.5 ผ่านคอลัมน์ด้วยสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตด 0.09 โมลาร์ ปริมาณ 2 เท่าของคอลัมน์ แล้วผ่านสารละลายพิษงู 390 มิลลิกรัม ในสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตดบัฟเฟอร์ ลงในคอลัมน์ ชะด้วยสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตด 0.09 โมลาร์ จนไม่มีโปรตีนออกมาจากคอลัมน์อีก ตรวจสอบด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร มีค่าเท่ากับสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ แล้วเปลี่ยนเป็นชะด้วย concave salt gradient ระหว่างสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตด ความเข้มข้น 0.14 กับ 1.4 โมลาร์ ปริมาณอย่างละ 500 มิลลิลิตร แล้วชะต่อด้วยสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตด 1.4 โมลาร์ สารละลายที่ออกจากคอลัมน์จะเก็บแยกส่วน ปริมาตรหลอดละ 3.0 มิลลิลิตร โดยมีอัตราการไหล 30 มิลลิลิตร/ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร เขียนกราฟ ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร กับลำดับที่ของหลอดที่ออกจากคอลัมน์ รวมส่วนของพิษงูที่แยกได้ซึ่งอยู่ภายใต้ peak เดียวกัน นำแต่ละส่วนไปหาปริมาณโปรตีนและตรวจสอบยืนยันผลส่วนของสารละลายโปรตีนที่แยกได้จากพิษงูเห่าไทยที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อตามผลวิจัยของ วรรณา ธรรมพาลเลิศ (2534) โดยการหาแอกติวิตีการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก

การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford (Waterborg and Matthew. 1994)

วัสดุและสารเคมี

1. สารละลาย Bradford
2. สารละลายโปรตีนมาตรฐาน (bovine serum albumin) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร
3. สารละลายฟิซงู

อุปกรณ์

1. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง ของ SHIMAZU รุ่น UV 1200
2. เครื่องผสมสาร (Vortex Mixer)

วิธีดำเนินการ

เตรียมกราฟมาตรฐานโปรตีน ความเข้มข้นระหว่าง 5 – 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายโปรตีนมาตรฐาน 5 – 50 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 ไมโครลิตร เติมสารละลาย Bradford 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร เขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน สำหรับสารละลายฟิซงู นำสารละลายฟิซงู 100 ไมโครลิตร เติมสารละลาย Bradford ผสม วัดค่าการดูดกลืนแสง เช่นเดียวกับโปรตีนมาตรฐาน อ่านค่าโปรตีนจากกราฟ คำนวณความเข้มข้นของปริมาณโปรตีนในสารละลายฟิซงู

การกำจัดเกลือ (Desalting) โดยวิธี Dialysis

วัสดุและสารเคมี

1. น้ำกลั่น
2. โซเดียมซัลไฟด์ (sodium sulfide) 0.3 %
3. กรดซัลฟูริก 0.2 %

อุปกรณ์

1. ถัง dialysis ที่มี : Molecular weight cut off 3,000 Flat width 18 mm. Diameter 11.5 mm. Sample capacity 1.0 ml/cm.
2. เชือก
3. Magnetic stirrer

วิธีดำเนินการ

เตรียมถุง (dialysis tubing) โดยการชะด้วยน้ำกลั่น กำจัดสารประกอบกำมะถัน โดยแช่ถุงในสารละลายโซเดียมซัลไฟด์ 0.3 % ที่ 80 °ซ. 1 นาที ล้างด้วยน้ำร้อน 60 °ซ. 2 นาที แช่ในกรดซัลฟูริก 0.2 % ล้างด้วยน้ำร้อน ตัดถุงให้มีความยาวมากกว่าที่ต้องการใช้บรรจุ มัดปมด้านล่างด้วยเชือก ใส่ตัวอย่างส่วนของสารละลายพิษ มัดปิดปากถุง แล้วแช่ถุงในน้ำกลั่น เปลี่ยนน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง เก็บสารละลายโปรตีนที่อยู่ในถุง นำไปทำแห้งต่อไป โดยวิธี Lyophilization (freeze dry)

การตรวจสอบความเป็นพิษต่อกล้ามเนื้อหัวใจ (Myocardial Toxicity) ของพิษงูเห่าไทย โดยการวัดคลื่นไฟฟ้าหัวใจ (Electrocardiogram , ECG)

วัสดุและสารเคมี

1. พิษงูเห่าส่วนที่ XIII ที่ได้จากการแยกพิษงูเห่าไทยด้วย Bio – Rex 70 Ion Exchange Chromatography ที่ละลายด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9 %
2. หนู (Wistar Rat) ขนาดประมาณ 200 – 300 กรัม เพศผู้
3. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9 % (normal saline solution , nss)
4. ยาสลบ Pentobarbital

อุปกรณ์

1. เครื่องวัดคลื่นไฟฟ้าหัวใจ เครื่องวัดความดันเลือด และเครื่องวัดการหายใจ
2. เข็มฉีดยา
3. แผ่นรองผ่าตัดที่มีเครื่องควบคุมอุณหภูมิ
4. อุปกรณ์สำหรับผ่าตัด

วิธีดำเนินการ

การเตรียมหนูเพื่อตรวจสอบ โดยชั่งน้ำหนักหนู ทำการสลบหนูด้วยการฉีดยาสลบ Pentobarbital ขนาดยา 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ของน้ำหนักหนู นำหนูวางบนแผ่นรองผ่าตัดที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °ซ. ตรึงขาหนูทั้ง 4 ข้าง เปิดผิวหนังคอหนู เปิดหลอดลม สอดท่อ tracheal tube มัดให้แน่น หาเส้นเลือดแดง common carotid (หลอดเลือดแดงที่นำเลือดไปเลี้ยงสมอง) สอดท่อเข้าไปในเส้นเลือดเพื่อวัดความดันเลือดโดยต่อปลายท่อนอกหลอดเลือดเข้ากับเครื่องวัดความดันเลือด บริเวณใกล้ลำคอเปิดผิวหนังเยื่อหุ้มเส้นเลือดดำ jugular vein สอดท่อที่

ต่อกับเข็มฉีดยาเข้าในเส้นเลือด ทาง electrode (needle) ของเครื่องวัดคลื่นไฟฟ้าหัวใจลงใต้ชั้นผิวหนังของหนูทั้ง 4 ขา แล้วทำการวัดการหายใจ ความดันเลือด และ คลื่นไฟฟ้าหัวใจของหนู ดังรายละเอียดต่อไป

การตรวจสอบ หนูที่นำมาทดลองจะแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ตัว ดังนี้ กลุ่ม 1 สำหรับทดสอบพิษงูที่ขนาดพิษ 0.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม โดยแต่ละตัว จะวัดการหายใจ ความดันเลือด และคลื่นไฟฟ้าหัวใจ ก่อนฉีดสาร (control , Tc) ช่วงเวลา 5 นาที แล้วฉีดสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9 % ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร หลังจาก 5 นาที ทำการวัด (Tnss) ต่อจากนั้นฉีดพิษงูเห่าส่วนที่ XIII ขนาดพิษ 0.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม หนู ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ทำการวัดหลังจากฉีดพิษและทุก ๆ 5 นาที เป็นเวลา 60 นาที (T0 , T5 , T10 , ... , T60) กลุ่ม 2 สำหรับทดสอบพิษงูที่ขนาดพิษ 1.0 มิลลิกรัม/กิโลกรัม หนู โดยหนูแต่ละตัว จะวัดการหายใจ ความดันเลือด และคลื่นไฟฟ้าหัวใจ ก่อนฉีดสาร ช่วงเวลา 5 นาที แล้วฉีดสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9 % ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร หลังจาก 5 นาที ทำการวัดค่า แล้วฉีดพิษงูส่วนที่ XIII ขนาดพิษ 1.0 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ทำการวัดช่วงเวลาหลังจากฉีดพิษ (T0) จนหนูตาย ประมาณ 15 นาที โดยจะวัดทุก ๆ 1 นาที (T0 , T1 , T2 , ... , death) กลุ่ม 3 สำหรับทดสอบพิษงูที่ขนาดพิษ 2.0 มิลลิกรัม/กิโลกรัม หนู โดยหนูแต่ละตัว จะวัดการหายใจ ความดันเลือด และคลื่นไฟฟ้าหัวใจ ก่อนฉีดสาร ช่วงเวลา 5 นาที แล้วฉีดสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9 % ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ทำการวัดหลังจากฉีด 5 นาที ต่อจากนั้นฉีดพิษงูเห่าส่วนที่ XIII ขนาดพิษ 2.0 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ทำการวัดค่าช่วงเวลาหลังจากฉีดพิษ (T0) จนหนูตาย ประมาณ 7 นาที โดยจะวัดทุก 1 นาที (T0 , T1 , T2 , ... , death)

การวัดค่าแอกติวิตีของพิษงูในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก ตามวิธีของ คาร์ลสันและคณะ (1971)

วัสดุและสารเคมี

1. เลือดคนปกติที่ใส่ สารโซเดียม ซิเตรต เพื่อป้องกันการแข็งตัว
2. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.9 %
3. พิษงู

อุปกรณ์

1. เซนตริฟิวส์
2. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง

วิธีดำเนินการ

การแยกเก็บเม็ดเลือดแดง นำเลือดมาปั่นที่ความเร็ว 350 g แยกเก็บเม็ดเลือดแดง ล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9 % หลาย ๆ ครั้ง แล้วเตรียม suspension ของเม็ดเลือดแดง โดยนำเม็ดเลือดแดงมาเจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9 % ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร มีค่าเป็น 0.8 การเตรียมส่วนของพิษงูที่ต้องการทดสอบโดยนำมาละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9 % ตามปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนที่ต้องการ การทำแบลงค์โดยใช้ suspension ของเม็ดเลือดแดง 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9 % 0.25 มิลลิลิตร นำมาเขย่าเบา ๆ ที่อุณหภูมิ 37 °C. เป็นเวลา 5 ชม. แล้วเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9 % 3 มิลลิลิตร นำมาเซนตริฟิวส์ นำสารละลายส่วนใสมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ส่วนสารละลายเม็ดเลือดแดงที่กำหนดให้แตกตัว 100 % ทำเช่นเดียวกับแบลงค์ โดยใช้ suspension ของเม็ดเลือดแดง 1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นแทนสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9 % ทุกชั้น สำหรับการวัดแอกติวิตีของพิษงูที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก ทำเช่นเดียวกับการทำแบลงค์ แต่ใช้สารละลายพิษงูแทนสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9 % 0.25 มิลลิลิตร คำนวณหาแอกติวิตีของพิษงูที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก โดยเทียบกับค่าที่กำหนดให้เม็ดเลือดแดงแตก 100 เปอร์เซ็นต์

การตรวจสอบสมบัติความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (Cytotoxic test)

เซลล์มะเร็งที่ใช้ทดสอบมี 2 ชนิด คือ

1. เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู (Murine lymphocytic leukemia cells, P388) เป็น suspension cell
2. เซลล์มะเร็งปากมดลูกของคน (HeLa cells) เป็น monolayer cell เกาะติดผิวภาชนะที่ใช้เลี้ยงเซลล์

การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู (P388) โดยการหาค่า ED₅₀

วัสดุและสารเคมี

1. RPMI 1640 medium ที่มี 10 % Newborn Calf Serum (NCS)
2. P388 cells
3. 0.4 % Trypan blue

4. พืชเหง้าและส่วนของพืชเหง้าที่แยกได้
5. Phosphate buffer saline (PBS)
6. 5 – Fluorouracil (5 – FU)

อุปกรณ์

1. ตู้บ่ม (CO₂ incubator) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
2. ขวดเลี้ยงเซลล์ (Culture flask)
3. อุปกรณ์ต่าง ๆ สำหรับเลี้ยงและถ่ายเซลล์ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (Aseptic technique)
4. Haemocytometer และ กล้องจุลทรรศน์

วิธีดำเนินการ

เลี้ยงเซลล์ P388 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI ที่มี 10 % NCS ในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 °ซ. ให้มีอายุประมาณ 48 – 72 ชม. นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (Viable cell count) ด้วยวิธี Dye Exclusion (รายละเอียดวิธีนับเซลล์แสดงในภาคผนวก) แล้วเตรียม stock P388 cell suspension จากเซลล์ P388 ที่เลี้ยงไว้ ให้มีความเข้มข้น 5×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร โดยการเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI

การเตรียมพืชเหง้าและส่วนของพืชเหง้าที่แยกได้ โดยนำมาละลายในสารละลาย PBS ให้มีความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร กรองด้วยแผ่นกรองเมมเบรน ขนาด 0.45 ไมครอน นำมาเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI ให้มีความเข้มข้นตามที่ต้องการระดับต่าง ๆ 4 ระดับ และเตรียมสารละลาย 5 – FU (ยารักษามะเร็ง) เพื่อใช้เป็นสารควบคุมเชิงบวก(positive control) โดยเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI จนได้ระดับความเข้มข้นเป็น 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แล้วเจือจางต่อจนได้ความเข้มข้นเป็น 0.04 และ 0.08 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

การทดสอบความเป็นพิษ สามารถแบ่งออกเป็น 3 ส่วน ดังนี้

1) negative control ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเซลล์ 3.0 มิลลิลิตร สารละลาย PBS 1 % ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 1.0 มิลลิลิตร และ stock P388 cell suspension 1.0 มิลลิลิตร

2) positive control ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเซลล์ 3.0 มิลลิลิตร สารละลาย 5 – FU 1.0 มิลลิลิตร และ stock P388 cell suspension 1.0 มิลลิลิตร

3) test solutionหรือสารละลายพืชที่จะทดสอบ ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเซลล์ 3.0 มิลลิลิตร สารละลายพืช 1.0 มิลลิลิตร และ stock P388 cell suspension 1.0 มิลลิลิตร

นำสารต่าง ๆ ดังกล่าวใส่ขวดเลี้ยงเซลล์ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ปริมาตรรวมทั้งหมด 5.0 มิลลิลิตร แต่ละกลุ่มทำ 2 ซ้ำ นำขวดเลี้ยงเซลล์ทั้งหมดไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °ซ.

5% CO₂ เป็นเวลา 7 วัน วัดอัตราการเจริญของเซลล์โดยวิธีนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต โดยวิธี Dye Exclusion ที่นับเซลล์ด้วย Haemocytometer ย้อมเซลล์ด้วยสี Trypan blue เซลล์ที่มีชีวิตจะไม่ติดสี ส่วนเซลล์ที่ตายจะติดสีน้ำเงิน นับจำนวนเซลล์ทุกวัน แต่เซลล์จะมีการเจริญดีที่สุดในวันที่ 3 และ 4 คำนวณค่าเป็นจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วคำนวณให้เป็นจำนวนเซลล์ต่อขวดเลี้ยงเซลล์ จากนั้นหาเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของเซลล์ P388 ในสารทดสอบต่าง ๆ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโต} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของขวดที่ใส่สารทดสอบ} \times 100}{\text{จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของขวด negative control}}$$

นำมาหาค่า ED₅₀ โดยเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตกับความเข้มข้นของสารทดสอบเป็น ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บน normal graph paper แล้วอ่านค่าความเข้มข้นของสารทดสอบที่ทำให้เซลล์ P388 มีการเจริญที่ 50 เปอร์เซ็นต์

การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cells) โดยการหาค่า ED₅₀

วัสดุและสารเคมี

1. 10 % NCS ใน EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium)
2. HeLa cells
3. พืชงูเห่าและส่วนประกอบของพืชงูเห่า
4. 1xHBSS (Hank s' balanced salt solution)
5. 0.25 % Trypsin ใน HEPES – Busser Saline (HBS)
6. Bovine Serum Albumin (BSA) 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
7. Solution C
8. Folin – ciocalteau reagent (F – C) อัตราส่วน F – C : น้ำ = 5 : 7
9. 5 – FU

อุปกรณ์

1. ตู้บ่ม
2. ขวดเลี้ยงเซลล์ ที่ฆ่าเชื้อแล้ว
3. อุปกรณ์ต่าง ๆ สำหรับเลี้ยงและถ่ายเซลล์ ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ
4. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง

วิธีดำเนินการ

เลี้ยงเซลล์มะเร็ง HeLa ในอาหารเลี้ยงเซลล์ EMEM ที่มี 10 % NCS ในตู้บ่ม CO₂ ที่อุณหภูมิ 37 °ซ. ให้มีอายุ 48 – 72 ชม.

การเตรียม HeLa cell suspension โดยนำเซลล์ HeLa ที่เลี้ยงไว้ ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมด ล้างเซลล์ด้วย 1 × HBSS 5 มิลลิลิตร ย่อยเซลล์ให้หลุดเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ ด้วย 0.25 % Trypsin ใน HBS จำนวน 4 มิลลิลิตร เก็บในตู้บ่ม 37 °ซ. 2 – 3 นาที (จนสังเกตเห็นว่าเซลล์เริ่มหลุดออกจากผิวขวดเลี้ยงเซลล์ จะเห็นมีลักษณะค่อนข้างกลม) ดูด Trypsin ทิ้งให้เหลือในขวดเล็กน้อย แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ 4 มิลลิลิตร ไขปิดดูดอาหารขึ้นลงตรงด้านในของขวดเลี้ยงเซลล์ ให้เซลล์ที่เกาะติดผนังอยู่หลุดออก ถ้ายังหลุดไม่หมดให้ใช้ขวดเลี้ยงเซลล์ด้านที่เซลล์เกาะติดอยู่ เคาะกับฝ่ามือให้เซลล์หลุดออกเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ เติมน้ำลงไปที่อีก 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เซลล์กระจายสม่ำเสมอ นำ cell suspension ที่ได้ไปนับจำนวนเซลล์ โดยใช้วิธี Trypan blue exclusion คำนวณหา จำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ จนได้จำนวนเซลล์เป็น 4×10^5 เซลล์/มิลลิลิตร

การเตรียมพิษงูเห่าและส่วนของพิษงูเห่าที่แยกได้ (test solution) โดยนำมาละลายในสารละลาย PBS ให้มีความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แล้วกรองด้วยแผ่นกรองเมมเบรน ขนาด 0.45 ไมครอน นำมาเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ EMEM ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน อย่างน้อย 3 ระดับ และเตรียมสารละลาย 5 – FU เพื่อใช้เป็น positive control เจือจางจนได้ความเข้มข้นเป็น 4.0 และ 10.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

การทดสอบความเป็นพิษ โดยแบ่งออกเป็น 4 ส่วน ดังนี้

1) negative control Day 0 โดยนำ cell suspension 3.0 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ความเร็ว 1,500 รอบ/นาที เก็บเซลล์ด้านล่างแล้วล้างด้วยสารละลาย PBS เก็บไว้ที่ 0 °ซ.

2) negative control Day 4 ประกอบด้วย cell suspension 3.0 มิลลิลิตร และ 1 % PBS ใน EMEM 1.0 มิลลิลิตร

3) สารละลายพิษงูเห่าและส่วนของพิษงูเห่าที่แยกได้ ประกอบด้วย cell suspension 3.0 มิลลิลิตร และ สารละลายพิษงู 1.0 มิลลิลิตร

4) positive control Day 4 ประกอบด้วย cell suspension 3.0 มิลลิลิตร และ สารละลาย 5 – FU 1.0 มิลลิลิตร

นำสารต่าง ๆ ดังกล่าว ใส่ขวดเลี้ยงเซลล์ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ยกเว้น negative Day 0 แล้วนำไปบ่มที่ตู้บ่ม CO₂ อุณหภูมิ 37 °ซ. เป็นเวลา 4 วัน ในแต่ละกลุ่มทำ 2 ข้ำ เมื่อครบกำหนด 4 วัน นำขวดเลี้ยงเซลล์ที่บ่มไว้ มาเทอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมด ล้างด้วยสาร

ละลาย PBS 2 ครั้ง ทั้งสารละลาย PBS นำไปวัดอัตราการเจริญของเซลล์มะเร็ง HeLa โดยการหาปริมาณโปรตีน พร้อมกับ Day 0 ดูแผนผังการทดสอบ หน้าถัดไป

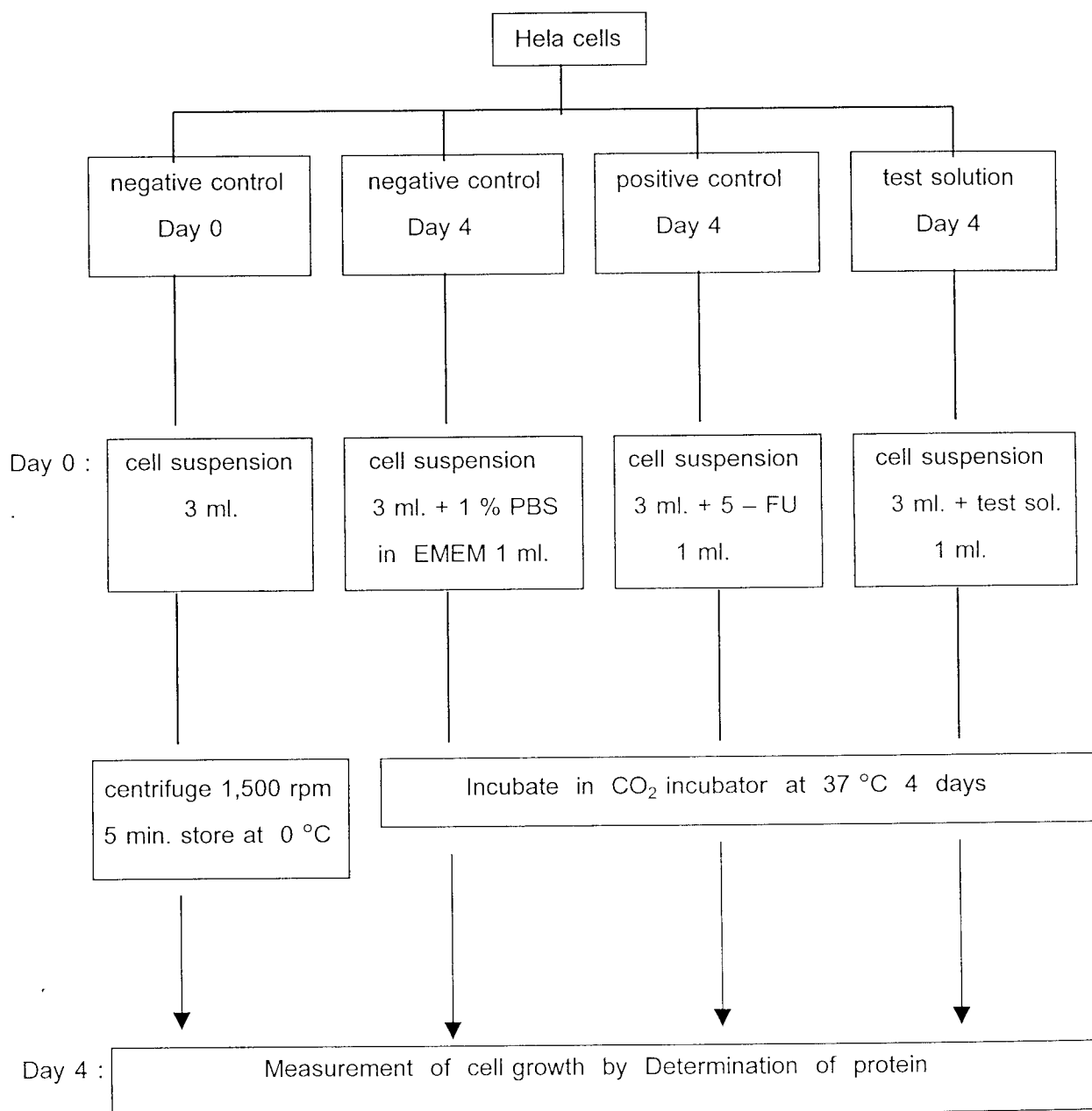
การวัดอัตราการเจริญของเซลล์มะเร็ง HeLa โดยการหาปริมาณโปรตีนของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ โดยอาศัยหลักที่ว่าถ้าปริมาณโปรตีนมากหมายถึงจำนวนเซลล์ก็มากด้วย การวัดโปรตีนใช้วิธีของ Oyama และ Eagle (Oyama & Eagle. 1956 : 305 – 307) โดยนำไปประยุกต์ใช้กับวิธี colorimetric ของ Lowry และคณะ ซึ่งใช้ Folin reagent เป็นตัวทำให้เกิดสี (Lowry, et al. 1951 : 265 – 275) รายละเอียดวิธีวัดปริมาณโปรตีนแสดงในภาคผนวก แล้วหาเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของเซลล์ HeLa ในสารทดสอบต่าง ๆ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโต} = (T \times 100) / C$$

T คือ ค่าการดูดกลืนแสงจากการหาปริมาณโปรตีนของเซลล์ในหลอดเลี้ยงเซลล์ที่ใส่สารทดสอบ
C คือ ค่าการดูดกลืนแสงจากการหาปริมาณโปรตีนของ negative control Day 4

หาค่า ED₅₀ โดยเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตกับความเข้มข้นของสารทดสอบเป็น ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บน normal graph paper แล้วอ่านค่าความเข้มข้นของสารทดสอบที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ HeLa ที่ 50 เปอร์เซ็นต์

Flowchart of Experimentation



ภาพประกอบ 8 แผนผังขั้นตอนการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง HeLa

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนจากพิษงูเห่าที่แยกได้

Polyacrylamide gel Electrophoresis (PAGE) โดยวิธี Acetic acid – Urea

Polyacrylamide gel (Panyin & Chalkley. 1969)

วัสดุและสารเคมี

1. โปรตีนพิษงู
2. ชุดสารเคมี สำหรับเตรียมเจลและขั้นตอนดำเนินการแยกโปรตีน
 - 2.1 Stock acrylamide solution (%T = 30 , %C = 1.5)
 - 2.2 Ammonium persulfate
 - 2.3 TEMED (N,N,N',N' - tetramethylethylenediamine)
 - 2.4 Reservoir buffer pH 3 (0.9 M. acetic acid)
 - 2.5 Sample solvent : HCl , 2-mercaptoethanol , urea และ pyronin Y
 - 2.6 Protein stain - Coomassie blue R 250
 - 2.7 Destaining solution
 - 2.8 Urea
 - 2.9 Acetic acid

อุปกรณ์

1. ชุดเครื่องมือสำหรับทำอิเล็กโตรโฟรีซิส แบบ slap gel (ชุด mini protein II cell ของ Bio - Rad

วิธีดำเนินงาน

เตรียม Polyacrylamide gel (separating gel และ stacking gel) ในชุดอุปกรณ์ สำหรับเตรียมเจล แล้วต่อเข้ากับชุดอุปกรณ์ในการแยกโปรตีน ใส่ตัวอย่างโปรตีนพิษงูที่ละลายใน sample solvent ลงในเจลที่เตรียมไว้ เติม reservoir buffer ต่อเครื่องมือกับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า ผ่านกระแสไฟฟ้า ขนาด 120 โวลท์ เวลา 4 - 5 ชม. (หรือจนกว่าสีของ pyronin Y ห่างจากขอบล่างของเจล 1 ซม.) นำเจลออกมาย้อมสีด้วย Coomassie brilliant blue R 250 เป็นเวลา 18 - 24 ชม. แล้วกำจัดสีที่ไม่จับกับโปรตีนบนแผ่นเจลออกด้วย destaining solution ตรวจดูแถบสีที่เกิดขึ้นบนแผ่นเจล แล้วตรึงโปรตีนด้วยกรดอะซิติก 7 เปอร์เซ็นต์

SDS – Polyacrylamide gel Electrophoresis โดยวิธี Discontinuous Urea - SDS-PAGE system (Anderson, Berry & Telser . 1983)

วัสดุและสารเคมี

1. โปรตีนพิษงู
2. ชุดสารเคมีสำหรับเตรียมเจล และขั้นตอนดำเนินการแยกโปรตีน
 - 2.1 Resolving gel acrylamide stock (36 %T , 5 %C)
 - 2.2 Stacking gel acrylamide stock (6.25 %T , 20 %C)
 - 2.3 Buffer solution A : 1 M. Tris , 0.2 % SDS (pH 7.8 ด้วย H_2SO_4)
 - 2.4 Buffer solution B : 0.074 M. Tris , 0.1 % SDS (pH 7.8 ด้วย H_2SO_4)
 - 2.5 Urea
 - 2.6 Ammonium persulfate
 - 2.7 TEMED
 - 2.8 Sucrose
 - 2.9 Coomassie blue R 250 solution
 - 2.10 Destaining solution
 - 2.11 Standard protein – molecular weight range 2,350 – 46,000

อุปกรณ์

1. ชุดเครื่องมือสำหรับทำอิเล็กโตรโฟรีซิส แบบ slap gel (ชุด Mini Protein II cell ของ Bio-Rad

วิธีดำเนินงาน

เตรียม SDS - PAGE ทั้ง separating gel และ stacking gel ในชุดอุปกรณ์สำหรับเตรียมเจล แล้วต่อเข้ากับชุดอุปกรณ์สำหรับแยกโปรตีน ใส่ตัวอย่างโปรตีนจากพิษงูและโปรตีนมาตรฐานที่ละลายใน sample solvent หลังต้มเดือดที่ 100°C . 10 นาที ลงในเจล ได้สารละลายบัฟเฟอร์ เติม Buffer solution B ที่ขั้ว cathode และ Buffer solution A เจือจาง 5 เท่า ที่ขั้ว anode ต่อเครื่องมือกับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า ผ่านกระแสไฟฟ้าขนาด 15 มิลลิแอมป์ จนกระทั่ง tracking dye ห่างจากขอบล่างของเจล 1 ซม. นำเจลออกมาย้อมสีด้วย Coomassie blue R 250 24 ซม. แล้วกำจัดสีส่วนเกินออกจากแผ่นเจลด้วย destaining solution ตรวจสอบแถบของโปรตีนที่เกิดขึ้นบนแผ่นเจล แล้ววัดรัศมีในกรดอะซิติก 7 เปอร์เซ็นต์ หาอัตราการเคลื่อนที่ระหว่าง ระยะการเคลื่อนที่ของโปรตีนต่อระยะที่สารเคลื่อนที่ทั้งหมด (Rf) เขียนกราฟมาตรฐาน ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับค่า Rf ของโปรตีนมาตรฐาน

ฐานแต่ละชนิด เปรียบเทียบค่า Rf ของโปรตีนพิษจากกราฟมาตรฐาน เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนพิษ

การแยกส่วนประกอบของพิษที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อโดยเทคนิค Gel Filtration Chromatography

วัสดุและสารเคมี

1. Sephadex G - 50 Fine
2. สารละลายแอมโมเนียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ pH 6.5
3. ส่วนของสารละลายโปรตีนจากพิษที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อ

อุปกรณ์

1. คอลัมน์ ขนาด 1.5×100 ซม.
2. เครื่องเก็บแยกส่วน และ บั๊ม ของ BIO-RAD
3. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง ของ SHIMAZU รุ่น UV 1200

วิธีดำเนินงาน

เตรียมคอลัมน์ โดยบรรจุ Sephadex G – 50 ในสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตต 0.2 โมลาร์ นำพิษส่วนที่ XIII ที่ละลายใน 0.2 โมลาร์ แอมโมเนียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ ใส่ในคอลัมน์ แล้วชะด้วยสารละลายบัฟเฟอร์เดียวกัน ด้วยอัตราการไหล 20 มิลลิลิตร/ชั่วโมง เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ ปริมาตรหลอดละ 3.0 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร แล้วเขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับลำดับที่ของหลอดที่ออกจากคอลัมน์ ทำการรวมสารละลายที่อยู่ภายใต้พีคเดียวกัน

การแยกโปรตีนที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อให้บริสุทธิ์ โดยวิธี Ion Exchange Chromatography โดยใช้ Bio - Rex 70

วัสดุและสารเคมี

1. สารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมอะซิเตต 0.15 และ 1.5 โมลาร์ pH 7.3

2. ส่วนของสารละลายโปรตีนพินูที่แยกได้จาก Gel Filtration Chromatography - Sephadex G - 50 ที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อ
3. Bio – Rex 70 resin ขนาด 400 mesh

อุปกรณ์

1. คอลัมน์ ขนาด 1.5 X 80 เซนติเมตร
2. เครื่องเก็บแยกส่วน และ บั๊ม ของ BIO-RAD
3. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง ของ SHIMAZU รุ่น UV 1200
4. ชุดอุปกรณ์สำหรับทำ concave salt gradient

วิธีดำเนินงาน

เตรียมคอลัมน์ที่บรรจุด้วย Bio - Rex 70 เรซิน ให้อยู่ในสมดุลย์ของสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตด 0.15 โมลาร์ pH 7.3 นำส่วนของพินูละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ แล้วผ่านลงในคอลัมน์ ชะด้วย concave salt gradient ระหว่างสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตด ความเข้มข้น 0.15 กับ 1.5 โมลาร์ pH 7.3 (ปริมาตรของสารละลายบัฟเฟอร์ 0.15 โมลาร์ เป็นสองเท่าของสารละลายบัฟเฟอร์ 1.5 โมลาร์) ด้วยอัตราการไหลในการชะ 18 มิลลิลิตร/ชั่วโมง เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ ปริมาตรหลอดละ 3.0 มล. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร เขียนกราฟ รวมส่วนของสารละลายโปรตีน ที่อยู่ภายใต้พีคเดียวกัน

การหามวลโมเลกุลของโปรตีนพินูด้วยวิธี Mass Spectrometry

วัสดุและสารเคมี

1. โปรตีนพินู
2. อะซิโตไนไทรล์ (acetonitrile)
3. สารละลายกรดฟอร์มิก

อุปกรณ์

1. เครื่อง Mass spectrometry - VG Trio 2000 (VG Biotech , Altricham , UK)
ระบบ Electrospray Ionization source (ESI – MS)
2. 626 HPLC pump (Water Corp. Milford , USA.)
3. Manlynx software (VG Biotech , Manchester , UK)

วิธีดำเนินงาน

นำโปรตีนพิษงูปริมาณ 0.1 – 0.2 มิลลิกรัม ละลายใน 30 ไมโครลิตรของสารละลายผสมระหว่างอะซิโตนไดล์และน้ำ ที่มีความเข้มข้น 50 % (V/V) ซึ่งมีกรดฟอร์มิกเข้มข้น 0.5 % (V/V) ฉีดสารละลายโปรตีนพิษงู 20 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง Mass spectrometry อัตราการไหลควบคุมด้วย HPLC pump ที่ 8 ไมโครลิตร/นาที ปรับเทียบมวลโมเลกุล (Mass calibration) ด้วยโปรตีนมาตรฐานไมโอโกลบิน (myoglobin) โดย scan ค่า m/z ช่วง 500 - 1800

การหองค์ประกอบของกรดอะมิโนในโปรตีน ที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณ

วัสดุและสารเคมี

1. โปรตีนพิษงู
2. ชุดสารสำหรับย่อยโปรตีนและหองค์ประกอบกรดอะมิโน
 - 2.1. กรดไฮโดรคลอริก 6 นอร์มัล
 - 2.2 สารละลายโซเดียมซีเตรตบัฟเฟอร์ 0.2 นอร์มัล pH 2.20 , 3.25 , 4.25 และ 6.10
 - 2.3. โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.2 นอร์มัล
 - 2.4 สารละลายโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 5.5
 - 2.5 สารละลายนินไฮดริน
 - 2.6 สารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน

อุปกรณ์

1. เครื่องวิเคราะห์หากรดอะมิโน (Amino acid Analyzer) : Perkin-Elmer - L8500 Hitachi ที่ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข
2. ชุดอุปกรณ์สำหรับย่อยโปรตีน
 - 2.1 Bombelroll tubes
 - 2.2 Autoclave หรือ Oven
 - 2.3 Rotary evaporator

วิธีดำเนินงาน

ซึ่งโปรตีนที่ทราบน้ำหนักแน่นอน ใส่หลอด Bombelroll (ปริมาณไม่ต่ำกว่า 1 มิลลิกรัม) เติมกรดไฮโดรคลอริก 6 นอร์มัล ให้ความร้อนด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 115 ° ซ. อย่างน้อย 6 ชม. หรือใช้ตุ๋น 24 ชม. นำตัวอย่างมาระเหยให้แห้งด้วย rotary evaporator ละลายตัวอย่างโปรตีนด้วยสารละลายโซเดียมซิติเตด 0.2 นอร์มัล pH 2.2 ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร กรองด้วยแผ่นกรองเมมเบรนเซลลูโลสไนเตรด ขนาด 0.45 ไมครอน สำหรับสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน เตรียมให้มีความเข้มข้นของกรดอะมิโน ชนิดละ 5.00 นาโนโมล ในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมซิติเตด 0.2 นอร์มัล pH 2.2 แล้วนำเข้าเครื่องวิเคราะห์กรดอะมิโน นำผลที่ได้มาคำนวณหาปริมาณกรดอะมิโนแต่ละชนิด ในรูป mole residues/ mole protein สำหรับกรดอะมิโน ซิสเตอีน (cysteine) มีขั้นตอนวิเคราะห์เพิ่มเติม โดยนำไปย่อยด้วยกรด performic 2.0 มิลลิลิตร ก่อน แล้วจึงนำมาย่อยต่อด้วยกรดไฮโดรคลอริก 6 นอร์มัล ต่อจากนั้นทำตามเดิม นำเข้าเครื่องวิเคราะห์กรดอะมิโน

การวิเคราะห์ข้อมูล

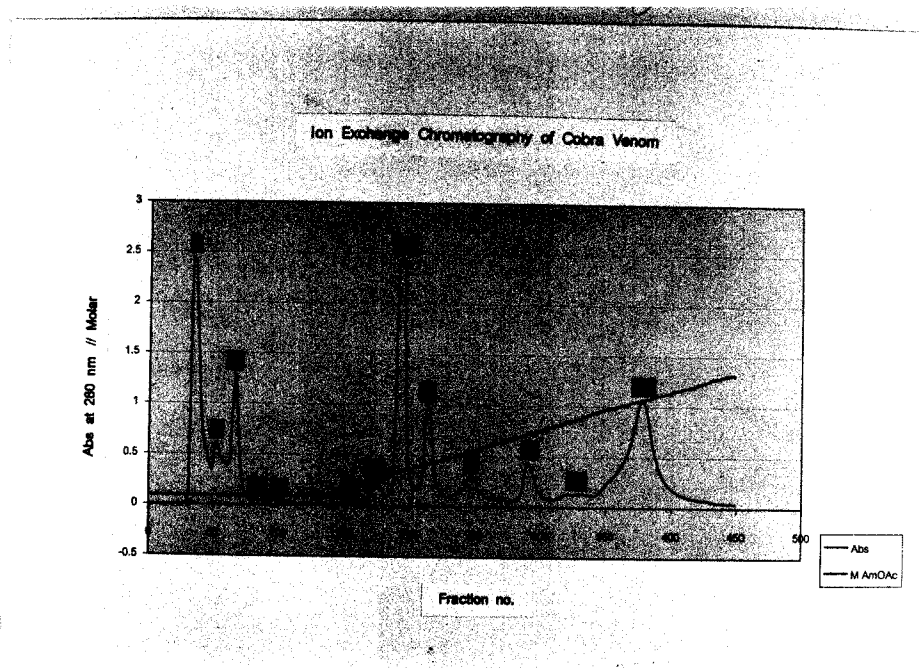
1. การตรวจสอบเลือกส่วนที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณ จากการแยกพิษงูเห่าไทยด้วยเทคนิคต่าง ๆ ใช้การทดสอบหาแอกติวิตีในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก
2. ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีน โดยใช้ Electrophoresis แบบ PAGE และ SDS - PAGE โดยดูจากจำนวนและความเข้มของแถบสีบนแผ่นเจล ของโปรตีนส่วนที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อ เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน
3. ตรวจสอบมวลโมเลกุลของโปรตีนส่วนที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อด้วย SDS - PAGE และ MS
4. เปรียบเทียบองค์ประกอบกรดอะมิโนของโปรตีน ที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อ ที่แยกจากพิษงูเห่าไทยกับองค์ประกอบกรดอะมิโนของสารพิษพวก cardiotoxin หรือ cytotoxin จากพิษงูเห่าหรือพิษงูชนิดอื่น ๆ ที่ได้มีการศึกษาแล้วว่ามีส่วนประกอบคล้ายคลึงกันหรือไม่และโปรตีนชนิดนี้ใช้สารพิษพวก cardiotoxin หรือไม่ และต้องเปรียบเทียบกับสมบัติอื่น ๆ ของโปรตีนชนิดนี้ด้วย เช่น มวลโมเลกุล สมบัติความเป็นกรดเบส สมบัติความเป็นพิษต่อเซลล์และเนื้อเยื่อ จากการทดสอบการตายของกล้ามเนื้อหัวใจ ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง แอกติวิตีในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก เป็นต้น

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

1. ผลการแยกโปรตีนของพิษงูเห่าไทยด้วยวิธี Ion Exchange Chromatography โดยใช้ Bio – Rex 70

เมื่อผ่านพิษงูเห่าไทย 390 มิลลิกรัม ที่ละลายในสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.09 โมลาร์ pH 6.5 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์ที่บรรจุด้วย Bio – Rex 70 พิษงูเห่าไทยแยกออกเป็น 13 ส่วนให้ชื่อว่า I II III IV V VI VII VIII IX X XI XII และ XIII ภาพประกอบ 9 ผลการแยกพิษงูเห่าที่ได้ ได้ผลเช่นเดียวกับผลการวิจัยของวรรณ (วรรณ ธรรมพาลีศ. 2534) ทั้งจำนวนส่วนของพิษงูและลักษณะกราฟที่ได้



ภาพประกอบ 9 กราฟแสดงผลการแยกพิษงูเห่าไทยด้วยวิธี Ion Exchange Chromatography โดยใช้ Bio – Rex 70 resin ที่ได้จากการผ่านพิษงูเห่าไทย 390 มิลลิกรัม ะด้วยสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.09 โมลาร์ pH 6.5 และตามด้วย concave salt gradient ระหว่างความเข้มข้น 0.14 กับ 1.4 โมลาร์ ปริมาตรอย่างละ 500 มิลลิลิตร แล้วชะต่อด้วย 1.4 โมลาร์ ด้วยอัตราการไหล 30 มิลลิลิตร/ชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 3 มิลลิลิตร

1.1 ผลการหาปริมาณโปรตีนแต่ละส่วนที่แยกได้จากพิษงูเห่า

จากการหาปริมาณโปรตีนในพิษงูเห่าแต่ละส่วนที่แยกได้เทียบกับปริมาณโปรตีนในพิษงูเห่าที่ไม่ได้แยกจะเห็นว่า พิษงูส่วนที่ XIII เป็นส่วนประกอบที่มีในพิษงูเห่ามากที่สุด คือ 39.62 % รองลงมาคือ พิษงูส่วนที่ VIII และ I คือ 17.05 % และ 9.55 % ตามลำดับ ดูตาราง 2

ตาราง 2 ปริมาณโปรตีนของส่วนต่าง ๆ ที่แยกได้จากพิษงูเห่าไทยด้วย Bio – Rex 70 Ion Exchange Chromatography

ส่วนของพิษงูเห่า	มิลลิกรัมโปรตีน	% Yield	การตายของเนื้อเยื่อ**
I	30.0	9.55	+
II	4.6	1.47	-
III	3.7	1.18	-
IV	0.38	0.12	-
V	0.63	0.20	-
VI	0.81	0.26	-
VII	5.1	1.61	-
VIII	53.6	17.05	-
IX	10.0	3.18	-
X	12.6	4.02	-
XI	22.3	7.1	-
XII	10.3	3.28	-
XIII	124.4	39.62	++
รวม	278.4	88.66	
พิษงูเห่ายังไม่แยก	314*	100	+++

* พิษงูเห่าไทยยังไม่แยกมีปริมาณโปรตีน 80.5 % (จาก 390 มิลลิกรัม)

** จากผลการวิจัยของวรรณา ชรรพพาเลิศ (วรรณา ชรรพพาเลิศ. 2534)

1.2 ผลการหาแอกติวิตีของพิษงูในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก (Hemolysis)

เพื่อยืนยันผลว่าพิษงูส่วนที่ I และ XIII มีผลทำให้เกิดเนื้อตาย ตามงานวิจัยของวรรณ และหาว่าส่วนใดที่มีผลสูงสุดเพื่อเลือกนำไปศึกษาขั้นต่อไป โดยทำการทดสอบหาแอกติวิตีของพิษงูในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก ผลปรากฏว่า พิษงูเห่าทั้ง 2 ส่วน คือ ส่วนที่ I และ XIII รวมทั้งพิษงูยังไม่แยก สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงแตก โดยพิษงูยังไม่แยกแสดงแอกติวิตีสูงสุด รองลงมาคือ ส่วนที่ XIII และ I ตามลำดับ โดยที่พิษงูส่วนที่ XIII ตรวจไม่พบแอกติวิตีของเอนไซม์ phospholipase A₂ ดังตาราง 3 ดังนั้นจึงเลือกพิษงูเห่าส่วนที่ XIII เพื่อนำไปศึกษาขั้นต่อไป ทั้งการศึกษสมบัติต่าง ๆ และการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ เพื่อหาองค์ประกอบกรดอะมิโนในโปรตีน ในการประกอบการวินิจฉัยว่าน่าจะเป็นโปรตีนกลุ่มใด

ตาราง 3 แอกติวิตีการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกของพิษงูเห่ายังไม่แยก พิษงูส่วน I และ XIII

พิษงูเห่า	ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัม)	แอกติวิตีการทำให้ เม็ดเลือดแดงแตก(%)	แอกติวิตีของ PLA ₂
พิษงูยังไม่แยก	500	100	+
I	500	37.5	+
XIII	500	77.5	-

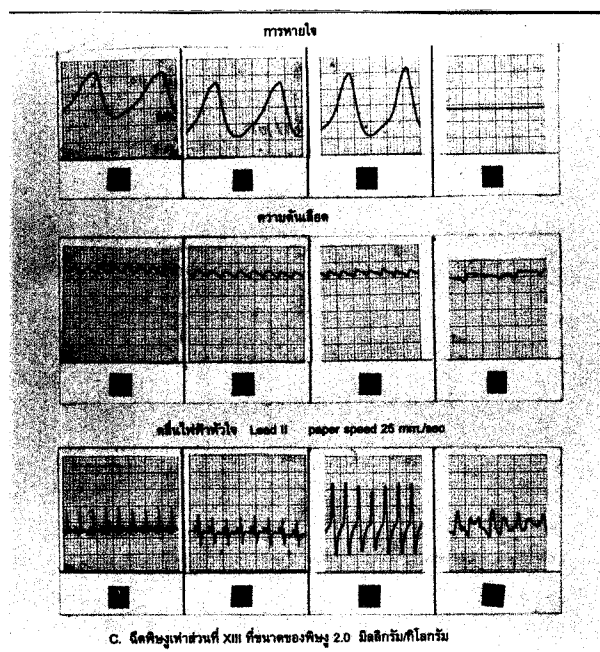
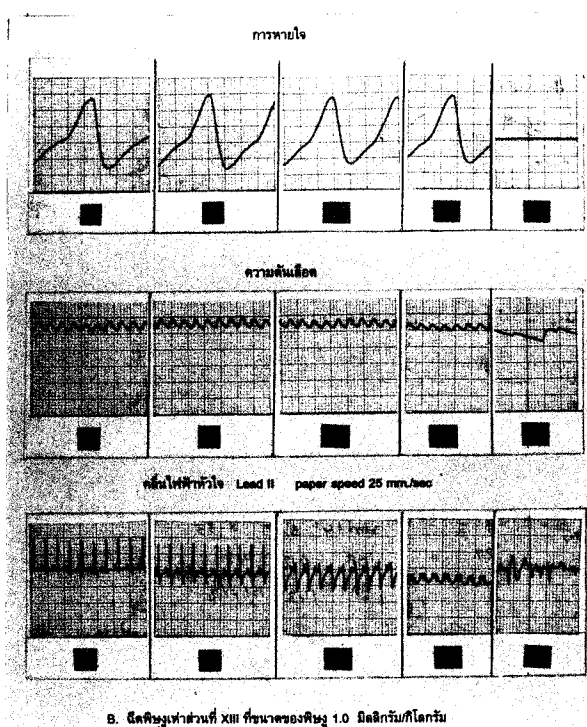
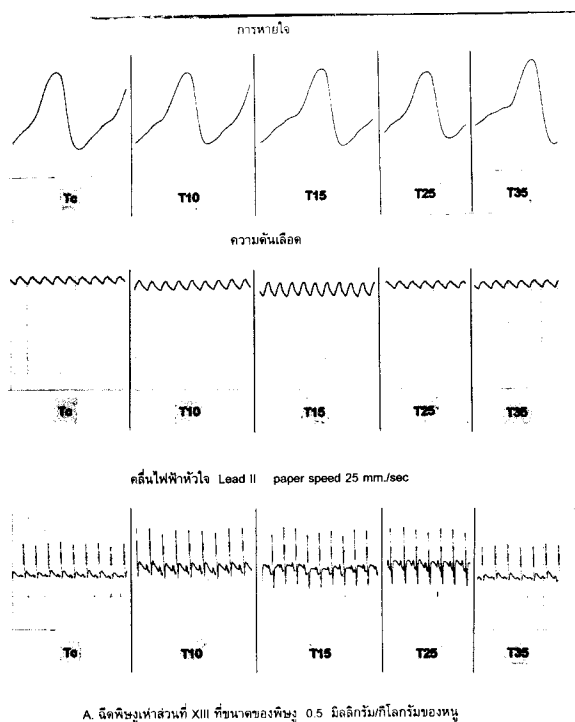
1.3 ผลการตรวจวิเคราะห์พิษงูเห่าส่วนที่ XIII โดย Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE)

นำพิษงูส่วนที่ XIII มาตรวจวิเคราะห์ด้วย PAGE พบว่า มีแถบโปรตีนอย่างน้อย 5 แถบ ภาพประกอบ 16

1.4 ผลการตรวจสอบความเป็นพิษต่อกล้ามเนื้อหัวใจของพิษงูเห่าส่วนที่ XIII โดยการวัดคลื่นไฟฟ้าหัวใจ (ECG)

หลังจากทำการสลบหนู (rat) ด้วย Pentobarbital ปริมาณ 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม แล้ว ฉีดหนูด้วยพิษงูเห่าส่วนที่ XIII ที่แยกจากพิษงูเห่าไทย เข้าทางเส้นเลือดดำ ขนาดพิษ 3 ระดับ คือ 0.5 , 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัม/กิโลกรัมของหนู โดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9 % เป็นสารละลายทำให้เจือจาง ในแต่ละระดับขนาดพิษจะฉีดหนู 3 ตัว เกิดความผิดปกติกับหัวใจของหนู ดังนี้ อัตราการเต้นของหัวใจลดลงและเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วมากเมื่อใกล้ตาย สำหรับพิษงูส่วนที่ XIII ขนาดพิษ 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (หนูตายภายใน 15 และ 7 นาที ตาม

ลำดับ) ส่วนที่ขนาดพิษ 0.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม หนูไม่ตายภายใน 1 ชั่วโมงและมีอัตราการเต้นของหัวใจใกล้เคียงก่อนฉีดสาร อัตราการเต้นของหัวใจลดลงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.95 สำหรับขนาดพิษ 2.0 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (T5) จังหวะการเต้นของหัวใจของหนูผิดปกติ (arrhythmias) หลังจากฉีดพิษ โดยจะสังเกตเห็นว่าลักษณะคลื่นไฟฟ้าหัวใจของหนูช่วง P – R interval ยาวขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับ control (ก่อนฉีดสาร) ทั้ง 3 ระดับขนาดพิษ (ขนาดพิษ 0.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัมหนู ที่เวลา T15 สำหรับ 1.0 มิลลิกรัม/กิโลกรัมหนู ที่เวลา T10 และที่ 2.0 มิลลิกรัม/กิโลกรัมหนู ที่เวลา T5) ซึ่งแสดงว่าเกิด atrio – ventricular block ขึ้น เช่นเดียวกับช่วง QRS complex ของคลื่นไฟฟ้าหัวใจกว้างขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ทั้ง 3 ระดับขนาดพิษ (ขนาดพิษ 0.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัมหนู ที่เวลา T15 สำหรับ 1.0 มิลลิกรัม/กิโลกรัมหนู ที่เวลา T10 และ T15 และที่ 2.0 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ที่เวลา T5) ซึ่งบ่งบอกถึงการถูกทำลายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ ระดับความดันเลือดลดลง หลังจากนั้นจะเกิด ventricular tachycardia ก่อนแล้วเกิด ventricular fibrillation ในหนูบางตัว หรือเกิด ventricular fibrillation เลย และหนูตาย แต่สำหรับหนูที่ฉีดพิษสูงเท่าส่วนที่ XIII ขนาดพิษ 0.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ไม่เกิด ventricular fibrillation และหนูไม่ตาย การหายใจของหนูที่ระดับขนาดพิษ 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เป็นปกติจนเกือบตายจึงเกิดการเปลี่ยนแปลง ส่วนที่ระดับขนาดพิษ 0.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม การหายใจไม่เปลี่ยนแปลง รายละเอียดเกี่ยวกับลักษณะคลื่นไฟฟ้าหัวใจและข้อมูลประกอบต่าง ๆ จากการทดสอบแสดงใน ภาพประกอบ 10 ตาราง 4 และ 5 (T หมายถึง นาที)



ภาพประกอบ 10 ผลของพิษงูเห่าส่วนที่ XIII ต่อคลื่นไฟฟ้าหัวใจ ความดันเลือด และการหายใจของหนู (rat) ที่สลบ บันทึกระหว่างเวลา ก่อนฉีดสาร (Tc) หลังฉีดสารละลายไซเดียมคลอไรด์ 0.09 % (Tnss) และหลังฉีดพิษงูส่วนที่ XIII ระหว่างเวลา 0 - 30 นาที ที่ระดับขนาดพิษ 0.5 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัม/กิโลกรัมของหนู (ภาพประกอบย่อย A B และ C ตามลำดับ)

ตาราง 4 ผลของพิษงูเห่าส่วนที่ XIII ต่ออัตราการเต้นของหัวใจของหนู (rat) ที่สลบ ที่ขนาดพิษระดับต่าง ๆ

ขนาดพิษของ พิษงู(มก./กก.)	อัตราการเต้นของหัวใจ (ครั้ง/นาที)							
	Tc	Tnss	T0	T5	T10	T15	T20	T30
0.5	360±34	363±36	359±42	350±39	360±37	376±55	369±53	377±34
1.0	412±41	420±40	416±35	390±39	507±70	death		
2.0	399±18	400±19	401±16	351±9*	death			

ข้อมูลแสดงในรูป Mean ± S.D. * ระดับความเชื่อมั่น $P < 0.05$ โดยเปรียบเทียบกับ Control ด้วยวิธี Two – tail paired t – test ก่อนฉีดสาร (Tc) หลังฉีดสารละลายไซโตเดียมคลอไรด์ 0.9 % (Tnss) หลังฉีดพิษงูส่วนที่ XIII ที่เวลาต่าง ๆ (T0 – T30)

ตาราง 5 ผลของพิษงูเห่าส่วนที่ XIII ในการแสดงผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะคลื่นไฟฟ้าหัวใจของหนูที่สลบ A (P – R interval) B (QRS complex width)

A

ขนาดพิษของ พิษงู(มก./กก.)	P – R interval (msec)							
	Tc	Tnss	T0	T5	T10	T15	T20	T30
0.5	38±3	38±3	38±3	38±3	40±0	53±6*	40±0	40±0
1.0	40±0	40±0	40±0	50±5	52±3*	death		
2.0	40±0	40±0	40±0	57±3**	death			

ข้อมูลแสดงในรูป Mean ± S.D. * ระดับความเชื่อมั่น $P < 0.05$ ** ระดับความเชื่อมั่น $P < 0.01$ โดยเปรียบเทียบกับ Control ด้วยวิธี Two – tail paired t – test ก่อนฉีดสาร (Tc) หลังฉีดสารละลายไซโตเดียมคลอไรด์ 0.9 % (Tnss) หลังฉีดพิษงูส่วนที่ XIII ที่เวลาต่าง ๆ (T0 – T30)

B

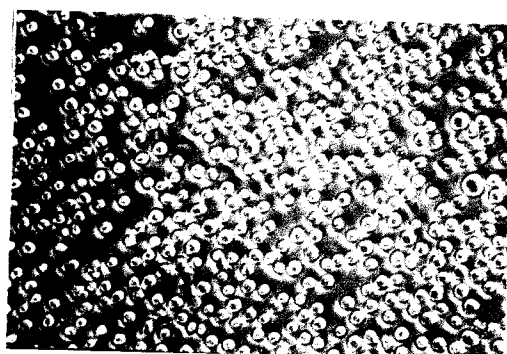
ขนาดพิษของ พิษงู(มก./กก.)	QRS complex width (msec)							
	Tc	Tnss	T0	T5	T10	T15	T20	T30
0.5	25±5	25±5	25±5	25±5	37±6	50±10*	37±6	32±10
1.0	25±5	25±5	25±5	50±10*	80±20*	death		
2.0	22±3	22±3	22±3	57±6**	death			

ข้อมูลแสดงในรูป Mean ± S.D. * ระดับความเชื่อมั่น $P < 0.05$ ** ระดับความเชื่อมั่น $P < 0.01$ โดยเปรียบเทียบกับ Control ด้วยวิธี Two – tail paired t – test ก่อนฉีดสาร (Tc) หลังฉีดสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (Tnss) หลังฉีดพิษงูส่วนที่ XIII ที่เวลาต่าง ๆ (T0 – T30)

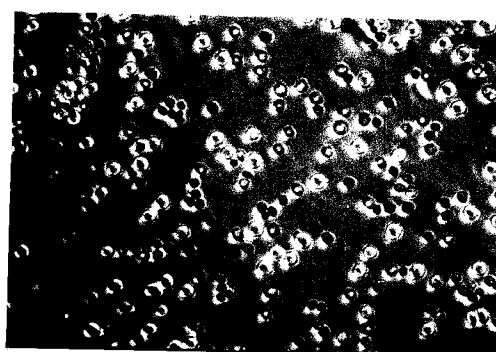
1.5 ผลการทดสอบสมบัตินพิษต่อเซลล์มะเร็งโดยหาค่า ED_{50}

1.5.1 เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู (P388 cells)

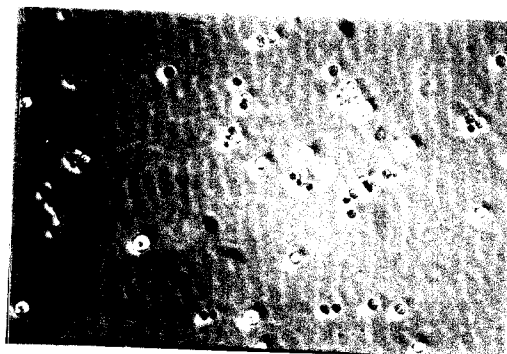
พิษงูเห่าส่วนที่ XIII และพิษงูเห่ายังไม่แยก สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต และทำลายเซลล์มะเร็ง P388 ได้ โดยแสดงสมบัตินพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 เมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโต (จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต) กับส่วน Negative control ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ได้ค่า ED_{50} ดังนี้ พิษงูเห่ายังไม่แยกมีค่า ED_{50} ที่ 1.75 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พิษงูเห่าส่วนที่ XIII มีค่า ED_{50} ที่ 1.47 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ดูภาพประกอบ 11 และ 12 ตาราง 6



A negative control



B พืชงูเห่าไทยยังไม่แยก ที่ระดับความเข้มข้น 1.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

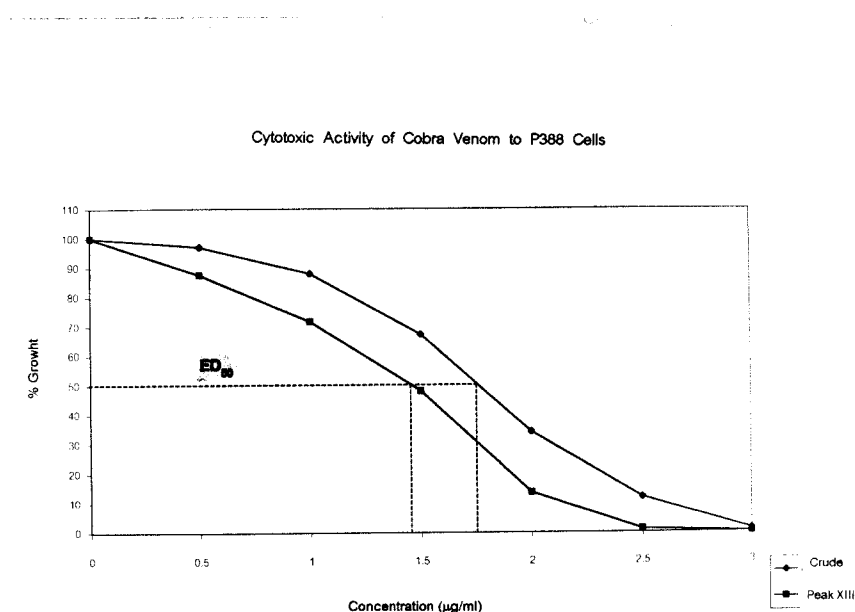


C พืชงูเห่าไทยส่วนที่ XIII ที่ระดับความเข้มข้น 1.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ภาพประกอบ 11 แสดงแอคติวิตีสมบัติความเป็นพิษของพืชงูเห่าไทยยังไม่แยก และพืชงูเห่าส่วนที่ XIII ต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู P388 (ภาพประกอบย่อย A B และ C) แสดงให้เห็นว่าพืชงูเห่าส่วนที่ XIII และพืชงูเห่าไทยยังไม่แยก ระดับความเข้มข้น 1.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว P388 ได้ 51.9 % และ 32.8 % ตามลำดับ

ตาราง 6 เปอร์เซนต์การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู P388 ในสารละลาย
พืชมูเห่าไทยที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

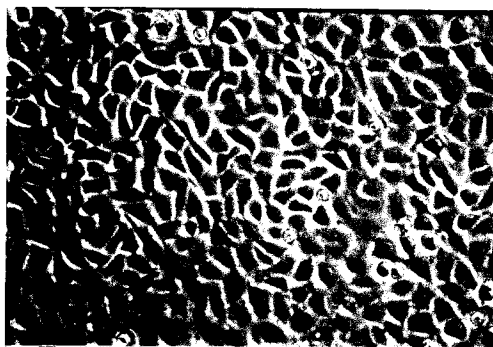
สารทดสอบ	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	เปอร์เซนต์การเจริญเติบโตของเซลล์ P388 ในวันที่ 3 (%)		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
Negative Control	-	100	100	100
พืชมูเห่ายัง ไม่แยก	1.0	89.5	86.5	88.0
	1.5	68.9	65.5	67.2
	2.0	34.8	33.4	34.1
	3.0	0.67	1.0	0.84
พืชมูเห่า ส่วนที่ XIII	1.0	74.4	68.9	71.6
	1.5	50.9	45.3	48.1
	2.0	13.7	13.5	13.6
	2.5	1.8	0.34	1.1
Positive Control (5 – FU)	0.04	66.8	-	66.8
	0.08	33.7	-	33.7



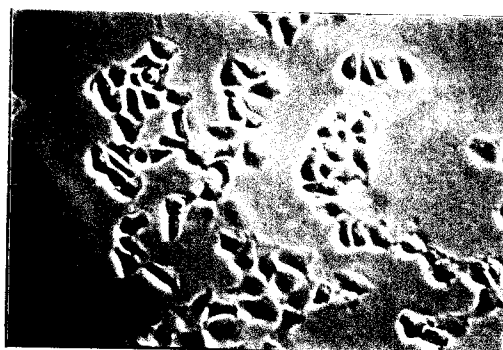
ภาพประกอบ 12 กราฟแสดงค่า ED₅₀ และเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของพิษงูเห่าไทยยังไม่แยกและพิษงูเห่าไทยส่วนที่ XIII

1.5.2 เซลล์มะเร็งปากมดลูกของมนุษย์ (HeLa cells)

พิษงูเห่าไทยส่วนที่ XIII และพิษงูเห่าไทยยังไม่แยก สามารถทำลายเซลล์และยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง HeLa ได้ โดยแสดงสมบัติความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง HeLa เมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตกับส่วน Negative control ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ได้ค่า ED₅₀ ดังนี้ พิษงูเห่าไทยยังไม่แยกมีค่า ED₅₀ ที่ 6.75 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่วนพิษงูเห่าไทยส่วนที่ XIII มีค่า ED₅₀ ที่ 4.3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ภาพประกอบ 13 และ 14 ตารางที่ 7



A. Negative control



B. พืชงูเห่าไทยยังไม่แยกที่ระดับความเข้มข้น 8.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

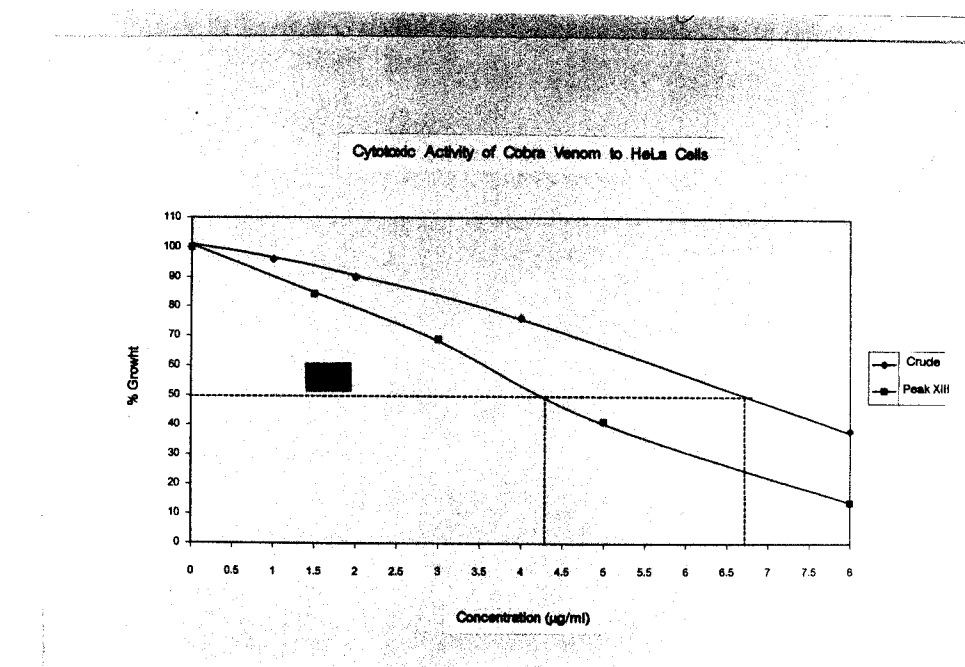


C. พืชงูเห่าไทยส่วนที่ XIII ที่ระดับความเข้มข้น 8.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ภาพประกอบ 13 แสดงแอคติวิตีสมบัติความเป็นพิษของพืชงูเห่าไทยยังไม่แยก และพืชงูเห่าไทยส่วนที่ XIII ต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa (ภาพประกอบย่อย A B และ C) แสดงให้เห็นว่า พืชงูเห่าส่วนที่ XIII และ พืชงูเห่ายังไม่แยก ระดับความเข้มข้น 8.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถทำลายเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa ได้ 86.1 % และ 62.0 % ตามลำดับ

ตาราง 7 เปอร์เซนต์การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa ในสารละลายพิษงูเห่าไทยที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

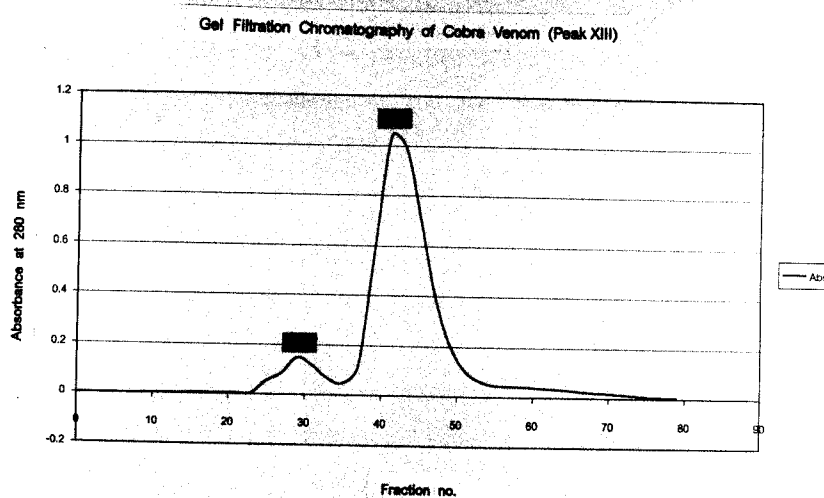
สารทดสอบ	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	เปอร์เซนต์การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง HeLa (%)		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
Negative Control	-	100	100	100
พิษงูเห่าไทย ยังไม่แยก	1.0	99.6	92.8	96.2
	2.0	88.2	91.1	89.6
	4.0	73.8	78.0	75.9
	8.0	37.1	38.8	38.0
พิษงูเห่าไทย ส่วนที่ XIII	1.5	80.6	87.9	84.2
	3.0	64.1	73.6	68.8
	5.0	39.6	42.6	41.1
	8.0	15.6	12.2	13.9
Positive Control (5 – FU)	4.0	22.2	-	22.2
	10.0	11.3	-	11.3



ภาพประกอบ 14 กราฟแสดงค่า ED_{50} และเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง HeLa ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของพิษงูเห่าไทยยังไม่แยกและพิษงูเห่าไทยส่วนที่ XIII

2. ผลการแยกส่วนประกอบพิษงูเห่าไทยที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อ ส่วนที่ XIII ด้วยเทคนิค Gel Filtration Chromatography

นำพิษงูเห่าไทยส่วนที่ XIII 50 มิลลิกรัม ที่ละลายในสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตดบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ pH 6.5 ผ่านลงในคอลัมน์ที่บรรจุด้วย Sephadex G – 50 ส่วนประกอบพิษงูแยกออกเป็น 2 ส่วน ให้ชื่อว่า XIII A และ XIII B โดย XIII A เป็น peak เล็ก ๆ ส่วน XIII B เป็น peak ขนาดใหญ่ ภาพประกอบ 15



ภาพประกอบ 15 กราฟแสดงการแยกพิษงูเห่าส่วนที่ XIII ด้วย Sephadex G – 50 Gel Filtration Chromatography ปริมาณ 50 มิลลิกรัม ละลายด้วยสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตดบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ pH 6.5 ด้วยอัตราการไหล 20 มิลลิลิตร/ชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 3 มิลลิลิตร

2.1 ผลการหาปริมาณโปรตีนของส่วนที่แยกได้จากพิษงูเห่าส่วนที่ XIII

จากการแยกพิษงูเห่าส่วนที่ XIII แยกได้ 2 ส่วน คือ XIII A และ XIII B โดยมี % Yield เมื่อเทียบกับพิษงูส่วนที่ XIII เป็น 0.82 % และ 64.1 % ตามลำดับ และเมื่อคิดเทียบกับพิษงูยังไม่แยกมีค่า % Yield เป็น 0.32 % และ 25.4 % ตามลำดับ ตาราง 8

ตาราง 8 ปริมาณโปรตีนของส่วนต่าง ๆ ที่แยกได้จากพิษงูเห่าส่วนที่ XIII ด้วย Gel Filtration Chromatography

ส่วนของพิษงูเห่า	มิลลิกรัมโปรตีน	% Yield เทียบกับส่วนที่ XIII	% Yield เทียบกับพิษงูยังไม่แยก
XIII A	0.91	0.82	0.32
XIII B	32.04	64.10	25.40
รวม	32.95	64.92	25.71

2.2 ผลการหาแอกติวิตีของพิษงูส่วนต่าง ๆ ที่แยกได้จากพิษงูเห่าส่วนที่ XIII ต่อการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก

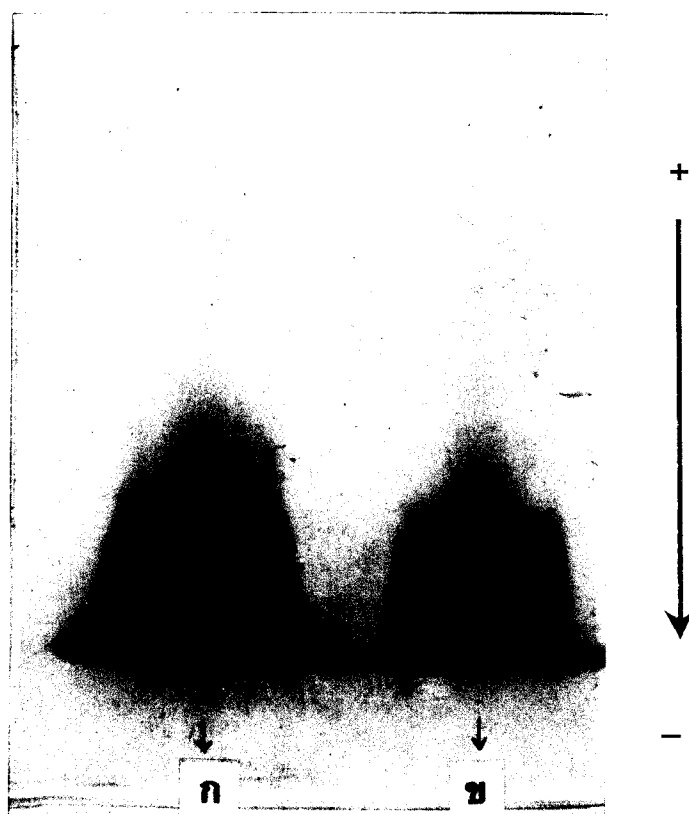
เมื่อนำพิษงูทั้ง 2 ส่วนที่แยกได้มาทดสอบ ผลปรากฏว่า พิษงูเห่าส่วน XIII A ไม่มีแอกติวิตีการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก ส่วนพิษงูส่วนที่ XIII B มีแอกติวิตีในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก 87.5% ดูตาราง 9 ดังนั้นแสดงว่าพิษงูส่วนที่ XIII B มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อ จึงเลือกพิษงูส่วนนี้ไปศึกษาต่อไป

ตาราง 9 แอกติวิตีการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกของพิษงูที่แยกจากพิษงูส่วนที่ XIII ด้วย Sephadex G – 50

ส่วนของพิษงูเห่า	ปริมาณโปรตีน (μg)	แอกติวิตีการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก (%)
XIII A	500	0
XIII B	500	87.5

2.2 ผลการตรวจวิเคราะห์พิษงูเห่าส่วนที่ XIII B โดย Polyacrylamide Gel Electrophoresis

นำพิษงูเห่าส่วน XIII B มาตรวจวิเคราะห์ด้วย PAGE พบว่ามีแถบโปรตีนอย่างน้อย 4 แถบ แสดงว่ามีโปรตีนอย่างน้อย 4 ชนิด ภาพประกอบ 16

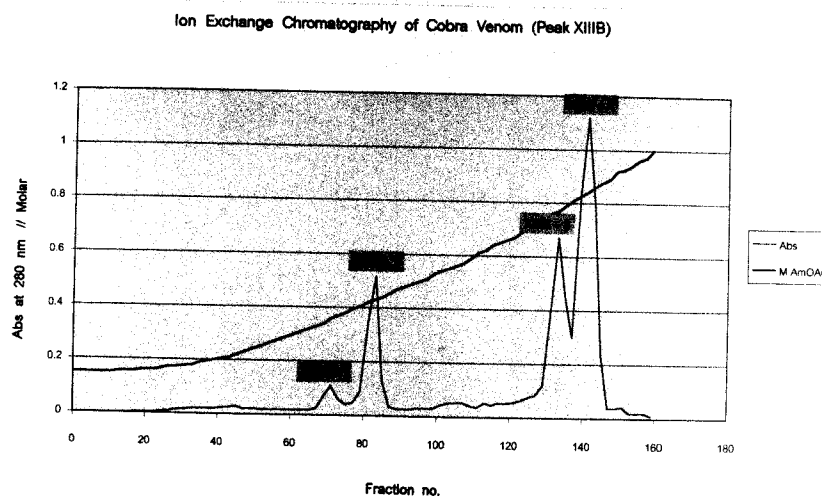


ก) พิษงูส่วน XIII ข) พิษงูส่วน XIII B

ภาพประกอบ 16 แสดงรูปแบบของโปรตีนในพิษงูเห่าที่แยกได้ ที่วิเคราะห์ด้วย PAGE

3. ผลการแยกโปรตีนส่วนที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อ (ส่วน XIII B) ด้วยเทคนิค Ion Exchange Chromatography

นำพิษงูเห่าไทยส่วนที่ XIII B 60 มิลลิกรัม ที่ละลายในสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.15 โมลาร์ pH 7.3 ผ่านลงในคอลัมน์ที่บรรจุด้วย Bio – Rex 70 พิษงูแยกออกเป็น 4 ส่วน ให้ชื่อว่า XIII B – 1 XIII B – 2 XIII B – 3 และ XIII B – 4 ภาพประกอบ 17



ภาพประกอบ 17 กราฟแสดงการแยกพิษงูเห่าส่วน XIII B โดยใช้ Bio – Rex 70 Ion Exchange Chromatography ปริมาณ 60 มิลลิกรัม ะด้วย concave salt gradient ของสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 7.3 ระหว่างความเข้มข้น 0.15 กับ 1.5 โมลาร์ ด้วยอัตราการไหล 18 มิลลิลิตร/ชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 3 มิลลิลิตร

3.1 ผลการหาปริมาณโปรตีนของพิษงูเห่าส่วนที่แยกได้จากพิษงูส่วนที่ XIII B

จากการแยกพิษงูเห่าส่วน XIII B แยกออกได้ 4 ส่วน คือ XIII B – 1 , XIII B – 2 , XIII B – 3 และ XIII B – 4 พิษงูเห่าส่วนที่ XIII B – 4 มี % Yield สูงสุด คือ 24.08 % เมื่อเทียบกับพิษงูส่วน XIII B รองลงมาคือส่วน XIII B – 3 , XIII B – 2 และ XIII B – 1 ตามลำดับ ตาราง 10

ตาราง 10 ปริมาณโปรตีนของส่วนต่าง ๆ ที่แยกได้จากพิษงูส่วนที่ XIII B ด้วย Bio – Rex 70

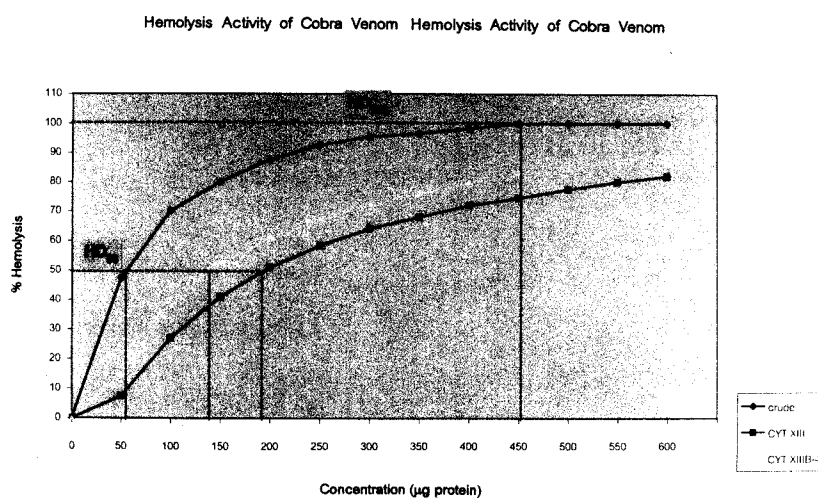
ส่วนของพิษงูเห่า	มิลลิกรัมโปรตีน	% Yield	
		เทียบกับส่วน XIII B	เทียบกับพิษงูยังไม่แยก
XIII B – 1	1.32	2.20	0.56
XIII B – 2	5.78	9.63	2.45
XIII B – 3	9.22	15.37	3.90
XIII B – 4	14.45	24.08	6.12
รวม	30.76	51.28	13.03

3.2 ผลการหาแอกติวิตีของพิษงูในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก

นำพิษงูแต่ละส่วนที่แยกได้มาทดสอบ ผลปรากฏว่า พิษงูส่วน XIII B – 1 ตรวจไม่พบแอกติวิตีในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก ส่วนพิษงูส่วนที่ XIII B – 4 มีแอกติวิตีสูงสุดคือ 85 % รองลงมาคือ ส่วน XIII B – 3 มีแอกติวิตี 67.5 % และส่วน XIII B – 2 มีแอกติวิตี 25.0 % ดูตาราง 11 ดังนั้นแสดงว่าพิษงูส่วน XIII B – 2 , XIII B – 3 และ XIII B – 4 แสดงผลต่อการตายของเนื้อเยื่อ นอกจากนี้ได้หาค่า HD_{50} และ HD_{100} ของพิษงูเห่ายังไม่แยก พิษงูส่วนที่ XIII และพิษงูส่วน XIII B – 4 ได้ค่าดังนี้คือ พิษงูยังไม่แยกมีค่า HD_{50} ที่ 55 ไมโครกรัมโปรตีน และ HD_{100} ที่ 450 ไมโครกรัมโปรตีน พิษงูส่วนที่ XIII มีค่า HD_{50} ที่ 195 ไมโครกรัมโปรตีน และพิษงูส่วน XIII B – 4 มีค่า HD_{50} ที่ 135 ไมโครกรัมโปรตีน ดังภาพประกอบ 18

ตาราง 11 แอคติวิตีการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกของพิษงูส่วนที่แยกได้จากพิษงูส่วนที่ XIII B

ส่วนของพิษงูเห่า	ปริมาณโปรตีน (μg)	แอคติวิตีการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก (%)
XIIIB – 1	500	0
XIIIB – 2	500	25.0
XIIIB – 3	500	67.5
XIIIB – 4	500	85.0

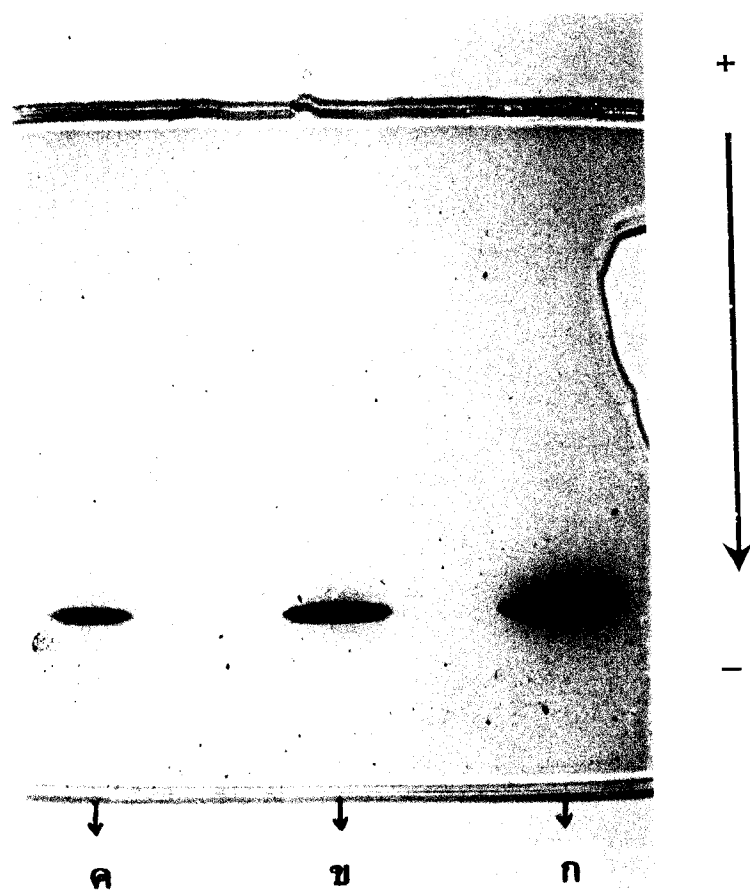


ภาพประกอบ 18 กราฟแสดงแอคติวิตีการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกของ พิษงูเห่าที่ยังไม่แยก พิษงูส่วน XIII และพิษงูส่วน XIIIB – 4 ในการหาค่า HD_{50} และ HD_{100}

3.3 ผลการตรวจวิเคราะห์พิษงูส่วนต่าง ๆ ที่แยกได้จากพิษงูส่วน XIII B ด้วย Polyacrylamide Gel Electrophoresis และ SDS – Polyacrylamide Gel Electrophoresis

3.3.1 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนพิษงูที่แยกได้ด้วย PAGE

นำโปรตีนพิษงูแต่ละส่วนที่แยกได้ที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อมาตรวจวิเคราะห์ด้วย PAGE พบว่าพิษงูทุกส่วน คือ XIII B – 2 , XIII B – 3 และ XIII B – 4 มีแถบโปรตีนเพียง 1 แถบ ภาพประกอบ 19



ก) พิษงูส่วน XIII B – 2 ข) พิษงูส่วน XIII B – 3 ค) พิษงูส่วน XIII B – 4

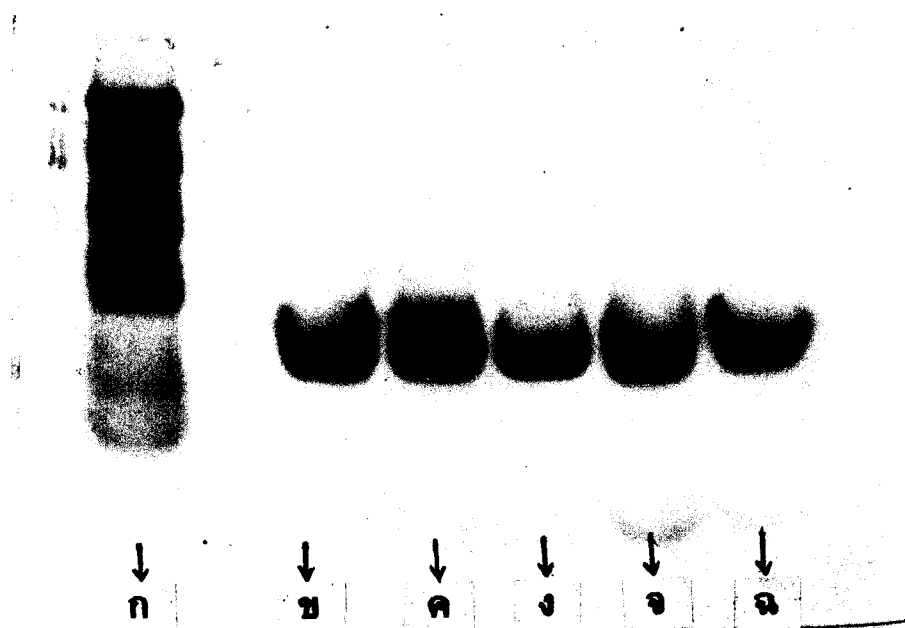
ภาพประกอบ 19 แสดงรูปแบบของโปรตีนในพิษงูเห่าที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อที่ตรวจวิเคราะห์โดยวิธี PAGE

3.3.2 ผลการวิเคราะห์ส่วนของพิษงูที่แยกได้ด้วย SDS – PAGE

นำพิษงูที่ยังไม่ได้แยก พิษงูส่วนที่ XIII พิษงูส่วนที่ XIIIIB พิษงูส่วนที่ XIIIIB – 2 ส่วนที่ XIIIIB – 3 ส่วนที่ XIIIIB – 4 และโปรตีนมาตรฐาน มาวิเคราะห์ด้วย SDS – PAGE ได้ผลดังนี้ พิษงูที่ยังไม่ได้แยกมีแถบโปรตีนมากที่สุด พิษงูส่วนที่ XIII มีแถบโปรตีนกว้าง 1 แถบ ช่วงน้ำหนักโมเลกุล 6,500 – 14,300 ดาลตัน เช่นเดียวกับส่วนที่ XIIIIB แต่มีแถบโปรตีนแคบกว่า ภาพประกอบ 20 A โปรตีนมาตรฐานที่ใช้ประกอบด้วยโปรตีน 6 ชนิด มีมวลโมเลกุลต่าง ๆ ดังที่แสดงในตาราง 12 เมื่อนำโปรตีนที่แยกได้เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน จากกราฟมาตรฐานระหว่าง $\log_{10}$ มวลโมเลกุลกับอัตราการชะลอการเคลื่อนที่ของโปรตีนต่อระยะทางการเคลื่อนที่ของสารทั้งหมด (Rf) ภาพประกอบ 20 B ภาพประกอบ 21 ได้ผลดังนี้ พิษงูส่วน XIIIIB มีแถบโปรตีนหลายแถบ พิษงูส่วน XIIIIB – 1 , XIIIIB – 2 , XIIIIB – 3 และ XIIIIB – 4 มีน้ำหนักโมเลกุลช่วง 6,500 – 8,000 ดาลตัน



A ก) พืชส่วน XIII ข) พืชส่วน XIII B ค) พืชยังไม่แยก ง) โปรตีนมาตรฐาน

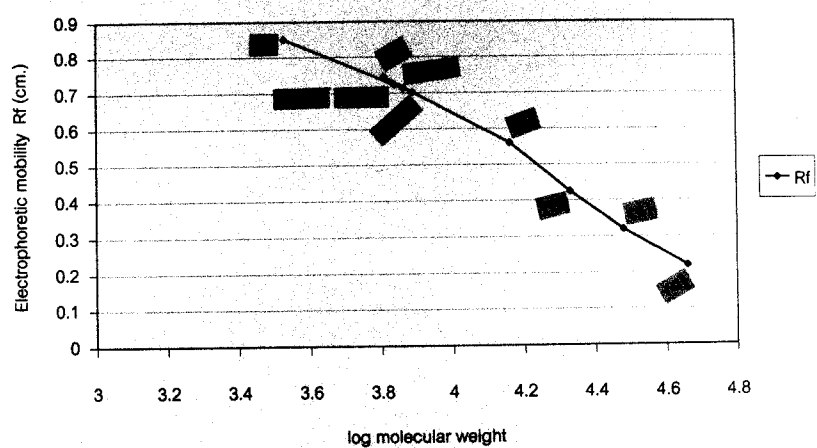


B ก) โปรตีนมาตรฐาน ข) พืชส่วน XIII B - 1 ค) พืชส่วน XIII B
ง) พืชส่วน XIII B - 4 จ) พืชส่วน XIII B - 3 ฉ) พืชส่วน XIII B - 2

ภาพประกอบ 20 แสดงรูปแบบของโปรตีนในพืชเห่าไทยที่วิเคราะห์โดยวิธี SDS - PAGE

ตาราง 12 แสดงมวลโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน

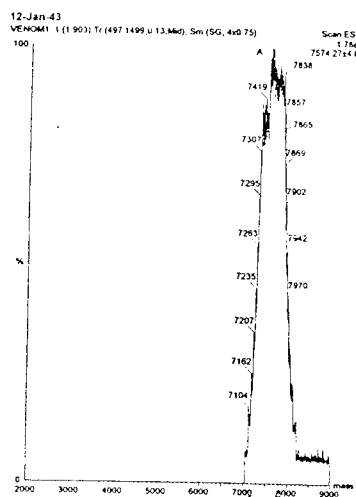
โปรตีน	มวลโมเลกุล (ดาลตัน)
Ovalbumin (O)	46,000
Carbonic anhydrase (C)	30,000
Trypsin inhibitor (T)	21,500
Lysozyme (L)	14,300
Aprotinin (A)	6,500
Insulin (b) chain (Ib)	3,400
Insulin (a) chain (Ia)	2,350



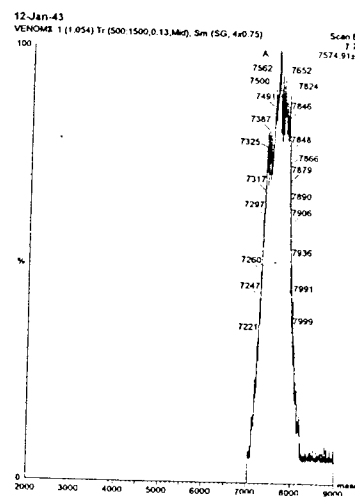
ภาพประกอบ 21 กราฟมาตรฐานโปรตีนจากการวิเคราะห์ SDS - PAGE

3.4 ผลการวิเคราะห์โปรตีนพิษงูเห่าที่แยกได้ด้วยวิธี Mass – Spectrometry

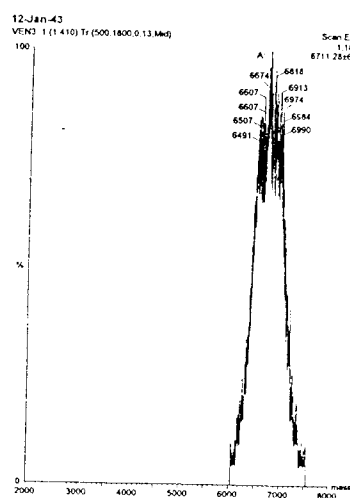
เมื่อนำพิษงูเห่าที่แยกได้ส่วนต่าง ๆ XIII B – 1 , XIII B – 2 , XIII B – 3 และ XIII B – 4 ที่แยกได้จากพิษงูส่วน XIII B มาตรวจวิเคราะห์ด้วย ESI – MS ผลการวิเคราะห์เป็นดังนี้ พิษงูส่วน XIII B – 1 มีน้ำหนักโมเลกุล 7574.27 ± 4.65 ดาลตัน พิษงูส่วน XIII B – 2 น้ำหนักโมเลกุล 7574.91 ± 4.33 ดาลตัน พิษงูส่วน XIII B – 3 มีน้ำหนักโมเลกุล 6711.28 ± 6.95 ดาลตัน และพิษงูส่วน XIII B – 4 น้ำหนักโมเลกุล 6692.13 ± 2.54 ภาพประกอบ 22



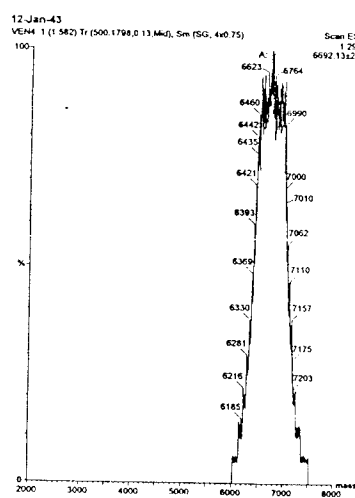
XIIIB - 1



XIIIB - 2



XIIIB - 3



XIIIB - 4

ภาพประกอบ 22 สเปกตรัมแสดงมวลโมเลกุลของโปรตีนพิษงู ส่วนที่ XIIIB - 1 , XIIIB - 2
XIIIB - 3 และ XIIIB - 4 ที่วิเคราะห์โดย ESI - MS

4. ผลการวิเคราะห์หาองค์ประกอบกรดอะมิโนในโปรตีนที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณ

นำส่วนของพิษงูที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อที่แยกจากพิษงูส่วน XIII B คือ พิษงูส่วน XIII B – 3 และ XIII B – 4 (จากการหาแอกติวิตีการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก) มาหาองค์ประกอบกรดอะมิโนในโปรตีน สำหรับพิษงูส่วน XIII B – 2 มีแอกติวิตีการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกต่ำและมีปริมาณน้อยจึงไม่นำมาวิเคราะห์ ให้ผลดังแสดงในตารางที่ 13 จะเห็นว่าพิษงูทั้ง 2 ส่วนประกอบด้วยกรดอะมิโน 60 ตัว 15 ชนิด ไม่พบกรดอะมิโน Glutamic acid , Histidine และ Tryptophan มี Cystine 4 ตัว (8 Cysteine) มี Lysine Valine และ Leucine สูง

ตาราง 13 องค์ประกอบกรดอะมิโนของโปรตีนจากพิษงูเห่าไทยที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณ

กรดอะมิโน	พิษงูเห่า (mole residues per mole of protein)	
	XIIIB - 3	XIIIB - 4
Aspartic acid	6.40 (6)	8.19 (8)
Threonine	3.11 (3)	2.56 (3)
Sersine	2.15 (2)	1.88 (2)
Glutamic acid	0.00 (0)	0.00 (0)
Proline	5.41 (5)	4.44 (4)
Glycine	2.54 (2)	2.25 (2)
Alanine	1.90 (2)	2.83 (3)
Valine	7.05 (7)	4.69 (5)
Methionine	2.19 (2)	1.82 (2)
Isoleucine	0.57 (1)	1.79 (2)
Leucine	5.72 (6)	5.74 (6)
Tyrosine	2.62 (3)	2.84 (3)
Phenylalanine	2.45 (2)	1.39 (1)
Lysine	8.75 (9)	8.57 (9)
Histidine	0.00 (0)	0.00 (0)
Arginine	1.87 (2)	1.89 (2)
Tryptophan	0.00 (0)	0.00 (0)
Half – Cystine	8.36 (8)	8.38 (8)
Total	60	60

บทที่ 5

สรุปผล อภิปราย และข้อเสนอแนะ

สรุปและอภิปรายผล

งูเห่าเป็นงูพิษชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญมากทางการแพทย์ เพราะมีพิษร้ายแรงและมีชุกชุมมากในประเทศไทย กลุ่มผู้ถูกงูเห่ากัดมักจะมีปัญหา เกิดการเน่าตายของเนื้อเยื่อบริเวณแผลที่ถูกกัด ถ้าไม่ได้รับการรักษาที่ถูกต้อง แผลจะขยายกว้างไปเรื่อย ๆ การรักษาทำได้ยากและใช้เวลานานเป็นปัญหาสำคัญอย่างหนึ่งทางการแพทย์ ได้มีผู้ศึกษาแล้วว่าการเน่าตายของเนื้อเยื่อจากงูเห่ากัดเป็นผลจากพิษงูไม่ได้เกิดจากการติดเชื้อจุลินทรีย์ พิษงูส่วนใหญ่ประกอบไปด้วยโปรตีนหลายชนิด ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจว่าโปรตีนชนิดใดเป็นสาเหตุสำคัญ เพื่อจะได้นำไปใช้หาทางป้องกันและรักษาแผลเน่าตายจากงูเห่ากัด การที่จะตรวจสอบว่าเป็นโปรตีนพวกใดสามารถทำได้โดยการศึกษาแอกติวิตีต่าง ๆ ของโปรตีนว่ามีสมบัติอย่างไร และหาองค์ประกอบโครงสร้างของโปรตีนนั้น เพื่อนำมาพิจารณาเปรียบเทียบ นอกจากนี้ยังอาจนำโปรตีนที่ทราบนี้ไปใช้ประโยชน์อย่างอื่นต่อไปได้ วิธีการศึกษาโดยการแยกโปรตีนที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อโดยใช้เทคนิค Ion Exchange Chromatography และ Gel Filtration Chromatography พร้อมกับการศึกษาสมบัติต่าง ๆ

จากการแยกพิษงูเห่าไทย *Naja kaouthia* ด้วย Bio – Rex 70 Ion Exchange Chromatography ตามวิธีแยกของคาร์ลสันและคณะ (Karlsson, Arnberg & Eaker. 1971 : 1 – 16) และวรรณ ธรรมพาลีศ (วรรณ ธรรมพาลีศ. 2534) สามารถแยกพิษงูเห่าไทยได้ 13 ส่วน คือ ส่วนที่ I , II , III , ... , XIII ภาพประกอบ 9 ได้ผลการแยกเช่นเดียวกับงานวิจัยดังกล่าวข้างต้น ได้ทำการหาปริมาณโปรตีนของพิษงูส่วนต่าง ๆ ที่แยกได้ พิษงูส่วนที่ XIII มี % Yield สูงสุด คือ 39.6 % รองลงมาคือพิษงูส่วนที่ VIII และ I ตามลำดับ จากงานวิจัยของวรรณ ธรรมพาลีศ ชี้ว่าพิษงูเห่าไทยส่วนที่ I กับ XIII และพิษงูยังไม่แยก มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณ โดยพิษงูยังไม่แยกมีผลสูงสุด รองลงมาคือพิษงูส่วนที่ XIII และ I ตามลำดับ ดังนั้นในงานวิจัยนี้ได้นำพิษงูส่วนที่ I และ XIII มาตรวจสอบยืนยันผลว่าเป็นส่วนของพิษงูเห่าที่ทำให้เกิดเนื้อเยื่อตาย โดยการหาแอกติวิตีการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก จากตาราง 3 จะเห็นว่าพิษงูส่วนที่ XIII แสดงแอกติวิตีสูงกว่าส่วนที่ I คือ 77.5 % และ 37.5 % ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลวิจัยของวรรณ ธรรมพาลีศ ที่ใช้การฉีดพิษงูเข้าทางใต้ชั้นผิวหนังของกระต่ายและตรวจเนื้อเยื่อทางพยาธิวิทยา และพิษงูส่วนที่ XIII ตรวจไม่พบแอกติวิตีของเอนไซม์ Phospholipase A₂ ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยทำลาย phospholipid ที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ต่าง ๆ ทำให้เซลล์ต่าง ๆ รวมทั้งเซลล์เม็ดเลือดแดงแตก ทั้งยังเป็นเอนไซม์ที่พบในพิษงูทุกชนิด ทั้งนี้

ได้อ้างถึงเมื่อตอนต้น (บทที่ 1 และ 2) ว่าลักษณะและความรุนแรงของแผลเนื้อเยื่อตายจะแตกต่างกันในงูพิษแต่ละชนิด ถ้าเอ็นไซม์ Phospholipase A₂ เป็นส่วนสำคัญในการทำให้เกิดเนื้อเยื่อตาย ลักษณะแผลเนื้อเยื่อตายจึงน่าจะเหมือน ๆ กัน ดังนั้นโปรตีนจากพิษงูส่วนที่ XIII จึงน่าจะเป็นสาเหตุสำคัญในการเกิดเนื้อเยื่อตายจากแผลงูเห่ากัด ซึ่งคาร์ลสันและคณะคิดว่าจากการแยกพิษงูเห่าไทย *Naja naja siamensis* ด้วย Bio – Rex 70 พิษงูส่วนสุดท้าย น่าจะเป็นสารพิษพวก cardiotoxin เนื่องจากมีแอคติวิตีการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก แต่ไม่มีแอคติวิตีของเอ็นไซม์ Phospholipase A₂ และมีค่า LD₅₀ ปานกลาง (Karlsson, Arnberg & Eaker. 1971 : 1 – 16) ทั้งนี้จึงได้เลือกพิษงูส่วนที่ XIII ไปศึกษาขั้นต่อไป พิษงูเห่าส่วนที่ XIII เป็นโปรตีนที่มีสมบัติเป็นเบส (highly basic protein) เพราะแยกออกมาเป็นส่วนสุดท้ายจากการแยกพิษงูเห่าด้วย Bio – Rex 70 ซึ่งเป็น Cation Exchange Chromatography ภาพประกอบ 9 เมื่อนำพิษงูส่วนที่ XIII มาตรวจวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ด้วย Polyacrylamide Gel Electrophoresis พบว่ามีแถบโปรตีนอย่างน้อย 5 แถบ แสดงว่าประกอบไปด้วยโปรตีนอย่างน้อย 5 ชนิด ซึ่งจะต้องนำไปแยกต่อไป

จากผลการตรวจสอบความเป็นพิษต่อกล้ามเนื้อหัวใจของพิษงูส่วนที่ XIII โดยการวัดคลื่นไฟฟ้าหัวใจ (ECG) จากภาพประกอบ 10 ตาราง 4 และตาราง 5 จะเห็นว่าพิษงูส่วนที่ XIII มีผลต่อการทำงานของหัวใจหนู ทำให้เกิดความผิดปกติกับหัวใจ อัตราการเต้นของหัวใจมีแนวโน้มลดลง ลักษณะคลื่นไฟฟ้าหัวใจ มีช่วง P – R interval ยาวขึ้น แสดงว่าเกิด Atrio – Ventricular block เกิดขึ้น ซึ่งการเกิด A – V block แสดงว่ามีพยาธิสภาพเกิดขึ้น สาเหตุหนึ่งเกิดจากมีกล้ามเนื้อหัวใจตาย หรือกล้ามเนื้อหัวใจอักเสบของทางเดินไฟฟ้าหัวใจ ทำให้การเหนี่ยวนำไฟฟ้าระหว่างเอเตรียมและเวนทริเคิลล่าช้า หรือการเหนี่ยวนำถูกปิดกั้น ประกอบกับคลื่นไฟฟ้าหัวใจมีช่วง QRS complex กว้าง แสดงว่า A – V block เกิดอย่างสมบูรณ์ (ขั้น 3) ตำแหน่งของการปิดกั้นอยู่ไต่ระดับ A – V node ลงไป คือบริเวณ bundle branch ซึ่งบ่งชี้ว่าบริเวณกล้ามเนื้อหัวใจที่ตายจะต้องกว้างมากจึงลงไปทำอันตรายแก่ bundle branch ทั้ง 2 ข้างได้ (อยู่ในเวนทริเคิล) ความดันเลือดลดลง จึงหวั่นการเต้นของหัวใจผิดปกติ หลังจากนั้นในหนูบางตัวที่ระดับขนาดพิษ 1.0 มิลลิกรัม/กิโลกรัม จะเกิด Ventricular tachycardia ก่อนเกิด Ventricular fibrillation การเกิด Ventricular tachycardia (VT) มักเกิดในภาวะที่กล้ามเนื้อหัวใจเสียไปอย่างมาก กล้ามเนื้อหัวใจตายอย่างเฉียบพลันเป็นบริเวณกว้าง หลังจากนั้นมักจะเกิด Ventricular fibrillation (VF) ตามมา Ventricular fibrillation เป็นสาเหตุของ Cardiac arrest ที่พบบ่อยที่สุดของโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดและกล้ามเนื้อหัวใจตาย (ชมพูนุท อ่องจรีต. 2525 : 1 – 201) หนูที่ฉีดพิษงูส่วนที่ XIII ขนาดพิษ 0.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ไม่เกิด VT และ VF และหนูไม่ตาย แสดงว่ากล้ามเนื้อหัวใจไม่ได้บาดเจ็บมาก สามารถฟื้นคืนสู่สภาพปกติได้ ซึ่งเป็นการปรับตัวเพื่อความอยู่รอดตามธรรมชาติ จากผลการวิจัยส่วนนี้แสดงให้เห็นว่าพิษงูส่วนที่ XIII มีผลต่อการตายของกล้ามเนื้อ

หัวใจ ดังจากลักษณะต่าง ๆ ของคลื่นไฟฟ้าหัวใจ ที่ได้ชี้แจงในตอนต้น แชนเกอร์ ได้ชี้ว่าพิษงูเห่าอินเดียที่ยังไม่แยกและ cardiotoxin ที่แยกบริสุทธิ์เป็นสาเหตุทำให้หัวใจหยุดเต้น (Cardiac arrest) (Sarker. 1951 : 469 – 471) มีการศึกษาว่า cardiotoxin เป็นสาเหตุทำให้ความดันเลือดลดลง คลื่นไฟฟ้าหัวใจเปลี่ยนแปลง มี P – R interval ยาว และ ช่วง QRS complex กว้าง เกิด complete Atrio – Ventricular block จึงหวัะการเต้นของหัวใจผิดปกติ (Tu. 1977 : 302) เช่นเดียวกับ cardiotoxin ที่แยกจากพิษงูเห่าตอนใต้ของจีน *Naja naja atra* ทั้งพิษงูยังไม่แยกและ cardiotoxin fraction ทำให้เกิดความผิดปกติกับหัวใจ ลักษณะคลื่นไฟฟ้าหัวใจเปลี่ยนแปลงโดยช่วง P – R interval ยาวขึ้น และช่วง QRS complex กว้าง เกิด A – V block จึงหวัะการเต้นของหัวใจผิดปกติ ความดันเลือดลดลง เกิด VT และ VF และตาย (Sun & walker. 1986 : 233 – 245) ซึ่งจะเห็นว่าพิษงูเห่าไทยส่วนที่ XIII แสดงผลทำให้เกิดความผิดปกติกับหัวใจ โดยมีลักษณะความผิดปกติของคลื่นไฟฟ้าหัวใจ คล้ายกับสารพิษ cardiotoxin ที่แยกจากพิษงูเห่าชนิดต่าง ๆ ที่อ้างถึง ดังนั้นพิษงูเห่าไทยส่วนที่ XIII อาจจะเป็นสารพิษกลุ่ม cardiotoxin

จากผลการทดสอบสมบัติความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง โดยการหาค่า ED_{50} ของพิษงูเห่าไทย พิษงูเห่ายังไม่แยกและพิษงูเห่าส่วนที่ XIII แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู P388 (ภาพประกอบ 11) และเซลล์มะเร็งปากมดลูกของมนุษย์ HeLa (ภาพประกอบ 13) โดยมีค่า ED_{50} ต่อเซลล์มะเร็ง P388 เป็น 1.75 และ 1.47 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ตาราง 6 และภาพประกอบ 12) มีค่า ED_{50} ต่อเซลล์มะเร็ง HeLa เป็น 6.75 และ 4.3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ตาราง 7 และภาพประกอบ 14) จากข้อมูลจะเห็นว่าพิษงูเห่าส่วนที่ XIII มีแอกติวิตีสมบัติความเป็นพิษดีกว่าพิษงูยังไม่แยกไม่มากนัก เนื่องจากในพิษงูยังไม่แยกยังประกอบด้วยส่วนประกอบอื่น ๆ นอกจากพิษงูส่วนที่ XIII ที่เป็นพิษต่อเซลล์ เช่น เอ็นไซม์ phospholipase A_2 เอ็นไซม์ L – amino acid oxidase เป็นต้น หรือส่วนประกอบในพิษงูยังไม่แยกที่เป็นพิษต่อเซลล์ออกฤทธิ์ส่งเสริมกัน ทำให้มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น พิษงูส่วนที่ XIII มีแอกติวิตีต่อเซลล์มะเร็ง P388 สูงกว่า เซลล์มะเร็ง HeLa เพราะเซลล์มะเร็ง P388 มีลักษณะเป็น suspension cell ที่มีพื้นที่ผิวรอบ ๆ ให้สารพิษเข้าสัมผัสได้ทุกส่วน ทำให้ sensitive สูง ส่วนเซลล์มะเร็ง HeLa เป็น monolayer cell สารพิษเข้าสัมผัสได้ยากกว่า ดังดูจากผลของยารักษามะเร็ง 5 – FU ที่ใช้เป็น Positive control (ตาราง 6 และ 7) สรุปได้ว่าพิษงูส่วนที่ XIII มีสมบัติความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิด เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับแอกติวิตีการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก พิษงูส่วนที่ XIII มีค่า HD_{50} เป็น 195 ไมโครกรัมโปรตีน (ต่อปริมาตร 4 มิลลิลิตร) ดังนั้นความเข้มข้นจึงประมาณ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) แสดงว่าพิษงูเห่าไทยส่วนที่ XIII มีความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) ต่อเซลล์มะเร็งดีกว่าเซลล์ปกติ เช่นเซลล์เม็ดเลือดแดงมาก จากงานวิจัยของอิวากูชิและคณะ ได้ศึกษาแอกติวิตีการทำให้เซลล์แตก (cytolytic activity) ของ cytotoxin ที่แยกจากพิษงูเห่าอินเดีย (*Naja naja*) ต่อเซลล์มะเร็งต่างๆ และเซลล์ปกติ เช่น เซลล์

เม็ดเลือดแดง เซลล์ม้าม ผลปรากฏว่า Cytotoxin II มีฤทธิ์ทำให้เซลล์แตกต่อเซลล์มะเร็งสูงกว่า เซลล์ปกติมาก โดยมีค่า IC_{50} ประมาณ 10 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (Iwaguchi, Takechi & Hayashi. 1985 : 343 – 349) เช่นเดียวกับ Cytotoxin P4 ที่แยกจาก พิษงูเห่าพิษแอฟริกา *Naja nigricollis nigricollis* ที่แสดงแอกติวิตีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่อ เซลล์มะเร็ง (melanoma B 16 , WEHI 3 B leukemia , rat chondrosarcoma) สูงกว่าเซลล์ ปกติ (mouse and human erythrocyte , spleen cell) และสามารถทำลายเซลล์มะเร็งในหลอด ทดลองและยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งในสิ่งมีชีวิต (Chaim - Matyas, Borkow & Ovada. 1991 : 415 – 421) คุณสมบัติอย่างหนึ่งของสารพิษ cardiotoxin หรือ cytotoxin คือมีฤทธิ์ทำ ลายหรือยับยั้งเซลล์และเนื้อเยื่อทั้งเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็ง ดังที่ได้อ้างถึงนี้และในบทที่ 2 ซึ่ง จะเห็นว่าพิษงูเห่าส่วนที่ XIII แสดงสมบัตินี้เช่นกัน

ผลการแยกพิษงูเห่าไทยส่วนที่ XIII ที่แยกด้วย Sephadex G – 50 (Gel Filtration Chromatography) แยกออกเป็น 2 ส่วน คือ XIII A และ XIII B ภาพประกอบ 15 โดยพิษงูเห่าส่วน XIII A มี % Yield ของโปรตีน 0.82 % และส่วน XIII B มี % yield โปรตีน 64.1 % ซึ่งเป็นโปรตีน ส่วนใหญ่ที่แยกได้ ตาราง 8 เมื่อนำทั้ง 2 ส่วนไปทดสอบหาส่วนที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อ โดยการหาแอกติวิตีทำให้เม็ดเลือดแดงแตก พิษงูส่วน XIII A ไม่แสดงแอกติวิตี ส่วนที่ XIII B มี แอกติวิตี 87.5 % ตาราง 9 ดังนั้นจึงเลือกพิษงูส่วนที่ XIII B มาตรวจวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ด้วย PAGE พบว่ายังมีแถบโปรตีนหลายแถบอยู่แสดงว่าประกอบด้วยโปรตีนหลายตัว ซึ่งต้องนำไป แยกให้บริสุทธิ์ในขั้นต่อไป

จากผลการแยกโปรตีนพิษงูเห่าไทยส่วนที่ XIII B ที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อด้วย Bio Rex – 70 (Ion Exchange Chromatography) ที่สมดุลในสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตด 0.15 โมลาร์ pH 7.3 สามารถแยกได้ 4 ส่วน คือ ส่วน XIII B – 1 , XIII B – 2 , XIII B – 3 และ XIII B – 4 ภาพประกอบ 7 แต่ละส่วนมีปริมาณโปรตีนดังนี้ 1.32 , 5.78 , 9.22 และ 14.45 มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ พิษงูทั้ง 4 ส่วน เมื่อนำมาหาแอกติวิตีการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก พิษงูส่วนที่ XIII B – 1 ไม่พบแอกติวิตี ส่วนที่ XIII B – 2 มีแอกติวิตีต่ำคือ 25 % ส่วนที่ XIII B – 3 มีแอกติวิตี 67.5 % และส่วนที่ XIII B – 4 มีแอกติวิตีสูงสุดคือ 85 % เมื่อนำพิษงูยังไม่แยก พิษงูส่วนที่ XIII และ XIII B – 4 มาเปรียบเทียบกันโดยการหาค่า HD_{50} พิษงูยังไม่แยกมีแอกติ วิตีสูงสุดคือ มีค่า HD_{50} ที่ 55 ไมโครกรัมโปรตีน พิษงูส่วนที่ XIII มีค่า HD_{50} ที่ 195 ไมโครกรัม โปรตีน และพิษงูส่วน XIII B – 4 มีค่า HD_{50} ที่ 135 ไมโครกรัมโปรตีน ภาพประกอบ 18 จะเห็น ว่าพิษงูยังไม่แยกมีแอกติวิตีสูงสุด สาเหตุอาจเป็นเพราะว่าพิษงูยังไม่แยก ประกอบไปด้วยโปรตีนของสารที่ร่วมกันแล้วออกฤทธิ์ส่งเสริมกันทำให้ประสิทธิภาพสูงขึ้น ตัวอย่างเช่น cardiotoxin จากพิษงูเห่าไทย *Naja naja siamensis* เมื่อทำงานร่วมกับ เอ็นไซม์ phospholipase A_2 (มี ปริมาณ 2 – 3 % w/w) ประสิทธิภาพในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกเพิ่มขึ้น 20 – 30 เท่า

(Harvey, et al. 1983 : 215 – 221) พิษุส่วนที่ XIII B – 4 มีแอกติวิตีสูงกว่าพิษุส่วนที่ XIII เนื่องจากมีการแยกให้บริสุทธิ์ขึ้น ผลจากการตรวจสอบพิษุส่วนที่ XIII B – 2 , XIII B – 3 และ XIII B – 4 ด้วย PAGE พิษุแต่ละส่วนแยกออกเป็นแถบโปรตีนเดี่ยว ๆ แสดงว่าน่าจะได้โปรตีนที่บริสุทธิ์ ภาพประกอบ 19 และจากการตรวจสอบด้วย SDS – PAGE พิษุส่วนที่ XIII และ XIII B มีโปรตีนแถบเดียวมีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 6,500 – 14,000 ดาลตัน (แสดงว่าโปรตีนที่ประกอบอยู่มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกัน) ภาพประกอบ 20 A สำหรับการตรวจสอบพิษุส่วน XIII B – 1 , XIII B – 2 , XIII B – 3 และ XIII B – 4 มีน้ำหนักโมเลกุล ช่วง 6,500 – 8,000 ดาลตัน เช่นกัน ซึ่งจะเห็นว่ามีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกัน จากผลการวิเคราะห์พิษุส่วน XIII B – 1 , XIII B – 2 , XIII B – 3 และ XIII B – 4 ด้วย ESI – MS พิษุส่วน XIII B – 1 และ XIII B – 2 มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกัน คือ 7,574.27 และ 7,574.91 ส่วนพิษุส่วน XIII B – 3 มีน้ำหนักโมเลกุล 6,711.28 และพิษุส่วน XIII B – 4 มีน้ำหนักโมเลกุล 6,692.13 จะเห็นว่ามีน้ำหนักโมเลกุลจาก SDS – PAGE และ MS สอดคล้องกัน พิษุส่วนที่ XIII B – 3 และ XIII B – 4 มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับของสารพิษ cardiotoxin จากพิษุเห่าชนิดต่าง ๆ คือ ประมาณ 6,500 – 7,000 ดาลตัน (Fryklund & Eaker. 1975 : 2860 – 2868 ; Hayashi, et al. 1976 : 210 – 214 ; Harvey, Marshall & Karlsson. 1982 : 379 – 396)

จากผลการวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน ที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณ พิษุส่วน XIII B – 2 ไม่นำมาวิเคราะห์เพราะมีแอกติวิตีต่ำและมีปริมาณน้อยมากหลังจากทำแห้งแล้ว จากตาราง 13 พิษุส่วนที่ XIII B – 3 และ XIII B – 4 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 60 ตัว 15 ชนิด ไม่พบกรดอะมิโน Glutamic acid , Histidine และ Tryptophan มี 8 Cysteine หรือ 4 disulfide bonds เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของพิษุส่วนที่ XIII B – 3 และ XIII B – 4 ไปเปรียบเทียบกับตารางแสดงลำดับกรดอะมิโนของสารพิษ neurotoxin และ cardiotoxin จากพิษุเห่าต่าง ๆ (ตาราง 16 , 17 และ 18 ในภาคผนวก) พิษุส่วนที่ XIII B – 3 และ XIII B – 4 มีองค์ประกอบคล้ายกับสารพิษ cardiotoxin ถึงแม้ shortchain postsynaptic neurotoxin จะมีจำนวนกรดอะมิโนและน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกัน แต่ชนิดและจำนวนของกรดอะมิโนแต่ละชนิดต่างกัน คือ shortchain postsynaptic neurotoxin จะไม่พบกรดอะมิโน Alanine , Phenylalanine และ Methionine หรือ Leucine แต่จะมี Glutamic acid สูง Valine น้อย ต่างจากสารพิษ cardiotoxin

สรุปจากการแยกโปรตีนที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณ จากพิษุเห่าไทย *Naja kaouthia* โปรตีนที่แยกได้คือ พิษุเห่าส่วนที่ XIII B – 3 และ XIII B – 4 น่าจะเป็นสารพิษกลุ่ม cardiotoxin เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนในโปรตีน น้ำหนักโมเลกุลคือมีน้ำหนักโมเลกุล 6,711 และ 6,692 ดาลตัน ตามลำดับ เป็นโปรตีนที่มีสมบัติเป็นเบส ออกฤทธิ์ต่อการทำงานของหัวใจ แสดงสมบัตินี้ความเป็นพิษต่อเซลล์และเนื้อเยื่อของทั้งเซลล์ปกติ

และเซลล์มะเร็ง สำหรับโปรตีนส่วน XIII B – 2 มีแอคติวิตีทำให้เกิดเลือดแดงแตกดำ และมีน้ำหนักโมเลกุล 7,500 ดาลตัน อาจจะเป็นสารพิษที่เรียกว่า Cardiotoxin – Like Basic Polypeptide (CLBP) เพราะจากงานวิจัยของทาเกชิและคณะ ได้ศึกษาสารพิษจากพิษงูเห่าตอนใต้ของจีน *Naja naja atra* และให้ชื่อว่า CLBP ซึ่งมีสมบัติเป็นพิษต่อเซลล์ดำและมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 7,500 ดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโน 61 ตัว (Takeshi, Tanada & Hayashi. 1985 : 795 – 802)

พิษของงูหลาย ๆ วงศ์ สามารถทำให้เกิดเนื้อเยื่อตาย (Necrotic tissue) ได้ ลักษณะและความรุนแรงของแผลเนื้อเน่าตายจากงูกัด จะแตกต่างกันไปในงูแต่ละชนิดแต่ละกลุ่ม เนื่องจากส่วนประกอบของพิษงูในพิษแต่ละชนิด (Ownby & Colberg. 1988 : 459 – 474) โดยสามารถแบ่งส่วนประกอบโปรตีนของพิษงูที่ทำให้เกิดกล้ามเนื้อตายได้ 4 พวก คือ 1) Myotoxin a และสารพิษที่มีลักษณะคล้ายกัน Myotoxin a มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 5,000 มีกรดอะมิโน 42 residues 3 disulfide bridges ซึ่งแยกได้จากงู *Crotalus viridis viridis* จากอเมริกา สารพิษกลุ่มนี้พบในงูสกุล *Crotalus* และ *Sistrurus* (Bober, et al. 1988 : 665 – 675) 2) phospholipase A เป็นส่วนประกอบของพิษงูที่ทำให้เกิดกล้ามเนื้อตายในงูวงศ์ Hydrophidae หรือกลุ่มงูทะเล (Tu, Passey & Toom. 1970 : 96 – 106) และในกลุ่ม Crotalidae สกุล Bothrop, Agkistrodon (กลุ่มงูกะปะ) เป็นต้น 3) Hemorrhagic toxins ที่มีแอคติวิตีการทำให้กล้ามเนื้อตาย เช่นจากงู *Crotalus atrox* จากตอนใต้ของสหรัฐอเมริกา 4) สารพิษหลายอย่างร่วมกัน (Miscellaneous compounds) (Tu. 1991 : 297 – 347) สำหรับพิษงูเห่าไทยยังไม่มีมีการวิจัยอย่างชัดเจนว่า โปรตีนชนิดใดในส่วนประกอบของพิษงูเห่าไทย ที่ทำให้เกิดเนื้อเยื่อตายจากแผลงูกัด แต่จากงานวิจัยในปริณฎณิพนธ์นี้ พอจะสรุปได้ว่าโปรตีนที่เป็นสาเหตุสำคัญทำให้เกิดเนื้อเยื่อตายเป็นสารพิษกลุ่ม cardiotoxin อย่างไรก็ตามน่าจะมีโปรตีนชนิดอื่น ๆ ร่วมด้วย เช่น เอ็นไซม์ phospholipase A₂ ที่ตรวจพบแอคติวิตีในพิษงูส่วนที่ 1 ที่มีผลทำให้เกิดเนื้อเยื่อตายเมื่อโปรตีนทั้ง 2 ชนิด ทำงานร่วมกันทำให้ประสิทธิภาพต่อการทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อสูงขึ้น ซึ่งจะเห็นว่าพิษงูยังไม่แยกทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อสูงสุด (วรรณ ธรรมพาลเลิศ . 2534)

โปรตีนที่มีผลต่อการตายของเซลล์และเนื้อเยื่อ เฉพาะบริเวณที่แยก จากพิษงูเห่าไทย (cardiotoxin) สามารถนำไปผลิตแอนติบอดีแก่พิษงูเห่าไทยที่มีความจำเพาะเจาะจง สำหรับยับยั้งการตายของเนื้อเยื่อในผู้ป่วย ที่ถูกงูเห่าไทยกัดอย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้นได้ นอกจากนี้ โปรตีนที่แยกได้อาจนำไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์อื่น ๆ เป็นต้นว่า นำไปพัฒนาสำหรับเป็นสารทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อที่ร่างกายไม่ต้องการ เช่น เซลล์มะเร็ง ซึ่งจะเห็นว่าโปรตีนที่มีผลต่อการตายของเซลล์และเนื้อเยื่อของพิษงูเห่าไทย แสดงแอคติวิตีเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสูงกว่าเซลล์ปกติมาก สอดคล้องกับการศึกษาของคานะและคณะที่ได้ศึกษาผลของ cardiotoxin จาก Formosan cobra ต่อ chick embryonal fibroblast ที่สามารถ transforme โดย Rous

sarcoma virus ที่การกลายพันธุ์ sensitive ต่ออุณหภูมิ โดยพบว่า transformed cells มีแอคติวิตีการแตกของเซลล์ (cytolytic action) สูงกว่า non – transformed cells จากเซลล์ชนิดเดียวกัน ED₅₀ เป็น 2 และ 8 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (Kaneda, et al. 1985 : 313 – 316) ดังนั้นชี้ให้เห็นว่าเมื่อนำโปรตีนนี้ไปใช้ในระดับความเข้มข้น ที่สามารถทำลายเซลล์มะเร็งได้ เซลล์ปกติอื่น ๆ ก็ไม่น่าจะเป็นอันตราย อย่างไรก็ตามย่อมจะเป็นการดีกว่าถ้าจะหาวิธีให้สารพิษออกฤทธิ์เจาะจงกับเซลล์มะเร็งโดยเฉพาะ โดยไม่มีผลต่อเซลล์ปกติ เมื่อไม่นานนี้ได้มีการคิดค้นวิธีการผสม (hybrid) โปรตีนให้จับคู่ (coupled) กับสารพิษ โมเลกุลรวมนี้เรียกว่า “immunotoxins” ซึ่งมักจะเป็นการนำเอา monoclonal antibody หรือ polyclonal antibody ที่จำเพาะของเซลล์หนึ่ง ๆ มาจับกับสารพิษ โดยถ้านำเอาสารพิษที่มีฤทธิ์ทำลายเซลล์อย่าง พิษงู ส่วน XIII B – 4 มาจับกับแอนติบอดีของเซลล์มะเร็งมาใช้ เพื่อยับยั้งเซลล์มะเร็งอย่างเจาะจง น่าจะเป็นหนทางหนึ่งที่น่าจะเป็นไปได้ในการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

กลไกการทำงานของโปรตีน ที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณ จากพิษงูเห่าไทย (cardiotoxin) ยังไม่ทราบแน่ชัด บริเวณที่โปรตีนพิษ (cardiotoxin) จับกับเซลล์ (Binding site) อาจจะเป็นประจุลบบนเยื่อหุ้มเซลล์ เนื่องจากโปรตีนชนิดนี้เป็น highly basic protein ที่มีประจุสุทธิเป็นบวก สามารถเกิด Ion interaction กับประจุลบของ phospholipid บนผิวเยื่อหุ้มเซลล์ (Dufourcq & Foucon. 1978 : 1170 – 1176 ; Vincent, et al. 1978 : 103 – 108) ได้ หรือโปรตีนสารพิษนี้สามารถจับกับบริเวณจับของ Ca²⁺ บนผิวเซลล์ได้ เพราะจากการทดลองที่มีการเติม Ca²⁺ สามารถป้องกันการเกิดพิษจาก cardiotoxin ได้ หรืออาจจะเกิดจากการจับของ cardiotoxin กับ membrane protein ซึ่งเกี่ยวข้องกับ disulfide – sulhydryl interchange ระหว่าง disulfide bridge ในสารพิษกับหมู่ -SH ของ membrane protein (Harvey. 1991 : 93) สำหรับกลไกการทำให้เซลล์ตาย อาจเกิดจากการซ่อนไซของสารพิษผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไป ทำให้เซลล์แตก (Bougis, et al. 1981 : 4915 – 4920) หรืออาจเกิดจากการที่โปรตีนที่เป็นพิษกับเซลล์จับกับ membrane lipids ที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ ATPase ไปยับยั้ง Sodium pump ทำให้ภายในเซลล์มีการสะสมออสโมนต่าง ๆ ทำให้เซลล์แตก (Zoheer, et al. 1975 : 293 – 303) อย่างไรก็ตามยังไม่ทราบชัดเจนว่ากลไกการทำงานเป็นอย่างไร จะต้องศึกษาในรายละเอียดระดับโมเลกุลต่อไป พร้อมกับศึกษาโครงสร้างของโปรตีนชนิดนี้ ทั้งการหาการเรียงลำดับของกรดอะมิโนและโครงสร้าง 3 มิติ เพื่อนำไปสู่ความเข้าใจความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของโปรตีนและหน้าที่ทางชีวภาพของโปรตีนที่แสดงออกได้

ผลการศึกษาวิจัยในปริญญานิพนธ์เรื่องนี้เป็นข้อมูลพื้นฐาน เพื่อนำไปใช้ประโยชน์หาทางป้องกันและรักษาแผลเนื้อเยื่อตายจากงูเห่ากัดให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น และนำไปเพื่อใช้ในการศึกษาในขั้นต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1. ในการศึกษาขั้นต่อไปควรนำพิษงูเห่าส่วนที่ XIII B – 3 และ XIII B – 4 ไปหาการเรียงลำดับของกรดอะมิโนในโปรตีน เพื่อให้สามารถนำไปเปรียบเทียบได้อย่างถูกต้องชัดเจนยิ่งขึ้น และควรนำไปศึกษาโครงสร้างสามมิติของโปรตีนด้วย
2. การแยกพิษงูเห่าไทย ถ้าต้องการเฉพาะพิษงูส่วนที่ XIII B – 3 และ XIII B – 4 (cardiotoxin) ควรแยกด้วยวิธี Gel Filtration chromatography – Sephadex G – 75 ก่อน แล้วค่อยมาแยกต่อด้วย Ion Exchange Chromatography เพราะจะสะดวกและรวดเร็วกว่า
3. ควรมีการแยกพิษงูส่วนที่ I ให้บริสุทธิ์ และตรวจสอบโครงสร้าง เพื่อหาว่าเป็นโปรตีนชนิดใด ที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อ
4. ในการตรวจวัดความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ควรมีการตรวจวัดในสิ่งมีชีวิต (vivo) ด้วย และควรนำพิษงูส่วน XIII B – 3 และ XIII B – 4 ไปตรวจวัดความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งโดยการหาค่า ED₅₀ ด้วย ในการศึกษาขั้นต่อไป
5. ศึกษาวิธีผลิตแอนติบอดี ต่อพิษงูส่วนที่ XIII XIII B XIII B – 3 และ XIII B – 4 ในการยับยั้งรักษาแผลเนื้อเยื่อเน่าตายจากแผลงูเห่ากัด
6. ศึกษากลไกการทำงานแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารพิษกลุ่มนี้ และความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและหน้าที่ทางชีวภาพ

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- กองวิทยาศาสตร์ สภาอากาศไทย. (2540?). *งูพิษและการผลิตเซรัม*. กรุงเทพฯ : นิเวรรดา.
- ชมพูนุท อ่องจรีต. (2525). *คลื่นไฟฟ้าหัวใจทางคลินิก*. ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : ยูนิตีพับลิเคชั่น.
- ชาญ โพนกุล, บรรณาธิการ. (2531). “งูพิษกัดในประเทศไทย,” ใน การประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 1 เรื่องพิษจากพืช สัตว์และจุลชีพ. : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- โชติ ชิดรานนท์. (2530). *พยาธิวิทยาพื้นฐาน*. เชียงใหม่ : ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ธัญญ์ เพ็ญชาติ. (2531, พฤษภาคม). “ความรู้เกี่ยวกับงูพิษที่สำคัญในเมืองไทย,” *จุลสารสมาคมศิษย์เก่าแพทย์จุฬาลงกรณ์*. 2(5) : 16 – 26.
- นราทร ธรรมบุตร, สมใจ เจริญประยูร และ ผ่องพรรณ นันทาพิสุทธิ. (2527, กันยายน). “จุลชีววิทยาของแมลงเห่ากัด,” *สารศิริราช*. 33(9) : 589 – 595.
- บุญเยื่อน ทุมวิภาต และ วิโรจน์ นุตพันธุ์. (2525). *การรักษาผู้ป่วยถูกงูพิษกัดและงูพิษในประเทศไทย*. กรุงเทพฯ : พิมพ์เส.
- ประไพ พงษ์ประสิทธิ์, ชุติ มิตรกุล และ นราดล นพคุณ. (2531, กันยายน). “อาการเฉพาะที่ของแมลงเห่ากัด : พยาธิสภาพ จุลชีพ และสาเหตุที่อาจเป็นไปได้,” *J. Med. Assoc. Thai*. 71(9) : 475 – 480.
- ไพบุลย์ จินตกุล และ ลาวัณย์ จันทรโสม. (2539). *งูพิษในประเทศไทย*. กรุงเทพฯ : นิเวรรดา.
- ภักธี หนูณรงค์. (2538). *การเปรียบเทียบองค์ประกอบของพิษงูที่ได้จากงูเห่าไทย (Naja kaouthia) ที่มีดอกจันสมบูรณ์และดอกจันไม่สมบูรณ์*. ปริญญาโท วท. (เคมีชีวภาพ). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร. ถ่ายเอกสาร.
- มุกดา ตฤณานันท์, และคนอื่นๆ. (2522). “สัตว์มีพิษและการรักษาสัตว์,” ใน *โครงการตำราศิริราช*. กรุงเทพฯ : คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล มหิดล.
- ยุวดี วัฒนโกศลสิน. (2540?). *โปรตีนและการสังเคราะห์โปรตีน*. เอกสารประกอบการสอนวิชาชีวเคมีการแพทย์. : ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร.

- วรรณ ธรรมพาลีศ. (2534). การศึกษาส่วนประกอบของพิษงูเห่าไทยที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณ. ปรินญาณพนธ์ วทม. (เคมีชีวภาพ). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร. ถ่ายเอกสาร.
- วิญญู มิตรานันท์. (2535). พยาธิวิทยากายวิภาคพื้นฐาน. กรุงเทพฯ : โอเอสพริ้นติ้งเฮาส์.
- วิไลรัตน์ นุชประมูล. (2528). อิเล็กโทรโฟรีซิสทางการแพทย์. กรุงเทพฯ : ภาควิชาเคมีคลินิก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- เวคิน นพนิตย์. (2523). พยาธิวิทยา. สงขลา : มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- อามัสสรา ชมิดท์. (2537ก). คู่มือทางชีวเคมี. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : รั้วเขียว.
- อามัสสรา ชมิดท์. (2537ข). เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส. กรุงเทพฯ : รั้วเขียว.
- Adamich, M. & Dennis, E. A. (1978). "Exploring the Action and Specificity of Cobra Venom Phospholipase A₂ to Human Erythrocyte ,Ghost Membranes and Lipid mixtures," *J. Biol. Chem.* 253 : 5121 – 5125.
- Ahmad, T. & Lawrence, A. J. (1993). "Purification and Activation of Phospholipase A₂ Isoforms from *Naja mossambica mossambica* (Spitting cobra) Venom," *Toxicon*. 31 : 1279 – 1291.
- Aloof-Hirsch, S., Vries, A. D. & Berger, A. (1968). "The Direct Lytic Factor of Cobra Venom; Purification and Chemical Characterization," *Biochem. Biophys. Acta*. 54 : 53 – 60.
- Anderson, B. L., Berry, R. W. & Telser, A. (1983). "A Sodium Dodecyl sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis System That Separates Peptides and Proteins in the Molecular Weight Range of 2,500 to 90,000," *Analytical Biochemistry*. 132 : 365 – 375.
- Arms, K. & Mapheeters, D. (1975). "Sensitivity of Cultured Embryonic Heart Cells to Cardiotoxin Obtained from *Naja naja siamensis* Venom," *Toxicon*. 13 : 333 – 338.
- Atassi, M. Z. (1991). "Postsynaptic-Neurotoxin – Acetylcholine Receptor Interaction and the Binding Sites on the Two Molecules," in *Handbook of Natural Toxin*,

- Vol 5. Reptile Venom and Toxins*. Edited by Tu, T. A. p 53 – 83. New York : Marcel Dekker.
- Bhat, M. K. & Gowda, V. (1989). "Purification and Characterization of a Myotoxic Phospholipase A₂ from Indian Cobra (*Naja naja naja*) Venom," *Toxicon*. 27 : 861 – 873.
- Bober, M. A. et al. (1988). "Detection of Myotoxin a – Like Protein in Various Snake Venoms," *Toxicon*. 26 : 665 – 673.
- Bon, C. & Hawgood, B. (1991). "Snake Venom Presynaptic Toxins," in *Handbook of Natural Toxins, Vol. 5. Reptile Venom and Toxins*. Edited by Tu, T. A . p. 3 - 52. New York : Marcel Dekker.
- Botes, D. P. (1972). "Snake Venom Toxins The Amino Acid Sequence of Two Toxins from *Naja melanoleuca* Venom," *J. Biol. Chem*. 247 : 2866.
- Botes, D. P. et al. (1971). "Snake Venom Toxins. Purification , Properties and Complete Amino Acid Sequence," *J. Biol. Chem*. 244 : 4147.
- Bougis, P. et al. (1981). "Penetration of Phospholipid Monolayer by Cardiotoxins," *Biochemistry*. 20 : 4915 – 4920.
- Bougis, P. E., Marchat, P. & Rochat, H. (1987). "In Vivo Synergy of Cardiotoxin and Phospholipase A₂ from the Elapid Snake *Naja mossambica mossambica*," *Toxicon*. 25 : 427 – 431.
- Braganca, B. M., Patel, N. T. & Badrinath, P. G. (1967). "Isolation and Properties of a Cobra Venom Factor Selectively Toxic to Yoshida Sarcomacells," *Biochem. Biophys. Acta*. 36 : 508 - 520
- Cambell, C. H. (1979). "Symptomatology , Pathology and Treatment of the Bites of Elapid Snakes," in *Snake Venom. Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 52. Edited by Lee, C. Y. p. 898 - 921. Berlin : Springer-Verlag.
- Chaim – Matyas, A., Borkow, G. & Ovadia, M. (1991). "Isolation and Characterization of a Cytotoxin P₄ from the Venom of *Naja nigricollis nigricollis* Preferentially Active on Tumor Cells. *Biochem. Int*. 24(3) : 415 – 421.

- Chang, C. C. et al. (1972). "Role of Cardiotoxin and Phospholipase A₂ in the Blockade of Nerve Conduction and Depolarization of Skeletal Muscle Increase by Cobra Venom," *Br. J. Pharmac.* 44 : 752 – 764.
- Condrea, E., De Vries, A. & Mager, J. (1964). "Hemolysis and Spitting of Human Erythrocyte Phospholipids by Snake Venoms," *Biochem. Biophys. Acta.* 84 : 60 - 73.
- Condrea, E. (1974). "Membrane-Active Polypeptides from Snake Venom : Cardiotoxin and Haemocytotoxins," *Experientia.* 30 : 121 - 129.
- Cyama, V. I. & Eagle, H. (1956). "Measurement of Cell Growth in Tissue Culture with a Phenol Reagent (Folin-Ciocalteu)," *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 91 : 305 - 307.
- Davidson, F. F. & Dannis, E. A. (1991). "Structure , Function , and Mode of Action of Snake Venom and Other Phospholipase A₂ ," in *Handbook of Natural Toxin, Vol. 5. Reptile Venom and Toxins.* Edited by Tu, T. A. p. 107 – 145. New York : Marcel Dekken.
- Dufourcq, J. & Faucon. (1978). "Specific Binding of a Cardiotoxin from *Naja mossambica mossambica* to Charged Phospholipids Detected by Intrinsic Fluorescence," *Biochemistry.* 7 : 1170 – 1176.
- Endo, T. & Tamiya, N. (1991). "Structure – Function Relationships of Postsynaptic Neurotoxins from Snake Venoms," in *Snake Toxins.* Edited by Harvey, A. L. p. 165 – 222. New York : Pergamon Press.
- Fletcher, J. E. & Lizzo, F. H. (1987). "Contracture Induction by Snake Venom Cardiotoxin in Skeletal Muscle from Humans and Rats," *Toxicon.* 25(9) : 1003 – 1010.
- Fryklund, L. & Eaker, D. (1969). "The Complete Amino acid Sequence of a Cardiotoxin from the Venom of *Naja naja* (Cambodian cobra)," *Biochemistry.* 14 : 2860 – 2868.
- Gad, S. C. & Chengelis, C. P. (1992). *Animal Models in Toxicology.* New York : Marcel Dekker.

- Gassanov, S. E. et al. (1997). "Cobra Venom Cytotoxin Free of Phospholipase A₂ and Its Effect on Model Membranes and T leukemia Cells," *J. Membr. Biol.* 155(2) : 133 – 142.
- Garrett, R. H. & Grisham, C. M. (1995). *Biochemistry*. U.S.A. : Saunders College Publishing.
- Harris, J. B. (1991). "Phospholipase in Snake Venom Substance That Induces Apoptosis," *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 224 : 134 – 139.
- Harvey, A. L., Marshall, R. J. & Karlsson, E. (1982). " Effects of Purified Cardiotoxins from The Thailand Cobra (*Naja naja siamensis*) on Isolated Skeletal and Cardiac muscle Preparations," *Toxicon*. 20 : 379 - 396.
- Harvey, A. L., Hider, R. C. & Khader, F. (1983). "Effect of Phospholipase A on Actions of Cobra Venom Cardiotoxins on Erythrocytes and Skeletal Muscle," *Biochem. Biophys. Acta*. 728 : 215 - 221.
- Harvey, A. L. (1991). "Cardiotoxins from Cobra Venoms," in *Handbook of Natural Toxins*, Vol. 5. Reptile Venoms and Toxins. Edited by Tu, T. A. P. 85 - 106. New York : Marcel Dekken.
- Hawgood, B. & Bon, C. (1991). "Snake Venom Presynaptic Toxins," in *Handbook of Natural toxins*, Vol. 5. Reptile Venom and Toxins. Edited by Tu, T. A. P. 3 - 52. New York : Marcel Dekken.
- Hayashi, K. et al. (1976). "Amino acid sequence of Cardiotoxin from the Venom of *Naja naja atra*," *Febs. Letters*. 66 : 210 – 214.
- Hider, R. C., Karlsson, E. & Namiranian, S. (1991). "Separation and Purification of Toxins from Snake Venoms," in *Snake Toxins*. Edited by Harvey, A. L. P. 1 - 34. New York : Pergamon Press.
- Hinman, C. L. et al. (1987). "Effect of Cardiotoxin D from *Naja naja siamensis* Snake Venom Upon Murine Splenic Lymphocytes," *Toxicon*. 25 : 1011 – 1014.
- Hodges, S. J., Agbaji, A. S. & Hider, R. C. (1987). "Cobra Cardiotoxin - Purification , Effects on Skeletal Muscle and Structure/Activity Relationships," *Eur. J. Biochem.* 165 : 373 - 383.

- Iddon, D., Theakston, R. D. G. & Ownby, C. L. (1987). "A Study of the Pathogenesis of Local Skin Necrosis Induced by *Naja nigricollis* (spitting cobra) Venon Using Simple Histological Staining Techniques," *Toxicon*. 25 : 665 - 672.
- Iwaguchi, T., Takeshi, M. & Hayashi, K. (1985). "Cytolytic Activity of Cytotoxin Isolated from Indian Cobra Venom Against Experimental Tumor Cells," *Biochem. Int.* 10 (3) : 343 – 349.
- Jiang, M. S., Fletcher, J. E. & Smith, L. E. (1989). "Factors Influencing the Hemolysis of Human Erythrocytes by Cardiotoxins from *Naja naja kaouthia* and *Naja naja atra* Venoms and Phospholipase A₂ with Cardiotoxin - like Activities from *Bungarus fasciatus* Venom," *Toxicon*. 27 : 247 - 257.
- Jiang, M. S., Fletcher, J. E. & Smith, L. A. (1989). "Effects of Divalent Cation on Snake Venom Cardiotoxin – Induced Hemolysis and ³H – Deoxyglucose – 6 – Phosphate Release from Human Red Blood Cells," *Toxicon*. 27 : 1297 – 1305.
- Jimenez, J. M. (1970). *Clinical Toxicology*. 3 : 389.
- Joubert, J. & Taljaard, N. (1980). "Purification , some Properties and Amino acid sequence of two Phospholipase A (CM II and CM III) from *Naja naja kaouthia* Venom," *Eur. J. Biochem.* 12 : 493 – 499.
- Kaneda, N. et al. (1985). "Action of Cobra Cardiotoxin on Chick Embryonal Fibroblasts Transformed with a Temperature – Sensitive Mutant of Rous Sarcoma Virus," *FEBS. Lett.* 192(2) : 313 – 316.
- Karlsson, E. (1979). "Chemistry of Protein Toxins in snake Venoms," in *Snake Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 52. Edited by Lee, C. Y. p. 159 - 212. Berlin : Springer - Verlag.
- Karlsson, E., Amberg, H. & Eaker, D. (1971). "Isolation of the Principal Neurotoxins of Two *Naja naja* Subspecies," *Eur. J. Biochem.* 21 : 1 - 16.
- Karlsson, E. & Eaker, D. (1972). "Isolation of the Principal Neurotoxins of *Naja naja* Subspecies from the Asian Mainland," *Toxicon*. 10 : 217 – 225.
- Karlsson, E., Eaker, D. L. & Porath, J. (1966). "Purification of a Neurotoxin from the Venom of *Naja nigricollis*," *Biochem. Biophys. Acta.* 127 : 505.

- Lankisch, P. G. et al. (1971). "Binding of Phospholipase A to the Direct Lytic Factor Revealed by the Interaction of Ca^{2+} with the Hemolytic Effect," *Biochem. Biophys. Acta.* 239 : 267 - 272.
- Larsen, P. R. & Wolff, J. (1968). "The Basic Protein of Cobra Venom. I. The Isolation and Characterization of Cobramines A and B," *J. Biol. Chem.* 243 : 1283 – 1289.
- Lee, C. Y. (1973). "Chemistry and Pharmacology of Polypeptide Toxins," in *Collected Paper on Snake Venoms.* 1948 - 1973. Edited by Lee, C.Y., Ouyang, C. & Chang, C. C. p. 84 - 103. Taiwan.
- Lee, C. Y. (1973). "Mode of Action of Cobra Venom and Its Purified Toxins," in *Collected Paper on Snake Venoms* 1948 - 1973. Edited by Lee, C. Y., Ouyang, C. & Chang, C. C. p. 7 – 66. Taiwan.
- Lee, C. Y. (1979) "Enzyme in Snake Venom," in *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 52. Edited by Lee, C. Y. p. 121 - 123 , 141 - 143. Berlin : Springer - Verlag.
- Louw, A. T. & Carlsson, F. H. H. (1979). "The Preparation of Phospholipase A_2 - Free Cardiotoxin from Snake Venom by Hydrophobic Interaction Chromatography," *Toxicon.* 7 : 193 – 197.
- Lowry, O. H. et al. (1951). "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent," *Chemistry.* 193 : 265 – 275.
- Matyas, C. A. & Ovadia, M. (1987). "Cytotoxic Activity of Various Snake on Melanoma, B16F10 and Chondrosarcoma," *Life Science.* 40 : 1601 – 1607.
- Meb, D. (1969). "Preliminary Studies on Small Molecule Toxic Components of Elapid Venoms," *Toxicon.* 6 : 247 - 253.
- Merel, J. C. (1991). *The Snake of Thailand and their Husbandry.* Florida : Kriger Publishing.
- Miranda, F. et al. (1970). "Purification of Animal Neurotoxins. Isolation and Characterization of Four Neurotoxins from Two Different Source of *Naja haje* Venom," *Eur. J. Biochem.* 17 : 477.

- Muszkat, K. A. et al. (1984). "Photochemically Induced Nuclear Polarization Study of Exposed Tyrosines, tryptophans, Histamines in Postsynaptic Neurotoxin and in Membranotoxins of Elapid and Hydrophid Snake Venom," *Biochemistry*. 23 : 4913 – 4920.
- Ohkura, K. et al. (1988). "Amino Acid Sequence of Four Cytotoxins (Cytotoxin I , II , III and IV) Purified from the Venom of the Thailand Cobra, *Naja naja siamensis*," *Biochem. Biophys. Acta*. 954 : 148 – 153.
- Ou, Y. J. et al. (1997). "Dual Effects of Extracellular Ca^{2+} on Cardiotoxin - Induced Cytotoxicity and Cytosolic Ca^{2+} Changes in Cultured Single Cells of Rabbit Aortic Endothelium," *Biochem. Biophys. Acta*. 1330 : 29 - 38.
- Ownby, C. L. & Colberg, T. R. (1988). "Classification of Myonecrosis Induced by Snake Venoms : Venoms from the Prairic Rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*), Western Diamondback Rattlesnake (*Crotalus atrox*) and the Indian Cobra (*Naja naja naja*)," *Toxicon*. 26 : 459 – 474.
- Ownby, C. L., Fletcha, J. E. & Colberg, T. R. (1993). "Cardiotoxin 1 from Cobra (*Naja naja atra*) Venom Cause Necrosis of Skeletal Muscle in vivo," *Toxicon*. 31 : 697 – 709.
- Oyama, V. I. & Eagle, H. (1956). "Measurement of cell Growth in Tissue Culture with a Phenol Reagent (Folin – Ciocalteu)," *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 91 : 305 – 307.
- Panyim, S. & Chalkley, R. (1969). " High Resolution Acrylamide Gel Electrophoresis of Histones," *Arch. Biochem. Biophys.* 130 : 337 – 346.
- Phillips, J., & Murray, P. (1995). *The Biology of Disease*. Great Britain : Blackwell Science.
- Ratanabanangkoon, K., Buranawuti, T., & Cherolchu, C. (1978). "Comparative Cardiovascular and Respiratory Effects of *Bungarus fasciatus* and *Naja naja siamensis* Venoms in Dog," *Comp. Biochem. Physiol.* 60C : 61 - 63.
- Reid, H. A. (1964). "Cobra Bite," *Brit. Med. J.* 2 : 540.
- Robbins, S. H. & Kumar, V. (1987). *Basic Pathology*. U.S.A. : W.B. Saunders Company.

- Sarker, N. K. (1951). "Action Mechanism of Cobra Venom , Cardiotoxin and Allied Substance on Muscle Contraction," *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 78 : 469 – 471.
- Stringer, J., Kainer, R. A. & Tu, A. T. (1971). "Ultrastructure Studies of Myonecrosis Induced by Cobra Venom in Mice," *Toxicology and Applied Pharmacology.* 18 : 442 – 450.
- Suhr, S-M. & Kim, D-S. (1996). "Identification of the Snake Venom Substance That Induces Apoptosis," *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 224 : 134 – 139.
- Sun, J. J. & Walker, M. J. A. (1986). "Action of Cardiotoxin from the Southern Chinese Cobra (*Naja naja atra*) on Rat Cardiac Tissue," *Toxicon.* 24 : 233 – 245.
- Takeshi, M., Tanaka, y. & Hayashi, K. (1985). "Amino Acid Sequence of a Cardiotoxin -- Like Basic Polypeptide (CLBP) with Low Cytotoxic Activity Isolated from the Venom of the Formasan Cobra (*Naja naja atra*)," *Biochem. Int.* 11 (6) : 795 – 802.
- Takeshi, M., Tanaka, Y. & Hayashi, K. (1986). "Binding of Cardiotoxin Analogue III from Formasan Cobra Venom to FL Cells," *FEBS Lett.* 205 : 143 – 146.
- Tan, N. H. & Tan, C. S. (1987). "Enzymematic Activities of Malayan Cobra (*Naja naja supertrix*) Venoms," *Toxicon.* 25 : 1249 - 1253.
- Tonsing, L. et al. (1983). "The Binding of Snake Venom Cardiotoxins to Heart Cell Membranes," *Biochem. Biophy. Acta.* 732 : 282 – 288.
- Tu, A. T. (1977). *Venom : Chemistry and Molecular Biology.* U.S.A. : John Wiley & Son.
- Tu, A. T. (1991). "Tissue Damaging Effect by Snake Venoms : Hemorrhage and Myonecrosis," in *Handbook of Natural Toxin, Vol 5. Reptile Venom and Toxins.* Edited by Tu, T. A. p. 297 – 347. New York : Marcel Dekken.
- Tu, A. T., Possey, R. B. & Toom, P. B. (1970). "Isolation and Characterization of Phospholipase A from Sea Snake, *Laticauda semifasciata*," *Arch. Biochem. Biophys.* 140 : 96 – 106.

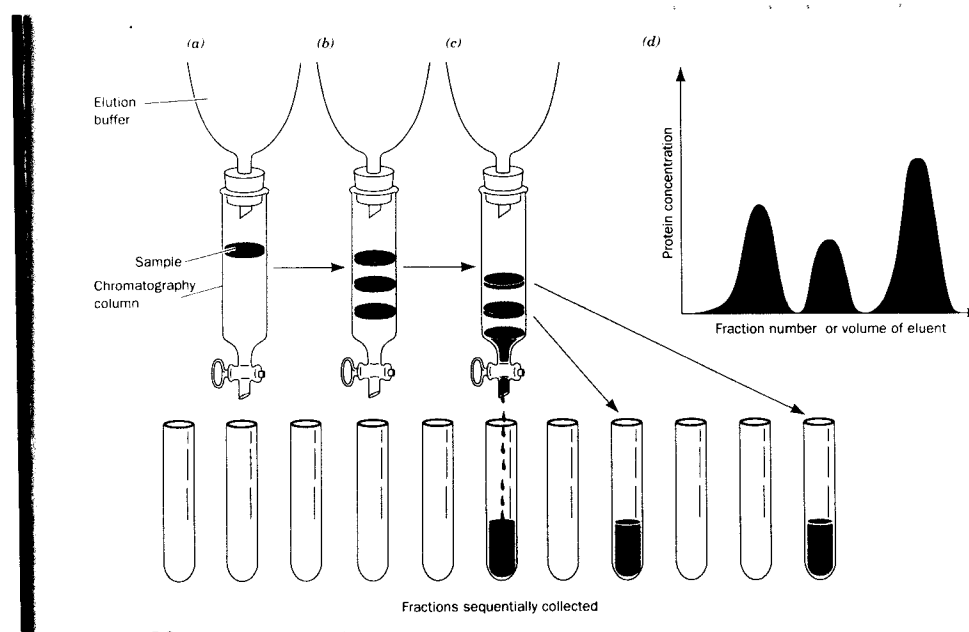
- Vincent, J. P., Balerna, M. & Lazdunski, M. (1978). "Properties of Association of Cardiotoxin with Lipid Vesicles and Natural Membrane," *BEBS Lett.* 85 : 103 – 106.
- Vernon, L. P. & Rogers, A. (1992). "Effect of Calcium and Phosphate Ion on Hemolysin Induced by Pyrularia Thionin and *Naja naja kaouthia* Cardiotoxin," *Toxicon.* 30 : 701 – 709.
- Voet, D. & Voet, J. G. (1995). *Biochemistry*. 2nd ed. Canada : John Wiley & Sons.
- Walter, J. B. & Israel, M. S. (1987). *General Pathology*. New York : Churchill Livingstone.
- Warrell, D, A. et al (1976). "Necrosis , Haemorrhage and Complement Depletion Following Bites by the Spitting Cobra (*Naja nigricollins*)," *Q. J. Med.* 45 : 1.
- Waterborg, J. H. & Matthews, H. R. (1994). " The Bradford Method for Protein Quantitation," in *Method in Molecular Biology : Basic Protein and Peptide Protocols*, Vol. 32. Edited by Walker, J. M. p. 9 – 15. U.S.A. : Humana Press.
- Wuster, W. & Thorpe, R. S. (1991). "Asia Cobras. Ssystematics and Snakebite," *Experientia.* 47 : 205 – 209.
- Yang, C. C. (1974). "Chemistry and Evolution of Toxins in Snake Venoms," *Toxicon.* 12 : 1 - 43.
- Yang, C. C. et al. (1969). "Amino Acid Composition and End Group Analysis of Cobrotoxin," *Toxicon.* 7 : 43.
- Zaheer, J. P. et al. (1975). "Inactivation of ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$) – Stimulated ATPase by a Cytotoxic Protein from Cobra Venom in Relation to Its Effects on Cells," *Biochem. Biophy. Acta.* 394 : 293 – 303.
- Zaheer, A. & Braganca, B. M. (1980). "Comparative Study of Three of Basic Polypeptides from Snake Venoms in Relation to Their Effect on the Cell Membrane of Normal and Tumor Cells," *Cancer Biochem. Biophys.* 5(1) : 41 – 46.

Zusman, N. et al. (1984). "On the Interaction of Cobra Venom Protein Cardiotoxin with Erythrocytes," *Biochem. Biophys. Acta.* 124 : 629 – 636.

ภาคผนวก

1. Ion Exchange Chromatography (โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุไฟฟ้า)

เป็นวิธีที่ใช้แยกสารที่มีประจุโดยอาศัยหลักของการดูดซับแบบผันกลับได้ (reversible adsorption) อีออนในสารละลายจะไปแทนที่อีออนอื่นที่มีประจุชนิดเดียวกันที่จับกับหมู่ที่มีประจุ (charge group) บนตัวกลางแลกเปลี่ยนอีออน (Ion – exchanger) ด้วยแรงทางไฟฟ้า (electrostatic force) ตัวแลกเปลี่ยนอีออนเป็นตัวกลางที่ไม่ละลาย เหนียว มีหมู่ที่มีประจุที่จับกันด้วยพันธะโควาเลนต์ ตัวกลางนี้เป็นสารพวก เรซินสังเคราะห์ polysaccharide และ copolymer ของ styrene เป็นต้น แบ่งออกเป็น 2 พวก คือ 1) ตัวแลกเปลี่ยนแอนไอออน (Anion – exchanger) มีหมู่ที่มีประจุ (functional group) เป็นประจุลบ จะจับกับอีออนที่มีประจุลบ 2) ตัวแลกเปลี่ยนแคตไอออน (Cation – exchanger) มีหมู่ที่มีประจุเป็นประจุบวก จะจับกับอีออนที่มีประจุบวก ดูตาราง 14 pH และ ไอออนิกสเตรนจ์ของบัฟเฟอร์ (μ) ต้องเลือกเพื่อให้สารที่สนใจศึกษาเท่านั้นจับกับตัวแลกเปลี่ยนอีออน คือทำให้สารที่สนใจมีประจุสุทธิตรงข้ามกับตัวแลกเปลี่ยนอีออน ถ้าใช้ตัวแลกเปลี่ยนแอนไอออนบัฟเฟอร์เริ่มต้นควรมี pH ที่สูงกว่า pI 1 หน่วย แต่ถ้าใช้ตัวแลกเปลี่ยนแคตไอออนควรมี pH ต่ำกว่า pI 1 หน่วย การชะสารที่สนใจออกจากคอลัมน์ทำได้ 3 แบบ คือ isocratic , stepwise และ gradient elution สำหรับการชะล้างสารแบบ gradient ทำได้ 2 วิธี คือ การเปลี่ยนแปลง pH หรือการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเกลือ (μ) (อาภัสสรฯ ชมิทธ์. 2537 : 35 – 41 ; Hider, Karlsson & Namiranian. 1991 : 12 – 23)



ภาพประกอบ 23 ภาพการแยกโปรตีนออกจากกันโดยวิธี Ion Exchange Chromatography (Voet & Voet. 1995)

ตาราง 14 หมู่ที่มีประจุของตัวแลกเปลี่ยนไอออน

ตัวแลกเปลี่ยนไอออน	หมู่ที่มีประจุ*
ตัวแลกเปลี่ยนแคตไอออน	
Polymerized methacrylic acid (Bio – Rex 70 , Amberlite IRC – 50)	$MX - CH_2COO^-$
CM , Carboxymethyl	$MX - OCH_2COO^-$
SP , Sulphopropyl	$MX - OCH_2CH_2CH_2SO_3^-$
ตัวแลกเปลี่ยนแอนไอออน	
DEAE , diethylaminoethyl	$MX - OCH_2CH_2NH^+ (CH_2CH_3)_2$
Q , quaternary amine (Pharmacia Mono Q)	$MX - CH_2N^+ (CH_3)_3$

* MX = matrix

2. Gel Filtration Chromatography

เป็นวิธีที่ใช้แยกสารพวก macromolecule เช่น โปรตีนให้บริสุทธิ์โดยอาศัยความแตกต่างของมวลโมเลกุล วิธีนี้คอลัมน์ถูกบรรจุด้วยเจล เจลทำหน้าที่เป็นตะแกรกร่อนโมเลกุล ประกอบด้วยพอลิเมอร์ที่เชื่อมโยงกันเป็นตาข่ายร่างแห มีคุณสมบัติเฉื่อย ไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่กำลังวิเคราะห์และไม่มีประจุ ช่องว่างในรูพรุนของเจลที่มีของเหลวแทรกตัวอยู่ จะเป็นปริมาตรของเจลเกือบทั้งหมด เจลมี 3 ชนิด คือ เดกซ์แทรน (dextran) พอลิอะคริลาไมด์ (polyacrylamide) อะกาโรส (agarose) ตัวกลางที่นิยมใช้มากคือ เดกซ์แทรน ที่มีชื่อทางการค้าว่า Sephadex เป็นพอลิเมอร์ของกลูโคส ที่มีมวลโมเลกุลสูง สังเคราะห์ขึ้นจากการหมักน้ำตาลซูโครสโดยแบคทีเรีย *Leuconostoc mesenteroides* ซึ่งมีหน่วย glyceryl ether เชื่อมโยงเป็นตาข่ายร่างแหระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลของสายโซ่พอลีกลูโคส Sephadex มีหลายชนิด ตาม G – type แต่ละชนิดกันที่ระดับของการเชื่อมโยงเป็นร่างแห ระดับของการเชื่อมโยงเป็นตาข่ายร่างแหนี้เป็นตัวกำหนดขนาดของรูพรุนของเจล ซึ่งหมายถึงความสามารถในการแยกสารที่มีมวลโมเลกุลต่างกันและการพองตัวของเม็ดเจล Bio – gel เป็นชื่อทางการค้าของพอลิอะคริลาไมด์ Sepharose เป็นชื่อทางการค้าของอะกาโรส ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของ D – galactose และ

3, 6 - anhydro - L - galactose เหมาะสำหรับแยกโปรตีนกลอบูลาร์ที่มีขนาดใหญ่ และ DNA ตาราง 15 แสดงตัวกลางเจลและช่วงน้ำหนักโมเลกุลของสารที่เหมาะสมในการแยก เมื่อผ่านสารละลายผสมของโมเลกุล ที่มีขนาดต่างกันไปในคอลัมน์ ที่บรรจุด้วยเจล โมเลกุลที่มีขนาดเล็กสามารถแพร่กระจายเข้าไปในรูพรุนของเจล ส่วนโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ไม่สามารถเข้าไปในรูพรุนได้ จะอยู่เพียงบริเวณนอกและระหว่างเจลนั้น ทำให้ถูกชะล้างออกจากคอลัมน์ได้เร็วกว่าโมเลกุลขนาดเล็ก (อาภัสสรา ชมิดท์. 2537 : 41 – 51)

88 Section 5-3. Chromatographic Separations

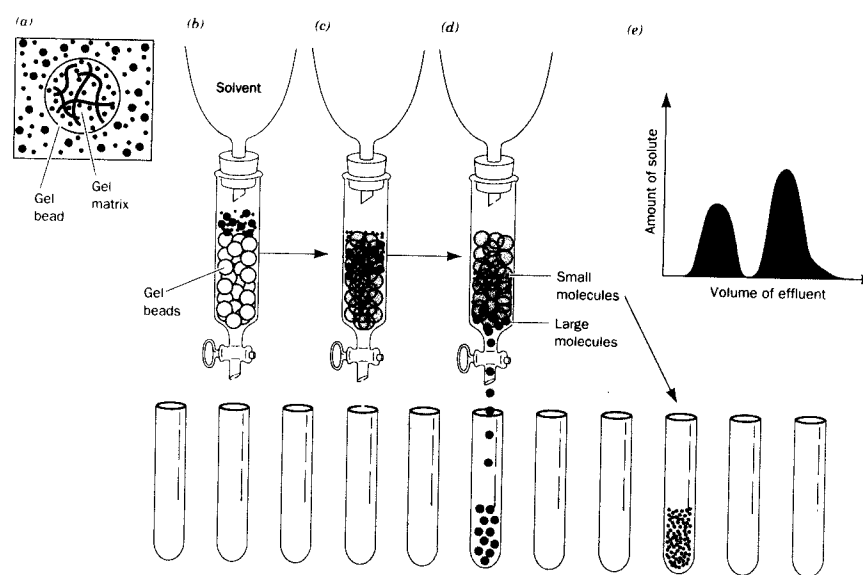


Figure 5-12
A schematic illustration of gel filtration chromatography. (a)

ภาพประกอบ 24 ภาพการแยกโปรตีนออกจากกันด้วยวิธี Gel Filtration Chromatography (Voet & Voet. 1995)

ตาราง 15 ตัวกลางเจลที่ใช้ใน Gel Filtration Chromatography

สารและชื่อการค้า	Fractionation range (molecular weight , Da)
Dextran	
Sephadex G – 10	0 – 700
Sephadex G – 25	1,000 – 5,000
Sephadex G – 50	1,500 – 30,000
Sephadex G – 75	3,000 – 70,000
Sephadex G – 100	4,000 – 150,000
Sephadex G – 150	5,000 – 300,000
Sephadex G – 200	5,000 – 800,000
Polyacrylamide	
Bio – gel P – 2	100 – 1,800
Bio – gel P – 6	1,000 – 6,000
Bio – gel P – 60	3,000 – 60,000
Bio – gel P – 150	15,000 – 150,000
Bio – gel P – 300	60,000 – 400,000
Agarose	
Sepharose 2 B	$2 \times 10^6 - 25 \times 10^6$
Sepharose 4 B	$3 \times 10^5 - 3 \times 10^6$
Sepharose 6 B	$10^4 - 20 \times 10^6$

3. อิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis)

อิเล็กโทรโฟรีซิส เป็นวิธีที่ดีที่สุดวิธีหนึ่งในการแยกและเตรียมสารชีวโมเลกุลที่มีประจุไฟฟ้าให้บริสุทธิ์ ได้แก่ โปรตีน กรดนิวคลีอิก และ นิวคลีโอไทด์ นอกจากนี้ยังใช้ในการศึกษาสมบัติและพิสูจน์ความบริสุทธิ์ของสารเหล่านี้ วิธีนี้อาศัยหลักที่ว่าสารที่มีประจุไฟฟ้าจะเคลื่อนที่ไปในสนามไฟฟ้า โดยเคลื่อนไปยังขั้วไฟฟ้าที่มีประจุตรงข้ามกัน สารที่มีประจุไฟฟ้าต่างกันย่อม

มีแรงเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าต่างกัน และโมเลกุลขนาดเล็ก มักเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ ที่มีประจุเท่ากัน อัตราเร็วของการเคลื่อนที่ (electrophoretic mobility) ขึ้นอยู่กับปริมาณประจุสุทธิบนโมเลกุลของสาร ความเร็วในการเคลื่อนที่ของโมเลกุล จะเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของสนามไฟฟ้าและประจุของโมเลกุล แต่จะเป็นสัดส่วนกลับกับขนาดและความหนืดของสารละลาย โมเลกุลที่มีประจุและขนาดต่างกัน ก็จะเคลื่อนที่ด้วยความเร็วไม่เท่ากันในสนามไฟฟ้าที่ความเข้มข้นที่กำหนด และในเวลาที่กำหนดด้วย (อาภัสสรา ชมิดท์. 2537 : 58)

อิเล็กโทรโฟรีซิสแบ่งเป็น 2 ชนิด คือ

1. Free electrophoresis อนุภาคของสารที่มีประจุเคลื่อนที่ในตัวกลางที่เป็นสารละลายโดยไม่มีตัวกลางค้ำจุน
2. Zone electrophoresis อนุภาคของสารที่มีประจุเคลื่อนที่ในตัวกลางที่เป็นสารละลาย ซึ่งถูกดูดซับอยู่บนตัวกลางค้ำจุนที่เป็นของแข็ง

องค์ประกอบสำคัญในการทำ Zone electrophoresis ได้แก่ อนุภาคที่มีประจุ ตัวกลางค้ำจุน และสนามไฟฟ้า แบ่งเป็นหลายชนิดตามความแตกต่างของตัวค้ำจุน แต่ชนิดที่เหมาะสมกับการแยกโปรตีนและเป็นที่ยอมรับคือ อิเล็กโทรโฟรีซิส แบบ polyacrylamide - gel electrophoresis (วิลโลว์ นุชประมุข. 2538) ตัวกลางค้ำจุน polyacrylamide - gel เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการสร้างพอลิเมอร์ระหว่าง acrylamide และ N , N' - methylene bis - acrylamide หรือ Bis โดยมี tetramethylenediamine (TEMED) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา polymerization และ Ammonium persulfate เป็นตัวเริ่มต้นให้เกิดปฏิกิริยา (initiator) เมื่อ Ammonium persulfate ละลายน้ำจะเกิดอนุมูลอิสระ เมื่ออยู่ร่วมกับ acrylamide จะเกิดการส่งอนุมูลอิสระให้กับโมเลกุลของ acrylamide ซึ่ง acrylamide ที่ถูก activate จะใช้วิธีเดียวกันนี้กับโมเลกุลอื่น ๆ ของ acrylamide ทำให้เกิดการสร้างสายยาวของ acrylamide และแต่ละสายจะเชื่อมโยงกันด้วย Bis การเชื่อมโยงระหว่างสายนี้ทำให้ตัวกลางเจลมีลักษณะของตาข่ายหรือเป็นรูพรุน ขนาดของรูนี้ถูกกำหนดโดยปริมาณของ acrylamide และ Bis ตัวกลางเจลทำหน้าที่เป็นตะแกรกร่อนโมเลกุล ทำให้การแยกสารดีขึ้น อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ polyacrylamide - gel ทำได้ 2 แบบ คือ column gel และ slab gel ปัจจุบันนิยมแบบ slab gel มากกว่า เพราะสามารถแยกวิเคราะห์สารพร้อมกันเป็นจำนวนมากในแผ่นเจลเดียวกัน นอกจากนี้ยังมี อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ ที่เรียกว่า Discontinuous gel electrophoresis ที่ประกอบด้วยตัวกลางเจล 2 ส่วน คือ separating gel มีรูพรุนขนาดเล็ก และ stacking gel มีรูพรุนขนาดใหญ่ ซึ่งโปรตีนที่ต้องการแยก จะถูกบีบให้ได้แถบที่แคบคมชัดก่อนตรงส่วน stacking gel ก่อนเข้าสู่ separating gel เมื่อเคลื่อนที่ใน separating gel ก็จะใช้หลักการแยกของอิเล็กโทรโฟรีซิสทั่วไป ภาพประกอบ 25 (อาภัสสรา ชมิดท์. 2537 : 62 - 71)

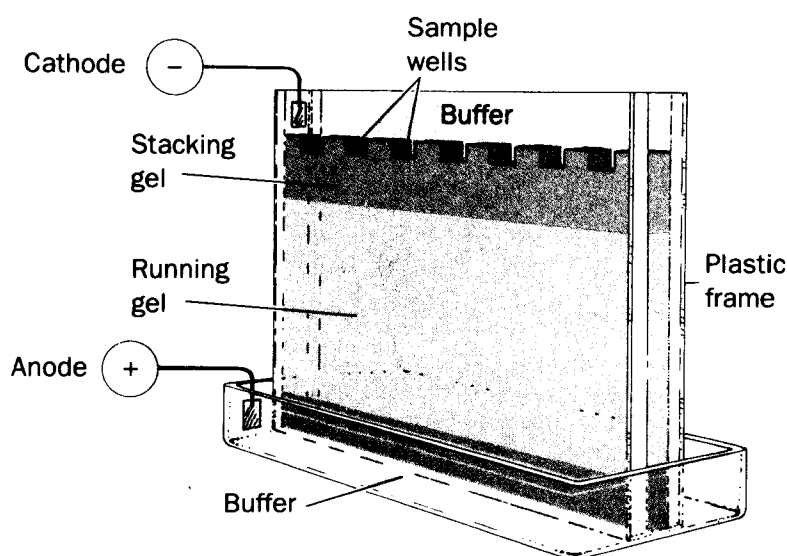


Figure 5.24

ภาพประกอบ 25 อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ Discontinuous gel (Voet & Voet. 1995)

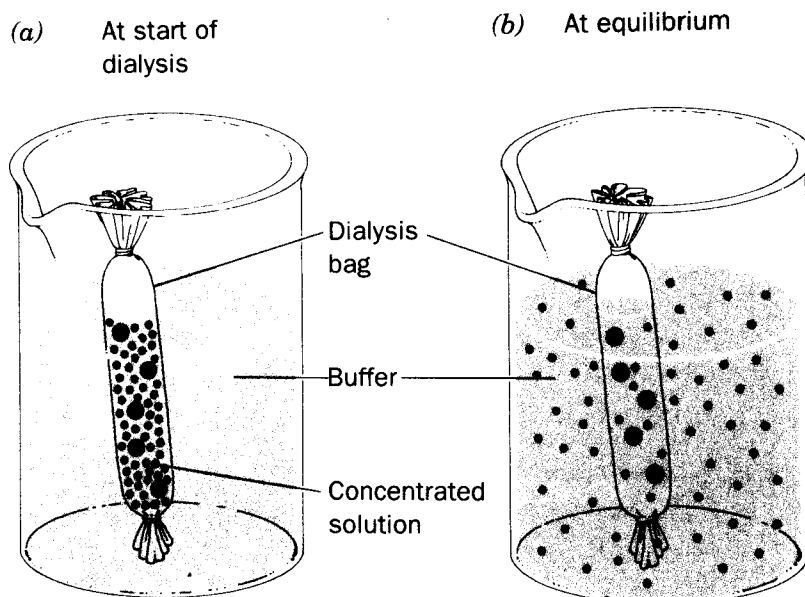
ขั้นตอนการหาดำแหน่งของสารที่แยกได้ เมื่อแยกสารได้แล้วจะหาดำแหน่งของสารที่แยกได้ ทำได้ง่ายโดยการย้อมสีที่เหมาะสม เช่น Coomassie brilliant blue R 250 , Fast green , Silver เป็นต้น หรืออาจจะไม่ใช้วิธีย้อมสีถ้าสารที่แยกได้มีคุณสมบัติเรืองแสง จะหาดำแหน่งโดยการส่องด้วยแสงอุลตราไวโอเลต (ไวไรต์น นุชประมุข. 2526 ; อาภัสสรา ชมิทธ์. 2537 : 43 – 47)

อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ SDS – Polyacrylamide Gel (SDS – PAGE) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกหน่วยย่อยของโปรตีนและหามวลโมเลกุล โดยโปรตีนที่ต้องการแยกอยู่ในสารละลายที่มี anionic detergent ที่มีประจุลบ คือ sodium dodecyl sulfate หรือ SDS โดย SDS จับกับโปรตีนตรงบริเวณ hydrophobic ของโมเลกุล ทำให้โปรตีนคลายการขดม้วนออกเป็นสายยาวของ polypeptide มีรูปร่างเป็นแท่ง นอกจากนี้ยังมีการเติมตัวรีดิวซ์ เช่น β - mercaptoethanol หรือ Dithiothreitol ที่สามารถทำลายพันธะไดซัลไฟด์ในโปรตีน ทำให้สามารถแยกหน่วยย่อย (subunit) ของโปรตีนออกจากกัน เมื่อโปรตีนจับกับ SDS ซึ่งมีประจุลบโปรตีนจะมีประจุลบ เมื่อให้สนามไฟฟ้า โปรตีนแต่ละชนิดจะเคลื่อนเข้าหาขั้วบวก แต่จะแยกออกจากกันโดยอาศัยความแตกต่างของขนาดของโมเลกุลหรือน้ำหนักโมเลกุล วิธีนี้ใช้ในการหาน้ำหนักโมเลกุลโดยประ

มาของโซโพลิเปปไทด์ โดยทำการเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล (อาภัสสรา ชมิดท์. 2537 : 72 – 74)

4. ไดแอลลิซิส (Dialysis)

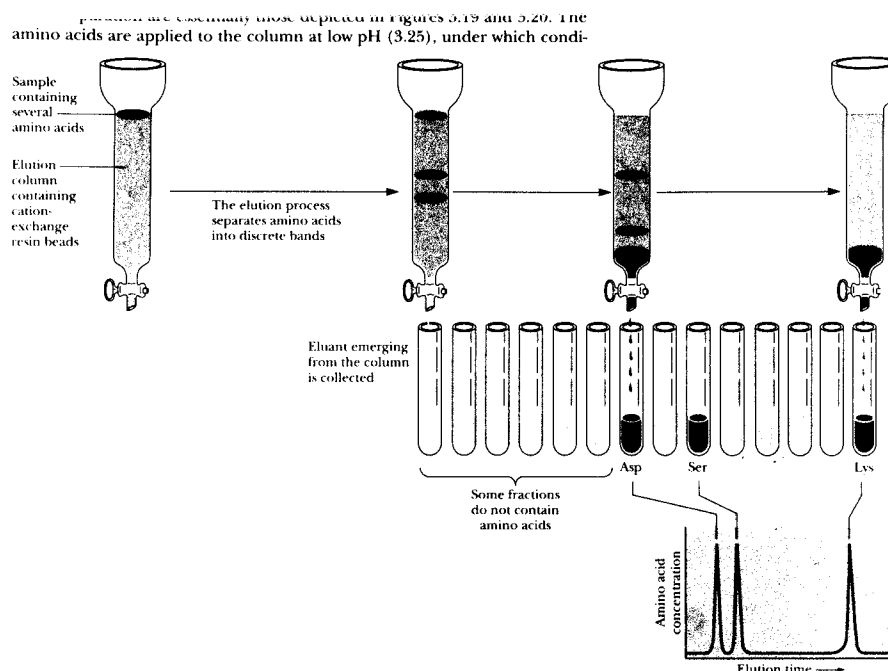
เป็นวิธีการแยกโมเลกุลชนิดต่าง ๆ ออกจากกันโดยอาศัยความแตกต่างของขนาดของโมเลกุล ตัวอย่างเช่น ใช้แยกโปรตีนออกจากสารโมเลกุลเล็ก ๆ ถุงไดแอลลิซิสเป็นเยื่อกึ่งซึมได้ (semipermeable membrane) ที่มีรูพรุน รูพรุนเหล่านี้ยอมให้โมเลกุลเล็ก ๆ เช่น เกลือ NaCl น้ำตาลซูโครส รวมทั้งไอออนและแมแทบอไลต์เล็ก ๆ แพร่ผ่านเข้าออกเมมเบรนได้ โมเลกุลที่มีขนาดใหญ่กว่าเส้นผ่าศูนย์กลางของรูพรุน เช่น โปรตีน จะคงอยู่ภายในถุง ในขณะที่โมเลกุลขนาดเล็กกว่า แพร่ผ่านรูพรุนออกสู่ข้างนอกถุงไดแอลลิซิส โดยต้องเลือกถุงไดแอลลิซิสให้เหมาะสมกับขนาดของโปรตีนที่สนใจ ซึ่งดูจาก molecular weight cut off ที่แสดงสมบัติของถุงไดแอลลิซิสนั้น (อาภัสสรา ชมิดท์. 2537 : 87)



ภาพประกอบ 26 การแยกสารโมเลกุลใหญ่ออกจากสารโมเลกุลเล็ก ๆ โดยวิธีไดแอลลิซิส (Voet & Voet. 1995)

5. การหาค่าประกอบกรดอะมิโนของโปรตีน

ขั้นแรกนี้จะนำโปรตีนมาไฮโดรไลซ์ เพื่อทำลายพันธะเปปไทด์ ที่เชื่อมระหว่างกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ออก โดยการต้มในกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 6 N ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม. จะได้กรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ปนกันอยู่ ซึ่งสามารถแยกออกจากกันได้โดยใช้ Ion Exchange Chromatography บนคอลัมน์ที่บรรจุ Sulfonated polystyrene ซึ่งกรดอะมิโนแต่ละชนิด ที่ออกมาจากคอลัมน์ จะหาได้โดยการให้ทำปฏิกิริยากับ นินไฮดริน (Ninhydrin) ซึ่งเป็นสารที่ทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนที่มี free amino group แล้วให้สารสีม่วง ถ้ากรดอะมิโนเป็นโปรลีนแล้ว จะได้สารสีเหลือง วิธีนี้สามารถตรวจสอบกรดอะมิโนที่มีปริมาณต่ำระดับเป็นไมโครกรัมได้ (ยุวดี วัฒนโกศลสิน : 75 – 76) เครื่องวิเคราะห์กรดอะมิโน (Amino acid Analyzer) ใช้หลักการเดียวกันนี้เพียงแต่การแยกใช้ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) และมีส่วนของเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงของสี ที่เกิดจากปฏิกิริยาของกรดอะมิโนกับนินไฮดริน โดยจะประมวลผล คำนวณความเข้มข้นของกรดอะมิโนแต่ละชนิดออกมา โดยเปรียบเทียบกับกรดอะมิโนมาตรฐาน



ภาพประกอบ 27 ภาพการแยกกรดอะมิโนออกจากกันด้วยเทคนิค Cation Exchange Chromatography (Garrett & Grisham. 1995)

องค์ประกอบกรดอะมิโนในโปรตีนจากสารพิษของพิษงูเห่าชนิดต่าง ๆ ที่ได้มีการศึกษาแล้ว
แสดงในตาราง 16 , 17 และ 18

ตาราง 16 องค์ประกอบกรดอะมิโนในโปรตีนของสารพิษ neurotoxin แบบ long – chain postsynaptic neurotoxin

Amino acid	<i>N. naja naja</i>		<i>N. siamensis</i>	<i>N. haje</i>	<i>N. melanoleuca</i>	<i>N. nivea</i>
	Toxin 3	Toxin 4	Toxin 3	Toxin III	Toxin b	Toxin α
Asp	9	9	9	10	10	9
Thr	9	9	9	7	8	5
Ser	3	4	3	3	3	3
Glu	1	1	1	3	3	1
Pro	6	6	6	6	6	6
Gly	5	5	4	5	4	5
Ala	2	2	3	3	4	3
Half-cys	10	10	10	10	10	10
Val	4	4	4	4	5	5
Met	0	0	0	1	0	2
Iso	5	4	5	4	4	3
Leu	1	1	1	1	1	1
Tyr	1	1	1	1	1	1
Phe	3	3	3	3	3	3
Lys	4	4	5	4	4	6
His	1	1	1	0	1	1
Arg	6	6	5	5	5	6
Trp	1	1	1	1	1	1
Total	71	71	71	71	71	71
F. W.	7,834	7,807	7,820	7,806	7,764	7,897
Ref.	Karlsson,		Karlsson,	Miranda,	Botes.	Botes,
	et al.		et al.	et al.	1972	et al.
	1971		1971	1970		1971

ตาราง 17 องค์ประกอบกรดอะมิโนในโปรตีนของสารพิษ neurotoxin แบบ short – chain postsynaptic neurotoxin

Amino acid	<i>N. naja atra</i> Cobrotoxin	<i>N. nigricollis</i> Toxin α	<i>N. oxiana</i>	<i>N. nivea</i> Toxin δ	<i>N. siamensis</i> Toxin 7C
Asp	8	7	8	7	8
Thr	8	8	6	7	8
Ser	4	2	4	4	4
Glu	7	6	6	7	7
Pro	2	5	4	4	2
Gly	7	5	5	5	7
Ala	0	0	0	0	0
Half-Cys	8	8	8	8	8
Val	1	2	2	1	1
Met	0	0	0	0	0
Iso	2	3	2	3	2
Leu	1	2	2	1	1
Tyr	2	1	1	1	2
Phe	0	0	0	0	0
Lys	3	6	5	6	2
His	2	2	2	2	2
Arg	6	3	4	4	7
Trp	1	1	2	1	1
Total	62	61	61	61	62
F. W.	6,949	6,787	6,786	6,834	6,985
Ref.	Yang, et al. 1969	Karlsson, et al. 1966	Karlsson & Eaker 1972	Botes, et al. 1971	Karlsson, et.al. 1971

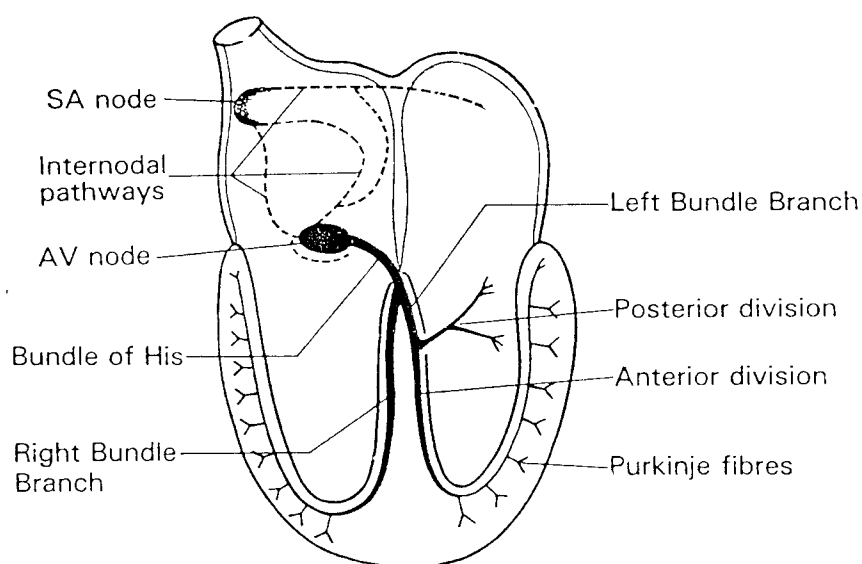
ตาราง 18 องค์ประกอบกรดอะมิโนในโปรตีนของสารพิษ cardiotoxin

Amino acid	<i>N. naja</i>	<i>N. naja atra</i>	<i>N. naja siamensis</i>			
	F8	III	CT-I	CT-II	CT-III	CT-IV
Asp	8	6	8	7	8	6
Thr	3	3	3	2	3	3
Ser	3	2	3	1	2	2
Glu	0	0	0	0	0	0
Pro	4	5	4	5	4	5
Gly	2	2	2	2	2	2
Ala	2	2	2	5	3	2
Half-Cys	8	8	8	8	8	8
Val	4	7	4	5	5	7
Met	3	2	3	2	2	2
Iso	4	1	4	2	2	1
Leu	6	6	6	6	6	6
Tyr	2	3	2	3	3	3
Phe	1	2	1	1	1	2
Lys	8	9	8	9	9	9
His	0	0	0	0	0	0
Arg	2	2	2	2	2	2
Trp	0	0	0	0	0	0
Total	60	60	60	60	60	60
F. W.	6,727	7,000	6,693	6,646	6,709	6,739
Ref.	Frykund & Eaker. 1975	Hayashi, et al. 1976	←----- Ohkura, et al. 1988 ----->			

6. คลื่นไฟฟ้าหัวใจ

หัวใจเป็นอวัยวะที่มีพลังอย่างมากที่สุดของร่างกายเพราะต้องสูบฉีดโลหิตออกไปเลี้ยงร่างกาย สำหรับในทางสรีรไฟฟ้า (electrophysiology) หัวใจประกอบด้วยห้องเพียง 2 ห้อง คือ เอเทรียม และ เวนทริเคิล ทั้งสองหน่วยแยกจากกันด้วยวงแหวนที่ประกอบด้วยเนื้อเยื่อ (fibrous ring) ซึ่งมีคุณสมบัติฉนวนทางไฟฟ้า แต่กระแสไฟฟ้าก็สามารถผ่านจากเอเทรียมลงมาถึงเวนทริเคิลได้โดยทางเดินพิเศษ คือทางระบบเหนี่ยวนำไฟฟ้า (conducting system) ซึ่งประกอบด้วย เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจนี้เอง แต่เป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติพิเศษ ที่จะทำให้หัวใจทำงานได้เองอย่างเป็นจังหวะ โดยเป็นตัวเริ่มทำให้กล้ามเนื้อหัวใจมีการกระตุ้นด้วยขบวนการไฟฟ้าและมีกลไกไกไปตามลำดับ จนในที่สุดมีผลทำให้เกิดการหดตัวและคลายตัวของกล้ามเนื้อหัวใจอย่างสม่ำเสมอ และเกิดอยู่ตลอดเวลาด้วย ระบบการเหนี่ยวนำไฟฟ้านี้ประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ดังภาพประกอบ

28



ภาพประกอบ 28 แสดงถึงส่วนประกอบต่าง ๆ ของระบบเหนี่ยวนำไฟฟ้าของหัวใจ (conducting system) (ชมพูนุท อ่องจรีต. 2522)

การทำงานของหัวใจเกิดขึ้นเพราะมีประจุไฟฟ้าออกจาก Sino – Atrial node (SA node) ซึ่งอยู่ในกล้ามเนื้อหัวใจของเอเทรียมขวาส่งผ่านไปทั่วเอเทรียม ทำให้เอเทรียมหดตัวแล้วประจุไฟฟ้านี้ก็จะผ่านไป Atrio – Ventricular node (AV node) ลงไปตาม bundle of His และแยกออกไปตาม right bundle branch และ left bundle branch สู่วেন্টริเคิลขวาและซ้ายตามลำดับ โดยไปทาง Purkinje fibre

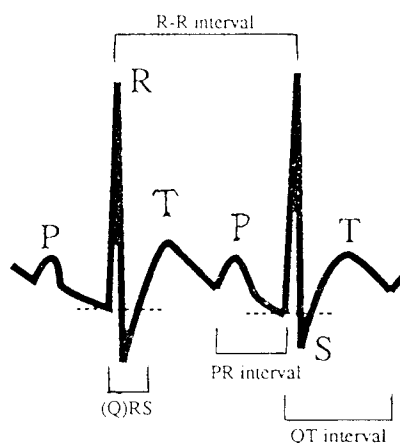
เซลล์ของกล้ามเนื้อหัวใจแต่ละเซลล์ แต่ละปลายจะมีขั้วหรือประจุ ในเซลล์ของกล้ามเนื้อที่ปกติและในขณะพัก เซลล์นี้จะมีประจุบวกอยู่ด้านนอกและประจุลบอยู่ด้านใน เมื่อประจุเหล่านี้สมดุลกันภาวะของเซลล์ในตอนต้น คือภาวะ polarization เมื่อเซลล์ของกล้ามเนื้อหัวใจถูกกระตุ้นด้วยประจุไฟฟ้า เซลล์ของกล้ามเนื้อหัวใจจะเกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้นทันทีและกระจายไปทั่วผนังเซลล์ ทำให้ประจุกลับตรงข้ามจากเดิมคือที่ผิวเซลล์ด้านนอกจะกลายเป็นประจุลบและผิวด้านในกลายเป็นประจุบวก ขบวนการที่เกิดขึ้นนี้คือ depolarization ซึ่งเมื่อเกิดขึ้นแล้วจะกระจายอย่างรวดเร็วไปทั่วผนังเซลล์ของกล้ามเนื้อหัวใจ มีกระแสไฟฟ้าเกิดขึ้นและกระแสไฟฟ้านี้จะเหนี่ยวนำเซลล์ถัดไปให้เกิด depolarization ขึ้นทั่วทั้งเซลล์ และต่อไปที่เซลล์อื่น ๆ ไปเรื่อย ๆ ทำให้กล้ามเนื้อหดตัว เมื่อประจุไฟฟ้าผ่านไปทั่วเซลล์แล้วจะกลับเข้าสู่ภาวะสมดุลใหม่ นั่นคือภาวะของการเกิด repolarization ศักดาไฟฟ้าที่เกิดขึ้นขณะที่เซลล์เปลี่ยนจากภาวะ polarization เป็น depolarization นั้นเกี่ยวข้องกับความสัมพันธ์ของ electrolyte ที่อยู่ภายในและภายนอกเซลล์ด้วยแคตไอออนที่สำคัญ ในส่วนภายนอกเซลล์คือ โซเดียม ส่วนภายในเซลล์คือ โพแทสเซียม เมื่อผนังเซลล์อยู่ในภาวะ polarization จะมีศักดาไฟฟ้าลบภายในเซลล์และภายในเซลล์จะมีโพแทสเซียมและโซเดียมต่ำ เมื่อเทียบกับภายนอกเซลล์ แต่พอเซลล์กล้ามเนื้อถูกกระตุ้นทางไฟฟ้า ผนังเซลล์จะหยุดทำหน้าที่กั้นโซเดียมไว้ไม่ให้เข้าเซลล์ ดังนั้นขณะเกิด depolarization ขึ้นนั้นจึงมีการไหลของโซเดียมไอออนเข้าไปในเซลล์อย่างรวดเร็วและมีการหดตัวของกล้ามเนื้อหัวใจ การที่ sino – atrial node สามารถปล่อยประจุไฟฟ้าออกไปทำให้เกิด depolarization ขึ้นในเซลล์หนึ่งและต่อไปยังเซลล์ต่าง ๆ นี้ ทำให้สามารถบันทึก electrical voltage ที่เกิดจากขบวนการทั้งหมด โดยการวาง electrode ไว้บนผิวหนังของร่างกายและอีกปลายหนึ่งต่อกับ galvanometer ซึ่งมีความไวเป็นพิเศษและเข็มของ galvanometer นี้จะเคลื่อนไหวไปตาม voltage ที่เกิดขึ้นในกล้ามเนื้อของหัวใจ โดยบันทึกลงบนกระดาษกราฟ กราฟที่ได้คือ electrocardiogram (ECG)

คลื่นไฟฟ้าหัวใจ ประกอบด้วยคลื่นต่าง ๆ ดังนี้

- 1) P wave เกิดจาก atrial depolarization
- 2) QRS complex ประกอบด้วย Q wave , R wave และ S wave เกิดจาก ventricular depolarization
- 3) T wave เกิดจาก repolarization

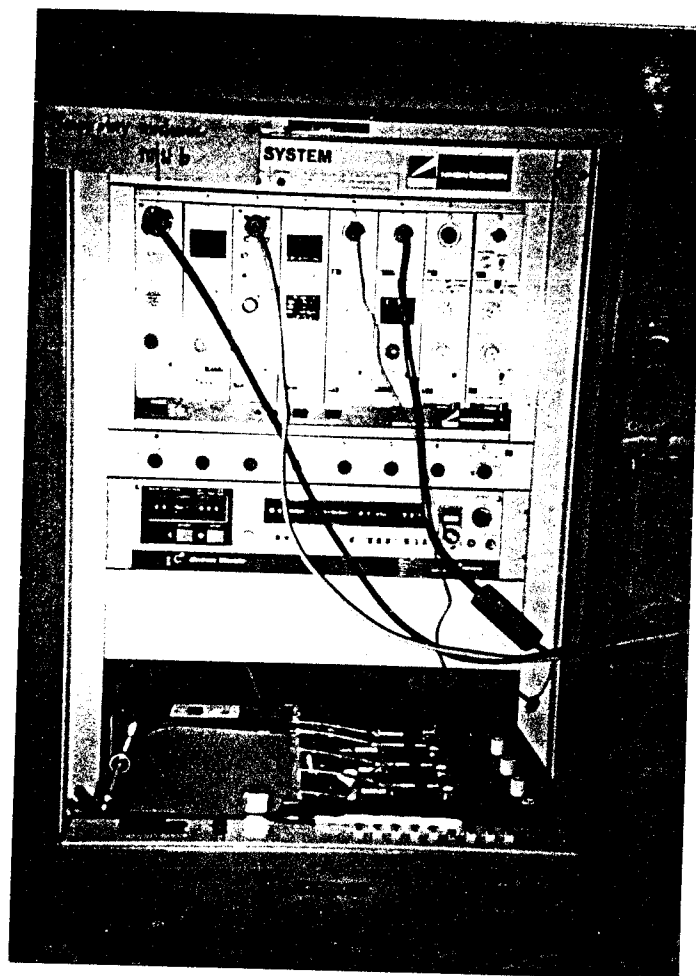
คลื่นทั้งหมดนี้รวมเป็น 1 cycle ภาพประกอบ 29

The Rat



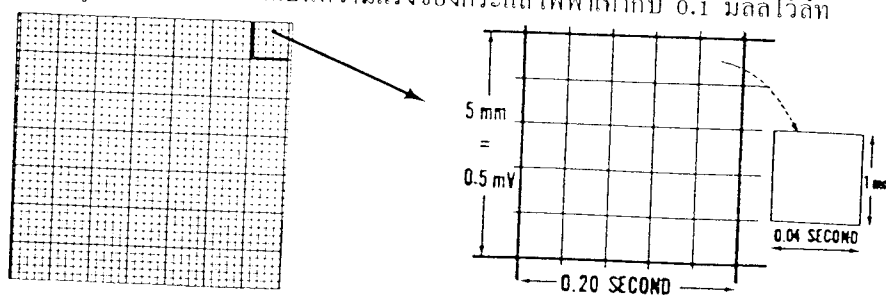
ภาพประกอบ 29 คลื่นไฟฟ้าหัวใจของหนู (rat) ปกติ (Gad & Chengelis. 1996)

เครื่องบันทึกกราฟจากหัวใจ ปัจจุบันเป็นแบบ high quality electronic amplifier มีเข็มที่ใช้เขียนกราฟลงบนกระดาษกราฟ หรือต่อ electronic amplifier นี้ให้คลื่นไฟฟ้าหัวใจออกที่จอโทรทัศน์เลยหรือต่อกับคอมพิวเตอร์ ทำให้อ่านความสะดวกมากขึ้น ภาพประกอบ 30 กระดาษที่ใช้บันทึกคลื่นไฟฟ้าหัวใจนั้นเป็นกระดาษพิเศษ เมื่อโดนความร้อนจากเข็มของเครื่องบันทึกคลื่นไฟฟ้าหัวใจที่เคลื่อนไปมาบนกระดาษกราฟก็จะทำให้เกิดเส้นและมีรูปร่างเป็นไปตามลักษณะการเคลื่อนไหวของเข็มทำให้เราสามารถอ่านคลื่นไฟฟ้าหัวใจได้ทันที กระดาษบันทึกคลื่นไฟฟ้าหัวใจจะมีตารางจำนวนมาก ตารางใหญ่ประกอบด้วยความกว้าง 5 มิลลิเมตร และสูง 5 มิลลิเมตร และยังมีเส้นย่อยทั้งด้านตั้งและด้านนอนอีก แต่ละเส้นจะห่างกัน 1 มิลลิเมตร โดยตลอด เมื่อเปิดสวิตช์ให้เครื่องทำงานนั้น ถ้าให้เครื่องวิ่งไปด้วยอัตราธรรมดา คือ 25 มิลลิเมตรต่อวินาที แล้วช่วงที่เกิดขึ้นเป็นระยะ 1 มิลลิเมตร ก็จะใช้เวลา 0.04 วินาที และระยะของ 1 ช่องใหญ่ หรือ 5 มิลลิเมตร ก็จะใช้เวลา $0.04 \times 5 = 0.20$ วินาที ใช้วัดความกว้างของ wave หรือ QRS complex และ interval ต่าง ๆ ได้ ภาพประกอบ 31



ภาพประกอบ 30 เครื่องบันทึกคลื่นไฟฟ้าหัวใจ

1 ช่องเล็ก (1 มม.) ของกระดาษบันทึกคลื่นไฟฟ้าหัวใจมีค่าเท่ากับ 0.04 วินาที
 5 ช่องเล็ก หรือ 1 ช่องใหญ่ (5 มม.) เท่ากับ 0.2 วินาที
 ความสูงแต่ละช่องเล็กคิดเป็นความแรงกระแสไฟฟ้าเท่ากับ 0.1 มิลลิโวลต์



ช่วงแบ่งบนกระดาษบันทึกคลื่นไฟฟ้าหัวใจ

ภาพประกอบ 31 กระดาษบันทึกคลื่นไฟฟ้าที่ขยายใหญ่

การอ่านคลื่นไฟฟ้าหัวใจ โดยต้องตรวจดูคลื่นไฟฟ้าหัวใจทั่ว ๆ ไปให้ทั่วถึงก่อน แล้วตรวจดูจังหวะการเต้น (rhythm) ของหัวใจในคลื่นไฟฟ้าหัวใจ หาอัตราการเต้นของหัวใจ ตรวจดู P wave ทหาระยะ P – R และ Q – T interval ตรวจดูค่าของ QRS complex interval ดูความสูงของ R wave และ S wave เป็นต้น ซึ่งลักษณะของคลื่นไฟฟ้าหัวใจที่ปรากฏสามารถบอกถึงพยาธิสภาพและการทำงานของหัวใจได้ การวัดความยาวของคลื่นหรือความยาวของคลื่นรวม segment มีประโยชน์มากในการอ่านคลื่นไฟฟ้าหัวใจ

P – R interval คือ ระยะเวลา นับตั้งแต่จุดเริ่มต้นของ P wave ไปจนถึงจุดเริ่มต้นของ QRS complex (msec)

QRS interval คือ ระยะเวลา นับตั้งแต่จุดเริ่มต้นของ Q wave ไปจนถึงจุดสุดท้ายของ QRS complex (msec)

Q – T interval คือ ระยะเวลา จากจุดเริ่มต้นของ QRS complex ไปจนปลายสุดของ T wave (msec)

อัตราการเต้นของหัวใจ หาได้โดยนับจำนวน R wave ที่อยู่ใน 15 ช่องใหญ่ของกระดาษคลื่นด้วย 20 (ครั้ง/นาที)

จังหวะการเต้นของหัวใจ ถ้าเป็นปกติอย่างสม่ำเสมอเรียกว่า sinus rhythm ถ้าภาวะที่หัวใจเต้นเร็วผิดปกติ เรียก Tachycardia แต่ถ้าหัวใจเต้นผิดปกติด้วยเรียก Tachyarrhythmia และถ้าหัวใจเต้นช้า เรียก Bradycardia แต่จังหวะผิดปกติด้วยเรียกว่า Bradyarrhythmia

Atrio – Ventricular Block (A – V block) เกิดขึ้นจากการเหนี่ยวนำไฟฟ้าระหว่างเอเทรียมและเวนตริเคิลล่าช้ากว่าธรรมดา หรือการเหนี่ยวนำนี้ถูกขัดขวาง หรือถูกปิดกั้น (มีช่วง P – R ยาวกว่าปกติ) สาเหตุหนึ่งอาจเกิดจากทางเดินไฟฟ้าหัวใจมีพยาธิสภาพขึ้น

Ventricular Tachycardia (VT) เป็นภาวะที่หัวใจเต้นเร็ว จังหวะการเต้นของหัวใจส่วนใหญ่ยังจะสม่ำเสมอ P wave มักหายไป ใน QRS complex ช่วง QRS กว้างและรูปร่างแปลก ชอบเกิดในภาวะที่กล้ามเนื้อหัวใจเสียไปอย่างมาก

Ventricular Fibrillation (VF) เป็นภาวะที่หัวใจเต้นเร็วมาก จังหวะการเต้นไม่สม่ำเสมอ รูปร่างของคลื่นเป็นเส้นหยักไปมา ซึ่งมีความแตกต่างกัน ไม่พบคลื่น P wave , QRS complex หรือ T wave เลย มีแต่คลื่นหยักไปมา VF เป็นสาเหตุของ cardiac arrest ที่พบบ่อยมาก เป็นสาเหตุของการตายอย่างปัจจุบันทันด่วน พบในโรคที่ทำให้กล้ามเนื้อหัวใจเสียไปอย่างมาก ๆ (ชมพูนุท อ่องจิริต. 2525)

ตาราง 19 ข้อมูลเกี่ยวกับ Cardiovascular และคลื่นไฟฟ้าหัวใจของหนู (rat) ปกติ

System	Data
Cardiovascular	
Arterial blood pressure	
Systolic	84 – 184 mmHg
Diastolic	58 – 145 mmHg
Heart rate	330 – 480 beats/min.
Cardiac output	10 – 80 ml./min.
Blood volume	
Plasma	40.4 (36.3 – 45.3) ml./kg.
Whole blood	64.1 (57.5 – 69.9) ml./kg.
ECG waveform	
P wave	10 – 20 msec
P – R interval	35 – 50 msec
QRS interval	12 – 25 msec
Q – T interval	38 – 80 msec

ที่มา Gad & Chengelis. 1996 : 23 - 67

7. การทดสอบสมบัติความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

7.2 วิธีนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (Viable cell count)

วิธีนับจำนวนเซลล์ใช้วิธี Dye Exclusion ที่นับเซลล์ด้วย Haemocytometer ย้อมเซลล์ด้วยสี Trypan blue ภาพประกอบ 32 เซลล์ที่มีชีวิตจะไม่ติดสี ส่วนเซลล์ที่ตายจะติดสีน้ำเงิน มีวิธีการดังนี้

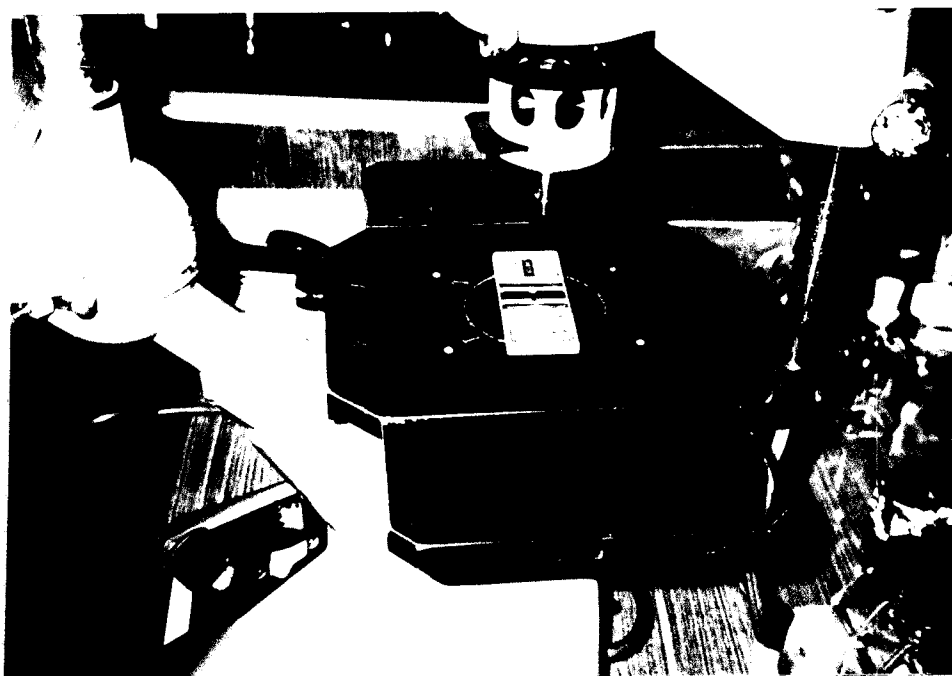
เขย่าขวดเลี้ยงเซลล์ให้เซลล์กระจายทั่วกัน หรือใช้ปิเปตดูดขึ้นลงให้เซลล์กระจายไม่เกาะกลุ่ม แล้วปิเปต 0.4 % Trypan blue 0.2 มิลลิลิตร และ cell suspension 0.2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันโดยใช้ pasteur pipet ดูดขึ้นลงเบา ๆ ปล่อยให้ทิ้งไว้ 5 – 10 นาที แล้วนำ cell suspension ที่ย้อมสีแล้วไปหยดบน Haemocytometer ซึ่งมี cover slid ปิดอยู่ทั้งสอง chamber นับจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ (เซลล์ที่ตายจะติดสีน้ำเงินของ Trypan blue) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100 เท่า 1 chamber ของ Haemocytometer มีทั้งหมด 9

ช่อง จะสู่มนั้เพียง 5 ช่อง นำค่าจำนวนเซลล์เฉลี่ยที่นับได้ทั้งสอง chamber ไปคำนวณเป็นจำนวนเซลล์ต่อปริมาตร(มิลลิลิตร)

$$C = [(A \times 2) / 5] \times 10^4$$

C คือ จำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร

A คือ จำนวนเซลล์เฉลี่ยที่นับได้



ภาพประกอบ 32 วิธีนับจำนวนเซลล์ด้วย Haemocytometer

Haemocytometer มี 2 chamber แต่ละ chamber มีทั้งหมด 9 ช่อง ให้สู่มนั้ 5 ช่อง แล้วคำนวณจำนวนเซลล์ใน 1 มิลลิลิตร ดังนี้

Haemocytometer 1 ช่อง มีปริมาตร	=	area x depth
	=	$1 \text{ mm}^2 \times 0.1 \text{ mm.}$
	=	0.1 mm^3
	=	0.0001 cm^3
	=	$1 \times 10^{-4} \text{ ml}$

กำหนดให้จำนวนเซลล์ที่นับได้ใน 5 ช่อง	=	M cells
ปริมาตรของ cell suspension : Trypan blue dye	=	1 : 1
∴ จำนวนเซลล์ใน 1 ช่อง	=	2 M / 5 cells
จำนวนเซลล์ในปริมาตร 1 ml	=	(2 M / 5) x 10 ⁴ cells
∴ cell concentration	=	(2 M / 5) x 10 ⁴ cells/ml.

7.2 วิธีวัดอัตราการเจริญของเซลล์มะเร็ง HeLa โดยการหาปริมาณโปรตีนของเซลล์ที่มีชีวิต

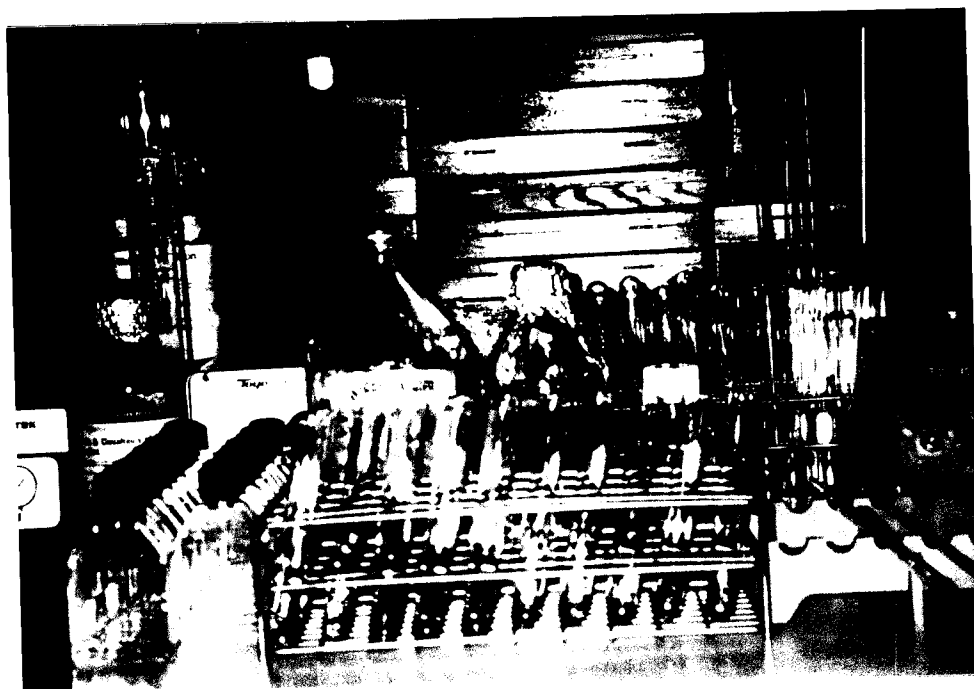
โดยอาศัยหลักที่ว่าถ้าปริมาณโปรตีนมากหมายถึงจำนวนเซลล์ก็มากด้วย การวัดโปรตีนใช้วิธีของ โอยามาและอีเกิล (Oyama & Eagle. 1956 : 305 – 307) โดยนำไปประยุกต์ใช้กับวิธี colorimetric ของเลารีและคณะ ซึ่งใช้ Folin reagent เป็นตัวทำให้เกิดสี (Lowry, et al. 1951 : 265 – 275)

- 1) การเตรียมกลุ่มควบคุม (blank) ใส่ น้ำกลั่น 1.0 มิลลิลิตร และ solution C 5.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากัน
- 2) การเตรียมกลุ่มสารละลายโปรตีนมาตรฐาน ปิเปตสารละลาย BSA ที่เข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง เติมน้ำกลั่น 5.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
- 3) การเตรียมเซลล์เพื่อใช้หาโปรตีน
 - negative control Day 0 เติมน้ำกลั่น 5.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เซน-ตริฟิวส์ นำไปเขย่าด้วย mixer จากนั้นปิเปต cell solution 1.0 มิลลิลิตร solution C 4.0 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เขย่าให้เข้ากัน
 - เซลล์ Day 4 หลังจากที่ได้ล้างด้วย PBS แล้ว เติมน้ำกลั่น 5.0 มิลลิลิตร เพื่อละลายโปรตีนออกจากเซลล์ นำไปเขย่าด้วย mixer ได้เป็น cell solution แล้วปิเปต cell solution 1.0 มิลลิลิตร solution C 4.0 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากัน
- 4) นำสารละลายในหลอดทดลองทั้งหมดมาเติม สารละลาย F-C 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว จะมีสีน้ำเงินเกิดขึ้น ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที นำสารละลายทั้งหมดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ต้องวัดให้เสร็จภายใน 2 ชม. ภาพประกอบ 33 คู่มือวิธีหาปริมาณโปรตีนในตารางที่ 20

ตาราง 20 แสดงปริมาณสารละลายต่าง ๆ ที่ใช้ในการหาปริมาณโปรตีน (มิลลิลิตร)

Reagent	Blank	Protein control	Day 0	Day 4
Cell solution	-	-	1	1
BSA (50 µg/ml)	-	1	-	-
Solution C	5	5	4	4
Distilled water	1	-	1	1
F-C : water	0.5	0.5	0.5	0.5
= 5 : 7 *				

* rapidly mixed



ภาพประกอบ 33 วิธีวัดอัตราการเจริญของเซลล์มะเร็ง HeLa โดยการหาปริมาณโปรตีนของเซลล์ที่มีชีวิต

สรุปงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ cardiotoxin จากพิษงูเห่าต่าง ๆ

NAME / YEAR	SNAKE VENOM	PURIFICATION METHOD	AIMS of STUDY	RESULTS
Braganca et.al. / 1966	Cobra Venom <i>Naja naja</i>	HClO ₄ - supernatant CM - cellulose (IEC) Sephadex G - 50 (GFC) Acetone - precipitation	- Isolation proteins - Cytotoxic property to yoshida sarcoma cells	Isolation --- purify cobra venom factor , pI > 9.4 , MW. 10,500 Cytotoxicity --- high and Selective for yoshida sarcoma cells than other cells
Aloof-Hirsch Et al. / 1968	Ringhal <i>Haemachatus haemachatus</i>	Precipitation - Trichloroacetic acid Sephadex G – 50 (GFC)	- Purified methods - Chemical - characterization of direct lytic factor	Purify --- DLF – single chain protein , MW. 7,000 , 57 amino acids. , 4 disulfide bridges , N - terminal --- Leu , C - terminal --- Ser , inhibit growth in some bacteria
Fryklund and Eaker / 1975	Cambodian cobra <i>Naja naja</i>	Sephadex G - 75 (GFC) Bio-Rex 70 (IEC)	- Amino acid sequence of CTX	Cardiotoxin F.8 --- MW. 6,727 60 amino acids , 4 disulfide bridges , single peptide , devoid of His ,Trp , Glu
Arm and Mepheeters / 1975	Thailand cobra <i>N. siamensis</i>	Sephadex CM – 50 (IEC)	- Effect of CTX to embryonic heart cells	CTX --- irreversibly Depolarized heart cells , At high conc. (40 g/ml.) stop beating of heart within 1 min.

NAME / YEAR	SNAKE VENOM	PURIFICATION METHOD	AIMS of STUDY	RESULTS
Hayashi et al. / 1976	Formason cobra <i>N. naja atra</i>	Sephadex G - 50 (GFC) CM cellulose (IEC)	Amino acid sequence	CTX --- 60 amino acid residues MW. --- 7,000 daltons
Dufoureq and Faucon / 1978	<i>N.mossambica</i> <i>Mossambica</i>	—	Specific binding of CTX to charged of phospholipids	CTX --- bind to negative charged but not bind to neutral or switter ionic phospholipids , CTX – LIPID complexes --- dissociated by high ionic strength or pH effects
Louw and Carlsson / 1979	<i>N. mossambica</i> <i>H. hemachatus</i>	—	Method for prepare Phospholipase A ₂ - Free Cardiotoxin	Using --- Hydrophobic interaction chromatography by Phenyl Sepharose CL - 4B decrease gradient elution.
Bougis et.al. / 1981	<i>N.mossambica</i> <i>mossambica</i>	Sephadex G-50 (GFC) Amberlite CG-50 (IEC)	Penetration of Phospholipid Monolayer by CTX	CTX --- can penetrate CTX --- interaction with neutral and negative charge Phospholipid.
Harvey et al. / 1982	<i>N. naja siamensis</i>	Bio – Rex 70 Sephadex G – 50 (GFC) Bio – Rex 70 (IEC)	- Purified CTX - Effects of CTX on skeletal and cardiac muscle cells.	CTX --- 4 types CTX II , III , IV --- caused Contracture and depolarization. , high calcium prevent action of CTX

NAME / YEAR	SNAKE VENOM	PURIFICATION METHOD	AIMS of STUDY	RESULTS
Harvey et al. / 1983	<i>N. naja siamensis</i>	Sephadex G - 50 (GFC) SP Sephadex C - 25 (IEC) phenyl - Sepharose CL- 4B (hydrophobic)	- Ability of CTX with and without PLA ₂ contaminate on to lyse human RBC , depolarize and contract skeletal muscle.	CTX --- hemolysis activity ($\geq 10^{-5}$ M) , depolarize and contract skeletal muscle CTX + PLA ₂ --- increase hemolytic activity and depolarize but not enhance the contracture.
Zuusman et al. / 1984	<i>N. naja siamensis</i>	—	- Interaction of CTX with erythrocytes (hemolysis)	CTX --- high concentration to high hemolysis activity. Adding EDTA --- increase hemolysis activity.
Bougis et al. / 1987	<i>N. mossambica mossambica</i>	—	- Synergy of CTX and PLA ₂ in vivo on survival time in mice.	CTX + PLA ₂ (simultaneous) ---- survival time decrease. Inject PLA ₂ before CTX 15 min. --- survival time is drastically reduce.
Ohkura et al. / 1988	<i>N. naja siamensis</i>	Sephadex G-75 (GFC) CM – cellulose (IEC)	- Purify and Amino acid sequence.	4 cytotoxins --- I , II , III and IV 60 amino acid residues.

NAME / YEAR	SNAKE VENOM.	PURIFICATION METHOD	AIMS of STUDY	RESULTS
Jiang et al. / 1989	<i>N. naja atra</i> <i>N. naja kaouthia</i>	-	- Factors influencing the hemolysis of human RBC by CTX.	Age of RBC --- aged > fresh Temperature of incubate --- 37 °C > 20 °C Divalent cation (Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+}) --- 0.5 - 2 mM. > 5 - 40 mM. PH --- 7.5 - 8.5 Glucose (2 mM. Divalent ion) -- -- 5.3 mM > 40 mM. Mechanism of hemolysis ---- independent PLA_2
Ownby et al. /1993	<i>N. naja atra</i>	FPLC - Mono S prepacked HR 10/10 column RP - HPLC - C14 column.	- Test ability of CTX cause necrosis of skeletal muscle cells. (mice)	Purified CTX 1 cause necrosis of skeletal muscle cells in vivo upon im. Injection. Examination by light & electron microscope.
Fletcher et al. 1996	<i>N. naja kaouthia</i>	—	- Study on mechanism of CTX , melittin and myotoxin are similar and difference that cause necrosis	Myonecrosis --- CTX are similar to melittin and PLA_2 , that rapid lysis of sarcolemma , myofibril clumping and hypercontraction of sarcomeres but difference from crotoxin and myotoxin a

NAME / YEAR	SNAKE VENOM	PURIFICATION METHOD	AIMS of STUDY	RESULTS
Ou et al./ 1997	<i>N. naja atra</i>	—	- Effect of extracellular Ca^{2+} on CTX , that induced cytotoxicity in cultured single cell of rabbit aortic endothelium.	Ca^{2+} --- high conc. (7-10 mM) protected cells from CTX injury. Ca^{2+} - free medium --- less prominent to CTX activities. Ca^{2+} - physiologically conc. (1.2 mM) --- cell necrosis by CTX (1 - 30 μM)

CTX = Cardiotoxin
 PLA₂ = Phospholipase A₂
 IEC = Ion Exchange Chromatography
 GFC = Gel Filtration Chromatography
 MW. = Molecular weight.
 RBC = Red blood cell

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นางสาว เพ็ญศรี กิตติเจริญรัตน์
วันเดือนปีเกิด	16 มกราคม 2511
สถานที่เกิด	อำเภอลาดหลุมแก้ว จังหวัดปทุมธานี
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	184/79 ม. 2 ต. ท่าทราย อ. เมือง จ. นนทบุรี 11000
ตำแหน่งหน้าที่การงานในปัจจุบัน	นักวิทยาศาสตร์ประจำห้องปฏิบัติการเอกซน
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	บริษัท แซน. อี. 68 แล็บ จำกัด 642 / 3-7 ถ. วงศ์สว่าง แขวงบางซื่อ เขตบางซื่อ กรุงเทพฯ 10800
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2529	มัธยมศึกษาปีที่ 6 จากโรงเรียนปทุมวิไล
พ.ศ. 2532	วท.บ. (ชีววิทยา) จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ บางเขน
พ.ศ. 2542	วท.ม. (เคมีชีวภาพ) จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร