615.942
ส 838ก
ว.3

การศึกษาคุณสมบัติเอนไซม์ฟอสฟอไลเปสเอทู จากงูแมวเซา

ปริญญานิพนธ์
ของ
สุภาภรณ์ ปิยะศิริกุล

11 พ.ค. 2535

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต
กันยายน 2530

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

178751

การศึกษาคุณสมบัติเอนไซม์ฟอสฟอไลเปสเอทู จากงูแมวเซา

บทคัดย่อ

ของ

สุภาภรณ์ ปิยะศิริกุล

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต

กันยายน 2530

การศึกษาคุณสมบัติของฟอสฟอไลเปสเอทูครั้งนี้ ได้แยกพิษงูแมวเซาออกเป็นส่วน ๆ ด้วยวิธี เจล ฟิลเตรชัน โครมาโตกราฟี ซึ่งใช้ เซฟาเดกซ์ จี - 75 แยกพิษงูออกได้ 5 ส่วน (peak) พบว่า ส่วนที่ 2 (II) เป็นส่วนที่มีฟอสฟอไลเปสเอทูแอคติฟวิตี เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย ดิส อะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรฟอริซีส พบว่า ส่วนที่ II มีแถบโปรตีนน้อยกว่าพิษงูที่ยังไม่ได้แยก เมื่อนำส่วนที่ II มาแยกด้วยวิธี แคทอิออน เอกซ์เชนจ์ โดยใช้ ซีเอ็ม - เซฟาเดกซ์ ซี - 50 แยกได้ 5 ส่วน และส่วนที่ 5 (II_5) เป็นส่วนที่มีฟอสฟอไลเปสเอทูแอคติฟวิตี

นำพิษงูที่ยังไม่ได้แยก พิษงูส่วนที่ II และส่วนที่ II_5 มาทดสอบคุณสมบัติการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก พบว่า พิษงูทั้งหมดให้ผลต่อการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกในเปอร์เซนต์ที่ต่ำมาก แต่เปอร์เซนต์การแตกของเม็ดเลือดแดงจะเพิ่มขึ้นอย่างมาก เมื่อมีไข่แดงเป็น substrate เมื่อทดสอบคุณสมบัติเร่งการแข็งตัวของเลือด พบว่าพิษงูที่ยังไม่ได้แยก เร่งการแข็งตัวของเลือดได้ถึง 14 เท่าของการแข็งตัวของเลือดตามปกติ พิษงูส่วนที่ II สามารถเร่งการแข็งตัวของเลือดน้อยลงเหลือ 7 เท่าของการแข็งตัวของเลือดปกติ ในขณะที่พิษงูส่วนที่ II_5 ไม่เร่งการแข็งตัวของเลือดเลย ในการตรวจสอบการทำให้เกิด local tissue necrosis โดยใช้พิษงูที่ยังไม่ได้แยกและพิษงูส่วนที่ II พบว่าที่ยังไม่ได้แยกสามารถทำให้เกิด local tissue necrosis ได้มากกว่าพิษงูส่วนที่ II

นำพิษงูแต่ละส่วนมาฉีดกระตุ้นกระต่ายได้แอนตี - ดรูกวีนัม แอนตี - ฟอสฟอไลเปสเอทูจากพิษงูส่วนที่ II และแอนตี - ฟอสฟอไลเปสเอทูจากพิษงูส่วนที่ II_5 จากการตรวจสอบด้วยวิธี ดับเบิล อิมมูโนดิฟฟิวชัน พอจะบอกได้ว่าพิษงูส่วนที่ II_5 นั้นเป็นเอนไซม์บริสุทธิ์ แอนตี - ฟอสฟอไลเปสเอทูที่ได้จากพิษงูส่วนที่ II_5 สามารถยับยั้งฟอสฟอไลเปสเอทูแอคติฟวิตี ทั้งในพิษงูที่ยังไม่ได้แยก และพิษงูที่แยกได้ส่วนที่ II และ II_5 ได้ดีกว่าแอนตี - ฟอสฟอไลเปสเอทูที่ได้จากส่วนอื่น ๆ และเมื่อนำแอนตี - ฟอสฟอไลเปสเอทูจากส่วนที่ II มายับยั้งการเกิด local tissue necrosis ที่เนื้อเยื่อผิวกระต่ายที่ถูกฉีดด้วยพิษงูแมวเซา ก็สามารถยับยั้งได้

A STUDY ON PROPERTIES OF PHOSPHOLIPASE A_2 FROM SIAMESE RESSEL VIPER (*Vipera russellii siamensis*, M. SMITH)

AN ABSTRACT

BY

SUPAPORN PIYASIRIKUL

Presented in partial fulfillment of the requirements

for the Master of Education degree

at Srinakharinwirot University

September 1987

In the study of the phospholipase A_2 actirities, the Siamese Russel Viper venom was isolated using gel filtration on Sephadex G - 75 column which showed five major peaks (I - V). Peak II exhibited phospholipase A_2 activities. Using polyacrylamide gel eletrophoresis, there are three dark bands comparing to few more bands from the crude venom. Inon exchange chromatography on CM - Sephadex C - 50 column of peak II gave five minor peaks (II - II_5). Peak II_5 contained phospholipase A_2 activities.

The crude venom, peak II and peak II_5 showed a direct hemolysis on red blood cells by using the protein concentration upto 350 µg/ml. Hemolysis of the sheep erythrocytes did not exceed 5 %. However the indirect lytic action was enhanced when the egg yolk emulsion was mixed in the reaction mixture.

The coagulation capacity of the crude venom, peak II and peak II_5 were studied. The result showed that the crude venom contained 7 times and 14 times coagulantion activity than that of peak II and peak II_5. Peak II_5 had no coagulation capacity.

From the study of local tissue necrosis of crude venom and phospholipase A_2 from peak II as well as peak II_5 it was found that the crude venom and phospholipase A_2 in ve tro showed that the anti - phospholipase A_2 from peak II_5 gave the highest inhibition effect of the enzyme activities, the anti - phospholipase A_2 from peak II as well showed the neuterizing capacity of local tissue necrosis.

คณะกรรมการที่ปรึกษาประจำตัวนิสิตและคณะกรรมการสอบ ได้พิจารณาปริญญานิพนธ์ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒได้

คณะกรรมการที่ปรึกษา		คณะกรรมการสอบ	
.....	ประธาน	.....	ประธาน
.....	กรรมการ	.....	กรรมการ
.....	กรรมการ	.....	กรรมการ
		.....	กรรมการ

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยคำแนะนำ และความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก อาจารย์ ดร. สายสุนม ธรรมพิทักษ์ แห่งคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร อาจารย์นฤมล พักมณี แห่งกองวิทยาศาสตร์ สภากาชาดไทย จึงขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ผู้วิจัย ขอขอบพระคุณ นายแพทย์เพทล นพคุณ แห่งโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำ biopsy และอภิปรายผล

ผู้วิจัย ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. ยุวดี มาคะผดุงรัตน์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์พันธุ์สิน เกตุทัต ที่กรุณาช่วยแก้ไขปริญญานิพนธ์เรื่องนี้จนสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ผู้วิจัย ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์สุภวัฒน์ ยุติวงศ์ ผู้อำนวยการกองวิทยาศาสตร์ สภากาชาดไทย ที่ได้ให้ความช่วยเหลือทางด้านสถานที่และเครื่องมือในการทดลอง

ผู้วิจัยขอน้อมรำลึกถึงพระคุณมารดา ที่ได้ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจในการศึกษา และขอขอบคุณ พี่ ๆ น้อง ๆ และเพื่อน ๆ ตลอดจนนักวิทยาศาสตร์และเจ้าหน้าที่แห่งกองวิทยาศาสตร์ สภากาชาดไทย ที่ได้มีส่วนช่วยเหลือให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

สุภาภรณ์ ปิยะสิริกุล

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	บทนำ	1
	คำนำ	1
	จุดมุ่งหมายของการวิจัย	4
	ความสำคัญของการวิจัย	5
	ขอบเขตของการวิจัย	5
	คำนิยามศัพท์เฉพาะ	5
2	ทฤษฎีและเอกสารที่เกี่ยวข้อง	7
	ลักษณะทั่วไปและธรรมชาติของงูแมวเซา	7
	การศึกษาความเป็นพิษของพิษงูแมวเซา	7
	การศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับเอนไซม์ฟอสฟอไลเปสเอทู	10
	การแยกพิษงูแมวเซาและงูอื่น ๆ เพื่อการศึกษาคุณสมบัติฟอสฟอไลเปสเอทูแอคติวิตี	11
3	การดำเนินการทดลอง	15
	การแยกพิษงูแมวเซา โดยวิธี เจล ฟิวเตรชัน โครมาโตกราฟี ..	15
	การวัดค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ฟอสฟอไลเปสเอทู	16
	การหาปริมาณโปรตีน ในพิษงูแมวเซาที่มีฟอสฟอไลเปสเอทูแอคติวิตี	18
	การแยกเอนไซม์ฟอสฟอไลเปสเอทู ให้บริสุทธิ์ขึ้น โดยวิธีแคทไอออนเอกซ์เชนจ์	19
	การวิเคราะห์พิษงูแมวเซาที่แยกได้ โดยวิธี ดิส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรฟอรีซีส	20

บทที่ หน้า

การศึกษาคุณสมบัติการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก ของพิษงูแมวเซา .. 23
การศึกษาคุณสมบัติการเร่งการแข็งตัวของเลือด ของพิษงูแมวเซา . 25
การหาความเป็นพิษ (แอลดี - 50) ของพิษงูแมวเซา 26
การทดสอบการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณ (local tissue necrosis) เนื่องจากพิษของงูแมวเซาและฟอสฟอไลเปสเอทู ที่ได้จากพิษงูแมวเซา 27
การฉีดกระตุ้นให้สัตว์ทดลองสร้างแอนตีบอดีย์ต่อพิษงูแมวเซาและส่วน ของพิษงูแมวเซาที่มีฟอสฟอไลเปสเอทูแอคติฟวิตี 28
การตรวจสอบแอนตี - ฟอสฟอไลเปสเอทู แอนตี - ครูดวีนัม จาก เซรุ่มที่ได้จากการฉีดกระตุ้นกระต่าย ด้วยวิธี ดับเบิล อิมมูโนดิฟฟิวชัน 30
การวัดความสามารถในการยับยั้งฟอสฟอไลเปสเอทูแอคติฟวิตี ด้วยแอนตี - ครูดวีนัม และแอนตี - ฟอสฟอไลเปสเอทู 32
การตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งการตายของเนื้อเยื่อ ที่เกิดจากพิษงูแมวเซา ด้วย แอนตี - ฟอสฟอไลเปสเอทู 34

ผลการทดลอง 36
การแยกพิษงูด้วยเทคนิค เจล ฟิลเตรชัน โครมาโตกราฟี 36
การแยกพิษงูส่วนที่ II ด้วยเทคนิคแคทไอออนเอกซ์เชนจ์ 40
การหาค่าฟอสฟอไลเปสเอทูแอคติฟวิตีในพิษงูส่วนต่าง ๆ 42
การตรวจสอบความเป็นพิษในพิษงูแมวเซา 45
การศึกษาคุณสมบัติการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกโดยพิษงูแมวเซา ส่วนต่าง ๆ 47
การศึกษาคุณสมบัติในการเร่งการแข็งตัวของเลือด 49

บทที่ หน้า

การศึกษาคุณสมบัติการทำให้เนื้อเยื่อตายเฉพาะบริเวณ (local tissue necrosis) 51

การตรวจสอบแอนติบอดีย์ ที่ได้จากการฉีดกระตุ้นกระต่ายด้วยพิษงูแมวเซาส่วนต่าง ๆ 56

การตรวจสอบคุณสมบัติ แอนติ - ฟอสฟอไลเปสเอทูที่ได้จากพิษงูแมวเซาส่วนต่าง ๆ 58

5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ 60

สรุปและอภิปรายผล 60

ข้อเสนอแนะ 65

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัย 66

บรรณานุกรม 67

บัญชีตาราง

ตาราง		หน้า
1	แสดงการยับยั้งฟอสฟอไลเปสเอทูแอคติฟวิตีในโครทอกซินและพิษงูโครตาลัส โดยแอนตี – ฟอสฟอไลเปสเอทู ที่ได้จากพิษงูโครตาลัส	13
2	แสดงปริมาณโปรตีนในแต่ละส่วนที่มีฟอสฟอไลเปสเอทูแอคติฟวิตี	38
3	แสดงค่าฟอสฟอไลเปสเอทูแอคติฟวิตีของพิษงูแมวเซา	43
4	แสดงค่าความเป็นพิษของพิษงูแมวเซาส่วนที่ยังไม่ได้แยก ส่วนที่แยกได้ที่ II และส่วนที่แยกได้ที่ II_5	46
5	แสดงความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกของพิษงูแมวเซา .	48
6	แสดงคุณสมบัติในการเร่งการแข็งตัวของเลือดของพิษงูแมวเซา	50
7	แสดงผลของพิษงูแมวเซา ฟอสฟอไลเปสเอทูจากพิษงูแมวเซา พิษงูแมวเซากับแอนตี – ฟอสฟอไลเปสเอทู และฟอสฟอไลเปสเอทูจากพิษงูแมวเซากับแอนตี – ฟอสฟอไลเปสเอทู ในการทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณ	55
8	แสดงความสามารถในการยับยั้งฟอสฟอไลเปสเอทูแอคติฟวิตีในส่วนต่าง ๆ ของพิษงูแมวเซา โดย แอนตี – ฟอสฟอไลเปสเอทู ที่ได้จากเซรุ่มของกระต่าย ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยพิษงูส่วนต่าง ๆ และแอนตี – วีนัม จากม้า	59

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ		หน้า
1	แสดงการย่อยฟอสฟอไลปิดด้วยเอนไซม์ฟอสฟอไลเปสเอทู	3
2	แสดงลักษณะทั่วไปของงูแมวเซา	8
3	แสดงกลไกการเกิดลิ่มเลือด	9
4	แสดงส่วนของพิษงูโครตาลัสที่แยกได้	12
5	แสดงส่วนของโปรตีนจากพิษงูแมวเซาที่แยกด้วย DEAE cellulose column	14
6	แสดงตำแหน่งของหลุมรุ้นที่เจาะสำหรับใช้ในการทดสอบ ดับเบิล อิมมูโนดิฟฟิวชัน	31
7	แสดงส่วนของโปรตีนที่ได้จากการผ่านพิษงูแมวเซา 0.2 กรัม ลงในคอลัมน์ เซฟาเดกซ์ จี - 75 ขนาด 2.6 × 70 เซนติเมตร	37
8	แสดงรูปแบบของโปรตีนในพิษงูแมวเซาที่วิเคราะห์โดย ดิส อะคริลาไมด์ อิเลคโตรฟอริซีส	39
9	แสดงส่วนของโปรตีนที่ได้จากการผ่านพิษงูแมวเซาส่วนที่ II 57 มิลลิกรัม ลงในคอลัมน์ ซีเอ็ม - เซฟาเดกซ์ ซี - 50 ขนาด 2.6 × 40 เซนติเมตร	41
10	แสดงการหาค่าฟอสฟอไลเปสเอทูแอคติฟวิตี คิดเป็นไมโครกรัมของพิษงูที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก 50 %	44
11	แสดงการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณ เมื่อฉีดพิษงูแมวเซาที่ใต้ผิวหนังของกระต่าย	52
12	แสดงการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณ เมื่อฉีดพิษงูแมวเซาและพิษงูแมวเซากับแอนตี - ฟอสฟอไลเปสเอทู แล้วทำ biopsy	53

ภาพประกอบ หน้า

13 แสดงพริบิทิน ลายน์ ที่ได้จากการฉีดกระตุ้นกระต่ายด้วยพิษงูในส่วน
ที่มีฟอสฟอไลเปสเอทู แอคติฟวิตี โดยวิธี ดับเบิล อิมมูโนดิฟฟิวชัน 57

บทที่ 1

บทนำ

คำนำ

นับแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน งูได้เข้ามามีบทบาทเกี่ยวข้องกับมนุษย์มาก ซึ่งจะมีบทบาทในทางให้โทษมากกว่าให้คุณ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มงูพิษ ซึ่งมีอยู่ด้วยกันหลายชนิด ที่ก่อให้เกิดปัญหา ทางด้านสวัสดิภาพและความปลอดภัยของประชากรโลก ไม่ว่าจะเป็นประเทศที่พัฒนาแล้วหรือที่กำลังพัฒนา จากรายงานของ ทูและทูม (สัณห์ พณิชยกุล 2510 : 1 อ้างอิงมาจาก To and Toom. 1966 : unpage) รายงานว่า ประเทศที่พัฒนาแล้ว เช่น สหรัฐอเมริกา มีคนถูกงูกัดประมาณปีละ 300 - 500 คน ในขณะที่ประเทศต่าง ๆ ในแถบตอนใต้ของเอเชียและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้พบว่ามีคนถูกงูกัดถึงปีละ 25,000 ถึง 35,000 คน

งูเป็นสัตว์เลื้อยคลาน จัดอยู่ใน Class : Reptilia, Subclass : Symatosausia, Order : Squamata, Suborder : Serpentes รูปร่างลักษณะภายนอกเป็นทรงกระบอกเรียวยาว หางมักจะเรียวเล็ก ไม่มีระยาง ไม่มีเปลือกตา และไม่มีช่องหูเปิด ห่อหุ้มด้วยผิวหนังที่มีเกล็ด (บุญเยือน ทุมวิภาต และวิโรจน์ นุตพันธุ์ 2525 : 2)

งูมีอยู่มากมายหลายชนิด กระจัดกระจายอยู่ทั่วไปตามที่ต่าง ๆ บนพื้นโลก ซึ่งมีอยู่ไม่น้อยกว่า 2,300 ชนิด เมื่อพิจารณาตามโครงสร้างของกระดูก ลำตัว ส่วนหัว และลักษณะภายนอกอื่น ๆ ทำให้จัดแบ่งงูออกได้เป็น 23 วงศ์ ในจำนวนนี้จัดเป็นงูพิษได้ 4 วงศ์ มีประมาณ 300 - 400 ชนิด ได้แก่

1. Elapidae แบ่งเป็น 23 สกุล มีงูพิษประมาณ 200 ชนิด ตัวอย่าง เช่น งูเห่า งูเห่าพ่นพิษ งูสามเหลี่ยม เป็นต้น

2. Viperidae แบ่งเป็น 15 สกุล มีงูพิษประมาณ 69 ชนิด ตัวอย่าง เช่น งูแมวเซา Vipera aspis ที่พบในประเทศฝรั่งเศส เป็นต้น

Crotalidae แบ่งเป็น 6 สกุล มีงูพิษประมาณ 77 ชนิด ตัวอย่าง เช่น งูกะปะ งูเขียวหางไหม้ เป็นต้น

4. Hydrophiidae หมายถึง งูพิษทุกชนิด ที่อาศัยอยู่ในทะเล ตัวอย่าง เช่น งูคออ่อน งูชายธง งูผ้าขี้ริ้ว เป็นต้น (บุญเยือน ทุมวิภาต และวิโรจน์ นุตพันธุ์ 2525 : 10).

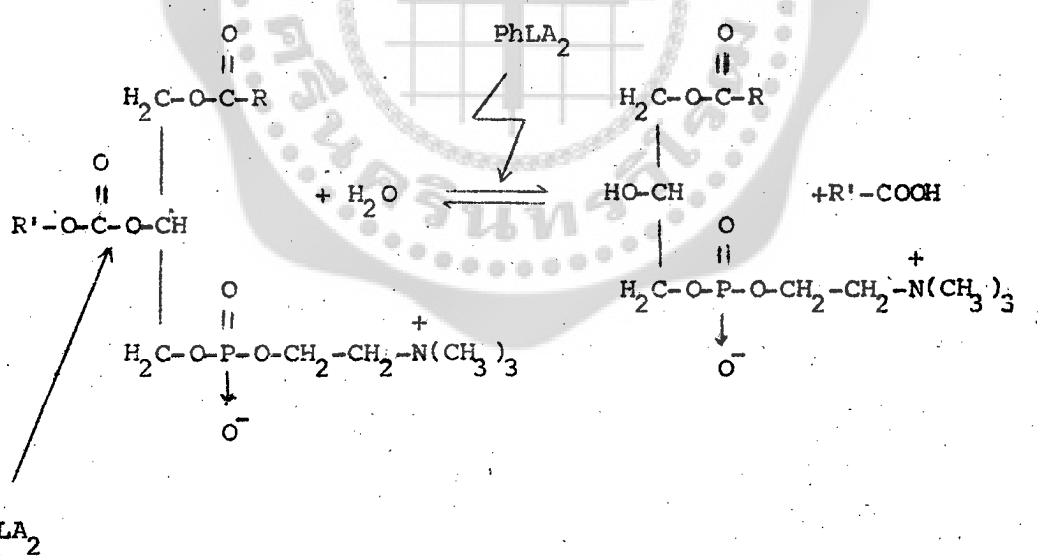
ลักษณะพิเศษของงูพิษที่ต่างจากงูธรรมดาคือ งูพิษจะต้องมีเขี้ยว ซึ่งมีท่อต่อไปสู่ต่อมพิษ เมื่องูกัดเหยื่อ กล้ามเนื้อรอบต่อมพิษจะบีบตัว ทำให้น้ำพิษไหลออกจากต่อมไปสู่เขี้ยว ฉะนั้น รอยแผลของผู้ที่ถูกงูพิษกัด จะต้องมีจุดสองจุด ซึ่งแสดงถึงรอยเขี้ยวและอาจมีเลือดซึม ส่วนงูที่ไม่มีพิษจะไม่มีเขี้ยว แผลที่มองเห็นจึงเป็นเพียงรอยถากหรือถลอกเท่านั้น (มุกดา ตฤษณานนท์ 2529 : 2)

ในประเทศไทยมีงูพิษหลายชนิด อยู่กระจายทั่วไป แต่ความชุกชุมของงูพิษแต่ละชนิดอาจแตกต่างกันไป เช่น งูกะปะมีชุกชุมทางภาคใต้ ส่วนทางภาคกลาง งูที่ชุกชุม คือ งูเห่า และงูแมวเซา

ตามรายงานที่ได้จากโรงพยาบาลอภัยภูเบศร จังหวัดปราจีนบุรี พบว่า ผู้ที่ถูกงูแมวเซากัด ส่วนมาก เป็นกสิกรชาวนา คือ 63 รายในจำนวน 66 ราย จะถูกกัดมากในช่วงฤดูฝน ซึ่งตรงกับช่วงฤดูไถหว่าน ดำนา ผู้ป่วยเกือบทั้งหมดจะถูกกัดที่เท้า ผู้ป่วยที่ถูกงูแมวเซากัด จะมีอาการเลือดออกผิดปกติ เลือดออกตามไรฟัน อาเจียนเป็นเลือด ปัสสาวะ อุจจาระเป็นเลือด มีเลือดกำเดาออก มีจ้ำเลือดตามผิวหนัง ไอเป็นเลือด มีเลือดออกในสมอง (จุล กาญจนเจตนี 2525 : 1 - 5) และเนื่องจากแผลที่ถูกงูแมวเซากัด จะมีพิษแทรกเข้าถึงชั้นใต้ผิวหนัง ทำให้ผิวหนังรอบ ๆ แผล และรอยถูกกัดเปลี่ยนเป็นสีคำคล้ำ ถ้าได้รับพิษมากรอยนี้จะกระจายเป็นบริเวณกว้าง เกิดตุ่มใสและรอยพองที่บริเวณแผลและที่อื่น ๆ ของร่างกาย เมื่อตุ่มแตก เนื้อเยื่อบริเวณนั้นจะเป็นเนื้อตาย (local tissue necrosis) อาการเนื้อเยื่อตายเฉพาะบริเวณนี้จะเกิดขึ้นร้อยละ 10 - 50 ของคนที่ถูกงูแมวเซากัด ส่วนคนที่ถูกงูเห่ากัดจะเกิดอาการนี้ทุกคน และถ้ามีการติดเชื้อแทรกซ้อน แผลจะขยายกว้างและกินลึกจนยากแก่การรักษา งูแมวเซาตัวหนึ่ง ๆ มีปริมาณพิษที่จะปล่อยออกมาในการกัดคนแต่ละครั้ง ประมาณ 72 มิลลิกรัม หากร่างกาย

ได้รับพิษเพียง 47 มิลลิกรัม ก็จะทำให้ตายได้ (บุญเยือน ทุมวิภาค และวิโรจน์ บุตพันธุ์ 2525 : 82)

พิษงูแมวเซาประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดที่เป็นพิษ ที่สำคัญได้แก่ แฟคเตอร์เท็น แอคติฟเวเตอร์ (factor x activator) ไคนิโนจีเนส (kinenogenase) ฮิสตามีริค - เรลีอาซิง (histameric - releasing) โปรตีนเนส (Proteinas) และฟอสฟอไลเปสเอทู (phospholipase A_2) (จุล กาญจนเจตนี 2529 : 2) ในการวิจัยครั้งนี้ จะศึกษาคุณสมบัติเอนไซม์ฟอสฟอไลเปสเอทู เอนไซม์นี้มีชื่อเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า เลซิธิเนส (lecithinase) จะไปเปลี่ยนเลซิธิน (lecithin) ให้เป็นไลโซเลซิธิน (lysolecithin) สารนี้มีผลไปทำให้ผนังเซลล์เม็ดเลือดแดง และผนังเซลล์ของเนื้อเยื่ออื่น ๆ ในร่างกายถูกทำลาย เช่น เนื้อเยื่อที่ไต เนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ เป็นต้น (Zeller. 1948 : 146) ซิงเกอร์ (Singer. 1971 : 459) ได้เสนอสมการแสดงการย่อยฟอสฟอไลปิด โดยเอนไซม์ฟอสฟอไลเปสเอทู ตามภาพประกอบ 1



$PhLA_2$ = Phospholipase A_2

ภาพประกอบ 1 แสดงการย่อยสลายฟอสฟอไลปิดด้วยเอนไซม์ฟอสฟอไลเปสเอทู (Singer. 1971 : 146)

การย่อยฟอสฟอไลปิดโดยฟอสฟอไลเปสเอทูนี้เอง จะทำลายผนังเซลล์เม็ดเลือดแดงและผนังเซลล์อื่น ๆ ซึ่งมีฟอสฟอไลปิดเป็นองค์ประกอบอยู่ และเมื่อทำงานร่วมกับเอนไซม์โปรตีนเนส จะไปทำลายผนังเซลล์เส้นเลือดฝอย ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดอาการตกเลือด (Haemorrhage) เกิดการพุพองและการตายของเนื้อเยื่อ (Slotta. 1955 : 422 Suzuki and Iwanaga. 1970 : 193) นอกจากนี้ ยังมีผลทำให้เกิดความดันเลือดต่ำด้วย (Feldberg and Kellaway. 1937 : 257 Ho and Lee. 1981 : 181)

จากการศึกษาค้นคว้าโดย จุล กาญจนเจตนี (จุล กาญจนเจตนี 2525 : 1 - 5) พบว่า ผู้ที่ถูกงูแมวเซากัด จะมีผลทางระบบโลหิตและยังทำลายเนื้อเยื่อ เช่น ที่ไต อันเป็นผลทำให้เกิดไตวาย และถึงแก่ความตายในที่สุด ทั้งยังเกิดการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณ ทั้งหมดที่เกิดขึ้นนี้ คาดว่าเป็นผลของเอนไซม์ฟอสฟอไลเปสเอทู ซึ่งมีอยู่เป็นปริมาณมากในพิษงูแมวเซา จึงน่าสนใจที่จะศึกษาเอนไซม์นี้จากพิษงูแมวเซา เพราะยังไม่มีผู้ศึกษาลึกในรายละเอียด โดยเฉพาะอย่างยิ่งการผลิตแอนตี - ฟอสฟอไลเปสเอทู (anti - phospholipase A_2) เพื่อทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์ฟอสฟอไลเปสเอทู และพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการรักษาผู้ที่ถูกงูแมวเซากัด ในโอกาสต่อไป

<u>ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า</u>

1. เพื่อแยกและศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ฟอสฟอไลเปสเอทูที่แยกได้จากพิษงูแมวเซา

2. เพื่อผลิต แอนตี - ฟอสฟอไลเปสเอทู จากฟอสฟอไลเปสเอทูที่แยกได้จากพิษงูแมวเซา

3. เพื่อศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งฟอสฟอไลเปสเอทูแอคทิฟวิตี โดย แอนตี - ฟอสฟอไลเปสเอทู ที่ผลิตได้

ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า

1. ผลของการศึกษาทำให้ทราบถึงความเป็นพิษของพิษงูแมวเซา ในส่วนที่มีฟอสฟอไลเปสเอทูแอคติฟวิตี โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อระบบโลหิตและเนื้อเยื่อของสัตว์ทดลอง

2. เพื่อให้ได้ แอนตี - ฟอสฟอไลเปสเอทูที่สามารถยับยั้งฟอสฟอไลเปสเอทูแอคติฟวิตี ในพิษงูแมวเซา

ขอบข่ายของการศึกษาค้นคว้า

การศึกษาครั้งนี้ ใช้พิษงูแมวเซาไทย ที่ได้จากแผนกวิจัยและตรวจ กองวิทยาศาสตร์ สภากาชาดไทย เป็นพิษงูที่เก็บจากงูแมวเซาหลายตัวรวมกัน แล้วทำให้แห้งโดยใช้เครื่องมือไลโอฟิไลเซอร์ (Lyophilizer)

คำนิยามศัพท์เฉพาะ

1. เจล ฟิลเตรชัน (gel filtration) หมายถึง เทคนิคการแยกสารทางชีวเคมี โดยอาศัยความแตกต่างของขนาดโมเลกุลของสารที่ต้องการแยก

2. โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรฟอรีซีส (polyacrylamide gel electrophoresis) หมายถึง เทคนิคในการวิเคราะห์ แยกและทดสอบความบริสุทธิ์ของสารชีวโมเลกุล โดยอาศัยการเคลื่อนที่ของสารชีวโมเลกุลที่มีประจุไฟฟ้าแตกต่างกันในสนามไฟฟ้า

3. วอยด์ โวลุม (void volume) หมายถึง ปริมาตรของช่องว่างระหว่างเจล ภายในคอลัมน์ เจล ฟิลเตรชัน

4. ฟอสฟอไลเปสเอทูแอคติฟวิตี (phospholipase A_2 activity) หมายถึง ความสามารถในการออกฤทธิ์หรือคุณสมบัติของเอนไซม์ฟอสฟอไลเปสเอทู ที่มีต่อสารที่จะถูกเอนไซม์ฟอสฟอไลเปสเอทูย่อย ซึ่งสารที่ใช้ในการวิจัยนี้คือ ไข่แดง

5. แอนตี - วีนัม (anti - venom) หมายถึง เซรุ่มที่เก็บได้จากสัตว์ทดลองภายหลังจากที่ได้ฉีดกระตุ้น (immunize) สัตว์ทดลองด้วยพิษงู ซึ่งสามารถยับยั้งความเป็นพิษของพิษงู ในการวิจัยนี้ จะได้แอนตี - ฟอสฟอไลเปสเอทูจากการฉีดกระตุ้นกระต่ายด้วยฟอสฟอไลเปสเอทู

6. พรีซิพิติน ลายน์ (precipitin line) หมายถึง แนวตะกอนที่ปรากฏขึ้น เนื่องจากแอนติบอดีย์ (ในที่นี้คือแอนตี - ฟอสฟอไลเปสเอทู) เข้าทำปฏิกริยากับแอนติเจน (ในที่นี้หมายถึง ฟอสฟอไลเปสเอทู) และการที่เกิดเป็นแนว ก็เนื่องมาจากการทดลองนี้ ได้บรรจุแอนติบอดีย์ และแอนติเจนในแผ่นวุ้นเดียวกัน แต่อยู่ห่างกัน จึงเกิดการเหนี่ยวนำแพร่เข้าหากันเป็นแนว

7. ไลโอฟิไลเซอร์ (lyophilizer) หมายถึง เครื่องมือที่ใช้ทำพิษงูที่เป็นของเหลวให้แห้งเป็นของแข็ง โดยวิธีทำแห้งที่เรียกว่า freeze drying คือการทำให้น้ำหมดไปจากพิษงู

8. แอลดี - 50 (LD_{50}) หมายถึง ปริมาณพิษงูที่สามารถทำให้หนูขาวหนัก 18 กรัม ตาย 50 % ของจำนวนหนูขาวทั้งหมดที่ใช้ในการทดลอง

บทที่ 2

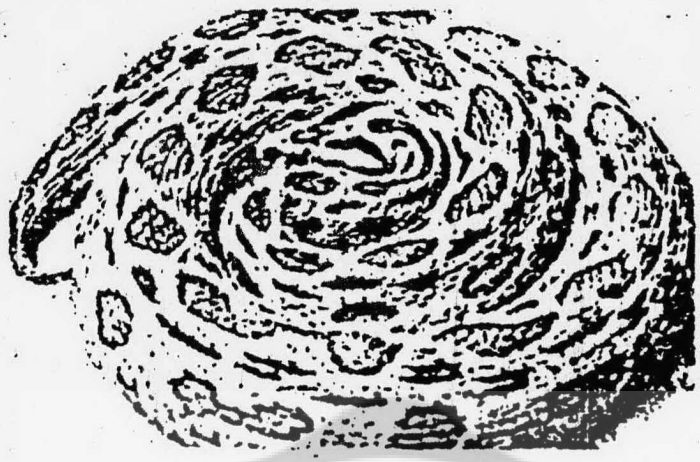
ทฤษฎีและเอกสารที่เกี่ยวข้อง

ลักษณะทั่วไปและธรรมชาติของงูแมวเซา

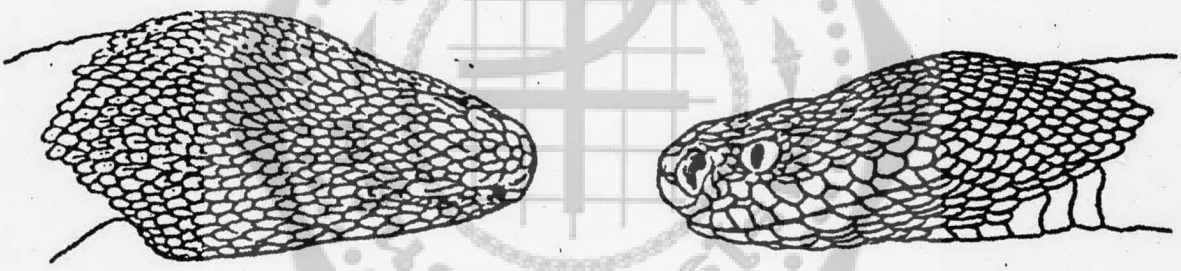
งูแมวเซา เป็นงูชนิดเดียวในวงศ์ Viperidae ที่มีในประเทศไทย มีชื่อสามัญว่า Siamese Russel Viper มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า Vipera russellii Siamensis, M. Smith งูแมวเซาที่โตเต็มที่ยาวประมาณ 758 มิลลิเมตร (หัวยาว 43 มิลลิเมตร ตัวยาว 583 มิลลิเมตร และ หางยาว 132 มิลลิเมตร) หัวเป็นรูปสามเหลี่ยมคอเล็ก หางสั้น มีเขี้ยวยาวโง้ง ยื่นจากกระดูกขากรรไกรบนด้านหน้าของปาก และเขี้ยวนี้สามารถยื่นยาวออกมาและพับเก็บได้ ลำตัวสีน้ำตาล มีลายเป็นรูปวงแหวนสีน้ำตาลแก่เกือบดำ เรียงเป็นแนวตลอดความยาวของลำตัวเป็นสามแถบ ขนานกัน คือ แถบบนหลัง และสองข้างลำตัว (ภาพประกอบ 2) งูแมวเซาเคลื่อนไหวช้า มักทำเสียงขู่เมื่อมีศัตรูเข้าใกล้ เสียงขู่นั้นดังยาวคล้ายเสียงลมยางรถยนต์รั่ว ชอบขดตัวนอนตามซอกหิน โพรงดิน และในกอหญ้าใหญ่ ๆ มักออกหากินเวลากลางคืน และเวลากลางวันของวันที่มีอากาศเย็น เป็นงูที่ออกลูกเป็นตัว ครั้งละ 30 - 45 ตัว งูแมวเซามีชุกชุมในภาคกลาง เช่น นครนายก ลพบุรี สระบุรี ชัยนาท และปราจีนบุรี (บุญเยือน ทุมวิภาต และวิโรจน์ นุตพันธุ์ 2525 : 80 จุล กาญจนเจตนี 2529 : 1)

การศึกษาความเป็นพิษของพิษงูแมวเซา

การศึกษาความเป็นพิษของพิษงูแมวเซา เริ่มต้นในคริสตศตวรรษที่ 19 แลมป์และเพื่อน (สัณห์ พาณิชยกุล 2510 : 5 - 6 อ้างอิงมาจาก Lamp et al. 1905 : unpage) ได้ศึกษาการออกฤทธิ์ของพิษงูแมวเซาในประเทศอินเดีย พบว่าการออกฤทธิ์ของพิษงู จะเกิดขึ้นได้สองแบบ ในภาวะที่แตกต่างกันไปตามขนาด (dose) ของพิษงูที่ฉีดเข้าไปในสัตว์ทดลอง คือ ถ้าฉีดพิษงูเข้าไปในสัตว์ทดลองด้วยขนาดที่สามารถทำให้สัตว์ตายอย่างรวดเร็ว โดยฉีดเข้าทางเส้นเลือดแล้วสัตว์ทดลองจะตายทันที เมื่อ

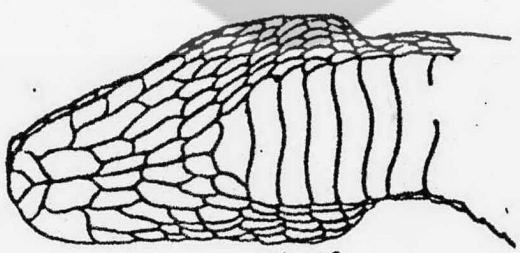


แสดงรูปร่างงูแมวเซา



แสดงส่วนหัวด้านบน

แสดงส่วนหัวด้านข้าง

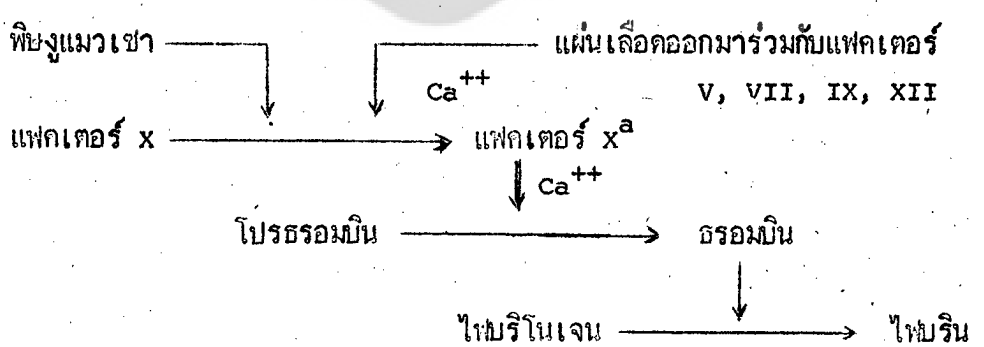


แสดงส่วนหัวด้านล่าง

ภาพประกอบ 2 แสดงลักษณะทั่วไปของงูแมวเซา (Siamese Russel Viper)
(บุญเยือน ทุมวิภาค วิโรจน์ นุตพันธุ์ 2525 : 65)

ตรวจดูจะพบการแข็งตัวของเลือดตั้งตามเส้นเลือด (intravascular clotting) เพียงอย่างเดียว แต่ถ้าฉีดเข้าทางใต้ผิวหนัง (subcutaneous injection) ด้วยขนาดที่ไม่ทำให้สัตว์ทดลองตายทันที จะพบว่า สัตว์จะมีอาการแบบเรื้อรัง ต่อมาจะมีอาการตกเลือด บวม และมีน้ำขังภายใต้ผิวหนัง (oedema) ในการหาค่าความสามารถในการขจัดพิษหรือต่อต้านพิษงู (neutralizing power) โดยใช้แอนตี - วีนัมนั้น ได้ทำการทดลองทั้งในร่างกายที่มีชีวิต (in vivo) และในหลอดทดลอง (in vitro) พบว่าการทดลองที่จะได้ผลแน่นอนนั้น ต้องทำการทดลองในร่างกายของสัตว์ทดลองที่มีชีวิต และค่านี้จะเปลี่ยนแปลงไปเสมอ แม้ในสัตว์ทดลองชนิดเดียวกัน ดังนั้น ก่อนจะนำแอนตี - วีนัมมาใช้ ควรมีการตรวจหาค่าความสามารถในการขจัดพิษทุกครั้ง ซึ่งวิธีนี้ถือปฏิบัติมาจนถึงทุกวันนี้ (Anderson. 1932 : 1) ในการศึกษาคุณสมบัติของพิษงูแมวเซาวิธีหนึ่งโดยทดสอบในหลอดทดลอง พบว่าพิษงูแมวเซา เมื่อทำให้เจือจาง 5,000,000 ถึง 10,000,000 เท่า จึงจะหมดฤทธิ์ในการเร่งการแข็งตัวของเลือด (Taylor et al. 1935 : 103)

แกงกูลี (Ganguly. 1936 : 913) ได้อธิบายกลไกการทำงานของพิษงูแมวเซาในการเร่งการแข็งตัวของเลือดว่า พิษงูจะไปทำลายผนังแผ่นเลือด ทำให้แผ่นเลือดแตก แล้วจึงปล่อยธรอมโบไคเนส (thrombokinese) หรือธรอมโบพลาสติน (thromboplastin) ออกมา จึงไปทำให้เกิดการแข็งตัวของเลือด



ภาพประกอบ 3 แสดงกลไกการเกิดลิ่มเลือด

(ดัดแปลงจาก จุล กาญจนเจตนี 2529 : 4)

กลไกการเกิดลิ่มเลือด (blood coagulation) โดยพิษงูแมวเซานั้น จุล กาญจนเจตนี (จุล กาญจนเจตนี 2525 : 3) ได้อธิบายไว้ว่า เป็นสาเหตุสำคัญ ที่ทำให้ผู้ป่วยถึงแก่ความตาย อันเกิดจากการกระทำของ factor X activator ที่มีอยู่ในพิษงูแมวเซา ไปกระตุ้น factor X ทำให้เกิด active factor X(X^a) ซึ่งจะเป็นตัวไปเปลี่ยนโปรธรอมบินให้เป็นธรอมบิน แล้วธรอมบินจะไปเปลี่ยนไฟบริโนเจนให้เป็นไฟบริน (ภาพประกอบ 3) เป็นสาเหตุให้เกิดลิ่มเลือดขึ้นในร่างกาย ลิ่มเลือดนี้จะไปขัดขวางการไหลเวียนของโลหิต เป็นผลให้อวัยวะต่าง ๆ ขาดเลือด ขาดออกซิเจน เกิดภาวะไม่ทำงาน ที่สำคัญคือ ที่ไต ขณะเดียวกัน ผลของการเกิดลิ่มเลือด เป็นเหตุให้ปัจจัยการแข็งตัวของเลือดถูกใช้ไป โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ไฟบริโนเจน และแผ่นเลือดลดต่ำลง ทำให้เกิดภาวะเลือดออกอย่างรุนแรง นอกจากนี้ยังพบอาการป่วยอื่น ๆ ต่อไตในรายที่ถูกงูแมวเซากัด คือ เกิดอาการต่าง ๆ ตั้งแต่ กลุ่มเส้นเลือดฝอยบริเวณส่วนต้นของไตอักเสบ (glomerulitis) เส้นเลือดอาร์เทอรีอักเสบ (arteritis) เกิดการตายของเนื้อเยื่อท่อไต (tubular necrosis) การตายของเนื้อเยื่อหุ้มไต (certical necrosis) หลอดโลหิตที่ไตอุดตัน ทำให้เนื้อเยื่อบริเวณนั้นตาย (renal infarction) และสุดท้ายจะเกิดภาวะไตวาย (acute renal failure) ซึ่งจะทำให้ผู้ป่วยถึงแก่ความตาย อาการต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นจนกระทั่งผู้ป่วยถึงแก่ความตาย อาจเกิดขึ้นภายในเวลาอันรวดเร็ว คือ ประมาณ 3 - 24 ชั่วโมง หลังจากถูกงูกัด (จุล กาญจนเจตนี 2525 : 4 - 5)

ในการแตกหรือการสลายตัวของแผ่นเลือด พบว่าเอนไซม์ฟอสฟอไลเปสเอทูที่มีในพิษงูแมวเซา งูเห่า และงูอื่น ๆ อีกหลายชนิด เป็นต้นเหตุที่ทำให้เยื่อหุ้มแผ่นเลือดเปลี่ยนรูปร่างไป (Condrea. et al. 1967 : 95 - 98)

<u>การศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับเอนไซม์ฟอสฟอไลเปสเอทูจากพิษงู</u>

เอนไซม์ฟอสฟอไลเปสเอทู (3.1.1.4) มีชื่อเรียกตามระบบสากลว่า ฟอสฟาไทด์ เอซิล ไฮโดรเลส (Phosphatide acyl hydrolase) มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 11,000 - 15,000 (Slotta and Franenkel - Conrat. 1938 : 1076 - 1081)

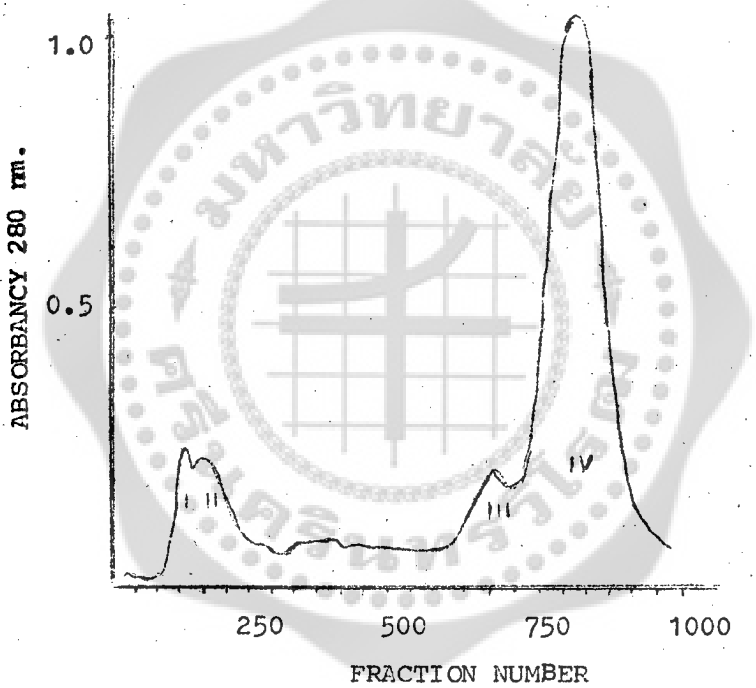
ในการค้นคว้าก่อนปี 2493 มักอธิบายไว้เพียงแต่ว่า ฟอสฟอไลเปสเอทูเป็นเอนไซม์ที่มีส่วนร่วมในการทำงานของพิษงูมากที่สุด แต่ที่เตรียมขึ้นมาใช้ในการศึกษายังไม่บริสุทธิ์เท่าที่ควร และการย่อยฟอสฟอไลปิดที่กระทำโดยฟอสฟอไลเปสเอทู ก็ยังไม่มีการวัดค่าแน่นอนชัดเจน แต่ในระยะต่อมา การค้นคว้า และแนวความคิดเกี่ยวกับเอนไซม์ฟอสฟอไลเปสเอทู ได้เปลี่ยนไปอย่างรวดเร็ว จากการศึกษาพิษงูเห่าได้หวัน พบว่า เอนไซม์ฟอสฟอไลเปสเอทูที่ได้จากพิษของงูชนิดนี้ มีค่าปริมาณพิษต่ำสุดที่ทำให้สัตว์ทดลองตาย (minimum lethal dose) ในหนู ประมาณ 0.1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักหนู 1 กิโลกรัม (Sasaki. 1957 : 845 - 847) และฟอสฟอไลเปสเอทูที่พบในงูเห่าและงูแมวเซา มี 3 ชนิด ซึ่งต่างก็มีโปรตีนที่มีฟอสฟอไลเปสเอทูแอคติฟวิตี ซึ่งพบว่าเป็นเบส 1 ชนิด และเป็นกรด 2 ชนิด และยังพบอีกว่ามีชนิดที่เป็นเบสเท่านั้นที่เป็นพิษ ส่วนชนิดที่เป็นกรดจะไม่เป็นพิษในตัวของมันเอง (Dolori. 1971 : 941 - 942)

<u>การแยกพิษงูแมวเซาและงูอื่น ๆ เพื่อการศึกษาคุณสมบัติ ฟอสฟอไลเปสเอทู</u>

1. การแยกพิษงูแมวเซาชนิด Indian Russell's Viper ที่ได้จากสถาบันฮอฟกิน (Haffkine Institute) บอมเบย์ โดยใช้ เจล เซฟาเดกซ์ จี - 75 พบว่าได้โปรตีนที่มีฟอสฟอไลเปสเอทูแอคติฟวิตี 2 ส่วน คือ ส่วนที่ 2 และ 3 และเมื่อนำไปทดสอบโดยฉีดเข้าใต้ผิวหนังของกระต่าย พบว่า เนื้อเยื่อบริเวณผิวหนังของกระต่ายที่ถูกฉีดด้วยพิษงูทั้งสองส่วน ถูกทำลาย เป็นสะเก็ดดำ (Dimitrov and Kankonker. 1968 : 213)

2. ฮวงและลี (Huang and Lee. 1984 : 207) ได้แยกพิษงูแมวเซา (<u>Vipera russelli</u>) ที่ได้จากสวนและห้องทดลองแอสติก (Astik farm and Laboratory) บอมเบย์ ประเทศอินเดีย โดยใช้เจล เซฟาเดกซ์ จี - 75 ได้พิษงูแยกเป็น 5 ส่วน นำมาทดสอบ พบว่า ส่วนที่ 2 และ 3 เป็นส่วนที่มีฟอสฟอไลเปสเอทูแอคติฟวิตีสูงกว่าส่วนอื่น ๆ ที่แยกได้ คือมีค่าถึง 213 และ 293 ไมโครโมลต่อวินาทีต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ ในขณะที่ส่วนอื่น ๆ มีค่าไม่ถึง 50 ไมโครโมลต่อวินาทีต่อมิลลิกรัม และพบว่าทั้งสองส่วนนี้ มีค่า แอลดี - 50 เกือบเท่ากัน และเกือบเท่ากับพิษงูที่ยังไม่ได้แยก

3. ฮานาชิโร และคนอื่น ๆ (Hanashiro and others. 1978 : 750) ได้แยกพิษงูโครตาลัส ชนิด งูหางกระดิ่ง อเมริกาใต้ (Crotalus durissus terificus) จากสถาบัน บูตันตัน (Institute Butantan) ประเทศบราซิล โดยใช้ ซีเอ็ม - เซฟาเดกซ์ ซี - 50 และชะด้วยสารละลายแอมโมเนียม ฟอร์เมต บัฟเฟอร์ พีเอช 3.5 พิษงูที่แยกได้ในครั้งนี้มี 4 ส่วน (ภาพประกอบ 4) และเมื่อนำมาหาค่า ฟอสฟอไลเปสเอทูแอคติวิตี พบว่า พิษงูในส่วนที่ II และ IV เท่านั้นที่มีฟอสฟอไลเปสเอทูแอคติวิตี



ภาพประกอบ 4 แสดงส่วนของพิษงูโครตาลัสที่แยกได้โดย ซีเอ็ม - เซฟาเดกซ์ ซี - 50 (Hanashiro and others. 1978 : 750)

เมื่อนำส่วนที่ II และ IV มาเตรียม แอนตี - ฟอสฟอไลเปสเอทู แล้วนำมายับยั้งพิษโครทอกซิน และพิษงูโครตาลัส ก็สามารถยับยั้งได้ ดังตาราง 1

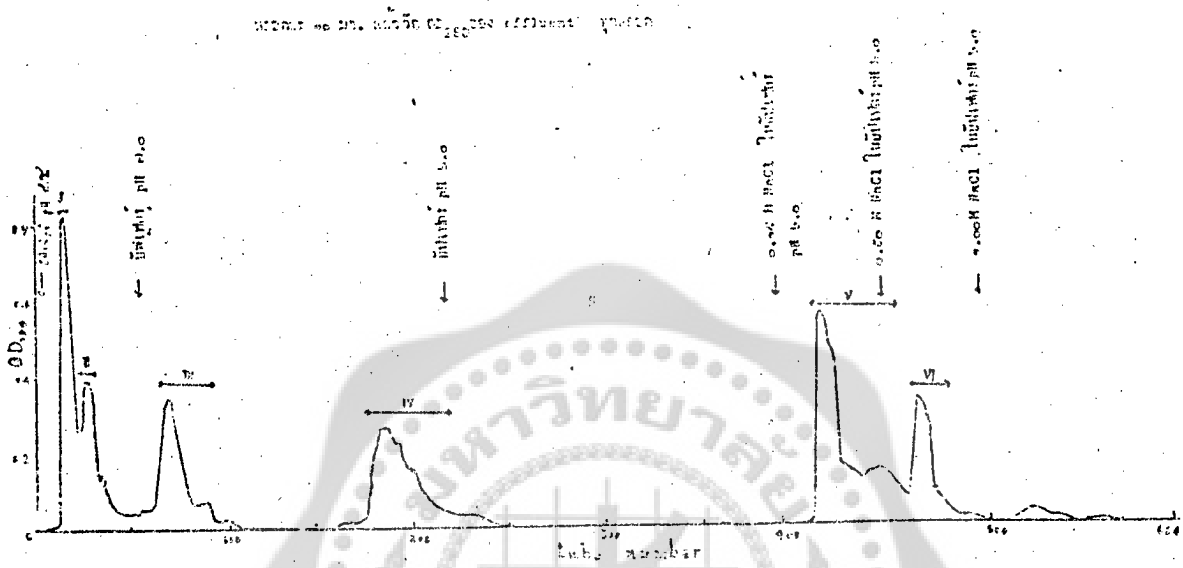
Toxic material[a]	Per cent mortality 24 hr after i.p. inoculation, µg							
	1	2.90	4.40	5	6.32	7.50	10	11.44
Crotoxin								
No serum	50	100	100		100			
50 µl serum		0	0		100			
Crude venom								
No serum	50			100		100	100	100
50 µl serum				0		0	58	100

[a] LD_{50} = 0.070(0.056-0.088)mg/kg for crotoxin and 0.092(0.079-0.107) mg/kg for crude venom 24 hr after intraperitonial inoculation in mice.

ตาราง 1 แสดงการยับยั้งฟอสฟอไลเปสเอทูแอคติฟวิตีในโครทอกซินและพิษงูโครตาลัส โดยแอนตี - ฟอสฟอไลเปสเอทู ที่ได้จากพิษงูโครตาลัส

4. สัณห์ พณิชยกุล (สัณห์ พณิชยกุล 2510 : 1 - 5) ได้แยกพิษงูแมวเซา Vipera russellii Siamensis, M. Smith โดยใช้ DEAE cellulose column ซึ่งแยกได้ 7 ส่วน เมื่อนำแต่ละส่วนมาวัดความเป็นพิษต่อสัตว์ทดลอง พบว่ามีอยู่ 5 ส่วน ที่เป็นพิษต่อสัตว์ทดลอง และมีส่วนที่ 5 มีความเป็นพิษสูงกว่าส่วนอื่น ๆ และยังพบว่าในส่วนที่ 5 นี้ มีค่าฟอสฟอไลเปสแอคติฟวิตีสูงมากด้วย

5. ชัยฤทธิ์ โพธิสุข (ชัยฤทธิ์ โพธิสุข 2515 : 20) ได้แยกพิษงูแมวเซา (Viper russellii Siamensis, M. Smith) โดยใช้ DEAE cellulose column ซึ่งแยกได้ 6 ส่วน (ภาพประกอบ 5) และได้นำส่วนทั้งหมดมาศึกษาความเป็นพิษของเอนไซม์ในทุกส่วน



ภาพประกอบ 5 แสดงส่วนของโปรตีนจากพิษงูแมวเซาที่แยกด้วย DEAE cellulose column

(ชัยฤทธิ์ โพธิสุข 2515 : 37)

บทที่ 3

การดำเนินการทดลอง

1. <u>การแยกพิษงูแมวเซา โดยวิธี เจล ฟิลเตรชัน คอลัมน์โครมาโตกราฟี</u> (Huang and Lee. 1984 : 207)

<u>สารเคมี</u>

1. พิษงูแมวเซาที่ได้จากแผนกวิจัยและตรวจ กองวิทยาศาสตร์ สภากาชาดไทย เป็นพิษที่รวบรวมจากงูหลายตัว และนำมาทำให้แห้ง

2. เจล เซฟาเดกซ์ จี - 75 (gel Sephadex G - 75)

3. สารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมอะซิเตต ความเข้มข้น 0.03 โมลาร์ พีเอช 6.5

<u>อุปกรณ์</u>

1. คอลัมน์ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.6 เซนติเมตร ยาว 70 เซนติเมตร ของบริษัท Pharmacia Fine Chemical ประเทศสวีเดน

2. เครื่องเก็บแยกส่วน (fractional collector) ของบริษัท LKB ประเทศสวีเดน

3. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ของบริษัท Beckman model DU - 6 ประเทศสหรัฐอเมริกา

<u>วิธีดำเนินการทดลอง</u>

1. บรรจุส่วนผสมเซฟาเดกซ์ จี - 75 ลงในคอลัมน์ จนได้ความสูงของเจล 60 เซนติเมตร

2. ผ่านคอลัมน์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมอะซิเตต 0.03 โมลาร์ พีเอช 6.5 ประมาณ 2 เท่าของปริมาตร เจล ที่บรรจุในคอลัมน์

3. ผ่านคอลัมน์ด้วย บลูเดกซ์แตรน (blue dextran) ที่มีความเข้มข้น 2 % เพื่อหาวอยด์ โวลุม

4. ละลายพิษงูแมวเซา ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมอะซิเตต 0.03 โมลาร์ พีเอช 6.5 จนได้พิษงูที่มีความเข้มข้น 5 %

5. ผ่านสารละลายพิษงู 4 ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ลงในคอลัมน์ ชะด้วยสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.03 โมลาร์ พีเอช 6.5 แล้วเก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ หลอดละ 3.0 ลูกบาศก์เซนติเมตร ด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง และวัดฟอสฟอไลเปสเอทูแอคติฟวิตี

6. เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างส่วนต่าง ๆ ที่แยกได้จากคอลัมน์กับค่าการดูดกลืนแสง และกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างส่วนต่าง ๆ ที่แยกได้จากคอลัมน์กับฟอสฟอไลเปสเอทูแอคติฟวิตี

7. รวมส่วนที่มีฟอสฟอไลเปสเอทูแอคติฟวิตี เข้าด้วยกัน วัดปริมาตรทั้งหมด ปริมาณโปรตีน และวัดฟอสฟอไลเปสเอทูแอคติฟวิตี

2. <u>การวัดค่าแอคติฟวิตีของฟอสฟอไลเปสเอทู โดยดัดแปลงจากวิธีของ Grassmann and Hannig</u> (Grassmann and Hannig. 1954 : 30)

<u>สารเคมี</u>

1. พิษงูแมวเซาแต่ละส่วนที่แยกได้
2. สารละลายไข่แดง
3. เลือดแกะ
4. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9 %

อุปกรณ์

1. เครื่องอุ่นสารที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
2. เครื่องเซนตริฟิวจ์ (Centra - 7R Refrigerated Centrifuge)
3. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง

วิธีดำเนินการทดลอง

1. เตรียมสารละลายไข่แดง 4 % (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9 %

2. เติมสารละลายไข่แดง ในข้อ 1 ปริมาตร 0.8 ลูกบาศก์เซนติเมตร ลงในหลอดทดลองที่มีพิษงูที่แยกได้ 0.2 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำไปอุ่นในเครื่องอุ่นสารที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง

3. นำสารผสมในข้อ 2 มา 0.03 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใส่ลงในเลือดแกะ 0.3 ลูกบาศก์เซนติเมตร (6.6×10^8 เซลล์/ลูกบาศก์เซนติเมตร) และเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9 % ในปริมาตร 2.6 ลูกบาศก์เซนติเมตร

4. นำสารผสมในข้อ 3 อุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

5. ปั่นสารที่ได้ในข้อ 4 ด้วยความเร็ว 350 g นาน 10 นาที นำส่วนที่ใสมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 545 นาโนเมตร แล้วมาเทียบเป็นค่าเปอร์เซนต์ของการแตกของเม็ดเลือด โดยเทียบจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 545 นาโนเมตร ของเลือดแกะ 0.3 ลูกบาศก์เซนติเมตร ในน้ำกลั่น 2.8 ลูกบาศก์เซนติเมตร (6.6×10^8 เซลล์/ลูกบาศก์เซนติเมตร) ซึ่งเป็นค่า 100 เปอร์เซนต์ ของการแตกของเม็ดเลือด

3. <u>การหาปริมาณโปรตีน ในพืชงูที่มีฟอสฟอไลเปสเอนูแอกติฟวิตี</u> (Lowry. 1951 : 265 - 275)

<u>สารเคมี</u>

1. สารละลาย A : สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 2 % ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์
2. สารละลาย B : สารละลายคอปเปอร์ (II) ซัลเฟต ความเข้มข้น 0.5 % ในสารละลายโซเดียม โปแตสเซียม ทาร์เตรต ความเข้มข้น 1 %
3. สารละลาย C : ผสมสารละลาย A 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร ด้วย สารละลาย B 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร
4. สารละลาย D : ผสมฟีนอล รีเอเจนท์ 1 ส่วน ด้วยน้ำกลั่น 1 ส่วน
5. อัลบูมินจากเซรุ่มวัว (Bevine Serum albumin) เป็นสารละลายโปรตีนมาตรฐาน ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร
6. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่เข้มข้น 0.9 %

<u>อุปกรณ์</u>

เครื่องมือวัดค่าการดูดกลืนแสง

<u>วิธีดำเนินการทดลอง</u>

1. ละลายพืชงูที่ต้องการหาปริมาณโปรตีนในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9 % ให้มีปริมาตร 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร (ปริมาณโปรตีนอยู่ระหว่าง 25 - 200 โมโครกรัม) ผสมกับสารละลาย C ปริมาตร 3 ลูกบาศก์เซนติเมตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที

2. เติมสารละลาย D ปริมาตร 0.3 ลูกบาศก์เซนติเมตร ลงในสารผสมข้อ 1 เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที

3. วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ได้ ที่ความยาวกลื่น 650 นาโนเมตร

4. อ่านค่าปริมาณโปรตีนของสารละลายจากข้อ 3 โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (อัลบูมินจาก เซรุ่มวัว) ที่มีปริมาณโปรตีนตั้งแต่ 0 - 200 ไมโครกรัมต่อ 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร

4. <u>การแยกเอนไซม์ฟอสฟอไลเปส เอ ทู ให้บริสุทธิ์ขึ้น โดยวิธี แคทไอออนแอกซ์เชนจ์</u>

<u>สารเคมี</u>

1. เจล ซีเอ็ม - เซฟาเดกซ์ ซี - 50 (CM - sephadex C - 50)

2. สารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมอะซีเตต เข้มข้น 0.01 โมลาร์ พีเอช 5.8 ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.7 โมลาร์

3. สารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมอะซีเตต เข้มข้น 0.01 โมลาร์ พีเอช 5.8

4. พิษงูที่แยกได้ส่วนที่ II ที่นำมาทำให้แห้ง

<u>อุปกรณ์</u>

1. คอลัมน์ ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.6 เซนติเมตร ยาว 40 เซนติเมตร

2. เครื่องเก็บแยกส่วน

3. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง

<u>วิธีดำเนินการทดลอง</u>

1. บรรจุส่วนผสม ซีเอ็ม - เซฟาเดกซ์ ซี - 50 ลงในคอลัมน์จนมีความสูงของเจล 35 เซนติเมตร

2. ผ่านคอลัมน์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมอะซิเตต ประมาณ 2 เท่าของปริมาตรทั้งหมดของเจล ที่บรรจุในคอลัมน์

3. ละลายเอนไซม์ฟอสฟอไลเปสเอทูที่ได้จากพิษงูส่วนที่ II ด้วยสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตต 0.01 โมลาร์ พีเอช 5.8 จนได้สารละลายที่มีปริมาตร 4 ลูกบาศก์เซนติเมตร มีปริมาณโปรตีนในสารละลาย 57 มิลลิกรัม

4. ผ่านสารละลายในข้อ 3 ลงในคอลัมน์ ชะด้วย 0.01 โมลาร์ สารละลายแอมโมเนียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.8 แล้วเก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ หลอดละ 2.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน จนไม่มีโปรตีนออกจากคอลัมน์

5. เปลี่ยนบัฟเฟอร์ที่จะใช้ชะ ให้ชะด้วย ลิเนียร์ ซอลต์ แกรเดียนต์ (linear salt gradient) โดยใช้สารละลายแอมโมเนียมอะซิเตต เข้มข้น 0.01 โมลาร์ พีเอช 5.8 ปริมาตร 200 ลูกบาศก์เซนติเมตร และสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.7 โมลาร์ เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ หลอดละ 2.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน

6. นำสารละลายแต่ละหลอดที่ได้มาวัดหาปริมาณโปรตีน โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง และหาค่าฟอสฟอไลเปสเอทูแอคติฟวิตี

7. เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างส่วนต่าง ๆ ที่แยกได้ กับค่าการดูดกลืนแสง และแสดงความสัมพันธ์ระหว่างส่วนต่าง ๆ ที่แยกได้ กับฟอสฟอไลเปสเอทูแอคติฟวิตี

8. รวมส่วนที่มีฟอสฟอไลเปสเอทูแอคติฟวิตี เข้าด้วยกัน วัดปริมาตรทั้งหมดและปริมาณโปรตีน

5. <u>การวิเคราะห์พิษงูแมวเซาที่แยกได้ โดยวิธี ดิส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซีส</u> (Davis. 1964 : 404 - 427)

<u>สารเคมี</u>

1. สารละลายอะคริลาไมด์ : บิส - อะคริลาไมด์ (30 % : 0.8 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)

ห้องสมุดบัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2. สารละลายบัฟเฟอร์ ทริส - ไฮโดรเจนคลอไรด์ ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ พีเอช 8.9

3. สารละลายบัฟเฟอร์ ทริส - ไฮโดรเจนคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.7

4. สารละลาย เอ็น, เอ็น, เอ็น; เอ็น; - เตตระเมธิลเอธิลไดเอมีน ความเข้มข้น 10 %

5. สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต ความเข้มข้น 5 %

6. สารละลายบัฟเฟอร์ ทริส - ไกลซีน ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 8.3

7. สารละลายโคมาสซี บลู 1 % ในเมทานอล : กรดอะซิติก : น้ำ (ในอัตราส่วน 5 : 1 : 4)

8. สารตัวอย่าง ซึ่งประกอบด้วย พิษงูแมวเซาส่วนที่ยังไม่ได้แยก ส่วนที่ II ที่ผ่าน เจล เซฟาเดกซ์ จี - 75 และส่วนที่ II_5 ที่ผ่าน ซีเอ็ม - เซฟาเดกซ์ ซี - 50 ในปริมาตร 0.2 ลูกบาศก์เซนติเมตร ไกลซีน 0.03 ลูกบาศก์เซนติเมตร สารละลายบัฟเฟอร์ ทริส - ไฮโดรเจนคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.7 ในปริมาตร 0.2 ลูกบาศก์เซนติเมตร สารละลายบรอมฟีนอล บลู ความเข้มข้น 0.01 % ปริมาตร 0.05 ลูกบาศก์เซนติเมตร

<u>อุปกรณ์</u>

1. หลอดนำก๊าซขนาด 0.5 × 13 เซนติเมตร พร้อมจุกยางที่เจาะรูตรงกลาง ฐานรอง และแผ่นพาราฟิล์ม

2. กล่องสำหรับใส่บัฟเฟอร์ ซึ่งมีลวดพลาตินัมต่ออยู่สำหรับนำไฟฟ้า

3. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า

<u>วิธีดำเนินการทดลอง</u>

1. เตรียม เจล แยกส่วน (separating gel) โดยผสมสารละลายต่อไปนี้ลงใน ฟลาสค์ดูดอากาศ (suction flask)

178751

สารละลายอะคริลาไมด์ : บิส - อะคริลาไมด์

(30 % : 0.8 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร

สารละลายบัฟเฟอร์ ทริส - ไฮโดรเจนคลอไรด์

ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ พีเอช 8.9 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร

สารละลายเอ็น, เอ็น, เอ็น', เอ็น'-เตตระเมธิลีนไดเอมีน

ความเข้มข้น 10 % 0.1 ลูกบาศก์เซนติเมตร

น้ำกลั่น 9.8 ลูกบาศก์เซนติเมตร

นำไปดูดอากาศออก 2 - 3 นาที แล้วเติมสารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต ความเข้มข้น 5 % ลงไป 0.1 ลูกบาศก์เซนติเมตร เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน

2. ใช้ปิเปตดูดสารละลายเจลจากข้อ 1 บรรจุลงในหลอดนำก๊าซที่ปิดปลายด้านหนึ่งไว้ด้วยพาราฟิล์ม จนกระทั่งสารละลายในหลอดนำก๊าซมีความสูง 10 เซนติเมตร แล้วค่อย ๆ เติมน้ำกลั่นปิดผิวหน้าเจล เพื่อให้ผิวหน้าเจลเรียบเมื่อแข็งตัว ตั้งเจลไว้ให้แข็งตัวเป็นเวลาประมาณ 30 นาที

3. เตรียม เจล ชักนำ (stacking gel) โดยผสมสารละลายต่อไปนี้ลงในหลอดทดลอง

สารละลายอะคริลาไมด์ : บิส - อะคริลาไมด์

(30 % : 0.8 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) 0.625 ลูกบาศก์เซนติเมตร

สารละลายบัฟเฟอร์ ทริส - ไฮโดรเจนคลอไรด์

ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.7 1.25 ลูกบาศก์เซนติเมตร

สารละลายเอ็น, เอ็น, เอ็น', เอ็น'- เตตระเมธิลีนไดเอมีน

ความเข้มข้น 10 % 0.05 ลูกบาศก์เซนติเมตร

สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต

ความเข้มข้น 5 % 0.02 ลูกบาศก์เซนติเมตร

น้ำกลั่น 3.055 ลูกบาศก์เซนติเมตร

เขย่าสารละลายให้เข้ากัน

4. เทน้ำออกจากเจลที่ได้จากข้อ 2 แล้วใช้ปิเปตดูดสารละลายจากข้อ 3 บรรจุลงไปจนได้ความสูงของเจลเพิ่มขึ้นจากเดิม 0.5 เซนติเมตร ปิดผิวหน้าเจลด้วยน้ำกลั่นเล็กน้อย ตั้งเจลไว้ให้แข็งตัว เป็นเวลา 30 นาที

5. บรรจุแท่งเจลลงในกล่องสำหรับใส่บัฟเฟอร์ในแนวตั้ง ใส่สารละลายบัฟเฟอร์ ทริส - ไกลซีน พีเอช 8.3 ลงในกล่องบนและล่างจนสารละลายบัฟเฟอร์ท่วมปลายแท่งเจลทั้ง 2 ข้าง

6. หยอดสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้ประมาณ 0.02 ลูกบาศก์เซนติเมตร ลงบนหน้าเจล ผ่านกระแสไฟฟ้าขนาด 3 มิลลิแอมแปร์ต่อแท่งเจล โดยกำหนดให้ขั้วลบอยู่ด้านบน

7. ตัดกระแสไฟฟ้าเมื่อแถบสีบรอมฟีนอล บลู เคลื่อนถึงระยะทางประมาณ 1 เซนติเมตร จากปลายล่างของแท่งเจล เอาเจลออกจากกล่องมาแช่ในอ่างน้ำเย็น แล้วใช้เข็มฉีดยาดูดน้ำเย็น ฉีดเข้าไปไล่เอาเนื้อเจลออกจากหลอด ใช้เข็มจิ้มที่ตำแหน่งสีบรอมฟีนอล บลู เพื่อเป็นเครื่องหมาย

8. นำแท่งเจลที่ได้ไปย้อมสี ดูตำแหน่งโปรตีน ด้วยสารละลาย โคมาสซี บลู ในสารเคมีข้อ 7 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างสีส่วนที่เกินออกด้วยสารละลาย เมทานอล : กรดอะซิติก : น้ำ (ในอัตราส่วน 5 : 7 : 88)

6. <u>การศึกษาการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก</u> (Zusman and others. 1981 : 57)

<u>สารเคมี</u>

1. พิษงูแมวเซา และเอนไซม์ฟอสฟอไลเปสเอทูที่แยกได้จากพิษงูแมวเซา
2. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.9 %
3. เลือดแกะ

อุปกรณ์

1. เครื่องเซนตริฟิวจ์
2. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง

วิธีดำเนินการทดลอง

1. ปั่นเลือดแกะ ที่ความเร็ว 350 g เป็นเวลา 10 นาที เก็บเม็ดเลือดแดงไว้ ล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9 % 3 ครั้ง

2. นำเม็ดเลือดแดงจากข้อ 1 มาเตรียมสารละลายแขวนลอยของเม็ดเลือดแดง โดยให้มีความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดง เป็น 2 % (ปริมาตรต่อปริมาตร)$_0$ ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.9 %

3. เตรียมสารละลายที่กำหนดให้แตกตัว 100 % โดยนำเม็ดเลือดแดงในข้อ 2 มา 3.0 ลูกบาศก์เซนติเมตร ปั่นที่ความเร็ว 350 g เป็นเวลา 10 นาที เก็บเม็ดเลือดแดงมาเติมน้ำกลั่น 4 ลูกบาศก์เซนติเมตร อุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

4. เตรียมสารละลายตัวอย่างดังนี้

4.1 พิษงูแมวเซาที่ยังไม่ได้แยกปริมาณโปรตีน 200 300 1,000 และ 10,000 ไมโครกรัม

4.2 พิษงูที่แยกได้ส่วนที่ II และ II_5 ปริมาณโปรตีน 200 300 1,000 และ 10,000 ไมโครกรัม

5. ผสมสารแขวนลอยของเม็ดเลือดแดงจากข้อ 2 ปริมาตร 3 ลูกบาศก์เซนติเมตร กับสารละลายจากข้อ 4 ปริมาตร 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร อุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซส นาน 30 นาที

6. ปั่นสารผสมจากข้อ 3 และข้อ 5 ที่ความเร็ว 350 g นาน 10 นาที นำของเหลวใสส่วนบนมาวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 545 นาโนเมตร

7. ทำการทดลองอีกครั้งตั้งแต่ข้อ 2 – 6 แต่เปลี่ยนเม็ดเลือดเป็น 6.6×10^8 เซลล์ต่อลูกบาศเซนติเมตร (เทียบเท่าสารแขวนลอย 0.2 % โดยปริมาตรต่อปริมาตร) นำมาในปริมาตร 0.3 ลูกบาศก์เซนติเมตร

8. จากค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ นำมาคำนวณเปอร์เซนต์การแตกของเม็ดเลือดแดงของสารละลายจากข้อ 5 แล้วนำมาเขียนกราฟเพื่อหา 50 % ของการแตกของเม็ดเลือดแดง

7. <u>การศึกษาคุณสมบัติการเร่งการแข็งตัวของเลือด</u> (สัณห์ พณิชยกุล 2510 : 34)

<u>สารเคมี</u>

1. พิษงูแมวเซา และเอนไซม์ฟอสฟอไลเปสเอทูที่แยกได้จากพิษงูแมวเซา
2. สารละลายโซเดียมซิเตรต ความเข้มข้น 3.8 %
3. สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์
4. เลือดคนปกติ (citrated blood) ผสมกับสารกันการแข็งตัวของเลือด

<u>อุปกรณ์</u>

1. หลอดทดลองขนาด 10 × 100 มิลลิเมตร
2. ลวดพลาตินัม
3. เครื่องเซนตริฟิวจ์

<u>วิธีดำเนินการทดลอง</u>

1. ปั่นเลือดคนปกติ ที่ความเร็ว 110 g เป็นเวลา 10 นาที เก็บพลาสมาไว้
2. เตรียมสารละลายพิษงูแมวเซา ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.9 % ให้มีความเข้มข้นของโปรตีน 150 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร
3. เตรียมพิษงูส่วนที่แยกได้ที่มีฟอสฟอไลเปสเอทูแอคทีฟวิตี ให้มีปริมาณโปรตีน 150 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร
4. นำสารละลายที่ได้จากข้อ 2 มา 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ผสมกับพลาสมาจากข้อ 1 ปริมาตร 0.2 ลูกบาศก์เซนติเมตร ในหลอดทดลองขนาด 10 × 100 มิลลิเมตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์

ที่มีความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ลงไป 0.2 ลูกบาศก์เซนติเมตร เริ่มจับเวลาของการแข็งตัวของเลือด โดยใช้ลวดพลาตินัมจุ่มตรวจสอบดูเป็นระยะ ๆ จนสังเกตเห็นเส้นใยติดลวดพลาตินัม จึงจับเวลาได้ทันที

8. การหาความเป็นพิษ (แอลดี - 50) ของพิษงูแมวเซา

สารเคมี

1. พิษงูแมวเซา และเอนไซม์ฟอสฟอไลเปสเอที่แยกได้จากพิษงูแมวเซา
2. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.9 %

อุปกรณ์และสัตว์ทดลอง

1. หลอดฉีดยา พร้อมเข็มฉีดขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร
2. หนูขาวที่มีน้ำหนักตัวละ 18 กรัม

วิธีดำเนินการทดลอง

1. เตรียมสารละลายพิษงูแมวเซาที่ยังไม่ได้แยก พิษงูที่แยกแล้วส่วนที่ II และพิษงูที่แยกแล้วส่วนที่ II_5 ให้มีปริมาณโปรตีน 6.50 8.45 10.99 11.69 15.20 19.76 25.69 33.40 และ 43.42 ไมโครกรัม โดยโปรตีนที่ใช้แต่ละส่วนมีปริมาตร 0.2 ลูกบาศก์เซนติเมตร

2. นำสารละลายในข้อ 1 มาฉีดหนูขาวที่มีน้ำหนักตัว ตัวละ 18 กรัม โดยฉีดเข้าทางเส้นเลือดดำที่หาง โดยใช้หนู 5 ตัวต่อสารละลายแต่ละความเข้มข้น

3. บันทึกจำนวนหนูที่ตาย ของแต่ละสารละลาย หลังจากเก็บไว้ 4 ชั่วโมง

4. ผลจากการทดลองที่ได้ คำนวณ แอลดี - 50 ตามวิธีของ Karber (Karber, Mayer and Manfred. 1961 : 905)

$$m = X_s - d\left(S_i - \frac{1}{2}\right)$$

m คือ log แอลดี - 50

X_s คือ log ของขนาดพิษงูที่เริ่มทำให้หนูขาวตาย 100%

d คือ log ของค่าคงที่ของการหารระหว่างขนาดพิษงู

S_i คือ ผลรวมของ response ratio

response ratio คือ อัตราส่วนระหว่างจำนวนหนูที่ตายกับจำนวนหนูทั้งหมด

9. <u>การทดสอบการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณ (local tissue necrosis) เนื่องจากพิษงูแมวเซา และฟอสฟอไลเปสเอทูที่ได้จากพิษงูแมวเซา</u>

<u>สารเคมี</u>

1. พิษงูแมวเซา และเอนไซม์ฟอสฟอไลเปสเอทูที่แยกได้จากพิษงูแมวเซา
2. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.9 %
3. สารละลายเซรุ่มแก้พิษงูแมวเซาที่ได้จากการฉีดกระตุ้นม้าด้วยพิษงูแมวเซา

<u>อุปกรณ์และสัตว์ทดลอง</u>

1. หลอดฉีดยาพร้อมเข็มฉีดยาขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร
2. หลอดฉีดยาพร้อมเข็มฉีดยาขนาด 20 ลูกบาศก์เซนติเมตร
3. กล้องถ่ายรูป
4. กระต่าย น้ำหนักตัวละ 2.5 กิโลกรัม

<u>วิธีดำเนินการทดลอง</u>

1. เตรียมพิษงูแมวเซา ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9 % ให้มีความเข้มข้นของโปรตีน 60 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร

2. เตรียมเอนไซม์ฟอสฟอไลเปสเอทูที่มีในพิษงูแมวเซาที่แยกได้ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ให้มีความเข้มข้นของโปรตีน 60 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร

3. เตรียมเซรุ่มแก้พิษงูแมวเซาจากม้าปริมาตร 30 ลูกบาศก์เซนติเมตร

4. โกนขนกระต่ายที่สีข้างทั้งสองจนเกรียน

5. ฉีดสารละลายพิษงูในข้อ 1 ทางใต้ผิวหนังด้านหนึ่งของกระต่ายในส่วนที่ถูกโกนขน โดยฉีดในปริมาตร 0.30 ลูกบาศก์เซนติเมตร

6. ฉีดเซรุ่มที่เตรียมไว้ในข้อ 3 เข้าทางเส้นเลือดดำที่หูของกระต่าย เพื่อยับยั้งพิษต่าง ๆ ในพิษงูที่จะทำให้กระต่ายตาย

7. ฉีดสารละลายฟอสฟอไลเปสเอทูที่เตรียมไว้ในข้อ 2 เข้าทางใต้ผิวหนังที่สีข้างด้านที่เหลือของกระต่าย ปริมาตร 0.30 ลูกบาศก์เซนติเมตร

8. บันทึกภาพรอยแผลที่เกิดขึ้นภายหลังจากการทดลอง 24 ชั่วโมง และวัดความกว้างของรอยแผลทุกวันเป็นเวลา 3 วัน หลังการทดลอง

9. เจาะเนื้อที่รอยแผลของกระต่าย ไปทำการตรวจสอบการตายของเนื้อเยื่อ (biopsy)

10. บันทึกภาพจากสไลด์ที่แสดงการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณ จากผลของการทำ biopsy

10. <u>การกระตุ้นให้สัตว์ทดลองสร้างแอนติบอดีย์ต่อพิษงูแมวเซา และส่วนของพิษงูแมวเซาที่มีฟอสฟอไลเปสเอทูแอคติฟวิตี</u> (Hanashiro and others. 1978 : 746)

<u>สารเคมี</u>

1. พิษงูแมวเซาและเอนไซม์ฟอสฟอไลเปสเอทูที่แยกได้จากพิษงูแมวเซา

2. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.9 %

3. Freund's complete adjuvant ซึ่งเป็นสารที่ช่วยให้สัตว์ทดลองสร้างแอนติบอดีย์ได้เต็มที่

อุปกรณ์และสัตว์ทดลอง

1. หลอดฉีดยาพร้อมเข็มฉีดยาขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร
2. กระต่ายที่มีน้ำหนัก 2.5 กิโลกรัม

วิธีดำเนินการทดลอง

1. ละลายพิษงูที่แห้ง และส่วนที่แยกได้และพบว่ามีฟอสฟอไลเปสเอทูแอคติฟวิตี ที่ทำแห้งเก็บไว้ ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9 % ให้มีความเข้มข้นของโปรตีน 800 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร

2. นำสารละลายในข้อ 1 ผสมกับ Freund's complete adjuvant ในปริมาณเท่า ๆ กัน (โดยปริมาตรต่อปริมาตร) เพื่อช่วยให้การกระตุ้นดีขึ้น

3. ฉีดของผสมในข้อ 2 ทางใต้ผิวหนัง (subcutaneous) บริเวณโคนขาของกระต่าย ในปริมาตร 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ทำให้กระต่ายได้รับสารครั้งแรกในปริมาณ 200 ไมโครกรัม

4. เมื่อเวลาผ่านไป 2 สัปดาห์ เตรียมสารละลายพิษงู เช่นเดียวกับข้อ 1 แต่ให้มีความเข้มข้นของโปรตีนเป็น 400 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร โดยไม่ต้องผสม Freund's complete adjuvant ฉีดใต้ผิวหนังของกระต่ายในปริมาณ 1.0 ลูกบาศก์เซนติเมตร ทำให้กระต่ายได้รับพิษงูในครั้งที่ 2 ในปริมาณ 400 ไมโครกรัม

5. สัปดาห์ที่ 4 เตรียมพิษงูให้มีความเข้มข้นของโปรตีนเป็น 400 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตรไม่ผสม Freund's complete adjuvant ทำให้กระต่ายได้พิษงูในครั้งนี้ในปริมาณ 200 ไมโครกรัม

6. สัปดาห์ที่ 5 เจาะเลือดกระต่ายทางเส้นเลือดที่หู มาตั้งทิ้งไว้ให้เลือดแข็งตัว แยกเอาเซรุ่มมาใช้

11. <u>การตรวจสอบแอนตี – ฟอสฟอไลเปสเอทูและแอนตี – วีนัม จากเซรุ่มที่ได้จากการฉีดกระตุ้นกระต่าย</u> ด้วยวิธี ดับเบิล อิมมูโนดิฟิวชัน (Hudson and Frank. 1980 : 360)

<u>สารเคมี</u>

1. สารละลายบัฟเฟอร์ โซเดียมบาบิทอล ไฮโดรเจนคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 8.2

โซเดียมบาบิทอล	47.6	กรัม
สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 โมลาร์	69	ลูกบาศก์เซนติเมตร
สารละลายโซเดียมเอไซด์เข้มข้น 10 %	4.2	ลูกบาศก์เซนติเมตร
เติมน้ำกลั่นจนสารละลายมีปริมาตร	1,000	ลูกบาศก์เซนติเมตร

2. ละลาย วุ้น (โนเบิล อาการ์) ในสารละลายบัฟเฟอร์ โซเดียมบาบิทอล ไฮโดรคลอไรด์ จากข้อ 1 ให้มีความเข้มข้น 1.5 %
3. โคมาสซี บลู
4. กรดอะซิติก
5. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.9 %

<u>อุปกรณ์</u>

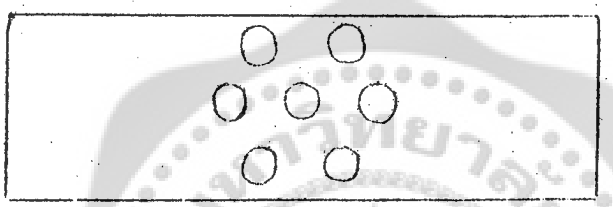
1. เครื่องดูดสูญญากาศ
2. แผ่นสไลด์ ขนาด 1 × 3 นิ้ว
3. กล่องที่อิ่มตัวด้วยไอน้ำ
4. ปิเปตอัตโนมัติ

วิธีดำเนินการทดลอง

1. หลอมรุ้นที่เตรียมไว้ให้เหลว

2. ใช้ปิเปตดูดรุ้น 3 ลูกบาศก์เซนติเมตร เทลงบนแผ่นสไลด์ขนาด 1 × 3 นิ้ว ปล่อยให้รุ้นแข็งตัวในกล่องที่มีความชื้น

3. เจาะรุ้นให้เป็นหลุม (ภาพประกอบ 6) แล้วดูดรุ้นในหลุมออกด้วยเครื่องดูดสูญญากาศ เตรียมสไลด์เช่นนี้ไว้ 3 แผ่น



ภาพประกอบ 6 แสดงตำแหน่งของหลุมรุ้นที่เจาะสำหรับใช้ในการทดสอบดับเบิล อิมมูโนดิฟฟิวชัน

4. หยดสารละลายพิษงูแมวเซาที่ยังไม่ได้แยก และที่แยกได้จาก เซฟาเดกซ์ จี - 75 และแยกจาก ซีเอ็ม - เซฟาเดกซ์ ซี 50 ลงในแต่ละหลุมกลางของแผ่นสไลด์ ส่วนหลุม ที่อยู่รอบ ๆ ให้หยด แอนติบอดีย์ ที่ได้จากเซรุ่มของกระต่ายที่รับการฉีดกระตุ้นด้วยพิษงูที่แยกได้แต่ละส่วน และเซรุ่มที่ได้จากม้า

5. เก็บแผ่นสไลด์ไว้ในกล่องที่อิ่มตัวด้วยไอน้ำ ในที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำแผ่นสไลด์มาล้างโปรตีนส่วนที่เกินออกจากรุ้นด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9 % หลาย ๆ ครั้ง

6. ใช้กระดาษกรองเนื้อละเอียดปิดทับรุ้นบนแผ่นสไลด์ ตั้งทิ้งไว้เพื่อให้รุ้นแห้ง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

7. นำแผ่นสไลด์มาย้อมสี ด้วยสารละลายโครมาสชี บลู ที่มีสีโครมาสชี บลู 0.5 % ในสารละลายกรดอะซิติก 20 % เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างสีส่วนที่เกินออกด้วยสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 20 % หลาย ๆ ครั้ง จนเห็นแถบสีน้ำเงินของพริซิพิติน ลายน์

12. การวัดความสามารถในการยับยั้งแอคติฟวิตีของฟอสฟอไลเปสเอทูด้วยแอนตี - กรูดวีนัม (anti - crude venum) และแอนตี - ฟอสฟอไลเปสเอทู ดัดแปลงมาจากวิธีของ Grassmann and Hannig (Grassmann and Hannig. 1954 : 30)

สารเคมี

1. พิษงูแมวเซาในส่วนที่ยังไม่ได้แยก ส่วนที่แยกได้ส่วนที่ II และ II_5
2. แอนตี - กรูดวีนัม, แอนตี - ฟอสฟอไลเปสเอทู ที่ได้จากเซรุ่มกระต่าย
3. สารละลายไข่แดง
4. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9 %

อุปกรณ์

1. เครื่องอุ่นสาร
2. เครื่องเซนตริฟิวจ์
3. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง

วิธีดำเนินการทดลอง

1. เตรียมสารละลายไข่แดง 4 % (โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก) ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9 %

2. เตรียมสารละลายพิษงูทั้งที่ยังไม่ได้แยก และที่แยกได้ตามสารเคมีข้อ 1 ให้มีความเข้มข้นของโปรตีน ตามค่าแอคติฟวิตี ที่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงแตก 50 %

3. เตรียมแอนตี - กรูดวีนัม, แอนตี - ฟอสฟอไลเปสเอทูทั้ง 2 ส่วน โดยทำให้เจือจาง 1 : 10 ในแต่ละหลอดมีปริมาตรของสารละลาย 20 25 30 35 และ 40 ลูกบาศก์เซนติเมตร

4. ผสมสารในข้อ 2 และข้อ 3 อย่างละ 0.1 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดย

4.1 แอนตี – กรูดวีนัมผสมกับพิษงู ส่วนที่ยังไม่ได้แยก

4.2 แอนตี – ฟอสฟอไลเปสเอทูจากพิษงู ส่วนที่ II ผสมกับฟอสฟอไลเปสเอทู ส่วนที่ II ฟอสฟอไลเปสเอทู ส่วนที่ II_5 และพิษงูที่ยังไม่ได้แยก

4.3 แอนตี – ฟอสฟอไลเปสเอทูจากพิษงู ส่วนที่ II_5 ผสมกับฟอสฟอไลเปสเอทู ส่วนที่ II ฟอสฟอไลเปสเอทู ส่วนที่ II_5 และพิษงูที่ยังไม่ได้แยก

4.4 แอนตี – วีนัมจากม้า ผสมกับฟอสฟอไลเปสเอทู ส่วนที่ II ฟอสฟอไลเปสเอทู ส่วนที่ II_5 และพิษงูที่ยังไม่ได้แยก

5. เก็บสารผสมในข้อ 4 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที แล้วเติมสารละลายไข่แดงในข้อ 1 ในปริมาตร 0.8 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำไปอุ่นที่เครื่องอุ่นสารที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

6. นำสารผสมในข้อ 5 มา 0.03 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใส่ลงในเลือดแกะ 0.3 ลูกบาศก์เซนติเมตร (6.6×10^8 เซลล์/ลูกบาศก์เซนติเมตร) และเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9 % ในปริมาณ 2.6 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

7. ปั่นสารที่ได้ในข้อ 6 ด้วยความเร็ว 350 g นาน 10 นาที นำส่วนที่ใสมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 545 นาโนเมตร แล้วมาเทียบเป็นค่าเปอร์เซนต์ของการแตกของเม็ดเลือดแดง โดยเทียบจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 545 นาโนเมตร ของเลือกแกะ 0.3 ลูกบาศก์เซนติเมตร (6.6×10^8 เซลล์/ลูกบาศก์เซนติเมตร) ที่เติมน้ำกลั่นแทนสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9 % ในปริมาณ 2.6 ลูกบาศก์เซนติเมตร

13. ตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งการตายของเนื้อเยื่ออันเกิดจากพิษงูแมวเซาห้วย แอนตี - ฟอสฟอไลเปสเอทู

สารเคมี

1. พิษงูแมวเซาที่ยังไม่ได้แยก
2. สารละลายเซรุ่มแก้พิษงูแมวเซาที่ได้จากม้า
3. แอนตี - ฟอสฟอไลเปสเอทูที่ได้จากพิษงูแมวเซาที่แยกได้ส่วนที่ II
4. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9 %

อุปกรณ์และสัตว์ทดลอง

1. หลอดฉีดยา พร้อมเข็มฉีดยา ขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร
2. หลอดฉีดยา พร้อมเข็มฉีดยา ขนาด 20 ลูกบาศก์เซนติเมตร
3. กล้องถ่ายรูป
4. กระต่ายน้ำหนักตัวละ 2.5 กิโลกรัม

วิธีดำเนินการทดลอง

1. เตรียมพิษงูแมวเซาในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9 % ให้มีความเข้มข้นของโปรตีน 60 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร
2. เตรียมเซรุ่มแก้พิษงูจากม้าปริมาตร 30 ลูกบาศก์เซนติเมตร
3. โกนขนกระต่ายที่สีข้างทั้งสองจนเกรียน
4. ฉีดพิษงูแมวเซาในข้อ 1 ทางใต้ผิวหนังทั้ง 2 ด้าน บริเวณที่โกนขน ฉีดในปริมาตร 0.30 ลูกบาศก์เซนติเมตร
5. ฉีดเซรุ่มที่เตรียมไว้ในข้อ 2 เข้าทางเส้นเลือดที่หูของกระต่าย ในปริมาตร 30 ลูกบาศก์เซนติเมตร

6. ฉีดสารละลายแอนตี - ฟอสฟอไลเปสเอทูจากส่วนที่ II ในปริมาตร 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร เข้าใต้ผิวหนังบริเวณแผลที่ฉีดพิษงูข้างหนึ่ง โดยแบ่งฉีดเข้า 5 จุด

7. เก็บกระต่ายไว้ 6 ชั่วโมง แล้วเจาะเนื้อเยื่อกระต่าย (biopsy) ไปตรวจ

8. บันทึกภาพจากสไลด์ที่ได้จากการทำ biopsy

บทที่ 4

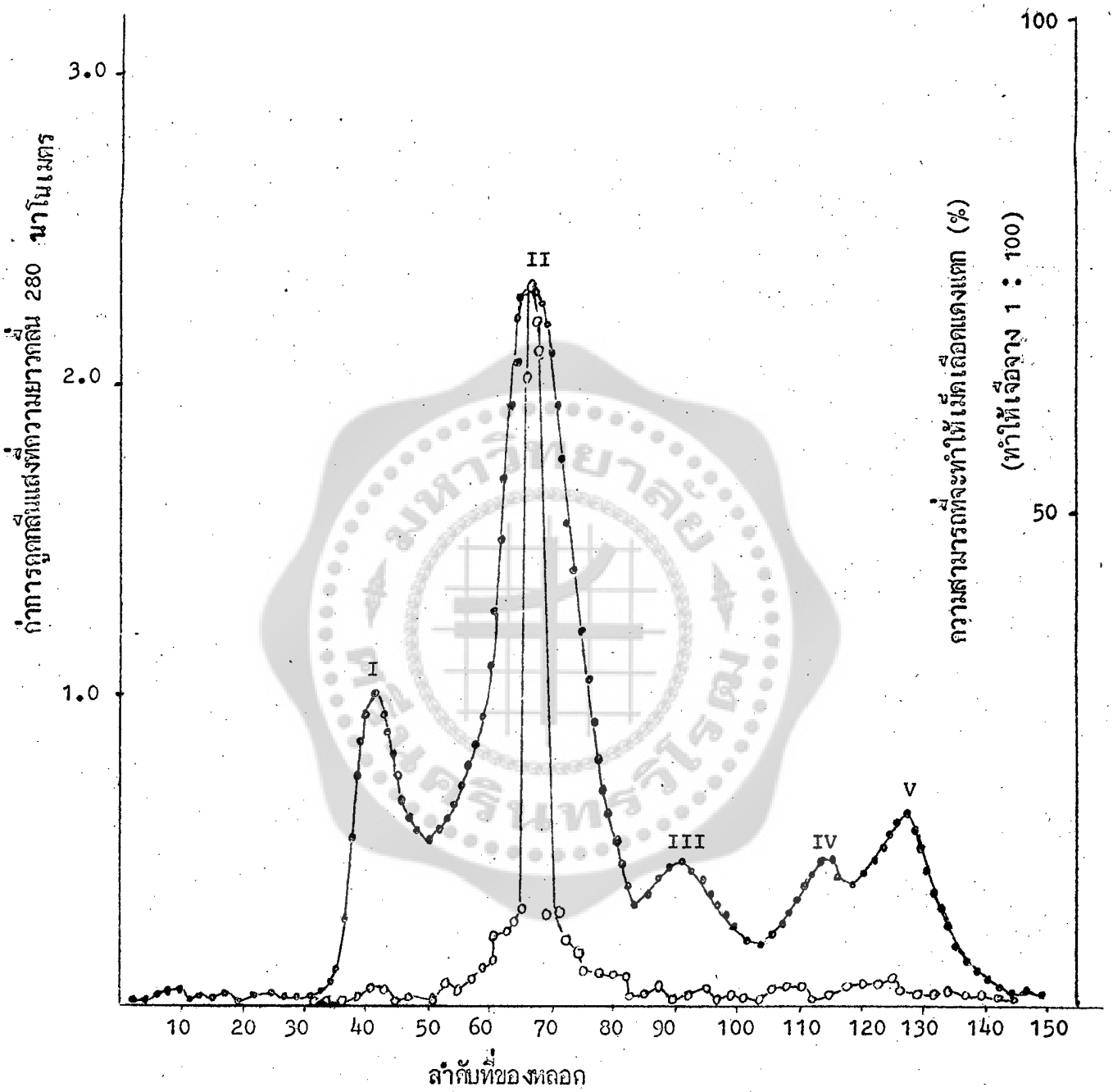
ผลการทดลอง

1. การแยกพิษงูแมวเซาด้วยเทคนิค เจล ฟิลเตรชัน โครมาโตกราฟี (gel filtration chromatography) เมื่อผ่านพิษงู 0.2 กรัม ที่ละลายใน 0.03 โมลาร์ แอมโมเนียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.5 ปริมาตร 4 ลูกบาศก์เซนติเมตร ลงในคอลัมน์ ขนาด 2.6 × 70 เซนติเมตร ที่บรรจุ เซฟาเดกซ์ จี - 75 พิษงูที่แยกออกมามี 5 ส่วน ให้ชื่อว่า I II III IV และ V (ภาพประกอบ 7) แล้วนำพิษงูที่ได้แต่ละส่วน มาทดสอบ ได้ผลดังต่อไปนี้

1.1 หาค่าฟอสฟอไลเปสเอทูแอคติฟวิตี พบว่า พิษงูแมวเซาที่แยกได้ส่วนที่ II เท่านั้นที่มีฟอสฟอไลเปสเอทูแอคติฟวิตี (ภาพประกอบ 7)

1.2 เมื่อนำพิษงูที่ยังไม่ได้แยกและที่แยกได้ส่วนที่ II มาหาปริมาณโปรตีน พบว่า พิษงูส่วนที่ยังไม่ได้แยกมีความเข้มข้นของโปรตีน 37.5 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ดังนั้นการบรรจุพิษงูในคอลัมน์ครั้งนี้ มีปริมาณโปรตีนทั้งหมด 150 มิลลิกรัม ซึ่งคิดเป็น % yield 100 % และเมื่อนำพิษงูที่แยกได้ส่วนที่ II มาหาปริมาณโปรตีน พบว่า มีความเข้มข้นของโปรตีน 0.668 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร แต่พิษงูส่วนที่ II นี้ มีปริมาตร 105 ลูกบาศก์เซนติเมตร ดังนั้นปริมาณโปรตีนในส่วนที่ II ที่แยกได้นี้จึงมีค่า 69.62 มิลลิกรัม คิดเป็น % yield 46.41 % (ตาราง 2)

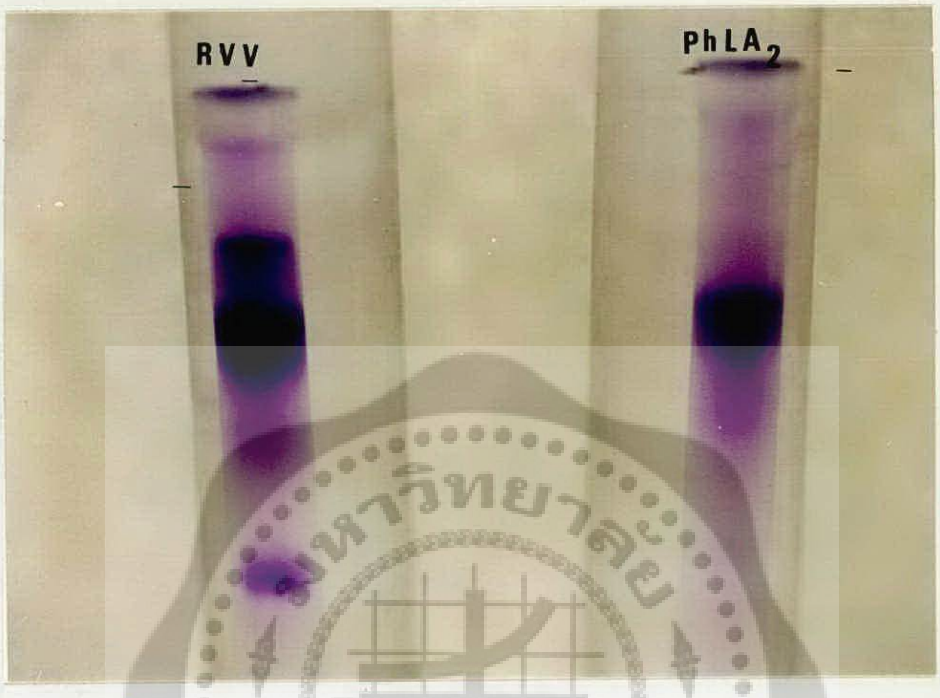
1.3 นำพิษงูที่ยังไม่ได้แยก และที่แยกได้ส่วนที่ II มาวิเคราะห์ด้วยวิธี ดิส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรฟอริซีส พบว่ามีแถบโปรตีนบนแท่งเจล โดยแถบโปรตีนบนแท่งเจลที่ผ่านพิษงูส่วนที่ II มีแถบโปรตีน 3 แถบ ซึ่งน้อยกว่าพิษงูที่ยังไม่ได้แยก (ภาพประกอบ 8)



ภาพประกอบ 7 แสดงส่วนของโปรตีนที่ได้จากการผ่านพิษงูแมวเซา 0.2 กรัม ลงในคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี – 75 ขนาด 2.6 × 70 เซนติเมตร ชะด้วยสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.03 โมลาร์ พีเอช 6.5 เก็บสารหลอดละ 3 ลูกบาศก์เซนติเมตร

ตาราง 2 แสดงโปรตีนในแต่ละส่วนที่มีฟอสฟอไลเปสเอทูแอคติฟวิตี

	ความเข้มข้นของโปรตีน (มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร	ปริมาตรของแต่ละส่วน (ลูกบาศก์เซนติเมตร)	ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม)	% yield (%)
พิษงูแมวเซา ที่ไม่ได้แยก	37.50	4.00	150.00	100.00
ฟอสฟอไลเปสเอทูแยกโดยเซฟาเดกซ์ จี - 75	0.67	150.00	69.62	46.41
ฟอสฟอไลเปสเอทูแยกโดยซีเอ็ม - เซฟาเดกซ์ ซี - 50	0.27	62.50	16.75	11.17



ภาพประกอบ ๔ แสดงรูปแบบของโปรตีนในพิษงู ที่วิเคราะห์โดย คิส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลกโตรฟอริซีส

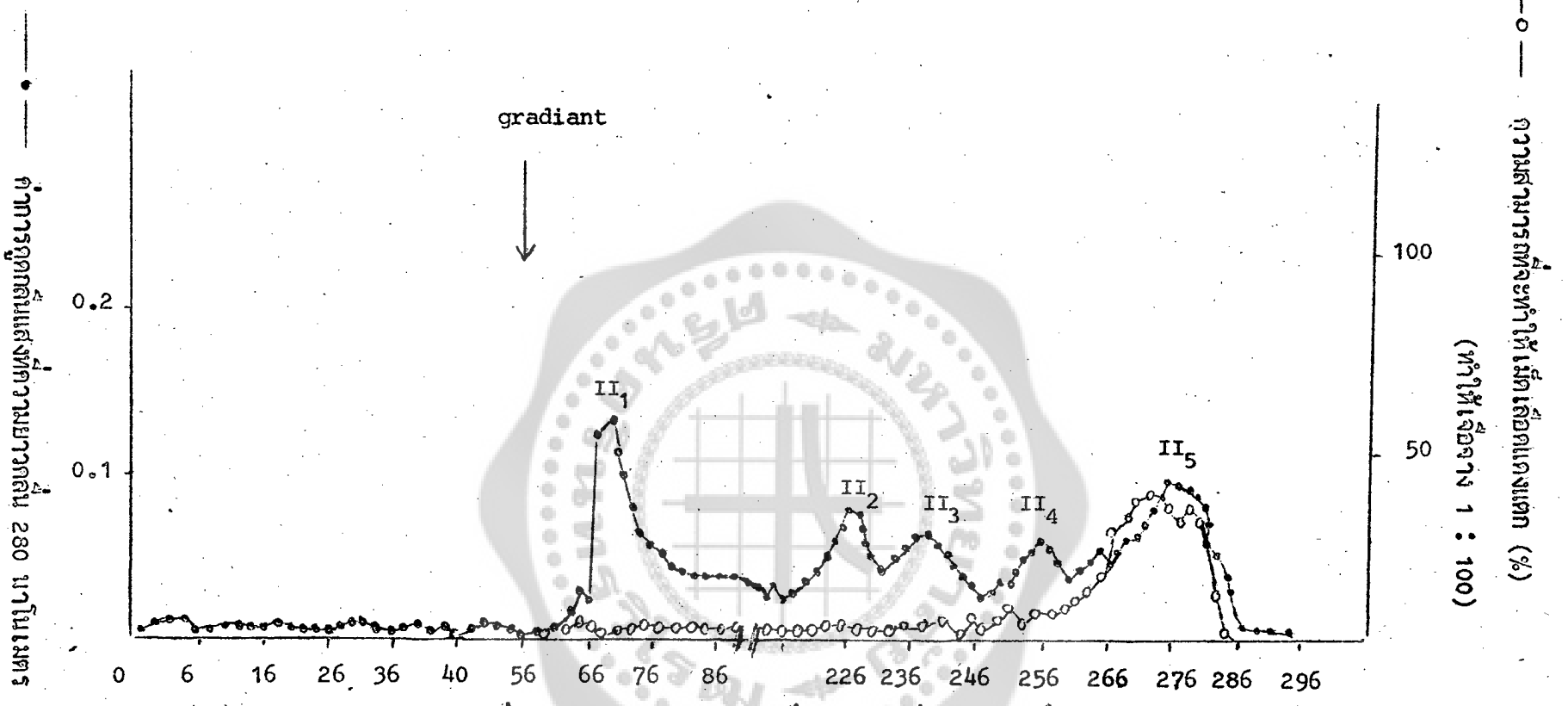
RVV : พิษงูแมวเซาที่ยังไม่ได้แยก

$PhLA_2$: พิษงูแมวเซาส่วนที่แยกได้ โดยผ่านคอลัมน์ เซฟาเดกซ์ จี - 75

2. การแยกพิษงูให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยเทคนิคของอิออนเอกซ์เชนจ์ โครมาโตกราฟี (Ion - exchange chromatography) ละลายพิษงูส่วนที่ II ที่ทำแห้ง 57 มิลลิกรัม ในสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ พีเอช 5.8 ปริมาตร 4 ลูกบาศก์เซนติเมตร เมื่อผ่านพิษงูส่วนนี้ลงในกอลัมน์ ขนาด 2.6 × 40 เซนติเมตร ที่บรรจุ ซีเอ็ม - เซฟาเดกซ์ ซี - 50 พบว่าสามารถแยกพิษงูออกได้เป็น 5 ส่วน ให้ชื่อว่า II, II_2, II_3, II_4 และ II_5 (ภาพประกอบ 9) เมื่อนำมาทดสอบได้ผลดังต่อไปนี้

2.1 หาค่าฟอสฟอไลเปสเอทูแอคติฟวิตี พบว่าพิษงูแมวเซาที่แยกได้ส่วนที่ II_5 เท่านั้น ที่มีฟอสฟอไลเปสเอทูแอกติฟวิตี (ภาพประกอบ 9)

2.2 เมื่อนำพิษงูส่วนที่ II_5 นี้ มาหาปริมาณโปรตีน พบว่า พิษงูส่วนที่ II_5 มีความเข้มข้นของโปรตีน 0.268 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร และจากการรวมส่วนของโปรตีนในส่วนที่ II_5 นี้ ได้ปริมาตรสารละลาย 62.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ปริมาณโปรตีนในส่วนนี้ทั้งหมดจึงเป็น 16.75 มิลลิกรัม ซึ่งคิดเป็น % yield เท่ากับ 11.17 % (ตาราง 2)

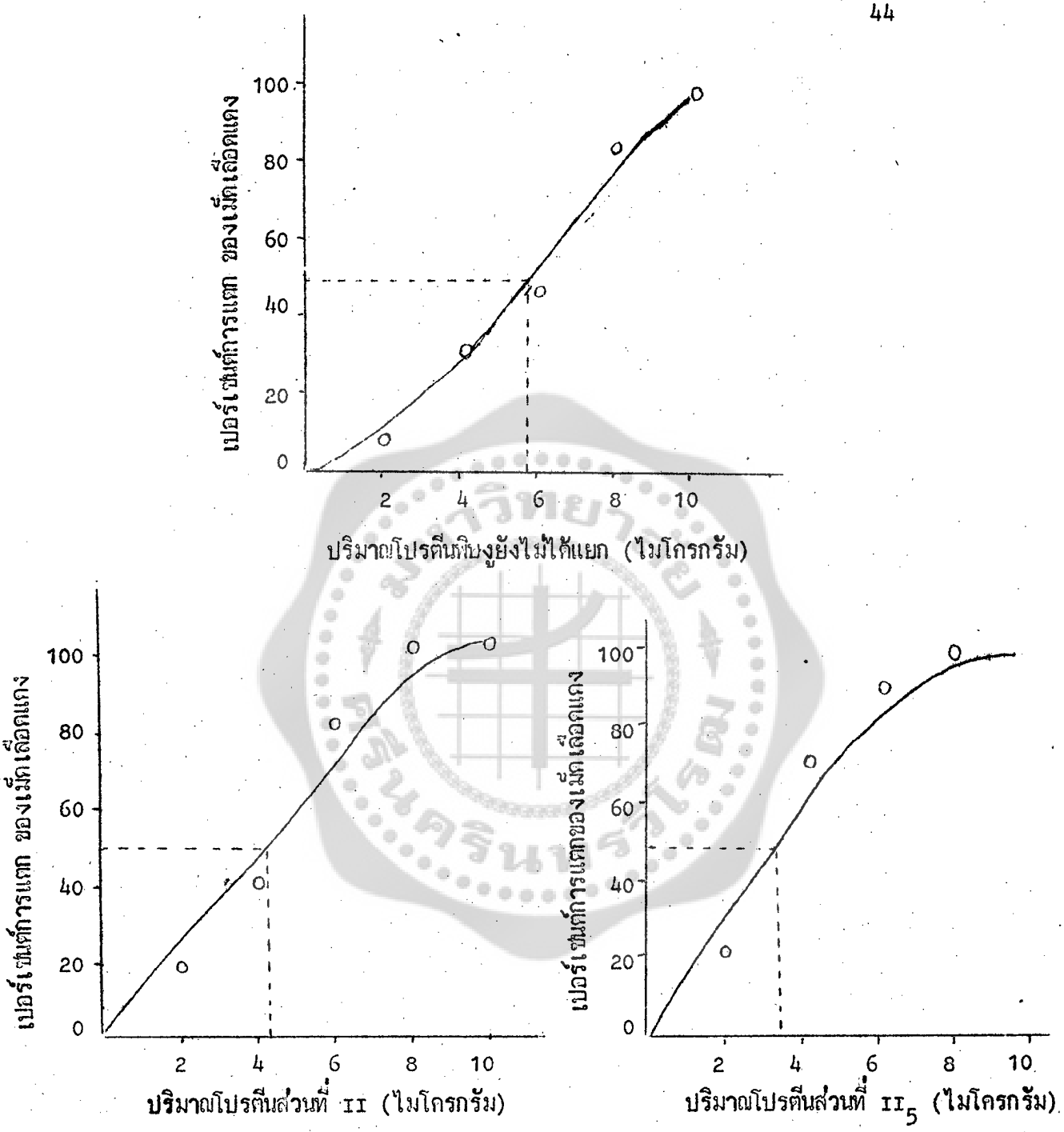


ภาพประกอบ 9 แสดงส่วนของโปรตีนที่ได้จากการผ่านพิษงูแมวเซาที่แยกได้ส่วนที่ II 57 มิลลิกรัม ลงในคอลัมน์ ซีเอ็ม – เซฟาเดกซ์ ซี – 50 ขนาด 2.6 × 40 เซนติเมตร ชะด้วยสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.01 โมลาร์ พีเอช 5.8 จำนวน 56 หลอด แล้วเปลี่ยนเป็นชะด้วย linear salf gradiant (200 ลูกบาศก์เซนติเมตร 0.01 โมลาร์ สารละลายแอมโมเนียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.8 กับ 200 ลูกบาศก์เซนติเมตร 0.01 โมลาร์ แอมโมเนียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.8 ที่มี 0.7 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์) และตามด้วย 0.01 โมลาร์ แอมโมเนียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.8 ที่มี 0.7 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ 200 ลูกบาศก์เซนติเมตร เก็บสารหลอดละ 2.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร

3. เมื่อนำพิษงูส่วนต่าง ๆ คือพิษงูที่ยังไม่ได้แยก พิษงูที่แยกได้ส่วนที่ II และพิษงูที่แยกได้ส่วนที่ II_5 มาหาค่าฟอสฟอไลเปสเอทูแอคติวิตี เพื่อการเปรียบเทียบตามการทดลองที่ 2 เมื่อตรวจสอบค่าความสามารถที่จะทำให้เม็ดเลือดแดงแตก 50 % ของพิษงูแต่ละส่วน พบว่า พิษงูที่ยังไม่ได้แยกต้องใช้พิษงูที่มีปริมาณโปรตีน 5.8 ไมโครกรัม พิษงูส่วนที่ II ใช้พิษงูที่มีปริมาณโปรตีน 4.2 ไมโครกรัม และพิษงูส่วนที่ II_5 ใช้พิษงูที่มีปริมาณโปรตีน 3.2 ไมโครกรัม (ตาราง 5 และภาพประกอบ 10) ที่จะทำให้เม็ดเลือดแดงแตก 50 % เมื่อมีไข่แดงเป็น substrate

ตาราง 3 แสดงค่าฟอสฟอไลเปสเอทูแอคติฟวิตีของพิษงูแมวเซา :- พิษงูแมวเซาที่ยังไม่แยก ส่วนที่ II และส่วนที่ II_5

ปริมาณโปรตีนของพิษงูที่ใช้ในการหาแอคติฟวิตี ไมโครกรัม	เปอร์เซนต์การแตกของเม็ดเลือดแดง		
	พิษงูแมวเซาที่ยังไม่ได้แยก	พิษงูส่วนที่ II	พิษงูส่วนที่ II_5
2	9	18	21
4	32	38	73
6	48	80	91
8	84	100	100
10	100	100	100
ปริมาณพิษงูที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก 50 % คิดเป็นไมโครกรัม	5.8	4.2	3.2



ภาพประกอบ 10 แสดงการหาค่าฟอสฟอไลเปสเอหูแอคติฟวิตี คิดเป็นไมโครกรัม ของพิษงูที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก 50 %

4. ในการตรวจสอบความเป็นพิษของพิษงูแมวเซา พบว่าพิษงูแมวเซาส่วนที่ยังไม่ได้แยกมีความเป็นพิษโดยคิดจากค่า แอลดี - 50 เป็น 0.412 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักหนู 1 กิโลกรัม พิษงูแมวเซาส่วนที่ II มีค่าแอลดี - 50 เป็น 0.591 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักหนู 1 กิโลกรัม และพิษงูแมวเซาส่วนที่ II_5 มีค่าแอลดี - 50 เป็น 1.739 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักหนู 1 กิโลกรัม (ตาราง 4)

ตาราง 4 แสดงค่าความเป็นพิษของพิษงูแมวเซาส่วนที่ยังไม่ได้แยก พิษงูที่แยกได้ส่วนที่ II และที่แยกได้ส่วนที่ II_5

ปริมาณโปรตีนที่ใช้ฉีดหนูขาว 1 ตัว หนัก 18 กรัม (ไมโครกรัม)	จำนวนหนูที่ตายในการฉีดพิษงูแต่ละส่วน		
	พิษงูที่ยังไม่ได้แยก	พิษงูส่วนที่ II	พิษงูส่วนที่ II_5
6.50	2	1	0
8.45	3	2	0
10.99	5	3	0
11.69	5	5	0
15.20	5	5	0
19.76	5	5	1
25.69	5	5	2
33.40	5	5	4
43.42	5	5	5
ค่า แอลดี - 50 (มิลลิกรัมต่อน้ำหนักหนู 1 กิโลกรัม)	0.412	0.591	1.739

5. การศึกษาคุณสมบัติการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก พบว่า พิษงูแมวเซาที่ยังไม่ได้แยก มีผลทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้มากกว่าพิษงูที่แยกได้ส่วนที่ II และส่วนที่ II_5 คือเมื่อใช้พิษงูส่วนที่ไม่ได้แยก 350 ไมโครกรัม ทำให้เม็ดเลือดแดง 2 % (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตร 3 ลูกบาศก์เซนติเมตรแตกตัวได้ 5 % ส่วนพิษงูส่วนที่ II และ II_5 ทำให้เม็ดเลือดแตกได้ 3 และ 2 % ตามลำดับ และความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกนั้น ขึ้นกับปริมาณพิษงูที่ใช้ กล่าวคือ เมื่อเพิ่มพิษงูที่ยังไม่ได้แยกเป็น 1,000 ไมโครกรัมของโปรตีน ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกคิดเป็น 7 % และถ้าใช้ปริมาณโปรตีน 10,000 ไมโครกรัม ก็จะทำให้เม็ดเลือดแดงแตก 18 % (ตาราง 5)

ตาราง 5 ความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกของเอนไซม์ฟอสฟอไลเปส เอ ทู ในพิษงูแมวเซา พิษงูที่แยกส่วนที่ II และพิษงูที่แยกส่วนที่ II_5 โดยใช้ความเข้มข้นของเลือดต่างกัน

พิษงูมีปริมาณโปรตีนเป็นไมโครกรัม	เปอร์เซนต์การแตกของเม็ดเลือดแดง		
	พิษงูที่ยังไม่ได้แยก	พิษงูที่แยกแล้วส่วนที่ II	พิษงูที่แยกแล้วส่วนที่ II_5
10,000	18	7	-
1,000	7	5	5
350	5	3	2
200	0	0	0

ก. ใช้สารแขวนลอยของเม็ดเลือดแดงที่เข้มข้น 2 % 3 ลูกบาศก์เซนติเมตร

พิษงูมีปริมาณโปรตีนเป็นไมโครกรัม	เปอร์เซนต์การแตกของเม็ดเลือดแดง		
	พิษงูที่ยังไม่ได้แยก	พิษงูที่แยกแล้วส่วนที่ II	พิษงูที่แยกแล้วส่วนที่ II_5
350	33	15	14
300	24	14	12
250	18	14	13
200	2	9	12
150	0	0	0

ข. ใช้สารแขวนลอยของเม็ดเลือดแดงเข้มข้น 0.2 % (ปริมาณเม็ดเลือด 6.6×10^8 เซลล์ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร) 0.3 ลูกบาศก์เซนติเมตร

6. การศึกษาคุณสมบัติในการเร่งการแข็งตัวของเลือดเมื่อนำพิษงูแต่ละส่วนมาในปริมาณโปรตีน 150 ไมโครกรัม ในสารละลายพิษงู 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร พบว่าพิษงูแมวเซาที่ยังไม่ได้แยก สามารถเร่งการแข็งตัวของเลือดได้ดีมาก คือทำให้เลือดแข็งตัวในเวลาเฉลี่ย 7.33 วินาที ในขณะที่การแข็งตัวของเลือดปกติทั่วไปใช้เวลา 101.67 วินาที ส่วนพิษงูที่แยกได้ส่วนที่ II สามารถเร่งการแข็งตัวของเลือดได้น้อยลงกว่าส่วนที่ยังไม่ได้แยก คือใช้เวลาในการแข็งตัวของเลือดเฉลี่ย 51.00 วินาที ส่วนพิษงูที่แยกได้ส่วนที่ II_5 ไม่มีคุณสมบัติเร่งการแข็งตัวของเลือด เพราะใช้เวลาเฉลี่ย 97.00 วินาที ซึ่งใกล้เคียงกับเวลาที่ใช้ในการแข็งตัวของเลือดตามปกติ (ตาราง 6)

ตาราง 6 แสดงคุณสมบัติในการเร่งการแข็งตัวของเลือดในพิษงูแมวเซา ที่ยังไม่ได้แยกพิษงู**ส่วนที่** II และ**ส่วนที่** II_5

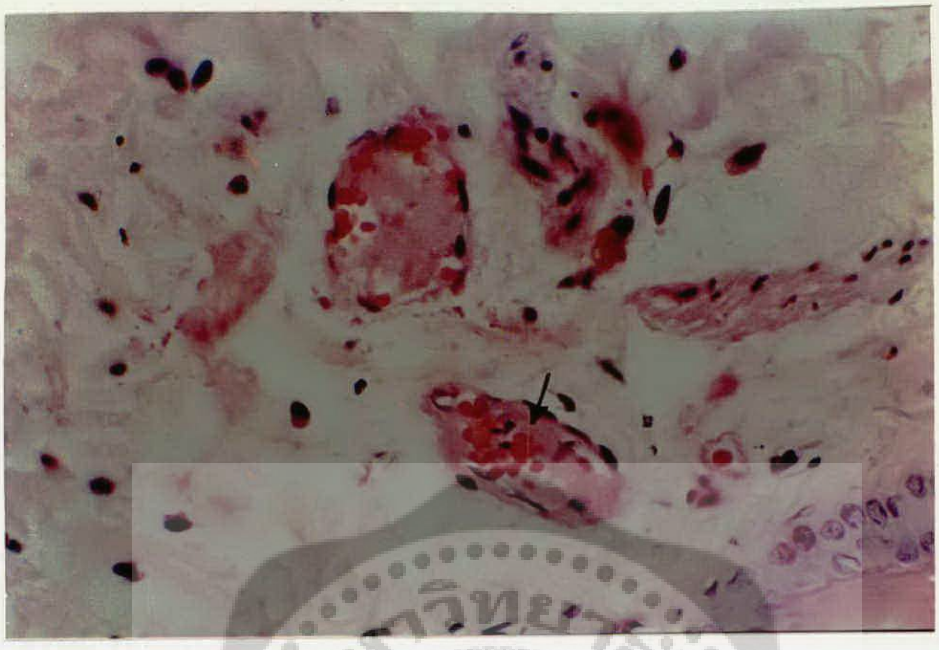
ส่วนของพิษงู	ปริมาณโปรตีนในพิษงู ไมโครกรัม	เวลาที่ใช้ในการแข็งตัวของเลือด (วินาที)			
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
พิษงูที่ยังไม่ได้แยก	150	7	9	6	7.33
พิษงูที่แยกได้ส่วนที่ II	150	45	49	59	51.00
พิษงูที่แยกได้ส่วนที่ II_5	150	95	107	89	97.00
สารละลายโซเดียมคลอไรด์	0	102	105	98	101.67

7. การศึกษาคุณสมบัติในการทำให้เนื้อเยื่อตายเฉพาะบริเวณ (local tissue necrosis) พบว่าพิษงูส่วนที่ยังไม่ได้แยก สามารถทำให้มีการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณ โดยตรวจสอบแผลบนหลังกระต่าย หลังจากฉีดพิษงูแมวเซา 24 ชั่วโมง พบว่าแผลมีลักษณะดำคล้ำ เป็นสะเก็ดแห้งแข็ง (ภาพประกอบ 11 ก.) ส่วนการตรวจสอบโดยการทำ biopsy หลังจากการฉีดพิษงูแมวเซาแล้ว 6 ชั่วโมง พบว่าเริ่มมีการตายของเนื้อเยื่อใต้ผิวหนัง จากภาพประกอบ 12 ก. พบว่า มีการเกาะของไฟบรินรอบ ๆ เยื่อหุ้มเซลล์ในเนื้อเยื่อบริเวณนั้น (สรชี้) ซึ่งส่งผลให้เนื้อเยื่อนั้นตาย และการตายของเนื้อเยื่อจะลุกลามต่อไป กล่าวคือ ถ้าเก็บกระต่ายไว้ 18, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าขนาดของแผลกว้างขึ้น (ตาราง 7) และเมื่อใช้พิษงูที่แยกได้ส่วนที่ II ก็ทำให้มีการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณเช่นเดียวกัน (ภาพประกอบ 11 ข.) แต่มีขนาดของแผลแคบกว่า แผลที่ฉีดด้วยพิษงูที่ยังไม่ได้แยก (ภาพประกอบ 11 และตาราง 7)

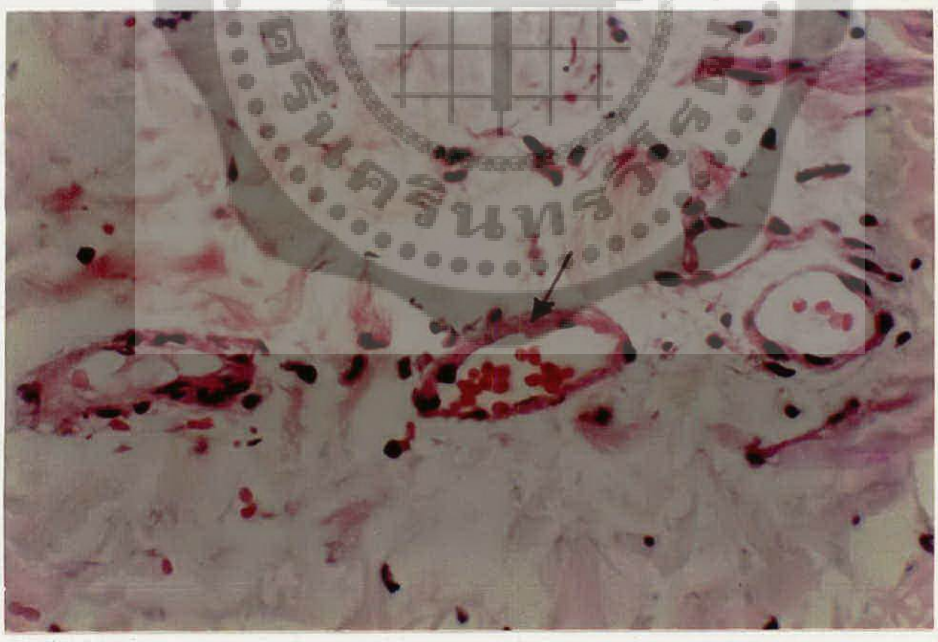
ก. กระต่ายได้รับการฉีด พิษงูที่ยังไม่ได้แยก

ข. กระต่ายได้รับการฉีด พิษงูที่แยกได้ส่วนที่ II

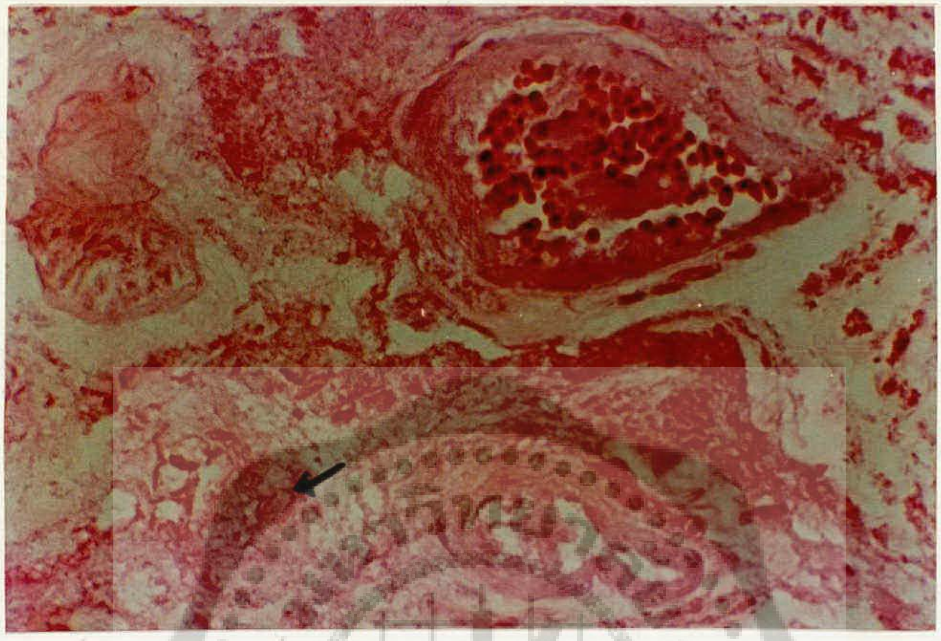
ภาพประกอบ 11 แสดงการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณเมื่อฉีดพิษงูแมวเซาที่ใต้ผิวหนังของกระต่าย



ภาพประกอบ 12 ก. แสดงสภาพเนื้อเยื่อกระต่ายที่ฉีดพิษงูที่ยังไม่ได้แยกเก็บไว้ 6 ชั่วโมง แล้วทำ biopsy



ภาพประกอบ 12 ข. แสดงสภาพเนื้อเยื่อกระต่ายที่ฉีดพิษงูแมวเซาที่ยังไม่ได้แยกและแอนตี - ฟอสฟอไลเปสเอหู เก็บไว้ 6 ชั่วโมง แล้วทำ biopsy



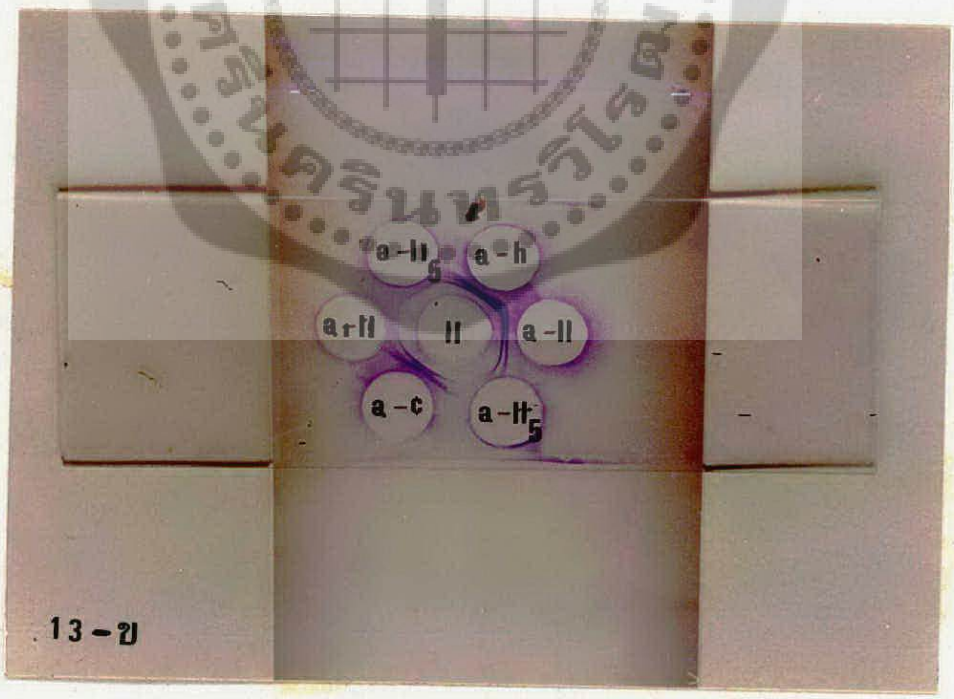
ภาพประกอบ 12 ค. แสดงสภาพเนื้อเยื่อกระต่ายที่ฉีดพิษงูแมวเซาที่ยังไม่ได้แยกเก็บไว้ 24 ชั่วโมง แล้วทำ biopsy

ตาราง 7 แสดงผลของพิษงูแมวเซา, ฟอสฟอไลเปสเอทูจากงูแมวเซา, พิษงูแมวเซากับแอนตี – ฟอสฟอไลเปสเอทู และฟอสฟอไลเปสเอทูจากงูแมวเซากับ แอนตี – ฟอสฟอไลเปสเอทู ในการทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อ เฉพาะบริเวณในกระต่าย

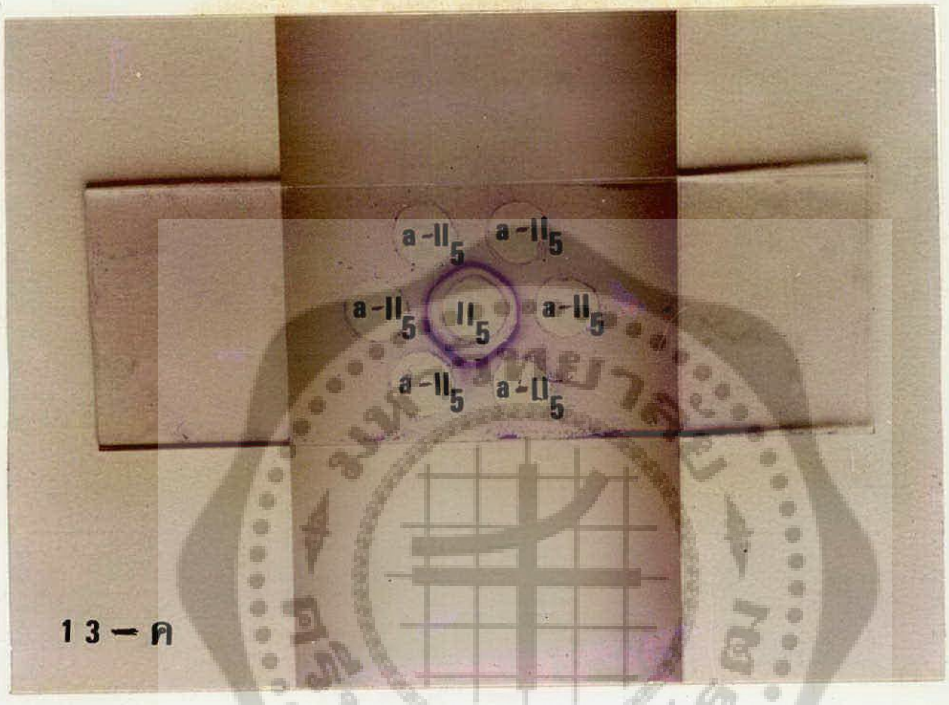
ชนิดของสารที่ฉีดเข้าใต้ผิวหนังของกระต่าย	ความกว้างของแผล (เซนติเมตร)			
	6 ชั่วโมง	18 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
1. พิษงูแมวเซาที่ยังไม่ได้แยก	2.0	4.0	4.0	5.0
2. พิษงูแมวเซาส่วนที่ II	2.5	3.5	4.0	4.5
3. พิษงูแมวเซาที่ยังไม่ได้แยกกับแอนตี – ฟอสฟอไลเปสเอทูที่ได้จากส่วนที่ II	2.0	3.0	3.0	3.5
4. พิษงูแมวเซาส่วนที่ II กับแอนตี – ฟอสฟอไลเปสเอทูที่ได้จากส่วนที่ II	2.0	2.5	3.0	3.0

8. การตรวจสอบแอนติบอดีย์ (antibody) ที่ได้จากการฉีดกระตุ้นกระต่ายด้วยพิษงูส่วนที่ยังไม่ได้แยก พิษงูที่แยกได้ส่วนที่ II และพิษงูที่แยกได้ส่วนที่ II_5 พบว่า แอนตี - ครูดวีนัม (แอนติบอดีย์ที่ได้จากการฉีดกระตุ้นกระต่ายด้วยพิษงูส่วนที่ยังไม่ได้แยก) สามารถให้พริซิพิติน ลายน์ กับพิษงูส่วนที่ยังไม่ได้แยกหลายแถบ แอนตี - ฟอสฟอไลเปสเอทู จากพิษงูส่วนที่ II สามารถให้พริซิพิติน ลายน์ กับพิษงูที่ยังไม่ได้แยก 2 แถบ และแอนตี - ฟอสฟอไลเปสเอทูจากพิษงูส่วนที่ II_5 สามารถให้พริซิพิติน ลายน์ กับพิษงูที่ยังไม่ได้แยก 1 แถบ (ภาพประกอบ 13 ก.) ส่วนพิษงูส่วนที่ II นั้น เมื่อทดสอบกับแอนตี - ครูดวีนัม และแอนตี - ฟอสฟอไลเปสเอทูส่วนที่ II ต่างก็ให้พริซิพิติน ลายน์ 2 แถบ (ที่เห็นชัดเจน) แต่เมื่อทดสอบกับแอนตี - ฟอสฟอไลเปสเอทูส่วนที่ II_5 พบว่า จะให้พริซิพิติน ลายน์ เพียง 1 แถบ (ภาพประกอบ 13 ข.) สำหรับการทดสอบแอนตี - ฟอสฟอไลเปสเอทู ที่ได้จากพิษงูส่วนที่ II_5 กับฟอสฟอไลเปสเอทูจากพิษงูส่วนที่ II_5 พบว่า เกิดพริซิพิติน ลายน์ 1 แถบ ที่ต่อครบเป็นวงกลมไม่มีแถบใดที่มีปลายแถบปัดออก (ภาพประกอบ 13 ค.)

13-ก



13-ข



c : พิษงูที่ยังไม่ได้แยก

II : ฟอสฟอไลเปสเอทูจากพิษงูส่วนที่ II

II_5 : ฟอสฟอไลเปสเอทูจากพิษงูส่วนที่ II_5

a – c : แอนตี – กรูดวีนัม

a – h : แอนตี – วีนัมจากม้า

a – II : แอนตี – ฟอสฟอไลเปสเอทูจากพิษงูส่วนที่ II

$a - II_5$: แอนตี – ฟอสฟอไลเปสเอทูจากพิษงูส่วนที่ II_5

ภาพประกอบ 13 แสดงพริชิพิติน ลายน์ ที่ได้จากการทดสอบ แอนตี – ฟอสฟอไลเปสเอทูจากการฉีดกระตุ้นพิษงูส่วนที่มีฟอสฟอไลเปสเอทูแอคติฟวิตี ในกระต่ายโดยวิธี ดับเบิล อิมมูโนดิฟฟิวชัน

9. การตรวจสอบคุณสมบัติของแอนตีบอดีย์ ที่ได้จากการฉีดกระตุ้นกระต่ายด้วยพิษงูแมวเซาที่ยังไม่ได้แยก พิษงูที่แยกได้ส่วนที่ II และพิษงูที่แยกได้ส่วนที่ II_5

9.1 ทดสอบความสามารถในการยับยั้งฟอสฟอไลเปสเอทูแอคติฟวิตี พบว่าเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งพิษงูส่วนที่ยังไม่ได้แยกด้วยแอนตี - ฟอสฟอไลเปสเอทูส่วนที่ II_5 แอนตี - ฟอสฟอไลเปสเอทูส่วนที่ II แอนตี - กรูดวีนัม และแอนตี - วีนัมจากม้า พบว่า แอนตี - ฟอสฟอไลเปสเอทูส่วนที่ II_5 มีความสามารถในการยับยั้งดีที่สุด เพราะใช้แอนตี - ฟอสฟอไลเปสเอทูส่วนที่ II_5 ที่มีปริมาณโปรตีน 45 ไมโครกรัม ก็สามารถยับยั้งการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกเนื่องจากพิษงูที่ยังไม่ได้แยก 5.8 ไมโครกรัมของโปรตีนได้หมด ในขณะที่แอนตีบอดีย์อื่น ๆ คือ แอนตี - ฟอสฟอไลเปสเอทู ที่ได้จากพิษงูส่วนที่ II แอนตี - กรูดวีนัม และแอนตี - วีนัมจากม้า จะต้องใช้ถึง 114 126 และ 127 ไมโครกรัมของโปรตีน ตามลำดับ (ตาราง 8) เมื่อเปรียบเทียบความสามารถของแอนตี - ฟอสฟอไลเปสเอทูส่วนที่ II_5 ในการยับยั้งฟอสฟอไลเปสเอทูแอคติฟวิตีในพิษงูส่วนต่าง ๆ พบว่า แอนตี - ฟอสฟอไลเปสเอทูส่วนที่ II_5 นี้ สามารถยับยั้งแอคติฟวิตีของฟอสฟอไลเปสเอทูจากพิษงูส่วนที่ II_5 ได้ดีที่สุดคือใช้เพียง 28 ไมโครกรัมของโปรตีน ขณะที่พิษงูส่วนอื่น ๆ ต้องใช้ในปริมาณที่สูงขึ้น คือ พิษงูส่วนที่ II ใช้ 50 ไมโครกรัม และส่วนที่ยังไม่ได้แยกต้องใช้ 45 ไมโครกรัม

9.2 ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณที่เกิดจากพิษงูแมวเซาที่ยังไม่ได้แยก โดยแอนตี - ฟอสฟอไลเปสเอทู พบว่า จากการฉีดแอนตี - ฟอสฟอไลเปสเอทู 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร รอบ ๆ แผลที่ฉีดพิษงู เจาะเนื้อเยื่อไปตรวจหลังการฉีดพิษงู และแอนตี - ฟอสฟอไลเปสเอทู 6 ชั่วโมง พบว่า เนื้อเยื่อยังคงปกติ ไม่มีการจับของไฟบรินที่เยื่อหุ้มเซลล์ของเนื้อเยื่อบริเวณนั้น (ภาพประกอบ 12 ข.)

ตาราง 8 แสดงความสามารถในการยับยั้งฟอสฟอไลเปสเอทูแอคติฟวิตีในส่วนต่าง ๆ ของพิษงูแมวเซา โดยแอนตี – ฟอสฟอไลเปสเอทูที่ได้จากเซรุ่มของกระต่ายที่ได้รับการกระตุ้นด้วยพิษงูส่วนต่าง ๆ และแอนตี – วีนัมจากม้า

ชนิดของแอนตี – วีนัมที่ใช้ในการยับยั้งฟอสฟอไลเปสเอทูแอคติฟวิตี	ปริมาณโปรตีนของแอนตี – วีนัม และแอนตีฟอสฟอไลเปสเอทู ที่ใช้ในการยับยั้งฟอสฟอไลเปสเอทูแอคติฟวิตี (ไมโครกรัม)		
	พิษงูที่ยังไม่ได้แยก (5.8 ไมโครกัม)*	พิษงูส่วนที่ II (4.2 ไมโครกรัม)*	พิษงูส่วนที่ II_5 (3.2 ไมโครกรัม)*
แอนตี – ฟอสฟอไลเปสเอทู จากส่วนที่ II_5	45	50	28
แอนตี – ฟอสฟอไลเปสเอทู จากส่วนที่ II	114	120	100
แอนตี – ครูดวีนัม	126	–	–
แอนตี – วีนัมจากม้า	127	136	110

*ปริมาณโปรตีนของพิษงูที่ใช้เป็นขนาดที่จะทำให้เม็ดเลือดแดง 6.6×10^8 เซลล์ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ปริมาตร 0.3 ลูกบาศก์เซนติเมตร แตกได้ 50 %

บทที่ 5

สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปและอภิปรายผล

การศึกษาเกี่ยวกับพิษงูแมวเซา เพื่อให้ทราบถึงคุณสมบัติทางเอนไซม์ที่เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของพิษงู มีผู้สนใจและศึกษามาบ้าง ส่วนใหญ่จะเป็นการศึกษาถึงความเป็นพิษของเอนไซม์ทุกส่วน ในประเทศไทยมีผู้เคยศึกษาถึงคุณสมบัติของพิษงูแมวเซาเพื่อการวิจัย คือ สัณห์ พณิชยกุล (สัณห์ พณิชยกุล 2510 : 54) และชัยฤทธิ์ โพธิสุข (ชัยฤทธิ์ โพธิสุข 2515 : 99) ต่างก็ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ แต่ละชนิดในพิษงูแมวเซา โดยวิธีแยกพิษงูด้วย DEAE cellulose และได้นำส่วนของโปรตีนที่แยกได้มาทดสอบคุณสมบัติทางเอนไซม์ทุกตัวโดยไม่จำเพาะเจาะจงลงไป ซึ่งก็ได้เป็นแนวทางแก่ผู้วิจัยในการที่จะเลือกเอนไซม์ที่น่าสนใจมาศึกษา ในการวิจัยครั้งนี้ สำหรับในต่างประเทศ มีผู้สนใจทำการวิจัยพิษงูแมวเซากันอย่างกว้างขวาง และได้ศึกษาเอนไซม์แต่ละชนิดอย่างเจาะลึก โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์ฟอสฟอไลเปสเอทู ได้มีการศึกษากันอย่างมาก ทั้งจากงูแมวเซาและจากงูประเภทอื่น ๆ เช่น Dimitrov และ Kankonkar (Dimitrov and Kankonkar. 1968 : 213 - 221) โดยแยกพิษงูแมวเซาจากอินเดีย โดยใช้ เจล เซฟาเดกซ์ จี - 75 ได้เอนไซม์หลายตัว และได้เลือกเอนไซม์ฟอสฟอไลเปสเอทูมาศึกษา พบว่า สามารถทำให้เนื้อเยื่อตายเฉพาะบริเวณ (local tissue necrosis) ในผิวหนังของกระต่าย เมื่อผู้วิจัยนำมาเป็นแนวทางในการศึกษาเอนไซม์ฟอสฟอไลเปสเอทูจากพิษงูแมวเซาในประเทศไทย โดยการแยกพิษงูแมวเซาด้วยเซฟาเดกซ์ จี - 75 ได้แยกพิษงูได้ 5 ส่วน และพบว่าส่วนที่ II เป็นส่วนที่มีฟอสฟอไลเปสเอทูแอคติฟวิตีเพียงส่วนเดียว (ภาพประกอบ 7)

เมื่อนำพิษงูที่ยังไม่ได้แยกและพิษงูที่แยกได้ส่วนที่ II มาทำดิส อะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรฟอริซีส พบว่า พิษงูส่วนที่ II มีแถบโปรตีนน้อยกว่าพิษงูที่ยังไม่ได้แยก แต่ก็ยังมีแถบของโปรตีนมากกว่า 1 แถบ แสดงว่าเอนไซม์นี้ยังไม่บริสุทธิ์ จึงได้นำเอนไซม์

ส่วนที่ II นี้มาแยกอีกครั้ง โดยผ่าน ซีเอ็ม - เซฟาเดกซ์ ซี - 50 ภายในคอลัมน์ ขนาด 2.6 × 40 เซนติเมตร แยกพิษงูส่วนที่ II ได้ 5 ส่วน (ภาพประกอบ 9) เมื่อนำมาหาฟอสฟอไลเปสเอทูแอคติฟวิตี พบว่า ส่วนที่ 5 (II_5) เป็นส่วนที่มีฟอสฟอไลเปสเอทูแอคติฟวิตี และเมื่อรวมส่วนของโปรตีนที่แยกได้แต่ละส่วนแล้ว โปรตีนที่แยกได้ส่วนที่ II_5 มีฟอสฟอไลเปสเอทูแอคติฟวิตีมากที่สุด คือปริมาณโปรตีนในส่วนนี้ 3.2 ไมโครกรัม สามารถทำให้เม็ดเลือดแดง 6.6×10^8 เซลล์ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ปริมาตร 0.3 ลูกบาศก์เซนติเมตร แตกได้ 50 % โดยมีไข่แดงเป็น substrate ในขณะที่โปรตีนที่ได้จากพิษงูส่วนที่ II ต้องใช้ในปริมาณ 4.2 ไมโครกรัม และพิษงูที่ยังไม่ได้แยกต้องใช้ปริมาณโปรตีน 5.8 ไมโครกรัม ในการทำให้เม็ดเลือดแดง 6.6×10^8 เซลล์ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ปริมาตร 0.3 ลูกบาศก์เซนติเมตร แตก 50 % โดยมีไข่แดงเป็น substrate

เมื่อนำพิษงูมาตรวจสอบคุณสมบัติต่าง ๆ ดังนี้ คือ

1. ตรวจสอบคุณสมบัติในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกโดยตรง พบว่า พิษงูแมวเซา ทั้งที่ยังไม่ได้แยก ส่วนที่แยกได้ส่วนที่ II และส่วนที่ II_5 มีคุณสมบัติทำให้เม็ดเลือดแดงแตก แม้จะเห็นว่า มีเปอร์เซนต์การแตกของเม็ดเลือดค่อนข้างต่ำ แต่จากการทดลองพบว่าความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกของพิษงูส่วนต่าง ๆ นั้น ขึ้นกับความเข้มข้นของพิษงูที่ใช้ จากตาราง 5 จะเห็นว่า ถ้าใช้พิษงูที่ยังไม่ได้แยก 350 ไมโครกรัมของโปรตีนในสารละลาย 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร จะทำให้เม็ดเลือดแดง 2 % ปริมาตร 3 ลูกบาศก์เซนติเมตร แตกได้ 5 % แต่ถ้าเพิ่มปริมาณโปรตีนให้มากขึ้น เป็น 1 มิลลิกรัม ในสารละลาย 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร จะทำให้เม็ดเลือดแดงแตก เป็น 8 % และถ้าเพิ่มพิษงูเป็น 10 มิลลิกรัม ในสารละลายพิษงู 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ก็จะทำให้เม็ดเลือดแดงแตกเป็น 18 % เมื่อใช้พิษงู ส่วนที่ II และส่วนที่ II_5 ในปริมาณโปรตีนเท่ากับพิษงูส่วนที่ยังไม่ได้แยก จะทำให้เม็ดเลือดแดงแตกในเปอร์เซนต์ที่น้อยกว่า คือ ในปริมาณโปรตีน 350 ไมโครกรัม ของส่วนที่ II และส่วนที่ II_5 ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้ 4 และ 3 % ตามลำดับ และถ้าเพิ่มพิษงูส่วนที่ II และ II_5 เป็นปริมาณโปรตีน 1 มิลลิกรัมในสารละลายพิษงู 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร พบว่าจะทำให้การแตกของเม็ดเลือดแดงเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน แต่ถ้า

เพิ่มปริมาณโปรตีนเป็น 10 มิลลิกรัม แล้ว ปรากฏว่า การแตกของเม็ดเลือด เพิ่มขึ้นอีกเพียงเล็กน้อย จากผลการทดลองดังกล่าวสามารถอธิบายได้ว่า ความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกของพิษงูแมวเซา ขึ้นกับการทำงานร่วมของเอนไซม์มากกว่า 1 ชนิดที่มีในพิษงูแมวเซา เช่นเป็นการทำงานร่วมของเอนไซม์ฟอสฟอไลเปสเอทูกับเอนไซม์โปรตีนเนส (สัณห์ พณิชยกุล 2510 : 2) แสดงว่าพิษงูส่วนที่ II และ II_5 ได้ถูกแยกเอนไซม์ที่มีส่วนร่วมในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกออกไปแล้ว จึงมีความสามารถในการทำงานนี้น้อยลง แต่ถ้าเราพิจารณาตารางที่ 3 ซึ่งเป็นตารางแสดงค่าการหาฟอสฟอไลเปสเอทูแอกติฟวิตี จะเห็นว่า พิษงูที่มี substrate อยู่ด้วยนั้น จะทำให้ความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้มากขึ้น ดังที่ได้กล่าวมาแล้วเกี่ยวกับการหาฟอสฟอไลเปสเอทูแอคติฟวิตี ทั้งนี้เป็นเพราะว่าฟอสฟอไลเปสเอทูที่มีในพิษงูแมวเซา เข้าทำปฏิกริยากับฟอสฟอไลปิดในไข่แดง ที่เรียกว่า เลซิธิน ทำให้ได้สารประกอบไลโซเลซิธิน ที่จะไปทำลายผนังเซลล์ของเม็ดเลือดแดง ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก ดังปฏิกริยาในภาพประกอบ 1 และเราทราบว่า ในร่างกายของคนและสัตว์ประกอบด้วยเซลล์มากมาย ซึ่งต่างก็มีผนังเซลล์ที่ประกอบด้วย สารฟอสฟอไลปิด ดังนั้น เมื่อพิษงูแมวเซา เข้าสู่ร่างกายของเหยื่อแล้ว ฟอสฟอไลเปสเอทูที่มีอยู่ในพิษงูแมวเซา จะเข้าทำปฏิกริยากับฟอสฟอไลปิดเหล่านั้น ทำให้ได้ไลโซเลซิธินไปทำลายผนังเม็ดเลือดแดงและเนื้อเยื่ออื่น ๆ ในร่างการของเหยื่อ เมื่อพิจารณาผลการทดลองจากตารางที่ 3 จะเห็นว่าส่วนของพิษงูแมวเซาที่แยกได้ส่วนที่ II_5 มีความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกขณะที่มี substrate ได้มากกว่าพิษงูส่วนที่ II และพิษงูที่ยังไม่ได้แยก ซึ่งก็สอดคล้องกับคำกล่าวข้างต้น และยืนยันได้ว่าพิษงูส่วนที่ II_5 เป็นส่วนที่มีฟอสฟอไลเปสเอทูสูง ขณะเดียวกันก็สอดคล้องกับคำกล่าวของ คอนเดรีย (Condrea. 1978 : 452) ที่ว่า การแตกตัว (hydrolysis) ของ substrate โดยฟอสฟอไลเปสเอทูในพิษงูนั้นขึ้นกับโครงสร้างของสารประกอบฟอสฟอไลปิดที่มีอยู่ใน substrate อันได้แก่ ไข่แดง พลาสมา หรือผนังเซลล์ของสิ่งมีชีวิต และจากการทดลองใช้เม็ดเลือด 6.6×10^8 เซลล์ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ในปริมาตร 0.3 ลูกบาศก์เซนติเมตร มาผสมกับพิษงู โดยไม่มีไข่แดง ต้องใช้ปริมาณโปรตีน

ของพิษงูสูงกว่าการทดลองที่มีไข่แดงถึง 60 เท่า ก็ยังทำให้การแตกตัวของเม็ดเลือดน้อยกว่าการแตกตัวของเม็ดเลือดในส่วนผสมที่มีไข่แดงเป็น substrate (ตาราง 5 ข.)

2. ตรวจสอบคุณสมบัติทำให้เลือดแข็งตัว พบว่าพิษงูแมวเซาที่ยังไม่ได้แยกมีคุณสมบัติเร่งการแข็งตัวของเลือดอย่างมาก คือ ในปริมาณโปรตีน 150 ไมโครกรัม ในสารละลาย 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร สามารถทำให้เลือดแข็งตัวในเวลาเฉลี่ย 7.33 วินาที (ตาราง 6) ขณะที่การแข็งตัวของเลือดปกติ ใช้เวลาเฉลี่ย 101.67 วินาที ส่วนพิษงูที่แยกได้ส่วนที่ II มีคุณสมบัติเร่งการแข็งตัวได้บ้าง คือทำให้เลือดแข็งตัวในเวลาเฉลี่ย 51.00 วินาที แต่พิษงูส่วนที่ II_5 ไม่มีคุณสมบัติเร่งการแข็งตัวของเลือด เพราะใช้เวลาในการแข็งตัวของเลือดใกล้เคียงกับการแข็งตัวของเลือดตามปกติ จากผลการทดลองนี้แสดงว่า เอนไซม์ฟอสฟอไลเปสเอทูจากงูแมวเซาไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเร่งการแข็งตัวของเลือด ในทางตรงกันข้าม จากการแยกฟอสฟอไลเปสเอทูจากพิษงู vipera berus orientale โดยบอฟฟา และคนอื่น ๆ (Boffa and others. 1976 : 828 - 838) พบว่า ฟอสฟอไลเปสเอทูมีคุณสมบัติต่อต้านการแข็งตัวของเลือด (anti coagulant activity) ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่น่าจะมีการศึกษาค้นคว้าในรายละเอียดเพื่อใช้ให้เป็นประโยชน์ในโอกาสต่อไป สำหรับผลการเร่งการแข็งตัวของเลือดจากพิษงูส่วนที่ II แสดงให้เห็นว่าการแข็งตัวของเลือดไม่ได้เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ตัวหนึ่งตัวใดโดยเฉพาะ แต่เกิดจากเอนไซม์หลายตัว เพราะเมื่อแยกเอนไซม์ออกไปแล้ว ยังทำให้เอนไซม์ที่เหลือมีคุณสมบัติเร่งการแข็งตัวของเลือด แต่มีความสามารถน้อยลงไปกว่าพิษงูที่ยังมีเอนไซม์อยู่ครบในพิษงูที่ยังไม่ได้แยก

3. ตรวจสอบคุณสมบัติการทำให้เกิด local tissue necrosis (การตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณ) พบว่าพิษงูที่ยังไม่ได้แยก และที่แยกได้ในส่วนที่ II สามารถทำให้เกิด local tissue necrosis แต่พิษงูส่วนที่ II ให้ผลของ tissue necrosis น้อยกว่าพิษงูที่ยังไม่ได้แยก คือมีแผลขนาดเล็กกว่า (ภาพประกอบ 11) และเมื่อเก็บสัตว์ทดลองไว้นาน ยิ่งทำให้ขนาดของแผลกว้างขึ้น (ตาราง 7) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการเกิด tirrue necrosis หากเกิดขึ้นแล้วจะมีการลุกลามขยายกว้างขึ้น

เรื่อย ๆ ซึ่งบางครั้งก็กินลึกจนถึงกระดูก (บุญเยือน ทุมวิภาต และวิโรจน์ นุตพันธุ์ 2525 : 82) และการทดลองพบว่า พิษงูในส่วนที่ II มีผลต่อการเกิด local tissue necrosis น้อยกว่าการฉีดกระต่ายด้วยพิษงูที่ยังไม่ได้แยก ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าการเกิด tissue necrosis เป็นการทำงานร่วมของเอนไซม์ฟอสฟอไลเปสเอทูและเอนไซม์อื่น ๆ ที่มีในพิษงูแมวเซา

เมื่อตรวจสอบคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ฟอสฟอไลเปสเอทูจากพิษงูแมวเซาแล้ว จึงได้นำพิษงูที่ยังไม่ได้แยก ที่แยกได้ในส่วนที่ II และส่วนที่ II_5 มาฉีดกระตุ้นกระต่าย เพื่อให้สร้างแอนติบอดีย์ และนำแอนติบอดีย์ที่ได้มายับยั้งฟอสฟอไลเปสเอทูแอคติฟวิตีจากการฉีดกระตุ้นกระต่าย แล้วนำเซรุ่มจากกระต่ายตัวที่ได้รับการฉีดพิษงู มาตรวจสอบด้วยวิธี ดับเบิล อิมมูโนดิฟฟิวชัน พบว่า เซรุ่มที่ได้ ต่างก็เกิด พริซิพิติน ลายน์ ทั้งกับพิษงูที่ยังไม่ได้แยก พิษงูที่แยกได้ส่วนที่ II และพิษงูส่วนที่ II_5 ตามลำดับ กล่าวคือ เซรุ่มที่ได้จากพิษงูส่วนที่ II จะเกิดพริซิพิติน ลายน์ มากกว่า 1 แถบ ทั้งกับพิษงูที่ยังไม่ได้แยก และพิษงูส่วนที่ II ถ้าเป็นเซรุ่มจากพิษงูส่วนที่ II_5 จะทำให้เกิดพริซิพิติน ลายน์ เพียงแถบเดียว ไม่ว่าจะทำปฏิกริยากับพิษงูส่วนที่ไม่ได้แยก พิษงูส่วนที่ II หรือพิษงูส่วนที่ II_5 และเพื่อบรรจุพิษงูส่วนที่ II_5 ที่หลุมกลาง และบรรจุแอนตี - ฟอสฟอไลเปสเอทูที่หลุมรอบ ๆ ที่เหลือ (ภาพประกอบ 6) จะเกิดพริซิพิติน ลายน์ แถบเดียวกับทุกหลุม และปลายของแต่ละแถบโค้งเข้าหากัน จนดูต่อเป็นเส้นโค้งเดียวกัน (ภาพประกอบ 13) จึงน่าจะเป็นไปได้ว่า เอนไซม์ฟอสฟอไลเปสเอทูที่ได้จากพิษงูส่วนที่ II_5 เป็นเอนไซม์ฟอสฟอไลเปสเอทูที่บริสุทธิ์ (purefided phospholipase A_2)

จากการนำ แอนตี - ฟอสฟอไลเปสเอทูที่ได้จากพิษงูที่ยังไม่ได้แยก พิษงูส่วนที่ II และ II_5 มาทดสอบการยับยั้งฟอสฟอไลเปสเอทูแอคติฟวิตี พบว่า แอนตี - ฟอสฟอไลเปสเอทูที่ได้จากพิษงูแมวเซาส่วนที่ II_5 สามารถยับยั้งฟอสฟอไลเปสเอทูแอคติฟวิตีที่ได้จากพิษงูที่แยกได้ส่วนที่ II_5 พิษงูที่ยังไม่ได้แยก และที่แยกได้ในส่วนที่ II และมีคุณสมบัติในการยับยั้งได้ดีกว่า แอนตี - ฟอสฟอไลเปสเอทูที่ได้จากพิษงูที่ยังไม่ได้แยก และที่แยกได้ส่วนที่ II (ตาราง 8) เป็นที่น่าสังเกตว่า แอนตี - ฟอสฟอไลเปสเอทูที่ได้จากพิษงูส่วน

ที่ II_5 มีอำนาจยับยั้งฟอสฟอไลเปสเอทูแอคติฟวิตีได้ดีกว่า แอนตีบอดีย์ที่ได้จากพิษงูส่วนอื่น ๆ จึงน่าสนใจที่จะศึกษาและพัฒนา เพื่อใช้ประโยชน์ในการสร้างเซรุ่มที่จะนำมายับยั้งฟอสฟอไลเปสเอทูแอคติฟวิตีในโอกาสต่อไป

เมื่อนำ แอนตี - ฟอสฟอไลเปสเอทูที่ได้จากพิษงูส่วนที่ II มายับยั้งการเกิด local tissue necrosis ที่เกิดจากการฉีดพิษงูที่ยังไม่ได้แยก เข้าที่ใต้ผิวหนังของกระต่าย โดยฉีดแอนตี - ฟอสฟอไลเปสเอทูปริมาตร 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร เข้าที่รอบ ๆ แผลของกระต่ายที่ฉีดพิษงูแมวเซาดังกล่าว จากการทำ biopsy หลังการฉีดพิษงู และแอนตีบอดีย์ 6 ชั่วโมง พบว่า เนื้อเยื่อส่วนที่เจาะไปตรวจ มีลักษณะปกติ ไม่เกิด local tissue necrosis (ภาพประกอบ 12 ข.) ส่วนเนื้อเยื่อกระต่ายบริเวณที่ฉีดเฉพาะพิษงูแมวเซาเพียงอย่างเดียว เริ่มเกิดการสะสมของไซบรินที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ และค่อย ๆ ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ (บริเวณลูกศรชี้ในภาพประกอบ 12 ก.) และถ้าเก็บกระต่ายไว้นาน 24 ชั่วโมง ยิ่งทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลายมากขึ้น จนกระทั่งเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลายไปจนหมด (ภาพประกอบ 12 ค. ที่ตำแหน่งลูกศรชี้) ซึ่งอาการนี้เป็นการเกิด tissue necrosis ขึ้นที่เนื้อเยื่อที่ได้รับพิษงู จากผลการทดลองนี้ จะเห็นว่า แอนตี - ฟอสฟอไลเปสเอทูที่ได้ มีคุณสมบัติในการยับยั้งฟอสฟอไลเปสเอทูแอคติฟวิตี ที่มีผลต่อการเกิด local tissue necrosis จึงน่าสนใจที่จะพัฒนาแอนตี - ฟอสฟอไลเปสเอทูนี้นำไปใช้ในการรักษา local tissue necrosis ซึ่งเป็น local effect ที่เกิดจากการได้รับพิษงู เช่น งูเห่า และงูแมวเซาได้ในโอกาสต่อไป

<u>ข้อเสนอแนะ</u>

ฟอสฟอไลเปสเอทูที่ได้จากพิษงูที่แยกได้ในส่วนที่ II และ II_5 ค่อนข้างจะเจือจาง จึงควรนำมาทำให้แห้งด้วยวิธี ไลโอฟิไลซ์ เพื่อให้มีความเข้มข้นมากขึ้น เพื่อความเหมาะสมที่จะนำมาตรวจสอบคุณสมบัติและใช้ในการทดสอบอื่น ๆ ต่อไป และยังเป็นการเก็บรักษาแอคติฟวิตีของเอนไซม์อีกด้วย เพราะปรากฏว่า ฟอสฟอไลเปสเอทูทั้ง 2 ส่วนที่ได้มานี้ เมื่อเก็บในรูปของสารละลาย จะสูญเสียแอคติฟวิตีของเอนไซม์ไป

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัย

1. ควรทำการศึกษา พิษของฟอสฟอไลเปสเอทูที่เกิดร่วมกับเอนไซม์อื่น ๆ ในพิษงูแมวเซา เพื่อการศึกษาเปรียบเทียบ

2. ควรศึกษาเอนไซม์ฟอสฟอไลเปสเอทู ในส่วนที่ II_5 ที่มีผลต่อการเกิดการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณ

3. ควรศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของ แอนตี - ฟอสฟอไลเปสเอทู ในการยับยั้งการเกิด การตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณ

4. ควรศึกษาความสัมพันธ์ของฟอสฟอไลเปสเอทูจากงูแมวเซากับงูเห่า เพื่อใช้ในการรักษาแผลที่ถูกงูเห่ากัด ในรายของผู้ถูกงูกัดที่รักษาโดยใช้เครื่องช่วยหายใจ

5. ควรศึกษาวิธีที่เหมาะสม ในการเก็บเอนไซม์ที่แยกได้จากพิษงู และแอนตีบอดีย์ที่ได้จากการกระตุ้นสัตว์ทดลองด้วยพิษงู เพื่อไม่ให้เกิดการสูญเสียแอคติฟวิตีของเอนไซม์

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

จุล กาญจนเจฑนี "งูแมวเซา" วารสารโรงพยาบาลเจ้าพระยาอภัยภูเบศร ปราจีนบุรี ปีที่ 3, ฉบับที่ 2, 1 - 6, 2529

ชัยฤทธิ์ โพธิสุข การศึกษาความเป็นพิษและการศึกษาเอนไซม์ในพิษงูแมวเซา วิทยานิพนธ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2515, 99 หน้า

บุญเยือน ทุมวิภาต และวิโรจน์ นุตพันธุ์ การรักษาผู้ป่วยถูกงูพิษกัด โรงพิมพ์พิฆเนศ 2525, 162 หน้า

มุกดา ตฤษณานนท์ "งูพิษในประเทศไทย" เอกสารประกอบการบรรยายการสัมมนาเรื่องงูพิษในประเทศไทย วันที่ 10 กรกฎาคม 2529 2 หน้า โรเนียว

วิทยาศาสตร์, กอง เอกสารวิธีทำ Lyophilize ม.ป.ป. 4 หน้า

สัณห์ พณิชยกุล การศึกษาแยกพิษงูแมวเซาออกเป็นส่วน ๆ เพื่อการศึกษาทางเอนไซม์ วิทยานิพนธ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2510, 54 หน้า

Anderson, L.A.P. Ind. J. Med. 20, 1932. pp. 1.

Boffa, C.A., M.C. Boffa and J.J. Winchenne. A phospholipase A_2 with anticoagulant activity. I. Isolation from Vipera berus venom and properties Biochem biophy Acta (Amst.) 429, 828 - 838, 1976.

Condrea E. "Hemolytic Effect of Snake Venom" Snake venom 1978. 1101 p.

Condrea, E., M. Berzilay and A. de Vries. "Study of Hemolysis in the Lethal Effects of Naja naja Venom in the Mouse and Guinia pig Toxicon 7 : 95 - 98, 1967.

Davis, B.J. Annals New York Acedemic : of Science 121 : 404 - 427, 1964.

Delori, P.J. Isolation, Purification and Study of a Toxic Phospholipase A_2 from Vipera berus venom Biochemic 53 : 941 - 948, 1971.

Dimitrov, G.D. and R.C. Kankonkar. "Fractionation of Vipera russelli Venom by Gel Filtration - I" Toxicon 5 : 213 - 221, 1968.

Feldberg, W. and C.H. Kellaway. "Liberation of Histamin from the Perfused Lung by Snake Venoms" J. Physiol. Lond 90, 1937 a.

Ganguly, S.N. ind. j. Med. Res. 24. 1936. 913 p.

Grassmann, W. and K. Hannig "Elektrophoretische Untensuchungen an Schlangen - und Inseltentoxinen. Hoppe - Seyler's Z. physiol Chem. 296 30, 1954.

Hanashiro, M.A. and others. "Neutralization of Crotoxin and Crude Venom by Rabbit Antiserum to Crotalus Phöspholipase A" Immunochemistry, 15, 745 - 750, 1978.

Ho C.L. and C.Y. Lee "Cardiovascular Effects of Phospholipase A_2 Purified from Various Snake Venoms" Proc. Natn. Sci. Coun. ROC 5 : 181, 1981.

Hudson, Leslie and Frank C. Hay. Practical Immunology. 2nd ed., London, 1980. 360 p.

Huang, H.C. and C.Y. Lee "Isolation and Phamacological Properties of Phospholipase A_2 From Vipera russellii (Russell's Viper) Snake Venom" Toxicon 22 : 207 - 217, 1984

Karber, E.A. and Manfred M. Mayer. Experimental Immunochemistry. United State of America, Charles C Thomas. Publisher, 1961. 905 p.

Lowry, O.H. and others. "Prote Measurement with the Folin Phenol — Ragent," J. Bicl. Chem. 193 : 265, 1951.

Sasaki. T. "Chemical Studies on the Poison of Formosan Cobra II. The Terminal Amino Acid Residues of Purified Poison (Neurotoxin) J. Pharm. Soc. Jpn. 77 : 845 - 847, 1957.

Slotta, K. Chemistry and biochemistry of snake venoms Fontschs. Chem org. Nat. Stoffe 12 : 406, 1955.

Slotta, K.H., Franckel - Conrat and H. "Schlangengift. III" Miteil Reinigung and Krystallisation des Klapperschlangen - Giftes. Ber. deut. 71, 1076 - 1081, 1938.

Singer, S.J. "The Molecular Organization of Biological Membranes" In Rothfield, L.J. (Ed) : Structure and Function of Biological Membranes, 146 - 222, 1971.

Suzuki, T. and S. Iwanaga. "Snake Venom" In Ecdos. E.S. (Ed) Bradykinin, Kallidin, and Kallikrein. Handbook of Experimental Pharmacology 25 : 193 - 212, 1970.

Taylor, F., S.M.K. Mallick and M.L. Ahuya. Ind. J. Med. Res. 23 : 131, 1935.

Zeller. E.A. "Advances in Enzymology" Intersirence Publishers Inc. New York 8 : 459, 1948.

Zusman, N., N. Cafmeyes and R.A. Hudson. Purification Characterization of the cordiotoxins from the venom of the thailand cobra Naja naja sismensis comp. Biochem. Physiol 6913 1981, 517 p.