

615.942

๖๖๖๖

๖.๖

การศึกษาส่วนประกอบของนิษฐาไทที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณ

ปริญญาโท

ของ

วรรณ ธรรมพาส

๖๖ พ.ศ. ๖๖๖

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒประสานมิตรเพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ

เมษายน ๖๖๖

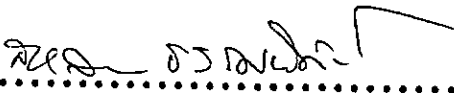
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

174660

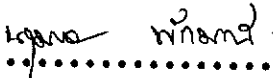
คณะกรรมการควบคุม และคณะกรรมการสอบได้พิจารณาปฏิญานพนธ์ฉบับนี้แล้ว
เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒได้.

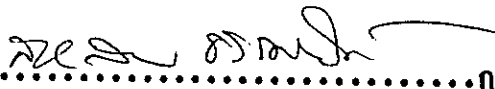
คณะกรรมการควบคุม

..........ประธาน
(อ. นฤมล นึกมน)

..........กรรมการ
(ดร. สายสนม ชรรณิกัษ)

คณะกรรมการสอบ

..........ประธาน
(อ. นฤมล นึกมน)

..........กรรมการ
(ดร. สายสนม ชรรณิกัษ)

..........กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม
(อ. อนันต์ นุทธาสถาพร)

บัณฑิตวิทยาลัยอนุมัติให้รับปฏิญานพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

..........คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศ. ดร. สมพร บัวทอง)

วันที่... ๘... เดือน... พฤษภาคม... พ.ศ. ๒๕๓๔...

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยคำแนะนำและช่วยเหลืออย่างดียิ่ง จาก อาจารย์
นฤมล พักmani กองวิทยาศาสตร์ สภาอากาศไทย อาจารย์ ดร.สายสนม ธรรมนิทัศน์ และ
อาจารย์ อนันต์ พุทธิยาสถานร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ อาจารย์นายแพทย์ นิเชฐ สัมปทานกุล ภาควิชาพยาธิวิทยา
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณา แปลผลและแนะนำทางพยาธิวิทยา ผู้วิจัย
ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ เกษร นะสัง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุมาลี เหลืองสกุล
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ที่กรุณาแก้ไขปริญญานิพนธ์เรื่องนี้
จนสมบูรณ์ยิ่งขึ้น และคุณวาทินี ธนะนิมิตร แห่งกองวิทยาศาสตร์ สภาอากาศไทย ที่กรุณาช่วยให้
คำแนะนำ การใช้เครื่องมือในการวิจัย

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณอาจารย์ วิเชียร สามารถ ผู้อำนวยการโรงเรียนศรีอยุธยา
ที่ให้การสนับสนุนในการศึกษา

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณฝ่ายวิจัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ที่ให้
ทุนสนับสนุนการวิจัย

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์นายแพทย์ศุภวัฒน์ ชูติวงศ์ ผู้อำนวยการกอง
วิทยาศาสตร์ สภาอากาศไทย ที่ได้ให้ความช่วยเหลือทางด้านสถานที่และเครื่องมือในการวิจัย

ผู้วิจัยขอโน้มรำลึกถึงพระคุณมารดาที่สนับสนุนในการศึกษา ขอขอบคุณ นายสัตวแพทย์
สมพร ธรรมพาลีศ ที่เป็นกำลังใจในการศึกษาและขอขอบคุณ พี่ ๆ น้อง ๆ และเพื่อนทั้งที่
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร และที่โรงเรียนศรีอยุธยา ตลอดจนนักวิทยาศาสตร์
การแพทย์ และเจ้าหน้าที่แห่งกองวิทยาศาสตร์ สภาอากาศไทย ที่ได้มีส่วนช่วยเหลือให้
ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

วรรณ ธรรมพาลีศ

เมษายน 2534

สารบัญ

บทที่

หน้า

1 บทนำ	1
งูเห่าไทย	2
ส่วนประกอบของนิษุ	4
งานวิจัยและแนวคิดที่เกี่ยวข้อง	4
ความสำคัญของการวิจัย	6
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	6
ขอบเขตของการวิจัย	7
ประโยชน์ที่จะได้รับจากการวิจัย	7
เอนไซม์ที่ศึกษาในนิษุเห่าไทย	7
เอนไซม์ฟอสโฟไลเฟส เอทู	7
เอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส	8
วิธีการที่ใช้แยกและวิเคราะห์นิษุเห่าไทย	9
ไอออนเอ็กซ์เชนจ์โครมาโตกราฟี	9
อิเล็กโตรโฟรีซิส	10
ปฏิกิริยาการเกิดตะกอนระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี	13
เซลล์วิทยาสำหรับพยาธิวิทยา	13
การตายของเซลล์และเนื้อเยื่อมี 2 ประเภท	14
ชนิดสาเหตุและลักษณะการตายของเซลล์และเนื้อเยื่อ	15
คำนิยามศัพท์เฉพาะ	16
2 วิธีการวิจัย	
การแยกนิษุเห่าไทยโดยวิธีไอออน เอ็กซ์เชนจ์ โครมาโตกราฟี ตามวิธีของคาร์ลสัน อาร์นเบิร์ก และอีเกอร์	17
การหาปริมาณโปรตีนตามวิธีของลาวรี	18
การวัดค่าแอกติวิตีของฟอสโฟไลเฟส เอทู ตามวิธีของเมบส์และซาเมจิมา	20

การวัดค่าแอกติวิตีของอะซิติลโคลีนเอสเตอเรส ตามวิธีของลี	21
การหาค่าความเป็นพิษแอลดี ₅₀ ตามวิธีของคาร์เบอร์ เมเยอร์ และแมนเฟรต	22
การทดสอบการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณ ของพิษที่ยังไม่ได้แยกพิษงูเห่าไทย โดยฉีดเข้าชั้นผิวหนังบริเวณขาหลังของกระต่าย	24
การวิเคราะห์พิษงูเห่าไทย โดยใช้วิธีโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟเรซิส ตามวิธีของโฮเฟอร์	26
การวิเคราะห์พิษงูเห่าไทย โดยวิธีเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตร- โฟเรซิส ตามวิธีของนิวอลล์	29
การฉีกกระดุนให้สัตว์ทดลองสร้างแอนติบอดีต่อพิษงูส่วนที่ I และส่วนที่ XIII ที่ ทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณ ตามวิธีของอานาซีโร ซิลวาและ เบียร์	29
การตรวจสอบแอนติบอดี-ของพิษงูส่วนที่ I และส่วนที่ XIII จากเซรัม ที่ได้ จากการฉีกกระดุนกระต่าย โดยวิธีดับเบิล อิมมูโนดิฟฟูชัน ตามวิธีของมิตซูโกะ และสกุภรณ์ ปิยะศิริกุล	31
การตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณ ที่เกิดจากพิษงูเห่าไทยส่วนที่ I และส่วนที่ XIII ด้วยแอนติบอดีของพิษงูส่วนที่ I และแอนติบอดีพิษงูส่วนที่ XIII	33

3 ผลการวิจัย

ผลการวิจัยแยกพิษงูเห่าไทยด้วยวิธีไอออน แอ็กซ์เชนจ์ โครมาโตกราฟี โดยใช้ ไบโอ-เร็กซ์ 70	36
ผลการศึกษาสมบัติต่าง ๆ ของพิษงูเห่าแต่ละส่วนที่แยกได้	37
ผลการหาปริมาณโปรตีนในพิษงูแต่ละส่วนที่แยกได้	37
ผลการวัดแอกติวิตีของฟอสโฟไลเฟส เอท	38
ผลการวัดแอกติวิตีของอะซิติลโคลีนเอสเตอเรส	38
ผลการศึกษาความเป็นพิษของพิษงูเห่าไทยที่ไม่ได้แยก และแต่ละส่วนที่แยกได้	38
ผลการศึกษาสมบัติการทำให้เนื้อเยื่อตายเฉพาะบริเวณของพิษงูที่ไม่ได้แยกและ แต่ละส่วนที่แยกได้	38

ผลการศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกระต่ายตรงรอยแผลที่ฉีดน้ำเกลือ 0.15 โมล ต่อลูกบาศก์เดซิเมตร นิษุที่ไม่ได้แยก นิษุส่วนที่ I และนิษุส่วนที่ XIII..	43
ผลการวิเคราะห์นิษุเพ่าไทย โดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟริซิส ตามวิธีของโอเนอร์	47
ผลการวิเคราะห์นิษุเพ่าไทยโดยวิธีเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตร- โฟริซิส ตามวิธีของบิวลส์	47
ผลการฉีดกระตุ้นไฟลต์ว์ทดลองสร้างแอนติบอดี ต่อนิษุเพ่าไทยส่วนที่ I และส่วนที่ XIII ที่ได้จากการฉีดกระตุ้นกระต่าย	50
ผลการศึกษาความสามารถในการยับยั้งการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณ โดยใช้ แอนติบอดีต่อนิษุส่วนที่ I และส่วนที่ XIII	52
 4 สรุป อภิปราย และข้อเสนอแนะ	
สรุปและอภิปรายผล	58
ข้อเสนอแนะ	61
 บรรณานุกรม	63
ภาคผนวก	67
ประวัติผู้วิจัย	71

บัญชีตาราง

ตาราง

หน้า

1	แสดงความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ ที่เหมาะสมกับขนาดของโมเลกุลของสาร ที่ต้องการแยก	12
2	แสดงสีย้อมที่เหมาะสมในการใช้ย้อมสารต่าง ๆ	12
3	แสดงความเข้มข้นของพิษงูเห่าไทยที่ยังไม่ได้แยก และแต่ละส่วนของพิษที่ แยกได้ในการหาค่าความเป็นพิษ	23
4	แสดงส่วนผสมของเจลแยกส่วน (10 %) และเจลชักนำในการวิเคราะห์พิษ งูเห่าไทย ด้วยโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟเรซิส	29
5	แสดงสมบัติต่าง ๆ ของพิษงูเห่าไทย แต่ละส่วนที่แยกได้	37
6	แสดงความกว้างของแถบเนื้อเยื่อตายเฉพาะบริเวณในกระต่ายที่เกิดจาก การฉีดพิษงูเห่าไทยที่ยังไม่ได้แยก พิษงูเห่าส่วนที่ I และ พิษงูเห่าส่วนที่ XIII	39
7	แสดง มวลโมเลกุล ของโปรตีนมาตรฐาน	50
8	แสดง ความกว้างของแถบที่เกิดจากการฉีดสารชนิดต่าง ๆ ที่ขึ้นผิวหนัง ของกระต่าย หลังจากฉีดเป็นเวลา 6 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง	53

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ

หน้า

1	แสดงภาพงูเห่าไทยและลักษณะของคอกงัน	3
2	ก. แสดงแผลเนื้อมีตายที่ยังไม่ได้รักษา ข. แสดงแผลเนื้อมีตายที่รักษาแล้ว	3
3	แสดงการย่อยสลายพอสฟอไลบิคด้วยเอนไซม์พอสฟอไลเนส เอทู	8
4	แสดงปฏิกิริยาเอสเทอร์ไฮโดรไลซิส (ester hydrolysis) ของอะซิติลโคลีน ด้วยอะซิติลโคลีน เอสเตอเรส	9
5	แสดงเรซินชนิดแคทไอออน เอ็กซ์เชนเจอร์ และแอนไอออน เอ็กซ์เชนเจอร์ ...	10
6	แสดงแผนภาพการตายของเซลล์และเนื้อเยื่อ	14
7	สภาพเนื้อเยื่อของ เซลล์ปกติ และเนื้อเยื่อที่เกิดโคแอกูเลชัน นิโครซิสใน เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ	15
8	แสดงตำแหน่งของหลุมวันที่เจาะสำหรับใช้ในการทดสอบด้วยวิธี คับเบิล อิมมูโน- คิฟนิวชัน	32
9	กราฟแสดงส่วนของโปรตีนที่ได้จากการผ่านพิษงูเห่าไทย 0.5 กรัม ลงในคอลัมน์ ไอออนเอ็กซ์เชนจ์ โครมาโตกราฟีของไฮโอ-เร็กซ์ 70 ขนาด 2.6 x 25 เซนติเมตร	36
10	ฉีพหนังของกระต่ายที่เกิดเนื้อเยื่อตายเฉพาะบริเวณเมื่อนึกพิษงูเห่าไทยที่ไม่ได้แยก เข้าชั้นฉีพหนังของกระต่าย เป็นเวลานาน (ก) 1 ชั่วโมง และ (ข) 24 ชั่วโมง	40
11	ฉีพหนังของกระต่ายที่เกิดเนื้อเยื่อตายเฉพาะบริเวณเมื่อนึกพิษงูเห่าไทยส่วนที่ I ที่ชั้นฉีพหนังของกระต่ายเป็นเวลานาน (ก) 1 ชั่วโมง และ (ข) 24 ชั่วโมง	41
12	ฉีพหนังของกระต่ายที่เกิดเนื้อเยื่อตายเฉพาะบริเวณเมื่อนึกพิษงูเห่าไทยส่วนที่ XIII ที่ชั้นฉีพหนังของกระต่ายเป็นเวลานาน (ก) 1 ชั่วโมง และ (ข) 24 ชั่วโมง	42

- 13 แสดงสภาพเนื้อเยื่อกระต่ายหลังจากการฉีดน้ำเกลือเข้มข้น 0.15 มิลลิลิตรต่อลูกบาศก์-
เดซิเมตร เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (ก.ข) และหลังจากฉีดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
(ค.ง) 44
- 14 แสดงสภาพเนื้อเยื่อกระต่ายหลังจากฉีดพิษงูเห่าไทยที่ยังไม่ได้แยก เป็นเวลา
6 ชั่วโมง (ก.ข) และหลังจากฉีดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ค.ง) 45
- 15 แสดงสภาพเนื้อเยื่อผิวหนังของกระต่ายหลังจากฉีดพิษงูส่วนที่ I เป็นเวลา 24
ชั่วโมง กำลังขยาย 100 เท่า 46
- 16 แสดงสภาพเกิดเนื้อเยื่อผิวหนังของกระต่ายหลังจากฉีดพิษงูส่วนที่ XIII เป็น
เวลา 24 ชั่วโมง กำลังขยาย 100 เท่า 46
- 17 แสดงรูปแบบของโปรตีนในพิษงูเห่าไทยที่วิเคราะห์โดยโพลีอะคริลาไมด์ เจล
อิเล็กโตรโฟรีซิส 48
- 18 แสดงรูปแบบของโปรตีนในพิษงูเห่าไทยที่วิเคราะห์โดย เอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์
เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส 49
- 19 แสดงวิธีฉีดพิษงู ที่ได้จากการทดสอบแอนติบอดีต่อพิษงูส่วนที่ I (ภาพ ก)
และแอนติบอดีต่อพิษงูส่วนที่ XIII (ภาพ ข) โดยวิธี ดับเบิลอิมมูโนดิฟฟิวชัน
หลุมกลางเป็นพิษงูและหลุมรอบ ๆ เป็นแอนติบอดีจากกระต่าย 51
- 20 แสดงสภาพของเนื้อเยื่อกระต่าย ที่ได้รับการฉีดน้ำเกลือเข้มข้น 0.15 มิลลิลิตรต่อ
ลูกบาศก์เดซิเมตร เป็นเวลา 6 ชั่วโมงและ 24 ชั่วโมง (ก.ค) เปรียบเทียบ
กับสภาพของเนื้อเยื่อกระต่ายที่ฉีดพิษงูที่ไม่ได้แยก เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และ
24 ชั่วโมง (ข.ง) 54
- 21 แสดงสภาพเนื้อเยื่อกระต่ายที่ได้รับการฉีดพิษงูเห่าไทยที่ยังไม่ได้แยก ร่วมกับ
แอนติบอดีของพิษงูส่วนที่ I เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ข.ง) เปรียบเทียบกับ
สภาพเนื้อเยื่อกระต่ายที่ฉีดพิษงูที่ไม่ได้แยก เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ก.ค) 55
- 22 แสดงสภาพเนื้อเยื่อกระต่ายที่ได้รับการฉีดพิษงูเห่าไทยที่ไม่ได้แยก ร่วมกับ
แอนติบอดีของพิษงูส่วนที่ XIII เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ข.ง) เปรียบเทียบ
กับสภาพเนื้อเยื่อกระต่ายที่ฉีดพิษงูที่ไม่ได้แยก เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ก.ค) ... 56

- 23 แสดงสภาพเนื้อเยื่อกระต่ายที่ได้รับการฉีดพิษงูเห่าไทยที่ไม่ได้แยก ร่วมกับ
แอนติบอดีของพิษงูส่วนที่ I และ XIII เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ข.ง)
เปรียบเทียบสภาพเนื้อเยื่อกระต่ายที่ฉีดพิษงูที่ไม่ได้แยก เป็นเวลา 24
ชั่วโมง (ก.ค)..... 57

บทที่ 1

บทนำ

จากรายงานทางสถิติพบว่า ประชากรที่ถูกงูพิษกัดในภาคพื้นเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีอัตราการตาย 0.5 คน ต่อประชากร 100,000 คน นับว่าเป็นอัตราการตายที่สูงรายงานดังกล่าวบ่งชี้ว่า การถูกงูพิษกัดยังเป็นปัญหาที่สำคัญของประเทศในภาคพื้นเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งรวมถึงประเทศไทยด้วย ได้มีรายงานจากกองวิชาการ สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข ประเทศไทย รายงานว่า ในจำนวนผู้ป่วยด้วยสาเหตุจากพิษธรรมชาติ 17,361 คน (พ.ศ. 2523 - 2530) เป็นผู้ป่วยเนื่องจากถูกงูพิษกัด 16,990 คน คิดเป็น 97.80 % ของผู้ป่วยทั้งหมด (วิศิษฐ์ ลิตปรีชา. 2531) สาเหตุหนึ่งที่ประเทศในภาคพื้นเอเชียตะวันออกเฉียงใต้อย่างประเทศไทย ประสบกับปัญหาอัตราการถูกงูพิษกัดสูง เนื่องจากภูมิประเทศและภูมิอากาศโดยทั่วไปเหมาะเป็นที่อยู่อาศัยของงู ซึ่งมีทั้งประเภทงูมีพิษ และงูไม่มีพิษ ลักษณะพิเศษที่งูพิษต่างจากงูไม่มีพิษ คือ งูพิษมีเขี้ยวพิษซึ่งมีท่อต่อไปสู่ต่อมพิษ เมื่องูกัดเหยือก้ามเนื้อรอบต่อมพิษจะบีบตัว ทำให้น้ำพิษไหลออกจากต่อมพิษไปสู่เขี้ยวและไปยังรอยแผลที่ถูกกัด (สุภาภรณ์ ปิยะศิริกุล. 2530)

การที่งูพิษทุกชนิดมีเขี้ยวพิษ ดังนั้น รอยเขี้ยวจึงเป็นสิ่งสำคัญที่สุดในการวินิจฉัยงูพิษกัด รอยเขี้ยวส่วนใหญ่มี 2 รอย ห่างกันประมาณ 0.5 - 3 เซนติเมตร ตามขนาดของงู

งูพิษที่สำคัญในประเทศไทยมี 7 ชนิด คือ งูเห่า (cobra) งูจงอาง (king cobra) งูสามเหลี่ยม (banded krait) งูทะเล (sea snake) งูพิษขะ (malayan pit viper) งูแมวเซา (russell's viper) และงูเขียวหางไหม้ (green pit viper, Trimeresurus) ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ตามการออกฤทธิ์ของงูพิษ คือ กลุ่มงูพิษทางระบบประสาท และกลุ่มงูพิษทางระบบโลหิต (มุกดา ตฤณานันท์ และคนอื่น ๆ. 2522)

งูพิษทางระบบประสาท ได้แก่ งูเห่า งูจงอาง งูสามเหลี่ยม และงูทะเลส่วนใหญ่

อาการทางประสาทจะเกิดขึ้นภายใน 1/2 - 1 ชั่วโมง โดยเริ่มต้นจาก หนังตาตก ลิ้นตาม้วนขึ้น กล้ามเนื้อที่ช่วยในการหายใจเป็นอัมพาต และจะเสียชีวิตจากการหยุดหายใจ

พิษทางระบบโลหิต ได้แก่ งูแมวเซา งูเขียวหางไหม้และงูเห่า ๔ พิษจะทำให้เกิดเลือดออกใต้ผิวหนังของแขนขาที่ถูกกัด เลือดออกตามไรฟัน อาเจียนเป็นเลือด และเลือดออกทั่วไป ซึ่งเป็นสาเหตุให้เสียชีวิตได้ (ชาญ โชนกุล. 2531)

งูเห่าไทย

งูเห่าไทยเป็นงูพิษ จัดอยู่ในวงศ์ Elapidae ชื่อวิทยาศาสตร์ Naja kaouthia เป็นงูพิษที่ร้ายแรงที่สุดชนิดหนึ่ง พบมากตามพื้นที่เกษตรกรรมของประเทศ ลักษณะที่สำคัญ คือ มีหัวป้อมมน เกสคบนหัวเป็นเกล็ดขนาดใหญ่ ลูกตาดำกลม แผ่นแม่เบี้ยเห็นคอกงัน (ภาพประกอบ 1) (มุกดา ตฤณานันท์. 2522) เชื่อว่าพิษติดแน่นกับตอนหน้าของขากรรไกร บางชนิดพิษได้แตกต่างกันตามสภาพสิ่งแวดล้อม เป็นงูขนาดกลางยาวเต็มที่ประมาณ 1.2-1.5 เมตร พบได้ทุกภาคของประเทศ แต่ชุกชุมตามพื้นที่ลุ่ม (ชาญ โชนกุล. 2531) ในกลุ่มผู้ถูกงูเห่ากัด พบได้ประมาณ 50% มักเกิดการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณ (local tissue necrosis) ที่บริเวณที่ถูกกัด (Pugh and others. 1980 ; Iddon, Theakston and Ownby. 1987) โดยผิวหนังบริเวณรอบรอยที่ถูกกัดจะคล้ำแล้วเกิดเนื้อตายใต้ผิวหนัง ต้องทำการรักษาโดยการเจาะเนื้อส่วนที่ตายออก (ภาพประกอบ 2) และนำเนื้อเยื่อส่วนอื่นมาปะแทน ซึ่งต้องรักษาแผลหลายครั้งกว่าจะเป็นปกติ และถ้ามีการติดเชื้อร่วมด้วยการตายของเนื้อเยื่อจะขยายกว้างและกินลึกจะรักษายากมาก อาจจะต้องตัดอวัยวะบริเวณส่วนที่ถูกกัดออกทำให้พิการได้ (ชัยใหญ่ เนืงชาติ. 2521 ; นราทร ธรรมบุตร, สมใจ เจริญประเสริฐ และผ่องพรรณ นันทานิสฺสทธิ. 2527) ดังนั้น เรื่องของการถูกงูเห่ากัดจึงเป็นปัญหาทางการแพทย์ที่สำคัญปัญหาหนึ่ง



ภาพประกอบ 1 ภาพงูเห่าไทยและลักษณะของคอกงัน



ภาพประกอบ 2 ก. แสดงแผลเนือตายที่ยังไม่ได้รับการรักษา
ข. แสดงแผลเนือตายที่รักษาแล้ว

ส่วนประกอบของพิษงู

พิษงูประกอบด้วยสารผสมเชิงซ้อน 80 % และน้ำ 20 % ในส่วนสารผสมเชิงซ้อน เป็นโปรตีน 90 % ที่เหลือ 10 % เป็นส่วนที่ไม่ใช่โปรตีน ส่วนที่เป็นโปรตีนมี 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นพิษ (toxin) และส่วนที่เป็นเอนไซม์ (enzyme)

ส่วนประกอบที่เป็นพิษสำหรับกลุ่มอีแลปิตี (elapidae) ที่สำคัญคือ นิวโรทอกซิน (neurotoxin) พบแล้วประมาณ 40 ชนิด นิวโรทอกซินของพิษงูเห่าไทย เป็นนิวโรทอกซิน สายยาว (long chain neurotoxin) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 71 ตัว มีพันธะไดซัลไฟด์ 5 พันธะ ออกฤทธิ์โดยจับกับอะซิติลโคลีนรีเซพเตอร์ของเซลล์กล้ามเนื้อรอบ ๆ ปลายประสาท ทำให้อะซิติลโคลีนจับกับรีเซพเตอร์ไม่ได้ทำให้เกิดอัมพาต (ศาสตราจารย์ ภาควิชาเภสัชศาสตร์. 2529)

ส่วนประกอบของพิษที่เป็นเอนไซม์ พบแล้วประมาณ 26 ชนิด ที่พบบ่อยในทุกชนิด มี ประมาณ 12 ชนิด เอนไซม์บางชนิดจะพบเป็นลักษณะของงูพิษแต่ละชนิด เช่น อะซิติลโคลีน-เอสเตอเรส ในกลุ่มอีแลปิตี เอนโคเปปทิเคส, ฮรอมโบนลาสคินโลคเอนไซม์ ฮรอมบินโลคเอนไซม์ และคิโนจิเนส พบในกลุ่มไวเพริตี (viperidae) เอนไซม์เหล่านี้อาจมีส่วนสำคัญ ในการทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อและความผิดปกติของการแข็งตัวของเลือด (ชาญ โชนกุล. 2531 ; Lee. 1979)

งานวิจัยและแนวคิดที่เกี่ยวข้อง

จากปัญหาของการถูกงูเห่าไทยกัดและทำให้เกิดเนื้อเยื่อตาย ได้มีนักวิจัยหลายคนให้ความสนใจ ศึกษาหว่าสาเหตุการเกิดการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณที่งูเห่ากัดได้ ที่จะทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อ เฉพาะบริเวณที่ถูกงูเห่ากัด คือ

1. เกิดจากการติดเชื้อเพราะว่าในปากงูมีจุลินทรีย์หลายชนิด (ชลดา คงวัฒนา. 2533)
2. เกิดจากพิษงู จากรายงานของกลุ่มแพทย์ของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ที่ศึกษาเนื้อเยื่อ

และจุลินทรีย์จากบาดแผลของผู้ถูกงูเห่ากัด ตั้งแต่ปี 2521-2528 จำนวน 47 ราย พบว่า ยังไม่สามารถบอกได้แน่นอนว่า การตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณในผู้ถูกงูเห่ากัดเกิดจากจุลินทรีย์หรือพิษงู (ประไพ พงษ์ประสิทธิ์, ชูลี มีตรกุล และนงคณ นพคณ. 2531) และในปี 2522 มุกดา ตฤณานันท์ ได้ทำการวิจัยโดยฉีดพิษงูเห่าไทยที่ปราศจากเชื้อเข้าชั้นผิวหนัง (intradermal) ในสุนัข ปรากฏว่า สุนัขทุกรายเกิดเนื้อเยื่อตายเฉพาะบริเวณ และรายที่พบเชื้อแบคทีเรียที่แผล แม้ว่าจะใช้ยาต้านจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียก็ไม่สามารถทำให้แผลหายเร็วขึ้น คงกินเวลานานเช่นเดิม จากผลงานวิจัยนี้จึงชี้ว่า การเกิดเนื้อเยื่อตายเฉพาะบริเวณของผู้ถูกงูเห่ากัดมิได้เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียแต่เกิดจากพิษของงูเห่า นอกจากพิษงูเห่าไทยแล้ว พิษงูเห่าพันธุ์พิษ (*Naja nigricollis*) (Pugh and others. 1980; Iddon, Theakston and Ownby. 1987) พิษงูของพิษในวงศ์แลปิดี เช่น *Oxyuranus scutellatus* (Harris and Maltin. 1982) หรือพวงงูทะเล (Mebis, Ehrenfeld and Semejima. 1983) และ *Naja naja naja* ซึ่งเป็นงูเห่าของอินเดีย (Ownby and Colberg. 1988) งูเห่าหรือพิษในวงศ์แลปิดีเหล่านี้ทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณได้เช่นเดียวกัน

ตามเหตุผลและงานวิจัยต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้น ทำให้ผู้วิจัยเกิดแนวความคิดที่จะศึกษาส่วนประกอบของพิษงูเห่าไทย ที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณและศึกษาคุณสมบัติของแอนติบอดีที่มีผลต่อการยับยั้งการตายของเนื้อเยื่อ เพื่อเป็นแนวทางในการป้องกันและรักษาอาการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณในผู้ที่ถูกงูเห่าไทยกัด

การแยกพิษงูเห่าทำได้หลายวิธี ผู้วิจัยได้รวบรวมงานวิจัยที่มีผู้ศึกษาเกี่ยวกับการแยกพิษงูเห่า คือ

ในปี 1966 คณะผู้วิจัยของไต้หวันได้ทำการแยกพิษงูเห่าไต้หวัน (*Formosan cobra*, *Naja naja atra*) ด้วยซีเอ็มเซฟาเด็กซ์ ซี 50 คอลัมน์ (CM - sephadex C-50 column chromatography) โดยมีแอมโมเนียมอะซิเตต บัฟเฟอร์ เป็นตัวชะ พบว่าแยกพิษงูเห่าได้ 12 ส่วน (Lo, Chen and Lee. 1966)

ต่อมาปี 1971 คณะผู้วิจัยซึ่งนำโดยคาร์ลสันได้แยกนิวโรทอกซิน (neurotoxin) ของงูเห่า 2 ชนิด คือ Naja naja naja และ Naja siamensis โดยใช้ไอออนเอ็กซ์เชนจ์คอลัมน์โครมาโตกราฟี (ion exchange column chromatography) ที่มีไบโอ-เร็กซ์ 70 เป็นตัวกลาง (Bio- Rex 70) และตามด้วย เจล ฟิลเตรชัน (gel filtration) ที่มีเซฟาเดกซ์ - 50 (Sephadex G 50) เป็นตัวกลาง พบว่า นิวโรทอกซินที่ได้จากพิษงูทั้ง 2 ชนิด มีความแตกต่างกัน และพบว่าพิษงูเห่าแยกได้ 10 ส่วน (Karlsson, Arnberg and Eaker. 1971)

จากการศึกษางานวิจัยดังกล่าวข้างต้น ทำให้ผู้วิจัยมีแนวความคิดนอสรุปเป็นขั้นตอนได้ดังนี้

1. แยกพิษงูออกเป็นส่วน ๆ ด้วยวิธีไอออน เอ็กซ์เชนจ์ คอลัมน์โครมาโตกราฟี
2. ศึกษาสมบัติของพิษงูที่แยกได้ โดยเน้นการศึกษาทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะ

บริเวณ

3. ผลิตแอนติบอดีป้องกันการเกิดการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณจากพิษงูเห่าไทย

ความสำคัญของการวิจัย

1. ผลจากการวิจัยทำให้ทราบถึง ส่วนของพิษงูเห่าไทยที่ทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณในเนื้อเยื่อของสัตว์ทดลอง
2. เพื่อให้ได้แอนติบอดีของพิษงูเห่าไทย ส่วนที่ทำให้เกิดเนื้อเยื่อตายเนื้อไขสันหลังในการเกิดการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณในสัตว์ทดลอง

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อแยกและศึกษาส่วนประกอบของพิษงูเห่าไทย
2. เพื่อศึกษาส่วนประกอบของพิษงูเห่าไทยที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะ

บริเวณของกระต่าย

3. เพื่อเตรียมแอนติบอดีที่มีผลในการยับยั้งการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณของ
กระต่าย และศึกษาคุณสมบัติของแอนติบอดี

ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ ใช้พิษงูเห่าไทยที่ได้จากแผนกวิจัยและพัฒนา กองวิทยาศาสตร์
สภาการศึกษาไทย เป็นพิษงูที่เก็บจากงูเห่าไทยหลายตัวรวมกัน แล้วทำให้แห้งโดยใช้เครื่องทำแห้ง
(Lyophilizer)

ประโยชน์ที่จะได้รับจากการวิจัย

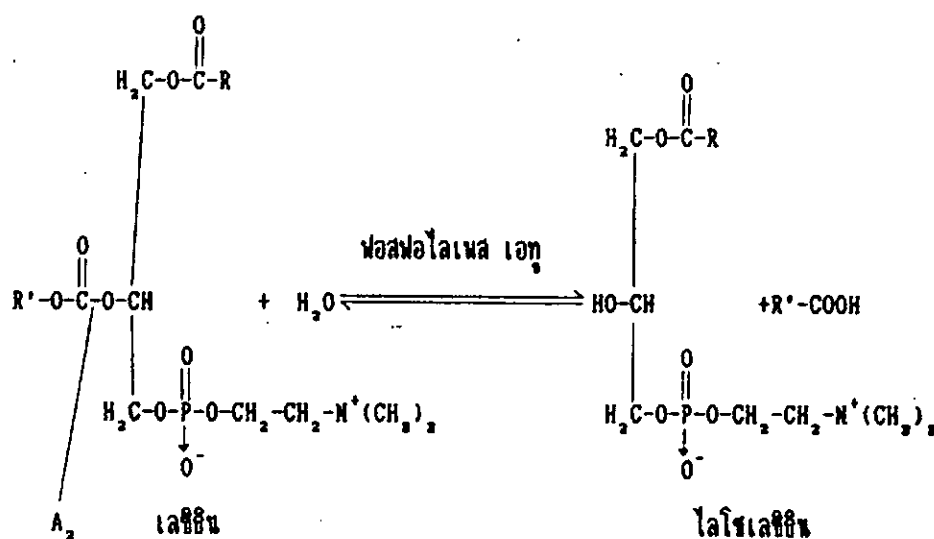
1. เพื่อให้ทราบถึงสมบัติทางประการในพิษงูเห่าไทย ที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อ
เฉพาะบริเวณในกระต่าย
2. เพื่อเป็นแนวทางในการผลิตแอนติบอดี สำหรับยับยั้งการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะ
บริเวณในผู้ป่วยที่ถูกงูเห่าไทยกัด

เอนไซม์ที่ศึกษาในพิษงูเห่าไทย

เอนไซม์ฟอสโฟไลเปส เอ₂ (phospholipase A₂, Ph A₂)

เอนไซม์ฟอสโฟไลเปสเอ₂ พบได้ทั่วไปในพิษงู ผึ้งและแมลงมุม รวมทั้งเนื้อเยื่อของ
สัตว์ทั่วไป แต่พบมากที่สุดชนิดในพิษงูวงศ์ Viperidae, Crotalidae, Elapidae และ
Hydrophidae ฟอสโฟไลเปส เอ₂ มีความสามารถในการทำปฏิกิริยาได้ดีในช่วงพีเอช 7.5-
8.5 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 11,000 - 31,000 ซับสเตรท (substrate) ที่มีความ
จำเพาะและนิยมใช้ของฟอสโฟไลเปส เอ₂ คือ ฟอสโฟไลปิด (phospholipid) หรือแอลฟา
เลซิธิน (α -lecithin) ซึ่งปกติคนจะมีเลซิธินอยู่ในเม็ดเลือด หรือในพลาสมา หรือมีในไข่แดง
ของสัตว์ ซึ่งเมื่อได้รับฟอสโฟไลเปส เอ₂ จะเปลี่ยนเลซิธินให้เป็นไลโซเลซิธิน (Lysolecithin)

โดยเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ที่ตำแหน่งเบตาคาร์บอน หรือคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ของฟอสโฟไลปิด ซึ่งสารไลโซเลซิธินที่เกิดขึ้นจะทำให้ผนังเซลล์เม็ดเลือดแดงแตก หรือผนังเซลล์ของเนื้อเยื่ออื่น ๆ ในร่างกายถูกทำลาย (Lee. 1979 ; Tan and Tan 1987 ; Tan and Arunmozhiaras. 1989)

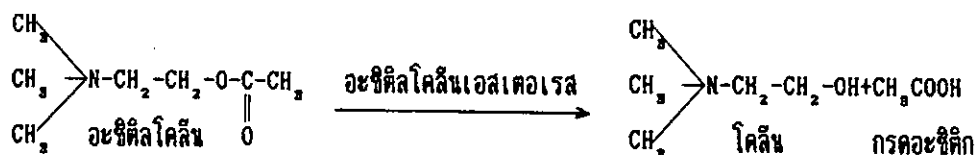


ภาพประกอบ 3 แสดงการย่อยสลายฟอสโฟไลปิดด้วยเอนไซม์ฟอสโฟไลเพล เอ็นไซม์

เอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส (Acetylcholinesterase)

มีในพิษงูพิษวงศ์ Elapidae และ Hydrophidae เป็นเอนไซม์ที่ไฮโดรไลซ์อะซิติลโคลีน (acetylcholine) เป็นโคลีน (choline) และ กรดอะซิติก (acetic acid) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 126,000 ดาลตัน ให้แอกติวิตีที่ต่ำที่สุดในช่วง pH 8-8.5 ที่อุณหภูมิ 37-38 องศาเซลเซียส มีอะซิติลโคลีนเป็นซับสเตรต เมื่อถูกพิษกีดเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส จะทำลายอะซิติลโคลีนที่หลั่งจากปลายประสาทให้เป็นโคลีน และกรดอะซิติก ทำให้สารสื่อประสาทอะซิติลโคลีนถูกทำลาย การส่งกระแสประสาทจากพรีแกงลิออนิกไฟเบอร์ (preganglionic fiber)

ไปยังโพลีแซคคาไรด์เมมเบรน (postsynaptic membrane) ไม่เกิดขึ้นทำให้การส่งงานทางระบบประสาทหยุดชะงักไม่สามารถส่งงานไปยังอวัยวะต่าง ๆ ได้ (Chang and Lee, 1965 ; Lee, 1979)



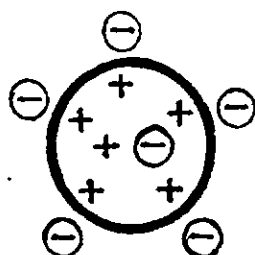
ภาพประกอบ 4 แสดงปฏิกิริยาเอสเทอร์ไฮโดรไลซิส (ester hydrolysis)
อะซิติลโคลีนด้วยอะซิติลโคลีนเอสเตอเรส

วิธีการที่ใช้แยกและวิเคราะห์พิษงูเห่าไทย

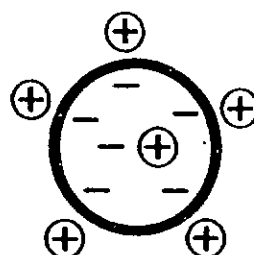
ไอออนเอ็กซ์เชนจ์โครมาโตกราฟี

พิษงูประกอบด้วยสารทางชีวเคมี ดังนั้นการแยกพิษจึงแยกโดยใช้เทคนิคการแยกสารทางชีวเคมี ซึ่งมีหลายวิธี วิธีหนึ่งที่น่าสนใจคือ ไอออนเอ็กซ์เชนจ์คอลัมน์โครมาโตกราฟีใช้หลักการดูดซับ และการแลกเปลี่ยนไอออนของเรซิน สารที่ใช้เป็นตัวแลกเปลี่ยนไอออนส่วนมากเป็นสารอินทรีย์พวกเรซิน (resin) เช่น โพลีสไตรีน (polystyrene) และ อนุพันธ์ของโพลีสไตรีน หรืออนุพันธ์ของเซลลูโลส (cellulose) โดยที่เรซินที่เป็นตัวแลกเปลี่ยนไอออนกับสารอื่นจะต้องมีสมบัติทั้งสามารถดูดซับ และมีไอออนพร้อมที่จะให้ไอออนอื่นมาแทนที่ได้เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสารละลายที่เป็นตัวชะอย่างเหมาะสม

เรซินที่ใช้ในคอลัมน์มี 2 ชนิด คือ ตัวแลกเปลี่ยนไอออนลบ หรือ แอนไอออนเอ็กซ์เชนเจอร์ (anion exchanger) และตัวแลกเปลี่ยนไอออนบวกหรือแคตไอออนเอ็กซ์เชนเจอร์ (cation exchanger) (Pharmacia fine chemical, 1980-1981)



ตัวแลกเปลี่ยนไอออนลบ
(anion exchanger)



ตัวแลกเปลี่ยนไอออนบวก
(cation exchanger)

ภาพประกอบ 5 แสดงเรซินชนิดแอนไอออนเอ็กซ์เชนเจอร์ และแคตไอออนเอ็กซ์เชนเจอร์

อิเล็กโตรโฟรีซิส

อิเล็กโตรโฟรีซิส เป็นเทคนิคการแยกสารด้วยกระแสไฟฟ้า โดยอาศัยคุณสมบัติพื้นฐานทางฟิสิกส์ อนุภาคที่มีประจุแตกต่างกัน จะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วไฟฟ้าที่มีประจุตรงข้าม กล่าวคือ อนุภาคที่มีประจุบวก (cation) จะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วลบ (cathode) อนุภาคที่มีประจุลบ (anion) จะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วบวก (anode) ส่วนอนุภาคที่ไม่มีประจุหรืออนุภาคที่มีประจุสุทธิเท่ากับศูนย์จะไม่เคลื่อนที่ ดังนั้นสารที่ไม่แสดงประจุไม่สามารถแยกด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสได้ (วไลรัตน์ นุชประมาณ. 2528)

อิเล็กโตรโฟรีซิสแบ่งเป็น 2 ชนิดคือ

1. Free electrophoresis อนุภาคของสารที่มีประจุเคลื่อนที่ในตัวกลางที่เป็นสารละลายโดยไม่มีตัวกลางค้ำจุน

2. Zone electrophoresis อนุภาคของสารที่มีประจุเคลื่อนที่ในตัวกลางที่เป็นสารละลายซึ่งถูกดูดซับอยู่บนตัวกลางค่าจุดที่เป็นของแข็ง

องค์ประกอบสำคัญในการทำ Zone electrophoresis ได้แก่ อนุภาคที่มีประจุ ตัวกลางค่าจุดและสนามไฟฟ้า

ตัวกลางค่าจุดที่ดีควรมีสสมบัติเนื้อไม่มีประจุ ยอมให้อนุภาคเคลื่อนที่โดยไม่เกิดหางยาว (tailing) และหลังจากสิ้นสุดการแยกสารแล้วสามารถนำแถบที่แยกได้มาศึกษาต่อได้ง่ายและเกิดการแพร่กระจายของสารที่แยกได้น้อยที่สุดเช่น

โพลีอะคริลาไมด์ เจล เกิดจากการเชื่อมโยงของอะคริลาไมด์ กับ เอ็น. เอ็น. ไนเมธิลีน บิส-อะคริลาไมด์ (N, N' - methylene bis-acrylamide) โดยมี เทตระเมธิลเอธิลีนไดอะมิน (tetramethyl ethylenediamine, TEMED) ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการแข็งตัว (polymerization) และมีแอมโมเนียม เปอร์ซัลเฟต (ammonium persulfate) หรือไรโบฟลาวิน (riboflavin) เป็นตัวตั้งต้นให้เกิดปฏิกิริยา (initiation factor) ทำให้เกิดอนุภาคอิสระ (free radical) ลักษณะของโพลีอะคริลาไมด์ เจล ที่แข็งตัวจะคล้ายวุ้น โครงสร้างภายในเป็นรูพรุนคล้ายร่างแห ซึ่งขนาดของรูพรุนเปลี่ยนแปลงได้โดยขึ้นกับความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ และ เมธิลีน บิส-อะคริลาไมด์ (চারার্কন স্ক্রি. 2531; pharmacia find chemical. 1980-1981)

ขั้นตอนการหาค่าหนึ่งของสารที่แยกได้ เมื่อแยกสารได้แล้วจะหาค่าหนึ่งของสารที่แยกได้ ทำได้ง่ายโดยการย้อมสีที่เหมาะสม (ตาราง 2) หรืออาจจะไม่ใช้วิธีย้อมสี ถ้าสารที่แยกได้มีคุณสมบัติเรืองแสง จะหาค่าหนึ่งโดยการส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (ริโลว์คิน นุชประมาณ. 2528)

ตาราง 1 แสดงความเข้มข้นของ อะคริลาไมด์ที่เหมาะสมกับขนาดของโมเลกุลของสารที่ต้องการแยก

ความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ (%)	ขนาดของโมเลกุล (กิโลดาลตัน)
7.5	35-300
10.0	20-250
12.5	12-50
15.0	7-40

ตาราง 2 แสดงสีย้อมที่เหมาะสมในการใช้ย้อมสารต่าง ๆ

สารที่แยก	สีย้อม
โปรตีน	ปอนเซียส เบลค, อะมิโน แบลค, เอโซคาร์มิน บี (ponceas s, amino black, azocarmine B)
ไลโปโปรตีน	โคมาสซี บริลเลียนท์ บลู อาร์ (coomassi brilliant blue R)
ไกลโคโปรตีน	เพอร์ไอโอไดค แอซิก ซีน (periodic acid schiff)
ดี เอ็น เอ หรือ อาร์ เอ็น เอ	อีไธเดียม บ्रोไมด์ (ethidium bromide)
เอนไซม์	สเปซิฟิก แอคติวิตี สเทน (specific activity stain)

โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟริซิส และ เอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟริซิส ต่างกันที่เติมสารโซเดียม โดเดซิล ซัลเฟต (เอสดีเอส) ในสารละลาย ตัวอย่างและสารละลายบัฟเฟอร์ต่าง ๆ ซึ่งเทคนิคนี้มีหลักการแยกโปรตีน โดยอาศัยขนาด หรือน้ำหนักของโมเลกุลเป็นสำคัญ โดยทำให้โปรตีนจับกับหมู่โดเดซิลซัลเฟต (dodecyl sulphate) ที่มีประจุลบของ เอสดีเอส ทำให้โปรตีนมีประจุลบเหมือนกันหมด โปรตีนจะสูญเสียสภาพธรรมชาติและสายโพลีเปปไทด์จะคลายตัวมีลักษณะเหมือนท่อนตรง (rod shape) ประโยชน์ของเทคนิคนี้ใช้ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของสารโปรตีนตัวอย่างได้ โดยทำการเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (ตาราง 7) ที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล (Hoefler, 1990-1991)

การตรวจสอบแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นโดยใช้ปฏิกิริยาการเกิดตะกอน (precipitation)

ปฏิกิริยาการเกิดตะกอน ระหว่าง แอนติเจน (antigen) กับแอนติบอดี (antibody)

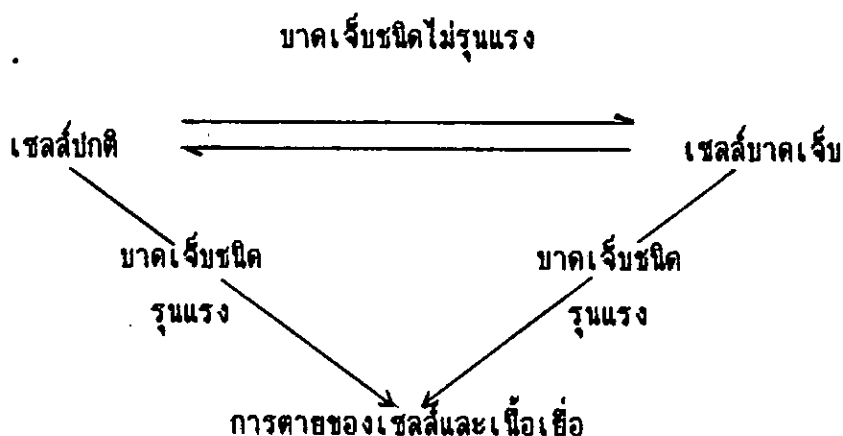
ปฏิกิริยาการเกิดตะกอนเป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่าง แอนติเจนที่เป็นสารละลายกับ แอนติบอดีที่จำเพาะในปริมาณที่ได้สัดส่วนเหมาะสมกัน เกิดเป็นแอนติเจน-แอนติบอดีคอมเพล็กซ์ ที่ไม่ละลายน้ำ ตกตะกอน ถ้าให้ปฏิกิริยาเกิดในตัวอย่าง เช่น วัณจะเห็นตะกอนเป็นเส้นสีขาว (precipitin line) การตรวจสอบแอนติบอดีโดยวิธี ดับเบิล อิมมูโนดิฟฟิวชัน (double immunodiffusion, agar gel diffusion, immunodiffusion or euchterlony) วิธีนี้ให้แอนติเจนและแอนติบอดีซึมเข้าหากันในแนวนอนทำปฏิกิริยาในวงตัวกลางที่อยู่บนแผ่นกระจก โดยเจาะหลุมในวงใสแอนติเจน และแอนติบอดีคนละหลุมให้ซึมไปในวงเข้าหากัน เมื่อพบกันตรงที่ได้อัตราส่วนกันจะเกิดการตกตะกอน (ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก, 2531 ; Hood and other, 1980)

การศึกษาการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณในการวิจัย

เซลล์วิทยาสำหรับพยาธิวิทยา

ลักษณะทั่วไปของเซลล์สัตว์ (Eukaryotic cell) ประกอบด้วย ไซโทพลาสซึม

(cytoplasm) หรือไซโตซอล (cytosol) และนิวเคลียส (nucleus) เซลล์ถูกห่อหุ้มด้วยเยื่อบางที่เรียกว่าเซลล์เมมเบรน (cell membrane) หรือ พลาสมาเมมเบรน (plasma membrane) เซลล์แต่ละชนิดมีลักษณะแตกต่างกัน โดยขึ้นอยู่กับสิ่งแวดล้อม หน้าที่และองค์ประกอบภายในเซลล์ การตายของเซลล์และเนื้อเยื่อ (necrosis หรือ cell death) เกิดขึ้นได้ ที่ใดที่หนึ่งของร่างกาย ภายหลังจากมีการบาดเจ็บของเซลล์ชนิดรุนแรงจนเซลล์ไม่สามารถจะกลับคืนสู่สภาพปกติได้ (เวคิน นพนิตย์. 2523 ; Walter and Israel. 1987 ; Nagenvoorte and Mooi. 1989)



ภาพประกอบ 6 แสดงแผนภาพการตายของเซลล์และเนื้อเยื่อ

การตายของเซลล์และเนื้อเยื่อมี 2 ประเภท คือ

1. การตายของเซลล์และเนื้อเยื่อเฉพาะที่ (local necrosis) ภายในร่างกายที่ยังมีชีวิตอยู่
2. การตายทั่วร่างกายหรือสิ้นชีวิต (somatic death)

ลักษณะทั่วไปของเซลล์และเนื้อเยื่อที่เกิดการตาย (necrotic cell and necrotic tissue) เซลล์ที่ตายจะมีการติดสีของนิวเคลียสไฮโทพลาสซึมผิดปกติ คือ ไฮโทพลาสซึม จะสีแดงเข้มกว่าปกติ ส่วนนิวเคลียสจะมีสีน้ำเงินเข้มกว่าปกติ รวมทั้งเล็กลงหรือแตกออกเป็นเกล็ด รอบเนื้อเยื่อที่ตายจะมีเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เรียกว่าเซลล์อักเสบ (inflammatory cell) ซึ่งเป็นอาการเกิดปฏิกิริยาโต้ตอบของเนื้อเยื่อ (เวคิน นพนิตย์. 2524)

ชนิดสาเหตุและลักษณะของการตายของเซลล์และเนื้อเยื่อ

โคแอกูเลชัน นิโครซิส (coagulation necrosis) สาเหตุการตายของเซลล์และเนื้อเยื่อเนื่องจากเซลล์และเนื้อเยื่อของอวัยวะขาดเลือดมาหล่อเลี้ยง หรือถูกสารพิษ เช่น เมอร์คิวรคลอไรด์ พอมัลดีไฮด์ นิซง ลักษณะนิโครซิส (necrosis) จะยังเห็นโครงร่างของเนื้อเยื่อที่บอกลักษณะของอวัยวะนั้นได้ แต่ลักษณะของเซลล์โดยละเอียดจะไม่เหลืออยู่ (ภาพประกอบ 7) ไฟบรินอยด์ นิโครซิส (Fibrinoid necrosis) สาเหตุเกิดการแพ้เกิดบ่อยที่สุดในเนื้อเยื่อคอนเนคทีฟ (connective tissue) ซึ่งทำให้มีคอลลาเจน (collagen) ลักษณะการตายของเนื้อเยื่อจะมีสีแดงเป็นเนื้อเดียวกันและไม่มีลักษณะของไฟเบอร์ (fiber) ของเนื้อเยื่อเดิมอยู่เลย (Robbins and Kumar. 1987)



เซลล์ปกติ



โคแอกูเลชัน นิโครซิส

ภาพประกอบ 7 สภาพเนื้อเยื่อของเซลล์ปกติและโคแอกูเลชัน นิโครซิส ในเซลล์กล้ามเนื้อสัตว์

คำนิยามศัพท์เฉพาะ

1. ไลโอไฟล์เซอร์ (lyophilizer) หมายถึง เครื่องมือที่ใช้ทำพิษที่เป็นของเหลวให้แห้งเป็นของแข็งโดยวิธีทำแห้งที่เรียกว่า freeze drying คือทำให้น้ำหมดไปจากพิษ
2. แอลดี₅₀ (LD₅₀) หมายถึงปริมาณพิษที่สามารถทำให้หนูขาวหนัก 18 กรัม ตาย 50% ของจำนวนหนูขาวทั้งหมดที่ใช้ในการวิจัย
3. ไบออปซี (biopsy) คือ การตัดชิ้นเนื้อจากอวัยวะของคนหรือสัตว์ขณะที่ยังมีชีวิตอยู่เพื่อนำไปศึกษา
4. พาโธโลจี (pathology) เป็นวิชาวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวกับพยาธิสภาพของระบบต่าง ๆ ในร่างกาย อวัยวะ เนื้อเยื่อ เซลล์ของคนและสัตว์ ตลอดจนศึกษาเรื่องโรคและการเกิดโรค
5. นิโครซิสหรือเซลล์แตก (necrosis or cell death) คือ การตายของเซลล์และเนื้อเยื่อ ณ ที่ใดที่หนึ่งของร่างกายภายหลังจากที่เซลล์ได้รับบาดเจ็บรุนแรง (lethal injury) ซึ่งเซลล์ภายในเนื้อเยื่อนั้นไม่สามารถกลับคืนสู่สภาพปกติได้
6. โคแอกูเลชัน นิโครซิส (coagulation necrosis) เป็นการตายของเซลล์และเนื้อเยื่อเนื่องจากเซลล์และเนื้อเยื่อของอวัยวะนั้นขาดเลือดมาหล่อเลี้ยง ลักษณะนิโครซิสแบบนี้จะเห็นโครงร่างของเนื้อเยื่อที่บอกลักษณะของอวัยวะนั้นได้ แต่ลักษณะของเซลล์โดยละเอียดจะไม่เหลืออยู่
7. ไฟบรินอยด์ นิโครซิส (fibrinoid necrosis) เป็นการตายของเซลล์และเนื้อเยื่อที่เกิดจากการแพ้ ลักษณะเซลล์หรือเนื้อเยื่อจะมีสีแดงเป็นเนื้อเดียวกันจะไม่มีลักษณะของไฟเบอร์ของเนื้อเยื่อเดิมเหลืออยู่

บทที่ 2
วิธีการวิจัย

1. การแยกพิษงูเห่าไทยด้วยวิธีไอออน เอ็กซ์เชนจ์ โครมาโตกราฟี ตามวิธีของคาร์ลสัน, อาร์นเบิร์ก และ อีเกอร์ (Karlsson, Arnberg and Eaker. 1971)

สารเคมี

1. พิษงูเห่าไทยที่ได้จากแผนกวิจัยและพัฒนา กองวิทยาศาสตร์ สภาเกษตรกรไทย เป็นพิษที่รวบรวมจากงูหลายตัว และนำมาทำให้แห้ง
2. แลกไอออน เอ็กซ์เชนจ์ ไบโอ-เร็กซ์ 70 เรซิน (cation exchange Bio-Rex 70 resin) ผลิตภัณฑ์ของบริษัทไบโอแนรด์
3. สารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมอะซิเตต เข้มข้น 0.09, 0.20, 0.14 และ 1.40 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร พีเอช 6.5

อุปกรณ์

1. คอลัมน์ที่มีขนาด 2.6x30 เซนติเมตร
2. เครื่องเก็บแยกส่วน (fractional collector) รุ่น LKB Ultrarac R ของบริษัท LKB ประเทศสวีเดน
3. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Du-6 ของบริษัท Beckman ประเทศสหรัฐอเมริกา

วิธีดำเนินการวิจัย

1. บรรจุส่วนผสมไบโอ-เร็กซ์ 70 เรซิน ในสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมอะซิเตต

เข้มข้น 0.20 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร นีเอช 6.5 ลงในคอลัมน์ ขนาด 2.6×30 เซนติเมตร จนได้ความสูง 25 เซนติเมตร

2. ผ่านคอลัมน์นี้ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมอะซิเตตเข้มข้น 0.09 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร นีเอช 6.5 ประมาณ 2 เท่าของปริมาตรทั้งหมดของเรซิน

3. ผ่านสารละลายน้ำขุ่น 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่มีความเข้มข้นของปริมาณโปรตีน 50 มิลลิกรัม ต่อ ลูกบาศก์เซนติเมตร ลงในคอลัมน์ ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมอะซิเตตเข้มข้น 0.09 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร นีเอช 6.5 จนกระทั่งไม่มีโปรตีนออกจากคอลัมน์ (คือเมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร มีค่าเท่ากับสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมอะซิเตตเข้มข้น 0.09 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร นีเอช 6.5)

4. เปลี่ยนเป็นชะด้วย (concave salt gradient) 500 ลูกบาศก์เซนติเมตร ของสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมอะซิเตตเข้มข้น 0.14 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร นีเอช 6.5 และ 500 ลูกบาศก์เซนติเมตร และสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมอะซิเตตเข้มข้น 1.40 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร นีเอช 6.5

5. เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ให้มีปริมาตรหลอดละ 3 ลูกบาศก์เซนติเมตร ด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน นำสารละลายทุกหลอดเว้นหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความคลื่น 280 นาโนเมตร

6. รวมส่วนของพิษที่แยกได้ ซึ่งอยู่ภายใต้ฟิสิกโปรตีนเดียวกัน นำแต่ละส่วนไปหาปริมาณโปรตีน, ค่าความเป็นพิษ และแอนติวิตีของเอนไซม์ฟอสโฟไลเนส เอช และอะซิติล โคลิน เอสเตอเรส ต่อไป

2. การหาปริมาณโปรตีนตามวิธีของลาวรี่ (Lowry, 1951)

สารเคมี

1. สารละลาย A : สารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น 2 % ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร

2. สารละลาย B : สารละลายคอปเปอร์ ซัลเฟตเข้มข้น 0.5 % ใน

สารละลายโซเดียม โปแตสเซียมคาร์เตต เข้มข้น 1%

3. สารละลาย C : สารละลายผสมของสารละลาย A 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร และสารละลาย B 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร

4. สารละลาย D : สารละลายผสมของนิโวลรีเอเจนต์ 1 ส่วน กับน้ำกลั่น 1 ส่วน

5. สารละลายนิซุที่ยังไม่ได้แยกและนิซุ แต่ละส่วนที่แยกได้

6. อัลบูมินจากเซรัมวัว (bovine serum albumin) เป็นสารละลายโปรตีน มาตรฐาน ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร

7. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.15 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร

อุปกรณ์

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง

วิธีดำเนินการวิจัย

1. นำสารละลายนิซุที่ต้องการหาปริมาณโปรตีน ปริมาตร 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ซึ่งเจือจางให้มีปริมาณโปรตีนอยู่ระหว่าง 20-200 ไมโครกรัม ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.15 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร ผสมกับสารละลาย C ปริมาตร 3 ลูกบาศก์เซนติเมตร เขย่าให้เข้ากันและตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลานาน 10 นาที

2. เติมสารละลาย D ปริมาตร 0.3 ลูกบาศก์เซนติเมตร เขย่าให้เข้ากันแล้ว ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

3. วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ได้ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร

4. อ่านค่าปริมาณโปรตีนของสารละลายโดยเทียบจากกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (อัลบูมินจากเซรัมวัว) ที่มีปริมาณโปรตีนตั้งแต่ 0-200 ไมโครกรัม ต่อ 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร

3. การวัดค่าแอกติวิตีของฟอสโฟไลเฟส เอช ตามวิธีของเมบส์และซามะจิมา (Mebbs and Samejima. 1986)

สารเคมี

1. นิซงูที่ยังไม่ได้แยกและนิซงูแต่ละส่วนที่แยกได้
2. สารละลายโซ่แดง
3. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.15 โมลต่อลูกบาศก์เซนติเมตร
4. สารละลายโซเดียมบารบิตอล 4.124 กรัม ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.15 โมลต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ปริมาตร 200 ลูกบาศก์เซนติเมตร

อุปกรณ์

1. เครื่องอุ่นสาร
2. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง

วิธีดำเนินการวิจัย

1. เตรียมสารละลายโซ่แดงโดยใช้โซ่แดงจากไข่ไก่ปริมาตร 0.5-0.8 ลูกบาศก์เซนติเมตร ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.15 โมลต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ปริมาตร 40 ลูกบาศก์เซนติเมตร
2. ปรับ พีเอช ของสารละลายให้มี พีเอช 6.8 ด้วยสารละลายโซเดียมบารบิตอล
3. ปรับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโซ่แดง ที่ความยาวคลื่น 900 นาโนเมตร ให้เป็น 0.600 ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.15 โมลต่อลูกบาศก์เซนติเมตร
4. ผสมสารละลายโซ่แดงปริมาตร 2.8 ลูกบาศก์เซนติเมตร กับนิซงูปริมาตร 0.2 ลูกบาศก์เซนติเมตร อุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 900 นาโนเมตร นำผลที่ได้คำนวณหา

ค่าสเปกตรัมแอมพลิจูดของฟอสฟอไรเฟส เอช (ชนิดต่อมิลลิกรัมโปรตีน) โดย 1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 900 นาโนเมตร ลดลง 1.0 มิลลิเคลต้า ของค่า การดูดกลืนแสงที่ 900 นาโนเมตร ในเวลา 1 นาที (Lee. 1979)

4. การวัดค่าแอมพลิจูดของอะซิติลโคลีนเอสเตอเรสตามวิธีของลี (Lee. 1979)

สารเคมี

1. นิซงูที่ยังไม่ได้แยกและนิซงูแต่ละส่วนที่แยกได้
2. สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.04 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร
3. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.1 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร
4. สารละลายอะซิติลโคลีนโบรไมด์ เข้มข้น 0.1 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร
5. สารละลายอัลคาไลน์ ไฮดรอกซิลามีน ซึ่งเป็นสารละลายผสมระหว่างสารละลาย ไฮดรอกซิลามีน เข้มข้น 1 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร กับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 1.75 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1
6. สารละลายกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 3 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร
7. สารละลายเฟอร์รัสคลอไรด์ เข้มข้น 1.85 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร

วิธีดำเนินการวิจัย

1. เตรียมสารละลายนิซงู ที่ต้องการวัดแอมพลิจูดของอะซิติลโคลีนเอสเตอเรส ในหลอดทดลอง หลอดละ 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมน้ำเกลือแมกนีเซียมคลอไรด์ และ สารละลายโซเดียมคลอไรด์ อย่างละ 0.1 ลูกบาศก์เซนติเมตร
2. นำส่วนผสมในข้อ 1 ไปอุ่นในเครื่องอุ่นสารที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที
3. เติมน้ำเกลืออะซิติลโคลีนโบรไมด์ หลอดละ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร และนำไปอุ่นในเครื่องอุ่นสารที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

4. เติมสารละลายอัลคาไลน์ไฮดรอกซิลามีน 4 ลูกบาศก์เซนติเมตร สารละลายไฮโดรคลอริก 2 ลูกบาศก์เซนติเมตร และสารละลายเฟอร์รึคลอไรด์ 2 ลูกบาศก์เซนติเมตร เขย่าให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน

5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

6. ทำกราฟมาตรฐานของอะซิติลโคลีน โดยให้ความเข้มข้นของอะซิติลโคลีนเป็น 1,000 3,000 5,000 7,000 และ 9,000 ไมโครโมล

7. นำค่าการดูดกลืนแสงของสารที่วัดได้เทียบค่าจากกราฟมาตรฐาน จะได้จำนวนไมโครโมลของอะซิติลโคลีนที่เหลืออยู่

8. คำนวณหาจำนวนอะซิติลโคลีนที่ถูกไฮโดรไลซ์ โดยเอาจำนวนอะซิติลโคลีนเริ่มต้น คือ 10,000 ไมโครโมล - จำนวนอะซิติลโคลีนที่เหลืออยู่ เมื่อหารจำนวนโมลอะซิติลโคลีนที่ถูกไฮโดรไลซ์ด้วย 10 นาที จะได้ค่าแอกติวิตีของอะซิติลโคลีนเอสเตอเรส เป็นยูนิต

9. นำค่าแอกติวิตีของอะซิติลโคลีนเอสเตอเรสเป็นยูนิตในสารละลายนิซงู 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร หารด้วยปริมาณโปรตีนเป็นมิลลิกรัมในสารละลายนิซงู 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร จะได้ค่าสเปซิฟิกแอกติวิตีของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส เป็นยูนิตต่อ 1 มิลลิกรัมโปรตีน

5. การหาความเป็นพิษ แอลดี₅₀ (LD₅₀) ตามวิธีของคาร์เบอร์ เมเยอร์ และแมนเฟรด
(Karber, Mayer and Manferd. 1961)

สารเคมี

1. นิซงูที่ยังไม่ได้แยก และนิซงูแต่ละส่วนที่แยกได้
2. สารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.15 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร

อุปกรณ์และสัตว์ทดลอง

1. หลอดชนิดยา พร้อมเข็มฉีดยา ขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร
2. หนูขาวที่มีน้ำหนักตัวละ 18 กรัม

ตาราง 3 แสดงความเข้มข้นของพิษงูเห่าไทยที่ยังไม่ได้แยก และแต่ละส่วนที่แยกได้ในการหาค่าความเป็นพิษ

ส่วนของพิษงู	ความเข้มข้นของพิษงูเห่าไทยที่ใช้ฉีดหนู mice หนักตัวละ 18 กรัม ในการหาค่าความเป็นพิษ (LD_{50}) (มีลิลิกกรัมต่อ 0.2 ลูกบาศก์เซนติเมตร)					
	1.25	2.50	5	10	20	40
พิษงูที่ยังไม่ได้แยก						
I						
II	0.153	0.305	0.61	1.22	2.44	4.88
III	0.029	0.579	0.114	0.228	0.456	0.912
IV	0.030	0.059	0.118	0.236	0.472	-
V	0.145	0.29	0.58	1.16	2.32	-
VI	0.011	0.022	0.044	0.088	0.176	-
VII	0.003	0.005	0.009	0.018	0.036	0.072
VIII	0.001	0.002	0.003	0.006	0.12	0.024
IX	0.004	0.008	0.016	0.032	0.064	-
X	0.001	0.002	0.004	0.008	0.016	-
XI	0.002	0.004	0.007	0.014	0.028	-
XII	0.002	0.004	0.007	0.014	0.028	-
XIII	0.008	0.016	0.032	0.063	0.126	0.252

วิธีดำเนินการวิจัย

1. เตรียมสารละลายพิษที่ยังไม่ได้แยก และพิษแต่ละส่วนที่แยกได้ให้มีความเข้มข้นของปริมาณโปรตีน (ตามตาราง 3) ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.15 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร
 2. ฉีดสารละลายในข้อ 1 ปริมาตร 0.2 ลูกบาศก์เซนติเมตร เข้าทางเส้นเลือดดำที่หางหนูขาวที่มีน้ำหนักตัวละ 18 กรัม โดยใช้หนู 5 ตัวต่อสารละลายแต่ละความเข้มข้น
 3. บันทึกจำนวนหนูตายของแต่ละความเข้มข้นของสารละลาย หลังจากเก็บไว้ 24 ชั่วโมง
 4. ผลการทดลองที่ได้ คำนวณหาค่า แอลดี $_{50}$ ตามวิธีของ คาร์เบอร์, เมเยอร์ และแมนเฟรด (Karber, Mayer and Manfred. 1961)
- สูตรการคำนวณหาค่า แอลดี $_{50}$ ตามวิธีของ คาร์เบอร์, เมเยอร์ และแมนเฟรด (Karber, Mayer and Manfred. 1961)

$$m = X_u - d (Si - 1/2)$$

m คือ log แอลดี $_{50}$

X_u คือ log ของขนาดพิษที่เริ่มทำให้หนูขาวตาย 100%

d คือ log ของค่าคงที่ของการหารระหว่างขนาดพิษ

Si คือ ผลรวมของ response ratio

response ratio คือ อัตราส่วนระหว่างจำนวนหนูที่ตายกับจำนวนหนูทั้งหมด

6. การทดสอบการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณ (local tissue necrosis) ของพิษเห่าไทย โดยฉีดเข้าชั้นผิวหนัง (Intradermal) บริเวณขาหลังของกระต่าย

สารเคมี

1. พิษเห่าไทยที่ไม่ได้แยก และพิษแต่ละส่วนที่แยกได้
2. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.15 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร

3. สารละลายเซรัมแก๊นซิงค์เห่าไทย ที่ได้จากการฉีดกระตุ้นม้าด้วยนิงซิงค์เห่าไทย
4. เอนไซม์อัลกอออล 70%

อุปกรณ์และสัตว์ทดลอง

1. หลอดนิตยานพร้อมเข็มฉีดขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร
2. หลอดนิตยานพร้อมเข็มฉีดขนาด 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร
3. กระต่ายน้ำหนักตัวละ 2.5 กิโลกรัม
4. มีดผ่าตัด
5. กล้องถ่ายภาพ

วิธีดำเนินการวิจัย

1. เตรียมนิงซิงค์เห่าไทย ที่ไม่ได้แยกในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.15 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร ให้มีปริมาณโปรตีนเข้มข้น 50 มิลลิกรัม ต่อ ลูกบาศก์เซนติเมตร
2. เตรียมนิงซิงค์ที่แยกได้แต่ละส่วน ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.15 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร ให้มีปริมาณโปรตีนตามเปอร์เซ็นต์ของแต่ละส่วนของนิงซิงค์ที่อยู่ในนิงซิงค์เห่าไทย เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร
3. เตรียมเซรัมแก๊นซิงค์เห่าไทยจากม้า ปริมาตร 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร
4. โกงชนกระต่ายที่โคนขาหลังจนเกรียน
5. ฉีดสารละลายโซเดียมคลอไรด์และสารละลายนิงซิงค์ในข้อ 1 และ 2 ปริมาตร 0.2 ลูกบาศก์เซนติเมตร เข้าชั้นผิวหนังที่โคนขาหลังของกระต่าย
6. ฉีดเซรัมแก๊นซิงค์เห่าไทย เข้าทางเส้นเลือดดำที่หูกระต่าย ตัวละ 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร
7. วัดความกว้างของรอยแผล บันทึกภาพรอยแผลที่เกิดขึ้นภายหลังการฉีดนิงซิงค์ 1, 6 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ
8. เจาะเนื้อที่บริเวณรอยแผลที่ฉีดไปทำการตรวจสอบทาง Histopathology ของ

เนื้อเยื่อภายหลังจากการฉีดพิษ 1, 6 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ

9. บันทึกภาพทาล์วโลดที่แสดงภาพการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณและจากย้อมเนื้อเยื่อ
ด้วยยาสีลภาพ

7. การวิเคราะห์พิษงูเห่าไทยโดยใช้วิธี โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟเรซิส ตามวิธี
ของโฮเฟอร์ (Hofer. 1990-1991)

สารเคมี

1. สารละลายพิษงูเห่าไทยที่ยังไม่ได้แยก พิษส่วนที่ I และพิษส่วนที่ XIII
2. สารละลายบัฟเฟอร์ ทริส-โลเวอร์ แทงค์ (tris-lower tank solution)
ละลาย ทริส 22.7 กรัม ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 1 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร
ปริมาตร 150 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วเติมน้ำให้มีปริมาตรครบ 3 ลิตร ปรับ พีเอช ให้ได้ 7.47
3. สารละลายบัฟเฟอร์ ทริส-อัพเปอร์ แทงค์ (tris-upper tank solution)
ละลายทริส 4.56 กรัม โกลซิน 3.0 กรัม ในน้ำให้มีปริมาตร 1 ลิตร ปรับ พีเอช ให้ได้ 8.89
4. สารละลายบัฟเฟอร์ ทริส-เซปারেติง เจล (tris-seperating gel)
ละลายทริส 11.47 กรัม ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 1 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร
ปริมาตร 28.92 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมน้ำให้มีปริมาตร 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร
5. สารละลายบัฟเฟอร์ ทริส-สแตคกิง เจล (tris-stacking gel buffer
solution) ละลาย ทริส 1.92 กรัม ในกรดฟอสฟอริก เข้มข้น 0.33 โมลต่อลูกบาศก์
เดซิเมตร ปริมาตร 25.6 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมน้ำให้มีปริมาตร 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร
6. สารละลายอะคริลาไมด์ สำหรับเตรียมเจลแยกส่วน (acrylamide solution
for seperating gel) ละลาย อะคริลาไมด์ 3.80 กรัม บิส 2.0 กรัม ในน้ำให้มีปริมาตร
100 ลูกบาศก์เซนติเมตร
7. สารละลายอะคริลาไมด์ สำหรับเตรียมเจลชักนำ (acrylamide solution
for stacking gel) ละลายอะคริลาไมด์ 5 กรัม บิส 1.25 กรัม ในน้ำให้มีปริมาตร 100
ลูกบาศก์เซนติเมตร

8. คตะลิสต์ (Catalyst) ประกอบด้วย 0.06% แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต และ 0.002% ไโรโบฟลาวินฟอสเฟต

9. สารละลายซูโครส-ไคย์ (Sucrose-dye solution) มีส่วนผสมของซูโครสเข้มข้น 50% และ 0.1% บรอมีนอลบลู

10. สารละลายฟิกเซทีฟ (fixative) มีความเข้มข้น 12.5% ของกรดไตรคลอโรอะซิติก

11. สารละลายโคมาสซีบลู 0.25%

12. สารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 7% ในเมทานอล 5%

13. ทีอีเอ็มอีดี (TEMED ; tetramethyl ethylene diamine)

อุปกรณ์

1. เครื่องมือในการเตรียมโพลีอะครีลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส แบบแผ่น (slab gel)
2. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้ากำลังสูง
3. เครื่องเขย่าสาร

วิธีดำเนินการวิจัย

1. เตรียมเจลแยกส่วน (separating gel) โดยผสมสารละลาย ตามตาราง 3
2. ใช้ปิเปตดูดสารละลายบรรจุในแผ่นกระจกที่เตรียมไว้ (12 x 14 เซนติเมตร) จนกระทั่งมีความสูง 9 เซนติเมตร ค่อย ๆ เติมน้ำกลั่นปิดผิวหน้าของเจลเพื่อให้ผิวหน้าเจลเรียบ เมื่อแห้งตัว ตั้งทิ้งไว้จนเจลแห้งตัว 2 ชั่วโมง
3. เตรียมเจลชักนำ (stacking gel) โดยผสมสารละลาย ตามตาราง 3
4. เทน้ำที่หน้าของผิวเจลออก เลียบหวี (comb) ตามจำนวนสารตัวอย่างที่ต้องการ ใช้ปิเปตดูดสารละลายเจลชักนำเททับจนเต็มถึงขอบกระจก ตั้งเจลไว้ให้แห้งตัว
5. บรรจุแผ่นเจลในกล่องเครื่องมือที่ใช้แยก เติมสารละลายบัฟเฟอร์

6. ตึงหรืออก นำสารละลายนิชงูแต่ละตัวอย่างปริมาตร 0.05 ลูกบาศก์เซนติเมตร ของนิชงูที่ยังไม่ได้แยก, นิชงูส่วนที่ I และส่วนที่ XIII ที่มีโปรตีน 70, 70 และ 140 ไมโครกรัม ผสมกับสารละลายซูโครส-โคย์ 5 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมตัวอย่าง

7. ต่อเครื่องมือกับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า ผ่านกระแสไฟฟ้าขนาด 15 มิลลิแอมป์ โดยให้ขั้วลบอยู่ด้านบน

8. ตัดกระแสไฟฟ้าเมื่อแถบสีของบรอมฟินอลบลู เคลื่อนที่ก่อนถึงขอบกระจกด้านล่าง ประมาณ 1 เซนติเมตร

9. นำแผ่นเจลออกจากแผ่นกระจก ทำเครื่องหมายเพื่อให้ทราบชนิดของสารตัวอย่าง ระบายแผ่นเจลลงในสารละลายนิชงู เติมน้ำไปแช่เย็บบนเครื่องแช่สารนาน 80 นาที

10. นำแผ่นเจลที่ได้ย้อมสีด้วยสารละลายโครมาสซิบูล เพื่อค้นหาตำแหน่งของโปรตีน โดยเติมสารละลายโครมาสซิบูล ใส่ลงในสารละลายข้อ 9 ในอัตราส่วนสารละลายโครมาสซิบูลต่อสารละลายนิชงู เป็น 2 ต่อ 50 แล้วไปแช่เย็บบนเครื่องแช่เย็บนาน 1 ชั่วโมง

11. นำแผ่นเจลมาล้างสีส่วนเกินออกด้วยสารละลายกรดอะซิติกในเมทานอล จนเห็นแถบโปรตีนที่ติดสีของโครมาสซิบูลชัดเจน

12. ถ่ายรูปแผ่นเจล

ตาราง 4 แสดงส่วนผสมของเจลแยกส่วน (10%) และเจลชักนำ ในการวิเคราะห์พิษงูเห่าไทย ด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟริซิส

สาร	เจลแยกส่วน 10 % (ลูกบาศก์เซนติเมตร)	เจลชักนำ (ลูกบาศก์เซนติเมตร)
สารละลายอะคริลาไมด์ (6)	2.5	-
สารละลายอะคริลาไมด์ (7)	-	2
บัฟเฟอร์สำหรับเจลแยกส่วน (4)	2.5	-
บัฟเฟอร์สำหรับเจลชักนำ (5)	-	1
น้ำ	3.75	-
คะตะลิสต์ (8)	1.25	1
ทีอีเอ็มอีดี (TEMED)	20 ไมโครลิตร	4 ไมโครลิตร

การวิเคราะห์พิษงูเห่าไทยโดยวิธีเอดส์เจล โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟริซิส ตามวิธีของ
นีวิลล์ (Neville, 1971) รายละเอียดอยู่ในภาคผนวก

8. การฉีดกระตุ้นให้สัตว์ทดลองสร้างแอนติบอดีต่อพิษงูเห่าไทย ส่วนที่ I และส่วนที่ XIII
ที่ทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณ ตามวิธีของ ฮานาชิโร, ซิลวาและเบียร์
(Hanashiro, Silva and Bier, 1978)

สารเคมี

1. พิษงูเห่าไทย ส่วนที่ I และ XIII ที่ทำแห้ง
2. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.15 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร
3. Freund's complete adjuvant ซึ่งเป็นสารที่ช่วยให้สัตว์ทดลองสร้าง

แอนติบอดีได้เต็มที่

อุปกรณ์และสัตว์ทดลอง

1. หลอดนิกยานพร้อมเข็มนิกยานขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร
2. กระต่ายที่มีน้ำหนัก 2.5 กิโลกรัม

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ละลายส่วนประกอบพิษงูเห่าไทยส่วนที่ I และ XIII แต่ละส่วนในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.15 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร ให้ความเข้มข้นของโปรตีน 400 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร
2. นำสารละลายในข้อ 1 ผสมกับ Freund's complete adjuvant ในปริมาณเท่า ๆ กัน (โดยปริมาตรต่อปริมาตร)
3. ฉีดส่วนผสมในข้อ 2 เข้าทางกล้ามเนื้อ (intramuscular) บริเวณโคนขาหลังของกระต่าย ในปริมาตร 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ทำให้กระต่ายได้รับพิษครั้งแรก มีปริมาณโปรตีน 100 ไมโครกรัม
4. เมื่อเวลาผ่านไป 2 สัปดาห์ เตรียมสารละลายพิษงู ส่วนที่ I และ XIII แต่ละส่วนในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.15 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร ให้ความเข้มข้นของโปรตีนเป็น 400 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ฉีดสารละลายพิษงูนี้ที่ชั้นใต้ผิวหนัง (subcutaneous) เป็นจุดบริเวณหลังของกระต่ายจุดละ 0.2 ลูกบาศก์เซนติเมตร จำนวน 5 จุด
5. สัปดาห์ที่ 4 เตรียมสารละลายของส่วนประกอบพิษงูส่วนที่ I และ XIII แต่ละส่วนให้ความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ฉีดสารละลายพิษงูที่ชั้นผิวหนัง (intradermal) ของกระต่ายปริมาตร 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร
6. สัปดาห์ที่ 5 เจาะเลือดกระต่ายทางเส้นเลือดที่หู ตั้งทิ้งไว้ให้เลือดแข็งตัว แยกเอาเซรุ่มมาใช้

9. การตรวจสอบแอนติบอดีของชิ้นส่วนที่ 1 และส่วนที่ XIII จากเซรัมที่ได้จากการฉีดกระตุ้นกระต่าย ด้วยวิธี คัมเบล อิมมูโนดิฟฟิวชัน ตามวิธีของมิตซูกิยะ (Mitsuko, 1989) และ สุภาภรณ์ ปิยะศิริกุล (2530)

สารเคมี

1. สารละลายบัฟเฟอร์ โซเดียมบิซทอล ไฮโดรเจนคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.05 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร พีเอช 8.2 มีส่วนผสมของสารละลาย

โซเดียมบิซทอล

47.6 กรัม

สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร ปริมาตร 69 ลูกบาศก์เซนติเมตร

สารละลายโซเดียมเอไซด์เข้มข้น 10%

ปริมาตร 4.2 ลูกบาศก์เซนติเมตร

เติมน้ำกลั่นให้สารละลายมีปริมาตรครบ

1,000 ลูกบาศก์เซนติเมตร

2. สารละลายวุ้น (โนเบิลอาการ์) ให้มีความเข้มข้น 1.5% ในสารละลายบัฟเฟอร์ โซเดียมบิซทอลไฮโดรเจนคลอไรด์

3. สารละลายโคมาลซิบลูในกรดอะซิติก ที่มีโคมาลซิบลู 0.5% ในสารละลาย กรดอะซิติก 20%

4. สารละลายวุ้น 1% สำหรับเคลือบผิวสไลด์

5. สารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.15 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร

อุปกรณ์

1. แผ่นสไลด์ขนาด 1x3 นิ้ว

2. ก่อ่งที่อ้อมตัวด้วยไอน้ำ

3. บีเปตอัตโนมัติ

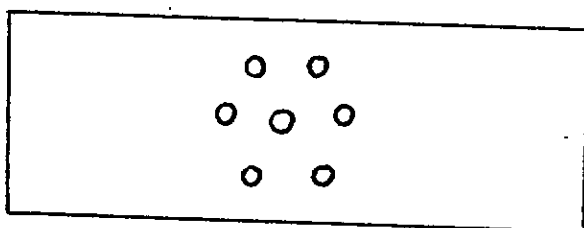
4. เครื่องปั๊มสุญญากาศ

5. ตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

6. กล้องถ่ายรูป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. เคลือบแผ่นสไลด์ด้วยสารละลายวุ้น 1% ปริมาตร 1.0 ลูกบาศก์เซนติเมตร
เปลี่ยนให้ลมน้ำเลมอทั่วแผ่น อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
2. หลอมสารละลายวุ้น 1.5 % ในสารละลายบัฟเฟอร์ยาพิคตอลไฮโครเจนคลอไรด์ ใช้
ปิเปตดูดสารละลายวุ้นปริมาตร 3 ลูกบาศก์เซนติเมตร เทลงบนสไลด์ที่เคลือบแล้วจำนวน 2 แผ่น
ปล่อยให้วุ้นแข็งตัวในกล่องความชื้น
3. เจาะวุ้นให้เป็นหลุม (ดังแสดงในภาพประกอบ 8)



ภาพประกอบ 8 แสดงตำแหน่งของหลุมวุ้นที่เจาะสำหรับใช้ในการทดสอบด้วยวิธี คับเบิล
อิมมูโนดิฟฟิวชัน

4. หยดสารละลายแอนติเจน คือ นิษฐานแต่ละส่วน ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อ
ลูกบาศก์เซนติเมตร ลงในหลุมกลางของแผ่นสไลด์ ส่วนหลุมที่อยู่รอบ ๆ ให้หยดแอนติบอดีที่ได้
จากเซรุ่มของกระต่ายที่รับการฉีดกระตุ้นด้วยแอนติเจน ซึ่งทำให้เจือจางเป็นลำดับ ๆ ละ 2 เท่า
ปริมาตรที่หยดหลุมละ 5 ไมโครลิตร

สไลด์แผ่นที่

แอนติเจน

แอนติบอดีต่อ

1	ส่วนประกอบนิษฐานส่วนที่ I	ส่วนประกอบนิษฐานส่วนที่ I
2	ส่วนประกอบนิษฐานส่วนที่ XIII	ส่วนประกอบนิษฐานส่วนที่ XIII

5. นำสไลด์ทั้ง 2 แผ่น เก็บไว้ในกล่องที่อ้อมตัวด้วยไอน้ำ และนำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

6. นำแผ่นสไลด์มาล้างโปรตีนส่วนที่เกินออกด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.15 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร หลาย ๆ ครั้ง และล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วใช้กระดาษกรองเนื้อละเอียด ปิดทับวันบนแผ่นสไลด์ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

7. นำแผ่นสไลด์อ้อมสีด้วยสารละลายโครมาสซึบลูวาน 10 นาที จากนั้นล้างสีส่วนเกินออกด้วยสารละลายกรดอะซิติก 20% หลาย ๆ ครั้ง จนเห็นแถบสีน้ำเงินของพริซินตินลายน์

8. บันทึกภาพการเกิดแถบสีน้ำเงินของพริซินตินลายน์

10. การตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณ ที่เกิดจากพิษงูเห่าไทย นิขุส่วน I และส่วนที่ XIII ด้วยแอนติบอดีของนิขุส่วนที่ I และส่วนที่ XIII

สารเคมี

1. นิขุส่วนที่ I และส่วนที่ XIII
2. แอนติบอดีของนิขุส่วนที่ I และส่วนที่ XIII
3. สารละลายเซรุ่มแก้นิขุเห่าไทยที่ได้จากม้า
4. สารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.15 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร

อุปกรณ์และสัตว์ทดลอง

1. หลอดนิคยา พร้อมเข็มนิคยา ขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร
2. หลอดนิคยา พร้อมเข็มนิคยา ขนาด 20 ลูกบาศก์เซนติเมตร
3. กระต่ายน้ำหนักตัวละ 2.5 กิโลกรัม
4. กล้องถ่ายรูป

วิธีดำเนินการวิจัย

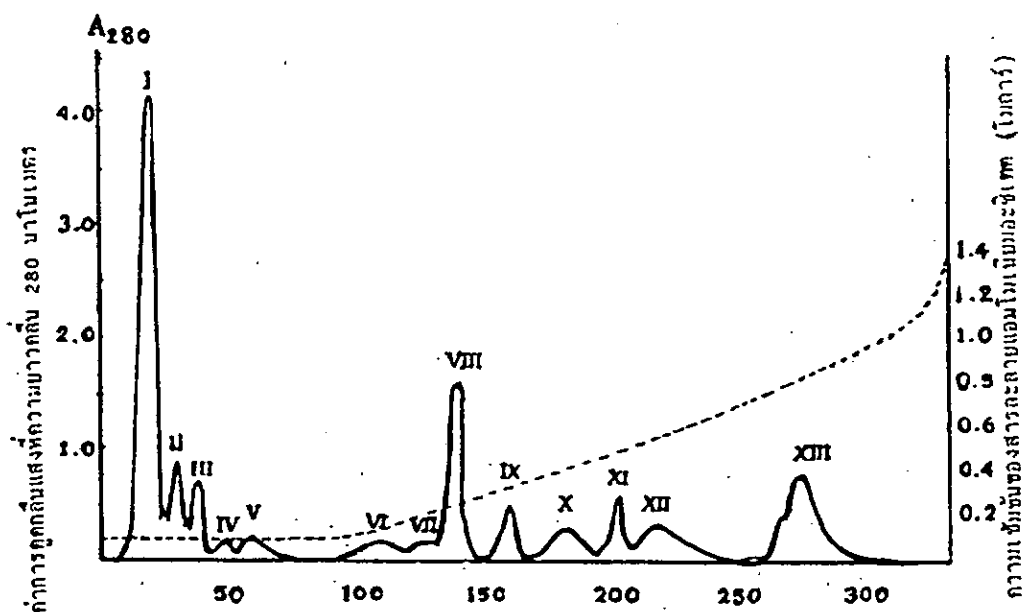
1. เตรียมสารละลายของนิษฐาไพไทยที่ยังไม่ได้แยกในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.15 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร ให้มีความเข้มข้นของปริมาณโปรตีน 50 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร
2. เตรียมสารละลายนิษฐา ส่วนที่ I และส่วนที่ XIII ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.15 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร ให้มีความเข้มข้นของปริมาณโปรตีนเป็น 13.125 และ 12.60 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร
3. โกงชนกระต่ายที่โคนขาหลังทั้งสองข้างจนเกรียนจำนวน 6 ตัว
4. ฉีดสารละลายนิษฐาในข้อ 1 และ ข้อ 2 ปริมาตร 0.2 ลูกบาศก์เซนติเมตร เข้าชั้นใต้ผิวหนังที่โคนขาหลังทั้งสองข้างของกระต่าย
5. กระต่ายตัวที่ 1 ฉีดสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.15 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร
6. กระต่ายตัวที่ 2 ฉีดด้วยนิษฐาที่ยังไม่ได้แยกที่ขาหลังข้างหนึ่ง และอีกข้างหนึ่งฉีดด้วยนิษฐาที่ยังไม่ได้แยก และตามด้วยแอนติบอดีต่อนิษฐาส่วนที่ I รอบ ๆ รอยแผล 5 จุด ๆ ละ 0.04 ลูกบาศก์เซนติเมตร
7. กระต่ายตัวที่ 3 ฉีดในทำนองเดียวกันกับกระต่ายตัวที่ 2 แต่เปลี่ยนเป็นแอนติบอดีต่อนิษฐาส่วนที่ XIII
8. กระต่ายตัวที่ 4 ทำนองเดียวกันกับตัวที่ 2 แต่เปลี่ยนเป็นแอนติบอดีต่อนิษฐาส่วนที่ I และส่วนที่ XIII ผลมกันโดยปริมาตรเท่ากัน
9. กระต่ายตัวที่ 5 ฉีดสารละลายนิษฐาส่วนที่ 1 ทั้งสองข้าง และฉีดยาแอนติบอดีของนิษฐาส่วนที่ I รอบ ๆ รอยแผล 5 จุด ๆ ละ 0.04 ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่โคนขาหลังของกระต่าย
10. กระต่ายตัวที่ 6 ฉีดสารละลายนิษฐา ส่วนที่ XIII ทั้งสองข้าง และฉีดยาแอนติบอดีของนิษฐา ส่วนที่ XIII รอบ ๆ รอยแผล 5 จุด ๆ ละ 0.04 ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่โคนขาหลังของกระต่าย (ฉีดเข้าชั้นผิวหนังของกระต่าย)
11. ฉีดเซรุ่มให้กระต่าย ที่เส้นเลือดที่ขาทุกตัวตัวละ 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร
12. ถ่ายภาพผิวหนังของกระต่ายบริเวณรอยแผลที่ฉีด เมื่อฉีดเป็นเวลานาน 6 และ 24 ชั่วโมง วัดขนาดความกว้างของแผล บันทึกผล

13. เจาะเนื้อกระต่ายบริเวณรอยแผลที่ฉีด เพื่อทำ biopsy และ ตรวจสอบพยาธิ
ของเนื้อเยื่อ เมื่อฉีดเป็นเวลานาน 6 และ 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายภาพทาลัสไลต์

บทที่ 3
ผลการวิจัย

1. ผลการแยกนิษุเห่าไทยด้วยวิธีไอออน เอ็กซ์เชนจ์ โครมาโตกราฟีโดยใช้ไบโอ-เร็กซ์ 70

เมื่อนิษุเห่าไทย 0.5 กรัม ที่ละลายในสารละลาย 0.09 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร แอมโมเนียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.5 ปริมาตร 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร ลงในคอลัมน์ขนาด 2.6×25 เซนติเมตร ที่บรรจุไบโอ-เร็กซ์ 70 แยกได้ 13 ส่วน ให้ชื่อว่า I , II , III , IV , V , VI , VII , VIII , IX , X , XI , XII และ XIII ตามลำดับ (ภาพประกอบ 9)



ลำดับที่ของหลอด

ภาพประกอบ 9 กราฟแสดงส่วนของโปรตีนที่ได้จากการผ่านนิษุเห่าไทย 0.5 กรัม ลงในคอลัมน์ ไอออน เอ็กซ์เชนจ์ โครมาโตกราฟี ของ ไบโอ-เร็กซ์ 70 ขนาด 2.6×25 เซนติเมตร ะด้วยสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตต 0.09 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร พีเอช 6.5 และ ตามด้วย concave salt gradient ของสารละลายแอมโมเนียม อะซิเตต พีเอช 6.5 ความเข้มข้น 0.14 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร ถึง 1.40 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร เก็บ สารละลายหลอดละ 3 ลูกบาศก์เซนติเมตร

2. ผลการศึกษาสมบัติต่างๆ ของนิษฐเห่าแต่ละส่วนที่แยกได้

2.1 ผลการหาปริมาณโปรตีนในนิษฐเห่าแต่ละส่วนที่แยกได้

จากการหาปริมาณโปรตีนในนิษฐเห่าแต่ละส่วนที่แยกได้ เทียบกับปริมาณโปรตีนในนิษฐเห่าที่ไม่ได้แยกจะเห็นว่านิษฐส่วนที่ I เป็นส่วนประกอบที่มีในนิษฐเห่ามากที่สุด คือ 26.25 % รองลงมาคือ นิษฐส่วนที่ XIII และ VIII ตามลำดับ (ตาราง 5)

ตาราง 5 แสดงสมบัติต่าง ๆ ของนิษฐเห่าไทยที่แยกได้

ส่วนของนิษฐ	Yield (%)	LD ₅₀ (มิลลิกรัมต่อ น้ำหนักหนู 1 กิโลกรัม)	สเปกตรัมออกฤทธิ์ ของฟอสฟอไรเนส เอกู (ยูนิต์ต่อมิลลิ กรัมโปรตีน)	สเปกตรัมออกฤทธิ์ ของอะริคิลโคลิค เอสเตอเรส (ยูนิต์ต่อมิลลิกรัม โปรตีน)	การตาย ของเนื้อเยื่อ
I	26.25	30.60	106	658	+
II	2.30	8.65	751	5000	0
III	1.85	15.65	1331	3895	0
IV	0.81	38.35	1707	2815	0
V	1.72	2.90	1406	4000	0
VI	1.01	1.65	52	2370	0
VII	0.83	0.50	100	3000	0
VIII	14.54	0.15	22	306	0
IX	3.71	0.45	191	596	0
X	2.61	0.20	50	1034	0
XI	1.55	0.20	0	1443	0
XII	0.98	0.30	0	2585	0
XIII	25.20	1.40	0	593	+
รวม	83.36	-	-	-	-
นิษฐที่ยัง ไม่ได้แยก	100.00	0.30	404	4129	+

2.2 ผลการวัดแอกติวิตีของฟอสฟอไลเฟส เอทู

จากการศึกษาสเปซิฟิคแอกติวิตี (specific activity) ของฟอสฟอไลเฟส เอทู ในแต่ละส่วนของนิษุที่แยกได้ พบว่าสเปซิฟิคแอกติวิตีของ ฟอสฟอไลเฟส เอทู มีมากในนิษุ ส่วนที่ II, III, IV และ V (ตาราง 5) นิษุส่วนอื่นๆ (I, VI, VII, VIII, IX และ X) มีสเปซิฟิคแอกติวิตี ของฟอสฟอไลเฟส เอทู น้อยมาก และไม่พบแอกติวิตีของฟอสฟอไลเฟส เอทู ในนิษุส่วนที่ XI, XII และ XIII

2.3 ผลการวัดแอกติวิตีของอะซิติลโคสทินเอสเตอเรส

ผลการศึกษาแอกติวิตีของอะซิติลโคสทินเอสเตอเรสทั้งแสดงในตาราง 5 พบว่า มีสเปซิฟิคแอกติวิตีของอะซิติลโคสทินเอสเตอเรส มากในนิษุ ส่วนที่ II, III, IV, V, VI, VII, X, XI และ XII นิษุส่วนที่เหลือมีสเปซิฟิคแอกติวิตีของอะซิติลโคสทินต่ำ

2.4 ผลการศึกษาคือความเป็นนิษของนิษุเห่าไทย (แอลดี₅₀) ที่ไม่ได้แยกและแต่ละ ส่วนที่แยกได้

ผลการศึกษาซึ่งแสดงในตารางที่ 5 พบว่า ส่วนของนิษุที่มีค่าความเป็นนิษสูง ที่สุดคือ นิษุ ในส่วนที่ VIII มีค่า 0.15 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักหนู 1 กิโลกรัม ซึ่งมีความเป็นนิษ มากกว่านิษุที่ยังไม่ได้แยก (0.30 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักหนู 1 กิโลกรัม) ถึง 2 เท่า และส่วนที่มี ความเป็นนิษต่ำสุด คือ นิษุในส่วนที่ IV มีค่า 38.35 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม

2.5 ผลการศึกษาศมบัติการทำให้เนื้อเยื่อตายเฉพาะบริเวณของนิษุที่ ไม่ได้แยก และ นิษุแต่ละส่วนที่แยกได้

เมื่อนิษุเห่าที่ยังไม่ได้แยก ที่มีความเข้มข้นของปริมาณโปรตีน เป็น 50 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร และนิษุแต่ละส่วนที่แยกได้ตามสัดส่วนที่มีอยู่ในนิษุที่ ไม่ได้แยก (50 มิลลิกรัม ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร) นิษุเข้าชั้นผิวหนังบริเวณโคนขาหลังของกระต่ายปริมาตร 0.2 ลูกบาศก์เซนติเมตร พบว่านิษุที่ยังไม่ได้แยก, นิษุส่วนที่ I และนิษุส่วนที่ XIII เท่านั้น ที่ทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณ (ตาราง 5)

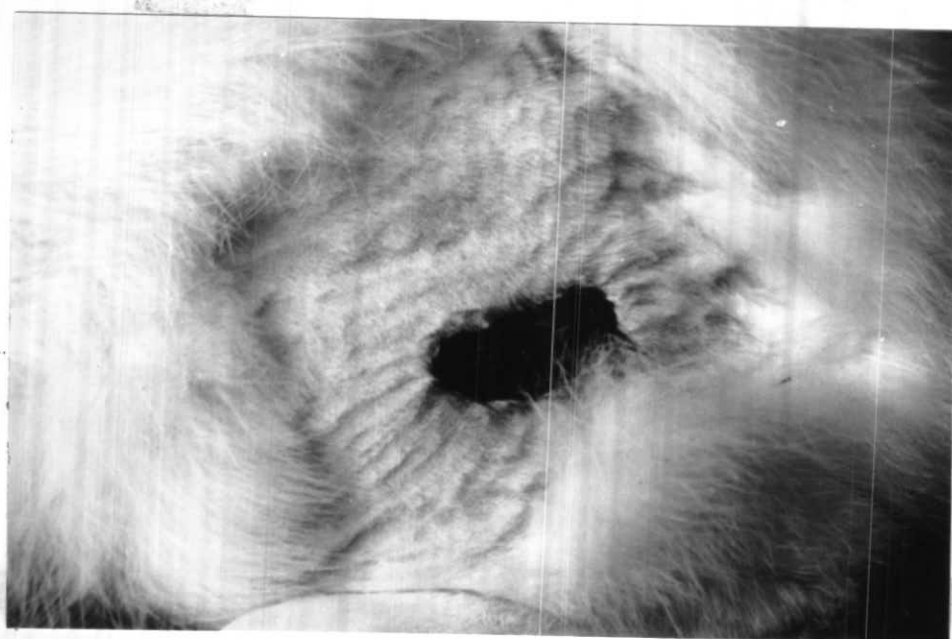
ลักษณะของรอยแผลที่เกิดเนื้อเยื่อตายรุนแรงและกว้างที่สุด เมื่อนิษุที่ยังไม่ได้แยก นิษุส่วนที่ XIII และนิษุส่วนที่ 1 ตามลำดับ (ตาราง 6, ภาพประกอบ 10, 11 และ 12)

ตาราง 6 แสดงความกว้างของแผลที่เนื้อเยื่อตายเฉพาะบริเวณในกระต่ายที่เกิดจากการฉีดพิษงูเห่าไทยที่ยังไม่ได้แยก พิษงูส่วนที่ I และพิษงูส่วนที่ XIII

ชนิดของสารที่ฉีด	ความกว้างของแผล (เซนติเมตร)		
	1 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง
พิษงูเห่าไทยที่ยังไม่ได้แยก	2.0	3.0	4.0
พิษงูส่วนที่ I	0.5	1.5	2.0
พิษงูส่วนที่ XIII	1.5	2.0	3.5
สารละลายโซเดียมคลอไรด์	-	-	-
เข้มข้น 0.15 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร			



ก. 1 ชั่วโมง

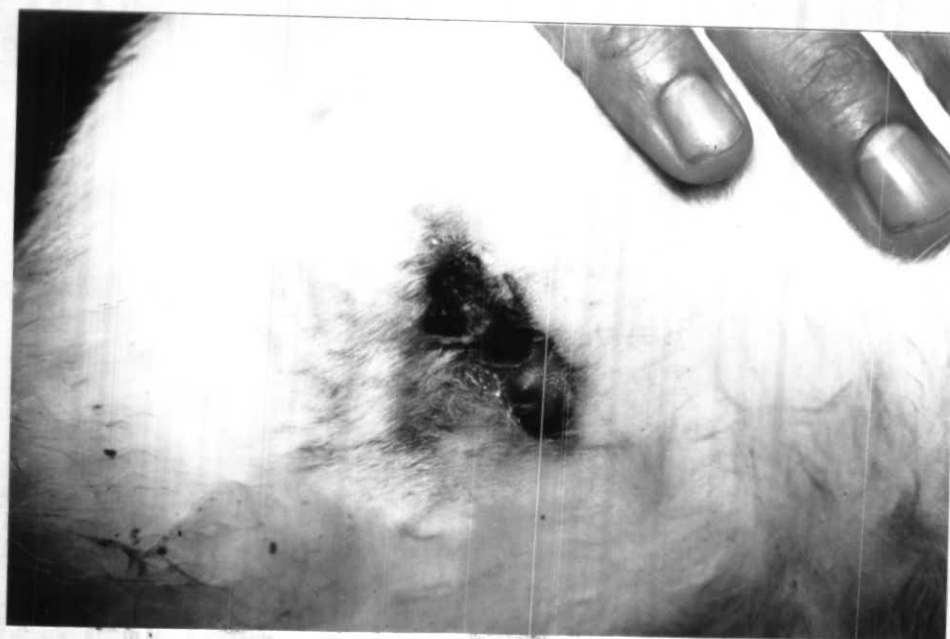


ข. 24 ชั่วโมง

ภาพประกอบ 10 ผิวหนังของกระต่ายที่เกิดเนื้อเยื่อตายเฉพาะบริเวณเมื่อนัดหนังเท้าไทยที่ยังไม่ได้แยกที่ชั้นผิวหนังของกระต่าย เป็นเวลานาน (ก.) 1 ชั่วโมง และ (ข.) 24 ชั่วโมง

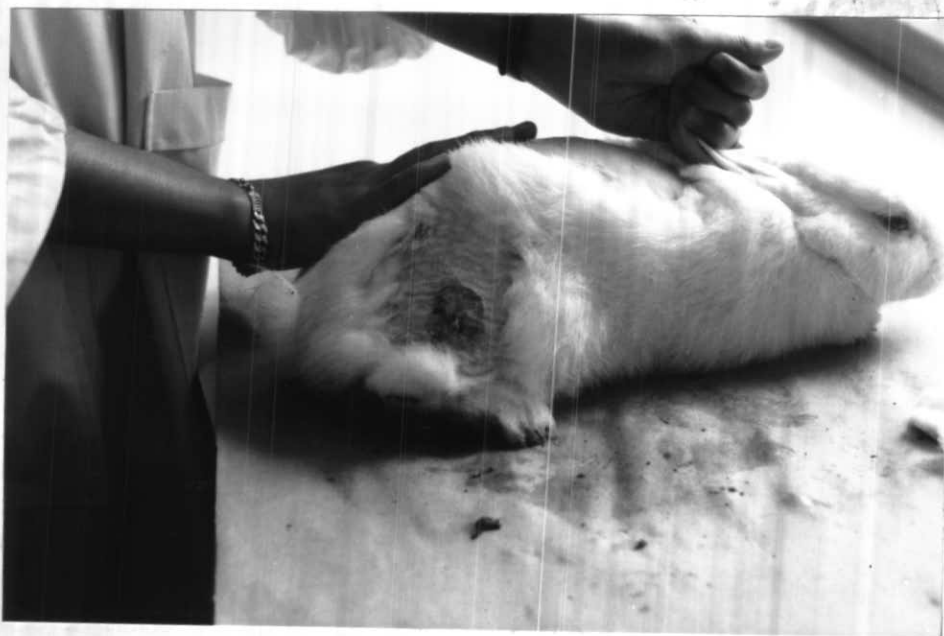


ก. 1 ชั่วโมง



ข. 24 ชั่วโมง

ภาพประกอบ 11 ผิวหนังของกระต่ายที่เกิดเนื้อเยื่อตายเฉพาะบริเวณเมื่อดัดนิษฐานเห่าไทย
ส่วนที่ 1 ที่ชั้นผิวหนังของกระต่ายเป็นเวลานาน (ก.) 1 ชั่วโมง และ(ข.) 24 ชั่วโมง



ก. 1 ชั่วโมง



ข. 24 ชั่วโมง

ภาพประกอบ 12 ผิวหนังของกระต่ายที่เกิดเนื้อเยื่อตายเฉพาะบริเวณเมื่อนัดนิษฐานเห่าไทย
ส่วนที่ XIII ที่ขึ้นผิวหนังของกระต่ายเป็นเวลานาน (ก.) 1 ชั่วโมง และ(ข.) 24 ชั่วโมง

2.6 ผลการศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกระต่ายตรงรอยแผลที่ฉีดยาน้ำเกลือ 0.15 มิลลิลิตรต่อลูกบาศก์เซนติเมตร, พืชงูเห่าที่ยังไม่ได้แยก พืชงูส่วนที่ I และพืชงูส่วนที่ XIII

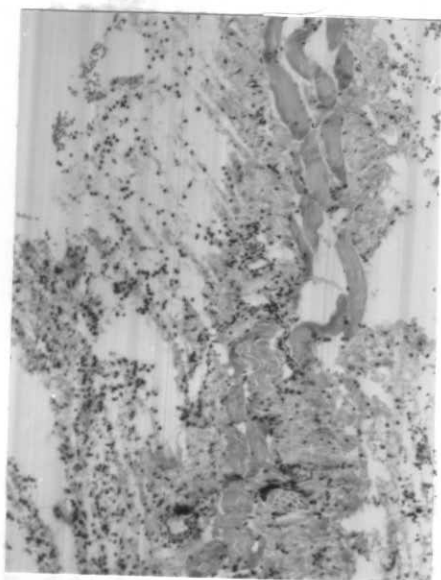
ตัดเนื้อเยื่อกระต่ายตรงบริเวณรอยแผลที่ฉีดยาน้ำเกลือ (0.15 มิลลิต่อลูกบาศก์เซนติเมตร) และบริเวณที่ฉีดยาน้ำพืชงูเห่าที่ยังไม่ได้แยก พืชงูส่วนที่ I และพืชงูส่วนที่ XIII แล้วนำไปย้อมสี เพื่อตรวจพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อโดยอาศัยเทคนิคทาง histopathology พบว่า

เมื่อฉีดยาน้ำเกลือเข้มข้น 0.15 มิลลิต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ปริมาตร 0.2 ลูกบาศก์เซนติเมตร สภาพเนื้อเยื่อกระต่ายปกติ (ภาพประกอบ 13)

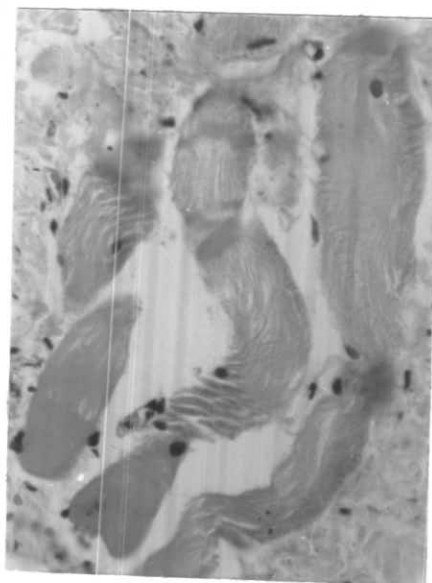
เนื้อเยื่อของกระต่ายหลังจากฉีดยาน้ำพืชงูเห่าไทยที่ยังไม่ได้แยก 10 มิลลิกรัม ต่อ 0.2 ลูกบาศก์เซนติเมตร สภาพเนื้อเยื่อเกิดการตายของเนื้อเยื่อทั้งผิวหนังชั้นนอก ผิวหนังชั้นในและกล้ามเนื้อ (ภาพประกอบ 14)

เนื้อเยื่อของกระต่ายที่ฉีดยาน้ำพืชงูเห่าไทยส่วนที่ I สภาพเนื้อเยื่อเกิดการตายของเนื้อเยื่อทั้งผิวหนังชั้นนอกผิวหนังชั้นในและกล้ามเนื้อแต่ความรุนแรงน้อยกว่า (ภาพประกอบ 15)

เนื้อเยื่อของกระต่ายที่ฉีดยาน้ำพืชงูเห่าไทยส่วนที่ XIII สภาพเนื้อเยื่อเกิดการตายของเนื้อเยื่อทั้งผิวหนังชั้นนอก ผิวหนังชั้นในและกล้ามเนื้อ แต่รุนแรงน้อยกว่าพืชงูที่ไม่ได้แยก (ภาพประกอบ 16)



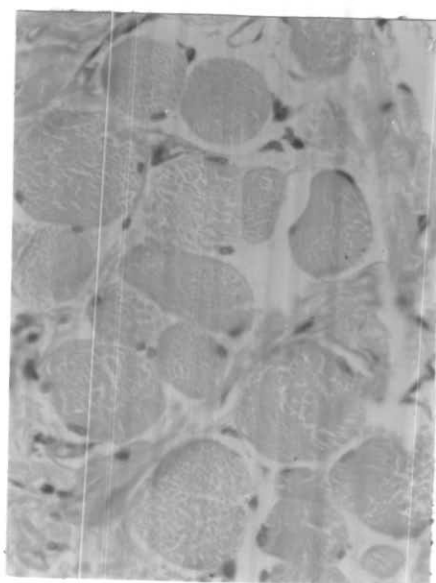
ก



ข



ค

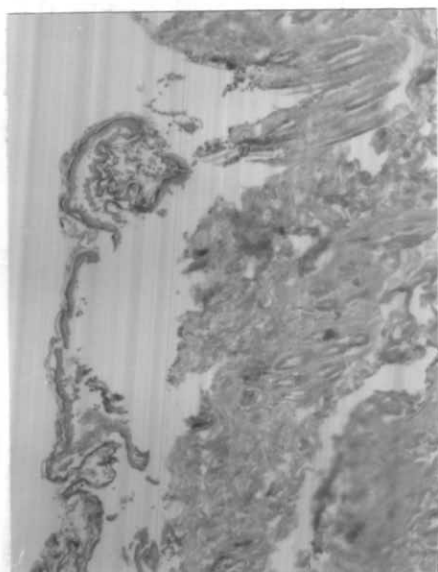


ง

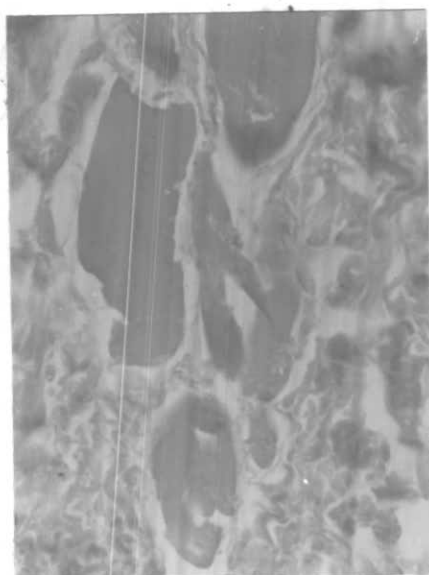
ภาพประกอบ 13 แสดงสภาพเนื้อเยื่อกระต่ายหลังจากฉีดน้ำเกลือเข้มข้น 0.15 โมลต่อ
ลูกบาศก์เดซิเมตร เป็นเวลา 6 ชั่วโมง(ก,ข) และหลังจากฉีดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง(ค,ง)

ก และ ค ภาพเนื้อเยื่อของผิวหนัง กำลังขยาย 100 เท่า

ข และ ง ภาพเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ กำลังขยาย 400 เท่า



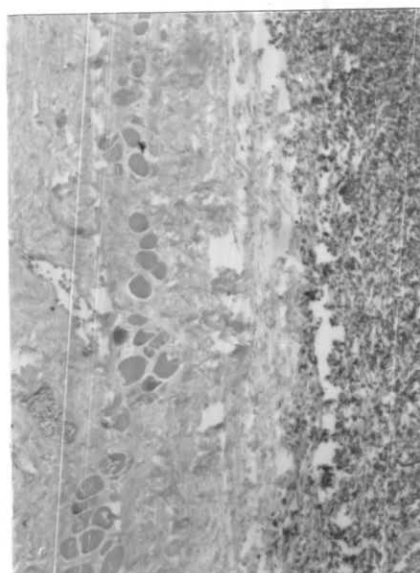
ก



ข



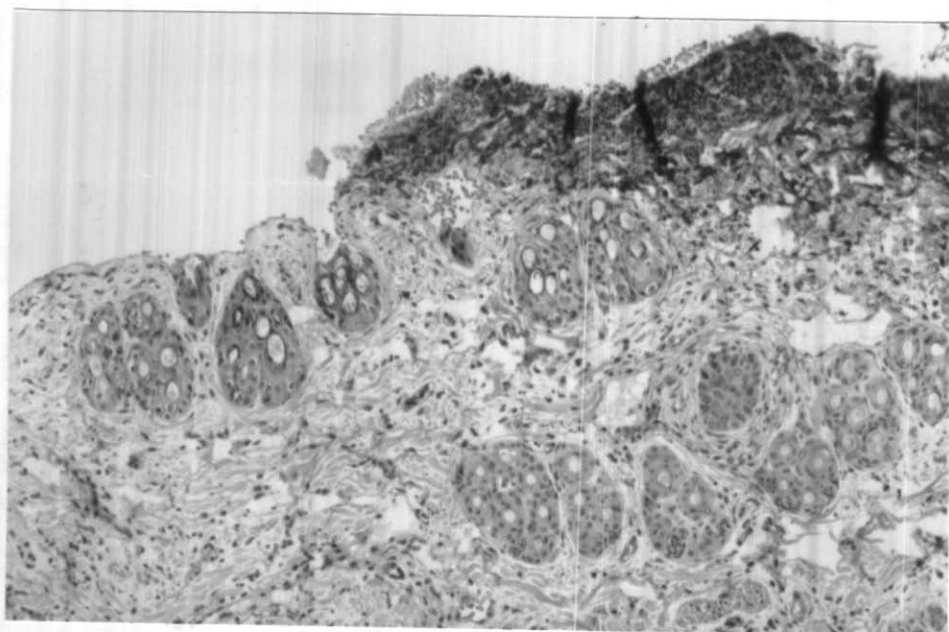
ค



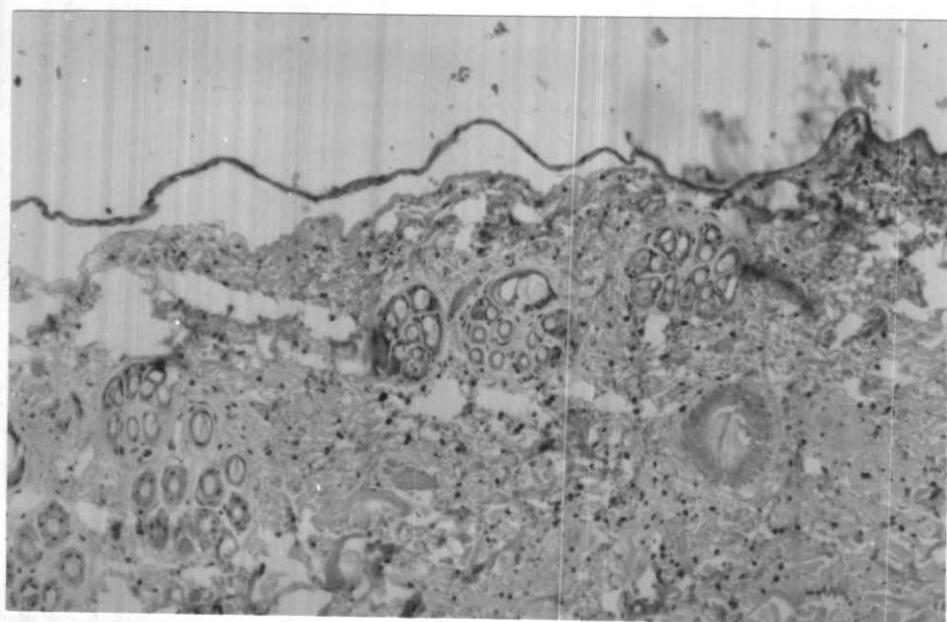
ง

ภาพประกอบ 14 แสดงสภาพเนื้อเยื่อกระต่ายหลังจากฉีดพิษที่ยังไม่ได้แยกเป็นเวลา 6 ชั่วโมง (ก, ข) และหลังจากฉีดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ค, ง)

ก , ค และ ง กำลังขยาย 100 เท่า
 ข กำลังขยาย 400 เท่า



ภาพประกอบ 15 แสดงสภาพเนื้อเยื่อของกระต่ายหลังจากฉีดพิษส่วนที่ I เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กำลังขยาย 100 เท่า



ภาพประกอบ 16 แสดงสภาพเนื้อเยื่อของกระต่ายหลังจากฉีดพิษส่วนที่ XIII เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กำลังขยาย 100 เท่า

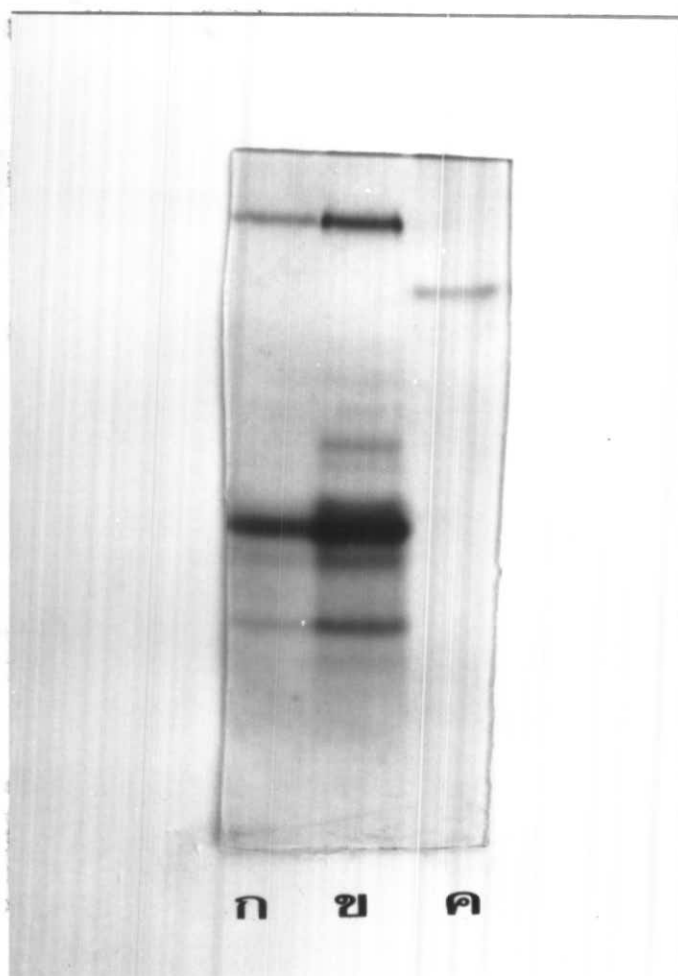
3. ผลการวิเคราะห์นิษุเห่าไทยโดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส ตามวิธีของ
โฮเฟอร์ (Hoefler. 1990-1991)

นำนิษุที่ยังไม่ได้แยกนิษุส่วนที่ I และส่วนที่ XIII มาวิเคราะห์ด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่า นิษุส่วนที่ I มีแถบโปรตีนมากกว่า I แถบ แต่จำนวนแถบน้อยกว่านิษุเห่าที่ไม่ได้แยก ส่วนนิษุส่วนที่ XIII มีแถบโปรตีนเพียง I แถบ (ภาพประกอบ 17)

4. ผลการวิเคราะห์นิษุเห่าไทยโดยวิธี เอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส
ตามวิธีของเนวิลล์ (Neville. 1971)

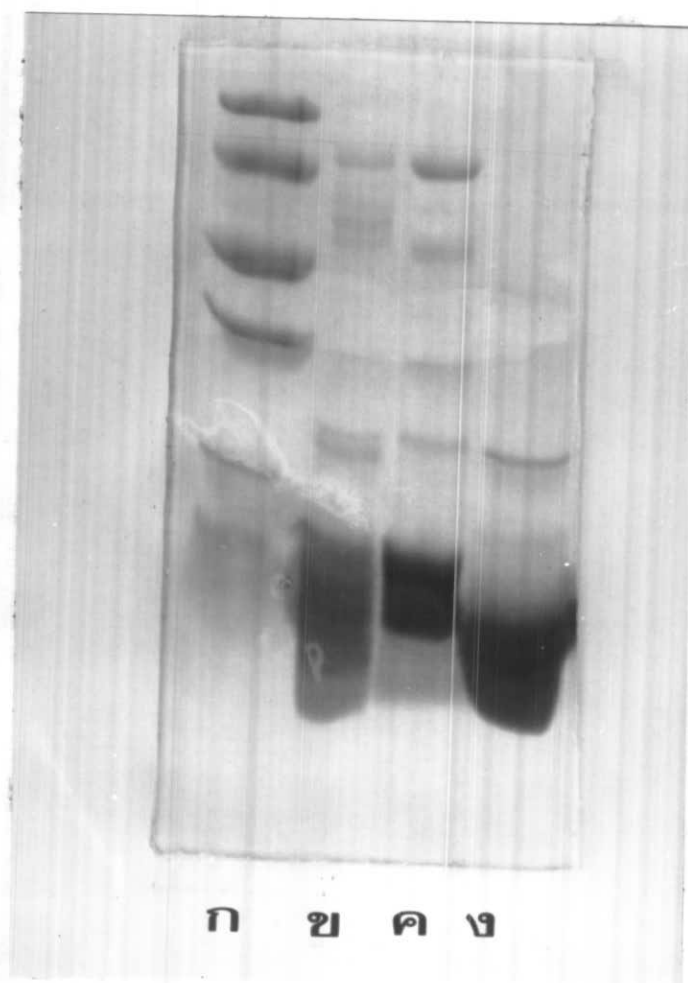
นำนิษุที่ยังไม่ได้แยก นิษุส่วนที่ I ส่วนที่ XIII และโปรตีนมาตรฐานมาวิเคราะห์ด้วยวิธี เอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส ได้ผลดังนี้

นิษุที่ยังไม่ได้แยกมีแถบโปรตีนมากที่สุด เมื่อเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน พบว่า แถบโปรตีนเหล่านั้น มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 10,300 ถึง 94,000 คาลตัน นิษุส่วนที่ I มีแถบโปรตีนหลายแถบ เมื่อเทียบกับโปรตีนมาตรฐานพบว่า แถบโปรตีนเหล่านั้นมีน้ำหนักโมเลกุล 10,300, 11,800, 21,000, 29,800, 35,000, 48,500, 55,000 และ 67,000 คาลตัน และนิษุส่วนที่ XIII พบแถบโปรตีน 4 แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 14,500, 20,000, 26,000 และ 32,000 คาลตัน (ภาพประกอบ 18)



ภาพประกอบ 17 แสดงรูปแบบของโปรตีนในพิษงูเห่าไทยที่วิเคราะห์โดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟเรซิส

- ก : พิษงูส่วนที่ I
- ข : พิษงูที่ยังไม่ได้แยก
- ค : พิษงูส่วนที่ XIII



ภาพประกอบ 18 แสดงรูปแบบของโปรตีนในพิษงูเห่าไทยที่วิเคราะห์โดยวิธี เอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟเรซิส

ก : โปรตีนมาตรฐาน (ตาราง 7)

ข : พิษงูที่ยังไม่ได้แยก

ค : พิษงูส่วนที่ I

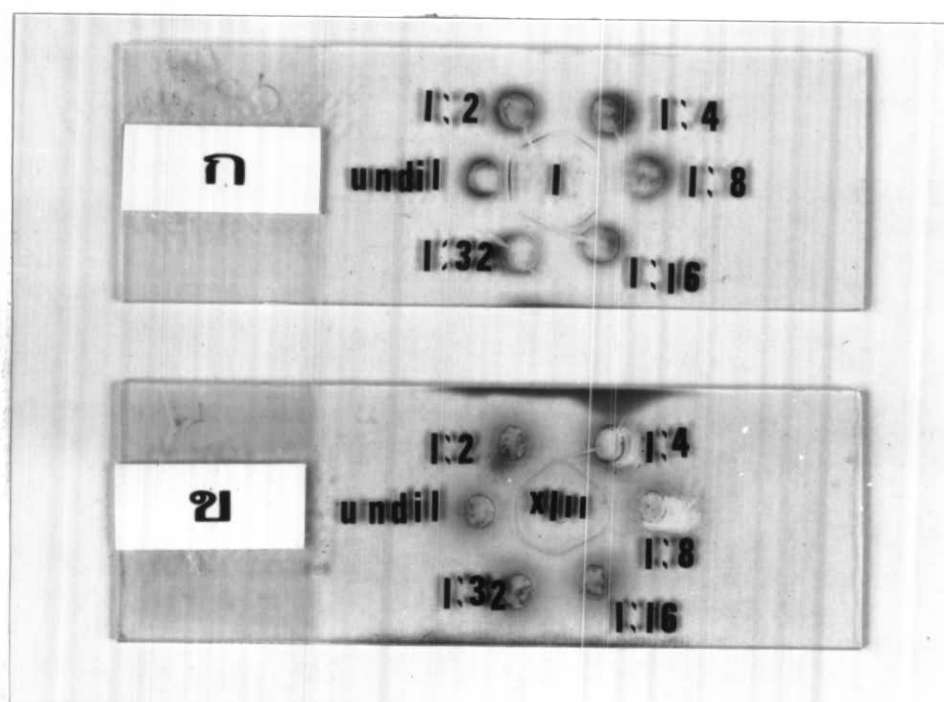
ง : พิษงูส่วนที่ XIII

ตาราง 7 แสดงมวลโมเลกุลของ โปรตีนมาตรฐาน

โปรตีน	มวลโมเลกุล (คาลตัน)
ฟอสฟอรีเลส บี	94,000
อัลบูมิน	67,000
โอวาลบูมิน	43,000
คาร์บอนิก แอนไฮเดรส	30,000
ทริปซิน อินฮิบิเตอร์	20,100
แอลฟา-แลคทาลบูมิน	14,400

5. ผลการนิคกระตุ้นให้สัตว์ทดลองสร้างแอนติบอดีต่อพิษงูเห่าไทยส่วนที่ I และส่วนที่ XIII

เมื่อนิคกระตุ้นกระต่ายด้วยพิษงูส่วนที่ I และส่วนที่ XIII ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 4 แล้ว นำเซรุ่มจากกระต่ายเหล่านี้มาตรวจสอบแอนติบอดีต่อพิษงูส่วนที่ I และส่วนที่ XIII โดยวิธีดัดเบิลอิมมูโนคิฟิชั่นพบว่า เซรุ่มจากกระต่ายตัวที่ฉีดด้วยพิษงูส่วนที่ I เกิดพรีซิพิตินลายน์กับพิษงูส่วนที่ I จำนวน 1 เส้น ส่วนแอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายตัวที่ฉีดด้วยพิษงูส่วนที่ XIII เกิดพรีซิพิตินลายน์กับพิษงูส่วนที่ XIII จำนวน 1 เส้น (ภาพประกอบ 19) และเมื่อทำการเจือจางแอนติบอดีต่อพิษงูส่วนที่ I และต่อพิษงูส่วนที่ XIII จนถึง 1 ต่อ 32 พบว่า ยังสามารถเกิดพรีซิพิตินลายน์จำนวน 1 เส้น



ภาพประกอบ 19 แสดงพริบดิน ลายน์ ที่ได้จากการทดสอบแอนติบอดีต่อพิษงูส่วนที่ I (ภาพ ก) และแอนติบอดีต่อพิษงูส่วนที่ XIII (ภาพ ข) โดยวิธีดัดเบิ้ลอิมมูโนดิฟฟิวชัน หลุมกลางเป็นพิษงู และหลุมรอบ ๆ เป็นแอนติบอดีจากกระต่าย

6. ผลการศึกษาความสามารถในการยับยั้งการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณโดยใช้แอนติบอดี
ต่อพิษงูส่วนที่ I และส่วนที่ XIII

6.1 เมื่อนัดสารละลายน้ำเกลือ 0.15 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร 0.2 ลูกบาศก์-เซนติเมตร หลังจากฉีดเป็นเวลา 6 และ 24 ชั่วโมง สภาวะผิวหนังภายนอกของกระต่ายเป็นปกติ แต่ตอนแรกจะมีการขม่น้ำเล็กน้อย สภาวะเนื้อเยื่อของกระต่ายที่ตัดมาและตรวจทาง histopathology พบว่าผิวหนังชั้นนอก ผิวหนังชั้นใน และกล้ามเนื้อเป็นปกติ (ตาราง 8 และภาพประกอบ 20)

6.2 กระต่ายที่ฉีดด้วยพิษงูเห่าไทยที่ยังไม่ได้แยกพร้อมกับแอนติบอดีของพิษงูส่วนที่ I หลังจากฉีดเป็นเวลา 6 และ 24 ชั่วโมง ลักษณะความรุนแรงของแผลเนื้อตายที่ผิวหนังภายนอกของกระต่ายลดลงและแคบลง เมื่อเปรียบเทียบกับแผลที่ฉีดพิษงูที่ยังไม่ได้แยกอย่างเดี่ยว (ตาราง 8) สภาวะของเนื้อเยื่อกระต่ายที่ตัดและตรวจทาง histopathology พบว่าผิวหนังชั้นนอก ผิวหนังชั้นในและกล้ามเนื้อ ของเนื้อเยื่อที่ตายดีขึ้น มีการฟื้นตัวของสภาวะเนื้อเยื่อทั่วไป (ภาพประกอบ 21)

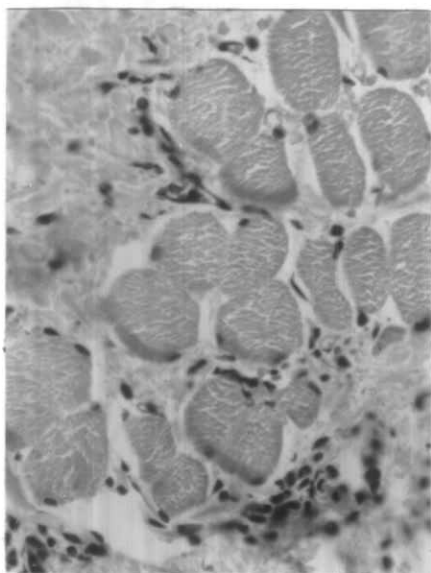
6.3 กระต่ายที่ฉีดด้วยพิษงูเห่าไทยที่ไม่ได้แยกพร้อมกับแอนติบอดีของพิษงูส่วนที่ XIII หลังจากฉีดเป็นเวลา 6 และ 24 ชั่วโมง ลักษณะความรุนแรงของแผลเนื้อตายที่ผิวหนังภายนอกของกระต่ายลดลงและแคบลง เมื่อเปรียบเทียบกับแผลที่ฉีดพิษงูที่ไม่ได้แยกอย่างเดี่ยว (ตาราง 8) จากผลการศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกระต่ายพบว่า ผิวหนังชั้นนอก ผิวหนังชั้นใน และกล้ามเนื้อของการเกิดเนื้อตายดีขึ้นมีการฟื้นตัวของผิวหนังชั้นนอก (ภาพประกอบ 22)

6.4 เมื่อนัดพิษงูเห่าไทยที่ยังไม่ได้แยกพร้อมกับแอนติบอดีของพิษงูส่วนที่ I และส่วนที่ XIII หลังจากฉีดเป็นเวลา 6 และ 24 ชั่วโมง ลักษณะความรุนแรงของแผลเนื้อตายจากสภาวะผิวหนังภายนอกลดลงและแคบลง เมื่อเปรียบเทียบกับแผลที่ฉีดพิษงูที่ยังไม่ได้แยกอย่างเดี่ยว (ตาราง 8) จากการศึกษาสภาวะเนื้อเยื่อกระต่าย พบว่าผิวหนังชั้นนอก ผิวหนังชั้นใน และกล้ามเนื้อของการเกิดเนื้อตายดีขึ้นกว่าข้อ 6.2 และ 6.3 มีการฟื้นตัวของเนื้อเยื่อทั่วไปและการงอกใหม่ของเนื้อเยื่อที่ตาย (ภาพประกอบ 23)

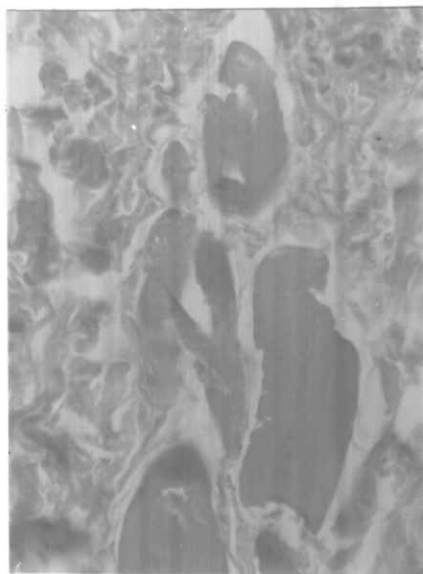
6.5 เมื่อนัดพิษงูส่วนที่ I ร่วมกับแอนติบอดีของพิษงู ส่วนที่ I และฉีดพิษงูส่วนที่ XIII ร่วมกับแอนติบอดีของพิษงูส่วนที่ XIII หลังฉีดเป็นเวลา 6 และ 24 ชั่วโมง ให้ผลเหมือนหัวข้อ 6.4 และดีกว่า

ตาราง 8 แสดงความกว้างของผลที่เกิดจากการฉีดสารชนิดต่าง ๆ ที่ชั้นผิวหนังของกระต่าย
หลังจากฉีดเป็นเวลา 6 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง

ชนิดของสารที่ฉีดเข้าชั้นผิวหนัง ของกระต่าย	ความกว้างของผล (เซนติเมตร)	
	6 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง
1. น้ำเกลือ	-	-
2. นิซงูที่ยังไม่ได้แยก	3.0	4.0
3. นิซงูที่ยังไม่ได้แยกกับแอนติบอดีของนิซงู ส่วนที่ I	2.5	3.5
4. นิซงูที่ยังไม่ได้แยกกับแอนติบอดีของนิซงู ส่วนที่ XIII	2.5	3.5
5. นิซงูที่ยังไม่ได้แยกกับแอนติบอดีของนิซงู ส่วนที่ I และส่วนที่ XIII	2.0	3.0
6. นิซงูส่วนที่ I กับแอนติบอดีของนิซงูส่วนที่ I	1.5	1.0
7. นิซงูส่วนที่ XIII กับแอนติบอดีของนิซงู ส่วนที่ XIII	2.0	2.5



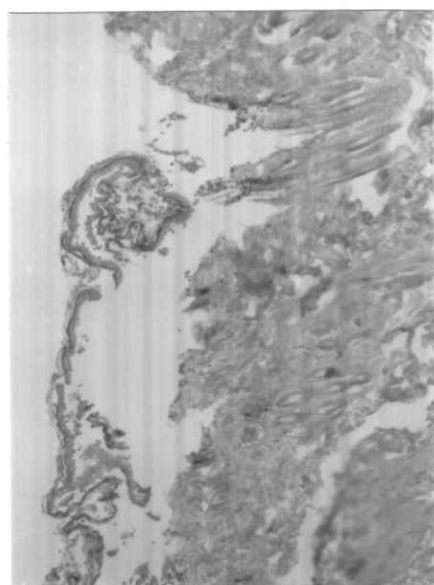
ก



ข

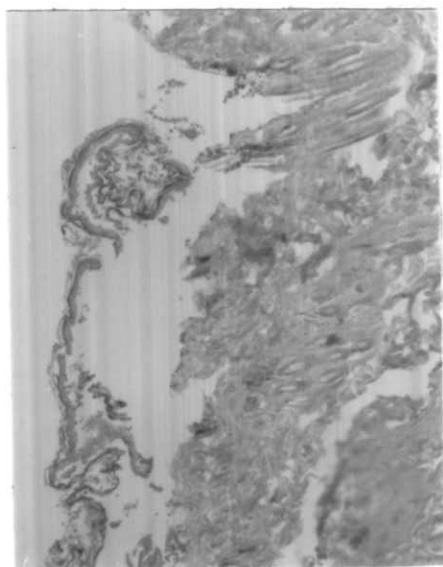


ค

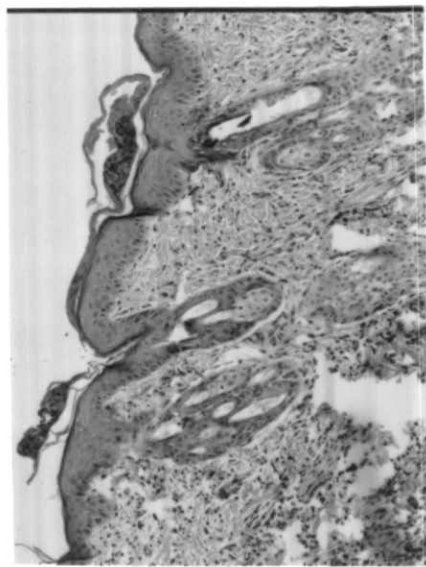


ง

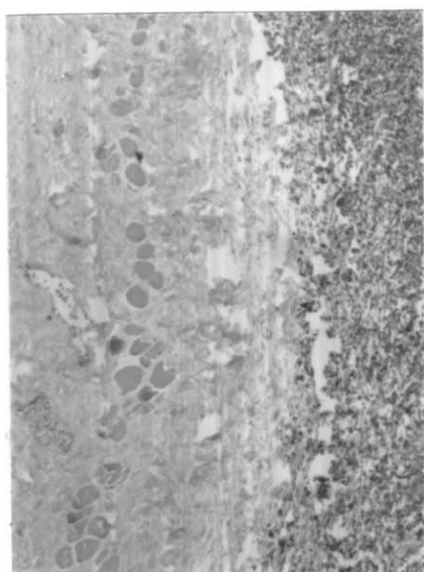
ภาพประกอบ 20 แสดงสภาพของเนื้อเยื่อกระต่ายที่ได้รับการฉีดน้ำเกลือเข้มข้น 0.15 โมลต่อ
 ลูกบาศก์เดซิเมตร เป็นเวลา 6 และ 24 ชั่วโมง (ก, ค) เปรียบเทียบกับสภาพของเนื้อเยื่อ
 ที่ฉีดพิษงูที่ไม่ได้แยกเป็นเวลา 6 และ 24 ชั่วโมง (ข, ง) ก และ ข กำลังขยาย 400 เท่า
 ค และ ง กำลังขยาย 100 เท่า



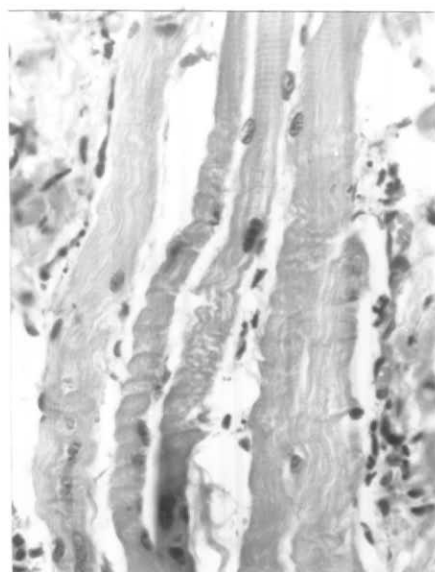
ก



ข

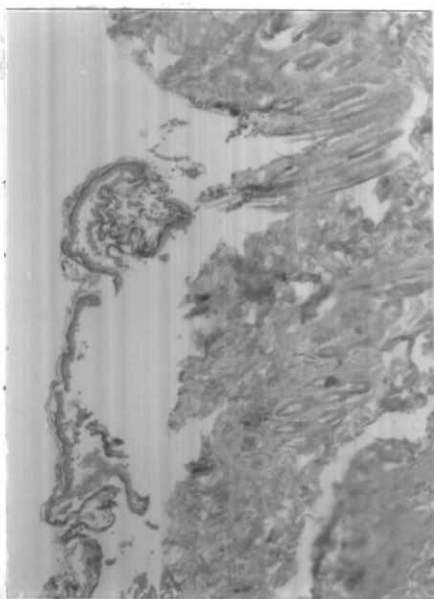


ค

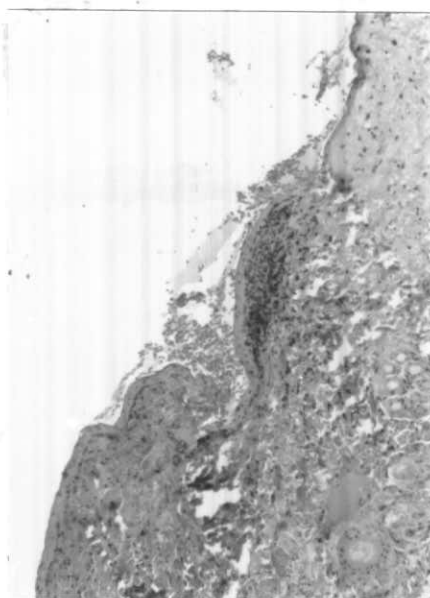


ง

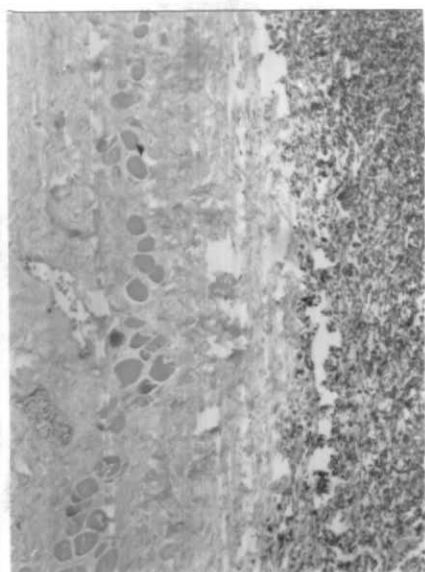
ภาพประกอบ 21 แสดงสภาพเนื้อเยื่อกระต่ายที่ได้รับการฉีดพิษงูเห่าไทยที่ยังไม่ได้แยกพร้อมกับแอนติบอดีของพิษงูส่วนที่ 1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ข, ง) เปรียบเทียบกับสภาพที่ฉีดพิษงูที่ยังไม่ได้แยก เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ก, ค) ก ข และ ค กำลังขยาย 100 เท่า ง กำลังขยาย 400 เท่า



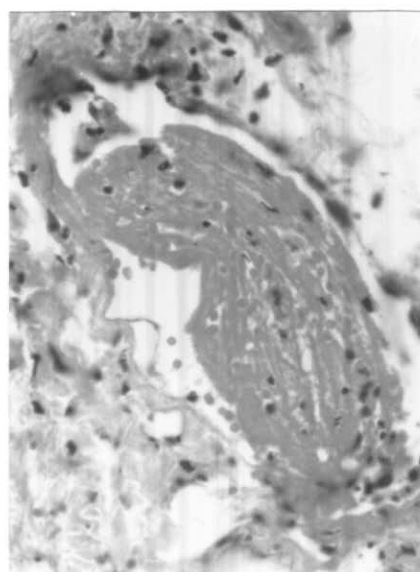
ก



ข

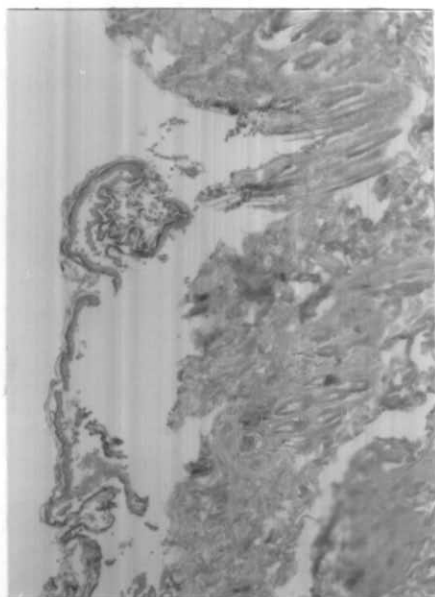


ค

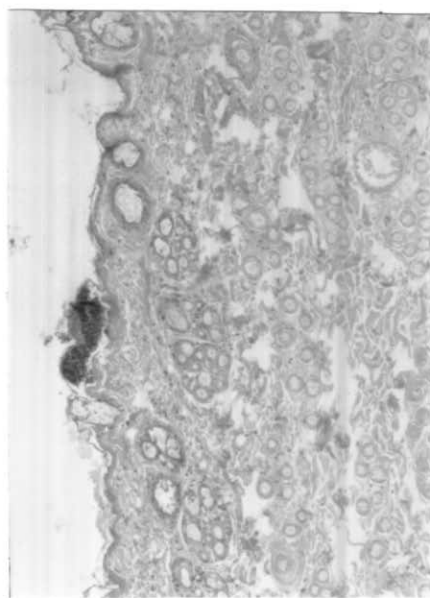


ง

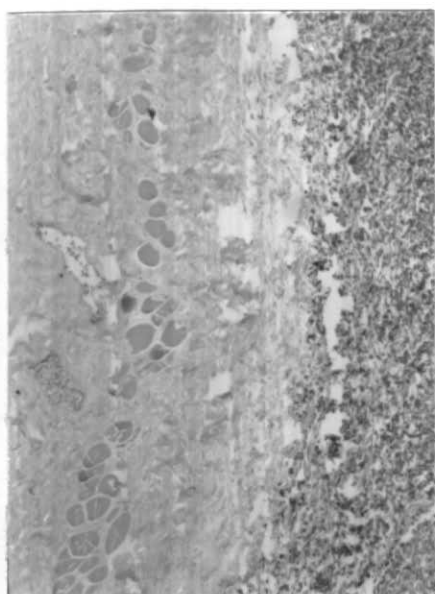
ภาพประกอบ 22 แสดงสภาพเนื้อเยื่อกระต่ายที่ได้รับการฉีดพิษงูเห่าไทยที่ไม่ได้แยกพร้อมกับแอนติบอดีของพิษงูส่วนที่ XIII เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ข, ง) เปรียบเทียบกับสภาพเนื้อเยื่อที่ฉีดพิษงูที่ยังไม่ได้แยกเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ก, ค) ก ข และ ค กำลังขยาย 100 เท่า ง กำลังขยาย 400 เท่า



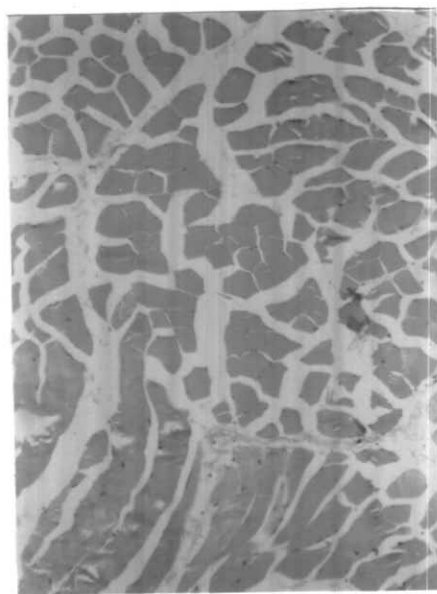
ก



ข



ค



ง

ภาพประกอบ 23 แสดงสภาพเนื้อเยื่อของกระต่ายที่ได้รับการฉีดพิษงูเห่าไทยที่ไม่ได้
 แยกร่วมกับแอนติบอดีของพิษงู ส่วนที่ I และ XIII เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ข, ง)
 เปรียบเทียบกับสภาพเนื้อเยื่อที่ฉีดพิษงูที่ไม่ได้แยก เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ก, ค)
 ก ข และ ค กำลังขยาย 100 เท่า ง กำลังขยาย 400 เท่า

บทที่ 4

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปและอภิปรายผล

ในประเทศไทย กลุ่มผู้ถูกงูเห่ากัดจะพบการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณ ประมาณ 50% ซึ่งมักจะเกิดหลังถูกงูเห่ากัดภายใน 1-32 ชั่วโมง (ชาญ โพนกุล. 2531) ผลที่ รอยกัดมีการเน่าตายของผิวหนังตั้งแต่เนื้อจนรุนแรงขนาดโตประมาณ 1-5 เซนติเมตร ประมาณ 27.6% ต้องปลุกผิวหนังและต้องอยู่โรงพยาบาลเฉลี่ยอย่างน้อย 33 วัน และหากมีอาการ การตายของเนื้อเยื่อรุนแรงอาจต้องตัดอวัยวะที่ถูกกัดออก ซึ่งทำให้การรักษาผู้ถูกงูเห่ากัดยังเป็นปัญหา สำคัญปัญหาหนึ่งทางการแพทย์ จึงมีผู้ให้ความสนใจศึกษาสาเหตุของการตายของเนื้อเยื่อที่ถูกงูเห่า กัด จากการศึกษาพยาธิสภาพจากรอยแผลเขี้ยวงูเห่ากัด โดยตัดชิ้นเนื้อจากรอยเขี้ยวหลังกัดใน เวลาต่าง ๆ ซึ่งยังสรุปผลไม่ได้แน่นอนว่า พยาธิสภาพของแผลงูเห่ากัดจะเกิดจากสาเหตุใด (ประไพ นงษ์ประสิทธิ์, ชูลี มิตรกุล และมงคล นพคุณ. 2531) ได้ทำการทดลองฉีดพิษงูเห่า ที่ผ่านการกรองให้ปลอดเชื้อแล้วฉีดเข้าชั้นผิวหนังของสุนัข พบว่า เกิดการตายของเนื้อเยื่อชั้น ไขมันเฉพาะบริเวณที่ฉีดพิษงูเห่าทุกตัว (มุกดา ตฤณานันท์. 2522) จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า สาเหตุที่ทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณมาจากพิษงู และโดยอาศัยแนวทางการวิจัย จากการแยกนิวโรทอกซินจากพิษงูเห่าไทย ซึ่งเป็นผลการวิจัยของคาร์ลสัน, อาร์เบริกและอีเกอร์ (Karlsson, Arnbers and Eaker. 1971) และศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อโดยใช้เทคนิค ทางกายวิภาคศาสตร์ ตามแนวทางการวิจัย ของอีคเคน, ฮีกสตัน และโอนบี (Idden, Theakston and Ownby. 1987) ศึกษาการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณในผู้ป่วยที่ถูกงูเห่า นกัด ทั้งหมดนี้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่ใช้ในการศึกษาส่วนประกอบของพิษงูเห่าไทยที่ทำให้เกิด การตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณ

จากผลการทดลองในภาพประกอบ 9 พบว่า เมื่อผ่านพิษงูลงในคอลัมน์ที่บรรจุด้วย ไบโอ - เร็กซ์ 70 สามารถแยกพิษงูเห่าได้ 13 ส่วน คือ ส่วนที่ I, II, III... XIII

ตามลำดับ จากนั้นนำนิษุที่แยกได้แต่ละส่วนฉีดเข้าผิวหนังของขาหลังของกระต่าย โดยศึกษาการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณ ศึกษาความเป็นพิษ (แอลดี₅₀) วัดสเปซิฟิคแอคทิวิตี ของเอนไซม์ ฟอสโฟไลเฟส เอช และอะซิติลโคลีนเอสเตอเรส ทั้งนี้เพื่อศึกษาว่า การทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อมีความสัมพันธ์กับความเป็นพิษของเอนไซม์ฟอสโฟไลเฟส เอช และเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรสหรือไม่ เพราะ เอนไซม์ฟอสโฟไลเฟส เอช สามารถย่อยสลายละลายฟอสโฟไลปิด ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของเซลล์เมมเบรน อาจเป็นสาเหตุสำคัญของการตายของเซลล์และเนื้อเยื่อ ส่วนเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรสเป็นเอนไซม์ที่พบเฉพาะในนิษุกลุ่มอีแลปติเท่านั้น

ผลการทดลองที่แสดงในตาราง 5 จะเห็นว่า ส่วนประกอบของนิษุส่วนที่ I และ XIII เท่านั้น ที่ทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณ ส่วนประกอบของนิษุเห่าไทยส่วนที่ I มีแอคทิวิตีของเอนไซม์ฟอสโฟไลเฟส เอช น้อยและนิษุส่วนที่ XIII ไม่มีแอคทิวิตีของเอนไซม์ฟอสโฟไลเฟส เอช ในขณะที่ส่วนที่ II, III, IV และ V พบสเปซิฟิคแอคทิวิตีของเอนไซม์ฟอสโฟไลเฟส เอช สูงมาก คือ 751, 1331, 1707 และ 1406 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ส่วนแอคทิวิตีของเอนไซม์ อะซิติลโคลีนเอสเตอเรสพบมากในนิษุ ส่วนที่ II, III, IV, V, VI, VII, X, XI และ XII แต่พบน้อยในนิษุส่วนที่ I และ XIII จากผลการทดลองนี้ได้บ่งชี้ว่า เอนไซม์ฟอสโฟไลเฟส เอช และอะซิติลโคลีนเอสเตอเรส ไม่มีความสัมพันธ์กับการทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณ

ในจำนวนนิษุที่แยกได้ 13 ส่วน (ตาราง 5) พบว่า นิษุส่วนที่ VIII มีความเป็นพิษสูงสุด คือ 0.15 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เป็น 2 เท่าของนิษุเห่าที่ยังไม่ได้แยก นิษุส่วนที่ VIII มีแนวโน้มที่จะเป็น นิวโรทอกซิน เนื่องจากการแยกนิษุเห่าไทยครั้งนี้แยกตามวิธีของคาร์ลสันและคนอื่นๆ ได้แยกนิวโรทอกซินจากนิษุเห่าไทย เมื่อปี ค.ศ. 1971 จากผลการทดลองนี้แสดงว่า นิวโรทอกซินไม่เกี่ยวข้องกับการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณ

จากตาราง 6 แสดงขนาดของรอยผลการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณที่ผิวหนังกระต่าย เมื่อนัดด้วยนิษุเห่าไทยที่ยังไม่ได้แยกนิษุส่วนที่ I และนิษุส่วนที่ XIII พบว่า

รอยแผลที่ผิวหนังกระต่ายที่ฉีดด้วยพิษ ส่วนที่ XIII มีขนาดใกล้เคียงกับรอยแผลที่เกิดจากการฉีดพิษเห่าไทยที่ไม่ได้แยกและมีขนาดใหญ่กว่ารอยแผลที่เกิดจากการฉีดพิษส่วนที่ I

ผลจากการวิเคราะห์พิษส่วนที่ I และ XIII เปรียบเทียบกับพิษเห่าไทยที่ยังไม่ได้แยกโดยวิธีโพลิอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่า พิษส่วนที่ I และ XIII มีแถบโปรตีนน้อยกว่าพิษเห่าไทยที่ยังไม่ได้แยกพิษส่วนที่ I มีแถบโปรตีนมากกว่า 1 แถบ ในขณะที่พิษส่วนที่ XIII มีแถบโปรตีนเพียง 1 แถบ และเนื่องจากความเข้มข้นของปริมาณโปรตีนของพิษส่วนที่ XIII มากกว่าพิษที่ยังไม่ได้แยกถึงสองเท่า จึงเป็นสาเหตุให้ไม่เห็นแถบโปรตีนตรงตำแหน่งของพิษส่วนที่ XIII ในแถบโปรตีนของพิษที่ยังไม่ได้แยก การแยกส่วนประกอบของพิษเห่าไทยที่ทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณครั้งนี้ ไม่ได้แยกให้บริสุทธิ์ เนื่องจากการเป็นการศึกษาเพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐาน เพื่อเป็นแนวทางในการรักษาการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณในผู้ป่วยที่ถูกงูเห่ากัด และหากแยกให้บริสุทธิ์จะเป็นการเริ่มต้นการผลิตและต้นทุนในการผลิตแอนติบอดีต่อพิษ ที่ทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณ ส่วนการวิเคราะห์พิษส่วนที่ I และ XIII โดยวิธีเอสดีเอส โพลิอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส จะเห็นว่าพิษส่วนที่ I มีโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่าง ๆ กัน คือ 10,300 , 11,800, 21,000, 29,800 , 35,000, 48,500, 55,000 และ 67,000 คาลตัน และพิษส่วนที่ XIII มีโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 14,500, 20,000, 26,000 และ 32,000 คาลตัน ทั้ง ๆ ที่ในการทำโพลิอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส มีแถบโปรตีนเพียง 1 แถบ เท่านั้น ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าพิษส่วนที่ XIII เป็นโปรตีนที่มีมากกว่า 1 โพลีเปปไทด์มาจับกัน

เมื่อนำพิษ ส่วนที่ I และ XIII มาฉีดกระตุ้นกระต่าย เพื่อให้สร้างแอนติบอดี และตรวจสอบเซรัมจากกระต่ายที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยพิษส่วนที่ I และส่วนที่ XIII ด้วยวิธีดัมเบิล อิมมูโนดิฟฟูชัน พบว่า เซรัมที่ได้จากกระต่ายตัวที่ฉีดด้วยพิษส่วนที่ I เกิดปฏิกิริยาลายกับพิษส่วนที่ I จำนวน 1 เส้น ส่วนเซรัมที่ได้จากกระต่ายตัวที่ฉีดด้วยพิษส่วนที่ XIII เกิดปฏิกิริยาลายกับพิษส่วนที่ XIII จำนวน 1 เส้น (ภาพประกอบ 19) แอนติบอดีต่อพิษส่วนที่ I และส่วนที่ XIII สามารถเกิด ปฏิกิริยาลาย กับพิษส่วนที่ I และส่วนที่ XIII ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร เมื่อทำให้เจือจางเป็น 1:2, 1:4, 1:8, 1:16

และ 1:32 การที่แอนติบอดีของพิษงูส่วนที่ I และ XIII สามารถเกิดปฏิกิริยาลายัน กับพิษงู ส่วน I และ XIII แสดงว่า แอนติบอดีที่ผลิตขึ้นมีความจำเพาะและเหมาะสมกับพิษงูส่วนที่ I และส่วนที่ XIII

ผลการศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกระต่าย เมื่อฉีดด้วยพิษงูเห่าไทยที่ยังไม่ได้แยกพิษงูส่วนที่ I และพิษงูส่วนที่ XIII และเมื่อฉีดร่วมกับแอนติบอดีของพิษงู ได้ผลดังนี้

1. เมื่อฉีดพิษงูเห่าที่ยังไม่ได้แยก พิษงูส่วนที่ I และ ส่วนที่ XIII พบว่า ทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณ (ภาพประกอบ 10, 11, 12, 14, 15 และ 16) มีหลายลักษณะมี coagulation necrosis ของผิวหนังชั้นนอก ผิวหนังชั้นใน กล้ามเนื้อเกิด fibrinoid necrosis ของไฟเบอร์ของเนื้อเยื่อต่าง ๆ หรือเกิดลักษณะ thrombosis ในเนื้อเยื่อ
2. เมื่อฉีดพิษงูที่ยังไม่ได้แยกและตามด้วยแอนติบอดีของพิษงูส่วนที่ I หรือ การฉีดพิษงูที่ยังไม่ได้แยกพร้อมกับแอนติบอดีของพิษงูส่วนที่ XIII หรือการฉีดพิษงูที่ยังไม่ได้แยกพร้อมกับแอนติบอดี ของทั้งพิษงูส่วนที่ I และ ส่วนที่ XIII หรือเมื่อฉีดพิษงูส่วนที่ I ร่วมกับแอนติบอดีของพิษงูส่วนที่ I หรือฉีดพิษงูส่วนที่ XIII ร่วมกับแอนติบอดีของพิษงู ส่วนที่ XIII พบว่าการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณจะลดลงเห็นได้ชัดเจน ทั้งสภาพภายนอกของแผลและจากการตัดเนื้อเยื่อแล้วตรวจดูสภาพเนื้อเยื่อโดยใช้เทคนิคทางกายวิภาคศาสตร์เปรียบเทียบกับสภาพของเนื้อเยื่อที่ฉีดพิษงูไม่ได้แยกอย่างเดียว แสดงให้เห็นว่า แอนติบอดีมีความสามารถในการยับยั้งการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณได้ (ภาพประกอบ 21, 22, และ 23) และเมื่อวัดขนาดความกว้างของแผลที่ถูกฉีดด้วยพิษงูร่วมกับแอนติบอดีของพิษงูจะมีขนาดลดลง (ตาราง 8) ซึ่งให้ผลที่สอดคล้องกัน

ผลการศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกระต่าย เมื่อฉีดด้วยสารละลายไซโตเคมีคลอไรด์เข้มข้น 0.15 มิลลิกรัมต่อกบาศก์เดซิเมตร พบว่าผิวหนังและสภาพเนื้อเยื่อของกระต่ายปกติ (ตาราง 6 และ 8 ; ภาพประกอบ 13 และ 20)

ข้อเสนอแนะ

1. พิษงูเห่าไทยที่แยกได้ส่วนที่ I และ XIII ควรแยกให้บริสุทธิ์ขึ้น และศึกษาว่าส่วนใดมีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณ

2. ควรทำการศึกษาพิษของเอนไซม์ฟอสโฟไลเฟส เอทู ร่วมกับ เอนไซม์ อะซิติลโคสิโนเอสเตอเรส ว่ามีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณ หรือไม่
3. ควรศึกษาแอกติวิตีของเอนไซม์ตัวอื่น ๆ ในพิษงูเห่าไทยเพื่อศึกษาว่า เอนไซม์ตัวใดที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณ
4. การศึกษาเกี่ยวกับเนื้อเยื่อสัตว์ ควรศึกษาในกระต่ายตัวเดียวกัน เนื่องจากกระต่ายแต่ละตัวอาจจะมีพยาธิสภาพต่าง ๆ ที่แตกต่างกันได้

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- คณาจารย์ ภาควิชาเภสัชศาสตร์ . ตำราเภสัชวิทยา . กรุงเทพฯ : คณะแพทยศาสตร์ มหิดล, 2529.
- ชาญ โพนกุล . "งูพิษกัดในประเทศไทย," ใน การประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 1 เรื่องพิษจากพืช สัตว์และจุลินทรีย์ บรรณาธิการโดย ชาญ โพนกุล . หน้า 21-31. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2531.
- ชัยใหญ่ เนื้ฐชาติ . "ความรู้เกี่ยวกับงูพิษที่สำคัญในเมืองไทย," จุลสารสมาคมศิษย์เก่าแพทย์ จุฬาลงกรณ์ . 2(5) : 16-26 ; พฤษภาคม 2521.
- ชลดา คงวัฒนา . "Bacteria in the Buccal Cavity in Thailand." ใน การประชุมวิชาการประจำปี 2533 (ครั้งที่ 31) . บรรณาธิการโดยสุทธิพร จิตรมิตรภาพ. หน้า 65 . กรุงเทพฯ : คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2533.
- ธารารัตน์ ศุภศิริ . "อีเล็คโตรโฟรีซิส," ใน เอกสารประกอบการประชุมปฏิบัติการเรื่อง การแยกสารทางชีวเคมี . หน้า 143-144 . กรุงเทพฯ : คณะวิทยาศาสตร์ศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร, 2528.
- นราทร อรรถบุตร . สมใจ เจริญประยูร และผ่องพรรณ นันทานิลุทธิ์ . "จุลชีววิทยาของ แผลงูพิษกัด," สารศิริราช . 33(9) : 589-595 ; กันยายน 2527.
- ประไพ พงษ์ประสิทธิ์ . รุณี มิตรกุล และนงคณ นพคุณ . "อาการเฉพาะที่ของแผลงูเห่ากัด: พยาธิสภาพ จุลชีพ และสาเหตุที่อาจเป็นไปได้," J. Med. Assoc. Thai. 71(9) : 475-480 ; กันยายน 2531.
- ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก . ภูมิคุ้มกันวิทยาขั้นสูง . เชียงใหม่ : คณะเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่, 2531.
- มุกดา ตฤณยานันท์ และคนอื่น ๆ . "สัตว์มีพิษและการรักษาสัตว์," ใน โครงการตำราศิริราช. หน้า 21-33 . กรุงเทพฯ : คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล มหิดล, 2522.
- วิไลรัตน์ นุชประมุข . อีเล็คโตรโฟรีซิสทางการแพทย์. กรุงเทพฯ : ภาควิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหิดล, 2528.

- วิศิษฐ์ ลิตปรีชา . "นิชธรรมชาติในประเทศไทย," ใน การประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 1 เรื่องพิษจากพืช สัตว์และจุลินทรีย์ , บรรณาธิการโดย ช่าง โพชนกุล. หน้า 1-2 .
 กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2531.
- เวคิน นนดิษฐ์ . พยาธิวิทยา . สงขลา : มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2523.
- _____ . เทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยา . สงขลา : มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2524.
- สุภาพรณ บิยะศิริกุล. การศึกษาค้นคว้าเคมีเอนไซม์ฟอสโฟไลเปส เอช จากงูแมวเซา. ปรินซ์นิพนธ์
 กศ.ม. ประสานมิตร : มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร , 2530. อัดสำเนา.
- Chang, C.C. and C.Y. Lee. "Cholinesterase and Anticholinesterase Activity Snake Venoms," J. Formosan. 54(3) : 144-146 ; 1965.
- Hanashiro, M.A.; M.H. Silva and O.G. Bier. "Neutralization of Crotoxin and Crude Venom by Rabbit Antiserum to Crotalus Phospholipase A," Immunochemistry. 15 : 745-750 ; 1978.
- Harris, J.B. and C.A. Maltin, "Myotoxic activity of the Crude Venom and the Principal Neurotoxin, Taipoxin, of the Australian Taipan, Oxyuranus scutellatus," Br. J. Pharmac. (76) : 61-75 ; 1982.
- Hoefer Scientific Instruments. Hoefer Electrophoresis Catalog and Exercise. California. 94107 U.S.A., 1990-1991.
- Hood, E.L. and others. "Detection and Application of Antigen Antibody Reaction," Immunology. 2 : 52 ; 1980.
- Iddon, D., R.D.G. Theakston and C.L. Ownby. "A Study of the Pathogenesis of Local Skin Necrosis Induced by Naja nigricollis (Spitting cobra) Venom Using Simple Histological Staining Techniques," Toxicon. 26(6) : 665-672 ; 1987.
- Karber, E.A., Mayer and Manfred. Experimental Immunochemistry. U.S.A. : Charles C. Thomas Publishen, 1961.
- Karlsson, E., H. Amberg and D. Eaker. "Isolation of the Principal Neurotoxins of Two Naja naja Subspecies," J. Biochem. 21 : 1-16 ; 1971.
- Lee, C.Y. "Enzyme in Snake Venom," in Handbook of Experiment Pharmacology. P. 121-123, 141-143. New York ; Springer-Verlag, 1979.
- Lo, T.B., Y.H. Chen and C.Y. Lee. "Chemical Studies of Formosan Cobra (Naja naja atra) Venom. Part I Chromatographic Separation of Crude Venom on DE-Sephadex and Preliminary Characterization of Its Components," J. Chinese Chemistry. 13(1) : 25-37 ; 1966.
- Lowry, O.H. and others. "Protein Measurement With the Folin Phenol Reagent," J. Chemistry. 193 : 265-275 ; 1951.
- Mebs, D., M. Ehrenfeld and Y. Samejima. "Local Necrotizing Effect of Snake and Muscle Relationship to Serum Creatine Kinase," Toxicon 21(3) : 393-404 ; 1983.

- Mebs, D. and Y. Samejima. "Isolation and Characterization of Myotoxic Phospholipases A₂ from Crotalid Venoms," Toxicon. 24 : 161-162 ; 1986.
- Mitsuko, A. "Rabbit Antiserum to Crotalus Phospholipase A₂," Immunochemistry. 5 : 745-750 ; 1989.
- Negenvoorte, C.A. and W.J. Mooi. "Processing of Biopsy Specimens," in Biopsy Pathology of the Pulmonary Vasculature. 17-23. Great Britain : Press University, 1989.
- Neville, D.M. "Discontinuous gel Electrophoresis," J.Biochemistry. 246 : 6328-6334 ; 1971.
- Ownby, C.L. and T.R. Colberg. "Classification of Myonecrosis Induced by Snake Venoms ; Venoms from the Prairie Rattlesnake (Crotalus viridis viridis), Western Diamondback Rattlesnake (Crotalus atrox) and Indian Cobra (Naja naja naja)," Toxicon. 26(5) : 459-462 ; 1988.
- Pharmacia Fine Chemicals. Ion Exchange Chromatography Principles and Methods. Sweden ; Rahms Lund March, 1980-1981.
- Pugh, R.N.H. and others. "Epidemiology of Human Encounters With the Spitting Cobra, Naja nigricollis, in the Malumfashi Area of Northern Nigeria," Annal. Medicine. 74(5) : 523-530 ; 1980.
- Robbins, S.L. and V. Kumar. Basic Pathology. U.S.A. : W.B. Saunders Company, 1987.
- Tan, N.H. and A. Arumozhiarasi. "Isolation and Characterization of an Acidic Lethal Phospholipase A₂ from Malayan Cobra (Naja naja sputatrix) Venom," 18(4) : 785-792 ; April, 1989.
- Tan, N.H. and C.S. Tan. "Enzymatic Activities of Malayan Cobra (Naja naja sputatrix) Venoms," Toxicon. 25(11) : 1249-1253 ; 1987.
- Walter, J.B. and M.S. Israel. General Pathology. New York : Churchill Livingstone, 1987.

ภาคผนวก

การวิเคราะห์พิษงูเห่าไทยโดยวิธี เอสดีเอส โพลีอะครีลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟเรซิส
ตามวิธีของ นีวิลล์ (Neville, 1971)

สารเคมี

1. สารละลายโปรตีนมาตรฐาน สารละลายพิษงูเห่าไทยที่ไม่ได้แยกพิษงูส่วนที่ 1 และส่วนที่ XIII ให้มีปริมาณโปรตีนแต่ละส่วนเป็น 70 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร
2. สารละลายโลเวอร์ เจล บัฟเฟอร์ (lower gel buffer) ละลาย ทริส 20.68 กรัม ในสารละลายเข้มข้น 1 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร ปริมาตร 12.3 ลูกบาศก์-เซนติเมตร เติมน้ำให้มีปริมาตร 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร พีเอช 9.18
3. สารละลายอะครีลาไมด์ 15% ละลายอะครีลาไมด์ 15.0 กรัม บิส 0.2 กรัม ในน้ำให้มีปริมาตร 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร
4. สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 0.2%
5. สารละลาย ทีโอเอ็มอีดี 120 ไมโครลิตรในน้ำให้มีปริมาตร 20 ลูกบาศก์เซนติเมตร
6. สารละลายอัพเปอร์ เจล บัฟเฟอร์ (upper gel buffer) ละลายทริส 2.62 กรัม ในสารละลายกรดซัลฟริกเข้มข้น 0.5 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร ปริมาตร 10.68 ลูกบาศก์-เซนติเมตร เติมน้ำให้มีปริมาตร 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร พีเอช 6.14
7. แซมเปิล บัฟเฟอร์ (sample buffer) ประกอบด้วย 20% เอสดีเอส ปริมาตร 20 ไมโครลิตร สารละลายเมอร์แคปโตเอทานอล (mercaptoethanol) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และ 0.05% โบรโมฟินอลบลู ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ในแต่ละสารตัวอย่าง
8. โลเวอร์ บัฟเฟอร์ แทงค์ (lower buffer tank) ละลายทริส 258.5 กรัม ในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร ปริมาตร 76.85 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมน้ำให้มีปริมาตร 5 ลิตร พีเอช 9.5
9. อัพเปอร์ บัฟเฟอร์ แทงค์ (upper buffer tank) ละลายทริส 4.92 กรัม กรดบอริก 2.42 กรัม และ 1 กรัม เอสดีเอส ในน้ำให้มีปริมาตร 1000 ลูกบาศก์เซนติเมตร พีเอช 8.64
10. สารละลายย้อมสีโปรตีน (staining solution) ละลาย 6.3 กรัม ไครมาสซิล ในสารละลายผสมของกรดอะซิติก 95% ปริมาตร 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร

สารละลายเอทานอลปราศจากน้ำปริมาตร 450 ลูกบาศก์เซนติเมตร และเติมน้ำให้มีปริมาตร 1000 ลูกบาศก์เซนติเมตร

11. สารละลายล้างสีโปรตีน (destaining solution) ละลายกรดอะซิติก 95% ปริมาตร 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร และเอทานอลปราศจากน้ำปริมาตร 210 ลูกบาศก์เซนติเมตรในน้ำให้มีปริมาตร 1000 ลูกบาศก์เซนติเมตร

อุปกรณ์

1. เครื่องมือในการเตรียมโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟริซิสแบบแผ่น
2. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้ากำลังสูง
3. เครื่องเขย่าสาร

วิธีดำเนินการวิจัย

1. เตรียมเจลแยกส่วนโดยผสมสารละลายข้อ 1, 2, 3 และ 4 ในอัตราส่วน 1 : 1 : 1 : 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตรสารละลายละ 2.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร
2. ใช้ปิเปตดูดสารละลาย บรรจุในแผ่นกระจกที่เตรียมไว้ (10 x 12 เซนติเมตร) จนมีความสูง 9 เซนติเมตร ค่อย ๆ เติมน้ำกลั่นปิดผิวหน้าเจล
3. เตรียมเจลชักนำ โดยผสมสารละลายข้อ 2, 3, 5 และสารละลาย ทีอีเอ็มอีดี เข้มข้น ปริมาตร 0.2, 0.625, 1.65 ลูกบาศก์เซนติเมตร และ 6.25 ไมโครลิตรตามลำดับ
4. เทน้ำที่หน้าผิวเจลเลียบหัวตามจำนวนสารตัวอย่างใช้ปิเปตดูดสารละลายเจลชักนำ เททบจนเต็มถึงขอบกระจก ตั้งเจลทิ้งไว้ให้แข็งตัว
5. บรรจุแผ่นเจลในกล่องเครื่องมือที่ใช้แยก เติมสารละลายบัฟเฟอร์
6. เตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน และสารละลายพิษ โดยผสมสารละลายข้อ 1 และข้อ 7 เติมน้ำให้มีปริมาตร 100 ไมโครลิตร ต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที
7. ดึงหัวออกใส่สารละลายพิษในข้อ 6 หลุมละ 60 ไมโครลิตร
8. ต่อเครื่องมือกับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าแรงสูง ผ่านกระแสไฟฟ้าขนาด 15 มิลลิแอมป์ โดยให้ขั้วลบอยู่ด้านบน

9. ตัดกระแสไฟฟ้าเมื่อแถบสีของบรอมฟีนอลบลู เคลื่อนที่ก่อนถึงขอบกระจกด้านล่าง ประมาณ 1 เซนติเมตร
10. นำแผ่นเจลออกจากแผ่นกระจก ให้นำไปแช่ในสารละลายสแตนนิง และ เขย่าบนเครื่องเขย่าสารนาน 30 นาที
11. นำแผ่นเจลแช่ในสารละลายสีสแตนนิง และเขย่าบนเครื่องเขย่าสารจนเห็น แถบโปรตีนที่ติดสีโคมาลซิบลูชัดเจน
12. ถ่ายรูปแผ่นเจล
13. พาค่าอัตราการเคลื่อนที่ระหว่างระยะการเคลื่อนที่ของสารต่อระยะที่สาร เคลื่อนที่ทั้งหมด (R_f) เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างน้ำหนักรโมเลกุลกับค่า R_f ของสารละลาย โปรตีนมาตรฐานที่ทราบค่า น้ำหนักรโมเลกุล เปรียบเทียบค่า R_f ของสารจากกราฟ มาตรฐาน จะได้ค่า น้ำหนักรโมเลกุลของสารตามต้องการ อย่างใกล้เคียงมากหรือถูกต้อง (วิไลลักษณ์ นุชประมุล, 2528)

ประวัติย่อของผู้วิจัย

ชื่อ	นาง วรณา	ชื่อสกุล	ธรรมนาเลิศ
เกิดวันที่	18	เดือน	ธันวาคม
สถานที่เกิด			อำเภอนครหลวง จังหวัดกรุงเทพมหานคร
สถานที่อยู่ปัจจุบัน			บ้านเลขที่ 100/154 ซอยเสนานิคม 1 ถนนพหลโยธิน แขวงลาดพร้าว เขตลาดพร้าว กรุงเทพฯ 10230
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน			อาจารย์ 2 ระดับ 6
สถานที่ทำงานปัจจุบัน			โรงเรียนศรีอยุธยา ถนนศรีอยุธยา แขวงพญาไท เขตราชเทวี กรุงเทพฯ สังกัดกรมสามัญศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ
ประวัติการศึกษา			

พ.ศ. 2511	ปกศ. ต้น จากวิทยาลัยครูบ้านสมเด็จเจ้าพระยา
พ.ศ. 2513	ปกศ. สูง (วิชาเอกวิทยาศาสตร์ วิชาโทคณิตศาสตร์ และภาษาอังกฤษ) จากวิทยาลัยครูบ้านสมเด็จเจ้าพระยา
พ.ศ. 2515	กศ.บ. (วิชาเอกเคมี วิชาโทคณิตศาสตร์) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สงขลา
พ.ศ. 2533	วท.ม. (เคมีชีวภาพ) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

การศึกษาส่วนประกอบของนิมูงเห่าไทยที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณ

บทคัดย่อ
ของ
วรรณา ชรรมนาเลิศ

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒประสานมิตรเพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ

เมษายน 2534

บทคัดย่อ

การตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณในผู้ถูกงูเห่ากัด จะพบประมาณ 50% ที่รักษา ยากมาก ส่วนใหญ่จะต้องใช้วิธีตัดเนื้อเยื่อส่วนอื่นของร่างกายมาตัดปะแผล (Tissue graft) และหากรอยแผลเกิดรุนแรงมากอาจต้องตัดอวัยวะส่วนที่ถูกกัดนั้นออก ทำให้พิการได้ ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาส่วนประกอบของพิษงูเห่าไทย ที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐาน ในการหาวิธียับยั้งการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณของผู้ถูกงูเห่ากัด

ในงานวิจัยนี้ แยกพิษงูเห่าไทยด้วยวิธีโอออน เอ็กซ์เซนจ์ โครมาโตกราฟี โดยใช้ ไบโอ - เร็กซ์ 70 ที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ขนาด 2.6×25 เซนติเมตร ตามวิธีของคาร์ลสัน อันเบิร์กและอีเกอร์ (1971) แยกได้ 13 ส่วน คือ I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII และ XIII ตามลำดับ เมื่อนำพิษงูเห่าแต่ละส่วนเข้าชั้นผิวหนังของ กระต่าย และการตรวจสอบด้วยการครอยแผลที่ผิวหนังตรงรอยฉีดควบคู่กับการตัดเนื้อเยื่อบริเวณ รอยแผลไปตรวจสอบทางกายวิภาคศาสตร์ พบว่าพิษงูส่วนที่ I และ XIII เท่านั้นที่ทำให้เกิด การตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณ จากผลการศึกษาแอกติวิตีของเอนไซม์ฟอสโฟไลเฟส เอทู และเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส ในพิษงูแต่ละส่วนที่แยกได้ พบว่าแอกติวิตีของเอนไซม์ ฟอสโฟไลเฟส เอทู มีมากในพิษงูส่วนที่ II, III, IV และ V ส่วนแอกติวิตีของเอนไซม์ อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส มีมากในพิษงูส่วนที่ II, III, IV, V, VI, VII, X, XI และ XII ในขณะที่พิษงูส่วนที่ I และ XIII มีแอกติวิตีของเอนไซม์ทั้งสองนี้ต่ำ ซึ่งเป็นข้อบ่งชี้ว่า เอนไซม์ฟอสโฟไลเฟส เอทู และอะซิติลโคลีนเอสเตอเรส ในพิษงูเห่าไทยไม่เกี่ยวข้องกับการ ทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณ สำหรับการศึกษาความเป็นพิษ (แอลดี₅₀) พบว่า พิษงูส่วนที่ VIII มีความเป็นพิษสูงสุด (0.15 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) มีแนวโน้มที่จะเป็นนิวโรทอกซินในพิษงูส่วนนี้

เมื่อวิเคราะห์พิษงูส่วนที่ I และ XIII ด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่า พิษงูส่วนที่ I มีแถบโปรตีนมากกว่า 1 แถบ ส่วนพิษงูส่วนที่ XIII มีแถบโปรตีนเพียง

แถบเดี่ยว ส่วนการวิเคราะห์นิษฐ 2 ส่วนนี้ด้วยวิธีเอสดีแอล โพลีอะครีลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าในนิษฐส่วนที่ I มีโปรตีนขนาดโมเลกุลตั้งแต่ 10,300 - 67,000 คาลตัน และ นิษฐส่วนที่ XIII มีโปรตีนขนาด 14,500 - 32,000 คาลตัน ตามลำดับ

ขั้นตอนสุดท้ายในงานวิจัยนี้ ได้เตรียมแอนติบอดีต่อนิษฐเท่าที่แยกได้ส่วนที่ I และ XIII และศึกษาความสามารถในการยับยั้งการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณในกระต่าย โดยการฉีดนิษฐส่วนที่ I และส่วนที่ XIII และนิษฐเท่าที่ยังไม่ได้แยก จากนั้นตามด้วยแอนติบอดีต่อนิษฐส่วนที่ I แอนติบอดีต่อนิษฐส่วนที่ XIII และแอนติบอดีต่อนิษฐส่วนที่ I และ XIII ร่วมกัน รอบ ๆ รอยฉีดนิษฐที่บริเวณโคนขาหลังของกระต่ายแต่ละตัวตามลำดับ พบว่าการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณลดลงเห็นได้ชัดเจน ทั้งจากสภาพพยาธิสภาพภายนอกที่ดีขึ้น ขนาดความกว้างของรอยแผลแคบลง พบว่าพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกระต่ายบริเวณที่ฉีดนิษฐ และแอนติบอดีของนิษฐมีการเปลี่ยนแปลงในทางที่ดีขึ้นทั้งผิวหนังชั้นนอก ผิวหนังชั้นในและกล้ามเนื้อ ซึ่งนับว่าได้ข้อมูลที่ดีที่จะเป็นแนวทางในการพัฒนาและดัดแปลง เพื่อผลิตเป็นแอนติบอดีในการรักษาการตายของเนื้อเยื่อเฉพาะบริเวณในผู้ป่วยที่ถูกงูเห่ากัดต่อไป

A STUDY ON LOCAL TISSUE NECROTIC EFFECTING
COMPONENTS FROM THE VENOM OF
SIAMESE COBRA (Naja kaouthia)

AN ABSTRACT
BY
WANNA THAMMAPALERD

Presented inpartial fulfillment of requirements
for the Master of Science degree in Biological Chemistry
April 1991

Abstract

Approximately fifty percent of the victims bitten by the cobra faces the problem of local tissue necrosis which is hard to cure. Tissue graft has to be managed since a part of the tissue at a wound is removed. It could be as serious that limbs might be removed to save the life of the patients. The purpose of this study is to determine the fractions which caused the necrosis and to prepare antivenom against those fractions.

The research was carried out to isolate Siamese cobra venom by ion exchange chromatography. The column of Bio-Rex 70 was used to operate the chromatography of 0.5 gram of the venom. Thirteen fractions were collected and the proteins of each fraction was examined for the phospholipase A_2 and acetylcholinesterase activities as well as the fractions that cause tissue necrosis. Fraction I and XIII of the ion exchange chromatography were found to contain the factors causing tissue necrosis. However a very low activities of phospholipase A_2 and acetylcholinesterase were found. The low activities of these two enzymes indicates a small possibility of phospholipase A_2 and acetylcholinesterase involving in tissue necrosis. The toxicity test (LD_{50}) showed that fraction VIII contained most toxic factor which indicates the containmng of neurotoxin.

In testing of fraction I and XIII with polyacrylamide gel electrophoresis more protein bands were found in fraction I while only one band was found in fraction XIII. In another test of these two fractions with SDS polyacrylamine gel electrophoresis, the protein bands having molecular weight of 10,300-67,000 daltons and 14,500-32,000 daltons were found in fraction I and XIII respectively.

The last part of this study was concentrated on the preparation of antibodies of fraction I and fraction XIII and the neutralization properties were determined to be effective against tissue necrosis. The results showed that the rabbit tissue necrotized by fraction I, fraction XIII or crude cobra venom could regenerate after injection of antibodies against these two fractions into the venom injected sites. *This finding will be useful to further develop and produce the effective antibody for treatment of local tissue necrosis.