

๕15.๙4 2

พ 15๙ ๐

๘.3

การศึกษาโปรตีนจากพิษงูแมวเซาที่มีผลต่อการทำงานของไตในหนูขาว

3 - ซี.ย. 2542



เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ

มีนาคม 2542

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

11๙๐๙๘

การศึกษาโปรตีนจากพิษงูแมวเซาที่มีผลต่อการทำงานของไตในหนูขาว



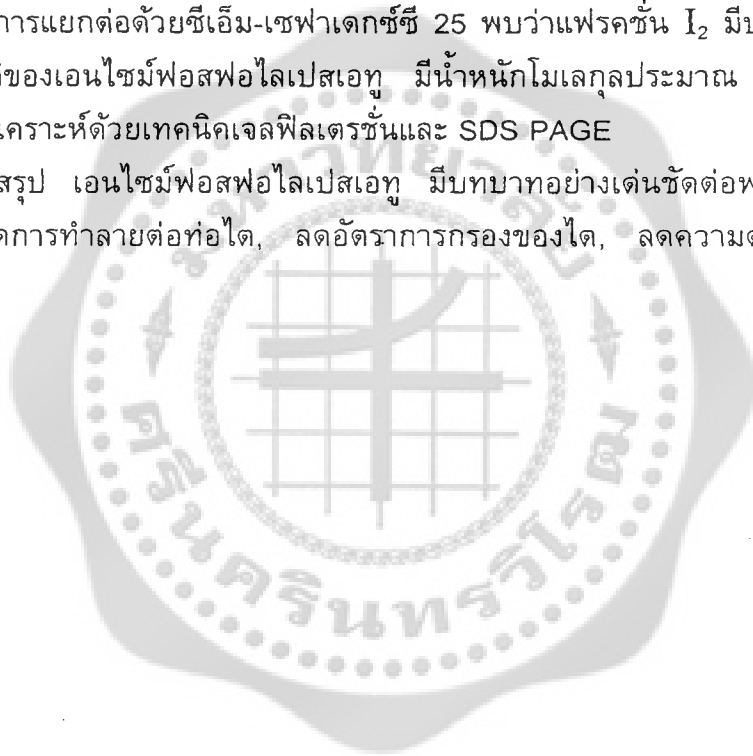
เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ

มีนาคม 2542

การศึกษาและทดลองผลของพิษงูแมวเซาชนิดหยาบและพิษงูส่วนที่แยกแล้วต่อการทำ
งานของไต

นำพิษงูแมวเซาชนิดหยาบทำการแยกด้วยเจลฟิลเตรชัน (เซฟาเดกซ์จี 100) และไอออน
เอกซ์เชนจ์โครมาโตกราฟี (ซีเอ็ม-เซฟาเดกซ์จี 25) ได้เป็น 4 ส่วนคือ G1, G2, G3 และ G4
โดยเมื่อทำการแยกด้วยเจลฟิลเตรชัน และชะด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7 พบว่าแฟรคชัน G2
มีคุณสมบัติของเอนไซม์ฟอสโฟไลเปสเอทู เมื่อนำทุกแฟรคชันมาทดสอบการทำงานของไตโดย
ฉีดพิษงูความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักหนูทดลอง พบว่าพิษงูชนิดหยาบและ
แฟรคชัน G2 สามารถลดค่าอัตราการกรองของไตอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับภาวะปกติ
แต่แฟรคชัน G1, G3 และ G4 ไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกับ ผลต่อความดันโลหิต เมื่อนำ
แฟรคชัน G2 ทำการแยกต่อด้วยซีเอ็ม-เซฟาเดกซ์จี 25 พบว่าแฟรคชัน I_2 มีปริมาณโปรตีนมาก
สุดและมีคุณสมบัติของเอนไซม์ฟอสโฟไลเปสเอทู มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 14,000 ดาลตัน
จากการแยกและวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชันและ SDS PAGE

กล่าวโดยสรุป เอนไซม์ฟอสโฟไลเปสเอทู มีบทบาทอย่างเด่นชัดต่อพยาธิสรีรวิทยาของ
ไต โดยทำให้เกิดการทำลายต่อท่อไต, ลดอัตราการกรองของไต, ลดความดันโลหิตอย่างมีนัย
สำคัญ .



**A STUDY OF PROTEIN COMPONENTS FROM RUSSELL'S VIPER VENOM AFFECTING
THE RENAL FUNCTION OF WISTAR RATS**

**AN ABSTRACT
BY
PHONGPHAT WETCHASIT**



**Presented in partial fulfillment of the requirements for the
Master of Science degree in Biological Chemistry
at Srinakharinwirot University**

March 1999

The present experiments were carried out to study the effects of Russell's viper venom and its fractions on renal function.

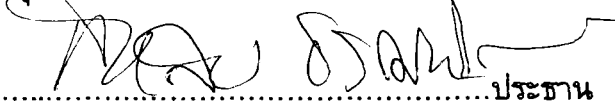
Crude venom from Russell's viper siamensis was partially purified by gel filtration (Sephadex G-100) and ion exchange chromatography (CM-Sephadex C-25). Four peaks namely G1, G2, G3 and G4 were obtained from sephadex G-100 eluted by phosphate buffer. Phospholipase A₂ was mainly detected on peak G2 which correspond to the previous work. Every peaks from gel filtration were carried out to tested for the effect on renal function. Renal functions was performed every 30 minutes interval after intravenous injections of crude (0.3 mg/kg body weight) and its fractionated venom. The significant decrease in the glomerular filtration rate was observed by the effect of G2 and crude venom. Hemolysis was also noted as well as the marked decrease in blood pressure compare to normal condition while no effects of G1, G3 and G4 were appearant.

G2 was carried on for further fractionated by CM-Sephadex C-25, the mainly peak I₂ was detected for PLA₂ activity and its molecular weight was calculated approximatly 14,000 dalton using gel filtration and SDS PAGE.

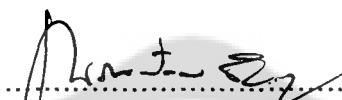
It can be concluded that the enzyme expression shows strong evidence on renal pathophysiology, including renal tubular necrosis, decrease in renal glomerular filtration rate, blood pressure.

คณะกรรมการควบคุมและคณะกรรมการสอบได้พิจารณาปริญญาบัตรฉบับนี้แล้ว
เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอก
เคมีชีวภาพของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒได้

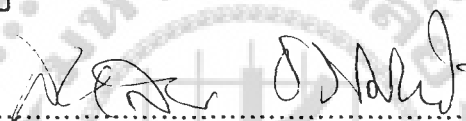
คณะกรรมการควบคุม


.....ประธาน

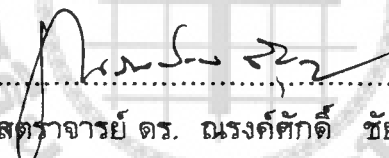
(ดร. สายสนม ชรรณพิทักษ์)



.....กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร. ณรงค์ศักดิ์ ชัยบุตร)

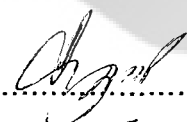
คณะกรรมการสอบ


.....ประธาน

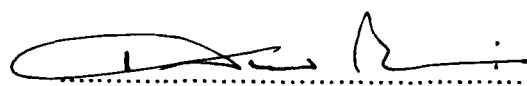
(ดร. สายสนม ชรรณพิทักษ์)


.....กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร. ณรงค์ศักดิ์ ชัยบุตร)


.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนันต์ พุทธิพิทยาสาพร)


.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม
(รองศาสตราจารย์ ดร. ชารัตน์ สุภศิริ)

บัณฑิตวิทยาลัยอนุมัติให้รับปริญญาบัตรฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ ของมหาวิทยาลัย
ศรีนครินทรวิโรฒ


.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ ดร. เสริมศักดิ์ วิศาลาภรณ์)

วันที่ 12 เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2542

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลือและแนะนำอย่างดียิ่งจาก ดร.สายสนม ธรรมพิทักษ์ ทั้งด้านการวางแผนการทดลอง รวมถึงตรวจแก้ปริญญานิพนธ์ จนเรียบร้อยสมบูรณ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สกล พงศกร อดีตหัวหน้าภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ที่ได้ให้ความกรุณาตรวจทาน ปริญญานิพนธ์ และคำแนะนำในการกล่าวรายงาน ตลอดจนอนุญาตให้ใช้เครื่องมือ และ สัตว์ทดลอง รวมถึงห้องปฏิบัติการด้วยดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.ณรงค์ศักดิ์ ชัยบุตร หัวหน้าภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำในการวางแผน การทดลองเป็นอย่างดี ตลอดจนให้ความรู้ทั้งยังได้กรุณาแก้ไขปริญญานิพนธ์จนสมบูรณ์ยิ่ง

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ธารารัตน์ ศุภศิริ อาจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำ ให้ความรู้ และกรุณาร่วมเป็นกรรมการสอบปริญญานิพนธ์ ทั้งยังได้กรุณาตรวจทานแก้ไข ปริญญานิพนธ์จนสมบูรณ์ยิ่ง

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนันต์ พุทธิยาสถาพร อาจารย์ ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ที่ให้คำปรึกษาและ คำแนะนำ และกรุณาร่วมเป็นกรรมการสอบปริญญานิพนธ์ ให้ความรู้ทั้งยังได้กรุณาตรวจ ทานแก้ไขปริญญานิพนธ์จนสมบูรณ์ยิ่ง

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภักตร์เพ็ญ ทิพยมนตรี อาจารย์ประจำภาควิชา สรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ให้คำปรึกษาด้านระบบ ไหลเวียนโลหิต

ขอขอบพระคุณ ท่านอาจารย์ อัมพร จาริยะพงศ์สกุล อาจารย์ประจำภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ให้คำปรึกษาด้าน Micro circulation

ขอขอบพระคุณ ดร.ฉัตรศรี เดชะปัญญา อาจารย์ประจำภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ให้คำปรึกษาด้าน Molecular Biology

ขอขอบพระคุณ ท่านอาจารย์ พรรณี หนูซื่อตรง อาจารย์ประจำภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ให้คำแนะนำในการวิเคราะห์ข้อมูล ทางสถิติ

ขอขอบคุณท่านหัวหน้าภาควิชาตรีวิทยา, คณาจารย์และเจ้าหน้าที่ภาควิชาตรีวิทยา
มหาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตรทุกท่านที่ได้ให้ความร่วมมือ อำนวยความสะดวกและให้
กำลังใจเสมอมาตลอดจนปริญญานิพนธ์ฉบับนี้เรียบร้อยสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ คุณณฤมล พักมณี หัวหน้าศูนย์วิจัยและพัฒนา กองวิทยาศาสตร์
สภากาชาดไทยที่ให้คำแนะนำทางด้านสัมมนาวิชาการทางด้านงูพิษ

ขอขอบคุณ คุณศักดิ์พร ทองพิลา นักวิทยาศาสตร์ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้ให้คำปรึกษาทางด้านภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และช่วย
ค้นข้อมูลประกอบการเขียนปริญญานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณ คุณเพ็ญศรี กิติเจริญรัตน์ ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำอิเล็กทรอนิกส์
ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ไม่สามารถสำเร็จลงไปได้หากไม่ได้รับการช่วยเหลืออย่างดียิ่ง
จาก คุณจันทร์ทิพย์ คงสินรัตนชัย ที่ได้มีส่วนช่วยในการค้นคว้าข้อมูลประกอบการเขียนเรียบ
เรียง และจัดทำต้นฉบับปริญญานิพนธ์ จนเสร็จสมบูรณ์ จึงขอขอบคุณไว้ ณ ที่นี้

ท้ายนี้ขออน้อมรำลึกถึงพระคุณบิดา มารดา และ พี่ชาย ที่ได้ให้การอบรมเลี้ยงดู
สนับสนุนในทุก ๆ ด้าน ทั้งนี้ขอขอบคุณผู้มีพระคุณช่วยเหลือทุกท่านที่มีได้กล่าวนามในที่นี้
จนปริญญานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

พงษ์พัฒน์ เวชสิทธิ์

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
คำนำ.....	1
2 เอกสารที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย.....	2
ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า.....	59
ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า.....	59
ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า.....	59
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	60
การหา V_o , V_t ของ K_3FeCN_6 ของ blue dextrane และ V_e ของพืษงูแมวเซา โดยเทคนิคเจลฟิลเตรชัน.....	62
การวิเคราะห์พืษงูแมวเซาที่แยกได้โดยวิธีเจลฟิลเตรชัน.....	63
การหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีแบรดฟอร์ด.....	63
การทดลองทางสรีรวิทยา.....	64
การหาค่าแอกติวิตีของฟอสโฟไลเปสเอทตามวิธีของเมปล์และซาเมจิมา(1986).....	65
4 ผลการวิจัย.....	68
ผลการหาส่วนประกอบของโปรตีนพืษงูแมวเซาเทคนิคเจลฟิลเตรชัน (Sephadex G100).....	68
ผลการหา V_o , V_t ของ K_3FeCN_6 และ Blue dextrane	70
ผลการแยกโปรตีนมาตรฐาน Ovalbumin, Ribonuclease, Albumin, Chymotrypsinogen.....	71
ผลการหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน G2.....	73
ผลการแยกองค์ประกอบของพืษงูแมวเซาตามน้ำหนักโมเลกุล.....	74
ผลการแยกพืษงูแมวเซา I_2	76
ผลการแยกพืษงูแมวเซาอย่างหยาบ, พืษงูส่วน G1, G2, G3 และ G4 และ I_2 ผ่าน SDS PAGE.....	77
ผลของพืษงูอย่างหยาบและพืษงูส่วน G1, G2, G3 และ G4 ต่อความดันโลหิต..	78

4 (ต่อ)

ผลของพิษงูอย่างหายาบบและพิษงูส่วน G1, G2, G3 และ G4 ต่ออุณหภูมิร่างกาย..	79
ผลของพิษงูอย่างหายาบบและพิษงูส่วนG1,G2,G3 และ G4 ต่ออัตราการกรองของไต	80

5 สรุป อภิปรายผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	81
สรุปผลเจลฟิลเตรชั่น.....	81
สรุปผลภาคปฏิบัติการทดลองทางสรีรวิทยา.....	82
ข้อเสนอแนะ.....	84

บรรณานุกรม.....	85
-----------------	----

ภาคผนวก.....	91
ภาคผนวก ก.....	92
ภาคผนวก ข.....	94
ภาคผนวก ค.....	96
ภาคผนวก ง.....	98

ประวัติย่อผู้วิจัย.....	116
-------------------------	-----

บทคัดย่อ.....	117
---------------	-----

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 องค์ประกอบพิษงูแมวเซาที่ไม่ได้แยก.....	10
2 แสดงเอนไซม์ชนิดต่างๆ ซึ่งเป็นองค์ประกอบของพิษงูและสามารถทำให้เกิด พยาธิสภาพต่อไตได้.....	11
3 แสดงแพคเตอร์ต่างๆ ในพลาสมาที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือด.....	13
4 แสดงองค์ประกอบพิษงู RVV-V และรอมโบไซทิน.....	17
5 แสดงการแบ่งกลุ่ม (subclass) ของเอนไซม์ RVV-V ตาม SWISSPROT CODE.....	19
6 แสดงการตรวจสอบทางห้องปฏิบัติการแสดงผลของพิษงูแมวเซาต่อปัจจัย การแข็งตัวของเลือด.....	22
7 แสดงการเปรียบเทียบเอนไซม์ NOS มี 2 รูปแบบคือ NOS (cNOS) และ inducible NOS (iNOS)	30
8 องค์ประกอบของเนื้อเยื่อผิวหนัง (epidermis)	33
9 ตารางแสดงองค์ประกอบของกรดไขมันของเมมเบรนเฟลตเลท.....	34
10 องค์ประกอบของกรดไขมันและไขมันของเมมเบรนเม็ดเลือดแดง.....	35
11 แสดงชนิดของสารเคมี ที่สามารถกระตุ้นเกร็ดเลือดได้.....	38
12 แสดงค่าที่ใช้ในการหาหน้าหนักโมเลกุลของ G2.....	73
13 ผลการหาปริมาณโปรตีนด้วยเทคนิคแบรดฟอร์ดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm.....	99
14 แสดงปริมาณโปรตีนในแต่ละแฟรคชันที่แยกด้วยเซฟาเดกซ์จี100.....	99
15 แสดงค่า PLA ₂ activity.....	100
16 แสดงผลของพิษงูแมวเซาต่ออุณหภูมิร่างกาย.....	113

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 แสดงต่อมพิษของงูสกุล Viperidae.....	3
2 แสดงเซลล์ ในต่อมพิษงูสกุล Viperidae.....	4
3 แสดงการกระจายตัวของงู <i>Vipera ammodytes</i> , <i>Vipera apis</i> , <i>Vipera ursinii</i>	5
4 แสดงการกระจายตัวของงู <i>Vipera berus</i> , <i>Vipera kaznakovi</i> , <i>Vipera latasti</i>	5
5 แสดงการเปรียบเทียบงูแมวเซาสปีชีส์ต่างกันคือ <i>Siamensis</i> และ <i>Pulchella</i>	6
6 แสดงการกระจายตัวของงูแมวเซาสปีชีส์ <i>Siamensis</i> กับ <i>Pulchella</i>	6
7 แสดงโปรตีนชนิดต่าง ๆ ซึ่งอยู่ในพลาสมาสามารถกระตุ้นให้เกิดขบวนการแข็งตัวของเลือดได้.....	12
8 แสดงพิษงูแมวเซาสามารถกระตุ้น factor X ให้เป็น FXa ในขบวนการแข็งตัวของเลือดโดยอาศัยเอนไซม์ RVVC.....	15
9 แสดงตำแหน่งการย่อยของเอนไซม์ RVV-V ต่อ FV เปรียบเทียบกับทรอมบิน.....	16
10 แสดงตำแหน่งการทำงานของพิษงูแมวเซาในการเปลี่ยน FV ให้เป็น FVa เปรียบเทียบกับทรอมบิน.....	16
11 แสดงองค์ประกอบของกรดอะมิโนของพิษงูแมวเซา (RVV-V _γ).....	18
12 แสดงองค์ประกอบของกรดอะมิโนของพิษงูแมวเซา (RVV-V _γ) ซึ่งยึดติดกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ 6 ตำแหน่ง.....	19
13 กลไก DIC ต่อการเกิด พยาธิสภาพ.....	20
14 กลไกการทำงานของไลพอกซิเดสต่อกรดลิโนเลนิก (8,11,14-eicosatrienoic acid)...	24
15 กลไกการกระตุ้น เม็ดเลือดขาวด้วย chemotactic agent.....	27
16 โครงสร้างของ PAF	29
17 แสดงโครงสร้างของเซลล์เมมเบรนและโครงสร้างของไมโทคอนเดรียซึ่งมีองค์ประกอบของเมมเบรนทำหน้าที่ในขบวนการหายใจ.....	32
18 องค์ประกอบของเซลล์เมมเบรนของเพลตเลท.....	33
19 เซลล์ของลำไส้ ส่วน jejunum มีลักษณะ swelling จากผลของ PGE1 ความเข้มข้น 1×10^{-6} M.....	37
20 การเปลี่ยนแปลงของเซลล์เมมเบรนเนื่องจากผลของเอนไซม์ฟอสโฟไลเปส.....	39
21 แบบจำลองการทำงานของเอนไซม์ PLA ₂ โดยแสดงบริเวณเร่ง (active site).....	40
22 เปรียบเทียบโครงสร้าง 3 มิติของเอนไซม์ฟอสโฟไลเปสเอทากับฟอสโฟไลเปสซี.....	41
23 แผนภาพการทำงานของเอนไซม์ฟอสโฟไลเปสเอท.....	41

ภาพประกอบ

หน้า

24	พยาธิวิทยาที่เกิดจากเอนไซม์ฟอสโฟไลเปสเอทู.....	42
25	การทำงานของเอนไซม์กลุ่มฟอสโฟไลเปสมีผลต่อการเกิด inflammation.....	43
26	การย่อยสับสเตรทตำแหน่งเร่งปฏิกิริยา (His-48, Gly-30, Asp-49,) ของเอนไซม์ฟอสโฟไลเปสเอทู.....	44
27	ลำดับกรดอะมิโนของโปรเอนไซม์ของฟอสโฟไลเปสเอทู (zymogen) และตำแหน่งพันธะไดซัลไฟด์ 7 ตำแหน่ง โดยด้านปลายอะมิโนจะถูกย่อยได้ด้วยเอนไซม์ทริปซินตรงตำแหน่ง Arg-Ala.....	45
28	การเปรียบเทียบลำดับอนุกรมของกรดอะมิโนฟอสโฟไลเปสเอทู (อักษรย่อ) ในงูและสัตว์ชนิดต่าง ๆ	45
29	โมเลกุลของออกซิเจน (O ₂) โมเลกุลเกาะกับแคลเซียมไอออนตรงตำแหน่งบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ฟอสโฟไลเปสเอทู.....	46
30	ตำแหน่งด้านปลาย N (N-terminat) เข้าร่วมกับบริเวณเร่ง.....	46
31	ตำแหน่งบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ฟอสโฟไลเปสเอทู ซึ่งได้จากภาพถ่าย X-ray ผลึกของเอนไซม์ฟอสโฟไลเปสเอทู.....	47
32	แสดงการจับของ (R) 2-dodecanoyl-amino-1-hexanol-phosphoglycerol (amide) กับบริเวณเร่งของเอนไซม์ฟอสโฟไลเปสเอทู.....	47
33	บทบาทของฟอสโฟไลเปสซี มีผลทำให้ เซลล์มีการหดตัว (contraction) หรือเซลล์บวมก็มีกลไกรวมกับฟอสโฟไลเปสเอทู ทำให้พยาธิสภาพของเซลล์มีลักษณะเป็น ไปแนวเดียวกันดังกลไก.....	48
34	บทบาทของฟอสโฟไลเปสซี มีผลทำให้เซลล์ประสาทมีการบวมแล้วแตกสลาย.....	48
35	การเปลี่ยนแปลงทางโลหิตพลศาสตร์ในไตอีกเสบของโกลเมอรูลัสชนิดเฉียบพลัน....	51
36	กลไกควบคุมระบบการไหลเวียนโลหิตของไต.....	51
37	แสดงการอุดตันของท่อไตจากสาเหตุต่าง ๆ	52
38	แสดงกลไกการเกิด tubulointerstitial Nephropathy จากสาเหตุส่วนใหญ่ และจากที่เกิดร่วมกับโรคไตอีกเสบรุนแรงชนิดต่าง ๆ.....	53
39	แสดงภาวะการขาดเลือดของไต.....	55
40	แผนผังแสดงการทดลองโดยย่อ.....	66
41	แสดงปริมาณโปรตีนที่แยกด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชัน (เซฟาเดกซ์จี100).....	67
42	กราฟแสดงการแยกพิษงูแมวเซา 200 มก. ครั้งที่ 1 ด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชัน (เซฟาเดกซ์จี100) ชะด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 M pH7 ด้วยอัตราการไหล 30 มล./ชม. ทำการเก็บหลอดละ 3 มล. ปริมาตรรวมของคอลัมน์ 426 มล.....	68

- 43 กราฟแสดงการแยกพิษงูแมวเซา 200 มก. ครั้งที่ 2 ด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชัน (เซฟาเดกซ์จี100) ชะด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 M pH7 ด้วยอัตราการไหล 16 มล./ชม. ทำการเก็บหลอดละ 3 มล ปริมาตรรวมของคอลัมน์ 459 มล..... 68
- 44 กราฟแสดงการเปรียบเทียบการแยกโปรตีนจากพิษงูแมวเซาด้วยเทคนิค เจลฟิลเตรชันเซฟาเดกซ์จี 100 ครั้งที่ 1 และ 2 สามารถแยกโปรตีนเป็น 3 กลุ่มคือ G1, G2 และ G3 ทำการวัดหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีเบรดฟอร์ด ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร 69
- 45 กราฟแสดงการหา V_0 และ V_t ของคอลัมน์ขนาด 2.5 ซม. x 75 ซม. บรรจุด้วย เซฟาเดกซ์จี100 โดยใช้โพแทสเซียมเพอร์โรไซยาไนด์และบลูเดกซ์แทรน 1% และ 2% ปริมาตร 0.5มล. ตามลำดับ..... 70
- 46 กราฟแสดงการแยกโปรตีนมาตรฐาน Ovalbumin (2mg) และ Ribonuclease A (2mg) โดยคอลัมน์เซฟาเดกซ์จี100 ขนาด 2.5 ซม. x 75 ซม. ชะด้วยฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH7 ด้วยอัตราการไหล 30 มล./ชม. ทำการเก็บหลอดละ 5 มล. ปริมาตรรวมของคอลัมน์ 330 มล..... 71
- 47 กราฟแสดงการแยกโปรตีนมาตรฐาน albumin (2mg/ml), chymotrypsinogen (2mg/ml) ผ่านคอลัมน์ขนาด 2.5 ซม. x 75 ซม. บรรจุด้วยคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี 100 ชะด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH7 อัตราการไหล 30 มล./ชม. ทำการ เก็บหลอดละ 5 มล. ปริมาตรรวมของคอลัมน์ 265 มล. 71
- 48 ผลการประมาณค่าน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนของ G2 โดยเปรียบเทียบค่า K_{av} กับ MW ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน..... 73
- 49 แสดงถึงเปอร์เซ็นต์องค์ประกอบโปรตีนในพิษงูแมวเซาอย่างหยาบตาม ขนาดน้ำหนักโมเลกุล..... 74
- 50 การแยกพิษงูแมวเซา (I_2) ความเข้มข้น 10 มก./มล., 30 มก./มล. ด้วยเทคนิค ไอออนเอ็กซ์เชนจ์ (CM-Sephadex C25) 0.02 - 0.2 M ด้วยฟอสเฟต บัฟเฟอร์ พีเอชเกอร์เดียนท์ 6 - 9.2 ด้วยอัตราการไหล 30 มล./ชม. และ 18 มล./ชม. ทำการเก็บหลอดละ 4 มล และ 2 มล. 76
- 51 ภาพแสดงการแยกพิษงูแมวเซาเทคนิค SDS PAGE แสดงให้เห็นองค์ประกอบ ของพิษงูชนิดหยาบ (Lane.3) และพิษงูแมวเซาส่วนที่แยกด้วย Sephadex G100 คือส่วนของ G1 (Lane.4), G2 (Lane.5), G3 (Lane.6), G4 (Lane.7) และพิษงูส่วนที่แยกด้วย CM-Sephadex C25 คือ I_2 (Lane 8)..... 77

52	ภาพแสดงพิษงูแมวเซาชนิดหยาบ (crude) และพิษงูส่วนที่แยกด้วย Sephadex G100 (G1, G2, G3 และ G4) เข้มข้น 0.3 mg/Kg ผ่านทาง Jugular Vein โดยมีผลต่อระดับความดันเลือดบน (Systolic, sys) และความดันเลือดล่าง (diastolic, dias)	78
53	ภาพแสดง Russell's viper Venom affects on body temperature.....	79
54	ผลของพิษงูแมวเซาอย่างหยาบ และพิษงูส่วนที่แยกด้วยเจลฟิลเตรชัน G2, G4 มีผลต่ออัตราการลดการกรองของไต.....	80
55	เป็นผลจากการฉีดพิษงู (crude) 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมเข้ากล้ามเนื้อในเวลา 24 ชั่วโมง A. โกลเมอรูลัสหดตัวโดยทั่วไป (*) B. ที่ proximal, distal convoluted tubule มีเลือดบรรจุภายใน (*) C. พบ RBC รูปของ ecchynoi (*) และ inflammatory cell D. พบเลือดในไตโดยทั่วไป (*)	114
56	แสดงผลของพิษงูแมวเซาต่อไต ซึ่งได้จากการแยกพิษงูแมวเซาชนิดหยาบด้วย เจลฟิลเตรชัน (G100) A. พิษงูส่วน G2 0.2 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/12 ชั่วโมง ทำให้เกิดเซลล์นิโครซิส (*) B. พิษงูส่วน G1 0.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/12 ชั่วโมง พบเลือดบรรจุอยู่ในทิวบูลต่าง ๆ (*) C. และ D. พิษงูแมวเซาแฟรคชัน G3 ขนาด 4 และ 1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/1 ชั่วโมง ตามลำดับ (*).....	115

บทที่ 1

บทนำ

คำนำ

พยาธิสภาพที่สำคัญของผู้ที่ถูกงูแมวเซากัดคือ ภาวะไตวายชนิดเฉียบพลันมักพบในผู้ถูกงูแมวเซากัดซึ่งเป็นปัญหาในแถบภูมิภาคเอเชียใต้แก่ พม่า ศรีลังกา อินเดีย ปากีสถาน บังคลาเทศ จีน และประเทศไทย ส่วนในพม่ามีรายงานการถูกกัดมากกว่า 1,000 คนต่อปี ซึ่งเป็นสาเหตุการตายลำดับที่ 5 ของประเทศนี้ (Myint-Lwin and et al., 1985, Maung-Maung-Aye. 1990) ในประเทศไทยพบงูชนิดนี้มากในแถบจังหวัดภาคกลาง เช่น ลพบุรี อ่างทอง นครนายก สุพรรณบุรี (บุญเยื่อน ทุมวิภาต และ วิโรจน์ นุตพันธ์ 2525 : 80) และเป็นปัญหาต่อพื้นที่เกษตรกรรมของประเทศไทยคือต่อชาวไร่ชาวนาโดยตรง งูแมวเซา (Russell's viper snake, RV) จัดเป็นงูอยู่ในวงศ์ไวยเปอริดี (Viperidae) พิษงูมีลักษณะเป็นของเหลวข้นสีเหลืองใส ละลายน้ำ ประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิด เช่น โปรตีนเนส (proteinase) และฟอสโฟไลเปส เอทู (Phospholipase A₂, PLA₂) เอนไซม์ชนิดนี้ยังเรียกอีกชื่อหนึ่งว่าเลซิทีเนส (lecithinase) จะไปเปลี่ยนเลซิทีน (lecithin) ให้กลายเป็นไลโซเลซิทีน (lysolecithin) ซึ่งมีผล ต่อการแตกตัวของเม็ดเลือดแดง กระตุ้นการหลั่งสารฮีสตามีน (histamine) และเบรดีไคนิน (bradykinin) ออกจากเนื้อเยื่อ เพิ่มการซึมผ่านของหลอดเลือดฝอย กระตุ้นกล้ามเนื้อเรียบเกิดความดันโลหิตต่ำ และ anaphylactic shock ได้ เคลื่อนย้ายและสะสมเม็ดเลือดขาว ปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาถึงโปรตีนของพิษงูแมวเซาที่มีผลต่อการทำงานของไต และผู้วิจัยหวังว่าหากสามารถแยกโปรตีนของพิษงูในส่วนนี้ได้ กระบวนการของพิษงูแมวเซาต่อไตได้ทั้งในแง่ชีวเคมี สรีรวิทยา และเภสัชวิทยา ซึ่งจะเป็นแนวทางในการที่จะลดพยาธิสภาพและสาเหตุการตายเนื่องจากภาวะไตวายได้ในที่สุด

บทที่ 2

เอกสารที่เกี่ยวข้องงานวิจัย

พิษงูแมวเซาเป็นของเหลวเหนียวประกอบด้วยโปรตีนอย่างน้อย 90 % ซึ่งเป็นโปรตีนชนิดที่มีพิษ โปรตีน ชนิดไม่มีพิษ สารอินทรีย์ และสารอนินทรีย์ชนิดต่าง ๆ การดูดซึมพิษเข้าสู่ร่างกายต้องอาศัยทางระบบน้ำเหลือง (lymphatic channels) โดยมีการดูดซึมช้า ๆ และแพร่ผ่านเข้าสู่กระแสเลือด ซึ่งมีผลทำให้เกิดความผิดปกติแบบทั่วทั้งร่างกายและแบบเฉพาะที่โดยมีพิษต่อหลายระบบดังเช่น เป็นพิษต่อระบบการไหลเวียนโลหิตซึ่งได้แก่หลอดเลือดและหัวใจ ต่อระบบหายใจ ระบบประสาท ระบบขับถ่ายปัสสาวะได้แก่ ไต ระบบทางเดินอาหารเช่น ลำไส้ ตับ ม้าม นอกจากนี้ยังมีพิษต่อกล้ามเนื้อ ไขมันใต้ผิวหนัง รวมทั้งผิวหนังบริเวณที่มีพยาธิสภาพ หรือบริเวณแผลที่ถูกรังด้วยรังสีแกมมา (Russell's viper snake) มีชื่อตามภาษาอังกฤษ Tic-Polonga, Russell's viper , Daboia

ชื่อท้องถิ่น Sinhala name Thith Polonga

Tamil name Kannadi viriyam

Classification

Family Viperidae (Solenoglypha)

subfamily Viperinae

genus species subspecies 1. *Vipera russelli russelli*

2. *Vipera russelli siamensis*

3. *Vipera russelli formensis*

4. *Vipera russelli limitis*

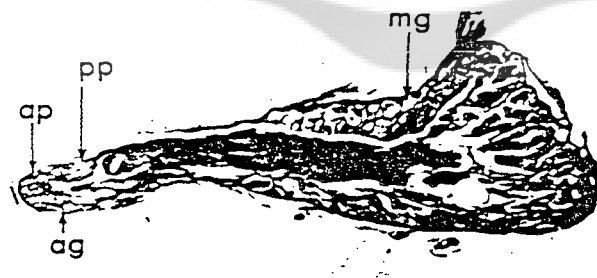
5. *Vipera russelli pulchella*

ลักษณะงูแมวเซา (*Vipera russelli siamensis* (Smith, 1917)) มีลำตัวยาวประมาณ 1 เมตร ลำตัวแบน หัวขนาดใหญ่ รูปสามเหลี่ยม มีแถบรูปตัว V จรดจมูก ปกคลุมด้วยเกล็ดเล็ก ๆ มีสันด้านล่างลำตัวมีเกล็ดขนาดใหญ่ เรียบ และ glossy มีประมาณ 158 - 168 เกร็ด ส่วนบริเวณหางมีประมาณ 40 - 46 คู่ หางสั้น มีลิ่มสีน้ำตาลดำแยกเป็นแฉก ลำตัวมีลายรูปกลม สีคล้ายลูกบิด (neck lace) ด้านบนและด้านข้างสีเหลืองหรือน้ำตาลอ่อน หรือซีดโกแลต ลักษณะเช่นเดียวกับสีตามพื้นที่สกุล *Siamensis* มีลายรูปสามเหลี่ยมแทรกอยู่ระหว่างลาย 2 สาย ด้านท้องสีออกเหลืองหรือขาวแซมด้วยจุดดำ ๆ พันเป็นแบบชนิด solenoglyphous หรือสามารถหมุนไปข้างหน้าได้ ยาวประมาณ 1.5 ถึง 2 เซนติเมตร พันจะพับเก็บไปด้านหลัง เมื่อปากปิดสนิท เมื่อทำการกัดเหยื่อพันจะติดตัว ไปข้างหน้า

และฝังลงในเหยื่อ กล้ามเนื้อ บริเวณต่อม บีบไล่พิษจากต่อมเข้าสู่เหยื่อจำนวนมาก แล้วดึงเขี้ยวกลับ
รอกจนกระทั่งเหยื่อหมดแรง

อาหาร	หนู, กิ้งก่า, กบ นก งูแมวเซาสามารถอดอาหารนานนับเดือนได้
อุปนิสัย	งูเป็นสัตว์หากินเวลาพลบค่ำ เคลื่อนไหวช้า มักชอบให้เหยื่อเดินเข้ามาหา ไม่ชอบบุกรุกบ้านคน เมื่อโกรธจะส่งเสียงดัง hiss ขดตัวอยู่กลางวงเวลาโจมตีจะส่งเสียงดัง harts และพุ่งเข้าหาเหยื่อ
แหล่งอาศัย	ชอบอยู่ทุ่งกว้าง ทุ่งหญ้า พื้นที่ทำการเกษตรกรรม หลังฝนตก หรือตอนกลางคืน ชอบอยู่ตามหิน ริมถนน (gravel road)
การมีลูก	เป็นสัตว์ชนิด ovoviviparous มีลูก ครั้งละ 20 - 40 ตัว
ฤดูผสมพันธุ์	มกราคม - กุมภาพันธ์

งูพิษมีต่อมพิษจะประกอบด้วยต่อมน้ำลายมีท่อจะทำการสร้างสารพิษจาก เยื่อบุผิวชนิดพิเศษ ภายในต่อมแล้วทำการเก็บไว้ เมื่อต้องการปลดปล่อยพิษผ่านเขี้ยวสู่เหยื่อของมัน เพื่อใช้ในการป้องกันตัว หรือใช้เป็นอาหาร ดังภาพประกอบ 1



ภาพประกอบ 1 แสดงต่อมพิษของงูสกุล *Viperidae* แสดงส่วนต่อม accessory gland (ag), ap.(anterior part of ag.), pp (posterior part of ag.), l (lumen), mg (main gland)

เราสามารถจัดแบ่งหมวดหมู่ของงูพิษที่สำคัญดังนี้
 Classification and distribution of snake (family)

Family Viperidae (Solenoglypha)

Agkistrodon blomhofii

Trimeresurus albolaris

Vipera russelli

Vipera berus

Vipera ursinii

Vipera palaestinae

Family Elapidae (Proteroglypha)

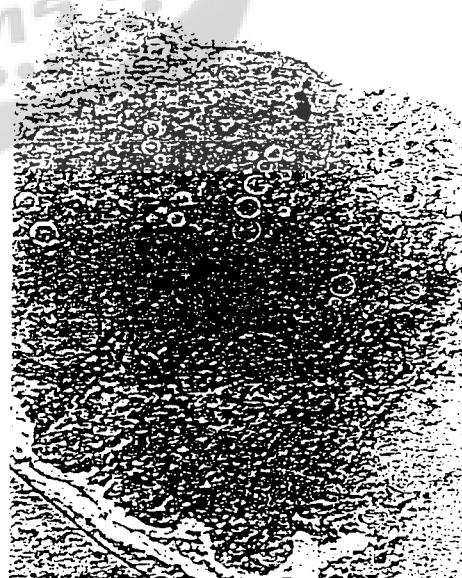
Bungarus fasciatus

Hydrophis spp.

Family Colubridae (Opisthoglypha)

Boiga spp.

Enhydris spp.



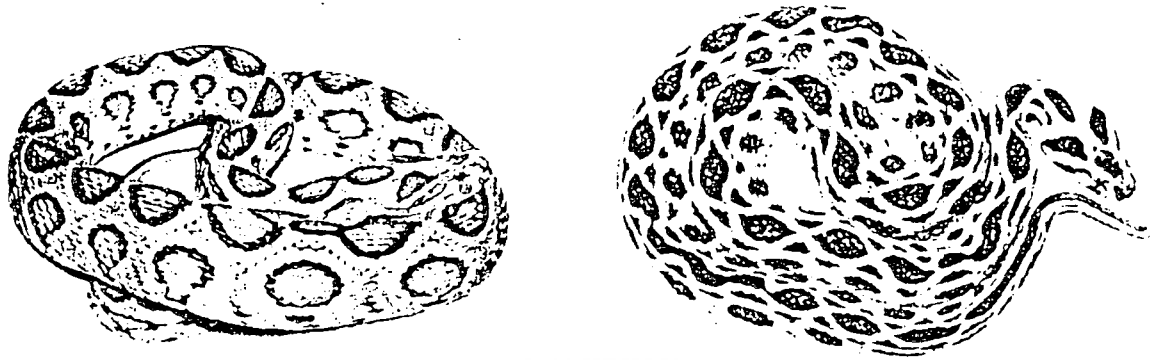
ภาพประกอบ 2 แสดงเซลล์ในต่อมพิษงูสกุล *Viperidae*



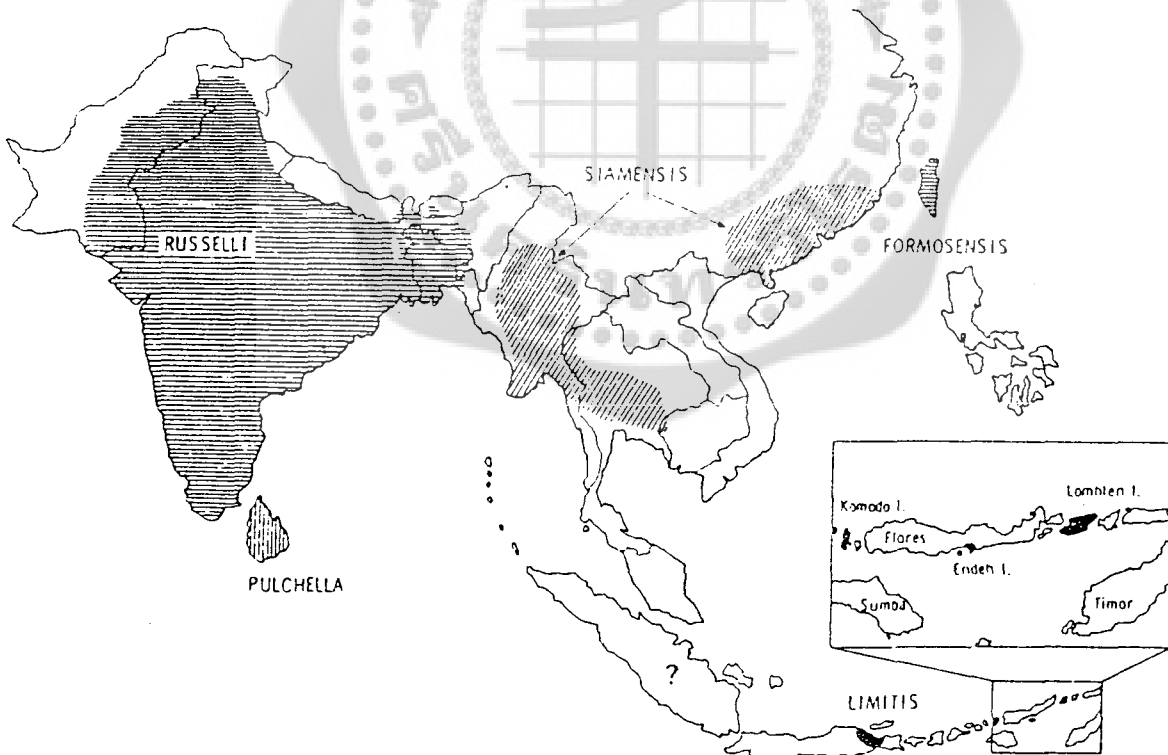
ภาพประกอบ 3 แสดงการกระจายตัวของ *Vipera ammodytes* (เส้นแนวนอน) *Vipera apis* (เส้นเฉียง) และ *Vipera ursinii* (เส้นตั้งฉาก)



ภาพประกอบ 4 แสดงการกระจายตัวของ *Vipera berus* (เส้นแนวนอน) , *Vipera kaznakovi* (เส้นตั้งฉาก) และ *Vipera latasi* (เส้นเฉียง)



ภาพประกอบ 5 แสดงการเปรียบเทียบงูแมวเซาซึ่งมีซันสปีชีส์ต่างกันคือ *siamensis* กับ *pulchella*



ภาพประกอบ 6 แสดงการกระจายตัวของงูแมวเซาซันสปีชีส์ *siamensis* กับ *pulchella*

องค์ประกอบทางเคมีของพิษงูแมวเซา

การแยกพิษงูและคุณสมบัติทางเคมี สัทน์ พาณิชกุล (1977) แยกพิษงูแมวเซาด้วยเทคนิคไอออนเอกซ์เชนจ์โครมาโตกราฟีโดยใช้ DEAE-cellulose (diethylaminoethyl-cellulose acetate) พบว่าพิษงูประกอบด้วยเอนไซม์ต่าง ๆ คือ ฟอสโฟไดเอสเทอเรส (phosphodiesterase), ฟอสโฟโมโนเอสเทอเรส (phosphomonoesterase), อะดีโนซีนไตรฟอสฟาเตส (adenosine triphosphatase), เลซิทีเนส (lecithinase), แอล-อะมิโนแอซิดออกซิเดส (L-amino acid oxidase), นิวคลีโอไซด์ (5-nucleosidase) และโปรทีเอส (protease) ต่อมา Lee (1984) ทำการแยกพิษงูแมวเซาด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชัน (จี-75) พบว่าพิษงูแมวเซาสามารถแยกได้เป็น 5 ส่วน คือ แฟรคชัน I, II, III, IV และ VI ซึ่งมีคุณสมบัติของ PLA₂ โดยแฟรคชันที่ III มีคุณสมบัติที่สูงที่สุด และได้ทำการแยกแฟรคชันที่ II และ III ต่อ โดยแฟรคชันที่ II แยกได้อีก 12 แฟรคชันและมีคุณสมบัติของ PLA₂ เช่นกัน โดยแฟรคชันที่ II - 2 มีแอกติวิตีสูงสุด ส่วนแฟรคชันที่ III แยกต่อได้ถึง 13 แฟรคชัน และมีแอกติวิตีของ PLA₂ เช่นกัน แล้วยังพบว่าแฟรคชันที่ III - 3 มีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของกล้ามเนื้อลายของลูกไก่ที่ความเข้มข้น 3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นอกจากนี้เกือบทุกแฟรคชันมีคุณสมบัติลดความดันโลหิตของหลอดเลือดแดงที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และมีคุณสมบัติต่อเนื้อเยื่อปอดโดยพบว่าแฟรคชันที่ II - 5, II - 7, III - 3, III - 6 และ III - 10 สามารถเพิ่มการซึมผ่านของเนื้อเยื่อปอดได้

ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของแฟรคชัน III - 3, III - 6 และ III - 10 มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 15,054 ดาลตัน, 15,167 ดาลตัน และ 15,029 ดาลตัน มีค่า pI เท่ากับ 4.15, 8.80 และ >10 ตามลำดับ จากการทดลองสรุปได้ว่าเบสิค PLA₂ ของงูแมวเซามีคุณสมบัติดังนี้คือ ยับยั้งการทำงานของประสาทพรีซินแนปส์ติคของกล้ามเนื้อลาย, ลดความดันโลหิต, มีผลต่อการทำงานของกล้ามเนื้อเรียบของลำไส้เล็กของหนูตะเภา, มีคุณสมบัติทนความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส มีผลต่อการปลดปล่อยสาร SRS จากปอดของหนูตะเภา และเพิ่มความดันของปอดให้สูงขึ้นโดยใช้เทคนิคไอออนเอกซ์เชนจ์โครมาโตกราฟี ซีเอ็มเซฟาเดกซ์ซี-50 (CM-Sephadex C-50) ศึกษาคุณสมบัติของ PLA₂

สุภาภรณ์ ปิยะศิริกุล (1987) ทำการแยกพิษงูแมวเซาด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชัน (จี-75) และเทคนิคไอออนเอกซ์เชนจ์โครมาโตกราฟี (ซีเอ็มเซฟาเดกซ์ซี-50) พบว่าโปรตีนส่วนที่ 2 มีคุณสมบัติของ PLA₂ และสามารถทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อได้ (necrosis) Vishwanath และคนอื่น ๆ (1988) ทำการแยกพิษงูแมวเซาโดยใช้ซีเอ็มเซฟาเดกซ์ซี-25 สามารถแยกได้ถึง 20 แฟรคชันแต่มีคุณสมบัติของ PLA₂ เพียง 8 แฟรคชันโดยมีแฟรคชัน VRV PLVI มีแอกติวิตีสูงสุดเมื่อทำการแยกด้วยซีเอ็มเซฟาเดกซ์ซี-50 พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 11,900 ดาลตัน สามารถย่อยสลาย PC (phosphatidyl choline), PE (phosphatidyl ethanolamine), PS (phosphatidyl serine) ยกเว้น PI

(phosphatidyl inositol) มีค่า K_m 5.7×10^{-4} M, 4.3×10^{-4} M และ 1.3×10^{-1} M ตามลำดับ มีค่า LD_{50} (i.p 3.5 ไมโครกรัม/ กรัม น้ำหนักตัว) ภายใน 300 ± 20 นาที สามารถกระตุ้นให้เกิดการบวมต่ออวัยวะที่ ความเข้มข้น 0.85 ไมโครกรัม ภายใน 45 นาที และคงอยู่ได้นาน 4 ชั่วโมง

Vishwanath B. S., R. Manjunatha Kini และ T. Veerabasappa Gowda ทำการแยกพิษงูแมวเซา 200 มิลลิกรัมใน 2 มิลลิลิตรของ 0.02 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.00 โดยเทคนิคไอออนเอกซ์เชนจ์โครมาโตกราฟี (ซีเอ็มเซฟาเดกซ์ซี-25) คอลัมน์ขนาด 1.2×120 เซนติเมตร พบว่าพิษงูแมวเซาสามารถแยกได้ 20 แฟรคชัน แต่มี คุณสมบัติของ PLA_2 คือชื่อ VRV PL (Vipera russelli venom fractions), VRV PLI- VRV PLVI พบว่า VRV PLVI มีแอกติวิตีสูงสุด ทำการแยกให้บริสุทธิ์ต่อโดย SDS - PAGE (Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis) CM-Sephadex G-50 และใช้ 0.05 M ทริสไฮโดรคลอไรด์ พีเอช 7.00 พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 12,100 ดาลตัน optimum พีเอช 7.3 - 8.0 สามารถทนความร้อนเนื่องจากมีพันธะไดซัลไฟด์จำนวนมาก, สามารถย่อยสลาย PC, PE, PS ยกเว้น PI มีค่า K_m 5.7×10^{-4} M, 4.3×10^{-4} M และ 1.3×10^{-1} M ตามลำดับ PLVI มีค่า LD_{50} (i.p. 3.5 ไมโครกรัม/ กรัม น้ำหนักตัว) ภายใน 300 ± 20 นาที สามารถกระตุ้นให้เกิดการบวมต่ออวัยวะที่ความเข้มข้นน้อยสุดคือ 0.85 ไมโครกรัม ภายใน 45 นาที และคงอยู่ได้นาน 4 ชั่วโมง

Kasturi S. และ T. Veebasappa Gowda (1987) พบว่าแฟรคชันต่าง ๆ คือ VRV PLV, VRV PLVI และ VRV PLVIII_a ซึ่งเป็น PLA_2 ที่มีสเปซิฟิคแอกติวิตี 111 นาโนโมล/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน และมีปริมาณเป็น 45%, 24% ของโปรตีนที่ยังไม่ได้แยก โปรตีนเหล่านี้แยกโดยซีเอ็มเซฟา-เดกซ์ซี25 ตามด้วยซีเอ็มเซฟาเดกซ์จี-50 มีคุณสมบัติเบสิคโปรตีนและทนความร้อนที่ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง มีค่า $pI > 10$ มีน้ำหนักโมเลกุลตามวิธี SDS - PAGE ที่ 11,800 ดาลตัน ค่า LD_{50} ที่ i.p 3.5 ไมโครกรัม/ กรัม น้ำหนักตัว สรุปได้ว่า VRV PLVIII_a มีพิษต่อปอดรุนแรง ทำให้เกิดอัมพาตต่อขาหลังในหนูไม่สามารถเคลื่อนไหวและตาย, ทำให้เกิดภาวะบวมเมื่อฉีดเข้าในอวัยวะ ที่ระดับความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม, เป็นพิษต่อดับ ไต โดยทำให้เกิดภาวะเลือดออกในอวัยวะ และยังมีพิษต่อกล้ามเนื้อโดยทำให้เกิดการตายเนื้อเยื่อบริเวณที่ฉีด เพราะ VRV PLVIII_a มีค่า LD_{50} ที่ i.p. 1.8 ไมโครกรัม/ กรัม น้ำหนักตัว $pI = 8.6$ มีสเปซิฟิคแอกติวิตี 56 นาโนโมล/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน ไม่มีผลต่อปอด และไม่พิษต่อกลิ้มเนื้อ, VRV PLVIII_a มีค่า LD_{50} ที่ i.p. 3.5 ไมโครกรัม/ กรัม น้ำหนักตัว $pI = 9.9$ มีสเปซิฟิคแอกติวิตี 84 นาโนโมล/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน ไม่เป็นพิษต่อกลิ้มเนื้อ มีคุณสมบัติทำให้เม็ดเลือดแดงแตก เกิดภาวะเลือดออกเมื่อฉีดเข้าได้ผิวหนัง และภายในหลอด

ทดลอง ทำลายต่อมพิทูอิตารี และ VRV PLVIII_u มีคุณสมบัติทำให้เม็ดเลือดแดงแตกในหลอดทดลอง เกิดภาวะเม็ดเลือดแดงแตกในอวัยวะปอด ตับ ไต และกล้ามเนื้อ

Gowda และคนอื่น ๆ ได้ทำการแยกแฟรคชันและหาอนุกรมของ VRV PLVIII_u PLA₂ ชนิดเบสิคโปรตีนของงูแมวเซาศรีลังกา ซึ่งออกฤทธิ์ทำลายกล้ามเนื้อ มีแอกติวิตี 40% ของ พิษงูแมวเซาที่ยังไม่ได้ทำการแยก เมื่อทำการแยกด้วยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซิลิควิดโครมาโตกราฟี ชนิดรีเวอร์สเฟส (RP-HPLC) และอิเล็กโตรโฟรีซิสพบว่า มีน้ำหนักโมเลกุล 13,000 และเป็นเปปไทด์ชนิดเส้นเดี่ยว พบว่ามีความคล้ายคลึงกับไมโอทอกซินทรี (myotoxin III) ของงู *Bothrops asper* ถึง 73% เหมือนกับแอมโมโตทอกซิน เอ (*Vipera ammodytes ammodytes*) 81.8 %

Maung-Maung-Thwin และคนอื่น ๆ (1995) ได้ทำการทดลองแยกพิษงู *Daboia russelli siamensis* (DbTx) ด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชัน (จี-75), เทคนิคไอออนเอ็กซ์เชนจ์โครมาโตกราฟี (ซีเอ็ม-เซฟาเดกซ์ ซี25) และแยกต่อด้วยเทคนิค HPLC สามารถแยก PLA₂ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 15,000 ดาลตัน ค่า LD₅₀ ที่ i.p. 1.8 มิลลิกรัม/กิโลกรัม พบการเรียงตัวของกรดอะมิโนด้านปลายอะมิโนมีการเรียงตัวดังนี้ NFFQF AEMIV KMTGK EAVHS.

ตาราง 1 องค์ประกอบของพิษงูแมวเซา

Constituent	Colubridae	Viperidae	Crotalidae
	(<i>Naja naja</i>)	(Russell's viper)	(<i>Crotalusterrificus</i> <i>terrificus</i>)
Total nitrogen	16.8 %	15.8 %	11.9 %
Protein	94	100 %	69.9 %
Albumin	-	57.8 %	-
Globulin	-	42.2 %	-
Total phosphorus	9.36 /100 mg	13.02 /100 mg	14.0 /100 mg
Total inorganic phosphorus	5.46 /100 mg	5.71 /100 mg	5.46 /100 mg
Acid soluble phosphorus	7.3 /100 mg	10.92 /100 mg	10.92 /100 mg
Acid insoluble phosphorus	2.06 /100 mg	2.1 /100 mg	3.088 /100 mg
7 minutes hydrolyzing phosphorus	2.18 /100 mg	1.01 /100 mg	4.36 /100 mg
Chloride	-	0.29 %	0.19 %
Metallic ions :			
Na	-	1.42 %	1.86 %
K	-	0.86 %	0.22 %
Zn	4.6 %	-	-
Ca	-	-	-
Mg	-	-	-
Fe	0.028 mg%	0.016 mg%	-
Co			

E. Grasset et al. (1956).

ตาราง 2 แสดงเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ซึ่งเป็นองค์ประกอบของพิษงูและสามารถทำให้เกิดพยาธิสภาพต่อไตได้ (LEE, 1979)

Enzymes in Snake Venom

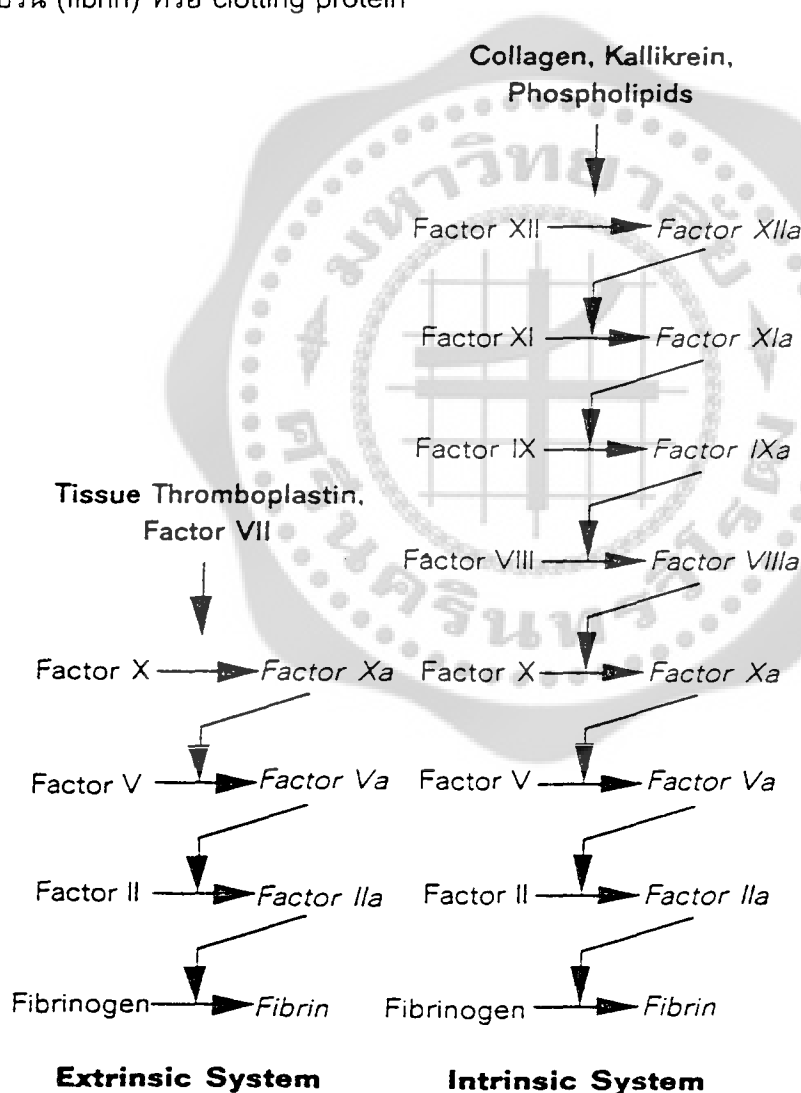
Table Some properties of enzymes found in snake venoms^a

Trivial name	Typical substrate	Molecular weight	Characteristics
Phospholipase A ₂	Phosphatidylcholine	11000–15000	Simple protein, heat stable, histidine active site
L-amino acid oxidase	L-amino acid	100000–130000	Glycoprotein, 2 moles FAD per mole enzyme, heat unstable
Phosphodiesterase	Oligonucleotides	115000	Heat labile, EDTA sensitive, acid unstable, optimum at pH 9
5'-Nucleotidase	5'-Mononucleotides	100000	Heat labile, Zn ²⁺ sensitive, EDTA sensitive, acid unstable, optimum at pH 8.5
Phosphomonoesterase	p-Nitrophenylphosphate	100000	Heat labile, Zn ²⁺ sensitive, EDTA sensitive, acid unstable, optimum at pH 8.5–9
Deoxyribonuclease	DNA and RNA		Optimum at pH 5.0
Ribonuclease	RNA	15900	Optimum at pH 7–9, specific towards pyrimidine nucleotides
Hyaluronidase	Hyaluronic acid		Heat labile, optimum at pH 4.0, resembles testicular enzyme
NAD-nucleosidase	NAD	100000	Heat labile, optimum at pH 7.5, nicotinamide sensitive
Arylamidase	L-Leucine naphthylamide	100000	Heat labile, SH-enzyme, PCMB sensitive, optimum at pH 8.5
Endopeptidase	Casein, Hemoglobin	21400–95000	Glycoprotein, metal (Ca ²⁺ , Zn ²⁺) protease, EDTA sensitive, heat labile, optimum at pH 8–9
Arginine ester hydrolase	BAEE, TAME	27000–30000	Glycoprotein, heat stable, DFP sensitive, optimum at pH 8–9
Kininogenase	Plasma kininogen, BAEE	33500	Heat stable, DFP sensitive, specific towards kininogen
Thrombinlike enzyme	Fibrinogen, BAEE	28000–33000	Glycoprotein, heat stable, DFP sensitive
Factor X activator	Factor X	78000	Glycoprotein, heat labile, DFP insensitive, EDTA sensitive, activates also Factor IX
Prothrombin activator	Prothrombin	56000	Glycoprotein, heat labile, DFP insensitive, EDTA sensitive
Factor V activator	Factor V, BAEE	20000	DFP sensitive, heat stable
Acetylcholinesterase	Acetylcholine	126000	Heat labile, DFP sensitive, optimum at pH 8–8.5
Phospholipase B	Lysolecithin		Heat stable, optimum at pH 10

^a DFP = Diisopropylphosphorofluoridate; PCMB = p-Chloromercuribenzoate; BAEE = Benzoyl-L-arginine ethyl ester; TAME = Tosyl-L-arginine methyl ester.

Coagulation & Dissemination intravascular Clot

กระบวนการแข็งตัวของเลือดแบ่งเป็น 3 ขั้นตอน ในขั้นตอนแรกเป็นการสังเคราะห์สารประกอบโปรตีนคอมเพลกซ์ (protein complex) ที่เรียกว่าทรอมโบพลาสทินคอมเพลกซ์ (thromboplastin complex) จาก inactive thromboplastin โดยมีการรวมตัวกันกับปัจจัย intrinsic factors ซึ่งหมายถึง สารที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือดที่อยู่ในพลาสมา รวมทั้ง เกร็ดเลือดด้วย นอกจากนี้ยังเกิดจากการรวมตัวระหว่าง inactive thromboplastin กับปัจจัย extrinsic factors ซึ่งหมายถึง สารที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือดที่อยู่ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ อีกด้วย ขั้นตอนที่สองจะเกิดการเปลี่ยนแปลงจากโปรตีนโปรทรอมบิน (prothrombin) ไปเป็นทรอมบิน (thrombin) โดยการกระตุ้นด้วยทรอมโบพลาสทินคอมเพลกซ์กับไอออนของแคลเซียม ซึ่งโปรตีนทรอมบินที่เกิดขึ้นจะไปกระตุ้นปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงจากไฟบริโนเจน (fibrinogen) ไปเป็นไฟбрิน (fibrin) หรือ clotting protein



ภาพประกอบ 7 แสดงโปรตีนชนิดต่างๆ ซึ่งอยู่ในพลาสมาสามารถถูกกระตุ้นให้เกิดกระบวนการแข็งตัวของเลือดได้

โปรตีนที่มีบทบาทต่อการแข็งตัวของเลือด (blood - coagulating protein) มีหลายชนิดเขียนในรูปเลขโรมัน โดยโปรตีนเหล่านี้จะอยู่ในรูปเอนไซม์ที่ยังไม่ได้ทำงาน (proenzyme) จะถูกกระตุ้นให้กลายเป็นเอนไซม์ที่ทำงานได้ขณะที่เกิดปฏิกิริยาการแข็งตัวของเลือด เราเรียกปฏิกิริยานี้ว่า enzymatic amplification reaction ปฏิกิริยาดำเนินไปเป็นขั้น ๆ เรียกว่า cascade reaction

ตาราง 3 แสดงแฟคเตอร์ต่าง ๆ ในพลาสมาที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือด

factor's	ชื่อเรียก
I	Fibrinogen
II	Prothrombin
III	Thromboplastin
IV	Calcium
V	Proaccelerin or Accelerator (Ac) Globulin or Labile factor
VII	Proconvertin or Cothromboplastin or Autoprothrombin or Serum prothrombin conversion accelerator (SPCA)
VIII	Antihemophilic Factor or Antihemophilic Globulin (AHG)
IX	Plasma thromboplastin component (PTC) or Christmas factor
X	Stuart - Prower factor
XI	Plasma thromboplastin antecedent (PTA)
XII	Hageman factor
XIII	Fibrin - stabilizing factor or Laki Lorand facotr (LLF)

(พจน์ ศรีบุญลือ และ ประสงค์ คุณานันท์วัฒนชัยเดช. 2535)

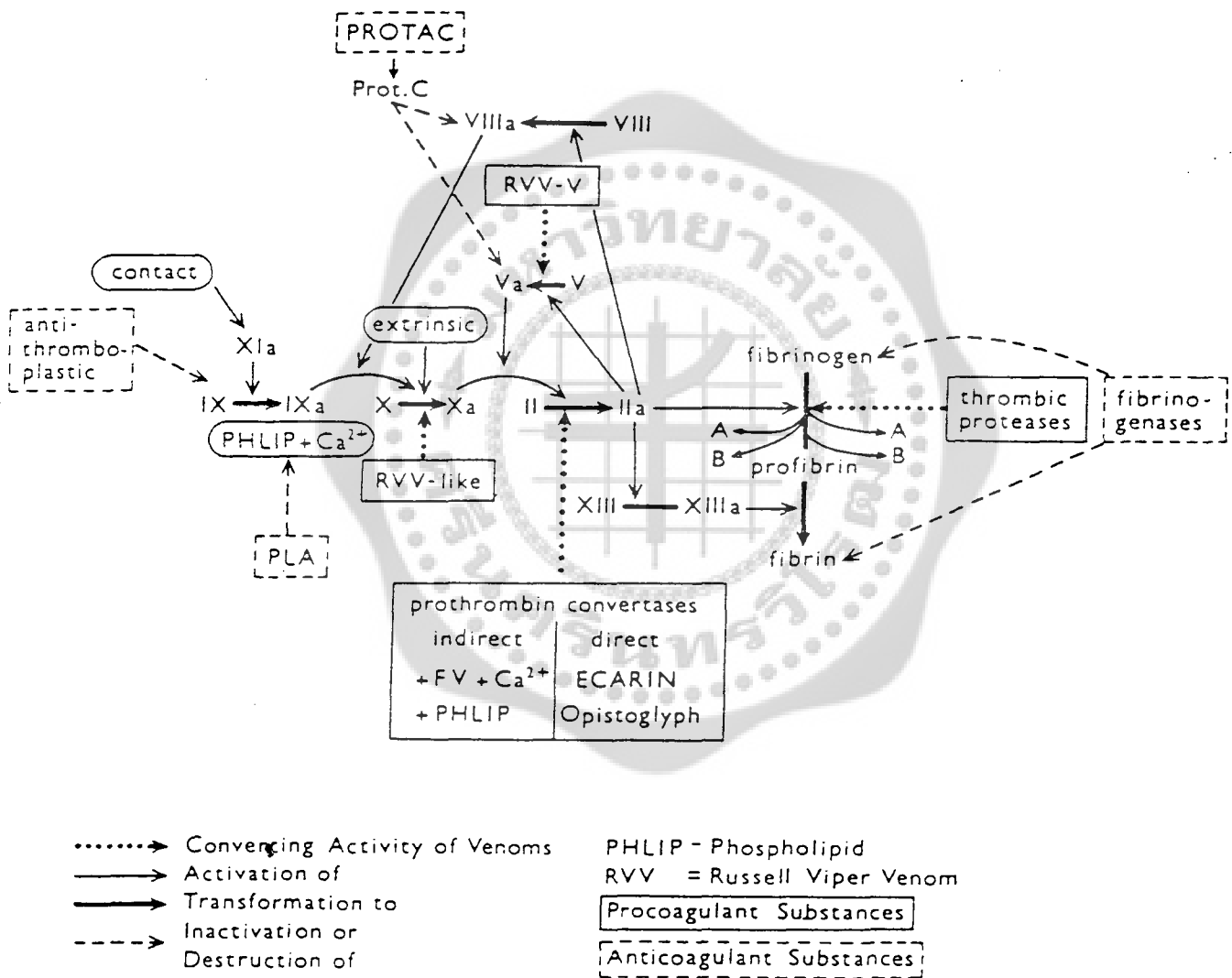
Action of Venoms on Coagulation

ผลของพิษงูแมวเซาต่อภาวะเลือดออกผิดปกติ และการแข็งตัวของเลือด (Disorders of Haemostasis and coagulation)

พิษงูแมวเซาจะออกฤทธิ์กระตุ้น factor X ให้เป็น Xa ได้โดยตรงซึ่ง Xa นี้ก็จะทำหน้าที่เป็น active enzyme เกิดการกระตุ้น coagulation pathway อย่างต่อเนื่อง เปลี่ยนโปรทรอมบิน เป็นทรอมบิน ซึ่งจะเปลี่ยนไฟบริโนเจน (fibrinogen) เป็นไฟบริน (fibrin) เกิดเป็นลิ่มเลือด fibrin clot อยู่ในหลอดเลือดและในส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย เรียกภาวะนี้ว่า disseminated intravascular coagulation (DIC) ทำให้ผู้ป่วยมีอาการเลือดออกอย่างมากเนื่องจากขาดปัจจัยการแข็งตัวของเลือด (coagulation factor) โดยเฉพาะแฟคเตอร์ที่ V, แฟคเตอร์ที่ I (fibrinogen) และแฟคเตอร์ที่ VIII รวมทั้งเกร็ดเลือด (โครงการตำราจุฬา อายุรศาสตร์ ฉบับที่ 6. 2537)

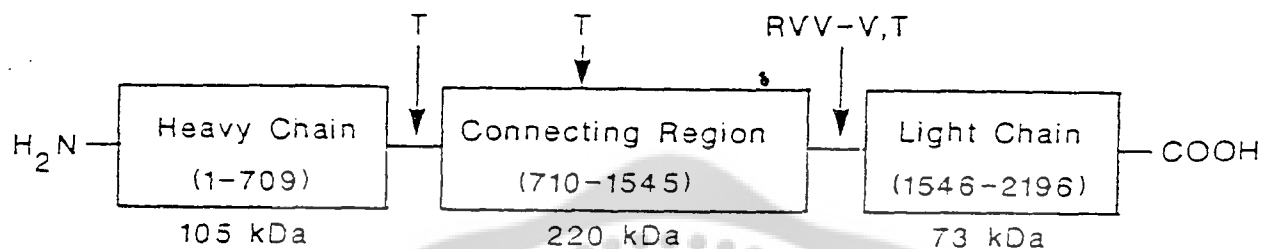
เอนไซม์โปรตีน RVVC ของงูแมวเซาต่อการกระตุ้น FX (Coagulation of RVVC action on FX) RVVC (Russelli Viper Venom Coagulant) เป็นโปรตีนของพิษงูแมวเซาซึ่งมีคุณสมบัติเปลี่ยน Factor X (FX) ให้เป็น FXa เช่นเดียวกับ Tissue thromboplastin โดยอาศัยแคลเซียมและฟอสโฟไลปิด ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์โปรตีเอสละลายพันธะเอสเทอร์บอนด์ (esterolytic enzyme) ซึ่งไม่ถูกยับยั้งด้วย DFP (Diisopropyl phosphorofluoridate) และ PMSF เมื่อแยกต่อด้วย affinity chromatography และ SDS polyacrylamide gel มีน้ำหนักโมเลกุล 60,000 ดาลตัน แต่เมื่อแยกด้วยเครื่องเซนตริฟิวส์ชนิดความเร็วสูง พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 124,000 ดาลตัน แสดงให้เห็นว่า RVVC อยู่ในรูปของสายคู่ (dimer) มีค่า clotting activity สูงสุดที่พีเอช 7 โดยมีแคลเซียมอิออนความเข้มข้น 7 mM ไม่สามารถย่อยโปรตีนสาย β -chain ของอินซูลินได้ แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะของเอนไซม์ RVVC โดย RVVC สามารถย่อย FX ตรงตำแหน่ง Arg-Ile ให้โพลีเปปไทด์สายสั้นขนาดน้ำหนัก 11,000 ดาลตัน และโพลีเปปไทด์สายยาวขนาดน้ำหนัก 44,000 ดาลตัน โดยยังคงเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (Harvey., 1991)

นอกจากนี้ผลของการเกิดการกระตุ้นการแข็งตัวของเลือดทำให้เกิดผลอื่น ๆ ตามมาด้วย เช่น การเกิด Protein C metabolism pathway โปรตีนซี (Protein C) เป็นไซโมเจน ถูกเปลี่ยนเป็นซีรีนโปรตีเอส (serine protease) ด้วย thrombin-thrombomodulin complex บนผิวของเซลล์เยื่อบุผิวหลอดเลือด (endothelial cell) ร่วมกับโปรตีนเอส (Protein S) ออกฤทธิ์ยับยั้ง factor Va และ VIII a และกระตุ้น fibrinolysis ด้วยโปรตีนซีถูก inactivates ด้วยตัวยับยั้งโปรตีนซี (Protein C inhibitor) ในพลาสมา



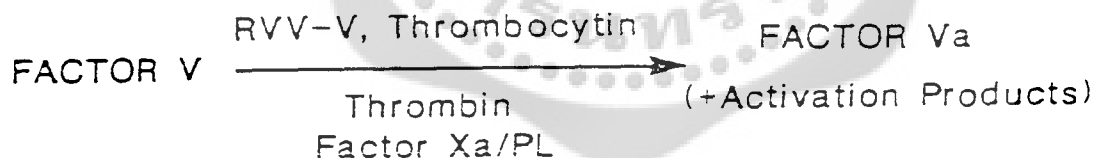
ภาพประกอบ 8 แสดงพิษงูแมวเซาสามารถกระตุ้น factor X ให้เป็น FXa ในกระบวนการแข็งตัวของเลือดได้ โดยอาศัยเอนไซม์ RVVC

เอนไซม์ของพิกซูแมวเซา (RVV-V) ต่อการกระตุ้นแฟคเตอร์ไฟว์ เป็นไกลโคโปรตีน ซึ่งละลายอยู่ในระบบไหลเวียนโลหิต ไม่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการแข็งตัวของเลือดเป็นเปปไทด์สายเดี่ยวมีองค์ประกอบกรดอะมิโน 2,196 หน่วย ในกระบวนการแข็งตัวของเลือด FX จะถูกเปลี่ยนเป็น FXa โดยทรอมบินจะย่อย FV ตรงตำแหน่ง Arg709-Ser710, Arg1018-Thr1019 และ Arg1545-Ser1546 แต่ RVV-V ทำการย่อย FV เพียงตำแหน่งเดียวคือ Arg1545-Ser1546



ภาพประกอบ 9 แสดงตำแหน่งการย่อยของเอนไซม์ RVV-V ต่อ FV เปรียบเทียบกับทรอมบิน (Anthony T.Tu, 1991)

ทรอมบินย่อย FV ได้เปปไทด์ 2 สายคือ ด้านปลายอะมิโนที่มี MW 105 KDa และด้านปลายคาร์บอกซี มี MW 73 KDa ส่วน RVV-V ย่อยด้านปลายคาร์บอกซี (กรดอะมิโน 1,546 - 2,196 หน่วย) มี MW 73 KDa และด้านปลายอะมิโน (กรดอะมิโน 1 - 1,545 หน่วย) มี MW \cong 300,000 Da



ภาพประกอบ 10 แสดงตำแหน่งการทำงานของพิกซูแมวเซา RVV-V ในการเปลี่ยน FV ให้เป็น FVa เปรียบเทียบกับทรอมบิน

RVV-V เป็นไกลโคโปรตีนสายเดี่ยว มี MW 28,000 (SDS PAGE) เป็นโปรตีนประกอบด้วยเบสเป็นส่วนใหญ่ (Lys+His+Arg) มีคาร์โบไฮเดรตรวมอยู่ด้วย 6% เช่น กาแลคโตส, แมนโนส, N-acetyl-glucosamine และ N-acetyl-neuraminic acid เอนไซม์สามารถถูกยับยั้งได้ด้วย DFP (serine protease inhibitor)

ตาราง 4 แสดงองค์ประกอบพหุ RVV-V และ thrombocytin

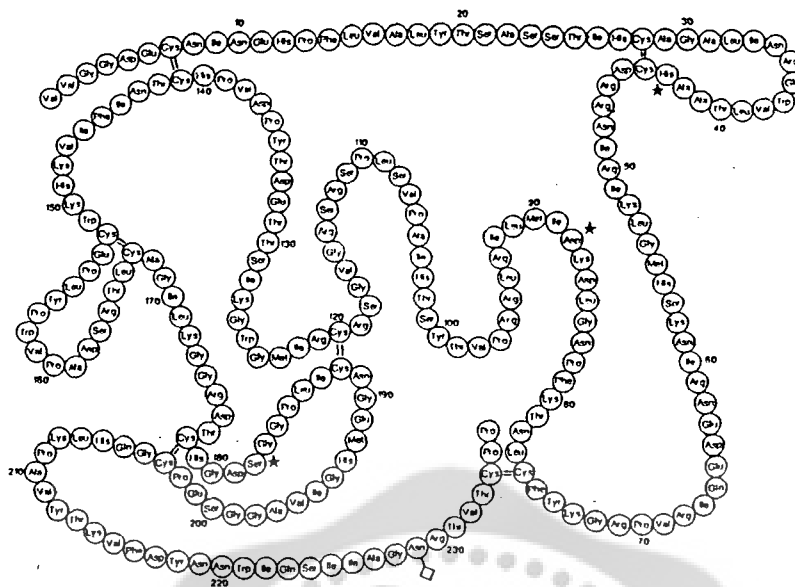
Components	RVV-V (res/27,200 g of glycoprotein)	Thrombocytin (res/36,00 g of glycoprotein)
Amino acid		
Lysine	12	22
Histidine	10	8
Arginine	16	14
Aspartic acid	23	25
Threonine	15	14
Serine	15	21
Glutamic acid	11	12
Proline	15	21
Glycine	21	22
Alanine	12	16
Half-cystine	12	13
Valine	16	17
Methionine	3	3
Isoleucine	18	20
Leucine	15	24
Tyrosine	6	3
Phenylalanine	6	5
Tryptophan	6	12
Carbohydrate		
Fucose	1	3
Galactose	2	—
Glucose	—	5
Mannose	1	8
N-Acetylglucosamine	3	11
N-Acetylgalactosamine	—	4
N-Acetylneuraminic acid	1	4
Protein (%)	94	83
Carbohydrate (%)	6	17

RVV-V Isoform เอนไซม์ RVV-V ประกอบด้วย ไอโซฟอร์ม 3 ตัว RVV-V α , -V β และ V γ RVV-V α และ V γ มี MW 29,000 (SDS PAGE), RVV-V β มี MW 1,500 Da นอกจากนี้พบว่า RVV-V α มีลำดับกรดอะมิโนต่างจาก RVV-V γ 6 ตำแหน่งคือ

		10	20	30	40																																			
RVV-V γ	V	VGGDEECN	INEHPFL	VALVY	TSASSSTIHC	AGALINR	EWVLT																																	
ACC-C	V	IGGDEECN	INEHRIPL	ALVYANG	- - -	SLCGGT	LINQEWVLT																																	
Flavoxobin	V	VGGDEECN	INEHPFL	VALVY	DAWSGRFL	CGGT	LINPEWVLT																																	
Batroxobin	V	IGGDEECN	INEHPFL	AFMY	Y - -	SPRYFCGM	TLINQEWVLT																																	
Bov. Thrombin	I	VEGQDAE	VGLSPWQ	VMLFR	KSPQEL	ELCGAS	LISDRWVLT																																	
		50	60																																					
RVV-V γ	A	AHC	- - - -	ORRN	IR	- - - -	- - - -	IKLGMH	SKNIR	NEDEQIR																														
ACC-C	A	RHC	- - - -	DRGN	-	- - - -	- - - -	MYLGMH	NLKV	LNKODIALRR																														
Flavoxobin	A	AHC	- - - -	DSKN	FK	- - - -	- - - -	MLGAHS	SQKVL	NEDEQIR																														
Batroxobin	A	AHC	- - - -	NRR	- F	- - - -	- - - -	MRIH	LGH	HAGSVA	NYDEVVR																													
Bov. Thrombin	A	AHC	L	LYPPWD	KNI	F	V	DDL	LV	R	I	-	-	GH	SR	TR	Y	E	R	K	V	E	K	I																
		70	80	90	100																																			
RVV-V γ	V	PRGK	- YFC	LN	TKEF	NGL	DKD	I	ML	I	R	L	R	RP	V	T	YS	TH	I	A	P	V																		
ACC-C	F	PKK	- YFC	LN	TRND	T	W	DKD	I	ML	I	R	L	N	R	P	V	R	S	A	H	I	A	P	L															
Flavoxobin	N	PKK	- F	I	C	P	N	KK	N	T	E	V	L	D	K	D	I	M	L	I	K	L	D	S	P	V	S	Y	S	E	H	I	A	P	L					
Batroxobin	Y	PKK	- F	I	C	P	N	KK	K	N	V	I	T	D	K	D	I	M	L	I	R	L	D	R	P	V	K	N	S	E	H	I	A	P	L					
Bov. Thrombin	S	M	L	D	K	I	Y	I	H	P	R	Y	N	W	K	E	N	L	D	R	D	I	A	L	L	K	L	K	R	P	I	E	L	S	D	Y	I	H	P	V
		110	120	130																																				
RVV-V γ	S	L	P	S	R	S	R	G	- - - -	V	G	S	R	C	R	I	M	G	W	G	K	I	S	T	T	E	D	T	- - - -	Y	P	D								
ACC-C	S	L	P	S	N	P	P	S	- - - -	V	G	S	V	C	R	I	M	G	W	G	T	I	T	S	P	N	A	T	- - - -	L	P	D								
Flavoxobin	S	L	P	S	N	P	P	S	- - - -	V	G	S	V	C	R	I	M	G	W	G	S	I	T	T	P	V	E	E	T	- - - -	F	P	D							
Batroxobin	S	L	P	S	N	P	P	S	- - - -	V	G	S	V	C	R	I	M	G	W	G	A	I	T	T	S	E	E	T	- - - -	Y	P	D								
Bov. Thrombin	C	L	P	D	K	Q	T	A	A	K	L	H	A	I	G	F	K	G	R	V	T	G	W	G	N	R	R	E	T	W	T	T	S	V	A	E	V	Q	P	S
		140	150	160	170																																			
RVV-V γ	V	P	H	C	T	N	I	F	I	V	K	H	K	W	C	E	P	L	Y	P	W	V	P	A	D	S	R	T	L	C	A	G	I	L	K	G	G	- - -		
ACC-C	V	P	H	C	A	N	I	N	I	L	D	Y	A	V	C	Q	A	A	Y	K	G	L	A	-	-	A	T	T	L	C	A	G	I	L	E	G	G	- - -		
Flavoxobin	V	P	H	C	A	N	I	N	L	L	D	D	V	E	C	K	P	O	Y	P	E	L	L	P	E	Y	R	T	L	C	A	G	V	L	Q	G	G	- - -		
Batroxobin	V	P	H	C	A	N	I	N	L	F	N	N	T	V	C	R	E	A	Y	N	G	L	-	P	-	A	K	T	L	C	A	G	V	L	Q	G	G	- - -		
Bov. Thrombin	V	L	Q	V	V	N	L	P	L	V	E	R	P	V	C	K	A	S	T	R	I	R	I	T	-	N	D	M	F	C	A	G	Y	K	P	G	E	G	K	R
		180	190	200																																				
RVV-V γ	R	D	T	C	H	G	D	S	G	G	P	L	I	C	- - - -	N	G	E	M	H	-	G	I	V	A	G	G	S	E	P	C	G	H	L	K					
ACC-C	K	D	T	C	K	G	D	S	G	G	P	L	I	C	- - - -	N	G	Q	F	Q	-	G	I	L	S	V	G	G	N	P	C	A	Q	P	R	K				
Flavoxobin	I	D	T	C	G	F	D	S	G	T	P	L	I	C	- - - -	N	G	Q	F	Q	-	G	I	V	Y	I	G	S	H	P	C	A	Q	S	R	K				
Batroxobin	I	D	T	C	G	F	D	S	G	G	P	L	I	C	- - - -	N	G	Q	F	Q	-	G	I	L	S	W	G	S	D	P	C	A	E	P	R	K				
Bov. Thrombin	G	D	A	C	E	G	D	S	G	G	P	F	V	M	K	S	P	Y	N	N	R	W	Y	Q	M	G	I	V	S	W	G	-	E	G	C	D	R	N	G	K
		210	220	230																																				
RVV-V γ	P	A	V	Y	T	K	V	F	D	Y	T	D	W	I	Q	S	I	I	A	G	N	R	T	V	T	C	P	P												
ACC-C	P	G	I	Y	T	K	V	F	D	Y	T	D	W	I	Q	S	I	I	S	G	N	T	D	A	T	C	P	P												
Flavoxobin	P	G	I	Y	T	K	V	F	D	Y	N	A	W	I	Q	S	I	I	A	G	N	T	A	A	T	C	L	P												
Batroxobin	P	A	F	Y	T	K	V	F	D	Y	L	P	W	I	Q	S	I	I	A	G	N	K	T	A	T	C	-	P												
Bov. Thrombin	Y	G	F	Y	T	H	I	V	E	R	L	K	K	W	I	Q	K	V	I	D	R	L	G	S																

ภาพประกอบ 11 แสดงองค์ประกอบกรดอะมิโนของพิษงูแมวเซา (RVV-V γ)

ตำแหน่งที่ 22 Thr (α) \rightarrow Ala (γ), 29 Gly (α) \rightarrow Ala (γ), 191 Glu (α) \rightarrow Glu (γ), 192 Ile (α) \rightarrow Met (γ), 193 Gln (α) \rightarrow His (γ) และ 224 Asn (α) \rightarrow Ser (γ) และตำแหน่งเร่งปฏิกิริยาตำแหน่งที่ His-43, Asp-88, Ser-182 ซึ่งเหมือนกับตำแหน่งเร่งปฏิกิริยาของ ไคโมทริปซิน (chymotrypsin) คือ His-57, Asp-109, Ser-195



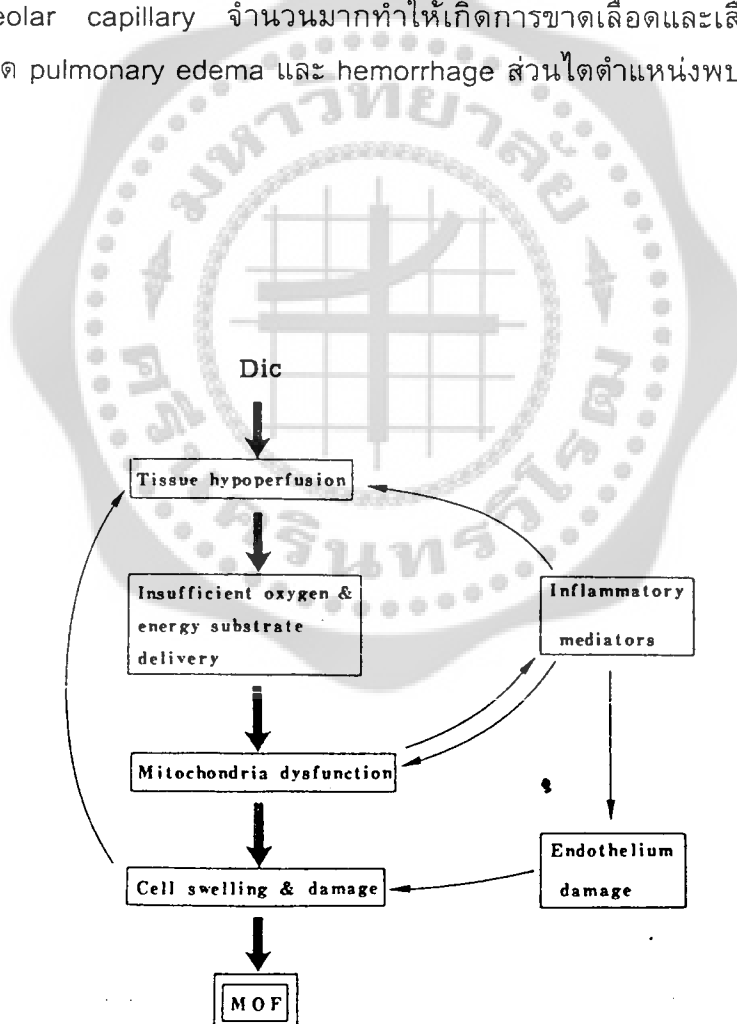
ภาพประกอบ 12 แสดงลำดับกรดอะมิโนของ RVV-Vy ซึ่งยึดติดกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ 6 ตำแหน่ง เครื่องหมาย * แสดงตำแหน่งเร่งปฏิกิริยา คือ His-43, Asp-88, Ser-182

ตาราง 5 แสดงการแบ่งกลุ่ม (subclass) ของเอนไซม์ RVV-V ตาม SWISSPROT CODE (Woolley & Steffen., 1994)

Subclass	Code	Origin	Length	Signal	SER	Subsequence	Codon
Esterase D	ESTD\$HUMAN	<i>Homo sapiens</i>	>297	?	164	MSIFGHSMGGHGA	TCC
Juvenile Hormone esterase	ESTJ\$HELVI	<i>Heliothis virescens</i>	564	19	220	ITIAGQSAGASAA	AGC
Esterase P	ESTP\$DROME	<i>Drosophila melanogaster</i>	544	19	206	IVLIGHSAGGASA	TCT
	ESTP\$RAT	<i>Rattus norvegicus</i>	565	18	221	VTIFGESAGGFSV	TCT
Tropin esterase	TPESP\$PEPU	<i>Pseudomonas putida</i>	272	?	110	TTVIGHSMGSMTA	?
Sterol esterase	A33668(PIR)	<i>Bos taurus</i>	>597	?	212	ITLFGESAGQSV	?
Gramicidin S biosynth. prot.	GRST\$BACBR	<i>Bacillus brevis</i>	256	?	95	FAFLGHSMGALIS	AGC
Thioesterases	SAST\$ANAPL	<i>Anas platyrhynchos</i>	251	?	90	FALFGHSFGSFVS	AGT
	SAST\$RAT	<i>Rattus norvegicus</i>	263	?	101	FAFFGHSGFSYIA	AGT
	SAST\$VIBAN	<i>Vibrio anguillarum</i>	252	?	92	TIIVGHSMGAQVA	AGT
Fatty acid synthetase	FAS1\$YEAST	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1845	?	274	KGA'FGHSQGLVTA	TCT
					1808	ATFAGHSLGEYAA	TCT
	FAS\$RAT	<i>Rattus norvegicus</i>	2505	?	2228	YRVAGYSFGACVA	TCT
	FAS\$MOUSE	<i>Mus musculus</i>	>838	?	635	HRIAGYSFGACVA	TCA
	FAS\$CHICK	<i>Gallus gallus</i>	2446	?	2235	YRIAGYSFGACVA	TCT
Arginine esterase	ESTAS\$CANFA	<i>Canis familiaris</i>	260	?	212	DTCYGDGGGPLIC	TCA
Proteinase	RVVAS\$VIPRU	<i>Vipera russelli siamensis</i>	236	?	182	DTCHGDSGGGPLIC	?
	RVVG\$VIPRU	<i>Vipera russelli siamensis</i>	236	?	182	DTCHGDSGGGPLIC	?
Enterochelin esterases	FES\$ECOLI	<i>Escherichia coli</i>	374	?	255	TVVAGQSFGLLSA	AGT
Cholesterol esterases	CHESS\$RAT	<i>Rattus norvegicus</i>	612	20	214	ITIFGESAGAASV	TCT
	CHESS\$HUMAN	<i>Homo sapiens</i>	745	23	217	ITLFGESAGGASV	TCT
Methylesterase	CHEB\$SALTY	<i>Salmonella typhimurium</i>	349	?	164	LIAIGASTGGTEA	?

DIC (Disseminated intravascular coagulation)

DIC คือภาวะที่เกิดไมโคร thrombus (microthrombus) จำนวนมากในหลอดเลือดฝอยทั่วร่างกาย ปริมาณไมโคร thrombus ที่เกิดขึ้นอาจมีนับล้านกระจายไปทั่วร่างกายในปริมาณที่ไม่เท่ากัน DIC เป็นความผิดปกติในระบบการแข็งตัวของเลือด เนื่องจากมีการใช้เกร็ดเลือดไฟบรินและโคแอกกูเรชั่นแฟคเตอร์ (coagulation factor) ไปเป็นจำนวนมาก บางครั้งเรียก consumption coagulopathy เกิดเนื่องจากพิษภูกระตุ้นให้เกิดการแข็งตัวของเลือดทาง extrinsic pathway และมีความผิดปกติเกี่ยวกับปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งไม่ให้เกิดการแข็งตัวของเลือด extrinsic และ/หรือ intrinsic pathway ไมโคร thrombus ของ DIC ที่เกิดขึ้นในหลอดเลือดระดับหลอดเลือดฝอย (capillary) ทำให้เกิดความผิดปกติ 2 อย่างคือเลือดออกผิดปกติ (hemorrhagic diathesis) ความผิดปกติจากการขาดเลือด (ischemia) อาจเกิดในสมอง ไมโคร thrombus อาจทำให้เกิด hemorrhage และ microinfarction ส่งผลให้เกิดอาการทางประสาทได้ DIC ที่เกิดใน alveolar capillary จำนวนมากทำให้เกิดการขาดเลือดและเสื่อมสลายของ pneumocyte ทำให้เกิด pulmonary edema และ hemorrhage ส่วนไตตำแหน่งพบไมโคร thrombus คือโกลเมอรูลัส



ภาพประกอบ 13 แสดงกลไกของ DIC ต่อการเกิดพยาธิสภาพ

ผลของพิษงูแมวเซาต่อกระบวนการ Coagulation

Iswariah และ David (1932) พบว่ามีเลือดออกตามอวัยวะต่าง ๆ เช่น หัวใจ Macfarlane (1967) พบ factor x activator ในพิษงูกระตุ้น factor x ในกระบวนการแข็งตัวของเลือดให้เป็น factor Xa ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ไปกระตุ้นต่อโปรทรอมบินให้เปลี่ยนเป็นทรอมบิน และเกิดไฟบรินขึ้นตามลำดับ Yang (1974) จากผลที่มีฤทธิ์ทำให้เกิดการแข็งตัวของเลือดนี้ พบว่าทำให้เกิดการแข็งตัวของเลือดภายในหลอดเลือดเมื่อให้พิษงูแมวเซาทางหลอดเลือดดำ, Chugh (1954) และคณะ กลุ่มอาการ disseminated intravascular coagulation (DIC) Aye (1985) มี defibrinated syndrome ร่วมกับ hemorrhagic syndrome และยังพบว่ามีเลือดออกในไตและต่อมใต้สมอง Tungthanathanich (1986) และคณะ พบว่า clotting time ยาวนานผิดปกติ และเกิดภาวะเลือดไม่แข็งตัวด้วย



ตาราง 6 แสดงการตรวจสอบทางห้องปฏิบัติการ แสดงผลของพิษงูแมวเซาต่อปัจจัยการแข็งตัวของเลือด

ผลการตรวจสอบห้องปฏิบัติการ	งูแมวเซา	งูกะปะ	งูเขียวหางไหม้
1. Anemia	yes	yes	yes
2. Leucocytosis	yes	yes	yes
3. platelet	decrease	decrease	decrease
4. VCT	prolonged → UC	prolonged → UC	prolonged → UC
5. PTT, PT, TT	prolonged	prolonged	prolonged
6. Fibrinolysis	increased	increased	increased
7. Fibrinogen	↓	↓ → 0	↓ → 0
8. Factor V	↓	not change	not change
9. Factor X	↓	not change	not change
10. Schistocyte	yes (occasional)	no	no
11. Intravascular hemolysis	yes (occasional)	no	no
others			
1. BUN	↑	normal	normal
2. creatinine	↑	normal	normal

UC = unclotted

(บุญเชียร ปานเสถียรกุล และ ภัทรพร อิศรางกูร ณ อยุธยา. 2528.)

เอนไซม์ฟอสโฟไลเปสเอทู่ทำให้เกิดภาวะขาดออกซิเจน มีผลทำให้เกิดภาวะขาด ATP เนื่องจากระดับแคลเซียมสูงขึ้นภายในเซลล์ เซลล์เกิดการสูญเสียเซลล์เมมเบรนมีผลต่อขบวนการหายใจในไมโทคอนเดรีย

ไฮพ็อกเซีย (Hypoxia) หมายถึงการมีปริมาณของออกซิเจนไปเลี้ยงเนื้อเยื่อน้อยลงทำให้เกิด cell injury และ cell death จากสาเหตุการขาดเลือดไปเลี้ยงไต (ischemia) ซึ่งอาจเกิดจากการอุดตันของหลอดเลือดโดยมีก้อนเลือดแข็งตัวอุด หรือภาวะบวมของหลอดเลือดทำให้ช่องว่าง (lumen, ลูเมน) ของหลอดเลือดแคบลงหรือตีบตัน แบ่งภาวะเป็น

Reversible cell injury การเกิดไฮพ็อกเซีย จุดแรกที่มีการกระทบคือ กระบวนการหายใจที่ใช้ออกซิเจนของเซลล์ เซลล์นำออกซิเจนไปสร้าง ATP โดยผ่านกระบวนการ oxidative phosphorylation ทำให้ระดับของ ATP ลดลง แต่มี AMP เพิ่มขึ้น AMP จะไปกระตุ้นการทำงานของ phosphofructokinase และ phosphorylase เป็นผลให้เพิ่มอัตราการเกิด anaerobic glycolysis เกิดการสะสมกรดแลคติก เกิดภาวะกรดทำให้เกิดการจับกลุ่มของโครมาตินในนิวเคลียสของเซลล์ การลดลงของ ATP เป็นผลทำให้โซเดียมไอออน (Na^+) เข้ามาสะสมภายในเซลล์ และโพแทสเซียมไอออน (K^+) กระจายออกนอกเซลล์ ส่วนน้ำและไอออนไหลเข้าสู่เซลล์เพิ่มขึ้น เกิดภาวะเซลล์บวม (cell swelling) มีการบวมของ RER (rough endoplasmic reticulum) ทำให้มีการสร้างโปรตีนลดลง แต่กลับมีการสะสมไขมันมากขึ้น เนื่องจากสารไขมันต้องรวมกับอะโปโปรตีน (apoprotein) ก่อนจึงจะถูกขับผ่านผนังเซลล์ออกไปได้ ส่วนไมโทคอนเดรีย (mitochondria) และไลโซโซม (lysosome) จะมีการบวมเช่นกัน มีการเพิ่ม permeability ของเมมเบรน มีการรั่วของเอนไซม์ เช่น RNAase, DNAase, protease, phosphatase

องค์ประกอบของเซลล์จะถูกย่อยสลาย ฟอสโฟลิปิด (phospholipid) จะถูกจับกิน โดยฟาโกไซต์ (phagocyte) หรือถูกย่อยสลายเป็นกรดไขมัน (fatty acid) ถ้ามีการตกตะกอนของแคลเซียม แคลเซียมก็จะไปทำปฏิกิริยากับกรดไขมันกลายเป็น calcium soap

ผลต่อไมโทคอนเดรีย (mitochondria)

ทำให้ความสามารถในการทำหน้าที่ของไมโทคอนเดรียเสียไป ส่งผลให้ไม่มี oxidative phosphorylation และหยุดการสร้าง ATP การขาด ATP ทำให้ผนังเซลล์ไม่สามารถควบคุมความสมดุลของไอออนและน้ำภายในเซลล์ดังที่กล่าวมาข้างต้น ภาวะบวมจะเกิด cytoplasmic bleb, ไมโครวิลไล (microvilli) บวม ไมโทคอนเดรียระยะแรกมีการหดตัว ต่อมาเกิดการบวม ER (endoplasmic reticulum) ทำให้ไรโบโซม (ribosome) หลุดออกไปจากเมมเบรนของมัน การสูญเสียหน้าที่ของเมมเบรนเนื่องจากผลการทำลายเซลล์เมมเบรนทำให้ปริมาณของแคลเซียมเพิ่มสูงขึ้นภายในเซลล์ ไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ฟอสโฟไลเปส, เอนไซม์โปรตีเอส ทำให้มีการทำลาย cytoskeleton สุดท้ายทำให้เซลล์ฉีกขาด (วิทยุ มิตรานันท์. 2540)

เอนไซม์ ฟอสโฟไลเปสเอทู่ มีผลต่อการกระตุ้นเอนไซม์ไลพอกซีจีเนส (Lipoxygenase) หรือไลพอกซิเดส (Lipoxidase) ให้ทำงาน โดยมีการผลิตกรดอะราชิโดนิก 6 ขั้นตอนผ่านกลไกไลพอกซีจีเนสรวมทั้งเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมัน

Enzymic oxidation โดยไลพอกซิเดสเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันไฮดรอกซิเจน ไม่เกี่ยวข้องกับพันธะคู่ แต่ขึ้นกับความจำเพาะของไลพอกซิเดสเกิดเป็นไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (hydroperoxide) และมีการแตกตัวของ ROOH เนื่องจากเป็นสารไม่เสถียรต่อไป

ปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันไม่อิ่มตัว

1. เกิดการย่อยสลายกรดไขมันลิโนเลอิก (linoleic acid) , กรดลิโนเลนิก (linolenic acid), กรดอะราชิโดนิก (arachidonic acid)

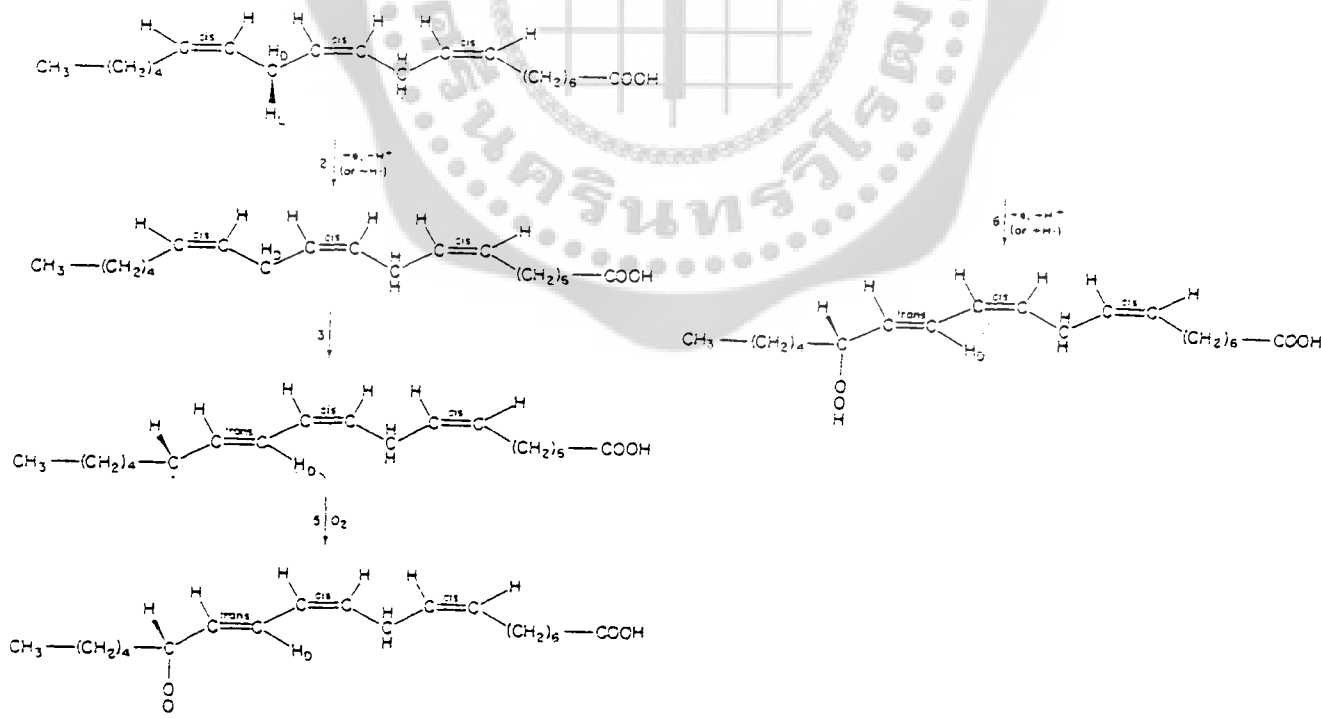
2. เกิดผลผลิตจากปฏิกิริยาทำให้เกิดอนุมูลอิสระ (free radicals) ไปทำลายโปรตีน ความจำเพาะของไลพอกซิเดสต่อสับสเตรท

3. เอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อกรดไขมันและไขมันที่มี cis-cis penta-1,4-diene unit (-CH=CH-CH₂-CH=CH-) ได้แก่ กรดไขมันพวกรดลิโนเลนิกและกรดอะราชิโดนิก ผลที่ได้มีการเติม hydroperoxy group (-OOH) ตรงตำแหน่ง ω-6

4. มีความจำเพาะต่อหมู่ -CH- ตรงตำแหน่ง ω-8

5. เอนไซม์มีความจำเพาะต่อ L-configuration ของ methylene group ที่ตำแหน่ง ω-8

6. การเกิดออกซิเดชัน (autoxidation) ของกรดลิโนเลนิกผลผลิตจะต่างกับกับกรณีของปฏิกิริยาไลพอกซิเดสคือจะเกิดการผสมของ 13-hydroperoxy (ω-8) และ



ภาพประกอบ 14 แสดงกลไกการทำงานของไลพอกซิเดสต่อกรดลิโนเลนิก (8, 11, 14-eicosatrienoic acid)

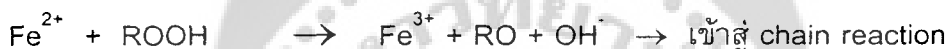
ตัวแปรที่มีผลต่อการสลายไขมัน

1. กรดไขมันอิสระ ปฏิกริยาออกโตออกซิเดชันจะแปรตามปริมาณของกรดไขมันอิสระ และแปรผันตามระดับความไม่อิ่มตัว (degree of unsaturation) คือยังมีพันธะคู่มาก ปฏิกริยาออกโตออกซิเดชันจะเกิดได้ดี ส่วนปฏิกริยาไลพอกซิเดส จะแปรตามปริมาณ cis, cis,1;4-pentadiene unit

2. เป็นตัวแปรสำคัญในการเกิดปฏิกริยาทั้งแบบไลพอกซิเดส และ ออกโตออกซิเดชัน

3. หากมีการยับยั้งไลพอกซิเดสและไลเปสก็จะมีผลต่อปฏิกริยา fat deterioration ได้

4. pro-oxidants กรณีของ ออกโตออกซิเดชัน สารพวก Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} อีออนเหล่านี้จะเร่งปฏิกริยาการเกิดอนุมูลอิสระมากขึ้น โดยเฉพาะการสลายตัวของ hydroperoxide ทำให้ได้ free radical chain reaction เร็วขึ้น สารพวก pro-oxidants จะไปทำให้ induction phase ของกราฟสั้นลง โลหะพวกนี้พบในฮีโมโกลบิน (hemoglobin), ไมโอโกลบิน (myoglobin), ไซโตโครม (cytochrome) ทำให้ fat deterioration เกิดเร็วขึ้น



เอนไซม์ฟอสโฟไลเปสเอทามีผลต่อการกระตุ้นเอนไซม์ไลเปส กล่าวคือไลโปไลซิส (lipolysis) หมายถึงเกิดการไฮโดรไลซ์ พันธะเอสเทอร์ และกลีเซอไรด์ โดยเอนไซม์ไลเปสและน้ำ (lipid hydrolase) เกิดผลผลิตเป็นกลีเซอรอลและกรดไขมันอิสระ ผลผลิตที่เกิดขึ้นคือกรดไขมันอิสระจะเข้าสู่จรรยาของออกซิเดชัน ออกโตออกซิเดชันเป็นปฏิกริยาออกซิเดชันของกรดไขมันทั้งกรดไขมันไม่อิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัว แต่อัตราเร็วของปฏิกริยาต่างกันคือ Arachidonic acid : Linolenic acid : linoleic acid : oleic acid = 40:20:10:1 = จำนวนพันธะคู่ 4:3:2:1 ปฏิกริยาออกโตออกซิเดชันต้องมีออกซิเจนแต่ไม่มีเอนไซม์ ได้ผลผลิตเป็นอัลดีไฮด์, คีโตน หรือโพลีเมอร์ของ conjugate double bond

เอนไซม์ฟอสโฟไลเปสเอทามีผลต่อการกระตุ้นเอนไซม์โปรติเอส (protease) โดยทำให้ระดับแคลเซียมในเซลล์สูงขึ้น ส่วนการควบคุมการแข็งตัวของเลือด ลักษณะของปฏิกริยา คือ สลายพันธะเปปไทด์ ด้วยน้ำ

ประเภทของโปรติเอส แบ่ง 4 กลุ่มตามกลไกการทำงาน

1. serine protease
2. sulfhydryl protease
3. metal-containing protease
4. acid protease

Serine protease (Alkali protease pH 6.7-9 เอนไซม์กลุ่มนี้)

1. chymotrypsin E.C.3.4.4.5, 3.4.4.6
2. trypsin E.C.3.4.4.4
3. Elastase E.C.3.4.4.7
4. thrombin E.C.3.4.4.13

คุณสมบัติ

1. ถูกยับยั้งได้ด้วย DFP (diisopropyl phosphofluoridate) ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับไฮดรอกซิลของอนุมูลซีรีล (seryl residue) ในบริเวณเร่งของเอนไซม์
2. มีหมู่ imidazole อยู่ในบริเวณเร่ง
3. เอนไซม์ทั้งหมดเป็น endopeptidases



เอนไซม์ฟอสโฟไลเปสเอทูมีผลต่อการกระตุ้นกรดไขมันคือกรดอะราชิโดนิก เกิดผลผลิตคือพรอสตาแกลนดินและสารอื่น ๆ ทำให้เกิดการอักเสบ (Inflammation) การอักเสบแบ่งเป็น 2 ชนิดคือ การอักเสบเฉียบพลัน (acute inflammation) และการอักเสบเรื้อรัง (chronic inflammation)

acute inflammation เกิดในเวลาสั้น ๆ เพียงไม่กี่นาทีจนกระทั่งถึงสองวัน ลักษณะสำคัญคือมีของเหลวประกอบด้วยโปรตีนจากพลาสมาและเม็ดเลือดขาว เข้ามายังบริเวณที่อักเสบ เรียกว่า exudation ส่วนมากจะเป็นนิวโทรฟิล จะเกิดอาการ ปวด บวม แดง ร้อน และเสียหายที่การทำงานของอวัยวะนั้น อาการเหล่านี้เกิดจากการเปลี่ยนแปลงการไหลเวียนเลือด และขนาดของหลอดเลือด, การเพิ่มการซึมผ่านของหลอดเลือด (permeability) และเม็ดเลือดขาวเข้ามายังบริเวณอักเสบ

กลไกการเพิ่มการซึมผ่านของหลอดเลือด (permeability)

1. เซลล์ผนังหลอดเลือด (endothelial cell) หดตัว ทำให้ช่องว่างระหว่างเซลล์เพิ่มขึ้น การเพิ่ม permeability วิธีนี้พบบ่อยสุด เช่น จากการกระตุ้นของฮีสตามีน, แรติไดโนลิน, และลิโคไทรอิน โดยมีผลต่อหลอดเลือดดำขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 20 - 60 ไมครอน แต่ไม่มีผลต่อหลอดเลือดฝอยหรือหลอดเลือดแดงขนาดเล็ก ซึ่งใช้เวลาประมาณ 15 - 30 นาที

2. มีการจัดเรียงโครงสร้างของเซลล์ผนังหลอดเลือดและช่องว่างระหว่างเซลล์ใหม่ ได้แก่พวก Interleukin-1 (IL-1), tumor necrosis factor (TNF), interferon gamma (IFN- γ) ทำให้การหดตัวแยกจากกัน และมีช่องว่างระหว่างเซลล์เพิ่มขึ้น การตอบสนองอยู่นาน 24 ชั่วโมงขึ้นไป

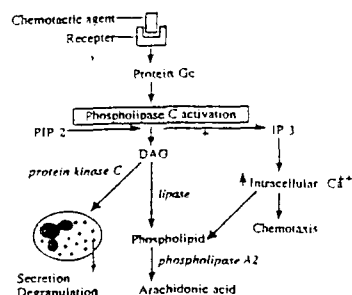
3. การทำลายเซลล์ผนังหลอดเลือดโดยตรง ทำให้เซลล์ผนังหลอดเลือดฝอยตายและหลุดจากชั้น basement membrane (ทั้งของหลอดเลือดแดงขนาดเล็ก, หลอดเลือดฝอยและหลอดเลือดดำขนาดเล็ก) ตายลง ทำให้สารน้ำรั่วซึมทันที ภาวะนี้จะหยุดเมื่อมีกระบวนการแข็งตัวของเลือด (thrombosis) หรือมีการซ่อมแซมเกิดขึ้นสาเหตุอาจเนื่องมาจากไซโตไคน์ ทำให้เซลล์ผนังหลอดเลือดหดตัว การรั่วซึมของสารน้ำจะเกิดหลังได้รับการกระตุ้น 2 - 12 ชั่วโมง

4. เซลล์ผนังหลอดเลือดเปลี่ยนแปลงเนื่องจากเม็ดเลือดขาว เมื่อเม็ดเลือดขาวมาจับกับเซลล์ผนังหลอดเลือดโดยระยะแรกของการอักเสบจะถูกกระตุ้นให้ปล่อยสาร เช่น อนุพันธ์อิสระของออกซิเจนหรือเอนไซม์บางตัวออกมาย่อยสลาย

5. จากหลอดเลือดฝอยสร้างขึ้นใหม่ระยะแรกยอมให้สารน้ำผ่านออกมามากกว่าปกติ

6. เมื่อถูกกระตุ้นด้วย chemotaxis รอบ ๆ หลอดเลือดโดยสาร chemotaxis จะจับกับเม็ดเลือดขาวเกิดการตอบสนอง ดังภาพประกอบ 16

ภาพประกอบ 15 แสดงกลไกการกระตุ้นเม็ดเลือดขาวด้วย chemotactic agent



สารเคมีตัวกลางที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ

หลอดเลือดขยายตัว

Prostaglandin I_2 , E_2 , D_2 , $F_{2\alpha}$

NO

เพิ่ม Permeability ของหลอดเลือด

Histamine

Bradykinin

C_{3a} และ C_{5a} (anaphylatoxin)

Leukotriene - C_4 , D_4 , E_4

PAF

Adhesion

Leukotriene B_4

C_{5a}

Chemotaxis

Leukotriene B_4

C_{5a}

cytokine (IL-8)

ใช้ IL-1, IL-6, TNF

Prostaglandin E_2

ปวด Prostaglandin

Bradykinin

ทำลายเนื้อเยื่อจาก

ไลโซโซมของนิวโทรฟิลและแมคโครฟาจ

อนุพันธ์อิสระของออกซิเจน

NO

(วิญญู มิตรานันท์. 2540)

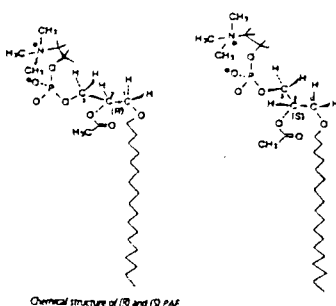
ผลของฟอสโฟไลเปสเอช₂ กระตุ้นการสร้างไซโตไคน์ (Cytokine) จากลิมโฟไซต์ ไซโตไคน์เป็นสารประเภทโพลีเปปไทด์ (polypeptide) สร้างจากลิมโฟไซต์ (lymphocyte) และแมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้น ตัวที่มีฤทธิ์เป็นสารตัวกลางในกระบวนการอักเสบได้แก่ Interleukin-1 (IL-1), tumor necrosis factor (TNF α และ TNF β) และกลุ่ม Interleukin-8 (IL-8)

IL-1 และ TNF สร้างจากทีลิมโฟไซต์ (T lymphocyte) ที่ถูกกระตุ้นโดยสารตัวกลางอื่นในกระบวนการอักเสบ มีฤทธิ์ทำให้เกิด acute phase reaction เช่น ไข้, เบื่ออาหาร, เพลีย, ช็อค หรือมีนิวโทรฟิล (neutrophil) จำนวนมากในกระแสโลหิต ทำให้เม็ดโลหิตขาว ติดผนังหลอดเลือดโดยเพิ่ม adhesive molecule พบเซลล์บุผนังหลอดเลือด มีการสร้าง PGI₂, NO, growth factor, interleukin และยังทำให้เกิดการแข็งตัวของเลือดง่ายขึ้น นอกจากนี้ IL-1 และ TNF ยังมีผลต่อไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) ทำให้เพิ่มการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและสร้างไคคอลลาเจนมากขึ้น

IL-8 สร้างจากแมคโครฟาจ ถูกกระตุ้นจากผนังหลอดเลือด, IL-1, TNF มีฤทธิ์ดึงดูดนิวโทรฟิล จึงมีฤทธิ์เป็น chemokine

PF4 (Platelet factor 4) มีฤทธิ์เป็นเคโมแทกซิส (chemotaxis) ต่อนิวโทรฟิล, โมโนไซต์ (monocyte), อีโอซิโนฟิล และทำให้แมสต์เซลล์ปลดปล่อยฮีสตามีนออกมา

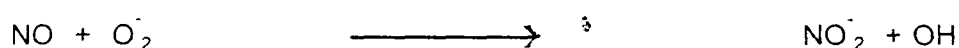
PAF (Platelet - activating factor) สันเคราะห์จากฟอสโฟลิปิด (phospholipid) โครงสร้างทางเคมี acetyl glycerol ether phosphoryl choline (AGEPC) เมื่อได้รับภัยอันตรายจะถูกสร้างและปล่อยออกมาทันทีจากเซลล์ เบโซฟิล, แมสต์เซลล์, นิวโทรฟิล, โมโนไซต์/แมคโครฟาจ, เซลล์บุผนังหลอดเลือด, เกร็ดเลือด บทบาท PAF (1-alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphate) จำเพาะเซลล์เป้าหมาย ทำให้มีการสร้างสารอีโคซานอยด์ (eicosanoid) โดยกระตุ้นเกร็ดเลือด ทำให้หลอดเลือดและหลอดเลือดหดตัว แต่ความเข้มข้นต่ำมาก ทำให้หลอดเลือดขยายตัว และเพิ่ม permeability ของหลอดเลือดขนาดเล็ก มีฤทธิ์แรงกว่าฮีสตามีน 100 - 10,000 เท่า ยังช่วยให้ integrin บนเม็ดเลือดขาวจับกับเซลล์บุผนังหลอดเลือดมากขึ้น คือถูกเม็ดเลือดขาวเข้ามาบริเวณที่อักเสบ ทำให้แกรนูลของเม็ดเลือดขาวแตกออกและกระตุ้นให้เกิดอนุพันธ์อิสระของออกซิเจน



ภาพประกอบ 16 แสดงโครงสร้างของ PAF

Nitric oxide หรือ nitrogen monoxide (NO)

เป็นอนุมูลอิสระรูปก๊าซที่สามารถละลายได้ทั้งในน้ำและไขมัน โครงสร้างโมเลกุล (N=O) ไม่มีการเก็บสะสม แต่จะสร้างขึ้นเมื่อได้รับอันตราย และใช้วิธีการแพร่ (diffusion) ไปออกฤทธิ์ที่เซลล์เป้าหมาย เซลล์ที่สร้าง NO ได้แก่ เซลล์บุผนังหลอดเลือด, แมคโครฟาจ, NO ถูกสังเคราะห์มาจากกรดอะมิโน L-arginine, ออกซิเจน และ NADPH โดยมีเอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS) เปลี่ยนเป็น L-citrulline และ NO NO ถูกสร้างจากแมคโครฟาจ ยังมีฤทธิ์ทำลายเซลล์เป้าหมาย หรือทำปฏิกิริยากับ superoxide ได้ nitrogendioxide และอนุมูล hydroxyl ดังสมการ



ทั้ง NO_2 และ OH มีฤทธิ์ทำลายเซลล์

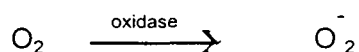
ตาราง 7 แสดงการเปรียบเทียบเอนไซม์ NOS มี 2 รูปแบบคือ constitutive NOS (cNOS) และ inducible NOS (iNOS)

คุณลักษณะ	cNOS	iNOS
แหล่งผลิต	เซลล์บุผนังหลอดเลือด	แมคโครฟาจ, Kupffer cell, เซลล์กล้ามเนื้อเรียบของผนังหลอดเลือด
ตัวกระตุ้น (activator)	ทรอมบิน, ADP, Acetylcholine, Calcium ionophore, Glutamate	
ตัวชักนำ (inducer)	การออกกำลังกาย	Lipopolysaccharide (LPS) Interferon - LPS + IL-1 α LPS + TNF α oxidised low - density lipoprotein

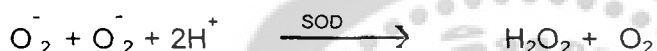
อนุมูลอิสระ (Free radical)

ปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระ ว่องไวในการทำปฏิกิริยากับสารเคมีชนิดอินทรีย์และอนินทรีย์ เช่น โปรตีน, ไขมัน, คาร์โบไฮเดรต โดยเฉพาะทำปฏิกิริยากับเมมเบรน กรดนิวคลีอิก ภายในนิวเคลียส อนุมูลอิสระที่สำคัญคือ ออกซิเจน ($O^{\cdot -}$), คาร์บอน (C) และไนโตรเจน (N) นั้น เมื่อเกิด Toxic intermediated 3 ชนิด คือ superoxide ($O_2^{\cdot -}$), hydrogen peroxide (H_2O_2) และ hydroxyl ion ($OH^{\cdot -}$)

superoxide ($O_2^{\cdot -}$) เกิดภายในไมโทคอนเดรียโดยขบวนการ autoxidation หรือเกิดจากเอนไซม์ภายในไซโตพลาสซึมได้แก่ xanthine oxidase, cytochrome P-450 ปฏิกิริยาดังนี้



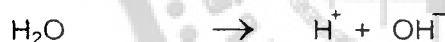
superoxide ($O_2^{\cdot -}$) อาจถูกเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) เปลี่ยนไปเป็น hydrogen peroxide



Hydrogen peroxide (H_2O_2) เกิดจาก superoxide โดยอาศัยเอนไซม์ SOD หรือเกิดขึ้นโดยตรงจากเอนไซม์ oxidase ที่อยู่ใน peroxisome

Hydrogen radical (OH) เกิดดังนี้

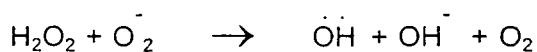
1. การ hydrolysis น้ำด้วย ionizing radiation ทำให้อะตอมของน้ำเกิดการแตกตัวเป็นไฮดรอกซิล



2. Fenton reaction โดยมีโลหะหนักเข้าร่วม



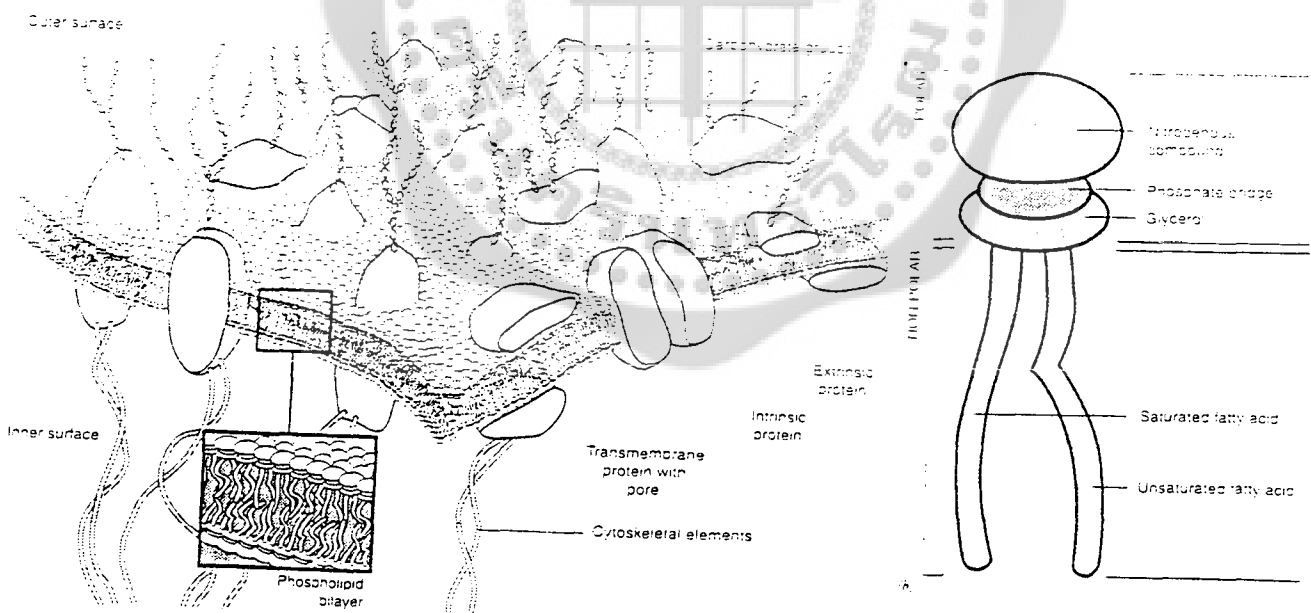
3. Haber - Weiss reaction



Action of Venoms on Red blood cell, White blood cell and platelet

Biological membrane หรือเยื่อชีวภาพ คือ เยื่อบางที่ห่อหุ้มเซลล์และออร์แกเนลล์ มีลักษณะเป็นชั้นที่วางเรียงทับซ้อนกันสามชั้น (trilaminar structure) คือ มีชั้นดำทึบ สองชั้น ขนานกันอยู่ด้านนอก ตรงกลางเป็นแถบโปร่งใส ติดสลับกันเป็น ทึบ-โปร่ง-ทึบ เราเรียกว่า unit membrane พบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีคล้ายคลึงกับ unit membrane มีความหนาประมาณ 7.5 - 10 นาโนเมตร ชั้นทึบแสงแต่ละชั้นหนาประมาณ 2.5 - 3.0 นาโนเมตร และแถบโปร่งใส ตรงกลางหนาประมาณ 2.5 - 4.0 นาโนเมตร มีองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญคือ ไขมันและ โปรตีน โดยมีสัดส่วนแต่ละชนิดประมาณร้อยละ 50 มีน้ำตาลอยู่ในปริมาณเล็กน้อย

ไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์เป็นโคเลสเตอรอล (cholesterol) และฟอสโฟลิปิด (phospholipid) (มี 4 ชนิด คือ ฟอสฟาติดีลโคลีน (phosphatidylcholine), สฟิงโกไมอีลิน (sphingomyelin), ฟอสฟาติดีลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine), ฟอสฟาติดีลซีรีน (phosphatidylserine))



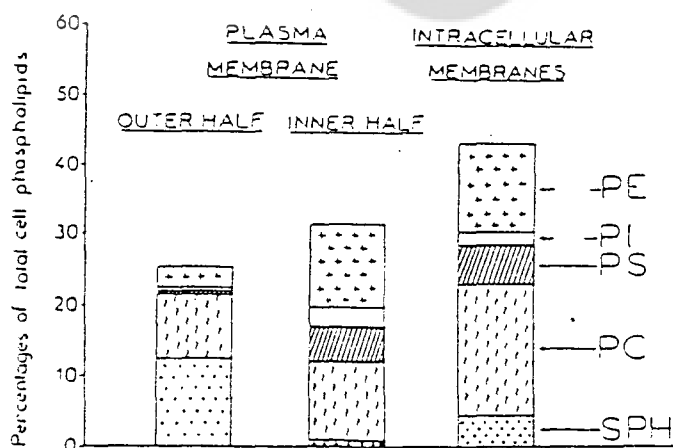
ภาพประกอบ 17 แสดงโครงสร้างของเซลล์เมมเบรนและโครงสร้างของไมโทคอนเดรียซึ่งมี องค์ประกอบของเมมเบรนทำหน้าที่ในขบวนการหายใจ

เนื้อเยื่อบุผิว (epidermis) เป็นกลุ่ม ๆ เซลล์เรียงตัวกันเป็นแผ่นปกคลุมห่อหุ้มหรือบุส่วนต่าง ๆ ของร่างกายทั้งภายนอกและภายใน เช่น ท่อทางเดินอาหาร, ท่อทางเดินหายใจ, ท่อทางเดินปัสสาวะ, เนื้อเยื่อบุผิว ประกอบด้วย เซลล์มากกว่า 1 ชั้นขึ้นไป เรียกว่า stratified epithelium ประกอบด้วยชั้นต่าง ๆ 4 ชั้น , stratum corneum, stratum lucidum, stratum granulosum, stratum germinativum ซึ่งมีองค์ประกอบทางเคมีต่าง ๆ เช่น 1) โปรตีนเคอราติน (keratin) 2) สารสีเมลานิน (melanin pigment) 3) ลิพิด (lipid)

ตาราง 8 แสดงองค์ประกอบของเนื้อเยื่อบุผิว (epidermis)

ชนิดของลิพิด	Stratum germinativum (%)	stratum lucidum & granulosum (%)	stratum corneum (%)
phospholipid	44.5	25.3	4.9
sphingolipid	7.3	11.7	18.1
cholesterol sulfate	2.4	5.5	1.5
Free sterol	11.2	11.5	14.0
sterol/wax esters	5.3	4.7	5.4
Alkanes	3.9	3.8	6.1
squalenes	4.9	4.6	4.8
Free fatty acids	7.0	9.2	19.3
Triglycerols	12.4	24.7	25.2

(พจน์ ศรีบุญลือ และ ประสงค์ คุณานันท์ฉัยเดช. 2535.)



ภาพประกอบ 18 แสดงองค์ประกอบของเมมเบรนของเฟลตเลท

ตาราง 9 แสดงองค์ประกอบของกรดไขมันของเมมเบรนพลาสมา

Phospholipids	Total cells	Plasma membrane		Intracellular membranes
		Outer leaflet	Inner leaflet	
Sphingomyelin	0	0	0	0
Phosphatidylcholine	55.2	13.2	15.6	26.4
Phosphatidylserine	30.0	1.2	13.8	15.0
Phosphatidylinositol	28.2	3.0	15.0	10.2
Phosphatidylethanolamine	105.6	11.4	45.6	48.6
Total ¹	219.0	28.8 (13.1 %)	90.0 (41.1 %)	100.2 (45.8 %)
Total (measured) ²	194.0	12.4 (6.4 %)	104.8 (54.0 %)	76.8 (39.6 %)

Results are given in nmoles of arachidonic acid/10⁹ platelets. Numbers in parentheses refer to the percentage of total platelet arachidonic acid.

Fatty acids aldehydes (FAME, DMA)	In whole platelet PE	In unreacted PE	In PE-TNP derivative
16 : 0 DMA	5.6 ± 0.3	6.3 ± 1.9	6.1 ± 1.4
16 : 0	4.0 ± 0.4	4.1 ± 0.3	3.4 ± 0.6
16 : 1	1.1 ± 0.4	1.0 ± 0.3	0.9 ± 0.7
18 : 0 DMA	13.1 ± 0.3	11.7 ± 1.1	12.7 ± 0.9
18 : 1 DMA	3.8 ± 0.2	3.5 ± 0.4	4.0 ± 0.7
18 : 0	15.2 ± 1.4	14.6 ± 2.0	14.6 ± 1.3
18 : 1	6.6 ± 0.9	6.8 ± 1.3	5.3 ± 1.2
18 : 2	3.2 ± 0.8	3.7 ± 0.5	1.7 ± 0.5
18 : 3, 20 : 0	0.9 ± 0.3	0.6 ± 0.4	0.7 ± 0.5
20 : 1	0.6 ± 0.3	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.2
20 : 3	0.8 ± 0.2	0.9 ± 0.3	1.0 ± 0.4
20 : 4	31.7 ± 2.2	32.0 ± 1.8	35.3 ± 2.0
22 : 3, 22 : 4	5.2 ± 0.2	5.6 ± 1.3	5.4 ± 0.2
24 : 1	0.9 ± 0.2	0.8 ± 0.2	1.2 ± 0.4
22 : 5, 25 : 0	3.4 ± 0.2	3.0 ± 0.2	2.6 ± 0.1
22 : 6	2.5 ± 0.2	2.2 ± 0.4	2.7 ± 1.2
Other	1.5 ± 0.6	2.9 ± 1.0	0.9 ± 0.2

ตาราง 10 แสดงองค์ประกอบของกรดไขมันและไขมันของเมมเบรนเม็ดเลือดแดง

Human erythrocyte lipids			
Lipid	mg/ml RBC	mg/g Hb	Reference
Total lipid	5.10 ± 0.51	15.45 ± 1.54	[6]
Phospholipid	2.98 ± 0.2	9.03 ± 0.61	[6]
Plasmalogen	0.56	1.69	[6]
Total cholesterol (unesterified)	1.20 ± 0.08	3.63 ± 0.21	[6,7]
Fatty acids	2.00	6.06	[6]
Other	0.92 ± 0.18	2.78 ± 0.54	[6]
FATTY ACIDS AS PERCENT OF TOTAL FATTY ACID			
Lauric (<i>n</i> -C ₁₂)		0.3	[8]
Myristic (<i>n</i> -C ₁₄)		0.8	[8]
Pentanoic (<i>n</i> -C ₁₅)		0.3	[8]
Palmitoleic (16:1)		1.1	[8]
Palmitic (<i>n</i> -C ₁₆)		41.0	[8]

Fatty acid compositions of erythrocyte phospholipids (mole percent)					
Shorthand designation	Mixed phospholipids (methanol fraction)	Reference			Reference
		Ethanolamine	Serine	Choline	
12:0	0.1	0.1	[6]
14:0	0.5	0.2	Trace	0.5	[6]
15:0	0.3	0.2	Trace	0.3	[6]
16:0	28.8	18.9	7.1	33.0	[6]
cis 16:1 ⁹	0.7	0.6	0.4	0.1	[6]
17:0	0.4	Trace	0.3	0.5	[6]
18:0	15.1	8.0	41.6	11.7	[6]
cis 18:1 ⁹	18.3	21.6	7.9	17.9	[6]
trans 18:1 ⁹	2.9	3.6	5.1	2.7	[6]
cis, cis 18:2 ^{9,12}	10.6	7.0	2.8	18.2	[6]
cis, cis, cis 18:3 ^{9,12,15}	...	Trace	[6]
19:0 iso or ante-iso	Trace	0.2	[6]
20:0	0.1	...	Trace	0.2	[6]
20:1 ¹¹	0.2	0.3	Trace	0.2	[6]
20:2 ^{8,11}	...	Trace	[6]
20:2 ^{11,14}	0.1	0.1	...	0.2	[6]
20:3 ^{5,8,11}	1.6	1.0	2.1	1.6	[6]
20:4 ^{5,8,11,14}	10.8	21.9	19.7	5.0	[6]
20:5 ^{3,6,11,14,17}	0.8	1.4	0.3	0.5	[6]
Unknown (22:unsat.?)	1.7	4.7	2.2	0.3	[6]
22:5	0.7	0.8	0.9	1.7	[6]
22:5	2.3	2.3	2.0	2.7	[6]
22:5 ^{7,10,13,16,19}	1.0	1.0	[6]
22:6 ^{4,7,10,13,16,19}	2.1	3.9	4.2	1.1	[6]
14:0	Trace	0.8	[6]
Branched 15:0	2.8	2.6	5.5	...	[6]
15:0 iso or ante-iso	0.1	...	0.4	...	[6]
15:0	0.2	0.3	[6]
15:0	0.2	0.3	[6]
Unknown	0.1	...	1.6	1.0	[6]
cis 16:1 ⁹	Trace	0.2	[6]
16:0	18.2	15.9	17.1	49.8	[6]
Branched 17:0 unsat.?	0.9	1.5	[6]
Branched 17: unsat.?	2.4	3.0	[6]
Branched 17:0	5.8	5.5	11.3	6.9	[6]
17:0 iso or ante-iso	1.1	0.8	0.7	2.9	[6]
cis, cis 18:2 ^{9,12}	Trace	...	1.4	...	[6]
cis 18:1 ⁹	6.8	7.0	5.4	5.3	[6]
18:1 isomer	13.2	18.8	10.5	7.7	[6]
18:0	37.1	40.4	32.3	19.2	[6]
Unknown	1.3	2.1	[6]

ผลของพิษงูแมวเซาต่อหลอดเลือดและเม็ดเลือด

Chepra และ Chowan (1932), Iswariah และ David (1934) พบว่า พิษงูแมวเซามีคุณสมบัติในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกของพิษงูนั้นสามารถเสริมฤทธิ์ได้ด้วยสารเลซีธิน และจะแตกทันทีเมื่อเติมเลซีธินขนาดความเข้มข้น 0.0035 มก./มล. ลงไป ส่วนโคเลสเตอริน (cholesterin) เป็นตัวป้องกันการเกิดเม็ดเลือดแดงแตก Ohima และคณะ (1969) เชื่อว่าพิษงูแมวเซาทำให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือดโดยไปหลังโพรสตาแกลนดินและไคนิน นอกจากนี้มีผลไปเพิ่มฤทธิ์ของไคนินอีกด้วย Gerber และคณะ (1978) เชื่อว่าพิษงูไปกระตุ้นให้มีการหลั่งของฮอร์โมนที่ไปทำให้หลอดเลือดหดตัว ดังนั้นผลในการขยายตัวของหลอดเลือดของโพรสตาแกลนดินจึงลดลง และหรือทำให้มีการสร้าง thromboxane มากขึ้น มีผลทำให้หลอดเลือดหดตัวอย่างแรง Draten และคณะ (1980) แพรคซันของ PLA_2 จากพิษงูแมวเซาหลัง TXA_2 , PGI_2 , LTs และฮีสตามีน จากการ perfuse guinea-pig Lung, autacoid เหล่านี้เพิ่ม permeability ของหลอดเลือด ทำให้เกิดคั่งน้ำใน perfuse lungs, ฮีสตามีนและ PGI_2 มีคุณสมบัติโดยตรงต่อหลอดเลือดขยายตัว Lee (1984) พบว่า PLA_2 จากงูแมวเซามีฤทธิ์ทำลายหลอดเลือดฝอยทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อ Huang (1984) พบว่ามีการกระตุ้นให้มีการหลั่ง PGE_2 และยังพบว่าระบบไหลเวียนภายในไตควบคุมโดยระบบฮอร์โมน 2 ระบบคือ ฮอร์โมนที่ทำให้หลอดเลือดหดตัว ได้แก่ นอร์อิพิเนพรีนกับอะดรีนาลินและ ระบบเรนินแองจิโอเทนซิน ในขณะที่กลุ่มโพรสตาแกลนดินคอมพาวนด์ และระบบแคลลิคริน-ไคนิน (Kallikrein-kinin) ออกฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดขยายตัว Suwprasert (1986) มีการทำลายผนังเซลล์ของเม็ดเลือดแดงจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ PLA_2 ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกภายในหลอดเลือด.

Action of Snake Venoms on Endothelium

ผลของพิษงูแมวเซาต่อพยาธิสภาพของหลอดเลือด (vasculotoxin) คือผลของ vasculitis (หลอดเลือดอักเสบ) ต่อการทำงานของเส้นเลือด เมื่อเส้นเลือดเกิดการอักเสบ การทำงานของหลอดเลือด (endothelial cell) และ กล้ามเนื้อเรียบ (smooth muscle) ของเส้นเลือดผิดปกติ หรือเสียความสมดุลย์ไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งพวก muscular arteries โดยที่ physiologic endothelial - dependent relaxation of smooth muscle ที่ห่อหุ้มเส้นเลือดจะเสียไป ดังนั้น จึงไม่ตอบสนองต่อ stress ต่าง ๆ หรือสิ่งกระตุ้น เช่น แคทีโคลามีน (catecholamine), วาโซเพรสซิน (vasopressin), เซโรโทนิน (serotonin), ทรอมบิน (thrombin) รวมทั้งไม่สามารถหลั่ง endothelial derived relaxing factor ซึ่งเป็น vasodilators substance ออกมาเหมือนปกติได้ Vessel wall injury (inflammation) จะทำให้ เซลล์บุผิวหลอดเลือด สร้างพรอสตาไซคลิน (prostacyclin) ลดลง สร้าง tissue plasminogen activator ลดลง ในการลดการหลั่ง endothelial derived relaxing factors แต่กลับเพิ่มการสร้าง endothelin ซึ่งจะก่อให้เกิดการหดตัวของหลอดเลือด vasoconstriction จากการหดตัวของ vascular เกิดภาวะอักเสบของหลอดเลือดและเกิดการตายของเนื้อเยื่อได้

นอกจากนี้ inflamed vessel wall จะกระตุ้น (activate) platelet ทำให้ ทรอมบอกแซน (Thromboxan) เพิ่มมากขึ้น ซึ่งจะให้มี platelet aggregation เกิด clot formation ร่วมกับการมีภาวะ hyperfibrinogenemia hypofibrinolysis และ thrombocytosis นอกจากนี้ factors ที่เกิดจาก platelet activation จะทำให้มีเซลล์บุผิวหลอดเลือดและเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ (smooth muscle) เกิด proliferation ผลลัพธ์คือมี vascular occlusion (โครงการตำราจุฬา วิทยาศาสตร์ ฉบับที่ 6. 2537)



ภาพประกอบ 19 แสดงเซลล์ของลำไส้ส่วน jejunum มีลักษณะ swelling จากผลของ PGE1 ความเข้มข้น 1×10^{-6} M

พิษงูแมวเซาต่อเกร็ดเลือด (platelet)

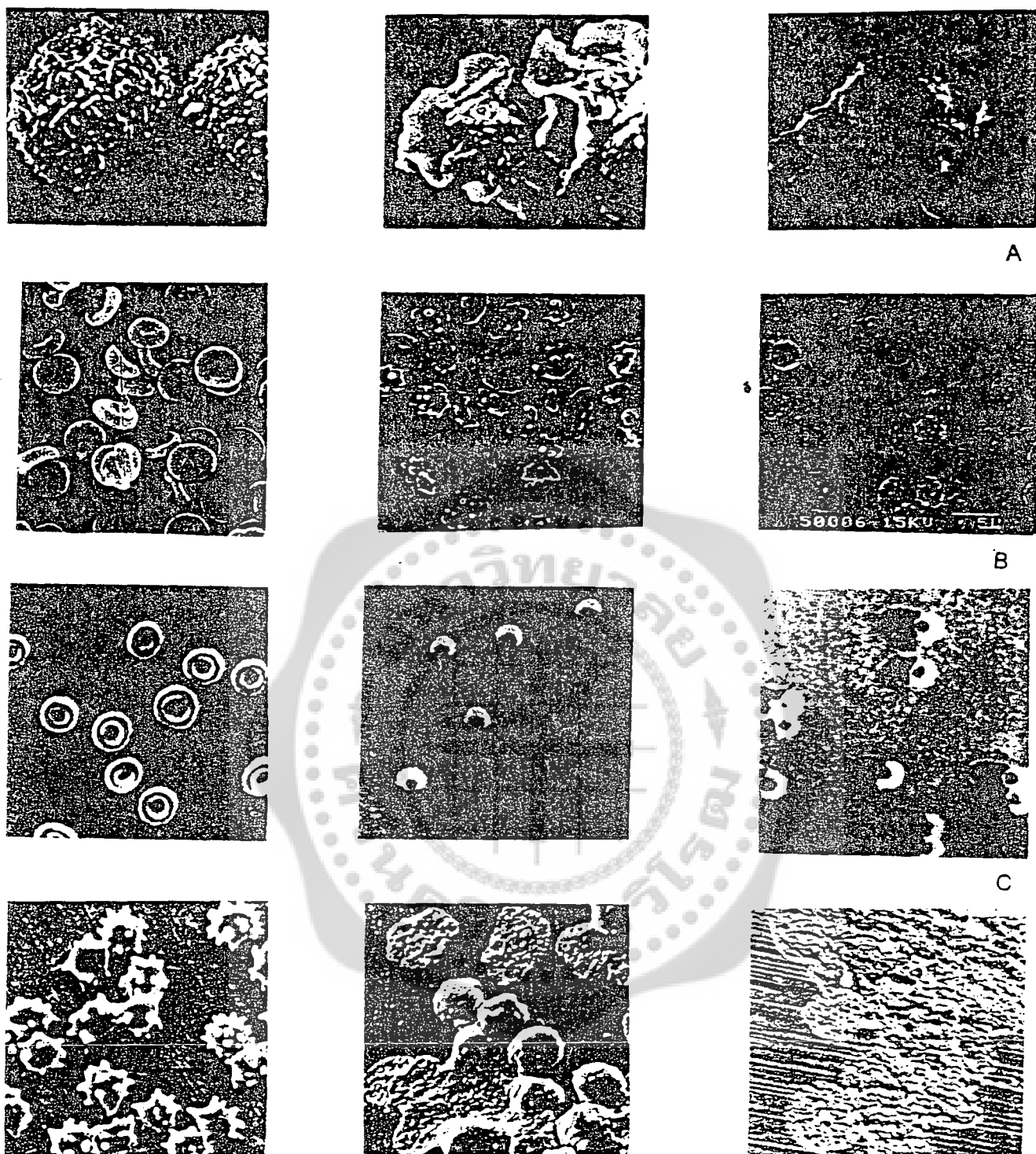
ฟอสโฟไลเปสเอทู่ มีไอโซเมอร์มากกว่า 1 ชนิด ทำให้มีคุณสมบัติแตกต่างกันไปตั้ง เช่น มีค่า Isoelectric point (pI) ตั้งแต่ pH 3 - 10 และยังมีมวลโมเลกุลแตกต่างกันไป สามารถจัดแบ่งเอนไซม์ฟอสโฟไลเปสตามการกระตุ้นทรอมโบไซต์ดังนี้

1. ฟอสโฟไลเปสเอทู่ที่กระตุ้นเกร็ดเลือดให้เกาะกลุ่มกัน
2. ฟอสโฟไลเปสเอทู่ที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกร็ดเลือด โดยพบว่า เบลีคฟอสโฟไลเปสเอทู่อาจกระตุ้นผ่าน PGI₂ (พรอสตาไซคลิน)
3. ฟอสโฟไลเปสเอทู่ชนิดไม่มีคุณสมบัติใด ๆ ต่อเกร็ดเลือด

ฟอสโฟไลเปสเอทู่ซึ่งสามารถปล่อยกรดอะราชิโดนิก ตำแหน่งแอลฟาของฟอสโฟไลเปดเกิดการ สร้าง TXA₂ โดยอาศัยแคลเซียมที่ออกมาจากภายนอกเซลล์ สามารถยับยั้งได้ด้วย EDTA, verapamil และ nitroprusside (Alan., 1991)

ตาราง 11 แสดงชนิดของสารเคมีที่สามารถกระตุ้นเกร็ดเลือดได้

Name	Source	MW	Mode of action
Aggregation inducers			
Convulxin	<i>Crotalus durissus cascavella</i>	60,000	Stimulates thromboxane A ₂ synthesis
	<i>Trimeresurus mucrosquamatus</i>	78,400	
Aggregoserpentin	<i>Trimeresurus</i> species	43,000	Increases Ca ²⁺ influx; activates endogenous PLA
	<i>Calloselasma rhodostoma</i>		
Thrombocytin	<i>Bothrops</i> species	36,000	Thrombin-like serine protease
Crotalocytin	<i>Crotalus horridus horridus</i>	55,000	Stimulates arachidonic pathway
Botrocetin	<i>Bothrops</i> species	N.D.	Reacts with platelets in the presence of vWF
Phospholipase A ₂	Elapidae, Viperidae, Crotalidae species		Stimulates thromboxane A ₂ formation; liberates Ca ²⁺ ; increases Ca ²⁺ influx
Aggregation inducer	<i>Echis carinatus</i>	16,000	Prothrombin-convertase activity; creates thrombin
Aggregation inhibitors			
PLA	<i>Vipera russelli</i>	N.D.	Reacts with the outer layer of the membrane
PLA	<i>Trimeresurus gramineus</i>	12,400	Interacts with macromolecules of the membrane, very likely with actomyosin
PLA	<i>Agkistrodon halys</i>	14,000	
Inhibitor without PLA activity	<i>Echis carinatus</i>	6,800	Interferes with the interaction of platelets and fibrinogen
ADPase	<i>Agkistrodon acutus</i> (acutin)	94,000	Hydrolyzes endogenous and exogenous ADP



ภาพประกอบ 20 การเปลี่ยนแปลงของเซลล์เมมเบรนเนื่องจากผลของเอนไซม์ฟอสโฟไลเปส
 A) แสดงการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของนิวโทรฟิลเนื่องจากผลของ Phorbol ester B) ผลของพิษงู
 TFV (*Trimeresurus flavoviridis* venom) ต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ RBC เป็น echino-
 spherocytes จากพิษงูส่วน crude และส่วนของฟอสโฟไลเปสเอทู C) ภาวะ crenate และ
 spherocytic cell อันเนื่องมาจากพิษงู *Vipera palestinae* (5 $\mu\text{g/ml}$) D) แสดงการบวมและมี
 การรั่วซึมออกของโพแทสเซียมไอออนเนื่องจาก menadione

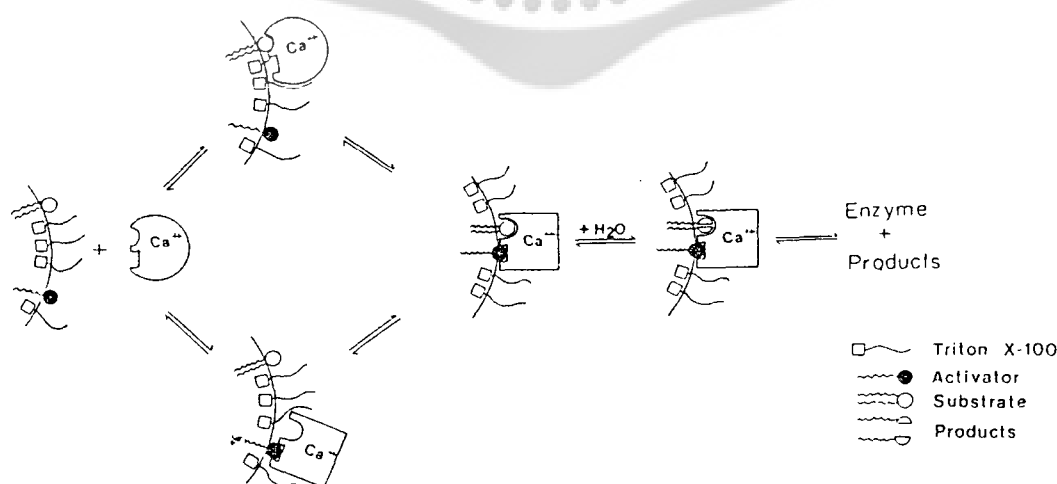
เอนไซม์

PLA₂ (EC3.1.1.4) เป็นเอนไซม์ในสิ่งมีชีวิตและใช้ในกระบวนการย่อยอาหาร และป้องกันตัว พบได้ใน สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม, สัตว์เลื้อยคลาน, แมลง และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังอื่น ๆ รวมทั้งพืชและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังชั้นต่ำ ตัวอย่างเช่น PLA₂ จาก ต่อมของพิษงู, ผึ้ง, แมงป่อง, และกิ้งก่าบางชนิด PLA₂ ที่พบในงูมีฤทธิ์ทำให้เสียชีวิตได้ เช่น งูเห่า (Cobras), งู kraits, งูทะเล (sea snake) , งู vipers พืชเหล่านี้มีบทบาททางการแพทยีกกล่าวคือทำให้เกิด anaphylatic Shock โดยเฉพาะเอนไซม์ PLA₂

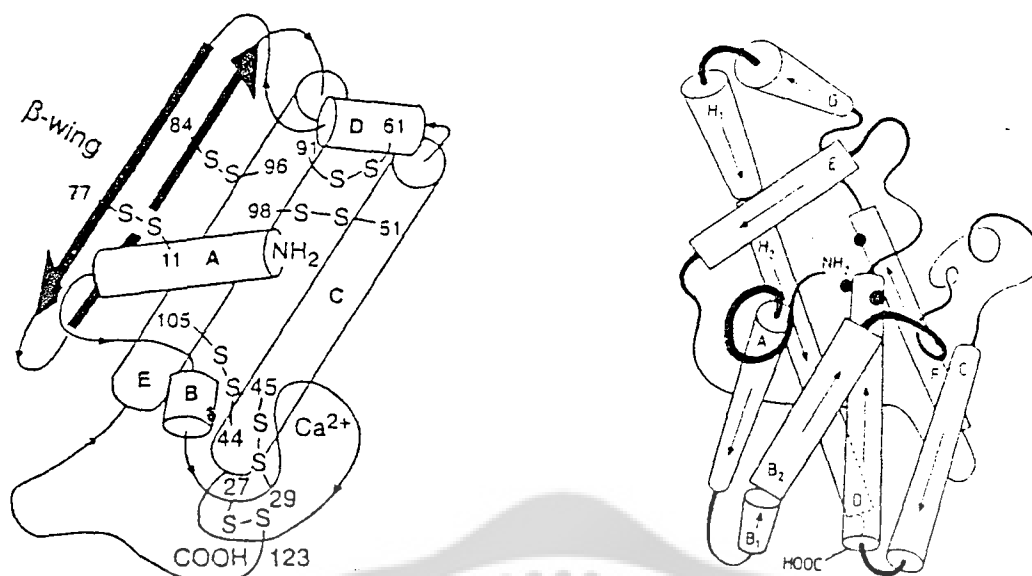
ปัจจุบัน พบว่า PLA₂ มีบทบาทในกระบวนการการสืบพันธุ์ (reproduction), ระบบภูมิคุ้มกันและภาวะภูมิแพ้ จากการศึกษาเอนไซม์ PLA₂ ต่อการปลดปล่อยกรดอะราชิโดนิก ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของพรอสตาแกลนดินและลิวโคไตรอิน (leukotrienes) โดยมีจีโปรตีน (G protein) เข้ามาช่วยด้วย

PLA₂ เป็นเอนไซม์ย่อยฟอสโฟลิปิดตรงตำแหน่ง Sn-2 (ดังรูป) ของกลีเซอรอล แล้วปลดปล่อยกรดไขมันเป็นอิสระ ดังรูป ในธรรมชาติฟอสโฟลิปิด มีหลายชนิด เช่น ฟอสฟาติดีลโคลีน (phosphatidylcholine, PC), ฟอสฟาติดีลเอธานอลเอมีน (phosphatidylethanolamine, PE), ฟอสฟาติดีลซีรีน (phosphatidylserine, PS), ฟอสฟาติดีลอิโนซิทอล (phosphatidylinositol PI), Platelet-activating factor (PAF), Plasmalogen, plasmenylcholine, 1-alkylether PC, และอื่น ๆ สารเหล่านี้พบกระจายอยู่ในรูปแบบต่าง ๆ เช่น ไมเซลล์ (ฟอสโฟลิปิด), เยื่อหุ้มเมมเบรน (membrane bilayers), monomeric

PLA₂ ทำหน้าที่ ย่อยฟอสโฟลิปิด ซึ่งพบอยู่ในรูปของเมมเบรนเอนไซม์ หรือรูปของเอนไซม์ที่หลั่งมานอกเซลล์ (soluble enzyme) การทำงานของ PLA₂ จากตับอ่อนหรืองูเห่า ต้องอาศัยพื้นผิวสำหรับเกาะ หรือฝังตัว (anchoring) เพื่อปรับเปลี่ยนโครงสร้าง (protein-lipid interaction) ให้เหมาะสม เพื่อทำการย่อยสลายสับสเตรท (substrate)

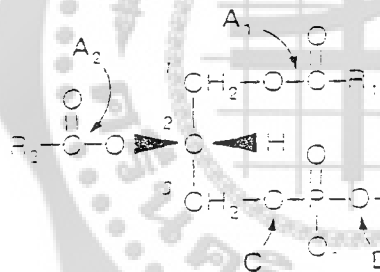


ภาพประกอบ 21 แบบจำลองการทำงานของเอนไซม์ PLA₂ โดยแสดงบริเวณเร่ง (active site)

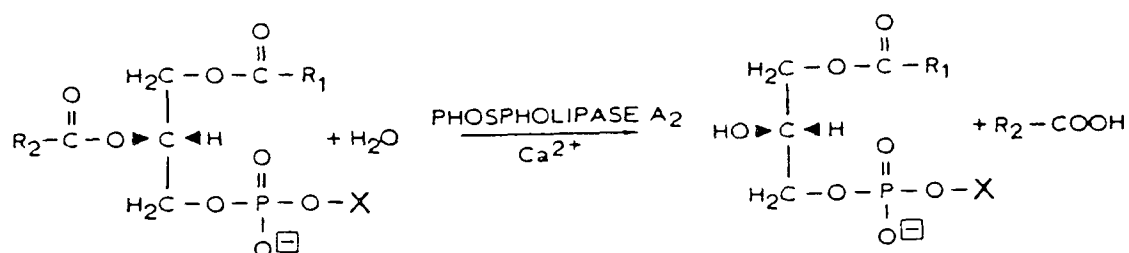


ภาพประกอบ 22 เปรียบเทียบโครงสร้าง 3 มิติของ เอนไซม์ PLA₂ กับ PLC เอนไซม์ PLA₂ ซึ่งมีแคลเซียมไอออนเป็นโคแฟกเตอร์มีพันธะไดซัลไฟด์อยู่ 7 ตำแหน่ง, PLC ซึ่งมี Zn²⁺ เป็นโคแฟกเตอร์

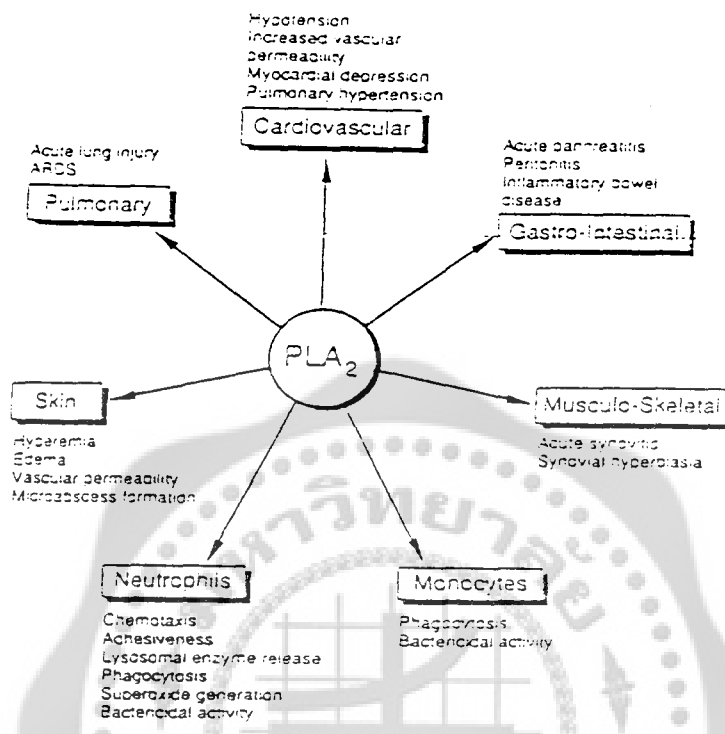
(A)



(B)



ภาพประกอบ 23 แสดงการทำงานของเอนไซม์ PLA₂ (A) ตำแหน่งการทำปฏิกิริยากับ สับสเตรทโดยเอนไซม์ฟอสโฟไลเปสชนิดต่างๆ (B) แสดงถึงการทำปฏิกิริยาแบบ Sn-2 ของเอนไซม์ซึ่งเป็นกรดอะซิโดนิคโดยปฏิกิริยาต้องอาศัยแคลเซียมไอออนเป็นโคแฟกเตอร์



ภาพประกอบ 24 แสดงพยาธิวิทยาที่เกิดจากเอนไซม์ PLA₂

Extracellular mammalian PLA₂

พบว่า Extracellular mammalian PLA₂ มีบทบาทสำคัญ 2 ประการคือ 1) PLA₂ แยกจากสัตว์เลื้อยคลานด้วยนม เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินอาหารและ 2) เกี่ยวข้องกับระบบ inflammation PLA₂ จากตับอ่อนสร้างอยู่ในรูปของไซโมเจน เมื่อเข้าสู่ระบบทางเดินอาหารจะถูกย่อยโดยทริปซิน ทำหน้าที่ย่อยสารประเภทฟอสโฟลิปิด แล้วพบอยู่ในเกลือน้ำดี (bile salt) นอกจากนี้ยังพบในปอด กระเพาะอาหาร ลำไส้เล็กและไต โดยพบยื่นอยู่ในโครโมโซมที่ 12

PLA₂ ที่มีบทบาทต่อ inflammation พบในช่องท้อง (peritoneal exudate), ในข้อเข่า (synovial fluid) ซึ่งมีบทบาทใน inflammation และ wound healing , ในเกล็ดเลือด (platelet), ในม้ามที่ทำการบดแล้ว และในรก (placenta)

Intracellular Mammalian Phospholipase A₂

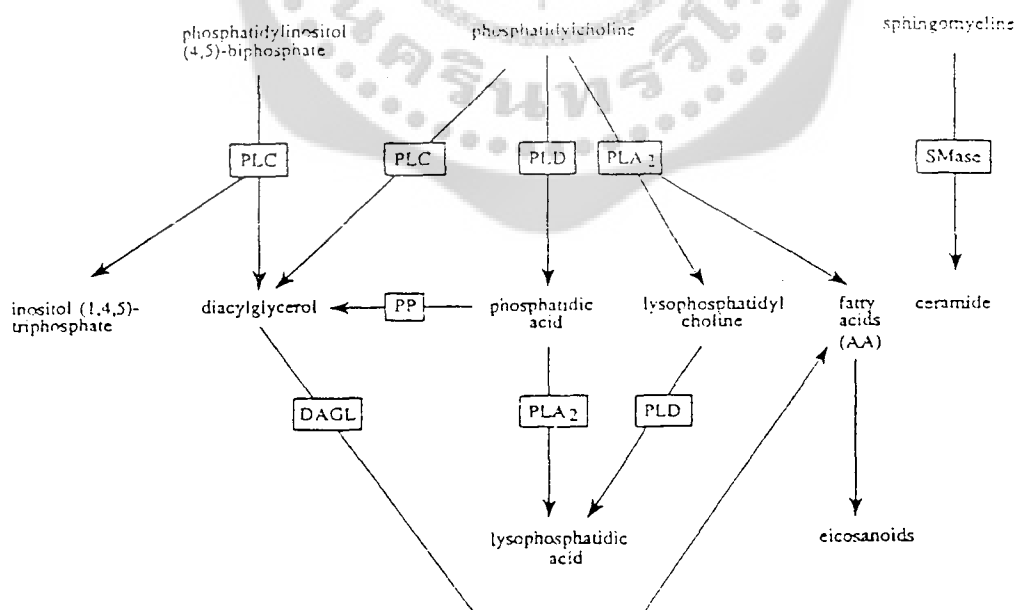
พบในไมโทคอนเดรียของตับ PLA₂ เป็นเอนไซม์ต้องการ Ca²⁺ (Divalent cation requirement) สามารถแบ่ง PLA₂ ทางจุลศาสตร์คือ pancreatic PLA₂ (ในหมูและวัว), Acid PLA₂ (*N. naja naja*) และ diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox* มีค่า Ca²⁺ affinity 10⁻⁴ M)

พิษซึ่ง มีองค์ประกอบของเอนไซม์ฟอสโฟไลเปสเอช มีบทบาทสำคัญต่อเยื่อหุ้มเมมเบรนโดยสามารถปลดปล่อยกรดอะราชิโดนิก พบว่ามีเมแทบอลิซึมมากมายภายในเซลล์ สารกลุ่มพรอสตานอยด์ (prostanoids) เป็นกลุ่มหนึ่งได้จากการทำปฏิกิริยาของ cyclooxygenase นอกจากนี้ lipoygenase ทำปฏิกิริยากับกรดอะราชิโดนิกจะได้ hydroperoxyeicosatetraenoic acid (HPETEs) และอนุพันธ์ไฮดรอกซีของ HETEs, ลิโค-ไตรอีน (LTs) และไลพอกซิน (lipoxin) สารในกลุ่ม HETEs เช่น LB4 มีบทบาทในขบวนการ anaphylactic มีผลต่อการหดตัวของหลอดเลือด การบีบตัวของเส้นเลือด และเพิ่มการซึมผ่านของหลอดเลือด ส่วน lipoxin A ทำให้หลอดเลือดบีบตัว

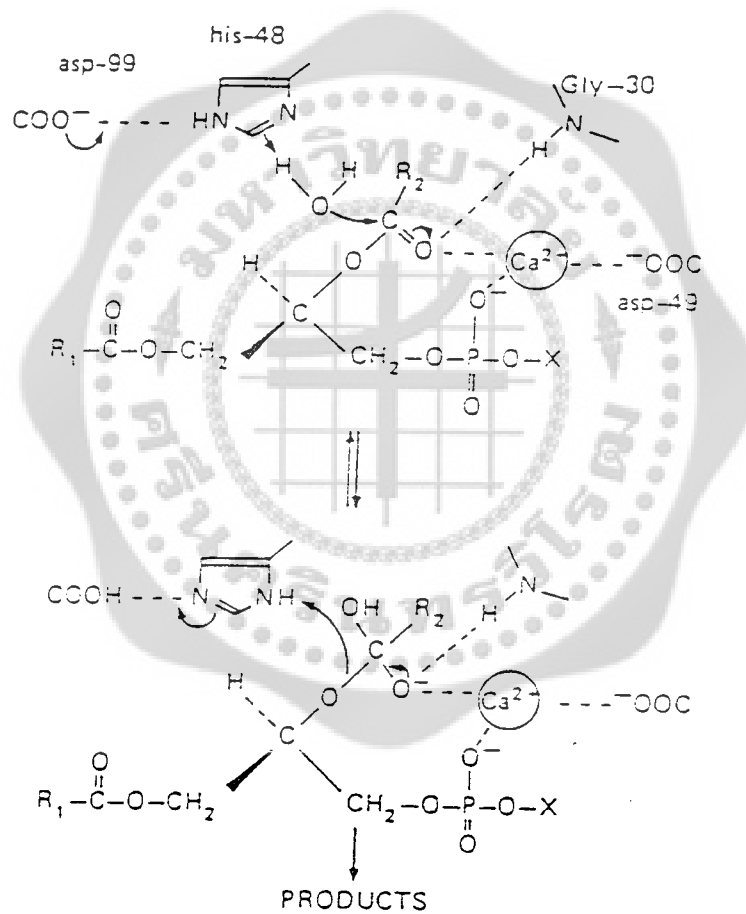
การบาดเจ็บของหลอดเลือดอาจรุนแรงขึ้นเนื่องมาจากการอักเสบวม (swell) เนื่องจากสาร PGs หรือ HETEs ย่อมก่อให้เกิดความเสียหายต่อพลาสมาเมมเบรนของหลอดเลือด ทำให้เซลล์ตายหรือหลุดลอก (detach) จาก basement membrane ทำให้เปิดชั้น subendothelium ต่อระบบไหลเวียนโลหิตกระตุ้นเกร็ดเลือด ๆ ปลดปล่อยสาร (TXA₂, ADP) เกิดการเกาะกลุ่ม (aggregate) และปลดปล่อยสาร (content) ผ่านทางระบบ SCS (surface cannicular system)

สารปลดปล่อยออกมาทำหน้าที่คือ ดึงดูด (chemotaxis) ได้แก่ PAF, PDGF PDGF เป็น mitogen ที่มีฤทธิ์แรงต่อไฟโบรบลาสต์, grill cell และกล้ามเนื้อเรียบ (ถูกยับยั้งได้ด้วย alpha-2-macroglobulin) PDGF มีฤทธิ์เป็น chemotaxis ต่อนิวโทรฟิล, โมโนไซต์, กล้ามเนื้อเรียบและไฟโบรบลาสต์ ทำให้มี proliferation ของกล้ามเนื้อเรียบ

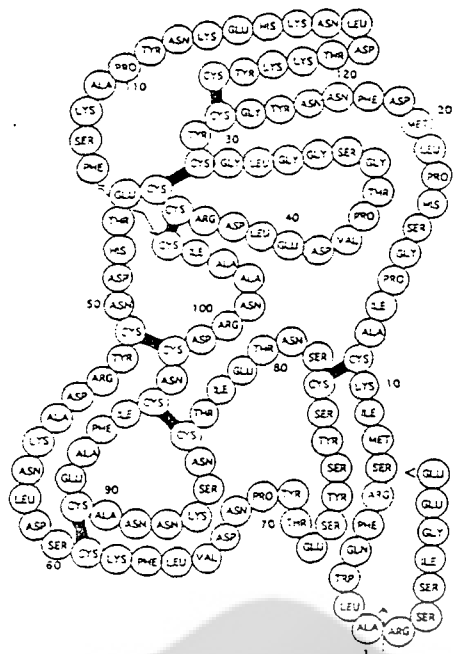
PAF เกิดจากเซลล์บุผิวหลอดเลือดถูกกระตุ้นโดย thrombin หรือ ลิโค-ไตรอีน PAF จะจับเกร็ดเลือด



ภาพประกอบ 25 แสดงการทำงานของเอนไซม์กลุ่มฟอสโฟไลเปสมีผลต่อการเกิด inflammation



ภาพประกอบ 26 แสดงการย่อยสลายสเตรทตรงตำแหน่งเร่งปฏิกิริยา (His-48, Gly-30, Asp-49) ของเอนไซม์ PLA₂

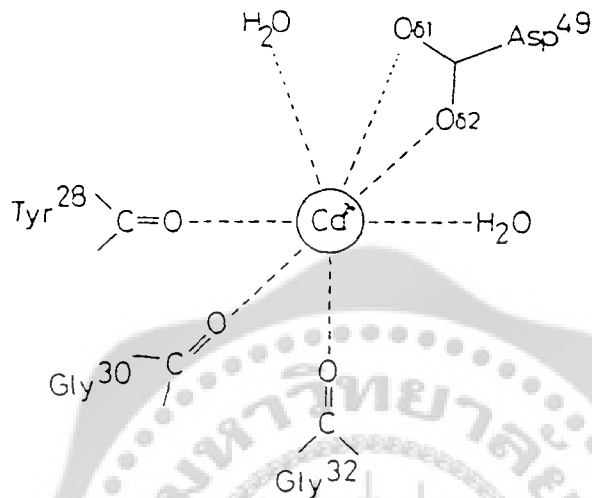


ภาพประกอบ 27 แสดงลำดับกรดอะมิโนของโปรเอ็นไซม์ของ PLA₂ (zymogen) และตำแหน่งพันธะไดซัลไฟด์ 7 ตำแหน่งโดยปลายด้าน N จะถูกย่อยได้ด้วยเอนไซม์ทริปซินตรงตำแหน่ง Arg-Ala

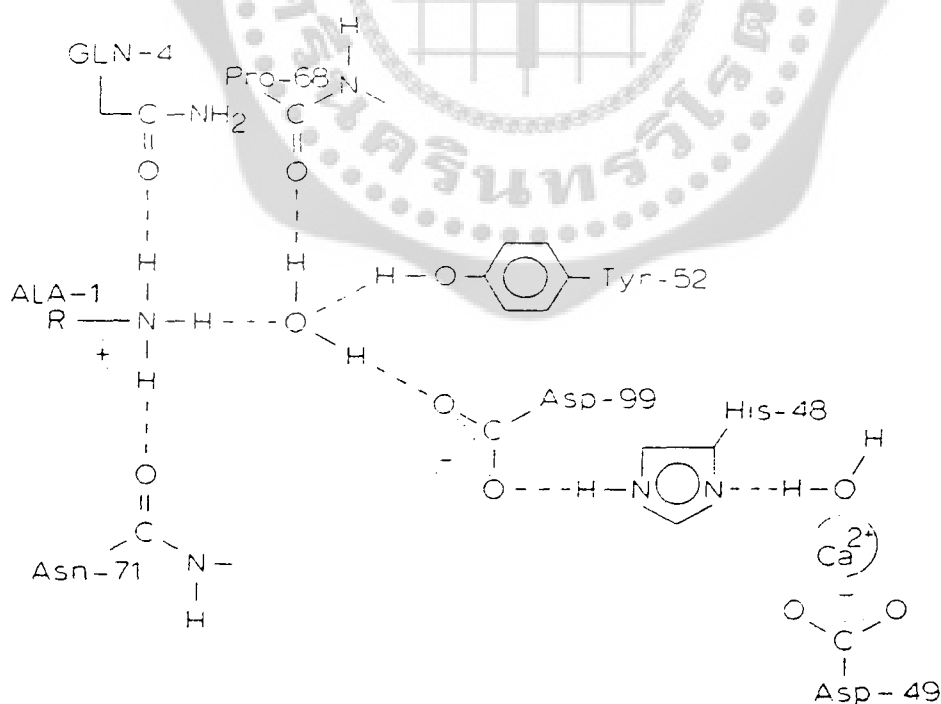


1	Q	2	N	3	E	4	R	5	D	6	L	7	R	8	K	9	L	10	G	11	C	12	G	13	G	14	E	15	R	16	T	17	E	18	S	19	D	20	R	21	L	22	H	23	K	24	R	25	L	26	H	27	K	28	L	29	V	30	D	31	K	32	S	33	K	34	K	35	K	36	V	37	V	38	K	39	V	40	V	41	K	42	K	43	K	44	K	45	K	46	K	47	K	48	K	49	K	50	K	51	K	52	K	53	K	54	K	55	K	56	K	57	K	58	K	59	K	60	K	61	K	62	K	63	K	64	K	65	K	66	K	67	K	68	K	69	K	70	K	71	K	72	K	73	K	74	K	75	K	76	K	77	K	78	K	79	K	80	K	81	K	82	K	83	K	84	K	85	K	86	K	87	K	88	K	89	K	90	K	91	K	92	K	93	K	94	K	95	K	96	K	97	K	98	K	99	K	100	K	101	K	102	K	103	K	104	K	105	K	106	K	107	K	108	K	109	K	110	K	111	K	112	K	113	K	114	K	115	K	116	K	117	K	118	K	119	K	120	K	121	K	122	K	123	K	124	K	125	K	126	K	127	K	128	K	129	K	130	K	131	K	132	K	133	K	134	K	135	K	136	K	137	K	138	K	139	K	140	K	141	K	142	K	143	K	144	K	145	K	146	K	147	K	148	K	149	K	150	K	151	K	152	K	153	K	154	K	155	K	156	K	157	K	158	K	159	K	160	K	161	K	162	K	163	K	164	K	165	K	166	K	167	K	168	K	169	K	170	K
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---

ภาพประกอบ 28 แสดงการเปรียบเทียบลำดับอนุกรมของกรดอะมิโนของเอนไซม์ PLA₂ (อักษรย่อ) ในงูและสัตว์ชนิดต่าง ๆ

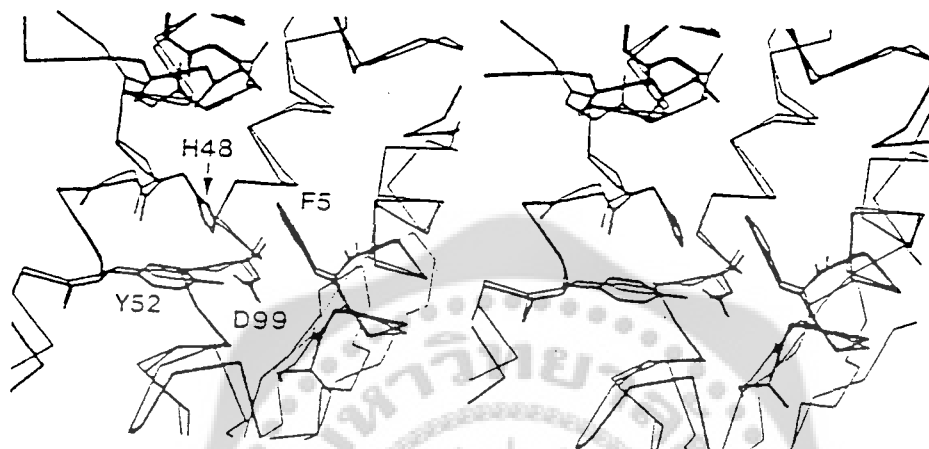


ภาพประกอบ 29 แสดงบทบาทของโมเลกุลต่อเอนไซม์ โมเลกุลของออกซิเจน (O_2) 7 โมเลกุล เกาะอยู่กับแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) ตรงตำแหน่งบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ PLA_2

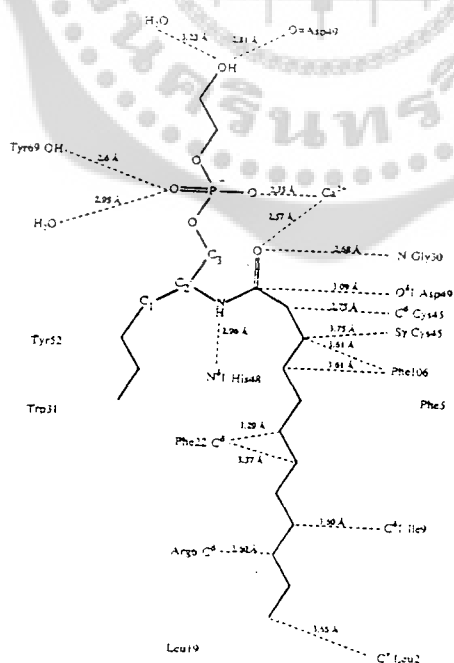


ภาพประกอบ 30 แสดงตำแหน่งปลายด้าน N (Ala) เข้าร่วมกับบริเวณเร่ง เกิดปฏิกิริยาแบบ ไฮโดรเจนบอนด์ (H-bond) กับจุดเร่งปฏิกิริยาตำแหน่งที่ Asp-99 และ His-48 โดยมีน้ำเป็นตัวเชื่อม ส่วนแคลเซียมไอออนมีโมเลกุลของน้ำเข้ามาร่วมตำแหน่ง Asp-49 และ His-48

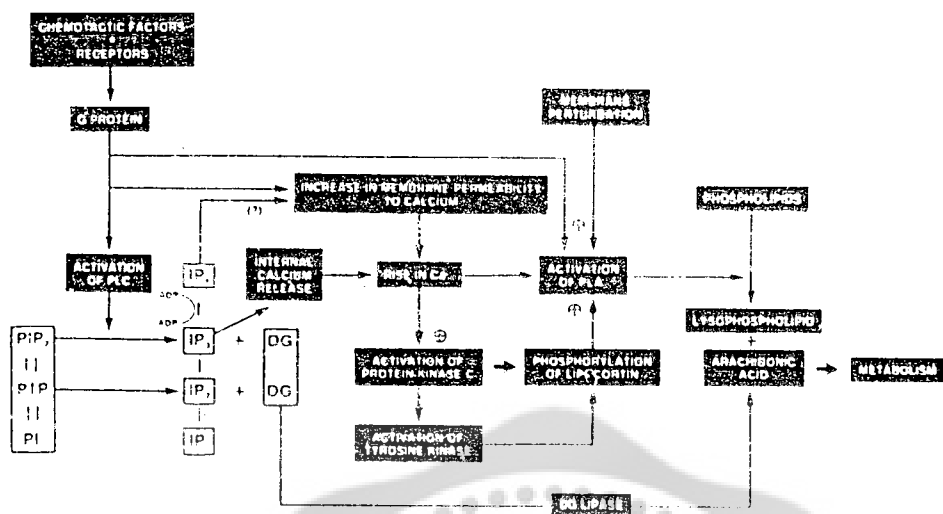
สารยับยั้งสำหรับ PLA₂ (R)-2- dodecanoyl-amino-1-hexanol-phosphoglycol (amide)
or (R)-1-O-yl -2 heptylphosphonyl-glycero-3-phospho-ethanolamine (phosphonate) ทั้ง
2 ตัวจับแทนตำแหน่ง ของ แคลเซียม (Woolley & Stedden., 1994)



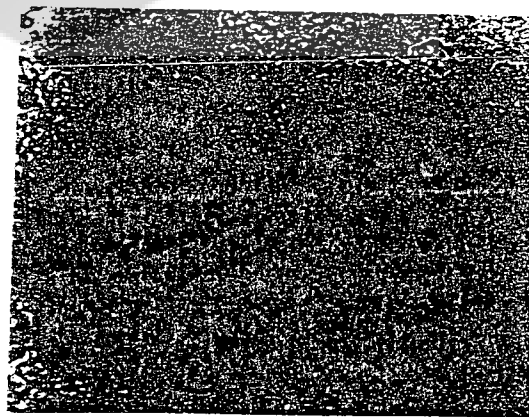
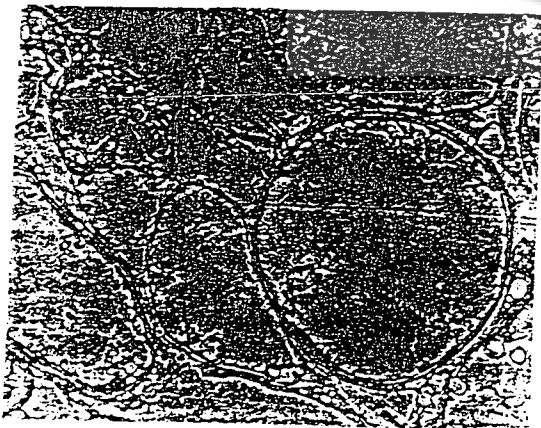
ภาพประกอบ 31 แสดงตำแหน่งบริเวณเร่งของเอนไซม์ PLA₂ ซึ่งได้จากการถ่ายภาพ X-ray
ผลึกของเอนไซม์ PLA₂



ภาพประกอบ 32 แสดงการจับของ (R) 2-dodecanoyl-amino-1-hexanol-phosphoglycerol
(amide) กับบริเวณเร่งของเอนไซม์ PLA₂



ภาพประกอบ 33 แสดงบทบาทของฟอสโฟไลเปส ซี ที่มีผลทำให้เซลล์มีการหดตัว (contraction) หรือเซลล์วมก็มิกลไกรวมกับ PLA_2 ทำให้พยาธิสภาพของเซลล์มีลักษณะเป็นไปแนวเดียวกันดังกลไก



ภาพประกอบ 34 แสดงบทบาทของฟอสโฟไลเปสซี ที่มีผลทำให้เซลล์ประสาทมีการวมแล้วแตกสลาย

ไตเป็น solid organ ที่มีหน่วยเล็กที่สุดในการทำงานเรียกว่า เนฟรอน (nephron) ใน 1 เนฟรอน ประกอบด้วย โกลเมอรูลัส (glomerulus), proximal convoluted tubule, long loop of Hele (Descending limb ผนังบางและ ascending limb ผนังหนา), distal convoluted tubule และ collecting tubule

หน้าที่หลักของไตมีอยู่ 2 ประการคือ ขจัดของเสียที่เป็นส่วนเกินอยู่ในเลือดที่เกิดจากเมแทบอลิซึม (metabolism) หรือได้รับจากภายนอกโดยกรองผ่าน โกลเมอรูลัส และหน้าที่รักษาสภาพสิ่งแวดล้อมภายนอกเซลล์ให้คงที่อยู่เสมอ เช่น ดุลย์น้ำ, พีเอช, ดุลย์กรด-ด่าง, ดุลย์อิเล็กโตรไลต์และความดันออสโมติก (osmotic pressure) โดยอาศัยทิวบูล (tubule) เป็นตัวดูดกลับ (reabsorbtion) หรือขับถ่าย (secretion)

โครงสร้างและการทำงานของไต ไตประกอบด้วย 1) โกลเมอรูลัส 2) หลอดฝอยไต (renal tubule) 3) หลอดเลือดที่นำเลือดมาเลี้ยงไต รวมทั้งแขนงย่อยหลอดเลือดเหล่านั้น และ 4) เนื้อเยื่อแทรกไต (interstitial tissue) โกลเมอรูลัสทำหน้าที่ กรองพลาสมาจากหลอดเลือดไปสู่ Bowman's space เพื่อสร้างน้ำปัสสาวะ ไตขับสารต่าง ๆ ออกทางปัสสาวะ โดยอาศัยกลไก 2 ส่วนคือ การกรองผ่านโกลเมอรูลัส (glomerular filtration) การปรับเปลี่ยนเซลล์หลอดฝอยไต ซึ่งอาจเป็น tubular secretion หรือ tubular reabsorbtion

การวัดประสิทธิภาพการทำงานของไต

1. การหาค่าซีรัมครีเอตินิน (serum creatinine) ครีเอตินินเป็นผลผลิตจากเมแทบอลิซึมของครีเอตินิน (creatinine) ในกล้ามเนื้อถูกขับออกทางไต โดยกระบวนการกรองผ่านโกลเมอรูลัสเป็นส่วนใหญ่ เมื่อไตทำงานบกพร่อง ค่าอัตราการกรองพลาสมาที่โกลเมอรูลัส (GFR) ลดลง ทำให้อัตราการขับครีเอตินินออกทางปัสสาวะลดลงตามปริมาณครีเอตินินในเลือดจะสูงขึ้นเป็นปฏิกิริยาผกผัน โดยมีความสัมพันธ์แบบ hyperbolic curve ถ้าค่าซีรัมครีเอตินินเพิ่มเป็น 2 มิลลิกรัม/ เดซิลิตร GFR มักเหลือเพียงประมาณร้อยละ 40 - 50 ของค่าปรกติ และเมื่อซีรัมครีเอตินินเพิ่มเป็น 3 และ 4 มิลลิกรัม/ เดซิลิตร GFR มักเหลือเพียงประมาณร้อยละ 20 - 30 และ 15 - 20 ตามลำดับ และเมื่อซีรัมครีเอตินินเท่ากับ 10 มิลลิกรัม/ เดซิลิตร GFR มักเหลือเพียงประมาณร้อยละ 1 - 2 ของค่าปรกติเท่านั้น

creatinine clearance test หลักการเป็นการหาค่าครีเอตินินถูกกำจัด ออกจากพลาสมา หรือซีรัมในเวลาที่กำหนด เพื่อช่วยบอกถึง GFR ของไตทั้ง 2 ข้างรวมกันโดยการวัดปริมาณของปัสสาวะในเวลาที่กำหนดและปริมาณของครีเอตินินในพลาสมาและในปัสสาวะ

$$\text{creatinine clearance} = \frac{U \times V}{S}$$

V (volume) = ปริมาณของปัสสาวะ ml/min (เก็บปัสสาวะ 24 ชม.)

U (urine) = ครีเอตินินในปัสสาวะ mg/dL

S (serum) = ครีเอตินินในซีรัม mg/dL

(ปราณี สิงห์ประเสริฐ, กุมรา ดา ละลักษณะ และ เบญจวรรณ รุ่งนิตะรังษี. 2529)

2. การวัดค่าการกรองผ่านโกลเมอรูลัส (glomerular filtration, GFR) GFR หมายถึง อัตราการกรองของสารน้ำ (plasma) จากหลอดเลือดฝอยเล็ก ๆ ในไตผ่าน glomerular basement membrane ออกไปสู่ Bowman's space หน่วยของ GFR คือ มิลลิลิตร / นาที (เกรียง ตั้งสง่า, ถนอม สุภาพร และ บุญธรรม จิระจันทร์. 2537.)

ปัจจัยควบคุม GFR มี 3 ปัจจัย

1. แรงดันที่เกิดขึ้นที่ capillary wall glomeruli
2. อัตราการไหลของพลาสมาผ่านโกลเมอรูล
3. permeability และพื้นที่ผิวของ filtering capillaries

สาเหตุ ความผิดปกติของ GFR คือ 1) มีการลดลง glomerular hydrostatic pressure 2) Bowman's space hydrostatic pressure เพิ่มขึ้น 3) plasma oncotic pressure เพิ่มขึ้นมาก 4) Renal blood flow ลดลง 5) permeability หรือ พื้นที่ผิวของ filtering capillaries ลดลง การลดลงของ GFR ทำให้ไม่สามารถขับของเสีย จึงมีสารนั้นเกินกว่าปกติอยู่ในเลือดของเสียดังกล่าว เช่น ครีเอตินิน, BUN (blood urea nitrogen)

ทิวบูล

ทำหน้าที่การควบคุมน้ำ, อิเล็กโทรไลต์ (electrolyte) และกรดต่าง เพื่อปรับสมดุลของ ECF ซึ่งมี osmolarity แคบเพียง 280 - 290 mosmol/ kg ส่วน proximal tubule ทำการ reabsorb filtrate ได้แก่ สารน้ำ, กลูโคส, กรดอะมิโน, Na^+ , Cl^- , HCO_3^- , K^+

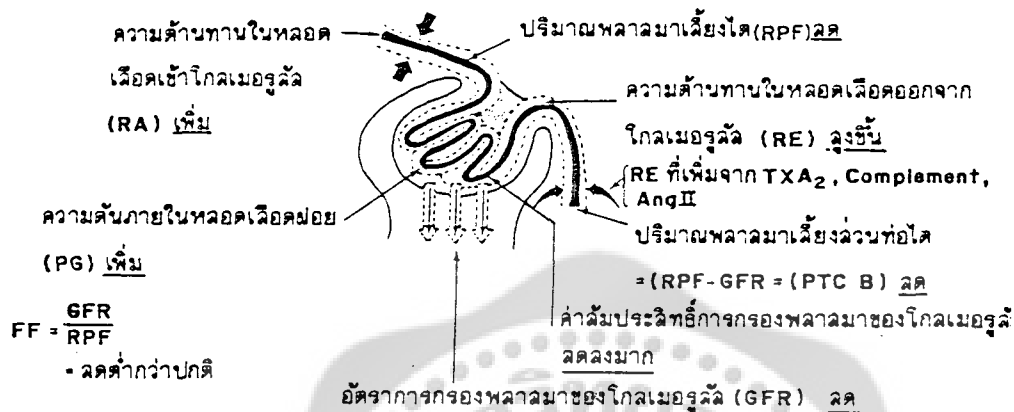
Thin limb of Henle's loop น้ำไม่สามารถผ่านผนัง เว้นแต่อิเล็กโทรไลต์ โดยเฉพาะ Cl^- ซึ่งถูกปั๊มออกสู่ interstitial fluid ทำให้ Na^+ และ Cl^- ออกไปได้จนเป็น hypoosmolar urine (ปราณี สิงห์ประเสริฐ และภุมรา ตาละลักษณ์. 2539)

ผลที่ได้รับจากการเกิด ATN

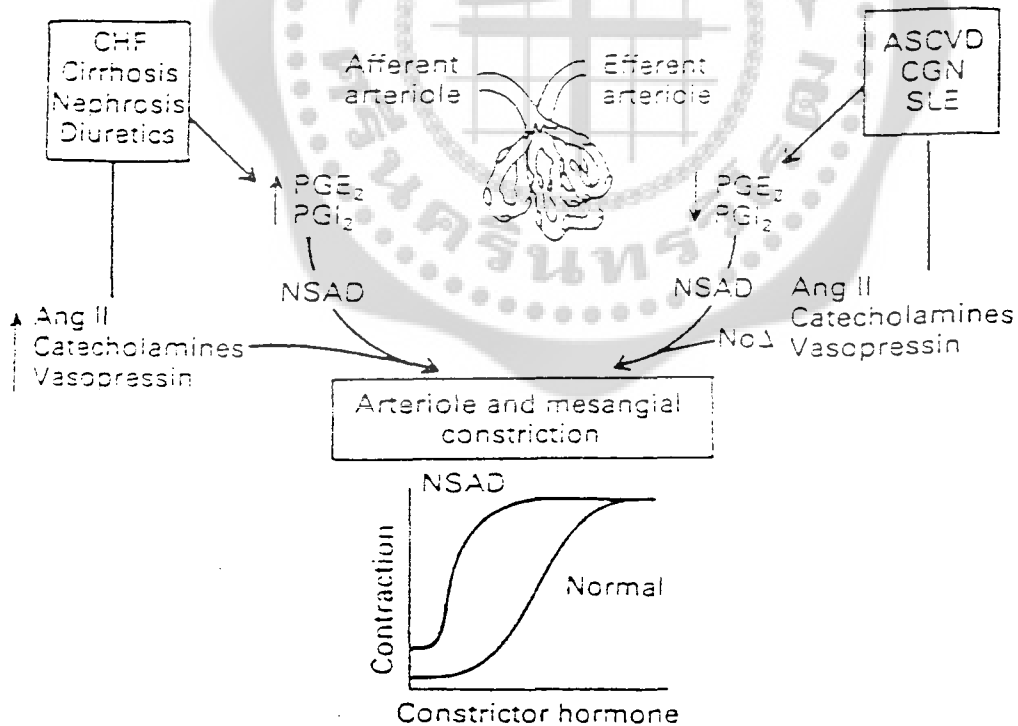
1. ภาวะ ATN ไม่สามารถขับน้ำหรือเกลือแร่ผ่านทางปัสสาวะได้
2. หากไตไม่ทำงานเกิดการคั่งของโซเดียม
3. โปแทสเซียมจะออกจากเซลล์ทำให้มีระดับในเลือดสูงขึ้น
4. ภาวะ acidosis จะมีการคั่งของ H^+
5. ฟอสฟอรัสและแมกนีเซียม ภาวะไตวายร่างกายจะขับออกไม่ได้ทำให้ระดับในเลือดสูงขึ้น
6. สำหรับแคลเซียมจะมีระดับต่ำกว่าปกติ

(คณะกรรมการการศึกษาต่อเนื่องวชิรพยาบาล. 2537)

แสดงการเปลี่ยนแปลงทางโลหิตพลศาสตร์ในไต (intrarenal hemodynamics) ในไตอีกเสบของไกลเมอรูลัสชนิดเฉียบพลัน



ภาพประกอบ 35 แสดงการเปลี่ยนแปลงทางโลหิตพลศาสตร์ในไต ในไตอีกเสบของไกลเมอรูลัสชนิดเฉียบพลัน



ภาพประกอบ 36 แสดงกลไกควบคุมระบบการไหลเวียนโลหิตของไตในไตซึ่งมีพยาธิสภาพต่างๆ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับว่าระดับของฮอร์โมนที่มีผลต่อ vasoconstriction หรือต่อ vasodilation อันใดจะมีฤทธิ์มากกว่ากัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพยาธิสภาพของ endothelial cell และ mesangial cell

ภาวะไตวาย (Acute renal failure)

หมายถึง ภาวะไตทำหน้าที่ลดลงโดยเฉียบพลัน ทำให้จำนวนปัสสาวะลดลงเหลือน้อยกว่า 400 มล./วัน เกิดการคั่งของ ๑ เสีย และมีการเปลี่ยนแปลงสภาพต่าง ๆ ในร่างกายบางครั้ง จำนวนปัสสาวะไม่ลดลงก็ได้แต่มีระดับ BUN และครีเอตินิน (creatinine) เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ

ภาวะไตวายเฉียบพลันจำแนกตามสาเหตุ 1. pre renal cause 2. renal cause 3. post renal cause

1. Pre renal cause พบสาเหตุมีการสูญเสียน้ำ เช่น การอ้วกเสบ, ตกเลือด, การมีภาวะมีปริมาตรน้ำนอกเซลล์ (ECFV) มากกว่าปรกติ ซึ่งผู้ป่วยเหล่านี้มี effective arterial volume ลดลง ปกติเลือดไปเลี้ยงไตประมาณ 20% ของเลือดที่ออกจากหัวใจหรือประมาณ 1 ลิตร/นาที ถ้าเลือดออกจากหัวใจได้น้อยลงหรือความดันต่ำลง ทำให้เกิด vasoconstriction เลือดไปเลี้ยงไตน้อยลง glomerular filtration rate (GFR) ลดลง tubule มีการดูดซึ่มกลับของน้ำและเกลือแร่เพิ่มขึ้นทำให้จำนวนปัสสาวะลดลง และมีความเข้มข้นมากขึ้น แต่ระดับโซเดียมในปัสสาวะกลับลดลง

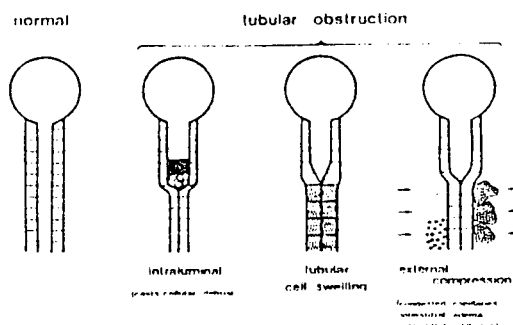
2. renal cause เกิดจากการมีพยาธิสภาพของเนื้อไตเองมากกว่า 80% เกิดจาก acute tubular necrosis (ATN) ซึ่งเป็นผลจากไตขาดเลือดมาเลี้ยงหรือได้รับสารที่เป็นพิษ ภาวะที่ไตขาดเลือดมาเลี้ยงอาจเกิดจาก pre renal cause ที่มีอาการรุนแรงหรืออยู่นาน ทำให้เกิดพยาธิสภาพที่ไตด้วย ซึ่งพิษงูแมวเซา (RVV) ก็มีพิษต่อไตด้วย

กลไกการเกิด ATN อาจมีสาเหตุจาก

1. มีการดูดซึ่มกลับ filtrate เข้าไปในเส้นเลือดที่มาเลี้ยงทิวบูล โดยผ่านทาง tubular cell ที่ถูกทำลาย (Back filtration) ทำให้ส่วนที่ออกมาเป็นน้ำปัสสาวะหรือของเสียขับออกมาน้อยลง

2. มีการอุดตันของท่อไตจากเศษของเซลล์ต่าง ๆ (RBC) หรือเซลล์บวม (inflammation) ไปอุดตันทิวบูล ทำให้ความดันใน tubule สูงขึ้นต้านกับความดันของ GFR

3. เลือดไปเลี้ยงไตน้อยลง โดยเฉพาะบริเวณคอร์เทกซ์ (cortex) จะมี afferent arteriole constriction แต่ efferent arteriole กลับมี dilatation ทำให้เลือดผ่านโกลเมอรูล (glomeruli) โดยไม่มีการกรองเกิดขึ้น



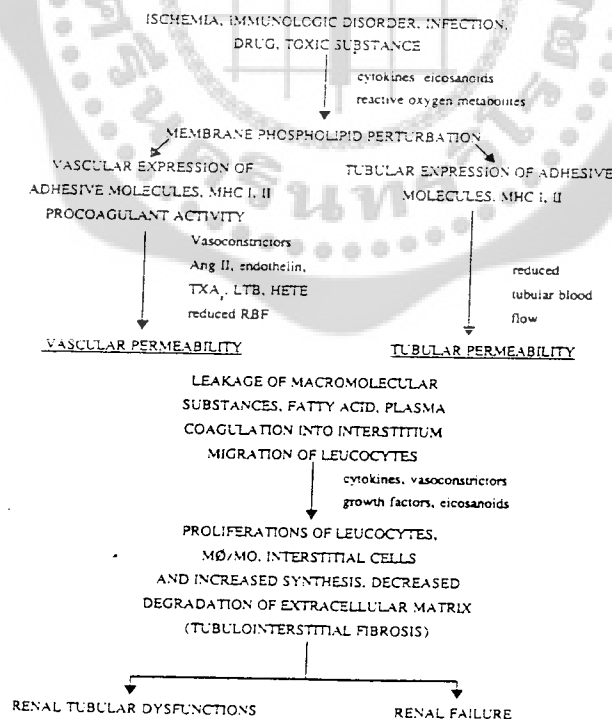
ภาพประกอบ 37 แสดงการอุดตันของท่อไตจากสาเหตุต่างๆ

บทบาทของเกร็ดเลือดต่อความผิดปกติของไต พบว่าตัวเกร็ดเลือดผิดปกติ เช่น เกร็ดเลือดมีการเกาะกลุ่มผิดปกติ เกร็ดเลือดนี้เมื่อไหลเข้าหลอดเลือดฝอยของไต (renal microcirculation) จะถูกยึดโดย adhesive molecule เช่น Von Willebrand factor ตัวเกร็ดเลือดจะหลั่งสารที่เป็นผลจากการกระตุ้น arachidonic acid cascade ออกมาเช่น platelet activating factor (PAFs), Thromboxane A₂ (TXA₂) พวกอีโคซานอยด์ (eicosanoid) ต่าง ๆ และ reactivite oxygen radical สารที่ถูกขับออกมานี้จะไปทำลายส่วนของพอสโพลิปิดในเมมเบรน ทำให้เซลล์บุผิวในหลอดเลือดฝอยปล่อยสารกรดอะราชิโดนิกเพิ่มมาอีก ผ่านกระบวนการ arachidonic cascade เช่นเดียวกันแล้วหลั่งสารที่ทำให้ไตอักเสบ เซลล์บุผิวในหลอดเลือดฝอยจะสูญเสียความสามารถในการสร้างสารเคลือบผิวที่มีประจุไฟฟ้าชนิดลบ (sialoprotein) ได้ทำให้มีการสูญเสียโปรตีนและการอักเสบจะมีการกระตุ้นเกร็ดเลือดตลอดเวลาทำให้เกร็ดเลือดถูกทำลายไปเรื่อย ๆ อายุของเกร็ดเลือดจึงคงสั้นเป็นเวลานาน

กล่าวโดยสรุป RVV มีผลทางตรงและทางอ้อมต่อเกร็ดเลือด

1. เกิดภาวะจำนวนเกร็ดเลือดต่ำ มีการใช้เกร็ดเลือดในภาวะการเกิดลิ่มเลือดในภาวะ DIC
2. หน้าที่ของเกร็ดเลือดผิดปกติ เนื่องจากการทำลายไฟบริน ทำให้เกิดผลผลิต

FDP (fibrin degradation product) การคั่งของ FDP มีผลทำให้ผิวของเกร็ดเลือดผิดปกติ เกร็ดเลือดจึงทำหน้าที่ได้น้อยลง (สุรพล อิศรไกรศิลป์, 2536)



ภาพประกอบ 38 แสดงกลไกการเกิด tubulointerstitial Nephropathy จากสาเหตุส่วนใหญ่ และจากที่เกิดร่วมกับโรคไตอักเสบรุนแรงชนิดต่างๆ

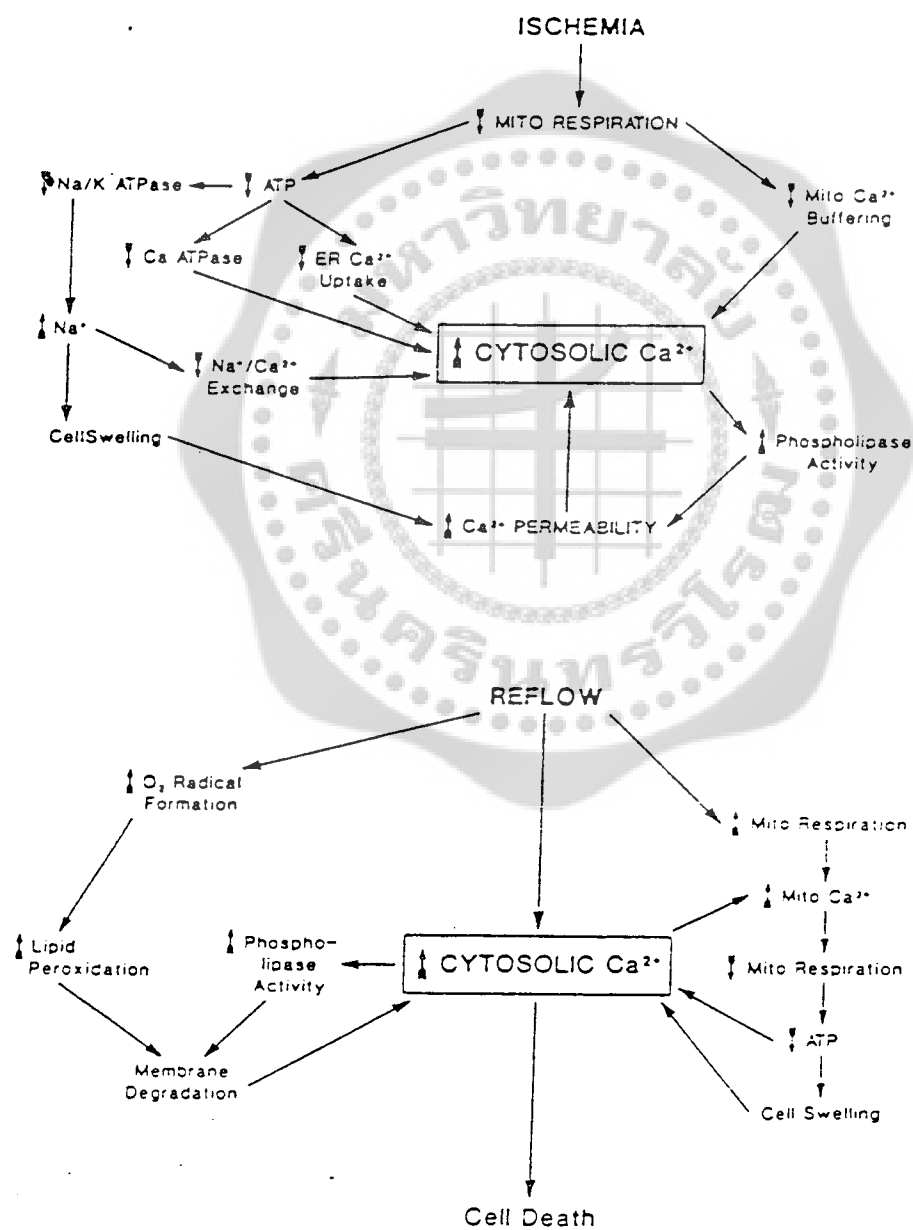
พยาธิสภาพของไตเป็นการศึกษาเพื่อ 1) สาเหตุการเกิดโรค (etiology) 2) พยาธิกำเนิด (pathogenesis) 3) การเปลี่ยนแปลงรูปร่างหรือโครงสร้าง (morphologic change) 4) การเปลี่ยนแปลงในหน้าที่การทำงาน (functional alteration)

ภาวะเลือดออกผิดปกติพบได้บ่อยในผู้ป่วยไตวายเรื้อรัง สาเหตุเกิดจากความผิดปกติของทั้งหน้าที่ของเกร็ดเลือด และปัจจัยการแข็งตัวของเลือด บางรายมีจำนวนเกร็ดเลือดต่ำ เกร็ดเลือดมีหน้าที่ผิดปกติมี platelet aggregation, platelet adhesiveness ลดลง มีความผิดปกติของ platelet factors-3, platelet ADP, และ ATP ลดลง

ภาวะไตวายเรื้อรัง (chronic renal failure) ไตเป็นอวัยวะเกี่ยวข้องกับการสร้างเม็ดเลือด โดยสร้างฮอร์โมนอีริโทรพอยอิติน (erythropoietin) เมื่อมีไตวาย มักมีโลหิตจางเกิดขึ้น ผู้ป่วยไตวายเรื้อรัง และมีระดับครีเอตินีนมากกว่า 6 มก./ดล. จะมีภาวะโลหิตจางเกิดขึ้น เม็ดเลือดแดงมักมีขนาดปกติ ดิสซีปรกติ อาจพบเซลล์ รูปร่างผิดปกติ เช่น เศษชิ้นส่วนของเซลล์ (fragmented cell), เซลล์รูปหยดน้ำ (tear drop cell), เซลล์มีซี่ขีดจาง (burr cell) และ schistocyte จำนวนเรติคูลโลไซท์ (reticulocyte) ต่ำ

ภาวะไตขาดออกซิเจนจะกระตุ้นการหลั่งอีริโทรพอยอิตินมากขึ้น ซึ่งจะมีผลให้มีการสร้างเม็ดเลือดแดงในไขกระดูก โดยกระตุ้นให้มีการแบ่งตัวและมีการเปลี่ยนแปลง erythroid progenitor cell และ early erythroid precursor cell (สุรพล อิศรไกรศิลป์, 2536)

พยาธิสรีรของเซลล์ไตขาดเลือด (Pathophysiology of renal cell ischemia) ภาวะการขาดเลือดทำให้เกิดพยาธิสภาพต่อเซลล์ไตโดยตรง โดยขึ้นกับระยะเวลาที่ขาดเลือด (ischemia time) และระยะที่มีเลือดกลับมาเลี้ยงเซลล์ไตใหม่ (reperfusion) ซึ่งจะพบการเปลี่ยนแปลงผนังเซลล์ เช่น เซลล์ไมโทคอนเดรีย, เซลล์เยื่อหุ้มเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม, กระทบต่อหน้าที่ของเซลล์เมมเบรน เช่น บทบาทของ Na - K ATPase ทำให้เซลล์ยอมให้ Na⁺ และ Ca²⁺ ผ่านเข้าสู่เซลล์มากขึ้น แต่มีระดับโพแทสเซียมภายในเซลล์ลดลง ปริมาตรของเซลล์เพิ่มขึ้น กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ภายในเซลล์โดยเฉพาะ PLA₂, โปรตีเอส (protease), ออกซิเดส (oxidase) ทำยาสเซลล์มีการย่อยสลายตัวเอง โดยหลอดเลือดไม่สามารถสร้าง PGI₂ และ EDLF ได้อีกต่อไป ทำให้การตอบสนองต่อการหดตัวสูงกว่า (vasoconstriction) เสริมภาวะ bleb ยื่นออกมา ทำยาสเซลล์แตก กลายเป็น cast อุดท่อไต เกิด back pressure ต่อโกลเมอรูลัสได้ ผลก็คือเกิดภาวะไตวายเฉียบพลัน



ภาพประกอบ 39 แสดงภาวะการขาดเลือดของไต (ประสิทธิ์ พุตระกูล และนริสรา พุตระกูล. 2537)

ผลของพิษงูต่อไต

ไตเป็นอวัยวะที่มีเส้นเลือดเล็ก ๆ มากมาย ดังนั้นปัญหาต่อไตอันเนื่องมาจากพิษงูจึงมีมากตามไปด้วย อาการทางคลินิกที่พบ

Proteinuria ภาวะรั่วซึมของโปรตีนในปัสสาวะ มักพบปริมาณต่ำกว่า 1 กรัม/ 24 ชั่วโมง ในประเทศพม่า พบว่าผู้ที่ถูกงูแมวเซากัด สามารถตรวจพบโปรตีนในปัสสาวะ เนื่องมาจากการเพิ่มการซึมผ่านจากโกลเมอรูลาร์ นอกจากนี้ยังพบฮีโมโกลบินในปัสสาวะด้วยเช่นกัน

Hematuria ภาวะมีฮีโมโกลบินในน้ำปัสสาวะ จากการศึกษาก้อนกล้อง light microscope อาจเนื่องมาจากสาเหตุเลือดออกจากภาวะความผิดปกติของการแข็งตัวของเลือด หรือจากภาวะการทำลายหลอดเลือด เนื่องจากพิษงูเอง ภาวะเนื้อไตตาย (infarction) อาจเป็นสาเหตุมีฮีโมโกลบินรวมทั้งการปวดหลังร่วมด้วย

Renal failure ภาวะไตวายพบในผู้ป่วยที่ถูกงูสกุลต่าง ๆ กัด เช่น งูทะเล, งูแมวเซา (Russell's viper), Puffadder, sawscale, Bothrops javavaca, crotalid snake, tiger snake และงู Agkistrodon ในประเทศไทยผู้ป่วยที่ถูกงูแมวเซา, งูทะเล และ งูเขียวหางไหม้ จะพบอาการไตวายร่วมด้วย แต่กลุ่มงูแมวเซาพบว่ามีความชุกของโรคนี้มากที่สุด

ภาวะ DIC (Disseminated intravascular coagulant) Intravascular hemolysis และ Hemoglobinuria มักจะปรากฏหลังจากถูกงูกัด มีอุบัติการณ์ประมาณ 70 % บางครั้งอาจพบภาวะ myoglobinuria ภาวะไตวายหากการดำเนินไปของโรคนานกว่า 1 หรือมากกว่า 2 สัปดาห์ ภาวะ oliguria และ anuria จะมีความรุนแรงขึ้น คาดหวังได้ว่าเกิดภาวะ cortical necrosis, acute interstitial nephritis

การผิดปกติของเนื้อเยื่อไตเนื่องจากพิษงู RVV (Renal pathological changes)

1. Glomerular lesions เมื่อทำการศึกษาเนื้อเยื่อวิทยา พบว่า mesangial proliferation และ พบ mesangiolytic และ tubular necrosis นอกจากนี้ ยังพบพยาธิสภาพของไตแบบ extracapillary proliferative glomerulonephritis, acute interstitial nephritis, cortical ecrosis

2. พยาธิสภาพของไตแบบ bilateral massive acute cortical necrosis มี fibrin thrombi อย่างเด่นชัดในโกลเมอรูลัสร่วมกับ mesangial proliferation (อ้างอิงจาก : โลहितวิทยา, 1995)

Efrati และ Reif (1953) จากการตรวจไตผู้ป่วยที่ถูกงูแมวเซากัด 4 รายพบมี petechia ในเยื่อบุกรวยไต และที่กระเพาะปัสสาวะ ภายในไตพบหลอดเลือดทั้งภายในคอร์เทกซ์ และเมดัลลาปรงพอง Sen และคณะ (1968) พบว่าแฟรคชันของ PLA_2 จากพิษงูแมวเซาสามารถลดระดับเรนินในพลาสมาลงได้อย่างเด่นชัดในหนูแรท (rat) ที่มีความดันเลือดสูง จากสาเหตุที่ได้อาจเกิดการขัดขวาง plasma renin activity โดยกระตุ้นผ่าน renin preinhibitor Dewee และ Geduldig (1973) Electrophysiology บันทึกในขณะที่ได้รับพิษงูแมวเซา พบว่าการเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์ของผิวเยื่อเซลล์ขึ้นอยู่กับปริมาณความเข้มข้นของพิษ ผลดังกล่าวเปรียบเทียบกับฤทธิ์ของ 2,4- ไดไนโตรฟีนอล (dinitrophenol ,DNP) ต่อการเกิดดีโพลาไลเซชันที่ผิวเยื่อเซลล์ไต ในกลไกการเคลื่อนผ่านของไอออนต่าง ๆ ผ่านเยื่อเซลล์ โดย DNP สามารถยับยั้ง aerobic phosphorylation ในเซลล์หลอดเลือดไต มีการหยุดชะงักของ electrogenic sodium pump รัญญู เพ็ญชาติ (1974) ผลต่อระบบขับถ่ายปัสสาวะหรือไตนั้นมีรายงานว่าพิษงูแมวเซากดการทำงานของไตและทำให้เกิดภาวะไตวายเฉียบพลันตามมา Chugh และคณะ (1975) มีการอักเสบของโกลเมอรูลัสของไต ส่วน interstitium มีการเจริญของเซลล์ mesangium ผิดปรกติ เกิด nephrotic syndrome มีระดับยูเรียไนโตรเจนและครีเอตินินสูงในพลาสมา Chugh และคณะ (1975) ภาวะไตวายเฉียบพลันไม่ว่าในคนหรือสัตว์ทดลอง จะเกิดเร็ว 2 - 24 ชั่วโมงหลังถูกงูกัด Terrago 1975 ทำการศึกษาพบว่าเซลล์ของไตที่สร้างโปรสตาแกลนดิน TXA_2 มีอยู่ 4 ชนิดคือ glomerular endothelial cell, mesangial cell, glomerular epithelial cells, glomerular parietal epithelial cells Terrago และคณะ (1975) พบว่าเซลล์ที่สร้าง PGs คือเซลล์ที่สามารถใช้ arachidonic acid เซลล์ดังกล่าวมีอยู่ทั่วไปที่หน่วยไต เช่น หลอดเลือดฝอยของโกลเมอรูลัส, เซลล์ thin limb ของ Henie's loop เซลล์หลอดเลือดฝอยไตรวม และเซลล์ medullary interstitium

Aung khin (1978) ผู้ป่วยถูกงูแมวเซากัดจะพบภาวะไตวายโดยอาจจะเกิดจากพิษงูทำให้เกิดความผิดปกติในการแข็งตัวของเลือด ทำให้ เลือดแข็งตัวแล้วไปอุดตันที่หลอดเลือดฝอยของไต ทำให้ไตขาดเลือดไปเลี้ยง Sitiprija และคณะ (1982) ในช่วงระยะ 2 - 24 ชั่วโมง พบมีปัสสาวะน้อยผิดปกติ หรือไม่มีเลย ซึ่งเป็นผลเนื่องจากการตายของหลอดเลือดฝอยไต หรือเกิดจากการตายเนื้อเยื่อไตบริเวณคอร์เทกซ์ Tung vongchai (1984) พบว่าพิษงูแมวเซาทำให้การไหลเวียนของเลือดทั่วร่างกายและในไตลดลงในระยะแรกหลังได้รับพิษ Chaiyabutr และคณะ (1985) รายงานว่าระบบฮอร์โมนที่ หลั่งออกมาทำให้หลอดเลือดในไตหดตัวคือระบบเรนินแองจิโอเทนซิน โดยทำการศึกษาในหนูแรทที่ได้รับสารยับยั้งการสร้างแองจิโอเทนซิน-2 (MK-422, enalapril mealeate) ก่อนทำการฉีดพิษงูแมวเซาปรากฏว่าสามารถลดผลของพิษงูต่อการไหลเวียนของเลือดในไตได้ และได้ศึกษาสรีรวิทยาของเซลล์ของหลอดเลือดไตส่วนต้นพบว่า พิษงูทำให้มีการลดความต่างศักย์ไฟฟ้าของเซลล์ไตเช่นเดียวกับ 2,4-ไดไนโตรฟีนอล (dinitrophenol ,DNP) ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งกระบวนการสร้าง ATP ในไมโทคอนเดรีย ทำให้เชื่อว่าพิษงูแมวเซาอาจมีผลเปลี่ยนแปลงตำแหน่งที่ทำหน้าที่ขนส่งไอออนที่ผนังเซลล์ของหลอดเลือดไต ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้าที่ผนังเซลล์ของหลอดเลือดไต หรืออาจมีผล

โดยตรงต่อการสร้าง ATP ในเซลล์ของหลอดเลือดทำให้การขนส่งไอออนผ่านผนังเซลล์เปลี่ยนแปลง Tungthanathanich และคณะ (1986) ค่าแฟรคชันของไตรกลีเซอไรด์ตั้งแต่ ชั่วโมงที่ 2 ไปจนถึงชั่วโมงที่ 24 เชื่อว่ามีการหลั่งของสารที่ทำให้หลอดเลือดในไตหดตัว โดยพบว่าค่าความต้านทานของหลอดเลือดในไตเพิ่มขึ้นหลายเท่าหลังจากได้รับพิษงู

บทบาทพิษงูแมวเซาต่อระบบหายใจ

Iswariah และ David (1932) การตายของผู้ป่วยที่ถูกงูแมวเซากัดจะมีเลือดออกมากผิดปกติจากหลอดเลือดฝอยหรือจากการแข็งตัวของเลือดภายในหลอดเลือด พยาธิสภาพของปอดพบมีจุดเลือดออกในเยื่อปอด ปอดคั่งน้ำร่วมกับมีเลือดออก Semdegard และคณะ (1982) การที่ PLA_2 เพิ่มความดันเลือดแดงของปอดนี้ พบว่าเกิดร่วมกับการหลั่ง PGs like substance สารเหล่านี้ได้แก่ TXA_2 , PGI_2 , LTs Hung (1984) ผลการทดลองฉีด PLA_2 fraction ของพิษงูแมวเซาเป็น bolus เข้าไปในปอดที่แยกออกมาจากตัวหนูตะเภา พบมีการหลั่ง TXA_2 , PGI_2 LTs ออกจากปอด



ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า

1. เพื่อทำการแยกโปรตีนของพิษงูแมวเซาด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชัน (Gel filtration) และไอออนเอ็กซ์เชนจ์โครมาโตกราฟี (Ion exchange chromatography) เพื่อหาโปรตีนจากพิษงูแมวเซาไทยที่มีผลต่อการทำงานของไต
2. เพื่อศึกษาทางพิษวิทยา (toxicology) โดยการหาค่า LD_{50} ของโปรตีนจากงูแมวเซาไทยที่ทำให้เกิด LD_{50}
3. เพื่อศึกษาหาระดับความเข้มข้นและคุณสมบัติทางเอนไซม์ของโปรตีนที่มีผลต่อการทำงานของไต³

ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า

1. เป็นแนวทางในการผลิตแอนติบอดีพิษงูที่จำเพาะต่อโปรตีนที่มีผลต่อการทำงานของไต
2. เป็นแนวทางอธิบายการเกิดภาวะไตวายเฉียบพลันเนื่องจากพิษของงูแมวเซา
3. เป็นประโยชน์ต่อการวินิจฉัยและให้การบำบัดแก่ผู้ป่วยที่ถูกงูแมวเซากัด

ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า

ศึกษาเฉพาะพิษงูแมวเซาของไทย (*Vipera russelli siamensis*) ในส่วนโปรตีนที่มีผลเฉพาะต่อการทำงานของไต

บทที่
วิธีดำเนินการวิจัย

1. การหา V_o , V_t โดยเทคนิคเจลฟิลเตรชัน

1.1 วัสดุอุปกรณ์สารเคมี

- 1.1.1 ซีเอ็ม - เซฟาเดกซ์ ซี 25 CM - Sephadex C-25, Sigma Chemical Co, Ltd.
- 1.1.2 เซฟาเดกซ์ จี 100 (Sephadex G-100, Sigma Chemical Co., Ltd.)
- 1.1.3 โพแทสเซียมเฟอร์โรไซยาไนด์ ($K_3(Fe)CN_6$)
- 1.1.4 บลูเดกซ์แทรน (blue dextrane)
- 1.1.5 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ($NaH_2PO_4 + Na_2HPO_4$) พีเอช 7.00
- 1.1.6 คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 ซม. ยาว 75 ซม. Pharmacia Fine Chemical ประเทศสวีเดน
- 1.1.7 เครื่องเก็บแยกส่วน (fraction collector) บริษัท LKB BROMMA 2112 MEURAC ประเทศสวีเดน
- 1.1.8 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-VISIBLE Recording spectrophotometer) model UV-160 บริษัท Shimadzu
- 1.1.9 เครื่องระเหยแห้งภายใต้ความดันต่ำ (freezed dryer)

1.2 การทดสอบทางสรีรวิทยา

1.2.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

- 1.2.1.1 เครื่องบันทึกการทำงานทางสรีรวิทยา (polygraph) ของ Nihon Kohden ประเทศญี่ปุ่น
- 1.2.1.2 pressure transducer model TP-400T ของ Nihon Kohden ประเทศญี่ปุ่น
- 1.2.1.3 respiratory-Pick up model TR-612T ของ Nihon Kohden ประเทศญี่ปุ่น
- 1.2.1.4 กล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast model SMZ-2T ของ Nihon Kohden ประเทศญี่ปุ่น
- 1.2.1.5 polyethylene tube (PE 50) สำหรับ catheterize ureter (ID 0.58 มิลลิเมตร x 0.965 มิลลิเมตร*)
- 1.2.1.6 PE 60 สำหรับ catheterize หลอดเลือดแดงที่คอ (Common carotid)
- 1.2.1.7 เครื่องควบคุมอุณหภูมิตัวทดลอง
- 1.2.1.8 เครื่องควบคุมอุณหภูมิน้ำแบบไหลวน (thermostatic bath/circulator) ของ Grant ประเทศอังกฤษ

- 1.2.1.9 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-VIS spectrophotometer) model UV-160A ของ Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น
- 1.2.1.10 หนูขาว (wistar rat) เพศผู้ น้ำหนัก 280-300 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลอง ศาเลียม มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตนครปฐม จากนั้นนำมาเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิควบคุมเวลา สว่าง 12 ชั่วโมง มีด 12 ชั่วโมง ให้อาหารสำเร็จรูปของบริษัทเจริญโภคภัณฑ์
- 1.2.1.11 พิษงูแมวเซา (Russelli's viper siamensis) ชนิด crude ที่ผ่านการระเหยแห้งภายใต้ความดันต่ำ (lyophilized) ได้จากสถานเสาวภา กองวิทยาศาสตร์ สภากาชาดไทย
- 1.2.1.12 ยาสลบเพนโทบาร์บิทัล (pentobarbital)
- 1.2.1.13 น้ำเกลือปราศจากเชื้อ 0.9 %
- 1.2.1.14 เฮพาริน

1.3 การวิเคราะห์หาปริมาณครีเอตินิน

1.3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

- 1.3.1.1 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-VIS spectrophotometer) model UV-160A ของ Shimadzu
- 1.3.1.2 เครื่องถ่ายน้ำยาอัตโนมัติ
- 1.3.1.3 ชุดทดสอบครีเอตินิน (creatinine Kits, Sigma Chemical Co.,Ltd.)

1.4 การวิเคราะห์พิษงูแมวเซาที่แยกได้โดยวิธีโพลีอะคริลเอไมด์เจล อิเล็กโตรโฟเรซิส

(David 1964: 404-427)

1.4.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

- 1.4.1.1 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง
- 1.4.1.2 สารละลายแบรดฟอร์ด (bradford, M.M. 1976)
- 1.4.1.3 สารละลายอะคริลาไมด์ (acrylamide) : บิส อะคริลาไมด์ (methylene bisacrylamide), 30% : 0.8% (W/V)
- 1.4.1.4 ทริสไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCL) พีเอช 6.7, 1.5M ทริสไฮโดรคลอไรด์ พีเอช 8.9
- 1.4.1.5 20% N,N,N',N'-tetramethyl-ethylenediamine (TEMED)
- 1.4.1.6 5% แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ammonium persulfate)
- 1.4.1.7 ทริสไกลซีนบัฟเฟอร์ (tris-glycine buffer) พีเอช 8.3

1.5 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีแบรคฟอร์ด

1.5.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

- 1.5.1.1 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง
- 1.5.1.2 เครื่องจ่ายน้ำยาอัตโนมัติ
- 1.5.1.3 โคแมสซีบริลเลียนบลู
- 1.5.1.4 โปรตีนมาตรฐาน (BSA)

1.6 การวิเคราะห์หาปริมาณไอออน

1.6.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

- 1.6.1.1 เครื่องอะตอมมิกแอสซอร์บชัน สเปกโตรโฟโตเมตริก (Atomic absorption spectrophotometer) ของ Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น
- 1.6.1.2 เครื่องจ่ายน้ำยาอัตโนมัติ
- 1.6.1.3 สารมาตรฐาน Na^+ , K^+ , Ca^{2+}
- 1.6.1.4 น้ำกลั่นชนิดกลั่น 3 ครั้ง และผ่านการกำจัดไอออนแล้ว

1.7 การวิเคราะห์หาค่าแอกติวิตีของฟอสฟอไลเปสเอนู

1.7.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

- 1.7.1.1 เครื่องอ่านสารชนิดควบคุมอุณหภูมิได้
- 1.7.1.2 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง
- 1.7.1.3 เครื่องวัด พี.เอช.
- 1.7.1.4 สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.15 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร ปริมาตร 40 ลูกบาศก์เซนติเมตร
- 1.7.1.5 ไข่ไก่

2. การหา V_0 , V_t ของ K_2FeCN_6 , blue dextrane และ V_e ของพืชมูแมวเขาโดยเทคนิค

เจลฟิลเตรชัน

(2.1) การหา V_0 , V_e , V_t โดยเทคนิคเจลฟิลเตรชัน

เซฟาเดกซ์มีลักษณะเป็นผง ก่อนใช้ต้องแช่ในตัวทำละลาย (น้ำ, บัฟเฟอร์) ให้อิ่มตัวเสียก่อน โดยค่อย ๆ เติมผงเจลลงไปในตัวทำละลายทีละน้อย กวนจนกระทั่งเจลพองตัวเต็มที่ แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เจลดกตะกอน ด้านเอาผงเจลที่ตกตะกอนข้างออกด้วยตัวทำละลาย 2-3 ครั้ง ใส่บัฟเฟอร์ลงในคอลัมน์ประมาณ 1/5 ของความยาวคอลัมน์ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ กวนเจลที่ล้างแล้วให้เข้ากัน แล้วเทลงข้าง ๆ คอลัมน์ คนให้เจลเข้ากับบัฟเฟอร์ เมื่อเจลจะเริ่มตกตะกอนเรียงตัว ลดปลายสายข้างลงเพื่อปล่อยให้บัฟเฟอร์ไหลออก ปรับความสูงให้ได้ 65 เซนติเมตร ถ้าเจลที่ใส่ไป ครั้งแรกไม่พอ เมื่อจะเติมเจลครั้งต่อไปควรเติมเจลก่อนที่เจลครั้งก่อนจะเรียงตัวกันหมด ถ้าจำเป็นอาจต้องคนส่วนบนของเจลในคอลัมน์ แล้วค่อย ๆ เติมเจลลงไปในหม้อจนได้ความสูงของแท่งเจล

ลประมาณ 65 เซนติเมตร เมื่อบรรจุเจลลงในคอลัมน์เรียบร้อยแล้ว ปรับให้อัตราการไหลออกของ บัฟเฟอร์เป็น 1 ลบ.ซม. ปล่อยให้บัฟเฟอร์ที่เหนือเจลค่อย ๆ ไหลออกจนหมดถึงผิวหน้าของเจล จะได้คอลัมน์ที่พร้อมจะใช้ในการแยกสาร

สารที่ใช้ในการทดลองประกอบด้วย โปแทสเซียมเฟอร์โรไซยาไนด์ น้ำหนักโมเลกุล 329, ความเข้มข้น 1 เปอเซ็นต์ บลูเคกซ์แทรน น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 2 ล้าน 2 เปอเซ็นต์ หยด 1 มิลลิลิตร ของสารผสมลงข้าง ๆ คอลัมน์ โดยวนไปรอบ ๆ คอลัมน์อย่าให้ผิวหน้าของเจลสะเทือน เริ่มเก็บบัฟเฟอร์ที่ไหลออกมาในหลอดแก้ว เมื่อสารตัวอย่างซึมลงในเจลหมด ล้างสารตัวอย่างที่ อาจติดอยู่ที่ผิวคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ 0.5 มิลลิลิตร ปล่อยให้บัฟเฟอร์ส่วนนี้ซึมลงในเจล แล้วล้างซ้ำ อีกครั้ง เมื่อเสร็จยกปลายสายยางลง รักษาระดับการไหลออกของบัฟเฟอร์เหนือเจลให้สูงประมาณ 5 เซนติเมตร ปล่อยให้ปลายสายยางลง รักษาระดับการไหลออกของบัฟเฟอร์ให้ช้าและคงที่ (3.5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง) เก็บสารละลายที่ชะออกมาในหลอดแก้วหลอดละ 5 มิลลิลิตร จนกระทั่งสาร ตัวสุดท้ายถูกชะออกมา

2.1.1 การหาปริมาณสารของบลูเคกซ์แทรนและโปแทสเซียมเฟอร์โรไซยาไนด์

สารผสมที่ใช้ทั้งสองชนิดมีสีอยู่ในตัวเอง จึงสามารถหาปริมาณของสารได้โดยวัด ความเข้มข้นของสีด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง หาปริมาณบลูเคกซ์แทรนสีน้ำเงินวัดค่าการดูด กลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร และโปแทสเซียมเฟอร์โรไซยาไนด์ 1% สีเหลืองวัดค่า การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร โดยใช้ 0.2 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.00 เป็น blank เขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงลงบนแกน Y กับปริมาณของสารละลายที่ถูกชะออก มาบนแกน X จากค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของบลูเคกซ์แทรน และ โปแทสเซียมเฟอร์โรไซยาไนด์ จะทำให้ทราบค่า V_o (void volume), V_t (total volume) ของคอลัมน์และหาค่า K_d (partition coefficient) ของโปรตีนมาตรฐาน

2.1.2 ทำการแยกพิษงูโดยวิธีเจลฟิลเตรชัน โดยนำพิษงูแมวเซา 200 มิลลิกรัม/5 มิลลิลิตร มาผ่านคอลัมน์ที่บรรจุด้วยเซฟาเดกซ์ จี 100 อยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ และชะด้วยสารละลาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 M พีเอช 7.00 ทำการเก็บ eluent หลอดละ 3 มิลลิลิตร ด้วยเครื่อง แบ่งเก็บสารละลายโดยกำหนดอัตราการไหลเป็น 16 มิลลิลิตร/ชั่วโมง จากนั้นนำส่วนที่เป็น peak profile เดียวกันมารวมกันและทดสอบหาโปรตีนด้วยวิธีของแบรดฟอร์ด

2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีแบรดฟอร์ด

การหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีแบรดฟอร์ด เป็นการใช้โคมมาสซีบริลเลียนบลู (Commassie brilliant blue G-250) ซึ่งจะจับกับโปรตีนและให้สีเกิดขึ้น วิธีนี้ใช้เวลาเพียงไม่กี่นาที เท่านั้นก็สามารถใช้หาปริมาณโปรตีนในสารละลายที่มีความเข้มข้นของโปรตีนต่ำ ๆ ได้

- 2.2.1 นำสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง และเติมน้ำทุกหลอดจนมีปริมาตรครบ 0.1 มิลลิลิตร
- 2.2.2 เติมโคแมสซึบิลิเียนบลูลงไปในหลอดละ 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร
- 2.2.3 เขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณโปรตีนมาตรฐาน
- 2.3 การทดลองทางสรีรวิทยา
- 2.3.1 นำหนูเพศผู้น้ำหนัก 300-500 กรัม แบ่งหนูเป็นกลุ่มควบคุมและกลุ่มฉีดพิษงูกลุ่มละ 5 ตัว
- 2.3.2 ทำการสลบหนูด้วย เพนโทบาร์บิทอล ขนาดความเข้มข้น 50 มก./1 ก.ก. โดยฉีดเข้าช่องท้อง
- 2.3.3 ทำการโกนขนบริเวณลำคอ หน้าท้อง บริเวณขาพับด้านใน
- 2.3.4 นำหนุมาวางบนบอร์ดผ่าตัดหนูที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37°C ตลอดการทดลอง
- 2.3.5 ทำการเปิดหลอดลม (tracheotomy) เพื่อทำการสอดท่อช่วยหายใจ แล้วทำการวัดการหายใจด้วยทรานสดิวเซอร์ Nostril pickup
- 2.3.6 ทำการเปิดหาเส้นเลือดแดง common carotid ที่คอเพื่อทำการสอดท่อ (catheter) เพื่อวัดความดันโลหิต โดยต่อเข้ากับ blood pressure transducer ซึ่งเชื่อมต่อกับแอมพลิไฟเออร์ของเครื่องโพลีกราฟมัลติชันแนล ทำการอ่านค่าและบันทึกความดันช่วงบน (systolic) และความดันช่วงล่าง (Diastolic) จาก digital monitor
- 2.3.7 ทำการเปิดเส้นเลือดแดงที่ขา (femoral artery) เพื่อเก็บตัวอย่างเลือด
- 2.3.8 ทำการเปิดเส้นเลือดดำที่คอ (jugular vein) เพื่อฉีดพิษงูหรือน้ำเกลือ 0.9% โดยใช้เครื่องปั๊มหลอดเลือดกำหนดอัตราการไหลที่ 1 มล./ช.ม.
- 2.3.9 ทำการบันทึกคลื่นไฟฟ้าหัวใจโดยสอดอิเล็กโทรดตาม standard Limb Lead
- 2.3.10 ทำการสอดเทอร์มัลโพรบ (thermal probe) เพื่อบันทึกและควบคุมอุณหภูมิสัตว์ทดลองให้ได้ 37°C เสมอ
- 2.3.11 ทำการเปิดช่องท้องในแนว linea alba เพื่อเก็บตัวอย่างปัสสาวะโดยการสอดท่อ (catheter) ผ่านหลอดไตทั้งซ้ายและขวา รััดให้แน่น ทำการปิดช่องท้อง

2.4 การหาค่าแอกติวิตีของฟอสโฟไลเฟสเอช ตามวิธีของ เมปส์และซาเมจิมา (Mebs and Samejima 1986)

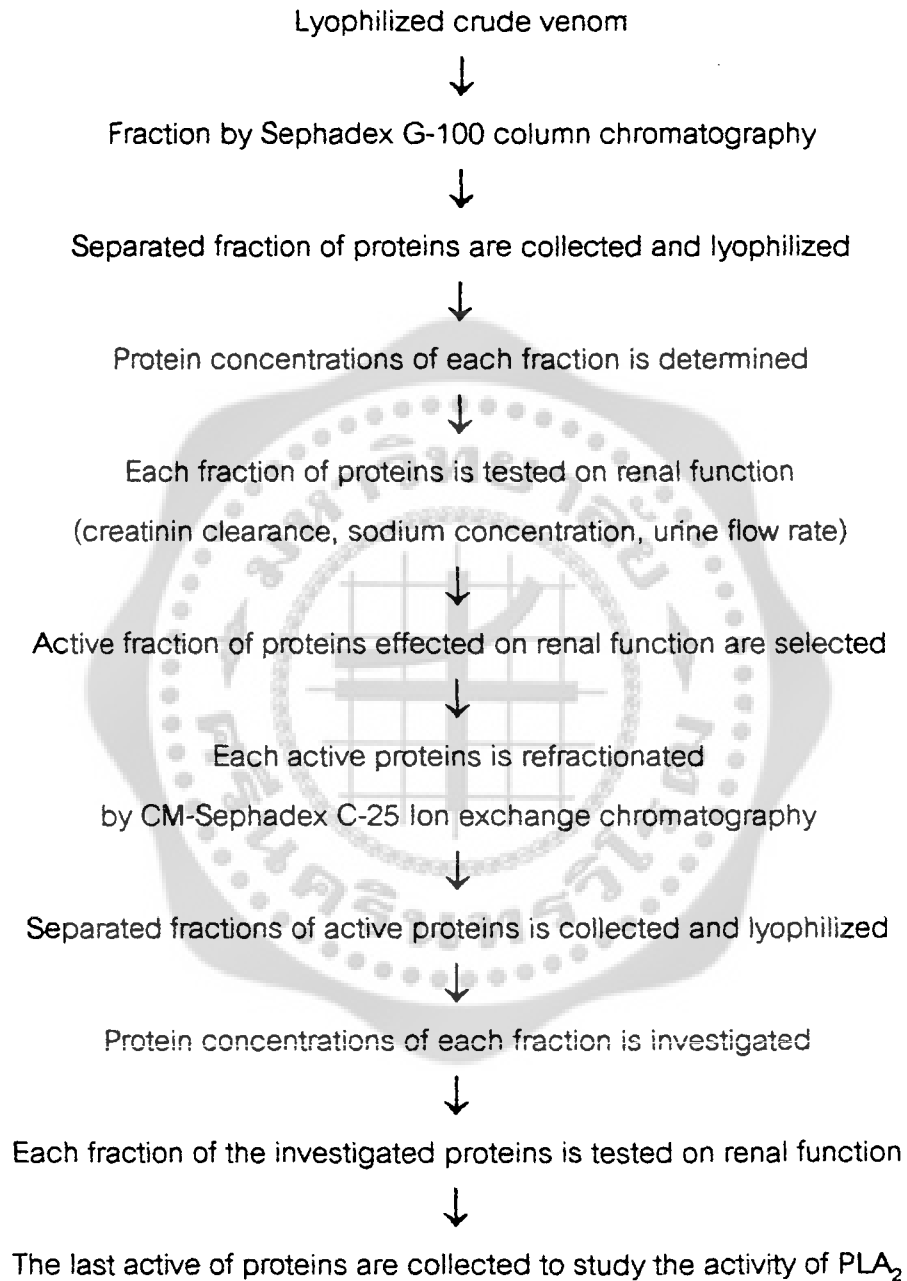
- 2.4.1 เตรียมสารละลายไข่แดงโดยใช้ไข่แดงจากไข่ไก่ปริมาตร 0.5-0.8 ลูกบาศก์ เซนติเมตร ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.15 โมลต่อลูกบาศก์ เซนติเมตร ปริมาตร 40 ลูกบาศก์เซนติเมตร
- 2.4.2 ปรับ พีเอช ของสารละลายไข่แดงในข้อ 1 ให้มี พีเอช 6.8 ด้วยสารละลาย โซเดียมบอร์บิโกล
- 2.4.3 เจือจางสารละลายไข่แดงในข้อ 2 ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.15 โมลต่อลูกบาศก์เซนติเมตร โดยให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 900 นาโนเมตร ของสารละลายไข่แดง เป็น 0.600
- 2.4.4 ผสมสารละลายในข้อ 3 ปริมาตร 2.8 ลูกบาศก์เซนติเมตร กับพิฆงปริมาตร 0.2 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
- 2.4.5 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 900 นาโนเมตร ของสารละลายในข้อ 4 นำผลที่ได้คำนวณหาค่าสเปซิฟิกแอกติวิตีของฟอสโฟไลเฟส เอช (ยูนิตต่อ มิลลิกรัมโปรตีน โดย 1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 900 นาโนเมตร ลดลง 1.0 มิลลิเคลด้า ของค่าการดูดกลืนแสงที่ 900 นาโนเมตรในเวลา 10 นาที)

2.5 การวิเคราะห์หาปริมาณครีเอตินิน

นำเลือดและปัสสาวะมาปั่นแยกเอาพลาสมาทำการวิเคราะห์หาปริมาณครีเอตินินด้วย ชุดทดสอบครีเอตินิน นำค่าที่ได้มาคำนวณตามสมการ $GFR_c = U_c V / P_c$

- 2.5.1 เตรียม Alkaline picrate solution 50 มิลลิลิตรของ Creatinine colour reagent เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 มิลลิลิตร
- 2.5.2 วิธีเตรียมการทดลองดังนี้หลอดที่ 1 เป็น blank โดยเติมน้ำกลั่น 0.3 มิลลิลิตร
- 2.5.3 หลอดที่ 2 ใส่สารมาตรฐานครีเอตินิน (3 mg./dL.) 0.3 มิลลิลิตร
- 2.5.4 หลอดที่ 3 หลอดสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ 0.3 มิลลิลิตร
- 2.5.5 นำหลอดที่ 1, 2 และ 3 มาเติม Alkaline picrate solution 3 มิลลิลิตร เป็นเวลา 8 - 12 นาที อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตร
- 2.5.6 นำหลอดทดลองทุก ๆ หลอดเติม Acid reagent 0.1 มิลลิลิตร แล้วเขย่านาน 5 นาที อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 nm. นำผลไปคำนวณหาปริมาณครีเอตินินตามสมการ $Creatinine (mg/dL) = (INITIAL - FINAL / INITIAL STD. - FINAL STD.) \times 3$

FLOW CHART OF EXPERIMENT



ภาพประกอบ 40 แผนผังแสดงการทดลองโดยย่อ

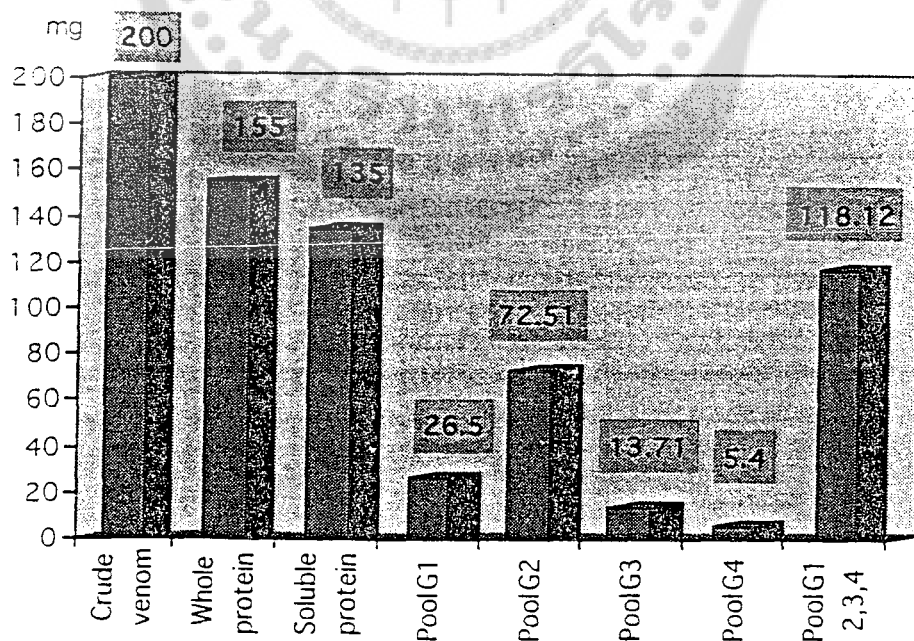
บทที่ 4

ผลการวิจัย

การทดลองการแยกพิษงูแมวเซาออกเป็นส่วน ๆ โดยนำพิษงูผ่านคอลัมน์เซฟาเดกซ์จี100 แล้วชะด้วย 0.2 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.00 ด้วยอัตราการไหล 60.00 ลูกบาศก์/ชั่วโมง จากนั้นเก็บสารละลายที่ได้ไปวัดปริมาณโปรตีนซึ่งดูจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ผลปรากฏว่าสามารถแยกแฟรคชันออกได้เป็น 4 ส่วนดังรูปประกอบ โดยแฟรคชันที่ G1 เป็นโปรตีนหลอดที่ 34 ถึง 47 แฟรคชันที่ G2 เป็นโปรตีนหลอดที่ 62 ถึง 80 ส่วนแฟรคชันที่ G3 เป็นโปรตีนหลอดที่ 90 ถึง 100 และส่วนแฟรคชันที่ G4 เป็นโปรตีนหลอดที่ 106 ถึง 125 การทดลองทำที่อุณหภูมิห้อง

โปรตีนที่แยกได้นั้นหลังจากไดอะไลซิส (dialysis) และระเหยแห้ง (freez dry) แล้วนำมาละลายในน้ำกลั่นเพื่อคำนวณหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีเบรดฟอร์ด ผลสรุปได้ดังตาราง 13

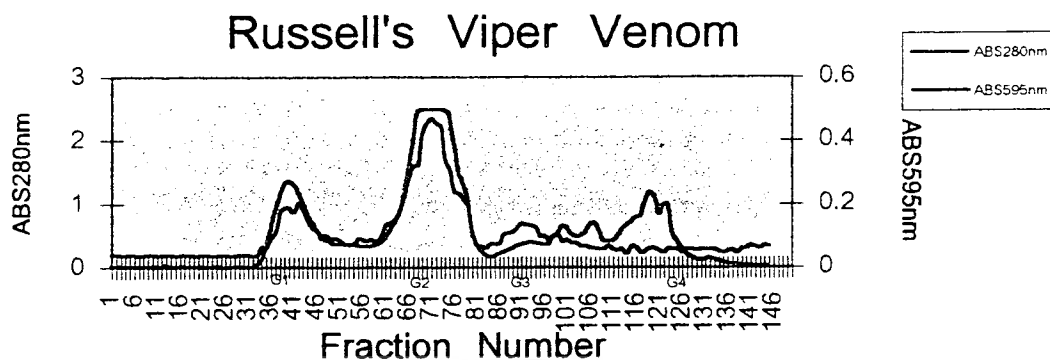
จากการแยกหาปริมาณโปรตีนด้วยเจลฟิลเตรชัน ด้วยเซฟาเดกซ์จี100 พบว่าโปรตีนรวมและของแต่ละแฟรคชันคือ G1, G2, G3 และ G4 การแยกครั้งที่ 1 เปรียบเทียบครั้งที่ 2 ได้ผลการทดลองดังภาพประกอบ 45 และ 46 และเมื่อนำโปรตีนทั้ง 2 ครั้งมาเฉลี่ยจะได้ผลดังภาพประกอบ 42



ภาพประกอบ 41 แสดงปริมาณโปรตีนที่แยกด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชัน (เซฟาเดกซ์ จี100)

การหาส่วนประกอบของโปรตีนพิษงูแมวเซาเทคนิคเจลฟิลเตรชัน (Sephadex G100)

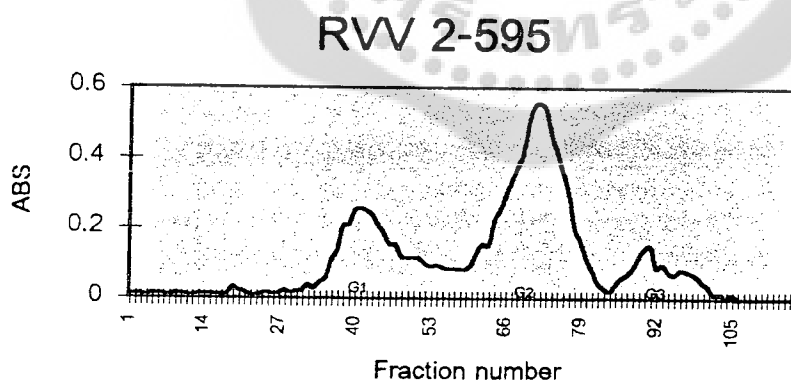
การแยกพิษงูแมวเซาด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี โดยผ่านพิษงูชนิดหยาบ 200 มก. ที่ละลายใน 0.2 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ปริมาตร 5 มล.



ภาพประกอบ กราฟแสดงการแยกพิษงูแมวเซา 200 มก. ครั้งที่ 1 ด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชัน (เซฟาเดกซ์จี 100) ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลลาร์ pH 7 อัตราการไหล 30 มล./ชม. ทำการเก็บหลอดละ 3 มล. ปริมาตรรวม 426 มล.

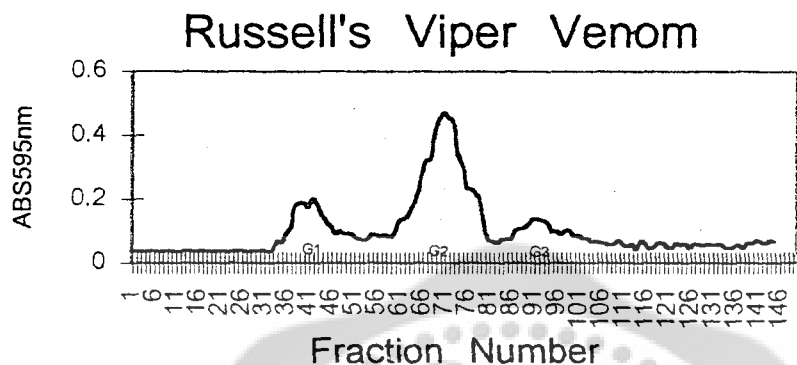
ภาพประกอบ 42 กราฟแสดงการแยกพิษงูแมวเซา 200 มก. ครั้งที่ 1 ด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชัน (เซฟาเดกซ์จี 100) ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 M พีเอช 7 อัตราการไหล 30 มล./ชั่วโมง ทำการเก็บหลอดละ 3 มล. ปริมาตรรวมของคอลัมน์ 426 มล.

ทำการแยกพิษงูแมวเซา เทคนิคเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี โดยผ่านพิษงูชนิดหยาบ 200 มก. ทำซ้ำเหมือนกับข้อ 1 แต่ อัตราการไหลที่ 16 มล./ชั่วโมง ผลการทดลองดังรูป



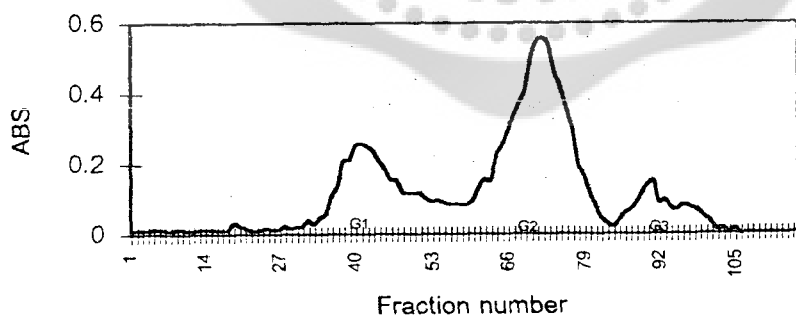
ภาพประกอบ กราฟแสดงการแยกพิษงูแมวเซา 200 มก. ครั้งที่ 2 ด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชัน (เซฟาเดกซ์จี 100) ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลลาร์ pH 7 อัตราการไหล 16 มล./ชม. ทำการเก็บหลอดละ 3 มล. ปริมาตรรวม 426 มล.

ภาพประกอบ 43 กราฟแสดงการแยกพิษงูแมวเซา 200 มก. ครั้งที่ 2 ด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชัน (เซฟาเดกซ์จี 100) ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 M พีเอช 7 อัตราการไหล 16 มล./ ชั่วโมง ทำการเก็บหลอดละ 3 มล. ปริมาตรรวมของคอลัมน์ 459 มล.



ภาพประกอบ ภาพแสดงการแยกพิษงูแมวเซา 200 มก. ครั้งที่ 1 ด้วยเทคนิคเจลเพอร์เมชัน (เซฟานอกซ์จี 100) ระบุด้วยฟอลโฟลโบทัมเปอร์ 0.2 ไมคราร์ pH 7 อัตราการไหล 30 มล./ชม ทำการเก็บหลอดละ 3 มล. ปริมาตรรวม 426 มล.

RVV 2-595

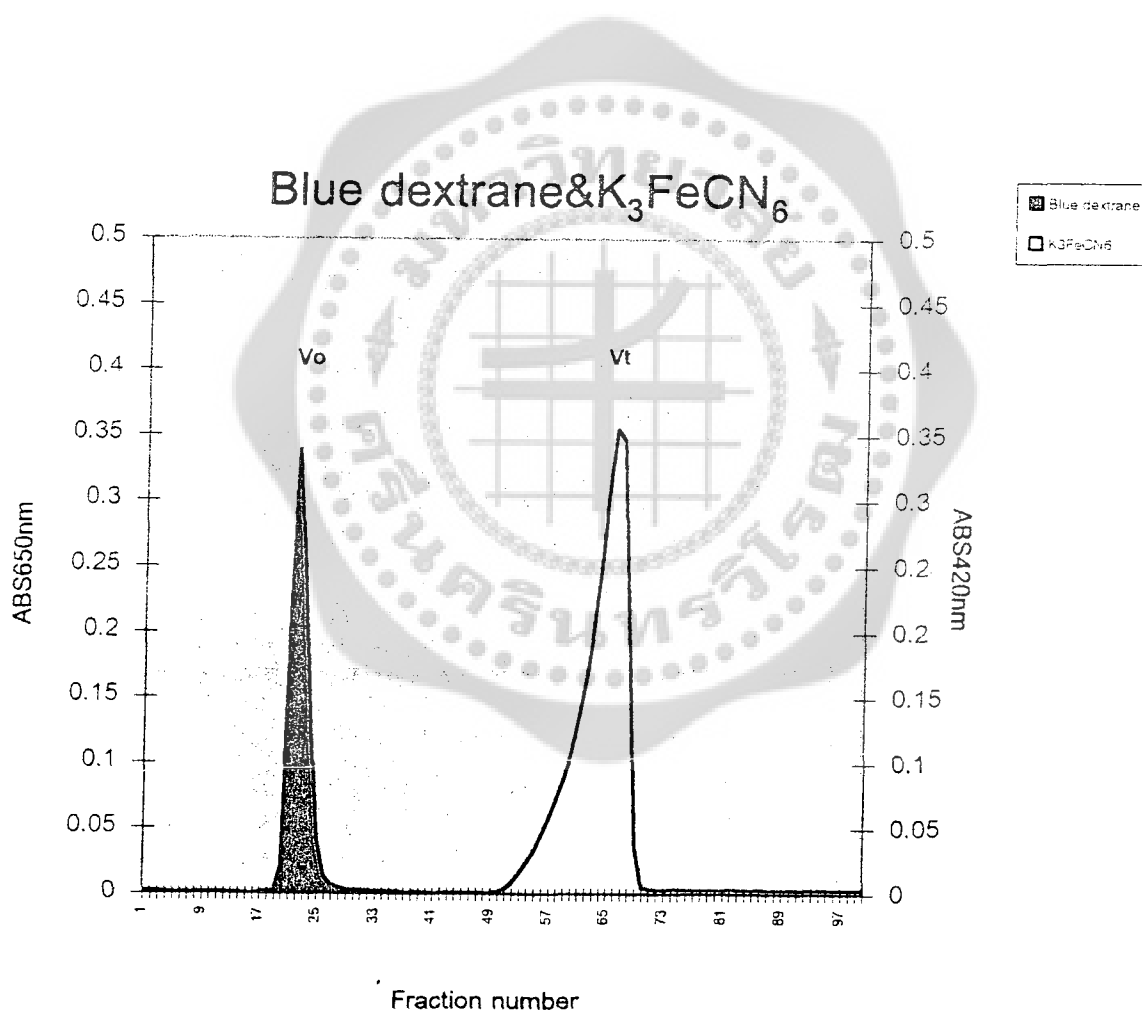


ภาพประกอบ ภาพแสดงการแยกพิษงูแมวเซา 200 มก. ครั้งที่ 2 ด้วยเทคนิคเจลเพอร์เมชัน (เซฟานอกซ์จี 100) ระบุด้วยฟอลโฟลโบทัมเปอร์ 0.2 ไมคราร์ pH 7 อัตราการไหล 15 มล./ชม ทำการเก็บหลอดละ 3 มล. ปริมาตรรวม 426 มล.

ภาพประกอบ 44 แสดงการเปรียบเทียบการแยกโปรตีนจากพิษงูแมวเซาด้วยเทคนิคฟิลเตรชัน เซฟาเดกซ์จี 100 ครั้งที่ 1 และ 2 สามารถแยกโปรตีนเป็น 3 กลุ่มคือ G1, G2 และ G3 ทำการวัดหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีเบรดฟอร์ด ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร

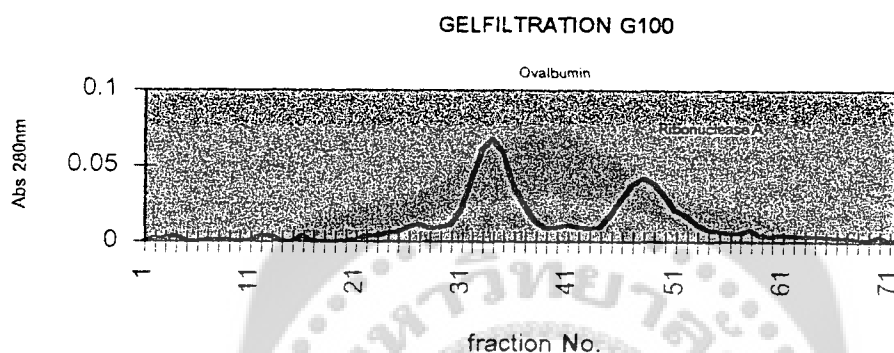
การหาน้ำหนักโมเลกุล

ผลการทดลองหาขนาดโมเลกุลของโปรตีน โดยใช้สารละลายโปรตีนมาตรฐานที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดใหญ่คือ 2% บลูเดกซ์แทรน 0.5 มล. (MW = 2,000,000) กับสารโมเลกุลขนาดเล็กคือ 1% โพแทสเซียมเฟอร์โรไซยาไนด์ โดยทำการชะคอลัมน์ด้วยอัตราการไหลที่ 40 มล./ชม. เก็บตัวอย่าง ๗ ละ 7.5 มล. แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของบลูเดกซ์แทรนที่ 650 นาโนเมตร และโพแทสเซียมเฟอร์โรไซยาไนด์ที่ 420 นาโนเมตร จะได้ $V_o = 110$ มล. และ $V_t = 330$ มล.



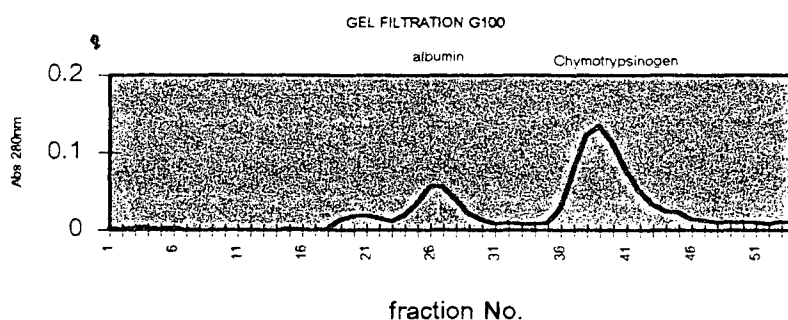
ภาพประกอบ 45 กราฟแสดงการหา V_o และ V_t ของคอลัมน์ขนาด 2.5 x 75 ซม. ซึ่งบรรจุด้วยเซฟาเดกซ์จี 100 โดยใช้โพแทสเซียมเฟอร์โรไซยาไนด์และบลูเดกซ์แทรน 1% และ 2% ปริมาตร 0.5 มล. ตามลำดับ

การแยกโปรตีนมาตรฐานด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี (เซฟาเดกซ์จี 100) เมื่อผ่าน Ovalbumin - Ribonuclease โดยใช้โปรตีนมาตรฐานไวโบนิวคลีเอสเอ 2 มก./มล. และใช้ Ovalbumin 2 มก./มล. เช่นกัน ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ผสมให้เข้ากันทำการชะผ่านคอลัมน์ อัตราการไหล 30 มล./ชม. แล้วทำการเก็บแฟรคชันละ 5 มล. แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ทำการเขียนกราฟ ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร กับลำดับหลอดที่เก็บสาร ผลการทดลองดังรูป



ภาพประกอบ 46 กราฟแสดงการแยกโปรตีนมาตรฐาน Ovalbumin (2 mg) และ Ribonuclease A (2 mg) โดยคอลัมน์เซฟาเดกซ์จี 100 ขนาด 0.25 ซม. x 75 ซม. ชะด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7 ด้วยอัตราการไหล 30 มล./ชั่วโมง ทำการเก็บหลอดละ 5 มล. ปริมาตรรวมของคอลัมน์ 330 มล.

ทำการแยกโปรตีนมาตรฐานด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี (เซฟาเดกซ์จี 100) โดยผ่านอัลบูมิน 2 มก./มล., ไคโมทริปซิน 2 มก./มล. ผ่านคอลัมน์ขนาด 2.5 ซม. x 75 ซม. ในสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ด้วยอัตราการไหล 21 มล./ชม. ทำการเก็บแฟรคชันละ 5 มล. ดังรูป



ภาพประกอบ 47 กราฟแสดงการแยกโปรตีนมาตรฐาน albumin (2mg/ml), chymotrypsinogen (2mg/ml) ผ่านคอลัมน์ขนาด 0.25 ซม. x 75 ซม. บรรจุด้วยเซฟาเดกซ์จี 100 อัตราการไหล 30 มล./ชั่วโมง ทำการเก็บหลอดละ 5 มล. ปริมาตรรวมของคอลัมน์ 265 มล.

การหาค่าสัมประสิทธิ์ของคอลัมน์ V_o และ V_t ของคอลัมน์ โดยใช้สารละลายโปรตีน
มาตรฐานที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดใหญ่คือ 2% บลูเดกซ์แทรน 0.5 มล. (MW = 2,000,000) กับ
สารซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลขนาดเล็กคือ 1% โพแทสเซียมเฟอร์ไรไซยาไนด์ 0.5 มล. ทำการชะ
คอลัมน์ด้วยอัตราการไหล 40 มล./ชม. เก็บตัวอย่างละ 7.5 มล. แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง
ของบลูเดกซ์แทรนที่ 650 นาโนเมตร และ โพแทสเซียมเฟอร์ไรไซยาไนด์ ที่ 420 นาโนเมตร

การทดลองแยกโปรตีนมาตรฐานด้วยเซฟฟาเดกซ์ จี100 ได้ออกเป็น 4 แฟรคชันนำแต่ละ
แฟรคชันมาคำนวณหาค่า K_{av} ตามสมการดังนี้

$$K_{av} \text{ (chymotrypsin)} = \frac{V(\text{chymotrypsin}) - V(\text{blue dextran})}{V(K_3FeCN_6) - V(\text{blue dextran})} = \frac{195 - 110}{330 - 110} = 0.386$$

$$K_{av} \text{ (Albumin)} = \frac{V(\text{Albumin}) - V(\text{blue dextran})}{V(K_3FeCN_6) - V(\text{blue dextran})} = \frac{135 - 110}{330 - 110} = 0.114$$

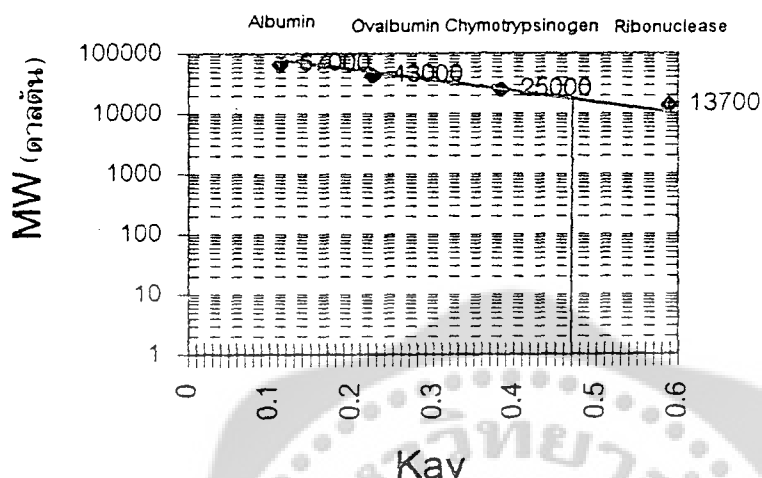
$$K_{av} \text{ (Ovalbumin)} = \frac{V(\text{Ovalbumin}) - V(\text{blue dextran})}{V(K_3FeCN_6) - V(\text{blue dextran})} = \frac{160 - 110}{330 - 110} = 0.227$$

$$K_{av} \text{ (Ribonuclease)} = \frac{V(\text{Ribonuclease}) - V(\text{blue dextran})}{V(K_3FeCN_6) - V(\text{blue dextran})} = \frac{240 - 110}{330 - 110} = 0.59$$

$$K_{av} (K_3FeCN_6) = \frac{V(K_3FeCN_6) - V(\text{blue dextran})}{V(K_3FeCN_6) - V(\text{blue dextran})} = \frac{195 - 110}{330 - 110} = 1.0$$

$$K_{av} \text{ (blue dextran)} = \frac{V(\text{blue dextran}) - V(\text{blue dextran})}{V(K_3FeCN_6) - V(\text{blue dextran})} = \frac{195 - 110}{330 - 110} = 0$$

น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน G2



ภาพประกอบ 48 ผลการประมาณค่าน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนของ G2 โดยเปรียบเทียบค่า Kav กับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน

ตาราง 12 แสดงค่าที่ใช้ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของ G2

โปรตีนมาตรฐาน	น้ำหนักโมเลกุล	log MW	Ve (ml)	Kav
Albumin	67,000	4.820	135	0.114
Ovalbumin	43,000	4.639	160	0.227
Chymotrypsin	25,000	4.397	195	0.386
Ribonuclease	13,700	4.136	240	0.590
K ₃ FeCN ₆	329.25	-	330	1.000
Blue dextrane	1,000,000	-	110	0.000
RVV G1	> 100,000 *	-	126	0.050
RVV G2	≈ 20,000 *	-	213	0.468
RVV G3	< 10,000 *	-	273	0.740

* หมายถึงค่าที่หาจากค่า Kav

ผลการแยกพิษงูแมวเซาอย่างหยาบ

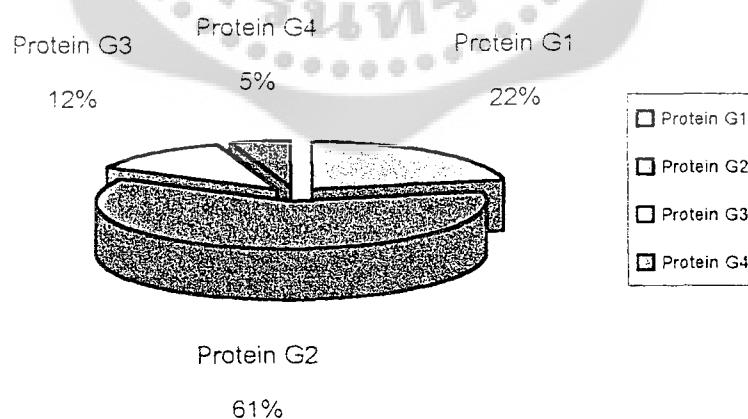
ผลการแยกโปรตีนสามารถจัดแบ่งกลุ่มโปรตีนตามขนาดโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบพิษงูได้ดังนี้ กลุ่ม G1 มีน้ำหนักโมเลกุลมากที่สุด ประมาณ 100,000 ดาลตัน, G2 มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดกลาง ประมาณ 14,000 - 20,000 ดาลตัน และกลุ่มสุดท้าย G3 และ G4 มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดเล็กน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 10,000 ลงมา

ทำให้ได้ข้อสรุปดังนี้ สามารถจัดแบ่งกลุ่มโปรตีนของพิษงูแมวเซาตามน้ำหนักโมเลกุลได้ 3 กลุ่มคือ

- 1) กลุ่ม G1 มีน้ำหนักโมเลกุลมากที่สุด ประมาณ มากกว่า 100,000 ดาลตัน
- 2) กลุ่ม G2 มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดกลาง ประมาณ 14,000 - 20,000 ดาลตัน
- 3) กลุ่ม G3 และ G4 มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดเล็กน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 10,000 ลงมา

นอกจากนี้ สามารถทราบถึงสัดส่วนของปริมาณของโปรตีนของพิษงูแมวเซา ตามโปรตีนหรือน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน จากผลการทดลองพิษงูแมวเซาแบ่งออกเป็นกลุ่มดังภาพประกอบ 49

องค์ประกอบของพิษงูแมวเซา

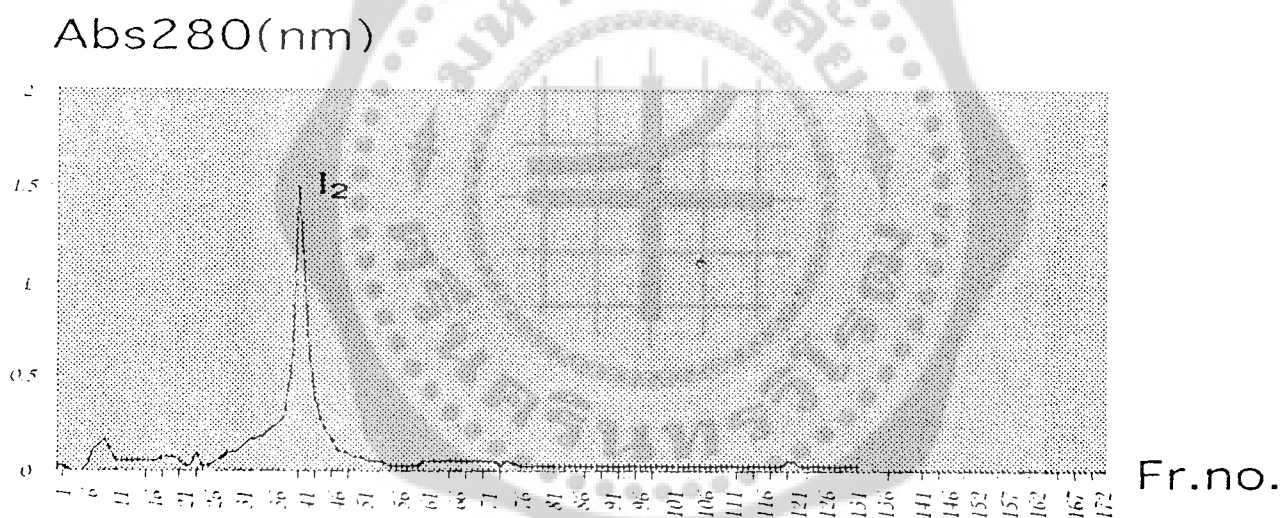
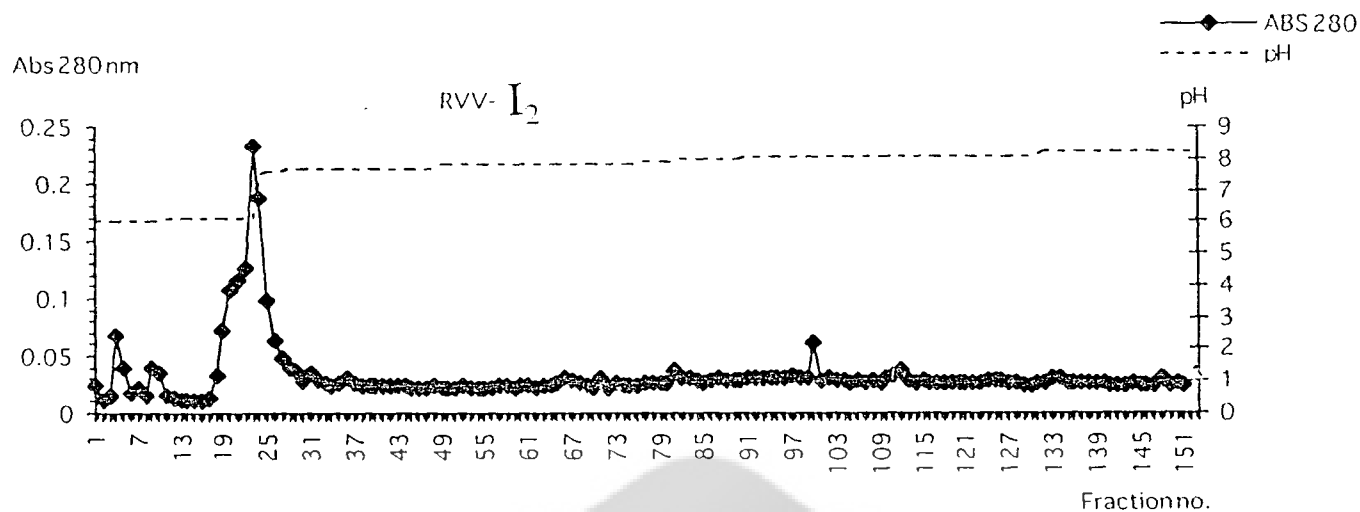


ภาพประกอบ 49 แสดงถึงเปอร์เซ็นต์องค์ประกอบโปรตีนในพิษงูแมวเซาอย่างหยาบตามขนาดน้ำหนักโมเลกุล

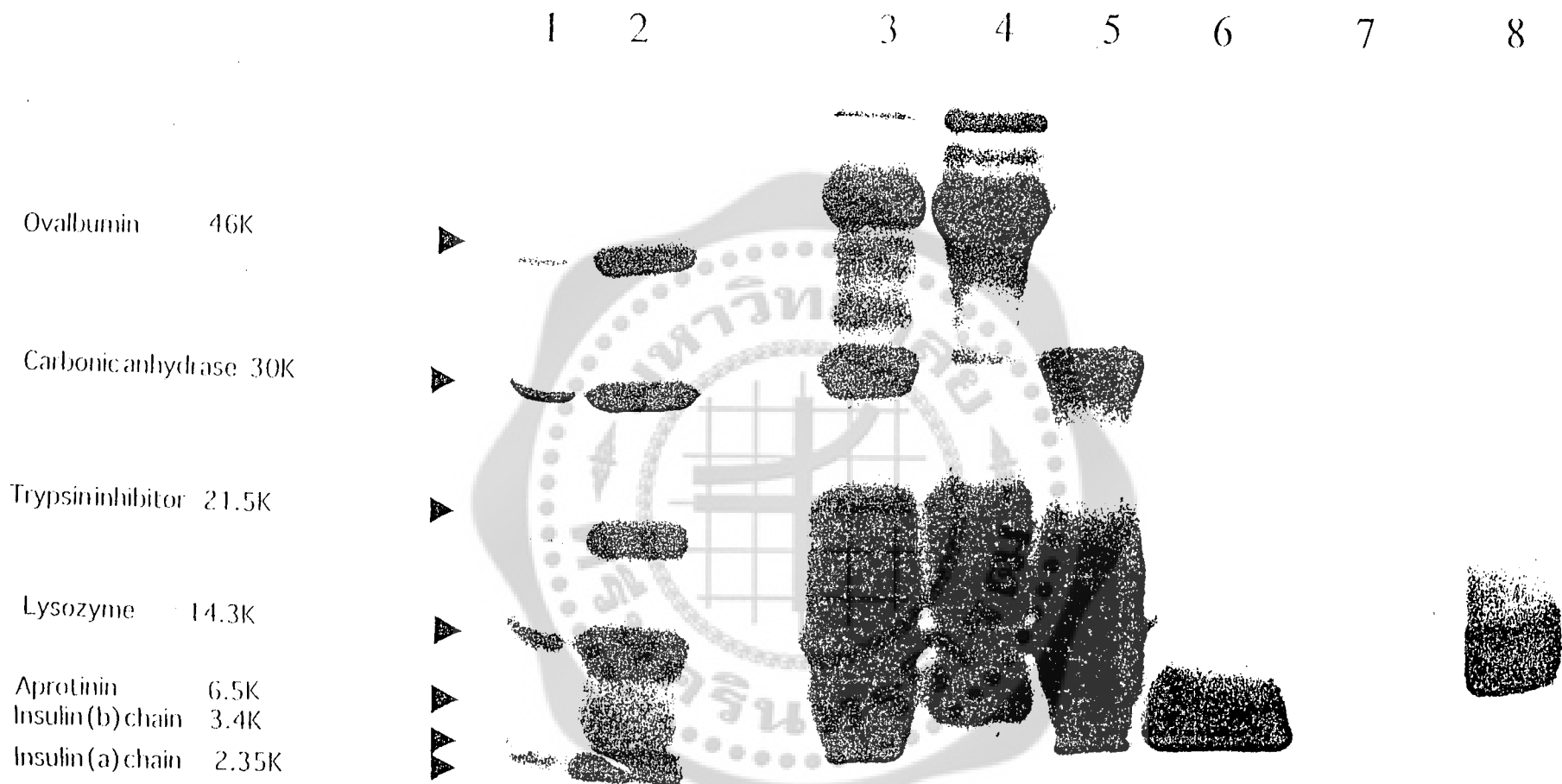
จากเปอร์เซ็นต์องค์ประกอบโปรตีนในพืชสมุนไพรอย่างหายาตามขนาดน้ำหนักโมเลกุล พบว่าสามารถจัดกลุ่ม โดยสรุปดังนี้คือ

- 1) กลุ่ม G1 น้ำหนักโมเลกุลสูง พบว่ามีองค์ประกอบโปรตีน 22%
- 2) กลุ่ม G2 น้ำหนักโมเลกุลขนาดกลาง 10,000 - 20,000 มีปริมาณโปรตีนมากที่สุดคือ 61% ของพืชอย่างหายา น่าจะมีบทบาทมากที่สุด และคาดว่าแอนไซม์จัดอยู่ในกลุ่มนี้ ได้แก่ ฟอสโฟไลเปสเอทู มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 14,000 ดาลตัน, โปรตีเอส ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 27,000 ดาลตัน
- 3) กลุ่ม G3 น้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 10,000 ดาลตันลงมา พบว่ามีองค์ประกอบโปรตีน 12% ของพืชอย่างหายา
- 4) G4 พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ โดยพบว่ามีค่าองค์ประกอบโปรตีนต่ำมากพบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 สูงมาก แต่เมื่อใช้เทคนิคของแบรดฟอร์ด พบว่ามีค่าต่ำมาก แต่เนื่องจาก ปริมาตรโดยรวมสูงขึ้นจึงทำให้มีค่า โปรตีนโดยรวมสูงถึง 5 %

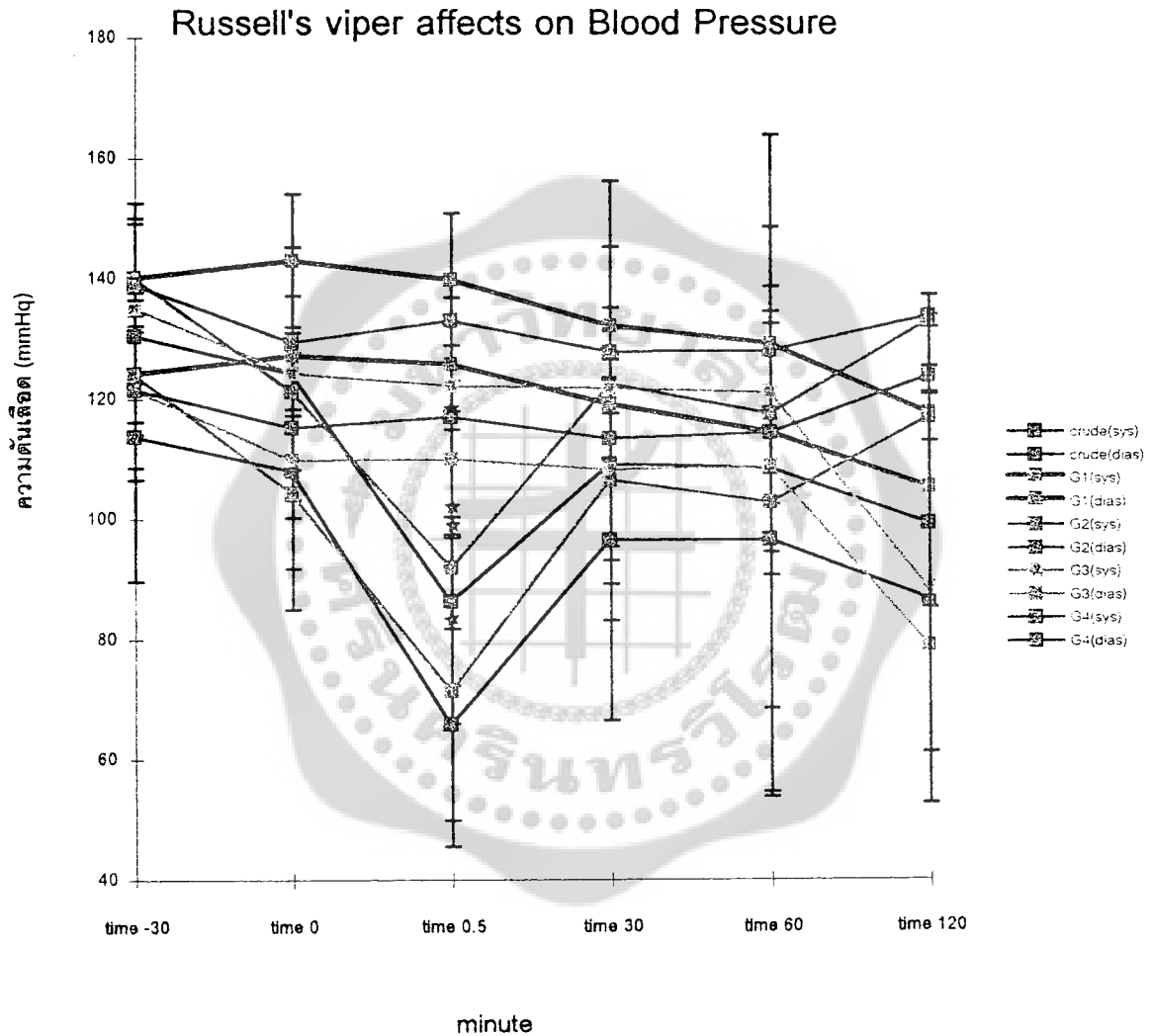




แผนภาพ 50 การแยกพิษงูแมวเซา (I_2) ความเข้มข้น 10 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการแยกด้วย CM-sephadex C 25 แบบพีเอชเกรเดียน 0.02-0.2 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์, พีเอช 6-8.5 อัตราการไหล 12 และ 18 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ทำการเก็บหลอดละ 4 และ 2 มิลลิลิตรตามลำดับ

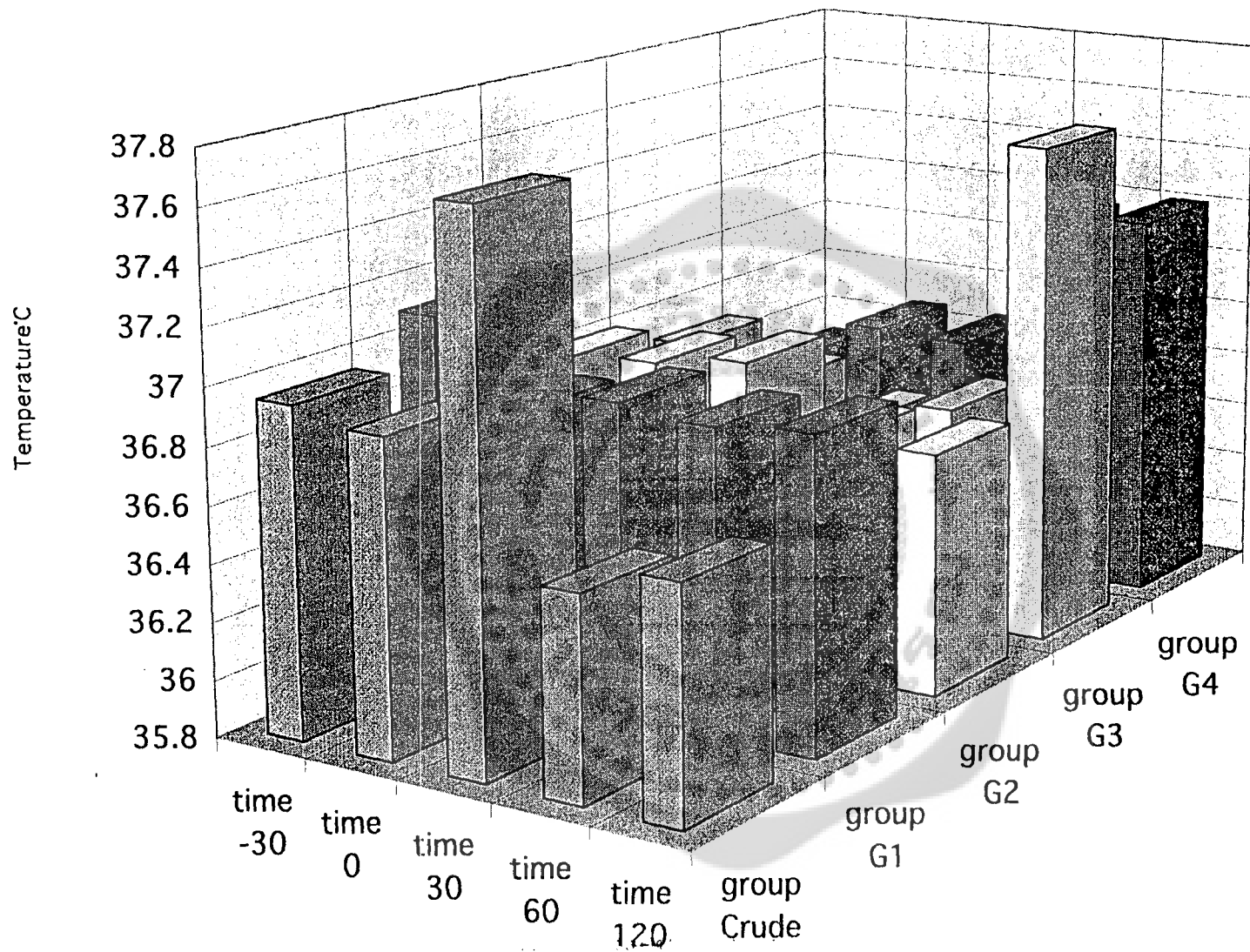


แผนภาพ 51 แสดงการแยกพิษงูแมวเซาด้วยเทคนิค SDS PAGE แสดงให้เห็นองค์ประกอบของพิษงูแมวเซาชนิดหยาบ (Lane 3) และพิษงูแมวเซาส่วนที่แยกด้วย Sephadex G100 คือส่วนของ G1 (Lane4), G2 (Lane5), G3 (Lane6), G4 (Lane7) และพิษงูส่วนที่แยกด้วย CM-Sephadex C-25 คือ I₂ (Lane8)



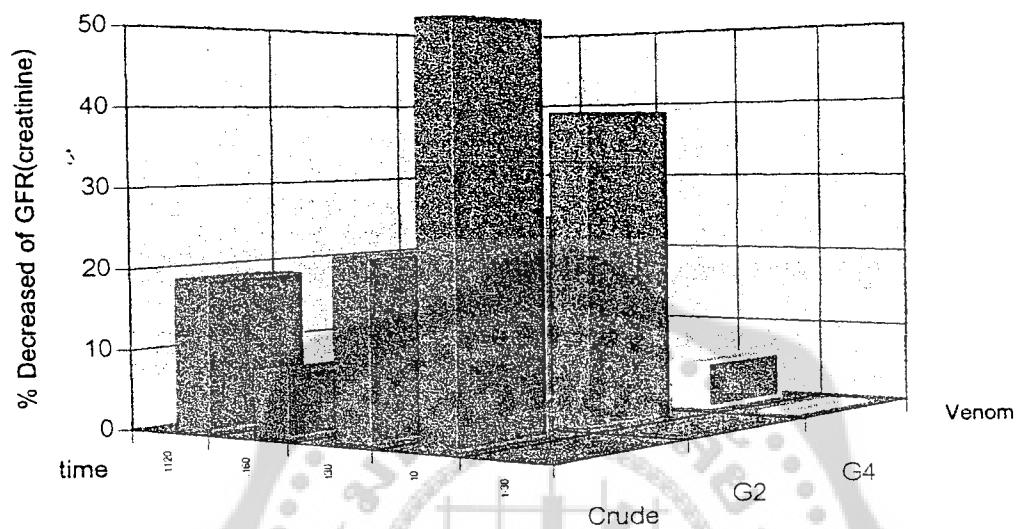
ภาพประกอบ 52 พิษงูแมวเซาชนิดหยาบ และพิษงูส่วนที่แยกด้วย เทคนิคเจลฟิลเตรชัน (G1, G2, G3, G4) โดยฉีดพิษงู 0.3 มิลลิกรัม แสดงผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับความดันบน-ล่าง ของหลอดเลือดแดง common carotid. * $P < 0.05$.

Russell's Viper Affects on Body temperature



แผนภาพ 53 แสดงพิษงูแมวเซาต่ออุณหภูมิสัตว์ทดลอง

Russell's Viper Venom Affects on Kidney Function



ภาพประกอบ 54 ผลของพิษงูแมวเซาอย่างหยาบและพิษงูส่วนที่แยกด้วยเจลฟิลเตรชัน G2, G4 พบว่ามีผลลดอัตราการกรองของไต

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

เจลฟิลเตรชัน

ในการแยกสารผสมระหว่างบลูเดกซ์แทรนกับโพแทสเซียมเพอร์โรไซยาไนด์โดยผ่านคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี100 พบว่าบลูเดกซ์แทรนซึ่งมีสีน้ำเงินจะซึมลงในเจลและเคลื่อนที่ออกมาได้เร็วกว่าโพแทสเซียมเพอร์โรไซยาไนด์ซึ่งมีสีเหลืองเมื่อชะด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 แสดงว่าโมเลกุลของบลูเดกซ์แทรนมีขนาดใหญ่กว่าโมเลกุลของโพแทสเซียมเพอร์โรไซยาไนด์ และสามารถเคลื่อนที่ผ่านช่องว่างระหว่างเม็ดเจลเท่านั้นไม่สามารถผ่านเข้าไปภายในเม็ดเจลได้ จึงถูกชะออกมาได้เร็วกว่าโพแทสเซียมเพอร์โรไซยาไนด์ ซึ่งมีโมเลกุลขนาดเล็กต้องเคลื่อนที่ผ่านทั้งช่องว่างระหว่างเม็ดเจลและช่องว่างภายในเม็ดเจลจึงถูกชะออกมาช้า จากการเปรียบเทียบขนาดโมเลกุลอย่างคร่าว ๆ นี้ทำให้สรุปว่า ปริมาตรฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ชะบลูเดกซ์แทรนผ่านคอลัมน์ออกมาจะเท่ากับ V_0 ของคอลัมน์ ส่วนปริมาตรบัฟเฟอร์ที่ชะโพแทสเซียมเพอร์โรไซยาไนด์ผ่านคอลัมน์ออกมาจะเท่ากับ V_i ของคอลัมน์ (เพราะว่าสารที่นำมาแยกมีสารผสมอยู่เพียง 2 ชนิด ดังนั้นปริมาตรบัฟเฟอร์ที่ชะสารโมเลกุลใหญ่ออกมาจะเท่ากับ V_0 ของคอลัมน์ ส่วนปริมาตรบัฟเฟอร์ที่ชะสารโมเลกุลเล็กออกมาจะเท่ากับ V_i ของคอลัมน์) ค่าปริมาตรทั้งสองค่านี้คือ V_0 และ V_i จะหาได้จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาตรสารที่ถูกชะออกมากับค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ จากผลการทดลองกราฟที่ได้มี 2 พิกัด พิกัดแรกเป็นพิกัดของบลูเดกซ์แทรน พิกัดที่สองเป็นพิกัดของโพแทสเซียมเพอร์โรไซยาไนด์ ตำแหน่งที่วัดค่าการดูดกลืนแสงได้สูงสุดในแต่ละช่วง หรือที่พิกัดแต่ละพิกัดเป็นจุดที่เราจะอ่านปริมาตร เพราะเมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงได้สูงสุด แสดงว่าสารแต่ละตัวถูกชะออกมาจากคอลัมน์จนหมด ทำให้ความเข้มข้นของสารมีค่าสูงสุดดังนั้นค่าการดูดกลืนแสงจึงมีค่ามากที่สุด จากกราฟการชะผ่านบลูเดกซ์แทรนและโพแทสเซียมเพอร์โรไซยาไนด์ที่พิกัด แรกอ่านค่าปริมาตรสารละลายที่ถูกชะออกมาได้ 110 มิลลิลิตร ซึ่งเท่ากับ V_0 ของคอลัมน์ ที่พิกัดที่สองอ่านค่าปริมาตรสารละลายที่ถูกชะออกมาได้ 330 มิลลิลิตร ซึ่งเท่ากับ V_i ของคอลัมน์ เราสามารถคำนวณค่า partition coefficient (K_d) จากสมการ $K_d = V_e - V_0 / V_i - V_0$

ค่า K_d นี้บอกให้ทราบถึงความสามารถของสาร ที่จะแทรกตัวเข้าไปในเม็ดเจล จากค่าที่คำนวณได้บอกว่า โพแทสเซียมเพอร์โรไซยาไนด์ซึ่งมีโมเลกุลขนาดเล็กนั้น จะสามารถแทรกตัวเข้าไปในเม็ดเจลได้ดี ในขณะที่บลูเดกซ์แทรนซึ่งมีโมเลกุลขนาดใหญ่ นั้น จะไม่สามารถผ่านเข้าไปในเม็ดเจลได้เลย

เมื่อพิจารณาน้ำหนักโมเลกุลของสารแต่ละตัวกับความสามารถในการแยกสารของเจลที่ใช้พบว่าเซฟาเดกซ์ จี100 ที่ใช้มีความสามารถในการแยกสารที่มีมวลโมเลกุลระหว่าง 4,000 - 150,000 ดาลตัน ดังนั้นโมเลกุลของบลูเดกซ์แทรนจึงไม่สามารถผ่านเม็ดเจลเข้าไปได้

การทดลองนี้ สิ่งสำคัญที่สุด ที่จะมีผลกระทบต่อความถูกต้องแม่นยำของผลการทดลองคือ การแพคเจลลงในคอลัมน์ ถ้าไม่มีเทคนิคการแพคที่ดีพออาจทำให้เกิดฟองอากาศหรือเกิดการลาดเอียงที่เป็น supporter ของเจล จะทำให้การเรียงตัวของเม็ดเจลไม่ดี เกิดช่องว่างระหว่างเม็ดเจลมากทำให้ไม่สามารถแยกองค์ประกอบของตัวอย่างออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์

บทบาทโดยสรุปของพินูแมวเซา

ฟอสโฟไลเปสเอทูล่าลายพลาสมาเมมเบรนของเซลล์ และยับยั้งการทำงานของไมโทคอนเดรีย โดยสามารถยับยั้งหรือทำลายลูกโซ่การถ่ายทอดอิเล็กตรอน โดยฟอสโฟไลเปสไปเกาะและทำลายฟอสโฟไลปิด ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญส่วนหนึ่งของโครงสร้างผนังของไมโทคอนเดรีย ทำให้เอนไซม์ที่อยู่ในไมโทคอนเดรียถูกกระทบกระเทือน และพบว่าไมโทคอนเดรียของสัตว์มีลักษณะบวม ในท่อไตและเนฟรอน แต่ส่วนที่ทำงานมากต่อ ATP คือ proximal convoluted tubule, distal convoluted tubule และ thick ascending limb ส่วน collecting tubules ซึ่งมีหน้าที่ดูดน้ำกลับด้วยวิธี passive transport อาจจะมีผลน้อยกว่า

พบว่าบริเวณไตชั้นคอร์เท็กซ์คือ Glomerulus มีการสะสมของพินูแมวเซา ย่อมแสดงว่าพินูแมวเซามีผลทำลายท่อไต และพบว่ามี การแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้น (proliferation) ชดเชยส่วนที่ถูกทำลายเกิดขึ้นในส่วนของท่อไตส่วนนั้น นอกจากนี้ยังพบว่าไซโตพลาสซึมของเซลล์มีลักษณะโปร่งใสแสดงถึงการถูกทำลายของออร์แกเนลล์ต่าง ๆ ภายในเซลล์รวมทั้งไมโทคอนเดรียด้วย

ไตเป็นอวัยวะที่มีบทบาทสำคัญในการกำจัดพินูแมวเซาโดยบางส่วนของพินูแมวเซาสามารถถูกขับออกไปในปัสสาวะ มีการศึกษาพบว่าไตสามารถกำจัดพินูแมวเซาส่วนใหญ่ออกมาในปัสสาวะได้ในเวลา 20 นาที หลังจากฉีดพินูแมวเซา

น่าเชื่อว่าการสลายตัวของไขมันในเซลล์และระหว่างเซลล์ และพบว่ามีฟาโกไซโตซิสมีการขับปัสสาวะลดลง ทำให้การทำงานของไตล้มเหลว ดังนั้น พินูแมวเซาอันเนื่องมาจากเอนไซม์ฟอสโฟไลเปสเอทูล่าเป็นผลให้เกิดความผิดปกติของท่อไตส่วน proximal convoluted tubule และ thick ascending limb

เราพบว่าบทบาทของพินูแมวเซาอันเนื่องมาจากเอนไซม์โปรตีเอสและเอนไซม์ไลเปสมีผลต่อร่างกายค่อนข้างกว้างขวางและรุนแรงยิ่งขึ้น เมื่อฤทธิ์ของเอนไซม์ทั้ง 2 ทำงานพร้อมกันทำให้ปฏิกิริยาเสริมกัน และเพิ่มฤทธิ์การทำลายทวีขึ้น (amplifier) ทำให้เซลล์ในอวัยวะต่าง ๆ เช่น ไต, ปอด, สมอง ตลอดจนเซลล์ที่อยู่ในระบบไหลเวียนโลหิต ไม่สามารถควบคุมความสมดุลอยู่ได้ ผลก็คือทำให้เซลล์เสียสภาพไปและเสียชีวิตในที่สุด

โดยสรุปพินูแมวเซามีฤทธิ์ทำให้เกิดภาวะต่าง ๆ เหล่านี้

1. ภาวะขาดเลือด เนื่องจาก

- 1.1 เม็ดเลือดแดงแตกทำลาย (hemolysis) และสูญเสียรูปร่าง (deformation)
- 1.2 ภาวะความดันโลหิตต่ำ ทำให้เกิด stasis ในหลอดเลือดดำ ลดการซึมผ่านออกซิเจน, อาหาร และเกิดภาวะ acidosis
- 1.3 ภาวะ microthrombi & thromboemboli การอุดตันของลิ่มเลือดในระบบหลอดเลือดฝอยเล็ก ๆ เช่น ไต ทำให้อวัยวะนั้นขาดเลือดไปเลี้ยง
- 1.4 ภาวะ Vasoconstriction จากภาวะ hypotension และ mediator ของสารที่หลั่งมาจาก PMN, mesangial cell ,ระบบ adrenergic system และ จากเกร็ดเลือด

2. ขบวนการ necrosis เกิดจากเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมขาดเลือดข้างต้น และจากการเพิ่มระดับ Ca^{2+} ภายในเซลล์ และออร์แกเนลล์ต่าง ๆ เช่น RER, ไมโทคอนเดรีย, เวสิเคิล (vesicle) ทำให้ระดับ ATP ลดต่ำลง ผลตามมา เซลล์เกิดภาวะบวมและ necrosis พืชงูแมวเซา มีผลกระทบกว้างขวางและรุนแรงต่อทุกระบบ เช่น ระบบหายใจ, ระบบขับถ่าย (ไต), ระบบประสาท, สมอ, ระบบต่อมไร้ท่อ อันเนื่องมาจากเอนไซม์ของพืชงูแมวเซา

3. โปรตีเอสทำให้เกิดภาวะ DIC มีการสลายโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับระบบการแข็งตัวของเลือด และทำลายโดยทางอ้อมผ่านพลาสมิน มีการสูญเสียเกร็ดเลือดโดยการทำลายโดยตรง และลดจำนวนเนื่องมาจากถูกนำไปใช้ในกระบวนการแข็งตัวของเลือด ผลตามมามีเกิด hemodiathesis เนื่องจากสูญเสียเกร็ดเลือดและพลาสมาโปรตีน มีการกระตุ้นการสร้างและปลดปล่อยสารจากเซลล์ต่าง ๆ เหล่านี้ เช่น PDGF, C_{5a} , LTs, PGs, TXA_2 , PAF จากเซลล์เม็ดเลือดขาว, เกร็ดเลือด, ลิมโฟไซต์

4. ฟอสโฟไลเปสจากพืชงูแมวเซาทำให้เม็ดเลือดแดงมีรูปร่างผิดปกติ จนถูกทำลายปลดปล่อยสารเร่งการแข็งตัวของเลือด เช่น ไลปิดเมมเบรน, ADP, thromboplastin รวมทั้ง Fe^{2+} เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ

5. Inflammation พืชงูแมวเซากระตุ้นให้หลั่งสาร PGI_2 , PGE_2 , PGD_2 , PGA_2 , HPETE, HETE, bradykinin จากหลอดเลือดผลคือ เกิดภาวะ redness swelling heat and pain ทำให้เซลล์เกิดการบาดเจ็บจากการหลังกรดอะราชีโดนิกเนื่องจากฤทธิ์ของฟอสโฟไลเปสเอท

กล่าวโดยสรุป สาเหตุการตายของเซลล์อาจมาจากสาเหตุ 3 ประการ 1) ขบวนการ peroxidation ของเมมเบรน 2) การกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ฟอสโฟไลเปส (PLC, PLA_2) และกระตุ้นเอนไซม์โปรตีเอส และเอนไซม์นิวคลีเอสโดยแคลเซียม 3) ภาวะการขาดออกซิเจนของไตอาจทำให้การทำงานของเอนไซม์ผิดปกติไป ผลคือมีการรั่วไหลของแคลเซียมเข้าสู่เซลล์ เช่นเดียวกับกรณีการเกิดบวมของเซลล์ ซึ่งเกิดจากการกระตุ้นของเอนไซม์ PLA_2 ของพืชงูแมวเซาโดยตรงต่อเซลล์เมมเบรนของไต หรือผ่านทางขบวนการแข็งตัวของเลือด จากผลพืชงูแมวเซาก่อให้เกิดการกระตุ้น mediator มากมาย เช่น PGs, LTs, TXA_2 , PGI_2 ฯลฯ ซึ่งทำให้เกิด inflammation (swell) ของเซลล์ ผลคือเซลล์มีการเปลี่ยนรูปร่าง (shape change) แบบกลับคืนได้ (reversible) หรือแบบไม่สามารถกลับคืนมาได้ (point of no return) ทำให้เกิดการตาย (necrosis) ของโกลเมอรูลัส, ท่อไต เกิดภาวะ nephrosis ในที่สุด

สรุปภาคปฏิบัติการทดลองทางสรีรวิทยา

สรุปพิษงูแมวเซาต่อพลาสมาอิเล็กโทรไลต์และผลทางสรีรวิทยา พิษงูขนาดความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัม/กิโลกรัมมีผลโดยตรงทำให้ความดันเลือดลดลงในหนู wistar rat แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อัตราการเต้นของหัวใจลดลงเล็กน้อยไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกับอัตราการหายใจและอุณหภูมิร่างกาย ผลต่อไตพบว่าค่าอัตราการกรองลดลงอย่างนัยสำคัญ พิษงูแมวเซามีผลเพิ่มการขับถ่ายโซเดียม, โพแทสเซียมและแคลเซียม แสดงถึงท่อไตมีปัญหาในการดูดซึมกลับของอิเล็กโทรไลต์เหล่านี้

สรุปบทปฏิบัติการทางเคมี

สรุปผลการแยกพิษงูแมวเซา พิษงูแมวเซาประกอบด้วยโปรตีน 70 - 80 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก มีองค์ประกอบโปรตีนตามน้ำหนักโมเลกุลโดยพิจารณาจากค่า Kav และอิเล็กโทรโฟรีซิสคือ กลุ่ม G1 100,000 ดาลตัน, กลุ่ม G2 10,000 - 30,000 ดาลตัน และ กลุ่มสุดท้าย G3 - G4 ประมาณ 1,000 ดาลตัน โดยแต่ละกลุ่มมีส่วนของโปรตีนเท่ากับ 22, 61, 12, 5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ ยังมีชนิดของโปรตีนซึ่งเป็นองค์ประกอบแตกต่างกันด้วย กล่าวคือ กลุ่ม G1 มีองค์ประกอบโปรตีนประมาณ 8 - 10 ชนิด, กลุ่ม G2 มีองค์ประกอบโปรตีนประมาณ 5 ชนิด, กลุ่ม G3 มีองค์ประกอบโปรตีน 1 - 2 ชนิด และ กลุ่ม G4 ไม่พบองค์ประกอบโปรตีน ส่วนการแยกด้วยไอออนเอ็กเชนจ์โครมาโตกราฟีของโปรตีน I₂ พบว่าสามารถแยกกลุ่มขององค์ประกอบโปรตีนเพียง 3 ชนิด

ข้อเสนอแนะ

สิ่งที่น่าศึกษาและสนใจที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาทดลองนี้คือ การแยกหาน้ำหนักโมเลกุลของแต่ละโปรตีนในพิษงู แล้วทำการทดสอบผลของพิษงูต่อเซลล์เพาะเลี้ยงของไต เช่น มีแซงเกียลเซลล์ (mesangial cell), เซลล์ท่อไต เฟลตเลท เม็ดเลือดแดง, เซลล์เอนโดทีเลียมเซลล์ และเซลล์เม็ดเลือดขาว เพื่อศึกษาการทำงานระดับเซลล์ และระดับโมเลกุลต่อไป



บรรณานุกรม

- เกรียง ตั้งสง่า, ถนอม สุภาพรและบุญธรรม จิระจันทร์. ความรู้ทางทฤษฎีเกี่ยวกับการฟอกเลือดด้วยเครื่องไตเทียม. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ชวนพิมพ์, 2537.
- โครงการตำราจุฬายุทธศาสตร์ ฉบับที่ 6. ตำรายุทธศาสตร์. ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ยูนิตีพับลิเคชัน, 2537
- ชลลดา บุรณกาล และณรงค์ศักดิ์ ชัยบุตร. “บทบาทของแคลเซียมต่อหน้าที่ของไตในสุนัขขณะที่ได้รับพิษงูแมวเซา”, เวชสารสัตวแพทย์. 20(2) : 375-391 ; มิถุนายน, 2539.
- เดชา ร่มไทร. Blood coagulant” เชียงใหม่ : ภาควิชาคลินิกัลไมโครสโคปี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2533.
- ทิพย์ ศรีไพศาล. โลหิตวิทยา1995. กรุงเทพฯ : สมาคมโลหิตวิทยาแห่งประเทศไทย, 2538.
- บุญเชียร ปานเสถียรกุล และ ภัทรพร อิศรางกูร ณ อยุธยา. การอบรมเชิงปฏิบัติการภาวะเลือดออกง่าย. โครงการเลือดออกง่าย ร.พ.เด็ก กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข และสมาคมโลหิตวิทยาแห่งประเทศไทย ณ ตึกผู้ป่วยนอก ร.พ.เด็ก. 2528
- บุญเยื่อน ทุมวิภาค และวิโรจน์ นุตพันธ์. การรักษาผู้ป่วยถูกงูพิษกัด. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์พิมพ์เนศ, 2525.
- ปราณี สิงห์ประเสริฐ, ภูมรา ตาละลักษณ์ และ เบญจวรรณ รุ่งนิตะรังษี. พยาธิทางคลินิก คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล. โรงพิมพ์เรือนแก้ว, 2539
- ประสิทธิ์ พุตระกูล และนริศรา พุตระกูล. โรคไตคลินิก. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2537.
- พจน์ ศรีบุญลือ และ ประสงค์ คุณานัฐณ์ชัยเดช. ชีวเคมีของเนื้อเยื่อ. พิมพ์ครั้งที่ 1, ขอนแก่น; มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2535.
- วิญญู มิตรานันท์. พยาธิวิทยากายวิภาคพื้นฐาน. พิมพ์ครั้งที่ 2, กรุงเทพฯ; โอ.เอส.พรินติ้งแฮสส์, 2540.
- วิทยา ศรีดามา. โครงการตำรายุทธศาสตร์. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ยูนิตีพับลิเคชัน, 2537.
- วรรณ ธรรมพาลีศ. การศึกษาส่วนประกอบของพิษงูเห่าไทยที่มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อเฉพาบริเวณ. ปริญญานิพนธ์ วท.ม. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร, 2530. อัดสำเนา.
- สัณฑ์ พณิชกุล. การศึกษาการแยกพิษงูแมวเซาออกเป็นส่วน ๆ เพื่อการศึกษาทางเอนไซม์. วิทยานิพนธ์ วท.ม. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2510. อัดสำเนา.

- สุภาภรณ์ ปิยะศิริกุล. การศึกษาคุณสมบัติเอนไซม์ฟอสโฟไลเปสเอชจากงูแมวเซา. ปรินญา-
นิพนธ์ กศ.ม. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร, 2530.
อัดสำเนา.
- สมาคมเวชปฏิบัติทั่วไป. เวชปฏิบัติทั่วไป เล่ม 1. คณะกรรมการการศึกษาต่อเนื่องวชิรพยาบาล,
2537.
- สุรพล อิศรไกรศีล. การเปลี่ยนแปลงทางโลหิตวิทยาเกี่ยวกับโรคระบบอื่น โครงการตำรา-ศิริราช.
พิมพ์ครั้งที่ 3, เรือนแก้วการพิมพ์, 2536.
- อากัสรา ชมิดท์. เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์ ไร่เขียว, 2537.
- Anthony, T.TU. Handbook of Natural Toxins. Colorado : Marce Dekker Inc, 5 ; 1991.
- Avogaro, P. and G. Ricci. Phospholipids and Atherosclerosis, New York : Raven press,
1983.
- Bell, R.D., A.K. Mandal and D.E. Parker. "The Effect of Splenectomy on Renal Function
in Epinephrine-induced Renal Failure," Proceeding of the Society for
Experimental Biology and Medicine. 167 : 12-14 ; 1981.
- Born, G.V.R., et al. Handbook of Experimental Pharmacology. New York : Springer-
Verlag, 52 ; 1979.
- Bradlow. B.A. and A.J. Marcus. "Action of Snake Venom Phospholipase A on Isolated
Platelet Membranes," Proceedings of the Society for Experimental for Biology
and Medicine. 123 : 889-893 ; 1966.
- Bruno, L., et al. "The Dynamics of Local Tissue Damage Induced by Bothrops Asper
Snake Venom and Myotoxin II on the Mouse Cremaster Muscle : An Intravital
and Electron Microscopic Study," Toxicon. 32(1) : 41-55 ; 1994.
- Bucherl, W., E.E. buckley and V. Deulfeu. Venomous Aminals and Their Venoms.
New York : Academic Press. 1 ; 1968.
- Chaiyabutr, N., et al. " Effect of Converting Enzyme Inhibitor on Renal Function of Rats
Following Russell's Viper Venom Administration," ICMR Annals. 5:169-179;1985.
- Chaiyabutr, N., et al. "Russell;s Viper Venom-induced Depolarization in the Proximal
Tubule of Triturus Kidney," Thai Joutnal of Veternary Medicine. 15 : 297- 303 ;
1985.
- Chomdej, B. and W. Pfaller. "The Acute Effect of Russell's Viper Venom on Renal
Function in Rats," Chulalongkorn Medical Journal. 31(4) : 296-301; 1987.

- Chopra, Lieut-Colonel R.N. and J.S. Chowhan. "Action of the Indian Daboia (*Vipera Russellii*) Venom on the Circulatory System," Indian Journal of Medical Research. 21(3) : 493-505 ; 1934.
- Clarkson, A.R., et al. "Glomerular Coagulation in Acute Ischaemic Renal Failure," The Quarterly Journal of Medicine. 39 : 585-599 ; 1970.
- Clemens, R., et al. "Therapeutic Effects of Antivenom Supplemented by Antithrombin III in Rats Experimentally Envenomated with Russell's Viper (*Daboia Russellii Siamensis*) Venom," Toxicon. 33(1) : 77-82 ; 1995.
- Dale, M.M. and J.C. Foreman. Textbook of Immunopharmacology. Oxford : Blackwell Scientific, 2 ; 1989.
- Date, A. and J.C.M. Shastry. "Renal Ultrastructure in Cortical Necrosis Following Russell's Viper Envenomation" The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 84 : 3-8; 1981.
- Date, A. and J.C.M. Shastry. "Renal Ultrastructure in Cortical Necrosis Following Russell's Viper Envenomation" Pathology. 137 : 225-241; 1982.
- Dubourdieu, D.J.,H. Kawaguchi and W.T. Shier. "Molecular Weight Variations in the Diversity of Phospholipase A₂ forms in Reptile Venoms," Toxicon. 25(3) : 333-343 ; 1987.
- Dunnill, M.S. and D,W, Jerrome. "Renal Tubular Necrosis due to Shock : Light and Electron Microscope Observations," Journal of Pathology. 118 : 109-112 ; 1975.
- Gerber, J.G., et al. "Prostaglandins and Renin Release : II Assessment of Renin Secretion Following Infusion of PGI₂, E₂, D₂ into the Renal Artery of Anesthetized Dogs," Prostaglandins. 15(1) : 81-88; 1978.
- Gooding, K. and M. Dekker. HPLC of Biological Macromolecules. 51 : 1990.
- Harvey, A.L., Snake Toxins. Sec. 134 Pergamin press, 1991.
- Huang, H.C. "Effect of Phospholipases A₂ from *Vipera Russellii* Snake Venom on Blood Pressure, Plasma Prostacyclin Level and Renin Activity in Rats," Toxicon. 22(2) : 253-264 ; 1984.
- Huang, H.C. "Release of Slow Reacting Substance from the Guinea-Pig Lung by Phospholipases A₂ of *Vipera Russellii* Snake Venom," Toxicon. 22(3) : 359-372 ;1984.
- Khin, M.A. "Histological and Ultra Structural Changes of the Kidney in Renal Failure after Viper Envenomation," Toxicon. 16 : 71-75 ; 1978.

- Kochva, E. "The Origin of Snakes and Evolution of the Venom Apparatus," Toxicon. 25(1) : 65-106 ; 1987.
- Laosombat, V. "Bleeding Disorder due to Snake Bite," Songkla Medical Journal. 2(2) : 171-176 ; 1984.
- Lee, C. Y. and H.C. Huang. "Isolation and Pharmacological Properties of Phospholipase A₂ from *Vipera Russellii* Snake Venom," Toxicon. 22(2) : 207-217 ; 1984.
- Maxwell, H.M., et al. Advances in Nephrology. London : Year Book Medical Publishers Inc, 11 ; 1982.
- Ouyang, C. and T.F. Huang. "Effect of Purified the Phospholipases A₂ from Snake Venom and Bee Venom on Rabbit Platelet Function," Toxicon. 22(5) : 705-718 ; 1984.
- Pe, T., K.A. Cho and A.A. Myint. "Amount of Venom Injected by Russell's Viper (*Vipera Russellii*) in Killing Prey," The Snake. . 23 : 71-74 ; 1991.
- Pe, T. and K.A. Cho. "Amount of Venom Injected by Russell's Viper (*Vipera Russellii*)," Toxicon. 24(7) : 730-733 ; 1986.
- Pfeilschifter, J., et al. "Cytokine-stimulated Secretion of Group II Phospholipases A₂ by Rat Mesangial Cells," The Journal of Clinical Investigation. 92 : 2516-2523 ; 1993.
- Ratcliffe, P.J., S. Pukrittayakamee and J.G.G. Ledingham, "Direct Nephrotoxicity of Russell's Viper Venom Demonstrated in the Isolated Perfused Rat Kidney," The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 40(3) : 312-319 (8-078) ; 1989.
- Rousseau, A. and S. Gatt. "Utilization of Membranous Lipid Substrates by Membrane-bound Enzymes : Intramembrane and Intermembrane Hydrolysis of Diacylglycerol by Lipase of Rat Liver Microsomes," Federation of European Biochemical Societies. 167(1) : 42-46 ; 1984.
- Sakuragawa, N., et al. "Studies on Coagulation-Fibrinolytic Activity of Snake Venoms," The Snake. 11 : 176-183 ; 1979.
- Sarangji, A., et al. "Renal Involvement in Viperine Snake bite," Indian Journal of Medical Research. 71 : 918-923 ; 1980.
- Sen, S., et al. "Plasma Renin Activity in Hypertensive Rats after Treatment with Renin Preinhibitor," American Journal of Physiology. 216 (3) : 499-503 ; 1969.

- Shastri, J.C.M., et al. "Renal Failure Following Snake Bite. A Clinicopathological Study of Nineteen Patients," The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 26(5) : 1032-1038 ; 1977.
- Sithiprija, V., et al. "Acute Interstitial Nephritis in Snake Bite," The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 31(2) : 408-410; 1982.
- Soe, S., T. Than and K.E. Han. "The Nephrotoxic Action of Russell's Viper (*Vipera Russellii*) Venom," Toxicon. 28 : 461-467 ; 1990.
- Than, T. "Haemostatic Disturbances in Patients Bitten by Russell's Viper (*Vipera Russellii Siamensis*) in Burma," British Journal of Haematology. 69 : 513-520 ; 1988.
- Thein, K., et al. "Establishment of Solid-Phase Immunoradiometric Assay for Quantification of Russell's Viper (*Vipera Russellii*) Venom in Circulation Following Serotherapy," The Snake. 26 : 105-109 ; 1994.
- Thwin, M.M., et al. "A Major Lethal Factor of the Venom of Burmese Russell's Viper (*Daboia Russell's Viper Siamensis*) ; Isolation, N-terminal Sequencing and Biological Activities of Daboiatoxin," Toxicon. 31(1) : 77-82 ; 1995.
- Tokumine, J., et al. "Effect of Trimeresurus Flavoviridis Venom Basic Phospholipases A₂ without Enzymatic Activity on Erythrocyte Shape," The Snake. 24 : 23-33; 1992.
- Triplett, D.A. Platelet Function Laboratory Evaluation and Clinical Application. Chicago : Americal Society of Clinical Pathologist, 1987.
- Tungthanathanich, P.,N. Chaiyabutr and V. Sitprija. "Effect of Russell's Viper (*Vipera Russellii Siamensis*) Venom on Renal Hemodynamics in Dogs," Toxicon. 24(4) : 365-371 ; 1986.
- Vadas, P. "Elevated Plasma Phospholipase A₂ Level : Correlation with the Hemodynamic and Pulmonary Changes in Gram-Negative Septic shock," The Journal of Laboratory and Clinical Medicine. 104(6) : 873-881 ; 1984.
- Win, T., et al. "Effectiveness of Intramuscular Antivenom Therapy in Russell's Viper (*Vipera Russellii*) Envenomed Rats," The Snake. 23 : 55-58 ; 1991.
- Wooley, P. & P.B. Steffen. Lipases their Structure, Biochem and Application. Cambridge University, 1994.
- Yang, C.C., et al. "Lysine Modification in Snake Venom Phospholipase A₂," The Snake. 14 : 110-118 ; 1982.
-





นิยามและศัพท์เฉพาะ

alveolar capillary	= หลอดเลือดฝอยของถุงลม
chemotaxis	= ปฏิกริยาเข้าหรือหนีจากของโปรโตพลาสซึม (protoplasm) ที่มีต่อตัวกระตุ้นทางเคมี (= chemiotaxis).
defibrinated syndrome	= ภาวะไร้ไฟбрิน
hypoxia	= ปริมาณออกซิเจนต่ำ การขาดแคลนออกซิเจนในอากาศที่หายใจเข้า
Inflammation	= การอักเสบ
Ischemia	= การขาดเลือด
lecithin	= กลุ่มของฟอสโฟลิปิดที่ประกอบด้วยเอสเทอร์ของกลีเซอรอล ; 1,2-diacyl-sn-glycerol
lysolecithin	= เลซิทินซึ่งสูญเสียกรดไขมันอิสระ
pneumocyte	= เซลล์บุผิวถุงลม
pulmonary edema	= ปอดบวม
renal cortical necrosis	= การเกิดการตาย





ฟอสเฟตบัฟเฟอร์

ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เป็นบัฟเฟอร์ที่ใช้ประโยชน์ได้ครอบคลุมย่าน physiological range และใช้ได้ทั่วไปกับเซลล์และเนื้อเยื่อทั่วไป .โดยปกติจะใช้ความเข้มข้น = 0.2 M ของเกลือฟอสเฟต 2 ตัวคือ NaH_2PO_4 และ Na_2HPO_4 การเตรียมอาจจะเตรียมปริมาณน้อยใช้หมดภายใน 2-3 วัน แล้วเตรียมใหม่ เพราะเชื้อแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ดี หรืออาจจะเตรียมแบบปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่าน millipore membrane และเก็บไว้ขวดละ 100 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้ borosilicate bottles เพราะ Na_2HPO_4 กัดกร่อนเนื้อแก้วชนิดธรรมดาได้ ปกติจะใช้สาร Na_2HPO_4 มากกว่า NaH_2PO_4 ประมาณ 4 เท่า

Phosphate buffer

Solution A : NaH_2PO_4 , 0.2 M ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 27.6 gm/litre)

Solution B : Na_2HPO_4 , 0.2 M ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 53.65 gm/litre,
or $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 71.63 gm/litre)

การเตรียม 0.2 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.00

- | | |
|----------------------------|--------------|
| 1. สารละลาย A (solution A) | 33 มิลลิลิตร |
| 2. สารละลาย B (solution B) | 67 มิลลิลิตร |
| 3. เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร | 1 ลิตร |



สภาวะ (Condition) ที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณโซเดียมด้วยเครื่องอะตอมมิกแอพซอร์พชั่น

Condition Na

INSTRUMENT CONDITION		
HC LAMP	# 4	L/MIN
HC LAMP	-	mA
Slit	0.5	nm
WL	589.0	nm
Mode	HC LAMP	

ANALOG OUT	
Response	bar
Expansion	1.0
Chart speed	10 mm/ min

FLAME CONDITION		
FLAME	Air - C ₂ H ₂	
Fuel	1.6	L/min
Oxidant	8	L/min
Burner	10	cm
Height	-	cm
Angle	-	

CONC. CALB	
Mode	Normal
STD. 1	0.1
STD. 2	0.5
STD. 3	1.0
STD. 4	1.5
STD. 5	2.0
UNIT	PPM

MESUREMENT CONDITION		
Signal proc.	Integ hold	
Pre - spray	3	sec
Integ time	5	sec
Repeat	2	
Max-N	3	
CV	5	%



ภาคผนวก ง

ตาราง 13 ผลการทดลองการหาปริมาณโปรตีนเทคนิคเบรดฟอร์ดวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm

ผลการแยกโปรตีนชนิดหยาบ ครั้งที่ 1 (RW_{1st})	ค่าการดูดกลืนแสง 595 nm (วัดครั้งที่)		
	1	2	เฉลี่ย
โปรตีน G_1	0.372	0.347	0.419
โปรตีน G_2	0.822	0.812	0.817
โปรตีน G_3	0.240	0.241	0.2405
โปรตีน G_4	0.072	0.073	0.0725
ผลการแยกโปรตีนชนิดหยาบ ครั้งที่ 2 (RW_2)	ค่าการดูดกลืนแสง 595 nm (วัดครั้งที่)		
	1	2	เฉลี่ย
โปรตีน G_1	0.386	0.403	0.394
โปรตีน G_2	0.771	0.771	0.771
โปรตีน G_3	0.239	0.254	0.24
โปรตีน G_4	0.054	0.054	0.054

ตารางที่ 14 แสดงปริมาณโปรตีนในแต่ละแฟรคชันที่แยกด้วยเซนาเดกซ์จี 100

แฟรคชัน	ปริมาตร(มล.)		ความเข้มข้น ไมโครกรัม/ไมโครลิตร		ปริมาณโปรตีน มิลลิกรัม		ปริมาณโปรตีนใน แต่ละส่วน เฉลี่ย มิลลิกรัม
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	
แฟรคชัน G_1	42	45	0.62	0.60	26.04	27	26.5
แฟรคชัน G_2	57	63	1.215	1.18	70.68	74.34	72.51
แฟรคชัน G_3	33	42	0.36	0.37	11.88	15.54	13.71
แฟรคชัน G_4	60	60	0.10	0.08	6	4.8	5.4

PLA₂ Activity

Sample	O.D. 900 นาโนเมตร/10 นาที่ ที่ 37 องศาเซลเซียส	Total activity of Enzyme PLA ₂
Crude	0.259	25.9
G1	0.087	8.70
G2	0.370	37.0
G3	0.037	3.70
G4	0.056	5.60
I ₂	0.229	22.9

1 UNIT = hydrolysis of 1 μ mole phosphotidylcholine/ minute

RW1 ABS 200 mg 595 ไมโครเมตร

1	0.039	31	0.041	61	0.133	91	0.139	121	0.052
2	0.039	32	0.036	62	0.140	92	0.137	122	0.047
3	0.039	33	0.038	63	0.150	93	0.133	123	0.062
4	0.039	34	0.066	64	0.179	94	0.128	124	0.057
5	0.039	35	0.063	65	0.219	95	0.099	125	0.060
6	0.039	36	0.091	66	0.281	96	0.162	126	0.047
7	0.039	37	0.110	67	0.321	97	0.088	127	0.058
8	0.039	38	1.173	68	0.326	98	0.102	128	0.038
9	0.039	39	1.188	69	0.421	99	0.102	129	0.054
10	0.039	40	1.190	70	0.455	100	0.082	130	0.059
11	0.039	41	1.173	71	0.470	101	0.087	131	0.056
12	0.039	42	1.203	72	0.455	102	0.077	132	0.057
13	0.039	43	0.186	73	0.444	103	0.077	133	0.058
14	0.039	44	0.152	74	0.342	104	0.067	134	0.050
15	0.039	45	0.126	75	0.309	105	0.069	135	0.046
16	0.039	46	0.115	76	0.239	106	0.063	136	0.052
17	0.039	47	0.090	77	0.233	107	0.062	137	0.057
18	0.039	48	0.101	78	0.218	108	0.056	138	0.047
19	0.039	49	0.090	79	0.197	109	0.060	139	0.062
20	0.039	50	0.092	80	0.111	110	0.070	140	0.061
21	0.039	51	0.086	81	0.072	111	0.058	141	0.071
22	0.039	52	0.076	82	0.068	112	0.052	142	0.067
23	0.039	53	0.073	83	0.062	113	0.059		
24	0.039	54	0.074	84	0.074	114	0.043		
25	0.039	55	0.090	85	0.075	115	0.068		
26	0.039	56	0.081	86	0.075	116	0.063		
27	0.039	57	0.083	87	0.103	117	0.044		
28	0.039	58	0.089	88	0.107	118	0.051		
29	0.039	59	0.081	89	0.112	119	0.062		
30	0.036	60	0.099	90	0.126	120	0.062		

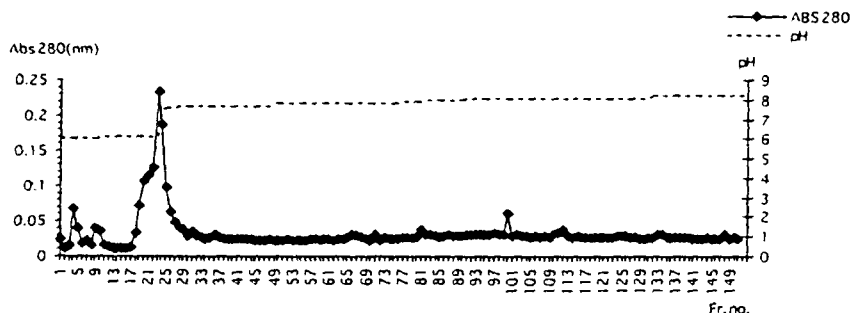
RW1 200 mg 280 นาโนเมตร

1	0.014	31	0.008	61	0.469	91	0.371	121	0.839
2	0.010	32	0.013	62	0.577	92	0.391	122	0.988
3	0.019	33	0.039	63	0.709	93	0.402	123	0.988
4	0.015	34	0.116	64	0.885	94	0.401	124	0.532
5	0.012	35	0.298	65	1.122	95	0.385	125	0.414
6	0.009	36	0.578	66	1.477	96	0.370	126	0.324
7	0.008	37	0.889	67	1.944	97	0.376	127	0.233
8	0.008	38	1.112	68	2.448	98	0.473	128	0.179
9	0.015	39	1.288	69	2.488	99	0.553	129	0.144
10	0.010	40	1.36	70	2.488	100	0.654	130	-
11	0.020	41	1.32	71	2.488	101	0.638	131	0.121
12	0.005	42	1.21	72	2.488	102	0.535	132	0.159
13	0.039	43	1.05	73	2.488	103	0.495	133	0.141
14	0.007	44	0.88	74	2.488	104	0.501	134	0.109
15	0.008	45	0.73	75	2.422	105	0.545	135	0.087
16	0.008	46	0.61	76	1.998	106	0.674	136	0.073
17	0.025	47	0.52	77	1.545	107	0.712	137	-
18	0.008	48	0.44	78	1.349	108	0.588	138	0.056
19	0.010	49	0.42	79	1.135	109	0.438	139	0.048
20	0.011	50	0.37	80	0.538	110	0.418	140	0.044
21	0.009	51	0.37	81	0.376	111	0.425	141	0.041
22	0.012	52	0.37	82	0.272	112	0.485	142	0.034
23	0.015	53	0.36	83	0.210	113	0.587	143	0.032
24	0.016	54	0.36	84	0.177	114	0.656	144	0.034
25	0.012	55	0.36	85	0.187	115	0.727	145	0.032
26	0.005	56	0.34	86	0.220	116	0.791		
27	0.006	57	0.34	87	0.239	117	0.824		
28	0.006	58	0.34	88	0.272	118	1.025		
29	0.008	59	0.363	89	0.303	119	1.194		
30	0.009	60	0.401	90	0.343	120	1.131		

RW2 200 mg 598 นาโนเมตร

1	0.011	31	0.022	61	0.132	91	0.150	121	0.02
2	0.011	32	0.040	62	0.156	92	0.088	122	0.021
3	0.011	33	0.027	63	0.150	93	0.098	123	0.035
4	0.011	34	0.147	64	0.219	94	0.078	124	0.017
5	0.011	35	0.058	65	0.254	95	0.068	125	0.012
6	0.011	36	0.106	66	0.291	96	0.083	126	0.01
7	0.011	37	0.140	67	0.336	97	0.08	127	0.016
8	0.011 ³	38	0.207	68	0.370	98	0.073	128	0.024
9	0.011	39	0.211	69	0.415	99	0.065	129	0.001
10	0.011	40	0.252	70	0.507	100	0.045	130	0.021
11	0.011	41	0.256	71	0.550	101	0.033	131	0.02
12	0.011	42	0.249	72	0.556	102	0.011	132	0.024
13	0.011	43	0.238	73	0.535	103	0.016	133	0.015
14	0.011	44	0.208	74	0.459	104	0.005	134	0.016
15	0.011	45	0.187	75	0.417	105	0.014	135	0.011
16	0.011	46	0.154	76	0.357	106	0.002	136	0.015
17	0.011	47	0.154	77	0.294	107	0.004	137	0.001
18	0.011	48	0.119	78	0.203	108	0.006	138	0.006
19	0.033	49	0.115	79	0.166	109	0.021	139	0.026
20	0.023	50	0.116	80	0.120	110	0.001	140	0.018
21	0.021	51	0.115	81	0.085	111	0.002	141	0.004
22	0.011	52	0.101	82	0.048	112	0.017	142	0.014
23	0.009	53	0.092	83	0.031	113	0.029	143	0.001
24	0.014	54	0.096	84	0.021	114	0.028	144	0.005
25	0.017	55	0.090	85	0.039	115	0.006	145	0.005
26	0.012	56	0.085	86	0.058	116	0.029	146	0.034
27	0.014	57	0.085	87	0.068	117	0.02		
28	0.024	58	0.085	88	0.087	118	1.022		
29	0.017	59	0.083	89	0.12	119	1.016		
30	0.022	60	0.097	90	0.141	120	1.023		

1.	0.023	34.	0.099	67	1.845	100	0.359	133	0.100
2.	0.023	35.	0.227	68	2.327	101	0.359	134	0.089
3.	0.021	36.	0.438	69	2.484	102	0.359	135	0.073
4.	0.019	37.	0.683	70	2.484	103	0.434	136	0.065
5.	0.021	38.	1.064	71	2.484	104	0.421	137	0.060
6.	0.019	39.	0.140	72	2.484	105	0.465	138	0.051
7.	0.018	40.	1.137	73	2.484	106	0.504	139	0.048
8.	0.019	41.	1.058	74	2.309	107	0.592	140	0.044
9.	0.020	42.	0.918	75	1.918	108	0.741	141	0.039
10.	0.035	43.	0.753	76	1.503	109	0.642	142	0.039
11.	0.040	44.	0.602	77	1.111	110	0.459	143	0.033
12.	0.039	45.	0.412	78	0.806	111	0.451	144	0.033
13.	0.046	46.	0.402	79	0.542	112	0.477	145	0.029
14.	0.028	47.	0.351	80	0.374	113	0.526	146	0.028
15.	0.020	48.	0.356	81	0.256	114	1.205	147	0.028
16.	0.018	49.	0.359	82	0.200	115	1.333	148	0.028
17.	0.014	50.	0.327	83	0.159	116	0.615	149	0.026
18.	0.016	51.	0.289	84	0.153	117	0.543	150	0.023
19.	0.014	52.	0.288	85	0.167	118	0.653	151	0.048
20.	0.013	53.	0.292	86	0.197	119	0.678	152	0.035
21.	0.011	54.	0.288	87	0.232	120	0.647	153	0.019
22.	0.008	55.	0.282	88	0.272	121	0.608		
23.	0.010	56.	0.273	89	0.307	122	0.568		
24.	0.014	57.	0.266	90	0.341	123	0.475		
25.	0.008	58.	0.271	91	0.360	124	0.406		
26.	0.008	59.	0.292	92	0.373	125	0.335		
27.	0.009	60.	0.339	93	0.379	126	0.246		
28.	0.008	61.	0.415	94	0.373	127	0.205		
29.	0.003	62.	0.521	95	0.356	128	0.185		
30.	0.010	63.	0.649	96	0.359	129	0.233		
31.	0.009	64.	0.812	97	0.331	130	0.165		
32.	0.014	65.	1.043	98	0.337	131	0.124		
33.	0.040	66.	1.386	99	0.340	132	0.110		



แบบภาพแสดง การสกัดพืชมารซา(G2) ความเข้มข้น 10 มก./มล.
ด้วยเทคนิคโอดอนซีกของโครมาโตกราฟี (CM-Sephadex G25) โดยใช้อัลบูมิน-คอกการล่อน 0.02-0.2
โมลที่ละลายผสมกันด้วย 6-9.2 อัตราการไหล 1.2 มล./ชม. ทำการแยกเก็บหลอดละ 4 มล.

RVV I ₂ (10 mg)		ion - pH gradient		sample 100 μ l			
หลอดที่	ABS(280)	หลอดที่	ABS(280)	หลอดที่	ABS(280)	หลอดที่	ABS(280)
1	0.024	21	0.116	41	0.024	61	0.023
2	0.010	22	0.126	42	0.023	62	0.021
3	0.015	23	0.232	43	0.023	63	0.023
4	0.067	24	0.188	44	0.023	64	0.023
5	0.039	25	0.097	45	0.022	65	0.026
6	0.017	26	0.064	46	0.021	66	0.031
7	0.022	27	0.048	47	0.022	67	0.028
8	0.015	28	0.040	48	0.024	68	0.027
9	0.040	29	0.037	49	0.021	69	0.023
10	0.034	30	0.029	50	0.021	70	0.021
11	0.015	31	0.034	51	0.022	71	0.030
12	0.014	32	0.028	52	0.023	72	0.021
13	0.011	33	0.027	53	0.022	73	0.027
14	0.011	34	0.025	54	0.022	74	0.024
15	0.011	35	0.026	55	0.022	75	0.025
16	0.011	36	0.031	56	0.021	76	0.025
17	0.014	37	0.027	57	0.023	77	0.026
18	0.033	38	0.024	58	0.024	78	0.026
19	0.071	39	0.023	59	0.021	79	0.026
20	0.106	40	0.023	60	0.023	80	0.026

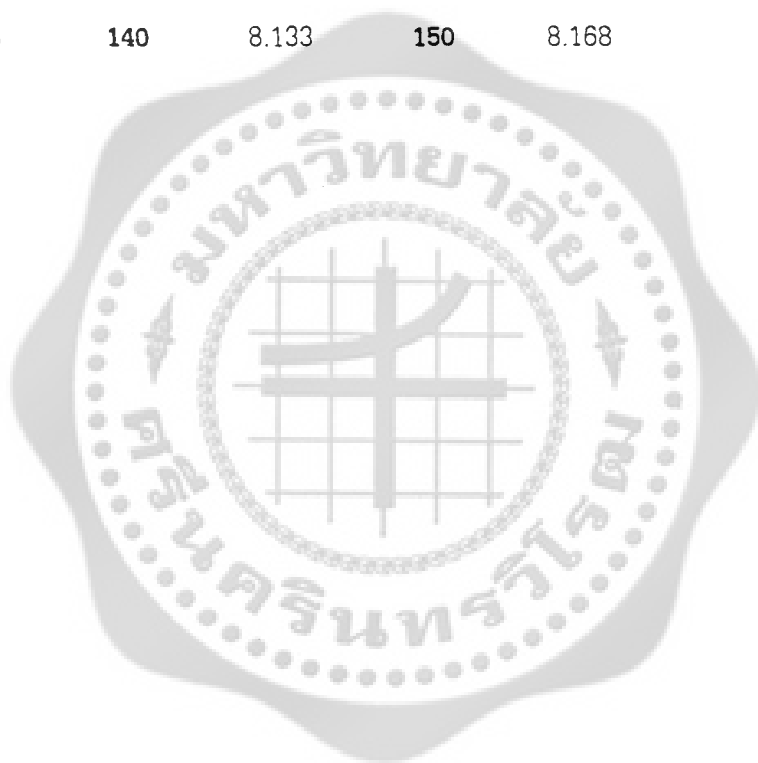
หลอดที่	ABS	หลอดที่	ABS	หลอดที่	ABS	หลอดที่	ABS
81	0.038	101	0.028	121	0.026	141	0.025
82	0.030	102	0.030	122	0.027	142	0.025
83	0.030	103	0.029	123	0.026	143	0.025
84	0.028	104	0.028	124	0.028	144	0.027
85	0.027	105	0.027	125	0.028	145	0.025
86	0.028	106	0.029	126	0.028	146	0.025
87	0.030	107	0.027	127	0.026	147	0.024
88	0.028	108	0.028	128	0.026	148	0.031
89	0.028	109	0.027	129	0.025	149	0.025
90	0.029	110	0.031	130	0.025	150	0.026
91	0.030	111	0.032	131	0.026	151	0.025
92	0.030	112	0.036	132	0.026		
93	0.031	113	0.029	133	0.030		
94	0.031	114	0.026	134	0.030		
95	0.031	115	0.029	135	0.026		
96	0.031	116	0.026	136	0.026		
97	0.032	117	0.026	137	0.026		
98	0.031	118	0.026	138	0.026		
99	0.036	119	0.026	139	0.026		
100	0.060	120	0.027	140	0.026		

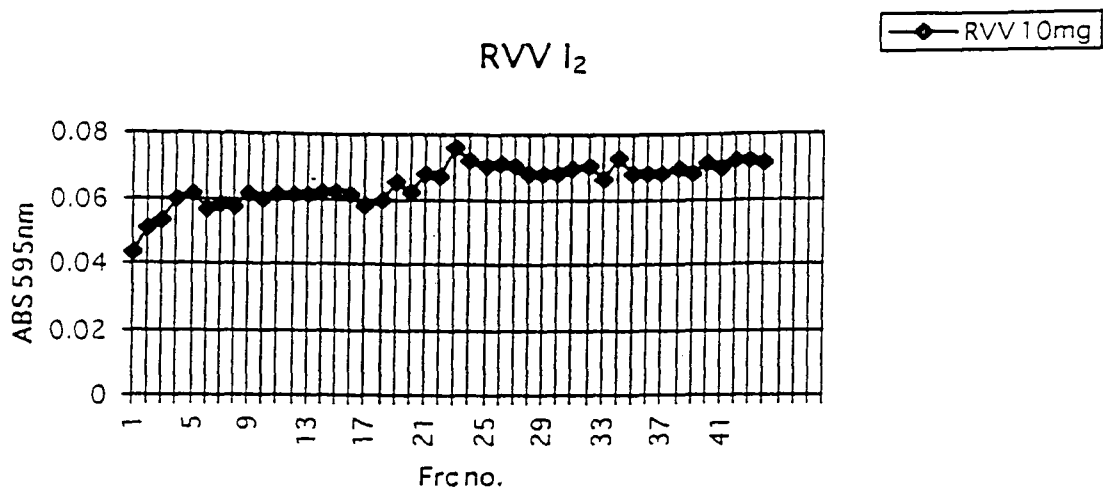
RVV I₂ (10 mg)

Ion - pH gradient

หลอดที่	pH	หลอดที่	pH	หลอดที่	pH	หลอดที่	pH
1	5.967	31	7.683	61	7.803	91	8.115
2	5.992	32	7.623	62	7.806	92	8.116
3	5.975	33	7.700	63	7.786	93	8.104
4	6.065	34	7.720	64	7.841	94	8.154
5	5.992	35	7.725	65	7.781	95	8.139
6	6.006	36	7.722	66	7.816	96	8.139
7	6.042	37	7.748	67	7.788	97	8.138
8	6.050	38	7.753	68	7.857	98	8.139
9	6.041	39	7.756	69	7.797	99	8.116
10	6.088	40	7.750	70	7.774	100	8.117
11	6.116	41	7.767	71	7.865	101	8.117
12	6.108	42	7.756	72	7.768	102	8.118
13	6.108	43	7.759	73	7.841	103	8.119
14	6.115	44	7.778	74	7.862	104	8.119
15	6.115	45	7.763	75	7.874	105	8.092
16	6.115	46	7.758	76	7.875	106	8.106
17	6.115	47	7.785	77	7.954	107	8.106
18	6.115	48	7.796	78	7.942	108	8.107
19	6.115	49	7.722	79	7.938	109	8.105
20	6.116	50	7.770	80	7.935	110	8.103
21	6.117	51	7.789	81	7.969	111	8.121
22	6.118	52	7.800	82	8.010	112	8.121
23	6.119	53	7.811	83	8.036	113	8.160
24	7.465	54	7.804	84	8.083	114	8.116
25	7.616	55	7.806	85	8.009	115	8.117
26	7.619	56	7.813	86	8.029	116	8.165
27	7.648	57	7.813	87	8.022	117	8.169
28	7.703	58	7.777	88	8.057	118	8.153
29	7.679	59	7.782	89	8.061	119	8.171
30	7.676	60	7.824	90	8.036	120	8.154

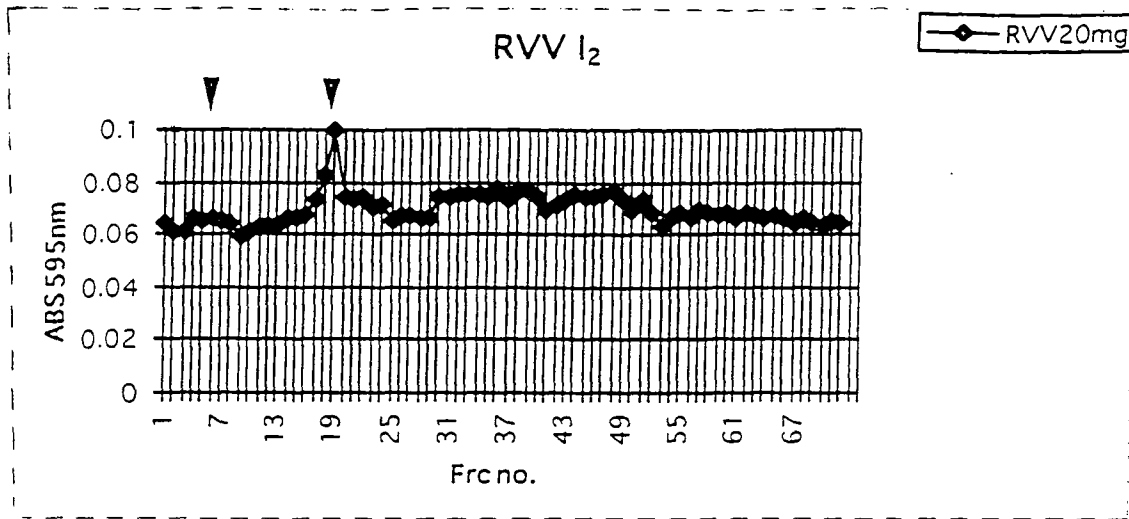
หลอดที่	pH	หลอดที่	pH	หลอดที่	pH	หลอดที่	pH
121	8.154	131	8.104	141	8.161	151	8.168
122	8.154	132	8.142	142	8.163		
123	8.135	133	8.245	143	8.173		
124	8.135	134	8.167	144	8.159		
125	8.135	135	8.156	145	8.173		
126	8.139	136	8.123	146	8.133		
127	8.147	137	8.153	147	8.144		
128	8.100	138	8.121	148	8.146		
129	8.127	139	8.101	149	8.159		
130	8.185	140	8.133	150	8.168		





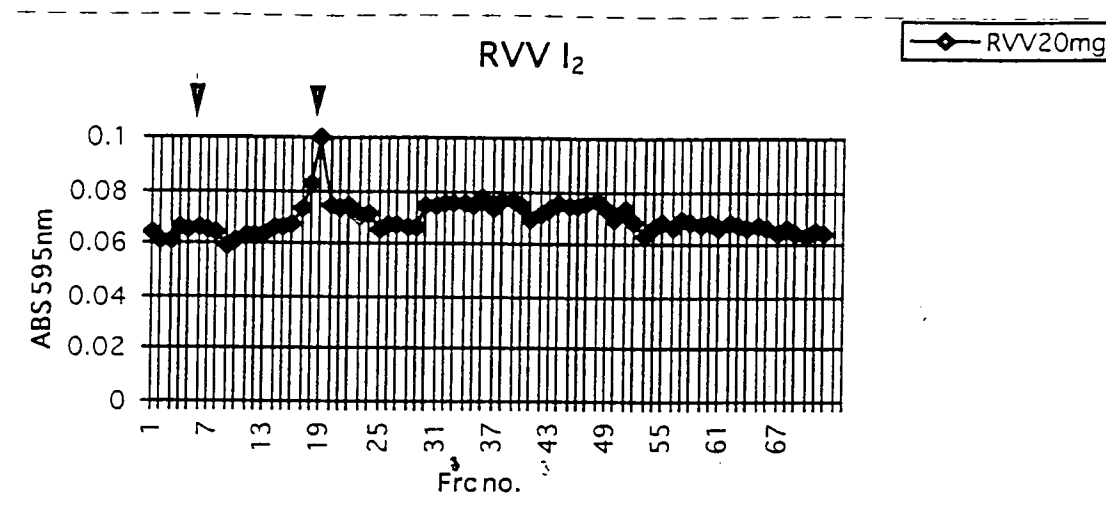
RVV I₂ 10 μl

tube no	ABS λ 595	tube no	ABS λ 595	tube no	ABS λ 595	standard curve
1	0.043	16	0.061	31	0.069	ปริมาตร ความเข้มข้น ABS 10 μl = 10 μg = 0.055 20 μl = 20 μg = 0.078 40 μl = 40 μg = 0.141 60 μl = 60 μg = 0.176 80 μl = 80 μg = 0.215 หมายเหตุ RVV I ₂ 10 mg มีจำนวน 150 tube วัดเพียง 44 tube
2	0.051	17	0.058	32	0.070	
3	0.053	18	0.060	33	0.066	
4	0.060	19	0.065	34	0.077	
5	0.061	20	0.062	35	0.068	
6	0.056	21	0.068	36	0.068	
7	0.058	22	0.067	37	0.068	
8	0.57	23	0.076	38	0.069	
9	0.061	24	0.072	39	0.068	
10	0.060	25	0.070	40	0.071	
11	0.061	26	0.071	41	0.069	
12	0.061	27	0.070	42	0.072	
13	0.061	28	0.068	43	0.072	
14	0.062	29	0.068	44	0.071	
15	0.062	30	0.068	45		

RVV I₂ μ l

tube no	ABS λ 595	tube no	ABS λ 595	tube no	ABS λ 595	tube no	ABS λ 595
1	0.064	21	0.073	41	0.069	61	0.066
2	0.061	22	0.075	42	0.071	62	0.068
3	0.061	23	0.070	43	0.073	63	0.067
4	0.066	24	0.071	44	0.076	64	0.066
5	0.065	25	0.065	45	0.074	65	0.067
6	0.066	26	0.067	46	0.075	66	0.066
7	0.065	27	0.067	47	0.076	67	0.064
8	0.064	28	0.066	48	0.077	68	0.066
9	0.059	29	0.066	49	0.073	69	0.064
10	0.061	30	0.075	50	0.069	70	0.063
11	0.063	31	0.075	51	0.073	71	0.065
12	0.063	32	0.076	52	0.068	72	0.064
13	0.066	33	0.076	53	0.063	standard curve	
14	0.066	34	0.076	54	0.066	ปริมาตร ความเข้มข้น ABS	
15	0.066	35	0.074	55	0.068	10 μ l = 10 μ g = 0.055	
16	0.067	36	0.078	56	0.066	20 μ l = 20 μ g = 0.078	
17	0.073	37	0.073	57	0.069	40 μ l = 40 μ g = 0.141	
18	0.083	38	0.077	58	0.068	60 μ l = 60 μ g = 0.176	
19	0.100	39	0.077	59	0.067	80 μ l = 80 μ g = 0.215	
20	0.075	40	0.075	60	0.068		

หมายเหตุ วัดเพียง 72 หลอด จำนวนทั้งหมด 151 หลอด



RVV I ₂ (20 mg)		ion - pH gradient		ABS 180			
หลอดที่	ABS	หลอดที่	ABS	หลอดที่	ABS	หลอดที่	ABS
1	0.000	21	0.146	41	0.026	61	0.038
2	0.000	22	0.102	42	0.026	62	0.038
3	0.007	23	0.071	43	0.029	63	0.042
4	0.096	24	0.056	44	0.025	64	0.044
5	0.063	25	0.045	45	0.023	65	0.048
6	0.029	26	0.043	46	0.024	66	0.051
7	0.028	27	0.040	47	0.024	67	0.049
8	0.028	28	0.033	48	0.024	68	0.045
9	0.066	29	0.038	49	0.032	69	0.040
10	0.045	30	0.039	50	0.026	70	0.037
11	0.037	31	0.031	51	0.030	71	0.035
12	0.045	32	0.031	52	0.025	72	0.038
13	0.058	33	0.037	53	0.024	73	0.033
14	0.076	34	0.039	54	0.024	74	0.033
15	0.097	35	0.030	55	0.026	75	0.033
16	0.122	36	0.031	56	0.024	76	0.031
17	0.158	37	0.027	57	0.025	77	0.033
18	0.430	38	0.028	58	0.025	78	0.039
19	0.659	39	0.026	59	0.029	79	0.031
20	0.255	40	0.026	60	0.031	80	0.031

หลอดที่	ABS	หลอดที่	ABS	หลอดที่	ABS	หลอดที่	ABS
81	0.036	101	0.036	121	0.031	141	0.025
82	0.036	102	0.030	122	0.031	142	0.026
83	0.036	103	0.030	123	0.028	143	0.034
84	0.035	104	0.029	124	0.027	144	0.037
85	0.038	105	0.029	125	0.027	145	0.029
86	0.036	106	0.031	126	0.027	146	0.028
87	0.038	107	0.029	127	0.027	147	0.025
88	0.036	108	0.034	128	0.030	148	0.022
89	0.037	109	0.028	129	0.028	149	0.031
90	0.040	110	0.027	130	0.031	150	0.025
91	0.038	111	0.027	131	0.027	151	0.025
92	0.038	112	0.029	132	0.026	152	0.025
93	0.037	113	0.028	133	0.025	153	0.014
94	0.037	114	0.031	134	0.026	154	0.026
95	0.037	115	0.029	135	0.026	155	0.027
96	0.036	116	0.000	136	0.028	156	0.026
97	0.034	117	0.032	137	0.026	157	0.026
98	0.033	118	0.023	138	0.028	158	0.025
99	0.032	119	0.028	139	0.028	159	0.026
100	0.043	120	0.028	140	0.025		

ตาราง 16 แสดงผลของพิษงูแมวเซาต่ออุณหภูมิร่างกาย

กลุ่มควบคุม	อุณหภูมิร่างกาย				
code เวลา	-30	0	30	60	120
A	38.3	37.1	37	37	37
B	36.9	36.6	36.7	-	37.2
C	36.5	36.5	36.8	37.2	36.7
D	36.3	36.5	37.2	36.7	36.8
E	37.3	37.4	36.8	36.8	36.8
	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5
mean	37.1	36.82	36.9	36.87	36.9

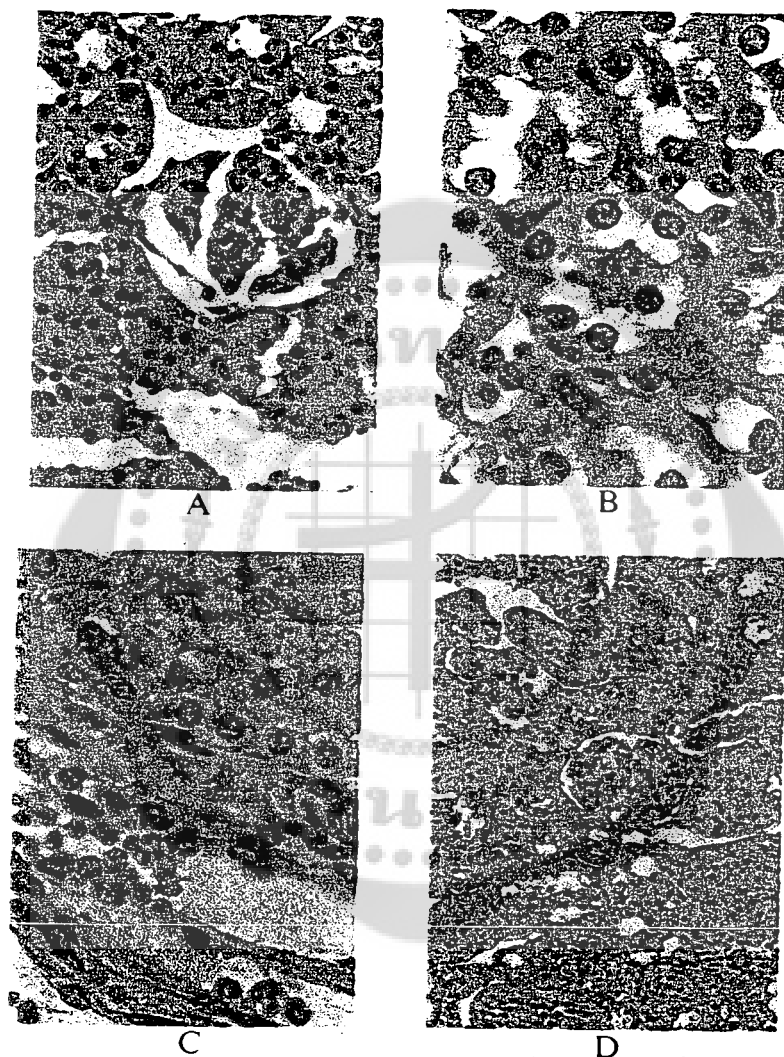
กลุ่มทดลอง G1	อุณหภูมิร่างกาย				
code เวลา	-30	0	30	60	120
A	36.2	36.6	36.5	37.1	37.1
B	36.7	36.7	36.8	37.1	37.1
C	37.3	37.3	37.1	36	36
D	37.2	37.2	37.2	37.1	37.1
E	36.5	36.5	36.9	36.8	36.8
F	36.9	37.1	36.8	35.9	35.9
	n=6	n=6	n=6	n=6	n=6
mean	36.8	36.76	36.88	36.66	36.66

กลุ่มทดลอง G3	อุณหภูมิร่างกาย				
code เวลา	-30	0	30	60	120
A	36.2	36.5	36.6	37.3	37.7
B	37	36.4	36.4	37.1	37.5
C	36.8	37.1	36.1	36.5	36.7
D	36.3	37.4	37.5	37.7	37
	n=4	n=4	n=4	n=4	n=4
mean	36.575	36.66	36.65	37.15	37.225

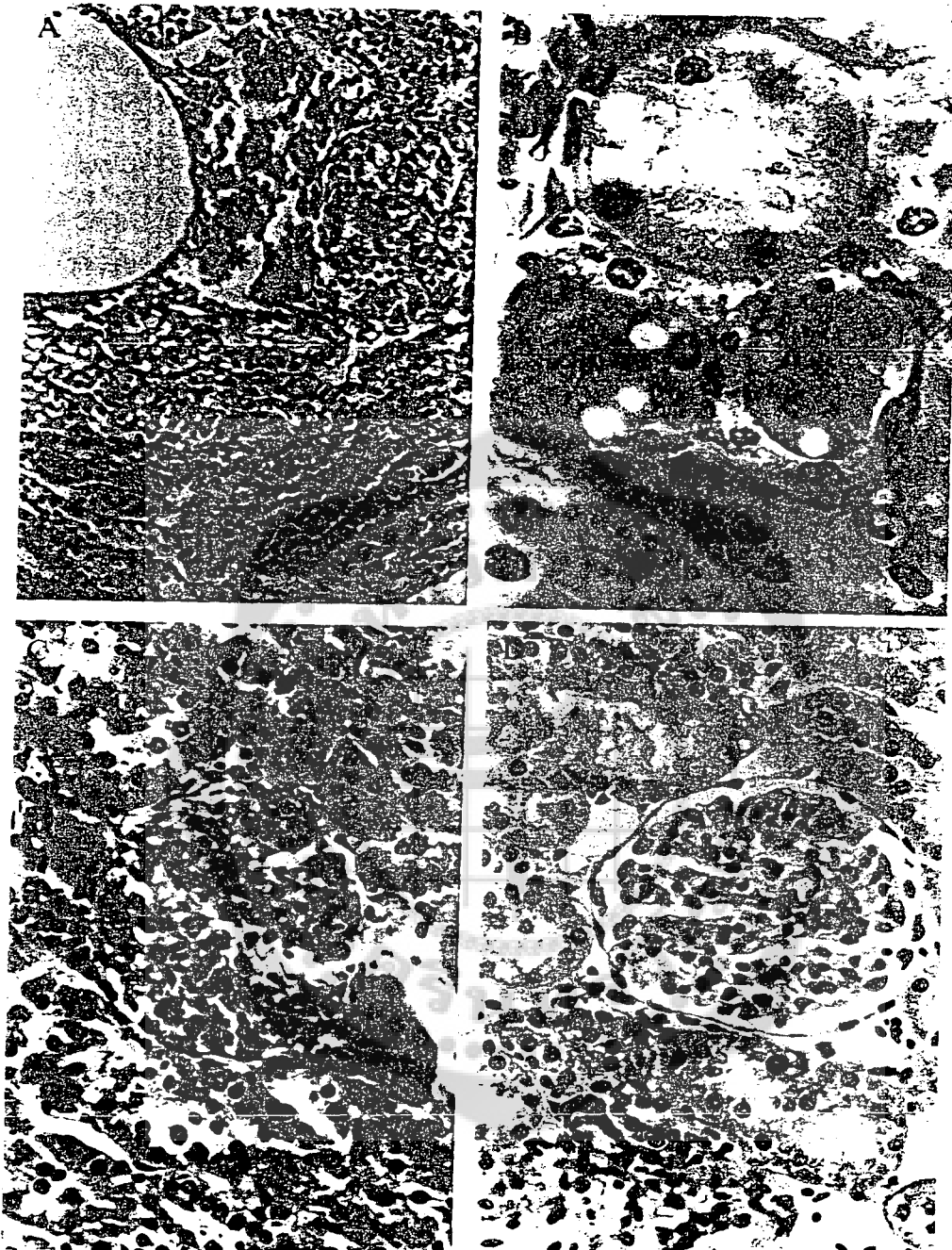
กลุ่มทดลอง G2	อุณหภูมิร่างกาย				
code เวลา	-30	0	30	60	120
A	35.6	36.1	36.1	36.5	37.6
B	37.8	37.7	37.7	38	
C	36	35.7	36	35.8	
D	37.4	36.9	36.3	36.3	
	n=4	n=4	n=4	n=4	n=1
mean	36.7	36.6	36.53	36.65	37.6

กลุ่มทดลอง G4	อุณหภูมิร่างกาย				
code เวลา	-30	0	30	60	120
A	37.4	37.3	37.7	37.8	37.7
B	38.1	37.4	37.7	38	37.8
C	36.4	37	37	36.6	-
D	36.4	36.9	37.3	37.3	37.3
E	35	36.8	36.1	36.5	36.5
	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5
mean	36.66	37.08	36.65	37.24	37.5

กลุ่มทดลอง crude	อุณหภูมิร่างกาย				
code เวลา	-30	0	30	60	120
A	36.6	36.7	36.1	35.5	35.5
B	37.35	36.3	36.3	36.3	36.3
C	38.3	38.9	38.3	37.4	37.2
D	37.2	37	36.8	36.6	37
E	36.1	36.1	36.2	36.2	
F	36	36.6	36.7	37.1	
	n=6	n=6	n=6	n=6	n=4
mean	36.95	36.93	37.73	36.52	36.675



ภาพประกอบ 55 เป็นผลจากการฉีดพิษงู (crude) 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมหนูเข้ากล้ามเนื้อในเวลา 24 ชั่วโมง A. โกลเมอรูลัสหดตัวโดยทั่วไป (*) B. ที่ proximal, distal convoluted tubule มีเลือดบรรจุภายใน (*) C. พบ RBC รูปของ ecchynoi (*) และ inflammatory cell D. พบเลือดในไตโดยทั่วไป (*)



ภาพประกอบ 56 แสดงผลของพิษงูแมวเซาต่อไต ซึ่งได้จากการแยกพิษงูแมวเซาชนิดหยาบด้วย เจลฟิลเตรชัน (G100) A. พิษงูส่วน G2 0.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เวลา 12 ชั่วโมงทำให้เกิดเซลล์ นิโครซิส (*) B. พิษงูส่วน G1 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เวลา 12 ชั่วโมง พบเลือดบรจุอยู่ในทิว บุลต่าง ๆ (*) C. และ D. พิษงูแมวเซาเฟรคชัน G3 ขนาด 4 และ 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เวลา 1 ชั่วโมง ตามลำดับ (*)

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ นายพงษ์พัฒน์ ชื่อสกุล เวชสิทธิ์
 เกิดวันที่ 15 กันยายน พุทธศักราช 2504
 สถานที่เกิด อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา
 สถานที่อยู่ปัจจุบัน บ้านเลขที่ 9/27 ซ. เจริญสะพานพิบูลย์สงคราม
 ต.บางซื่อ เขตบางซื่อ
 กรุงเทพฯ 10800

ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์ ระดับ 5

สถานที่ทำงานปัจจุบัน ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์
 มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร
 สุขุมวิท 23 กรุงเทพฯ 10110

ประวัติการศึกษา

พ.ศ.2522 มัธยมศึกษาปีที่ 6 (แผนกวิทยาศาสตร์) จากโรงเรียนวัดราชาธิวาส
 พ.ศ.2528 วท.บ. (ชีววิทยา) จากมหาวิทยาลัยรามคำแหง
 พ.ศ.2542 วท.ม. (เคมีชีวภาพ) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร