บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

ปัจจุบันการเตรียมเซรุ่มแก้พิษงูเห่ายังได้เซรุ่มที่มีคุณภาพไม่ดีเท่าที่ควร ทั้งยังมีปัญหาต่าง ๆเช่น ต้องใช้เวลานานและค่าใช้จ่ายสูง ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาค้นคว้าหาวิธีการต่าง ๆที่จะปรับปรุงเพื่อให้ได้เซรุ่มที่มีคุณภาพดีขึ้น เป็นที่ทราบกันดีว่าไลโปโซมสามารถช่วยทำให้การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน (immune response) ต่อโปรตีนหรือแอนติเจนต่าง ๆ ดีขึ้น (New และคณะ, 1985) ถ้าแอนติเจนถูกบรรจุไว้ภายในไลโปโซม แอนติเจนนั้นจะถูกปล่อยออกมาทีละน้อย ทำให้เกิดการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันติดต่อกันเป็นเวลานาน และถ้าแอนติเจนนั้นมีความเป็นพิษสูงก็จะไม่เกิดอันตรายต่อสัตว์ทดลองที่ใช้ในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดี ในการวิจัยนี้ได้เตรียมพิษงูเห่าให้อยู่ภายในไลโปโซมโดยวิธีรีเวิร์สเฟสอีแวพอเรชัน พบว่าได้ไลโปโซมชนิดไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางอยู่ในช่วง 50 - 500 นาโนเมตร และเป็นขนาดที่ใกล้เคียงกับที่มีผู้เคยทำมาแล้ว (Szoka และคณะ,1980) คือมีทั้งขนาดเล็ก (small vesicles)และขนาดใหญ่ (large vesicles) ปกติไลโปโซมที่จัดอยู่ในพวกขนาดเล็กและขนาดใหญ่ จะมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 25-50 และ 200-1,000 นาโนเมตรตามลำดับ (Szoka & Papahadjopoulos , 1980) ไลโปโซมที่เตรียมได้นี้ส่วนใหญ่จะเป็นยูนิลาเมลลาหรือโอลิโกลาเมลลา (Szoka & Papahadjopoulos,1978) ส่วนไลโปโซมชนิดเติมออสเมียมเทตรอกไซด์จะมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางอยู่ในช่วง 250-1,000 นาโนเมตร ซึ่งจัดอยู่ในพวกขนาดใหญ่และโดยมากจะเป็นชนิดโอลิโกลาเมลลา

การเตรียมพิษงูเห่าให้อยู่ภายในไลโปโซมชนิดไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์ พบว่ามีเปอร์เซนต์การห่อหุ้ม (% entrapped) ระหว่าง 20 - 50 เปอร์เซนต์ ซึ่งถือว่าเป็นค่าค่อนข้างสูงและได้ค่าใกล้เคียงกับที่ Szoka และคณะ (1978) เคยทำไว้ ส่วนเปอร์เซนต์การห่อหุ้มของพิษงูเห่าที่อยู่ภายในไลโปโซมชนิดเติมออสเมียมเทตรอกไซด์มีค่าสูงมาก คือมีค่าอยู่ระหว่าง 95 - 97 เปอร์เซนต์ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับที่ Theakston และคณะเคยทำไว้เช่นกัน การเตรียมไลโปโซมทั้งสองชนิดนี้จะได้เปอร์เซนต์การห่อหุ้มของพิษงูเห่าต่างกัน เนื่องจากมีวิธีการในการเตรียมต่างกัน การที่เปอร์เซนต์การห่อหุ้มจะสูงหรือไม่นั้นขึ้นกับปัจจัยต่าง ๆ

หลายประการเช่น สัดส่วนของลิพิดที่ใช้ ความเข้มข้นของไอออน (ionic strength) ของบัฟเฟอร์ อัตราส่วนระหว่างส่วนที่เป็นน้ำและส่วนที่เป็นลิพิดเป็นต้น และในการเตรียมไลโปโซม โดยวิธีรีเวิร์สเฟสอีแวพอเรชันจะได้ไลโปโซมที่เป็นแบบยูนิลาเมลลา หรือโอลิโกลาเมลลาที่มีอัตราส่วนระหว่างชั้นที่เป็นน้ำต่อไขมันสูง ซึ่งจะทำให้ได้เปอร์เซนต์การห่อหุ้มสูงด้วย (Szoka & Papahadjopoulos,1978)

เมื่อทดสอบดูความเป็นพิษของพิษงูเห่าซึ่งเตรียมให้อยู่ในไลโปโซมโดยการหา LD_{50} พบว่าพิษงูเห่าที่อยู่ภายในไลโปโซมชนิดเติมออสเมียมเทตรอกไซด์มีค่า LD_{50} สูงสุดซึ่งสูงกว่าพิษงูอิสระถึง 46 เท่า และสูงกว่าพิษงูเห่าที่อยู่ภายในไลโปโซมชนิดไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์ 1.4 เท่า ส่วนการทดลองของ New และคณะ (1985) พบว่าพิษงูที่อยู่ภายในไลโปโซมชนิดเติมออสเมียมเทตรอกไซด์มีค่า LD_{50} สูงกว่าพิษงูอิสระ 8.3 เท่า และสูงกว่าพิษงูที่อยู่ภายในไลโปโซมชนิดไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์ 1.8 เท่า ซึ่งแสดงให้เห็นว่าออสเมียมเทตรอกไซด์ช่วยทำให้ความเป็นพิษของพิษงูลดลง โดยการทำให้พิษงูเกิดพันธะข้าม (cross linking) และโมเลกุลถูกตัด (cleavage)(Emerman & Behrman,1982 ; Nielson & Griffith , 1979)

ในการวิจัยนี้ได้ใช้พิษงูเห่าที่เตรียมให้อยู่ภายในไลโปโซม กระตุ้นให้กระต่ายสร้างแอนติบอดีต่อพิษงูเห่าโดยการฉีดเข้าทางเส้นเลือดดำ พบว่าหลังการฉีดครั้งแรกเพียงครั้งเดียวจะได้แอนติบอดีในปริมาณค่อนข้างต่ำ การสร้างแอนติบอดีจะสูงขึ้นอย่างมากหลังการฉีดซ้ำครั้งแรก กระต่ายทุกตัวจะสร้างแอนติบอดีได้สูงสุดหลังการฉีดซ้ำครั้งที่สอง พบว่ากระต่ายที่ฉีดด้วยพิษงูเห่าซึ่งอยู่ภายในไลโปโซมชนิดเติมออสเมียมเทตรอกไซด์ หลังการฉีดครั้งแรกจะตรวจไม่พบแอนติบอดีเลย ซึ่งต่างจากของ Theakston และคณะ (1985)ที่ทดลองในแกะแล้วพบว่าแกะสามารถสร้างแอนติบอดีได้ในปริมาณสูงอย่างรวดเร็วหลังการฉีดเพียงครั้งเดียว และคงอยู่ในกระแสโลหิตเป็นเวลานาน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของสัตว์ทดลองที่ใช้ ชนิดของพิษงู รวมทั้งวิธีการในการเตรียมไลโปโซม ในการวิจัยนี้ได้เติมออสเมียมเทตรอกไซด์ 2 ครั้ง คือ เติมก่อนและหลังจากที่เกิดไลโปโซมแล้ว แต่ของ Theakston และคณะ เติมเฉพาะหลังจากที่เกิดเป็นไลโปโซมแล้ว การที่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์ 2 ครั้งอาจทำให้พิษงูเกิดพันธะข้าม (cross-linking) และทำให้การยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลของสฟิงโกมัยอิลินและคอเลสเตอรอลเป็นไปอย่างเหนียวแน่นมากกว่า พิษงูที่อยู่ภายในไลโปโซมจึงออกมาได้ยากขึ้น ทำให้กระต่ายไม่มีการสร้างแอนติบอดีหรือสร้างได้แต่มีปริมาณต่ำมากจน

หาไตเตอร์ไม่ได้ แต่กระต่ายสามารถสร้างแอนติบอดีได้ในปริมาณสูงขึ้นหลังจากฉีดซ้ำครั้งแรก และสร้างแอนติบอดีได้สูงสุดหลังการฉีดซ้ำครั้งที่สอง Theakston และคณะ พบว่าการฉีดพิษงูที่อยู่ภายในไลโปโซมให้กับหนู (mice) เพียงครั้งเดียวแล้วสามารถกระตุ้นให้มีการสร้างแอนติบอดีในระดับสูงนั้น จะต้องฉีดพิษงูในปริมาณที่สูงมาก แต่ผลการวิจัยนี้ พบว่ากระต่ายสร้างแอนติบอดีที่มีไตเตอร์ต่ำ อาจเนื่องมาจากปริมาณพิษงูเห่าที่ฉีดเข้าไปนั้นไม่สูงพอ อย่างไรก็ตามปริมาณแอนติบอดีที่ได้จากการทดลองนี้ไม่สามารถนำไปเปรียบเทียบกับผลของ Theakston และคณะได้ เนื่องจากในการทดลองนี้แสดงปริมาณของแอนติบอดีด้วยค่าไตเตอร์ แต่ Theakston และคณะ แสดงเป็นค่าความสามารถในการดูดกลืนแสง โดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนท์แอสเสย์ (ELISA optical density) เป็นที่น่าสังเกตุว่ากระต่ายกลุ่มที่ฉีดด้วยพิษงูเห่าที่อยู่ภายในไลโปโซมชนิดเติมออสเมียมเทตรอกไซด์แต่ละตัวจะมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนในความสามารถที่จะสร้างแอนติบอดีต่อพิษงูเห่า

เมื่อเปรียบเทียบการสร้างแอนติบอดีต่อพิษงูเห่าระหว่างกระต่าย 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ฉีดด้วยพิษงูเห่าที่อยู่ภายในไลโปโซมชนิดเติม และไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์มีแนวโน้มว่ากลุ่มแรกจะสร้างแอนติบอดีต่อพิษงูเห่าได้ในปริมาณค่อนข้างต่ำกว่ากลุ่มหลัง ทั้งนี้เป็นไปได้ว่าออสเมียมเทตรอกไซด์ อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างในโมเลกุลของโปรตีนในพิษงูเห่าไปบ้าง ทำให้การหาปริมาณแอนติบอดี (antibody titer) โดยวิธี ELISA ได้ค่าต่ำลง ในการวิจัยนี้แสดงให้เห็นได้ชัดเจนว่าการใช้พิษงูเห่าที่อยู่ภายในไลโปโซม ฉีดให้กระต่ายจะทำให้ได้แอนติบอดีต่อพิษงูเห่าสูงกว่าการใช้พิษงูเห่าโดยตรง ซึ่งสูงกว่าประมาณ 5-12 เท่า ทำให้เป็นไปได้ว่าการใช้พิษงูเห่าที่อยู่ในไลโปโซมสามารถใช้ได้ในปริมาณ (500 ไมโครกรัม/กระต่าย) ที่สูงกว่าการใช้พิษงูเห่าโดยตรง (20 ไมโครกรัม/กระต่าย)รวมทั้งไลโปโซมยังแสดงสมบัติเป็นแอดจูแวนท์ (adjuvant)กระตุ้นและเพิ่มการทำงานของฟาโกไซด์และแมโครฟาจ (Theakston,1984) นอกจากนั้นการฉีดพิษงูอิสระเข้าไปในกระแสโลหิตโดยตรง พิษงูจะหายไปจากกระแสโลหิตอย่างรวดเร็วส่วนพิษงูเห่าที่อยู่ภายในไลโปโซมจะมีชั้นของลิพิดป้องกันไม่ให้พิษงูสัมผัสกับโลหิตโดยตรงและจะค่อย ๆ ถูกปล่อยออกมาทีละน้อย ทำให้กระตุ้นให้มีการสร้างแอนติบอดีได้เป็นเวลานาน (Theakston และคณะ,1985) ซึ่งจะเห็นได้ในช่วงหลัง ๆ ของการฉีดกระตุ้นกระต่าย (สัปดาห์ที่ 52) ว่ากระต่ายที่ฉีดด้วยพิษงูที่อยู่ในไลโปโซมจะยังคงมีระดับของแอนติบอดีอยู่สูงกว่าที่ฉีดด้วยพิษงูอิสระ

การฉีดพิษงูเห่าที่อยู่ภายในไลโปโซมเข้าทางเส้นเลือดดำและเข้าใต้ผิวหนังกระต่าย จะทำให้มีการสร้างแอนติบอดีเพิ่มขึ้นหลังการฉีดกระตุ้นคล้าย ๆ กัน แต่การฉีดเข้าทางเส้นเลือดดำจะมีการสร้างแอนติบอดีได้สูงกว่า ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากพิษงูเห่าที่ใช้ฉีดมีปริมาณสูงกว่า และระยะเวลาของการฉีดกระตุ้นก็ต่างกันด้วย หรืออาจเนื่องจากความแตกต่างของวิธีที่ใช้ฉีด หรือความแตกต่างภายในสัตว์ทดลองแต่ละตัว (Hurn & Chantler,1980) นอกจากนี้ยังพบว่าการฉีดพิษงูเห่าซึ่งอยู่ภายในไลโปโซม จะทำให้ได้แอนติบอดีในระดับต่ำกว่าที่ได้จากการฉีดพิษงูเห่าผสมแอดจูแวนท์เข้าใต้ผิวหนัง ซึ่งได้ผลคล้ายกับของ Theakston และคณะ (1985) ที่พบว่าการฉีดพิษงู Echis carinatus ที่อยู่ภายในไลโปโซมจะทำให้ได้แอนติบอดีในระดับต่ำกว่าการฉีดพิษงูผสมแอดจูแวนท์ ซึ่งอาจเป็นเพราะวิธีที่ใช้ฉีดเข้าทางเส้นเลือดเพียงครั้งเดียว จะกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันไม่ดีเท่ากับการฉีดเข้าใต้ผิวหนังหลาย ๆ ครั้ง

การหาปริมาณแอนติบอดีในเซรุ่มกระต่ายในการวิจัยครั้งนี้ได้ใช้วิธี ELISA ที่พัฒนาขึ้นมาเอง เนื่องจากวิธีนี้เป็นวิธีที่มีความไวสูง สะดวกและรวดเร็วสามารถใช้วัดปริมาณครั้งละหลาย ๆ ตัวอย่างได้ (Theakston,1983 ; Theakston & Reid,1979)และได้ใช้วิธีนี้ในการทดสอบความจำเพาะของแอนติเซรุ่มที่ได้จากการฉีดพิษงูเห่าในรูปต่าง ๆ ด้วย โดยใช้พิษงูชนิดต่าง ๆ มาทดสอบได้แก่งูเห่า งูสามเหลี่ยม งูจงอาง งูแมวเซา และงูเขียวหางไหม้ ซึ่งพบว่าไม่มีปฏิกิริยาข้าม (cross-reaction) กับพิษงูเหล่านี้เลย และจากการทดสอบความจำเพาะของแอนติเซรุ่มต่อพิษงูเห่า โดยวิธีอิมมูโนดิฟฟิวชันก็ได้ผลเช่นเดียวกัน คือแอนติเซรุ่มต่อพิษงูเห่ามีความจำเพาะต่อพิษงูเห่าเท่านั้น ทำให้สันนิษฐานได้ว่าโครงสร้างทางเคมีของส่วนประกอบในพิษงูเหล่านี้แตกต่างจากพิษงูเห่า หรืออาจมีแอนติจินิคดีเทอร์มิแนนท์ (antigenic determinant) แตกต่างกันซึ่งมีรายงานว่าในพิษงูเห่า พิษงูสามเหลี่ยม และพิษงูจงอางมีส่วนประกอบที่สำคัญคือ นิวโรทอกซิน (postsynaptic neurotoxin) ส่วนในพิษงูแมวเซาและงูเขียวหางไหม้ มีส่วนประกอบที่สำคัญคือ ฮีโมทอกซิน (hemotoxin) และพบว่าพิษงูเหล่านี้มีลักษณะโครงสร้างทางเคมีแตกต่างกัน คือมีการเรียงตัวของกรดอะมิโนแตกต่างกัน (Karlsson,1979;Joubert,1973)

การใช้ประโยชน์จากแอนติบอดีต่อพิษงูในทางการแพทย์ก็คือเพื่อการรักษาผู้ถูกงูพิษกัดโดยการให้แอนติบอดีต่อพิษงูชนิดนั้น ๆ การวิจัยนี้จึงได้นำแอนติบอดีต่อพิษงูเห่าที่ได้จากกระต่ายมาทดสอบความสามารถในการทำลายความเป็นพิษ (neutralization) ของพิษงูเห่า ซึ่ง

พบว่าความสามารถในการทำลายความเป็นพิษ มีความสัมพันธ์กับปริมาณของแอนติบอดีที่มีอยู่ในเซรุ่ม คือแอนติบอดีที่ได้จากการฉีดพิษงูเห่าที่อยู่ในไลโปโซมชนิดไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์ (ทางเส้นเลือดดำ) มีความสามารถในการทำลายความเป็นพิษของพิษงูเห่าได้สูง คือประมาณ 14 LD_{50} รองลงมาคือแอนติบอดีที่ได้จากการฉีดพิษงูเห่าที่อยู่ในไลโปโซมชนิดเติมออสเมียมเทตรอกไซด์ซึ่งสามารถทำลายความเป็นพิษได้ประมาณ 7 LD_{50} และแอนติบอดีที่ได้จากการฉีดพิษงูเห่าอิสระจะได้ค่าต่ำสุดคือประมาณ 3 LD_{50} นอกจากนี้พบว่าแอนติบอดีที่ได้จากการฉีดพิษงูเห่าผสมกับแอดจูแวนท์ ซึ่งมีไตเตอร์สูงที่สุดกลับมีความสามารถในการทำลายความเป็นพิษ (ประมาณ 11 LD_{50}) ได้ต่ำกว่าแอนติบอดีที่ได้จากการฉีดพิษงูเห่าที่อยู่ในไลโปโซมชนิดไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์เล็กน้อย สาเหตุอาจเป็นเพราะแอนติบอดีที่ได้จากการฉีดพิษงูเห่าผสมแอดจูแวนท์ ถูกเก็บไว้ก่อนนำมาหาความสามารถในการทำลายความเป็นพิษเป็นเวลานานกว่า และระหว่างที่เก็บแช่แข็ง (-20 องศาเซลเซียส) มีการนำมาละลาย (Freez-thaw) หลายครั้ง ซึ่งอาจทำให้แอนติบอดีมีความสามารถในการจับกับพิษงูได้ลดลง เช่นเดียวกับที่เคยพบว่าแอนติเซรุ่มต่อพิษงูเห่าที่เตรียมได้จากม้าถ้าเก็บที่ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลาหลายเดือน ความสามารถในการทำลายความเป็นพิษจะลดลงมากกว่า 2 เท่า

อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าแอนติบอดีต่อพิษงูเห่าที่ได้จากการฉีดพิษงูเห่าซึ่งอยู่ในไลโปโซมจะมีปริมาณค่อนข้างสูงมาก คือมีค่าไตเตอร์ (โดยวิธี ELISA) ระดับ 10^4-10^5 แต่มีความสามารถในการทำลายความเป็นพิษค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับแอนติบอดีต่อพิษงูเห่าที่ได้จากม้าและทำให้บริสุทธิ์แล้ว ซึ่งมีค่าสูงถึง 126 LD_{50} (กองวิทยาศาสตร์ สภากาชาดไทย) สาเหตุอาจเป็นได้หลายประการเช่น การเปรียบเทียบกันระหว่างแอนติบอดีที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วกับที่ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์ไม่น่าจะทำได้ เนื่องจากเคยพบว่าแอนติบอดีที่ได้จากม้าและทำให้บริสุทธิ์แล้วจะมีความสามารถในการทำลายความเป็นพิษของพิษงูเห่า ได้สูงกว่าแอนติบอดีที่ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์ถึง 2.4 เท่า นอกจากนั้นการเปรียบเทียบกันระหว่างแอนติบอดีที่ได้จากสัตว์ต่างชนิดกันตลอดจนวิธีที่ใช้ฉีดสัตว์ทดลอง (immunization) ต่างกันไม่น่าเป็นไปได้ เนื่องจากปัจจัยเหล่านี้มีผลต่อการสร้างแอนติบอดีดังกล่าวมาแล้วข้างต้น สาเหตุอีกประการหนึ่งที่ทำให้แอนติบอดีต่อพิษงูเห่าที่ได้จากกระต่าย (ในการวิจัยนี้) มีความสามารถในการทำลายความเป็นพิษของพิษงูเห่าได้ต่ำ อาจเนื่องมาจากได้เก็บเซรุ่มไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลานานหลายเดือนกว่าจะนำไปทดสอบนิวทรัลไลเซชัน (neutralization) จึงทำให้ได้ค่าต่ำดังกล่าวมาแล้วข้างต้น นอกจากนั้นการที่แอนติบอดีต่อพิษงูเห่ามีค่าไตเตอร์สูงแต่มี

ความสามารถในการทำลายความเป็นพิษของพิษงูเห่าต่ำ อาจเป็นเพราะบริเวณที่เป็นแอนติจินิคดีเทอร์มิแนนท์ (antigenic determinant) ของพิษงูเห่าไม่ได้อยู่บริเวณเดียวกันกับบริเวณที่ทำให้เกิดพิษ ดังนั้นแอนติบอดีจึงไม่สามารถจับกับบริเวณที่ทำให้เกิดพิษได้ จึงทำให้ยังแสดงความเป็นพิษอยู่ (Karlsson,1971;Karlsson,1979)

เป็นที่น่าเสียดายว่าในการวิจัยนี้ไม่สามารถหาระดับไตเตอร์ของแอนติเซรุ่มที่ได้จากม้าโดยวิธี ELISA เนื่องจากไม่มีคอนจูเกตสำหรับจะจับกับเซรุ่มของม้า ดังนั้นจึงไม่มีผลเปรียบเทียบระดับแอนติบอดีระหว่างเซรุ่มม้ากับเซรุ่มกระต่าย และทำให้ไม่สามารถสรุปได้ว่าเซรุ่มชนิดใดมีระดับแอนติบอดีสูงกว่ากัน และถึงแม้ว่าผลการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อพิษงูเห่าที่ได้จากกระต่ายโดยวิธี ELISA และอิมมูโนดิฟฟิวชันจะบ่งว่าแอนติบอดีที่ได้มีความจำเพาะต่อพิษงูเห่าเท่านั้น แต่การวิจัยนี้ยังไม่ได้ทดสอบนิวทรัลไลเซชันของแอนติบอดีต่อพิษงูเห่าโดยการใช้พิษงูชนิดต่าง ๆ นอกเหนือจากพิษงูเห่าจึงทำให้ไม่ทราบว่าเซรุ่มที่ได้สามารถจะใช้แก้พิษงูชนิดต่าง ๆ ได้หรือไม่มากน้อยเพียงใด

ในการหาอัตราการปล่อยพิษงูเห่าออกจากไลโปโซมสู่กระแสโลหิต หลังจากฉีดไลโปโซมที่มีพิษงูอยู่ภายในให้กับกระต่าย จำเป็นต้องใช้วิธีที่มีความไวและความถูกต้องสูง ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้พัฒนาวิธี ELISA สำหรับวัดปริมาณพิษงูเห่าในเซรุ่มกระต่าย ซึ่งพบว่าได้วิธีที่มีความไวค่อนข้างสูง คือมีความไวถึง 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรเซรุ่ม ซึ่งความไวขนาดนี้สูงพอที่จะวัดปริมาณพิษงูเห่าในเซรุ่มกระต่ายโดยใช้ปริมาณเซรุ่มเพียง 100 ไมโครลิตร ความแม่นยำของการวัดปริมาณพิษงูเห่าในเซรุ่มกระต่ายที่ความเข้มข้นระหว่าง 25.4-65.9 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรเซรุ่มในการทดลองเดียวกันเป็นที่น่าพอใจ คือได้ร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%cv) อยู่ในช่วงประมาณ 3-8 เท่านั้นและความแม่นยำในต่างการทดลองและต่างวันกันก็อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้คือมีค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน อยู่ในช่วงประมาณ 6-8 ถือได้ว่าวิธี ELISA นี้มีความแม่นยำสูงพอสมควร ส่วนความถูกต้องของวิธีวัดที่ศึกษาโดยการหาเปอร์เซนต์รีคอบเวอรี (% recovery) ของพิษงูเห่ามาตรฐานที่เติมลงไปในเซรุ่มกระต่าย พบว่าปริมาณพิษงูที่เติมลงไปกับที่วัดได้มีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิดคือมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient,) ใกล้เคียง 1.0 คือมีค่าประมาณ 0.994 ซึ่งแสดงว่าการวัดปริมาณพิษงูเห่าในเซรุ่มกระต่ายโดยวิธี ELISA ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความถูกต้องสูงพอสมควร

ในการวัดปริมาณพิษงูเห่าในเซรุ่มกระต่ายโดยวิธี ELISA ได้มีการควบคุมคุณภาพ (quality control) ของการวัดด้วย โดยการควบคุมความแม่นยำของวิธีวัด โดยในการทดลองแต่ละครั้งจะต้องวัดปริมาณพิษงูเห่าในตัวอย่างเซรุ่ม (pooled serum) ที่มีความเข้มข้นต่างกัน 3 ความเข้มข้นคือต่ำ กลาง และสูงควบคู่ไปด้วย ทั้ง 3 ตัวอย่างนี้จะต้องวัดได้ความเข้มข้นของพิษงูเห่าอยู่ในช่วงของค่าเฉลี่ย $\pm$ 2 เท่าของความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean$\pm$2SD) ถ้าวัดได้เกินช่วงนี้จะถือว่าการทดลองครั้งนั้นเชื่อถือไม่ได้ (Challand และคณะ,1974)

อัตราการปล่อยพิษงูเห่าออกจากไลโปโซมชนิดที่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์จะออกมาช้าในตอนเริ่มแรก คือใน 10 นาทีแรกออกมาโดยเฉลี่ยประมาณ 0.98 เปอร์เซนต์ของพิษงูทั้งหมดที่มีอยู่ในไลโปโซม เมื่อเทียบกับที่ปล่อยออกมาจากไลโปโซมชนิดไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์ ซึ่งออกมาประมาณ 1.44 เปอร์เซนต์ และพบว่าหลังจากฉีดพิษงูอิสระ (20ไมโครกรัม) 10 นาที จะพบพิษงูเห่าอยู่ในกระแสโลหิต 42 เปอร์เซนต์ของที่ฉีดในระยะหลังจากฉีด 7 วันไปแล้ว จะพบพิษงูเห่าในเลือดลดลงในกระต่ายที่ฉีดด้วยไลโปโซมชนิดไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์คล้ายกับที่ฉีดด้วยพิษงูอิสระ ซึ่งในเซรุ่มของกระต่ายบางตัวจะไม่พบพิษงูเลยตั้งแต่วันที่ 7 เป็นต้นไป ส่วนในกระต่ายที่ฉีดด้วยไลโปโซมชนิดเติมออสเมียมเทตรอกไซด์หลัง 7 วัน จะยังพบพิษงูอยู่ในเซรุ่มตลอดระยะเวลา 4 สัปดาห์ จะเห็นได้ว่าอัตราการปล่อยพิษงูเห่าออกจากไลโปโซมจะเป็นไปอย่างช้า ๆ โดยเฉพาะไลโปโซมชนิดเติมออสเมียมเทตรอกไซด์ ทั้งนี้เนื่องจากออสเมียมเทตรอกไซด์ทำให้เกิดพันธะข้าม (cross-linking) ระหว่างสฟิงโกมัยอิลินและคอเลสเตอรอลที่อยู่ใกล้กัน ทำให้ไลโปโซมปล่อยพิษงูเห่าออกมาได้ยากขึ้น จึงพบพิษงูเห่าในกระแสโลหิตเป็นเวลานาน จากสมบัติเหล่านี้ของไลโปโซมทำให้น่าเป็นไปได้ว่าไลโปโซมอาจจะใช้แทนฟรอยด์แอดจูแวนท์ (Freund's adjuvant) สำหรับฉีดให้กับสัตว์ทดลองได้ ซึ่งจากการทดลองฉีดไลโปโซมเข้าใต้ผิวหนังพบว่าไลโปโซมไม่ทำให้ผิวหนังบริเวณที่ฉีดเกิดการอักเสบ และไม่ทำให้สัตว์ทดลองเกิดความเครียดซึ่งต่างจากการใช้แอดจูแวนท์ ที่มักทำให้เกิดการอักเสบอย่างมาก โดยเฉพาะคอมพลีทฟรอยด์แอดจูแวนท์ (Complete Freund'adjuvant)

ในการวิจัยนี้สามารถเตรียมพิษงูเห่าให้อยู่ภายในไลโปโซม ทั้งชนิดเติมและไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์โดยวิธีรีเวิร์สเฟสอีแวพอเรชันได้เป็นผลสำเร็จ และพบว่ามีเปอร์เซนต์ของพิษงูที่ถูกห่อหุ้ม(% entrapped) ค่อนข้างสูงและทำให้ความเป็นพิษลดลงอย่างมาก และ

สามารถฉีดพิษงูเห่าให้กับกระต่ายได้ในปริมาณค่อนข้างสูง โดยกระต่ายไม่เป็นอันตราย และไลโปโซมยังช่วยให้มีการสร้างแอนติบอดีได้เพิ่มขึ้นกว่าที่ใช้พิษงูอิสระอย่างไรก็ตามนับว่าการใช้พิษงูเห่าซึ่งอยู่ในไลโปโซมสามารถทำให้กระต่ายสร้างแอนติบอดีต่อพิษงูเห่าได้ในปริมาณสูง คือมีไตเตอร์ระดับ 10^4-10^5 ถึงแม้ว่าจะได้เซรุ่มที่มีความสามารถในการทำลายความเป็นพิษ (neutralization) ไม่สูงนัก ในอนาคตถ้าจะมีการวิจัยเรื่องนี้ต่อไปน่าจะลองใช้ไลโปโซมฉีดเข้าใต้ผิวหนัง และใช้ปริมาณพิษงูให้เหมาะสม หรือทดลองกับสัตว์ใหญ่เช่นม้าหรือแกะ เป็นต้น ซึ่งผลจากการวิจัยครั้งนี้อาจใช้เป็นแนวทางได้พอสมควร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย