บทที่ 1

บทนำ

งูที่พบในโลกมี 2340 ชนิด(species) เป็นงูพิษมากกว่า 420 ชนิด การจำแนกชนิดของงูโดยใช้ความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา จะแบ่งงูพิษออกเป็น 4 วงศ์(families)คือ

1.Elapidae ได้แก่ งูเห่า งูจงอาง งูสามเหลี่ยม เป็นต้น

2.Viperidae ได้แก่ งูแมวเซา งูเขียวหางไหม้ เป็นต้น

3.Crotalidae ได้แก่ งูกะปะ เป็นต้น

4.Hydrophiidae ได้แก่ งูทะเล เป็นต้น

ประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมทั้งประเทศไทย ต่างมีปัญหาผู้ป่วยที่ถูกงูพิษกัด ส่วนมากจะเป็นงูที่อยู่ในวงศ์ elapidae และ viperidae ได้แก่ งูเห่าไทย(Naja naja kaouthia) งูจงอาง(Ophiophagus hannah) งูสามเหลี่ยม(Bungarus fasciatus) งูแมวเซา(Vipera russelli siamensis) และ งูกะปะ(Agkistrodon rhodostoma) เป็นต้น ในบรรดางูพิษที่กล่าวมานั้น งูเห่าไทย(Naja naja kaouthia หรือ Naja naja siamensis)จัดเป็นงูที่มีพิษร้ายแรงที่สุด มีอยู่ชุกชุมพบได้ในทุกภาคของประเทศไทย มีรายงานว่าผู้ป่วยที่ถูกงูพิษกัดเป็นงูเห่าถึง 25% ในช่วงปี 1981-1986(Viravan และคณะ,1986)

พิษงูโดยทั่วไปแล้วประกอบด้วยสารผสมเชิงซ้อน ซึ่งมีส่วนที่เป็นโปรตีนประมาณ 90% และส่วนที่เหลือ 10%เป็นส่วนที่ไม่ใช่โปรตีน ซึ่งจะเป็นสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์(Devi,1968;Russell, 1983) ส่วนที่เป็นโปรตีนประกอบด้วยโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์และโปรตีนที่ไม่มีสมบัติเป็นเอนไซม์ โปรตีนที่เป็นเอนไซม์มีหลายชนิดเช่น ฟอสโฟไดเอสเตอเรส(phosphodiesterase) ฟอสโฟไลเปส เอ(phospholipase A) ไฮยาลูโรนิเดส(hyaluronidase) โปรตีเอส (protease) อะมิโนแอซิดออกซิเดส(amino acid oxidase) เอทีพีเอส ATPase)และเปปติเดส(peptidase)เป็นต้น เอนไซม์บางชนิดพบในพิษงูของงูพิษบางวงศ์ เช่นอะเซทิลโคลีน-เอสเทอเรส (acetylcholinesterase)พบเฉพาะในพิษงูของงูพิษวงศ์ elapidae ธรอมบินไลค์ เอนไซม์(thrombin like enzyme) พบเฉพาะในพิษงูของงูพิษวงศ์ viperidae เป็นต้น

ส่วนโปรตีนที่ไม่มีสมบัติเป็นเอนไซม์ส่วนใหญ่จะเป็นชนิดเบสิก(basic protein)คือมากที่โมเลกุลมีประจุสุทธิเป็นบวกที่ pH เป็นกลาง มีค่า pI(Isoelectric point)สูง ได้แก่ นิวโรทอกซิน (neurotoxin) คาร์ดิโอทอกซิน(cardiotoxin) ไซโตทอกซิน(cytotoxin)พบในพิษงู Naja naja ไดเร็คไลติคแฟคเตอร์(direct lytic factor) คอบรามีน เอ และ บี(cobramine A,B)พบในพิษงู Naja naja nigricollis (Yang,1971)

ในปัจจุบันการรักษาผู้ป่วยที่ถูกงูพิษกัด จะใช้ซีรัม (serum)จากม้าซึ่งได้จากการฉีดพิษงูเห่าเข้าในม้า เมื่อม้าสร้างภูมิคุ้มกัน ในซีรัมจะมีแอนติบอดีต่อพิษงูนั้นๆเรียก แอนติเวนิน(anti-venin) ซีรัมจากม้านี้จะใช้ฉีดเข้าผู้ป่วยเพื่อให้เกิดกระบวนการทำลายความเป็นพิษของพิษงู แต่พบว่ามีข้อเสียคือมีประสิทธิภาพ(potency)ต่ำ ใช้ได้กับงูชนิดเดียวเท่านั้น และต้องใช้แอนติเวนินกับผู้ป่วยในปริมาณมากซึ่งอาจเป็นปัญหากับผู้ป่วย คือ ทำให้เกิดอาการซีรัมซิคเนส(serum sick-ness)และอาการแพ้อย่างรุนแรง(hypersensitivity) การหลีกเลี่ยงการใช้ซีรัมโดยรักษาตามอาการขณะเกิดความล้มเหลวของระบบหายใจ จะต้องใช้เครื่องช่วยหายใจซึ่งผู้ป่วยจะเสี่ยงต่อการติดเชื้อในโรงพยาบาล นอกจากนั้นยังไม่สามารถมั่นใจได้ว่าสภาพความแข็งแรงของกล้ามเนื้อภายหลังฟื้นจากการถูกงูกัด จะเหมือนหรือดีเท่ากับสภาพก่อนถูกกัดหรือไม่ ดังนั้นการรักษาแบบประคับประคองจนกว่าร่างกายจะกำจัดพิษได้หมดจะเสี่ยงต่อความพิการภายหลังได้

จากปัญหาข้างต้นจึงน่าจะมีการผลิตซีรัมที่มีความจำเพาะและมีไตเตอร์(titer)สูง สาเหตุที่ความสามารถในการทำลายพิษของแอนติเวนินต่ำ อาจเนื่องมาจากมีแอนติเวนินต่อทอกซินที่เป็นสาเหตุการตายต่ำ เพราะทอกซินดังกล่าวเป็นอิมมูโนเจนที่ไม่ดีและมีความเป็นพิษสูง ทำให้ไม่สามารถใช้ปริมาณสูงในการกระตุ้นสัตว์ทดลองได้ การแยกเอาส่วนที่มีความเป็นพิษสูงออกมาจากพิษงูแล้วทำให้ความเป็นพิษลดลง(detoxify) และดัดแปลงโมเลกุลให้มีความเป็นแอนติเจนสูงขึ้นแล้วจึงใช้สำหรับการผลิตซีรัม จึงน่าจะเป็นวิธีผลิตซีรัมที่มีประสิทธิภาพดี

ได้มีการทดลองแยกโครทอกซิน(crotoxin) ซึ่งเป็นนิวโรทอกซินจากพิษงู Crotalus durissus terrificus และโครทอกซินยังได้แยกออกเป็น 2 องค์ประกอบ คือ ฟอสโฟไลเปส เอ และโครทาโปติน(crotapotin) เมื่ออยู่แยกกันสมบัติที่เป็นพิษต่อประสาทจะหมดไป แต่เมื่อรวม 2 องค์ประกอบเข้าด้วยกันสมบัติดังกล่าวจะกลับคืนมา มีรายงานว่าโครทาโปตินเป็นตัวพาฟอสโฟไลเปสให้เข้าไปจับกับเนื้อเยื่อเป้าหมาย(target tissue) และป้องกันการเข้าไปจับแบบไม่จำเพาะ(nonspecific absorption) (Jeng และคณะ,1978; Haberman และ Breithaupt,1978; Bon และ Jeng,1979) กระต่ายที่ถูกกระตุ้นด้วยฟอสโฟไลเปสที่ได้จาก

พิษงู Crotalus durissus terrificus จะสามารถผลิตแอนติบอดีที่ทำลาย(neutralize) พิษประสาทจากโครทอกซินได้(Hanashiro และคณะ,1978)และรวมทั้งจากพิษงู(whole venom) ได้ด้วย (Da Silva และ Bier,1982;Santos,Diniz,Pacheco และ Da Silva,1988)

สำหรับการศึกษาพิษงูเห่าไทยได้มีการแยกทอกซิน ด้วยวิธีไอออนเอกซ์เชนจ์โครมาโตกราฟี(Ion exchange chromatography) โดยใช้คอลัมน์ไบโอเร็กซ์-70 (Bio-Rex 70)หรือแอมเบอไลต์ ไออาร์ซี-50 (Amberlite IRC-50) ซึ่งเป็นแคทไอออนเอกซ์เชนเจอร์(cation exchanger) ซึ่งมีสมบัติเหมาะสำหรับแยกเบสิกโปรตีน และทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยนำไปผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี 50(Karlsson,Arnberg และ Eaker,1971) พบว่าแยกได้เป็นนิวโรทอกซิน คาร์ดิโอทอกซิน และฟอสโฟไลเปส เอ ในพิษงูเห่าไทยจะมีนิวโรทอกซินและคาร์ดิโอทอกซินประมาณ 28 และ 30 เปอร์เซนต์ของโปรตีนทั้งหมดในพิษงูตามลำดับ โดยนิวโรทอกซินมีลักษณะเป็นโปรตีนสายเดี่ยว มีสมบัติทนกรดและทนความร้อน โมเลกุลประกอบด้วยกรดอะมิโน 71 ตัว มีขนาดประมาณ 7,800 ดาลตัน ระหว่างกรดอะมิโนในสายโพลีเปปไทด์มีการเชื่อมกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ 5 ตำแหน่ง(Karlsson และคณะ,1971) การออกฤทธิ์ของนิวโรทอกซินที่แยกได้จากพิษงูวงศ์ elapidae จะมีทั้งที่เป็น

1. โพสซินแนปติค นิวโรทอกซิน(post synaptic neurotoxin) ซึ่งมีกลไกการออกฤทธิ์โดยเข้าไปจับกับนิโคตินิค อะเซทิลโคลีน รีเซปเตอร์ บริเวณส่วนต่อระหว่างปลายประสาทกับกล้ามเนื้อของกล้ามเนื้อกระบังลม ทำให้อะเซทิลโคลีนไปจับไม่ได้ เป็นการหยุดยั้งการทำงานของกล้ามเนื้อ

2. พรีซินแนปติค นิวโรทอกซิน(pre synaptic neurotoxin)

โพสซินแนปติค นิวโรทอกซินโดยทั่วไปจะแบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย ตามความยาวของสายโพลีเปปไทด์ คือ ทอกซินสายสั้น(Short chain toxin) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 60-62 ตัว ในโพลีเปปไทด์สายเดี่ยว เชื่อมระหว่างสายด้วยพันธะไดซัลไฟด์ 4 ตำแหน่ง มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 7,000 ดาลตัน และทอกซินสายยาว(Long chain toxin) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 71-74 ตัวในโพลีเปปไทด์สายเดี่ยว เชื่อมระหว่างสายด้วยพันธะไดซัลไฟด์ 5 ตำแหน่ง มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 8,000 ดาลตัน

พันธะไดซัลไฟด์มีความสำคัญในการรักษารูปร่างของนิวโรทอกซิน ให้อยู่ในสภาพที่ออกฤทธิ์ได้(Yang,1974) ทำให้มีอาการทางเภสัชวิทยาเหมือนกับพิษของยางน่อง(curare,d-tubocurarine) ซึ่งใช้อาบลูกดอกของพวกอินเดียนในอเมริกาใต้(South American Indian) จึง

เป็นสาเหตุที่ทำให้บางครั้งจึงเรียกทอกซินชนิดนี้ว่า คูราริไมเมติกนิวโรทอกซิน(curaremimetic neurotoxin) นิวโรทอกซินที่ได้จากพิษงูเห่าไทยจัดเป็นทอกซินสายยาว(Long chain neurotoxin) กลไกการทำงานของนิวโรทอกซินคือจะเข้าไปจับกับนิโคตินิค อะเซทิลโคลีน รีเซพเตอร์(nicotinic acetylcholine receptor)บริเวณส่วนต่อระหว่างปลายประสาทกับกล้ามเนื้อ(myoneural junction)ของกล้ามเนื้อกระบังลม ป้องกันไม่ให้อะเซทิลโคลีน(acetylcholine) ซึ่งเป็นนิวโรทรานสมิตเตอร์(neurotransmitter)ไปจับได้ เป็นการหยุดยั้งการทำงานของกล้ามเนื้อ ทำให้เกิดอาการหายใจวาย(respiratory paralysis)(Lester, 1970, 1972 a, b; Eaker, 1971)) การจับกันของนิวโรทอกซินกับรีเซพเตอร์ จะจับกันโดยมีค่า Kd(dissociation constants)อยู่ในช่วง 10^{-10}-10^{-11} M และจับกันด้วยแรงไฮโดรโฟบิค (hydrophobic forces)และพันธะไฮโดรเจน(hydrogen bonding)เท่านั้น

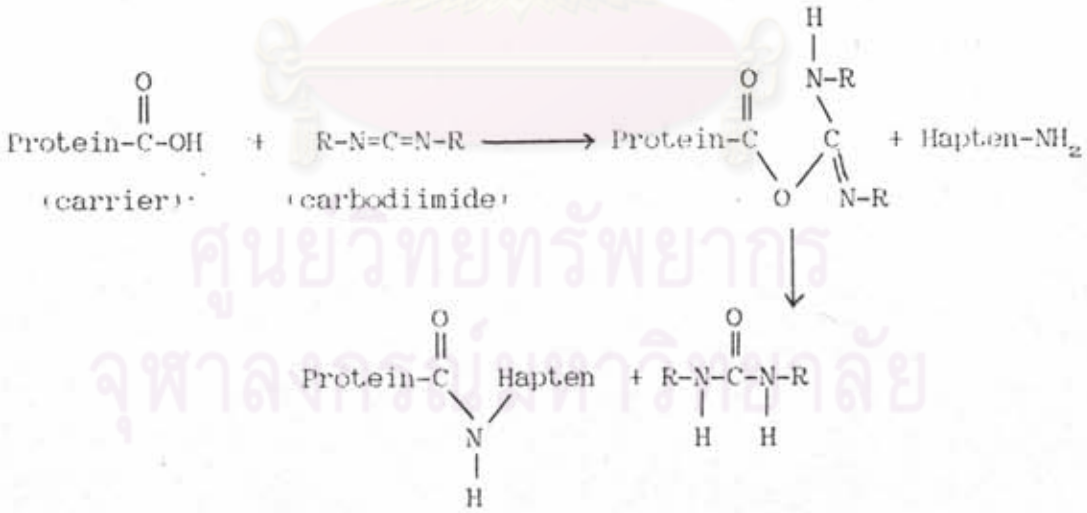
ถึงแม้ว่านิวโรทอกซินจะเป็นสารพิษสำคัญที่พบในพิษงูเห่า แต่ผู้ที่ได้รับพิษงูจำนวนมากมักจะเสียชีวิตด้วยอาการล้มเหลวของระบบไหลเวียนโลหิต(circulatory failure)ทั้งๆที่มีการช่วยเหลือทางระบบหายใจแล้วก็ตาม แสดงว่าในพิษงูเห่ามีสารที่ออกฤทธิ์ต่อระบบไหลเวียนโลหิตด้วย สารนี้เรียกว่า คาร์ดิโอทอกซิน ได้มีการแยกคาร์ดิโอทอกซินออกมาจากพิษงูเห่าอินเดีย(Indian cobra)ครั้งแรกโดย Sarkar(1947) คาร์ดิโอทอกซินเป็นโพลีเปปไทด์สายเดี่ยว มีฤทธิ์หยุดการทำงานของหัวใจ(Sarkar, 1951, Lee และคณะ, 1968) ทำให้กล้ามเนื้อลายถูกกระตุ้น(depolarize)และกระตุก(contracture)(Chang, 1979)และทำให้เม็ดเลือดแดงแตก(Condrea, 1974, 1979, a, b; Jaffe, Newton, McGuigan, 1970)

คาร์ดิโอทอกซินจากพิษงูเห่าไทยมีลักษณะโครงสร้างทางโมเลกุลคล้ายนิวโรทอกซินประกอบด้วยกรดอะมิโน 60 ตัว น้ำหนักโมเลกุล 6,727 ดาลตัน เชื่อมระหว่างสายด้วยพันธะไดซัลไฟด์ 4 ตำแหน่ง(Fryklund และ Eaker, 1975) การออกฤทธิ์ต่างจากนิวโรทอกซิน โดยไม่มีฤทธิ์ในการสกัดกั้นที่ส่วนต่อระหว่างปลายประสาทกับกล้ามเนื้อแต่จะทำให้เกิดหัวใจวาย(cardiovascular failure) โดยทำให้มีเลือดออก(haemorrhage)ในเนื้อเยื่อต่างๆ(Sivamogstham และ Tejasen, 1973) ถ้าฉีดพิษงูเห่า(crude venom)เข้าสัตว์ทดลองด้วยปริมาณน้อยๆจะทำให้หัวใจของสัตว์ทดลองเต้นเร็วขึ้นและมีแรงบีบตัวดีกว่าปกติ แต่ถ้าใช้ปริมาณสูงอาจไปกีดกั้นระบบคอนดัคตีฟ(conductive system)ของหัวใจ หรือไปกดการกระตุ้น(excitability)ของกล้ามเนื้อหัวใจ(Sivamogstham and tejasen, 1974) ทำให้หัวใจหยุดเต้นอยู่ในท่าซิสโตล์(systole)และไม่สามารถช่วยให้กลับเต้นได้อีก มีรายงานว่าคาร์ดิโอทอกซินมีกลไกการออกฤทธิ์

คล้ายดิจิตาลิส(digitalis) ซึ่งเป็นสารกระตุ้นการหดตัวของกล้ามเนื้อหัวใจ(Sarkar, 1951) คาร์ดิโอทอกซินจัดเป็นเมมเบรนทอกซิน(menbrane toxin)คือจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระบบการเข้าออกของสารผ่านเซลล์เมมเบรน

นิวโรทอกซินและคาร์ดิโอทอกซินเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก มีความสามารถกระตุ้นให้ร่างกายสร้างแอนติบอดีต่อตัวมันได้ต่ำเรียกสารลักษณะนี้ว่าแฮบเทน(hapten) การเพิ่มน้ำหนักโมเลกุลให้กับแฮบเทนโดยการเชื่อม(conjugate)แฮบเทนเข้ากับโปรตีนตัวอื่นจะทำให้สมบัติการเป็นอิมมูโนเจนของแฮบเทนสูงขึ้น (Beiser, Butler, Erlanger, 1968 ;Mekala, Seppala, 1986)

โปรตีนที่ใช้เป็นตัวเชื่อมกับแฮบเทน เรียกว่าโปรตีนตัวนำ(carrier) ที่นิยมใช้ได้แก่ โอวาลบูมิน(ovalbumin) ไฟบริโนเจน(fibrinogen) ฮีโมไซยานิน(hemocyanin) ซีรัม-อัลบูมิน(serum albumin)และไทโรกลอบูลิน(thyroglobulin)เป็นต้น โมเลกุลของโปรตีนตัวนำจะมีหมู่ที่ใช้เชื่อมกับแฮบเทนได้เช่น หมู่คาร์บอกซิล หมู่อะมิโน เป็นต้น ในการเชื่อมระหว่างแฮบเทนกับโปรตีนตัวนำนิยมใช้คาร์โบไดอิไมด์(carbodiimide)เป็นตัวเชื่อม(coupling reagent)ซึ่งจะทำให้เกิดการจับกันระหว่างหมู่คาร์บอกซิลของโปรตีนตัวนำ กับหมู่อะมิโนของแฮบเทน (Goodfriend, 1964; Mekala และ Sepala, 1986; Bauminger และ Wilcheck, 1980) ดังปฏิกิริยา



หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โมเลกุลที่ได้นี้นอกจากจะมีความเป็นแอนติเจนสูงขึ้นแล้ว น่าจะมีความเป็นพิษลดลงด้วย เคยมีผู้รายงานว่าในการทดลองเปลี่ยนแปลงโมเลกุลของโครโบทอกซิน (crobotoxin) ซึ่งเป็นนิวโรทอกซินของงูเห่าไต้หวัน (Naja naja atra) ด้วยวิธีฟลูโอเรสซีน ไทโอคาร์บามิเลชัน (fluorescine thiocarbamylation) ที่บริเวณหมู่อะมิโนของไลซีนพบว่าความเป็นพิษของทอกซินเสียไปโดยไม่มีผลต่อสมบัติการเป็นแอนติเจน (antigenicity) ของทอกซิน แสดงว่าบริเวณหมู่อะมิโนอิสระมีส่วนเกี่ยวข้องกับการทำงานของแอคทีฟไซท์ (active site) (Yang, 1974) จึงคาดว่าหมู่อะมิโนอิสระของนิวโรทอกซินและคาร์ดิโอทอกซินซึ่งส่วนใหญ่อยู่ที่ตำแหน่งความเป็นพิษถ้าถูกนำมาเชื่อมกับหมู่คาร์บอกซิลของโปรตีนตัวนำ อาจจะทำให้ความเป็นพิษลดลง เนื่องจากไม่สามารถจับกับรีเซปเตอร์บนเซลล์เป้าหมายได้เหมือนเดิม ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงโมเลกุลของทอกซินบริเวณที่แสดงความเป็นพิษ (functionally essential group) โดยไม่เปลี่ยนแปลงบริเวณโครงสร้างที่สำคัญ (structural essential group) ของทอกซินน่าจะทำให้ได้โมเลกุลที่ปราศจากพิษ แต่มีโครงสร้างใกล้เคียงของเดิมมากที่สุด

ในการวิจัยครั้งนี้จึงพยายามแยกนิวโรทอกซินและคาร์ดิโอทอกซินออกจากพิษงูเห่าไทย และทำให้บริสุทธิ์ขึ้น แล้วนำไปเชื่อมกับโปรตีนตัวนำ เช่น อัลบูมิน และไทโรกลอบูลิน เพื่อทำให้ทอกซินมีความเป็นแอนติเจนสูงขึ้นและมีความเป็นพิษลดลง หลังจากนั้นจึงนำทอกซินคอนจูเกตไปกระตุ้นให้สัตว์ทดลองสร้างแอนตินิวโรทอกซินและแอนติคาร์ดิโอทอกซิน ซึ่งคาดว่าจะได้แอนติซีรัมที่มีประสิทธิภาพสูงในการทำลายความเป็นพิษ (neutralization) ของพิษงูเห่าไทย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย