บทนำ

งู เป็นสัตว์เลื้อยคลานประเภทหนึ่ง ซึ่งมีอยู่มากมาย และกระจัดกระจายอยู่ทั่วไปบนพื้นโลก จากรายงานของ Tu และ Toom (1966) พบว่าในโลกมีงูอยู่อย่างน้อย ๒,๓๐๐ ชนิด (species) ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็นพวก ๆ ตามหลักการจัดจำพวกสัตว์ (animal classification) โดยอาศัยความแตกต่างของลักษณะโครงสร้างของกระดูกและกระโหลกศรีษะ รวมทั้งลักษณะบางอย่างทางชีววิทยาได้เป็น ๒๓ วงศ์

จากจำนวน ๒๓ วงศ์นี้ เป็นวงศ์ของงูพิษ ๓ วงศ์ ซึ่งประกอบไปด้วยงูพิษประมาณ ๓๐๐-๔๐๐ ชนิด

๑. Elapidae แบ่งออกได้เป็น ๒๓ genera ประกอบไปด้วยงูพิษประมาณ ๒๖๐ ชนิด ตัวอย่างที่เรารู้จักได้แก่ งูสามเหลี่ยม งูเห่า เป็นต้น

๒. Viperidae แบ่งออกได้เป็น ๑๕ genera ประกอบไปด้วยงูประมาณ ๖๙ ชนิด ตัวอย่างที่เรารู้จักได้แก่ งูแมวเซา เป็นต้น

๓. Crotalidae แบ่งออกได้เป็น ๖ genera ประกอบไปด้วยงูประมาณ ๗๗ ชนิด ตัวอย่างในวงศ์นี้ได้แก่ งูกะปะ rattle snake เป็นต้น

นอกจากนี้หนังสือบางเล่มได้แบ่งงูพิษออกเป็น ๔ วงศ์ โดยเพิ่มเข้าไปอีกวงศ์หนึ่ง คือ

Hydrophiidae หมายถึง งูพิษทุกชนิดที่อาศัยอยู่ในทะเล

ปัญหาเรื่อง คนถูกงูพิษกัดเป็นปัญหาที่สำคัญ และยุ่งยากมากปัญหาหนึ่ง ทางด้านสวัสดิภาพ ความปลอดภัยของประชากรทั่วโลก โดยเฉพาะในประเทศด้อยพัฒนา เช่น ประเทศต่าง ๆ ในอาฟริกา เอเชียและบางประเทศในยุโรปและอเมริกาเหนือรวมทั้งเม็กซิโก แม้ในประเทศสหรัฐอเมริกาเอง จากรายงานของ Tu และ Toom (1966) พบว่ามีพลเมืองที่ตายโดยถูกงูกัดประมาณปีละ ๓๐๐-๕๐๐ คน ในขณะที่ประเทศต่าง ๆ ในแถบตอนใต้ของเอเชีย และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (ไม่รวมจีน) พบว่าสูงถึงปีละ ๒๕,๐๐๐-๓๕,๐๐๐ คน

ลักษณะโดยทั่วไปของพิษงู พบว่าเป็นของเหลวเหนียว ๆ ที่ประกอบด้วยสาร

จำพวกโปรตีนอย่างน้อย ๙๐% ซึ่งมีทั้งโปรตีนชนิดที่เป็นพิษ (poisonous protein) และโปรตีนชนิดไม่เป็นพิษ (non - poisonous protein) นอกจากนี้ยังประกอบไปด้วยสารประกอบอินทรีย์และอนินทรีย์ต่าง ๆ อีกหลายชนิด Roy (1938) ได้พบว่าพิษงูทั่ว ๆ ไปประกอบด้วย

๑. สารประกอบพวกโปรตีนซึ่งประกอบไปด้วย อัลบูมินและโกลบูลิน (albumin and globulin) เป็นส่วนใหญ่

๒. สารประกอบพวกโปรตีโอสและเปปโตน (proteoses และ peptones) ซึ่งสารพวกนี้ไม่ตกตะกอนโดยความร้อน

๓. สารประกอบอินทรีย์บางอย่างซึ่งมีสี และละลายได้ดีในอัลกอฮอล์

๔. สารประกอบอนินทรีย์ บางชนิด เช่น คลอไรด์ ฟอสเฟต เป็นต้น

ส่วนประกอบของสารต่าง ๆ เหล่านี้ จะมีสารใดมากหรือน้อยขึ้นกับชนิดของงูพิษแต่ละชนิด ซึ่งจะมีคุณสมบัติพิเศษ เฉพาะตัวที่แตกต่างออกไปจากพิษงูชนิดอื่น ๆ และความเป็นพิษในแต่ละชนิดนั้นเชื่อว่าอาจเกิดจากการทำงานของสารที่เป็นพิษ (active toxic principle) เพียงหนึ่งอย่างหรือมากกว่าหนึ่งขึ้นไปก็ได้ โดยความเป็นพิษเกิดจากการทำงานร่วมกันของสารที่เป็นพิษแต่ละอย่าง นอกจากนี้จากรายงานของ Zeller (1948) พบว่าในตอนต้นคริสตศตวรรษที่ ๑๙ ได้มีผู้พบเอนไซม์หลายชนิดในพิษงูต่าง ๆ และเชื่อว่าเอนไซม์ต่าง ๆ ที่พบในพิษงูเหล่านี้มีส่วนรวมในการทำให้เกิดความเป็นพิษในพิษงูด้วย เอนไซม์ต่าง ๆ ที่พบในพิษงูมีหลายชนิด เช่น lecithinase หรือมีอีกชื่อหนึ่งว่า phospholipase A ซึ่งจะไปเปลี่ยน lecithin ให้เป็น lysolecithin ซึ่งสารตัวนี้จะมีคุณสมบัติในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก จึงเชื่อว่าเอนไซม์ตัวนี้อาจมีส่วนช่วยทำให้เกิดเม็ดเลือดแดงแตก เราพบเอนไซม์นี้ในพิษงูเกือบทุกชนิด proteinase พบมากในพิษงูหลายชนิดรวมทั้งในวงศ์ Viperidae ด้วย เชื่อกันว่าเป็นเอนไซม์ที่เป็นอันตรายมาก เพราะมันจะไปทำลายพวก tissue ต่าง ๆ ในร่างกายซึ่งล้วนแต่เป็นโปรตีนทั้งนั้น พบว่าในกรณีที่ทำงานร่วมกับ lecithinase จะไปทำลายผนังของเส้นเลือดฝอยทำให้เกิดอาการ

ตกเลือด (haemorrhage) ขึ้นได้ peptidase เป็นเอนไซม์ที่จะไป hydrolyse พวก polypeptide ซึ่งเอนไซม์ตัวนี้พบว่ามีอยู่ในพิษงูไม่กี่ชนิดและมี activity ต่ำมาก phosphodiesterase เอนไซม์ชนิดนี้พบมากในพิษงูเกือบทุกชนิด เชื่อว่ามันจะไป hydrolyse cozymase NAD, RNA และ DNA ด้วย phosphomonoesterase ไม่พบแพร่หลายนัก โดยมากพบมากในวงศ์ Elapidae ใน Viperidae ไม่ค่อยพบมาก นักจะทำหน้าที่ hydrolyse พวก linkage ของ phosphate เช่น สารพวก glucose (1- or 6-) phosphates, adenosine triphosphatase พบว่าอาจมีส่วนในการทำให้เกิดอาการช็อค (shock) ในร่างกาย โดยมันจะไป hydrolyse adenosine triphosphate ซึ่งเป็นสารที่เก็บพลังงานเพื่อใช้ในร่างกาย 5' - nucleotidase พบมากในพิษงูหลายชนิดเช่นกัน เอนไซม์นี้จะ hydrolyse linkage ของพวก phosphate ที่เกาะอยู่ที่ตำแหน่งที่ ๕ ของน้ำตาลพวก ribose หรือ deoxyribose ของสารพวก nucleotides, choline esterase พบมากในวงศ์ Elapidae ไม่พบในวงศ์ Viperidae เลย พบว่ามันจะไป hydrolyse สาร acetyl choline ซึ่งเป็นสารอยู่ระหว่างปลายประสาทกับกล้ามเนื้อทำให้สารตัวนี้เสียไป จึงอาจทำให้กล้ามเนื้อไม่ทำงาน catalase เป็นเอนไซม์ที่พบบ้างในพิษงูเพียงไม่กี่ชนิด ในรายที่ถูกงูพิษที่มีเอนไซม์ชนิดนี้กัด จะทำให้เลือดกลายเป็นสีดำ เนื่องจากถูก oxidize จาก haemoglobin ให้กลายเป็น methaemoglobin, L-amino acid oxidase เชื่อว่าเป็นเอนไซม์ที่ไม่เป็นพิษ แต่มีในพิษงูเพื่อใช้ในการย่อยอาหาร พบว่าเมื่อทำงานร่วมกับ proteinase แล้วจะไปเร่งปฏิกริยาของ proteinase ทำให้ผิวหนังบริเวณที่ถูกกัดเกิดพุพอง เน่าเปื่อย (necrosis) เอนไซม์ชนิดนี้พบในพิษงูเกือบทุกชนิด นอกจากนี้ยังพบเอนไซม์ hyaluronidase ในพิษงูบางชนิดซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้ เป็นเอนไซม์สำหรับ hydrolyse พวก carbohydrate เพียงชนิดเดียวที่พบในพิษงู ตัวเอนไซม์เองเชื่อว่าไม่เป็นพิษ แต่จะไปช่วยในการเป็น spreading factor ของ พิษงูเข้าไปในส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ที่กล่าวมาแล้วนี้น่าจะมีส่วนร่วมในการทำให้เกิดอาการเป็นพิษ เช่น อาการช็อค

การทำให้ผิวหนังพุพอง เน่าเปื่อย การทำให้เม็ดเลือดแดงแตก (haemolysis) การเร่งการแข็งตัวของเลือด (blood coagulation) การตกเลือด เมื่อเป็นเช่นนี้ความเป็นพิษของพิษงู จึงอาจเป็นผลเนื่องจากสารประกอบโปรตีนทั้งชนิดที่เป็นเอนไซม์และไม่เป็นเอนไซม์

โดยทั่วไปการรักษาคนไข้ที่ถูกงูพิษกัด เขาใช้ฉีดซีรั่มซึ่งได้จากการสร้างอำนาจคุ้มกัน (antibody) ขึ้นในสัตว์ เช่น ม้าหรือแกะ โดยการฉีดพิษงูปริมาณน้อย ๆ ซึ่งไม่พอที่จะทำให้ม้าตายได้ เข้าไปในม้าหลาย ๆ ครั้ง แต่ละครั้งค่อย ๆ เพิ่มปริมาณพิษงูขึ้นทีละน้อย โดยวิธีนี้ ม้าจะสร้างอำนาจคุ้มกันขึ้นในเลือดเพื่อทำลายความเป็นพิษของพิษงูนั้น อำนาจคุ้มกันต่อพิษงูนี้ เราเรียก anti-venom เมื่อม้าสร้างอำนาจคุ้มกันขึ้นเพียงพอแล้วก็ดูดเอาเลือดม้ามาเตรียมซีรั่ม เพื่อใช้ในการรักษาคนที่ถูกงูกัดได้ แต่วิธีนี้มีข้อเสีย คือ anti-venom ต่อพิษงูชนิดใดก็ใช้ได้เฉพาะในการรักษาคนที่ถูกงูพิษชนิดนั้นกัดเท่านั้น ไม่สามารถจะใช้รักษาคนที่ถูกงูพิษชนิดอื่นกัดได้ นอกจากนี้ Tu และ Toom (1966), Zeller (1948) ได้รายงานว่าแม้กระทั่งงูพิษชนิดเดียวกันอยู่ในที่ที่มีดินฟ้าอากาศ (climate) และ สภาพภูมิศาสตร์ (geographical areas) ต่างกันออกไปหรือพิษของงูชนิดเดียวกันอยู่ในสภาพดินฟ้าอากาศและสภาพภูมิศาสตร์คล้ายกัน แต่อยู่ในสรีระสภาพของร่างกาย (physiological conditions) ที่แตกต่างกันจะไม่สามารถใช้ anti-venom มารักษาคนไข้ที่ถูกกัดแทนกันได้

จากเหตุผลต่าง ๆ ดังกล่าวมาแล้วข้างต้นจะเห็นได้ว่า เรายังไม่ทราบถึงการทำงานที่แท้จริงของพิษงูชนิดต่าง ๆ เลย ดังนั้นถ้าเราสามารถศึกษารายละเอียดในการทำงานที่แท้จริง โดยสามารถแยกเอาสารที่เป็นพิษออกมาและทำให้บริสุทธิ์ได้ และศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ในทางชีวเคมี (biochemical action) สมบัติทางสรีระ (physiological action) รวมทั้งสมบัติในทางเภสัช (pharmacological action) ได้แล้วเราก็จะอธิบายถึงการทำงานของพิษงูได้ว่า มันจะมีปฏิกริยาเป็นพิษต่อร่างกายอย่างไร อันจะนำมาซึ่งการคิดค้นหาวิธีรักษาหรือป้องกันคนที่ถูกงูพิษกัดได้ โดยวิธีการที่เหมาะสมต่อไป

งูแมวเซา มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า Vipera russellii อยู่ในวงศ์ Viperidae

ซึ่งงูพิษในวงศ์นี้พบว่า จะมีเฉพาะแต่ในโลกเก่าซึ่งได้แก่ เอเชีย ยุโรป และอาฟริกาเท่านั้น งูแมวเซาเป็นงูพิษที่พบมากที่สุดในทวีปเอเชีย โดยเฉพาะในประเทศแถบร้อน เช่น อินเดีย จีน ญี่ปุ่น ใต้หวัน และไทยเป็นต้น ในประเทศไทยเราพบมากในจังหวัดแถบภาคกลางเช่น ลพบุรี อ่างทอง และสุพรรณบุรีเป็นต้น ซึ่งนับว่าเป็นงูพิษที่สำคัญชนิดหนึ่งของพวกชาวนา ชาวไร่ คนที่ถูกงูชนิดนี้กัดโดยมากมักจะตายในระยะเวลาอันสั้น หากไม่ได้รับการรักษาโดยฉีด anti-venom ให้เร็วที่สุดที่จะเร็วได้ ปัจจุบันเราทราบว่าพิษงูแมวเซาเป็นพิษที่กระทำอันตรายต่อระบบโลหิต (haemotoxin) ซึ่งตางกับงูเห่าซึ่งเป็นพิษชนิดที่ทำอันตรายต่อระบบประสาทในร่างกาย (neurotoxin)

การศึกษาความเป็นพิษของพิษงูแมวเซาเริ่มต้นในตอนต้นคริสตศตวรรษที่ ๑๙ ในประเทศอินเดีย โดย Lamb กับพรรคพวก (1903), (1905) ได้ศึกษาพบว่าการทำงานของพิษงูแมวเซาจะทำได้ ๒ แบบในสภาวะที่แตกต่าง กันไปของปริมาณ (dose) ของพิษงูที่ฉีดเข้าในร่างกายและวิธีการที่ฉีดเข้าไปในร่างกาย กล่าวคือ ถ้าฉีดพิษงูเข้าไปในร่างกายด้วยปริมาณที่จะทำให้สัตว์ทดลองตายอย่างรวดเร็ว โดยฉีดเข้าทางเส้นเลือด (intravenous injection) แล้วสัตว์ทดลองจะตายโดยมีโลหิตแข็งตัวและคั่งอยู่ตามเส้นเลือด (intravascular clotting) แต่เพียงอย่างเดียว แต่ถ้าฉีดพิษงูเข้าทางใต้ผิวหนัง (subcutaneous injection) ด้วยปริมาณที่ไม่ทำให้สัตว์ทดลองตายทันที จะพบว่าสัตว์จะมีอาการแบบเรื้อรัง (chronic action) ต่อมาจะตายโดยตรวจพบอาการที่เห็นชัดคือ การตกเลือด และบวม มีน้ำขังตามใต้ผิวหนัง (oedema) เขาได้ทดลองคำณวนหาความเป็นพิษมากน้อยของพิษงูแมวเซา โดยหาค่าออกมาเป็น * Minimum Lethal Dose (MLD) โดยการฉีดเข้าเส้นเลือด และได้พยายามหาความสามารถของคุณสมบัติในการขจัดพิษหรือต่อต้านพิษของ anti-venom โดยหาค่า ** neutralizing value ของ anti-venom ทั้งใน in vivo และ in vitro

---

*MLD คือ ปริมาณพิษงูที่น้อยที่สุดที่ฉีดเข้าไปแล้วจะทำให้สัตว์ทดลองตายใน ๒-๓ นาที

**neutralizing value หมายถึงปริมาณของ anti-venom ที่จะใช้ในการขจัดความเป็นพิษของพิษงูได้หมดพอดี

Anderson (1932) ได้ศึกษาผลงานของ Lamb (1903),(1905) และ Acton กับ Knowles (1914),(1915) ได้พบว่าค่า actual neutralizing power ของ anti-venom จะหาได้ถูกต้องแน่นอนต้องใช้วิธี in vitro และ ค่าอันนี้จะขึ้นกับสัตว์ทดลองด้วย และอาจเปลี่ยนแปลงไปได้เสมอ ดังนั้นก่อนจะนำ anti-venom มาใช้ทุกครั้งควรมีการทดลองหาค่า neutralizing power ก่อนถูกครั้ง ซึ่งวิธีการอันนี้ก็ได้ถือปฏิบัติอยู่จนกระทั่งทุกวันนี้ Taylor และ Mallick (1935) ได้พบว่า anti-venom ของพิษงูแมวเซา พิษงู Echis carinata และVipera berus สามารถขจัดคุณสมบัติของการทำให้ตกเลือดในพิษงูแมวเซาได้และเมื่อใช้ anti-venom ของพิษงู Echis carinata มาขจัดคุณสมบัติของการทำให้ตกเลือดในพิษงูแมวเซาได้จนหมดไปแล้วก็ยังพบว่าพิษงูแมวเซายังมีค่า MLD คงเดิมไม่เปลี่ยนแปลง แสดงให้เห็นว่า คุณสมบัติที่ทำให้เกิดการตกเลือดในพิษงูแมวเซาไม่ใช่ตัวที่เป็นพิษที่แท้จริง จะทำให้สัตว์ทดลองหรือสัตว์ที่ถูกกัดตายได้ เพียงแต่มีคุณสมบัติของการตกเลือดอยู่ในพิษงูชนิดนี้บ้างเท่านั้น Taylor et al (1935) ได้ศึกษาทาง in vitro ถึงคุณสมบัติในการไปเร่งการแข็งตัวของเลือด พบว่า พิษงูแมวเซาเมื่อทำให้เจือจางลง ๕,๐๐๐,๐๐๐ ถึง ๑๐,๐๐๐,๐๐๐ เท่า จึงจะหมดคุณสมบัติในการไปเร่งการแข็งตัวของเลือด นอกจากนี้เขายังได้ ศึกษาคุณสมบัตินี้ในทาง in vivo อีกด้วยและพบว่า เมื่อเราฉีดพิษงูเข้าไปในสัตว์ทดลองโดยวิธีใดก็ตาม ถ้าปริมาณของพิษงูนั้นมากพอที่จะไปทำให้สัตว์ทดลองตายในทันที (๒-๓ นาที) แล้ว สัตว์ทดลองจะตายเนื่องจากการแข็งตัวของเลือดในเส้นเลือด แต่ถ้าเราฉีดพิษงูเข้าไปโดยวิธีใดก็ตาม แล้วไม่ทำให้สัตว์ทดลองตายในทันที อาจตายหลังจากฉีดเป็นชั่วโมง หรืออาจไม่ตายก็ตาม จะพบว่าเลือดของสัตว์ชนิดนั้นจะไม่แข็งตัวแม้ว่าจะเจาะเอาออกจากร่างกายมาทิ้งไว้ถึง ๒๔ ชั่วโมงก็ตาม และยังได้พบว่าในกรณีสัตว์ทดลองที่ฟื้น หรือหายป่วยจากการฉีดพิษงูชนิดนี้เข้าไป เวลาของการแข็งตัวของเลือดจะค่อย ๆ สั้นเข้า ๆ จนในที่สุด เวลาของการแข็งตัวของเลือดจะปกติ และยังได้พบว่าในเลือดของสัตว์ที่ไม่แข็งตัวนั้นเนื่องจากขาดสารประกอบที่ใช้ในการแข็งตัวของเลือด คือ fibrinogen จึงให้ข้อเสนอว่า การที่พิษงูจะทำให้เลือดแข็งตัวหรือไม่นั้น มิใช่เนื่องจากการทำงานได้ ๒ อย่าง ในสภาวะที่แตกต่าง

กัน ความจริงแล้วเป็นการทำงานเพียงอย่างเดียว คือไปเร่งการแข็งตัวของเลือด ต่างกันแต่ว่าเป็นผลจากการทำงานช้าหรือเร็ว กล่าวคือ ในกรณีที่ฉีดพิษงูปริมาณสูง ๆ เข้าไปในร่างกาย จะไปเร่งให้เลือดแข็งตัวอย่างรวดเร็วตามเส้นโลหิตทั่ว ๆ ไป เพราะปฏิกริยาจะเกิดอย่างรวดเร็ว แต่ถ้าเราฉีดพิษงูปริมาณต่ำ ๆ เข้าไปในร่างกาย ปฏิกริยาจะเกิดช้า การแข็งตัวของเลือดจึงไปเกิดที่บริเวณเส้นเลือดฝอย (capillaries) ทำให้ fibrin ไปสะสมอยู่ตามเส้นเลือดฝอย ร่างกายจึงขาด fibrinogen มาไหลเวียนในกระแสเลือด ดังนั้น เลือดที่เจาะออกมาจึงไม่แข็งตัว Rosenfield และ Lenke (1935) ได้พบว่าในพิษงูแมวเซาสีคุณสมบัติไปทำให้เกิดการตกเลือดขึ้นในร่างกายได้ โดยเฉพาะตามเส้นเลือดฝอย ตาม mucous membrane และยังพบอีกว่า พิษงูชนิดนี้มี proteolytic activity สูงมาก Ahuja และBrooks (1948) ได้ทำการทดลองพบว่า ไม่ว่าจะฉีดพิษงูเข้าไปในร่างกาย โดยฉีดเข้าทางเส้นเลือดหรือฉีดเข้ากล้ามเนื้อก็ตาม พบว่า พิษงูแมวเซาจะมีคุณสมบัติเพียงอย่างเดียว คือ ไปเร่งการแข็งตัวของเลือดและเมื่อฉีดพิษงูในทางเส้นเลือดนั้น ถ้าใช้ปริมาณพิษงูน้อยกว่าค่า MLD แล้ว จะได้ผลเหมือนการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ และยังได้ทำการทดลองสนับสนุนว่า ในพิษงูแมวเซาจะประกอบไปด้วยส่วนที่เป็นพิษ ซึ่งจะทำอันตรายสัตว์จนถึงตาย (main toxic principle) เพียงชนิดเดียว คือส่วนที่มีคุณสมบัติในการไปเร่งการแข็งตัวของเลือดนี้เอง ส่วนคุณสมบัติอื่น ๆ เช่น การไปทำให้เกิดการตกเลือด การทำให้เม็ดเลือดแดงแตก เหล่านี้ อาจมีอยู่บ้างแต่น้อยจนไม่สามารถไปทำลายชีวิตสัตว์ทดลองได้ Ahuja et al (1946) ได้ทำการทดลองแสดงว่า heparin สามารถป้องกันหรือขจัดความเป็นพิษของงูแมวเซาได้ทั้งใน in vivo และ in vitro อันเป็นการสนับสนุนว่า ส่วนที่เป็นพิษจริง ๆ ในพิษงูแมวเซาอันจะทำให้สัตว์ถึงตาย (main toxic principle)นั้นน่าจะเนื่องจากการแข็งตัวของเลือดแต่เพียงอย่างเดียว Macfarlane และ Barnett (1934) ได้ พบว่าพิษงูแมวเซาสามารถเร่งการแข็งตัวของเลือดคนปกติและในคนเป็นโรค haemophilia (เลือดออกไม่หยุด) ได้และได้ทดลองใช้พิษงูแมวเซาห้ามเลือดในคนเป็นhaemophilia ได้ผลดี นอกจากนี้ยังพบว่า ในสภาพเป็นของแข็ง พิษงูจะมีคุณสมบัติอยู่ตัวและสามารถ

จะเก็บรักษาไว้ได้นานโดยไม่เปลี่ยนแปลง แต่ในสภาพที่เป็นสารละลาย จะสูญเสียคุณสมบัติต่าง ๆ ไปได้ง่าย แม้จะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ ๐°ซ. ก็ตาม Ganguly และ Malkana (1936) ได้วิเคราะห์ถึงคุณสมบัติทางเคมีของพิษงูแมวเซา พบว่าประกอบไปด้วย C,H, O, N ไม่พบ P จึงสรุปได้ว่าในพิษงูไม่มี cephalin, kehalin และnucleoprotein และได้พบว่าในพิษงูมีโปรตีนประมาณ ๔๖.๘% ในจำนวนนี้ประกอบไปด้วย globulin 23.35 , albumin 22.12%, proteoses 50.52% นอกจากนี้ยังมีสารพวกไขมันซึ่งละลายได้ดีใน ether อีกประมาณ ๒.๘% และพิษงูแมวเซานี้จะมีสารที่มีคุณสมบัติในการเป็นพิษอยู่ ๓ ชนิด คือ ส่วนที่ไปเร่งการแข็งตัวของเลือด ส่วนที่เป็นคุณสมบัติในการทำให้สัตว์ทดลองตาย และส่วนที่ไปทำให้เกิดอาการตกเลือด คุณสมบัติที่สำคัญทั้ง ๓ ชนิดนี้ อยู่ในโปรตีนส่วนที่เป็น proteoses ทั้งสิ้นRoy (1938) ได้ศึกษาพบว่าพิษงูแมวเซามี proteolytic activity สามารถย่อย fibrin ได้ และพบว่ามี lipolytic activity คือ lecithinase activity ไม่พบ haemolytic activity เลย Ghosh และ Battachaya (1939) ได้พยายามแยกส่วนประกอบที่สำคัญของพิษงูแมวเซาออกจากกัน โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วย Na_2SO_4 แล้วดูด (adsorb) ด้วย aluminium hydroxide พบว่าสารที่แยกได้โดยวิธีนี้ มีความเป็นพิษสูงเป็น ๗.๘ เท่าของพิษงูที่ยังไม่ได้แยก Ganguly (1936)ได้อธิบายการทำงานของพิษงูแมวเซาในการเร่งการแข็งตัวของเลือดว่า ตัวพิษงูเองไม่มีคุณสมบัติในการเร่งการแข็งตัวของเลือด แต่มันไปทำปฏิกริยากับ blood platelet ทำให้เซลล์ของ blood platelet แตกแล้วปล่อย thrombokinase หรือ thromboplastin ออกมาจึงไปเร่งการแข็งตัวของเลือดทางอ้อม ดังนี้

platelet + พิษงูแมวเซา

prothrombin —thrombokinase→ thrombin ..... (A)

thrombin + fibrinogen ⟶ fibrin ..... (B)

Page et al (1941) ได้พบว่า พิษงูแมวเซาใช้ในการหา prothrombin coagulation time ได้ผลดีกว่า thrombokinase หรือ thromboplastin ที่สกัดได้จากปอดและสมอง De Beer และ Tuckahoe (1947) ใช้พิษงูแมวเซาไปเร่งการแข็งตัวของสุนัขที่กิน 3,3' methylene bis (4-hydroxy coumarin) dicoumarol ได้เร็วกว่าใช้ thromboplastin ที่ได้จากสมองหรือปอด Mowson (1949) ใช้พิษงูแมวเซาหาปริมาณ prothrombin ได้ผลดี สดวก แน่นอนและรวดเร็วกว่าเมื่อใช้ thromboplastin จากสมองและปอด Biggs และ Mc. farlane (1953) ได้กล่าวว่า พิษงูแมวเซาจะมีคุณสมบัติคล้ายกับ thromboplastin ที่ได้จากสมองและปอด มีแตกต่างกันไปบ้างเล็กน้อย คือ พิษงูจะทำงานได้ดีต่อเมื่อมี blood platelet หรือ lipid factor เช่น lecithin ตัวใดตัวหนึ่งอยู่ด้วย ถ้าขาดแฟคเตอร์นี้แล้ว จะไม่สามารถเร่งการแข็งตัวของเลือดได้เลย ในขณะที่ thromboplastin สามารถทำงานได้โดยไม่ต้องการแฟคเตอร์นี้ก็ได้ อีกข้อหนึ่ง คือ พิษงูแมวเซาจะไปเร่งการแข็งตัวของ plasma ของคนที่กิน dicoumarol ได้เร็วกว่า thromboplastin นอกจากนี้พิษงูจะทำงานได้ดีต้องมี factor V อยู่ด้วย Hjort (1957) ได้พบว่า พิษงูแมวเซาสามารถจะเปลี่ยน proaccelerin ให้กลายเป็น accelerin ได้โดยไม่ต้องมี Ca^{++} อยู่ด้วย Borsch Grevink (1960) ได้ใช้พิษงูแมวเซาหาปริมาณ factor V ได้ Peden และ Peacock (1958) พบว่าการทำงานของพิษงูแมวเซานอกจากต้องการแฟคเตอร์ V รวมทั้งซีรั่มและ blood platelet หรือ lipid factor ในการเกิดปฏิกริยาเร่งการแข็งตัวของเลือดแล้ว ยังต้องการ Stuart Prower Factor ไปช่วยเร่งปฏิกริยาอีกด้วย เขาได้ทดลองปฏิกริยาของพิษงูในการเร่งการแข็งตัวของเลือด โดยใช้ซีรั่มของวัวและ phosphatidyl ethanolamine แทน lipid factor จากผลการทดลองเขาได้อธิบายการทำงานของพิษงูแมวเซาว่า ขั้นแรกพิษงูอาจไปทำปฏิกริยากับสารซึ่งสลายตัวง่ายในซีรั่มของวัว ซึ่งคิดว่าน่าจะเป็นโปรตีน โดยทำปฏิกริยาแบบ enzymatic reaction แล้วได้สารออกมาตัวหนึ่ง ซึ่งสารตัวนี้เมื่อมี lipid factor หรือ platelet ก็จะไปเร่งปฏิกริยาการเปลี่ยน prothrombin ให้กลายเป็น thrombin ได้ จะเห็นได้ว่า lipid factor ซึ่งในที่นี้เขาใช้ phosphatidyl ethanolamine แทนนั้นไม่ได้

เข้ามาเกี่ยวข้องในปฏิกริยาขั้นแรกระหว่าง พิษงูกับโปรตีนในซีรั่มเลย Peacock (1961) ได้ศึกษาปฏิกริยาการเร่งการแข็งตัวของเลือด โดยพิษงูแมวเซาได้พบว่า ปฏิกริยาระหว่างพิษงูกับแฟคเตอร์ในซีรั่มนั้นต้องมีแฟคเตอร์ V และ Stuart Prower factor มาช่วยปฏิกริยาจึงเกิดได้ดี Williams และ Esnouf (1962) ได้ใช้ DEAE cellulose แยกพิษงูแมวเซาออกได้เป็นส่วนต่าง ๆ ถึง ๙ ส่วน และใน ๙ ส่วนนี้จะมีส่วนหนึ่งซึ่งมีคุณสมบัติในการเร่งการแข็งตัวของเลือดได้อย่างรุนแรงถึง ๘ เท่าของพิษงูที่ยังไม่ได้แยก ในขณะที่ส่วนอื่น ๆ อีก ๘ ส่วนเกือบจะไม่มีคุณสมบัติอันนี้เลย เขาได้ทำการทดลองให้เห็นว่าปฏิกริยาของสารในส่วนนี้กับโปรตีนที่ได้จาก plasma ของวัวเป็นแบบ enzymatic reaction และยังพบว่าสารในส่วนนี้สามารถ hydrolyse toluene p-sulfonyl-arginine methyl ester (TAME) ซึ่งเป็น substrate ในการหา activity ของ proteinase ได้ นอกจากนี้ยังได้ศึกษาเอนไซม์บางตัวที่มีในพิษงู เช่น L-amino acid oxidase, phosphodiesterase, adenosine triphosphatase, phosphomonoesterase, lecithinase เหล่านี้เป็นต้น

จะเห็นได้ว่าที่กล่าวมาแล้วข้างต้นนี้ทั้งหมดเป็นความรู้ทั่ว ๆ ไปเกี่ยวกับพิษงูแมวเซา ซึ่งได้ศึกษาค้นคว้าในต่างประเทศ แต่ในประเทศไทยการศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับพิษงูนี้ยังไม่เคยมีมาก่อนเลย ปัจจุบันมีแต่เพียงการผลิตซีรั่มซึ่งเป็น Specific anti-venom เพื่อใช้ในการรักษาคนไข้ที่ถูกงูพิษชนิดนี้กัด ที่สถานเสาวภา สภากาชาดไทยเท่านั้น ดังนั้นจึงน่าจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการที่จะเริ่มต้น ศึกษา ค้นคว้าถึงคุณสมบัติต่าง ๆ ของพิษงูชนิดนี้ดูบ้าง

ในการศึกษาต่อไปนี้ จะทำการแยกพิษงูออกเป็นส่วน ๆ โดยใช้ DEAE cellulose เพื่อเป็นการศึกษาเบื้องต้นดูว่า พิษงูแมวเซาในเมืองไทยประกอบไปด้วยส่วนต่าง ๆ ที่สำคัญกี่ส่วน อาจแตกต่างออกไปจากของต่างประเทศบ้างหรือไม่ และจะได้ศึกษาถึงคุณสมบัติของเอนไซม์บางตัวที่มีในพิษงูชนิดนี้ในเมืองไทย เพื่อจะหา activity ดูว่ามีมากน้อยแค่ไหน รวมทั้งศึกษาถึงความเป็นพิษของโปรตีน ในแต่ละส่วนที่แยกออกมาได้ ทั้งนี้เพื่อนำมาซึ่งความสัมพันธ์ระหว่าง ความเป็นพิษของพิษงูกับ activity

ของเอนไซม์ ซึ่งอาจจะเป็นทางหนึ่งซึ่งเราสามารถนำเอาเหตุผลต่าง ๆ มาใช้อธิบายถึงความเป็นพิษของพิษงูชนิดนี้เท่าที่จะทำได้ อีกทั้งการศึกษาเอนไซม์เหล่านี้ในพิษงู อาจเป็นไปได้ว่าถ้ามีปริมาณเอนไซม์ในพิษงูมากพอแล้ว เราอาจใช้พิษงูชนิดนี้เป็นแหล่ง (source) ของเอนไซม์บางชนิด ซึ่งอาจนำไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาค้นคว้าด้านอื่น ๆ ต่อไปอีกด้วย

การทดลอง

๑. พิษงูแมวเซาและพิษงูเห่า

ได้จากแผนกคิดค้น กองวิทยาศาสตร์ สถานเสาวภา สภากาชาดไทย เป็นพิษที่เก็บครั้งเดียวจากงูหลาย ๆ ตัวรวมกัน แล้วทำแห้งโดยเครื่องมือ freeze drying เมื่อวันที่ ๓๑ กรกฎาคม พ.ศ. ๒๕๐๖

๒. เคมีภัณฑ์

DEAE cellulose ชนิด S & S ได้จาก Dr. Floyd W.Dunn คณะแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ 2-amino, 2- (hydroxy-methyl)-propane-1,3 diol (tris) และ glycine ซื้อจากบริษัท British Drug Houses (B. D. H.) ประเทศอังกฤษ bis (p-nitrophenyl)phosphate mono Na - salt, P-nitrophenyl phosphate di Na-salt และ lecithin ซื้อจากบริษัท Koch-Light ประเทศอังกฤษ Adenosine triphosphate (ATP) และ L-leucine ซื้อจากบริษัท Nutritional Biochemical Corporation ประเทศสหรัฐอเมริกา ส่วนเคมีภัณฑ์อื่น ๆ นอกจากที่กล่าวมานี้ ซื้อจากบริษัท May & Baker ประเทศอังกฤษ

๓. เครื่องมือ

Fraction collector ของบริษัท LKB - Radirac model 3402 B ประเทศสวีเดน Spectrophotometer ของบริษัท Unicam model Sp 500 ประเทศอังกฤษ เครื่องมือ freeze drying; Warburg respirometer ของบริษัท Townson & Mercer ประเทศอังกฤษ เครื่องมือ shaking water bath ของ Gallenkamp ประเทศอังกฤษ

๔. วิธีแยกพิษงูแมวเซา

ใช้วิธีของ Williams และ Esnouf (1962) โดยชั่ง DEAE cellulose หนัก ๒๕ กรัม แล้วแบ่งออกเป็น ๕ ส่วน ๆ ละ ๕ กรัม นำแต่ละส่วนมาแช่ใน 2 M NaCl

in 0.01 M tris phosphate buffer pH 6 ปริมาตรพอสมควร แล้วนำมาบรรจุในคอลัมน์ แก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน ๓ เซ็นติเมตร โดยแต่ละส่วนบรรจุภายใต้ความดันของแก๊ส H_2 ต่าง ๆ กัน เริ่มจากส่วนแรกใช้ความดัน ๕๐ มิลลิเมตรของปรอท ส่วนที่ถัดขึ้นไปเพิ่มความดันของแก๊ส N_2 ขึ้นส่วนละ ๕๐ มิลลิเมตร จนส่วนบนสุดใช้ความดัน ๒๕๐ มิลลิเมตรของปรอท ตอนนี้จะได้ความสูงของ DEAE-celluose ที่บรรจุ ๓๐ เซ็นติเมตรล้างคอลัมน์ด้วย 0.01 M tris phosphate buffer pH 6 ปริมาณ ๒ ลิตร แล้วเปลี่ยนมาล้างด้วย 0.01 M tris phosphate buffer pH 8.5 จนกระทั่งสารละลายที่รองมาจากคอลัมน์มี pH = 8.5 ด้วย ชั่งพิษงู ๒๐๗.๙ มิลลิกรัม ละลายใน tris phosphate buffer pH 8.5 ปริมาณ ๒๕ มิลลิลิตรนำไปเซนตริฟิวก์(centrifuge) ที่ ๕๐๐ × g นาน ๒ นาที เอาส่วนที่ไม่ละลายออกเสีย นำส่วนที่ใสมาเทใส่คอลัมน์หลังจากรอจนสารละลายพิษงูไหลลงไปจนหมดแล้ว เริ่มผ่าน 0.01 M trisphosphate buffer pH 8.5 ลงในคอลัมน์เก็บสารละลายที่ไหลออกมาจากคอลัมน์โดยใช้ fraction collector ที่ละ ๑๐ มิลลิลิตรโดยปรับให้อัตราการไหลประมาณ ๘ นาทีต่อ ๑๐ มิลลิลิตร เมื่อผ่าน 0.01 M tris phosphate buffer pH 8.5 จนครบ ๕๐๐ มิลลิลิตรแล้วเปลี่ยนสารละลายเป็น 0.01 M tris phosphate buffer pH 7 และผ่านสารละลายนี้ลงไปเรื่อย ๆ จนกระทั่ง pH ของสารละลายที่ไหลออกมาจากคอลัมน์มี pH 7 ด้วย จึงเปลี่ยนไปใช้ 0.01 M tris phosphate buffer pH 6 จนกระทั่ง pH ของสารละลายที่เก็บได้มี pH=6 เปลี่ยนสารละลายใหม่เป็น 0.15 M NaCl ใน 0.01 M tris phosphate buffer pH 6 ๕๐๐ มิลลิลิตร 0,5 M NaCl ใน 0.01 M tris phospate buffer pH 6 ๕๐๐ มิลลิลิตร และ 1 M NaCl ใน 0.01 M tris phosphate buffer pH 6๑ ลิตรตามลำดับ

นำสารละลายที่เก็บได้จากคอลัมน์ ในแต่ละหลอดไปวัดปริมาณโปรตีนโดยวัด optical density ที่ความยาวคลื่น ๒๘๐ mμ ด้วยเครื่อง spectrophotometer จากโปรตีนที่เก็บได้ทุกหลอดในแต่ละส่วน นำมารวมกันแล้วนำไป dialyse กับน้ำที่อุณหภูมิ ๔°ซ. เพื่อไล่เกลือ tris phosphate และสารละลายอื่น ๆ ที่ dialyse ได้ออกเสียโดยเปลี่ยนน้ำหลาย ๆ ครั้ง นำสารละลายโปรตีนแต่ละส่วนที่ dialyse

แล้วนี้มาทำให้แห้งโดยใช้เครื่องมือ freeze drying แล้วละลายใน 0.15 M NaCl นำมาหาโปรตีนทั้งหมดในแต่ละส่วนโดยการวัด optical density ที่ความยาวคลื่น ๒๘๐ mμ เทียบกับค่า optical density ที่วัดได้จากสารละลายของพิษงูใน 0.15 M NaCl ที่เราทราบความเข้มข้นแน่นอนแล้ว จากนี้เราก็สามารถคำนวนหาปริมาณโปรตีนที่แยกได้ในแต่ละส่วน สารละลายโปรตีนที่แยกได้ในแต่ละส่วนนี้ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -๒๐°ซ. เพื่อหา activity ของเอนไซม์และหาความเป็นพิษเทียบกับพิษงูต่อไป

๕. <u>การวัดความเป็นพิษของงูแมวเซา</u> (toxicity assay)

ใช้วิธีของ Karber, The State Serum Institute Copenhagen โดยฉีด ๐.๕ มิลลิลิตรของสารละลายพิษงูหรือโปรตีนแต่ละส่วนที่แยกได้ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันเข้าไปทางเส้นเลือดที่หางหนูขาว (mice) ที่มีน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ ๑๖-๑๘ กรัม โดยแบ่งออกเป็นกลุ่ม ๆ ละประมาณ ๓-๕ ตัว ใช้เข็ม tuberculin ขนาดจุ ๑ มิลลิลิตร แล้วสังเกตุดูการตายภายใน ๒๔ ชั่วโมง จากนั้น คำนวนหาความเป็นพิษของพิษงูจากค่า LD_{50} โดยใช้สูตร

$$m = X_s - d\,(S_i - \tfrac{1}{2})$$

กำหนดให้ $m = \log LD_{50}$

X_s = ค่า log ของปริมาณพิษงูที่ต่ำที่สุดที่จะทำให้หนูที่ถูกฉีดตายหมด

d = interval between successive log dose

$S_i = \Sigma_i P_i$

P_i = response ratio

$$= \frac{\text{number of animals dead on } i^{th} \text{ dose level}}{\text{number of animals injected on } i^{th} \text{ dose level}}$$

$\tfrac{1}{2}$ = ปริมาตรพิษที่ฉีดเข้าไปแต่ละครั้งเป็นมิลลิลิตร

๖. การวัด activity ของ phosphodiesterase

ใช้วิธีของ Suzuki และ Iwanaga (1958) ดัดแปลงจากวิธีของ Degarilhe และ Laskowski (1955) ดังนี้

005367

ดูดสารละลายต่อไปนี้ คือ 0.0025 M sodium bis p-nitro phenyl phosphate ๑.๕ มิลลิลิตร 0.01M $MgSO_4$ ๐.๓ มิลลิลิตร และ 0.2M glycine buffer pH 8.2 ๐.๕ มิลลิลิตรใส่รวมกันใน conical flask ขนาด ๒๕ มิลลิลิตร นำไปอุ่น(incubate) ที่อุณหภูมิ ๓๗°ซ. ในเครื่อง shaking water bath โดยเขย่าอยู่ตลอดเวลา เป็นเวลา ๕ นาที แล้วเติมสารละลายพิษงูใน 0.15 M NaCl ขน ๑.๒๔ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรหรือสารละลายโปรตีนแต่ละส่วนที่แยกออกมาได้จากพิษงูลงไป ๐.๕ มิลลิลิตร อุ่นต่อไปที่ ๓๗°ซ. โดยเขย่าอยู่ตลอดเวลานาน ๑๕ นาที แล้วหยุดปฏิกริยาโดยการเติม 0.1 N NaOH ลงไป ๒ มิลลิลิตร สารละลายที่ได้นำไปวัด optical density เทียบกับ blank เมื่อใช้ 0.15 M NaCl แทนสารละลายพิษงูที่ความยาวคลื่น ๔๔๐ mμ เพื่อหาปริมาณ p-nitrophenol ที่ถูกขับออกมา กำหนด activity ของเอนไซม์โดยให้ ๑ หน่วยของเอนไซม์มีค่าเท่ากับ optical density ที่วัดได้ ๑ หน่วย

๗. การวัด activity ของ phosphomonoesterase

ใช้วิธีของ Suzuki และ Iwanaga (1958) ดัดแปลงจากวิธีของ Gulland และ Jackson (1938) ดังต่อไปนี้

ดูดสารละลายต่อไปนี้ คือ 0.01 M disodium p-nitro phenyl phosphate ๐.๕ มิลลิลิตร 0.01M $MgSO_4$ ๐.๘ มิลลิลิตร และ 0.2 M glycine buffer pH 7.9 ๐.๕ มิลลิลิตรใส่รวมกันใน conical flask ขนาด ๒๕ มิลลิลิตร นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ ๓๗°ซ. ในเครื่อง shaking water bath โดยเขย่าอยู่ตลอดเวลานาน ๕ นาที แล้วเติมสารละลายพิษงูใน 0.15 M NaCl ขน ๑.๓๐ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรหรือสารละลายของโปรตีนแต่ละส่วนที่แยกออกมาได้จากพิษงูลงไป ๐.๕ มิลลิลิตร อุ่นต่อไปที่ ๓๗°ซ. โดยเขย่าอยู่ตลอดเวลาอีกนาน ๓๐ นาที แล้วหยุดปฏิกริยาโดยเติม 0.1 N NaOH

i 17864714x

ลงไป ๒ มิลลิลิตร สารละลายที่ได้นำไปวัดoptical density เทียบกับ blank เมื่อใช้ 0.15 M. NaCl แทนสารละลายพิษงูที่ความยาวคลื่น ๔๔๐ m μ เพื่อหา p-nitrophenol ที่ถูกขับออกมา กำหนด activityของเอนไซม์เช่นเดียวกับเอนไซม์ phosphodiesterase

๘. การวัด activity ของ Adenosine triphosphatase

ใช้วิธีของ Williams และ Esnouf (1962) ดังนี้

ดูดสารละลายต่อไปนี้ 0.02 M.ATP ๐.๑ มิลลิลิตร 0.08 M tris phosphate buffer ๐.๕ มิลลิลิตร และ 0.1 M. $MgSO_4$ 0.10 มิลลิลิตรลงใน conical flask ขนาด ๒๕ มิลลิลิตร นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ ๓๗°ซ. ในเครื่อง shaking water bath โดยเขย่าอยู่ตลอดเวลาเป็นเวลา ๕ นาที แล้วเติมสารละลายพิษงูใน 0.15 M. NaCl ข้น ๑.๓๐ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรหรือสารละลายของโปรตีนแต่ละส่วนที่แยกออกมาได้จากพิษงูลงไป ๐.๒ มิลลิลิตร อุ่นต่อไปโดยเขย่าอยู่ตลอดเวลาที่ ๓๗°ซ. อีกนาน ๑๕ นาที หยุดปฏิกริยาโดยเติม ๑๐% TCA (trichloro acetic acid) ปริมาณเท่าตัว คือ ๐.๔ มิลลิลิตร สารละลายที่ได้นำไปเซนตริฟิวก์ที่ ๑,๕๐๐ xg นาน ๒๐ นาที เอาตะกอนออกให้หมด ส่วนที่เป็นน้ำใสนำมาหาปริมาณ phosphorous โดยวิธีของ Berenblum และ Chain (1938) โดยนำมาเติมสารละลาย NaOH จน pH=7 เติมน้ำให้ปริมาตรทั้งหมดเป็น ๕ มิลลิลิตร ถ่ายใส่กรวยแยก แล้วเติม 10 N.H_2SO_4 ๐.๕ มิลลิลิตร น้ำ ๒ มิลลิลิตร ๕% ammonium molybdate ๒.๕ มิลลิลิตร และ iso butyl alcohol ๑๐ มิลลิลิตรเขย่านาน ๑-๒ นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น ไขเอาชั้นของน้ำซึ่งอยู่ในชั้นล่างทิ้ง แล้วล้างชั้นของ iso butyl alcohol โดยเขย่ากับ 1 N.H_2SO_4 ครั้งละ ๕ มิลลิลิตร ๒ ครั้ง นำมาเติมสารละลาย $SnCl_2$ ๑๕ มิลลิลิตร ($SnCl_2$ ในที่นี้ได้จาก $SnCl_2$ ๑๐ กรัมละลายใน HCl ๒๕ มิลลิลิตรแล้วนำสารละลายนี้มา dilute ๒๐๐ เท่าด้วย 1 N.H_2SO_4) เขย่า ๓๐ นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น ไขเอาชั้นของน้ำทิ้ง ส่วนชั้นของ iso butyl alcohol ซึ่งมีสีน้ำเงินเนื่องจาก ammonium phospho molybdate ถูกรีดิวซ์ด้วย $SnCl_2$ ได้ complex นั้น ไขออกมาใส่ใน volumetric flask แล้วทำให้

ปริมาตรเป็น ๑๐ มิลลิลิตร โดยเติมethyl alcohol นำไปวัด optical density ที่ ๖๔๐m μ จากค่า optical density ที่วัดได้นำมาคำณวนหาปริมาณฟอสเฟตที่ถูกขับออกมาได้โดยดูจากกราฟมาตรฐาน กำหนด activity ของเอนไซม์ โดยให้ ๑ หน่วยของเอนไซม์มีค่าเท่ากับปริมาณฟอสฟอรัสที่ถูกขับออกมา ๑ ไมโครกรัมในเวลา ๑๕ นาที

๙. <u>การวัดactivity ของ L-amino acid oxidase</u>

ใช้วิธีของ S. Ratner (1955) โดยใช้Warburg respirometer ดังนี้

ใส่0.1M. L-leucine pH 7.2 ๐.๕ มิลลิลิตรใน sidearm ส่วนใน main compartment ใส่ ๐.๕ มิลลิลิตรของสารละลายพิษงูใน0.15 M.NaCl ขัน ๑๒.๓๖ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือสารละลายพิษงูเห่าใน0.15M.NaCl ขัน ๑๐ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือสารละลายของโปรตีนในแต่ละส่วนที่แยกจากพิษงู ในcentral well ใส่ ๒๐% KOH ๐.๒ มิลลิลิตรกับกระดาษกรองพับเป็นแฉก ๆ อุ่นที่ ๓๗°ซ. นาน ๕ นาที แล้วเริ่มปฏิกริยาโดยเท L-leucine ลงไปในmain compartment แล้วอ่านปริมาตรที่ O_2 ถูกใช้ไปทุก ๆ ๕ นาที ที่ ๓๗.๕°ซ. เป็นเวลา ๑ ชั่วโมง นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟ แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง O_2 ที่ถูกใช้ไปทุก ๆ ๕ นาทีกับเวลาที่เพิ่มขึ้น จากกราฟนี้เราจะคำณวนปริมาณ O_2 ที่ถูกใช้ไปในเวลา ๖๐ นาทีได้ กำหนด activity ของเอนไซม์โดยให้ ๑ หน่วยของเอนไซม์มีค่าเท่ากับ ๖๐ ไมโครลิตรของ O_2 ที่ถูกใช้ไปในเวลา ๑ ชั่วโมงที่ ๓๗.๕°ซ.

๑๐. <u>การศึกษาคุณสมบัติในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก (direct haemolysin)</u>

ใช้ดัดแปลงวิธีของ Neumann และ Habermann (1954) ดังต่อไปนี้

เตรียมเลือดก่อนใช้วิธีของ Collier (1938) โดยใช้เลือดคน ๑.๒ มิลลิลิตร ล้างด้วย bufferized normal saline solution pH 7.2 (เตรียมได้โดยใช้ ๘.๕ กรัมของ NaCl และ ๒๐ มิลลิลิตรของ 0.1N. dibasic sodium phosphate นำมาเติมน้ำให้ปริมาตรเป็น ๑ ลิตร แล้วเติมกรดเกลือจนกระทั่ง pH=7.2) ครั้งละ ๑๐ มิลลิลิตร ๕ ครั้ง แล้วนำมาเติมน้ำเกลือขัน 0.15 M ๕๐ มิลลิลิตร ใช้เลือดที่เตรียม

ได้นี้ ๓.๐ มิลลิลิตรมาเติม ๑.๐ มิลลิลิตรของสารละลายพิษงูข้น ๔.๓๓ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อุ่นที่อุณหภูมิ ๓๗°ซ. นาน ๓๐ นาที แล้วนำออกมาแช่ในอ่างน้ำแข็งทันที แล้วนำมาเซนตรีฟิวก์ที่ ๐°ซ. ๑,๓๐๐ x g นาน ๑๐ นาที ส่วนที่เป็นน้ำใสนำมาเติม ๑% $K_3Fe(CN)_6$ (w/v) ๔ หยด ถ้าพิษงูสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงแตกแล้วจะมี haemoglobin ถูกขับออกมา ซึ่งเมื่อถูก oxidize โดย $K_3Fe(CN)_6$ จะได้เป็น methaemoglobin ซึ่งจะมีคุณสมบัติในการดูดแสงที่ความยาวคลื่น ๖๓๐ mμ ดังนั้นเมื่อนำสารละลายที่ได้ไปวัด optical density ที่ความยาวคลื่น ๖๓๐ mμ จากค่า optical density ที่วัดได้เราก็จะบอกได้ว่าพิษงูและโปรตีนที่แยกได้มีคุณสมบัติในการไปทำให้เม็ดเลือดแดงแตกมากน้อยเพียงไรได้

๑๑. <u>การวัด activity ของ lecithinase</u>

ใช้วิธีของ Collier (1952) ดัดแปลงโดย Yang Iwanaga และ Kawashi (1958) ดังนี้

ใช้ ๑.๐ มิลลิลิตรของเลือดที่เตรียมได้ดังการศึกษาคุณสมบัติในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกมาทำให้เจือจาง ๕ เท่า โดยเติม 0.15 M.NaCl ลงไป ๔ มิลลิลิตร นำไปวัด optical density ที่ ๖๖๐ mμ แล้วนำไปแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ ๒๔-๒๕°ซ. ขณะเดียวกันดูดสารละลายต่อไปนี้ คือ ๐.๕ มิลลิลิตร 0.2 M.veronal-HCl buffer pH 7 และพิษงูหรือโปรตีนแต่ละส่วนที่แยกออกมาจากพิษงูที่มีค่า optical density อยู่ระหว่าง ๐.๐๑-๐.๒ ที่ความยาวคลื่น ๒๘๐ mμ ๐.๒ มิลลิลิตรใส่ใน conical flask ขนาด ๒๕ มิลลิลิตร แล้วอุ่นที่อุณหภูมิ ๒๕°ซ. นาน ๓ นาที เติม 0.01 M. lecithin suspension ลงไป ๐.๒ มิลลิลิตร อุ่นต่อไปที่อุณหภูมิเดิมอีกนาน ๑๕ นาที จากนั้นหยุดปฏิกริยาโดยเติม ๙๕% ethyl alcohol ๒ มิลลิลิตร แล้วดูดสารละลายที่ได้นี้ ๐.๑ มิลลิลิตรเติมลงไปในสารละลายของเลือดที่เตรียมไว้ข้างต้น อุ่นต่อไปที่อุณหภูมิ ๒๕°ซ. อีกนาน ๑๕ นาที แล้วนำไปวัด optical density ที่ ๖๖๐ mμ ถ้าพิษงูมี activity ของเอนไซม์แล้ว มันจะเปลี่ยน lecithin ให้เป็น lysolecthin ซึ่งไปทำให้เม็ดเลือกแดงแตก ดังนั้นค่า optical density ของสารละลายเลือดที่ความยาวคลื่น ๖๖๐ mμ จะลดน้อยลง จากค่าผลต่างของ optical density ที่วัดได้

ในครั้งแรกและครั้งหลังเรานำมาคำณวนหา activity ของเอนไซม์ได้โดยให้ ๑ หน่วยของเอนไซม์มีค่าเท่ากับ $(E_0-E)\times 30$ เมื่อ E_0 เท่ากับ optical density ที่วัดได้ในครั้งแรก E เท่ากับ optical density ที่วัดได้หลังจากเกิดปฏิกริยาแล้ว และ ๓๐ คือ ค่า dilution factor

๑๒. <u>การศึกษาคุณสมบัติในการไปเร่งการแข็งตัวของเลือด</u> (Blood coagulant)

ใช้ดัดแปลงวิธีของ Williams และ Esnouf (1962) ดังต่อไปนี้

นำเอาเลือดคนปกติ ๕๐ มิลลิลิตรมาเซนตริฟิวก์ที่ ๑,๓๐๐ x g นาน ๑๐ นาที เพื่อเอาเม็ดเลือดแดงออก ส่วนที่เป็น plasma นำมาใช้ในการทดลองหาเวลาของการแข็งตัวของเลือดโดยใช้ plasma ๐.๒ มิลลิลิตรรวมกับพิษงูที่ความเข้มข้น ตั้งแต่ ๐.๑ ถึง ๒๐ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรหรือโปรตีนแต่ละส่วนที่แยกได้จากพิษงู ๐.๑ มิลลิลิตรในหลอดทดลองขนาด ๑๐ มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากันดี แล้วอุ่นที่อุณหภูมิ ๓๗.๕°ซ. เติม $CaCl_2$-buffer pH 7.2 ลงไป ๐.๒ มิลลิลิตร แล้วเริ่มจับเวลาการแข็งตัวของเลือด โดยเอียงหลอดดูทุก ๆ นาที จนกระทั่ง plasma แข็งตัว จากเวลาของการแข็งตัวของเลือดที่วัดได้นี้นำมาคำณวนหา specific activity ของโปรตีนส่วนต่าง ๆ ที่แยกจากพิษงู โดยเทียบกับคุณสมบัติอันนี้ของพิษงูจากกราฟมาตรฐานที่ได้จากการพล้อตระหว่างเวลาของการแข็งตัวของเลือดเป็นวินาทีกับความเข้มข้นของพิษงูบนแกน log ทั้ง ๒ แกน โดยกำหนดให้ค่า specific activity คือ ค่าความเข้มข้นของพิษงูที่ยังไม่ได้แยกเป็นส่วน ๆ ในหน่วยของไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่จะให้ activity ของคุณสมบัติในการแข็งตัวของเลือดเท่ากับในโปรตีนแต่ละส่วนที่แยกจากพิษงู เมื่อมีความเข้มข้น ๑ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเทียบจากกราฟมาตรฐาน

ผลการทดลอง

A) การแยกพิษงูโดย DEAE cellulose

ได้ทำการแยกพิษงูแมวเซาออกเป็นส่วน ๆ โดยใช้ผ่านลงไปในคอลัมน์ของ DEAE cellulose แล้วใช้ tris phosphate buffer ที่ pH ต่าง ๆ กัน elute ลงมาตามลำดับเก็บสารละลายที่ไหลออกมาจากคอลัมน์ทีละ ๑๐ มิลลิลิตร ซึ่งนำไปวัดปริมาณโปรตีนในแต่ละหลอดโดยการวัด optical density ที่ 280 mμ ผลปรากฏว่าได้โปรตีนออกมาทั้งหมด ๗ ส่วน ตามรูปที่ ๑ โดยส่วนที่ I เป็นโปรตีนในหลอดที่ ๑๕ ถึง ๒๖ ส่วนที่ IIเป็นโปรตีนจากหลอดที่ ๒๗ ถึง ๓๙ ส่วนที่III จากหลอดที่ ๕๐ ถึง ๖๕ ส่วนที่IV จากหลอดที่ ๖๕ ถึง ๗๖ ส่วนที่ V จากหลอดที่ ๑๔๐ ถึง ๒๒๕ ส่วนที่ VI จาก หลอดที่ ๕๑๒ ถึง ๕๔๐ และส่วนที่ VII จากหลอดที่ ๕๗๘ ถึง ๖๐๐ การทดลองทำที่ อุณหภูมิ ๕-๘°ซ. ในห้องเย็นของภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ก่อนทำการทดลองนี้ได้ทำการทดลองแยกพิษงูแมวเซาโดยใช้วิธีเดียวกันนี้มาแล้วครั้งหนึ่งที่อุณหภูมิห้องประมาณ ๒๕-๓๐°ซ. ผลปรากฏว่าแยกพิษงูได้ ๗ ส่วนเช่นกัน

โปรตีนที่แยกได้นั้นหลังจาก dialyse และ freeze dry แล้วนำมาละลายใน 0.15 M NaCl วัด optical density ที่ความยาวคลื่น 280m μ แล้วคำณวนปริมาณโปรตีนที่ได้ในแต่ละส่วน ได้ผลดังตารางที่ ๑

ตารางที่ ๑

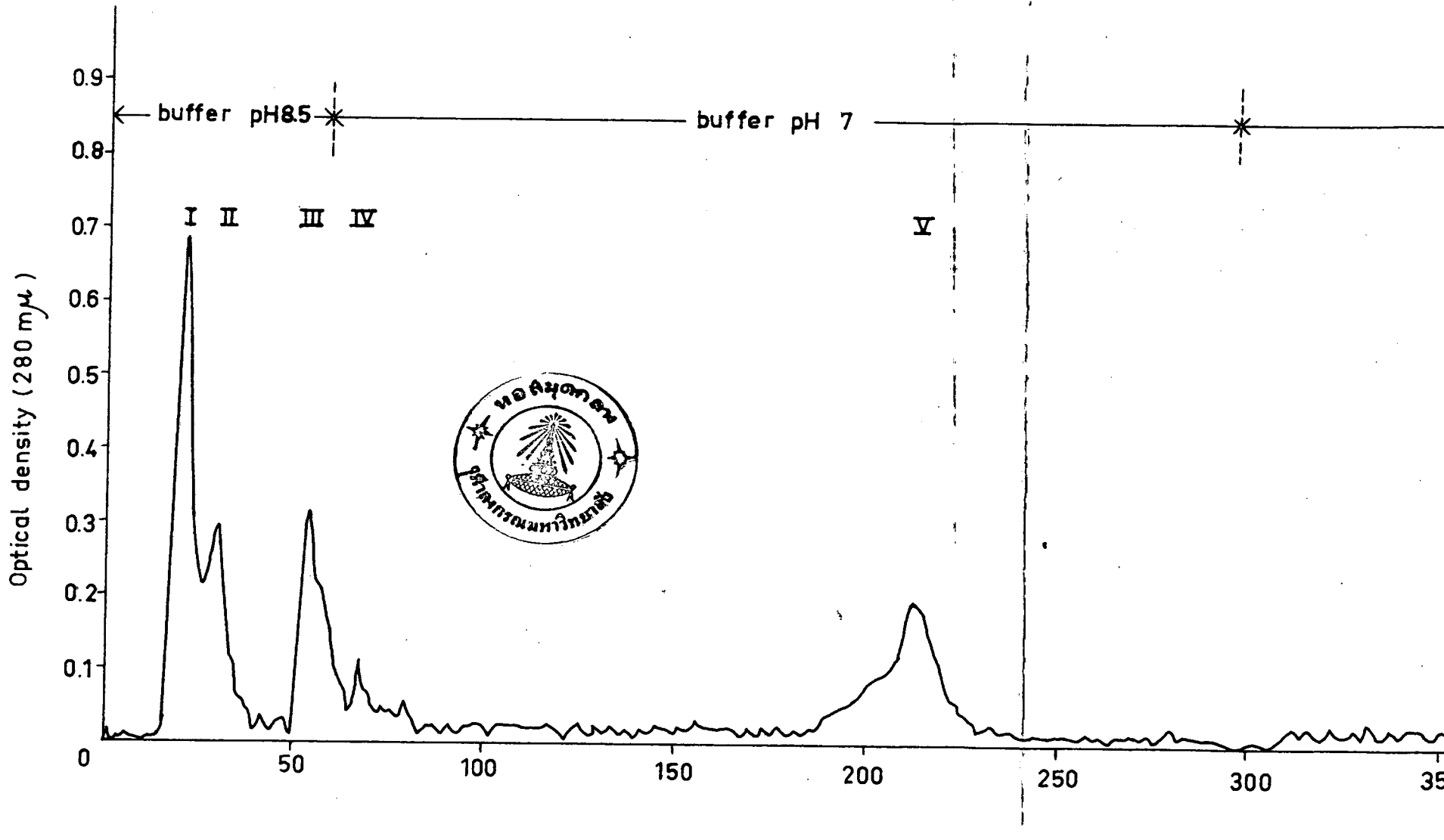
แสดงปริมาณโปรตีนของแต่ละส่วนที่แยกจากพิษงูโดยใช้ DEAE cellulose เมื่อใช้พิษงูหนัก ๒๐๗.๔ มิลลิกรัมที่อุณหภูมิ ๕-๘°ซ. อัตราการไหลของ buffer ๗๕ มิลลิลิตรต่อชั่วโมง

โปรตีนส่วนที่	บริมาตร (มล.)	calculated optical density (280 mμ)	ความเข้มข้นของโปรตีนแต่ละส่วน (มก./มล.)	ปริมาณโปรตีนในแต่ละส่วน (มก.)	ปริมาณโปรตีนในแต่ละส่วนเทียบกับโปรตีนที่ใช้ทั้งหมด (%)
I	๒๕.๐	๑.๓๕	๑.๑	๒๗.๕	๑๓.๒
II	๒๒.๑	๐.๗๕	๐.๖	๑๓.๓	๖.๔
III	๒๕.๐	๐.๖๘	๐.๕	๑๒.๕	๖.๑
IV	๑๒.๐	๐.๐๘	๐.๑	๑.๒	๐.๖
V	๑๒.๙	๑.๕๕	๑.๒	๑๕.๔	๗.๕
VI	๒๔.๕	๒.๒๕	๑.๘	๔๔.๑	๒๑.๒
VII	๒๕.๐	๑.๘๐	๑.๔	๓๕.๐	๑๖.๘

รวมปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่แยกได้จากคอลัมน์ = ๗๑.๘% ของพิษงูที่ใช้ตอนแรกเริ่ม

รู
ป

การแยกพิษงูแมวเซาอ



หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

Tu

B) การศึกษาความเป็นพิษและทางเอนไซม์ในพิษงูแมวเซา

๑. การศึกษาความเป็นพิษ (Toxicity assay)

ได้ทำการทดลองวัดความเป็นพิษของโปรตีนทั้ง ๗ ส่วนที่แยกจากพิษงูแมวเซา และในพิษงูที่ยังไม่ได้แยก โดยฉีดพิษงูที่ความเข้มข้น ต่าง ๆ กันเข้าไปในหนูขาวทางเส้นเลือดที่หางหนู ซึ่งแบ่งออกเป็นกลุ่ม ๆ ละ ๓ ตัว แล้วสังเกตการตายของมันภายใน ๒๔ ชั่วโมง จากนั้นคำณวนค่า LD_{50} ได้ดังผลการทดลองแสดงในตารางที่ ๒ จะเห็นได้ว่าโปรตีนที่แยกจากพิษงูส่วนที่ V จะมีค่า LD_{50} ต่ำที่สุด นั่นคือ มีความเป็นพิษสูงที่สุด และโปรตีนส่วนที่มีความเป็นพิษรองลงมา คือ โปรตีนส่วนที่ I ส่วนที่VI ส่วนที่ II และส่วนที่ VII จะมีความเป็นพิษต่ำที่สุด โดยที่ในโปรตีนส่วนที่ IIIและที่ IV จะไม่มีความเป็นพิษเลย อย่างไรก็ตามเราพบว่าแม้ในโปรตีนส่วนที่ V ที่มีความเป็นพิษสูงที่สุดนั้นก็ยังมีความเป็นพิษต่ำกว่าในพิษงูที่ยังไม่ได้แยก

ตารางที่ ๒

แสดงความเป็นพิษของโปรตีนแต่ละส่วนที่แยกจากพิษงูแมวเซา และของพิษงูแมวเซาที่ยังไม่ได้แยก

พิษงูที่ใช้	กลุ่มที่	ปริมาณโปรตีนที่ฉีด (ไมโครกรัม)	จำนวนหนูที่ตาย / จำนวนหนูที่ฉีด (P_i)	$\sum P_i$	LD_{50}	LD_{50} ต่อมิลลิกรัมโปรตีนที่ใช้	relative Toxicity ของโปรตีนแต่ละส่วนต่อพิษงูที่ยังไม่ได้แยก
พิษงูที่ยังไม่ได้แยก	๑	๑๐	๓/๓ = ๑	๑	๗.๑	๑๔๐.๘	๑
	๒	๕	๐/๓ = ๐	๑			
I	๑	๗๒.๙	๓/๓ = ๑	๑	๓๓.๖	๒๙.๘	๐.๒๑
	๒	๓๖.๕	๒/๓ = ๐.๖๗	๑.๖๗			
	๓	๑๘.๓	๐/๓ = ๐	๑.๖๗			
II	๑	๒๙๖.๒	๓/๓ = ๑	๑	๒๖๖.๗	๖.๐	๐.๐๔
	๒	๑๔๘.๑	๑/๓ = ๐.๓๓	๑.๓๓			
	๓	๗๔.๑	๐/๓ = ๐	๑.๓๓			
V	๑	๓๘.๓	๑/๓ = ๑	๑	๒๗.๑	๓๖.๙	๐.๒๖
	๒	๑๙.๑	๐/๓ = ๐	๑			
VI	๑	๔๔๔.๔	๓/๓ = ๑	๑	๖๒.๕	๑๖.๐	๐.๑๑
	๒	๒๒๒.๒	๒/๓ = ๐.๖๗	๑.๖๗			
	๓	๑๑๑.๑	๒/๓ = ๐.๖๗	๒.๓๔			
	๔	๕๕.๖	๑/๓ = ๐.๓๓	๒.๖๗			
	๕	๒๗.๘	๑/๓ = ๐.๓๓	๓.๐๐			
	๖	๑๓.๙	๑/๓ = ๐.๓๓	๓.๓๓			
	๗	๖.๙	๐/๓ = ๐	๓.๓๓			
VII	๑	๗๑๑.๑	๓/๓ = ๑	๑	๕๐๑.๙	๒.๐	๐.๐๑
	๒	๓๙๕.๖	๐/๓ = ๐	๑			

* หมายเหตุ จำนวนหนูที่ฉีดกลุ่มละ ๓ ตัว

๒) <u>การศึกษาเอนไซม์ phosphodiesterase</u>

ได้วัดactivity ของเอนไซม์ phosphodiesterase ในโปรตีนทั้ง ๗ ส่วนที่แยกจากพิษงู และในพิษงูที่ยังไม่ได้แยก โดยในตอนแรกได้ศึกษาผลของ pH ต่อเอนไซม์นี้ จากผลในรูปที่ ๒ จะเห็นว่า optimum pH ของเอนไซม์ในพิษงูแมวเซา มีค่า ๘.๒ ดังนั้นจึงใช้ pH 8.2 ในการทดลองหา activityของเอนไซม์ phospho diesterase ผลที่ได้แสดงอยู่ในตารางที่ ๓ จะเห็นได้ว่า activity ของเอนไซม์นี้จะพบมากที่สุดในโปรตีนที่แยกจากพิษงูส่วนที่ I ซึ่งมี activity สูงกว่าในพิษงูที่ยังไม่ได้แยกถึง ๘ เท่า รองลงมาคือ โปรตีนส่วนที่ v ส่วนที่ IIส่วนที่ IVส่วนที่III สวนที่VI ตามลำดับและโปรตีนส่วนที่ VII จะมี activityของเอนไซม์ phospho diesterase ต่ำที่สุด

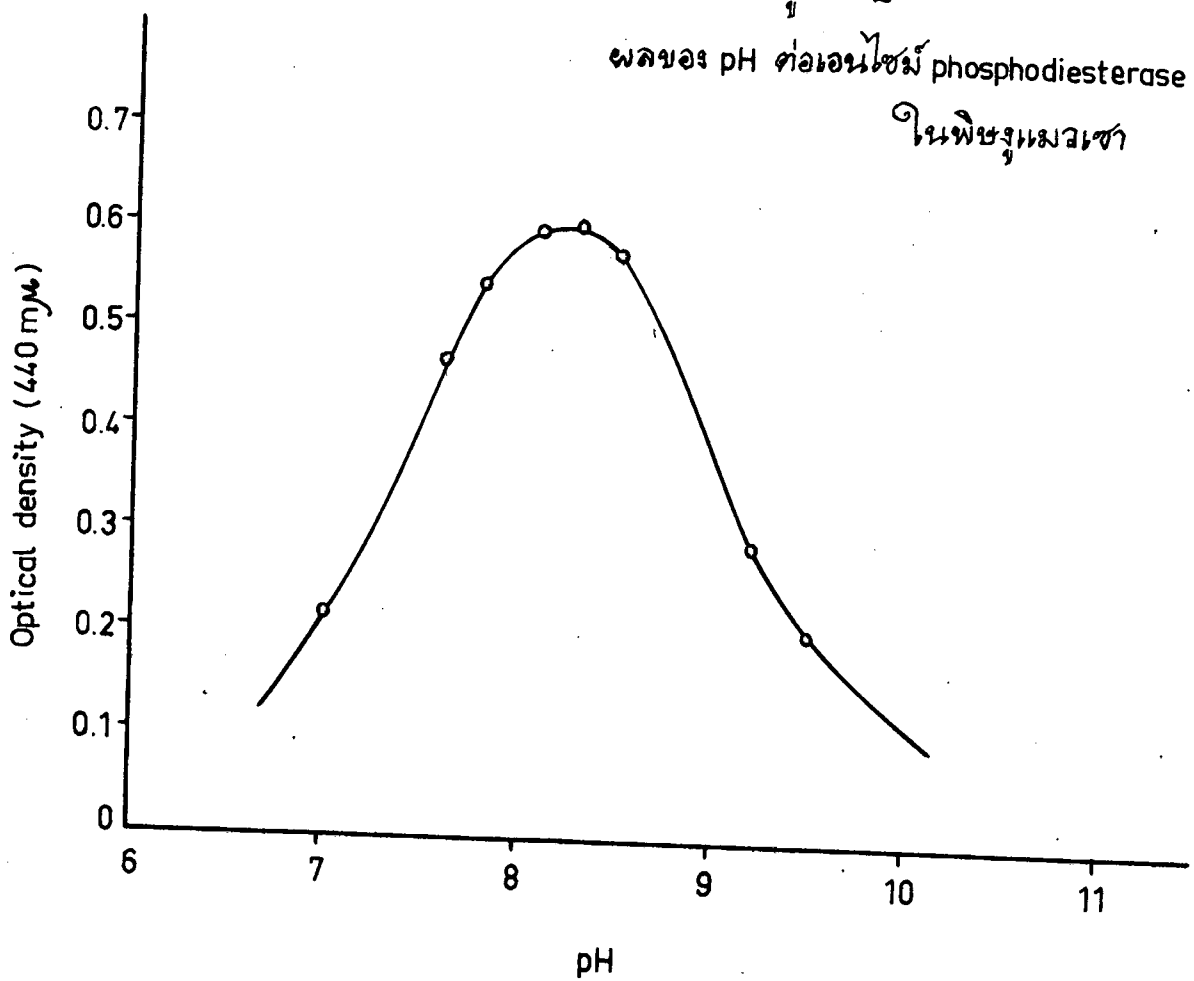
ตารางที่ ๓

phosphodiesterase activity ในโปรตีนแต่ละส่วนที่แยกจากพิษงู และในพิษงูที่ยังไม่ได้แยก

โปรตีนส่วนที่	ความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้ (มก./มล.)	ปริมาณโปรตีนที่ใช้ (มก.)	optical density(440 mμ)				activity ของเอนไซม์ต่อมิลลิกรัมของโปรตีน	% activity
			ครั้งที่๑	ครั้งที่๒	ครั้งที่๓	เฉลี่ย		
พิษงูที่ยังไม่ได้แยก	๑.๓	๐.๖๕	๐.๓๑๒	๐.๓๖๐	๐.๓๖๑	๐.๓๔๕	๐.๕๓	๑๐๐
I	๑.๑	๐.๕๕	๐.๘๖๐	๐.๙๒๐	๐.๘๖๐	๐.๘๘๐	๑.๖๐	๓๐๒
II	๐.๖	๐.๓๐	๐.๑๑๘	๐.๑๒๔	๐.๐๙๕	๐.๑๑๓	๐.๓๘	๗๒
III	๐.๕	๐.๒๕	๐.๐๑๘	๐.๐๒๔	๐.๐๒๑	๐.๐๒๑	๐.๐๘	๑๕
IV	๐.๑	๐.๐๕	๐.๐๐๗	๐.๐๑๕	๐.๐๐๓	๐.๐๐๕	๐.๑๐	๑๙
V	๑.๒	๐.๖๐	๐.๒๗๒	๐.๒๙๐	๐.๒๙๗	๐.๒๘๖	๐.๔๘	๙๑
VI	๑.๘	๐.๙๐	๐.๐๓๕	๐.๐๔๐	๐.๐๔๒	๐.๐๓๙	๐.๐๔	๘
VII	๑.๔	๐.๗๐	๐.๐๑๔	๐.๐๑๙	๐.๐๒๐	๐.๐๑๘	๐.๐๒	๔

รูปที่ 2

ผลของ pH ต่อเอนไซม์ phosphodiesterase ในพิษงูแมวเซา



๓) การศึกษา phosphomonoesterase

ได้วัด activity ของเอนไซม์ phosphomonoesterase ในโปรตีนแต่ละส่วนที่แยกออกมาจากพิษงูและในพิษงูที่ยังไม่ได้แยก โดยตอนแรกได้ศึกษาถึงผลของ pH ที่มีต่อเอนไซม์ดังแสดงในรูปที่ ๓ จากรูปจะเห็นได้ว่า optimum pH ของเอนไซม์ phosphomonoesterase ในพิษงูแมวเซาที่มีค่า ๗.๙ ดังนั้นจึงใช้ pH 7.9 ในการหา activity ของเอนไซม์ ดังแสดงอยู่ในตารางที่ ๙ จะเห็นได้ว่า activity ของเอนไซม์นี้ในโปรตีนส่วนที่ I จะสูงสุด รองลงมาคือ โปรตีนส่วนที่ III ส่วนที่ IV ตามลำดับ ถัดมาคือโปรตีนส่วนที่ II และ V ซึ่งมี activity เท่ากัน และโปรตีนส่วนที่ VI และ VII จะมี activity เท่ากันและน้อยที่สุด แต่อย่างไรก็ดีจะสังเกตได้ว่า แม้ activity ในโปรตีนส่วนที่ I ที่สูงสุดก็ยังมีค่าต่ำกว่าในพิษงูที่ยังไม่ได้แยกเกือบ ๓ เท่า

ตารางที่ ๔

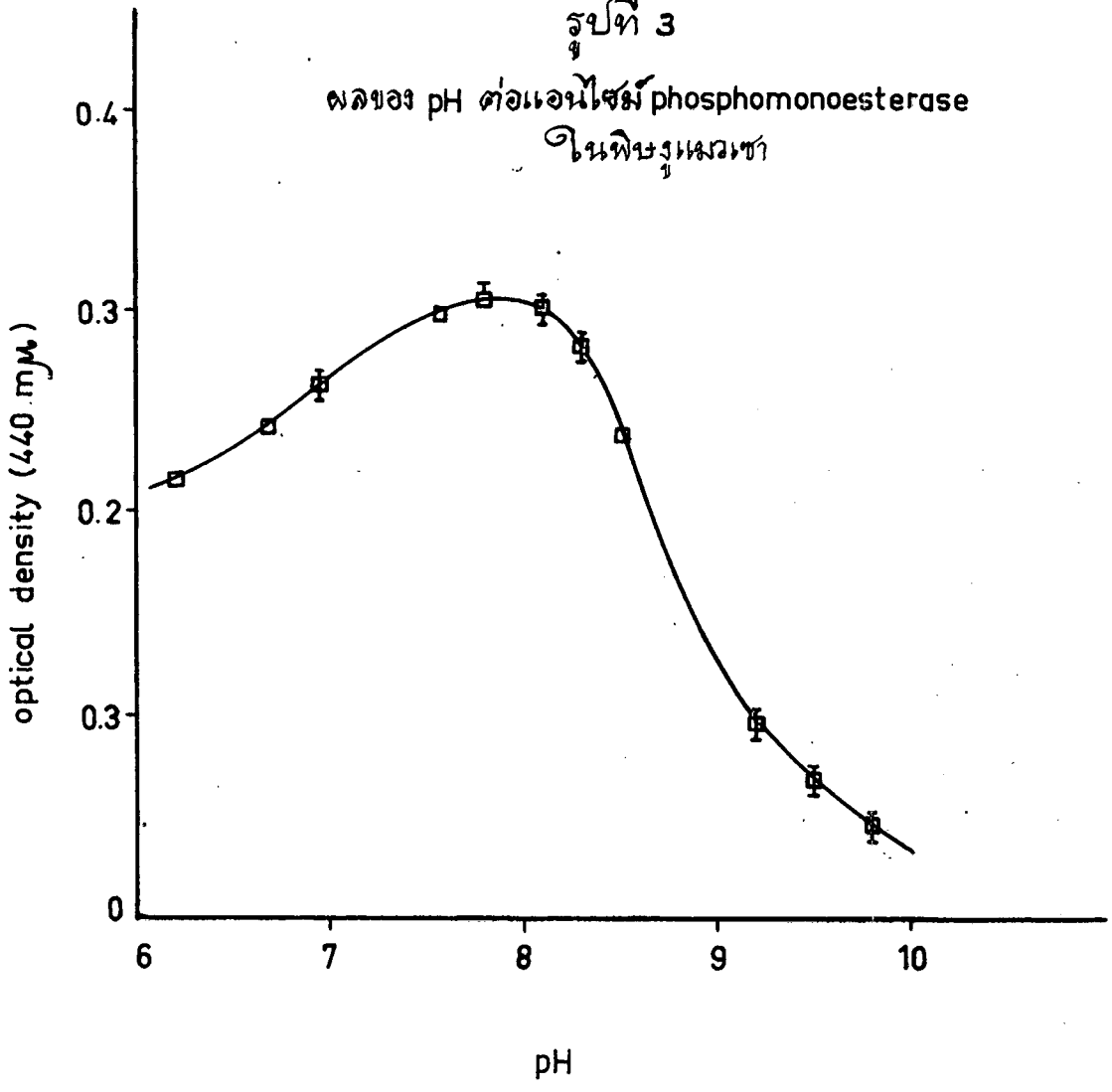
phosphomonoesterase activity ในโปรตีนแต่ละส่วนที่แยกจากพิษงู และในพิษงูที่ยังไม่ได้แยก

โปรตีนส่วนที่	ความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้ (มก./มล.)	ปริมาณโปรตีนที่ใช้ (มก.)	optical density(440 mμ)				activity ของเอนไซม์ต่อมิลลิกรัมโปรตีน	% activity
			ครั้งที่๑	ครั้งที่๒	ครั้งที่๓	เฉลี่ย		
พิษงูที่ยังไม่ได้แยก	๑.๓	๐.๖๕	๐.๓๐๕	๐.๒๘๐	๐.๒๙๐	๐.๒๙๒	๐.๔๕	๑๐๐
I	๑.๑	๐.๕๕	๐.๐๘๙	๐.๑๑๐	๐.๑๐๐	๐.๐๙๙	๐.๑๘	๔๐
II	๐.๖	๐.๓๐	๐.๐๑๐	๐.๐๐๔	๐.๐๑๘	๐.๐๑๑	๐.๐๔	๙
III	๐.๕	๐.๒๕	๐.๐๒๙	๐.๐๓๗	๐.๐๒๒	๐.๐๒๙	๐.๑๒	๒๘
IV	๐.๑	๐.๐๕	๐	๐	๐.๐๑๐	๐.๐๐๓	๐.๐๖	๑๓
V	๑.๒	๐.๖๐	๐.๐๒๒	๐.๐๒๕	๐.๐๑๙	๐.๐๒๒	๐.๐๔	๙
VI	๑.๘	๐.๙๐	๐.๐๓๐	๐.๐๒๒	๐.๐๓๓	๐.๐๒๙	๐.๐๓	๗
VII	๑.๔	๐.๗๐	๐.๐๑๔	๐.๐๒๖	๐.๐๒๕	๐.๐๒๒	๐.๐๓	๗

รูปที่ 3

ผลของ pH ต่อแอนไซม์ phosphomonoesterase

ในพิษงูแมวเซา



๔) การศึกษา adenosine triphosphatase

ได้วัด activity ของเอนไซม์ adenosine triphosphatase ในพิษงูแมวเซาที่ยังไม่ได้แยกและในโปรตีนแต่ละส่วนที่แยกออกมาจากพิษงู โดยตอนแรกได้ศึกษาผลของ pH ที่มีต่อเอนไซม์ ดังแสดงในรูปที่ ๔ จากรูปจะเห็นได้ว่า optimun pH ของเอนไซม์ adenosine triphosphatase ในพิษงูมีค่า ๘.๒ ดังนั้นจึงใช้ pH 8.2 ในการหา activity ของเอนไซม์ ในพิษงูที่ยังไม่ได้แยกและในโปรตีนแต่ละส่วนที่แยกจากพิษงู ดังแสดงในรูปที่ ๕ จะเห็นได้ว่าโปรตีนส่วนที่ I ที่แยกจากพิษงูจะมี activity ของ adenosine triphosphatase สูงที่สุด รองลงมา คือ โปรตีนส่วนที่ IV โปรตีนส่วนที่ II ส่วนที่ V ส่วนที่ III ส่วนที่ VI ตามลำดับและโปรตีนส่วนที่ VII จะมี activity ต่ำที่สุด

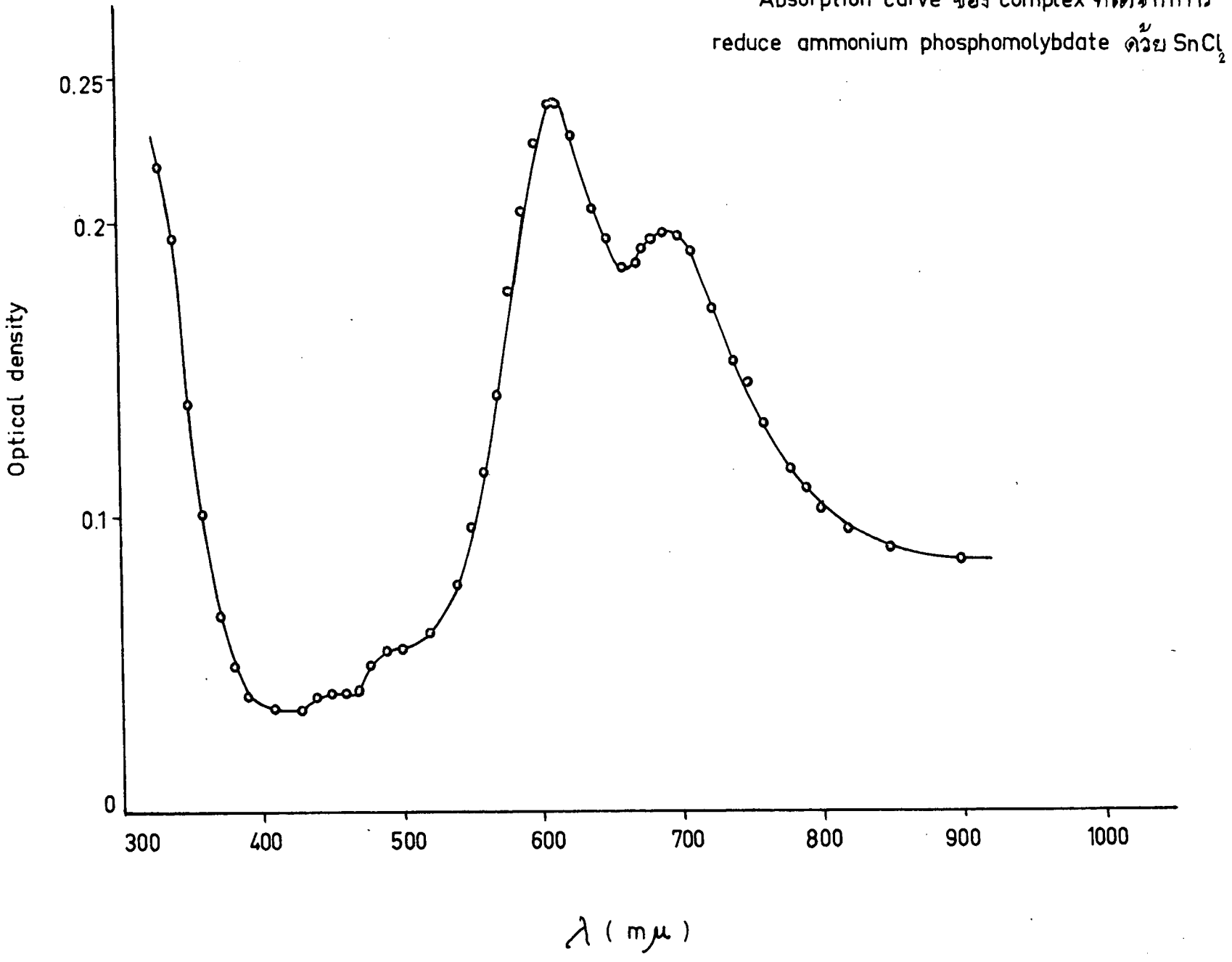
ตารางที่ ๕

activity ของ adenosine triphosphatase ในโปรตีนแต่ละส่วนที่แยกจากพิษงูและพิษงูที่ยังไม่ได้แยก

โปรตีนส่วนที่	ความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้ (มก./มล.)	ปริมาณของโปรตีนที่ใช้ (มก.)	calculated optical density (690 mμ)			ปริมาณฟอสฟอรัสที่คำนวนได้ (ไมโครกรัม)	activity ของเอนไซม์ต่อมิลลิกรัมโปรตีน	% activity
			ครั้งที่๑	ครั้งที่๒	เฉลี่ย			
พิษงูที่ยังไม่ได้แยก	๑.๓	๐.๒๖	๑.๔๔	๑.๔๒	๑.๔๓	๔๘.๕	๑๘๖.๕	๑๐๐
I	๑.๑	๐.๒๒	๒.๐๔	๑.๘๗	๑.๔๘	๕๐.๐	๒๒๗.๓	๑๒๑
II	๐.๖	๐.๑๒	๐.๒๔	๐.๓๐	๐.๓๐	๗.๕	๖๒.๕	๓๔
III	๐.๕	๐.๑๐	๐.๓๑	๐.๐๑	๐.๑๖	๔.๕	๔๕.๐	๒๔
IV	๐.๑	๐.๐๒	๐.๐๘	๐.๐๕	๐.๐๖	๒.๐	๑๐๐.๐	๕๔
V	๑.๒	๐.๒๔	๐.๔๐	๑.๕๖	๐.๔๘	๑๒.๒	๕๐.๘	๒๗
VI	๑.๘	๐.๓๖	๐.๑๙	๐.๒๒	๐.๒๑	๕.๕	๑๕.๓	๘
VII	๑.๔	๐.๒๘	๐.๒๐	๐.๐๖	๐.๑๓	๓.๕	๑๒.๖	๗

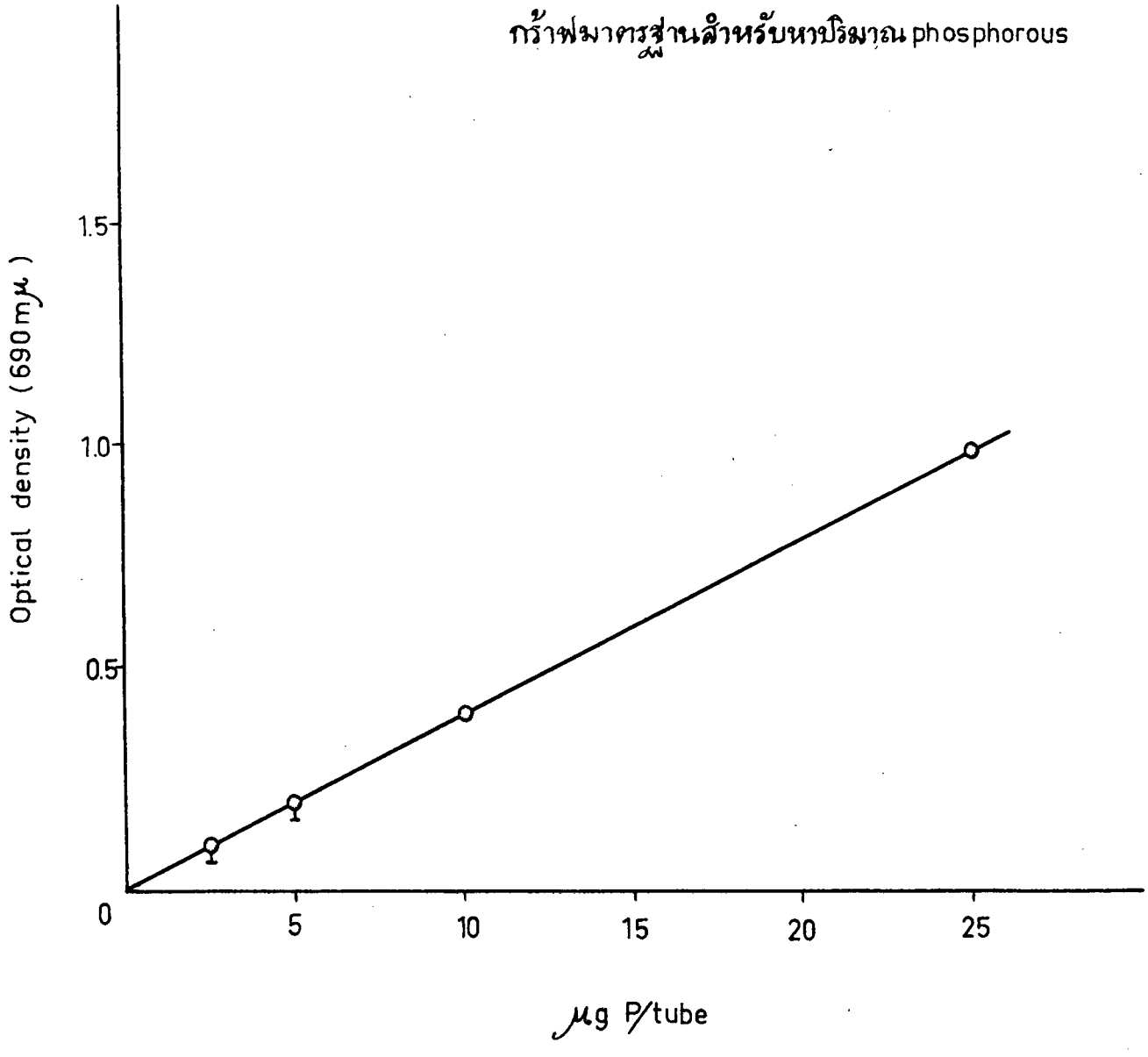
รูปที่ 4

Absorption curve ของ complex ที่ได้จากการ reduce ammonium phosphomolybdate ด้วย $SnCl_2$



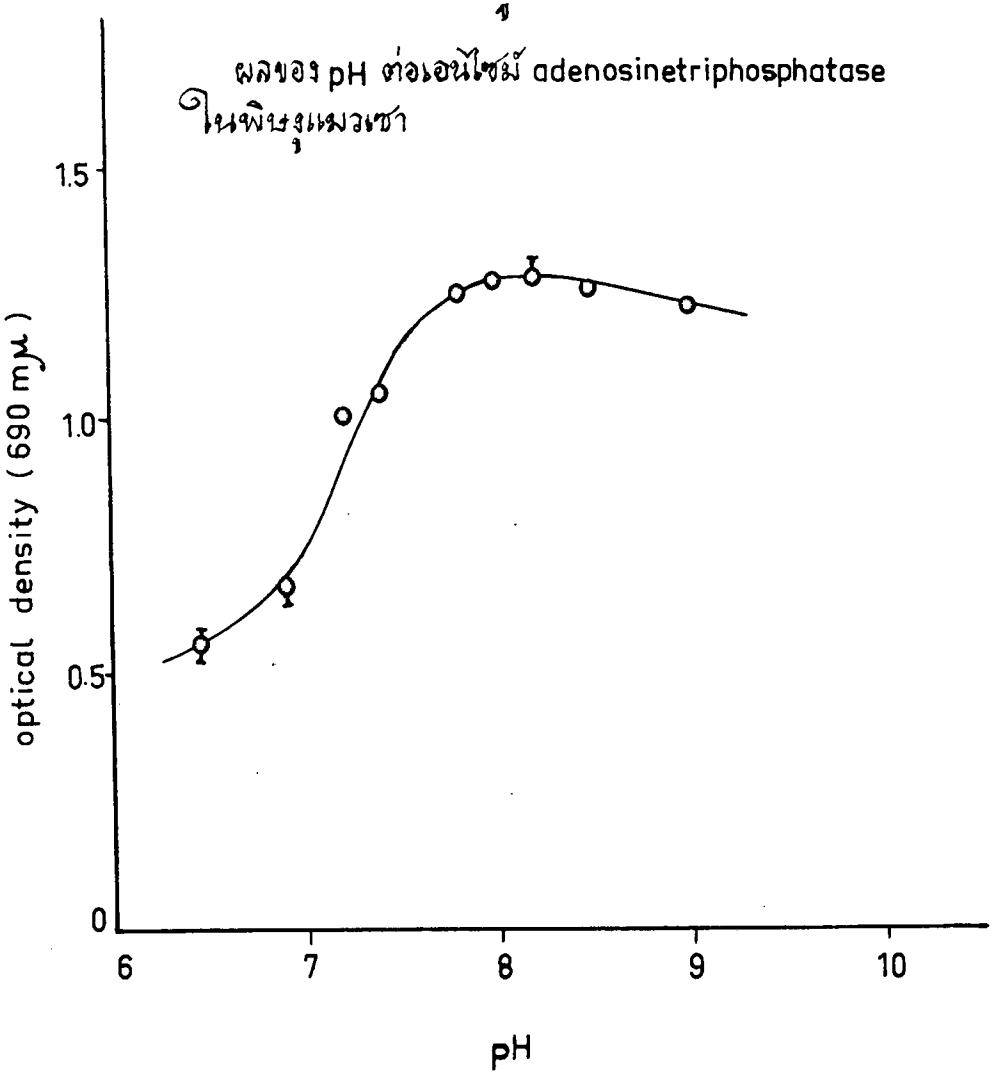
รูปที่ 5

กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณ phosphorous



รูปที่ 6

ผลของ pH ต่อเอนไซม์ adenosinetriphosphatase
ในพืชรูแมวเซา



๕. การศึกษา L-amino acid oxidase

ได้วัด activity ของเอนไซม์ L-amino acid oxidase ในโปรตีนแต่ละส่วนที่แยกออกจากพิษงูแมวเซาและในพิษงูแมวเซาที่ยังไม่ได้แยก รวมทั้งพิษงูเห่าที่ยังไม่ได้แยกด้วยโดยใช้ Warburg respirometer ที่ pH 7.2 ผลที่ได้แสดงในตารางที่ ๖ จะเห็นได้ว่า activity ของเอนไซม์ชนิดนี้มีในพิษงูเห่าที่ยังไม่ได้แยกสูงกว่าในพิษงูแมวเซาที่ยังไม่ได้แยกส่วนในโปรตีนทั้ง ๗ ส่วนที่แยกพิษงูแมวเซานั้น ไม่พบว่ามี activity ของเอนไซม์ L-amino acid oxidase เลย

ตารางที่ ๖

L-amino acid oxidase ในพิษงูแมวเซาที่ยังไม่แยก และในโปรตีนแต่ละส่วนที่แยกจากพิษงูแมวเซา

โปรตีนส่วนที่	ปริมาณโปรตีนที่ใช้ (มก.)	O_2 ที่ใช้ไปใน ๑ ช.ม. (ไมโครลิตร)	activity ของเอนไซม์ต่อมิลลิกรัมของโปรตีน	% activity
พิษงูเห่า	๕.๐	๒๔๔.๖	๐.๘๓	-
พิษงูแมวเซา ที่ยังไม่ได้แยก	๖.๒	๒๔.๕	๐.๐๗	๑๐๐
I	๐.๕๕	๐	๐	๐
II	๐.๓๐	๐	๐	๐
III	๐.๒๕	๐	๐	๐
IV	๐.๐๕	๐	๐	๐
V	๐.๖๐	๐	๐	๐
VI	๐.๙๐	๐	๐	๐
VII	๐.๗๐	๐	๐	๐

๖) <u>การศึกษาคุณสมบัติในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกโดยตรง</u> (direct haemolytic property)

ได้วัด activity ของคุณสมบัติในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกโดยตรงในพิษงูแมวเซาที่ยังไม่ได้แยกและในโปรตีนแต่ละส่วนที่แยกออกมาจากพิษงูโดยวัด activity ในพิษงูแมวเซาที่ยังไม่ได้แยกก่อน พบว่าเมื่อทดลองใช้พิษงูที่มีความเข้มข้นถึง ๔.๓๓ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมาอุ่นกับสารละลายของเม็ดเลือดแดงที่ ๓๗°ซ. นาน ๓๐ นาทีแล้วนำไป centrifuge เอาเม็ดเลือดแดงที่เหลืออออก นำส่วนที่เป็นน้ำใสมา oxidize ด้วย $K_3Fe(CN)_6$ วัดด้วย optical density ที่ความยาวคลื่น 630 mμ เพื่อวัดปริมาณ methaemoglobin ที่เกิดขึ้นผลปรากฏว่าพิษงูแมวเซาทั้งในแต่ละส่วนที่แยกแล้วและที่ยังไม่ได้แยกไม่มี activity ของคุณสมบัติในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกโดยตรงเลย

๗) การศึกษา lecithinase

ได้วัด activity ของเอนไซม์ lecithinase ในโปรตีนแต่ละส่วนที่แยกจากพิษงูแมวเซาและในพิษงูที่ยังไม่ได้แยก โดยวัด activity ที่ pH 7 ดังแสดงอยู่ในตารางที่ ๕ จะเห็นได้ว่า lecithinase activity ในพิษงูแมวเซาที่ยังไม่ได้แยกจะมีค่าสูงกว่าในพิษงูเห่าและในโปรตีนทั้ง ๗ ส่วนที่แยกจากพิษงูแมวเซานั้น จะมีเพียง ๓ ส่วนที่มี activity ของเอนไซม์ lecithinase คือ โปรตีนส่วนที่ III ส่วนที่ V และส่วนที่ VII โดยในโปรตีนส่วนที่ V จะมี activity สูงสุดคือสูงประมาณ ๑.๕ เท่าของในพิษงูที่ยังไม่ได้แยก ถัดมาคือโปรตีนส่วนที่ VII และ โปรตีนส่วนที่ III จะมี activity ต่ำที่สุด

ตารางที่ ๗

activity ของเอนไซม์ lecithinase ในพิษงูที่ยังไม่ได้แยกและในโปรตีนแต่ละส่วนที่แยกจากพิษงูแมวเซา

โปรตีนส่วนที่	ความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้ (มก./มล.)	ปริมาณโปรตีนที่ใช้ (มก.)	optical density ที่ลดลง เนื่องจากพิษงู (E_0 - E)	activity ของเอนไซม์ (E_0 - E) x 30	activity ของเอนไซม์ต่อมิลลิกรัมของโปรตีน	% activity
พิษงูเห่า	๐.๒๑	๐.๐๔๒	๐.๐๖๒	๑.๘๖	๔๔.๓	๔๔
พิษงูแมวเซาที่ไม่ได้แยก	๐.๑๒	๐.๐๒๔	๐.๐๘๐	๒.๔๐	๑๐๐	๑๐๐
I	๐.๑๗	๐.๐๓๔	๐	๐	๐	๐
II	๐.๐๖	๐.๐๑๒	๐	๐	๐	๐
III	๐.๐๕	๐.๐๑๐	๐.๐๐๓	๐.๐๔	๔	๔
IV	๐.๐๗	๐.๐๑๔	๐	๐	๐	๐
V	๐.๑๒	๐.๐๒๔	๐.๑๒๐	๓.๖๐	๑๕๐	๑๕๐
VI	๐.๑๘	๐.๐๓๖	๐	๐	๐	๐
VII	๐.๑๔	๐.๐๒๘	๐.๐๒	๐.๖๐	๒๑.๔	๒๑

๘) การศึกษาคุณสมบัติในการเร่งการแข็งตัวของเลือด (blood coagulation activity)

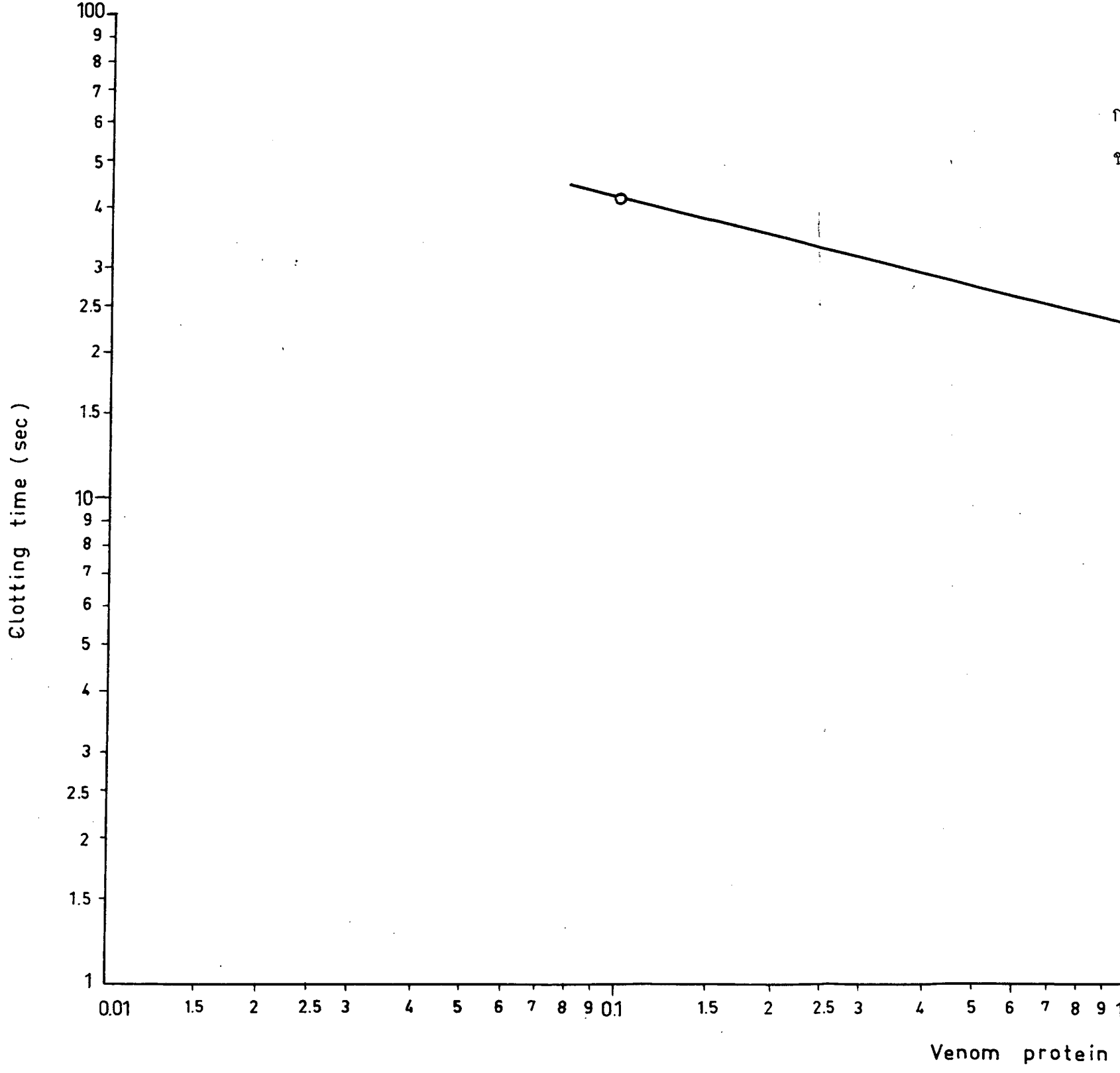
ได้วัด activity ของคุณสมบัติในการเร่งการแข็งตัวของเลือดในโปรตีนทั้ง ๗ ส่วนที่แยกจากพิษงูแมวเซาเทียบกับพิษงูแมวเซาที่ยังไม่ได้แยก โดยเราทราบจาก Williams and Esnouf (1962) ว่า พิษงูแมวเซาที่ทำให้เลือดแข็งตัวในเวลาไม่เกิน ๕๐ วินาทีแล้ว เมื่อพล้อตระหว่าง เวลาของการแข็งตัวเป็นวินาทีกับความเข้มข้นของโปรตีนเป็น (µg/ml) ใน log scale แล้ว จะได้ curve เป็นเส้นตรงดังแสดงในรูปที่ ๗ ดังนั้นจากกราฟมาตรฐานนี้ เราจะเปรียบเทียบคุณสมบัติในการเร่งการแข็งตัวของเลือดในโปรตีนแต่ละส่วนที่แยกจากพิษงูกับพิษงูที่ยังไม่ได้แยกได้ดังแสดงไว้ในตารางที่ ๘ จะเห็นได้ว่า activity ของคุณสมบัติในการเร่งการแข็งตัวของเลือดในโปรตีนที่แยกจากพิษงูส่วนที่ VI จะมี activity สูงสุด คือ สูงถึง ๓ เท่าของ activity ที่พบในพิษงูที่ยังไม่ได้แยก ถัดจากโปรตีนส่วนที่ VI คือ โปรตีนส่วนที่ VII ส่วนที่ I ส่วนที่ V ส่วนที่ II ซึ่งมี activity น้อยลงตามลำดับ และในโปรตีนที่แยกได้ส่วนที่ III และส่วนที่ IV จะไม่พบ activity ของคุณสมบัติอันนี้เลย

ตารางที่ ๘

activity ของคุณสมบัติในการเร่งการแข็งตัวของเลือดในโปรตีนแต่ละส่วนที่แยกได้จากพิษงูแมวเซา เทียบกับพิษงูแมวเซาที่ยังไม่ได้แยก

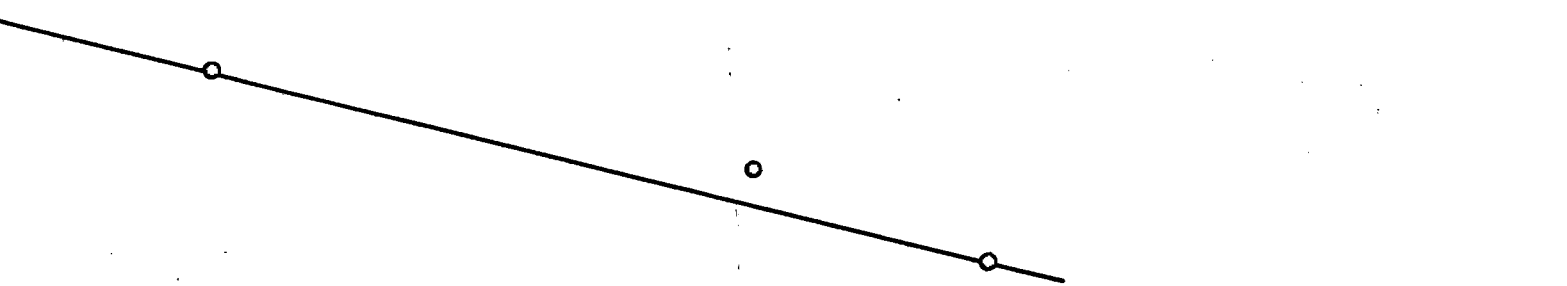
โปรตีนส่วนที่	ความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้ ($\frac{\text{ไมโครกรัม}}{\text{มิลลิลิตร}}$)	เวลาที่ใช้ในการแข็งตัวของเลือด (วินาที)				* Specific activity
		ครั้งที่ ๑	ครั้งที่ ๒	ครั้งที่ ๓	เฉลี่ย	
พิษงูที่ยังไม่ได้แยก	๒.๐	๑๙.๐	๑๙.๕	๒๐.๖	๑๙.๗	๑
I	๕๕.๐	๑๗.๙	๑๘.๑	๑๖.๘	๑๗.๖	๐.๐๕
II	๖๐๐.๐	๔๕.๓	๔๕.๙	๔๗.๑	๔๖.๑	๐.๐๐๐๑
III	๕๐๐.๐	๑๑๑.๘	๑๐๗.๐	๑๐๘.๓	๑๐๘.๓	< ๐.๐๐๐๑
IV	๑๐๐.๐	๑๐๖.๐	๑๐๐.๐	๑๐๒.๔	๑๐๒.๘	< ๐.๐๐๐๑
V	๒๔.๐	๓๒.๘	๓๕.๒	๓๓.๔	๓๓.๘	๐.๐๑
VI	๑.๘	๑๕.๔	๑๖.๙	๑๔.๒	๑๕.๕	๓
VII	๑๔.๐	๒๔.๕	๒๓.๘	๒๔.๔	๒๔.๔	๐.๐๖
blank (0.15M.NaCl)	๐	๑๐๑.๒	๑๐๓.๖	๑๐๐	๑๐๑.๖	๐

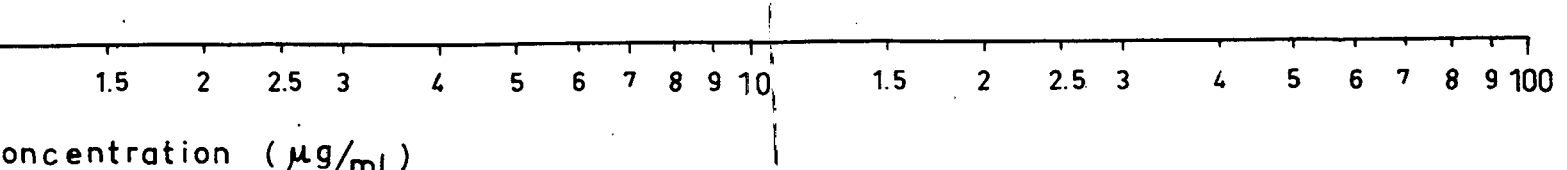
* Specific activity คือ ค่าความเข้มข้นของพิษงูที่ยังไม่ได้แยกหนวยเป็นไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่จะให้ activity ของคุณสมบัติในการเร่งการแข็งตัวของเลือดเท่ากับในโปรตีนแต่ละส่วนที่แยกออกจากพิษงูแมวเซา เมื่อมีความเข้มข้นเป็น ๑ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเทียบจากกราฟมาตรฐาน


Clotting time (sec)
100
9
8
7
6
5
4
3
2.5
2
1.5
10
9
8
7
6
5
4
3
2.5
2
1.5
1
0.01
1.5
2
2.5
3
4
5
6
7
8
9
0.1
1.5
2
2.5
3
4
5
6
7
8
9
Venom protein

รูปที่ 7

ฟมาตรฐานสำหรับคำนวนหา activity ของคุณสมบัติในการเร่งการแข็งตัว
เลือดของโปรตีนแต่ละส่วนที่แยกจากพิษงูเทียบกับพิษงูที่ยังไม่ได้แยก





ตารางที่ ๔

เปรียบเทียบปริมาณคุณสมบัติต่าง ๆ ที่พบในพิษงูที่ยังไม่ได้แยกเป็นส่วน ๆ และในโปรตีนแต่ละส่วนที่แยกออกจากพิษงู

พิษงูที่ใช้	ปริมาณโปรตีนที่แยกได้ในแต่ละส่วน (มิลลิกรัม)	relative Toxicity ของโปรตีนแต่ละส่วนต่อพิษงูที่ยังไม่ได้แยก	Phosphodi-esterase (%activity)	Phosphomono-esterase (%activity)	ATP-ase (%activity)	Lecithinase (%activity)	L-amino acid oxidase (%activity)	Specific activity ในการเร่งการแข็งตัวของเลือด
พิษงูที่ยังไม่ได้แยก	-	๑	๑๐๐	๑๐๐	๑๐๐	๑๐๐	๑๐๐	๑
I	๒๗.๕	๐.๒๑	๓๐๒	๔๐	๑๒๑	๐	๐	๐.๐๕
II	๑๓.๓	๐.๐๔	๗๒	๙	๓๔	๐	๐	๐.๐๐๐๑
III	๑๒.๕	non toxic	๑๕	๒๘	๒๔	๙	๐	< ๐.๐๐๐๑
IV	๑.๒	non toxic	๑๙	๑๓	๕๔	๐	๐	< ๐.๐๐๐๑
V	๑๕.๔	๐.๒๖	๙๑	๙	๒๗	๑๕๐	๐	๐.๐๑
VI	๔๔.๑	๐.๑๑	๘	๗	๘	๐	๐	๓
VII	๓๕.๐	๐.๐๑	๔	๗	๗	๒๑	๐	๐.๐๖

วิจารณ์ผลของการทดลอง

ได้มีผู้พยายามศึกษาความสัมพันธ์ของพิษงูกับ activity ของเอนไซม์ในพิษงู กันมาเป็นเวลานานแล้ว แต่ยังไม่ได้ผลที่แน่นอนโดย Taborda et al (1952) ได้เสนอว่า เอนไซม์ nucleases เป็นส่วนที่เป็นพิษที่แท้จริงในพิษงู Braganca และ Quastel (1953) คิดว่า phospholipase A หรือ lecithinase ในพิษงูเห่าเป็นส่วนที่ทำให้เกิดพิษชนิด neurotoxin ในงูเห่า Yang et al (1959) ได้ทำการทดลองให้เห็นว่า neurotoxin ในงูเห่าไม่ได้เกิดจากเอนไซม์ lecithinase หรือเอนไซม์ตัวใดตัวหนึ่งเลย Master และ Rao (1961) ได้ยืนยันผลงานของ Yang อีกที่หนึ่งโดยใช้ electrophoresis แยกพิษงูออกเป็นส่วน ๆ พบว่าส่วนที่เป็น neurotoxin ในงูเห่าจะมีคุณสมบัติแยกไปต่างหากจากเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ที่มีในพิษงูเห่าและได้แยกเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ที่มีในงูแมวเซา พบว่ามี lecithinase, proteanase, L-amino acid oxidase, phosphodiesterase, phosphomonoesterase และ 5'-nucleotidase พบว่าเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ เหล่านี้ แต่ละตัวจะไม่เป็นพิษ แต่เมื่อเอาส่วนของ lecithinase, protease, coagulase และ L-amino acid oxidase รวมกันแล้วจะได้ความเป็นพิษกลับมาอีก แต่การทดลองโดยใช้ electrophoresis แยกพิษงูนั้นไม่ค่อยได้ผลแน่นอน เพราะสารที่ใช้แต่ละครั้งมีปริมาณน้อย จึงแนะนำให้ใช้ ion exchanger ในการศึกษาและแยกพิษงูแทน เพราะจะใช้พิษงูได้ครั้งละมาก ๆ นอกจากนี้ยังได้ทดลองนำเอา พิษงูแมวเซาที่ยังไม่ได้แยกไป dialyse กับน้ำ ผลปรากฏว่า หลังจาก dialyse แล้ว พิษงูยังคงมีความเป็นพิษคงเดิมไม่เปลี่ยนแปลง แสดงว่าส่วนที่เป็นพิษในงูควรจะเป็นสารประกอบพวกโปรตีน จากการทดลองของเรา เมื่อใช้ DEAE cellulose แยกพิษงูแมวเซาออกเป็นส่วน ๆ พบว่า เราสามารถแยกส่วนประกอบของพิษงูได้ถึง ๗ ส่วน ซึ่งเมื่อหาความเป็นพิษของแต่ละส่วนโดยหา LD_{50} ในหนูขาว จะพบว่ามีส่วนที่มีคุณสมบัติในการเป็นพิษ (active toxic principle) อยู่ ๕ ส่วน ซึ่งแต่ละส่วนจะมีความเป็นพิษมากน้อยต่างกันออกไป แต่อย่างไรก็ดีจะเห็นว่า ในสารประกอบโปรตีนที่เป็นพิษทั้ง ๕ ส่วนที่แยกออกจากพิษงูนี้ แต่ละ

ส่วนจะมีความเป็นพิษน้อยกว่าในพิษงูที่ยังไม่ได้แยกตามตารางที่ ๒ แสดงว่าความเป็นพิษของงูแมวเซา น่าจะเป็นผลจากการทำงานร่วมกันของโปรตีนส่วนที่เป็นพิษทั้ง ๕ ส่วน ซึ่งผลการทดลองนี้จะไปค้านกับการทดลองของ Ahuja และ Brooks (1948) ที่แสดงว่า ในพิษงูแมวเซาจะมีส่วนประกอบที่สำคัญที่ทำให้เป็นพิษเพียงชนิดเดียวคือ ส่วนที่จะไปเร่งการแข็งตัวของเลือดเท่านั้น แต่จากการทดลองของเรา พบว่า ความเป็นพิษโดยการไปเร่งการแข็งตัวของเลือดนี้ น่าจะเป็นแต่เพียงส่วนประกอบที่เป็นพิษชนิดหนึ่งในจำนวนทั้งหมด ๕ ส่วนที่เราพบเท่านั้น คือ ในโปรตีนที่แยกจากพิษงูส่วนที่ VI ซึ่งเราพบว่ามีคุณสมบัติในการเร่งการแข็งตัวของเลือดได้มากที่สุดถึงเกือบ ๓ เท่าของในพิษงูที่ยังไม่ได้แยก ดังแสดงในตารางที่ ๘ และเมื่อดู activity ของเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ที่เราศึกษา คือ phosphodiesterase, phosphomonoesterase, adenosine tri phophatase, lecithinase, L-amino acid oxidase จะเห็นได้ว่า activity ของเอนไซม์เหล่านี้ต่ำมากเมื่อเทียบกับในโปรตีนส่วนอื่น ๆ จึงคิดว่าความเป็นพิษของโปรตีนในส่วนที่ VI นี้น่าจะเป็นผลเนื่องจากคุณสมบัติในการไปเร่งการแข็งตัวของเลือด ถ้าเป็นเช่นนี้จริง จากค่า LD_{50} ของโปรตีนในส่วนที่ VIซึ่งมากกว่าในพิษงูแมวเซาที่ยังไม่แยกถึง ๙ เท่า แสดงว่าความเป็นพิษในงูที่ยังไม่แยกจะสูงกว่าถึง ๙ เท่า จะยิ่งเป็นเหตุผลที่แสดงให้เห็นว่า ความเป็นพิษของพิษงูแมวเซาไม่ใช่เนื่องจากคุณสมบัติในการไปเร่งการแข็งตัวของเลือดแต่เพียงอย่างเดียวแน่ เพราะถ้าเป็นเช่นนั้นจริงแล้ว ความเป็นพิษของโปรตีนที่แยกได้ในส่วนที่ VI จะต้องสูงกว่าในพิษงูแมวเซาที่ยังไม่ได้แยก

ในโปรตีนส่วนที่ I ที่แยกจากพิษงูนั้นความเป็นพิษ เราไม่ทราบว่าเกิดจากอะไร แต่จากตารางที่ ๙ จะเห็นได้ว่าในโปรตีนส่วนนี้มี activity ของเอนไซม์ phosphodiesterase, phosphomonoesterase, adenosine tri-phosphatase สูงที่สุด และมี activity ของคุณสมบัติในการเร่งการแข็งตัวของเลือดเล็กน้อย ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่า ความเป็นพิษของโปรตีนในส่วนนี้ อาจเนื่องจากการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ทั้ง ๓ ตัวดังนี้ adenosine triphosphate (ATP) ถูก hydrolyse โดย adenosine triphosphatase (ATP-ase) ได้

adenosine di phosphate (ADP) กับ inorganic phosphate ในขณะที่ phosphodiesterase และ phosphomonoesterase อาจไปทำกับพวกสารประกอบที่ร่างกายจะใช้ในการเปลี่ยน ADP ให้กลับไปเป็น ATP ใหม่เช่น NAD, glucose (1-or6-)phosphate โดยตัด phosphate group ออกไป จึงทำให้ ATP ถูกสร้างขึ้นมาใหม่ไม่ทัน เมื่อสัตว์ขาด ATP ซึ่งเป็นตัวให้พลังงานในร่างกาย ก็อาจเป็นอันตรายถึงตายได้

ในโปรตีนที่แยกจากพิษงูส่วนที่ V เราพบว่า มีความเป็นพิษสูงสุดเมื่อเทียบกับโปรตีนที่แยกจากพิษงูส่วนอื่น ๆ และจากตารางที่ ๔ จะเห็นได้ว่ามี activity ของเอนไซม์ lecithinase สูงที่สุด โดยสูงถึง ๑.๕ เท่าของพิษงูที่ยังไม่ได้แยก และ activity ของ phosphodiesterase มากเป็นรองจากโปรตีนในส่วนที่ I ส่วน activity ของเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ มีน้อยมากจนไม่น่าจะเป็นพิษ ในกรณีของ lecithinase นั้นพบว่า ไม่น่าจะทำให้เป็นพิษเช่นกัน เพราะ Bussard (1954), Neumann และ Habermann (1955) สามารถแยก lecithinase ออกจาก neurotoxin ของพิษงูได้ และเมื่อแยกออกมาแล้ว พบว่า ความเป็นพิษยังคงเดิม Gitter et al (1957) ได้แยก neurotoxin จากพิษงู Vipera xanthina palastine ได้ และพบว่ามีคุณสมบัติต่างกับ lecithinase ที่มีในพิษงูชนิดนั้นด้วย ดังนั้น lecithinase ในโปรตีนส่วนนี้จึงไม่น่าจะเป็นตัวทำให้เป็นพิษ และ phosphodiesterase ที่พบในโปรตีนส่วนนี้ก็ไม่น่าจะทำให้เกิดความเป็นพิษมากกว่าในโปรตีนส่วนที่หนึ่ง เพราะปริมาณน้อยกว่าในส่วนที่หนึ่ง และเอนไซม์ตัวอื่น ๆ ที่จะมาทำงานร่วมกันเหมือนเอนไซม์ในส่วนที่หนึ่งก็มี activity ต่ำมาก ดังนั้นความเป็นพิษของโปรตีนในส่วนนี้จึงไม่น่าจะเนื่องจากเอนไซม์ทั้ง ๒ ตัวที่กล่าวมา อาจจะเป็นพิษเนื่องจากมีสารประกอบอะไรสักตัวหนึ่ง ซึ่งควรจะเป็นโปรตีน อาจจะเป็นเอนไซม์ตัวใดตัวหนึ่งซึ่งเราไม่ได้ศึกษาในที่นี้ หรืออาจจะเป็นสารซึ่งไม่ใช่เอนไซม์ก็ได้

ในโปรตีนที่แยกจากพิษงูแมวเซาส่วนที่ II จากตารางที่ ๔ จะเห็นได้ว่า ในโปรตีนส่วนนี้มี activity ของเอนไซม์ adenosine triphosphatase, phosphodiesterase มากพอควร และ phosphomonoesterase เล็กน้อย ไม่พบ activity

อื่นเลย จึงเห็นได้ว่าถ้าความเป็นพิษของโปรตีนในส่วนที่ I เนื่องจากการทำงานร่วมกันของเอนไซม์จริงแล้วความเป็นพิษของโปรตีนในส่วนนี้อาจเนื่องจากผลเช่นเดียวกันกับในโปรตีนส่วนที่ I หรืออาจเป็นผลเนื่องจากมีสารเป็นพิษชนิดอื่นซึ่งอาจเป็นเอนไซม์หรือไม่ใช่เอนไซม์ซึ่งเรายังไม่ได้ศึกษาไว้ในที่นี้ แต่อย่างไรก็ดี จากรูปที่ ๑ จะเห็นได้ว่าโปรตีนในส่วนที่ I และII นี้ เราแยกออกจากกันได้ไม่ complete นัก อาจเป็นไปได้ที่โปรตีนในส่วนที่ I อาจมีติดปนมากับโปรตีนในส่วนที่ IIทำให้เกิดความเป็นพิษขึ้นก็อาจเป็นได้ เพราะเราจะเห็นว่าความเป็นพิษของโปรตีนในส่วนที่IIจะมีความเป็นพิษต่ำกว่าในส่วนที่ I ประมาณเกือบ ๕ เท่า ซึ่งความไม่บริสุทธิ์อันนี้เราอาจแก้ไขได้โดยนำโปรตีนในส่วนนี้มาทำให้บริสุทธิ์ขึ้นอาจโดยการทำ electrophoresis หรืออาจแยกโดย ionexchanger ก็ได้ เพื่อไล่ protein ในส่วนที่ I ที่มีติดมาในส่วนที่IIออกให้หมดหลังจากนั้นจึงนำมาหาค่า LD_{50} ใหม่อีกครั้งหนึ่ง ถ้ายังได้ค่า LD_{50} คงเดิมอยู่ก็น่าจะเป็นได้ว่าโปรตีนในส่วนที่II นี้มีส่วนเป็นพิษอยู่ด้วยแน่ ๆ

ในโปรตีนที่แยกจากพิษงูส่วนที่ VII จากตารางที่ ๙ จะเห็นได้ว่าโปรตีนในส่วนนี้ จะมีความเป็นพิษต่ำสุด และ activity ของเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ที่เราศึกษาก็มี activity ต่ำมากจนไม่น่าจะทำให้เกิดเป็นพิษได้ ดังนั้นความเป็นพิษของโปรตีนในส่วนนี้ก็เช่นกันอาจเป็นพิษเนื่องจากมีสารชนิดใดชนิดหนึ่งซึ่งอาจเป็นเอนไซม์หรือไม่ใช่เอนไซม์และเราไม่ได้ศึกษาไว้ในที่นี้

เมื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติต่าง ๆ ของพิษงูแมวเซาในเมืองไทยกับของต่างประเทศ ซึ่งอยู่คนละสภาพของดินฟ้าอากาศและคนละสภาพภูมิศาสตร์ พบว่าพิษงูชนิดนี้ในเมืองไทยเราแยกออกเป็นส่วนประกอบ (active principle) ได้ ๗ ส่วน โดยวิธีเดียวกันนี้ Williams และ Esnouf (1962) แยกของต่างประเทศได้ถึง ๙ ส่วน และเมื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติอื่น ๆ รวมทั้ง activity ของเอนไซม์พบว่าในแต่ละส่วนจะมีปริมาณมากน้อยแตกต่างกันออกไป โดยเฉพาะเอนไซม์ L-amino acid oxidase ซึ่งในต่างประเทศมี activity สูงถึง ๓๓๕ ไมโครลิตรของออกซิเจนที่ใช้ไปใน ๑ ช.ม. ต่อมิลลิกรัมของพิษงูในเมื่อ activity ของพิษงูชนิดนี้ในเมืองไทยมีเพียง ๐.๐๗ ไมโครลิตร

ของออกซิเจนที่ใช้ไปใน ๑ ช.ม. ต่อมิลลิกรัมของพิษงูเท่านั้น แต่มีข้อที่เหมือนกันคือ ในโปรตีนส่วนต่าง ๆ ที่แยกได้จากพิษงูนั้นจะมีอยู่ส่วนหนึ่งซึ่งมีคุณสมบัติในการเร่งการแข็งตัวของเลือดได้ดีที่สุดในขณะที่ส่วนอื่น ๆ พบคุณสมบัตินี้น้อยมาก อย่างไรก็ตามเราก็ยังบอกเลยไม่ได้ว่าพิษงูแมวเซาในประเทศไทย มีคุณสมบัติเหมือนหรือต่างกับของในต่างประเทศทั้งนี้เพราะ DEAE cellulose ที่เราใช้แยกพิษงูนั้นเป็นคนละ grade และซื้อจากคนละบริษัทโดย Williams และ Esnouf (1962) ใช้ชนิด Whatman DE 50 ของบริษัท Kocklight ประเทศอังกฤษ ของเราใช้ชนิด S&S ซึ่งได้จาก Dr. Dunnแห่งคณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ซึ่งอาจจะมีความแตกต่างกันไปบ้างในด้านของ capacity หรือ %-crosslinkage เป็นต้น

ในแง่การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเป็นพิษกับ activity ของเอนไซม์ในโปรตีนแต่ละส่วนที่เป็นพิษนั้น จะมีเพียงส่วนเดียวที่พบว่าน่าจะเป็นพิษเนื่องจากการเร่งการแข็งตัวของเลือดส่วนโปรตีนในส่วนอื่น ๆ นั้นเรายังบอกไม่ได้ว่า เป็นพิษเนื่องจากอะไรจนกว่าจะได้มีการศึกษาค้นคว้าให้ละเอียดลงไปกว่านี้อีก ซึ่งอาจทำได้โดยหาวิธีแยกเอนไซม์ต่าง ๆ ที่มีในแต่ละส่วนออกจากกัน แล้วทำให้บริสุทธิ์ นำไปทดสอบความเป็นพิษของเอนไซม์เฉพาะตัวดูว่ามีความเป็นพิษหรือไม่ ถ้าหากแต่ละตัวไม่เป็นพิษ ก็ลองนำเอาแต่ละตัวมารวมกันด้วยอัตราส่วนของ activity ที่เราหาได้ในโปรตีนแต่ละส่วน แล้วลองทดสอบความเป็นพิษของมันอีกทีหนึ่ง หรืออาจทำได้อีกวิธีหนึ่ง โดยนำเอาโปรตีนส่วนที่เป็นพิษเหล่านี้มาทำให้บริสุทธิ์โดยหาวิธีแยกเอาเอนไซม์ต่าง ๆ ที่มีในแต่ละส่วนออกจากกันให้หมด ซึ่งอาจใช้วิธี electrophoresis หรือ ionexchanger โดยใช้ resin ชนิดต่าง ๆ กัน และ buffering system ต่าง ๆ กัน หลังจากแยกเอาเอนไซม์ต่าง ๆ ออกได้หมดแล้ว นำไปทดสอบความเป็นพิษดูใหม่อีกครั้งหนึ่ง พบว่ายังคงมีความเป็นพิษอยู่ก็แสดงว่าความเป็นพิษของพิษงูไม่ใช่เนื่องจาก activity ของเอนไซม์เหล่านี้แน่ ๆ ทั้งนี้ความเป็นพิษของพิษงู อาจเนื่องจากคุณสมบัติอันอื่น ๆ ซึ่งอาจเป็นได้ว่าเนื่องจากเอนไซม์ตัวอื่น ๆ ที่เรายังไม่ได้ศึกษาหรือค้นพบมาก่อนก็เป็นได้ ทั้งนี้เพราะสารที่เป็นพิษในแต่ละส่วนของโปรตีนที่แยกจากพิษงูเราเชื่อว่าเป็นโปรตีน และการทำงานของสารโปรตีนที่มีปริมาณเพียงเล็กน้อย แต่สามารถทำงานได้อย่างกว้างขวางรุนแรงนี้น่าจะเป็นการทำงานแบบ

enzymatic reaction ทั้งนี้เราจะต้องศึกษาค้นคว้าต่อไปอีก เป็นที่น่าเสียดายว่าในการทดลองนี้เราไม่ได้ทำการทดลองหา activity ของเอนไซม์บางตัวที่เคยพบและเชื่อว่ามีในพิษงูแมวเซา เช่น proteolytic enzyme หรือ proteinase, 5'-nucleotidase เป็นต้นทั้งนี้เพราะขาดวัสดุ และเคมีภัณฑ์ที่จะใช้ในการทดลอง ดังนั้นถ้ามีโอกาสคิดว่าจะพยายามศึกษาถึง activity ของเอนไซม์ทั้งสองตัวนี้รวมทั้งเอนไซม์หรือคุณสมบัติอื่น ๆ ที่พบว่าน่าจะมีในพิษงูชนิดนี้ และถ้าเป็นไปได้อาจศึกษาเลยไปจนขั้นเอนไซม์ - kinetic หรืออาจเลยไปจนขั้นทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ ซึ่งน่าจะเป็นประโยชน์สำหรับความรู้ทางด้านนี้ได้มาก

สรุปผลการทดลอง

๑. ได้ทำการทดลองแยกพิษงูแมวเซาออกเป็นส่วน ๆ โดยใช้ DEAE cellulose ได้โปรตีนต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบของพิษงู ๗ ชนิด

๒. โดยการวัดความเป็นพิษปรากฏว่า โปรตีนทั้ง ๗ ส่วนนี้มีอยู่ ๕ ส่วนที่เป็นพิษ (active toxic principle) แต่ความเป็นพิษของแต่ละส่วน มีความเป็นพิษน้อยกว่าในพิษงูที่ยังไม่ได้แยก แสดงว่าความเป็นพิษของพิษงูที่ยังไม่ได้แยกน่าจะเกิดจากการทำงานร่วมกันของโปรตีนทั้ง ๕ ส่วนที่แยกออกมาจากพิษงู

๓. โปรตีนที่เป็นพิษทั้ง ๕ ส่วนที่แยกจากพิษงูพบว่า จะมีอยู่ส่วนหนึ่งซึ่งความเป็นพิษน่าจะเนื่องจากคุณสมบัติในการเร่งการแข็งตัวของเลือดและพบว่าคุณสมบัติในการเร่งการแข็งตัวของเลือดในส่วนนี้รุนแรงถึง ๓ เท่าของพิษงูที่ยังไม่ได้แยก

๔. ได้ศึกษา activity ของเอนไซม์ phosphodiesterase, phosphmonoesterase, adenosine triphosphatase, L-amino acid oxidase, lecithinase ในโปรตีนที่แยกจากพิษงูแต่ละส่วน และในพิษงูที่ยังไม่ได้แยกด้วยพบว่าในโปรตีนส่วนที่ I จะมี activity ของเอนไซม์ phosphodiesterase, phosphomonoesterase และ adenosine triphosphatase สูงที่สุด ในโปรตีนส่วนที่ V พบว่ามี activity ของ lecithinase สูงที่สุด และ phosphodiesterase มากเป็นรองจากในโปรตีนส่วนที่ I

๕. พบว่าพิษงูแมวเซาไม่มีคุณสมบัติในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก (direct haemolysin) เลย

๖. activity ของเอนไซม์ L-amino acid oxidase ในพิษงูแมวเซามีค่าต่ำมากและไม่พบ activity ของเอนไซม์ชนิดนี้ในโปรตีนทุกส่วนที่แยกจากพิษงูแมวเซาเลย