

ฤทธิ์ของพิษงูจงอาง (OPHIOPHAGUS HANNAH) ต่อกล้ามเนื้อร่วมประสาท



นางสาวจรีพร น้อยพรหม

สถาบันวิทยบริการ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

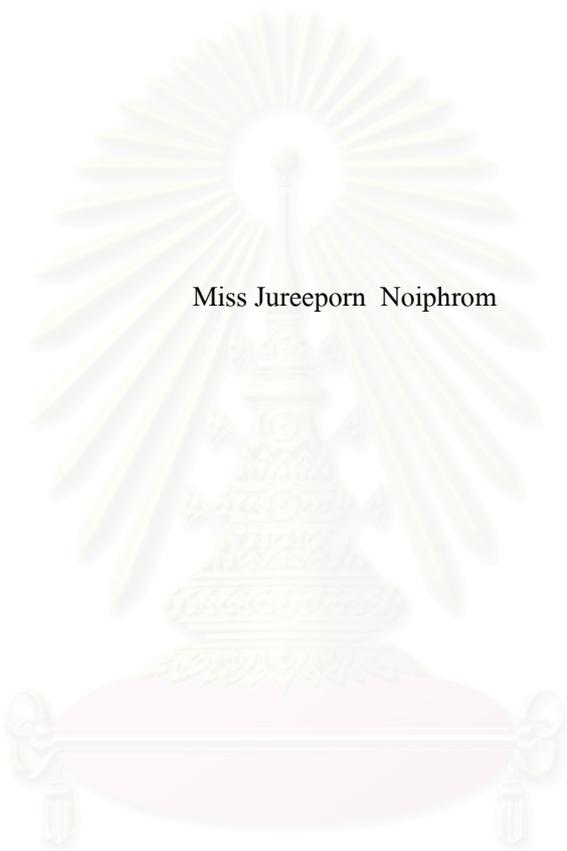
สาขาวิชาเภสัชวิทยา (สหสาขาวิชา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

NEUROMUSCULAR EFFECT OF KING COBRA (OPHIOPHAGUS HANNAH) VENOM



Miss Jureeporn Noiphrom

สภามหาวิทยาลัยบูรพา
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Pharmacology
(Interdisciplinary Program)

Graduate School Chulalongkorn University

Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ฤทธิ์ของพิษงูจงอาง (OPHIOPHAGUS HANNAH) ต่อกล้ามเนื้อร่วม
ประสาท
โดย นางสาวจุรีพร น้อยพรหม
สาขาวิชา เกษษวิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ โสภิต ธรรมอารี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาค้นคว้าตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ม.ร.ว. กัลยา ดิงศภัทย์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรีย์ เจียรณมงคล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ โสภิต ธรรมอารี)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. มยุรี ดันดีสิระ)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สพ.ญ. ดร. สฤณี กลั่นทกานนท์ ทองทรง)

จิวีพร น้อยพรหม : ฤทธิ์ของพิษงูจงอาง (OPHIOPHAGUS HANNAH) ต่อกล้ามเนื้อ
ร่วมประสาท. (NEUROMUSCULAR EFFECT OF KING COBRA (OPHIOPHAGUS
HANNAH) VENOM) อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ. ไชยศักดิ์ ธรรมอารี, 76 หน้า.

พิษงูจงอางจัดอยู่ในกลุ่มพิษต่อระบบประสาท ผู้ที่ถูกงูจงอางกัดจะเกิดอาการกล้ามเนื้อ
อ่อนแรงและเป็นอัมพาต ด้วยฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทนี้ จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะนำพิษงู
จงอางมาพัฒนาเป็นยาเพื่อประโยชน์ทางการรักษา ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษา
หาส่วนกิ่งบริสุทธิ์ของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาท และกลไกเบื้องต้นในการ
ออกฤทธิ์ของส่วนกิ่งบริสุทธิ์นี้ โดยทำการศึกษาใน phrenic nerve - hemi-diaphragm
preparations ที่แยกได้จากกวางหนุมานัส ซึ่งจะทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทที่
ตอบสนองต่อการกระตุ้น phrenic nerve ด้วยไฟฟ้า ผลการศึกษาพบว่าพิษงูจงอาง (crude) มีฤทธิ์
ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทขึ้นกับปริมาณความเข้มข้นที่ใช้ ทำการแยกพิษงูจงอางโดยผ่านลงใน
Q-Sepharose column สามารถแยกได้ 7 ส่วน (F1 - F7) F1 มีฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทที่
ที่สุด นำ F1 มาแยกส่วนโดยผ่านลงใน Cellulofine GCL-1000 sf column ได้ 3 ส่วน (F1.1 - F1.3)
F1.2 มีฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทดีที่สุด จึงทำการแยก F1.2 โดยผ่านลงใน SP-Sepharose
column ทำให้ได้ส่วนกิ่งบริสุทธิ์ 4 ส่วน (F1.2.1 - F1.2.4) ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อ
ร่วมประสาท เวลาที่ใช้ในการยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (50% inhibition)
ของ crude venom (80 µg/ml), F1 (30.5 µg/ml), F1.2 (16.6 µg/ml), F1.2.1 (1.4 µg/ml), F1.2.2
(4.4 µg/ml), F1.2.3 (1.7 µg/ml) และ F1.2.4 (3.7 µg/ml) ได้แก่ 4.2 ± 0.1 , 4.6 ± 0.2 , 4.3 ± 0.3 ,
 30.7 ± 2.0 , 7.4 ± 0.4 , 12.8 ± 0.3 และ 9.5 ± 0.5 นาที ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าส่วนกิ่งบริสุทธิ์
F1.2.2 - F1.2.4 มีฤทธิ์ดี จึงนำมาศึกษากลไกเบื้องต้น พบว่าส่วนกิ่งบริสุทธิ์ทั้ง 3 ส่วนออกฤทธิ์ที่
บริเวณ postsynaptic และไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วย
ไฟฟ้า

สาขาวิชา เกษษวิชา
ปีการศึกษา 2550

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

4789069920 : MAJOR PHARMACOLOGY

KEY WORD: *OPHIOPHAGUS HANNAH* / NEUROMUSCULAR / PHRENIC NERVE – DIAPHRAGM

JUREEPORN NOIPHROM : NEUROMUSCULAR EFFECT OF KING COBRA (*OPHIOPHAGUS HANNAH*) VENOM. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SOPIT THARMAREE, 76 pp.

King cobra venom (KCV) is classified as a neurotoxic venom. Human envenomed by king cobra developed muscle paralysis. The neuromuscular (NM) blocking effect of KCV may be of interest for developing a therapeutic agent. Therefore this study aimed at investigating the semi-purified fractions of king cobra venom possessing the neuromuscular blocking action and their mechanisms of action using the isolated mouse's phrenic nerve – hemi-diaphragm preparation. NM blocking effect of the test compounds on muscle contraction induced by electrical stimulation of the phrenic nerve was measured. The crude venom showed dose-dependent NM blocking effect. Fractionation of the crude venom using Q-Sepharose column obtained seven fractions (F1 – F7). The F1 showed the highest NM blocking effect. Further fractionation of the F1 using Cellulofine GCL-1000 sf column obtained 3 fractions (F1.1 – F1.3). The F1.2 showed the highest potency of NM blocking effect. The F1.2 was further fractionated using SP-Sepharose column, 4 semi-purified fractions (F1.2.1 – F1.2.4) were obtained. The time (min) taken the crude venom (80 µg/ml), the F1 (30.5 µg/ml); F1.2 (16.6 µg/ml); F1.2.1 (1.4 µg/ml); F1.2.2 (4.4 µg/ml); F1.2.3 (1.7 µg/ml); and F1.2.4 (3.7 µg/ml) to produce 50% inhibition of the twitch tension were 4.2 ± 0.1 , 4.6 ± 0.2 , 4.3 ± 0.3 , 30.7 ± 2.0 , 7.4 ± 0.4 , 12.8 ± 0.3 and 9.5 ± 0.5 min, respectively. The semi-purified F1.2.2 – F1.2.4 were studied for their mechanisms of action. All semi-purified fractions showed the postsynaptic blocking action but the muscle contraction induced by direct electrical stimulation on muscle was not affected.

Field of study Pharmacology
 Academic year 2007

Student's signature.....*Jureeporn Noiphrom*.....
 Advisor's signature.....*Thamara S.*.....

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์โสภิต ชรรมาโร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำตลอดจนข้อคิดเห็นและความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ทำให้วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สพ.ญ. ดร. สฤณี กลั่นทกานนท์ ทองทรง ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำตลอดจนแนวคิดต่าง ๆ เกี่ยวกับเทคนิควิธีการแยก และการทดลองที่ใช้ mouse phrenic nerve-diaphragm preparation ในงานวิจัย รวมถึงความช่วยเหลืออื่น ๆ ในการทำการวิจัย

ขอขอบพระคุณ คุณอรพรรณ แซ่โคว้ว ที่ให้ความอนุเคราะห์พิษงูอง่าง ส่วน (fractions) และส่วนกึ่งบริสุทธิ์ (semi-purified fractions) เพื่อนำมาใช้ในการทดลอง

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ทุกท่านในภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ และคณะสัตวแพทยศาสตร์ ที่ได้ให้ความรู้ตลอดการศึกษาในระดับปริญญาโทมาบัดนี้

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ทุกท่านในหลักสูตร ที่มีส่วนช่วยเหลือ เอื้ออำนวยความสะดวกเกี่ยวกับสถานที่ ตลอดจนงานธุรการต่าง ๆ รวมทั้งให้ความช่วยเหลืออื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องในการทำวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ศูนย์สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่อาคารสัตว์ทดลอง สถานเสาวภา สภากาชาดไทย ที่ดูแลและให้ความสะดวกเกี่ยวกับสัตว์ทดลอง เพื่อนำมาใช้ในการวิจัย

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัว ที่เป็นกำลังใจในการศึกษา และการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ และขอขอบคุณเพื่อน ๆ ตลอดจนผู้ที่มีส่วนช่วยเหลือทุกท่าน ที่ช่วยสนับสนุนการทำงานวิจัยและการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ สัตว์ทดลองทุกชีวิต ที่เสียสละเพื่อให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ฉ
คำอธิบายลักษณะและคำย่อ.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาวิจัย.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
กรอบแนวคิดการวิจัย.....	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย.....	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
แนวคิดและทฤษฎี.....	6
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	12
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	17
สัตว์ทดลอง เครื่องมือและอุปกรณ์.....	17
สารเคมี.....	18
วิธีดำเนินการวิจัย.....	22
- เตรียม mouse phrenic nerve – hemi-diaphragm.....	22
- ทดสอบการหดตัวของกล้ามเนื้อกระบังลม เมื่อกระตุ้น phrenic nerve ด้วยไฟฟ้าโดยใช้ suction electrode.....	22
- ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทของพิษงูจงอาง.....	23
- ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทของ F1 – F7, F1.1 – F1.3 และ F1.2.1 – F1.2.4.....	23
- ศึกษากลไกเบื้องต้นในการออกฤทธิ์ของส่วนกิ่งบริสุทธ์ ที่มีฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาท.....	24
- การวิเคราะห์ข้อมูล.....	28

	หน้า
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	29
- การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทของพิษงูจงอางและ fractions.....	29
- การทดสอบตำแหน่งการออกฤทธิ์ของส่วนกิ่งบริสุทธิ์ที่บริเวณ pre- หรือ Postsynaptic	37
- การทดสอบการออกฤทธิ์ของส่วนกิ่งบริสุทธิ์ในการยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อกระบังลม เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า.....	44
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	52
- อภิปรายผลการวิจัย.....	52
- สรุปและข้อเสนอแนะ.....	54
รายการอ้างอิง.....	56
ภาคผนวก.....	59
ภาคผนวก ก.....	60
ภาคผนวก ข.....	62
ภาคผนวก ค.....	65
ภาคผนวก ง.....	75
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	76

สารบัญญัตินำ

ตารางที่	หน้า
1. ความเข้มข้นของแต่ละ Fraction F1 – F7 ที่ใช้ในการทดสอบ และผลการทดสอบ ฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาท.....	31
2. ความเข้มข้นของแต่ละ Fraction F1.1 – F1.3 ที่ใช้ในการทดสอบ และผลการทดสอบ ฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาท.....	31
3. ความเข้มข้นของแต่ละ Fraction F1.2.1 – F1.2.3 ที่ใช้ในการทดสอบ และผล การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาท.....	32
4. ผลการ contraction ของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้น phrenic nerve ด้วยไฟฟ้า (control).....	66
5. เวลา (min.) ที่ใช้ในการทำให้เกิด 50% inhibition ของพิฆงจงอาจ.....	66
6. ผลการทดสอบฤทธิ์ของ F1 – F7.....	67
7. ผลการทดสอบฤทธิ์ของ F1.1 – F1.3.....	67
8. ผลการทดสอบฤทธิ์ของ F1.2.1 – F1.2.4.....	68
9. Twitch tension (g) ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M ก่อนและหลังการกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้า (Control)....	68
10. Twitch tension (g) ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M ก่อนและหลัง neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก F1.2.2.....	69
11. Twitch tension (g) ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M ก่อนและหลัง neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก F1.2.3.....	69
12. Twitch tension (g) ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M ก่อนและหลัง neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก F1.2.4.....	70
13. เวลา (min.) ที่ใช้ในการทำให้เกิด 95% inhibition ของ Tubocurarine chloride.....	70
14. Twitch tension (%) ที่เวลาต่าง ๆ เมื่อทดสอบฤทธิ์ของ Tubocurarine chloride $20 \mu\text{M}$ ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้า.....	71
15. ผลการ contraction ของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า.....	71

16. ผลการ contraction ของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า โดยใช้ Unipolar electrode และ Bipolar electrode หลังการปิดกั้น neuromuscular transmission ด้วย Tubocurarine chloride.....	71
17. Twitch tension (%) ที่เวลาต่าง ๆ เมื่อทดสอบฤทธิ์ของ F1.2.2 – F1.2.4 ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นด้วยไฟฟ้าโดยตรง และกลุ่ม control.....	74



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1. การสื่อประสาทที่บริเวณ neuromuscular junction.....	9
2. กระบวนการหดตัวของกล้ามเนื้อหลังการสื่อกระแสประสาท.....	10
3. งูจงอาง (<i>Ophiophagus hannah</i>).....	12
4. ขั้นตอนการแยกส่วนพิษงูจงอาง.....	20
5. ชุดเครื่องมือสำหรับศึกษา phrenic nerve – hemi-diaphragm preparation ที่แยกจาก กายหนูเมาส์.....	21
6. ภาพประกอบคำอธิบายการทดลองที่ 4.2.....	23
7. ภาพประกอบคำอธิบายการทดลองที่ 4.3 และ 4.4.....	24
8. ภาพประกอบคำอธิบายการทดลองที่ 4.5.1.....	26
9. ภาพประกอบคำอธิบายการทดลองที่ 4.5.2.3 และ 4.5.2.4.....	28
10. การหดตัวของกล้ามเนื้อกระบังลม เมื่อกระตุ้น phrenic nerve ด้วยไฟฟ้าระดับ supramaximal voltage โดยใช้ suction electrode.....	29
11.ฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทของพิษงูจงอางที่ความเข้มข้น 5, 10, 20, 40, 80 และ 160 $\mu\text{g/ml}$ และกลุ่ม control.....	33
12. ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ทำให้เกิด 50% inhibition กับความเข้มข้นของพิษงู.....	33
13. ฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทของ F1 – F7.....	34
14. ฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทของ F1.1 – F1.3.....	35
15. ฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทของ F12.1 – F1.23.....	36
16. การหดตัวของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อกระบังลมด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M แบบสะสมทีละความเข้มข้น (control).....	38
17. การหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M แบบสะสมทีละความเข้มข้น ทั้งก่อนและหลังการกระตุ้น phrenic nerve ด้วยไฟฟ้า (control).....	39
18. การหดตัวของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อกระบังลมด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M แบบสะสมทีละความเข้มข้น หลังการเกิด neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก F1.2.2.....	40

ภาพที่	หน้า
19. การหัดตัวของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อกระบังลมด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M แบบสะสมทีละความเข้มข้น หลังการเกิด neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก F1.2.3.....	41
20. การหัดตัวของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อกระบังลมด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M แบบสะสมทีละความเข้มข้น หลังการเกิด neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก F1.2.4.....	42
21. การหัดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M แบบสะสมทีละความเข้มข้น ทั้งก่อนและหลังการเกิด neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก F1.2.2.....	43
22. การหัดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M แบบสะสมทีละความเข้มข้น ทั้งก่อนและหลังการเกิด neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก F1.2.3.....	43
23. การหัดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M แบบสะสมทีละความเข้มข้น ทั้งก่อนและหลังการเกิด neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก F1.2.4.....	44
24. ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ทำให้เกิด 95% inhibition กับความเข้มข้นของ Tubocurarine chloride.....	46
25. ฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทของ Tubocurarine chloride.....	47
26. การหัดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อ โดยตรงด้วยไฟฟ้า.....	48
27. การหัดตัวของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อ โดยตรงด้วยไฟฟ้า หลังการปิดกั้น neuromuscular transmission ด้วย Tubocurarine.....	49
28. การเปรียบเทียบการหัดตัวของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อ โดยตรงด้วยไฟฟ้า ทั้งที่ไม่ใช้ Tubocurarine chloride และใช้ Tubocurarine chloride เพื่อปิดกั้น neuromuscular transmission.....	50
29. ผลของ F1.2.2 – F1.2.4 ต่อการหัดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อ โดยตรง ด้วยไฟฟ้า หลังการปิดกั้น neuromuscular transmission ด้วย Tubocurarine chloride....	51
30. กราฟแสดงส่วนของพิชุงของางที่แยกได้ในแต่ละรอบ.....	65
31. การเปรียบเทียบการหัดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อ โดยตรงด้วยไฟฟ้า โดยใช้ Unipolar electrode และ Bipolar electrode.....	73

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

Ach	=	Acetylcholine
Ca ²⁺	=	Calcium ion
K ⁺	=	Potassium ion
Na ⁺	=	Sodium ion
CO ₂	=	Carbondioxide
O ₂	=	Oxygen
°C	=	องศาเซลเซียส
M	=	molar
mM	=	millimolar
μl	=	micromolar
L	=	liter
ml	=	milliliter
μl	=	microliter
g	=	gram
n	=	sample size
SR	=	sarcoplasmic reticulum
%	=	percent
/	=	per

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

พิษงูเป็นสารประกอบเชิงซ้อน ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนเป็นส่วนใหญ่ มีทั้ง enzymatic protein เช่น phospholipase A₂, acetylcholinesterase, protease เป็นต้น และ non-enzymatic protein โดยเฉพาะสารพิษ (toxins) เช่น neurotoxin, cardiotoxin, myotoxin เป็นต้น โปรตีนต่าง ๆ ในพิษงูมีบทบาทด้านชีวเคมีและเภสัชวิทยาต่าง ๆ เพื่อประโยชน์ในการหาอาหารของงู นักวิจัยหลายกลุ่มทำการศึกษาคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาของพิษงูเพื่อเป็นจุดเริ่มต้นของการพัฒนายาใหม่ ตัวอย่างยาที่ถูกพัฒนาขึ้นมา ได้แก่ ยา ACE inhibitor : captopril (1) เป็นยาชนิดแรก ที่พัฒนามาจาก bradykinin potentiating peptides แยกได้จากพิษงู *Bothrops jararaca* ซึ่งเป็นงูพิษชนิดหนึ่งพบในต่างประเทศ

ยาที่พัฒนาจากองค์ประกอบของสิ่งมีชีวิตถูกพัฒนาขึ้น เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการป้องกันและรักษาโรคหรืออาการผิดปกติต่าง ๆ ปัจจุบันมีการนำพิษจากแบคทีเรีย *Clostridium botulinum* (Botulinum toxin) มาใช้ประโยชน์ทั้งในด้านรักษาโรค และใช้ด้านความงามอย่างแพร่หลาย โดยอาศัยฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาท ซึ่งออกฤทธิ์ที่บริเวณ presynaptic เกี่ยวกับการบีบตัวของกล้ามเนื้อที่ผิดปกติ Botulinum toxin ถูกนำมาใช้เป็นส่วนหนึ่งในโปรแกรมการรักษาเพื่อช่วยบรรเทาอาการปวดหรืออาการผิดปกติของกล้ามเนื้อ (2) เช่น อาการกระพริบตาไม่หยุด (blepharism) และใช้ด้านความงามเพื่อลดรอยเหี่ยวย่น โดยทำให้กล้ามเนื้อที่บีบตัว เกิดการคลายตัวให้ผลลดริ้วรอยเหี่ยวย่นเป็นที่น่าพอใจ

พิษงูในกลุ่มที่เป็นพิษต่อระบบประสาท มีฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทด้วยเช่นกัน ซึ่งเมื่อได้รับพิษงูในกลุ่มนี้ เช่น ถูกงูจงอางกัด จะเกิดอาการกล้ามเนื้ออ่อนแรง หนังตาตก พูดไม่ชัด กลืนลำบาก เป็นอัมพาต และหายใจเองไม่ได้ ส่วนของพิษงูที่สำคัญในการทำให้เกิดฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาท คือ neurotoxin ด้วยฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทที่มีในพิษงู จึงอาจนำส่วนของพิษงูมาใช้ประโยชน์ในการรักษาโรคหรืออาการต่างๆ เกี่ยวกับกล้ามเนื้อบีบตัวผิดปกติได้ ซึ่งนอกจากจะนำไปใช้ในลักษณะคล้ายกับ Botulinum toxin แล้ว ยังอาจนำไปใช้ในด้านอื่น เช่น มีการนำ neurotoxin มาใช้ประโยชน์ในการศึกษาวิจัยเพื่อหาแนวทางการยับยั้งการติดเชื่อไวรัสในเซลล์กล้ามเนื้อและเซลล์ประสาท (muscular and neuronal cells) และการศึกษาเพื่อการเข้าใจถึงการเกิดโรค Myasthenia gravis โดยอาศัยโครงสร้างและการจับกับ nicotinic acetylcholine

receptor ของ neurotoxin รวมถึงการนำ neurotoxin มาใช้เป็นเครื่องมือ (probe) สำหรับการติดฉลากเพื่อจำแนก neuronal nicotinic receptor : $\alpha 7$ -subtype ในโรคต่าง ๆ เช่น Alzheimer's disease เป็นต้น (3)

งูพิษที่อยู่ในวงศ์ (Family) Elapidae เป็นงูพิษที่พิษมีฤทธิ์ต่อระบบประสาท มีการศึกษา neurotoxin ที่แยกได้จากพิษงูใน Family นี้ ซึ่งพบ neurotoxin ทั้งที่ออกฤทธิ์บริเวณ presynaptic และ postsynaptic ตัวอย่างเช่น neurotoxin จากงูเห่าได้หว่านออกฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทที่บริเวณ postsynaptic และ neurotoxin จากงูสามเหลี่ยมได้หว่านออกฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทที่บริเวณ presynaptic เป็นต้น (4) ในประเทศไทยงูพิษใน Family นี้มีหลายชนิด ได้แก่ งูเห่าไทย (*Naja kaouthia*), งูเห่าพ่นพิษ (*Naja siamensis*), งูจงอาง (*Ophiophagus hannah*), งูสามเหลี่ยม (*Bungarus fasciatus*), งูทับสมิงคลา (*B. candidus*) และงูทะเลชนิดต่าง ๆ เป็นต้น งูจงอางเป็นงูพิษที่น่าสนใจ เนื่องจากงูจงอางเป็นงูพิษที่มีขนาดใหญ่ มีพิษรุนแรง ต่อมพิษใหญ่ ปริมาณพิษย่อมมากตามไปด้วย สามารถเพาะเลี้ยงได้โดยสถานเสาวภา และการศึกษาเกี่ยวกับพิษงูจงอางในประเทศไทยยังมีไม่มากนัก จึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาส่วนของพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาท (neuromuscular blockade) เพื่อเป็นแนวทางในการนำมาใช้ในทางการแพทย์ต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาฤทธิ์ของพิษงูจงอาง ส่วน (fraction) ของพิษงูจงอาง และส่วนกึ่งบริสุทธิ์ (semi-purified fraction) ในการยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาท
2. ศึกษากลไกเบื้องต้นในการออกฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทของส่วนกึ่งบริสุทธิ์ที่แยกได้จากพิษงูจงอาง

คำถามการวิจัย

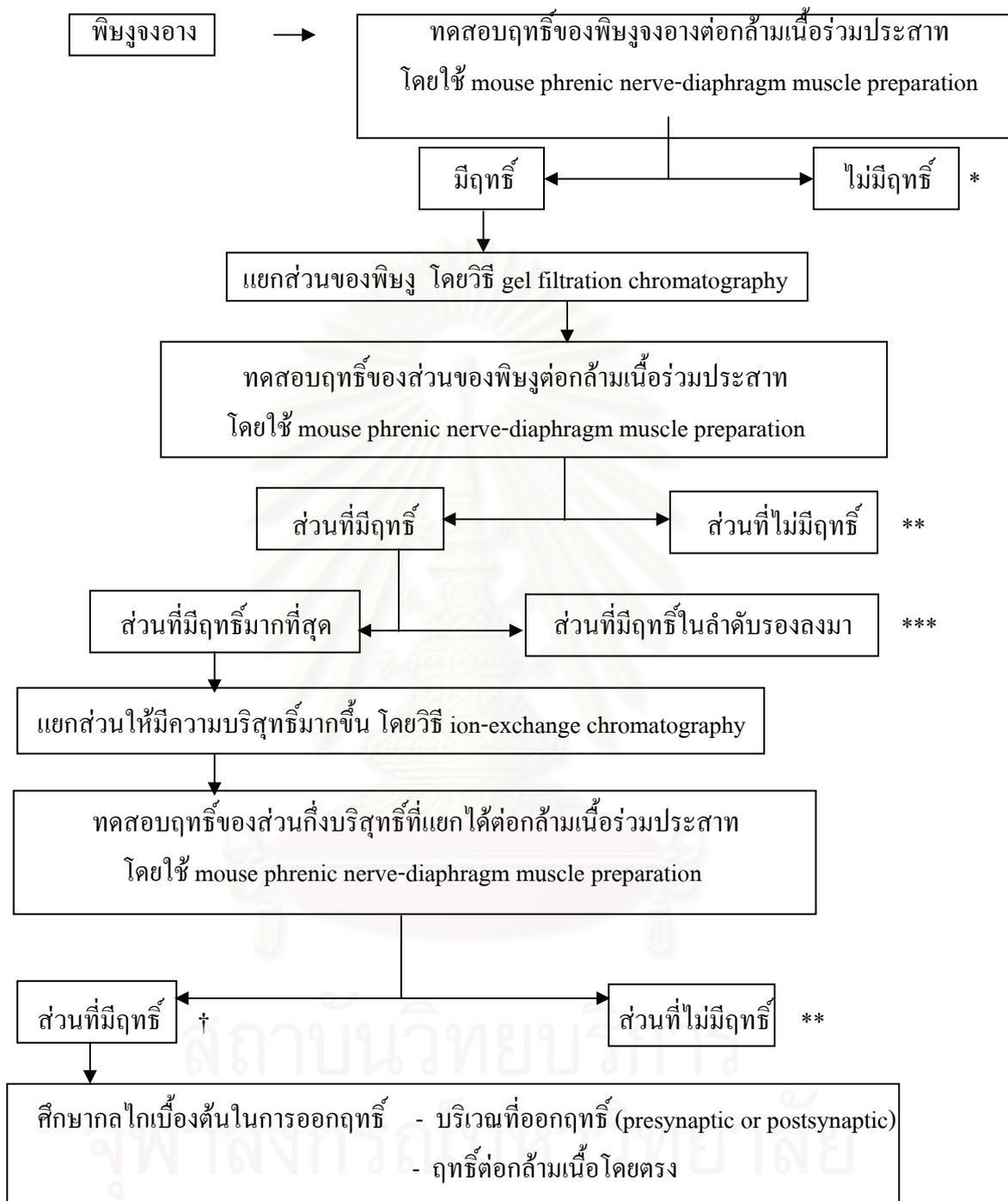
1. พิษงูจงอางมีส่วนที่มีฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทหรือไม่
2. ส่วนกึ่งบริสุทธิ์ที่แยกได้จากพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาท ออกฤทธิ์ที่บริเวณใด

สมมติฐานการวิจัย

พิษงูจงอางมีส่วนที่มีฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาท โดยส่วนกึ่งบริสุทธิ์ที่แยกได้จากพิษงูจงอางนั้นนอกจากออกฤทธิ์ที่ postsynaptic แล้ว อาจมีส่วนที่ออกฤทธิ์บริเวณ preynaptic ด้วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กรอบแนวคิดการวิจัย



- * ทำการทดลองซ้ำเพื่อยืนยันผลการไม่พบฤทธิ์ และค้นหาเหตุผล
- ** อาจนำไปศึกษาในแง่มุมอื่นต่อไปในอนาคต แต่ถ้าไม่พบฤทธิ์ในทุกส่วนของพินิจ ทำการทดลองซ้ำเพื่อยืนยันผล และค้นหาเหตุผล
- *** อาจนำไปศึกษาในแง่มุมอื่นต่อไปในอนาคต
- † อาจนำส่วนประกอบนี้ไปตรวจสอบความเป็นพิษ วิเคราะห์โปรตีน โครงสร้าง ลำดับกรดอะมิโน enzyme activity หรือลักษณะต่าง ๆ และศึกษากลไกในระดับลึก รวมถึงการศึกษาเพื่อนำส่วนประกอบนี้ไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ ให้เป็นประโยชน์ต่อไปในอนาคต

ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยนี้จะทำการศึกษาฤทธิ์ของพิษงูจงอาง ส่วน (fraction) ของพิษงูจงอาง และ ส่วนกึ่งบริสุทธิ์ (semi-purified fraction) ของพิษงูจงอาง ในการยับยั้งการสื่อสารที่กล้ามเนื้อ ร่วมประสาท (neuromuscular junction) นอกจากนี้ยังศึกษากลไกเบื้องต้นในการออกฤทธิ์ของส่วน กึ่งบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ที่ดีในการยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาท โดยทำการศึกษาการออกฤทธิ์ยับยั้ง กล้ามเนื้อร่วมประสาทเมื่อทำการกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า และศึกษาว่าส่วนกึ่งบริสุทธิ์ นั้นออกฤทธิ์ที่บริเวณ pre- หรือ postsynaptic ซึ่งตลอดการวิจัยจะใช้ mouse phrenic nerve- diaphragm preparation ในการศึกษาทดลอง

ปัญหาทางจริยธรรม (จรรยาบรรณการใช้สัตว์ในงานทางวิทยาศาสตร์)

ผู้วิจัยจะปฏิบัติตามจรรยาบรรณการใช้สัตว์ในงานทางวิทยาศาสตร์และหลักการ The Three R's โดยพิจารณาความจำเป็นในการใช้สัตว์ทดลอง ซึ่งการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ต่อ กล้ามเนื้อร่วมประสาท (Neuromuscular effect) มีความจำเป็นต้องใช้ nerve-muscle preparation ที่ เตรียมจากสัตว์ทดลอง จำนวนสัตว์ทดลองจะใช้ในปริมาณน้อยที่สุดที่คาดว่าจะให้ผลมีนัยสำคัญ ทางสถิติ และจะปฏิบัติต่อสัตว์อย่างมีมนุษยธรรม ซึ่งจะทำการสลบสัตว์ทดลองด้วยก๊าซ คาร์บอนไดออกไซด์ (95% CO₂ + 5% O₂) ให้สลบถึงหมดความรู้สึกและเสียชีวิตในที่สุด แล้ว จึงทำการผ่าตัดแยก phrenic nerve-diaphragm เมื่อเสร็จสิ้นการทดลอง สัตว์ทดลองจะถูกส่งไปที่ ศูนย์สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อกำจัดซากโดยวิธีมาตรฐาน นอกจากนี้สัตว์ทดลองจะได้รับอาหารและน้ำอย่างเพียงพอ และได้รับการดูแลเลี้ยงดูในสภาวะที่ เหมาะสม ทั้งนี้การดำเนินการวิจัยได้ทำหลังจากโครงการวิจัยผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการ พิจารณาจริยธรรมการวิจัยของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยแล้ว

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ส่วนกึ่งบริสุทธิ์ที่แยกได้จากพิษงูจงอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาท ซึ่งสามารถนำไปศึกษาเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ต่อไป
2. พัฒนาวิธีการศึกษาทดลองโดยใช้ mouse phrenic nerve – hemi-diaphragm preparation ซึ่งสามารถนำรูปแบบการศึกษานี้ไปใช้ได้ในการศึกษาโครงการอื่นๆ ต่อไป
3. ได้ข้อมูลวิจัยพื้นฐานเกี่ยวกับพิษงูจงอางเพื่อใช้ในการศึกษาและพัฒนาต่อไป

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แนวคิดและทฤษฎี

การทำงานของส่วนต่าง ๆ ของร่างกายจะถูกควบคุมด้วยระบบประสาท ซึ่งระบบประสาทที่รับรู้ความรู้สึกจากตัวรับ (receptor) ที่ผิวหนังและอวัยวะรับสัมผัสเข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลาง และส่งคำสั่งจากระบบประสาทส่วนกลางไปยังกล้ามเนื้อลาย คือ ระบบประสาทร่างกาย (Somatic Nervous System, SNS) โดยส่วนที่ทำหน้าที่นำสัญญาณความรู้สึกเข้าระบบประสาทส่วนกลางและส่งคำสั่งออกจากระบบประสาทส่วนกลาง คือ เส้นประสาท (nerve) ส่วนปลายสุดของเส้นประสาท คือ ปลายประสาท (Nerve endings) ซึ่งจัดแบ่งตามหน้าที่ได้ 2 กลุ่ม ได้แก่ ปลายประสาทรับความรู้สึก (Sensory nerve endings) และปลายประสาทสั่งการ (Motor nerve endings) ปลายประสาทสั่งการจะเชื่อมต่อกับเซลล์กล้ามเนื้อชนิดต่าง ๆ หรือเซลล์ต่อมที่เป็นเซลล์เป้าหมาย

Synapse เป็นบริเวณที่เซลล์ประสาทส่งผ่านกระแสประสาทไปยังเซลล์อื่น synapse บริเวณกล้ามเนื้อร่วมประสาท (neuromuscular junction) จะเกิดการสื่อสารจากปลายประสาทสั่งการสู่กล้ามเนื้อ (ภาพที่ 1) การทำงานของกล้ามเนื้อลายจะถูกสั่งจากปลายประสาทสั่งการโดยการส่งผ่านกระแสประสาท ซึ่งจะเริ่มขึ้นเมื่อกระแสประสาท (action potential) ถูกส่งมาตามเส้นใยประสาท การเปลี่ยนแปลงที่บริเวณส่วนปลายของเส้นใยประสาทสั่งการ (presynaptic membrane) และส่วนของเซลล์กล้ามเนื้อที่เส้นใยประสาทมาสิ้นสุด (postsynaptic membrane) เกิดขึ้นดังนี้ (5)

1. บริเวณ Presynaptic membrane

เกิดการหลั่งสารสื่อประสาท โดยเมื่อกระแสประสาทเคลื่อนมาถึงส่วนปลายของเส้นใยประสาท (axon terminal) จะทำให้ voltage-gated calcium channels เปิด Ca^{2+} จากภายนอกไหลเข้าสู่ presynaptic knob การเพิ่มขึ้นของ Ca^{2+} ภายใน axon terminal ส่งผลให้ presynaptic vesicles เชื่อมรวมกับ plasma membrane สารสื่อประสาท (neurotransmitter) ได้แก่ acetylcholine ที่บรรจุอยู่ภายใน presynaptic vesicles ถูกปล่อยออกมาใน synaptic cleft ด้วยขบวนการ exocytosis acetylcholine จะแพร่ข้าม synaptic cleft มาจับกับ acetylcholine receptor ซึ่งอยู่บนผิวของ plasma membrane ของกล้ามเนื้อ calcium ion ที่ไหลเข้าสู่ axon terminal จะถูกปั๊มออกไป การจับกันของ acetylcholine กับตัวรับ ทำให้เพิ่มการนำกระแส (conductance) โดยเปลี่ยนแปลง ion permeability ส่งผลให้เกิด depolarization ที่บริเวณ motor end plate และเริ่มการส่ง action potential

กระจายต่อ ๆ ไป depolarization ที่เกิดขึ้นจะเกิดแบบชั่วคราว เนื่องจาก acetylcholine จะถูก hydrolyze เปลี่ยนเป็น choline และ acetate อย่างรวดเร็วโดย acetylcholinesterase ซึ่งมีอยู่มากที่ postsynaptic membrane และถูกขนส่งกลับสู่ axon terminal เพื่อใช้สร้าง acetylcholine ขึ้นมาใหม่ ในเส้นประสาท และเก็บไว้ใน presynaptic vesicles (ภาพที่ 1) (5, 6)

2. บริเวณ Postsynaptic membrane

เกิดการหดตัว (contraction) ของกล้ามเนื้อ โดยเมื่อ acetylcholine มาจับ nicotinic acetylcholine receptor ที่บริเวณ motor end plate ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง ion permeability ของ Na^+ และ K^+ โดยทำให้ voltage-gated Na^+ channels เปิด เกิดการไหลเข้าของ Na^+ และจากนั้น voltage-gated K^+ channels ก็จะเปิด เกิดการไหลออกของ K^+ กระแสไอออน (Ionic currents) ของ Na^+ และ K^+ ส่งผลให้เกิด depolarization ที่บริเวณ motor end plate เกิด end-plate potential ซึ่งจะเปิด voltage-gated Na^+ channels ที่อยู่ใกล้เคียง เป็นผลให้เกิด depolarization ต่อ ๆ ไป เกิดการส่งต่อ action potential และ action potential จะถูกส่งกระจายไปตาม sarcolemma ในทุกทิศทางและลงมายัง T tubules ทำให้ calcium ion ถูกปล่อยออกมาจาก terminal cisternae ของ sarcoplasmic reticulum (SR) เข้าสู่ cytosol ไปจับกับ Troponin C ซึ่งเป็นโปรตีนที่ประกอบอยู่ในเส้นใยกล้ามเนื้อ ซึ่งทำให้ Tropomyosin บน Actin filament เคลื่อนตัว เผย myosin-binding sites ทำให้ Myosin filament เข้ามาจับกับ Actin filament และดึงไปในแนวกลางของ sarcomere ทำให้กล้ามเนื้อเกิดการหดตัว จากนั้นเกิดการปล่อยพลังงานออกมา เป็นผลให้ Actin และ Myosin filament แยกออกจากกัน และเข้าสู่ระยะพัก ถ้าระดับ calcium ion ยังคงสูง Actin และ Myosin filament ก็จะกลับมาจับกันใหม่ เมื่อ action potential สิ้นสุด ระดับ calcium ion ลดต่ำลง calcium ion จะแยกตัวออกจาก Troponin C และถูกปั๊มกลับเข้าสู่ SR Actin และ Myosin filament กลับเข้าสู่ภาวะปกติ การหดตัวของกล้ามเนื้อสิ้นสุดลง muscle fiber คลายตัว (ภาพที่ 2) (5, 6)

ยาที่ออกฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาท โดยออกฤทธิ์ที่บริเวณ presynaptic ตัวอย่างเช่น Botulinum toxin ออกฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาท โดยยับยั้งการปล่อยสารสื่อประสาทออกมาจาก presynaptic axon terminal โดยจับกับ neuronal acceptor บน nerve terminal axolemma และเข้าไปยัง nerve terminal จากนั้นเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (conformation) ในส่วน heavy chain ของ toxin ทำให้ส่วน light chain ไปอยู่ใน cytoplasm ส่งผลให้ metallo-protease ของ light chain ทำงาน ซึ่งจะออกฤทธิ์ที่ SNAREs proteins ใน nerve terminal ชนิดของ SNAREs proteins และตำแหน่งบน SNAREs proteins ที่ toxin ไปออกฤทธิ์นั้น ขึ้นกับแต่ละ subtype ของ

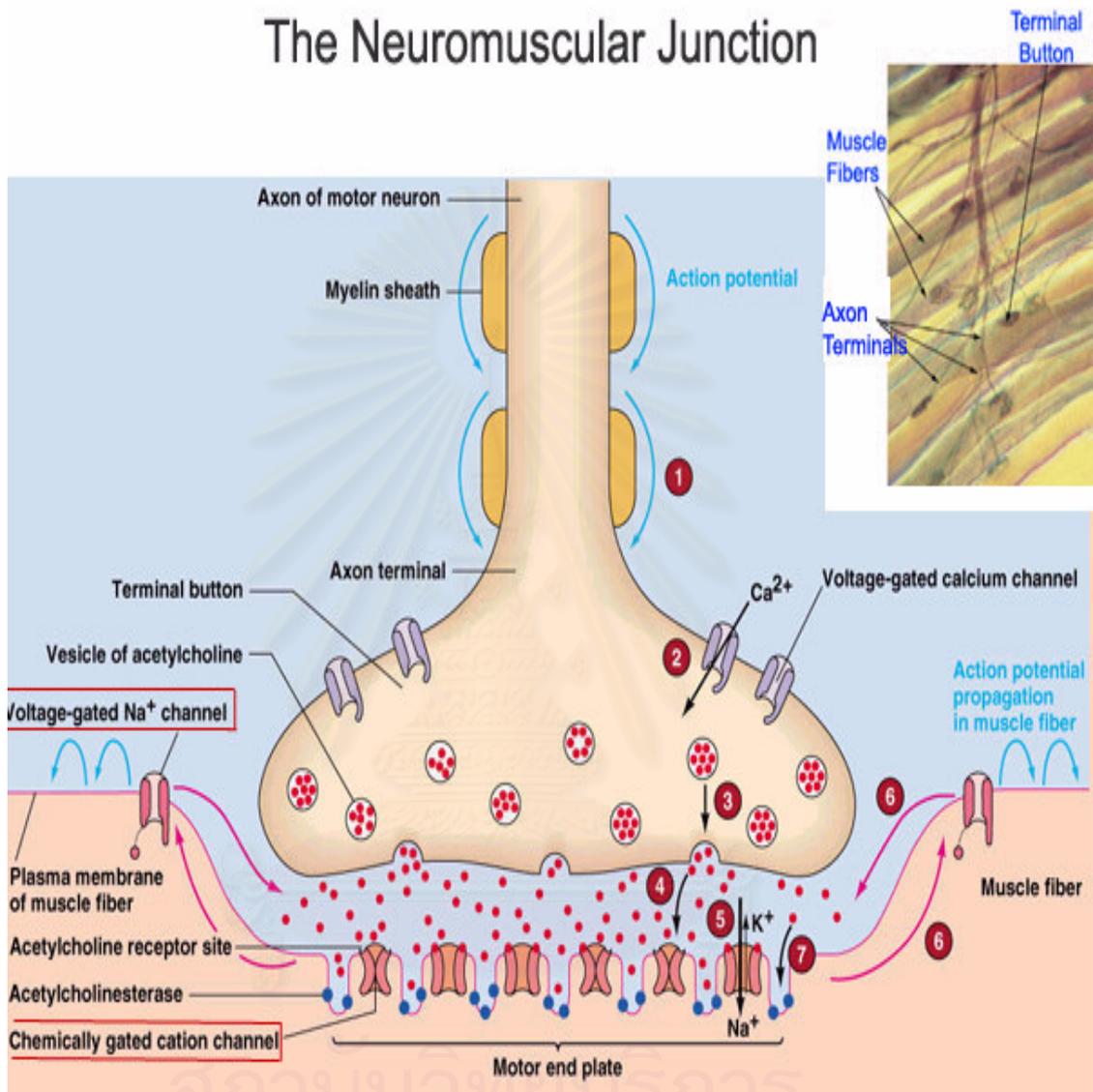
toxin ด้วยเหตุนี้จึงส่งผลให้ synaptic vesicles ไม่สามารถเชื่อมรวมเข้ากับ plasma membrane ที่ปลายประสาท ขั้วยังการปล่อยสารสื่อประสาท ทำให้เกิดการขั้วยังกล้ามเนื้อร่วมประสาทต่อไป (7)

ยาที่ออกฤทธิ์ขั้วยังกล้ามเนื้อร่วมประสาท โดยออกฤทธิ์ที่บริเวณ postsynaptic ตัวอย่างเช่น Tubocurarine chloride ซึ่งเป็น competitive neuromuscular blocker ที่เป็นยาคลายกล้ามเนื้อ และเคยถูกนำมาใช้ร่วมกับยาสลบก่อนทำการผ่าตัด จะออกฤทธิ์โดยแย่งจับกับ acetylcholine receptor ที่อยู่บน motor end plate ซึ่ง acetylcholine receptor ประกอบไปด้วย 4 subunits คือ 2α , β , γ และ δ ประกอบกันเป็น pentamer บริเวณที่ acetylcholine เข้ามาจับคือ α -subunits ซึ่งเป็นบริเวณที่ tubocurarine เข้ามาจับด้วยเช่นกัน แต่ subunits อื่นก็มีผลต่อการจับด้วย ตัวอย่างเช่น α -subunits 1 unit ร่วมกับ γ -subunits ทำให้การจับกับ acetylcholine สูงขึ้น แต่ถ้า α -subunits ร่วมกับ δ -subunits จะทำให้การจับกับ acetylcholine ต่ำลง ใน adult muscle γ -subunits จะถูกแทนที่ด้วย ϵ -subunits ซึ่ง ϵ -subunits นี้จะไวต่อ tubocurarine มากกว่า การแย่งจับกับ acetylcholine receptor นี้ทำให้ขั้วยังการทำงานของ acetylcholine ซึ่งจะ ทำให้ไม่เกิดการส่ง action potential ต่อไปได้ ส่งผลให้กล้ามเนื้อไม่เกิดการหดตัว (8)

นอกจากนี้ ยาที่มีผลต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อที่บริเวณ postsynaptic โดยออกฤทธิ์โดยตรงที่กล้ามเนื้อ ตัวอย่างเช่น ยา Dantrolene Sodium (hydantoin derivative) เป็นยาคลายกล้ามเนื้อที่ใช้ควบคุมการหดเกร็งของกล้ามเนื้อ ที่เกี่ยวเนื่องมาจากการบาดเจ็บที่ spinal cord, stroke, cerebral palsy หรือ multiple sclerosis และยังใช้ป้องกันและรักษา malignant hyperthermia ด้วย ซึ่งออกฤทธิ์โดยรบกวนการปล่อย Ca^{2+} จาก sarcoplasmic reticulum และมีผลต่อ CNS ทำให้เกิด drowsiness, dizziness และทำให้เกิดการอ่อนแรง (9)

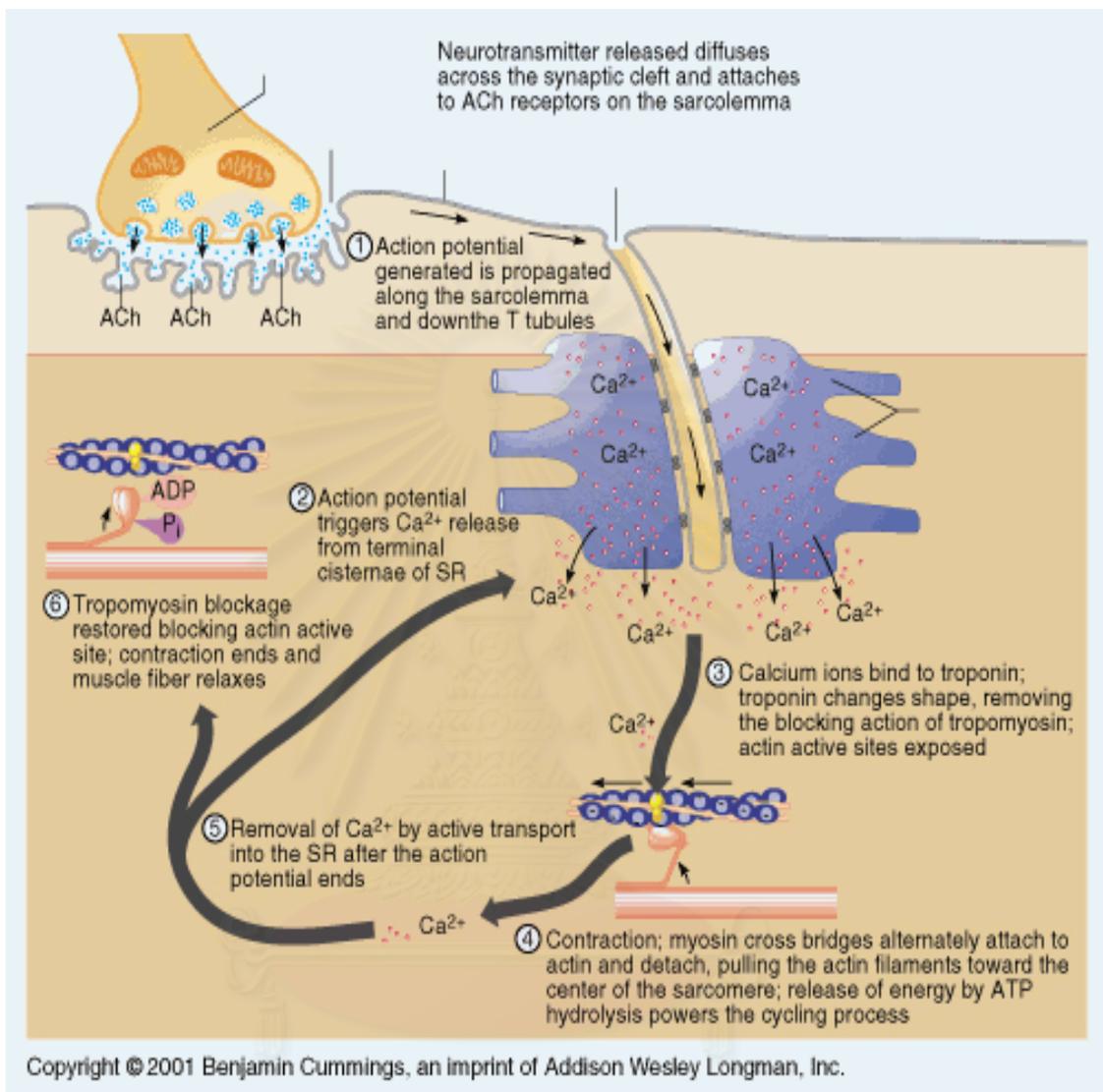
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

The Neuromuscular Junction



ภาพจาก www.colorado.edu

ภาพที่ 1 การสื่อสารที่บริเวณ neuromuscular junction



ภาพจาก <http://thebrain.mcgill.ca>

ภาพที่ 2 กระบวนการหดตัวของกล้ามเนื้อหลังการสื่อกระแสประสาท

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิษงู ประกอบด้วยโปรตีนเป็นส่วนใหญ่ มีทั้ง enzyme และ toxin โดยทั่วไป enzyme ในพิษงูจะออกฤทธิ์ 1) ทำให้หลอดเลือดฝอยเฉพาะที่ (local capillary) เสียหายและเกิดเนื้อตาย (tissue necrosis) ได้แก่ proteinases, phospholipase, arginine ester hydrolase และ hyaluronidase เป็นต้น 2) เปลี่ยนแปลงกระบวนการแข็งตัวและไม่แข็งตัวของเลือด ได้แก่ proteinases ชนิดต่าง ๆ และ phospholipase A เป็นต้น 3) ชักนำให้เกิดความดันต่ำ (hypotension) และความเจ็บปวดอย่างรุนแรงอันเนื่องมาจาก vasoactive peptides เช่น kinin-releasing enzyme (kininogenase) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมี enzyme อื่น ๆ ที่มีการรายงานว่าเป็นองค์ประกอบที่เป็นพิษ เช่น 5'-nucleotidase, phosphodiesterase และ enzyme อื่นที่เกี่ยวข้อง, cholinesterase และ L-amino acid oxidase เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานเกี่ยวกับ enzyme เหล่านี้ที่แยกได้เป็น fractions โดยวิธี chromatography และ electrophoresis นั้นไม่ก่อให้เกิดพิษอย่างรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิต เหตุที่ถูกรูปลักษณ์จะเสียชีวิตเนื่องจากความล้มเหลวของระบบหายใจ หรือระบบไหลเวียนโลหิต ซึ่งเป็นผลมาจากการทำงานของ neurotoxin, cardiotoxin, coagulation factors และสารอื่น ๆ ที่ออกฤทธิ์เดี่ยว ๆ หรือออกฤทธิ์ร่วมกัน ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพิษงูต่อเส้นประสาทและกล้ามเนื้อซึ่งมีผลเกี่ยวข้องกับระบบหายใจ มีความซับซ้อนเนื่องจากการออกฤทธิ์ร่วมกันขององค์ประกอบในพิษงู เช่น membrane toxin และ phospholipase A อาจจะมีผลต่อโครงสร้างของเส้นประสาทและกล้ามเนื้อ และ neurotoxin มีผลในการยับยั้งการส่งผ่านกระแสประสาทที่บริเวณกล้ามเนื้อร่วมประสาท neurotoxin แบ่งได้ 2 ชนิดคือ presynaptic neurotoxin และ postsynaptic neurotoxin โดย postsynaptic neurotoxin แบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ short neurotoxin ซึ่งมี 60-62 amino acid residues (4 disulfide bonds) และ long neurotoxin ซึ่งมี 71-74 amino acid residues (5 disulfide bonds) postsynaptic neurotoxin จะจับกับ acetylcholine receptor ที่บริเวณ motor end-plate ได้อย่างเจาะจงและเหนียวแน่น ซึ่งจะป้องกันไม่ให้เกิด depolarization อันเนื่องมาจาก acetylcholine ยับยั้งการสื่อกระแสประสาท ตัวอย่างเช่น Cobrotoxin ที่แยกได้จากพิษงูเห่าได้หวัน สำหรับ presynaptic neurotoxin ประกอบด้วย polypeptide chains 2 ชนิดที่ไม่เหมือนกัน คือ A chain ซึ่งมี 120 amino acid residues และ B chain มี 60 amino acid residues presynaptic neurotoxin ออกฤทธิ์โดยยับยั้งการหลั่ง acetylcholine จาก motor nerve terminal และยังพบ phospholipase A₂ activity นอกจากนี้ presynaptic neurotoxin บางชนิด สามารถออกฤทธิ์เป็น myonecrotic toxins ทำให้เกิดเนื้อตายได้ ตัวอย่างเช่น β -Bungarotoxin ที่แยกได้จากพิษงูสามเหลี่ยมได้หวัน (4, 10)



ภาพจาก <http://202.28.50.45/~neebio/biodiversity/show11.php?Page=15>

ภาพที่ 3 งูจงอาง (*Ophiophagus hannah*)

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

งูจงอาง เป็นงูพิษใน Family (วงศ์) Elapidae เป็นงูพิษที่ยาวที่สุดในโลก มีนิสัยค่อนข้างดุ สามารถแผ่แม่เบี้ยได้เช่นเดียวกับงูเห่า แต่แม่เบี้ยของงูจงอางจะเล็กกว่างูเห่าเมื่อเทียบกันตามสัดส่วน แม่เบี้ยของงูจงอาง ไม่มีลายดอกจันอย่างในงูเห่า แต่จะมีลายจาง ๆ พาดตามขวางเป็นบั้ง ๆ แทน นอกจากนี้งูจงอางยังมีเกล็ดบนหัวคู่พิเศษ 1 คู่ อยู่ด้านหลังของเกล็ดกระหม่อม เกล็ดคู่พิเศษนี้มีชื่อเรียกว่า occipitals ซึ่งในงูเห่าจะไม่มีเกล็ดคู่นี้ งูจงอางเป็นงูที่ออกหากินได้ทั้งในเวลากลางวันและคืนไม่ร้อนจัดและในเวลาพลบค่ำ อาหารหลักคืองูชนิดอื่น ๆ แม้กระทั่งงูเหลือมที่ตัวไม่โตนักก็เคยพบว่าเป็นเหยื่อของงูจงอาง นอกจากกินงูแล้ว บางครั้งงูจงอางอาจกินสัตว์จำพวกตะกวด กิ้งก่า ตุ๊กแก เป็นอาหาร การแพร่กระจายของงูจงอางในประเทศไทยพบได้ในป่าทุกภาค แต่พบทางใต้มากกว่า งูจงอางมีพิษทางระบบประสาทที่รุนแรงมาก เมื่อถูกงูจงอางกัดจะเกิดอาการกล้ามเนื้ออ่อนแรง หนังตาตก พูดไม่ชัด กลืนลำบาก เป็นอัมพาต และหายใจเองไม่ได้ (11) งูจงอางมี neurotoxin เป็นโปรตีนหลักที่มีฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้ออวัยวะประสาท

มีรายงานการแยกองค์ประกอบของพิษงูจงอางเพื่อนำมาศึกษา ดังนี้

Joubert และคณะ (12) ได้ทำการแยก toxin 2 ชนิดจากพิษงูจงอางด้วยเทคนิค ion-exchange chromatography โดยผ่านพิษงูลงในคอลัมน์ carboxymethyl (CM)-cellulose ได้ส่วนของพิษงู 4 ส่วน ส่วนที่ 2 และ 3 ซึ่งมีความเป็นพิษสูงถูกนำไปแยกให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยการใช้เทคนิค gel filtration chromatography โดยใช้ Sephadex G-50 เป็นตัวกลางในการแยก ส่วนที่ 2 แยกได้ 4 ส่วนย่อย มี 1 ส่วนย่อยที่เป็น major toxin (toxin a) ส่วนที่ 3 แยกได้ 3 ส่วนย่อย และมี 1 ส่วนย่อยที่เป็น major toxin (toxin b) Toxin a และ b ที่แยกได้มีน้ำหนักโมเลกุล 7,800 ดาลตัน เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และมีค่าความเป็นพิษ (Lethal dose₅₀, LD₅₀) เท่ากับ 0.3 และ 0.35 ไมโครกรัม/กรัม ตามลำดับ

Tan และคณะ (13) ได้ทำการแยกพิษงูจงอางด้วยวิธี ion-exchange chromatography โดยผ่านพิษงูลงในคอลัมน์ diethylaminoethyl (DEAE)-Sephacel ได้ส่วนของพิษงู 6 ส่วน ทำการหา enzyme activity ในส่วนของพิษงูที่แยกได้ พบว่า ส่วนที่เป็น major lethal toxin อยู่ใน ส่วนประกอบย่อยที่ 1 ซึ่งมี activity ของ 5'-Nucleotidase และ Phosphodiesterase

Chang และคณะ (14) ได้ทำการแยก postsynaptic neurotoxin (α -neurotoxin) จากพิษงูจงอางโดยใช้ sulfopropyl (SP)-Sephadex C-25, Sephadex G-50, CM-52 และ Reverse-phase – High performance liquid chromatography (RP-HPLC) neurotoxin ที่แยกได้เป็น basic polypeptide ที่มี pI (isoelectric point) 9.05 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 72 ตัว และ cysteine 10 ตัว toxin ที่แยกได้มีความคล้ายคลึงกับ α -bungarotoxin ที่แยกได้จากพิษงูสามเหลี่ยมได้วันถึง 60% และมีคุณสมบัติในการจับกับ nicotinic acetylcholine receptor ของปลาไหลไฟฟ้า (*Torpedo californica*)

Lin และคณะ (15) ได้ทำการแยก neurotoxin 2 ชนิด ได้แก่ Oh-6A และ Oh-6B จากพิษงูจงอางโดยผ่านพิษงูลงในคอลัมน์ SP-Sephadex C-25, CM-52 และ SynChropakRP-P Neurotoxin ที่แยกได้ประกอบด้วย กรดอะมิโน 70 ตัว และ cysteine 10 ตัว 46-53% ของลำดับกรดอะมิโนใน neurotoxin นี้มีความคล้ายคลึงกับ Oh-4, Oh-5, Toxin a และ Toxin b จากพิษงูเดียวกัน

Chang และคณะ (16) ได้แยก Oh9-1 ซึ่งเป็น neurotoxin ชนิดใหม่ มีโครงสร้างต่างจาก α -neurotoxin 6 ชนิดที่ได้มีการแยกมาแล้วก่อนหน้านี้ Oh9-1 แยกได้จากพิษงูจงอางโดยผ่านพิษงูลงในคอลัมน์ SP-Sephadex C-25 ได้ส่วนของพิษงู 9 ส่วน จากนั้นส่วนที่มี neurotoxin activity นำไปแยกต่อด้วยวิธี RP-HPLC โดยใช้ SynChropak RP-P ได้ส่วนย่อย 3 ส่วน ส่วนย่อยที่ 1

เป็นส่วนที่เป็น neurotoxin เมื่อนำไปหาลำดับกรดอะมิโน พบว่าประกอบด้วยกรดอะมิโน 57 ตัว และ cysteine 8 ตัว Oh9-1 สามารถยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อที่ถูกชักนำโดย carbachol แบบย้อนกลับไม่ได้ (irreversible) โดยไปจับกับ nicotinic acetylcholine receptor ที่ postsynaptic ความสามารถในการยับยั้งการหดตัวที่ 50% นี้คิดเป็น 4 เท่าของ α -bungarotoxin

De P และคณะ (17) ได้ทำการแยก CM36 จากพิษงูจงอาง โดยใช้ CM-Sephadex และ High performance liquid chromatography (HPLC) neurotoxin ที่แยกได้มีน้ำหนักโมเลกุล 15 กิโลดาลตัน มีค่าความเป็นพิษ 3.5 ไมโครกรัมต่อหนู 20 กรัม เมื่อนิ็ดพิษเข้าทางหลอดเลือดดำที่หางหนู กลไกความเป็นพิษต้องอาศัย Ca^{2+} แต่ไม่พบว่ามี phospholipase A_2 activity toxin CM36 ไม่มีผลต่อการทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจของหนูตะเภา ไม่มีผลต่อความดันเลือดของแมวและหนูขาว แต่มีผลต่อระบบหายใจในหนูแรทและหนูตะเภา

He และคณะ (18) ได้ทำการแยกส่วนพิษงูจงอางด้วยวิธี gel filtration โดยใช้ Sephadex G-50 ได้ส่วนของพิษงู 4 ส่วน ในส่วนที่ 4 มี neurotoxin activity จากนั้นนำส่วนที่ได้ไปแยกต่อโดยผ่านใน AKTA Source 15 S ได้ส่วนย่อย 9 ส่วน โดยส่วนที่ 1 ถึง 6 ได้ทำให้บริสุทธิ์ต่อด้วย RP-HPLC สุดท้ายได้ α -neurotoxin 7 ชนิด นำไปหาลำดับกรดอะมิโนเพื่อเปรียบเทียบกับ neurotoxin ที่ได้จากการ clone จากต่อมพิษงู

Pu และคณะ (19) ได้ทำการศึกษา hannalgesin ซึ่งเป็น neurotoxin ที่มี analgesic activity จากพิษงูจงอาง โดยทำการแยกพิษงูจงอางด้วย Sephadex C-25, G-50 column และ HPLC นำ hannalgesin มาทดสอบ analgesic effect ด้วย hot-plate test ซึ่งพบว่าเพิ่ม latency time ทดสอบ Rota-rod test พบว่าไม่ทำให้เกิด motor impairment แต่ในการทดสอบ Maximal electroshock seizure test ไม่พบฤทธิ์ป้องกันการชัก นอกจากนี้ยังพบว่าฤทธิ์ analgesic activity ของ hannalgesin มีส่วนเกี่ยวข้องกับ opioid และ nitric oxide

ดังที่กล่าวแล้ว พิษงูจงอางมีฤทธิ์เป็นพิษต่อระบบประสาท มีรายงานการศึกษาพิษงูชนิดอื่นรวมถึงพิษแมงมุมที่มีฤทธิ์เป็นพิษต่อระบบประสาท โดยเกี่ยวข้องกับการยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาท ดังนี้

Realii และคณะ (20) ทำการศึกษาพิษต่อประสาท (neurotoxic) และกล้ามเนื้อ (myotoxic) ของพิษงูเห่า (*Naja naja kaothia*) โดยทดสอบใน rat isolated phrenic nerve-diaphragm preparation และ chick biventer cervicis muscle preparation ทดสอบหา bioelectrical potentials และ phospholipase A_2 activity รวมถึงศึกษา morphometry ด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง พบว่าพิษ

งูเห่ามีฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาท โดยออกฤทธิ์ที่ postsynaptic รวมถึงพบ phospholipase A₂ activity ซึ่งพบว่ามีความเกี่ยวข้องในการยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาท และพบความเป็นพิษต่อกล้ามเนื้อด้วย

Cooper และ Reich (21) ได้ทำการแยก neurotoxin จากพิษงูเห่าพ่นพิษ (*Naja naja siamensis*) ด้วย phosphocellulose, Sephadex G-50 และ carboxymethylcellulose ทำการตรวจสอบด้วย polyacrylamide gel electrophoresis ที่ pH 4.3 และ pH 7.0 neurotoxin ถูกติดฉลากด้วย pyridoxal phosphate ตามด้วยการ reduction ของ Schiff's base ด้วย tritiated sodium borohydride การติดฉลากที่ toxin ทำให้เหลือความแรงของพิษ 50% ซึ่งยังคงแสดงฤทธิ์ยับยั้ง acetylcholine ที่บริเวณ motor end plate ของปลาไหลไฟฟ้า (*Electrophorus electricus*), rodents และ amphibia

Nirathanan และคณะ (22) ได้ทำการแยก mikatoxin (α -neurotoxin) จากพิษงู *Micropechis ikaheka* ด้วยวิธี gel filtration และ reverse-phase chromatography และนำมาตรวจสอบด้วยวิธี SDS-PAGE, Electrospray ionization mass spectrometry และหา N-terminal amino acid sequence จากนั้นทดสอบ enzyme activity พบว่าไม่มี phospholipase A₂ activity และ acetylcholinesterase activity นอกจากนี้พบว่า mikatoxin สามารถยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาท มีฤทธิ์ antagonism จับกับ postsynaptic nicotinic acetylcholine receptors โดยทดสอบใน chick biventer cervicis muscle preparation และ mouse phrenic nerve-hemidiaphragm muscle preparation แต่ไม่พบฤทธิ์ยับยั้ง ganglionic transmission ใน guinea pig ileum และ ไม่พบการยับยั้ง muscarinic responses ใน rat anococcygeus

Rossetto และคณะ (23) ได้รายงานการศึกษาเกี่ยวกับ presynaptic neurotoxin เกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทใน Clostridium neurotoxins และ Snake neurotoxins ที่มี phospholipase A₂ activity โดยจะกล่าวถึงโครงสร้างของ toxin กลไกการออกฤทธิ์ และการนำไปใช้ทางคลินิก ซึ่ง Clostridium neurotoxins มีกลไกการออกฤทธิ์ดังที่กล่าวไว้แล้วข้างต้น สำหรับ Snake neurotoxins ที่มี phospholipase A₂ activity กลไกการออกฤทธิ์ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่อาจเป็นไปได้ว่ามีการเริ่มต้นโดย phospholipase A₂ neurotoxin ชักนำให้เกิดการเชื่อมรวมกันของ synaptic vesicles กับ plasma membrane โดยไม่มีการคืนกลับสู่สภาพเดิม (retrieval) toxin จะจับกับ membrane ผ่านทาง neurotoxin receptor และผลิตภัณฑ์ (products) ที่ได้จากปฏิกิริยา hydrolysis ของ phospholipase A₂ จะปรับเปลี่ยน physiological function ในแนวทางที่ส่งเสริมให้เกิด neuroexocytosis นอกจากนี้ fatty acid และ lysophospholipid ซึ่งคาดว่าถูกผลิตโดย

phospholipase A₂ จะเปลี่ยนแปลงรูปร่างและหน้าที่ของ organelles ต่าง ๆ ที่อยู่บริเวณ synaptic terminal

Kuruppu และคณะ (24) ได้ทำการศึกษา presynaptic neuromuscular activity ของพิษงู *Glyphodon tristis* โดยทดสอบใน chick biventer cervicis muscle preparation ทดสอบหา phospholipase A₂ activity และ ศึกษา morphology พบว่าพิษงูมีฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทโดยออกฤทธิ์ที่ presynaptic และพบความเป็นพิษต่อกล้ามเนื้อด้วย

Damico และคณะ (25) ได้ทำการศึกษาพิษต่อประสาท (neurotoxic) และกล้ามเนื้อ (myotoxic) ของพิษงู *Lachesis muta muta* โดยทดสอบใน mouse phrenic nerve-diaphragm muscle preparation และ chick biventer cervicis muscle preparation ทดสอบ creatine kinase release และ phospholipase A₂ activity รวมถึงศึกษา morphometry ด้วยกล้อง Light microscope พบว่าพิษงูมีฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาท โดยออกฤทธิ์ที่ postsynaptic แต่ต้องใช้พิษงูที่ความเข้มข้นสูง จึงเป็นไปได้ว่าอาจออกฤทธิ์ที่ presynaptic ด้วย และพบว่าพิษงูมีความเป็นพิษต่อกล้ามเนื้อ

Fontana และคณะ (26) ได้ทำการทดสอบฤทธิ์และศึกษากลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทของพิษแมงมุม *Theraphosa blondii* ใน mouse phrenic-nerve diaphragm โดยทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทเมื่อกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้า และกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า และวัด Intracellular bioelectrical potential ที่บริเวณ endplate ของกล้ามเนื้อกระบังลม พบว่าพิษแมงมุมมีฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาท และถูกต้านฤทธิ์ด้วย neostigmine ได้เล็กน้อย เมื่อทำการล้างพิษออกไป กล้ามเนื้อสามารถกลับมาหดตัวได้บ้างเล็กน้อย แต่พิษแมงมุมไม่มีผลต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า membrane potential ของ muscle fibers ไม่ถูกเปลี่ยนแปลงไปโดยพิษแมงมุม แต่พิษแมงมุมมีผลในการลด endplate potential และทำให้หมดไปในที่สุด

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สัตว์ทดลอง

หนูพันธุ์ Swiss albino mice เพศผู้ น้ำหนัก 30-40 กรัม สั่งซื้อจากสถานเสาวภา สภากาชาดไทย (มาตรฐาน GMP) พักสัตว์ก่อนทำการทดลองที่ศูนย์สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (มาตรฐาน SPF) โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 °C ภายใต้อุณหภูมิ 12 ชั่วโมง light/dark cycle โดยไม่จำกัดอาหารและน้ำ

2. เครื่องมือและอุปกรณ์

2.1 ชุดอุปกรณ์ Organ bath แบบ Double Walled Harvard Type ขนาด 25 ml

ประกอบด้วยหลอดแก้ว 2 ชั้น มีช่องเปิดให้ Gas Carbogen (95% O₂ + 5% CO₂) ไหลผ่านเข้าสู่ชั้นในซึ่งใช้บรรจุ Physiological Solution สำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อ ชั้นนอกมีน้ำไหลเวียนอยู่เพื่อควบคุมอุณหภูมิของ Oxygenated Physiological Solution ที่อยู่ชั้นในให้คงที่ที่ 37 องศาเซลเซียส ตลอดการทดลอง โดยใช้ Thermo regulating water pump

2.2 ถังบรรจุก๊าซ Carbogen (95% O₂ + 5% CO₂)

2.3 เครื่องรับสัญญาณสำหรับวัดการหดตัวของเนื้อเยื่อ

2.4 เครื่องแปลงสัญญาณ

2.5 เครื่องปรับแต่งสัญญาณ Bridge Amp

2.6 เครื่องบันทึกสัญญาณและแสดงผลรุ่น Biopac Lab Pro MP100

2.7 เครื่องกระตุ้นไฟฟ้า (stimulator)

2.8 Suction electrode และ unipolar electrode

2.9 ชุดเครื่องมือผ่าตัดเล็ก

2.10 เครื่องชั่งแบบละเอียด

2.11 โพลีเมรีฟอสฟอรัสที่มีต่อไปยังถึงก๊าซ carbogen

3. สารเคมี

3.1 สารเคมีที่ใช้เตรียมสารละลาย Krebs solution

- Sodium chloride (Merck, Germany); Potassium chloride (Merck, Germany); Calcium chloride (Merck, Germany); Magnesium sulphate (Merck, Germany); Potassium dihydrogen Phosphate (Merck, Germany); Sodium hydrogen carbonate (Merck, Germany); Glucose (Merck, Germany)

3.2 Acetylcholine iodide (Sigma, U.S.A)

3.3 Tubocurarine chloride (Sigma, U.S.A)

3.4 สารทดสอบ

- พิษงูจงอาง (crude venom) จัดซื้อจากสถานเสาวภา สภากาชาดไทย อยู่ในรูปผงแห้ง สีเหลืองอ่อน ได้จากงูจงอางที่มีแหล่งอาศัยอยู่ในเขตจังหวัดเพชรบูรณ์ ในการทดลองจะละลายพิษงูด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการ

ทำการแยกส่วนพิษงูจงอาง โดย คุณอรวรรณ แซ่โล้ว นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ ระดับ 7 ฝ่ายวิจัยและพัฒนา สถานเสาวภา สภากาชาดไทย ให้ได้ส่วน (fractions) และส่วนกึ่งบริสุทธิ์ (semi-purified fractions) เพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อเรียบประสาท ดังนี้

- fractions 1 – 7 (F1 – F7) อยู่ในรูปผงแห้ง สีขาว ได้จากการแยกส่วนพิษงูจงอาง โดยนำพิษงูจงอางผ่านลงใน Q-Sepharose column การแยกส่วนนี้เป็นการแยกด้วยวิธี Ion exchange chromatography อาศัยหลักการแยกส่วนตามความแตกต่างของจำนวนประจุผลลัพท์ (net charge) บนโมเลกุลของสารต่าง ๆ ที่ต้องการแยก ซึ่ง Q-Sepharose จะทำหน้าที่เป็น Anion exchanger มีคุณสมบัติในการจับกับสารที่มีประจุลบ การแยกเกิดขึ้นได้เนื่องจากสารต่างชนิดกันมีความสามารถในการจับกับ Anion exchanger แตกต่างกันตามความแตกต่างของจำนวนประจุลบบนโมเลกุลของสารเหล่านั้น (27) chromatogram ที่ได้จากการแยกส่วนแสดงไว้ในภาคผนวก ทำการคิด % yield ของโปรตีนของแต่ละส่วนที่ได้ โดยคิดเปอร์เซ็นต์ตามปริมาณโปรตีนของแต่ละส่วน โดยให้ปริมาณโปรตีนของพิษงูก่อนทำการแยกส่วนเป็น 100%

- fractions 1.1 – 1.3 (F1.1 – F1.3) อยู่ในรูปผงแห้ง สีขาว ได้จากการแยก F1 โดยนำ F1 ผ่านลงใน Cellulofine GCL-1000 sf column การแยกส่วนนี้เป็นการแยกด้วยวิธี Gel filtration chromatography มีหลักการแยกส่วนตามขนาดและน้ำหนักของโมเลกุลโดยอาศัยการกรองผ่านรูพรุน (molecular sieving) ของตัวค้ำจุนที่เรียกว่า gel ซึ่ง Cellulofine GCL-1000 sf จะทำหน้าที่เป็นตัวค้ำจุน ขนาดของรูพรุน (pore size) ที่อยู่ภายในเม็ด gel จะเป็นตัวกำหนดขนาดโมเลกุลของสารที่จะลอดผ่านได้ โดยสารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่าขนาดของรูจะลอดผ่านไม่ได้ แต่จะเคลื่อนผ่านลงมาตามช่องว่างระหว่างเม็ด gel จึงสามารถแยกสารที่มีขนาดโมเลกุลต่างกันออกจากกันได้ (27) chromatogram ที่ได้จากการแยกส่วนแสดงไว้ในภาคผนวก ทำการคิด % yield ของโปรตีนของแต่ละส่วนที่ได้ โดยคิดเปอร์เซ็นต์ตามปริมาณโปรตีนของแต่ละส่วน โดยให้ปริมาณโปรตีนของ F1 ก่อนทำการแยกส่วนเป็น 100%

- semi-purified fractions 1.2.1 – 1.2.4 (F1.2.1 – F1.2.4) อยู่ในรูปผงแห้ง สีขาว ได้จากการแยก F1.2 โดยนำ F1.2 ผ่านลงใน SP-Sepharose column การแยกส่วนนี้เป็นการแยกด้วยวิธี Ion exchange chromatography ซึ่ง SP-Sepharose ทำหน้าที่เป็น Cation exchanger มีคุณสมบัติในการจับกับสารที่มีประจุบวก การแยกเกิดขึ้นได้เนื่องจากสารต่างชนิดกันมีความสามารถในการจับกับ Cation exchanger แตกต่างกันตามความแตกต่างของจำนวนประจุบวกบนโมเลกุลของสารเหล่านั้น (27) chromatogram ที่ได้จากการแยกส่วนแสดงไว้ในภาคผนวก ทำการคิด % yield ของโปรตีนของแต่ละส่วนที่ได้ โดยคิดเปอร์เซ็นต์ตามปริมาณโปรตีนของแต่ละส่วน โดยให้ปริมาณโปรตีนของ F1.2 ก่อนทำการแยกส่วนเป็น 100%

ในการทดลองจะละลายแต่ละส่วนด้วยน้ำกลั่น ให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการ ความเข้มข้นของแต่ละส่วนที่ใช้ จะคำนวณโดย แต่ละส่วนมี % yield ของโปรตีนเท่าไร คิดความเข้มข้นตามเปอร์เซ็นต์นั้น โดยให้ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองของสารตั้งต้นเป็น 100% ตัวอย่างเช่น สารตั้งต้นคือ พืชจางอง ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองคือ 80 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อแยกส่วนแล้ว ได้ F1 ซึ่งมี % yield ของโปรตีนคือ 38.1% คำนวณความเข้มข้นที่ใช้โดย 38.1% ของ 80 $\mu\text{g/ml}$ มีค่าเท่ากับ 30.5 $\mu\text{g/ml}$ ดังนั้นจึงใช้ F1 ที่ความเข้มข้น 30.5 $\mu\text{g/ml}$ ในการทดลอง เป็นต้น



ภาพที่ 4 ขั้นตอนการแยกส่วนพิษงูจงอาง

สถาบันวิจัยพิษวิทยา
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



เครื่องบันทึกสัญญาณและแสดงผล



เครื่องแปลงสัญญาณและเครื่องปรับแต่งสัญญาณ



เครื่องกระตุ้นไฟฟ้า



เครื่องรับสัญญาณการหดตัวของเนื้อเยื่อ



Organ bath ขนาด 25 ml สำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ภาพที่ 5 ชุดเครื่องมือสำหรับศึกษา phrenic nerve – hemi-diaphragm preparation ที่แยกจากกายหนู
เมาส์

4. วิธีดำเนินการวิจัย

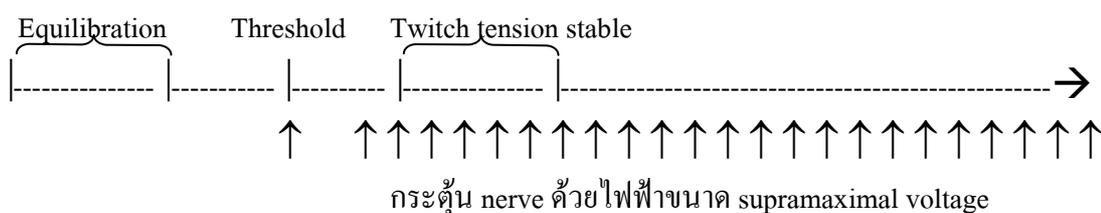
4.1 เตรียม mouse phrenic nerve – hemi-diaphragm preparation

- ทำการสลบหนูด้วย CO₂ (95% CO₂ + 5% O₂) โดยใส่หนูลงในโหลมีฝาปิดที่ต่อกับถังบรรจุก๊าซ CO₂ เปิดให้ก๊าซ CO₂ เข้าไปในโหล และเฝ้าสังเกตว่าหนูสลบถึงหมดความรู้สึก และตายในที่สุด จากนั้นทำการผ่าตัดแยก mouse phrenic nerve – hemi-diaphragm (28) ทันทีก
- นำ mouse phrenic nerve – hemi-diaphragm มาใส่ใน organ bath ที่บรรจุ oxygenated (95% O₂ + 5% CO₂) Krebs solution ซึ่งส่วนประกอบและวิธีเตรียมแสดงไว้ในภาคผนวก สำหรับเลี้ยงกล้ามเนื้อกระบังลม ผูกปลายล่างของกล้ามเนื้อยึดกับก้น organ bath ผูกปลายบนกับตะขอที่ต่อกับ transducer แยกกล้ามเนื้อกระบังลมไว้ภายใต้แรงตึงขณะพัก (resting tension) ประมาณ 0.8 กรัม และอุณหภูมิ 37 °C ส่วนเส้นประสาท phrenic nerve จะถูกสอดไว้ใน suction electrode เพื่อไม่ให้เกิดการกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงเมื่อทำการกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้า

4.2 ทดสอบการหดตัวของกล้ามเนื้อกระบังลม เมื่อกระตุ้น phrenic nerve ด้วย

ไฟฟ้าโดยใช้ suction electrode (control, n = 5)

- เตรียม mouse phrenic nerve – hemi-diaphragm ตามวิธีเตรียมข้อ 4.1
- พักเนื้อเยื่อให้อยู่ในภาวะสมดุล (equilibrium) 30 นาที จากนั้นทำการกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้าที่ขนาดต่างๆ โดยเริ่มต้นที่ 0.5 โวลต์ ในความถี่ (frequency) 0.1 Hertz (Hz) และระยะเวลาในการกระตุ้น (duration) 0.2 millisecond (ms) โดยใช้ suction electrode
- สังเกตกระแสไฟฟ้าที่ทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อ (ระดับ Threshold) และบันทึกค่าแรงตึงที่เกิดขึ้นจากการหดตัวของกล้ามเนื้อ (twitch tension)
- คำนวณหา supramaximal voltage (4 x Threshold) จากกระแสไฟฟ้าระดับ Threshold
- หยุดกระตุ้นด้วยไฟฟ้าและพักประมาณ 5 นาที จากนั้นทำการกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้าที่ขนาด supramaximal voltage, frequency 0.1 Hz และ duration 0.2 ms โดยใช้ suction electrode
- บันทึกค่า twitch tension ตามเวลาต่าง ๆ จนกระทั่งไม่มีการหดตัวของกล้ามเนื้อ (twitch tension มีค่าเท่ากับ resting tension) แสดงว่ากล้ามเนื้อไม่ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า
- เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง twitch tension (%) กับเวลา จะได้ระยะเวลาที่กล้ามเนื้อมีความคงทนสามารถเกิดการหดตัวได้เมื่อกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้า เลือกช่วงเวลาที่กล้ามเนื้อเกิดการหดตัวคงที่มาใช้ในการทดลอง



ภาพที่ 6 ภาพประกอบคำอธิบายการทดลองที่ 4.2

4.3 ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทของพิษงูจงอาง (n = 5)

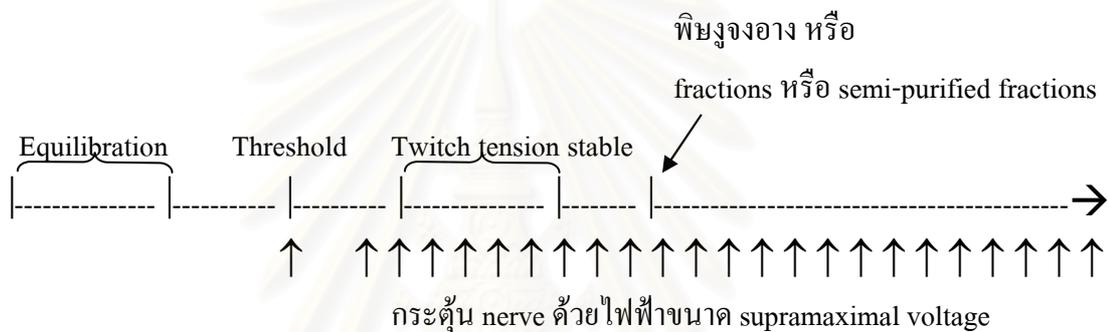
- เตรียม mouse phrenic nerve – hemi-diaphragm ตามวิธีเตรียมข้อ 4.1
- พักเนื้อเยื่อให้อยู่ในภาวะ equilibrium 30 นาที จากนั้น ทำการกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้าที่ขนาด supramaximal voltage, frequency 0.1 Hz และ duration 0.2 ms โดยใช้ suction electrode
- บันทึกค่า twitch tension และปล่อยให้ twitch tension มีความคงที่ (stable) 10 นาที
- ทำการทดสอบผลของพิษงูจงอางต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อ โดยใส่พิษงูจงอางที่ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 100 μ l ให้ความเข้มข้น 5, 10, 20, 40, 80 หรือ 160 μ g/ml ใน organ bath
- บันทึกค่า twitch tension ที่เปลี่ยนแปลงหลังให้พิษงูจงอางในแต่ละความเข้มข้น สังเกตผลต่อไปจนกระทั่ง twitch tension คงที่ (ระยะเวลาที่ดูผลจะอยู่ในช่วงที่ twitch tension มีความคงที่)
- เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง twitch tension (%) กับความเข้มข้นของพิษงูจงอางที่ใช้ ทำการเลือกความเข้มข้นของพิษงูจงอางน้อยที่สุดที่ทำให้เกิดฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทมากที่สุด และความเข้มข้นนั้นต้องให้ผลคงที่เช่นเดิมเมื่อมีการทำซ้ำใหม่ (reproducible)
- ใช้ความเข้มข้นของพิษงูจงอางที่เลือกไว้เป็นค่าตั้งต้นในการคำนวณหาความเข้มข้นของ F1 – F7 ซึ่งจะคำนวณตาม % yield ของโปรตีน ที่ได้จากการแยกส่วนของแต่ละ fraction

4.4 ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทของ F1 – F7, F1.1 – F1.3 และ

F1.2.1 – F1.2.4 (n = 5)

- เตรียม mouse phrenic nerve – hemi-diaphragm ตามวิธีเตรียมข้อ 4.1
- พักเนื้อเยื่อให้อยู่ในภาวะ equilibrium 30 นาที จากนั้น ทำการกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้าที่ขนาด supramaximal voltage, frequency 0.1 Hz และ duration 0.2 ms โดยใช้ suction electrode
- บันทึกค่า twitch tension และปล่อยให้ twitch tension มีความคงที่ (stable) 10 นาที
- ทำการทดสอบผลของ F1 – F7, F1.1 – F1.3 หรือ F1.2.1 – F1.2.4 ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อ โดยใส่ F1 – F7, F1.1 – F1.3 หรือ F1.2.1 – F1.2.4 ที่ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 100 μ l ให้ความเข้มข้นใน organ bath ตามที่คำนวณได้ตาม % yield ของโปรตีน

- บันทึกค่า twitch tension ที่เปลี่ยนแปลงหลังให้แต่ละ fractions สังเกตผลต่อไปจนกระทั่ง twitch tension คงที่ (ระยะเวลาที่ดูผลจะอยู่ในช่วงที่ twitch tension มีความคงที่)
- เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง twitch tension (%) กับเวลา
- สำหรับ F1 – F7 และ F1.1 – F1.3 เลือก fraction ที่ใช้เวลาน้อยที่สุดในการยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อ 50% (50% inhibition) เพื่อนำไปทำการแยกส่วนให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นต่อไป
- สำหรับ F1.2.1 – F1.2.4 เลือก semi-purified fractions ที่มีฤทธิ์ที่ดีในการยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาท เพื่อนำไปศึกษากลไกเบื้องต้นในการออกฤทธิ์ต่อไป



ภาพที่ 7 ภาพประกอบคำอธิบายการทดลองที่ 4.3 และ 4.4

4.5 ศึกษากลไกเบื้องต้นในการออกฤทธิ์ของส่วนกิ่งบริสุทธ์ ที่มีฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาท ได้แก่ F1.2.2 – F1.2.4

4.5.1 ทดสอบการออกฤทธิ์ที่บริเวณ pre- หรือ postsynaptic ของส่วนกิ่งบริสุทธ์

4.5.1.1 ทดสอบการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นด้วย exogenous acetylcholine ก่อนและหลังการกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้า (control, n = 5)

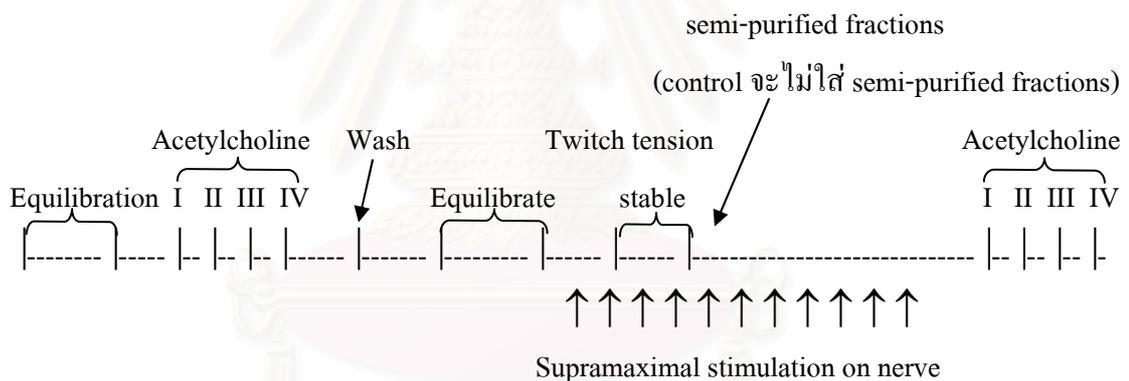
- เตรียม mouse phrenic nerve – hemi-diaphragm ตามวิธีเตรียมข้อ 4.1
- พักเนื้อเยื่อให้อยู่ในภาวะ equilibrium 30 นาที จากนั้นใส่ acetylcholine iodide ที่ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 100 μ ให้ได้ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M ใน organ bath ทุก 5 นาที แบบสะสมที่ละความเข้มข้น

- บันทึกค่า twitch tension ที่เกิดขึ้น หลังกระตุ้นให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อด้วย acetylcholine iodide ในแต่ละความเข้มข้น นำผลที่ได้ไปสร้างกราฟ dose-response curve ของ mouse phrenic nerve – hemi-diaphragm เมื่อกระตุ้นด้วย acetylcholine ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ
- ทำการล้างเนื้อเยื่อทุก 3 นาที จำนวน 10 ครั้ง โดยทิ้ง oxygenated Krebs solution ที่มีอยู่เดิมใน organ bath และเติม oxygenated Krebs solution ใหม่ลงไป
- พักเนื้อเยื่อให้อยู่ในภาวะ equilibrium 30 นาที จากนั้นกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้าที่ขนาด supramaximal voltage, frequency 0.1 Hz และ duration 0.2 ms โดยใช้ suction electrode
- บันทึกค่า twitch tension และปล่อยให้การหดตัวของกล้ามเนื้อดำเนินไป 60 นาที จากนั้นหยุดกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้าและพักประมาณ 5 นาที
- ใส่ acetylcholine iodide อีกครั้ง ที่ปริมาตร 100 μ l ให้ได้ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M ใน organ bath ทุก 5 นาที แบบสะสมทีละความเข้มข้น
- บันทึกค่า twitch tension ที่เกิดจากการกระตุ้นให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อด้วย acetylcholine iodide ในแต่ละความเข้มข้น นำผลที่ได้ไปสร้างกราฟ dose-response curve ของ mouse phrenic nerve – hemi-diaphragm เมื่อกระตุ้นด้วย acetylcholine ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ
- เปรียบเทียบ dose-response curve ของ mouse phrenic nerve – hemi-diaphragm เมื่อกระตุ้นด้วย acetylcholine ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ทั้งก่อนและหลังการกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้า

4.5.1.2 ทดสอบการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นด้วย acetylcholine หลังการเกิด neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก semi-purified fractions (n = 5)

- เตรียม mouse phrenic nerve – hemi-diaphragm ตามวิธีเตรียมข้อ 4.1
- พักเนื้อเยื่อให้อยู่ในภาวะ equilibrium 30 นาที จากนั้นใส่ acetylcholine iodide ที่ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 100 μ l ให้ได้ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M ใน organ bath ทุก 5 นาที แบบสะสมทีละความเข้มข้น
- บันทึกค่า twitch tension ที่เกิดขึ้น หลังกระตุ้นให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อด้วย acetylcholine iodide ในแต่ละความเข้มข้น นำผลที่ได้ไปสร้างกราฟ dose-response curve ของ mouse phrenic nerve – hemi-diaphragm เมื่อกระตุ้นด้วย acetylcholine ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ
- ทำการล้างเนื้อเยื่อทุก 3 นาที จำนวน 10 ครั้ง โดยทิ้ง oxygenated Krebs solution ที่มีอยู่เดิมใน organ bath และเติม oxygenated Krebs solution ใหม่ลงไป
- พักเนื้อเยื่อให้อยู่ในภาวะ equilibrium 30 นาที จากนั้นกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้าที่ขนาด supramaximal voltage, frequency 0.1 Hz และ duration 0.2 ms โดยใช้ suction electrode

- ปล่อยให้ twitch tension มีความคงที่ (stable) 10 นาที จึงใส่แต่ละ semi-purified fractions ปริมาตร 100 μ ให้ได้ความเข้มข้นใน organ bath เท่ากับที่ใช้ในข้อ 4.4
- เมื่อเกิด neuromuscular blockade แล้วยังคงกระตุ้นเส้นประสาทต่อไปจนครบ 60 นาที จากนั้นหยุดกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้าและพักประมาณ 5 นาที
- ใส่ acetylcholine iodide อีกครั้ง ที่ปริมาตร 100 μ ให้ได้ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M ใน organ bath ทุก 5 นาที แบบสะสมทีละความเข้มข้น
- บันทึกค่า twitch tension ที่เกิดจากการกระตุ้นให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อด้วย acetylcholine iodide ในแต่ละความเข้มข้น นำผลที่ได้ไปสร้างกราฟ dose-response curve ของ mouse phrenic nerve – hemi-diaphragm เมื่อกระตุ้นด้วย acetylcholine ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ
- เปรียบเทียบ dose-response curve ของ mouse phrenic nerve – hemi-diaphragm เมื่อกระตุ้นด้วย acetylcholine ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ทั้งก่อนและหลังการเกิด neuromuscular blockade อันเนื่องมาจากแต่ละ semi-purified fractions



ภาพที่ 8 ภาพประกอบคำอธิบายการทดลองที่ 4.5.1

4.5.2 ทดสอบการออกฤทธิ์ของส่วนกิ่งบริสุทธิ์ ในการยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อกระบังลม เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า

4.5.2.1 ทดสอบหาความเข้มข้นของ Tubocurarine chloride (n = 3)

- เตรียม mouse phrenic nerve – hemi-diaphragm ตามวิธีเตรียมข้อ 4.1
- พักเนื้อเยื่อให้อยู่ในภาวะ equilibrium 30 นาที จากนั้น ทำการกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้าที่ขนาด supramaximal voltage, frequency 0.1 Hz และ duration 0.2 ms โดยใช้ suction electrode
- บันทึกค่า twitch tension และปล่อยให้ twitch tension มีความคงที่ (stable) 10 นาที

- ทำการทดสอบผลของ Tubocurarine chloride ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อ โดยใช้ Tubocurarine chloride ที่ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 100 μ l ให้ได้ความเข้มข้น 2.5, 5, 10 or 20 μ M ใน organ bath
- บันทึกค่า twitch tension ที่เปลี่ยนแปลงหลังให้ Tubocurarine chloride ในแต่ละความเข้มข้น เมื่อ twitch tension ลดลงจนเหลือ 5% หรือน้อยกว่า หรือจนกระทั่งคงที่ สังเกตผลต่อไปจนครบ 2 ชั่วโมง (Tubocurarine chloride สามารถจับกับ acetylcholine receptor ได้ตลอดจนครบระยะเวลาที่ทำการทดลอง ซึ่ง neuromuscular transmission จะถูกปิดกั้นไว้ตลอดจนครบระยะเวลาที่ทำการทดลองด้วยเช่นกัน)
- เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง twitch tension (%) กับความเข้มข้นของ Tubocurarine chloride ที่ใช้ และเลือกความเข้มข้นของ Tubocurarine chloride น้อยที่สุดที่ทำให้เกิดฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทมากที่สุด และความเข้มข้นนั้นต้องให้ผลคงที่เช่นเดิมเมื่อมีการทำซ้ำใหม่

4.5.2.2 ทดสอบการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า

โดยใช้ unipolar electrode (n = 5)

- เตรียม mouse phrenic nerve – hemi-diaphragm ตามวิธีเตรียมข้อ 4.1
- พักเนื้อเยื่อให้อยู่ในภาวะ equilibrium 30 นาที จากนั้น ทำการกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้าที่ระดับ supramaximal voltage, frequency 0.1 Hz และ duration 2 ms โดยใช้ unipolar electrode
- บันทึกค่า twitch tension ตามเวลาต่าง ๆ จนกระทั่งไม่มีการหดตัวของกล้ามเนื้อ (twitch tension มีค่าเท่ากับ resting tension) แสดงว่ากล้ามเนื้อไม่ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า
- เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง twitch tension (%) กับเวลา จะได้ระยะเวลาที่กล้ามเนื้อมีความคงทนสามารถเกิดการหดตัวได้เมื่อกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้า

4.5.2.3 ทดสอบการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า

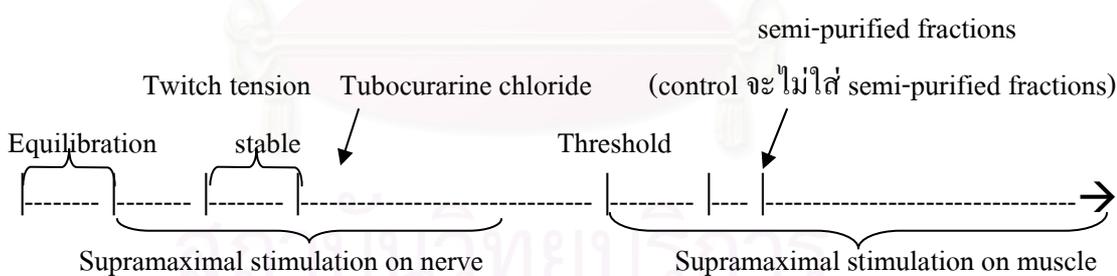
โดยใช้ unipolar electrode หลังการปิดกั้น neuromuscular transmission (control, n = 5)

- เตรียม mouse phrenic nerve – hemi-diaphragm ตามวิธีเตรียมข้อ 4.1
- ปิดกั้น neuromuscular transmission โดยใช้ Tubocurarine chloride ตามความเข้มข้นที่เลือกไว้ในวิธีทดลองข้อ 4.5.2.1
- หยุดกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้า จากนั้นทำการกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้าที่ระดับ supramaximal voltage, frequency 0.1 Hz และ duration 2 ms โดยใช้ unipolar electrode
- บันทึกค่า twitch tension ตามเวลาต่าง ๆ จนกระทั่งไม่มีการหดตัวของกล้ามเนื้อ (twitch tension มีค่าเท่ากับ resting tension) แสดงว่ากล้ามเนื้อไม่ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า

- เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง twitch tension (%) กับเวลา จะได้ระยะเวลาที่กล้ามเนื้อ มีความคงทนสามารถเกิดการหดตัวได้เมื่อกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้า

4.5.2.4 ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อกระบังลมของ semi-purified fractions เมื่อทำการกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า (n = 5)

- เตรียม mouse phrenic nerve – hemi-diaphragm ตามวิธีเตรียมข้อ 4.1
- ปิดกั้น neuromuscular transmission โดยใช้ Tubocurarine chloride ตามความเข้มข้นที่เลือกไว้ในวิธีทดลองข้อ 4.5.2.1
- หยุดกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้า จากนั้นทำการกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้าที่ระดับ supramaximal voltage, frequency 0.1 Hz และ duration 2 ms โดยใช้ unipolar electrode
- เมื่อทำการกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้าที่ระดับ supramaximal voltage แล้ว 5 นาที จึงใส่แต่ละ semi-purified fractions ปริมาตร 100 μ l ให้ได้ความเข้มข้นใน organ bath เท่ากับที่ใช้ในข้อ 4.4
- บันทึกค่า twitch tension ที่เกิดขึ้น สังเกตผลต่อไปจนครบ 1.5 ชั่วโมง
- เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง twitch tension (%) กับเวลา
- พิจารณาการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อทำการกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า ทั้งที่ใส่และไม่ใส่ semi-purified fractions ลงไป



ภาพที่ 9 ภาพประกอบคำอธิบายการทดลองที่ 4.5.2.3 และ 4.5.2.4

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ฤทธิ์ต่อกล้ามเนื้อร่วมประสาทของพิษงูหรือส่วนของพิษงู โดยพิจารณาค่า twitch tension (%) กับเวลา แสดงผลโดยใช้ค่าเฉลี่ยร้อยละ \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (Mean \pm S.E.M.) ทดสอบค่าทางสถิติโดยใช้ ANOVA (Tukey) และ paired t-Test พิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ($p < 0.05$)

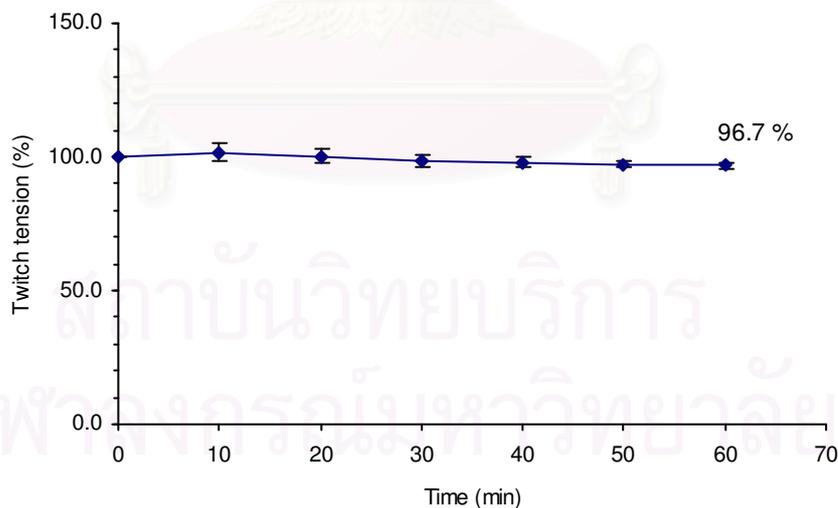
บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อพร้อมประสาทของพิษงูจงอางและ fractions

1.1 การหดตัวของกล้ามเนื้อกระบังลม เมื่อกระตุ้น phrenic nerve ด้วยไฟฟ้าโดยใช้ suction electrode (control, n = 5)

การทดสอบการหดตัวของกล้ามเนื้อกระบังลม เมื่อกระตุ้น phrenic nerve ด้วยไฟฟ้าระดับ supramaximal voltage (0.1 Hz, 0.2 msec) โดยใช้ suction electrode ทั้งนี้ไฟฟ้าระดับ supramaximal voltage จะอยู่ในช่วง 4-10 โวลต์ พบว่ากล้ามเนื้อกระบังลมสามารถหดตัวได้มากกว่า 4 ชั่วโมง โดยการหดตัวจะค่อย ๆ ลดลงทีละน้อย ซึ่งกล้ามเนื้อเกิดการหดตัวลงที่ (ลดลงไปไม่เกิน 5%) ได้ภายใน 60 นาที พบว่าการหดตัวลดลงอยู่ที่ 96.7% ในนาทีที่ 60 ดังนั้นจึงใช้ช่วงเวลานี้สำหรับการทดลองต่อไป (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 การหดตัวของกล้ามเนื้อกระบังลม เมื่อกระตุ้น phrenic nerve ด้วยไฟฟ้าระดับ supramaximal voltage โดยใช้ suction electrode แสดงค่าเป็น Mean \pm S.E.M (n = 5)

1.2 ฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทของพิษงูจงอาง (n = 5)

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทของพิษงูจงอาง (crude venom) ที่ความเข้มข้น 5, 10, 20, 40, 80 และ 160 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าเวลาที่ใช้ในการทำให้เกิด 50% inhibition ได้แก่ 23.4 \pm 0.9, 19.7 \pm 0.5, 9.1 \pm 0.4, 6.9 \pm 0.3, 4.2 \pm 0.1 และ 4.0 \pm 0.1 นาที ตามลำดับ (ภาพที่ 11) และเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่าง twitch tension (%) กับความเข้มข้นของพิษงู พบว่าพิษงูจงอางที่ความเข้มข้น 80 $\mu\text{g/ml}$ เป็นความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ให้ฤทธิ์มากที่สุด และให้ฤทธิ์ยับยั้งไม่ต่างกับพิษงูจงอางที่ความเข้มข้น 160 $\mu\text{g/ml}$ อย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 12) ดังนั้นจึงใช้พิษงูจงอางที่ความเข้มข้น 80 $\mu\text{g/ml}$ เป็นค่าตั้งต้นในการคำนวณหาความเข้มข้นของ Fraction F1 – F7 ที่จะใช้ศึกษาต่อไป

1.3 ฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทของ Fraction F1 – F7 (n = 5)

เมื่อคำนวณความเข้มข้นของ F1 – F7 ตาม % yield ของโปรตีน ที่ได้ของแต่ละ fraction ทำให้ได้ความเข้มข้นของแต่ละ fraction ที่ใช้ตามตารางที่ 1 และจากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทของ F1 – F7 ให้ผลดังตารางที่ 1 ซึ่ง F1 มีฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทดีที่สุด (ภาพที่ 13) ดังนั้นจึงทำการแยก F1 เพื่อให้ได้ส่วนที่บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นต่อไป

1.4 ฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทของ F1.1 – F1.3 (n = 5)

เมื่อคำนวณความเข้มข้นของ F1.1 – F1.3 ตาม % yield ของโปรตีน ที่ได้ของแต่ละ fraction ทำให้ได้ความเข้มข้นของแต่ละ fraction ที่ใช้ตามตารางที่ 2 และจากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทของ F1.1 – F1.3 ให้ผลดังตารางที่ 2 ซึ่ง F1.2 มีฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทดีที่สุด (ภาพที่ 14) ดังนั้นจึงทำการแยก F1.2 เพื่อให้ได้ส่วนที่บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นต่อไป

1.5 ฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทของ semi-purified fractions (n = 5)

เมื่อคำนวณความเข้มข้นของ F1.2.1 – F1.2.4 ตาม % yield ของโปรตีน ที่ได้ของแต่ละ fraction ทำให้ได้ความเข้มข้นของแต่ละ fraction ที่ใช้ตามตารางที่ 3 และจากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทของ F1.2.1 – F1.2.4 ให้ผลดังตารางที่ 3 และภาพที่ 15 ซึ่ง F1.2.2, F1.2.3 และ F1.2.4 มีฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทที่ดี และมีฤทธิ์ไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นจึงทำการศึกษากลไกเบื้องต้นในการออกฤทธิ์ของ F1.2.2, F1.2.3 และ F1.2.4 ต่อไป

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นของแต่ละ Fraction F1 – F7 ที่ใช้ในการทดสอบ และผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาท

Fraction No.	Yield (%)	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Time taken to cause 50% inhibition (min)	Twitch tension at the 50 th minute after fractions added (%)
crude	-	80	4.2 ± 0.1	-
1	38.1	30.5	4.6 ± 0.2	-
2	10.4	8.3	-	83.4 ± 2.1
3	9.3	7.4	-	70.7 ± 1.9
4	11.3	9.0	-	67.5 ± 4.5
5	11.3	9.0	-	90.1 ± 2.9
6	4.1	3.3	-	84.3 ± 2.9
7	5.4	4.3	-	83.5 ± 2.7

แสดงค่าเป็น Mean \pm S.E.M (n = 5)

ตารางที่ 2 ความเข้มข้นของแต่ละ Fraction F1.1 – F1.3 ที่ใช้ในการทดสอบ และผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาท

Fraction No.	Yield (%)	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Time taken to cause 50% inhibition (min)	Twitch tension at the 50 th minute after fractions added (%)
1	-	30.5	4.6 ± 0.2	-
1.1	23.9	7.3	42.8 ± 2.7	-
1.2	54.4	16.6	4.3 ± 0.3	-
1.3	29.2	8.9	-	70.5 ± 3.1

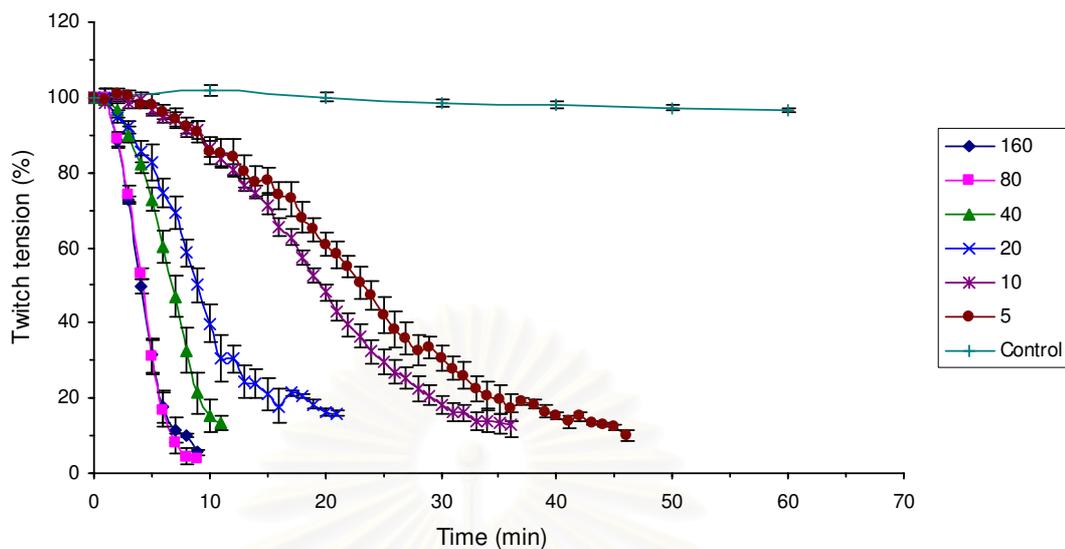
แสดงค่าเป็น Mean \pm S.E.M (n = 5)

ตารางที่ 3 ความเข้มข้นของแต่ละ Fraction F1.2.1 – F1.2.3 ที่ใช้ในการทดสอบ และผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาท

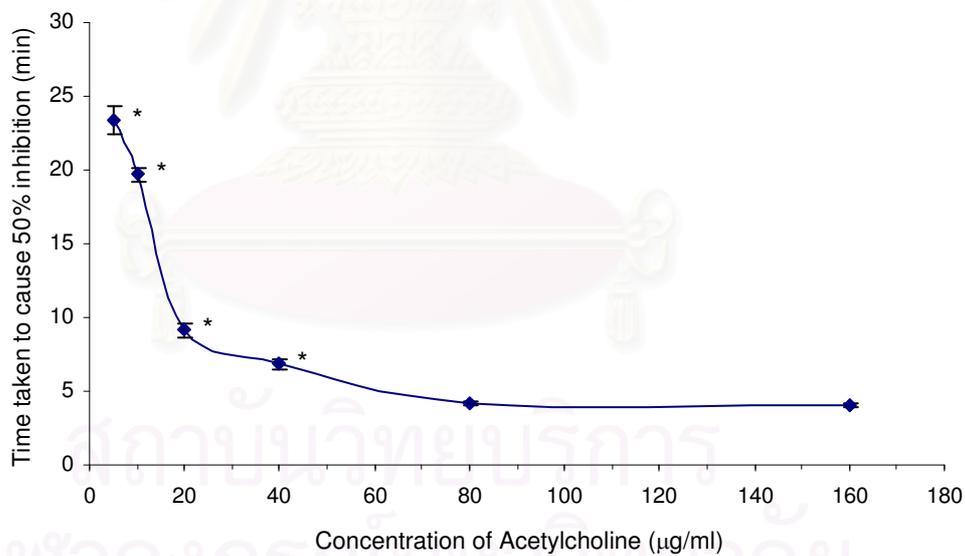
Fraction No.	Yield (%)	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Time taken to cause 50% inhibition (min.)
1.2	-	16.6	4.3 ± 0.3
1.2.1	8.5	1.4	30.7 ± 2.0
1.2.2	26.8	4.4	7.4 ± 0.4
1.2.3	10.2	1.7	12.8 ± 0.3
1.2.4	22.2	3.7	9.5 ± 0.5

แสดงค่าเป็น Mean \pm S.E.M (n = 5)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

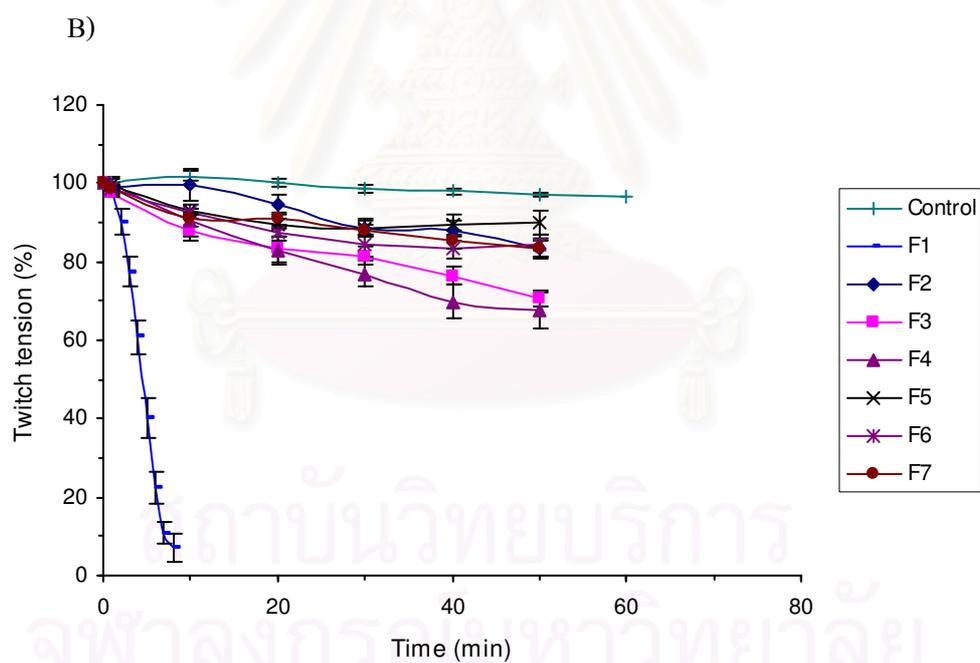
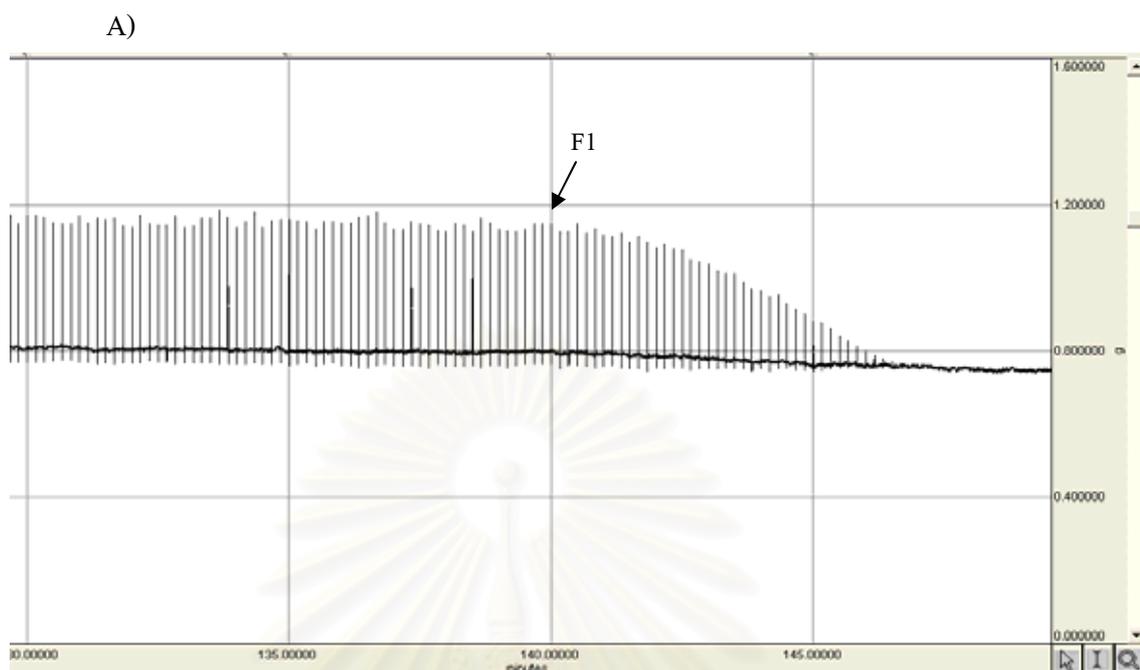


ภาพที่ 11ฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อเรียบประสาทของพิษงูจงอางที่ความเข้มข้น 5, 10, 20, 40, 80 และ 160 $\mu\text{g/ml}$ และกลุ่ม control แสดงค่าเป็น Mean \pm S.E.M (n = 5)

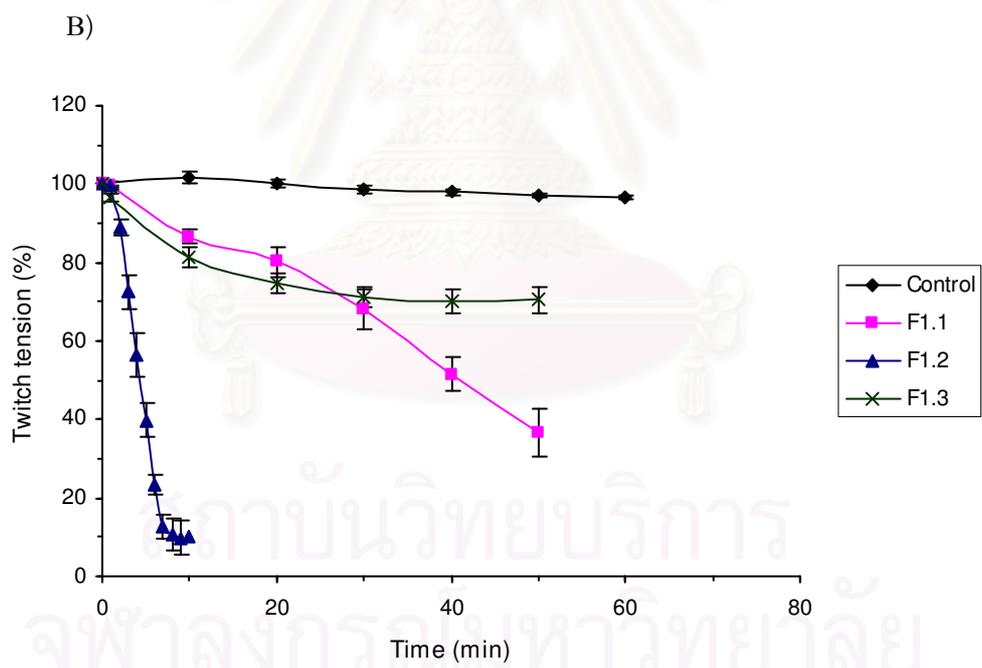
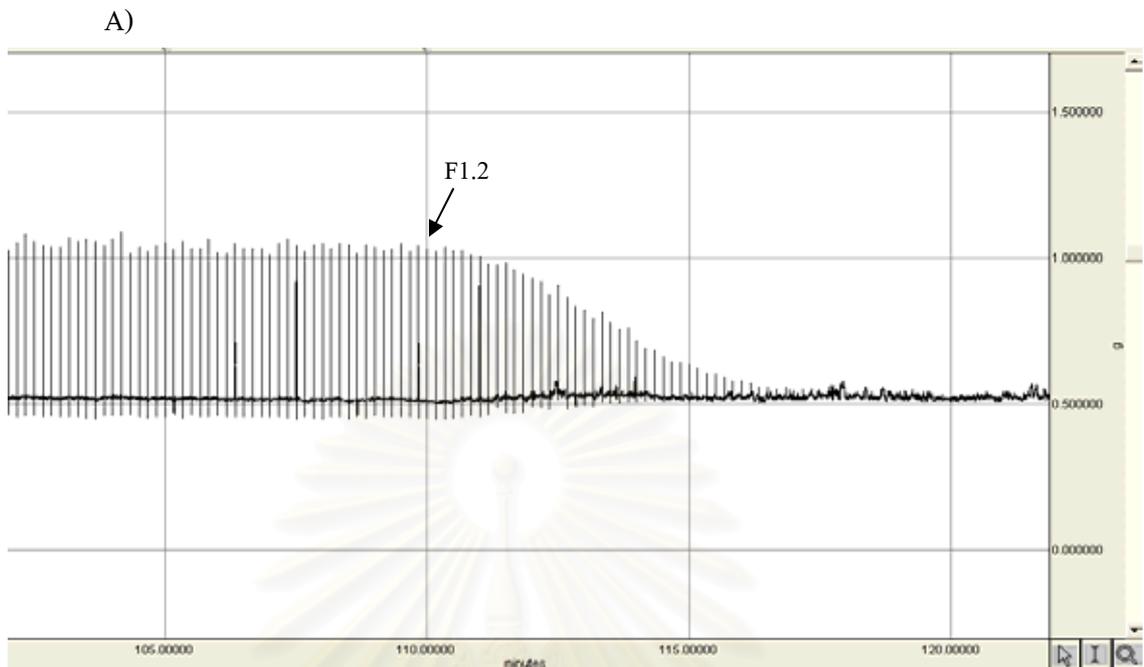


ภาพที่ 12 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ทำให้เกิด 50% inhibition กับความเข้มข้นของพิษงู แสดงค่าเป็น Mean + S.E.M (n = 5)

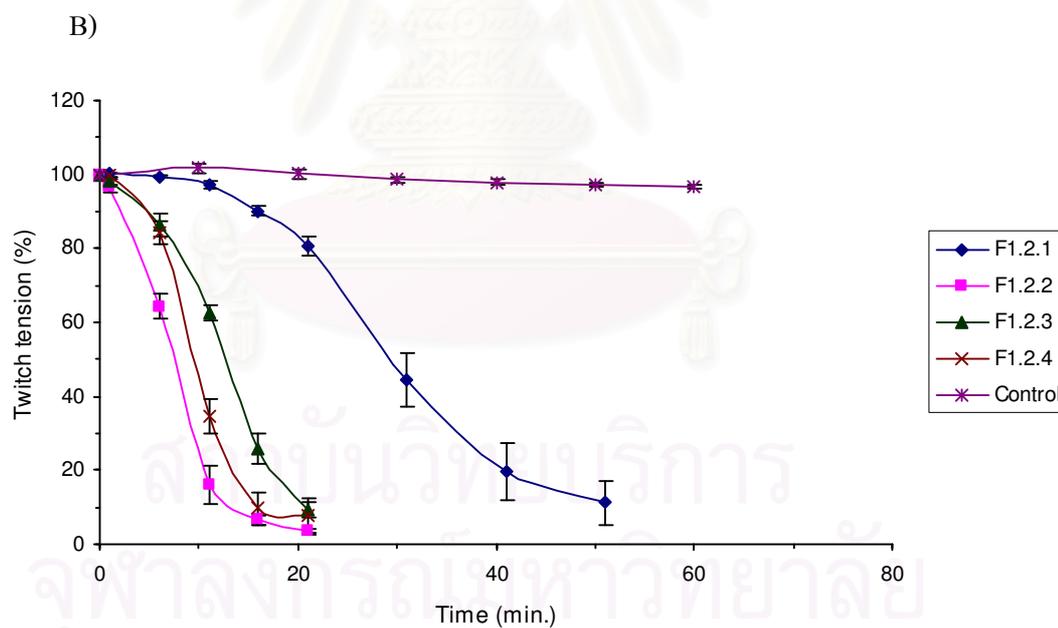
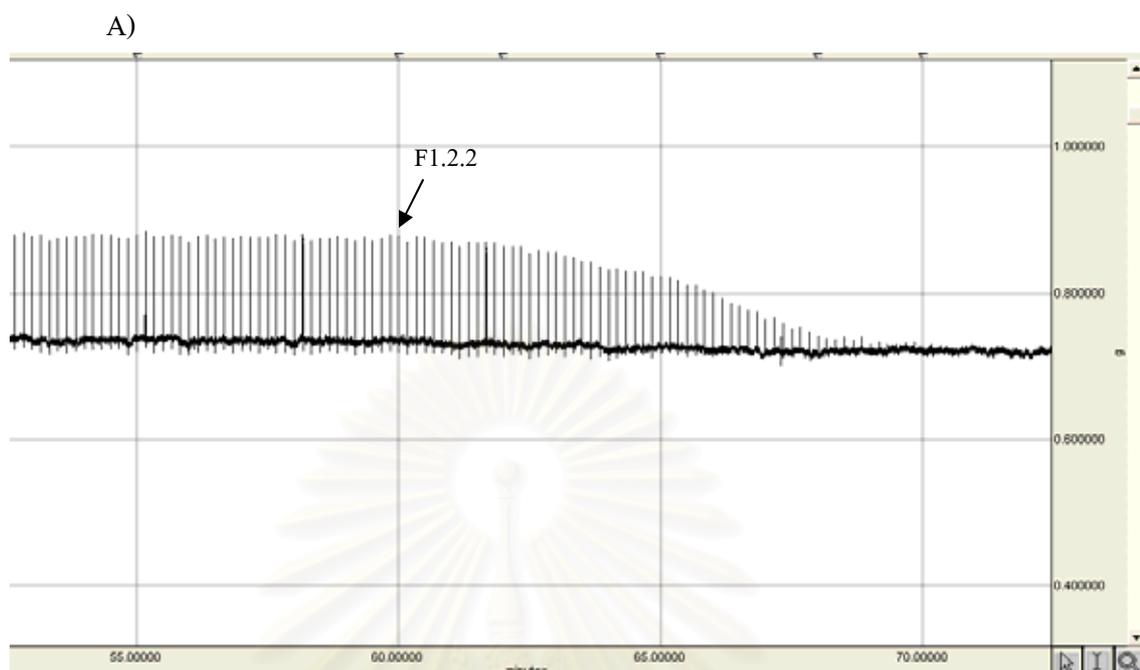
* ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับความเข้มข้น 160 $\mu\text{g/ml}$ (ANOVA, Tukey, $p < 0.05$)



ภาพที่ 13 กุทรียับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทของ F1 – F7, A) ตัวอย่าง Tracing แสดงกุทรียับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทของ F1, B) กราฟแสดงกุทรียับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทของ control และ F1 – F7 แสดงค่าเป็น Mean \pm S.E.M (n = 5)



ภาพที่ 14 ฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อพร้อมประสาทของ F1.1 – F1.3, A) ตัวอย่าง Tracing แสดงฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อพร้อมประสาทของ F1.2, B) กราฟแสดงฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อพร้อมประสาทของ control และ F1.1 – F1.3 แสดงค่าเป็น Mean \pm S.E.M (n = 5)



ภาพที่ 15 กุทรีขัยยังกล้ามเนื้อร่วมประสาทของ F1.2.1 – F1.2.4, A) ตัวอย่าง Tracing แสดงกุทรีขัยยังกล้ามเนื้อร่วมประสาทของ F1.2.2, B) กราฟแสดงกุทรีขัยยังกล้ามเนื้อร่วมประสาทของ control และ F1.2.1 – F1.2.4 แสดงค่าเป็น Mean \pm S.E.M (n = 5)

2. การทดสอบตำแหน่งการออกฤทธิ์ของส่วนกิ่งบริสุทธิที่บริเวณ pre- หรือ postsynaptic

2.1 การหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นด้วย exogenous acetylcholine ก่อนและหลังการกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้า (control, n = 5)

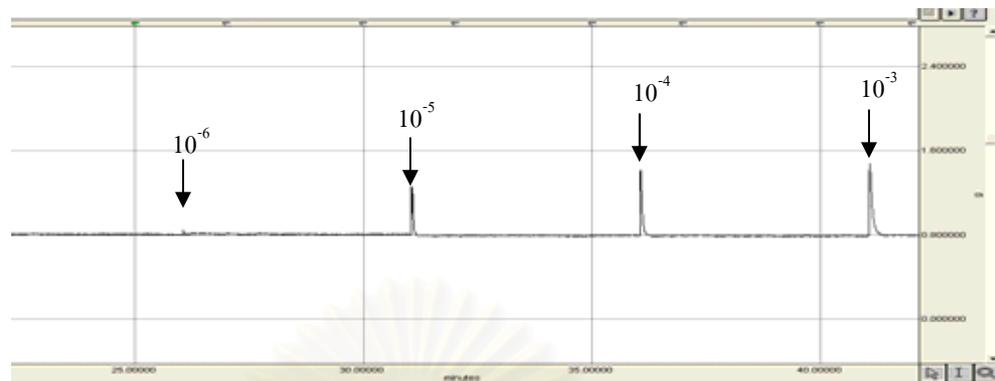
การกระตุ้นกล้ามเนื้อกระบังลมด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M แบบสะสมทีละความเข้มข้น ทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อ ทั้งก่อนและหลังการกระตุ้น phrenic nerve ด้วยไฟฟ้า (ภาพที่ 16) จากการเปรียบเทียบการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นด้วย acetylcholine ทั้ง 4 ความเข้มข้น ทั้งก่อนและหลังการกระตุ้น phrenic nerve ด้วยไฟฟ้า ในกลุ่ม control พบว่า acetylcholine ที่ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} และ 10^{-3} M ทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อทั้งก่อนและหลังการกระตุ้น nerve ด้วยไฟฟ้า ไม่มีความแตกต่างกัน แต่ที่ความเข้มข้น 10^{-4} M ทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อทั้งก่อนและหลังการกระตุ้น nerve ด้วยไฟฟ้า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 17) ซึ่งอาจเนื่องมาจากความผันแปรของแต่ละชิ้นเนื้อที่นำมาทำการทดสอบ

2.2 การหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นด้วย acetylcholine หลังการเกิด neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก semi-purified fractions (n = 5)

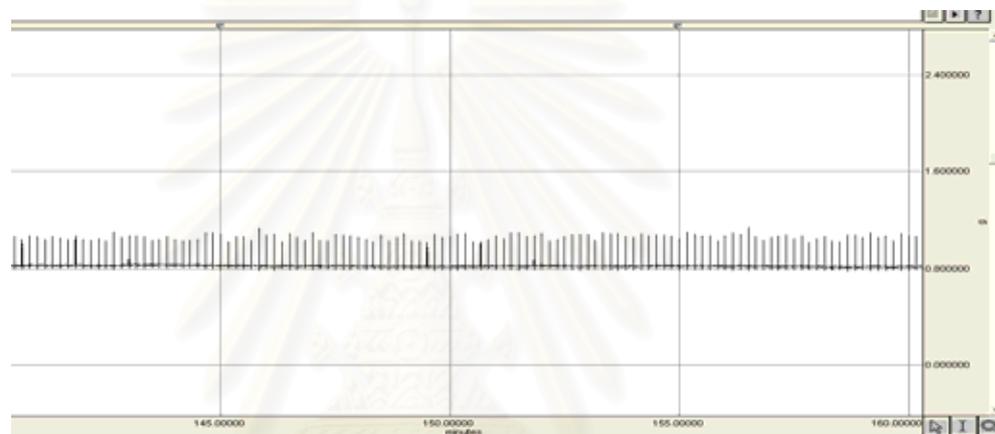
การกระตุ้นกล้ามเนื้อกระบังลมด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M แบบสะสมทีละความเข้มข้น ก่อนการกระตุ้น phrenic nerve ด้วยไฟฟ้าทำให้เกิดการ contraction ของกล้ามเนื้อ แต่การกระตุ้นกล้ามเนื้อด้วย exogenous acetylcholine หลังการเกิด neuromuscular blockade อันเนื่องมาจากฤทธิ์ของ F1.2.2, F1.2.3 และ F1.2.4 ทำให้เกิดหดตัวของกล้ามเนื้อเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ดังภาพที่ 18, 19 และ 20 ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นด้วย acetylcholine ทั้ง 4 ความเข้มข้น ทั้งก่อนและหลังการเกิด neuromuscular blockade อันเนื่องมาจากฤทธิ์ของ F1.2.2, F1.2.3 และ F1.2.4 ให้ผลดังภาพที่ 21, 22 และ 23 ตามลำดับ เมื่อทดสอบทางสถิติแล้วพบว่า การกระตุ้นกล้ามเนื้อด้วย acetylcholine ที่ความเข้มข้น 10^{-6} และ 10^{-5} M ทั้งก่อนและหลังการเกิด neuromuscular blockade อันเนื่องมาจากฤทธิ์ของ F1.2.2, F1.2.3 และ F1.2.4 ไม่มีความแตกต่างกัน ซึ่งอาจเนื่องมาจากการหดตัวของกล้ามเนื้อที่เกิดขึ้นไม่สูงจาก baseline มากนัก ดังนั้นจึงพิจารณาว่าการกระตุ้นกล้ามเนื้อด้วย acetylcholine ที่ความเข้มข้น 10^{-4} และ 10^{-3} M ซึ่งจะเห็นได้ว่า semi-purified fraction ทั้ง 3 fractions ออกฤทธิ์ที่บริเวณ postsynaptic

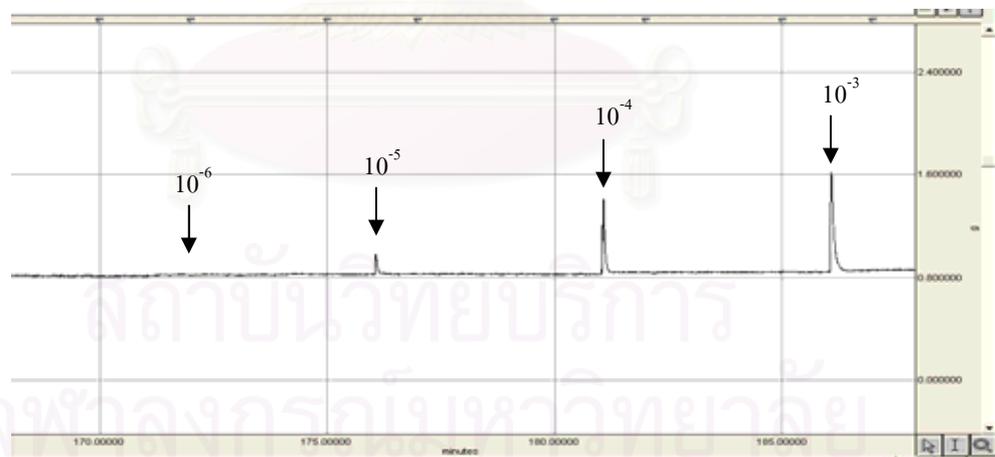
A)



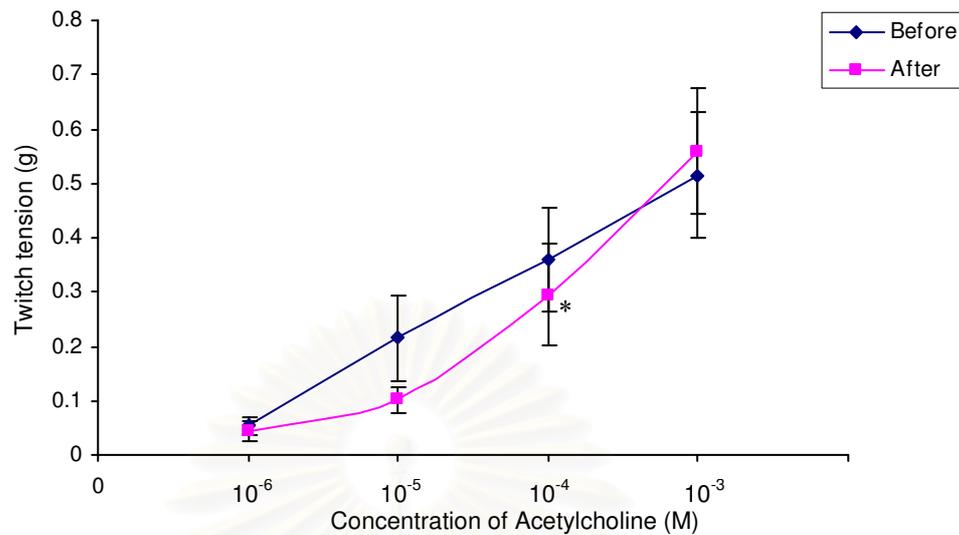
B)



C)



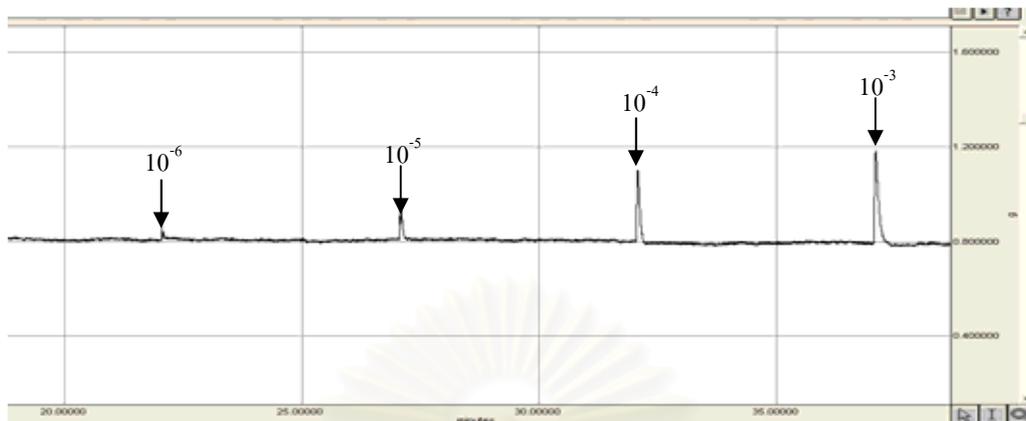
ภาพที่ 16 การหัดตัวของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อกระบังลมด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M แบบสะสมทีละความเข้มข้น (control), A) ก่อนการกระตุ้น phrenic nerve ด้วยไฟฟ้า, B) การกระตุ้น phrenic nerve ด้วยไฟฟ้า, C) หลังการกระตุ้น phrenic nerve ด้วยไฟฟ้า



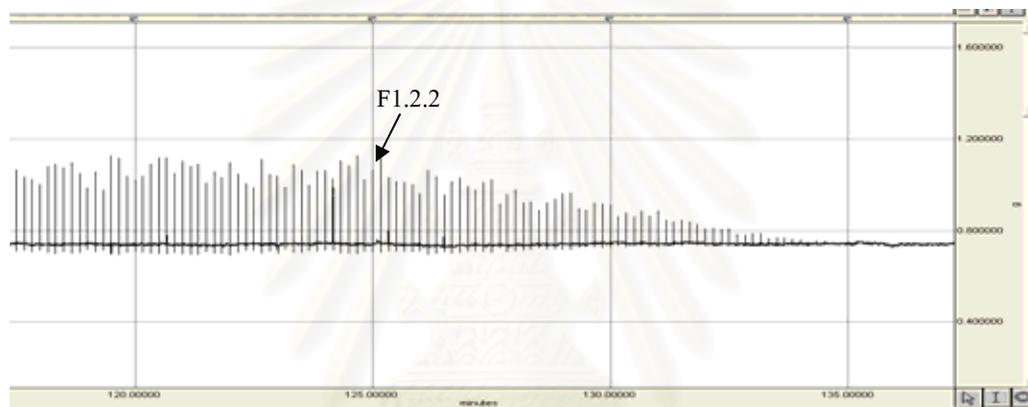
ภาพที่ 17 การหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M แบบสะสมทีละความเข้มข้น ทั้งก่อน (Before) และหลัง (After) การกระตุ้น phrenic nerve ด้วยไฟฟ้า (control), แสดงค่าเป็น Mean \pm S.E.M (n = 5)

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยเทียบกับการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นด้วย acetylcholine ก่อนการกระตุ้น phrenic nerve ด้วยไฟฟ้า ของแต่ละความเข้มข้น (Paired t-Test, $p < 0.05$)

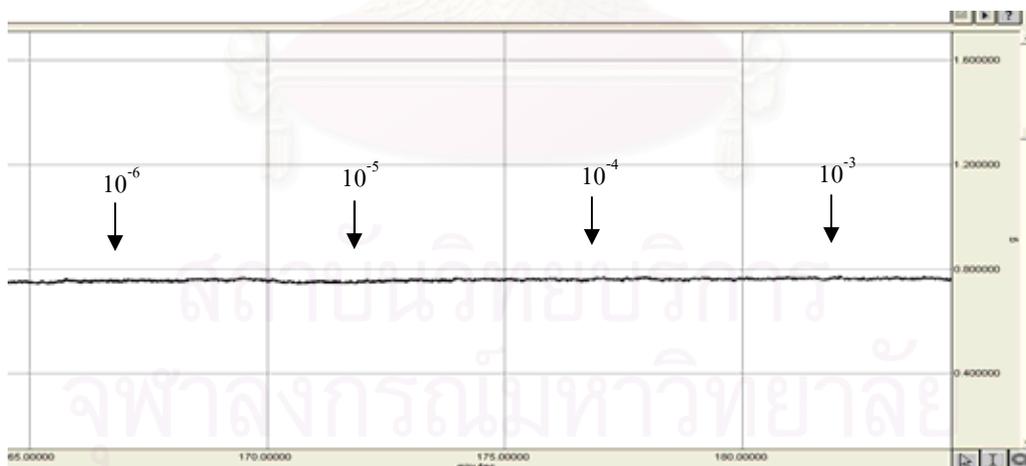
A)



B)

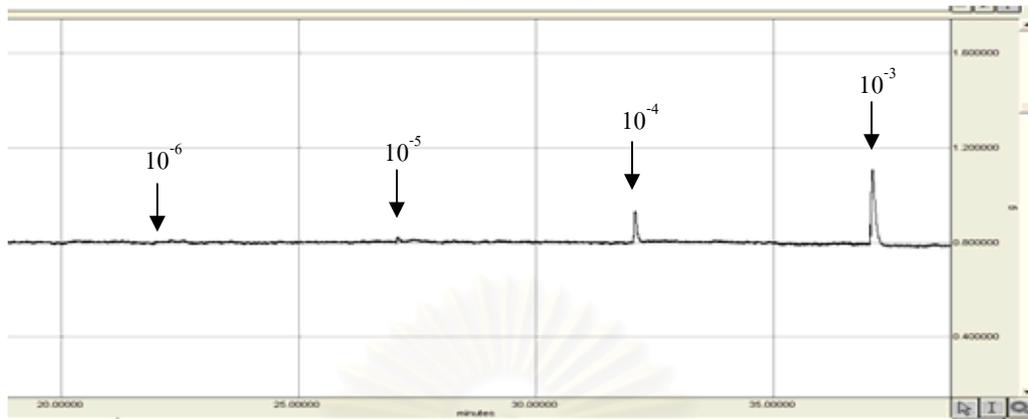


C)

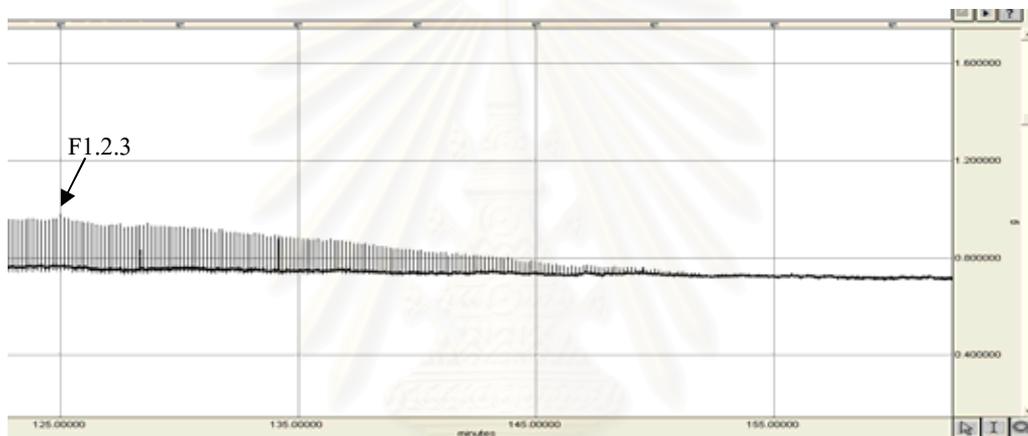


ภาพที่ 18 การหัดตัวของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อกระบังลมด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M แบบสะสมทีละความเข้มข้น หลังการเกิด neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก F1.2.2, A) ก่อนการเกิด neuromuscular blockade, B) neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก F1.2.2, C) หลังการเกิด neuromuscular blockade

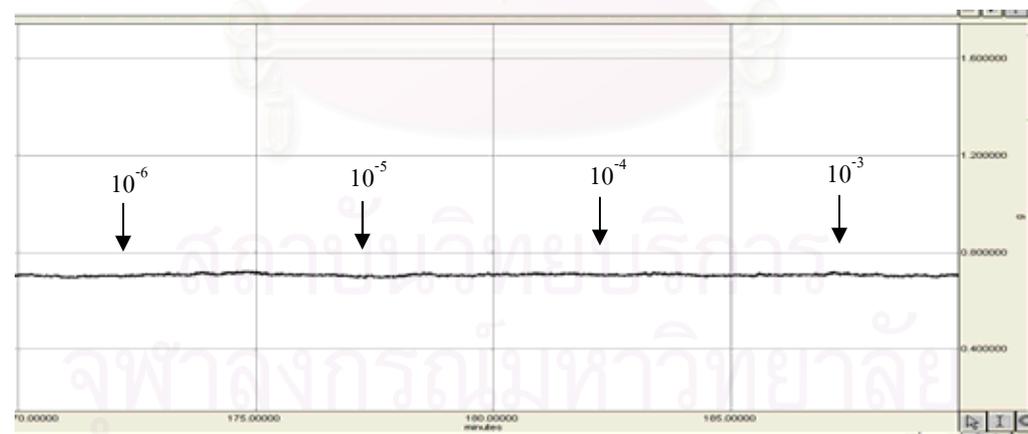
A)



B)

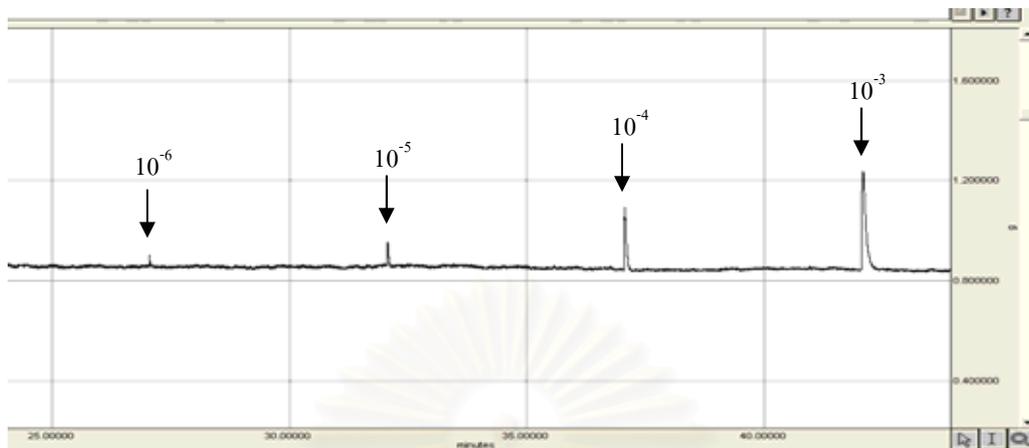


C)

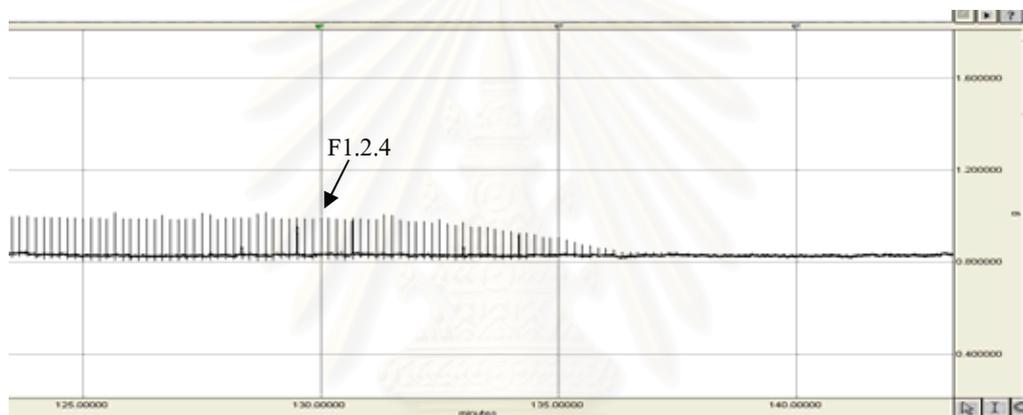


ภาพที่ 19 การหัดตัวของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อกระบังลมด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M แบบสะสมทีละความเข้มข้น หลังการเกิด neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก F1.2.3, A) ก่อนการเกิด neuromuscular blockade, B) neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก F1.2.3, C) หลังการเกิด neuromuscular blockade

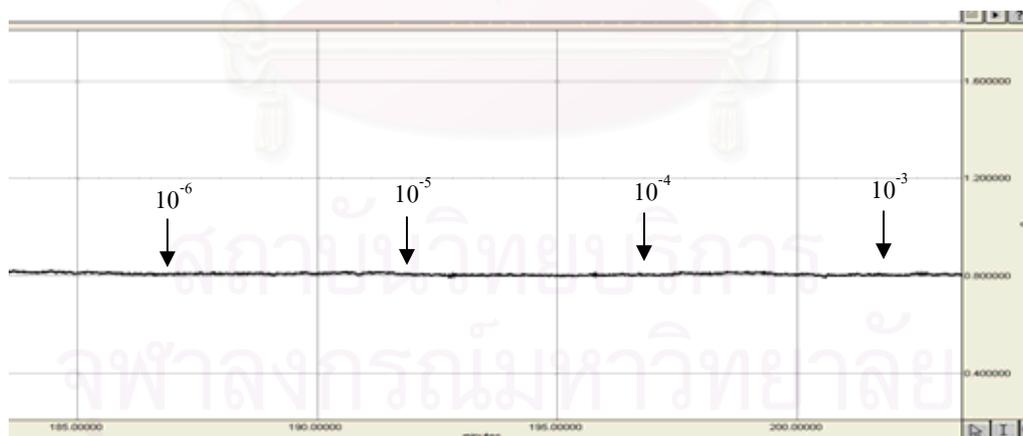
A)



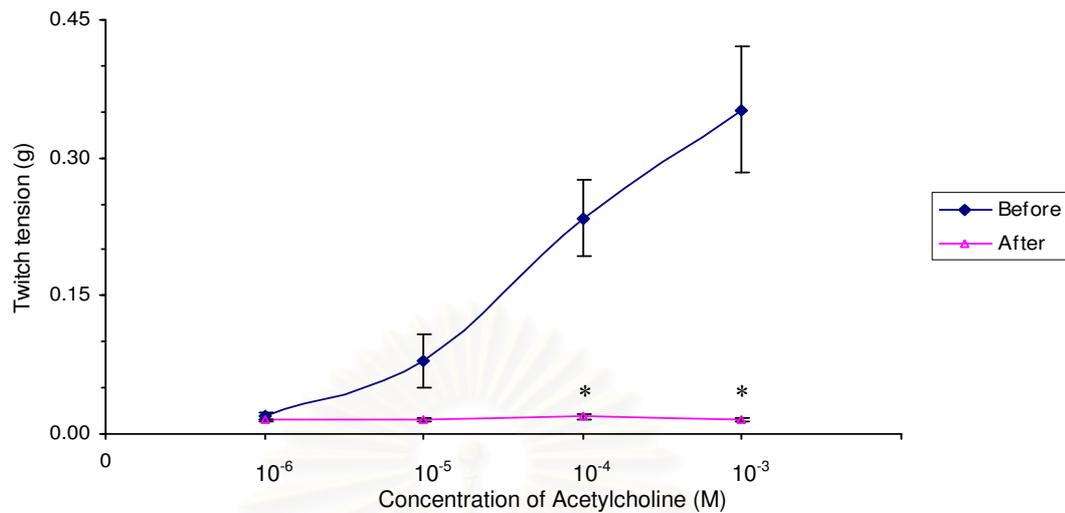
B)



C)

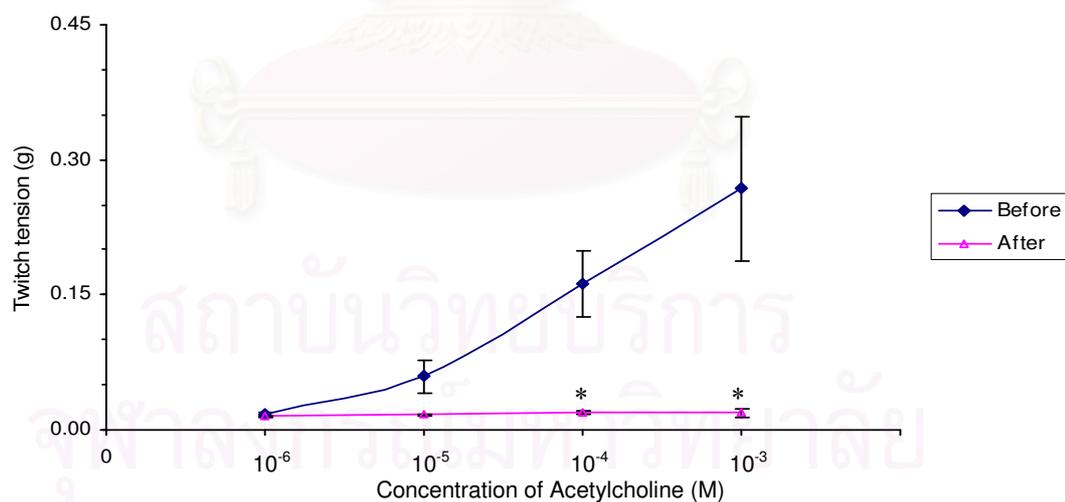


ภาพที่ 20 การหดตัวของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อกระบังลมด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M แบบสะสมทีละความเข้มข้น หลังการเกิด neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก F1.2.4, A) ก่อนการเกิด neuromuscular blockade, B) neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก F1.2.4, C) หลังการเกิด neuromuscular blockade



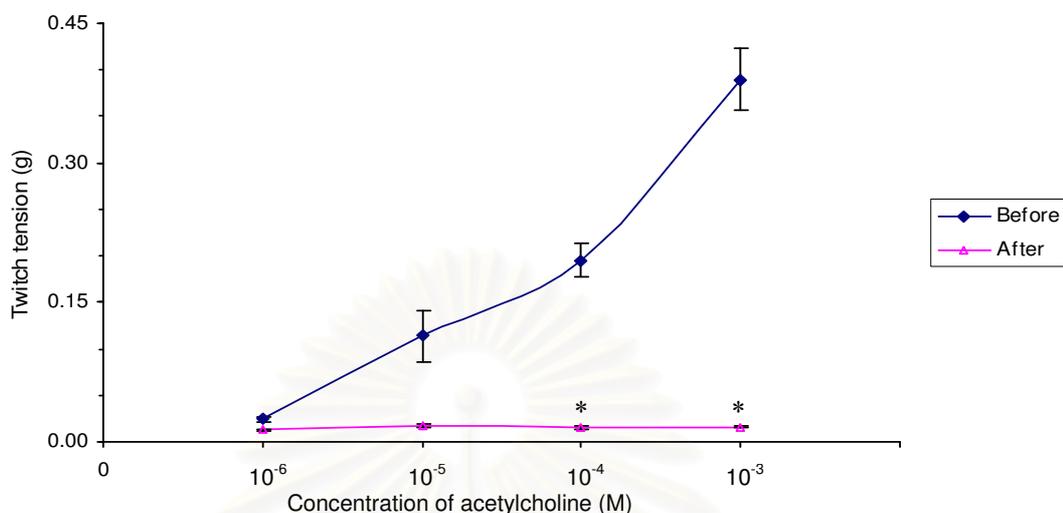
ภาพที่ 21 การหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M แบบสะสมทีละความเข้มข้น ทั้งก่อน (Before) และหลัง (After) การเกิด neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก F1.2.2, แสดงค่าเป็น Mean \pm S.E.M (n = 5)

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยเทียบกับการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นด้วย acetylcholine ก่อนการกระตุ้น phrenic nerve ด้วยไฟฟ้า ของแต่ละความเข้มข้น (Paired t-Test, $p < 0.05$)



ภาพที่ 22 การหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M แบบสะสมทีละความเข้มข้น ทั้งก่อน (Before) และหลัง (After) การเกิด neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก F1.2.3, แสดงค่าเป็น Mean \pm S.E.M (n = 5)

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยเทียบกับการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นด้วย acetylcholine ก่อนการกระตุ้น phrenic nerve ด้วยไฟฟ้า ของแต่ละความเข้มข้น (Paired t-Test, $p < 0.05$)



ภาพที่ 23 การหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M แบบสะสมทีละความเข้มข้น ทั้งก่อน (Before) และหลัง (After) การเกิด neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก F1.2.4, แสดงค่าเป็น Mean \pm S.E.M (n = 5)

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยเทียบกับการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นด้วย acetylcholine ก่อนการกระตุ้น phrenic nerve ด้วยไฟฟ้า ของแต่ละความเข้มข้น (Paired t-Test, $p < 0.05$)

3. การทดสอบการออกฤทธิ์ของส่วนกิ่งบริสุทธ์ในการยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อกระบังลม เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า

3.1 ความเข้มข้นของ Tubocurarine chloride (n=3)

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทของ Tubocurarine chloride ที่ความเข้มข้น 2.5, 5, 10 และ 20 μM พบว่าเวลาที่ใช้ในการทำให้เกิด 95% inhibition ได้แก่ 5.7 ± 0.6 , 3.4 ± 0.3 , 2.7 ± 0.2 และ 2.5 ± 0.2 นาที ตามลำดับ ซึ่งความเข้มข้น 10 μM เป็นความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ทำให้เกิดฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทมากที่สุด (ภาพที่ 24) แต่เพื่อให้เกิดการปิดกั้น neuromuscular transmission อย่างแน่นอนจึงเลือกใช้ Tubocurarine chloride ที่ความเข้มข้น 20 μM ในการทดลองกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า เมื่อทดลองปิดกั้น neuromuscular transmission ด้วย Tubocurarine chloride ที่ความเข้มข้น 20 μM และทดลองกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้าต่อไปอีกจนครบ 2 ชั่วโมง ให้ผลดังภาพที่ 25 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า Tubocurarine chloride 20 μM สามารถปิดกั้น neuromuscular transmission ได้ตลอดจนครบระยะเวลาที่ทำการทดลอง

3.2 การหัดตัวของกล้ามเนื้อกระบังลม เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า โดยใช้ unipolar electrode (n = 5)

การทดสอบการหัดตัวของกล้ามเนื้อกระบังลม เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้าระดับ supramaximal voltage (0.1 Hz, 2 msec) โดยใช้ unipolar electrode ทั้งนี้ไฟฟ้าระดับ supramaximal voltage จะอยู่ในช่วง 16 - 40 โวลต์ ผลการหัดตัวของกล้ามเนื้อกระบังลม เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า ภายใน 1.5 ชั่วโมง แสดงดังภาพที่ 26

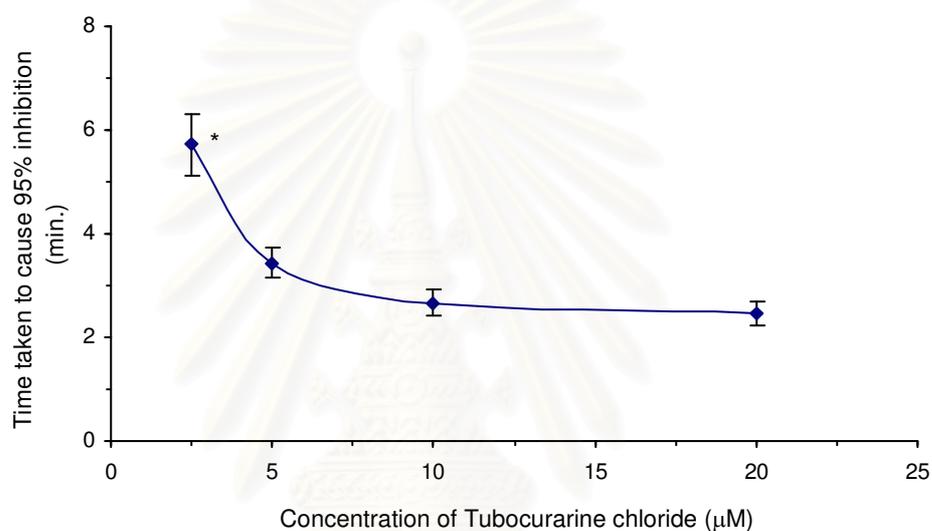
3.3 การหัดตัวของกล้ามเนื้อกระบังลม เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า โดยใช้ unipolar electrode หลังการปิดกั้น neuromuscular transmission (control, n = 5)

หลังจากทำการปิดกั้น neuromuscular transmission โดย Tubocurarine chloride ที่ความเข้มข้น 20 μM จึงทดสอบการหัดตัวของกล้ามเนื้อกระบังลม เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้าระดับ supramaximal voltage (0.1 Hz, 2 msec) โดยใช้ unipolar electrode ผลการหัดตัวของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า ภายใน 1.5 ชั่วโมง แสดงดังภาพที่ 27 เมื่อทำการเปรียบเทียบการหัดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า ทั้งที่ไม่ปิดกั้นและปิดกั้น neuromuscular transmission ด้วย Tubocurarine chloride (20 μM) ให้ผลดังภาพที่ 28 ซึ่งจะเห็นว่าที่เวลา 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 นาที การหัดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อด้วยไฟฟ้า หลังการใช้ Tubocurarine chloride ปิดกั้น neuromuscular transmission ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับที่ไม่มี Tubocurarine chloride ซึ่งการหัดตัวของกล้ามเนื้อที่ลดลงนี้อาจเป็นผลของ Tubocurarine chloride ดังนั้นในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการหัดตัวของกล้ามเนื้อของ semi-purified fraction เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า จึงจะพิจารณาการเปลี่ยนแปลงการหัดตัวของกล้ามเนื้อภายใน 30 นาที

3.3 ฤทธิ์ยับยั้งการหัดตัวของกล้ามเนื้อของ semi-purified fractions เมื่อทำการกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า (n = 5)

หลังจากปิดกั้น neuromuscular transmission โดย Tubocurarine chloride ที่ความเข้มข้น 20 μM จึงทดสอบฤทธิ์ของ F1.2.2, F1.2.3 และ F1.2.4 ต่อการหัดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า พบว่าเมื่อให้การหัดตัวของกล้ามเนื้อที่ 1 นาที ก่อนใส่ fraction (เท่ากับนาทีที่ 4 หลังการกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า ทั้งในกลุ่ม control และกลุ่มทดลอง) เป็นการหัดตัวของกล้ามเนื้อ 100% จากนั้นจึงใส่ F1.2.2, F1.2.3 หรือ F1.2.4 ลงไปใน organ bath ณ นาทีที่ 5 หลังการกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงการหัดของ

กล้ามเนื้อหลังได้ semi-purified fractions ทั้ง 3 fractions และทดสอบทางสถิติ (ANOVA, Tukey, $p < 0.05$) พบว่าให้ผลการหดตัวของกล้ามเนื้อไม่ต่างจากกลุ่ม control (ภาพที่ 29) แสดงว่า F1.2.2, F1.2.3 และ F1.2.4 ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า

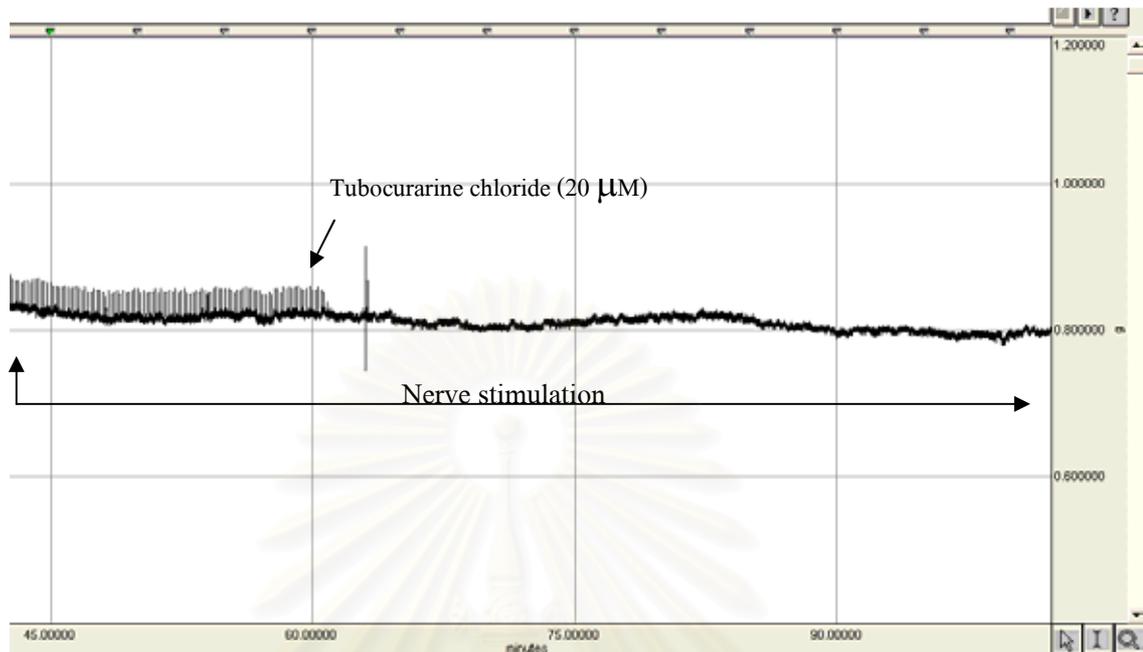


ภาพที่ 24 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ทำให้เกิด 95% inhibition กับความเข้มข้นของ Tubocurarine chloride, แสดงค่าเป็น Mean + S.E.M (n = 5)

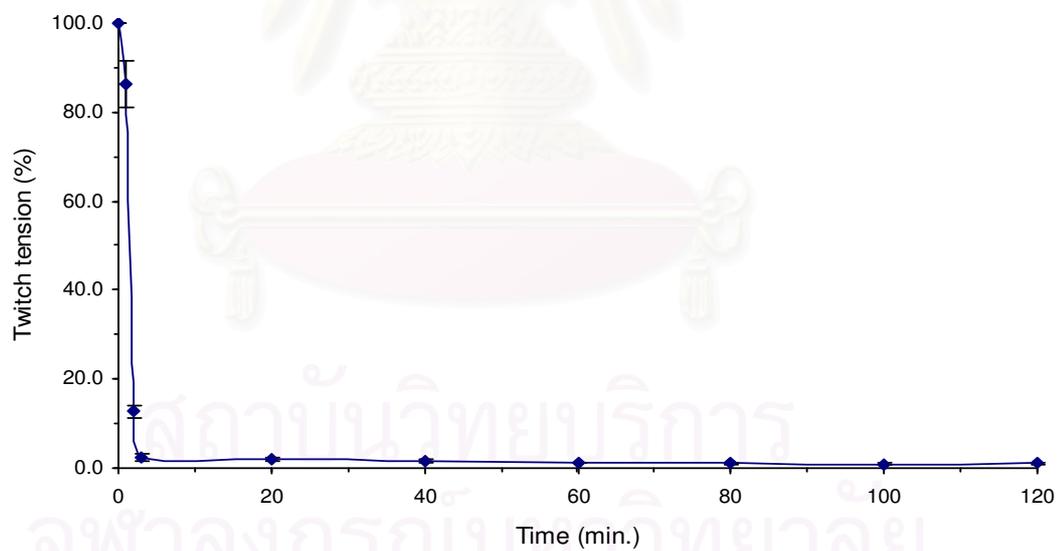
* ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับความเข้มข้น 20 μM (ANOVA, Tukey, $p < 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

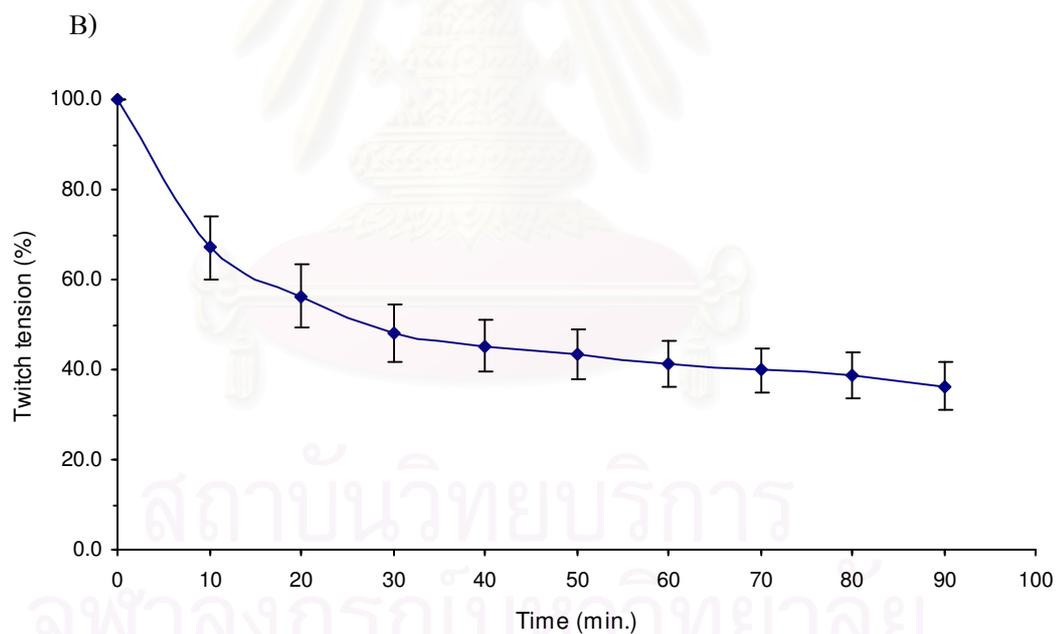
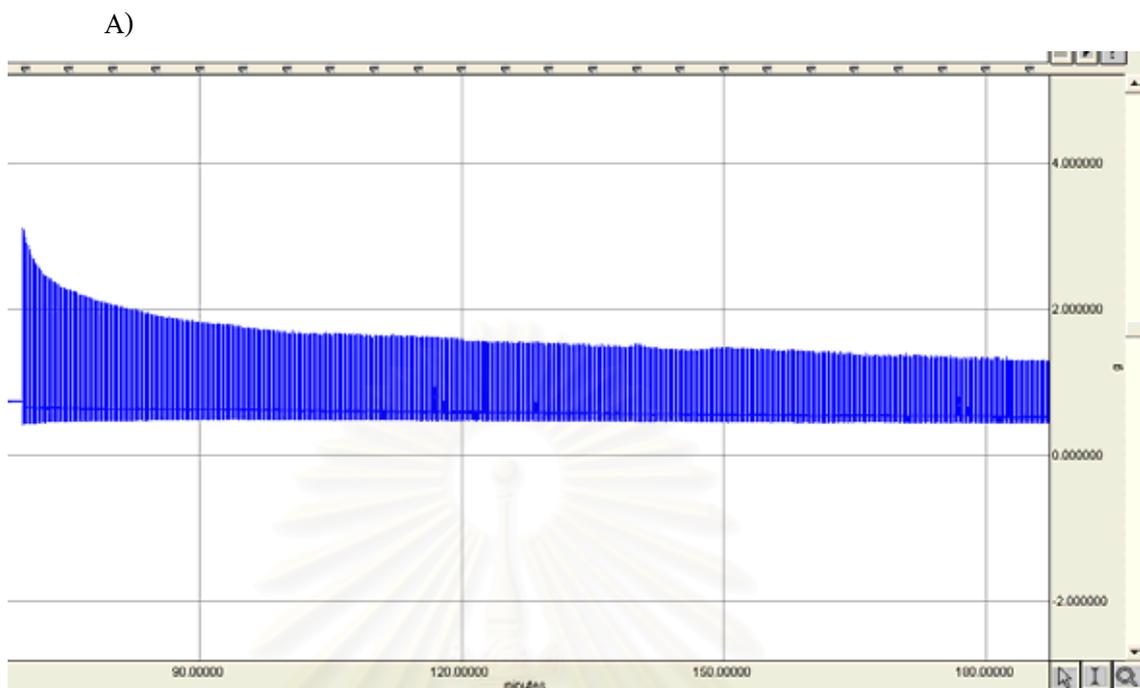
A)



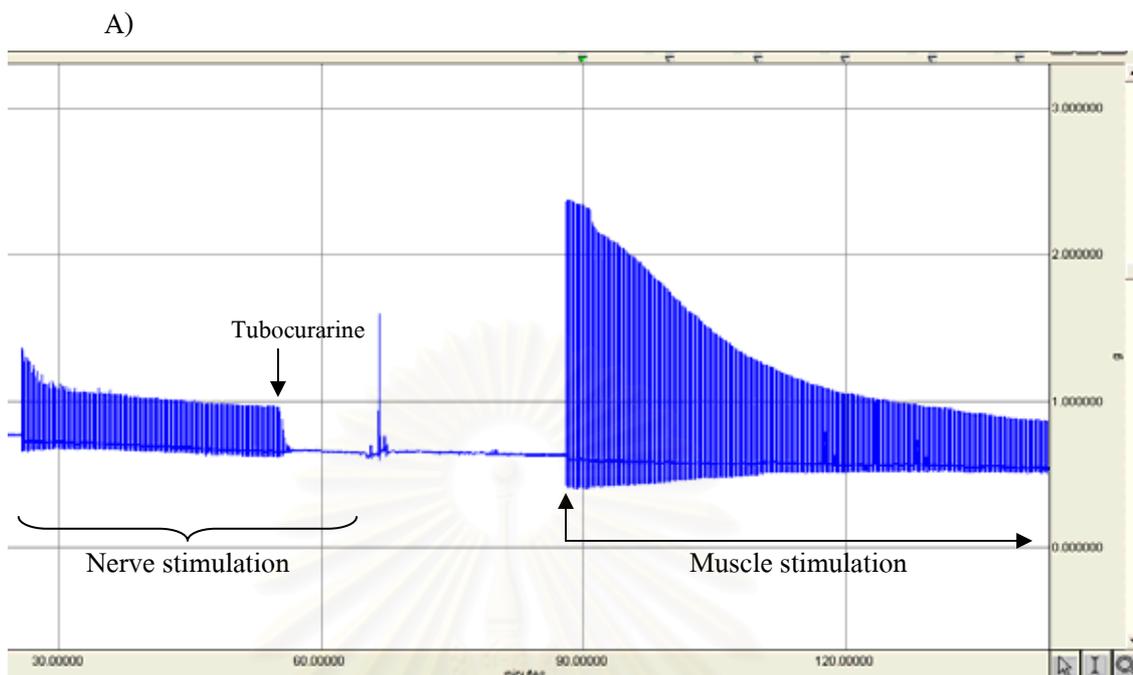
B)



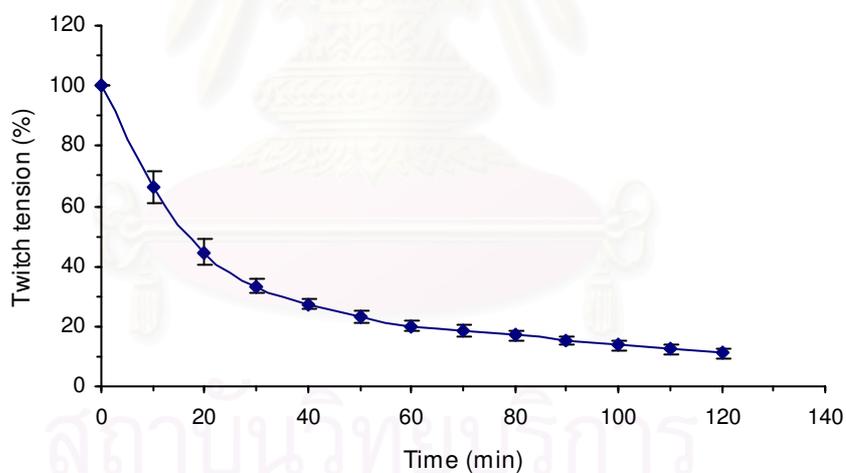
ภาพที่ 25ฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อเรียบประสาทของ Tubocurarine chloride, A) ตัวอย่าง Tracing แสดงฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อเรียบประสาทของ Tubocurarine chloride ($20 \mu\text{M}$), B) กราฟแสดงการปิดกั้น neuromuscular transmission โดย Tubocurarine chloride ($20 \mu\text{M}$) โดยที่ 0 นาที (twitch tension 100%) คือการหดตัวของกล้ามเนื้อก่อนใส่ Tubocurarine chloride จากนั้นคือการหดตัวของกล้ามเนื้อหลังใส่ Tubocurarine chloride ที่เวลาต่าง ๆ, แสดงค่าเป็น Mean \pm S.E.M (n = 5)



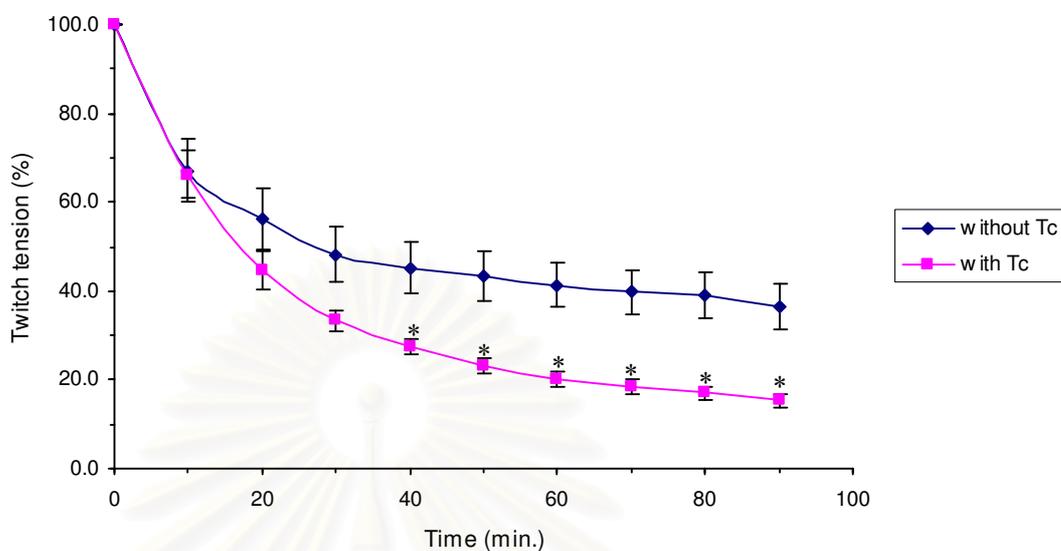
ภาพที่ 26 การหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า, A) ตัวอย่าง Tracing แสดงการหดตัวของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า, B) กราฟแสดงการหดตัวของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า, แสดงค่าเป็น Mean \pm S.E.M (n = 5)



B)



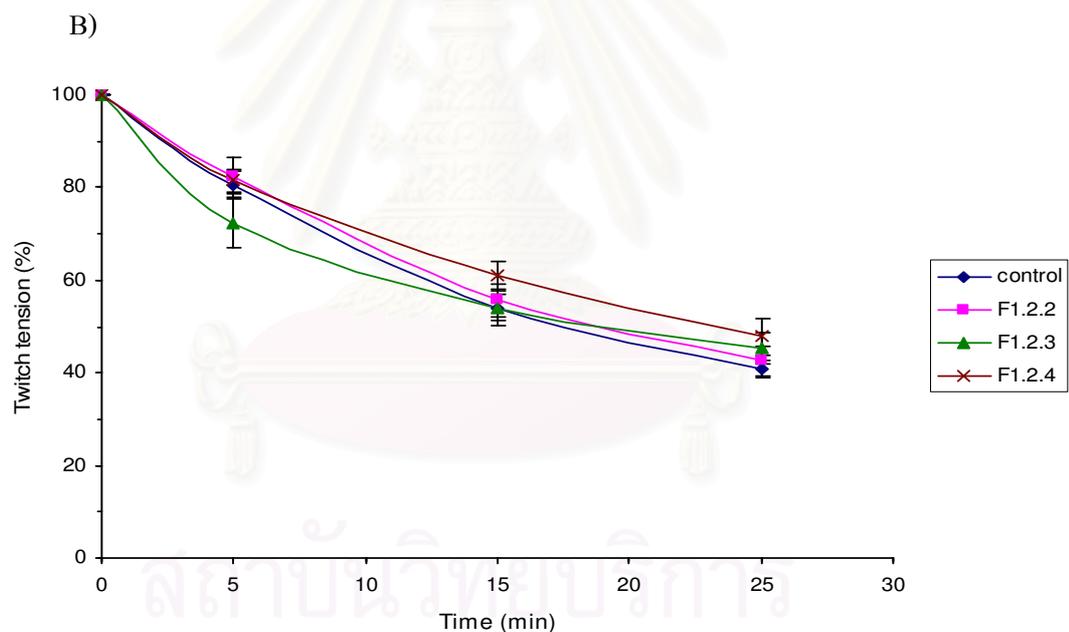
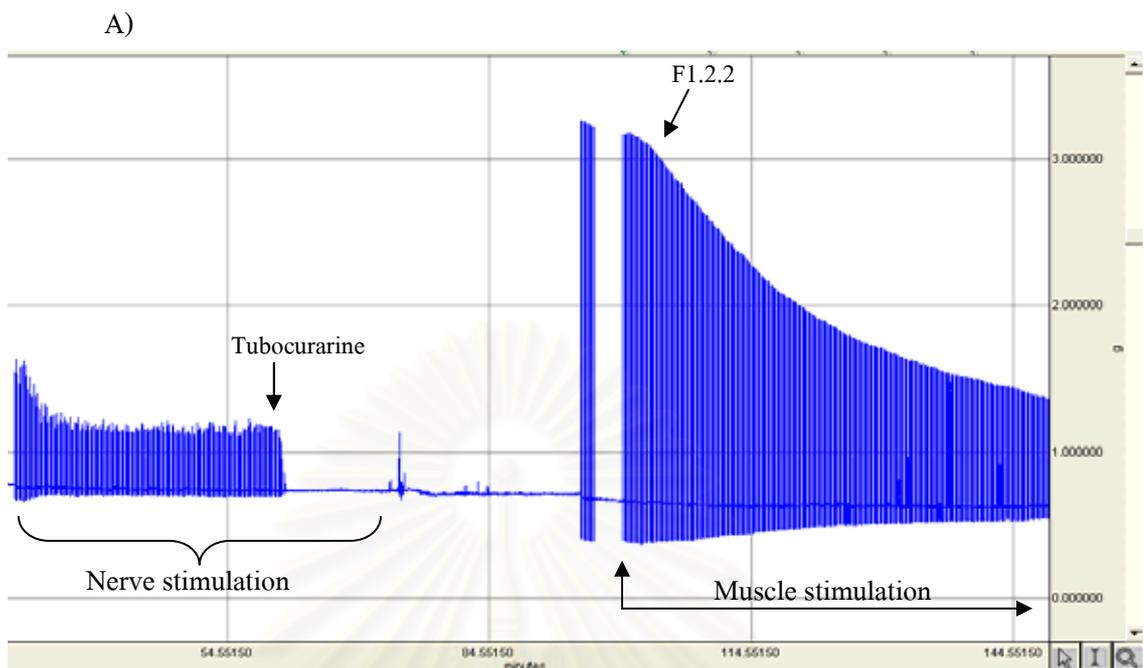
ภาพที่ 27 การหดตัวของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า หลังการปิดกั้น neuromuscular transmission ด้วย Tubocurarine, A) ตัวอย่าง Tracing แสดงการหดตัวของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า หลังการปิดกั้น neuromuscular transmission ด้วย Tubocurarine chloride, B) กราฟแสดงการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วย ไฟฟ้าที่เวลาต่าง ๆ หลังการปิดกั้น neuromuscular transmission ด้วย Tubocurarine chloride โดยที่ 0 นาที (twitch tension 100%) คือการหดตัวของกล้ามเนื้อก่อนใส่ Tubocurarine chloride แสดงค่าเป็น Mean \pm S.E.M (n = 5)



ภาพที่ 28 การเปรียบเทียบการหดตัวของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า ทั้งที่ไม่ใช้ Tubocurarine chloride (without Tc) และใช้ Tubocurarine chloride เพื่อปิดกั้น neuromuscular transmission (with Tc), แสดงค่าเป็น Mean + S.E.M (n = 5)

* ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบการหดตัวของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรง ด้วยไฟฟ้า โดยไม่ใช้ Tubocurarine chloride ที่เวลาเดียวกัน (ANOVA, $p < 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 29 ผลของ F1.2.2 – F1.2.4 ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรง ด้วยไฟฟ้า หลังการปิดกั้น neuromuscular transmission ด้วย Tubocurarine chloride, A) ตัวอย่าง Tracing แสดงผลของ F1.2.2 ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า หลังการปิดกั้น neuromuscular transmission ด้วย Tubocurarine chloride, B) กราฟแสดงผลของ F1.2.2 – F1.2.4 ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า หลังการปิดกั้น neuromuscular transmission และกลุ่ม control โดยที่ 0 นาที (twitch tension 100%) คือการหดตัวของกล้ามเนื้อในนาทีที่ 4 หลังกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า (ก่อนใส่ fraction ในกลุ่มทดลอง), แสดงค่าเป็น Mean \pm S.E.M (n = 5)

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

อภิปรายผลการวิจัย

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทของพิษงูจงอาง และส่วนของพิษงูจงอาง โดยใช้ mouse phrenic nerve – hemi-diaphragm ประกอบด้วยกล้ามเนื้อกระบังลมที่มีเส้นประสาทติดอยู่ ซึ่งแสดงถึงการทำงานบริเวณ neuromuscular junction กล้ามเนื้อกระบังลมจะถูกเลี้ยงอยู่ในสารละลาย Krebs solution ซึ่งเป็นสถานะที่เซลล์กล้ามเนื้อและเส้นประสาทยังมีชีวิตอยู่ได้ และยังสามารถทำงานได้ กล้ามเนื้อจะถูกกระตุ้นด้วยไฟฟ้าโดยผ่านทาง phrenic nerve ส่งต่อมายังกล้ามเนื้อ ทำให้กล้ามเนื้อเกิดการหดตัว (contraction) ตามจังหวะความถี่ของการกระตุ้น กล้ามเนื้อสามารถหดตัวได้มากกว่า 4 ชั่วโมง แม้ว่าการหดตัวนั้นจะค่อย ๆ ลดลงทีละน้อย แต่มีช่วงเวลาที่กล้ามเนื้อหดตัวคงที่ คือลดลงไม่เกิน 5% ที่ช่วงเวลา 60 นาที ซึ่งช่วงเวลานี้จะใช้ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาท และเพื่อให้แน่ใจว่ากล้ามเนื้ออยู่ในช่วงเวลาที่กล้ามเนื้อหดตัวได้คงที่ จึงปล่อยให้การหดตัวคงที่อยู่ที่ประมาณ 10 นาที จึงเริ่มทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทด้วยพิษงูจงอางหรือ fractions ภายในเวลาไม่เกิน 50 นาที และเนื่องจากการแยกส่วนพิษงูในแต่ละครั้งจะได้ปริมาณ fraction ที่แยกได้น้อยมาก ดังนั้นความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบจะสัมพันธ์กับ % yield ของโปรตีน ที่ได้ของแต่ละ fraction

จากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทของพิษงู (crude venom) และส่วนของพิษงู เมื่อพิจารณาความแรงในการออกฤทธิ์แล้วจะเห็นได้ว่า พิษงูจงอางถูกแยกออกเป็นทั้ง fractions และ semi-purified fractions และความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองก็ถูกทอนส่วนลงตาม % yield ของโปรตีนที่ได้ แต่ยังพบฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาทของ F1 (30.5 $\mu\text{g/ml}$), F1.2 (16.6 $\mu\text{g/ml}$), F1.2.2 (4.4 $\mu\text{g/ml}$) และ F1.2.4 (3.7 $\mu\text{g/ml}$) ที่ฤทธิ์ไม่แตกต่างจาก crude venom (80 $\mu\text{g/ml}$) ซึ่งแสดงว่า semi-purified fractions ที่มีฤทธิ์แรงและน่าสนใจ คือ F1.2.2 และ F1.2.4

การแยกส่วนพิษงูจงอางนั้นอาจมีขั้นตอนหรือวิธีการแยกที่แตกต่างกันไป แต่โดยทั่วไปแล้วจะอาศัยหลักการทาง chromatography ซึ่งอาศัยความแตกต่างของประจุบนโมเลกุล (ion exchange chromatography) อาศัยความแตกต่างของขนาดโมเลกุล (gel filtration chromatography) อาศัยความสามารถในการถูกดูดซับที่ความแตกต่างกัน (affinity chromatography) เป็นต้น และใช้เทคนิค HPLC มาช่วยทำให้ส่วนที่แยกได้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น ซึ่งในการศึกษานี้ใช้เทคนิค ion exchange chromatography และ gel filtration chromatography ในการแยกส่วน โดย

semi-purified fractions ที่แยกได้ อาจเป็น neurotoxin ชนิดเดียวกันหรือต่างชนิดกันกับที่มีผู้เคยทำการแยกไว้ ซึ่งต้องทำการพิสูจน์ความบริสุทธิ์และหาลำดับกรดอะมิโนต่อไป

ฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อพร้อมประสาทของ semi-purified fractions ทำให้กล้ามเนื้อไม่เกิดการ contraction เมื่อกระตุ้นด้วยไฟฟ้าผ่านทางเส้นประสาท บริเวณที่ fraction จะออกฤทธิ์อาจเป็นที่ presynaptic หรือ postsynaptic ซึ่งจะทำการทดสอบได้โดยใช้ exogenous acetylcholine หาก semi-purified fractions ออกฤทธิ์ที่บริเวณ presynaptic จะทำให้ไม่เกิดการหลั่ง endogenous acetylcholine เมื่อให้ exogenous acetylcholine ซึ่งจะเข้าไปจับที่ acetylcholine receptor ได้ ชักนำให้กล้ามเนื้อเกิดการหดตัว แต่หาก exogenous acetylcholine ไม่สามารถทำให้กล้ามเนื้อเกิดการหดตัวได้ นั่นคือไม่สามารถเข้าไปจับที่ acetylcholine receptor ได้ เนื่องจากที่ presynaptic membrane มีการหลั่ง endogenous acetylcholine แสดงว่า semi-purified fractions ออกฤทธิ์ที่บริเวณ postsynaptic จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า semi-purified fraction F1.2.2, F1.2.3 และ F1.2.4 ออกฤทธิ์ที่บริเวณ postsynaptic ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Chang และคณะ (16) ที่ศึกษาในพิษงูจงอางเช่นกัน และยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Reali และคณะ (20) ซึ่งศึกษาในพิษงูเห่าไทยซึ่งเป็นงูพิษที่อยู่ในวงศ์เดียวกับงูจงอาง และมีความคล้ายคลึงกับงูจงอางทั้งรูปร่าง ลักษณะภายนอก และองค์ประกอบของพิษงู (10)

การออกฤทธิ์ที่บริเวณ postsynaptic นี้้อาจออกฤทธิ์ได้ 2 วิธี โดย semi-purified fraction ไปจับกับ acetylcholine receptor ทำให้ acetylcholine ไม่สามารถทำงานได้จึงไม่ทำให้เกิดการ contraction ของกล้ามเนื้อ หรือ semi-purified fraction อาจออกฤทธิ์ที่กล้ามเนื้อโดยตรง

เมื่อทำการทดสอบต่อไปจะทำการป้องกันไม่ให้กล้ามเนื้อเกิดการหดตัวเนื่องจากกระแสประสาทที่ส่งมาจาก phrenic nerve โดยปิดกั้น neuromuscular transmission ด้วย Tubocurarine chloride ซึ่งจะจับกับ acetylcholine receptor ไว้ หากมีการกระตุ้นที่เส้นประสาทเกิดขึ้น และหลั่ง acetylcholine ออกมา ก็จะไม่สามารถจับกับ acetylcholine receptor ที่กล้ามเนื้อได้ และไม่ชักนำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อด้วยเช่นกัน นอกจากนี้ Tubocurarine chloride ยังช่วยป้องกันไม่ให้ semi-purified fraction จับกับ acetylcholine receptor ด้วย เนื่องจากทั้ง acetylcholine และ tubocurarine สามารถจับกับ nicotinic acetylcholine receptor ที่บริเวณ α -subunits ได้ เช่นเดียวกัน (8) ซึ่งจะทำให้แน่ใจได้ว่าการทดสอบฤทธิ์ของ semi-purified fraction ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้านั้น เป็นการทดสอบการออกฤทธิ์ที่กล้ามเนื้อโดยตรง ดังนั้น เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า ซึ่งจะทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อ และทำการทดสอบด้วย semi-purified fractions หากกล้ามเนื้อยังเกิดการหดตัวได้ แสดงว่าไม่มี

การออกฤทธิ์ที่กล้ามเนื้อโดยตรง แต่หากยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อได้ แสดงว่า semi-purified fractions มีการออกฤทธิ์ที่กล้ามเนื้อโดยตรง

จากผลการทดลอง จะเห็นได้ว่าการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า ในกลุ่ม control มีค่าลดต่ำลงมาก ซึ่งอาจเป็นเพราะการกระตุ้นกล้ามเนื้อด้วยไฟฟ้าโดย unipolar electrode จะสูญเสียกระแสไฟฟ้าบางส่วนไป เพราะต้องส่งกระแสไฟฟ้าผ่าน physiological solution ไปยังสายกราวด์เพื่อให้ครบวงจร จึงอาจส่งผลให้กล้ามเนื้อเกิดการหดตัวที่ต่ำลง เนื่องมาจากสูญเสียปริมาณกระแสไฟฟ้าที่ใช้กระตุ้นกล้ามเนื้อไป หรืออาจเนื่องมาจากต้องใช้กระแสไฟฟ้าที่มากขึ้นในการกระตุ้นกล้ามเนื้อ เพราะกระแสไฟฟ้าบางส่วนต้องสูญเสียไป จึงทำให้กล้ามเนื้ออ่อนล้าลง แต่ได้ทำการทดลองเพื่อยืนยันผลโดยใช้ bipolar electrode กระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรง ซึ่งกระแสไฟฟ้าจะถูกส่งไปยังกล้ามเนื้อโดยไม่มีการสูญเสียให้กับ solution ผลการทดสอบพบว่าเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วย electrode ทั้งสองชนิดแล้ว ให้ผลการหดตัวของกล้ามเนื้อที่ไม่ต่างกัน แสดงให้เห็นว่าการหดตัวของกล้ามเนื้อที่ลดต่ำลงนี้ไม่ได้เกิดจากกระแสไฟฟ้า ซึ่งผลการทดลองได้แสดงไว้ในภาคผนวก แต่การหดตัวของกล้ามเนื้อที่ลดลงนี้อาจเป็นผลของ tubocurarine chloride ซึ่งนำมาใช้ปิดกั้น neuromuscular transmission ซึ่งอาจมีความเข้มข้นที่สูงเกินไป อาจทำให้กล้ามเนื้อเกิดการอ่อนล้าลง เนื่องจาก tubocurarine มีผลรบกวน mitochondrial oxidative metabolism (29) ซึ่งอาจส่งผลถึงพลังงานที่ต้องใช้ในการเกิด cross-bridge ของ actin และ myosin ในการทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อ แต่อย่างไรก็ตามในช่วงเวลา 30 นาทีแรกการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อด้วยไฟฟ้า หลังการใช้ Tubocurarine chloride เทียบกับที่ไม่ได้ใช้ Tubocurarine chloride แล้วให้ผลไม่ต่างกันจึงสามารถพิจารณาการหดตัวของกล้ามเนื้อหลังการทดสอบด้วย semi-purified fractions ที่เปลี่ยนแปลงไป เทียบกับ control ได้ ซึ่งผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่า F1.2.2, F1.2.3 และ F1.2.4 ไม่มีการออกฤทธิ์ที่กล้ามเนื้อโดยตรง เพราะการหดตัวของกล้ามเนื้อที่ดำเนินไปตามเวลาต่าง ๆ หลังการทดสอบด้วย semi-purified fraction ทั้ง 3 fractions ให้ผลไม่ต่างจากกลุ่ม control

สรุปและข้อเสนอแนะ

การศึกษาสามารถสรุปได้ว่า พิษงูจงอางมีส่วนที่มีฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้อร่วมประสาท เมื่อแยกส่วนพิษงูได้ส่วนกิ่งบริสุทธ์คือ F1.2.1 – F1.2.4 ส่วนที่มีฤทธิ์แรงที่สุด คือ F1.2.2 และ F1.2.4 รองลงมาคือ F1.2.3 และ F1.2.1 ตามลำดับ โดยกลไกเบื้องต้นในการออกฤทธิ์ของ F1.2.2, F1.2.3 และ F1.2.4 คือ ออกฤทธิ์ที่บริเวณ postsynaptic และไม่มีการออกฤทธิ์ที่กล้ามเนื้อโดยตรง

ดังนั้นจึงน่าที่จะออกฤทธิ์โดยจับกับ acetylcholine receptor บนกล้ามเนื้อ ยับยั้งไม่ให้กล้ามเนื้อเกิดการหดตัวได้

ในการศึกษาต่อไปจึงน่าที่จะทำการศึกษาพิสูจน์ความบริสุทธิ์ ศึกษาถึงโครงสร้าง และหาลำดับกรดอะมิโนของ semi-purified fractions ที่แยกได้ เพื่อนำไปเทียบชนิดกับ neurotoxin ที่แยกได้และมีการรายงานในการศึกษาวิจัยอื่นๆ ก่อนหน้านี้ และเพื่อการ clone ส่วนที่บริสุทธิ์ที่น่าสนใจ นำไปพัฒนาเป็นยาหรือสารออกฤทธิ์ที่เป็นประโยชน์ทางการแพทย์หรืองานวิจัยต่อไป และอาจทำการศึกษายืนยันการออกฤทธิ์ที่บริเวณ nicotinic acetylcholine receptor และยืนยันตำแหน่งในการจับว่าอยู่ที่ subunits ไต และยังคงศึกษาถึงฤทธิ์อื่นๆ ของ semi-purified fractions ที่แยกได้ เช่น analgesic activity ซึ่งมีผู้รายงานไว้ว่าพบฤทธิ์นี้ใน neurotoxin ที่แยกได้จากพิษงูจงอาง (19) ตลอดจนศึกษาถึง enzyme activity เช่น phospholipase A₂ ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญที่พบในพิษงู เนื่องจากพบการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ใน neurotoxin ที่แยกจากพิษงูเห่าไทยซึ่งเป็นพิษงูที่มีความคล้ายคลึงกับพิษงูจงอางมาก (20) นอกจากนี้อาจศึกษาถึงความเข้มข้นของ tubocurarine chloride ที่เหมาะสมในการนำมาใช้ ปิดกั้น neuromuscular transmission เพื่อไม่ให้มีผลกระทบท่อ การหดตัวของกล้ามเนื้อในการทดลองต่อไป

รายการอ้างอิง

1. Harvey, A. L.; Bradley, K. N.; Cochran, S. A.; Rowan, E. G.; Pratt, J. A.; Quillfeldt, J. A. and Jerusalinsky, D. A. What can toxins tell us for drug discovery?. Toxicon 36, 11 (1998): 1635-1640.
2. Bentsianov, B.; Zalvan, C. and Blitzer, A. Noncosmetic use of Botulinum toxin. Clinics in Dermatology 22 (2004): 82-88.
3. Yee, J. S. P.; Nanling, G.; Afifiyan, F.; Donghui, M.; Lay, P. S.; Armugam, A. and Jeyaseelan, K. Snake postsynaptic neurotoxins; gene structure, phylogeny and applications in research and applications in research and therapy. Biochimie 86 (2004): 137-149.
4. Yang, C. C. Snake neurotoxins. The Snake 16 (1984): 90-103.
5. ภาควิชาสรีรวิทยา, คณะเภสัชศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. หนังสือประกอบการบรรยาย วิชากายวิภาคศาสตร์และสรีรวิทยา 1 พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพมหานคร: คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2546.
6. Bern, R. M.; Levy, M. N.; Koeppen, B. M. and Stanton, B. M. Physiology. 5th ed. U.S.A.: Mosby, 2004.
7. Meunier, F. A.; Schiavo, G. and Molgo, J. Botulinum neurotoxins: from paralysis to recover of functional neuromuscular transmission. Journal of Physiology 96 (2002): 105-113.
8. Garland, M. C.; Foreman, R. C.; Chad, J. E.; Holden-Dye, L. and Walker, R. J. The actions of muscle relaxants at nicotinic acetylcholine receptor isoforms. European Journal of Pharmacology 357 (1998): 83-92.
9. Tatro, D. S. Drug facts 2nd ed. U.S.A.: Facts and comparisons, 2000.
10. Lee, C. Y. Snake Venom U.S.A.: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1979.
11. ไพบูลย์ จินตกุล และ ลาวัณย์ จันทร์โสม. งูพิษในประเทศไทย กรุงเทพฯ: บริษัท ประชาชน จำกัด, 2539.
12. Joubert, F. J. Snake venom toxins: The amino acid sequences of two toxins from *Ophiophagus hannah* (king cobra) venom. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Protein Structure 317 (1973): 85-98.
13. Tan, N. H. and Saifuddin, M. N. Enzymatic and toxic properties of *Ophiophagus hannah* (king cobra) venom and venom fractions. Toxicon 27, 6 (1989): 689-695.

14. Chang, C.; Huang, T. Y.; Kuo, K. W.; Chen, S. W.; Huang, K. F. and Chiou, S. H. Sequence characterization of a novel α -neurotoxin from the king cobra (*Ophiophagus Hannah*) venom. Biochemical and Biophysical Research Communications 191, 1 (1993): 214-223.
15. Lin, S.; Chang, L. and Chang, C. Disulfide isomers of α -neurotoxins from king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom. Biochemical and Biophysical Research Communications 254 (1999): 104-108.
16. Chang, L.; Liou, J.; Lin, S. and Huang, H. Purification and characterization of a neurotoxin from the venom of *Ophiophagus hanna* (king cobra) venom. Biochemical and Biophysical Research Communications 294 (2002): 574-578.
17. De, P.; Dasgupta, S. C. and Gomes, A. A lethal neurotoxic protein from Indian king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom. Indian Journal of Experimental Biology 40, 12 (2002): 1359-64.
18. He, Y. Y.; Lee, W. H and Zhang, Y. Cloning and purification of alpha-neurotoxins from king cobra (*Ophiophagus hannah*). Toxicon 44, 3 (2004): 295-303.
19. Pu, X. C.; Wong, P. T. H.; and Gopalakrishnakone, P. A novel analgesic toxin (Hannalgesin) from the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*) Toxicon 33, 11 (1995): 1425-1431.
20. Reali, M.; Serafim, F. G.; Cruz-Höfling, M. A. and Fontana, M. D. Neurotoxic and myotoxic actions of *Naja naja Kaothia* venom on skeletal muscle *in vitro*. Toxicon 41 (2003): 657-665.
21. Cooper, D and Reich, E. Neurotoxin from venom of the cobra, *Naja naja siamensis*. The Journal of Biological Chemistry 247, 10 (1972): 3008-3013.
22. Nirthanan, S.; Gao, P.; Gopalakrishnakone, P.; Gwee, M. C. E.; Khoo, K. E.; Cheah, L. S. and Kini, R. M. Pharmacological characterization of mikatoxin, an α -neurotoxin isolated from the venom of the New-Guinean small-eyed snake *Micropechis ikaheka*. Toxicon 40 (2002): 863-871.
23. Rossetto, O.; Rigoni, M. and Montecucco, C. Different mechanism of blockade of neuroexocytosis by presynaptic neurotoxins. Toxicology Letters 149 (2004): 91-101.
24. Kuruppu, S.; Fry, B. G. and Hodgson, W. C. Presynaptic neuromuscular activity of venom from the brown-headed snake (*Glyphodon tristis*). Toxicon 45 (2005): 383-388.

25. Damico, D. C. S.; Bueno, L. G. F.; Simioni, L. R.; Marangoni, S.; Cruz-Höfling, M. A. and Novello, J. C. Neurotoxic and myotoxic actions from *Lachesis muta muta* (surucucu) whole venom on the mouse and chick nerve-muscle preparations. Toxicon 46 (2005): 222-229.
26. Fontana, M. D.; Lucas, H. S. M. and Vital Brazil, O. Neuromuscular blocking action of the *Theraphosa blondii* spider venom. Journal of Venomous Animals and Toxins 8, (2002): 98-101.
27. วีชนี อรรถทิพพหลคุณ. คอลัมน์โครมาโตกราฟี กรุงเทพฯ: ภาควิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2534.
28. Bülbbring, E. Observations on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. British Journal of Pharmacology 1 (1946): 38-61.
29. Gallagher, C. H. and Judah, J. D. The effects of neuromuscular blocking agents on mitochondria-III Effect of d-tubocurarine and pyrrolizidine alkaloids on the uptake and depletion of cations. Biochemical pharmacology 16 (1967): 883-895.



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สารละลาย Krebs solution

ประกอบด้วย : NaCl	118	mM
KCl	4.8	mM
KH ₂ PO ₄	1.2	mM
CaCl ₂	2.5	mM
MgSO ₄	2.4	mM
NaHCO ₃	25	mM
D-Glucose	11	mM

วิธีการคำนวณ

NaCl 118 mM (MW = 58.44)

NaCl 1 mM เท่ากับ 58.44 mg/L

ต้องการ NaCl 118 mM เท่ากับ $58.44 \times 118 = 6895.9$ mg/L หรือ 6.8959 g/L

ดังนั้น ต้องชั่ง NaCl 6.8959 กรัม ละลายในตัวทำละลายให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

KCl 4.8 mM (MW = 74.55)

KCl 1 mM เท่ากับ 74.55 mg/L

ต้องการ KCl 4.8 mM เท่ากับ $74.55 \times 4.8 = 357.8$ mg/L หรือ 0.3578 g/L

ดังนั้น ต้องชั่ง KCl 0.3578 กรัม ละลายในตัวทำละลายให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

CaCl₂ 2.5 mM (MW = 147.02)

CaCl₂ 1 mM เท่ากับ 147.02 mg/L

ต้องการ CaCl₂ 2.5 mM เท่ากับ $147.02 \times 2.5 = 367.55$ mg/L หรือ 0.3676 g/L

ดังนั้น ต้องชั่ง CaCl₂ 0.3676 กรัม ละลายในตัวทำละลายให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

MgSO₄ 2.4 mM (MW = 246.48)

MgSO₄ 1 mM เท่ากับ 246.48 mg/L

ต้องการ MgSO₄ 2.4 mM เท่ากับ $246.48 \times 2.4 = 591.55$ mg/L หรือ 0.5916 g/L

ดังนั้น ต้องชั่ง MgSO₄ 0.5916 กรัม ละลายในตัวทำละลายให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

KH₂PO₄ 1.2 mM (MW = 136.09)

KH₂PO₄ 1 mM เท่ากับ 136.09 mg/L

ต้องการ KH₂PO₄ 1.2 mM เท่ากับ $136.09 \times 1.2 = 163.31$ mg/L หรือ 0.1633 g/L

ดังนั้น ต้องชั่ง KH₂PO₄ 0.1633 กรัม ละลายในตัวทำละลายให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

NaHCO₃ 25 mM (MW = 84.01)

NaHCO₃ 1 mM เท่ากับ 84.01 mg/L

ต้องการ NaHCO₃ 25 mM เท่ากับ $84.01 \times 25 = 2100.3$ mg/L หรือ 2.1003 g/L

ดังนั้น ต้องชั่ง NaHCO₃ 2.1003 กรัม ละลายในตัวทำละลายให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

D-Glucose 11 mM (MW = 180.16)

D-Glucose 1 mM เท่ากับ 180.16 mg/L

ต้องการ D-Glucose 11 mM เท่ากับ $180.16 \times 11 = 1981.8$ mg/L หรือ 1.9818 g/L

ดังนั้น ต้องชั่ง D-Glucose 1.9818 กรัม ละลายในตัวทำละลายให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

หมายเหตุ : น้ำหนักโมเลกุลที่ใช้ในการคำนวณเพื่อเตรียมสารละลาย ต้องเป็นน้ำหนักโมเลกุลของสารเคมีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการนั้น ๆ

วิธีเตรียม

1. ชั่งสารเคมีตามน้ำหนักที่คำนวณได้และละลายในน้ำกลั่นดังนี้

NaCl 6.8959 g ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 100 ml _____ (1)

KCl 0.3578 g ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 100 ml _____ (2)

CaCl₂ 0.3676 g ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 100 ml _____ (3)

MgSO₄ 0.5916 g ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 100 ml _____ (4)

KH₂PO₄ 0.1633 g ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 300 ml _____ (5)

D-Glucose 1.9818 g ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 100 ml _____ (6)

- นำ (1), (2), (3), (4), (5) และ (6) เทลงใน beaker ขนาด 1000 ml ตามลำดับความสามารถในการละลายของสารแต่ละตัวจากละลายดีมากไปยังละลายน้อย เมื่อสารผสมกันดี เติม NaHCO₃ 2.1003 g ลงไป ผสมให้เข้ากันหากยังไม่เข้ากันหรือยังละลายไม่ดีอาจเติมน้ำกลั่นลงไปอีกประมาณ 100 ml
- เทสารละลายลงใน volumetric flask ขนาด 1000 ml แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1000 ml ปิดขวดแล้วผสมสารทั้งหมดอีกครั้ง โดยกลับขวดพลิกไปมาเบาๆ 5-10 ครั้ง (สารทั้งหมดต้องละลายเป็นเนื้อเดียวกัน)
- เก็บสารละลายไว้ในตู้เย็น ซึ่งเก็บไว้ใช้ได้ประมาณ 2-3 วัน การใช้ทุกครั้งให้รินใส่ภาชนะที่ปราศจากเชื้อในปริมาณที่ต้องการใช้แล้วจึงนำไปใช้ ถ้าใช้แล้วเหลือห้ามเทกลับใส่ขวดให้ทิ้งไปเพื่อป้องกันการปนเปื้อน

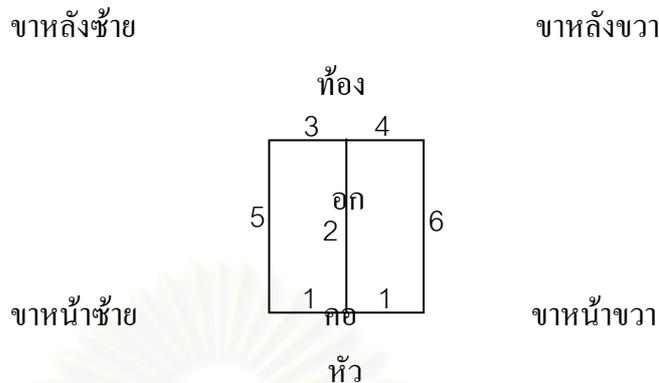
ภาคผนวก ข

การเตรียม phrenic nerve – hemi-diaphragm ที่แยกจากกายหนู mouse (Mouse phrenic nerve – hemi-diaphragm preparation)

วิธีดำเนินการ

1. เตรียม Krebs solution และนำไปแช่ในตู้เย็นให้มีอุณหภูมิประมาณ 20 องศาเซลเซียส
2. เตรียมชุดอุปกรณ์ organ bath ให้เรียบร้อย โดยเติม Krebs solution ใส่ไว้ใน organ bath ชั้นใน เปิดเครื่อง Thermo regulating water pump เพื่อควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ที่ 37 องศาเซลเซียส และเปิดท่อและถัง gas carbogen ให้ gas ไหลผ่านเข้าไปฟุ้งกระจายใน Krebs solution เตรียมรอไว้
3. เปิดเครื่องวัดการหดตัวของเนื้อเยื่อ เครื่องแปลงสัญญาณ เครื่องปรับแต่งสัญญาณ และเครื่องบันทึกสัญญาณและแสดงผล รวมถึงอุปกรณ์อื่นที่เกี่ยวข้อง ทำการ calibrate แรงดึง (tension) ด้วยตุ้มน้ำหนักขนาด 5 g โดยแขวนตุ้มน้ำหนักไว้กับตะขอที่ต่อกับ transducer และทำการ calibrate
4. เตรียมชุดอุปกรณ์ผ่าตัดเล็ก เข็มซึ่งมีไหมร้อยอยู่ และถาดจีฟี่สำหรับรองผ่าตัด
5. ใส่ Krebs solution ที่มีอุณหภูมิประมาณ 20 องศาเซลเซียส ลงในถาดจีฟี่สำหรับรองผ่าตัด เปิดท่อ gas ปล่อยให้ gas carbogen ให้ไหลผ่านเข้าไปฟุ้งกระจายใน Krebs solution เตรียมรอไว้
6. สลบหนูด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ โดยใส่หนูลงในโหลมีฝาปิดซึ่งต่อกับท่อก๊าซ
7. เมื่อหนูสลบลึก หมดความรู้สึก และเสียชีวิต ทำการผ่าเปิดบริเวณช่องคอซึ่งจะตัดเส้นเลือด บีบเลือดให้ออกมากที่สุด
8. ตัดหนังช่วงอกออกไปเพื่อเปิดให้เห็นกระดูกซี่โครงทั้งซ้ายและขวา ตามภาพแสดงแนวการผ่าตัด แนวการตัดที่ 2 ให้ตัดจากคอกยาวไปจนถึงท้องช่วงต้น
9. ตัดกระดูกซี่โครงออกเพื่อเปิดให้เห็นช่องอกตามแนวการตัดในภาพแสดงแนวการผ่าตัด โดยแนวการตัดที่ 2 ให้ตัดจากคอกไปจนถึงกระดูกซี่โครงซี่สุดท้ายมากที่สุด และแนวการตัดที่ 3 และ 4 ให้ตัดเลาะซิดไปตามแนวกระดูกซี่โครงซี่สุดท้ายมากที่สุด
10. เมื่อช่องอกเปิดโล่งจะเห็นต่อมไทมัส หัวใจ และปอด รวมไปถึงกระบังลมซึ่งเป็นแผ่นกล้ามเนื้อบาง ๆ กั้นระหว่างช่องอกและช่องท้อง
11. ค่อย ๆ ดึงปอดแต่ละ lobe ออกมาและตัดทิ้งไปอย่างระวัง เนื่องจาก phrenic nerve จะอยู่จากกระบังลมพาดมาจนถึงต่อมไทมัส

12. ตัดหัวใจออกไปอย่างระวัง ซึ่งจะเห็น phrenic nerve ชัดเจนขึ้น



___ แสดงแนวการตัดตามลำดับ

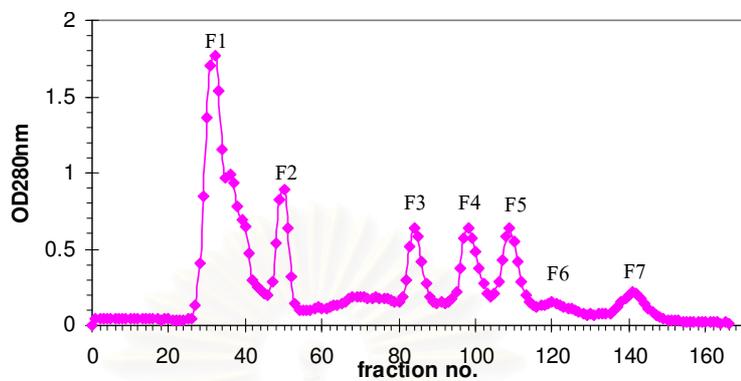
ภาพแสดงแนวการผ่าตัดเปิดช่องอก

13. ตัดกล้ามเนื้อบริเวณช่องท้องด้านหลังกระบังลมทั้งด้านซ้ายและขวาออกไป โดยตัดเลาะให้ชิดไปตามแนวกระดูกซี่โครงซี่สุดท้ายมากที่สุด
14. ขณะนี้จะเห็นกระบังลมซึ่งมี phrenic nerve ติดอยู่และพาดไปจนถึงต่อมไทมัส ตัดให้ชิดขั้วต่อมไทมัสให้มากที่สุด ซึ่ง phrenic nerve จะติดอยู่ด้วย
15. ตัดเส้นเลือดที่พาดผ่านกระบังลมทั้งด้านนอกและท้องออกไป โดยตัดให้ชิดกระบังลมซึ่งต้องระวังไม่ให้ตัดโดน phrenic nerve และไม่ให้กระบังลมขาดหรือเสียหาย
16. ตัดแยกกระบังลมซึ่งมี phrenic nerve ติดอยู่รวมถึงต่อมไทมัสออกจากกายหนู โดยตัดให้ชิดพื้นที่ท้องมากที่สุด
17. รับประทานเนื้อเยื่อที่ตัดได้ใส่ลงในถาดซีฟิ่งสำหรับรองผ่าตัดซึ่งมี Oxygenated Krebs solution ที่มีอุณหภูมิประมาณ 20 องศาเซลเซียส ใส่เตรียมไว้
18. ใช้หมุดปักที่ซี่โครงเพื่อแสดงกระบังลมด้านซ้ายและขวาได้อย่างชัดเจน ทำการตัดเนื้อเยื่อที่ไม่เกี่ยวข้องออกไปได้แก่ ต่อมไทมัส ไขมันที่อาจเกาะอยู่บนเส้นประสาท และกล้ามเนื้ออื่น ๆ ที่ติดมาด้วย
19. ตัดแยก phrenic nerve-diaphragm ซึ่งมี phrenic nerve อยู่ ทั้งด้านซ้ายและขวาออกจากกัน ซึ่งจะได้เนื้อเยื่อ 2 ชิ้น
20. ใช้เข็มร้อยตรงซี่โครงทั้งด้านบนและด้านล่างของกระบังลม ผูกมัดใหม่กับซี่โครงให้แน่นโดยปล่อยปลายเชือกด้านบนให้ยาวไว้สำหรับผูกกับตะขอที่ต่อกับ transducer และปล่อยเชือกด้านล่างไว้สำหรับผูกกับ organ bath
21. รับประทานเนื้อเยื่อไปใส่ไว้ในแต่ละ organ bath (เนื้อเยื่อ 1 ชิ้น ต่อ 1 organ bath) ที่บรรจุ Oxygenated Krebs solution อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่เตรียมไว้

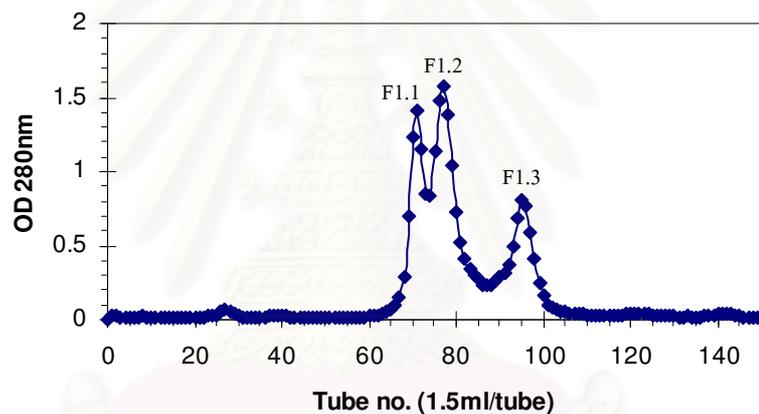
22. ผูกปลายล่างของกล้ามเนื้อกระบังลมยึดติดกับก้น organ bath และผูกปลายบนกับตะขอที่ต่อกับ transducer และใช้ suction electrode ดูด phrenic nerve ไว้ ซึ่งเมื่อทำการกระตุ้นด้วยไฟฟ้าจะกระตุ้นผ่านทาง phrenic nerve โดยไม่เกิดการกระตุ้นที่กล้ามเนื้อโดยตรง
23. แซ่กล้ามเนื้อไว้ใน Oxygenated Krebs solution อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้อัตราความดัน 0.8 g เปลี่ยนถ่าย Oxygenated Krebs solution ใหม่ใน organ bath และพักเนื้อเยื่อให้อยู่ในภาวะสมดุล (equilibrium) 30 นาที
24. เปิดเครื่องกระตุ้นไฟฟ้า (stimulator) ซึ่งเชื่อมต่อกับ suction electrode ทดลองปล่อยกระแสไฟฟ้าผ่านทาง phrenic nerve เพื่อกระตุ้นให้กล้ามเนื้อเกิดการหดตัว ด้วยความถี่ (frequency) 0.1 Hz และ ระยะเวลาในการกระตุ้น (duration) 0.2 ms โดยเริ่มต้นให้กระแสไฟฟ้าตั้งแต่ 0.5 V ไปจนกระทั่งกล้ามเนื้อเกิดการหดตัว
25. เมื่อกระตุ้นด้วยไฟฟ้าผ่านทาง phrenic nerve แล้วกล้ามเนื้อกระบังลมเกิดการหดตัว แสดงว่า phrenic nerve – hemi-diaphragm ที่เตรียมนั้นยังมีชีวิตสามารถใช้ทำการทดลองต่อไปได้ แต่หากกล้ามเนื้อกระบังลมไม่เกิดการหดตัว แสดงว่า phrenic nerve – hemi-diaphragm ที่เตรียมนั้นไม่สามารถใช้ทำการทดลองต่อไปได้

ภาคผนวก ค

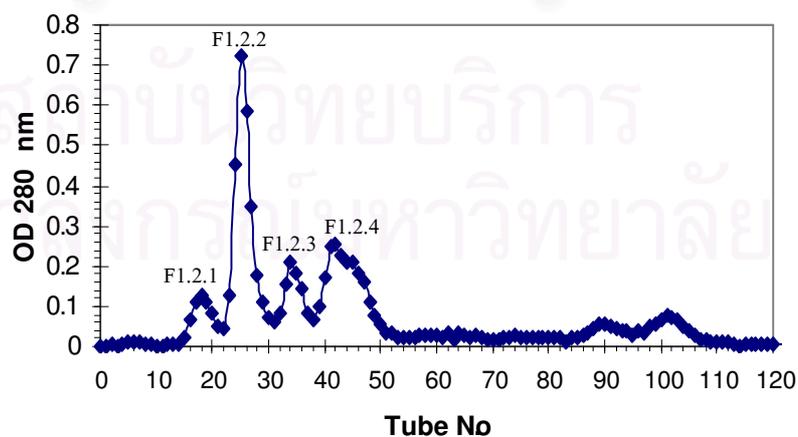
A) F1 – F7



B) F1.1 – F1.3



C) F1.2.1 – F1.2.4



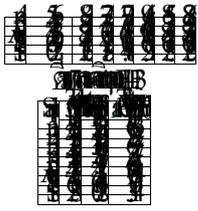
ภาพที่ 30 กราฟแสดงส่วนของพียงูจางที่แยกได้ในแต่ละรอบ
(แยกโดยคุณอรพรรณ แซ่โค้ง ฝ่ายวิจัยและพัฒนา สถานเสาวภา สภากาชาดไทย)

ตารางที่ 4 ผลการ contraction ของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้น phrenic nerve ด้วยไฟฟ้า (control)
แสดงเป็นค่า Twitch tension (%)

Time (min)	n1	n2	n3	n4	n5	Average	SD	SE
0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.0	0.0
10	105.0	105.1	98.4	101.1	99.3	101.8	3.2	1.4
20	103.6	101.6	96.6	99.9	98.8	100.1	2.7	1.2
30	100.4	98.7	95.6	100.5	97.7	98.6	2.0	0.9
40	97.1	100.2	95.3	99.6	97.4	97.9	2.0	0.9
50	96.6	99.0	95.6	97.8	97.4	97.3	1.3	0.6
60	97.6	97.6	95.5	97.0	95.8	96.7	1.0	0.4

ตารางที่ 5 เวลา (min.) ที่ใช้ในการทำให้เกิด 50% inhibition ของพินูจองาง

Concentration of venom ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	5	10	20	40	80	160
n1	20.52	19.63	9.02	7.53	4.25	3.80
n2	22.40	21.10	9.35	6.74	4.08	4.43
n3	23.46	19.34	9.96	6.25	3.99	3.86
n4	25.88	20.08	9.72	7.75	4.56	4.10
n5	24.80	18.20	7.58	5.99	4.11	4.00
Average	23.41	19.67	9.13	6.85	4.20	4.04
SD	2.09	1.06	0.94	0.77	0.22	0.25
SE	0.93	0.47	0.42	0.34	0.10	9.72



ตารางที่ 6 ผลการทดสอบฤทธิ์ของ F1 – F7

Sample	Time taken to cause 50% Inhibition (min)	Twitch tension at the 50 th min. (%)					
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
n1	4.99	86.0	69.1	64.4	80.8	89.4	84.8
n2	4.19	78.5	64.1	61.1	92.2	86.6	80.1
n3	4.04	78.9	74.2	56.1	96.6	86.5	77.0



สถาบันวิจัยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบฤทธิ์ของ F1.2.1 – F1.2.4

Sample	Time taken to cause 50% Inhibition (min)			
	F1.2.1	F1.2.2	F1.2.3	F1.2.4
n1	28.37	6.42	12.03	8.58
n2	25.92	6.87	12.97	8.76
n3	28.14	7.03	12.10	9.09
n4	34.49	7.84	12.95	9.81
n5	36.33	8.75	13.89	11.19
Average	30.65	7.38	12.79	9.49
SD	4.50	0.92	0.76	1.06
SE	2.01	0.41	0.34	0.48

ตารางที่ 9 Twitch tension (g) ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย exogenous acetylcholine

ที่ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M ก่อนและหลังการกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้า (Control)

Concentration of Acetylcholine (M)	Twitch tension (g)							
	Before				After			
	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}
n1	0.0578	0.4690	0.6300	0.6972	0.0141	0.1626	0.5893	0.7831
n2	0.1174	0.3193	0.5212	0.8420	0.1080	0.1221	0.4210	0.7982
n3	0.0445	0.1192	0.3068	0.5213	0.0540	0.1208	0.2321	0.6358
n4	0.0332	0.1161	0.2382	0.2609	0.0226	0.0859	0.1387	0.2428
n5	0.0158	0.0506	0.1059	0.2546	0.0158	0.0158	0.0933	0.3336
Average	0.0537	0.2148	0.3604	0.5152	0.0429	0.1014	0.2949	0.5587
SD	0.0388	0.1742	0.2127	0.2610	0.0398	0.0550	0.2071	0.2570
SE	0.0173	0.0779	0.0951	0.1167	0.0178	0.0246	0.0926	0.1149
Baseline	0.0125							

ตารางที่ 10 Twitch tension (g) ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M ก่อนและหลัง neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก F1.2.2

Concentration of Acetylcholine (M)		F1.2.2							
		n1	n2	n3	n4	n5	Average	SD	SE
Before	10^{-6}	0.0320	0.0120	0.0169	0.0111	0.0220	0.0188	0.0086	0.0038
	10^{-5}	0.1278	0.0376	0.0368	0.0269	0.1696	0.0797	0.0648	0.0290
	10^{-4}	0.3052	0.1247	0.1380	0.2935	0.3110	0.2345	0.0945	0.0423
	10^{-3}	0.3979	0.2466	0.2898	0.2261	0.6015	0.3524	0.1543	0.0690
After	10^{-6}	0.0160	0.0135	0.0123	0.0142	0.0173	0.0147	0.0020	0.0009
	10^{-5}	0.0176	0.0226	0.0123	0.0127	0.0157	0.0162	0.0042	0.0019
	10^{-4}	0.0186	0.0120	0.0153	0.0288	0.0183	0.0186	0.0063	0.0028
	10^{-3}	0.0192	0.0120	0.0169	0.0111	0.0183	0.0155	0.0037	0.0017
Baseline		0.0122							

ตารางที่ 11 Twitch tension (g) ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M ก่อนและหลัง neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก F1.2.3

Concentration of Acetylcholine (M)		F1.2.3							
		n1	n2	n3	n4	n5	Average	SD	SE
Before	10^{-6}	0.0153	0.0112	0.0144	0.0263	0.0182	0.0171	0.0057	0.0026
	10^{-5}	0.0430	0.0320	0.0352	0.1317	0.0561	0.0596	0.0414	0.0185
	10^{-4}	0.2669	0.1390	0.1071	0.2231	0.0758	0.1624	0.0802	0.0359
	10^{-3}	0.4693	0.3196	0.3883	0.0914	0.0712	0.2680	0.1786	0.0799
After	10^{-6}	0.0153	0.0128	0.0175	0.0170	0.0121	0.0150	0.0024	0.0011
	10^{-5}	0.0169	0.0144	0.0175	0.0201	0.0152	0.0168	0.0022	0.0010
	10^{-4}	0.0163	0.0144	0.0238	0.0248	0.0167	0.0192	0.0048	0.0021
	10^{-3}	0.0169	0.0128	0.0397	0.0129	0.0106	0.0186	0.0120	0.0054
Baseline		0.0128							

ตารางที่ 12 Twitch tension (g) ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย exogenous acetylcholine ที่ความเข้มข้น 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} M ก่อนและหลัง neuromuscular blockade อันเนื่องมาจาก F1.2.4

Concentration of Acetylcholine (M)		F1.2.4							
		n1	n2	n3	n4	n5	Average	SD	SE
Before	10^{-6}	0.0215	0.0174	0.0277	0.0291	0.0245	0.0240	0.0047	0.0021
	10^{-5}	0.2224	0.0585	0.0832	0.1033	0.1012	0.1137	0.0633	0.0283
	10^{-4}	0.2055	0.1708	0.1464	0.2551	0.1994	0.1954	0.0409	0.0183
	10^{-3}	0.3420	0.3336	0.3621	0.3988	0.5122	0.3898	0.0729	0.0326
After	10^{-6}	0.0123	0.0142	0.0108	0.0129	0.0153	0.0131	0.0018	0.0008
	10^{-5}	0.0184	0.0142	0.0216	0.0113	0.0169	0.0165	0.0039	0.0018
	10^{-4}	0.0138	0.0111	0.0145	0.0145	0.0205	0.0149	0.0034	0.0015
	10^{-3}	0.0189	0.0174	0.0123	0.0162	0.0158	0.0161	0.0025	0.0011
Baseline		0.0125							

ตารางที่ 13 เวลา (min.) ที่ใช้ในการทำให้เกิด 95% inhibition ของ Tubocurarine chloride

Tubocurarine chloride (μ M)	2.5	5	10	20
n1	6.82	3.06	2.93	2.89
n2	5.57	3.26	2.90	2.31
n3	4.75	3.98	2.17	2.16
Average	5.71	3.43	2.67	2.45
SD	1.04	0.48	0.43	0.39
SE	0.6	0.3	0.2	0.2

ตารางที่ 14 Twitch tension (%) ที่เวลาต่าง ๆ เมื่อทดสอบฤทธิ์ของ Tubocurarine chloride 20 μ M
ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้า

Time (min)	n1	n2	n3	Average	SD	SE
0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.00	0.0
1	84.1	78.4	96.0	86.2	8.98	5.2
2	15.4	12.1	10.8	12.8	2.35	1.4
3	4.0	2.4	0.9	2.4	1.56	0.9
20	2.5	2.4	0.9	1.9	0.90	0.5
40	1.8	1.9	1.0	1.6	0.49	0.3
60	1.0	1.3	1.2	1.2	0.15	0.1
80	0.9	1.5	0.8	1.1	0.38	0.2
100	0.9	1.1	0.9	1.0	0.12	0.1
120	1.0	1.5	0.9	1.1	0.32	0.2

ตารางที่ 15 ผลการ contraction ของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า
แสดงเป็นค่า Twitch tension (%)

Time (min.)	n1	n2	n3	n4	n5	Average	SD	SE
0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.0	0.0
10	65.0	64.1	84.3	78.7	43.2	67.1	15.9	7.1
20	54.7	53.5	73.7	66.5	32.9	56.3	15.6	7.0
30	49.2	47.8	62.1	57.0	25.0	48.2	14.2	6.4
40	47.8	44.9	57.6	51.9	23.7	45.2	12.9	5.8
50	45.3	43.4	57.8	47.0	23.3	43.4	12.5	5.6
60	43.7	42.2	52.7	45.6	22.6	41.4	11.2	5.0
70	43.4	40.7	50.3	43.3	21.4	39.8	10.9	4.9
80	42.5	39.9	49.4	43.4	19.3	38.9	11.5	5.1
90	40.0	38.5	46.0	41.1	16.2	36.4	11.6	5.2

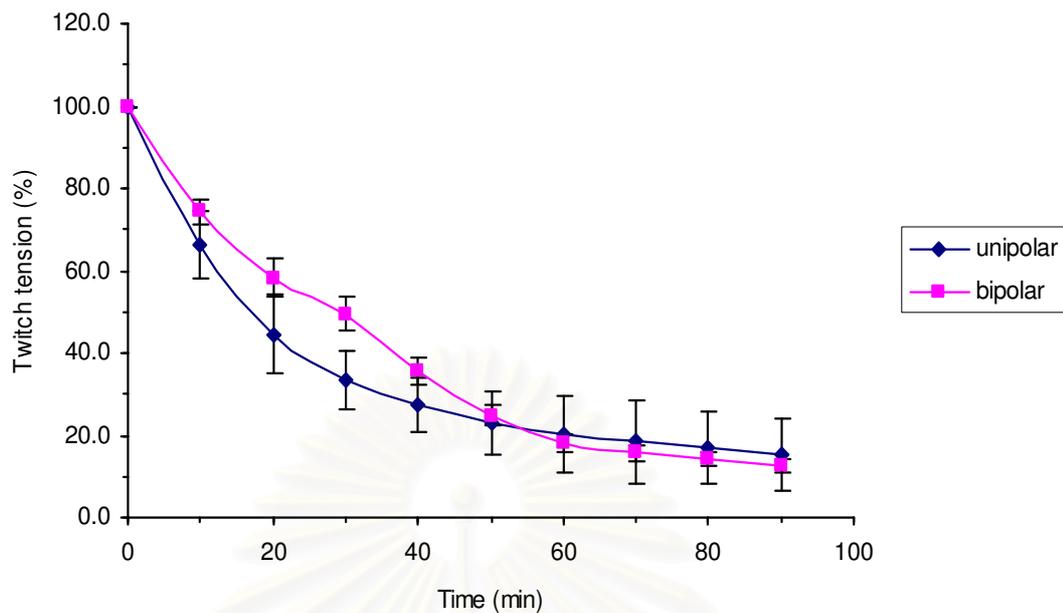
ตารางที่ 16 ผลการ contraction ของกล้ามเนื้อ เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า โดยใช้

Unipolar electrode และ Bipolar electrode หลังการปิดกั้น neuromuscular transmission

ด้วย Tubocurarine chloride

แสดงเป็นค่า Twitch tension (%)

Electrode	Time(min.)	n1	n2	n3	n4	n5	Average	SD	SE
Unipolar	0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.0	0.0
	10	73.2	79.7	65.9	65.7	46.9	66.3	12.3	5.5
	20	49.0	56.4	39.7	46.0	31.6	44.5	9.4	4.2
	30	38.4	37.6	28.3	35.0	27.2	33.3	5.2	2.3
	40	31.5	27.1	23.0	31.0	24.1	27.3	3.9	1.8
	50	25.7	19.6	19.3	28.6	22.2	23.1	4.0	1.8
	60	21.6	16.5	16.7	26.5	19.6	20.2	4.1	1.9
	70	19.0	14.6	15.2	25.1	18.2	18.4	4.2	1.9
	80	16.3	14.7	14.5	22.9	16.8	17.1	3.4	1.5
	90	14.5	13.0	13.5	20.4	14.9	15.2	3.0	1.3
Bipolar	0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.0	0.0
	10	65.0	75.3	72.5	76.2	83.0	74.4	6.5	2.9
	20	40.5	64.3	61.2	57.9	67.5	58.3	10.6	4.7
	30	36.3	52.5	58.4	43.7	57.0	49.6	9.4	4.2
	40	31.1	36.2	44.7	26.5	40.8	35.9	7.3	3.3
	50	29.1	27.4	20.3	17.9	29.4	24.8	5.3	2.4
	60	24.2	16.8	13.0	14.2	21.7	18.0	4.8	2.2
	70	22.7	13.7	12.3	12.4	17.7	15.8	4.5	2.0
	80	19.6	12.0	10.9	11.6	16.2	14.1	3.7	1.7
	90	17.2	10.5	10.3	9.7	16.0	12.7	3.6	1.6



ภาพที่ 31 การเปรียบเทียบการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อโดยตรงด้วยไฟฟ้า โดยใช้ Unipolar electrode และ Bipolar electrode แสดงค่าเป็น Mean \pm S.E.M (n = 5)

ตารางที่ 17 Twitch tension (%) ที่เวลาต่าง ๆ เมื่อทดสอบฤทธิ์ของ F1.2.2 – F1.2.4 ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นด้วยไฟฟ้าโดยตรง และกลุ่ม control

Group	Time(min.)	n1	n2	n3	n4	n5	Average	SD	SE
Control	0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.0	0.0
	5	84.0	87.2	77.5	82.7	71.2	80.5	6.3	2.8
	15	56.2	61.7	46.7	58.0	47.9	54.1	6.5	2.9
	25	44.0	41.2	33.4	44.1	41.3	40.8	4.4	2.0
fr1.2.2	0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.0	0.0
	5	87.2	75.0	82.1	94.7	73.4	82.5	8.8	3.9
	15	62.2	46.2	58.2	63.8	48.3	55.7	8.0	3.6
	25	50.9	32.0	45.3	45.3	39.7	42.6	7.2	3.2
fr1.2.3	0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.0	0.0
	5	79.3	77.8	51.7	77.0	75.4	72.2	11.6	5.2
	15	64.6	53.4	41.6	53.5	57.4	54.1	8.3	3.7
	25	56.6	40.3	38.9	42.1	49.2	45.4	7.4	3.3
fr1.2.4	0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.0	0.0
	5	86.7	74.6	82.5	86.5	77.7	81.6	5.4	2.4
	15	67.5	51.3	65.4	56.3	64.8	61.0	6.9	3.1
	25	54.5	36.9	53.2	39.0	55.5	47.8	9.1	4.1

ภาคผนวก ง
ผลการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย



บันทึกข้อความ

ส่วนราชการ ฝ่ายวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทร 4455, 4493 ต่อ 14
ที่ วจ. 3/2549 วันที่ 7 กรกฎาคมพ.ศ. 2549

เรื่อง แจ้งผลพิจารณาจริยธรรมการวิจัย

เรียน นางสาวจรีพร น้อยพรหม

จากการประชุมคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย ครั้งที่ 14/2549 ในวันอังคารที่ 4
กรกฎาคม พ.ศ. 2549 ได้พิจารณาโครงการวิทยานิพนธ์ ดังรายละเอียดดังต่อไปนี้

เรื่อง ฤทธิ์ของพืชงูจงอางต่อกล้ามเนื้อส่วนประสาท"

หัวหน้าโครงการวิจัย นางสาวจรีพร น้อยพรหม

คณะกรรมการมีมติให้ผ่านจริยธรรมการวิจัยได้

จึงเรียนมาเพื่อทราบ

(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงวิไล ชินธเนศ)

รองคณบดีฝ่ายวิจัย

ปฏิบัติราชการแทนคณบดี คณะแพทยศาสตร์

สถาบันวิทยุ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ติดต่อประสานงาน คุณสุกัญญา คุณเพ็ญศรี

โทร: 0-2256-4455, 4493 ต่อ 14, 15

REC. No. 297/48

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวจุรีพร น้อยพรหม เกิดเมื่อวันที่ 9 เมษายน พ.ศ. 2519 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีววิทยา) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ในปีการศึกษา 2540 และเข้าศึกษาต่อหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชวิทยา คณะบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2547 ปัจจุบันปฏิบัติงานในตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์การแพทย์ ฝ่ายวิจัยและพัฒนา สถานเสาวภา สภากาชาดไทย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย