บทที่ 5

การอภิปรายผล

ในการแยกโปรตีนส่วนที่เป็นพิษหรือ neurotoxin ออกจากพิษงูเห่า เพื่อให้ได้โปรตีนพิษที่ค่อนข้างบริสุทธิ์นั้น ได้มีผู้ทดลองแล้วหลายท่าน Kabara และ Fischer (1972) ได้รายงานว่าสามารถแยก neurotoxin โดย dialyse ผ่าน dialysing bag ออกมาได้ เพราะโปรตีนพิษนี้มีขนาดโมเลกุลเล็กพอที่จะผ่านเยื่อบาง ๆ ของถุงสำหรับ dialyse ที่ Kabara และ Fischer ใช้ในการทดลอง ผู้วิจัยจึงได้ทดลองใช้วิธีนี้โดยคาดว่าจะได้โปรตีนพิษแยกออกมาอยู่นอกถุงที่ใช้ในการ dialyse ส่วนสารอื่นและโปรตีนอื่นที่โมเลกุลใหญ่จะคงอยู่ภายในถุง แต่ผลการทดลองปรากฏว่า พบโปรตีนออกมานอกถุงที่ใช้ในการ dialyse ปริมาณหนึ่ง ซึ่งตรวจได้โดยการวัด Optical Density ที่ความยาวคลื่น 280 มิลลิไมครอน แต่โปรตีนมีความเจือจางและไม่สามารถนำไปหาค่าความเป็นพิษหรือ LD_{50} ได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงไม่สามารถใช้วิธีดังกล่าวในการทำให้พิษงูบริสุทธิ์ต่อไป การที่ผลการทดลองไม่เป็นไปตามที่คาดคิดไว้อาจเป็นเพราะถุงสำหรับ dialyse ที่ใช้อาจจะมีขนาดของรูต่างกับที่ Kabara และ Fischer ใช้ แต่ในรายงานที่ทั้ง 2 ท่านเขียนไว้ไม่ได้กล่าวละเอียดถึงชนิดของถุง dialyse นอกจากนี้เครื่องมือที่ Kabara และ Fischer ใช้ได้ประดิษฐ์อย่างซับซ้อนเกินที่ผู้วิจัยจะทำตามได้

Yang (1965) ได้ใช้วิธี ammonium sulfate fractionation แยก neurotoxin ออกมาจากพิษงูเห่าชื่อ Naja naja atra ได้ ผู้วิจัยได้ทดลองใช้วิธีนี้กับงูเห่าไทยพบว่า ปริมาณโปรตีนพิษที่แยกออกมาได้มีปริมาณน้อยมากคิดเป็นผลผลิตร้อยละ 1.434 ของพิษงูที่ใช้ทั้งหมด และคิดเป็นร้อยละ 5.736 ของโปรตีนพิษที่มีอยู่ ดังนั้นจึงมีการสูญเสียโปรตีนพิษไปในระหว่างการทดลองถึงร้อยละ 94.264 ของโปรตีนพิษทั้งหมด ซึ่งนับว่าไม่คุ้มค่ากับการลงทุนทำ วิธีนี้มีข้อดีตรงที่

โปรตีนพิษมีความบริสุทธิ์สูง มีค่า LD_{50} = 0.072 มิลลิกรัมต่อหนูหนัก 1 กิโลกรัม แต่มีข้อเสียตรงที่มีการสูญเสียโปรตีนพิษในระหว่างการทดลองแต่ละขั้นมาก

การวิจัยที่มิได้รายงานในที่นี้ ผู้วิจัยได้ทดลองแยกโปรตีนพิษโดยใช้วิธี ammonium sulfate fractionation หลายครั้งและใช้ความเข้มข้นของ ammonium sulfate ต่าง ๆ กัน แต่ผลการทดลองได้ผลไม่ดีเพราะโปรตีนพิษได้กระจายไปอยู่ตาม fraction ต่าง ๆ ไม่รวมอยู่ใน fraction ใด fraction หนึ่งเป็นส่วนใหญ่ ถึงแม้ว่าผู้วิจัยจะได้พยายามใช้พิษงูสด (พิษงูก่อนทำให้แห้ง) ก็ตาม ผลก็ยังไม่ดีขึ้น

<u>การใช้ความร้อนแยกโปรตีนบางส่วนออกจากพิษงู</u>

โดยที่โปรตีนพิษสามารถทนความร้อนได้สูง Yang และ Devi ได้รายงานว่าโปรตีนพิษจากพิษงู<u>Naja naja atra</u>เป็นสารที่ทนความร้อนใน pH ที่เป็นกรด คือถ้าละลายใน buffer pH 5.8 และแช่ในอ่างน้ำอุณหภูมิ 80° เซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีจะไม่สูญเสียคุณสมบัติเลย (Yang, 1965 และ Devi, 1968) ผู้วิจัยจึงได้ทดลองใช้อุณหภูมิ 80° เซลเซียสเป็นเวลา 20 นาทีกับพิษงูเห่าไทย เพื่อทำให้โปรตีนส่วนที่ไม่ทนความร้อนซึ่งเป็นโปรตีนที่ไม่มีพิษตกตะกอนแล้วแยกส่วนนี้ออก โปรตีนส่วนที่เหลืออยู่นี้พบว่ามีปริมาณโปรตีนร้อยละ 65 ของปริมาณพิษงูที่นำมาแยกทั้งหมด และมีความเป็นพิษสูงขึ้นกว่าพิษงูเห่าธรรมชาติ ดังผลการทดลองในข้อ 2 บทที่ 4 และจากการคำนวณในข้อ 3 บทเดียวกันนี้จะเห็นได้ว่า ค่าจำนวน LD_{50} ในพิษงูเห่าทั้งหมดได้สูญเสียไปในระหว่างแยกด้วยความร้อน = 16.7 เปอร์เซนต์ ดังนั้นโปรตีนที่ได้จากการแยกโปรตีนบางส่วนออกไปแล้วจะมีค่าจำนวน LD_{50} กลับคืนมาร้อยละ 83 3

การสูญเสียส่วนที่เป็นพิษของพิษงูในระหว่างการทดลองนี้อาจเนื่องมาจาก

1. ส่วนที่เป็นพิษซึ่งสูญหายไปนั้นอาจจะสูญเสียไปในระหว่างขั้นตอนของการ

ทดลองเช่น อาจจะถูกเอนไซม์พวกที่ย่อยโปรตีนซึ่งอยู่ในพิษงูเองเป็นตัวมาทำลาย หรือโปรตีนพิษติดไปกับเครื่องใช้บ้าง ทำให้สูญเสียไปบางส่วน

2. โปรตีนพิษบางส่วนอาจเกาะติดกับโปรตีนที่ตกตะกอน จึงทำให้พิษสูญเสียไปบ้าง

3. การตายของสัตว์หรือคนด้วยพิษงูเห่านั้น ได้มีรายงานว่าเนื่องมาจากโปรตีนหรือ neurotoxin(Yang, et al., 1959, 1960) เป็นส่วนใหญ่ แต่โปรตีนอื่นหรือสารชนิดอื่นก็อาจมีผลต่อการตายด้วย ซึ่งอาจจะไม่มีผลโดยตรงแต่จะมีผลในแง่ที่ไปมีปฏิกริยาร่วมกับโปรตีนหรือสารอื่น หรือแม้แต่โปรตีนพิษเอง แล้วทำให้เกิดการตายขึ้น ถ้าโปรตีนหรือสารนี้ถูกทำลายด้วยความร้อนก็อาจมีผลทำให้ความเป็นพิษ (จำนวน LD_{50}) ของพิษงูส่วนที่เหลือลดลงกว่าเดิม

<u>การทำพิษงูให้อยู่ในรูปโพลิเมอร์</u>

จากการทดลองในข้อ 5.2.1 บทที่ 3 จะเห็นว่าผู้วิจัยมิได้ระบุปริมาณที่แน่นอนของ glutaraldehyde ที่หยดลงไปในพิษงูที่จะทำให้เป็นโพลิเมอร์ ตามที่ Avrameas (1969) ได้ใช้ glutaraldehyde เชื่อมโมเลกุลของเอ็นไซม์เข้ากับโมเลกุลของโปรตีนเช่นเชื่อมโมเลกุลของเอ็นไซม์ peroxidase เข้ากับโมเลกุลของโปรตีน immunoglobulin G ของคน เป็นต้น Avarameas ได้รายงานว่าปริมาณ glutaraldehyde 10 เปอร์เซนต์ของจำนวนโปรตีนที่จะนำมาเชื่อมโมเลกุลเข้าด้วยกันเป็นปริมาณที่เหมาะสมที่สุด ผู้วิจัยได้ทดลองใช้ glutaraldehyde ปริมาณนี้แต่พบว่า โมเลกุลของโปรตีนพิษในพิษงูมาจับกันเป็นโพลิเมอร์ไม่หมด จึงได้ทดลองเพิ่มปริมาณ glutaraldehyde ขึ้นจนถึง 30% ของจำนวนโปรตีนพิษงู แต่พิษงูก็ยังเป็นโพลิเมอร์ไม่หมดยังมีส่วนที่เป็นพิษละลายอยู่ในส่วนน้ำใส (supernatant) อยู่ จึงได้แยกน้ำใสมาแล้วหยด glutaraldehyde ลงไปเป็นจำนวนมาก ปริมาตรที่หยดเท่า ๆ กับปริมาตรของส่วนน้ำใสที่มีพิษอยู่ พบว่า

ส่วนน้ำใสนี้หมดความเป็นพิษ เมื่อนำไปฉีดหนูขาว (Swiss mice) หนูไม่ตาย การทดลองนี้จึงไม่สามารถรายงานปริมาณของ glutaraldehyde ได้ว่าใช้เป็นกี่เปอร์เซนต์ของปริมาณโปรตีนพิษงู เพราะไม่ทราบแน่ว่ามีโปรตีนในน้ำใสเท่าใด

การที่ต้องใช้ glutaraldehyde จำนวนมากนี้ ผู้วิจัยกาดว่าเนื่องจากพิษงูประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิดและมีขนาดโมเลกุลต่าง ๆ กัน ตั้งแต่โมเลกุลใหญ่มากเช่น เอ็นไซม์บางชนิดไปจนถึงสารที่มีโมเลกุลที่เล็กขนาดเป็นสาย peptide สั้น ๆ เช่น cardiotoxin, cytotoxin, neurotoxin เป็นต้น ในการทำโพลิเมอร์พิษงูด้วยสาร glutaraldehyde จึงต้องใช้ปริมาณที่แตกต่างจากที่ Avarameas (1969) ได้ทำการทดลอง ซึ่งใช้โมเลกุลของโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลต่างกันเพียง 2 ชนิดมาต่อกัน ทั้งนี้เนื่องมาจากโปรตีนในพิษงูมีขนาดของโมเลกุลที่แตกต่างกัน และเป็นโปรตีนหลายชนิดซึ่งประกอบด้วยโปรตีนที่มีจำนวน free amino group ที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ประจุบนโมเลกุลของโปรตีนก็แตกต่างกันออกไปด้วย ความแตกต่างกันของโปรตีนที่มาเชื่อมต่อกันนี้จึงเป็นสาเหตุใหญ่ในการที่ทำให้ไม่สามารถใช้ปริมาณ glutaraldehyde ได้เท่ากับที่มีผู้เคยทดลองทำมาแล้ว แต่อย่างไรก็ดีการปรับ pH ของสารละลายพิษงูได้ทำให้ใกล้เคียงกับ isoelectric pH ของโปรตีนพิษ ก็จะเป็นการช่วยได้มากในการทำให้โมเลกุลของโปรตีนพิษที่มีขนาดเล็กมาจับกันเป็นโพลิเมอร์

<u>ความเป็นพิษของโพลิเมอร์พิษงู</u>

จากผลการทดลองข้อที่ 5 บทที่ 4 แสดงให้เห็นว่าไม่มีความเป็นพิษเหลืออยู่ในโพลิเมอร์ทั้งส่วนที่เป็นน้ำใสและส่วนที่เป็นตะกอน และจากผลที่ได้ฉีดโพลิเมอร์เพื่อให้เกิดภูมิคุ้มกันในหนู (Wistar Strain Rat) นั้น ปริมาณโพลิเมอร์พิษงูที่นี้ดพบว่าสูงกว่าค่า LD_{50} ของหนูนั้นถึง 50 - 70 เท่า ปรากฏว่าหนูที่ถูก immunize นั้นไม่ตายดังผลการทดลองข้อ 6.1 เป็นเครื่องแสดงว่าโพลิเมอร์พิษงูไม่มีความเป็นพิษเหลือเลย ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการ immunize สัตว์

เพื่อให้สร้างภูมิคุ้มกัน เพราะในการทำนี้จะต้องใช้แอนติเจนปริมาณมากพอที่จะทำให้สัตว์นั้นสร้างภูมิคุ้มกันได้ ซึ่งถ้าใช้พิษงูเห่าธรรมชาติเราจะไม่สามารถใช้ปริมาณนี้มา immunize สัตว์ได้ เพราะจะทำให้สัตว์นั้นตาย

โพลิเมอร์พิษงูจึงเป็นพิษงูที่ถูกเปลี่ยนแปลงแล้วทำให้ความเป็นพิษหมดไป แต่ถ้าจะนำไปใช้ประธยชน์ในการทำซีรั่มแก้พิษงูคือ นำไป immunize สัตว์ พิษงูนี้จะต้องมีคุณสมบัติของการเป็นแอนติเจน (antigenic property) เหมือนกับพิษงูธรรมชาติ หรือใกล้เคียง นั่นคือพิษงูที่เปลี่ยนแปลงนี้จะสามารถทำให้สัตว์สร้างแอนติบอดี้ที่สามารถทำลายพิษงูเห่าธรรมชาติได้ จากผลการทดลองในข้อ 6.2.1 บทที่ 4 จะเห็นได้ว่าโพลิเมอร์ของ heated toxin สามารถให้ภูมิคุ้มกันพิษงูเห่าในหนูได้

<u>ระดับแอนติบอดี้ที่ถูกสร้างขึ้นในหนูโดยโพลิเมอร์ของ heated toxin</u>

จากผลการทดลองข้อ 6.2.1 บทที่ 4 จะเห็นว่าระดับแอนติบอดี้ในซีรั่มหนูมีปริมาณสูงขึ้นหลังจากที่ฉีดโพลิเมอร์ของ heated toxin แล้ว 1 สัปดาห์ ถ้าหลังจากนั้นแล้วถึง 2 สัปดาห์จะลดลงดังเช่น ระดับของแอนติบอดี้หลัง dose ที่ 4 และ dose ที่ 7 เป็นเวลา 14 วัน แต่ระดับแอนติบอดี้ในช่วง 14 วันหลัง dose ที่ 7 ลดต่ำลงไม่มากเท่าช่วง 14 วันหลัง dose ที่ 4 ที่เป็นเช่นนี้ผู้วิจัยมีความเห็นว่าเนื่องจากได้ฉีดโพลิเมอร์ dose ที่ 5, 6 และ 7 ติดต่อกันทุก 7 วัน รวมทั้งหนูได้รับการฉีดโพลิเมอร์มาก่อนจนถึง dose ที่ 4 ด้วย จึงทำให้ระดับแอนติบอดี้หลัง dose ที่ 7 แล้ว 14 วันยังไม่ลดลงต่ำ จึงเป็นแนวทางที่ทำให้คิดต่อไปว่า ถ้าเราสามารถให้โพลิเมอร์หลาย ๆ dose ติดต่อกันทุก 7 วัน ระดับแอนติบอดี้อาจจะคงระดับเดิมต่อไปได้นานเกิน 14 วันก็ได้

จากการที่ระดับแอนติบอดี้ยังคงที่เมื่อฉีด dose ที่ 11 แล้ว 7 วัน ทำให้ผู้วิจัยเข้าใจว่าถ้าฉีด dose ต่อ ๆ ไปอีกระดับแอนติบอดี้อาจจะไม่สูงไปกว่านี้

อีก แต่เนื่องจากต้องการทดสอบโดยการฉีดพิษงูเข้าไปในตัวหนูที่มีภูมิคุ้มกันนี้โดยตรง จึงไม่ได้รอตรวจว่าระดับแอนติบอดี้จะลดลงเมื่อใด และนอกจากนี้การเจาะเลือกจากเส้นเลือดที่ตาของหนูบ่อยครั้งทำให้เกิดแผลเป็นทำให้การเจาะยากขึ้น และหนูออนแอลง เนื่องจากคมยาสลบบ่อยครั้งด้วย ผู้วิจัยเกรงว่าถ้าเจาะเลือดต่อไปจะทำให้การทดสอบโดยวิธีฉีดพิษงูเข้าในหนูโดยตรงนี้ทำได้ยาก จากผลการทดลองในข้อ 6.2.1 บทที่ 4 นี้ อาจสรุปได้ว่า สำหรับสัตว์ทดลองที่ใช้คือหนู (Wistar Strain Rat) การสร้างแอนติบอดี้ต่อโพลิเมอร์พิษงูอาจจะสามารถทำได้เพียงระดับนี้ แต่ถ้าเป็นสัตว์ชนิดอื่นหรือสัตว์ที่ใหญ่กว่านี้เช่น แกะ ม้า อาจจะสามารถสร้างภูมิคุ้มกันต่อพิษงูได้ดีกว่าก็เป็นได้ ดังนั้นการวิจัยโดยการพยายามหาสัตว์ที่ใหญ่กว่านี้มาทำการทดลองจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจอย่างยิ่ง และนอกจากนี้ในการวิจัยนี้ได้ทดลองใช้ปริมาณของโพลิเมอร์ที่ immunize หนูเท่ากันหมดโดยตลอด เนื่องจากไม่สามารถหาหนูจำนวนมากมาทำการทดลองใช้ปริมาณต่าง ๆ กันได้ รวมทั้งพิษงูที่มีอยู่ก็มีปริมาณจำกัด ดังนั้นระดับแอนติบอดี้ที่สร้างขึ้นอาจจะสูงได้มากที่สุดเพียงเท่านี้ คือ ซีรั่ม 1 มิลลิลิตรทำลายพิษงูได้ 13.40 LD_{50} สำหรับการ immunize ด้วยปริมาณโพลิเมอร์เท่าที่กล่าวมาแล้ว แต่ถ้าสามารถทำการวิจัยต่อไปโดยทดลองใช้ปริมาณโพลิเมอร์ต่าง ๆ กัน ก็อาจจะหาปริมาณที่เหมาะสมที่จะทำให้ระดับของแอนติบอดี้สูงขึ้นกว่าการทดลองนี้ได้

<u>ระดับแอนติบอดี้ที่ถูกสร้างขึ้นในหนูโดยโพลิเมอร์ของ unheated toxin</u>

จากผลการทดลองข้อ 6.2.2 บทที่ 4 จะเห็นว่าระดับแอนติบอดี้ที่สร้างขึ้นในหนูโดยโพลิเมอร์ของ unheated toxin อยู่ในระดับต่ำมากจนไม่สามารถคำนวณค่าจำนวนพิษงูที่ซีรั่มทำลายได้ ถึงแม้ว่าจะ immunize หนูด้วยโพลิเมอร์นี้จนถึง dose ที่ 11 ระดับแอนติบอดี้ก็ยังไม่สูงขึ้น จึงเข้าใจว่า unheated toxin มีโปรตีนอื่นที่ไม่มีใน heated toxin ปนอยู่ โปรตีนส่วนนี้คือโปรตีนส่วนที่ตกตะกอนโดยใช้ความร้อน 80° เซลเซียส ซึ่งอาจจะมีอิทธิพลต่อการเกิดโพลิเมอร์

ของโปรตีนพิษหรืออาจจะรวมกับโปรตีนพิษจนทำให้เสีย คุณสมบัติของการเป็นแอนติเจน ได้

การทดสอบหาภูมิคุ้มกันในหนูโดยฉีดพิษงูเข้าในตัวหนู (in vivo test)

จากผลการทดลองข้อ 7 บทที่ 4 จะเห็นว่า หนูกลุ่มที่ถูก immunize ด้วยโพลิเมอร์ของ heated toxin สามารถทนต่อพิษงูได้ 8 LD_{50} ซึ่งที่จริงแล้วหนูควรจะทนพิษงูได้มากกว่านี้ เพราะภายในตัวหนูจะมีแอนติบอดี้อยู่เป็นจำนวนมาก สาเหตุที่ทำให้หนูทนได้ไม่มากนี้ผู้วิจัยเข้าใจว่าเกิดจาก

1. อาจเป็นเพราะหนูได้รับการฉีดพิษงูจำนวน 3 LD_{50} และ 5LD_{50} มาก่อน จึงอาจทำให้โมเลกุลของแอนติบอดี้ต่อพิษงูในซีรั่มในตัวหนูถูกใช้ไปจำนวนหนึ่งก่อนที่จะได้รับพิษงูจำนวน 8 LD_{50}

2. จากสาเหตุข้อ 1 และการเจาะเลือดหนูเป็นระยะเวลานาน ๆ ทำให้หนูมีสุขภาพเสื่อมลง รวมทั้งการที่ถูกดมยาสลบบ่อยครั้งด้วย จึงทำให้หนูสร้างความต้านทานได้ไม่ดี

3. การฉีดพิษงูปริมาณที่สูง ๆ เข้าในร่างกายสัตว์ ถึงแม้ว่าสัตว์นั้นจะมีแอนติบอดี้ต่อพิษงูระดับสูงก็ตาม แต่ด้วยความเป็นพิษที่สูงของพิษงู แอนติบอดี้อาจจะเข้าทำลายพิษงูไม่ทันมีพิษบางส่วนที่รอดไปจับกับเซลล์เป้าหมาย ทำให้สัตว์นั้นเจ็บป่วยและตายเพราะส่วนที่เป็นพิษของพิษงูมีความร้ายแรงมากด้วยปริมาณเพียงเล็กน้อยก็ทำให้สัตว์นั้นตายได้

ส่วนการฉีดพิษงูเข้าในหนูกลุ่มที่ immunize ด้วยโพลิเมอร์ของ unheated toxin พบว่าการตายน้อยลงเมื่อฉีดพิษงูจำนวน 3 LD_{50} แสดงว่ามีแอนติบอดี้ต่อพิษงูอยู่ในเลือดบ้าง แต่น้อยมากจนไม่สามารถจะทำลายพิษงูจำนวน 3 LD_{50} ให้หมดไปได้ จึงมีพิษบางส่วนเหลืออยู่และไปทำให้หนูตาย

การวิธีนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการผลิตซีรั่มแก้พิษงู ซึ่งจะต้องใช้พิษงูฉีดเข้าในตัวม้า การฉีดพิษงูนี้จะไม่สามารถใช้ปริมาณที่สูงเพราะจะทำให้ม้าตาย ทำให้การสร้างแอนติบอดี้เกิดได้ไม่มาก แต่ถ้าเราสามารถทำพิษงูให้หมดความเป็นพิษโดยทำให้อยู่ในรูปโพลิเมอร์ ก็จะสามารถฉีดแอนติเจนนี้ได้จำนวนมากขึ้นในจำนวนที่พอเหมาะสำหรับให้ม้าสร้างภูมิคุ้มกันได้ดี และการทำโพลิเมอร์จะเป็นการเพิ่มขนาดโมเลกุลของโปรตีนพิษ เนื่องจากโปรตีนพิษในพิษงูตามธรรมชาตินอกจากจะมีพิษแล้วยังมีขนาดโมเลกุลเล็ก (ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 70 โมเลกุล) ซึ่งสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กเพียงนี้ย่อมมีประสิทธิภาพในการเป็นแอนติเจนต่ำกว่าสารที่โมเลกุลใหญ่ ดังนั้นการทำโพลิเมอร์ย่อมทำให้คุณสมบัติของการเป็นแอนติเจนของพิษงูดีขึ้น วิธีการนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการผลิตซีรั่มแก้พิษงูอย่างยิ่งและนอกจากนี้วิธีทำพิษงูให้อยู่ในรูปของโพลิเมอร์โดยใช้วิธีนี้ยังเป็นวิธีสดวก ไม่ยาก ไม่เปลืองเวลา และไม่เปลืองทุนทรัพย์ในการทำด้วย