บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. <u>ความเป็นพิษ (toxicity) ของพิษงูเห่าไทย</u>

พิษงูเห่าที่ใช้ตลอดการทดลองได้จากสถานเสาวภา สภากาชาดไทย เป็นพิษงูที่ทำให้แห้งในอุณหภูมิต่ำ (lyophilization) จากการหาความเป็นพิษของพิษงูเห่าไทยที่ใช้ทดลองคือ lot ที่ 32.1627 และ lot ที่ 31.8635 โดยการหาค่า LD_{50} ด้วยวิธีของ Reed และ Muench (Reed and Muench, 1938) พบว่า

พิษงูเห่า lot ที่ 32.1627 มีค่า LD_{50} = 0.214 มิลลิกรัมต่อหนูหนัก 1 กิโลกรัม

พิษงูเห่า lot ที่ 31.8635 มีค่า LD_{50} = 0.218 มิลลิกรัมต่อหนูหนัก 1 กิโลกรัม

ผลการทดลองหาค่า LD_{50} ของพิษงูเห่าไทยทั้ง 2 lot จะเห็นได้ว่าค่า LD_{50} ใกล้เคียงกันมาก ดังนั้นจากผลการทดลองที่ทำมาอาจจะสรุปได้ว่าค่า LD_{50} ของพิษงูเห่าไทยมีค่าประมาณ 0.216 มิลลิกรัมต่อหนูหนัก 1 กิโลกรัม

2. <u>ผลของการขจัดโปรตีนที่ไม่มีพิษ (non - toxic protein) ด้วยความร้อน</u>

ได้นำพิษงูเห่าแห้งมาละลายใน acetate buffer pH 5.8 โดยให้สารละลายพิษงูมีความเข้มข้น 10, 15, 20, 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ต่อจากนั้นนำไปแช่ในอ่างน้ำร้อนที่ 80° เซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วแยกเอาส่วนน้ำใส (supernatant) มาหาปริมาณโปรตีน ผลการทดลองได้แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2

แสดงผลของการขจัดโปรตีนที่ไม่มีพิษออกจากพิษงู โดยใช้สารละลายพิษงูที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

ความเข้มข้นของพิษงู		ทำการทดลองครั้งที่	โปรตีนที่เหลือในส่วนน้ำใส (%)		โปรตีนที่ตกตะกอน (%)		ความเป็นพิษของโปรตีนส่วนที่เหลือเป็น LD_{50} มก/หนูหนัก ๑ กก.	
มก./มล.	(%)		ค่าจากการทดลอง	ค่าเฉลี่ย	ค่าจากการทดลอง	ค่าเฉลี่ย	ค่าจากการทดลอง	ค่าเฉลี่ย
10	1.0	1	64.50	68.55	35.50	31.45	0.175	0.177
		2	72.60		27.40		0.178	
15	1.5	1	60.50	64.52	39.50	35.48	0.161	0.196
		2	68.53		31.47		0.231	
20	2.0	1	63.30	65.20	36.70	34.80	0.173	0.192
		2	67.10		32.90		0.211	
25	2.5	1	64.80	67.95	35.20	32.05	0.167	0.172
		2	71.10		28.90		0.176	

ตามตารางที่ 2 จะเห็นได้ว่า ความเข้มข้นของสารละลายพิษงูที่ทดลองทั้ง 4 ค่านั้นไม่ได้มีผลต่อปริมาณของโปรตีนที่ตกตะกอนหรือของโปรตีนที่ประสงค์จะแยกออกไปเลย ปริมาณของโปรตีนที่เหลือในส่วนน้ำใสซึ่งมีโปรตีนพิษปนอยู่ในปริมาณที่สูงนั้นมีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 64 ถึง 68 ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้ความเข้มข้นของสารละลายพิษงู 2.5 เปอร์เซนต์ เพื่อจะได้สารละลายพิษงูที่มีความเข้มข้นพอเหมาะที่จะใช้ทดลองต่อไปได้

ในการทดลองต่อไปได้เตรียมสารละลายพิษงูทั้ง 2 lot ให้มีความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซนต์แล้วแยกเอาโปรตีนที่ไม่มีพิษออกโดยใช้ความร้อนตามวิธีที่กล่าวมาแล้วในบทที่ 3 ข้อ 2.3 หลังจากแยกตะกอนออกไปแล้วได้หาปริมาณโปรตีนในน้ำใสที่ได้พบว่า มีปริมาณโปรตีนเหลืออยู่ประมาณร้อยละ 65 โปรตีนพิษส่วนใหญ่จะอยู่ในน้ำใสนี้ นอกจากนั้นยังมีโปรตีนอื่น ๆ ที่ทนความร้อนปนอยู่ด้วย นำไปหาค่าความเป็นพิษพบว่ามีค่า LD_{50} = 0.167 มิลลิกรัมต่อหนูหนัก 1 กิโลกรัม ส่วนโปรตีนที่ตกตะกอนจะเป็นค่าโปรตีนส่วนที่หายไปจากน้ำหนักพิษงูแห้งทั้งหมดคือร้อยละ 35 ได้เปรียบเทียบค่าความเป็นพิษของพิษงูที่แยกโปรตีนบางส่วนออกไปแล้วนี้กับพิษงูเท่าธรรมชาติ ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3

แสดงการเปรียบเทียบความเป็นพิษของพิษงูที่ได้ตามธรรมชาติ(unheated toxin) และพิษงูที่ใช้ความร้อนแยกโปรตีนบางส่วนออก (heated toxin)

พิษงูเห่า	หนูทดลอง กลุ่มที่ (กลุ่มละ 5 ตัว)	ปริมาณโปรตีนที่ฉีด (ไมโครกรัม/หนู 1 ตัว)	จำนวนหนูตาย / จำนวนหนูที่ฉีด	LD_{50} (มก./หนู 1 กก.)	จำนวน LD_{50} ในพิษงู 1 มก.
พิษงูเห่าที่ได้ตามธรรมชาติ	1	36.096	5/5	0.216	202.9
	2	18.048	5/5		
	3	9.024	5/5		
	4	4.512	0/5		
	5	2.256	0/5		
พิษงูเห่าที่แยกโปรตีนบางส่วนออกโดยใช้ความร้อน	1	13.952	5/5	0.167	260.4
	2	6.976	5/5		
	3	3.488	0/5		
	4	1.744	0/5		
	5	0.872	0/5		

จากตารางที่ 3 จะเห็นว่าค่าความเป็นพิษของพิษงูเห่าที่แยกโปรตีนบางส่วนออกไปแล้วมีค่า LD_{50} = 0.167 มิลลิกรัมต่อหนูหนัก 1 กิโลกรัม ส่วนพิษงูเห่าธรรมชาติมีค่า LD_{50} = 0.216 มิ ลลิกรัมต่อหนูหนัก 1 กก. แสดงว่าหลังจากแยกโปรตีนบางส่วนออกไปแล้วจะทำให้พิษงูมีความเป็นพิษสูงขึ้นและโปรตีนที่แยกออกไปนั้น ส่วนใหญ่จะเป็นโปรตีนที่ไม่มีพิษ แต่โปรตีนส่วนนี้ไม่สามารถจะนำมาหาค่าความเป็นพิษได้เนื่อง จากเป็นโปรตีนที่ถูกทำลายโดยความร้อนมีลักษณะเป็นตะกอนชิ้นใหญ่ขนาดต่าง ๆ กัน ไม่สามารถฉีดเข้าในหนูเพื่อหาค่า LD_{50} ได้

3. <u>ผลของการคำนวณหาค่าของความเป็นพิษที่ได้กลับคืนมาหลังจากการขจัดโปรตีนที่ไม่มีพิษบางส่วนออก โดยคิดตามค่า LD_{50} (Percentage of Recovery Toxin)</u>

เริ่มการทดลองใช้พิษงูเห่าหนัก 500 มิลลิกรัม

จำนวน LD_{50} ในพิษงู 500 มิลลิกรัม = $\frac{500}{0.216}$ = 2336.5 LD_{50}

หลังจากแยกโปรตีนบางส่วนออกแล้ว เหลือพิษงูอีก 65% = $65 \times \frac{500}{100}$ = 325 มก.

จำนวน LD_{50} ในพิษที่เหลือ 325 มิลลิกรัม = $\frac{325}{0.167}$ = 1946.1 LD_{50}

เพราะฉะนั้นปริมาณพิษงู (toxin) โดยคิดตามจำนวน LD_{50} ที่หายไปหลังจากแยกโปรตีนบางส่วนออกไปแล้ว = 2336.5 − 1946.1

= 390.4 LD_{50}

จำนวน LD_{50} ที่หายไปคิดเป็นร้อยละ $\frac{390.40 \times 100}{2336.5}$ = 16.7

จากการคำนวณข้างต้นจะเห็นว่า จำนวน LD_{50} ในพิษงูตั้งต้น 500 มิลลิกรัม จะลดลงหลังจากนำพิษงูนั้นไปให้ความร้อน แสดงว่าความเป็นพิษของพิษงูได้สูญเสียไปบ้างหลังจากแยกโปรตีนบางส่วน ซึ่งอยู่ในรูปตะกอนออกไปแล้ว ความเป็นพิษที่หายไปประมาณร้อยละ 16.7 นั้น อาจเนื่องจาก

โมเลกุลของโปรตีนพิษบางส่วนเกาะติดกับตะกอน หรือส่วนพิษที่หายไปนั้นได้สูญเสียไปตามขั้นตอนของการทดลอง ได้แสดงสรุปค่าที่คำนวณได้ในตารางที่ 4

ตารางที่ 4

แสดงค่าความเป็นพิษของพิษงูที่สูญเสียไปในขบวนการขจัดโปรตีนที่ไม่มีพิษ

ปริมาณพิษงูที่ใช้ในการทดลองตั้งต้น (มิลลิกรัม)	หลังจากให้ความร้อนมีปริมาณพิษงูเหลืออยู่ (มิลลิกรัม)	จำนวน LD_{50} ในพิษงูตั้งต้น	จำนวน LD_{50} ในพิษงูหลังจากให้ความร้อน	จำนวน LD_{50} ที่หายไปหลังจากให้ความร้อน	จำนวน LD_{50} ที่หายไป (ร้อยละ)
500	325	2336.5	1946.1	390.4	16.7

จากค่าที่แสดงในตารางที่ 4 จะเห็นว่าค่าความเป็นพิษซึ่งคิดเป็น LD_{50} ของพิษงูหลังจากให้ความร้อนแล้วลดลงร้อยละ 16.7 ดังนั้นพิษงูที่ให้ความร้อนแล้วจะมีความเป็นพิษที่ได้กลับคืนมาคิดเป็นร้อยละ 83.3

4. ผลการทำพิษงูให้อยู่ในรูปโพลิเมอร์

ได้ทำโพลิเมอร์ของพิษงูทั้ง 2 ชนิดคือ heated toxin และ unheated toxin ตามวิธีการที่กล่าวแล้วในบทที่ 3 ข้อ 5.2.1 โดยหยด glutaraldehyde เป็น 2 ขั้นตอนผลที่ได้มีดังนี้คือ

ขั้นที่ 1 หลังจากหยด glutaraldehyde ลงไปในสารละลายพิษงูปริมาณ 30 เปอร์เซนต์ โดยคิดตามน้ำหนัก (weight by weight) จะเกิดตะกอนขึ้น ตะกอนที่ได้จากสารละลายพิษงูมีลักษณะเป็นตะกอนสีส้ม เป็นตะกอนหนักและมีปริมาณมาก

ขั้นที่ 2 หลังจากหยด glutaraldehyde ลงในส่วนน้ำใสที่แยกได้จากขั้นที่ 1 ปริมาณเกินพอ (excess) โดยใส่ glutaraldehyde ลงไปปริมาตรเท่ากับปริมาตรของส่วนน้ำใสที่แยกได้ ตะกอนที่เกิดขึ้นมีสีส้มอ่อนเป็นตะกอนเบาและมีปริมาณน้อย ขนาดตะกอนเล็กกว่าตะกอนในขั้นที่ 1

นำตะกอนทั้ง 2 ครั้งรวมทั้งน้ำใสที่ได้ในขั้นที่ 1 มารวมกันแล้ว dialyse เพื่อเอา glutaraldehyde ออกก่อนที่จะนำไปใช้ฉีดสัตว์ ในการทำโพลิเมอร์นั้นได้ทดลองทำทั้งโพลิเมอร์ของ heated toxin และ unheated toxin แต่ไม่เห็นความแตกต่างกันระหว่างโพลิเมอร์ทั้ง 2 ชนิด นำโพลิเมอร์ที่ได้จากการเตรียมข้างต้นไป immunize สัตว์

5. <u>ผลการทดสอบความเป็นพิษ (toxicity) ของโพลิเมอร์</u>

หลังจากได้โพลิเมอร์ซึ่งอยู่ในรูป suspension จากการเตรียมดังกล่าวในบทที่ 3 ข้อ 5.2.1 และข้อ 5.2.2 แล้ว ก่อนที่จะนำโพลิเมอร์ไป immunize หนู (rat) ได้ทำการทดสอบความเป็นพิษของโพลิเมอร์ที่เตรียมได้ก่อนโดยฉีดเข้าไปในช่องท้องของหนูขาว (Swiss mice) จากการทดลองที่ไม่ได้รายงานในที่นี้โดยการใช้ glutaraldehyde ปริมาณต่ำกว่า 30 เปอร์เซนต์พบว่าตะกอนที่เกิดขึ้นไม่มีพิษเหลืออยู่ แต่พิษงูยังคงเหลืออยู่ในส่วนน้ำใส (supernatant) ดังนั้นการทดสอบความเป็นพิษหลังจากที่พิษงูอยู่ในรูปโพลิเมอร์แล้วจึงทดสอบเฉพาะความเป็นพิษของส่วนน้ำใส หลังจากเตรียมโพลิเมอร์ดังกล่าวในข้อ 5.2.1 และข้อ 5.2.2 แล้ว ได้ทดสอบความเป็นพิษที่เหลืออยู่ในน้ำใส โดยฉีดน้ำใส 1 มิลลิลิตรเข้าทางช่องท้องของหนูขาว ผลการทดลองพบว่า หนูขาวที่ได้รับการฉีดน้ำใสทั้ง 3 ตัวไม่แสดงอาการอย่างใดเลย ปริมาตรของส่วนน้ำใสที่ฉีดหนู (mice) นี้มีปริมาตรสูงกว่าปริมาตรของส่วนน้ำใสที่ปนอยู่กับโพลิเมอร์พิษงูที่จะ immunize ในหนู (rat) ถึง 20 เท่า (โดยเทียบปริมาตรกับน้ำหนักของหนูที่ฉีด)

6. การกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อพิษงูเห่าในหนู (Wistar Strain Rat)

6.1 ผลการฉีดโพลิเมอร์พิษงูเพื่อให้เกิดภูมิคุ้มกันในหนู

ได้ทำการทดลองโดยแบ่งหนูออกเป็น 3 กลุ่มคือ

กลุ่มที่ 1 จำนวนหนู 7 ตัว ได้รับการฉีดโพลิเมอร์ของ heated toxin ตัวละ 2 – 3 มิลลิกรัม ผลการทดลองพบว่า หนูไม่แสดงอาการเจ็บป่วยใด ๆ และอยู่ครบทั้ง 7 ตัว

กลุ่มที่ 2 จำนวนหนู 7 ตัว ได้รับการฉีดโพลิเมอร์ของ unheated toxin ตัวละ 2 – 3 มิลลิกรัมเช่นเดียวกับกลุ่มแรก ผลการฉีดพบว่า หนูไม่แสดงอาการเจ็บป่วยใด ๆ เช่นเดียวกับหนูกลุ่มที่ 1

กลุ่มที่ 3 จำนวนหนู 5 ตัว ได้รับการฉีดพิษงูเห่าธรรมชาติตัวละ 2 – 3 มิลลิกรัม ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงกว่าค่า LD_{50} ที่หาในหนู (mice) ถึง 50 – 70 เท่า (การที่ใช้ปริมาณนี้เพื่อต้องการให้ปริมาณแอนติเจนเท่ากับที่ฉีดในกลุ่มที่ 1 และ 2) ผลการฉีดพบว่าหนูตายหมดทั้ง 5 ตัว

ผลการทดลองแสดงให้เห็นได้ชัดเจนว่า เราไม่สามารถใช้พิษงูธรรมชาติมากระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันในหนูได้ เพราะพิษงูจะฆ่าหนูตายหมด ดังนั้นผลการทดลองต่อไปนี้จึงเป็นผลการทดลองที่ทำกับหนูกลุ่มที่ 1 และ 2 ซึ่งจะได้รับพิษงูที่อยู่ในรูปโพลิเมอร์เท่านั้น

6.2 ระดับของแอนติบอดี้ที่สร้างขึ้นในหนู (Wistar Strain Rat)

6.2.1 ระดับของแอนติบอดี้ที่เกิดจากการฉีดโพลิเมอร์ของ heated toxin

ซีรั่ม ที่เจาะได้แต่ละครั้งหลังการฉีดโพลิเมอร์ ได้นำมาหาระดับของแอนติบอดี้โดยดูประสิทธิภาพในการ neutralize พิษงูเห่าที่ได้ตามธรรมชาติด้วยวิธีการตามข้อ 6.2.2 ในบทที่ 3 ผลการทดลองปรากฏในตารางที่ 5 และรูปที่ 1

ตารางที่ 5

แสดงผลการหาระดับของแอนติบอดี้ในซีรั่มของหนู (Wistar Strain Rat) หลังจากฉีดโพลิเมอร์ของ heated toxin ในระยะเวลาต่าง ๆ

เจาะเลือดครั้งที่	ระยะเวลาในการเจาะเลือดเพื่อหาระดับแอนติบอดี้	ปริมาณที่ฉีดเข้าในหนู (Swiss mice) 1 ตัว		จำนวนหนูรอด / จำนวนหนูที่ถูกฉีด	ปริมาณพิษงูที่ซีรั่ม 1 มล. ทำลายได้
		ซีรั่ม (มิลลิลิตร)	พิษงูธรรมชาติ (มิลลิกรัม)		
1	หลังจากฉีด dose ที่ 2 แล้ว 7 วัน	0.25	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	0 LD_{50}
		0.125	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	
		0.0625	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	
2	หลังจากฉีด dose ที่ 4 แล้ว 7 วัน	0.25	0.0098 ($2LD_{50}$)	3/3	11.30LD_{50}
		0.125	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	
		0.0625	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	
3	หลังจากฉีด dose ที่ 4 แล้ว 14 วัน	0.25	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	0 LD_{50}
		0.125	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	
		0.0625	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	

ตารางที่ 5 (ต่อ)

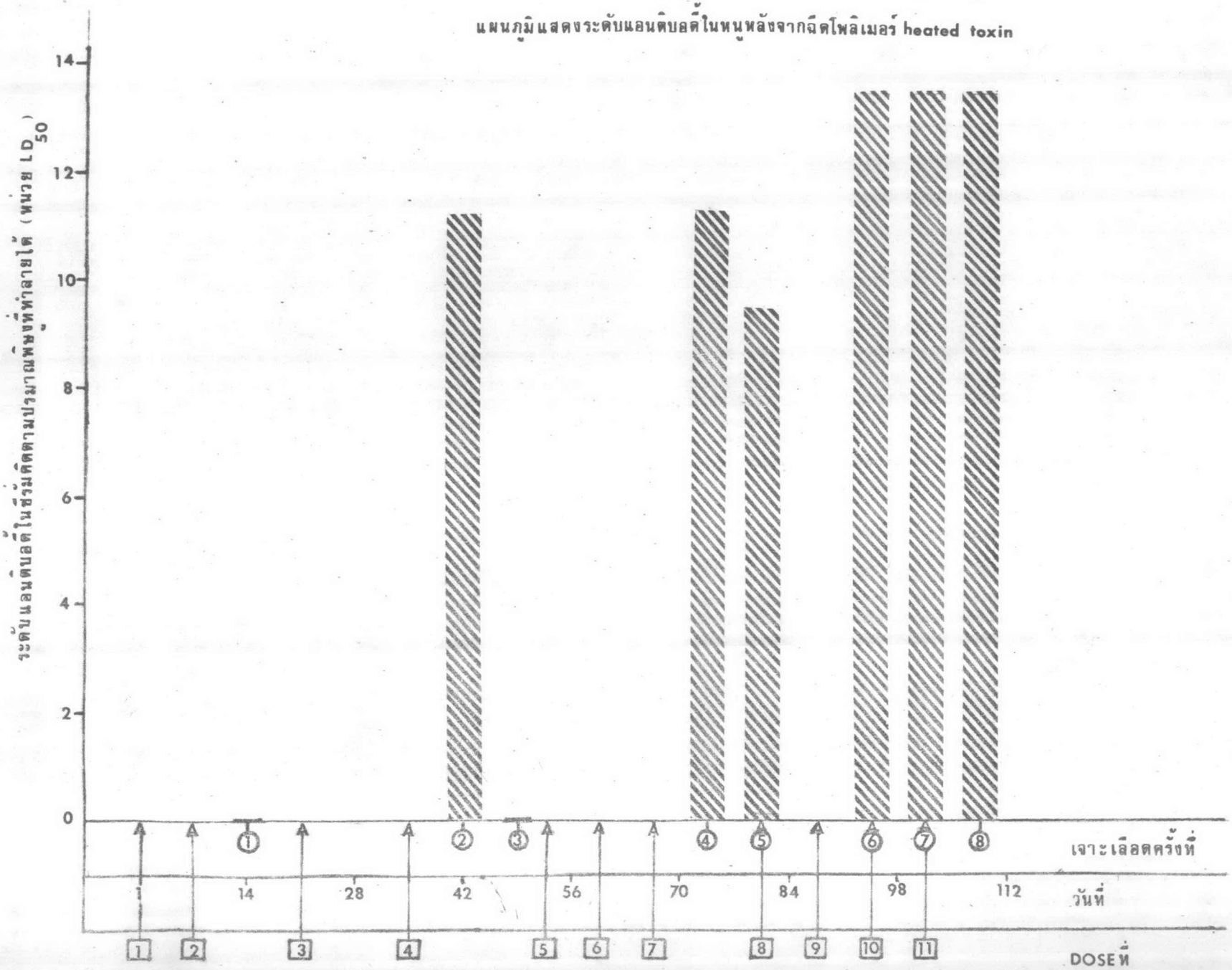
เจาะเลือดครั้งที่	ระยะเวลาในการเจาะเลือดเพื่อหาระดับแอนติบอดี้	ประมาณที่ฉีดเข้าในหนู (Swiss mice) 1 ตัว		จำนวนหนูรอด / จำนวนหนูที่ถูกฉีด	ปริมาณพิษงูที่ซีรั่ม ๑ มิลลิลิตรทำลายได้
		ซีรั่ม (มิลลิลิตร)	พิษงูธรรมชาติ (มิลลิกรัม)		
4	หลังจากฉีด dose ที่ 7 แล้ว 7 วัน	0.25	0.0098 ($2LD_{50}$)	3/3	11.30LD_{50}
		0.125	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	
		0.0625	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	
5	หลังจากฉีด dose ที่ 7 แล้ว 14 วัน	0.25	0.0098 ($2LD_{50}$)	2/3	9.50 LD_{50}
		0.125	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	
		0.0625	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	
6	หลังจากฉีด dose ที่ 9 แล้ว 7 วัน	0.25	0.0098 ($2LD_{50}$)	3/3	13.42LD_{50}
		0.125	0.0098 ($2LD_{50}$)	1/3	
		0.0625	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	
7	หลังจากฉีด dose ที่ 10 แล้ว 7 วัน	0.25	0.0098 ($2LD_{50}$)	3/3	13.42LD_{50}
		0.125	0.0098 ($2LD_{50}$)	1/3	
		0.0625	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	

ตารางที่ 5 (ต่อ)

เจาะเลือดครั้งที่	ระยะเวลาในการเจาะเลือดเพื่อหาระดับแอนติบอดี้	ปริมาณที่ฉีดเข้าในหนู (Swiss mice) 1 ตัว		จำนวนหนูรอด / จำนวนหนูที่ถูกฉีด	ปริมาณพิษงูที่ซีรั่ม ๑ มิลลิลิตร ทำลายได้
		ซีรั่ม (มิลลิลิตร)	พิษงูธรรมชาติ (มิลลิกรัม)		
8	หลังจากฉีด dose ที่ 11 แล้ว 7 วัน	0.25	0.0098 ($2LD_{50}$)	3/3	13.42LD_{50}
		0.125	0.0098 ($2LD_{50}$)	1/3	
		0.0625	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	

รูปที่ 1

แผนภูมิแสดงระดับแอนติบอดี้ในหนูหลังจากฉีดโพลิเมอร์ heated toxin



จากตารางที่ 5 จะเห็นได้ว่าหลังจากฉีดโพลิเมอร์ของ heated toxin แล้ว 2 dose ยังตรวจไม่พบระดับของแอนติบอดี้ในหนูตามวิธีดังกล่าวข้างต้น แต่เมื่อฉีดโพลิเมอร์ถึง dose ที่ 4 แล้วระดับของแอนติบอดี้ได้สูงขึ้นโดยที่ซีรั่มหนู 1 มิลลิลิตรสามารถทำลายพิษงูได้ 11.30 LD_{50} แต่ถ้าตรวจแอนติบอดี้หลังจากฉีดพิษงูแล้ว 14 วันระดับแอนติบอดี้จะลดลง และถ้าฉีด dose ต่อ ๆ ไปติดต่อกันอีก 3 dose จนถึง dose ที่ 7 จะพบว่าระดับแอนติบอดี้จะสูงขึ้นมาเท่าเดิม คือซีรั่ม 1 มิลลิลิตรสามารถทำลายพิษงูได้ 11.30 LD_{50} และเมื่อทดสอบหลังจากฉีด dose ที่ 7 แล้ว 14 วัน ระดับแอนติบอดี้ลดลงแต่ไม่มากคือซีรั่ม 1 มิลลิลิตรสามารถทำลายพิษงูได้ 9.50 LD_{50}

ต่อมาเมื่อฉีด dose ที่ 8, dose ที่ 9 แล้วทดสอบหลังจากฉีด dose ที่ 9 แล้ว 7 วัน พบว่าระดับแอนติบอดี้สูงขึ้นกว่าเดิมอีกคือ ซีรั่ม 1 มิลลิลิตรสามารถทำลายพิษงูได้ 13.42 LD_{50} และต่อมาเมื่อทำการทดสอบหลังจากฉีด dose ที่ 10 และ dose ที่ 11 แล้ว 7 วัน ทั้ง 2 dose พบว่าระดับแอนติบอดี้ยังคงสูงเท่าเดิมคือซีรั่ม 1 มิลลิลิตรสามารถทำลายพิษงูได้ 13.42 LD_{50}

จากแผนภูมิในรูปที่ 1 อาจสรุปได้ว่า ระดับของแอนติบอดี้จะสูงมากในวันที่ 7 หลังจากที่ immunize แล้ว และจะค่อย ๆ ลดลง ถ้าตรวจดูหลังจาก immunize แล้ว 14 วัน ระดับจะลดต่ำลง แต่ถ้า immunize ติดต่อกันทุกสัปดาห์(คือ dose ที่ 5,6,7) แล้วตรวจดูระดับแอนติบอดี้ภายหลัง 2 สัปดาห์พบว่าระดับของแอนติบอดี้ลดลงเล็กน้อย หลังจากการ immunize ด้วย dose ที่ 9 แล้ว ระดับของแอนติบอดี้สูงขึ้นคือ neutralize ได้ 13.42 LD_{50} ระดับของแอนติบอดี้นี้คงที่หลังจากให้ dose ที่ 10 และ 11 คือไม่สูงขึ้นอีกเลย

6.2.2 <u>ระดับของแอนติบอดี้ที่เกิดจากการฉีดโพลิเมอร์ของ unheated toxin</u>

ได้ทดลองกระตุ้นภูมิคุ้มกันพิษงูเห่าในหนู โดยการฉีดโพลิเมอร์ของ unheated toxin พบว่าระดับของแอนติบอดี้ที่ neutralize พิษงูเห่า

ตารางที่ 6

แสดงผลการหาระดับของแอนติบอดี้ในซีรั่มของหนู (Wistar Strain Rat) หลังจากฉีกโพลิเมอร์ของ unheated toxin ในระยะเวลาต่าง ๆ

เจาะเลือดครั้งที่	ระยะเวลาในการเจาะเลือดเพื่อหาระดับแอนติบอดี้	ปริมาณที่ฉีดเข้าในหนู (Swiss mice) 1 ตัว		จำนวนหนูรอด / จำนวนหนูที่ถูกฉีด	ปริมาณพิษที่ซีรั่ม ๑ มิลลิลิตรทำลายได้
		ซีรั่ม (มิลลิลิตร)	พิษธรรมชาติ (มิลลิกรัม)		
1	หลังจากฉีด dose ที่ 2 แล้ว 7 วัน	-	-	-	-
2	หลังจากฉีด dose ที่ 4 แล้ว 7 วัน	0.25	0.0098 ($2LD_{50}$)	1/3	ระดับแอนติบอดี้ต่ำมากไม่สามารถหาค่าได้
		0.125	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	
		0.0625	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	
3	หลังจากฉีด dose ที่ 4 แล้ว 14 วัน	0.25	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	0 LD_{50}
		0.125	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	
		0.0625	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	

ตารางที่ 6 (ต่อ)

เจาะเลือดครั้งที่	ระยะเวลาในการเจาะเลือดเพื่อหาระดับแอนติบอดี้	ปริมาณที่ฉีดเข้าในหนู (Swiss mice) 1 ตัว		จำนวนหนูรอด / จำนวนหนูที่ถูกฉีด	ปริมาณพิษงูที่ซีรั่ม 1 มิลลิลิตรทำลายได้
		ซีรั่ม (มิลลิลิตร)	พิษงูธรรมชาติ (มิลลิกรัม)		
4	หลังจากฉีด dose ที่ 7 แล้ว 7 วัน	0.25	0.0098 ($2LD_{50}$)	1/3	ระดับแอนติบอดี้ต่ำมากไม่สามารถหาค่าได้
		0.125	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	
		0.0625	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	
5	หลังจากฉีด dose ที่ 7 แล้ว 14 วัน	-	-	-	-
6	หลังจากฉีด dose ที่ 9 แล้ว 7 วัน	0.25	0.0098 ($2LD_{50}$)	1/3	ระดับแอนติบอดี้ต่ำมากไม่สามารถหาค่าได้
		0.0125	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	
		0.0625	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	
7	หลังจากฉีด dose ที่ 10 แล้ว 7 วัน	0.25	0.0098 ($2LD_{50}$)	1/3	ระดับแอนติบอดี้ต่ำมากไม่สามารถหาค่าได้
		0.125	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	
		0.0625	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	
8	หลังจากฉีด dose ที่ 11 แล้ว 7 วัน	0.25	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	0 LD_{50}
		0.125	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	
		0.0625	0.0098 ($2LD_{50}$)	0/3	

ไม่สูงเท่ากับการฉีดโพลิเมอร์ของ heated toxin ระดับของแอนติบอดี้ในหนูที่ถูกกระตุ้นโดยโพลิเมอร์ของ unheated toxin ปรากฏในตารางที่ 6

จากตารางที่ 6 หลังจากเจาะเลือดครั้งที่ 1 และครั้งที่ 5 แล้วไม่ได้นำซีรั่มไปทำ neutralization เนื่องจากการสังเกตดูระดับซีรั่มในช่วงนี้ของหนูกลุ่มที่ฉีดโพลิเมอร์ของ unheated toxin แล้วพบว่าในช่วงนี้ระดับแอนติบอดี้ไม่สูงและจากการเปรียบเทียบกันพบว่าหนูกลุ่มนี้สร้างแอนติบอดีได้ไม่ดีเหมือนกลุ่มที่ฉีดด้วยโพลิเมอร์ของ heated toxin จากตารางที่ 6 จะเห็นได้ว่าระดับแอนติบอดี้ไม่ขึ้นสูงเลย มีบางช่วงที่ซีรั่ม 1 มิลลิลิตรเมื่อใส่รวมกับพิษงู 8 LD_{50} แล้วฉีดหนู ผลปรากฏว่าหนูอยู่รอดเพียงตัวเดียวจากทั้งหมด 3 ตัว จึงทำให้หาค่าระดับของแอนติบอดี้ที่ neutralize พิษงูไม่ได้ หลังจากฉีดโพลิเมอร์ของ unheated toxin นี้จนครบ 11 dose แล้วระดับของแอนติบอดี้ก็ยังไม่สูงขึ้นเลย

6.2.3 <u>การเปรียบเทียบระดับแอนติบอดี้ในหนูกลุ่มที่ฉีดโพลิเมอร์ของ heated toxin กับหนูกลุ่มที่ฉีด unheated toxin</u>

ผลการเปรียบเทียบระดับแอนติบอดี้ที่ neutralize พิษงูเห่าในหนูทั้ง 2 กลุ่ม ได้แสดงไว้ในตารางที่ 7

ตารางที่ 7

เปรียบเทียบระดับของแอนติบอดี้ในซีรั่มหนูกลุ่มที่ได้รับการฉีดโพลิเมอร์ของ heated toxin และหนูกลุ่มที่ได้รับการฉีดโพลิเมอร์ของ unheated toxin

ระยะเวลาในการเจาะเลือดเพื่อหาระดับแอนติบอดี้	จำนวนซีรั่มที่นำมาทดสอบ (มิลลิลิตร	ซีรั่มที่ได้จากการฉีดโพลิเมอร์ของ heated toxin		ซีรั่มที่ได้จากการฉีดโพลิเมอร์ของ unheated toxin	
		จำนวนหนูรอด / จำนวนหนูที่ถูกฉีด	ซีรั่ม ๑ มิลลิลิตร ทำลายพิษงูได้	จำนวนหนูรอด / จำนวนหนูที่ถูกฉีด	ซีรั่ม ๑ มิลลิลิตร ทำลายพิษงูได้
หลังจากฉีด dose ที่ 4 แล้ว 7 วัน	1	3/3	11.30 LD_{50}	1/3	ระดับแอนติบอดี้ต่ำมากไม่สามารถหาค่าได้
	0.5	0/3		0/3	
	0.25	0/3		0/3	
หลังจากฉีด dose ที่ 4 แล้ว 14 วัน	1	0/3	0 LD_{50}	0/3	0 LD_{50}
	0.5	0/3		0/3	
	0.25	0/3		0/3	
หลังจากฉีด dose ที่ 7 แล้ว 7 วัน	1	3/3	11.30 LD_{50}	1/3	ระดับแอนติบอดี้ต่ำมากไม่สามารถหาค่าได้
	0.5	0/3		0/3	
	0.25	0/3		0/3	

ตารางที่ 7 (ต่อ)

ระยะเวลาในการเจาะเลือดเพื่อหาระดับแอนติบอดี้	จำนวนซีรั่มที่นำมาทดสอบ (มิลลิลิตร)	ซีรั่มที่ได้จากการฉีดโพลิเมอร์ของ heated toxin		ซีรั่มที่ได้จากการฉีโพลิเมอร์ของ unheated toxin	
		จำนวนหนูรอด / จำนวนหนูที่ฉีด	ซีรั่ม ๑ มิลลิลิตร ทำลายพิษงูได้	จำนวนหนูรอด / จำนวนหนูที่ถูกฉีด	ซีรั่ม ๑ มิลลิลิตร ทำลายพิษงูได้
หลังจากฉีด dose ที่ 9 แล้ว 7 วัน	1	3/3	13.42 LD_{50}	1/3	ระดับแอนติบอดี้ต่ำมากไม่สามารถหาค่าได้
	0.5	1/3		0/3	
	0.25	0/3		0/3	
หลังจากฉีด dose ที่ 10 แล้ว 7 วัน	1	3/3	13.42 LD_{50}	1/3	ระดับแอนติบอดี้ต่ำมากไม่สามารถหาค่าได้
	0.5	1/3		0/3	
	0.25	0/3		0/3	
หลังจากฉีด dose ที่ 11 แล้ว 7 วัน	1	3/3	13.42 LD_{50}	0/3	ซีรั่มไม่สามารถทำลายพิษงูได้
	0.5	1/3		0/3	
	0.25	0/3		0/3	

จากตารางที่ 7 จะเห็นว่า neutralizing antibody ที่ได้จากโพลิเมอร์ของ unheated toxin ที่จะทำลายพิษงูนั้นมีน้อยมาก และระดับของแอนติบอดี้ไม่สูงขึ้นเลยถึงแม้จะฉีดโพลิเมอร์ต่อไปอีกหลายครั้ง ส่วนโพลิเมอร์ของ heated toxin สามารถทำให้หนูสร้าง neutralizing antibody ได้สูงกว่ามากและถึงแม้ว่าจะฉีดโพลิเมอร์ต่อไปอีกหลายครั้งระดับแอนติบอดี้ก็ไม่สูงขึ้นจากเดิม แสดงว่าสำหรับหนูที่ทดลองและแอนติเจนที่ใช้ตาม dose ที่รายงานนี้ ระดับแอนติบอดี้อาจจะสูงได้มากที่สุดเพียงแค่นี้ คือซีรั่มจากหนูกลุ่มที่ฉีดโพลิเมอร์ของ heated toxin นี้สามารถทำลายพิษงูได้ 13.42 LD_{50}

7. ผลการทดสอบหาภูมิคุ้มกันในหนู (Wistar Strain Rat) โดยการฉีดพิษงูเข้าในตัวหนู (in vivo test)

ได้ทำการทดสอบภูมิคุ้มกันในตัวหนูโดยการฉีดพิษงูเข้าไปในตัวหนูที่ได้รับการ immunize ด้วยโพลิเมอร์ของพิษงูทั้ง 2 ชนิดจนถึง dose ที่ 11 และเจาะเลือดหาระดับแอนติบอดี้แล้วดังนี้

7.1 หนูกลุ่มที่ฉีดด้วยโพลิเมอร์ของ heated toxin เพื่อให้เกิดภูมิคุ้มกันพบว่า หลังจากใช้พิษงูจำนวน 3 LD_{50} ฉีดเข้าทางช่องท้องแล้ว 24 ชั่วโมง หนูยังอยู่ครบทั้ง 7 ตัว และไม่แสดงอาการเจ็บป่วยใด ๆ ทั้งสิ้น ต่อมาอีก 1 วันได้ทดลองฉีดพิษงูอีก 5 LD_{50} เข้าทางช่องท้องเช่นกันพบว่าหลังจากฉีดแล้ว 24 ชั่วโมง หนูอยู่ครบและไม่แสดงอาการเจ็บป่วยใด ๆ ต่อมาอีก 1 วันฉีดพิษงูอีก 8 LD_{50} เข้าทางช่องท้อง หลังจากที่ฉีดประมาณ 6 - 7 ชั่วโมง หนู 2 ตัวมีอาการไม่สบาย ส่วนอีก 5 ตัวยังคงปรกติ ต่อมาหลัง 24 ชั่วโมง หนูตาย 2 ตัว อีก 5 ตัวมีอาการไม่สบายเล็กน้อย แต่ก็สามารถอยู่รอดได้ในเวลาต่อมา

7.2 หนูกลุ่มที่ฉีดด้วยโพลิเมอร์ของ unheated toxin เพื่อให้เกิดภูมิคุ้มกัน หลังจากฉีดด้วยพิษงูเห่าจำนวน 3 LD_{50} เข้าทางช่องท้องหนูทั้ง 7 ตัว พบว่าหนูทั้ง 7 ตัวมีอาการไม่สบายในเวลาต่อมาหลังจากฉีดประมาณ 6 - 7 ชั่วโมง ต่อมาหลังจาก 24 ชั่วโมงได้มีหนูตาย 4 ตัว อีก 3 ตัวที่เหลือมีอาการไม่สบายต่อ

มาไม่นานก็ตายทั้งหมดครบ 7 ตัว การตายของหนูกลุ่มนี้ช้ากว่าหนูที่ถูกฉีดด้วยพิษงูเห่าโดยที่หนูไม่เคยถูก immunized มาก่อนเลยเพราะหนูที่ไม่เคยได้รับการกระตุ้นให้สร้างภูมิคุ้มกันจะตายในเวลาไม่ถึง 2 ชั่วโมงหลังจากที่ฉีด แสดงว่าโพลิเมอร์ของ unheated toxin ก็สามารถทำให้หนูสร้างแอนติบอดี้ต่อพิษงูได้บ้าง แต่ไม่สูงมากพอที่จะทำให้หนูอยู่รอดหลังจากที่ฉีดพิษงูจำนวน 3 LD_{50}

ผลการทดลองฉีดพิษงูเข้าในหนูทั้ง 2 กลุ่มได้นำมาเปรียบเทียบกันดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8

แสดงการเปรียบเทียบความต้านทานต่อพิษงูในหนู 2 กลุ่มที่ถูก immunize ด้วยโพลิเมอร์ของ heated toxin และ unheated toxin (in vivo test)

จำนวนพิษงูเห่าที่ฉีดเข้าในหนู 1 ตัว	หนูกลุ่มที่ฉีดด้วยโพลิเมอรของ heated toxin	หนูกลุ่มที่ถูกฉีดด้วยโพลิเมอร์ของ unheated toxin
3 LD_{50}	อยู่ครบทั้ง 7 ตัวและไม่แสดงอาการเจ็บป่วยใด ๆ	มีอาการเจ็บป่วยและตายในเวลาต่อมา แต่ตายช้ากว่าหนูที่ไม่เคยถูกฉีดเพื่อให้เกิดภูมิคุ้มกันมาก่อน
5 LD_{50}	อยู่ครบทั้ง 7 ตัวและไม่แสดงอาการเจ็บป่วยใด ๆ	—
8 LD_{50}	2 ตัวมีอาการไม่สบายและตายตายในเวลาต่อมา อีก 5 ตัวมีอาการไม่สบาย แต่ยังคงอยู่รอด	—