บทที่ 2

การวิจัยที่เกี่ยวข้อง

งูเห่าที่พบมากที่สุดในประเทศไทยคือ sub-species Naja naja siamensis และมี sub - species อื่นที่พบรองลงมาคือ Naja naja kaouthia และ Naja naja atra (Lec, 1971)

ส่วนประกอบของพิษงูเห่าโดยทั่วไป

พิษงูที่รีดออกมาจากงูเห่าโดยทั่วไปรวมทั้งงูเห่าไทยประกอบด้วยสารหลายชนิดมีโปรตีน 90 - 92% นอกจากนั้นเป็นสารอื่น ๆ รวมทั้งอนินทรียสารด้วย (Lo, et al, 1966)

สารประกอบพวกโปรตีน แบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มคือ

1. โปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็นพิษได้แก่ neurotoxin, cardiotoxin, cobramines, Direct Lytic Factor (DLF), toxin a และ cytotoxin (Devi, 1968)

2. โปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ โปรตีนส่วนใหญ่ในพิษงูจะอยู่ในกลุ่มนี้ เอนไซม์ที่พบมีมากกว่า 10 ชนิด ที่สำคัญมี hyaluronidase, L-ophio-amino acid oxidase, cholinesterase, phosphodiesterase และพวก proteolytic enzymes อีกหลายชนิด (Zeller, 1948, 1951)

3. ส่วนของโปรตีนที่ยังไม่ทราบคุณสมบัติที่แน่นอน

สารประกอบที่ไม่เป็นโปรตีนแบ่งออกได้ดังนี้

1. อินทรียสารได้แก่ adenosine, inosine, cholesterol free lecithin และ protein-bounded lecithin (Lo, et al.,1966)

2. อนินทรียสาร ประกอบด้วยธาตุสังกะสีเป็นจำนวนค่อนข้างสูง (Lo, et al, 1966) นอกจากนี้ใน Formosan cobra venom ยังมีรายงานว่าพบธาตุและสารอื่น ๆ ในเถ้าที่ได้จากการเผาพิษงูได้แก่ แมกนีเซี่ยม, แคลเซี่ยม, โซเดี่ยม, คลอรีน, สารประกอบซัลเฟต และสารประกอบฟอสฟอรัสเพนตาออกไซด์ (Lee, 1971)

ในบรรดาส่วนประกอบต่าง ๆ ของพิษงูที่กล่าวมาแล้ว neurotoxin เป็นส่วนประกอบที่มีความสำคัญและสมควรที่จะได้รับการศึกษาและวิจัยมากที่สุด เพราะเป็นสาเหตุของการตาย (Yang, et al, 1959, 1960; Yang, 1960; Lee และ Peng, 1961; Vick et al, 1965)

Neurotoxin ในพิษงูเห่าทั่วไป

neurotoxin เป็นสารในพิษงูที่เป็นสาเหตุสำคัญของการตาย โดยที่ neurotoxinนี้จะไปจับกับ acetyl choline receptor ที่อยู่บน motor end plate ที่กระบังลม อันเป็นผลให้เกิดอัมมะพาตที่ระบบหายใจ (peripheral respiratory paralysis) (Yang, et al; 1959, 1960; Yang,1960; Lee และ Peng, 1961; Vick, et al, 1965)

คุณสมบัติของ Neurotoxin

1. เป็น polypeptides เล็ก ๆ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 7,000 - 8,000 ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 60 - 70 โมเลกุล (Yang, 1974)

2. ทนความร้อนได้ดีในสภาวะที่เป็นกรด สามารถทนความร้อนได้ถึง 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ในสภาวะเช่นนี้โปรตีนอื่นเช่น cardiotoxin, hemolysin, cholinesterase จะสูญเสียคุณสมบัติหมด (Devi, 1968; Yang, 1965)

3. มี isoelectric point ที่ pH สูงกว่า 9.4 (Devi ,1968)

4. โมเลกุลมีประจุเป็นบวก (Yang, 1974)

5. มีคุณสมบัติของการเป็นแอนติเจนที่เลวหรือมี antigenic potency ต่ำ (Jimenez - Porras, 1968; Chang & Yang, 1969)

neurotoxin นี้แบ่งออกเป็น 2 พวกใหญ่ ๆ ตามความยาวของสาย polypeptide คือ

1. toxin ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 60 - 62 โมเลกุลและภายในสายเดียวกัน cross-linked ด้วย 4 disulfide bridges มีชื่อว่า short neurotoxin (Karlson et al, 1972)

2. toxin ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 71 - 74 โมเลกุลและ cross - linked ด้วย 5 disulfide bridges ภายในแต่ละสายเรียกว่า long neurotoxin (Yang, 1974)

ทั้ง short และ long neurotoxin จะมีความสามารถในการทำให้เกิดการตายได้เหมือนกัน โดยที่ neurotoxin ทั้งสองประเภทนี้จะจับกับ acetyl choline receptor บน motor end plate ที่กระบังลม (Lee,et al, 1967; Tseng, et al, 1968)

<u>การแยก neurotoxin ออกจากสารอื่น(Purification of neurotoxin)</u>

เนื่องจาก neurotoxin มีความสำคัญ ดังนั้นจึงได้มีผู้พยายามแยก neurotoxin ออกจากพิษงูเห่าหลายชนิด ด้วยวิธีการต่าง ๆ กัน โดยมีจุดประสงค์ที่จะนำ neurotoxin บริสุทธิ์มาศึกษาและวิจัยเพื่อหาวิธีการสำหรับช่วยผู้ถูกงูพิษกัดที่ดีที่สุด

การแยก neurotoxin มีวิธีต่าง ๆ และทำในพิษงูเห่าชนิดต่าง ๆ กัน ดังปรากฏในตารางที่ 1

ตารางที่ ๑

แสดงการแยก Neurotoxin ออกจากพิษงูเห่า Genus Naja

Species หรือ Subspeciesของงู	ชื่อทั่วไป	ถิ่นที่อยู่	ชื่อ Neurotoxinที่แยกได้	วิธีการแยก	ผู้ทดลองและวิจัย
Naja naja atra	Taiwan cobra	Taiwan	cobrotoxin (62)*	amm. sulfate fractionation and carboxymethyl-cellulose chromatography	Yang (1965)
N. nigricolis	Black neck spitting cobra	Southern Africa	Toxin α (61)	ion exchange chromatography ด้วย Amberlite IRC - 50	Karlsson,et.al. (1966)
N. haje haje	Egyptian cobra	Nile Valley Egypt	Toxin α (61)	gradient chromatography ด้วย Amberlite CG-50 และทำSephadex G-50 gel filtration	Botes and Strydon (1969)
(N. haje annulifera)			Toxin I (61)		Miranda,et al.(1970)
			Toxin II (61)		Miranda,et al.(1970)
(N. haje anchietae	Ethiopian cobra	Ethiopia	Toxin II (61)		Miranda,et al.(1970)
			Toxin III(71)		Miranda,et al.(1970)
N. nivea	Cape cobra	South Africa	Toxin α (71)	ion exchange chromatography ด้วย Amberlite CG-50 และทำCM-cellulose chromatography และ Sephadex G-50 gel filtration	Botes,et al. (1971)
			Toxin B (61)		
			Toxin δ (61)		
N. naja kaouthia	Monocellate cobra	India	Toxin (71)	ion exchange chromatography ด้วย Bio. Rex 70 ใน volatile amm. acetate buffer แล้วตามด้วย Sephadex G-50 gel filtration	Karlsson and Eaker (1972)
N. naja siamensis	Monocellate Thai cobra (regular type and light phase)	Thai	Toxin 3 (71)	ใช้วิธีแยกเช่นเดียวกับ N. naja kaouthia	Karlsson,et al.(1971)
			Toxin 5 (61)		
			Toxin 3 c(62)		
			Toxin 7 c(62)		
N. naja naja	Indian spectacled cobra	India	Toxin 3 (71)	ใช้วิธีแยกเช่นเดียวกัน N. naja kaouthia	Karlsson,et al.(1971)
			Toxin 4 (71)		
N. naja naja	black cobra	West Pakistan	Toxin (71)		Karlsson and Eaker (1972)
N. naja oxiana		Iran	Oxiana toxin (61)		Karlsson and Eaker (1972)

หมายเหตุ *ตัวเลขที่แสดงในวงเล็บคือจำนวนกรดอะมิโนที่พบต่อ ๑ โมเลกุลของ Neurotoxin ที่แยกได้

Neurotoxin ในพิษงูเห่าไทย

งูเห่าไทยประกอบด้วย neurotoxin ประมาณ 25% ของน้ำหนักแห้ง (Karlsson และ Eaker,1972) และจากการแยกด้วยเทคนิค exchange chromatograph โดยใช้ Bio - Rex 70 และ volatile ammonium acetate buffers แล้วตามด้วยการแยกโดย gel filtration บน Sephadex G 50 พบว่า neurotoxin ของงูเห่าไทยแยกออกได้เป็น 2 ส่วน (Karlsson, et al, 1971)

1. principal toxins คือส่วนของ neurotoxin ที่เรียกว่า toxin siamensis 3 neurotoxinชนิดนี้เป็นสารพวก polypeptide ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน 71 โมเลกุล จึงจัดไว้เป็นพวก long neurotoxin ในแต่ละสายของ polypeptide จะมี disulfide bond เชื่อมโยงกรดอะมิโนภายในสายเข้าด้วยกันถึง 5 ตำแหน่ง neurotoxin ส่วนใหญ่ที่มีอยู่ในพิษงูเห่าไทยเป็นพวก long neurotoxin

2. minor toxins neurotoxin ชนิดนี้มีอยู่เป็นส่วนน้อยในพิษงูเห่าไทย มีประมาณ 1% หรือน้อยกว่านี้ประกอบด้วย 3 components คือ

toxin siamensis 5 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 61 โมเลกุล

toxin siamensis 3 c ประกอบด้วยกรดอะมิโน 62 โมเลกุล

toxin siamensis 7 c ประกอบด้วยกรดอะมิโน 62 โมเลกุล

ภายในแต่ละสาย polypeptide ของ neurotoxin เหล่านี้จะมี disulfide bond เชื่อมโยงกรดอะมิโนภายในสายเข้าด้วยกัน 4 ตำแหน่ง neurotoxin นี้จัดเป็นพวก short neurotoxin.

ทั้ง principal toxins และ minor toxins มีคุณสมบัติที่ทำให้เกิดการตายได้เช่นเดียวกัน (Karlsson, et al; 1971)

ส่วนประกอบของ toxin siamensis 3 (principal toxins) ของงูเห่าไทย

toxin siamensis 3 ของงูเห่าไทยเป็น polypeptide ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 7820 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 71 โมเลกุล (Karlsson, et al, 1971) มีกรดอะมิโน Isoleucine อยู่ทาง N - terminal และกรดอะมิโน Proline อยู่ทาง C - terminal ชนิดและจำนวนของกรดอะมิโนที่ประกอบเป็นสาย peptide มีดังนี้

Aspatic acid	9	โมเลกุล	Isoleucine	5	โมเลกุล
Threonine	9	"	Leucine	1	"
Serine	3	"	Thenylalanine	3	"
Glutamic acid	1	"	Lysine	5	"
Proline	6	"	Histidine	1	"
Glycine	4	"	Arginine	5	"
Alanine	3	"	Tryptophan	1	"
Half - cystine	10	"	Tyrosine	1	"
Valine	4	"			

(Karlsson, et al; 1971)

หน้าที่ของกรดอะมิโนบนสาย polypeptide ของ neurotoxin ที่มีในพิษงูเห่าทั่วไป

Yang (1974) ได้แบ่งกรดอะมิโนบนสาย polypeptide ของ neurotoxin ออกเป็น 2 พวกตามหน้าที่ (biological function) ดังนี้

1. functionally essential groups เป็นพวกที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับความเป็นพิษคือ เป็นกรดอะมิโนกลุ่มที่อยู่ตรง active site ของโมเลกุลซึ่งเป็นตำแหน่งที่จะจับกับ receptor ของเซลล์เป้าหมาย (target cell) ถ้าเปลี่ยนแปลงส่วนนี้อาจจะทำให้ความเป็นพิษของ neurotoxin ลดลงหรือหมดไป

เนื่องจากไม่สามารถจับกับ receptor บนเซลล์เป้าหมายได้เหมือนเดิม

2. structurally essential groups เป็นกรดอะมิโนพวกที่ทำหน้าที่รักษาโครงสร้างของโมเลกุลของสาย polypeptides ของ toxin แต่ไม่เกี่ยวกับการจับบนเซลล์เป้าหมาย

จะเห็นได้ว่าถ้ากรดอะมิโนในพวกแรกถูกเปลี่ยนแปลงก็จะทำให้ความเป็นพิษเปลี่ยนไปด้วย แต่ถ้ากรดอะมิโนในพวกที่สองถูกเปลี่ยนไปก็จะทำให้โครงสร้างของโมเลกุลเปลี่ยนและอาจมีผลทำให้ antigenic property เปลี่ยนไปด้วย ดังนั้นถ้าเราสามารถเปลี่ยนแปลงตรง functionally essential groups โดยไม่เปลี่ยนตรง structurally essential groups ก็จะได้โมเลกุลของ toxin ที่ปราศจากพิษแต่มีโครงสร้างเหมือนเดิมหรือใกล้เคียงของเดิมมากที่สุด

<u>การเปลี่ยนแปลงโมเลกุลของ neurotoxin เพื่อลดความเป็นพิษ</u>

จากการทราบว่า neurotoxin เป็นส่วนสำคัญในพิษงูเห่าที่ทำให้เกิดการตาย ทำให้มีผู้พยายามหาวิธีลดความเป็นพิษ โดยการเปลี่ยนแปลงโมเลกุลของ toxin ให้อยู่ในรูปของสารที่ไม่มีพิษหรือมีพิษลดลงแต่ให้มีโครงสร้างหรือ antigenic property คงเดิมมากที่สุด

จากผลงานของ Yang(1974) ที่กล่าวมาแล้วข้างต้น จะเห็นได้ว่าการทำให้ neurotoxin หมดสภาพการเป็นสารพิษโดยที่โครงสร้างของโมเลกุลยังคงเดิมนั้นน่าจะกระทำได้ โดยการเลือกเปลี่ยนแปลงเฉพาะโมเลกุลของกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องกับความเป็นพิษโดยไม่ให้มีผลต่อกรดอะมิโนที่ควบคุมโครงสร้างเลย ได้มีผู้พยายามเปลี่ยนแปลง neurotoxin เพื่อให้ได้โมเลกุลของ neurotoxin ที่มีคุณสมบัติดังกล่าวข้างต้นด้วยวิธีการต่าง ๆ กันดังนี้ คือ

1. <u>เปลี่ยนแปลงโดยเปลี่ยนตรงส่วนกรดอะมิโน tryptophan</u>

เนื่องจากกรดอะมิโน tryptophan ที่อยู่บนโมเลกุลของ short

neurotoxin ของพิษงูเห่า Naja naja atra ซึ่งเรียกว่า cobrotoxin และบนโมเลกุลของ toxin ในพิษงูทะเลอีกหลายชนิดเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้โมเลกุลมีพิษ คือ เป็นกรดอะมิโนที่จัดอยู่ในพวก functionally essential group(Chang และ Hayashi, 1969;Chang และ Yang,1973; Seto,et al, 1970; Tu และ Hong, 1971; Tu,et al,1971; Tu และ Toom, 1971) ดังนั้น Chang และ Yang(1973) จึงได้เปลี่ยนแปลงโมเลกุลของ short neurotoxin โดยเปลี่ยนแปลงตรงส่วนของกรดอะมิโน tryptophan ด้วยวิธีการ 3 วิธีคือ

ก. โดยเปลี่ยน tryptophanให้เป็นสาร N-formylkyneurenine โดยวิธี ozonization ใน formic acid

ข. โดย oxidized tryptophan ให้เป็น oxindole derivative ด้วย N - bromosuccinimide

ค. เปลี่ยนแปลงโมเลกุลของ tryptophane โดยให้ทำปฏิกริยากับ 2 - hydroxy - 5 - nitrobenzyl bromide(HNB - bromide) หรือ 2 - nitrophenyl sulfenyl chloride

ผลการทดลองพบว่า การเปลี่ยนแปลงโมเลกุลของ cobrotoxin ซึ่งเป็น short neurotoxinด้วยวิธีดังกล่าวทั้ง 3 วิธี ทำให้ความเป็นพิษหมดไป แต่ immunological property ยังคงเดิมคือยังทำปฏิกริยากับ antibody ต่อ cobrotoxin ได้ และสามารถกระตุ้นให้กระตายสร้าง antibody ต่อ cobrotoxin ได้

กรดอะมิโนที่ทำหน้าที่เป็น functionally essential group ในโมเลกุลของพิษชนิดหนึ่งอาจจะไม่ทำหน้าที่เดิมในโมเลกุลของพิษอีกชนิดหนึ่ง สำหรับพิษงูเห่าไทย toxin siamensis 3 ซึ่งเป็น long neurotoxin ได้ถูกนำมาเปลี่ยน

แปลงโดย Karlsson และ Eaker(1972) โดยเปลี่ยนกรดอะมิโน trypto-phan บนโมเลกุลของ toxin นี้ด้วย HNB- bromide และพบว่าโมเลกุลของ toxin siamensis 3 ที่เปลี่ยนไปนี้จะ polymerize ได้ ถ้าtoxin อยู่ในรูป trimer หรือโมเลกุลใหญ่กว่านี้จะไม่มีพิษเหลือ แต่ถ้าอยู่ในรูป dimer จะมีความเป็นพิษเล็กน้อย แต่ถ้าอยู่ในรูป monomer คือไม่ polymerize จะมีพิษเหลืออยู่ประมาณ 20% - 50% ดังนั้นเฉพาะการเปลี่ยนแปลงโมเลกุลของ tryptophan ไม่ได้เป็นการทำให้ความเป็นพิษหมดไปอย่างสิ้นเชิง จึงดูเสมือนว่า tryptophan อาจจะไม่ได้ทำหน้าที่เป็น functionally essential group โดยตรงแต่มีส่วนช่วยในการทำงานของ functionally essential group ในโมเลกุลของ toxin siamensis 3

2. <u>เปลี่ยนแปลงโดยเปลี่ยนตรงส่วนกรดอะมิโน tyrosine</u>

ได้มีการเปลี่ยนแปลงโดยใช้ Cobrotoxin จากงูเห่า <u>N. naja atra</u> ทำปฏิกริยากับ tetranitromethane ผลการทดลองพบว่า cobrotoxin ซึ่งมีกรดอะมิโน tyrosine 2 โมเลกุลคือตำแหน่งที่ 39 ซึ่งอยู่รอบนอกของ toxin และตำแหน่งที่ 25 ซึ่งฝังอยู่ข้างใน การเปลี่ยนแปลงตรงตำแหน่งที่ 39 จะไม่ทำให้ความเป็นพิษและโครงสร้างของ toxin เปลี่ยนแปลง แต่ถ้าเปลี่ยนแปลงตรงตำแหน่งที่ 25 จะทำให้ความเป็นพิษและโครงสร้างเสียไป การเปลี่ยนแปลงที่ทำให้โครงสร้างเสียนี้เป็นผลให้ antigenic property เปลี่ยนไปด้วย (Chang et al,1971) ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่งกรดอะมิโน tyro-sine จึงเป็นวิธีการที่ไม่เหมาะ

3. <u>เปลี่ยนแปลงตรงส่วนกรดอะมิโน histidine</u>

Huang, et al (1972) เปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน histidine บนโมเลกุลของ cobrotoxin ของงูเห่า <u>N. naja atra</u> โดยวิธี Photo -

oxidation พิษงูชนิดนี้มีกรดอะมิโน histidine 2 โมเลกุล การเปลี่ยนแปลงด้วยวิธีดังกล่าวจะเกิดปฏิกริยาได้ดีกับ histidine ตำแหน่งที่ 32 แต่ไม่เกิดกับตำแหน่งที่ 4 หลังจากเปลี่ยนแปลงแล้วความเป็นพิษและ antigenic property ของ toxin เสียไปหมด ดังนั้นการเปลี่ยนตำแหน่งนี้จึงใช้ไม่ได้

4. เปลี่ยนแปลงตรงส่วนกรดอะมิโน arginine

ใน cobrotoxin ของงูเห่า N.naja atra มีกรดอะมิโน arginine ที่ตำแหน่ง 28,30,37,40,43 และ 65 บนโมเลกุล Yang, et al. (1973) ได้ใช้ phenyl glyoxal ทำปฏิกริยากับ toxin นี้ พบว่าเมื่อกรดอะมิโน arginine 4 โมเลกุลถูกเปลี่ยนแปลง ความเป็นพิษจะลดลง แต่ antigenic property ก็เสียไปด้วย การเปลี่ยนแปลงตรงกรดอะมิโน arginine จึงไม่เหมาะสม

5. เปลี่ยนแปลงตรงส่วน free carboxyl group

Chang, et al. (1971) ได้ทดลองกับ cobrotoxin เช่นเดียวกับการทดลองที่แล้ว โมเลกุลของ toxin นี้ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มี free carboxyl group 7 โมเลกุลคือ glutamic acid 4 โมเลกุล aspartic acid 2 โมเลกุล และ asparagine 1 โมเลกุล โดยการ activate toxin นี้ด้วย water - soluble carbodiimide แล้วใช้ glycine methyl ester เข้าทำปฏิกริยากับ free carboxyl group ของกรดอะมิโนพบว่าเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงตรง free carboxyl group ของกรดอะมิโนทั้ง 7 โมเลกุลแล้ว toxin จะสูญเสียความเป็นพิษและ anti genic property โดยสิ้นเชิง นั่นคือโครงสร้างของโมเลกุลของ toxin ได้ถูกทำลาย การเปลี่ยนแปลงตรงส่วนนี้จึงใช้ไม่ได้

6. เปลี่ยนแปลงตรงส่วน free amino group

Yang, et al. (1967) ได้เปลี่ยนแปลง cobrotoxin ด้วยวิธี

fluorescine thiocarbamylation ตรงส่วน free amino groups ของกรดอะมิโน ysine บนโมเลกุลของ toxin นี้ พบว่าความเป็นพิษของ toxin สูญเสียไปโดยไม่มีผลต่อ antigenic property ของ toxin เลย ซึ่งแสดงว่า free amino group มีความสำคัญต่อการทำงานของ active site ของ toxin นี้ Chang (1970) ได้ทดสอบ antigenic property ของ toxin ที่เปลี่ยนแปลงด้วยวิธีดังกล่าวโดยทำ precipitin reactions, immunodiffusion และ immunoelectrophoresis และพบว่า toxin ที่เปลี่ยนด้วยวิธีนี้ไม่มีการเปลี่ยนทาง antigenic property เลย

การเปลี่ยนแปลง neurotoxin โดยเปลี่ยนตรงโมเลกุลของกรดอะมิโนตำแหน่งต่าง ๆ บนสาย polypeptide นี้ จะทำได้ผลดีโดยให้มีความเป็นพิษลดลงแต่มี antigenic property คงเดิม กรดอะมิโนที่ถูกเปลี่ยนแปลงจะต้องเป็นกรดอะมิโนที่อยู่ใน functionally essential group แต่ไม่ควรจะอยู่ใน structurally essential group

การเปลี่ยนแปลง neurotoxin ด้วยวิธีต่าง ๆ ดังกล่าวมาแล้วมีทั้งที่ให้ผลดีนั่นคือ ทำให้ความเป็นพิษลดลงแต่สามารถทำให้สัตว์สร้างแอนติบอดี้ต่อ toxin ได้ และที่ให้ผลไม่ดีก็คือความเป็นพิษลดลง แต่ไม่สามารถกระตุ้นให้สัตว์สร้างแอนติบอดี้ต่อ toxin ได้

เนื่องจากในระยะ 8 - 9 ปีมานี้ ได้มีนักวิทยาศาสตร์นำสาร glutaraldehyde มาใช้ในการ polymerize โปรตีนต่าง ๆ มากขึ้น และพบว่าโพลิเมอร์ที่ได้นั้นยังมี activity คงเดิม จึงทำให้ผู้วิจัยสนใจที่จะลองนำ glutaraldehyde มาทำให้พิษงูอยู่ในรูปโพลิเมอร์

<u>การเชื่อมต่อโมเลกุลของโปรตีนด้วย glutaraldehyde</u>

glutaraldehyde เป็นสารที่แต่เดิมมีผู้นำมาใช้เป็น tanning agent และตกมาไม่นานนี้ได้ถูกนำไปใช้เป็น cell fixative สำหรับใช้กับกล้องจุลทัศน์ชนิดอีเล็คตรอน ซึ่งได้ผลดีเนื่องจากเอนไซม์ต่าง ๆ ที่อยู่ภายในเซลล์

ยังคงอยู่ในสภาพดี (Avrameas, 1969).

ได้มีผู้นำสารนี้ไปใช้กับโปรตีนหลายชนิดเพื่อเชื่อมต่อโมเลกุลของโปรตีนเหล่านั้นเข้าด้วยกัน เช่น การเชื่อมต่อโปรตีน Ig G ของคนเพื่อให้อยู่ในสภาพ insoluble , เชื่อมต่อ Bovine Serum Albumin เข้ากับเอ็นไซม์ peroxidase, เชื่อมต่อโปรตีนเข้ากับเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ เป็นต้น (Avrameas และ Ternynck, 1969; Avrameas, 1969) การใช้ glutaraldehyde เชื่อมต่อโมเลกุลของโปรตีนเข้าด้วยกันนั้นไม่ทำให้เสีย Immunological properties ของโปรตีนนั้น ๆ Avrameas และ Ternynch(1969) พบว่า antigenic determinants ของแอนติเจนหรือ antibody activities ของแอนติเจนและแอนติบอดี้ที่อยู่ในรูปโพลิเมอร์อันเกิดจาก glutaraldehyde polymerization นั้นยังคงอยู่ในสภาพเดิม หรืออาจเปลี่ยนไปเพียงส่วนน้อยเท่านั้น และนอกจากนี้ glutaraldehyde ยังมีประสิทธิภาพและความเหมาะสมที่สุดในการทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนของเอ็นไซม์และโปรตีน (enzyme - protein complexes) ซึ่งสารประกอบเชิงซ้อนนี้ยังคงไว้ซึ่งส่วนของ enzymatic และ immunological specificity ได้อย่างดีที่สุด (Avrameas, 1969)

การทำงานของ Glutaraldehyde ในการเชื่อมต่อโมเลกุลของโปรตีนเข้าด้วยกันนี้ เกิดขึ้นจากปฏิกริยาระหว่าง Glutaraldehyde กับกรดอะมิโนที่มี free amino groups ที่อยู่ภายในโมเลกุลของโปรตีนนั้น ๆ และพบว่า lysine เป็นกรดอะมิโนตัวเดียวที่เกี่ยวข้องกับปฏิกริยานี้ (Quicho and Richards, 1966) โปรตีนที่มีโมเลกุลเชื่อมต่อกันนี้จะอยู่ในสภาพ insoluble protein ปฏิกริยาระหว่าง glutaraldehyde กับ free-amino group ของกรดอะมิโน lysine นี้เกิดขึ้นโดยมีกลไกเป็นไปตามแบบของ Schiff base formation (Quicho & Richards, 1966) นั่นคือเมื่อ glutaraldehyde

ทำปฏิกริยากับกรดอะมิโนที่มี free ammino group กรดอะมิโนจะถูกเปลี่ยนเป็นสารที่เรียกว่า Schiff base ก่อนแล้วจะมีการเชื่อมต่อกันระหว่าง Schiff base 2 ตัว ทำให้โมเลกุลของโปรตีนที่มี Schiff base มาต่อกันกลายเป็นโปรตีนโมเลกุลใหญ่และอยู่ในสภาพ insoluble

เนื่องจาก principal neurotoxin ของงูเห่าไทยคือ toxin siamensis 3 ประกอบด้วยกรดอะมิโน lysine 5 โมเลกุลใน 1 สาย polypeptide ดังนั้นจึงคาดว่าการเชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลของ neurotoxin นี้ด้วย glutaraldehyde สามารถจะทำได้และทำให้ toxin มีโมเลกุลใหญ่ขึ้น หรืออาจจะมีการเปลี่ยนโครงสร้างตรง active site ด้วย ทำให้การจับของ toxin กับเซลล์เป้าหมายเกิดขึ้นไม่ได้เป็นการลดความเป็นพิษของ toxin ส่วน antigenic property ของ toxin จะสูญเสียไปด้วยหรือไม่นั้นคาดว่าอาจจะไม่สูญเสียไปมาก เนื่องจากคุณสมบัติของ glutaraldehyde ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

การวิจัยที่จะกล่าวต่อไป ได้มุ่งที่จะทำให้พิษงูเห่าไทยอยู่ในรูปโพลิเมอร์ โดยการใช้ glutaraldehyde และทดสอบ antigenic property ของโพลิเมอร์โดยการพิสูจน์ถึงความสามารถในการทำให้เกิดแอนติบอดี้ต่อพิษงูเห่าในหนู .