

การทำลายพิษงูเห่าโดยการทำให้อยู่ในรูปของโพลีเมอร์และคุณสมบัติ
ของการ เป็นแอนติเจนของโพลีเมอร์ในหนู



นางสาวกาญจนา คีระสมบูรณ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
แผนกวิชาพฤกษศาสตร์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2521

000088

DETOXIFICATION OF COBRA VENOM BY POLYMERIZATION
AND ITS ANTIGENIC PROPERTY IN RATS

Miss Kanchana Keerasomboon

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Botany

Graduate School

Chulalongkorn University

1978

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การทำลายพืชมุเหาะโดยการทำให้อยู่ในรูปของโพลีเมอร์
และคุณสมบัติของการเป็นแอนติเจนของโพลีเมอร์ในหนู

โดย น.ส. กาญจนา ศีระสมบุรณ์

แผนกวิชา พศกษศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย
ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบัณฑิต



..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร. วิศิษฐ์ ประจวบเหมาะ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไวยทย์ พุฒารีย์)



..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล)



..... กรรมการ
(แพทย์หญิง คุณหญิง ศรีประไพ ผ่องอักษร)

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การทำลายพิษงูเห่าโดยการทำให้อยู่ในรูปของโพลีเมอร์ และคุณสมบัติของการ เป็นแอนติเจนของโพลีเมอร์ในหนู
ชื่อนิติศ กาญจนาศรีระสมบรรณ
อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล
แผนกวิชา พฤษศาสตร์
ปีการศึกษา 2520

บทคัดย่อ

จุดมุ่งหมายของการวิจัยนี้เพื่อที่จะทำให้โปรตีนพิษ (neuro toxin) ในพิษงูเห่าไทย (Naja naja siamensis) มีประสิทธิภาพ ในการเป็นแอนติเจนได้ดีขึ้น เพื่อประโยชน์ในการผลิตซีรัมแก้พิษงู โดยปกติ โปรตีนพิษมีขนาดโมเลกุลเล็กและมีความเป็นพิษสูง จึงเป็นปัญหาในการ immunize สัตว์ เพื่อผลิตซีรัมแก้พิษงู เนื่องจากจะต้องใช้ปริมาณพิษที่ต่ำกว่าปริมาณที่เหมาะสมในการฉีดสัตว์และยังทำให้สัตว์สร้างแอนติบอดีที่ได้นั้น เพราะเป็นสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าสารที่เหมาะสมจะเป็นแอนติเจนด้วย นอกจากนี้ส่วนประกอบของพิษงูที่เป็นโปรตีนไม่มีพิษอื่น ๆ ยังทำให้ได้ซีรัมที่มีแอนติบอดีที่ไม่มีประโยชน์ในการแก้พิษงูด้วย

การวิจัยนี้ได้พยายามแยกโปรตีนส่วนที่ไม่มีพิษออกจากพิษงูเห่า โดยใช้วิธีการให้ความร้อน 80° เซลเซียส เป็นเวลา 20 นาทีในขณะที่สารละลายพิษงูอยู่ในสภาพเป็นกรดมี pH = 5.8 หลังจากแยกโปรตีนที่ตกตะกอนออกไปแล้ว จะได้อัตราส่วนที่เป็นน้ำใสซึ่งมีโปรตีนพิษที่ทนความร้อนได้ขึ้นอยู่กับ น้ำส่วนน้ำใสหรือ "heated toxin" ไปทำให้โมเลกุลของโปรตีนพิษเชื่อมต่อกันแล้วมีขนาดโมเลกุลใหญ่ขึ้นโดยใช้ 2.5% glutaraldehyde เป็นตัวเชื่อม

ผลการทดลองพบว่าสามารถใช้ความร้อนแยกโปรตีนบางส่วน
 ออกจากพิษงูได้ประมาณ 35 เปอร์เซ็นต์ โปรตีนส่วนที่เหลือ 65 เปอร์เซ็นต์
 พบว่ามีความเป็นพิษสูงกว่าพิษงูเห่าธรรมชาติคือมีค่า $LD_{50} = 0.167$ มิลลิกรัม
 ต่อหนู 1 กิโลกรัม (พิษงูเห่าธรรมชาติมีค่า $LD_{50} = 0.216$ มิลลิกรัมต่อ
 หนู 1 กิโลกรัม) โปรตีนส่วนที่เหลือหรือ heated toxin นี้มีปริมาณความ
 เป็นพิษที่คิดเป็นจำนวน LD_{50} ลดลงไป 16.7 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นความเป็น
 พิษใน heated toxin ที่โคกกลับคืนมาคือ 83.3 เปอร์เซ็นต์ heated
 toxin ซึ่งนำไปทำให้เป็นโพลีเมอร์โดยใช้ glutaraldehyde พบว่า
 ความเป็นพิษหมดไป และโคเปรียบเทียบกับพิษงูเห่าธรรมชาติหรือ "unheated
 toxin" ที่นำมาทำโพลีเมอร์ด้วยวิธีเดียวกัน พบว่าความเป็นพิษหมดไปเช่น
 เดียวกัน แต่โพลีเมอร์ของ heated toxin สามารถกระตุ้นหนู
 (Wistar Strain Rat) สร้างแอนติบอดีได้สูงกว่าโพลีเมอร์ของ
 unheated toxin มาก จากการทดสอบโดยใช้ปฏิกิริยา neutrali-
 zation ในหลอดทดลองพบว่า ซีรัมที่ได้จากหนูกลุ่มที่ฉีดโพลีเมอร์ของ
 heated toxin 1 มิลลิลิตร สามารถทำลายพิษงูเห่าได้ 13.42 LD_{50}
 หลังจาก immunize หนูแล้ว 9 dose เป็นเวลา 3 เดือน และระดับ
 นี้ก็สูงขึ้นอีกถึงแม้จะฉีดแอนติเจนต่อไป ซึ่งแสดงให้เห็นว่าในหนูสามารถ
 สร้างแอนติบอดีได้มากในระดับเท่านี้ ส่วนในหนูกลุ่มที่กระตุ้นด้วยโพลีเมอร์
 ของ unheated toxin ระดับแอนติบอดีต่อพิษงูตัวมากจนไม่สามารถหาค่า
 การทำลายพิษงูได้

นอกจากนี้โคทดสอบโดยการฉีดพิษงูเห่าธรรมชาติเข้าในตัวยู
 ที่ถูก immunize ด้วยโพลีเมอร์ ผลปรากฏว่าหนูที่ immunize ด้วยโพลีเมอร์
 ของ heated toxin สามารถทนพิษงูได้ 8 LD_{50} แต่หนูที่ immunize
 ด้วยโพลีเมอร์ของ unheated toxin ไม่สามารถทนพิษงูขนาด 3 LD_{50}
 ได้ แต่เนื่องจากมีแอนติบอดีเล็กน้อยจึงทำให้การตายของหนูกลุ่มนี้ช้าลง

การวิจัยนี้จะมีประโยชน์ในการผลิตซีรัมแกพิษงู โดยที่จะสามารถ
 ใช้โพลีเมอร์ของ heated toxin แทนพิษงูหาธรรมชาติในการกระตุ้นให้
 สัตว์สร้างแอนติบอดีต่อพิษงูเห่า ซึ่งนอกจากจะทำให้สัตว์ไม่ได้รับอันตรายจาก
 พิษงูแล้วยังสามารถใช้ปริมาณที่สูงกว่าพิษงูหาธรรมชาติได้ถึง 50 - 70 เท่า
 และการวิจัยนี้ยังเป็นแนวทางที่จะให้ทำการวิจัยขั้นต่อ ๆ ไป เพื่อให้ได้ข้อมูล
 ที่สมบูรณ์ยิ่งขึ้น เช่น การหาปริมาณโพลีเมอร์ที่เหมาะสมในการ immunize
 สัตว์ การทดลองใช้สัตว์อื่นเช่น กระจ่าง แกะ มา เป็นต้นในการ immunize
 ด้วยโพลีเมอร์ ซึ่งอาจจะให้แอนติบอดีที่มีระดับสูงขึ้น การทดลองทำโปรตีนพิษงู
 ให้มีความบริสุทธิ์สูงขึ้นก่อนที่จะนำมาทำโพลีเมอร์ เป็นต้น.

1

Thesis Title Detoxification of Cobra Venom by Polymeri-
zation and Its Antigenic Property in Rats

Name Kanchana Keerasomboon

Thesis Advisor Assistant professor Dr. Naline Nilubol

Department Botany

Academic Year 1977

ABSTRACT

The purpose of this study was to increase the antigenic potency of neurotoxin of Thai Cobra (Naja naja siamensis). In the production of Cobra anti-venom, we faced several problems due to the neurotoxin, the highly toxic protein composition of the venom. Firstly, having small molecular size, it exhibited low antigenic potency. Secondly, its high toxicity prevented the use of optimal dose of venom in immunization of animals, because fatality prevailed. Apart from these, the non-toxic protein composition of the venom induced the production of useless antibodies and hence, when injected into man, it imposed several undesirable side effects.

To isolate the non-toxic protein, we heated the suspension of cobra venom in acidic condition (pH 5.8) at 80°C for 20 min. The 35% precipitating protein was removed, and the remaining 65% supernatant contained partially purified heat-

stable toxin as named "heated toxin". Subsequently, the heated toxin was polymerized by 2.5% glutaraldehyde.

The heated toxin had higher toxicity than natural cobra venom, having $LD_{50} = 0.167$ mg/kg of mice (natural cobra venom $LD_{50} = 0.216$ mg/kg of mice). The percentage of recovery of toxicity of heated toxin was 83.3 and 16.7% was lost in the heating procedure. The polymer of heated toxin was found to be non-toxic, and induced considerable titer of anti-toxin in Wistar Strain Rat. The polymer of unheated toxin (natural venom) was also tested and found to be non-toxic, but could induce a very low titer of anti-toxin.

In vitro neutralization test showed that 1 ml of serum from rats immunized with polymer of heated toxin neutralized maximally 13.42 LD_{50} of cobra venom after rats being immunized with 9 successive doses during 3 months. While LD_{50} value was not calculable when immunized with polymer of unheated toxin.

In vivo neutralization test, the group of rats immunized with polymer of heated toxin withstood 8 LD_{50} , while those immunized with polymer of unheated toxin could not withstand 3 LD_{50} , but death was delayed.

This study suggested the advantage in using polymer of heated cobra toxin in anti-venom production, not only that rats could receive the polymer 50 - 70 folds more than

natural venom, but also that antigenic property of the toxin remained. Further investigations can be done, e.g., to determine the optimal dose of polymer in immunization in order to increase antibody titer; to test the immune response in larger animals, e.g., rabbit, sheep, horse, etc.; to increase purity of neurotoxin before polymerization.

กิติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จจุลวงไปควยคือควยความกุแเอาใจใส่ให้คำปรึกษา
แนะนำและให้กำลังใจจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ คร.นดิน นิลอุบล อาจารย์
ที่ปรึกษา ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้ควย

ผู้วิจัยขอกราบขอบคุณ รองศาสตราจารย์ คร.ไววิทย์ พุทธาริ หัวหน้า
แผนกวิชาพิษุศาสตร์และประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์นี้ แพทย์หญิง
คุณหญิงศรีประไพ ผองอักษร ผู้อำนวยการสถานเสาวภาที่กรุณาให้คำปรึกษา
และให้ความสะดวกเกี่ยวกับพินงเหาที่ใช้ในการทดลอง ศาสตราจารย์ คร.
ม.ร.ว.พูนพิงศ์ วรุณี หัวหน้าแผนกวิชาชีววิทยาที่กรุณาให้ใช้สถานที่เลี้ยง
สัตว์ทดลองและให้ความสะดวกในการใช้เครื่องปั้นแยกสาร และรองศาสตรา-
จารย์ แพทย์หญิง คุณหญิงศรีจิตรา มุนนาค หน่วยคอมไรทอและเมตคาบอสิสัม
แผนกอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ใช้
ห้องปฏิบัติการในการแยกพินงูในการทดลองระยะคน

ผู้วิจัยไม่อาจลืมพระคุณของ นายแพทย์วิศาล เขาวงศิริ ผู้ให้คำแนะนำ
เพื่อเป็นแนวทางของการวิจัยนี้ และขอขอบคุณ คุณจรัด เอกะวิภาต ผู้ช่วย
กุแแลสัตว์ทดลองและเจาะเลือดหนูให้ตลอดการวิจัย

นอกจากนี้ค่าใช้จ่ายต่าง ๆ ในการวิจัย ผู้วิจัยได้รับความช่วยเหลือ
จากเงินทนสมเด็จพระมหิตลาริเบศรอกุคยเคชวิกกรมบรมชนกนารถ จึงทำให้
การวิจัยนี้สำเร็จจุลวงไปควยคือ.

สารบัญ

	๒
	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ช
กิตติกรรมประกาศ	ญ
รายการตารางประกอบ	ฎ
รายการรูปประกอบ	ฏ
รายการแผนผังประกอบ	ฒ
บทที่	
1 บทนำ	1
2 การวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
3 วิธีการทดลอง	18
การลดปริมาณของ โปรตีนที่ไม่มีพิษซึ่งปนอยู่ในพิษที่รีดจาก งูเห่า	18
การขจัดโปรตีนส่วนที่ไม่มีพิษออกจากพิษงูเห่าโดยใช้ ความร้อน	18
การหาปริมาณโปรตีนใน heated toxin	19
การหาความเป็นพิษของพิษงู	20
การทำให้โมเลกุลของพิษอยู่ในรูปโพลีเมอร์พิษงู	20
การหาคุณสมบัติของการเป็นแอนติเจนของ โพลีเมอร์พิษงู	22
4 ผลการทดลอง	27
ความเป็นพิษของพิษงูเห่าไทย	27

บทที่	หน้า
ผลของการฉีดโปรตีนที่ไม่มีพิษด้วยความร้อน	27
ผลของการคำนวณหาค่าของความเป็นพิษที่โลกด้คืนมาหลังจากการฉีด โปรตีนที่ไม่มีพิษบางส่วนออกโดยคิดตามค่า LD ₅₀ (Percentage of of Recovery Toxin)	31
ผลการทำพิษงูให้อยู่ในรูปโพลีเมอร์	32
ผลการทดสอบความเป็นพิษของโพลีเมอร์	33
การกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อพิษงูเห่าในหนู (wistar Strain Rat)	34
ผลการทดสอบหาภูมิคุ้มกันต่อพิษงูเห่าในหนูโดยการฉีดพิษงูเข้าในตัวหนู (in vivo test)	45
5 การอภิปรายผล	47
6 ข้อสรุปและขอเสนอแนะ	55
เอกสารอ้างอิง	57
ประวัติ	64

รายการตารางประกอบ

ตารางที่

หน้า

1	แสดงการแยก neurotoxin ออกจากพิษงูเห่า Genus <u>Naja</u>	8
2	แสดงผลของการชักโปรตีนที่ไม่มีพิษออกจากพิษงูโดยใช้ สารละลายพิษงูที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน	28
3	แสดงการเปรียบเทียบความเป็นพิษของพิษงูที่ได้อุณหภูมิ (unheated toxin) และพิษงูที่ได้รับความร้อนแยกโปรตีน ออกบางส่วน (heated toxin)	30
4	แสดงค่าความเป็นพิษของพิษงูที่สูญเสียไปในขบวนการชัก โปรตีนที่ไม่มีพิษ	32
5	แสดงผลการหาระดับของแอนติบอดีในซีรัมของหนู (wistar (strain Rat) หลังจากฉีดโพลีเมอร์ของ heated toxin ในระยะเวลาต่าง ๆ	35
6	แสดงผลการหาระดับของแอนติบอดีในซีรัมของหนูหลังจากฉีด โพลีเมอร์ของ unheated toxin ในระยะเวลาต่าง ๆ	40
7	เปรียบเทียบระดับของแอนติบอดีในซีรัมหนูกลุ่มที่ได้รับการฉีด โพลีเมอร์ของ heated toxin และหนูกลุ่มที่ได้รับการฉีด โพลีเมอร์ของ unheated toxin	48
8	แสดงการเปรียบเทียบความต้านทานต่อพิษงูในหนู 2 กลุ่ม ที่ถูก immunize ด้วยโพลีเมอร์ของ heated toxin และ unheated toxin (in vivo test)	46

รายการรูปประกอบ

รูปที่

หน้า

1. แผนภูมิแสดงระดับแอนติบอดีในหนูหลังจากฉีดโพลีเมอร์
heated toxin 38

รายการแผนผังประกอบ

แผนผังที่

หน้า

- 1 แสดงการฉีดพิษงูและเจาะเลือดในหนู
(Wistar Strain Rat) 24