บทที่ 1

บทนำ

งูที่อาศัยอยู่ทั่วไปบนพื้นโลกนี้มีทั้งชนิดมีพิษและไม่มีพิษ โดยอาศัยลักษณะความแตกต่างทางรูปร่าง รวมทั้งลักษณะทางอิมมูโนวิทยาสามารถแบ่งงูได้เป็น 23 วงศ์ (families)ซึ่งมีอยู่ประมาณ 2,340 ชนิด (species) (Dowling & Duellman, 1978) และในจำนวนนี้จัดเป็นงูพิษ 3 วงศ์ แบ่งได้เป็น 420 ชนิด งูพิษทั้ง 3 วงศ์นี้ได้แก่ Elapidae (งูเห่า งูจงอาง งูสามเหลี่ยม) Viperidae (งูแมวเซา)และ Crotalidae (งูกะปะ) บางครั้งอาจจัดเพิ่มอีก 1 วงศ์คือ Hydrophidae ซึ่งได้แก่งูพิษทุกชนิดที่อาศัยอยู่ในทะเล

ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งในเขตร้อน ที่มีลักษณะภูมิประเทศและดินฟ้าอากาศที่เอื้ออำนวยต่อการดำรงชีวิตของงูเป็นอย่างมาก ดังนั้นจึงพบว่ามีงูอาศัยอยู่มากมายหลายชนิด ในจำนวนงูที่มีพิษนี้มีงูอยู่ 6 ชนิด ซึ่งพบว่าเป็นงูที่มีผู้ถูกกัดอยู่บ่อย ๆ งูเหล่านี้ได้แก่ งูเห่าไทย (Naja naja kaouthia หรือ Naja naja siamensis) งูจงอาง(Ophiophagus hannah) งูสามเหลี่ยม (Bangarus fasciatus) งูแมวเซา (Vipera russeli siamensis) งูกะปะ (Agkistrodon rhodostoma) และงูเขียวหางไหม้ (Trimeresurus popeorum) (Tu และคณะ,1967 ; Underwood, 1979) ในปีหนึ่ง ๆ ประเทศไทยมีผู้ถูกงูพิษกัดเป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะงูเห่าไทยซึ่งมีชุกชุมทั่วทุกภาคของประเทศ และพบมากตามนาข้าว งูเห่าไทยเป็นงูพิษที่ทำให้ผู้ถูกกัดถึงแก่ชีวิต(Ganthavorn ,1969) รายงานผู้ถูกงูกัดในระยะเวลา 5 ปี มีจำนวนถึง 4,850 ราย ในจำนวนนี้เป็นผู้ถูกงูเห่ากัด 25 เปอร์เซนต์ และมีผู้เสียชีวิตถึง 6.5 เปอร์เซนต์ ของผู้ถูกงูเห่ากัด (Mitrakulและคณะ, 1984)

พิษงูเห่าประกอบด้วยส่วนที่เป็นโปรตีนประมาณ 90 เปอร์เซนต์ และส่วนที่ไม่ใช่โปรตีนเพียง 10 เปอร์เซนต์ ซึ่งประกอบด้วยอินทรีย์และอนินทรียสารต่าง ๆ หลายชนิด ส่วนที่เป็นโปรตีนมี 2 ส่วนคือส่วนที่เป็นพิษ (toxin) และส่วนที่เป็นเอนไซม์ (Karlsson,1979) ในพิษงูเห่าไทยโปรตีนส่วนที่เป็นพิษจะประกอบด้วยนิวโรทอกซิน (Neurotoxin) และคาร์ดิโอทอกซิน (Cardiotoxin)(Tan,1983) ซึ่งมีประมาณ 28 และ 60 เปอร์เซนต์

ของโปรตีนในพิษงูเห่าตามลำดับ สาเหตุสำคัญที่ทำให้ผู้ถูกกัดถึงแก่ชีวิตก็คือนิวโรทอกซิน (Lee,1971) พบว่า 94 เปอร์เซนต์ของผู้ถูกกัดจะแสดงอาการทางประสาท (neurotoxic activity) ส่วนประกอบสำคัญของนิวโรทอกซินจากพิษงูเห่าไทยคือ ไซเมนซิสทอกซิน 3 (siamensis toxin 3) ซึ่งเป็นโพลิเพปไทด์ (polypeptide) ชนิดสายเดี่ยวทนต่อความร้อนได้ดี ประกอบด้วยกรดอะมิโน 71 ตัวยึดเหนี่ยวกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) 5 พันธะภายในสาย (Aharonovและคณะ, 1974) พิษงูเห่าไทยจัดเป็นชนิดโพสซินแนปติค นิวโรทอกซิน (post synaptic neurotoxin)โดยจัดตามตำแหน่งที่ออกฤทธิ์ต่อมอเตอร์เอนเพลท (motor end plate) (Lee,1972)

นิวโรทอกซินออกฤทธิ์โดยหยุดการทำงานของกล้ามเนื้อ ทำให้เกิดอัมพาตของกล้ามเนื้อ ทางเดินหายใจล้มเหลวและผู้ป่วยถึงแก่ชีวิต (Yang , 1972 ; Cooper & Reich, 1972) ในการทำงานตามปกติของระบบกล้ามเนื้อ เกิดจากอะซิทิลโคลีน (acetylcholine) ซึ่งถูกสร้างจากอะซิทิลโคเอนไซม์ เอ (acetyl coenzyme A) และโคลีน (choline)ในไซโตพลาสซึมของบริเวณปลายประสาท โดยการเร่งของเอนไซม์โคลีนอะซิทิลทราเน์สเฟอร์เรส (choline acetyltransferase) เก็บที่ซินแนพติคเวสิเคิล (synaptic vesicles) เมื่อเกิดศักย์ไฟฟ้าที่ปลายประสาทแอกซอน (axon terminal) จะทำให้มีการไหลของแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) เข้าสู่เซลล์และเกิดการหลั่งของอะซิทิลโคลีนออกมาจับกับนิโคตินิค อะซิทิลโคลีน รีเซพเตอร์(nicotinic acetylcholine receptor , Ach R) ในผนังปลายประสาทของกล้ามเนื้อลาย (postsynaptic membranes of skeleton muscles) (Burden และคณะ, 1975) ทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อ จากนั้นอะซิทิลโคลีน เอสเทอเรส (acetylcholine esterase) จะทำลายอะซิทิลโคลีนให้หมดไปเป็นการหยุดการทำงานของกล้ามเนื้อ ทำให้เกิดการหดและคลายตัวของกล้ามเนื้อได้ กลไกการทำงานของนิวโรทอกซินก็คือการไปขัดขวางการจับกันของอะซิทิลโคลีน กับนิโคตินิค อะซิทิลโคลีน รีเซพเตอร์ โดยต้านมันจะเข้าไปจับแทนที่รอยต่อประสาทกล้ามเนื้อลาย (skeletal myoneural junction) อย่างจำเพาะ การจับนี้มีการย้อนกลับของปฏิกิริยาต่ำมาก (Lester,1970) พบว่ามีค่าคงที่ของการแตกตัว(dissociation constant, Kd) ประมาณ 10^{-10}-10^{-11} โมลต่อลิตร (Weber & Chengeux,1974 ; Chicheportiche และคณะ,1975) การจับกันของนิวโรทอกซินกับรีเซพเตอร์ (receptor) นี้จับกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ พันธะโควาเลนท์ (covalent bond) และอิเลคโทรสเตติค อินเทอแรคชั่น

(electrostatic interaction)

ปัญหาเรื่องงูพิษกัดเป็นปัญหาสำคัญทางด้านสวัสดิภาพและความปลอดภัยของประชากร ผู้ถูกกัดอาจถึงแก่ชีวิต อาจพิการ การทำงานของอวัยวะบางส่วนอาจเสียไป หรืออาจเกิดเนื้อตายบริเวณที่ถูกกัด (necrosis) รวมทั้งต้องใช้เวลานานในการรักษา ซึ่งทำให้เกิดความสูญเสียทั้งชีวิตและทรัพย์สินเป็นอย่างมาก (Reid,1964) ในการรักษาผู้ถูกงูพิษกัดให้รอดชีวิตโดยมากจะเป็นการรักษาตามอาการ หรือการให้เซรุ่มแก้พิษงู (antivenin) ซึ่งมีความจำเพาะและมีประสิทธิภาพสูง (Chaisinและคณะ, 1986) หน่วยงานที่ผลิตเซรุ่มแก้พิษงูเห่าไทย และแจกจ่ายไปทั่วประเทศได้แก่ กองวิทยาศาสตร์ สภากาชาดไทย และองค์การเภสัชกรรม วิธีการผลิต ทำโดยการฉีดพิษงูปริมาณน้อย ๆ เข้าไปในม้า ซึ่งต้องใช้เวลาค่อนข้างนานเนื่องจากพิษงูมีความเป็นพิษสูง และประกอบกับการฉีดพิษงูซึ่งผสมกับแอดจูแวนท์มักจะทำให้มีการอักเสบของเนื้อเยื่อบริเวณที่ฉีด ดังนั้นในการที่จะให้ได้เซรุ่มแก้พิษงู (antivenin) ที่มีไตเตอร์สูง ๆ จะเสียเวลามาก และมีวิธีการที่ยุ่งยาก (New และคณะ ,1984) ในปัจจุบันเซรุ่มแก้พิษงูเห่าที่ผลิตได้ยังมีคุณภาพไม่ดีเท่าที่ควร และจำนวนที่ผลิตได้ยังไม่เพียงพอกับความต้องการ สาเหตุสำคัญที่ทำให้การผลิตยังมีปัญหาอาจเนื่องมาจาก

1 พิษงูที่ฉีดเข้าไปในม้า เพื่อให้เกิดการสร้างแอนติบอดีมีพิษร้ายแรงดังนั้นในการฉีดแต่ละครั้งจึงต้องใช้ปริมาณน้อย ซึ่งอาจจะเป็นปริมาณที่ต่ำกว่าปริมาณที่เหมาะสม จึงทำให้มีการสร้างแอนติบอดีได้ในระดับต่ำ

2 พิษงูประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิด ส่วนที่มีความสำคัญและเป็นสาเหตุที่ทำให้เสียชีวิตคือนิวโรทอกซิน และคาร์ดิโอทอกซิน ซึ่งเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กคือมีขนาด 7820 และ 6727 ดาลตันตามลำดับ (Karlsson และคณะ, 1971) ดังนั้นจึงมีประสิทธิภาพในการเป็นแอนติเจน (antigenic potency) ต่ำ คือไม่สามารถกระตุ้นให้มีการสร้างแอนติบอดีได้ในระดับสูง (Theakston และคณะ, 1985)

จากการที่เซรุ่มแก้พิษงูเห่า (antivenin) ที่ประเทศไทยผลิตได้ในปัจจุบัน ยังมีคุณภาพไม่ดีพอ จึงต้องใช้เซรุ่มปริมาณมากในการรักษาผู้ถูกงูเห่ากัด โดยอาจมีปริมาณตั้งแต่ 20 - 60 มิลลิลิตร จนถึง 200 -700 มิลลิลิตร หรือบางครั้งอาจมากกว่านี้ การได้รับเซรุ่มในปริมาณมาก อาจทำให้เกิดอันตราย โดยอาจมีอาการตั้งแต่ไม่รุนแรงจนกระทั่งรุนแรงถึงแก่ชีวิต (Loprinzi และคณะ, 1983 ; Sutherland & Loving,1979) อาการที่พบคือ

อาการแพ้เซรุ่ม (serum sickness) เกิดภายหลังจากการที่ผู้ถูกงูพิษกัดได้รับการฉีดเซรุ่มแก้พิษงู (antivenom) ที่เตรียมได้จากม้า ซึ่งจะไปกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อโปรตีนในเซรุ่มของม้าที่หลงเหลืออยู่ ทำให้เกิดการรวมตัวของแอนติเจนและแอนติบอดีในกระแสโลหิตได้เป็นอิมมูนคอมเพล็กซ์ (immune complex) ไปอยู่ตามส่วนต่างๆ ของร่างกาย ผู้ป่วยจะมีอาการปวดบวมแดงในตำแหน่งที่ฉีดก่อน จากนั้นจะมีอาการไข้ ต่อมน้ำเหลืองและม้ามโต มีผื่นแดงที่ผิวหนัง ปวดข้อ และเส้นเลือดอักเสบ (สุทธิพันธ์ สาระสมบัติ และคณะ, 2523)

อะนาฟีแลกซีสช็อค (Anaphylaxis shock) เป็นกลุ่มอาการที่เกิดจากการแพ้ปฏิกิริยาที่เกิดมักจะรวดเร็ว และรุนแรงทำให้ถึงแก่ชีวิตได้ในบางครั้ง เกิดจากการที่ร่างกายได้รับแอนติเจน(เซรุ่มแก้พิษงู) ซึ่งเข้าไปกระตุ้นให้ร่างกายสร้างแอนติบอดีขึ้น เมื่อได้รับการกระตุ้นจากแอนติเจนนั้นอีกในโอกาสต่อมาจึงเกิดการแพ้ โดยแอนติเจนจะรวมตัวกับแอนติบอดีแล้วกระตุ้นเซลล์เป้าหมาย (target cell) ชนิดต่างๆ ในร่างกายเช่น มาสเซลล์ (mast cell) นิวโทรฟิล (neutrophil) อีโอสิโนฟิล (eosinophil) ให้หลั่งสารที่เกี่ยวข้องกับการแพ้ออกมา เช่น ฮีสทามีน (histamine) ซีโรโทนิน (serotonin) และไคนิน (kinin) เป็นต้น สารที่ถูกขับออกมานี้จะไปกระตุ้นพวกไพรแมรีช็อคทิสชู (primary shock tissue) ให้เกิดปฏิกิริยาแพ้ขึ้น โดยทั่วไปจะทำให้กล้ามเนื้อเรียบหดตัว หลอดเลือดฝอยขยายตัว และเพิ่มความสามารถที่จะซึมผ่านหลอดเลือด (vascular permeability) (สันต์ ทัดถีรัตน์ และคณะ ,2519)

ปัจจุบันยังคงมีการศึกษาค้นคว้าหาวิธีการผลิตเซรุ่มแก้พิษงู ให้มีประสิทธิภาพในการรักษาสูง มีความสามารถในการทำลาย (neutralization) ความเป็นพิษของพิษงู และส่วนที่เป็นเอนไซม์ต่าง ๆ ได้สูง ดังที่กล่าวมาแล้วว่าการผลิตเซรุ่มแก้พิษงูทำได้โดยการฉีดพิษงูเข้าไปในม้า แพะ หรือแกะ และปริมาณของพิษงูที่ใช้ฉีดจะต้องไม่เป็นอันตราย ทั้งวิธีการในการเตรียมพิษงูที่จะใช้ฉีดจะต้องไม่ทำให้สมบัติในการเป็นอิมมูโนเจน (immunogen) เปลี่ยนแปลงไป คือให้ลักษณะโครงสร้างของส่วนที่เป็นพิษยังคงเดิม

วิธีเตรียมพิษงูให้มีความเป็นพิษลดลงมีวิธีการต่าง ๆ เช่น

1 การใช้สารเคมี (Chemical method) โดยการผสมสารเคมีกับพิษงูก่อนฉีดสัตว์ทดลองสารเคมีอาจเป็น

1.1 สเตียรอยด์ (steroid compound) เช่นการใช้เอสไทรออลไดโซเดียมซัคซิเนต (Estriol - 16,17- disodium succinate) ผสมกับพิษงูเห่าจะป้องกันการเกิดภาวะตกเลือด (hemorrhage) ได้ในสัตว์ทดลอง

1.2 คาร์โบไฮเดรต เช่น เฮพพาริน (heparin) จะรวมตัวกับส่วนประกอบที่จะทำให้เกิดการตกเลือดของพิษงูเห่า ทำให้มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดภาวะตกเลือดได้

1.3 สารประกอบซึ่งมีกำมะถันเป็นองค์ประกอบ (compounds containing sulfur) เช่น กรดไดไฮโดรไธออคติค (dihydrothioctic acid) กลูตาไธโอน (glutathione) และไธโอยูเรีย (thiourea) สารประกอบเหล่านี้มีกลไกในการป้องกันการเกิดพิษของพิษงูคือจะเกิดผลโดยตรงต่อพิษงูโดยการยับยั้งกิริยา (action) ของพิษงูต่อเนื้อเยื่อ

1.4 สารประกอบคีเลทิ่ง (chelating compounds) เช่น EDTA จะไปขจัดพวกสังกะสีไอออน (Zn^{2+}) และแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) ออกจากส่วนที่เป็นโปรตีนของพิษงูทำให้สามารถทำลายความเป็นพิษของพิษงูได้

2 การฉายรังสี (Radiation method) โดยการนำพิษงูมาฉายแสงต่าง ๆ เช่น

2.1 แสงช่วงที่ตามองเห็น (visible light)

Kocholaty (1966) พบว่าเมื่อผสมเมธิลีนบลูกับพิษงู Crotalus atrox แล้วนำไปฉายด้วยแสง visible light จะทำให้ความเป็นพิษของพิษงูลดลง แต่การใช้วิธีนี้กับพิษงูบางชนิดจะได้เซรุ่มที่มีคุณภาพต่ำลง

2.2 แสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet light)

Tejasen และ Ottolenghi (1970) พบว่าแสงอัลตราไวโอเลตสามารถทำให้ความเป็นพิษของพิษงูลดลง และความเป็นพิษที่ลดลงนี้จะแปรผันตามเวลาที่ได้รับแสง และพบว่าสมบัติในการเป็นอิมมูโนเจนยังคงเต็ม

2.3 โคบอลท์ - 60

Parananda และคณะ (1976) พบว่าการใช้โคบอลท์ - 60 กับพิษงูเห่าจะทำให้ความเป็นพิษลดลงแต่ความสามารถในการเป็นอิมมูโนเจนจะต่ำลงด้วย

2.4 รังสีเอกซ์ (X - rays)

Flowers (1963) พบว่าการใช้รังสีเอกซ์กับพิษงูจะทำให้ความเป็นพิษและความเป็นอิมมูโนเจนลดลง

กล่าวโดยสรุปคือคุณภาพของเซรุ่มจะดีหรือไม่ขึ้นกับชนิดของพิษงู และรังสีที่ใช้ Ownby และ Tu (1977) รายงานว่าการฉายรังสีพิษงูเห่าทำให้ความเป็นอิมมูโนเจนลดลง เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) หรือโครงสร้างตติยภูมิ (tertiary structure) ของพิษงูเห่า

ในประเทศไทยการรักษาผู้ถูกงูเห่ากัด โดยการใช้เซรุ่มแก้พิษงูเห่ายังมีปัญหาอยู่มากมาย เพราะมีรายงานว่าในการใช้เซรุ่มเพื่อรักษาผู้ถูกงูเห่ากัด แม้บางทีจะมีปริมาณมากกว่า 600 มิลลิลิตร ก็ตามแต่ก็ยังไม่สามารถรักษาชีวิตคนไข้ไว้ได้ (Viravan และคณะ, 1986) ในการที่จะให้ได้เซรุ่มแก้พิษงูเห่าที่มีประสิทธิภาพในการรักษาสูง ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น การเตรียมพิษงูที่จะใช้ฉีด ชนิดของสัตว์ทดลอง วิธีที่จะฉีด (routes of immunization) รวมทั้งปริมาณและความเข้มข้นของพิษงูที่จะใช้ฉีด ซึ่งในการศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับเรื่องการผลิตเซรุ่มแก้พิษงูเห่าได้มีการค้นคว้าหาวิธีการต่าง ๆ เพื่อให้ได้เซรุ่มที่มีไตเตอร์สูงในระยะเวลาอันสั้น มีความจำเพาะและสามารถทำลายความเป็นพิษของพิษงูได้ดี วิธีการหนึ่งที่ได้มีการค้นคว้าและกำลังเป็นที่สนใจ ก็คือการเตรียมพิษงูให้อยู่ในรูปของไลโปโซม (liposomes)

ไลโปโซมเป็นชั้นของฟอสโฟลิพิด (phospholipid) ซึ่งจัดเป็นโมเลกุลประเภท "amphipathic" คือมีส่วนหัวเป็นส่วนที่ละลายน้ำ (water- soluble head)และมีส่วนหางเป็นส่วนที่ไม่ละลายน้ำ (water - insoluble tail) เรียงตัวโดยหันส่วนหัวออกด้านนอกและหันส่วนหางเข้าหากัน มีลักษณะปิดล้อมเป็นเม็ดกลม ภายในมีน้ำหรือสารละลายอยู่ ซึ่งถ้าเป็นการจัดเรียงตัวเป็นชั้นเดียวเรียกว่า ยูนิลาเมลลา ไลโปโซม (Unilamellar liposomes) แต่ถ้าเป็นการจัดเรียงตัวหลายชั้นสลับกันระหว่างชั้นของฟอสโฟลิพิด (lipid phase) และชั้นของน้ำ (aqueous phase) จะเรียกว่ามัลติลาเมลลาไลโปโซม (Multilamellar liposomes)

มีผู้นำไลโปโซมไปใช้งานอย่างกว้างขวาง เช่น Duzgunesและคณะ (1983) ได้ใช้ไลโปโซมเป็นแบบจำลองในการศึกษาเกี่ยวกับสมบัติต่าง ๆ ของผนังเซลล์ (cell membrane) เนื่องจากมีความคล้ายคลึงกับผนังเซลล์ของสิ่งมีชีวิต(Tyrrell และคณะ, 1976)

นอกจากนี้ยังมีการใช้ไลโปโซมในการบรรจุสารต่าง ๆ ที่ละลายน้ำได้ไว้ภายใน เช่น ยา โปรตีน กรดนิวคลีอิก และสารชีวภาพต่าง ๆ เพื่อประโยชน์ต่อการรักษาทางการแพทย์ การศึกษาทางเภสัชวิทยา ทางชีวเคมี รวมทั้งทางอิมมูโนวิทยา (Gregoriadis,1976; Szoka & Papahadjopoulos,1978) เนื่องจากไลโปโซมมีลักษณะคล้ายคลึงกับผนังเซลล์ จึงทำให้ไม่เกิดอันตราย และยังป้องกันไม่ให้สารที่บรรจุอยู่ภายใน เช่น ยาต่าง ๆ ถูกเจือจางหรือถูกทำลาย เมื่ออยู่ในกระแสโลหิต จึงทำให้ยาถูกส่งไปยังอวัยวะเป้าหมายที่เกิดโรคในความเข้มข้นสูง มีฤทธิ์ข้างเคียงน้อย ยังผลให้มีประสิทธิภาพในการรักษาสูง (Gregoriadis,1973) ตัวอย่างสารหรือตัวยาต่าง ๆ ที่บรรจุภายในไลโปโซม เช่น อะไมโลไกลโคซิเดส (amyloglycosidase) เพื่อใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่มีความบกพร่องเกี่ยวกับการสะสมไกลโคเจน (glycogenstoragedisease)(Tyrrellและคณะ,1976) อินซูลินเพื่อใช้รักษาโรคเบาหวาน (Palet & Ryman,1976)และอะราบิโนฟูราโนซิลไซโตซีน (1-*B*-D-Arabinofuranosylcytosine) เพื่อใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง (S.Kim และคณะ,1987 ; Mayhew และคณะ,1976) เป็นต้น

เทคนิคการเตรียมไลโปโซมมีวิธีการต่าง ๆ กันเช่น เอธานอลอินเจคชั่น(ethanol injection) อีเธอร์อินฟิวชัน (ether infusion) แต่ทั้ง 2 วิธีนี้มีประสิทธิภาพในการห่อหุ้ม (entrapped) ต่ำ ดังนั้นจึงได้มีการหาวิธีการในการเตรียมไลโปโซมแบบอื่น และพบว่าวิธีรีเวิร์สเฟสอีแวพอเรชัน(Reverse-phase evaporation)เป็นวิธีที่มีข้อดีวิธีหนึ่ง คือจะได้ยูนิลาเมลลา (unilamella)ขนาดใหญ่หรือได้โอลิโกลาเมลลา (oligolamellar) ซึ่งเป็นไลโปโซมที่มีชั้นของฟอสโฟลิพิด 2-3 ชั้นสลับกับชั้นที่เป็นน้ำ ที่มีอัตราส่วนของชั้นที่เป็นน้ำ (aqueous phase) ต่อลิพิด (lipid phase)สูง (Nayer และคณะ, 1986) ทำให้มีเปอร์เซ็นต์การห่อหุ้ม (% entrapped) สูงถึง 20-60 เปอร์เซนต์ (Szoka,1980) นอกจากวิธีในการเตรียมจะง่ายแล้วยังสามารถใช้ฟอสโฟลิพิดได้หลายชนิด และสามารถเพิ่มอัตราส่วนระหว่างฟอสโฟลิพิดกับน้ำได้ด้วย ทำให้เตรียมครั้งละมาก ๆ ได้ (Szoka และคณะ ,1978)

เพื่อให้การบรรจุสารต่าง ๆ ไว้ภายในไลโปโซม โดยวิธีรีเวิร์สเฟสอีแวพอเรชัน (Reverse -phase evaporation)ประสบความสำเร็จและมีประสิทธิภาพสูงจะต้องคำนึงถึง

1 ชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์(organic solvent)ต้องปราศจากเปอร์ออกไซด์ (peroxide) ซึ่งกำจัดออกได้โดยการกลั่น เป็นการป้องกันไม่ให้ฟอสโฟลิพิด หรือสารที่จะถูกหุ้มไว้ภายในไลโปโซมถูกทำลาย ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้โดยมากจะเป็นอีเธอร์ผสมกับคลอโรฟอร์มในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร(Szoka,1980)

2 ชนิดและสัดส่วนของลิพิดที่ใช้ จะต้องเลือกให้เหมาะสมเพื่อให้ได้เปอร์เซนต์การห่อหุ้มสูง ๆและพบว่าขนาดของไลโปโซมขึ้นกับส่วนประกอบของลิพิดและตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ (Szokaและคณะ,1978) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าถ้ามีสฟิงโกมัยอิลิน (sphingomyelin) และคอเลสเตอรอล (cholesterol) ในสัดส่วนที่เหมาะสมจะกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองระบบภูมิคุ้มกัน (immune response) ต่อแอนติเจนที่บรรจุอยู่ภายในได้ดีขึ้น (Tyrrell และคณะ,1976)

3 ความสามารถในการละลายลิพิดของตัวทำละลายอินทรีย์ (Straubinger & Papahadjopoulos,1983) เนื่องจากลิพิดชนิดต่างๆ ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ต่างชนิดกันจึงต้องเลือกใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ให้เหมาะสม

4 อัตราส่วนที่เหมาะสมของส่วนที่เป็นน้ำ (aqueous phase) และส่วนที่เป็นลิพิด (lipid phase) ซึ่งโดยมากใช้อัตราส่วน 1:3 โดยปริมาตร (Szoka & Papahadjopoulos 1980 ; Shew & Deamer,1985)

5 บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการละลายสารที่จะบรรจุภายในไลโปโซม โดยมากจะใช้ pH 7-8 และมีความเข้มข้นไอออนต่ำ เพราะการมีความเข้มข้นไอออนสูง จะทำให้เปอร์เซนต์การห่อหุ้มลดลง (Straubinger และคณะ, 1983; Ohsawa และคณะ,1985)

6 ขนาดของภาชนะที่ใช้บรรจุสารในการเตรียมไลโปโซมจะต้องเหมาะสม ถ้ามีขนาดใหญ่เกินไป เมื่อถึงขั้นตอนระเหยเอาตัวทำละลายอินทรีย์ออกจะมีผลให้ระเหยเร็วเกินไป ทำให้ส่วนที่เป็นบัฟเฟอร์ (aqueous phase) ระเหยตามออกไปด้วย ส่วนที่เป็นของเหลวในภาชนะก็จะแห้งไปหมดหรือเกือบหมด ไม่เกิดเป็นไลโปโซมหรือเกิดน้อยมาก (Szoka & Papahadjopoulos ; Pidgeon & McNeely,1980) นอกจากนี้ความหนาของภาชนะที่ใส่ก็มีผลต่อการเตรียมไลโปโซมด้วย เนื่องจากในการผสมส่วนที่เป็นน้ำ และส่วนที่เป็นลิพิดให้เข้ากันจะต้องใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonic wave) ซึ่งในกรณีที่ภาชนะที่ใช้มีความ

หนาเกินไป จะทำให้คลื่นเสียงเข้าไปไม่ถึงภายใน ทำให้การสั่นสะเทือนของของเหลวน้อย จึงต้องใช้เวลานานในการผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ซึ่งการใช้เวลาในการผสมนานอาจทำให้โปรตีน หรือสารต่าง ๆ ถูกทำลายได้ (Kirby & Gregoriadis,1986)

การเตรียมไลโปโซมโดยวิธีรีเวิร์สเฟสอีแวพอเรชัน (Reverse phase evaporation) อาจมีข้อเสียคือถ้าสารที่ถูกหุ้มเป็นพวกโปรตีน เมื่อใส่ลงไปในตัวทำละลายอินทรีย์จะทำให้มีการสัมผัสกันโดยตรง รวมทั้งระหว่างขั้นตอนการเตรียมยังมีการโซนิเคท (sonicate) โดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง อันอาจเป็นผลทำให้โปรตีนบางส่วนถูกทำลายได้ (Szoka & Papahadjopoulos,1980)

New และ Theakston (1985)ได้รายงานการเตรียมพิษงู Echis carinatus ซึ่งเป็นงูอยู่ในวงศ์ Viperidae พบมากในแถบอเมริกาใต้ ให้อยู่ภายในไลโปโซมทั้งชนิดเติมและไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์ พบว่าเมื่อเตรียมพิษงูให้อยู่ภายในไลโปโซมจะทำให้ความเป็นพิษลดลงโดยลดลงถึง 8 เท่าในไลโปโซมที่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์ และเมื่อนำไลโปโซมนี้ไปฉีดให้กับหนู (mice) ทางเส้นเลือดดำ พบว่าหลังจากฉีดพิษงูเพียงครั้งเดียวก็จะมีการสร้างแอนติบอดีต่อพิษงูได้ในระดับสูง และคงอยู่ในกระแสโลหิตเป็นเวลานาน (New และคณะ,1985) และพบว่าเมื่อฉีดให้กับกระต่ายทางเส้นเลือดหรือทางใต้ผิวหนัง หรือใช้พิษงูชนิดอื่นในการเตรียมไลโปโซม เช่น Bungarus candidus (Malayan krait) ก็จะให้ผลเช่นเดียวกัน (New และคณะ,1984) ถ้านำไลโปโซมซึ่งหุ้มพิษงู Echis carinatusไปฉีดในแกะทางเส้นเลือดดำ แล้วศึกษาอัตราการปล่อยพิษงูออกจากไลโปโซมโดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนท์แอสเสย์ (Enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA) พบว่าอัตราการปล่อยพิษงูออกมาในกระแสโลหิตจะต่ำมากคือมีเพียง 0.9 เปอร์เซนต์ของพิษงูที่ฉีดเข้าไปภายใน 10 นาทีหลังฉีด และลดลงเหลือ 0.5 เปอร์เซนต์หลังฉีด 1 วัน และตรวจไม่พบพิษงูหลังฉีด 3 วัน ซึ่งแสดงว่ามีพิษงูปริมาณเพียงเล็กน้อยค่อยๆ ถูกปล่อยออกมาจากไลโปโซม เพื่อกระตุ้นให้มีการสร้างแอนติบอดี พบว่าแอนติบอดีที่สร้างขึ้นมีระดับค่อนข้างสูง และคงอยู่ในกระแสโลหิตเป็นเวลานานเช่นเดียวกัน (Theakston และคณะ ,1985)

Bolanos และ Cerdas (1980) ผลิตเซรุ่มแก้พิษงู (antivenin) Crotalus durissus (Tropical rattlesnake) แต่พบว่าเป็นแอนติเจนที่ไม่ดี เพราะเมื่อนำไปฉีดให้กับสัตว์ทดลองจะต้องใช้เวลานานในการสร้างแอนติบอดี และแอนติบอดีที่ได้มีไตเตอร์ต่ำ และคุณภาพไม่ดี ดังนั้นในปี คศ.1989 Freitas และคณะ จึงได้เตรียมพิษงูนี้ให้อยู่ภายในไลโปโซมแล้วนำไปฉีดเข้าทางเส้นเลือดดำและใต้ผิวหนังหนู (mice) และกระต่ายตามลำดับ และพบว่าหลังจากฉีดเพียงครั้งเดียว จะมีการสร้างแอนติบอดีขึ้นอย่างรวดเร็ว และคงอยู่ในกระแสโลหิตเป็นเวลานานทั้งแอนติบอดีที่ได้ยังมีประสิทธิภาพในการรักษาสูงอีกด้วย

ปัญหาต่าง ๆ ในการผลิตเซรุ่มแก้พิษงูโดยวิธีทางการค้า (commercial method) มีมากมายเช่นได้เซรุ่มที่มีคุณภาพต่ำ เสียเวลา และสิ้นเปลือง ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว ดังนั้น การเตรียมพิษงูให้อยู่ในรูปของไลโปโซมโดยวิธีรีเวิร์สเฟสอีแวพอเรชันทั้งชนิดเติม และไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์ อาจเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถกำจัดปัญหาต่าง ๆ นี้ได้เนื่องจาก

1 ไลโปโซมชนิดไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์ (Non-osmicated liposomes) ที่เตรียมโดยการทำให้พิษงูเข้าไปอยู่ภายในไลโปโซม แล้วนำไปฉีดให้กับสัตว์ทดลอง (New และคณะ,1985) ไลโปโซมจะมีบทบาทต่อการสร้างแอนติบอดีต่อพิษงูคือ

1.1 ไลโปโซมจะหุ้มพิษงูไว้ภายใน โดยชั้นนอกเป็นชั้นของลิพิดล้อมรอบอยู่ เมื่อพิษงูซึ่งถูกหุ้มอยู่ภายในมิได้สัมผัสกับองค์ประกอบต่าง ๆ ในโลหิตโดยตรง ทำให้การแสดงความเป็นพิษ (toxicity) ของพิษงูลดลง เป็นผลทำให้สัตว์ทดลองไม่ได้รับอันตราย (Theakston และคณะ,1985)

1.2 พิษงูซึ่งอยู่ภายในโลโปโซมจะถูกปล่อยออกมาทีละน้อย จึงทำให้เซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันได้มีโอกาสสัมผัสกับแอนติเจนเป็นเวลานาน ทำให้สัตว์ทดลองสร้างแอนติบอดีได้ในระดับสูงและคงอยู่ในกระแสโลหิตเป็นเวลานานจากการฉีดเพียงครั้งเดียว (Theakston และคณะ ,1985)

1.3 ไลโปโซมมีสมบัติเป็นแอดจูแวนท์ คือจะทำให้พิษงูอยู่ในบริเวณที่ฉีดเป็นเวลานาน จึงมีโอกาสสัมผัสกับเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันได้นานขึ้น (Tyrrell และคณะ ,1976) เป็นการเพิ่มพูนการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อพิษงูนั้นได้ดีกว่าการให้พิษงูเพียงอย่างเดียว (Davis & Gregoriadis,1987 ; Allison & Gregoriadis , 1974)

1.4 เมื่อฉีดไลโปโซมทางเส้นเลือด พบว่าไลโปโซม่จะถูกส่งไปยังตับและม้าม ซึ่งเป็นอวัยวะที่มีเซลล์พวกแมโครฟาจ (macrophage) อยู่มาก (Tyrrell และคณะ,1976) แมโครฟาจจะจับกับไลโปโซมแล้วไปกระตุ้นที-เซลล์ (T-cell)และบี-เซลล์(B-cell) ให้ทำงานร่วมกัน โดยที-เซลล์จะหลั่งสารไปกระตุ้นบี-เซลล์ ให้เปลี่ยนเป็น plasma cell จากนั้นจะมีการเพิ่มจำนวนและมีการสร้างแอนติบอดีขึ้น

2 ไลโปโซมชนิดเติมออสเมียมเทตรอกไซด์ (Osmicated liposomes) ซึ่งเตรียมโดยการทำให้พิษงูเข้าไปอยู่ภายในไลโปโซมเช่นกัน แต่ในระหว่างการเตรียมมีการเติมออสเมียมเทตรอกไซด์ (Osmium tetroxide) ความเข้มข้นต่ำ ๆ ลงไปด้วย ไลโปโซมชนิดนี้จะมีบทบาทสำคัญต่อการสร้างแอนติบอดีต่อพิษงูเพิ่มมากกว่าไลโปโซมชนิดไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์คือ

2.1 ออสเมียมเทตรอกไซด์จะช่วยทำให้ผนังของไลโปโซม (liposomes membrane) มีความคงทนโดยทำให้เกิดพันธะข้าม (cross-linking)ระหว่างสฟิงโกมัยอีลินหรือฟอสโฟลิพิด (phospholipid) ที่อยู่ใกล้กัน ดังนั้นจึงเป็นการป้องกันไม่ให้ พิษงูที่อยู่ภายในไลโปโซมออกมาทีละจำนวนมาก แต่จะทำให้พิษงูค่อย ๆ ออกมาทีละน้อย และสามารถสัมผัสกับเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันได้เป็นเวลานาน อีกทั้งพิษงูในปริมาณน้อย ๆ ที่ออกมาจะไม่เป็นอันตรายต่อสัตว์ทดลองด้วย ทำให้มีการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้มีการสร้างแอนติบอดีได้ในระดับสูงในระยะเวลาอันรวดเร็วและปรากฏอยู่ในกระแสโลหิตเป็นเวลานาน (New และคณะ,1985; Freitas และคณะ,1989 ; Theakston และคณะ,1985)

2.2 ออสเมียมเทตรอกไซด์จะทำให้ความเป็นพิษ (toxicity)ของพิษงูลดลง (Freitas และคณะ,1989) นอกจากนี้ยังสามารถลดแอคติวิตี (activity) ของเอ็นไซม์ต่าง ๆ ที่เป็นส่วนประกอบของพิษงูด้วยเช่น ฟอสโฟไลเปสเอ (phospholipase A) นิวคลีโอทิเดส (5 - nucleotidase) เอทีพีเอส (ATP ase) กลีเซอโรฟอสฟาเทส (glycerophosphatase) และเพปทิเดส (peptidase) เป็นต้น โดยการไปทำให้เอ็นไซม์เหล่านี้ถูกตัด (cleavage) และเกิดพันธะข้าม (cross-linking)(New และคณะ,1985 ; Theakston และคณะ, 1985 ; Emerman & Behrman, 1982)

2.3 ออสเมียมเทตรอกไซด์ไม่เป็นอันตรายต่อสัตว์ทดลอง หรือมีฤทธิ์ข้างเคียงใดๆ ถ้ามีอยู่ในกระแสโลหิตจะถูกขับออกทางระบบหายใจอย่างรวดเร็ว(New และคณะ,1985)

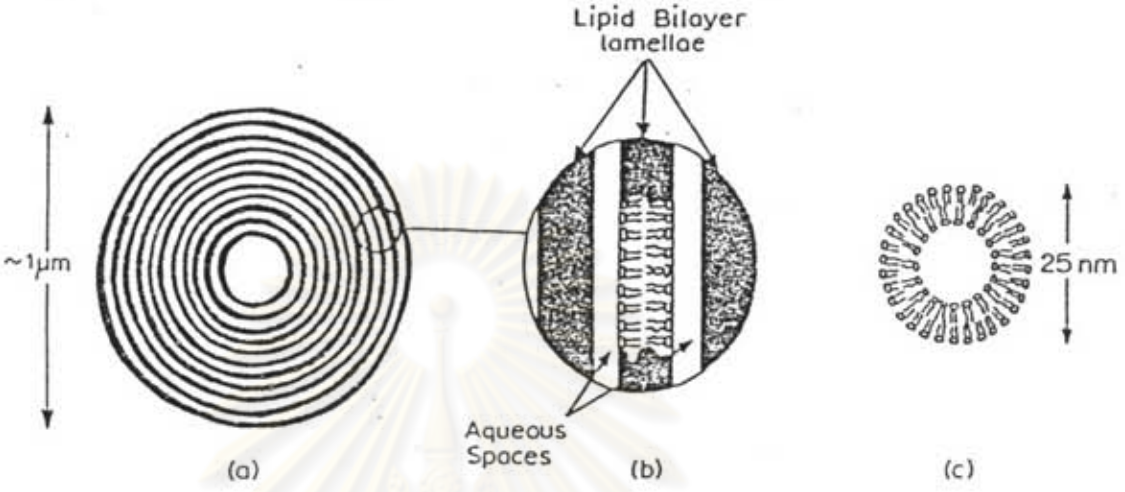
2.4 สามารถใช้ในการเตรียมเซรุ่มแก้พิษงูปริมาณมากในสัตว์ใหญ่อื่น ๆ เช่นม้า หรือ แกะได้ เพื่อนำไปใช้ในการรักษาผู้ถูกงูกัด (New และคณะ,1985)

2.5 อาจพัฒนาโดยนำเอาไลโปโซมที่หุ้มพิษงูไว้ภายใน ไปฉีดให้กับคนที่มีอัตราเสี่ยงต่อการถูกงูกัดสูง เพื่อให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันด้วยตนเอง (active immunization) (New และคณะ, 1985 ; Theakston และคณะ, 1985 ; Freitas และคณะ, 1989)

ในการวิจัยนี้มุ่งที่จะหาวิธีการที่จะผลิตเซรุ่มแก้พิษงูเห่าที่มีคุณภาพสูง ผลิตได้อย่างรวดเร็วและมีราคาถูก โดยจะเตรียมพิษงูเห่าให้อยู่ในรูปของไลโปโซมทั้งชนิดที่เติมและไม่เติมออสเมียมเทตรอกไซด์ แล้วฉีดเข้ากระต่ายเพื่อให้กระต่ายสร้างแอนติบอดีต่อพิษงูเห่า และติดตามหาปริมาณแอนติบอดีหรือระดับภูมิต้านทานต่อพิษงูเห่าในเซรุ่มของกระต่าย โดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนท์แอสเสย์ (Neutralization test) นอกจากนั้น ในการวิจัยนี้จะพัฒนาวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนท์แอสเสย์ สำหรับหาปริมาณพิษงูเห่าในเซรุ่มกระต่ายด้วย เพื่อศึกษาอัตราการปล่อยพิษงูออกจากไลโปโซม เนื่องจากวิธีนี้เป็นวิธีที่สะดวก มีความจำเพาะและมีความไวสูง คาดว่าผลการวิจัยนี้อาจเป็นแนวทางสำหรับการค้นคว้า และการวิจัยขั้นต่อไปในสัตว์ทดลองขนาดใหญ่ และอาจนำไปประยุกต์ใช้กับพิษงูชนิดอื่นต่อไปในอนาคตได้ด้วย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

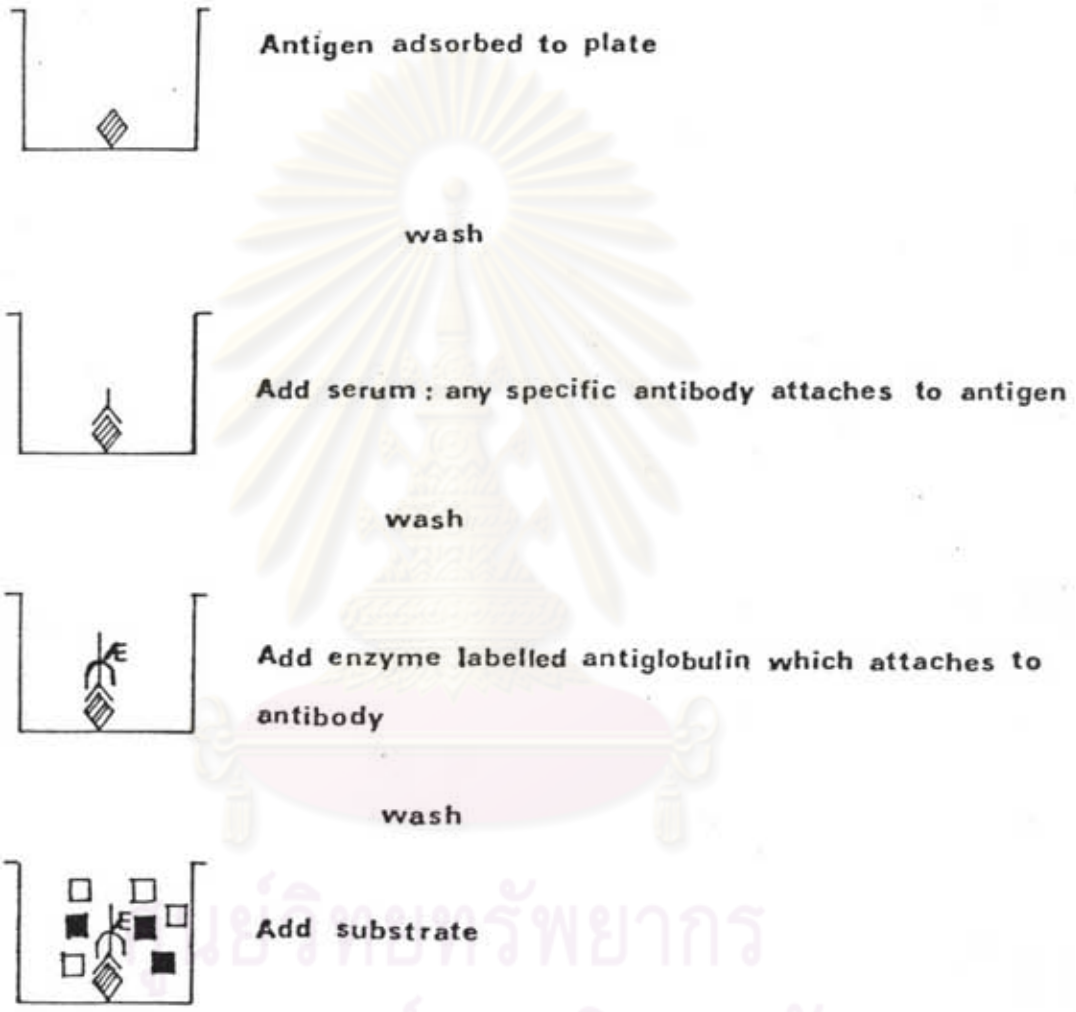
รูปที่ 1 ลักษณะของไลโปโซม



Schematic representations of liposomes. (a) Multilamellar liposome. (b) Enlarged view of (a). (c)Small, unilamellar liposome. (Tyrrell และคณะ ,1976)

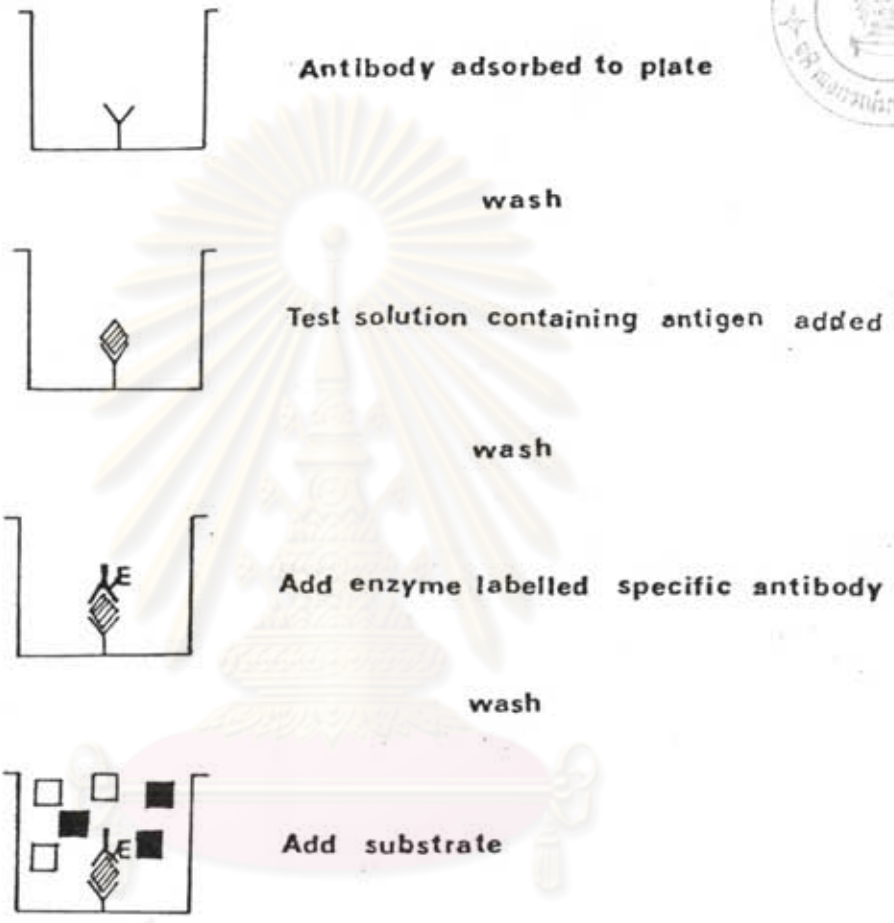
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 2 หลักการหาปริมาณแอนติบอดีโดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนท์แอสเสย์



ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3 หลักการหาปริมาณพิษงูเห่าโดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนท์แอสเสย์



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

019743