ปฏิสัมพันธ์ระหว่างพิษงูจงอาง (*Ophiophagus hannah*) กับสารสกัดจากกระเจียวแดง (*Curcuma sessilis* Gage.)

The interactions between King Cobra (*Ophiophagus hannah*) venom and *Curcuma sessilis* Gage. Extracts

สิริณัฏฐ์ รักษาเคน (Sirinut Raksaken)* ดร.สัมภาษณ์ คุณสุข (Dr.Sumpars Khunsook)**

บทคัดย่อ

การศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างพิษงูจงอาง (*Ophiophagus hannah*) กับสารสกัดจากกระเจียวแดง (*Curcuma sessilis* Gage.) โดยใช้เทคนิค SDS-PAGE และตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์เจลาติเนส ในน้ำพิษงูจงอางตามวิธีของ Pornmanee *et al.* (2008) โดยทำการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนตามวิธี Bradford (1976) พบว่าน้ำพิษของงูจงอางมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 79 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ส่วนสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดงมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.38 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เมื่อทำการเปรียบเทียบแบบแผนโปรตีนของน้ำพิษงูจงอางก่อนและหลังการได้รับสารสกัดจากกระเจียวแดงด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุล 124.67 และ 11.20 kDa หายไปจากแบบแผนโปรตีนหลังได้รับสารสกัดจากกระเจียวแดง และจากการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์เจลาติเนสในน้ำพิษงูจงอางที่ได้รับสารสกัดพบว่าสารสกัดจากกระเจียวแดงมีผลทำให้กิจกรรมของเอนไซม์เจลาติเนสลดลง

ABSTRACT

The interactions between King Cobra (*Ophiophagus hannah*) venom and the extracts from *Curcuma sessilis* Gage were studied by SDS-PAGE and examined the activity of gelatinase with *Ophiophagus hannah* by using the methods of Pornmanee *et al*. (2008). Protein quantitation was analyzed by using Bradford method (1976). The results showed that there are approximate protein concentration 79.00 mg/ml in King Cobra venom and protein concentration 0.38 mg/ml in the *Curcuma sessilis* Gage extracts. The protein patterns of King Cobra venom that was got the treatment with *Curcuma sessilis* Gage extracts were compared by SDS-PAGE. The result showed that after treatments with extracts, the 124. 67 and 11.20 kDa protein band of King Cobra venom was disappeared. The *Curcuma sessilis* Gage extracts can reduce the activity of gelatinase in King Cobra venom.

คำสำคัญ: พิษงูจงอาง (*โอฟีโอฟากัส ฮันนา*) กระเจียวแดง เอนไซม์เจลาติเนส

Keywords: King Cobra (*Ophiophagus hannah*) venom, *Curcuma sessilis* Gage., gelatinase

** นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาสำหรับครู คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*

*** อาจารย์ สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*

บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม ประชากรส่วนใหญ่ในประเทศโดยเฉพาะประชากรที่อาศัยในเขตพื้นที่ชนบท ประกอบอาชีพทางการเกษตรเป็นอาชีพหลัก อันได้แก่ ทำนา ทำสวน ทำไร่ และเลี้ยงสัตว์ และเนื่องจากเป็นประเทศที่มีลักษณะภูมิประเทศและภูมิอากาศที่มีความเหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของสัตว์มีพิษหลายชนิด จึงทำให้สามารถพบสัตว์มีพิษกระจายอยู่ตามไร่นา เทือกสวนของเกษตรกรแทบทุกพื้นที่ งูพิษถือเป็นสัตว์มีพิษอีกหนึ่งประเภทที่เป็นสาเหตุของปัญหาสำคัญทางสารธารณสุขในประเทศไทย จากการรายงานของสำนักระบาดวิทยา ประจำปี 2558 พบว่าในปีดังกล่าวมีผู้ที่ถูกงูพิษกัดจำนวน 4,618 ราย ซึ่งภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีจำนวนผู้ป่วยมากที่สุดคือ 1,819 ราย โดยเฉพาะในช่วงปลายฤดูฝนเข้าสู่ฤดูหนาวซึ่งเป็นฤดูแห่งการเก็บเกี่ยวผลการผลิตทางการเกษตรพบมีผู้ถูกงูพิษกัดจำนวนมาก (ชำนาญ, 2558)

งูจงอางเป็นงูพิษอีกหนึ่งชนิดที่ถือว่าเป็นปัญหาสำคัญเนื่องจากชอบหากินตามพื้นดิน ผู้ป่วยที่ถูกงูจงอางกัดจะมีอาการ หนังตาตก ขากรรไกรแข็ง พูดไม่ชัด กลืนน้ำลายไม่ได้ แน่นหน้าอก ตาพร่า อ่อนเพลีย เป็นอัมพาต จนอาจตายด้วยภาวะการหายใจล้มเหลว เนื่องจากพิษของงูชนิดนี้เป็นพิษที่มีผลต่อระบบประสาท หรือ neurotoxins ในส่วนของลักษณะแผลที่ถูกกัดเป็นแผลถลอก บวมแดง และเน่าลึก เพราะนอกเหนือจาก neurotoxins แล้ว ในน้ำพิษของงูจงอางยังประกอบด้วยเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการบวมของแผล เช่น Acidic phospholipase A_2 (A-PLA_2) และL-amino acid oxidase เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ที่ทำให้เกิดความเสียหายต่อกล้ามเนื้อ เนื้อเยื่อต่างๆ รวมทั้งผิวหนังโดยรอบบริเวณแผลที่ถูกงูกัด เช่น เอนไซม์เจลาติเนส (gelatinase) เป็นต้น (ภัทรพงศ์, 2550; Chang *et al.,* 2006)

การรักษาผู้ป่วยที่ถูกงูพิษกัดในปัจจุบันทำได้โดนการให้เซรุ่มแก้พิษงู แต่เนื่องจากพื้นที่ทางการเกษตรหลายพื้นที่ตั้งอยู่ห่างไกลจากโรงพยาบาลหรือสถานบริการแก้พิษงู อีกทั้งยังขาดยวดยานพาหนะในการนำส่งผู้ป่วย รวมไปถึงภาระค่าใช้จ่ายที่ค่อนข้างสูง เกษตรกรที่ถูกงูพิษกัดส่วนใหญ่จึงหันมารักษาอาการป่วยจากพิษงูโดยอาศัยพืชสมุนไพรที่มีในท้องถิ่นแทน ซึ่งการใช้สมุนไพรในการรักษาผู้ป่วยที่ถูกงูกัดเป็นภูมิปัญญาท้องถิ่นที่อยู่คู่กับคนในชนบทมาช้านาน มีการระบุว่าชาวบ้านในหมู่บ้านโคกสง่า ตำบลทรายมูล อำเภอน้ำพอง จังหวัดขอนแก่น ซึ่งเป็นหมู่บ้านที่เลี้ยงงูจงอางไว้ใต้ถุนบ้านเพื่อใช้ในการจัดแสดงงู ร่วมกับการขายพืชสมุนไพรให้กับนักท่องเที่ยวที่สนใจเข้าชมเกือบทุกหลังคาเรือน และเมื่อมีผู้ถูกงูจงอางกัดชาวบ้านได้มีการใช้ลำต้นใต้ดินของว่านพญางูที่นิยมปลูกในครัวเรือนมารักษาบาดแผลที่เกิดจากการถูกกัด และพบว่าสามารถรักษาแผลได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่ามีพืชสมุนไพรอีกหลายชนิดที่มีความสามารถในการต้านพิษงูได้ เช่น เสลดพังพอนตัวผู้ กระทงลาย เขยตาย เป็นต้น จากข้อมูลดังกล่าวส่งผลให้นักวิจัยหลายท่านหันมาให้ความสำคัญในการศึกษาพืชสมุนไพรที่สามารถต้านการออกฤทธิ์ของพิษงูได้ พืชในวงศ์ Zingiberaceae สกุล *Curcuma* เป็นพืชอีกหนึ่งกลุ่มที่นักวิจัยให้ความสนใจ โดยมีรายงานการวิจัยพบว่าสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของว่านพญางูตัวเมีย (*Curcuma* sp.) สามารถลดการจับกันระหว่างพิษงูเห่าและแอนติบอดีของพิษงูเห่าได้ (ประสงค์ และคณะ, 2548) และเมื่อนำสารสกัดจากว่านพญางูตัวเมียมาตรวจสอบความสามารถในการลดการจับกันระหว่าง neurotoxin บริสุทธิ์กับแอนติบอดี พบว่าสารสกัดจากว่านพญางูตัวเมียสามารถลดการจับกันระหว่าง neurotoxin บริสุทธิ์กับแอนติบอดีได้จริง จนทำให้แถบโปรตีนของ neurotoxin จางลงอย่างเห็นได้ชัด (ศักดา และคณะ, 2546)

ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงได้ทำการศึกษาปฏิสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นระหว่างสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดง (*Curcuma sessilis* Gage.) ซึ่งเป็นพืชในสกุล *Curcuma* อีกหนึ่งชนิดที่พบได้ทั่วไปในเขตพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือกับพิษของงูจงอาง (*Ophiophagus hannah*) โดยทำการศึกษาแบบแผนโปรตีนของน้ำพิษงูจงอางทั้งก่อนและหลังการได้รับสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดงด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate

polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) อีกทั้งทำการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์เจลาติเนส (gelatinase) ในน้ำพิษของงูจงอางหลังได้รับสารสกัดจากกระเจียวแดง ทั้งนี้เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษา และการทำวิจัย รวมทั้งนำไปสู่การหาแนวทางการปฐมพยาบาลผู้ป่วยที่ถูกงูพิษกัดในเบื้องต้นก่อนส่งตัวเข้ารับการรักษายังสถานพยาบาลต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

1) เพื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในน้ำพิษของงูจงอาง (*Ophiophagus hannah*) และสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดง (*Curcuma sessilis* Gage.) โดยวิธี Bradford (1976)

2) เพื่อเปรียบเทียบแบบแผนโปรตีนของน้ำพิษงูจงอางก่อนและหลังการได้รับสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดง (*Curcuma sessilis* Gage.)

3) เพื่อตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์เจลาติเนส (Gelatinase) ในน้ำพิษของงูจงอางหลังการได้รับสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดง (*Curcuma sessilis* Gage.)

4) เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษา และวิจัย เกี่ยวกับการรักษาผู้ป่วยที่ถูกงูพิษกัดด้วยพืชสมุนไพรในท้องถิ่น

วิธีการวิจัย

การเตรียมตัวอย่าง

1) การเตรียมตัวอย่างน้ำพิษงูจงอาง

นำน้ำพิษงูจงอางที่ได้รับความอนุเคราะห์จากชมรมงูจงอางแห่งประเทศไทย บ้านโคกสง่า ตำบลทรายมูล อำเภอน้ำพอง จังหวัดขอนแก่น มาเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และทำการเจือจางพิษงูด้วย Phosphate Buffered Saline (PBS) โดยใช้อัตราส่วนของพิษงูจงอางต่อตัวทำละลาย 1:50 ในการนำมาใช้ในการทดลองทุกครั้ง

2) การเตรียมสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดง

นำลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดงมาล้างน้ำประปาไหลผ่าน 5 นาที แล้วตามด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ผึ่งลมให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นหั่นลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดงเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปชั่งให้ได้ตัวอย่าง 100 กรัม นำไปบดให้ละเอียดด้วยโกร่งบดสาร เติมสารละลาย PBS (pH 7.4) 50 มิลลิลิตร แล้วทำการคั้นสารสกัดใส่ในหลอดทดลอง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5300 รอบ/นาที นาน 15 นาที จำนวน 2 รอบ เพื่อแยกตะกอนออกจากสารสกัด นำสารสกัด (ส่วนใส) ใส่ลงในหลอดไวออล หลอดละ 100 ไมโครลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนของน้ำพิษงูจงอางและสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดงด้วยวิธี Bradford (1976) โดยทำการเติมสารตัวอย่างลงในหลอดทดลองขนาด 10 X 75 (มม.) ตัวอย่างละ 20 ไมโครลิตรจากนั้นเติมสารละลาย Bradford 1,000 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยวิธีการ vortex ตั้งสารละลายทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรด้วยเครื่อง spectrophotometer จัดทำกราฟโปรตีนมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA) จากค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย Bovine serum albumin (BSA) ที่ระดับความเข้มข้น 0 – 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หาปริมาณโปรตีนของน้ำพิษงูจงอางและสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดงโดยเทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA)

การวิเคราะห์แบบแผนโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE

ทำการวิเคราะห์แบบแผนโปรตีนของน้ำพิษงูจงอาง ทั้งก่อนและหลังการได้รับสารสกัดจากจากกระเจียวแดง โดยการเตรียม Polyacrylamide Gel โดยใช้ 4% Stacking gel และ 12% Separating gel ที่มี 0.1% SDS เป็นองค์ประกอบ จากนั้นเตรียมสารละลายตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ดังนี้

Lane 1 Protein makers ปริมาณ 3 ไมโครลิตร

Lane 2 น้ำพิษของงูจงอางที่มีปริมาณโปรตีน 3.1 ไมโครกรัม

Lane 3 สารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดงที่มีปริมาณโปรตีน 3.1 ไมโครกรัม

Lane 4 น้ำพิษของงูจงอาง และสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดงที่มีปริมาณโปรตีนตัวอย่างละ 3.1 ไมโครกรัม

ทำการบ่มสารละลายตัวอย่างที่อุณหภูมิห้องนาน 3 นาที จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น นำสารตัวอย่างโหลดลงในเจลที่เตรียมไว้ แล้วทำการแยกขนาดโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ ในชั้นของ Stacking gel นาน 25 นาที จากนั้นใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 120 โวลต์ นาน 45 นาที สำหรับชั้น Separating gel จากนั้นนำแผ่นเจลมาย้อมด้วย 0.1% Coomassie brilliant blue R-250 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการล้างสีส่วนเกินออกด้วย destaining solution จนแผ่นเจลใส และเห็นแถบโปรตีนชัดเจน แล้วจึงล้างเจลด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง ตากเจลให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงนำแผ่นเจลมาวิเคราะห์แบบแผนโปรตีน

การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์เจลาติเนส (gelatinase)

ทำการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์เจลาติเนส (gelatinase) ด้วยวิธีของ Pornmanee et al. (2008) ทำได้โดยการนำแผ่นฟิล์ม X-ray (Kodak X-OMAT) ซึ่งเป็นแผ่นฟิล์มที่มีเจลาตินเคลือบอยู่ที่ผิวมาตัดให้ได้ขนาด 9 X 9 ตร.ซม. แล้ววาดตารางขนาด 2 X 2 ตร.ซม. จำนวนทั้งหมด 16 ช่อง ในด้านตรงข้ามกับด้านที่ต้องการจะหยดสารละลายตัวอย่าง จากนั้นทำการเตรียมสารละลายตัวอย่างดังตารางที่ 2 บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แล้วหยดสารละลายตัวอย่างลงบนแผ่นฟิล์ม X-ray ที่เตรียมไว้ ตามแผนผังในภาพที่ 1

		สารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียว (µg)			
		0	1	2	4
น้ำพิษงู (µg)	0	1	2	3	4
	1	5	6	7	8
	2	9	10	11	12
	4	13	14	15	16

ภาพที่ 1 แผนผังแสดงการหยดสารละลายตัวอย่างลงบนแผ่นฟิล์ม X-ray

ซึ่งการหยดสารละลายตัวอย่างลงบนแผ่นฟิล์ม X-ray นั้น ต้องหยดลงบริเวณตรงกลางของช่องที่วาดไว้ในลักษณะเป็นวงวงเดียวไม่กระจาย จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำแผ่นฟิล์ม X-ray มาล้างด้วยน้ำกลั่น ตากให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง วิเคราะห์ผลที่ได้ โดยสังเกตจากบริเวณวงใส (clear

zone) ซึ่งเกิดจากการย่อยเจลาตินที่เคลือบบนแผ่นฟิล์ม X-ray ของเอนไซม์เจลาติเนส (gelatinase) เปรียบเทียบความสมบูรณ์ของวงใสแต่ละวง

ตารางที่ 1 สารละลายตัวอย่างเพื่อใช้ในการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์เจลาติเนส (gelatinase)

หลอดที่	น้ำพิษงู (µl)	สารสกัดจากกระเจียว (µl)	PBS (µl)	ปริมาตรสุทธิ (µl)
1	0	0	12.8	12.8
2	0	2.6	10.2	12.8
3	0	5.1	7.7	12.8
4	0	10.3	2.5	12.8
5	0.6	0	12.2	12.8
6	0.6	2.6	9.6	12.8
7	0.6	5.1	7.1	12.8
8	0.6	10.3	1.9	12.8
9	1.3	0	11.5	12.8
10	1.3	2.6	8.9	12.8
11	1.3	5.1	6.4	12.8
12	1.3	10.3	1.2	12.8
13	2.5	0	10.3	12.8
14	2.5	2.6	7.7	12.8
15	2.5	5.1	5.2	12.8
16	2.5	10.3	0	12.8

ผลการวิจัย

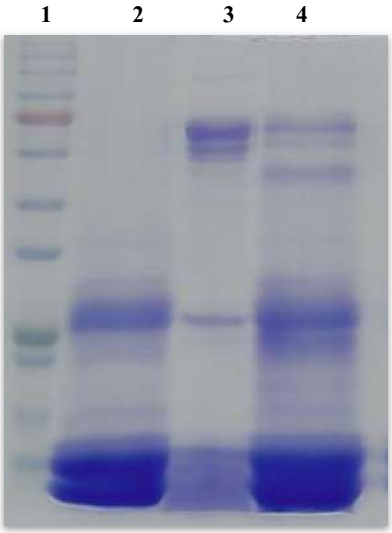
การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

จากการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในน้ำพิษของงูจงอาง (*Ophiphagus hannah*) และสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดง (*Curcuma sessilis* Gage.) โดยวิธี Bradford (1976) พบว่าในน้ำพิษของงูจงอางมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 79 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ส่วนในสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดงพบโปรตีน 0.38 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

การวิเคราะห์แบบแผนโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE

จากการวิเคราะห์แบบแผนและน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนในสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดง (*Curcuma sessilis* Gage.) และน้ำพิษของงูจงอาง (*Ophiphagus hannah*) ทั้งก่อนและหลังได้รับสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดง โดยเปรียบเทียบกับแถบของโปรตีนมาตรฐาน (Protein Makers) ที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันจำนวน 12 โมเลกุลได้แก่ 11, 17, 20, 25, 35, 48, 63, 75, 100, 135, 180 และ 245 kDa พบว่าสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดงมีโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลแตกต่างกันทั้งหมด 7 โมเลกุล ได้แก่ 7.92, 10.85, 17.16, 22.26, 29.11, 33.46 และ37.14 kDa ในขณะที่น้ำพิษของงูจงอางประกอบด้วยโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลแตกต่างกันทั้งหมด 9

โมเลกุล ได้แก่ 8.69, 11.20, 12.96, 25, 28.68, 57.38, 67.45, 72.14 และ 124.64 kDa และในน้ำพิษของงูจงอางที่บ่มด้วยสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดงมีจำนวนโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันจำนวน 10 โมเลกุล ได้แก่ 8.07, 10.85, 12.96, 17.16, 25, 28.68, 33.46, 57.38, 67.45 และ 72.14 kDa ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 2 และ ภาพที่ 3



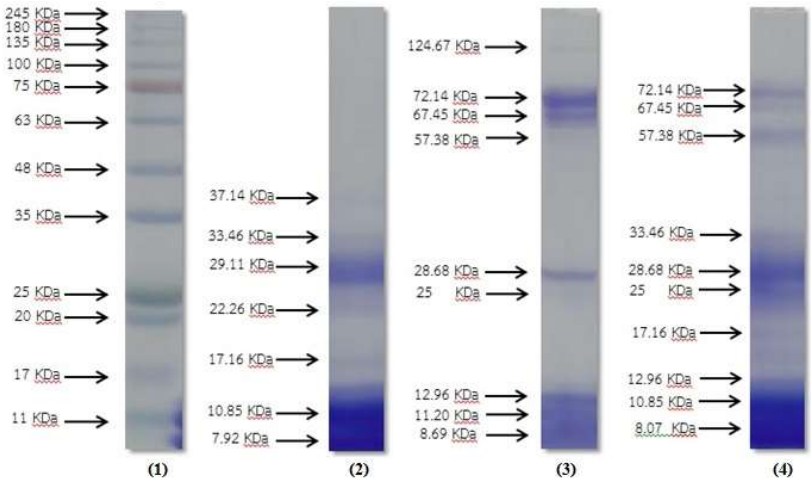
ภาพที่ 2 ลักษณะแบบแผนโปรตีนของสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดง และน้ำพิษงูจงอาง ทั้งก่อนและหลังได้รับสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดง

Lane 1 Protein Makers

Lane 2 สารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดง

Lane 3 น้ำพิษของงูจงอาง

Lane 4 น้ำพิษของงูจงอางหลังได้รับสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดง



ภาพที่ 3 แบบแผนโปรตีนและน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนในสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดง

และน้ำพิษงูจงอาง ทั้งก่อนและหลังได้รับสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดง

Lane 1 Protein Makers

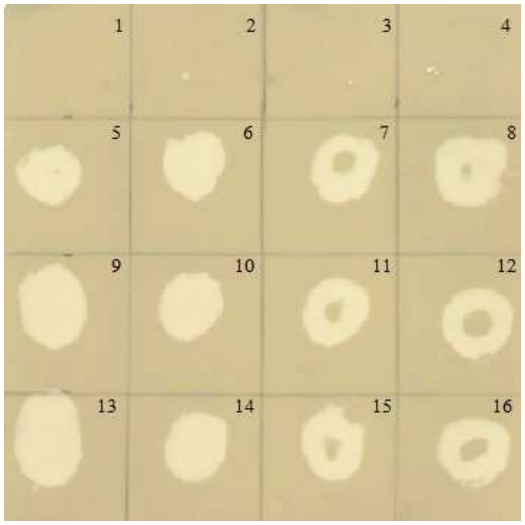
Lane 2 สารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดง 3.1 µg

Lane 3 น้ำพิษงูจงอาง 3.1 µg

Lane 4 น้ำพิษงูจงอาง 3.1 µg หลังได้รับสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดง 3.1 µg

การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์เจลาติเนส (gelatinase)

จากการตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์เจลาติเนส (gelatinase) ในน้ำพิษของงูจงอางที่ได้รับสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดงในอัตราส่วนต่างๆ โดยสังเกตจากการถูกย่อยของเจลาตินที่เคลือบอยู่บนผิวของแผ่นฟิล์ม X-ray (Kodak X - OMAT) จนมีลักษณะเป็นวงใส พบว่าน้ำพิษของงูจงอางที่ได้รับสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดงในอัตราส่วนที่แตกต่างกันมีความสามารถในการย่อยเจลาตินที่เคลือบอยู่บนแผ่นฟิล์ม X-ray ได้แตกต่างกัน ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 ลักษณะของแผ่นฟิล์ม X-ray ที่ได้รับการตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์เจลาติเนส (geletinase) ในน้ำพิษของงูจงอางที่ได้รับสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดงในอัตราส่วนต่างๆ

ช่องที่ 1 : อัตราส่วนระหว่างโปรีตีนในน้ำพิษงูจงอางกับสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดง (0:0)

ช่องที่ 2 : อัตราส่วนระหว่างโปรีตีนในน้ำพิษงูจงอางกับสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดง (0:1)

ช่องที่ 3 : อัตราส่วนระหว่างโปรีตีนในน้ำพิษงูจงอางกับสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดง (0:2)

ช่องที่ 4 : อัตราส่วนระหว่างโปรีตีนในน้ำพิษงูจงอางกับสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดง (0:4)

ช่องที่ 5 : อัตราส่วนระหว่างโปรีตีนในน้ำพิษงูจงอางกับสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดง (1:0)

ช่องที่ 6 : อัตราส่วนระหว่างโปรีตีนในน้ำพิษงูจงอางกับสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดง (1:1)

ช่องที่ 7 : อัตราส่วนระหว่างโปรีตีนในน้ำพิษงูจงอางกับสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดง (1:2)

ช่องที่ 8 : อัตราส่วนระหว่างโปรีตีนในน้ำพิษงูจงอางกับสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดง (1:4)

ช่องที่ 9 : อัตราส่วนระหว่างโปรีตีนในน้ำพิษงูจงอางกับสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดง (2:0)

ช่องที่ 10 : อัตราส่วนระหว่างโปรีตีนในน้ำพิษงูจงอางกับสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดง (2:1)

ช่องที่ 11 : อัตราส่วนระหว่างโปรีตีนในน้ำพิษงูจงอางกับสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดง (2:2)

ช่องที่ 12 : อัตราส่วนระหว่างโปรีตีนในน้ำพิษงูจงอางกับสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดง (2:4)
ช่องที่ 13 : อัตราส่วนระหว่างโปรีตีนในน้ำพิษงูจงอางกับสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดง (4:0)
ช่องที่ 14 : อัตราส่วนระหว่างโปรีตีนในน้ำพิษงูจงอางกับสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดง (4:1)
ช่องที่ 15 : อัตราส่วนระหว่างโปรีตีนในน้ำพิษงูจงอางกับสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดง (4:2)
ช่องที่ 16 : อัตราส่วนระหว่างโปรีตีนในน้ำพิษงูจงอางกับสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดง (4:4)

จากภาพที่ 4 เป็นการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์เจลาติเนส (gelatinase) ในน้ำพิษของงูจงอางทั้งก่อนและหลังการได้รับสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดง โดยกำหนดอัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นของโปรตีนในน้ำพิษงูจงอางกับสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดงทั้งหมด 16 อัตราส่วน พบว่าความเข้มข้นของโปรตีนในน้ำพิษงูจงอาง : ความเข้มข้นของโปรตีนในสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดงที่อัตราส่วน 0:0, 0:1, 0:2 และ 0:4 บริเวณที่ทำการหยดสารละลายแผ่นฟิล์ม X-ray ยังมีลักษณะทึบไม่มีการย่อยเจลาตินที่เคลือบบนแผ่นฟิล์ม X-ray เกิดขึ้น ส่วนที่อัตราส่วน 1:0, 1:1, 2:0, 2:1 4:0 และ 4:1 สังเกตพบกิจกรรมของเอนไซม์เจลาติเนส โดยมีการย่อย เจลาตินที่เคลือบอยู่บนแผ่นฟิล์ม X-ray ลักษณะเป็นวงใสสมบูรณ์ ในส่วนของอัตราส่วน 1:2, 1:4, 2:2, 2:4, 4:2 และ 4:4 พบว่ามีการย่อยเจลาตินลักษณะเป็นวงใสแต่ไม่สมบูรณ์ พบจุดทึบอยู่บริเวณตรงกลางวง โดยอัตราส่วน 2:4 เป็นอัตราส่วนที่พบกิจกรรมการย่อยเจลาตินน้อยที่สุดทำให้เกิดวงที่ใสที่มีลักษณะไม่สมบูรณ์มากที่สุด

ภาพที่ 5 กิจกรรมของเอนไซม์เจลาติเนส (gelatinase) ในน้ำพิษของงูจงอางต่อการย่อยเจลาตินบนแผ่นฟิล์ม X-ray
(ก) เกิดการย่อยเจลาตินที่สมบูรณ์มีลักษณะเป็นวงใส
(ข) เกิดการย่อยเจลาตินที่ไม่สมบูรณ์

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างพิษงูจงอาง (*Ophiphagus hannah*) กับสารสกัดจากกระเจียวแดง (*Curcuma sessilis* Gage.) โดยทำการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนทั้งในน้ำพิษของงูจงอางและสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดงโดยวิธี Bradford (1976) แล้วทำการวิเคราะห์แบบแผนโปรตีนของน้ำพิษงูจงอางทั้งก่อนและหลังการได้รับสารสกัดจากกระเจียวแดงโดยวิธี SDS-PAGE แล้วทำการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ เจลาติเนส (gelatinase) ด้วยวิธีของ Pornmanee *et al*. (2008) พบว่า ปริมาณของโปรตีนในน้ำพิษของงูจงอาง (*Ophiophagus hannah*) เท่ากับ 79 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งมีความแตกต่างจากการศึกษาของกนกพรรณ (2558) และ พัชราภา (2555) ที่พบว่าปริมาณของโปรตีนในน้ำพิษงูจงอางเท่ากับ 135.3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ 39.35 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรตามลำดับ ทั้งนี้อาจมีปัจจัยหลายอย่างที่ส่งผลต่อความแตกต่างของปริมาณโปรตีนในน้ำพิษของงูจงอาง อาทิเช่น ขนาดและอายุของงู ความสดใหม่ของน้ำพิษ หรือแม้กระทั่งอาจมีการเสื่อมสภาพของโปรตีนในขณะเก็บรักษา ในขณะที่ปริมาณโปรตีนที่พบในสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดง (*Curcuma sessilis* Gage.) มีปริมาณเพียง 0.38 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรเท่านั้น ซึ่งเมื่อทำการเปรียบเทียบกับการศึกษาปริมาณโปรตีนในสารสกัดจากว่านพญางู (*Curcuma zedoaroides* Chaveerach A.

and Tanee T.) ซึ่งเป็นพืชในสกุลเดียวกับกระเจียวแดงของจรัญญา (2553) พบว่ามีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 3.90 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จะเห็นว่าสารสกัดจากพืชมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบอยู่ในปริมาณที่ค่อนข้างน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับที่พบในสัตว์

จากการเปรียบเทียบแบบแผนโปรตีนของน้ำพิษของงูจงอางก่อนและหลังการได้รับสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดง พบว่าก่อนได้รับสารสกัดพบโปรตีนในน้ำพิษของงูจงอางที่มีขนาดโมเลกุลแตกต่างกันทั้งสิ้นจำนวน 9 โมเลกุล แต่เมื่อทำการบ่มน้ำพิษงูจงอางร่วมกับสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดงพบว่าแถบโปรตีนในน้ำพิษของงูจงอางมีการเปลี่ยนแปลงไป โดยพบว่ามีแถบโปรตีนจำนวน 2 แถบ ได้แก่แถบของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 11.20 และ 124.67 kDa หายไปจากแบบแผนโปรตีน ซึ่งหากนำผลดังกล่าวมาพิจารณาร่วมกับผลการตรวจสอบโปรตีนในพิษงูเห่าที่ถูกทำลายด้วยสารออกฤทธิ์ในสารสกัดจากว่านพญางูตัวเมีย (*Curcuma* sp.) ด้วยวิธี western immunoblotting ที่พบว่าโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 14, 23, 27 และ 70 kDa มีการจางหายไป และยังสามารถพิสูจน์ได้ว่าโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 14 kDa นั้นคือ neurotoxin (ประสงค์ และคณะ, 2005) จะพบว่าโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 11.20 kDa 1 ใน 2 ของโปรตีนที่หายไปจากแบบแผนโปรตีน มีขนาดโมเลกุลใกล้เคียงกับ neurotoxin ในพิษของงูเห่า จึงอาจมีความเป็นไปได้ว่าโปรตีนขนาดดังกล่าวจะเป็น neurotoxin ในน้ำพิษของงูจงอาง ซึ่งจำเป็นต้องทำการตรวจสอบให้ชัดเจนต่อไป นอกจากนี้ยังพบว่ามีโปรตีนบางแถบในแบบแผนโปรตีนมีขนาดลดลงอีกด้วย ซึ่งถือเป็นการบ่งชี้ให้เห็นว่าสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดงมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของแถบโปรตีนในน้ำพิษงูจงอาง โดยสารสกัดนี้อาจมีสารบางชนิด หรือเอนไซม์บางตัว (กลุ่ม Protease) ที่สามารถย่อย หรือตัดแถบโปรตีน หรืออาจมีฤทธิ์ทำให้โปรตีนเกิดการเสื่อมสภาพ ส่งผลให้แถบโปรตีนบางขนาดมีขนาดโมเลกุลเล็กลงหรือหายไปจากแบบแผนโปรตีน

ในส่วนของการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์เจลาติเนส (gelatinase) ในน้ำพิษของงูจงอางหลังการได้รับสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดง โดยทำการกำหนดความเข้มข้นระหว่างน้ำพิษของงูจงอางกับสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดงในอัตราส่วนที่แตกต่างกันทั้งสิ้น 16 อัตราส่วน แล้วนำแต่ละอัตราส่วนไปหยดลงบนแผ่นฟิล์ม X-ray ที่มีเจลาตินเคลือบที่ผิว ทำการสังเกตขนาด และความสมบูรณ์ของวงใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นบนแผ่นฟิล์ม X-ray ผลปรากฏว่าอัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นของน้ำพิษงูจงอางกับสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดงในแต่ละอัตราส่วนมีผลต่อการเกิดวงใสบนแผ่นฟิล์ม X-ray ที่แตกต่างกัน ซึ่งพบทั้งที่เกิดเป็นวงที่มีลักษณะใสสมบูรณ์ และวงใสที่มีส่วนทึบอยู่บริเวณตรงกลางวงทำให้เกิดวงใสที่ไม่สมบูรณ์ โดยอัตราส่วนระหว่างโปรตีนในน้ำพิษของงูจงอางกับสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดงที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เจลติเนสในน้ำพิษงูจงอางได้ดีที่สุดในการวิจัยครั้งนี้ คืออัตราส่วน 2:4 ซึ่งจะสังเกตพบว่าวงใสมีความสมบูรณ์ค่อนข้างน้อยและมีส่วนทึบอยู่บริเวณตรงกลางวง นั่นหมายความว่าสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดงสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เจลาติเนส (gelatinase) ได้ และเมื่อพิจารณาลักษณะผลของการยับยั้งของสารสกัดที่มีต่อน้ำพิษของงูจงอางจะพบว่าเกิดขึ้นเฉพาะที่บริเวณตรงกลางของวง ซึ่งลักษณะดังกล่าวมีความสอดคล้องกับการศึกษาของจรัญญา (2553) ที่ทำการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์เจลาติเนส (gelatinase) ในน้ำพิษของงูเห่าไทยหลังได้รับสารสกัดจาก ลำต้นใต้ดินของว่านพญางูที่เกิดการยับยั้งที่บริเวณตรงกลางวงเช่นเดียวกัน จึงอาจสันนิษฐานได้ว่า สารที่มีความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เจลาติเนส (gelatinase)ในสารสกัดกระเจียวแดงนั้นมีการรวมกลุ่มกันบริเวณกลางหยดของสารละลายจึงส่งผลให้การยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เจลาติเนส (gelatinase) เกิดขึ้นเฉพาะบริเวณกลางวง รวมทั้งอาจกล่าวได้ว่ากิจกรรมของเอนไซม์ เจลาติเนส (gelatinase) ที่ลดลงเป็นผลมาจากการหายไปจากแบบแผนโปรตีนของโปรตีนในน้ำพิษงูจงอางหลังได้รับสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของกระเจียวแดง

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณนางสาวกมลชนก แผ้วพลสง ที่ได้ให้คำแนะนำและให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์และสารเคมีในการทำวิจัยในครั้งนี้ ชมรมงูจงอางบ้านโคกสง่า ตำบลทรายมูล อำเภอน้ำพอง จังหวัดขอนแก่น ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์น้ำพิษงูจงอาง โครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ (สควค.)ที่ให้การอนุเคราะห์และสนับสนุนการศึกษาและการวิจัย รวมทั้งภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ทำวิจัย และสนับสนุนการทำวิจัยมาโดยตลอด

เอกสารอ้างอิง

กนกพรรณ เครือประเสริฐกุล. ปฏิสัมพันธ์ระหว่างพิษงูจงอางและสารสกัดจากเมล็ดหมากและเปลือกมังคุด [โครงการวิจัย]. ขอนแก่น: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2558.

จรัญญา เครือเขื่อนเพชร. การยับยั้งพิษของงูเห่าไทยด้วยสารสกัดจากว่านพญางู [โครงการวิจัย]. ขอนแก่น :ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2553.

ชำนาญ ม่วงแดง. งูพิษกัด (Snake bite) [ออนไลน์] 2558 [อ้างเมื่อ 30 ตุลาคม 2560]. จากhttp://www.boe.moph.go.th/Annual/AESR2015/sum_aesr.php

ประสงค์ สีหานาม, นิสันต์ สัตยาศัย, จินตนา สัตยาศัย, ศักดา ดาดวง. สมบัติบางประการของสารที่มีฤทธิ์ต้านพิษงูเห่าซึ่งสกัดจากสมุนไพร. วิจัย มข. (บศ.) 2548; 5(ฉบับพิเศษ): 21-29.

พัชราภา คำราช. ปฏิสัมพันธ์ระหว่างพิษงูจงอาง*(Ophiophagus hannah)* กับสารสกัดจากว่านตีนตะขาบ *(Muchlenbeckia platyclada)* [โครงการวิจัย]. ขอนแก่น: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2555.

ภัทรพงศ์ สินประจักษ์ผล. พิษงูจงอาง. นิติเวชศาสตร์ 2550; 1(2): 97-102.

ศักดา ดาดวง, นิสันต์ สัตยาศัย, จินตนา สัตยาศัย. การทำบริสุทธิ์และตรวจหาสมบัติของสารออกฤทธิ์ในสมุนไพรซึ่งมีฤทธิ์ต้านพิษงูเห่า [โครงการวิจัย]. ขอนแก่น: ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2546.

Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of Proteiutilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem 1976; 72: 248-254.

Chang LS, Chen KC, Lin SR, Huang HB. Purification and characterization of *Ophiophagus Hannah* cytotoxin-like proteins. Toxicon 2006; 48: 429-436.

Pornmanee P, Sanchez EE, Lopez G, Petsom A, Khow O, Pakmanee N, Chanhome L, Sangvanich P, Perez JC. Neutralization of lethality and proteolytic activities of Malayan pit viper (Calloselasma rhodostoma) venom with North American Virginia opossum (Didelphis virginiana) serum. Toxicon 2008; 52(1): 86-189.