บทคัดย่อ

222958

สัญญาเลขที่ BRG 4780015

"การศึกษาผลของสารยับยั้งเอ็นไซม์ และแอนติบอดี้ที่ฉีดเฉพาะที่ใน
การลดการเกิดแผลเน่าตายของหมูที่ได้รับพิษงูเห่าหรืองูกะปะ"

"Study on the effect of locally injected enzyme inhibitors/antibody
in the prevention/reduction of local tissue necrosis in pig injected
with *Naja kaouthia* or *Calloselasma rhodostoma* venom"

หัวหน้าโครงการ นายกวี รัตนบรรณางกูร
ห้องปฏิบัติการอิมมูโนวิทยา สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ และ สถาบันบัณฑิตศึกษาจุฬาภรณ์
Email: kavi@cri.or.th, sckrt@mahidol.ac.th

ระยะเวลาของโครงการ 18 เดือน

บทนำ พิษงูกะปะและงูเห่า ทำให้เกิดอาการทั่วไปซึ่งอาจทำให้ผู้ป่วยตายได้และยังทำให้เกิดอาการเฉพาะที่ซึ่งทำให้เกิดเนื้อเน่าตายและอาจจะทำให้พิการได้ โดยที่เซรุ่มแก้พิษงูจะรักษาได้เฉพาะอาการทั่วไปเท่านั้นแต่มีผลในการลดหรือรักษาอาการเนื้อเยื่อเน่าตายไม่ได้หรือได้น้อยมาก การวิจัยนี้พยายามศึกษาหาวิธีการที่จะช่วยลดหรือป้องกันการเกิดเนื้อเยื่อเน่าตายจากพิษงู

วัตถุประสงค์ การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ ก) เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้หมูซึ่งคล้ายคนในด้านกายวิภาคและ สรีรวิทยา ในการศึกษาอาการเนื้อเน่าตายอันเกิดจากพิษงูเห่าและงูกะปะ

ข) ศึกษาพยาธิสภาพของชั้นเนื้อเยื่อต่างๆ รอบบริเวณที่ฉีดด้วยพิษงู โดยเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ระยะห่างและความลึกต่างๆและระยะเวลาต่างๆหลังการฉีดพิษงู และค) ศึกษาผลการฉีดสารยับยั้งเอ็นไซม์ต่างๆ และแอนติบอดี้เข้าที่รอยฉีดพิษงูว่ามีการลดอาการเนื้อเยื่อเน่าตายได้หรือไม่อย่างไร

ผลการทดลอง ก) จากการใช้ลูกหมู (น.น. 20 กก.) ในการทดลองพบว่า สามารถวัด induration และ hemorrhage ได้อย่างสะดวกหลังจากการฉีดพิษงู i.d. ที่สีข้างของหมู โดยวัดจากรอยฉีดเดียวกันแต่ต่างเวลากันและ ได้ข้อมูลของแต่ละอาการจำนวน 24 จุด ต่อหมูและอาการทั้ง2 เป็นแบบ dose-response relationship ส่วนการศึกษา myonecrosis ได้ทำการฝังท่อเข้าเส้นเลือด jugular vein ไว้ 1 สัปดาห์ก่อนการทดลองโดยหมูไม่มีอาการผิดปรกติแต่อย่างใด เมื่อฉีดพิษงูกะปะจำนวน 32 mg เข้ากล้ามเนื้อ (i.m.) และเก็บตัวอย่างเลือดเป็นเวลา 72 ชม. ปรากฏว่าระดับ Creatine kinase (CK) และ cortisol เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนแต่ IL-6 ไม่ขึ้น นอกจากนี้ยังได้ทดลองเก็บชิ้นเนื้อที่ระยะห่างและระยะเวลาต่างๆหลังการฉีดพิษงู และที่ความลึกต่างๆ ของชั้นผิวหนังเพื่อศึกษาพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นหลังการฉีดพิษงูซึ่งการทดลองนี้สามารถทำได้ดีในหมู โดยสรุปแล้ว หมูเป็นสัตว์ทดลองที่ดีสำหรับศึกษาอาการเนื้อเน่าตายอันเกิดจากพิษงู ผลงานนี้ลงตีพิมพ์ในวารสาร TOXICON (1)

ข) จากการทำ biopsy ที่ระยะห่างและความลึกต่างๆ จากรอยฉีดพิษงู และเก็บชิ้นเนื้อเป็นระยะเวลาต่างๆ หลังฉีดพิษงู ทำให้ทราบถึงขบวนการการเกิดพยาธิสภาพซึ่งไม่สามารถศึกษาในคนได้ โดยสรุปพิษงูกะปะทำให้เกิดอาการเลือดออกจากเส้นเลือดแดงในชั้นใต้ผิวหนังภายใน 1-3 นาที หลังการฉีดพิษและมีการบวมและมีการรวมตัวของเซล PMN ส่วนในชั้นกล้ามเนื้อมีการสลายและเน่าตายที่พบมากในบริเวณที่มีเลือดออก ส่วนการฉีดพิษงูเห่าทำให้เกิดการสลายและตายของกล้ามเนื้อภายในนาทีแรกๆ โดยไม่มีอาการเลือดออก และมีการรวมตัวของ collagen ในทุกชั้นของกล้ามเนื้อ ผลการทดลองนี้ให้ข้อมูลในด้านเอ็นไซม์และสารพิษจากพิษงูแต่ละชนิดในการก่อพยาธิสภาพและการหาสารต่อต้านเอ็นไซม์มาใช้ลดอาการแผลเน่าตายด้วย

ค) จากการฉีดสารยับยั้งเอ็นไซม์ต่างๆ (N-phenylglycine สำหรับ metalloprotease และ phospholipase A_2, Sodium aurothiomalate สำหรับ hyaluronidase) และแอนติบอดี้เข้าที่รอยฉีดพิษงูทันทีหรือ 2 นาที หลังการฉีดพิษงู พบว่าสารยับยั้งและแอนติบอดี้สามารถลด induration, hemorrhage และระดับของ CK (ซึ่งบ่งถึงการเกิดกล้ามเนื้อเน่าตาย) ได้อย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติ และจากการดู histopathology ก็พบการลดพยาธิสภาพด้วย

<u>สรุป</u> ผลของโครงการวิจัยนี้เป็นการเปิดกว้างต่อการศึกษาปัญหาเนื้อเน่าตาย โดยได้แสดงว่า ก.) หมูเป็นสัตว์ทดลองที่ดีมากในการศึกษาปัญหานี้โดยสามารถลดความผันแปรทางชีววิทยาด้วยการลดจำนวนสัตว์ทดลองเช่น หนู และผลการทดลองสามารถนำมาสรุปใช้ในคนได้มั่นใจขึ้น ข.) การศึกษาพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นทันทีหลังการฉีดพิษงูทำให้ทราบถึงสารในพิษงูที่เป็นสาเหตุของการเกิดพยาธิสภาพและทำให้การหาสารยับยั้งได้ถูกต้องขึ้น และ ค.) การทดลองฉีดสารยับยั้งเอ็นไซม์มีผลในการลดอาการเนื้อเยื่อเน่าตายได้ ผลของการวิจัยนี้จะนำมาซึ่งวิธีการลดหรือป้องกันการเกิดเนื้อเยื่อเน่าตายอันเกิดจากพิษงูได้ในอนาคต

วารสารอ้างอิง

1. Srisurat Imkhieo, Chowalit Nakthong, Wannapa Kespichayawattana, Rungtiva Sirimujalin, Parin Suwannaprapha, Kavi Ratanabanangkoon. Pig as an experimental model for the study of snake venom induced local tissue necrosis. Toxicon. 2009; 53: 317-322.

ABSTRACT

222958

Project Title: "Study on the effect of locally injected enzyme inhibitors/antibody in the prevention/reduction of local tissue necrosis in pig injected with *Naja kaouthia* or *Calloselasma rhodostoma* venom"

Kavi Ratanabanangkoon
Laboratory of Immunology, Chulabhorn Research Institute and Chulabhorn Graduate Institute, Bangkok

Email: kavi@cri.or.th, sckrt@mahidol.ac.th

Introduction The venoms of Malayan pit viper (*C. rhodostoma*, CR) and the Thai cobra (*N. kaouthia*, NK) can cause systemic as well as local poisoning. While specific antivenoms can reverse the systemic toxicity, they are not effective in reducing the local effects which can lead to prolonged hospitalization and in some case amputation. This important medical problem could not, for various reasons, be studied in man, and has been studied in rodents whose skin structures are vastly different from man. The aim of this research project was to study the local tissue necrosis (LTN) in the pig and the search for possible treatment modality.

Objectives The objectives are a) to use pig as an experimental animal model for the study of LTN, b) to study the histopathology of LTN caused by the two venoms and c) to study the effects of various enzyme inhibitors and specific antibody on LTN.

Results and Discussion a) Intradermal injection of CR venom on the lateral sides of the pig (20 kg), caused induration which could easily be measured during 60 minutes after injection. Subcutaneous hemorrhage at these injection sites could be quantitated after 4 hr. A pig could yield 24 data points on induration and hemorrhage, both of which showed dose-response relationship. Myonecrosis could be studied by implantation of a catheter into the jugular vein and blood could be gently drawn to determine the creatine kinase (CK), cortisol and IL-6 levels over a 72 hour period after s.c. injection of the venom. Furthermore biopsy specimens around the venom injection sites at various time and depth could be taken to study the histopathology of LTN caused by each venom. Thus, it was concluded that pig can serve as a good experimental model for LTN. These results have been published (1).

b) Histopathology study of the biopsy specimen taken at various depths and distances from the venom injection sites have shed light on the events minutes, even seconds, after venom injection. This information provided useful clue to the possible causative agents i.e., enzymes, toxins which lead to LTN and guided the selection of enzyme inhibitors/antibody which most likely effective in reducing LTN in man.

c) Various enzyme inhibitors (N-phenylglycine for metalloprotease and phospholipase A_2 and sodium aurothiomalate for hyaluronidase) and equine $F(ab')_2$ antibody against CR, when injected 2 minutes after and into the venom injection site, were shown to reduce the induration, subcutaneous hemorrhage and the level of plasma CK. Histopathology studies at these injection sites have also shown a reduction of LTN caused by the venom.

Reference: 1. Srisurat Imkhieo, Chowalit Nakthong, Wannapa Kespichayawattana, Rungtiva Sirimujalin, Parin Suwannaprapha, Kavi Ratanabanangkoon. Pig as an experimental model for the study of snake venom induced local tissue necrosis. Toxicon. 2009; 53: 317-322.