



การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของกล้ามเนื้อหัวใจ ไต ตับ และกล้ามเนื้อลาย
หลังการรับพิษจากงูกะปะ งูแก้วหางแดง และงูจงอาง ในหนูขาว
Histopathological Change of Cardiac Muscle, Kidney, Liver and Skeletal
Muscle Following Envenomation by *Calloselasma rhodostoma*
(Malayan Pit Viper), *Trimeresurus hageni* (Hargen Pit Viper)
and *Ophiophagus hannah* (King Cobra) in Rats

นิศรา หล่อทอง
Nissara Lorthong

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชากายวิภาคศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Anatomy
Prince of Songkla University
2564
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของกล้ามเนื้อหัวใจ ไต ตับ และกล้ามเนื้อลาย
หลังการรับพิษจากงูกะปะ งูแก้วหางแดง และงูจงอาง ในหนูขาว
Histopathological Change of Cardiac Muscle, Kidney, Liver and Skeletal
Muscle Following Envenomation by *Calloselasma rhodostoma*
(Malayan Pit Viper), *Trimeresurus hageni* (Hargen Pit Viper)
and *Ophiophagus hannah* (King Cobra) in Rats

นิศรา หล่อทอง
Nissara Lorthong

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชากายวิภาคศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Anatomy
Prince of Songkla University
2564
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของกล้ามเนื้อหัวใจ ไต ตับ และกล้ามเนื้อลาย
หลังการรับพิษจากงูกะปะ งูแก้วหางแดง และงูจงอาง ในหนูขาว

ผู้เขียน นางสาวนิศรา หล่อทอง

สาขาวิชา กายวิภาคศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....

..... ประธานกรรมการ

(พันโทหญิง ผศ.ดร.วิภาพรรณ ชิมมากทอง)

(รศ.ดร.รักษวรรณ พูนคำ)

..... กรรมการ

(พันโทหญิง ผศ.ดร.วิภาพรรณ ชิมมากทอง)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....

..... กรรมการ

(พันโท รศ.ดร.เจนยุทธ ไชยสกุล)

(พันโท รศ.ดร.เจนยุทธ ไชยสกุล)

..... กรรมการ

(รศ.ดร.อุราพร วงศ์วัชรานนท์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชากายวิภาคศาสตร์

.....

(ศาสตราจารย์ ดร.ดำรงศักดิ์ ฟ้ารุ่งแสง)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มี
ส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ

(พันโทหญิง ผศ.ดร.วิภาพรรณ ชิมมากทอง)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ

(พันโท รศ.ดร.เจนยุทธ ไชยสกุล)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ลงชื่อ

(นางสาวนิศรา หล่อทอง)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน
และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ

(นางสาวนิศรา หล่อทอง)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของกล้ามเนื้อหัวใจ ไต ตับ และกล้ามเนื้อลาย
 หลังการรับพิษจากงูกะปะ งูแก้วหางแดง และงูจงอาง ในหนูขาว
 ผู้เขียน นางสาวนิศรา หล่อทอง
 สาขาวิชา กายวิภาคศาสตร์
 ปีการศึกษา 2563

บทคัดย่อ

การถูกงูกัดเป็นสาเหตุหนึ่งของการเสียชีวิตและพิการในประเทศเขตร้อนทั่วโลก โดยโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในพิษงูมีบทบาทในการเหนี่ยวนำอาการแสดงที่พบในผู้ป่วยหลังถูกงูกัด ได้แก่ พิษต่อระบบประสาท พิษต่อระบบไหลเวียนโลหิต พิษต่อเซลล์และเนื้อเยื่อ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของกล้ามเนื้อหัวใจ ไต ตับ และกล้ามเนื้อลายในหนูขาวที่ได้รับการฉีดพิษงูกะปะ (*Calloselasma rhodostoma* venom; CRV) พิษงูแก้วหางแดง (*Trimeresurus hageni* venom; THV) และพิษงูจงอาง (*Ophiophagus hannah* venom; OHV) การฉีดพิษงูทางหลอดเลือดดำในหนูขาวทั้งหมดสติ พบว่า พิษของงูกะปะและงูแก้วหางแดงมีผลลดค่าความดันเลือดแดงเฉลี่ย ภายใน 15 วินาที ในขณะที่การฉีดพิษงูจงอางไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงความดันเลือดแดงเฉลี่ยเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับการฉีดน้ำเกลือ การศึกษาจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อไตหลังการฉีดพิษงูกะปะ (500 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม), พิษงูแก้วหางแดง (1200 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) และ พิษงูจงอาง (1000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ทางกล้ามเนื้อ พบการคั่งของเลือดภายใน renal tubule, glomerulus และ segmental artery รวมถึงการฝ่อลีบของ glomerulus ส่วนเนื้อเยื่อตับพบการคั่งของเลือดที่ central vein, portal triad และ sinusoid อีกทั้งยังพบ inflammatory cell และ Kupffer cells กระจายเป็นบริเวณกว้าง ในกล้ามเนื้อหัวใจ พบว่าพิษงูทั้ง 3 ชนิดสามารถทำให้เกิด rupture ของ cardiac myofibers ได้ อย่างไรก็ตาม พิษงูกะปะ และพิษงูแก้วหางแดงไม่มีผลเหนี่ยวนำการเกิดพิษต่อกล้ามเนื้อลายที่ชัดเจน โดยแตกต่างจากพิษงูจงอาง (1000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ที่เหนี่ยวนำการเกิดพิษต่อกล้ามเนื้อลายได้ การศึกษาครั้งนี้พบว่า พิษงูกะปะและพิษงูแก้วหางแดงที่มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นพิษต่อระบบไหลเวียนโลหิตสามารถเหนี่ยวนำการเกิดพยาธิสภาพในเนื้อเยื่อไต ตับ และกล้ามเนื้อหัวใจ มากกว่าพิษของงูจงอางที่มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นพิษต่อระบบประสาทและกล้ามเนื้อ

Thesis Title	Histopathological change of cardiac muscle, kidney, liver and skeletal muscle following envenomation by <i>Calloselasma rhodostoma</i> (Malayan pit viper), <i>Trimeresurus hageni</i> (Hargen pit viper) and <i>Ophiophagus hannah</i> (King cobra) in rats
Author	Miss Nissara Lorthong
Major Program	Anatomy
Academic Year	2020

ABSTRACT

Snakebite envenoming is a cause of death and disability in many tropical countries worldwide. Toxic proteins in snake venom induce a number of clinical outcomes, such as neurotoxicity, cardiotoxicity, and cytotoxicity. The objective of this study was to determine histopathological changes of cardiac muscle, kidney, liver, and skeletal muscle following the administration of *Calloselasma rhodostoma* venom (CRV), *Trimeresurus hageni* venom (THV), and *Ophiophagus hannah* venom (OHV). Intravenous administration (IV) of CRV (dose 1000 µg/kg) or THV (dose 800 µg/kg) significantly reduced the mean arterial pressure (MAP) and eventually killed envenomed rats within 15 seconds. Change in MAP was not observed following administration of OHV (1000 µg/kg; IV) compared with that of vehicle control. Intramuscular (IM) administration of CRV (dose 500 µg/kg) or THV (dose 1200 µg/kg) or OHV (dose 1000 µg/kg). Caused congestion of renal tubule and segmental artery, including glomerulus atrophy. Venoms also induced congestion of hepatic central vein, portal triad, and sinusoid. Moreover, inflammatory cells and Kupffer cells were also detected throughout liver tissues. In envenomed heart tissues, we found that 3 snake venoms generated rupture of cardiac myofibers. The presence of skeletal muscle damage was observed following administration of OHV (dose 1000 µg/kg; IM). However, neither CRV or THV displayed myotoxicity in experimentally envenomed rats. This finding concludes that venom components associated with cardiotoxicity in CRV and THV are responsible for pathological changes of kidney, liver and cardiac tissues. These toxic compounds are likely to be absent in King cobra venom (OHV).

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยต้องขอกราบขอบพระคุณ พันโทหญิง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิภาพรรณ ชิมมากทอง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และ พันโท รองศาสตราจารย์ ดร.เจนยุทธ ไชยสกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม เป็นอย่างยิ่ง ที่คอยช่วยเหลือในการวางแผนการวิจัย ให้คำปรึกษาชี้แนะข้อสังเกตต่าง ๆ ทำให้ผู้วิจัยได้พัฒนา แนวความคิดและไตร่ตรองปัญหาต่าง ๆ อย่างรอบคอบมากยิ่งขึ้น ตลอดจนการตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ระหว่างการดำเนินงานวิจัย ซึ่งเป็นแนวทางอันมีคุณค่าและเป็นประโยชน์ต่อวิทยานิพนธ์ นอกจากนี้ยังคอยสนับสนุนและเป็นที่กำลังใจเสมอมา ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาและขอขอบพระคุณอาจารย์ทั้ง 2 ท่านเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย ที่ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อุราพร วงศ์วัชรานนท์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วันดี อุดมอักษร และ รองศาสตราจารย์ ดร.รักษวรรณ พูนคำ ที่ได้คอยให้ความช่วยเหลือ แนะนำในขั้นตอนกระบวนการตรวจสอบและปรับแก้ไขวิทยานิพนธ์ รวมถึงความช่วยเหลืออื่นๆ ในทุก ๆ ด้านตลอดระยะเวลาการทำวิจัย นอกจากนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์มนรัศมี โกมลเกรียงไกร และคณาจารย์ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ทุกท่าน ที่ได้ให้คำแนะนำปรึกษาที่ดีตลอดมาในระหว่างการทำวิจัย ขอขอบคุณ คุณปิยากร บุญยัง และ ขอขอบคุณเพื่อนๆในภาควิชากายวิภาคศาสตร์ รวมถึงกัลยาณมิตรที่ดีทุกๆ คนที่ไม่ได้เอ่ยนามมานี้ ที่คอยรับฟังปัญหาอุปสรรค ช่วยเหลือ และให้กำลังใจตลอดมา

สุดท้ายนี้ที่ขาดเสียไม่ได้ ผู้วิจัยต้องขอกราบขอบพระคุณบิดามารดา และ ครอบครัว ซึ่งเป็นกำลังที่สำคัญ ที่คอยแนะนำสนับสนุนและให้กำลังใจเสมอมา คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอน้อมบูชาพระคุณบิดามารดาและบูรพาจารย์ทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอนวิชาความรู้ และให้ความเมตตากรุณาแก่ผู้วิจัยตลอดมาทำให้การศึกษาวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

นิศรา หล่อทอง

สารบัญ

บทที่		หน้า
	สารบัญ	(8-9)
	สารบัญตาราง	(10)
	สารบัญรูปภาพ	(10)
1	บทนำ	
	1.1 ความสำคัญและที่มาของการวิจัย	1-3
	1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	4
	1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
	1.4 ขอบเขตของงานวิจัย	4
2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
	2.1 การถูกงูพิษกัด (Snake-bite envenoming)	5
	2.2 งูพิษในประเทศไทย 4 ตระกูล	5-7
	2.3 งูกะปะ (<i>Calloselasma rhodostoma</i>)	
	▪ ลักษณะของงูพิษ/แหล่งที่พบ	7
	▪ อาการแสดงของผู้ป่วยเมื่อได้รับพิษงูกะปะ	7
	▪ กลไกการออกฤทธิ์ของพิษงูกะปะ	8
	2.4 งูเขียวหางไหม้ (<i>Trimeresurus spp</i>)	
	▪ ลักษณะของงูพิษ/แหล่งที่พบ	8-9
	▪ อาการแสดงของผู้ป่วยเมื่อได้รับพิษงูเขียวหางไหม้	9
	▪ กลไกการออกฤทธิ์ของพิษงูเขียวหางไหม้	9
	2.5 งูแก้วหางแดง (<i>Trimeresurus hageni</i>)	
	▪ ลักษณะของงูพิษ/แหล่งที่พบ	10
	▪ อาการแสดงของผู้ป่วยเมื่อได้รับพิษงูแก้วหางแดง	10
	▪ กลไกการออกฤทธิ์ของพิษงูแก้วหางแดง	11
	2.6 งูจงอาง (<i>Ophiophagus hannah</i>)	
	▪ ลักษณะของงูพิษ/แหล่งที่พบ	12
	▪ อาการแสดงของผู้ป่วยเมื่อได้รับพิษงูจงอาง	12
	▪ กลไกการออกฤทธิ์ของพิษงูจงอาง	12

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
2		
	2.7 โพรตีนที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในพิษงู	14-15
	2.8 การศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อหลังถูกงูกัดในอดีต	16-18
3	วิธีการดำเนินการวิจัย	
	3.1 วิธีการดำเนินการวิจัย	19
	3.2 ลักษณะตัวอย่างหรือประชากรที่ทำการศึกษา	19-23
	3.3 ศึกษาผลของพิษงูต่อความดันโลหิตในหนูขาว	24-25
	3.4 ศึกษาปริมาณของโปรตีนจากพิษจากงูกะปะ งูแก้วหางแดง และงูจงอาง	26-27
	3.5 วิธีฉีดพิษเข้าสู่ตัวทดลองและการเก็บตัวอย่าง	28-29
	3.6 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของกล้ามเนื้อหัวใจ ไต ตับ และกล้ามเนื้อลาย หลังการรับพิษจากงูกะปะ งูแก้วหางแดง และงูจงอาง	30-33
	3.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ	34
	3.8 ระยะเวลาที่ใช้ในการวิจัย	34
	3.9 สถานที่ทำการวิจัยแผนการดำเนินการวิจัย	34
	3.10 แผนการดำเนินการวิจัย	35
4	ผลการวิจัย	
	4.1 ผลของพิษงูต่อความดันโลหิตในหนูขาว	36-44
	4.2 การวิเคราะห์โปรตีนใน CRV, THV และ OHV ด้วยวิธี SDS-PAGE analysis	45-46
	4.3 ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของกล้ามเนื้อหัวใจ ไต ตับ และกล้ามเนื้อลาย หลังฉีด CRV, THV และ OHV	47-88
5	วิจารณ์ผลการศึกษา	89-94
6	สรุปผลและข้อเสนอแนะ	95-96
อ้างอิง		97-104
ภาคผนวก		105-108
ประวัติผู้เขียน		109

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	แสดงปริมาณของพิษงูทั้ง 3 ชนิด สำหรับ SDS-PAGE	27
ตารางที่ 2	ตารางระดับความรุนแรงของเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อลาย (Skeletal muscle)	30
ตารางที่ 3	ตารางระดับความรุนแรงของเนื้อเยื่อไต (Kidney)	31
ตารางที่ 4	ตารางระดับความรุนแรงของเนื้อเยื่อตับ (Liver)	32
ตารางที่ 5	ตารางระดับความรุนแรงของเนื้อเยื่อหัวใจ (Cardiac muscle)	33
ตารางที่ 6	แผนการดำเนินงานวิจัย	35
ตารางที่ 7	แสดงค่า Mean arterial pressure (CRV, THV, OHV)	43
ตารางที่ 8	แสดงระดับคะแนนพยาธิสภาพของกล้ามเนื้อหัวใจ	54
ตารางที่ 9	แสดงระดับคะแนนพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อไต	68
ตารางที่ 10	แสดงระดับคะแนนพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับ	82
ตารางที่ 11	แสดงระดับคะแนนพยาธิสภาพของกล้ามเนื้อลาย	90

สารบัญรูปภาพ

			หน้า
รูปที่	1-1	แผนที่แสดงการคาดการณ์การเสียชีวิตจากการถูกกัดในพื้นที่ต่างๆทั่วโลก	1
รูปที่	2-1	ลักษณะของงูกะปะ	8
รูปที่	2-2	ลักษณะของงูเขียวหางไหม้	10
รูปที่	2-3	ลักษณะของงูแก้วหางแดง	11
รูปที่	2-4	ลักษณะของงูจงอาง	13
รูปที่	2-5	ชนิด Phospholipase A ₂ (PLA ₂)	14
รูปที่	2-6	จุลพยาธิวิทยาของตับและไต (Paper review; 2012)	16
รูปที่	2-7	จุลพยาธิวิทยาของไตและกล้ามเนื้อลาย (Paper review; 2018)	17
รูปที่	3-1	แบบแผนวิจัย	19
รูปที่	3-2	แสดงลักษณะการทำ Protein assay	20
รูปที่	3-3	การออกแบบการทดลอง (Experimental design)	23
รูปที่	3-4	แสดงหัตถการการเปิดช่องคอ Cannulated	25
รูปที่	3-5	แสดงหัตถการการเปิดช่องอกเพื่อเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ สำหรับการย้อม Hematoxylin&Eosin	29
รูปที่	4-1	แสดงค่าความดันโลหิตหลังการฉีด Normal saline	36
รูปที่	4-2	การเปลี่ยนแปลงของความดันโลหิตหลังการฉีดพิษ CRV	38
รูปที่	4-3	การเปลี่ยนแปลงของความดันโลหิตหลังการฉีดพิษ THV	40
รูปที่	4-4	การเปลี่ยนแปลงของความดันโลหิตหลังการฉีดพิษ OHV	42
รูปที่	4-5	ความดันโลหิต Systolic blood pressure (CRV, THV, OHV)	44
รูปที่	4-6	ความดันโลหิต Diastolic blood pressure (CRV, THV, OHV)	44
รูปที่	4-7	การแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE	46
รูปที่	4-8	แสดงลักษณะของกล้ามเนื้อหัวใจ ในหนูกลุ่ม control	47
รูปที่	4-9	แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของกล้ามเนื้อหัวใจ หลังฉีด CRV	49
รูปที่	4-10	แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของกล้ามเนื้อหัวใจ หลังฉีด THV	51
รูปที่	4-11	แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของกล้ามเนื้อหัวใจ หลังฉีด THV	53

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 4-12 แสดงค่าเฉลี่ยความกว้างของ cardiac myofibers	56
รูปที่ 4-13 แสดงลักษณะของเนื้อเยื่อไต ที่ตำแหน่งบริเวณ glomerulus ในหนูกลุ่ม control	57
รูปที่ 4-14 แสดงลักษณะของเนื้อเยื่อไต ที่ตำแหน่งบริเวณ segmental artery ในหนูกลุ่ม control	58
รูปที่ 4-15 แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อไต หลังฉีด CRV (glomerulus)	60
รูปที่ 4-16 แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อไต หลังฉีด CRV (segmental artery)	61
รูปที่ 4-17 แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อไต หลังฉีด THV (glomerulus)	63
รูปที่ 4-18 แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อไต หลังฉีด OHV (segmental artery)	64
รูปที่ 4-19 แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อไต หลังฉีด OHV (glomerulus)	66
รูปที่ 4-20 แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อไต หลังฉีด OHV (segmental artery)	67
รูปที่ 4-21 แสดงค่าเฉลี่ยความกว้างของ glomerulus	70
รูปที่ 4-22 แสดงลักษณะของเนื้อเยื่อตับ ที่ตำแหน่งบริเวณ central vein ในหนูกลุ่ม control	71
รูปที่ 4-23 แสดงลักษณะของเนื้อเยื่อตับ ที่ตำแหน่งบริเวณ portal triad ในหนูกลุ่ม control	72
รูปที่ 4-24 แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อตับ หลังฉีด CRV (central vein)	74
รูปที่ 4-25 แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อตับ หลังฉีด CRV (portal triad)	75
รูปที่ 4-26 แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อตับ หลังฉีด THV (central vein)	77

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

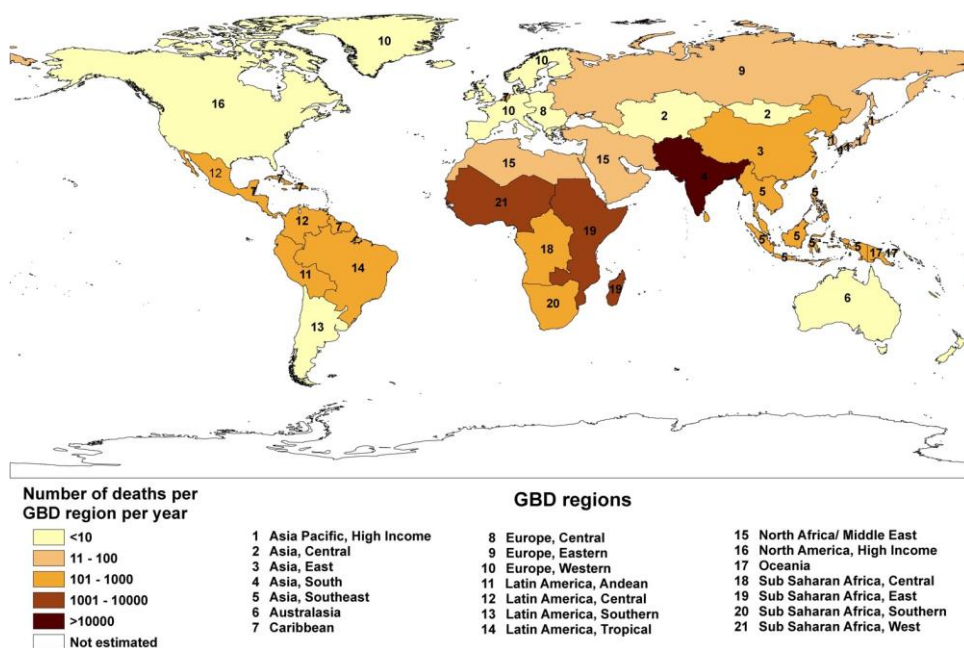
		หน้า
รูปที่ 4-27	แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อตับ หลังฉีด THV (Portal triad)	78
รูปที่ 4-28	แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อตับ หลังฉีด OHV (Central vein)	80
รูปที่ 4-29	แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อตับ หลังฉีด OHV (Portal triad)	81
รูปที่ 4-30	แสดงค่าเฉลี่ยความกว้างของ sinusoid	84
รูปที่ 4-31	แสดงลักษณะของกล้ามเนื้อลาย ในหนูกลุ่ม Control	85
รูปที่ 4-32	แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของกล้ามเนื้อลาย หลังฉีด CRV	87
รูปที่ 4-33	แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของกล้ามเนื้อลาย หลังฉีด THV	88
รูปที่ 4-34	แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของกล้ามเนื้อลาย หลังฉีด OHV	89
รูปที่ 4-35	แสดงค่าเฉลี่ยความกว้างของ Skeletal myofibers	92

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของการวิจัย

การถูกงูกัด (Snakebite envenoming) จัดเป็นปัญหาสาธารณสุขที่ทำให้เกิดการเสียชีวิตและพิการสูงเป็นอันดับต้นๆของโลก โดยเฉพาะในทวีปแอฟริกาและเอเชีย จากสถิติขององค์การอนามัยโลก (World Health Organization; WHO) พบว่าทั่วโลกมีประชากรที่ถูกงูกัดประมาณ 2.7 ล้านรายต่อปี มีผู้พิการประมาณ 400,000 รายต่อปี และเสียชีวิตประมาณ 81,000-138,000 รายต่อปี^[55] จากการสำรวจในทวีปเอเชีย พบว่ามีประชากรถูกงูกัดเฉลี่ย 2 ล้านรายต่อปี โดยในประเทศไทย มีอัตราเฉลี่ยของประชากรที่ถูกงูกัดสูงถึง 790,000 รายต่อปี (snakebite envenoming, WHO, 2019)^[52]



รูปที่ 1-1 แผนที่แสดงการคาดการณ์การเสียชีวิตจากการถูกงูกัดในพื้นที่ต่างๆทั่วโลก

(Kasturiratne และคณะ 2008)

งูที่มีความสำคัญต่อระบบสาธารณสุขไทยมี 7 ชนิดเป็นงูใน Family Elapidae 4 ชนิด ได้แก่ งูเห่าไทย (*Naja kaouthia*) งูจงอาง (*Ophiophagus hannah*) งูสามเหลี่ยม (*Bungarus fasciatus*) งูทับสมิงคลา (*Bungarus candidus*) และงูใน Family Viperidae 3 ชนิด ได้แก่ งูแมวเซา (*Daboia siamensis*) งูกะปะ (*Calloselasma rhodostoma*) และกลุ่มงูเขียวหางไหม้ (*Trimeresurus* spp.)^[2] อาการแสดงที่พบหลังถูกงูกัดจะขึ้นอยู่กับองค์ประกอบในพิษงู ที่เป็นองค์ประกอบประเภทโปรตีนมากกว่า 90% ในรูปของ polypeptide toxins และ enzymes โดยโปรตีนและ enzymes เหล่านี้ส่งผลให้เกิดพยาธิสภาพต่างๆ หลังถูกงูกัด^[3] ได้แก่

พิษต่อระบบประสาท (Neurotoxicity) เป็นอาการที่เกิดการทำลายต่อระบบประสาท จาก Neurotoxin และ enzyme phospholipase A₂^[1] ซึ่งพบในพิษของงูใน Family Elapidae ได้แก่ งูเห่าไทย (*Naja kaouthia*) งูจงอาง (*Ophiophagus hannah*) งูสามเหลี่ยม (*Bungarus fasciatus*) งูทับสมิงคลา (*Bungarus candidus*) โดย Neurotoxin เป็นสารพิษที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก^[46] จึงสามารถดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดได้รวดเร็ว และจับกับ Nicotinic receptors ที่บริเวณ neuromuscular junction ส่งผลให้ผู้ป่วย มีอาการกล้ามเนื้ออ่อนแรง หนังตาตก ลิ้นแข็ง พูดไม่ชัด กลืนน้ำลายไม่ได้ หายใจไม่สะดวก มีอาการแน่นหน้าอก และส่งผลให้เสียชีวิตจากภาวะการหายใจล้มเหลว^[26,29]

พิษต่อระบบไหลเวียนโลหิต (Hematotoxicity) เป็นความผิดปกติที่เกิดขึ้น จากโปรตีน hemorrhagins ที่พบได้ในพิษของงูกลุ่ม Family Viperidae ได้แก่ งูแมวเซา (*Daboia siamensis*) งูกะปะ (*Calloselasma rhodostoma*) และกลุ่มงูเขียวหางไหม้ (*Trimeresurus* spp.) hemorrhagins มีฤทธิ์ทำลาย endothelial cell ที่ผนังด้านในของหลอดเลือด (vascular endothelium) ทำให้เลือดสามารถไหลผ่านออกมาจากผนังที่ถูกทำลาย ผู้ป่วยจึงมีเลือดออกตามอวัยวะต่างๆ ของร่างกาย^[21,29] นอกจากนี้งูพิษใน Family Viperidae ยังมี Procoagulant enzymes ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีผลยับยั้งการเกาะกลุ่มกันของเกร็ดเลือด (coagulation) ซึ่ง Procoagulant toxins จะไปกระตุ้น factors ต่างๆ ในขั้นตอนการแข็งตัวของเลือด ในพิษงูแมวเซา (*Daboia siamensis*) Procoagulant toxins จะไปกระตุ้น clotting factors V และ X^[4] ส่วน Procoagulant toxins ในพิษของงูกะปะ (*Calloselasma rhodostoma*) และกลุ่มงูเขียวหางไหม้ (*Trimeresurus* spp.) จะกระตุ้น clotting factor I (fibrinogen) ทำให้เลือดไม่แข็งตัวจึงมีเลือดออกในเนื้อเยื่อต่างๆ เช่น เยื่อช่องปาก ฟัน ลำไส้ กระเพาะอาหาร และตำแหน่งรอยเขียวที่ถูกกัด^[3]

นอกจากพิษต่อระบบประสาทและพิษต่อระบบโลหิตแล้ว พิษงูบางชนิดยังมีพิษที่ทำให้เกิดการทำลายต่อเนื้อเยื่อ คือ Cytotoxins ซึ่งมีฤทธิ์ทำลายเซลล์โดยตรง ทำให้เกิด tissue necrosis โดยพบว่าบริเวณที่ถูกงูที่มี cytotoxin กัดจะมีอาการบวมและการตายของเนื้อเยื่อบริเวณนั้น

การทำลายของเนื้อเยื่อนี้มักพบในผู้ป่วยที่ถูกกัดโดยงูในกลุ่ม Viperidae เช่น งูกะปะ (*Calloselasma rhodostoma*) หรืองูในกลุ่มงูเขียวหางไหม้ (*Trimeresurus* spp.) นอกจากนี้ยังพบได้ในผู้ป่วยที่ถูกงูเห่า (*Naja kaouthia*) และงูจงอาง (*Ophiophagus hannah*) ในผู้ป่วยบางรายแผลที่เกิดจากการถูกกัด อาจเกิดตุ่มน้ำเหลืองพุพอง และอาจมีเลือดแทรกอยู่ตามแผลได้ หรือ hemorrhagic blebs^[2] ในรายที่มีอาการรุนแรงอาจทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อถึงจนถึงชั้นกล้ามเนื้อ นอกจากนี้ยังพบว่าในพิษงูยังมีเอนไซม์ที่สำคัญอีก 3 ชนิด คือ Acidic phospholipase A₂ (A-PLA₂), L-amino acid oxidase (LAO) และเอนไซม์เจลาติเนส (gelatinase) ที่ทำให้เกิดการบวมของแผลและเนื้อเยื่อตายหลังถูกกัด^[29,43]

สำหรับในภาคใต้ของประเทศไทยพบว่าเป็นแหล่งชุกชุมของงูพิษหลายชนิดที่เป็นสาเหตุของการบาดเจ็บและพิการจากตายของเนื้อเยื่อหลังการถูกกัด เช่น งูเห่าพันพิษ งูกะปะ (*Calloselasma rhodostoma*) งูจงอาง (*Ophiophagus hannah*) งูเขียวหางไหม้ลายเสือ (*Trimeresurus purpureomaculatus*) และงูแก้วหางแดง (*Trimeresurus hageni*) โดยสองชนิดหลังจัดเป็นงูในวงศ์เดียวกับงูเขียวหางไหม้ (*Trimeresurus albolabris*) ที่พบได้ทั่วประเทศไทย จากการศึกษาเกี่ยวกับอาการพิษหลังถูกกัดทั้งภายในประเทศไทยและต่างประเทศโดยเฉพาะในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ นักวิจัยส่วนใหญ่มุ่งเน้นถึงแนวทางรักษาอาการพิษต่อระบบประสาท (Neurotoxicity) และระบบโลหิต (Hematotoxicity) แต่ยังไม่มีการศึกษาถึงแนวทางการป้องกันการตายของเนื้อเยื่อหลังถูกพิษกัดในเชิงลึก วิทยานิพนธ์นี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของกล้ามเนื้อหัวใจ ไต ตับ และกล้ามเนื้อลายของหนูขาว หลังการฉีดพิษ งูกะปะ (*Calloselasma rhodostoma*) งูแก้วหางแดง (*Trimeresurus hageni*) และงูจงอาง (*Ophiophagus hannah*) ซึ่งเป็นงูพิษที่เป็นสาเหตุสำคัญของการบาดเจ็บและพิการหลังถูกกัดในผู้ป่วยจากการตายของเนื้อเยื่อ (gangrene) โดยจะทำการเปรียบเทียบระดับความรุนแรงของเนื้อเยื่อที่ได้รับพิษทั้ง 3 ชนิดในเนื้อเยื่อของสัตว์ทดลอง รวมทั้งเปรียบเทียบองค์ประกอบพื้นฐานในพิษงูทั้ง 3 ชนิดที่เกี่ยวข้องกับการเกิด tissue necrosis ความรู้ที่ได้จากการศึกษานี้จะนำไปพัฒนาแนวทางการรักษาและลดอัตราการเสียชีวิตรวมทั้งความพิการในผู้ป่วยที่ถูกกัดต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยา ของกล้ามเนื้อหัวใจ ไต ตับ และกล้ามเนื้อลาย ในสัตว์ทดลอง ที่ได้รับการฉีดพิษงูกะปะ งูแก้วหางแดง และงูจงอาง เปรียบเทียบกับกลุ่มสัตว์ทดลองที่ไม่ได้รับพิษงูทั้ง 3 ชนิด
- เพื่อศึกษาเปรียบเทียบระดับความรุนแรงต่อการเกิดพยาธิสภาพในเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อหัวใจ ไต ตับ และกล้ามเนื้อลายของสัตว์ทดลองหลังการฉีดพิษงูกะปะ งูแก้วหางแดง และงูจงอาง
- เพื่อศึกษาวิเคราะห์ความแตกต่างของโปรตีนในพิษงูกะปะ งูแก้วหางแดง และงูจงอาง

1.3 ประโยชน์ที่จะได้จากการวิจัย

- ทราบการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยา ของกล้ามเนื้อหัวใจ ไต ตับ และกล้ามเนื้อลาย หลังการฉีดพิษงูกะปะ งูแก้วหางแดง และงูจงอาง
- สามารถนำความรู้ทางจุลพยาธิวิทยาของพิษงูแต่ละชนิด ไปใช้เป็นความรู้พื้นฐานในการพัฒนาการรักษาทางการแพทย์ ในผู้ป่วยที่ถูกงูกัด

1.4 ขอบเขตของงานวิจัย

- ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยา ของกล้ามเนื้อหัวใจ ไต ตับ และกล้ามเนื้อลาย ในหนูขาว ที่ได้รับการฉีดพิษงูกะปะ งูแก้วหางแดง และงูจงอาง เข้าทางกล้ามเนื้อลาย
- ศึกษาจุลพยาธิวิทยา ของกล้ามเนื้อหัวใจ ไต ตับ และกล้ามเนื้อลาย ในหนูขาว ที่ได้รับการฉีดพิษงูกะปะ งูแก้วหางแดง และงูจงอาง ด้วยเทคนิค Hematoxylin & Eosin staining
- เปรียบเทียบองค์ประกอบในพิษงูกะปะ งูแก้วหางแดง และงูจงอาง ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 การถูกงูพิษกัด (Snake-bite envenoming)

การถูกงูพิษกัด (Snake-bite envenoming) ยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญทางการแพทย์ จากผลการสำรวจสถิติขององค์การอนามัยโลก (World Health Organization หรือ WHO) ยืนยันว่า การถูกงูพิษกัดส่งผลให้เกิดอัตราการเสียชีวิตและทำให้เกิดความพิการสูง^[55] เมื่อพิจารณาตามสถิติแล้วพบว่าคนไทยส่วนใหญ่จะถูกงูพิษกัดในช่วงปลายฤดูฝน ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่การเก็บเกี่ยวผลผลิตของเกษตรกร โดยพบอัตราการเสียชีวิตในพื้นที่ชนบทสูงกว่าชุมชนเมือง ได้แก่กลุ่มอาชีพ ชาวนา ชาวสวน เป็นส่วนใหญ่ อัตราการถูกงูพิษกัดเมื่อแบ่งเป็นภูมิภาคจากสูงที่สุด ได้แก่ภาคใต้ รองลงมาคือ ภาคกลาง ภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบปัญหาที่เกิดขึ้นตามมาหลังจากเข้ารับการรักษาพบว่า 98.14% แพทย์ไม่สามารถระบุชนิดของงูพิษที่กัดประชากรได้^[2] เนื่องจากปัจจุบันนี้ยังคงมีการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาของงูพิษน้อย และนอกจากปัญหาเหล่านี้แล้ว สิ่งที่สำคัญ คือ งูพิษเป็นปัจจัยที่คนไทยไม่อาจหลีกเลี่ยงได้โดยเฉพาะเกษตรกร เพราะประเทศไทยเป็นประเทศที่มีลักษณะภูมิประเทศและภูมิอากาศที่มีความเหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของสัตว์มีพิษเป็นอย่างมาก ดังนั้นจึงปฏิเสธไม่ได้ว่างูพิษนั้นยังคงเป็นปัญหาที่สำคัญมากที่ต้องเร่งศึกษาและทำความเข้าใจให้มากยิ่งขึ้น จากสถิติพบว่าประชากรในภาคใต้ถูกงูพิษกัดสูงที่สุดโดยอันดับ 1 คือ งูกะปะ คิดเป็นร้อยละ 40 รองลงมาคือ งูเขียวหางไหม้ คิดเป็นร้อยละ 34 งูเห่า คิดเป็นร้อยละ 12 งูแมวเซา คิดเป็นร้อยละ 10 ของจำนวนประชากร และที่เหลืออีกร้อยละ 4 เป็นงูพิษชนิดอื่น ๆ^[2,4] ซึ่งจากข้อมูลดังกล่าว พบว่างูกะปะ และงูเขียวหางไหม้มีร้อยละของจำนวนประชากรที่โดนงูพิษกัดสูงที่สุดเป็นอันดับ 1 และ 2 ในประเทศไทย

2.2 งูพิษในประเทศไทยจำแนกออกเป็น 4 ตระกูล คือ

1. Elapidae พิษของงูตระกูลนี้มีผลต่อระบบประสาท (neurotoxins) พิษของงูกลุ่มนี้จะไปจับกับแผ่นเชื่อมประสาทสั่งการและกล้ามเนื้อ (Neuromuscular junction) ซึ่งจะมีเขี้ยวพิษ (poison fang) อยู่ทางด้านหน้าของกรามบน ลักษณะเขี้ยวสั้นไม่สามารถเคลื่อนไหวหรืองอพับได้ งูตระกูลนี้ได้แก่ งูเห่า (Monocled cobra, *Naja kaouthia*) งูจงอาง (King cobra, *Ophiophagus hannah*) พิษของงู 2 ชนิดนี้ จะไปจับกับตัวรับด้านกล้ามเนื้อ (post-synapse) พิษของงูเห่าและงูจงอางมีฤทธิ์ cytotoxicity ซึ่งทำให้เกิดบวมตรงตำแหน่งที่ถูกกัดด้วย ส่วน งูสามเหลี่ยม (Banded krait, *Bungarus fasciatus*) และงูทับสมิงคลา (Malayan krait, *Bungarus candidus*) พิษจะจับกับปลายประสาท (pre-synapse) และจะไม่พบการบวมตรงตำแหน่งที่ถูกกัด

เนื่องจากมีรายงานถึงพิษงูสามเหลี่ยม และงูทับสมิงฆลาว่าไม่มีฤทธิ์ cytotoxicity^[4, 52] ในบริเวณรอยเขี้ยวที่กัตลักษณะอาการสำคัญของผู้ที่ถูกงูพิษในตระกูลนี้กัต คือ ตาพร่ามัว ลิ้นแข็งพูดไม่ชัด หนึ่งตาตก ทำให้กล้ามเนื้อเป็นอัมพาต โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีการอัมพาตของกล้ามเนื้อที่ช่วยในการหายใจ ส่งผลให้ผู้ที่ถูกงูพิษตระกูลนี้กัตระบบหายใจล้มเหลว ไม่สามารถหายใจได้ด้วยตนเอง และเสียชีวิตในที่สุด (Warrell et al., 1983)^[42] นอกจากนี้ยังมีข้อมูลยืนยันถึงความพิษของงูตระกูลนี้ว่า นอกจากมีผลร้ายแรงต่อระบบประสาท แล้วอาจยังมีความเป็นพิษต่อเม็ดเลือด ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกหรือออกตันได้อีกด้วย

2. Viperidae (Vipers) พิษของงูในตระกูลนี้มีผลต่อระบบไหลเวียนโลหิต (hemorrhagins) ซึ่งพิษของงูกลุ่มนี้จะมืฤทธิ์กระตุ้นปัจจัยในการจับตัวเป็นลิ่มเลือดน้อยลงอย่างมาก (coagulation factors) ทำให้เกิดภาวะเลือดออกง่าย^[29] ซึ่งได้แก่ งูแมวเซา (*Daboia siamensis*) งูกะปะ (*Calloselasma rhodostoma*) และงูเขียวหางไหม้ (*Trimeresurus* spp.) เขี้ยวพิษของมันจะอยู่ทางด้านหน้าของกรามบน เขี้ยวยาว มีความพิเศษคือสามารถเคลื่อนไหวและงอพับเก็บได้ โดย Viperidae จะถูกแบ่งออกเป็น 2 subfamilies คือ

Cratalinae งูกลุ่มนี้จะมืรู (pit) อยู่ระหว่างตากับจมูก ซึ่งทำหน้าที่รับรู้ความรู้สึกร้อน (thermosensitive organ) ทำให้รู้ตำแหน่งของเหยื่ออย่างชัดเจน งูกลุ่มนี้ได้แก่ งูเขียวหางไหม้ (Green Pit Viper, *Trimeresurus* spp.) และงูกะปะ (Malayan pit viper, *Calloselasma rhodostoma*) ซึ่งพิษจะกระตุ้น Fibrinogen (Factor I) และมีพิษ Hemorrhagins ทำลายผนังด้านในของหลอดเลือดฝอย จากการกระตุ้นดังกล่าว จะทำให้เกิดปัจจัยการจับเป็นลิ่มเลือด ทำให้เกิดภาวะเลือดออกง่าย นอกจากนี้พิษของงูกลุ่มนี้มีผลทาง cytotoxicity ซึ่งทำให้บริเวณที่ถูกกัดบวมและเน่าได้

Viperinae งูกลุ่มนี้จะไม่มีรู (pit) อยู่ระหว่างตากับจมูก ได้แก่ งูแมวเซา (Russell's Viper, *Daboia russellii*) โดยพิษของงูแมวเซามีความเป็น procoagulant ซึ่งจะกระตุ้น Factor X และ factor V ทำให้มีเลือดออกง่ายตามจุดต่างๆ โดยพบว่ามีผลทำให้เกิด nephrotoxicity โดยตรง และพิษของงูแมวเซายังทำลายเนื้อเยื่อ (cytotoxicity) ร่วมอีกด้วย ผลที่ถูกกัดจึงมีลักษณะบวม นอกจากนี้ในต่างประเทศพบว่า 30% ของผู้ป่วยมีอาการของ neurotoxicity ร่วมด้วย ซึ่งเป็นผลจากเลือดออกที่ต่อม pituitary.

3. Hydrophiidae พิษของงูตระกูลนี้จะทำลายกล้ามเนื้อ (myotoxicity) ทำให้เกิดการสลายตัวของกล้ามเนื้อ (rhabdomyolysis) และโพแทสเซียมสูงในเลือด (hyperkalemia) นอกจากนี้ยังทำให้เกิดผลทาง neurotoxicity งูกลุ่มนี้เขี้ยวพิษจะวางตัวอยู่ที่กรามบน ลักษณะเขี้ยวสั้นและเคลื่อนไหวไม่ได้ ได้แก่ จำพวกงูทะเล ลักษณะพิเศษ คือ หัวเล็ก ลำตัวยาว มีลายที่ลำตัวเป็นปล้องๆ สีขาวหรือสีเหลือง สลับกับสีเทาหรือดำ

4. Colubridae พิษงูในกลุ่มนี้จะเกิด procoagulant effects และ hemorrhagic ทำให้ตามอวัยวะต่างๆของร่างกายมีเลือดออก ได้แก่ งู Rhabdophis tigrinis ที่พบในประเทศไทย คือ งูลายสาบคอดแดง (*Rhabdophis subminiatus*) ซึ่งมีลักษณะคล้ายงูเขียวแต่หางไม่มีสีน้ำตาล มีสีแดงที่คอ ซึ่งมีเขี้ยวพิษอยู่ด้านในสุดของกรามบน (back fanged snakes) ลักษณะเขี้ยวพิษสั้น มักไม่พบอัตราของผู้ที่ถูกงูชนิดนี้กัดเท่าไรนัก อย่างไรก็ตามบางรายงานพบว่ามีผู้เสียชีวิตจากการถูกงูชนิดนี้กัดแล้ว^[4,52]

2.3 งูกะปะ (Malayan pit viper, *Calloselasma rhodostoma*)

ลักษณะของงูพิษ/แหล่งที่พบ งูกะปะ (อังกฤษ: Malayan pit viper) เป็นงูพิษที่มีพิษรุนแรงมากอันดับ 1 ในภาคใต้ของประเทศไทย มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Calloselasma rhodostoma* เป็นงูเพียงชนิดเดียวในสกุล *Calloselasma* ลักษณะลำตัวของงูกะปะจะอ้วน หางเรียวยาว ด้านข้างลำตัวมีลายลักษณะคล้ายหลังคaban ลำตัวสีเทาอมชมพูลายสีน้ำตาลเข้ม เกล็ดมีขนาดใหญ่ จะงอยปากงอนขึ้นข้างบน ส่วนหัวเป็นรูปสามเหลี่ยม คอเล็ก มักหากินในเวลาพลบค่ำและกลางคืน โดยเฉพาะช่วงเวลาที่มีความชื้นในอากาศสูง เช่น ในช่วงฤดูหลังฝนตก มักพบอาศัยบริเวณที่มีใบไม้เพื่อซ่อนตัว เวลาตกใจจะขดตัวนิ่ง มีความไวในการฉกกัด งูกะปะจะมีความยาวเต็มที่ประมาณ 1 เมตร เป็นงูที่มีการปรับตัวได้ดีเพื่อดำรงชีวิตอยู่ได้ โดยเฉพาะในพื้นที่ที่มีการทำเกษตรกรรมได้ เช่น บริเวณสวนปาล์มน้ำมัน และสวนยางพารา^[42] งูกะปะจัดเป็นงูพิษที่มีความรุนแรงมากอันดับ 1 ในภาคใต้ของประเทศไทย

อาการแสดงของผู้ป่วยเมื่อได้รับพิษงูกะปะ ผู้ป่วยที่ถูกกัดหลังจาก 10 นาที พบว่าบริเวณรอบแผลที่ถูกกัดจะบวมอย่างรวดเร็ว และบวมเพิ่มกระจายอย่างรวดเร็วภายใน 1 ชั่วโมง จะมีเลือดไหลออกตามรอยเขี้ยวกัดตลอดเวลา บริเวณแขนขาที่บวมจะมีสีเขียวคล้ำ ผิวหนังเกิดพองและเน่าในที่สุด พิษของงูกะปะมีผลรบกวนต่อความดันโลหิตอย่างมาก ดังนั้นผู้ที่โดนกัดจะเสียชีวิตได้จากความดันโลหิตต่ำ ซึ่งความดันโลหิตต่ำนั้น เกิดจากการที่ผู้ป่วยเสียเลือดมาก^[26,41]

กลไกการออกฤทธิ์ของพิษงูกะปะ พิษของงูกะปะนั้น มีผลต่อระบบไหลเวียนโลหิต (hemorrhagins) ซึ่งเกี่ยวข้องกับ Coagulation factors ทำให้เกิดปัจจัยการแข็งตัวของเลือดและเกล็ดเลือดที่ผิดปกติ ส่งผลให้เลือดออกในเนื้อเยื่อของร่างกาย จากการศึกษางานวิจัยของ Slagboom และคณะ ในปี 2017 บ่งบอกว่า พิษของงูกะปะมีผลต่อที่รุนแรงต่อระบบโลหิต มีผลต่อความดันโลหิตอย่างมาก ผู้ที่โดนกัดจะเสียชีวิตได้จากความดันโลหิตต่ำ^[26,54] จากการศึกษาพบว่าพิษงูส่วนใหญ่จะมีการสะสมของพิษที่ไต และขับถ่ายออกทางปัสสาวะ แต่เนื่องจากงูกะปะเป็นงูที่อยู่ในกลุ่ม Crotalinae จะพบการสะสมของพิษทั้งในไต ปอดและตับ ซึ่งจะถูกขับถ่ายออกทางน้ำดี^[4] และนอกจากนี้ยังพบว่าพิษของงูกะปะยังมีผลต่อระบบประสาทรวมได้อีกด้วย^[45]



รูปที่ 2-1 งูกะปะ (Malayan pit viper, *Calloselasma rhodostoma*)

Ismail และคณะ (2014).

2.4 งูเขียวหางไหม้ (Green Pit Viper, *Trimeresurus* spp)

ลักษณะของงูพิษ/แหล่งที่พบ งูเขียวหางไหม้ (Green Pit Viper) อยู่ในตระกูล Viperidae อยู่ในวงศ์ย่อย Crotalinae เช่นเดียวกับงูแก้วหางแดง (Hargen pit viper, *Trimeresurus* spp.) ซึ่งจัดเป็นงูตระกูลเดียวกัน มักพบกระจายในแถบเอเชีย มีการกระจายพันธุ์อย่างกว้างขวางตั้งแต่ทะเลทรายไปจนถึงป่าฝน จากการศึกษาวิจัยพบว่า มีประชากรงูชนิดนี้กัดกระจายอยู่ประเทศลาว บริเวณฮ่องกง ไต้หวัน ไทย จีน ศรีลังกา และญี่ปุ่น (Viravan, et al., 1992)^[21] นอกจากนี้ยังมีรายงานยืนยันผลของพิษชนิดนี้อีกว่า ส่งผลโดยตรงต่อระบบไหลเวียนโลหิต โดยเกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือด ทำให้เลือดแข็งตัวน้อยลง เป็นผลให้เกิดภาวะเลือดออกง่ายในอวัยวะต่างๆ

(Witharana, et al., 2019)^[43] อย่างไรก็ตามผลกระทบที่เกิดกับประชากรที่ถูกกักอาจทำให้เกิดผลข้างเคียงอื่นๆหลายอย่างได้ เช่นภาวะช็อกจากการถูกพิษหรือทำให้เกิดภาวะภูมิแพ้ (Sivaganabalan, et al., 2017)

อาการแสดงของผู้ป่วยเมื่อได้รับพิษงูเขียวหางไหม้ มีอาการปวดบวมชัดเจน ผิวหนังพองลักษณะเป็นถุงน้ำ (blister) หรือเกิดลักษณะที่เป็น hemorrhagic bleb บริเวณที่ถูกกัดจะมีรอยเขียวช้ำ (ecchymosis) และมีเลือดซึมผ่านรอยเขียว บางรายเกิด gangrene บริเวณที่ถูกกัด สำหรับผู้ป่วยที่ถูกงูเขียวหางไหม้กัดบางราย อาจพบ lymphangitis ซึ่งเป็นการอักเสบของท่อน้ำเหลือง และ thrombophlebitis เป็นการอักเสบของหลอดเลือดร่วมกันได้ นอกจากนี้ยังสามารถพบอาการของเลือดออกผิดปกติ ได้แก่ เลือดออกตามไรฟัน เลือดออกในเนื้อเยื่อ มีเลือดออกขณะไอ รวมถึงผู้ป่วยอาจมีปัสสาวะเป็นเลือด ความเป็นพิษต่อเม็ดเลือดอาจส่งผลให้มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำและการแข็งตัวของลิ่มเลือดที่ผิดปกติ^[60]

กลไกการออกฤทธิ์ของพิษงูเขียวหางไหม้ งูเขียวหางไหม้ออกฤทธิ์คล้าย thrombin มีการกระตุ้น Fibrinogen ให้เป็น Fibrin โดยการกระตุ้นนี้จะไม่เกิด cross-linked fibrin ทำให้ได้เพียง fibrin monomer ดังนั้นจึงส่งผลให้ไม่เกิดภาวะ DIC; disseminated intravascular coagulation หรือลักษณะของการมีเลือดออกผิดปกติ ภาวะนี้เกิดจากการที่ fibrinogen ถูกใช้จนหมดนั่นเอง นอกจากนี้พิษงูชนิดนี้ยังมีผลทำลายเกล็ดเลือดได้อีกด้วย^[41]



รูปที่ 2-2 งูเขียวหางไหม้ (Green Pit Viper, *Trimeresurus* spp)

<https://www.doctor.or.th/clinic/detail/7191>

2.5 งูแก้วหางแดง (Hagen's Pit Viper, *Trimeresurus hageni*)

ลักษณะของงูพิษ/แหล่งที่พบ งูแก้วหางแดง (อังกฤษ : Hagen pit viper) อยู่ในตระกูล Viperidae อยู่ในวงศ์ย่อย Crotalinae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Trimeresurus* spp. ลักษณะโดยทั่วไป ส่วนหัวจะยาวมีความมนใหญ่ ส่วนคอเล็กแคบ ตัวอ้วนแต่สั้น ปลายหางมีสีแดงชัดเจน ลำตัวมีสีเขียวอมเหลืองสด บางตัวมีสีเขียวอมน้ำเงิน หางสีแดงสด บางตัวมีหางสีแดงคล้ำเกือบเป็นสีน้ำตาล^[21] พบกระจายอยู่ทั่วไปในประเทศไทย อยู่ตามต้นไม้ ดังนั้นผู้ประกอบอาชีพเกษตรกรรมในพื้นที่เก็บผลไม้จึงมักโดนงูชนิดนี้กัดในระหว่างที่เก็บผลไม้ ซึ่งพบมากบริเวณภาคกลาง เช่น กรุงเทพฯ นครปฐม ราชบุรี กาญจนบุรี ปทุมธานี อุรุธยา อ่างทอง สระบุรี ลพบุรี และชลบุรี ภาคใต้บางพื้นที่ นอกจากนี้ยังพบมากใน อินเดีย จีน พม่า ศรีลังกา

อาการแสดงของผู้ป่วยเมื่อได้รับพิษงูแก้วหางแดง อาการจะคล้ายกับงูเขียวหางไหม้ โดยผู้ป่วยจะมีอาการปวด มี hemorrhagic bleb ลักษณะผิวหนังที่ถูกกัดจะมีรอยเขียวช้ำ หรือเรียกว่า ecchymosis บางรายอาจมีเลือดซึมออกจากรอยแผลที่โดนเขี้ยวพิษ มีเนื้อตายคล้ำเป็นสีเขียว ในผู้ป่วยบางรายพบการอักเสบของท่อน้ำเหลืองและการอักเสบของหลอดเลือดร่วมด้วยได้เช่นกัน^[26]

กลไกการออกฤทธิ์ของพิษงูแก้วหางแดง งูแก้วหางแดงเป็นงูในกลุ่มที่มีพิษต่อระบบไหลเวียนโลหิต (hemorrhagins) เช่นเดียวกับงูกะปะ แต่ระดับความรุนแรงจะน้อยกว่าพิษ serine protease และ metalloproteinase มีการวิเคราะห์ความเป็นพิษของพิษต่อ monocyte ของมนุษย์และ fibroblast ที่ผิวหนังและทั้งคู่แสดงให้เห็นถึงความับพิษต่อเซลล์



รูปที่ 2-3 งูแก้วหางแดง (Hagen's Pit Viper, *Trimeresurus hageni*)
Ismail และคณะ (2014).

อาการแสดงเฉพาะของงูในกลุ่ม Viperidae คือ เกิดความผิดปกติของการแข็งตัวของเลือด โดยเลือดจะไม่แข็งตัว ส่งผลให้เลือดออกตามอวัยวะต่างๆ เช่น ผิวหนัง ไรฟัน รอยเข็ม หรือแผลเก่า บางรายมีเลือดกำเดาไหล เลือดออกขณะไอ บางรายเลือดออกในสมองร่วมด้วย หรือบางรายนเกิดอาการช็อคจากการที่เลือดออกมากใน tissue พิษงูในกลุ่มนี้เป็นพิษต่อระบบการทำงานของหัวใจ ทำให้หัวใจเต้นผิดจังหวะ บางรายชักนำให้เกิดไตวายเฉียบพลันได้ ในบางรายพบลักษณะการแพ้แบบ anaphylactic reaction ซึ่งผู้ป่วยจะมีอาการปวดท้อง บวมตามบริเวณต่างๆ เหงื่อออก มีตาแดง หน้าแดง และริมฝีปากเป็น angioneurotic edema เกิดจาก autopharmacologic substances ซึ่งเป็นสารคัดหลั่งในพิษงู อาการจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจากพิษงูเข้าสู่ร่างกาย^[1]

2.6 งูจงอาง (King cobra, *Ophiophagus hannah*)

ลักษณะของงูพิษ/แหล่งที่พบ งูจงอาง (อังกฤษ : King cobra) เป็นงูพิษที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในตระกูล Elapidae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Ophiophagus hannah* พบกระจายมากทางภาคใต้ ภาคกลางและอีสาน ตามลำดับ โดยอาศัยอยู่ตามป่าที่บึง งูจงอางนั้นมีความสามารถคล้ายกับงูเห่า คือสามารถแผ่แม่เบี้ยได้ แต่มีความพิเศษคืองูจงอางมีเกล็ดบนหัวคู่พิเศษ 1 คู่ อยู่ที่เกล็ดกระหม่อมทางด้านหลัง ซึ่งในงูเห่าจะไม่มีเกล็ดคู่นี้^[46] ลักษณะของงูจงอางส่วน หัวกลมทู่ใหญ่ ไม่มีลายดอกจัน แต่ทำเสียงขู่คล้ายงูเห่า ลำตัวเรียวยาว เป็นงูสีน้ำตาลแดงอมเขียวเป็นส่วนมาก ใต้ท้องของงูจงอางสีเหลืองเกือบขาว ใต้คอมีสีสีแดงหรือส้ม^[13] งูจงอางจะเลื้อยเชื่องช้า แต่วิ่งไวปราดเปรี้ยวเมื่อตกใจ มีนิสัยสามารถชูคอขึ้นสูง 1 ใน 3 ของความยาวลำตัว หากถูกงูชนิดนี้กัดแล้ว อัตราการรอดชีวิตนั้นน้อยมาก เพราะงูจงอางมีขนาดใหญ่ ต่อมพิษใหญ่ ปริมาณพิษที่ฉีดออกจากเขี้ยวพิษจึงมีมาก ทำให้พิษมีความรุนแรงมาก หากเปรียบเทียบความรุนแรงและปริมาณของน้ำพิษกับงูเห่าแล้ว สูงมากกว่าถึง 10 เท่า ดังนั้นจึงทำให้ผู้ที่ถูกงูจงอางกัดเสียชีวิตอย่างรวดเร็วภายในเวลาไม่ถึง 30 นาที^[54] จากการศึกษาความเป็นพิษในงูจงอางนั้นมีความน่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากพบว่าผู้ที่ถูกกัดมีอัตราการเสียชีวิตสูงถึง 75% และยังคงมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งสถิติในแอฟริกาพบผู้เสียชีวิตไม่น้อยเช่นกัน เฉลี่ย 5.9 ถึง 12.3% ต่อปี^[1]

อาการแสดงของผู้ป่วยเมื่อได้รับพิษงูจงอาง ผู้ป่วยที่ถูกงูจงอางกัดจะมีอาการ หนึ่งตาตก ขากรรไกรแข็ง พูดไม่ชัด กลืนน้ำลายไม่ได้ แน่นหน้าอก ตาพร่ามัว อ่อนเพลีย มีอาการกล้ามเนื้ออ่อนแรง และเป็นอัมพาต ส่งผลให้อาจตายได้ในที่สุด ด้วยภาวะการหายใจล้มเหลว

กลไกการออกฤทธิ์ของพิษงูจงอาง เนื่องจากพิษของงูจงอางนั้น เป็นพิษที่มีผลต่อระบบประสาท (neurotoxins) ด้วยฤทธิ์ยับยั้งกล้ามเนื้ออวัยวะประสาท ผู้ป่วยจึงมีอาการหนึ่งตาตก ขากรรไกรแข็ง พูดไม่ชัด กลืนน้ำลายไม่ได้ แน่นหน้าอก ตาพร่ามัว อ่อนเพลีย มีอาการกล้ามเนื้ออ่อนแรง และเป็นอัมพาต ในส่วนของ ลักษณะผลที่บวมแดง และเน่าลึก เพราะเนื่องจากในพิษของงูจงอางนั้นประกอบด้วยเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการบวมของแผล เช่น Acidic phospholipase A₂ (A-PLA₂) และ L-amino acid oxidase และยังมีเอนไซม์ที่ทำให้กล้ามเนื้อหรือเนื้อเยื่อต่างๆเกิดความเสียหายได้อีกด้วย เช่น เอนไซม์เจลาติเนส (gelatinase) เป็นต้น^[26]

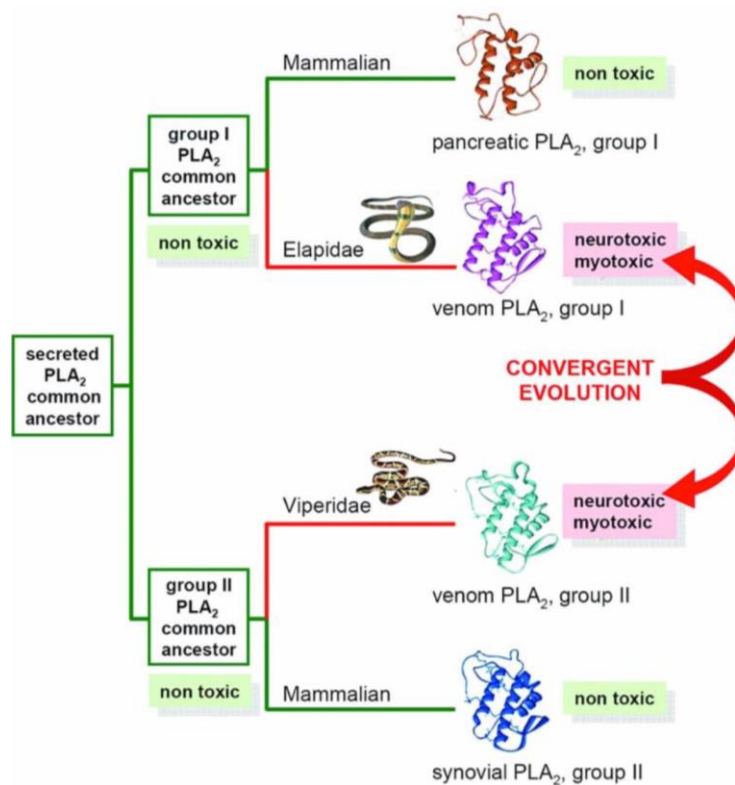


รูปที่ 2-4 งูจงอาง (King cobra, *Ophiophagus hannah*)
Ismail และคณะ (2014).

อาการเฉพาะของงูในกลุ่ม Elapidae คือ เป็นอาการที่เกิดขึ้นต่อระบบประสาท (neurotoxicity) เริ่มจากหนังตาตก (ptosis) มองเห็นภาพซ้อน (double vision) ไม่สามารถถอดแว่นตาได้ และมีอาการชาที่ริมฝีปาก ซึ่งจะเกิดขึ้นภายหลังถูกงูกัด 1-2 ชั่วโมง บางรายนาน 6-10 ชั่วโมง อาการแสดงต่อมาจะชัดเจนขึ้น โดยมีอาการ dysarthria และในที่สุดส่งผลให้เกิด respiratory failure ในบางรายอาจมีอาการแขนขาอ่อนแรง โดยพบว่าอาการเหล่านี้จะกลับคืนสู่ปกติ ภายในเวลาประมาณ 1 ชม.ภายหลังจากได้รับเซรุ่มแก้พิษงู หรือหลังจากได้รับยา anticholinesterase แต่หากใช้การรักษาแบบประคับประคอง อาจใช้เวลานาน 2-7 วัน อาการจึงจะกลับคืนสู่ภาวะปกติ^[1]

โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในพิษงู

1. Phospholipase A₂ (PLA₂) เป็นเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ neurotoxicity และ myotoxicity ซึ่งสลาย membrane phospholipid หรือ plasma membrane ส่งผลให้มีการบาดเจ็บต่อ membrane เกี่ยวข้องกับการยับยั้งกระบวนการ L-type Ca²⁺ channels^[10] ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสมดุลสารของ Ca²⁺ ใน cytosol ของกล้ามเนื้อ จึงมี Ca²⁺ เพิ่มมากขึ้นภายในเซลล์ มีผลทำให้เกิด hypercontraction ของกล้ามเนื้อ โดยออกฤทธิ์ที่ cardiac muscle ทำให้เกิด myocardial degeneration และ ออกฤทธิ์ที่ skeletal muscle เกิดลักษณะ myodegeneration และ necrosis คือ เซลล์จะมีลักษณะบวม, striation เสียหาย, เกิดการ disruption ของ myofibrils, clumped myofibrils นอกจากนี้เอนไซม์นี้ยังมีความสำคัญอย่างมากต่อการเกิด hypotension หัวใจเต้นช้าลง ทำให้คลื่นไฟฟ้าหัวใจผิดปกติ, tissue necrosis, flaccid paralysis, anticoagulation ซึ่ง PLA₂ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ PLA₂-I, PLA₂-II^[25] (รูปที่ 5)



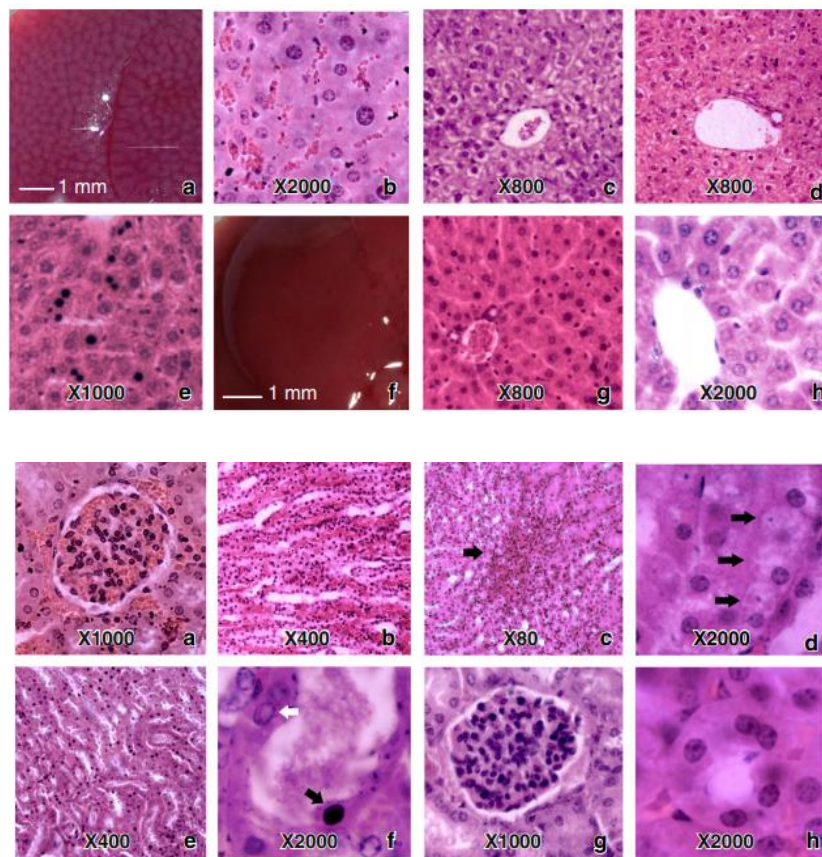
รูปที่ 2-5 toxic activities of snake venom phospholipase A₂ (PLA₂)

Lomonte และคณะ. (2011)

2. **L-aminoacid oxidase (LAO)** เป็น flavoenzyme ที่ช่วยเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Catalytic Oxidation) ทำให้เกิดอาการบวมจาก hydrogen peroxide ซึ่งมาจากกระบวนการ enzyme-catalyzed oxidative deamination ซึ่งมีฤทธิ์ cytotoxicity โดยจะไปลดความสามารถในการเกาะกัน ของเซลล์และไปยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์โดยกลไกการออกฤทธิ์นั้นเกิดจากการออกฤทธิ์จะเกิดที่ L-amino acid oxidase ซึ่งไปยับยั้ง thymidine uptake ของเซลล์ มีผลต่อการรวมตัวของ platelet และทำให้เกิดการ apoptosis และ necrosis ของเซลล์^[20, 39]
3. **Neurotoxins** เป็นองค์ประกอบในพิษงูที่ทำลายระบบประสาท (neurotoxicity) ซึ่งเป็นโมเลกุลขนาดเล็ก สามารถถูกดูดซึมได้รวดเร็วไปตามกระแสเลือด มีกลไกการออกฤทธิ์ที่ neuromuscular junction ทำให้เกิด flaccid paralysis, ptosis, ophthalmoplegia, loss of facial tone, dysarthria และ dysphagia โดยแบ่งเป็น 2 ชนิด คือ
 - Presynaptic neurotoxins ออกฤทธิ์ยับยั้ง acetylcholine (ACh) ที่ปลายประสาท จึงไม่เกิด การนสัญญาณประสาทที่ postsynaptic membrane.
 - Postsynaptic neurotoxins ออกฤทธิ์โดยยับยั้งการจับกันของ nicotinic receptors ของ cholinergic neurons กับ acetylcholine (ACh) ที่บริเวณ motor end-plate ทำให้ ACh ไม่สามารถนำสัญญาณประสาทไปยังบริเวณ postsynaptic membrane ได้
4. **Snake venom Metalloprotease (SVMPs)** มีฤทธิ์ทำให้เกิด haemorrhage, myonecrosis, skin damage, thrombogenesis, hypotension และ inflammatory SVMPs แบ่งออกเป็น 3 class ตามขนาดและองค์ประกอบโดเมน ซึ่งมีโมเลกุลตั้งแต่ 20-100 kDa; SVMP (P-I) P-I SVMP เป็น SVMPs ที่เล็กที่สุด ทำให้เกิด edema, blisters และ infiltration ของ leukocytes ซึ่งสิ่งนี้ทำให้เกิด degranulation ของ mast cells, SVMP (P-II) ยับยั้งการรวมตัวของเกล็ดเลือด, สลายโปรตีน, ทำให้เกิดการตายของเซลล์, SVMP (P-III) หน้าทีคล้ายคลึงกัน โดยหลักๆ ออกฤทธิ์ในการทำให้เกิดเลือดออกภายในเนื้อเยื่อ^[8]

การศึกษาจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อหลังถูกงูกัดในอดีต

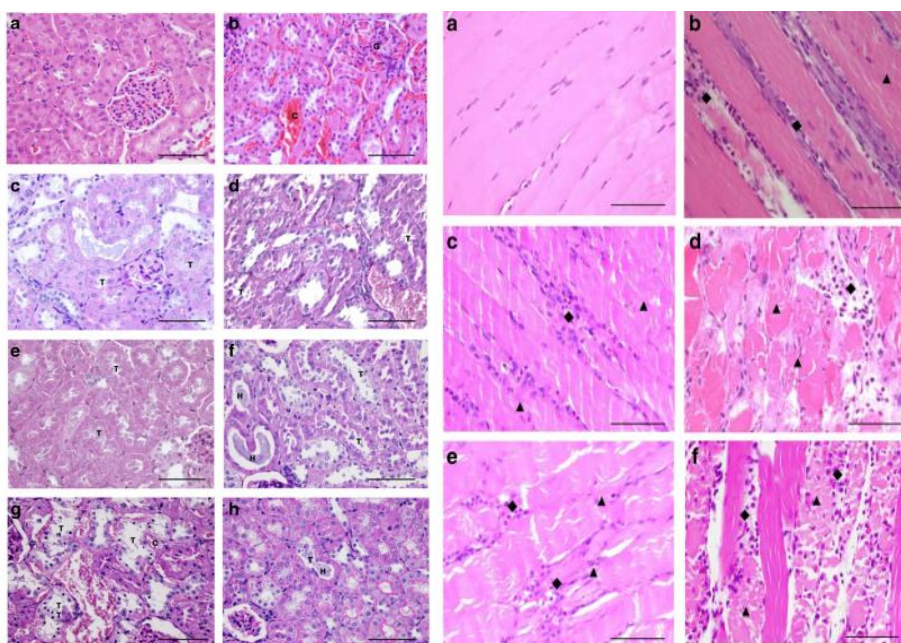
งานวิจัยของ Anjana และคณะ ในปี 2012 ศึกษาผลของ toxicity หลังได้รับพิษ hump-nosed pit vipers (*Hypnale hypnale*) จากเอเชียใต้ ซึ่งทำการศึกษาในหนู mice พบว่ามีลักษณะของการเกิด hemorrhages ในส่วน medulla, glomeruli และ vessels, เกิด renal tubular necrosis เห็นได้ชัดจาก pyknosis พบว่ามี hyaline cast ลักษณะของตับ หลังได้รับพิษ hump-nosed pit vipers (*Hypnale hypnale*) พบว่ามีลักษณะของเลือดคั่ง หรือ congestion ภายใต้อันตรายอย่างรุนแรง พิษจากเซลล์ทำให้เกิด pulmonary edema, และเกิด cell degeneration และ necrosis



รูปที่ 2-6 แสดง morphological หลังได้รับ hump-nosed pit vipers (*Hypnale hypnale*) จากเอเชียใต้ แสดงลักษณะพยาธิสภาพเนื้อเยื่อตับ (รูปบน) พยาธิสภาพในเนื้อเยื่อไต (รูปล่าง)

Silva และคณะ (2012)

งานวิจัยของ Mongkon และคณะ ในปี 2018 ได้ทำการศึกษา Non-neurotoxic activity ของงูทับสมิงคลา (*Bungarus candidus*) จากประเทศไทย ซึ่งสัตว์ทดลองได้รับการฉีดพิษเข้าทางกล้ามเนื้อ (50 µg/kg, i.m.) จากนั้นทำการ termination ที่เวลา 3, 6 และ 24 ชม. หลังจากได้รับพิษ ผลการศึกษากล้ามเนื้อ gastrocnemius พบว่า skeletal muscle แสดงระดับ myofibers สลายหรือเสียหายเล็กน้อย มีการแทรกซึมของ neutrophilic และเกิด muscle necrosis สำหรับเนื้อเยื่อไตพบการเปลี่ยนแปลงของ morphological ตั้งแต่ระดับเล็กน้อยจนถึงปานกลาง พบ interstitial vessels congestion, hyaline cast, ลักษณะของ tubular injury, มีการขยายกว้างของ renal capillary ทำให้เห็นเป็นลักษณะโครงสร้างภายในอัดแน่น การสัมผัสพิษที่เวลา 24 ชม. พบว่าเกิด loss of brush border และ congestion กระจายหนาแน่นเป็นวงกว้าง



รูปที่ 2-7 แสดง morphological หลังได้รับพิษงูทับสมิงคลา (*Bungarus candidus*) จากประเทศไทย แสดงลักษณะพยาธิสภาพเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อลาย (รูปซ้าย) พยาธิสภาพในเนื้อเยื่อไต (รูปขวา)

Charoenpitakchai และคณะ (2018)

งานวิจัยของ David ในปี 1989 ศึกษาพิษของ Russell's viper ซึ่งเป็นงูพิษในวงศ์ viperidae งูพิษกลุ่มนี้จะมีผลต่อระบบไหลเวียนโลหิต องค์ประกอบของพิษมีโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยการแข็งตัวของเลือด โดยพบว่า PLA₂ ทำให้เกิดการสลายของเม็ดเลือด ภาวะสลายของเนื้อเยื่อ มีผลต่อระบบประสาทร่วมด้วย พบลักษณะหลอดเลือดมีการขยายตัว และพิษมีผลต่อการเกิดภาวะ shock ได้ด้วย^[15]

งานวิจัยของ Hutton ในปี 1990 ทำการศึกษาการถูกงูกัดในไทยของ *T. albolabris* และ *T. macrops* พบว่ามีผลกระทบทางคลินิก คือ *T. macrops* สามารถทำให้ผิวหนังของเหยื่อเกิดอาการบวม และเจ็บปวดเฉพาะที่ ภายในเนื้อเยื่อพบ neutrophil มากกว่าปกติ หรือ leukocytosis และ thrombocytopenia เป็นภาวะที่ร่างกายมีจำนวนเกล็ดเลือดต่ำกว่าค่าปกติ สำหรับ *T. albolabris* พบว่าสามารถทำให้เกิดความรุนแรงมากขึ้น โดยพบลักษณะของแผลพุพองและมีการตายของเนื้อเยื่อ หรือการ necrosis ของเซลล์ อาจเกิดภาวะ shock พบว่าเกล็ดเลือดต่ำ และพบกลุ่มของ neutrophil กระจายตัวอยู่ภายในเนื้อเยื่อ ยังไม่มีหลักฐานของการแข็งตัวของเลือด^[23]

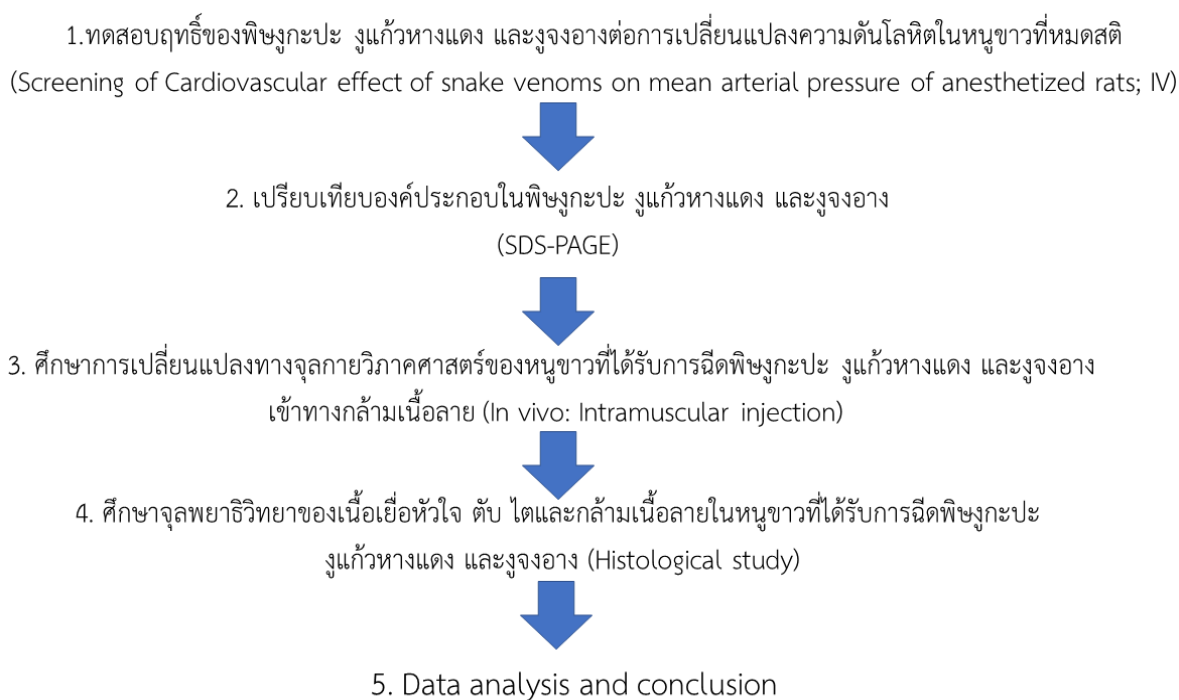
งานวิจัยของ Zeng ในปี 2019 เป็นกรณี case ของผู้ป่วยโดยงูพิษกัด *Trimeresurus stejnegeri* กล่าวว่าผู้ป่วย 309 ราย จะพบอาการแทรกซ้อนนี้ในทางคลินิกเพียง 8 รายเท่านั้น โดยผู้ป่วยรายนี้มีอาการ Acute cerebral infarction หลังถูกกัดเริ่มแรกผู้ป่วยมีอาการปวดและบวมอย่างรุนแรง มีผื่นแดงเฉพาะที่ และ เกิดอาการที่เรียกว่า ecchymosis หรือ ลักษณะของจ้ำเลือดที่เกิดขึ้นเอง ภายหลังจากกัดเพียงไม่กี่วินาที อย่างไรก็ตามการถูกงู *T. Stejnegeri* กัดสามารถนำไปสู่ภาวะกล้ามเนื้ออ่อนแรง อย่างไรก็ตามอาการของสมองขาดเลือดเฉียบพลัน ยังอธิบายได้ด้วยกลไกความเสียหายของการไหลเวียนโลหิต ซึ่งเกิดจากการแข็งตัวของเลือด ส่งผลให้สมองขาดเลือด^[66]

จากงานวิจัยของ Sitprija ในปี 2006 พบว่า ภาวะไตวายเฉียบพลัน หรือ acute kidney injury เกี่ยวข้องกับพิษงูที่มีผลต่อ myotoxicity และพิษงูที่มีผลต่อการแข็งตัวของเลือด พยาธิสภาพที่เกิดขึ้นต่อเนื้อเยื่อสามารถทำให้เกิดการสลายของเนื้อเยื่อ การศึกษาลักษณะพยาธิสภาพต่อไตพบว่า เกิดภาวะ mesangiolytic, glomerulonephritis, vasculitis, tubular และ interstitial nephritis โดยการ necrosis นั้นเป็นพยาธิสภาพสำคัญของการเกิดภาวะไตวายเฉียบพลันด้วย^[51]

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 วิธีการดำเนินการวิจัยและสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล แบบแผนการวิจัย



รูปที่ 3-1 แสดงแบบแผนการวิจัย

3.2 ลักษณะตัวอย่างหรือประชากรที่ทำการศึกษา

เป็นงานวิจัยเชิงทดลอง (experimental study) โดยใช้หนูขาวเพศผู้พันธุ์ Sprague-Dawley น้ำหนัก 250-300 กรัม จากบริษัทโนมูระ สยาม จำกัด การใช้สัตว์ทดลองในการศึกษาในครั้งนี้ได้ผ่านการพิจารณาจริยธรรมจากหน่วยสัตว์ทดลองและคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรม วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า กรมแพทยทหารบก

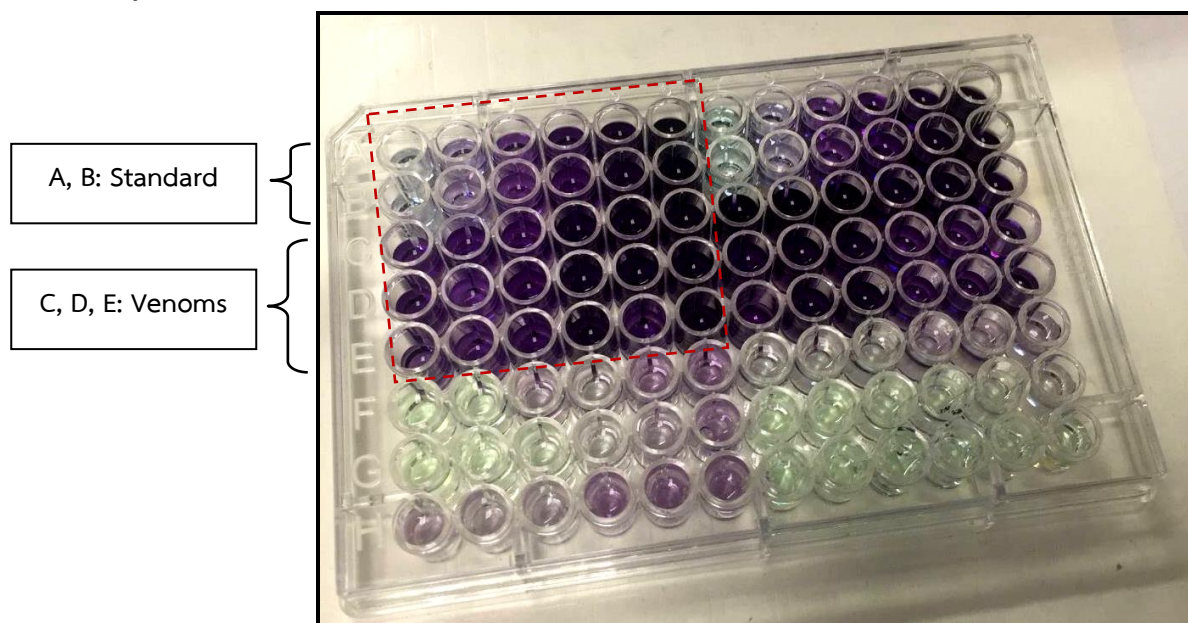
แหล่งที่มาพิษงู

พิษงูกะปะ (*Calloselasma rhodostoma* venom: CRV) รีดจากงูกะปะของประเทศมาเลเซีย และพิษงูแก้วหางแดง (*Trimeresurus hageni* venom: THV) รีดจากงูแก้วหางแดงของประเทศอินโดนีเซีย ชนิดไลโอไฟล์ซึ่ได้จาก Latoxan Laboratory ประเทศฝรั่งเศส พิษงูจงอาง (*Ophiophagus hannah* venom; OHV) รีดจากงูกะปะของประเทศมาเลเซียจาก Jeffrey Cheah School of Medicine and Health Sciences, Monash University Sunway Campus ประเทศมาเลเซีย

การเตรียมพิษงู

Protein assay

หาปริมาณความเข้มข้นโปรตีนของพิษงู 3 ชนิดได้แก่ พิษงูกะปะ พิษงูเขียวหางไหม้ และพิษงูจงอาง โดยนำพิษงูที่ lyophilize มาละลายกับ DW ปริมาตร 1000 μ l และถูกทำให้เจือจาง (1:2 และ 1:5) ดูดสารตัวอย่างลง well ขนาด 96 well plates ในปริมาตร 25 μ l/well จากนั้นเติมสารละลายชุดหาโปรตีน (BCA protein assay reagent kit) ที่ได้จากการเตรียมลงใน well ปริมาตร 200 μ l/well โดยการหาปริมาณโปรตีนต้องทำ standard protein ซึ่งใช้ BSA (bovine serum albumin) เป็นโปรตีนมาตรฐาน ความเข้มข้นตามลำดับดังนี้ 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.025 และ 0 mg/ml จากนั้นนำไปป่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 nm ด้วยเครื่อง ELISA plate reader spectrophotometer.



รูปที่ 3-2 แสดงภาพที่เกี่ยวข้องกับการทำ Protein assay

วิธีกำหนดขนาดตัวอย่าง

- การกำหนดจำนวนตัวอย่างสัตว์ทดลองจากการคำนวณโดยใช้สูตรสำหรับ

Student's t-test คือ $N = 2(\sigma/\Delta)^2(Z_\alpha + Z_\beta)^2$ (n = 4)

ANOVA คือ $\Phi^2 = (nD^2)/2a\sigma^2$ (n = 5)

โดยกำหนดค่า a = 8

Alpha (α) = 5 % หรือ 0.05

Beta (β) = 5 %, $\sigma = 4$

D = 14 และ

Power = 0.95 (1-0.05)

N = 5

n = number of sample in each treatment group

D = maximum difference between any two treatment

a = number of treatment for comparison

σ = standard deviation of the variable

α = type I error (0.05)

β = type II error, 1- β is the power of the test

Φ = parameter to be determined from Minitab program

โดยอ้างอิงจำนวนสัตว์ทดลองจากการคำนวณและจากงานวิจัยเดิมที่ได้รับการตีพิมพ์จาก Chaisakul, J.; Isbister, G. K.; Tare, M.; Parkington, H. C.; Hodgson, W. C., Hypotensive and vascular relaxant effects of phospholipase A₂ toxins from Papuan taipan (*Oxyuranus scutellatus*) venom. European journal of pharmacology 2014, 723, 227-33

โดยนำค่าผลต่างของผลการทดลองจากเอกสารอ้างอิงมาคำนวณ หาค่า D และ σ

Mean arterial pressure A = 56 ± 7% ลดด้วย Mean arterial pressure B = 42 ± 3%

D = 14 และ $\sigma = 4$ ด้วยโปรแกรม Minitab ในการคำนวณหาจำนวนประชากร

ซึ่งค่า n หรือจำนวนสัตว์ทดลองที่คำนวณได้ คือประชากรกลุ่มละ 4-5 ตัว

การออกแบบกลุ่มการทดลอง

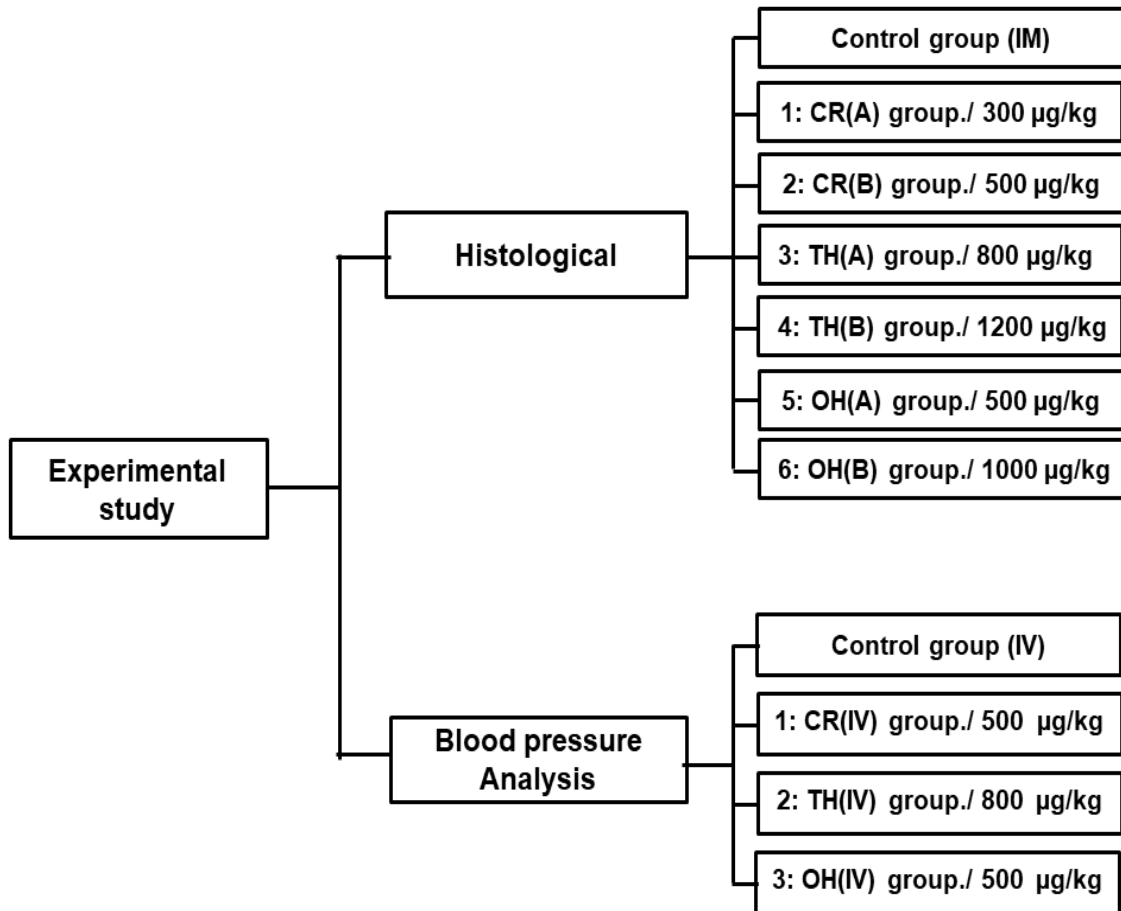
Histological studies แบ่งเป็น 7 กลุ่ม

- กลุ่มควบคุม (control) ซึ่งได้รับการฉีด normal saline ขนาด 120 μ l
- กลุ่มทดลองที่ 1 CR (A) ฉีดพิษงูกะปะ (CRV) 300 μ g/kg
- กลุ่มทดลองที่ 2 CR (B) ฉีดพิษงูกะปะ (CRV) 500 μ g/kg
- กลุ่มทดลองที่ 3 TH (A) ฉีดพิษงูแก้วหางแดง (THV) 800 μ g/kg
- กลุ่มทดลองที่ 4 TH (B) ฉีดพิษงูแก้วหางแดง (THV) 1200 μ g/kg
- กลุ่มทดลองที่ 5 OH (A) ฉีดพิษงูจงอาง (OHV) 500 μ g/kg
- กลุ่มทดลองที่ 6 OH (B) ฉีดพิษงูจงอาง (OHV) 1000 μ g/kg

In vivo study; Anesthetized rat preparation แบ่งเป็น 3 กลุ่ม

- กลุ่มควบคุม ซึ่งได้รับการฉีด normal saline ขนาด 120 μ l
- กลุ่มทดลองที่ 1 CR ฉีดพิษงูกะปะ (CRV) 500 μ g/kg
- กลุ่มทดลองที่ 2 TH ฉีดพิษงูแก้วหางแดง (THV) 800 μ g/kg
- กลุ่มทดลองที่ 3 OH ฉีดพิษงูจงอาง (OHV) 500 μ g/kg

การเลี้ยงและดูแลหนูทุกกลุ่มก่อนการทดลอง หนูทุกกลุ่มจะได้รับอาหารและน้ำอย่างเพียงพอ



ภาพที่ 3-3 แสดงการแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลองในการทดสอบพิษงูกะปะ (CRV), พิษงูแก้วหางแดง (THV), และพิษงูจงอาง (OHV)

3.3 ศึกษาผลของพิษงูต่อความดันโลหิตในหนูขาว (*In vivo study; Anesthetized rat preparation*)

การศึกษาผลของพิษงูต่อความดันโลหิตใช้ หนูขาวเพศผู้พันธุ์ Spraque-Dawley หนัก 250-350 กรัม โดยถูกแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มทดลองที่ 1 ได้รับการฉีดพิษงูกะปะ (CRV) กลุ่มทดลองที่ 2 ได้รับการฉีดพิษงูแก้วหางแดง (THV) และกลุ่มทดลองที่ 3 ได้รับการฉีดพิษงูจงอาง (OHV) ขนาด 500 µg/kg โดยพิษถูกดำเนินการฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำ (intravenous via internal Jugular vein, IV) รายละเอียดกลุ่มทดลองมีดังนี้

กลุ่ม Control (IV)

กลุ่มควบคุม ซึ่งได้รับการฉีด normal saline ขนาด 120 µl

กลุ่มที่ 1 CR (IV)

กลุ่ม CR (A) ซึ่งได้รับการฉีดพิษงูกะปะ (CRV) ขนาด 500 µg/kg

กลุ่มที่ 2 CR (IV)

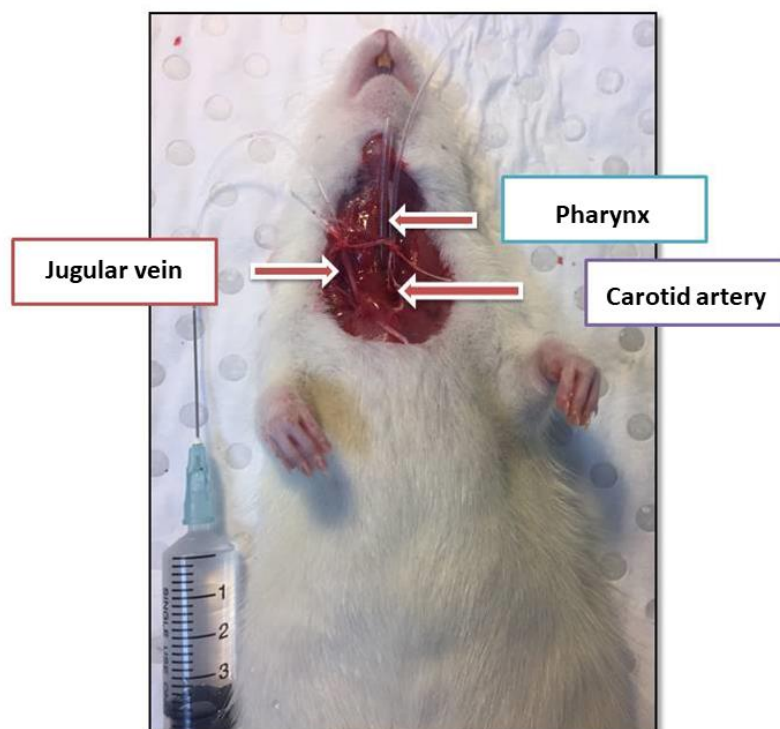
กลุ่ม CR (B) ได้รับการฉีดพิษงูแก้วหางแดง (THV) ขนาด 800 µg/kg

กลุ่มที่ 3 TH (IV)

กลุ่ม TH (A) ได้รับการฉีดพิษงูจงอาง (OHV) ขนาด 500 µg/kg

ขั้นตอนการดำเนินการศึกษาความดันโลหิต

- สัตว์ทดลองจะถูกทำให้สลบด้วยการฉีด pentobarbitone (80-100 mg/kg) เข้าที่ช่องท้อง
- ทำการผ่าตัดเปิดบริเวณ cervical region เพื่อใส่ท่อช่วยหายใจ ผ่านทาง Pharynx
- ทำการเปิดหลอดเลือดดำ (internal jugular vein) สำหรับการฉีดพิษงู
- ความดันโลหิต (blood pressure) และอัตราการเต้นของหัวใจ (heart rate) ถูกวัดด้วยการสอดท่อ (cannula) ที่บรรจุ heparin ทางหลอดเลือดแดง carotid ผ่าน pressure transducer ที่ต่อเข้ากับเครื่อง PowerLab ความดันโลหิตจะถูกบันทึกก่อนฉีดพิษงู และหลังการฉีดพิษงู



รูปที่ 3-4 แสดงการเปิดช่องคอในหนูขาวเพื่อสอดท่อกับหลอดเลือดต่างๆ

เมื่อสิ้นสุดการทดลองทุกครั้ง สัตว์ทดลองทุกตัวจะถูกกำจัดด้วยการฉีด pentobarbital (300 mg/kg) เพื่อหยุดการเต้นของหัวใจ โดยผู้ทำการวิจัย และเก็บเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อหัวใจ ไต ตับ และกล้ามเนื้อลาย เพื่อทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป การกำจัดซากสัตว์โดยการเผา ผ่านระบบการจัดการมูลฝอยของโรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า

3.4 การศึกษาปริมาณของโปรตีนจากพืชจากงูกะปะ งูแก้วหางแดง และงูจงอาง โดยวิธี SDS-PAGE Analysis มีขั้นตอนดังนี้

เตรียม Resolving gel : 15 % gel ตาม protocol ประกอบด้วย H₂O , Tris pH 8.8 , 40%bis-acryamide,10% SDS ,10%APS และ TEMED ผสมสารเคมีให้เข้ากันตามปริมาณที่ต้องการใช้ เติม Separating gel ลงใน gel sandwich อย่างช้าๆ เพื่อลดโอกาสเกิดฟองอากาศ ปรับหน้าเจลให้เรียบด้วย Isopropanol/Absolute alcohol. จากนั้นรอเจลแข็งตัวเป็นเวลา 30 นาที จึงเท Absolute alcohol. ออก

เตรียม Stacking gel : ตาม protocol ประกอบด้วย H₂O , Tris pH 8.8 , 40%bis-acryamide,10%APS และ TEMED ผสมสารเคมีให้เข้ากันตามปริมาณที่ต้องการใช้ เติม Stacking gel ลงใน gel sandwich จากนั้นนำ comb มาใส่ระหว่างช่องว่างของกระจกและ notched alumina plates รอเจลแข็งตัวเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม Running Buffer ไปให้ท่วมเจล และค่อยๆ ดึง comb ออกจาก stacking gel ก่อนการ load protein ที่เตรียมไว้เพื่อการทดสอบ

เตรียมตัวอย่างโปรตีนทดสอบ

ใช้พืชที่ได้จากการหา protein concentration ได้แก่ พืชงูกะปะขนาดความเข้มข้น 1mg/ml , พืชงูเขียวหางไหม้ขนาดความเข้มข้น 1.35 mg/ml และพืชงูจงอางที่ขนาดความเข้มข้น 1mg/ml) มาคำนวณให้ได้ค่าความเข้มข้นในปริมาณที่ต้องการ ผสมลงใน reducing protein loading buffer และ non-reducing protein loading buffer นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเปิดพืชงูกะปะ งูแก้วหางแดง และงูจงอาง ปริมาณ 10 mg ลงใน 15%SDS-PAGE gel ที่เตรียมไว้ ตามลำดับ โดย load protein มาตรฐาน (protein marker) เพื่อใช้ในการบอกน้ำหนักโมเลกุลและติดตามการเคลื่อนที่ของโปรตีนที่สนใจ จากนั้นทดสอบโปรตีนด้วยเครื่องรันโปรตีนเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ย้อมโปรตีนด้วยสี x-press blue และนำไปอ่านค่าโปรตีนด้วยเครื่องทางห้องปฏิบัติการ

ตารางที่ 1 แสดง ปริมาตรของพิษงูที่ load ทั้ง 3 ชนิด

No.	1	2	3	4	5	6	7	8
Types	B	M	NCR	RCR	NTH	RTH	NOH	ROH
Venoms	-	7	10 μ l	10 μ l	7.40 μ l	7.40 μ l	10 μ l	10 μ l
Buffer	-	-	10 μ l	10 μ l	12.60 μ l	12.60 μ l	10 μ l	10 μ l
รวม			20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l

B = Blank

M = protein marker

NCR = non-reducing protein + CRV

RCR = reducing protein + CRV

NTH = non-reducing protein +THV

RTH = reducing protein +THV

NOH = non-reducing protein + OHV

ROH = reducing protein + OHV

3.5 การฉีดพิษงูทางกล้ามเนื้อในสัตว์ทดลองและการเก็บตัวอย่าง

แบ่งสัตว์ทดลองแบ่งออกเป็น 7 กลุ่ม ซึ่งประกอบไปด้วย กลุ่มที่ได้รับการฉีด normal saline (control), กลุ่มที่ได้รับการฉีดพิษงูกะปะ (CRV), กลุ่มที่ได้รับพิษงูแก้วหางแดง (THV) และกลุ่มที่ได้รับพิษงูจงอาง (OHV) โดยมีรายละเอียดดังนี้

กลุ่มที่ 1 Control (IM)

ได้รับการฉีด normal saline ขนาด 120 μ l

กลุ่มที่ 2 CRV (A)

ได้รับการฉีดพิษงูกะปะ (CRV) ขนาด 300 μ g/kg

กลุ่มที่ 3 CRV (B)

ได้รับการฉีดพิษงูกะปะ (CRV, ขนาด 500 μ g/kg)

กลุ่มที่ 4 THV (A)

ได้รับการฉีดพิษงูแก้วหางแดง (THV) ขนาด 800 μ g/kg

กลุ่มที่ 5 THV (B)

ได้รับการฉีดพิษงูแก้วหางแดง (THV) ขนาด 1200 μ g/kg

กลุ่มที่ 6 OHV (A)

กลุ่ม OHV (A) ฉีดพิษงูจงอาง (OHV) ขนาด 500 μ g/kg

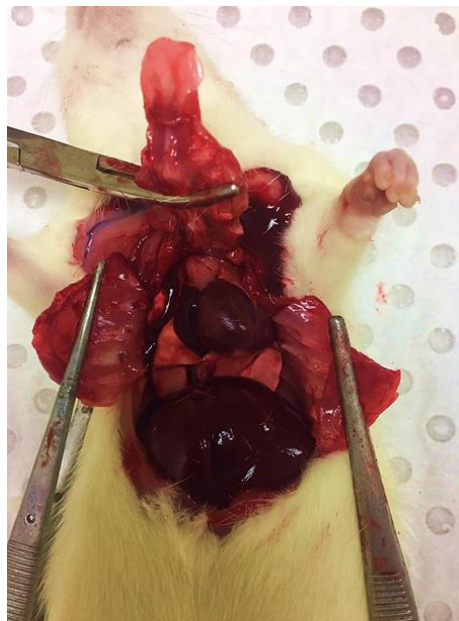
กลุ่มที่ 7 OHV (B)

ได้รับการฉีดพิษงูจงอาง (OHV) ขนาด 1 mg/kg

ขั้นตอนการฉีดพิษงู

- ชั่งน้ำหนักสัตว์ทดลอง
- ฉีด X-LAZINE และ Zoletil100 เข้าทางช่องท้อง (IP) เพื่อให้สัตว์ทดลองสงบและลดความเจ็บปวดในระหว่างทำการทดลอง
- ฉีดพิษงูเข้าทางกล้ามเนื้อ Gastrocnemius (Intramuscular injection; IM)
- กำหนดเวลาในการสัมผัสพิษหลังการฉีดที่ 24 ชั่วโมง

- เมื่อครบกำหนดเวลาการสัมผัสพิษจึงทำการการุณยฆาต โดยการฉีด Pentobarbital (100 mg/kg)
- เก็บตัวอย่างที่ต้องการศึกษา คือ หัวใจ ไตทั้งสองข้าง ตับ และกล้ามเนื้ออ่อน ใน 10% buffer formalin เพื่อนำไปทำการศึกษา วิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 3-5 แสดงการเปิดช่องอกสัตว์ทดลอง เพื่อเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ

สถานที่ทำการทดลอง: สถานสัตว์ทดลอง ภาควิชาเภสัชวิทยา กองศึกษาวิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า

3.6 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของกล้ามเนื้อหัวใจ ไต ตับ และกล้ามเนื้อลาย หลังการรับพิษจากงูกะปะ งูแก้วหางแดง และงูจงอาง อย่างละเอียด โดยใช้การศึกษาผ่านระดับจุลทรรศน์แสงสว่าง (Light microscope).

หลังจากทำการ termination และเก็บเนื้อเยื่อที่ต้องการศึกษาจากสัตว์ทดลองเรียบร้อยแล้ว เนื้อเยื่อทั้งหมดที่ถูกเก็บไว้ใน 10% buffer formalin จะนำมาเข้าสู่กระบวนการย้อมเนื้อเยื่อ โดยใช้เทคนิค Hematoxylin & Eosin Staining (H&E) รายละเอียดดังนี้

- เนื้อเยื่อที่อยู่ใน 10% buffer formalin เข้าสู่กระบวนการ processing โดยการดึงน้ำออก (dehydration) ด้วย alcohol 70%, 80%, 95% ,100% ethanol และ Xylene ตามลำดับ เป็นเวลา 22 ชั่วโมง และผ่านกระบวนการ embedding
- นำบล็อกเนื้อเยื่อที่ได้จากการ embedding มาตัดด้วยเครื่อง Microtome ที่ความหนาประมาณ 5 ไมครอน
- เนื้อเยื่อที่ตัดถูกวางบนแผ่นสไลด์ จากนั้นนำเนื้อเยื่อแผ่นสไลด์ไปย้อม H&E เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของกล้ามเนื้อหัวใจ ไต ตับ และกล้ามเนื้อลาย ด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง (LM)

การวิเคราะห์ระดับความรุนแรงของพยาธิสภาพ ดำเนินการวิเคราะห์ดังตาราง

ตารางที่ 2 แสดงระดับความรุนแรงของพยาธิสภาพเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อลาย (skeletal muscle)

Tissue change	Description	Score
Muscle necrosis	No evidence of muscle necrosis	0
	Less than 25% muscle necrosis	+
	25-50% muscle necrosis	++
	Diffuse muscle necrosis	+++

Nanayakkara, D., Ratnayake, R., & Ranasinghe, J. S. (2009)^[19]

ตารางที่ 3 แสดงระดับความรุนแรงของพยาธิสภาพเนื้อเยื่อไต (kidney)

Tissue change	Description	Score
Congestion	No congestion	0
	Focal glomeruli and interstitial vessels	+
	Diffuse glomeruli and interstitial vessels	++
	In almost all glomeruli and interstitial vessels or hemorrhage	+++
Inflammatory infiltration	No inflammatory infiltrate	0
	1-3 inflammatory foci/ section	+
	4-6 inflammatory foci/ section	++
	>6 inflammatory foci/ section	+++
Tubular injury	No evidence of tubular injury	0
	Less than 50% loss of brush border	+
	More than 50% loss of brush border with cell sloughing off	++
	In almost all tubular necrosis	+++

Nanayakkara, D., Ratnayake, R., & Ranasinghe, J. S. (2009)^[19]

ตารางที่ 4 แสดงระดับความรุนแรงของพยาธิสภาพเนื้อเยื่อตับ (liver)

Tissue change	Description	Score
Congestion	No congestion	0
	In few sinusoids and vessels	+
	In about half of sinusoids and vessels	++
	In almost all sinusoids and vessels	+++
Inflammatory infiltration	No inflammatory infiltrate	0
	1-3 inflammatory foci/ section	+
	4-6 inflammatory foci/ section	++
	>6 inflammatory foci/ section	+++
Necrosis	No necrosis	0
	Focal necrosis	+
	Zonal necrosis	++
	Confluent necrosis	+++

Nanayakkara, D., Ratnayake, R., & Ranasinghe, J. S. (2009)^[19]

ตารางที่ 5 ตารางระดับความรุนแรงของพยาธิสภาพเนื้อเยื่อหัวใจ (cardiac muscle)

Tissue change	Description	Score
Myocardial Damage	No lesions	0
	Slight derangement of muscle fibers, few inflammatory cells and vacuoles	0.5
	Focal lesions of the subendocardial portion of the apex and mid-ventricle, inflammatory cells, interstitial edema, vacuolization of myocytes	1
	Focal lesions of the subendocardium of the apical and mid ventricular region with right ventricular involvement	1.5
	Focal lesions extending over a wider area of both ventricles	2
	Focal lesions extending over a wider area of both ventricles, extensive inflammatory cell infiltration, interstitial edema, rupture of myofibers	2.5
	Confluent lesions of the apex, mid-left ventricle and right ventricle, extensive inflammatory cell infiltration, profuse edema	3
	Confluent lesions throughout the heart	4

Sachdeva, Jaspreet, et al (2014).^[18]

3.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลจากการศึกษานำเสนอในรูปแบบของค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบน โดยจะนำเสนอในรูปแบบของตาราง ร้อยละ สัดส่วน แล้วแต่กรณี สำหรับการเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลอง และเปรียบเทียบความแตกต่างข้อมูลภายในระหว่างกลุ่มโดยใช้สถิติ ANOVA กำหนดค่านัยสำคัญทางสถิติ p -value < 0.05 คำนวณโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์สถิติแบบสำเร็จรูป GraphPad Prism

3.8 ระยะเวลาที่ใช้ในการวิจัยแผนการดำเนินการวิจัย

ตั้งแต่เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2563 ถึงเดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2564

3.9 สถานที่ทำการวิจัย

- สถานสัตว์ทดลอง ภาควิชาเภสัชวิทยา มหาวิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า
จังหวัดกรุงเทพมหานคร
- ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
จังหวัดสงขลา

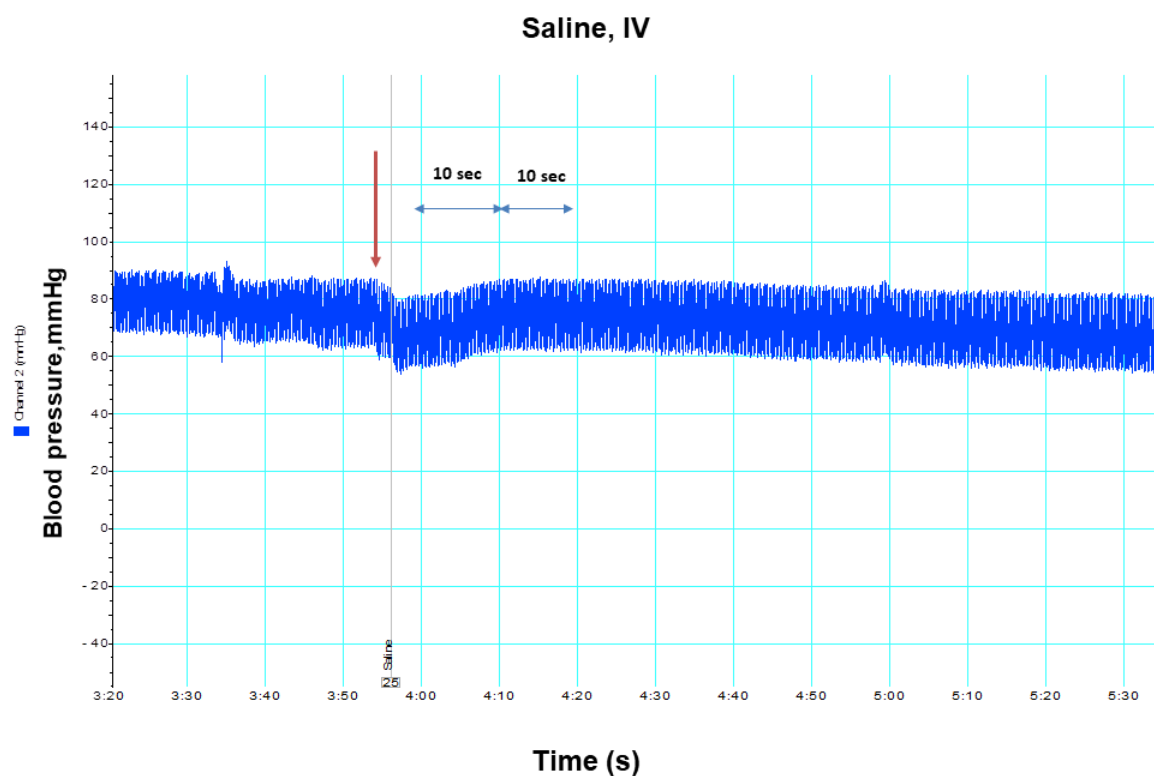
บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลของพิษงูต่อความดันโลหิตในหนูขาว

4.1.1 การเปลี่ยนแปลงความดันโลหิตหลังฉีดสารละลาย saline (Negative control)

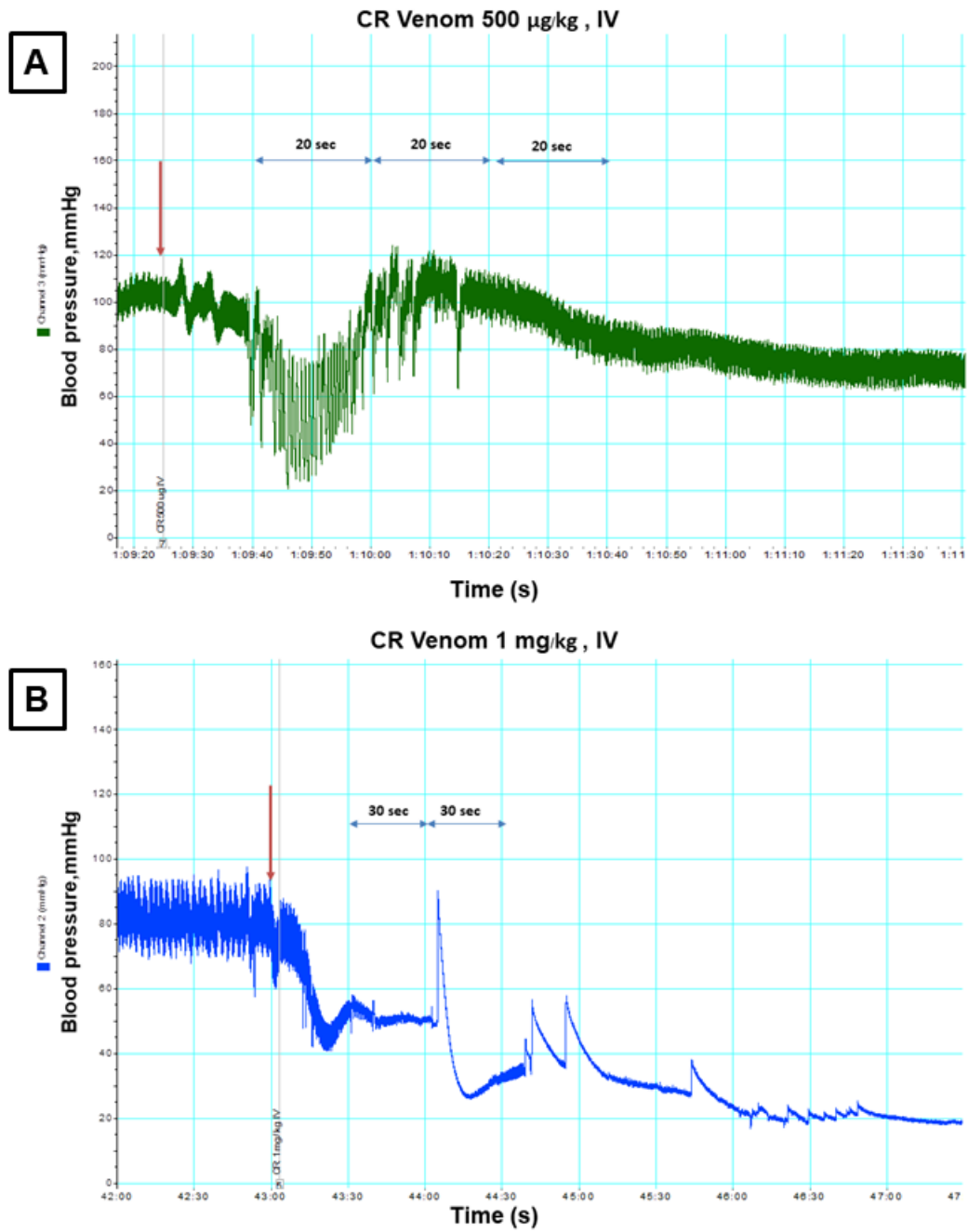
การฉีด Normal saline ขนาด 200 μ l ทางหลอดเลือดดำ (IV) มีผลลดค่า mean arterial pressure (MAP) เล็กน้อยจาก 77 mmHg เป็น 63 mmHg หลังทำการฉีดที่เวลา 5 วินาที หลังจากนั้นที่เวลาผ่านไป 15 วินาที MAP ได้ปรับตัวเพิ่มขึ้นใกล้เคียงกับ MAP ในภาวะปกติก่อนทำการฉีด (รูปที่ 4-1)



รูปที่ 4-1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา (s) กับ ความดันโลหิต (mmHg) หลังได้รับการฉีด normal saline 200 μ l ทางหลอดเลือดดำ (IV) , n = 3

4.1.2 การเปลี่ยนแปลงความดันโลหิตหลังฉีด CRV (*Calloselasma rhodostoma* venom; พิษงูกะปะ)

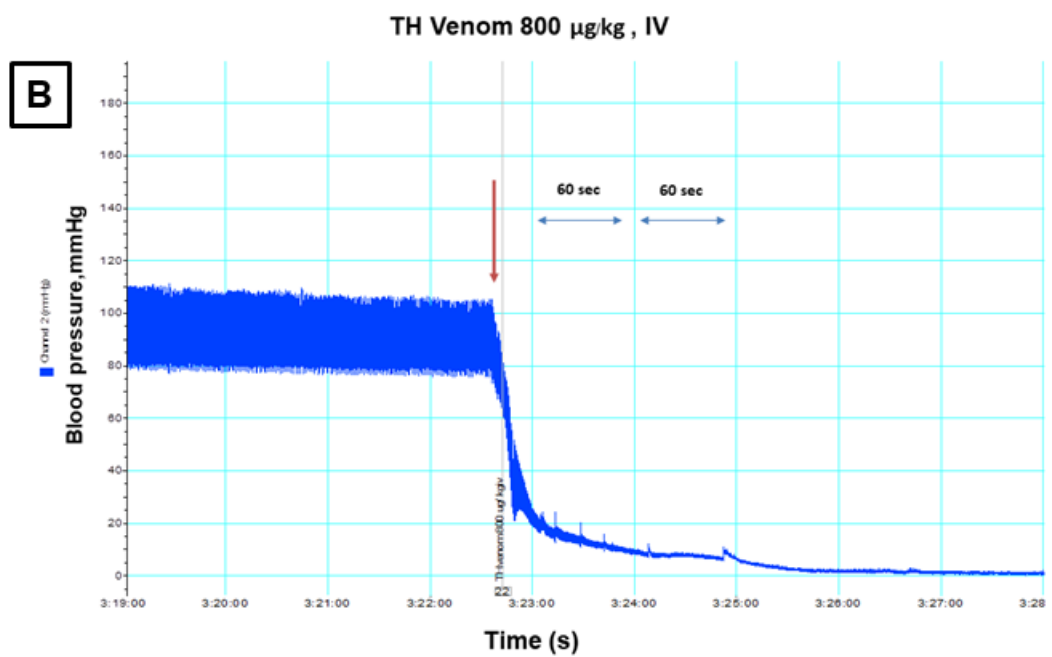
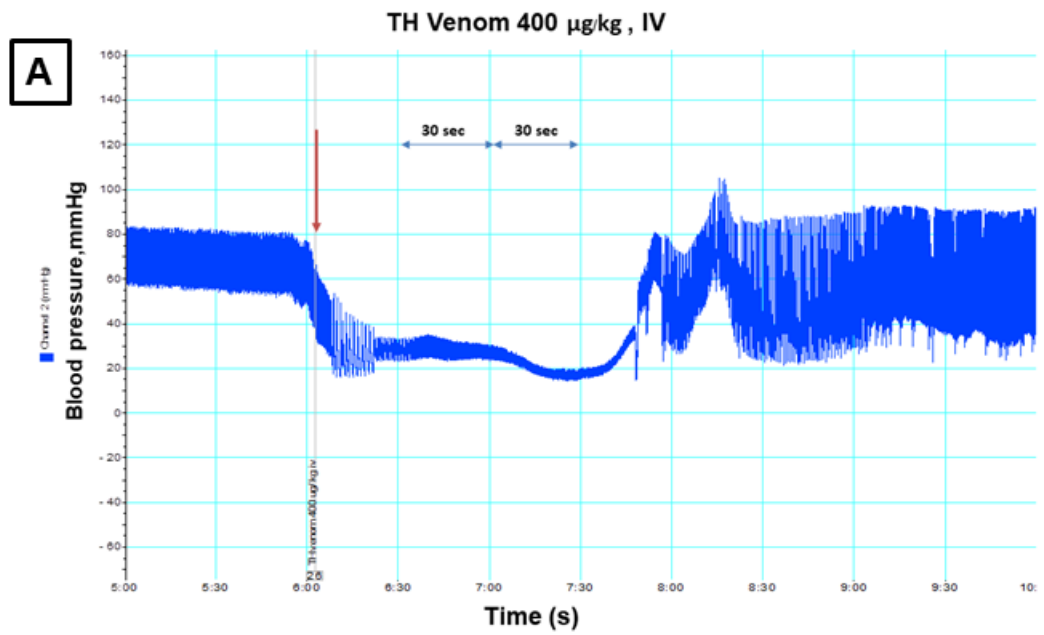
CRV ขนาด 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ มีผลลด MAP ในหนูขาวภายใน 15 วินาทีหลังทำการฉีด IV โดยลดลงจาก 102 mmHg เป็น 66 mmHg และแปรปรวนไม่คงที่อย่างต่อเนื่อง ที่เวลา 30 วินาที, 60 วินาที, และ 90 วินาที MAP มีค่า 62 mmHg, 97 mmHg, และ 80 mmHg ตามลำดับ ที่ 120 วินาที ความดันโลหิตค่อยๆปรับตัวคงที่เป็น 70 mmHg ในขณะที่ CRV ขนาด 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ มีผลลด MAP จาก 81 mmHg ก่อนฉีด เป็น 68 mmHg โดยที่เวลาหลังจาก 120 วินาที MAP ลดต่ำลงมากจนไม่สามารถวัดได้และหลังจากนั้นพบว่า การฉีด CRV ขนาด 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ เข้าทางหลอดเลือดดำ มีผลทำให้หนูขาวเสียชีวิตในที่สุด (รูปที่ 4-2)



รูปที่ 4-2 การเปลี่ยนแปลงของความดันโลหิตหลังการฉีดพิษ; (A) CRV 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ และ (B) CRV 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ทางหลอดเลือดดำ (IV), (n = 2)

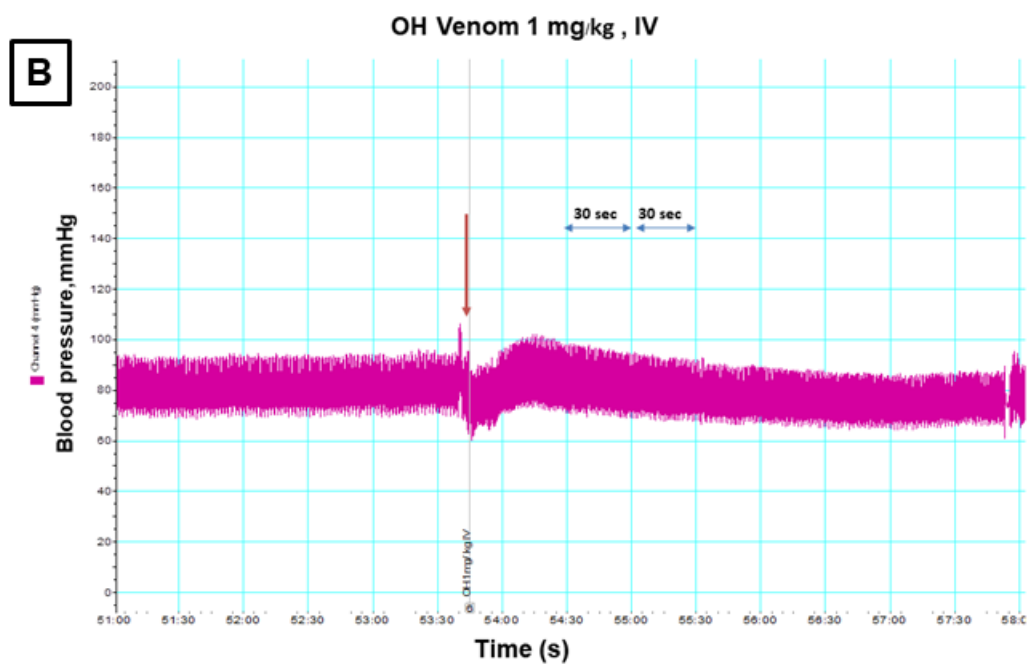
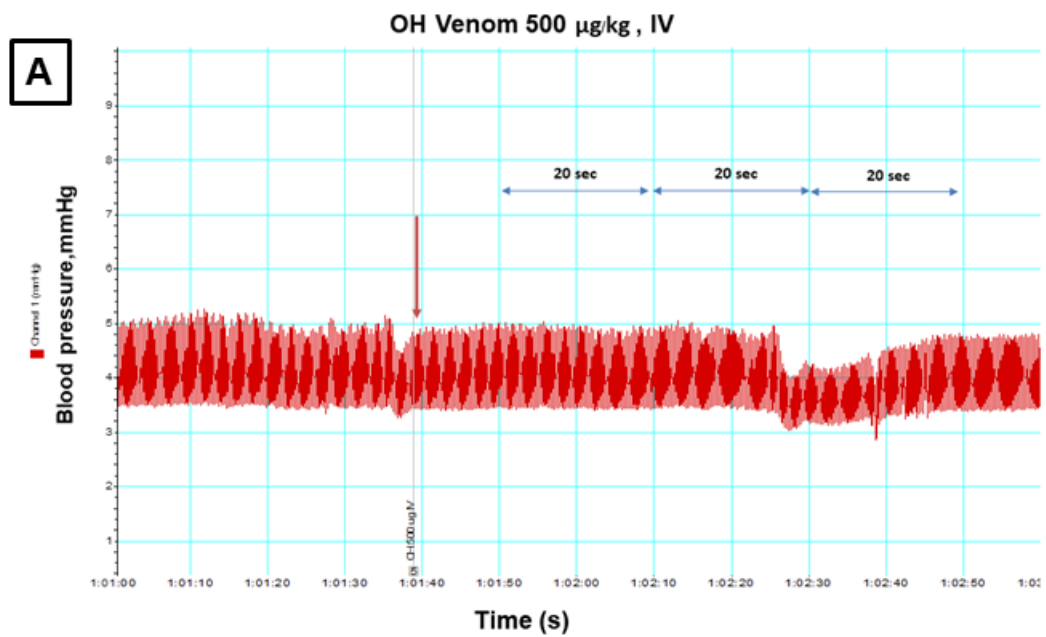
4.1.3 การเปลี่ยนแปลงความดันโลหิตหลังฉีด THV (*Trimeresurus hageni* venom; พิษงูแก้วหางแดง)

THV ขนาด 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ มีผลลดค่า MAP ในหนูขาวภายใน 15 วินาทีหลังทำการฉีด IV โดย MAP ลดลงจาก 63 mmHg เป็น 25 mmHg และต่ำลงเรื่อยๆ จนถึง ณ เวลาที่ 90 วินาที ค่า MAP ลดต่ำที่สุดที่ 16.7 mmHg และที่เวลา 120 วินาที MAP ค่อยๆปรับตัวเพิ่มขึ้นเป็น 47 mmHg ในขณะที่ THV ขนาด 1,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ มีผลลด MAP ที่เวลา 15 วินาทีจาก 82 mmHg ก่อนฉีด เป็น 21.7 mmHg โดยค่า MAP ลดต่ำลงมากเรื่อยๆเป็น 16.7 mmHg, 11.7 mmHg และ 10 mmHg จากนั้นพบว่า การฉีด CRV ขนาด 1,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ เข้าทางหลอดเลือดดำ มีผลทำให้หนูขาวเสียชีวิตในที่สุด (รูปที่ 4-3)



รูปที่ 4-3 การเปลี่ยนแปลงของความดันโลหิตหลังการฉีดพิษ; (A) THV 400 $\mu\text{g/kg}$ และ (B) THV 800 $\mu\text{g/kg}$ ทางหลอดเลือดดำ (IV), (n = 2)

4.1.4 การเปลี่ยนแปลงความดันโลหิตหลังฉีด OHV (*Ophiophagus hannah* venom; พิษจงอาง) OHV ขนาด 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ มีผลลดค่า MAP เพียงเล็กน้อย พบว่าภายใน 15 วินาทีหลังทำการฉีด IV ความดันโลหิตลดลงจาก 77 mmHg เป็น 76 mmHg และลดลงเป็น 75 mmHg, 69 mmHg ตามลำดับ หลังจากเวลา 90 วินาที MAP ค่อยๆปรับตัวขึ้นเป็น 75 mmHg ในขณะที่ OHV ขนาด 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ MAP ที่ชัดเจน (รูปที่ 4-4)

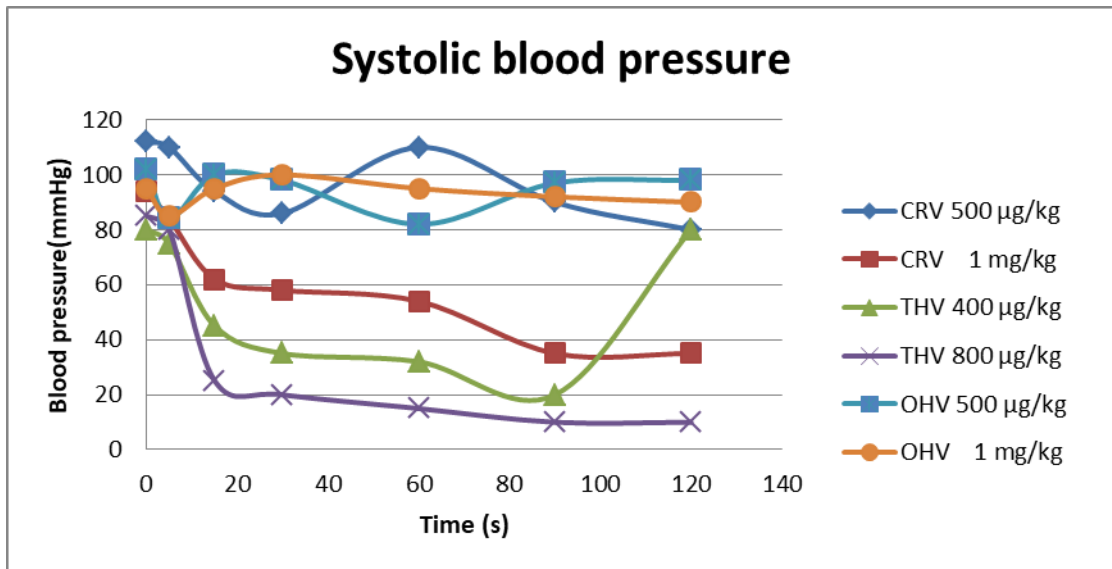


รูปที่ 4-4 การเปลี่ยนแปลงของความดันโลหิตหลังการฉีดพิษ; (A) OHV 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ และ (B) OHV 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ทางหลอดเลือดดำ (IV), (n = 2)

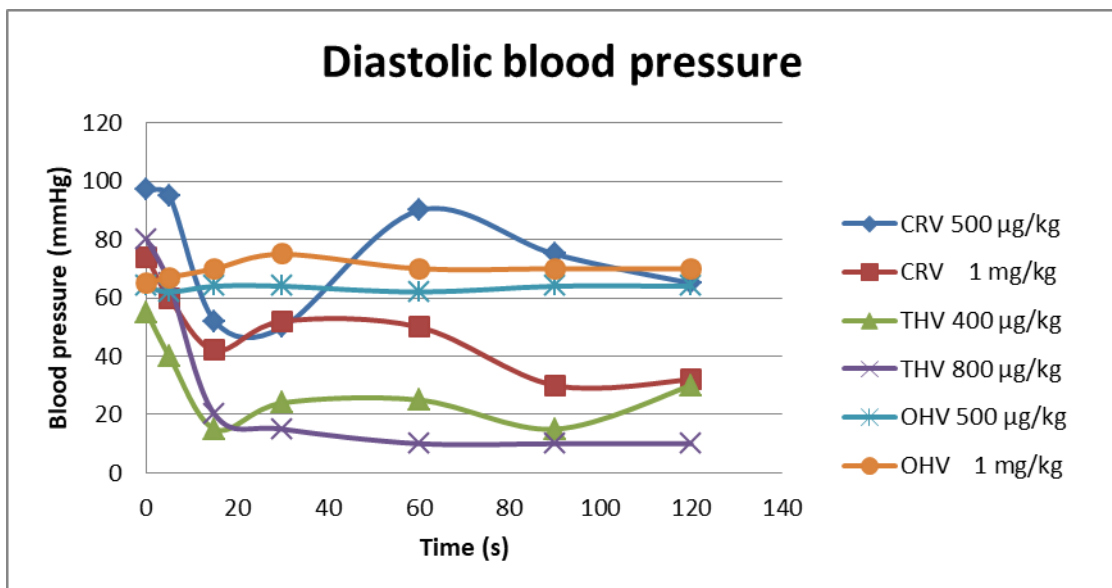
ตารางที่ 7 แสดงค่า mean arterial pressure (mmHg) ณ ช่วงเวลาต่างๆ หลังได้รับ CRV, THV และ OHV (n =2-3)

ค่าเฉลี่ยของความดันโลหิต Mean arterial pressure						
Time (s)	LOW DOSE			HIGH DOSE		
	CR 500 µg/kg	TH 400 µg/kg	OH 500 µg/kg	CR 1 mg/kg	TH 800 µg/kg	OH 1 mg/kg
Mean Arterial Pressure (MAP),mmHg						
Pre-injection point	102	63	77	81	82	75
Injection time	100	52	69	68	70	73
15	66	25	76	49	21.7	78
30	62	28	75	54	16.7	83
60	97	27	69	51	11.7	78
90	80	16.7	75	32	10	77
120	70	47	75	33	10	77

** คำนวณจากสูตร Mean Arterial Pressure (MAP) = Diastolic blood pressure (DBP) +
($\frac{1}{3}$ * Pulse pressure)



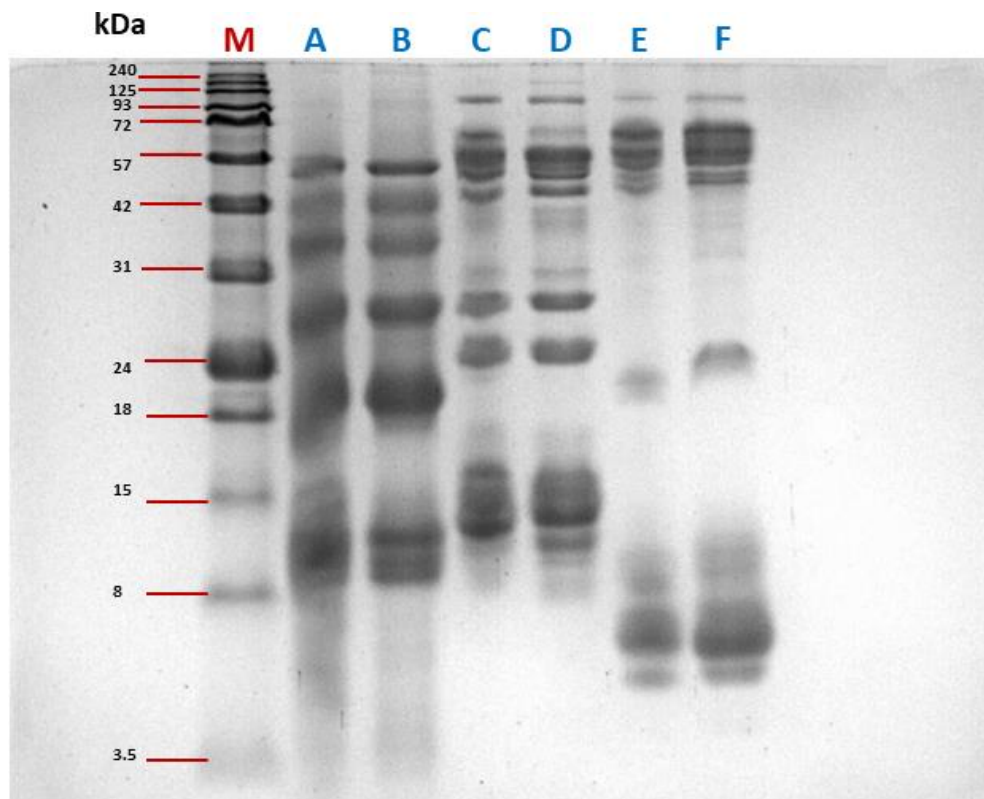
รูปที่ 4-5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความดันโลหิตตัวบน; systolic blood pressure (mmHg) กับเวลา (s) หลังได้รับ CRV , THV และ OHV (n=2)



รูปที่ 4-6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความดันโลหิตตัวล่าง; diastolic blood pressure (mmHg) กับเวลา (s) หลังได้รับ CRV , THV และ OHV (n = 2)

4.2 การวิเคราะห์โปรตีนใน CRV, THV และ OHV ด้วยวิธี SDS-PAGE analysis

การวิเคราะห์องค์ประกอบโปรตีนใน CRV, THV และ OHV ตามลำดับ (10 µg) ด้วยวิธี SDS-PAGE analysis หลังจากย้อมด้วย X-press blue พบว่า พิษงูกะปะ (CRV) ทั้งที่อยู่ในสารละลาย non-reducing (A) และ reducing (B) ประกอบด้วยแถบโปรตีน 6-7 แถบ ซึ่งมีขนาดตั้งแต่ 8 kDa ถึง 57 kDa เมื่อเปรียบเทียบกับ Molecular weight (M) โดย CRV ในสารละลาย non-reducing จะพบกลุ่มโปรตีนหนาแน่นที่ตำแหน่งโปรตีนช่วง 8-15 kDa และ 18-24 kDa (A) CRV ในสารละลาย reducing (B) พบว่ามีการแยกของแถบโปรตีนมากขึ้น โดยที่ขนาดโปรตีนในช่วง 8-15 kDa พบแถบโปรตีนจำนวน 3 กลุ่ม และในโปรตีนช่วง 18-72 kDa พบแถบโปรตีน 5 กลุ่ม พิษงูแก้วหางแดง (THV) ทั้งที่อยู่ในสารละลาย non-reducing (C) และ reducing (D) ประกอบด้วยแถบโปรตีน 8-9 แถบ ซึ่งมีขนาดตั้งแต่ 8 kDa ถึง 57 kDa เมื่อเปรียบเทียบกับ Standard marker (M) โดย THV ในสารละลาย non-reducing จะพบกลุ่มโปรตีนหนาแน่นที่ตำแหน่งโปรตีนในช่วง 8-15 kDa, 24-31 kDa และ 42-57 kDa (C) THV ในสารละลาย reducing (D) พบว่ามีการแยกของแถบโปรตีนมากขึ้น โดยที่ขนาดโปรตีนในช่วง 8-15 kDa พบแถบโปรตีนจำนวน 3 กลุ่ม และในโปรตีนช่วง 24-57 kDa พบแถบโปรตีน 6-7 กลุ่ม พิษงูจงอาง (OHV) ทั้งที่อยู่ในสารละลาย non-reducing (E) และ reducing (F) ประกอบด้วยแถบโปรตีน 7-8 แถบ ซึ่งมีขนาดตั้งแต่ 3.5 kDa ถึง 72 kDa เมื่อเปรียบเทียบกับ Molecular weight marker (M) โดย OHV ในสารละลาย non-reducing จะพบกลุ่มโปรตีนหนาแน่นในตำแหน่งโปรตีนในช่วง 3.5-8 kDa และ 42-72 kDa (E) OHV ในสารละลาย reducing (F) พบว่ามีการแยกของแถบโปรตีนมากขึ้น โดยที่ขนาดโปรตีนในช่วง 3.5-8 kDa พบแถบโปรตีนจำนวน 3 กลุ่ม และในโปรตีนช่วง 42-72 kDa พบแถบโปรตีน 4-5 กลุ่ม

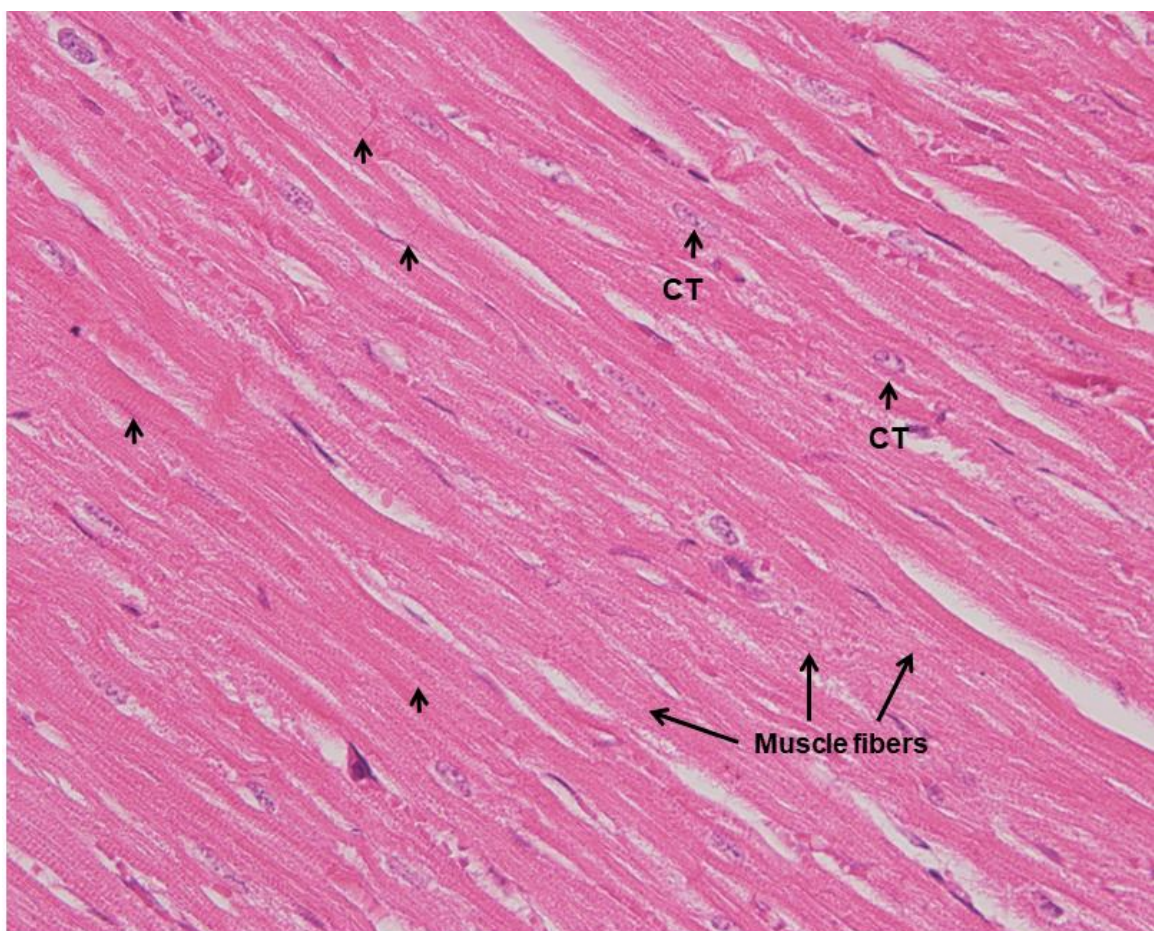


รูปที่ 4-7 การแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE (15% SDS-PAGE gel) ย้อมด้วย X-press blue; M = Molecular weight marker; A = non-reducing CRV; B = Reducing CRV; C = non-reducing THV; D = reducing THV; E = Non-reducing OHV; F = reducing OHV

4.3 ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของกล้ามเนื้อหัวใจ ไต ตับ และกล้ามเนื้อลาย หลังฉีด CRV, THV และ OHV

4.3.1 การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของกล้ามเนื้อหัวใจ (Cardiac muscle)

ในการศึกษาเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของกล้ามเนื้อหัวใจหลังฉีด CRV, THV และ OHV ด้วยวิธี Haematoxylin & Eosin staining (H&E) โดยศึกษาลักษณะของ muscle fibers, inflammatory cell และ vacuoles

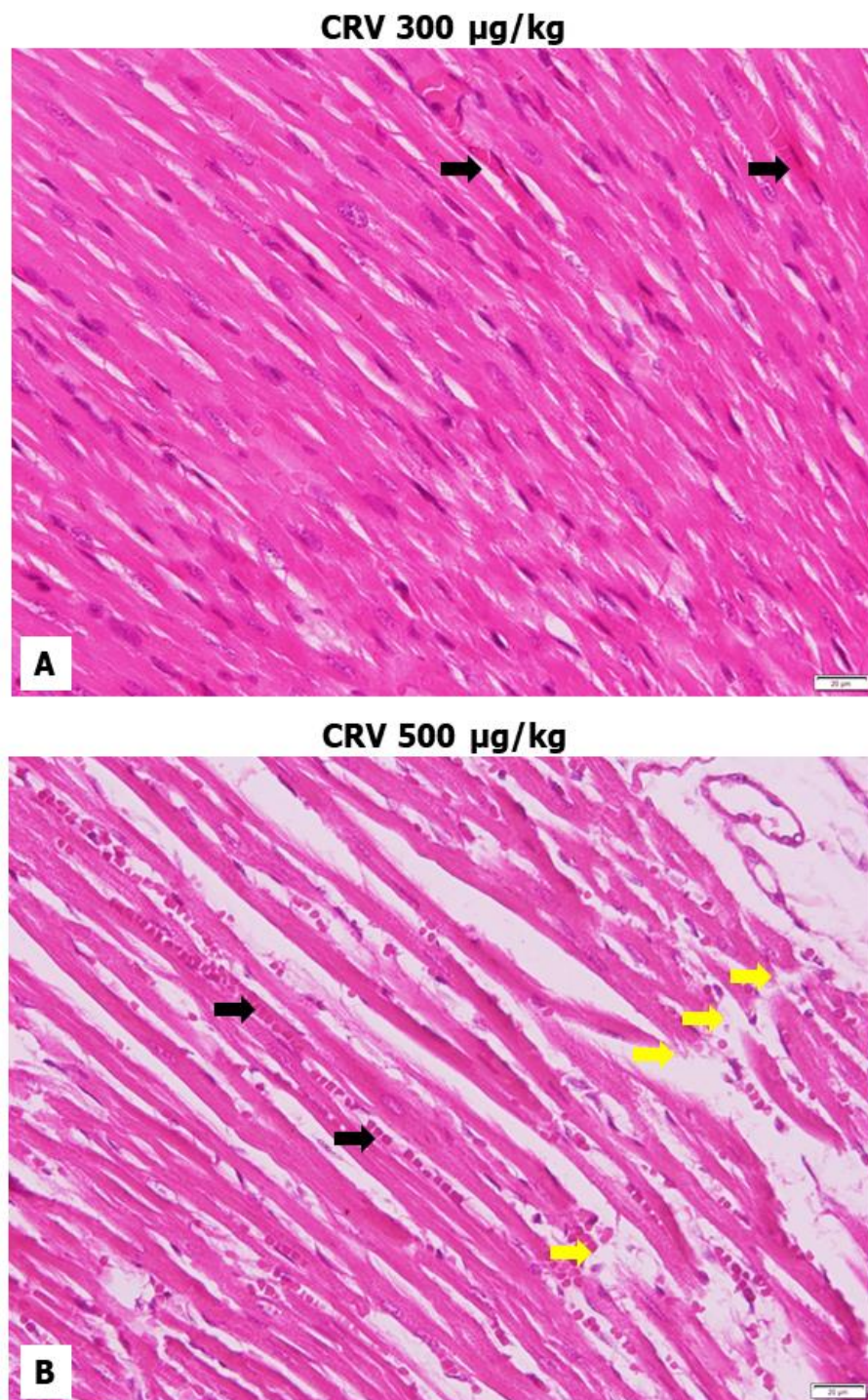


รูปที่ 4-8 แสดงลักษณะของกล้ามเนื้อหัวใจที่ย้อมด้วย H&E staining ในหนูกลุ่ม control; intercalated discs (ลูกศรชี้), CT = centrally located nucleus; scale bar = 20 μ m

กลุ่มที่ได้รับการฉีด CRV

กลุ่มที่ได้รับการฉีด CRV (300 µg/kg, IM) แสดงลักษณะของ cardiac muscle fibers ที่ค่อนข้างใกล้เคียงปกติ คือลักษณะของ muscle fibers มีการแยกเป็นแขนงและติดต่อกันเป็นร่างแห เป็นระเบียบชัดเจน แต่อาจพบบางตำแหน่งที่เกิด congestion บ้างเล็กน้อย (รูปที่ 4-9A)

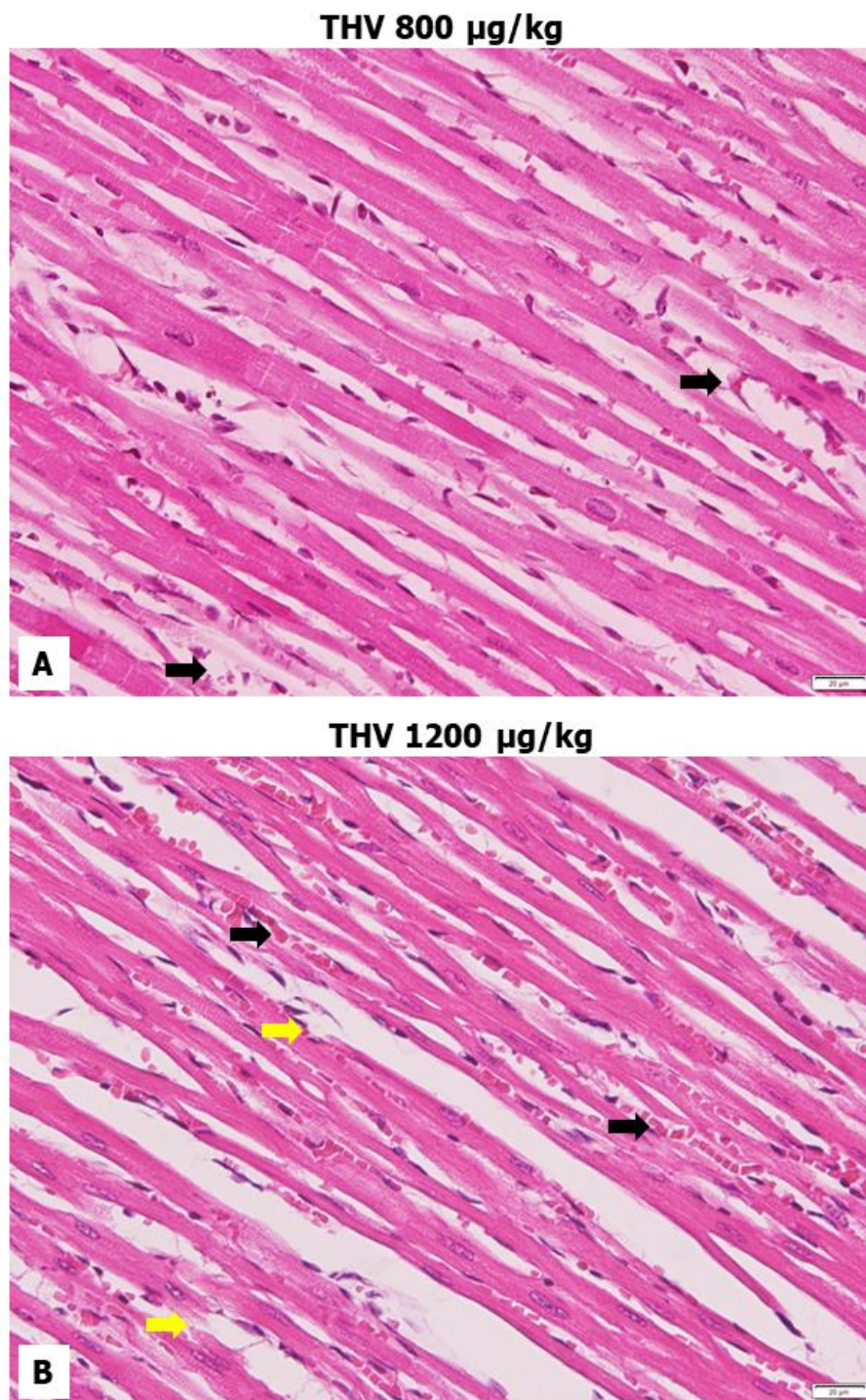
กลุ่มที่ได้รับการฉีด CRV (500 µg/kg, IM) จะพบว่า ลักษณะของ muscle fibers มีความเสียหาย เกิดการฉีกขาด เกิดความเสียหายต่อ nucleus และการเรียงตัวที่ไม่เป็นระเบียบของ muscle fibers ส่วนของ Intercellular space กว้าง และพบว่ามีเม็ดเลือดกระจายอยู่มากผิดปกติ ภายในเนื้อเยื่อ แสดงถึงการมีเลือดออกมาก สามารถบ่งบอกได้ถึงภาวะของการอักเสบ (รูปที่ 4-9B)



รูปที่ 4-9 แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของกล้ามเนื้อหัวใจ ที่ย้อมด้วย H&E staining ในหนูขาวที่ทำการฉีด CRV ขนาด 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$, IM (A) และ CRV ขนาด 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, IM (B) ทางกล้ามเนื้อสาย; scale bar = 20 μm

กลุ่มที่ได้รับการฉีด THV

กลุ่มที่ได้รับการฉีด THV (800 µg/kg, IM) และ THV (1200 µg/kg, IM) พบว่า ระดับความรุนแรงไม่แตกต่างกันในขนาดพิษที่ต่างกัน โดยพบว่า ลักษณะของ muscle fibers มีขนาด fibers ที่เล็ก Intercellular space กว้าง และมี congestion กระจายอยู่ทั่วๆ เนื้อเยื่อ พบการฉีกขาดของ muscle fibers น้อย (รูปที่ 4-10A, 4-10B)

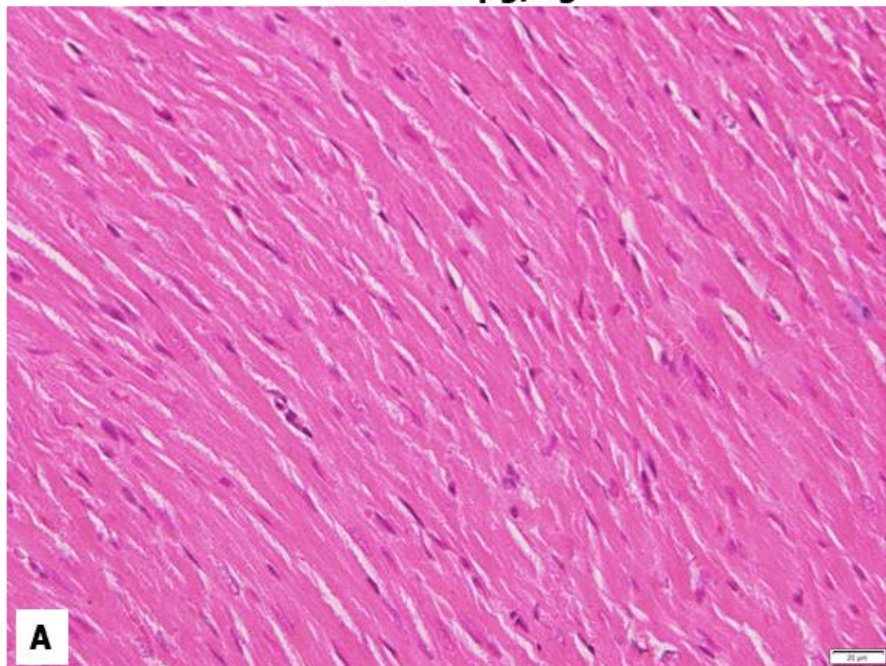
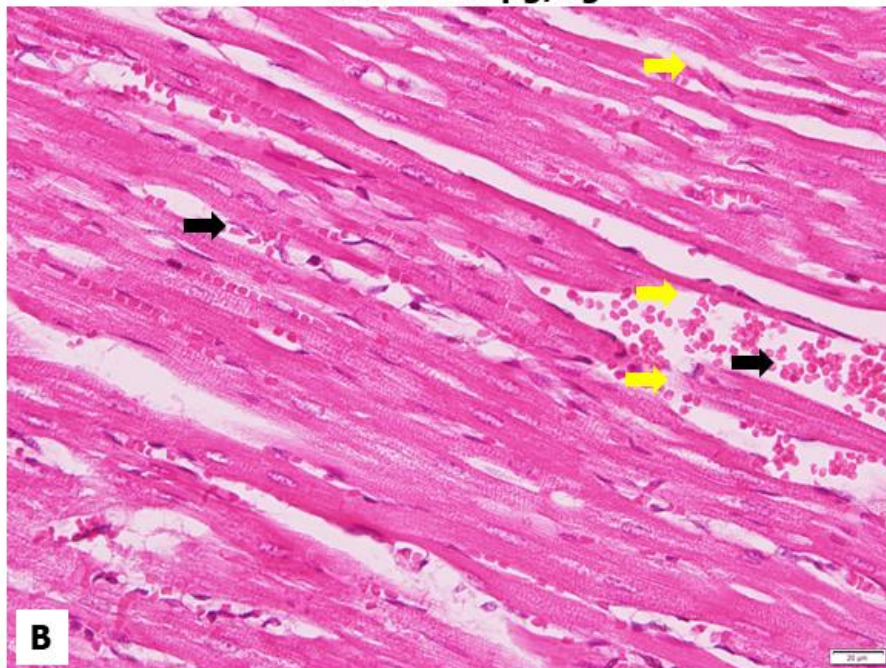


รูปที่ 4-10 แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของกล้ามเนื้อหัวใจ ที่ย้อมด้วย H&E staining ในหนูขาวที่ทำการฉีด THV ขนาด 800 $\mu\text{g}/\text{kg}$, IM (A) และ THV ขนาด 1200 $\mu\text{g}/\text{kg}$, IM (B) ทางกล้ามเนื้อ; scale bar = 20 μm

กลุ่มที่ได้รับการฉีด OHV

กลุ่มที่ได้รับการฉีด OHV (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, IM) พบว่าเกิด congestion เล็กน้อยมากภายในเนื้อเยื่อ ซึ่งลักษณะ muscle fibers มีการแยกเป็นแขนงใกล้เคียงปกติ ไม่มีการฉีกขาดของ muscle fibers ในกล้ามเนื้อหัวใจ (รูปที่ 4-11A)

กลุ่มที่ได้รับการฉีด OHV (1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$, IM) มีการฉีกขาดของ muscle fibers และมี congestion เกิดขึ้นภายในเนื้อเยื่อ แต่ความรุนแรงน้อยกว่า CRV (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$) เล็กน้อย (รูปที่ 4-11B)

OHV 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ **OHV 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$** 

รูปที่ 4-11 แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของกล้ามเนื้อหัวใจ ที่ย้อมด้วย H&E staining ในหนูขาวที่ทำการฉีด OHV ขนาด 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, IM (A) และ OHV ขนาด 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$, IM (B) ทางกล้ามเนื้อ; scale bar = 20 μm

ตารางที่ 8 แสดงระดับคะแนนพยาธิสภาพของกล้ามเนื้อหัวใจ (cardiac muscle)

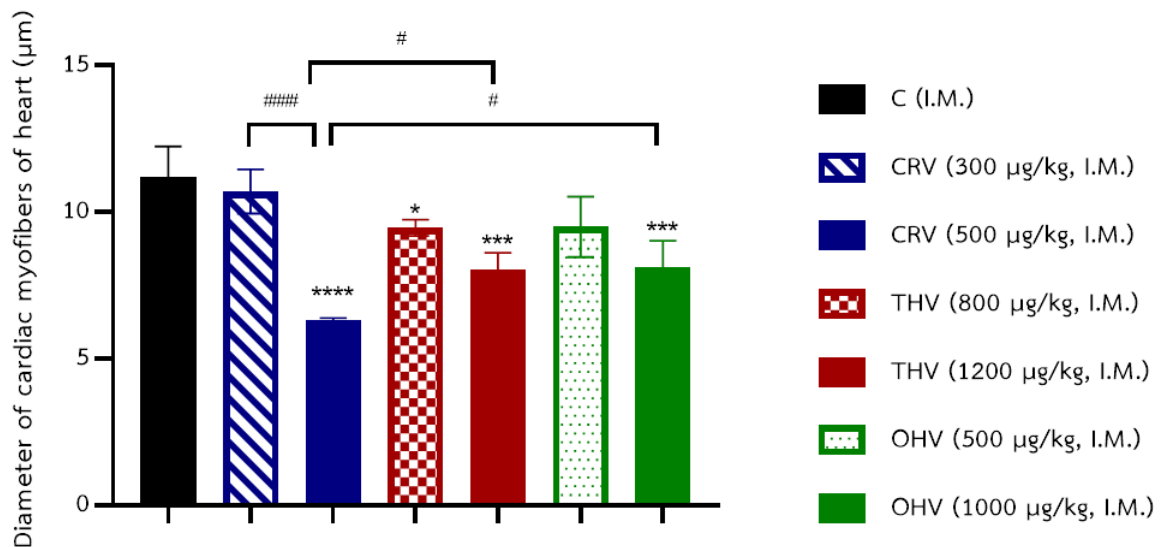
Tissue change	Score					
	CRV (300 µg/kg)	CRV (500µg/kg)	THV (800µg/kg)	THV (1200µg/kg)	OHV (500µg/kg)	OHV (1000µg/kg)
Myocardial damage	0.5	3	2.5	2.5	0.5	3

เมื่อทำการประเมินระดับความรุนแรงของพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นกับกล้ามเนื้อหัวใจ ในแต่ละกลุ่มเมื่อนำมาเปรียบเทียบกันแล้ว พบว่า

CRV (500 µg/kg, IM) และ OHV (1000 µg/kg, IM) แสดงระดับความรุนแรงของ Myocardial damage ที่เกรด 3 พบพยาธิสภาพที่ apex of heart และ ventricles นอกจากนี้พบ inflammatory cell กระจายอย่างกว้างขวาง รวมถึงพบลักษณะ edema ของ cell myocytes และการฉีกขาดของ cardiac myofibers ที่มาก

THV (800 µg/kg, IM) และ THV (1200 µg/kg, IM) แสดงระดับความรุนแรงของ Myocardial damage ที่เกรด 2.5 ซึ่งพบลักษณะพยาธิสภาพหรือรอยโรคที่บริเวณ ventricles พบ inflammatory cell กระจายอยู่บางส่วน และลักษณะที่สำคัญที่บ่งบอกคือ cardiac myofibers เริ่มต้นมีการฉีกขาด

CRV (300 µg/kg, IM) และ OHV (500 µg/kg, IM) แสดงระดับความรุนแรงของ Myocardial damage น้อยที่สุดอยู่ที่เกรด 0.5 พบการอักเสบเล็กน้อยของ cardiac myofibers และ vacuoles (ตารางที่ 8)



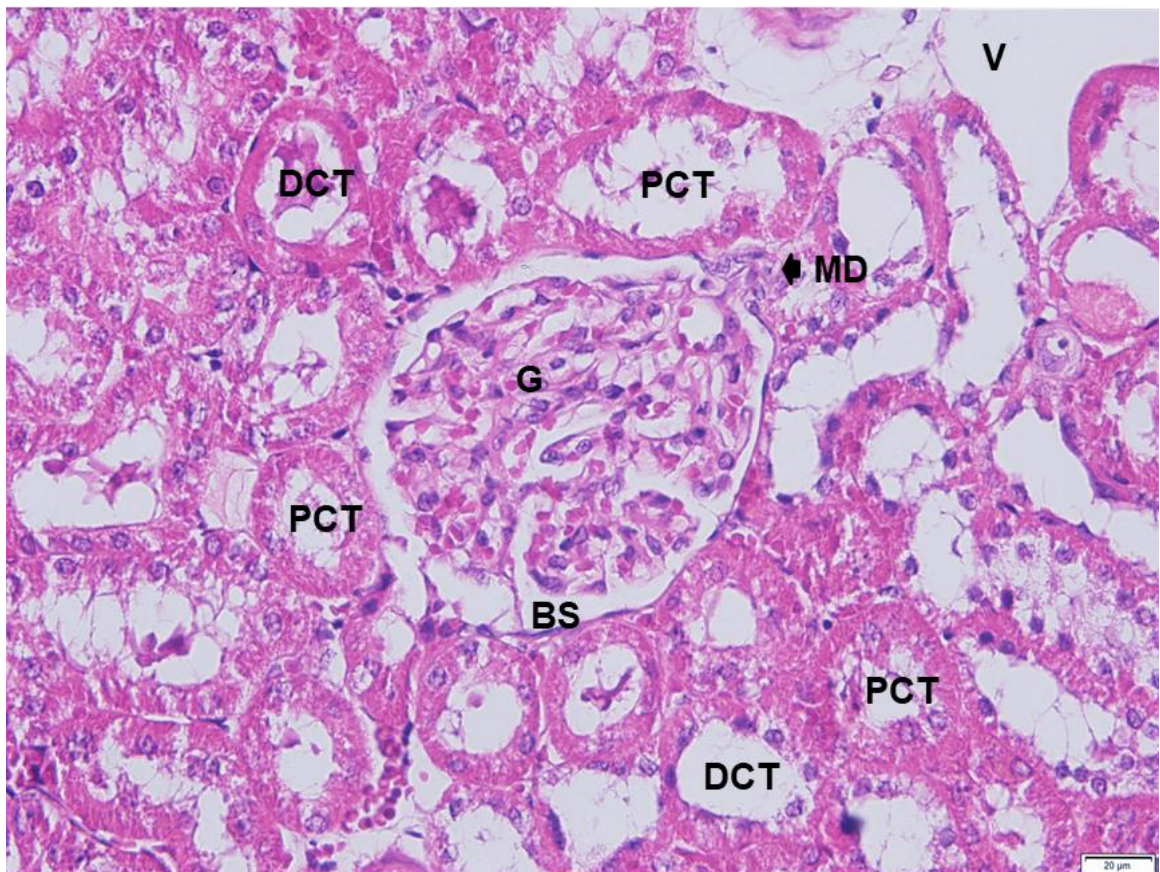
รูปที่ 4-12 แสดงค่าเฉลี่ยความกว้างของ cardiac myofibers : C; Control, CRV (L); *Calloselasma rhodostoma* venom ขนาด 300 µg/kg, CRV (H); *Calloselasma rhodostoma* venom ขนาด 500 µg/kg, THV (L); *Trimeresurus hageni* venom ขนาด 800 µg/kg, THV (H); *Trimeresurus hageni* venom ขนาด 1200 µg/kg, OHV (L); *Ophiophagus hannah* venom ขนาด 500 µg/kg, OHV (H); *Ophiophagus hannah* venom ขนาด 1000 µg/kg. (N=4)

(**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม C)

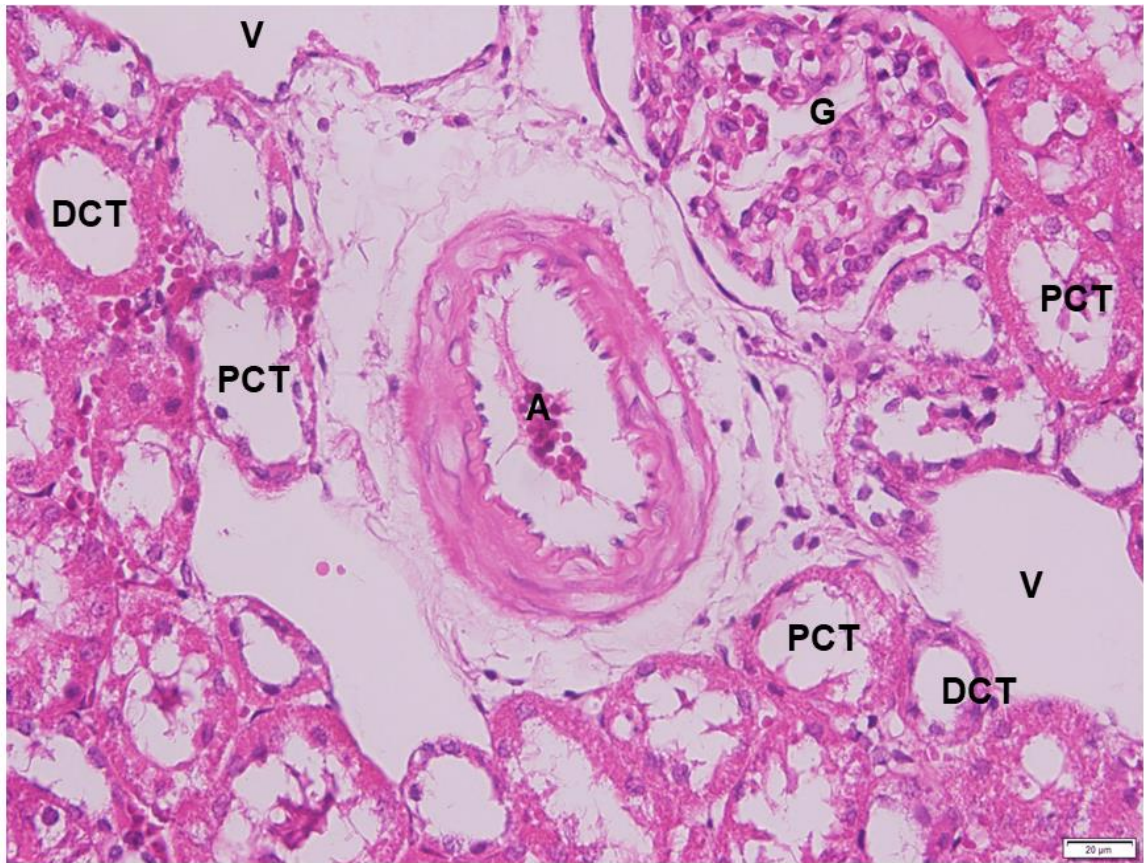
(#### $p < 0.0001$, ### $p < 0.001$, # $p < 0.05$ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม)

4.3.2 การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อไต (kidney tissue)

ในการศึกษาเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อไตหลังฉีด CRV, THV และ OHV ทางกล้ามเนื้อ (IM) ด้วยวิธี Haematoxylin & Eosin staining (H&E) โดยศึกษาลักษณะของ glomerulus, tubular และ segmental artery ซึ่งเป็นแขนงจาก renal artery



รูปที่ 4-13 แสดงลักษณะของเนื้อเยื่อไต ตำแหน่งบริเวณ glomerulus ที่ย้อมด้วย H&E staining ในหนูกลุ่ม control; G = glomerulus, BS = Bowman's capsule, PCT = proximal convoluted tubule, DCT = distal convoluted tubule และ MD = macular densa; scale bar = 20 μm

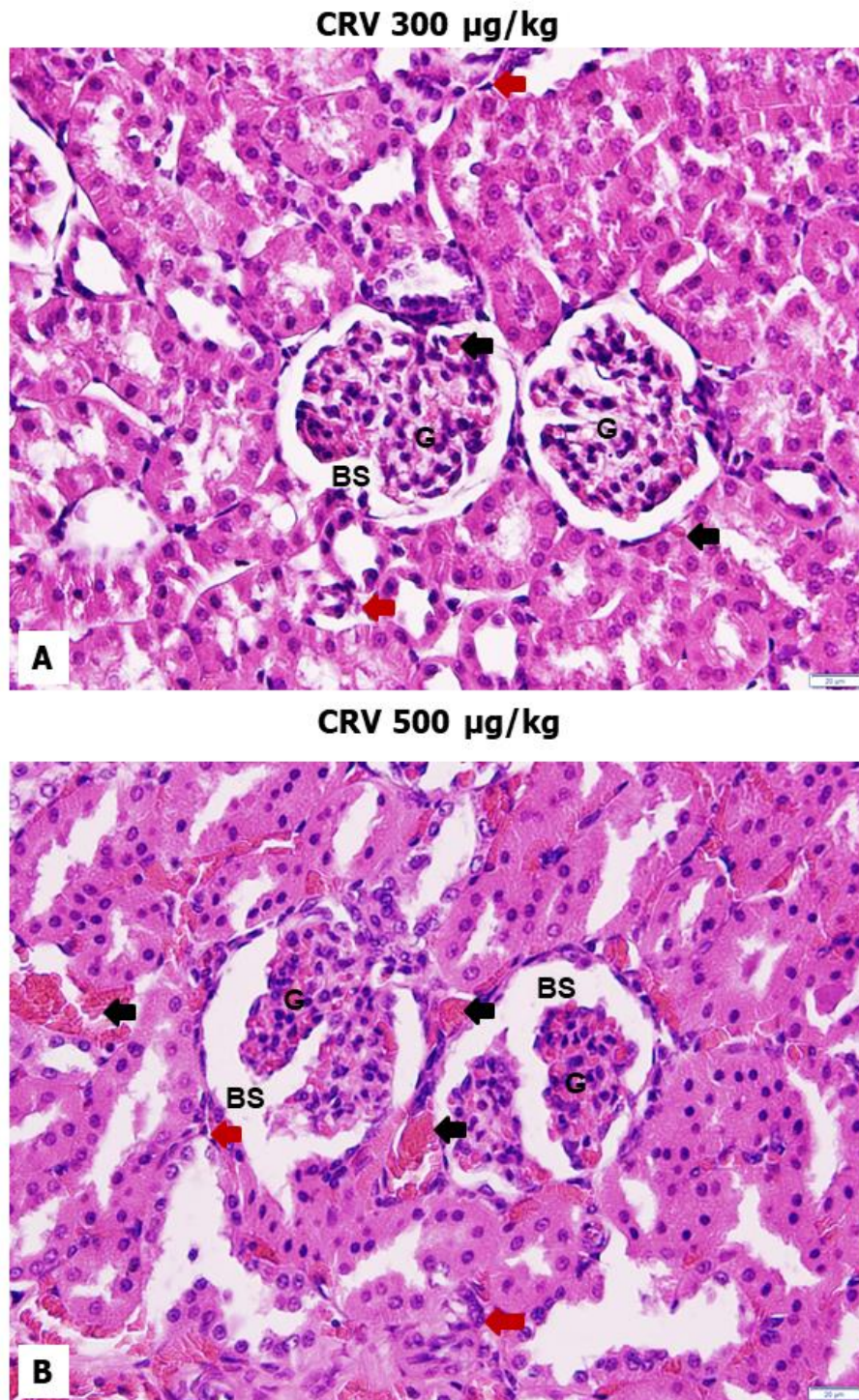


รูปที่ 4-14 แสดงลักษณะของเนื้อเยื่อไต ตำแหน่งบริเวณ segmental artery ที่ย้อมด้วย H&E staining ในหนูกลุ่ม control; A = segmental artery, V = segmental vessels, PCT = proximal convoluted tubule และ DCT = distal convoluted tubule ; scale bar = 20 μm

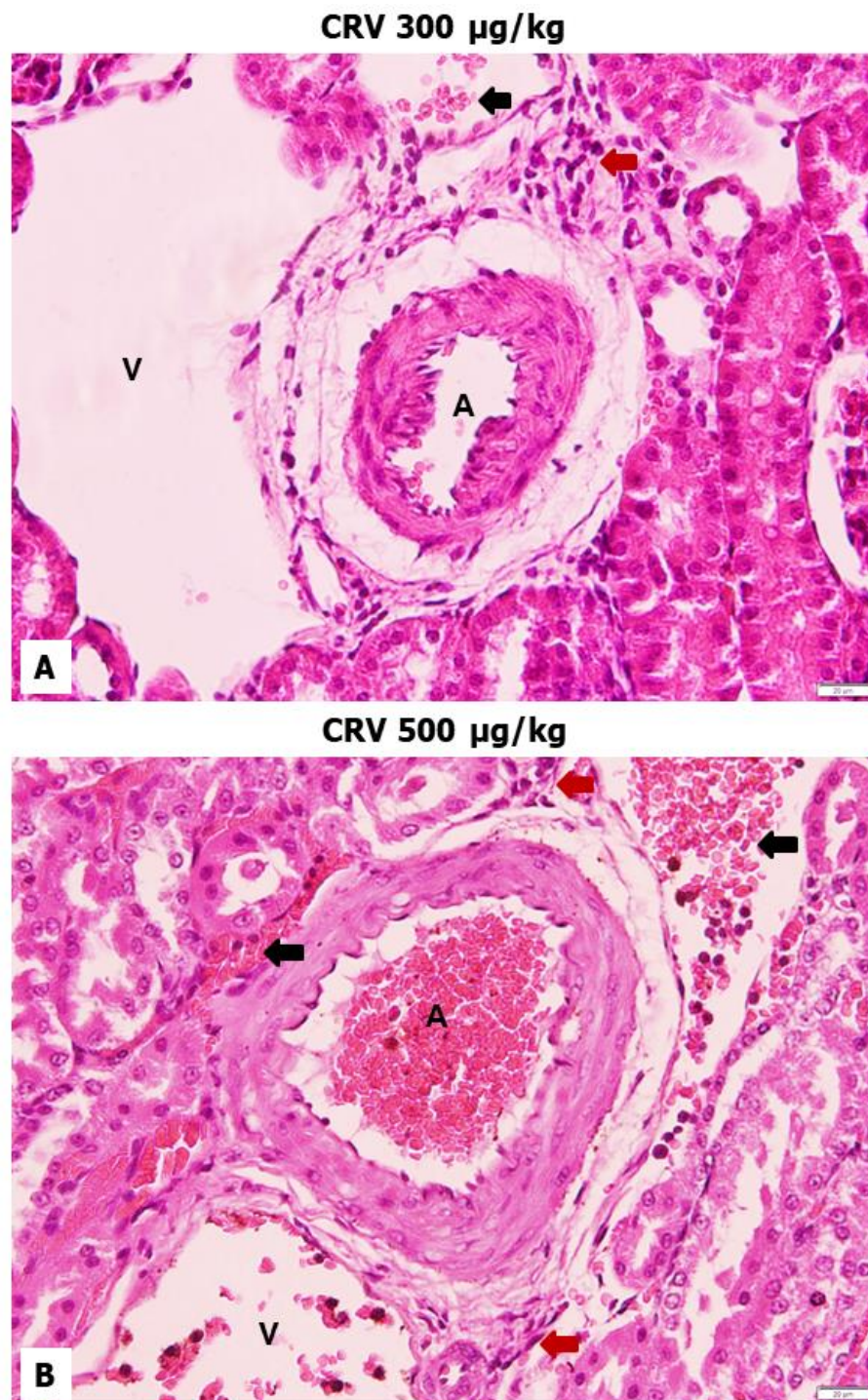
กลุ่มที่ได้รับการฉีด CRV

ในกลุ่มที่ได้รับการฉีด CRV (300 µg/kg, IM) พบว่าระดับความรุนแรงโดยรวมจัดอยู่ที่เกรด 1 โดยพบ congestion ภายในเนื้อเยื่อไตกระจายอยู่น้อย ลักษณะ glomerulus ใกล้เคียงปกติ พบการอักเสบของ tubular เล็กน้อย (รูปที่ 4-15A)

ในกลุ่มที่ได้รับการฉีด CRV (500 µg/kg, IM) มีระดับความรุนแรงของความเสียหายในเนื้อเยื่อไต อยู่ที่เกรด 2-3 โดยพบการเกิด congestion อย่างหนาแน่นภายใน tubular, glomerulus และบริเวณ segmental artery มีการทำลายต่อ glomerulus ทำให้เกิด atrophy นอกจากนี้ยังพบ tubular cast ภายในท่อไต และพบการรวมกลุ่มกันของ lymphocyte ซึ่งบ่งบอกถึงภาวะของการอักเสบภายในเนื้อเยื่อไต (รูปที่ 4-15B) นอกจากนี้พบลักษณะการหนาตัวของผนังเลือดหลอดเลือด (รูปที่ 25B) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control (รูปที่ 4-13, 4-14)



รูปที่ 4-15 แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อไตบริเวณ glomerulus ที่ย้อมด้วย H&E staining ในหนูที่ได้รับการฉีด CRV ขนาด 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$, IM (A) และ CRV ขนาด 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, IM (B) ทางกล้ามเนื้อ; scale bar = 20 μm

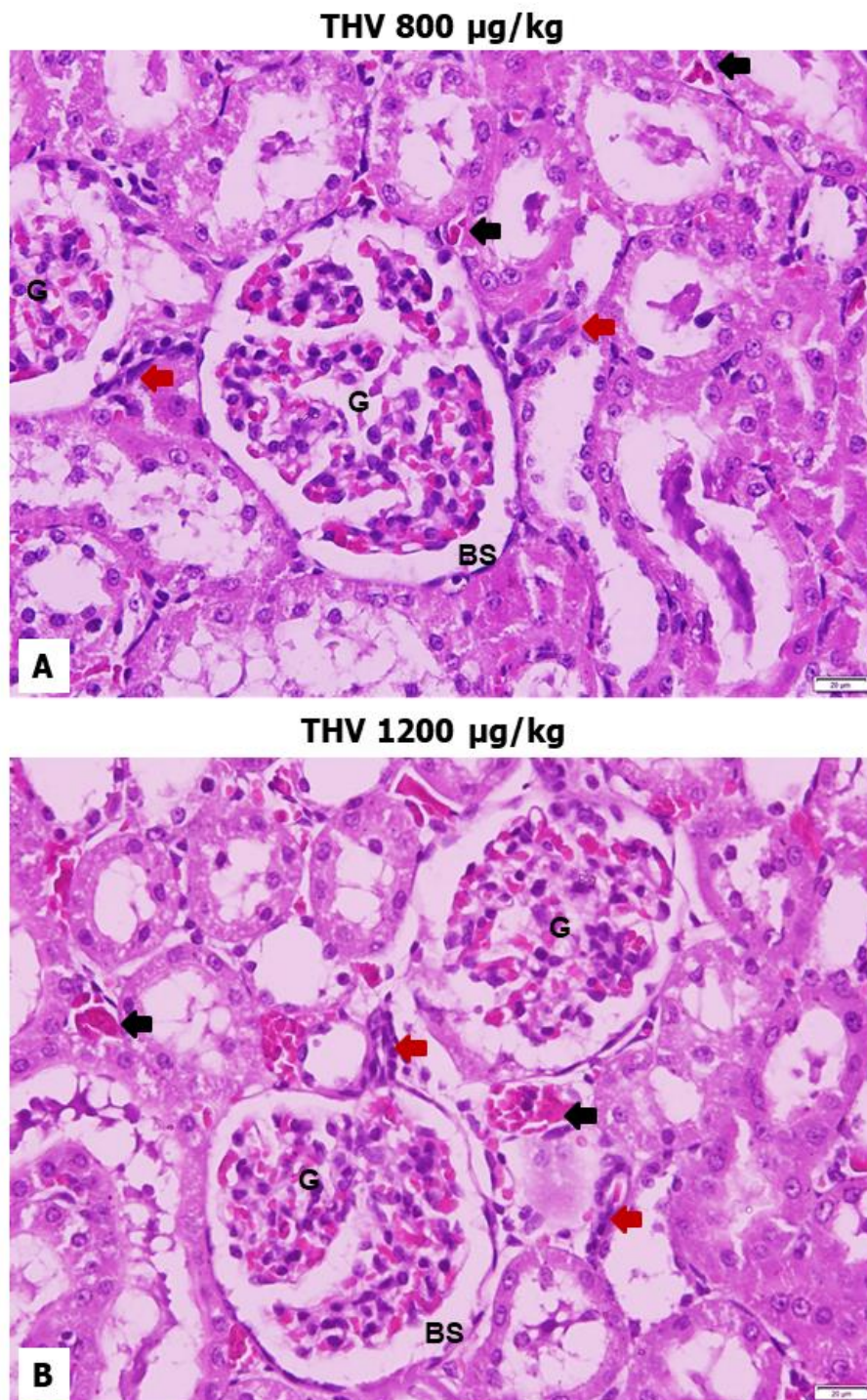


รูปที่ 4-16 แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อไต บริเวณ segmental artery ที่ย้อมด้วย H&E staining ในหนูที่ได้รับการฉีด CRV ขนาด 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$, IM (A) และ CRV ขนาด 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, IM (B) ด้วย H&E staining; scale bar = 20 μm

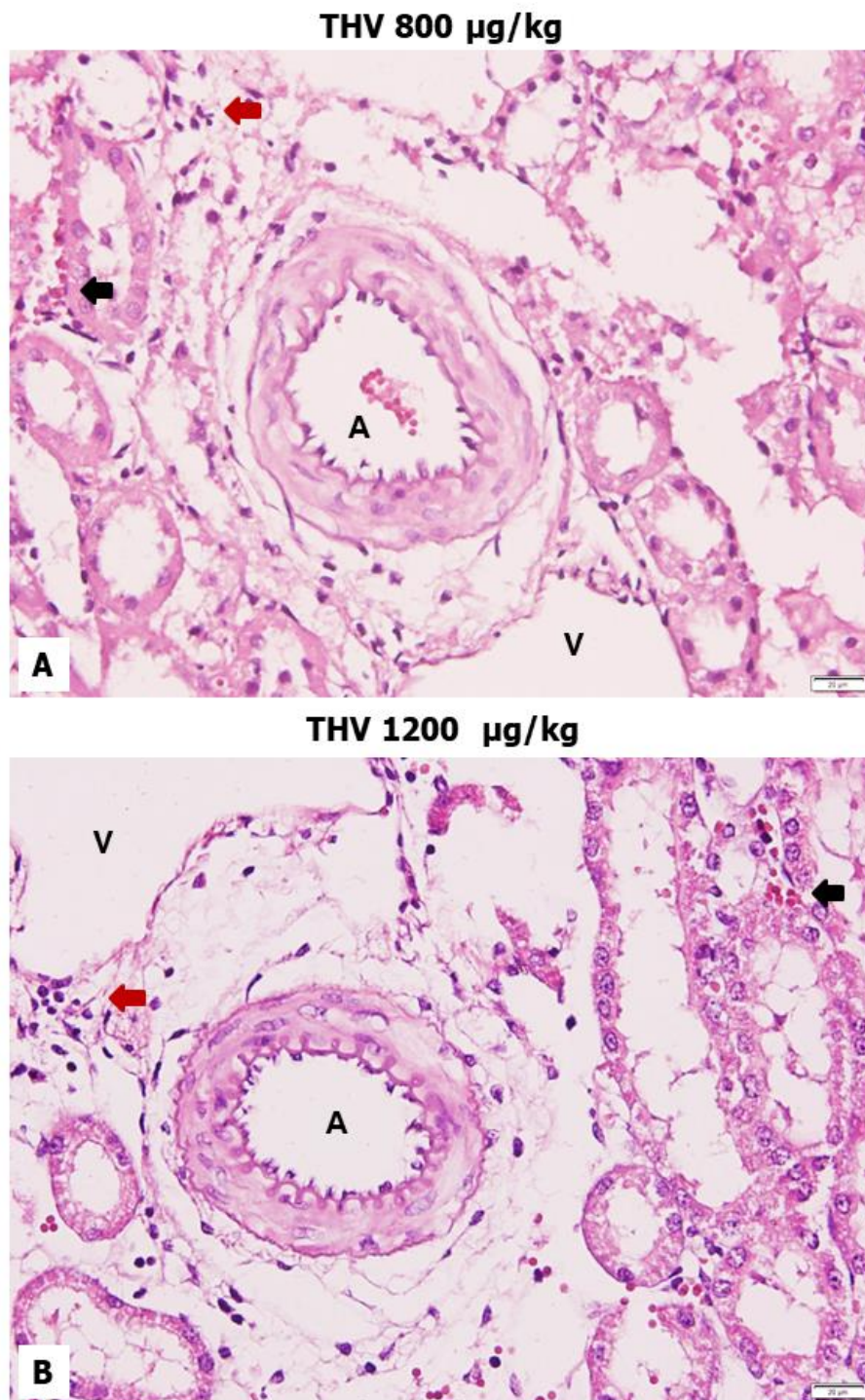
กลุ่มที่ได้รับการฉีด THV

ในกลุ่มที่ได้รับ THV (800 µg/kg, IM) พบความรุนแรงน้อยกว่ากลุ่ม THV (1200 µg/kg, IM) เล็กน้อย จัดระดับความเสียหายอยู่ที่เกรด 2 เกิด congestion ภายในเนื้อเยื่อ และมีลักษณะที่บ่งชี้ถึงภาวะการอักเสบของท่อไต (รูปที่ 4-17A)

ในกลุ่มที่ได้รับการฉีด THV (1200 µg/kg, IM) พบว่า ลักษณะความรุนแรงใกล้เคียงกับกลุ่มที่ได้รับการฉีด CRV (500 µg/kg, IM) คือเกิด congestion ภายในเนื้อเยื่อไตค่อนข้างหนาแน่น ทั้งในส่วนของ glomerulus และ tubular นอกจากนี้พบ tubular cast และ lymphocyte ภายในเนื้อเยื่อ ระดับความรุนแรงจัดอยู่ที่เกรด 2-3 (รูปที่ 4-17B)



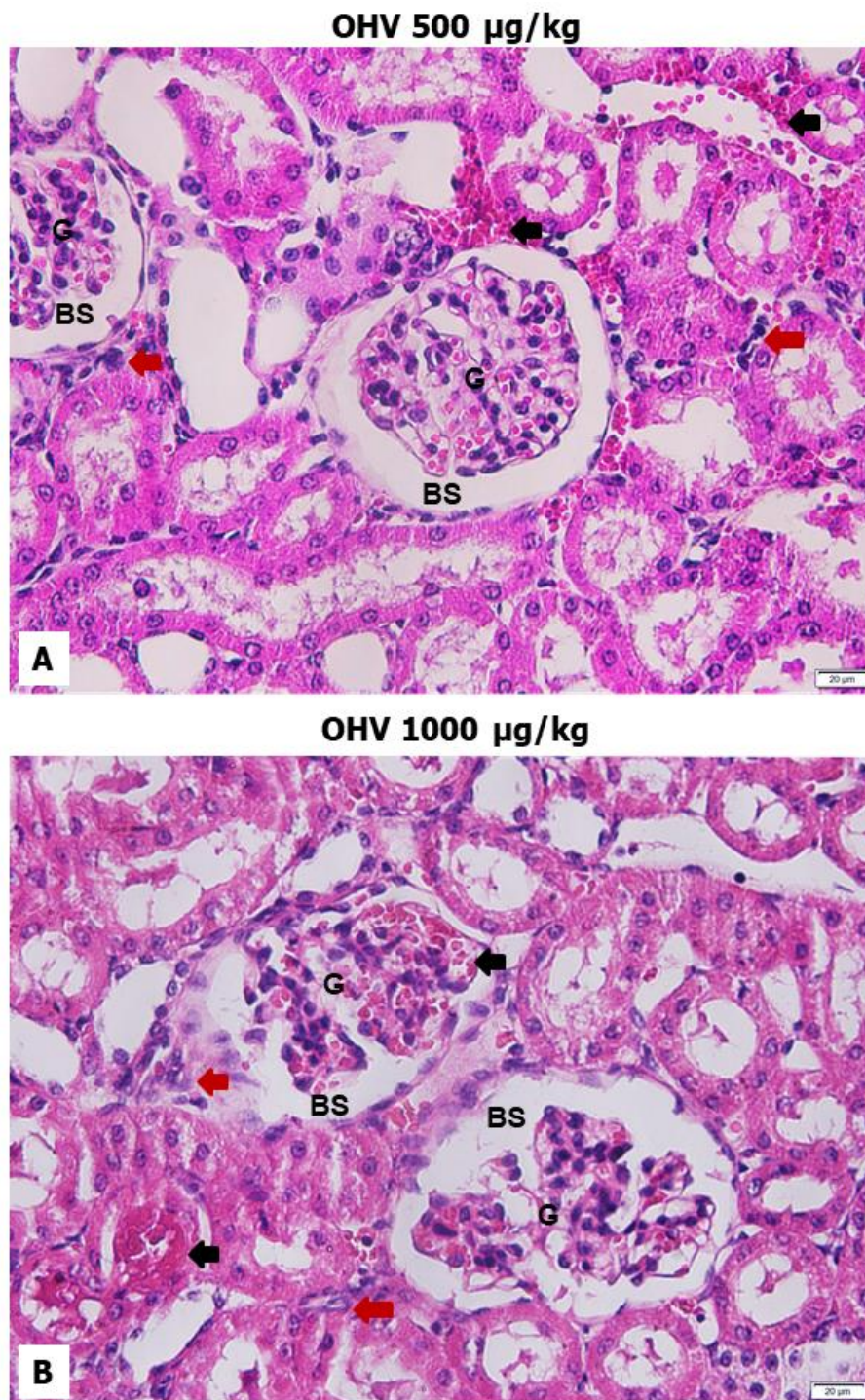
รูปที่ 4-17 แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อไต บริเวณ glomerulus ที่ย้อมด้วย H&E staining ในหนูที่ได้รับการฉีด THV ขนาด 800 $\mu\text{g}/\text{kg}$, IM (A) และ THV ขนาด 1200 $\mu\text{g}/\text{kg}$, IM (B); scale bar = 20 μm



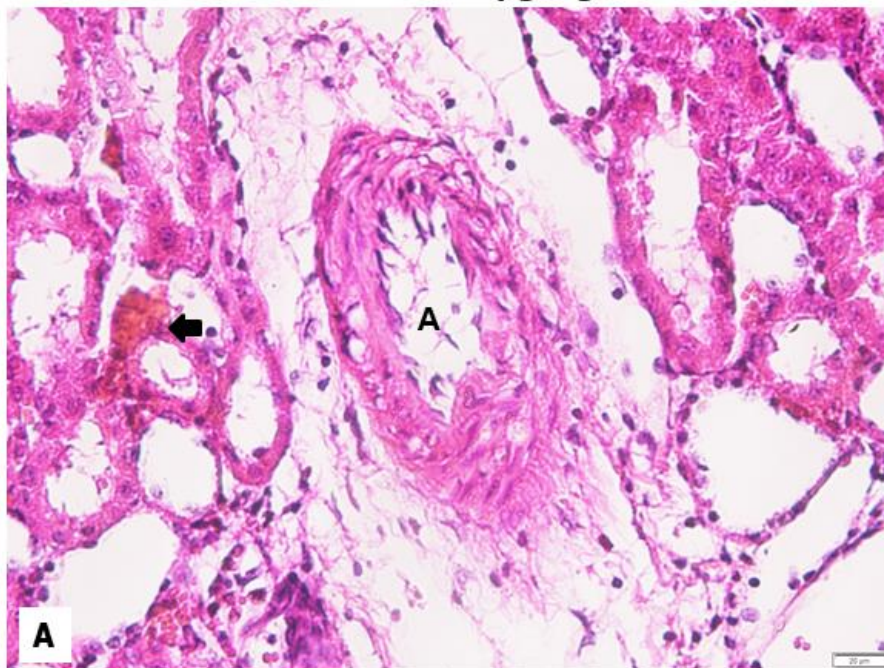
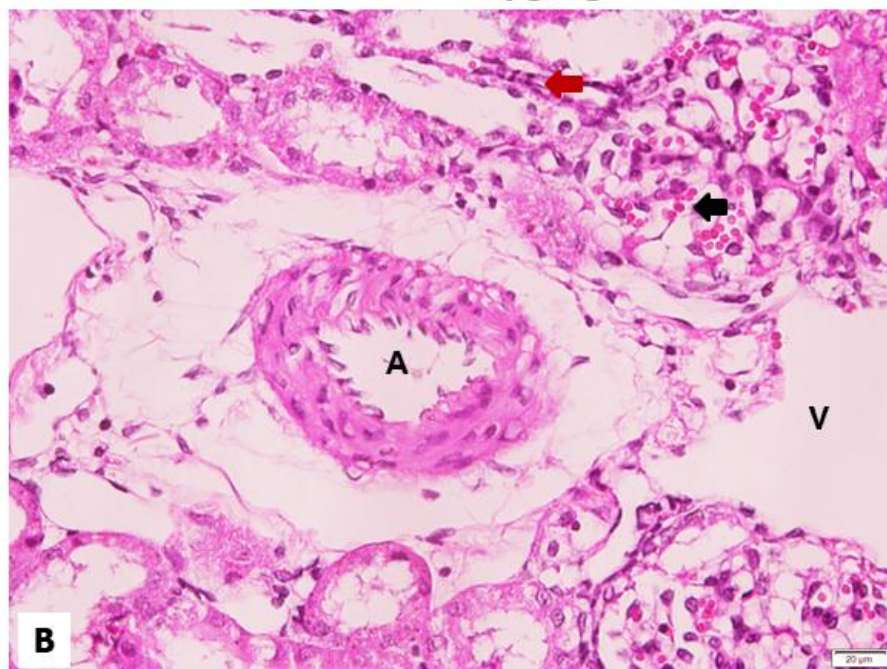
รูปที่ 4-18 แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อไต ตำแหน่งบริเวณ segmental artery ที่ย้อมด้วย H&E staining ในหนูที่ได้รับการฉีด THV 800 $\mu\text{g}/\text{kg}$, IM (A) และ THV 1200 $\mu\text{g}/\text{kg}$, IM (B); scale bar = 20 μm

กลุ่มที่ได้รับการฉีด OHV

ในกลุ่มที่ได้รับการฉีด OHV (500 µg/kg, IM) และ OHV (1000 µg/kg, IM) ระดับความรุนแรงไม่แตกต่างกันในขนาดพิษที่ต่างกัน ซึ่งพบว่ามี congestion กระจายอยู่ทั่วบริเวณเนื้อเยื่อไต tubular และ glomerulus มีการอักเสบโดยพบ lymphocyte cell และ tubular cast ภายในท่อไต ซึ่งระดับความรุนแรงจัดอยู่ที่เกรด 2 (รูปที่ 4-19A, 4-19B)



รูปที่ 4-19 แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อไต ตำแหน่งบริเวณ glomerulus ที่ย้อมด้วย H&E staining ในหนูที่ได้รับการฉีด OHV 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, IM (A) และ OHV 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$, IM (B); scale bar = 20 μm

OHV 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ **OHV 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$** 

รูปที่ 4-20 แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อไต ตำแหน่งบริเวณ segmental artery ที่ย้อมด้วย H&E staining ในหนูที่ได้รับการฉีด OHV ขนาด 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, IM (A) และ ขนาด OHV 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$, IM (B); scale bar = 20 μm

ตารางที่ 9 แสดงระดับคะแนนพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อไต (kidney tissue)

Tissue change	Score					
	CRV (300µg/kg)	CRV (500µg/kg)	THV (800µg/kg)	THV (1200µg/kg)	OHV (500µg/kg)	OHV (1000µg/kg)
Congestion	+	+++	++	+++	++	++
Inflammatory infiltration	+	++	++	++	++	++
Tubular injury	+	+++	++	++	++	++

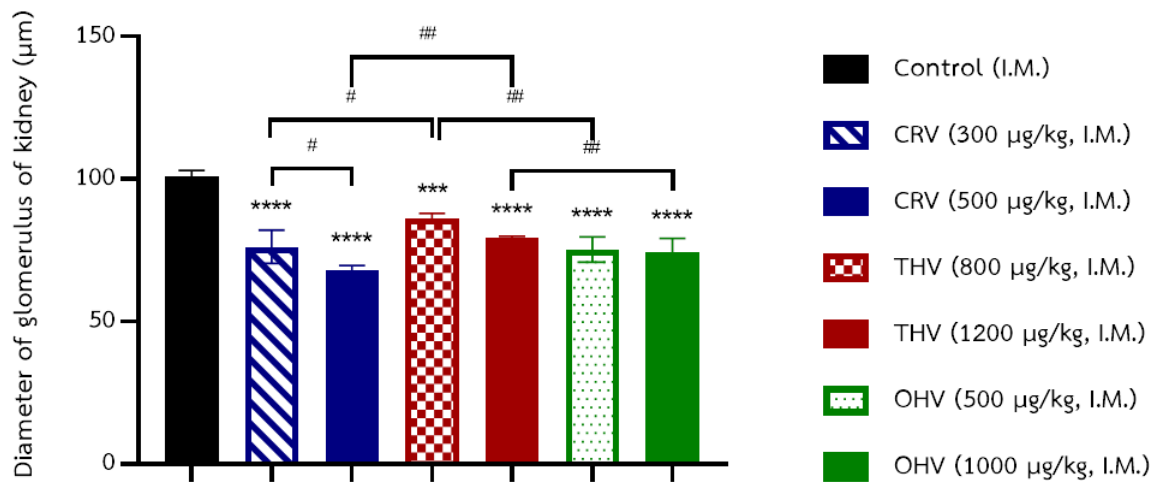
เมื่อทำการประเมินระดับความรุนแรงทางพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นกับเนื้อเยื่อไต ในแต่ละกลุ่มเมื่อนำมาเปรียบเทียบกันแล้ว พบว่า

CRV (500 µg/kg; IM) แสดงระดับความรุนแรงของ congestion อยู่ที่เกรด 3 มีเลือดคั่งเกือบทั้งหมดของ glomeruli และ interstitial vessels, inflammatory infiltration อยู่ที่เกรด 2 พบ lymphocyte 4-6 กลุ่ม และ tubular injury อยู่ที่เกรด 3 เกิด tubular necrosis เกือบทั่วทั้งหมดของเนื้อเยื่อ

THV (1200 µg/kg; IM) แสดงระดับความรุนแรงของ congestion อยู่ที่เกรด 3 มีเลือดคั่งเกือบทั้งหมดของ glomeruli และ interstitial vessels, inflammatory infiltration อยู่ที่เกรด 2 พบ lymphocyte 4-6 กลุ่ม และ tubular injury อยู่ที่เกรด 2 brush border ถูกทำลายมากกว่า 50%

THV (800 µg/kg; IM), OHV (500 µg/kg; IM) และ OHV (1000 µg/kg; IM) แสดงระดับความรุนแรงของ congestion อยู่ที่เกรด 2 มีเลือดคั่งกระจายทั่วๆ glomeruli และ interstitial vessels, inflammatory infiltration อยู่ที่เกรด 2 พบ lymphocyte 4-6 กลุ่ม และ tubular injury อยู่ที่เกรด 2 brush border ถูกทำลายมากกว่า 50%

CRV (300 µg/kg; IM) แสดงระดับความรุนแรงของ congestion อยู่ที่เกรด 1 มีเลือดคั่งเล็กน้อยบางบริเวณของ glomeruli และ interstitial vessels, inflammatory infiltration อยู่ที่เกรด 1 พบ lymphocyte 1-3 กลุ่ม และ tubular injury อยู่ที่เกรด 1 brush border ถูกทำลายน้อยกว่า 50% (ตารางที่ 9)



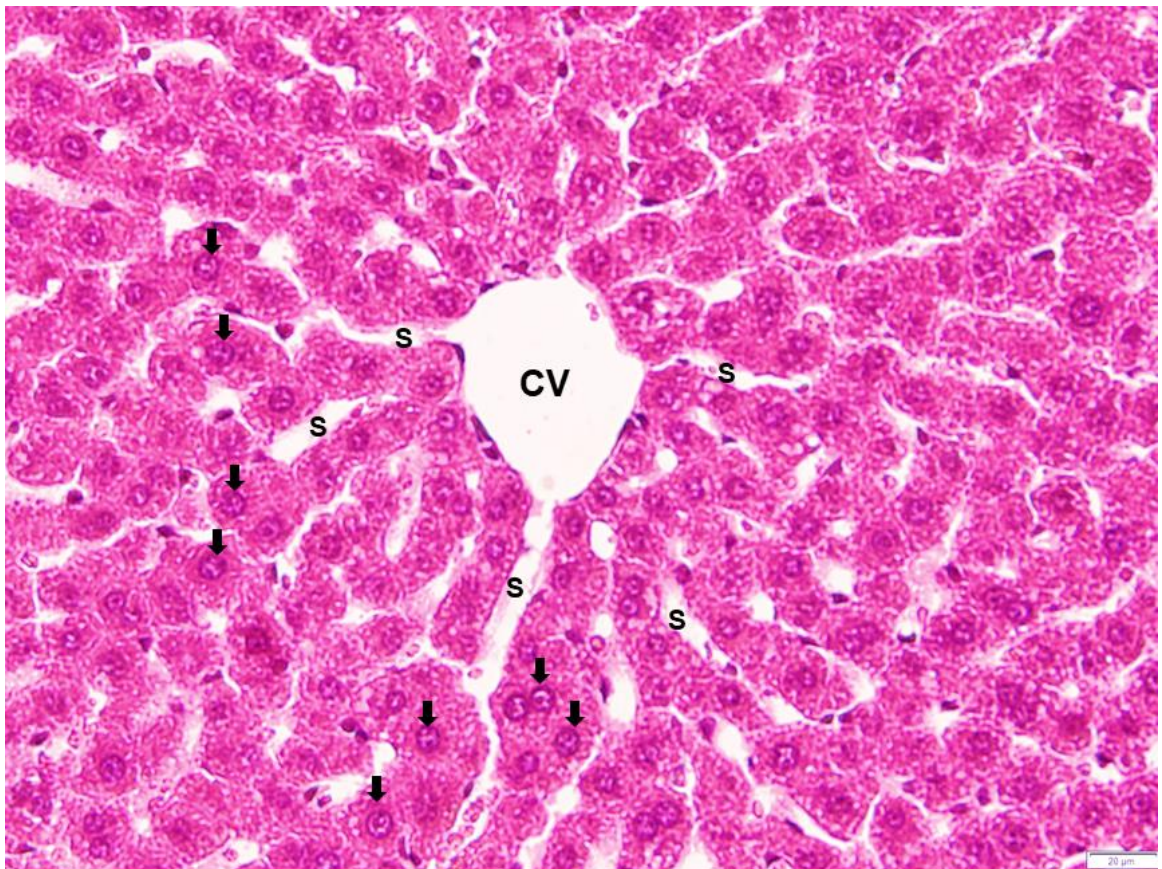
รูปที่ 4-21 แสดงค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของ glomerulus ในไต: C; Control, CRV (L); *Calloselasma rhodostoma* venom ขนาด 300 µg/kg, CRV (H); *Calloselasma rhodostoma* venom ขนาด 500 µg/kg, THV (L); *Trimeresurus hageni* venom ขนาด 800 µg/kg, THV (H); *Trimeresurus hageni* venom ขนาด 1200 µg/kg, OHV (L); *Ophiophagus hannah* venom ขนาด 500 µg/kg, OHV (H); *Ophiophagus hannah* venom ขนาด 1000 µg/kg. (N=4)

(**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม C)

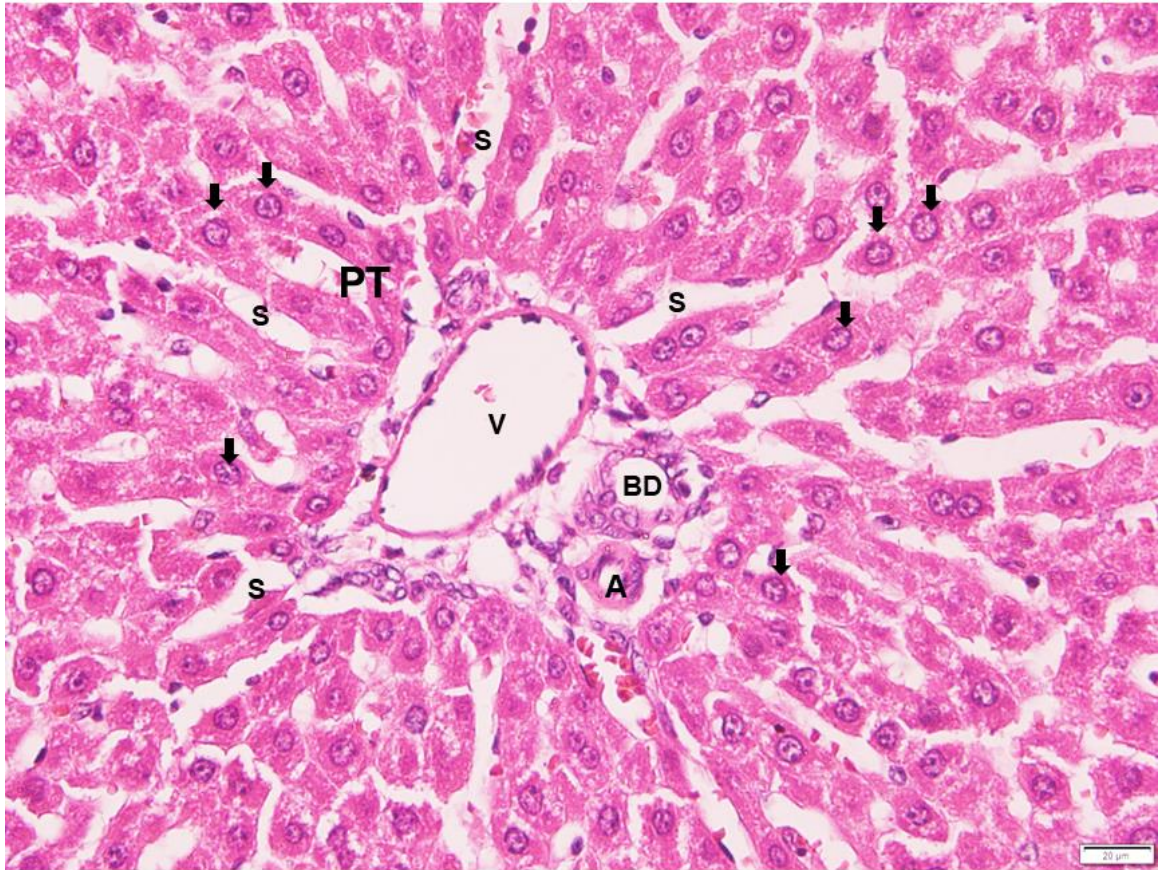
(## $p < 0.01$, # $p < 0.05$ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม)

4.3.3 การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อตับ (liver tissue)

ในการศึกษาเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อตับ หลังฉีด CRV, THV และ OHV ด้วยวิธี Haematoxylin & Eosin staining (H&E) โดยศึกษา ลักษณะของ central vein, portal triad และ ลักษณะของ sinusoid



รูปที่ 4-22 แสดงลักษณะของเนื้อเยื่อตับ ที่ตำแหน่งบริเวณ central vein ที่ย้อมด้วย H&E staining ในหนูกลุ่ม control; CV = central vein, S = sinusoid และ hepatocyte (ลูกศรชี้); scale bar = 20 μm

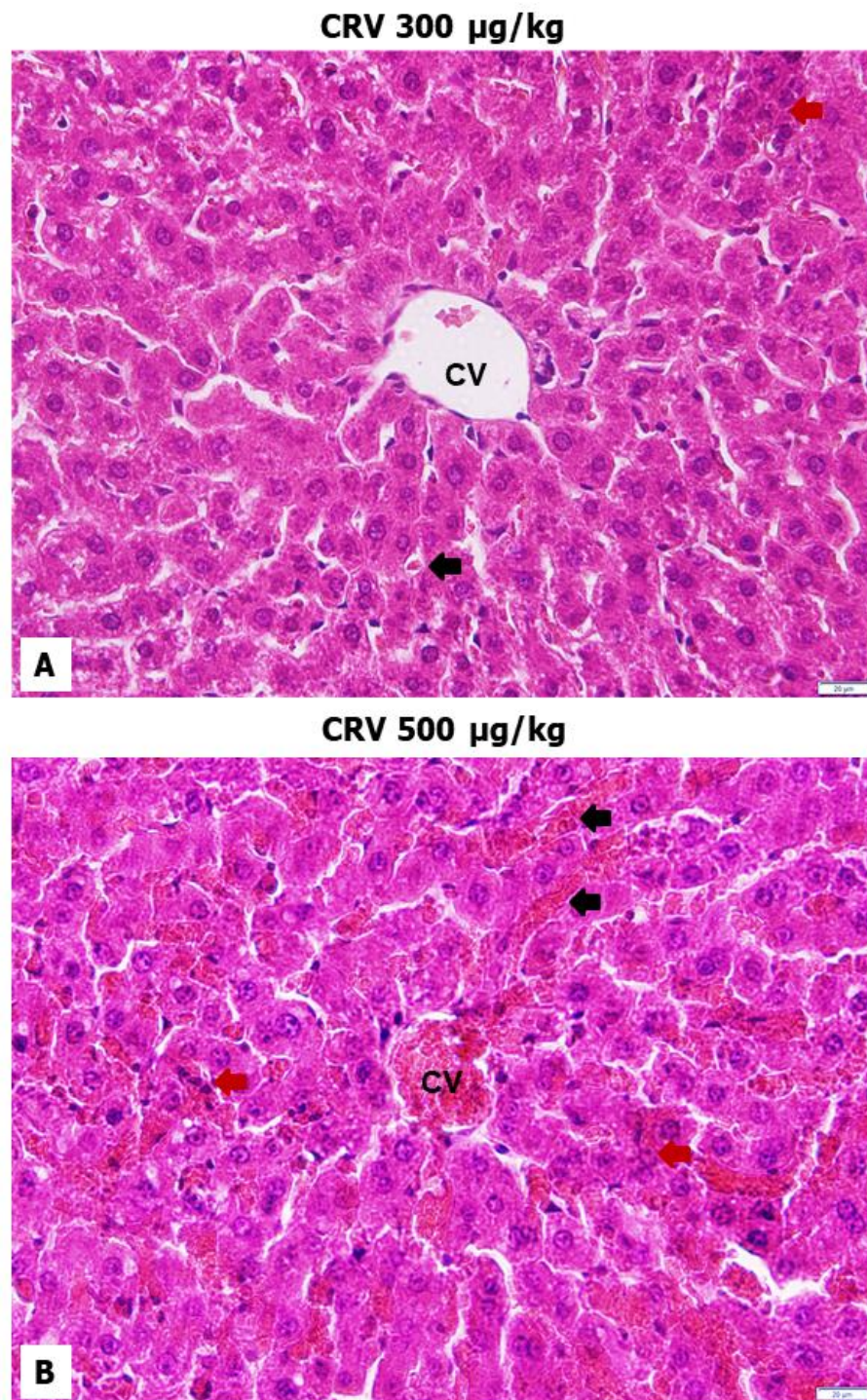


รูปที่ 4-23 แสดงลักษณะของเนื้อเยื่อตับ ตำแหน่งบริเวณ portal triad ที่ย้อมด้วย H&E staining ในหนูกลุ่ม control; PT = portal triad, A = hepatic artery, V = hepatic portal vein, B = bile duct, S = sinusoid และ hepatocyte cell (ลูกศรชี้); scale bar = 20 μm

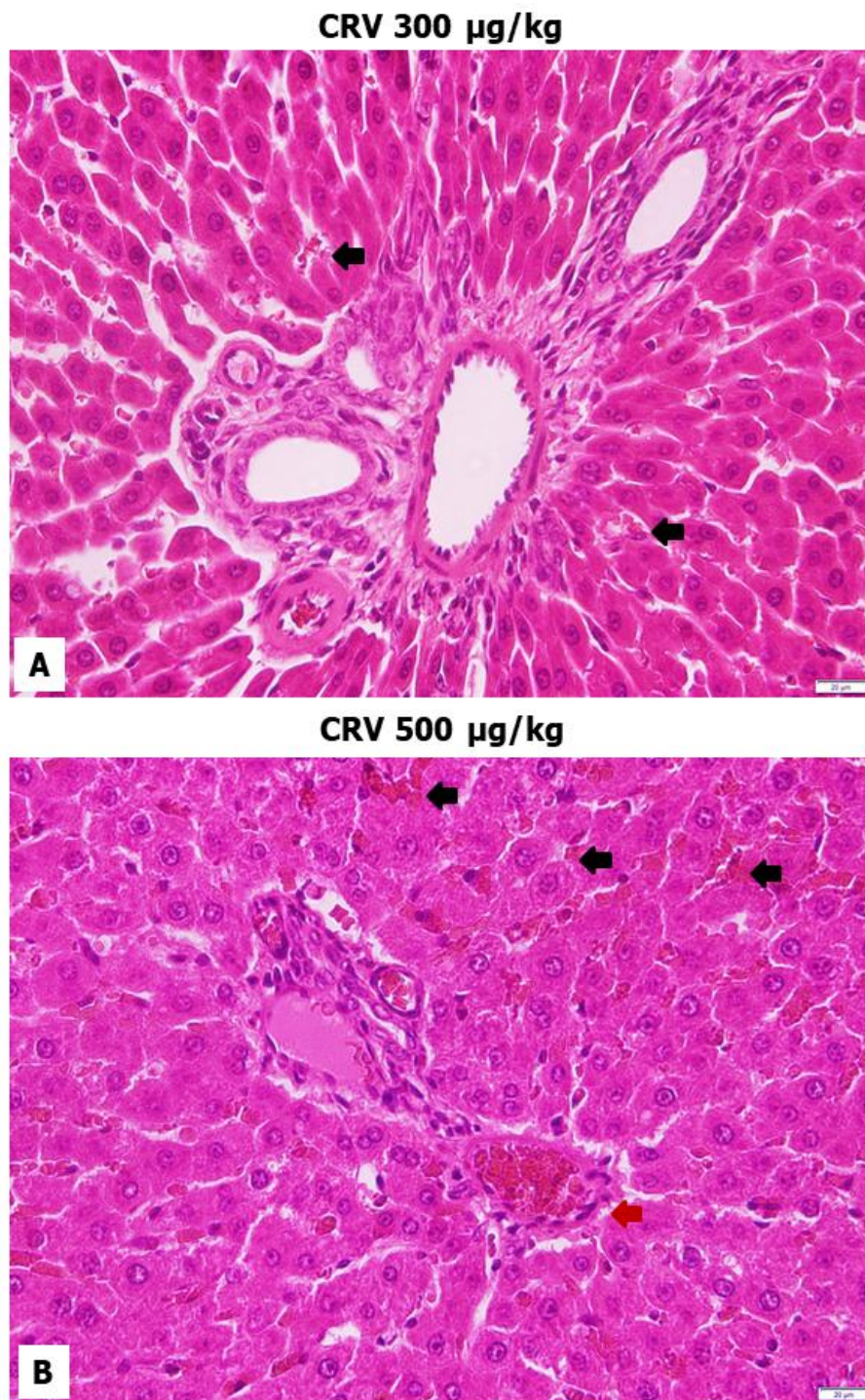
กลุ่มที่ได้รับการฉีด CRV

กลุ่มที่ได้รับการฉีด CRV (300 µg/kg; IM) พบว่า เกิดความเสียหายเล็กน้อย มี congestion เล็กน้อยในบางบริเวณ พบ inflammatory cell บริเวณ sinusoid และ central vein บางบริเวณ ลักษณะของ hepatic lobules และ hepatocyte มีความใกล้เคียงปกติ พยาธิสภาพไม่ชัดเจน จัดระดับความรุนแรงอยู่ที่เกรด 1 (รูปที่ 4-24A, 4-25A)

กลุ่มที่ได้รับการฉีด CRV (500 µg/kg; IM) เกิดความเสียหายที่ชัดเจน มี congestion ในเนื้อเยื่อตับอย่างหนาแน่น แทรกระหว่าง sinusoid บริเวณ central vein และ portal triad มี inflammatory cell และพบ Kupffer cells กระจายทั่วๆ เนื้อเยื่อตับ ลักษณะของ sinusoid ไม่เรียงเป็นสายยาว มี edema ของ hepatocyte cell ระดับความรุนแรงจัดอยู่ในระดับเกรด 2-3 (รูปที่ 4-24B, 4-25B)



รูปที่ 4-24 แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อตับ ตำแหน่งบริเวณ central vein ที่ย้อมด้วย H&E staining ในหนูที่ได้รับการฉีด CRV 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$, IM (A) และ CRV 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, IM (B); scale bar = 20 μm

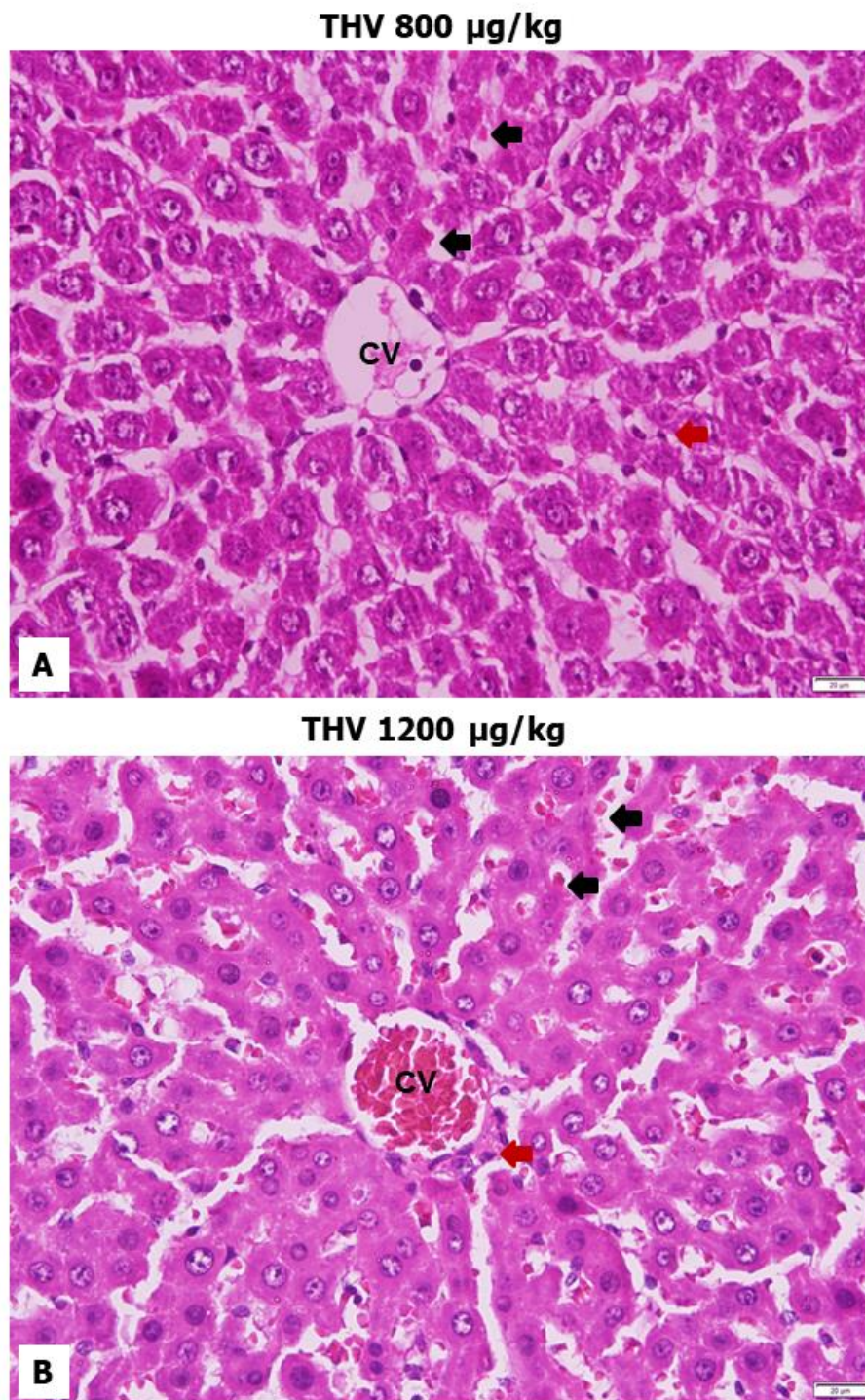


รูปที่ 4-25 แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อตับ ตำแหน่งบริเวณ portal triad ในหนูกลุ่ม CRV ขนาด 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$, IM (A) และ CRV ขนาด 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, IM (B) ด้วย H&E staining; scale bar = 20 μm

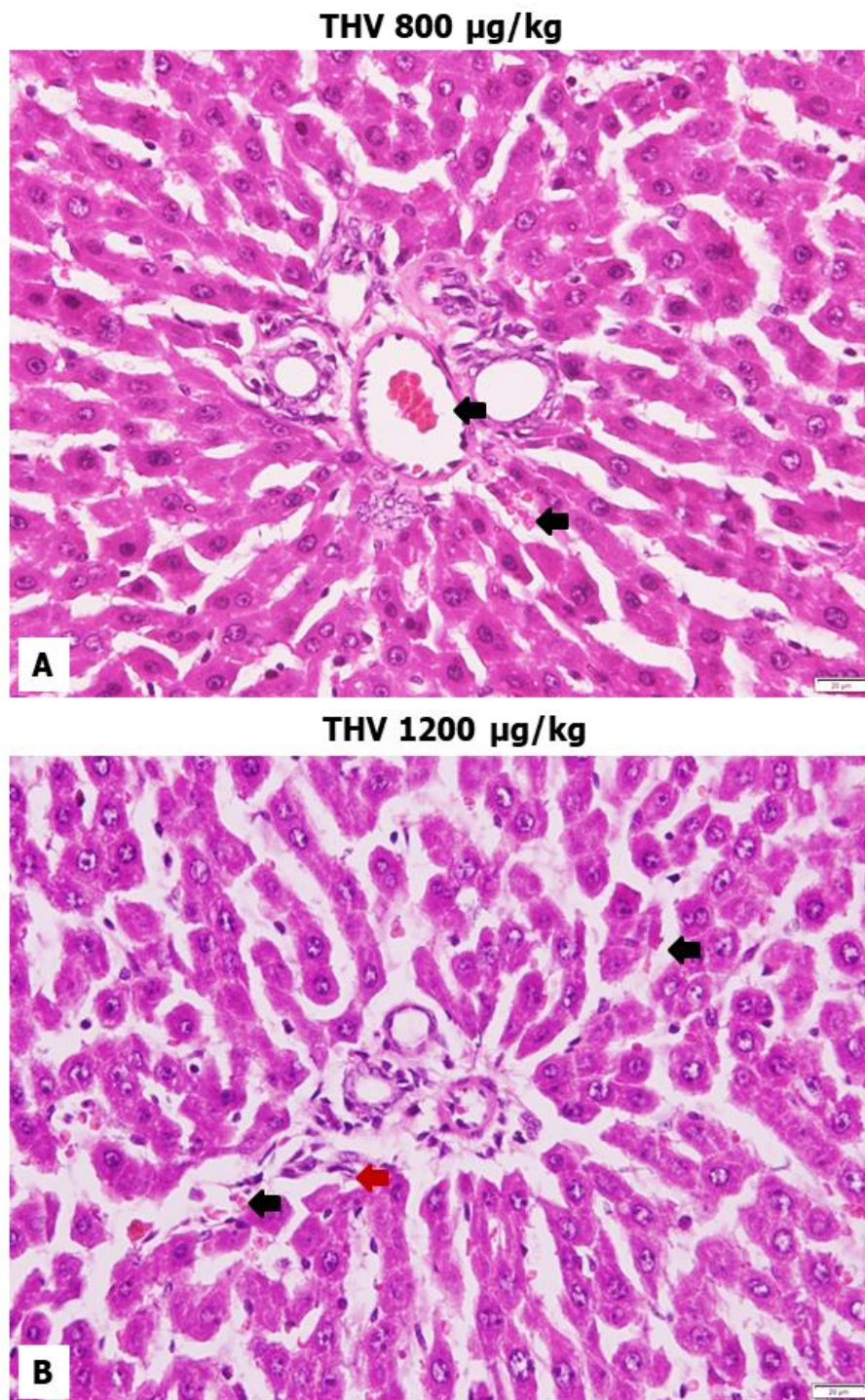
กลุ่มที่ได้รับการฉีด THV

ในกลุ่มที่ได้รับการฉีด THV (800 µg/kg; IM) พบลักษณะความผิดปกติใกล้เคียงกับ CRV (300 µg/kg; IM) ซึ่งมี congestion เล็กน้อยในบางบริเวณ พบ inflammatory cell บริเวณ sinusoid และ central vein บางบริเวณ ลักษณะของ hepatic lobules และ hepatocyte มีความใกล้เคียงปกติ พยาธิสภาพไม่ชัดเจน จัดระดับความรุนแรงอยู่ที่เกรด 1 (รูปที่ 4-26A, 4-27A)

ในกลุ่มที่ได้รับการฉีด THV (1200 µg/kg; IM) มีระดับความรุนแรงอยู่ที่เกรด 2 ซึ่งพบว่า มี congestion กระจายอยู่ทั่วๆ เนื้อเยื่อตับ พบใน central vein และ แทรกตาม sinusoid พบ inflammatory cell และลักษณะของ sinusoid เรียงไม่เป็นระเบียบ รุนแรงน้อยกว่า CRV (500 µg/kg; IM) (รูปที่ 4-26B, 4-27B)



รูปที่ 4-26 แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อตับ ตำแหน่งบริเวณ central vein ในหนูกลุ่ม THV ขนาด 800 $\mu\text{g}/\text{kg}$, IM (A) และ THV ขนาด 1200 $\mu\text{g}/\text{kg}$, IM (B); scale bar = 20 μm

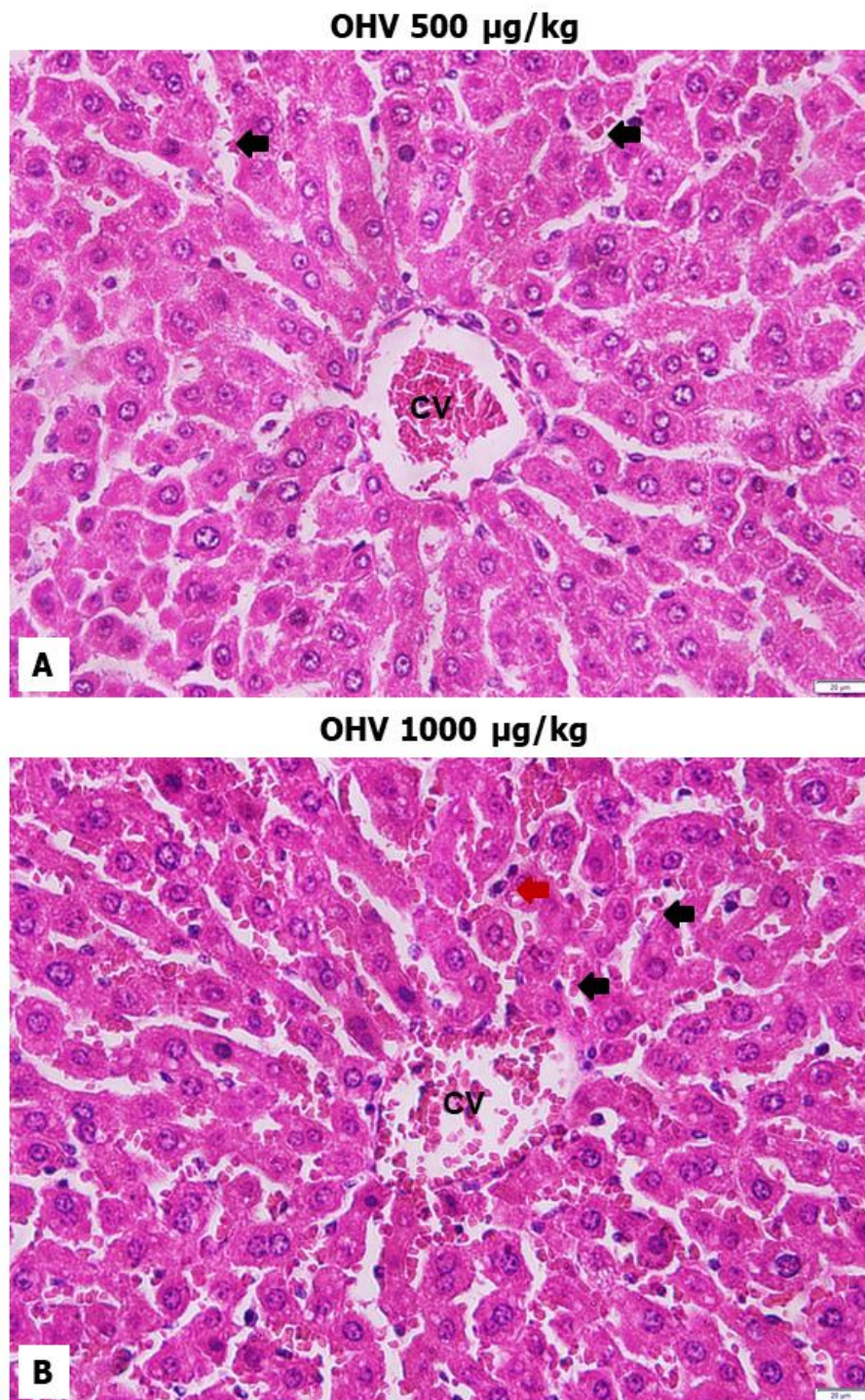


รูปที่ 4-27 แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อตับ บริเวณ portal triad ที่ย้อมด้วย H&E staining ในหนูที่ได้รับการฉีด THV ขนาด 800 $\mu\text{g}/\text{kg}$, IM (A) และ THV ขนาด 1200 $\mu\text{g}/\text{kg}$, IM (B); scale bar = 20 μm

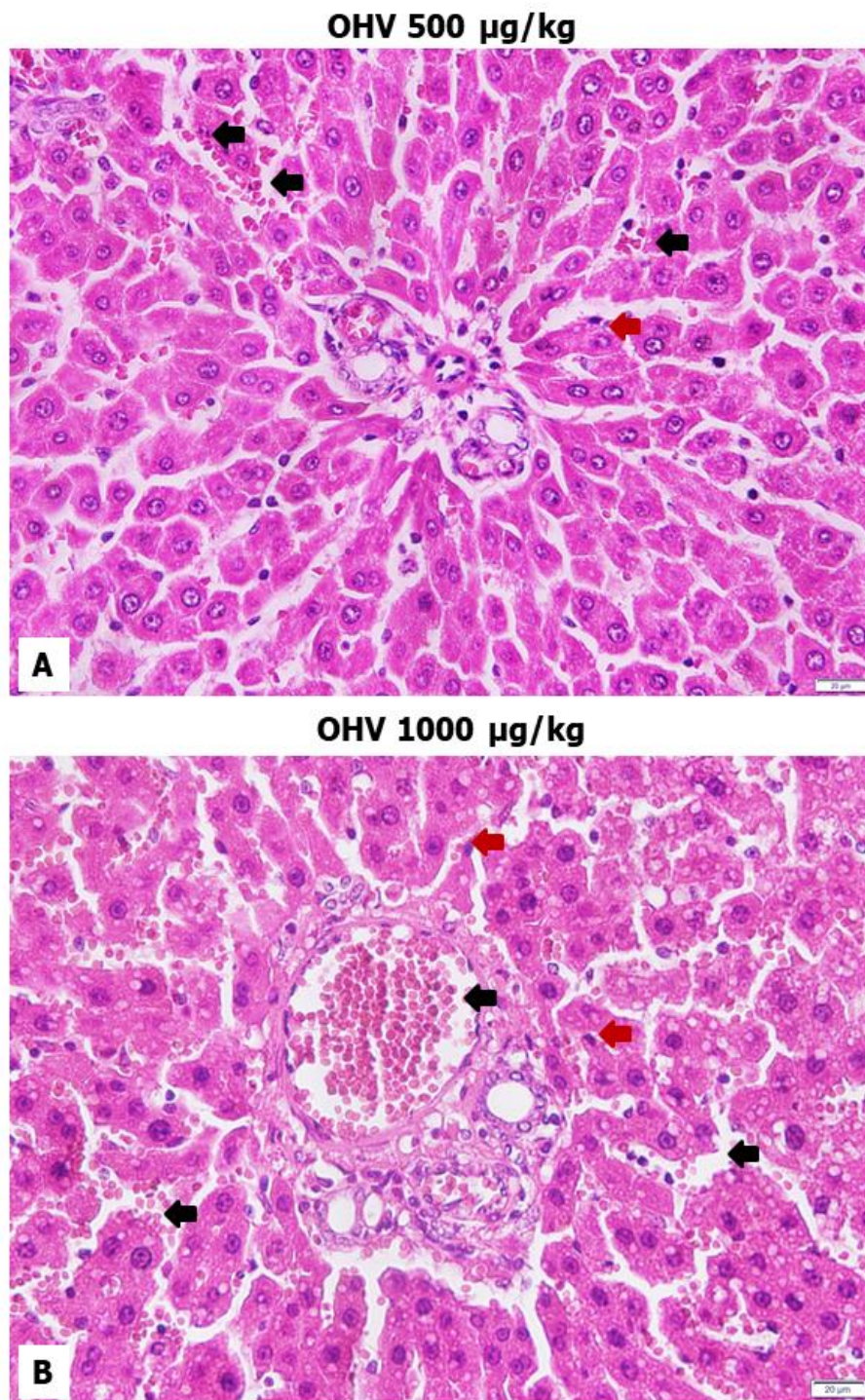
กลุ่มที่ได้รับการฉีด OHV

ในกลุ่มที่ได้รับการฉีด OHV (500 µg/kg; IM) พบความเสียหายเล็กน้อย มี congestion เล็กน้อยในบางบริเวณ พบ inflammatory cell บริเวณ sinusoid และ central vein บางบริเวณ ลักษณะของ hepatic lobules และ hepatocyte มีความใกล้เคียงปกติ พยาธิสภาพไม่ชัดเจน จัดระดับความรุนแรงอยู่ที่เกรด 1 (รูปที่ 4-28A, 4-29A)

ในกลุ่มที่ได้รับการฉีด OHV (1000 µg/kg; IM) มีระดับความรุนแรงอยู่ที่เกรด 2 ซึ่งพบว่า มี congestion กระจายอยู่ทั่วๆ เนื้อเยื่อตับ พบใน central vein และ แทรกตาม sinusoid พบ inflammatory cell และลักษณะของ sinusoid เรียงไม่เป็นระเบียบ แร่นแรงน้อยกว่า CRV (500 µg/kg; IM) เล็กน้อย (รูปที่ 4-28B, 4-29B)



รูปที่ 4-28 แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อตับ ตำแหน่งบริเวณ central vein (CV) ที่ย้อมด้วย H&E staining ในหนูที่ได้รับการฉีด OHV ขนาด 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, IM (A) และ OHV ขนาด 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$, IM (B); scale bar = 20 μm



รูปที่ 4-29 แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อตับ บริเวณ portal triad ที่ย้อมด้วย H&E staining ในหนูขาวที่ได้รับการฉีด OHV ขนาด 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, IM (A) และ OHV ขนาด 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$, IM (B) ทางกล้ามเนื้อ (IM); scale bar = 20 μm

ตารางที่ 10 แสดงระดับคะแนนพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับ (liver tissue)

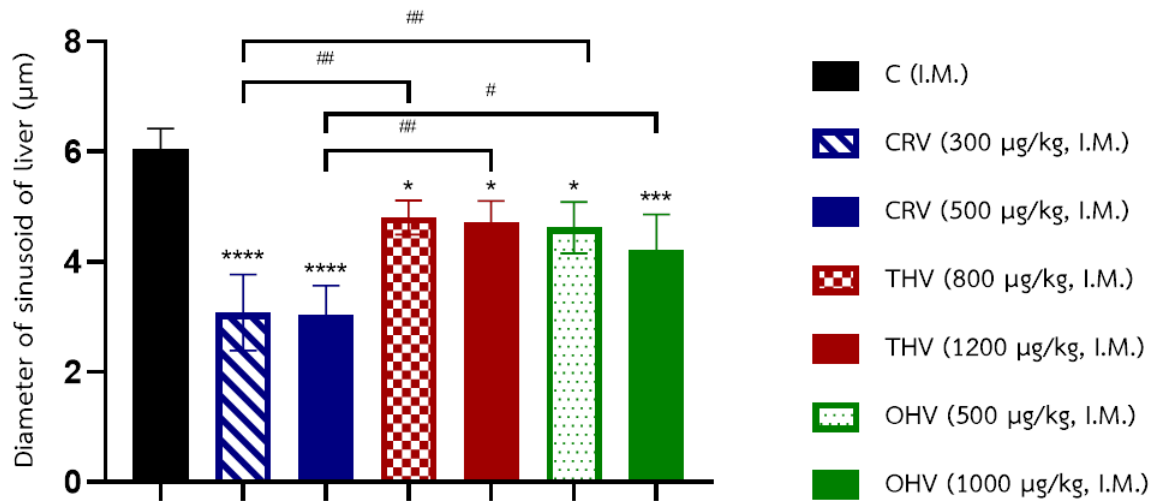
Tissue change	Score					
	CRV (300µg/kg)	CRV (500µg/kg)	THV (800µg/kg)	THV (1200µg/kg)	OHV (500µg/kg)	OHV (1000µg/kg)
Congestion	+	+++	+	++	+	++
Inflammatory infiltration	+	++	+	++	+	++
necrosis	+	+++	+	++	+	++

เมื่อทำการประเมินระดับความรุนแรงทางพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นกับเนื้อเยื่อตับ ในแต่ละกลุ่มเมื่อนำมาเปรียบเทียบกันแล้ว

CRV (500 µg/kg; IM) แสดงระดับความรุนแรงของ congestion อยู่ที่เกรด 3 มีเลือดคั่งเกือบทั้งหมดระหว่าง sinusoids และ vessels, inflammatory infiltration อยู่ที่เกรด 2 พบ lymphocyte 4-6 กลุ่ม และ hepatic necrosis อยู่ที่เกรด 3 เกิดการตายของ hepatocytes cell เกือบทั่วทั้งหมดของเนื้อเยื่อ

THV (1200 µg/kg; IM) และ OHV (1000 µg/kg; IM) แสดงระดับความรุนแรงของ congestion อยู่ที่เกรด 2 มีเลือดคั่งประมาณครึ่งหนึ่งภายใน sinusoids และ vessels, inflammatory infiltration อยู่ที่เกรด 2 พบ lymphocyte 4-6 กลุ่ม และ hepatic necrosis อยู่ที่เกรด 2 เกิดการตายของ hepatocytes cell บางบริเวณ

CRV (300 µg/kg; IM), THV (800 µg/kg; IM) และ OHV (500 µg/kg; IM) แสดงระดับความรุนแรงของ congestion อยู่ที่เกรด 1 มีเลือดคั่งเล็กน้อยบางบริเวณของ sinusoids และ vessels, inflammatory infiltration อยู่ที่เกรด 1 พบ lymphocyte 1-3 กลุ่ม และ hepatic necrosis อยู่ที่เกรด 1 เกิดการตายของ hepatocytes cell เล็กน้อย (ตารางที่ 10)



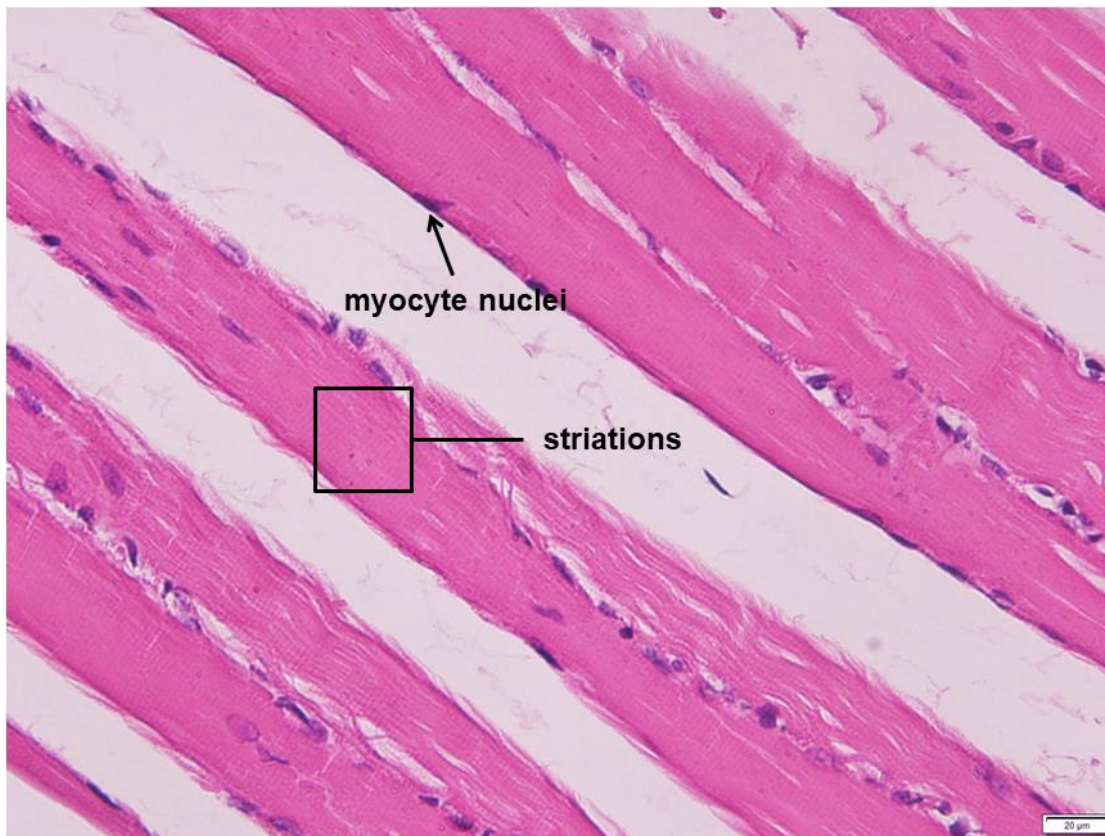
รูปที่ 4-30 แสดงค่าเฉลี่ยความกว้างของ sinusoid ในตับ: C; Control, CRV (L); *Calloselasma rhodostoma* venom 300 µg/kg, CRV (H); *Calloselasma rhodostoma* venom ขนาด 500 µg/kg, THV (L); *Trimeresurus hageni* venom ขนาด 800 µg/kg, THV (H); *Trimeresurus hageni* venom ขนาด 1200 µg/kg, OHV (L); *Ophiophagus hannah* venom ขนาด 500 µg/kg, OHV (H); *Ophiophagus hannah* venom ขนาด 1000 µg/kg. (N=4)

(**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม C)

(#### $p < 0.0001$, ### $p < 0.001$, ## $p < 0.01$, # $p < 0.05$ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม)

4.3.4 การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของกล้ามเนื้อลาย (skeletal muscle)

ในการศึกษาเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของกล้ามเนื้อลาย หลังฉีด CRV, THV และ OHV โดยการย้อม Haematoxylin & Eosin staining (H&E)



รูปที่ 4-31 แสดงลักษณะของกล้ามเนื้อลายที่ย้อมด้วย H & E staining จากหนูขาวในกลุ่ม Control; scale bar = 20 μm

กลุ่มที่ได้รับการฉีด CRV

ในกลุ่มที่ได้รับการฉีด CRV (300 µg/kg; IM) และ CRV (500 µg/kg; IM) พบการฉีกขาดของ muscle fibers บางตำแหน่ง และไม่พบลักษณะของความเสียหายที่บ่งชี้ถึงการอักเสบอย่างชัดเจน แสดงลักษณะ fibers และ skeletal muscle cell ยังคงใกล้เคียงกลุ่มควบคุม ไม่พบความแตกต่างที่ชัดเจนมาก ความเสียหายจัดอยู่ในระดับเกรด 1 (รูปที่ 4-32)

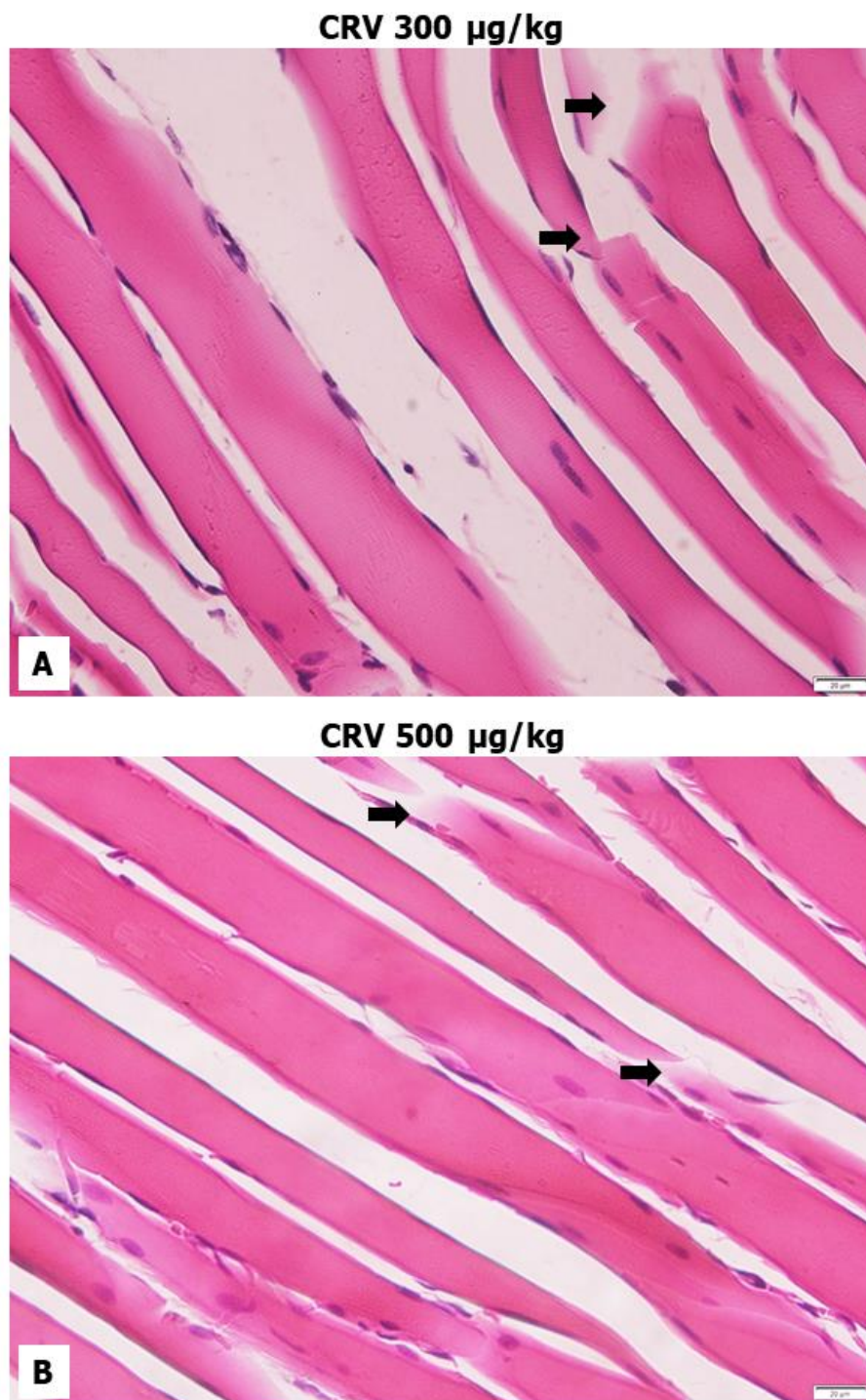
กลุ่มที่ได้รับการฉีด THV

ในกลุ่มที่ได้รับการฉีด THV (800 µg/kg; IM) และ THV (1200 µg/kg; IM) พบการฉีกขาดของ muscle fibers บางตำแหน่งเช่นเดียวกัน และไม่พบลักษณะของความเสียหายที่บ่งชี้ถึงการอักเสบ แสดงลักษณะ fibers และ skeletal muscle cell ยังคงใกล้เคียงกลุ่มควบคุม ไม่พบความแตกต่างที่ชัดเจน ความเสียหายจัดอยู่ในระดับเกรด 1 (รูปที่ 4-33)

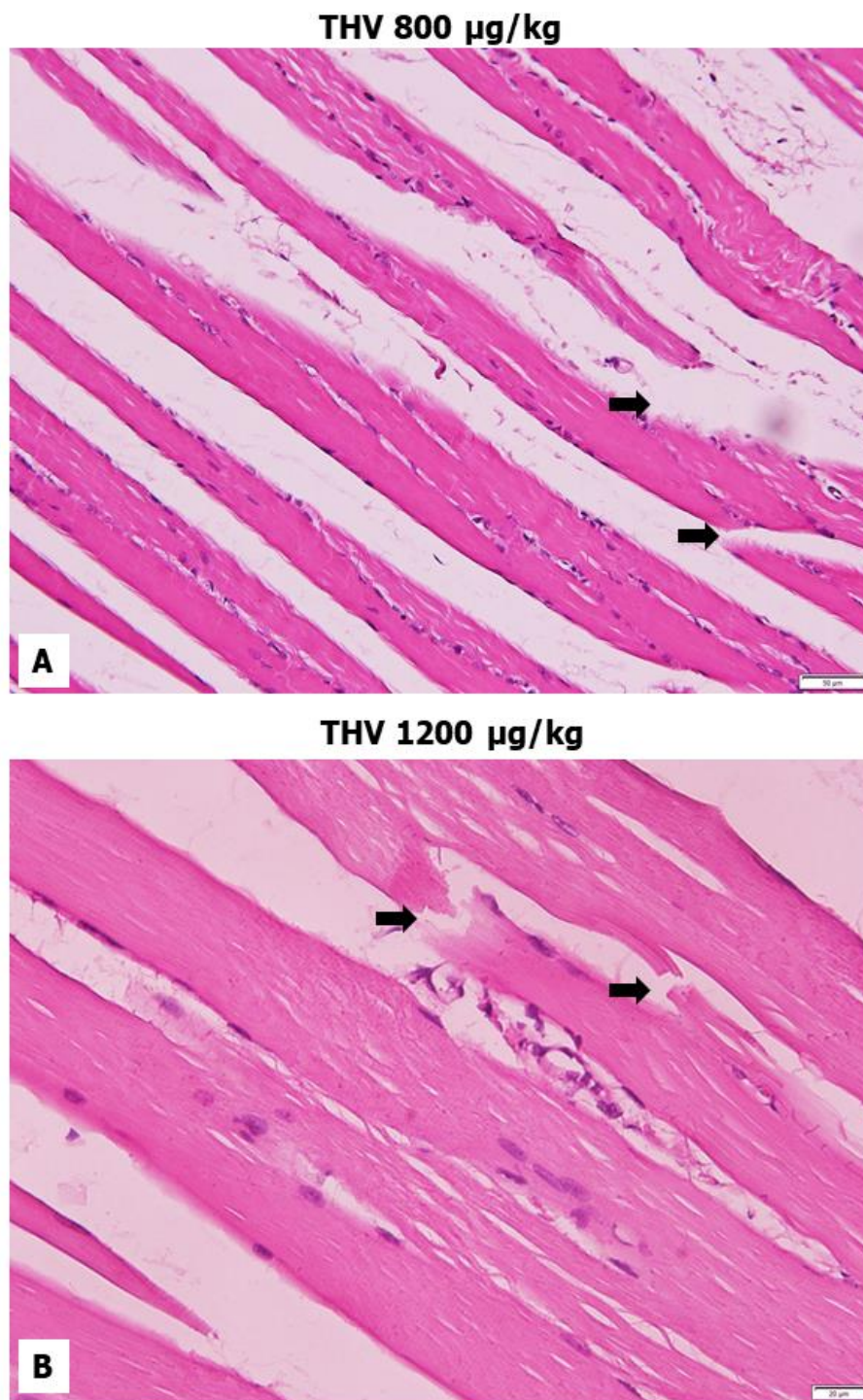
กลุ่มที่ได้รับการฉีด OHV

ในกลุ่มที่ได้รับการฉีด OHV (500 µg/kg; IM) พบการฉีกขาดของ muscle fibers บางตำแหน่ง และไม่พบลักษณะของความเสียหายที่บ่งชี้ถึงการอักเสบ แสดงลักษณะ fibers และ skeletal muscle cell ยังคงใกล้เคียงกลุ่มควบคุม ไม่พบความแตกต่างที่ชัดเจน

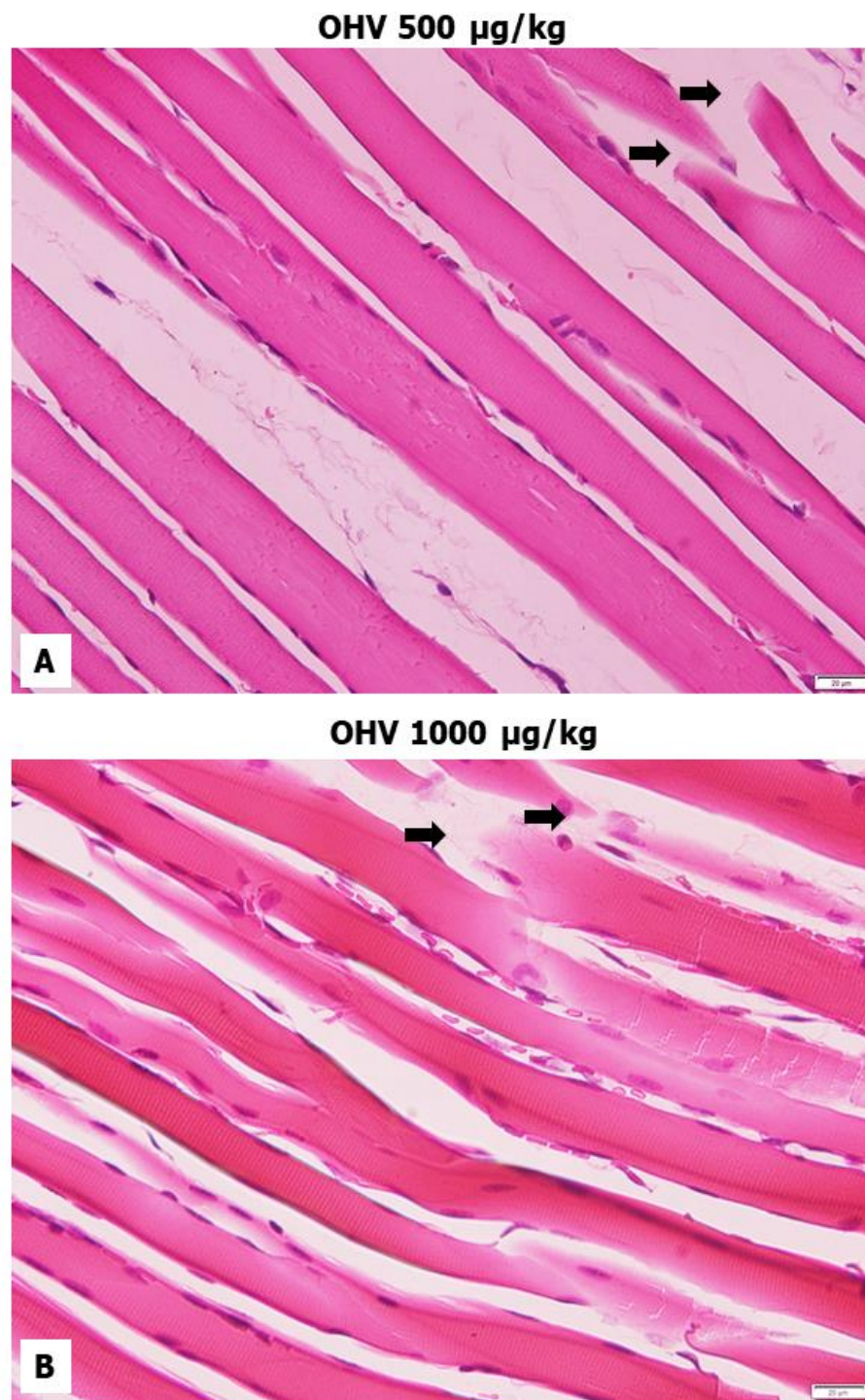
ในกลุ่ม OHV (1000 µg/kg; IM) มีความเสียหายเพิ่มมากกว่ากลุ่มอื่นเล็กน้อย คือพบลักษณะของ congestion ในบางบริเวณเพิ่มขึ้น และมี muscle fibers ฉีกขาดเพิ่ม แต่ถึงอย่างไรก็ตามแม้ลักษณะความเสียหายสำหรับ OHV (1000 µg/kg; IM) ดูเหมือนมีความรุนแรงมากกว่ากลุ่มอื่น แต่ยังคงมีความเสียหายน้อยกว่า 25% ดังนั้นความเสียหายจัดอยู่ในระดับเกรด 1 เช่นเดียวกัน (รูปที่ 4-34)



รูปที่ 4-32 แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของกล้ามเนื้อลาย ที่ย้อมด้วย H&E staining ในหนูขาวที่ได้รับการฉีด CRV ขนาด 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$, IM (A) และ CRV ขนาด 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$, IM (B); scale bar = 20 μm



รูปที่ 4-33 แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยากล้ามเนื้อลาย ที่ย้อมด้วย H&E staining ในหนูขาวที่ได้รับการฉีด THV ขนาด 800 $\mu\text{g}/\text{kg}$, IM (A) และ THV ขนาด 1200 $\mu\text{g}/\text{kg}$, IM (B); scale bar = 20 μm



รูปที่ 4-34 แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของกล้ามเนื้อลาย ที่ย้อมด้วย H&E staining ในหนูขาวที่ได้รับการฉีด OHV 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, IM (A) และ OHV 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$, IM (B) ทางกล้ามเนื้อ (IM); scale bar = 20 μm

ตารางที่ 11 แสดงระดับคะแนนพยาธิสภาพของกล้ามเนื้อลาย (skeletal muscle)

Tissue change	Score					
	CRV (300µg/kg)	CRV (500µg/kg)	THV (800µg/kg)	THV (1200µg/kg)	OHV (500µg/kg)	OHV (1000µg/kg)
Muscle necrosis -Less than 25% muscle necrosis	+	+	+	+	+	+

เมื่อทำการประเมินระดับความรุนแรงทางพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นกับกล้ามเนื้อลาย ในแต่ละกลุ่มเมื่อนำมาเปรียบเทียบกันแล้ว พบว่า หลังการฉีด

CRV (300 µg/kg; IM) ทำให้เกิด Muscle necrosis ที่เกรด 1 หรือการแตกหักของ skeletal myofibers น้อยกว่า 25%

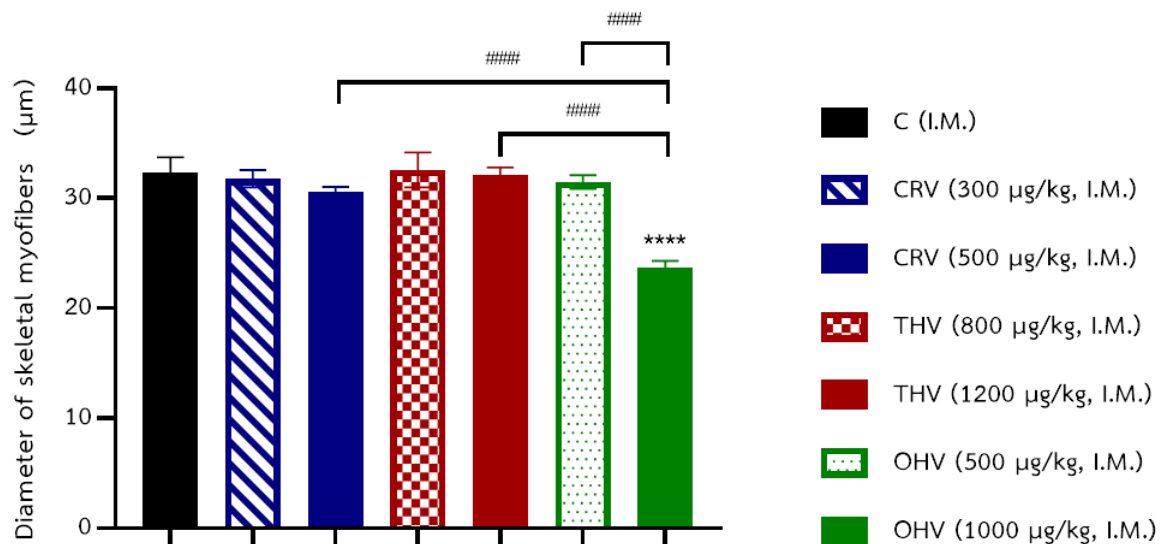
CRV (500 µg/kg; IM) ทำให้เกิด Muscle necrosis ที่เกรด 1 หรือการแตกหักของ skeletal myofibers น้อยกว่า 25%

THV (800 µg/kg; IM) ทำให้เกิด Muscle necrosis ที่เกรด 1 หรือการแตกหักของ skeletal myofibers น้อยกว่า 25%

THV (800 µg/kg; IM) ทำให้เกิด Muscle necrosis ที่เกรด 1 หรือการแตกหักของ skeletal myofibers น้อยกว่า 25%

OHV (500 µg/kg; IM) ทำให้เกิด Muscle necrosis ที่เกรด 1 หรือการแตกหักของ skeletal myofibers น้อยกว่า 25%

OHV (1000 µg/kg; IM) แม้ความเสียหายจะรุนแรงมากกว่ากลุ่มอื่น แต่ถึงอย่างไรความเสียหายยังคงน้อยกว่า 25% จึงจัดอยู่ที่เกรด 1 (ตารางที่ 11)



รูปที่ 4-35 แสดงค่าเฉลี่ยความกว้างของ skeletal myofibers ของกล้ามเนื้อของ: C; Control, CRV (L); *Calloselasma rhodostoma* venom ขนาด 300 µg/kg, CRV (H); *Calloselasma rhodostoma* venom ขนาด 500 µg/kg, THV (L); *Trimeresurus hageni* venom ขนาด 800 µg/kg, THV (H); *Trimeresurus hageni* venom ขนาด 1200 µg/kg, OHV (L); *Ophiophagus hannah* venom ขนาด 500 µg/kg, OHV (H); *Ophiophagus hannah* venom ขนาด 1000 µg/kg. (N=4)

(**** $p < 0.0001$ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม C)

(#### $p < 0.0001$ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม)

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการวิจัย

จากการศึกษาผลของพิษงูต่อความดันโลหิตในหนูขาวพบว่าการฉีด CRV (*Calloselasma rhodostoma* venom; พิษงูกะปะ) และ THV (*Trimeresurus hageni* venom; พิษงูแก้วทางแดง) ทำให้มีการลดลงของ MAP โดย CRV และ THV เป็นพิษงูใน families viperidae ซึ่งมีองค์ประกอบที่ทำให้เกิด hematotoxicity และเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของความดันโลหิต^[38,63] ที่ลดต่ำลงภายใน 15 วินาที การฉีด CRV ขนาด 500 µg/kg และ THV ขนาด 400 µg/kg เข้าทางหลอดเลือดดำ (IV) ส่งผลให้ MAP ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับ MAP ในภาวะปกติ โดยการฉีด CRV และ THV ในขนาดที่สูงขึ้น (1000 µg/kg) มีผลทำให้ MAP ลดต่ำลงมากจนไม่สามารถวัดความดันโลหิตได้ และทำให้หนูขาวเสียชีวิตในที่สุด

งานวิจัยก่อนหน้าของ Luksic และคณะ ในปี 2008 ที่ศึกษาพิษงูใน families viperidae ได้บ่งชี้ถึงขนาดของพิษที่หนูทดลองได้รับ (4 mg subcutaneous injection) สามารถทำให้หนูทดลองเสียชีวิตได้ในระยะเวลา 48 ชม.^[32] และงานวิจัยในปี 2006 ที่ศึกษาพิษงูในวงศ์ Viperidae จากสาธารณรัฐโครเอเชีย^[35] พบว่า พิษเกี่ยวข้องกับ cardiocirculatory disturbances^[36] ซึ่งเหนี่ยวนำให้เกิด cardiac effects^[5] เป็นสาเหตุของอาการ shock อย่างเฉียบพลันได้ถึง 5.1% นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ยืนยันผลของพิษงูกลุ่ม viperidae ที่ศึกษา Horned Viper (*Vipera ammodytes* L.)^[63] พบว่ามีผลลด MAP อย่างรวดเร็วและมีการเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของคลื่นไฟฟ้าหัวใจ ผลกระทบที่โดดเด่นที่สุด คือการหดตัวของกล้ามเนื้อหัวใจ การเพิ่มและลดลงของ diastolic pressure และ systolic pressure ซึ่งจะเกิดขึ้นในกรณีที่ได้รับพิษสูง 150 µg/mL หลังจากผ่านไปหลายนาที^[32] ซึ่งพิษมีผลต่อการเต้นของหัวใจทำให้เกิด irreversible asystolic cardiac arrest จากภาวะ hypercontracture จากการศึกษา mechanism ของพิษต่อหัวใจที่ส่งผลต่อความดันโลหิต^[7,61] มีความเกี่ยวข้องกับ Ca^{2+} ภายในเซลล์ โดย Ca^{2+} จะเป็นตัวทำให้ Actin สามารถจับกับ Myosin ได้ ซึ่งหาก Ca^{2+} ใน cytosol มีมาก จำนวนจุดเกี่ยวข้องกับ Actin – myosin จะยิ่งมากขึ้น^[9,19] ดังนั้นการเพิ่ม Ca^{2+} ใน cytosol จะทำให้แรงบีบของกล้ามเนื้อหัวใจมากขึ้นตามไปด้วย^[16,62] งานวิจัยของ Fox และคณะ ในปี 2005 ที่ศึกษาโปรตีนของ *Trimeresurus stejnegeri* venom พบว่า metalloproteinases (SVMPs) เป็นเอนไซม์ที่ทำให้ความดันเลือดต่ำ^[17] เนื่องจาก SVMPs อาจมีผลยับยั้ง L-type Ca^{2+} channels ของหลอดเลือด^[10] นอกจากนี้ยังมีองค์ประกอบอื่นในพิษงูที่เหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด เช่น bradykinin และ PLA_2 ^[47] พบว่า PLA_2 มีผลทำให้เกิด cardiotoxicity^[67] ซึ่งมีผลต่อการทำลาย cell membranes และทำให้เกิดการคั่งของ Ca^{2+} ภายในเซลล์ เป็นสาเหตุให้เกิด hypercontraction ของกล้ามเนื้อ ส่วน bradykinin peptide มีฤทธิ์ยับยั้งการเปิดของ L-type Ca^{2+} channels ได้เช่นกัน ซึ่งส่งผลต่อหัวใจ ทำให้เกิด

การขยายตัวของหลอดเลือด^[27] อย่างไรก็ตามพบว่าการศึกษา OHV ทางหลอดเลือดดำไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ MAP ในหนูขาว แม้ได้รับการฉีดในขนาดสูง (1000 µg/kg, IV) ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่าใน OHV อาจมีองค์ประกอบที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของระบบไหลเวียนโลหิตในปริมาณน้อยหรือไม่มีโปรตีนที่เหนี่ยวนำการเกิด hematotoxicity

การวิเคราะห์องค์ประกอบใน CRV, THV, และ OHV ด้วย SDS-PAGE analysis ทั้งที่อยู่ในสารละลาย non-reducing และ reducing protein พบว่า CRV มีขนาดโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในช่วง 8-15 และ 18-72 kDa ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sugita Kunalan และคณะ ในปี 2018 ที่ศึกษาลักษณะเฉพาะของโปรตีนในพิษงูกะปะ (*Calloselasma rhodostoma*; CR) และพิษงูจาง (*Ophiophagus hannah*; OH) จากประเทศมาเลเซีย หลังจากย้อมด้วย coomassie blue แสดง molecular weight ที่แตกต่างกัน พบว่า Viperidae (CR) อยู่ในช่วง <60 kDa และ Elapidae (OH) พบโปรตีนขนาดใหญ่ อยู่ที่ 70 kDa, 25 kDa และ 10 kDa ซึ่ง CR พบโปรตีนและเอนไซม์ที่สำคัญ ได้แก่ SVMPs (P-I,P-II,P-III), PDE (phospholipase type B), SVSP, C-type lactin (CTL), PLA₂ และ LAAO ในขณะที่ OH พบโปรตีนที่สำคัญ ได้แก่ 3FTx (Three-finger toxin), complement C3 homolog และ Kunitz-type อย่างไรก็ตามพบว่า SVMPs, CRiSP (Cysteine-rich secretory proteins), PDF, PLA₂ ก็ยังเป็นองค์ประกอบโปรตีนใน OHV ด้วย จากรายงาน SVMP (P-I) อยู่ในช่วง 20-30 kDa, SVMP (P-II) อยู่ในช่วง 30-60 kDa, SVMP (P-III) อยู่ในช่วง 60-100 kDa, CRiSP พบ molecular weight ในช่วง 20-30 kDa^[28,33] จากรายงานวิจัยของ Siddharth Bhatia และคณะ^[12] ศึกษาขนาดโปรตีนในพิษ *Echis carinatus* ซึ่งเป็นงูในวงศ์ viperidae จาก 3 รัฐของประเทศอินเดีย โดยพบว่า metalloproteinase (P-II and P-III SVMP); SVMP (P-II) molecular weight อยู่ในช่วง 30-60 kDa, SVMP (P-III) อยู่ในช่วง 60-100 kDa และ L-amino acid oxidase (LAAO) อยู่ในช่วง ~ 50-70 kDa^[12] ส่วน PLA₂ มีขนาดโมเลกุลประมาณ 12-16 kDa และ Serine proteases (SVSP) มีขนาดโมเลกุลที่ 25-35 kDa.

ในพิษงูแก้วหางแดง (THV) พบโปรตีนในช่วง 8-15, 24-57 kDa ซึ่งขนาดโปรตีนอยู่ในช่วงที่สอดคล้องกับการศึกษาวิจัยของ Supeecha Kumkate และคณะ^[32] ที่ศึกษา proteomics analysis ในพิษงูเขียวหางไหม้ตาโต (*Trimeresurus macrops*; TM) และพิษงูแก้วหางแดง (*Trimeresurus hageni*; TH) พบองค์ประกอบที่เป็นโปรตีนสำคัญ ได้แก่ PLA₂, SVMP, SVSP, CRiSPs, disintegrin, LAAO และ C-type lactin โดย PLA₂ สามารถทำให้เกิด neurotoxic, myotoxic, cardiotoxic, cytotoxic, hemolytic, hypotensive platelet aggregation, anticoagulant และ edematogenic โปรตีน SVMPs ทำให้เกิด hemorrhagic, fibrinolytic, prothrombin activating, blood coagulation, apoptotic และ ยับยั้งกระบวนการ platelet aggregation^[32,33] การศึกษาพิษงูเขียวหางไหม้ลายเสือ (*Trimeresurus purpureomaculatus*; TP)

จากประเทศมาเลเซีย^[57] พบขนาดโมเลกุลของโปรตีนอยู่ที่ 55-60 kDa ซึ่งระบุว่าเป็น LAAO (L-Amino Acid Oxidase)^[65] LAAO สามารถทำให้เกิด hemorrhage, edema, coagulation และเกิด platelet aggregation ผลการศึกษาพิษงูจงอาง (OHV) พบโปรตีนในช่วง 3.5-8 kDa และ 42-72 kDa ที่สอดคล้องกับงานวิจัยของ Choo Hock Tan และคณะ ในปี 2015 พบโปรตีนในพิษงูจงอาง จากประเทศมาเลเซีย ขนาดโปรตีนอยู่ในช่วง 50-70 kDa, 20-30 kDa และขนาดต่ำ <14 kDa^[33] ระบุว่าเป็น LAAOs และ SVMPs (53-65 kDa), CRISPs (27 kDa), PLA₂s และ 3FTxs (<14 kDa)^[12,64] อย่างไรก็ตามจากข้อมูลพบว่า โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบหลักที่พบใน CRV และ THV คือ SVMPs ซึ่งมีผลทำให้เกิดพยาธิสภาพหลักๆ คือ hemorrhagic, fibrinolytic, proinflammatory และทำให้เกิด platelet aggregation นอกจากนี้ยังมี PDE, SVSP, CTL, LAAO และ PLA₂ ที่พบว่ามียากในพิษงูกลุ่ม Viperidae ซึ่งแตกต่างใน OHV แม้มี SVMPs, PDE, LAAO และ PLA₂ เป็นองค์ประกอบแต่ไม่ใช่โปรตีนหลัก ซึ่งโปรตีนหลักของ OHV ได้แก่ 3FTx (Three-finger toxin) โดยพบว่า 3FTx เป็น lethal factor ของ OHV นอกจากนี้ยังมีโปรตีนที่สำคัญ คือ complement C3 homolog เมื่อเข้าสู่กระแสเลือดจะทำให้เกิด complement activation, Kunitz-type ทำหน้าที่ยับยั้ง serine protease และ block ion channels (K⁺ และ Ca²⁺)

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของกล้ามเนื้อหัวใจ ไต ตับ และกล้ามเนื้อลาย แสดงผลของพิษงูกะปะ (CRV), งูแก้วหางแดง (THV) และงูจงอาง (OHV) พบว่า CRV มีฤทธิ์ทำลายกล้ามเนื้อหัวใจ (cardiac muscle) โดยเกิดการฉีกขาดของ cardiac myofibers และพบ myocytes edema ร่วมกับการเกิด congestion ซึ่งระดับความรุนแรงของพิษมีความแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับปริมาณพิษที่ได้รับ ซึ่งพิษงูกะปะและงูแก้วหางแดงจะมีองค์ประกอบที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพต่อระบบไหลเวียนโลหิต การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า พิษงูกลุ่ม viperidae มีโปรตีน PLA₂ ซึ่งมีฤทธิ์ทำลาย plasma membrane โดยการยับยั้ง L-type Ca²⁺ channels^[21] ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของ Ca²⁺ ใน cytosol มีผลให้เกิด hypercontraction ของกล้ามเนื้อหัวใจ โดยออกฤทธิ์ที่ cardiac muscle จะทำให้เกิด myocardial degeneration หรือ cardiac muscle rupture^[25] นอกจากนี้ เอนไซม์นี้ยังมีความสำคัญอย่างมากต่อการเกิด hypotension ทำให้หัวใจเต้นช้าลง คลื่นไฟฟ้าหัวใจผิดปกติ เกิด tissue necrosis, flaccid paralysis, anticoagulation ได้^[63] จากการรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับ cardiotoxicity พบว่าโปรตีนหลายตัวมีผลทำให้เกิด L-type Ca²⁺ channel blockers ส่งผลให้หัวใจและหลอดเลือดทำงานผิดปกติ โดยทำให้หัวใจเต้นช้าลง หลอดเลือดมีการขยายตัวเพิ่มขึ้น^[47] มีรายงานสนับสนุนอีกว่า cardiovascular dysfunction เกิดจาก โปรตีน bradykinin, snake venom metalloproteinases (SVMPs) and PLA₂s^[25,27] มีผลให้เกิดการทำลายต่อเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อหัวใจ ในงานวิจัยที่ศึกษา SVMPs และ PLA₂s บ่งชี้ว่ามีผลยับยั้ง L-type Ca²⁺ channels^[10] ซึ่งเกิดการปิดกั้นการไหลของ Ca²⁺ จาก extracellular matrix เข้าและออก

intracellular matrix ส่งผลให้เกิดการคั่งของ Ca^{2+} ภายใน cytosol โดยภาวะที่ Ca^{2+} ในเซลล์มากเกินไป มีผลทำให้เกิด hypercontracture^[7,19] ซึ่งเป็นภาวะที่กล้ามเนื้อเกิดการหดตัวที่เร็วแต่ไม่มีประสิทธิภาพ ส่งผลให้เกิด cellular disruption หรือกล้ามเนื้อหัวใจตาย ซึ่งเกิดกระบวนการ peroxidation ของไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ เป็นเหตุให้โครงสร้างและหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย และเกิดการฉีกขาด สำหรับพิษงูจงอางในการศึกษาครั้งนี้พบว่า OHV 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ มีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยจากการศึกษาทางวิจัยของ นพ.ภัทรพงศ์ สิ้นประจักษ์ พบว่า พิษงูจงอางมีส่วนประกอบที่เป็นโปรตีน PLA_{2s} ซึ่งโปรตีนตัวนี้ส่งผลให้เกิด myocardial degeneration ซึ่งเป็น myotoxicity มีฤทธิ์ทำลาย plasma membrane ของ cardiac muscle fibers^[49] โดยเกิดการ block ของ L-type Ca^{2+} channels เช่นเดียวกัน^[10,25,27,47]

นอกจากนี้การศึกษานี้พบระดับความรุนแรงของพิษต่อเนื้อเยื่อไต โดยความรุนแรงมากที่สุดเป็นอันดับ 1 เมื่อเทียบพยาธิสภาพที่เกิดกับอวัยวะอื่น ๆ พบว่าเกิด congestion บริเวณ glomeruli และ interstitial vessels เกิด inflammatory infiltration กระจายทั่วเนื้อเยื่อไต และเกิด tubular necrosis และพบปัสสาวะเป็นเลือด การศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาของพิษงูกลุ่ม viperidae ในปี 2018 ของ Rituparna Ghosh และคณะ กล่าวว่าความรุนแรงของพยาธิสภาพขึ้นอยู่กับปริมาณและความเข้มข้นของพิษ อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ได้แสดงผลของ CRV (300 $\mu\text{g}/\text{kg}$), CRV (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$), THV (800 $\mu\text{g}/\text{kg}$), THV (1200 $\mu\text{g}/\text{kg}$), OHV (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$) และ OHV (1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) มีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม งานวิจัยของ Rituparna ซึ่งให้เห็นความผิดปกติรวมถึงลักษณะการบวมของ glomerulus และ tubular necrosis^[6] ซึ่งยืนยันว่าพิษงูทำให้เกิดพิษที่รุนแรงต่อไตอย่างมาก ความรุนแรงที่เกิดขึ้นมาจากโปรตีนหลายชนิด ที่สำคัญคือ SVMPs^[22] ซึ่งมีส่วนสำคัญในการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อ ทำให้เกิด inflammatory และ haemodynamic ซึ่งกระบวนการเหล่านี้ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำของโปรตีนในพิษงูส่งผลให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์ในที่สุด^[41] นอกจากนี้ยังมีรายงานระบุว่าบริเวณที่พบความหนาแน่นของหลอดเลือดสูงมีแนวโน้มที่จะเกิดพยาธิสภาพที่รุนแรงตามไปด้วย^[14,24,50,53] โดยเมื่อพิษเข้าสู่ร่างกายจะถูกดูดซึมผ่านทางกระแสเลือด ดังนั้นบริเวณที่มีหลอดเลือดมากจึงเกิดการแพร่กระจายของพิษที่รุนแรง การเกิด Intravascular haemolysis เป็นการทำลายเม็ดเลือดแดงที่เกิดขึ้นในกระแสโลหิต ทำให้ hemoglobin คั่งค้างอยู่ในกระแสโลหิต globin ที่เหลือจากการจับกับ haptoglobin จะถูกขับออกทางไตเป็น Hemoglobinuria^[11] จากงานวิจัยของ Cattell และคณะ พบว่า Habu snake venom เหนี่ยวนำการเกิด glomerulonephritis^[30] โดยกลไกที่เกิดจากการสร้าง antibody ไปจับกับ antigen จนเกิดการกระตุ้น complement ในกระแสเลือด ทำให้ร่างกายหลั่ง kinin กระตุ้นระบบการแข็งตัวของเลือด เป็นผลให้ lymphocyte แทรกซึมผ่านเข้ามา จึงเกิดการอักเสบและกระตุ้นให้มีการเพิ่มขึ้นของ mesangial cell จนเกิดอุดตันที่หลอดเลือดฝอย ส่งผลให้มีการรั่วไหลของ

เม็ดเลือดแดง เกิด congestion ในเนื้อเยื่อ^[20,39,51] Silva ได้ทำการศึกษา toxicity ของ hump-nosed pit vipers (*Hypnale hypnale*) ต่อไตพบ hemorrhages ในชั้น medulla, เกิด congestion ตามบริเวณ glomeruli และ vessels พบลักษณะของ brush border ที่ถูกทำลาย เกิด tubular injury และ cell necrosis^[49] ซึ่งแสดงให้เห็นว่าพิษงูมีผลกระทบต่อเนื้อเยื่อไต และจากงานวิจัยของ Mongkon ได้ทำการศึกษา non-neurotoxic activity ของ *Bungarus candidus* พบว่าเกิด interstitial vessels congestion, hyaline cast, tubular injury, มีการขยายกว้างของ renal capillary ทำให้เห็นเป็นลักษณะโครงสร้างภายในอัดแน่น การสัมผัสพิษที่เวลา 24 ชม. พบว่าเกิดความเสียหายของ brush border และเกิด congestion กระจายหนาแน่นเป็นวงกว้าง^[13] อย่างไรก็ตามมีหลายงานวิจัยชี้ให้เห็นว่าพยาธิสภาพเหล่านี้เป็นผลจากโปรตีน SVMPs ที่มีการเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ และทำให้เกิดการตายของเซลล์^[18,58] ในขณะที่ PLA₂ จะออกฤทธิ์ทำลาย cell membrane ทำให้ผนังของเซลล์เกิดการฉีกขาด ส่งผลให้เกิดการกระจายตัวของเม็ดเลือดไปยังส่วนต่างๆได้ งานวิจัยของ Morais ศึกษา L-Aminoacid Oxidase (LAO) ต่อ nephrotoxicity^[39,65] พบว่า LAO เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งมีฤทธิ์เป็น cytotoxicity โดยเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของ Membrane permeability ซึ่งเพิ่มการซึมผ่านของผนังหลอดเลือด มีผลต่อการรวมตัวของ platelet และทำให้เกิดการ necrosis ของเซลล์^[20, 39]

จากผลการศึกษาพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นในเนื้อเยื่อตับ พบว่า CRV (300 µg/kg), CRV (500 µg/kg), THV (800 µg/kg), THV (1200 µg/kg), OHV (500 µg/kg) และ OHV (1000 µg/kg) มีความต่างอย่างมีนัยสำคัญ ระดับความรุนแรงมากที่สุด คือ CRV (500 µg/kg) ซึ่งแสดงถึงภาวะที่เกิด inflammatory มีเลือดคั่งภายใน central vein และแทรกในช่อง sinusoid แสดงลักษณะของ cell ที่มีการบวม ซึ่งทำให้ช่อง sinusoid แคบ มีรายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับลักษณะของการเกิดการอักเสบจากพิษงู สำหรับ SVMPs ซึ่งนอกจากจะมีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้เกิด hemorrhage และ myonecrosis แล้วยังมีบทบาทกระตุ้นการอักเสบด้วย โดย SVMP (P-I) ทำให้เกิด edema เกิดเป็นตุ่มน้ำ (blisters) และแผลพุพอง จากนั้นกลุ่มของ leukocyte จึงเกิดกระบวนการ migration ทำให้เกิดการอักเสบตามมา^[58] นอกจากนี้มีรายงานถึงโปรตีน cytotoxins ที่มีฤทธิ์ทำลายเซลล์โดยตรง จึงทำให้เกิด blisters hemorrhagic blebs และ tissue necrosis ได้ cytotoxins ในพิษงูจะกระตุ้นกระบวนการอักเสบของร่างกาย ชักนำให้เกิดการขาดเลือดใต้ชั้นผิวหนัง ซึ่งเกิดจากกระบวนการ platelet-leukocyte aggregation ร่วมกับเกิด endothelial injury ของ capillaries จนเกิดลักษณะการบวมขึ้นของ tissue และเกิดการ necrosis ของเนื้อเยื่อ เมื่อมีความเสียหายมากขึ้นจนถึงขั้นลึกพร้อมกับ exotoxin จะเกิดการอุดตันของ venule และ arterioles จึงทำให้ความเสียหายขยายแพร่กระจายอย่างรวดเร็ว ซึ่งอาจรุนแรงจนเกิด systemic toxicity ได้

จากการศึกษาในครั้งนี้ เมื่อศึกษาลักษณะพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นในกล้ามเนื้อลาย ผ่านกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง พบว่า พยาธิสภาพที่เกิดขึ้นในทุกกลุ่มจัดอยู่ที่เกรด 1 ซึ่งพบความเสียหายของ muscle necrosis น้อยกว่า 25% แต่จากผลจากสถิติ เมื่อทำการวัดขนาดความกว้างของ myofibers พบว่า OHV ขนาด 1000 µg/kg มีแนวโน้มการเกิดพยาธิสภาพที่มากกว่าพิษงู CRV และ THV โดยแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่พิษอื่นๆ ไม่แสดงค่าความสัมพันธ์ทางสถิติ งานวิจัยของ Mongkon และคณะ ในปี 2018 ได้ทำการศึกษา non-neurotoxic activity ของงูทับสมิงคลา (*Bungarus candidus*) จากประเทศไทย ซึ่งสัตว์ทดลองได้รับการฉีดพิษเข้าทางกล้ามเนื้อ (50 µg/kg, IM) จากนั้นทำการ termination ที่เวลา 3, 6 และ 24 ชม. ผลการศึกษากล้ามเนื้อ gastrocnemius พบว่า skeletal muscle แสดงลักษณะของ myofibers สลายหรือเสียหายเล็กน้อย มีการแทรกซึมของ neutrophilic และเกิด muscle necrosis^[49] จากงานวิจัยของ Picado และคณะ^[25] ศึกษาคุณสมบัติ LPA₂ ในการเหนี่ยวนำให้เกิด skeletal muscle damage โดยพบว่า มีความเกี่ยวข้องกับ ion และ molecules ที่ปล่อยออกมาจาก cell damage ซึ่งมีการกระตุ้นให้เกิดการไหลออกของ K⁺ และการไหลเข้าของ Ca²⁺ ไปในเซลล์ ATP เกิดการ diffusion ไปยังบริเวณ myofibers damage ดังนั้น ATP จึงทำหน้าที่เปรียบเสมือนตัวเร่งปฏิกิริยาให้เกิดการขยายกว้างของ myofibers damage^[15,25] มีงานวิจัยหลายงานสนับสนุนผลที่รุนแรงของพิษงูจงอางต่อเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อลาย เนื่องจากงูจงอางเป็นงูที่มีพิษต่อระบบประสาท ซึ่งพบว่าภายในพิษมีองค์ประกอบโปรตีน ที่เป็น neurotoxin ซึ่งจะจับกับ nicotinic acetylcholine receptor ที่บริเวณรอยต่อประสาทและกล้ามเนื้อ ทำให้ยับยั้งการส่งสัญญาณจากปลายประสาทไปยังกล้ามเนื้อลาย โดย PLA₂ จะทำให้เนื้อเยื่อมีการอักเสบมากขึ้น เกิดลักษณะ myodegeneration และ necrosis คือเกิด cell edema เกิดการ disruption ของ myofibrils และเกิด clumped myofibrils^[49] โปรตีนทั้ง 2 จะออกฤทธิ์และทำงานร่วมกัน ดังนั้นการลุกลามของพยาธิสภาพจึงแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็วในกล้ามเนื้อลาย อย่างไรก็ตามในครั้งนี้อาจยังไม่สามารถสรุปแน่ชัดได้ถึงความรุนแรงของพิษงูจงอางต่อกล้ามเนื้อลาย เนื่องจากพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นยังไม่เด่นชัดมากเท่าที่ควร อาจเพราะระยะเวลาของการสัมผัสพิษในหนูทดลองที่ยังน้อยเกินไปสำหรับการทดลองครั้งนี้

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า พิษทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ พิษงูกะปะ (CRV), งูแก้วหางแดง (THV) และงูจงอาง (OHV) มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อหัวใจ ไต ตับ และกล้ามเนื้อลาย ซึ่งความรุนแรงของพยาธิสภาพขึ้นอยู่กับปริมาณของพิษที่เข้าสู่ร่างกาย และระยะเวลาของการสัมผัสพิษก็จัดเป็นส่วนสำคัญที่ส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อเนื้อเยื่อต่างๆ ในครั้งนี้ พบว่าการฉีดพิษเข้าทางกล้ามเนื้อลาย (IM) พิษของงู families Viperidae (CRV, THV) มีผลโดยตรงต่ออวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบไหลเวียนเลือดมากกว่าพิษของงู families Elapidae (OHV) โดยความรุนแรงที่ส่งผลมากที่สุด คือ เนื้อเยื่อไต ตับ และเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อหัวใจ (ตามลำดับ) พยาธิสภาพที่เกิดขึ้นนี้ถูกเหนี่ยวนำจากโปรตีน SVMPs ทำให้เกิด hemorrhagic, fibrinolytic, blood coagulation รวมถึงการยับยั้งกระบวนการ platelet aggregation นอกจากนี้ผลจากโปรตีน PLA₂, LAO, CTL, PDE และ SVSP ก็มีบทบาทสำคัญต่อการเหนี่ยวนำให้เกิด neurotoxic, myotoxic, cardiotoxic, cytotoxic, hemolytic, hypotensive platelet aggregation และ anticoagulant โดยพิษของงู families Viperidae (CRV, THV) ที่มีผลโดยตรงต่อระบบไหลเวียนโลหิต สามารถทำให้เกิดพยาธิสภาพต่อไตสูงเป็นอันดับ 1 โดยพบว่า เกิด congestion, glomerulus atrophy และพบ tubular cast รวมถึงการรวมกลุ่มกันของ lymphocyte ซึ่งบ่งบอกถึงการอักเสบภายในเนื้อเยื่อไต นอกจากนี้เนื้อเยื่อตับยังได้รับความเสียหาย โดยพบ congestion แทรกระหว่าง sinusoid อย่างหนาแน่น เกิด hepatocyte cell edema และพบ Kupffer cells กระจายทั่วๆ เนื้อเยื่อตับ ในครั้งนี้ผู้วิจัยพบความเสียหายที่เกิดขึ้นต่อกล้ามเนื้อหัวใจ โดยพบว่าเกิด muscle fibers rupture สำหรับการทดสอบผลของพิษงูต่อความดันโลหิตเพื่อสนับสนุนผลต่อระบบโลหิตของ CRV และ THV โดยการฉีดพิษเข้าทางหลอดเลือดดำ (IV) พบว่า CRV (1000 µg/kg, IV) และ THV (800 µg/kg, IV) ส่งผลให้เกิดการเสียชีวิตในสัตว์ทดลอง ในขณะที่ OHV (500 µg/kg, IV) และ OHV (1000 µg/kg, IV) ไม่ส่งผลดังกล่าว โดย MAP มีความใกล้เคียงกับค่าปกติ และพบว่า OHV มีผลต่ออวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบไหลเวียนโลหิตที่น้อยกว่า CRV และ THV เนื่องจาก OHV มีโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบหลักเกี่ยวข้องกับการเกิดผลทางระบบประสาท โดยโปรตีนที่พบใน OHV ได้แก่ 3FTx, complement C3 homolog และ Kunitz-type นอกจากนี้ SVMPs, CRISP, PDF, PLA₂ ก็ยังคงมีบทบาทที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพได้ นอกจากอวัยวะทั้ง 3 ที่เกี่ยวข้องกับระบบไหลเวียนโลหิต ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาผลของพิษงูต่อกล้ามเนื้อลาย โดยศึกษากล้ามเนื้อ gastrocnemius เนื่องจากต้องการทราบถึงผลของพิษต่อกล้ามเนื้อโดยตรง จากผลการวิเคราะห์ผ่านกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างในครั้งนี้ พบว่า CRV, THV และ OHV หลังฉีดพิษทางกล้ามเนื้อลาย (IM) แสดงระดับความรุนแรงของพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นน้อยกว่า 25% หลังจากทำการวัดขนาดความกว้างของ myofibers พบว่า OHV

(1000 µg/kg, I.M.) แสดงค่าการมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามผลที่เกิดขึ้นต่อกล้ามเนื้อลายยังไม่เด่นชัดมากนัก อาจเนื่องจากระยะเวลาของการสัมผัสพิษที่น้อยเกินไป ซึ่งมีรายงานบ่งชี้ถึงช่วงระยะเวลาที่สามารถทำให้เกิดพยาธิสภาพที่ชัดเจนอยู่ในช่วง 48-72 ชม. ซึ่งเป็นเกณฑ์ที่สามารถนำไปศึกษาต่อไปสำหรับผู้สนใจศึกษาผลของพิษงู โดยจากแนวโน้มพยาธิสภาพในครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า OHV อาจมีผลต่อกล้ามเนื้อลายที่รุนแรงได้

งานวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า ข้อมูลที่ได้แสดงผลทางพยาธิวิทยาต่อกล้ามเนื้อหัวใจ ไต ตับ และกล้ามเนื้อลาย จากการได้รับพิษของงู 3 ชนิด ได้แก่ งูกะปะ (CRV), งูแก้วหางแดง (THV) และงูจงอาง (HV) จะเป็นประโยชน์ในทางการแพทย์ เพื่อเป็นแนวทางในการวิเคราะห์แยกผลที่เกิดขึ้นต่ออวัยวะต่างๆได้ครอบคลุมมากยิ่งขึ้น เพื่อลดอัตราการเสียชีวิต และความพิการของผู้ป่วยหลังจากถูกงูพิษกัดต่อไปได้ในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล. งูพิษ [อินเทอร์เน็ต]. กรุงเทพมหานคร: คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล; [สืบค้นเมื่อวันที่ 20 มกราคม 2021]. จาก <https://med.mahidol.ac.th/poisoncenter/th/pois-cov/snake>
2. จุล กาญจนเจตน์, สุคนธ์ วิสุทธิพันธ์. งูจงอางกัด อาการทางคลินิกและการรักษา จดหมายเหตุการณ์แพทย์. แพทยสภาสาร; 2537;77: หน้า 646-51.
3. สุชัย สุเทพารักษ์. เซรุ่มต้านพิษงู (SNAKE ANTIVENOMS). ใน: จารุวรรณ ศรีอาภา, บรรณาธิการ. ยาต้านพิษ 3. ครั้งที่ 1. สมุทรปราการ: สมาคมพิษวิทยาคลินิก; 2556. หน้า 29.
4. ศูนย์ข้อมูลพิษวิทยา กระทรวงสาธารณสุข. งูพิษกัดและการดูแลผู้ป่วย [อินเทอร์เน็ต]. กรุงเทพมหานคร: ศูนย์ข้อมูลพิษวิทยา กระทรวงสาธารณสุข; [สืบค้นเมื่อวันที่ 20 มกราคม 2021]. จาก http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_toxic/a_tx_1_001c.asp?info_id=104
5. Al-Johany AM, Al-Sadoon MK, Moneim AE, Bauomy AA, Diab MS. Histological, molecular and biochemical detection of renal injury after Echis pyramidum snake envenomation in rats. Saudi journal of biological sciences 2015;22(3):302-311.
6. Al-Snafi AE. Adonis aestivalis: pharmacological and toxicological activities-A review. Asian Journal of Pharmaceutical Science & Technology 2016;6(2):96-102.
7. Alloatti G, Camino E, Cedrini L, Losano, G, Marsh NA., Whaler BC. The effects of Gaboon viper (*Bitis gabonica*) venom on the electrical and mechanical activity of the guinea-pig myocardium. Toxicon 1986;24:47-61.
8. Bernardoni JL, Sousa LF, Wermelinger LS, Lopes AS, Prezoto BC, Serrano SM, Moura-da-Silva AM. Functional variability of snake venom metalloproteinases: adaptive advantages in targeting different prey and implications for human envenomation. PLoS One 2014;9(10):e109651.
9. Boron WF, & Boulpaep EL. Medical physiology. Philadelphia, PA: Elsevier 2017.
10. Calvete JJ. Snake venomomics: From the inventory of toxins to biology. Toxicon 2013;75:44-62.

11. Cattell V. Focal mesangial proliferative glomerulonephritis in the rat caused by Habu snake venom: the role of platelets. *British journal of experimental pathology* 1979;60(2):201.
12. Chang HC, Tsai TS, Tsai IH. Functional proteomic approach to discover geographic variations of king cobra venoms from Southeast Asia and China. *J Proteomics* 2013;89:141–53.
13. Charoenpitakchai M, Wiwatwarayos K, Jaisupa N, Rusmili MRA, Mangmool S, Hodgson WC, Chaisakul J. Non-neurotoxic activity of Malayan krait (*Bungarus candidus*) venom from Thailand. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 2018;24(1):1-9.
14. Chugh KS, Singhal PC, Kher VK, Gupta VK, Malik GH, Narayan G, Datta BN. Spectrum of acute cortical necrosis in Indian patients. *The American journal of the medical sciences* 1983;286(1):10-20.
15. David A. Snake venoms in science and clinical medicine 1. Russell's viper: biology, venom and treatment of bites. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1989;83(6):732-740.
16. El-Saadani MA, & El-Sayed MF. A bradykinin potentiating peptide from Egyptian cobra venom strongly affects rat atrium contractile force and cellular calcium regulation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 2003;136(4):387-395.
17. Fox JW, Serrano SM. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. *Toxicon* 2005;45:969–985.
18. Gutiérrez JM, Escalante T, Rucavado A, Herrera C. Hemorrhage caused by snake venom metalloproteinases: a journey of discovery and understanding. *Toxins* 2016;8(4):93.

19. Hall, J. E. Guyton and Hall textbook of medical physiology. Philadelphia, PA: Elsevier 2016.
20. Hiu JJ, Yap MKK. Cytotoxicity of snake venom enzymatic toxins: phospholipase A2 and l-amino acid oxidase. *Biochemical Society Transactions* 2020;48(2):719-731.
21. Ho M, Looareesuwan S, Vejcho S, Chanthavanich P, Supanaranond W, Phillips RE, Karbwang J. Clinical Significance of Venom Antigen Levels in Patients Envenomed by the Malayan Pit Viper (*Calloselasma Rhodostoma*). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1986;35(3):579-587.
22. Huang HC. Effects of phospholipase A2 from *Vipera russelli* snake venom on blood pressure, plasma prostacyclin level and rennin activity in rats. *Toxicon* 1984;22:253-64.
23. Hutton RA, Looareesuwan S, Ho M, Silamut K, Chanthavanich P, Karbwang J, Warrell DA. Arboreal green pit vipers (*genus Trimeresurus*) of South-East Asia: bites by *T. albolabris* and *T. macrops* in Thailand and a review of the literature. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1990;84(6):866-874.
24. Indraprasit S, Boonpucknavig V. Acute interstitial nephritis after a Russell's viper snake bite. *Clinical nephrology* 1986;15:111.
25. Instituto CP. Phospholipases A2 From Viperidae Snake Venoms: How do They Induce Skeletal Muscle Damage. 2011;58:647-659
26. Ismail AK. Snakebite and Envenomation Management in Malaysia. *Clinical Toxinology* 2014;1-27.
27. Joseph R, Pahari S, Hodgson WC, Kini RM. Hypotensive agents from snake venoms. *Current Drug Targets-Cardiovascular & Hematological Disorders* 2004;4:437-459.
28. Khoo O, Pannipa C, Narumol P. Venom protein of the haematotoxic snakes *Cryptelytrops albolabris*, *Calloselasma rhodostoma*, and *Daboia russelii siamensis*. *Sci. Asia* 2011;37: 377-381.

29. Kini RM. Excitement ahead: Structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. *Toxicon* 2003;42(8):827-840.
30. Kubo A, Iwano M, Kobayashi Y. In vitro effects of Habu snake venom on cultured mesangial cells. *Nephron* 2002;92:665–72.
31. Kumkate S, Chanhom L, Thiangtrongjit T, Noiphrom J, Laoungboa P, Khaw O, Reamtong O. Venomics and Cellular Toxicity of Thai Pit Vipers (*Trimeresurus macrops* and *T. hageni*). *Toxins* 2020;12(1): 54.
32. Kurohmaru M, Matsui T, Igarashi H, Hattori S, Hayashi Y. Distribution of actin filaments in the seminiferous epithelium of the Habu, *Trimeresurus flavoviridis*. *Anatomia, histologia, embryologia* 2019;48(5):505-507.
33. Kunalan S, Othman I, Syed Hassan S, Hodgson WC. Proteomic characterization of two medically important malaysian snake venoms, *calloselasma rhodostoma* (malayan pit viper) and *ophiophagus hannah* (king cobra). *Toxins* 2018;10(11):434.
34. Looareesuwan S, Viravan C, Warrell DA. Factors contributing to fatal snake bite in the rural tropics: analysis of 46 cases in Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1988; 82:930-4.
35. Luksic B, Bradaric N, Prgomet S. Venomous snakebites in southern Croatia. *Collegium antropologicum* 2006;30:191–197.
36. Maretic Z. Electrocardiographic changes following bites and stings of venomous animals. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* 1982;33:325–334.
37. Matsumoto K, Hiraiwa N, Yoshiki A, Ohnishi M, Kusakabe M. Tenascin-C expression and splice variant in habu snake venom-induced glomerulonephritis. *Exp. Mol. Pathol* 2002;72:186–95.
38. Moore RS. Second-degree heart block associated with envenomation by *Vipera berus*. *Emergency Medicine Journal* 1988;5(2):116–118.

39. Morais IC, Pereira GJ, Orzáez M, Jorge RJ, Bincoletto C, Toyama MH, Martins AM. L-Aminoacid oxidase from *Bothrops leucurus* venom induces nephrotoxicity via apoptosis and necrosis. *PLOS One* 2015;10(7): e0132569.
40. Nanayakkara D, Ratnayake R, Ranasinghe JS. Histopathological Changes in Brain, Kidney and Liver of Mice following Intramuscular Administration of Krait Venom. *Ceylon Journal of Science (Biological Sciences)* 2009;38(1):1.
41. Nelson BK. Snake Envenomation Incidence, Clinical Presentation and Management. *Medical Toxicology* 1989;4(1):17-31.
42. Pochanugool C, Wilde H, Jitapunkul S, Limthongkul S. Spontaneous recovery from severe neurotoxic envenoming by a Malayan krait *Bungarus candidus* (Linnaeus) in Thailand. *Wilderness & Environmental Medicine* 1997;8(4):223-225.
43. Rojnuckarin P, Chanthawibun W, Noiphrom J, Pakmanee N, Intragumtornchai T. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of antivenom for local effects of green pit viper bites. Retrieved January 20, 2021
44. Rojnuckarin P, Intragumtornchai T, Sattapiboon R, Muanpasitporn C, Pakmanee N, Khoo O, Swasdikul D. The effects of green pit viper (*Trimeresurus albolabris* and *Trimeresurus macrops*) venom on the fibrinolytic system in human. *Toxicon* 1999; 37(5):743-755.
45. Rosenberger LR. Southeast Asia's Currency Crisis: A Diagnosis and Prescription. *Contemporary Southeast Asia* 1997;19(3):223-251.
46. Rouault M, Rash LD, Escoubas P, Boilard E, Bollinger J, Lomonte B, Lambeau G. Neurotoxicity and Other Pharmacological Activities of the Snake Venom Phospholipase A2OS2: The N-Terminal Region Is More Important Than Enzymatic Activity†. *Biochemistry* 2006;45(18):5800-5816.
47. Rusmili MR, Yee TT, Mustafa MR, Hodgson WC, Othman I. Proteomic characterization and comparison of Malaysian *Bungarus candidus* and *Bungarus fasciatus* venoms. *J. Proteom* 2014;110:129-144.

48. Sachdeva J, Dai W, Kloner RA. Functional and histological assessment of an experimental model of Takotsubo's cardiomyopathy. *Journal of the American Heart Association* 2014;3(3):e000921.
49. Silva A, Gunawardena P, Weilgama D, Maduwage K, Gawarammana I. Comparative in-vivo toxicity of venoms from South Asian hump-nosed pit vipers (Viperidae: Crotalinae: *Hypnale*). *BMC research notes* 2012;5(1):1-7.
50. Sitprijia V, Suvanpha R, Pochanugool C, Chusil S, Tungsanga K. Acute interstitial nephritis in snake bite. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1982;31:408–10.
51. Sitprijia, Visith. "Snakebite nephropathy." *Nephrology* 2006; 11(5):442-448.
52. Soe S, Win MM, Htwe TT, Lwin M, Thet SS, Kyaw WW. Renal histopathology following Russell's viper (*Vipera russelli*) bite. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 1993;24:193– 7.
53. Study on the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*). *Toxicon*1992; 30(5-6): 551.
54. Suchithra N, Pappachan J, Sujathan P. Snakebite envenoming in Kerala, South India: Clinical profile and factors involved in adverse outcomes. Retrieved January 20, 2021
55. Suntravat M, Yusuksawad M, Sereemaspun A, Pérez JC, Nuchprayoon I. Effect of purified Russell's viper venom-factor X activator (RW-X) on renal hemodynamics, renal functions, and coagulopathy in rats. *Toxicon* 2011;58(3):230-238.
56. Tan CH, Liew JL, Navanesan S, Sim KS, Tan NH, Tan KY. Cytotoxic and anticancer properties of the Malaysian mangrove pit viper (*Trimeresurus purpureomaculatus*) venom and its disintegrin (purpureomaculin). *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 2020;26.
57. Teixeira CDFP, Fernandes CM, Zuliani JP, Zamuner SF. Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2005;100: 181-184.

58. Thamaree S, Sitprija V, Punyavoravuth V et al. Effects of Russell's viper venom on mediator production in cultured human umbilical vein endothelial cells. *J. Med. Assoc. Thai* 2001;84 (Suppl 1): S197–207.
59. Thumtecho S, Tangtrongchitr T, Srisuma S, Kaewrueang T, Rittilert P, Pradoo A, Wananukul W. Hematotoxic Manifestations and Management of Green Pit Viper Bites in Thailand. *Therapeutics and Clinical Risk Management* 2020;695-704.
60. Unkovic-Cvetkovic N, Cvetkovic M, Petkovic D, Jovanovic T, Unkovic S. Histopathological changes in rat myocardium caused by *Vipera ammodytes ammodytes* (European viper) snake venom. *Toxicon* 1983;21:429–432.
61. Usman A, Gandhi J, Gupta G. Physiology, Bowditch Effect. [Updated 2020 Aug 24]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL). StatPearls Publishing;2020
62. Valora N, Bruno C, Fidanza A. Action of *Vipera ammodytes* venom on the rat electrocardiogram. II. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper* 1970;46:373–375.
63. Vonk FJ, Casewell NR, Henkel CV, Heimberg AM, Jansen HJ, McCleary RJ. The king cobra genome reveals dynamic gene evolution and adaptation in the snake venom system. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110 (51):20651–6.
64. World Health Organization. Snakebite envenoming [Internet]. Switzerland: World Health Organization; [Updated 2021 Jan 20]. จาก <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/snakebite-envenoming>.
65. Zainal Abidin SA, Rajadurai P, Hoque Chowdhury M, Othman I, Naidu R. Cytotoxic, anti-proliferative and apoptosis activity of L-amino acid oxidase from Malaysian *Cryptelytrops purpureomaculatus* (CP-LAAO) venom on human colon cancer cells. *Molecules* 2018;23(6):1388.
66. Zeng X, Hu J, Liang X, Wu Y, Yan M, Zhu M, Fu Y. Acute cerebral infarction following *Trimeresurus stejnegeri* snakebite: A case report. *Medicine* 2019; 98(23).

67. Chaisakul J, Rusmili MRA, Hodgson WC, Hatthachote P, Suwan K, Inchan A, Chootip K. A pharmacological examination of the cardiovascular effects of Malayan krait (*Bungarus candidus*) venoms. *Toxins* 2017, 9(4), 122.

ภาคผนวก

1 การเตรียมสารเคมีสำหรับการศึกษาเนื้อเยื่อวิทยา

1.1 การเตรียม 10% formalin: 1000 ml

สารเคมีที่ใช้

Formaldehyde	100	ml
Distilled water	900	ml

ขั้นตอนการเตรียม

1. ผสม formaldehyde และ distilled water เข้าด้วยกัน
2. ใช้ magnetic stirrer ในการช่วยผสมสารเพื่อให้เข้ากันได้ดียิ่งขึ้น

1.2 การเตรียม Stock solution 1% eosin

สารเคมีที่ใช้

Stock eosin solution

Eosin yellowish	10	grams
95% ethanol	80	ml
Distilled water	20	ml

Working eosin solution

1% stock eosin	1	ส่วน
95% ethanol	1	ส่วน

ขั้นตอนการเตรียม

1. ละลาย eosin yellowish ด้วยน้ำกลั่นที่ละน้อยๆ โดยใช้ magnetic stirrer ช่วยผสม
2. เมื่อ eosin yellowish ละลายจนหมด จากนั้นเติม 95% ethanol และผสมให้เข้ากัน
3. ก่อนการใช้ working eosin solution ให้เติม glacial acetic acid ปริมาตร 0.5 ml ต่อ eosin 100 ml

1.3 การเตรียม Mayor's hematoxylin

สารเคมีที่ใช้

Hematoxylin	1	gram
Potassium alum	50	grams
Sodium iodate	0.2	gram
Citric acid	1	gram

Chloral hydrate	50	grams
Distilled water for up to	1000	ml

ขั้นตอนการเตรียม

1. ชั่งสารเคมีทุกตัวตามปริมาณข้างต้นของสารเคมีที่ใช้
2. ละลายสารทั้งหมดด้วยน้ำ จากนั้นทำการกรองและเก็บไว้ใช้เมื่อต้องการ

2 การเตรียมสารเคมีสำหรับ SDS-PAGE

2.1 การเตรียม Resolving (15% Gel)

สารเคมีที่ใช้

H ₂ O	3.75	ml
Tris pH 8.8	2.5	ml
40% bis-acrylamide	3.75	ml
10% SDS	100	μl
10% APS	60	μl
TEMED	7	μl

2.2 การเตรียม Stacking gel

สารเคมีที่ใช้

H ₂ O	2.5	ml
Tris pH 6.8	1	ml
40% bis-acrylamide	350	μl
10% APS	30	μl
TEMED	5	μl

ขั้นตอนการเตรียม

สำหรับ resolving และ stacking gel : pipette สารทุกตัวให้ได้ปริมาณตามที่ต้องการ ใส่ในภาชนะที่พอเหมาะ การเติม TEMED ควรทำในขั้นตอนสุดท้าย จากนั้นผสมสารให้เข้ากัน

2.3 การเตรียม 1.5M Tris – pH 8.8

สารเคมีที่ใช้

Tris-base	18.17	grams
น้ำกลั่น	60	ml

วิธีการเตรียม

ละลายสารเคมีตามปริมาตรสารเคมีที่ใช้ข้างต้น ปรับ pH โดยใช้ 1N HCl จนได้ค่า pH 8.8 แล้ว จากนั้นปรับปริมาตรโดยใช้น้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุทธิ 100 ml และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4°C

2.4 การเตรียม Tris - pH 6.8

สารเคมีที่ใช้

Tris-base	6.06	grams
น้ำกลั่น	60	ml

วิธีการเตรียม

ละลายสารเคมีตามปริมาตรสารเคมีที่ใช้ข้างต้น ปรับ pH โดยใช้ 1N HCl จนได้ค่า pH 6.8 แล้ว จากนั้นปรับปริมาตรโดยใช้น้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุทธิ 100 ml และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4°C

2.5 การเตรียม Reducing protein buffer

สารเคมีที่ใช้

5X Lamelli Buffer	40	µl
Distilled water	150	µl
Mercaptoethanol	10	µl

2.6 การเตรียม Non-reducing protein buffer

สารเคมีที่ใช้

5X Lamelli Buffer	40	µl
Distilled water	160	µl

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล นางสาวนิศรา หล่อทอง
รหัสประจำตัวนักศึกษา 6210220014

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (กายภาพบำบัด)	มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์	2559

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Lorthong, N., Nuanyaem, N., Chaisakul, J., Khimmaktong, W. Histopathological Changes of Kidney Following Malayan pit viper and King cobra in Variation Doses in the Rats. The proceeding of the 43rd Annual Conference of the Anatomy Association of Thailand, May 5-7, 2021, p.61-64.