



สถานเสาวภา สภากาชาดไทย
เพื่อปวงชน เพื่อวิทยา เพื่อนมนุษย์

สารเสาวภา

Queen Saovabha Memorial Institute Bulletin (QSMI Bulletin)

ISSN 1685 – 6341

ปีที่ 23 ฉบับที่ 2 / 2567

VOLUME 23, NO. 2 / 2024



สถานเสาวภา สภากาชาดไทย
Queen Saovabha Memorial Institute



สารเสาวภา

Queen Saovabha Memorial Institute Bulletin (QSMI Bulletin)

คณะดำเนินการ	สถานเสาวภา สภากาชาดไทย	
ที่ปรึกษา	วิศิษฎ์ สิตปรีชา	ณรงค์ศักดิ์ ชัยบุตร
บรรณาธิการ	สุนุชชา สุนทรารชุน	
รองบรรณาธิการ	ลาวัลย์ จันทร์โฮม อรรรรณ แซ่ไคว้	บุญเลิศ ลำเลิศเดชา สุรศักดิ์ เอกโสภาวรรณ
กองบรรณาธิการ	สุจิตตรา ขุนทรัพย์ สุดา พันธุ์จันทร์ ทักษะ เวสารัชพงษ์ ณัฐวดี มนต์อ่อน ศรัณยา หวังเจริญตระกูล	ธรรมบุญ ดวงโสน สุเมธ โพธิกุล ปณิธิ ละอองบัว ชานนท์ ฝาเงิน ศันสนีย์ กาญจนวีรวิทย์
จัดพิมพ์และเผยแพร่โดย	สถานเสาวภา สภากาชาดไทย 1871 ถนนพระราม 4 เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทรศัพท์ 0 2252 0161 www.saovabha.org	
ออกแบบปกโดย	ศรัณยา หวังเจริญตระกูล	

ISSN 1685 – 6341

* เนื้อหาบทความทางวิชาการในวารสารนี้เป็นความคิดเห็นและความรับผิดชอบของผู้เขียน

บทบรรณาธิการ

สารเสาวภา ฉบับที่ 2 ประจำปีที่ 23 พ.ศ. 2567 ยังคงมุ่งเน้นที่จะเผยแพร่ผลงานทางวิชาการด้านวิทยาศาสตร์ตามพันธกิจของสถานเสาวภา โดยมีการเรียบเรียงเนื้อหาที่เป็นศาสตร์เฉพาะเข้าใจยากให้เป็นภาษาไทยที่ง่ายต่อการทำความเข้าใจ เพื่อให้ผู้อ่านเกิดความศรัทธาต่อข้อมูลที่นำเสนอที่เป็นประโยชน์ในวงกว้าง

ในสารเสาวภาฉบับนี้ มีเนื้อหาทั้งบทความวิจัยและบทความวิชาการที่มีความหลากหลายและน่าสนใจสำหรับนักวิชาการและประชาชนผู้สนใจทางวิทยาศาสตร์ ประกอบด้วยบทความวิจัยที่เกี่ยวข้องกับโรคพิษสุนัขบ้า 1 เรื่อง คือ การศึกษาเปรียบเทียบผลของสารกันเลือดแข็งต่างชนิดต่อระดับภูมิคุ้มกันโรคพิษสุนัขบ้าในตัวอย่างเลือดมาที่ตรวจด้วยวิธี RFFIT และบทความวิจัยที่เกี่ยวข้องกับพิษงูและงูพิษ 2 เรื่อง คือ การศึกษาความสัมพันธ์ของระดับภูมิคุ้มกันกับค่า ED_{50} ในตัวอย่างเซรัมแก่พิษงู และการสังเคราะห์โปรตีนยับยั้งเอนไซม์ฟอสโฟไลเปสเอทูจากงูน้ำ นอกจากนี้ ยังมีบทความวิชาการอีก 2 เรื่อง ซึ่งเกี่ยวข้องกับการประยุกต์ใช้ไบโอเซนเซอร์ชนิดแอปตาเมอร์และการใช้ถุงนอกเซลล์จากพิษงูเพื่อประโยชน์ทางการแพทย์

กองบรรณาธิการสารเสาวภาขอขอบคุณผู้สนับสนุนทุกท่านที่ได้สละเวลาในการรวบรวมและเรียบเรียงเนื้อหาความรู้อันมีคุณค่าทางวิชาการ และหวังเป็นอย่างยิ่งว่าสารเสาวภาฉบับนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับผู้อ่านทุกท่าน พบกันใหม่ในฉบับหน้า

สุนุชชา สุนทรารชุน

บรรณาธิการ



สารเสาวภา

Queen Saovabha Memorial Institute Bulletin

ปีที่ 23 ฉบับที่ 2 / 2567

VOLUME 23 NO. 2 / 2024 ISSN 1685 – 6341

- การศึกษาเปรียบเทียบผลของสารกันเลือดแข็งต่างชนิดต่อระดับภูมิคุ้มกันโรคพิษสุนัขบ้า
ในตัวอย่างเลือดม้าด้วยวิธีตรวจ RFFIT 1 - 5
*A comparative study on the effects of different anticoagulants on rabies antibody levels
in horse plasma using the RFFIT test*
วชิราภรณ์ แสงสีลม สุรสิทธิ์ อุษสุวรรณ ณรงค์ศักดิ์ ชัยบุตร
- ความสัมพันธ์ของระดับภูมิคุ้มกันกับค่า ED₅₀ ในตัวอย่างเซรุ่มแก้พิษงู 7 - 11
*Relationship between antibody titer and the median effective dose (ED₅₀) in snake
antivenom*
จุรีพร น้อยพรหม
- การสังเคราะห์โปรตีนยับยั้งเอนไซม์ฟอสโฟไลเปส เอทู จากงูน้ำ (*Sinonatrix annularis*) 13 - 17
*Synthesis of phospholipase A₂ inhibitory protein from water snake (*Sinonatrix annularis*)*
วิจิต ทวีกาญจน์ จุรีพร น้อยพรหม อรรวรรณ แซ่โค้ว
- แอปตาเมอร์และการประยุกต์ใช้ประโยชน์ 19 - 25
Aptamer and its application
อภิญา ลงยา
- ถุงนอกเซลล์ (Extracellular vesicles) จากพิษงู กับการประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ 27 - 33
Medical applications of snake venom-derived extracellular vesicles
กมลวรรณ เขียนไชยพันธ์



การศึกษาเปรียบเทียบผลของสารกันเลือดแข็งต่างชนิดต่อระดับภูมิคุ้มกันโรคพิษสุนัขบ้าในตัวอย่างเลือดม้าด้วยวิธีตรวจ RFFIT

A comparative study on the effects of different anticoagulants on rabies antibody levels in horse plasma using the RFFIT test

วชิราภรณ์ แสงสีสม¹ สุรัสวดี อู่ยสุวรรณ² ณรงค์ศักดิ์ ชัยบุต³

Wachiraporn Saengseesom¹, Suraseha Ouisuwan², Narongsak Chaiyabutr³

1 ฝ่ายวิจัยและพัฒนา สถานเสาวภา สภากาชาดไทย

2 สถานีเพาะเลี้ยงม้าและสัตว์ทดลองฯ สถานเสาวภา สภากาชาดไทย

3 ฝ่ายวิชาการ สถานเสาวภา สภากาชาดไทย

1 Department of Research and Development, Queen Saovabha Memorial Institute, Thai Red Cross Society

2 Horse Farm & Laboratory Animal Breeding Center, Queen Saovabha Memorial Institute, Thai Red Cross Society

3 Queen Saovabha Memorial Institute, Thai Red Cross Society

บทคัดย่อ: เป็นที่ทราบกันว่าสารกันเลือดแข็งหลายชนิดมีความเหมาะสมที่แตกต่างกันสำหรับเตรียมพลาสมาเพื่อใช้ในการตรวจทางห้องปฏิบัติการ อย่างไรก็ตาม ยังไม่เคยมีรายงานการเตรียมตัวอย่างพลาสมาที่ใช้ในการตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันต่อโรคพิษสุนัขบ้าด้วยวิธี RFFIT ดังนั้นในการศึกษานี้ใช้สารกันเลือดแข็งต่างชนิด ได้แก่ ซิตเรท อีดีทีเอ เฮปารินและ โซเดียมฟลูออไรด์ เพื่อการเตรียมตัวอย่างพลาสมาที่ใช้ในการตรวจด้วยวิธี RFFIT โดยใช้ตัวอย่างจากเลือดม้าที่ได้รับวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าจำนวน 5 ตัว ทำการเจาะเก็บเลือดจากม้าแต่ละตัว นำมาแบ่งให้เท่าๆ กัน แยกเป็นการเก็บตัวอย่างซีรัมและตัวอย่างพลาสมาที่ใช้สารกันเลือดแข็งต่างชนิดกัน จากผลการวัดระดับภูมิคุ้มกันโรคพิษสุนัขบ้าทั้งหมดที่ได้โดยวิธี RFFIT ตัวอย่างพลาสมาที่เติมสารโซเดียมฟลูออไรด์พบว่ามีระดับภูมิคุ้มกันต่อโรคพิษสุนัขบ้ามากกว่าการใช้สารกันเลือดแข็งชนิดอื่นประมาณ 7% อย่างไรก็ตาม ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกกลุ่มตัวอย่างพลาสมาที่ใช้สารกันเลือดแข็งต่างชนิดกัน จากผลการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าการใช้พลาสมาที่ใช้สารกันเลือดแข็งต่างชนิดทั้ง 4 ชนิดสามารถนำมาใช้ตรวจวัดหาระดับภูมิคุ้มกันต่อโรคพิษสุนัขบ้าด้วยวิธี RFFIT ได้

คำสำคัญ: สารกันเลือดแข็ง ซิตเรท อีดีทีเอ เฮปาริน โซเดียมฟลูออไรด์ วิธี RFFIT

ABSTRACT: It is generally accepted that various types of anticoagulants are suitable for preparing plasma for laboratory purposes. However, limited studies have compared rabies antibody levels in serum and plasma samples prepared with different anticoagulants using the rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT). Therefore, we used different anticoagulants, including citrate, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), heparin, and sodium fluoride (NaF), to prepare plasma for the RFFIT test. Blood samples were collected from five horses vaccinated with the rabies vaccine, and the whole blood of each horse was divided to prepare both serum and plasma using the specified anticoagulants. The determinations of rabies antibody levels using RFFIT test were then performed on both the serum and plasma samples. Plasma samples using NaF as an anticoagulant caused an increase in rabies antibody levels by approximately 7% compared to plasma samples using other anticoagulants. However, no significant differences in rabies antibody levels were observed among the different plasma samples prepared with the various anticoagulants. These findings suggest that plasma prepared with four different types of anticoagulants can be used for the RFFIT test.

Keywords: Anticoagulants, EDTA, Citrate, Heparin, NaF, RFFIT test, Rabies

บทนำ

การแยกตัวอย่างพลาสมาจากเลือด โดยใช้สารกันเลือดแข็ง (Anticoagulant) เพื่อให้ตัวอย่างพลาสมาอยู่ในสภาพที่มีคุณสมบัติเหมือนกับอยู่ในร่างกายให้มากที่สุด สารกันเลือดแข็งมีอยู่หลายชนิด คุณสมบัติของแต่ละชนิดจะมีผลไปขัดขวางบางขั้นตอนของกระบวนการแข็งตัวของเลือด (Clotting process) (Benjamin, 1967) การเลือกใช้สารกันเลือดแข็งควรเลือกใช้ให้เหมาะสมเพื่อให้ได้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่ถูกต้องแม่นยำและเพื่อลดความผิดพลาดที่ส่งผลกระทบต่อการทดสอบ จึงมีการเลือกใช้สารกันเลือดแข็งที่ส่งผลกระทบต่อสภาพด้านฟิสิกส์หรือชีวเคมีของพลาสมาในตัวอย่างเลือดที่มาจากสัตว์ชนิดเดียวกันหรือต่างชนิดกันที่ใช้ในทางการแพทย์และห้องปฏิบัติการ (Lei et al., 2009) สารกันเลือดแข็งแต่ละชนิดมีคุณสมบัติในกระบวนการแข็งตัวของเลือดต่างกัน เช่น ซิตราต (Citrates) ส่วนมากจะเป็นสารโซเดียมซิตราต (Sodium citrate) โดยซิตราตจะจับกับแคลเซียมไอออน (Ca^{++}) ในเลือด อยู่ในรูป Calcium-citrate complex ทำให้ลดระดับแคลเซียมไอออน (Ca^{++}) อิสระในเลือด ซึ่งจะส่งผลต่อกระบวนการแข็งตัวของเลือด โดยทั่วไปโซเดียมซิตราตจะอยู่ในรูปสารละลายที่มีความเข้มข้น 3.2 หรือ 3.8 % ในอัตรา 1 ส่วนต่อเลือด 9 ส่วน สารกันเลือดแข็งชนิดนี้นิยมใช้ในการตรวจ D-dimer และ Lupus anticoagulant สารกันเลือดแข็งชนิดอีดีทีเอ (Ethylenediamine tetraacetic acid: EDTA) ใช้ได้ทั้งในรูปของกรดและเกลือโซเดียม สารนี้จะไปยับยั้งการแข็งตัวของเลือดโดยการรวมเป็นคอมเพล็กซ์กับแคลเซียมไอออน จึงนิยมใช้กับการนับเซลล์เม็ดเลือด (Complete blood count: CBC) การตรวจทางด้านไวรัสวิทยา และทางด้านอนุชีวโมเลกุล เช่น การทำ Polymerase Chain Reaction: PCR เป็นต้น สารกันเลือดแข็งชนิดเฮปาริน (Heparin) เป็นสารกันเลือดแข็งที่มีตามธรรมชาติในร่างกายและมีอยู่เล็กน้อยในเลือด เฮปารินสามารถยับยั้งกลไกการแข็งตัวของเลือดในหลายขั้นตอน เช่น ในขั้นตอนการเปลี่ยนโปรทรอมบิน (Prothrombin) เป็นทรอมบิน (Thrombin) และในขั้นตอนการเปลี่ยนไฟบริโนเจน (Fibrinogen) เป็นไฟบริน (Fibrin) ใช้ในการตรวจทางเคมีในเลือด (Blood chemistry) และการตรวจวิเคราะห์ความผิดปกติใน

ระดับโครโมโซม (Chromosome study) สารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมฟลูออไรด์ (Sodium fluoride: NaF) มีคุณสมบัติป้องกันการใช้น้ำตาลในเซลล์ของเม็ดเลือดแดง โดยไปยับยั้งกระบวนการไกลโคไลซิส (Anti-glycolysis) จึงใช้ในการตรวจระดับน้ำตาลและแอลกอฮอล์ในกระแสเลือด (กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์, 2566)

อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานผลกระทบของสารกันเลือดแข็งชนิดต่างๆ ในตัวอย่างพลาสมากับการตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันโรคพิษสุนัขบ้าด้วยวิธี Rapid Florescent Focus Inhibition Test (RFFIT) ดังนั้น วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ เพื่อให้เป็นข้อมูลในการเลือกใช้สารกันเลือดแข็งให้เหมาะสมในการตรวจระดับภูมิคุ้มกันโรคพิษสุนัขบ้าในห้องปฏิบัติการ การวิจัยนี้ใช้ตัวอย่างจากเลือดม้าที่ได้รับวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้า จำนวน 5 ตัว ทำการเจาะเก็บเลือดจากม้าแต่ละตัวนำมาแบ่งให้เท่าๆ กัน แยกเป็นการเก็บตัวอย่างซีรัมและตัวอย่างพลาสมาที่ใส่สารกันเลือดแข็งต่างชนิดกันและนำมาตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันต่อโรคพิษสุนัขบ้าด้วยวิธี RFFIT

ขั้นตอนและวิธีการ

การเจาะเก็บเลือดม้า

นำม้าจำนวน 5 ตัวที่เคยได้รับวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้า มาเจาะเลือดที่ตำแหน่งหลอดเลือดดำที่คอ (Jugular vein) ตัวละ 25 มิลลิลิตร (มล.) โดยแบ่งใส่หลอดๆ ละ 5 มล. จำนวน 5 หลอด หลอดที่ 1 ไม่มีการเติมสารกันเลือดแข็ง ตั้งทิ้งไว้ให้เลือดแข็งตัว หลอดที่ 2-5 เติมสารกันเลือดแข็งดังนี้ หลอดที่ 2 เติมโซเดียมซิตราต ปริมาณ 4.0 มิลลิกรัม (มก.) ต่อเลือด 1 มล. หลอดที่ 3 เติมอีดีทีเอ ปริมาณ 1.0 มก. ต่อเลือด 1 มล. หลอดที่ 4 เติมเฮปารินความเข้มข้น 10 IU ต่อเลือด 1 มล. และหลอดที่ 5 เติมโซเดียมฟลูออไรด์ 10 มก. ต่อเลือด 1 มล. จากนั้นนำหลอดเลือดทั้งหมดไปปั่นแยกเม็ดเลือดด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที จะได้ตัวอย่างในหลอดที่ 1 เป็นซีรัม ส่วนหลอดที่ 2-5 จะได้ตัวอย่างเป็นพลาสมา นำไปเก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ $-20^{\circ}C$ ก่อนนำไปตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันต่อโรคพิษสุนัขบ้าด้วยวิธี RFFIT

ในการศึกษาไข่ม้าเป็นสัตว์ทดลองได้ผ่านการอนุมัติจริยธรรม การวิจัยในสัตว์ทดลองจากคณะกรรมการการพิจารณาจริยธรรมการใช้สัตว์ทดลองของสถานเสาวภา สภากาชาดไทย เลขที่ QSMI-ACUC-006-2024

การตรวจด้วยวิธี Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT)

Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT) เป็นวิธีตรวจมาตรฐาน (Gold standard) ในการตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันต่อโรคพิษสุนัขบ้าที่ได้รับการยอมรับจากองค์การอนามัยโลก (World Health Organization: WHO) และองค์การสุขภาพสัตว์โลก (World Organization of Animal Health: WOAH) สามารถใช้ตรวจตัวอย่างที่ได้จากทั้งคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม โดยการนำตัวอย่างที่ต้องการตรวจ ได้แก่ ซีรัม หรือ พลาสมา มาเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน ในไมโครเพลท 96 หลุม จากนั้นเติมไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าชนิดเชื้อเป็น สายพันธุ์ CVS-11 ที่ความแรงอยู่ในช่วง 30-100 TCID₅₀ (TCID₅₀ : 50% Tissue Culture Infection Dose) ปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อภายใต้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 90 นาที หลังจากนั้นเติมเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด BHK-21 (Baby Hamster Kidney cells) ปริมาณเซลล์ 2×10^5 ต่ออาหารเลี้ยงเซลล์ 1 มล. ลงในไมโครเพลท 96 หลุม ๆ ละ 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อภายใต้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% นาน 21 ชั่วโมง หากตัวอย่างที่นำมาตรวจมีภูมิคุ้มกันที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าจะสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสหรือทำลายฤทธิ์ไวรัสก่อโรคได้ (Neutralization) ทำให้ไม่เหลือไวรัสที่จะติดเชื่อในเซลล์ได้ เมื่อนำเซลล์มายึดติดกับเพลท และย้อมด้วยคอนจูเกต (Conjugate) ซึ่งเป็นแอนติบอดีอีกชนิดที่มีความจำเพาะต่อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้า และติดสลาด้วยสารเรืองแสงสีเขียว (Fluorescein Isothiocyanate: FITC) หลุมละ 35 ไมโครลิตร จะไม่พบเซลล์ที่มีการเรืองแสง แต่ถ้าตัวอย่างซีรัมหรือพลาสมาไม่มีภูมิคุ้มกันที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้า ไวรัสจะทำลายฤทธิ์ และสามารถเจริญในเซลล์เพาะเลี้ยงได้ เมื่อย้อมด้วยคอนจูเกต เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสจะเห็นสีเขียวของ FITC

นับจำนวนเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าแล้วนำมาคำนวณหาระดับภูมิคุ้มกัน โดยการคำนวณระดับภูมิคุ้มกันจะเปรียบเทียบกับซีรัมมาตรฐาน (Standard reference serum) ที่ได้รับจากองค์การอนามัยโลกและมีหน่วยเป็น IU/ml (International unit per milliliter) (Smith et al., 1996)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

การตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันต่อโรคพิษสุนัขบ้าด้วยวิธี RFFIT ในตัวอย่างพลาสมาจากเลือดม้าที่มีการใช้สารกันเลือดแข็งต่างชนิดกัน เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย (Mean±SD) โดยวิธี One way ANOVA (Repeated measures) วัดความแตกต่างด้วย Bonferroni's post-hoc test

ผลและการอภิปราย

ผลการเปรียบเทียบระดับภูมิคุ้มกันต่อโรคพิษสุนัขบ้าจากตัวอย่างซีรัมและตัวอย่างพลาสมาที่ใช้สารกันเลือดแข็งต่างชนิดได้แก่ ซิเตรต อิติทีเอ เฮปาริน โซเดียมฟูลอไรด์ ด้วยวิธี RFFIT พบว่าระดับภูมิคุ้มกันในตัวอย่างเป็นพลาสมาที่ใช้สารกันเลือดแข็งต่างชนิดกัน จะมีระดับภูมิคุ้มกันต่อโรคพิษสุนัขบ้าที่ใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ระดับภูมิคุ้มกันต่อโรคพิษสุนัขบ้าจะระหว่างกลุ่ม ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) แม้ว่ามีการรายงานว่าสารกันเลือดแข็งบางชนิดมีผลต่อส่วนประกอบในพลาสมา เช่น ซิเตรต ที่มีการเตรียมในรูปแบบ Acid-Citrate-Dextrose (ACD) มีผลกระทบต่อเกล็ดเลือด (Platelet) ในพลาสมา มีปริมาณที่น้อยมาก สามารถนำพลาสมาไปใช้ทดสอบในทางการแพทย์และสัตวแพทย์ได้ แต่พบว่าสารกันเลือดแข็งบางชนิด เช่น อิติทีเอมีผลกระทบต่อเกล็ดเลือด ทำให้จำนวนเกล็ดเลือดเพิ่มมากขึ้น ส่วนสารกันเลือดแข็งชนิดเฮปารินทำให้มีการจับกลุ่มของเกล็ดเลือดจึงมีผลต่อวิธีการตรวจนับเม็ดเลือด (Kennedy et al., 2021) สารโซเดียมฟูลอไรด์เป็นสารกันเลือดแข็ง มีผลต่อเลือดคือทำให้เม็ดเลือดแขวนลอย

อยู่ในพลาสมาได้เป็นเวลานาน สารโซเดียมฟลูออไรด์จะสามารถทำปฏิกิริยากับเฮโมโกลบินของเม็ดเลือดแดงจะอยู่ในรูปของ Fluoride methaemoglobin complex ทำให้เลือดที่ใส่โซเดียมฟลูออไรด์ มีลักษณะสีแดงเพิ่มขึ้นเป็นผลจากการเปลี่ยนระดับประจุไฟฟ้าที่เม็ดเลือด (White, et al 1964) ผลของการตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันต่อโรคพิษสุนัขบ้าในพลาสมาที่ใส่สารโซเดียมฟลูออไรด์ พบว่ามีค่าระดับภูมิคุ้มกันสูงกว่าตัวอย่างพลาสมาที่ใช้สารกันเลือดแข็งชนิดอื่น ประมาณ 7% และไม่มีค่านัยสำคัญทางสถิติที่แตกต่างในพลาสมาของม้าตัวเดียวกัน จากผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าการใช้พลาสมาที่ใส่สารกันเลือดแข็งที่แตกต่างกันทั้ง 4 ชนิด

นี้ ให้ค่าระดับภูมิคุ้มกันที่ไม่แตกต่างกัน จึงเป็นไปได้ว่าสารกันเลือดแข็งทั้ง 4 ชนิดที่มีคุณสมบัติทางชีวเคมีที่แตกต่างกัน ไม่ทำให้เกิดผลกระทบต่อขั้นตอนในการตรวจด้วยวิธี RFFIT จึงสรุปได้ว่าตัวอย่างพลาสมาที่เติมสารกันเลือดแข็งที่แตกต่างกันทั้ง 4 ชนิด สามารถนำมาใช้ตรวจวัดหาค่าระดับภูมิคุ้มกันต่อโรคพิษสุนัขบ้าด้วยวิธี RFFIT นี้ได้ อย่างไรก็ตามค่าที่แตกต่างกันของชนิดสารกันเลือดแข็งที่อยู่ในพลาสมา โดยเฉพาะสารโซเดียมฟลูออไรด์อาจมีผลต่อกระบวนการตรวจด้วยวิธี RFFIT โดยอาจมีกลไกปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงได้ในบางขั้นตอนของวิธีการ ซึ่งยังไม่พบข้อมูลและการอ้างอิง เพื่อเป็นแนวทางให้ทำการศึกษาต่อไปได้

ตารางที่ 1 แสดงผลของระดับภูมิคุ้มกันต่อโรคพิษสุนัขบ้าที่ตรวจด้วยวิธี Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT) (หน่วย IU/ml) ในตัวอย่างเลือดม้าที่แยกเป็นซีรัมและพลาสมาที่ใช้สารกันเลือดแข็งต่างชนิดกัน

Horse number	Control (Serum)	Citrate (Plasma)	EDTA (Plasma)	Heparin (Plasma)	NaF (Plasma)
1) 4756	250.00	261.06	272.62	250.00	272.62
2) 5403	162.10	148.65	148.65	176.77	184.60
3) 5512	176.77	162.10	192.77	192.77	192.77
4) 5605	229.25	210.22	239.40	229.25	219.53
5) 5610	272.62	297.30	297.30	272.62	297.30
X ± SD	218.15±47.32 ^a	215.86±63.47 ^a	230.14±60.10 ^a	224.28±39.60 ^a	233.36±49.61 ^a

การวิเคราะห์สถิติค่าระดับภูมิคุ้มกันต่อโรคพิษสุนัขบ้าด้วยวิธี Analysis of variance ใช้ Bonferroni test ในกลุ่มตัวอย่างพลาสมาที่ใส่สารกันเลือดแข็งต่างชนิด เปรียบเทียบกับตัวอย่างซีรัมซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม (Control) โดยอักษร a แสดงค่าที่เหมือนกันระหว่างกลุ่มเมื่อเปรียบเทียบค่าทางสถิติไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

เอกสารอ้างอิง

- กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลชุมพรเขตรอุดมศักดิ์. 2566. คู่มือการส่งตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการส่งตรวจต่อ (Referral laboratory) หมายเลขเอกสารSD-Guideline-CEN-002 มีนาคม ฉบับที่ 6. 3-4.
- Aizawa, H., Kawabata, H., Sato, A., Masuki, H., Watanabe, T., Tsujino, T., Isobe, K., Nakamura, M., Nakata, K., Kawase, T. 2020. A comparative study of the effects of anti-coagulants on pure platelet-rich plasma quality and potency. *Biomedicines* 8, 42. Doi:10.3390/biomedicines8030042
- Benjamin, M. M. 1967. *Outline of veterinary clinical pathology*. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA.
- Kennedy, A. D., Ford, L., Wittmann, B., Conner, J., Wulff, J., Mitchell, M., Evans, A. M., Toal, D. R. 2021. Global biochemical analysis of plasma, serum and whole blood collected using various anticoagulant additives. *PLOS ONE* 16(4), e0249797. Doi.org/10.1371/journal.pone.0249797
- Lei, H., Gui, L., Xiao, R. 2009. The effect of anti-coagulants on the quality and biological efficacy of platelet-rich plasma. *Clin. Biochem.* 42(13-14), 1452–1460.
- Smith, J. S., Yager, P. A., Baer, G. M. 1996. A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies virus-neutralizing antibody. In: Meslin, F.X., Koprowsky, H. and Kaplan, M.M., Eds., *Laboratory Techniques in Rabies*, 4th Edition, WHO, Geneva, 181-187.
- White, A., Handler, P., Smith, E. L. 1964. *Principle of biochemistry*. 3rd Edition. McGraw Hill Book Company, Inc., New York, USA.
-





สารเสาวภา

Queen Saovabha Memorial Institute Bulletin



ความสัมพันธ์ของระดับภูมิคุ้มกันกับค่า ED₅₀ ในตัวอย่างเซรุ่มแก้พิษงู

Relationship between antibody titer and the median effective dose (ED₅₀) in snake antivenom

จूरืพร น้อยพรหม

Jureporn Noiphrom

ฝ่ายวิจัยและพัฒนา สถานเสาวภา สภากาชาดไทย

Department of Research and Development, Queen Saovabha Memorial Institute, Thai Red Cross Society

บทคัดย่อ: การผลิตเซรุ่มแก้พิษงู ตั้งแต่เซรุ่มจากเลือดม้าเข้าสู่กระบวนการผลิตขั้นตอนต่างๆ จนกระทั่งได้เป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จก่อนจำหน่าย หลายขั้นตอนมีการทดสอบการหักล้างฤทธิ์การทำให้ตายจากพิษงูแต่ละชนิดในสัตว์ทดลองที่ 50% (The Median Effective Dose, ED₅₀) ซึ่งในแต่ละรอบการผลิตต้องใช้สัตว์ทดลองจำนวนมากในการทดสอบ ด้วยเป้าหมายในการลดการใช้สัตว์ทดลองตามหลักจริยธรรมการใช้สัตว์ทดลอง (The 3Rs) คณะวิจัยหลายคณะได้ทดลองเตรียมวิธี Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่าความแรงของเซรุ่มแก้พิษงูที่ได้จากวิธี ELISA เปรียบเทียบกับค่า ED₅₀ ซึ่งเป็นค่ามาตรฐานที่ใช้ในการผลิตเซรุ่มแก้พิษงู โดยพิจารณาความสัมพันธ์อย่างง่าย (Simple correlation coefficient, ค่า r) ซึ่งผลที่ได้มีความหลากหลาย ขึ้นกับชนิดของพิษงู/เซรุ่มแก้พิษงู และสภาวะต่างๆ ของวิธี ELISA ที่เตรียมขึ้น อย่างไรก็ตามอาจสรุปได้ว่าวิธี ELISA มีแนวโน้มที่จะนำมาพัฒนาเพื่อใช้ประมาณค่า ED₅₀ และช่วยลดการใช้สัตว์ทดลองเพื่อทดสอบหาค่า ED₅₀ ได้ แต่ต้องมีการศึกษาวิจัย เก็บข้อมูล และเตรียมวิธี ELISA ในสภาวะที่เหมาะสม

คำสำคัญ: ELISA ED₅₀ เซรุ่มแก้พิษงู ความสัมพันธ์

ABSTRACT: In the snake antivenom production process, from hyperimmunized horses' plasma to the finished products, the Median Effective Dose (ED₅₀) was investigated in many steps. For each production lot, a lot of laboratory animals were used. In the aim to reduce animals used following the 3Rs, many researchers suggested an Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA), which was developed for a correlation study between the estimated potency of snake antivenom obtained from ELISA and ED₅₀, considering the simple correlation coefficient r value. The correlation of ELISA and ED₅₀ in this issue was various, depending on the type of venom/antivenom and the condition of all steps of the ELISA setting. However, it could be concluded that ELISA was potent for ED₅₀ determination and could reduce animals used for ED₅₀ tests in some production processes, but good study and development were needed.

Keywords: ELISA, ED₅₀, antivenom, correlation

บทนำ

งูพิษที่สำคัญในประเทศไทยโดยหลักมี 7 ชนิด แบ่งเป็นกลุ่มที่พิษมีฤทธิ์ต่อระบบประสาท ได้แก่ งูเห่าไทย งูจงอาง งูสามเหลี่ยม งูทับสมิงคลา และกลุ่มที่พิษมีฤทธิ์ต่อระบบโลหิต ได้แก่ งูกะปะ งูแมวเซา งูเขียวหางไหม้ทองเหลือง การรักษาผู้ที่ถูกงูพิษกัดต้องทำอย่างถูกต้องและรวดเร็ว การใช้เซรัมแก่พิษงูเป็นวิธีการที่สำคัญในการรักษาชีวิตของผู้ที่ถูกงูพิษกัดไว้ได้ ในประเทศไทยมีเซรัมแก่พิษงูเดี่ยวชนิดหนึ่งสำหรับใช้แก่พิษงูแต่ละชนิด ทั้ง 7 ชนิด และมีเซรัมแก่พิษงูรวมชนิดหนึ่ง 2 ชนิด สำหรับใช้แก่พิษงูรวมระบบประสาท และพิษงูรวมระบบโลหิต การผลิตเซรัมแก่พิษงูทำได้โดยฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในม้าด้วยพิษงู เพื่อให้ม้าสร้างภูมิคุ้มกันต่อพิษงู จากนั้นทำการเจาะเก็บเลือดมาและแยกพลาสมา (Crude plasma) เป็นเซรัมดิบนำส่งเข้ากระบวนการผลิต ในระหว่างกระบวนการผลิตตั้งแต่การติดตามระดับภูมิคุ้มกันในม้าก่อนเจาะเก็บเลือด และหลังการเจาะเก็บเป็น Crude plasma จะถูกทดสอบการหักล้างฤทธิ์การทำให้อยู่ตายจากพิษงูแต่ละชนิดในสัตว์ทดลองที่ 50% (The Median Effective Dose, ED₅₀) Crude plasma ที่ผ่านเกณฑ์ที่กำหนด จะถูกส่งเข้ามาในสายการผลิตและนำมารวมกันเป็น Pooled crude plasma จากนั้นทำการทดสอบ ED₅₀ อีกครั้ง ตัวอย่างที่ให้ผลผ่านเกณฑ์ที่กำหนด จะถูกส่งต่อเข้าสู่กรรมวิธีการผลิตเซรัมแก่พิษงูได้เป็นเซรัมก่อนทำแห้ง (Concentrated bulk) แต่ละ Bulk ต้องทำการทดสอบ ED₅₀ และหากผ่านเกณฑ์ที่กำหนดจะถูกทำแห้งได้เป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จ (Finished product) ซึ่งจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องทดสอบหาค่า ED₅₀ ใน Finished product ตามค่ามาตรฐานความแรงของเซรัมแก่พิษงูแต่ละชนิดที่กำหนดไว้ หากผ่านเกณฑ์มาตรฐาน เซรัมแก่พิษงูที่ผลิตขึ้นในแต่ละรอบนั้นจึงจะสามารถออกวางจำหน่ายได้ ดังนั้นในแต่ละรอบการผลิตจึงต้องใช้สัตว์ทดลองจำนวนมากในการทดสอบ สำหรับวิธีมาตรฐาน (Standard protocol) ในการทดสอบหาค่า ED₅₀ ในสัตว์ทดลอง ตาม WHO Guidelines 2010 สามารถทำได้โดยบ่มตัวอย่างเซรัมแก่พิษงูกับพิษงูที่ความเข้มข้นต่างๆ (3-6 Median Lethal Dose, LD₅₀) เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อให้เซรัมแก่พิษงูได้ทำปฏิกิริยากับพิษงูก่อน แล้วจึงฉีด

ส่วนผสมของเซรัมแก่พิษงูกับพิษงูในสัตว์ทดลอง (หนูเม้าส์) บันทึกจำนวนการตายของสัตว์ทดลองภายในเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับกรณีฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำ (Intravenous test) หรือ 48 ชั่วโมง สำหรับกรณีฉีดเข้าทางช่องท้อง (Intra-peritoneal test) จากนั้นทำการวิเคราะห์หาปริมาณเซรัมแก่พิษงูที่สามารถหักล้างฤทธิ์การทำให้อยู่ตายในสัตว์ทดลองได้ที่ 50% หรือ ED₅₀ ซึ่งการรายงานผลเป็นปริมาณพิษงู (มิลลิกรัม) ที่ถูกหักล้างฤทธิ์ด้วยเซรัมแก่พิษงูขนาด 1 มิลลิตร

แนวทางในการลดการใช้สัตว์ทดลองด้วยเทคนิค ELISA

คณะวิจัยหลายคณะได้พยายามที่จะหาวิธีทดแทนหรือลดการใช้สัตว์ทดลองตามหลักจริยธรรมการใช้สัตว์ทดลอง (The 3Rs; Replacement, Reduction and Refinement) ซึ่งองค์กรนานาชาติหลายแห่ง เช่น WHO, FDA (USA) และ ECVAM (The European Centre for the Validation of Alternatives Methods, European Union) สนับสนุนการลดการทดสอบโดยใช้สัตว์ทดลอง และเน้นย้ำถึงความสำคัญของการไม่ให้สัตว์ทดลองได้รับความเจ็บปวดหรือทุกข์ทรมาน เทคนิค Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) เป็นการทดสอบในหลอดทดลองวิธีการหนึ่งที่มีการศึกษาวิจัยเพื่อหวังผลในการใช้ทดแทนหรือลดการใช้สัตว์ทดลอง โดยวิธี ELISA จะอาศัยหลักการทางภูมิคุ้มกันวิทยา และการจับกันอย่างจำเพาะเจาะจงแบบลูกกุญแจและแม่กุญแจ (Lock and key) ของแอนติเจนและแอนติบอดี สำหรับวิธีการทดสอบโดยรวมทำได้โดยนำแอนติเจนหรือแอนติบอดี (อิมมูโนโกลบูลิน) เคลือบตรึงไว้บนพื้นผิวในเพลท (Plate) เมื่อเติมตัวอย่างแอนติบอดีหรือแอนติเจนที่มีความจำเพาะต่อกันลงไป ก็ จะเกิดการจับกันอย่างจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีนั้น สารอื่นที่ไม่มีความจำเพาะต่อกันจะไม่จับและถูกล้างออกไป จากนั้นจะใช้แอนติบอดีตัวที่สองซึ่งติดฉลากด้วยเอนไซม์และมีความจำเพาะต่อแอนติเจน-แอนติบอดีที่จับกันอยู่บนพื้นผิวนั้น เป็นตัวแสดงปฏิกิริยาการจับกันระหว่างแอนติเจนแอนติบอดีที่เกิดขึ้นหลัง-

จากเติมสารเริ่มต้นการเกิดปฏิกิริยา (Substrate) ของ เอนไซม์ที่ใช้ติดฉลาก Substrate จะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์และเกิดสี ในทุกๆ ขั้นตอนนี้จะต้องใช้เวลาบ่มและล้างส่วนที่ไม่จับกันออกไป ความเข้มของสีที่เกิดขึ้นวัดได้จากการอ่านค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance หรือ Optical density, OD) ด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท (ELISA plate reader) ที่ความยาวคลื่นที่เหมาะสม วิธี ELISA สามารถพลิกแพลงได้หลายรูปแบบตามแต่จุดประสงค์ของการตรวจวัด หากต้องการตรวจวัดแอนติบอดีหรืออิมมูโนโกลบูลินในตัวอย่างเซรัมแก่พิษงู อาจทำได้โดยเคลือบแอนติเจนซึ่งในที่นี้คือพิษงูไว้ที่พื้นผิว เติมตัวอย่างเซรัมแก่พิษงูที่ต้องการทดสอบที่มีอิมมูโนโกลบูลินอยู่ และใช้แอนติบอดีตัวที่สองที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (Peroxidase) และมีความจำเพาะต่ออิมมูโนโกลบูลินในตัวอย่างเซรัมแก่พิษงู จากนั้นเติม OPD-H₂O₂ หรือ TMB-H₂O₂ ซึ่งเป็น Substrate ของเอนไซม์ Peroxidase และอ่านค่า OD ของสีที่เกิดขึ้น หากสีมีความเข้มมากบ่งชี้ว่าเกิดการจับกันระหว่างแอนติเจน-แอนติบอดีมาก แสดงให้เห็นว่าในตัวอย่างเซรัมแก่พิษงูมีอิมมูโนโกลบูลินที่จำเพาะกับพิษงูมาก โดยทั่วไประดับภูมิคุ้มกันต่อพิษงูที่ได้จากวิธี ELISA จะรายงานผลเป็นความเจือจางสูงสุดที่เซรัมแก่พิษงูสามารถจับกับพิษงูได้และมีความมากกว่าตัวอย่างซีรัมม้าปกติที่ไม่ได้รับการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยพิษงูบวกค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานอย่างน้อยสองเท่า (+2SD) แต่ผลที่ได้จากวิธี ELISA ยังสามารถทำการวิเคราะห์หาปริมาณเซรัมแก่พิษงูที่สามารถจับกับปริมาณพิษงูที่ใช้ทดสอบ และทำการคำนวณต่อเพื่อหาปริมาณพิษงู (มิลลิกรัม) ที่สามารถจับกับตัวอย่างเซรัมแก่พิษงูขนาด 1 มิลลิลิตร ได้ เช่นเดียวกับค่า ED₅₀ ที่ทดสอบในสัตว์ทดลอง

ดังที่กล่าวแล้วว่าวิธี ELISA สามารถบ่งชี้ได้ว่าในตัวอย่างเซรัมแก่พิษงูมีอิมมูโนโกลบูลินที่จำเพาะกับพิษงูมากน้อยเพียงใด จึงมีความเป็นไปได้ที่ข้อมูลระหว่าง ELISA กับ ED₅₀ ของเซรัมแก่พิษงูจะมีความสอดคล้องสัมพันธ์กัน ซึ่งหากเป็นเช่นนั้น อาจทดลองใช้ค่าที่ได้จากวิธี ELISA มาคำนวณหรือประมาณค่า ED₅₀ ของตัวอย่างเซรัมแก่พิษงูนั้น

เพื่อลดการใช้สัตว์ทดลองได้ การพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลของเซรัมแก่พิษงูที่ได้จากวิธี ELISA และ ED₅₀ อย่างง่ายนั้น สามารถทำได้โดยสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าที่ได้จาก ELISA และ ED₅₀ พิจารณาการกระจายตัวของข้อมูล แนวโน้มของจุดข้อมูลที่ได้เชิงเส้นตรง และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์อย่างง่าย (Simple correlation coefficient) ซึ่งในที่นี้จะพิจารณาจากค่า r ที่ได้จากกราฟ อาจใช้สมการเชิงเส้นตรงที่ได้จากกราฟของชุดข้อมูลนี้ในการคำนวณเพื่อประมาณหาค่า ED₅₀

ค่า r ที่ได้จากกราฟ สามารถพิจารณาได้ ดังนี้

- หากค่า r เป็นบวก แสดงว่าค่าที่ได้จากวิธี ELISA กับ ED₅₀ มีความสัมพันธ์เชิงบวก คือ เมื่อค่า ED₅₀ สูง ค่าที่ได้จากวิธี ELISA จะมีค่าสูง หรือ เมื่อค่า ED₅₀ ต่ำ ค่าที่ได้จากวิธี ELISA จะมีค่าต่ำด้วย และหากค่า $r = 1$ ค่าที่ได้จากวิธี ELISA กับ ED₅₀ มีความสัมพันธ์เชิงบวกอย่างสมบูรณ์ หรืออนุมานได้ว่า ค่า ED₅₀ และ ค่าที่ได้จากวิธี ELISA มีค่าเท่ากัน เมื่ออ่านจากกราฟในแกน X และ แกน Y

- หากค่า r เป็นลบ แสดงว่าค่าที่ได้จากวิธี ELISA กับ ED₅₀ มีความสัมพันธ์เชิงลบ คือ เมื่อค่า ED₅₀ ต่ำ ค่าที่ได้จากวิธี ELISA จะมีค่าสูง หรือ เมื่อค่า ED₅₀ สูง ค่าที่ได้จากวิธี ELISA จะมีค่าต่ำ และหากค่า $r = -1$ ค่าที่ได้จากวิธี ELISA กับ ED₅₀ มีความสัมพันธ์เชิงลบอย่างสมบูรณ์ หรืออนุมานได้ว่า เมื่อค่า ED₅₀ สูงสุด ค่าที่ได้จากวิธี ELISA จะมีค่าต่ำสุด เมื่ออ่านจากกราฟในแกน X และ แกน Y

ดังนั้นในการเตรียมวิธี ELISA เพื่อประมาณหรือคำนวณหา ED₅₀ จึงต้องการให้ค่า r ที่ได้เข้าใกล้ 1 มากที่สุด ซึ่งจะหมายถึงค่าที่ได้จากวิธี ELISA มีความสัมพันธ์กับค่า ED₅₀ มาก

การศึกษาความสัมพันธ์ของระดับภูมิคุ้มกันกับค่า ED₅₀ ในตัวอย่างเซรัมแก่พิษงู

Heneine et al. (1998) ได้ทำการศึกษาในเซรัมแก่พิษงูรวมสกุล *Bothrops* โดยทำการแยกส่วนพิษงู *B. jararaca* ซึ่งเป็นพิษงูที่มีฤทธิ์ต่อระบบโลหิต ทั้งแยกตามประจุด้วยวิธี Ion exchange chromatography และแยกต่อตามขนาดด้วยวิธี

Gel filtration chromatography นำส่วนของพิษงูมาเคลือบที่ผิว ELISA plate เติมตัวอย่างพลาสมาที่มีภูมิคุ้มกันสูง (Hyperimmune horse plasma) 14 ตัวอย่าง หรือเซรัมแก่พิษงูรวมสกุล *Bothrops* (Final product) 15 หน่วยการผลิต ที่เจือจาง 1:10000 และใช้ Sheep anti-horse IgG-peroxidase conjugate ที่เจือจาง 1:2000 โดยมี OPD-H₂O₂ เป็น Substrate วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร พบว่า เมื่อใช้ส่วนของพิษงูที่มีฤทธิ์ทำให้เกิดเลือดออก (Hemorrhagic activity) ในการเตรียมวิธี ELISA ผลของตัวอย่างเซรัมแก่พิษงูมีความสอดคล้องกับ ED₅₀ โดยมีค่า $r = 0.8$ และเมื่อใช้ส่วนของพิษงูที่มีการทำงานของเอนไซม์ฟอสโฟไลเปสเอทู (Phospholipase A₂ activity) เตรียมวิธี ELISA ผลของตัวอย่างเซรัมแก่พิษงูมีความสอดคล้องกับ ED₅₀ โดยมีค่า $r = 0.6$

แต่การศึกษาของ Maria et al. (1998) ที่ทำการศึกษาในพิษงู *B. jararaca* เช่นกัน โดยทดลองใช้พิษงูและส่วนพิษงูที่แยกด้วยวิธี Gel filtration chromatography และมีฤทธิ์ทำให้เกิดการตายในสัตว์ทดลอง เคลือบที่ผิว ELISA plate เติมตัวอย่างเซรัมแก่พิษงู 26 ตัวอย่าง ที่เจือจาง 1:32,000 ใช้ Sheep anti-horse IgG-peroxidase conjugate ที่เจือจาง 1:1,000 และใช้ OPD-H₂O₂ เป็น Substrate วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร พบว่าวิธี ELISA ที่เตรียมโดยใช้พิษงูให้ผลความสอดคล้องกับ ED₅₀ มีค่า $r = 0.65$ ในขณะที่ใช้ส่วนของพิษงูที่มีฤทธิ์ทำให้เกิดการตายในสัตว์ทดลองเตรียมวิธี ELISA จะได้ค่า $r = 0.85$ มีความสอดคล้องกับค่า ED₅₀ มากกว่า

ในปี 2018 Khaing et al. ได้พัฒนาวิธี ELISA เพื่อติดตามการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในม้าที่ฉีดกระตุ้นด้วยพิษงูแมวเซา (*Daboia siamensis*) ซึ่งเป็นพิษงูที่มีฤทธิ์ต่อระบบโลหิต โดยใช้พิษงูแมวเซาเคลือบผิว ELISA plate ใช้ตัวอย่างเซรัมแก่พิษงูที่เจือจาง 1:27,000 ใช้ Rabbit anti-horse IgG-peroxidase conjugate 1:50,000 และใช้ TMB-H₂O₂ เป็น Substrate วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร เมื่อคำนวณหา Neutralizing capacity ที่ได้จากวิธี ELISA เทียบกับค่า ED₅₀ ในตัวอย่างเซรัมแก่พิษงูอ้างอิงที่แสดงเป็นจำนวนพิษงู (มิลลิกรัม) ที่เซรัมแก่พิษงู 1 มิลลิลิตร สามารถ

หักล้างฤทธิ์ของพิษงูได้ ผลการทดสอบในตัวอย่างเซรัมแก่พิษงูแมวเซาทั้งหมด 210 ตัวอย่าง ค่าที่ได้จากวิธี ELISA มีความสอดคล้องกับค่า ED₅₀ โดยมีค่า $r = 0.982$ มีความไว (Sensitivity) 92% และมีความจำเพาะ (Specificity) 96%

สำหรับเซรัมแก่พิษงูกลุ่มระบบประสาท Rungsiwongse และ Ratanabanangkoon (1991) ได้ทดลองใช้วิธี ELISA ที่พัฒนาขึ้น ในการประเมินความแรงของเซรัมแก่พิษงูเห่าไทย (*Naja kaouthia*) โดยทำการแยกส่วนพิษงูเห่าไทยโดยวิธี Gel filtration chromatography และแยกต่อด้วยวิธี Ion exchange chromatography ได้ส่วนที่เป็นพิษต่อระบบปลายประสาทที่ต่อกับกล้ามเนื้อ ชนิดที่ 3 (Postsynaptic neurotoxin 3) จากนั้นทดลองเปรียบเทียบการใช้พิษงูเห่าไทย และ Neurotoxin 3 เคลือบบนผิว ELISA plate เติมตัวอย่างเซรัมแก่พิษงูเห่าไทย 8 ตัวอย่าง ที่ความเข้มข้นต่างกัน ใช้ Sheep anti-horse IgG-peroxidase conjugate ที่เจือจาง 1:30 และใช้ OPD-H₂O₂ เป็น Substrate วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร เมื่อวิเคราะห์หาค่าระดับแอนติบอดี (Antibody titers) พบว่ามีความสอดคล้องกับค่า ED₅₀ ได้ค่า $r = 0.82$ และ $r = 0.95$ ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์หา Antibody units จากกราฟมาตรฐาน (Standard curve) ที่สร้างขึ้นจากเซรัมแก่พิษงูอ้างอิง พบว่ามีความสอดคล้องกับผล ED₅₀ ได้ค่า $r = 0.83$ และ $r = 0.95$ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าค่า Antibody titers และค่า Antibody units ยังมีความสอดคล้องกันด้วย

ในปี 2018 Liu et al. ทดลองหา Antibody titers ในตัวอย่างเซรัมแก่พิษงูเห่าไต้หวัน (*Naja atra*) เทียบกับค่า ED₅₀ โดยทำการสังเคราะห์ Peptides ที่เป็น Short-chain neurotoxin และ Cytotoxin ในพิษงู *N. atra* และเตรียมวิธี ELISA โดยใช้ Peptides ทั้งสองชนิดนี้เป็นแอนติเจนในการเคลือบผิว ELISA plate ใช้ Goat anti-horse IgG-peroxidase conjugate 1:10,000 และ TMB-H₂O₂ เป็น Substrate วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร เมื่อวิเคราะห์หาค่า Antibody titers พบว่ามีความสอดคล้องกับผล ED₅₀ ได้ค่า $r = 0.992$ และ $r = 0.998$ ตามลำดับ

สรุปและวิจารณ์

จากตัวอย่างงานวิจัยข้างต้นจะเห็นได้ว่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าที่ได้จากวิธี ELISA ที่เตรียมขึ้น กับค่า ED₅₀ มีความผันแปรหลากหลาย ได้ค่า r ตั้งแต่ 0.60 ถึง 0.99 ตามแต่ชนิดพิษงู/เซรุ่มแก้พิษงู และสภาวะต่างๆ ของวิธี ELISA ที่เตรียมขึ้น ซึ่งแม้จะเป็นพิษงู/เซรุ่มชนิดแก้พิษงูชนิดเดียวกัน ถ้าเตรียมวิธี ELISA ในสภาวะที่ต่างกัน ก็จะให้ผลความสัมพันธ์ที่ต่างกัน หากพิจารณาถึงปัจจัยที่เกี่ยวข้องต่อความสัมพันธ์ระหว่างค่าที่ได้จากวิธี ELISA ที่เตรียมขึ้น กับค่า ED₅₀ อาจมีทั้งชนิดและขนาดของพิษงูหรือส่วนของพิษงูที่เลือกนำมาใช้เคลือบตรึงอยู่ที่พื้นผิว ELISA plate ความเจือจางของตัวอย่างเซรุ่มแก้พิษงูที่ใช้ทดสอบ ความเจือจางของสารที่ใช้วิเคราะห์ในแต่ละขั้นตอน ช่วงเวลาในการบ่ม/ล้าง และวิธีการที่ใช้คำนวณหาค่าความแรงของเซรุ่มแก้พิษงู หรือวิธีการที่ใช้อ่านค่าที่ได้จากวิธี ELISA เพื่อนำมาใช้วิเคราะห์ความสัมพันธ์กับค่า ED₅₀ นอกจากนี้ความชำนาญของผู้ทำการทดสอบก็มีความสำคัญด้วยเช่นกัน เนื่องจากวิธี ELISA มีหลายขั้นตอน การเกิดข้อผิดพลาดแม้เพียงเล็กน้อยในแต่ละขั้นก็จะส่งผลต่อความเบี่ยงเบนของค่าที่อ่านได้

เอกสารอ้างอิง

Giron, A. A., Arrieta, K. M., Bratti, X. C., Stiles, B. G., Gutierrez, J. M. 1997. A comparison of *in vitro* methods for assessing the potency of therapeutic antisera against the venom of the coral snake *Micrurus nigrocinctus*. *Toxicon* 35(4), 573-581.

Gutierrez, J. M. 2018. Preclinical assessment of the neutralizing efficacy of snake antivenoms in Latin America and the Caribbean: A review. *Toxicon* 146, 138-150.

Heneine, L. G. D., Carvalho JR, A. D., Barbosa, D. F., Santos, M. R. A. D. 1998. Development of an ELISA to assess the potency of horse therapeutic polyvalent antithrotophic antivenom. *Toxicon* (10), 1363-1370.

Khaing, E. M., Hurtado, P. R., Hurtado, E., Zaw, A., White, J., Warrell, D. A., Alfred, S., Mahmood, M. A., Peh,

C. A. 2018. Development of an ELISA assay to determine neutralizing capacity of horse serum following immunisation with *Daboia siamensis* venom in Myanmar. *Toxicon* 151, 163-168.

Liu, B. S., Wu, W. G., Lin, M. H., Li, C. H., Jiang, B. R., Wu, S. C., Leng, C. H., Sung, W. C. 2018. Identification of immunoreactive peptides of toxins to simultaneously assess the neutralization potency of antivenoms against neurotoxicity and cytotoxicity of *Naja atra* venom. *Toxins* (Basel) 10(1), 10. Doi:10.3390/toxins10010010.

Maria, W. S., Cambuy, M. O., Costa, J. O., Velarde, D. T. 1998. Neutralizing potency of horse antithrotophic antivenom, correlation between *in vivo* and *in vitro* methods. *Toxicon* 36(10), 1433-1439.

Rungsiwongse, J., Ratanabanangkoon, K. 1991. Development of an ELISA to assess the potency of horse therapeutic antivenom against Thai cobra venom. *J. Immunol. Methods* 136, 37-43.

World Health Organization. 2010. WHO guidelines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins. World Health Organization, Geneva.





สารเสาวภา

Queen Saovabha Memorial Institute Bulletin



การสังเคราะห์โปรตีนยับยั้งเอนไซม์ฟอสโฟไลเปสเอทู จากงูน้ำ (*Sinonatrix annularis*)

Synthesis of phospholipase A₂ inhibitory protein from water snake (*Sinonatrix annularis*)

วิชิต ทวีกาญจน์ จุรีพร น้อยพรม อรวรรณ โค้ว

Wichit Thaveekarn, Jureeporn Noiphrom, Orawan Khaw

ฝ่ายวิจัยและพัฒนา สถานเสาวภา สภากาชาดไทย

Department of Research and Development, Queen Saovabha Memorial Institute, Thai Red Cross Society

บทคัดย่อ: ฟอสโฟไลเปส เอทู (PLA₂) เป็นเอนไซม์ที่พบได้ทั่วไปในพิษงูหลายชนิด โดยเอนไซม์นี้จะไฮโดรไลซ์ฟอสโฟลิปิดในเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดผลข้างเคียงที่เป็นอันตรายทั้ง บริเวณที่ถูกงูกัด และระบบต่างๆ ของร่างกาย สิ่งที่น่าสนใจในระบบไหลเวียนเลือดตามธรรมชาติของงู คือ จะมีสารโปรตีนยับยั้ง PLA₂ หากพิษของงูเข้าสู่ระบบไหลเวียนเลือด ดังนั้น การสังเคราะห์โปรตีนยับยั้ง PLA₂ จากงูอาจเป็นแนวทางในการต่อต้านพิษงูได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงได้ทำการออกแบบโปรตีนยับยั้งฟอสโฟไลเปส เอทู ในรูปแบบแกมมา (PLIY) เพื่อใช้ในการลดกิจกรรมของ PLA₂ ในพิษงูแมวเซา (*Daboia siamensis*) โดยการออกแบบและสังเคราะห์ PLIY จากข้อมูลยีนตับของ งูน้ำ *Sinonatrix annularis* และ ทำให้บริสุทธิ์ ทำการทดสอบระดับกิจกรรมของเอนไซม์ PLA₂ ในพิษงูชนิดต่างๆ และนำ PLIY มาลดฤทธิ์ของกิจกรรมเอนไซม์ PLA₂ ในพิษงู ผลการทดลองพบว่าพิษงูแมวเซาให้ผลกิจกรรมเอนไซม์ PLA₂ สูงสุดในบรรดาพิษงูห้าชนิดที่คัดเลือกมา สำหรับในหลอดทดลอง PLIY สามารถลดกิจกรรม เอนไซม์ PLA₂ ในพิษงูแมวเซาได้มากถึง 34.8%

คำสำคัญ: ฟอสโฟไลเปส เอทู งูแมวเซา โปรตีนยับยั้งฟอสโฟไลเปส เอทู งูน้ำ

ABSTRACT: Phospholipase A₂ (PLA₂) is a common enzyme in many snake species' venom that hydrolyzes phospholipids in cell membranes, causing snake venom's local and systemic adverse effects. Interestingly, snakes' blood circulation contains PLA₂ inhibitors (PLI), which naturally neutralize PLA₂ if their venom leaks into the circulation. Hence, synthesizing the liver PLA₂ inhibitor snake gene might be an effective anti-venom strategy. Therefore, we use phospholipase A₂ inhibitor gamma (PLIY), a PLA₂ inhibitor gamma form, to reduce the PLA₂ activity of crude *Daboia siamensis* venom. We synthesized and purified the PLIY from the liver of *Sinonatrix annularis* data to screen the PLA₂ activity in the snake venoms and tested the neutralization effect of the purified PLIY against PLA₂ activity in crude *D. siamensis* venom. *D. siamensis* had the highest PLA₂ activity among 5 selected venomous snakes. *In vitro*, the PLIY could reduce crude *D. siamensis* PLA₂ activity by up to 34.8%. PLIY may be one of the therapeutic agents for snakebite treatment.

Keywords: Phospholipase A₂, *Daboia siamensis*, Phospholipase A₂ inhibitor, Water snake

บทนำ

งูพิษกัวยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขในประเทศไทย และประเทศเขตรอบบางประเทศ เมื่อถูกงูพิษกัดสามารถทำให้เกิดภาวะอาการอันตรายอย่างเฉียบพลันทางการแพทย์ เช่น อัมพาต เลือดออกผิดปกติ เลือดออกรุนแรง ไตวาย และเนื้อเยื่อถูกทำลายตรงบริเวณที่ถูกงูพิษกัด (WHO, 2016) ผลทางเภสัชวิทยาของพิษงูสามารถแบ่งออกเป็น 3 ประเภทหลัก ได้แก่ พิษต่อระบบโลหิต พิษต่อระบบประสาท และพิษต่อเซลล์ (WHO, 2010) ในพิษงูมีองค์ประกอบของโปรตีนหลายชนิด ได้แก่ ฟอสโฟไลเปส เอทู (PLA₂) เมทัลโลโปรตีนเอส (Metalloproteinases) แอลอะมิโนแอซิดออกซิเดส (L-amino acid oxidases) เซอรินโปรตีนเอส (Serine proteinases) และ ตรีฟิงเกอร์ เปปไทด์ (Three finger peptide) (Slagboom et al., 2017)

ฟอสโฟไลเปส เอทู (PLA₂) เป็นเอนไซม์ไลโปไลติก พบได้ในพิษงูในวงศ์ Elapidae และวงศ์ Viperidae (Harris and Scott-Davey, 2013) PLA₂ ถูกค้นพบในปี 1951 ในพิษงูเห่า จากการเกิดไฮโดรไลซิสของฟอสฟาติดีลโคลีน (Wittoff, 1951) PLA₂ แบ่งได้เป็น 5 รูปแบบ ได้แก่ Secretory PLA₂ (sPLA₂), Cytosolic PLA₂s (cPLA₂), Calcium independent PLA₂s (iPLA₂), Platelet activating factor (PAF) acetyl hydrolase/oxidised lipid lipoprotein associated PLA₂ (LpPLA₂s), และ Lysosomal PLA₂ (LPLA₂s) (Murakami and Kudo, 2002) PLA₂ สามารถทำให้เกิดเลือดออกมากขึ้น ณ บริเวณที่ถูกกัด (Nanjaraj et al., 2014) โดยกลไกการทำงานของ PLA₂ จะไปไฮโดรไลซ์พันธะเอสเทอร์ที่ตำแหน่ง Sn-2 ของฟอสโฟลิปิดในเยื่อหุ้มพลาสมาของเซลล์ต่างๆ โดยเฉพาะเม็ดเลือดแดง ส่งผลให้เกิดการแตกของเม็ดเลือดแดง (Burke and Dennis, 2009) ภาวะการตกเลือด (Hemorrhage) ที่เกิดจาก PLA₂ สามารถพบได้ในพิษงูหลายชนิด เช่น *Trimeresurus mucrosquamatus* (Chen et al., 1994) *Hypnale hypnale*, *Echis carinatus* และ *Daboia russelii* (Sandesha et al., 2022)

ในทางกลับกันตัวงูเองก็มีสารในการยับยั้งฟอสโฟไลเปสเอทู (Phospholipase A₂ Inhibitor, PLI) เพื่อปกป้อง

ตัวเองจากการมีพิษงูอยู่ในระบบหมุนเวียนเลือด สามารถพบ PLI ในวงศ์ Elapidae, Viperidae, Hydrophidae, Colubridae และ Boidae (Lizano et al., 2003) PLI จากงูจึงอาจเป็นอีกตัวเลือกหนึ่งสำหรับต้านการอักเสบและต้านพิษจากงู (Marcussi et al., 2007) PLI มีโครงสร้าง 3 รูปแบบ ได้แก่ อัลฟา (α) เบตา (β) และแกมมา (γ) สำหรับ PLIY จะให้ผลการยับยั้ง PLA₂ ได้กว้างมากที่สุด (Broadest spectrum) (Nishida et al., 2010)

เนื่องจากงูน้ำ *Sinonatrix annularis* มักเป็นเยื่อของงูมีพิษ จึงมีการพัฒนาตัวเองในการต่อต้านต่อพิษงู เช่น มีการสร้างโปรตีน PLIY (สร้างมาจากยีนที่ทับ) สิ่งที่น่าสนใจ คือ เมื่อนำ PLIY ไปผสมรวมกับพิษงูและฉีดเข้าบริเวณกล้ามเนื้อหรือบริเวณใต้ผิวหนังของสัตว์ทดลอง สามารถลดความเป็นพิษของการตกเลือด (Hemorrhagic toxicity) จากพิษงูได้หลายชนิด ได้แก่ *Deinagkistrodon acutus*, *Naja atra* และ *Akistrodon halys* (Le et al., 2015; Xiong et al., 2017)

งูแมวเซา (*D. siamensis*) เป็นงูพิษพบได้ทั่วไปในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พิษของงูชนิดนี้สามารถขัดขวางการแข็งตัวของเลือด ทำให้มีเม็ดเลือดแดงแตก เกิดภาวะตกเลือดหรือเลือดออกภายใน และเกิดอาการบวมที่แขนหรือขาที่ถูกกัด ซึ่งอาการที่เกิดส่วนใหญ่เกิดจาก PLA₂ ในพิษ (Warrell, 1989) จากรายงานการถูกงูพิษกัดในประเทศไทย พบผู้ป่วยในภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงใต้การถูกงูแมวเซากัดสูงกว่าภาคอื่นๆ โดยผู้ป่วยจะมีอาการบวมอย่างรุนแรงตรงบริเวณที่ถูกกัด เลือดไม่แข็งตัว การทำงานของไตผิดปกติ และในบางกรณี อาจมีอาการทางหัวใจและสมองขาดเลือด (Holzer and Mackessy, 1996)

ฟอสโฟไลเปส เอทู (PLA₂) มักพบในพิษงูหลายชนิด การลดฤทธิ์ของเอนไซม์ PLA₂ ในพิษงูโดยโปรตีน PLIY จึงมีความน่าสนใจ ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ออกแบบและสังเคราะห์โปรตีนรีคอมบิแนนท์ PLIY จากยีนต้นของงู *S. annularis* เพื่อทดสอบว่า PLIY สามารถลดการทำงานของเอนไซม์ PLA₂ จากพิษงูแมวเซาและคาดว่า PLIY อาจเป็นโปรตีนที่ช่วยรักษาสำหรับการถูกงูพิษกัดในอนาคตได้

วิธีการและผลการทดลอง

1. การหาค่า LD₅₀ (Median lethal dose) ของเอนไซม์ PLA₂ จากพิษงูแมวเซา

ตารางที่ 1 แสดงค่า LD₅₀ ของ PLA₂ จากพิษงูแมวเซา

ความเข้มข้น µg ของ PLA ₂ งูแมวเซา (ในปริมาตร 200 µl ต่อหนู 1 ตัว)	หนูตาย (ตัว)	รอด (ตัว)
16	5	ไม่รอด
11.43	5	ไม่รอด
8.16	3	2
5.83	2	3
4.16	1	4
2.98	ไม่ตาย	5

จากข้อมูลตารางที่ 1 เมื่อนำไปคำนวณหาค่า LD₅₀ ของ PLA₂ จากพิษงูแมวเซา จะอยู่ที่ 7.03 µg (n=5)

2. การตรวจสอบกิจกรรม PLA₂ ที่มีในพิษงู (Crude) ชนิดต่างๆ แสดงข้อมูลในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงผลการทดสอบ PLA₂ activity ในพิษงูต่าง ๆ

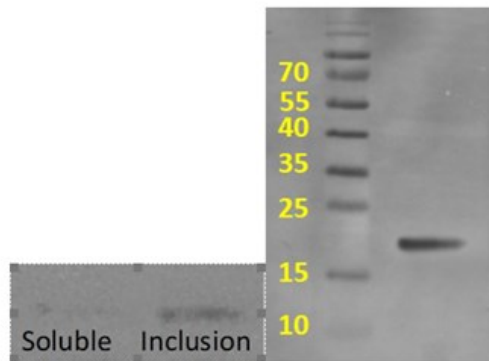
PLA ₂ activity (mmole/mg)	SD (N=3)
งูแมวเซา	0.178 ±0.015
งูกะปะ	0.089 ±0.003
งูเห่า	0.089 ±0.004
งูเขียว	0.082 ±0.003
งูจงอาง	0.063 ±0.009

จากผลตารางที่ 2 พบว่าพิษงูแมวเซามีค่ากิจกรรมเอนไซม์ PLA₂ มากที่สุดคือ 0.178 mmole/mg ส่วนพิษงูที่ให้ผล PLA₂ น้อยที่สุดคือพิษงูจงอาง

3. การโคลน PLA₂ inhibitor gamma (PLY)

ออกแบบยีน PLY จาก *S. annularis* (ยีนดับ) โดยอาศัยฐานข้อมูลของ GenBank: JN975878.1 ทำการโคลนยีนเพื่อให้โปรตีน PLY มีการแสดงออกใน *E. coli* จากนั้นทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Ni²⁺ affinity column แล้วจึงตรวจ

สอบน้ำหนักโมเลกุล และ ชนิดโปรตีน ซึ่งผล PLY ที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 20 kDa และอยู่ในรูป Inclusion body จากการตรวจสอบด้วยวิธี Western blot ต่อ His-tag **ดังรูปที่ 1**

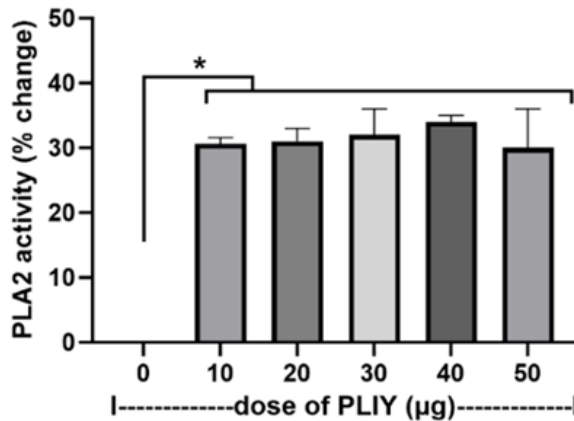


รูปที่ 1 แสดงโปรตีน PLIY ที่แสดงออกในรูปแบบ Inclusion body ด้วยวิธี Western blot (รูปซ้าย) และขนาดน้ำหนักโมเลกุลของ PLIY ประมาณ 20 kDa บน 10% SDS PAGE (รูปขวา)

นำโปรตีน PLIY ที่ได้ ไปทำการตรวจสอบหาชนิดของโปรตีนด้วยวิธี Liquid chromatography–mass spectrometry (LCMS/MS) พบว่าเป็น โปรตีน PLIY ของงู *S. annularis*

4. การทดสอบ PLIY เพื่อลดฤทธิ์กิจกรรมเอนไซม์ PLA₂ ของพิษงูแมวเซา (Crude venom)

โดยใช้พิษงูแมวเซาความเข้มข้น 0.5 mg/ml ปริมาตร 25 µl ผสมกับ PLIY ปริมาตร 25 µl ที่เจือจางความเข้มข้นต่างๆ (10 ถึง 50 µg) (n=3) แสดงดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 แสดงค่า% PLA₂ activity ของพิษงูแมวเซาที่ลดลงด้วย PLA₂ gamma inhibitor

จากรูปที่ 2 พบว่า PLIY ความเข้มข้น 30 µg สามารถลดฤทธิ์ PLA₂ ของพิษงูแมวเซาได้ดีที่สุด คิดเป็น 34.8% เมื่อเพิ่มความเข้มข้น PLIY ไปถึง 50 µg พบว่าไม่สามารถลดฤทธิ์ PLA₂ Activity ของพิษงูแมวเซาได้มากขึ้น (ค่าทางสถิติ ตั้งแต่ 30-50 µg ให้ผลไม่แตกต่างกัน)

สรุปและวิจารณ์ผล

พอสโไฟเลเปส เอชทู (PLA₂) บริสุทธิ์จากพิษงูแมวเซา มีค่า LD₅₀ ที่ 7.03 µg และพบว่ามีค่ากิจกรรมเอนไซม์ PLA₂ ในพิษงูแมวเซาให้ค่าสูงสุดในบรรดาพิษงูทั้งหมด (งูกะปะ งูเห่า งูเขียวหางไหม้ และงูจงอาง) สำหรับผลจากการใช้ PLY ที่ออกแบบและสังเคราะห์มานั้นมีคุณสมบัติในการลดฤทธิ์กิจกรรมของเอนไซม์ PLA₂ ของงูแมวเซาได้จริง (*in vitro*) สูงสุดถึง 34.8% โดยการศึกษาต่อไปจะนำ PLY ไปทดสอบการลด Hemorrhagic toxicity จากพิษงูแมวเซาในสัตว์ทดลอง PLA₂ inhibitor ที่ได้มานั้นน่าจะมีส่วนสำคัญต่อการลดการอักเสบ Inflammatory PLA₂-related diseases และเป็น Anti-inflammation, Antivenom-like bioactive molecules สำหรับการต้านพิษงูในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

- Burke, J. E., Dennis, E. A. 2009. Phospholipase A₂ structure/function, mechanism, and signaling. *J. Lipid Res.* 50, 237–242.
- Chen, L., Liu, C., Chang, C. 1994. Isolation and characterization of a toxic phospholipase A₂ from the venom of the Taiwan habu (*Trimeresurus mucrosquamatus*). *Bio-technol. Appl. Biochem.* 19, 61–73.
- Guidelines for the management of snakebites. 2016. 2nd Edition. สืบค้นวันที่ 29 มกราคม 2567. จาก <https://www.who.int/publications/item/9789290225300>.
- Guidelines for the prevention and clinical management of snakebite in Africa. 2010. สืบค้นวันที่ 29 มกราคม 2567. จาก <https://www.who.int/publications/item/9789290231684>.
- Harris, J., Scott-Davey, T. 2013. Secreted phospholipases A₂ of snake venoms: effects on the peripheral neuromuscular system with comments on the role of phospholipases A₂ in disorders of the CNS and their uses in industry. *Toxins* 5, 2533–2571.
- Holzer, M., Mackessy, S. P. 1996. An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A₂. *Toxicon* 34, 1149–1155.
- Le, Z., Li, X., Yuan, P., Liu, P., Huang, C. 2015. Orthogonal optimization of prokaryotic expression of a natural snake venom phospholipase A₂ inhibitor from *Sinonatrix annularis*. *Toxicon* 108, 264–271.
- Lizano, S., Domont, G., Perales, J. 2003. Natural phospholipase A₂ myotoxin inhibitor proteins from snakes, mammals and plants. *Toxicon* 42, 963–977.
- Marcussi, S., Sant'Ana, C. D., Oliveira, C. Z., Rueda, A. Q., Menaldo, D. L., Belebony, R. O. Stabeli, R. G., Giglio, J. R., Fontes, M. R. M., Soares, A. M. 2007. Snake venom phospholipase A₂ inhibitors: medicinal chemistry and therapeutic potential. *Curr. Top. Med. Chem.* 7, 743–756.
- Murakami, M., Kudo, I. 2002. Phospholipase A₂. *J. Biochem.* 131, 285–292.
- Nanjaraj, A. N., Yariswamy, M., Vikram, J., Nataraju, A., Gowda, T. V., Vishwanath, B. S. 2014. Implications of phytochemicals in snakebite management: present status and future prospective. *Toxin Rev* 33(3), 60-83.
- Nishida, M., Okamoto, M., Ohno, A., Okumura, K., Hayashi, K., Ikeda, K., Inoue, S. 2010. Inhibitory activities of the heterotrimers formed from two α-type phospholipase A₂ inhibitory proteins with different enzyme affinities and importance of the intersubunit electrostatic interaction in trimer formation. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1804, 2121–2127.
- Sandesha, V. D., Darshan, B., Tejas, C., Girish, K. S., Kempaiah, K. 2022. A comparative cross-reactivity and paraspecific neutralization study on *Hypnale hypnale*, *Echis carinatus*, and *Daboia russelii* monovalent and therapeutic polyvalent anti-venoms. *PLOS Negl. Trop. Dis.* 16 (3), e0010292. Doi: 10.1371/journal.pntd.0010292.
- Slagboom, J., Kool, J., Harison, R. A., Casewell, N. R. 2017. Haemotoxic snake venoms: their functional activity, impact on snakebite victims and pharmaceutical promise. *Br. J. Haematol* 177, 947–59.
- Warrell, D. A. 1989. Snake venoms in science and clinical medicine 1. Russell's viper: biology, venom and treatment of bites. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg* 83, 732–40.
- Wittcoff, H. 1951. The Phosphatides. Reinhold Publishing Corporation, New York, USA. 284-307.
- Xiong, S., Luo, Y., Zhong, L., Xiao, H., Pan, H., Liao, K., Yang, M., Huang, C. 2017. Investigation of the inhibitory potential of phospholipase A₂ inhibitor gamma from *Sinonatrix annularis* to snake envenomation. *Toxicon* 137, 83–91.





สารเสาวภา

Queen Saovabha Memorial Institute Bulletin



แอปตาเมอร์และการประยุกต์ใช้ประโยชน์

Aptamer and its application

อภิญา ลงยา

Apinya Longya

ฝ่ายวิจัยและพัฒนา สถานเสาวภา สภากาชาดไทย

Department of Research and Development, Queen Saovabha Memorial Institute, Thai Red Cross Society

บทคัดย่อ: แอปตาเมอร์ (Aptamer) หรือแอปตาเซนเซอร์ (Aptasensor) เป็นไบโอเซนเซอร์ (Biosensor) ชนิดหนึ่งซึ่งใช้จับโมเลกุลเป้าหมาย โดยแอปตาเมอร์ที่เป็นตัวตรวจจับเป็นชิ้นดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอสังเคราะห์สายสั้นๆ (20–90 นิวคลีโอไทด์) หรือเปปไทด์สายสั้นๆ ที่เรียกรวมๆ ว่าแอปตาเมอร์ โดยธรรมชาติแอปตาเมอร์มีความสามารถในการจับอย่างจำเพาะเจาะจงกับโมเลกุลเป้าหมายได้หลากหลายชนิด เช่น เซลล์ แบคทีเรีย ดีเอ็นเอ โปรตีน ยา กรดอะมิโน เป็นต้น แอปตาเมอร์มีความเสถียรมากกว่าตัวจับที่เป็นแอนติบอดี ทนต่อสภาวะแวดล้อมได้ดี ทำให้มีอายุการใช้งานนาน จึงมักถูกเรียกว่าแอนติบอดีสังเคราะห์ ด้วยความที่แอปตาเมอร์สามารถผลิตได้ง่ายและราคาไม่สูง มีความจำเพาะที่หลากหลายมากกว่าแอนติบอดีในหลายๆ ด้าน และไม่จำเป็นต้องใช้สัตว์ทดลองในกระบวนการผลิต ในขณะที่การคัดเลือกแอนติบอดีมักประสบปัญหาจากการไม่ตอบสนองภูมิคุ้มกันที่แปรเปลี่ยนและมีขั้นตอนการผลิตยุ่งยาก มีต้นทุนสูง และใช้ระยะเวลานาน ดังนั้นแอปตาเมอร์จึงเหมาะสำหรับการพัฒนาเป็นชุดตรวจวินิจฉัยชนิดรวดเร็วแบบ Point-of-care ในการคัดกรองโรคเบื้องต้นในพื้นที่ระบาดหรือพื้นที่ที่ขาดแคลนเครื่องมือตรวจทางการแพทย์ รวมถึงมีการนำแอปตาเมอร์มาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ทำให้ปัจจุบันแอปตาเมอร์กำลังเข้ามามีบทบาทสำคัญ และเป็นเทคโนโลยีที่นักวิทยาศาสตร์ให้ความสนใจในการที่จะพัฒนา เพื่อใช้ร่วมหรือทดแทนการใช้แอนติบอดีที่ผลิตขึ้นจากสัตว์ทดลองในอนาคต บทความปริทัศน์นี้จะอธิบายถึงหลักการของแอปตาเมอร์ การผลิตและการนำแอปตาเมอร์ไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ

คำสำคัญ: แอปตาเมอร์ แอปตาเซนเซอร์ ไบโอเซนเซอร์ แอนติบอดีสังเคราะห์

ABSTRACT: Aptamer, or aptasensor, is one of the biosensors that is specific to various types of targets, such as cancer cells, bacteria, DNA, drug proteins or amino acids, etc. Aptamers are typically defined as relatively short (20–90 nucleotides) single-stranded DNA or RNA molecules that bind with high affinity and specificity. Aptamers are frequently referred to as synthetic antibodies but are easier to obtain and less expensive to produce; aptamers do not need animals or an immune response for their production and are in several ways more versatile than antibodies. In the current epidemic, point-of-care testing is advantageous because it is easy to use, more accessible, faster to detect, and has high accuracy and sensitivity. Aptamer performance factors as key drivers for future innovations in aptamer applications and replacing antibodies. Therefore, this review article explains the principle of aptamer, aptamer production, aptamer selection, and its applications.

Keywords: Aptamer, Aptasensor, Biosensor, Synthetic antibodies

บทนำ

แอปตาเมอร์ คือ ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอสายเดี่ยว หรือ เปปไทด์ (Peptide) ที่สามารถจับกับโมเลกุลเป้าหมายได้อย่างจำเพาะ โดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทุติยภูมิ เพื่อจับกับโมเลกุลเป้าหมาย แอปตาเมอร์สามารถจับกับโมเลกุลต่างๆ ได้หลากหลาย เช่น ไอออนของโลหะ (Metal ion) สี (Organic dye) กรดอะมิโน โปรตีน ไวรัส แบคทีเรีย และเซลล์ ซึ่งแอปตาเมอร์ได้มาจากกระบวนการคัดเลือกในหลอดทดลอง (*in vitro*) ที่เรียกว่า Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX) ที่พัฒนาโดย Tuerk and Gold ในปี 1990 แอปตาเมอร์มีคุณสมบัติคล้ายกับแอนติบอดี แต่มีข้อดีกว่า คือ กระบวนการในการคัดเลือกแอปตาเมอร์ไม่จำเป็นต้องใช้สัตว์ทดลอง และใช้เวลาสั้นกว่าการผลิตแอนติบอดีมาก โดยทั่วไปการผลิตแอนติบอดีใช้เวลา 3-6 เดือน แต่การผลิตแอปตาเมอร์ใช้เวลาประมาณ 2 สัปดาห์ นอกจากนี้

นี้แอปตาเมอร์ยังสังเคราะห์ได้ง่ายโดยใช้กระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี และสามารถเพิ่มปริมาณได้ด้วยการทำ PCR มีความคงทนต่ออุณหภูมิสูงและสภาวะกรด-ด่างมากกว่าแอนติบอดี และยังสามารถในการแยกความแตกต่างโมเลกุลของสารที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกันได้ โดยอาศัยรูปร่างและพันธะที่จำเพาะในการจับกับโมเลกุลเป้าหมาย (**ตารางที่ 1**) ปัจจุบันมีงานวิจัยที่นำแอปตาเมอร์มาใช้ประโยชน์หลากหลาย เช่น นำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรค และใช้ในการรักษาโรค โดยการนำยามาติดเข้ากับแอปตาเมอร์ เพื่อให้แอปตาเมอร์ขนส่งยาไปยังเป้าหมายที่จำเพาะ ทำให้ยาออกฤทธิ์ตรงตำแหน่งที่ต้องการ ทำให้ปัจจุบันแอปตาเมอร์เข้ามามีบทบาทในการตรวจวินิจฉัยและการรักษาโรคมกขึ้น จึงมีความเป็นไปได้ที่แอปตาเมอร์จะถูกนำมาใช้ร่วมหรือทดแทนแอนติบอดีที่ผลิตจากสัตว์ทดลอง ซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการพัฒนาด้านการแพทย์ในอนาคต

ตารางที่ 1 ความแตกต่างระหว่างแอปตาเมอร์และแอนติบอดี

	แอปตาเมอร์	แอนติบอดี
ขนาด (Molecular weight)	เล็ก (~12-30 kDa)	ใหญ่ (~150-180 kDa)
โครงสร้างทุติยภูมิ (Secondary structure)	หลากหลาย เช่น Hairpin, Loop, Pseudoknot, G-quartet เป็นต้น	β -sheets
ระยะเวลาในการผลิต	น้อย (ชั่วโมง-เดือน)	มาก (มากกว่า 6 เดือน)
การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน	ต่ำ	สูง
ขนาดเล็กที่สุดของโมเลกุลเป้าหมาย	~60 Da	~600 Da
โมเลกุลเป้าหมาย	หลากหลาย เช่น กรดอะมิโน โปรตีน เซลล์ ไวรัส ยา เป็นต้น	แอนติเจน (โปรตีน)
ความคงทน	สูง	ต่ำ
การดัดแปลงโมเลกุล	หลากหลาย	มีข้อจำกัด
การใช้สัตว์ทดลองในกระบวนการผลิต	ไม่ใช่	ใช่
ค่าใช้จ่าย	น้อย	มาก

ปัจจุบันมีรายงานจำนวนมาก ที่กล่าวถึงการนำแอปตาเมอร์ไปใช้ประโยชน์ ทั้งทางการแพทย์ การเกษตร และ ปศุสัตว์ สำหรับประเทศไทยมีการศึกษาและพัฒนาแอปตาเมอร์มาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์เช่นเดียวกัน โดยล่าสุด คณะวิจัยจากศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ ภายใต้การสนับสนุนทุนวิจัยจากสถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข (สวรส.) คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) และสมาคมเคมี (Royal Society Chemistry) แห่งประเทศสหราชอาณาจักร ได้ทำการพัฒนาแอปตาเมอร์ ร่วมกับการใช้วัสดุนาโนเพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัย และติดตามภาวะเบาหวาน เนื่องจากแอปตาเมอร์ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถจับได้จำเพาะกับน้ำตาลกลูโคสที่อยู่นอกเม็ดเลือดแดง ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้การเกิดภาวะเบาหวานได้เป็นอย่างดี โดยวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถวินิจฉัยภาวะเบาหวานได้อย่างมีประสิทธิภาพ และครอบคลุมกลุ่มประชากรที่วิธีเดิมไม่สามารถตรวจวินิจฉัยได้ นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยชนิดรวดเร็วแบบ Point-of-care testing ซึ่งเป็นการทดสอบวินิจฉัยทางการแพทย์ที่จุดดูแลหรือสถานที่ดูแลผู้ป่วย จากเดิมที่การทดสอบในอดีตทั้งหมดหรือส่วนใหญ่จำกัดอยู่ในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ การทดสอบแบบ Point-of-care จึงเป็นประโยชน์อย่างมากในการคัดกรองโรคเบื้องต้นในพื้นที่ระบาดหรือพื้นที่ที่ขาดแคลนเครื่องมือตรวจทางการแพทย์ เช่น การตรวจคัดกรองโรคไวรัสโคโรนาที่ก่อให้เกิดโรคไขข้ออักเสบ เชื้อวัณโรคชนิดมัยโคแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis* ไวรัสตับอักเสบบี พยาธิเท้าช้าง เป็นต้น สามารถวินิจฉัยโรคติดเชื้อในสัตว์เลี้ยง เช่น พยาธิหัวใจสุนัข แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคโลหิตจางในสุนัขและแมว เป็นต้น รวมถึง โรคติดเชื้อในสัตว์เศรษฐกิจ เช่น ไวรัสไข้หวัดสุกร (Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome Virus หรือ PRRSV) โรคติดเชื้อ Infectious Bronchitis Virus (IBV) ในไก่ โรคติดเชื้อในวัว เป็นต้น ในทางการแพทย์มีการศึกษาแอปตาเมอร์ที่จำเพาะต่อไวรัสใบด่างมันสำปะหลัง (ปัญญาภูมิ, 2559) การคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จำเพาะต่อโปรตีน CP4 EPSPS เพื่อการตรวจสอบถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม (อัจฉราพรรณ และรัชณี, 2021) สำหรับทิศทางของโครงการวิจัยในอนาคตจะมีการพัฒนาแอปตาเมอร์ สำหรับโมเล

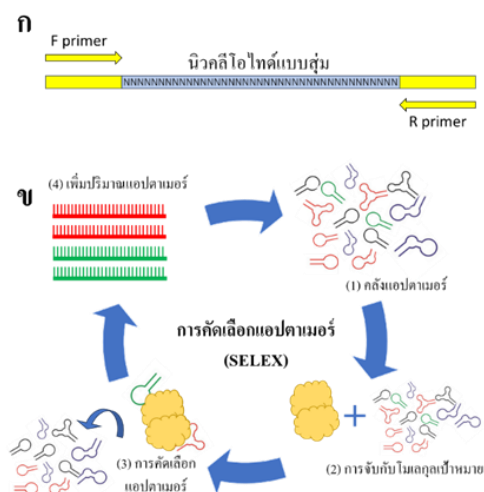
กุลเป้าหมายอื่นๆ เพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัย (Diagnostic) หรือการบำบัดโรค (Therapeutic) สำหรับโรคที่พบบ่อย และมีความสำคัญในประเทศต่อไป

การผลิตดีเอ็นเอแอปตาเมอร์

หลักการสำคัญในการผลิตดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ประกอบด้วย การสังเคราะห์และเพิ่มปริมาณคลิ่งแอปตาเมอร์ และการคัดเลือกแอปตาเมอร์ที่มีความจำเพาะกับโมเลกุลเป้าหมาย การสร้างคลิ่งแอปตาเมอร์ทำได้โดยใช้ปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งดีเอ็นเอแม่แบบที่ได้จากการสังเคราะห์จะประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์แบบสุ่มจำนวน 40 เบส (N40) อยู่บริเวณกลางของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์และบริเวณด้านข้างทั้งสองด้านเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นคู่สมกับไพรเมอร์ของแอปตาเมอร์เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณด้วย PCR (รูปที่ 1 ก) หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยา PCR จะได้เส้นดีเอ็นเอหลากหลายรูปแบบเนื่องจากมีบริเวณนิวคลีโอไทด์แบบสุ่ม มีรายงานการศึกษาว่าการใช้นิวคลีโอไทด์แบบสุ่มจำนวน 40 เบส (N40) อยู่บริเวณกลางของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ทำให้ได้ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์มากถึง 10^{14} - 10^{16} รูปแบบ เมื่อนำดีเอ็นเอแอปตาเมอร์มาทำให้อยู่ในรูปดีเอ็นเอสายเดี่ยว จะทำให้แอปตาเมอร์เกิดเป็นโครงสร้างทุติยภูมิจากพันธะต่างๆ ระหว่างนิวคลีโอไทด์ พร้อมทั้งจะนำไปคัดเลือกแอปตาเมอร์ที่จำเพาะกับโมเลกุลเป้าหมายซึ่งเป็นหัวใจสำคัญของเทคนิคแอปตาเมอร์ โดยขั้นตอนการคัดเลือกนี้อาศัยกระบวนการในหลอดทดลอง (*in vitro*) ที่เรียกว่า Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX) (รูปที่ 1 ข) โดยนำคลิ่งดีเอ็นเอแอปตาเมอร์สายเดี่ยว (Single stand DNA aptamer) ที่ได้ไปผสมและบ่มกับโมเลกุลเป้าหมายด้วยสัดส่วนและเวลาที่เหมาะสม จากนั้นล้างแอปตาเมอร์ที่ไม่จับกับโมเลกุลเป้าหมายออก เซลล์แอปตาเมอร์ที่จับกับโมเลกุลเป้าหมายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม เพื่อนำไปเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR อีกครั้ง ในการเพิ่มปริมาณแอปตาเมอร์หลังจากการคัดเลือก จะเป็น การเพิ่มเฉพาะแอปตาเมอร์ที่จับกับโมเลกุลเป้าหมายเท่านั้น ไม่ใช้การเพิ่มปริมาณแบบสุ่มเหมือนการทำ PCR ในครั้งแรก

ทำการคัดเลือกด้วยเทคนิค SELEX ซ้ำอีก 6-20 รอบ เพื่อเป็นการเพิ่มความจำเพาะของแอนติบอดี แต่จำนวนรอบของการทำซ้ำที่มากขึ้นอาจทำให้ได้แอนติบอดีน้อยลง เนื่องจากจะสูญเสียแอนติบอดีบางรูปแบบที่จับได้ไม่ดีพอไประหว่างการล้างแอนติบอดีในแต่ละรอบ นำแอนติบอดีจากรอบสุดท้ายของการคัดเลือกไปหาลำดับเบสเพื่อศึกษาโครงสร้างและรูปร่างของแอนติบอดี และดัดแปลงโมเลกุล

ของแอนติบอดีให้เหมาะสมต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในงานด้านต่างๆ ต่อไป เช่น การติดตามฟลูออเรสเซนต์ การติดตามด้วยปฏิกิริยาเคมีต่างๆ เพื่อนำไปติดตามโมเลกุลเป้าหมาย การเติมสารบางอย่างหรือยาเพื่อใช้ในการขนส่ง การเติมหมู่เมทิล (Methyl-) การเปลี่ยนแปลงหรือแทนที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ เป็นต้น



รูปที่ 1 ภาพจำลองการสังเคราะห์และคัดเลือกแอนติบอดีที่จำเพาะกับโมเลกุลเป้าหมาย ก แสดงแอนติบอดีแม่แบบและตำแหน่งไพรเมอร์ (Primer) เพื่อเพิ่มปริมาณคลิ่งแอนติบอดีด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ข แสดงการคัดเลือกแอนติบอดีที่จับกับโมเลกุลเป้าหมายด้วยวิธี Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX)

การใช้ประโยชน์แอนติบอดีในงานด้านต่างๆ

1. การตรวจวินิจฉัย (Diagnostics)

การพัฒนาชุดตรวจภาคสนาม โดยใช้แอนติบอดีเป็นหนึ่งในเทคนิคที่มีการศึกษาและนำมาใช้เพื่อเพิ่มความจำเพาะ แม่นยำ ในการตรวจวินิจฉัยโรคต่างๆ โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อก่อโรคหรือโมเลกุลเป้าหมายในเลือดหรือตัวอย่างส่งตรวจที่บ่งบอกความผิดปกติต่างๆ มีการนำแอนติบอดีมาดัดแปลงและพัฒนาพร้อมกับเทคนิคอื่น เช่น การตรึงแอนติบอดีบนแผ่นไมมเบรอนเพื่อพัฒนาเป็นชุดตรวจแบบ Lateral flow หรือแผ่นตรวจโรคอย่างง่ายและรวดเร็ว เป็นต้น ตัวอย่างการศึกษาที่ใช้แอน-

ติบอดีในการตรวจวินิจฉัย เช่น การหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Coronavirus-2 (SARS-CoV-2) เพื่อวินิจฉัยการติดเชื้อโควิด-19 (Mandal et al., 2021) การใช้แอนติบอดีในการตรวจพิษงูสามเหลี่ยม (*Bungarus caeruleus*) โดยหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ β -Bungarotoxin (Anand et al., 2021) เป็นต้น

2. การรักษาโรค (Therapeutics)

ในปี 1990 จุดเริ่มต้นของการพัฒนาเทคนิคแอนติบอดีคือการใช้แอนติบอดีในการหาโมเลกุลที่จำเพาะต่อ Bacteriophage T4 DNA polymerase ต่อมามีการศึกษาหาแอนติบอดีเพื่อไปยังยัง

TAR decoys ของผู้ติดเชื้อ HIV-1 เพื่อยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส HIV (Sullenger et al., 1990) และมีการศึกษาการใช้แอปตาเมอร์ในการยับยั้ง และกระตุ้นเป้าหมายอย่างต่อเนื่อง มีการทดลองทางคลินิกสำหรับการรักษาโรคต่างๆ เช่น จอประสาทตาเสื่อม การแข็งตัวของเลือด เนื่องจกวิทยา และการอักเสบ ลิ้มเลือดอุดตันในหลอดเลือด มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันแบบไม่อีลอยด์ มะเร็งเซลล์ไต มะเร็งปอดชนิดไม่ใช่เซลล์ขนาดเล็ก และจำลิมเลือดอุดตัน มีการใช้แอปตาเมอร์ในการกระตุ้น และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เป้าหมายเป็นต้น (Byun, 2021)

3. ขนส่งยาไปยังเซลล์เป้าหมาย (Drug delivery)

มีหลายการศึกษาเกี่ยวข้องกับการขนส่งโมเลกุลยาไปยังเซลล์เป้าหมายเพื่อการบำบัด โดยเฉพาะ มะเร็ง มีการขนส่งกรดนิวคลีอิกหรือยาผ่านแอปตาเมอร์ไปยังชั้นไขมัน (Lipid bilayer) เพื่อยับยั้งการแสดงออกของยีนในเซลล์เป้าหมายหรือการรักษา มะเร็ง (Kim et al., 2019) มีการขนส่งยา Doxorubicin ด้วย Aptamer-exosome ในการขนส่งยาเพื่อรักษามะเร็ง (Zou et al., 2019) เป็นต้น นอกจากนี้แอปตาเมอร์ยังสามารถใช้เป็นยา โดย Macugen เป็นแอปตาเมอร์ตัวแรกที่ได้รับการอนุมัติจาก FDA ในปี 2004

4. ตรวจจับโมเลกุลเป้าหมาย (Detection)

แอปตาเมอร์มีคุณสมบัติในการจับอย่างจำเพาะกับโมเลกุลเป้าหมาย จึงมีการพัฒนาแอปตาเมอร์ในการตรวจจับหาสารหรือโมเลกุลเป้าหมาย เช่น ตรวจจับโลหะหนักในตัวอย่างอาหาร ตรวจจับ สารพิษจากเชื้อราที่ปนเปื้อนในอาหาร ใช้ในการตรวจหาโปรตีน Prostate-specific antigen (PSA) ที่ผลิตจากต่อมลูกหมากเพื่อใช้ในการตรวจจับหาสูจิโนคโตอาชญากรรมทางเพศ การตรวจหาสารโอคราทอกซิน (Ocratoxin) ซึ่งเป็นสารพิษจากเชื้อราที่ปนเปื้อนในอาหาร หรือแม้กระทั่งการตรวจหาไวรัสตับอักเสบบีหรือสารที่เกี่ยวข้องกับการระเบิดได้ เป็นต้น

5. พัฒนาวัคซีน (Vaccines)

แอปตาเมอร์มีข้อได้เปรียบที่สำคัญเหนือโมโนโคลนอลแอนติบอดี จึงมีการนำมาศึกษาทางการแพทย์อย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะในแง่การรักษาและป้องกันโรค มีทั้งการนำแอปตาเมอร์มาเป็นตัวยับยั้งเชื้อก่อโรค เช่น ยับยั้งไวรัส หรือใช้เป็นตัวช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ เช่นการศึกษาการใช้แอปตาเมอร์เป็นตัวเพิ่มประสิทธิภาพการกระตุ้นของวัคซีน (Vaccine adjuvant)

6. ใช้เป็นเครื่องมือในห้องปฏิบัติการ (Research tool)

ด้วยคุณสมบัติของแอปตาเมอร์ที่คล้ายแอนติบอดี จึงมีการศึกษาและงานวิจัยที่นำแอปตาเมอร์มาใช้แทนแอนติบอดีในห้องปฏิบัติการ เช่น ในเทคนิค Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

7. ถ่ายภาพเซลล์หรือเนื้อเยื่อเป้าหมาย (Cell imaging)

แอปตาเมอร์มีข้อดีในการดัดแปลงโมเลกุล จึงมีการนำแอปตาเมอร์ที่จำเพาะกับเซลล์หรือโมเลกุลเป้าหมายมาติดฉลากสารเรืองแสง หรือสี โดยสารฟลูออเรสเซนต์เป็นสารเรืองแสงที่นิยมใช้ในการเชื่อมต่อกับแอปตาเมอร์เพื่อถ่ายภาพเนื่องจากมีความไวสูง ราคาถูก ตัวอย่างการใช้ประโยชน์ด้านการถ่ายภาพ ได้แก่ การนำแอปตาเมอร์ที่จำเพาะต่อตัวรับไกลโคโคลโปรตีนเพื่อใช้ในการถ่ายภาพและบ่งชี้การมีชีวิตของเซลล์ การใช้แอปตาเมอร์ที่จำเพาะกับโปรตีน Mucin ซึ่งจะพบมากในเซลล์มะเร็งมาติดฉลากสารเรืองแสงและนำมาใช้ในการวินิจฉัยโรคมะเร็งจากภาพถ่ายได้ และการศึกษาที่นำอนุภาคนาโนบาร์โค็ดมาต่อกับแอปตาเมอร์มาใช้ในการตรวจหาเซลล์เนื้องอก Circulating Tumor Cell (CTC) เป็นต้น (Li et al., 2011)

จากบทความปริทัศน์นี้แสดงให้เห็นถึงข้อดีและการใช้ประโยชน์ของแอปตาเมอร์ ด้วยเทคโนโลยีและวิทยาศาสตร์ที่ก้าวหน้า อาจเป็นไปได้ว่าแอป-

ตาเมอร์จะสามารถมาแทนแอนติบอดีที่ผลิตจากสัตว์ทดลองในอนาคตได้



รูปที่ 2 การนำเทคนิคแอปตาเมอร์ไปใช้ประโยชน์ในงานด้านต่าง ๆ

เอกสารอ้างอิง

ปัญญาวุฒิ อัมพูชินทร์. 2559. ไวรัสไบด่างมันสำปะหลังในประเทศไทยและการคัดเลือก Aptamer ที่จำเพาะเพื่อการตรวจสอบโรค. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. หน้า 1-103

อัจฉราพรรณ ใจเจริญ รัชณี สงประยูร. 2561. การคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จำเพาะต่อโปรตีน CP4 EPSPS เพื่อการตรวจสอบถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม. วารสารวิชาการเกษตร 36 (2), 141-152.

แนวหน้าคอลัมน์ (พบหอม มศว). 2560. นวัตกรรม “ชุดตรวจวินิจฉัยโรคชนิดรวดเร็ว” ในยุคประเทศไทย 4.0. สืบค้นวันที่ 1 กรกฎาคม 2565. จาก <https://www.naewna.com/columnonline/29004>

Anand, A., Chatterjee, B., Dhiman, A., Goel, R., Khan, E., Malhotra, A., Santra, V., Salvi, N., Khadilkar, M. V., Bhatnagar, I., Kumar, A., Asthana, A., Sharma, T. K. 2021. Complex target SELEX-based identification of DNA aptamers against *Bungarus caeruleus* venom for the detection of envenomation

using a paper-based device. Biosens. Bioelectron 193, 113523.

Byun, J. S. 2021. Recent progress and opportunities for nucleic acid aptamers. Life 11(3), 193.

Kim, M. W., Jeong, H. Y., Kang, S. J., Jeong, I. H., Choi, M. J., You, Y. M., Im, C. S., Song, I. H., Lee, T. S., Lee, J. S., Lee, A. Park, Y. S. 2019. Anti-EGF receptor aptamer-guided Co-delivery of anti-cancer siRNAs and quantum dots for theranostics of triple-negative breast cancer. Theranostics 9, 837-852.

Li, J., Xu, M., Huang, H., Zhou, J., Abdel-Halimb, E. S., Zhang, J. R., Zhu, J. J. 2011. Aptamer-quantum dots conjugates-based ultrasensitive competitive electrochemical cytosensor for the detection of tumor cell. Talanta 85, 2113-2120.

Mandal, M., Dutta, N., Dutta, G. 2021. Aptamer-based biosensors and their implications in COVID-19 diagnosis. Analytical Methods 13 (45), 5400-5417.

- Sullenger, B. A., Gallardo, H. F., Ungers, G. E., Gilboa, E. 1990. Overexpression of TAR sequences renders cells resistant to human immunodeficiency virus replication. *Cell* 63, 601–608.
- Wang, L., Ma, W., Chen, W., Liu, L., Zhu, Y. 2011. An aptamer-based chromatographic strip assay for sensitive toxin semi-quantitative detection. *Biosens. Bioelectron* 26, 3059–3062.
- Yang, C. C. 1999. Cobrotoxin: structure and function. *J. Nat. Toxins* 8(2), 221-233. PMID: 10410333.
- Zon, G. 2022. Recent advances in aptamer applications for analytical biochemistry. *Anal. Biochem* 644, 113894.
- Zou, J., Shi, M., Liu, X., Cheng, J., Xing, X., Qiu, L., Tan, W. 2019. Aptamer-Functionalized exosomes: elucidating the cellular uptake mechanism and the potential for cancer-targeted chemotherapy. *Anal. Chem* 91(3), 2425–2430.
-





สารเสาวภา

Queen Saovabha Memorial Institute Bulletin



ถุงนอกเซลล์ (Extracellular vesicles) จากพิษงู กับการประยุกต์ใช้ทางการแพทย์

Medical applications of snake venom-derived extracellular vesicles

กมลวรรณ เขียนไชยจันทร์

Kamolwan Khianchaikhan

ฝ่ายวิจัยและพัฒนา สถาบันเสาวภา สภากาชาดไทย

Department of Research and Development, Queen Saovabha Memorial Institute, Thai Red Cross Society

บทคัดย่อ: ถุงนอกเซลล์ (Extracellular vesicles; EVs) เป็นส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ที่ภายในบรรจุสารชีวโมเลกุล เช่น กรดนิวคลีอิก โปรตีน ลิพิด และเมตาบอไลต์ ซึ่งเป็นตัวกลางสำหรับการสื่อสารระหว่างเซลล์และควบคุมกระบวนการทางสรีรวิทยาและพยาธิวิทยาต่างๆ ปัจจุบันมีการศึกษา EVs อย่างแพร่หลายเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ในด้านต่างๆ เช่น ในด้านการวินิจฉัย การรักษาโรค นำส่งยา และใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของโรค การศึกษาถุงนอกเซลล์จากพิษงู (Snake venom extracellular vesicles; SVEVs) แสดงให้เห็นถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนพิษงูกับเซลล์ที่ได้รับพิษงู โดย SVEVs จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับเซลล์และการสื่อสารระหว่างเซลล์ ส่งผลกระทบต่อเซลล์ร่างกายอย่างรุนแรง ทำให้เกิดการอักเสบ โรคไตเรื้อรัง ปัญหาทางระบบภูมิคุ้มกัน และปัญหาทางระบบประสาทในระยะยาวต่อผู้ที่ได้รับพิษงู (Long-term effect) บทความนี้ได้อธิบายเกี่ยวกับบทบาทของ SVEVs ที่ส่งผลกระทบต่อเซลล์ที่ได้รับพิษงู เพื่อให้เกิดความเข้าใจกลไกปฏิสัมพันธ์ของพิษงูและอาจเป็นแนวทางการพัฒนาการรักษาใหม่ๆ ต่อผลกระทบจากพิษงูได้

คำสำคัญ: ถุงนอกเซลล์ พิษงู การบำบัด

ABSTRACT: Extracellular vesicles (EVs) are nano-sized membrane vesicles containing nucleic acids, proteins, lipids, and metabolites secreted by the cell, which act as mediators of cell-to-cell communication and regulate various physiological and pathological processes. Recent research has highlighted the significant role of EVs in medical research and application, including diagnosis, heding, drug delivery, and disease biomarker development. Studies on snake venom extracellular vesicles (SVEVs) have revealed that snake venom can induce inflammation, chronic kidney disease, immunological and neurological effects, and long-term effects by altering cellular level and intercellular communication through EVs. This article is to describe the role of SVEVs on exposed cells to snake venom as a basis for understanding the mechanism of exposed cell response, leading to alternative therapeutic approaches on snake venom effects.

Keywords: Extracellular vesicles (EVs), Snake venom, Therapeutic

บทนำ

การถูกงูพิษกัดเป็นปัญหาทางสาธารณสุขของประเทศไทยและทั่วโลก ปี 2560 องค์การอนามัยโลก (WHO) ประกาศให้การถูกงูกัดเป็นหนึ่งในโรคเขตร้อนที่ถูกละเลย (Neglected Tropical Diseases) ซึ่งเป็นสาเหตุของการบาดเจ็บ ทูพพลภาพ และเสียชีวิตในหลายประเทศทั่วโลก โดยเฉพาะพื้นที่เกษตรกรรมและเขตชนบท พิษงูมีองค์ประกอบหลักที่เป็นเปปไทด์ โปรตีน ทั้งที่เป็นเอนไซม์และไม่เป็นเอนไซม์ รวมทั้งมีโมเลกุลอื่นๆ ที่อยู่ภายในถุงนอกเซลล์ (Extracellular vesicles; EVs) องค์ประกอบเหล่านี้มีส่วนสำคัญต่อการทำลายและสร้างผลกระทบอย่างรุนแรงต่อเซลล์ที่ได้รับพิษงูทั้งในระยะสั้นและระยะยาว

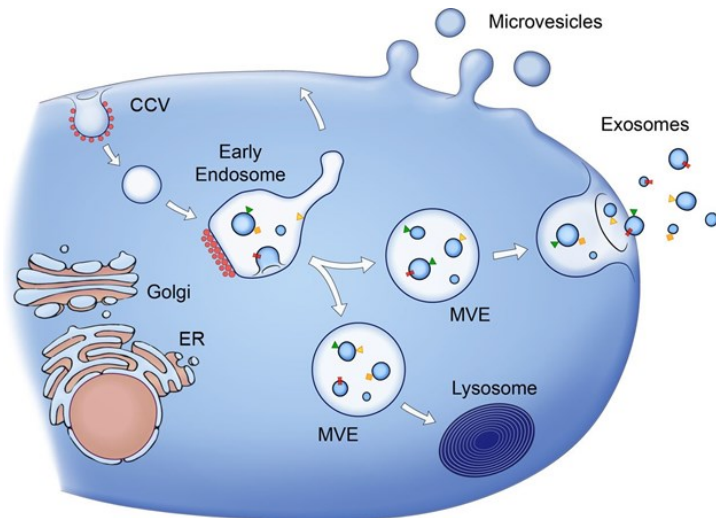
ปัจจุบันมีการศึกษา EVs อย่างแพร่หลายในวงการแพทย์ โดยเฉพาะด้านการวินิจฉัยและการรักษาโรคต่างๆ เนื่องจาก EVs มีบทบาทสำคัญในการเป็นตัวกลางสื่อสารระหว่างเซลล์และการขนส่งโมเลกุลทางชีววิทยา เช่น กรดนิวคลีอิก โปรตีน ลิพิด และเมตาบอไลต์ไปยังเซลล์ผู้รับ เพื่อควบคุมกระบวนการทางสรีรวิทยา และพยาธิวิทยาต่างๆ และโมเลกุลเหล่านี้สามารถพัฒนาเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (Biomarker) ได้ จากการศึกษา EVs ในพิษงู (Snake Venom Extracellular Vesicles; SVEVs) โดยวิธี Ultracentrifuge และการวิเคราะห์โปรตีโอมิกส์ (Proteomics) และไมโครอาร์เอ็นเอโอมิกส์ (MicroRNAomics) พบว่ามีโปรตีนและไมโครอาร์เอ็นเอ (MicroRNA: miRNA) ที่สำคัญต่อการขัดขวางกลไกการห้ามเลือด (Hemostatic system) โดยทำลายการทำงานของไฟบริโนเจน (Fibrinogen) และกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์ (Apoptosis) นอกจากนี้การศึกษา EVs ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ที่ได้รับพิษงู พบว่าองค์ประกอบของโปรตีนมีความแตกต่างไปจาก EVs ของเซลล์ที่ไม่ได้รับพิษงู โปรตีนบางชนิดมีการแสดงออกเพิ่มขึ้น และโปรตีนบางชนิดมีการแสดงออกลดลง ซึ่งส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงในระดับเซลล์และการสื่อสารระหว่างเซลล์ของเซลล์ที่ได้รับพิษงู ซึ่งแสดงให้เห็นถึงผลของพิษงูต่อการเปลี่ยนแปลงในระดับเซลล์และการสื่อ-

สารระหว่างเซลล์ บทบาทของ SVEVs ยังถูกคาดการณ์ว่าจะส่งผลกระทบต่ออย่างรุนแรงในระยะยาวต่อผู้ที่ได้รับพิษงู (Long-term effect) เช่น ทำให้เกิดการอักเสบ โรคไตเรื้อรัง ปัญหาทางระบบภูมิคุ้มกัน และปัญหาทางระบบประสาท ดังนั้น การศึกษา SVEVs จึงอาจเป็นเส้นทางใหม่ในการพัฒนาการต้านพิษงู ที่ไม่ต้องอาศัยการรักษาโดยใช้เซรัมจากสัตว์เท่านั้น

การศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับ EVs จากพิษงูและเซลล์ที่ได้รับพิษงู มีความสำคัญต่อการค้นพบโมเลกุลใหม่ที่ช่วยให้เข้าใจเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์และปฏิกิริยาของพิษงูที่อาจส่งผลกระทบต่ออย่างรุนแรงในระยะยาวต่อผู้ที่ได้รับพิษงู และเป็นแนวทางสำหรับการวิจัยทางการแพทย์เกี่ยวกับพิษงู เพื่อพัฒนาและหาแนวทางในการรักษาผลกระทบจากพิษงูใหม่ๆ ต่อไป

ถุงนอกเซลล์ (Extracellular vesicles; EVs)

ถุงนอกเซลล์ (EVs) เป็นส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ที่อยู่ในบรรจุมูลชีวโมเลกุลต่างๆ เช่น กรดนิวคลีอิก (DNA, RNA หรือ miRNA) โปรตีน ลิพิด และเมตาบอไลต์ เกิดได้ทั้งจากการหลั่ง การสังเคราะห์ หรือการหลุดออกมาจากเยื่อหุ้มเซลล์ภายใต้สภาวะปกติและพยาธิสภาพ (Mathiesen et al., 2021; Kumar et al., 2024) EVs ที่มีการศึกษามากที่สุด คือ Exosomes และ Microvesicles โดย Exosome จะมีขนาดระหว่าง 30 ถึง 200 นาโนเมตร ถูกสร้างขึ้นภายในเซลล์และปล่อยออกมาจากเซลล์โดยรวมกับส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ ในขณะที่ Microvesicles มีขนาดใหญ่ได้ถึง 1,000 นาโนเมตร ถูกสร้างขึ้นโดยตรงจากเยื่อหุ้มเซลล์ ดังนั้นเยื่อหุ้มของ EVs เหล่านี้จึงมีองค์ประกอบเดียวกันกับเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ต้นกำเนิด (Raposo and Stoorvogel, 2013; van Niel et al., 2022) (รูปที่ 1)

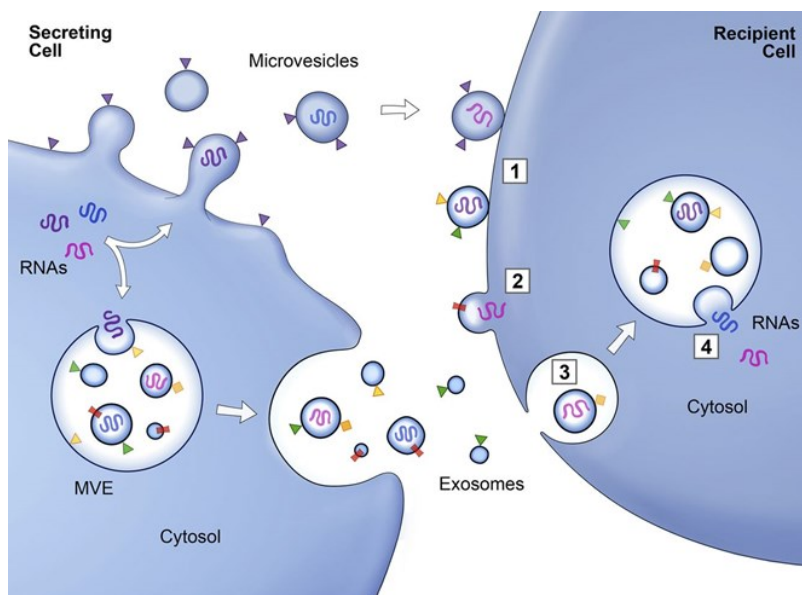


รูปที่ 1 ภาพจำลองการสร้าง EVs ที่แตกต่างกันระหว่าง Exosome และ Microvesicles (Raposo and Stoorvogel, 2013)

การแพร่กระจายเชื้อ

ถุงนอกเซลล์ หรือ EVs มีหน้าที่เป็นตัวกลางสำหรับการสื่อสารระหว่างเซลล์ผ่านการถ่ายโอนสารชีวโมเลกุลต่างๆ ไปยังเซลล์ผู้รับและยังมีบทบาทสำคัญในการปกป้องโมเลกุลดังกล่าวให้ไปถึงเซลล์ผู้รับ เพื่อควบคุมกระบวนการทางสรีรวิทยาและพยาธิวิทยาต่างๆ (Ela et al., 2013; Raposo and Stoorvogel, 2013) (รูปที่ 2) การหลั่ง EVs สามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด มีการศึกษาจำนวนมากที่แสดงให้เห็นถึงบทบาทของ EVs ในสภาวะสมดุลของเซลล์ การซ่อมแซมและการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน การแข็งตัวของเลือด การสร้างเนื้องอก และมะเร็ง การเสื่อมของระบบประสาท และการแพร่กระจายของเชื้อโรคประเภท

ต่างๆ จึงมีการใช้ EVs เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่สำคัญและเป็นเป้าหมายในการรักษาโรคต่างๆ ได้ (Ela et al., 2013; Abhange et al., 2021) ดังนั้น การศึกษา EVs กลายเป็นเครื่องมือสำหรับการรักษาโรคต่างๆ ผ่านกลไกที่แตกต่างกัน เช่น การปรับภูมิคุ้มกัน การต่อต้านการตายของเซลล์ การสร้างเส้นเลือดใหม่ การซ่อมแซมเนื้อเยื่อ รวมทั้งความสามารถในการเข้าถึงเซลล์ที่เฉพาะเจาะจง (Ela et al., 2013; Herrmann et al., 2021; Du et al., 2023)



รูปที่ 2 ภาพจำลอง EVs ที่เป็นตัวกลางสำหรับการสื่อสารระหว่างเซลล์ผ่านการถ่ายโอนสารชีวโมเลกุลต่างๆ (1) EVs ที่ถูกหลั่งออกมาจากเซลล์ต้นกำเนิด (เซลล์ทางด้านซ้าย) จะเข้าจับกับเยื่อหุ้มของเซลล์ผู้รับ (เซลล์ทางด้านขวา) (2) EVs จะหลอมรวมกับเยื่อหุ้มของเซลล์ผู้รับและปล่อยสารชีวโมเลกุลต่างๆ เข้าสู่เซลล์ผู้รับ หรือ (3) EVs ถูกนำเข้าสู่เซลล์ผู้รับด้วยกระบวนการ endocytosis (4) เมื่อ EVs ถูกนำเข้าสู่เซลล์ผู้รับแล้ว จะหลอมรวมกับเยื่อหุ้มของออร์แกเนลล์หรือส่วนที่เกี่ยวข้องกับ Endocytosis ภายในเซลล์ผู้รับและปล่อยสารชีวโมเลกุลต่างๆ ภายในเซลล์ผู้รับ (Raposo and Stoorvogel, 2013)

บทบาทของถุงนอกเซลล์ในพิษงู (Snake venom extracellular vesicles; SVEVs)

ถุงนอกเซลล์จากพิษงู (SVEVs) สามารถพบได้ในพิษงู จึงมีการนำ SVEVs มาศึกษากลไกระหว่างพิษงูกับเซลล์ที่ได้รับพิษงู จากการศึกษาเกี่ยวกับองค์ประกอบของโปรตีนและไมโครอาร์เอ็นเอ (MicroRNA; miRNA) ทั้งหมดใน SVEVs และผลกระทบของ SVEVs ต่อเซลล์ที่ได้รับพิษงู พบว่า EVs เหล่านี้ มีการกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ผู้รับ เช่น กระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์ (Apoptosis) นอกจากนี้มีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับ EVs ที่มีการหลั่งออกมาจากเซลล์ที่ได้รับพิษงู เพื่อดูการสื่อสารระหว่างเซลล์ที่มีการตอบสนองต่อพิษงู พบว่าเซลล์ที่ได้รับพิษงูเหล่านี้มีการสร้างชีวโมเลกุลอื่นๆ ใน EVs ที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น มีการสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบและภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้น โปรตีนเหล่านี้จะถูกส่งไปยังเซลล์ผู้รับอื่นๆ ให้เกิดการตอบสนองต่อไป สารชีวโมเลกุลต่างๆ ที่ถูกปล่อยออกมาจากเซลล์ที่

ได้รับพิษงูผ่าน SVEVs มีความเกี่ยวข้องต่อการอักเสบ โรคไตเรื้อรัง ปัญหาทางระบบภูมิคุ้มกัน และปัญหาทางระบบประสาท บทบาทของ SVEVs จึงถูกคาดการณ์ว่าจะส่งผลกระทบอย่างรุนแรงในระยะยาวต่อผู้ที่ได้รับพิษงู (Long-term effect) (Willard et al., 2021; Gonçalves-Machado et al., 2022; Liao et al., 2023; Nagendra et al., 2024)

มีการศึกษา EVs ในพิษงูทางกระดิ่ง *Crotalus durissus terrificus* เพื่อตรวจสอบเซลล์ต้นกำเนิดของ EVs ที่หลั่งออกมาในพิษงู จากการศึกษาวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ EVs โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าเป็น EVs ประเภท Microvesicles ที่ถูกหลั่งออกมาในพิษงู มีเซลล์ต้นกำเนิดมาจาก Microvilli ที่อยู่ทางด้าน Apical membrane ของเซลล์ต่อมพิษงู (ที่มีการหลั่งพิษงู) นอกจากนี้มีการวิเคราะห์โปรตีนโอไมกส์เพื่อศึกษาโปรตีนที่อยู่ใน EVs พบว่าประกอบด้วยโปรตีนที่มาจากไซโตพลาสซึม เยื่อหุ้มเซลล์ เยื่อหุ้มร่างแหเอนโดพลาสมิก เยื่อหุ้มของกอลจิ บอดี

และพบโปรตีนที่มีบทบาทในการสร้างพิษ ได้แก่ Ecto-5'-nucleotidase ซึ่งเป็นโปรตีนจากเยื่อหุ้มเซลล์ที่ปรับเปลี่ยนการทำงานของเปปไทด์หลายชนิด (Souza-Imber et al., 2017)

การเปรียบเทียบองค์ประกอบของโปรตีนใน EVs ในกลุ่มพิษงู 4 ชนิด (*Akistrodon contortrix contortrix*, *Crotalus atrox*, *Crotalus viridis* และ *Crotalus cerberus oreganus*) โดยใช้การวิเคราะห์โปรตีโอมิกส์ พบว่า EVs มีขนาดระหว่าง 50–500 นาโนเมตร ประกอบด้วยโปรตีนหลัก 8 ชนิด ได้แก่ Snake venom metalloproteinase (SVMP), Snake venom serine protease (SVSP), Phospholipase A₂ (PLA₂), L-amino acid oxidase (LAO), 5' nucleotidase, C-type lectin, Cysteine-rich secretory proteins (CRISP) และ Disintegrin การตรวจทางชีวเคมีระบุว่า EVs มีกิจกรรมของ Metalloproteinase และ Fibrinolytic สูง นอกจากนี้ยังพบว่า EVs เหล่านี้ส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) การศึกษาชิ้นเป็นการรายงานแรกที่แสดงให้เห็นองค์ประกอบโปรตีนของ EVs ในพิษงูอย่างครอบคลุมได้ทราบการทำงานระดับโมเลกุลของโปรตีนบางชนิดที่แสดงถึงบทบาทสำคัญของ EVs ในเรื่องความเป็นพิษต่อเซลล์ของพิษงู และให้ความเข้าใจในกระบวนการสร้างพิษ (Carregari et al., 2018)

การศึกษาโปรตีโอมิกส์ของ EVs ในพิษงู *Crotalus atrox* และ *C. oreganus helleri* และ EVs จากพลาสมาของหนูที่ถูกฉีดพิษงู พบว่า EVs ในพิษงูทั้ง 2 ชนิดนี้มีโปรตีน 5' nucleosidase, L-amino acid oxidase, และ Metalloproteinases ในปริมาณมาก และเมื่อศึกษา EVs ในพลาสมาของหนูที่ถูกฉีดพิษงู พบว่า มีโปรตีนหลายชนิดที่มีการแสดงออกสูงขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ได้แก่โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ Cytochrome P450 เมแทบอลิซึมของไขมัน ภูมิคุ้มกันและการอักเสบเฉียบพลัน และการตอบสนองต่อ Heat shock ในขณะที่โปรตีนที่มีการแสดงออกลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่าเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งอิเล็กตรอนในไมโทคอนเดรีย, NADH, TCA, Cortical cytoskeleton, Reticulum stress และ การเกิดปฏิกิริยา

Oxidation reduction ดังนั้นการศึกษาโปรตีนจาก EVs ในพิษงูและพลาสมาของหนูที่ได้รับพิษงู แสดงให้เห็นองค์ประกอบในพิษงูและองค์ประกอบที่สำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของสิ่งมีชีวิตที่ได้รับพิษงู (Willard et al., 2021)

นอกจากนี้ได้มีการศึกษาโปรตีน CRISPs จากพิษงู *Crotalus scutulatus scutulatus* พบว่าโปรตีนชนิดนี้สามารถกระตุ้นการยึดเกาะและการส่งสัญญาณโมเลกุลหลายชนิด ซึ่งอาจมีบทบาทสำคัญในสรีรวิทยาและพยาธิวิทยาของผู้ที่ถูกงูกัด จึงมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับผลของพิษงูและผลของโปรตีน CRISPs ที่บริสุทธิ์ต่อการเปลี่ยนของ EVs ในพลาสมาของหนูที่ได้รับพิษงู พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการยึดเกาะของเซลล์ การจัดเรียงโครงร่างของเซลล์ การส่งสัญญาณ การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน และการขนส่งผ่านถุงเวซิเคิลอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับพลาสมาของหนูที่ไม่ได้รับโปรตีน CRISPs ที่บริสุทธิ์ ซึ่งการแสดงออกที่เปลี่ยนไปของโปรตีนเหล่านี้ ส่งผลกระทบทั้งแบบเฉียบพลันบริเวณบาดแผลและผลกระทบระยะยาวผ่านกระบวนการส่งสัญญาณของเซลล์ที่ได้รับพิษ การค้นพบนี้แสดงให้เห็นว่า CRISPs มีบทบาทสำคัญในผลกระทบเฉียบพลันและผลกระทบระยะยาวของพิษ (Reyes et al., 2023)

การศึกษา SVEVs ในพิษงู *Bothrops jararaca* โดยการปั่นแยก SVEVs ด้วยเครื่อง Ultracentrifuge ความเร็วรอบหมุนเหวี่ยงที่ 20,000 g (P20K) และ 100,000 g (P100K) พบว่า SVEVs ในกลุ่ม P20K มีความหลากหลายของขนาด EVs ที่ 30-1,000 นาโนเมตร ในขณะที่ EVs ในกลุ่ม P100K มีความหลากหลายของขนาด EVs น้อยกว่าที่ 30-130 นาโนเมตร และเมื่อทำการวิเคราะห์โปรตีนที่อยู่ใน SVEVs ของทั้ง P20K และ P100K พบโปรตีน Ecto 5'-nucleotidase ปริมาณมากที่สุด ซึ่งโปรตีนนี้มีบทบาทเกี่ยวกับการกีดกันภูมิคุ้มกัน นอกจากนี้ยังได้ศึกษาผลของ SVEVs ต่อเซลล์ Macrophage และ Muscle cell พบว่าเซลล์ทั้งสองชนิดมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเยื่อหุ้มนิวเคลียส มีการแพ้ตัวของโครมาตินลดลง และการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในกลุ่ม RNA-binding protein หลายโปรตีน โดย

เฉพาะอย่างยิ่งจากกลุ่ม P100K นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับผลของเซรัมแก้พิษงู (Antivenom) ต่อปฏิสัมพันธ์ระหว่าง SVEVs และเซลล์ Macrophage และ Muscle cell พบว่า เซรัมแก้พิษงูทำให้ SVEVs มีการเคลื่อนที่เข้าเซลล์ Macrophage และ Muscle cell น้อยลง จึงทำให้เซลล์มีโอกาสได้รับผลกระทบจากพิษงูน้อย การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า SVEVs มีความสำคัญต่อการเกิดปฏิกิริยาต่างๆ กับเซลล์ที่ได้รับพิษงู รวมถึงการปรับภูมิคุ้มกันและการเกิดผลกระทบระยะยาวของพิษงูต่อเซลล์ด้วย (Gonçalves-Machado et al., 2022)

นอกจากการศึกษาโปรตีนของ SVEVs แล้ว ยังมีการศึกษาเกี่ยวกับ miRNA ของ SVEVs ด้วย โดยได้มีการแยก Exosome ออกจากพิษงูเห่า *Naja atra* แล้วค้นหา miRNA พบว่ามี miRNA หลายชนิดใน Exosome ซึ่งมีบทบาทเกี่ยวกับการอยู่รอดและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ การขนส่งโมเลกุลและการส่งสัญญาณของเซลล์ และการควบคุมการแสดงออกของยีนผ่านกระบวนการ Transcription และ Epigenetics นอกจากนี้ยังพบ miRNA ที่สำคัญคือ miR-2904 ซึ่งมีบทบาทอย่างมากต่อการแสดงออกในหนูทดลอง โดยพบว่าเมื่อทำการฉีด miR-2904 ในหนูทดลอง ทำให้หนูเกิดอาการคล้ายกับได้รับพิษทั้งหมด พบความเสียหายที่ตับ และตัวบ่งชี้ทางชีวเคมีในซีรัม เช่น Alanine aminotransferase (ALT), Aspartate aminotransferase (AST), Creatine kinase (CK), Lactate dehydrogenase (LDH), Cholinesterase (Che), Total bilirubin (TB) และ Direct bilirubin (DB) มีระดับเพิ่มสูงขึ้น แต่ระดับ Creatinine (CRE) ลดลง ซึ่งบ่งบอกถึงความเสียหายต่อกล้ามเนื้อ ตับ ไต ในการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงบทบาทสำคัญของของ miRNA ใน EVs ของพิษงูที่สร้างผลกระทบรุนแรงต่อสิ่งมีชีวิตที่ได้รับพิษงู และทำให้ได้ข้อมูลเชิงลึกใหม่สำหรับนำไปประยุกต์ต่อการรักษาและการพัฒนาเซรัมแก้พิษงูต่อไป (Liao et al., 2023)

จากการศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นถึงบทบาทสำคัญของ SVEVs ที่ส่งผลกระทบต่อเซลล์ที่ได้รับพิษงู และส่งผลให้การสื่อสารของเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงไป อย่างไรก็ตามการศึกษา EVs ทางด้านพิษงูยังมีอยู่น้อยมาก โดยเฉพาะ

อย่างยิ่งในประเทศไทยที่ยังไม่มีการศึกษา SVEVs ดังนั้นการศึกษา SVEVs อาจช่วยให้มีโอกาสดักค้นพบโมเลกุลใหม่ และกลไกการออกฤทธิ์และปฏิกิริยาของพิษงูในอีกแง่มุมหนึ่งที่ส่งผลกระทบต่ออย่างรุนแรงทั้งในระยะสั้นและระยะยาวต่อผู้ที่ได้รับพิษงู เพื่อเป็นแนวทางสำหรับการวิจัยทางการแพทย์ในด้านพิษงูและแนวทางในการรักษาผลกระทบจากพิษงูต่อไปได้

เอกสารอ้างอิง

- Abhange, K., Makler, A., Wen, Y., Ramnauth, N., Mao, W., Asghar, W., Wan, Y. 2021. Small extracellular vesicles in cancer. *Bioact Mater* 6(11), 3705–3743.
- Carregari, V. C., Rosa-Fernandes, L., Baldasso, P., Bydlowski, S. P., Marangoni, S., Larsen, M. R., Palmisano, G. 2018. Snake Venom Extracellular Vesicles (SVEVs) reveal wide molecular and functional proteome diversity. *Sci. Rep* 8(1), 12067. Doi:10.1038/s41598-018-30578-4
- Du, S., Guan, Y., Xie, A. Yan, Z., Gao, S., Li, W., Rao, L., Chen, X., Chen, T. 2023. Extracellular vesicles: a rising star for therapeutics and drug delivery. *J. Nanobiotechnol* 21(1), 231. Doi: 10.1186/s12951-023-01973-5
- Ela, S., Mager, I., Breakefield, X. O., Wood, M. J. 2013. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov* 12(5), 347–57.
- Gonçalves-Machado, L., Verçoza, B. R. F., Nogueira, F. C. S., Melani, R. D., Domont, G. B., Rodrigues, S. P., Rodrigues, J. C. F., Zingali, R. B. 2022. Extracellular vesicles from *Bothrops jararaca* venom are diverse in structure and protein composition and interact with mammalian cells. *Toxins* 14(11), 806. Doi: 10.3390/toxins14110806

- Herrmann, I. K., Wood, M. J. A., Fuhrmann, G. 2021. Extracellular vesicles as a next-generation drug delivery platform. *Nat. Nanotechnol* 16, 748–759.
- Kumar, M. A., Baba, S. K., Sadida, H. Q., Marzooqi, S. A., Jerobin, J., Altemani, F. H., Algehainy, N., Alanazi, M. A., Abou-Samra, A., Kumar, R., Al-Shabeeb Akil, A. S., Macha, M. A., Mir, R., Bhat, A. A. 2024. Extracellular vesicles as tools and targets in therapy for diseases. *Signal Transduct. Target Ther.* 9, 27. Doi: 10.1038/s41392-024-01735-1
- Liao, T., Gan, M., Qiu, Y., Lei, Y., Chen, Q., Wang, X., Yang, Y., Chen, Y., Zhao, Y., Niu, L., Wang, Y., Zhang, S., Zhu, L., Shen, L. 2023. miRNAs derived from cobra venom exosomes contribute to the cobra envenomation. *J. Nanobiotechnol* 21, 356. Doi: 10.1186/s12951-023-02131-7
- Liao, Y., Zhang, Z., Ouyang, L., Mi, B., Liu, G. 2023. Engineered extracellular vesicles in wound healing: design, paradigms, and clinical application. *Wiley. Small* 20(7), e2307058. Doi: 10.1002/sml.202307058
- Mathiesen, A., Hamilton, T., Carter, N., Brown, M., McPheat, W., Dobrian, A. 2021. Endothelial extracellular vesicles: from keepers of health to messengers of disease. *Int. J. Mol. Sci* 22(9), 4640. Doi: 10.3390/ijms22094640
- Nagendra, K., Bakkannavar, S. M., Bhat, V. R., Sirur, F. M. 2024. A review on snake venom extracellular vesicles: Past to present. *Toxicon* 244, 107772. Doi: 10.1016/j.toxicon.2024.107772
- Raposo, G., Stoorvogel, W. 2013. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol* 200, 373–383.
- Reyes, A., Hatcher, J. D., Salazar, E., Galan, J., Iliuk, A., Sanchez, E. E., Suntravat, M. 2023. Proteomic profiling of extracellular vesicles isolated from plasma and peritoneal exudate in mice induced by *Crotalus scutulatus scutulatus* crude venom and its purified cysteine-rich secretory protein (C_{ss}-CRiSP). *Toxins (Basel)* 15(7), 434. Doi: 10.3390/toxins15070434
- Souza-Imberg, A., Carneiro, S. M., Giannotti, K. C., Sant'Anna, S. S., Yamanouye, N. 2017. Origin and characterization of small membranous vesicles present in the venom of *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon* 136, 27–33.
- van Niel, G., Carter, D. R. F., Clayton, A., Lambert, D.W., Raposo, G., Vader, P. 2022. Challenges and directions in studying cell-cell communication by extracellular vesicles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 23, 369–382.
- Willard, N. K., Salazar, E., Oyervides, F. A., Wiebe, C. S., Ocheltree, J. S., Cortez, M., Perez, R. P., Markowitz, H., Iliuk, A., Sanchez, E. E., Suntravat, M., Galan, J. A. 2021. Proteomic identification and quantification of snake venom biomarkers in venom and plasma extracellular vesicles. *Toxins* 13(9), 654. Doi: 10.3390/toxins13090654

สารเสาวภา
(QUEEN SAOVABHA MEMORIAL INSTITUTE BULLETIN; QSMI Bulletin)
คำชี้แจงการส่งบทความ

1. ประเภทของบทความ	มีรายละเอียดดังนี้
บทความวิชาการ (Academic Article)	เป็นบทความทางวิชาการเชิงวิทยาศาสตร์ ที่มีเนื้อหาที่เป็นประโยชน์และสร้างสรรค์ ความยาวไม่น้อยกว่า 5 หน้าและไม่เกิน 10 หน้า
2. การเตรียมต้นฉบับ	มีรายละเอียดดังนี้
ภาษา	เป็นภาษาไทย พิมพ์ด้วย Word for windows XP โดยเว้นระยะห่างระหว่างบรรทัด 1.5 เท่า รูปแบบตัวอักษร TH SarabunPSK ขนาด 16 มีเลขหน้ากำกับทางมุมขวาบนและใส่หมายเลขบรรทัดกำกับไว้ด้วย ค่าย่อให้ใช้เฉพาะที่เป็นสากลเท่านั้นและต้องบอกคำเต็มไว้ครั้งแรกก่อน ในส่วนของบทความจะต้องมีทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ
ตาราง แผนภูมิ ภาพประกอบ	ต้นฉบับที่มีตาราง แผนภูมิ และภาพประกอบ ให้ใส่หลังจากมีการกล่าวถึงในเนื้อหา โดยวางไว้กึ่งกลางหน้ากระดาษ มีความละเอียด 300 dpi และบันทึกภาพโดยใช้นามสกุล .jpg หรือ .tif เพื่อความชัดเจนในการจัดพิมพ์ สำหรับคำอธิบายตาราง แผนภูมิ และภาพประกอบ ให้พิมพ์ใต้ภาพหรือเหนือตาราง
3. ส่วนประกอบของบทความ	ประกอบด้วย
ชื่อเรื่อง	ควรตั้งให้สั้น กระชับ แต่ได้ใจความ ครอบคลุมหรือเกี่ยวข้องกับบทความ ทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ
ชื่อผู้เขียน	เขียนตัวเต็มทั้งชื่อตัวและนามสกุลทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ไม่ต้องระบุปริญญาหรือตำแหน่งทางวิชาการ ในกรณีที่มีผู้แต่งหลายคน ให้ระบุชื่อผู้รับผิดชอบบทความและที่อยู่ติดต่อได้
ชื่อหน่วยงาน	ระบุชื่อหน่วยงานและสถาบันของผู้ร่วมงานทุกคนที่สามารถติดต่อได้ ทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ
บทคัดย่อ	ย่อเฉพาะเนื้อหาสำคัญเท่านั้น ความยาวไม่ควรเกิน 120 คำหรือ 12 บรรทัด ให้มีบทคัดย่อเป็นภาษาไทยและภาษาอังกฤษ
คำสำคัญ	ไม่ควรเกิน 5 คำ ทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ
เนื้อหา	อาจแบ่งเป็นหัวข้อเพื่อให้ง่ายต่อการอ่าน เช่น บทนำ เนื้อเรื่อง อาจมีขั้นตอนการทำงานหรือวิธีการคร่าวๆ บทสรุป วิเคราะห์และวิจารณ์ เอกสารอ้างอิง

<p>4. การอ้างอิง</p>	<p><u>การอ้างอิงในเนื้อหา</u></p> <p>1. ใช้การอ้างอิงแบบ นาม-ปี ไว้ในวงเล็บท้ายประโยคที่ต้องการอ้างอิง โดยภาษาไทยระบุ ชื่อ-นามสกุลผู้แต่งตามด้วยปีที่พิมพ์ ภาษาอังกฤษระบุเฉพาะชื่อสกุลของผู้แต่ง ตามด้วยปีที่พิมพ์ แต่ถ้าชื่อผู้แต่งที่อ้างอิงเป็นส่วนหนึ่งของเนื้อหาที่จะเขียนต่อไป ให้วงเล็บเฉพาะปีที่พิมพ์</p> <p>2. การอ้างอิงบทความที่มีผู้แต่งมากกว่า 1 คน ภาษาไทยให้อ้างชื่อ-นามสกุลภาษาอังกฤษให้อ้างเฉพาะชื่อสกุล</p> <p>2.1 ผู้แต่ง 2 คน ให้ใช้ชื่อ-นามสกุล/ชื่อสกุลของผู้แต่งทั้ง 2 คน ภาษาไทยใช้ชื่อ-นามสกุลจริงเชื่อมด้วย “และ” ภาษาอังกฤษใช้ชื่อสกุลเชื่อมด้วย “and”</p> <p>2.2 ผู้แต่ง 2 คนขึ้นไป ให้ใช้ชื่อ-นามสกุล ภาษาอังกฤษระบุเฉพาะชื่อสกุลของผู้แต่งคนแรก ตามด้วย “และคณะ” (ภาษาอังกฤษตามด้วยคำว่า “et al.”) แล้วตามด้วยปีที่พิมพ์ ในทุกครั้งของการอ้างอิง</p> <p>2.3 กรณีอ้างอิงผลงานมากกว่า 1 ชิ้น ให้ใช้เครื่องหมาย “;” คั่นระหว่างบทความแต่ละเรื่อง และเรียงลำดับอ้างอิงตามปี โดยเรียงจากปีเก่ามาปีใหม่สุด ตามลำดับ</p> <p><u>การอ้างอิงท้ายบทความ</u></p> <p>1. การเรียงลำดับเอกสารอ้างอิง ให้เรียงเอกสารภาษาไทยขึ้นก่อน ตามด้วยเอกสารภาษาอังกฤษ โดยเรียงลำดับตามอักษรพยัญชนะ</p> <p>2. ถ้ามาจากเอกสารภาษาไทย ให้ใช้ชื่อ-นามสกุลเป็นภาษาไทย ถ้ามาจากเอกสารภาษาอังกฤษ ให้ใช้ชื่อผู้เขียนเป็นภาษาอังกฤษ ให้เขียนชื่อสกุลตัวเต็ม นำหน้า ตามด้วยอักษรย่อชื่อต้นและชื่อกลาง</p>
<p>5. เอกสารอ้างอิง</p>	<p><u>วารสาร</u></p> <p>ชื่อผู้เขียน. ปีที่พิมพ์. ชื่อบทความ. ชื่อวารสาร ฉบับที่ (เลขที่), หน้าแรก-หน้าสุดท้าย.</p> <p><u>หนังสือ/ตำรา</u></p> <p>ชื่อผู้เขียน. ปีที่พิมพ์. ชื่อหนังสือ. พิมพ์ครั้งที่ (ถ้ามี). สำนักพิมพ์, ชื่อเมือง. หน้าแรก-หน้าสุดท้าย.</p> <p><u>บทหนึ่งในหนังสือ/ตำรา</u></p> <p>ชื่อผู้เขียน. ปีที่พิมพ์. ชื่อเรื่อง. ใน: ชื่อบรรณาธิการ. ชื่อหนังสือ. พิมพ์ครั้งที่ (ถ้ามี). สำนักพิมพ์, ชื่อเมือง. หน้าแรก-หน้าสุดท้าย.</p> <p><u>สื่ออิเล็กทรอนิกส์</u></p> <p>ชื่อผู้เขียน. ปีที่เผยแพร่สารนิเทศบนอินเทอร์เน็ต (ถ้ามี). ชื่อเรื่อง/ชื่อบทความ. สืบค้น วัน เดือน ปี, จาก http://www.....</p>

	<p>เอกสารประกอบการสัมมนา/ประชุมวิชาการ ชื่อผู้เขียน. ปีที่พิมพ์. ชื่อเรื่อง/ชื่อบทความ. ใน: ชื่อการสัมมนา/ประชุมวิชาการ ครั้งที่(ถ้ามี) ประจำปี. หน่วยงานที่รับผิดชอบ. วันที่จัดการสัมมนา/ประชุม. หน้าแรก-หน้าสุดท้าย.</p> <p>เอกสารแบบไม่มีชื่อผู้เขียน ชื่อเรื่อง/ชื่อบทความ/ชื่อหนังสือ. ปีที่พิมพ์. ฉบับที่ (เลขที่), หน้าแรก-หน้าสุดท้าย.</p>
<p>6. การรับเรื่องพิมพ์</p>	<p>ส่งต้นฉบับในรูปแบบของไฟล์ มาที่ E-mail: sunutcha.s@redcross.or.th หรือ sunutcha@yahoo.com</p>
<p>7. สถานที่ติดต่อ</p>	<p>สุนุชชา สุนทรารชุน บรรณาธิการ สารเสาวภา ฝ่ายวิจัยและพัฒนา สถานเสาวภา สภากาชาดไทย 1871 ถ. พระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทร. (02) 252-0161-4 ต่อ 82534 E-mail: sunutcha.s@redcross.or.th หรือ sunutcha@yahoo.com</p>