STUDIES ON THE EFFECTS OF HYALURONIDASE INHIBITORS AND ANTIVENOM ANTIBODY ON THE LOCAL TISSUE DAMAGE CAUSED BY *NAJA KAOUTHIA* AND *CALLOSELASMA RHODOSTOMA* VENOMS

SENEE YINGPRASERTCHAI

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (MICROBIOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2002

ISBN 974-04-142-5

4136995 SCMI/M : MAJOR: MICROBIOLOGY; M.Sc. (MICROBIOLOGY)
KEY WORDS : HYALURONIDASE/SNAKE VENOM/NECROSIS

SENEE YINGPRASERTCHAI: STUDIES ON THE EFFECTS OF HYALURONIDASE INHIBITORS AND ANTIVENOM ANTIBODY ON THE LOCAL TISSUE DAMAGE CAUSED BY *NAJA KAOUTHIA* AND *CALLOSELASMA RHODOSTOMA* VENOMS. THESIS ADVISORS: KAVI RATANABANANGKOON, Ph.D., CHALOBON YOOSOOK, Ph.D., PRASIT PALITTAPONGARNPIM, M.D.
160 p. ISBN 974-04-142-5

Snake envenomation is an important medical problem, especially in tropical regions of the world. The symptoms following snakebites may be only local (hemorrhage, edema, myonecrosis) or may include systemic effects (neurotoxicity and/or hematotoxicity) which may result in the death of victims. While antivenoms have been used successfully in saving lives, they have minimal preventive effect on the local tissue necrosis which in some cases require amputation and resulted in permanent disability. Venom hyaluronidase which hydrolyzes mucopolysaccharides of connective tissues is known to increase venom diffusion and thus aggrevate the local tissue injury in snakebite victims.

Experiments have been carried out to find potent inhibitors of hyaluronidase with the aim of reducing local tissue damage and systemic toxicities caused by *Naja kaouthia* (NK) and *Calloselasma rhodostoma* (CR) venom. The results showed that cromolyn sodium (CS) and sodium aurothiomalate (SAT) at 10mM, completely inhibited the enzymes of venom. In *in vivo* experiments, CS and SAT a dose of 256 and 195 μg /mouse, respectively, significantly prolonged the survival time of mice receiving lethal doses of NK and CR venoms. CS, SAT and specific antivenom $F(ab')_2$ when incubated with the venom prior to injection have been shown to significantly reduce all parameters of local tissue necrosis. In the independent type experiment, CS, SAT and antivenom $F(ab')_2$ have been shown to be effective if injected within 1 minute after the injection of venom. At longer time intervals of 3 and 10 minutes the inhibitors/antibody were effective in reducing some parameters of local tissue necrosis but the extent of inhibition was lower. Under light microscope, CS, SAT and $F(ab')_2$ antibody were found to decrease the necrotic area of muscle injected with the venoms. These results indicate that the inhibitors and antivenom $F(ab')_2$ when injected immediately at the sites of bites can reduce the systemic and local toxicity of NK and CR venoms.

4136995 SCMI/M : สาขา : จุลชีววิทยา ; วทม. (จุลชีววิทยา)

เสนีย์ ยิ่งประเสริฐชัย : การศึกษาผลของตัวยับยั้งเอนไซม์ hyaluronidase และแอนติบอดีต่อการเกิดเนื้อตาย สาเหตุจากพิษงูเห่า และงูกะปะ (STUDIES ON THE EFFECTS OF HYALURONIDASE INHIBITORS AND ANTIVENOM ANTIBODY ON THE LOCAL TISSUE DAMAGE CAUSED BY *NAJA KAOUTHIA* AND *CALLOSELASMA RHODOSTOMA* VENOMS) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: กวี รัตนบรรณางกูร Ph.D., ชโลบล อยู่สุข Ph.D., ประสิทธิ์ ผลิตผลการพิมพ์ M.D. 160 p.
ISBN 974-04-142-5

การถูกงูพิษกัดยังเป็นปัญหาสำคัญทางการแพทย์ที่พบในหลายทวีป โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศในเขตร้อนชื้น อาการที่เกิดจากงูพิษกัดอาจเป็นเฉพาะที่เช่น แผลเน่าเปื่อยในบริเวณที่กัด และ/หรืออาการพิษทั่วร่างกาย (systemic poisoning) เช่น พิษต่อระบบประสาท, ต่อระบบเลือด เป็นต้น ซึ่งอาการดังกล่าวอาจจะทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิต ปัจจุบันการรักษาผู้ที่ถูกงูพิษกัดจะใช้เซรุ่มแก้พิษงู ที่สามารถช่วยชีวิตผู้ที่ถูกงูพิษกัดได้ แต่เซรุ่มแก้พิษงูไม่สามารถป้องกันหรือรักษาอาการแผลเน่าเปื่อยในบริเวณที่งูกัดได้ ซึ่งอาจทำให้ผู้ป่วยต้องได้รับการผ่าตัดตกแต่งแผลหรือตัดนิ้วหรือแขน-ขา

Hyaluronidase เป็นเอนไซม์ในพิษงูที่สามารถย่อย mucopolysaccharide ของ connective tissue เป็นผลให้พิษงูกระจายเข้าไปทำลายเนื้อเยื่อเป็นบริเวณกว้างขึ้น และช่วยให้พิษแพร่เข้าไปทั่วร่างกายได้เร็วขึ้น จากสาเหตุข้างต้นจึงดำเนินการศึกษาและวิจัยหาตัวยับยั้ง hyaluronidase โดยคาดว่าจะสามารถใช้สารดังกล่าวในการลดอาการแผลเน่าเปื่อย และอาการทั่วไปอันเกิดจากพิษงูเห่าและพิษงูกะปะได้

ได้พบว่าตัวยับยั้ง hyaluronidase 2 ชนิด คือ cromolyn sodium (CS) และ sodium aurothiomalate (SAT) ที่ความเข้มข้น 10 mM สามารถยับยั้งการทำงานของ hyaluronidase ในพิษงูทั้งสองชนิด และพบว่าหนูที่ได้รับพิษงูร่วมกับ CS หรือ SAT ที่ความเข้มข้น 256 หรือ 196 µg/ตัว ตามลำดับ สามารถยืดระยะเวลาตาย (survival time) ขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับหนูที่ได้รับพิษงูเพียงอย่างเดียว หนูในกลุ่มที่ฉีดด้วยพิษงูกะปะ พบว่ามีหนูทดลองบางตัวรอดชีวิต การศึกษาผลของ CS, SAT และแอนติบอดีชนิด $F(ab')_2$ ต่อการเกิดเนื้อตาย (edema, hemorrhage และ myonecrosis) พบว่า CS, SAT และแอนติบอดีชนิด $F(ab')_2$ สามารถลดการเกิดเนื้อตายได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อผสมพิษงูกับ ตัวยับยั้งก่อนฉีด นอกจากนี้การทดลองโดยการฉีดพิษงูก่อนแล้วตามด้วยตัวยับยั้งหรือแอนติบอดีเข้าในบริเวณเดียวกัน พบว่าเมื่อฉีด CS, SAT หรือแอนติบอดีภายใน 1 นาทีหลังจากฉีดพิษงูจะสามารถลดการเกิดแผลเน่าตายได้อย่างมีนัยสำคัญและเมื่อให้ตัวยับยั้งหรือแอนติบอดีที่เวลา 3-10 นาทีหลังจากฉีดพิษงู พบว่า สามารถลดเนื้อตายได้บ้างแต่จะลดลงน้อย ลักษณะพยาธิสภาพที่ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของกล้ามเนื้อขาของหนูพบว่า CS, SAT และแอนติบอดีชนิด $F(ab')_2$ สามารถลดขอบเขตและพื้นที่บริเวณเนื้อตาย อันเกิดจากพิษงูทั้งสองได้อย่างชัดเจน การศึกษาชี้ให้เห็นว่าตัวยับยั้งเอนไซม์ hyaluronidase และแอนติบอดีต่อพิษงู สามารถลดอาการพิษทั่วร่างกายและอาการแผลเน่าเปื่อยสาเหตุจากพิษงูเห่าและงูกะปะ