

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยครั้งนี้ คณะผู้วิจัยสามารถสกัดโปรตีนและทำให้บริสุทธิ์จากวันของวุ้นหางจระเข้ ได้โปรตีนดังกล่าวมีขนาดโมเลกุลประมาณ 12 kDa และตั้งชื่อว่า AVPI-12 ซึ่งโปรตีนดังกล่าวสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่ม proteases ได้ หรือแสดงฤทธิ์เป็น protease inhibitor โดยสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในการย่อย γ subunit ของ human fibrinogen ด้วยเอนไซม์ serine proteases ชนิด human plasmin และ bovine trypsin และ เอนไซม์ในกลุ่ม cysteine proteases เช่น papain เป็นต้น นอกจากนี้ AVPI-12 ยังมีความต้านทานต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ plasmin และ trypsin ได้ดีกว่า papain นอกจากนี้ AVPI-12 ยังทนต่อการย่อยด้วย trypsin ดีกว่าโปรตีนที่เป็น serine protease inhibitor ที่พบได้ในเลือดของมนุษย์ที่ออกฤทธิ์ต่อระบบการแข็งตัวของเลือด คือ α_2 -macroglobulin ผลการทดลองนี้แสดงว่า AVPI-12 มีแนวโน้มที่จะทนทานเมื่ออยู่ในสถานะที่มี proteases ได้ดีกว่า α_2 -macroglobulin เมื่อพิจารณาคุณสมบัติทั้งการเป็น protease inhibitor และ ขนาดโมเลกุลของ AVPI-12 พบว่ามีความใกล้เคียงกับโปรตีนที่พบได้จากพืชที่มีคุณสมบัติเป็น proteases inhibitor เช่น cystatin family 1 ที่มีขนาดประมาณ 11 kDa (Ryan และคณะ, 1998), protease inhibitor ในกลุ่ม Kunitz และ Bowman-Birk ซึ่งโดยทั่วไปพบว่ามีขนาดประมาณ 18-24 และ 8-10 kDa (de Oliveira และคณะ, 2012) เมื่อพิจารณาจากลำดับของกรดอะมิโน 10 ตัวแรกจากปลาย N-terminal ของโปรตีน AVPI-12 คือ R-D-W-A-E-P-N-D-G-Y ซึ่งเป็นลำดับของกรดอะมิโนที่ไม่ซ้ำกับโปรตีนชนิดใด ๆ ใน databases รวมทั้ง protease inhibitor จากพืชชนิดต่าง ๆ (ดังแสดงในตารางที่ 1) ดังนั้น โปรตีนชนิดนี้จึงจัดว่าเป็น protease ชนิดใหม่ และจากความสามารถทนทานต่อการย่อย และการยับยั้งเอนไซม์ protease ในกลุ่ม serine protease ได้ดีของ AVPI-12 แสดงให้เห็นว่า AVPI-12 มีแนวโน้มเป็น serine protease inhibitor

จากการทดลองการเป็น fibrinogenolytic inhibitor ของ AVPI-12 ต่อ human plasmin พบว่า AVPI-12 มีฤทธิ์ยับยั้งการย่อย γ subunit ของ human fibrinogen ได้ดีเหมือนกับ α_2 -macroglobulin ซึ่งเป็นตัวยับยั้งของ human plasmin ในกระแสเลือด และยังยับยั้ง human plasmin ได้แบบ dose dependent ซึ่งการออกฤทธิ์ยับยั้งการย่อย γ subunit ของ human fibrinogen ได้ ถือว่ามีความสำคัญ เนื่องจากในธรรมชาติของกระบวนการแข็งตัวของเลือดที่จะต้องมีการสร้าง fibrin clot เพื่อให้เลือดหยุดไหลนั้น ต้องอาศัย γ -subunit ของ fibrinogen ในการที่จะช่วยรักษาหรือคงสภาพของ fibrin polymer ให้เหนียวแน่นไม่ให้ถูกย่อยสลายได้ง่าย ๆ ด้วยกระบวนการ fibrinolysis (Mosesson และคณะ, 2001)

นอกจากนี้ยังพบว่า AVPI-12 สามารถยับยั้งไม่ให้เกิดการย่อย fibrin clot ได้อย่างสมบูรณ์จากการทดสอบด้วย colorimetric method และ SAXS ซึ่งผลการทดลองจาก SAXS จะเห็นได้อย่างชัดเจนว่า AVPI-12 สามารถป้องกันการถูกย่อยได้อย่างสมบูรณ์ด้วย plasmin ได้ โดยดูจากความสูงของ peak ที่ยังคงสูงอยู่เมื่อเทียบกับ peak ของ fibrin clot ที่ถูกย่อยด้วย plasmin ในสถานะที่ไม่มี inhibitor และ peak ของ fibrin clot ที่ไม่มีทั้ง inhibitor และ plasmin ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับผลที่ได้จากการใช้ α_2 -macroglobulin เป็น

inhibitor ซึ่งผลการทดลองที่ได้ครั้งนี้จาก SAXS มีความเชื่อถือได้ โดยพบว่า SAXS spectrum ของ fibrin clot มีค่า q และ ลักษณะของ peak ใกล้เคียงกับที่เคยมีการรายงานโดย Brown และคณะ (2009) โดยค่า q ของ fibrin clot จะมีค่าประมาณ 0.285 nm^{-1} หรือ เท่ากับ $d = 22 \text{ nm}$ โดยความสัมพันธ์ของ q และ d หาได้จาก wave vector ซึ่งมีสมการดังนี้ $q = 2\pi/d$ ซึ่ง d คือ fibrin periodicity มีหน่วยเป็น nanometer (Brown และคณะ, 2009) และพบว่าค่า q ของ fibrin clot เปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยทั้งในสถานะที่มีและไม่มี เอนไซม์ หรือ inhibitor เช่นในสถานะที่ fibrin clot ถูกย่อยด้วย plasmin ค่า q มีค่าประมาณ 0.288 nm^{-1} หรือ d ประมาณ 21.8 nm แต่ค่าความสูงของ peak ที่ต่ำลงเมื่อมี plasmin แสดงถึงว่ามีการลดลงของ fibrin clot จากภาวะที่เป็นของแข็ง (solid state) กลายเป็นของเหลว (liquid state) และเมื่อมีตัวยับยั้ง หรือ inhibitor ทำให้การถูกย่อยช้าลงหรือเกิดได้ไม่สมบูรณ์ความสูงของ peak จึงยังคงสูงอยู่หรือลดลงเล็กน้อยดังแสดงในผลการทดลองรูปที่ 10

จากผลการทดลอง N-terminal amino acid sequencing, fibrinogenolytic inhibitory activity, fibrinolytic inhibitory activity ผลการทดสอบทางชีวเคมี รวมทั้งผล SAXS พบว่า AVPI-12 เป็น serine protease inhibitor ชนิดใหม่ที่สามารถยับยั้งการทำงานของ plasmin ได้คล้ายคลึงกับ plasma serine protease inhibitor คือ α_2 -macroglobulin แต่มีความต้านทานต่อการถูกย่อยด้วย proteases มากกว่า แสดงว่า AVPI-12 มีแนวโน้มจะพัฒนาใช้เป็นยากลุ่ม antifibrinolytic treatment ได้

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนจาก N-terminal ของโปรตีน AVPI-12 กับ proteases inhibitors จากพืชชนิดต่าง ๆ

Protease Inhibitor	The first 10-11 amino acids at N-terminus	Similarity (%)	References
AVPI-12	RDWAEPNDGY		
Cysteine protease Inhibitor (CPI)			
HCB-SunI	PYGGGGTESG	-	Zhang <i>et al.</i> (2006)
Oryzacystatin I	MSSDGGPVLG	-	Ryan <i>et al.</i> (1998)
CPI from apple fruit	DNQGSANSVE	-	Ryan <i>et al.</i> (1998)
CPI from soybean	AALEKVQELG	-	Ryan <i>et al.</i> (1998)
Heat-stable serine protease			
Potide-G	QICTMCCAGRK	-	Kim <i>et al.</i> (2006)
Kunitz trypsin inhibitor			
SSTI	KTQVLDANGNI	-	Macedo <i>et al.</i> (2011)
ERYLA	VLLDGNGEVVQ	-	Ramos <i>et al.</i> (2009)
PROJU	QELLDVDGEIL	-	Oliva <i>et al.</i> (2010) ¹
ACACO	KELLDADGDIL	-	Oliva <i>et al.</i> (2000) ²
EATI	NELKDMEGDIL	-	de Oliveira <i>et al.</i> (2012)

(-) มีความแตกต่างอย่างๆไม่มีนัยสำคัญ

HCB-SunI (*Helianthus annuus*, sunflower seeds cathepsin B inhibitor); Potide-G (potato tubers, *Solanum tuberosum* L. cv. Golden Valley serine protease inhibitor); SSTI (*Sapindus saponaria* L. seeds trypsin inhibitor); ERYLA (*Erythrina latissima* trypsin inhibitor); PROJU (*Prosopis juliflora* trypsin inhibitor); ACACO (*Acacia confusa* trypsin inhibitor); EATI (*Entazada acaciifolia* (Benth.) seeds trypsin inhibitor)