

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการวิจัยเบื้องต้นของคณะผู้วิจัย พบว่าสารสกัดโปรตีนขนาดโมเลกุล 48 kDa ที่แยกให้บริสุทธิ์ได้จากส่วน crude ของน้ำยางของต้นขนุนมีฤทธิ์ในการป้องกันจุลชีพทั้งแบคทีเรียและเชื้อรา จึงตั้งชื่อโปรตีนชนิดนี้ว่า antimicrobial protease 48 (AMP48) และในการวิจัยครั้งนี้ คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาคุณสมบัติเชิงชีวเคมีและเภสัชวิทยาของโปรตีนนี้เพิ่มเติม พบว่าโปรตีนชนิดนี้เป็นชนิด serine protease เมื่อทำการแยกกลุ่มของโปรตีนโดยใช้ inhibitors ที่จำเพาะกับโปรตีนในกลุ่มต่าง โดย AMP48 สามารถยับยั้งการทำงานได้ด้วย PMSF และ SBTI (Mekkriengkrai และคณะ, 2004; Devaraja และคณะ, 2011) โปรตีนนี้มีลำดับกรดอะมิโน 11 ตัวแรกจาก N-terminal ของสาย polypeptide คือ A-Q-E-G-G-K-D-D-D-G-G ซึ่งเป็นลำดับของกรดอะมิโนที่ไม่ซ้ำกับโปรตีนชนิดใด ๆ ใน BLAST databases รวมทั้ง serine proteases จากพืชชนิดต่าง ๆ (ดังแสดงในตารางที่ 2) ดังนั้นโปรตีนชนิดนี้จึงจัดว่าเป็น serine protease ชนิดใหม่

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนจาก N-terminal ของโปรตีน AMP48 กับ serine proteases จากพืชชนิดต่าง ๆ

Serine Protease	sequence of 10-11 amino acids at N-terminus	Similarity (%)	Reference
AMP48	AQEGGKDDDGG		
Lilly LIM9	TTHTPDYLGIQ	-	Kobayashi <i>et al.</i> (1994)
<i>Cucumis melo</i> L	TTRSWDFLGFP	-	Yamagata <i>et al.</i> (1994)
Tomato P69B	TTRSPTFLGLE	-	Tornero <i>et al.</i> (1997)
White gourd	TTRSWDFLNFP	-	Uchikoba <i>et al.</i> (1998)
<i>Arabidopsis</i>	TTRTPLFLGL	-	Yamagata <i>et al.</i> (2000)
Bamboo protease	TTRTPSFLRLS	-	Arima ¹ <i>et al.</i> (2000)
<i>Euphorbia supine</i> protease B	TTRTPNFLGL	-	Arima ² <i>et al.</i> (2000)
SCSI (soy bean) (D)	TTRSWDFLKS	-	Povovic <i>et al.</i> (2002)
Port C1 (soy bean)	TTRSWDFIGH	-	Povovic <i>et al.</i> (2002)
<i>Cucumis trigonus</i> Roxburghi	TTRSWDFLSG	-	Asif-Ullah <i>et al.</i> (2006)

(-) มีความแตกต่างอย่างๆ ไม่มีนัยสำคัญ

จากการศึกษาโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน AMP48 พบว่าประกอบด้วย α -helix (51%) ซึ่งมากกว่า β -sheet (9%) โครงสร้างทุติยภูมิของ AMP48 ที่ได้มีความแตกต่างจาก serine protease ที่ได้จากพืชอื่น ๆ ซึ่งโดยทั่วไปมักจะประกอบด้วย β -sheet (34-48%) มากกว่า α -helix (7-13%) (Rajesh และคณะ, 2006; Patel และคณะ, 2012) อย่างไรก็ตามการศึกษาโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนจากพืชอื่น ๆ ด้วย CD spectroscopy ก็มีการวัดในช่วง pH ของสารละลายตัวอย่างในช่วง 7-7.4 ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาครั้งนี้ คือที่ pH 8.8

โปรตีน AMP48 มีช่วงการทำงานได้ดีที่ pH 8 และคงทนต่อ pH ในช่วง 7-10 ที่อุณหภูมิ 55-60 °C และมีประสิทธิภาพการทำงานโดยคงทนต่ออุณหภูมิจนถึง 50 °C ซึ่งผลของ pH และอุณหภูมิต่อการทำงานของ AMP48 มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนในกลุ่ม serine protease จากพืชชนิดอื่น ๆ เช่น glycosylated protease จาก *Euphorbia milii* (Yadav และคณะ, 2006) และโปรตีนเอสทีที่มีความคงทนสูงจากต้น *Ficus benghalensis* (Sharma และคณะ, 2009)

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า AMP48 มีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยา คือ มี fibrinogenolytic และ fibrinolytic activities โดย AMP48 สามารถย่อย α subunit ของ human fibrinogen ได้ดี ตามด้วยการย่อยแบบ partial hydrolysis ของ β และ γ subunits ซึ่งลักษณะการย่อย human fibrinogen แบบนี้มี ความคล้ายคลึงกับเอนไซม์ที่มีแนวโน้มนำมารักษาโรคได้ (potential therapeutic enzymes) คือ เอนไซม์จากพิษงู ชนิด Colombian *Bothrops atrox* (Patiño และคณะ, 2010) fibrinogenase จาก Taiwan habu (Huang และคณะ, 1993) และ α -microfibrase จาก chinese habu (Wei และคณะ, 2002) รวมทั้งมีฤทธิ์คล้ายคลึงกับโปรตีนเอสทีสกัดได้จากพืชชนิดต่าง ๆ เช่น serine protease จาก *E. hitra* (Patel และคณะ, 2012) จากการทดสอบคุณสมบัติ fibrinolytic activity ของ AMP48 พบว่าโปรตีนนี้สามารถย่อย α -chain และ α -polymer และ partial hydrolyze β -chain และ γ -dimer ของ human fibrin clot ได้ ซึ่งคุณสมบัติในการเป็น fibrinolytic activity ของ AMP48 ได้รับการพิสูจน์ยืนยันเพิ่มเติมจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทุติยภูมิของ human fibrin clot จากปฏิกิริยาเมื่อเติม AMP48 โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทั้ง α -helix และ β -sheet ของ human fibrin clot ด้วยเทคนิค ATR-FTIR spectroscopy ซึ่งพบว่า AMP48 สามารถทำให้โครงสร้างหลักระดับทุติยภูมิของ fibrin clot ลดลงได้ตามระยะเวลาที่ทำปฏิกิริยา

จากผลการทดลอง N-terminal amino acid sequencing, fibrinogenolytic, fibrinolytic activities รวมทั้งผล ATR-FTIR spectroscopy และผลการยับยั้งการทำงานของ AMP48 ด้วย protease ชนิดต่าง ๆ พบว่าโปรตีนนี้เป็น serine protease ชนิดใหม่ (novel serine protease) มีแนวโน้มจะใช้เป็นยารักษาโรคในกลุ่มอาการจำพวก thromboembolic disorders เช่น deep vein thrombosis, strokes และ heart attacks ได้