โครงการย่อย E
การเตรียม สารยับยั้งแคนดิด้าและสารยับยั้งโปรตีเอสในปริมาณสูงจากน้ำยางพาราและการทดสอบระดับพรีคลินิก

จากรายงานผลวิจัยในโครงการย่อย 3 (การทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนต้านเชื้อแคนดิด้าจากน้ำยางพารา) ได้พบว่าสารยับยั้งแคนดิด้า คือ hevein ซึ่งเป็น latex allergen (Hev b 6) หรือ สารที่ทำให้เกิดการแพ้ จึงไม่มีประโยชน์ใดที่จะทำการเตรียมในปริมาณสูงเพื่อการทดสอบระดับพรีคลินิก แต่จากรายงานในโครงการย่อยโครงการย่อย 5 (การศึกษาการออกฤทธิ์ของโปรตีนยับยั้งโปรตีเอส ต่อเชื้อก่อโรคและการประยุกต์ใช้ทางการแพทย์) ได้พบว่าโปรตีนยับยั้งโปรตีเอส จากยางพารา (protease inhbibitor, HPI) สามารถออกฤทธิ์ 1) ยับยั้งเอนไซม์ gingipain ที่หลั่งออกมาจากเชื้อ porphylomonas gingivalis เพื่อย่อยสลายเหงือกในโรคปริทันต์หรือเหงือกอักเสบ 2) ยับยั้งการเจริญเติมโตของไวรัส hepatitis B (HBV) การค้นพบนี้มีประโยชน์ที่จะนำ HPI และ 3) เสริมการทำงานของ anti-fungal protein/ peptide โดยป้องกันการถูกทำลายของสารดังกล่าวโดย intracellular proteases ของเชื้อที่ถูกทำลายให้ตายลงจากสาร anti-fungal ดังกล่าว ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องหากระบวนการเตรียมสารยับยั้งโปรตีเอสจากน้ำยางในปริมาณสูงเพื่อให้เพียงพอสำหรับเพื่อการทดสอบระดับพรีคลินิก

E.1 การเตรียม สารยับยั้งโปรตีเอส (HPI) ในปริมาณสูงจากน้ำยางพารา

อุปกรณ์และวิธีการ

a) การเตรียมผงซีรั่มแห้งจากน้ำยางสด

นำน้ำยางสดที่กรีดได้ใหม่ๆมาเหนียวนำให้เกิดการจับตัวเป็นก้อนโดยการเติมกรดฟอร์มิค(0.2% ต่อปริมาตร) ลงไปในน้ำยางสด เพื่อให้สภาพความเป็นกรดเหนี่ยวนำให้เกิดการจับตัวของก้อนยาง แล้วจึงทำการแยกเอาส่วนของ fresh serum (F-serum) ออกจากก้อนยางโดยการรีดผ่านเครื่องรีดยางแผ่น ทำการรวมรวบ F-serum แล้วแล้วนำไปกรองผ่าน กรองผ่านเครื่อง microfiltration ขนาด 0.22 ไมครอน เพื่อขจัดเชื้อจุลชีพและแยกอนุภาคยางที่ปนเปื้อนอยู่ใน F-serum ออกไป แล้วทำให้เป็นผงแห้งโดยใช้เครื่อง spray dryer

b) การทำบริสุทธิ์ HPI

นำผงซีรั่มแห้งไปละลายน้ำกลั่น แล้วนำไปตกตะกอนด้วย acetone โดยใช้ช่วง % acetone saturatuion ดังนี้ 0-50, 50-70, 70-80 และ 80-95% ตามลำดับ นำช่วงความอิ่มตัวที่ได้ HPI สูงสุดไปใช้เป็น HPI บริสุทธิ์

c) การ assay HPI

แอคติวิตีของ HPI สามารถวัดได้โดยดูจากความสามารถของ PI ในการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ โปรตีเอส เช่น trypsin หรือ gingipain ในการย่อย benzoyl-DL-arginine-p-

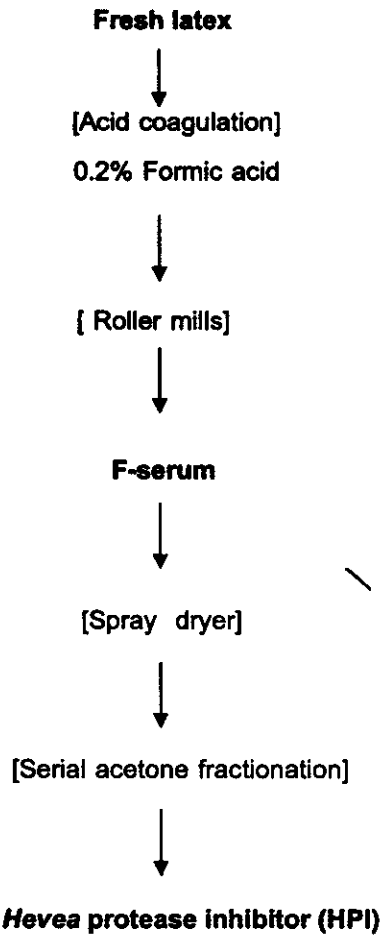
nitroanilide (BAPNA) ซึ่งเป็นสับเสตรทที่มีสี โดยการทำ stock solution ที่ประกอบด้วย BAPNA จำนวน 30 mg ซึ่งละลายอยู่ใน dimethylsulfoxide (DMSO) แล้วไป dilute 100 เท่า ด้วย 50 mM Tris-HCl pH 80.0 ก่อนใช้เป็น substrate solution นำ PI sample ไป preincubate กับ trypsin (ปริมาตร 100 µl , 0.1 mg/ml ใน 50 mM Tris-HCl pH 7.5)ที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที โดยมีปริมาตรรวม 300 µl หลังจากนั้นเริ่ม incubation ด้วยการเติม BAPNA substrate solution ปริมาตร 500 µl ที่ 37°C เป็นเวลา 20 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม acetic acid 30% (v/v) ทำการวัดปริมาณของ p-nitoraniline ที่ถูกสลายออกมาจาก BAPNA ที่ OD 410 nm. โดย 1 unit ของ PI activity จะเท่ากับปริมาณค่า O.D. ที่ 410 nm ที่ลดลง 0.1 หน่วย เมื่อเทียบกับ control ซึ่งมีแต่ trypsin หรือ gingipain อยู่ใน reaction mixture

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

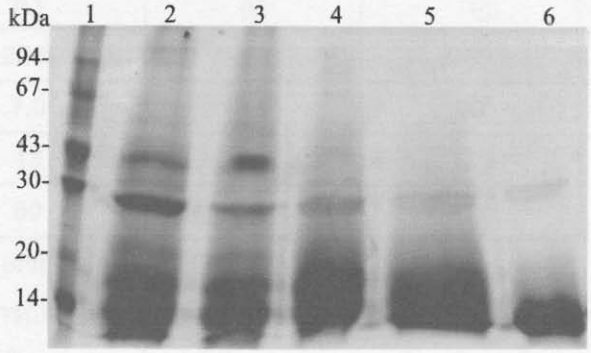
เนื่องจาก HPI เป็นสารที่อยู่ในส่วนของของเหลวใส หรือ ชั้นกลาง C-serum ที่ได้หลังการนำน้ำยางไปปั่นแยกด้วยเครื่อง ultracentrifuge แต่วิธีดังกล่าวไม่สามารถนำมาใช้ในการเตรียม HPI จากน้ำยางสดในปริมาณสูงได้เพราะต้นทุนสูงและเสียเวลามาก ดังนั้นจึงได้เปลี่ยนมาเป็นลำดับขั้นตอนต่าง ๆดังรูปที่ E.1 ซึ่งเริ่มด้วยการสกัดเตรียมซีรั่มจากแผ่นยางหลังการเติมกรดลงไปในน้ำยางเพื่อให้ยางจับตัวเป็นก้อน และทำการแยกส่วนของของเหลวใสออกจากก้อนยางแผ่น โดยการนำไปรีดโดยใช้เครื่องรีดยางแผ่น ของเหลวใสที่ได้ (F-serum) จะมี HPI ร่วมอยู่กับโปรตีนที่ละลายน้ำได้ที่มีอยู่ในน้ำยางหลายชนิด ได้ปริมาตร F-serum ที่เตรียมได้จากน้ำยาง 50 ลิตร เท่ากับ 28 ลิตร (ตารางที่ E.1) เมื่อนำ F-serum ไปทำให้เป็นผงแห้งโดยผ่านพ่นด้วยเครื่อง spray dryer จะได้ผงแห้ง750 กรัม ซึ่งสามารถนำผงดังกล่าวไปละลายน้ำกลั่นเพื่อทำแยกโปรตีนตัวอื่น ๆออกจากสารละลาย F-serum โดยวิธีตกตะกอนด้วยอะซิโตน (acetone fractionation) โดยเพิ่มระดับช่วงความเข้มข้นของ acetone ขึ้นเรื่อย ๆ โดยโปรตีนที่ไม่ใช่ HPI ส่วนใหญ่จะตกตะกอนช่วงความเข้มข้น acetone ก่อน 80% และ HPI บริสุทธิ์จะที่ตกตะกอนช่วงความเข้มข้นอะซิโตนระหว่าง 80-95% ดังรูปที่ E.2 จะเห็นแถบโปรตีนของ HPI อย่างเด่นชัดและมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 7.5 kDa จะเห็นว่า HPI ที่ได้มีความบริสุทธิ์ค่อนข้างสูงและมีการแถบโปรตีนขนาดประมาณ 30 kDa ปนอยู่เพียงเล็กน้อย เมื่อเทียบกับ HPI ที่เตรียมได้จาก C-serum ซึ่งต้องใช้การปั่นแยกน้ำยางสดด้วยเครื่อง ultracentrifuge ซึ่งจะเห็นแถบโปรตีน HPI เพียงแถบเดียว (รูปที่ E.3)

ส่วนการหาปริมาณ activity ของ HPI ซึ่งดูจากความสามารถของ HPI ในการยับยั้ง activity ของ trypsin พบว่าน้ำยาง 50 ลิตร ได้ total activity ของ HPI หลังทำบริสุทธิ์ด้วยการวิธี acetone fractionation ช่วงความเข้มข้น 80-95% ประมาณ 260 TIU (trypsin inhibition unit) ความเข้มข้นของ HPI ในน้ำยางพารามีประมาณ 5.2 mTIU/ml ซึ่งอยู่ในช่วงใกล้เคียงกับระดับความเข้มข้นต่ำสุด (7-70 mTIU /ml) ที่ทางการแพทย์ใช้สารละลาย PI (Aprotinin) ที่สกัด

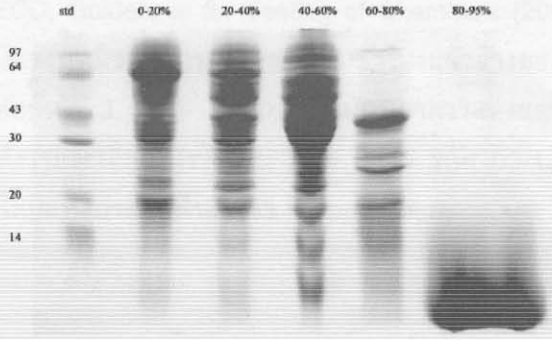
จากปอดวัว สำหรับยับยั้งการทำงานของ thrombin protease ในการป้องกันการสูญเสียเลือดในการผ่าตัดหัวใจคนไข้ (open heart surgery)]



รูปที่ E.1 ขั้นตอนการเตรียมสารยับยั้งโปรตีเอส HPI ในปริมาณสูงจากน้ำยางพารา



รูปที่ E.2 SDS-PAGE ของ HPI บริสุทธิ์ ซึ่งได้จากการนำสารละลายผงแห้ง F-serum (lane 2) ไปตกตะกอนด้วยอะซิโตนช่วงต่างๆ 0-40% (lane 3); 40-60% (lane 4); 60-80% (lane 5);80-95%(lane 6) ตามลำดับโดย HPI จะตกตะกอนช่วง 80-95%



รูปที่ E.3 SDS-PAGE ของ PI บริสุทธิ์ ซึ่งได้จากการนำ C-serum ไปตกตะกอนด้วยอะซิโตนช่วงความแข้มข้นต่างๆ (0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80%, 80-95% ตามที่ได้บ่งไว้) โดย HPI จะตกตะกอนช่วง 80-95%

ตารางที่ E.1 ปริมาณ activity ของ HPI ที่เตรียมได้จากน้ำยางสดตามขั้นตอนในรูป E.1

ครั้งที่	ปริมาตรน้ำยางสด (L)	ปริมาตร F-serum (L)	น้ำหนักผงแห้ง (g)	Total HPI actitity (TIU*)
1	28.5	16	260	158
2	7.0	3.5	80	34
3	13	6.5	130	68
รวม	**50**	**26**	**470**	**260**

*TIU = trypsin inhibitor unit

โดย 1 TIU จะสามารถลด activity ของ trypsin จำนวน 2 units ลงไป 50% ซึ่ง trypsin 1 unit จะย่อย BAPNA ได้ 1 μmole ต่อนาทีที่ pH 7.8 และอุณหภูมิ 25 °C

E.2 การทดสอบทางพรีคลินิกของสารยับยั้งโปรตีเอส (HPI)

เนื่องจาก HPI สามารถออกฤทธิ์ เสริมการทำงานของ anti-fungal protein/ peptide โดยป้องกันการถูกทำลายของสารดังกล่าวโดย intracellular proteases ของเชื้อที่ถูกทำลายให้ตายลงจากสาร anti-fungal ดังกล่าว ดังนั้นเราอาจจะใช้ HPI ในรูปสมุนไพรทาเสริมฤทธิ์กับยาฆ่าเชื้อราแคนดิด้าชนิดที่เป็นเบปไทด์เช่นจำพวก histatin, lactoferrin ได้ หาก HPI ไม่มีคุณสมบัติในการก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อ ผลจากส่งสาร HPI บริสุทธิ์ที่เตรียมได้ในปริมาณสูง ไปทดสอบทาง skin irritation หรือการก่อความระคายเคืองต่อผิวหนังกระต่าย โดยใช้วิธีทดสอบหมายเลข 404 ของ OECD, Guidelines for Testing of Chemicals (2001) โดยใช้สารละลาย HPI ปริมาตร 0.5 ml ปิดลงบนผิวหนังกระต่ายนาน 4 ชั่วโมงแล้วล้างออก สังเกตความผิดปกติของผิวหนังกระต่ายติดต่อกัน 3 วัน ปรากฏว่าไม่พบอาการแดงและอาการบวมต่อผิวหนังกระต่าย แต่อย่างใด ดังรายละเอียดในรายงาน ฝภผ.17/49 รหัส 03-12-48 โดย สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) (Appendix 9)