4. วิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การสกัดและทำบริสุทธิ์โปรตีโอลิปิดเลคตินจากถั่วฝักยาว (VSA)

ในการศึกษาเลคตินครั้งนี้เป็นการศึกษาเลคตินชนิดที่ไม่ละลายน้ำ (membrane lectin) ซึ่งการสกัดเลคตินได้ดัดแปลงวิธีการสกัดโปรตีโอลิปิดของ Folch และ Lees (1951) เลคตินที่สกัดได้จากวิธีนี้เรียกว่า โปรตีโอลิปิดเลคติน เพราะเป็นโปรตีนที่ละลายได้ในสารละลายอินทรีย์ที่ใช้ละลายไขมันคือสารละลายคลอโรฟอร์มต่อเมทานอลในอัตราส่วน 2:1 โดยพบว่าโปรตีโอลิปิดเลคตินจากถั่วฝักยาวสามารถละลายได้ดีในชั้นของคลอโรฟอร์มมากกว่าชั้นของ fluff แสดงว่าเลคตินชนิดนี้มี hydrophobicที่สูงกว่า ลิปิดทั่ว ๆ ไป

การทำบริสุทธิ์ VSA จึงเลือกโปรตีโอลิปิดเลคตินที่อยู่ในชั้นคลอโรฟอร์ม จากการทำบริสุทธิ์พบว่า VSA มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.3 เท่าแสดงดังตารางที่ 3 และเมื่อวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่า VSA มีน้ำหนักโมเลกุลย่อย 25,000 ดาลตัน และมีน้ำหนักโมเลกุลรวม 100,000 ดาลตัน เมื่อวิเคราะห์โดยวิธีเจลฟิลเตรชั่น แสดงว่า VSA มีลักษณะโมเลกุลประกอบด้วย 4 หน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน ซึ่งมีหลายโมเลกุลย่อยคล้ายกับเลคตินที่พบในพืชตระกูลถั่วส่วนใหญ่เช่น เลคตินจากถั่วลิสง มีน้ำหนักโมเลกุลรวม 98,000 ดาลตัน ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน (Lotan *et al.,* 1974) และคล้ายกับเลคตินจาก *Ulex europeus* II มีน้ำหนักโมเลกุลรวม 105,000 ดาลตัน ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 23,000-25,000 ดาลตัน และจากการวิเคราะห์สมบัติการเป็นไกลโคโปรตีนโดยทำ SDS-PAGE แล้วย้อมด้วยสีชนิด PAS พบว่า VSA ย้อมติดสีชมพูของชนิด PAS แสดงว่า VSA เป็นไกลโคโปรตีน เหมือนกับเลคตินจากเมล็ดของ *Talisia esculenta* (Freire *et al.,* 2002)

4.1.1 สมบัติของ VSA

การทดสอบความสามารถของ VSA ในการเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงชนิดต่าง ๆ พบว่า VSA สามารถเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของกระต่ายและหนูได้ดีเท่ากัน แต่ไม่สามารถเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของคน (A, B, AB, O) จึงสามารถสรุปได้ว่าเลคตินมีความจำเพาะกับเลือดสัตว์ฟันแทะและไม่มีความจำเพาะกับเม็ดเลือดแดงของคน (A, B, AB, O) ซึ่งจากการที่ VSA เหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงเฉพาะเลือดของสัตว์ฟันแทะนั้นคล้ายกับ เลคตินที่เตรียมได้จากน้ำยางพาราที่สามารถเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มเม็ดเลือด

แดงของหนูและของกระต่ายแต่ไม่สามารถเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของคนได้ (Pasitkul, 2001) และ คล้ายกับเลคตินจากรากของจำปะดะที่สามารถเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของกระต่ายได้ แต่ไมสามารถเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของคน (Tong-in, 2001) และคล้ายกับเลคตินจาก *Euphorbia marinata* (Stripe *et al.,* 1993) อีกทั้งยังคล้ายกับเลคตินจากพืชในตระกูล *Araceae* ที่มีความจำเพาะกับเม็ดเลือดสัตว์ เช่น กระต่าย หมู หนู และแกะ แต่ไม่มีความจำเพาะกับเม็ดเลือดแดงของคน

การยับยั้งแอคติวิตีของ VSA ด้วยน้ำตาลชนิดต่าง ๆ

จากการศึกษาผลของการยับยั้งแอคติวิตีของ VSA ด้วยน้ำตาลชนิดต่าง ๆ พบว่าไม่มีน้ำตาลชนิดใดที่สามารถยับยั้งแอคติวิตีของ VSA ได้อย่างสมบูรณ์ นอกจากน้ำตาล N-acetylglucosamine ที่ความเข้มข้น 200 mM ที่สามารถยับยั้งแอคติวิตีของเลคตินได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น แสดงว่า VSA อาจมีความจำเพาะต่อน้ำตาล N-acetylglucosamine ที่เชื่อมกลุ่มสายโซ่หมู่น้ำตาล เนื่องจากเมื่อใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลสูงถึง 200 mM ก็ไม่สามารถยับยั้งแอคติวิตีได้อย่างสมบูรณ์ แต่เมื่อทำการทดสอบการยับยั้งแอคติวิตีของ VSA ด้วยไกลโคโปรตีนชนิดต่าง ๆ และตัวยับยั้งการทำงานของ VSA ที่สกัดได้จากถั่วฝักยาว พบว่าตัวยับยั้งการทำงานของ VSA ที่สกัดได้จากชั้นของ aqueous สามารถยับยั้งแอคติวิตีของ VSA ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ มิวซิน CS-HLLBP ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการทำงานของ HLL ที่อยู่ใน C-serum ของน้ำยาง , asialo fetuin และ fetuin ตามลำดับ จากสมบัติดังกล่าวมีลักษณะคล้ายกับสมบัติของเลคตินจากน้ำยางพาราและเลคตินจากรากจำปาดะที่ได้รายงานโดย Pasitkul (2001) และ Tong-in (2001) โดยพบว่าไม่มีน้ำตาลชนิดใดที่สามารถยับยั้งแอคติวิตีของเลคตินได้ จะมีเพียงแต่ไกลโคโปรตีนหลายชนิดที่สามารถยับยั้งแอคติวิตีของเลคตินได้ และในน้ำยางพาราก็พบว่าตัวยับยั้งการทำงานของเลคตินเช่นเดียวกับที่พบในถั่วฝักยาว โดยสามารถยับยั้งแอคติวิตีของ HLL ได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับไกลโคโปรตีนที่มาจากแหล่งอื่นเช่นกัน

4.1.2 ปัจจัยต่าง ๆ ต่อแอคติวิตีของ VSA

จากการศึกษาอิทธิพลของเอนไซม์ทริปซิน และโปรเนส ที่นำมาย่อย VSA หลังจากครบเวลาที่ใช้ในการย่อยด้วยเอนไซม์แล้ว พบว่า VSA สามารถทนต่อการย่อยของเอนไซม์ได้คือเมื่อนำ VSA มาย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน และโปรเนส แอคติวิตีเปลี่ยนไปเป็น 100%, และ 125% ตามลำดับ จากการที่เอนไซม์โปรเนสทำให้ VSA มีแอคติวิตีที่ดีขึ้นทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเอนไซม์ไปย่อย VSA แล้วทำให้บริเวณของตำแหน่งการจับกับ ligand ให้สามารถทำงานได้ดีขึ้น จึงสามารถจับกับไกลโคโปรตีนบนผิวเม็ดเลือดแดงได้มากขึ้น ซึ่งคล้ายกับเลคตินจาก ground bean เมื่อนำเลคตินมาบ่มด้วยเอนไซม์ทริปซิน พบว่าเอนไซม์ ทริปซินไม่มีผลต่อแอคติวิตีของเลคติน (Wong

and NG, 2002) และเมื่อทำการศึกษาผลของอิทธิพลของ pH ต่อการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของกระต่ายที่เหนี่ยวนำโดย VSA พบว่า VSA ไม่ทนต่อภาวะที่เป็นกรด แต่จะทนต่อภาวะที่เป็นกรดอ่อนและสภาวะที่เป็นเบสในช่วง pH 6-10 ซึ่งคล้ายกับเลคตินจากเห็ด *Hericium erinaceum* ที่สามารถทนต่อ pH ในช่วงความเป็นกรดอ่อนและเบสได้ดีที่ช่วง pH 5-10.5 (Kawagishi *et al.,* 1994) นอกจากนี้ยังพบว่าคล้ายกับเลคตินจาก African yam beans ที่สามารถทนต่อ pH ได้ในช่วงกว้างคือ pH 2-10 (Machuka *et al.,* 1999) เพียงแต่เลคตินจาก African yam beans ทนต่อความเป็นกรดได้มากกว่า และในการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิ พบว่า VSA สามารถทนอุณหภูมิได้สูงถึง 90°ซ โดยที่ไม่สูญเสียแอคติวิตีของเลคติน ซึ่งคล้ายกับเลคตินจากรากจำปาดะที่สามารถทนอุณหภูมิได้สูงถึง 90°ซ โดยที่ไม่สูญเสียแอคติวิตีของเลคตินเช่นกัน (Tong-in, 2001) และในการศึกษาอิทธิพลของไดวาเลนท์แคตไอออน (Ca^{2+}, Mg^{2+} และ Mn^{2+}) และ EDTA พบว่าทั้งไดวาเลนท์แคตไอออน และ EDTA ไม่มีผลต่อการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงที่เหนี่ยวนำโดย VSA ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า VSA เองมีไดวาเลนท์ในตัวเองอยู่แล้วและในตำแหน่ง prosthetic group และ VSA จับกับไดวาเลนท์แคตไอออนแน่นดังนั้น EDTA จึงไม่สามารถดึงไดวาเลนท์ออกมาได้ ซึ่งคล้ายกับเลคตินจากรากจำปาดะซึ่งไดวาเลนท์แคตไอออน (Ca^{2+}, Mg^{2+} และ Mn^{2+}) และ EDTA ไม่มีผลต่อการเกาะกลุ่มของอนุภาคยาง

จากการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีอิทธิพลต่อแอคติวิตีของ VSA เช่น อุณหภูมิ pH และเอนไซม์ที่นำมาย่อย VSA พบว่า VSA มีความเสถียรต่อปัจจัยต่างๆที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ซึ่งมีคุณสมบัติเข้าข่ายจำพวกสารก่อให้เกิดภูมิแพ้ แต่ในการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถหาตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยที่แพ้โปรตีนจากถั่วฝักยาวมาทำการศึกษาด้าน IgE Immunoblot เพื่อยืนยันข้อสมมุติฐานนี้ได้

4.2 การสกัดและทำบริสุทธิ์ตัวยับยั้งการทำงานของ VSA

ตัวยับยั้งการทำงานของ VSA เตรียมได้จากส่วนของสารละลายที่แยกจากตะกอนถั่วฝักยาวหลังจากการเซนตริฟิวจ์ จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาทำการตกตะกอนด้วยอะซิโตนที่ความอิ่มตัวของอะซิโตนเป็นช่วง ๆ นำตะกอนโปรตีนในช่วงความอิ่มตัวของอะซิโตนที่ 40-60% ไปทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ไคตินที่ตรึงด้วยเลคติน พบว่าตัวยับยั้งมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.1 เท่า ดังตารางที่ 11 จากนั้นนำมาวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าตัวยับยั้งการทำงานของ VSA มีน้ำหนักโมเลกุล 14,000 ดาลตัน แสดงดังรูปที่ 13 แถวที่ 7 และเมื่อทำการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธีเจลฟิลเตรชัน พบว่าเลคตินมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 54,000 ดาลตัน ดังนั้นตัวยับยั้งการทำงานของ VSA มีลักษณะประกอบไปด้วย 4 หน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน

4.2.1 ปัจจัยต่าง ๆต่อตัวยับยั้งแอคติวิตีของ VSA

ได้ทำการศึกษาอิทธิพลของ pH ต่อแอคติวิตีของตัวยับยั้งการทำงานของ VSA พบว่าตัวยับยั้งไม่สามารถทนต่อความเป็นกรดและเบสได้ แต่ทนต่อสภาพความเป็นกรดอ่อนและเบสอ่อนได้คือในช่วง pH 6-8 ซึ่งคล้ายกับตัวยับยั้งการทำงานของเลคตินที่พบในส่วนของ C-serum ในน้ำยางพารา เพียงแต่ตัวยับยั้งการทำงานของเลคตินในน้ำยางพาราจะทนต่อความเป็นเบสมากกว่าคือ จะทนต่อ pH ในช่วง pH6-10 (Pasitkul, 2001) จากนั้นได้ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของตัวยับยั้งการทำงานของ VSA พบว่าตัวยับยั้งการทำงานของ VSA มีความเสถียรต่ออุณหภูมิมากคือสามารถทนต่ออุณหภูมิ 100 ^{o}ซ เป็นเวลานาน 30 นาที ซึ่งมีความเสถียรต่ออุณหภูมิมากกว่าตัวยับยั้งการทำงานของเลคตินที่พบในน้ำยางพารา คือตัวยับยั้งการทำงานของเลคตินจากน้ำยางพาราทนต่ออุณหภูมิได้แค่ 50 ^{o}ซ (Pasitkul, 2001)

4.3 การเกาะกลุ่มของอนุภาคยางซึ่งเหนี่ยวนำโดยโปรตีโอลิปิดเลคติน

เนื่องจากมีการศึกษาการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางที่เหนี่ยวนำโดยเลคตินมาก่อนหน้านี้โดย Pasitkul (2001) ได้ทำการสกัดและทำบริสุทธิ์รวมทั้งศึกษาสมบัติของเลคตินดังกล่าว พบว่าเลคตินบริสุทธิ์จากผนังของลูทอยด์มีความสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางได้ พร้อมทั้งมีการพบว่าไกลโคโปรตีนบนผิวอนุภาคยางมีขนาด 24 kD และมีความจำเพาะต่อเลคตินจากผนังของลูทอยด์ ดังนั้นเลคตินดังกล่าวจึงสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางได้ (Rukseree, 1998) และต่อมาได้มีการพบว่าเลคตินในน้ำยางดังกล่าวเป็นชนิดไม่ละลายน้ำแต่ละลายในตัวทำละลายไขมัน (เกศจี, 2544) ซึ่ง VSA ก็เป็นเลคตินที่ละลายในตัวทำละลายไขมันเช่นกัน แต่ในถั่วฝักยาวไม่มีอนุภาคห่อหุ้มไขมัน (lipid particle) ที่สามารถเตรียมมาศึกษาได้ง่ายเหมือนอนุภาคที่ห่อหุ้มไขมันประเภทยาง จึงได้นำ VSA ไปทดสอบสมบัติการเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางจากพืชที่ให้น้ำยาง (ยางอินเดีย รัก ลีลาวดี โป๊ยเซียน และย่านขน) เพื่อเป็นการทดสอบการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางซึ่งเป็นอนุภาคไขมัน จากการทดสอบการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางพบว่า VSA สามารถเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางได้แสดงว่า VSA มีความจำเพาะกับไกลโคโปรตีนที่อยู่บนผิวของอนุภาคของยางพารา เหมือนกับเลคตินจากน้ำยางพาราที่สามารถเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางได้เช่นกัน ดังนั้นจากการทดสอบการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางที่เหนี่ยวนำโดยโปรตีโอลิปิดเลคตินสามารถสรุปได้ว่า เลคตินชนิด

hydrophobic จากถั่วฝักยาวมีสมบัติคล้ายกับ เลคตินชนิด hydrophobic ที่พบในน้ำยางพารา ซึ่งเลคตินดังกล่าวมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มของอนุภาคห่อหุ้มยาง และส่งผลให้เกิดการอุดตันในท่อน้ำยาง สำหรับเลคตินชนิด hydrophobic จากถั่วฝักยาวน่าจะมีบทบาทที่คล้ายกันแต่เนื่องจากถั่วฝักยาวเป็นพืชที่ไม่สามารถสร้างน้ำยางได้ จึงน่าจะมีบทบาทในการปิด (สมาน) บาดแผลในพืชโดยการเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มของอนุภาคห่อหุ้มไขมันอื่นๆ และเพราะโปรตีนยับยั้งจากถั่วฝักยาวเป็นโปรตีโอลิปิดที่มีขนาด 14 kD คล้ายกับไกลโคโปรตีนบนผิวของอนุภาคยางซึ่งมีขนาด 14 kD และ 24 kD (Rukseree, 1998) ทั้งนี้จะต้องทำการศึกษาทาง immuno staining เพื่อหาแหล่งต้นตออนุภาคไขมันที่มีตัวยับยั้ง VSA ในเนื้อเยื่อของถั่วฝักยาวต่อไป

ผลของระยะเวลาและค่า titer ในการบ่มต่อการเกาะกลุ่มของอนุภาคยาง

จากการศึกษาการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางเมื่อเพิ่มเวลาในการบ่ม และค่าtiterของเลคตินมากขึ้น พบว่าเมื่อเพิ่มเวลาบ่มโปรตีโอลิปิดเลคตินให้นานขึ้นจะส่งผลให้เกิดการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางก็มากขึ้น และเมื่อเพิ่มค่า titer ของเลคตินมากขึ้น พบว่าส่งผลให้เกิดการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางมากขึ้นเช่นกัน แสดงว่าเวลาที่ใช้ในการบ่ม และค่าtiterของโปรตีโอลิปิดเลคตินมีความแปรผันโดยตรงกับการเกาะกลุ่มของอนุภาคยาง

การเกาะกลุ่มของอนุภาคยางที่มาจากพืชให้น้ำยางชนิดต่าง ๆ โดย VSA

จากการศึกษา VSA กับการเหนี่นวนำการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางจากพืชชนิดอื่น (ยางอินเดีย รัก โป๊ยเซียน ย่านขน และลีลาวดี) พบว่า VSA สามารถเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางได้เช่นเดียวกับการเหนี่ยวนำการเกาะอนุภาคยางจากยางพารา แสดงว่าโปรตีโอลิปิดเลคตินมีความจำเพาะกับไกลโคโปรตีนที่อยู่บนผิวของอนุภาคยางทั้งจากยางพาราและพืชอื่นที่ใช้ในการทดสอบ จากการเหนี่ยวนำให้เกิดการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางแสดงให้เห็นว่าบนอนุภาคยางของพืชแต่ละชนิดก็จะมีไกลโคโปรตีนที่มีความจำเพาะแตกต่างกันอยู่บนผิวของอนุภาคยาง

การเกาะกลุ่มของอนุภาคยางที่เหนี่ยวนำโดย VSA กับ HLL

เมื่อทำการทดสอบการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางที่เหนี่ยวนำโดย VSA เปรียบเทียบกับ HLL จากยางพาราโดยใช้ปริมาตรtiterเท่ากัน พบว่า VSA สามารถเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางจากลีลาวดี ยางอินเดีย และย่านขนได้ แต่ HLL จากยางพารา สามารถเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางจากรัก และโป๊ยเซียนได้ดีกว่า VSA ระดับความสามารถในการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางที่เหนี่ยวนำโดย VSA และ HLL นั้นแสดงให้เห็นว่าไกลโคโปรตีนบนผิวของอนุภาคยางแต่ละชนิดมีทั้งส่วนของคาร์โบไฮเดรตที่เกี่ยวข้องกับการจดจำที่ต่างกันบ้างเล็กน้อย

การยับยั้งการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางด้วยตัวยับยั้งการทำงานของ VSA

จากผลการทดลองการยับยั้งการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางด้วยตัวยับยั้งการทำงานของ VSA ที่สามารถสกัดได้จากส่วนของสารละลายของถั่วฝักยาว พบว่าตัวยับยั้งการทำงานของ VSA สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางที่เหนี่ยวนำได้ทั้งโดยโปรตีโอลิปิดเลคตินจากถั่วฝักยาวซึ่งอยู่ในตระกูล Leguminoseae และเลคตินจากยางพาราอยู่ในตระกูล Euphorbeaceae โดยตัวยับยั้งการทำงานของ VSA แสดงว่าสมบัติของบริเวณ binding site ของ VSA และเลคตินจากน้ำยางพาราน่าจะมีความคล้ายกัน และ VSA ก็สามารถยับยั้งการทำงานของ HLL จากน้ำยางพาราได้เช่นกัน และเมื่อใช้ปริมาณโปรตีนของตัวยับยั้งต่อการยับยั้งการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางที่แตกต่างกันจากมากไปน้อย พบว่าการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางแปรผันตรงกับปริมาณโปรตีนตัวยับยั้งที่ใช้