4. บทวิจารณ์

4.1 การศึกษาเลคตินจากพืช

การศึกษาผลงานตีพิมพ์เกี่ยวกับเลคตินที่ผ่านมาชี้ชัดว่าเลคตินพบมากในพืชตระกูลถั่ว โดยเฉพาะในส่วนที่เป็นเมล็ด นอกจากนั้นก็พบบ้างในส่วนที่เป็นรากสะสมอาหารของพืช(ข้อ 1.3) งานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาเลคตินในส่วนดังกล่าวของพืชประจำท้องถิ่น หรือพืชที่หาได้ง่ายทั่วไปในไทยภาคเหนือ เนื่องจากเลคตินเป็นโปรตีน หรือไกลโคโปรตีนจึงละลายน้ำได้ทำให้สกัดออกจากส่วนต่าง ๆ ของพืชได้โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีความแรงอิออนใกล้เคียงกับสารละลายในเซล

จากการไดอะไลซ์สิ่งที่สกัดได้จากพืชเพื่อแยกโปรตีนออกจากสารอื่น ๆ ที่มีโมเลกุลขนาดเล็กเช่น เกลือแร่ และน้ำตาล เป็นต้น แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ปริมาณเลคติน และชนิดของน้ำตาลจับจำเพาะ เปรียบเทียบกับสิ่งที่สกัดได้จากพืชก่อนทำการไดอะไลซ์แล้วพบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน (ข้อ 3.2.3, 3.3.3, และ 3.7) แสดงว่าสิ่งที่เจือปนอยู่ในสิ่งสกัดไม่รบกวนปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนกับสารละลายโคแมสสี หรือปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงโดยเลคตินหรือเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของน้ำตาลในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดโดยเลคติน ดังนั้นจึงขอเสนอแนะไว้ว่าการตรวจหาเลคตินจากพืชอาจจะไม่จำเป็นต้องนำสิ่งที่สกัดได้ไปทำการไดอะไลซ์ให้เสียเวลาก่อนที่จะทำการวิเคราะห์

เนื่องจากเลคตินมีสมบัติในการทำให้เซลเกาะกลุ่มจึงใช้เป็นหลักในการวิเคราะห์ปริมาณเลคตินได้ แต่เลคตินมีความจำเพาะกับคาร์โบไฮเดรตที่ผิวเซลและคาร์โบไฮเดรตที่ผิวของเซลต่างชนิดกันก็ไม่เหมือนกัน ดังนั้นเลคตินบางชนิดจึงมีความจำเพาะกับชนิดของเซลด้วย สำหรับงานวิจัยนี้เจาะจงใช้เซลเม็ดเลือดแดงของคนเพราะหาง่าย เตรียมง่าย และสะดวกต่อการเก็บรักษา ในกรณีที่ใช้เม็ดเลือดแดงสภาพปกติสามารถตรวจพบเลคตินในพืช 7 ชนิดคือ ขนุน คำบูชา ถั่วแปบ ถั่วราชมาษ ถั่วลาย ถั่วยาง และไมยราบยักษ์ (ข้อ 3.3.3) สำหรับพืชที่ตรวจไม่พบเลคตินได้ทดลองใช้เม็ดเลือดแดงที่ปรับปรุงด้วยเอนไซม์เช่น นิวรามินิเดส ทริปซิน เป็นต้น ทำให้ตรวจพบเลคตินในพืชอีก 2 ชนิดคือ เลคตินจากกวาวเครือทำให้เม็ดเลือดแดงซึ่งปรับปรุงด้วยนิวรามินิเดส หรือทริปซินแล้วเกาะกลุ่ม และเลคตินจากเครือเขาปู้ทำให้เม็ดเลือดแดงซึ่งปรับปรุงด้วยทริปซินแล้ว เกาะกลุ่ม สำหรับพืชที่เหลืออีก 5 ชนิดคือ ก่อเตอย ก่อแป้น ก่อแหลม ถั่วแดง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

และมะขม ตรวจไม่พบเลคติน นอกจากเม็ดเลือดแดงของคนซึ่งนิยมใช้ตรวจหาเลคตินแล้ว เม็ดเลือดแดงจากสัตว์บางชนิดก็สามารถใช้ตรวจหาเลคตินได้[4] เช่น การใช้เม็ดเลือดแดงของกระต่าย ทดสอบเลคตินจากถั่ว Pinto การใช้เม็ดเลือดแดงของหมูทดสอบเลคตินจากถั่วราชมาษ เป็นต้น และนอกจากเม็ดเลือดแดงแล้ว เซลชนิดอื่นก็สามารถนำมาใช้ตรวจหาเลคตินได้ เช่น เม็ดเลือดขาว ตัวอสุจิ แบคทีเรีย ยีสต์ และรา เป็นต้น ตัวอย่างเช่น Namjuntra[33] ใช้ตัวอสุจิของคนและหนูตรวจหาเลคตินจากเมล็ดสะตอ และถั่วฝักยาว เป็นต้น ดังนั้นชนิดของเซลจึงเป็นปัจจัยที่น่าได้รับการพิจารณาต่อไปในกรณีของพืชที่ตรวจไม่พบเลคติน เมื่อใช้เซลเม็ดเลือดแดงของคน

เลคตินบางชนิดต้องการปัจจัยบางอย่างในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม เช่น โลหะอิออนพวก Ca^{2+} Mn^{2+} Mg^{2+} Cu^{2+} Cd^{2+} โปรตีนหรือสารบางชนิด ความแรงอิออน และความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม เป็นต้น และถ้าจุดหมายของเลคตินคือโปรตีนที่จับจำเพาะกับคาร์โบไฮเดรตเท่านั้นไม่จำเป็นต้องทำให้เซลเกาะกลุ่มด้วย[1] โปรตีนที่มีบริเวณจับคาร์โบไฮเดรตแห่งเดียวในโมเลกุลก็จัดเป็นเลคตินที่ไม่สามารถตรวจสอบได้โดยการเกาะกลุ่มของเซล สิ่งต่าง ๆ ดังกล่าวนี้รวมทั้งความไวของเทคนิคที่ใช้ในการตรวจสอบ สมควรได้รับการพิจารณาอย่างละเอียดก่อนที่จะสรุปว่าพืชชนิดนั้นไม่มีเลคติน

4.2 น้ำตาลที่จับจำเพาะกับเลคติน

จากผลการทดสอบความจำเพาะของเลคตินต่อชนิดของคาร์โบไฮเดรต (ข้อ 3.7) สามารถสรุปชนิดของน้ำตาลที่จับจำเพาะกับเลคตินแต่ละชนิดได้ ดังที่รวบรวมไว้ในตาราง 4.1 และเนื่องจากน้ำตาลที่ใช้ทดสอบการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงมีหลายชนิด บางชนิดก็ยับยั้งได้ และบางชนิดก็ยับยั้งไม่ได้ ถ้าพิจารณาน้ำตาลสองชนิดที่มีการจัดตัวของหมู่ภายในโมเลกุลต่างกันตำแหน่งเดียว แต่น้ำตาลชนิดหนึ่งยับยั้งได้และอีกชนิดหนึ่งยับยั้งไม่ได้ แสดงว่าหมู่นั้นในน้ำตาลมีความสำคัญต่อการจับของเลคติน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

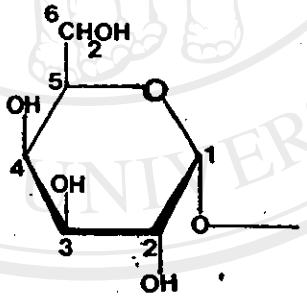
ตาราง 4.1 ความจำเพาะของเลคตินต่อชนิดของคาร์โบไฮเดรต

แหล่งของเลคติน	น้ำตาลที่จับจำเพาะ	ตำแหน่งของคาร์บอนที่มีกลุ่มไฮดรอกซิลซึ่งถูกจับโดยเลคติน	หมายเหตุ
ขนุน	∝-D-galactosyl	C-4 , C-6 (C-3?)	disaccharide>monosaccharide>trisaccharide
คำบูชา	D-galactosyl	C-4 , C-6 (C-3?)	monosaccharide=disaccharide>trisaccharide, polysaccharide
ถั่วราชมาษ	N-acetyl-D-galactosamine	C-4 , C-6 (C-3?)	disaccharide>monosaccharide,trisaccharide, polysaccharide
กวาวเครือ	∝-D-galactose	C-4 , C-6 (C-3?)	disaccharide>monosaccharide>trisaccharide, polysaccharide
ถั่วแปบ	D-mannosyl หรือD-glucosyl	C-3 , C-4 (C-6?)	monosaccharide>disaccharide
ถั่วยาง	∝-D-mannosyl หรือ ∝-D-glucosyl	C-3 , C-4 (C-6?)	monosaccharide=disaccharide,polysaccharide
ถั่วลาย	ยังวิเคราะห์ไม่พบ		
ไมยราบยักษ์	ยังวิเคราะห์ไม่พบ		
เครือเขาปู้	ยังวิเคราะห์ไม่พบ		

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.2.1 <u>เลคตินจากขนุน</u>

จากการทดสอบความสามารถของน้ำตาลในการยับยั้งการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มโดยเลคตินจากขนุน พบว่าเลคตินจากขนุนจับจำเพาะกับคาร์โบไฮเดรตตรงปลาย ∝-D-galactosyl (ข้อ 3.7.1) เมื่อพิจารณาโครงสร้างของ ∝-D-galactosyl จะพบกลุ่มไฮดรอกซิลอิสระอยู่ที่คาร์บอนตำแหน่ง 2,3,4 และ 6 ดังแสดงในรูป 4.1



รูป 4.1 โครงสร้างโมเลกุลของปลาย ∝-D-galactopyranosyl

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เนื่องจาก N-acetyl-D-galactosamine ยับยั้งการเกาะกลุ่มได้ใกล้เคียงกับ D-galactose และกลุ่ม acetamide อยู่ที่คาร์บอนตำแหน่ง 2 ดังนั้นการจับของเลคตินจากขนุนกับกาแลคโตสจึงไม่ต้องการกลุ่มไฮดรอกซิลอิสระของคาร์บอนตำแหน่ง 2 ของน้ำตาล สำหรับกลุ่มไฮดรอกซิลอิสระของคาร์บอนตำแหน่ง3 จะเกี่ยวข้องกับการจับของเลคตินกับกาแลคโตสหรือไม่ยังไม่สามารถบอกได้ด้วยข้อมูลที่มีอยู่ ถ้าต้องการทราบควรทดลองยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงด้วย D-gulose เปรียบเทียบกับ D-galactose เนื่องจาก D-glucose ไม่ยับยั้งการเกาะกลุ่มของ

เม็ดเลือดแดงในขณะที่ D-galactose ยับยั้ง และ D-glucose มีโครงสร้างโมเลกุลเหมือนกับ D-galactose ทุกประการ ยกเว้นกลุ่มไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่ง 4 ของกลูโคสเป็น equatorial แต่ของกาแลคโตสเป็น axial ดังนั้นการจับของเลคตินจากขนุนกับกาแลคโตสจึงต้องการกลุ่มไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแน่ง 4 ของน้ำตาล เนื่องจาก∝-D-fucose ไม่ยับยั้งการเกาะกลุ่มในขณะที่ D-galactose ยับยั้ง และ D-fucose มีโครงสร้างโมเลกุลเหมือน D-galactose ทุกประการยกเว้น D-fucose ไม่มีกลุ่มไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่ง 6 ดังนั้นการจับของเลคตินจากขนุนกับกาแลคโตส จึงต้องการกลุ่มไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่ง 6 ของน้ำตาล เพราะฉะนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าเลคตินจากขนุนจับจำเพาะกับปลาย ∝-D-galactosyl ตรงกลุ่มไฮดรอกซิลอิสระของคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 และ 6 ของน้ำตาลนั่นเอง

นอกจากนี้การที่ methyl-∝-D-galactopyranoside และ ∝-D-melibiose (หรือ 6-O-∝-D-galactopyranosyl-D-glucose) ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงโดยเลคตินจากขนุน แต่ methyl-β -D-galactopyranoside และ∝-lactose (หรือ 4-O -β -D-galactopyranosyl-D-glucose) ไม่ยับยั้งการเกาะกลุ่ม แสดงว่าเลคตินจากขนุนจับจำเพาะกับ D-galactose ที่ต่อกับปลายคาร์โบไฮเดรตด้วยพันธะ ∝ เท่านั้น และเนื่องจาก ∝-D-melibiose ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงได้มากกว่า D-galactose ถึง 8 เท่า ในขณะที่ D-raffinose (หรือ O-∝-D-galactopyranosyl-(1-->6)- ∝ -D-glucopyranosyl-β -D-fructofuranoside) ไม่ยับยั้งการเกาะกลุ่ม แสดงว่าเลคตินจากขนุนชอบชอบจับกับไดแซคคาไรด์มากกว่าโมโนแซคคาไรด์และไตรแซคคาไรด์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.2.2 เลคตินจากคำบูชา

จากการทดสอบความสามารถของน้ำตาลในการยับยั้งการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มโดยเลคตินจากคำบูชา พบว่าเลคตินจากคำบูชาจับจำเพาะกับคาร์โบไฮเดรตตรงปลาย D-galactosyl (ข้อ 3.7.2) เมื่อพิจารณาโครงสร้างของ D-galactosyl จะพบกลุ่มไฮดรอกซิลอิสระอยู่ที่คาร์บอนตำแหน่ง 2,3,4 และ 6 ดังแสดงในรูป 4.1 เนื่องจาก N-acetyl-D-galactosamine ยับยั้งการเกาะกลุ่มได้ใกล้เคียงกับ D-galactose และกลุ่ม acetamide อยู่ที่คาร์บอนตำแหน่ง 2 ดังนั้นการจับของเลคตินจากคำบูชากับกาแลคโตสจึงไม่ต้องการกลุ่มไฮดรอกซิลอิสระของคาร์บอนตำแหน่ง 2 ของน้ำตาล สำหรับกลุ่มไฮดรอกซิลอิสระของคาร์บอนตำแหน่ง 3 จะเกี่ยวข้องกับการจับของเลคตินกับกาแลคโตสหรือไม่ยังไม่สามารถบอกได้ด้วยข้อมูลที่มีอยู่ ถ้าต้องการทราบควรทดลองยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงด้วย D-gulose เปรียบเทียบกับ D-galactose เนื่องจาก D-glucose ไม่ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงในขณะที่ D-galactose ยับยั้ง และ D-glucose มีโครงสร้างโมเลกุลเหมือนกับ D-galactose ทุกประการ ยกเว้นกลุ่มไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่ง 4 ของกลูโคสเป็น equatorial แต่ของกาแลคโตสเป็น axial ดังนั้นการจับของเลคตินจากคำบูชากับกาแลคโตสจึงต้องการกลุ่มไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่ง 4 ของน้ำตาล เนื่องจาก D-galactose ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงได้มากกว่า ∝-D-fucose ถึง 16 เท่า และ D-fucose มีโครงสร้างโมเลกุลเหมือน D-galactose ทุกประการยกเว้น D-fucose ไม่มีกลุ่มไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่ง 6 ดังนั้นการจับของเลคตินจากคำบูชากับกาแลคโตสจึงต้องการกลุ่มไฮดรอกซิลอิสระ ที่คาร์บอนตำแหน่ง 6 ของน้ำตาล จึงอาจสรุปได้ว่าเลคตินจากคำบูชาจับจำเพาะกับปลาย D-galactosyl ตรงกลุ่มไฮดรอกซิลอิสระของคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 และ 6 ของน้ำตาลนั่นเอง

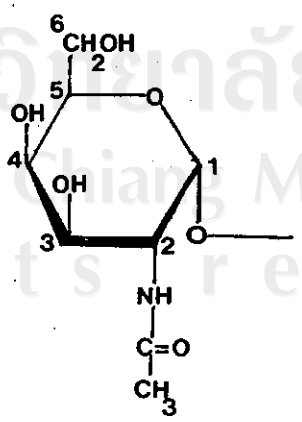
นอกจากนี้การที่ methyl-∝-D-galactopyranoside และ methyl-β-D-galactopyranoside ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงโดยเลคตินจากคำบูชาได้ใกล้เคียงกัน แสดงว่าเลคตินจากคำบูชาจับจำเพาะกับ D-galactose ที่ต่อกับกลายคาร์โบไฮเดรตด้วยพันธะ ∝ หรือ β ก็ได้ เนื่องจาก D-galactose, ∝-D-melibiose และ ∝-lactose ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงได้ใกล้เคียงกัน และยับยั้งดีกว่า D-raffinose แสดงว่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เลคตินจากคำบูชาชอบจับกับโมโนแซคคาไรด์เท่ากับไดแซคคาไรด์ และมากกว่าไตรแซคคาไรด์ เนื่องจากเลคตินจากคำบูชาสามารถจับกับเม็ดอะกาโรสในสภาพที่อุ่นกับกรดแล้วได้ดี (ข้อ 3.9) และเม็ดอะกาโรสซึ่งเป็นโพลีเมอร์ของ β-D-galactopyranosyl-(1-->4)-3, 6-anhydro- ∝-L-galactopyranosyl-(1-->3) เมื่อถูกสลายด้วยกรด จะได้ปลายอิสระ β-D-galactopyranosyl ซึ่งเลคตินจากคำบูชาสามารถจับได้ แสดงว่านอกจากโมโน- ได- และไตรแซคคาไรด์แล้ว เลคตินจากคำบูชาสามารถจับกับโพลีแซคคาไรด์ที่มีปลายอิสระเป็น D-galactopyranosyl ได้ด้วย

4.2.3 <u>เลคตินจากถั่วราชมาษ</u>

จากการทดสอบความสามารถของน้ำตาลในการยับยั้งการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มโดยเลคตินจากถั่วราชมาษ พบว่าเลคตินจากถั่วราชมาษจับจำเพาะกับคาร์โบไฮเดรตตรงปลายที่เป็น N-acetyl-D-galactosamine (ข้อ 3.7.3) เพราะ N-acetyl-D-galactosamine ยับยั้งการเกาะกลุ่มได้มากกว่า D-galactose ถึง 16 เท่า เมื่อพิจารณาโครงสร้างของ N-acetyl-D-galactosamine จะพบกลุ่มไฮดรอกซิลอิสระอยู่ที่คาร์บอนตำแหน่ง 3,4 และ 6 ดังแสดงในรูป 4.2



รูป 4.2 โครงสร้างโมเลกุลของปลาย N-acetyl-∝-D-galactosamine

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เนื่องจาก D-galactose ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงได้ที่ความเข้มข้น 0.2 M ในขณะที่ D-glucose ไม่ยับยั้งที่ความเข้มข้นนี้ แสดงว่าการจับของเลคตินจากถั่วราชมาษกับ N-acetyl-D-galactosamine อาจจะต้องการกลุ่มไฮดรอกซิลอิสระที่คาร์บอนตำแหน่ง 4 ของน้ำตาล และเนื่องจาก ∝-D-fucose ไม่ยับยั้งการเกาะกลุ่มที่ความเข้มข้น 0.2 M ในขณะที่ D-galactose ยับยั้ง แสดงว่าการจับของเลคตินจากถั่วราชมาษกับ N-acetyl-D-galactosamine อาจจะต้องการกลุ่มไฮดรอกซิลอิสระที่คาร์บอนตำแหน่ง 6 ของน้ำตาล เพราะฉะนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าเลคตินจากถั่วราชมาษจับจำเพาะกับ N-acetyl-D-galactosamine ตรงกลุ่ม acetamide ของคาร์บอนตำแหน่ง 2 และกลุ่มไฮดรอกซิลอิสระของคาร์บอนตำแหน่ง 4 และ 6 ของน้ำตาล อย่างไรก็ตามข้อสรุปของ acetamide ค่อนข้างหนักแน่น แต่ข้อสรุปของไฮดรอกซิลอาจผิดพลาดได้ เพราะ D-galactose ยับยั้งการเกาะกลุ่มได้ที่ความเข้มข้นสูงมากถึง 0.2 M จึงเป็นการยากที่จะสรุปเปรียบเทียบกับ D-glucose และ D-fucose ซึ่งไม่ยับยั้งที่ความเข้มข้น 0.2 M เหมือนกัน

นอกจากนี้การที่ methyl-∝-D-galactopyranoside และ ∝-D-melibiose ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงโดยเลคตินจากถั่วราชมาษได้ แต่ methyl-β-D-galactopyranoside และ ∝-lactose ไม่ยับยั้งการเกาะกลุ่ม แสดงว่า เลคตินจากถั่วราชมาษจับจำเพาะกับ N-acetyl-D-galactosamine ที่ต่อกับปลายคาร์โบไฮเดรตด้วยพันธะ∝ อย่างไรก็ตาม เนื่องจากความเข้มข้นของน้ำตาลที่นำมาใช้สรุปนั้นสูงมากคือ methly-∝-D-galactopyranoside ที่ 200 mM, methyl-β-D-galactopyranoside ที่ 200 mM, ∝-D-melibiose ที่ 50 mM และ ∝-lactose ที่ 167 mM จึงยังไม่สามารถสรุปเกี่ยวกับพันธะ β ได้อย่างชัดเจน เนื่องจาก ∝-D-melibiose ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดได้ที่ความเข้มข้น 50 mM D-galactose ยับยั้งได้ที่ 200 mM D-raffinose ยับยั้งไม่ได้ที่ 70 mM และเลคตินจากถั่วราชมาษสามารถจับกับเม็ดอะกาโรสในสภาพปกติได้ประมาณ 50% ของปริมาณเลคตินทั้งหมดในสิ่งสกัด จึงพอจะสรุปได้ว่าเลคตินจากถั่วราชมาษชอบจับกับไดแซคคาไรด์มากกว่าโมโนแซคคาไรด์ หรือไตรแซคคาไรด์ หรือ โพลีแซคคาไรด์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.2.4 เลคตินจากกวาวเครือ

จากการทดสอบความสามารถของน้ำตาลในการยับยั้งการทำให้เม็ดเลือดแดงที่ปรับปรุงด้วยเอนไซม์แล้วเกาะกลุ่มโดยเลคตินจากกวาวเครือ พบว่าเลคตินจากกวาวเครือจับจำเพาะกับคาร์โบไฮเดรตตรงปลาย ∝-D-galactosyl (ข้อ 3.7.6) เมื่อพิจารณาโครงสร้างของ ∝-D-galactosyl จะพบกลุ่มไฮดรอกซิลอิสระอยู่ที่คาร์บอนตำแหน่ง 2,3,4 และ 6 ดังแสดงในรูป 4.1 เนื่องจาก N-acetyl-D-galactosamine ยับยั้งการเกาะกลุ่มได้ใกล้เคียงกับ D-galactose และกลุ่ม acetamide อยู่ที่คาร์บอนตำแหน่ง 2 ดังนั้นการจับของเลคตินจากกวาวเครือกับกาแลคโตสจึงไม่ต้องการกลุ่มไฮดรอกซิลอิสระของคาร์บอนตำแหน่ง 2 ของน้ำตาล สำหรับกลุ่มไฮดรอกซิลอิสระของคาร์บอนตำแหน่ง 3 จะเกี่ยวข้องกับการจับของเลคตินกับกาแลคโตส หรือไม่ยังไม่สามารถบอกได้ด้วยข้อมูลที่มีอยู่ ถ้าต้องการทราบควรทดลองยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงด้วย D-gulose เปรียบเทียบกับ D-galactose เนื่องจาก D-glucose ไม่ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงในขณะที่ D-galactose ยับยั้ง และ D-glucose มีโครงสร้างโมเลกุลเหมือนกับ D-galactose ทุกประการ ยกเว้นกลุ่มไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่งแหน่ง 4 ของ กลูโคสเป็น equatorial แต่ของกาแลคโตสเป็น axial ดังนั้นการจับของเลคตินจากกวาวเครือกับกาแลคโตส จึงต้องการกลุ่มไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่ง 4 ของน้ำตาล เนื่องจาก ∝-D-fucose ไม่ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงในขณะที่ D-galactose ยับยั้ง และ D-fucose มีโครงสร้างโมเลกุลเหมือน D-galactose ทุกประการยกเว้น D-fucose ไม่มีกลุ่มไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่ง 6 ดังนั้นการจับของเลคตินจากกวาวเครือกับกาแลคโตสจึงต้องการกลุ่มไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่ง 6 ของน้ำตาล เพราะฉะนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าเลคตินจากกวาวเครือจับจำเพาะกับปลาย ∝-D-galactosyl ตรงกลุ่มไฮดรอกซิออิสระของคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 และ 6 ของน้ำตาลนั่นเอง

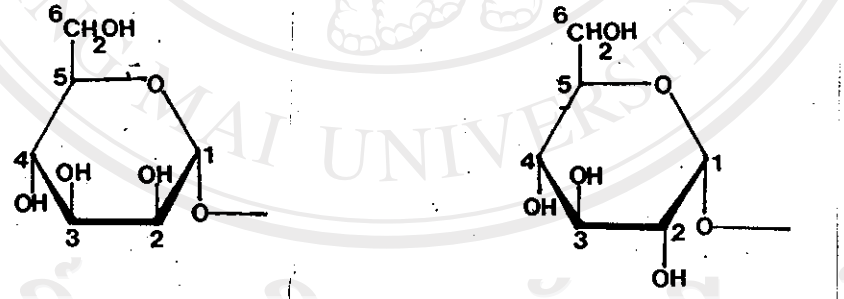
นอกจากนี้การที่ methyl-∝-D-galactopyranoside และ ∝-D-melibiose ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงได้มากกว่า methyl-β-D-galactopyranoside และ ∝-lactose เกิน 30 เท่า แสดงว่าเลคตินจากกวาวเครือจับจำเพาะกับ D-galactose ที่ต่อกับปลายคาร์โบไฮเดรตด้วยพันธะ ∝ เท่านั้น เนื่องจาก ∝-D-melibiose ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงได้มากกว่า D-galactose และ D-raffinose ถึง 8 และ 128 เท่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตามลำดับ และเลคตินจากกวาวเครือจับเม็ดอะกาโรสในสภาพธรรมชาติได้ แสดงว่าเลคตินจากกวาวเครือชอบจับไดแซคคาไรด์มากกว่าโมโนแซคคาไรด์ มากกว่าไตแซคคาไรด์ และโพลีแซคคาไรด์

4.2.5 เลคตินจากถั่วแปบ

จากการทดสอบความสามารถของน้ำตาลในการยับยั้งการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มโดยเลคตินจากถั่วแปบ พบว่าเลคตินจากถั่วแปบจับจำเพาะกับคาร์โบไฮเดรต ตรงปลาย D-mannosyl หรือ D-glucosyl (ข้อ 3.7.4) เมื่อพิจารณาโครงสร้างของ D-mannosyl และ D-glucosyl จะพบกลุ่มไฮดรอกซิลอิสระอยู่ที่คาร์บอนตำแหน่ง 2,3,4 และ 6 ดังแสดงในรูป 4.3 เนื่องจาก D-mannose, D-glucose และ N-acetyl-D-glucosamine สามารถ



ก. ∝-D-mannopyranosyl ข. ∝-D-glucopyranosyl

รูป 4.3 โครงสร้างโมเลกุลของปลาย ∝-D-mannosyl และ ∝-D-glucosyl

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดได้ใกล้เคียงกัน สำหรับ D-mannose และ D-glucose มีโครงสร้างโมเลกุลที่เหมือนกันทุกประการ ยกเว้นกลุ่มไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่ง 2 ของแมนโนสเป็น axial แต่ของกลูโคสเป็น equatorial และ N-acetyl-D-glucosamine ก็คือ D-glucose ที่มีกลุ่ม acetamide แทนกลุ่มไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่ง 2 ดังนั้นการจับของเลคตินจากถั่วแปบจึงไม่ต้องการกลุ่มไฮดรอกซิลอิสระที่คาร์บอนตำแหน่ง 2 ของแมนโนสหรือกลูโคส เนื่องจาก D-glucose ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงได้มากกว่า 3-O-methyl-D-glucopyranose สี่เท่า และกลุ่มเมธิลอยู่ที่คาร์บอนตำแหน่ง 3 ดังนั้นการจับของเลคตินจากถั่วแปบกับกลูโคสจึงต้องการกลุ่มไฮดรอกซิลอิสระที่คาร์บอนตำแหน่ง 3 ของน้ำตาล เนื่องจาก D-galactose ไม่ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงในขณะที่ D-glucose ยับยั้ง และ D-galactose มีโครงสร้างโมเลกุลเหมือนกับ D-glucose ทุกประการ ยกเว้นกลุ่มไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่ง 4 ของกาแลคโตสเป็น axial แต่ของกลูโคสเป็น equatorial ดังนั้นการจับของเลคตินจากถั่วแปบกับกลูโคส จึงต้องการกลุ่มไฮดรอกซิลอิสระที่คาร์บอนตำแหน่ง 4 ของน้ำตาล สำหรับกลุ่มไฮดรอกซิลอิสระของคาร์บอนตำแหน่ง 6 จะเกี่ยวข้องกับการจับของเลคตินกับแมนโนสหรือกลูโคสหรือไม่ยังไม่สามารถบอกได้ด้วยข้อมูลที่มีอยู่ ถ้าต้องการทราบควรทดลองยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงด้วย D-rhamnose เปรียบเทียบกับ D-mannose หรือ 6-deoxy-D-glucose เปรียบเทียบกับ D-glucose เพราะฉะนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าเลคตินจากถั่วแปบจับจำเพาะกับปลาย D-mannosyl หรือ D-glucosyl ตรงกลุ่มไฮดรอกซิลอิสระของคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 หรือ 4 ของน้ำตาลนั่นเอง

นอกจากนี้การที่ D-mannose และ methyl-∝-D-mannopyranoside สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงได้เท่ากัน แสดงว่าเลคตินจากถั่วแปบจับจำเพาะกับ D-mannose ที่ต่อกับปลายคาร์โบไฮเดรตด้วยพันธะ ∝ หรือ β ก็ได้ และเนื่องจาก D-glucose ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดได้มากกว่า sucrose และ D-maltose ถึง 4 และ 8 เท่าตามลำดับ แสดงว่าเลคตินจากถั่วแปบชอบจับกับโมโนแซคคาไรด์มากกว่า ไดแซคคาไรด์

4.2.6 <u>เลคตินจากถั่วยาง</u>

จากการทดสอบความสามารถของน้ำตาลในการยับยั้งการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มโดยเลคตินจากถั่วยาง พบว่าเลคตินจากถั่วยางจับจำเพาะกับคาร์โบไฮเดรตตรงปลาย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

D-mannosyl หรือ D-glucosyl (ข้อ 3.7.8) เมื่อพิจารณาโครงสร้างของ D-mannosyl และ D-glucosyl จะพบกลุ่มไฮดรอกซิลอิสระอยู่ที่คาร์บอนตำแหน่ง 2,3,4 และ 6 ดังแสดงในรูป 4.3 เนื่องจาก D-mannose, D-glucose และ N-acetyl-D-glucosamine ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงได้ใกล้เคียงกัน สำหรับ D-mannose และ D-glucose มีโครงสร้างโมเลกุลที่เหมือนกันทุกประการ ยกเว้นกลุ่มไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่ง 2 ของแมนโนส เป็น axial แต่ของกลูโคสเป็น equatorial และ N-acetyl-D-glucosamine ก็คือ D-glucose ที่มีกลุ่ม acetamide แทนกลุ่มไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่ง 2 ดังนั้นการจับของเลคตินจากถั่วยางจึงไม่ต้องการกลุ่มไฮดรอกซิลอิสระที่คาร์บอนตำแหน่ง 2 ของ แมนโนสหรือกลูโคส เนื่องจาก 3-O-methyl-D-glucopyranose ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงได้มากกว่า D-glucose ถึง 8 เท่า และกลุ่มเมธิลอยู่ที่คาร์บอนตำแหน่ง 3 ดังนั้นการจับของเลคตินจากถั่วยางกับกลูโคสจึงต้องการกลุ่มมาเชื่อมต่อที่คาร์บอนตำแหน่ง 3 ของน้ำตาล เนื่องจาก D-galactose ไม่ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงในขณะที่ D-glucose ยับยั้ง และ D-galactose มีโครงสร้างโมเลกุลเหมือนกับ D-glucose ทุกประการ ยกเว้นกลุ่มไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่ง 4 ของกาแลคโตสเป็น axial แต่ของกลูโคสเป็น equatorial ดังนั้นการจับของเลคตินจากถั่วยางกับกลูโคส จึงต้องการกลุ่มไฮดรอกซิลอิสระที่คาร์บอนตำแหน่ง 4 ของน้ำตาล สำหรับกลุ่มไฮดรอกซิลอิสระของคาร์บอนตำแหน่ง 6 จะเกี่ยวข้องกับการจับของเลคตินกับแมนโนสหรือกลูโคสหรือไม่ยังไม่สามารถบอกได้ด้วยข้อมูลที่มีอยู่ ถ้าต้องการทราบควรทดลองยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงด้วย D-rhamanose เปรียบเทียบกับ D-mannose หรือ 6-deoxy-D-glucose เปรียบเทียบกับ D-glucose เพราะฉะนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าเลคตินจากถั่วยางจับจำเพาะกับปลาย D-mannosyl หรือ D-glucosyl ตรงกลุ่มไฮดรอกซิลอิสระของคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 และ 4 ของน้ำตาลนั่นเอง

นอกจากนี้การที่ mehtyl-∝-D-mannopyranoside ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงได้ดีกว่า D-mannose สี่เท่า รวมทั้ง D-glucose, D-maltose (หรือ 4-O-∝-D-glucose) และ sucrose (หรือ ∝-D-glucopyranosyl-β-D-fructofurnoside) ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงได้ดีเท่ากันในขณะที่ D-Cellobiose (หรือ 4-O-β-D-glucopyranosyl-D-glucose) ไม่ยับยั้งการเกาะกลุ่มแสดงว่าเลคตินจากถั่วยางจับจำเพาะ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กับ D-mannose หรือ D-glucose ที่ต่อกับปลายคาร์โบไฮเดรตด้วยพันธะ α เท่านั้น และเนื่องจาก D-glucose, D-maltose และ sucrose ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดได้เท่ากัน รวมทั้งเลคตินจากถั่วยางจับเม็ดเดกซ์ตรานได้ดีในสภาพธรรมชาติ แสดงว่าเลคตินจากถั่วยางชอบจับโมโนแซคคาไรด์เท่ากับไดแซคคาไรด์ และสามารถจับกับโพลีแซคคาไรด์ได้ด้วย

สำหรับเลคตินจากถั่วลาย เลคตินจากไมยราบยักษ์และเลคตินจากเครือเขาปู้ เมื่อทดสอบความสามารถของน้ำตาลในการยับยั้งการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มตามข้อ 3.7.7, 3.7.8 และ 3.7.9 ตามลำดับ พบว่าไม่มีน้ำตาลตัวใดสามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงโดยเลคตินทั้งสามได้เลย ดังนั้นจึงยังไม่สามารถบอกชนิดของน้ำตาลที่จับจำเพาะของเลคตินเหล่านั้น คาดคะเนว่าชนิดของน้ำตาลที่จับจำเพาะอาจจะมีโครงสร้างซับซ้อน หรือขนาดโมเลกุลใหญ่กว่าน้ำตาลที่ใช้ทดสอบมาแล้ว

4.3 เลคตินร่วมในสิ่งที่สกัดจากพืช

ในขณะที่สิ่งสกัดจากไมยราบยักษ์สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงสภาพปกติ เม็ดเลือดแดงที่ถูกปรับปรุงด้วยนิวรามินิเดส และเม็ดเลือดแดงที่ถูกปรับปรุงด้วยทริปซินแล้วเกาะกลุ่มได้ในปริมาณที่เท่ากัน แต่สิ่งสกัดจากถั่วลายสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงในสภาพดังกล่าวเกาะกลุ่มได้ในปริมาณที่ต่างกันด้วยอัตราส่วน 1:8:64 (ตามข้อ 3.5 และ 3.6) จึงอาจเป็นไปได้ว่าในสิ่งสกัดจากถั่วลายมีเลคตินมากกว่าหนึ่งชนิด ตัวอย่างของพืชที่มีเลคตินมากกว่าหนึ่งชนิดเช่น ถั่วแดงหลวง (Phaseolus vulgaris) มีเลคติน 2 ชนิด ชนิดที่หนึ่งสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มมีน้ำหนักโมเลกุล 128,000 และประกอบด้วยสี่หน่วยย่อย ชนิดที่สองสามารถทำให้เม็ดเลือดขาวเกาะกลุ่ม มีน้ำหนักโมเลกุล 126,000 และประกอบด้วยสี่หน่วยย่อย เลคตินทั้งสองชนิดจับจำเพาะกับโอลิโกแซคคาไรด์[35]

ในขณะที่เลคตินจากขนุนไม่จับกับเม็ดอะกาโรสเลย และเลคตินจากคำบูชาจับกับเม็ดอะกาโรส 100% แต่เลคตินจากถั่วราชมาษจับกับเม็ดอะกาโรสได้ในปริมาณ 50-87.5% ทั้งนี้ไม่ว่าจะใช้เม็ดอะกาโรสในสภาพธรรมชาติหรือสภาพที่อุ่นกับกรด มีความเข้มข้นของเกลือแกงในขณะจับเป็น 0.15 หรือ 1.0 โมลาร์ก็ตามปริมาณการจับของเลคตินจากถั่วราชมาษกับเม็ดอะกาโรสก็ยังคงอยู่ในช่วงนั้น จึงอาจเป็นไปได้ว่าในสิ่งสกัดจากถั่วราชมาษมีเลคตินมากกว่าหนึ่งชนิด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากรายงานของ Galbraith และ Goldstein[36] พบว่าสิ่งสกัดจากถั่วราชมาษมีเลคติน 2 ส่วน ส่วนที่หนึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 247,000 และประกอบด้วย 8 หน่วยย่อย ส่วนที่สองมีน้ำหนักโมเลกุล 124,000 และประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย ส่วนทั้งสองจับจำเพาะกับ N-acetyl-D-galactosamine เหมือนกัน และเขาขอเรียกเลคตินสองส่วนนี้ว่าเป็น isolectins

4.4 แนวคิดในการเลือกทำเลคตินให้บริสุทธิ์ต่อไป

ผลการศึกษาเลคตินในสิ่งที่สกัดได้จากพืชต่างๆ ทั้ง 9 ชนิดนั้นนับว่าเลคตินจากขนุนน่าสนใจศึกษาต่อไปมากที่สุด เพราะมี specific activity หรือความบริสุทธิ์สูงสุด แต่เทคนิคการแยกเลคตินออกจากสิ่งสกัดอาจต้องใช้วิธีการยุ่งยากเพราะเลคตินจากขนุนไม่จับเม็ดอะกาโรสโดยตรง เลคตินที่น่าศึกษารองลงมาคือ เลคตินจากคำบูชา เพราะเทคนิคการแยกเลคตินออกจากสิ่งสกัดสามารถทำได้ง่ายโดยใช้เม็ดอะกาโรสที่อุ่นกับกรดแล้ว และอยู่ใน 1.0 โมลาร์เกลือแกงเป็นตัวจับเลคตินออกมา นอกจากนี้คำบูชายังเป็นพืชที่หาได้ง่ายมีอยู่ทั่วไปโดยเฉพาะกรมพัฒนาที่ดินกระทรวงเกษตรและสหกรณ์มีเมล็ดพันธุ์ไว้ใช้ปรับปรุงบำรุงดินในสภาพแหล่งเสื่อมโทรม แต่ข้อเสียของคำบูชาคือสิ่งที่สกัดได้มีลักษณะข้นมากและมีค่า specific activity ต่ำ ลำดับต่อไปที่น่าศึกษาคือเลคตินจากกวาวเครือ เพราะยังไม่พบรายงานการศึกษาเลคตินจากกวาวเครือในสิ่งตีพิมพ์ใดในขณะนี้ และเราก็ทราบชนิดของน้ำตาลที่จับจำเพาะแล้ว นอกจากนี้เลคตินจากกวาวเครือสามารถจับเม็ดอะกาโรสได้ จึงเป็นการง่ายที่จะแยกเลคตินออกจากสิ่งสกัด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved