



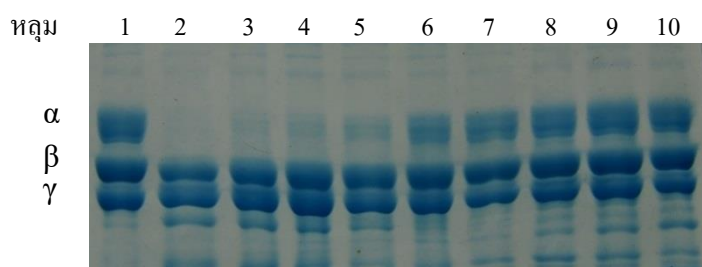






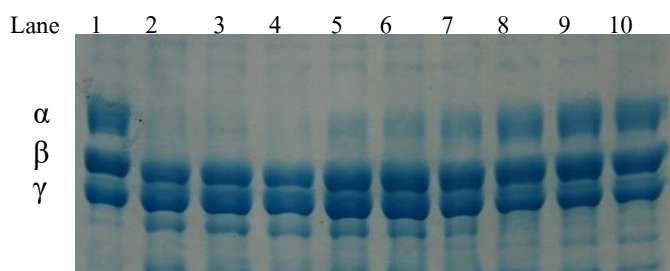
### ผลการทดสอบการยับยั้งพืงกะปะในการย่อยไฟบริโนเจนโดยไตรเปปไทด์

ผลการทดสอบการยับยั้งพืงกะปะในการย่อยไฟบริโนเจนโดยไตรเปปไทด์โดยใช้ Fibrinogenolytic activity ด้วยวิธี Reducing SDS-PAGE และย้อมสี Coomassie blue stain เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไตรเปปไทด์เรื่อยๆ โดยกำหนดให้ปริมาณพืงกะปะและปริมาณไฟบริโนเจนของมนุษย์คงที่ตั้งแต่หลุมที่ 2-10 พบว่า แถบโปรตีนสาย  $\alpha$  ของไฟบริโนเจนของมนุษย์ถูกยับยั้งการย่อยและเพิ่มการยับยั้งขนาดขึ้นเรื่อยๆ ตามลำดับและสามารถยับยั้งการย่อยได้สมบูรณ์ในหลุมที่ 8-10 สรุปได้ว่า ไตรเปปไทด์ทั้ง pERW และ pEKW สามารถยับยั้งพืงกะปะในการย่อยสาย  $\alpha$  ไฟบริโนเจนของมนุษย์ได้อัตราส่วน 1:2 (ภาพที่ 2-3)



หลุม	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
pERW (ไมโครกรัม)	0	0	0.05	0.11	0.17	0.23	0.29	0.35	0.4	0.47
พืงกะปะ (ไมโครกรัม)	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ไฟบริโนเจน (ไมโครกรัม)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

**ภาพที่ 2** แสดงการยับยั้งพืงกะปะกับไฟบริโนเจนของไตรเปปไทด์ pERW ด้วยวิธี Reducing SDS-PAGE และย้อมสี Coomassie blue stain หลุมที่ 1 ไฟบริโนเจน 100 ไมโครกรัม หลุมที่ 2 พืงกะปะ 1 ไมโครกรัม:ไฟบริโนเจน 100 ไมโครกรัม หลุมที่ 3 พืงกะปะ 1 ไมโครกรัม:pERW 0.05 ไมโครกรัม:ไฟบริโนเจน 100 ไมโครกรัม หลุมที่ 4 พืงกะปะ 1 ไมโครกรัม:pERW 0.11 ไมโครกรัม:ไฟบริโนเจน 100 ไมโครกรัม หลุมที่ 5 พืงกะปะ 1 ไมโครกรัม:pERW 0.17 ไมโครกรัม:ไฟบริโนเจน 100 ไมโครกรัม หลุมที่ 6 พืงกะปะ 1 ไมโครกรัม:pERW 0.23 ไมโครกรัม:ไฟบริโนเจน 100 ไมโครกรัม หลุมที่ 7 พืงกะปะ 1 ไมโครกรัม:pERW 0.29 ไมโครกรัม:ไฟบริโนเจน 100 ไมโครกรัม หลุมที่ 8 พืงกะปะ 1 ไมโครกรัม:pERW 0.35 ไมโครกรัม:ไฟบริโนเจน 100 ไมโครกรัม หลุมที่ 9 พืงกะปะ 1 ไมโครกรัม:pERW 0.4 ไมโครกรัม:ไฟบริโนเจน 100 ไมโครกรัม หลุมที่ 10 พืงกะปะ 1 ไมโครกรัม:pERW 0.47 ไมโครกรัม:ไฟบริโนเจน 100 ไมโครกรัม

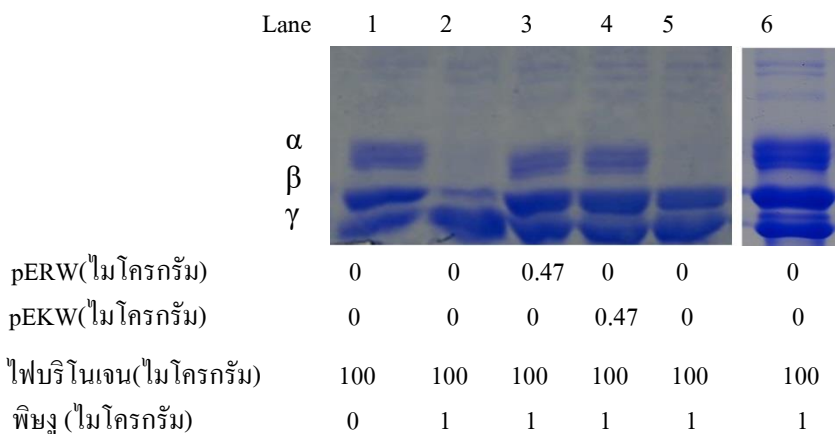


pEKW (ไมโครกรัม)	0	0	0.05	0.11	0.17	0.23	0.29	0.35	0.4	0.47
พินูจกะปะ (ไมโครกรัม)	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ไฟบริโนเจน (ไมโครกรัม)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

**ภาพที่ 3** แสดงการยับยั้งพินูจกะปะกับไฟบริโนเจนของไตรเปปไทด์ pEKW ด้วยวิธี Reducing SDS-PAGE และย้อมสี Coomassie blue stain หลุมที่ 1 ไฟบริโนเจน 100 ไมโครกรัม หลุมที่ 2 พินูจกะปะ 1 ไมโครกรัม:ไฟบริโนเจน 100 ไมโครกรัม หลุมที่ 3 พินูจกะปะ 1 ไมโครกรัม:pEKW 0.05 ไมโครกรัม:ไฟบริโนเจน 100 ไมโครกรัม หลุมที่ 4 พินูจกะปะ 1 ไมโครกรัม:pEKW 0.11 ไมโครกรัม:ไฟบริโนเจน 100 ไมโครกรัม หลุมที่ 5 พินูจกะปะ 1 ไมโครกรัม:pEKW 0.17 ไมโครกรัม:ไฟบริโนเจน 100 ไมโครกรัม หลุมที่ 6 พินูจกะปะ 1 ไมโครกรัม:pEKW 0.23 ไมโครกรัม:ไฟบริโนเจน 100 ไมโครกรัม หลุมที่ 7 พินูจกะปะ 1 ไมโครกรัม:pEKW 0.29 ไมโครกรัม:ไฟบริโนเจน 100 ไมโครกรัม หลุมที่ 8 พินูจกะปะ 1 ไมโครกรัม:pEKW 0.35 ไมโครกรัม:ไฟบริโนเจน 100 ไมโครกรัม หลุมที่ 9 พินูจกะปะ 1 ไมโครกรัม:pEKW 0.4 ไมโครกรัม:ไฟบริโนเจน 100 ไมโครกรัม หลุมที่ 10 พินูจกะปะ 1 ไมโครกรัม:pEKW 0.47 ไมโครกรัม:ไฟบริโนเจน 100 ไมโครกรัม

**ผลการทดสอบการยับยั้งพินูจกะปะในการย่อยไฟบริโนเจนโดยไตรเปปไทด์และผลการทดสอบพินูจกะปะใหม่ท้องเหลืองและพินูจกะปะในการย่อยไฟบริโนเจน**

ผลการทดสอบการยับยั้งพินูจกะปะในการย่อยไฟบริโนเจนโดยไตรเปปไทด์และผลการทดสอบพินูจกะปะใหม่ท้องเหลืองและพินูจกะปะในการย่อยไฟบริโนเจนโดยใช้ Fibrinolytic activity ด้วยวิธี Reducing SDS-PAGE และย้อมสี Coomassie blue stain เมื่อความเข้มข้นของไตรเปปไทด์ 0.47 ไมโครกรัม โดยกำหนดให้ปริมาณพินูจกะปะและปริมาณไฟบริโนเจนของมนุษย์คงที่ ตั้งแต่หลุมที่ 3-4 พบว่า แถบโปรตีนสาย  $\alpha$  ของไฟบริโนเจนของมนุษย์ถูกยับยั้งการย่อยและเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ หลุมที่ 5 พินูจกะปะใหม่ท้องเหลือง 1 ไมโครกรัม และปริมาณไฟบริโนเจน 100 ไมโครกรัม พบว่า พินูจกะปะใหม่ท้องเหลืองสามารถย่อยสาย  $\alpha$  ไฟบริโนเจนของมนุษย์ หลุมที่ 6 พินูจกะปะ 1 ไมโครกรัม และปริมาณไฟบริโนเจน 100 ไมโครกรัม พบว่า พินูจกะปะสามารถไม่ย่อยไฟบริโนเจนของมนุษย์ สรุปได้ว่าไตรเปปไทด์ทั้ง pERW และ pEKW สามารถยับยั้งพินูจกะปะในการย่อยสาย  $\alpha$  ของไฟบริโนเจนมนุษย์ได้ โดยเทียบกับพินูจกะปะใหม่ท้องเหลืองเป็นกลุ่มควบคุมบวกและพินูจกะปะเป็นกลุ่มความคลุม (ภาพที่ 4)



**ภาพที่ 4** แสดงการยับยั้งพินูจกะปะกับไฟบริโนเจนของไตรเปปไทด์ด้วยวิธี Reducing SDS-PAGE และย้อมสี Coomassie blue stain หลุมที่ 1 ไฟบริโนเจน 100 ไมโครกรัม หลุมที่ 2 พินูจกะปะ 1 ไมโครกรัม:ไฟบริโนเจน 100 ไมโครกรัม หลุมที่ 3 พินูจกะปะ 1 ไมโครกรัม:pERW 0.47 ไมโครกรัม:ไฟบริโนเจน 100 ไมโครกรัม หลุมที่ 4 พินูจกะปะ 1 ไมโครกรัม:pEKW 0.47 ไมโครกรัม หลุมที่ 5 พินูจเขียวหางไหม้ท้องเหลือง 1 ไมโครกรัม:ไฟบริโนเจน 100 ไมโครกรัม หลุมที่ 6 พินูจจาง 1 ไมโครกรัม:ไฟบริโนเจน 100 ไมโครกรัม

#### อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

นักวิจัยทั่วโลกต้องการหาตัวยับยั้งเอนไซม์เซอรินโปรตีเอสที่พบในกูพินระบบโลหิตที่ดีและที่พบในระบบการแข็งตัวของเลือดของมนุษย์ที่ดีซึ่งในปัจจุบันมีตัวต้านการแข็งตัวของเลือดชนิดใหม่ออกมาให้ใช้แล้ว (Liang et al., 2016) ยาเคมีพัฒนาสำเร็จที่สามารถป้องกันการแข็งตัวของเลือด เช่น ยากลุ่ม NOACs (Non-vitamin K antagonist oral anticoagulants) ประกอบด้วย Dabigatran, Rivaroxaban, Apixaban และ Edoxaban ซึ่งยา Dabigatran สามารถยับยั้ง thrombin ได้แบบ competitive inhibitor ส่วนยา Rivaroxaban, Apixaban และ Edoxaban สามารถยับยั้ง factor Xa ได้แบบ competitive inhibitor แต่ยากลุ่มนี้มีข้อจำกัดคือ ราคาสูง มีผลข้างเคียง ไม่สามารถใช้ในผู้ป่วยไตทำงานบกพร่องรุนแรงหรือผู้ป่วยที่ต้องฟอกไตได้ (Mekaj et al., 2015) เนื่องจากยากลุ่ม NOACs สามารถยับยั้งการแข็งตัวของเลือดได้ ส่วนพินูจระบบโลหิตสามารถกระตุ้นระบบการแข็งตัวของเลือดได้ ดังนั้น จึงมีการศึกษาถึงผลของการใช้ยากลุ่ม NOACs ในผู้ป่วยที่ถูกกูพินระบบโลหิตกัด พบว่า ยา Rivaroxaban มีความไวต่อการยับยั้ง factor X แต่ทั้งนี้จำเป็นต้องมีการทดลองทางคลินิกเนื่องจากจะต้องปรับการลดขนาดให้ยา Rivaroxaban ในผู้ป่วยไตทำงานบกพร่อง (Altman et al., 2014) มีการศึกษาการทำให้เกิดเลือดแข็งตัวแบบผิดปกติจากฤทธิ์ของพินูจระบบโลหิต พบว่า เซอรินโปรตีเอสในพินูจสามารถตัดสายไฟบริโนเจนได้ ซึ่งตัดเฉพาะสาย Fibrinopeptide A โดยไม่ตัดสาย Fibrinopeptide B ทำให้เกิดการแข็งตัวของเลือดทั่วร่างกายแบบผิดปกติ เพราะโดยปกติแล้ว thrombin จะตัดทั้งสองสายเพื่อสร้างเป็นก้อนเลือดแข็งตัวที่สมบูรณ์ เป็นผลให้ผู้ป่วยที่ถูกกูพินระบบโลหิตกัดมีระดับไฟบริโนเจนและเกล็ดเลือดต่ำ (Ullah et al., 2018)

กลุ่มวิจัยเราได้ทดสอบความแรงของพินูจหลายๆชนิดในประเทศไทยต่อการย่อยไฟบริโนเจนโดยวิธี fibrinolytic activity ผลเบื้องต้น พบว่า พินูจกะปะมีความแรงมากที่สุดในการย่อยไฟบริโนเจนในเวลารับมปฏิบัติการเท่ากันเมื่อเทียบกับพินูจเขียวหางไหม้ท้องเหลือง พินูจจาง พินูจสามเหลี่ยมและพินูจเห่า ซึ่งสัมพันธ์กับผลการทดลองข้างต้นพบว่าพินูจกะปะสามารถย่อยไฟบริโนเจนได้ดีตั้งแต่อัตราส่วนพินูจต่อไฟบริโนเจน 1:100 ลงมา ดังนั้น เราจึงเลือกพินูจกะปะในการวิจัยครั้งนี้ ผลการทดลองที่ได้อาจสอดคล้องกับการศึกษาการประเมินความรุนแรงของพินูจ

กะปะในประเทศไทย บ่งชี้ว่า ผู้ป่วยถูกกะปะกัดทั้งหมด 145 ราย พบความผิดปกติต่อระบบการแข็งตัวของเลือดร้อยละ 52.48 และเสียชีวิตจากสาเหตุดังกล่าว 2 ราย (Wongtongkam et al., 2005)

การทดสอบ pERW และ pEKW ต่อการยับยั้งเซอริน โปรตีเอสของพิษงูกะปะในการย่อยไฟบริโนเจน พบว่า ทั้ง pERW และ pEKW สามารถยับยั้งพิษงูกะปะในการย่อยสาย  $\alpha$  ของไฟบริโนเจนที่อัตราส่วนไทรเปปไทด์ต่อพิษงู 1:2 โดยน้ำหนัก บ่งชี้ว่า ไทรเปปไทด์ทั้งสองชนิดสามารถยับยั้งการย่อยไฟบริโนเจนโดยเอนไซม์เซอริน โปรตีเอสในพิษงูกะปะได้ โดยปกติงูกะปะจะปล่อยน้ำพิษเฉลี่ย 60 มิลลิกรัม ต่อการกัดหนึ่งครั้ง คิดเป็นเอนไซม์เซอริน โปรตีเอสซึ่งมีอยู่ร้อยละประมาณ 14.9 คิดเป็น 8.94 มิลลิกรัม ของปริมาณน้ำพิษทั้งหมด ดังนั้น ถ้าต้องการยับยั้งเซอริน โปรตีเอสของพิษงูกะปะจะต้องใช้ไทรเปปไทด์ถึง 8.94 มิลลิกรัม คิดเป็นเงิน 9,500 บาท จึงจะสามารถยับยั้งเซอริน โปรตีเอสของพิษงูกะปะต่อการกัดหนึ่งครั้งได้สมบูรณ์ ทั้งนี้ ข้อมูลดังกล่าวเป็นเพียงผลการทดลองเบื้องต้นและการคาดการณ์เท่านั้น หากในความเป็นจริงเราสามารถใส่ไทรเปปไทด์ร่วมกับเซรัมแก่พิษซึ่งมีแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเซอริน โปรตีเอสอยู่ (Ledsgaard et al., 2018) น่าจะช่วยลดค่าใช้จ่ายลงได้ อีกทั้ง ไทรเปปไทด์ทั้ง pERW และ pEKW ยังคงต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศค่าใช้จ่ายจึงค่อนข้างสูง

มีการศึกษาถึงกลไกการยับยั้งของ pERW และ pEKW ในพิษงู Taiwan habu พบว่า ไทรเปปไทด์ pERW มีกลไกแบบ non-competitive inhibition สามารถเกาะเอนไซม์เมทัลโลโปรตีนเนสบริเวณอื่นที่ไม่ใช่บริเวณ active site มีผลทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนไป ส่วนไทรเปปไทด์ pEKW มีกลไกแบบ competitive inhibition สามารถเกาะบริเวณ active site ของเอนไซม์เมทัลโลโปรตีนเนสเพื่อแย่งจับกับซับสเตรท พบว่า pEKW ทำให้การเกิด Cocrystallize ระหว่างเมทัลโลโปรตีนเนสของพิษงู Taiwan habu กับ  $Cd^{2+}$  จากนั้น  $Zn^{2+}$  ได้เข้าไปจับแทนที่  $Cd^{2+}$  ในระหว่างการเกิด Cocrystallized โดยคาดว่า tryptophan จับบริเวณ S3 pocket และ pyro-glutamate จับบริเวณ S1 pocket ส่วน กรดอะมิโนตรงกลางจับบริเวณ S2 pocket ของเมทัลโลโปรตีนเนส (Huang et al., 2002) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่เกี่ยวข้องกับเมทัลโลโปรตีนเนสของพิษงูระบบโลหิตอื่นๆ (Ding et al., 2015; Huang et al., 2002) ผลการทดลองครั้งนี้ยังบ่งชี้อีกว่า pERW เหมาะสมที่จะศึกษาต่อและนำไปประยุกต์ใช้ในมนุษย์

อาจกล่าวได้ว่า ไทรเปปไทด์สังเคราะห์มีความปลอดภัยต่อมนุษย์ก็เป็นไปได้ เนื่องจากมีโครงสร้างเป็นกรดอะมิโน 3 ตัวเรียงกัน กรดอะมิโนทั้งสามตัวละลายในน้ำเลือดได้ โดยกรดอะมิโน glutamate จัดอยู่ในหมู่ R ที่มีประจุลบ กรดอะมิโน tryptophan จัดอยู่ในหมู่ที่ไม่ชอบน้ำ ส่วนกรดอะมิโน arginine และ lysine จัดอยู่ในหมู่ R ที่มีประจุบวก ซึ่งกรดอะมิโนที่มีประจุทั้งหมดนี้มีสมบัติที่ละลายน้ำได้ดี (Lodish et al., 2016) ซึ่งบ่งชี้ว่า ไทรเปปไทด์ทั้ง pERW และ pEKW สามารถขับออกทางปัสสาวะได้เช่นกัน (Blom et al., 2016) มีการศึกษาถึงค่าครึ่งชีวิตในกระแสเลือดของไทรเปปไทด์สังเคราะห์ พบว่า เมื่อฉีดไทรเปปไทด์สังเคราะห์เข้าไปที่เส้นเลือดดำของหนูทดลองไทรเปปไทด์สังเคราะห์จะถูกขับทางปัสสาวะ โดยครึ่งชีวิตของไทรเปปไทด์สังเคราะห์น้อยกว่า 30 นาที (Green et al., 1992) นอกจากนี้ ยังมีรายงานความสำเร็จของการใช้ไทรเปปไทด์สังเคราะห์ mifamurtide ในการยับยั้งมะเร็งกระดูก (Osteosarcoma) ระยะลุกลามซึ่งเป็นผลมาจากเอนไซม์กลุ่มเมทัลโลโปรตีนเนสในมนุษย์ที่เรียกว่า ADAMs (Disintegrin And Metalloproteinases) โดยเข้าร่วมกับยาเคมีบำบัดในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งกระดูกทั้งหมด 1,000 คน พบว่าผู้ป่วยมีอาการดีขึ้นส่งผลให้ลดความเสี่ยงต่อการเสียชีวิตจากโรคมะเร็งกระดูกได้ ซึ่งในยุโรปไทรเปปไทด์ mifamurtide ได้รับการอนุมัติให้ใช้สำหรับการรักษาโรคมะเร็งกระดูกร่วมกับเคมีบำบัดได้ (Meyers et al., 2009)



### กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ศ.นพ. พลภัทร โรจน์นครินทร์ และ ดร.คม ไสงาม ที่เอื้อเฟื้อสารเคมี คอยให้คำชี้แนะ และให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆมาโดยตลอด ขอขอบพระคุณวิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ขอขอบพระคุณทุนอุดหนุนจากสำนักงานวิจัยแห่งชาติ (วช.) และทุนอุดหนุนเพื่อพัฒนา บัณฑิตศึกษาจากสำนักงานวิจัยแห่งชาติ (วช. บัณฑิต) ประจำปี 2561 เป็นอย่างสูง

### เอกสารอ้างอิง

แสงโสม ศิริพานิช. กู๊ด. สรุปรายงานเฟ้ระวังโรค; 2558.

Altman R, Gonzalez CD. Simple and rapid assay for effect of the new oral anticoagulant (NOAC) rivaroxaban: preliminary results support further tests with all NOACs. *Thrombosis journal*. 2014; 12(1): 7.

Blom W, Huijman J. Differential diagnosis of (inherited) amino acid metabolism or transport disorders. *Amino acids*. 1992; 2(1-2): 25-67.

Ding B, Xu Z, Qian C. Antiplatelet aggregation and antithrombosis efficiency of peptides in the snake venom of *Deinagkistrodon acutus*: Isolation, identification, and evaluation. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2015; 2015.

Green P, Shroot B, Bernard F, et al. In vitro and in vivo iontophoresis of a tripeptide across nude rat skin. *Journal of controlled release*. 1992; 20(3): 209-17.

Huang K-F, Hung C-C, Wu S-H. Characterization of three endogenous peptide inhibitors for multiple metalloproteinases with fibrinolytic activity from the venom of Taiwan habu (*Trimeresurus mucrosquamatus*). *Biochemical and biophysical research communications*. 1998; 248(3): 562-8.

Huang KF, Chiou SH, Ko TP. Determinants of the inhibition of a Taiwan habu venom metalloproteinase by its endogenous inhibitors revealed by X-ray crystallography and synthetic inhibitor analogues. *The FEBS Journal*. 2002; 269(12): 3047-56.

Liang G, Phillip Bowen J. Development of trypsin-like serine protease inhibitors as therapeutic agents: Opportunities, challenges, and their unique structure-based rationales. *Current topics in medicinal chemistry* 2016; 16(13): 1506-29.

Ledsgaard L, Jenkins T, Davidsen K. Antibody Cross-Reactivity in Antivenom Research. *Toxins* 2018; 10(10): 393.

Meyers PA. Muramyl tripeptide (mifamurtide) for the treatment of osteosarcoma. *Expert review of anticancer therapy* 2009; 9(8): 1035-49.

Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. *Molecular cell biology*: WH freeman New York; 2013; 10: 7167-3136.

Mekaj YH, Mekaj AY, Duci SB. New oral anticoagulants: their advantages and disadvantages compared with vitamin K antagonists in the prevention and treatment of patients with thromboembolic events. *Therapeutics and Clinical Risk Management* 2015; 11: 967-977.

Pinyachat A, Rojnuckarin P, Muanpasitporn C, Singhamatr P, Nuchprayoon S. Albocollagenase, a novel recombinant P-III snake venom metalloproteinase from green pit viper (*Cryptelytrops albolabris*), digests collagen and inhibits platelet aggregation. *Toxicon*. 2011; 57(5): 772-80.



- Pinyachat A. Comparative Studies of Structural and Functional Properties of Snake Venom Metalloproteinases. Journal of the Medical Association of Thailand= Chotmai het thangphaet. 2016; 99: S76-88.
- Solange M.T. Serrano. The long road of research on snake venom serine proteinases. Toxicon 2013; 62: 19-26.
- Tang ELH, Tan CH, Fung SY. Venomics of Calloselasma rhodostoma, the Malayan pit viper: A complex toxin arsenal unraveled. Journal of proteomics 2016; 148: 44-56.
- Ullah A, Masood R, Ali I, Ullah K, Ali H, Akbar H, et al. Thrombin-like enzymes from snake venom: Structural characterization and mechanism of action. International journal of biological macromolecules. 2018; 114: 788-811.
- Wongtongkam N, Wilde H, Sitthi-Amorn C. A study of 225 Malayan pit viper bites in Thailand. Military medicine. 2005; 170(4): 342-8.