



รายงานการวิจัย

การประยุกต์ใช้เปปไทด์สังเคราะห์เพื่อยับยั้งการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน

Application of synthetic peptide to inhibit melanogenesis

นางสาวอุทัยรัตน์ สุทธิสุวรรณ หัวหน้าโครงการ

โครงการวิจัยทุนสนับสนุนงานวิจัยของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ

งบประมาณเงินรายได้ ปี พ.ศ. 2565

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ

กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิจัยฉบับนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจาก งบประมาณอุดหนุนงานวิจัยงบประมาณเงินรายได้ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ ประจำปีงบประมาณ 2565 ซึ่งทำให้นักวิจัยได้มีโอกาสในการทำงานวิจัยที่สร้างสรรค์อันจะเป็นการสร้างองค์ความรู้เพื่อที่จะนำไปต่อยอดในการประยุกต์ใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์อภิชาติ กาญจนทัต จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งเป็นที่ปรึกษาในการทำงานวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณนางสาวปัทมสร่า แสงธนู พนักงานของสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และขอขอบพระคุณ คณะกรรมการตรวจที่ให้ความกรุณาตรวจรับเอกสารเป็นอย่างดี

คณะนักวิจัย

นางสาวกัญญ์รัตน์ สุทธิสุวรรณ

หัวหน้าโครงการ



บทคัดย่อ

เพปไทด์สังเคราะห์มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ฤทธิ์ในการยับยั้งการอักเสบ และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ การวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาความสามารถในการยับยั้งการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินของเพปไทด์สังเคราะห์ที่ได้จากการย่อยเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus* sp. VDW โดยศึกษาการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ศึกษาความเป็นพิษของเพปไทด์สังเคราะห์ต่อเซลล์มะเร็งผิวหนังของหนู (B16F10) ศึกษาการยับยั้งการแสดงออกของยีน TYR, TRP-1, TRP-2 และ MITF ภายในเซลล์ B16F10 และศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเม็ดสีเมลานินในปลาหมึก ผลการศึกษาพบว่าเพปไทด์สังเคราะห์ที่มีลำดับกรดอะมิโน AILQSYSGKTK มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสเมื่อใช้ L-dopa เป็นสารตั้งต้น นอกจากนี้เพปไทด์สังเคราะห์เส้นนี้ยังไม่เป็นพิษต่อเซลล์เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี MTT ในเซลล์มะเร็งผิวหนังของหนู (B16F10) และมีความสามารถในการยับยั้งการแสดงออกของยีน TYR, TRP-1, TRP-2 และ MITF ได้ ถึงแม้ว่าจะไม่มีผลในการยับยั้งการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินในปลาหมึกได้ก็ตาม ดังนั้นผลจากงานวิจัยในครั้งนี้จึงเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญให้กับงานวิจัยอื่นๆ ที่จะทำในอนาคตได้เป็นอย่างดี

คำสำคัญ : เพปไทด์สังเคราะห์ เมลานิน ไทโรซิเนส ฤทธิ์ต้านไทโรซิเนส ปลาหมึก



Abstract

Synthetic peptide has a biological activity such as antimicrobial, anticancer, anti-inflammatory and antioxidant activities. The purpose of this research is to determine ability on anti-melanogenesis of synthetic peptide derived from cyanobacterium *Synechococcus* sp. VDW by study on inhibition of tyrosinase, cytotoxicity of B16F10 melanocytes, TYR, TRP-1, TRP-2 and MITF gene inhibition into B16F10 melanocytes and anti-melanogenic in zebrafish. These results suggest that synthetic peptide, of which AILQSYSAGKTK had ability to anti-tyrosinase using L-dopa as a substrate. Furthermore, Synthetic peptide was not toxic to B16F10 melanocytes using MTT assay. Synthetic peptide (AILQSYSAGKTK) had the capacity to inhibited the expression of TYR, TRP-1, TRP-2 and MITF gene. Although, Synthetic peptide was not inhibites melanogenesis in zebrafish. Present finding was important data for future research.

Keywords: Synthetic peptide, Melanin, Tyrosinase, Antityrosinase, Zebrafish

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
Abstract	ค
สารบัญ	ง
สารบัญภาพ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรม	5
2.1 เพปไทด์ (peptide)	5
2.2 ผิวหนัง (Skin)	9
2.3 เมลานิน และสีผิว (Melanin and Skin color)	10
2.4 เอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase)	14
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	14
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	16
3.1 เพปไทด์สังเคราะห์	16
3.2 การตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนส	16
3.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งผิวหนังของหนู (B16F10)	17
3.4 การศึกษาความเป็นพิษของเพปไทด์สังเคราะห์ต่อเซลล์มะเร็งผิวหนังของหนู (B16F10) ด้วยวิธี MTT assay	17
3.5 การศึกษาปริมาณเมลานินในเซลล์มะเร็งผิวหนังของหนู (B16F10)	17
3.6 ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไทโรซิเนสในเซลล์มะเร็งผิวหนังของหนู (B16F10)	18

สารบัญ(ต่อ)

เรื่อง	หน้า
3.7 การศึกษาการยับยั้งการแสดงออกของยีน TYR, TRP-1, TRP-2 และ MITF ภายในเซลล์มะเร็งผิวหนังของหนู (B16F10)	18
3.8 การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเม็ดสีเมลานินในปลาหมึก	18
3.9 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	19
บทที่ 4 ผลการดำเนินการวิจัย	20
4.1 ผลการตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนส	20
4.2 ผลการศึกษาความเป็นพิษของเพปไทด์สังเคราะห์ต่อเซลล์มะเร็งผิวหนังของหนู (B16F10) ด้วยวิธี MTT assay	21
4.3 ผลการศึกษาปริมาณเมลานินในเซลล์มะเร็งผิวหนังของหนู (B16F10)	23
4.4 ผลการศึกษาการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไทโรซิเนสในเซลล์มะเร็งผิวหนังของหนู (B16F10)	25
4.5 ผลการศึกษาการยับยั้งการแสดงออกของยีน TYR, TRP-1, TRP-2 และ MITF ภายในเซลล์มะเร็งผิวหนังของหนู (B16F10)	27
4.6 ผลการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเม็ดสีเมลานินในปลาหมึก	32
บทที่ 5 สรุปผลการดำเนินการวิจัยและข้อเสนอแนะ	34
5.1 สรุปผลการดำเนินการวิจัย	34
5.2 ข้อเสนอแนะ	34
บรรณานุกรม	35
ภาคผนวก	39
ประวัติคณะผู้วิจัย	40

สารบัญภาพ

เรื่อง	หน้า
ภาพที่ 2.1 โครงสร้างโมเลกุลของเพปไทด์	5
ภาพที่ 2.2 กระบวนการชีวสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน	13
ภาพที่ 4.1 กราฟแสดงค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งผิวหนังของหนู (B16F10)	23
ภาพที่ 4.2 กราฟแสดงค่าปริมาณเม็ดสีเมลานินในเซลล์มะเร็งผิวหนังของหนู (B16F10)	24
ภาพที่ 4.3 กราฟแสดงการยับยั้งไทโรซิเนสในเซลล์มะเร็งผิวหนังของหนู	26
ภาพที่ 4.4 กราฟแสดงค่าการแสดงออกของยีน TYR	28
ภาพที่ 4.5 กราฟแสดงค่าการแสดงออกของยีน TRP-1	29
ภาพที่ 4.6 กราฟแสดงค่าการแสดงออกของยีน TRP-2	30
ภาพที่ 4.7 กราฟแสดงค่าการแสดงออกของยีน MITF	31



สารบัญตาราง

เรื่อง	หน้า
ตารางที่ 2.1 ชนิดและสภาวะที่เหมาะสมในการใช้งานเอนไซม์ย่อยโปรตีน	6
ตารางที่ 4.1 แสดงรายละเอียดของลำดับกรดอะมิโนของเพปไทด์ตัวอย่าง	20
ตารางที่ 4.2 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งไทโรซิเนสของเพปไทด์สังเคราะห์	21
ตารางที่ 4.3 แสดงค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งผิวหนังของหนู (B16F10)	22
ตารางที่ 4.4 แสดงค่าปริมาณเม็ดสีเมลานินในเซลล์มะเร็งผิวหนังของหนู (B16F10)	24
ตารางที่ 4.5 แสดงค่าระดับการยับยั้งไทโรซิเนสในเซลล์มะเร็งผิวหนังของหนู	26
ตารางที่ 4.6 แสดงค่าระดับการแสดงออกของยีน TYR	28
ตารางที่ 4.7 แสดงค่าระดับการแสดงออกของยีน TRP-1	29
ตารางที่ 4.8 แสดงค่าระดับการแสดงออกของยีน TRP-2	30
ตารางที่ 4.9 แสดงค่าระดับการแสดงออกของยีน MITF	31
ตารางที่ 4.10 ค่าปริมาณเมลานินสัมพัทธ์ของตัวอ่อนปลาหมอหลังจากได้รับสัมผัสกับเพปไทด์สังเคราะห์ตัวอย่างที่ 1 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	32



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

จากการที่ปัจจุบันมีรายงานวิจัยมากมายระบุว่าเพปไทด์ที่ได้จากการย่อยเซลล์ของสิ่งมีชีวิต มีฤทธิ์ทางชีวภาพมากมาย ประกอบกับประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความหลากหลายทางชีวภาพอันดับต้นๆ ของโลก จึงเป็นโอกาสดีสำหรับประเทศไทยเพราะมีทรัพยากรธรรมชาติที่มีคุณภาพเป็นจำนวนมาก เพื่อจะได้วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติที่มีอยู่ให้มีคุณภาพทัดเทียมกับต่างประเทศ และสามารถแข่งขันได้ในตลาดโลก เพื่อช่วยให้นำรายได้เข้าประเทศได้อีกด้วย ซึ่งจากกระแสความนิยมในผลิตภัณฑ์ที่ทำมาจากธรรมชาติมากขึ้น ทำให้มีจำนวนผู้บริโภคหันมานิยมใช้ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติแทนยาที่สังเคราะห์ทางเคมีที่มีราคาแพง ซึ่งผู้วิจัยสนใจเป็นที่จะทำการวิจัยเพื่อหาความสามารถของเพปไทด์สังเคราะห์ที่ได้จากไซยาโนแบคทีเรียเพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในระดับทางการแพทย์ เกษษกรรม หรืออุตสาหกรรม เช่น เป็นส่วนผสมในอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพและเครื่องสำอาง อีกทั้งเพื่อเป็นการวิจัยต่อยอดของงานวิจัยที่เคยทำมาก่อนหน้านี้ พบว่าเพปไทด์สังเคราะห์ที่ได้จากการย่อยเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus* sp. VDW มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง และมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดการอักเสบได้ดี

เพปไทด์ เป็นโปรตีนที่ถูกย่อยด้วยสารเคมีหรือเอนไซม์ได้เป็นสารที่มีขนาดที่หลากหลายโดยมีการควบคุมสภาวะต่าง ๆ เช่น อุณหภูมิ ระยะเวลา ค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็นต้น จึงทำให้ลักษณะสมบัติของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป การย่อยด้วยกรดหรือเบสเป็นการย่อยด้วยสารเคมี เป็นวิธีที่ไม่แพงและทำได้ง่าย แต่ควบคุมกระบวนการย่อยยากและยังเกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่คงที่ การย่อยด้วยเอนไซม์มีความจำเพาะสูงและปฏิกิริยาไม่รุนแรง เป็นการย่อยสลายโปรตีนบริเวณพันธะเพปไทด์โดยใช้โปรติเอส (protease) โดยมีโมเลกุลของน้ำร่วมด้วย เมื่อพันธะเพปไทด์แตกออกจะเกิดหมู่คาร์บอกซิลิก (carboxylic group) และหมู่อะมิโน (amino group) อิสระมากขึ้นทำให้ความสามารถในการละลายดีขึ้น (Kristinsson และ Rasco, 2000; Xie และคณะ, 2008) ลักษณะสมบัติของเพปไทด์ขึ้นอยู่กับสภาวะการย่อยและวัตถุดิบเริ่มต้น เพปไทด์มักมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ โดยเฉพาะไดเพปไทด์และไตรเพปไทด์ (Bhaskar และคณะ,

2007) ปัจจุบันเพปไทด์ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ เครื่องสำอาง เป็นต้น (Haslaniza และคณะ, 2010) เพปไทด์ สามารถแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ เช่น ฤทธิ์ต้านความดันโลหิต ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (Nagasawa และคณะ, 2001; Fahmi และคณะ, 2004; Lan และคณะ, 2014)

แสงแดดเป็นตัวกระตุ้นให้ร่างกายมีกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานิน (melanin) มากขึ้นทำให้ผิวมีสีที่เข้มขึ้น (Kim และ Uyama, 2005) และความเชื่อที่ว่ากรรมวิธีที่ชาวญี่ปุ่นบริโภคที่มีสุขภาพดี จึงทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ทำให้สีผิวจางลงหรือขาวขึ้นมีเพิ่มมากขึ้นโดยเป็นทั้งสารสังเคราะห์ และผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ ซึ่งแนวโน้มการใช้ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติเพิ่มมากขึ้นเพราะมีความปลอดภัย และผลข้างเคียงน้อย (Schurink และคณะ, 2007) ไทโรซิเนส (tyrosinase) เป็นเอนไซม์หลักในกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินซึ่งเป็นสารที่ทำให้สีผิวของคนเราแตกต่างกัน ซึ่งเม็ดสีเมลานินมีหน้าที่หลักในการป้องกันผิวหนังจากแสงอัลตราไวโอเลต โดยไทโรซิเนสเร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน (hydroxylation) ของกรดอะมิโนไทโรซีนเปลี่ยนเป็นแอล-3,4-ไฮดรอกซี-ฟีนิลอะลานีน หรือแอล-โดปา (L-3,4-dihydroxyphenylalanine; L-DOPA) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานิน ตามด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ของแอล-โดปา ไปเป็นโดปาคิวโนน (dopaquinone) และเกิดปฏิกิริยาออกซิเดทีฟโพลิเมอร์ไรเซชัน (oxidative polymerization) ของอนุพันธ์โดปา-คิวโนน ทำให้เกิดเม็ดสีเมลานินในที่สุด (Chan และคณะ, 2011) และยังสามารถนำมาผลิตเป็นยารักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับผิวหนังที่เกิดจากจำนวนเม็ดสีเมลานินที่เพิ่มมากขึ้น (hyperpigmentation) บริเวณผิวหนังชั้นนอก หรือผิวหนังชั้นใน หรือทั้งสองชั้น เช่น กระฝ้า เป็นต้น (Kim และ Uyama, 2005; Schurink และคณะ, 2007)

ไทโรซิเนส (EC.1.14.18.1) เป็นเอนไซม์ที่มีโคฟแฟกเตอร์เป็นองค์ประกอบ (Chiari และคณะ, 2011) พบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดเช่นในพืชจะเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาล (browning reaction) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทำหน้าที่สร้างเม็ดสีและยังเกี่ยวข้องกับความผิดปกติของสีผิวที่จางลง (hypopigmentation) เกิดจากเม็ดสีที่ขาดหายไปทำให้ผิวบริเวณนั้นมีสีต่างออกไปเมื่อเทียบกับผิวโดยรอบ เช่น โรคด่างขาว (vitiligo) หรือ ความผิดปกติของสีผิวที่เข้มขึ้น (hyperpigmentation) เกิดจากจำนวนเมลานินที่เพิ่มมากขึ้น เช่น กระ ฝ้า นอกจากนี้ไทโรซิเนสยังมีบทบาทในโรคมะเร็ง โรคที่มาจากความผิดปกติของระบบประสาท (neurodegenerative disease) เช่น โรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) (Schurink และคณะ, 2007) ดังนั้นการหาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไทโรซิเนสจึงเป็นประโยชน์ในหลายด้านเช่น ช่วยทำให้สีผิวขาวขึ้น หรือใช้รักษาผู้ป่วยที่มีความผิดปกติที่ผิวหนัง มีการ

รายงานสารที่สามารถยับยั้งไทโรซิเนสเช่น ไฮโดรควิโนน (hydroquinone) กรดโคจิก (kojic acid) และคอร์ติโคสเตอรอยด์ (corticosteroids) เป็นต้น (Chiari และคณะ, 2011) สารที่ได้จากธรรมชาติมีผลข้างเคียงน้อย และมีความปลอดภัยมากกว่าสารสังเคราะห์

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาเพปไทด์สังเคราะห์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะสามารถตรวจสอบพบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ทำให้ผิวหน้าขาวขึ้น ซึ่งมีสาเหตุมาจากเอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทำให้เกิดเม็ดสีเมลานินในเซลล์ผิวหน้า และหากตรวจสอบพบว่าเพปไทด์สังเคราะห์มีความสามารถในการยับยั้งการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินในระดับโมเลกุล และไม่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งผิวหนังของหนู (B16F10) รวมไปถึงมีฤทธิ์การยับยั้งเม็ดสีเมลานิน จะเป็นแนวทางการวิจัยหนึ่งที่มีความสำคัญเพื่อเปิดโอกาสให้ประเทศไทยได้มีองค์ความรู้ใหม่ สามารถนำไปต่อยอดพัฒนาไปเป็นผลิตภัณฑ์ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น การแพทย์ เภสัชกรรม และเครื่องสำอางในอนาคตได้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 เพื่อศึกษาผลของเพปไทด์สังเคราะห์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส
- 1.2.2 เพื่อศึกษาความเป็นพิษของเพปไทด์สังเคราะห์ต่อเซลล์มะเร็งผิวหนังของหนู (B16F10)
- 1.2.3 เพื่อศึกษาการยับยั้งการแสดงออกของยีน TYR, TRP-1, TRP-2 และ MITF ภายในเซลล์มะเร็งผิวหนังของหนู (B16F10) ที่ถูกกระตุ้นด้วยรังสียูวี
- 1.2.4 เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเม็ดสีเมลานินในปลาหมึกลาย
- 1.2.5 เพื่อสนองพระราชดำริในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

โครงการวิจัยนี้จะทำการศึกษาประสิทธิภาพของเพปไทด์สังเคราะห์ในการยับยั้งไทโรซิเนส ศึกษาความเป็นพิษของเพปไทด์สังเคราะห์ต่อเซลล์มะเร็งผิวหนังของหนูด้วยวิธี MTT assay ศึกษาการยับยั้งการแสดงออกของยีน TYR, TRP-1, TRP-2 และ MITF ภายในเซลล์มะเร็งผิวหนังของหนูที่ถูกกระตุ้นด้วยรังสียูวี โดยการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของระดับ mRNA ที่มีการสังเคราะห์ขึ้นโดยใช้เทคนิค Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) และการศึกษาการยับยั้งเม็ดสีเมลานิน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 ก่อให้เกิดองค์ความรู้ใหม่และคุณค่าทางวิชาการด้านการวิจัย
- 1.4.2 นำเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน ไปจดสิทธิบัตร
- 1.4.3 สามารถพัฒนาเพปไทด์สังเคราะห์ เพื่อนำไปเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง สร้างมูลค่าของผลิตภัณฑ์และนำไปแข่งขันในตลาดโลกได้
- 1.4.4 บูรณาการผลการวิจัยสู่การเรียนการสอนในรายวิชาที่มีความเกี่ยวข้อง เช่น วิชาชีววิทยา วิชาจุลชีววิทยาทั่วไป และวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

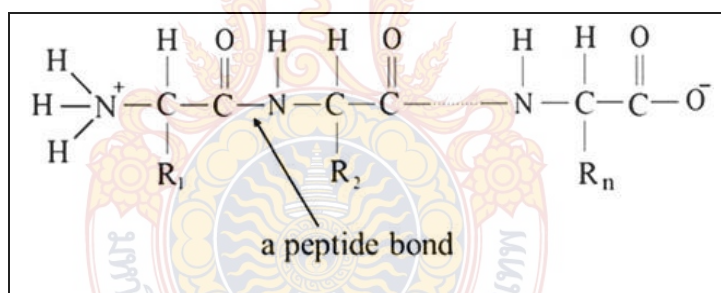


บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรม

2.1 เพปไทด์ (peptide)

เพปไทด์เป็นผลผลิตของกระบวนการย่อยโปรตีนให้ได้เป็นโมเลกุลที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนอิสระ หรือกรดอะมิโน 2 โมเลกุลหรือมากกว่ามาเรียงต่อกันด้วยพันธะเพปไทด์ โครงสร้างโมเลกุลของเพปไทด์แสดงดังภาพที่ 2.1 โดยทั่วไปเพปไทด์ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ เอนไซม์ที่นิยมใช้คือเอนไซม์โปรติเอส (Protease) โดยโมเลกุลขนาดใหญ่ของโปรตีนจะถูกตัดพันธะเพปไทด์ที่เชื่อมระหว่างกรดอะมิโนแต่ละหน่วยให้มีขนาดเล็กลง (Zhang และคณะ, 2014) เอนไซม์ที่สามารถใช้ในการย่อยโปรตีนให้ได้เป็นเพปไทด์แสดงดังตารางที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างโมเลกุลของเพปไทด์

ที่มา : https://www.researchgate.net/figure/A-general-formula-of-a-peptide-molecule-This-representation-shows-at-least-one-peptide_fig2_274401382 ข้อมูลวันที่ 18 เมษายน 2565

ตารางที่ 2.1 ชนิดและสภาวะที่เหมาะสมในการใช้งานเอนไซม์ย่อยโปรตีน

เอนไซม์	สภาวะ	อ้างอิง
Alcalase/Subtilisin A	pH 8.5 ที่อุณหภูมิ 55°C	Phongthai และคณะ, 2016
Actinase E	pH 8.0 ที่อุณหภูมิ 37°C	Phongthai และคณะ, 2016
Neutrase	pH 7.0 ที่อุณหภูมิ 45°C	Phongthai และคณะ, 2016
Pepsin	pH 2.0 ที่อุณหภูมิ 37°C	Chanput และคณะ, 2009
Trypsin	pH 7.0 ที่อุณหภูมิ 37°C	Chanput และคณะ, 2009
Protamex	pH 6.5 ที่อุณหภูมิ 50°C	Venuste และคณะ, 2013

เปปไทด์ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์จะมีฤทธิ์ทางชีวภาพ (Biological activity) โดยที่ประสิทธิภาพของการออกฤทธิ์ทางชีวภาพนั้นจะแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับลำดับของกรดอะมิโน และความยาวของสาย ฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ การต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) การยับยั้งจุลินทรีย์ (Antimicrobial) เป็นต้น (Park และคณะ, 2017) และปัจจัยสำคัญอีกประการหนึ่งที่มีผลทำให้เปปไทด์มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี คือ น้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์ เปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะมีฤทธิ์ทางชีวภาพดีกว่าเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (Jiang และคณะ, 2014) อีกทั้งมีงานวิจัยรายงานว่าเปปไทด์บางชนิดมีฤทธิ์ทางชีวภาพมากกว่าหนึ่งอย่าง (Piyadhamviboon และคณะ, 2012)

2.1.1 เปปไทด์สังเคราะห์ (Synthetic peptide)

เปปไทด์สังเคราะห์ถูกนำมาใช้ในการศึกษาวิจัยอย่างกว้างขวาง เปปไทด์อาจมีโครงสร้างเป็นโซ่ตรง โครงสร้างเป็นกิ่ง หรืออยู่ในรูปที่เป็นวงก็ได้ เปปไทด์สังเคราะห์ถูกสร้างขึ้นมาได้โดยสามารถทำได้ 2 แบบคือ การสังเคราะห์ในลักษณะสารละลาย หรือ solution-phase และการสังเคราะห์วิธี solid-phase การสังเคราะห์เปปไทด์ในสารละลายเป็นวิธีการสังเคราะห์แบบดั้งเดิม การสังเคราะห์วิธีนี้จะได้สารประกอบเปปไทด์ปริมาณมาก หรืออาจใช้วิธีการสังเคราะห์นี้ในกรณีที่จะต่อเชื่อมกรดอะมิโนชนิดที่ไม่ธรรมดา แต่การสังเคราะห์ด้วยวิธีนี้มีข้อเสียคือ การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างพันธะเปปไทด์เพื่อให้ปฏิกิริยาดำเนินไปแล้วให้เปอร์เซ็นต์ปริมาณของผลิตภัณฑ์สูง นอกจากนี้ความจำเป็นในการทำสารตัวกลาง (intermediate) ให้บริสุทธิ์ก่อนที่จะทำปฏิกิริยาในขั้นต่อไป ก็เป็นความไม่สะดวกของการสังเคราะห์ด้วยวิธีนี้ ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาการสังเคราะห์แบบ solid-phase (SPPS : Solid-Phase Peptide Synthesis) ขึ้นมาในปี 1963 โดย R.B. Merrifield เป็นผู้คิดค้นและริเริ่ม ต่อมาได้มีการพัฒนา

และดัดแปลงวิธีการสังเคราะห์แบบ SPSS จนในปัจจุบันนับได้ว่าเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว อีกทั้งยังสามารถใช้ในการสังเคราะห์สารประกอบเปปไทด์ที่มีโครงสร้างซับซ้อนได้

หลักการในการสังเคราะห์ด้วยวิธี solid-phase peptide synthesis คือการสร้างเปปไทด์บนเรซิน ซึ่งเป็นสารประกอบพอลิเมอร์ ทำให้รีเอเจนต์ส่วนที่เติมเกินมาสามารถถูกกำจัดออกได้ เพียงแค่การกรองและล้างเรซินที่มีเปปไทด์เกาะอยู่เท่านั้น ขั้นตอนในการสังเคราะห์เปปไทด์ก็ไม่ยุ่งยาก โดยเริ่มจากการทำปฏิกิริยาระหว่างกรดอะมิโนตัวแรกกับหมู่เชื่อมที่ยื่นมาจากเรซินเพื่อสร้างพันธะโคเวเลนต์ หลังจากนั้นก็จะเป็นการสร้างพันธะเปปไทด์เชื่อมต่อกับกรดอะมิโนตัวต่อ ๆ มา ในการเพิ่มกรดอะมิโนลงไปในสายเปปไทด์นั้นจะเริ่มจากปลายด้านหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl group, $-COOH$) ไปยังปลายด้านหมู่อะมิโน (amino group, $-NH_2$) และได้มีการพิสูจน์แล้วว่า การสังเคราะห์ตามลำดับขั้นตอนดังกล่าวนี้จะทำให้เกิด racemization น้อยกว่าการสังเคราะห์ที่เริ่มจากปลายของหมู่อะมิโน ลำดับขั้นตอนการสังเคราะห์เปปไทด์ประกอบด้วย

- 1) การเชื่อมกรดอะมิโนตัวแรกกับเรซิน หรือ solid support
- 2) หมู่ปกป้องชั่วคราวของหมู่อะมิโนของกรดอะมิโนตัวแรกจะถูกกำจัดออก เพื่อให้ได้หมู่อะมิโนอิสระ (free amino) ที่สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโนตัวถัดไปได้
- 3) การสร้างพันธะเปปไทด์เชื่อมต่อกับกรดอะมิโนตัวใหม่ หมุนเวียนกันเป็นลำดับขั้นตอนตามข้อ 2-3 ไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งได้สายเปปไทด์ตามที่ต้องการ
- 4) เปปไทด์ที่ได้จะถูกทำให้หลุดออกมาจากเรซินโดยใช้ cleaving reagents ซึ่งในขั้นตอนนี้จะกำจัดหมู่ปกป้องของ side-chains ทั้งหมดออกไปในคราวเดียวกันด้วย

การเลือกใช้หมู่ปกป้อง (protecting group) มีส่วนสำคัญในการสังเคราะห์เปปไทด์ ซึ่งในการสังเคราะห์เปปไทด์นิยมแบ่งหมู่ปกป้องออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ หมู่ปกป้องของหมู่อะมิโนในตำแหน่งแอลฟาไนโตรเจนซึ่งเรียกว่าหมู่ปกป้องชั่วคราว (temporary protecting group) ซึ่งจะต้องกำจัดออกทุกครั้งเพื่อสร้างพันธะเปปไทด์กับกรดอะมิโนตัวถัดไป และหมู่ปกป้องของ side chain ที่เรียกว่าหมู่ปกป้องถาวร (permanent protecting group) ซึ่งจะถูกกำจัดออกในขั้นตอนสุดท้ายพร้อมกันกับการทำให้เปปไทด์หลุดออกจากเรซิน (Schmolzer และคณะ, 1992; Coin และคณะ, 2007)

หมู่ปกป้องอะมิโนในตำแหน่งแอลฟาไนโตรเจน ยังสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ระบบ ได้แก่ การใช้หมู่ปกป้อง tert-butyloxycarbonyl (Boc) และการใช้หมู่ปกป้อง 9-fluorenyl methyloxy carbonyl (FMoc) สำหรับระบบแรกที่ใช้หมู่ปกป้อง Boc- นั้น เรียกอีกอย่างว่า standard Merrifield system หมู่ Boc- นี้มีความเสถียรในตัวทำละลายที่เป็นเบส และสามารถกำจัดออกได้อย่างรวดเร็วในสารละลายกรด

แก่ เช่น trifluoroacetic acid (TFA) หมูปกป้องของหมู่อะมิโน side chain สำหรับการสังเคราะห์ในระบบนี้จะใช้เป็นอนุพันธ์หมู่เอสเทอร์ อีเทอร์ และยูรีเทน ของ benzyl alcohol ซึ่งสามารถกำจัดออกได้โดยใช้ anhydrous hydrogen fluoride (HF) ที่ 0°C หรือ trifluoromethanesulfonic acid (TFMSA) ที่ 25°C

อีกระบบคือ การใช้หมู่ 9-fluorenylmethyloxycarbonyl (FMoc) การสังเคราะห์ในระบบนี้จะใช้สภาวะที่ไม่รุนแรง และเป็นระบบที่นิยมใช้กันมากในปัจจุบัน ซึ่งจะมีความเสถียรในสภาวะที่เป็นกรด และสามารถถูกกำจัดออกได้โดยใช้สารละลาย piperidine สำหรับหมูปกป้อง side chains จะถูกใช้เป็นอนุพันธ์เอสเทอร์ อีเทอร์ และยูรีเทน ของ tert-butanol ซึ่งสามารถกำจัดออกได้พร้อมกันกับปฏิกิริยาการทำให้เพปไทด์หลุดออกจากเรซิน โดยใช้ TFA และเพื่อเป็นการป้องกันไม่ให้คาร์โบแคทไอออน (carbocation) ที่มีความไวต่อปฏิกิริยาซึ่งจะเกิดขึ้นเมื่อหมูปกป้องหลุดออกมาจาก side chain ทำปฏิกิริยากับเพปไทด์ที่ไม่มีหมูปกป้อง จึงต้องมีการใส่สารตัวจับไอออนเหล่านี้ที่เรียกว่า scavengers ลงไปด้วย (Pedersen และคณะ, 2012 และ El-Faham)

2.1.2 ฤทธิ์ทางชีวภาพของเพปไทด์ (Bioactive peptide)

การออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเพปไทด์ขึ้นอยู่กับโครงสร้างปฐมภูมิและขนาดของเพปไทด์ซึ่งมีผลมาจากโครงสร้างปฐมภูมิของโปรตีน ฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านการต้านอนุมูลอิสระ เป็นผลมาจากกลไกการทำงานหลายรูปแบบ โดยกรดอะมิโนที่มีความสำคัญต่อการขจัดอนุมูลอิสระมีหมู่ฟังก์ชันที่สามารถให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระได้ เช่น หมู่ฟีนอลิกในไทโรซีน หมู่อินโดลในทริปโตเฟน หมู่ไทออลในซิสทีน และหมู่อิมิดาโซลในฮิสติดีน และกรดอะมิโน ลิวซีน วาลีน และโพรลีน ก็มีส่วนสำคัญต่อการทำลายอนุมูลอิสระเช่นเดียวกัน

เพปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระบางชนิดมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการจับกับโลหะไอออน เนื่องจากไอออนของโลหะ เช่น ทองแดงและเหล็ก มีความไวต่อปฏิกิริยาสูง เป็นเหตุให้เกิด reactive oxygen species ขึ้นในระบบ ถ้าเพปไทด์มีความสามารถในการเข้าจับกับไอออนของโลหะได้ดีจะช่วยลดการสร้างอนุมูลอิสระได้ (Shahidi and Zhong, 2008)

ปัจจุบันมีเพปไทด์หลายชนิดที่มีฤทธิ์ในการลดความดันโลหิตโดยทำการทดสอบจากความสามารถในการยับยั้งการทำงานของ angiotensin-converting enzyme (ACE) โดยเอนไซม์นี้ทำหน้าที่เปลี่ยนโมเลกุลของ angiotensin I ให้เป็น angiotensin II มีผลให้หลอดเลือดหดตัว ทำให้การยับยั้งการทำงานของ ACE จึงส่งผลดีต่อการลดความดันโลหิต เพปไทด์ที่เป็น ACE inhibitor มีลำดับกรดอะมิโนที่หลากหลาย แต่มีความคล้ายกันคือการที่กรดอะมิโนไฮโดรโฟบิกอยู่ที่ปลาย C-terminus

และอีกกรณีหนึ่งคือ อาร์จินีน ไลซีน หรือโพรลีน อยู่ที่ปลาย C-terminus โดยสมมติฐานของกลไกการยับยั้งการทำงานของ ACE คือเอนไซม์นี้มี catalytic site สองแห่ง เพปไทด์ที่ไฮโดรโฟบิกทำหน้าที่แย่งจับกับสารตั้งต้น C-terminal catalytic site (Hong และคณะ, 2008)

เพปไทด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลชีพ ทั้งแบคทีเรีย รา และไวรัส เพปไทด์เหล่านี้มีคุณสมบัติร่วมโดยมีกรดอะมิโนที่เป็นไฮโดรโฟบิกมากกว่าร้อยละ 50 ของกรดอะมิโนทั้งหมด มีส่วนที่มีประจุบวกจากไลซีน และอาร์จินีน และมีคุณสมบัติ amphipathic โดยส่วนมากมีกลไกการทำงานที่เกี่ยวข้องกับการทำลายผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลชีพ (Shahidi and Zhong, 2008)

เพปไทด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง กลไกการทำงานของเพปไทด์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง จำแนกได้เป็นสองประเภทคือ

- 1) การทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์มะเร็งผ่านการเกิด micelle หรือการเกิดรูพรุน
- 2) การเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ผ่านวิธีการส่งสัญญาณภายในเซลล์

ตัวแปรที่มีผลต่อฤทธิ์ต้านมะเร็งของเพปไทด์ คือความเป็นไฮโดรโฟบิก ประจุรวม ความเป็นแอมฟิพาธิค ลักษณะโครงสร้างทุติยภูมิในเยื่อหุ้มเซลล์ และความสามารถในการเกิดโอลิโกเมอร์เซชัน (Huang และคณะ, 2011)

2.2 ผิวหนัง (Skin)

ผิวหนังเป็นระบบปกคลุมร่างกายที่อยู่ชั้นนอกสุดในการป้องกันอันตรายต่างๆ ที่จะเกิดขึ้นกับร่างกาย ระบบผิวหนังประกอบด้วย ผม ขน เล็บ ต่อมไขมัน และต่อมเหงื่อ การที่ผิวหนังแต่ละส่วนจะทำหน้าที่ได้อย่างสมบูรณ์จำเป็นต้องมีโครงสร้างแต่ละส่วนที่แข็งแรง ทำงานประสานกันอย่างมีประสิทธิภาพ ผิวหนังมีโครงสร้างที่สำคัญต่างๆ ดังนี้

2.2.1 ชั้นหนังกำพร้า (Epidermis)

ชั้นหนังกำพร้า เป็นชั้นของเซลล์ที่ตายแล้ว และชั้นหนังกำพร้าที่ยังมีชีวิตอยู่ ผิวชั้นซีไคเป็นชั้นนอกสุดของผิวหนังกำพร้า ลักษณะเป็นเซลล์แบบมีสี่เหลี่ยมเรียงกันกับผิว ไม่มีนิวเคลียส ไม่มีกระบวนการเมแทบอลิซึม มีปริมาณความชื้นต่ำ มีส่วนประกอบหลักคือ เคราติน และไขมัน มีความหนาประมาณ 10-20 μL โดยความหนาจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับความถี่ในการสัมผัสสิ่งแวดล้อม ผิวชั้นนี้จะมีการ

ผลัดเปลี่ยนทุก 2-3 สัปดาห์ มีหน้าที่เป็นตัวกีดกันอันตรายให้กับร่างกายป้องกันการสูญเสียน้ำให้กับร่างกาย และป้องกันสิ่งแปลกปลอมจากภายนอก

2.2.2 ชั้นหนังแท้ (Dermis)

เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของร่างกาย ประกอบด้วยระบบเส้นเลือดฝอย ระบบประสาทรับความรู้สึกและระบบน้ำเหลือง ผิวหนังชั้นหนังแท้จึงมีหน้าที่เป็นแหล่งสารอาหารแก่ผิวหนัง ควบคุมอุณหภูมิของร่างกาย และตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกัน ประกอบด้วยเส้นใยคอลลาเจน ช่วยในการค้ำจุนโครงสร้าง และรองรับแรงจากภายนอก และเยื่อเกี่ยวพันอีลาสติก ช่วยให้ความยืดหยุ่น ในชั้นหนังแท้จะมีเซลล์อยู่น้อยเมื่อเทียบกับเซลล์ชั้นหนังกำพร้า เซลล์ที่สำคัญได้แก่ เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และเซลล์สร้างสีผิว (melanocyte) ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเม็ดสีผิว (melanin)

2.2.3 ชั้นใต้ผิวหนัง (Subcutaneoustissue, hypodermis)

เป็นชั้นไขมันใต้ผิวหนังซึ่งเป็นชั้นที่อยู่ลึกและมีความหนามากที่สุด มีหน้าที่ควบคุมความร้อนและเก็บพลังงาน ปกป้องร่างกายจากแรงกระแทก ประกอบด้วยเซลล์ไฟโบรบลาสต์ เซลล์อะดิโพไซต์ เส้นประสาท หลอดเลือดเซลล์แมโครฟาจ เป็นต้น (Oh และคณะ, 2014)

2.3 เมลานิน และสีผิว (Melanin and Skin color)

เมลานิน (melanin) เป็นรงควัตถุที่ทำให้ปรากฏลักษณะของสีผิว สีเส้นผม และสีนัยน์ตา เมลานินถูกสร้างขึ้นในเซลล์เมลานोไซท์ (melanocyte) ของมนุษย์ โดยจะถูกส่งไปเก็บยังเซลล์เคราติโนไซท์ (keratinocyte) ที่กระจายอยู่ทั่วไปตามผิวหนัง มีหน้าที่ดูดกลืนแสงซึ่งเป็นกระบวนการตอบสนองของร่างกายเมื่อได้รับแสงหรือสิ่งเร้าบางอย่างที่มากเกินไป เมลานินแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ ยูเมลานิน (eumelanin) และฟีโอเมลานิน (pheomelanin) เมลานินทั้งสองชนิดนี้จะผสมกันอยู่ในปริมาณที่แตกต่างกันไปตามแต่ละส่วนของอวัยวะต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับพันธุกรรมหรือเชื้อชาติของแต่ละบุคคล ยูเมลานินจะแสดงบทบาทของสีผิวที่มีลักษณะสีน้ำตาล-ดำ สำหรับฟีโอเมลานินจะแสดงบทบาทของสีผิวออกมาในลักษณะของสีชมพู-แดง จากสาเหตุนี้จึงทำให้อวัยวะต่างๆ เช่น ผิวหนังซึ่งมีสีน้ำตาล-เหลือง เพราะบริเวณผิวหนังมีปริมาณของยูเมลานินมากกว่าฟีโอเมลานิน ทำให้ลักษณะสีของผิวหนังมีสีน้ำตาล แตกต่างจากบริเวณริมฝีปากที่มีสีชมพู-แดง เนื่องจากที่บริเวณริมฝีปากมีปริมาณฟีโอเมลานินมากกว่ายูเมลานิน (Prota, 1980)

เมลานินมีหน้าที่ช่องกรองแสงอัลตราไวโอเล็ตจากแสงแดดและช่วยกระจายแสง เช่น แสงที่มีความยาวคลื่นสั้น (แสงสีม่วงฟ้า) เมื่อแสงนี้กระทบผิวหนังจะถูกหักเหออกไป แต่ถ้ามีปริมาณเมลานินมากเกินไปจะทำให้เกิดความผิดปกติของสีผิว (Pillaiyar และคณะ, 2017) ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างเมลานิน ได้แก่ รังสียูวี และพันธุกรรม สำหรับรังสียูวีมีผลต่อการสร้างเมลานิน 2 วิธีคือ

1) รังสียูวีจะกระตุ้นเซลล์เมลานोไซต์โดยตรง มีผลให้เอนไซม์ไทโรซิเนสถูกกระตุ้นให้ทำงานมากขึ้นและสร้างเม็ดสีเมลานิน ยังมีจำนวนเม็ดสีเมลานินมากยิ่งขึ้นทำให้มีสีผิวเข้มขึ้น

2) รังสียูวีจะไปกระตุ้นเซลล์เคราติโนไซต์ก่อให้เกิดการควบคุมการส่งสัญญาณแบบพาราไครน์ (paracrine regulation process) ทำให้เซลล์เคราติโนไซต์หลั่งสารหลายชนิดออกมา ได้แก่ โพรสตาแกลนดิน อี2 (Prostaglandin E₂) หรือ PGE₂, ฮอร์โมนเมลานोไซต์สติมูลิง (α -melanocyte stimulating hormone) หรือ α -MSH ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่หลั่งมาจากต่อมใต้สมองส่วนกลางสร้างมาจากเซลล์เมลานोไซต์ ฮอร์โมนนี้จะไปกระตุ้นการสร้างเมลานินผ่าน cyclic AMP (cAMP) ซึ่งไปกระตุ้นให้โปรตีนไคเนส เอ (protein kinase A) เร่งปฏิกิริยาฟอสโฟริเลชัน ส่งผลให้ยีน microphthalmia associated transcription factor (mitf gene) ซึ่งเป็นหน่วยพันธุกรรมที่ควบคุมเซลล์เมลานोไซต์ให้ทำงาน ทำให้มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ สร้างเมลานิน และควบคุมวงจรชีวิตของเซลล์ รวมถึงควบคุมการจำลองแบบดีเอ็นเอของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างเมลานิน ได้แก่ ไโรซิเนส, TRP-1 และ TRP-2 เป็นต้น นอกจากนี้เซลล์เมลานोไซต์จัดเป็น phagocytic cell ที่ตอบสนองต่อกระบวนการอักเสบที่ผิวหนัง กระตุ้นการหลั่งไซโตไคน์ interleukin-1 มีผลกระตุ้น MSH receptor ทำให้มีการสร้างเมลานินมากขึ้น เช่นเดียวกัน ACTH สามารถมีผลไปกระตุ้นในไตรโกอิกไซต์โดยไปเร่งการทำงานของ α -MSH (D'Mello และคณะ, 2016; Slominski และคณะ, 2012)

สีผิวของมนุษย์มีต้นกำเนิดมาจากชั้นนอกสุดของผิวหนังซึ่งมีเซลล์ที่ผลิตเม็ดสีเมลานินตั้งอยู่หรือที่เรียกว่าเซลล์เมลานोไซต์ (melanocyte cell) รูปแบบการกระจายของการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินโดยเซลล์เมลานोไซต์เป็นตัวกำหนดสีผิวที่แท้จริง เม็ดสีเมลานินมีบทบาทสำคัญในการดูดซับอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในไซโตพลาสซึมรวมถึงแสงอัลตราไวโอเล็ต เม็ดสีเมลานินถูกสร้างจากกระบวนการเมลานิเจเนซิส (melanogenesis) ในออร์แกเนลล์ที่ชื่อว่า เมลาโนโซม (melanosome) ที่อยู่ในเซลล์เมลานोไซต์ กระบวนการเมลานิเจเนซิส ซึ่งมีเมลานินสองชนิดที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นภายในเมลาโนโซมได้แก่ ยูเมลานิน (eumelanin) และฟีโอเมลานิน (pheomelanin) โดยขั้นแรกในการสังเคราะห์เมลานินเริ่มจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดอะมิโนไทโรซีน (tyrosine) เปลี่ยนไปเป็นโดปาคิวโนน (dopaquinone) ซึ่งถูกเร่งด้วยเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยขั้นแรกนี้เป็นขั้นกำหนดปฏิกิริยา (rate limiting step) ในการสังเคราะห์เม็ดสี

เมลานิน หลังจากโดปาคิวโนนถูกสร้างขึ้นโดยไทโรซิเนสจะถูกเปลี่ยนเป็นแอล-โดปา และโดปาโครม (dopachrome) ด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชัน (auto-oxidation) โดปาเป็นสารตั้งต้น (substrate) ของไทโรซิเนสและถูกออกซิไดส์ไปเป็นโดปาคิวโนน (dopaquinone) อีกครั้งโดยไทโรซิเนส ในท้ายที่สุดเมลานินถูกสร้างด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องจากไดไฮดรอกซีอินโดล (dihydroxyindole; DHI) และ ไดไฮดรอกซีอินโดล-2-คาร์บอกซิลิกแอซิด (dihydroxyindole-2-carboxylic acid; DHICA) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากโดปาโครม เมื่อมีซิสเทอีน (cysteine) หรือกลูตาไธโอน (glutathione) โดปาคิวโนนจะถูกเปลี่ยนเป็นซิสเทนิลโดปา (cysteinyl-dopa) หรือกลูตาไธโอนิลโดปา (glutathionyl-dopa) แล้วสร้างเป็นฟีโอเมลานินตามลำดับ ถึงแม้ว่าจะมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับวิธีการสร้างเม็ดสีเมลานินถึงสามเอนไซม์ได้แก่ ไทโรซิเนส ไทโรซิเนสรีเลทโปรตีน 1 และ 2 (tyrosinase-related protein 1, 2; TRP1, TRP2) แต่มีแค่ไทโรซิเนสเท่านั้นที่จำเป็นอย่างยิ่งในกระบวนการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินเนื่องจากเป็นเอนไซม์หลักในกระบวนการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน (Chang, 2012)

2.3.1 กระบวนการสร้างและควบคุมเม็ดสีเมลานิน

กระบวนการสร้างเม็ดสีที่เกิดขึ้นที่ผิวหนัง นอกจากขึ้นอยู่กับจำนวนและขนาดของเซลล์เมลานโนไซต์แล้ว ยังขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของเม็ดสีภายในเซลล์และการกระจายของเซลล์เมลานโนไซต์ โดยเมลานโนไซต์นี้จะทำหน้าที่สร้างเม็ดสีเมลานินเก็บไว้ในเมลานโนโซมแล้วส่งต่อไปยังเคราติโนไซต์ที่ชั้นล่างสุดของเอพิดอร์มิสหรือชั้นหนังกำพร้า กระบวนการสร้างเมลานินเกิดจากแสงแดดหรือรังสียูวีเป็นตัวกระตุ้นทำให้ไฟโบรบลาสต์หลั่งสารต่างๆ ออกมา ได้แก่ ไซโตไคน์ (cytokines), โกรทแฟกเตอร์ (growth factors), สารที่ก่อให้เกิดการอักเสบ (inflammatory factors) รวมถึงการกระตุ้นให้เซลล์เมลานโนไซต์สร้างไนตริกออกไซด์มากขึ้น ก่อให้เกิดการสร้างเม็ดสีเมลานินโดยการส่งสัญญาณภายในเซลล์ต่อกันเป็นทอดๆ ผ่านเอนไซม์ไทโรซิเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มออกซิเดสที่มีคอปเปอร์เป็นองค์ประกอบภายในโครงสร้างของโปรตีนที่บริเวณเร่ง และทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ดังกล่าว เอนไซม์ไทโรซิเนสสังเคราะห์มาจากไรโบโซมที่พบบนเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมชนิดหยาบ เมื่อสังเคราะห์ได้เมลานินจะส่งไปกักเก็บไว้ในเมลานโนโซมซึ่งมีลักษณะเป็นถุง (Pillaiyar และคณะ, 2017; Niu และ Aisa, 2017)

2.3.2 ชีวิตสังเคราะห์ของเมลานิน

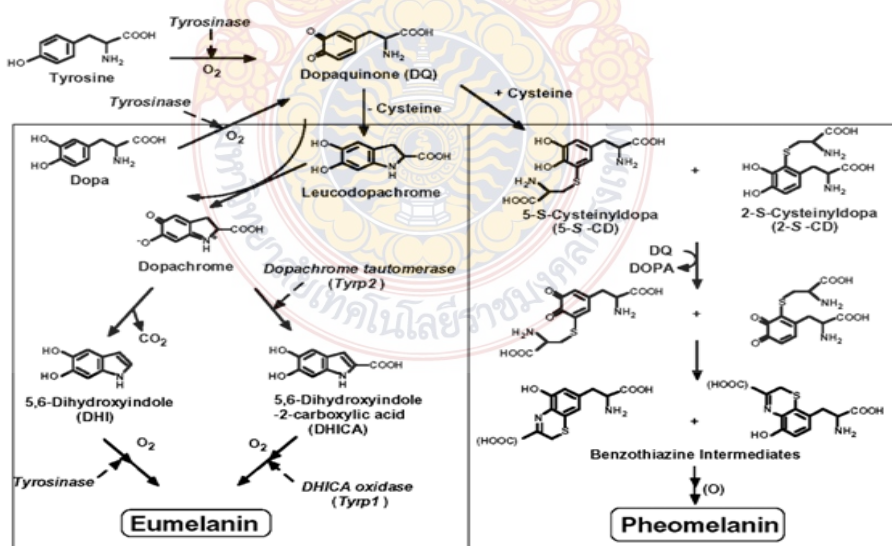
เอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์ที่พบในเซลล์เมลานโนไซต์ ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีอยู่ประมาณ 2-5% ของปริมาณเซลล์ผิวหนังทั้งหมด โดยเซลล์เมลานโนไซต์มีความจำเป็นต่อกระบวนการสร้างเมลานินเพื่อส่งให้แก่เซลล์เคราติโนไซต์ วิธีการสังเคราะห์เมลานินมีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 เอนไซม์ไทโรซิเนสเร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันเปลี่ยนแอล-ไทโรซีน (L-tyrosine) ไปเป็น 3,4 ไดไฮดรอกซีฟีนิลอะลานีน หรือแอล-โดปา (3,4-dihydroxyphenylalanine, L-DOPA)

ขั้นตอนที่ 2 แอล-โดปา (L-DOPA) ถูกออกซิไดซ์ไปเป็นโดปาคิวโนน (DOP Aquinone) จากนั้นจึงสังเคราะห์ต่อเป็นเมลานินซึ่งมีด้วยกันสองชนิด ได้แก่ ยูเมลานิน และฟีโอเมลานิน ทั้งนี้เม็ดสีเมลานินทั้งสองชนิดมีวิธีการสังเคราะห์ที่แตกต่างกัน โดยการสังเคราะห์ยูเมลานินซึ่งเป็นเม็ดสีเมลานินสีน้ำตาลหรือสีคล้ำจะอาศัยโปรตีนที่เรียกว่า tyrosinase-related protein 1 (TRP-1) และเอนไซม์ DOPachrome tautomerase (DCT หรือ TRP-2) ส่วนอีกวิธีหนึ่งจะอาศัยการคอนจูเกตกันระหว่างโดปาคิวโนนกับซิสเตอีน หรือกลูตาไธโอน เพื่อสังเคราะห์เป็นฟีโอเมลานินซึ่งเป็นเมลานินที่มีสีเหลือง

ขั้นตอนที่ 3 เม็ดสีเมลานินเหล่านี้จะถูกขนส่งไปเก็บไว้ยังเมลานโซม จากนั้นจะถูกขนส่งไปตามเดนไดรต์ เพื่อส่งเม็ดสีเหล่านี้ไปที่เคราติโนไซต์ซึ่งอยู่ใต้ชั้นผิวหนัง โดยปกติผิวหนังของคนเราจะมีรอบในการผลิตเซลล์ผิวประมาณ 28-39 วัน จากนั้นจะเกิดการสร้างเซลล์ผิวหนังขึ้นมาใหม่ เพื่อให้เกิดความกระจ่างใสของผิว หากไม่เป็นไปตามรอบนั้นจะทำให้เกิดความหมองคล้ำขึ้น (Pillaiyar และคณะ, 2017) ภาพแสดงกระบวนการชีวสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินดังแสดงในภาพที่ 2.2

ปัจจุบันมีการนำความรู้เกี่ยวกับกระบวนการชีวสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินมาประยุกต์ใช้ในเครื่องสำอาง โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางสำหรับทำให้ผิวขาวขึ้น ลบเลือนฝ้า กระ จุดต่างดำ



ภาพที่ 2.2 กระบวนการชีวสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน

ที่มา : <https://thaihealthlife.com/เมลานิน/> ข้อมูลวันที่ 21 เมษายน 2565

2.4 เอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase)

เอนไซม์ไทโรซิเนส เป็นเอนไซม์สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์เมลานิน ไทโรซิเนสมีขนาดประมาณ 60-70 กิโลดาลตัน ภายในโครงสร้างประกอบด้วยคอปเปอร์ เอนไซม์ไทโรซิเนสพบได้ทั่วไปในธรรมชาติทั้งในพืช เชื้อรา แมลง และสัตว์ ในคนพบเอนไซม์ไทโรซิเนสในเมลานโซม (melanosome) ซึ่งเป็นโครงสร้างสีน้ำตาลที่สร้างขึ้นโดยเซลล์เมลานोไซต์บริเวณชั้นล่างสุดของหนังกำพร้า ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเติมหมู่ไฮดรอกซีให้กับไทโรซีนซึ่งเป็นกรดอะมิโนในร่างกายเพื่อสังเคราะห์เป็น L-DOPA และเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันเปลี่ยน L-DOPA เป็น o-quinone Dopakinone จากการศึกษากลไกการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้โดยจับกับสารที่เป็น active site ของเอนไซม์ คือส่วนที่เป็น Cu^{2+} ซึ่งจะขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ จะเป็นสารประกอบพวก aromatic acid, aromatic aldehyde, tropolone, kojic acid และ salicylic acid โดยโครงสร้างที่มีความเป็น hydrophobic จะสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดี (Bae-Harboe และPark, 2012)

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปี ค.ศ. 2008 Momtaz และคณะ ได้ทำการสกัดพืชด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ในแอฟริกาใต้ 8 ชนิด ซึ่งเป็นพืชที่มีสารประกอบฟีนอลและไตรฟีนอลอยู่จำนวนมากและเป็นพืชที่ใช้อยู่ในทางการแพทย์ มาศึกษากิจกรรมยับยั้งไทโรซิเนสพบว่า *Hyaenanche globosa* Lamb. และ *Myrsine Africana* L. มีค่ายับยั้งมากกว่า 80% และมีความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถ ยับยั้งกิจกรรมไทโรซิเนสได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) เท่ากับ 27.1 และ 22.51 $\mu\text{g/ml}$

ในปี ค.ศ. 2009 Guo และคณะ ได้ทำการย่อยโปรตีนที่มีฤทธิ์จัดอนุมูลอิสระจากนมผงด้วยเอนไซม์ โปรติเอส นำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ ทำการแยกขนาดโปรตีนด้วยเทคนิค อัลตราฟิลเตรชัน พบว่ากรดอะมิโนที่สำคัญมี 12 สายด้วยกัน คือ อะลานีน-ลิวซีน (Ala-Leu) ฟีนิลอะลานีน-ไลซีน (Phe-Lys) ฟีนิลอะลานีน-อาร์จินีน (Phe-Arg) ไอโซลิวซีน-อาร์จินีน (Ile-Arg) ไลซีน-ฟีนิลอะลานีน (Lys-Phe) ไลซีน-ลิวซีน (Lys-Leu) ไลซีน-ไทโรซีน (Lys-Tyr) อาร์จินีน-ไทโรซีน (Arg-Tyr) ไทโรซีน-กรดแอสปาร์ติก (Tyr-Asp) ไทโรซีน-ไทโรซีน (Tyr-Tyr) ลิวซีน-แอสพาราจีน-อาร์จินีน (Leu-Asp-Arg) และไลซีน-แอสพาราจีน-ไทโรซีน-โปรลีน (Lys-Asn-Tyr- Pro)

ในปี ค.ศ. 2010 Chiari และคณะ ได้ทำการสกัดพืชท้องถิ่นในตอนกลางของประเทศอาร์เจนตินาจำนวน 91 ชนิดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ และศึกษากิจกรรมการยับยั้งไทโรซิเนส ได้สารสำคัญคือ (Z,Z)-5-(trideca-4,7-dienyl)-resorcinol มีความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งกิจกรรมไทโรซิเนสได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) เท่ากับ 0.49 $\mu\text{g/ml}$

ในปี ค.ศ. 2010 Zheng และคณะ ได้ทำการสกัดสารจากรากของต้นหม่อน (*Morus nigra*) ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ และศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสได้สารสำคัญ 9 ชนิดที่มีค่าการยับยั้งการทำงานของไทโรซิเนสได้ดีคือ (1) 5'-geranyl-5,7,2',4'-tetrahydroxyflavone (2) steppogenin-7-O- β -D-glucoside (3) 2,4,2',4'-tetrahydroxychalcone (4) kuwanon H (5) morachalcone A (6) moracin N (7) mulberrofuran G (8) oxyresveratrol-2-O- β -D-glucopyranoside (9) oxyresveratrol -3'-O- β -D-glucopyranoside โดยพบว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งไทโรซิเนสได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) เท่ากับ 37.09, 5.99, 0.062, 10.34, 0.14, 30.52, 17.53, 29.75 และ 1.64 μM ตามลำดับ

ในปี ค.ศ. 2011 Zheng และคณะ ได้สกัดสารจากลำต้นของแกแล (*Cudrania cochinchinensis*) แยกองค์ประกอบทางเคมีและศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนส พบว่ามีสารประกอบ 3 ชนิดที่มีค่าการยับยั้งการทำงานของไทโรซิเนสได้ดีคือ ($\pm$)2,3-cis-dihydromorin 2,3-trans-dihydromorin และ oxyresveratrol พบว่ามีค่า IC_{50} เท่ากับ 31.1, 21.1 และ 2.33 μM ตามลำดับ

ในปี ค.ศ. 2012 Liang และคณะ ได้ทำการสกัดจากรากห่วยาข้าวเย็นด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ และศึกษากิจกรรมการยับยั้งไทโรซิเนส ได้สารสำคัญคือ Dioscin และ Oxyresveratrol มีความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งกิจกรรมไทโรซิเนสได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) มากกว่า 100 และ 7.8 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เพปไทด์สังเคราะห์

เพปไทด์สังเคราะห์จำนวน 3 ตัวอย่าง ได้แก่ S_1 , S_2 และ S_3 ที่ย่อยได้จากเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus* sp. VDW ที่ได้จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ (Rutairat และคณะ, 2019) ถูกผลิตขึ้นมาจากเครื่องสังเคราะห์เพปไทด์ (model ABI 433 A; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) และนำไปวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของเพปไทด์สังเคราะห์ด้วยเครื่องแมสสเปกโตรเมทรี (model FinniganTM LXQTM; Thermo Fisher Scientific Inc.) ก่อนนำมาทำงานวิจัย

3.2 การตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนส

โดยการนำเพปไทด์สังเคราะห์จำนวนทั้ง 3 ตัวอย่าง ปริมาตร 35 μ l ผสมกับสารละลายไทโรซิเนส (333 U/mL ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 mM ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.5) ปริมาตร 15 μ l บ่มเป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เติมสารละลายตั้งต้นกรดอะมิโนไทโรซีน หรือแอล-3,4-ไดไฮดรอกซีฟีนิลอะลานีน ความเข้มข้น 12 mM ปริมาตร 55 μ l บ่มเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 37°C วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 nm คำนวณหาร้อยละการยับยั้งไทโรซิเนส โดยคำนวณเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งไทโรซิเนสได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) โดยมีสารละลายอาร์บูติน เป็นสารละลายยับยั้งมาตรฐาน (Batubara, 2010)

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งไทโรซิเนสคำนวณจากสมการ

$$\frac{[(Abs_{control} - Abs_{blank}) - (Abs_{sample} - Abs_{background})]}{(Abs_{control} - Abs_{blank})} \times 100$$

$Abs_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุม (ไม่มีตัวอย่าง)

Abs_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

$Abs_{background}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ใช้ละลายตัวอย่าง

Abs_{blank} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำกลั่น

การคำนวณค่า IC_{50} โดยใช้โปรแกรม GraphPad Crystal v.6.01 (GraphPad Program Inc., San Diego, CA)

3.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งผิวหนังของหนู (B16F10)

เซลล์ line ของเซลล์มะเร็งของหนู B16F10 ถูกเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) ที่ประกอบด้วย $NaHCO_3$ ปริมาณ 3.7 g/l, D-glucose ปริมาณ 4.5 g/l, glutamine, Na-pyruvate และ 10% fetal bovine serum บ่มที่อุณหภูมิ $37^{\circ}C$ ในสภาวะที่มี 5% CO_2 ทำการถ่ายเชื้อทุก ๆ 3 วัน ในอัตราส่วน 1:3 เก็บเกี่ยวเซลล์ด้วยวิธี trypsinization หลังจากนั้นนับจำนวนเซลล์ด้วย haemocytometer ทำการวิเคราะห์หาเมลานินและตรวจวัดกิจกรรมของไทโรซิเนส (Momtaz และคณะ, 2008)

3.4 การศึกษาความเป็นพิษของเพปไทด์สังเคราะห์ต่อเซลล์มะเร็งผิวหนังของหนู (B16F10) ด้วยวิธี MTT assay

นำเซลล์เมลานโนไซต์ B16F10 ที่ถูกเลี้ยงในอาหาร DMEM ใส่ในเพลต บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ $37^{\circ}C$ ในสภาวะที่มี 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลายเพปไทด์สังเคราะห์แล้วนำไปบ่มเลี้ยงต่อในสภาวะที่มี 5% CO_2 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาเติมสารละลาย MTT (ความเข้มข้น 0.05 mg/ml) หลุมละ 80 μ l แล้ววางไว้ในสภาวะที่มี 5% CO_2 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสออกเติม DMSO หลุมละ 0.1 μ l ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 15 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm จากนั้นคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์

3.5 การศึกษาปริมาณเมลานินในเซลล์มะเร็งผิวหนังของหนู (B16F10)

การหาปริมาณเม็ดสีเมลานินใช้วิธีการที่ดัดแปลงจาก Zhou และคณะ (2012) โดยนำเซลล์ B16F10 มาบ่มเลี้ยงในสภาวะที่มี 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลายเพปไทด์สังเคราะห์ที่ความเข้มข้นต่างๆ บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ $37^{\circ}C$ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ล้างเซลล์ด้วย 10 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 จำนวน 2 ครั้ง หลังจากนั้นเติม 0.25% ทริปซิน หลุมละ 0.25 ml บ่มที่อุณหภูมิ $37^{\circ}C$ ในสภาวะที่มี 5% CO_2 เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสออก แล้วเติม 1 M NaOH หลอดละ

0.1 ml นำไปอุ่นบน water bath ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm ทำการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของปริมาณเมลานิน

3.6 ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไทโรซิเนสในเซลล์มะเร็งผิวหนังของหนู (B16F10)

นำเซลล์เมลานोไซต์ B16F10 ที่ถูกเลี้ยงในอาหาร DMEM ใส่ในเพลต บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะที่มี 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมน้ำละลายเพปไทด์สังเคราะห์ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้อาร์บูตินเป็นตัวควบคุม หลังจากนั้นเติม PBS และ TritonX-100 ปริมาณ 100 µl ทำการดูดสารทั้งหมดใส่ใน 96-well plate แล้วเติม L-DOPA ที่ความเข้มข้น 2 mM ปริมาณ 100 µl บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร คำนวณหาร้อยละการยับยั้งไทโรซิเนส โดยคำนวณเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งไทโรซิเนสได้ร้อยละ 50 (IC₅₀)

3.7 การศึกษาการยับยั้งการแสดงออกของยีน TYR, TRP-1, TRP-2 และ MITF ภายในเซลล์มะเร็งผิวหนังของหนู (B16F10)

นำเซลล์มะเร็งผิวหนังของหนู (B16F10)) ที่ถูกกระตุ้นด้วยรังสียูวี มาทำการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของระดับ mRNA ที่มีการสังเคราะห์ขึ้นโดยใช้เทคนิค Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) โดยใช้ตัวควบคุม คือ Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) ซึ่งเป็นหน่วยหนึ่งทางพันธุกรรมที่ควบคุมเซลล์เมลานोไซต์ MITF ที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการจำลองแบบของเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตเม็ดสีเมลานิน (TYR, TRP-1 และ TRP-2) เป็น House keeping gene

3.8 การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเม็ดสีเมลานินในปลาหมอสี

ตัวอ่อนปลาหมอสีจะถูกนำมาทดสอบกับ สารละลายเพปไทด์สังเคราะห์ที่ให้ฤทธิ์ดีที่สุดจากการทดลองในหัวข้อก่อนหน้า โดยใช้สารละลายเพปไทด์สังเคราะห์ที่ความเข้มข้น 7.81, 15.63, 31.25, 62.5 และ 125 µg/ml เวลาที่ใช้ทดสอบคือ 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำตัวอ่อนปลาหมอสีไปสกัดเม็ดสีเมลานิน และตรวจสอบปริมาณเม็ดสีเมลานินด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer และคำนวณค่าปริมาณเมลานินสัมพัทธ์โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงลบ โดยมีกลุ่มควบคุมเชิงบวกสำหรับการยับยั้งการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน คือ ตัวอ่อนปลาหมอสีที่ได้รับสัมผัสกับน้ำเลี้ยงตัวอ่อนที่มี PTU ความเข้มข้น 0.0015% (w/v) โดยการศึกษาในหัวข้อนี้ผู้วิจัยส่งตัวอย่างเพปไทด์ไปวิเคราะห์ที่ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

3.9 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One way ANOVA) และทดสอบความแตกต่างระหว่างคู่การทดลองโดยวิธี Duncan's test กำหนดค่า $p < 0.05$ จึงถือว่ามีความสำคัญทางสถิติ



บทที่ 4

ผลการดำเนินการวิจัย

4.1 ผลการตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนส

นำเพปไทด์สังเคราะห์ทั้ง 3 ตัวอย่าง ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนที่ต่างกัน ที่ได้มาจากการย่อยเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus* sp. VDW ด้วยเอนไซม์ทริปซินมาตรวจสอบฤทธิ์ในการยับยั้งไทโรซิเนส เพปไทด์สังเคราะห์ที่นำมาทำงานวิจัยนี้มีลำดับของกรดอะมิโนแสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงรายละเอียดของลำดับกรดอะมิโนของเพปไทด์ตัวอย่าง

เพปไทด์สังเคราะห์	ลำดับกรดอะมิโน
S ₁	AILQSYSAGKTK
S ₂	IPDAHPVK
S ₃	LLVHAPVK

จากการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งไทโรซิเนสของเพปไทด์สังเคราะห์ S₁, S₂ และ S₃ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.2 พบว่าเพปไทด์สังเคราะห์ S₁ ซึ่งเป็นเพปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโน AILQSYSAGKTK ซึ่งประกอบด้วยลำดับของกรดอะมิโน คือ อะลานีน ไอโซลิวซีน ลิวซีน กลูตามีน ซีรีน ไทโรซีน ซีรีน อะลานีน ไกลซีน ไลซีน ทรีโอนีน และไลซีน มีฤทธิ์ในการยับยั้งไทโรซิเนสได้ดีที่สุด จึงเลือกที่จะนำเพปไทด์เส้นนี้ไปวิเคราะห์ต่อไป สำหรับเพปไทด์สังเคราะห์ S₂ ซึ่งเป็นเพปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโน IPDAHPVK ซึ่งประกอบด้วยลำดับของกรดอะมิโน คือ ไอโซลิวซีน โพรลีน แอสพาดิกแอซิด อะลานีน ฮิสติดีน โพรลีน วาลีน และ ลิวซีน และเพปไทด์สังเคราะห์ S₃ ซึ่งเป็นเพปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโน LLVHAPVK ซึ่งประกอบด้วยลำดับของกรดอะมิโน คือ ลิวซีน ลิวซีน วาลีน ฮิสติดีน อะลานีน โพรลีน วาลีน และไลซีน ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งไทโรซิเนส

ตารางที่ 4.2 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งไทโรซิเนสของเปปไทด์สังเคราะห์

เปปไทด์	IC ₅₀ (mg peptide/ml)	
S ₁ (AILQSYSAGKTK)	0.62±0.01	0.97±0.01
S ₂ (IPDAHPVK)	>1	>1
S ₃ (LLVHAPVK)	>1	>1

มีรายงานวิจัยพบว่าเปปไทด์ที่ย่อยได้จากขนไก่ โดยใช้เอนไซม์เพปซิน ซึ่งผ่านการคัดแยกขนาดโมเลกุลเปปไทด์ด้วย ultrafiltration เปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุล <3 กิโลดัลตัน มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีที่สุด เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธีเดียวกันกับงานวิจัยนี้ (Puttaporn และคณะ, 2017) ได้เคยมีรายงานวิจัยกล่าวว่า ความสัมพันธ์ของความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสกับกรดอะมิโนนั้นหากเปปไทด์มีกรดอะมิโน อาร์จินีน (arginine), ฟีนิลอะลานีน (phenylalanine), วาลีน (valine), อะลานีน (alanine), ลิวซีน (leucine), ไกลซีน (glycine), ซีรีน (serine), ซีสทีน (cysteine) และ ไอโซลิวซีน (isoleucine) จะมีส่วนช่วยทำให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยเฉพาะอย่างยิ่งหากเปปไทด์มีกรดอะมิโนอาร์จินีน หนึ่งหรือสองตัวจะยิ่งเพิ่มความสามารถดังกล่าวได้มากขึ้น (Schurink และคณะ, 2007) ฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของไทโรซิเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานิน ซึ่งหากผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งไทโรซิเนสได้ดี จะมีศักยภาพที่จะสามารถนำไปพัฒนาและใช้ประโยชน์ทางยาหรือเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้

4.2 ผลการศึกษาความเป็นพิษของเปปไทด์สังเคราะห์ต่อเซลล์มะเร็งผิวหนังของหนู (B16F10) ด้วยวิธี MTT assay

เมื่อนำเปปไทด์สังเคราะห์ S₁ เป็นเปปไทด์เส้นที่มีลำดับกรดอะมิโน AILQSYSAGKTK ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งผิวหนังของหนู B16F10 (MTT assay) ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.3 และภาพที่ 4.1 จากการทดสอบในครั้งนี้ใช้ Arbutin ที่ความเข้มข้น 62.5 µg/mL เป็น positive control

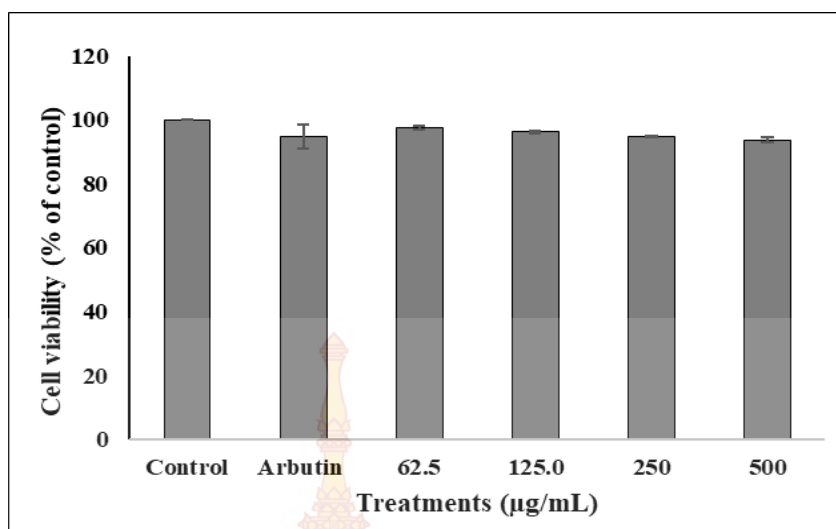
พบว่าเพปไทด์ที่นำมาทดสอบไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อทดสอบที่ความเข้มข้น 62.5, 125 และ 250 $\mu\text{g/mL}$

ตารางที่ 4.3 แสดงค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งผิวหนังของหนู (B16F10)

Treatments ($\mu\text{g/mL}$)	Cell viability (% of control) (B16F10)			AVG	SD
	1	2	3		
Control 0 $\mu\text{g/mL}$	100	100	100	100	0.00
Arbutin 62.5 $\mu\text{g/mL}$	97	91	97	95	3.67
Peptide 62.5 $\mu\text{g/mL}$	97	98	97	98	0.56
Peptide 125 $\mu\text{g/mL}$	96	97	96	96	0.47
Peptide 250 $\mu\text{g/mL}$	94	95	95	95	0.24
Peptide 500 $\mu\text{g/mL}$	93	94	94	94	0.79

การวิเคราะห์ด้วยวิธี MTT เป็นการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ในเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ซึ่งจะเปลี่ยน tetrazolium salt ให้เป็น formazan ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสีม่วง ที่สามารถใช้เป็นวิธีตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ เนื่องจากสารเหล่านี้จะกระตุ้นหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์และการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ได้

การมีชีวิตอยู่ของเซลล์มะเร็งผิวหนังของหนู B16F10 ที่ทำการทดสอบด้วยเพปไทด์สังเคราะห์ S_1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ แสดงในภาพที่ 4.1 พบว่าเซลล์มะเร็งผิวหนังของหนู B16F10 ที่ถูกทดสอบด้วยเพปไทด์ตัวอย่างที่ความเข้มข้น 62.5, 125, 250, และ 500 $\mu\text{g/mL}$ สามารถมีชีวิตอยู่ได้มากกว่า 95% แสดงให้เห็นว่าเพปไทด์สังเคราะห์ S_1 ที่ระดับความเข้มข้นที่ทำการทดสอบมีความปลอดภัยต่อเซลล์ ดังนั้นจึงใช้เพปไทด์ตัวอย่างที่ความเข้มข้นดังกล่าวมาทดสอบหาปริมาณเมลานิน และการยับยั้งไทโรซิเนส ในเซลล์มะเร็งผิวหนังของหนู (B16F10)



ภาพที่ 4.1 กราฟแสดงค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งผิวหนังของหนู (B16F10)

มีรายงานวิจัยถึงความสามารถของกากส้มสายน้ำผึ้งซึ่งเป็นกากของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม น้ำผลไม้ ว่ามีความสามารถยับยั้งการผลิตเม็ดสีเมลานินได้ ในงานวิจัยมีการทดสอบด้วยวิธี MTT เพื่อทดสอบความเป็นพิษของสารที่มีต่อเซลล์มะเร็งผิวหนังของหนู (B16F10) เช่นกัน พบว่าที่ความเข้มข้นของกากส้มสายน้ำผึ้ง 12.5 – 50.0 µg/mL สามารถทำให้เซลล์ B16F10 มีชีวิตรอดอยู่ได้มากกว่า 95% จึงบ่งบอกได้ว่าปริมาณความเข้มข้นที่นำมาทดสอบกระบวนการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินระดับเซลล์และกิจกรรมของเอนไซม์ไทโรซิเนสในเซลล์ B16F10 นั้นเป็นปริมาณที่เหมาะสม เพราะกิจกรรมของเอนไซม์ไทโรซิเนสในระดับเซลล์นั้นเป็นปัจจัยสำคัญที่จะกระตุ้นการบวนการสังเคราะห์เมลานิน และในที่สุดจะไปลดการผลิตเมลานินได้ (Kim และคณะ, 2013)

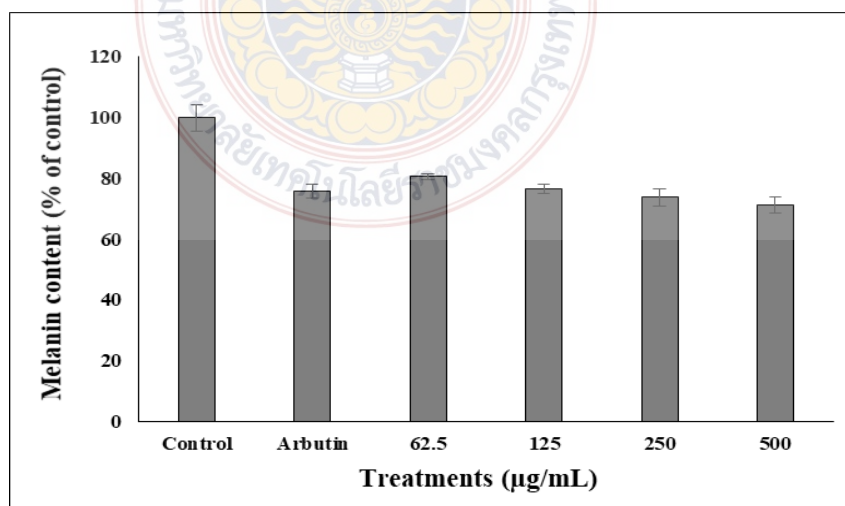
4.3 ผลการศึกษาปริมาณเมลานินในเซลล์มะเร็งผิวหนังของหนู (B16F10)

ในการทดสอบหาปริมาณเมลานินในเซลล์ผิวหนังของหนูใช้เพปไทด์สังเคราะห์ S_1 ที่ความเข้มข้น 62.5, 125, 250, และ 500 µg/mL จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้เพปไทด์ตัวอย่างที่มีความเข้มข้นมากขึ้นมีผลทำให้ปริมาณเมลานินในเซลล์ผิวหนังของหนู B16F10 ลดลง นอกจากนี้ปริมาณ

เมลานินในเซลล์มะเร็งผิวหนังของหนูจะลดลง เมื่อทดสอบด้วยเพปไทด์ตัวอย่างเปรียบเทียบกับตัวควบคุม ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.4 และภาพที่ 4.2

ตารางที่ 4.4 แสดงค่าปริมาณเม็ดสีเมลานินในเซลล์มะเร็งผิวหนังของหนู (B16F10)

Treatments ($\mu\text{g/mL}$)	% Melanin content (B16-F10)			AVG	SD
	1	2	3		
Control 0 $\mu\text{g/mL}$	102.45	102.59	94.96	100.00	4.37
Arbutin 62.5 $\mu\text{g/mL}$	73.43	76.10	78.11	75.88	2.35
Peptide 62.5 $\mu\text{g/mL}$	79.28	81.25	81.12	80.55	1.10
Peptide 125 $\mu\text{g/mL}$	74.97	77.71	77.32	76.67	1.49
Peptide 250 $\mu\text{g/mL}$	76.01	70.65	74.71	73.79	2.80
Peptide 500 $\mu\text{g/mL}$	68.03	72.22	73.27	71.17	2.77



ภาพที่ 4.2 กราฟแสดงค่าปริมาณเม็ดสีเมลานินในเซลล์มะเร็งผิวหนังของหนู (B16F10)

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเพปไทด์สังเคราะห์ S_1 สามารถลดปริมาณเมลานินในเซลล์มะเร็งผิวหนังของหนูได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Pinon และคณะ, 2011 ที่ทำการทดลองผลของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และการยับยั้งการสร้างเมลานินในเซลล์มะเร็งผิวหนังของหนู B16F10 โดยโปรตีนไฮโดรไลเซต อีกทั้งมีการรายงานว่าการการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และการยับยั้งการสร้างเมลานินจะสอดคล้องกัน คือถ้าสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดี ก็จะสามารถการยับยั้งการสร้างเมลานินในเซลล์มะเร็งผิวหนังของหนูได้ดีตามไปด้วย นอกจากนี้ในการวิเคราะห์ตรวจสอบกระบวนการสังเคราะห์เมลานินได้มีการทำวิจัยใน เซลล์มะเร็งผิวหนังของหนู (B16F10) เนื่องจากเป็นเซลล์ที่สามารถผลิตเมลานิน และมีกิจกรรมของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่สามารถตรวจสอบได้ และเป็นเซลล์ที่สามารถเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองได้ง่าย (Moragot และคณะ, 2019)

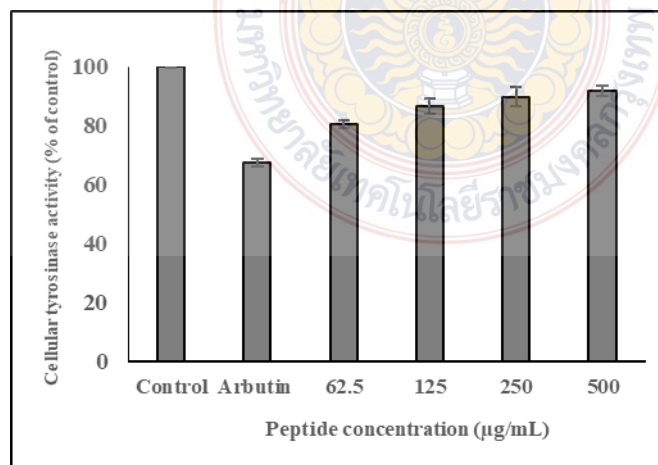
4.4 ผลการศึกษาการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไทโรซิเนสในเซลล์มะเร็งผิวหนังของหนู (B16F10)

เนื่องจากไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์สำคัญ (key enzyme) สำหรับการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไทโรซิเนสแสดงในตารางที่ 4.5 และภาพที่ 4.3 ผลการทดสอบบ่งบอกได้ว่าเพปไทด์สังเคราะห์ S_1 สามารถหยุดกิจกรรมไทโรซิเนสในระดับเซลล์ได้เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม ถึงแม้ว่าความสามารถของเพปไทด์สังเคราะห์ S_1 จะน้อยกว่าความสามารถของอาร์บูตินก็ตาม ผลของการยับยั้งไทโรซิเนสนี้ส่งผลทำให้ลดการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินในเซลล์มะเร็งผิวหนังของหนูได้ (Moragot และคณะ, 2019)

มีงานวิจัยถึงการยับยั้งไทโรซิเนสโดยทำการทดลองกับไทโรซอลและซาลิโดโรไซด์ว่าจะมีผลต่อการยับยั้งเมลานินอย่างไร พบว่าไทโรซอลถูกยับยั้งโดยกิจกรรมของไทโรซิเนสเมื่อใช้สารสกัดจาก *Rhodiola rosea* ที่ความเข้มข้น 0.4 mM จากผลการทดลองนี้กล่าวได้ว่าอาจจะมีส่วนประกอบอื่นๆ ของไทโรซอลที่อยู่ในสารสกัดจาก *Rhodiola rosea* ซึ่งมีส่วนทำให้เกิดการยับยั้งการสร้างเมลานิน (Wen และคณะ, 2013) นอกจากนี้มีรายงานวิจัยถึงผลของเพปไทด์จากปลานิลนั้นสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ โดยทำการทดสอบกิจกรรมของไทโรซิเนสในเซลล์มะเร็งผิวหนังของหนู B16F10 และอัตราการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไทโรซิเนสจะสัมพันธ์กับความเข้มข้นของเพปไทด์ตัวอย่าง (Xinyao และคณะ, 2022)

ตารางที่ 4.5 แสดงค่าระดับการยับยั้งไทโรซิเนสในเซลล์มะเร็งผิวหนังของหนู

Treatments (μg /ml)	B16-F10 (A_{405})			Cellular tyrosinase activity (%)
	1	2	3	AVG
Control	100.16	100.35	99.49	100.00
Arbutin 62.5	66.52	66.64	68.67	67.28
Peptide 62.5	80.45	79.67	81.39	80.50
Peptide 125	84.74	89.15	85.76	86.55
Peptide 250	93.29	88.37	87.44	89.70
Peptide 500	91.46	92.12	91.46	91.68



ภาพที่ 4.3 กราฟแสดงการยับยั้งไทโรซิเนสในเซลล์มะเร็งผิวหนังของหนู

4.5 ผลการศึกษาการยับยั้งการแสดงออกของยีน TYR, TRP-1, TRP-2 และ MITF ภายในเซลล์มะเร็งผิวหนังของหนู (B16F10)

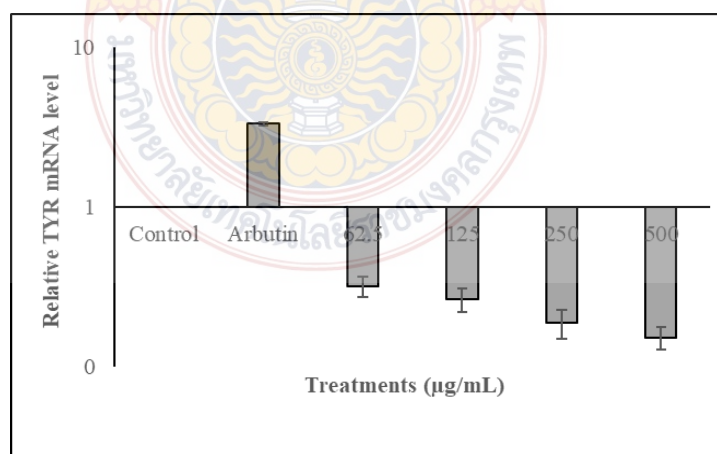
การศึกษาผลของการยับยั้งการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เมลานิน ได้แก่ ยีน TYR, TRP-1, TRP-2 และ MITF ในเซลล์มะเร็งผิวหนังของหนู มีผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.6 – 4.9 และภาพที่ 4.4 – 4.7

เพปไทด์ตัวอย่างที่ 1 ทุกๆ ความเข้มข้นสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน TYR, TRP-1 และ TRP-2 ได้มากกว่าตัวอย่างควบคุม แต่ยับยั้งการแสดงออกของยีน TYR น้อยกว่า อาร์บูตินที่ความเข้มข้น 62.5 $\mu\text{g/mL}$ นอกจากนี้พบว่าเพปไทด์สังเคราะห์ S_1 ทุกๆ ความเข้มข้นมีความสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน MITF ไกล่เคียงกับอาร์บูตินความเข้มข้น 62.5 $\mu\text{g/mL}$ จากผลการทดลองบ่งบอกได้ว่า เพปไทด์สังเคราะห์ S_1 มีความสามารถในการยับยั้งการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เมลานินได้

ผลการทดลองในครั้งนี้สอดคล้องกับผลการทดลองก่อนหน้านี้ซึ่งมีการนำสารสกัดจาก *Rhodiola rosea* มาทดสอบหาความสามารถในการยับยั้งการแสดงออกของยีน TRP-1, TRP-2 และ MITF ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเมลานิน (Chiang และคณะ, 2014) ในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม กระบวนการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินจะถูกควบคุมด้วยโปรตีนอย่างน้อย 3 ชนิด ได้แก่ TYR, TRP-1 และ TRP-2 สารwhitening ได้แก่ กรดนิโคตินิก หรือสารสกัดจากกากส้มสายน้ำผึ้ง สามารถยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน TYR, TRP-1, TRP-2 และ MITF ได้ (Kim และคณะ, 2013)

ตารางที่ 4.6 แสดงค่าระดับการแสดงออกของยีน TYR

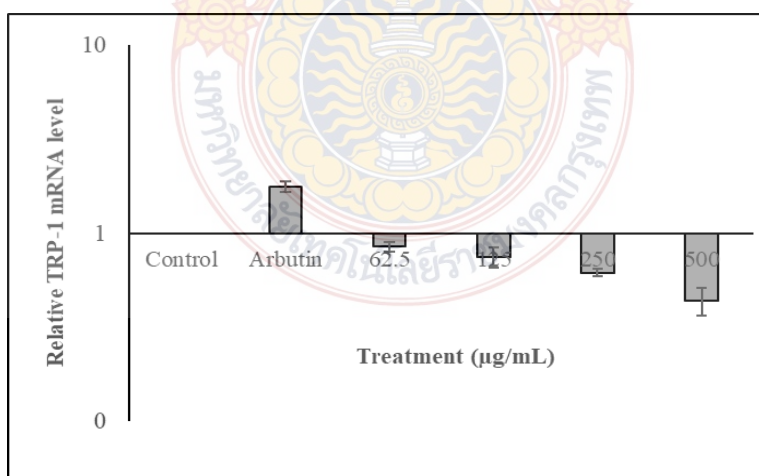
Results (TYR)			
Treatments ($\mu\text{g/mL}$)	AVG	SD	AVG+SD
Control 0	1.00	0.00	1.00 ± 0.00
Arbutin 62.5	3.33	0.07	3.33 ± 0.07
Peptide 62.5	0.32	0.05	0.32 ± 0.05
Peptide 125	0.27	0.04	0.27 ± 0.04
Peptide 250	0.19	0.04	0.19 ± 0.04
Peptide 500	0.15	0.02	0.15 ± 0.02



ภาพที่ 4.4 กราฟแสดงค่าการแสดงผลของยีน TYR

ตารางที่ 4.7 แสดงค่าระดับการแสดงออกของยีน TRP-1

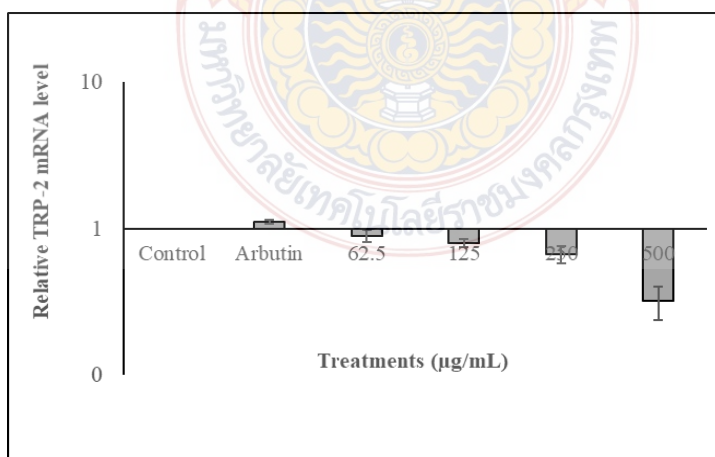
Results (TRP-1)			
Treatments ($\mu\text{g/mL}$)	AVG	SD	AVG+SD
Control 0	1.00	0.00	1.00 ± 0.00
Arbutin 62.5	1.77	0.12	1.77 ± 0.12
Peptide 62.5	0.85	0.05	0.85 ± 0.05
Peptide 125	0.75	0.09	0.75 ± 0.09
Peptide 250	0.62	0.03	0.62 ± 0.03
Peptide 500	0.44	0.07	0.44 ± 0.07



ภาพที่ 4.5 กราฟแสดงค่าการแสดงผลของยีน TRP-1

ตารางที่ 4.8 แสดงค่าระดับการแสดงออกของยีน TRP-2

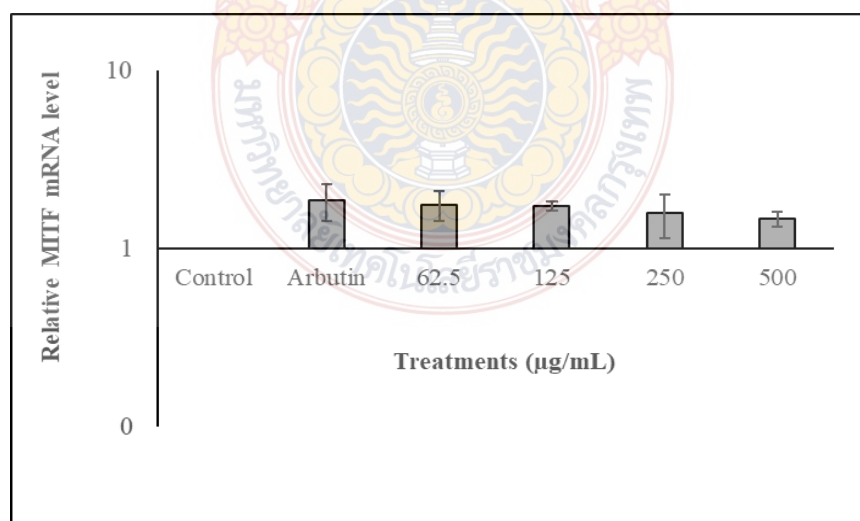
Results (TRP-2)			
Treatments ($\mu\text{g/mL}$)	AVG	SD	AVG+SD
Control 0	1.00	0.00	1.00 $\pm$ 0.00
Arbutin 62.5	1.12	0.04	1.12 $\pm$ 0.04
Peptide 62.5	0.90	0.09	0.90 $\pm$ 0.09
Peptide 125	0.80	0.05	0.80 $\pm$ 0.05
Peptide 250	0.67	0.09	0.67 $\pm$ 0.09
Peptide 500	0.32	0.08	0.32 $\pm$ 0.08



ภาพที่ 4.6 กราฟแสดงค่าการแสดงออกของยีน TRP-2

ตารางที่ 4.9 แสดงค่าระดับการแสดงออกของยีน MITF

Results (MITF)			
Treatments ($\mu\text{g/mL}$)	AVG	SD	AVG+SD
Control 0	1.00	0.00	1.00 $\pm$ 0.00
Arbutin 62.5	1.87	0.44	1.87 $\pm$ 0.44
Peptide 62.5	1.77	0.33	1.77 $\pm$ 0.33
Peptide 125	1.74	0.10	1.74 $\pm$ 0.10
Peptide 250	1.58	0.44	1.58 $\pm$ 0.44
Peptide 500	1.47	0.15	1.47 $\pm$ 0.56



ภาพที่ 4.7 กราฟแสดงค่าการแสดงออกของยีน MITF

4.6 ผลการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเม็ดสีเมลานินในปลาหมึก

เมื่อนำเพปไทด์สังเคราะห์ S_1 มาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเม็ดสีเมลานินกับตัวอ่อนปลาหมึก พบว่า ความเข้มข้น 7.81–125 $\mu\text{g/ml}$ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงลบ นั้นแสดงว่าเพปไทด์สังเคราะห์สังเคราะห์ S_1 ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน ในช่วงของความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ สำหรับกลุ่มควบคุมเชิงบวก (1-phenyl 2-thiourea) พบว่า มีการยับยั้งการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินอย่างชัดเจนจากการสังเกตลักษณะของตัวอ่อนโดยตรง และมีค่าปริมาณเมลานินสัมพันธ์เท่ากับ 0.5 ± 0.02 เท่า ซึ่งน้อยกว่ากลุ่มควบคุมเชิงลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.10 ค่าปริมาณเมลานินสัมพันธ์ของตัวอ่อนปลาหมึก หลังจากได้รับสัมผัสกับเพปไทด์สังเคราะห์ตัวอย่างที่ 1 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ตัวอย่างทดสอบ	ความเข้มข้น	ค่าปริมาณเมลานินสัมพันธ์	SD	ความแตกต่าง
Egg water (กลุ่มควบคุมเชิงลบ)	-	1.00	0.00	a
เพปไทด์สังเคราะห์ตัวอย่างที่ 1	7.81 $\mu\text{g/ml}$	1.01	0.14	a
	15.63 $\mu\text{g/ml}$	0.97	0.05	a
	31.25 $\mu\text{g/ml}$	0.98	0.07	a
	62.5 $\mu\text{g/ml}$	0.82	0.06	a
	125 $\mu\text{g/ml}$	0.88	0.15	a
1-Phenyl 2-thiourea (กลุ่มควบคุมเชิงบวก)	0.0015% (w/v)	0.50	0.02	b

หมายเหตุ : ข้อมูลที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ย (mean) ของ 3 ชุดการทดลองที่เป็นอิสระต่อกัน และความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของแต่ละกลุ่มแทนด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกัน (one-way ANOVA, ตามด้วย post hoc test: Tukey's, $p < 0.05$)

จากผลการทดลองในครั้งนี้พบว่าเพปไทด์สังเคราะห์ S_1 ไม่มีผลในการช่วยยับยั้งการสังเคราะห์ เม็ดสีเมลานินในปลาหมาลาย ซึ่งไม่สอดคล้องกับการทดลองในหลอดทดลองก่อนหน้านี้ ซึ่งอาจเกิดขึ้นได้เนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ทดสอบในหลอดทดลองกับในสัตว์ทดลองนั้นมีสภาพไม่เหมือนกัน แต่มีรายงานการวิจัยของ Ilandarage และคณะในปี 2020 ซึ่งได้ทำการสกัดสารจากม้าน้ำด้วยเอทานอล เพื่อศึกษาผลของการยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานินในเซลล์ B16F10 และในปลาหมาลาย พบว่าสารสกัดจากม้าน้ำสามารถยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานินในเซลล์ B16F10 และในปลาหมาลายได้

ในการทดสอบเกี่ยวกับการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินนั้นนิยมทำในปลาหมาลายซึ่งมีรายงานวิจัยมากมาย เช่น การทดสอบการเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างเม็ดสีของสารสกัดรำข้าว โดยผ่านวิธี p-ERK ก็ทำสารทดสอบในปลาหมาลาย ซึ่งพบว่าสารสกัดรำข้าวมีความสามารถในการเพิ่มอัตราการสร้างเม็ดสีเมลานินในปลาหมาลายได้ ซึ่งมีการนำมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์บำรุงเส้นผม (Kim และคณะ, 2019)



บทที่ 5

สรุปผลการดำเนินการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการดำเนินการวิจัย

จากผลการวิจัยในครั้งนี้พบว่าเพปไทด์สังเคราะห์ S_1 ที่มีลำดับกรดอะมิโน AILQSYSAGKTK มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ จึงเลือกใช้เพปไทด์สังเคราะห์ S_1 มาศึกษาวิจัยในหัวข้อการวิจัยถัดมา ซึ่งพบว่าเพปไทด์สังเคราะห์ S_1 ไม่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งผิวหนังของหนู B16F10 เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี MTT นอกจากนี้เพปไทด์สังเคราะห์ S_1 ที่ระดับความเข้มข้น 62.5, 125, 250, และ 500 $\mu\text{g/mL}$ มีความสามารถในการยับยั้งการแสดงออกของยีน TYR, TRP-1, TRP-2 และ MITF ได้ถึงแม้จะน้อยกว่าอาร์บูตินที่ระดับความเข้มข้น 62.5 $\mu\text{g/mL}$ ก็ตาม และถึงแม้ว่าเพปไทด์สังเคราะห์ S_1 จะไม่มีผลในการยับยั้งการสังเคราะห์เมลานินในปลาหมอสี ซึ่งก็อาจมีความเป็นไปได้เนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์ไทโรซิเนสเมื่ออยู่ในหลอดทดลองกับอยู่ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตจะมีประสิทธิภาพแตกต่างกัน

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.1 ควรมีการวิจัยต่อยอดจากงานวิจัยนี้โดยการนำเพปไทด์สังเคราะห์ที่มีลำดับกรดอะมิโนตามที่ทำในงานวิจัยนี้ไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

5.2 ควรนำงานวิจัยนี้เผยแพร่ในวารสารระดับนานาชาติ

บรรณานุกรม

- Bae-Harboe, Y.S. and Park, H.Y. 2012. Tyrosinase: A central regulatory protein for cutaneous pigmentation. *Journal of Investigative Dermatology*. 132(12) : 2678-2680.
- Chanput, W., Theerakulkait, C. and Nakai, S. 2009. Antioxidant properties of partially purified barley hordein, rice bran protein fractions and their hydrolysates. *Journal of Cereal Science*. 49(3) : 422-428.
- Chiang, H.M., Chien, Y.C., Wu, C.H., Kuo, Y.H., Wu, W.C., Pan, Y.Y., Su, Y.H. and Wen K.C. 2014. Hydroalcoholic extract of *Rhodiola rosea* L. (Crassulaceae) and its hydrolysate inhibit melanogenesis in B16F0 cells by regulating the CREB/MITF/tyrosinase pathway. *Food and Chemical Toxicology*. 65 : 129 – 139.
- Coin, I., Beyermann, M. and Bienert, M. 2007. Solid-phase peptide synthesis: from standard procedures to the synthesis of difficult sequences. *Nature Protocols*. 2(12) : 3247-3256.
- D'Mello, S.A., Finlay, G.J., Baguley, B.C. and Askarian-Amiri, M.E. 2016. Signaling pathways in melanogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*. 17(7) : 1144.
- El-Faham, A. and Albericio, F. 2011. Peptide coupling reagents, more than a letter soup. *Chemical Resource*. 111(11) : 6557-6602.
- Hong, F., Ming, L., Yi, S., Zhanxia, L., Yongquan, W. and Chi, L. 2008. The antihypertensive effect of peptides: A novel alternative to drugs?. *Peptide*. 29 : 1062-1071.
- Huang, Y., Wang, X., Wang, H., Liu, Y. and Chan, Y. 2011. Studies on mechanism of action of anticancer peptides by modulation of hydrophobicity within a defined structural framework. *Molecular Cancer Therapeutics*. 10 : 416-426.
- Ilandarage, M.N.M., Yung, H.C., Seungheon, L., Jiwon, S., Cho, R.L., Hyo, G.L., Jongho, L., Kyeong, J.L., You, J.J., Jeongin, M. and Gi, Y.K. 2020. Ethanol extract of *Hippocampus abdominalis* exerts anti-melanogenic effects in B16F10 melanoma cells and zebrafish larvae by activating the ERK signaling pathway. *Cosmetics*. 1-7.

- Jiang, H., Tong, T., Sun, J., Xu, Y., Zhao, Z. and Liao, D. 2014. Purification and characterization of antioxidative peptides from round scad (*Decapterus maruadsi*) muscle protein hydrolysate. *Food Chemistry*. 154 : 158-163
- Kim, S.S., Kim, M.J., Choi, Y.H., Kim, B.K., Kim, K.S. Park, K.J., Park, S.M., Lee, N.H. and Hyun, C.G. 2013. Down-regulation of tyrosinase, TRP-1, TRP-2 and MITF expressions by citrus press-cakes in murine B16F10 melanoma. *Asian Pacific Journal Tropical Biomedicine*. 3(8) : 617-622.
- Kim, Y.M., Eun, C.L., Han, M.L. and Young, K.S. 2019. Rice brane ash mineral extract increases pigmentation through the p-ERK pathway in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of molecular Science*. 20 : 2172-2181.
- Momtaz, S., Lall, N. and Basson, A. 2008. Inhibitory activities of mushroom tyrosine and DOPA oxidation by plant extracts. *South African Journal of Botany*. 74 : 577-582.
- Moragot, C., Takeshi, Y., Kenshi, Y., Setsuya, A. and Anchalee, C. 2019. Anti melanogenic effect of *Croton roxburghii* and *Croton sublyratus* leaves in α -MSH stimulated B16F10 cells. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 9 : 66-72.
- Niu, C. and Aisa, H.A. 2017. Upregulation of melanogenesis and tyrosinase activity: Potential agents for Vitiligo. *Molecules*. 22(8) : 1303
- Oh J, Byrd AL, Deming C, Conlan S, Kong HH, Segre JA. 2014. Biogeography and individuality shape function in the human skin metagenome. *Nature*. 514(7520) : 59-64.
- Park, C., Hong, S.H. and Choi, Y.H. 2017. Induction of apoptosis by Dae-Hwang-Mok-Dan-Tang in HCT-116 colon cancer cells through activation of caspases and inactivation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling. *Integrative Medicine Research*. 6(2) : 179-189.
- Pedersen, S.L., Tofteng, A.P., Malik, L. และ Jensen, K.J. 2012. Microwave heating in solid-phase peptide synthesis. *Chemical Society Reviews*. 41(5) : 1826-1844.

- Phongthai, S., Lim, S.-T. and Rawdkuen, S. 2016. Optimization of microwave-assisted extraction of rice bran protein and its hydrolysates properties. *Journal of Cereal Science*. 70 : 146-154.
- Pillaiyar, T., Manickam, M. and Namasivayam, V. 2017. Skin whitening agents: Medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 32(1) : 403-425.
- Pinon, A., Limami, Y., Micallef, L., Cook-Moreau, J., Liagre, B., Delage, C., Duval, R.E., Simon, A. 2011. A novel form of melanoma apoptosis resistance: Melanogenesis up-regulation in apoptotic B16-F0 cells delays ursolic acid-triggered cell death. *Experimental Cell Research*. 317 : 1669-1676.
- Piyadhamviboon, P., Wongngam W., Benjakul S. and Yongsawatdigul, J. 2012. Antioxidant and Angiotensin-Converting enzyme inhibitory activities of peotein hydrolysates prepared from Threadfin Bream (*Nemipterus* spp.) surimi by-products. *Journal Aquatic Food Product*, 21 : 265-278.
- Prota, G. 1980. Recent advances in the chemistry of melanogenesis. *Journal of Investigative Dermatology*. 75(1) : 122-127.
- Puttaporn, P., Tanatorn, S., Papassara S., Polkit S. and Aphichart K. 2017. Effects of protein hydrolysate from chicken feather meal on tyrosinase activity and melanin formation in B16F10 murine melanoma cells. *Food Science Biotechnology*. 26(5) : 1199-1208.
- Rutairat S., Saranya P., Tanatorn Saisavoey., Papassara S., Nuttha T. and Aphichart K. 2019. Free Radical Scavenging Properties and Induction of Apoptotic Effects in Preparation Obtained Upon Proteolysis of Bioactive Peptides from Microalgae *Synechococcus* sp. VDW. *Journal of Food Technology and Biotechnology*. 57(3) : 358 – 368.

- Schnolzer, M., Alewood, P., Jones, A., Alewood, D. and S.B. Kent. 1992. In situ neutralization in Boc-chemistry solid peptide synthesis. Rapid, high yield assembly of difficult sequences. *International Journal Peptide Protein Resource*. 40 (3-4) : 180-193.
- Schurink, M., Berkel, WJH., Wichers, HJ. And Boeriu, CG. 2007. Novel peptides with tyrosinase inhibitory activity. *Peptides*. 28 : 485-495.
- Shahidi, F., Zhong, Y. 2008. Bioactive peptides. *Journal of AOAC International*. 91 : 914-931.
- Slominski, A., Tobin, D.J., Shibahara, S. and Wortsman, J. 2012. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiological Reviews*. 84(4) : 1155-1228.
- Venuste, M., Zhang, X., Shoemaker, C.F., Karangwa, E., Abbas, S. and Kamdem, P.E. 2013. Influence of enzymatic hydrolysis and enzyme type on the nutritional and antioxidant properties of pumpkin meal hydrolysates. *Food and Function*. 4(5) : 811-820.
- Wen, K.C., Chang, C.S., Chien, Y.C., Wang, H.W., Wu, W.C., Wu, C.S. and Chiang, H.M.. 2013. Tyrosol and its analogues inhibit alpha-melanocyte-stimulating hormone-induced melanogenesis. *Journal Molecular Science*. 14 : 23420-23440.
- Xinyao, J., Shuzhen, C., Han, J., Xianbing, X., Zhenyu, W. and Ming, D. 2022. Tyrosinase inhibitory effects of the peptides from fish scale with the metal copper ions chelating ability. *Food Chemistry*. 390 : 133146 – 133154.

ภาคผนวก

อักษรแสดงสัญลักษณ์ในการจัดเรียงลำดับกรดอะมิโน

กรดอะมิโน	ตัวย่อกรดอะมิโน	อักษรแสดงสัญลักษณ์
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Aspartic acid	Asp	D
Cysteine	Cys	C
Glutamic acid	Glu	E
Glutamine	Gln	Q
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Methionine	Met	M
Phenylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Serine	Ser	S
Threonine	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

ประวัติคณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

- 1) ชื่อ นางสาวฤทัยรัตน์ นามสกุล สุทธิสุวรรณ
Miss Rutairat Suttisuwan
- 2) ตำแหน่งทางวิชาการ -
- 3) ตำแหน่งทางการบริหาร หัวหน้าสาขาวิชาชีววิทยา
- 4) สังกัดภาควิชา วิทยาศาสตร์ คณะ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ
- 5) E-mail: rutiarut.s@mail.rmutk.ac.th
- 6) โทรศัพท์มือถือ
- 7) โทรศัพท์ที่ทำงาน 02-879-9600 ต่อ 906
- 8) โทรสาร 02-879-9600 ต่อ 906
- 9) ที่อยู่ในการจัดส่งเอกสาร สาขาชีววิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ เลขที่ 2 ถนนนางลิ้นจี่ทุ่งมหาเมฆ
สาทร กรุงเทพมหานคร 10120
- 10) ประวัติการศึกษา
ปริญญาตรี : เทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปริญญาโท : เทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปริญญาเอก : เทคโนโลยีชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- 11) ผลงานวิจัย / ผลงานวิชาการ

กาญจนา ชินสำราญ และฤทัยรัตน์ สุทธิสุวรรณ. การพัฒนาการผลิตเซลล์จากแบคทีเรียในกากน้ำตาลโดยใช้น้ำมะพร้าวเป็นสารอาหารเสริมและการเติมสารที่ทำให้เกิดเจล.
วารสารวิชาการ มทร.สุวรรณภูมิ. ปีที่ 3 ฉบับที่ 2: 98-108. 2558.

กาญจนา ชินสำราญ **ฤทัยรัตน์ สุทธิสุวรรณ** และพิชามญช์ น้อยสุวรรณ. ความหลากหลายของไซยาโนแบคทีเรียในนาข้าวพื้นที่อำเภอบางแพ จ.ราชบุรี. การประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล ครั้งที่ 11 ประจำปี 2562.

พุดกรอง พันธุ์อุโมงค์ **ฤทัยรัตน์ สุทธิสุวรรณ** กิติศาสตร์ กระบวน ฉันทพร อ่อนคำ ปรียาวดี อภิสิริโรจน์ และ มยุริน พิมพ์ทอง. การใช้สารเคลือบผิวที่บริโภคนได้จากไฮโดรคอลลอยด์ร่วมกับสารสกัดจากชาเขียวในการปรับปรุงคุณภาพและยืดอายุการเก็บรักษาแก้วมังกรพันธุ์หั่นชิ้นพร้อมบริโภค. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. ปีที่ 50 ฉบับที่ 3 (พิเศษ) : 272-275. 2562.

ฤทัยรัตน์ สุทธิสุวรรณ และ เพ็ชร สุธิภรณ์. 2564. การหาภาวะที่เหมาะสมของการผลิตไกลซีนปีเทนภายใต้ความเครียดจากเกลือโดยไซยาโนแบคทีเรียชนิดเซลล์เดี่ยว *Synechococcus* sp. MH 393765. วารสารวิจัย มทร.กรุงเทพ. ปีที่ 15 เล่มที่ 1 : 110 – 121.

Choojun S. and **Sutthisuwan R.** 2007. Studies on Propionic acid Production from Whey by *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 in Combination with *Lactococcus lactis* TISTR 1401. The 5th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology. Khon Kaen University, Nong Khai Campus, Nong Khai, Thailand. November 1-3.

Choojun S. and **Sutthisuwan R.** 2008. Lactic acid Production from Whey by Mixed Culture of *Lactococcus lactis* TISTR 1401 and *Lactobacillus casei* TISTR 1341. Journal of Science Ladkrabang. Vol. 17 No.1 : 63-73.

Choojun S. and **Sutthisuwan R.** 2009. Development and Utilization of Propionic Acid Production from Whey by Coimmobilized Cultures of *Propionibacterium acidipropionici* TISTR 442 in Combination with *Lactococcus lactis* TISTR 1401 and Cell Recycling. Thailand Research Symposium 2009. Central World Plaza, Bangkok, Thailand. August 26-30.

Sukjai Choojun and **Rutairat Suttisuwan.** 2010. Lactic Acid Production by Coimmobilized Cells of *Lactococcus lactis* TISTR 1401 and *Lactobacillus casei* TISTR 1341 Using Whey as Substrate. Chiang Mai University Journal of Natural Science. Vol.9 No.2 : 245 – 254.

Choojun S. and **Sutthisuwan R.** 2011. Continuous Lactic Acid Production from Longan Juice by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108. *Journal of Agricultural Science and Technology B*. Vol.1 No.4 : 556-565.

Rutairat S., Saranya P., Nuttha T., Papassara S. and Aphichart K. 2016. Purification and Identification of antioxidant peptides from trypsin hydrolysates of microalgae *Synechococcus* sp. VDW protein. The 5th International Biochemistry and Molecular Biology Conference, Songkhla, Thailand. May 26-27.

Rutairat Suttisuwan, Saranya Phunpruch, Tanatorn Saisavoey, Papassara Sangtanoo, Nuttha Thongchul and Aphichart Karnchanatat. 2019. Free Radical Scavenging Properties and Induction of Apoptotic Effects of Fa Fraction Obtained after Proteolysis of Bioactive Peptides from Microalgae *Synechococcus* sp. VDW. *Food Technology and Biotechnology*. Vol. 57 No 3 : 358-368.

Rutairat Suttisuwan, Saranya Phunpruch, Tanatorn Saisavoey, Papassara Sangtanoo, Nuttha Thongchul and Aphichart Karnchanatat. 2019. Isolation and characterization of anti-inflammatory peptides derived from trypsin hydrolysis of microalgae protein (*Synechococcus* sp. VDW). *Food Biotechnology*. Vol. 33 : 303-324.

12) ความเชี่ยวชาญในสาขาวิชา

เทคโนโลยีการหมัก (Fermentation), จุลชีววิทยา (Microbiology), เปปไทด์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant peptide)

13) ประสบการณ์พิเศษ

ฝึกงานวิจัย เป็นเวลา 1 เดือน ด้าน Biotechnology ณ Glasgow University ประเทศสหราชอาณาจักร