

บทที่ 1

บทนำ

1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ในขณะที่นักวิจัยทั่วโลก โดยเฉพาะในแถบเอเชีย กำลังคิดค้นหรือหาวิธีจัดการกับเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่แพร่ระบาดอย่างกว้างขวางรวมถึงในประเทศไทย การแพร่ระบาดนี้ก่อให้เกิดความเสียหายต่อชีวิตและเศรษฐกิจเป็นจำนวนมาก การอุบัติขึ้นของเชื้อไวรัสไข้หวัดสายพันธุ์ใหม่หรือไข้หวัด 2009 ก็ได้นำมาซึ่งความหวาดกลัวและตื่นตระหนกอีกครั้ง เนื่องจากเชื้อไวรัสไข้หวัดสายพันธุ์ใหม่นี้มีลักษณะใกล้เคียงกับสายพันธุ์ที่เคยระบาดอย่างรุนแรงในปี 1918 หรือที่เรียกกันว่าไข้หวัดใหญ่สเปน (Spanish Flu) ที่ได้คร่าชีวิตประชากรโลกเป็นจำนวนมากถึง 40 ล้านคน แม้ว่าการแพร่ระบาดของไข้หวัดสายพันธุ์ใหม่ 2009 จะไม่รุนแรงมากนักเมื่อเทียบกับไข้หวัดใหญ่สเปน อย่างไรก็ตาม องค์การอนามัยโลกได้พยากรณ์ว่าการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสไข้หวัดสายพันธุ์ใหม่นี้อาจมีระดับความรุนแรงเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในอนาคต เนื่องจากเชื้อไวรัสมีการกลายพันธุ์สูงและมีวิวัฒนาการการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา ดังนั้นจึงเป็นเรื่องสำคัญอย่างยิ่งที่จะต้องทำความเข้าใจถึงกลไกหรือกระบวนการแพร่พันธุ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ รวมถึงการศึกษาพัฒนาหรือคิดค้นยาชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการรักษาไข้หวัดใหญ่ต่อไป

โรคไข้หวัดใหญ่ (influenza) ติดต่อและแพร่กระจายโรคได้ทั่วไปในคน ส่วนโรคไข้หวัดนก (bird flu หรือ avian influenza) เป็นชื่อโรคที่เรียกตามสาเหตุของพาหะที่ทำให้เกิดโรค เพราะได้รับเชื้อจากสัตว์ปีกคือ นก เป็นตัวแพร่เชื้อเข้าสู่คน ทั้งนี้ไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคไข้หวัดทั้งสองเป็นเชื้อไวรัสในกลุ่มเดียวกัน คือ influenza virus A ซึ่งอยู่ในตระกูล Orthomyxoviridae genus (Cross, Burleigh et al. 2001) เชื้อไวรัส Influenza type A สามารถแบ่งออกเป็น subtype ตามชนิดของแอนติเจนฮีแมกกลูตินิน (hemagglutinin; HA) และ นิวรามินิเดส (neuraminidase; NA) โดยที่ฮีแมกกลูตินินสามารถแบ่งได้เป็น subtype ต่าง ๆ ได้ 16 ชนิด และ นิวรามินิเดส สามารถแบ่งได้เป็น subtype ต่าง ๆ ได้ 9 ชนิด (Tobita 1997) กระบวนการแพร่พันธุ์ของเชื้อไข้หวัดนั้น เริ่มต้นจากไกลโคโปรตีนฮีแมกกลูตินินของอนุภาคไวรัสยึดเกาะกับตัวรับของโฮสต์ซึ่งประกอบด้วยกรดไขมันแอลิก (sialic acid, SA) เชื่อมต่อกับน้ำตาลกาแลคโตส (galactose, Gal) หากโปรตีนฮีแมกกลูตินินจับกับตัวรับบนผิวของโฮสต์ได้ดี เชื้อจะแพร่เข้าสู่ร่างกายโฮสต์ได้ง่ายมีการกระจายของเชื้ออย่างรวดเร็ว

ในทางตรงกันข้ามหากโปรตีนไม่สามารถยึดเกาะกับตัวรับบนผิวของโฮสต์ได้ การแพร่เข้าสู่เซลล์ของเชื้อไวรัสก็จะไม่เกิดขึ้น นอกจากฮีแมกกลูตินิน แล้ว โกลโคโปรตีนนิวรามิเนส และ เมมเบรนโปรตีนไอออนแชนแนลหรือ M2 chanel ยังมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเชื้อไวรัส โดยโกลโคโปรตีนนิวรามิเนสมีหน้าที่ตัดหมู่กรดไขมันของตัวรับที่ยึดเกาะไวรัสไว้เพื่อปลดปล่อยอนุภาคไวรัสตัวใหม่ออกจากเซลล์เริ่มต้น และแพร่กระจายไปสู่เซลล์อื่นๆ ต่อไป ส่วน M2 ทำหน้าที่ลอกเยื่อหุ้มเมมเบรนของไวรัสโดยการลำเลียงโปรตอนผ่านแชนแนลเข้าสู่เซลล์ไวรัส (Cross, Burleigh et al. 2001)

ในปัจจุบันมียารักษาไข้หวัดใหญ่เพียง 4 ชนิด เท่านั้นที่ผ่านการรับรองจากองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา ได้แก่ อะแมนตาดีน ไรแมนตาดีน โอเซลทามิเวียร์ และซานามิเวียร์ สำหรับยา 2 ชนิดแรกนั้นถูกพัฒนาขึ้นเพื่อป้องกันการรบกวนการทำงานของโปรตีน M2 ในขณะที่ยาอีก 2 ชนิดถูกคิดค้นขึ้นเพื่อใช้ขัดขวางการทำงานของโปรตีนนิวรามิเนส อย่างไรก็ตามการใช้ยาดังกล่าวได้ก่อให้เกิดปัญหาการดื้อยาสูง โดยเฉพาะอะแมนตาดีนและไรแมนตาดีน พบว่ามีอัตราการดื้อยาสูงถึง 90 % (De Clercq and Neyts 2007) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการพัฒนายาที่ออกฤทธิ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อเป้าหมายใหม่ ด้วยบทบาทที่สำคัญของโปรตีนฮีแมกกลูตินินทำให้เป็นเป้าหมายในการผลิตหรือคิดค้นยาสำหรับรักษาเชื้อไวรัสไข้หวัด ปัจจุบันยังไม่มีรายงานว่ามียาที่ผ่านการรับรองจากองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกาว่าสามารถออกฤทธิ์ขัดขวางหรือยับยั้งการทำงานของโปรตีนฮีแมกกลูตินินได้ ความก้าวหน้าในการคิดค้นหรือพัฒนายาที่ออกฤทธิ์ต้านโปรตีนฮีแมกกลูตินินนั้น มีกลุ่มวิจัยที่สามารถได้โครงสร้างสามมิติ ของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง โปรตีนฮีแมกกลูตินินกับ สาร tert-butyl hydroquinone หรือ TBHQ (Russell, Kerry et al. 2008) และอนุพันธ์ของคาร์บอกซาไมด์ (Vanderlinden, Göktas et al. 2010) และสารกลุ่ม NeO6 (Li, Wang et al. 2011) ซึ่งใช้ยับยั้งการทำงานในขั้นตอนการฟิวชั่นของโปรตีนฮีแมกกลูตินินเนื่องจากค่า pH ที่เป็นกรดของเอนโดโซมจะเหนี่ยวนำให้โปรตีนฮีแมกกลูตินินเกิดการเปลี่ยนโครงสร้างอย่างถาวร และนำไปสู่กระบวนการฟิวชั่นของเชื้อไวรัสต่อไป ดังนั้นสารออกฤทธิ์ยับยั้งในกลุ่มนี้จะทำหน้าที่ขัดขวางไม่ให้เกิดการเปลี่ยนโครงสร้างของโปรตีนฮีแมกกลูตินิน

รายงานจากระทรวงสาธารณสุขที่ระบุว่า สมุนไพรไทยหลายชนิดมีฤทธิ์ต้านไข้หวัดใหญ่ได้ โดยเฉพาะ "ฟ้าทะลายโจร" นั้นมีสรรพคุณดีเยี่ยม สารสำคัญหลักพบในฟ้าทะลายโจร คือ Andrographolide เป็นสารในกลุ่ม Diterpenoid lactone นอกจากนี้ยังพบอนุพันธ์อื่นๆ ของ andrographolide เช่น 1,4 - deoxy andrographolide และ neoandrographolide สืบเนื่องจากใน

ประเทศไทยการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารยับยั้งกับเชื้อไวรัสไข้หวัดนกยังมีข้อจำกัดอยู่มาก ทั้งนี้เนื่องจากการเพาะเชื้อไวรัสเป็นวิธีการที่ยุ่งยากมากอีกทั้งมีห้องปฏิบัติการชั้นสูงโรคน้อยแห่งที่ทำการเพาะเชื้อโรคได้ เพราะจะต้องมีอุปกรณ์ครบครัน มีมาตรการในการรักษาความปลอดภัย นอกจากนี้การเพาะเชื้อยังสิ้นเปลืองทั้งค่าใช้จ่ายและกินเวลา ต้องใช้นักวิทยาศาสตร์ที่มีความรู้และประสบการณ์สูงจึงจะทำการแยกเชื้อได้ งานวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาเชิงลึกในระดับโมเลกุลโดยใช้เทคนิคด้วยวิธีโมเลคิวลาร์ดอกกิ้งและโมเลคิวลาร์ไดนามิกส์ซิมูเลชัน (MD Simulations) ระหว่างโปรตีนฮีแมกกลูตินินซึ่งเป็นเป้าหมายแรกในการนำเชื้อเข้าสู่ร่างกายกับสารในกลุ่ม Diterpenoid lactone ที่สกัดได้จากฟ้าทะลายโจร ซึ่งเป็นเทคโนโลยีทางเคมีคอมพิวเตอร์ที่สามารถทำนายค่าพลังงานยึดจับได้ถูกต้องใกล้เคียงกับผลของการทดลอง ศึกษากลไกการทำงานและลักษณะความจำเพาะเจาะจงของโปรตีนฮีแมกกลูตินินที่มีต่อตัวยับยั้งที่ได้จากสารสกัดจากสมุนไพรท้องถิ่นอย่างสารในกลุ่ม Diterpenoid lactone ที่มีรายงานไว้แล้ว เพื่อให้เกิดความรู้ความเข้าใจในการขัดขวางการทำงานของโปรตีนฮีแมกกลูตินินอันจะเป็นโอกาสการค้นพบหรือพัฒนายาที่สามารถยับยั้งการทำงานของฮีแมกกลูตินินอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยึดจับของสารกลุ่ม Diterpenoid lactone ได้แก่ andrographolide, 1,4 - deoxy andrographolide และ neoandrographolide ในการยับยั้งการทำงานของโปรตีนฮีแมกกลูตินินของเชื้อไวรัส Influenza A ด้วยวิธีโมเลคิวลาร์ดอกกิ้ง
2. คัดเลือกสารยับยั้งจากข้อ 1 ที่มีประสิทธิภาพสูงในการยึดจับกับโปรตีนฮีแมกกลูตินินของเชื้อไวรัส Influenza A มาทำการศึกษาด้วยระเบียบวิธีโมเลคิวลาร์ไดนามิกส์ซิมูเลชัน เพื่ออธิบายถึงความเหมือน/ความแตกต่างทางด้านโครงสร้าง การเคลื่อนที่ของโปรตีนและตัวยับยั้ง ผลของ solvation รวมถึง คำนวณพลังงานเสรีกิ๊บส์ เปรียบเทียบผลการคำนวณที่ได้กับผลการทดลองหรือผลการคำนวณจากงานวิจัยอื่นๆ

1.3. ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. เตรียมโครงสร้าง 3 มิติ ของสารประกอบเชิงซ้อนของฮีแมกกลูตินินกับสารแอนโดรกราโฟไลด์และอนุพันธ์
 - หาค่าแห่งกึ่งกลางของตำแหน่งยึดจับ (binding site)
 - เติมประจุและพารามิเตอร์ตัวทำละลาย (solvation term) ให้กับโครงสร้างโปรตีน
 - ทำการเติมประจุให้กับสารแอนโดรกราโฟไลด์และอนุพันธ์
 - กำหนดขอบเขตของ Grid box

2. สร้าง Grid energy maps ด้วยคำสั่ง AutoGrid4 โดยใช้โปรแกรม ADT
 - สร้าง Grid energy maps ของอะตอมชนิดต่างๆ ที่อยู่ใน Grid box ด้วยโปรแกรม AutoGrid4
 - การเตรียม DPF file (Docking Parameter File) โดยใช้โปรแกรม ADT
 - การทำ docking โดยใช้โปรแกรม ADT
3. ศึกษาและเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยึดจับระหว่างโปรตีนฮีแมกกลูตินินของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่กับ สารอนุพันธ์แอนโดรกราโฟไลด์ในฟ้าทะลายโจร โดยวิธีโมเลกุลาร์ดอกกิ้ง
4. คัดเลือกสารยับยั้ง ที่มีประสิทธิภาพสูงในการยึดจับกับโปรตีนฮีแมกกลูตินินของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่มาทำการศึกษาด้วยระเบียบวิธีโมเลกุลาร์ไดนามิกส์ซิมูเลชัน เพื่ออธิบายถึงความเหมือน/ความแตกต่างทางด้าน โครงสร้าง การเคลื่อนที่ของโปรตีนและตัว รวมถึง คำนวณพลังงานเสรีกิบส์ เปรียบเทียบผลการคำนวณที่ได้กับผลการทดลองหรือผลการคำนวณจากงานวิจัยอื่นๆ

1.4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

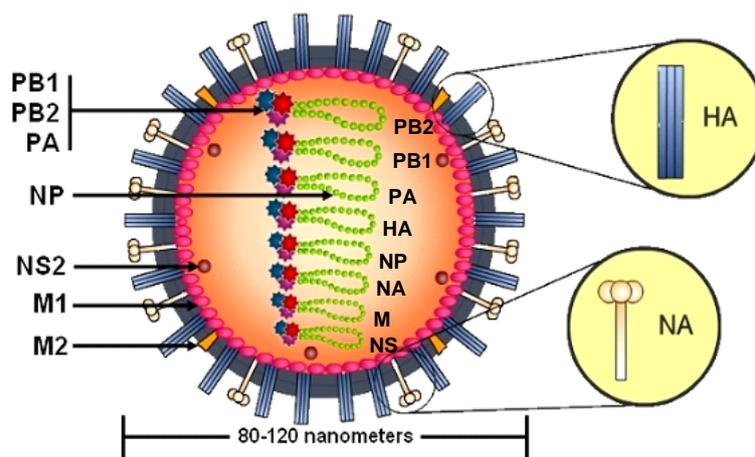
1. เป็นองค์ความรู้พื้นฐานที่สำคัญต่อการศึกษาวิจัยและคิดค้นพัฒนาาที่ออกฤทธิ์ด้านการทำงานของโปรตีนฮีแมกกลูตินินในไวรัสไข้หวัดนกต่อไป
2. สามารถนำเอาความรู้ทางด้านคอมพิวเตอร์มาประยุกต์ใช้ในการแก้ปัญหาระบบทางเคมีซึ่งสามารถสร้างความเชื่อมั่นของความเป็นไปได้ของระบบที่ทำการศึกษาก่อนทำการปฏิบัติการจริง
3. สามารถช่วยลดงบประมาณ และเวลาในการศึกษา ทดลองในห้องปฏิบัติการจริง
4. ใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาและการประยุกต์ใช้สมุนไพรรักษาโรคอื่นในการศึกษาวิจัยและคิดค้นพัฒนาาที่ออกฤทธิ์ด้านการทำงานของโปรตีนฮีแมกกลูตินินในไวรัสไข้หวัดนกต่อไป
5. เสนอผลงานในการประชุมวิชาการต่างๆ หรือ ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับชาติ

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไวรัสไข้หวัดใหญ่

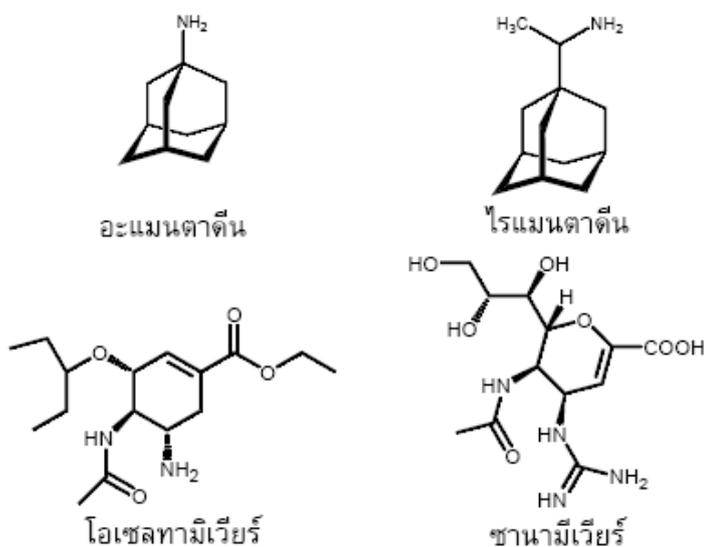
ไวรัสไข้หวัดใหญ่มีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวที่มีลักษณะเป็นท่อนๆ จัดอยู่ในกลุ่มของ *Orthomyxoviridae* (Matrosovich, Gambaryan et al. 1997; Karthik Viswanathan , Aravind Srinivasan et al. 2010) จากรหัสพันธุกรรมของนิวคลีโอโปรตีนและเมทริกซ์โปรตีนสามารถแบ่งเชื้อไวรัสออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ เอ บี และ ซี โดยเชื้อไวรัสในกลุ่มเอ จะมีการเปลี่ยนแปลงของรหัสพันธุกรรมค่อนข้างสูง จึงเป็นกลุ่มที่มีการระบาดรุนแรง พบได้บ่อย และก่อให้เกิดไวรัสสายพันธุ์ชนิดใหม่ๆ เชื้อไวรัสในกลุ่มบี จัดเป็นอีกกลุ่มที่ทำให้เกิดเชื้อไวรัสไข้หวัดสายพันธุ์ชนิดใหม่ๆ เช่นเดียวกับกลุ่มเอ แต่มีโอกาสพบค่อนข้างน้อยกว่า ส่วนเชื้อไวรัสในกลุ่มซี มักจะก่อให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ แต่ไม่ก่อให้เกิดสายพันธุ์ใหม่ของเชื้อไวรัส (Horimoto and Kawaoka 2001) ดังนั้นงานวิจัยส่วนใหญ่จึงมุ่งเน้นศึกษาเชื้อไวรัสไข้หวัดกลุ่ม เอ ที่บริเวณเปลือกผิวชั้นนอกของอนุภาคไวรัสกลุ่ม เอ จะประกอบด้วยไกลโคโปรตีน 2 ชนิด (รูปที่ 2.1) ได้แก่ ฮีแมกกลูตินิน (Hemagglutinin; HA) ซึ่งมี 16 ชนิด และนิรามินิเดส (Neuraminidase; NA) ซึ่งมี 9 ชนิด (Tobita 1997) ดังนั้นในการระบุสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่กลุ่ม เอ ทุกครั้งจะต้องมีการระบุทั้งชนิดของฮีแมกกลูตินิน และ นิรามินิเดสควบคู่กัน เช่น H1N1, H3N2 หรือ H5N1 เป็นต้น สำหรับไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาลที่ระบาดในมนุษย์เป็นประจำทุกปีนั้นคือสายพันธุ์ H1N1 และ H3N2



รูปที่ 2.1 โครงสร้างและองค์ประกอบของอนุภาคไวรัสไข้หวัดใหญ่

กระบวนการแพร่พันธุ์ของเชื้อไขหวัดนั้น เริ่มต้นจากไกลโคโปรตีนฮีแมกกลูตินิน ของอนุภาคไวรัสยึดเกาะกับตัวรับของโฮสต์ซึ่งประกอบด้วยกรดไซแอลิก (sialic acid, SA) เชื่อมต่อกับน้ำตาลกาแลคโตส (galactose, Gal) (Steinhauer 1999) การยึดเกาะนี้มีความจำเพาะเจาะจงสูง กล่าวคือหากโปรตีนฮีแมกกลูตินินจับกับตัวรับบนผิวของโฮสต์ได้ดี เชื้อจะแพร่เข้าสู่ร่างกายโฮสต์ได้ง่ายมีการกระจายของเชื้ออย่างรวดเร็ว ในทางตรงกันข้าม หากโปรตีนฮีแมกกลูตินินไม่สามารถยึดเกาะกับตัวรับบนผิวของโฮสต์ได้ การแพร่เข้าสู่เซลล์ของเชื้อไวรัสก็จะไม่เกิดขึ้น

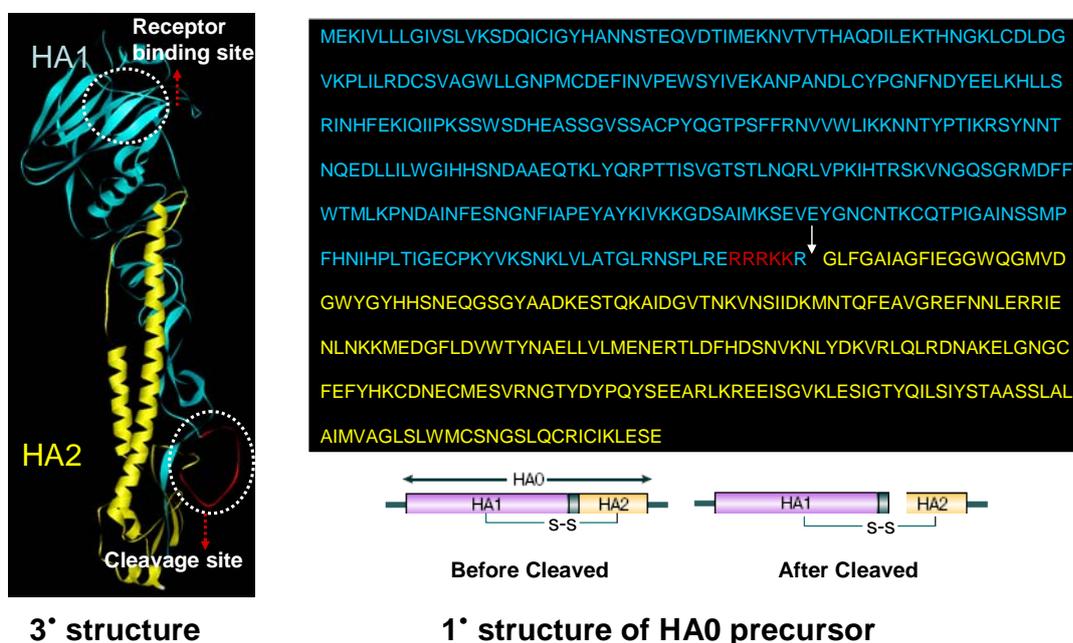
นอกจากฮีแมกกลูตินิน แล้ว เมมเบรนโปรตีนไอออนแชนแนลหรือ M2 และไกลโคโปรตีน NA ยังมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเชื้อไวรัส โดย M2 ทำหน้าที่ลอกเยื่อหุ้มเมมเบรนของไวรัสโดยการลำเลียงโปรตอนผ่านแชนแนลเข้าสู่เซลล์ไวรัส ส่วนไกลโคโปรตีน NA มีหน้าที่ตัดหมู่กรดไซแอลิกของตัวรับที่ยึดเกาะไวรัสไว้ เพื่อปลดปล่อยอนุภาคไวรัสตัวใหม่ออกจากเซลล์เริ่มต้น และแพร่กระจายไปสู่เซลล์อื่นๆ ต่อไป (Cross, Burleigh et al. 2001) ในปัจจุบันมียารักษาไขหวัดใหญ่เพียง 4 ชนิด (รูปที่ 2.2) เท่านั้นที่ผ่านการรับรองจากองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา ได้แก่ อะแมนตาดีน ไรแมนตาดีน โอเซลทามิเวียร์ และซานามิเวียร์ สำหรับยา 2 ชนิดแรกนั้นถูกพัฒนาขึ้นเพื่อป้องกันการรบกวนการทำงานของโปรตีน M2 ในขณะที่ยาอีก 2 ชนิดถูกคิดค้นขึ้นเพื่อใช้ขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ NA อย่างไรก็ตามการใช้ยาดังกล่าวได้ก่อให้เกิดปัญหาการดื้อยาสูง โดยเฉพาะอะแมนตาดีนและไรแมนตาดีน พบว่ามีอัตราการดื้อยาสูงถึง 90 % (De Clercq and Neyts 2007) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการพัฒนายาที่ออกฤทธิ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อเป้าหมายใหม่



รูปที่ 2.2 โครงสร้าง 2 มิติ ของยาที่ใช้ในการรักษาไวรัสไขหวัดใหญ่

2.2 โครงสร้างโปรตีนฮีแมกกลูตินิน

ฮีแมกกลูตินินเป็นไกลโคโปรตีนเกาะอยู่ที่ผิวของอนุภาคไวรัส อยู่ในรูปของไตรเมอร์ โดยที่ฮีแมกกลูตินินจะถูกสร้างเป็นสายโพลีเปปไทด์ตั้งต้น (precursor polypeptide) ที่เรียกว่า HA0 ก่อน จากนั้นจะถูกตัดตรงบริเวณถูกย่อย (cleavage site) ด้วยเอนไซม์โปรติเอสของโฮสต์ ออกเป็น 2 ส่วน คือ HA1 และ HA2 (รูป 2.3) ซึ่งโพลีเปปไทด์ทั้งคู่จะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ โดย HA1 ทำหน้าที่ในการจับกับตัวรับบนผิวเซลล์ของโฮสต์ ในขณะที่ HA2 ทำหน้าที่ในการฟิวชัน (fusion) เพื่อปล่อยสารพันธุกรรมเข้าสู่เซลล์ต่อไป (Steinhauer 1999) จากการวิเคราะห์โครงสร้างและลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนฮีแมกกลูตินิน ทั้ง 16 ชนิดนั้น สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่ม 1 ประกอบด้วย H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13, และ H16 และกลุ่ม 2 ประกอบด้วย H3, H4, H7, H10, H14 และ H15 (Russell, Kerry et al. 2008)



รูปที่ 2.3 โครงสร้างสามมิติและลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนฮีแมกกลูตินินของเชื้อไวรัสไข้หวัดสายพันธุ์ H5N1

ความสำคัญอีกประการของโปรตีนฮีแมกกลูตินิน คือ ใช้พิจารณาระดับความรุนแรงในการก่อโรคซึ่งแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ ชนิดก่อโรคไม่รุนแรง (low pathogenic influenza virus) และชนิดก่อโรครุนแรง (high pathogenic influenza virus) โดยพิจารณาจากกรดอะมิโนในบริเวณ cleavage site ของโปรตีนฮีแมกกลูตินิน ที่เป็นสายโพลีเปปไทด์ตั้งต้น ถ้าเป็นชนิดก่อให้เกิดโรครุนแรงจะพบว่าบริเวณดังกล่าวมีกรดอะมิโน -RRRKK- แทรกเข้ามา ซึ่งจะถูกลดอย่างจำเพาะเจาะจงด้วยเอนไซม์ฟิวรินที่พบทั่วไปตามร่างกาย ทำให้มีการกระจายของเชื้อเข้าสู่ร่างกายอย่างรวดเร็ว

นอกจากนี้ในเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรครุนแรงนั้นกรดอะมิโน –RRRKK-อาจมีความยาวเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ขณะที่จะไม่พบลำดับของกรดอะมิโนดังกล่าวในเชื้อไวรัสชนิดก่อโรคไม่รุนแรง (รูป 2.4) จากการศึกษที่ผ่านมาพบว่ามีเพียงสายพันธุ์ H5 และ H7 เท่านั้นที่เป็นไวรัสชนิดก่อให้เกิดโรครุนแรง (Horimoto and Kawaoka 2001)

	Cleavage site	
	← HA2 →	
A/mallard/Wisconsin/428/75	P Q R E - - - - T R G	ก่อโรคไม่รุนแรง
A/duck/minnesota/1525/81	* * * * - - - - * * *	
A/gull/Pennsylvania/4175/83	* * * * - - - - * K *	
A/Goose/Guangdong/1/96	* * * * R R R K K * *	
A/Chicken/HongKong/976/97	* * * * R R R K K * *	
A/chicken/Nakorn-Patong/Thailand/CU-K2/04	* * * * R R R K K * *	
A/cat/Thailand/KU-02/04	* * * * R R R K K * *	
A/tiger/Suphanburi/Thailand/T1-1/04	* * * * R R R K K * *	
A/dog/Thailand-Suphanburi/KU-08/04	* * * * R R R K K * *	
A/mallard/Vietnam/347/05	* * * * R R R K K * *	
A/Backyard-chicken/Pichit/Thailand/149/06 ←	* * * * R R R K K * *	
A/whiteteafowl/Bangkok/Thailand/CU-16/04	* * * * R K R K K * *	ก่อโรครุนแรง
A/KaljiPheasant/Bangkok/Thailand/CU-18/04	* * * * R K R K K * *	
A/openbill/Thailand/CU-2/04	* * * * K R R K K * *	
A/chicken/Thailand/Kanchanaburi/CK-160/05	* * * * K R R K K * *	
A/quail/Thailand/Nakhon Pathom/QA-161/05	* * * * K R R K K * *	
A/chicken/Thailand/Nontaburi/CK-162/05	* * * * K R R K K * *	
A/Thailand/NKI65/05	* * * * K R R K K * *	
A/Farm-chicken/Pichit/Thailand/410/06 ←	* * * * K R R K K * *	

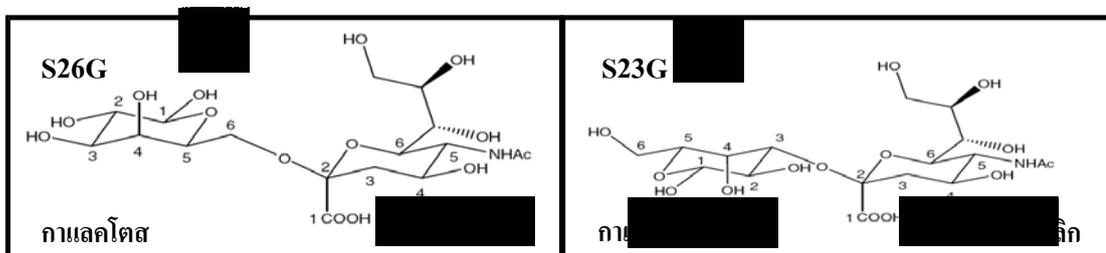
รูปที่ 2.4 ตำแหน่ง cleavage site ของโปรตีนฮีแมกกลูตินินชนิดก่อโรครุนแรง และ ไม่รุนแรง (Taisuke Horimoto 2005)

จากการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลของโปรตีนฮีแมกกลูตินิน ของไขหวัดนกสายพันธุ์ H5 ทั้งชนิดที่ก่อโรคไม่รุนแรงและรุนแรง และสายพันธุ์ H3 (ชนิดก่อโรคไม่รุนแรง) พบว่ากรดอะมิโน โดยเฉพาะอาร์จินีนที่ตำแหน่ง S1 ในสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรครุนแรงนั้นสามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนได้อย่างแข็งแรงกับกรดอะมิโนของเอนไซม์ฟิวรีน ในขณะที่สายพันธุ์ที่ก่อโรคไม่รุนแรงนั้นมีอันตรกิริยาดังกล่าวน้อยมาก นอกจากนี้การศึกษากลไกการตัดของเอนไซม์ฟิวรีนแสดงให้เห็นว่าน่าจะมีผ่าน 2 กระบวนการ คือการถ่ายโอนโปรตอน (proton transfer) และ nucleophilic attack

2.3 ความจำเพาะของฮีแมกกลูตินินในการเข้าจับกับตัวรับของโฮสต์

ในช่วงที่มีการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก H5N1 นั้นได้ก่อให้เกิดความตื่นตระหนกและกังวลเป็นอย่างมากว่า เชื้อไวรัสไข้หวัดนกจะแพร่หรือระบาดอย่างรุนแรงไปสู่มนุษย์ได้หรือไม่ อย่างไร และปัจจัยใดที่เป็นตัวควบคุมหรือกำหนดการแพร่ระบาดนี้ ดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้นว่าการยึดจับระหว่างโปรตีนฮีแมกกลูตินินของไวรัสและตัวรับบนผิวเซลล์ของโฮสต์นั้นถือเป็นด่านแรกที่สำคัญในการเข้าสู่เซลล์ของเชื้อไวรัสไข้หวัด เนื่องจากสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีลักษณะของตัวรับซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตเกาะอยู่บนผิวเซลล์แตกต่างกันออกไป ดังนั้นการยึดจับของ HA และตัวรับจึงมีความจำเพาะค่อนข้างสูง และความจำเพาะนี้เองที่เป็นปัจจัยกำหนดการติดเชื้อไวรัสในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นสัตว์ปีก สุนัข หรือแม้กระทั่งในมนุษย์ การยึดเกาะระหว่างโมเลกุลฮีแมกกลูตินินและตัวรับบนผิวของโฮสต์นั้นแบ่งได้เป็น 2 แบบ คือ การยึดเกาะกับตัวรับของโฮสต์ที่มีกรดไซเอลิกเชื่อมต่อกับน้ำตาลกาแลคโตสแบบแอลฟา 2,3 (SA- α 2,3-Gal; S23G) และแบบแอลฟา 2,6 (SA- α 2,6-Gal; S26G) (Horimoto and Kawaoka 2001; Karthik Viswanathan, Aravind Srinivasan et al. 2010) (รูป 2.5)

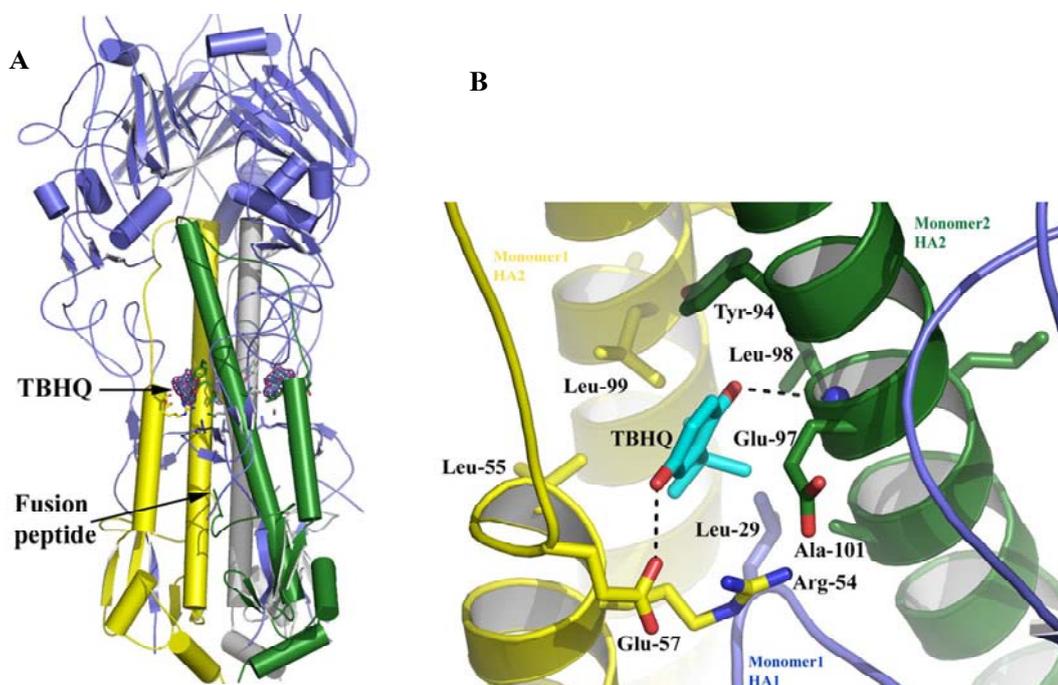
งานวิจัยจำนวนมาก แสดงให้เห็นว่าโปรตีนฮีแมกกลูตินินจากไวรัสไข้หวัดใหญ่ในสัตว์ปีกและม้าชอบที่จะจับกับตัวรับแบบ S23G เชื้อไวรัสในมนุษย์จะชอบจับแบบ S26G ส่วนเชื้อไวรัสในสุกรนั้นพบว่าสามารถจับกับตัวรับทั้ง 2 แบบได้ดีในบริเวณระบบทางเดินหายใจส่วนบนของมนุษย์จะมีตัวรับแบบ S26G เป็นส่วนใหญ่ ดังนั้นเชื้อไวรัสไข้หวัดนกจึงติดต่อดู่นได้ค่อนข้างยาก ส่วนระบบทางเดินหายใจส่วนล่างของมนุษย์นั้นจะมีตัวรับแบบ S23G ทำนองตรงกันข้าม ในระบบทางเดินหายใจของสัตว์ปีกส่วนใหญ่จะมีตัวรับแบบ S23G ดังนั้นในสัตว์ปีกจึงมีการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดนกได้ง่ายกว่า ได้มีการตั้งสมมติฐานว่าการติดเชื้อข้ามสายพันธุ์จากสัตว์ปีกไปยังมนุษย์น่าจะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงลักษณะการยึดเกาะของโปรตีนฮีแมกกลูตินินกับตัวรับจากแบบ S23G เป็นแบบ S26G



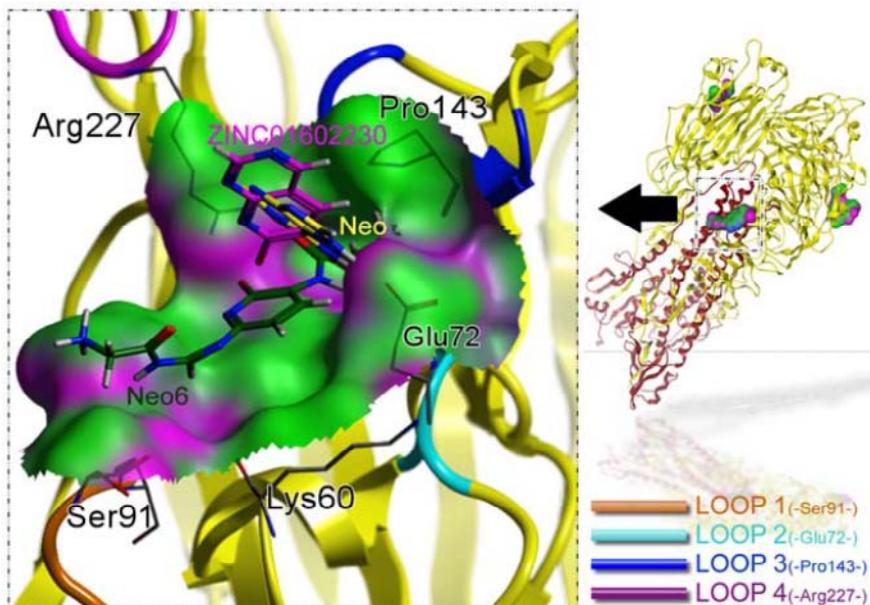
รูปที่ 2. โครงสร้างทางโมเลกุลของตัวรับของโฮสต์แบบ S23G และ S26G

2.4 ความก้าวหน้าในการพัฒนายาที่ออกฤทธิ์ต่อโปรตีน

ปัจจุบันยังไม่มีรายงานว่ามียาที่ผ่านการรับรองจากองค์การอาหารและยาสหรัฐอเมริกาที่สามารถออกฤทธิ์ขัดขวางหรือยับยั้งการทำงานของโปรตีนฮีแมกกลูตินินได้ ความก้าวหน้าในการคิดค้นหรือพัฒนายาที่ออกฤทธิ์ต้านโปรตีนฮีแมกกลูตินินนั้นมีเพียงกลุ่มอนุพันธ์ที่ใช้ยับยั้งการทำงานในขั้นตอนการฟิวส์ชันของโปรตีนฮีแมกกลูตินินเท่านั้น เช่น tert-butyl hydroquinone หรือ TBHQ (รูป 2.6) (Russell, Kerry et al. 2008) อนุพันธ์ของคาร์บอกซาไมด์ (Vanderlinden, Göktas et al. 2010) และสารกลุ่ม NeO6 (รูป 2.7) (Li, Wang et al. 2011) เนื่องจากค่า pH ที่เป็นกรดของแอนโดไซม์จะเหนี่ยวนำให้โปรตีนฮีแมกกลูตินินเกิดการเปลี่ยนโครงสร้างอย่างถาวร และนำไปสู่กระบวนการฟิวส์ชันของเชื้อไวรัสต่อไป ดังนั้นสารออกฤทธิ์ยับยั้งในกลุ่มนี้จะทำหน้าที่ขัดขวางไม่ให้เกิดการเปลี่ยนโครงสร้างของโปรตีนฮีแมกกลูตินินอย่างไรก็ตามสารในกลุ่มนี้สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานในขั้นตอนการฟิวส์ชันของโปรตีนฮีแมกกลูตินินในกลุ่ม 2 (H3, H4, H7, H10, H14 และ H15) เท่านั้น แต่ไม่สามารถออกฤทธิ์ต่อกลุ่ม 1 เช่น เชื้อไวรัสสายพันธุ์ H1 ที่มีการแพร่ระบาดในมนุษย์ และ H5 ที่ก่อให้เกิดโรคระบาดอย่างรุนแรงได้ ดังนั้นการคิดค้นหรือ พัฒนายาที่ออกฤทธิ์ขัดขวางการทำงานของฮีแมกกลูตินินในกลุ่มที่ 1 รวมทั้งสารที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งในบริเวณที่มีการยึดเกาะกับตัวรับจึงยังเป็นเรื่องที่จะต้องศึกษาและค้นคว้าต่อไป



รูปที่ 2.6 โครงสร้างไตรเมอร์ของโปรตีนฮีแมกกลูตินินสายพันธุ์ H14 (A) ลักษณะการยึดจับระหว่าง TBHQ และ โปรตีนฮีแมกกลูตินิน (B)



รูปที่ 2.7 ลักษณะการยึดจับระหว่าง NeO6 และ โปรตีนฮีแมกกลูตินิน

2.5 ฟีทอลอยด์และสารสำคัญ

จากรายงานจากระทรวงสาธารณสุขที่ระบุว่า สมุนไพรไทยหลายชนิดมีฤทธิ์ต้านไข้หวัดใหญ่ได้ โดยเฉพาะ "ฟีทอลอยด์" นั้นมีสรรพคุณดีเยี่ยม สารสำคัญหลักพบในฟีทอลอยด์ คือ Andrographolide เป็นสารในกลุ่ม Diterpenoid lactone นอกจากนี้ยังพบอนุพันธ์อื่นๆ ของ andrographolide เช่น 1,4 - deoxy andrographolide และ neoandrographolide นอกจากนี้มีรายงานว่า ฟีทอลอยด์ให้ผลในการป้องกันหวัดและบรรเทาอาการหวัด การศึกษาในนักเรียนโตในช่วงฤดูหนาว ให้กินยาเม็ดฟีทอลอยด์แห้ง ขนาด 200 มก./วัน ในเดือนแรกของการทดลองยังไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่กินยาและกลุ่มควบคุม หลังจาก 3 เดือนของการทดลอง อุดบัติการณการเป็นหวัดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม อัตราการเป็นหวัดในกลุ่มที่ได้รับฟีทอลอยด์เท่ากับ 20% ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีอัตราการเป็นหวัดเท่ากับ 62% ผลในการป้องกันของยา (the attributable protective effect) เท่ากับ 33% (Caceres, Hancke et al. 1997; Caceres, Hancke et al. 1999)

ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาเชิงลึกในระดับโมเลกุลโดยใช้เทคนิคเคมีคอมพิวเตอร์ ศึกษาของกลไกการทำงานและลักษณะความจำเพาะเจาะจงของโปรตีนฮีแมกกลูตินินที่มีต่อตัวรับซึ่งที่ได้จากสารสกัดจากสมุนไพรท้องถิ่น อย่างสารในกลุ่ม Diterpenoid lactone ที่มีรายงานไว้แล้วรวมถึงสารสกัดตัวใหม่ที่อาจจะสกัดได้จากสมุนไพรท้องถิ่น โดยเฉพาะจากฟีทอลอยด์ เพื่อให้เกิดความรู้

ความเข้าใจในการขัดขวางการทำงานของโปรตีนฮีแมกกลูตินิน อันจะเป็นโอกาสการค้นพบหรือพัฒนาาที่สามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีนฮีแมกกลูตินินอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

2.6 สรุปงานวิจัยที่สำคัญและเกี่ยวข้องกับฮีแมกกลูตินิน

ในปี 2006 Stevens และคณะ (Stevens, Blixt et al. 2006) ได้รายงานโครงสร้างของโปรตีนฮีแมกกลูตินิน สายพันธุ์ H5N1 (2004) ซึ่งได้จากการตกผลึกด้วยเทคนิค X-ray crystallography นอกจากนี้ยังได้เปรียบเทียบโครงสร้างของฮีแมกกลูตินินที่ได้จากเชื้อ H5N1 (2004) กับโปรตีนฮีแมกกลูตินินของเชื้อ H5N1 ที่พบใน Hong Kong ในปี 1997 รวมทั้งฮีแมกกลูตินิน ของ pandemic influenza สายพันธุ์ Spanish flu H1N1 (1918) ซึ่งเป็น pandemic strain ที่ระบาดในปี ค.ศ.1918 ซึ่งมีความรุนแรงมากที่สุดในประวัติศาสตร์ของการเกิดการระบาดใหญ่ทั้งหมด เป็นที่น่าสังเกตว่าทั้ง H1 (Spanish flu, 1918), H5 (Hong Kong, 1997) และ H5 (Vietnam, 2004) รวมทั้งเชื้อ H5N1 ที่แยกได้ในประเทศไทยต่างมีการเรียงตัวของกรดอะมิโนที่ประกอบเป็นโครงสร้างพื้นฐานของ receptor binding site (ตำแหน่งกรดอะมิโน ที่ 226 และ 228) ที่เหมือนกัน เพียงแต่เชื้อ Spanish flu มี การกลายพันธุ์เพิ่มอีก 1 ตำแหน่งคือที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 190 ของโปรตีนฮีแมกกลูตินิน จึงทำให้ฮีแมกกลูตินิน ของเชื้อสามารถจับกับตัวรับของเซลล์ของมนุษย์ได้อย่างสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ปัจจุบันยังไม่มียาต้านการออกฤทธิ์ของฮีแมกกลูตินิน แต่มีการพยายามออกแบบสารยับยั้งการทำงานของโปรตีนดังกล่าวนี้ตรงตำแหน่งที่จับกับตัวรับบนผิวเซลล์เพื่อไม่ให้อนุภาคของไวรัสเข้าสู่เซลล์ ตัวอย่างสารยับยั้งมีเสนอไว้ในปัจจุบันได้แก่สาร sialoglycopolymer ให้ค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งเชื้อ 50% (IC_{50}) เท่ากับ 12.8 ng/mL ซึ่งประสิทธิภาพของการยับยั้งเพิ่มขึ้นเป็น 40 เท่า และ 300 เท่า เมื่อเทียบกับสารยับยั้งที่มีการเสนอไว้ก่อนคือ sialoglycopeptide และ fetuin ตามลำดับ (Makimura, Watanabe et al. 2006; Ogata, Murata et al. 2007)

ในปี 2008 Tannistha Nandi (Nandi 2008) ได้เสนอ lead compound ที่คาดว่าจะสามารถใช้เป็นตัวยับยั้งการทำงานของโปรตีนฮีแมกกลูตินิน โดยใช้วิธีคัดเลือกลีดสารแบบ high throughput virtual screening จาก ZINC database ซึ่งพบว่าสาร ZINC00487720 และ ZINC0046810 มีแนวโน้ม

เป็นสารยับยั้งการทำงานของโปรตีนฮีแมกกลูตินินได้ดี ขณะนี้ได้มีการทดสอบสารทั้งสองกับสิ่งมีชีวิตหรือ *in vivo test*

ในปี 2011 Xiao-Bo Li และคณะ (Li, Wang et al. 2011) ได้เสนอ lead compound ที่คาดว่าน่าจะสามารถใช้เป็นตัวยับยั้งการทำงานของโปรตีนฮีแมกกลูตินิน โดยใช้วิธีคัดเลือกลำดับแบบ high throughput virtual screening จาก ZINC database ซึ่งพบว่าสาร NeO และ NeO6 มีแนวโน้มเป็นสารยับยั้งการทำงานของโปรตีนฮีแมกกลูตินินได้ดี ขณะนี้ได้มีการทดสอบสารทั้งสองกับสิ่งมีชีวิตหรือ *in vivo test*

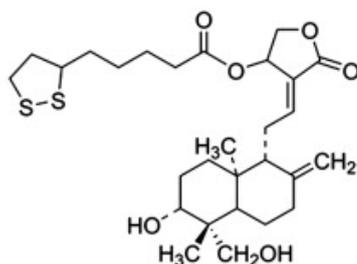
ในปี 2008 Russell และคณะ (Russell, Kerry et al. 2008) ได้ศึกษา tert-butyl hydroquinone หรือ TBHQ กับ HA พบว่าสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของขั้นตอนการฟิวส์ชันของโปรตีนฮีแมกกลูตินิน ในกลุ่ม 2 (H3 H4 H7 H10 H14 และ H15) เท่านั้น แต่ไม่สามารถออกฤทธิ์ต่อกลุ่ม 1 เช่น เชื้อไวรัสสายพันธุ์ H1 ที่มีการแพร่ระบาดในมนุษย์ และ H5 ที่ก่อให้เกิดโรคระบาดอย่างรุนแรงได้

2.7 งานวิจัยที่สำคัญและเกี่ยวข้องกับฟ้าทะลายโจร

ในปี 1997 และ 1999 Caceres DD (Caceres, Hancke et al. 1997; Caceres, Hancke et al. 1999) และคณะ รายงานว่าฟ้าทะลายโจรให้ผลในการป้องกันหวัดและบรรเทาอาการหวัด การศึกษาในนักเรียนโตในช่วงฤดูหนาว ให้กินยาเม็ดฟ้าทะลายโจรแห้ง ขนาด 200 มก./วัน ในเดือนแรกของการทดลองยังไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่กินยาและกลุ่มควบคุม หลังจาก 3 เดือนของการทดลอง อุบัติการณ์การเป็นหวัดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม อัตราการเป็นหวัดในกลุ่มที่ได้รับฟ้าทะลายโจรเท่ากับ 20% ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีอัตราการเป็นหวัดเท่ากับ 62%

ในปี 2009 Cheng, JX และคณะ (Cheng, Fang et al. 2009) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านไวรัส influenza ของสาร andrographolide และอนุพันธ์ ทั้งในสัตว์ทดลอง (*vivo*) และในหลอดทดลอง (*vitro*) เมื่อให้หนูที่ติดเชื้อมีไวรัส ชนิด H9N1, H5N1 และ N1N1 กินสารอนุพันธ์ ของ andrographolide ที่ชื่อว่า AL-1 (โครงสร้างดังรูปที่ 2.8) พบว่าลดอัตราการตายของ รวมถึงการติดเชื้อในปอดของหนูได้ ค่า LD₅₀ ของสาร AL-1 เท่ากับ 1243 mg/kg/d จากงานวิจัยนี้สรุปได้ว่า สาร

AL-1 สามารถยับยั้งการทำงานของฮีแมกกลูตินินที่บริเวณ receptor binding ได้ รายละเอียดดังตารางที่ 2.1



รูปที่ 2.8 โครงสร้าง 1,4-alpha-lipoyl andrographolide (AL-1)

ตาราง 2.1 ผลการยับยั้งการทำงานของฮีแมกกลูตินินที่บริเวณ receptor binding ด้วยสาร AL-1

Compound	Dose	Survived/total	MDD ^b ± S.D.	Mean host	Estimated
	(mg/kg/d)			weight change (g)	LD ₅₀ (mg/kg/d)
AL_1	1600	2/(10)	7.9 ± 1.7	-2.5	1243
	1200	6/(10)	9.7 ± 2.1	-1.9	
	800	9/(10)	11.0 ± 0.0	2.8	
	400	10/(10)	>21.0	3.1	
	200	10/(10)	>21.0	3.4	
Normal controls	-	5/(5)	>21.0	3.5	

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และโปรแกรมสำเร็จรูป

1. เครื่องคอมพิวเตอร์ PCs
2. โปรแกรมสำเร็จรูปทางเคมี เช่น AMBER10, Gaussian 03 และ Autodock Program.
3. เครื่องคอมพิวเตอร์แม่ข่าย มหาวิทยาลัยทักษิณ
4. เครื่องคอมพิวเตอร์แต่แม่ข่าย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
5. อินเทอร์เน็ต

3.1 เตรียมไฟล์ โครงสร้างสามมิติของโปรตีนฮีแมกกลูตินิน

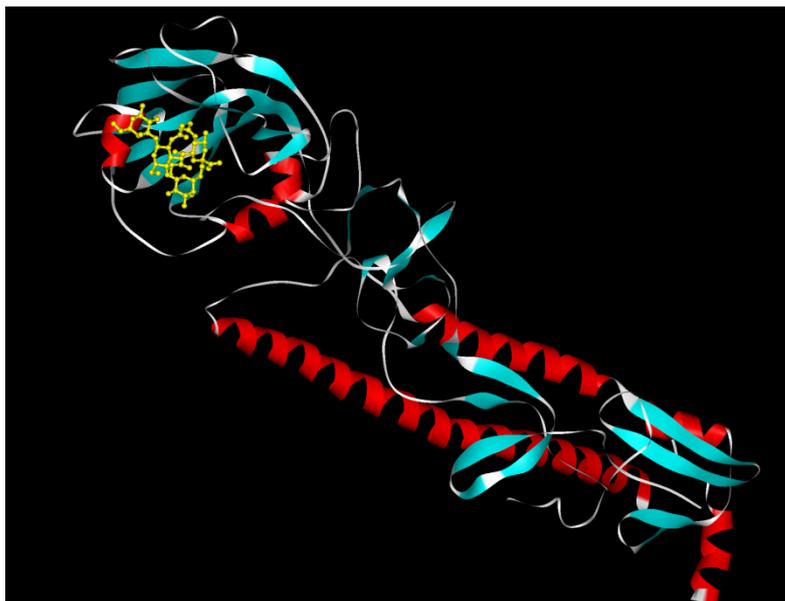
3.1.1 เตรียมโครงสร้างสามมิติโปรตีนฮีแมกกลูตินิน

สามารถดาวน์โหลดโครงสร้างสามมิติของโปรตีนฮีแมกกลูตินินได้จากเว็บไซต์ Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>) ดังรูปที่ 3.1 โดย PDB ID ของโปรตีนตัวนี้ คือ 3UBE



The screenshot displays the PDB website interface. At the top, it shows the PDB logo and the text "An Information Portal to Biological Macromolecular Structures". The search bar contains "3UBE". The main content area features the title "Influenza hemagglutinin from the 2009 pandemic in complex with ligand LSTC" and the PDB ID "3UBE". Below this, there is a section for "Primary Citation" with the following text: "Structural characterization of the hemagglutinin receptor specificity from the 2009 H1N1 influenza pandemic. Xiu, R., McBride, R., Nycholat, C.M., Paulson, J.C., Wilson, I.A. Journal: (2012) J.Virol. 86: 982-990. PubMed: 22072785 PubMedCentral: PMC3255799 DOI: 10.1128/JVI.06322-11 Search Related Articles in PubMed PubMed Abstract: Influenza virus hemagglutinin (HA) is the viral envelope protein that mediates viral attachment to host cells and elicits membrane fusion. The HA receptor-binding specificity is a key determinant for the host range and transmissibility of influenza." On the right side, there is a 3D molecular model of the protein structure, and a dropdown menu for "Display Files" and "Download Files" is visible.

รูปที่ 3.1 โครงสร้างสามมิติของโปรตีน 3UBE จากเว็บไซต์ Protein Data Bank



รูปที่ 3.2 โครงสร้างสามมิติสารประกอบเชิงซ้อน โปรตีนฮีแมกกลูตินินกับตัวรับ S26G

เมื่อทำการ save file จะได้ไฟล์ชื่อ 3UBE.pdb แต่ส่วนนี้ ยังไม่สามารถใช้ในการคำนวณได้ ต้องทำการเตรียมไฟล์ใหม่ ซึ่งสามารถทำได้ ดังนี้

3.1.1.1 เปิดไฟล์ 3UBE.pdb โดยใช้โปรแกรมที่เป็น text editor เช่น โปรแกรม EditPlus3 ส่วนต่างๆ ของไฟล์ PDB เช่น ส่วนที่เป็น annotation ของโครงสร้างสามมิติ ส่วนที่เก็บค่า coordinate x, y, z ของแต่ละ ATOM และส่วนที่เป็น HETATM ซึ่งจะเป็นส่วนของ inhibitor หรือ co-factor ต่างๆ ในตัวอย่างนี้ คือ สารอนุพันธ์แอนโดรกราโฟไลด์

3.1.1.2 ทำการพิจารณา โครงสร้างสามมิติของโปรตีน 3UBE (ไฟล์ protein.pdb) ว่ามีอะตอมหรือกรดอะมิโนใดหายไปบ้าง โดยใช้โปรแกรม chemweblab เปิดไฟล์ protein.pdb แล้วสั่งให้โปรแกรมแสดงเฉพาะโครงสร้าง backbone โดยคลิกที่ Display >backbone จากนั้นสังเกตคร่าวๆด้วยตา โดยการหมุนโครงสร้างสามมิติ และสังเกตความต่อเนื่องของโครงสร้างว่ามีการเชื่อมต่อกันตลอดทั้งโครงสร้างหรือไม่ ถ้ามีอะตอมหายไปบางส่วน อาจจะต้องทำการซ่อมแซม

3.1.1.3 ในกรณีโครงสร้างไม่ต่อเนื่องทำการเปิดไฟล์ด้วยโปรแกรม EditPlus3 ปรับเปลี่ยนที่ตำแหน่ง TER เพื่อให้โครงสร้างต่อเนื่องกัน ดังรูปที่ 3.3

Atom ID	Element	Residue	Chain	Conformation	Occupancy	x	y	z	Occupancy	Occupancy	Occupancy	Occupancy	Occupancy	Occupancy
2560	ATOM	2557	O5	SIA C 330		64.208	-11.321	-11.781	1.00	0.00				
2561	ATOM	2558	O6	SIA C 330		64.616	-8.093	-10.569	1.00	0.00				
2562	TER													
2563	ATOM	1	C1	<1> 1d		60.888	-17.059	-3.683	-0.12	+0.00	-0.010	61.867		
2564	ATOM	2	C2	<1> 1d		59.561	-17.595	-4.241	-0.25	+0.01	-0.019	61.867		
2565	ATOM	3	C3	<1> 1d		58.448	-16.954	-3.385	-0.33	-0.00	+0.010	61.867		
2566	ATOM	4	C4	<1> 1d		58.325	-15.426	-3.480	-0.27	+0.02	-0.051	61.867		
2567	ATOM	5	C5	<1> 1d		59.715	-14.753	-3.613	-0.09	-0.06	+0.131	61.867		
2568	ATOM	6	C6	<1> 1d		60.842	-15.651	-3.126	-0.08	+0.00	-0.014	61.867		
2569	ATOM	7	C13	<1> 1d		57.107	-17.678	-3.451	-0.54	-0.01	+0.015	61.867		
2570	ATOM	8	C16	<1> 1d		59.422	-19.118	-4.006	-0.41	-0.00	+0.014	61.867		
2571	ATOM	9	C18	<1> 1d		58.143	-19.643	-4.657	-0.49	-0.00	+0.010	61.867		
2572	ATOM	10	C21	<1> 1d		56.972	-18.689	-4.564	-0.46	-0.01	+0.016	61.867		
2573	ATOM	11	C24	<1> 1d		59.526	-17.306	-5.731	-0.26	-0.03	+0.040	61.867		
2574	ATOM	12	C36	<1> 1d		57.756	-14.949	-2.129	-0.44	-0.00	+0.018	61.867		
2575	ATOM	13	C33	<1> 1d		60.570	-20.004	-4.489	-0.30	+0.00	+0.060	61.867		
2576	ATOM	14	C42	<1> 1d		61.823	-19.917	-3.708	-0.27	+0.02	+0.107	61.867		
2577	ATOM	15	C54	<1> 1d		61.955	-19.791	-2.383	-0.27	-0.06	-0.256	61.867		
2578	ATOM	16	C44	<1> 1d		63.269	-19.524	-1.684	-0.34	+0.07	+0.135	61.867		
2579	ATOM	17	C49	<1> 1d		60.903	-19.689	-1.352	-0.24	+0.03	+0.348	61.867		
2580	ATOM	18	C45	<1> 1d		62.839	-18.944	-0.316	-0.35	+0.08	+0.205	61.867		
2581	ATOM	19	O51	<1> 1d		61.425	-19.181	-0.172	-0.36	-0.02	-0.248	61.867		
2582	ATOM	20	O50	<1> 1d		59.710	-19.964	-1.327	-0.41	+0.02	-0.288	61.867		
2583	ATOM	21	O52	<1> 1d		64.040	-20.684	-1.427	-0.32	-0.22	-0.312	61.867		
2584	ATOM	22	H53	<1> 1d		63.610	-21.420	-1.878	-0.41	+0.03	+0.210	61.867		
2585	ATOM	23	O31	<1> 1d		59.939	-14.218	-4.910	-0.08	+0.29	-0.328	61.867		
2586	ATOM	24	H32	<1> 1d		59.359	-14.673	-5.531	-0.45	-0.39	+0.204	61.867		
2587	ATOM	25	C28	<1> 1d		57.355	-14.886	-4.542	-0.18	-0.13	+0.131	61.867		
2588	ATOM	26	O40	<1> 1d		57.645	-13.542	-4.878	-0.16	+0.37	-0.320	61.867		
2589	ATOM	27	H41	<1> 1d		58.142	-13.578	-5.704	-0.45	-0.38	+0.193	61.867		
2590	TER													

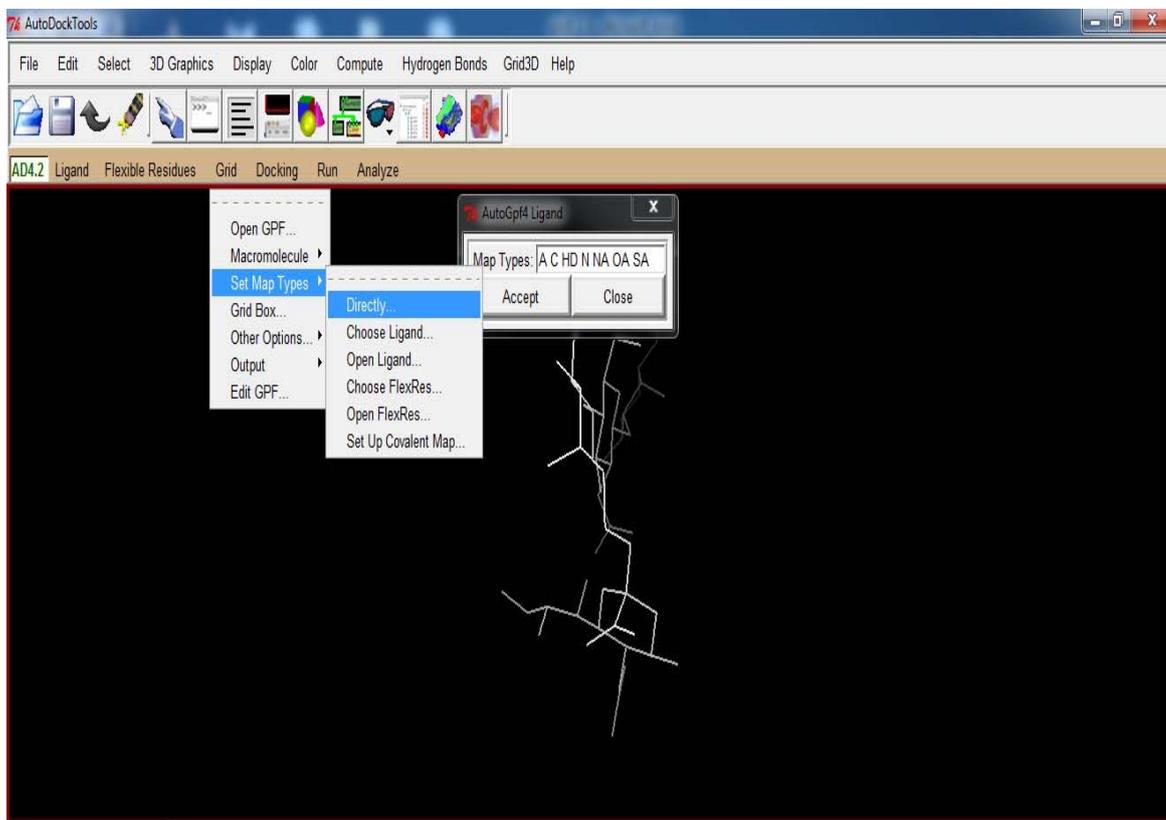
รูปที่ 3.3 การปรับเปลี่ยนตำแหน่ง TER เพื่อให้โครงสร้างต่อเนื่องกัน

3.1.1.4 หากตำแหน่งกึ่งกลางของ binding site ในกรณีนี้จะใช้ตำแหน่งกึ่งกลางของโมเลกุล S26G เนื่องจาก S26G เป็น ตัวรับ ที่ถูก solve ด้วยวิธี X-ray crystallography และพบว่าจับกับโปรตีนบริเวณกึ่งกลาง binding site ใช้โปรแกรม WebLab เปิดไฟล์ S26G.pdb จากนั้นคลิก Display > Sticks แล้วเลื่อนเมาส์ไปคลิกอะตอมใดอะตอมหนึ่งที่เราเห็นว่าอยู่กึ่งกลางของโครงสร้าง เมื่อคลิกแล้วจะปรากฏชื่อของอะตอมจุดชื่อของอะตอมนั้นไว้ แล้วใช้ text editor เปิดไฟล์ S26G.pdb หาบรรทัดที่มีโคออร์ดิเนตของอะตอมนั้น จุดค่า coordinate x, y, z ไว้เพื่อใช้ในการสร้าง Grid box ในขั้นตอนต่อไป คลิกด้วยตาไม่ได้

จากการเตรียมไฟล์ในข้อ 3.1.1.1 ถึง 3.1.1.4 จะได้ 2 ไฟล์ คือ 3UBE.pdb (ไฟล์โครงสร้างสามมิติของโปรตีน) และ S26G.pdb ขั้นตอนต่อไปจะเป็นการเติมประจุและ solvation term ให้กับทั้งสองโครงสร้าง

3.1.1.5 เติมประจุและ solvation term ให้กับโครงสร้างโปรตีน

เปิด โปรแกรม AutoDockTool (ADT) ที่ดาวน์โหลดจากเว็บไซต์ MGLTools และได้ทำการติดตั้งไว้แล้ว จากนั้นทำการเติมประจุ และ solvation term ให้กับ receptor โดยเลือก Grid > Macromolecule > open เลือกเปิดไฟล์ 3UBE.pdb จากนั้นเซฟไฟล์ผลลัพธ์เป็น 3UBE.pdbqt

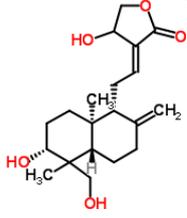
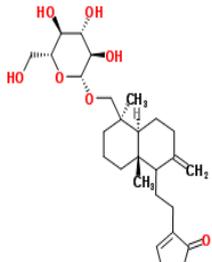
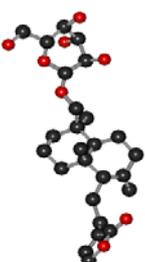
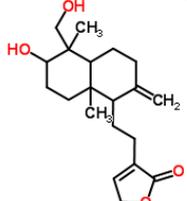
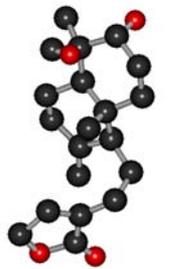
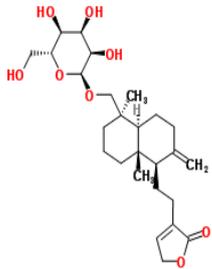
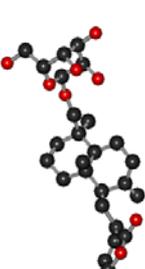
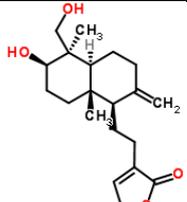
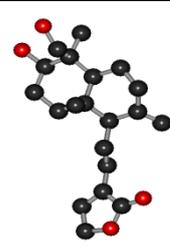
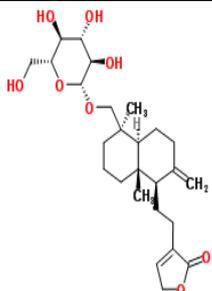
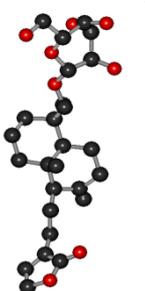
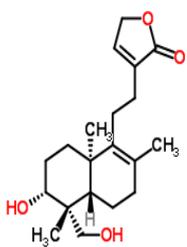
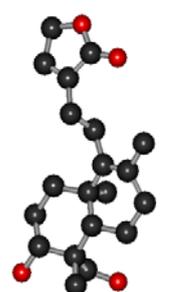
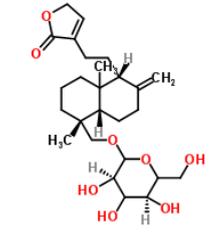
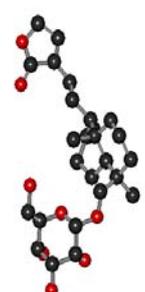
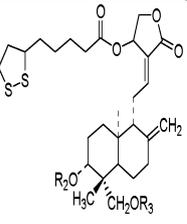
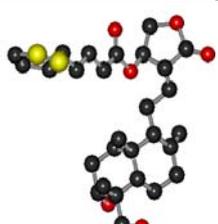


รูปที่ 3.4 การเพิ่มอะตอมไว้ใน Map Types

จากรูปที่ 3.4 คลิก Grid > Set MapTypes > Directly และพิมพ์ CL Br Fe I P เพิ่มลงไปในช่วง Map Types และกด accept เพื่อสั่งให้ AutoGrid4 สร้าง Grid energy maps ให้ครอบคลุมอะตอมทุกชนิดที่โปรแกรม AutoDock4 สามารถคำนวณค่าพลังงานได้

3.2 เตรียมไฟล์โครงสร้างสามมิติของสารแอนโดรกราโฟไลด์และอนุพันธ์ดังตาราง 3.1

ตารางที่ 3.1 โครงสร้าง 2 มิติ และ 3 มิติของสารกลุ่มแอนโดรกราโฟไลด์และอนุพันธ์ทั้ง 9 โครงสร้าง

ชื่อ	โครงสร้าง 2 มิติ	โครงสร้าง 3 มิติ	ชื่อ	โครงสร้าง 2 มิติ	โครงสร้าง 3 มิติ
Andrographolide			Neoandrographolide_1		
1,4-deoxy Andrographolide_1			Neoandrographolide_2		
1,4-deoxy Andrographolide_2			Neoandrographolide_3		
1,4-deoxy Andrographolide_3			Neoandrographolide_4		
14-alpha-lipoil andrographolide					

3.2.1. เปิดโครงสร้างตัวยับยั้ง สารกลุ่มแอนโดรกราโฟไลด์และอนุพันธ์ทั้ง 9 โครงร่าง

ที่วาดไว้ข้างต้นดังตารางที่ 3.1 ด้วยโปรแกรม AutoDockTools

โดยเลือก Ligand > Input > Open เลือกเปิดไฟล์ S26G เซฟไฟล์ผลลัพธ์ เป็น 1.pdbqt ถึง 9.pdbqt จะ save ตามลำดับของโครงสร้าง

3.3 โมเลกุลลาร์ต็อกกิ้งระหว่างอีแมกกลูตินินกับสารกลุ่มอนุพันธ์แอนโดรกราโฟไลด์

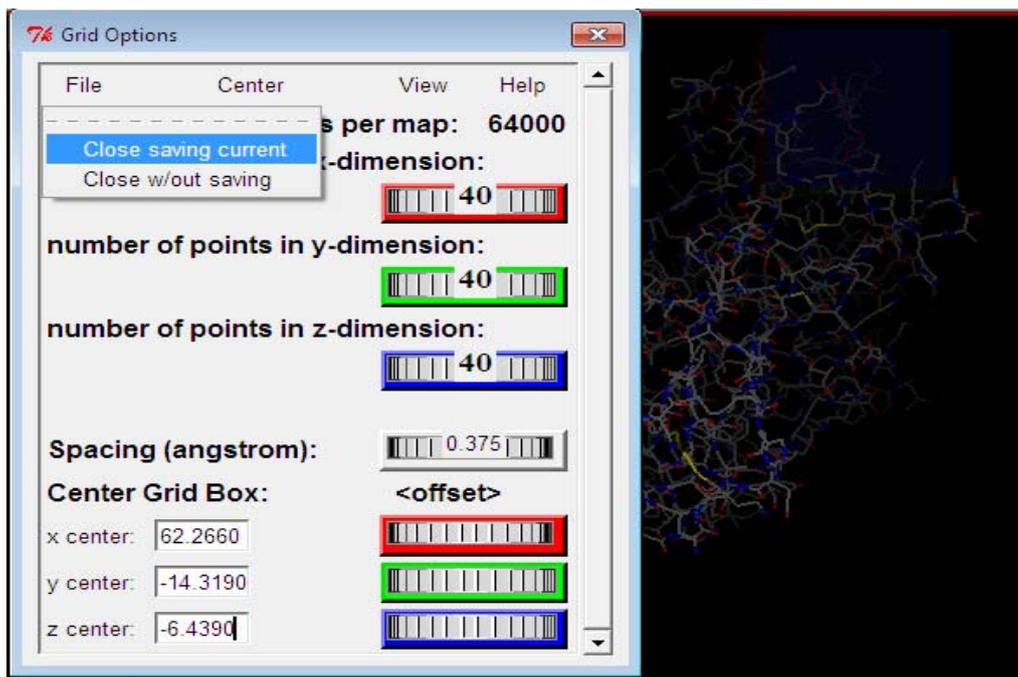
3.3.1 สร้าง Grid Parameter File (GPF)

Grid Parameter File เป็น text file ธรรมดา ที่เก็บค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่สำคัญ เพื่อใช้ในการสร้าง Grid box และ Grid energy maps สำหรับอะตอมชนิดต่างๆ โดยโปรแกรม AutoGrid4 จะสร้าง Grid ตามค่าพารามิเตอร์ที่อ่านได้จากไฟล์นี้

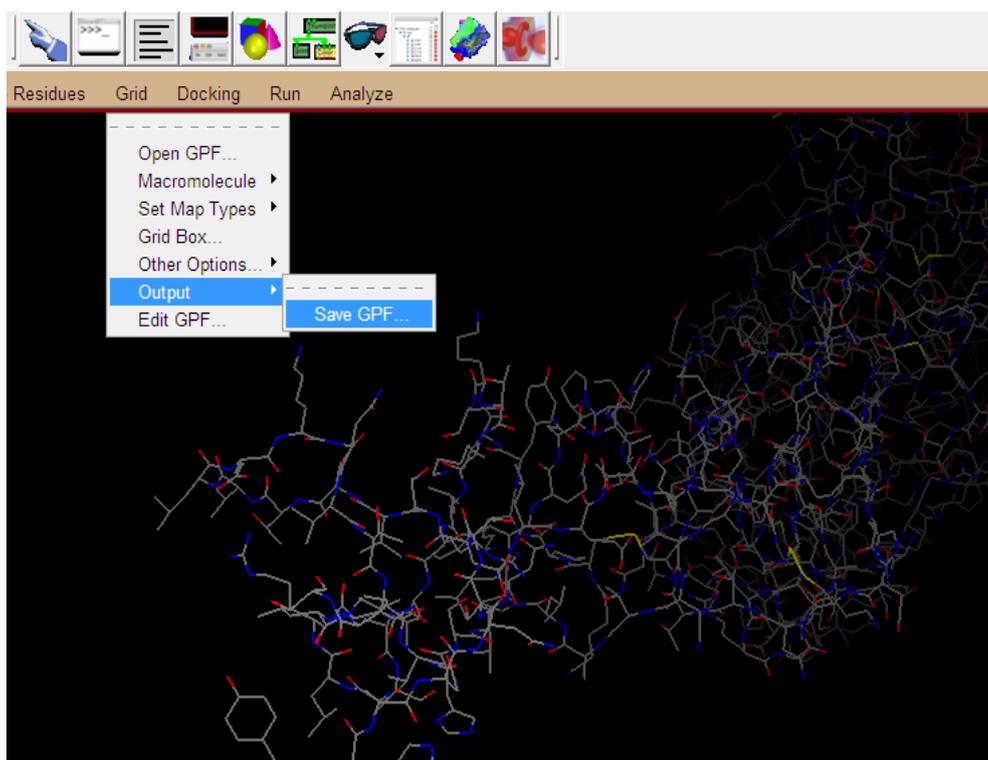
3.3.2 กำหนดขอบเขตของ Grid box

ขั้นตอนต่อมาเป็นขั้นตอนการสร้าง Grid box เพื่อกำหนดขอบเขตในการคำนวณค่า binding energy โดย Grid box นี้มีลักษณะเป็นกล่องสี่เหลี่ยม ในแต่ละ dimension (ในแนวแกน x, y และ z) ประกอบไปด้วยจุดเสมือน (virtual points) หลายจุด โดยปกติ ค่า default ของซอฟต์แวร์จะตั้งค่าให้จุดแต่ละจุดห่างกัน 0.375 Å ซึ่งเป็นระยะหนึ่งในสี่ของระยะห่างระหว่างอะตอมของคาร์บอนกับคาร์บอน ทำให้ซอฟต์แวร์สามารถสร้าง Grid และคำนวณค่าพลังงานได้ง่ายขึ้น ความยาวของกล่องในแต่ละ dimension จะเท่ากับ จำนวนจุดในแกนนั้น x ระยะห่างระหว่างจุด การปรับขนาดของกล่อง ควรปรับให้กล่องครอบคลุมบริเวณ binding site ทั้งหมดและควรมีส่วนของโปรตีนรวมอยู่ในทุกด้านของกล่องด้วย ligand ที่เราสนใจจะถูกโปรแกรม AutoDock4 จับใส่ลงไปในกลุ่มนี้ และเคลื่อนโครงสร้าง ligand ไปรอบๆ binding site โดย ligand จะไม่สามารถเคลื่อนออกนอกกล่องได้ เมื่อ ligand ถูกเคลื่อนไปแต่ละตำแหน่ง ก็จะมีการคำนวณค่าพลังงานระหว่าง ligand กับโปรตีนทุกครั้ง

การสร้าง Grid box สามารถทำได้โดยคลิก Grid > Grid box > Center on ligand (อาจจะเลือก Choose ligand ก่อน ที่ Grid > Set Map Types > Choose Ligand และทำการปรับขอบเขตของกล่องให้ครอบคลุมส่วนของ binding site โดยอาจจะมีการปรับ number of points in x, y, z -dimension : ให้อยู่ในช่วงระหว่าง 50-60 ในกรณีนี้เราจะตั้งค่าไว้ที่ 60 ทั้ง 3 dimensions (ดังรูปที่ 3.5) จากนั้นทำการเซฟไฟล์โดยคลิกที่ File > Close saving current เลือก Grid > Output > save GPF ตั้งชื่อไฟล์เป็น 3UBE.gpf (รูปที่ 3.6) จะได้ไฟล์ 3UBE.gpf จากนั้นทำการตรวจสอบไฟล์ 3UBE.gpf และแก้ไข parameter ควรตรวจสอบขนาดของ grid, ligand_types และ spacing ให้ตรงตามที่ต้องการ ค่า default ของ spacing จะเป็น 0.375



รูปที่ 3.5 การปรับขอบเขตของกล่องให้ครอบคลุม binding site



รูปที่ 3.6 ผลของการสร้างไฟล์ GPF

3.3.3 สร้าง Grid energy maps ด้วยคำสั่ง AutoGrid4 โดยใช้โปรแกรม ADT

ก่อนการรัน autogrid และ autodock ควรตรวจสอบการติดตั้งของโปรแกรมทั้งสองนี้ โดยโปรแกรมดังกล่าวสามารถดาวน์โหลดได้ในเว็บไซต์ <http://autodock.scripps.edu> การดาวน์โหลดโปรแกรม ควรใช้ให้ตรงกับระบบที่เครื่องคอมพิวเตอร์นั้นรองรับ เช่น ระบบวินโดวส์ ลินุกซ์ หรือยูนิกซ์ เป็นต้น

ข้อควรระวัง ควรนำไฟล์ “.gpf” และ “.pdbqt” ไว้ในโฟลเดอร์หรือ path เดียวกัน นอกจากนี้สำหรับระบบวินโดวส์ควรวางโปรแกรม autogrid4.exe และ autodock4.exe ลงใน path โดยชื่อของ path นั้นควรมีการตั้งชื่อที่ไม่มีการเว้นวรรค

3.3.3.1 สร้าง Grid energy maps ของอะตอมชนิดต่างๆ ที่อยู่ใน Grid box ด้วยโปรแกรม AutoGrid4 โดยใช้คำสั่ง

```
% autogrid4 -p 3UBE.gpf -l 3UBE.glg
```

จากคำสั่งด้านบน -p หมายถึง Parameter Filename ส่วนของ input file (.gpf) นั้นเอง และ -l หมายถึง Log Filename ซึ่งเป็นผลลัพธ์ที่ได้จากการคำนวณ grid คำสั่งนี้สามารถพิมพ์ลงบนโปรแกรม ADT ในกรณีของระบบวินโดวส์

สามารถเรียก AutoGrid4 โดยการใส่ full path ที่มี AutoGrid4 อยู่ และภายในไฟล์ 3UBE.gpf ควรระบุ full path ตรงตำแหน่งของ # grid_data_file, # macromolecule, และ # atom-specific affinity map ทั้งหมด เช่น

```
receptor C:\3UBE.pdbqt #ระบุ full path ของ macromolecule ว่าอยู่ที่ C:
```

3.3.3.2 การเตรียม DPF file (Docking Parameter File) โดยใช้โปรแกรม ADT

Docking Parameter File จะบอกให้โปรแกรม AutoDock ว่า map files ไหนที่ต้องใช้บ้าง โมเลกุลลิแกนด์ใดที่จะมีการเคลื่อนที่เข้าไปใน receptor จุดศูนย์กลางลิแกนด์และจำนวนของ torsions คืออะไร จำนวนของการประเมินค่าพลังงานสูงสุด จำนวนรอบของการรัน docking เป็นต้น ไฟล์ที่ได้รับจะเป็น “.dpf”

วิธีการเตรียม สามารถทำได้ดังนี้

3.3.3.2.1 เปิด ADT Tool > Docking > Macromolecule > Set Flexible Residues Filename... หรือ Set Rigid

Filename... > Choose 3UBE.pdbqt > Click Open (ขั้นตอนนี้จะไม่ปรากฏโครงสร้างของโปรตีน)

3.3.3.2.2 Docking > Ligand... > Open > Choose BOG.pdbqt > Click Open

3.3.3.2.3 Docking > Search Parameters... > Genetic Algorithm... > Click Accept

3.3.3.2.4 Docking > Docking Parameters...

3.3.3.2.5 Docking > Output > Lamarckian GA...

ในขั้นตอนสุดท้ายนี้ ผลลัพธ์ที่ได้จะเป็น 1_HA.dpf และคลิก Save

นอกจากนี้ ในกรณีที่ต้องการแก้ไขไฟล์ DPF ให้ไปที่ Docking > Edit DPF... และตรวจสอบลิแกนด์ไฟล์ตรง keyword 'move', ligand types, maximum number of energy evaluations, ga_pep_size = 150, evals = 2,500,000 และแก้ไขจำนวนรอบของการ docking ga_run = 100 (default)

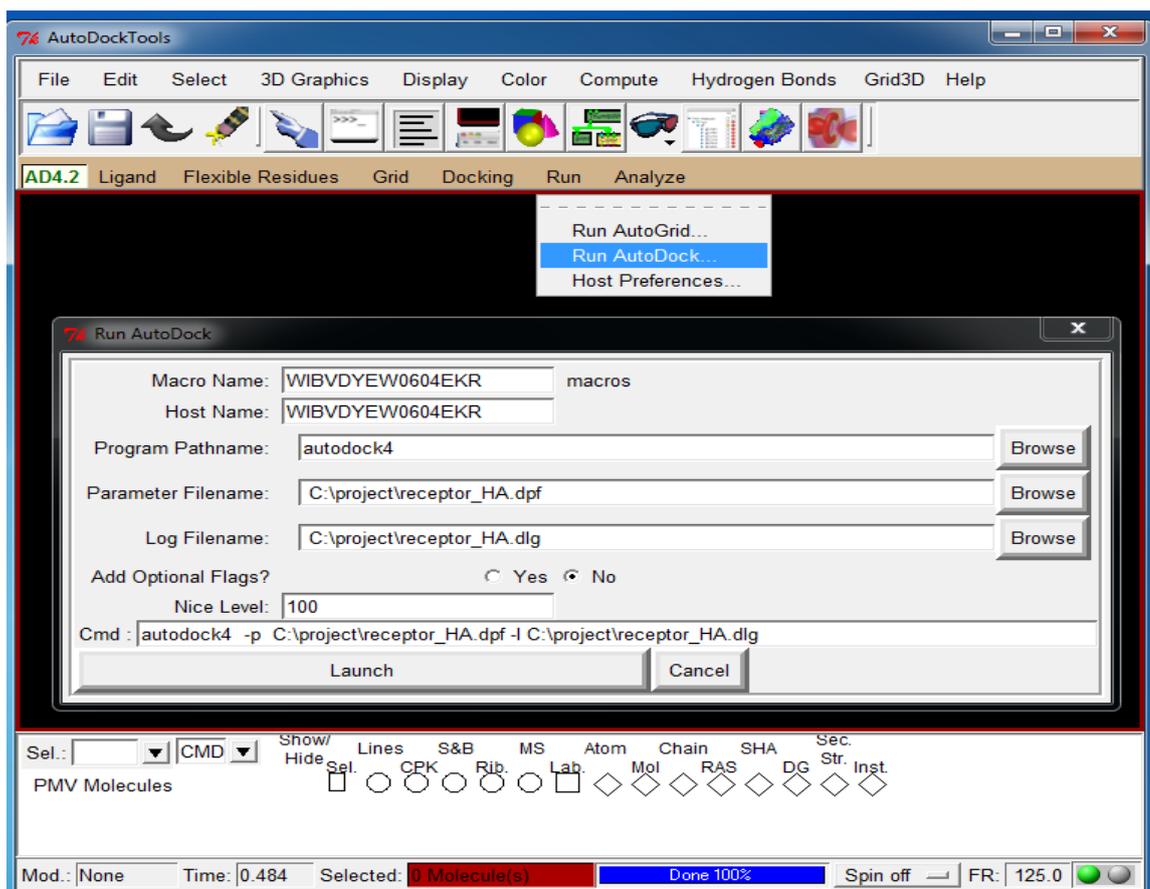
3.3.3.3 การทำ docking โดยใช้โปรแกรม ADT

การรัน AutoDock4 ไฟล์ต่างๆดังต่อไปนี้ คือ ไฟล์ 3UBE.pdbqt (receptor), 1.pdbqt (ligand), GPF file และ DPF file จะต้องมียู่ใน directory เดียวกัน เพื่อนำไปใช้ในการรัน คำสั่งการรันจะคล้ายกับคำสั่งของ AutoGrid4 เพียงแต่ใช้ไฟล์ dpf เป็นตัว Parameter file สำหรับ log file จะได้ไฟล์ dlgs

ข้อควรระวัง กรณีรัน docking ในระบบวินโดวส์ ควรเติม full path ภายในไฟล์ dpf ทำเช่นเดียวกับการเติม full path ภายในไฟล์ gpf ข้างต้น เพื่อให้โปรแกรม AutoDock รู้ว่าแต่ละข้อมูลอยู่ใน directory path อะไร วิธีการรันบนโปรแกรม ADT สามารถทำได้ดังรูปที่ 3.7 โดยไปที่ Run > Run AutoDock... > Click Browse สำหรับ Program Pathname ของ AutoDock4 ที่ติดตั้งไว้สำหรับระบบวินโดวส์ และระบุ path ของ Parameter Filename > Launch คำสั่งที่ใช้รันจะปรากฏ ดังนี้

```
autodock4 -p C:\project\receptor_HA.dpf -l C:\project\receptor_HA.dlgs
```

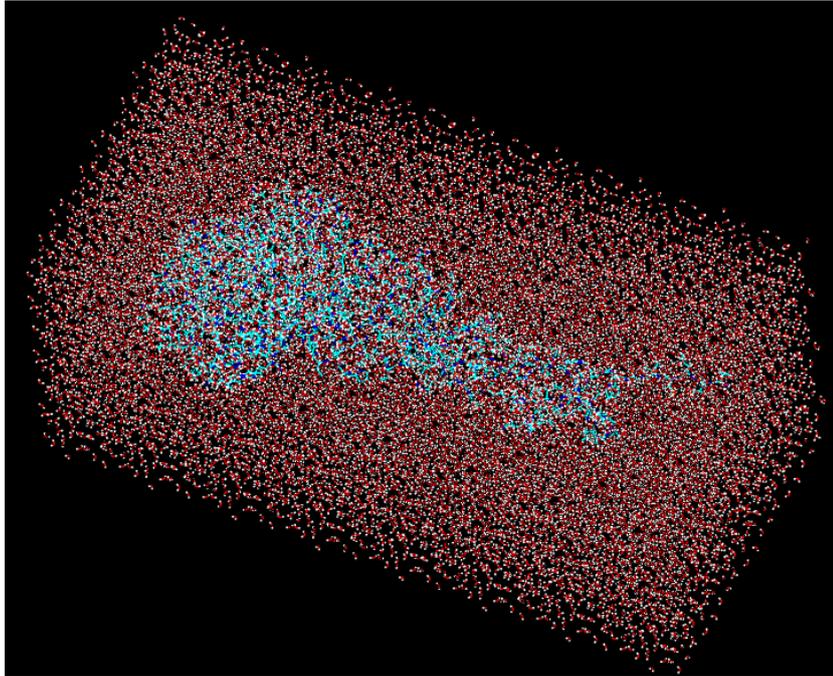
*ชื่อ Receptor ที่ระบุไว้ต้องเปลี่ยนตามไฟล์ที่เราได้ save ไว้ข้างต้น ถ้าไม่มีการเปลี่ยนไฟล์ อาจทำให้โปรแกรมไม่สามารถทำงานได้เนื่องจากหาไฟล์ไม่เจอ



รูปที่ 3.7 การรัน AutoDock4 บนโปรแกรม ADT

3.4 โมเลกุลาร์ไดนามิกส์ซิมูเลชันระหว่างอีแมกกลูตินินกับสารอนุพันธ์แอนโดรกราโฟไลด์

เมื่อได้โครงสร้างของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างตัวบัพยังกับอีแมกกลูตินินแล้ว ที่คัดลอกแล้วได้แก่ HA--1,4 - deoxy andrographolide_2 จากนั้นทำการเติมโมเลกุลไฮโดรเจนให้กับไกลโคโปรตีน HA เติมน้ำในลักษณะ cubic box และเติมไอออนเพื่อปรับระบบให้ระบบเป็นศูนย์ ดังรูป 3.8 จากนั้นทำการ minimization ระบบเพื่อปรับโครงสร้างเสถียรของไฮโดรเจน และ น้ำ ที่เติมลงในระบบ สุดท้ายก็ทำการจำลองการทำงานของสารประกอบเชิงซ้อนดังกล่าวด้วยวิธีโมเลกุลาร์ไดนามิกส์ซิมูเลชัน โดยใช้โปรแกรม AMBER 10 package (Case, Darden et al. 2008) เป็นเวลา 12 ns หรือ 12000 ps เริ่มต้นโดยการให้ความร้อนกับระบบซึ่งเดิม มีอุณหภูมิ 0 K เป็น 310 K ในช่วงเวลา 0 – 100 ps โดยให้ปริมาตรคงที่ จากนั้นคำนวณ ไปถึง 1200 ps โดยกำหนดให้ความดันคงที่ และอุณหภูมิคงที่ ๆ 310 K เก็บ snapshot ทุก ๆ 0.2 ps และใช้ snapshot ในช่วง 2.5 ns – 12 ns เก็บมาจำนวน 100 snapshots เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล



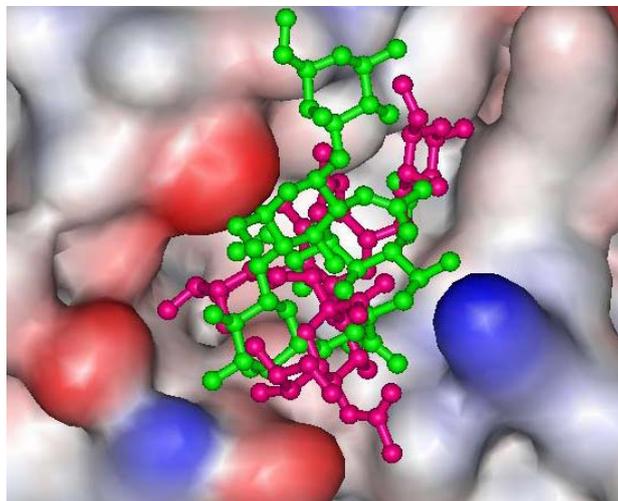
รูปที่ 3.8 โครงสร้างของสารประกอบเชิงซ้อน HA--1,4 - deoxy andrographolide_2 เมื่อเติมน้ำและไอออน

บทที่ 4

ผลการวิจัย และอภิปรายผล

4.1. ความสามารถในการทำ Re-docking ของโปรตีนฮีแมกกลูตินินกับตัวรับ S26G

โปรตีนฮีแมกกลูตินินเป็นโครงสร้างที่ได้จากเทคนิค X-ray crytallography ซึ่งมีตัวรับ S26G อยู่ในบริเวณยึดจับ (binding site) อยู่แล้วในงานวิจัยนี้เราจะเอาตัวรับ S26G ออกแล้วใช้โปรแกรม AutoDock จับ ตัวรับ S26G ใส่เข้าไปในบริเวณยึดจับใหม่เพื่อทดสอบพารามิเตอร์ที่ใช้ในการคำนวณ โดยนำตัวรับ S26G ที่ได้จากข้อมูลทาง X-ray มาทำการด็อกกิ้งกับโปรตีนฮีแมกกลูตินิน โดยจะตั้งรันทั้งหมด 100 ครั้ง พร้อมกับคำนวณค่า binding energy ระหว่างโปรตีนฮีแมกกลูตินินและ ตัวรับ S26G ด้วยวิธีการโมเลกุลาร์ด็อกกิ้ง จากผลการคำนวณพบว่าพลังงานติดลบ มีค่าเท่ากับ -6.01 kcal/mol และมี % conformational cluster เท่ากับ 22 % ซึ่งจะเห็นได้ว่าพลังงานที่ใช้ในการจับกันมีค่าต่ำๆ และมี % conformational cluster ค่อนข้างสูง แสดงว่าการยึดจับของโปรตีนฮีแมกกลูตินินกับตัวรับ S26G สามารถยึดจับกันได้ดี ดังแสดงในรูปที่ 4.1 ดังนั้นพารามิเตอร์ต่างๆที่ใช้ในการคำนวณตัวรับยังแอนโดรกราไฟโลด์และอนุพันธ์จะใช้เหมือนกับตัวรับ S26G



รูปที่ 4.1 เปรียบเทียบลักษณะการจับกันระหว่างโปรตีนฮีแมกกลูตินินกับตัวรับ S26G ที่ได้จาก X-ray และ S26G ที่ได้จากการทำโมเลกุลาร์ด็อกกิ้ง โดยที่ สีเขียวเป็น โครงสร้าง S26G ที่ได้จาก X-ray และสีชมพูเป็นโครงสร้างของ S26G ที่ได้จากการทำโมเลกุลาร์ด็อกกิ้ง

4.2. โมเลกุลาร์ด็อกกิ้งระหว่างอีแมกกลูตินินกับสารแอนโดรกราโฟไลด์และอนุพันธ์

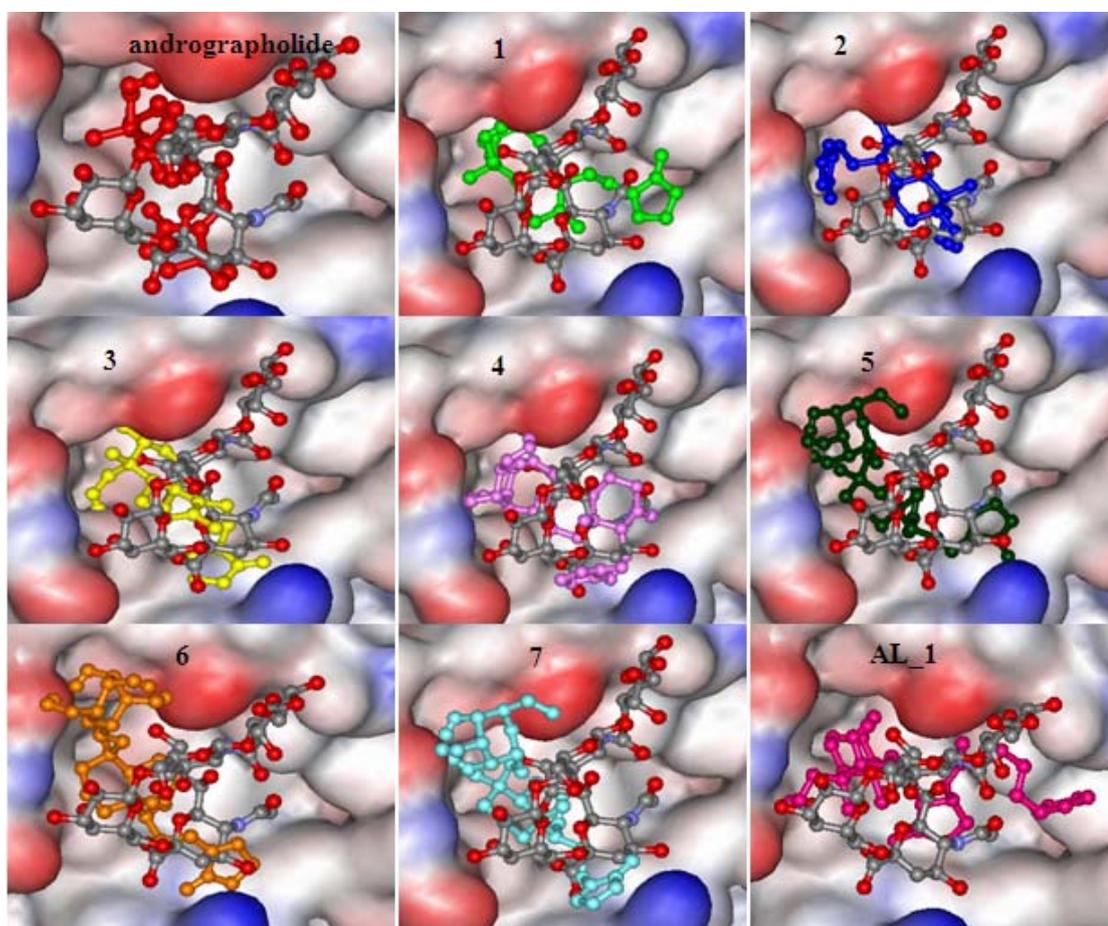
4.2.1 เปรียบเทียบโครงสร้างของสารยับยั้งในบริเวณยึดจับของโปรตีนอีแมกกลูตินิน

การเปรียบเทียบการเข้าจับกันของสาร andrographolide และอนุพันธ์ กับโปรตีนอีแมกกลูตินิน (3UBE) ซึ่งในโปรตีนอีแมกกลูตินิน จะมีตำแหน่งที่มีลักษณะโพรงเรียกว่าบริเวณยึดจับ (Binding site) ที่ทำให้สาร andrographolide และอนุพันธ์ สามารถเข้าจับกับกับโปรตีนอีแมกกลูตินินในโพรงได้ ถ้าตัวยับยั้งสามารถเข้าไปจับกับโปรตีนตรงตำแหน่งของตัวรับ S26G ตรงบริเวณยึดจับได้ดี แสดงว่าจับกับโปรตีนอีแมกกลูตินินได้ดี สารดังกล่าวมีโอกาสที่จะยับยั้งการทำงานของโปรตีนอีแมกกลูตินินได้ โครงสร้างสารประกอบเชิงซ้อนของสารยับยั้งทั้ง 9 ในบริเวณยึดจับของโปรตีนอีแมกกลูตินินที่ได้จากการทำโมเลกุลาร์ด็อกกิ้งแสดงดังรูปที่ 4.2 และจากการดำเนินการทั้งหมด 100 ครั้งพบว่าเปอร์เซ็นต์กลุ่มสารที่มีโครงสร้างเดียวกัน (% conformational cluster) ซึ่งเป็นค่าที่โปรแกรม AutoDock จะทำการจัด โครงสร้างของตัวยับยั้งที่อยู่ในลักษณะเดียวกันให้อยู่ในกลุ่มเดียวกันโดยใช้ค่าทางสถิติเป็นเกณฑ์ในการจัดกลุ่มแสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ผลของเปอร์เซ็นต์กลุ่มสารที่มีโครงสร้างเดียวกันที่ได้จากการทำโมเลกุลาร์ด็อกกิ้งระหว่างตัวยับยั้งทั้ง 9 โครงรูปกับโปรตีนอีแมกกลูตินิน

ตัวยับยั้ง	% conformational cluster	ตัวยับยั้ง	% conformational cluster
Andrographolide	32	Neoandrographolide_1	18
1,4 – deoxy andrographolide_1	31	Neoandrographolide_2	22
1,4 - deoxy andrographolide_2	33	Neoandrographolide_3	8
1,4 - deoxy andrographolide_3	31	Neoandrographolide_4	7
14-alpha-lipoyl andrographolide	4		

จากตารางที่ 4.1 พบว่า สาร 1,4 - deoxyandrographolide_2 มีค่า % conformational cluster สูงสุดเท่ากับ 33 % พบว่าสาร Andrographolide และอนุพันธ์ 1,4 - deoxyandrographolide จะมี ค่า % conformational cluster สูงกว่าสารอนุพันธ์ Neoandrographolide และ 14-alpha-lipoyl andrographolide ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสาร Andrographolide และอนุพันธ์ 1,4 - deoxyandrographolide จะมีโครงสร้างที่ค่อนข้างเล็กกว่าสารอนุพันธ์ Neoandrographolide และ 14-alpha-lipoyl andrographolide จึงทำให้มีเปอร์เซ็นต์กลุ่มสาร โครงสร้างเดียวกันมากกว่า ทั้งนี้เกณฑ์ในการเลือกตัวขั้วยังจะดูจากค่าพลังงานการยึดจับควบคู่กับเปอร์เซ็นต์กลุ่มสารที่มีโครงสร้างเดียวกัน ดังนั้นในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาค่าพลังงานการยึดจับระหว่างโปรตีนฮีแมกกลูตินินกับสาร ขั้วขั้วทั้ง 9 โครงรูปซึ่งได้กล่าวถึงในหัวข้อ 4.2



รูปที่ 4.2 ผลการดocking ระหว่าง สาร andrographolide และ อนุพันธ์ กับโปรตีนฮีแมกกลูตินินสาย พันธุ์ดั้งเดิม โดยหมายเลข 1 ถึง 3 คือ 1,4 - deoxy Andrographolide ตัวที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ ในขณะที่ หมายเลข 4 ถึง 7 คือ Neoandrographolide ตัวที่ 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ และ AL-1 คือ 14-alpha-lipoyl andrographolide

4.2.2 พันธะไฮโดรเจนของสารยับยั้งกับโปรตีนฮีแมกกลูตินิน

จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าเกิดพันธะไฮโดรเจนของโปรตีนฮีแมกกลูตินิน และตัวรับ S26G ในสายพหุคูณจะประกอบด้วยกรดอะมิโนที่สำคัญอยู่ 3 จุดคือ (1) 130-loop มีกรดอะมิโนที่สำคัญคือ Y95, V135, T136 และ A137 (2) 190-helix มีกรดอะมิโนที่สำคัญคือ K145 และ H183 (3) 220-loop มีกรดอะมิโนที่สำคัญคือ Q226, K222 และ D225 (Nunthaboot, Rungrotmongkol et al. 2009; Priyadarzini, Selvin et al. 2012) จากผลการคำนวณพบว่า การเกิดพันธะไฮโดรเจนของโปรตีนฮีแมกกลูตินิน (3UBE) กับตัวยับยั้งแอนโดรกราโฟไลด์และอนุพันธ์จะมีกรดอะมิโนที่สำคัญคือ D190, K145, G228, E227, T136 และ D225 ซึ่งตัวยับยั้งส่วนใหญ่จะชอบจับกับกรดอะมิโน Aspartic acid (D) และ Glutamic acid (E) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีขั้ว เงื่อนไขในการพิจารณาการเกิดพันธะไฮโดรเจน คือ ระยะทางระหว่างตัวให้และตัวรับโปรตอนกับมุมการเกิดพันธะไฮโดรเจน ระยะทางของตัวให้และตัวรับโปรตอนต้องมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 3.5 \AA จึงจะมีความสามารถในการเกิดพันธะไฮโดรเจนได้แข็งแรง ส่วนมุมพันธะจะเกิดพันธะไฮโดรเจนได้ดีจะอยู่ที่ 120-240 องศา แต่จะเกิดพันธะไฮโดรเจนได้ดีที่สุดที่มุม 180 องศา ซึ่งเป็นเส้นตรงเพราะสามารถยึดจับกันได้ดี จากการคำนวณระยะทางและมุมพันธะสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 4.2 จะเห็นได้ว่าระยะทางในการจับกับของพันธะจะน้อยกว่า 3.5 \AA แต่มุมพันธะที่ใช้ในการเกิดพันธะไฮโดรเจนส่วนใหญ่จะมากกว่า 120 องศา แต่มีเพียงบางตัวเท่านั้นที่น้อยกว่า 120 องศา คือ Gln226 ที่จับกับ O35 ของ 1,4-deoxy andrographolide_2 ที่มีมุมเท่ากับ 88.9 และ 86.2 \AA รวมถึง Lys228 ที่จับกับ H47 ของตัวยับยั้ง Neoandrographolide_1 มีมุมเท่ากับ 111.3 \AA และ Asp190 ที่จับกับ H73 ทั้งสองตัวจะมีมุมเท่ากับ 90.8 และ 92 \AA ของตัวยับยั้ง Neoandrographolide_2 ลักษณะการเกิดพันธะไฮโดรเจนจะแสดงในภาพที่ 4.3 ถึงภาพที่ 4.7 แต่อย่างไรก็ตาม การเกิดพันธะไฮโดรเจนจะเป็นแค่ตัวบอกความแรงของพันธะ ซึ่งจะเชื่อมโยงโดยตรงกับพลังงานที่จะกล่าวในหัวข้อถัดไป ดังนั้นถ้ามุมมากกว่า 120 องศา และความยาวพันธะน้อยกว่า 3.5 \AA พลังงานที่ใช้ในการเกิดพันธะไฮโดรเจนก็จะน้อยและติดลบมากขึ้น

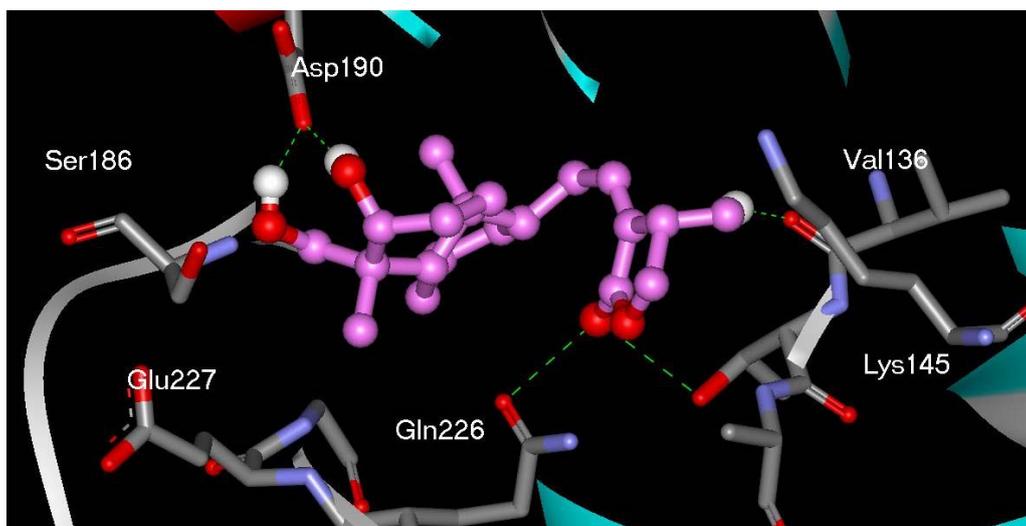
ตารางที่ 4.2 การเกิดพันธะไฮโดรเจน มุมพันธะ และ ความยาวพันธะระหว่างตัวยับยั้งกับ
โปรตีนฮีเมกกลูตินินโดยที่ AL_1 คือ 14-alpha-lipoyl andrographolide

ตัวยับยั้ง	การเกิดพันธะไฮโดรเจน (ฮีเมกกลูตินิน_ตัวยับยั้ง)	มุมพันธะ (องศา)	ระยะทาง (Å)
andrographolide	-Asp190_H14	146.7	2.11
	-Asp190_H32	166.0	2.06
	-Gln226_O50	137.1	2.79
	-Lys145_O50	123.6	2.72
	-Val136_H53	157.1	1.79
1,4-deoxy andrographolide_1	-His183_H34	121.3	2.27
	-Asp190_H54	171.7	1.68
1,4-deoxy andrographolide_2	-Val135_H54	133.4	2.13
	-Gln226_O35	88.9	2.56
	-Gln227_O35	86.2	3.10
1,4-deoxy andrographolide_3	-Lys145_O33	156.9	2.18
	-Gln226_H49	162.3	1.71
	-Ser186_H25	140.5	2.05
Neoandrographolide_1	-Asp190_H56	158.3	1.88
	-Lys145_O62	143.1	3.05
	-Gly228_H47	111.3	2.42
	-Glu227_H51	146.4	1.86
	-Glu227_H47	158.9	2.09
Neoandrographolide_2	-Asp190_H73	90.8	2.22
	-Asp190_H73	92	2.25
	-Glu227_H70	163.8	1.64
	-Glu227_H63	150	1.81
	-Glu227_H8	160	2.07
	-Lys145_O36	164.5	2.86
Neoandrographolide_3	-Asp190_H60	168.7	1.91
	-Glu227_H69	155.9	1.94
	-Glu227_H62	161.1	1.82

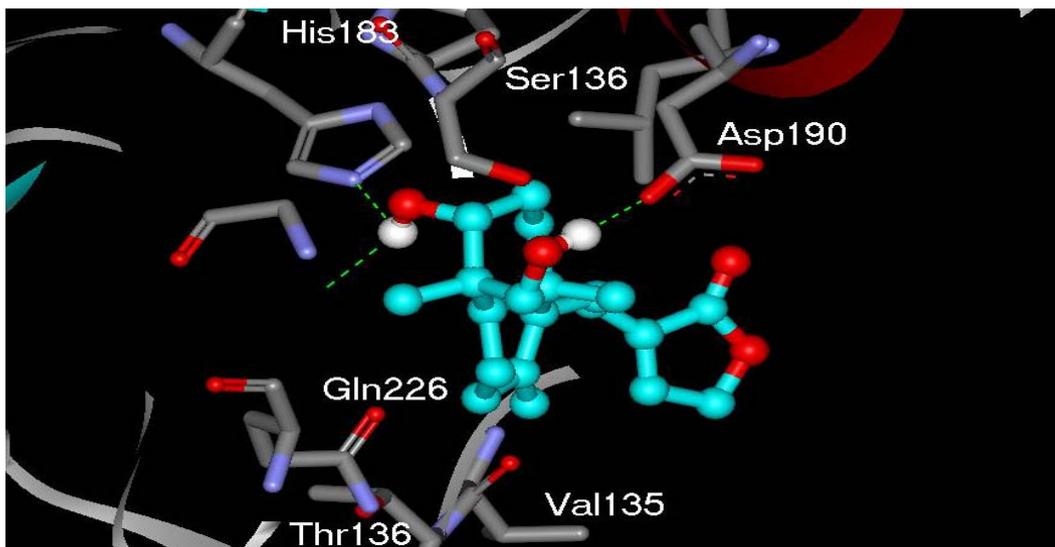
ตัวยับยั้ง	การเกิดพันธะไฮโดรเจน (ฮีแมกกลูตินิน_ตัวยับยั้ง)	มุมพันธะ (องศา)	ระยะทาง (Å)
Neoandrographolide_4	-Asp190 _ H71	171.4	2.38
	-Asp190 _ H71	145.7	2.04
	-Glu227 _ H68	172.8	1.74
	-Glu227 _ H69	163.8	1.83
	-Glu227 _ H70	161.6	1.83
	-Lys145 _ O30	113.8	3.01
AL_1	-Thr136 _ O46	146.4	2.99
	-Asp225 _ H31	158.9	1.94

ลักษณะการเกิดพันธะไฮโดรเจนของตัวยับยั้งกับโปรตีนฮีแมกกลูตินินแสดงดังรูปที่ 4.3 ถึง รูปที่

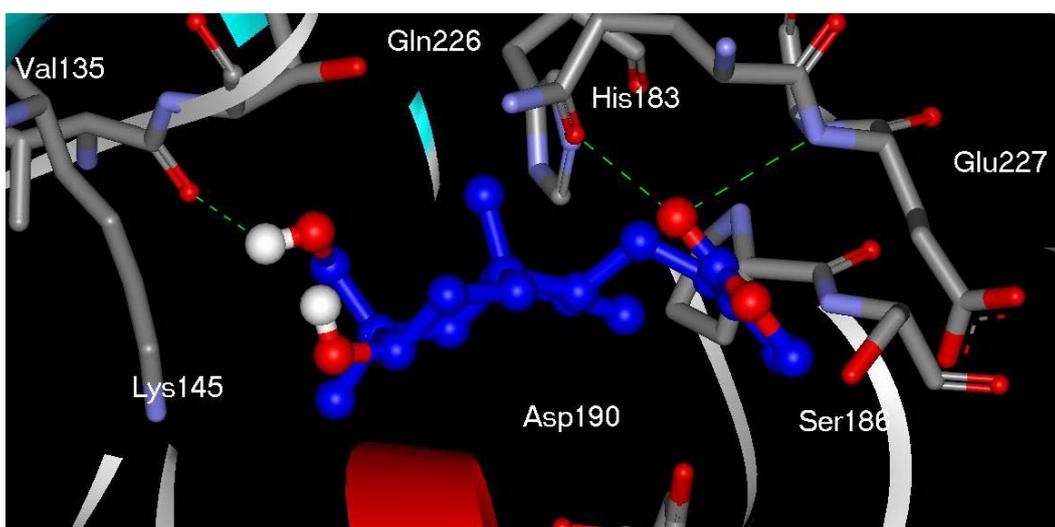
4.12



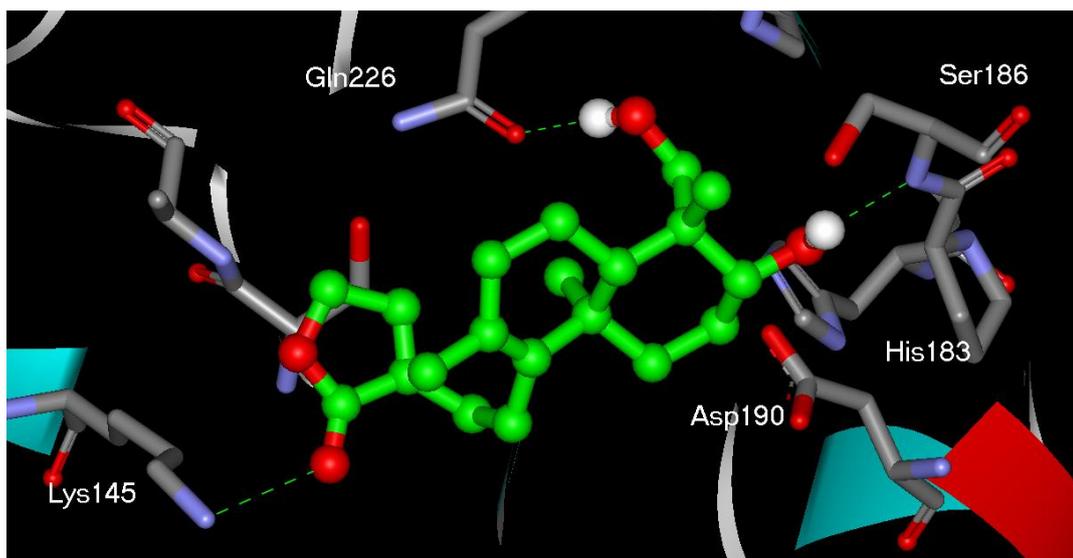
รูปที่ 4.3 การเกิดพันธะไฮโดรเจนของสาร Andrographolide กับโปรตีนฮีแมกกลูตินิน



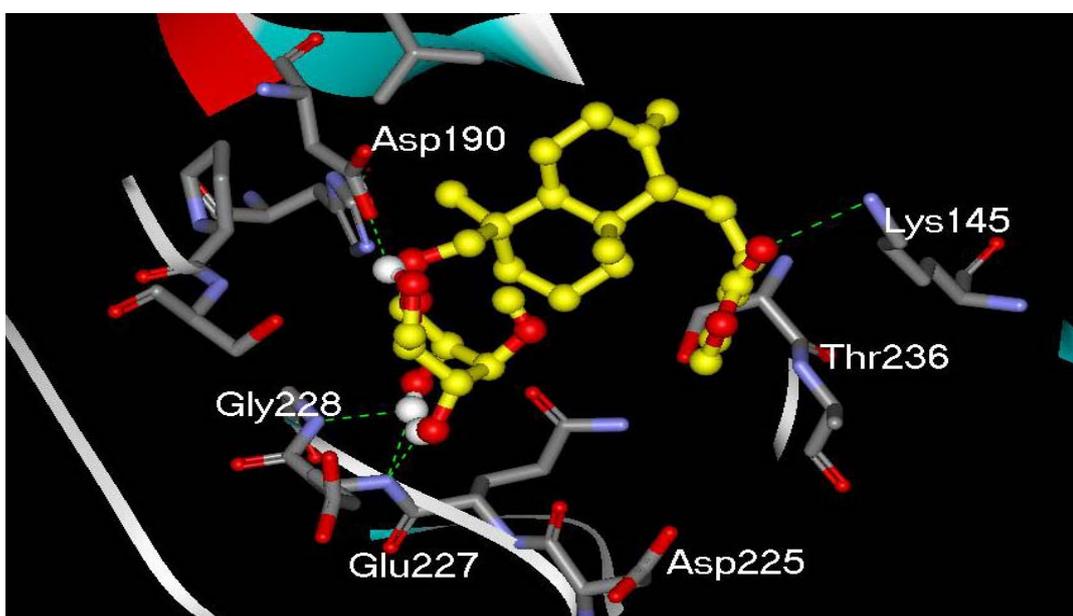
รูปที่ 4.4 การเกิดพันธะไฮโดรเจนของสาร 1,4-deoxy andrographolide_1 กับโปรตีนฮีแมกกลูตินิน



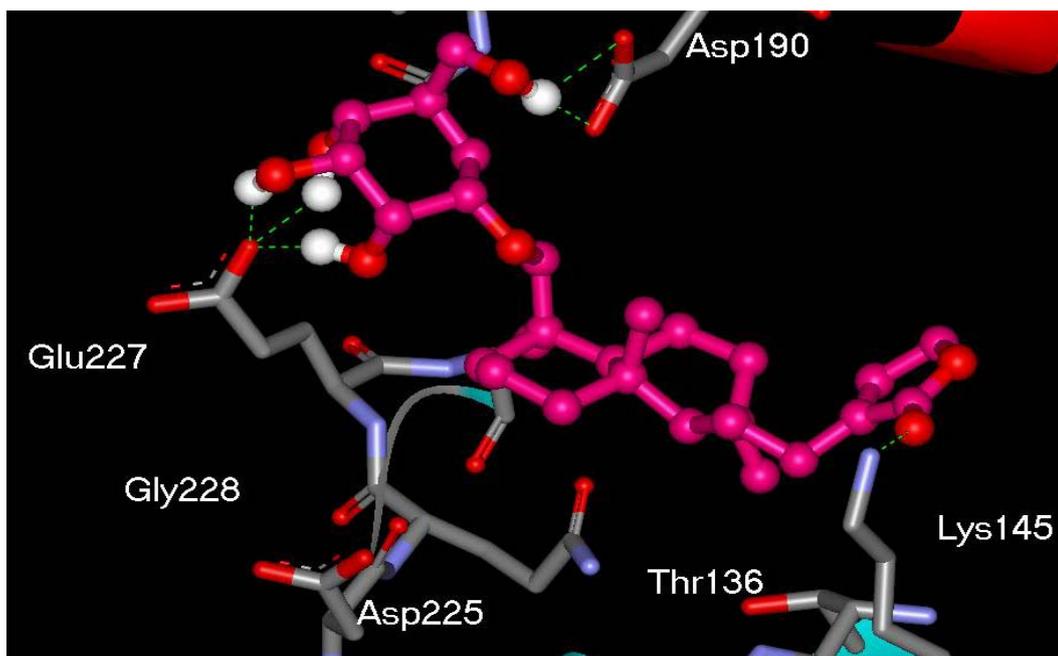
รูปที่ 4.5 การเกิดพันธะไฮโดรเจนของสาร 1,4-deoxy andrographolide_2 กับโปรตีนฮีแมกกลูตินิน



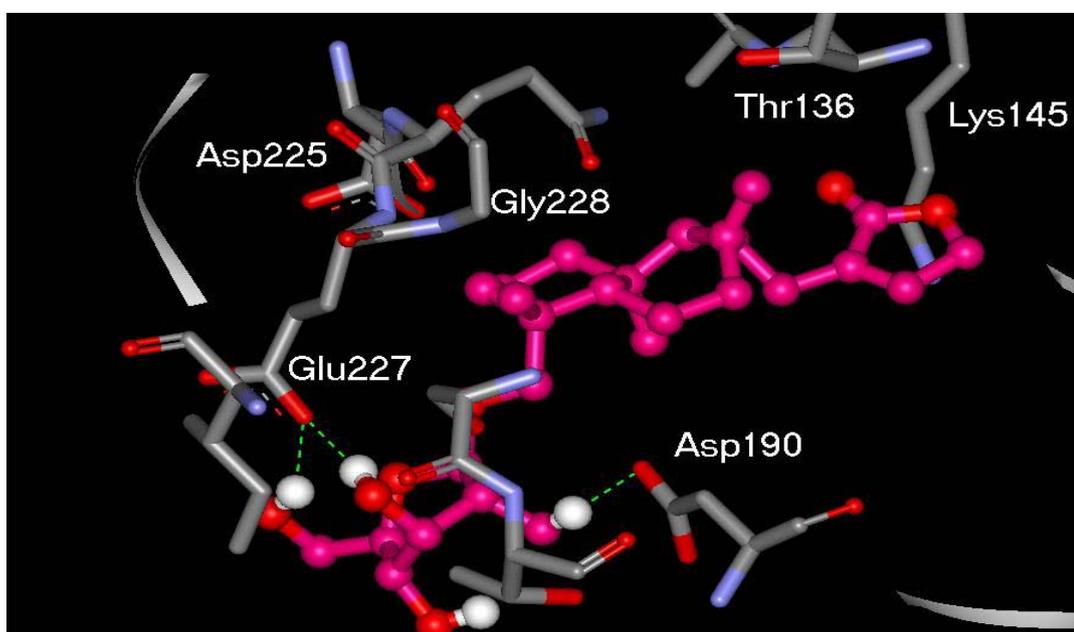
รูปที่ 4.6 การเกิดพันธะไฮโดรเจนของสาร 1,4-deoxy andrographolide_3 กับ โปรตีนฮีแมกกลูตินิน



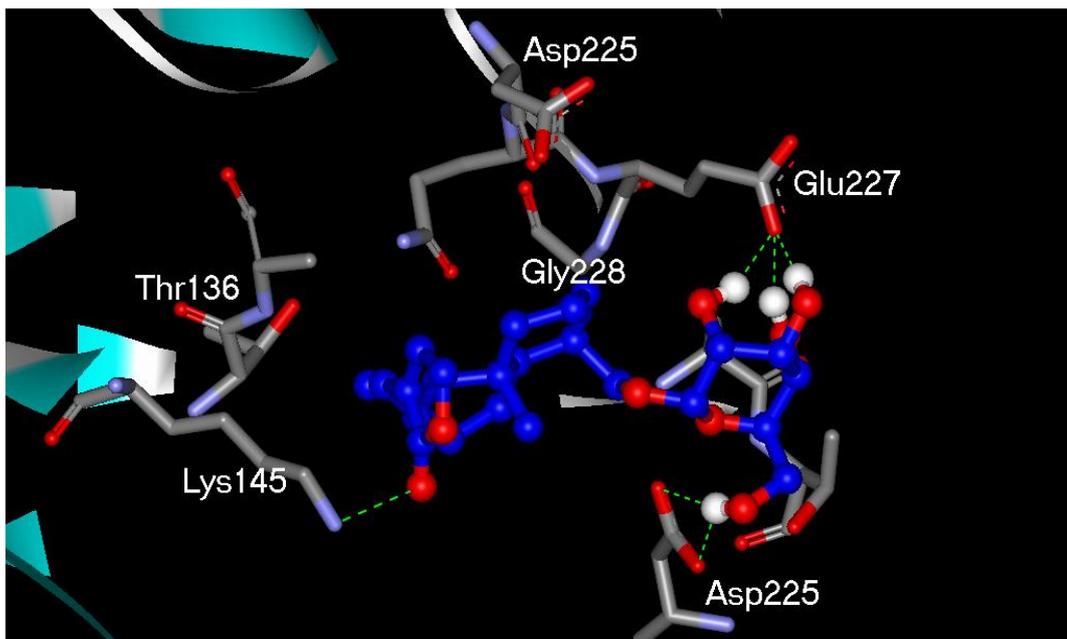
รูปที่ 4.7 การเกิดพันธะไฮโดรเจนของสาร Neoandrographolide_1 กับ โปรตีนฮีแมกกลูตินิน



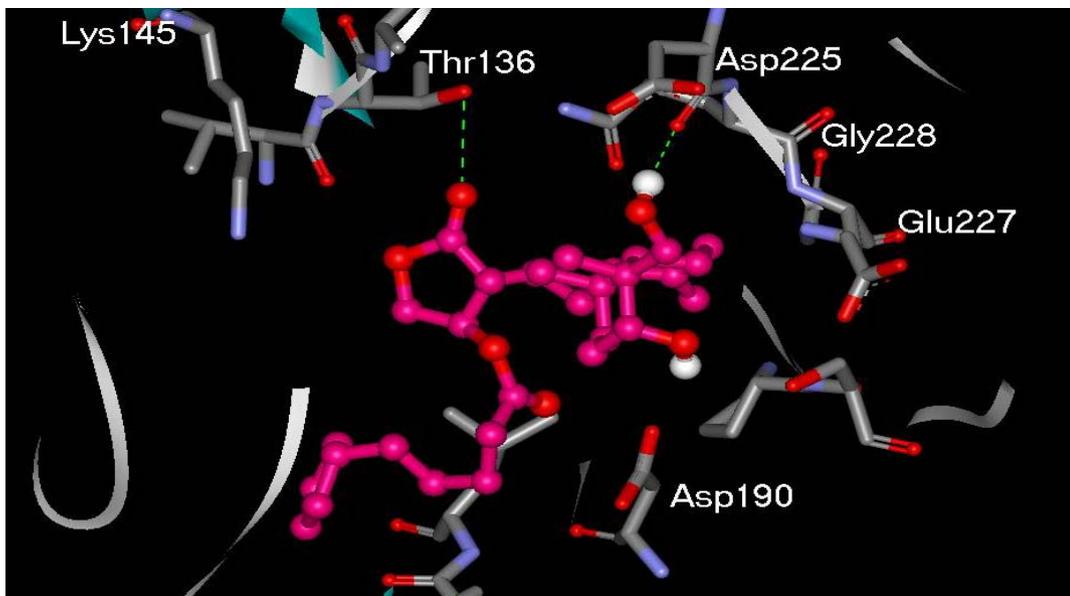
รูปที่ 4.8 การเกิดพันธะไฮโดรเจนของสาร Neoandrographolide_2 กับ โปรตีนฮีแมกกลูตินิน



รูปที่ 4.9 การเกิดพันธะไฮโดรเจนของสาร Neoandrographolide_3 กับ โปรตีนฮีแมกกลูตินิน



รูปที่ 4.10 การเกิดพันธะไฮโดรเจนของสาร Neoandrographolide_4 กับโปรตีนฮีแมกกลูตินิน



รูปที่ 4.11 การเกิดพันธะไฮโดรเจนของสาร 14-alpha-lipoyl andrographolide กับโปรตีนฮีแมกกลูตินิน

4.2.3 พลังงานในการยึดจับระหว่างสารยับยั้งกับโปรตีนฮีแมกกลูตินิน

ข้อมูลทางเทอร์โมไดนามิกส์ที่นิยมใช้ในการบอกอันตรกิริยาคือพลังงานเสรีของการยึดจับ (binding energy) โดยจะศึกษาอันตรกิริยาระหว่างสาร Andrographolide และอนุพันธ์กับโปรตีนฮีแมกกลูตินิน ถ้าค่าพลังงานการยึดจับระหว่างโปรตีนฮีแมกกลูตินินกับสารยับยั้งมีค่าเป็นลบแสดงว่าโปรตีนฮีแมกกลูตินินสามารถเข้าไปยึดจับกับสารยับยั้งได้ดีและมีความเสถียร ส่วนค่าพลังงานการยึดจับถ้ามีค่าเป็นบวกแสดงว่า ตัวยับยั้งไม่สามารถเข้าไปยึดจับกับโปรตีนฮีแมกกลูตินินได้ จากผลการคำนวณค่าพลังงานการยึดจับแสดงในตารางที่ 4.3 พบว่าการยึดจับระหว่างโปรตีนฮีแมกกลูตินินกับตัวยับยั้งสามารถยึดจับกันได้ดีและมีความเสถียรเนื่องจากมีค่าเป็นลบ จากการดำเนินการทั้งหมด 100 ครั้ง โดยเกณฑ์ในการเลือกตัวยับยั้งจะดูจากค่าพลังงานการยึดจับควบคู่กับเปอร์เซ็นต์กลุ่มสารที่มีโครงสร้างเดียวกันซึ่งเป็นที่โปรแกรม AutoDock จะทำการจัดโครงสร้างของตัวยับยั้งที่อยู่ในลักษณะเดียวกันให้อยู่ในกลุ่มเดียวกันโดยใช้ค่าทางสถิติเป็นเกณฑ์ในการจัดกลุ่ม จากผลการคำนวณในตารางที่ 4.3 พบว่าสาร 1,4 - deoxyandrographolide_1 สามารถจับกับโปรตีนฮีแมกกลูตินินได้ดีที่สุดโดยมีค่าพลังงานการยึดจับเท่ากับ -7.61 Kcal/mol และ % conformational cluster เท่ากับ 31% และ สาร Neoandrographolide_2 มีพลังงานต่ำสุดรองลงมาโดยมีค่าพลังงานการยึดจับเท่ากับ -7.53 Kcal/mol และ % conformational cluster เท่ากับ 22% ในขณะที่ตัวยับยั้งอื่นมีค่าพลังงานการยึดจับไม่แตกต่างกันมาก ตั้งแต่ -6.49 ถึง -6.93 Kcal/mol แต่มีค่า % conformational cluster ค่อนข้างแตกต่างกันตั้งแต่ 4 ถึง 32% ทั้งนี้ สารยับยั้ง Andrographolide และ 1,4 - deoxy andrographolide จะมี % conformational cluster ที่สูงกว่าเนื่องสารมีขนาดเล็กกว่าจึงยึดเกาะกับโปรตีนฮีแมกกลูตินินในตำแหน่งเดิมได้ง่ายกว่า ในขณะที่สารยับยั้งกลุ่ม Neoandrographolide มีขนาดที่ใหญ่กว่าจึงยึดเกาะกับโปรตีนฮีแมกกลูตินินในตำแหน่งเดิมได้ยากกว่าจึงมีค่า % conformational cluster ที่ต่ำกว่า

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จากผลการทำโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้งระหว่างฮีแมกกลูตินินกับสารแอนโดรกราโฟไลด์และอนุพันธ์จึงเลือกสาร 1,4 - deoxyandrographolide_1 มาทำการศึกษาด้วยระเบียบวิธีโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้งเชิงโมเลกุล เพื่ออธิบายถึงความเหมือน/ความแตกต่างทางด้านโครงสร้างการเคลื่อนที่ของโปรตีนและตัว รวมถึงคำนวณพลังงานเสรีกิบส์ เปรียบเทียบผลการคำนวณที่ได้กับผลการทดลองหรือผลการคำนวณจากงานวิจัยอื่นๆ

ตารางที่ 4.3 ผลของพลังงานการยึดจับต่ำสุด และเปอร์เซ็นต์กลุ่มสารที่มีโครงสร้างเดียวกันที่ได้จากการทำโมเลกุลาร์ดีอ็อกกิ่ง

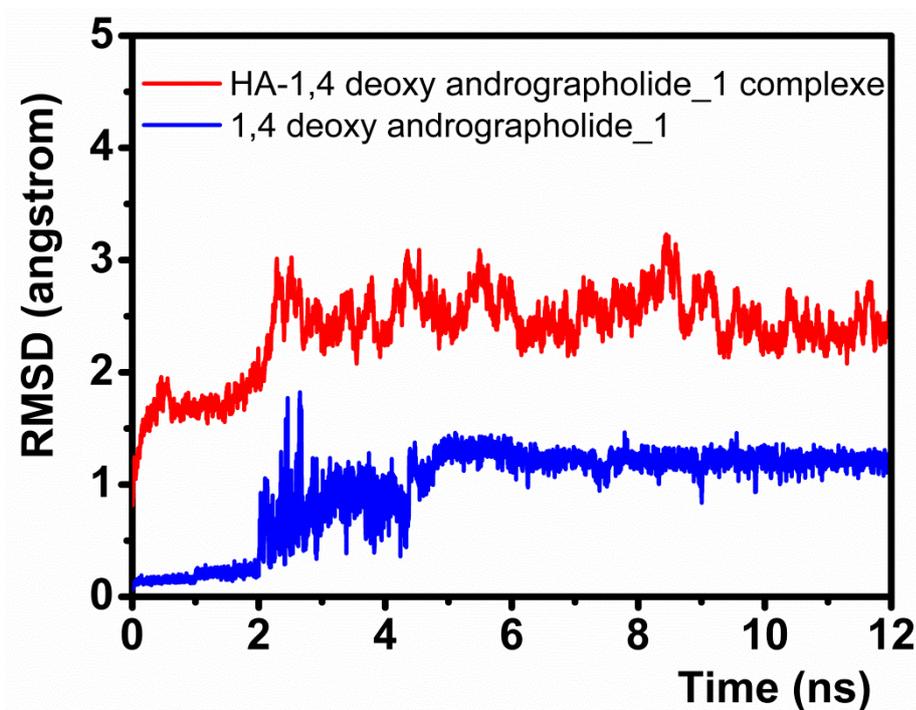
ตัวยับยั้ง	Lowest Binding Energy (Kcal/mol)	% conformational cluster	ตัวยับยั้ง	Lowest Binding Energy (Kcal/mol)	% conformational cluster
Andrographolide	-6.90	32	Neoandrographolide_1	-6.67	18
1,4 - deoxy andrographolide_1	-7.61	31	Neoandrographolide_2	-7.53	22
1,4 - deoxy andrographolide_2	-6.69	33	Neoandrographolide_3	-6.49	8
1,4 - deoxy andrographolide_3	-6.77	31	Neoandrographolide_4	-6.93	7
14-alpha-lipoyl andrographolide	-6.78	4			

4.3 โมเลกุลาร์ไดนามิกส์ซิมูเลชันระหว่างฮีแมกกลูตินินกับสารแอนโดรกราโฟไลด์และอนุพันธ์

4.3.1 ผลของการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโปรตีนและสารยับยั้งเทียบกับเวลา

ก่อนที่จะทำการวิเคราะห์ผลเกี่ยวกับโครงสร้างและพลังงานที่สนใจ ต้องตรวจสอบสมมูลของโครงสร้างของสารประกอบเชิงซ้อนโปรตีนกับตัวยับยั้ง HA--1,4 - deoxy andrographolide_1 ก่อน โดยการพล็อตค่า Root Mean Square Displacement (RMSD) ที่เวลาต่างๆ (ดังรูปที่ 4.12) จากการคำนวณพบว่าเมื่อจำลองระบบไปถึง 5 ns ทั้งสองระบบเข้าสู่สมมูลแล้วโดยค่า RMSD เริ่มคงที่ ดังนั้นการคำนวณครั้งนี้จึงใช้ snapshot ในช่วง 5 ns ถึง 12 ns ในการวิเคราะห์ข้อมูลเกี่ยวกับการ

เปลี่ยนทางโครงสร้าง พันธะไฮโดรเจน และพลังงานการยึดจับอิสระของฮีแมกกลูตินิน H1 กับตัวยับยั้ง 1,4 - deoxy andrographolide_1



รูปที่ 4.12 ค่า Root Mean Square Displacement (RMSD) ของระบบ HA--1,4 - deoxy andrographolide_1 โดยพล็อตตั้งแต่ 0-12 ns

4.3.2 พันธะไฮโดรเจนระหว่างสารยับยั้งกับโปรตีนฮีแมกกลูตินิน

เพื่อดูอันตรกิริยาระหว่างไกลโคโปรตีน HA และตัวยับยั้ง 1,4 - deoxy andrographolide_1 ที่ได้จากการทำโมเลกุลาร์ดอกกิ้งในบริเวณยึดจับของ HA (HA binding pocket) จึงทำการคำนวณ % Hydrogen bond occupation ระหว่างกรดอะมิโนของเฮนไซม์ HA กับตัวยับยั้ง 1,4 - deoxy andrographolide_1 ที่แสดงโครงสร้างและลำดับอะตอมดังรูปที่ 4.13 ผลการคำนวณแสดงในตารางที่ 4.4 จากการคำนวณพบว่าโมเลกุล 1,4 - deoxy andrographolide_1 เกิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโนของโปรตีน HA ทั้ง 3 จุดที่สำคัญดังที่กล่าวมาแล้วโดย เกิด 1 พันธะไฮโดรเจนที่แข็งแกร่งกับ Y95 ของกรดอะมิโน 130-loop มีค่า % Hydrogen bond occupation เท่ากับ 88% และเกิด 2 พันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน 190-loop โดยเกิด 1 พันธะไฮโดรเจนที่แข็งแกร่งกับ H183 มีค่า % Hydrogen bond occupation เท่ากับ 96% และเกิดอีก 1 พันธะ กับ D190 มีค่า % Hydrogen

bond occupation เท่ากับ 21% ส่วนกรดอะมิโนของโปรตีน HA บริเวณ 220-loop เกิดพันธะไฮโดรเจนที่ค่อนข้างแข็งแรงกับ 1,4 - deoxy andrographolide_1 ทั้งหมด 3 พันธะคือ กรดอะมิโนกลูตามิกตำแหน่ง 227 (E227) เกิด 1 พันธะ และ ไกลซีนตำแหน่ง 228 (G228) เกิด 2 พันธะ มีค่า % Hydrogen bond occupation เท่ากับ 76%, 75% และ 75% ตามลำดับ

จากผลของการคำนวณการเกิดพันธะไฮโดรเจนด้วยเทคนิคโมเลกุลาร์ไดนามิกส์ซิมูเลชันพบว่าตัวยับยั้ง 1,4 - deoxy andrographolide_1 สามารถเกิดพันธะกับกรดอะมิโนของโปรตีน HA ในตำแหน่งที่สำคัญและมีเปอร์เซ็นต์การเกิดพันธะที่ค่อนข้างสูงนั่นคือการเกิดพันธะมีความแข็งแรงและเกิดตลอดเวลาของการทำซิมูเลชันแสดงให้เห็นว่าตัวยับยั้ง 1,4 - deoxy andrographolide_1 มีโอกาสที่จะยับยั้งการทำงานของโปรตีนฮีแมกกลูตินินได้

ตารางที่ 4.4 ผลของการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างฮีแมกกลูตินินกับตัวยับยั้ง 1,4 - deoxy andrographolide_1 และเปอร์เซ็นต์การเกิดพันธะไฮโดรเจน (% Hydrogen bond occupation) ที่ได้จากการทำไดนามิกส์ซิมูเลชัน

ตัวยับยั้ง	การเกิดพันธะไฮโดรเจน (ฮีแมกกลูตินิน_ตัวยับยั้ง)	% Occupation
1,4-deoxy andrographolide_2	-H183_O1	96%
	-Y95_O1	88%
	-E227_O4	76%
	-G228_O4	75%
	-G228_H12	75%
	D190_H30	21%

4.3.3 พลังงานในการยึดจับระหว่างสารยับยั้งกับโปรตีนฮีแมกกลูตินิน

ข้อมูลทางเทอร์โมไดนามิกส์ที่นิยมใช้ในการบอกอันตรกิริยา (interaction) คือพลังงานเสรีของการยึดจับ (binding energy) โดยจะศึกษาอันตรกิริยาระหว่างฮีแมกกลูตินินกับตัวรับที่เป็นแบบ S23G และ S26G ในการคำนวณพลังงาน จะใช้วิธี MM-PBSA และใช้ snapshot ในช่วง 5 ns – 12 ns เก็บมาจำนวน 100 snapshots เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ ซึ่งถ้าค่า binding free energy ระหว่างฮีแมกกลูติ

นินกับตัวยับยั้งมีค่าเป็นลบแสดงว่าฮีแมกกลูตินินสามารถเข้าไปยึดจับกับตัวยับยั้งได้ดีและมีความเสถียรส่วนค่า binding free energy ถ้ามีค่าเป็นบวกแสดงว่าฮีแมกกลูตินินไม่สามารถเข้าไปยึดจับกับตัวยับยั้งได้ซึ่ง ผลการคำนวณค่า binding energy และเทอมพลังงานย่อยอื่นๆ ระหว่างฮีแมกกลูตินินกับยับยั้ง 1,4 - deoxy andrographolide_1 แสดงในตารางที่ 4.5 พบว่าการยึดจับระหว่างฮีแมกกลูตินินกับตัวยับยั้ง 1,4 - deoxy andrographolide_1 สามารถยึดจับกันได้ดีและมีความเสถียรเนื่องจากมีค่าเป็นลบ โดยมีค่าพลังงานการยึดจับเท่ากับ -72.33 kcal/mol ซึ่งพลังงานที่คำนวณได้ก็สอดคล้องกับผลของพันธะไฮโดรเจนระหว่าง HA และ ยับยั้ง 1,4 - deoxy andrographolide_1 เป็นการยืนยันว่าตัวยับยั้ง 1,4 - deoxy andrographolide_1 มีโอกาสที่จะยับยั้งการทำงานของโปรตีนฮีแมกกลูตินินได้

ตารางที่ 4.5 ผลของค่า binding energy และเทอมพลังงานย่อยอื่นๆ ระหว่างฮีแมกกลูตินินกับยับยั้ง 1,4 - deoxy andrographolide_1 ที่ได้จากการทำไดนามิกส์ซิมูเลชัน

ชนิดพลังงาน	พลังงาน (Kcal/mol)
พลังงานประจุ (ΔE_{ele})	-49.04 \pm 12.66
พลังงานวันเดอร์วาลส์ (ΔE_{vdw})	-33.96 \pm 3.51
พลังงานสถานะแก๊ส (ΔE_{MM})	-82.68 \pm 13.18
พลังงานรวมสารละลาย (ΔG_{sol})	10.35 \pm 2.35
พลังงานเสรีของการยึดจับ ($\Delta G_{binding}$)	-72.33 \pm 11.06

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาโมเลกุลาร์ดอกกิ่งระหว่างโปรตีนฮีแมกกลูตินินของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ H1N1 ที่ระบาดในปี 2009 กับตัวยับยั้ง andrographolide และ อนุพันธ์ ทั้งหมด 9 ตัว ผลการคำนวณพบว่า ตัวยับยั้ง 1,4 - deoxyandrographolide_1 สามารถจับกับโปรตีนฮีแมกกลูตินินได้ดีที่สุดโดยมีค่าพลังงานการยึดจับเท่ากับ -7.61 Kcal/mol และ % conformational cluster เท่ากับ 31 % ดังนั้นจึงเลือกสาร 1,4 - deoxyandrographolide_1 มาทำการศึกษาด้วยระเบียบวิธีโมเลคิวลาร์ไดนามิกส์ซิมูเลชัน จากผลของการคำนวณการเกิดพันธะไฮโดรเจนด้วยเทคนิคโมเลคิวลาร์ไดนามิกส์ซิมูเลชัน พบว่าตัวยับยั้ง 1,4 - deoxy andrographolide_1 สามารถเกิดพันธะกับกรดอะมิโนของโปรตีน HA ในตำแหน่งที่สำคัญและมีเปอร์เซ็นต์การเกิดพันธะที่ค่อนข้างสูงนั่นคือการเกิดพันธะมีความแข็งแรงและเกิดตลอดเวลาของการทำซิมูเลชัน โดย เกิด 1 พันธะกับ Y95, H183, D190, E227 มีค่า % Hydrogen bond occupation เท่ากับ 88%, 96%, 21% และ 76% ตามลำดับ และเกิด 2 พันธะกับ G228 โดยมีค่า % Hydrogen bond occupation เท่ากับ 75% และ 75% ตามลำดับ และผลการคำนวณค่า binding energy พบว่าการยึดจับระหว่างฮีแมกกลูตินินกับตัวยับยั้ง 1,4 - deoxy andrographolide_1 สามารถยึดจับกันได้ดีและมีความเสถียรเนื่องจากมีค่าเป็นลบโดยมีค่าพลังงานการยึดจับเท่ากับ -72.33 kcal/mol แสดงให้เห็นว่าการยึดจับระหว่างฮีแมกกลูตินินกับยับยั้ง มีความแข็งแรง ซึ่งพลังงานที่คำนวณได้ก็สอดคล้องกับผลของพันธะไฮโดรเจนระหว่าง HA และ ตัวยับยั้ง 1,4 - deoxy andrographolide_1 เป็นการยืนยันว่าตัวยับยั้ง 1,4 - deoxy andrographolide_1 มีโอกาสที่จะพัฒนาเป็นยาเพื่อยับยั้งการทำงานของโปรตีนฮีแมกกลูตินินได้

บรรณานุกรม

- Caceres, D. D., J. L. Hancke, et al. (1999). "Use of visual analogue scale measurements (VAS) to assess the effectiveness of standardized *Andrographis paniculata* extract SHA-10 in reducing the symptoms of common cold. A randomized double blind-placebo study." Phytomedicine **6**(4): 217-223.
- Caceres, D. D., J. L. Hancke, et al. (1997). "Prevention of common colds with *Andrographis paniculata* dried extract. A Pilot double blind trial." Phytomedicine **4**(2): 101-104.
- Case, D. A., T. A. Darden, et al. (2008). "AMBER10." University of California, San Francisco.
- Cheng, J.-X., B.-H. Fang, et al. (2009). "Activity of Andrographolide and Its Derivatives against Influenza Virus in Vivo and in Vitro." Biological and Pharmaceutical Bulletin **32**: 1385-1391.
- Cross, K. J., L. M. Burleigh, et al. (2001). "Mechanisms of cell entry by influenza virus." Expert. Rev. Mol. Med. **6**: 1-18.
- De Clercq, E. and J. Neyts (2007). "Avian influenza A (H5N1) infection: targets and strategies for chemotherapeutic intervention." Trends in Pharmacological Sciences **28**(6): 280-285.
- Horimoto, T. and Y. Kawaoka (2001). "Pandemic threat posed by avian influenza A viruses." Clin. Microbiol. Rev **1**: 29-141.
- Karthik Viswanathan , A. C., R. R. Aravind Srinivasan , V. Sasisekharan , et al. (2010). "Glycans as receptors for influenza pathogenesis." Glycoconj J **27**: 561–570
- Li, X.-B., S.-Q. Wang, et al. (2011). "Novel Inhibitor Design for Hemagglutinin against H1N1 Influenza Virus by Core Hopping Method." Plos One **6**(11): e28111.
- Makimura, Y., S. Watanabe, et al. (2006). "Chemoenzymatic synthesis and application of a sialoglycopolymer with a chitosan backbone as a potent inhibitor of human influenza virus hemagglutination." Carbohydrate Research **341**(11): 1803-1808.
- Matrosovich, M. N., A. S. Gambaryan, et al. (1997). "Avian influenza A viruses differ from human viruses by recognition of sialyloligosaccharides and gangliosides and by a higher conservation of the HA receptor-binding site." Virology **233**: 224-234.
- Nandi, T. (2008). "Proposed lead molecules against Hemagglutinin of avian influenza virus (H5N1)." Bioinformation **2**(6): 240-244.

- Nunthaboot, N., T. Rungrotmongkol, et al. (2009). "Molecular insights into human receptor binding to 2009 H1N1 influenza A hemagglutinin." Monatsh. Chem. **141**: 801-807.
- Ogata, M., T. Murata, et al. (2007). "Chemoenzymatic synthesis of artificial glycopolypeptides containing multivalent sialyloligosaccharides with a γ -polyglutamic acid backbone and their effect on inhibition of infection by influenza viruses." Bioorganic & Medicinal Chemistry **15**(3): 1383-1393.
- Priyadarzini, T. R. K., J. F. A. Selvin, et al. (2012). "Theoretical Investigation on the Binding Specificity of Sialyldisaccharides with Hemagglutinins of Influenza A Virus by Molecular Dynamics Simulations." J. Biol. Chem **287**: 34547-3557.
- Russell, R. J., P. S. Kerry, et al. (2008). "Structure of influenza hemagglutinin in complex with an inhibitor of membrane fusion." Proceedings of the National Academy of Sciences **105**(46): 17736-17741.
- Steinhauer, D. A. (1999). "Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus." Virology **258**: 1-20.
- Stevens, J., O. Blixt, et al. (2006). "Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus." Science **312**: 404-410.
- Taisuke Horimoto, Y. K. a. A. t. a. (2005). "Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents." Nature Reviews Microbiology **3** 591-600.
- Tobita, K. (1997). "Classification and nomenclature of influenza viruses." Nihon. Rinsho. **55**: 2512-2514.
- Vanderlinden, E., F. Göktaş, et al. (2010). "Novel inhibitors of influenza virus fusion: structure activity relationship and interaction with the viral hemagglutinin." J. Virol. **84**: 4277-4288.

ภาคผนวก

ภาคผนวก

ตารางที่ 1 ผลของพลังงานการยึดจับของสาร andrographolide กับโปรตีนฮีแมกกลูตินินจากการทำโมเลกุลาร์ดีอกกิ่ง

Cluster Rank	Lowest Binding Energy	Run	Mean Binding Energy	Num in Clus	Histogram
					5 10 15 20 25 30 35
1	-6.91	29	-6.40	19	#####
2	-6.90	16	-6.29	22	#####
3	-6.90	23	-6.41	32	#####
4	-6.79	55	-6.32	5	#####
5	-6.31	5	-6.29	2	##
6	-6.19	14	-6.09	10	#####
7	-6.00	65	-5.56	6	#####
8	-5.74	62	-5.74	1	##
9	-5.60	6	-5.60	1	#
10	-5.32	25	-5.32	1	#
11	-5.16	10	-5.16	1	#

ตารางที่ 2 ผลของพลังงานการยึดจับของสาร 1,4-deoxyandrographolide_1 กับโปรตีนฮีแมกกลูตินินจากการทำโมเลกุลาร์ดีอกกิ่ง

Cluster Rank	Lowest Binding Energy	Run	Mean Binding Energy	Num in Clus	Histogram
					5 10 15 20 25 30 35
1	7.61	27	7.19	31	#####
2	7.42	12	7.26	17	#####
3	6.87	85	6.59	25	#####
4	6.70	42	6.36	3	###
5	6.66	34	6.44	17	#####
6	6.27	92	6.27	1	#
7	6.24	4	6.22	2	##
8	6.20	23	6.20	1	#
9	5.92	78	5.92	2	##
10	5.77	9	5.77	1	#

ตารางที่ 3 ผลของพลังงานการยึดจับของสาร 1,4-deoxyandrographolide_2 กับโปรตีนฮีแมกกลูตินิน จากการทำโมเลกุลาร์ดอกกิ่ง

Cluster Rank	Lowest Binding Energy	Run	Mean Binding Energy	Num in Clus	Histogram
					5 10 15 20 25 30 35
1	-6.84	75	-6.01	5	#####
2	-6.69	87	-6.23	33	#####
3	-6.67	17	-6.13	12	#####
4	-6.38	35	-5.78	11	#####
5	-6.37	21	-5.83	16	#####
6	-6.24	84	-6.24	1	#
7	-6.17	3	-5.80	11	#####
8	-5.74	16	-5.73	2	##
9	-5.69	91	-5.69	1	#
10	-5.40	12	-5.35	4	####
11	-5.29	86	-5.21	2	##
12	-5.22	41	-5.08	2	##

ตารางที่ 4 ผลของพลังงานการยึดจับของสาร 1,4-deoxyandrographolide_3 กับโปรตีนฮีแมกกลูตินิน การทำโมเลกุลาร์ดอกกิ่ง

Cluster Rank	Lowest Binding Energy	Run	Mean Binding Energy	Num in Clus	Histogram
					5 10 15 20 25 30 35
1	6.77	43	5.62	31	#####
2	6.55	21	6.00	7	#####
3	6.31	95	5.70	27	#####
4	6.04	75	5.62	13	#####
5	6.03	72	5.49	7	#####
6	6.03	34	5.92	4	####
7	5.94	70	5.94	1	#
8	5.52	25	5.31	3	###
9	5.41	23	5.41	1	#
10	5.36	35	5.36	1	#
11	5.30	92	5.30	1	#
12	5.22	94	5.09	2	##
13	5.14	56	5.14	1	#
14	4.97	68	4.97	1	#

ตารางที่ 5 ผลของพลังงานการยึดจับของตัวยับยั้ง Neoandrographolide_1 กับ
โปรตีนฮีแมกกลูตินินจากการทำโมเลกุลาร์ดีคอกกิ่ง

Cluster Rank	Lowest Binding Energy	Run	Mean Binding Energy	Num in Clus	Histogram
1	-6.67	32	-5.64	18	#####
2	-6.66	69	-6.06	11	#####
3	-6.33	84	-5.06	4	####
4	-6.32	95	-5.65	5	#####
5	-6.27	27	-5.83	2	##
6	-6.04	53	-5.37	14	#####
7	-6.03	73	-5.69	2	##
8	-5.94	16	-5.21	6	#####
9	-5.88	28	-5.32	4	####
10	-5.69	63	-5.29	3	###
11	-5.59	59	-5.15	4	####
12	-5.55	91	-5.31	2	##
13	-5.54	20	-5.32	6	#####
14	-5.50	78	-5.17	4	####
15	-5.45	62	-5.16	3	###
16	-5.27	86	-5.27	1	#
17	-5.13	99	-4.67	2	##
18	-5.03	7	-4.98	2	##
19	-4.96	15	-4.96	1	#
20	-4.80	81	-4.39	2	##
21	-4.58	58	-4.01	2	##
22	-4.26	47	-4.26	1	#
23	-3.59	25	-3.59	1	#

ตารางที่ 6 ผลของพลังงานการยึดจับของตัวยับยั้ง Neoandrographolide_2 กับ
โปรตีนฮีแมกกลูตินินจากการทำโมเลกุลาร์ดอกกิ่ง

Cluster Rank	Lowest Binding Energy	Run	Mean Binding Energy	Num in Clus	Histogram
1	-7.53	23	-5.31	12	#####
2	-6.72	26	-5.72	10	#####
3	-6.10	60	-5.37	5	#####
4	-6.04	56	-5.73	2	##
5	-6.01	88	-5.57	3	###
6	-5.77	61	-5.77	1	#
7	-5.52	80	-4.91	7	#####
8	-5.49	39	-4.66	5	#####
9	-5.41	51	-5.41	1	#
10	-5.35	29	-5.15	2	##
11	-5.29	37	-4.92	4	####
12	-5.26	38	-5.26	1	#
13	-5.23	82	-5.23	1	#
14	-5.21	54	-5.21	1	#
15	-5.06	27	-4.13	3	###
16	-5.04	24	-4.68	3	###
17	-4.81	46	-4.20	6	#####
18	-4.74	7	-4.00	3	###
19	-4.72	66	-4.39	2	##
20	-4.67	57	-4.67	1	#
21	-4.56	5	-4.09	2	##
22	-4.56	14	-4.35	4	####
23	-4.45	13	-4.45	1	#
24	-4.42	52	-4.42	1	#
25	-4.38	6	-4.38	1	#
26	-4.27	64	-4.27	1	#
27	-4.26	73	-4.26	1	#
28	-4.14	71	-3.66	3	###
29	-4.11	45	-4.11	1	#
30	-3.87	10	-3.83	2	##
31	-3.86	98	-3.83	2	##
32	-3.78	9	-3.43	2	##
33	-3.69	3	-3.69	1	#
34	-3.62	59	-3.62	1	#
35	-3.55	99	-3.55	1	#
36	-3.45	78	-3.32	2	##
37	-3.20	1	-3.20	1	#

ตารางที่ 7 ผลของพลังงานการยึดจับของตัวยับยั้ง Neoandrographolide_3 กับ โพรตีนฮีแมกกลูตินินจากการทำโมเลกุลาร์ดอกกิ่ง

Cluster Rank	Lowest Binding Energy	Run	Mean Binding Energy	Num in Clus	Histogram
1	-6.49	30	-5.59	8	#####
2	-6.43	97	-5.36	6	#####
3	-6.33	86	-5.37	3	###
4	-6.24	34	-5.28	10	#####
5	-6.10	47	-5.21	8	#####
6	-6.07	33	-5.44	6	#####
7	-5.86	40	-5.36	4	####
8	-5.69	72	-5.34	4	####
9	-5.66	37	-5.48	4	####
10	-5.60	96	-5.31	4	####
11	-5.60	36	-5.00	7	#####
12	-5.53	28	-5.33	2	##
13	-5.52	8	-5.52	1	#
14	-5.49	93	-4.67	2	##
15	-5.38	14	-5.00	3	###
16	-5.32	79	-4.87	4	####
17	-5.11	35	-5.11	1	#
18	-5.08	27	-5.08	1	#
19	-5.02	21	-5.02	1	#
20	-4.78	25	-3.71	2	##
21	-4.78	94	-4.65	2	##
22	-4.73	80	-4.20	2	##
23	-4.67	6	-4.26	2	##
24	-4.60	56	-4.60	1	#
25	-4.55	00	-4.55	1	#
26	-4.51	38	-4.51	1	#
27	-4.51	53	-4.51	1	#
28	-4.45	7	-4.45	1	#
29	-4.16	64	-4.16	1	#
30	-4.13	32	-4.13	1	#
31	-4.08	44	-4.08	1	#
32	-4.07	42	-4.07	1	#
33	-4.00	18	-4.00	1	#
34	-3.84	11	-3.84	1	#
35	-3.59	9	-3.59	1	#
36	-3.21	84	-3.21	1	#

ตารางที่ 8 ผลของพลังงานการยึดจับของตัวยับยั้ง Neoandrographolide_4 กับ
โปรตีนฮีแมกกลูตินินจากการทำโมเลกุลาร์ดีอกกิ่ง

Cluster Rank	Lowest Binding Energy	Run	Mean Binding Energy	Num in Clus	Histogram
1	-6.93	75	-6.16	7	#####
2	-6.81	59	-5.92	6	#####
3	-6.78	41	-5.53	6	#####
4	-6.58	20	-6.04	2	##
5	-6.39	73	-5.36	5	#####
6	-6.29	11	-5.60	6	#####
7	-6.05	23	-4.93	8	#####
8	-6.04	80	-5.21	4	####
9	-5.83	98	-5.83	1	#
10	-5.72	4	-5.60	2	##
11	-5.50	54	-4.13	15	#####
12	-5.33	26	-5.03	2	##
13	-4.91	38	-4.67	5	#####
14	-4.88	69	-4.53	2	##
15	-4.87	87	-4.66	2	##
16	-4.77	19	-4.62	2	##
17	-4.72	7	-4.72	1	#
18	-4.68	68	-4.22	2	##
19	-4.59	83	-4.59	1	#
20	-4.38	35	-4.38	1	#
21	-4.29	93	-4.29	1	#
22	-4.14	48	-4.14	1	#
23	-4.09	94	-4.09	1	#
24	-3.76	60	-3.76	1	#
25	-3.73	91	-3.70	2	##
26	-3.67	42	-3.44	2	##
27	-3.60	76	-3.60	1	#
28	-3.59	77	-3.40	2	##
29	-3.53	65	-3.53	1	#
30	-3.43	00	-3.43	1	#
31	-3.25	90	-3.05	2	##
32	-3.20	97	-3.20	1	#
33	-3.06	89	-2.89	2	##
34	-2.79	43	-2.79	1	#
35	-2.79	92	-2.79	1	#

ตารางที่ 9 ผลของพลังงานการยึดจับของตัวยับยั้ง 14-alpha-lipoyl andrographolid กับ
โปรตีนฮีแมกกลูตินินจากการทำโมเลกุลาร์ดีออกกิ่ง

Cluster Rank	Lowest Binding Energy	Run	Mean Binding Energy	Num in Clus	Histogram
1	-6.78	53	-6.30	4	####
2	-6.32	59	-5.42	5	#####
3	-6.22	46	-5.78	9	#####
4	-6.21	41	-5.89	2	##
5	-6.20	30	-6.20	1	#
6	-6.19	18	-5.56	4	####
7	-6.00	3	-6.00	1	#
8	-5.99	76	-4.91	8	#####
9	-5.71	6	-5.71	1	#
10	-5.54	22	-4.51	5	#####
11	-5.53	82	-4.83	2	##
12	-5.52	2	-5.52	2	##
13	-5.52	75	-4.90	7	#####
14	-5.50	52	-5.50	1	#
15	-5.48	93	-5.48	1	#
16	-5.42	23	-4.88	5	#####
17	-5.41	71	-5.41	1	#
18	-5.41	13	-5.27	2	##
19	-5.39	15	-4.77	3	###
20	-5.28	90	-4.98	2	##
21	-5.25	16	-4.94	3	###
22	-5.15	10	-5.15	1	#
23	-5.14	56	-5.14	1	#
24	-5.08	86	-4.85	2	##
25	-5.06	91	-4.78	3	###
26	-5.05	55	-4.96	3	###
27	-4.89	38	-4.89	1	#
28	-4.86	60	-4.86	1	#
29	-4.84	19	-4.17	4	####
30	-4.80	51	-4.80	1	#
31	-4.75	58	-4.75	1	#
32	-4.73	79	-4.73	1	#
33	-4.63	42	-4.63	1	#
34	-4.55	81	-4.55	1	#
35	-4.52	21	-4.52	1	#
36	-4.48	95	-4.48	1	#
37	-4.44	9	-4.44	1	#

Cluster Rank	Lowest Binding Energy	Run	Mean Binding Energy	Num in Clus	Histogram
38	-4.44	8	-4.44	1	#
39	-4.30	24	-4.30	1	#
40	-4.00	94	-4.00	1	#
41	-3.83	39	-3.83	1	#
42	-3.64	33	-3.64	1	#
43	-3.15	74	-3.15	1	#
44	-2.94	97	-2.94	1	#