โครงงาน

การเรียนการสอนเพื่อเสริมสร้างประสบการณ์

ชื่อโครงการ การคำนวณโมเลกุลาร์ด๊อกกิ้งหลายเป้าหมายของคูมาริน

Multi-target docking calculation of coumarin

ชื่อนิสิต นายจิรายุส อาจรักษา **เลขประจำตัว** 5833012123

ภาควิชา เคมี

ปีการศึกษา 2561

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานทางวิชาการที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the senior project authors' files submitted through the faculty.

การคำนวณโมเลกุลลาร์ด็อกกิ้งหลายเป้าหมายของคูมาริน

Multi-target docking calculations of coumarins

โดย

นายจิรายุส อาจรักษา

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2561

โครงการ การคำนวณโมเลกุลลาร์ด็อกกิ้งหลายเป้าหมายของคูมาริน

โดย นาย จิรายุส อาจรักษา

ได้รับอนุมัติเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

.... ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร. มงคล สุขวัฒนาสินิทธิ์)

.... อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร. สมศักดิ์ เพียรวณิช)

.... กรรมการ

(อาจารย์ ดร. ณัฐพงศ์ ไพบูลย์วรชาติ)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

.... หัวหน้าภาควิชาเคมี

(รองศาสตราจารย์ ดร. วุฒิชัย พาราสุข)

วันที่ 24 เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2562

ชื่อโครงการ การคำนวณโมเลกุลลาร์ด็อกกิ้งหลายเป้าหมายของคูมาริน

ชื่อนิสิตในโครงการ นายจิรายุส อาจรักษา เลขประจำตัว 5833012123

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. สมศักดิ์ เพียรวณิช

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2561

บทคัดย่อ

คูมารินและอนุพันธ์มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย จึงมีความพยายามที่จะศึกษาหาส่วนของโครงสร้างที่ทำงานออกฤทธิ์ ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาหารูปแบบการเข้าจับระหว่างสารกลุ่มคูมารินและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับอาการ 4 ชนิด คือ โรคมะเร็ง อาการซึมเศร้า การอักเสบ และการแข็งตัวของเลือด โดยใช้สารกลุ่มคูมารินสำหรับแต่ละเอนไซม์จำนวน 40, 22, 54 และ 13 สารตามลำดับ การศึกษาใช้เทคนิคการคำนวณการเข้าจับเชิงโมเลกุลด้วยโปรแกรม AutoDock Vina โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด ได้มาจากคลังข้อมูลโปรตีน (2QC6, 2AZ5, 5AFZ และ 2V61) ผลการคำนวณพบว่าหมู่แทนที่บนอนุพันธ์ของคูมารินที่แตกต่างกันจะส่งผลให้รูปแบบการเข้าจับต่างกัน สารที่มีค่า pIC_{50} สูงส่วนใหญ่จะมีหมู่แทนที่เป็นธาตุกลุ่มฮาโลเจน วงอะโรมาติก หรือหมู่แทนที่ขนาดเล็ก ซึ่งจะส่งผลให้รูปแบบการเข้าจับไม่ต่างกัน ข้อมูลที่ได้นี้อาจจะเป็นประโยชน์ต่อการค้นคว้าและพัฒนายารักษาโรคตัวใหม่ที่มีประสิทธิภาพและมีความสามารถรักษาโรคได้หลากหลายในอนาคต

คำสำคัญ: คูมาริน, การคำนวณการเข้าจับเชิงโมเลกุล

Title Multi-target docking calculations of coumarins

Student Name Mister Jirayood Artraksa Student ID 5833012123

Advisor Name Associate Professor Dr. Somsak Pianwanit

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic Year 2018

Abstract

Coumarin and its derivatives have various biological activities. Attempts have been made to find pharmacophore of these compounds. In this work, binding modes between coumarins and enzymes related to 4 symptoms, which are anticancer, antidepressant, anti-inflammatory and anticoagulant, were studied by using 40, 22, 54 and 13 coumarins for each symptom, respectively. Molecular docking calculation technique was employed using AutoDock Vina. Three dimensional structures of the 4 enzymes were retrieved from the Protein Data Bank (2QC6, 2AZ5, 5AFZ, and 2V61). Calculation results indicated that different substituents on coumarin derivatives affect their binding modes. Compounds with high pIC_{50} values mostly contain halogen, aromatic ring or small substituent groups, in which their binding modes are quite similar. Obtained information may be helpful for design and development of a new effective drug with various biological functions in the future.

Keyword: coumarin, molecular docking calculation

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ผู้ทำการวิจัยได้รับความกรุณาอย่างสูงจากรองศาสตราจารย์ ดร. สมศักดิ์ เพียรวณิช ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ท่านได้ให้คำแนะนำและความรู้มากมายในการทำวิจัย ให้คำปรึกษาที่ก่อให้เกิดประโยชน์เมื่อเกิดปัญหาต่าง ๆ ซึ่งเกิดขึ้นตลอดเวลาระหว่างการทำวิจัย ให้ความเอาใจใส่ช่วยเหลือ จนทำให้การทำวิจัยและการเขียนรายงานฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

นอกจากนี้ผู้ทำงานวิจัยขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.มงคล สุขวัฒนาสินิทธิ์ และอาจารย์ ดร. ณัฐพงศ์ ไพบูลย์วรชาติ ที่กรุณาเสียสละเวลามาเป็นกรรมการในการสอบครั้งนี้ รวมถึงให้คำปรึกษาแนะนำในการเขียนรายงานจนเสร็จสมบูรณ์

โครงการวิจัยนี้ได้รับเงินสนับสนุนจากโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ของคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปีการศึกษา 2561 และได้รับความเอื้อเฟื้ออุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัยจากภาคเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตลอดจนความช่วยเหลือจากบุคลากรฝ่ายต่าง ๆ จึงขอกราบขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ค
Abstract	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญรูปภาพ	ซ
สารบัญตาราง	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ	2
1.3 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	2
1.3.1 คูมาริน	2
1.3.2 ฤทธิ์ทางชีวภาพของคูมาริน	3
1.3.3 เทคนิคการคำนวณการเข้าจับเชิงโมเลกุล	5
1.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
บทที่ 2 การทดลอง	8
2.1 การเตรียมโครงสร้างสามมิติของโมเลกุลของสารยับยั้งของในแต่ละโรค	8
2.2 การเตรียมโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ของโรคทั้งสี่โรค	8
2.3 การตรวจสอบความแม่นยำของโปรแกรม AutoDock Vina	8
2.4 คำนวณการเข้าจับเชิงโมเลกุลระหว่างสารยับยั้งจากอนุพันธ์ของคูมารินกับเอนไซม์รักษาโรคทั้งสี่ชนิด	9
2.5 การวิเคราะห์รูปร่างและตำแหน่งเข้าจับระหว่างสารยับยั้งและเอนไซม์	9
บทที่ 3 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	10
3.1 การตรวจสอบความแม่นยำของโปรแกรม AutoDock Vina	10

3.2 ผลของการศึกษาการเข้าจับระหว่างอนุพันธ์ของคูมารินกับเอนไซม์ของแต่ละโรค 11

3.2.1 การเข้าจับระหว่างอนุพันธ์ของคูมารินกับเอนไซม์ Casein Kinase 2 (CK2) 11

3.2.2 การเข้าจับระหว่างอนุพันธ์ของคูมารินกับเอนไซม์ Monoamine Oxidase B (MAOB) 18

3.2.3 การเข้าจับระหว่างอนุพันธ์ของคูมารินกับเอนไซม์ Cytokine 22

3.2.4 การเข้าจับระหว่างอนุพันธ์ของคูมารินกับเอนไซม์ Thrombin 31

3.3 ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและหมู่แทนที่กับฤทธิ์ทางชีวภาพของสารอนุพันธ์คูมาริน 33

3.3.1 ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างการเข้าจับกับฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ในโรคมะเร็ง 33

3.3.2 ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างการเข้าจับกับฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ในอาการซึมเศร้า 35

3.3.3 ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างการเข้าจับกับฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการอักเสบ 36

3.3.4 ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างการเข้าจับกับฤทธิ์ยับยั้งกับเอนไซม์ที่ทำให้เลือดแข็งตัว 38

บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง 40

เอกสารอ้างอิง 41

ประวัติผู้วิจัย 44

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1.1 โครงสร้างทางเคมีของคูมาริน 1

รูปที่ 1.2 ลักษณะของถั่วตองกา 1

รูปที่ 1.3 โครงสร้างและหมายเลขกำกับตำแหน่งของคูมาริน 3

รูปที่ 1.4 โครงสร้างของเอนไซม์ Casein Kinase 2 และสารยับยั้ง (PDB code 2QC6) 3

รูปที่ 1.5 โครงสร้างของเอนไซม์ Monoamine Oxidase B และสารยับยั้ง (PDB code 2V61) 4

รูปที่ 1.6 โครงสร้างของเอนไซม์ cytokine และสารยับยั้ง (PDB code 2AZ5) 4

รูปที่ 1.7 โครงสร้างของเอนไซม์ thrombin และสารยับยั้ง (PDB code 5AFZ) 5

รูปที่ 1.8 การคำนวณพลังงานกิบส์ของการเข้าจับ 6

รูปที่ 3.1 โครงสร้างการเข้าจับที่ได้จากการคำนวณ เทียบกับโครงสร้างทางการทดลอง 11

รูปที่ 3.2 โครงสร้างการเข้าจับระหว่างเอนไซม์ CK2 กับสารยับยั้ง 35

รูปที่ 3.3 โครงสร้างการเข้าจับระหว่างเอนไซม์ MAOB กับสารยับยั้ง 36

รูปที่ 3.4 โครงสร้างการเข้าจับระหว่างเอนไซม์ cytokine กับสารยับยั้ง 37

รูปที่ 3.5 โครงสร้างการเข้าจับระหว่างเอนไซม์ thrombin กับสารยับยั้ง 38

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 3.1 พลังงานการเข้าจับระหว่างสารยับยั้งกับเอนไซม์แต่ละโรค 10

ตารางที่ 3.2 ค่าฤทธิ์ทางชีวภาพและผลการเข้าจับระหว่าง CK2 กับสารอนุพันธ์ของคูมาริน 11

ตารางที่ 3.3 ค่าฤทธิ์ทางชีวภาพและผลการเข้าจับระหว่าง MAO-B กับสารอนุพันธ์ของคูมาริน 18

ตารางที่ 3.4 ค่าฤทธิ์ทางชีวภาพและผลการเข้าจับระหว่าง Cytokine กับสารอนุพันธ์ของคูมาริน 22

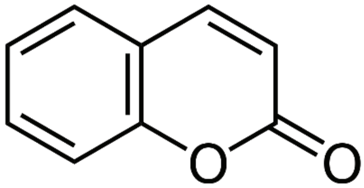
ตารางที่ 3.5 ค่าฤทธิ์ทางชีวภาพและผลการเข้าจับระหว่าง Thrombin กับสารอนุพันธ์ของคูมาริน 31

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในการวิจัยและพัฒนายารักษาโรคตัวใหม่จะต้องใช้ทรัพยากรและเงินทุนจำนวนมาก อีกทั้งยังใช้เวลาที่ค่อนข้างนาน ดังนั้นนักวิจัยจึงได้นำเอาเทคนิคทางเคมีคอมพิวเตอร์เข้ามาใช้เพื่อช่วยทำนายฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร เช่น เทคนิคการคำนวณการเข้าจับเชิงโมเลกุล (molecular docking calculation)[1] ซึ่งจะทำการคำนวณพลังงานการเข้าจับระหว่างสารยับยั้งกับตัวรับ ข้อมูลนี้สามารถใช้ในการทำนายฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร และยังช่วยให้ข้อมูลในการปรับปรุงโครงสร้างของสารให้มีอันตรกิริยาที่ดีขึ้นได้ ทำให้ช่วยลดความสิ้นเปลืองในการสังเคราะห์สารและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพทางการทดลองได้

คูมาริน (Coumarin) [รูปที่ 1.1] เป็นสารที่สกัดได้จากพืชหลายชนิด โดยจะพบมากในถั่วตองกา (Tonka bean) [รูปที่ 1.2] จากการศึกษาพบว่าคูมารินและอนุพันธ์มีฤทธิ์ในการรักษาโรคได้หลายชนิด[5-8] เช่น มะเร็ง [9,13] เอดส์ [14] ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย [15] ฆ่าเชื้อไวรัส [16,18] เป็นต้น แต่จากการศึกษาทำให้ทราบเพียงว่าอนุพันธ์ของคูมารินชนิดใดสามารถรักษาโรคชนิดใดได้เท่านั้น แต่ยังไม่สามารถระบุได้อย่างแน่นอนว่าส่วนใดของโครงสร้างสารอนุพันธ์คูมารินที่เป็นตำแหน่งที่ทำงานออกฤทธิ์ (pharmacophore) หรือตำแหน่งที่โมเลกุลจะจับกับเอนไซม์ในการยับยั้งโรคนั้น ๆ



รูปที่ 1.1 โครงสร้างทางเคมีของคูมาริน

ที่มา https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/coumarin

รูปที่ 1.2 ลักษณะของถั่วตองกา

ที่มา https://boisdejasmin.com/note/coumarin-and-tonka-bean

ในการหาตำแหน่งที่ทำงานออกฤทธิ์หรือตำแหน่งที่โมเลกุลจะจับกับเอนไซม์ในการยับยั้งโรคด้วยวิธีทางการทดลองมีความยุ่งยากและมีข้อจำกัดหลายประการ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะทำการหาตำแหน่งทำงานออกฤทธิ์ของคูมารินด้วยเทคนิคการคำนวณการเข้าจับเชิงโมเลกุล โดยจะนำเอนไซม์ที่จำเพาะต่อโรคต่าง ๆ จำนวน 4 โรคมาทำการคำนวณการเข้าจับกับโมเลกุลอนุพันธ์ของคูมารินหลายชนิด แล้วคำนวณหาค่าพลังงานการเข้าจับที่ต่ำที่สุด เพื่อพิจารณาหาส่วนของโมเลกุลที่เป็นตำแหน่งทำงานออกฤทธิ์

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

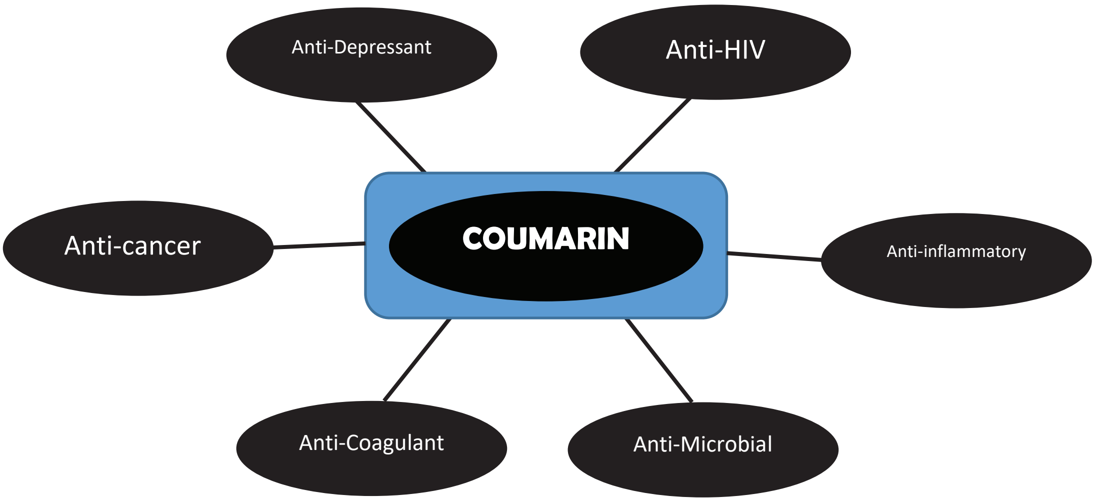
เพื่อหาตำแหน่งทำงานออกฤทธิ์ของคูมารินที่มีผลยับยั้งโรคโดยการศึกษาด้วยเทคนิคการคำนวณการเข้าจับเชิงโมเลกุล

1.3 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

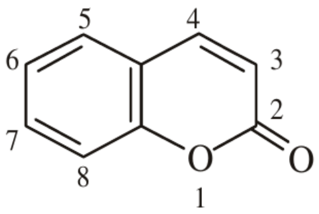
1.3.1 คูมาริน

โครงสร้างของคูมาริน (benzopyran-2-one) จะประกอบไปด้วยวงเบนซีนเชื่อมติดกับวง alpha-pyrone [รูปที่1] ซึ่งสารคูมารินและอนุพันธ์นั้นเป็นที่รู้กันดีว่ามีฤทธิ์ในการรักษาโรคได้หลากหลาย ยกตัวอย่างเช่น

1. มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง
2. มีฤทธิ์ในการยับยั้งการแข็งตัวของเลือด
3. มีฤทธิ์ในการรักษาหรือปกป้องระบบประสาท
4. มีฤทธิ์ในการรักษาโรคเอดส์
5. มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย, เชื้อรา และ ไวรัส
6. มีฤทธิ์ในการยับยั้งอาการซึมเศร้า



สารอนุพันธ์ของคูมารินที่มีหมู่แทนที่แตกต่างกันในตำแหน่งต่าง ๆ ของโครงสร้างจะทำให้ความสามารถในการรักษาโรคนั้นเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งในการแทนที่ของหมู่แทนที่บนในโมเลกุลของคูมารินนั้นจะมีอยู่ทั้งหมด 6 ตำแหน่งคือ ตำแหน่งที่ 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 ดังรูปที่ 1.3



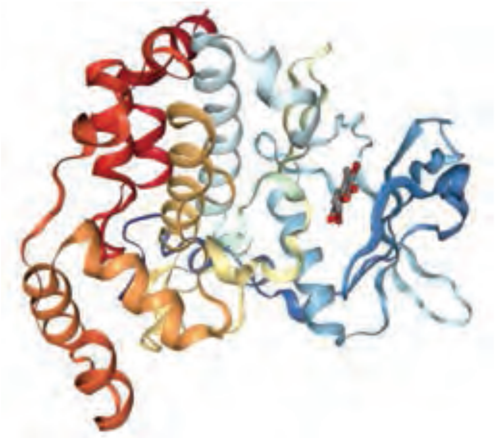
รูปที่ 1.3 โครงสร้างและหมายเลขกำกับตำแหน่งของคูมาริน

1.3.2 ฤทธิ์ทางชีวภาพของคูมาริน

กลไกการออกฤทธิ์ของยารักษาโรคที่เกิดจากเชื้อโรคส่วนมากจะเป็นการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่สำคัญและจำเป็นต่อการดำรงชีพของเชื้อโรค จึงมักเรียกยาประเภทนี้ว่าสารยับยั้ง โดยสารยับยั้งจะเข้าจับกับเอนไซม์ที่ตำแหน่งจำเพาะเจาะจงและส่งผลให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานตามปกติได้ จึงเป็นการขัดขวางการดำรงชีพของเชื้อโรค เนื่องจากคูมารินและอนุพันธ์มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้เลือกศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ 4 อย่างของคูมารินและอนุพันธ์ดังนี้

1.3.2.1 ฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็ง

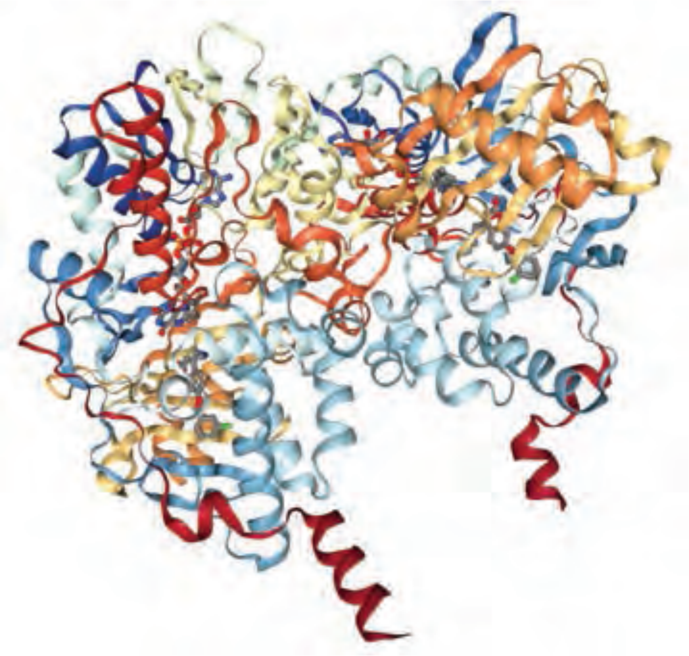
Casein Kinase 2 (CK2) เป็นเอนไซม์ที่ช่วยเร่งปฏิกิริยา phosphorylation และมีบทบาทสำคัญในกระบวนการหลายอย่างในเซลล์ นอกจากนี้ยังช่วยป้องกันการตายอย่างมีแบบแผน (apoptosis) ของเซลล์ด้วย โดยเอนไซม์ CK2 มีความเกี่ยวข้องกับเซลล์มะเร็ง เพราะช่วยให้เซลล์มะเร็งหลบหลีกการถูกกำจัดด้วยกระบวนการตายอย่างมีแบบแผนของร่างกายไปได้ อีกทั้งยังช่วยให้เซลล์มะเร็วได้รับสารที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิต ดังนั้นการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CK2 จึงเป็นแนวทางหนึ่งในการรักษาโรคมะเร็ง และสารอนุพันธ์ของคูมารินสามารถเข้าจับในบริเวณเร่ง (active site) ของ CK2 [รูปที่ 1.4] และยับยั้งการทำงานของ CK2 ได้



รูปที่ 1.4 โครงสร้างของเอนไซม์ Casein Kinase 2 และสารยับยั้ง (PDB code 2QC6)

1.3.2.2 ฤทธิ์ในการยับยั้งอาการซึมเศร้า

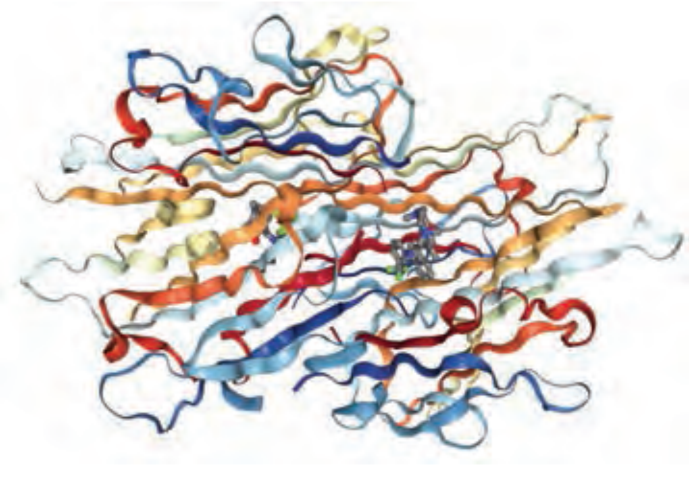
ในการรักษาอาการซึมเศร้า อนุพันธ์ของคูมาริน จะเข้าไปจับหรือเกิดพันธะกับบริเวณเร่งเพื่อไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ชื่อว่า Monoamine Oxidase B (MAOB) [รูปที่ 1.5] ซึ่งทำหน้าที่ส่งสัญญาณภายในสมอง (Synapse) ที่จะทำให้เกิดอาการซึมเศร้า



รูปที่ 1.5 โครงสร้างของเอนไซม์ Monoamine Oxidase B และสารยับยั้ง (PDB code 2V61)

1.3.2.3 ฤทธิ์ในการยับยั้งอาการอักเสบ

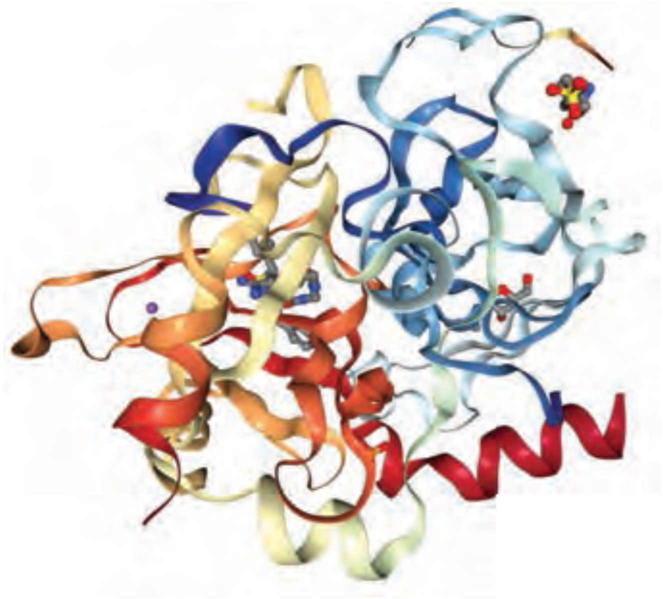
ในการรักษาอาการอักเสบ อนุพันธ์ของคูมาริน จะเข้าไปจับหรือเกิดพันธะกับบริเวณเร่งในตำแหน่ง tumor necrosis factor alpha (TNFa) ในเอนไซม์ cytokine โดยจะมีรูปร่างสามมิติดังแสดงในรูปที่ 1.6 ซึ่งเอนไซม์ cytokine ทำหน้าที่ส่งสัญญาณภายในเซลล์ โดยสารยับยั้งจะเข้าไปแย่งจับในตำแหน่ง TNFa ซึ่งเป็นตำแหน่งที่เกี่ยวกับภูมิคุ้มกัน เพื่อจะก่อให้เกิดการอักเสบหรือผื่นแดง



รูปที่ 1.6 โครงสร้างของเอนไซม์ cytokine และสารยับยั้ง (PDB code 2AZ5)

1.3.2.4 ฤทธิ์ในการยับยั้งการแข็งตัวของเลือด

ในการยับยั้งการแข็งตัวของเลือด อนุพันธ์ของคูมาริน จะเข้าไปจับหรือเกิดพันธะกับบริเวณเร่งของเอนไซม์ที่ชื่อว่า thrombin โดยจะมีรูปร่างสามมิติดังแสดงในรูปที่ 1.7 เนื่องจากเอนไซม์ thrombin เป็นเอนไซม์ที่จะทำให้ Fibrinogen เปลี่ยนเป็น Fibrin เพื่อทำหน้าที่เปรียบเสมือนเส้นใยที่จะทำให้เลือดแข็งตัว เมื่อตัวยาเข้าไปยับยั้งก็จะทำให้เลือดไม่แข็งตัว

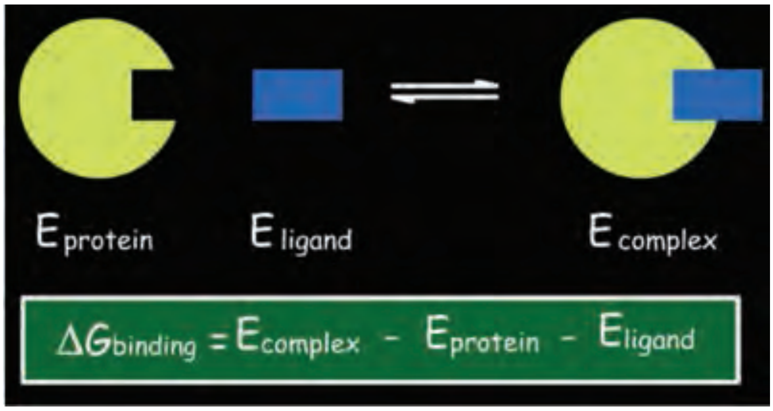


รูปที่ 1.7 โครงสร้างของเอนไซม์ thrombin และสารยับยั้ง (PDB code 5AFZ)

1.3.3 เทคนิคการคำนวณการเข้าจับเชิงโมเลกุล

การเข้าจับของสารเพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จะต้องมีความจำเพาะเจาะจง เปรียบเสมือนลูกกุญแจและแม่กุญแจ การคำนวณการเข้าจับเชิงโมเลกุล (molecular docking) ก็เปรียบเสมือนการลองใช้ลูกกุญแจไขแม่กุญแจเพื่อดูว่ามีความเหมาะสมมากน้อยเพียงใด โดยแม่กุญแจก็คือ ตัวรับ (receptor) ซึ่งเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น โปรตีนหรือเอนไซม์ ส่วนลูกกุญแจก็คือ สารยับยั้ง (inhibitor) ซึ่งเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก การคำนวณการเข้าจับเชิงโมเลกุลนั้นจะต้องมีส่วนประกอบสามส่วนได้แก่

- **Molecular representation** หมายถึงโครงสร้างที่จะเป็นตัวแทนของสารที่เราต้องการจะนำมาทดสอบการเข้าทำปฏิกิริยา ในที่นี้หมายถึง สารที่เราเตรียมขึ้นเพื่อเป็นตัวแทนของโมเลกุลสามมิติของตัวรับและสารยับยั้ง
- **Scoring method** หมายถึงวิธีการคำนวณหาว่าการเข้าจับของตัวรับและสารยับยั้งนั้นเกิดขึ้นได้ดีหรือไม่ โดยจะคำนวณจากพลังงานกิบส์ของการเข้าจับ ดังแสดงในรูปที่ 1.8 ซึ่งพลังงานการเข้าจับนี้จะคำนวณมาจากอันตรกิริยาต่าง ๆ ระหว่างเอนไซม์กับสารยับยั้ง เช่น electrostatic interaction, พันธะไฮโดรเจน, van der Waals interaction, hydrophobic force



รูปที่ 1.8 การคำนวณพลังงานกิบส์ของการเข้าจับ
ที่มา http://ncbr.muni.cz/~martinp/C3210/StructBioinf9.pdf

- **Searching algorithm** หมายถึงการหาตำแหน่งการเข้าจับ (binding site) ของสารที่เราต้องการค้นคว้า เนื่องจากเอนไซม์มีโครงสร้างขนาดใหญ่และมีความซับซ้อนมากเมื่อเทียบกับสารยับยั้ง จึงไม่สามารถคำนวณการเข้าจับทุกรูปแบบที่เป็นไปได้ภายในเอนไซม์ ดังนั้นจึงต้องอาศัยเทคนิคการสุ่มตัวอย่างที่มีประสิทธิภาพเพื่อหารูปแบบการเข้าจับที่ดีที่สุดภายในขอบเขตที่สามารถทำการคำนวณได้ โดยใช้ค่าพลังงานการเข้าจับเป็นเกณฑ์ตัดสิน ซึ่งเทคนิคการค้นหานี้มีอยู่หลายเทคนิคขึ้นกับการเลือกใช้ของแต่ละโปรแกรม เช่น โปรแกรม AutoDock Vina ใช้เทคนิค genetic algorithm ในการค้นหารูปแบบการเข้าจับที่ดีที่สุด

ในงานวิจัยนี้เลือกใช้โปรแกรม AutoDock Vina [13] สำหรับการคำนวณการเข้าจับเชิงโมเลกุล เพราะมีความถูกต้องแม่นยำสูง ให้ผลการคำนวณที่สอดคล้องกับข้อมูลทางการทดลอง โปรแกรมใช้งานง่าย คำนวณได้รวดเร็ว และได้รับการยอมรับกันทั่วโลก

1.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปี พ.ศ. 2554 Hong L. Zhai และคณะ [7] ศึกษาความสามารถในการต้านมะเร็งจากสารตัวอย่างที่เป็นสารอนุพันธ์ของคูมาริน ด้วยวิธีโมเลกุลลาร์โมเดลลิง จากนั้นทำการคำนวณจำลองระบบพร้อมทั้งศึกษาผลของหมู่แทนที่ในตำแหน่งต่าง ๆ ของโมเลกุลคูมารินด้วยเทคนิคต่าง ๆ เช่น การวิเคราะห์เชิงเปรียบเทียบสนามโมเลกุล (COMFA) และการวิเคราะห์เชิงเปรียบเทียบดัชนีความเหมือนเชิงโมเลกุล (COMSIA) สุดท้ายเมื่อได้โครงสร้างที่สามารถยับยั้งมะเร็ง จึงตรวจสอบการเข้าจับ ณ ตำแหน่งทำงานด้วยวิธีโมเลกุลลาร์ด็อกกิงด้วยโปรแกรม AutoDock 4.2 เพื่อเพิ่มความเข้าใจในการจะนำไปสู่การสังเคราะห์ยาที่ง่ายขึ้นในอนาคต

ในปี พ.ศ. 2549 Lionel Pochet และคณะ [8] ศึกษาผลของทางการยับยั้งการแข็งตัวของเลือด โดยสังเคราะห์สารยับยั้งที่เป็นอนุพันธ์ของคูมาริน ซึ่งจะมีหมู่แทนที่ในตำแหน่ง C3 เป็นหมู่ amine ได้สาร

ที่จะทำการวิเคราะห์ทั้งหมด 15 ตัวอย่างจากนั้น นำสารที่สังเคราะห์ได้มาศึกษาผลการเข้าจับต่อตำแหน่งทำงานในโปรตีน Thrombin โดยวิธีการโมเลกุลลาร์ด็อกกิงด้วยโปรแกรม GOLD พบว่าการเติมหมู่ Guanidine จะทำให้สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ลดลง และการเติมหมู่ aniline จะส่งผลให้การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มีประสิทธิภาพดีขึ้น

ในปี พ.ศ. 2554 Maria J. Matos และคณะ [9] ทำการสังเคราะห์สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Monoamine Oxidase B จากสารที่เป็นอนุพันธ์ของคูมาริน โดยการเติมหมู่ Aryl ในตำแหน่ง C3 และศึกษาความสามารถในการยับยั้งและความจำเพาะต่อเอนไซม์ของสารที่สังเคราะห์ได้ โดยวิธีโมเลกุลลาร์ด็อกกิ้งด้วยโปรแกรม Dock 6.4 พบว่า หมู่ Methyl ณ ตำแหน่ง C6 นั้นมีความสำคัญต่อการเติมหมู่ Phenyl และหมู่แทนที่บนวง Phenyl ในตำแหน่ง C3 ถ้าเป็นหมู่เล็กจะส่งผลให้การยับยั้งของทำงานของ Monoamine Oxidase B ได้ดีขึ้น

ในปี พ.ศ. 2547 Jie-Fei Cheng และคณะ [10] ศึกษาผลกระทบของหมู่แทนที่ต่าง ๆ ในสารยับยั้งที่เป็นอนุพันธ์ของคูมารินที่สังเคราะห์ได้ โดยทำการศึกษาการยับยั้งการทำงานของ Tumor necrosis factor ในเม็ดเลือดของมนุษย์ พบว่า ถ้าหากมีการเติมหมู่แทนที่ที่เป็นธาตุในกลุ่ม Halogen จะทำให้การทำงานของสารยับยั้งมีประสิทธิภาพดีขึ้น

บทที่ 2
การทดลอง

2.1 การเตรียมโครงสร้างสามมิติของโมเลกุลของสารยับยั้งของในแต่ละโรค

2.1.1 ทำการสืบค้นโครงสร้างโมเลกุลของสารที่มีความสามารถในการรักษาอาการ 4 อาการ ดังต่อไปนี้ ได้แก่ มะเร็ง การอักเสบ ซึมเศร้า และการแข็งตัวของเลือด

2.1.2 สร้างโครงสร้าง 3 มิติของสารยับยั้งด้วยโปรแกรม HyperChem แล้วทำการคำนวณปรับโครงสร้าง

2.1.3 นำโครงสร้างเสถียรที่ได้มาตัดอะตอมไฮโดรเจนชนิดนอนโพลาร์ (อะตอมไฮโดรเจนที่ไม่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจน) พร้อมทั้งทำการเตรียมข้อมูลของพันธะที่หมุนได้ในโมเลกุล ด้วยโปรแกรม AutoDock Tools

2.2 การเตรียมโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ของโรคทั้งสี่โรค

2.2.1 ทำการสืบค้นเอนไซม์ที่มีความเกี่ยวของกับโรคที่เรากำหนดทั้งสี่โรคที่ได้กล่าวไปข้างต้น และให้ทำการคัดเลือกเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อโมเลกุลของสารยับยั้งที่เป็นอนุพันธ์ของคูมาริน

2.2.2 ดาวน์โหลดโครงสร้างของเอนไซม์จากฐานข้อมูล Protein Data Bank

2.2.3 ทำการเตรียมโครงสร้างเอนไซม์ โดยการตัดโมเลกุลในส่วนที่ไม่ต้องการออก พร้อมทั้งหาบริเวณการเข้าจับ (Binding site)

2.2.4 นำเอนไซม์มาเติมอะตอมไฮโดรเจน และเติมพารามิเตอร์ที่จำเป็นต่อการเข้าจับด้วยโปรแกรม AutoDock Tools

2.3 การตรวจสอบความแม่นยำของโปรแกรม AutoDock Vina

ทำการทดสอบความแม่นยำของโปรแกรมสำหรับระบบอินติเกรสด้วยการใช้โครงสร้างเอกซเรย์ของเอนไซม์ในแต่ละโรคที่จับกับสารยับยั้งที่เป็นอนุพันธ์ของคูมาริน (PDB code 2QC6, 2AZ5, 5AFZ และ 2V61)

2.3.1 แยกโครงสร้างของสารยับยั้งและเอนไซม์ที่ได้จากฐานข้อมูล PDB ในแต่ละโรคออกจากกัน

2.3.2 เตรียมโครงสร้างของทั้งสารยับยั้งและเอนไซม์ด้วยโปรแกรม AutoDock Tools

2.3.3 คำนวณการเข้าจับกันของสารยับยั้งกับสารยับยั้งที่สร้างขึ้นด้วยโปรแกรม AutoDock Vina

2.3.4 วิเคราะห์เปรียบเทียบโครงสร้างการเข้าจับที่ได้จากการคำนวณกับโครงสร้างทางการทดลอง

2.4 คำนวณการเข้าจับเชิงโมเลกุลระหว่างสารยับยั้งจากอนุพันธ์ของคูมารินกับเอนไซม์รักษาโรคทั้งสี่ชนิด

2.4.1 หาตำแหน่งของบริเวณการเข้าจับโดยดูจากตำแหน่งของสารยับยั้งที่อยู่ภายในโครงสร้างสารเชิงซ้อนระหว่างเอนไซม์กับสารยับยั้งที่ได้จากฐานข้อมูล PDB

2.4.2 กำหนดขอบเขตการค้นหาให้ครอบคลุมบริเวณการเข้าจับ

2.4.3 คำนวณการเข้าจับเชิงโมเลกุลของสารยับยั้งแต่ละตัว

2.5 การวิเคราะห์รูปร่างและตำแหน่งเข้าจับระหว่างสารยับยั้งและเอนไซม์

2.5.1 นำไฟล์ที่ได้จากการคำนวณมาเลือกรูปแบบการเข้าจับที่มีพลังงานการเข้าจับที่ดีที่สุด

2.5.2 วิเคราะห์หากรดอะมิโนที่สามารถเกิดอันตรกิริยากับสารยับยั้ง โดยพิจารณากรดอะมิโนที่อยู่ภายในรัศมี 6 อังสตรอมรอบ ๆ สารยับยั้งแต่ละชนิด

2.5.3 พิจารณาการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างสารยับยั้งกับเอนไซม์

2.5.4 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบการเข้าจับกับค่าฤทธิ์ทางชีวภาพ

บทที่ 3
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

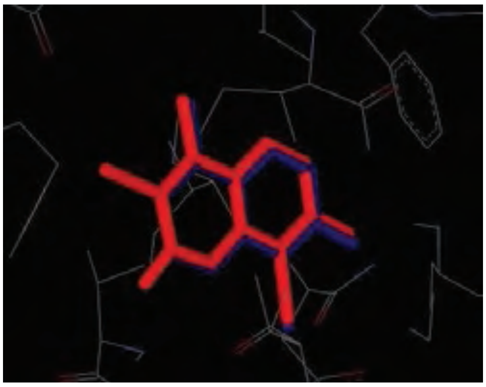
3.1 การตรวจสอบความแม่นยำของโปรแกรม AutoDock Vina

ทำการตรวจสอบความแม่นยำของโปรแกรมโดยนำโครงสร้างเอกซเรย์ของเอนไซม์แต่ละโรค (PDB 2QC6, 5AFZ, 2AZ5, 2V61 คือ เอนไซม์เกี่ยวกับโรคมะเร็ง, การแข็งตัวของเลือด, การอักเสบ และอาการซึมเศร้า ตามลำดับ) มาดึงสารยับยั้งที่เป็นอนุพันธ์ของคูมารินออก แล้วจึงทำการคำนวณการเข้าจับของเอนไซม์กับโครงสร้างของสารยับยั้งที่ใส่กลับเข้าไปใหม่ จากการที่บริเวณการเข้าจับในเอนไซม์มีความซับซ้อน ทำให้มีรูปแบบการเข้าจับได้มากมาย โปรแกรม AutoDock Vina จะทำการแสดงข้อมูลรูปแบบการเข้าจับที่มีพลังงานการเข้าจับต่ำสุด 9 ลำดับแรกให้ในไฟล์ผลการคำนวณ และในที่นี้จะแสดงค่าพลังงานการเข้าจับเฉพาะ 5 ลำดับแรกเท่านั้น ดังแสดงในตารางที่ 3.1 ซึ่งจะเห็นได้ว่ารูปแบบการเข้าจับมีความแตกต่างกัน โดยรูปแบบการเข้าจับลำดับแรกมีพลังงานการเข้าจับที่ต่ำที่สุดและในบางระบบมีค่าต่ำกว่าลำดับที่สองค่อนข้างมาก ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงจะเลือกใช้ผลการคำนวณลำดับแรกสำหรับการวิเคราะห์ข้อมูล

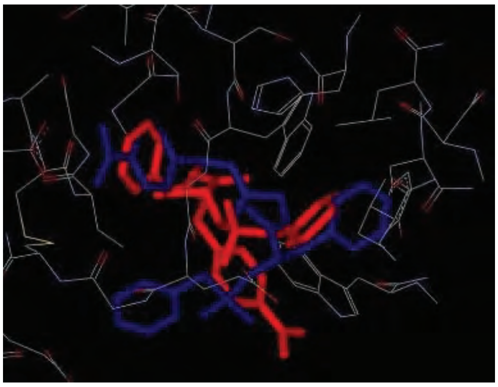
ตารางที่ 3.1 พลังงานการเข้าจับระหว่างสารยับยั้งกับเอนไซม์แต่ละโรค

MODE	พลังงานการเข้าจับ (kcal/mol)			
	2QC6	5AFZ	2AZ5	2V61
1	-9.6	-8.0	-9.1	-10.3
2	-8.5	-7.9	-8.8	-10.3
3	-8.4	-7.9	-8.8	-9.9
4	-8.4	-7.8	-8.6	-9.9
5	-8.2	-7.8	-8.6	-9.7

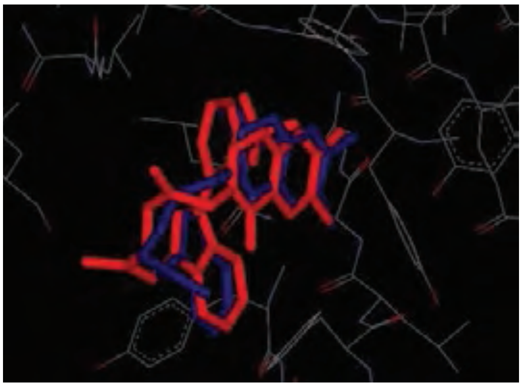
จากนั้นทำการซ้อนทับโครงสร้างการเข้าจับที่คำนวณได้ข้างต้นกับโครงสร้างทางการทดลองเพื่อดูความใกล้เคียงในการจัดเรียงตัวของโมเลกุลของสารยับยั้งที่ได้จากการคำนวณด้วยโปรแกรม AutoDock Vina ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 3.1 จากรูปจะเห็นว่าระบบ 2QC6 และ 2V61 โครงสร้างที่ได้จากการคำนวณซ้อนกับโครงสร้างทางการทดลองได้ดีมาก ในขณะที่ระบบ 5AFZ และ 2AZ5 มีความแตกต่างในเรื่องโครงรูป (conformation) ของสารยับยั้ง แต่มีตำแหน่งการเข้าจับที่สอดคล้องกัน ซึ่งเป็นเรื่องปกติที่มักพบจากการคำนวณการเข้าจับเชิงโมเลกุลของสารที่บิดงอได้ง่าย (flexible) ยิ่งสารมีความบิดงอได้ง่ายก็จะยิ่งมีโครงรูปที่เป็นไปได้มาก ดังนั้นรูปแบบการเข้าจับจึงมากตามไปด้วย การคำนวณการเข้าจับจึงมีความซับซ้อนมากยิ่งขึ้น จากผลการคำนวณที่ได้สามารถสรุปได้ว่าโปรแกรม AutoDock Vina มีประสิทธิภาพที่ดี ให้ความแม่นยำที่สูง สามารถใช้ในคำนวณกาเข้าจับระหว่างสารกลุ่มคูมารินและเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิดนี้ได้



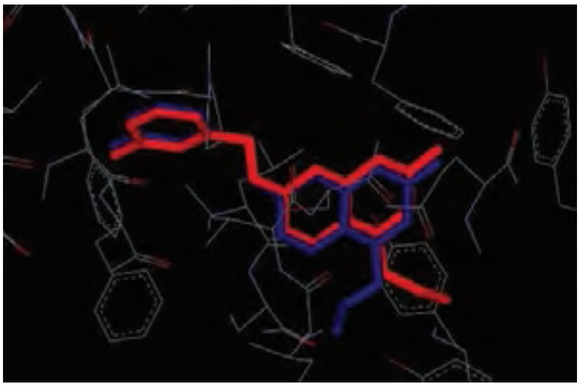
2QC6



5AFZ



2AZ5



2V61

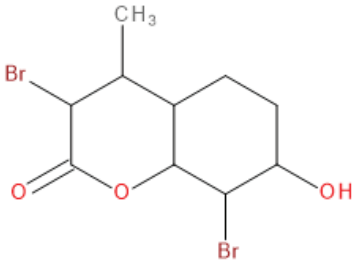
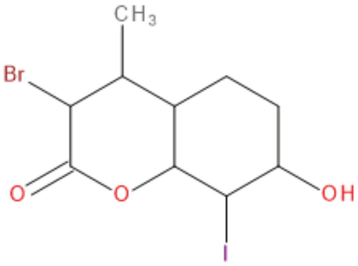
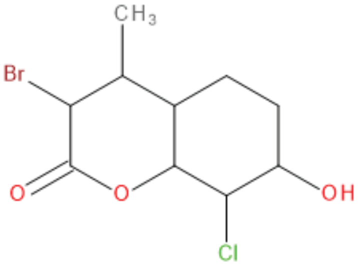
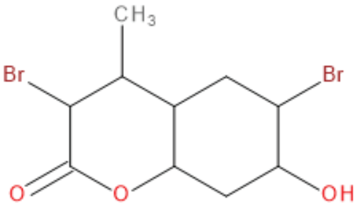
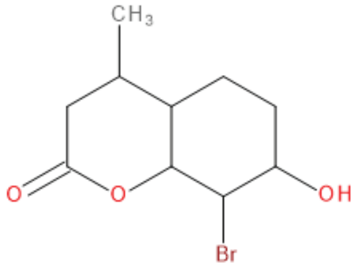
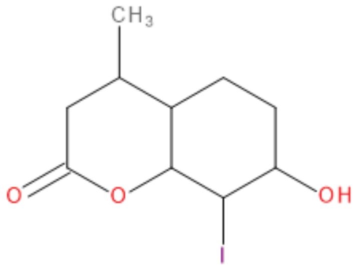
รูปที่ 3.1 โครงสร้างการเข้าจับที่ได้จากการคำนวณ (สีแดง) เทียบกับโครงสร้างทางการทดลอง (สีน้ำเงิน) ของเอนไซม์แต่ละโรค

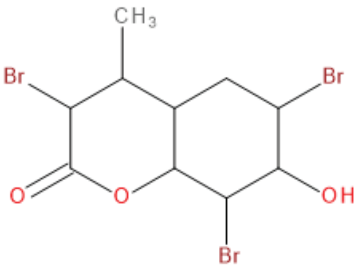
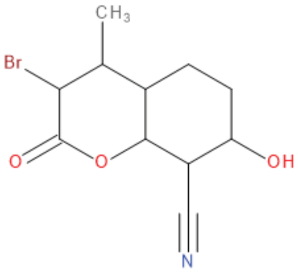
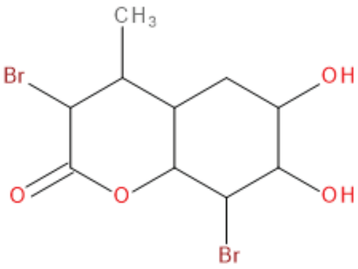
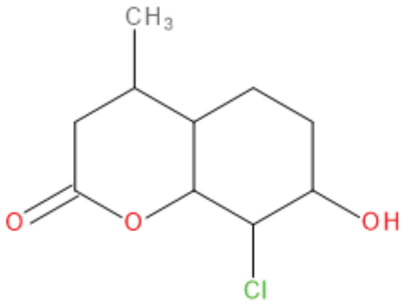
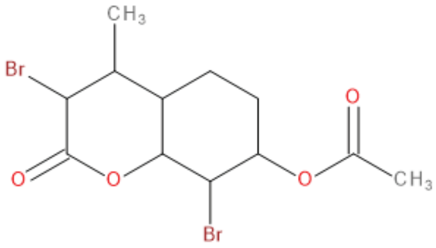
3.2 ผลของการศึกษาการเข้าจับระหว่างอนุพันธ์ของคูมารินกับเอนไซม์ของแต่ละโรค

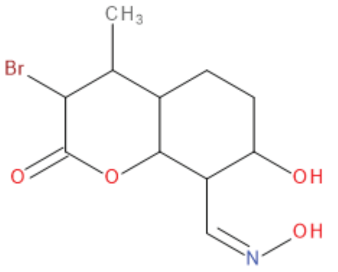
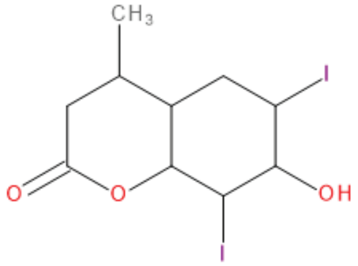
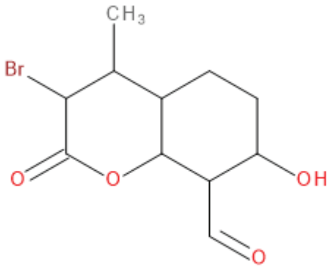
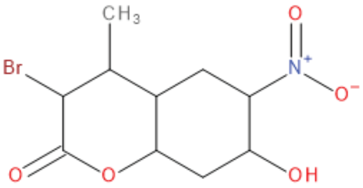
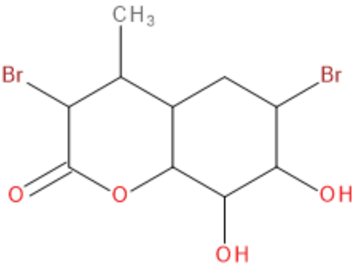
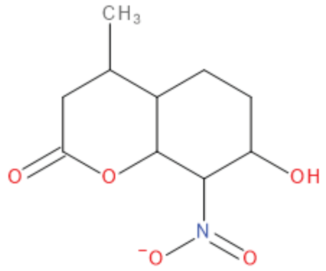
3.2.1 การเข้าจับระหว่างอนุพันธ์ของคูมารินกับเอนไซม์ Casein Kinase 2 (CK2)

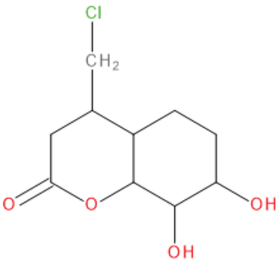
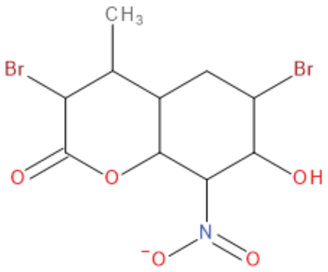
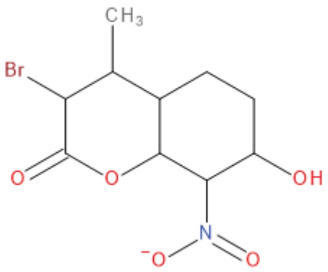
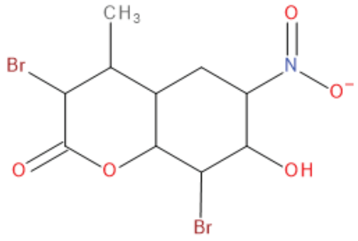
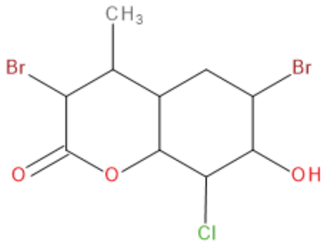
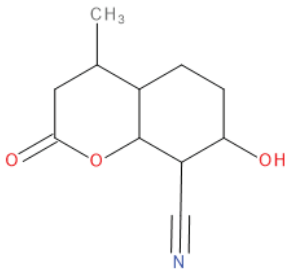
ผลการคำนวณการเข้าจับระหว่าง Casein Kinase 2 (CK2) กับอนุพันธ์ของคูมารินจำนวน 40 สาร ในบริเวณการเข้าจับด้วยโปรแกรม AutoDock Vina แสดงในตารางที่ 3.2 โดยแสดงรูปโครงสร้าง 2 มิติของสารยับยั้ง ค่าฤทธิ์ทางชีวภาพ (pIC_{50}) และกรดอะมิโนที่อยู่ภายในรัศมี 6 อังสตรอมรอบ ๆ สารยับยั้ง

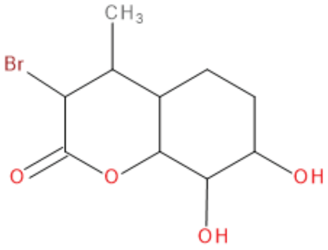
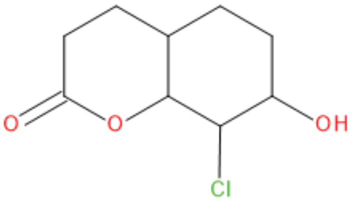
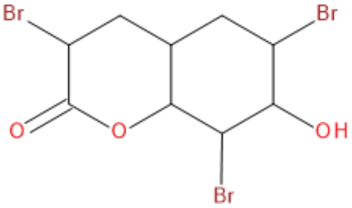
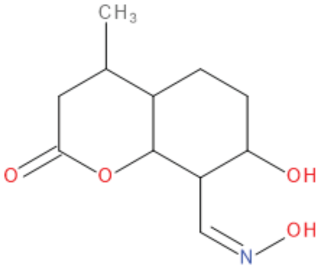
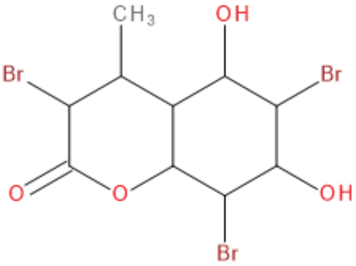
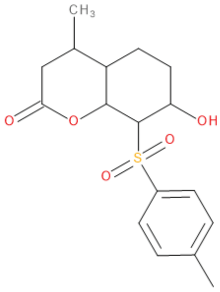
<u>ตารางที่ 3.2</u> ค่าฤทธิ์ทางชีวภาพและผลการเข้าจับระหว่าง CK2 กับสารอนุพันธ์ของคูมาริน 40 สาร

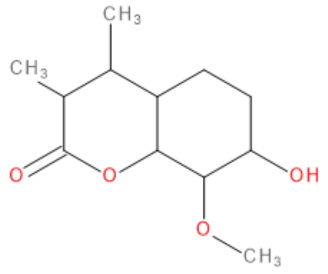
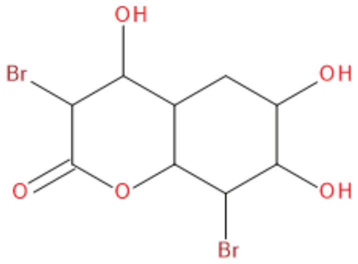
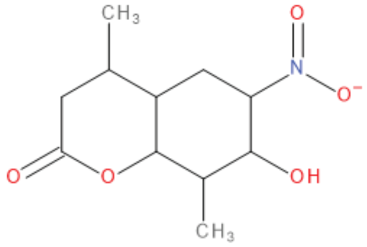
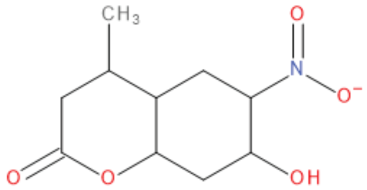
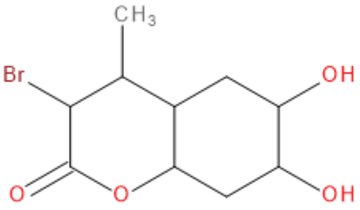
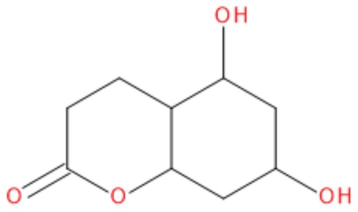
No.	Molecular Structure	pIC_{50}	ASP175	LYS68	SER51	VAL116
1		7.00	√	√		
2		6.55	√	√		
3		6.49	√	√		
4		6.18				
5		6.13	√	√		
6		6.10	√	√		

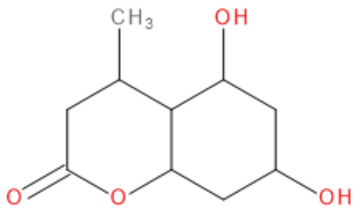
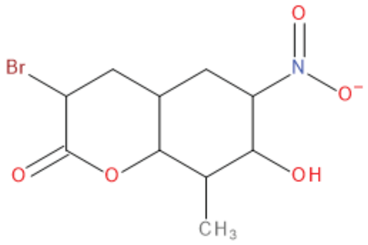
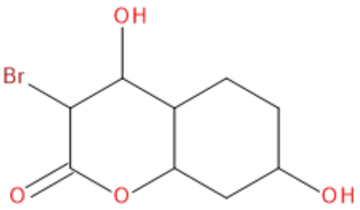
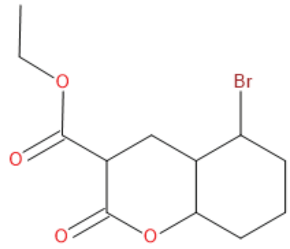
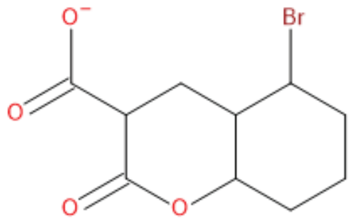
No.	Molecular Structure	pIC_{50}	ASP175	LYS68	SER51	VAL116
7		5.72				
8		5.72	√	√		
9		5.70	√	√		
10		5.66	√	√		
11		5.60				

No.	Molecular Structure	pIC_{50}	ASP175	LYS68	SER51	VAL116
12		5.60	√	√	√	
13		5.58				
14		5.48		√		
15		5.48			√	
16		5.44	√	√	√	
17		5.40		√	√	

No.	Molecular Structure	pIC_{50}	ASP175	LYS68	SER51	VAL116
18		5.40		√	√	
19		5.40				
20		5.40	√	√		
21		5.40		√	√	
22		5.39		√		
23		5.38	√	√		

No.	Molecular Structure	pIC$_{50}$	ASP175	LYS68	SER51	VAL116
24		4.98	√	√		
25		4.97				√
26		4.82		√		
27		4.70	√	√	√	
28		4.67				
29		4.64				

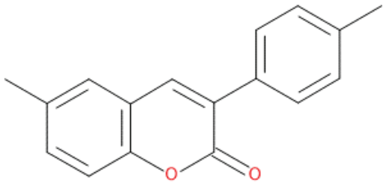
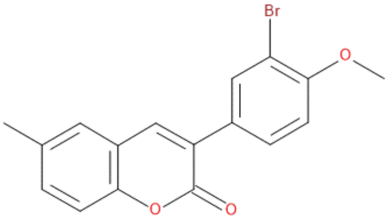
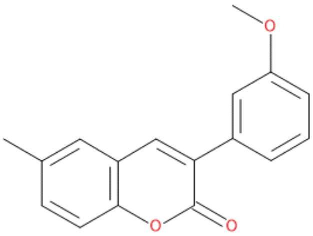
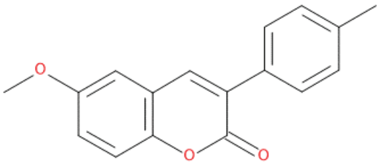
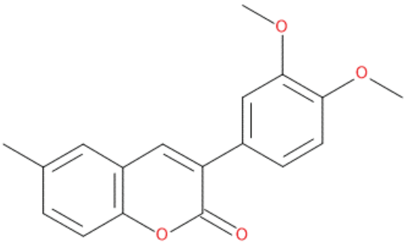
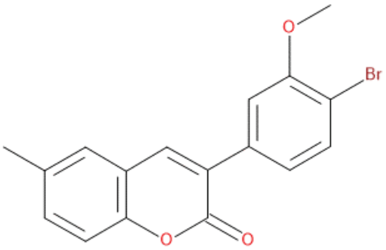
No.	Molecular Structure	pIC_{50}	ASP175	LYS68	SER51	VAL116
30		4.57		√		
31		4.55	√	√		
32		4.52		√	√	
33		4.52				
34		4.51		√		
35		4.46				

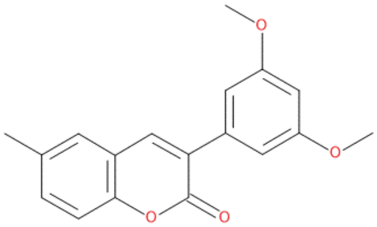
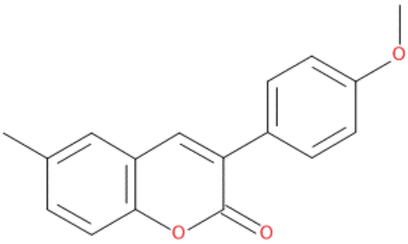
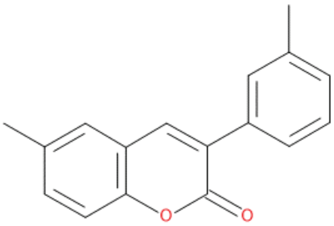
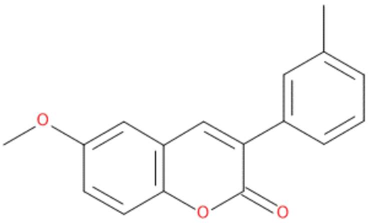
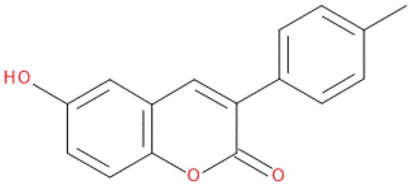
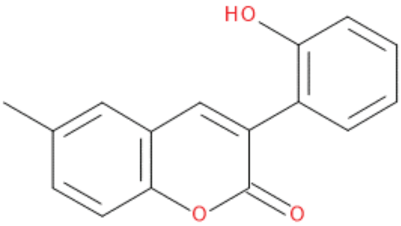
No.	Molecular Structure	pIC_{50}	ASP175	LYS68	SER51	VAL116
36		4.46	√	√		
37		4.46		√	√	
38		4.41	√	√		
39		3.93			√	
40		3.83			√	

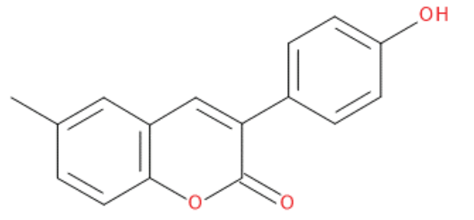
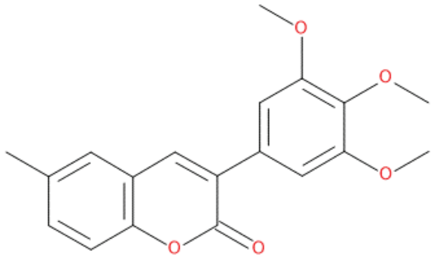
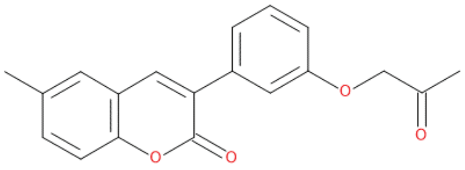
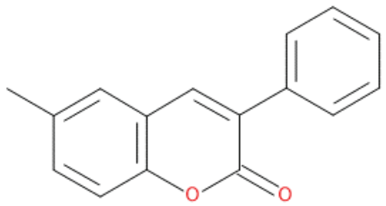
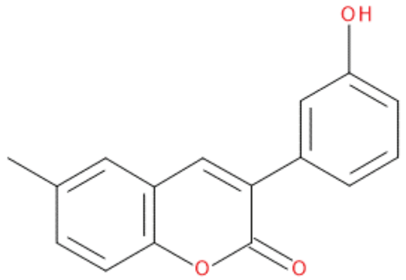
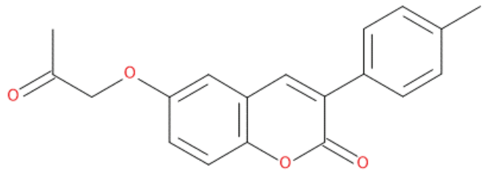
3.2.2 การเข้าจับระหว่างอนุพันธ์ของคูมารินกับเอนไซม์ Monoamine Oxidase B (MAOB)

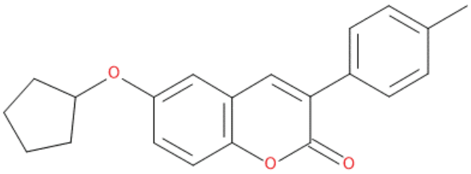
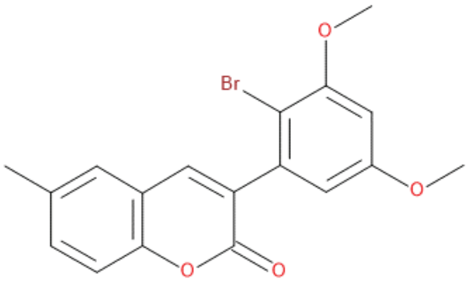
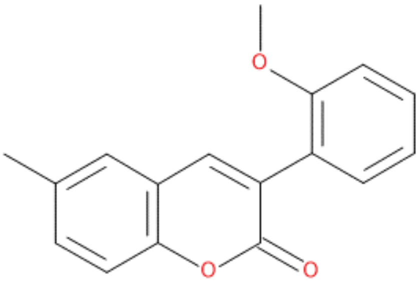
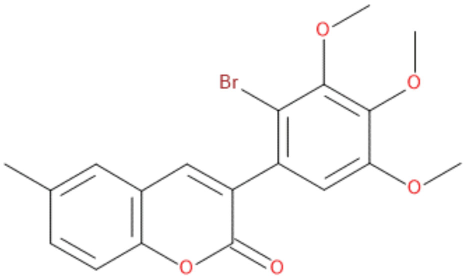
ผลการคำนวณการเข้าจับระหว่าง Monoamine Oxidase B (MAOB) กับอนุพันธ์ของคูมาริน จำนวน 22 สารในบริเวณการเข้าจับด้วยโปรแกรม AutoDock Vina แสดงในตารางที่ 3.3 โดยแสดงรูปโครงสร้าง 2 มิติของสารยับยั้ง ค่าฤทธิ์ทางชีวภาพ (pIC_{50}) และกรดอะมิโนที่อยู่ภายในรัศมี 6 อังสตรอม รอบ ๆ สารยับยั้ง

ตารางที่ 3.3 ค่าฤทธิ์ทางชีวภาพและผลการเข้าจับระหว่าง MAOB กับสารอนุพันธ์ของคูมาริน 22 สาร

No.	Molecular Structure	pIC_{50}	TYR326	CYS172	ILE199	THR201	TYR435	ILE198
1		9.51	√					
2		9.13	√					
3		9.10	√					
4		8.82		√				
5		8.56	√					
6		8.49	√					

No.	Molecular Structure	pIC_{50}	TYR326	CYS172	ILE199	THR201	TYR435	ILE198
7		8.05		√				
8		7.88	√				√	
9		7.82	√					
10		7.77	√					
11		7.17		√			√	√
12		6.92	√					

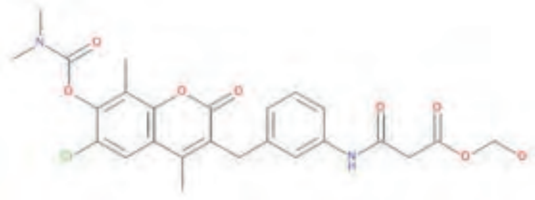
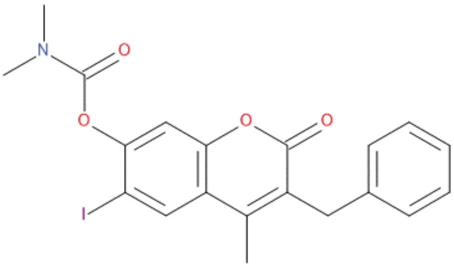
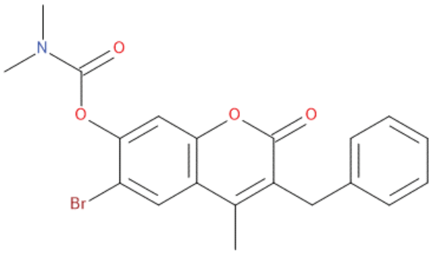
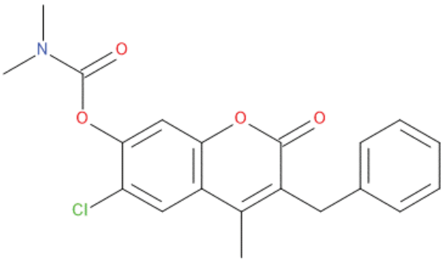
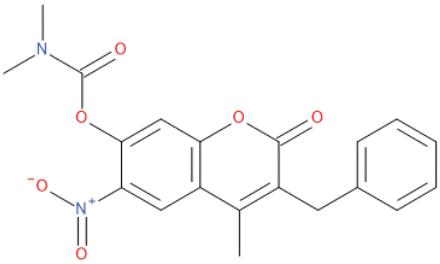
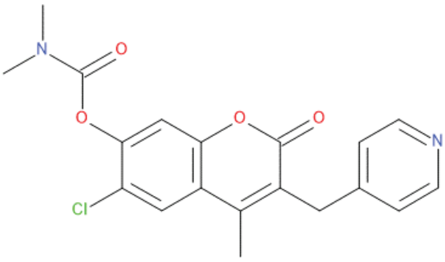
No.	Molecular Structure	pIC_{50}	TYR326	CYS172	ILE199	THR201	TYR435	ILE198
13		6.81	√					
14		6.79		√				
15		6.74	√		√			
16		6.55	√					
17		6.19	√					
18		5.26	√	√		√		

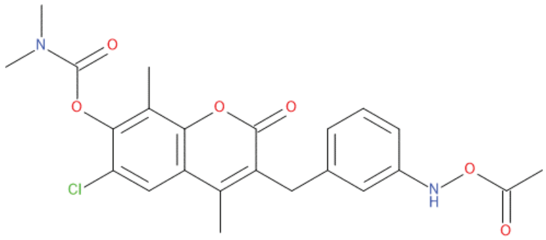
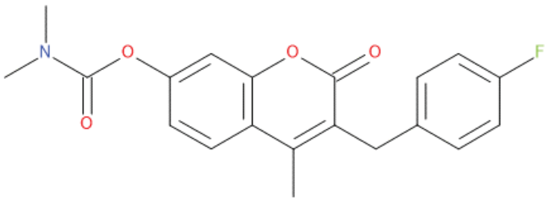
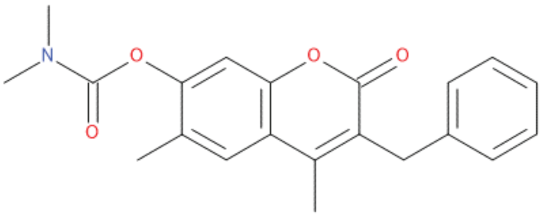
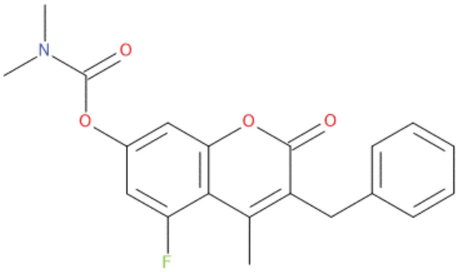
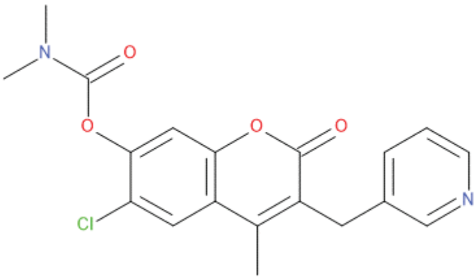
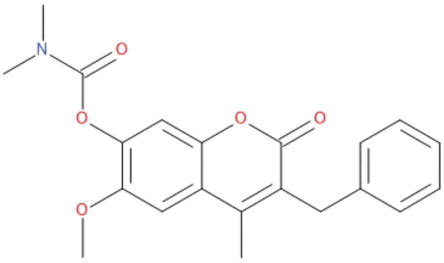
No.	Molecular Structure	pIC_{50}	TYR326	CYS172	ILE199	THR201	TYR435	ILE198
19		4.84						
20		4.27	√		√			
21		< 3.00	√					
22		< 3.00	√		√		√	

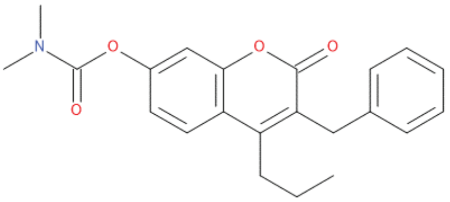
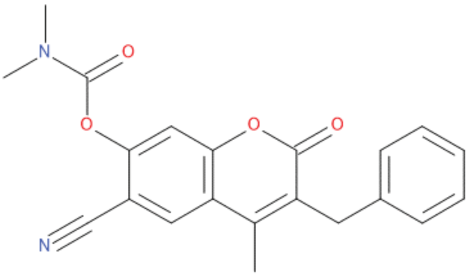
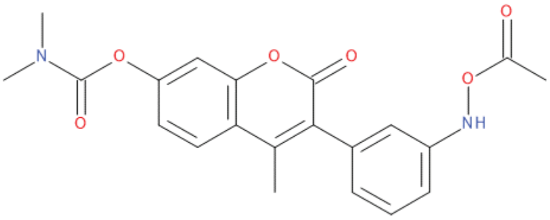
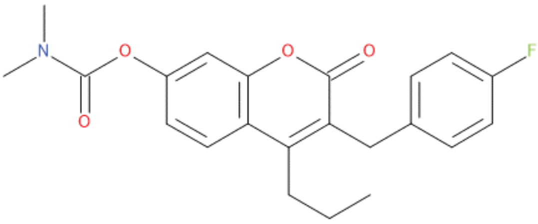
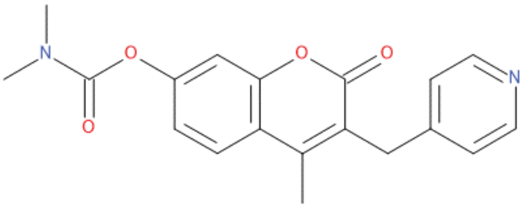
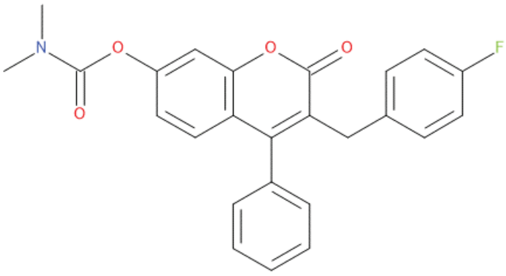
3.2.3 การเข้าจับระหว่างอนุพันธ์ของคูมารินกับเอนไซม์ Cytokine

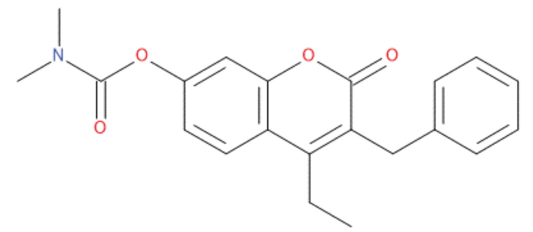
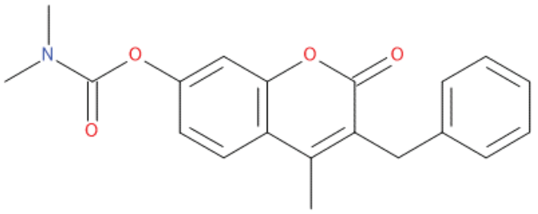
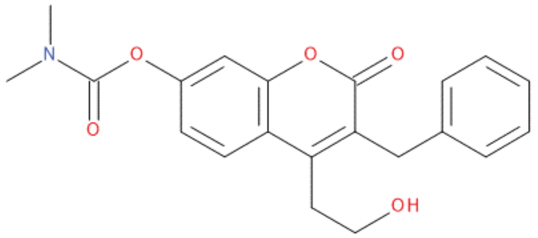
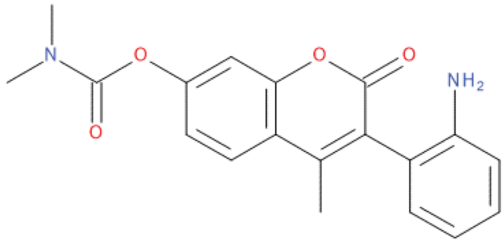
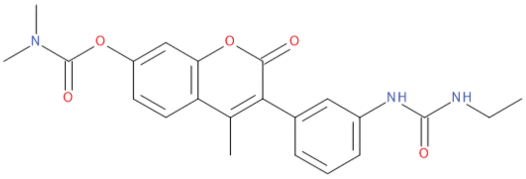
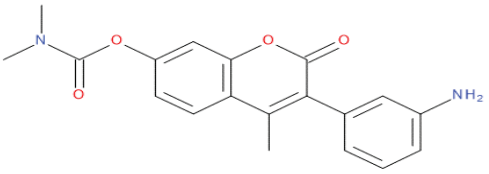
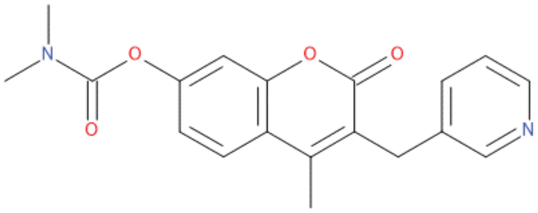
ผลการคำนวณการเข้าจับระหว่าง Cytokine กับอนุพันธ์ของคูมารินจำนวน 54 สารในบริเวณการเข้าจับด้วยโปรแกรม AutoDock Vina แสดงในตารางที่ 3.4 โดยแสดงรูปโครงสร้าง 2 มิติของสารยับยั้ง ค่าฤทธิ์ทางชีวภาพ (pIC_{50}) และกรดอะมิโนที่อยู่ภายในรัศมี 6 อังสตรอมรอบ ๆ สารยับยั้ง

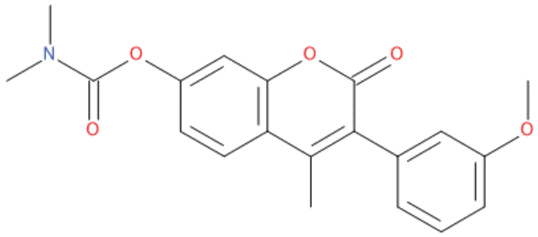
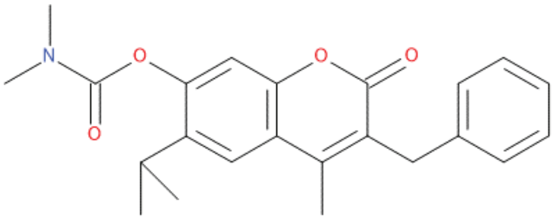
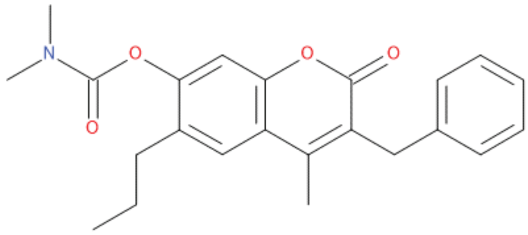
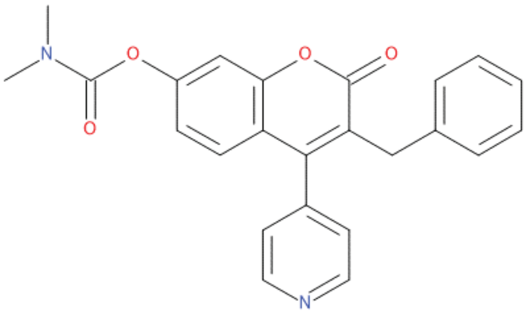
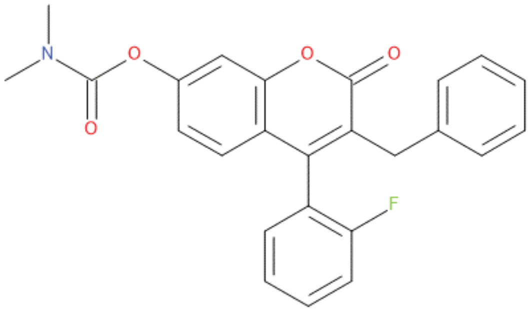
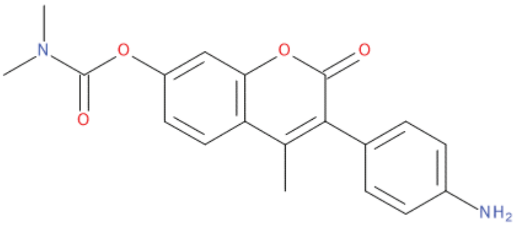
<u>ตารางที่ 3.4</u> ค่าฤทธิ์ทางชีวภาพและผลการเข้าจับระหว่าง Cytokine กับสารอนุพันธ์ของคูมาริน 54 สาร

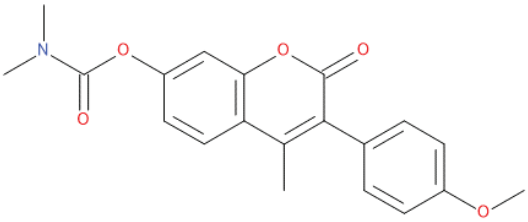
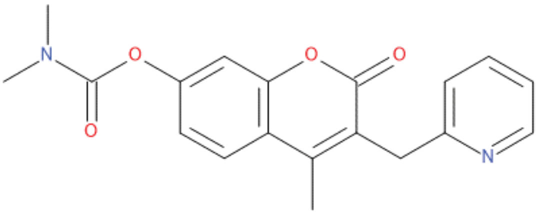
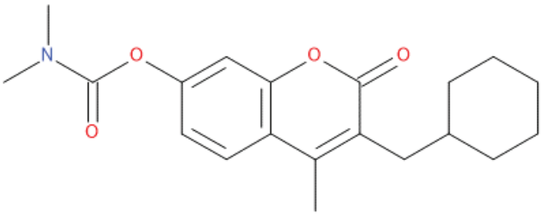
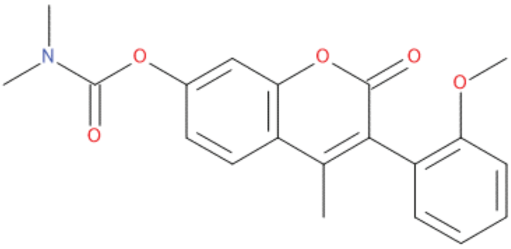
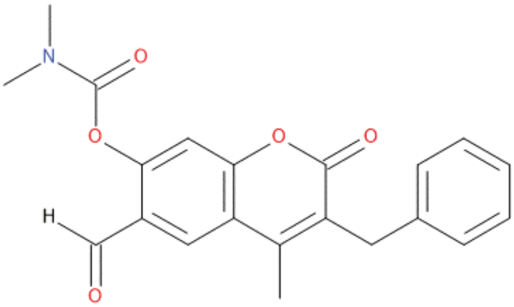
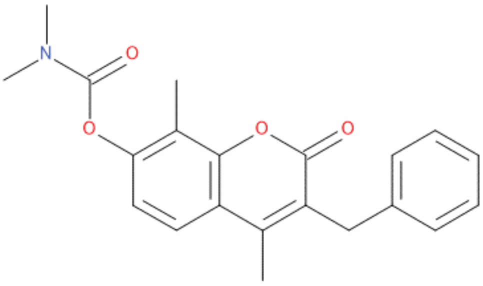
NO	Molecular Structure	pIC50	TYR151	SER60	GLN61	TYR119	LEU120	GLY121
1		7.30						
2		7.22					√	
3		7.22						
4		7.05						
5		6.92	√					
6		6.89						

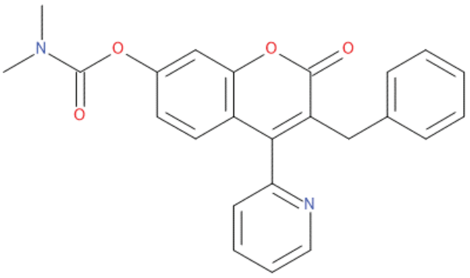
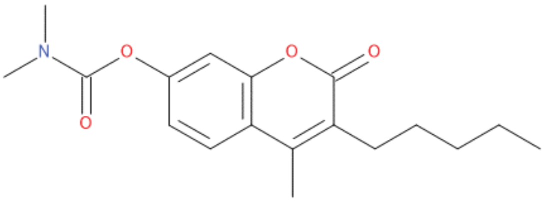
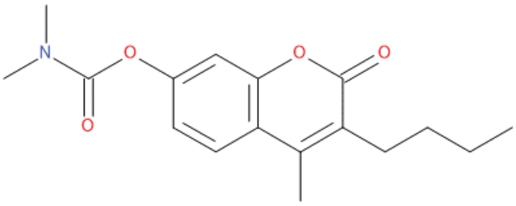
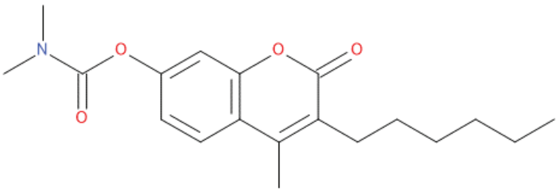
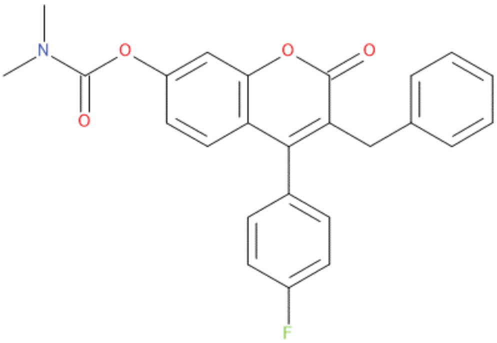
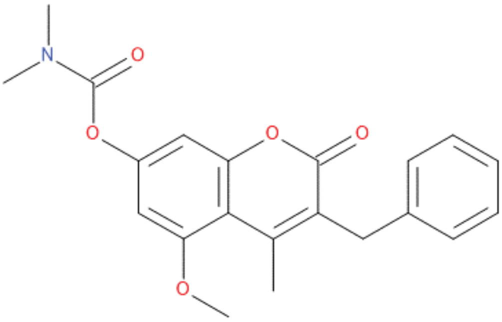
NO	Molecular Structure	pIC50	TYR151	SER60	GLN61	TYR119	LEU120	GLY121
7		6.51						
8		6.49		√				
9		6.4						
10		6.36					√	
11		6.35		√				
12		6.24						

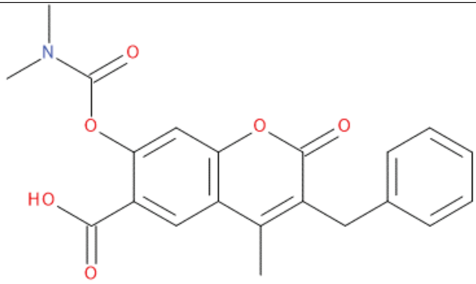
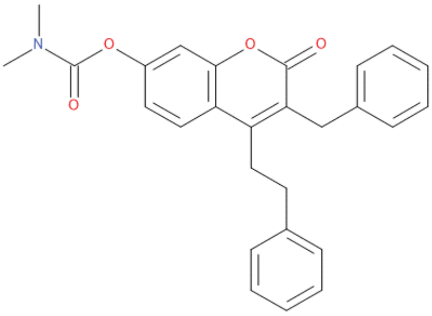
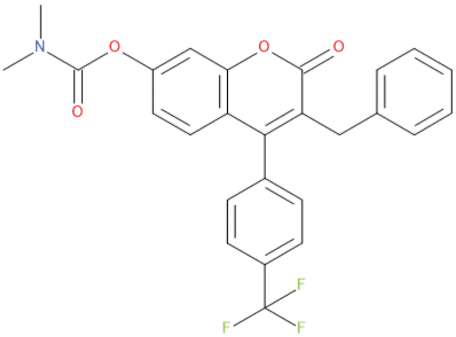
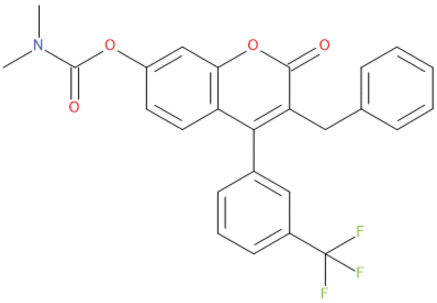
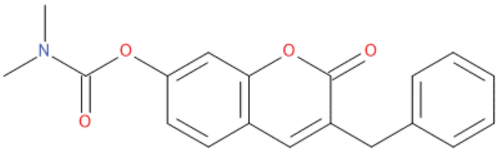
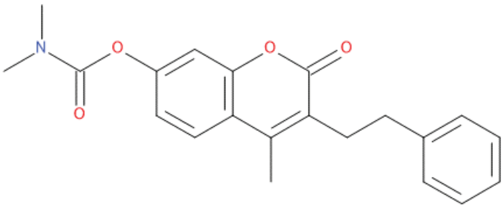
NO	Molecular Structure	pIC50	TYR151	SER60	GLN61	TYR119	LEU120	GLY121
13		6.11					√	
14		6.07			√			
15		5.96				√		
16		5.92					√	
17		5.89		√				
18		5.77				√		

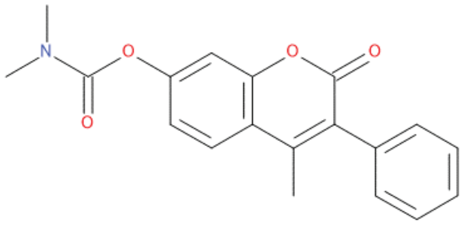
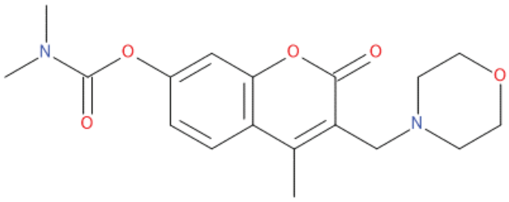
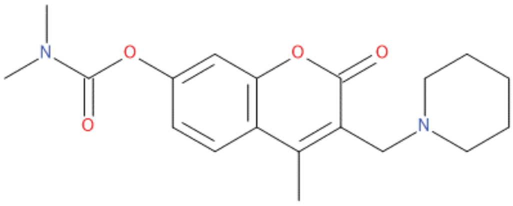
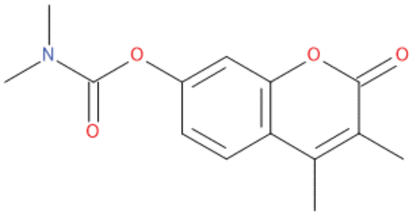
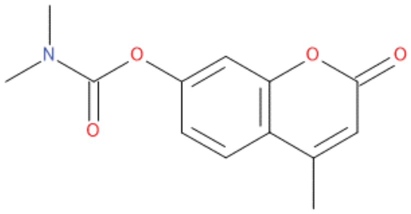
NO	Molecular Structure	pIC50	TYR151	SER60	GLN61	TYR119	LEU120	GLY121
19		5.77					√	
20		5.74						
21		5.68						
22		5.68						
23		5.62						
24		5.57	√					
25		5.57		√				

NO	Molecular Structure	pIC50	TYR151	SER60	GLN61	TYR119	LEU120	GLY121
26		5.49						
27		5.39						
28		5.34						
29		5.31	√					
30		5.31						
31		5.28	√			√		√

NO	Molecular Structure	pIC50	TYR151	SER60	GLN61	TYR119	LEU120	GLY121
32		5.25						√
33		5.19		√				
34		5.14						
35		5.12						√
36		5.01	√					
37		4.99						

NO	Molecular Structure	pIC50	TYR151	SER60	GLN61	TYR119	LEU120	GLY121
38		4.73						
39		4.64	√					
40		4.60	√					
41		4.59	√					
42		4.38						
43		< 3.00						

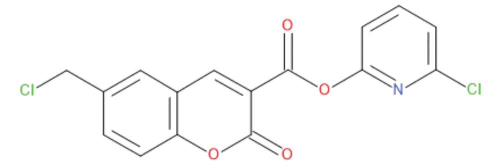
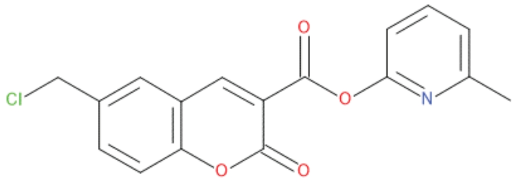
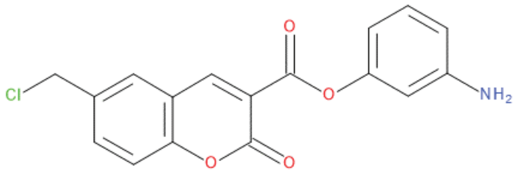
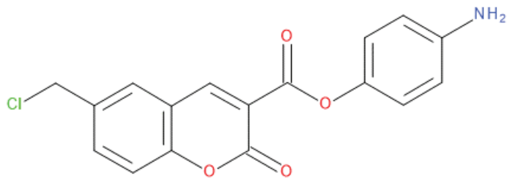
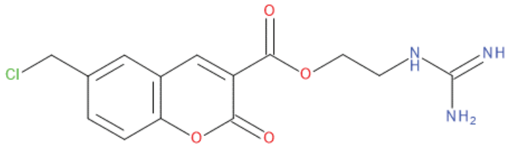
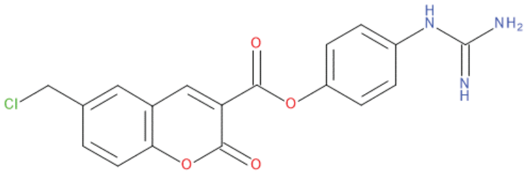
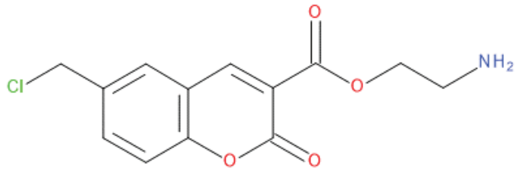
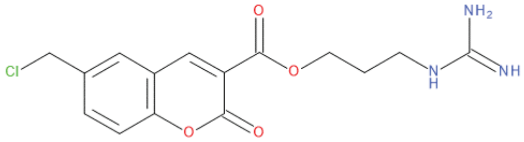
NO	Molecular Structure	pIC50	TYR151	SER60	GLN61	TYR119	LEU120	GLY121
44		< 3.00	√					
45		< 3.00						
46		< 3.00	√			√		
47		< 3.00	√					
48		< 3.00	√					
49		< 3.00					√	

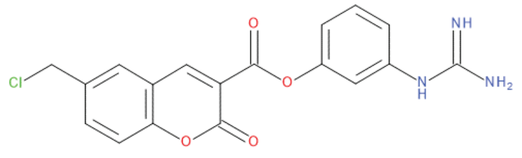
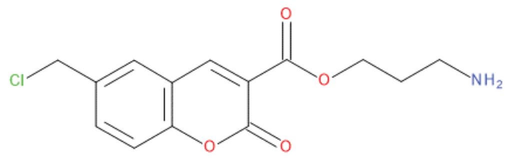
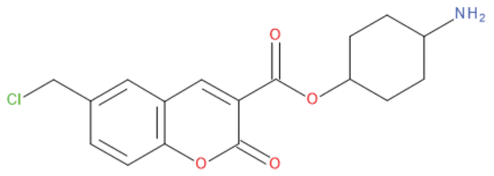
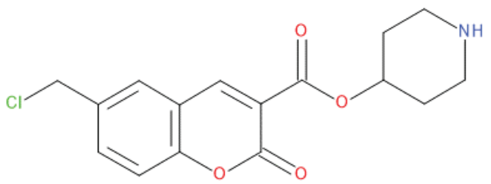
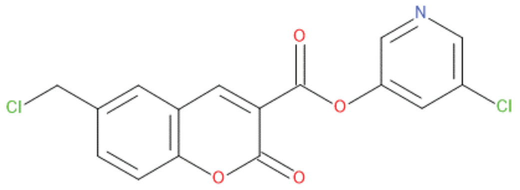
NO	Molecular Structure	pIC50	TYR151	SER60	GLN61	TYR119	LEU120	GLY121
50		< 3.00	√					
51		< 3.00						
52		< 3.00						
53		< 3.00	√					
54		< 3.00	√					

3.2.4 การเข้าจับระหว่างอนุพันธ์ของคูมารินกับเอนไซม์ Thrombin

ผลการคำนวณการเข้าจับระหว่าง Thrombin กับอนุพันธ์ของคูมารินจำนวน 13 สารในบริเวณการเข้าจับด้วยโปรแกรม AutoDock Vina แสดงในตารางที่ 3.5 โดยแสดงรูปโครงสร้าง 2 มิติของสารยับยั้ง ค่าฤทธิ์ทางชีวภาพ (pIC_{50}) และกรดอะมิโนที่อยู่ภายในรัศมี 6 อังสตรอมรอบ ๆ สารยับยั้ง

ตารางที่ 3.5 ค่าฤทธิ์ทางชีวภาพและผลการเข้าจับระหว่าง Thrombin กับสารอนุพันธ์ของคูมาริน 13 สาร

No.	Molecular structure	pIC_{50}	ASP189	SER195	GLY219	PHE227	TYR228	ALA190
1		6.06		√				
2		5.86		√				
3		5.70	√	√	√			
4		4.31	√					
5		3.97	√	√	√			
6		3.82		√				
7		3.55		√	√			
8		< 3.00	√	√		√	√	√

No.	Molecular structure	pIC_{50}	ASP189	SER195	GLY219	PHE227	TYR228	ALA190
9		< 3.00		√				
10		< 3.00		√				
11		< 3.00						√
12		< 3.00	√	√				
13		< 3.00		√				

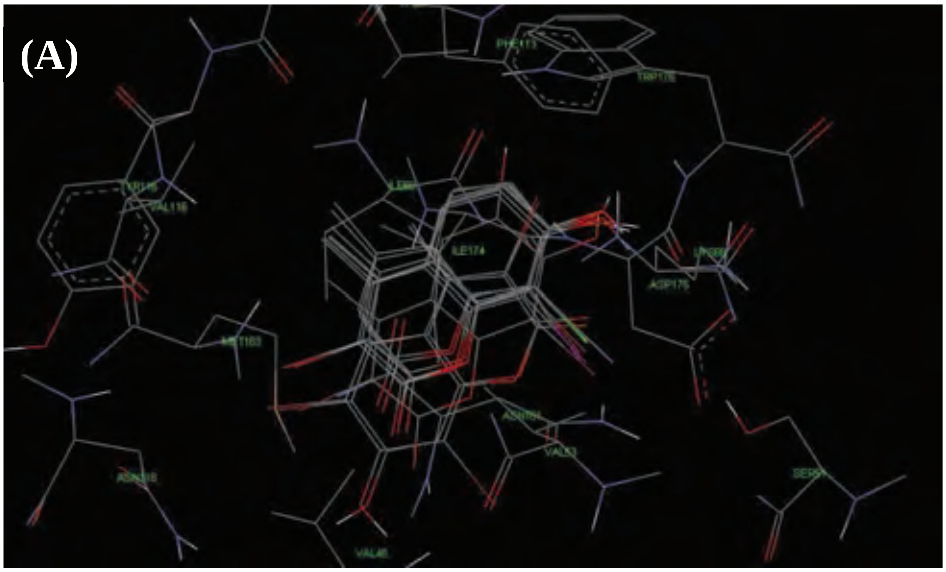
3.3 ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและหมู่แทนที่กับฤทธิ์ทางชีวภาพของสารอนุพันธ์คูมาริน

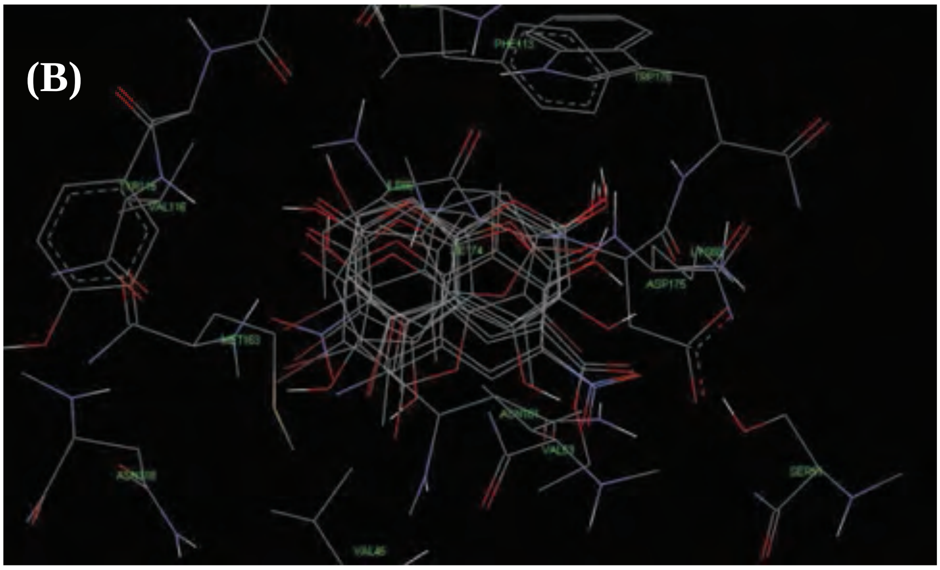
ทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์โดยแสดงโครงสร้างของสารอนุพันธ์คูมารินกลุ่มที่มีฤทธิ์สูงกับกลุ่มที่มีฤทธิ์ต่ำที่ได้จากการคำนวณให้อยู่ในภาพเดียวกัน เพื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบตำแหน่งและการจัดวางตัวในการเข้าจับและหาความสัมพันธ์กับค่าฤทธิ์ทางชีวภาพ (pIC_{50}) โดยจะแบ่งการวิเคราะห์เป็นแต่ละโรคดังต่อไปนี้

3.3.1 ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างการเข้าจับกับฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ในโรคมะเร็ง

จากการพิจารณาค่า pIC_{50} ที่แสดงดังตารางที่ 3.2 จะเห็นว่าสารในกลุ่มนี้จำนวน 40 สารมีค่า pIC_{50} ตั้งแต่ 3.83 ถึง 7.00 ผู้วิจัยจึงเลือกวิเคราะห์เปรียบเทียบสาร 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีฤทธิ์สูง (pIC_{50} สูงที่สุด 10 ลำดับแรก) และกลุ่มที่มีฤทธิ์ต่ำ (pIC_{50} ต่ำที่สุด 10 ลำดับท้าย) โครงสร้างการเข้าจับของสารทั้งสองกลุ่มแสดงดังรูปที่ 3.2 ผลการวิเคราะห์พบว่าสารกลุ่มที่มีฤทธิ์สูงทั้ง 10 สารมีรูปแบบการเข้าจับที่ใกล้เคียงกันดังแสดงในรูปที่ 3.2 (A) ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากโครงสร้างสองมิติที่มีลักษณะใกล้เคียงกัน

(ตารางที่ 3.2) โดยจะเห็นว่าโครงสร้างที่มีผลต่อฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ได้แก่ การแทนที่ในตำแหน่ง C3 และ C8 (ลำดับตำแหน่งอะตอมในคูมารินแสดงในรูปที่ 1.3) ของคูมารินด้วยธาตุหมู่ 7 และการไม่มีหมู่แทนที่ใดในตำแหน่ง C6 ของวงคูมาริน เพราะจากการวิเคราะห์พบว่าการมีหมู่แทนที่ ณ ตำแหน่ง C6 จะส่งผลให้สารอนุพันธ์คูมารินไม่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับเอนไซม์ได้ สาเหตุอาจเป็นเพราะการมีหมู่แทนที่ ณ ตำแหน่งนี้จะทำให้โมเลกุลสารไม่สามารถเข้าไปในโพรงช่องว่างของบริเวณเข้าจับในโครงสร้างเอนไซม์ได้ ส่วนสารกลุ่มที่มีฤทธิ์ต่ำทั้ง 10 สารจะมีรูปแบบการเข้าจับที่ค่อนข้างแตกต่างกันดังแสดงในรูปที่ 3.2 (B) ซึ่งอาจจะเป็นเพราะสารทั้ง 10 สารนี้มีหมู่แทนที่ที่มีขนาดใหญ่ ทำให้สารแต่ละตัวมีการบิดและปรับเปลี่ยนโครงรูปรวมทั้งทิศทางและตำแหน่งการเข้าจับเพื่อให้สามารถเกิดอันตรกิริยาที่เหมาะสม

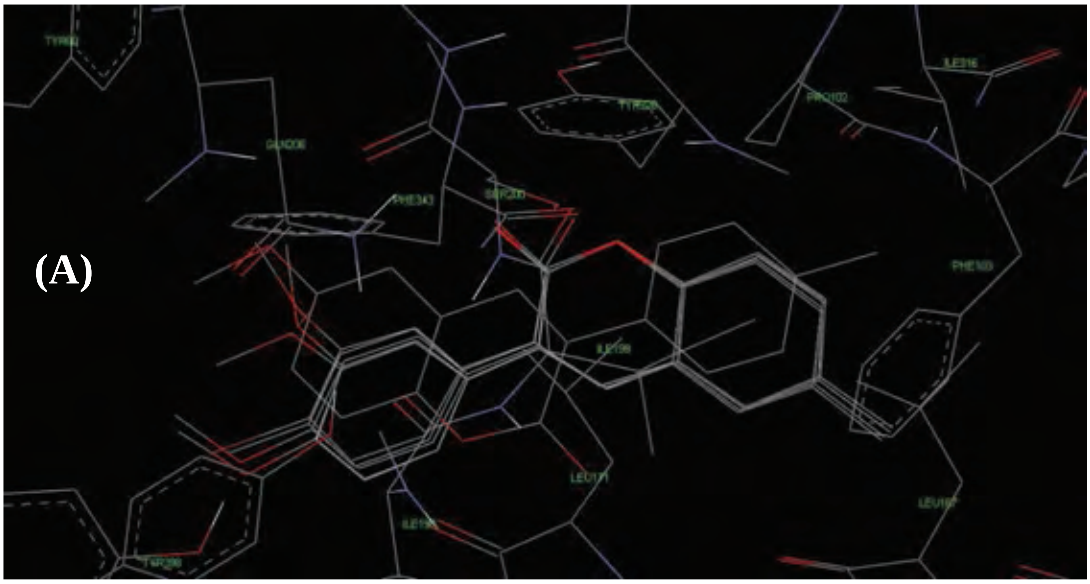


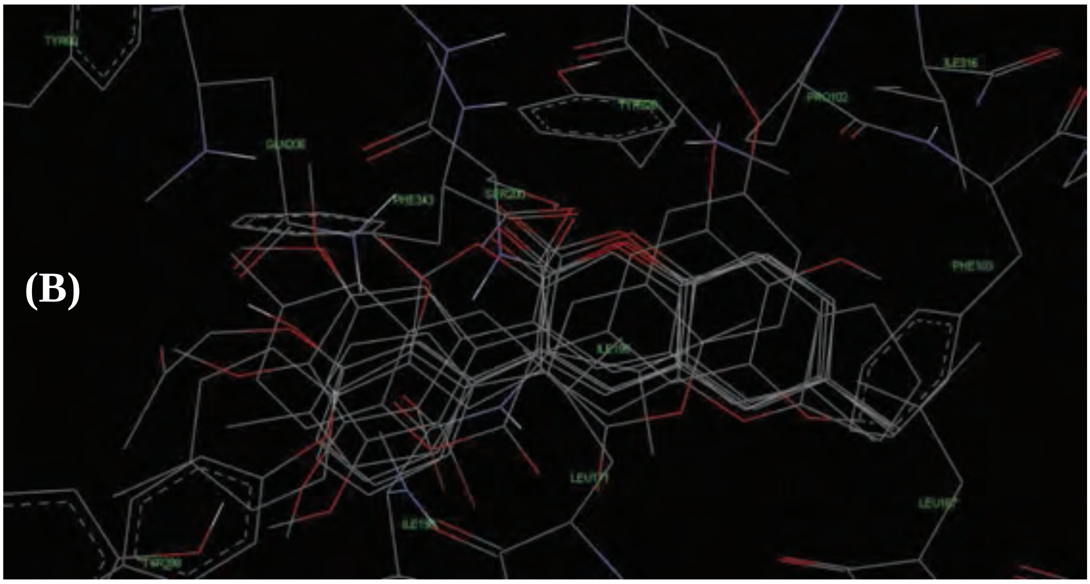


รูปที่ 3.2 โครงสร้างการเข้าจับระหว่างเอนไซม์ CK2 กับสารยับยั้ง (A) สารกลุ่มที่มีฤทธิ์สูง และ (B) สารกลุ่มที่มีฤทธิ์ต่ำ

3.3.2 ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างการเข้าจับกับฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ในอาการซึมเศร้า

จากการพิจารณาค่า pIC_{50} ที่แสดงดังตารางที่ 3.3 จะเห็นว่าสารในกลุ่มนี้จำนวน 22 สารมีค่า pIC_{50} ตั้งแต่ < 3.00 ถึง 9.51 ผู้วิจัยจึงเลือกวิเคราะห์เปรียบเทียบสาร 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีฤทธิ์สูง (pIC_{50} สูงที่สุด 6 ลำดับแรก) และกลุ่มที่มีฤทธิ์ต่ำ (pIC_{50} ต่ำที่สุด 6 ลำดับท้าย) โครงสร้างการเข้าจับของสารทั้งสองกลุ่มแสดงดังรูปที่ 3.3





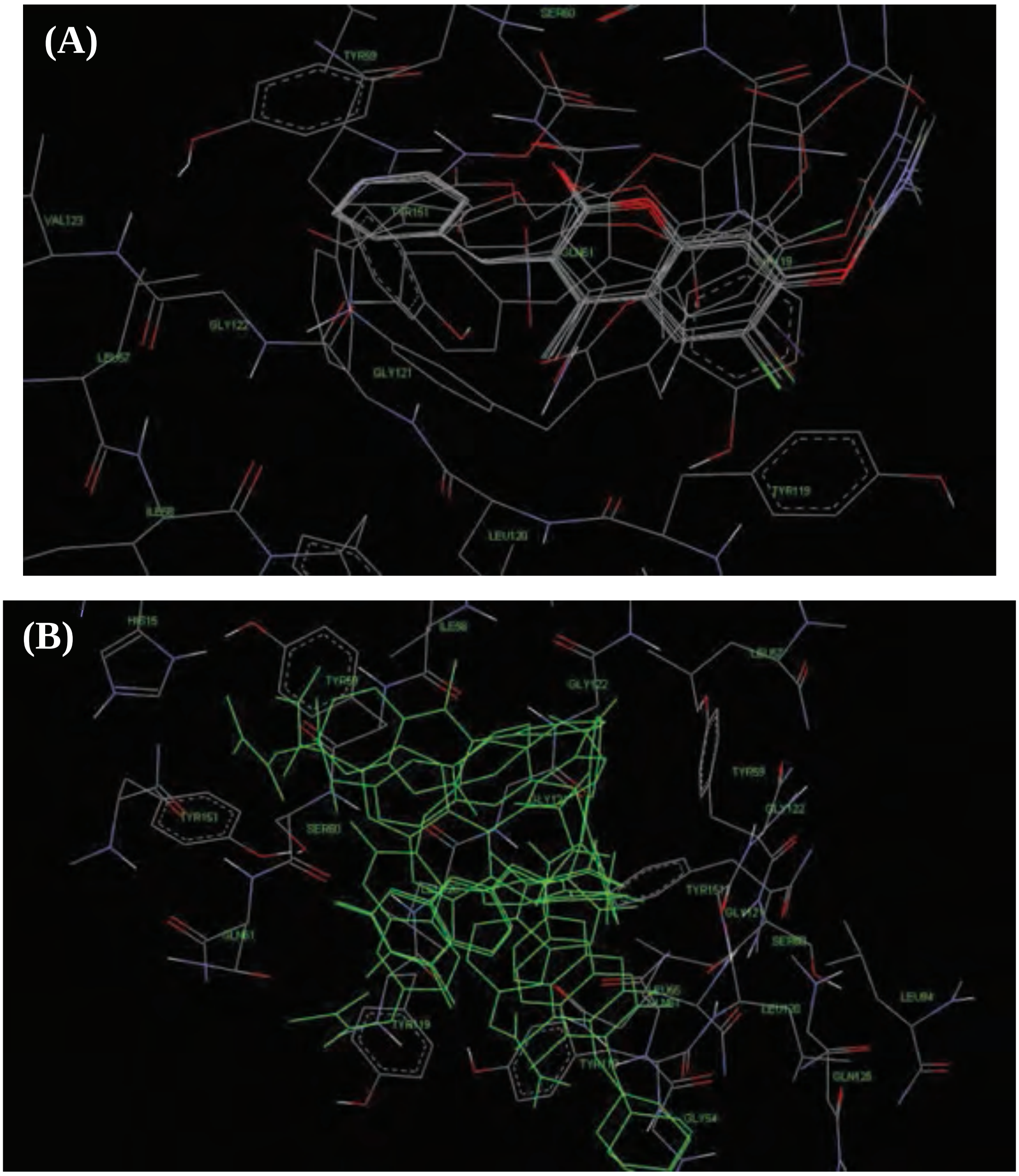
รูปที่ 3.3 โครงสร้างการเข้าจับระหว่างเอนไซม์ MAOB กับสารยับยั้ง (A) สารกลุ่มที่มีฤทธิ์สูง และ (B) สารกลุ่มที่มีฤทธิ์ต่ำ

ผลการวิเคราะห์พบว่าสารกลุ่มที่มีฤทธิ์สูงทั้ง 6 สารมีรูปแบบการเข้าจับที่ค่อนข้างใกล้เคียงกันดังแสดงในรูปที่ 3.3 (A) ในขณะที่สารกลุ่มที่มีฤทธิ์ต่ำทั้ง 6 สารมีรูปแบบการเข้าจับที่แตกต่างกันดังแสดงในรูปที่ 3.3 (B) ถึงแม้ว่าโครงสร้างสองมิติของสารทั้งสองกลุ่มนั้นมีความแตกต่างกันไม่ชัดเจนนัก เมื่อพิจารณาถึงปัจจัยย่อยต่าง ๆ พบว่าการแทนที่ของหมู่ methyl หรือหมู่ที่มีขนาดเล็กในตำแหน่ง C6 ของวงคูมารินส่งผลอย่างมีนัยสำคัญต่อรูปแบบและตำแหน่งของการเข้าจับ ความสำคัญต่อมาคือวงเบนซีนที่แทนที่ในตำแหน่ง C3 ของวงคูมาริน ซึ่งถ้าหากมีหมู่แทนที่เป็นจำนวนมากในวงเบนซีนจะส่งผลให้ค่า pIC_{50} ลดลง ซึ่งอาจจะเป็นผลของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างวงเบนซีนในเอนไซม์กับในโมเลกุลของสารยับยั้งเมื่อมีหมู่แทนที่เข้ามาอาจทำให้ระนาบของวงเบนซีนในโมเลกุลมีองศาเปลี่ยนไปทำให้การเกิดแรงยึดเหนี่ยวระหว่างกันมีค่าน้อยลงทำให้ไม่สามารถแข่งขันกับซับสเตรตได้อย่างมีประสิทธิภาพ

3.3.3 ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างการเข้าจับกับฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการอักเสบ

จากการพิจารณาค่า pIC_{50} ที่แสดงดังตารางที่ 3.4 จะเห็นว่าสารในกลุ่มนี้จำนวน 54 สารมีค่า pIC_{50} ตั้งแต่ < 3.00 ถึง 7.30 ผู้วิจัยจึงเลือกวิเคราะห์เปรียบเทียบสาร 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีฤทธิ์สูง (pIC_{50} สูงที่สุด 10 ลำดับแรก) และกลุ่มที่มีฤทธิ์ต่ำ (pIC_{50} ต่ำที่สุด 10 ลำดับท้าย) โครงสร้างการเข้าจับของสารทั้งสองกลุ่มแสดงดังรูปที่ 3.4 ผลการวิเคราะห์พบว่าสารกลุ่มที่มีฤทธิ์สูงทั้ง 10 สารมีรูปแบบการเข้าจับที่ใกล้เคียงกันดังแสดงในรูปที่ 3.4 (A) ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากโครงสร้างสองมิติที่มีลักษณะใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 3.2) โดยจะเห็นว่าโครงสร้างที่มีผลต่อฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ได้แก่ การแทนที่

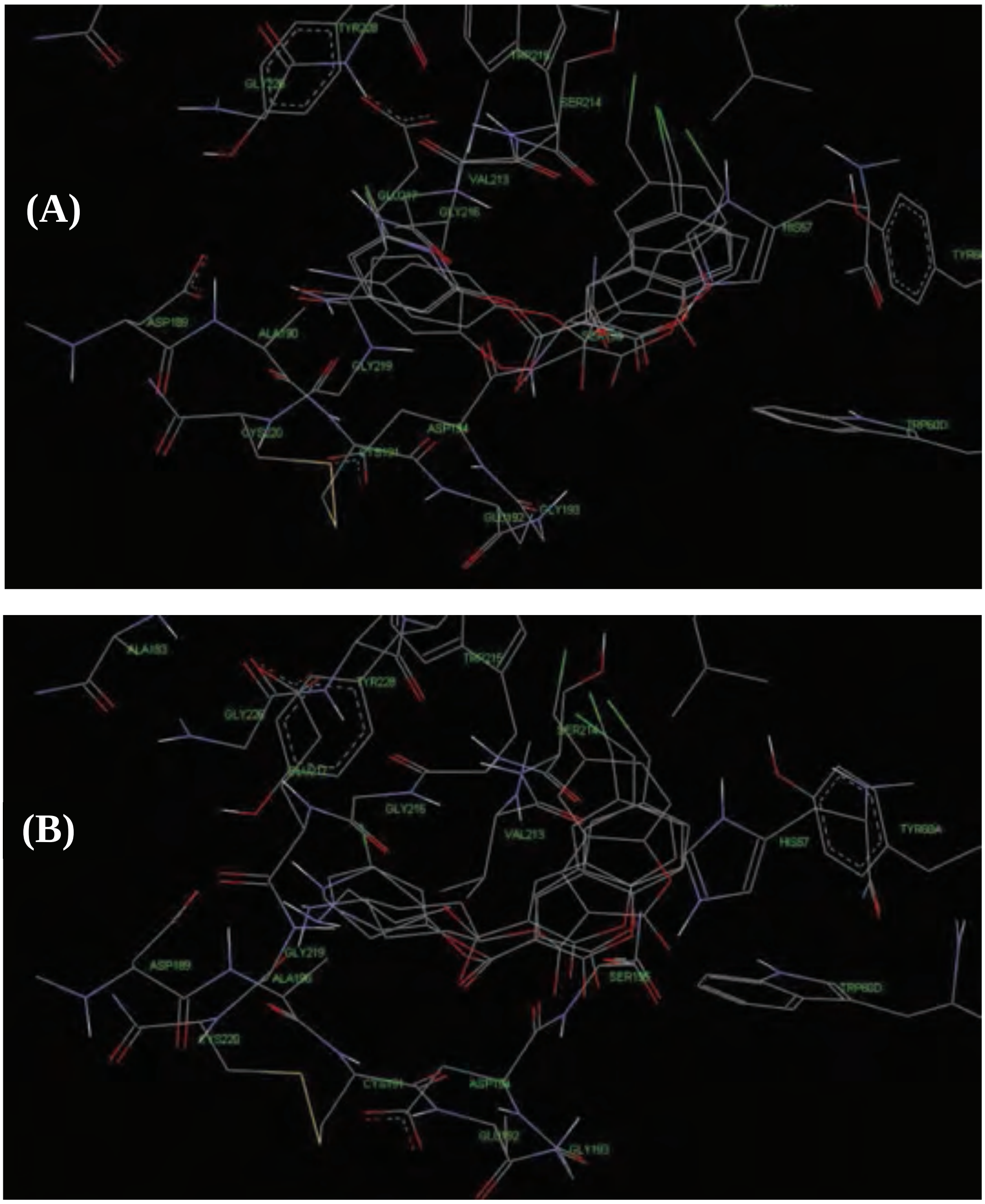
ในตำแหน่ง C6 ของคูมารินด้วยธาตุหมู่ 7 รวมไปถึงการแทนที่ด้วยหมู่ที่มีวงเบนซีนในตำแหน่ง C3 ของคูมาริน ส่วนสารกลุ่มที่มีฤทธิ์ต่ำทั้ง 10 สารจะมีรูปแบบการเข้าจับที่แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดดังแสดงในรูปที่ 3.4 (B) ซึ่งอาจจะเป็นผลที่เกิดจากการแทนที่ด้วยหมู่แทนที่อื่น ๆ ที่ไม่ใช่หมู่ที่มีผลมากที่ได้อธิบายก่อนหน้านี้



รูปที่ 3.4 โครงสร้างการเข้าจับระหว่างเอนไซม์ cytokine กับสารยับยั้ง (A) สารกลุ่มที่มีฤทธิ์สูง และ (B) สารกลุ่มที่มีฤทธิ์ต่ำ โดยสารยับยั้งแสดงเป็นเส้นสีเขียวเพื่อให้สังเกตเห็นได้อย่างชัดเจน

3.3.4 ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างการเข้าจับกับฤทธิ์ยับยั้งกับเอนไซม์ที่ทำให้เลือดแข็งตัว

จากการพิจารณาค่า pIC_{50} ที่แสดงดังตารางที่ 3.5 จะเห็นว่าสารในกลุ่มนี้จำนวน 13 สารมีค่า pIC_{50} ตั้งแต่ < 3.00 ถึง 6.06 ผู้วิจัยจึงเลือกวิเคราะห์เปรียบเทียบสาร 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีฤทธิ์สูง (pIC_{50} สูงที่สุด 4 ลำดับแรก) และกลุ่มที่มีฤทธิ์ต่ำ (pIC_{50} ต่ำที่สุด 4 ลำดับท้าย) โครงสร้างการเข้าจับของสารทั้งสองกลุ่มแสดงดังรูปที่ 3.5



รูปที่ 3.5 โครงสร้างการเข้าจับระหว่างเอนไซม์ thrombin กับสารยับยั้ง (A) สารกลุ่มที่มีฤทธิ์สูง และ (B) สารกลุ่มที่มีฤทธิ์ต่ำ

ผลการวิเคราะห์พบว่าทั้งสารกลุ่มที่มีฤทธิ์สูงทั้ง 4 สารและสารที่มีฤทธิ์ต่ำทั้ง 4 สารมีรูปแบบการเข้าจับที่ค่อนข้างคล้ายคลึงกันดังแสดงในรูปที่ 3.5 ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากการที่สารทั้งสองกลุ่มมีโครงสร้างหลักที่เหมือนกันและมีหมู่แทนที่ที่มีขนาดแตกต่างกันไม่มากนัก อีกทั้งยังมีค่า pIC_{50} ที่แตกต่างกันน้อยกว่าสารยับยั้งในหัวข้อก่อนหน้า จากการวิเคราะห์พบความเป็นไปได้ของแนวโน้มความสัมพันธ์ระหว่างหมู่แทนที่กับฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ได้แก่ การแทนที่ของอนุพันธ์ของเบนซีนที่แทนที่ในตำแหน่ง C3 ของคูมาริน แต่ข้อสันนิษฐานนี้ไม่อาจบ่งบอกความความจำเพาะของหมู่แทนที่ได้อย่างชัดเจนมากนัก เนื่องจากในสารที่มีค่า pIC_{50} ต่ำที่สุดก็มีการแทนที่ด้วยอนุพันธ์ของเบนซีนเช่นเดียวกัน ผู้วิจัยจึงคิดว่าการเกิดอันตรกิริยาที่ส่งผลต่อการเข้าจับระหว่างเอนไซม์ thrombin กับสารยับยั้งนี้อาจจะไม่สามารถบ่งบอกได้ด้วยเทคนิคการคำนวณการเข้าจับเชิงโมเลกุล

บทที่ 4
สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาหาผลของหมู่แทนที่ในสารยับยั้งที่ส่งผลต่อตำแหน่งและรูปแบบการเข้าจับระหว่างสารยับยั้งและเอนไซม์ในการเกิดอาการทั้งสี่ ได้แก่ การเกิดมะเร็ง การอักเสบ การแข็งตัวของเลือด และอาการซึมเศร้า โดยใช้เทคนิคการเข้าจับเชิงโมเลกุล ซึ่งโครงสร้างเอนไซม์ทั้งสี่นำมาจากคลังข้อมูลโปรตีน (Protein Data Bank) และโครงสร้างสารยับยั้งที่เป็นอนุพันธ์ของคูมารินที่มีหมู่แทนที่ต่างกัน โดยทำการวิเคราะห์ร่วมกับค่า IC_{50} ของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เพื่อบ่งบอกถึงความสามารถในการรักษาโรคด้วย สรุปได้ว่า หมู่แทนที่บนอนุพันธ์ของคูมารินที่แตกต่างกันจะส่งผลให้รูปแบบการเข้าจับต่างกัน ถ้าหากหมู่แทนที่มีสมบัติต่าง ๆ ใกล้เคียงกัน รูปแบบการเข้าจับจะมีรูปแบบคล้ายกัน ซึ่งในกรณีที่ค่า pIC_{50} มีค่าสูงนั้นหมู่แทนที่ส่วนใหญ่จะเป็นธาตุกลุ่มฮาโลเจน วงอะโรมาติก และหมู่แทนที่ขนาดเล็ก ซึ่งจะส่งผลให้รูปแบบการเข้าจับไม่ต่างกัน ข้อมูลที่ได้นี้อาจจะเป็นประโยชน์ต่อการค้นคว้าและพัฒนายารักษาโรคตัวใหม่ที่มีประสิทธิภาพและมีความสามารถรักษาโรคได้หลากหลายในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. Daniel, A.G.; Irwin, D.K. Molecular docking toward drug discovery. *Journal of Molecular recognition*. **1996**, 9, 175-186.

2. Todd, J.A.E.; Irwin, D.K. Critical Evaluation of Search Algorithms for Automated Molecular Docking and Database Screening Compute Chem. *John Wiley & Sons, Inc.* **1997**, 18, 1175-1189.

3. Rene, T.; Mikael, H.C. MolDock: A New Technique for High-Accuracy Molecular Docking. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2006**, 49, 3315-3321.

4. David, S.G.; Garrett, M.M.;Arthur, J.O. Automate Docking of Flexible Ligands : Applications of AutoDock. *Journal of Molecular recognition*. **1996**, 9, 1-5.

5. Peng, X.M.; L.V. Guri,D.; Zhou, H.C. Current Developments of Coumarin Compounds in Medicinal Chemistry. *Current Pharmaceutical Design*. **2013**, 19, 3884-3930.

6. Fédor, N.N.; Ghermes, G.C. Molecular docking: theoretical background, practical applications and perspectives. *Mendeleev Commun.* **2009**, 19, 237–242

7. Xiao, Y.H.; Zhi, J.S.; Hong, L.Z. Study on the Anticancer Activity of Coumarin Derivatives by Molecular Modeling. *Chem Biol Drug Des*. **2011**, 78, 651–658

8. Raphael, F.; Caroline, C.; Lionel P. Investigation of mechanism-base thrombin inhibitors: Implication of highly conserved water molecule for the binding of coumarin within the S pocket. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2006**, 16, 2017-2021

9. Maria, J.M.; Carmen, T.; Yunenierkis, P.C. Synthesis and Study of a Series of 3-Arylcoumarins as Potent and Selective Monoamine Oxidase B Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*., **2011**, 54, 7127–7137

10. Jie-Fei, C.; Mi, C.; David, W. Discovery and structure-activity relationship of coumarin derivative as TNF-alpha inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2004**, 14, 2411–2415

11. Zhou,X.; Wang,X.B.; Wang,T.; Kong,L.Yi. Design synthesis andacetyl cholinesterase inhibitory activity of novel coumarin analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2008**, 16, 8011–8021

12. Murray, R. D. H. Naturally occurring plant coumarins. Prog. *Chem. Org. Nat*. **2002**, 83, 1 –673

13. Chilin, A.; Battistutta, R.; Bortolato, A.; Cozza, G.;,. Coumarin as attractive casein kinase 2 (CK2) inhibitor scraffold an integrate approach to elucidate the putative binding motif and explain structure activity relationships. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2008**, 51, 752–759.

14. Xie, L. ; Takeuchi, Y. ; Cosentino, L.M. ; McPhail, A.T. ; Anti-AIDS Agents. 42. Synthesis and Anti-HIV Activity of Disubstituted (3‘R,4‘R)-3‘,4‘-Di-O-(S)-camphanoyl-(+)-cis-khellactone Analogues. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2001**, 44, 664-67

15. Bing, L. ; Ramdas, P. ; Ming, D. ; Daniel, A. ; Marjorie, H.B. ; Michelle M.B. Discovery and Characterization of Small Molecule Inhibitors of the BET Family Bromo domains. *Journal of Medicinal Chemistry.* **2011**, 54, 3827–3838

16. Tsay, S.C. ; Hwu, J.R. ; Singha, R. ; Huang, W.C. ; Chang, Y.H, ; Hsu, M.H. Novel Cyano- and N-Isopropylamidino-Substituted Derivatives of Benzo[b]thiophene-2 carboxanilides and Benzo[b]thieno[2,3-c] quinolones : Synthesis, Photochemical Synthesis, Crystal Structure Determination, and Antitumor Evaluation. *Journal of Medicinal Chemistry.* **2005**, 48, 2346-2360

17. Serra, S. ; Ferino, G. ; Matos, M.J. ; Vázquez, R.S. ; Delogu, G. ; Vina, D. Hydroxy coumarins as selective MAO-B inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2012**, 22, 258-261

18. Maria, J.M. ; Santiago, V. ; Rosa, M.G.F, ; Eugenio, U. ; Lourdes, S. ; Carol, F. Synthesis and evaluation of the antiparasitic activity of bis-(arylmethylidene) cycloalkanones. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2014**, 71, 282-289

ประวัติผู้วิจัย

นายจิรายุส อาจรักษา เกิดเมื่อวันที่ 10 ตุลาคม พ.ศ. 2539 ที่โรงพยาบาลพญาไท จังหวัดชลบุรี สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมปลาย แผนกวิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์ โครงการพัฒนาและส่งเสริมผู้มีความสามารถพิเศษ ด้านวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ (Science And Math) เมื่อปี พ.ศ. 2558 จากโรงเรียนสาธิต “พิบูลบำเพ็ญ” มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี และได้เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้หลังจากจบการศึกษาปริญญาตรี 148/1 ตำบลปลวกแดง อำเภอปลวกแดง จังหวัดระยอง 21140