รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

อันตรกิริยาระหว่างโปรตีนนิวรามินิเดสของไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ H1N1 กับสารออกฤทธิ์ในกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ด้วยเทคนิคโมเลกุลาด็อกกิ้ง

Interaction between influenza A H1N1 neuraminidase and phenolic and flavonoid compounds by molecular docking technique.

อาจารย์ ดร. พนิตา ก้งซุ่น

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ กองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยทักษิณ

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559

คำรับรองคุณภาพ

รายงานวิจัยเรื่อง **อันตรกิริยาระหว่างโปรตีนนิวรามินิเดสของไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ H1N1 กับสารออกฤทธิ์ในกลุ่มฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ด้วยเทคนิค molecular docking**

ผู้วิจัย **พนิตา ก้งซุ่น**

สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยทักษิณ ขอรับรองว่ารายงานวิจัยฉบับนี้ได้ผ่านการประเมินจากผู้ทรงคุณวุฒิแล้ว มีความเห็นว่าผลงานวิจัยฉบับนี้มีคุณภาพอยู่ในเกณฑ์

- ☐ ดีมาก
- ☐ ดี
- ☑ ปานกลาง
- ☐ พอใช้
- ☐ ควรปรับปรุง

(อาจารย์ ดร.วันลภ ดิษสุวรรณ์)
ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนา
วันที่ 12 เดือนมิถุนายน พ.ศ.2561

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาประสิทธิภาพการยึดจับระหว่างโปรตีนนิวรามินิเดส (NA) ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ 2009 H1N1 สายพันธุ์ดั้งเดิม (WT) สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง H274Y และ R292K กับยาโอเซลทาร์มิเวียร์ (OTV) สารแอนโดรกราโฟไลด์และอนุพันธ์ (AGD) ในฟ้าทะลายโจร ด้วยวิธีโมเลกุลาร์ด็อกกิ้ง ผลการคำนวณของ OTV พบว่าประสิทธิภาพในการยึดจับ OTV-WT ~ OTV-H274Y > OTV-R292K ซึ่งสอดคล้องกับค่า IC_{50}จากการทดลอง สำหรับผลการคำนวณของสาร AGD พบว่าสาร AGD 1 และ 5 มีโอกาสพัฒนาไปเป็นยารักษาโรคไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ WT และ H274Y ในขณะที่สาร AGD 2 มีโอกาสพัฒนาไปเป็นยารักษาสายพันธุ์ R292K ซึ่งมีอัตราการดื้อยาสูงเมื่อเทียบกับ WT และ H274Y เนื่องจากถึงแม้มีการกลายพันธุ์ไปแล้วก็ยังยึดจับกับ N1 ได้ดี มีพลังงานยึดจับกับสายพันธุ์ WT, H274Y และ R292K เท่ากับ -7.95, -8.09 และ -7.74 kcal/mol ตามลำดับ

คำสำคัญ: นิวรามินิเดส สารแอนโดรกราโฟไลด์และอนุพันธ์ R292K H274Y โมเลกุลาร์ด็อกกิ้ง

Abstract

In this study, molecular docking was performed on the 2009 H1N1 complexed with the well known drug, oseltamivir (OTV), and andrographolide and derivatives (AGD) from *Andrographis paniculata*, to investigate the binding affinity of the inhibitors toward wide type and mutant types at the position of H274Y and R292K of neuraminidase (NA). The results of OTV revealed that the efficiency of binding is OTV-WT ~ OTV-H274Y > OTV-R292K in which agree well with IC_{50} values from experimental data. The calculation revealed that AGD1 and AGD5 are good opportunity for developing as NA inhibitor for WT and H274Y. While AGD2 is a good opportunity for developing as NA inhibitor especially for R292K mutant that has more resistant fold when compare to wide type and H274Y. This is due to the AGD2 binds to NA active site in which the binding energies were -7.95, -8.09 and -7.74 kcal/mol for WT, H274Y and R292K, respectively.

Keywords: Neuraminidase, Andrographolide and Derivatives, H274Y, R292K, Molecular Docking

ประกาศคุณูปการ

รายงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยทักษิณ ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย ขอขอบคุณ คณาจารย์ และนักวิทยาศาสตร์ทุกท่านในสาขาวิชาเคมี มหาวิทยาลัยทักษิณ ผู้ซึ่งอนุเคราะห์อุปกรณ์ วัสดุทางคอมพิวเตอร์ จนทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบคุณ

พนิตา ก้งชุ่น

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ..... iv

ประกาศคุณูปการ..... v

สารบัญ..... vi

สารบัญตาราง..... viii

สารบัญภาพ..... ix

บทที่ 1 บทนำ..... 1

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย 1

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย 3

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย 3

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

2.1 ไวรัสไข้หวัดใหญ่..... 4

2.2 โครงสร้างโปรตีนนิวรามิเนส..... 4

2.3 ยาต้านไวรัสไข้หวัด..... 5

2.4 ยาต้านเชื้อไรัสชนิดยับยั้งการทำงานของโปรตีนนิวรามินิเดส..... 6

2.5 ความก้าวหน้าในการพัฒนายาที่ออกฤทธิ์ต่อนิวรามินิเดส..... 6

2.6 ฟ้าทะลายโจรและสารสำคัญ..... 6

2.7 สารสมุนไพรไทยบางชนิดที่สนใจ..... 7

2.8 วิจัยที่สำคัญและเกี่ยวข้องกับต่อนิวรามินิเดส..... 8

หน้า

2.9 วิจัยที่สำคัญและเกี่ยวข้องกับสมุนไพรไทย..... 11

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 15

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย..... 15

3.2 เตรียมไฟล์โครงสร้างสามมิติของโปรตีนนิวรามินิเดส..... 15

3.3 เตรียมไฟล์โครงสร้างสามมิติของสาร AGD และสารสมุนไพรไทยบางชนิดที่สนใจ..... 16

3.4 โมเลคิวลาร์ด็อกกิ้งระหว่างนิวรามินิเดสกับสาร AGD และสารสมุนไพรไทยที่สนใจ... 17

บทที่ 4 ผลการวิจัย และอภิปรายผล..... 18

4.1 อันตรกิริยากับสายพันธุ์ดั้งเดิม (WT)..... 18

4.2 อันตรกิริของสายพันธุ์กลายพันธุ์ H274Y และ R292K..... 20

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย 25

บรรณานุกรม..... 26

ภาคผนวก..... 29

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 ประสิทธิภาพในการจับกันของโปรตีนนิวรามินิเดสกับยาซานามิเวียร์
และสารประกอบซิงค์ 10

4.1 แสดงพลังงานในการยึดจับและ % conformational cluster ของ OTV
กับ N1 ทั้ง 3 สายพันธุ์ 18

4.2 แสดงการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างยา OTV กับ N1 ทั้ง 3 สายพันธุ์ 19

4.3 แสดงพลังงานในการยึดจับระหว่างสารสมุนไพรไทยที่สนใจกับ NA
สายพันธุ์ WT 20

4.4 แสดงพลังงานในการยึดจับระหว่างสารสมุนไพรไทยที่สนใจกับ NA
สายพันธุ์ H274Y 21

4.5 แสดงพลังงานในการยึดจับระหว่างสารสมุนไพรไทยที่สนใจกับ NA
สายพันธุ์ R292k 24

สารบัญภาพประกอบ

ภาพที่ หน้า

2.1 (A) แสดงโครงสร้างของโปรตีนนิวรามินิเดส (B) บริเวณที่มีการยึดจับกับตัวรับโฮสต์ 5

2.2 แสดงสูตรโครงสร้างของยาต้านไวรัสทั้ง 4 ชนิด 5

2.3 โครงสร้างโมเลกุลของแอนโดรกราโฟไลด์และอนุพันธ์ 7

2.4 ผลการคำนวณด้วย CDOCKER ของสารสกัดตัวที่ 8 11

2.5 อันตรกิริยาของสารแอนโดรกราโฟไลด์และอนุพันธุ์กับโปรตีนนิวรามินิเดสของไข้หวัด H1N1 13

2.6 โครงสร้าง AL-1 14

3.1 แสดงโครงสร้างสองมิติและสามมิติของสาร AGD และสารสมุนไพรไทยบางชนิดที่สนใจ 16

4.1 แสดงการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างสาร AGD สารที่ 1, 5 และ 9 กับ N1 สายพันธุ์ WT 20

4.2 แสดงการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างสาร AGD สารที่ 1, 5 และ 9 กับ N1 สายพันธุ์ H274Y 22

4.3 แสดงการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างสาร AGD สารที่ 2 และ 3 กับ N1 สายพันธุ์ R292K 24

4.4 แสดงการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างสาร AGD สารที่ 2 กับ N1 สายพันธุ์ WT และ H274Y 24

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ไข้หวัดใหญ่ (Influenza) เป็นโรคที่เกิดการติดเชื้อไวรัสที่ระบบทางเดินหายใจในสัตว์ปีกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และในช่วงแพร่ระบาดตามฤดูกาล โรคไข้หวัดใหญ่สามารถแพร่กระจายได้ง่ายจากมนุษย์สู่มนุษย์ (Albiñana et al., 2016) การแพร่ระบาดของไข้หวัดใหญ่ในมนุษย์พบว่ามีการแพร่ระบาดครั้งแรกในช่วงปี ค.ศ. 1918 – 1919 ที่เรียกว่า ไข้หวัดสเปน (Spanish flu) ซึ่งเป็นเหตุให้มีจำนวนผู้เสียชีวิตมากกว่า 50 ล้านคนทั่วโลก (Taubenberger & Morens, 2006) จัดเป็นปัญหาสุขภาพที่สร้างความตื่นตระหนก และวิตกกังวลอย่างมาก โรคไข้หวัดใหญ่ที่ทำให้เกิดการก่อโรคแบบรุนแรงเกิดจากเชื้อไวรัสอินฟลูเอนซาชนิด (type) เอ ซึ่งบนผิวมีไกลโคโปรตีนปรากฏอยู่สองชนิด คือ ฮีแมกกลูตินิน (Hemagglutinin; HA) มี 18 ชนิด (H1-H18) และนิวรามินิเดส (Neuraminidase; NA) มี 11 ชนิด (N1-N11) (Prevention, 2017) จึงทำให้เกิดระบบการเรียกชื่อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ สายพันธ์ต่างๆโดยระบุประเภทของ HA และ NA เช่น H1N1 และ H5N1 เป็นต้น (Chamni, 2014)

NA เป็นไกลโคโปรตีนที่ทำหน้าที่สลายพันธะไกลโคไซด์ที่เชื่อมระหว่างกรดไซอะลิกของไซอะโลไกลแคนและช่วยปล่อยไวรัสออกจากเซลล์เจ้าบ้านที่ติดเชื้อ โดยการทำลายรีเซพเตอร์บนเซลล์เจ้าบ้านและไวรัส ทำให้เชื้อไวรัสหลุดออกนอกเซลล์และช่วยให้ไวรัสแพร่กระจายไปติดเชื้อเซลล์ใกล้เคียงต่อไป จากการศึกษาโครงสร้างสามมิติของ NA พบว่าที่บริเวณเร่งของ NA สายพันธุ์ N1 ประกอบด้วย catalytic residues (R118, D151, D152, R224, E276, R292, R371 และ Y406) และ framework residues (E119, R156, W178, S179, D198, I222, E227, H274, E277, N294 และ E425) (T Rungrotmongkol, Yotmanee, Nunthaboot, & Hannongbua, 2011)

ยาต้านไข้หวัดใหญ่ที่นิยมใช้อยู่ในปัจจุบันคือโอเซลทามิเวียร์ (OTV) เนื่องจากมีความสะดวกในการใช้งาน มีลักษณะโครงสร้างคล้ายคลึงกับกรดไซอะลิก ทำให้สามารถยับยั้งการทำงานของ NA โดยการเข้าแทนที่กรดไซอะลิก และส่งผลให้ไวรัสไม่สามารถเคลื่อนที่ออกจากเซลล์เจ้าบ้านได้ (Weinstock & Zuccotti, 2009) ปัญหาสำคัญที่พบในการใช้ยาโอเซลทามิเวียร์คือการดื้อยาโดยเฉพาะเมื่อ N1 เกิดการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 274 จาก His เป็น Tyr (H274Y) และตำแหน่ง 292 จาก Arg เป็น Lys (R292K) ทำให้ขนาดของบริเวณเร่งของ NA เปลี่ยนไป (Thanyada Rungrotmongkol, Malaisree, Nunthaboot, Sompornpisut, & Hannongbua, 2010) ส่งผลต่อประสิทธิภาพของยาโอเซลทามิเวียร์เป็นอย่างมาก โดยค่า IC_{50} ของสายพันธุ์ดั้งเดิม (WT) และ

สายพันธุ์ที่กลายพันธุ์ H274Y และ R292K เท่ากับ 0.4 ± 0.1 nM, 110 ± 12 nM และ 3200 ± 220 nM ตามลำดับ (Vries et al., 2013)

ปัจจุบันมีการพัฒนาสารยับยั้งการทำงานของ NA ได้แก่ ฟาวิพิราเวียร์ (Favipiravir), ลานินามิเวียร์ (Laninamivir) และพีรามิเวียร์ (Peramivir) (Takashita et al., 2016) อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าสมุนไพรไทยหลายชนิดมีศักยภาพในการป้องกันโรค สารเคมีจากสมุนไพรบางชนิด มีกลไกออกฤทธิ์เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน รวมทั้งต้านและกำจัดอนุมูลอิสระอีกด้วย ทำให้เม็ดเลือดขาวในระบบภูมิคุ้มกันหลายชนิด มีความแข็งแรงและมีปริมาณเพิ่มขึ้น สมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต้านไวรัสไข้หวัดใหญ่ ได้แก่ ฟ้าทะลายโจร (Chen JX, 2009) ซึ่งสารสำคัญที่พบในสมุนไพรไทยฟ้าทะลายโจร คือสารแอนโดรกราโฟไลด์ (andrographolide) และยังพบอนุพันธ์ (AGD) เช่น neoandrographolide และ 14 - deoxy andrographolide ผักกลุ่มที่มีรสเปรี้ยว สารรสเปรี้ยวคือกรดอินทรีย์ต่าง ๆ คือ กรดแอสคอบิก (ascorbic acid) หรือ วิตามินซี เป็นสารต้านออกซิเดชั่นที่มีประสิทธิภาพสูง ช่วยเสริมระบบการทำงานของเม็ดเลือดขาวและระบบภูมิคุ้มกัน งานวิจัยพบว่า วิตามินซีจะช่วยบรรเทาความรุนแรง ลดระยะเวลาการเป็นหวัดและบรรเทาอาการแพ้ต่าง ๆ ได้ ผักรสเปรี้ยว เช่น กระเจี๊ยบแดง มะยม ส้มกบ ส้มเสี้ยว มะกอก แต้ว ส้มป่อย สมอไทย มะขาม มะขามป้อม มะกรูด มะนาว มะเฟือง ชะมวง มะดัน และ ตะลิงปลิง ผักกลุ่มที่มีรสฝาด สารประกอบที่ทำให้ผักมีรสฝาด ได้แก่ แทนนิน ซึ่งมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นสูงกว่าวิตามินซี 20 เท่า เสริมฤทธิ์วิตามินซีให้มีอายุยาวขึ้น และลดอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ ยังมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อโรคและสมานแผลด้วย ผักรสฝาด เช่น ยอดจิก ยอดมะม่วงหิมพานต์ ผักเม็ก ยอดกระโดน ยอดฝรั่ง กล้วยดิบ ผลมะตูมอ่อน ผักกลุ่มที่มีรสเผ็ดร้อน สารประกอบที่ทำให้ผักและพืชหัว มีกลิ่นหอมคือ น้ำมันหอมระเหย ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการเจริญเติบโตของเชื้อโรค ผักรสเผ็ดร้อน ได้แก่สารกลุ่มฟลาโวนอยด์และฟินอลิก เช่น ขิง ข่า ตะไคร้ ใบมะกรูด พริกไทย ดีปลี พลูคาว ใบกระเพรา ใบโหระพา ผักไผ่ ขมิ้นชัน เนียมหูเสือ ผักคราด กระเจียว ชะพลู ผักแพว ผักแขยง มีรายงานทางวิทยาศาสตร์ ในการนำสารสกัดฟลาโวนอยด์และฟินอลิกมาศึกษาการยับยั้งการทำงานของโปรตีนนิวรามินิเดส และมีค่า IC_{50} ที่ค่อนข้างน่าพอใจ

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาเปรียบเทียบการยับยั้งการทำงานของโปรตีนนิวรามินิเดสของไขหวัดใหญ่ 2009 H1N1 สายพันธุ์ WT สายพันธุ์กลายพันธุ์ H274Y และ R292K กับยา OTV สาร AGD และสารสมุนไพรไทยบางชนิดที่สนใจด้วยเทคนิคโมเลกุลาร์ด็อกกิ้ง (Molecular Docking) (Morris et al., 2009) เพื่อให้เกิดความรู้ความเข้าใจในการยับยั้งการทำงานของโปรตีนนิวรามินิเดสอันจะเป็นโอกาส ในการค้นพบหรือพัฒนายาที่สามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีนนิวรามินิเดสอย่างมีประสิทธิภาพ แม้จะเป็นสายพันธุ์ที่กลายพันธุ์

1.2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาวิธีการเตรียมโครงสร้างสามมิติของตัวยับยั้งสาร AGD และสารออกฤทธิ์ในกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์จากสมุนไพรไทยบางชนิดที่สนใจ

2. เพื่อศึกษาวิธีการเตรียมโครงสร้างสามมิติ ของสารประกอบเชิงซ้อนนิวรามินิเดสกับตัวยับยั้งสาร AGD และสารออกฤทธิ์ในกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์จากสมุนไพรไทยบางชนิดที่สนใจ

3. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของการยึดจับระหว่างโปรตีนนิวรามินิเดสของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ H1N1 กับตัวยับยั้งสาร AGD และสารออกฤทธิ์ในกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์จากสมุนไพรไทยบางชนิดที่สนใจ

1.3. ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. เตรียมโครงสร้างสามมิติของสารประกอบเชิงซ้อนของนิวรามินิเดส และสาร AGD และสารสมุนไพรไทยบางชนิดที่สนใจ

-หาตำแหน่งกึ่งกลางของ Binding site

-เติมประจุและ Solvation term ให้กับโครงสร้างโปรตีน

-เติมประจุให้กับสาร AGD และสารสมุนไพรไทยบางชนิดที่สนใจ

-กำหนดขอบเขต Grid Box

2. สร้าง Grid energy maps ด้วยคำสั่ง AutoGrid4 โดยใช้โปรแกรม ADT (Morris et al., 2009)

-สร้าง Grid energy maps ของอะตอมชนิดต่างๆ ที่อยู่ใน Grid Box ด้วยโปรแกรม AutoGrid4

-การเตรียม DPF file (Docking Parameter File) โดยใช้โปรแกรม ADT (Morris et al., 2009)

-การทำ Docking โดยใช้โปรแกรม AutoDockTools-1.5.6 (Morris et al., 2009)

ศึกษาและเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยึดจับของโปรตีนนิวรามินิเดสของไวรัสไข้หวัดใหญ่ H1N1 กับตัวยับยั้งสารสมุนไพรไทยบางชนิดที่สนใจด้วยวิธีโมเลกุลาร์ด็อกกิ้ง

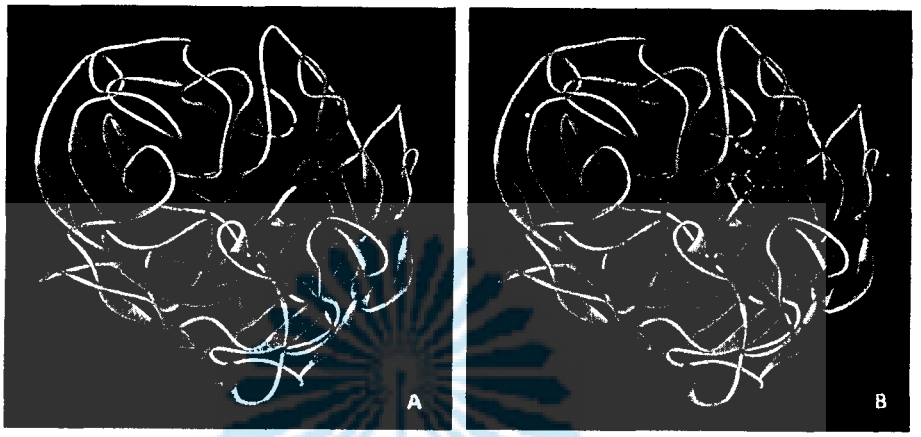
บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไวรัสไข้หวัดใหญ่

ไข้หวัดใหญ่ เกิดจากเชื้อไวรัส ที่เรียกว่า ไวรัสอินฟลูเอนซา (Influenza virus) สามารถแบ่งเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ออกเป็น 3 ชนิด คือ A, B และ C ไวรัสชนิด A ก่อให้เกิดการติดเชื้อในมนุษย์และสัตว์หลายชนิด มีการเปลี่ยนแปลงแอนติเจนของฮีแมกกลูตินินและนิวรามินิเดสไปจากเดิมมากจนกระทั่งเกิดเป็นสายพันธุ์ใหม่ขึ้นอยู่เรื่อยๆ ไวรัสชนิด B เป็นสาเหตุของโรคไข้หวัดใหญ่ที่พบรองลงมาจากชนิด A ก่อการติดเชื้อเฉพาะในมนุษย์เท่านั้น มีการเปลี่ยนแปลงแอนติเจนของฮีแมกกลูตินินเช่นกัน แต่ไม่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิมมากพอที่จะจัดเป็นสายพันธุ์ใหม่ ส่วนไวรัสชนิด C เป็นการติดเชื้อที่แสดงอาการอย่างอ่อนหรือไม่แสดงอาการ และไม่ทำให้เกิดการระบาด เนื่องจากเชื้อไวรัสชนิด A เป็นไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อและระบาดอย่างต่อเนื่องในมนุษย์และสัตว์ชนิดต่างๆ จึงเป็นกลุ่มที่ได้รับความสนใจในการศึกษาเป็นส่วนมาก

2.2 โครงสร้างนิวรามินิเดส (Neuraminidase)

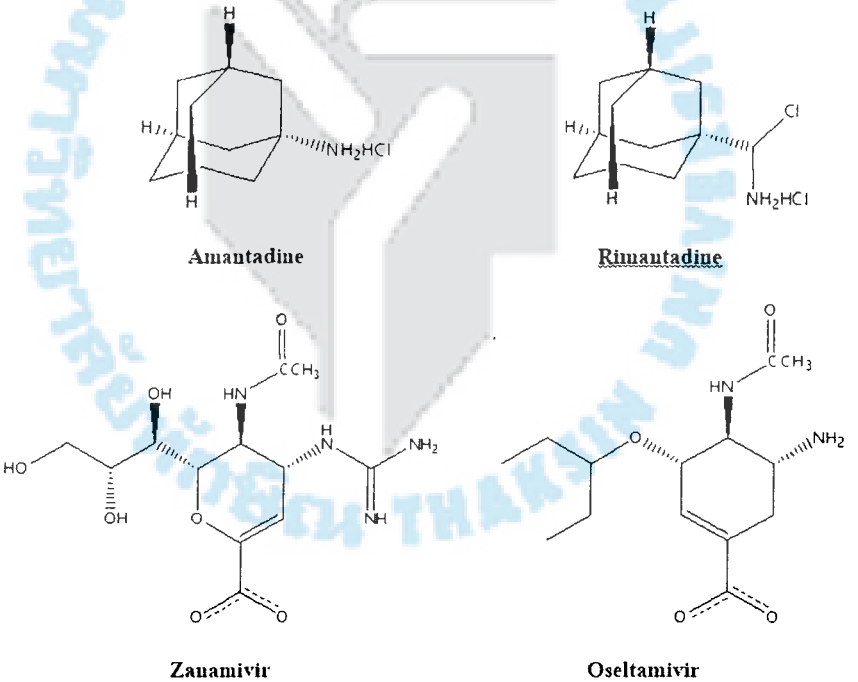
นิวรามินิเดสเป็นไกลโคโปรตีนที่สำคัญบนผิวของอนุภาคไวรัส (ภาพที่ 2.1) สามารถแบ่งออกเป็น 9 ชนิด คือ N1-N9 แต่มีเพียง 2 ชนิดเท่านั้นที่พบในคน คือ N1 และ N2 (Chamni, 2014) หน้าที่หลักของเอนไซม์ชนิดนี้ คือ ทำการตัดพันธะไกลโคไซด์ที่เชื่อมระหว่างไซอะลิก ซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่พบได้ในเนื้อเยื่อระบบทางเดินหายใจส่วนต้นของเซลล์เจ้าบ้านกับโปรตีนที่บริเวณผิวของเปลือกหุ้มอนุภาคไวรัส ทำให้ไวรัสสามารถเคลื่อนที่ออกจากเซลล์เจ้าบ้านได้ เอนไซม์ชนิดนี้สามารถพบได้ทั้งในไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A และ B โดยโปรตีนนิวรามินิเดสของไวรัสไข้หวัดใหญ่ทุกสายพันธุ์จะมีบริเวณยึดจับ (active site) ที่เหมือนกัน จากการศึกษาโครงสร้างสามมิติของ NA พบว่าที่บริเวณเร่งของของ NA สายพันธุ์ N1 ประกอบด้วย catalytic residues (R118, D151, D152, R224, E276, R292, R371 และ Y406) และ framework residues (E119, R156, W178, S179, D198, I222, E227, H274, E277, N294, และ E425) (T Rungrotmongkol et al., 2011)



ภาพที่ 2.1 (A) แสดงโครงสร้างของโปรตีนนิวรามินิเดส (B) บริเวณที่มีการยึดจับ กับตัวรับโฮสต์

2.3 ยาต้านไวรัสไข้หวัดใหญ่

ในปัจจุบันมีสารเคมีหลายชนิดที่ได้รับการคิดค้นและพัฒนาเป็นยาที่สามารถใช้ในการรักษาโรคไข้หวัดใหญ่ได้มียาเพียง 4 ชนิดเท่านั้นที่ผ่านการรับรองจากองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา ได้แก่ อะแมนตาดีน (Amantadine), ไรแมนตาดีน (Rimantadine), ซานามิเวียร์ (Zanamivir) และโอเซลทามิเวียร์ (Oseltamivir) (แสดงในภาพที่ 2.2) สำหรับ อะแมนตาดีน และไรแมนตาดีน เป็นยาที่ถูกคิดค้นขึ้นมาเพื่อยับยั้งการทำงานของ M2 ส่วน ซานามิเวียร์ และโอเซลทามิเวียร์ เป็นยาที่ถูกคิดค้นขึ้นมาเพื่อต้านการทำงานของนิวรามินิเดส (Chamni, 2014)



ภาพที่ 2.2 แสดงสูตรโครงสร้างของยาต้านไวรัสทั้ง 4 ชนิด (Chamni, 2014)

2.4 ยาต้านเชื้อไร้สชนิดยับยั้งการทำงานของโปรตีนนิวรามินิเดส

ปัจจุบันยาต้านไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดยับยั้งการทำงานของโปรตีนนิวรามินิเดส มีอยู่เพียง 2 ชนิด ที่ได้รับการอนุมัติจากองค์การอาหารและยาประเทศสหรัฐอเมริกา (US FDA) ให้จัดจำหน่ายสู่ท้องตลาดทั่วโลกตั้งแต่ปี ค.ศ. 1999 ได้แก่ ซานามิเวียร์ จำหน่ายภายใต้ชื่อทางการค้า Relenza® และโอเซลทามิเวียร์ จำหน่ายภายใต้ชื่อทางการค้า Tamiflu® โดยยาต้านไวรัสไข้หวัดใหญ่ทั้ง 2 ชนิด มีลักษณะโครงสร้างทางเคมีที่คล้ายคลึงกับกรดไซอะลิก ทำให้สามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีนนิวรามินิเดส โดยการเข้าแทนที่กรดไซอะลิก และส่งผลให้ไวรัสไม่สามารถเคลื่อนที่ออกจากเซลล์เจ้าบ้านได้ ซึ่งการยับยั้งการทำงานของโปรตีนนิวรามินิเดส ถือเป็นกลไกที่มีประสิทธิภาพในการหยุดการเจริญเติบโตของไวรัสและควบคุมการแพร่กระจายของไวรัสไปยังเซลล์อื่นๆ ทำให้นิวรามินิเดสเป็นเป้าหมายสำคัญในการพัฒนายาเพื่อรักษาและควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่

อย่างไรก็ตาม แม้ว่ายาทั้ง 2 ชนิด จะสามารถใช้ในการรักษาและควบคุมการแพร่ระบาดของไวรัสไข้หวัดใหญ่ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ปัญหาสำคัญที่พบเป็นประจำในยาต้านไวรัสคือปัญหาการดื้อยา ซึ่งพบมากในการใช้ยาโอเซลทามิเวียร์โดยเฉพาะเมื่อ N1 เกิดการกลายพันธ์ที่ตำแหน่ง 274 จาก His เป็น Tyr (H274Y) และตำแหน่ง 292 จาก Arg เป็น Lys (R292K) ทำให้ขนาดของบริเวณเร่งของ NA เปลี่ยนไป (Thanyada Rungrotmongkol et al., 2010) ส่งผลต่อประสิทธิภาพของยาโอเซลทามิเวียร์เป็นอย่างมาก โดยค่า IC_{50} ของสายพันธุ์ดั้งเดิม (WT) และสายพันธุ์ที่กลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง H274Y และตำแหน่ง R292K เท่ากับ 0.4 ± 0.1 nM, 110 ± 12 nM และ 3200 ± 220 nM ตามลำดับ (Vries et al., 2013)

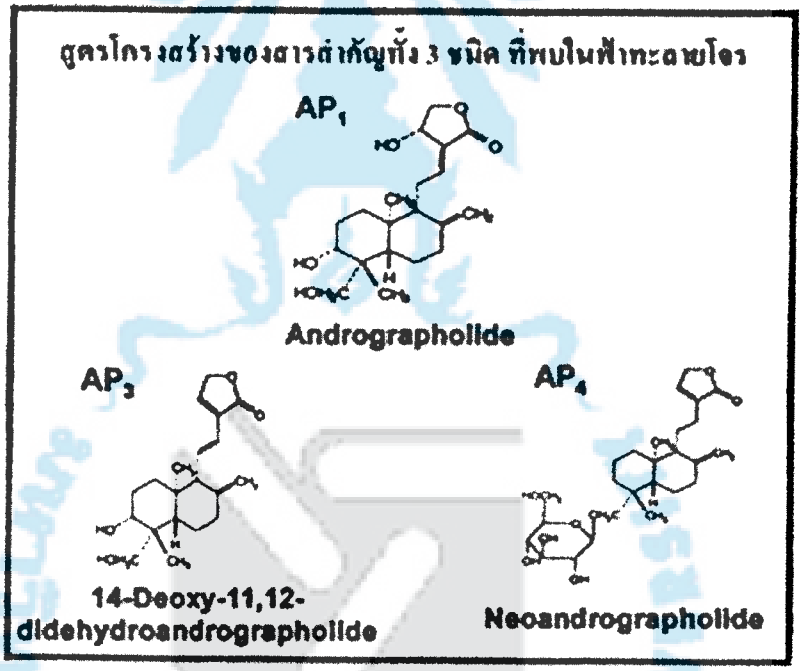
2.5 ความก้าวหน้าในการพัฒนายาที่ออกฤทธิ์ต่อโปรตีนนิวรามินิเดส

ปัจจุบันมีสารยับยั้งการทำงานของโปรตีนนิวรามินิเดสหลายชนิดที่ได้รับการพัฒนาจากบริษัทผู้ผลิตยาระดับโลก โดยผ่านเข้าสู่กระบวนการทดสอบทางคลินิกในขั้น 1, 2 และ 3 (clinical trial phase I, II, III) ซึ่งเป็นการทดสอบกับผู้ป่วยในระดับต่าง ๆ ก่อนที่จะผลิตเป็นยาเพื่อจำหน่ายออกสู่ท้องตลาด ตัวอย่างสารยับยั้งการทำงานของโปรตีนนิวรามินิเดส ที่อยู่ในขั้นตอนการทดสอบทางคลินิกในขั้นที่ 2 และ 3 ในประเทศสหรัฐอเมริกา ได้แก่ favipiravir, Laninamivir และ peramivir (Takashita et al., 2016)

2.6 ฟ้าทะลายโจรและสารสำคัญ

ฟ้าทะลายโจร (Andrographis paniculata วงศ์ Acanthaceae) สารสำคัญหลักที่พบคือ แอนโดกราโฟไลด์ (andrographolide) เป็นสารกลุ่ม ไดเทอปีนอยด์แลกโตน (diterpenoid lactone) ในดอกพบมากที่สุด และยังพบสารอนุพันธ์อื่นๆ เช่น นีโอแอนโดกราโฟไลด์ (neoandrographolide), ดีออกซีแอนโดกราโฟไลด์ (deoxyandrographolide) และ 14-ดีออกซี-

11,12-ไดดีไฮโดรแอนโดรกราโฟไลด์ (14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide) โครงสร้างแสดงดังภาพที่ 3 ประมาณ 5.9% รองลงมาคือใบ 3.7% และลำต้น 1% ตามข้อกำหนดของเภสัชตำรับสมุนไพรเล่มที่ 1 (Thai Herbal Pharmacopoeia) กำหนดให้วัตถุดิบฟ้าทะลายโจรที่ใช้เป็นยามีปริมาณเลกโตนรวมไม่น้อยกว่า 6% โดยคำนวณเป็น แอนโดรกราโฟไลด์ ใช้เฉพาะใบหรือทั้งต้นบนดิน เป็นยาแก้เจ็บคอ แก้ท้องเสีย แก้ไข้ หรือเป็นยาขมเจริญอาหาร นอกจากนี้ยังมีการวิจัยเกี่ยวกับฟ้าทะลายโจรว่าให้ผลการป้องกันและบรรเทาอาการหวัด โดยการให้ผู้ป่วยรับประทานยาเม็ดฟ้าทะลายโจรขนาด 200 มก./วัน ติดต่อกัน 3 เดือน พบว่าสามารถป้องกันการเกิดหวัดได้ถึง 33% โดยมีอัตราการเป็นหวัด เหลือเพียง 20% เมื่อรับประทานในขนาด 3-6 มก./วัน นาน 7 วัน ทำให้อาการไข้และเจ็บคอลดลง ซึ่งไม่ต่างจากการใช้ยาพาราเซตามอล



ภาพที่ 2.3 โครงสร้างโมเลกุลของแอนโดรกราโฟไลด์และอนุพันธ์

2.7 สารสมุนไพรไทยบางชนิดที่สนใจ

สารประกอบที่พบตามธรรมชาติในพืชหลายชนิด เช่น ผัก ผลไม้ เครื่องเทศ สมุนไพร ถั่วเมล็ดแห้ง เมล็ดธัญพืช ซึ่งถูกสร้างขึ้นเพื่อประโยชน์ในการเจริญเติบโต เช่น สารประกอบฟีนอล และสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ เป็นต้น

สารประกอบฟีนอลมีสรรพคุณที่ดีต่อสุขภาพคือ มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลิสระ (antioxidant) สามารถละลายได้ในน้ำสารประกอบฟีนอล มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนที่เป็นอนุพันธ์ของวงแหวนเบนซิน มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH group) อย่างน้อยหนึ่งหมู่ต่ออยู่สารประกอบ

ฟีนอลพื้นฐาน คือ สารฟีนอล (phenol) ในโมเลกุลประกอบด้วยวงแหวนเบนซิน 1 วง และหมู่ไฮดรอกซิล 1 หมู่ สารประกอบฟีนอลที่พบในธรรมชาติมีมากมายหลายชนิด และมีลักษณะสูตรโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกัน ตั้งแต่กลุ่มที่มีโครงสร้างอย่างง่าย เช่น กรดฟีนอลิก (phenolic acids) ไปจนถึงกลุ่มที่มีโครงสร้างเป็นพอลิเมอร์ เช่น ลิกนิน (lignin) กลุ่มใหญ่ที่สุดที่พบคือ สารประกอบพวกฟลาโวนอยด์ (flavonoid) สารประกอบฟีนอลที่พบในพืชมักจะรวมอยู่ในโมเลกุลของน้ำตาลในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ (glycoside) น้ำตาลชนิดที่พบมากที่สุดในโมเลกุลของสารประกอบฟีนอล คือ น้ำตาลกลูโคส (glucose) และพบว่าอาจมีการรวมตัวกันระหว่างสารประกอบฟีนอลด้วยกันเอง หรือสารประกอบฟีนอลกับสารประกอบอื่นๆ เช่น กรดอินทรีย์ (organic acid) รวมอยู่ในโมเลกุลของโปรตีน แอลคาลอยด์ (alkaloid) และเทอร์พีนอยด์ (terpenoid) เป็นต้น

ตัวอย่างของสารประกอบฟีนอลที่พบตามธรรมชาติในพืช

- จินเจอรอล (gingerol) พบใน ขิง
- ยูจินอล (eugenol) ใน กานพลู ตะไคร้ ใบกระเพรา
- แคปไซซิน (capsaicin) ในพริก
- เคอคิวมิน (Curcumin) ในขมิ้น
- แคทีชิน (catechin) ในชา

ฟลาโวนอยด์เป็นสารประกอบฟีนอล (phenolic compounds) ประเภทพอลิฟีนอล (polyphenol) มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนแอโรมาติก (aromatic ring) ที่มีจำนวนหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) รวมอยู่ในโมเลกุล ตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป สามารถละลายในน้ำได้ ส่วนใหญ่มักพบอยู่รวมกับน้ำตาล ในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ (glycoside) สารประกอบ flavonoids ได้แก่ flavonol, flavonone, flavone, isoflavone, flavonol catechin และ anthocyanins

- naringin เป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่ให้รสขมในเปลือกของผลไม้พืชตระกูลส้ม (citrus fruit)
- catechin พบในใชชาพบมากในชาเขียว

สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ จัดเป็น nutraceutical มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) โดยทำหน้าที่ในการหน่วงเหนี่ยวหรือเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) จึงช่วยหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระได้แหล่งของอาหารที่พบฟลาโวนอยด์มาก ได้แก่ พืช ผัก และผลไม้ เช่น ยอ ถั่วเหลือง กระชายดำ สารสกัดจากเมล็ดองุ่น รวมทั้งเครื่องดื่มต่างๆ เช่น ชา และไวน์ เป็นต้น

2.8 งานวิจัยที่สำคัญและเกี่ยวข้องกับนิวรามินิเดส

Rungrotmongkol, 2011 (Thanyada Rungrotmongkol, 2011) รายงานว่าการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก H5N1 ในหลายประเทศ ทำให้เกิดความตื่นตัวในการศึกษา ค้นหาและพัฒนายาตัวใหม่อย่างกว้างขวางทั้งในประเทศและต่างประเทศ เพื่อค้นหายาที่มีประสิทธิภาพที่สามารถออกฤทธิ์ได้ดีกับทั้งไวรัสสายพันธ์ปกติและสายพันธ์กลายพันธ์ และได้ศึกษาโดยการสร้างแบบจำลองของโครงสร้างสามมิติของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างยาทามิฟลูและ โปรตีนนิวรามินิเดสของไวรัสไข้หวัดนก โดยใช้ระเบียบวิธีการคำนวณเชิงโมเลคิวร์ลาไดนามิกซิมุเลชัน พบว่ายาทามิฟลูสามารถเข้าจับกับนิวรามินิเดส N1 ตรงบริเวณ binding site ได้อย่างเหมาะสม และจับได้ดีกว่าเอนไซม์นิวรามินิเดส N1 ของไวรัส H5N1 เล็กน้อย ส่วนไวรัสที่เกิดการกลายพันธ์ที่ตำแหน่ง H274Y ของเอนไซม์นิวรามินิเดสจะส่งผลให้ขนาดของ binding site ของยาทามิฟลูลดลงอย่างมาก ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการดื้อยา แต่การกลายพันธ์ที่ตำแหน่ง H294Y พบว่าการดื้อยาทามิฟลูไม่รุนแรงนัก เนื่องจากขนาดของ binding site มีขนาดค่อนข้างเท่าเดิม

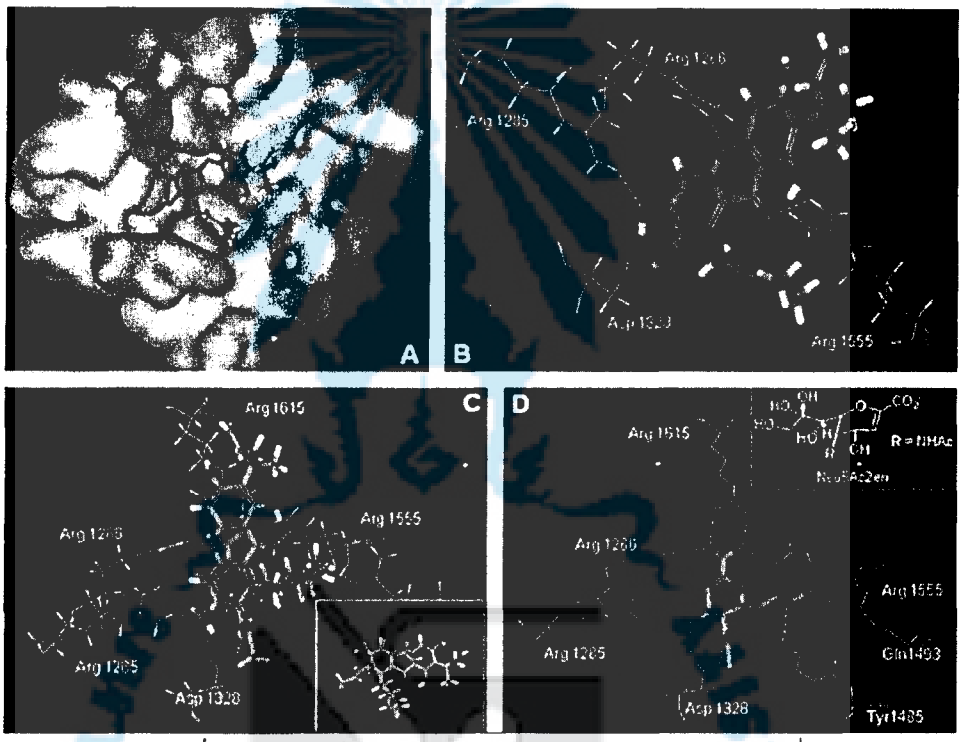
Singh, et al., 2013 (Singh, Gogoi, Bezbaruah, Bordoloi, & Barua, 2013) ได้ทำการศึกษาและเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการจับกันของโปรตีนนิวรามินิเดสกับยาซานามิเวียร์และสารประกอบซิงค์ ได้แก่ ZINC01696606, ZINC05069324 และ ZINC02468939 ด้วยวิธีการโมเลกุลาร์ด็อกกิ้ง ผลการทดลองผลพบว่าโมเลกุล ZINC01696606, ZINC05069324 และ ZINC02468939 สามารถจับกับโปรตีนนิวรมินิเดส ได้ดีกว่าซานามิเวียร์

ตารางที่ 2.1 ประสิทธิภาพในการจับกันของโปรตีนนิวรามินิเดสกับยาซานามิเวียร์ และสารประกอบซิงค์

Docking score for the top three ZINC compounds.				
SN	Ligand	MolDock score	Rerank score	H-Bond
1	ZINC01696606	-123.58	-99.44	-18.96
2	ZINC05069324	-113.25	-93.11	-10.53
3	ZINC02468939	-113.14	-89.28	-13.95
4	Zanamivir	-108.90	-84.33	-27.09

Ryu, Y. B., et al., 2009 (Ryu et al., 2009) ได้ทำการศึกษาทางจลศาสตร์ของสาร 8 ตัวของอนุพันธ์แซนโทนที่สกัดได้จาก *C. tricuspidata* ได้แก่ (1) Macluraxanthone, (2) Cudraxanthone L, (3) 1,3,7-trihydroxy-4-(1,1-dimethyl-2-propenyl)-5,6-(2,2-

dimethylchromeno) xanthone, (4) Cudratricusxanthone F, (5) Cudraxanthone D, (6) Cudraxanthone M และ (8) 1,3,6,7-tetrahydroxy-2-(3-methylbut-2-enyl)-8-(2-methylbut-3-en-2-yl)-9*H*-xanthen-9-one พบว่าสารที่สามารถยับยั้งการทำงานของนิวรามินิเดสได้ดีที่สุดคือสารสกัดตัวที่ 8 และได้ทำการศึกษาระดับโมเลกุลของสารตัวที่ 8 โดยใช้วิธีการคำนวณ CDOCKER พบว่าเกิดพันธะไฮโดรเจนที่ตำแหน่ง Arg1266, Arg1285, Arg1555 และ Asp1328 ดังภาพที่ 2.4



ภาพที่ 2.4 ผลการคำนวณด้วย CDOCKER ของสารสกัดตัวที่ 8

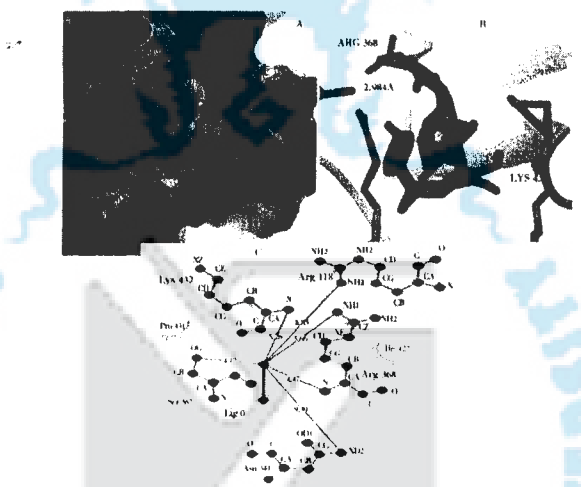
Cho, W.Y.,et al., 2013 (Choi et al., 2013) ได้ทำการศึกษาเพื่อตรวจสอบผลกระทบของนิวรามินิเดส (NA) จากการกลายพันธุ์ ของฟีโนไทป์ของตัวยับยั้งนิวรามินิเดสที่ต้านทานโรคไข้หวัดใหญ่ H1N1 ไวรัสที่แยกได้ในเกาหลีใต้ ในช่วงปี 2008-2009 เมื่อพิจารณาถึงผลกระทบของการกลายพันธุ์ในโปรตีนนิวรามินิเดสที่ต้านทานต่อ Nais เป็นสิ่งสำคัญในการตรวจสอบการความเป็นไปได้ที่เกิดขึ้นและการแพร่ของสายพันธุ์ดื้อยาในประชากรมนุษย์ เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่โปรตีนนิวรามินิเดส เช่นเดียวกับการพัฒนา Nais

Malaisree, M., et.al., 2008 (T. R. Maturos Malaisree, Panita Decha, Pathumwadee Intharathep, Ornjira Aruksakunwong, Supot Hannongbua, 2008), 2009 (T. R. Maturos Malaisree, Nadtanet Nunthaboot, Ornjira Aruksakunwong,

Pathumwadee Intharathep, Panita Decha, Pornthep Sompornpisut, Supot Hannongbua, 2009), 2010 (Malaisree, 2010) ได้ใช้วิธีจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล ศึกษาสารประกอบเชิงซ้อนของยาต้านไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่ใช้ในปัจจุบัน 3 ชนิดคือ โอเซลทามิเวียร์ ซานามิเวียร์และพีรามิเวียร์ กับ N1 โดยใช้เทคนิคต่างๆ ทางเคมีคอมพิวเตอร์ ในการศึกษาสมบัติทางโครงสร้าง อันตรกิริยาระหว่างยากับเป้าหมายและพลังงานเสรีการยึดจับของสารยับยั้งนิวรามินิเดส พบว่าหมู่คาร์บอกซิลิกและกัวนิดิเนียมของพีรามิเวียร์สร้างพันธะไฮโดรเจนกับ กรดอะมิโนรอบข้างได้มากกว่ายาชนิดอื่นโดยเฉพาะกับกรดอะมิโน D151 ซึ่งอยู่ตรงช่วงลูบที่ 150 ส่วนสายโซ่ขนาดใหญ่ของยาทั้งสามชนิด พบพันธะไฮโดรเจนที่หมู่ไฮโดรฟิลิกของซานามิเวียร์เท่านั้น ส่วนหมู่ไฮโดรโฟบิกของโอเซลทามิเวียร์ พบว่าบริเวณเร่งมีขนาดใหญ่เกินไปจึงนำไปสู่ประสิทธิภาพที่ลดลงของยาต่อ N1 ส่วนการกลายพันธุ์ที่ H274Y พบว่าสาเหตุของการดื้อยาโอเซลทามิเวียร์เกิดจากโพรงไฮโดรโฟบิกมีขนาดเล็กลง ทำให้พลังงานเสรีการยึดจับลดลงจาก -14.6 ± 4.3 เป็น -9.9 ± 6.4 Kcal/mol ส่วนการกลายพันธุ์ที่เป็นไปได้ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ปี 2009 ที่ R292K, E119V, H274Y และ N294S การลดประสิทธิภาพยาเกิดจากการลดลงของอันตรกิริยาของยากับ N1 อันได้แก่พันธะไฮโดรเจน แรงระหว่างประจุ และแรงแวนเดอร์วาลส์ นอกจากนี้ได้ใช้ วิธีการจำลองทาง QM/MM และ MD ศึกษากลไกขั้นแรกของปฏิกิริยาการตัดซับสเตรตของมนุษย์ กับนิวรามินิเดส สายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ N1-1918, N1-2005, N1-2009, N2-1967 และ N8-1963 พบว่า สายพันธ์ N1 และ N2 เท่านั้นที่สามารถเปลี่ยนรูปร่างของซับสเตรตจากรูปแชร์เป็นรูปทวิตโบต ซึ่งถูกทำให้เสถียรด้วย N/Q347 และ K431 ในขั้นตอนสุดท้ายได้พัฒนาวิธีใหม่ในการทำนายการยึดจับชื่อว่า Water-swap reaction coordinate (WSRC) โดยพลังงานเสรีสมบูรณ์ของการยึดจับ คำนวณได้จากการเปลี่ยนแปลงพลังงานเสรีของการเปลี่ยนกลุ่มของน้ำกับลิแกนด์ในบริเวณเร่งของโปรตีน พบว่าผลที่ได้สอดคล้องกับค่าการทดลอง ดังนั้น WSRC จึงเป็นแนวทางใหม่ในการทำนายการยึดจับของโปรตีนกับลิแกนด์ ซึ่งสามารถนำไปเป็นเครื่องมือสำคัญในกระบวนการพัฒนายา

Samson, M., et al., 2013 (Samson, Pizzorno, Abed, & Boivin, 2013) ได้ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ทางเภสัชและข้อบ่งชี้ทางคลินิกของตัวยับยั้งนิวรามินิเดส (NAIs) เนื่องจากมีการดื้อยาต้านไวรัส ซานามิเวียร์ และโอเซลทามิเวียร์ ที่ได้รับการอนุมัติสำหรับใช้ในการรักษาและป้องกันการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ ในการยับยั้งการทำงานของนิวรามินิเดส (NAIS) นอกจากนี้ยังมีความจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับความแตกต่างกันของสารต้านไข้หวัดใหญ่ ซึ่งอาจเป็นประโยชน์ต่อการลดอัตราการดื้อยาในผู้ป่วยที่ติดเชื้ออย่างรุนแรง จึงมีความจำเป็นในการพัฒนาประสิทธิภาพของยาต้านไวรัสใหม่ๆ รวมถึงสารที่มีฤทธิ์ในการต้านการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่

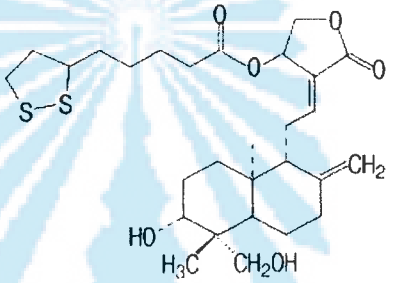
Seniya, et al.,2014 (Seniya, Shrivastava, Singh, & Khan, 2014) ได้ศึกษาความสามารถของสารแอนโดรกราโฟไลด์และอนุพันธ์ ในการยับยั้งการทำงานของนิวรามินิเดสของไข้หวัดหมู H1N1 ด้วยวิธีทางคอมพิวเตอร์ พบว่าสารแอนโดรกราโฟไลด์มีค่า binging energy สูงสุดเท่ากับ -10.88 Kcal/mol, เกิดพันธะไฮโดรเจน 3 ตำแหน่ง ได้แก่ Arg152, Lys150, และ Gly197 (ภาพที่ 6) และมีพลังงานระหว่างโมเลกุลรวมเท่ากับ -12.07 Kcal/mol เมื่อทำการเปรียบเทียบกับยา Oseltamivir และ Zanamivir ที่ได้รับการอนุมัติจากองค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกา ที่เกิดพันธะไฮโดรเจน 2 และ 4 ตำแหน่งที่ และมีค่า binding energies เท่ากับ -6.28 Kcal/mol และ -7.73Kcal/mol ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่า แอนโดรกราโฟไลด์ จากงานวิจัยสามารถสรุปได้ว่าแอนโดรกราโฟไลด์ มีศักยภาพในการยับยั้งการทำงานของนิวรามินิเดสของไข้หวัดหมู H1N1 และอาจจะใช้เป็นยาสมุนไพรทางเลือกสำหรับผู้ป่วยไข้หวัดหมูในเชิงบวก ด้วยความสามารถในการต้านไวรัสที่มีประสิทธิภาพและอาจได้รับการประเมินผลต่อไปเพื่อใช้ในการรักษาโรคไข้หวัดใหญ่ ผลแสดงดังภาพที่ 6



ภาพที่ 2.5 อันตรกิริยาของสารแอนโดรกราโฟไลด์และอนุพันธุ์กับนิวรามินิเดสของไข้หวัด H1N1

Caceres et al., 1997 (Cáceres DD, 1997) รายงานว่าฟ้าทะลายโจรให้ผลในการป้องกันหวัดและบรรเทาอาการหวัด การศึกษาในนักเรียนโตในช่วงฤดูหนาว ให้กินยาเม็ดฟ้าทะลายโจรแห้ง ขนาด 200 มก./วัน ในเดือนแรกของการทดลองยังไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่กินยาและกลุ่มควบคุม หลังจาก 3 เดือนของการทดลอง อุบัติการณ์การเป็นหวัดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม อัตราการเป็นหวัดในกลุ่มที่ได้รับฟ้าทะลายโจรเท่ากับ 20% ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีอัตราการเป็นหวัดเท่ากับ 62%

Chen, et. al., 2009 (Chen JX, 2009) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านไวรัส influenza ของสารแอนโดรกราโฟไลด์ และอนุพันธ์ ทั้งในสัตว์ทดลอง (vivo) และในหลอดทดลอง (vitro) เมื่อให้หนูที่ติดเชื้อไวรัส ชนิด H9N1 H5N1 และ N1N1 กินสารอนุพันธ์ ของแอนโดรกราโฟไลด์ ที่ชื่อว่า AL-1 (โครงสร้างดังภาพที่ 7) พบว่าลดอัตราการตายของ รวมถึงการติดเชื้อในปอดของหนูได้ ค่า LD_{50} ของสาร AL-1 เท่ากับ 1243 mg/kg/d จากงานวิจัยนี้สรุปได้ว่า สาร AL-1 สามารถยับยั้งการทำงานของฮีแมกกลูตินินที่ บริเวณ receptor binding ได้



ภาพที่ 2.6 โครงสร้าง AL-1

Kongsune, et. al., 2 015 (Kongsune, Malee, & Doloh, 2015) ได้ศึกษาประสิทธิภาพการยึดจับระหว่างโปรตีนฮีแมกกลูตินินของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธ์ H1N1 กับสารแอนโดรกราโฟไลด์และอนุพันธ์ที่พบในฟ้าทะลายโจร ด้วยวิธีโมเลกุลาร์ด็อกกิ้ง ผลการคำนวณพบว่าตัวยับยั้ง 1,4-deoxy andrographolide_1 สามารถจับกับโปรตีนฮีแมกกลูตินินได้ดีที่สุด ดังนั้นจึงเลือกสารดังกล่าวมาทำการศึกษาด้วยระเบียบวิธีโมเลกุลาร์ไดนามิกส์ซิมุเลชัน โดยพบว่าตัวยับยั้ง 1,4-deoxy andrographolide_1 สามารถเกิดพันธะกับกรดอะมิโน Y95, H183, D190, E227 และ G228 ของโปรตีนฮีแมกกลูตินิน และพบว่าพลังงานยึดจับระหว่างสารดังกล่าวเท่ากับ -72.33 kcal/mol แสดงให้เห็นว่าการยึดจับมีความแข็งแรงเป็นการยืนยันว่าตัวยับยั้ง 1,4-deoxy andrographolide_1 มีโอกาสที่จะพัฒนาเป็นยาเพื่อยับยั้งการทำงานของโปรตีนฮีแมกกลูตินินได้

Toviwek, 2013 (Toviwek, 2013) ได้ศึกษาระดับโมเลกุลเพื่อเปรียบเทียบโครงสร้างและพลังงานยึดจับของระบบ Human(H1)-S23G และ Human(H1)-S26G ด้วยระเบียบวิธีโมเลกุลาร์ไดนามิกส์ซิมุเลชัน จากการศึกษาพบว่ามุมทอร์ชันของระบบ Human(H1)-S26G จะเกิด 1 conformation ซึ่งเป็น cis conformation ในขณะที่ระบบ Human(H1)-S23G จะเกิด 2 conformation โดยในช่วงแรกเป็น trans เมื่อเวลาผ่านไป พยายามปรับให้เป็น cis conformation พันธะไฮโดรเจนของระบบ Human(H1)-S23G เกิดน้อยกว่าของระบบ Human(H1)-S26G โดยพนธะไฮโดรเจนของโมเลกุล SIA ของระบบ Human(H1)-S23G กับกรดอะมิโน K142 และ G225

ของเอนไซม์ HA หายไปเมื่อเทียบกับระบบ Human(H1)-S26G รวมถึงพันธะไฮโดรเจนของโมเลกุล GAL ของระบบ Human(H1)-S23G กับกรดอะมิโน D222 ในขณะที่ระบบ Human(H1)-S26G เกิดถึง 6 พันธะ ซึ่งจากผลการคำนวณที่พบนี้สามารถสรุปได้ว่าฮีแมกกลูตินิน H1 ยึดเกาะกับตัวรับแบบ S26G ได้ดีกว่าตัวรับแบบ S23G ยืนยันผลสรุปนี้ด้วยค่าพลังงานยึดจับ ($\Delta G_{binding}$) ของ Human(H1)-S26G จะมีพลังงานที่ต่ำกว่าระบบ Human(H1)-S23G ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการยึดจับระหว่างฮีแมกกลูตินินกับตัวรับแบบ S26G แข็งแรงกว่าตัวรับแบบ S23G

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

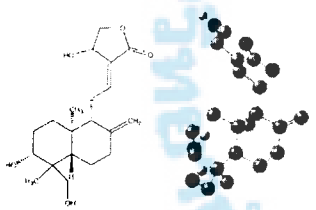
1. เครื่องคอมพิวเตอร์
2. โปรแกรมสำเร็จรูปทางเคมี ได้แก่ Hyperchem, Chemwebleb, MGL tool, Autodock Program, AMBER10 และ discovery studio 2.5
3. เครื่องคอมพิวเตอร์แม่ข่าย มหาวิทยาลัยทักษิณ
4. เครื่องคอมพิวเตอร์แม่ข่าย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
5. อินเตอร์เน็ต

3.2 วิธีการดำเนินการวิจัย

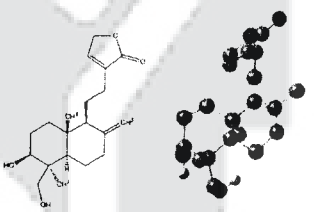
3.2.1 เตรียมไฟล์โครงสร้างสามมิติของโปรตีนนิวรามินิเดส

โครงสร้างสามมิติของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง NA กับ OTV ดาวน์โหลดจากเว็บไซต์ RCSB Protein Data Bank โดยใช้ PDB ID คือ 2HU4 (WT) และเตรียมโครงสร้างสามมิติของ NA ที่มีการกลายพันธุ์โดยเปลี่ยนตำแหน่งกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง H274 เป็น Y274 (H274Y) และตำแหน่ง R292 เป็น K292 (R292K) ด้วยโปรแกรม Swiss PDB Viewer (Guex & Peitsch, 1997)

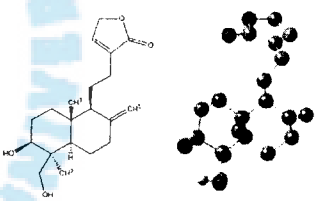
เตรียมไฟล์โครงสร้างสามมิติของสาร AGD และสารจากสมุนไพรไทยบางชนิดที่สนใจดังแสดงใน ภาพที่ 3.1



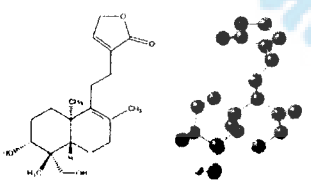
Andrographolide (1)



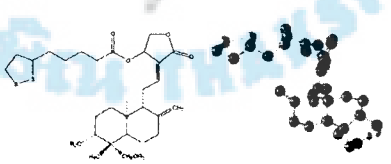
1,4-deoxy Andrographolide_1 (2)



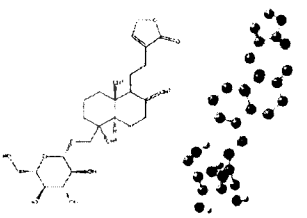
1,4-deoxy Andrographolide_2 (3)



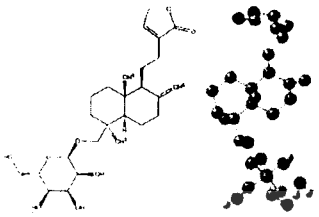
1,4-deoxy Andrographolide_3 (4)



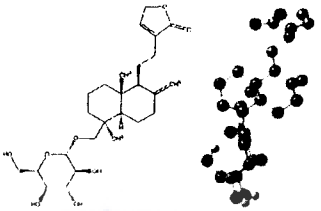
14-alpha-lipoly andrographolide (5)



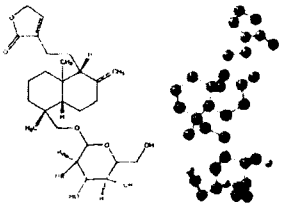
Neoandrographolide_1 (6)



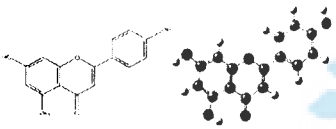
Neoandrographolide_2 (7)



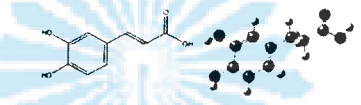
Neoandrographolide_3 (8)



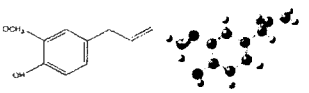
Neoandrographolide_4 (9)



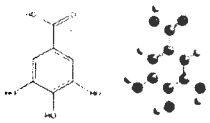
Apigenin (10)



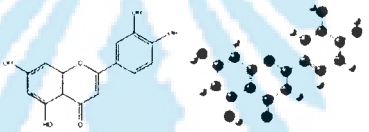
Caffeic acid (11)



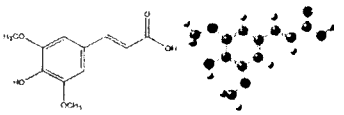
Eugenol (12)



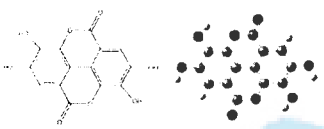
Gallic acid (13)



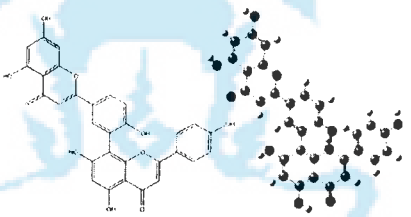
Luteolin (14)



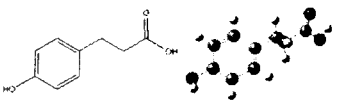
Sinapic acid (15)



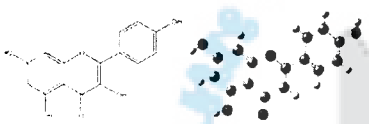
Ellagic acid (16)



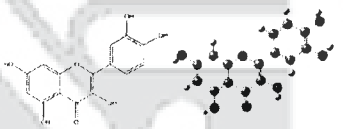
Amentoflavone (17)



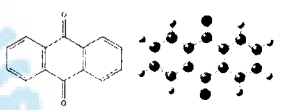
Phloretic acid (18)



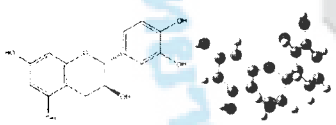
Kaempferol (19)



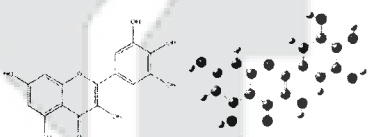
Quercetin (20)



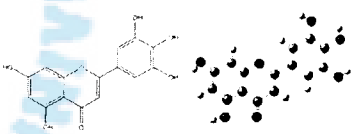
Anthraquinone (21)



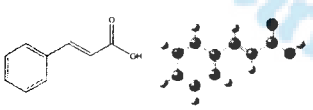
Catechin (22)



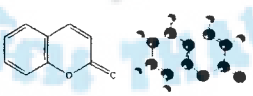
Myricetin (23)



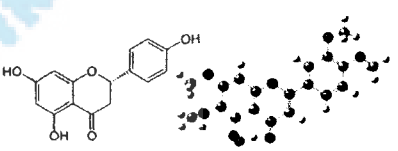
Tricetin (24)



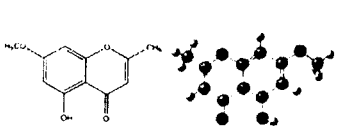
Cinnamaldehyde (25)



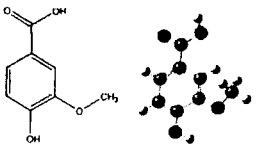
Coumarin (26)



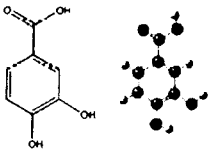
Naringenin (27)



Eugenin (28)



Vanillin (29)



Protocatechuic Acid (30)

ภาพที่ 3.1 แสดงโครงสร้างสองมิติและสามมิติของสาร AGD และสารสมุนไพรไทยบางชนิดที่สนใจ

3.2.2 โมเลคิวลาร์ด็อกกิ้งระหว่างโปรตีนนิวรามินิเดสกับสาร AGD และสารสมุนไพรไทยที่สนใจ

กำหนดตำแหน่งกึ่งกลางของ binding site ของแกน x, y และ z โดยใช้ตำแหน่งกึ่งกลางของโมเลกุลตัวรับ OTV เป็น -0.0030, 81.8690 และ 108.9590 ตามลำดับ จากนั้นทำการเติมประจุและ solvation term ให้กับโปรตีนด้วยโปรแกรม AutoDockTool (Morris et al., 2009) กำหนดขอบเขตของ Grid box เท่ากับ 50x50x50 เพื่อกำหนดขอบเขตในการคำนวณค่า binding energy โดยที่สารยับยั้งที่สนใจจะไม่สามารถเคลื่อนออกนอกกล่องนี้ได้ เมื่อสารยับยั้งถูกเคลื่อนไปแต่ละตำแหน่ง ก็จะมีการคำนวณค่าพลังงานระหว่างสารยับยั้งกับโปรตีนทุกครั้ง ทำการคำนวณ docking เพื่อหาตำแหน่งที่เหมาะสมในการจับตัวกันของโมเลกุลทั้งสองและรูปร่างโมเลกุลที่เหมาะสมที่สุดในการจับตัวกันของโมเลกุลทั้งสอง ในการทดลองครั้งนี้จะสั่ง ga_run ทั้งหมด 100 รัน โดยโปรแกรม AutoDock (Morris et al., 2009) และโปรแกรมจะทำการจัดโครงสร้างของลิแกนด์ ที่อยู่ในลักษณะเดียวกันให้อยู่ในกลุ่ม (Cluster) เดียวกันโดยใช้ค่าทางสถิติ (RMSD) เป็นเกณฑ์ในการจัดกลุ่ม

บทที่ 4
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 อันตรกิริกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (WT)

การทำโมเลกุลาร์ด็อกกิ้งเป็นการศึกษาการออกแบบโมเลกุลยาโดยคำนึงถึงรูปแบบการยึดจับระหว่างโปรตีนกับลิแกนด์ โดยพิจราณาจากค่าพลังงานในการยึดจับ (Binding Energy) ถ้าพลังงานในการยึดจับมีค่าเป็นลบแสดงว่าการยึดจับระหว่าง 2 โมเลกุลสามารถจับกันได้ดี และจะต้องพิจารณาควบคู่ไปกับความแข็งแรงของการเกิดพันธะไฮโดรเจน โดยพิจารณาได้จากความยาวพันธะและมุมพันธะระหว่างตัวให้กับตัวรับโปรตอน (Kongsune et al., 2015) ผลจากการศึกษาโมเลกุลาร์ด็อกกิ้งพบว่าพลังงานการยึดจับระหว่างยา OTV กับ NA สายพันธุ์ดั้งเดิมมีค่าเท่ากับ -6.99 kcal/mol (ตารางที่ 4.1) โดยเกิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโนของ N1 ดังต่อไปนี้ E119, D151, R292, Y347, R371 และ R371 (ตารางที่ 4.2) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Wang S-Q. (Wang, Cheng, Dong, Wang, & Chou, 2010) ซึ่งมีพลังงานการยึดจับระหว่างยา OTV กับ NA สายพันธุ์ดั้งเดิมเท่ากับ -6.92 kcal/mol และ Rungrotmongkol T. (Thanyada Rungrotmongkol, Frecer, De-Eknamkul, Hannongbua, & Miertus, 2009) รายงานว่ากรดอะมิโนดังกล่าวนี้เป็น key residues ในตำแหน่งยึดจับ

ตารางที่ 4.1 แสดงพลังงานในการยึดจับและ % conformational cluster ของ OTV กับ N1 ทั้ง 3 สายพันธุ์

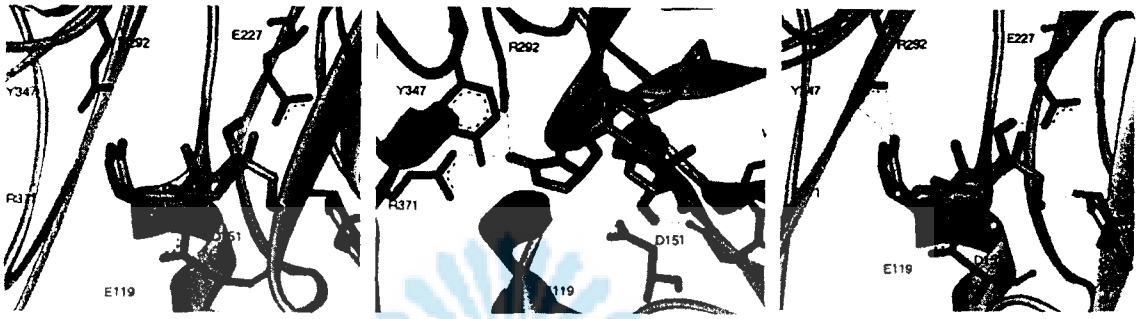
	WT		H274Y		R292K	
ligand	Binding energy (kcal/mol)	Num in Clus	Binding energy (kcal/mol)	Num in Clus	Binding energy (kcal/mol)	Num in Clus
OTV	-6.96	100	-6.99	100	-6.57	100

จากที่กล่าวมาแล้วข้างต้นว่าถ้าพลังงานในการยึดจับมีค่าเป็นลบแสดงว่าการยึดจับระหว่าง 2 โมเลกุลสามารถจับกันได้ดีซึ่งเมื่อเปรียบเทียบพลังงานยึดจับระหว่าง OTV กับ N1 และสาร AGD และสารสมุนไพรไทยบางชนิดที่สนใจกับ N1 พบว่าสารที่ 1, 2, 4, 5, 7, 8, 9 และ 17 มีพลังงานยึดจับต่ำกว่า OTV โดยสารตัวที่ 17 มีพลังงานในการยึดจับต่ำที่สุดเท่ากับ -8.97 kcal/mol

รองลงมาเป็น 5, 2, 7, 8, 1, 9 และ 4 มีพลังงานในการยึดจับเท่ากับ -8.40, -7.95, -7.57, -7.13,-7.38, -7.23 และ -7.14 kcal/mol ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3) แสดงว่าสารดังกล่าวยึดจับกับ N1 ได้ดีกว่ายา OTV อย่างไรก็ตามในการพิจารณาสารยับยั้งการทำงานของ NA ได้ดีหรือไม่นั้นจะพิจารณาจากพลังงานเพียงอย่างเดียวไม่ได้ต้องพิจารณาว่าเกิดอันตรกิริยากับกรดอะมิโนที่สำคัญในตำแหน่งยึดจับด้วยหรือไม่ (E119, D151, R292, R292, Y347, R371 และ R371) ซึ่งจากข้อมูลของการเกิดพันธะไฮโดรเจนของสายพันธุ์ดั้งเดิมพบว่า สารที่ 1, 5 และ 9 เกิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโนที่สำคัญใกล้เคียงกับยา OTV ดังแสดงในภาพที่ 4.1 ซึ่งจากผลการคำนวณสามารถสรุปได้ว่าสารที่ 1, 5 และ 9 มีโอกาสพัฒนาไปเป็นสารยับยั้งโปรตีน NA ของไข้หวัดใหญ่ 2009 H1N1

ตารางที่ 4.2 แสดงการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างยา OTV กับ N1 ทั้ง 3 สายพันธุ์

พันธะไฮโดรเจน OTV- WT			**พันธะไฮโดรเจน OTV- H274Y**			**พันธะไฮโดรเจน OTV-R292K**		
กรดอะมิโน	**ความยาวพันธะ (Å)**	**มุมพันธะ (องศา)**	**กรดอะมิโน**	**ความยาวพันธะ (Å)**	**มุมพันธะ (องศา)**	**กรดอะมิโน**	**ความยาวพันธะ (Å)**	**มุมพันธะ (องศา)**
E119	2.80	101.7	E119	2.88	103.7	E119	2.77	110.6
D151	2.73	100.9	D151	2.74	103.8	D151	2.63	111.0
R292	2.95	123.2	R292	2.77	129.8	R152	3.18	167.1
R292	2.64	150.2	Y347	2.87	118.5	K292	2.70	153.8
Y347	3.12	98.7	R371	2.89	101.4	Y347	2.87	100.8
R371	2.98	116.2	R371	2.75	148.6	R371	2.69	100.2
R371	2.76	113.8				R371	2.93	135.6
						R371	2.99	90.4



Andrographolide (1)-WT | 14-alpha-lipoly andrographolide (5)-WT | Neoandrographolide_4 (9)-WT

ภาพที่ 4.1 แสดงการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างสาร AGD สารที่ 1, 5 และ 9 กับ N1 สายพันธุ์ WT

ตารางที่ 4.3 แสดงพลังงานในการยึดจับระหว่างสารสมุนไพรไทยที่สนใจกับ N1 สายพันธุ์ WT

ligand	Binding Energy (kcal/mol)	ligand	Binding Energy (kcal/mol)	ligand	Binding Energy (kcal/mol)
1	-7.38	11	-4.44	21	-6.22
2	-7.95	12	-4.67	22	-6.64
3	-6.88	13	-3.63	23	-6.22
4	-7.14	14	-6.25	24	-6.47
5	-8.10	15	-4.58	25	-4.00
6	-5.89	16	-6.46	26	-5.21
7	-7.57	17	-8.97	27	-6.03
8	-7.43	18	-4.12	28	-5.36
9	-7.23	19	-6.61	29	-3.15
10	-6.31	20	-6.27	30	-3.41

4.2 อันตรกิริของสายพันธุ์กลายพันธุ์ H274Y และ R292K

มีรายงานว่าประสิทธิภาพยา OTV ลดลงเมื่อ N1 เกิดการกลายพันธ์ที่ตำแหน่ง 274 จาก His เป็น Tyr (H274Y) และ ตำแหน่ง 292 จาก Arg เป็น Lys (R292K) โดยค่า IC_{50} ของ OTV-WT, OTV-H274Y และ OTV-R292K เท่ากับ 0.4 ± 0.1 nM, 110 ± 12 nM และ 3200 ± 220 nM ตามลำดับ (Vries et al., 2013) ซึ่งผลจากการทำโมเลกุลาด็อกกิ้งของ OTV สายพันธุ์ดั้งเดิมและสาย

พันธุ์กลายพันธุ์ พบว่ามีพลังงานในการยึดจับ เท่ากับ -6.96, -6.99 และ -6.57 kcal/mol สำหรับระบบ OTV-WT, OTV-H274Y และ OTV-R292K ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1) จะเห็นว่าพลังงานในการยึดจับของระบบ H274Y ไม่ต่างจากระบบ WT มากนัก ในขณะที่ระบบ R292K มีพลังงานต่างจากระบบ WT ค่อนข้างมาก ซึ่งพลังงานการยึดจับของระบบ OTV-R292K ที่สูงกว่าอีกสองระบบเนื่องจากเมื่อกรดอะมิโน Arg ตำแหน่ง 292 กลายพันธุ์เป็น Lys ทำให้พันธะไฮโดรเจนที่เกิดกับ Arg292 จำนวน 2 พันธะที่พบในระบบ OTV-WT และ OTV-H274Y หายไป แต่เกิดพันธะไฮโดรเจนเพียง 1 พันธะ กับ Lys (ตารางที่ 2) ที่ได้กลายพันธุ์ไปถึงแม้กรดอะมิโน Arg กับ Lys เป็นกรดอะมิโนที่มีประจุบวกเหมือนกันแต่ Lys มีจำนวนคาร์บอนในหมู่ R น้อยกว่า Arg ทำให้สายโซ่สั้นกว่า พันธะไฮโดรเจนที่เกิดจึงไม่แข็งแรงเท่ากับของ Arg แสดงให้เห็นว่าการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง R292K มีผลต่อการดื้อยา OTV มากกว่าการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง H274Y ซึ่งสอดคล้องกับค่า IC_{50}จากการทดลอง (Vries et al., 2013)

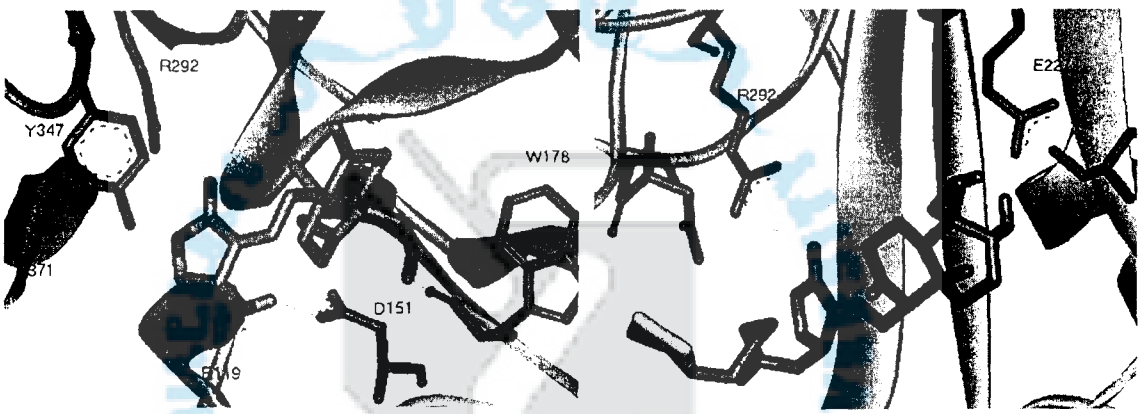
ตารางที่ 4.4 แสดงพลังงานในการยึดจับระหว่างสารสมุนไพรไทยที่สนใจกับ NA สายพันธุ์ H274Y

ligand	Binding Energy (kcal/mol)	ligand	Binding Energy (kcal/mol)	ligand	Binding Energy (kcal/mol)
1	-7.36	11	-4.39	21	-6.29
2	-8.09	12	-4.68	22	-5.86
3	-7.70	13	-3.45	23	-6.23
4	-7.85	14	-6.31	24	-6.52
5	-8.37	15	-4.60	25	-4.00
6	-7.33	16	-6.50	26	-5.21
7	-7.21	17	-9.00	27	-6.04
8	-7.29	18	-4.11	28	-5.38
9	-8.98	19	-6.64	29	-3.15
10	-6.36	20	-6.31	30	-3.40

สำหรับระบบ H274Y สารที่ 17 มีพลังงานในการยึดจับต่ำที่สุดเท่ากับ -9.00 kcal/mol รองลงมาเป็น 9, 5, 2, 4, 3, 1, 6, 8, 7, 19, 24, 16, 10, 14, 20, 21, 23, 27, 22, 28, 26, 12, 15, 11, 18, 25, 13, 30 และ 29 มีพลังงานในการยึดจับเท่ากับ -8.98, -8.37, -8.09, -7.85, -7.70,

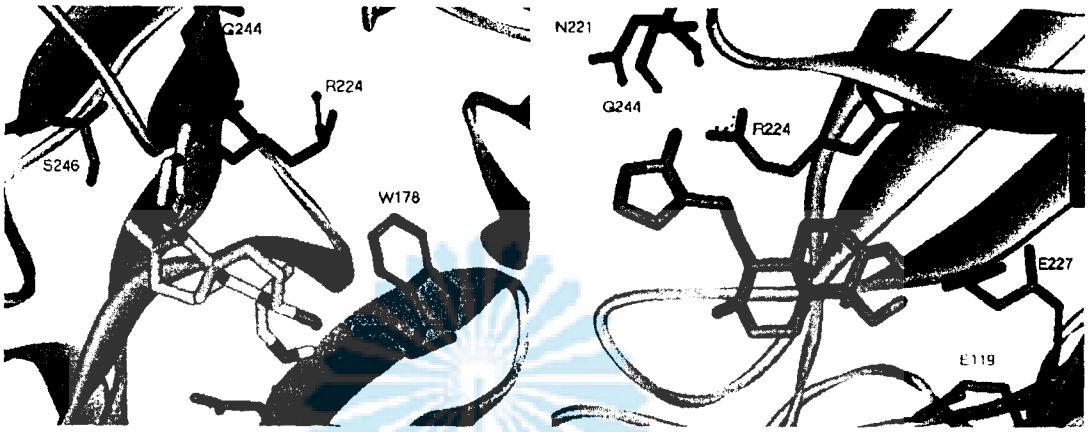
-7.36, -7.33, -7.29, -7.21, -6.64, -6.52, -6.50, -6.36, -6.31, 6.31, -6.29, -6.23, -6.04, -5.86, -5.38, -5.21, -4.68, -4.60, -4.39, -4.11, -4.00, -3.45, -3.40 และ -3.15 kcal/mol ตามลำดับ (ตารางที่ 4.4) แต่เมื่อพิจารณาจากการเกิดพันธะไฮโดรเจนพบว่า พบว่าสารที่ 1 และ 5 เกิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโนของ N1 ใกล้เคียงกับยา OTV โดยเกิดพันธะกับตำแหน่ง R292 ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่สำคัญที่มีผลต่อการดื้อยา OTV และกรดอะมิโนอื่นๆ ที่สำคัญ (ภาพที่ 4.2)

ระบบ R292K สารที่สนใจสารที่ 5 มีพลังงานในการยึดจับต่ำที่สุดเท่ากับ -8.85 kcal/mol รองลงมาเป็น 17, 9, 1, 2, 3, 7, 8, 4, 6, 19, 22, 24, 16, 10, 14, 20, 23, 21, 27, 28, 26, 12, 15, 11, 18, 25, 13, 30 และ 29 มีพลังงานในการยึดจับเท่ากับ -8.80, -8.68, -8.63, -7.74, -7.63, -7.44, -7.32, -7.26, -7.11, -6.55, -6.51, -6.39, -6.29, -6.25, -6.18, -6.14, -6.14, -6.00, -5.84, -5.23, -5.21, -4.66, -4.44, -4.15, -4.00, -3.83, -3.62, -3.34 และ -3.16 kcal/mol ตามลำดับ (ตารางที่ 4.5) แต่เมื่อพิจารณาจากการเกิดพันธะไฮโดรเจนพบว่าสาร AGD สารที่ 2 และ 3 มีการเกิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโนที่สำคัญของ N1 หลายพันธะ และมีพลังงานในการยึดจับค่อนข้างต่ำ (ภาพที่ 4.3)



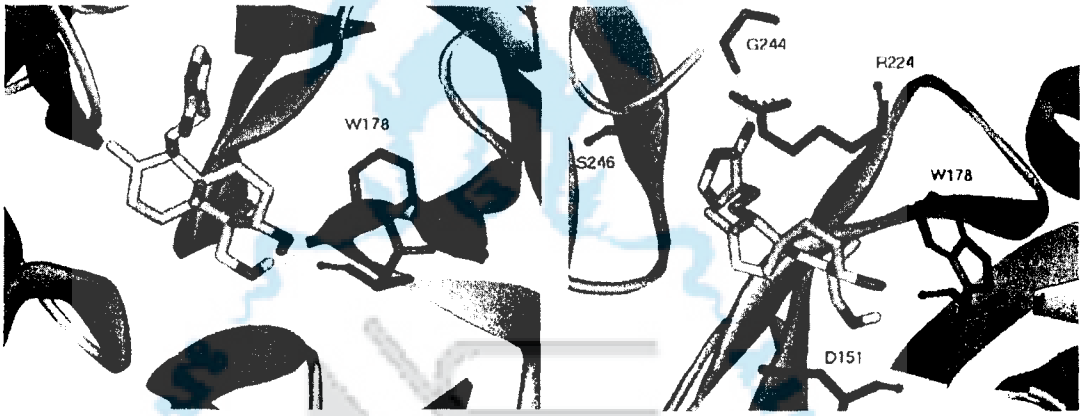
Andrographolide (1)-H274Y 14-alpha-lipoly andrographolide (5)-H274Y

ภาพที่ 4.2 แสดงการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างสาร AGD สารที่ 1 และ 5 กับ N1 สายพันธุ์ H274Y



1,4 – deoxy Andrographolide_1 (2)-R292K 1,4 – deoxy Andrographolide_2 (3)-R292K

ภาพที่ 4.3 แสดงการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างสาร AGD สารที่ 2 และ 3 กับ N1 สายพันธุ์ R292K



1,4 – deoxy Andrographolide_1 (AGD_2)-WT 1,4 – deoxy Andrographolide_1 (AGD_2)-H274Y

ภาพที่ 4.4 แสดงการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างสาร AGD สารที่ 2 กับ N1 สายพันธุ์ WT และ H274Y

จากผลการทำโมเลกุลาร์ด็อกกิ้งพบว่าสำหรับระบบดั้งเดิม สารที่ 1, 5 และ 9 เกิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโนที่สำคัญใกล้เคียงกับยา OTV และระบบ H274Y สารที่ 1 และ 5 เกิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโนที่สำคัญใกล้เคียงกับยา OTV แสดงว่าสาร AGD สารที่ 1 และ 5 มีโอกาสพัฒนาไปเป็นยารักษาโรคไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายพันธุ์ H274Y ได้ อย่างไรก็ตามสาร AGD สารที่ 1 และ 5 ไม่เกิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโนที่สำคัญกับสายพันธุ์กลายพันธุ์ R292K ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีผลต่อการดื้อยาของ OTV ในขณะที่ สาร AGD สารที่ 2 ซึ่งคือสาร 1,4 – deoxy Andrographolide_1 เป็นสารที่มีโอกาสพัฒนาไปเป็นยารักษาโรคไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์

ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายพันธุ์ H274Y และ R292K เนื่องจากถึงแม้มีการกลายพันธุ์ไปแล้วก็ยังยึดจับกับ N1 ได้ดีอยู่คือ มีพลังงานยึดจับกับสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายพันธุ์ H274Y และ R292K เท่ากับ -7.95, -8.09 และ -7.74 kcal/mol ตามลำดับ และเกิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโนที่สำคัญของ N1 อีก 2 สายพันธุ์ได้ดังแสดงในภาพที่ 4.4

ตารางที่ 4.5 แสดงพลังงานในการยึดจับระหว่างสารสมุนไพรไทยที่สนใจกับ NA สายพันธุ์ R292K

ligand	Binding Energy (kcal/mol)	ligand	Binding Energy (kcal/mol)	ligand	Binding Energy (kcal/mol)
1	-8.63	11	-4.15	21	-6.00
2	-7.74	12	-4.66	22	-6.51
3	-7.63	13	-3.62	23	-6.14
4	-7.26	14	-6.18	24	-6.39
5	-8.85	15	-4.44	25	-3.83
6	-7.11	16	-6.29	26	-5.21
7	-7.44	17	-8.80	27	-5.84
8	-7.32	18	-4.00	28	-5.23
9	-8.68	19	-6.55	29	-3.16
10	-6.25	20	-6.14	30	-3.44

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาโมเลกุลาร์ด็อกกิ้งระหว่างโปรตีนนิวรามินิเดส (NA) ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ 2009 H1N1 สายพันธุ์ดั้งเดิม (WT) และสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 274 จาก His เป็น Tyr (H274Y) และตำแหน่ง 292 จาก Arg เป็น Lys (R292K) กับยาโอเซลทามิเวียร์ (OTV) และสารแอนโดรกราโฟไลด์และอนุพันธ์ (AGD) และสารสมุนไพรไทยบางชนิดที่สนใจ ผลการคำนวณของ OTV พบว่าพลังงานในการยึดจับของระบบ H274Y ไม่ต่างจากระบบ WT มากนัก ในขณะที่ระบบ R292K มีพลังงานต่างจากระบบ WT ค่อนข้างมาก เนื่องจากพันธะไฮโดรเจนที่เกิดกับ Arg ตำแหน่ง 292 จำนวน 2 พันธะที่พบในการยึดจับระหว่างยา OTV กับ WT และ H274Y หายไป แต่เกิดพันธะไฮโดรเจนเพียง 1 กับ Lys ที่ได้กลายพันธุ์ไปโดยมีพลังงานในการยึดจับ เท่ากับ -6.96, -6.99 และ -6.57 kcal/mol สำหรับระบบ WT, H274Y และ R292K ตามลำดับ แสดงว่าความสามารถในการยึดจับระว่างยา OTV กับ NA ในระบบ WT ใกล้เคียงกับระบบ H274Y และทั้งสองระบบดีกว่าการยึดจับกับระบบ R292K (OTV-WT ~ OTV-H274Y > OTV-R292K) ซึ่งสอดคล้องกับค่า IC_{50}จากการทดลอง สำหรับผลการคำนวณของสารจากสมุนไพรไทยพบว่า สาร AGD สารที่ 1 และ 5 มีโอกาสพัฒนาไปเป็นยารักษาโรคไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายพันธุ์ H274Y ในขณะที่สาร AGD สารที่ 2 ซึ่งคือสาร 1,1 – deoxy Andrographolide_1 เป็นสารที่มีโอกาสพัฒนาไปเป็นยารักษาโรคไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายพันธุ์ H274Y และ R292K เนื่องจากถึงแม้มีการกลายพันธุ์ไปแล้วก็ยังยึดจับกับ N1 ได้ดีอยู่คือ มีพลังงานยึดจับกับสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายพันธุ์ H274Y และ R292K เท่ากับ -7.95, -8.09 และ -7.74 kcal/mol ตามลำดับ และสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโนที่สำคัญของ N1 อีก 2 สายพันธุ์ได้

บรรณานุกรม

Albiñana, C. B., Machara, A., Řezáčová, P., Pachl, P., Konvalinka, J., & Kožíšek, M. (2016). Kinetic, thermodynamic and structural analysis of tamiphosphor binding to neuraminidase of H1N1 (2009) pandemic influenza. *European Journal of Medicinal Chemistry, 121*, 100-109.

Cáceres DD, H. J., Burgos RA, Wikman GK. (1997). Prevention of common colds with Andrographis paniculata dried extract. A Pilot double blind trial. *Phytomedicine, 4*(2), 101-104.

Chamni, S. (2014). Influenza Virus and Current Anti-influenza Drugs. *Journal of Science and Technology, 22*(2), 258-271.

Chen JX, X. H., Ye WC, Fang BH, Liu YH, Yuan SH, Yu P, Wang YQ. (2009). Activity of andrographolide and its derivatives against influenza virus in vivo and in vitro. *Biol Pharm Bull, 32*(8), 1385-1391.

Choi, W., Shin, J.-Y., Jeong, H.-E., Jeong, M.-J., Kim, S.-J., Lee, J.-Y., & Kang, C. (2013). Generation and Characterization of Recombinant Influenza A(H1N1) Viruses Resistant to Neuraminidase Inhibitors. *Osong Public Health and Research Perspectives, 4*(6), 323-328.

Guex, N., & Peitsch, M. C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis., 18*, 2714-2723.

Kongsune, P., Malee, S., & Doloh, P. (2015). Inhibition of Influenza A Hemagglutinin H1N1 with Andrographolide and Derivatives. *Thaksin.J., 18*(1), 41-48.

Malaisree, M. (2010). *Binding and dynamics of neuraminidase subtype N1 complexed with inhibitors and with substrate by molecular dynamics and QM/MM MD simulations.* (Ph.D.), Chulalongkorn University.

Maturos Malaisree, T. R., Nadtanet Nunthaboot, Ornjira Aruksakunwong, Pathumwadee Intharathep, Panita Decha, Pornthep Sompornpisut, Supot Hannongbua. (2009). Source of oseltamivir resistance in avian influenza H5N1 virus with the H274Y mutation. *Amino Acids, 37*(4), 725–732.

Maturos Malaisree, T. R., Panita Decha, Pathumwadee Intharathep, Ornjira Aruksakunwong, Supot Hannongbua. (2008). Understanding of known drug-target interactions in the catalytic pocket of neuraminidase subtype N1. *Proteins, 71*(4), 1908-1918.

Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexiblity. . *J. Computational Chemistry, 16*, 2785-2791.

Prevention, C. f. D. C. a. (2017). Influenza Type A Viruses. from https://www.cdc.gov/flu/avianflu/influenza-a-virus-subtypes.htm

Rungrotmongkol, T. (2011). Molecular insight into inhibitory activity of oseltamivir and A-315675 against drug-resistant in influenza neuraminidase subtype N1. *The Thailand Research Fund (TRF)*, 1-20.

Rungrotmongkol, T., Frecer, V., De-Eknamkul, W., Hannongbua, S., & Miertus, S. (2009). Design of oseltamivir analogs inhibiting neuraminidase of avian influenza virus H5N1. *Antiviral Research, 82*(1), 51-58.

Rungrotmongkol, T., Malaisree, M., Nunthaboot, N., Sompornpisut, P., & Hannongbua, S. (2010). Molecular prediction of oseltamivir efficiency against probable influenza A (H1N1-2009) mutants: molecular modeling approach. *Amino Acids, 39*, 393–398.

Rungrotmongkol, T., Yotmanee, P., Nunthaboot, N., & Hannongbua, S. (2011). Computational studies of influenza A virus at three important targets: hemagglutinin, neuraminidase and M2 protein. *Current Pharmaceutical Design, 17*(17), 1720-1739.

Ryu, Y. B., Curtis-Long, M. J., Lee, J. W., Kim, J. H., Kim, J. Y., Kang, K. Y., . . . Park, K. H. (2009). Characteristic of neuraminidase inhibitory xanthones from Cudrania tricuspidata. *Bioorganic & Medicinal Chemistry, 17*(7), 2744-2750.

Samson, M., Pizzorno, A., Abed, Y., & Boivin, G. (2013). Influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. *Antiviral Research, 98*(2), 174-185.

Seniya, C., Shrivastava, S., Singh, S. K., & Khan, G. J. (2014). Analyzing the interaction of a herbal compound Andrographolide from Andrographis paniculata as a

folklore against swine flu (H1N1). *Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 4*, S624-S630.

Singh, S. P., Gogoi, D., Bezbaruah, R. L., Bordoloi, M. J., & Barua, N. C. (2013). Virtual screening on potential neuraminidase inhibitors of influenza A virus H1N1. *Drug Invention Today, 5*(3), 241-245.

Takashita, E., Ejima, M., Ogawa, R., Fujisaki, S., Neumann, G., Furuta, Y., . . . Odagiri, T. (2016). Antiviral susceptibility of influenza viruses isolated from patients pre- and post-administration of favipiravir. *Antiviral Research, 132*, 170-177.

Taubenberger, J. K., & Morens, D. M. (2006). 1918 Influenza: The mother of all pandemics. *Emerging Infectious Diseases, 12*(1), 15-22.

Toviwek, B. (2013). Source of the receptor recognition specificity on human influenza A virus: Why hemagglutinin H1 is better bind by S26G than S23G receptor. *Thaksin.J, 16*(3), 102-110.

Vries, E. v. d., Anber, J., Linden, A. v. d., Wu, Y., Maaskant, J., Stadhouders, R., . . . Schutten, M. (2013). Molecular Assays for Quantitative and Qualitative Detection of Influenza Virus and Oseltamivir Resistance Mutations. *The Journal of Molecular Diagnostics, 15*(3), 348-354.

Wang, S.-Q., Cheng, X.-C., Dong, W.-L., Wang, R.-L., & Chou, K.-C. (2010). Three new powerful oseltamivir derivatives for inhibiting the neuraminidase of influenza virus. *Biochemical and Biophysical Research Communications, 401*(2), 188-191.

Weinstock, D. M., & Zuccotti, G. (2009). The Evolution of Influenza Resistance and Treatment. *JAMA, 301*(10), 1066-1069.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ตารางก1 แสดงการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างยา OTV และสารที่สนใจกับ N1 ทั้ง 3 สายพันธุ์

	OTV- WT			OTV- H274Y			OTV- R292K		
ligand	กรดอะมิโน	ความยาวพันธะ (Å)	มุมพันธะ (องศา)	กรดอะมิโน	ความยาวพันธะ (Å)	มุมพันธะ (องศา)	กรดอะมิโน	ความยาวพันธะ (Å)	มุมพันธะ (องศา)
OTV	E119	2.80	101.7	E119	2.88	103.7	E119	2.77	110.6
	D151	2.73	100.9	D151	2.74	103.8	D151	2.63	111.0
	R292	2.95	123.2	R292	2.77	129.8	R152	3.18	167.1
	R292	2.64	150.2	Y347	2.87	118.5	K292	2.70	153.8
	Y347	3.12	98.7	R371	2.89	101.4	Y347	2.87	100.8
	R371	2.98	116.2	R371	2.75	148.6	R371	2.69	100.2
	R371	2.76	113.8				R371	2.93	135.6
							R371	2.99	90.4
1	D151	2.00	146.1	W178	2.08	117.2	W178	2.08	154.8
	W178	2.04	128.0	D151	1.89	144.4	N221	2.19	108.7
	E227	1.81	130.7	E227	1.74	131.7	T225	2.09	176.8
	R292	3.07	106.3	R292	2.72	130.7	G244	1.94	131.1
	R292	2.70	116.1	R292	2.89	123.8	S246	3.16	70.8
2	W178	2.05-H54	106.9	W178	1.94	121.8	W178	1.96	123.3
	W178	2.05-H51	128.1	W178	2.19	168.6	W178	2.01	160.3
				R224	2.63	132.0	R224	2.88	128.5
				R224	2.92	112.7	R224	3.20	128.1
				G244	2.49	129.4	G244	2.51	154.0
							S246	3.19	93.8
3	W178	2.04	167.8	N221	2.80	152.1	R224	2.73	124.3
	W178	1.98	150.6	R224	2.77	118.7	R224	3.07	106.7
	R292	2.69	153.1	E227	1.82	155.2	E227	1.78	158.4
	R292	2.84	129.7	E227	1.88	148.7	E227	1.84	149.9

ภาคผนวก ก (ต่อ)

ligand	OTV- WT			OTV- H274Y			OTV- R292K		
	กรดอะมิโน	ความยาวพันธะ (Å)	มุมพันธะ (องศา)	กรดอะมิโน	ความยาวพันธะ (Å)	มุมพันธะ (องศา)	กรดอะมิโน	ความยาวพันธะ (Å)	มุมพันธะ (องศา)
4	S246	2.05	132.0	W178	2.00	157.7	W178	1.84	151.8
				W178	2.18	143.6	W178	1.99	167.1
				N221	2.96	140.8	N294	2.85	134.6
				R224	2.67	135.5			
				R224	3.17	104.6			
				G244	2.60	113.1			
5	W178	2.06	117.4	W178	2.08	151.5	W178	2.16	138.5
	E227	1.81	133.6	N221	2.28	106.2	T225	2.21	164.1
	R292	3.07	108.8	T225	2.12	162.0	G244	1.74	171.2
	R292	2.71	116.4	G244	1.78	149.5			
6	S246	2.08	138.0	S246	1.81	143.6	W178	2.74	115.1
	S246	1.88	150.5	S246	1.82	139.1	S246	1.82	136.4
	A346	1.93	138.8	A346	2.16	120.7	S246	2.17	111.0
							A346	1.97	144.9
7	W178	1.92	142.2	E227	1.77	166.1	D151	2.04	143.1
	W178	1.95	111.2	S246	1.79	150.0	E227	1.72	160.7
	E227	2.00	133.9	S246	2.76	95.2	E227	1.89	152.1
	N294	2.90	73.7						
	A346	3.14	165.2						
8	S246	2.05	145.8	D151	2.02	158.6	D151	1.77	131.9
	S246	2.06	158.0	D151	2.14	126.4	D151	1.83	145.6
							Y347	1.81	111.3
							Y347	2.07	129.9

ภาคผนวก ก (ต่อ)

ligand	OTV- WT			OTV- H274Y			OTV- R292K		
	กรดอะมิโน	ความยาวพันธะ (Å)	มุมพันธะ (องศา)	กรดอะมิโน	ความยาวพันธะ (Å)	มุมพันธะ (องศา)	กรดอะมิโน	ความยาวพันธะ (Å)	มุมพันธะ (องศา)
9	W178	1.94	141.6	D151	2.15	109.8	E227	1.72	165.0
	W178	2.22	119.0	Y406	1.82	143.6	E227	1.74	172.5
	R292	3.11	111.8	Y406	2.16	152.0	S246	3.10	82.0
	Y347	2.53	101.7	E227	1.64	168.6			
	R371	2.89	164.5	E227	1.74	170.2			
				R292	3.03	111.2			
10	E277	2.08	129.8	E277	2.09	129.7	E277	2.11	131.6
11	R118	2.95	127.1	R118	2.92	124.6	K292	2.86	85.6
	R118	2.80	119.5	R118	2.86	112.5	Y406	2.01	157.2
	R371	2.95	104.9	W178	1.93	147.6			
	Y406	2.07	135.4	W178	1.89	155.8			
				R371	2.98	104.0			
				Y406	2.13	124.5			
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	R152	2.68	115.4	E227	1.79	145.1	R152	2.69	114.0
	W178	2.06	162.8				W178	2.06	107.7
	E227	1.91	119.9				E227	1.91	129.5
	E227	1.74	162.8				E227	1.76	159.7
14	W178	1.86	133.3	W178	1.90	125.1	E227	1.98	145.4
	E277	2.93	146.6	E277	3.19	137.8	E227	3.09	140.2
	E277	1.94	137.7	E277	2.01	146.4			
15	W178	1.92	137.4	W178	1.92	137.6	W178	1.92	152.3
	R292	2.83	111.6	R292	2.78	112.0	K292	2.85	88.1
	Y406	2.00	144.1	Y406	1.98	146.1	Y406	1.85	169.3

ภาคผนวก ก (ต่อ)

ligand	OTV- WT			OTV- H274Y			OTV- R292K		
	กรดอะมิโน	ความยาวพันธะ (Å)	มุมพันธะ (องศา)	กรดอะมิโน	ความยาวพันธะ (Å)	มุมพันธะ (องศา)	กรดอะมิโน	ความยาวพันธะ (Å)	มุมพันธะ (องศา)
16	T225	3.12	141.7	D151	2.98	150.8	D151	2.97	151.0
				T225	3.10	141.6	W178	2.03	163.7
							W178	1.80	164.6
							D225	3.08	142.9
17	W178	2.05	96.9	E227	2.34	121.2	W178	2.04	96.8
	R371	2.71	112.7	Y347	3.20	94.1	R371	2.71	114.2
				R371	2.70	111.9			
18	R118	2.93	131.1	R118	2.97	130.8	R152	2.88	121.0
	R118	2.84	116.3	R118	2.80	121.1			
	W178	2.03	127.8	W178	2.05	112.8			
	R371	3.01	99.5	R292	2.47	121.9			
				R371	2.96	102.8			
19	W178	1.96	116.6	W178	1.94	110.3	W178	1.90	38.1
	Y347	1.90	144.5	E277	2.01	130.0	E227	2.00	131.0
20	E277	3.10	139.5	W178	1.80	131.8	E277	2.03	134.4
	E277	2.12	128.6	E277	3.07	139.1	E277	2.85	145.7
				E277	2.10	133.0			
21	E227	3.00	85.8	E277	3.00	85.8	E277	3.00	86.2
22	E119	1.66	154.5	W178	2.15	110.1	E119	1.72	164.5
	D151	2.23	149.8				D151	2.23	145.9
	W178	1.83	147.0				W178	1.85	153.6
23	E277	2.09	132.6	E277	2.10	139.9	E277	2.08	135.1
	E277	2.63	158.5	E277	2.57	158.1	E277	2.00	159.7

ภาคผนวก ก (ต่อ)

ligand	OTV- WT			OTV- H274Y			OTV- R292K		
	กรดอะมิโน	ความยาวพันธะ (Å)	มุมพันธะ (องศา)	กรดอะมิโน	ความยาวพันธะ (Å)	มุมพันธะ (องศา)	กรดอะมิโน	ความยาวพันธะ (Å)	มุมพันธะ (องศา)
24	E277	2.05	138.8	E277	2.07	134.0	E277	2.07	140.5
	E277	2.67	153.7	E277	2.65	155.7	E277	2.68	153.3
25	R118	2.94	116.4	R118	2.90	119.2	-	-	-
	R118	2.87	137.4	R118	2.89	134.8			
	Y406	2.01	134.5	Y406	1.98	136.7			
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	R292	2.78	126.2	R292	2.79	125.1	K292	2.77	140.0
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	E227	1.78	155.1	E227	1.79	155.8	E227	1.79	155.5
30	R152	2.55	121.1	E227	1.75	140.2	R152	2.55	119.7
							W178	2.02	109.1
							E227	1.75	132.5

ภาคผนวก ข

แบบตอบรับการตีพิมพ์

บันทึกข้อความ

ส่วนงาน สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง โทร.7242

ที่ ศธ 64.26/0792 **วันที่** 1 สิงหาคม 2560

เรื่อง ตอบรับการตีพิมพ์บทความลงในวารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ

เรียน อาจารย์ ดร.พนิตา กั้งชุ่น

ตามที่ท่านได้ส่งบทความวิจัย เรื่อง "**การยับยั้งการทำงานของนิวรามินิเดสของไข้หวัดใหญ่ H1N1 สายพันธุ์ดั้งเดิม สายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยยาโอเซลทามิเวียร์ สารแอนโดรกราโฟไลด์และอนุพันธ์**" เพื่อพิจารณาตีพิมพ์ในวารสารมหาวิทยาลัยทักษิณนั้น ซึ่งได้ผ่านการพิจารณาคุณภาพบทความจากผู้ทรงคุณวุฒิแล้วนั้น กองบรรณาธิการวารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ **ขอตอบรับบทความวิจัยเรื่องดังกล่าวลงตีพิมพ์ในวารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ ปีที่ 21 ฉบับที่ 1 (มกราคม – มิถุนายน 2561)** และหากวารสารฉบับนี้เสร็จจะดำเนินการแจ้งให้ท่านทราบต่อไป

จึงเรียนมาเพื่อโปรดทราบ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประสงค์ เกษราธิคุณ)
บรรณาธิการวารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ