

การศึกษาโมเลกุลลาร์ติกกั้งและกลศาสตร์ควอนตัมของควิโนรีดักเตส 2
เป็นเอนไซม์เป้าหมายสำหรับมะเร็งเต้านม



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
พฤษภาคม 2556

การศึกษาโมเลกุลลาร์ติกกั้งและกลศาสตร์ควอนตัมของควิโนรีดักเตส 2
เป็นเอนไซม์เป้าหมายสำหรับมะเร็งเต้านม



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

พฤษภาคม 2556


ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การศึกษาโมเลกุลลาร์ติกกิงและกลศาสตร์ควอนตัมของควิโนรีดักเตส 2
เป็นเอนไซม์เป้าหมายสำหรับมะเร็งเต้านม



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
พฤษภาคม 2556

MOLECULAR DOCKING AND QUANTUM MECHANICS INVESTIGATION OF
QUINONE REDUCTASE 2 AS A TARGET ENZYME FOR BREAST CANCER



AN ABSTRACT
BY
PUNNARAI SIYAPONG

Presented in Partial Fulfillment of the Requirement for the
Master of Science Degree in Chemistry
at Srinakharinwirot University
May 2013

พรรณราย คิยะพงษ์. (2556). การศึกษาโมเลกุลลาร์ติกกิ้งและกลศาสตร์ควอนตัมของ
ควิโนนรีดักเตส 2 เป็นเอนไซม์เป้าหมายสำหรับมะเร็งเต้านม. ปริญญาโท วท.ม.(เคมี).
กรุงเทพฯ:บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัย ศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม:
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มะยูโซ๊ะ กูโน, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิริธร สโมสร.

ควิโนนรีดักเตส 2 (QR2) เป็นเอนไซม์ที่ช่วยเร่งปฏิกิริยารีดักชันของควิโนนไปเป็นไฮโดรควิโนนซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์เอสโตรเจน เมื่อไม่นานนี้ได้มีการศึกษาพบว่า QR2 อาจเปลี่ยนสับสเตรทของควิโนนไปเป็นสารพิษที่มีความว่องไวสูงในการทำลาย ดี เอ็น เอ และมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นให้เกิดมะเร็งเต้านม ซึ่งเป็นโรคมะเร็งที่พบมากที่สุดในผู้หญิงไทย ดังนั้นการใช้สารยับยั้งการทำงานของ QR2 อาจช่วยป้องกันเซลล์จากการถูกทำลายจากสารพิษเหล่านั้นได้ งานวิจัยนี้ทำการศึกษาโมเลกุลลาร์ติกกิ้งและกลศาสตร์ควอนตัมของเอนไซม์ QR2 ซึ่งเป็นเอนไซม์เป้าหมายสำหรับยับยั้งมะเร็งเต้านม โดยศึกษาโครงสร้างการเกิดอันตรกิริยาระหว่างตัวยับยั้งกับบริเวณการจับของเอนไซม์ QR2 โดยใช้วิธีการคำนวณทางโมเลกุลลาร์ติกกิ้งด้วยโปรแกรม AutoDock 4.2 เพื่อทำการออกแบบโมเลกุลใหม่หรือพัฒนาโมเลกุลเดิมให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ QR2 ที่ดีขึ้น หลังจากนั้นนำโครงสร้างที่ได้จากโมเลกุลลาร์ติกกิ้งมาคำนวณหาอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างตัวยับยั้งกับกรดอะมิโนแต่ละกรดอะมิโนที่อยู่ในบริเวณการจับของเอนไซม์ QR2 ด้วยระเบียบวิธีการคำนวณ semi empirical PM3MM แล้วคำนวณอันตรกิริยา (IE) ที่สำคัญ ระหว่างตัวยับยั้งกับกรดอะมิโนที่อยู่ในบริเวณโพรงการจับของเอนไซม์ QR2 ด้วย B3LYP/6-31G(d,p) จากการศึกษาโมเลกุลลาร์ติกกิ้ง พบว่าโครงสร้างของสารอนุพันธ์เบอร์เบอร์อินที่มีหมู่ aryloxy ที่ตำแหน่ง C-13 และมีหมู่ hydroxyl 2 หมู่ที่ตำแหน่ง C-9 และ C-10 จะให้ค่า Binding energy ที่ดีที่สุด และจากการคำนวณวิธีทางเคมีควอนตัม พบว่าตัวยับยั้งที่ 1.1-1.4 ที่ได้จากโครงสร้างฐานข้อมูลธนาคารโปรตีนรหัส 3G5M.pdb เกิดอันตรกิริยากับกรดอะมิโน Asn161 มากที่สุด และโครงสร้างตัวยับยั้งที่ 1.1, 2 และ 54 ในบริเวณโพรงการจับของเอนไซม์ QR2 ตำแหน่งที่ 1 ที่ได้จากการทำโมเลกุลลาร์ติกกิ้ง พบว่าตัวยับยั้งที่ 1.1, 2 และ 54 เกิดอันตรกิริยากับ FAD, Gly149 และ Gly150 มากที่สุดและมีค่า IE เท่ากับ -6.95 -2.56 และ -3.36 kcal/mol ตามลำดับ และในบริเวณการจับของเอนไซม์ QR2 ตำแหน่งที่ 2 พบว่าตัวยับยั้งที่ 1.3, 2 และ 54 เกิดอันตรกิริยากับ FAD, Gly149 และ Gln122 มากที่สุดและมีค่า IE เท่ากับ -8.61, -1.38 และ -3.68 kcal/mol ตามลำดับ จากข้อมูลดังกล่าวสามารถออกแบบโครงสร้างตัวยับยั้งที่มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้นได้ 4 โครงสร้าง

Punnarai Siyapong. (2013). *Molecular docking and quantum mechanics investigation of Quinone reductase 2 as a target enzyme for breast cancer*. Master thesis, M.Sc. (Chemistry). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Asst. Prof. Dr. Mayuso Kuno, Asst. Prof. Dr. Siritron Samoson.

Quinone reductase 2 (QR2) serves as an enzyme that catalyzed the reduction of quinones to hydroquinones involving in an estrogen synthesis pathway. Recent studies reported that QR2 may transform quinone substrates into highly reactive toxins that are capable of causing more cellular damage and playing a crucial role in stimulating breast cancer. Therefore, inhibition of QR2 activities by its inhibitors may lead to protection of cells from these toxins. This work focuses on the studies of molecular docking and quantum mechanics of QR2. In order to design new QR2 inhibitors and improve the potential of existing QR2 inhibitors, docking simulation was performed using AutoDock 4.2 to study some interactions between inhibitors and QR2 binding sites. The resulting inhibitors from molecular docking simulation subsequently were calculated for interaction energy (IE) between inhibitors and each amino acids in QR2 binding sites by semi empirical PM3MM, and then the important interactions were calculated by B3LYP/6-31G(d,p). The binding energy calculation using molecular docking showed that the structure of berberine derivatives having an aryloxy group at C-13, and two hydroxyl groups at C-9 and C-10 afforded the best result. Moreover the results from quantum mechanics calculation showed that the structures of inhibitors 1.1-1.4 resulting from protein bank database 3G5M.pdb were able to interact with amino acid Asn 161 at most. The quantum mechanics results showed that the inhibitors 1.1, 2 and 54 in the first binding site of QR2 binding cavity resulting from molecular docking simulation gave a maximum interaction with FAD, Gly149 and Gly150 with IE values of -6.95, -2.56 and -3.36 kcal/mol, respectively. Inhibitors 1.3, 2 and 54 in the second binding site of QR2 binding cavity also gave a maximum interaction with FAD, Gly149 and Gln122 with IE values of -8.61, -1.38 and -3.68 kcal/mol, respectively. This information was used to design some new QR2 inhibitors which accomplished 4 structures of better potential inhibitors.

ปริญญาโท
เรื่อง
การศึกษาโมเลกุลลาร์ดีอกิ่งและกลศาสตร์ควอนตัมของควิโนรีดักเตส 2
เป็นเอนไซม์เป้าหมายสำหรับมะเร็งเต้านม
ของ
พรรณราย คิยะพงษ์

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. สมชาย สันติวัฒนกุล)
วันที่ เดือน พ.ศ. 25.....

คณะกรรมการควบคุมปริญญาโท

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

..... ประธาน

..... ประธาน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มะยูโซ๊ะ กูโน)

(รองศาสตราจารย์ ดร. พรพิมล ม่วงไทย)

..... กรรมการ

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิริธร สโมสร)

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พัชรินทร์ ททรัพย์อากาศ)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิริธร สโมสร)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มะยูโซ๊ะ กูโน)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เนื่องจากผู้วิจัยได้รับความกรุณาอย่างยิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มะยุไซ๊ะ กูโน ประธานควบคุมปริญญานิพนธ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิริธร สโมสร กรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ ท่านได้เสียสละเวลาอันมีค่าเพื่อให้คำปรึกษา คำแนะนำ และให้ความช่วยเหลือในการดำเนินการวิจัยทุกขั้นตอน คณะกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา และชี้แนะข้อบกพร่องต่างๆ ตลอดจนการแก้ปัญหาอันเกิดจากการดำเนินการวิจัยและการเขียนปริญญานิพนธ์นี้แก่ผู้วิจัยเป็นอย่างดี อีกทั้งทำให้ผู้วิจัยได้รับประสบการณ์ ได้เรียนรู้และเห็นคุณค่าของงานวิจัย ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้ง และขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. พรพิมล ม่วงไทย ที่ให้ความกรุณาในการเป็นประธานในการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พัทธินารถ ทรัพย์อากาศ ที่ให้ความกรุณาเป็นกรรมการในการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ ตลอดจนให้คำแนะนำและชี้แนะข้อบกพร่องต่างๆ เพื่อให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น และขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเคมีทุกท่านที่ได้ถ่ายทอดความรู้และให้ความเมตตาเอาใจใส่ ให้ความช่วยเหลือแก่ผู้วิจัยด้วยดีเสมอมา

คุณค่าและประโยชน์ของปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ ขอมอบเป็นเครื่องบูชาพระคุณต่อครอบครัว “ศิยะพงษ์” ที่มอบความรัก คอยเอาใจใส่ และสนับสนุนในทุกๆด้าน ทำให้ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในครั้งนี้

พรรณราย ศิยะพงษ์

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ	1
ภูมิหลัง.....	1
ความมุ่งหมาย.....	4
ความสำคัญของงานวิจัย.....	4
ขอบเขตของงานวิจัย.....	4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
เอกสารความรู้เกี่ยวกับโรคมะเร็งเต้านม.....	5
ตัวบ่งชี้เซลล์มะเร็งเต้านม.....	19
การออกแบบตัวบ่งชี้เซลล์มะเร็งเต้านม.....	23
ระเบียบวิธีการคำนวณทางเคมีควอนตัมหรือเคมีคอมพิวเตอร์.....	24
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	29
3 วิธีดำเนินการวิจัย	36
โมเลกุลลาร์ดีอกกิ่ง.....	37
กลศาสตร์ควอนตัม.....	38
4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	43
โมเลกุลลาร์ดีอกกิ่ง.....	43
กลศาสตร์ควอนตัม.....	60
5 สรุปผล อภิปรายผลการวิจัย ข้อเสนอแนะ	68
บรรณานุกรม	70
อภิธานศัพท์	74

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 มะเร็งที่พบบ่อย 10 อันดับแรกของผู้หญิง.....	2
2 โครงสร้างของสาร 1.....	3
3 กระบวนการเปลี่ยนแปลงในร่างกายเมื่อสัมผัสสารก่อมะเร็ง.....	10
4 กลไกการเกิดมะเร็ง.....	11
5 กระบวนการสังเคราะห์และการเกิดออกซิเดชันของเอสโตรเจน.....	13
6 กระบวนการสังเคราะห์และการเกิดออกซิเดชันของ 2,3-Catechol	14
7 โครงสร้างของเอนไซม์ QR2.....	15
8 โครงสร้างของสาร 1 และสาร 2.....	16
9 โครงสร้างของสาร 1.1, สาร 1.2 สาร, 1.3 และสาร 1.4.....	17
10 บริเวณการจับของเอนไซม์ QR2 ตำแหน่งที่ 1.....	18
11 บริเวณการจับของเอนไซม์ QR2 ตำแหน่งที่ 2.....	18
12 โครงสร้างของสาร 3 สาร 4 และสาร 5.....	19
13 โครงสร้างของสาร 6 สาร 7 สาร 8 และสาร 9	21
14 โครงสร้างของสาร 10 สาร 11.....	21
15 อันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่าง สาร 12 กับ กรดอะมิโนข้างเคียงในบริเวณ Active site ของเอนไซม์Aromatase.....	23
16 โครงสร้างสาร 12 และโครงสร้างสาร 13.....	24
17 โครงสร้างของสาร 14 และสาร 15	26
18 โครงสร้างของสาร 16.....	26
19 โครงสร้างของสาร 17 และสาร 18.....	27
20 โครงสร้างของสาร 19 สาร 20 และสาร 21.....	28
21 โครงสร้างและวิธีการออกแบบของสาร 18 เพื่อใช้ยับยั้งเอนไซม์ Aromatase..	28
22 โครงสร้างของสาร 22.....	29
23 ปฏิกริยาของ CB1954.....	30
24 โครงสร้างของสาร 23 และสาร 24.....	31
25 โครงสร้างของสาร 25 และสาร 26.....	32

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
26 โครงสร้างของสาร 27, สาร 28, สาร 29 และสาร 30.....	33
27 โครงสร้างของสาร 31, สาร 32, สาร 33, สาร 34, สาร 35, สาร 36 และสาร 37.....	34
28 โครงสร้างของตัวยับยั้งที่ 38.....	51
29 โครงสร้างของตัวยับยั้งที่ 1 และกรดอะมิโน.....	52
30 โครงสร้างของตัวยับยั้งที่ 2 และกรดอะมิโน.....	52
31 โครงสร้างของตัวยับยั้งที่ 3 และกรดอะมิโน.....	53
32 โครงสร้างของตัวยับยั้งที่ 6 และกรดอะมิโน.....	53
33 โครงสร้างของตัวยับยั้งที่ 45 และกรดอะมิโน.....	54
34 โครงสร้างของตัวยับยั้งที่ 49 และกรดอะมิโน.....	54
35 โครงสร้างของตัวยับยั้งที่ 54 และกรดอะมิโน.....	55
36 โครงสร้างของตัวยับยั้งที่ 55 และกรดอะมิโน.....	56
37 โครงสร้างของตัวยับยั้งที่ 59 และกรดอะมิโน.....	58
38 โครงสร้างของตัวยับยั้งที่ 60 และกรดอะมิโน.....	58
39 โครงสร้างของตัวยับยั้งที่ 61 และกรดอะมิโน.....	59
40 โครงสร้างของตัวยับยั้งที่ 62 และกรดอะมิโน.....	60
41 อันตรกิริยาระหว่างตัวยับยั้งที่ 1.1 และ 1.2 ที่ได้จากโครงสร้าง X-ray กับกรดอะมิโนและ FAD ที่อยู่ในบริเวณการจับของเอนไซม์ QR2 ทั้ง 2 บริเวณ.....	63
42 โครงสร้างและอันตรกิริยาระหว่างตัวยับยั้งที่ได้จากการทำโมเลกุลลาร์ด็อกกิ่ง ของ 1.1, 2 และ 54 กับกรดอะมิโนและ FAD ในบริเวณการจับ ของเอนไซม์ QR2 ตำแหน่งที่ 1.....	65
43 โครงสร้างและอันตรกิริยาระหว่างตัวยับยั้งที่ได้จากการทำโมเลกุลลาร์ด็อกกิ่ง ของ 1.3, 2 และ 54 กับกรดอะมิโน และ FAD ในบริเวณการจับ ของเอนไซม์ QR2 ตำแหน่งที่ 2.....	

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 ขนาดของ Grid กับค่า BE ระหว่างตัวยับยั้งกับเอนไซม์ QR2.....	44
2 จำนวนรอบในการทำโมเลกุลลาร์ต็อกกิ่งกับค่า BE ระหว่างตัวยับยั้ง กับเอนไซม์ QR2.....	45
3 ค่า RMSD ของตัวยับยั้ง.....	46
4 ค่า IC ₅₀ และค่า BE ระหว่างตัวยับยั้งกับเอนไซม์ QR2.....	47
5 ค่า BE ระหว่างตัวยับยั้งที่ 59-62 กับเอนไซม์ QR2.....	57
6 ค่า IE ระหว่างตัวยับยั้งที่ 1.1 และ 1.2 ที่ได้จากโครงสร้าง 3G5M.pdb กับ กรดอะมิโน และ FAD ในบริเวณการจับของเอนไซม์ QR2 ตำแหน่งที่ 1 ด้วยระเบียบวิธี B3LYP ด้วย 6-31G(d,p) basis set.....	61
7 ค่าระหว่าง IE ตัวยับยั้งที่ 1.3 และ 1.4 ที่ได้จากโครงสร้าง 3G5M.pdb กับ กรดอะมิโน และ FAD ในบริเวณการจับของเอนไซม์ QR2 ตำแหน่งที่ 2 ด้วยระเบียบวิธี B3LYP ด้วย 6-31G(d,p) basis set.....	62
8 ค่า IE ระหว่างโครงสร้างตัวยับยั้งที่ได้จากการทำโมเลกุลลาร์ต็อกกิ่งของ 1.1, 2 และ 54 กับกรดอะมิโน และ FAD ในบริเวณการจับของเอนไซม์ QR2 ตำแหน่งที่ 1 ด้วยระเบียบวิธี B3LYP ด้วย 6-31G(d,p) basis set.....	64
9 ค่า IE ระหว่างโครงสร้างตัวยับยั้งที่ได้จากการทำโมเลกุลลาร์ต็อกกิ่งของ 1.3, 2 และ 54 กับกรดอะมิโน และ FAD ในบริเวณการจับของเอนไซม์ QR2 ตำแหน่งที่ 2 ด้วยระเบียบวิธี B3LYP ด้วย 6-31G(d,p) basis set.....	66

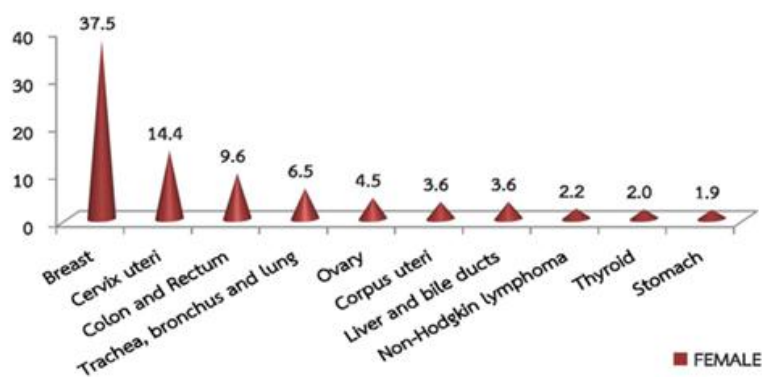
บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

ปัจจุบันโรคมะเร็งเป็นโรคที่สามารถเกิดขึ้นได้กับทุกคนและจากสถิติการเสียชีวิตของคนไทย ในปี พ.ศ. 2554 พบว่าคนไทยเสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งเป็นสาเหตุการตายอันดับหนึ่งและจากสภาพแวดล้อมในปัจจุบันที่ทำให้สังคมความเป็นอยู่ของทุกคนเปลี่ยนแปลงไป โดยเฉพาะสังคมเมืองที่ทำให้ประชากรในสังคมต้องเผชิญกับสภาพแวดล้อมที่มีมลภาวะ เนื่องมาจากการเร่งพัฒนาประเทศ และประชาชนขาดความเอาใจใส่ต่อสิ่งแวดล้อมทำให้เกิดมลพิษทางอากาศ มลพิษทางเสียงและโดยเฉพาะมลพิษทางอารมณ์ที่ทำให้เกิดความเครียด ซึ่งจะส่งผลทำให้ร่างกายอ่อนแอและเป็นสาเหตุนำไปสู่การเป็นโรคมะเร็งได้ในที่สุด อีกสาเหตุหนึ่งคือพฤติกรรมการรับประทานอาหารของประชากรในสังคมที่เปลี่ยนแปลงไป ส่วนใหญ่เน้นความสะดวกและรวดเร็ว แต่ไม่คำนึงถึงคุณค่าของอาหารที่รับประทานว่ามีคุณค่าทางโภชนาการเพียงพอหรือไม่ และอาหารที่รับประทานจะส่งผลต่อสุขภาพของร่างกายมากน้อยเพียงใด ส่วนอีกสาเหตุหนึ่งก็คือคนส่วนใหญ่เน้นการทำงานมากเกินไปจนลืมนึกถึงสุขภาพของตนเอง ขาดการออกกำลังกาย และการพักผ่อน เหล่านี้ล้วนเป็นสาเหตุที่ทำให้ประชาชนเป็นโรคมะเร็งเพิ่มขึ้น (อัญชูลี อูธา. 2554: 7-12)

มะเร็ง คือ กลุ่มของโรคที่เกิดจากความผิดปกติที่สารพันธุกรรมของเซลล์ร่างกาย ทำให้เซลล์ผิดปกติมีการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว แล้วเกิดก้อนเนื้อที่มีความผิดปกติตามไปด้วย จนในที่สุดเซลล์ปกติที่อยู่ในบริเวณก้อนเนื้อก้อนนั้น จะเกิดการตายเนื่องจากขาดเลือดจึงไม่สามารถไปเลี้ยงเซลล์ปกติได้ ถ้าเซลล์ที่ผิดปกติเหล่านี้เกิดในอวัยวะใดจะเรียกชื่อ มะเร็ง ตามอวัยวะนั้นเช่น มะเร็งปอด มะเร็งสมอง มะเร็งเต้านม มะเร็งปากมดลูก มะเร็งเม็ดเลือดขาว มะเร็งต่อมน้ำเหลือง และมะเร็งผิวหนัง เป็นต้น (ภักษร วันบรรจบ. 2554: 5)



ภาพประกอบ 1 แสดงมะเร็งที่พบบ่อย 10 อันดับแรกของผู้หญิง

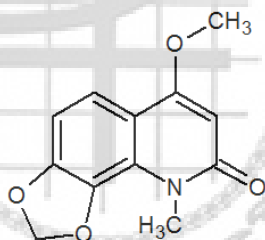
ที่มา: P. Attasara; et al. 2011: 3

จากรายงานทะเบียนผู้ป่วยมะเร็งรายใหม่ที่ได้รับบริการตรวจวินิจฉัยและรักษาที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ในระหว่างวันที่ 1 มกราคม 2554 ถึง 31 ธันวาคม 2554 แสดงไว้ตามภาพประกอบ 1 พบว่ามะเร็งเต้านมเป็นมะเร็งที่พบบ่อยที่สุดในเพศหญิงและมีโอกาสที่ผู้หญิงจะเป็นโรคมะเร็งเต้านมเพิ่มขึ้น รองลงมาคือมะเร็งปากมดลูกและมะเร็งในลำไส้ (P. Attasara; et al. 2011: 3)

ปัจจุบันเคมีคอมพิวเตอร์มีบทบาทและมีความสำคัญอย่างยิ่งในวงการวิทยาศาสตร์เกือบทุกสาขา สามารถใช้ในการศึกษาและการค้นคว้าวิจัยทางเคมี โดยจะใช้คอมพิวเตอร์ในการคำนวณและออกแบบโมเลกุลก่อนทำการทดลองจริง แล้วนำผลที่ได้จากการศึกษาด้วยคอมพิวเตอร์ มาเป็นแนวทางนำไปสู่วิธีที่ดีกว่าหรือดีที่สุดเพื่อนำไปปฏิบัติหรือทำการทดลองจริง นอกจากนี้ยังสามารถประยุกต์ใช้ในทางอุตสาหกรรมอีกด้วย โดยเฉพาะอุตสาหกรรมทางด้านยา เนื่องจากเคมีคอมพิวเตอร์มีประโยชน์และสามารถให้ข้อมูลที่ถูกต้องและเหมาะสม อีกทั้งยังสามารถประหยัดเวลาและงบประมาณในการสื่อสารเคมีและอุปกรณ์ต่างอีกด้วย (ธีรเกียรติ์ เกิดเจริญ. 2539: 17-22)

ดังนั้นจึงเป็นที่มาของการงานวิจัยนี้ เนื่องจากเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกลไกของโรคมะเร็งเต้านมมีด้วยกันหลายเอนไซม์ เช่น เอนไซม์ Aromatase และเอนไซม์ Quinone reductase 2 (QR2) โดยเอนไซม์ที่น่าสนใจและเป็นเป้าหมายสำหรับงานวิจัยนี้คือเอนไซม์ QR2 ซึ่งเป็นเอนไซม์เป้าหมายใหม่ที่จะใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของมะเร็งเต้านมหรือเพื่อใช้รักษาผู้ป่วยมะเร็งเต้านม ดังนั้นในงานวิจัยนี้สนใจศึกษาโครงสร้างและอันตรกิริยาระหว่างตัวยับยั้งเอนไซม์ QR2 ในโรคมะเร็งเต้านม

ได้แก่ ตัวยับยั้งที่ 1 ซึ่งมีลักษณะโครงสร้างดังภาพประกอบ 2 กับบริเวณการจับของเอนไซม์ QR2 ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ปรากฏอยู่ในธนาคารของฐานข้อมูลโครงสร้างของโปรตีน และศึกษาสารอนุพันธ์ของเบอร์เบอร์นซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ในหลอดทดลอง (*in vitro*) กับบริเวณการจับของเอนไซม์ QR2 โดยการวิจัยครั้งนี้จะใช้ระเบียบวิธีการคำนวณทางโมเลกุลลาร์ด็อกกิ้ง (Molecular Docking) และสนใจที่จะค้นหาโมเลกุลใหม่ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์ QR2 ที่ดีกว่าโครงสร้างเดิมที่ได้จากธนาคารข้อมูลโครงสร้างของโปรตีนหรือที่ได้จากการทดลอง และใช้ระเบียบวิธีทางเคมีควอนตัมหรือเคมีคอมพิวเตอร์เพื่อหาอันตรกิริยาที่สำคัญที่เกิดขึ้นระหว่างตัวยับยั้งที่มีอยู่เดิมหรือตัวยับยั้งตัวใหม่กับกรดอะมิโนที่อยู่ในบริเวณโพรงการจับของเอนไซม์ QR2 แล้วนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้มาเป็นข้อมูลสำคัญที่จะใช้อธิบายและทำให้เกิดความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกในการยับยั้งเอนไซม์ QR2 ของโรคมะเร็งเต้านม นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยในครั้งนี้คาดว่าจะจะเป็นข้อมูลที่สำคัญในการออกแบบตัวยับยั้งตัวใหม่หรือพัฒนาตัวยับยั้งที่มีอยู่เดิมให้มีประสิทธิภาพสูงกว่าตัวยับยั้งที่ 1 และสารอนุพันธ์ของเบอร์เบอร์นที่ได้จากการทดลอง



ภาพประกอบ 2 โครงสร้างของสาร 1

ความมุ่งหมายของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างตัวยับยั้งที่ 1 และสารอนุพันธ์ของเบอร์เบอร์นซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ในหลอดทดลองกับบริเวณการจับของเอนไซม์ QR2
2. เพื่อคำนวณอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างตัวยับยั้งที่ 1 และสารอนุพันธ์ของเบอร์เบอร์นกับบริเวณการจับของเอนไซม์ QR2

3. เพื่อออกแบบโมเลกุลที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ QR2 ของมะเร็งเต้านมที่ ดีกว่าหรือมีประสิทธิภาพสูงกว่าตัวยับยั้งที่ 1 และสารอนุพันธ์ของเบอร์เบอร์ินที่มีอยู่เดิม

ความสำคัญของการวิจัย

1. ทำให้ทราบโครงสร้างการเกิดอันตรกิริยาระหว่างตัวยับยั้งที่ 1 และสารอนุพันธ์ของเบอร์เบอร์ินกับบริเวณการจับของเอนไซม์ QR2
2. ทำให้ทราบค่าการกระจายของพลังงานการจับ (Binding energy) ระหว่างตัวยับยั้งที่ 1 และสารอนุพันธ์ของเบอร์เบอร์ินกับบริเวณการจับของเอนไซม์ QR2 โดยการคำนวณทางเคมีควอนตัมหรือเคมีคอมพิวเตอร์
3. ทำให้เป็นแนวทางในการออกแบบตัวยับยั้งตัวใหม่หรือพัฒนาตัวยับยั้งที่มีอยู่เดิมให้มี ประสิทธิภาพสูงขึ้น

ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาหาโครงสร้างที่เหมาะสมในการเข้าจับของตัวยับยั้งที่ 1, 2, 3, 6, 12 และตัวยับยั้งที่ 38-58 ซึ่งมีลักษณะโครงสร้างดังภาพประกอบในตาราง 4 ในบริเวณการจับทั้ง 2 บริเวณของเอนไซม์ QR2 ด้วยระเบียบวิธีโมเลกุลลาร์ต็อกกิง แล้วทำการพัฒนาหรือออกแบบโมเลกุลที่มีอยู่ให้มี ประสิทธิภาพสูงขึ้นด้วยระเบียบวิธีการคำนวณด้วยวิธีโมเลกุลลาร์ต็อกกิง และคำนวณอันตรกิริยาที่ เกิดขึ้นระหว่างตัวยับยั้งที่ 1 กับกรดอะมิโนที่อยู่ในบริเวณการจับของเอนไซม์ QR2 ด้วยระเบียบวิธีการ คำนวณ Semi empirical PM3MM และ B3LYP ด้วย 6-31G(d,p) basis set

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และได้นำเสนอหัวข้อต่อไปนี้

1. เอกสารความรู้เกี่ยวกับโรคมะเร็งเต้านม
2. ตัวยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม
3. การออกแบบตัวยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม
4. ระเบียบวิธีการคำนวณทางเคมีควอนตัมหรือเคมีคอมพิวเตอร์
5. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. เอกสารความรู้เกี่ยวกับโรคมะเร็งเต้านม

1.1 โรคมะเร็งเต้านม

เกิดจากเซลล์ในเต้านมเจริญเติบโตผิดปกติ สามารถแพร่กระจายไปยังเนื้อเยื่อข้างเคียงไปถึงส่วนอื่นๆ ทำให้เกิดการรวมตัวของเซลล์ที่ผิดปกติเกิดเป็นก้อนในเต้านม ซึ่งอาจเกิดจากท่อน้ำนมหรือต่อมน้ำนม

1.2 สาเหตุของการเกิดโรคมะเร็งเต้านม

จุฑามาศ แอนเนี่ยน (จุฑามาศ แอนเนี่ยน. 2550: 112) ได้ศึกษาปัจจัยของการเกิดโรคมะเร็งเต้านม โดยพิจารณาสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคมะเร็งเต้านมออกเป็น 2 ปัจจัยหลัก ดังนี้

1. ปัจจัยเสี่ยงจากภายในร่างกาย

1.1 เพศ พบโรคมะเร็งเต้านมในเพศหญิงมากกว่าเพศชาย

1.2 วัย พบว่าเมื่ออายุ 50 ปีขึ้นไป จะมีโอกาสเกิดโรคมะเร็งเต้านมและมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งเต้านมและมะเร็งเต้านมเป็นสาเหตุการตายที่สำคัญในผู้หญิงวัย 40-55 ปี ซึ่งในกลุ่มผู้หญิงอายุ 50-54 ปี มีประวัติการเกิดโรคมะเร็งเต้านมสูงขึ้นถึง 233 คน ต่อ 100,000 คน

1.3 พันธุกรรม โรคมะเร็งที่เกิดจากกรรมพันธุ์โดยตรงนั้นมีน้อยมาก มีเพียงร้อยละ 5-10 เท่านั้น ซึ่งพบในผู้หญิงที่เป็นมะเร็งเต้านมตั้งแต่อายุยังน้อย เช่น ในวัย 20 หรือวัย 30 ปี

1.4 ประวัติการมีประจำเดือน พบว่าในฮอโมนเพศหญิง ได้แก่ เอสโตรเจนและโปรเจสเตอโรนมีผลต่อการเกิดโรคมะเร็งเต้านม โดยฮอโมนเอสโตรเจนมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์เต้านม ดังนั้นช่วงเวลาการมีประจำเดือนจึงมีผลต่อการเกิดโรคมะเร็งเต้านม ซึ่งผู้หญิงที่มีอายุยังน้อยเริ่มมีประจำเดือนครั้งแรกและหมดประจำเดือนเมื่อมีอายุมาก จะมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งเต้านมสูง

1.5 ประวัติการตั้งครรภ์และการให้นมบุตร พบว่าผู้หญิงที่คลอดลูกคนแรกเมื่ออายุมากกว่า 30 ปีหรือคนที่ไม่เคยมีลูกมาก่อน จะมีความเสี่ยงต่อการเป็นโรคมะเร็งเต้านมมากกว่าผู้หญิงที่มีลูกตอนอายุน้อยกว่า 30 ปี นอกจากนี้ระยะเวลาที่ให้นมลูกก็มีความสำคัญ โดยพบว่าการให้นมลูกจะส่งช่วยป้องกันมะเร็งเต้านมได้ดีที่สุดสำหรับคุณแม่ที่อายุน้อยกว่า 30 ปี โดยเฉพาะการให้นมลูกติดต่อกันไม่น้อยกว่า 6 เดือน

2. ปัจจัยเสี่ยงจากภายนอกร่างกาย

2.1 อาหาร การเลือกรับประทานอาหารจะผลต่อระดับฮอโมนของร่างกายและการเกิดโรคมะเร็งเต้านม แต่ยังไม่มีความชัดเจนว่าอาหารชนิดใดที่ทำให้เกิดโรคมะเร็งเต้านม ซึ่งภาวะอ้วนในผู้หญิงหมดวัยประจำเดือนจะเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งเต้านม เพราะไขมันส่วนเกินในร่างกายสามารถเปลี่ยนเป็นฮอโมนเอสโตรเจนได้ ดังนั้นจึงควรรับประทานอาหารที่มีแคลอรีต่ำ ได้แก่ ผักและผลไม้สด ผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลือง และอาหารที่มีเส้นใยสูง

2.2 แอลกอฮอล์ การดื่มเครื่องดื่มที่มีปริมาณแอลกอฮอล์สูงมากติดต่อกันนานๆ จะเสี่ยงต่อการเป็นโรคมะเร็งเต้านม เพราะการดื่มเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์จะทำให้ฮอโมนเอสโตรเจนสูงขึ้น

2.3 สิ่งแวดล้อม พบว่าสารเคมีในสิ่งแวดล้อม ได้แก่ ยาฆ่าแมลงที่ปนเปื้อนมากับอาหารและเครื่องดื่ม รวมทั้งสารเคมีที่อยู่ในพลาสติกบรรจุอาหาร จะเพิ่มความเสี่ยงต่อการเป็นโรคมะเร็งเต้านม

2.4 การออกกำลังกาย พบว่าผู้หญิงที่ขาดการออกกำลังกายจะมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งมากกว่าผู้หญิงที่ออกกำลังกายสม่ำเสมอ ดังนั้นควรออกกำลังกายให้ได้อย่างน้อยสัปดาห์ละ 4 ชั่วโมง จะช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งเต้านมในระยะยาวได้

2.5 การสูบบุหรี่ ผู้หญิงที่สูบบุหรี่มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งเต้านมสูงกว่าผู้หญิงที่ไม่สูบบุหรี่ประมาณร้อยละ 25 นอกจากนี้ผู้หญิงที่สูบบุหรี่มาเป็นเวลานานและปริมาณการสูบบุหรี่ต่อวันสูงมีโอกาสมะเร็งเต้านมสูงขึ้นด้วย

1.3 ชนิดของโรคมะเร็งเต้านม

ชัญวลี ศรีสุโข (ชัญวลี ศรีสุโข. 2552: 74) ได้แบ่งชนิดของโรคมะเร็งเต้านม โดยพิจารณาชนิดของโรคมะเร็งเต้านมออกเป็น 2 ชนิด ดังนี้

1. มะเร็งเต้านมที่ยังไม่ลุกลาม เป็นมะเร็งที่ไม่แพร่กระจายผ่านพื้นผิวที่ห่อหุ้มเต้านมไปยังเนื้อเยื่ออื่นๆ ของเต้านม เช่น มะเร็งในท่อน้ำนม หรือมะเร็งต่อมน้ำนม

2. มะเร็งเต้านมที่ลุกลาม มะเร็งชนิดนี้ลุกลามจากเยื่อหุ้มท่อน้ำนมหรือต่อมน้ำนมไปยังเนื้อเยื่อของเต้านม หรือแพร่กระจายไปที่ต่อมน้ำเหลืองบริเวณรักแร้ ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น

2.1 มะเร็งลุกลามของท่อน้ำนม เป็นชนิดของมะเร็งที่พบมากที่สุด โดยเริ่มจากท่อน้ำนมแล้วลุกลามไปยังเนื้อเยื่อรอบๆ เต้านม หรือกระจายไปทางหลอดเลือด หลอดน้ำเหลือง

2.2 มะเร็งลุกลามของต่อมน้ำนม จะเริ่มที่เยื่อหุ้มต่อมน้ำนมแล้วลุกลามไปยังเนื้อเยื่อเต้านม หรือแพร่กระจายไปทางหลอดเลือด หรือหลอดน้ำเหลือง

1.4 อาการเริ่มต้นของโรคมะเร็งเต้านม

ชัญวลี ศรีสุโข (ชัญวลี ศรีสุโข. 2552: 77) ได้แบ่งอาการเริ่มต้นของโรคมะเร็งเต้านม โดยพิจารณาอาการเริ่มต้นของโรคมะเร็งเต้านมเป็น ดังนี้

1. คลำพบก้อนที่เต้านม
2. รักษะบวม เนื่องจากต่อมน้ำเหลืองที่รักษะบวมโตขึ้นผิดปกติ
3. เจ็บจืดๆ ที่เต้านม
4. เต้านมเปลี่ยนไป เช่น เปลี่ยนแปลงขนาด รูปร่างของเต้านมและผิวหนังของเต้านม
5. หัวนมเปลี่ยนไปจากเดิม เช่น มีการหดตัว คับ หรือแดงผิดปกติ
6. มีเลือดหรือน้ำออกจากหัวนม ส่วนใหญ่ร้อยละ 20 ของการมีเลือดออกจากหัวนมจะเป็นผู้ป่วยมะเร็งเต้านม
7. มีแผลเรื้อรังที่เต้านม

1.5 ระยะของโรคมะเร็งเต้านม

จุฑามาศ แอนเนียน (จุฑามาศ แอนเนียน. 2550: 116-117) ได้แบ่งระยะของการเกิดโรคมะเร็งเต้านม โดยพิจารณาระยะของโรคมะเร็งเต้านมออกเป็น 4 ระยะ ดังนี้

ระยะ 0 เป็นมะเร็งเฉพาะที่ไม่ลุกลามไปที่อื่นแบ่งตามตำแหน่งที่พบออกเป็น 2 แบบ คือ

- Lobular carcinoma in situ พบในเยื่อบุกระเปาะน้ำนมและเป็นมะเร็งที่ไม่ลุกลามไปถึงส่วนอื่นๆ การพบก้อนเนื้อในเต้านมนี้เป็นสัญญาณเตือนว่าเสี่ยงต่อการเป็นโรคมะเร็งเต้านม
- Ductal carcinoma in situ พบในเยื่อบุด้านในท่อน้ำนม ไม่ลุกลามไปถึงส่วนอื่นๆ หากทิ้งไว้โดยไม่รักษาเซลล์มะเร็งนั้นอาจลุกลามไปเนื้อเยื่อข้างเคียงได้ และกลายเป็นมะเร็งเต้านมที่มีการลุกลามต่อไป

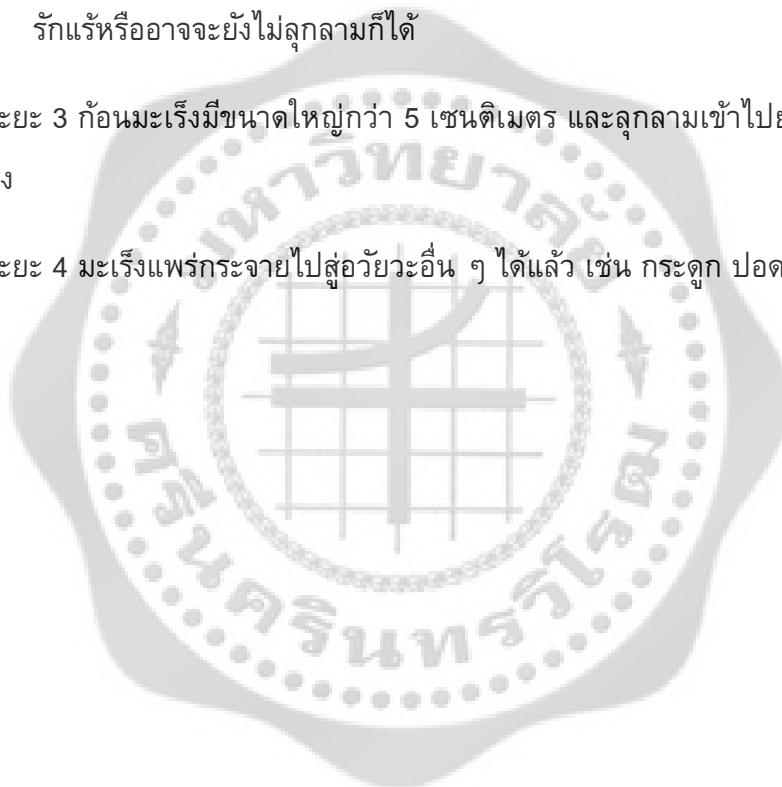
ระยะ 1 เป็นระยะเริ่มต้นของมะเร็งเต้านม สามารถลุกลามไปยังเนื้อเยื่อข้างเคียง แต่ไม่กระจายออกนอกเต้านม ขนาดก้อนมะเร็งในระยะนี้มีขนาดไม่เกิน 2 เซนติเมตร

ระยะ 2 เป็นระยะที่เริ่มแพร่กระจาย สามารถแบ่งได้ดังนี้

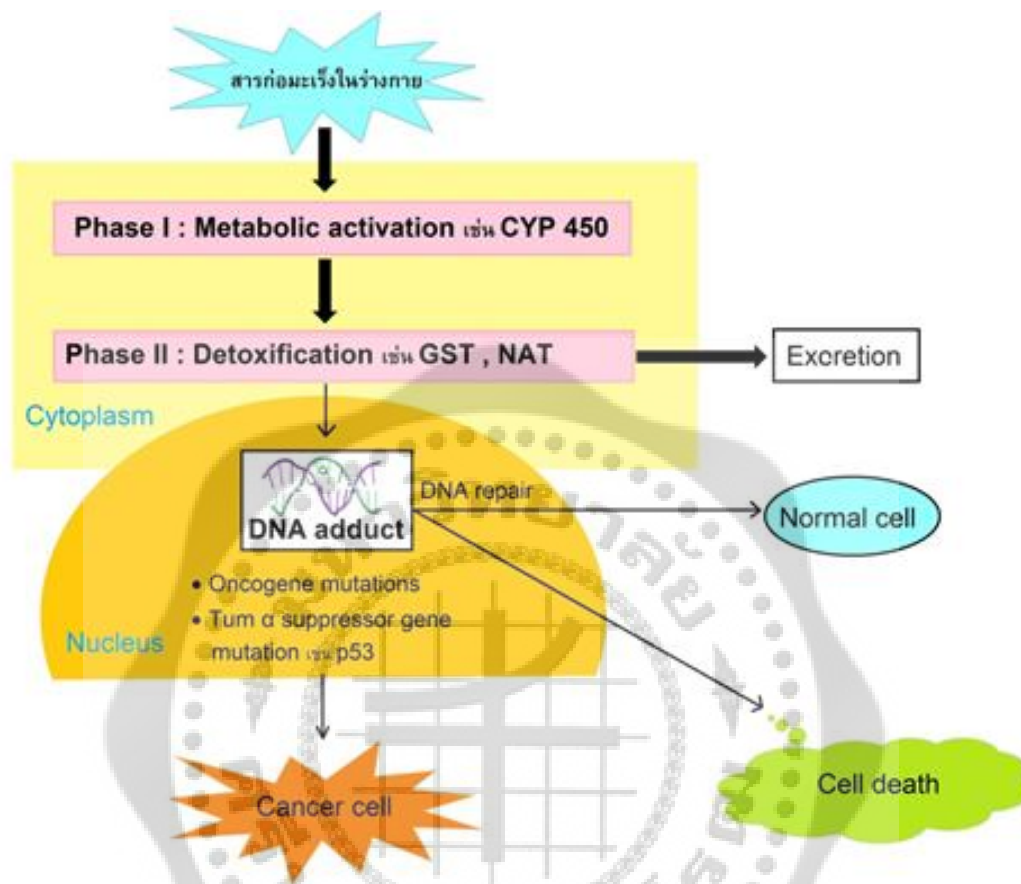
- ก้อนมะเร็งมีขนาดไม่เกิน 2 เซนติเมตร แต่สามารถแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองบริเวณรักแร้
- ก้อนมะเร็งมีขนาดไม่เกิน 2-5 เซนติเมตร ซึ่งอาจจะลุกลามไปยังต่อมน้ำเหลืองบริเวณรักแร้หรืออาจจะยังไม่ลุกลามก็ได้

ระยะ 3 ก้อนมะเร็งมีขนาดใหญ่กว่า 5 เซนติเมตร และลุกลามเข้าไปยังต่อมน้ำเหลืองและเนื้อเยื่อข้างเคียง

ระยะ 4 มะเร็งแพร่กระจายไปสู่อวัยวะอื่น ๆ ได้แล้ว เช่น กระดูก ปอด ตับและสมอง



1.6 กลไกการเกิดมะเร็ง

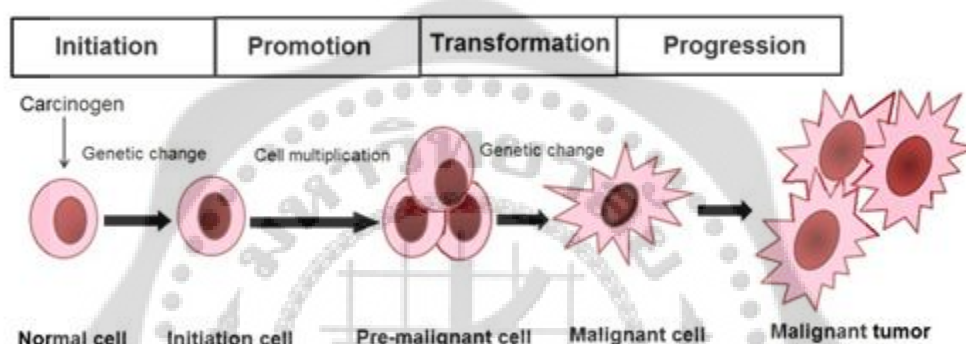


ภาพประกอบ 3 กระบวนการเปลี่ยนแปลงในร่างกายเมื่อสัมผัสสารก่อมะเร็ง

ดัดแปลงจาก: อุดุลย์เดช ไสลบาท. 2556

จากภาพประกอบ 3 เมื่อสารก่อมะเร็งเข้าสู่ร่างกายไม่ว่าจะทางการหายใจ การสัมผัส หรือการรับประทาน แล้วกระตุ้นการเผาผลาญสารก่อมะเร็ง (Metabolic activation) โดยเอนไซม์ Phase I แล้วได้สารที่ไปทำลาย DNA หรือทำให้ DNA เกิดการสูญเสียหรือเกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งระยะแรกนี้จะเกิดยากและใช้เวลานาน เนื่องจากต้องผ่านกระบวนการซ่อมแซมของเซลล์ จากนั้นภายในเซลล์จะมีเอนไซม์ Phase II ของกระบวนการลดความเป็นพิษของสาร (Metabolic detoxification) ซึ่งจะทำการสลายน้ำดีขึ้นและถูกกำจัดออกจากร่างกายได้

ถ้ากระบวนการลดความเป็นพิษของสารเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ สารที่ได้จะไปจับกับ DNA เรียกว่ากระบวนการในระยะนี้ว่า DNA adduct ซึ่งทำให้สารไปจับกับนิวคลีโอไทด์บนสาย DNA แต่ในระยะนี้ DNA จะสามารถถูกซ่อมแซมให้กลับมาปกติได้โดยโปรตีนในกลุ่ม DNA repair ได้ แต่ถ้า DNA ไม่สามารถซ่อมแซมได้อีก จะทำให้เกิดกระบวนการตายของเซลล์ในแบบต่างๆ เช่น Apoptosis และจะส่งผลให้ DNA ของเซลล์นั้นๆ เกิดการกลายพันธุ์ (Mutation) แบบถาวร กลายเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของมะเร็ง (อดุลย์เดช ไสลบาท. 2556)



ภาพประกอบ 4 กลไกการเกิดมะเร็ง

ดัดแปลงจาก: อดุลย์เดช ไสลบาท. 2556

จากภาพประกอบ 4 จะเห็นได้ว่าจะสามารถแบ่งระยะของการเกิดโรคมะเร็งได้ 4 ระยะ ดังนี้

1. ระยะ Initiation เป็นระยะที่เซลล์ปกติได้รับสารก่อมะเร็งจะทำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรม
2. ระยะ Promotion เป็นระยะที่เมื่อมีสารกระตุ้นอื่นที่กระตุ้น Growth factor จะทำให้เซลล์มะเร็งเจริญเติบโต
3. ระยะ Transformation เป็นระยะที่จะทำให้เซลล์มะเร็งเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง
4. ระยะ Progression เป็นระยะที่เซลล์มะเร็งจะเกิดการเปลี่ยนแปลง DNA และกลายเป็นเซลล์มะเร็งที่สมบูรณ์ (เจลิยว ปิยะชน. 2555: 52-54)

1.7 วิธีการรักษาโรคมะเร็งเต้านม มีด้วยกัน 4 วิธี ดังนี้

ชัญวลี ศรีสุโข (ชัญวลี ศรีสุโข. 2552: 84-87) ได้แบ่งวิธีการรักษาโรคมะเร็งเต้านม โดยพิจารณาวิธีการรักษาโรคมะเร็งเต้านมออกเป็น 4 ประเภท ดังนี้

1. การผ่าตัด อาจจะเป็นตัดเอาเฉพาะก้อนมะเร็งออกเท่านั้น หรือเลาะเอาต่อมน้ำเหลือง และเนื้อเยื่อที่ติดบริเวณใกล้เคียงออกไปด้วย

2. รังสี เป็นวิธีที่จะฉายรังสีในบริเวณที่เป็นโรคมะเร็ง เพื่อป้องกันการลุกลามของโรคมะเร็ง

3. การใช้เคมีบำบัด อาจใช้ร่วมกับการผ่าตัด การฉายรังสีและฮอร์โมน หรือรักษาเดี่ยวๆ โดยมีข้อพิจารณาดังนี้

3.1 มะเร็งกระจายไปที่ต่อมน้ำเหลือง

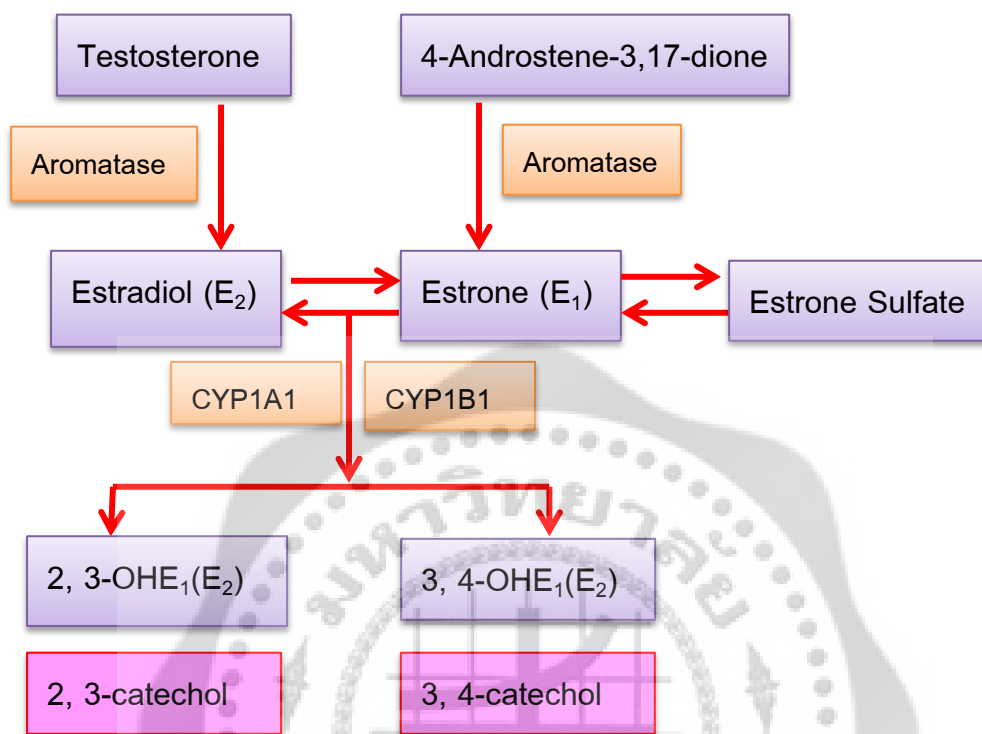
3.2 ผู้ป่วยเป็นมะเร็งเต้านมก่อนหมดประจำเดือน

3.3 มีการกระจายไปที่อวัยวะต่างๆ เช่น กระดูก ปอด สมอง

4. ฮอร์โมนบำบัด อาจใช้ร่วมกับการผ่าตัด การฉายรังสี เคมีบำบัด หรืออาจใช้มากกว่า

1 วิธีร่วมกัน จะใช้เมื่อผู้ป่วยมีตัวรับสัญญาณฮอร์โมน ซึ่งตัวรับสัญญาณฮอร์โมนมี 2 ตัว คือ ตัวรับสัญญาณฮอร์โมนเอสโตรเจน (ER) และมีตัวรับสัญญาณฮอร์โมนโปรเจสเทอโรน (PR) เมื่อพบว่าตัวรับสัญญาณฮอร์โมนจึงจะรักษาด้วยฮอร์โมนเช่น Tamoxifen หรือ Anastrozole ซึ่งจะไปทำหน้าที่จับกับฮอร์โมนหรือต้านทานฮอร์โมนในร่างกายไม่ให้ไปกระตุ้นการเจริญเติบโตของมะเร็ง

1.8 กระบวนการสังเคราะห์และการเกิดออกซิเดชันของเอสโตรเจน

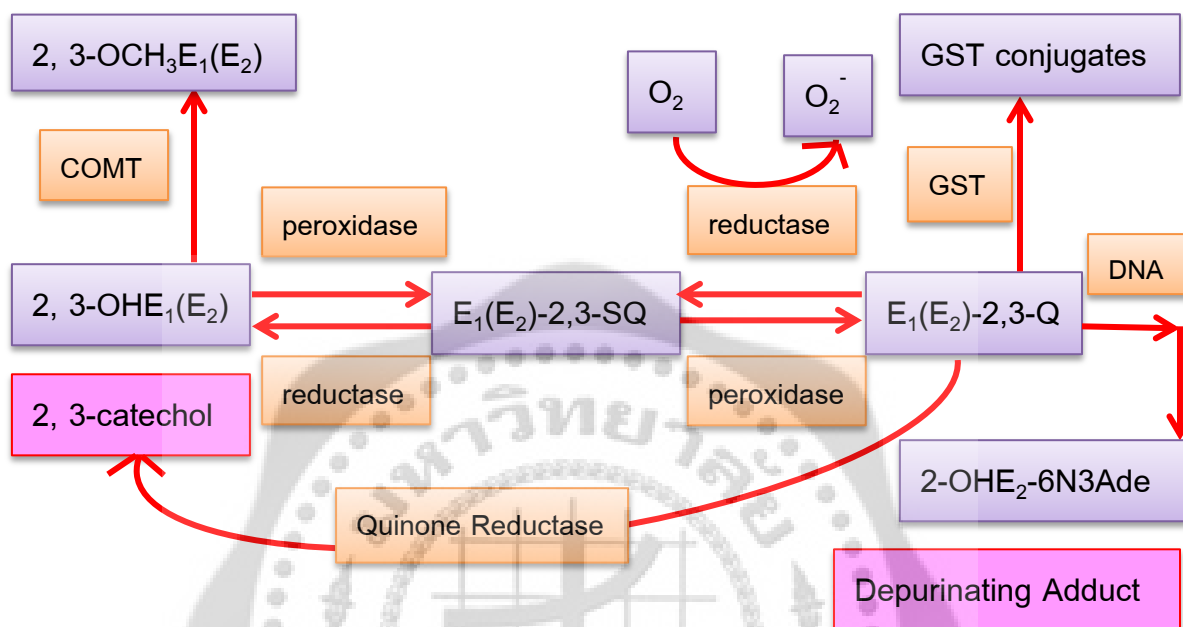


ภาพประกอบ 5 กระบวนการสังเคราะห์และการเกิดออกซิเดชันของเอสโตรเจน

ดัดแปลงจาก: Wei Yue; et al. 2013: 78

ในปี ค.ศ. 2013 เวย์ หยู และคณะ (Wei Yue; et al. 2013: 161-170) ได้ศึกษากลไกของเอสโตรเจนในการเกิดเซลล์มะเร็งเต้านม พบว่าเอสโตรเจนเป็นสาเหตุของการเกิดโรคมะเร็งเต้านม ถ้ามีปริมาณ Estradiol (E_2) ใน Plasma สูงขึ้นอัตราการเกิดมะเร็งเต้านมก็จะสูงขึ้นด้วยซึ่งอธิบายด้วยกระบวนการสังเคราะห์และการเกิดออกซิเดชันของเอสโตรเจนตามภาพประกอบ 5 มีกลไกดังนี้ เริ่มต้นด้วย Androgen (Testosterone และ Androstenedione) ถูกเปลี่ยนให้เป็นเอสโตรเจนในรูปของ (Estradiol = E_2 Estrone = E_1 หรือ Estrone sulfate) ด้วยเอนไซม์ Aromatase ตามด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชันของ E_1/E_2 ด้วยเอนไซม์ cytochrome P450 เช่น 1A1 และ 1B1 ที่อยู่ในเนื้อเยื่อบริเวณเต้านม เกิดเป็น 2-OHE₁/ E_2 (2,3-Catechol) จากนั้น catechol จะเกิดออกซิเดชันต่อไปให้ 2,3-quinone และ 3,4-quinone ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดการทำลาย DNA โดยเฉพาะอย่างยิ่ง 3,4-quinone ในที่นี้จะขอ

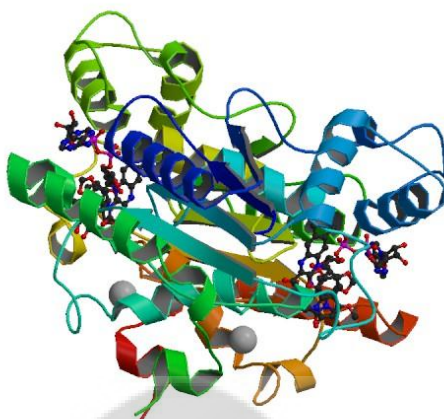
กล่าวถึงเฉพาะกระบวนการเกิดออกซิเดชันของ 2,3-Catechol เพราะกลไกของ 2,3-Catechol และ 3,4-Catechol จะคล้ายกัน ดังภาพประกอบ 6



ภาพประกอบ 6 กระบวนการเกิดออกซิเดชันของ 2,3-Catechol

ดัดแปลงจาก: Wei Yue; et al. 2013: 78

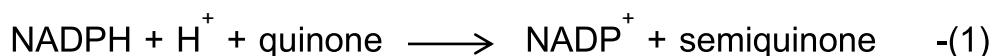
จากภาพประกอบ 6 จะมีกลไกดังนี้ เริ่มต้นด้วย 2,3-Catechol สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ 2 ทาง คือ 1. สามารถเปลี่ยนเป็น $2\text{OCH}_3\text{E}_2$ ด้วยเอนไซม์ catechol-o-methyltransferase (COMT) และ 2. เปลี่ยนเป็น 2,3-Semiquinone ด้วยเอนไซม์ peroxidase จากนั้น 2,3-Semiquinone ถูกออกซิไดซ์ต่อด้วยเอนไซม์ Peroxidase เกิดเป็น 2,3-Quinone ซึ่งถูกกำจัดออกได้โดยเอนไซม์ glutathione transferase (GST) หรือเกิดการรวมตัวกับ DNA ให้ depurinating adduct ทำให้ DNA เกิดการก่อกลายพันธุ์ได้ (DNA mutation) 2,3-Quinone ยังสามารถถูกรีดิวซ์ไปเป็น semiquinones ได้ด้วยเอนไซม์ cytochrome P450 reductase ในขั้นตอนนี้ทำให้เกิด ออกซิเจนสปีชีส์ที่ว่องไว (reactive oxygen species) ซึ่งเป็นสาเหตุให้ DNA ถูกทำลาย นอกจากนี้ 2,3-Quinone สามารถถูกรีดิวซ์กลับไปเป็น 2,3-catechol ได้ด้วยเอนไซม์ quinone reductase (QR2) และได้มีการรายงานที่ QR2 อาจจะไปเปลี่ยนสับสเตรทของ quinone ไปเป็นสารที่มีความว่องไวสูงมากในการทำลายเซลล์



ภาพประกอบ 7 โครงสร้างของเอนไซม์ QR2

ที่มา: RCSB PDB PROTIEN DATA BANK. 2556: ออนไลน์

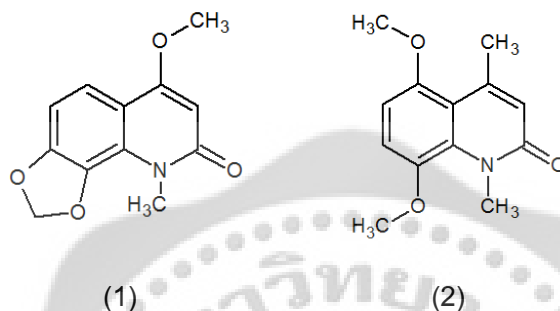
จากกลไกการเกิดโรคมะเร็งเต้านมจะเห็นได้ว่าเอนไซม์ QR มีส่วนเกี่ยวข้อง และในรายงานวิจัยใหม่ๆ พบว่าเอนไซม์ QR เป็นเอนไซม์เป้าหมายใหม่ที่จะใช้ในการค้นหาและออกแบบตัวยับยั้งเอนไซม์ QR ซึ่งเอนไซม์ QR แบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ QR1 และ QR2 โดยในงานวิจัยนี้สนใจศึกษาเอนไซม์ QR2 เพื่อค้นหาหรือออกแบบตัวยับยั้งเอนไซม์ QR2 ที่สามารถเข้าไปจับในบริเวณการจับของเอนไซม์ QR2 ซึ่งลักษณะโครงสร้างของเอนไซม์ QR2 เป็นดังภาพประกอบ 7 โดยเอนไซม์ชนิดนี้พบมากในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น หัวใจ ตับ กล้ามเนื้อ มีลักษณะเป็น Homodimer ภายในโครงสร้างจะมี Flavin Adenine dinucleotide (FAD) เป็น Cofactor ที่มีความสำคัญต่อการเร่งปฏิกิริยา นอกจากนี้พบว่าเอนไซม์ QR2 ยังเป็นเอนไซม์ที่อยู่ใน Phase II และเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา Quinone Reductase (QR) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่ม Oxidoreductase โดยมีสมการการเกิดดังนี้



จากสมการที่ 1 ทำให้เห็นว่าถ้าเอนไซม์ QR2 ในเซลล์มะเร็งเปลี่ยน Quinone สับสเตรทให้เป็นอนุมูลอิสระที่สามารถจับกับ DNA แล้วทำให้ DNA เกิดการเสียหาย หรือไปเพิ่มความเป็นพิษแก่ Quinone และพบว่าปริมาณเอนไซม์ QR2 จะมีมากขึ้นเมื่อเป็นมะเร็งเต้านมมีการลุกลามมากขึ้น (Christine E. Foster; et al. 1999: 9881-9886)

เอนไซม์ QR2 ที่มีอยู่ในธนาคารฐานข้อมูลโครงสร้างของโปรตีนมีทั้งหมด 53 โครงสร้าง แต่ งานวิจัยนี้สนใจโครงสร้างโปรตีนที่มีรหัส 3G5M.pdb ซึ่งมีตัวยับยั้ง Casimiroin หรือสาร 1 อยู่ในบริเวณ การจับทั้ง 2 บริเวณของเอนไซม์

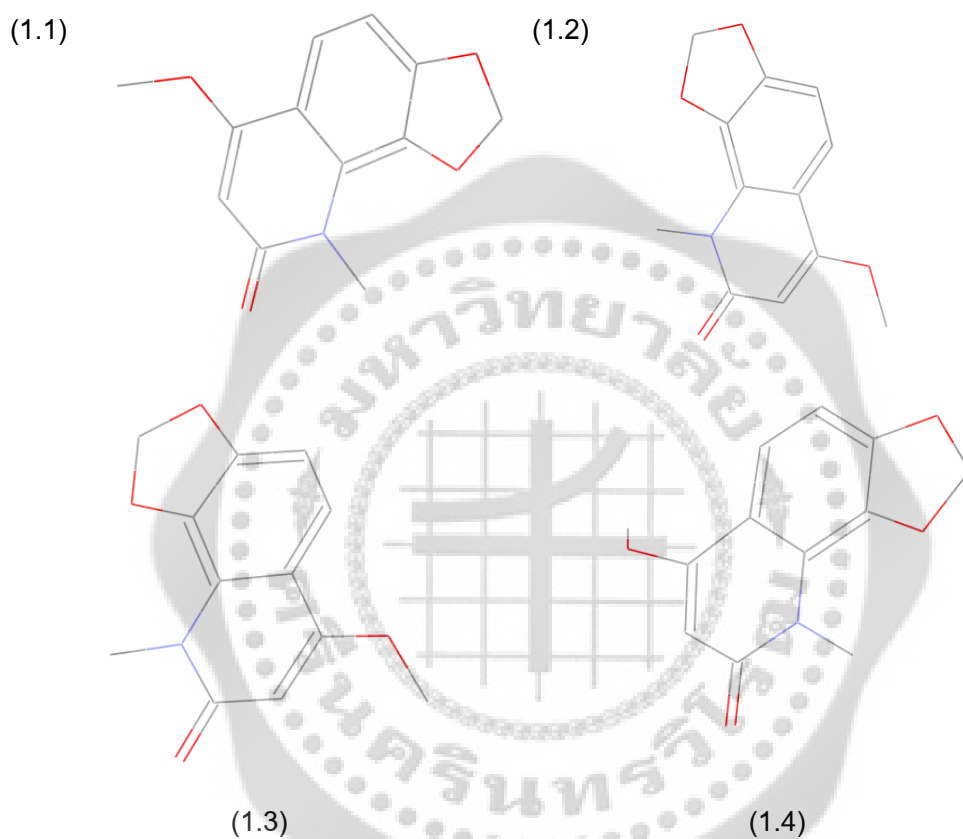
ตัวยับยั้งที่สนใจจะศึกษาคือ **Casimiroin** (สาร 1)



ภาพประกอบ 8 โครงสร้างของตัวยับยั้งที่ 1 และ 2

สาร 1 เป็นสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ได้จากเมล็ดของ *Zapote blanco* หรือ *Casimiroa edulis* สามารถยับยั้งเอนไซม์ QR2 และในธรรมชาติพบสาร 1 ในปริมาณที่น้อยมาก จึงได้มีรายงานการสังเคราะห์สาร 1 และอนุพันธ์ของสาร 1 ทั้งหมด 20 ชนิด (ภาพประกอบ 8) เพื่อยับยั้งเอนไซม์ QR2 และเอนไซม์ Aromatase ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคมะเร็งเต้านม มีลักษณะโครงสร้างของสาร 1 และสาร 2 เพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ QR2 และเอนไซม์ Aromatase ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคมะเร็งเต้านม โดยทดสอบกับเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด Hepa1c1c7, MCF-7, LNCaP และ LU พบว่าสาร 2 สามารถยับยั้งเอนไซม์ QR2 และเอนไซม์ Aromatase ได้ จากนั้นดูอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นในโครงสร้าง X-ray ของเอนไซม์ QR2 ด้วย Electron density พบว่าอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นของสาร 1 และสาร 2 ในเอนไซม์ QR2 คล้ายกันสามารถเข้าไปที่ Active site ของเอนไซม์ QR2 โดยโครงสร้างของสาร 1 และสาร 2 ขนานกับวง Isoalloxazine ของ FAD นอกจากนี้หมู่คาร์บอนิลของสาร 1 เกิดพันธะไฮโดรเจนกับหมู่อะมิโนของ Asn161 ทำให้ทราบว่าสาร 1 และสาร 2 สามารถยับยั้งเอนไซม์ QR2 และเอนไซม์ Aromatase ได้และสามารถใช้เป็นสารป้องกันการเกิดมะเร็งเต้านม (Arup Maiti; et al. 2009: 1873-1884)

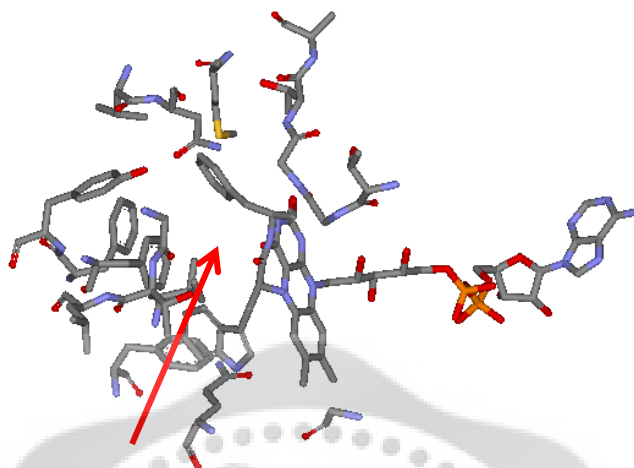
โครงสร้างโปรตีนที่มีรหัส 3G5M.pdb มีบริเวณการจับ 2 บริเวณ และแต่ละบริเวณการจับจะมีโครงสร้างสาร 1 อยู่ 2 โครงสร้าง ได้แก่ บริเวณการจับตำแหน่งที่ 1 จะมีตัวยับยั้งที่ 1.1 (สาร 1.1) และ 1.2 (สาร 1.2) ส่วนบริเวณการจับตำแหน่งที่ 2 จะมีตัวยับยั้งที่ 1.3 (สาร 1.3) และ 1.4 (สาร 1.4) ดังภาพประกอบ 9



ภาพประกอบ 9 โครงสร้างของสาร 1.1, สาร 1.2, สาร 1.3 และสาร 1.4

จากภาพประกอบ 9 จะเห็นว่าโครงสร้างของสาร 1.1-1.4 มีลักษณะโครงสร้างเหมือนกันแต่มี Orientation ที่ไม่เหมือนกัน เนื่องจากอยู่ในบริเวณการจับที่ตำแหน่งแตกต่างกัน

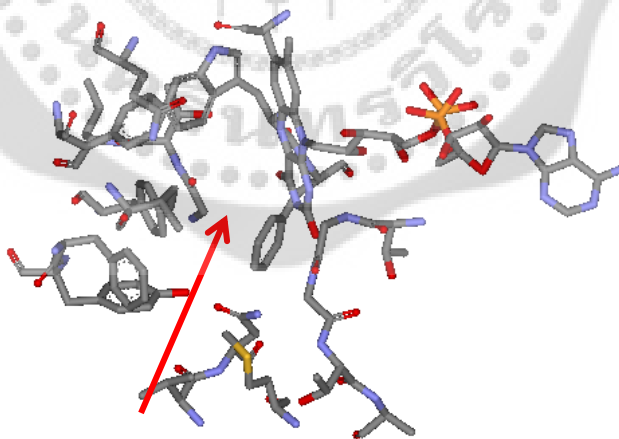
บริเวณการจับของเอนไซม์ QR2 ตำแหน่งที่ 1



ภาพประกอบ 10 บริเวณการจับของเอนไซม์ QR2 ตำแหน่งที่ 1

จากภาพประกอบ 10 จะเห็นว่า มีโพรงหรือบริเวณการจับของเอนไซม์ QR2 ตำแหน่งที่ 1 อยู่ ซึ่งบริเวณการจับ (Binding site) เป็นบริเวณที่สับสเตรท (substrate) สามารถเข้าจับกับเอนไซม์ได้ดี

บริเวณการจับของเอนไซม์ QR2 ตำแหน่งที่ 2



ภาพประกอบ 11 บริเวณการจับของเอนไซม์ QR2 ตำแหน่งที่ 2

จากภาพประกอบ 11 จะเห็นว่า มีโพรงหรือบริเวณการจับของเอนไซม์ QR2 ตำแหน่งที่ 2 อยู่

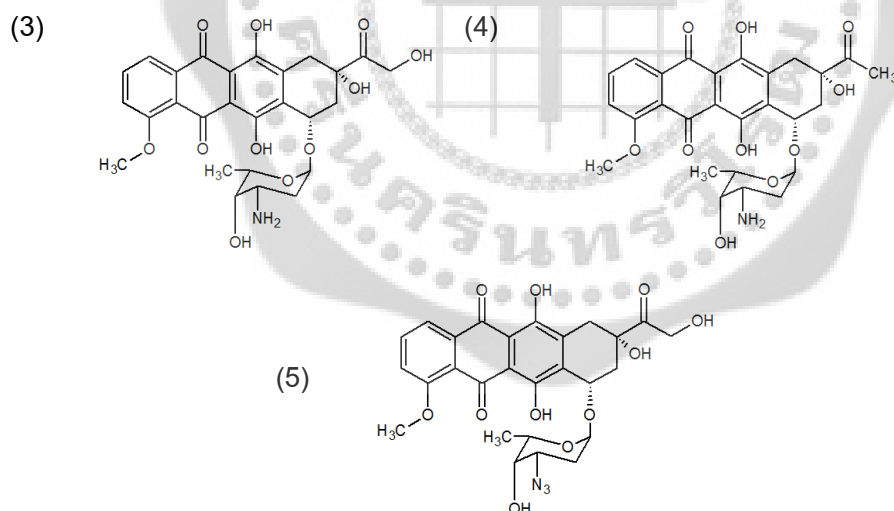
2. ตัวยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม

ชัญวลี ศรีสุโข (ชัญวลี ศรีสุโข. 2552: 84-87) ได้แบ่งชนิดของตัวยับยั้งที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งเต้านม โดยพิจารณาชนิดของตัวยับยั้งที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งเต้านมออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ดังนี้

1. ตัวยับยั้งเป้าหมายที่ไม่ใช่ฮอร์โมน ยาประเภทไนโตรเจน หรือมัสตาร์ด เช่น Cyclophosphamide, Methotrexat, 5-Fu, Doxorubicin (Adriamycin) และVincristine
2. ตัวยับยั้งเป้าหมายที่เป็นฮอร์โมน เช่น Tamoxifen และ Anastrozole

ซึ่งตัวยับยั้งที่ 1 ในงานวิจัยนี้จะอยู่ในกลุ่มตัวยับยั้งเป้าหมายที่ไม่ใช่ฮอร์โมน

ในปี ค.ศ. 2012 ชูเวิน ยู และคณะ (Shuwen Yu; et al. 2012: 3671-3684) ได้ทำการสังเคราะห์และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารในกลุ่ม 3'- Azido doxorubicin ตามภาพประกอบ 12 เพื่อใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็ง โดยสังเคราะห์สาร 3 และสาร 5 จากสาร 4



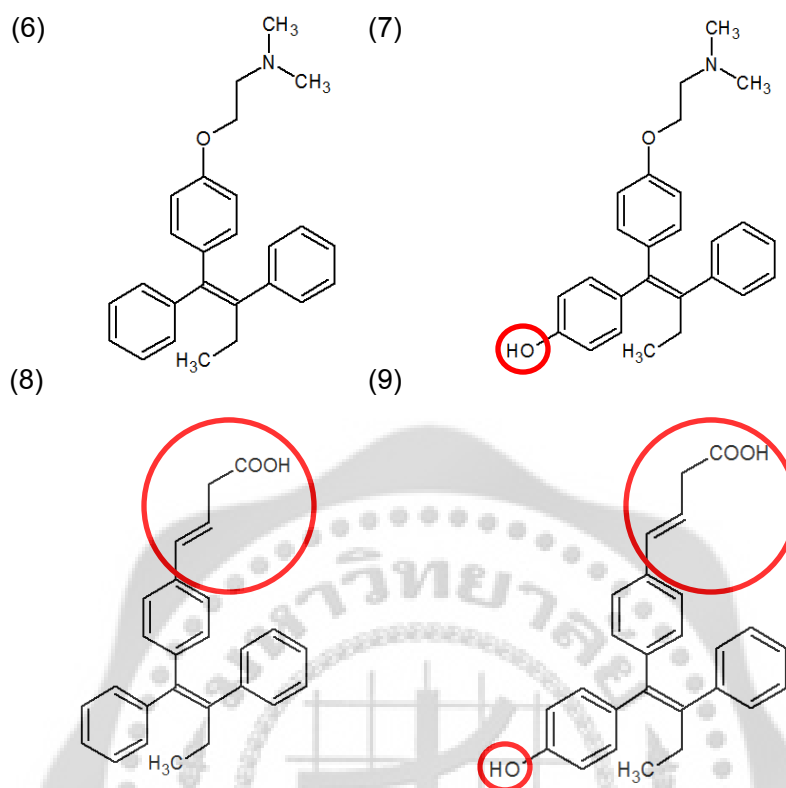
ภาพประกอบ 12 โครงสร้างของสาร 3, สาร 4 และสาร 5

ที่มา: Shuwen Yu; et al. 2012: 3671-3684

แล้วนำมาทดสอบในเซลล์มะเร็ง MCF-7 และ K562 พบว่าสาร 5 สามารถยับยั้งโรคมะเร็งได้ และมีความเป็นพิษน้อยกว่าสาร 3 และสาร 4 แล้วทำการยืนยันด้วยโมเลกุลลาร์ดีอกกิ่งระหว่างสาร 5

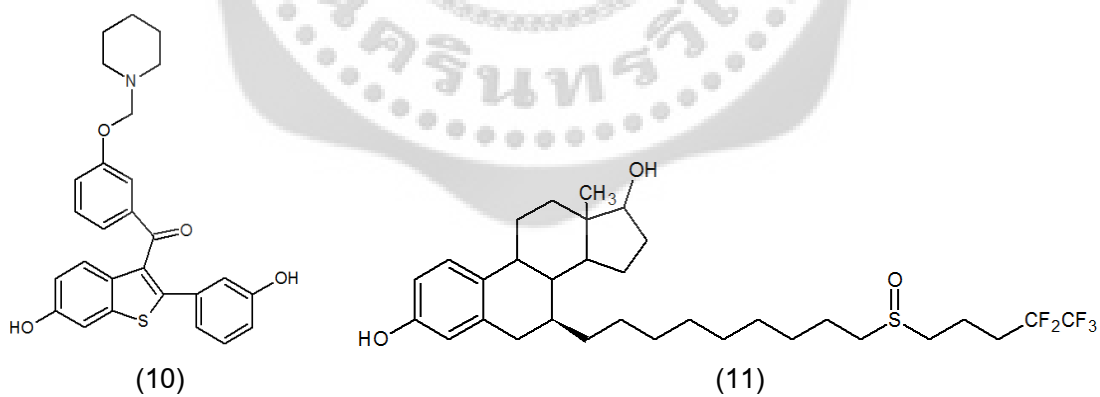
และสาร 3 ใน P-glycoprotein (P-gp) ของมนุษย์ (3G60) พบว่าสาร 5 และสาร 3 เกิด Hydrophobic interaction และ π - π stacking interaction กับกรดอะมิโน Ile336, Phe728, Leu971, Phe974 และ Val978 เหมือนกัน หลังจากนั้นนำสาร 5 มาทดลองในสัตว์ทดลอง ซึ่งก็พบว่าสาร 5 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งโรคมะเร็งได้ดีและมีความเป็นพิษน้อยกว่าสาร 3 ดังนั้นสาร 5 จึงมีศักยภาพในการนำมาพัฒนาใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็งต่อไป

ในปี ค.ศ. 2001 เดวิด เจ. เบนเทรม และคณะ (David J. Bentrem; et al. 2001: 838-846) ได้ทำการศึกษากลไกของ Estrogen Receptor α โดยใช้สาร 9 ซึ่งเป็นยาตัวใหม่ที่อยู่ในกลุ่มยับยั้งฮอร์โมนเอสโตรเจน (Antiestrogen) มีโครงสร้างหลักเหมือนกับโครงสร้างของสาร 6 ซึ่งเป็นตัวยับยั้งโรคมะเร็งเต้านมที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน แต่เนื่องจากพบว่ายังมีผลข้างเคียงอยู่ดังนั้นก็จึงได้ทำการแทนที่หมู่ R ของสาร 6 ด้วยหมู่ฟังก์ชันอื่น ดังภาพประกอบ 13 ส่วนภาพประกอบ 14 เป็นโครงสร้างยารักษาโรคมะเร็งเพื่อนำมาเปรียบเทียบกับอนุพันธ์ของสาร 6 จากนั้นนำโครงสร้างสาร 6 สาร 7 สาร 8 และสาร 9 มาทดสอบกับเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) เซลล์มะเร็งปากมดลูก (ECC-1) และเซลล์การกลายพันธุ์ของ estrogen receptor (D351Y) พบว่าสาร 9 ไม่ก่อให้เกิดการเจริญเติบโตของมะเร็งปากมดลูก แล้วบล็อกการสร้าง Estradiol แต่สาร 6 จะไปกระตุ้นเนื้อเยื่อของโพรงมดลูกให้กลายเป็นมะเร็งได้ จึงนำสาร 9 และสาร 10 มาทดสอบกับเซลล์ MCF-7 ด้วยวิธี Western blotting พบว่าสาร 9 และสาร 10 ไม่มีผลต่อปริมาณของ estrogen receptor (ER) แต่สาร 11 ทำให้ปริมาณของ ER ลดลง จึงนำมาทดสอบต่อโดยนำสารอนุพันธ์ของสาร 6 สาร 10 และ สาร 11 มาทดสอบ Transforming growth factor α (TGF α) ใน D351Y พบว่าสาร 9 และสาร 10 กระตุ้น TGF α ของ D351Y ER แต่สาร 11 จะขัดขวาง TGF α จากนั้นทำ Molecular models ของ ER complex เพื่อดู Interaction ระหว่างสาร 8 กับสาร 9 ใน ER complex พบว่าหมู่ 4-OH ของสาร 7 เกิด Interaction ที่ผิวกับ Asp351 แต่หมู่ Carboxylic acid ของสาร 9 เกิดแรงผลักรังที่ผิวกับ Asp351 ดังนั้นสาร 9 จึงเข้าจับกับเอสโตรเจนได้น้อยกว่าสาร 7 แล้วทำโมเลกุลลาร์ต็อกกิงสาร 7 และสาร 9 ใน ER complex (3ERT) พบว่าหมู่ Hydroxyl ของ สาร 7 เกิดพันธะไฮโดรเจนกับน้ำและ Glu33 และสาร 9 สามารถเข้าไปที่ Active site ของ ER complex ได้ โดยใช้สาร 7 เป็นตัว Dock ลงไปก่อน จึงสรุปได้ว่ากลไกการยับยั้งของ Estrogen Receptor α ด้วยสาร 9 แตกต่างจากกลไกของสารประกอบอื่นๆ และพบว่าสาร 9 ไม่ทำให้เกิดมะเร็งปากมดลูก



ภาพประกอบ 13 โครงสร้างของสาร 6, สาร 7, สาร 8 และสาร 9

ที่มา: David J. Bentrem; et al. 2001: 838-846



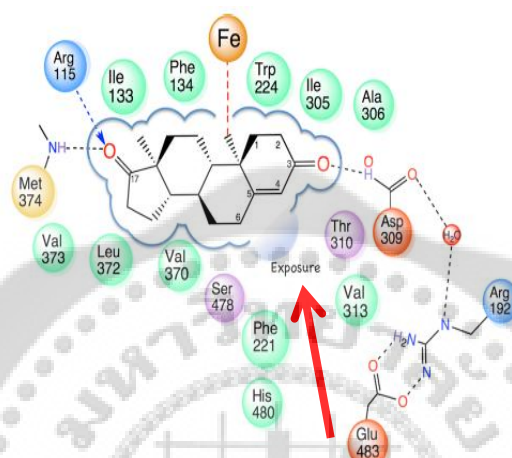
ภาพประกอบ 14 โครงสร้างของสาร 10 สาร 11

ที่มา: David J. Bentrem; et al. 2001: 838-846

ในปี ค.ศ. 2004 มาเรีย สตีโบโรวา และคณะ (Marie Stiborová; et al. 2004: 8374-8380) ได้ศึกษาโมเลกุล Ellipticine ว่าสามารถยับยั้งโรคมะเร็งได้หรือไม่และศึกษากระบวนการเกิด Metabolism ของ Ellipticine ว่าสามารถเกิดพันธะโคเวเลนต์กับ DNA adduct ใน Cytochromes P450 ของมนุษย์ แล้วได้โครงสร้าง 13-Hydroxyellipticine และ Ellipticine N²-oxide หรือไม่ เพื่อหายารักษาโรคมะเร็งชนิดใหม่ได้ พบว่า Ellipticine เป็นยาที่สามารถป้องกันไม่ให้มะเร็งแพร่กระจายโดย Ellipticine จะไปเกิดอันตรกิริยากับ DNA และสามารถยับยั้งเอนไซม์ Topoisomerase II ได้ โดยทำการทดสอบฤทธิ์ของ Ellipticine กับ CYPs ชนิดต่างๆ จากการทดลองพบว่า CYPs มีความเฉพาะเจาะจงกับการเกิดออกซิเดชันของ Ellipticine และกระบวนการสร้าง DNA adducts ซึ่งการเกิดออกซิเดชันของ Ellipticine ด้วย CYP1A1/2 จะได้ 9-Hydroxyellipticine และ 7-Hydroxyellipticine และการเกิดออกซิเดชันของ Ellipticine ด้วย CYP3A4 จะได้ 13-Hydroxyellipticine และ N²-oxide จากนั้นทำการยืนยันด้วยการทำโมเลกุลลาร์ต็อกกิ่งของ Ellipticine ใน CYP3A4 พบว่าโครงสร้างของ Ellipticine จะชนานและเกิดอันตรกิริยากับ Heme ของ CYP3A4 ได้ดี จึงทำให้สามารถยับยั้งการเกิดโรคมะเร็งหรือการแพร่กระจายได้ นอกจากนี้ยังสามารถอธิบายการเกิดออกซิเดชันของ Ellipticine ด้วย CYP3A4 ได้เป็น 13-Hydroxyellipticine และ N²-Oxide ได้อีกด้วย

3. การออกแบบตัวยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม

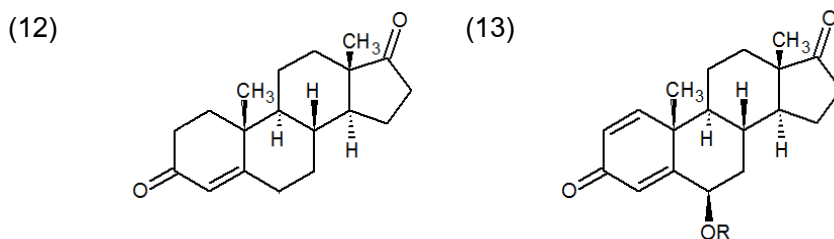
ในปี ค.ศ. 2012 ดาบาชิส โกล และคณะ (Debashis Ghosh; et al. 2012: 8464-8476) ได้ศึกษาการออกแบบตัวยับยั้งเอนไซม์ Aromatase



ภาพประกอบ 15 อันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างสาร 12 กับกรดอะมิโนข้างเคียงในบริเวณ Active site ของเอนไซม์ Aromatase

ที่มา: Debashis Ghosh; et al. 2012: 8464-8476

จากภาพประกอบ 15 จะเห็นว่าสาร 12 มีความจำเพาะต่อ Active site ของเอนไซม์ Aromatase และยังมีโพรงหรือช่องว่างอยู่จึงทำการออกแบบโมเลกุลของสาร 12 โดยเพิ่มหมู่ R ซึ่งเป็นสาร alkyloxy ที่ตำแหน่ง C₆ ของสาร 12 ดังภาพประกอบ 16 แล้วทำโมเลกุลลาร์ด็อกกิ่งสาร 13 ใน 1QKU, 3UA1, 3T3R 1OG5, 3QM4 และ 3RUK ด้วยโปรแกรม Molecular Operating Environment (MOE) พร้อมทั้งทดสอบกับเชื้อ MCF-7 พบว่าสารประกอบบางโมเลกุลมีค่า EC₅₀ ดีกว่า Exemestane ซึ่งเป็นตัวยับยั้ง Aromatase



ภาพประกอบ 16 โครงสร้างสาร 12 และโครงสร้างสาร 13

ที่มา: Debashis Ghosh; et al. 2012: 8464-8476

4. ระเบียบวิธีการคำนวณทางเคมีควอนตัมหรือเคมีคอมพิวเตอร์

เคมีคอมพิวเตอร์ เป็นศาสตร์ใหม่ที่เกิดจากทฤษฎีพื้นฐานของกลศาสตร์ควอนตัมและกลศาสตร์สถิติ สามารถใช้วัดสมบัติของสารด้วยวิธีการคำนวณได้ในระดับของแต่ละอะตอมหรือโมเลกุล ดังนั้นเคมีคอมพิวเตอร์จึงเป็นเครื่องมือวิจัยแห่งอนาคต (อทิทยา ศิริภิญญานนท์. 2546: 41)

การออกแบบสารที่ใช้เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ในกระบวนการพัฒนายาจำเป็นต้องใช้เวลานานหลายปี เริ่มตั้งแต่หาสมุนไพรมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อโรค ทำการสกัด ทำการทดสอบฤทธิ์กับเชื้อโรคและสัตว์ทดลอง หากมีผลข้างเคียงเกิดขึ้นจะต้องกลับไปเริ่มต้นใหม่ตั้งแต่กระบวนการหาสมุนไพรมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ ดังนั้นการออกแบบจำลองโมเลกุลของยาจึงเป็นเครื่องมือหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ แบบจำลองโมเลกุลสามารถคำนวณสมบัติทางโครงสร้าง (structural properties) ที่มีผลต่อการเข้าจับกันระหว่างตัวยากับเชื้อโรค เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการออกแบบยาต่อไป แบบจำลองโมเลกุลที่ใช้อยู่ในปัจจุบันแบ่งออกเป็น 2 วิธี ได้แก่

1. กลศาสตร์เชิงโมเลกุล (Molecular mechanics) เป็นวิธีการออกแบบที่นิยมมากทางด้านชีวเคมี มีหลักการคือ กำหนดโมเลกุลให้มีลักษณะเป็นอะตอมยึดกันเป็นก้อนมวลด้วยสปริง กำหนดแรงกระทำระหว่างอะตอมต่างๆ จากสมการชุดหนึ่งจึงสามารถกำหนดรูปแบบการเคลื่อนที่ของอะตอมต่างๆ ในโมเลกุลเช่น stretching คือการยืดหดของพันธะและ bending คือการงอของพันธะ โดยมีค่าพารามิเตอร์แต่ละชุดสำหรับเซตของอะตอมที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ จะเรียกว่า force-field parameters ได้มาจากการวิเคราะห์ข้อมูลจากการทดลองและจากการคำนวณทางทฤษฎี สามารถสร้างและแก้ไขโครงสร้างโมเลกุลพร้อมทั้งคำนวณหาโครงสร้างที่เสถียร

2. กลศาสตร์ควอนตัม (Quantum mechanics) คำนวณหาพลังงานของระบบอะตอมและโมเลกุลจากการแก้สมการคลื่น เป็นระเบียบวิธีที่ให้ผลการคำนวณที่ถูกต้องและสามารถประยุกต์ใช้ร่วมกับวิธีอื่นได้

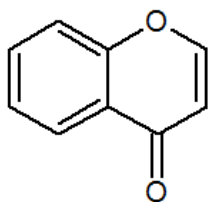
การออกแบบสารที่ใช้เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ในกระบวนการพัฒนายาส่วนใหญ่จะใช้วิธี โมเลกุล ลาร์ต็อกกิ้ง

โมเลกุลลาร์ต็อกกิ้ง เป็นเทคโนโลยีใหม่ในการออกแบบโดยอาศัยความสามารถทางคอมพิวเตอร์กราฟฟิกส์แบบ 3 มิติที่มีสมรรถนะสูง มักใช้กับ ยา หรือ เอนไซม์ ผู้ออกแบบจะนำโมเลกุลที่กำลังออกแบบมาลองสวมเข้ากับโมเลกุลเป้าหมาย เพื่อหาตำแหน่งที่เหมาะสมในการจับตัวกันของโมเลกุลทั้งสอง และรูปร่างโมเลกุลที่เหมาะสมที่สุด

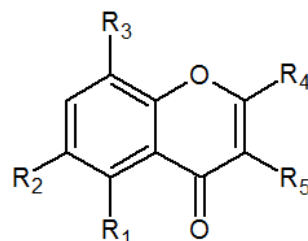
หลักของการโมเลกุลลาร์ต็อกกิ้ง คือ ต้องการค้นหาสารที่มีแรงกระทำระหว่างโมเลกุลกับเอนไซม์เป้าหมายได้แข็งแรงมากกว่าหรือใกล้เคียงกับสับสเตรตเดิมที่เอนไซม์เคยจับ แล้วคำนวณหาพลังงานการยึดจับระหว่างเอนไซม์กับสารชนิดต่างๆ จากนั้นนำมาทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่อไป (ธีรเกียรติ์ เกิดเจริญ, 2539: 17-22)

โมเลกุลลาร์ต็อกกิ้ง จะแบ่งออกเป็นสองส่วนคือ ส่วนแรก คือ ส่วนของ Receptor เป็นตัวรับหรือตัวที่ใช้จับกับตัวยับยั้งซึ่งเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น โปรตีน (เอนไซม์) ซึ่งงานวิจัยนี้จะใช้เอนไซม์ QR2 เป็น Receptor และส่วนที่สอง คือ ส่วนของ Ligand เป็นโมเลกุลที่มีขนาดเล็ก เช่น ตัวยับยั้งหรือยา และงานวิจัยนี้จะใช้ตัวยับยั้งที่ 1 เป็น Ligand การทำโมเลกุลลาร์ต็อกกิ้งของงานวิจัยนี้จะใช้โปรแกรม AutoDock 4.2

ในปี ค.ศ. 2002 จิราภรณ์ อังวิทยาธรณ์ และวีระศักดิ์ (Jiraporn Ungwitayatorn; & Weerasak. 2002: 11-17) ได้ศึกษาการโมเลกุลลาร์ต็อกกิ้งของสาร 15 เพื่อยับยั้ง HIV-1 Protease โดยนำโครงสร้างสาร 14 มาแทน R₁-R₆ ด้วยหมู่ฟังก์ชันต่างๆ ซึ่งลักษณะโครงสร้างของสาร 14 และสาร 15 เป็นดังภาพประกอบ 17



(14)

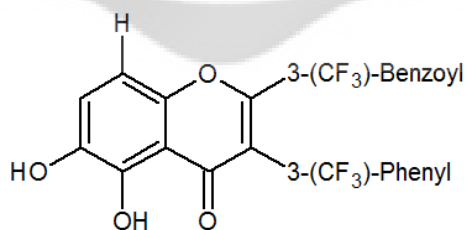


(15)

ภาพประกอบ 17 โครงสร้างของสาร 14 และสาร 15

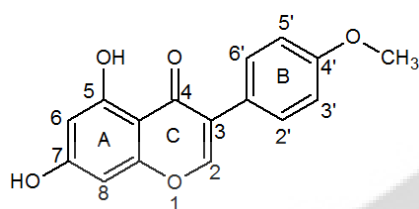
ที่มา: Jiraporn Ungwitayatorn; et al. 2002: 11-17

แล้วทำการสังเคราะห์สาร 15 ทั้งหมด 35 โครงสร้างมาทดสอบใน HIV-1 Protease ด้วย HPLC พบว่า สาร 16 สามารถยับยั้ง HIV-1 Protease ได้ดีที่สุดซึ่งมีโครงสร้างดังภาพประกอบ 18 จากนั้นทำการ โมเลกุลลาร์ด็อกกิ่งสาร 16 ใน HIV-1 protease ที่ตำแหน่ง Binding site ด้วยโปรแกรม FlexiDock พบว่าพันธะไฮโดรเจนของสาร 18 เกิด Interaction กับ Asp25, Asp25', Ile50 และ Ile50' เกิด Hydrophobic interaction กับ Val32, Ile50', Pro81, Val82, และ Ile84 แล้วนำค่า Binding energies ของสาร 15 ทั้ง 35 โมเลกุลมาศึกษา Quantitative structure-activity relationship (QSAR) ด้วย Multiple linear regression (MLR) เพื่อแสดงความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพของ Inhibitor (สาร 15) และค่า Binding energy (BE) พบว่ามีค่า r^2 เท่ากับ 0.9405

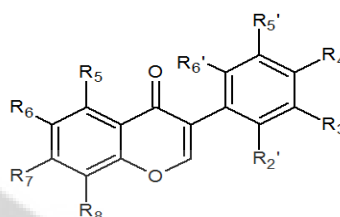


ภาพประกอบ 18 โครงสร้างของสาร 16

ในปี ค.ศ. 2012 เควิน บอนฟิลด์ และคณะ (Kevin Bonfield; et al. 2012: 2603-2613) ได้ทำการออกแบบโมเลกุลและทำการสังเคราะห์สาร 18 เพื่อใช้เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ Aromatase นำโครงสร้างของสาร 17 มาปรับเปลี่ยนโครงสร้างที่วง A และวง B โดยการแทนที่หมู่ R ด้วยหมู่ฟังก์ชันต่างๆ ได้เป็นสารประกอบที่ 18 ดังภาพประกอบ 19



(17)



(18)

ภาพประกอบ 19 โครงสร้างของสาร 17 และสาร 18

ที่มา: Kevin Bonfield; et al. 2012: 2603-2613

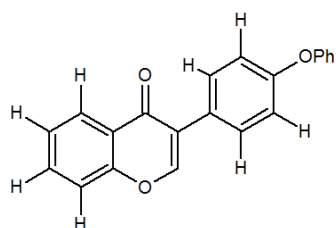
ซึ่งสาร 18 มีทั้งหมด 23 โครงสร้าง แล้วนำสาร 18 ทั้งหมดและ ketoconazole มาทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ Aromatase ของมนุษย์ (CYP19) ในหลอดทดลองด้วยเทคนิค Fluorescence พบว่าโครงสร้างสาร 19 20 และ 21 มีผลในการยับยั้ง Aromatase ซึ่งมีโครงสร้างดังภาพประกอบ 20 จึงทำโมเลกุลสารต่อกิ่ง 18 ในเอนไซม์ Aromatase (3EQM) ด้วยโปรแกรม SYBYL เพื่อดูการเกิด Interactions ของเอนไซม์ Aromatase กับสาร 18 เพื่อดู

1. Hydrophobic interactions พบว่าสาร 18 วง A หรือ B จะเกิด π - π stacking interactions กับวง Porphyrin ของ Aromatase หรือกรดอะมิโน เช่น Phe221, Trp224 และ Phe134

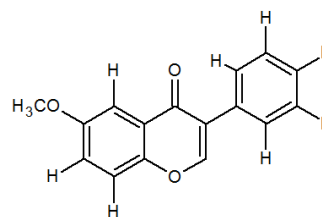
2. Hydrogen bonding พบว่า หมู่ methoxyl สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโนของ Aromatase คือ Met374, Arg192 และ Ser478

3. Heme iron coordination อะตอมไนโตรเจนของหมู่ pyridyl หรืออะตอมออกซิเจนของหมู่ carbonyl ของตัวยับยั้งเกิด Coordinate กับอะตอมเหล็กของ Heme และเพิ่มการ Binding interaction ดังภาพประกอบ 21 จากการทดลองพบว่าโครงสร้างสาร 19 20 และ 21 มีผลในการยับยั้ง Aromatase และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.4 ไมโครโมลาร์, 0.26 4 ไมโครโมลาร์ และ 5.8 4 ไมโครโมลาร์

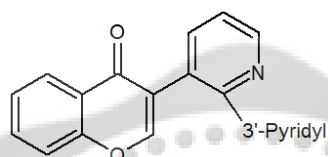
(19)



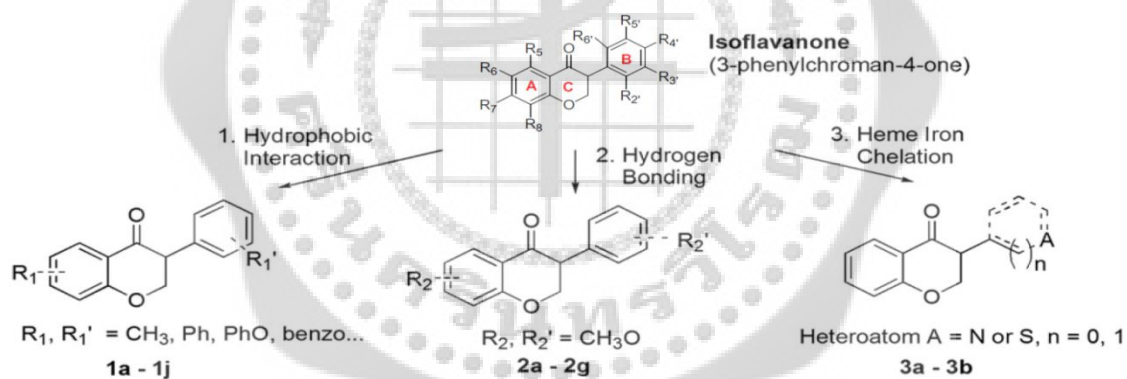
(20)



(21)



ภาพประกอบ 20 โครงสร้างของสาร 19, สาร 20 และสาร 21



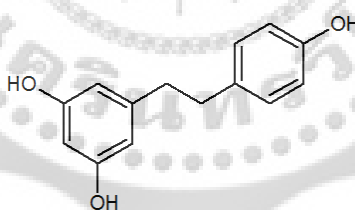
ภาพประกอบ 21 โครงสร้างและวิธีการออกแบบของสาร 18 เพื่อใช้ยับยั้งเอนไซม์ Aromatase

ที่มา: Kevin Bonfield; et al. 2012: 2603-2613

5. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปี ค.ศ. 2000 โอลิเวียร์ โนสจ็ิน และคณะ (Olivier Nosjean; et al. 2000: 31311-31317) ได้พิสูจน์ว่า Melatonin-binding Site MT3 สามารถจับกับ QR2 ได้หรือไม่และหาลักษณะเฉพาะของ QR2 ซึ่งเมลาโทนิมี 2 Receptors คือ MT1 และ MT2 ถ้า Melatonin receptor ทั้ง 2 อยู่ด้วยกันเป็น MT3 ซึ่งเป็นการตั้งสมมุติฐานจากการสังเกตศูนย์กลางของ Binding site ทั้งสอง งานวิจัยนี้สนใจทำ MT3 จากไตของหนู Syrian hamster ให้บริสุทธิ์โดยใช้โครมาโตกราฟีและดูความคล้ายคลึงกันของ เอนไซม์ QR2 ของมนุษย์กับหนูด้วย Mass spectrometry จากนั้นจะทำ Transfection โดยนำ DNA ของ MT3 ที่ได้จากไตหนูเข้าไปในเอนไซม์ QR2 ของหนูและนำ DNA ของ MT3 ที่ได้จากไตหนูเข้าไปในเอนไซม์ QR2 ของมนุษย์ (CHO-QR2) พบว่าลำดับสายกรดอะมิโนของเอนไซม์ QR2 ของหนูคล้ายกับลำดับสายกรดอะมิโนของเอนไซม์ QR2 ของมนุษย์ 95% และ MT3 สามารถควบคุมและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ QR2

ในปี ค.ศ. 2004 ลีโอนิด เบอรวานอฟสกี และคณะ (Leonid Buryanovskyy; et al. 2004: 11417-11426) ได้ทำการศึกษาโครงสร้าง Complex ของ QR2 กับสาร 22 งานวิจัยนี้สนใจ สาร 22 สามารถยับยั้ง QR2 ได้หรือไม่ โดยลักษณะโครงสร้างของสาร 22 เป็นดังภาพประกอบ 22



ภาพประกอบ 22 โครงสร้างของสาร 22

ที่มา: Leonid Buryanovskyy; et al. 2004: 11417-11426

นำสาร 22 มาทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ QR2 ในเซลล์มะเร็ง PC3 และเซลล์ลิวคีเมีย K562 โดยวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนเอนไซม์ QR2 ด้วย Fluorescence และ UVvis spectrophotometry พบว่าสาร 22 สามารถยับยั้ง QR2 ได้ จึงดูโครงสร้าง Complex ของ QR2 กับสาร 22 ด้วย Electron density พบว่าสาร 22 มีความเฉพาะเจาะจงกับ Active-site ของ QR2 และหมู่ไฮดรอกซิลของสาร 22

ทั้ง 3 หมู่จะเกิดพันธะไฮโดรเจนกับ Amino acids ของ QR2 โดยโมเลกุลของสาร 22 จะแบนราบและขนานกับวง Isoalloxazine ของ FAD ซึ่งเป็น Co-factor ของ QR2 ดังนั้นสาร 22 สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ จึงป้องกันการเกิดมะเร็งและป้องกันการเกิดโรคหัวใจ

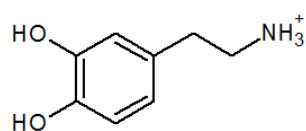
ในปี ค.ศ. 2005 หยู ฟู และคณะ (Yue Fu; et al. 2005: 332–338) ได้ศึกษาโครงสร้างของเอนไซม์ QR2 ใน Complex กับ CB1954 เป็น Prodrug สำหรับโรคมะเร็ง ซึ่ง CB1954 สามารถกระตุ้นเอนไซม์ Nitro-reductase และเอนไซม์ Quinone reductase ดังภาพประกอบ 23



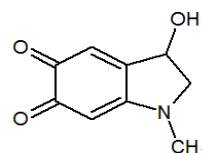
ภาพประกอบ 23 ปฏิกริยาของ CB1954

โดยเอนไซม์ QR2 สามารถกระตุ้น CB1954 ได้ดีกว่า QR1 ดูจาก k_{cat}/K_m จึงมาตุโครงสร้าง 3 มิติของเอนไซม์ QR2 ใน Complex กับ CB1954 ด้วย Electron density พบว่า CB1954 เกิดพันธะไฮโดรเจนกับหมู่ Amide ของ Gly150 และหมู่ carbonyl ของ Gly149 นอกจากนี้มีค่า Resolution เท่ากับ 1.5 อังสตรอม จากนั้นจะมาตุความแตกต่างระหว่าง CB1954 กับเอนไซม์ QR2 และเอนไซม์ QR1 พบว่าอะตอมไนโตรเจนทั้ง 2 อะตอม โดยอะตอมไนโตรเจนอะตอมแรกเกิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน Asn161 ของเอนไซม์ QR2 และอะตอมไนโตรเจนอีกอะตอมจะเป็น Reduction จึงสรุปได้ว่ากรดอะมิโน Asn161 ของเอนไซม์ QR2 และกรดอะมิโน His161 ของเอนไซม์ QR1 จะมี Substrate ที่จำเพาะแตกต่างกัน ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจาก Asn161 ไปเป็น His161 ของเอนไซม์ QR2 จะทำให้เอนไซม์ไม่สามารถกระตุ้น CB1954 ได้และอัตราปฏิกิริยาย้อนกลับของ Menadione reduction ไม่เปลี่ยนแปลง

ในปี ค.ศ. 2008 หยู ฟู่ และคณะ (Yue Fu; et al. 2008: 23829-23835) ได้ทำการศึกษาเพื่อหาโครงสร้าง Complex ระหว่างเอนไซม์ QR2 กับสาร 23 และสาร 24 โดยลักษณะโครงสร้างของสาร 23 และสาร 24 เป็นดังภาพประกอบ 24



(23)



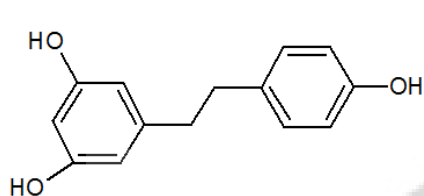
(24)

ภาพประกอบ 24 โครงสร้างของสาร 23 และสาร 24

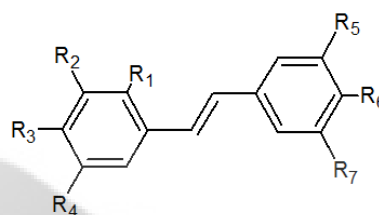
ที่มา: Yue Fu; et al. 2008: 23829-23835

พบว่า QR2 มีความจำเพาะต่อปฏิกิริยารีดักชันของสาร 24 แต่ QR1 ไม่มีผล จากโครงสร้างของ QR2 ใน Complex กับสาร 23 และสาร 24 ซึ่งทั้งสองโครงสร้างเกี่ยวข้องกับ Catecholamine quinones จากนั้นจะมาดูอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นกับโครงสร้าง Complex ระหว่างเอนไซม์ QR2 กับสาร 23 และสาร 24 ด้วย Electron density พบว่าอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นใน Complex ระหว่าง QR2 กับสาร 23 และสาร 24 มีความคล้ายคลึงกัน วงอะโรมาติกของ สาร 23 และสาร 24 ขนานกับวง Isoalloxazine ของ FAD นอกจากนี้สาร 23 และสาร 24 สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับหมู่คาร์บอนิลของ Gly174 ดังนั้นกลไกของ QR2 มีความจำเพาะต่อ Catechol quinones เมื่อเปรียบเทียบ QR2 กับ QR1 แตกต่างกันที่การหมุนที่ของ side chain ซึ่งมีเพียงกรดอะมิโนเดียวคือ Phe106 จึงมีความจำเพาะต่อประสิทธิภาพของเอนไซม์ จากผลความแตกต่างของเอนไซม์ทั้งสองแสดงว่า QR2 มีความสำคัญต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ Catecholamine ซึ่งเกี่ยวข้องกับสาเหตุการเกิดโรค Parkinson disease ได้

ในปี ค.ศ. 2010 บิน สัน และคณะ (Bin Sun; et al. 2010: 5352-5366) ได้ออกแบบสังเคราะห์และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร 26 ซึ่งสามารถยับยั้งเอนไซม์ทั้ง 2 คือ Aromatase และ QR2 นำโครงสร้างสาร 25 มาแทนที่หมู่ R ด้วยหมู่ฟังก์ชันต่างๆ ดังภาพประกอบ 25



(25)



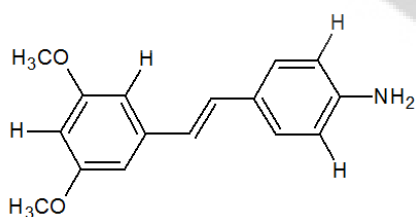
(26)

ภาพประกอบ 25 โครงสร้างของสาร 25 และสาร 26

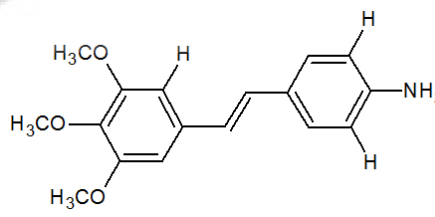
ที่มา: Bin Sun; et al. 2010: 5352-5366

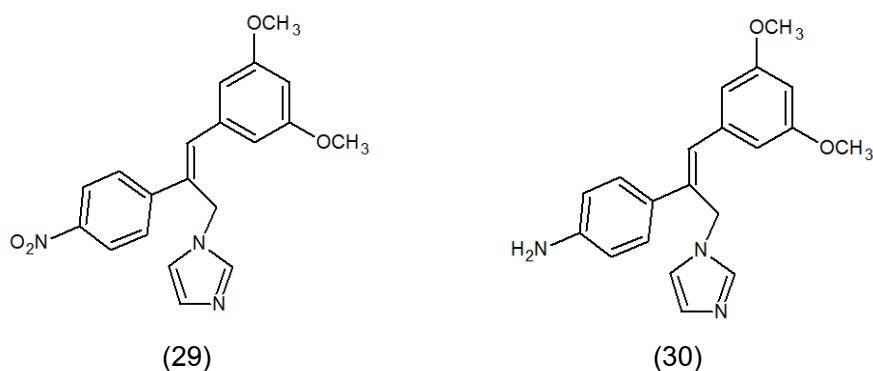
จะได้สาร 26 ทั้งหมด 59 โครงสร้าง ซึ่งพบว่าสาร 27 สามารถยับยั้งเอนไซม์ Aromatase จึงนำสาร 27 มาทำโมเลกุลลาร์ดีอกกิ้งในเอนไซม์ Aromatase และเอนไซม์ QR2 ด้วยโปรแกรม GOLD เพื่อดูการเกิด Interaction แล้วใช้คอมพิวเตอร์ในการออกแบบจำลองโมเลกุล พบว่าสาร 28 และ 29 สามารถยับยั้ง Aromatase ได้ดีกว่าด้วยสาร 25 และสาร 27 และ 30 สามารถยับยั้ง QR2 ได้ดีกว่าด้วยสาร 25 ด้วยเช่นกันดังภาพประกอบ 26

(27)



(28)





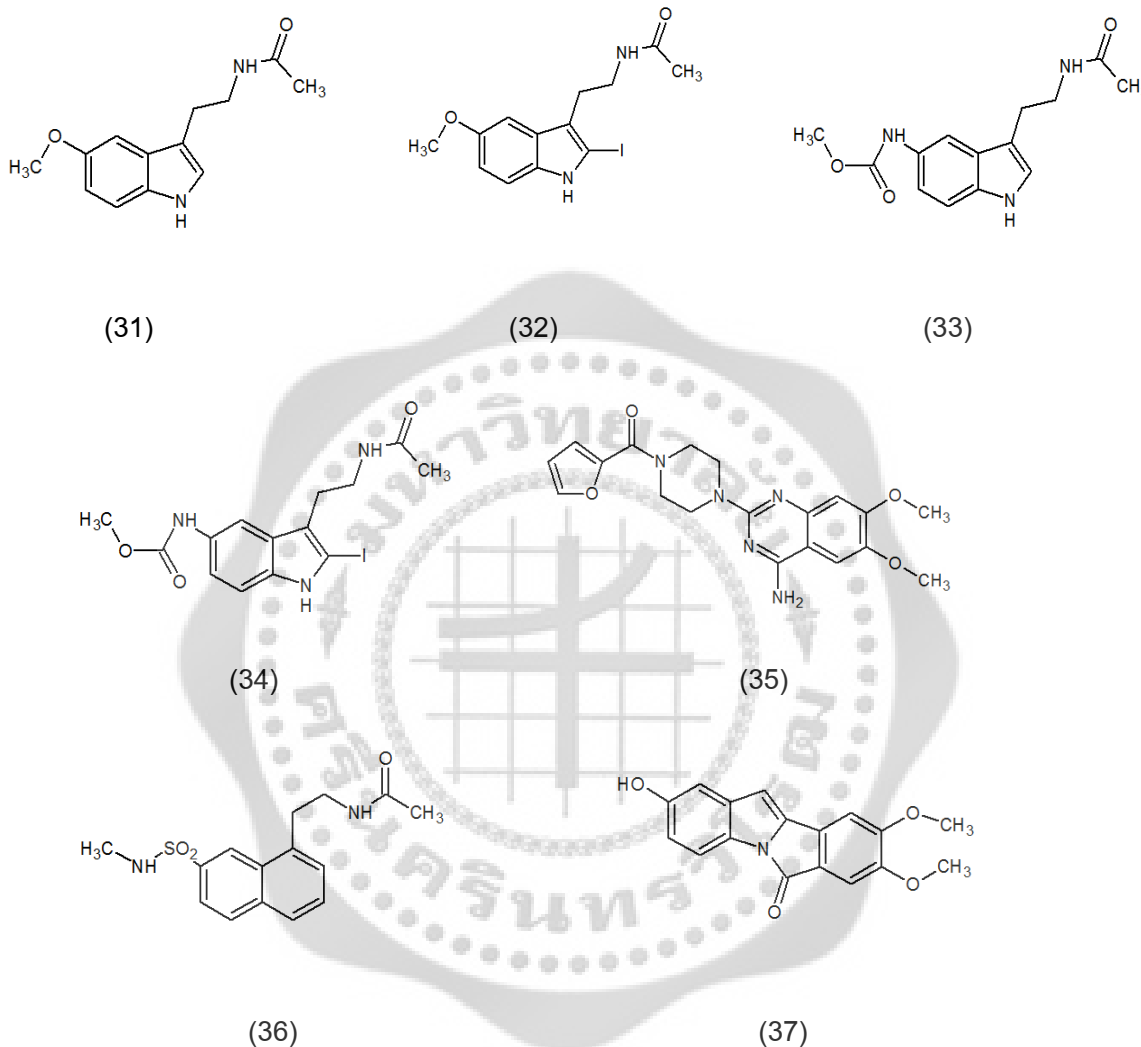
ภาพประกอบ 26 โครงสร้างของสาร 27, สาร 28, สาร 29 และสาร 30

ที่มา: Bin Sun; et al. 2010: 5352-5366

ในปี ค.ศ. 2011 เทจสึยะ ฮาชิโมโตะ และคณะ (Tetsuya Hashimoto; et al. 2011: 10-12) ได้ทำการศึกษาปริมาณที่เพิ่มขึ้นของเอนไซม์ QR2 ในต่อมสมองฮิปโปแคมปัส (Hippocampus) ของโรคสมองเสื่อม ซึ่ง QR2 เป็น Cytosolic flavoenzyme ใช้ในการล้างสารพิษ มีความสำคัญต่อการมีความทรงจำและสูญเสียความทรงจำ งานวิจัยจะวิเคราะห์ปริมาณของเอนไซม์ QR2 ในต่อมสมองฮิปโปแคมปัส, ต่อมทอนซิล (Amygdala) และลอนหน้าผากสฟีเรียของสมอง (Superior frontal gyrus) กับผู้ป่วยที่มีภาวะสมองเสื่อม Alzheimer's disease (AD) โดยใช้วิธี Western blot วิเคราะห์ปริมาณของเอนไซม์ QR2 พบว่าปริมาณของเอนไซม์ QR2 มีความสำคัญมากในต่อมสมองฮิปโปแคมปัสของผู้ป่วยโรคความจำเสื่อม และความสัมพันธ์ระหว่าง QR2 กับโรค AD ยังไม่แน่นอน แต่งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ QR2 ในต่อมสมองฮิปโปแคมปัสอาจเป็นสาเหตุของโรค AD หรือส่งเสริมความก้าวหน้าของโรค เนื่องจากปริมาณความเป็นพิษของ Quinone มีผลต่อการสูญเสียหน่วยความจำ

ในปี ค.ศ. 2011 สก็อต ดี พีแกน และคณะ (Scott D. pegan; et al. 2011: 1182-1195) ได้ศึกษาโครงสร้าง X-ray ของเอนไซม์ QR2 กับตัวยับยั้งที่ช่วงความเข้มข้นเป็นนาโนโมลาร์ เอนไซม์ QR2 พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา Quinone reductase มี FAD เป็น Cofactor ส่วน QR1 จะใช้ NADPH เป็น Co-substrate แต่ QR2 ไม่มี ซึ่งเอนไซม์ QR2 สามารถสร้าง Quinone ที่เป็นอนุมูลอิสระ เกี่ยวข้องกับโรคประสาทและโรคมะเร็ง เอนไซม์ QR2 สามารถพิสูจน์ลักษณะเฉพาะ

ของ Third melatonin receptor (MT3) โดยทดสอบการยับยั้งของเอนไซม์ QR2 ในเซลล์ของมนุษย์และ
ในหลอดทดลองด้วย MT3 ligand ที่ใช้ได้แก่ สาร 31-37 ซึ่งมีโครงสร้างดังภาพประกอบ 27



ภาพประกอบ 27 โครงสร้างของสาร 31, สาร 32, สาร 33, สาร 34, สาร 35, สาร 36 และสาร 37

พบว่ามีความจำเพาะเจาะจงและสามารถยับยั้งเอนไซม์ QR2 ของมนุษย์ได้ จึงจะมาดูโครงสร้าง X-ray ของเอนไซม์ QR2 ของมนุษย์ (hQR2) ใน Complex กับ MT3 ligand ด้วย Electron density พบว่าอนุพันธ์ของ MT3 สามารถเข้าไปที่ Active site ของ hQR2 และเกิดอันตรกิริยากับกรดอะมิโนของเอนไซม์ QR2 งานวิจัยนี้สามารถอธิบายโครงสร้างของเอนไซม์ QR2 กับคุณสมบัติของตัวยับยั้ง (MT3 ligand) ในเอนไซม์ QR2 ของมนุษย์และในหลอดทดลองได้

ในปี ค.ศ. 2012 มาทีแอส แอนโทนี และคณะ (Mathias Antoine; et al. 2012: 87-96) ได้ทำการศึกษาลักษณะของ Cofactor, Substrate และการสร้างพันธะของตัวยับยั้งยับยั้งกับเอนไซม์ QR2 ด้วยเทคนิค Nano-electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) เพื่ออธิบายทางคุณสมบัติและการทำงานของเอนไซม์ QR2 โดยนำเอนไซม์ QR2 ของมนุษย์มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย Size exclusion chromatography พบว่าเอนไซม์ QR2 สามารถแยกได้เป็น 2 สาร คือ Pool1 และ Pool2 แล้วศึกษาลักษณะการสร้างพันธะของ FAD กับ Pool1 ของ QR2 ด้วย Fluorescence แล้วนำ Pool1 และ Pool2 มาศึกษาลักษณะโครงสร้างและลักษณะของพีคด้วย ESI-MS จากนั้นจะศึกษาการสร้างพันธะของตัวยับยั้งยับยั้งกับเอนไซม์ QR2 ด้วย ESI-MS เช่นกัน โดยใช้ Melatonin, Resveratrol และ S26695 พบว่าตัวยับยั้งทั้ง 3 สามารถสร้างพันธะกับ FAD ที่ Active site และวง Flavin เกิดพันธะไฮโดรเจนกับ QR2 จากการทดลองพบว่า QR2 เป็น Homodimer เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยารีดักชันของ Quinone จึงนำมาทดสอบในร่างกายแล้วพบว่า QR2 ทำให้สูญเสียความทรงจำ ถ้ามีปริมาณเอนไซม์ QR2 มากเกินไปจะทำให้เป็นโรคความจำเสื่อม ดังนั้นงานวิจัยนี้ทำให้เข้าใจลักษณะเอนไซม์ QR2 ตัวยับยั้งและ Co-substrate

จากงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่าการนำเคมีควอนตัมหรือเคมีคอมพิวเตอร์มาศึกษาเอนไซม์ QR2 ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาลักษณะโครงสร้างและคำนวณอันตรกิริยาระหว่างตัวยับยั้งที่ 1 (สาร 1) และสารอนุพันธ์เบอร์เบอร์กับบริเวณการจับของเอนไซม์ QR2 ด้วยวิธีการโมเลกุลสาร์ต็อกกิ่งและวิธีทางกลศาสตร์ควอนตัม เพื่อออกแบบโมเลกุลที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ QR2 ของมะเร็งเต้านมที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้น

บทที่ 3

ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

งานวิจัยนี้ผู้วิจัยสนใจทำการศึกษาเกี่ยวกับโรคมะเร็งเต้านม ซึ่งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับโรคมะเร็งเต้านมมีด้วยกันหลายเอนไซม์ เช่น Aromatase และ QR2 เป็นต้น โดยสนใจที่จะศึกษาเอนไซม์ QR2 ซึ่งเป็นเอนไซม์เป้าหมายใหม่ที่จะใช้ในการพัฒนาตัวยับยั้งมะเร็งเต้านม จากฐานข้อมูลโครงสร้างของโปรตีนพบว่าเอนไซม์ที่มีรหัสโครงสร้างของโปรตีนที่เป็นเอนไซม์ของมนุษย์อยู่ทั้งหมด 53 โครงสร้าง (RCSB PDB PROTIEN DATA BANK. 2556: ออนไลน์) แต่ผู้วิจัยเลือกมา 1 โครงสร้างคือ 3G5M เนื่องจากเป็นโครงสร้างใหม่และมีตัวยับยั้งตัวใหม่ที่กำลังพัฒนาให้เป็นตัวยับยั้งในกลุ่มตัวยับยั้งเป้าหมายที่ไม่ใช่ฮอร์โมน โดยในโครงสร้างของรหัส 3G5M จะประกอบด้วยกัน 2 ส่วน ส่วนแรกคือ Receptor และส่วนที่สองคือส่วนของ Ligand (ตัวยับยั้งที่ 1) โดยโครงสร้างของเอนไซม์ QR2 มี 2 บริเวณการจับ โดยเรียกบริเวณดังกล่าวเป็นบริเวณการจับตำแหน่งที่ 1 (Binding site 1) และบริเวณการจับตำแหน่งที่ 2 (Binding site 2) โดยในแต่ละบริเวณการจับจะมี Ligand ปรากฏอยู่ในโครงสร้างของเอนไซม์ QR2

ส่วนในขั้นตอนการดำเนินการวิจัย ผู้วิจัยได้ดำเนินการศึกษาเป็น 2 ขั้นตอนดังนี้

1. โมเลกุลลาร์ด็อกกิ่งเพื่อหาโครงสร้างที่เหมาะสมในการเข้าจับของตัวยับยั้งในบริเวณการจับทั้ง 2 บริเวณ ด้วยโปรแกรม AutoDock 4.2
2. กลศาสตร์ควอนตัมเพื่อคำนวณหาอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างตัวยับยั้งที่มีต่อกรดอะมิโนที่สำคัญและอยู่ในบริเวณการจับทั้งสอง

โดยมีลำดับขั้นตอนการศึกษาคือจะทำการศึกษาดัวยระเบียบวิธีการคำนวณด้วยโมเลกุลลาร์ด็อกกิ่งก่อนเสมอ ยกเว้นโครงสร้างที่ได้มาจากฐานข้อมูลโครงสร้างของโปรตีน หลังจากได้โครงสร้างที่เหมาะสมในการเกิดอันตรกิริยาที่ได้จากระเบียบวิธีโมเลกุลลาร์ด็อกกิ่งแล้ว จึงได้ทำการศึกษาดัวยระเบียบวิธีการคำนวณด้วยกลศาสตร์ควอนตัมต่อไป โดยแต่ละขั้นตอนการดำเนินการมีรายละเอียดดังนี้

1. โมเลกุลลาร์ต็อกกิ่ง

ขั้นตอนการทำโมเลกุลลาร์ต็อกกิ่งจำเป็นต้องทำการหาโครงสร้างของโปรตีน โดยทั่วไปจะทำการ download โครงสร้างของโปรตีนจากธนาคารฐานข้อมูลโครงสร้างของโปรตีน ซึ่งในงานวิจัยนี้ใช้รหัสโครงสร้าง 3G5M.pdb หลังจากนั้น ได้ดำเนินการแยกโครงสร้างดังกล่าวออกเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนของ Receptor ในที่นี้คือ ส่วนของเอนไซม์ QR2 และอีกส่วนหนึ่งคือ ส่วนของ Ligand (ตัวยับยั้งที่ 1)

1.1 การเตรียม Receptor

นำไฟล์ Receptor ในที่นี้คือ เอนไซม์ QR2 มาเปิดด้วยโปรแกรม AutoDock 4.2 แล้วเอาโมเลกุลของน้ำออกจากโครงสร้างของเอนไซม์แล้วทำการเติมไฮโดรเจนอะตอมเพื่อให้ได้โครงสร้างของโปรตีนที่เหมาะสมและถูกต้อง เนื่องจากโครงสร้างของเอนไซม์ที่ได้จากธนาคารโครงสร้างของโปรตีนไม่มีไฮโดรเจนอะตอมในโครงสร้าง หลังจากนั้นเลือกกรตอะมีโนที่ต้องการให้ Flexible แล้วเติมประจุใน Receptor ด้วย Gasteiger charge ทำการบันทึกไฟล์ดังกล่าวออกเป็น 2 ไฟล์ คือ Rigid.pdbqt และ Flexible.pdbqt

1.2 การเตรียม Ligand

เนื่องจากไฟล์ Ligand ที่ได้จากโครงสร้างของ 3G5M นั้น ไม่มีไฮโดรเจนอะตอม ดังนั้นจึงทำการเติมไฮโดรเจนอะตอม แล้วทำการ Optimize ด้วยระเบียบวิธี HF/3-21G ด้วยโปรแกรม Gaussian 2003 และนำโครงสร้างที่ได้ optimize แล้วทำการแปลงให้เป็นไฟล์ประเภท pdb ไฟล์ แล้วเปิดด้วยโปรแกรม AutoDock 4.2 ทำการเติมประจุใน Ligand ด้วย Gasteiger charge แล้วบันทึกให้เป็นไฟล์ Ligand.pdbqt

1.3 ขนาดของGrid

เปิดไฟล์ Rigid.pdbqt (จากข้อ 1.1) และไฟล์ Ligand.pdbqt (จากข้อ 1.2) ทำการเซตค่า Grid ตามที่ต้องการ จากนั้นทำการบันทึกจะได้ไฟล์ Rigid.gpf แล้ว run Autogrid

1.4 การdocking

เปิดไฟล์ Rigid.pdbqt (จากข้อ 1.1) และไฟล์ Ligand.pdbqt (จากข้อ 1.2) เซตรูปแบบการทำโมเลกุลลาร์ต็อกกิ้ง เปิดไฟล์ Flexible.pdbqt (จากข้อ 1.1) แล้วเลือกพารามิเตอร์ในการทำโมเลกุลลาร์ต็อกกิ้ง แล้วทำการ run AutoDock

1.5 หาพารามิเตอร์ที่เหมาะสมสำหรับการ docking

พารามิเตอร์ที่เหมาะสมในการทำ Molecular docking เพื่อให้ได้โครงสร้างการเข้าจับของตัวยับยั้งที่ใช้ในการศึกษาในบริเวณการจับของเอนไซม์ QR2 โดยมี Parameter ที่ต้องศึกษาดังนี้

- กรดอะมิโนที่ Flexible
- จำนวนพันธะของกรดอะมิโนที่ต้อง Flexible
- ขนาดของ Grid
- รูปแบบการ Docking ว่าเป็นแบบ Random หรือไม่ Random
- จำนวนรอบในการทำโมเลกุลลาร์ต็อกกิ้ง

2. กลศาสตร์ควอนตัม

นำโครงสร้าง 3G5M.pdb มาทำตามขั้นตอนดังนี้

2.1 เตรียมโครงสร้างของตัวยับยั้งโรคมะเร็งที่อยู่ในบริเวณการจับของเอนไซม์ QR2 โดยนำโครงสร้างที่ได้จากฐานข้อมูลโครงสร้างของโปรตีน คือ 3G5M.pdb ส่วนโครงสร้างที่ไม่มีในธนาคารฐานข้อมูลโครงสร้างของโปรตีน ได้นำโครงสร้างที่ได้จากระเบียบวิธีการทำโมเลกุลลาร์ต็อกกิ้ง แล้วทำการสร้างแบบจำลองออกเป็น 2 แบบจำลอง โดยกำหนดให้ แบบจำลองที่ 1 มาจากบริเวณการจับของเอนไซม์ QR2 ในตำแหน่งที่ 1 และแบบจำลองที่ 2 มาจากบริเวณการจับของเอนไซม์ QR2 ในตำแหน่งที่ 2

2.2 กำหนดโครงสร้างบริเวณการจับโดยให้ตัวยับยั้งเป็นศูนย์กลาง แล้วเลือกกรดอะมิโนที่อยู่รอบๆ ในรัศมี 7 อังสตรอม ซึ่งทำให้ได้แบบจำลอง 2 แบบจำลอง

2.3 กรดอะมิโนที่อยู่ในบริเวณการจับตามเงื่อนไข 2.2 พบว่าประกอบด้วยกรดอะมิโนทั้งหมด 18 อะมิโน และ 1 โครงสร้างของ FAD

2.4 พิจารณาลำดับกรดอะมิโนที่ได้ในข้อ 2.3 ถ้าพบว่าลำดับกรดอะมิโนหายไปไม่เกิน 2 ลำดับ ให้เติมลำดับกรดอะมิโนที่หายไป

2.5 จากข้อ 2.4 พบว่ามีกรดอะมิโนทั้งหมด 25 ลำดับกรดอะมิโนกับ 1 โครงสร้างของ FAD

2.6 จากข้อ 2.5 ทำให้แบบจำลอง 2 แบบจำลอง ดังนี้

2.6.1 แบบจำลองในบริเวณการจับตำแหน่งที่ 1 ที่มาจากโปรตีนสาย A และ สาย B

โปรตีนสาย A ได้แก่

- $\text{CH}_3\text{CO-Trp105-Phe106-NHCH}_3$
- $\text{CH}_3\text{CO-Thr148-Gly149-Gly150-Thr151-Ala152-Glu153-Met154-Tyr155-NHCH}_3$
- $\text{CH}_3\text{CO-Val160-Asn161-NHCH}_3$
- $\text{CH}_3\text{CO-Glu193-NHCH}_3$

โปรตีนสาย B ได้แก่

- $\text{CH}_3\text{CO-Gly68-NHCH}_3$
- $\text{CH}_3\text{CO-Gln122-NHCH}_3$
- $\text{CH}_3\text{CO-Phe126-Asp127-Ile128-NHCH}_3$
- $\text{CH}_3\text{CO-Phe131-Tyr132-NHCH}_3$
- $\text{CH}_3\text{CO-Gly174-Thr175-Leu176-His177-Phe178-NHCH}_3$

ตัวยับยั้งและโมเลกุลอื่นที่อยู่ในบริเวณการจับ

- ตัวยับยั้งที่ 1

- FAD

2.6.2 แบบจำลองในบริเวณการจับตำแหน่งที่ 2 ที่มาจากโปรตีนสาย A และ สาย B

โปรตีนสาย A ได้แก่

- $\text{CH}_3\text{CO-Gly68-NHCH}_3$

- $\text{CH}_3\text{CO-Gln122-NHCH}_3$

- $\text{CH}_3\text{CO-Phe126-Asp127-Ile128-NHCH}_3$

- $\text{CH}_3\text{CO-Phe131-Tyr132-NHCH}_3$

- $\text{CH}_3\text{CO-Gly174-Thr175-Leu176-His177-Phe178-NHCH}_3$

โปรตีนสาย B ได้แก่

- $\text{CH}_3\text{CO-Trp105-Phe106-NHCH}_3$

- $\text{CH}_3\text{CO-Thr148-Gly149-Gly150-Thr151-Ala152-Glu153-Met154-Tyr155-NHCH}_3$

- $\text{CH}_3\text{CO-Val160-Asn161-NHCH}_3$

- $\text{CH}_3\text{CO-Glu193-NHCH}_3$

ตัวยับยั้งและโมเลกุลอื่นที่อยู่ในบริเวณการจับ

- ตัวยับยั้งที่ 1

- FAD

2.7 เติมหมู่อะซิทิล ($\text{CH}_3\text{CO-}$) ทางด้านปลาย N-และเติมหมู่ เมทิลอะมิโน ($\text{CH}_3\text{NH-}$) ทางด้านปลาย C ของแต่ละชุดของกรดอะมิโนในข้อ 2.6

2.8 สร้างโครงสร้างที่ได้ในข้อ 2.7 ให้สมบูรณ์โดยการเติมไฮโดรเจนอะตอม เนื่องจากโครงสร้างที่ได้จากฐานข้อมูลของโปรตีนจะไม่มีไฮโดรเจนอะตอม

2.9 ทำการคำนวณประจุสุทธิของแต่ละแบบจำลองที่ได้ในข้อ 2.8

2.10 ทำการ Optimize โครงสร้างของแต่ละแบบจำลอง เพื่อให้ได้แบบจำลองที่เหมาะสม ด้วยระเบียบวิธีการคำนวณ Semi-empirical PM3MM โดยทำการ Optimize บนพื้นฐานของ HAF (Hetero atom fixed) ของแบบจำลองที่ได้ทั้งหมด

2.11 นำแบบจำลองที่ได้ในข้อ 2.10 มาสร้างโมเดลของแต่ละกรดอะมิโน แล้วทำการเติมไฮโดรเจนที่บริเวณปลายของกรดอะมิโนแต่ละกรดอะมิโนที่ตัดออกมา และทำการ Optimize เฉพาะไฮโดรเจนที่เติมด้วย ระเบียบวิธีการคำนวณ Semi-empirical PM3MM

2.12 จากข้อ 2.11 ได้กรดอะมิโนย่อยทั้งหมด 25 กรดอะมิโน FAD และตัวยับยั้งที่ 1

2.13 ทำการสร้างคู่แบบจำลองระหว่างตัวยับยั้งกับแต่ละกรดอะมิโน และกับ FAD ทำให้ได้คู่แบบจำลองทั้งหมด 26 แบบจำลอง แล้วทำการคำนวณด้วยระเบียบวิธี B3LYP/6-31G(d,p)

2.14 คำนวณอันตรกิริยาที่ได้ในข้อ 2.13 ด้วยสมการที่ 2

$$IE = E_{(INH+XI)} - E_{(INH)} - E_{(XI)} \quad -(2)$$

เมื่อ IE	คือ	พลังงานของอันตรกิริยา
$E_{(INH+XI)}$	คือ	พลังงานของคู่ระหว่างตัวยับยั้งกับแต่ละกรดอะมิโนหรือ FAD
$E_{(INH)}$	คือ	พลังงานของตัวยับยั้ง
$E_{(XI)}$	คือ	พลังงานของแต่ละกรดอะมิโนหรือ FAD

2.15 สำหรับโครงสร้างที่ได้จากโมเลกุลลาร์ติกกั้งให้ดำเนินการตั้งแต่ข้อที่ 2.1 ถึง 2.14 โดยเลือกเฉพาะโครงสร้าง อนุพันธ์ของตัวยับยั้งที่ 1, 2 และ 54

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

การศึกษาโมเลกุลลาร์ติกกิ้งเพื่อหาโครงสร้างที่เหมาะสมในการเข้าจับของตัวยับยั้งในบริเวณการจับทั้ง 2 บริเวณของเอนไซม์ QR2 และศึกษาอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างตัวยับยั้งที่ 1 (สาร 1) เพราะตัวยับยั้งที่ 1 สามารถยับยั้งเอนไซม์ QR2 ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคมะเร็งเต้านม และสารอนุพันธ์เบอร์เบอร์กับกรดอะมิโนที่อยู่บริเวณการจับของเอนไซม์ QR2 ทั้งสองบริเวณ ด้วยระเบียบวิธีการคำนวณทางเคมีควอนตัม โดยงานวิจัยนี้จะทำการศึกษา อันตรกิริยาที่เกิดขึ้นด้วยระเบียบวิธีการคำนวณ B3LYP โดยใช้ 6-31G(d,p) basis set เพื่ออธิบายการกระจายพลังงานที่เกิดขึ้นในบริเวณการจับของเอนไซม์ QR2 กับตัวยับยั้งที่ 1 และสารอนุพันธ์เบอร์เบอร์บางโครงสร้าง โดยผลการวิเคราะห์ข้อมูลจะกล่าวถึงส่วนโมเลกุลลาร์ติกกิ้งก่อนแล้วจะกล่าวถึงการคำนวณทางเคมีควอนตัม เนื่องจากการคำนวณทางเคมีควอนตัมจะนำโครงสร้างที่ได้จากการทำโมเลกุลลาร์ติกกิ้ง

4.1 โมเลกุลลาร์ติกกิ้ง

ในการศึกษาโมเลกุลลาร์ติกกิ้งจะใช้โปรแกรม AutoDock 4.2 โดยทำการศึกษาเพื่อหาพารามิเตอร์ที่เหมาะสมสำหรับการทำโมเลกุลลาร์ติกกิ้งของตัวยับยั้งเอนไซม์ QR2

4.1.1 พารามิเตอร์ที่เหมาะสมสำหรับการดำเนินการโมเลกุลลาร์ติกกิ้ง

กรดอะมิโนที่ Flexible มี 2 กรดอะมิโน คือ Asn161 ที่อยู่ในสาย A และ สาย B เนื่องจาก Asn161 อยู่ในบริเวณโพรงการจับและอยู่ใกล้กับตัวยับยั้งที่ 1 มากที่สุดและพันธะที่ต้องให้ Flexible มีจำนวน 4 พันธะ

Grid คือ แผนที่ (map) ซึ่งแต่ละ map จะแบ่งตามชนิดของอะตอมของ Ligand ใช้ในการคำนวณอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างตัวยับยั้งที่ 1 กับโครงสร้างของเอนไซม์ QR2 ที่มีรหัส 3G5M.pdb ดังนั้น ขนาดของ Grid จึงต้องครอบคลุมตัวยับยั้งที่ต้องการศึกษาทุกโครงสร้างและต้องมีความเหมาะสม เนื่องจากถ้าขนาดของ Grid เล็กเกินไปจะทำให้พลังงานยึดเหนี่ยวระหว่างตัวยับยั้งกับ

เอนไซม์ที่ได้จะผิดพลาดไป ถ้าขนาดของ Grid ใหญ่เกินไปทำให้การทำโมเลกุลลาร์ต็อกกิ้งต้องใช้เวลา
มากเกินไป ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาขนาดของ grid ที่เหมาะสม

ตาราง 1 ขนาดของ Grid (\AA) กับค่า BE (kcal/mol) ระหว่างตัวยับยั้งกับเอนไซม์ QR2

ขนาดของ Grid (\AA)	BE (kcal/mol)
80	-8.82
90	-8.85
100	-9.03
110	-8.79
120	-8.61

จากตาราง 1 พบว่า เมื่อ Grid มีขนาด $x = y = z$ โดยมีค่าเท่ากับ 100\AA มีค่า
Binding energy (BE) สูงที่สุด ค่า BE เป็นพลังงานยึดเหนี่ยวที่เกิดขึ้นระหว่างตัวยับยั้งกับเอนไซม์
QR2 ที่ได้จากการคำนวณด้วยระเบียบวิธีโมเลกุลลาร์ต็อกกิ้ง ซึ่งถ้าค่า BE ติดลบมากแสดงว่า ตัวยับยั้ง
สามารถเข้าจับกับเอนไซม์ QR2 ได้ดี แต่เมื่อพิจารณาค่าพลังงานที่ได้พบว่า มีค่าพลังงานไม่แตกต่าง
มาก ดังนั้นสามารถใช้ขนาดของ Grid ขนาดใดก็ได้ แต่เนื่องจากโครงสร้างอนุพันธ์ของเบอร์เบอร์อินมี
ขนาดใหญ่กว่าตัวยับยั้งที่ 1 ดังนั้นดังนั้นในงานวิจัยนี้ จะใช้ grid ที่ขนาดเท่ากับ 100\AA

รูปแบบการ Docking เลือกแบบ Random เพื่อหาตำแหน่งในการเข้าจับของตัวยับยั้ง
ในบริเวณการจับของเอนไซม์ QR2 ได้ดีที่สุด

จำนวนรอบในการทำโมเลกุลลาร์ต็อกกิ้ง เพื่อหาโครงสร้างที่เป็นไปได้มากที่สุดในการ
เกิดอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นหรือในการเข้าจับระหว่างตัวยับยั้งกับเอนไซม์ QR2 ถ้าเพิ่มจำนวนรอบในการ
ทำ โมเลกุลลาร์ต็อกกิ้งมากขึ้นโอกาสที่จะหาตำแหน่งในการเข้าจับได้ดีที่สุดก็จะเพิ่มมากขึ้นในการ
กำหนดจำนวนรอบในขั้นตอนการทำโมเลกุลลาร์ต็อกกิ้ง

ตาราง 2 จำนวนรอบในการทำโมเลกุลลาร์ต็อกกิ้ง (รอบ) กับค่า BE (kcal/mol) ระหว่างตัวยับยั้งกับ เอนไซม์ QR2

จำนวนรอบในการทำโมเลกุลลาร์ต็อกกิ้ง (รอบ)	BE (kcal/mol)
70	-8.89
90	-9.18
110	-9.4
130	-9.43
150	-9.58
200	-9.56
250	-9.55

จากตาราง 2 พบว่า จำนวนรอบในการทำโมเลกุลลาร์ต็อกกิ้งเท่ากับ 150 รอบ มีค่า BE ที่เหมาะสม สำหรับงานวิจัยนี้เลือกจำนวนรอบในการทำโมเลกุลลาร์ต็อกกิ้ง เท่ากับ 150 รอบ เนื่องจากการเพิ่มจำนวนรอบให้มากกว่า 150 รอบ ค่าพลังงานที่ได้ไม่แตกต่างและการเพิ่มจำนวนรอบให้มากจะส่งผลทำให้ระยะเวลาที่ต้องใช้ในการคำนวณจะมากไปด้วยและเป็นการสิ้นเปลืองเวลา

วิธีการ Docking ได้แก่ Lamarckian GA เพราะ Lamarckian GA เป็นวิธีที่เกิดจากการนำข้อดีของ Local search parameters กับ Genetic algorithm มาผสมกัน ทำให้วิธีนี้ให้ค่า BE ดีที่สุด

เมื่อได้พารามิเตอร์ที่เหมาะสม ต่อมาจะทำ Redock โดยการนำ Ligand (ตัวยับยั้งที่ 1.1-1.4) ออกมา เติมไฮโดรเจนอะตอม แล้ว Dock ลงไปใน 3G5M.pdb ด้วยพารามิเตอร์ที่ได้กล่าวถึงไปก่อนหน้านี้

ตาราง 3 ค่า RMSD (อังสตรอม) ของตัวยับยั้ง

ตัวยับยั้ง	RMSD (Å)
1.1	1.745
1.2	1.004
1.3	1.339
1.4	1.164

RMSD (Root mean square deviation) เป็นค่าทางสถิติที่ใช้บ่งบอกความแตกต่างระหว่าง 2 โครงสร้างหรือมากกว่า จากตาราง 3 พบว่าค่า RMSD มีค่าน้อยแสดงว่าโครงสร้างระหว่างตัวยับยั้งที่ 1 กับตัวยับยั้งที่ 1.1-1.4 แตกต่างกันเล็กน้อย พารามิเตอร์ที่ได้มีความน่าเชื่อถือและเหมาะสม ซึ่งสามารถหาค่า RMSD ได้ดังสมการ

$$RMSD = \frac{\sqrt{\sum_i d_i^2}}{n} \quad - (3)$$

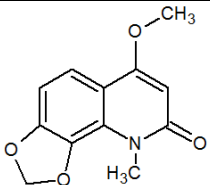
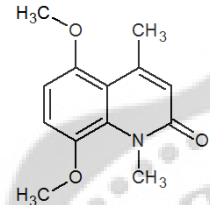
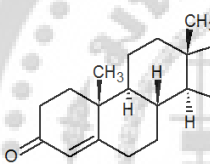
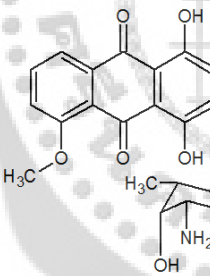
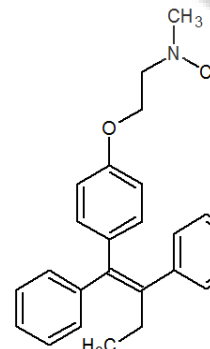
เมื่อ d คือ ระยะทางระหว่างอะตอมของตัวยับยั้งที่ 1 กับอะตอมของตัวยับยั้งที่ 1.1-1.4

n คือ จำนวนอะตอมของตัวยับยั้ง

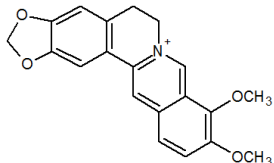
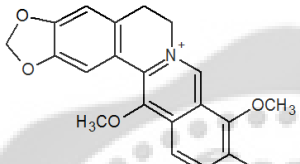
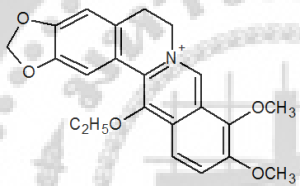
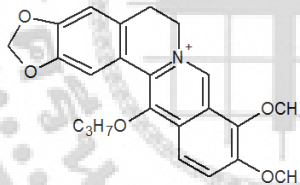
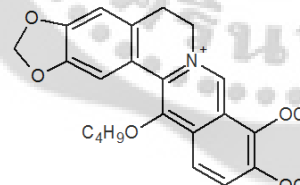
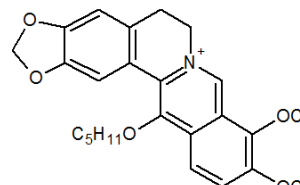
4.1.2 ค่า IC_{50} และพลังงานยึดเหนี่ยว (BE) ระหว่างตัวยับยั้งกับเอนไซม์ QR2

IC_{50} (Half maximal inhibitory concentration) คือหน่วยวัดความเข้มข้นของสารที่ใช้ยับยั้งปฏิกิริยาทางชีวเคมีของร่างกาย เชื้อโรค ให้ลดลงไปเหลือ 50% ถ้าค่า IC_{50} มีค่าน้อยแสดงว่ายามีประสิทธิภาพในการยับยั้งดี

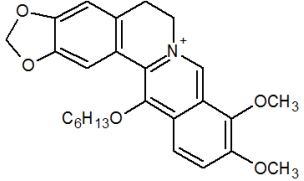
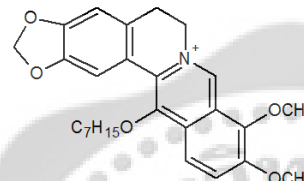
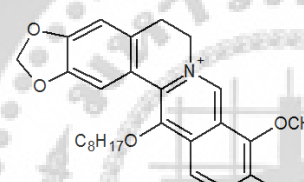
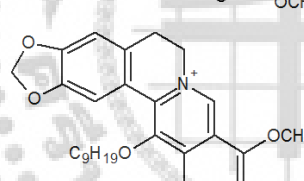
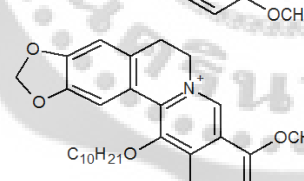
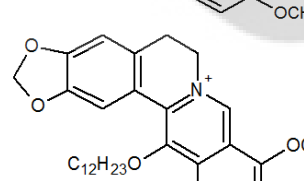
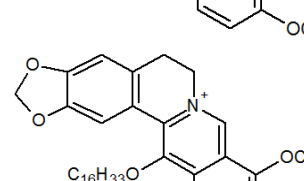
ตาราง 4 ค่า IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) และค่า BE (kcal/mol) ระหว่างตัวยับยั้งกับเอนไซม์ QR2

Ligand	Structure	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	BE (kcal/mol)
1		2.32	-6.62
2		17.60	-7.10
12		0.09	-7.71
3		5×10^{-5}	-6.82
6		2×10^{-4}	-5.99

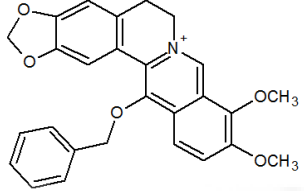
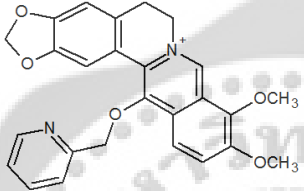
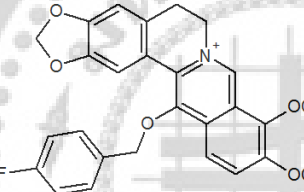
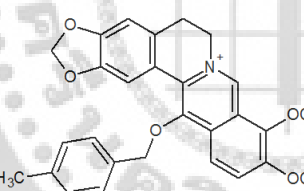
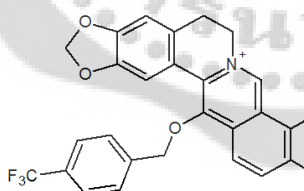
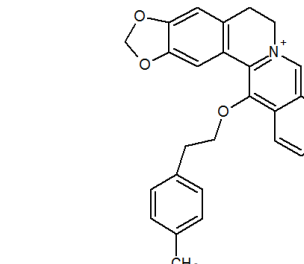
ตาราง 4 (ต่อ)

Ligand	Structure	IC ₅₀ (µg/mL)	BE (kcal/mol)
38		37.90	-9.40
39		46.16	-8.09
40		>50.00	-8.77
41		40.26	-8.86
42		26.26	-9.15
43		7.51	-9.61

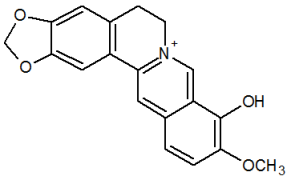
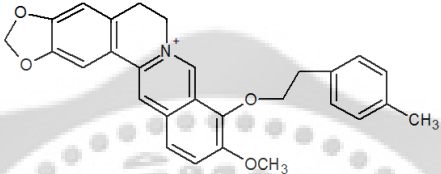
ตาราง 4 (ต่อ)

Ligand	Structure	IC ₅₀ (µg/mL)	BE (kcal/mol)
44	 C ₆ H ₁₃ O	9.06	-9.33
45	 C ₇ H ₁₅ O	2.04	-9.82
46	 C ₈ H ₁₇ O	0.75	-9.01
47	 C ₉ H ₁₉ O	1.18	-5.07
48	 C ₁₀ H ₂₁ O	0.28	-5.23
49	 C ₁₂ H ₂₃ O	1.70	-4.59
50	 C ₁₆ H ₃₃ O	0.96	-5.72

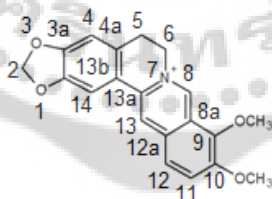
ตาราง 4 (ต่อ)

Ligand	Structure	IC ₅₀ (µg/mL)	BE (kcal/mol)
51		2.03	-10.30
52		>50.00	-10.26
53		3.71	-8.34
54		5×10^{-3}	-10.87
55		7.37	-7.92
56		1.97	-9.87

ตาราง 4 (ต่อ)

Ligand	Structure	IC ₅₀ (µg/mL)	BE (kcal/mol)
57		0.29	-10.01
58		0.60	-10.84

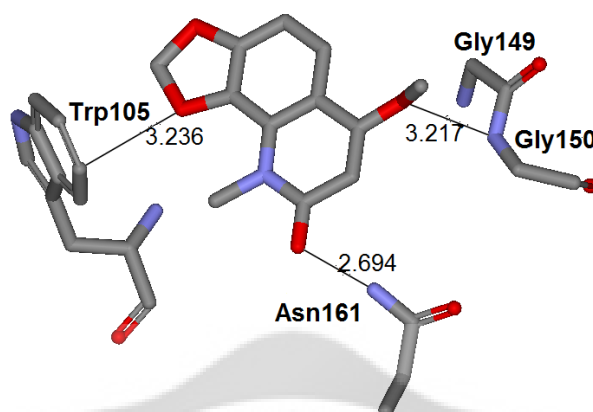
จากตาราง 4 พบว่าตัวยับยั้งที่ 38-58 ส่วนใหญ่มีค่า BE ต่ำกว่า ตัวยับยั้งที่ 1 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารอนุพันธ์เบอร์เบอร์รีนที่ 38-58 สามารถเข้าจับกับเอนไซม์ QR2 ได้ดีกว่าโมเลกุลตัวยับยั้งที่ 1 เมื่อพิจารณาโครงสร้างของสารประกอบทั้งหมดพบว่าโครงสร้างหลักตามภาพประกอบ 28 และสามารถแบ่งกลุ่มของโครงสร้างของตัวยับยั้งทั้งหมดออกเป็น 2 กลุ่มหลัก โดยพิจารณาจากหมู่ฟังก์ชันตำแหน่งที่ 13 คือ สารอนุพันธ์เบอร์เบอร์รีนที่มีหมู่ฟังก์ชัน alkoxy และมีหมู่ฟังก์ชัน aryloxy



ภาพประกอบ 28 โครงสร้างของตัวยับยั้งที่ 38

จากนั้นนำผลที่ได้จากการทำโมเลกุลลาร์ด็อกกิ่งมาพิจารณาลักษณะโครงสร้างที่เกิดขึ้นระหว่างตัวยับยั้งที่ 1, 2, 3, 6 และสารอนุพันธ์เบอร์เบอร์รีนทั้ง 2 กลุ่ม โดยจะเลือกพิจารณาเฉพาะตัวยับยั้งที่มีค่า BE มากที่สุดและน้อยที่สุด กำหนดโครงสร้างบริเวณการจับโดยให้ตัวยับยั้งเป็นศูนย์กลาง แล้วเลือกกรดอะมิโนที่อยู่รอบๆ ไนรัศมีประมาณ 4 Å° เพื่อหาอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างกรดอะมิโนกับตัวยับยั้งในบริเวณดังกล่าว

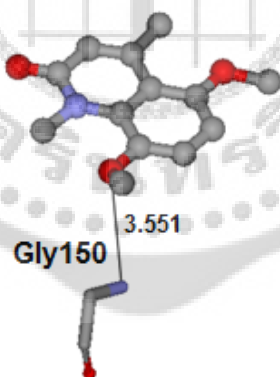
- ตัวยับยั้งที่ 1



ภาพประกอบ 29 โครงสร้างของตัวยับยั้งที่ 1 และกรดอะมิโน

จากภาพประกอบ 29 พบว่ากรดอะมิโนที่อยู่รอบตัวยับยั้งที่ 1 มี Trp105, Gly149, Gly150 และ Asn161 ซึ่ง Asn161 อยู่ใกล้กับตัวยับยั้งที่ 1 มากที่สุดและเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่คาร์บอนิลของตัวยับยั้งที่ 1 กับหมู่อะมิโนของ Asn161

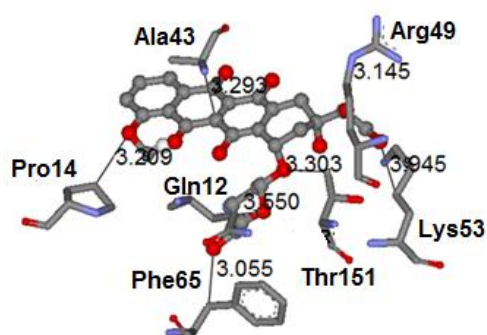
- ตัวยับยั้งที่ 2



ภาพประกอบ 30 โครงสร้างของตัวยับยั้งที่ 2 และกรดอะมิโน

จากภาพประกอบ 30 พบว่ากรดอะมิโนที่อยู่รอบตัวยับยั้งที่ 2 มีเพียง Gly150 เท่านั้น และเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่คาร์บอนิลของตัวยับยั้งที่ 2 กับหมู่อะมิโนของ Gly150

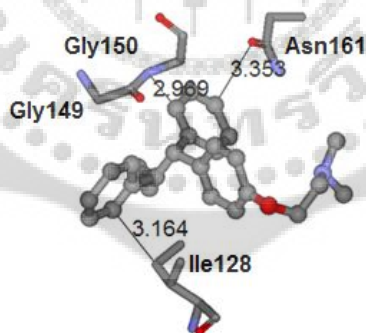
- ตัวยับยั้งที่ 3



ภาพประกอบ 31 โครงสร้างของตัวยับยั้งที่ 3 และกรดอะมิโน

จากภาพประกอบ 31 กรดอะมิโนที่อยู่รอบตัวยับยั้งที่ 3 มี Gln12, Pro14, Ala43, Arg49, Lys53, Phe65 และ Thr151 โดยกรดอะมิโนที่อยู่ใกล้กับตัวยับยั้งที่ 3 มากที่สุดคือ Phe65 และจากภาพจะเห็นว่ากรดอะมิโนที่อยู่รอบตัวยับยั้งที่ 3 ไม่เหมือนกับกรดอะมิโนที่อยู่รอบตัวยับยั้งที่ 1 เนื่องจากตัวยับยั้งที่ 3 เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ Aromatase ส่วนตัวยับยั้งที่ 1 และตัวยับยั้งที่ 3 เป็นเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ QR2

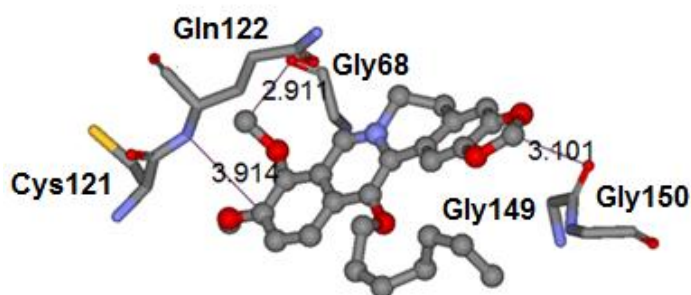
- ตัวยับยั้งที่ 6



ภาพประกอบ 32 โครงสร้างของตัวยับยั้งที่ 6 และกรดอะมิโน

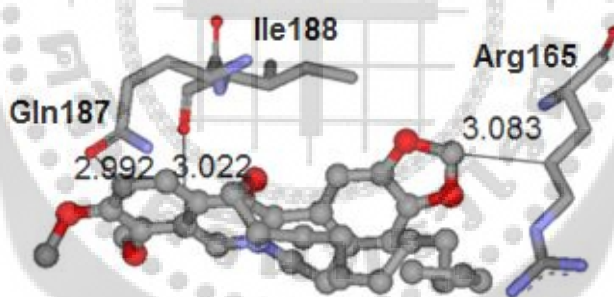
จากภาพประกอบ 32 กรดอะมิโนที่อยู่รอบตัวยับยั้งที่ 6 มี Ile128, Gly149, Gly150 และ Asn161 กรดอะมิโนที่อยู่ใกล้กับตัวยับยั้งที่ 6 มากที่สุดคือ Gly150 ซึ่งกรดอะมิโนที่อยู่รอบตัวยับยั้งที่ 6 คล้ายกับกรดอะมิโนที่อยู่รอบตัวยับยั้งที่ 1 แต่มีกรดอะมิโนที่เพิ่มจากตัวยับยั้งที่ 1 คือ Ile128 เนื่องจาก ตัวยับยั้งที่ 6 เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ Aromatase เช่นเดียวกับตัวยับยั้งที่ 3

- สารอนุพันธ์เบอร์เบอร์รีนที่มีหมู่ฟังก์ชัน alkoxy ที่ตำแหน่ง C₁₃



ภาพประกอบ 33 โครงสร้างของตัวยับยั้งที่ 45 และกรดอะมิโน

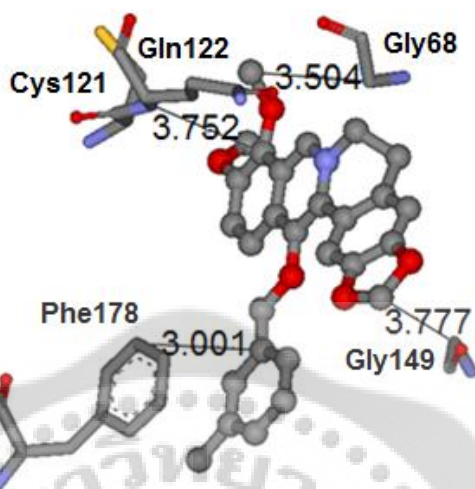
จากภาพประกอบ 33 กรดอะมิโนที่อยู่รอบตัวตัวยับยั้งที่ 45 มี Gly68, Cys121, Gln122, Gly149 และ Gly150 ซึ่ง Gly68 อยู่ใกล้กับตัวยับยั้งที่ 45 มากที่สุด เพราะมีหมู่แทนที่ methoxyl ยื่นออกมา ทำให้มีค่า BE มากที่สุดในกลุ่มที่มีหมู่ alkoxy ที่ตำแหน่ง C₁₃ จึงมีความสามารถในการยับยั้ง QR2 มากที่สุด



ภาพประกอบ 34 โครงสร้างของตัวยับยั้งที่ 49 และกรดอะมิโน

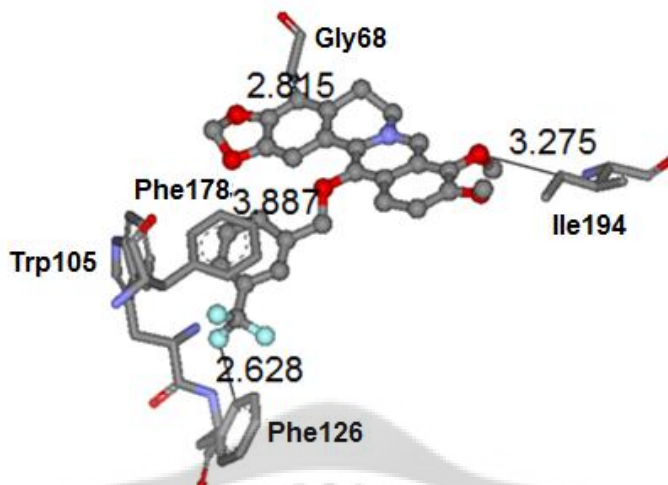
จากภาพประกอบ 34 กรดอะมิโนที่อยู่รอบตัวตัวยับยั้งที่ 49 มี Arg165, Gln187 และ Ile188 โดย Arg165 อยู่ใกล้กับตัวยับยั้งที่ 49 มากที่สุดแต่ก็ยังมียะยะที่ห่างกว่าตัวยับยั้งที่ 45 เนื่องจากตัวยับยั้งที่ 45 และ 49 มีโครงสร้างและหมู่ฟังก์ชันที่เหมือนกัน ต่างกันที่จำนวนคาร์บอนของ ตัวยับยั้งที่ 49 มีจำนวนมากกว่าจึงเกิดความเกะกะทำให้ ไม่สามารถเข้าใกล้กับอะมิโนต่างๆได้ จึงมีค่า BE น้อยที่สุดสามารถยับยั้ง QR2 น้อยที่สุดในกลุ่มที่มีหมู่ alkoxy ที่ตำแหน่ง C₁₃

- สารอนุพันธ์เบอร์เบอร์รีนที่มีหมู่ฟังก์ชัน aryloxy ที่ตำแหน่ง C₁₃



ภาพประกอบ 35 โครงสร้างของตัวยับยั้งที่ 54 และกรดอะมิโน

จากภาพประกอบ 35 กรดอะมิโนที่อยู่รอบตัวยับยั้งที่ 54 มี Gly68, Cys121, Gln122, Gly149 และ Phe178 ซึ่ง Gly68 อยู่ใกล้กับตัวยับยั้งที่ 54 มากที่สุดเหมือนกับ ตัวยับยั้งที่ 45 และหมู่ aryloxy ของตัวยับยั้งที่ 54 ขนานกับหมู่ benzyl ของ Phe178 เกิด Hydrophobic interaction เนื่องจากตัวยับยั้งที่ 54 มีหมู่ aryloxy ที่ตำแหน่ง C₁₃ แทนหมู่ alkoxy ทำให้มีค่า BE มากที่สุดในกลุ่มที่มีหมู่ aryloxy ที่ตำแหน่ง C₁₃ จึงมีความสามารถในการยับยั้ง QR2 มากที่สุด

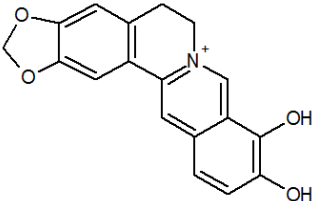
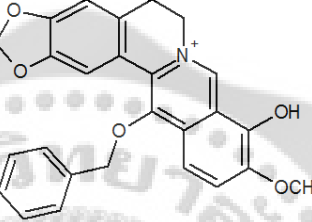
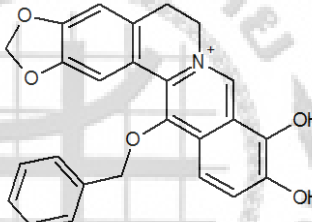
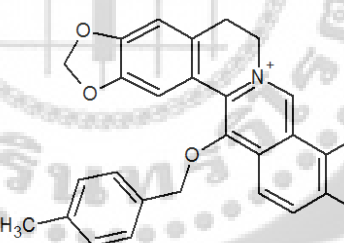


ภาพประกอบ 36 โครงสร้างของตัวยับยั้งที่ 55 และกรดอะมิโน

จากภาพประกอบ 36 กรดอะมิโนที่อยู่รอบตัวยับยั้งที่ 55 มี Gly68, Trp105, Phe106, Phe178 และ Ile194 โดย Ile194 อยู่ใกล้กับตัวยับยั้งที่ 55 มากที่สุด และหมู่ aryloxy ของตัวยับยั้งที่ 55 ขนานกับหมู่ benzyl ของ Phe178 เกิด Hydrophobic interaction เหมือนตัวยับยั้งที่ 54 แต่ที่วง aryloxy ของตัวยับยั้งที่ 55 มี fluorine อยู่ซึ่งเป็นอะตอมที่มีขนาดใหญ่กว่าอะตอมไฮโดรเจนของหมู่ methyl ของ ตัวยับยั้งที่ 54 ทำให้เกิดความเกะกะ ระยะทางระหว่างตัวยับยั้งที่ 55 กับ PHE178 จึงห่างกว่าตัวยับยั้งที่ 54 ทำให้มีค่า BE น้อยที่สุดในกลุ่มที่มีหมู่ aryloxy ที่ตำแหน่ง C₁₃ จึงมีความสามารถในการยับยั้ง QR2 น้อยที่สุด

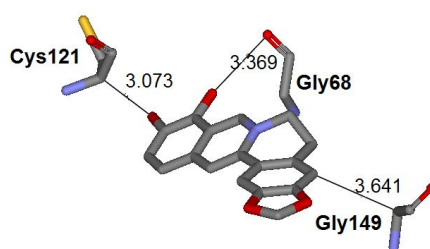
ดังนั้น จากค่า BE ที่ได้ทั้งหมดพบว่าสารอนุพันธ์เบอร์เบอร์รีนที่มีหมู่ฟังก์ชัน aryloxy จะมีค่า BE มากกว่ากลุ่มที่มีหมู่ alkoxy ที่ตำแหน่ง C₁₃ งานวิจัยนี้จึงทำการออกแบบโมเลกุลใหม่โดยการปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชัน methoxy ให้เป็น hydroxyl เพื่อค้นหาสารที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้นกว่าสารเดิมที่มีอยู่

ตาราง 5 ค่า BE ระหว่างตัวยับยั้งที่ 59-62 กับเอนไซม์ QR2

Ligand	Structure	BE (kcal/mol)
59		-10.71
60		-11.54
61		-12.33
62		-12.63

จากตาราง 5 พบว่าตัวยับยั้งที่ 62 มีค่า BE มากที่สุด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสามารถเข้าจับกับเอนไซม์ QR2 ได้ดีกว่าสารอนุพันธ์เบอร์เบอร์รี่ที่ 38-58 จากนั้นกำหนดโครงสร้างบริเวณการจับ โดยให้ตัวยับยั้งที่ 59-62 เป็นศูนย์กลาง แล้วเลือกกรดอะมิโนในรัศมีประมาณ 4 Å เช่นกัน

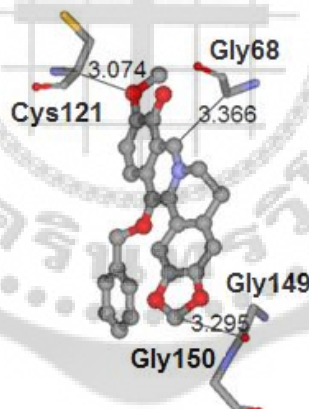
- ตัวยับยั้งที่ 59



ภาพประกอบ 37 โครงสร้างของตัวยับยั้งที่ 59 และกรดอะมิโน

จากภาพประกอบ 37 กรดอะมิโนที่อยู่รอบตัวยับยั้งที่ 59 มี Gly68, Cys121 และ Gly149 พบว่า Gly68 อยู่ใกล้กับตัวยับยั้งที่ 59 มากที่สุดเหมือนกับตัวยับยั้งที่ 45 และ 54 และหมู่ Hydroxyl ของ ตัวยับยั้งที่ 59 อยู่ใกล้กับ Cys121 มากขึ้น เนื่องจากตัวยับยั้งที่ 59 เป็นการนำตัวยับยั้งที่ 57 มาเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันจาก methoxy เป็น hydroxyl ที่ตำแหน่ง C₁₀ พบว่ามีค่า BE มากขึ้น

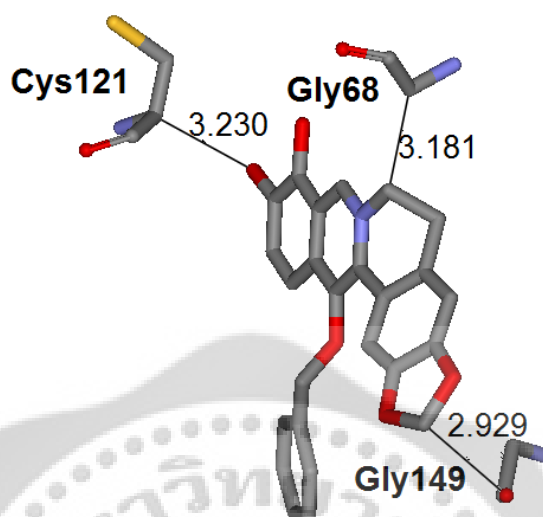
- ตัวยับยั้งที่ 60



ภาพประกอบ 38 โครงสร้างของตัวยับยั้งที่ 60 และกรดอะมิโน

จากภาพประกอบ 38 กรดอะมิโนที่อยู่รอบตัวยับยั้งที่ 60 มี Gly68, Cys121, Gly149 และ Gly150 โดย Cys121 อยู่ใกล้กับตัวยับยั้งที่ 60 มากที่สุด จากภาพประกอบ 34 พบว่าหมู่ hydroxyl ทำให้ค่า BE เพิ่มขึ้นจึงนำตัวยับยั้งที่ 51 มาเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันจาก Methoxy เป็น hydroxyl ที่ตำแหน่ง C₉ พบว่ามีค่า BE เพิ่มขึ้น

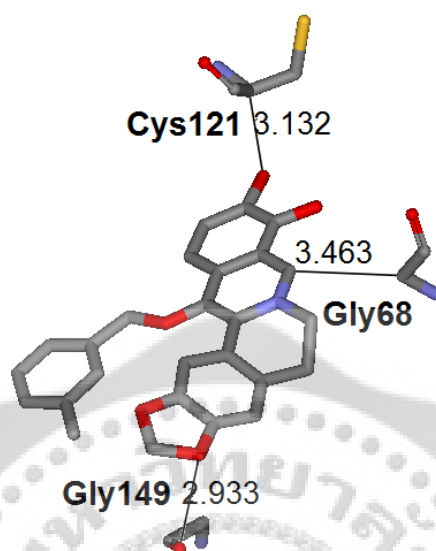
- ตัวยับยั้งที่ 61



ภาพประกอบ 39 โครงสร้างของตัวยับยั้งที่ 61 และกรดอะมิโน

จากภาพประกอบ 39 กรดอะมิโนที่อยู่รอบตัวยับยั้งที่ 61 มี Gly68, Cys121, และ Gly149 ซึ่ง Cys121 อยู่ใกล้กับตัวยับยั้งที่ 61 มากที่สุด จากภาพประกอบ 34 พบว่าหมู่ hydroxyl ทำให้ค่า BE เพิ่มมากขึ้นจึงนำตัวยับยั้งที่ 51 มาเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันจาก methoxy เป็น hydroxyl ที่ตำแหน่ง C₉ และ C₁₀ ทั้ง 2 ตำแหน่งพบว่ามีค่า BE เพิ่มมากขึ้นอีก เนื่องจากหมู่ hydroxyl ทั้ง 2 ตำแหน่งเกิดอันตรกิริยากับ Cys121

- ตัวยับยั้งที่ 62



ภาพประกอบ 40 โครงสร้างของตัวยับยั้งที่ 62 และกรดอะมิโน

จากภาพประกอบ 40 กรดอะมิโนที่อยู่รอบตัวยับยั้งที่ 62 มี Gly68 Cys121 และ Gly149 โดย Cys121 อยู่ใกล้กับตัวยับยั้งที่ 62 มากที่สุด จากภาพประกอบ 36 พบว่าถ้าเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันจาก methoxy เป็น Hydroxyl ทั้ง 2 ตำแหน่งพบว่ามีค่า BE เพิ่มมากจึงนำตัวยับยั้งที่ 54 ที่มีค่า BE มากที่สุด มาเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันจาก methoxy เป็น hydroxyl ที่ตำแหน่ง C₉ และ C₁₀ ทั้ง 2 ตำแหน่งพบว่ามีค่า BE มากที่สุดในกลุ่ม

4.2 กลศาสตร์ควอนตัม

โครงสร้างและอันตรกิริยาระหว่างตัวยับยั้งกับกรดอะมิโนที่อยู่ในบริเวณการจับของเอนไซม์ QR2 และFAD

4.2.1 โครงสร้างและอันตรกิริยาระหว่างตัวยับยั้งที่ 1 จากโครงสร้าง 3G5M.pdb กับกรดอะมิโนและ FAD ที่อยู่ในบริเวณการจับของเอนไซม์ QR2 ทั้ง 2 แบบจำลอง ด้วยระเบียบวิธีการคำนวณ B3LYP ด้วย 6-31G(d,p) basis set

ค่า IE (Interaction energy) เป็นพลังงานอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างตัวยับยั้งกับกรดอะมิโนแต่ละกรดอะมิโนที่อยู่ในบริเวณการจับและตัวยับยั้งกับ FAD

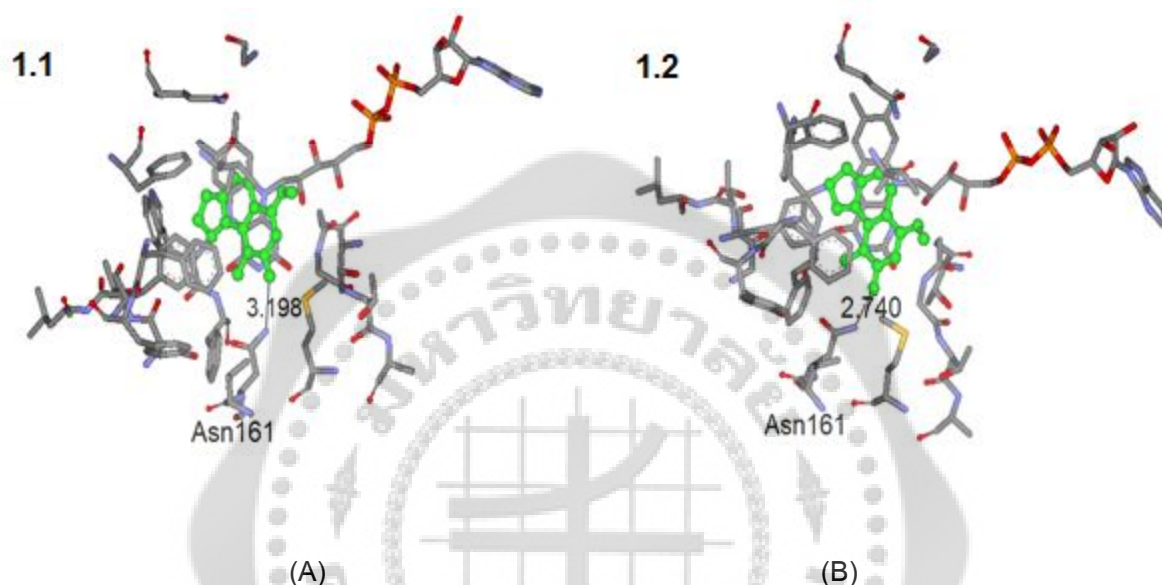
ตาราง 6 ค่า IE ระหว่างตัวยับยั้งที่ 1.1 และ 1.2 ที่ได้จากโครงสร้างฐานข้อมูลโครงสร้างของโปรตีนรหัส 3G5M.pdb กับกรดอะมิโน และ FAD ในบริเวณการจับของเอนไซม์ QR2 ตำแหน่งที่ 1 ด้วยระเบียบวิธี B3LYP ด้วย 6-31G(d,p) basic set

กรดอะมิโน	1.1 (kcal/mol)	1.2 (kcal/mol)
Trp105	-1.19	-0.39
Phe106	0.06	1.92
Thr148	-0.55	-0.56
Gly149	-2.15	-0.85
Gly150	-2.00	-0.41
Thr151	0.15	0.15
Ala152	-0.04	-0.06
Met154	1.09	0.62
Val160	-0.44	-0.58
Asn161	-5.65	-10.08
Gly68'	-0.01	0.00
Gln122'	-0.42	0.20
Phe126'	0.34	2.32
Ile128'	1.95	1.67
Phe131'	0.13	0.11
Tyr132'	-0.45	-0.85
Gln174'	-0.56	-1.73
Thr175'	0.14	0.18
Leu176'	0.00	-0.03
Phe178'	3.02	2.67
FAD	-1.61	-0.17

ตาราง 7 ค่า IE ระหว่างตัวบัพยั้งที่ 1.3 และ 1.4 ที่ได้จากโครงสร้างฐานข้อมูลโครงสร้างของโปรตีนรหัส 3G5M.pdb กับกรดอะมิโน และ FAD ในบริเวณการจับของเอนไซม์ QR2 ตำแหน่งที่ 1 ด้วยระเบียบวิธี B3LYP ด้วย 6-31G(d,p) basic set

กรดอะมิโน	1.3 (kcal/mol)	1.4 (kcal/mol)
Gly68	-0.02	-0.05
Gln122	-0.26	0.20
Phe126	0.19	0.05
Ile128	1.21	2.15
Phe131	0.23	0.24
Tyr132	-0.57	-0.59
Gln174	-0.63	-0.99
Thr175	-0.11	-0.12
Leu176	0.02	0.02
Phe178	3.31	3.00
Trp105'	-0.18	0.54
Phe106'	0.03	-0.31
Thr148'	-0.69	-0.72
Gly149'	-2.73	-1.36
Gly150'	-1.79	-1.33
Thr151'	0.09	0.14
Ala152'	0.02	0.03
Met154'	-0.60	-0.40
Val160'	-0.51	-0.55
Asn161'	-8.34	-8.60
FAD	-1.02	0.94

จากตาราง 6 และ 7 พบว่า ตัวยับยั้งที่ 1.1-1.4 ที่ได้จากโครงสร้าง 3G5M.pdb เกิดอันตรกิริยากับกรดอะมิโน Asn161 ในบริเวณการจับของเอนไซม์ QR2 ทั้ง 2 บริเวณมากที่สุดและมีค่า IE เท่ากับ -5.65, -10.08, -8.34 และ -8.60 kcal/mol ตามลำดับ จากนั้นจะมาพิจารณาโครงสร้างตัวยับยั้งที่ 1 กับกรดอะมิโนที่อยู่ในบริเวณการจับของเอนไซม์ QR2 ทั้ง 2 บริเวณ



ภาพประกอบ 41 อันตรกิริยาระหว่างตัวยับยั้งที่ 1.1 และ 1.2 ที่ได้จากโครงสร้าง X-ray กับกรดอะมิโน และ FAD

ภาพ (A) คือ อันตรกิริยาระหว่างตัวยับยั้งที่ 1.1 กับกรดอะมิโนที่อยู่ในบริเวณการจับตำแหน่งที่ 1 และภาพ (B) คือ อันตรกิริยาระหว่างตัวยับยั้งที่ 1.2 กับกรดอะมิโนที่อยู่ในบริเวณการจับตำแหน่งที่ 2 โดยให้โครงสร้างของตัวยับยั้งเป็นสีเขียว

จากภาพประกอบ 41 พบว่ากรดอะมิโน Asn161 อยู่ใกล้กับยับยั้งที่ 1.1 และ 1.2 มากที่สุดเหมือนกัน มีเป็นระยะทาง 3.198 และ 2.740 Å ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับค่า IE ของ ตาราง 6 และ 7 แสดงว่ากรดอะมิโน Asn161 มีความสำคัญต่อตัวยับยั้งที่ 1.1-1.4

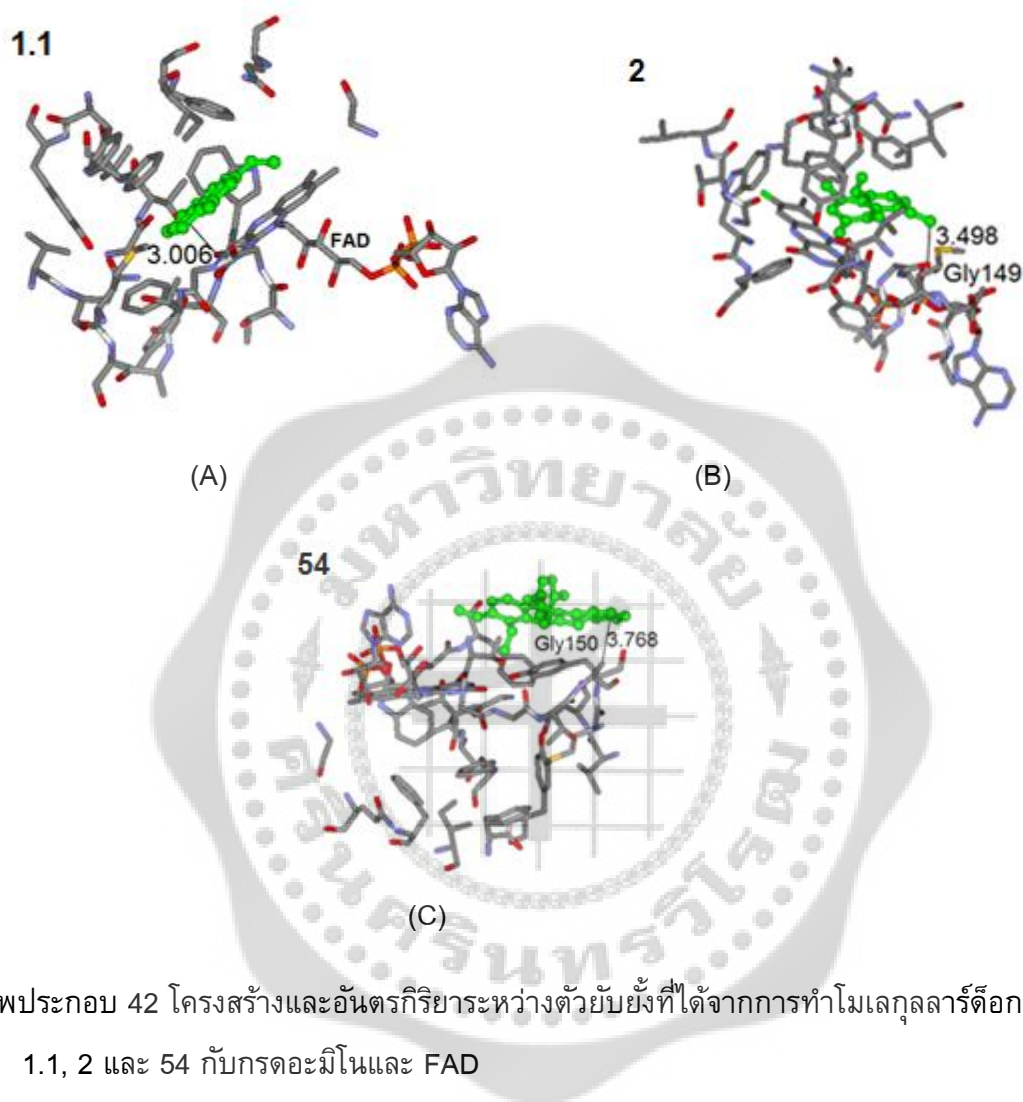
4.2.2 โครงสร้างและอันตรกิริยาระหว่างตัวยับยั้งที่ได้จากการทำโมเลกุลลาร์ต็อกกิ่งของยับยั้งที่ 1.1, 1.2, 2 และ 54 กับกรดอะมิโนและ FAD ที่อยู่ในบริเวณการจับของเอนไซม์ QR2 ทั้ง 2 แบบจำลอง ด้วยระเบียบวิธีการคำนวณ B3LYP ด้วย basis set 6-31G(d,p)

ตาราง 8 ค่า IE ระหว่างโครงสร้างตัวยับยั้งที่ได้จากการทำโมเลกุลสาร์ต็อกกิ่งของ 1.1, 2 และ 54 กับ กรดอะมิโน และ FAD ในบริเวณการจับของเอนไซม์ QR2 ตำแหน่งที่ 1 ด้วยระเบียบวิธี B3LYP ด้วย 6-31G(d,p) basis set

กรดอะมิโน	1.1 (kcal/mol)	2 (kcal/mol)	54 (kcal/mol)
Trp105	-1.24	-0.61	0.42
Phe106	-0.64	-1.80	-0.10
Thr148	0.03	0.04	1.50
Gly149	-0.99	-2.56	-0.44
Gly150	1.41	-0.60	-3.36
Thr151	0.21	0.04	0.27
Ala152	-0.10	0.07	1.93
Met154	0.00	1.05	-0.03
Val160	-0.43	0.04	0.65
Asn161	-3.10	-1.55	1.59
Gly68'	0.43	0.14	0.47
Gln122'	-2.33	-1.83	-0.25
Phe126'	-0.21	2.96	-0.05
Ile128'	-1.15	1.62	-0.02
Phe131'	0.05	-0.11	0.31
Tyr132'	-1.52	-0.12	0.32
Gln174'	0.97	0.02	0.13
Thr175'	-0.64	-0.07	0.22
Leu176'	0.05	0.04	-0.04
Phe178'	-4.58	2.67	0.20
FAD	-6.95	-0.14	-0.67

จากตาราง 8 พบว่า โครงสร้างตัวยับยั้งที่ 1.1, 2 และ 54 เกิดอันตรกิริยากับ FAD, Gly149 และ Gly150 มากที่สุดและมีค่า IE เท่ากับ -6.95, -2.56 และ -3.36 kcal/mol ตามลำดับ

ที่บริเวณการจับของเอนไซม์ QR2 ตำแหน่งที่ 1



ภาพประกอบ 42 โครงสร้างและอันตรกิริยาระหว่างตัวยับยั้งที่ได้จากการทำโมเลกุลลาร์ด็อกกิ่งของ 1.1, 2 และ 54 กับกรดอะมิโนและ FAD

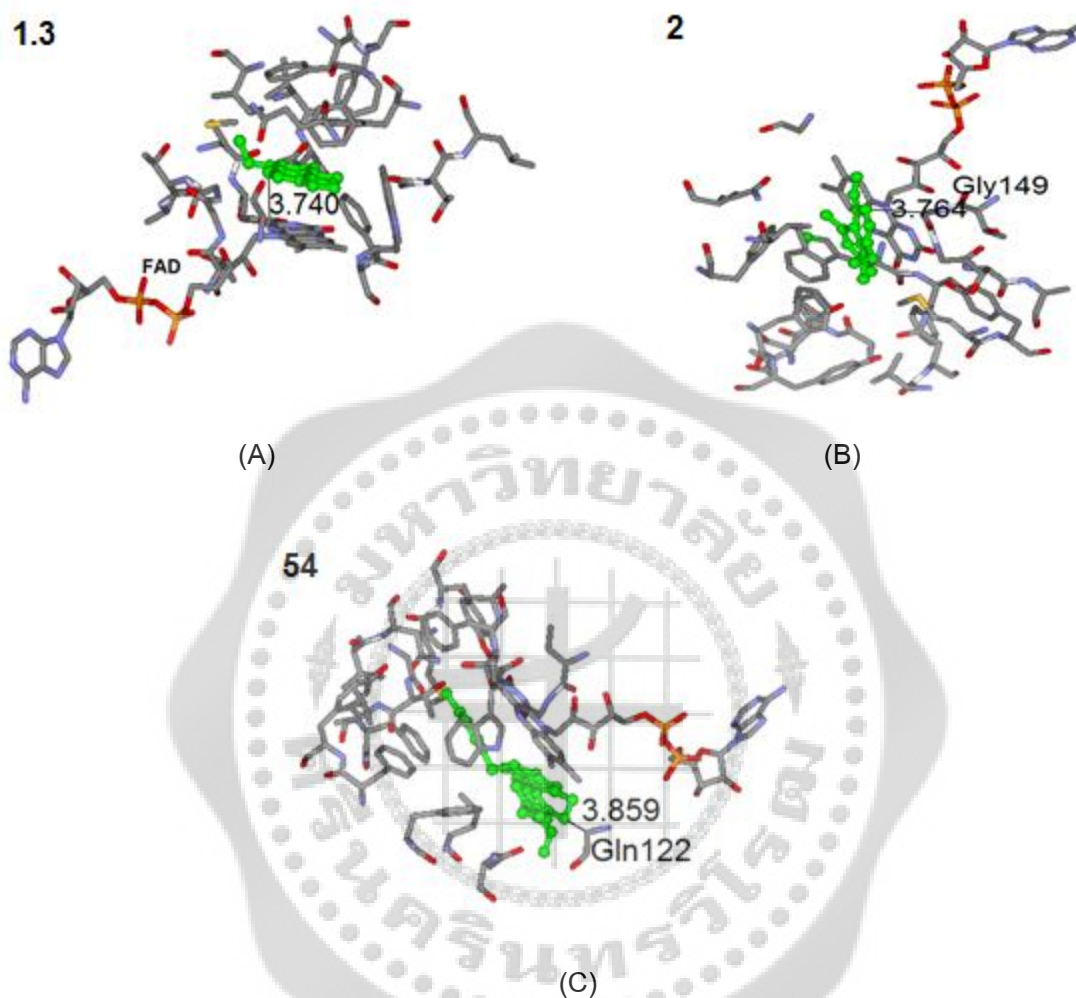
ภาพ (A), (B) และ (C) คือ อันตรกิริยาระหว่างตัวยับยั้งที่ 1.1, 2 และ 54 กับกรดอะมิโนที่อยู่ในบริเวณการจับตำแหน่งที่ 1 โดยให้โครงสร้างของตัวยับยั้งเป็นสีเขียว จากภาพประกอบ 42 พบว่ามี FAD, Gly149 และ Gly150 อยู่ใกล้กับยับยั้งที่ 1.1, 2 และ 54 เป็นระยะทาง 3.006, 3.498 และ 3.768 Å ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับค่า IE ของตาราง 8

ตาราง 9 ค่า IE ระหว่างโครงสร้างตัวยับยั้งที่ได้จากการทำโมเลกุลสาร์ต็อกกิ่งของ 1.3, 2 และ 54 กับกรดอะมิโน และ FAD ในบริเวณการจับของเอนไซม์ QR2 ตำแหน่งที่ 2 ด้วยระเบียบวิธี B3LYP ด้วย 6-31G(d,p) basis set

กรดอะมิโน	1.3 (kcal/mol)	2 (kcal/mol)	54 (kcal/mol)
Gly68	-0.09	0.27	8.81
Gln122	-0.07	-0.26	-3.68
Phe126	-6.11	2.37	6.61
Ile128	-0.18	3.95	5.85
Phe131	-0.30	3.18	1.17
Tyr132	-1.44	0.04	-0.08
Gln174	0.04	0.47	-1.76
Thr175	0.19	-0.20	-0.53
Leu176	0.08	0.02	-0.17
Phe178	1.28	1.99	1.02
Trp105'	-3.60	-0.40	-1.23
Phe106'	0.34	-0.82	3.58
Thr148'	-0.58	-0.95	-0.11
Gly149'	-1.85	-1.38	-3.19
Gly150'	-0.50	-0.51	-0.30
Thr151'	-0.38	0.25	-0.62
Ala152'	0.10	0.02	0.23
Met154'	2.32	1.17	0.05
Val160'	0.15	0.03	0.16
Asn161'	4.46	-0.64	2.47
FAD	-8.61	-0.53	10.11

จากตาราง 9 พบว่า โครงสร้างตัวยับยั้งที่ 1.3, 2 และ 54 เกิดอันตรกิริยากับ FAD, Gly149 และ Gln122 มากที่สุดและมีค่า IE เท่ากับ -8.61, -1.38 และ -3.68 kcal/mol ตามลำดับ

ที่บริเวณการจับของเอนไซม์ QR2 ตำแหน่งที่ 2



ภาพประกอบ 43 โครงสร้างและอันตรกิริยาระหว่างตัวยับยั้งที่ได้จากการทำโมเลกุลลาร์ด็อกกิ่งของ 1.3, 2 และ 54 กับกรดอะมิโน และ FAD

ภาพ (A), (B) และ (C) คือ อันตรกิริยาระหว่างตัวยับยั้งที่ 1.3, 2 และ 54 กับกรดอะมิโนที่อยู่ในบริเวณการจับตำแหน่งที่ 2 โดยให้โครงสร้างของตัวยับยั้งเป็นสีเขียว จากภาพประกอบ 43 พบว่ามี FAD, Gly149 และ Gln122 อยู่ใกล้กับตัวยับยั้งที่ 1.3, 2 และ 54 เป็นระยะทาง 3.740, 3.764 และ 3.859 Å ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับค่า IE ของตาราง 9

บทที่ 5

สรุปผล อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาโมเลกุลลาร์ต็อกกิ้งเพื่อหาโครงสร้างที่เหมาะสมในการเข้าจับของตัวยับยั้งในบริเวณการจับทั้ง 2 บริเวณจะได้พารามิเตอร์ที่เหมาะสม เป็นดังนี้

- กรดอะมิโนที่ Flexible คือ Asn161
- จำนวนพันธะของ Asn161 ที่ Flexible มี 4 พันธะ
- ขนาดของ Grid คือ 100 100 100
- รูปแบบการ Docking คือ random
- จำนวนรอบในการ run คือ 150

ซึ่งพบว่าสารอนุพันธ์เบอร์เบอร์รีนที่มีหมู่ aryloxy ที่ตำแหน่ง C₁₃ มีค่า BE ดีกว่าหมู่ alkoxy และถ้าเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันจาก methoxyl เป็น hydroxyl ที่ตำแหน่ง C₉ และ C₁₀ ทั้ง 2 ตำแหน่ง จะทำให้ค่า BE ดีขึ้น เนื่องจากเกิด Hydrophobic interaction ระหว่างหมู่ aryloxy ของตัวยับยั้งกับหมู่ phenyl ของ Phe178 และหมู่ hydroxyl ที่ตำแหน่ง C₉ และ C₁₀ เกิดอันตรกิริยากับ Cys121

จากการศึกษาโครงสร้างและอันตรกิริยาระหว่างตัวยับยั้งที่ 1.1-1.4 ที่ได้จากโครงสร้างฐานข้อมูลโครงสร้างของโปรตีนรหัส 3G5M.pdb ด้วยระเบียบวิธีการคำนวณ B3LYP ด้วย 6-31G(d,p) basis set พบว่าเกิดอันตรกิริยากับกรดอะมิโน Asn161 ที่อยู่ในบริเวณการจับของเอนไซม์ QR2 ทั้ง 2 บริเวณมากที่สุดและมีค่า IE เท่ากับ -5.65, -10.08, -8.34 และ -8.60 kcal/mol ตามลำดับ แสดงว่ากรดอะมิโน Asn161 มีความสำคัญต่อตัวยับยั้งที่ 1.1-1.4

โครงสร้างตัวยับยั้งที่ 1.1, 2 และ 54 ในบริเวณการจับของเอนไซม์ QR2 ตำแหน่งที่ 1 ที่ได้จากการทำโมเลกุลลาร์ต็อกกิ้ง แล้วทำการศึกษาดูด้วยระเบียบวิธีการคำนวณ B3LYP ด้วย 6-31G(d,p) basis set พบว่าตัวยับยั้งที่ 1.1, 2 และ 54 เกิดอันตรกิริยากับ FAD, Gly149 และ Gly150 มากที่สุด และมีค่า IE เท่ากับ -6.95, -2.56 และ -3.36 kcal/mol ตามลำดับ

โครงสร้างตัวยับยั้งที่ 1.3, 2 และ 54 ในบริเวณการจับของเอนไซม์ QR2 ตำแหน่งที่ 2 ที่ได้จากการทำโมเลกุลลาร์ด็อกกิ่ง แล้วทำการศึกษาด้วยระเบียบวิธีการคำนวณ B3LYP ด้วย 6-31G(d,p) basis set พบว่าตัวยับยั้งที่ 1.3, 2 และ 54 เกิดอันตรกิริยากับ FAD, Gly149 และ Gln122 มากที่สุด และมีค่า IE เท่ากับ -8.61, -1.38 และ -3.68 kcal/mol ตามลำดับ

ข้อมูลทางโครงสร้างและอันตรกิริยาระหว่างตัวยับยั้งที่ 1, 2 และ 54 กับบริเวณการจับเอนไซม์ QR2 ทั้ง 2 บริเวณนี้ มีประโยชน์ในการพัฒนาหรือออกแบบโครงสร้างตัวยับยั้งที่มีอยู่เดิมหรือตัวยับยั้งเอนไซม์ QR2 ตัวใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการจับกับเอนไซม์ QR2 ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคมะเร็งเต้านม และจากงานวิจัยครั้งนี้พบว่า ตัวยับยั้งที่ 59-62 เป็นตัวยับยั้งโรคมะเร็งเต้านมที่มีประสิทธิภาพ จึงควรนำตัวยับยั้งที่ 59-62 มาสังเคราะห์และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป





- จุฑามาศ แอนเนี่ยน. (2550). *Breast care & Breast cancer*. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ไกลล์หมอ.
- เฉลียว ปิยะชน. (2555). *เรื่องมะเร็งที่หมอ (อาจ) ไม่ได้บอกคุณ*. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: บริษัทอัมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง.
- ชญาวลี ศรีสุโข. (2552). *ตำาน 4 มะเร็งร้ายในผู้หญิง*. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: บริษัทอัมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง.
- ธีรเกียรติ์ เกิดเจริญ. (2539). เคมีคอมพิวเตอร์: คอมพิวเตอร์ช่วยออกแบบ
กุลกับการพัฒนานาโนเทคโนโลยี. *วารสารเทคโนโลยีวัสดุ*. 39(4): 17-22.
- ภักษร วันบรรจบ. (2554). *10 อันดับโรคมะเร็งกับสัญญาณเตือนภัย*. พิมพ์ครั้งที่ 1.
กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์กันยาวิร์.
- อัญชลี อุธา. (2554). *กินต้านมะเร็งต้านม*. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์บีเวลล์ สปีเชียล.
- อติทยา ศิริภิญญานนท์ ; และคนอื่น ๆ. (2556). เคมีศาสตร์แห่งสสาร: เคมีและการโยงโยกับสาขาอื่น.
วารสาร UpDATE. 46(192): 41.
- อดุลย์เดช ไสลบาท. (2556). *โรคมะเร็งที่เกิดขึ้นเนื่องจากการทำงาน*. (เอกสารประกอบการสอน).
อุบลราชธานี: คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. อัดสำเนา.
- Arup Maiti, P. V. Narasimha Reddy, Megan Sturdy, Laura Marler, Scott D. Pegan, Andrew D. Mesecar, et al. (2009). Synthesis of Casimiroin and Optimization of Its Quinone Reductase 2 and Aromatase Inhibitory Activities. *J. Med. Chem.* 52: 1873-1884.
- Bin Sun; et al. (2010). Design, synthesis, and biological evaluation of resveratrol analogues as aromatase and quinone reductase 2 inhibitors for chemoprevention of cancer. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 18: 5352–5366.
- Christine E. Foster, Mario A. Bianchet, Paul Talalay, Qinjian Zhao, and L. Mario Amzel. (1999). Crystal Structure of Human Quinone Reductase Type 2, a Metalloflavoprotein. *Biochemistry*. 38: 9881-9886.
- Debashis Ghosh; et al. (2012). Novel Aromatase Inhibitors by Structure-Guided Design. *Medical Chemistry*. 55: 8464-8476.

- David J. Bentrem; et al. (2001). Molecular Mechanism of Action at Estrogen Receptor a of a New Clinically Relevant Antiestrogen (GW7604) Related to Tamoxifen*. *Endocrinology*. 142: 838-846.
- Jiraporn Ungwitayatorn; & Weerasak . (2002). Docking Study of Chromone Derivatives as HIV-1 Protease Inhibitors. *Mahidol University Journal of Pharmaceutical Science*. 29: 11-17.
- Kevin Bonfield; et al. (2012). Development of a new class of aromatase inhibitors: Design, synthesis and inhibitory activity of 3-phenylchroman-4-one (isoflavanone) derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 20: 2603–2613.
- Leonid Buryanovskyy; et al. (2004). Crystal Structure of Quinone Reductase 2 in Complex with Resveratrol. *Biochemistry*. 43: 11417-11426.
- Marie Stiborová; et al. (2004). The Anticancer Drug Ellipticine Forms Covalent DNA Adducts, Mediated by Human Cytochromes P450, through Metabolism to 13-Hydroxyellipticine and Ellipticine N2-Oxide. *Cancer Research*. 64: 8374-8380.
- Mathias Antoinea; et al. (2012). Characterization of cofactors, substrates and inhibitor binding to flavoenzyme quinone reductase 2 by automated supramolecular nano-electrospray ionization mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*. 312: 87– 96
- Olivier Nosjean; et al. (2000). Identification of the Melatonin-binding Site MT3 as the Quinone Reductase 2. *BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 40: 31311 -31317
- P. Attasara, R. Buasom. (2011, July). National cancer institute department of medical services ministry of public health. *Hospital-based cancer registry*. 27: 3.
- RCSB PDB Protein Data Bank. (2556). 3G5M. สืบค้นเมื่อ 6 มีนาคม 2556, จาก <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3G5M>
- Shuwen Yu; et al. (2012). Synthesis and Biological Activities of a 3'-Azido Analogue of Doxorubicin Against Drug-Resistant Cancer Cells. *Molecular Sciences*. 13: 3671-3684.

- Scott D. Pegan; et al. (2011). X-ray structural studies of quinone reductase 2 nanomolar range inhibitors. *PROTEIN SCIENCE*. 20: 1182-1195.
- Tetsuya Hashimoto, Masami Nakai. (2011). Increased hippocampal quinone reductase 2 in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*. 502: 10-12.
- Wei Yue, James D. Yager, Ji-Ping Wang, Eldon R. Jupe, Richard J. Santen. (2013). Estrogen receptor-dependent and independent mechanisms of breast cancer carcinogenesis. *Steroids*. 78: 161-170.
- Yue Fu, Leonid Buryanovskyy, Zhongtao Zhang. (2008). Quinone Reductase 2 Is a Catechol Quinone Reductase. *BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 35: 23829–23835.
- Yue Fu, Leonid Buryanovskyy, Zhongtao Zhang. (2005). Crystal structure of quinone reductase 2 in complex with cancer prodrug CB1954. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 336: 332–338





ภาคผนวก

อภินันต์ศัพท์

EC₅₀

half maximal Effective Concentration

Ala

Alanine

Arg

Arginine

Asn

Asparagine

Asp

Aspartic Acid

Cys

Cysteine

Gln

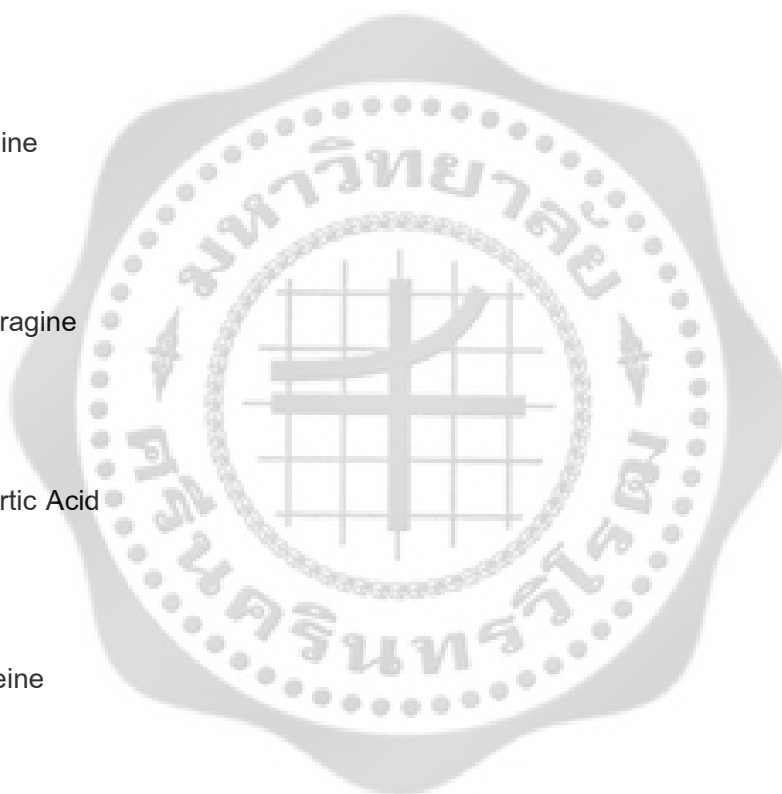
Glutamine

Glu

Glutamic Acid

Gly

Glycine



อภิวานศัพท (ต่อ)

His

Histidine

Ile

Isoleucine

Leu

Leucine

Lys

Lysine

Met

Methionine

Phe

Phenylalanine

Pro

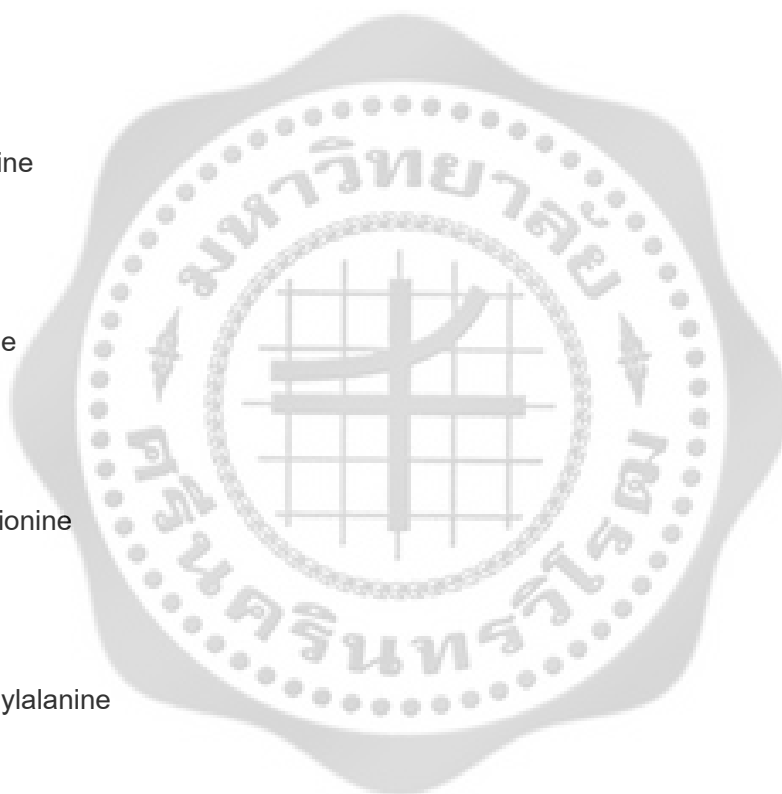
Proline

Ser

Serine

Thr

Threonine



อภิธานศัพท์ (ต่อ)

Trp

Tryptophan

Tyr

Tyrosine

Val

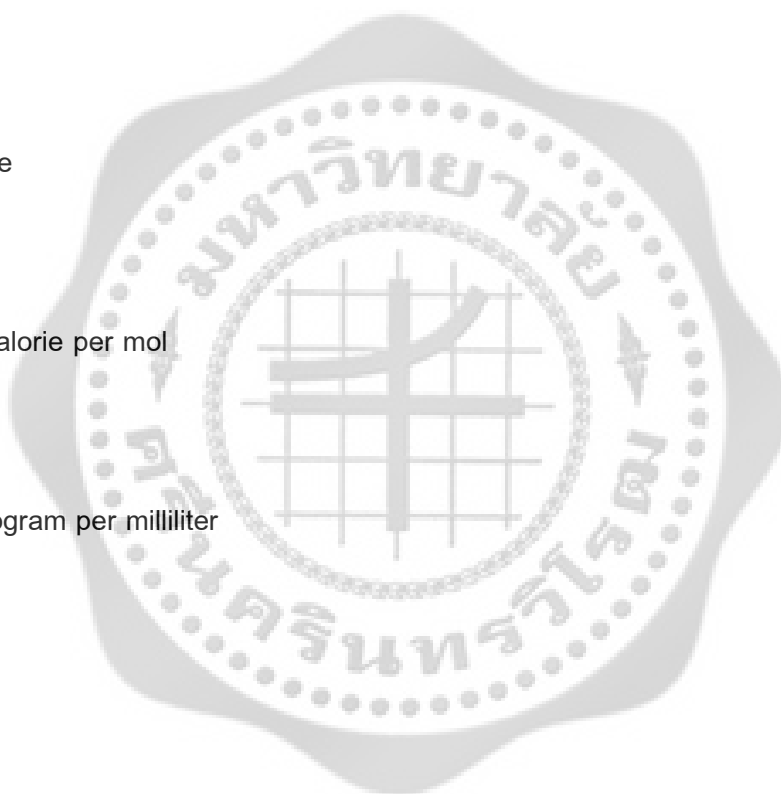
Valine

Kcal/mol

Kilocalorie per mol

µg/mL

Microgram per milliliter





ประวัติย่อของผู้วิจัย

ประวัติย่อของผู้วิจัย

ชื่อสกุล	นางสาวพรรณราย คิยะพงษ์
วันเดือนปีเกิด	21 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2532
สถานที่เกิด	จังหวัดกรุงเทพมหานคร
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 10 ซอยเศรษฐกิจ 30 แขวงบางแคเหนือ เขตบางแค จังหวัดกรุงเทพมหานคร 10160
ตำแหน่งหน้าที่การงานในปัจจุบัน	-
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2549	มัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนวัดนวลนรดิศ เขตภาษีเจริญ จังหวัดกรุงเทพมหานคร
พ.ศ. 2553	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเคมี จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ จังหวัดกรุงเทพมหานคร
พ.ศ. 2556	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเคมี จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ จังหวัดกรุงเทพมหานคร