

การศึกษาทางเคมีคอมพิวเตอร์ของอนุพันธ์ไพรีนชนิดใหม่กับโปรตีน โบไวน์
ซีรั่ม อัลบูมิน และ ไลโซไซม์



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
สิงหาคม 2558

การศึกษาทางเคมีคอมพิวเตอร์ของอนุพันธ์ไพรีนชนิดใหม่กับโปรตีน โบไวน์
ซีรั่ม อัลบูมิน และ ไลโซไซม์



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

สิงหาคม 2558

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การศึกษาทางเคมีคอมพิวเตอร์ของอนุพันธ์ไพรีนชนิดใหม่กับโปรตีน โบไวน์
ซีรั่ม อัลบูมิน และ ไลโซไซม์



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
สิงหาคม 2558

สุวิชา เพ็ชรนิล. (2558). การศึกษาทางเคมีคอมพิวเตอร์ของอนุพันธ์ไพรีนชนิดใหม่กับ โปรตีน โบวีน ซีรัม อัลบูมิน และ ไลโซไซม์. ปรินซิปีนิพนธ์ วท.ม.(เคมี). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. อาจารย์ที่ปรึกษาปรินซิปีนิพนธ์: รองศาสตราจารย์ ดร. อภิญา ชัยวิสุทธิทางกูร, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มะยุษี ภูโน.

ปัจจุบันเคมีคอมพิวเตอร์มีบทบาทและมีความสำคัญอย่างยิ่งในวงการวิทยาศาสตร์เกือบทุกสาขา สามารถใช้ในการศึกษาและการค้นคว้าวิจัยทางวิทยาศาสตร์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะสาขาเคมี เนื่องจากสามารถใช้คอมพิวเตอร์ในการคำนวณและออกแบบโมเลกุล แล้วนำผลที่ได้จากการศึกษาด้วยคอมพิวเตอร์มาเป็นแนวทางนำไปสู่วิธีที่ดีกว่าหรือดีที่สุดเพื่อนำไปปฏิบัติหรือทำการทดลองจริง ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาการจับระหว่างอนุพันธ์ไพรีนคือ Py-L-Phe, Py-L-Trp, Py-Gly-Phe, Py-Gly-Trp, Py-Gly-Gly-Phe และ Py-Phe-Gly-Gly กับ โปรตีน bovine serum albumin (BSA) และ lysozyme ที่มีรหัสโครงสร้าง 4OR0 และ 3WVY ตามลำดับ โดยวิธีการทางโมเลกุลลาร์ด็อกกิ้งด้วยโปรแกรม AutoDock 4.2 ซึ่งจะทำการ optimize โครงสร้างที่เหมาะสมของอนุพันธ์ไพรีน ด้วยระเบียบวิธี b3lyp/6-31g(d,p) จากนั้นนำมาศึกษา Spectroscopy ด้วยวิธีทางเคมีควอนตัม โดยพารามิเตอร์ของการโมเลกุลลาร์ด็อกกิ้ง (Molecular Docking) grid มีขนาด 60*60*60 Å ที่ตำแหน่งของ BSA ที่ $x = -6.632$, $y = 21.28$, $z = 114.14$ และตำแหน่งของ lysozyme ที่ $x = 0.014$, $y = 0.346$, $z = 0.105$ เลือกการคำนวณแบบ Lamarckian GA เพราะเป็นวิธีที่เกิดจากการนำข้อดีของ Local search parameters กับ Genetic algorithm มาผสมกัน ทำให้วิธีนี้ให้ค่าพลังงานการจับกันที่ดีที่สุด จำนวนรอบในการเข้าจับที่ 150 รอบ พบว่าอนุพันธ์ของไพรีนมีการดูดกลืนแสงที่มากที่สุดอยู่ในช่วง 342 ถึง 345 nm เมื่อทำการเพิ่มความยาวของโมเลกุลโดยเติมหมู่ glycine เข้าไปพบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไม่เปลี่ยนแปลง จึงสรุปได้ว่าการเติมหมู่ glycine เข้าไปภายในโมเลกุลผลต่อการดูดกลืนแสงของอนุพันธ์ไพรีน นอกจากนี้พบว่าพลังงานการจับของอนุพันธ์ไพรีน กับ BSA และ lysozyme ที่ได้จากการด็อกกิ้งให้ค่าพลังงานการจับมีค่าอยู่ในช่วง -13.69 ถึง -11.03 kcal/mol ของ BSA และค่าพลังงานการจับมีค่าอยู่ในช่วง -11.28 ถึง -9.63 kcal/mol ของ lysozyme โดยมีจำนวนโครงสร้างที่เข้าจับกับ BSA มีค่าระหว่าง 16 ถึง 123 และ จำนวนโครงสร้างที่เข้าจับกับ lysozyme มีค่าระหว่าง 3 ถึง 38 การจับ ของวงไพรีน กับ BSA เกิดที่บริเวณหมู่ methyl ของกรดอะมิโน LEU346 โดยจะเกิดแรง hydrophobic interaction ส่วน lysozyme เกิดการจับของวงไพรีนกับบริเวณวงแหวนเหลี่ยมของ TRP108 โดยจะเกิดแรง hydrophobic interaction เช่นเดียวกัน ซึ่งการศึกษาดังกล่าวทำให้เข้าใจการเกิดอันตรกิริยาของโปรตีนกับ ลิแกนด์ได้มากขึ้น

COMPUTATIONAL STUDY ON NEW PYRENE DERIVATIVES WITH BOVINE SERUM
ALBUMIN (BSA) AND LYSOZYME

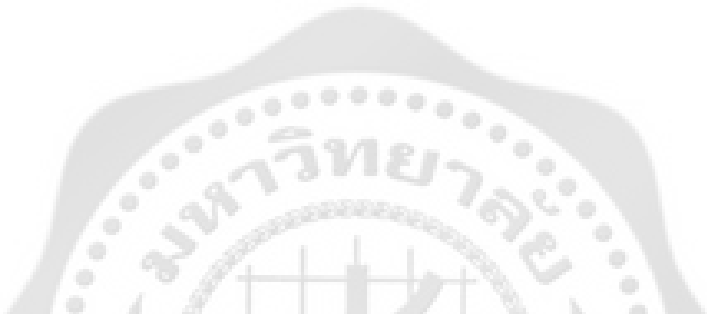


AN ABSTRACT
BY
SUWICHA PATNIN

Presented in Partial Fulfillment of the Requirement for the
Master of Science Degree in Chemistry
at Srinakharinwirot University
August 2015

Suwicha Patnin. (2015). *Study on new pyrene derivatives with Bovine serum albumin (BSA) and Lysozyme*. Master thesis, M.Sc. (Chemistry). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Assoc. Prof. Dr. Apinya Chaivisuthangkura, Asst. Prof. Dr. Mayuso Kuno.

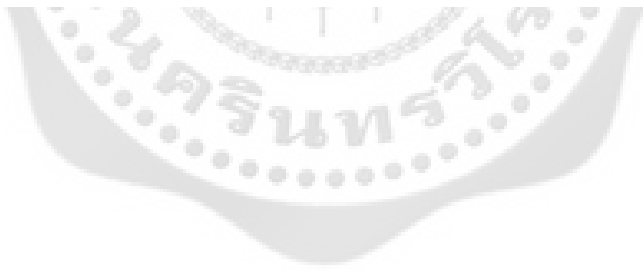
Nowaday, Computational chemistry has an important role in almost every field of science. It can be used in the study on scientific research effectively due to the use of computer calculations and molecular design. In this study, the binding between pyrene derivatives, Py-L-Phe, Py-L-Trp, Py-Gly-Phe, Py-Gly-Trp, Py-Gly-Gly-Phe and Py-Phe-Gly-Gly, with bovine serum albumin (BSA) (4OR0) and lysozyme (3WVY) by Molecular Docking was studied using AutoDock 4.2 program. In this work, the structures of pyrene derivatives were optimized by basic set of b3lyp/6-31g(d,p). The size of grid was 60*60*60 Å, x = -6.632, y = 21.28, z = 114.14 of BSA, x = 0.014, y = 0.346, z = 0.105 of lysozyme. The number of molecular docking cycles was around 150 cycles and the method of docking was Lamarckian GA. Pyrene derivatives showed the absorbance maxima at 342 to 345 nm. Adding glycine residue to the molecule of pyrene derivatives did not affect the absorbance maxima. The molecular docking results revealed that the binding energies between Py-L-Phe, Py-L-Trp, Py-Gly-Phe, Py-Gly-Trp, Py-Gly-Gly-Phe and Py-Phe-Gly-Gly to BSA were -13.17, -13.69, -10.23, -11.03, -12.32 and -12.17 kcal/mol, respectively with the number of conformation of 16 to 123, while the binding energies between Py-L-Phe, Py-L-Trp, Py-Gly-Phe, Py-Gly-Trp, Py-Gly-Gly-Phe and Py-Phe-Gly-Gly to lysozyme were -10.76, -11.28, -10.54, -10.94, -9.63 and -9.73 kcal/mol respectively with the number of conformation of 3 to 38. In addition, molecular docking showed that the pyrenyl chromophore was bound to BSA at the methyl group of LUE346 by hydrophobic interaction and bound to lysozyme at cyclopentane group of TRP108 by hydrophobic interaction. This results from the study can provide more understanding on ligand-protein interaction.



งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนวิจัยประเภททุนการศึกษาเพื่อทำปริญญานิพนธ์

จาก

บัณฑิตวิทยาลัย ประจำปีงบประมาณ 2558



ปริญญานิพนธ์
เรื่อง
การศึกษาทางเคมีคอมพิวเตอร์ของอนุพันธ์ไฟรน์ชนิดใหม่กับโปรตีน โบไวน์
ซีรัม อัลบูมิน และ ไลโซไซม์
ของ
สุวิชา เพ็ชรนิล

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.สมชาย สันติวัฒนกุล)
วันที่..... เดือน.....พ.ศ. 2558

อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์
.....ที่ปรึกษาหลักประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร. อภิญา ชัยวิสุทธิทางกูร) (รองศาสตราจารย์ ดร. สุนิตย์ สุขสำราญ)
.....ที่ปรึกษาร่วมกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มะยุไช้ ภูโน) (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พชรินทร์ ทรัพย์อากาศ)
.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. อภิญา ชัยวิสุทธิทางกูร)
.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มะยุไช้ ภูโน)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เนื่องจากผู้วิจัยได้รับความกรุณาอย่างยิ่งจาก
ศาสตราจารย์ ดร. อภิญา ชัยวิสุทธิทางกูรประธานควบคุมปริญญานิพนธ์ และ ผู้ช่วย
ศาสตราจารย์ ดร. มะยูโซ๊ะ ภูโนกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ ท่านได้เสียสละเวลาอันมีค่าเพื่อให้
คำปรึกษา คำแนะนำ และให้ความช่วยเหลือในการดำเนินการวิจัยทุกขั้นตอน คณะกรรมการควบคุม
ปริญญานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา และชี้แนะข้อบกพร่องต่างๆ ตลอดจนการแก้ปัญหาอันเกิดจาก
การดำเนินการวิจัยและการเขียนปริญญานิพนธ์นี้แก่ผู้วิจัยเป็นอย่างดี อีกทั้งทำให้ผู้วิจัยได้รับ
ประสบการณ์ ได้เรียนรู้และเห็นคุณค่าของงานวิจัย ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้ง และขอกราบขอบพระคุณเป็น
อย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุนิตย์ สุขสำราญที่ให้ความกรุณาในการเป็นประธาน
ในการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พัทธินารถ ทรัพย์อาภากร ที่ให้ความ
กรุณาเป็นกรรมการในการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ ตลอดจนให้คำแนะนำและชี้แนะข้อบกพร่อง
ต่างๆ เพื่อให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น และขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเคมีทุกท่านที่
ได้ถ่ายทอดความรู้และให้ความเมตตาเอาใจใส่ ให้ความช่วยเหลือแก่ผู้วิจัยด้วยดีเสมอมา

คุณค่าและประโยชน์ของปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ ขอมอบเป็นเครื่องบูชาพระคุณต่อครอบครัว
“เพชรนิล” ที่มอบความรัก คอยเอาใจใส่ และสนับสนุนในทุกๆ ด้าน ทำให้ผู้วิจัยประสบความสำเร็จ
ในครั้งนี้

สุวิชา เพ็ชรนิล

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	3
ความสำคัญของงานวิจัย.....	3
ขอบเขตของโครงการวิจัย.....	4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
กรดอะมิโน.....	5
โครงสร้างของกรดอะมิโน.....	5
การทำปฏิกิริยากับแสง.....	9
พันธะเพปไทด์ (Peptide bond).....	9
โปรตีน.....	10
แรงที่เกี่ยวข้องในการเกิดเสถียรภาพของโครงสร้างโปรตีน.....	12
โปรตีนที่ใช้ในการศึกษา.....	14
...ระเบียบวิธีการคำนวณทางเคมีควอนตัมหรือเคมีคอมพิวเตอร์.....	14
การออกแบบโมเลกุล (Molecular design).....	15
โมเลกุลาร์ด็อกกิง (Molecular docking).....	16
ประโยชน์ของเคมีคอมพิวเตอร์.....	18
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	19
3 ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย.....	31
การเตรียมโครงสร้างโปรตีน.....	32
การเตรียมลิแกนด์.....	33
การเตรียมไฟล์ สำหรับการคำนวณ Molecular docking.....	34

สารบัญ

บทที่	หน้า
4(ต่อ)	
ผลการทดลองและอภิปรายผล.....	37
โครงสร้างและการดูดกลืนแสงของอนุพันธ์ไพรีน.....	37
Molecular Docking.....	40
5 สรุปผล อภิปรายผลการวิจัย.....	61
บรรณานุกรม.....	65
ภาคผนวก.....	69
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	71

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 โครงสร้างพื้นฐานของกรดอะมิโน.....	5
2 การเกิด ionization ของกรดอะมิโน.....	6
3 กรดอะมิโนที่ไม่มีขั้วและไม่ชอบน้ำ.....	7
4 กรดอะมิโนที่เป็นอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน.....	7
5 กรดอะมิโนที่มีขั้วและไม่มีประจุ.....	8
6 กรดอะมิโนที่มีประจุบวก.....	8
7 กรดอะมิโนที่มีประจุลบ.....	9
8 พันธะเพปไทด์ของกรดอะมิโน.....	10
9 โครงสร้างทั้ง 4 ชนิดของโปรตีน.....	12
10 พันธะไฮโดรเจนที่เกิดในโปรตีน.....	13
11 การจับกันของโปรตีน BSA กับ ยา alprazolam.....	16
12 ภาพแสดงการ docking ในบริเวณจำเพาะของโปรตีน.....	17
13 ภาพแสดงการ docking และ reverse docking.....	18
14 อนุพันธ์ของไพรีน Py-L-Phe.....	19
15 โครงสร้าง Py-(Gly) _n -Phe.....	20
16 อนุพันธ์ของไพรีน โดย X คือ Try,Tyr,His.....	21
17 อนุพันธ์ของ Py-L-Phe และ Py-D-Phe.....	22
18 อนุพันธ์ของ PMA-L-Phe และ PMA-D-Phe.....	23
19 โครงสร้างของ Anthraquinone dyes.....	24
20 อนุพันธ์ของ Py-biotin.....	25
21 Docking ของ (-)-epicatechin-3-gallate กับ BSA.....	26

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
22 โครงสร้าง alprazolam.....	27
23 โครงสร้างสามมิติของ BSA และ โครงสร้าง isoliquiritigenin (ISL).....	28
24 การ docking ของ BMOP กับ BSA.....	29
25 แผนผังการศึกษาอันตรกิริยาระหว่าง สารประกอบอินทรีย์ที่มีฤทธิ์ในการ กรองแสง กับ BSA.....	30
26 โครงสร้างของ thionine.....	30
27 Protein Data Bank.....	32
28 การเปิดไฟล์โปรตีน.pdb ด้วยโปรแกรม AutoDockTools-1.5.4.....	33
29 การสร้างโครงสร้างของลิแกนด์.mol2 โดยใช้ โปรแกรม Gaussian.....	34
30 การกำหนดจุดศูนย์กลางและขนาด grid.....	35
31 การตั้งค่า docking.....	36
32 การเกิดปฏิกิริยาระหว่าง Py-L-Phe กับ BSA.....	46
33 การเกิดปฏิกิริยาระหว่าง Py-L-Trp กับ BSA.....	47
34 การเกิดปฏิกิริยาระหว่าง Py-Gly-Phe กับ BSA.....	48
35 การเกิดปฏิกิริยาระหว่าง Py-Gly-Trp กับ BSA.....	49
36 การเกิดปฏิกิริยาระหว่าง Py-Gly-Gly-Phe กับ BSA.....	50
37 การเกิดปฏิกิริยาระหว่าง Py-Phe-Gly-Gly กับ BSA.....	51
38 การเกิดปฏิกิริยาระหว่าง Py-L-Phe กับ Lysozyme.....	55
39 การเกิดปฏิกิริยาระหว่าง Py-L-Trp กับ Lysozyme.....	56
40 การเกิดปฏิกิริยาระหว่าง Py-Gly-Phe กับ Lysozyme.....	57
41 การเกิดปฏิกิริยาระหว่าง Py-Gly-Trp กับ Lysozyme.....	58
42 การเกิดปฏิกิริยาระหว่าง Py-Gly-Gly-Phe กับ Lysozyme.....	59
43 การเกิดปฏิกิริยาระหว่าง Py-Phe-Gly-Gly กับ Lysozyme.....	60

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 ผลของการศึกษาการดูดกลืนแสงของอนุพันธ์ไฟรีน.....	38
2 ขนาดของ Grid กับค่า binding energy ระหว่างลิแกนด์ NPS กับ BSA.....	41
3 ผลของการศึกษา Molecular docking ระหว่างอนุพันธ์ของไฟรีนกับ BSA.....	43
4 กรดอะมิโนโดยรอบในระยะ 4 Å ของโปรตีน BSA.....	45
5 ผลของการศึกษา Molecular docking ระหว่าง อนุพันธ์ของไฟรีนกับโปรตีน Lysozyme.....	52
6 กรดอะมิโนโดยรอบในระยะ 4 Å ของโปรตีน Lysozyme.....	54



บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

ในปัจจุบันนี้ วงการวิทยาศาสตร์ได้มีการพัฒนาการออกแบบตัวยาและอนุพันธ์ของตัวยานั้นๆ อย่างต่อเนื่องโดยเคมีคอมพิวเตอร์ได้มีบทบาทที่สำคัญอย่างยิ่งในการออกแบบตัวยาและการศึกษาวิจัย โครงสร้างทางเคมีของโมเลกุล รวมถึงสมบัติพลวัตของสารละลาย ข้อมูลดังกล่าวเป็นพื้นฐานที่สำคัญยิ่ง ต่อการวิจัยและพัฒนาในปัจจุบัน ซึ่งจำเป็นจะต้องอาศัยระเบียบวิธีทางเคมีคอมพิวเตอร์ และการคำนวณทางเคมีควอนตัมเพื่อช่วยอธิบายกลไกการเกิดปฏิกิริยาในระดับโมเลกุล รวมทั้งการเกิดอันตรกิริยาระหว่างตัวยาและโมเลกุลเป้าหมาย (target molecule) ที่จะนำไปสู่ความเข้าใจเกี่ยวกับพฤติกรรมและกลไกการเกิดปฏิกิริยาเคมีในระดับโมเลกุลได้ การสร้างแบบจำลองในการเกิดอันตรกิริยาของสารประกอบที่สนใจกับโมเลกุลเป้าหมายก่อนที่จะได้ทำการทดลองจริงจะเป็นแนวทางในการศึกษาแนวโน้มการเกิดปฏิกิริยาในการทดลองจริง ซึ่งจะเป็นการช่วยประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการซื้อสารเคมีและอุปกรณ์ที่จะเกิดขึ้น และนำมาเป็นแนวทางในการออกแบบยาเพื่อใช้ในทางอุตสาหกรรมและความคุ้มค่าต่อการลงทุนได้อีกด้วย จึงได้มีการนำเอาระเบียบวิธีการศึกษาโมเลกุลดี็อกกิ่ง (molecular docking) และกลศาสตร์ควอนตัม (quantum mechanics) เพื่อเป็นการทำนายหรือยืนยันผลของการเกิดอันตรกิริยาของสารประกอบที่สนใจกับโมเลกุลเป้าหมาย เช่น เอนไซม์ และโปรตีน ต่างๆ ทั้งยังสามารถใช้ในการศึกษาการจับกันของโปรตีนกับลิแกนด์ ที่มีสมบัติทางเภสัชวิทยาและทางเคมี เช่น การศึกษาอันตรกิริยาของโปรตีนกับลิแกนด์ โดยอาศัยการจำลองโมเลกุลในสามมิติ (three-dimensional molecular modeling)

นอกจากนี้แล้ว การศึกษาทางเคมีคอมพิวเตอร์ยังสนับสนุนผลการวิจัยที่ได้จากการทดลองในห้องปฏิบัติการ หรือในทางกลับกัน การศึกษาทางเคมีคอมพิวเตอร์ยังมีส่วนช่วยอธิบายหรือทำนายผลการทดลองบางระบบที่ไม่สามารถศึกษาได้ในทางปฏิบัติ เช่น กลไกการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ การเกิดพันธะไฮโดรเจน ผลของความเป็นโพลาไรในโครงสร้าง การทำนายสเปกตรัมของโมเลกุลที่ซับซ้อน เป็นต้น และด้วยการพัฒนาด้านวิทยาการคอมพิวเตอร์ และวิทยาการคำนวณ ส่งผลให้การศึกษาโดยวิธีเคมีคอมพิวเตอร์และการจำลองระบบมีความถูกต้องและใกล้เคียงกับระบบจริงมากยิ่งขึ้น และทำให้เกิดการพัฒนาความรู้ทางด้านทฤษฎีพื้นฐานขึ้นอย่างมาก ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในกระบวนการวิจัยด้านการค้นหาและพัฒนา ยา (drug discovery and development) การศึกษาทางเคมีคอมพิวเตอร์ช่วยในการ

ประหยัดเวลา(ธีรเกียรติ์ เกิดเจริญ. 2539: 17-22) และใช้ในการศึกษาอย่างแพร่หลาย โดยการออกแบบสารที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและทางเคมี จะศึกษาอันตรกิริยาของตัวยาต่อโมเลกุลเป้าหมายเพื่อดูบริเวณการจับที่เหมาะสม (binding site) และมีค่าพลังงานในการเกิดอันตรกิริยาของโมเลกุลเป้าหมาย (binding energy) ซึ่งถ้าการทดลองจริงต้องใช้ระยะเวลามากในการศึกษา ดังนั้นจึงได้มีการสร้างแบบจำลองโมเลกุลที่สามารถคำนวณสมบัติทางโครงสร้าง (Structural properties) ที่มีผลต่อการเข้าจับกันระหว่างตัวลิแกนด์กับโปรตีน เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาการออกแบบยาต่อไป แบบจำลองโมเลกุลที่นิยมใช้อยู่ในปัจจุบัน มีดังนี้

1. molecular mechanics (MM) หรือ Empirical force field สร้างจากสมการแบบ Empirical โดยพารามิเตอร์ต่างๆ ในสมการ และได้จากการทดลองหรือการคำนวณทางวิธี Quantum mechanics (QM) เช่น ระยะทางของพันธะ (bond distance) มุมของพันธะ (bond angle) การบิดงอของพันธะ (torsional angle) ซึ่งวิธีการนี้ มีความเหมาะสมสำหรับใช้คำนวณโครงสร้างที่มีขนาดใหญ่ เช่น การศึกษาโปรตีน BSA กับ isoliquiritigenin (Shi; et al. 2014: 643) ซึ่งพบว่าจะเกิดการจับของ ลิแกนด์ที่ตำแหน่ง Tyr173 และ Trp237 ซึ่งจะเป็นวิธีที่สามารถคำนวณได้อย่างรวดเร็ว

2. quantum mechanics (QM) ได้จากการหาผลเฉลยของสมการ ทางเคมีควอนตัมที่มีความแม่นยำสูง ยกตัวอย่างเช่น การศึกษาผลการเกิดอันตรกิริยาของตัวยับยั้งเนวิราพีน กับบริเวณโพรงการจับของเอนไซม์การถ่ายแบบเอช ไอ วี-1 quantum mechanics and molecular mechanics (QM/MM) ซึ่งสามารถนำไปศึกษาในระบบที่มีขนาดใหญ่ เช่น เอนไซม์ได้ จึงนับเป็นครั้งแรกที่มีการศึกษากลไกในการเกิดปฏิกิริยา (mechanistic reaction) ของเอนไซม์การถ่ายแบบ HIV-1 ทำให้เข้าใจสมบัติทางโครงสร้างและสมบัติทางพลศาสตร์ของตัวยับยั้งเนวิราพีนกับเอนไซม์การถ่ายแบบ HIV-1 ได้เป็นอย่างดี โดยการทดลองอาจมีความซับซ้อนและใช้เวลาในการคำนวณมาก (Rungrotmongkol; et al. 2007: 1)

ในปี ค.ศ. 1993 कुमारและคณะ (Kumar; et al. 1993: 13914) ได้ทำการศึกษาการทำปฏิกิริยาของอนุพันธ์ของแอนทราซีน 9-anthryl-methylamine hydrochloride (AMAC) หรือ 3-(9-anthryl)propyl amine hydrochloride (APAC) และอนุพันธ์ของไพรีน 4(1-pyrenyl) butyramine chloride (PBAC) กับ DNA และโปรตีน เช่น bovine serum albumin (BSA), calmodulin และ lactoglobulin พบว่า อนุพันธ์ของแอนทราซีน สามารถจับกับ DNA ได้ ส่วน PBAC สามารถจับกับโปรตีนได้ดีและได้ค่าคงที่การจับ (binding constant) ที่มีค่าสูง

จากนั้น कुमारและคณะ (Kumar; et al. 1997: 2085) จึงได้ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ *N*-(1-phenylalanine)-4(1-pyrene) butyramide (Py-L-Phe) เพื่อศึกษาการตัดโปรตีนด้วยอนุพันธ์ของไพรีน พบว่าอนุพันธ์ของไพรีนที่สังเคราะห์ขึ้นสามารถตัดโปรตีน BSA และ Lysozyme ได้โดยการกระตุ้นด้วยแสง การศึกษาทาง Spectroscopy และ อิเล็กโทรโฟรีซิส (SDS-PAGE) พบว่าเกิดการตัดที่ตำแหน่งระหว่าง Leu346 กับ Arg347 ของ BSA และ เกิดการตัดที่ตำแหน่งระหว่าง Val108 กับ Trp109 ของ Lysozyme

ทางผู้วิจัยจึงสนใจที่จะยืนยันการตัดโปรตีน BSA และ Lysozyme ด้วย อนุพันธ์ของ *N*-(1-phenylalanine)-4(1-pyrene) butyramide (Py-L-Phe) โดยใช้ระเบียบวิธีการคำนวณทางโมเลกุลลาร์ด็อกกิ่งและกลศาสตร์ควอนตัมเพื่อที่จะใช้ในการอธิบายกลไกในการอันตรกิริยาของโปรตีน BSA และ Lysozyme ด้วย อนุพันธ์ของไพรีน เช่น Py-L-Phe, Py-Phe-Gly-Gly, Py-Gly-Phe และ Py-Gly-Gly-Phe (Gly คือ Glycine) เพื่อจะศึกษาถึงอิทธิพลของความยาวโมเลกุล Py-L-Phe ว่ามีผลต่อการเกิดอันตรกิริยาต่อโปรตีนด้วยกลไกอย่างไร

ความมุ่งหมายของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างและอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างการจับกันของ โปรตีน BSA และ Lysozyme ด้วยอนุพันธ์ของไพรีน
2. เพื่อคำนวณหาพลังงานการจับ (binding energy) ที่เกิดขึ้นระหว่างโปรตีน BSA และ Lysozyme ด้วยอนุพันธ์ของไพรีน
3. เพื่อหาโพรงการจับ (binding site) ของการจับโปรตีน BSA และ Lysozyme ด้วยอนุพันธ์ของไพรีน

ความสำคัญของงานวิจัย

1. ทำให้ทราบโครงสร้างที่เหมาะสมและอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างการจับกันของโปรตีน BSA และ Lysozyme ด้วยอนุพันธ์ของไพรีน
2. ทำให้ทราบค่าพลังงานการจับ ที่เกิดขึ้นระหว่างโปรตีน BSA และ Lysozyme ด้วยอนุพันธ์ของไพรีน
3. ทำให้ทราบถึงโพรงการจับของการจับโปรตีน BSA และ Lysozyme ด้วยอนุพันธ์ของไพรีน

ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. การศึกษาพลังงานการจับกันของ โปรตีน BSA และ Lysozyme กับอนุพันธ์ของไฟรีนด้วยวิธีโมเลกุลด็อกกิ่ง
2. การศึกษาโครงข่ายการจับที่เกิดขึ้นระหว่างโปรตีน BSA และ Lysozyme กับอนุพันธ์ของไฟรีนด้วยวิธีโมเลกุลด็อกกิ่ง
3. การศึกษาโครงสร้างของอนุพันธ์ไฟรีนด้วยวิธีทางกลศาสตร์ควอนตัม



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

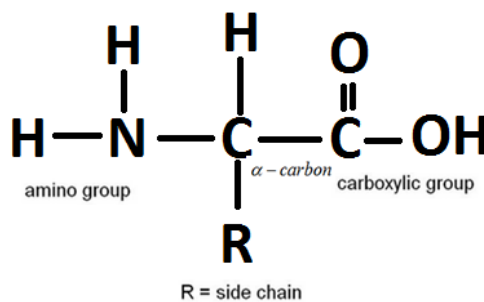
ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และได้นำเสนอหัวข้อต่อไปนี้

1. กรดอะมิโน
2. โปรตีน
3. ระเบียบวิธีการคำนวณทางเคมีควอนตัมหรือเคมีคอมพิวเตอร์
4. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กรดอะมิโน

1. โครงสร้างของกรดอะมิโน

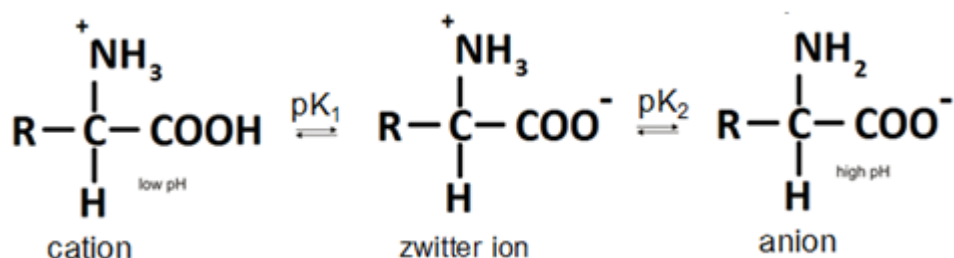
โมเลกุลกรดอะมิโน ประกอบด้วยอะตอมของแอลฟาคาร์บอนที่เกาะอยู่กับอะตอมของหมู่อะมิโน หมู่คาร์บอกซิลิก และหมู่ของ side chain (R group) (ภาพประกอบ 1)



ภาพประกอบ 1 โครงสร้างพื้นฐานของกรดอะมิโน

กรดอะมิโนบางตัวจะมี side chain ที่ประกอบไปด้วยหมู่อะมิโนอีกหมู่ เรียกหมู่อะมิโนที่ไม่ได้เกาะกับแอลฟาคาร์บอน (α -carbon) ว่า หมู่บีตาอะมิโน (β -amino) การที่กรดอะมิโนมีโครงสร้างเช่นนี้จะทำให้หมู่ที่มีฤทธิ์เป็นเบสคือหมู่อะมิโน และหมู่ที่มีฤทธิ์เป็นกรดคือหมู่คาร์บอกซิลิกอยู่ในโมเลกุลเดียวกัน เมื่อละลายในน้ำจึงมีการแตกตัวให้ทั้งประจุบวกและประจุลบอยู่ในโมเลกุลเดียวกัน เรียกว่าเป็น zwitter ion

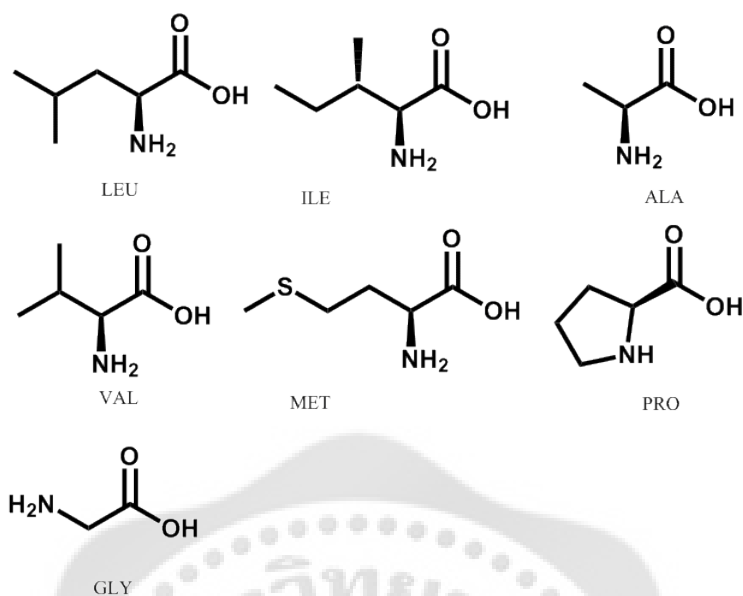
ซึ่งถ้าหากอยู่ในสารละลายที่มีฤทธิ์เป็นกรด กรดอะมิโนจะทำหน้าที่เป็นเบส และหากอยู่ในสารละลายที่มีฤทธิ์เป็นเบส กรดอะมิโนจะทำหน้าที่เป็นกรด (ภาพประกอบ 2)



ภาพประกอบ 2 การเกิด ionization ของกรดอะมิโน

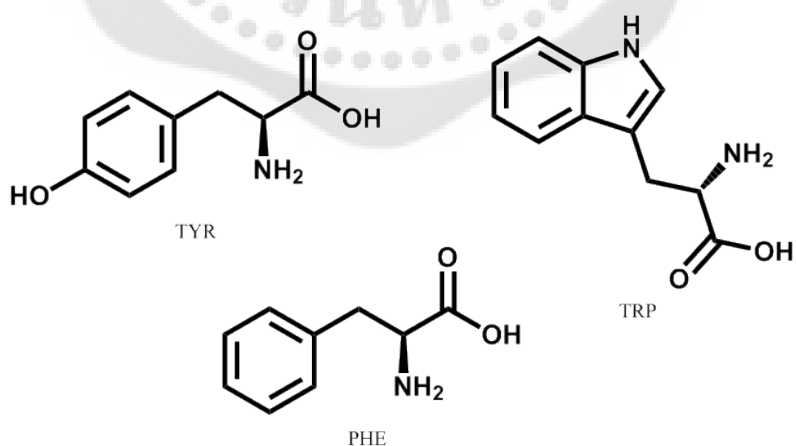
กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนที่พบในธรรมชาติมี 20 ชนิด ดังนั้น กรดอะมิโนทั้ง 20 ชนิดจะมีหมู่ของ side chain แตกต่างกันไปโดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 5 กลุ่มด้วยกัน ดังนี้

1. กรดอะมิโนที่ไม่มีขั้วและไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ได้แก่ ไกลซีน (Glycine) อะลานีน (Alanine) วาลีน (Valine) ลิวซีน (Leucine) ไอโซลิวซีน (Isoleucine) และ โพรลีน (Proline) กรดอะมิโนเหล่านี้มีบทบาทในการทำปฏิกิริยากับส่วนที่ไม่ชอบน้ำของโปรตีน และเพิ่มความยืดหยุ่นของโปรตีน (ภาพประกอบ 3)



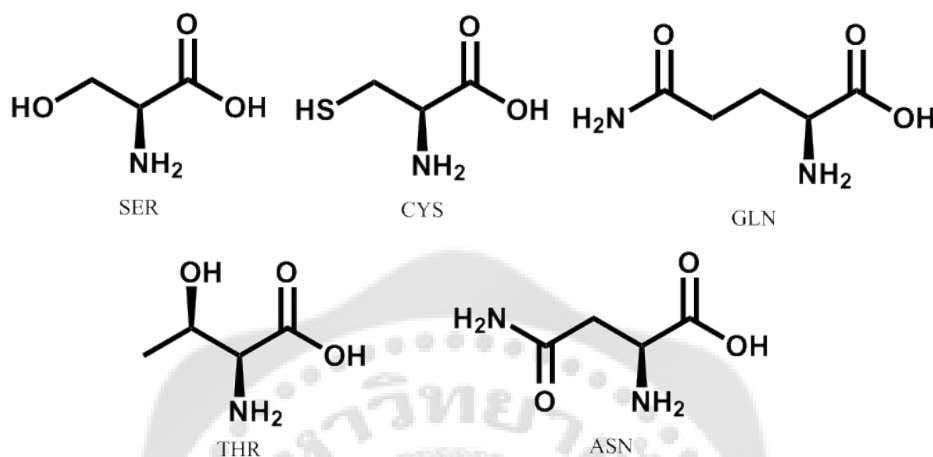
ภาพประกอบ 3 กรดอะมิโนที่ไม่มีขั้วและไม่ชอบน้ำ

2. กรดอะมิโนที่เป็นอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน ได้แก่ ฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine) ไทโรซีน (Tyrosine) ทริปโตเฟน (Tryptophan) มีบทบาทในการเพิ่มความแข็งแรงของโปรตีนโดยการซ้อนทับกันของวงแหวนอะโรมาติกซึ่งมีความคงตัว (ภาพประกอบ 4)



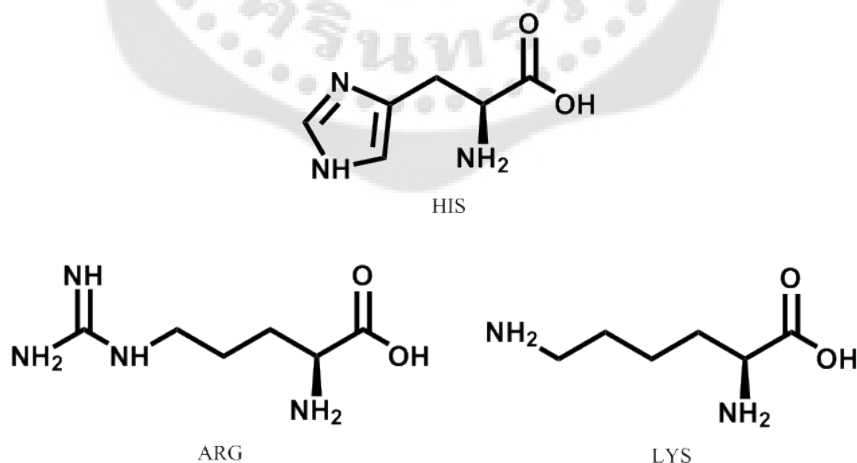
ภาพประกอบ 4 กรดอะมิโนที่เป็นอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน

3. กรดอะมิโนที่มีขั้วและไม่มีประจุ ได้แก่ เซอรีน Serine() ซิสทีอีน (Cysteine) ทรีโอนีน (Threonine) เมทไทโอนีน (Methionine) กลูตามีน (Glutamine) และ แอสปาราจีน (Asparagine) หมู่ฟังก์ชันเหล่านี้ชอบน้ำ (hydrophilic) และละลายในน้ำได้ดี (ภาพประกอบ 5)



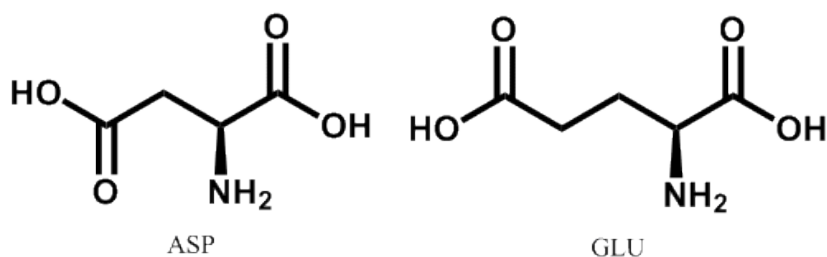
ภาพประกอบ 5 กรดอะมิโนที่มีขั้วและไม่มีประจุ

4. กรดอะมิโนที่มีประจุบวก ได้แก่ ฮิสทีดีน (Histidine) ไลซีน (Lysine) อาร์จินีน (Arginine) โดยจะแตกตัวให้ประจุบวกที่ pH 7 (ภาพประกอบ 6)



ภาพประกอบ 6 กรดอะมิโนที่มีประจุบวก

5. กรดอะมิโนที่มีประจุลบ ได้แก่ แอสพาเตต (Aspartate) และ กลูตาเมต (Glutamate) โดยจะแตกตัวให้ประจุลบที่ pH 7 (ภาพประกอบ 7)



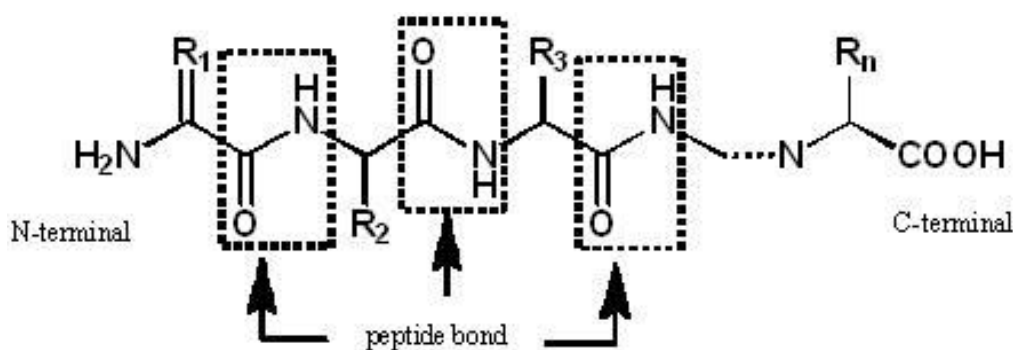
ภาพประกอบ 7 กรดอะมิโนที่มีประจุลบ

การทำปฏิกิริยากับแสงของกรดอะมิโน

กรดอะมิโนชนิดที่เป็นอะโรมาติก เช่น ฟีนิลอะลานีน ไทโรซีน ทรีปโตเฟน จะมีคุณสมบัติในการดูดกลืนแสงในช่วงใกล้แสงอุลตราไวโอเล็ต (near ultraviolet) คือ ช่วงความยาวคลื่น 250 ถึง 300 นาโนเมตร และนอกจากนี้ กรดอะมิโน ไทโรซีน และ ทรีปโตเฟน ยังสามารถมีฤทธิ์ในการเรืองแสงได้เมื่อได้รับแสงอุลตราไวโอเล็ต

เพปไทด์ (peptide)

เพปไทด์ เป็นพอลิเมอร์ของสายกรดอะมิโน เกิดจากการทำปฏิกิริยาของหมู่คาร์บอกซิลิกในกรดอะมิโนลำดับที่หนึ่ง กับหมู่อะมิโนของกรดอะมิโนลำดับที่สอง และสูญเสียน้ำไปหนึ่งโมเลกุล พันธะที่เชื่อมระหว่างกรดอะมิโนทั้งสองนั้นเป็นพันธะโคเวเลนต์ ระหว่าง คาร์บอนและไนโตรเจนเรียกว่า พันธะเพปไทด์ (peptide bond) โดยพันธะนี้จะสามารถเกิดขึ้นต่อเนื่องกันไปเรื่อยๆ จนเกิดเป็นสายพอลิเพปไทด์และจะถูกสร้างเป็นโมเลกุลของโปรตีน ซึ่งจะมีขนาดโมเลกุลตั้งแต่ 10 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 8)



ภาพประกอบ 8 พันธะเพปไทด์ของกรดอะมิโน

โปรตีน

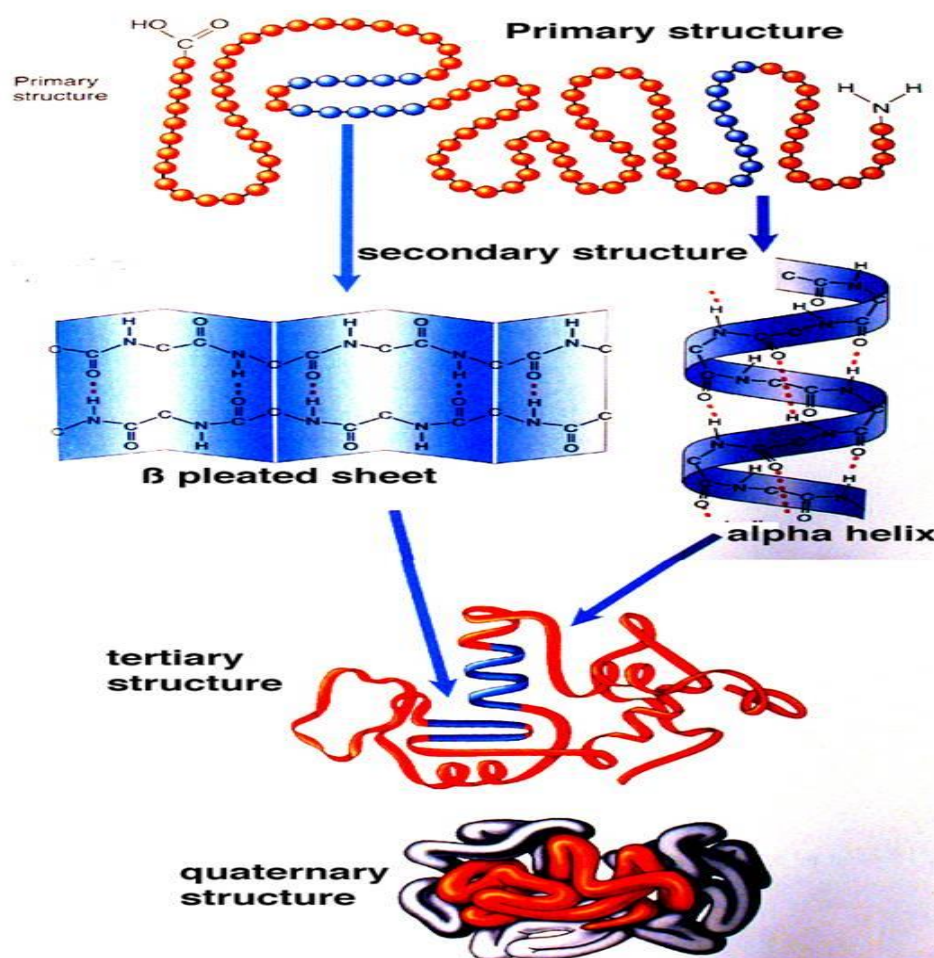
โปรตีนประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวนมากตั้งแต่ 10 กิโลดาลตันขึ้นไป มีโครงสร้างที่ซับซ้อนกว่าเพปไทด์ และมีโครงสร้างหลายแบบดังนี้

1. โครงสร้างปฐมภูมิ (primary structure) เป็นโครงสร้างอย่างง่ายที่จะแสดงให้เห็นถึงลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนในสายพอลิเพปไทด์ โดยจะกำหนดให้ปลายด้านหมู่อะมิโนเรียกว่า *N-terminal* อยู่ทางด้านซ้ายและปลายหมู่คาร์บอกซิลเรียกว่า *C-terminal* อยู่ทางด้านขวา ซึ่งการนับจากบริเวณของกรดอะมิโนภายในสายพอลิเพปไทด์ จะนับจากปลายด้านหมู่อะมิโนเป็นบริเวณที่ 1 และนับต่อไปเรื่อยๆ ไปจนถึงปลายสายพอลิเพปไทด์ (ภาพประกอบ 9)

2. โครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) เป็นโครงสร้างส่วนใดส่วนหนึ่งของโมเลกุลประกอบด้วยแบบที่พันกันเป็นเกลียวคล้ายสปริง เรียกว่า เกลียวแอลฟา (α -helix) เกิดจากการม้วนตัวของโครงสร้างปฐมภูมิ คล้ายกระดาษม้วน เนื่องจากมีพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่คาร์บอนิลกับหมู่อะมิโนในสายเดียวกันจึงเกิดการพันเกลียว และ แบบที่คล้ายจีบที่พับซ้อนกันเป็นระเบียบคล้ายจีบของกระโปรงพลีท เรียกว่า แผ่นบีตา (β -pleated sheet) เนื่องจากมีพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่คาร์บอนิลกับหมู่อะมิโนในสายที่ขนานกันจึงเกิดการพับจีบขึ้น และแบบเกลียวที่ไม่มีระเบียบ (random coil) การขดเป็นเกลียวหรือการพับซ้อนกันเพื่อให้มีเสถียรภาพในธรรมชาติ โดยจะมีการม้วนพับเอาส่วนที่ไม่ชอบน้ำเข้าไว้ด้านใน และหันเอาส่วนที่ชอบน้ำออกสู่ด้านนอก (ภาพประกอบ 9)

3. โครงสร้างแบบตติยภูมิ (tertiary structure) เป็นโครงสร้างแบบทุติยภูมิแบบต่างๆ มารวมเข้าด้วยกันเป็นโครงสร้างสามมิติ ซึ่งเป็นกระบวนการที่ซับซ้อน เพื่อที่จะทำให้โมเลกุลมีเสถียรภาพที่สุด จะมีแรงดึงดูดที่เกี่ยวข้องซึ่งจะเป็นปฏิกิริยาระหว่างหมู่ไฮโดรเจนของกรดอะมิโน ได้แก่ พันธะไฮโดรเจน พันธะไดซัลไฟด์ พันธะไอออนิก และ แรงดึงดูดไฮโดรโฟบิก โดยจะจัดเรียงตัวของหมู่ไม่ชอบน้ำเข้าสู่ด้านในของโมเลกุลและหมู่ที่ชอบน้ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มที่มีประจุให้มาอยู่ที่ผิวด้านนอกเป็นส่วนที่สัมผัสกับน้ำ โปรตีนชนิดที่เป็นก้อน (globular protein) ส่วนใหญ่ส่วนที่สัมผัสกับน้ำประกอบด้วยส่วนที่ไม่มีขั้วเกือบครึ่งหนึ่งรวมทั้งส่วนที่มีขั้วส่วนหนึ่งจะอยู่ด้านในของโมเลกุลทั้งนี้มาจากข้อจำกัดของการม้วนพับของโมเลกุล (ภาพประกอบ 9)

4. โครงสร้างแบบจตุรภูมิ (quaternary structure) เป็นโครงสร้างโมเลกุลของโปรตีนที่เกิดจากสายพอลิเพปไทด์มากกว่าหนึ่งสายมาเกาะเกี่ยวกัน อาจเป็นแบบสองสาย (dimers) สามสาย (trimers) สี่สาย (tetramers) หรือหลายๆ สาย (oligomers) เช่น บีตา-แลกโตโกลบูลิน พบเป็นแบบชนิดสองสายที่ pH 5-8 เป็นแบบ 8 สาย ที่ pH 3-5 และเป็นแบบ 1 สายที่ pH มากกว่า 8 สายพอลิเพปไทด์ที่มาเกาะเกี่ยวกันอาจเป็นชนิดเดียวกันหรือต่างชนิด เช่น ฮีโมโกลบินเป็นโครงสร้างแบบจตุรภูมิชนิดสี่สายพอลิเพปไทด์ที่ต่างกัน 2 ชนิดมาเกาะเกี่ยวกัน (ภาพประกอบ 9)



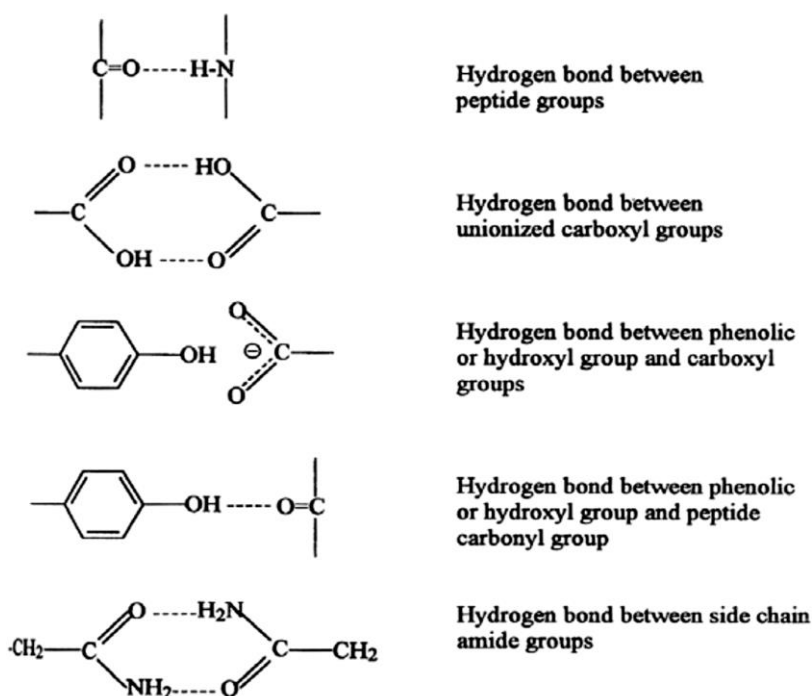
ภาพประกอบ 9 โครงสร้างทั้ง 4 ชนิดของโปรตีน

ที่มา Neil, C. (1999). Structures and properties of biological molecules

แรงที่เกี่ยวข้องในการเกิดเสถียรภาพของโครงสร้างโปรตีน

กระบวนการม้วนพับไปมาของสายพอลิเพปไทด์จนได้โครงสร้างแบบสามมิติของโปรตีนแต่ละชนิดจากสิ่งมีชีวิตเป็นกระบวนการที่ซับซ้อนและควบคุมโดยระบบพันธุกรรม แรงที่เกี่ยวข้องในการทำให้โมเลกุลของโปรตีนที่ม้วนพับไปมามีเสถียรภาพนอกจากพันธะเพปไทด์แล้วยังมีแรงอื่นอีก แบ่งออกเป็น 2 ชนิดหลักคือ ชนิดแรกเป็นแรงที่เกิดจากปฏิกิริยาภายในโมเลกุลของโปรตีน คือ แรงแวนเดอร์วาลส์ (van der

waals interaction) และแรงจากการกีดขวางเนื่องจากขนาด (steric hindrance interaction) อีกชนิดเป็นแรงที่เกิดจากปฏิกิริยาภายในโมเลกุลซึ่งเกิดจากอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมคือ พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) แรงดึงดูดระหว่างสารที่มีขั้วต่างกัน (electrostatic interaction) แรงที่เกิดจากปฏิกิริยาของสารที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic interaction) และ dipole-dipole interaction โดยพันธะไฮโดรเจนเป็นพันธะที่เกิดขึ้นมากที่สุด เมื่อเกิดพันธะขึ้นเป็นจำนวนมากจึงมีอิทธิพลต่อเสถียรภาพของโปรตีนค่อนข้างสูง พันธะไฮโดรเจนเกิดจากหมู่ต่างๆ ในโมเลกุลของโปรตีน พันธะไฮโดรเจนที่เกิดจากกลุ่มของเพปไทด์ในเกลียวแอลฟา และแผ่นบีตาที่มีจำนวนมากที่สุด กลุ่มของเพปไทด์ที่เกิดพันธะไฮโดรเจนยังก่อให้เกิด dipole-dipole interaction ระหว่าง N-H และ C=O และพันธะต่าง ๆ ที่ทำให้โมเลกุลของโปรตีนมีเสถียร (ภาพประกอบ 10)



ภาพประกอบ 10 พันธะไฮโดรเจนที่เกิดในโปรตีน

ที่มา Damodaran, S.(1996). Amino acids, peptides, and proteins

โปรตีนที่ใช้ในการศึกษา

ในการวิจัย ได้เลือกโปรตีนที่จะทำการศึกษา 2 ชนิด คือ BSA และ Lysozyme โดย BSA เป็นโปรตีนที่อยู่ในระบบเลือดทำหน้าที่เป็นโปรตีนขนส่งจะประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 583 กรดอะมิโน เป็นโปรตีนแบบก้อนกลม มี 3 domain ในแต่ละ domain จะมี subdomain คือ A และ B มีมวลโมเลกุล 67000 กิโลดาลตัน BSA มี isoelectric point ที่ช่วง pH 4.7-4.9 ถ้าค่า pH อยู่ในช่วงนี้ จะมีประจุเป็นศูนย์ แต่ถ้าค่า pH อยู่ในช่วงมากกว่า isoelectric point จะมีประจุเป็นลบ และ ถ้าค่า pH อยู่ในช่วงน้อยกว่า isoelectric point จะมีประจุเป็นบวก ส่วนใหญ่นิยมนำ BSA มาใช้ในการทดลองทางด้านเคมีเนื่องจากมีความเสถียรสูง มีจำนวน binding site หลายตำแหน่ง ทราบโครงสร้างและลำดับกรดอะมิโนที่แน่นอน และหาได้ง่ายราคาไม่แพง

Lysozyme เป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่สามารถสกัดได้จากไข่ขาว มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ มีฤทธิ์ในการเจาะผนังเซลล์ของแบคทีเรียและยังเป็นสารที่ใช้ปนในอาหาร (food additive) ทำหน้าที่เป็นสารกันเสีย (preservative) ได้อีกด้วย Lysozyme ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 129 กรดอะมิโน เป็นโปรตีนสายเดี่ยว มีมวลโมเลกุล 14300 กิโลดาลตัน จะมี isoelectric point ที่ pH 11 ถ้าค่า pH อยู่ในช่วงของ isoelectric point จะมีประจุเป็นศูนย์ แต่ถ้าค่า pH อยู่ในช่วงมากกว่า isoelectric point จะมีประจุเป็นลบ และ ถ้าค่า pH อยู่ในช่วงน้อยกว่า isoelectric point จะมีประจุเป็นบวก ที่นิยมนำมาใช้ในวิจัยเนื่องจากเป็นโปรตีนขนาดเล็กที่เสถียรและมีการต้านทานความร้อนสูง ทราบโครงสร้างและลำดับกรดอะมิโนที่แน่นอนและหาได้ง่ายราคาไม่แพง

ระเบียบวิธีการคำนวณทางเคมีคอมพิวเตอร์สำหรับการออกแบบโมเลกุล

เคมีคอมพิวเตอร์ (computational chemistry) เป็นสาขาวิชาเคมีแขนงหนึ่งที่น่าสนใจ สามารถของคอมพิวเตอร์มาใช้ในการศึกษาสมบัติทางโครงสร้างและทางเคมีของโมเลกุล ไอออนหรืออะตอมได้ ซึ่งเป็นการคำนวณโครงสร้างและสมบัติต่างๆ ของโมเลกุลด้วยโปรแกรมการคำนวณด้านเคมีคอมพิวเตอร์กับโครงสร้างทางเคมีที่สนใจ การศึกษานี้เรียกว่า การศึกษาด้วยแบบจำลองเชิงโมเลกุล (molecular modeling) ผลการคำนวณที่ได้ทางเคมีคอมพิวเตอร์นั้น สามารถช่วยในการอธิบายผลของการทดลองในห้องปฏิบัติการด้วยการอธิบายการเปลี่ยนแปลงในระดับโมเลกุล รวมถึงยังสามารถทำนายผลการทดลองที่ไม่สามารถทำได้หรือทำได้ยากในห้องปฏิบัติการได้ นอกจากนี้ยังช่วยลดขอบเขตการทดลองใน

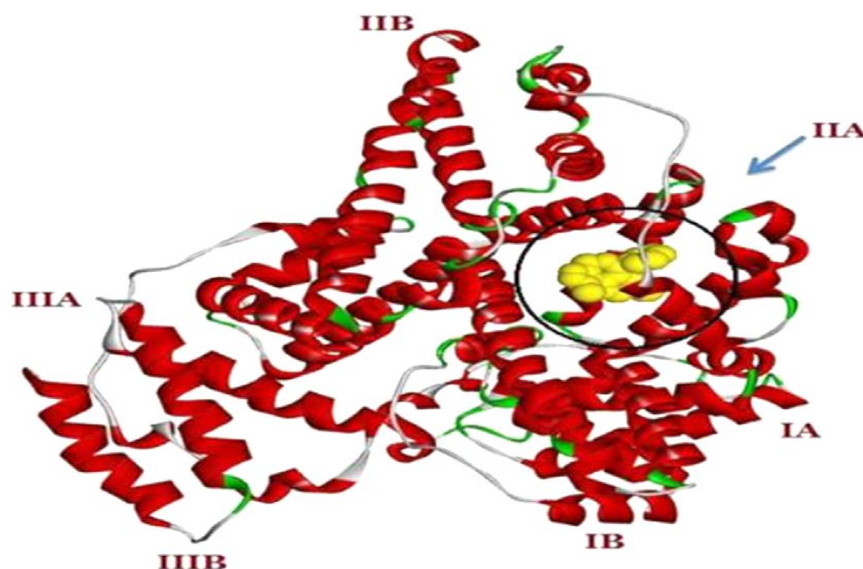
ห้องปฏิบัติการ เช่น การสกัดตัวยาจากสมุนไพรซึ่งอาจจะได้ตัวยาจำนวนหลายชนิด หากต้องนำสารทุกชนิดไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพว่าสามารถรักษาโรคได้หรือไม่นั้น จะต้องใช้ระยะเวลาและต้นทุนในการทดสอบสูงมาก ดังนั้นหากนำเทคนิคทางเคมีคอมพิวเตอร์เข้ามาช่วยในการคัดสรรเฉพาะสารที่คาดว่าจะสามารถพัฒนาเป็นตัวยาได้จริง ซึ่งสามารถลดจำนวนสารที่เหลือไม่ก็สารที่จะนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในห้องปฏิบัติการต่อไปได้ ดังนั้น การศึกษาทางเคมีคอมพิวเตอร์หรือแบบจำลองโมเลกุลนี้จึงสามารถนำมาลดขั้นตอนในการค้นหาที่มีศักยภาพที่สามารถนำไปพัฒนาต่อไป สามารถลดระยะเวลาในการทดลองในห้องปฏิบัติการทดลอง นอกจากนี้ยังสามารถช่วยยืนยันผลการทดลองและสนับสนุนผลการทดลองในห้องปฏิบัติการได้ (คัชรินทร์ ศิริวงศ์. 2550: 28-36)

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาทางเคมีคอมพิวเตอร์นั้น ส่วนใหญ่เป็นข้อมูลเกี่ยวกับสมบัติทางโครงสร้างและพลังงานของระบบที่เป็นอะตอม ไอออน หรือโมเลกุลที่สนใจศึกษา เทคนิคหรือวิธีการคำนวณในการศึกษาทางเคมีคอมพิวเตอร์มีหลากหลาย และเทคนิคหรือวิธีการคำนวณที่สำคัญได้แก่

1. การออกแบบโมเลกุล (molecular design)
2. โมเลกุลาร์ดีocking (molecular docking)

การออกแบบโมเลกุล (molecular design)

การออกแบบโมเลกุลจะแบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ receptor และ ลิแกนด์ โดยส่วนของตัว receptor จะมาจากฐานข้อมูลโครงสร้างของโปรตีน และส่วนของลิแกนด์ได้จากการสร้างโครงสร้างโดยใช้โปรแกรมทางคอมพิวเตอร์ได้แก่ Gaussian Chemdraw จากนั้นทำการ optimize โครงสร้างให้เหมาะสม และนำมาศึกษาด้วยวิธีทางเคมีคอมพิวเตอร์ เช่น การออกแบบโมเลกุลของยา (drug design) เพื่อศึกษาอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลยากับตำแหน่งกัมมันต์ (active site) ของโมเลกุลเป้าหมาย (เช่น ดีเอ็นเอ โปรตีน และ เอนไซม์) โดยวิธีโมเลกุลาร์ดีocking (molecular docking) (ภาพประกอบ 11)

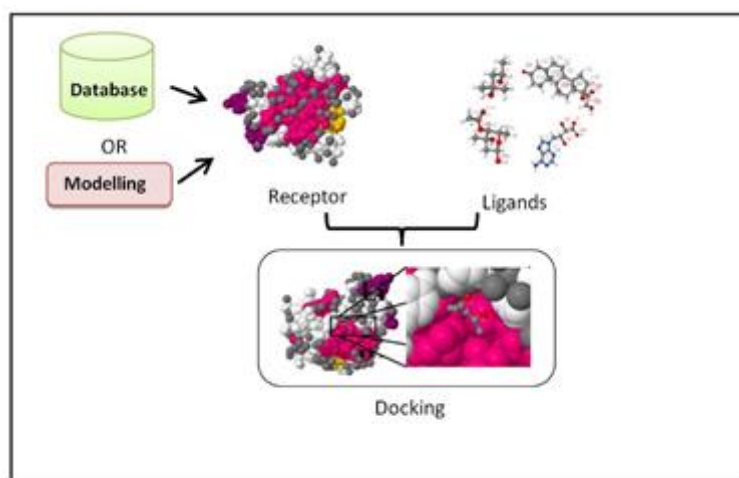


ภาพประกอบ 11 การจับกันของโปรตีน BSA กับ ยา alprazolam

ที่มา Sarkar; et al. 2013: 220-230

โมเลกุลาร์ด็อกกิง (molecular docking)

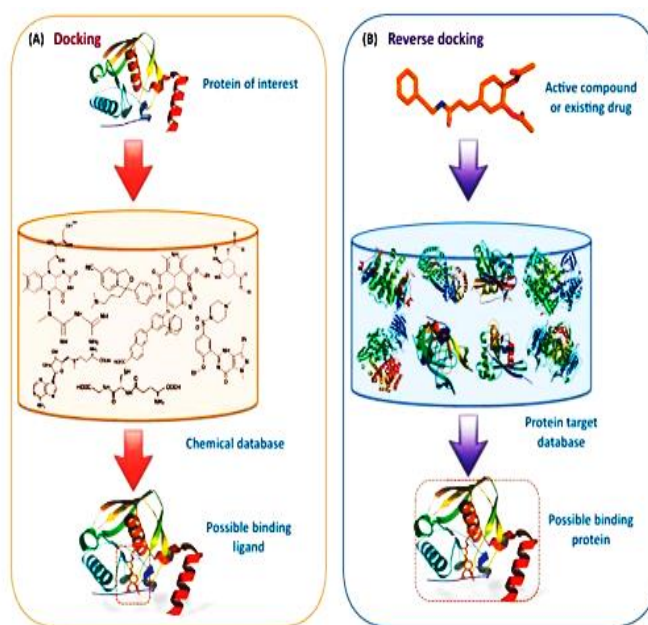
molecular docking เป็นวิธีที่ใช้ในการทำนายทิศทางของโมเลกุลหนึ่งต่อการเข้าจับอีกโมเลกุลหนึ่ง เพื่อสร้างเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่เสถียรและให้ผลของบริเวณการจับของโมเลกุล (binding site) พลังงานการจับกัน (binding energy) โดยส่วนใหญ่จะใช้กับโมเลกุลของสารชีวภาพ เช่น โปรตีน เอนไซม์ กรดนิวคลีอิก คาร์โบไฮเดรตและไขมัน วิธี molecular docking จะใช้ศึกษาการออกแบบโมเลกุลของตัวยา ชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์จำเพาะต่อโปรตีนหรือเอนไซม์เป้าหมาย ซึ่งนิยมเรียกว่า lock and key คือ ต้องมีความจำเพาะของตัว acceptor และ receptor จึงจะสามารถเกิดการ binding กันได้ (ภาพประกอบ 12)



ภาพประกอบ 12 ภาพแสดงการ docking ในบริเวณจำเพาะของโปรตีน
ที่มา Intechopen. (2014). (online)

การ docking สามารถแบ่งออกได้ 2 แบบ

1. docking คือ มีโปรตีนที่สนใจจะศึกษาและนำกลุ่มของลิแกนด์หลายชนิดที่เราสนใจมาทำเรา docking เพื่อหาตัวลิแกนด์ที่เหมาะสมต่อตัวโปรตีนที่สนใจ (ภาพประกอบ 13A)
2. reverse docking คือ มีลิแกนด์ที่สนใจจะศึกษาและนำกลุ่มของโปรตีนหลายชนิดที่เราสนใจมาทำการ docking เพื่อหาตัวโปรตีนที่เหมาะสมต่อตัวลิแกนด์ที่สนใจ (ภาพประกอบ 13B)



ภาพประกอบ 13 (A) ภาพแสดงการ docking (B) ภาพแสดงการ reverse docking
ที่มา Zheng; et al. 2013: 549-559

ประโยชน์ของเคมีคอมพิวเตอร์

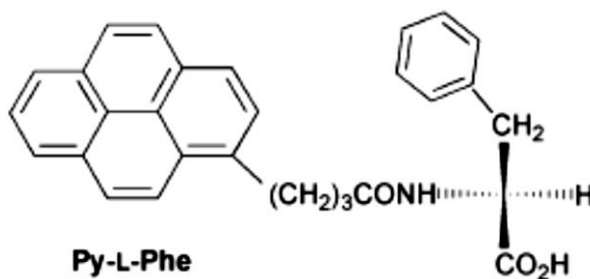
เคมีคอมพิวเตอร์สามารถประยุกต์ใช้ได้หลากหลายทาง เช่น

1. การศึกษาโครงสร้าง X-RAY
2. การศึกษาการออกแบบตัวยา (drug design)
3. การหาโครงสร้างที่เสถียรของสาร (optimization)
4. การศึกษาการจับกันระหว่างโปรตีนกับโปรตีน
5. การศึกษากลไกทางเคมีเมื่อเกิดอันตรกิริยา

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปี ค.ศ. 1993 कुमारและคณะ (Kumar; et al. 1993: 13914-13919) ได้ทำการศึกษาการทำปฏิกิริยาของอนุพันธ์ของแอนทราซีน 9-anthryl-methylamine hydrochloride (AMAC) หรือ 3-(9-anthryl)propylamine hydrochloride (APAC) และอนุพันธ์ของไพรีน 4(1-pyrenyl)butyramine chloride (PBAC) กับ DNA และโปรตีน BSA, calmodulin และ lactoglobulin พบว่า อนุพันธ์ของแอนทราซีนสามารถจับกับ DNA ได้ ส่วน PBAC สามารถจับกับโปรตีนได้ดีและได้ค่าคงที่การจับ (binding constant) ที่มีค่าสูง ซึ่ง PBAC สามารถจับที่บริเวณจำเพาะที่มีหมู่น้ำมัน (hydrophobic) ในบริเวณใกล้หมู่ที่มีประจุในโปรตีน ซึ่งการจับกันจะมีความจำเพาะกว่าการจับกับบริเวณที่ไม่ชอบน้ำหรือบริเวณหมู่ที่มีประจุในโปรตีนเพียงอย่างเดียว

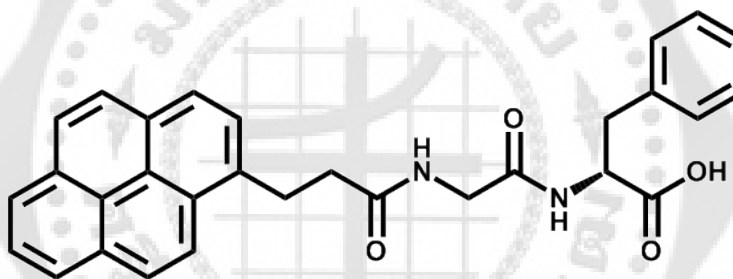
ในปี ค.ศ. 1997 कुमारและคณะ (Kumar; et al. 1997: 2085-2087) ได้ทำการศึกษาการตัดโปรตีนโดยกระตุ้นปฏิกิริยาด้วยแสง ซึ่งทำการออกแบบอนุพันธ์ของไพรีน คือ *N*-[4(1-pyrene)butyryl]-L-phenylalanine (Py-L-Phe) จากปฏิกิริยาระหว่าง L-phenylalanine กับ 4(1-pyrene)butyric acid ทำให้ได้อนุพันธ์ของไพรีนชนิดใหม่ซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีทั้งปลายที่มีขั้วและไม่มีขั้ว และนำโมเลกุลดังกล่าวมาศึกษาการตัดโปรตีน BSA และ Lysozyme พบว่า Py-L-Phe สามารถตัดโปรตีนด้วยแสงที่มีความยาวคลื่น 344 นาโนเมตร โดยมี cobalt(II)hexamine trichloride ($\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ หรือ CoHA) เป็นตัวรับอิเล็กตรอน (electron acceptor) จากนั้นทำการแยกเปปไทด์ที่ได้จากการตัดโปรตีนด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (SDS-PAGE) และนำมาหาลำดับของกรดอะมิโน พบว่า เกิดการตัดโปรตีน BSA ที่บริเวณจำเพาะระหว่าง Leu346 กับ Arg347 ส่วน การตัดโปรตีน Lysozyme เกิดที่บริเวณจำเพาะระหว่าง Val108 กับ Trp109 (ภาพประกอบ 14)



ภาพประกอบ 14 อนุพันธ์ของไพรีน Py-L-Phe

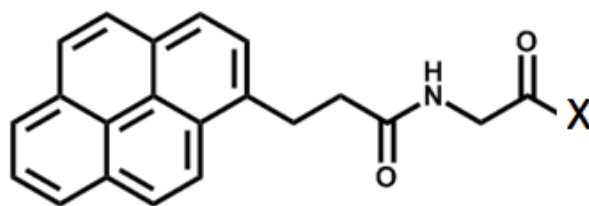
พืมา Kumar; et al. 1997: 2085-2087

ในปี ค.ศ. 1999 कुमारและคณะ (Kumar; et al. 1999: 4262-4270) ได้ทำการศึกษาอิทธิพลของความยาวของโมเลกุลของอนุพันธ์ไพรีนในการจับและตัดโปรตีนโดยนำ glycine มาเป็นตัวเชื่อมระหว่าง 4(1-pyrene)butyric acid กับ L-phenylalanine เกิดเป็นโครงสร้าง $\text{Py-(Gly)}_n\text{-Phe}$ ($n = 0, 1, 2$) จากการศึกษา พบว่า ความยาวของโมเลกุลมีผลต่อการจับและการตัดโปรตีน ซึ่งความยาวของโมเลกุลทำให้ประสิทธิภาพการตัดโปรตีนลดลง เมื่อความยาวเพิ่มขึ้นการตัดโปรตีน Lysozyme จะเกิดขึ้น 2 บริเวณ คือ ที่บริเวณหลักระหว่าง Val 108 และ Trp109 และบริเวณรองระหว่าง Ala110 และ Trp111 (ภาพประกอบ 15)



ภาพประกอบ 15 โครงสร้าง $\text{Py-(Gly)}_n\text{-Phe}$

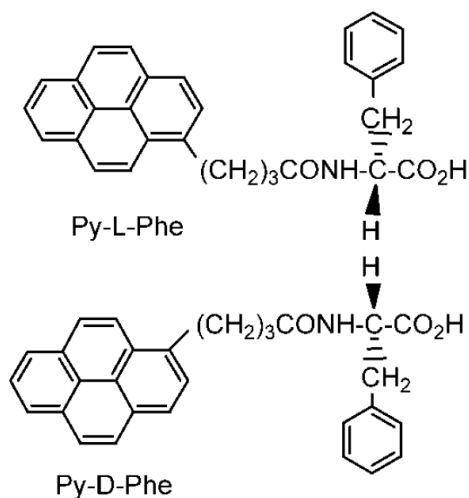
ในปี ค.ศ. 2000 कुमारและคณะ (Kumar; et al. 2000: 7019-7025) ได้ทำการศึกษาการตัดโปรตีนด้วยแสงโดยใช้กรดอะมิโนชนิดต่างๆ ในการสังเคราะห์อนุพันธ์ของไพรีน ได้แก่ L-tryptophan, L-tyrosine และ L-histidine แทน L-phenylalanine โดยจะใช้โมเลกุลของ Glycine เป็นตัวเชื่อมเพื่อเพิ่มความยืดหยุ่นของโครงสร้างโมเลกุลซึ่งจะเกิดเป็นโมเลกุลดังรูปของ Py-Gly-X ($X = \text{Trp, Tyr, His}$) จากผลการศึกษาการตัดโปรตีนด้วยอนุพันธ์ของไพรีนที่สังเคราะห์ขึ้น พบว่า จะไม่เกิดการตัดโปรตีนเมื่อใช้อนุพันธ์ของไพรีนที่สังเคราะห์ด้วยกรดอะมิโน L-tryptophan และ L-tyrosine เนื่องจากในโมเลกุลของอนุพันธ์ของไพรีนดังกล่าวจะเกิด Intramolecular quenching (ภาพประกอบ 16)



ภาพประกอบ 16 อนุพันธ์ของไพรีน โดย X คือ Try, Tyr, His

ที่มา Kumar; et al. 2000: 7019-7025

ในปี ค.ศ. 2001 कुमारและคณะ (Kumar; et al. 2001: 297-298) ได้ทำการศึกษาการตัดโปรตีน BSA ด้วยอนุพันธ์ไพรีนชนิดใหม่ที่มีสมบัติเป็น enantiomer กันนั้นคือ *N*-[4(1-pyrene)butyroyl]-L-phenylalanine (Py-L-Phe) และ *N*-[4(1-pyrene)butyroyl]-D-phenylalanine (Py-D-Phe) จากผลการทดลองพบว่า Py-L-Phe มีค่าการ binding ได้ดีกว่า Py-D-Phe และจากการศึกษาการตัดโปรตีน พบว่า Py-L-Phe สามารถเกิดการตัดโปรตีน BSA ได้ที่บริเวณ Leu346 และ Arg347 แต่ Py-D-Phe ไม่สามารถเกิดการตัดโปรตีนได้ แปลว่าคุณสมบัติของสารที่เป็น enantiomer อาจมีสมบัติที่แตกต่างกันได้ (ภาพประกอบ 17)



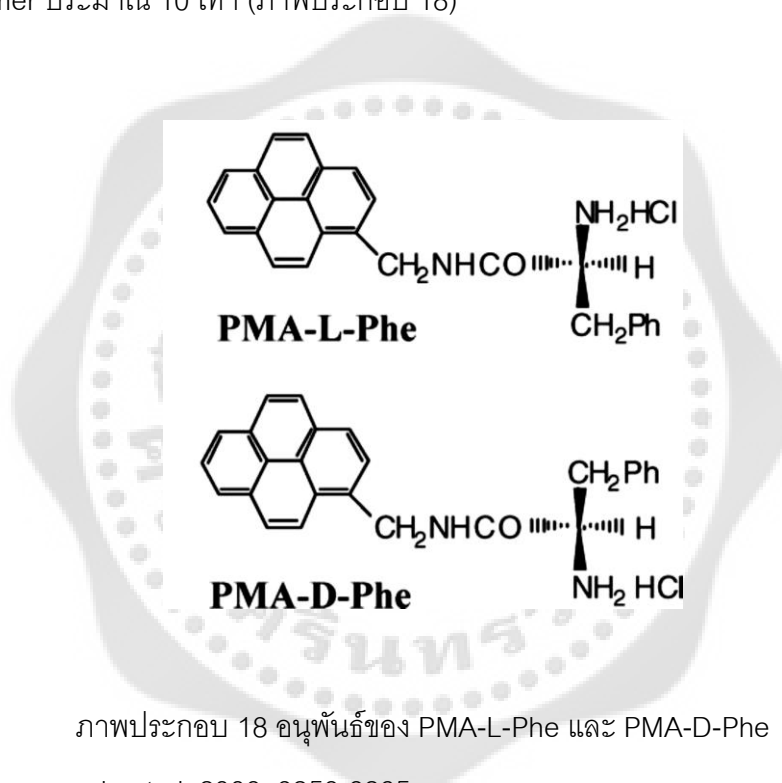
ภาพประกอบ 17 อนุพันธ์ของ Py-L-Phe และ Py-D-Phe

ที่มา Kumar; et al. 2001: 297-298

ในปี ค.ศ. 2002 कुमारและคณะ (Kumar; et al. 2002: 5810-5815) ได้ศึกษากลไกการเกิดปฏิกิริยาของอนุพันธ์ของไพรีนกับโปรตีน โดยใช้เทคนิค flash photolysis พบการเกิดอนุมูลอิสระของประจุบวกของอนุพันธ์ไพรีน (pyrene cation radical) เป็น intermediate โดยเกิดจาก CoHA เป็นตัวรับอิเล็กตรอนจาก Py^* ทำให้เกิดเป็น Py^+ ซึ่งจะเข้าไปดึงอะตอมของไฮโดรเจนของแอลฟาคาร์บอนบนกรดอะมิโนในโปรตีน ทำให้เกิดการสลายของพันธะเพปไทด์ในโปรตีน

ในปี ค.ศ. 2002 कुमारและคณะ (Kumar; et al. 2002: 579-592) ได้ทำการศึกษาสมบัติทางสเปกโทรสโกปีในการยับยั้งการคายแสง (fluorescence quenching) ของอนุพันธ์ไพรีน (Py-L-Phe) โดยใช้ CoHA เป็นตัวรับอิเล็กตรอน พบว่า การยับยั้งการคายแสงลดลงถึง 90% เมื่อ Py-L-Phe จับกับ BSA และการยับยั้งการคายแสงลดลง 30% เมื่อ Py-L-Phe จับกับ Lysozyme และเมื่อทำการศึกษาโดยใช้ Circular dichroism spectroscopy (CD) เพื่อศึกษาผลของโครงสร้างที่เป็น enantiomer ของ Py-L-Phe และ Py-D-Phe พบว่า L-isomer และ D-isomer ให้ผลของสัญญาณ CD ในทิศทางตรงข้ามกัน

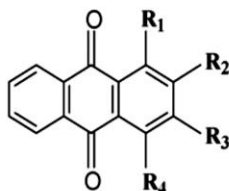
ในปี ค.ศ. 2008 บุรณประพุกษ์และคณะ (Buranaprapuk; et al. 2008: 9258-9265) ได้ศึกษาการจับของอนุพันธ์ของไพรีน L-phenylalanine-1(1-pyrene)methylamide (PMA-L-Phe) และ D-phenylalanine-1(1-pyrene)methylamide (PMA-D-Phe) กับโปรตีน BSA โดยทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ของไพรีนโดยการสลับตัวของ phenylalanine จากหมู่คาร์บอกซิลิก (COOH) ให้เป็นหมู่เอมีน (NH₂) จากผลการศึกษาพบว่า การกลับตัวดังกล่าวไม่มีผลต่อบริเวณการตัดโปรตีน แต่ทำให้การตัดโปรตีนได้ yield มากขึ้น เมื่อเทียบกับรายงานที่ผ่านมา จากการศึกษาค่าคงตัวที่จับ พบว่า D-isomer จับกับโปรตีนได้มากกว่า L-isomer ประมาณ 10 เท่า (ภาพประกอบ 18)



ภาพประกอบ 18 อนุพันธ์ของ PMA-L-Phe และ PMA-D-Phe
ที่มา Buranaprapuk; et al. 2008: 9258-9265

ในปี ค.ศ. 2011 ปารามากูรูและคณะ (Paramaguru; et al. 2010: 985-991) ได้ทำการศึกษาอันตรกิริยาของ สารประกอบสีย้อมของ Anthraquinone dyes เช่น Alizarin Red S, Acid blue 129 และ Uniblu กับ โปรตีน Lysozyme โดยทำการตรวจวัดด้วยวิธี spectroscopy และ Molecular docking ซึ่งพบว่าเกิดการยับยั้งการคายแสงแบบ static quenching และมีค่าคงที่การจับอยู่ในช่วงระหว่าง 1.7×10^4 ถึง $6.2 \times 10^7 \text{ L mol}^{-1}$ และจากผลการศึกษาทาง Molecular docking พบว่ามีการ binding ของ Alizarin Red เกิดขึ้นในบริเวณ Trp 62, Trp 63, Asp 45 และ Asp 52 และการ binding ของ Acid blue 129

เกิดขึ้นในบริเวณ Trp 62 และ Arg 112 ส่วน Uniblu เกิดขึ้นในบริเวณ Trp 62, Arg 112, Val 109 และ Ala 107 ซึ่งเป็นการยืนยันผลของการทดลองโดยแรงที่เกิดขึ้นคือ แรง hydrophobic และพันธะไฮโดรเจน เกิดการ binding ที่บริเวณบริเวณกรดอะมิโน Trp62 (ภาพประกอบ 19)



Alizarin red S (ARS): $R_1 = \text{OH}$; $R_2 = \text{OH}$; $R_3 = \text{SO}_3\text{Na}$ & $R_4 = \text{H}$

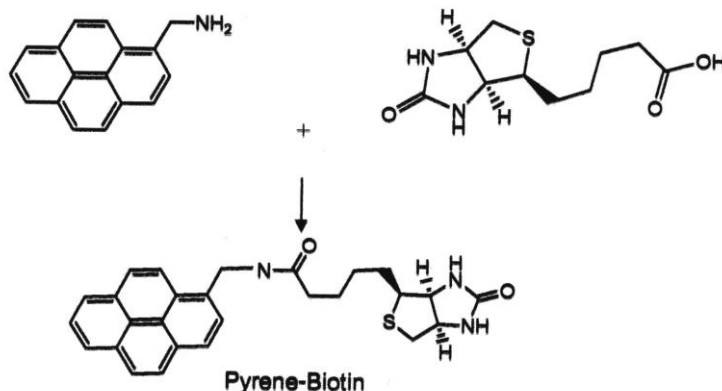
Acid blue 129 (AB): $R_1 = \text{NH}_2$; $R_2 = \text{SO}_3\text{Na}$; $R_3 = \text{H}$ & $R_4 =$

Uniblu (UB): $R_1 = \text{NH}_2$; $R_2 = \text{SO}_3\text{Na}$; $R_3 = \text{H}$ & $R_4 =$

ภาพประกอบ 19 โครงสร้างของ Anthraquinone dyes

ที่มา Paramaguru; et al. 2010: 985-991

ในปี ค.ศ. 2011 มาลัยแก้วและคณะ (Malaikaew; et al. 2011: 251-255) ได้ทำการศึกษาการตัดโปรตีน avidin โดยใช้อนุพันธ์ของไพรีนชนิดใหม่คือ d-biotinyl-1 (1-pyrene)methylamide (Py-biotin) และทำการกระตุ้นปฏิกิริยาด้วยแสง จากการศึกษการ binding ของ Py-biotin กับ avidin ด้วยวิธี absorption spectroscopy และ fluorescence spectroscopy พบว่าเกิด red shifts ของ absorption spectrum ของ Py-biotin เมื่อเกิดการ binding กับ avidin และการศึกษาการตัดโปรตีนโดยทำการฉายแสงที่ 342 nm ไปที่สารละลายผสมของ โปรตีน avidin, Py-biotin และ CoHA พบการตัดโปรตีนที่บริเวณ Thr77 and Val78 (ภาพประกอบ 20)



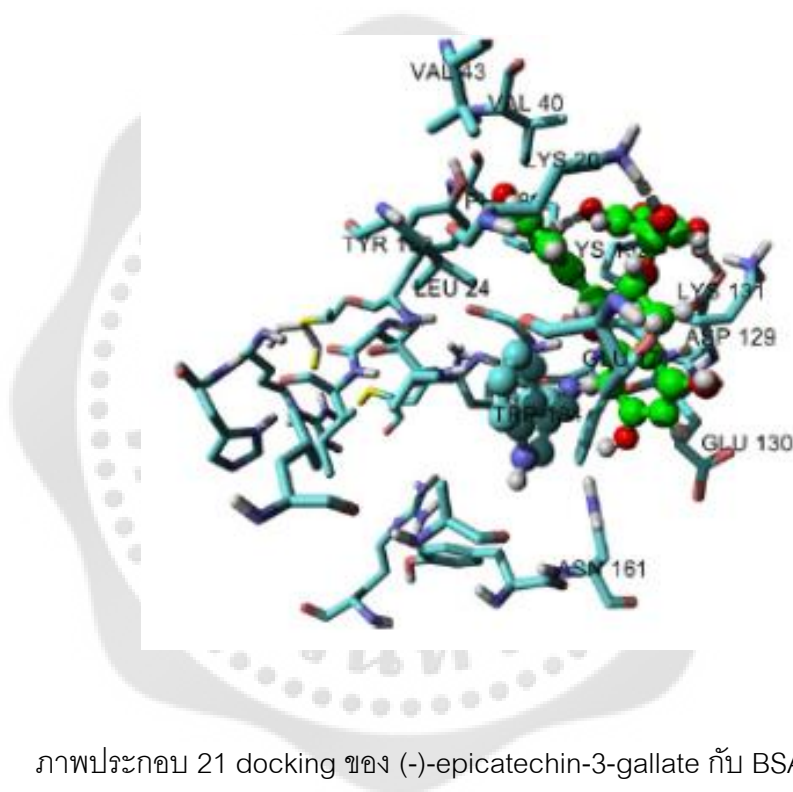
ภาพประกอบ 20 อนุพันธ์ของ Py-biotin

ที่มา Malaikaew; et al. 2011: 251-255

ในปี ค.ศ. 2012 ยายาพาราตีและคณะ (Jayabharathi; et al. 2012: 27-32) ได้ทำการศึกษานันตรกิริยาของ อนุพันธ์ของ benzimidazole คือ 1-(4-fluorobenzyl)-2-(4-fluorophenyl)-1 H-benzo [d]imidazole (FBFPB) กับ โปรตีน BSA โดยศึกษาด้วยวิธี UV-Vis, FT-IR, fluorescence spectroscopy และ molecular docking ผลการศึกษา พบว่าค่า quenching constant (K_{sv}) มีค่าเท่ากับ 2.84×10^4 , 2.55×10^4 และ 2.37×10^4 ที่อุณหภูมิ 301, 310 และ 318 K ตามลำดับ โดยเกิดการจับกันด้วยแรง hydrophobic และพันธะไฮโดรเจน โดยมีค่า Gibbs free energy change (ΔG) เท่ากับ $-24.55 \text{ kJ mol}^{-1}$, entropy change (ΔS) เท่ากับ $1.88 \text{ J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ และ enthalpy change (ΔH) เท่ากับ $-25.77 \text{ kJ mol}^{-1}$ และจากผลการศึกษาทาง molecular docking พบว่ามีการ binding เกิดขึ้นที่บริเวณ Leu138 และ Asp118 ในโปรตีน BSA

ในปี ค.ศ. 2012 เซิสและคณะ (Skr; et al. 2012: 2418-2424) ได้ทำการศึกษานันตรกิริยาของ สารประกอบ polyphenol ที่แตกต่างกันกับโปรตีน BSA ที่ pH 7.5 และอุณหภูมิ 25 °C สารประกอบ polyphenol ที่ใช้คือ [(-)-epigallocatechin-3-gallate, (-)-epigallocatechin, (-)-epicatechin-3-gallate], กลุ่ม flavones (kaempferol, kaempferol-3-glucoside, quercetin, naringenin) และกลุ่ม hydroxy-

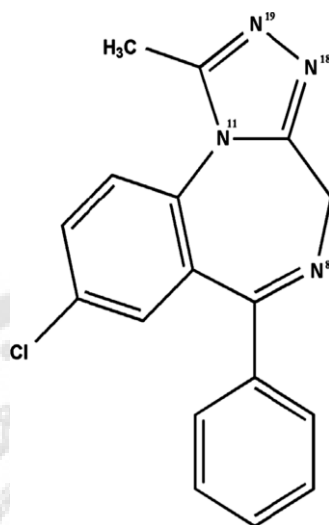
cinnamic acids (rosmarinic acid, caffeic acid, p-coumaric acid) โดยทำการศึกษาด้วยวิธี spectroscopy และ molecular docking ผลของการศึกษาทาง spectroscopy พบว่า ค่าคงที่การจับของ (-)-epigallocatechin-3-gallate, (-)-epicatechin-3-gallate มีค่าสูงกว่าของ (-)-epigallocatechin และของกลุ่ม flavones และกลุ่ม hydroxycinnamic acids พบว่า ค่าคงที่การจับมีค่าที่น้อยเมื่อเข้าจับกับ BSA แสดงให้เห็นว่าสารกลุ่ม polyphenol สามารถเกิดการ binding กับโปรตีน BSA ได้ และจากผลการศึกษาทาง molecular docking พบว่ามีการ binding เกิดขึ้นในบริเวณ Trp213 ในโปรตีน BSA (ภาพประกอบ 21)



ภาพประกอบ 21 docking ของ (-)-epicatechin-3-gallate กับ BSA
ที่มา Skrt; et al. 2012: 2418-2424

ในปี ค.ศ. 2013 ชาร์การ์และคณะ (Sarkar; et al. 2013: 220-230) ได้ทำการศึกษานันตรกิริยาของยา alprazolam กับ โปรตีน BSA ด้วยวิธี spectroscopy และ molecular docking ผลของการศึกษาทาง spectroscopy พบว่า ค่าคงที่การจับของ alprazolam มีค่าเท่ากับ $1.8 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$ และได้ค่า entropy change (ΔS) เท่ากับ $57.64 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ และ enthalpy change (ΔH) เท่ากับ 11.66 J mol^{-1} และแสดงให้เห็นว่าเกิดการจับกันด้วยแรง hydrophobic จากผลการศึกษาทาง molecular docking พบว่ามี

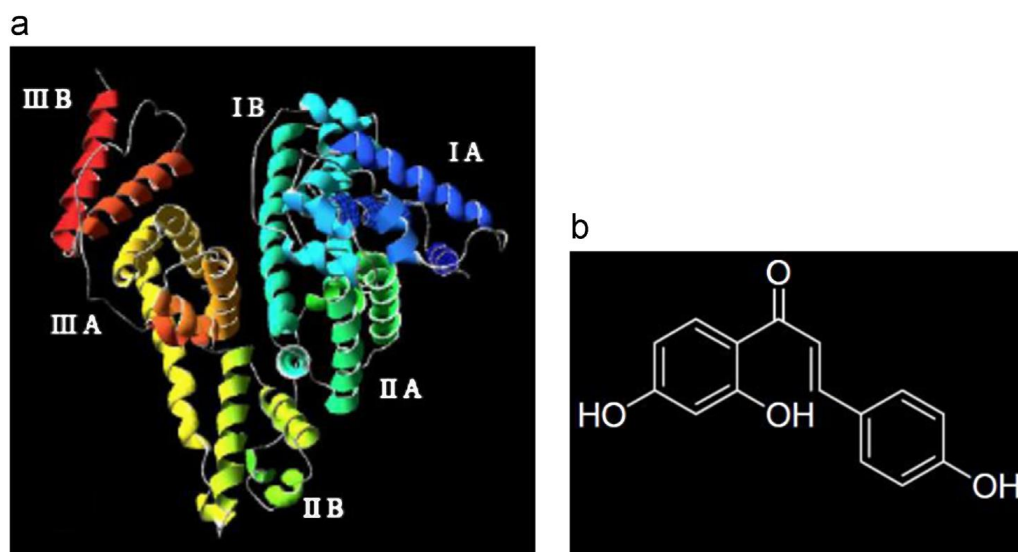
การ binding เกิดขึ้นในบริเวณ subdomain IIA และเกิดการ binding ที่บริเวณ Lys199 และ Arg257 (ภาพประกอบ 22)



ภาพประกอบที่ 22 โครงสร้าง alprazolam

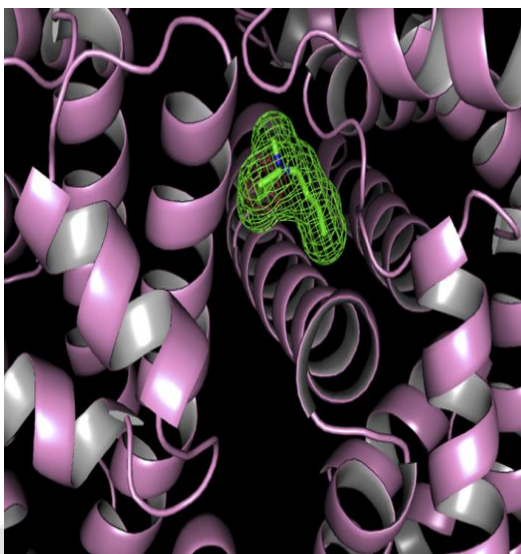
ที่มา Sarkar; et al. 2013: 220-230

ในปี ค.ศ. 2014 ซีและคณะ (Shi; et al. 2014: 643-650) ได้ทำการศึกษาอันตรกิริยาของ isoliquiritigenin (ISL) กับโปรตีน BSA ซึ่งทำการศึกษาดังวิธี circular dichroism (CD), fluorescence spectroscopy และ Molecular docking จากการศึกษาดัง fluorescence spectroscopy พบว่าเกิดการคายแสงที่ 338 nm และเกิดการยับยั้งการคายแสงแบบ static quenching และมี binding site 1 บริเวณมีค่าคงที่การจับ เท่ากับ 5.26×10^4 และจากผลการศึกษาดัง molecular docking มีการ binding เกิดขึ้นที่บริเวณ Trp273 กระบวนการ binding นั้นเป็นปฏิกิริยาที่สามารถเกิดขึ้นได้เอง โดยจะเกิดแรง van der waals และพันธะไฮโดรเจนเป็นแรงในการเกิดอันตรกิริยา (ภาพประกอบ 23)



ภาพประกอบ 23 (a) โครงสร้างสามมิติของ BSA และ (b) โครงสร้าง isoliquiritigenin (ISL)
ที่มา Shi; et al. 2014: 643-650

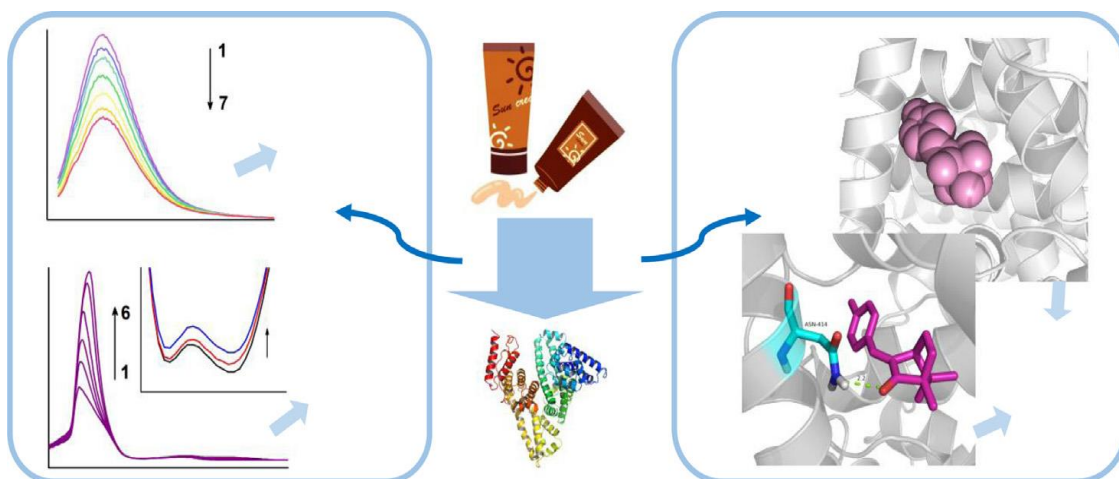
ในปี ค.ศ. 2014 คูมาริและคณะ (Kumari; et al. 2014: 349-356) ได้ทำการศึกษากลไกการยับยั้งการคายแสงของ BSA โดย 1-butyl-1-methyl-2-oxopyrrolidinium bromide (BMOP) ที่ได้จากการสังเคราะห์ขึ้นกับ โปรตีน BSA โดยศึกษาด้วยวิธี UV-Vis, FT-IR, fluorescence spectroscopy และ molecular docking จากการศึกษาพบว่า BMOP สามารถเกิดการยับยั้งการคายแสงของ BSA ได้แบบ dynamic quenching และมีผลสอดคล้องกับค่าพารามิเตอร์ทางเทอร์โมไดนามิก: Gibbs free energy change (ΔG), entropy change (ΔS) และ enthalpy change (ΔH) แสดงว่าปฏิกิริยานี้สามารถเกิดขึ้นได้เองและเกิดการ binding กันด้วยแรง hydrophobic จากการศึกษา molecular docking พบว่า BSA สามารถเกิดการ binding ได้ 2 ส่วนคือ ส่วนของ subdomain IIA และ IIIA ซึ่งเป็นส่วน hydrophobic cavity จากผลการศึกษาพบว่า BMOP สามารถจับกับ BSA ได้ดีในบริเวณ subdomain IIA และมีกรดอะมิโนโดยรอบคือ Arg196, Phe148, Arg458, Ser192, Gln195, His145, Tyr147 และ Asp108 แสดงให้เห็นว่า BMOP สามารถจับกับ BSA ในบริเวณ hydrophobic cavity และเกิดพันธะระหว่าง ไฮโดรเจนของ His145 กับ ออกซิเจนอะตอมของ BMOP (ภาพประกอบ 24)



ภาพประกอบ 24 การ docking ของ BMOP กับ BSA

พืมา Kumari; et al. 2014: 349-356

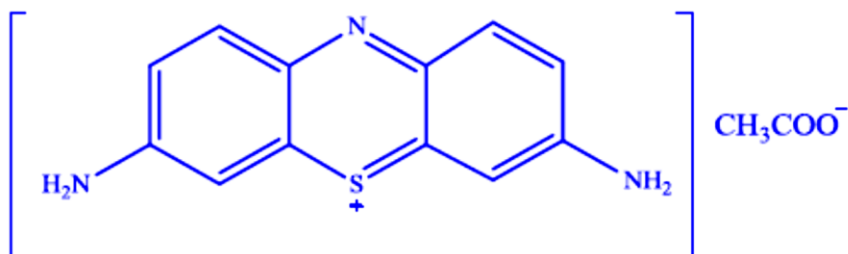
ในปี ค.ศ. 2015 โอวและคณะ (Ao; et al. 2015: 590-600) ได้ทำการศึกษากลไกการยับยั้งการคายแสงแบบ static quenching ของสารประกอบอินทรีย์ที่มีฤทธิ์ในการกรองแสง กับ โปรตีน BSA โดยทำการตรวจวัดด้วยวิธี spectroscopy และ molecular docking โดยสารอินทรีย์ที่มีฤทธิ์ในการกรองแสงในทีนี้มีทั้งหมด 5 ชนิดคือ คือ 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone, BP-3; 2-ethylhexyl 4-methoxycinnamate, EHMC; 4-methylbenzylidene camphor, 4-MBC; methoxydibenzoylmethane, BDM; homosalate, HMS) ซึ่งพบว่าเกิดการยับยั้งการคายแสงแบบ static quenching และมีค่าคงที่การจับอยู่ในช่วงระหว่าง $(0.78 \pm 0.02) \times 10^3$ ถึง $(1.29 \pm 0.01) \times 10^5$ ซึ่งพบว่าสารประกอบอินทรีย์ที่มีฤทธิ์ในการกรองแสงสามารถจะทำให้โครงสร้าง α -helical มีความเสถียรลดลงและจากผลการศึกษาทาง molecular docking พบว่ามีการ binding เกิดขึ้นในบริเวณ subdomain IIIA ของ BSA ซึ่งเป็นการยับยั้งผลของการทดลองโดยแรงที่เกิดขึ้นคือ แรง hydrophobic และพันธะไฮโดรเจน พบว่ามีการจับของ BP-3 เกิดขึ้นที่บริเวณ Leu453 และ Tyr434 ; EHMC เกิดขึ้นที่บริเวณ Arg433 และ Lys437; HMS เกิดขึ้นที่บริเวณ Ser512 และ Arg433 ; 4-MBC เกิดขึ้นที่บริเวณ Asn414; BDM เกิดขึ้นที่บริเวณ Lys437 โดยจะเป็นข้อมูลในการศึกษาผลของสารประกอบอินทรีย์ที่มีฤทธิ์ในการกรองแสงต่อร่างกายของมนุษย์ (ภาพประกอบ 25)



ภาพประกอบ 25 แผนผังการศึกษาอันตรกิริยาระหว่าง สารประกอบอินทรีย์ที่มีฤทธิ์ในการกรองแสง กับ BSA

ที่มา Ao; et al. 2015: 590-600

ในปี ค.ศ. 2015 ชานมูกาไรและคณะ (Shanmugaraj ; et al. 2015: 210-219) ได้ทำการศึกษาอันตรกิริยาของ สารประกอบสีย้อมของ thionine กับ โปรตีน Lysozyme โดยทำการตรวจวัดด้วยวิธี spectroscopy และ molecular docking ซึ่งพบว่าเกิดการยับยั้งการคายแสงแบบ static quenching และมีค่าคงที่การจับ อยู่ในช่วงระหว่าง $4.01 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$ มีจำนวน binding site 1 บริเวณ และจากผลการศึกษาทาง molecular docking พบว่ามีการ binding เกิดขึ้นในบริเวณ TRP63 ซึ่งเป็นการยืนยันผลของการทดลองโดยแรงที่เกิดขึ้นคือ แรง hydrophobic และพันธะไฮโดรเจน (ภาพประกอบ 26)



ภาพประกอบ 26 โครงสร้างของ thionine

ที่มา Krishnamoorthy ; et al. 2015: 210-219

บทที่ 3

ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

จากการศึกษาค้นคว้างานวิจัยที่ผ่านมาทำให้ผู้วิจัยสนใจทำการศึกษาการจับกันของโปรตีน Bovine Serum Albumin (BSA) และ Lysozyme กับอนุพันธ์ของไพรีน คือ *N*-(1-phenylalanine)-4(1-pyrene)butyramide (Py-L-Phe) โดยการปรับโครงสร้างของ Py-L-Phe ด้วยการเพิ่มกรดอะมิโน Glycine ในโครงสร้างอนุพันธ์ของไพรีน ซึ่งได้โครงสร้าง เป็นดังนี้ Py-L-Phe-Gly-Gly , Py-Gly-L-Phe และ Py-Gly-Gly-L-Phe แล้วทำการศึกษาความยาวของโมเลกุลของอนุพันธ์ Py-L-Phe มีผลต่อการเข้าจับกับโปรตีน BSA หรือ Lysozyme อย่างไร โดยอาศัยเทคนิคทางเคมีคอมพิวเตอร์ เพื่อศึกษาอันตรกิริยาที่สำคัญที่เกิดขึ้นระหว่างโปรตีน BSA และ Lysozyme ด้วยอนุพันธ์ของไพรีน

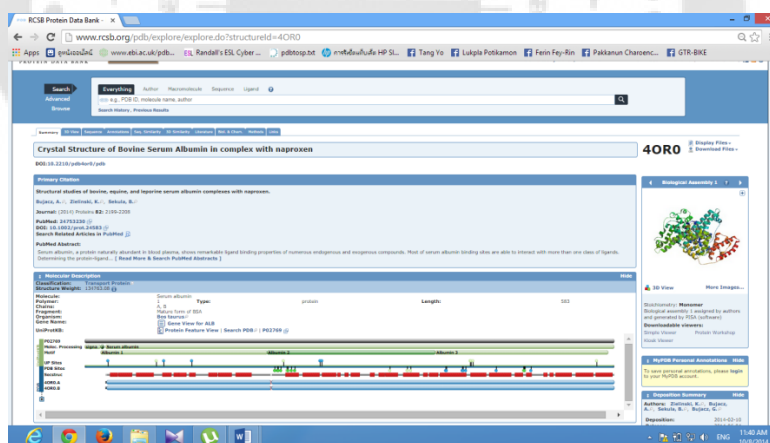
จากฐานข้อมูลโครงสร้างของโปรตีน พบว่ามีโครงสร้างของโปรตีน BSA 23 โครงสร้าง ส่วน Lysozyme มีโครงสร้างของโปรตีนทั้งสิ้น 84 โครงสร้าง จากฐานข้อมูลโครงสร้างของโปรตีนดังกล่าวผู้วิจัย ได้เลือกโปรตีน 1 โครงสร้างที่มีรหัสโครงสร้าง 4OR0 เป็นตัวแทนของโปรตีน BSA และ โปรตีนอีกหนึ่ง โครงสร้างที่มีรหัสโครงสร้าง 4C3W เป็นตัวแทนของโปรตีน Lysozyme เนื่องจากรหัสโครงสร้างดังกล่าวมี ค่า resolution ที่ต่ำทำให้ตัวโครงสร้างที่ได้มีความเสถียรสูงและเป็นรหัสโครงสร้างที่ใหม่ในฐานข้อมูล โครงสร้างของโปรตีน ในโครงสร้างของโปรตีนที่มีรหัส 4OR0 ซึ่งเป็นตัวแทนของโปรตีน BSA จะ ประกอบด้วยโปรตีน 2 สาย คือสาย A และสาย B โดยในแต่ละสายจะประกอบด้วย กรดอะมิโน 583 กรดอะมิโน นอกจากนี้พบว่าในบริเวณโพรงการจับของโปรตีน BSA ดังกล่าวยังพบ ลิแกนด์ที่มีชื่อรหัสว่า NPS: (2S)-2-(6-methoxynaphthalen-2-yl)propanoic acid ส่วนโปรตีนที่มีรหัส 3WVY ซึ่งเป็นตัวแทน โปรตีน Lysozyme พบว่าเป็นโปรตีนที่มีสายเดียวซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน 129 กรดอะมิโน และใน บริเวณโพรงการจับจะพบลิแกนด์ ที่มีชื่อรหัสว่า NAG: N-Acetyl-D-Glucosamine

การศึกษาด้วยเทคนิคทางเคมีคอมพิวเตอร์ ผู้วิจัยได้ดำเนินการตามลำดับขั้นตอนดังนี้

1. การเตรียมโครงสร้างโปรตีน
2. การเตรียมโครงสร้างของลิแกนด์
3. การเตรียมไฟล์ สำหรับการคำนวณ Molecular docking

1. การเตรียมโครงสร้างโปรตีน

การศึกษา molecular docking ของโครงสร้างโปรตีนเพื่อหาบริเวณที่เหมาะสมต่อการเข้าจับกับลิแกนด์ที่สนใจ โดยจะทำการ download โครงสร้างของโปรตีนที่เราสนใจจากฐานข้อมูลโครงสร้างโปรตีน (ภาพประกอบ 27) ที่เป็นไฟล์.pdb ภายในไฟล์.pdb จะประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนของโปรตีน กับ ส่วนของลิแกนด์ภายใน (ภาพประกอบ 27)

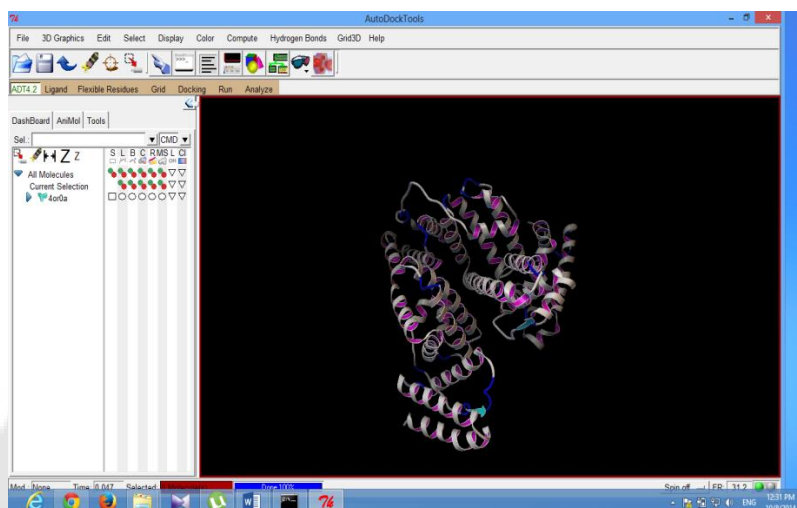


ภาพประกอบ 27 Protein Data Bank

ที่มา RCSB Protein Data Bank. (2014). (online)

นำไฟล์โปรตีน.pdb แยกเป็น 2 ส่วนคือส่วนของโปรตีน และส่วนของตัวลิแกนด์ แยกออกจากกัน จากนั้นทำการเปิดไฟล์โปรตีน.pdb ที่แยกแล้ว ด้วยโปรแกรม AutoDockTools -1.5.4 ซึ่งเป็นโปรแกรมที่ใช้เตรียมไฟล์ molecular docking และทำการลบโมเลกุลของน้ำภายในโครงสร้างโปรตีน.pdb ออกทั้งหมด

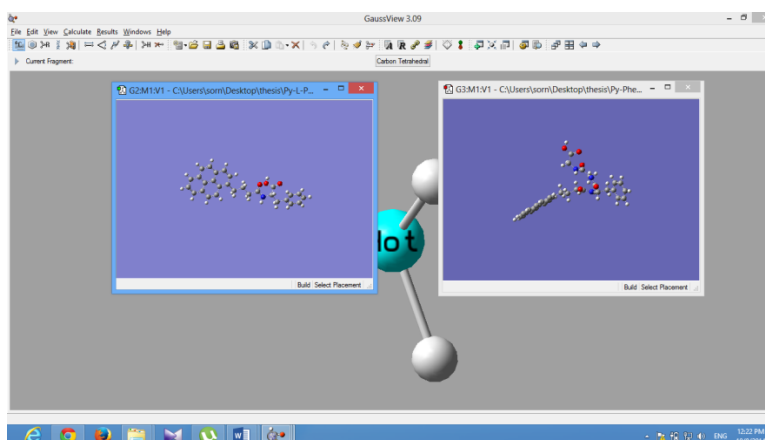
และเติมไฮโดรเจนอะตอมเข้าไป ส่วนของลิแกนด์ที่แยกออกมาจะนำไปทำ redock คือการนำลิแกนด์ของตัวโปรตีน.pdb มาทำการ docking ซ้ำเพื่อหาพารามิเตอร์ที่เหมาะสมต่อการทำ docking ของลิแกนด์ที่เราสนใจ (ภาพประกอบ 28)



ภาพประกอบ 28 การเปิดไฟล์โปรตีน.pdb ด้วยโปรแกรม AutoDockTools-1.5.4

2.การเตรียมลิแกนด์ (Ligand)

ทำการสร้างไฟล์ของลิแกนด์ขึ้นมาโดยใช้ โปรแกรม Gaussian ด้วยระเบียบวิธี b3lyp/6-31G เพื่อทำการ optimize ตัวโครงสร้างซึ่งยังไม่มีไฮโดรเจนอยู่ภายใน ผู้วิจัยจึงต้องทำการเติมไฮโดรเจน อะตอมเข้าไป จะได้โครงสร้างของลิแกนด์.log จากนั้นทำการแปลงไฟล์เป็นลิแกนด์.mol2 (ภาพประกอบ) และนำไฟล์ลิแกนด์.mol2 ที่ได้มาเปิดด้วยโปรแกรม AutoDockTools-1.5.4 ทำการบันทึกให้เป็นไฟล์ลิแกนด์ .pdbqt (ภาพประกอบ 29)



ภาพประกอบ 29 การสร้างโครงสร้างของลิแกนด์.mol2 โดยใช้ โปรแกรม Gaussian

3. การเตรียมไฟล์ สำหรับการคำนวณ Molecular docking

การศึกษา molecular docking เพื่อจะได้ทราบถึงบริเวณโครงสร้างการเข้าจับกันและพลังงานการเข้าจับกันของโปรตีนกับลิแกนด์ที่สนใจ ด้วยวิธีการเคมีคอมพิวเตอร์เพื่อคำนวณพลังงานการจับโดยระเบียบวิธีทางโมเลกุลลาร์ต็อกกิ้ง ด้วยโปรแกรม AutoDock 4.2 ที่ทำงานในระบบปฏิบัติการลินุกซ์ (Linux) โดยทำการเตรียมไฟล์ที่จำเป็นสำหรับโปรแกรม AutoDock 4.2 ด้วยโปรแกรม AutoDock Tool 1.5.6 ที่ทำงานบนระบบวินโดวส์ (Windows)

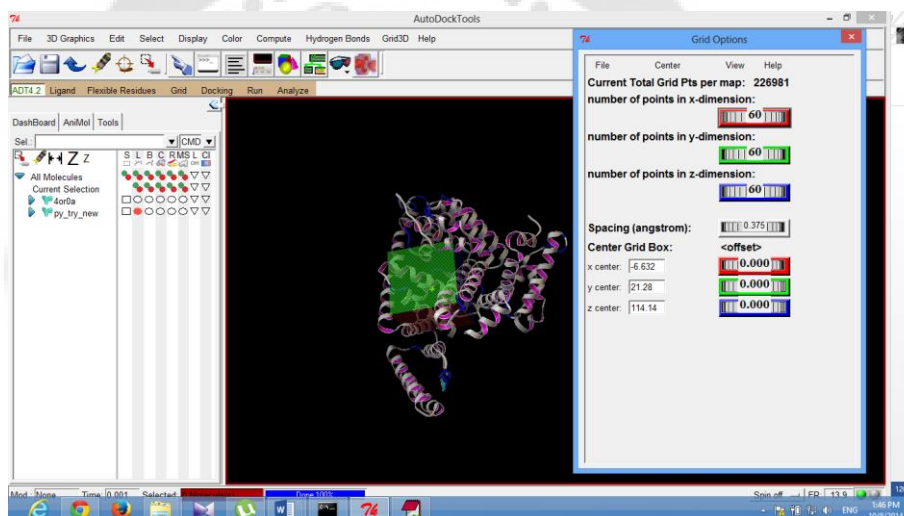
3.1 การเตรียมไฟล์ สำหรับการคำนวณ Molecular docking

การเตรียมไฟล์ run จะมีทั้งหมด 4 ไฟล์ คือ

1. โปรตีน.pdbqt
2. ลิแกนด์.pdbqt
3. ไฟล์โปรตีน.gpf
4. ไฟล์ลิแกนด์.dpf

3.2 การตั้งค่า Grid

เปิดไฟล์โปรตีน .pdb จากข้อที่ 1 และมาทำการบันทึกเป็นไฟล์โปรตีน .pdbqt และเปิดไฟล์ลิแกนด์.pdbqt ที่ได้จากข้อ 2 มาทำการตั้งค่าของ grid ซึ่งสามารถกำหนดขอบเขตของ grid ได้หลายแบบเช่น ให้จุดศูนย์กลางของ grid อยู่ที่บริเวณของโปรตีน บริเวณของลิแกนด์ และ อยู่ที่บริเวณของอะตอมที่เรากำหนด แล้วยังสามารถกำหนดขนาดของ Grid ได้ ตามที่ผู้วิจัยต้องการศึกษา จากนั้นจึงทำการบันทึกจะได้ไฟล์โปรตีน.gpf (ภาพประกอบ 30)



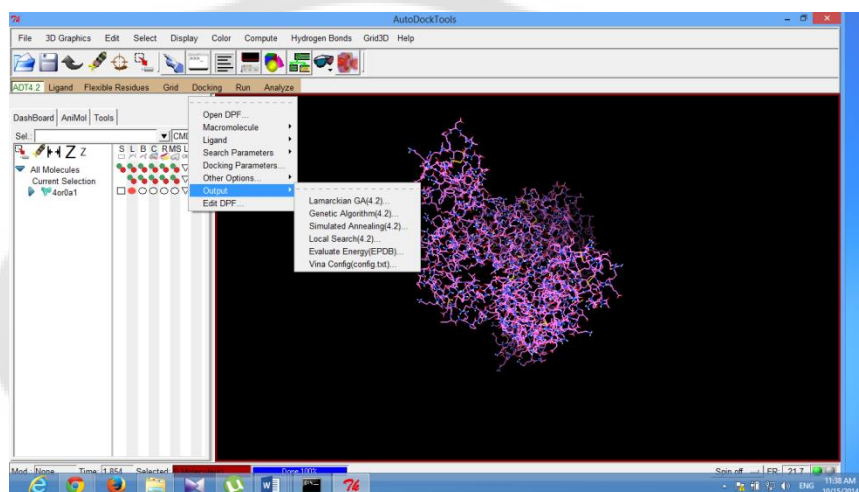
ภาพประกอบ 30 การกำหนดจุดศูนย์กลางและขนาด grid

เมื่อทำการเตรียมไฟล์ดังข้อ 3 เรียบร้อยแล้วจึงนำไฟล์ที่ได้เตรียมจากระบบปฏิบัติการ windows ย้ายไปที่ระบบปฏิบัติการ Linux เพื่อทำการรัน autogrid ของโปรตีน

คำสั่งการ run autogrid โดยใช้คำสั่ง autogrid4 -p ไฟล์ .gpf -l ไฟล์ .glg &

3.3 การ docking

เปิดไฟล์โปรตีน .pdbqt ที่ได้จากข้อ 3.2 และ เปิดไฟล์ลิแกนด์ .pdbqt ที่ได้จากข้อ 2 แล้วทำการเลือกรูปแบบการคำนวณ เช่น Genetic Algorithm, Simulated Annealing, Local search parameters และทำการเลือกจำนวนรอบในการเข้าจับ จากนั้นเลือกรูปแบบการบันทึกตามที่ต้องการ บันทึก คือ Lamarckian (GA), Genetic Algorithm, Simulated Annealing, Local Search แล้วจึงทำการบันทึกไฟล์ที่ตั้งค่าได้เป็นไฟล์ลิแกนด์.dpf (ภาพประกอบ 31)



ภาพประกอบ 31 การตั้งค่า docking

เมื่อทำการเตรียมไฟล์ดังข้อ 3.3 เสร็จเรียบร้อยแล้วจึงนำไฟล์ลิแกนด์ .dpf ที่ได้จากการเตรียมด้วย ระบบปฏิบัติการ windows ย้ายไปที่ระบบปฏิบัติการ Linux เพื่อทำการรัน autodock ของลิแกนด์ คำสั่งการ run autodock โดยใช้คำสั่ง autodock4 -p ไฟล์ .dpf -l ไฟล์ .dlg &

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผล

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาการเกิดอันตรกิริยาของโปรตีนกับอนุพันธ์ของไพรีนโดยการศึกษาโครงสร้างของอนุพันธ์ไพรีนด้วยวิธีทางกลศาสตร์ควอนตัมและ Molecular docking ที่เกิดขึ้นด้วยระเบียบวิธี B3LYP โดยใช้ 6-31G(d,p) basis set เพื่ออธิบายการกระจายพลังงานที่เกิดขึ้นในกระบวนการจับกันระหว่าง โปรตีนกับอนุพันธ์ของไพรีน และทำการศึกษด้วยวิธีทางกลศาสตร์ควอนตัมโดยมีผลการทดลองดังนี้

4.2.1 พารามิเตอร์สำหรับ Molecular Docking

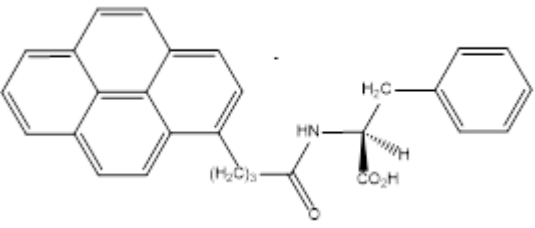
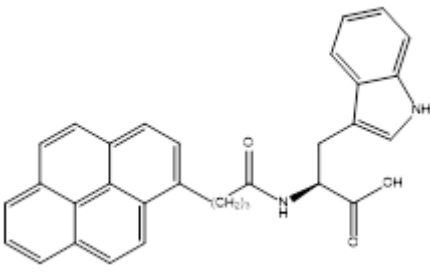
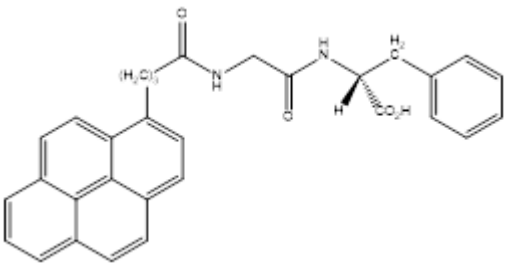
4.2.2 โปรตีน BSA

4.2.3 โปรตีน Lysozyme

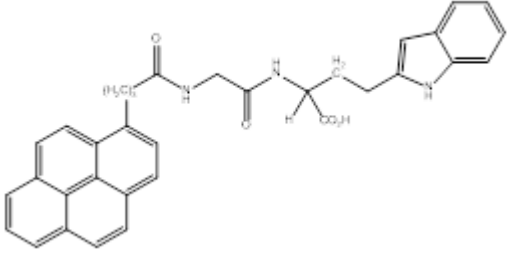
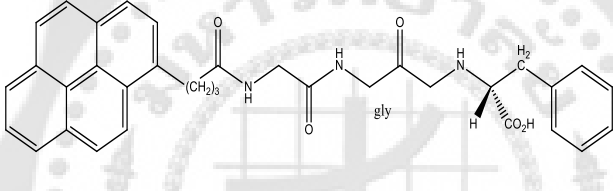
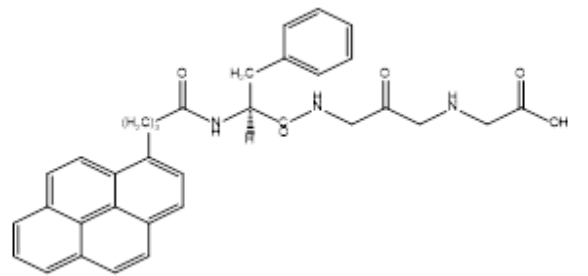
4.1 โครงสร้างและการดูดกลืนแสงของอนุพันธ์ไพรีน

การศึกษาโครงสร้างของอนุพันธ์ไพรีนด้วยวิธีทางกลศาสตร์ควอนตัมโดยทำการคำนวณเพื่อหาค่าการดูดกลืนแสงของอนุพันธ์ไพรีนทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษานี้ ได้แก่ Py-L-Phe, Py-L-Trp, Py-Gly-Phe, Py-Gly-Trp, Py-Gly-Gly-Phe และ Py-Phe-Gly-Gly ที่ระเบียบวิธี TD-B3LYP/6-31G(d,p) โดยกำหนดค่า nstates เป็น 50 เปรียบเทียบกับผลการทดลองที่ผ่านมาของอนุพันธ์ไพรีนได้ผลการศึกษาดังแสดงในตาราง 1

ตาราง 1 ผลของการศึกษาการดูดกลืนแสงของอนุพันธ์ไพรีน

อนุพันธ์ของไพรีน	โครงสร้าง	ค่าจากการ คำนวณ (nm)	ค่าจากการ ทดลอง (nm)
Py-L-Phe		342.77	343
Py-L-Trp		344.65	345
Py-Gly-Phe		342.73	345

ตาราง 1 (ต่อ)

อนุพันธ์ของไพรีน	โครงสร้าง	ค่าจากการ คำนวณ (nm)	ค่าจากการ ทดลอง (nm)
Py-Gly-Trp		345.35	345
Py-Gly-Gly-Phe		342.74	345
Py-Phe-Gly-Gly		342.67	343

จากตาราง 1 พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของอนุพันธ์ของไพรีนมีการดูดกลืนแสงมากที่สุดอยู่ในช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 342 ถึง 345 nm จากรายงานของ कुमारและคณะ (Kumar; et al. 1997: 2085-2087) พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของวงไพรีนจะอยู่ที่ 300 ถึง 400 nm โดยทำการทดลองวัดค่าการดูดกลืนแสงของอนุพันธ์ของไพรีน (Py-L- Phe, Py-L-Trp, Py-Gly-Phe, Py-Gly-Trp, Py-Gly-Gly-Phe, Py-Phe-Gly-Gly) ในช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 200 ถึง 800 พบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงที่มากที่สุดเท่ากับ 343, 345, 345, 345, 345 และ 343 nm ตามลำดับ และค่าที่ได้จากการคำนวณพบว่าให้ค่าการดูดกลืน

แสงที่มากที่สุดเท่ากับ 342.77, 344.65, 342.73, 345.35, 342.74 และ 342.67 nm ตามลำดับ ซึ่งค่าที่คำนวณได้ให้ค่าที่สอดคล้องกับการทดลองโดยมีเปอร์เซ็นต์ความคลาดเคลื่อนเพียง 0.55 ดังนั้น การคำนวณค่าการดูดกลืนแสงด้วยระเบียบวิธี TD-B3LYP ที่ basis set 6-31G(d,p) สามารถใช้ทำนายค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ไพรีนได้ ซึ่งเมื่อทำการเพิ่มความยาวของโมเลกุลโดยแทรกหมู่ glycine เข้าไปในโครงสร้างของ Py-L-Phe แล้วได้โครงสร้างดังต่อไปนี้ คือ Py-Gly-Phe, Py-Gly-Trp, Py-Gly-Gly-Phe และ Py-Phe-Gly-Gly พบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มีค่าการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าการแทรกหมู่ glycine ลงไปภายในโมเลกุลไม่มีผลต่อการดูดกลืนแสงของอนุพันธ์ไพรีนอย่างมีนัยสำคัญ

4.2 Molecular Docking

การศึกษา Molecular docking ในครั้งนี้ ได้ download โครงสร้างของโปรตีนจากธนาคารฐานข้อมูลโครงสร้างของโปรตีน (Protein data bank, www.rcsb.org) ที่มีรหัส 4OR0.pdb สำหรับโปรตีน BSA และรหัส 3WVY.pdb สำหรับโปรตีน lysozyme ส่วนโครงสร้างอนุพันธ์ไพรีนซึ่งเป็น ligand ได้ทำการ optimize ด้วยระเบียบวิธี HF/3-21G โดยใช้โปรแกรม Gaussian ส่วนการหาค่าพารามิเตอร์ที่เหมาะสมของการ Molecular docking เช่น ขนาดของ Grid ต้องมีขนาดที่ต้องครอบคลุมบริเวณที่ต้องการศึกษา และมีความเหมาะสม เนื่องจากถ้าขนาดของ Grid เล็กเกินไปจะทำให้พลังงานยึดเหนี่ยวระหว่างตัวลิแกนด์กับโปรตีนที่ได้ผิดพลาด ถ้าขนาดของ Grid ใหญ่เกินไปจะทำให้การทำ Molecular docking ต้องใช้เวลามากเกินไปดังนั้นจึงต้องทำการเลือกพารามิเตอร์ที่เหมาะสมสำหรับ Molecular Docking

4.2.1 พารามิเตอร์สำหรับ Molecular Docking

โดยการเลือกขนาดของ grid ที่เหมาะสมต่อการทำนั้นจะต้องทำการ redox เข้าไปภายในโมเลกุลของโปรตีนซึ่ง BSA รหัส 4OR0 จะมีลิแกนด์ NPS : 2S)-2-(6-methoxynaphthalen-2-yl)propanoic acid อยู่ภายใน และ lysozyme จะมีลิแกนด์ NAG : N-Acetyl-D-Glucosamine โดยจะทำการทดลองโดยเลือก Grid มีขนาด $x = y = z$ โดยมีขนาดเท่ากับ 60, 90, 120 Å ผลการทดลองดังแสดงในตาราง 2

ตาราง 2 ขนาดของ Grid กับค่า binding energy ระหว่างลิแกนด์ NPS กับ BSA

ขนาดของ Grid(Å)	binding energy (kcal/mol)
60	-8.96
90	-9.02
120	-9.06

จากผลแสดงขนาดของ Grid กับ ค่าพลังงานการจับ(binding energy) ระหว่างลิแกนด์ NPS กับ BSA พบว่าค่า พลังงานการจับเป็นพลังงานยึดเหนี่ยวที่เกิดขึ้นระหว่างลิแกนด์ NPS กับ BSA ที่ได้จากการคำนวณด้วยระเบียบวิธีโมเลกุลการดีอกกิ่ง ซึ่งถ้าค่า พลังงานการจับติดลบมากแสดงว่า ลิแกนด์สามารถเข้าจับกับ BSA ได้ดี แต่เมื่อพิจารณาค่าพลังงานที่ได้พบว่า มีค่าพลังงานไม่แตกต่างกันมากนัก ดังนั้นสามารถใช้ขนาดของ Grid ขนาดใดก็ได้

เมื่อได้พารามิเตอร์ที่เหมาะสม ต่อมาจะทำ redock โดยนำลิแกนด์ NPS จาก BSA มาเติมไฮโดรเจนอะตอม แล้ว dock ลงใน 4OR0.pdb พบว่า ได้ค่า RMSD เท่ากับ 2.341 ส่วนของ lysozyme โดยนำลิแกนด์ NAG มาทำการ dock ลงใน 3WVY.pdb ได้ค่า RMSD เท่ากับ 1.935 จึงสรุปว่าโครงสร้างดังกล่าวมีความเหมาะสมสามารถนำมาใช้ในการศึกษาได้

BSA เป็นโปรตีนที่มีขนาดใหญ่และทางผู้วิจัยได้ทราบบริเวณการจับโปรตีน BSA กับ อนุพันธ์ของไพริน ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวอ้างอิงมาจากการวิจัยก่อนหน้านี้ (Kumar; et al. 1997: 2085-2087) ซึ่งตำแหน่งที่กำหนดของ BSA เป็นตำแหน่งของกรดอะมิโน LEU346 เป็นบริเวณที่เกิดการตัดโปรตีนโดยอนุพันธ์ของไพริน จึงได้ทำการกำหนดค่าขนาดของ grid เท่ากับ 60 ตำแหน่ง $x = -6.632$, $y = 21.28$, $z = 114.14$ โดยกำหนด grid point spacing เท่ากับ 0.375 Å

Lysozyme เป็นโปรตีนที่มีขนาดเล็กจึงเลือกใช้ขนาดของ grid เท่ากับ 60 ก็สามารถครอบคลุมตัวโปรตีนได้ กำหนดตำแหน่งของ lysozyme ที่ $x = 0.014$, $y = 0.346$, $z = 0.105$ ซึ่งตำแหน่งที่กำหนดของ lysozyme เป็นตำแหน่งของกรดอะมิโน TRP108 เป็นบริเวณที่เกิดการตัดโปรตีนโดยอนุพันธ์ของไฟรีน ตำแหน่งดังกล่าวอ้างอิงมาจากการงานวิจัยก่อนหน้านี้ (Kumar; et al. 1997: 2085-2087) โดยกำหนด grid point spacing เท่ากับ $0.375 \text{ \AA}$ ทางผู้วิจัยพบว่าสามารถใช้ grid ขนาด $60 \text{ \AA}$ ก็จะสามารถครอบคลุมทั้งโครงสร้างสร้างของ Lysozyme

รูปแบบการ Docking ผู้วิจัยจะเลือกแบบ Random เพื่อหาตำแหน่งในการเข้าจับของอนุพันธ์ไฟรีนกับโปรตีนได้ดีที่สุดและเลือกการคำนวณแบบ Lamarckian GA เพราะเป็นวิธีที่เกิดจากการนำข้อดีของ Local search parameters กับ Genetic algorithm มาผสมกัน ทำให้วิธีนี้ให้ค่าพลังงานการจับกันที่ดีที่สุดโดยจำนวนรอบในการศึกษา Molecular docking เพื่อหาโครงสร้างที่เป็นไปได้มากที่สุดในการเกิดอันตรกิริยาจะบ่งบอกถึงตำแหน่งการเข้าจับของลิแกนด์ได้ดี ดังนั้นถ้าใช้จำนวนรอบในการศึกษา Molecular docking มากโอกาสที่จะหาตำแหน่งในการเข้าจับได้ดีที่สุดจะเพิ่มมากด้วยแต่จะใช้เวลาในการศึกษามากขึ้นแต่ถ้าใช้จำนวนรอบในการศึกษา Molecular docking น้อยโอกาสที่จะหาตำแหน่งในการเข้าจับก็อาจจะไม่ครอบคลุมตำแหน่งการจับภายในโปรตีนโดยในงานวิจัยนี้จะเลือกจำนวนรอบในการเข้าจับที่ 150 เพราะเป็นจำนวนรอบที่เหมาะสมและครอบคลุมตำแหน่งการเข้าจับของโปรตีนกับอนุพันธ์ของไฟรีนที่ใช้ในการทดลองมี 6 โมเลกุล ดังนี้ Py-L-Phe, Py-L-Trp, Py-Gly-Phe, Py-Gly-Trp, Py-Gly-Gly-Phe และ Py-Phe-Gly-Gly

4.2.2 โปรตีน BSA

BSA เป็นโปรตีนที่อยู่ในระบบเลือดทำหน้าที่เป็นโปรตีนขนส่งจะประกอบไปด้วย กรดอะมิโน 583 กรดอะมิโน เป็นโปรตีนแบบก้อนกลม มี 3 domain ในแต่ละ domain จะมี subdomain คือ A และ B มีมวลโมเลกุล 67000 กิโลดาลตัน

การศึกษา Molecular docking ระหว่างอนุพันธ์ของไพรีนกับ BSA

จากการศึกษาปฏิกิริยาระหว่างอนุพันธ์ไพรีน กับ BSA โดยวิธี Molecular docking เป็นวิธีที่ใช้ในการทำนายทิศทางของโมเลกุลหนึ่งต่อการเข้าจับอีกโมเลกุลหนึ่ง เพื่อสร้างเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่เสถียรและให้ผลของบริเวณการจับของโมเลกุล (binding site) พลังงานการจับกัน (binding energy:BE) โดยส่วนใหญ่จะใช้กับโมเลกุลของสารชีวภาพ เช่น โปรตีน เอนไซม์ กรดนิวคลีอิก คาร์โบไฮเดรตและไขมัน โดยการศึกษาจะให้ค่าของพลังงานการจับ (binding energy) ที่เกิดขึ้นระหว่างอนุพันธ์ไพรีนกับ BSA เมื่อเกิดปฏิกิริยาและศึกษาถึงโครงสร้างที่เหมาะสมต่อการจับโปรตีนโดยดูจากค่าจำนวนโครงสร้างที่เข้าจับ (number of conformation:NOC) ซึ่งจะอธิบายถึงจำนวนโครงที่เข้าจับกับตัวโปรตีนถ้ามีจำนวนโครงสร้างมากแปลว่าโครงสร้างนั้นสามารถจับกับตัวโปรตีนได้ดี แต่ถ้ามีจำนวนโครงสร้างน้อยแปลว่าโครงสร้างดังกล่าวยังไม่เหมาะสมต่อการจับโปรตีน โดยอนุพันธ์ไพรีนจะอยู่ใน 2 สถานะคือสถานะที่เป็นกลางหรือไม่มีประจุจะอยู่ใน RCOOH และสถานะที่มีประจุจะอยู่ในรูป RCOO^- ซึ่งผลของการศึกษา Molecular docking ระหว่างอนุพันธ์ของไพรีนที่มีประจุและไม่มีประจุ กับ BSA แสดงในตาราง 3

ตาราง 3 ผลของการศึกษา Molecular docking ระหว่างอนุพันธ์ของไพรีนกับ BSA

อนุพันธ์ของไพรีน	NOC	BE (kcal/mol)	NOC	BE (kcal/mol)
	ที่ไม่มีประจุ	ที่ไม่มีประจุ	ที่มีประจุ	ที่มีประจุ
Py-L-Phe	123	-13.17	128	-13.53
Py-L-Trp	108	-13.69	109	-14.36
Py-Gly-Phe	50	-10.23	93	-10.39
Py-Gly-Trp	49	-11.03	61	-11.21
Py-Gly-Gly-Phe	16	-12.32	26	-12.35
Py-Phe-Gly-Gly	21	-12.17	35	-12.44

ผลการทดลองตาราง 3 จากการศึกษาผลของ Molecular docking ระหว่างอนุพันธ์ไพรีน มีประจุและไม่มีประจุ กับ BSA พบว่า ค่าพลังงานการจับระหว่างอนุพันธ์ไพรีนที่ไม่มีประจุมีค่าอยู่ในช่วง -13.69 ถึง -11.03 kcal/mol โดยมีจำนวนโครงสร้างที่เข้าจับ มีค่าระหว่าง 16 ถึง 123 และพบว่าลิแกนด์ Py-L-Trp ให้ค่าพลังงานการจับมากที่สุดคือเท่ากับ -13.69 kcal/mol ส่วนลิแกนด์ Py-L-Phe ให้ค่า number of conformation มากที่สุดคือเท่ากับ 123 ส่วนค่าพลังงานการจับระหว่างอนุพันธ์ไพรีนที่มีประจุ มีค่าอยู่ในช่วง -14.36 ถึง -10.39 kcal/mol โดยมีจำนวนโครงสร้างที่เข้าจับ มีค่าระหว่าง 25 ถึง 128 และพบว่าลิแกนด์ Py-L-Trp ให้ค่าพลังงานการจับมากที่สุดคือเท่ากับ -14.36 kcal/mol ส่วนลิแกนด์ Py-L-Phe ให้ค่า number of conformation มากที่สุดคือเท่ากับ 128 จึงสรุปได้ว่าเมื่อทำการเพิ่มความยาวของโมเลกุลโดยเติมตัว glycine ลงไปพบว่ามีผลต่อค่าพลังงานการจับระหว่างอนุพันธ์ไพรีนกับ BSA แต่มีผลทำให้ให้ค่า number of conformation ลดลงเนื่องจากการเพิ่มความยาวของโมเลกุลมีผลต่อบริเวณการจับ (Binding site) โดยจะทำให้เกิดแรงกีดขวางเนื่องจากขนาด (steric hindrance interaction) ทำให้โครงสร้างเกิดความไม่เสถียรเกิดขึ้น และเมื่อพิจารณาอนุพันธ์ไพรีนที่มีประจุและไม่มีประจุพบว่าอนุพันธ์ไพรีนที่มีประจุทำให้พลังงานการจับเพิ่มขึ้นและจำนวนโครงสร้างที่เข้าจับเพิ่มขึ้นมากกว่าอนุพันธ์ไพรีนที่มีประจุซึ่งอนุพันธ์ไพรีนมีความสามารถในการจับกับ BSA ได้ ส่วนลิแกนด์ Py-L-Phe และ Py-L-Trp มีความสามารถในการจับกับ BSA ได้ดีและมีความเสถียรสูง ส่วน ลิแกนด์ Py-Gly-Phe และ Py-Gly-Trp สามารถจับโปรตีนได้ดีเพราะมีค่าพลังงานการจับที่สูงแต่มีความเสถียรน้อยกว่าของ Py-L-Phe และ Py-L-Trp เมื่อพิจารณาจากค่า Number of conformation และ Py-Gly-Gly-Phe กับ Py-Phe-Gly-Gly มีความสามารถในการจับกับ BSA ได้ดีและมีความเสถียรน้อย

การศึกษากรดอะมิโนโดยรอบในระยะ 4 Å ของ BSA เมื่อเกิดการจับกับอนุพันธ์ของไพรีน

ผลของการศึกษากรดอะมิโนโดยรอบในระยะ 4 Å ของ BSA เมื่อเกิดการจับกับอนุพันธ์ของไพรีนเพื่อหาบริเวณการจับจำเพาะ(binding site) และ ศึกษาถึงอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างอนุพันธ์ของไพรีน กับ BSA โดยการวัดระยะโดยรอบของอนุพันธ์ไพรีนเมื่อเกิดการจับภายในโมเลกุลของ BSA ซึ่งผลการทดลองดังแสดงในตาราง 4

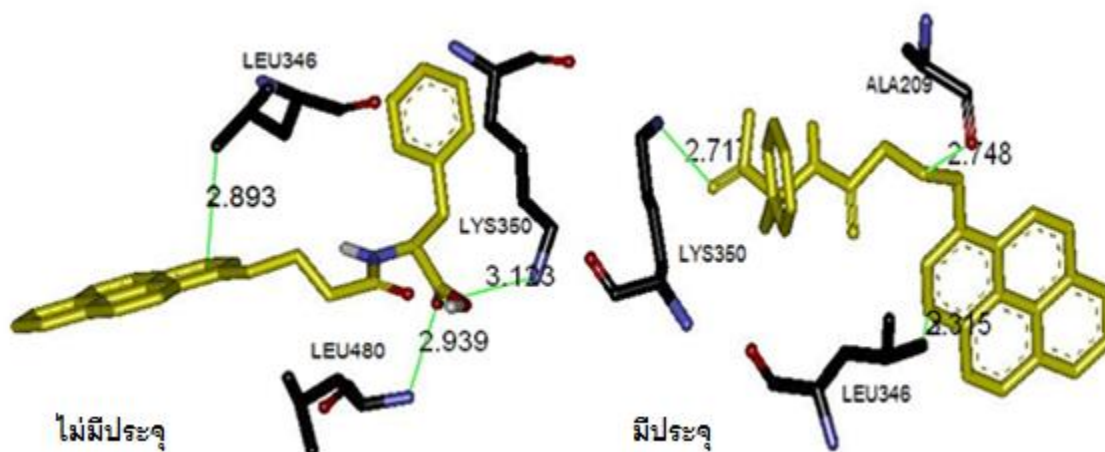
ตาราง 4 กรดอะมิโนโดยรอบในระยะ 4 Å ของ BSA

อนุพันธ์ของไพรีน	กรดอะมิโนโดยรอบในระยะ 4 Å	กรดอะมิโนโดยรอบในระยะ 4 Å
	ไม่มีประจุ	มีประจุ
Py-L-Phe	LEU346, LYS350, LEU480	ALA209, LEU346, LYS350
Py-L-Trp	ARG208, LEU346, LYS350	LEU346, LYS350, VAL481
Py-Gly-Phe	ALA209, LEU346, VAL481	ALA209, LEU346, LYS350
Py-Gly-Trp	TRP213, LEU346, LEU480	SER201, LEU346, LYS350
Py-Gly-Gly-Phe	VAL342, LEU346, LEU480	ARG208, LEU346, LEU480
Py-Phe-Gly-Gly	LEU346, LYS350, LEU480	ARG208, LEU346, LYS350

จากการศึกษาบริเวณการจับกันระหว่าง อนุพันธ์ของไพรีนที่มีประจุและไม่มีประจุกับ BSA พบว่า บริเวณที่เกิดการจับกันของอนุพันธ์ไพรีนกับ BSA โดยมีกรดอะมิโนในระยะ 4 Å คือ SER201, ARG208, ALA209, TRP213, VAL342, LEU346, LYS350, ASP450, SER479, LEU480 และ VAL481 ล้อมรอบอยู่ ซึ่งในงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าอนุพันธ์ไพรีนสามารถเข้าไปจับกับ BSA ได้ที่ตำแหน่ง LEU346 และ ARG347 (Kumar; et al. 1997: 2085-2087) จากผลการการศึกษาบริเวณการจับกันระหว่าง อนุพันธ์ของไพรีนที่มีประจุและไม่มีประจุกับ BSA พบว่ามีผลที่สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมา

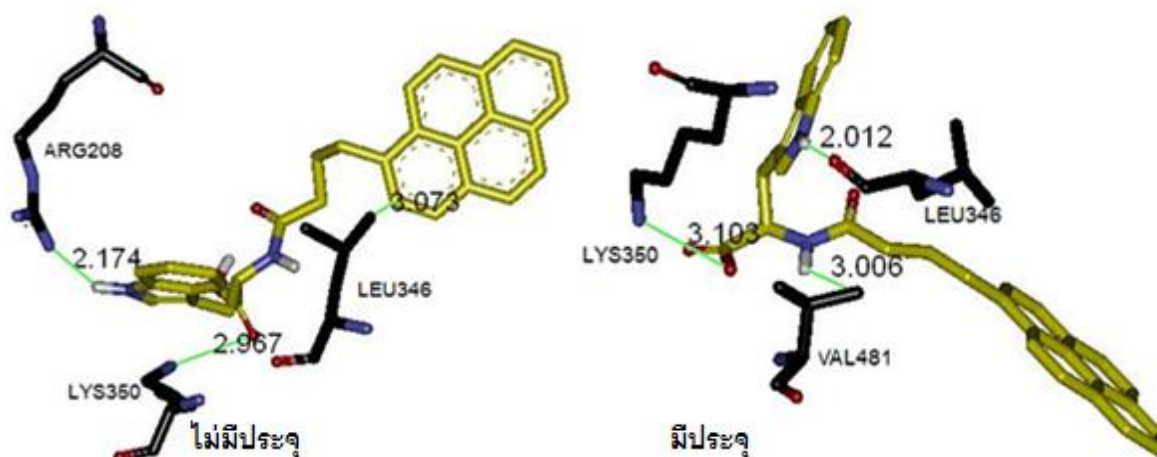
จากภาพประกอบ 32 แสดงให้เห็นถึง บริเวณการจับกันระหว่าง Py-L-Phe ที่มีประจุและไม่มีประจุ กับ BSA พบว่ามีกรดอะมิโนที่ล้อมรอบอนุพันธ์ไพรีนอยู่ 3 กรดอะมิโนคือ LEU346, LYS350 และ SER479 ของ Py-L-Phe ที่ไม่มีประจุ โดย Py-L-Phe จะหันบริเวณส่วนของวงไพรีนไปทางหมู่ methyl ของกรดอะมิโน LEU346 เกิดแรง hydrophobic interaction และจะหันบริเวณส่วนที่มีขั้วของหมู่คาร์บนิล ไปจับกับหมู่อะมิโนของกรดอะมิโน LYS350 เกิดพันธะไฮโดรเจน ส่วน Py-L-Phe ที่มีประจุ พบว่ามีกรด

อะมิโนที่ล้อมรอบอยู่ 3 กรดอะมิโนคือ ALA209, LEU346 และ LYS350 โดย Py-L-Phe จะหันบริเวณส่วนของวงไพรีนไปทางหมู่ methyl ของกรดอะมิโน LEU346 เกิดแรง hydrophobic interaction และจะหันบริเวณส่วนที่มีขั้วของหมู่คาร์บนิลไปจับกับหมู่อะมิโนของกรดอะมิโน LYS350 เกิดพันธะไฮโดรเจน และพบว่า Py-L-Phe ที่มีประจุ จะทำให้ระยะของกรดอะมิโนโดยรวมลดลงเมื่อเทียบกับ Py-L-Trp ที่ไม่มีประจุ



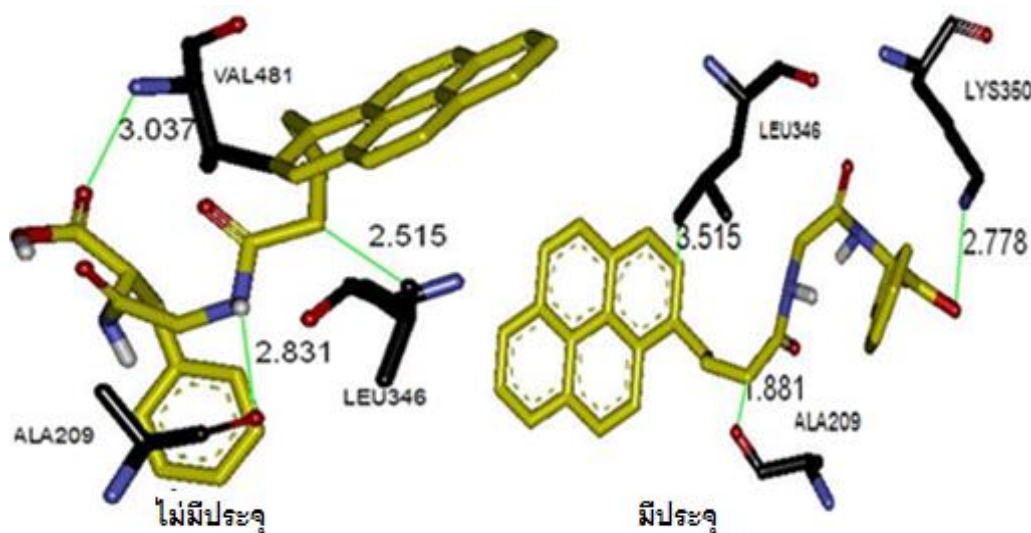
ภาพประกอบ 32 แสดงการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง Py-L-Phe ที่ไม่มีประจุและมีประจุ กับ BSA

จากภาพประกอบ 33 แสดงให้เห็นว่า มีกรดอะมิโนที่ล้อมรอบอนุพันธ์ไพรีนอยู่ 3 กรดอะมิโนคือ ARG208, LEU346 และ LYS350 ของ Py-L-Phe ที่ไม่มีประจุ ซึ่งพบว่า Py-L-Trp จะหันบริเวณส่วนของวงไพรีนไปทางหมู่ methyl ของกรดอะมิโน LEU346 เกิดแรง hydrophobic interaction และจะหันบริเวณส่วนที่มีขั้วของหมู่คาร์บนิล ไปจับกับ หมู่อะมิโนของกรดอะมิโน LYS350 เกิดพันธะไฮโดรเจน ส่วนของ Py-L-Trp ที่มีประจุ มีกรดอะมิโนที่ล้อมรอบอยู่ 3 กรดอะมิโนคือ LEU346, LYS350, VAL481 โดย Py-L-Trp จะหันบริเวณส่วนที่มีขั้วของหมู่คาร์บนิล ไปจับกับ หมู่อะมิโนของกรดอะมิโน LEU346 เกิดพันธะไฮโดรเจน และจะหันบริเวณส่วนที่มีขั้วของหมู่คาร์บนิล ไปจับกับ หมู่อะมิโนของกรดอะมิโน LYS350 เกิดพันธะไฮโดรเจน และพบว่า Py-L-Trp ที่มีประจุ จะทำให้ระยะของกรดอะมิโนโดยรวมลดลงเมื่อเทียบกับ Py-L-Trp ที่ไม่มีประจุ



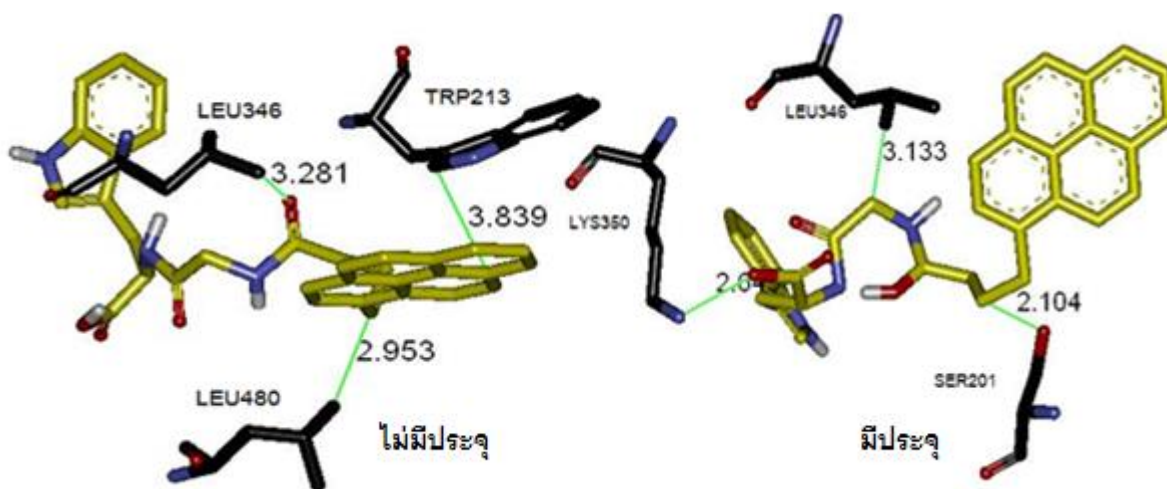
ภาพประกอบ 33 แสดงการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง Py-L-Trp ที่ไม่มีประจุและมีประจุ กับ BSA

ภาพประกอบ 34 แสดงให้เห็นว่า มีกรดอะมิโนที่ล้อมรอบอนุพันธ์ไพรีนอยู่ 3 กรดอะมิโน คือ ALA209, LEU346 และ VAL481 ของ Py-Gly-Phe ที่ไม่มีประจุ จะเห็นว่า Py-Gly-Phe เป็นอนุพันธ์ที่เกิดจาก Py-L-Phe โดยเพิ่ม glycine เข้าไปภายในโมเลกุลซึ่ง Py-Gly-Phe จะหันบริเวณส่วนของวงไพรีนไปทางหมู่ methyl ของกรดอะมิโน LEU346 เกิดแรง hydrophobic interaction และจะหันบริเวณส่วนที่มีขั้วของ หมู่คาบิณิด ไปจับกับ หมู่อะมิโนของกรดอะมิโน LYS350 เกิดพันธะไฮโดรเจน ส่วน Py-Gly-Phe ที่มีประจุ จะมีกรดอะมิโนที่ล้อมรอบอยู่ 3 กรดอะมิโน คือ ALA209, LEU346, LYS350 โดยพบว่า Py-Gly-Phe จะหันบริเวณส่วนของวงไพรีนไปทางหมู่ methyl ของกรดอะมิโน LEU346 เกิดแรง hydrophobic interaction และจะหันบริเวณส่วนที่มีขั้วของ หมู่คาบิณิด ไปจับกับ หมู่อะมิโนของกรดอะมิโน LYS350 เกิดพันธะไฮโดรเจน และพบว่า Py-Gly-Phe ที่มีประจุ จะทำให้ระยะของกรดอะมิโนโดยรอบลดลงเมื่อเทียบกับ Py-Gly-Phe ที่ไม่มีประจุ



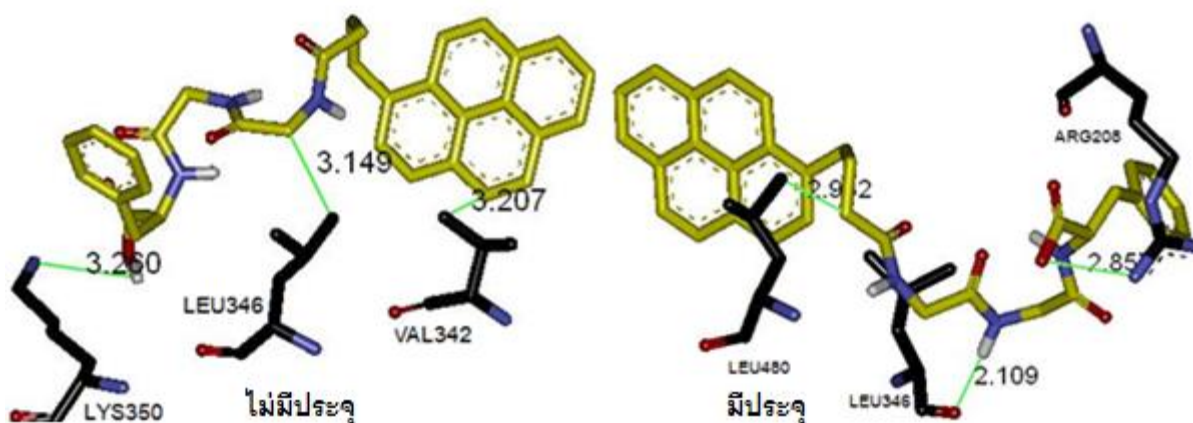
ภาพประกอบ 34 แสดงการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง Py-Gly-Phe ที่ไม่มีประจุและมีประจุ กับ BSA

ภาพประกอบ 35 แสดงให้เห็นว่า มีกรดอะมิโนที่ล้อมรอบอนุพันธ์ไพรีนอยู่ 3 กรดอะมิโน คือ TRP213, LEU346 และ LEU480 ของ Py-Gly-Trp ที่ไม่มีประจุ จะเห็นว่า Py-Gly-Trp เป็นอนุพันธ์ที่เกิดจาก Py-L-Trp โดยเพิ่ม glycine เข้าไปภายในโมเลกุลซึ่ง Py-Gly-Trp จะหันบริเวณส่วนของหมู่คาร์บอนิลไปทางหมู่ methyl ของกรดอะมิโน LEU346 เกิดแรง van der Waals และจะหันบริเวณส่วนของวงไพรีนไปจับกับ วงห้าเหลี่ยมของกรดอะมิโน TRP213 เกิดแรง hydrophobic interaction ส่วน Py-Gly-Trp ที่มีประจุ จะมีกรดอะมิโนที่ล้อมรอบอยู่ 3 กรดอะมิโน คือ SER201, LEU346 และ LYS350 โดยพบว่า Py-Gly-Trp จะหันบริเวณส่วนของสายโซ่ไปจับกับหมู่ methyl ของกรดอะมิโน LEU346 เกิดแรง van der Waals และจะหันบริเวณส่วนที่มีขั้วของ หมู่คาร์บอนิล ไปจับกับ หมู่อะมิโนของกรดอะมิโน LYS350 เกิดพันธะไฮโดรเจน และพบว่า Py-Gly-Trp ที่มีประจุ จะทำให้ระยะของกรดอะมิโนโดยรอบลดลงเมื่อเทียบกับ Py-Gly-Trp ที่ไม่มีประจุ



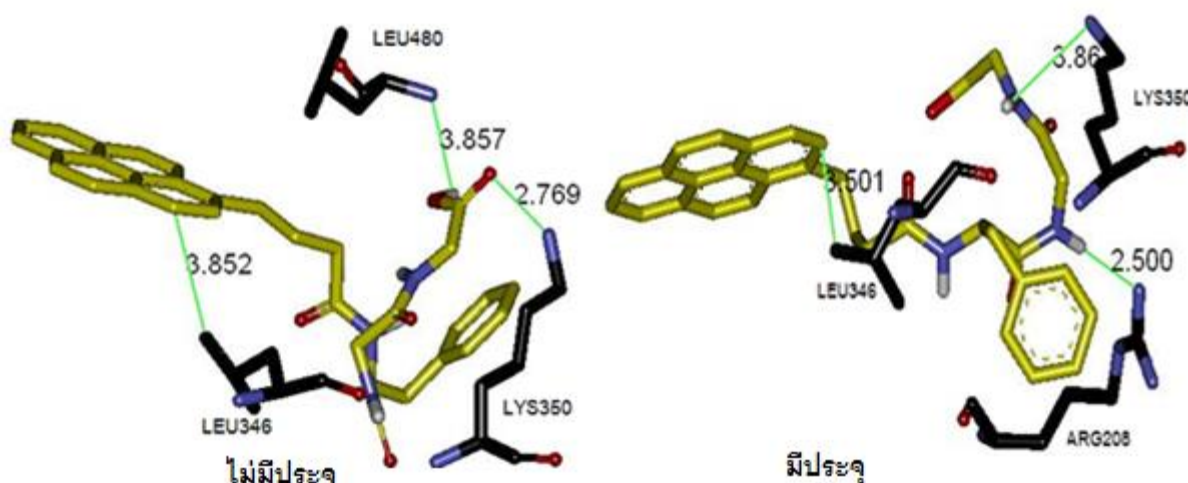
ภาพประกอบ 35 แสดงการเกิดปฏิกริยาระหว่าง Py-Gly-Trp ที่ไม่มีประจุและมีประจุ กับ BSA

ภาพประกอบ 36 แสดงให้เห็นว่า มีกรดอะมิโนที่ล้อมรอบอนุพันธ์ไพรีนอยู่ 3 กรดอะมิโน คือ VAL342, LEU346 และ LEU480 ของ Py-Gly-Gly-Phe ที่ไม่มีประจุ จะเห็นว่า Py-Gly-Gly-Phe เป็นอนุพันธ์ที่เกิดจาก Py-L-Phe โดยเพิ่ม glycine เข้าไปภายในโมเลกุลซึ่ง Py-Gly-Gly-Phe จะหันบริเวณส่วนของวงไพรีนไปทาง หมู่ methyl ของกรดอะมิโน VAL342 เกิดแรง hydrophobic interaction และจะหันบริเวณส่วนของสายโซ่ไปทางหมู่ methyl ของกรดอะมิโน LEU346 เกิดแรง van der waals โดยส่วน Py-Gly-Gly-Phe ที่มีประจุ จะมีกรดอะมิโนที่ล้อมรอบอยู่ 3 กรดอะมิโน คือ ARG208, LEU346 และ LEU480 โดยพบว่า Py-Gly-Gly-Phe จะหันบริเวณส่วนของหมู่คาบิโนล ไปจับกับ หมู่อะมิโนของกรดอะมิโน ARG208 เกิด พันธะไฮโดรเจน และจะหันบริเวณส่วนที่มีขั้วของ หมู่คาบิโนล ไปจับกับ หมู่อะมิโนของกรดอะมิโน LEU346 เกิดพันธะไฮโดรเจน และพบว่า Py-Gly-Gly-Phe ที่มีประจุ จะทำให้ระยะของกรดอะมิโนโดยรอบลดลงเมื่อเทียบกับ Py-Gly-Gly-Phe ที่ไม่มีประจุ



ภาพประกอบ 36 แสดงการเกิดปฏิกริยาระหว่าง Py-Gly-Gly-Phe ที่ไม่มีประจุและมีประจุ กับ BSA

ภาพประกอบ 37 แสดงให้เห็นว่า มีกรดอะมิโนที่ล้อมรอบอนุพันธ์ไพรีนอยู่ 3 กรดอะมิโน คือ LEU346, LYS350 และ LEU480 ของ Py-Phe-Gly-Gly ที่ไม่มีประจุ จะเห็นว่า Py-Phe-Gly-Gly เป็นอนุพันธ์ที่เกิดจาก Py-L-Phe โดยเพิ่ม glycine เข้าไป 2 ตัว ต่อกับส่วนของ phenylalanine ภายในโมเลกุล ซึ่ง Py-Phe-Gly-Gly จะหันบริเวณส่วนของ วงไพรีนไปทาง หมู่ methyl ของกรดอะมิโน LEU346 เกิดแรง hydrophobic interaction และจะหันบริเวณส่วนที่มีขั้วของ หมู่คาร์บนิล ไปจับกับ หมู่อะมิโนของกรดอะมิโน LYS350 เกิดพันธะไฮโดรเจน โดยส่วน Py-Phe-Gly-Gly ที่มีประจุ จะมีกรดอะมิโนที่ล้อมรอบอยู่ 3 กรดอะมิโน คือ ARG208, LEU346 และ LYS350 โดยพบว่า Py-Phe-Gly-Gly จะหันบริเวณส่วนของ วงไพรีนไปทาง หมู่ methyl ของกรดอะมิโน LEU346 เกิดแรง hydrophobic interaction และจะหันบริเวณส่วนที่มีขั้วของ หมู่อะมิโน ไปจับกับ หมู่อะมิโนของกรดอะมิโน ARG208 เกิดพันธะไฮโดรเจน และพบว่า Py-Gly-Gly-Phe ที่มีประจุ จะทำให้ระยะของกรดอะมิโนโดยรอบลดลงเมื่อเทียบกับ Py-Gly-Gly-Phe ที่ไม่มีประจุ



ภาพประกอบ 37 แสดงการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง Py-Phe-Gly-Gly ที่ไม่มีประจุและมีประจุ กับ BSA

4.2.3 โปรตีน Lysozyme

เป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่สามารถสกัดได้จากไข่ขาว มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ มีฤทธิ์ในการเจาะผนังเซลล์ของแบคทีเรียและยังเป็นสารที่ใช้ปนในอาหาร (food additive) ทำหน้าที่เป็นสารกันเสีย (preservative) ได้อีกด้วย lysozyme ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 129 กรดอะมิโน เป็นโปรตีนสายเดี่ยวมีมวลโมเลกุล 14300 กิโลดาลตัน

การศึกษา Molecular docking ระหว่างอนุพันธ์ของไพรีนกับ Lysozyme

จากการศึกษาปฏิกิริยาระหว่างอนุพันธ์ไพรีนกับ lysozyme โดยวิธี Molecular docking เป็นวิธีที่ใช้ในการทำนายทิศทางของโมเลกุลหนึ่งต่อการเข้าจับอีกโมเลกุลหนึ่ง เพื่อสร้างเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่เสถียร และให้ผลของบริเวณการจับของโมเลกุล (binding site) พลังงานการจับกัน (binding energy) โดยส่วนใหญ่จะใช้กับโมเลกุลของสารชีวภาพ เช่น โปรตีน เอนไซม์ กรดนิวคลีอิก คาร์โบไฮเดรตและไขมัน โดยการศึกษาจะให้ค่าของพลังงานการจับ (binding energy) ที่เกิดขึ้นระหว่างอนุพันธ์ไพรีนกับ lysozyme เมื่อเกิดปฏิกิริยาและศึกษาถึงโครงสร้างที่เหมาะสมต่อการจับโปรตีนโดยดูจาก ค่าจำนวนโครงสร้างที่เข้าจับ (number of conformation) ซึ่งจะอธิบายถึงจำนวนโครงที่เข้าจับกับตัวโปรตีนถ้ามีจำนวนโครงสร้าง

มากแปลว่าโครงสร้างนั้นสามารถจับกับตัวโปรตีนได้ดี แต่ถ้ามีจำนวนโครงสร้างน้อยแปลว่าโครงสร้างดังกล่าวยังไม่เหมาะสมต่อการจับโปรตีน โดยอนุพันธ์ไพรีนจะอยู่ใน 2 สถานะคือสถานะที่เป็นกลางหรือไม่ มีประจุจะอยู่ใน RCOOH และสถานะที่มีประจุจะอยู่ในรูป RCOO^- ซึ่งผลของการศึกษา Molecular docking ระหว่างอนุพันธ์ของไพรีนที่มีประจุและไม่มีประจุกับ Lysozyme ดังแสดงในตาราง 5

ตาราง 5 ผลของการศึกษา Molecular docking ระหว่าง อนุพันธ์ของไพรีนกับ Lysozyme

อนุพันธ์ของไพรีน	NOC	BE (kcal/mol)	NOC	BE (kcal/mol)
	ที่ไม่มีประจุ	ที่ไม่มีประจุ	ที่มีประจุ	ที่มีประจุ
Py-L-Phe	32	-10.76	38	-11.40
Py-L-Trp	15	-11.28	24	-11.57
Py-Gly-Phe	8	-10.54	16	-10.38
Py-Gly-Trp	8	-10.94	13	-10.68
Py-Gly-Gly-Phe	3	-9.63	5	-10.01
Py-Gly-Gly-Phe	5	-9.73	8	-10.23

ผลการทดลองตาราง 5 จากการศึกษาผลของ Molecular docking ระหว่างอนุพันธ์ไพรีนที่มีประจุและไม่มีประจุ กับ Lysozyme พบว่า ค่าพลังงานการจับระหว่างอนุพันธ์ไพรีนที่ไม่มีประจุมีค่าอยู่ในช่วง -11.28 ถึง -9.63 kcal/mol โดยมีจำนวนโครงสร้างที่เข้าจับ มีค่าระหว่าง 3 ถึง 32 และพบว่าลิแกนด์ Py-L-Trp ให้ค่าพลังงานการจับมากที่สุดคือเท่ากับ -11.28 kcal/mol ส่วนลิแกนด์ Py-L-Phe ให้ค่า number of conformation มากที่สุดคือเท่ากับ 32 ส่วนค่าพลังงานการจับระหว่างอนุพันธ์ไพรีนที่มีประจุมีค่าอยู่ในช่วง -11.57 ถึง -10.01 kcal/mol โดยมีจำนวนโครงสร้างที่เข้าจับ มีค่าระหว่าง 5 ถึง 38 และพบว่าลิแกนด์ Py-L-Trp ให้ค่าพลังงานการจับมากที่สุดคือเท่ากับ -11.57 kcal/mol ส่วนลิแกนด์

Py-L-Phe ให้ค่า number of conformation มากที่สุดคือเท่ากับ 38 จึงสรุปได้ว่าเมื่อทำการเพิ่มความยาวของโมเลกุลโดยเติมตัว glycine ลงไปพบว่ามียลต่อค่าพลังงานการจับระหว่างอนุพันธ์ไพรีนกับ Lysozyme แต่มีผลทำให้ให้ค่า number of conformation ลดลงเนื่องจากการเพิ่มความยาวของโมเลกุลมีผลต่อบริเวณการจับ (Binding site) โดยจะทำให้เกิดแรงกีดขวางเนื่องจากขนาด (steric hindrance interaction) ทำให้โครงสร้างเกิดความไม่เสถียรเกิดขึ้น และเมื่อพิจารณาอนุพันธ์ไพรีนที่มีประจุและไม่มีประจุพบว่า อนุพันธ์ไพรีนที่มีประจุทำให้พลังงานการจับเพิ่มขึ้นและจำนวนโครงสร้างที่เข้าจับเพิ่มขึ้นมากกว่าอนุพันธ์ไพรีนที่มีประจุซึ่งอนุพันธ์ไพรีนมีความสามารถในการจับกับ Lysozyme ได้ ส่วนลิแกนด์ Py-L-Phe และ Py-L-Trp มีความสามารถในการจับกับ Lysozyme ได้ดีและมีความเสถียรสูง ส่วน ลิแกนด์ Py-Gly-Phe และ Py-Gly-Trp สามารถจับโปรตีนได้ดีเพราะมีค่าพลังงานการจับที่สูงแต่มีความเสถียรน้อยกว่าของ Py-L-Phe และ Py-L-Trp เมื่อพิจารณาจากค่า Number of conformation และ Py-Gly-Gly-Phe กับ Py-Phe-Gly-Gly มีความสามารถในการจับกับ Lysozyme ได้ดีและมีความเสถียรน้อย

การศึกษากรดอะมิโนโดยรอบในระยะ 4 Å ของ Lysozyme เมื่อเกิดการจับกับอนุพันธ์ไพรีนผลของการศึกษากรดอะมิโนโดยรอบของ lysozyme เมื่อเกิดการจับกับ อนุพันธ์ของไพรีนเพื่อหาบริเวณการจับจำเพาะ (binding site) และศึกษาถึงอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่าง อนุพันธ์ของไพรีน กับ lysozyme โดยการวัดระยะโดยรอบของอนุพันธ์ไพรีน เมื่อเกิดการจับภายในโมเลกุลของ lysozyme ซึ่งแสดงผลการทดลองดังแสดงในตาราง 6

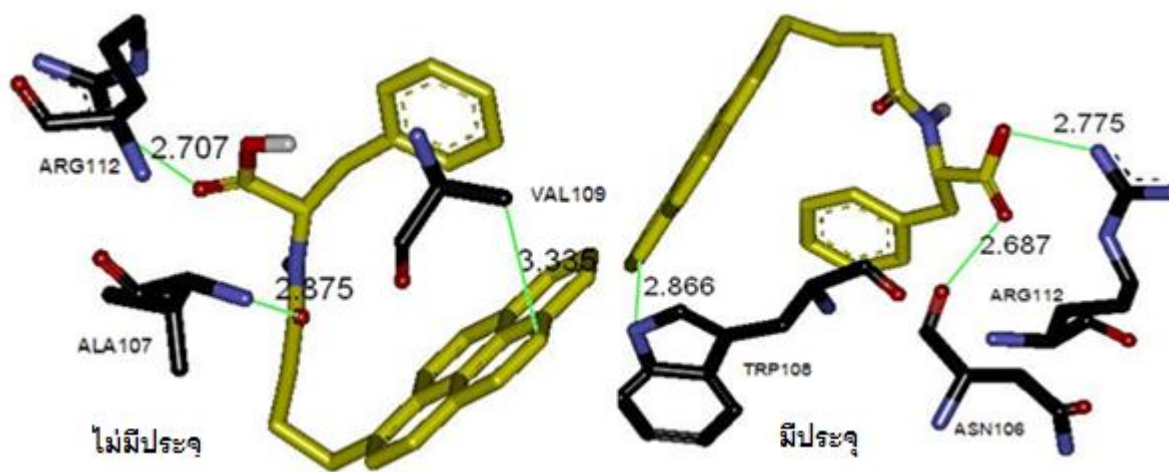
ตาราง 6 กรดอะมิโนโดยรอบในระยะ 4 Å ของโปรตีน Lysozyme

อนุพันธ์ของไพริน	กรดอะมิโนโดยรอบในระยะ 4 Å	
	ไม่มีประจุ	มีประจุ
Py-L-Phe	ALA107, VAL109, ARG112	ASN106, TRP108, ARG112
Py-L-Trp	THR47, ASN59, TRP108	ASN106, TRP108, ARG112
Py-Gly-Phe	TRP62, ASP101, TRP108	GLN57, ALA107, TRP108
Py-Gly-Trp	THR47, ASN59, TRP108	PHE34, GLU35, TRP108
Py-Gly-Gly-Phe	ALA48, ARG61, TRP108	GLU35, GLN57, TRP108
Py-Phe-Gly-Gly	ASN59, TRP108, VAL109	ASP52, TRP62, VAL109

จากการศึกษาบริเวณการจับกันระหว่าง อนุพันธ์ของไพรินกับ Lysozyme พบว่าบริเวณที่เกิดการจับกันของอนุพันธ์ไพรินกับ lysozyme มีกรดอะมิโนโดยรอบในระยะ 4 Å คือ PHE34, GLU35, ALA48, THR47, ASP52, ASN59, TRP63, ASP101, ASP106, ALA107, TRP108, VAL109 และ ARG112 ล้อมรอบอยู่ซึ่งจากการศึกษาพบว่าเกิดการจับกันระหว่างส่วนของวงไพริน กับ วงห้าเหลี่ยมของ TRP108 โดยจะเกิดแรงhydrophobic interaction ซึ่งในงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า อนุพันธ์ไพรินสามารถเข้าไปจับกับ lysozyme ได้ที่ตำแหน่ง TRP108 และ VAL109 (Kumar; et al. 1997: 2085-2087) ดังแสดงในภาพประกอบ 38

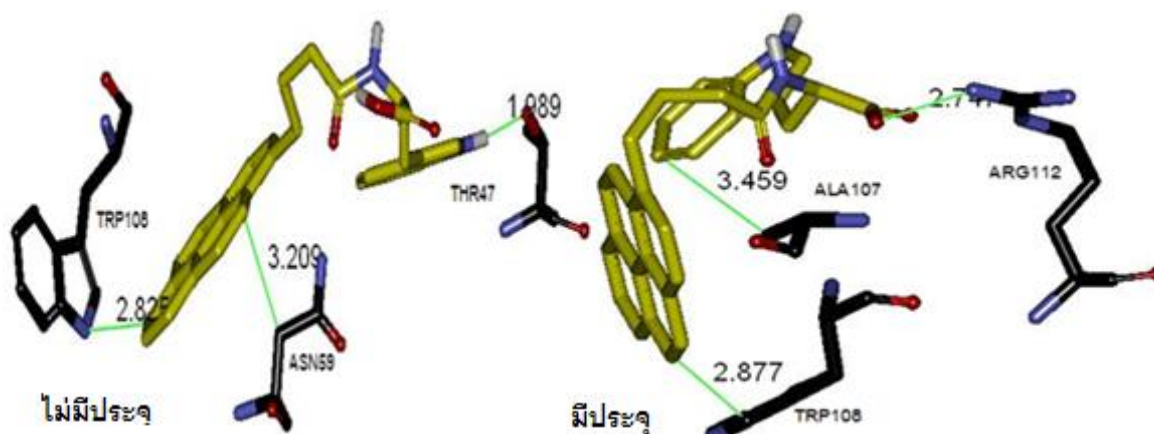
ภาพประกอบ 38 แสดงให้เห็นถึง บริเวณการจับกันระหว่าง Py-L-Phe กับ lysozyme ว่า Py-L-Phe มีกรดอะมิโนที่ล้อมรอบ 3 กรดอะมิโน คือ ALA107, VAL109 และ ARG112 ของ Py-L-Phe ที่ไม่มีประจุ ซึ่งพบว่า Py-L-Trp จะหันบริเวณส่วนของ วงไพรินไปจับ กับ หมู่ methyl ของกรดอะมิโน VAL109 เกิด แรง hydrophobic interaction และจะหันบริเวณส่วนที่มีขั้วของหมู่คาร์บอนิล ไปจับกับ

หมู่อะมิโนของกรดอะมิโน กับ ARG112 เกิดพันธะไฮโดรเจน ส่วนของ Py-L-Phe ที่มีประจุ มีกรดอะมิโนที่ล้อมรอบอยู่ 3 กรดอะมิโนคือ ASN106, TRP108 และ ARG112 โดย Py-L-Phe จะหันบริเวณส่วนของ วงไพรีนไปจับกับ วงห้าเหลี่ยมของกรดอะมิโน TRP108 และหันบริเวณส่วนที่มีขั้วของหมู่คาร์บนิล ไปจับกับ หมู่อะมิโนของกรดอะมิโน ARG112 เกิดพันธะไฮโดรเจน และพบว่า Py-L-Phe ที่มีประจุ จะทำให้ระยะของกรดอะมิโนโดยรอบลดลงเมื่อเทียบกับ Py-L-Phe ที่ไม่มีประจุ



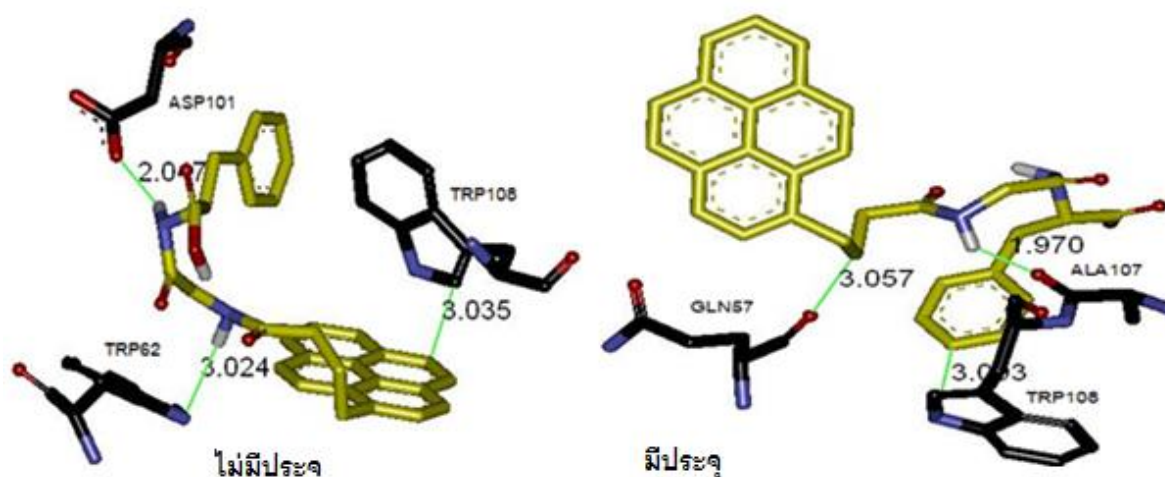
ภาพประกอบ 38 แสดงการเกิดปฏิกริยาระหว่าง Py-L-Phe ที่ไม่มีประจุและมีประจุ กับ lysozyme

ภาพประกอบ 39 แสดงให้เห็นว่า Py-L-Trp มีกรดอะมิโนที่ล้อมรอบ 3 กรดอะมิโน คือ THR47, ASN59 และ TRP108 ของ Py-L-Trp ที่ไม่มีประจุ จะหันบริเวณส่วนของ วงไพรีน ไปจับกับ วงห้าเหลี่ยมของกรดอะมิโน TRP108 เกิดแรง hydrophobic interaction และจะหันบริเวณส่วนที่มีขั้วของหมู่คาร์บนิล ไปจับกับ หมู่อะมิโนของกรดอะมิโน กับ THR47 เกิดพันธะไฮโดรเจน ส่วนของ Py-L-Trp ที่มีประจุ มีกรดอะมิโนที่ล้อมรอบอยู่ 3 กรดอะมิโนคือ ASN106, TRP108 และ ARG112 โดย Py-L-Trp จะหันบริเวณส่วนของ วงไพรีนไปจับกับ วงห้าเหลี่ยมของกรดอะมิโน TRP108 และหันบริเวณส่วนที่มีขั้วของหมู่คาร์บนิล ไปจับกับ หมู่อะมิโนของกรดอะมิโน ARG112 เกิดพันธะไฮโดรเจน และพบว่า Py-L-Trp ที่มีประจุ จะทำให้ระยะของกรดอะมิโนโดยรอบลดลงเมื่อเทียบกับ Py-L-Trp ที่ไม่มีประจุ



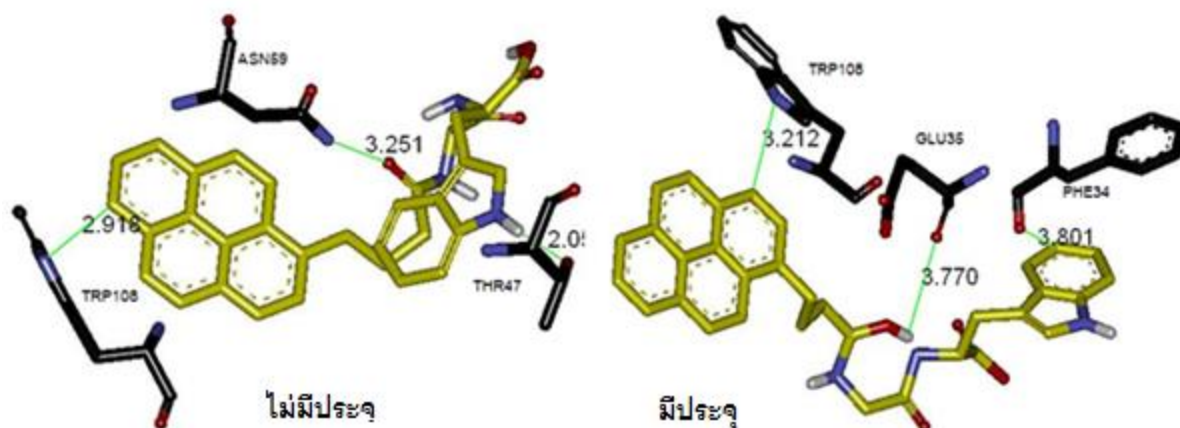
ภาพประกอบ 39 แสดงการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง Py-L-Trp ที่ไม่มีประจุและมีประจุ กับ lysozyme

ภาพประกอบ 40 แสดงให้เห็นว่า Py-Gly-Phe มีกรดอะมิโนที่ล้อมรอบ 3 กรดอะมิโน คือ TRP62, ASP101 และ TRP108 ของ Py-Gly-Phe ที่ไม่มีประจุ จะเห็นว่า Py-Gly-Phe เป็นอนุพันธ์ที่เกิดจาก Py-L-Phe โดยเพิ่ม glycine เข้าไปภายในโมเลกุลซึ่ง Py-Gly-Phe จะหันบริเวณส่วนของ วงไพรีน ไปจับกับ วงห้าเหลี่ยมของกรดอะมิโน TRP108 เกิดแรง hydrophobic interaction และจะหันบริเวณส่วนที่มีขั้วของหมู่คาร์บนิล ไปจับกับ หมู่อะมิโนของกรดอะมิโน กับ ASP101 เกิดพันธะไฮโดรเจน ส่วนของ Py-Gly-Phe ที่มีประจุ มีกรดอะมิโนที่ล้อมรอบอยู่ 3 กรดอะมิโนคือ GLN57, ALA107 และ TRP108 โดย Py-Gly-Phe จะหันบริเวณส่วนของ วงไพรีนไปจับกับ วงห้าเหลี่ยมของกรดอะมิโน TRP108 และหันบริเวณส่วนสายไซของ Py-Gly-Phe ไปจับกับ หมู่คาร์บนิลของกรดอะมิโน GLN57 เกิดแรง van der waals และพบว่า Py-Gly-Phe ที่มีประจุ จะทำให้ระยะของกรดอะมิโนโดยรอบลดลงเมื่อเทียบกับ Py-Gly-Phe ที่ไม่มีประจุ



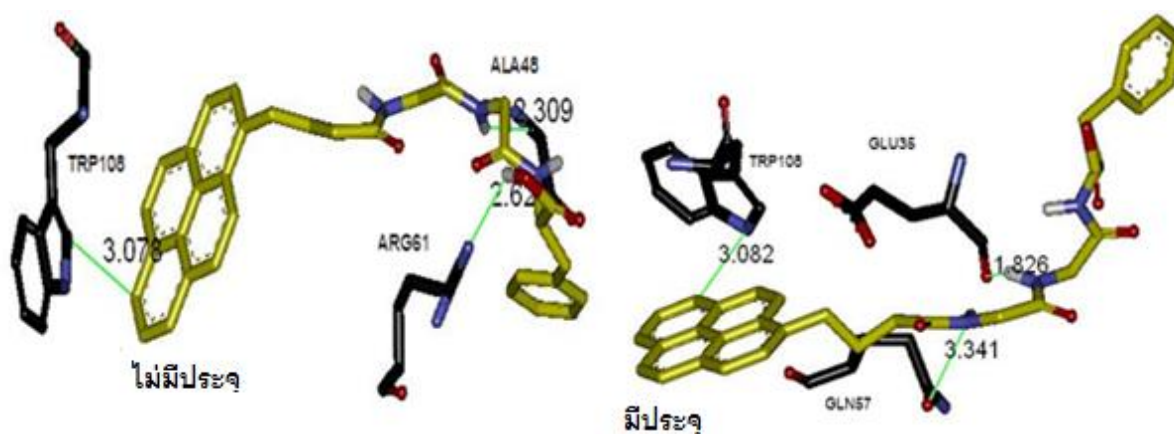
ภาพประกอบ 40 แสดงการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง Py-Gly-Phe ที่ไม่มีประจุและมีประจุ กับ Lysozyme

ภาพประกอบ 41 แสดงให้เห็นว่า Py-Gly-Trp มีกรดอะมิโนที่ล้อมรอบ 3 กรดอะมิโน คือ THR47, ASN59 และ TRP108 ของ Py-Gly-Trp ที่ไม่มีประจุ จะเห็นว่า Py-Gly-Trp เป็นอนุพันธ์ที่เกิดจาก Py-L-Trp โดยเพิ่ม glycine เข้าไปภายในโมเลกุลซึ่ง Py-Gly-Trp จะหันบริเวณส่วนของวงไพรีน ไปจับกับ วงห้าเหลี่ยมของกรดอะมิโน TRP108 เกิดแรง hydrophobic interaction และจะหันบริเวณส่วนที่มีขั้วของ หมู่คาร์บอนิล ไปจับกับ หมู่อะมิโนของกรดอะมิโน กับ ASN59 เกิดพันธะไฮโดรเจน ส่วนของ Py-Gly-Trp ที่มีประจุ มีกรดอะมิโนที่ล้อมรอบอยู่ 3 กรดอะมิโนคือ PHE34, GLU35 และ TRP108 โดย Py-Gly-Trp จะหันบริเวณส่วนของ วงไพรีนไปจับกับ วงห้าเหลี่ยมของกรดอะมิโน TRP108 และหันบริเวณส่วนของหมู่ hydroxyl ไปจับกับ หมู่คาร์บอนิลของกรดอะมิโน GLU35 เกิดแรง พันธะไฮโดรเจน และพบว่า Py-Gly-Trp ที่มีประจุ จะทำให้ระยะของกรดอะมิโนโดยรอบลดลงเมื่อเทียบกับ Py-Gly-Trp ที่ไม่มีประจุ



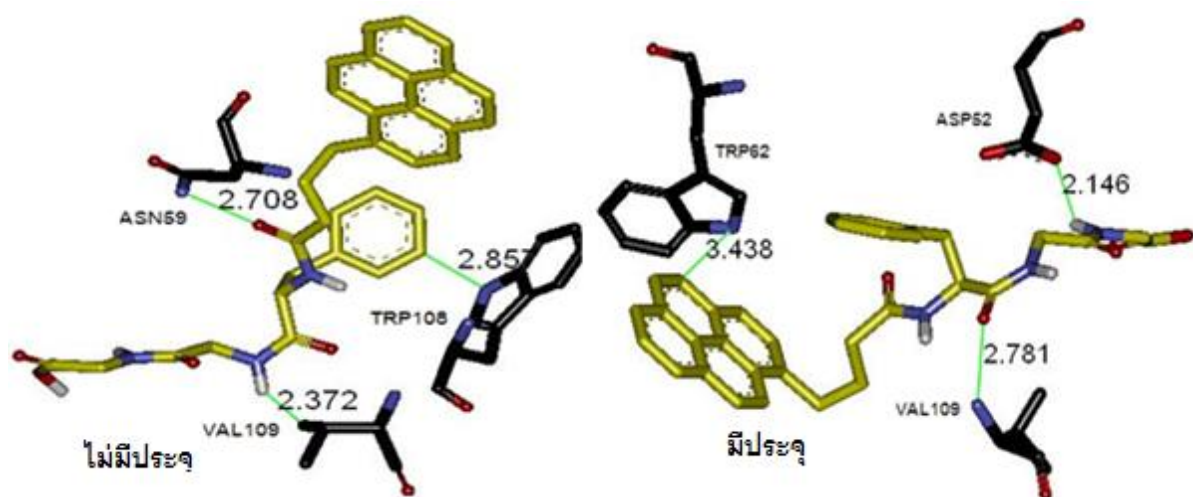
ภาพประกอบ 41 แสดงการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง Py-Gly-Trp ที่ไม่มีประจุและมีประจุ กับ Lysozyme

ภาพประกอบ 42 แสดงให้เห็นว่า Py-Gly-Gly-Phe มีกรดอะมิโนที่ล้อมรอบ 3 กรดอะมิโน คือ ALA48, ARG61 และ TRP108 ของ Py-Gly-Gly-Phe ที่ไม่มีประจุ จะเห็นว่า Py-Gly-Gly-Phe เป็นอนุพันธ์ที่เกิดจาก Py-L-Phe โดยเพิ่ม glycine เข้าไปภายในโมเลกุลซึ่ง Py-Gly-Gly-Phe จะหันบริเวณส่วนของ วงไพรีน ไปจับกับ วงห้าเหลี่ยมของกรดอะมิโน TRP108 เกิดแรง hydrophobic interaction และจะหันบริเวณส่วนที่มีขั้วของหมู่คาร์บนิล ไปจับกับ หมู่อะมิโนของกรดอะมิโน ARG61 เกิดพันธะไฮโดรเจน ส่วนของ Py-Gly-Gly-Phe ที่มีประจุ มีกรดอะมิโนที่ล้อมรอบอยู่ 3 กรดอะมิโนคือ GLU35, GLN57 และ TRP108 โดย Py-Gly-Gly-Phe จะหันบริเวณส่วนของ วงไพรีนไปจับกับ วงห้าเหลี่ยมของกรดอะมิโน TRP108 เกิดแรง hydrophobic interaction และหันบริเวณส่วนที่มีขั้วของหมู่คาร์บนิล ไปจับกับ หมู่อะมิโนของกรดอะมิโน GLU35 เกิดแรง พันธะไฮโดรเจน และพบว่า Py-Gly-Gly-Phe ที่มีประจุ จะทำให้ระยะของกรดอะมิโนโดยรอบลดลงเมื่อเทียบกับ Py-Gly-Gly-Phe ที่ไม่มีประจุ



ภาพประกอบ 42 แสดงการเกิดปฏิกริยาระหว่าง Py-Gly-Gly-Phe ที่ไม่มีประจุและมีประจุ กับ Lysozyme

ภาพประกอบ 43 แสดงให้เห็นว่า Py-Phe-Gly-Gly ว่า มีกรดอะมิโนที่ล้อมรอบอนุพันธ์ไพรีน อยู่ 3 กรดอะมิโนคือ ASN59, TRP108 และ VAL109 ของ Py-Phe-Gly-Gly ที่ไม่มีประจุ จะเห็นว่า Py-Phe-Gly-Gly เป็นอนุพันธ์ที่เกิดจาก Py-L-Phe โดยเพิ่ม glycine เข้าไป 2 ตัว ต่อกับส่วนของ phenylalanine ภายในโมเลกุลซึ่ง Py-Phe-Gly-Gly จะหันบริเวณส่วนของหมู่อะมิโนไปจับกับ หมู่ methyl ของ VAL109 เกิด แรง van der waals และหันบริเวณส่วนที่มีขั้วของหมู่คาร์บอนิล ไปจับกับ หมู่อะมิโนของกรดอะมิโน ASN59 และจะหันบริเวณส่วนของวงเบนซีน ไปจับกับ วงห้าเหลี่ยมของกรดอะมิโน TRP108 เกิดแรง hydrophobic interaction ส่วนของ Py-Phe-Gly-Gly ที่มีประจุ มีกรดอะมิโนที่ล้อมรอบอยู่ 3 กรดอะมิโนคือ ASP52, TRP62 และ VAL109 โดย Py-Phe-Gly-Gly จะหันบริเวณส่วนของ วงไพรีนไปจับกับ วงห้าเหลี่ยมของกรดอะมิโน TRP62 เกิดแรง hydrophobic interaction และหันบริเวณส่วนที่มีขั้วของหมู่คาร์บอนิล ไปจับกับ หมู่อะมิโนของกรดอะมิโน VAL109 เกิดแรง พันธะไฮโดรเจน และพบว่า Py-Phe-Gly-Gly ที่มีประจุ จะทำให้ระยะของกรดอะมิโนโดยรอบลดลงเมื่อเทียบกับ Py-Phe-Gly-Gly ที่ไม่มีประจุ



ภาพประกอบ 43 แสดงการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง Py-Phe-Gly-Gly ที่ไม่มีประจุและมีประจุ กับ lysozyme

บทที่ 5

สรุปผล อภิปรายผลการวิจัย

จากการศึกษา Molecular docking ของอนุพันธ์ไพรีนกับโปรตีนตัวอย่าง 2 ชนิด ได้แก่ BSA และ lysozyme โดยทำการ download โครงสร้างสามมิติของโปรตีนจากฐานข้อมูลของโปรตีนที่รหัส 4OR0 และ 3WVY ตามลำดับ และกำหนดขนาดของ Grid เท่ากับ $60 \times 60 \times 60$ Å สำหรับการศึกษาค้นคว้าของอนุพันธ์ไพรีนกับ BSA และ Lysozyme ได้มีการกำหนดตำแหน่งจุดศูนย์กลางของ Grid ไว้ที่ $x = -6.632$, $y = 21.28$, $z = 114.14$ และที่ $x = 0.014$, $y = 0.346$, $z = 0.105$ ตามลำดับ โดยมี ขนาดของ grid point spacing เท่ากับ 0.375 Å จำนวนรอบในการ run ที่ 150 รอบ โดยใช้รูปแบบ Random และคำนวณด้วยวิธี Lamarckian GA วิธีนี้ให้ค่าพลังงานการจับกันที่ดีที่สุด

การศึกษาเคมีควอนตัมโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของอนุพันธ์ไพรีนพบว่าตัวอนุพันธ์ของไพรีน (Py-L- Phe, Py-L-Trp, Py-Gly-Phe, Py-Gly-Trp, Py-Gly-Gly-Phe, Py-Phe-Gly-Gly) พบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงที่มากที่สุดเท่ากับ 342.77 , 344.65 , 342.73 , 345.35 , 342.74 และ 342.74 nm ตามลำดับ และค่าที่ได้จากการคำนวณพบว่าให้ค่าการดูดกลืนแสงที่มากที่สุดเท่ากับ 343 , 345 , 345 , 345 , 345 และ 343 nm และ 342.67 nm ตามลำดับ ซึ่งค่าที่คำนวณได้ให้ค่าที่สอดคล้องกับการทดลองโดยมีร้อยละความคลาดเคลื่อนเพียง 0.55 ดังนั้น การคำนวณค่าการดูดกลืนแสงด้วยระเบียบวิธี TD-B3LYP ที่ basis set 6-31G(d,p) สามารถใช้ทำนายค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ไพรีนได้ ซึ่งเมื่อทำการเพิ่มความยาวของโมเลกุลโดยแทรกหมู่ glycine เข้าไปในโครงสร้างของ Py-L-Phe แล้วได้โครงสร้างดังต่อไปนี้ คือ Py-Gly-Phe, Py-Gly-Trp, Py-Gly-Gly-Phe และ Py-Phe-Gly-Gly พบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มีค่าการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าการแทรกหมู่ glycine ลงไปภายในโมเลกุลไม่มีผลต่อการดูดกลืนแสงของอนุพันธ์ไพรีนอย่างมีนัยสำคัญ

จากการศึกษาผลของ Molecular docking ระหว่างอนุพันธ์ไพรีนมีประจุและไม่มีประจุ กับ BSA พบว่า ค่าพลังงานการจับระหว่างอนุพันธ์ไพรีนที่ไม่มีประจุมีค่าอยู่ในช่วง -13.69 ถึง -11.03 kcal/mol โดยมีจำนวนโครงสร้างที่เข้าจับ มีค่าระหว่าง 16 ถึง 123 และพบว่าลิแกนด์ Py-L-Trp ให้ค่าพลังงานการจับมากที่สุดคือเท่ากับ -13.69 kcal/mol ส่วนลิแกนด์ Py-L-Phe ให้ค่า number of conformation มากที่สุด

คือเท่ากับ 123 ส่วนค่าพลังงานการจับระหว่างอนุพันธ์ไพรีนที่มีประจุมีค่าอยู่ในช่วง -14.36 ถึง -10.39 kcal/mol โดยมีจำนวนโครงสร้างที่เข้าจับ มีค่าระหว่าง 25 ถึง 128 และพบว่าลิแกนด์ Py-L-Trp ให้ค่าพลังงานการจับมากที่สุดคือเท่ากับ -14.36 kcal/mol ส่วนลิแกนด์ Py-L-Phe ให้ค่า number of conformation มากที่สุดคือเท่ากับ 128 จึงสรุปได้ว่าเมื่อทำการเพิ่มความยาวของโมเลกุลโดยเติมตัว glycine ลงไปพบว่ามีผลต่อค่าพลังงานการจับระหว่างอนุพันธ์ไพรีนกับ BSA แต่มีผลทำให้ให้ค่า number of conformation ลดลงเนื่องจากการเพิ่มความยาวของโมเลกุลมีผลต่อบริเวณการจับ (Binding site) โดยจะทำให้เกิดแรงกีดขวางเนื่องจากขนาด (steric hindrance interaction) ทำให้โครงสร้างเกิดความไม่เสถียรเกิดขึ้น และเมื่อพิจารณาอนุพันธ์ไพรีนที่มีประจุและไม่มีประจุพบว่าอนุพันธ์ไพรีนที่มีประจุทำให้พลังงานการจับเพิ่มขึ้นและจำนวนโครงสร้างที่เข้าจับเพิ่มขึ้นมากกว่าอนุพันธ์ไพรีนที่มีประจุซึ่งอนุพันธ์ไพรีนมีความสามารถในการจับกับ BSA ได้ ส่วนลิแกนด์ Py-L-Phe และ Py-L-Trp มีความสามารถในการจับกับ BSA ได้ดีและมีความเสถียรสูง ส่วน ลิแกนด์ Py-Gly-Phe และ Py-Gly-Trp สามารถจับโปรตีนได้ดี เพราะมีค่าพลังงานการจับที่สูงแต่มีความเสถียรน้อยกว่าของ Py-L-Phe และ Py-L-Trp เมื่อพิจารณาจากค่า Number of conformation และ Py-Gly-Gly-Phe กับ Py-Phe-Gly-Gly มีความสามารถในการจับกับ BSA ได้ดีและมีความเสถียรน้อย

จากการศึกษาบริเวณการจับกันระหว่าง อนุพันธ์ของไพรีนที่มีประจุและไม่มีประจุกับ BSA พบว่าบริเวณที่เกิดการจับกันของอนุพันธ์ไพรีนกับ BSA โดยมีกรดอะมิโนในระยะ 4 Å คือ SER201, ARG208, ALA209, TRP213, VAL342, LEU346, LYS350, ASP450, SER479, LEU480 และ VAL481 การศึกษาพบว่าเกิดการจับกันระหว่างส่วนของวงไพรีนกับ หมู่ methyl ของ กรดอะมิโน LEU346 โดยจะเกิดแรง hydrophobic interaction และจะหันบริเวณส่วนที่มีขั้วของหมู่คาร์บอนิลไปจับกับหมู่อะมิโนของกรดอะมิโน LYS350 เกิดพันธะไฮโดรเจน ซึ่งในงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าอนุพันธ์ไพรีนสามารถเข้าไปจับกับโปรตีน BSA ได้ที่ตำแหน่ง LEU346 และ ARG347 (Kumar; et al. 1997: 2085-2087) ซึ่งการเพิ่ม glycine มีผลทำให้ขนาดของโมเลกุลยาวขึ้นต่อการ binding ที่เกิดขึ้นโดยทำให้ระยะห่างระหว่าง อนุพันธ์ของไพรีน กับ กรดอะมิโนโดยรอบมีค่าเพิ่มขึ้นทำให้เกิดการจับกันได้น้อยลง

จากการศึกษาผลของ Molecular docking ระหว่างอนุพันธ์ไพรินที่มีประจุและไม่มีประจุ กับ Lysozyme พบว่า ค่าพลังงานการจับระหว่างอนุพันธ์ไพรินที่ไม่มีประจุมีค่าอยู่ในช่วง -11.28 ถึง -9.63 kcal/mol โดยมีจำนวนโครงสร้างที่เข้าจับ มีค่าระหว่าง 3 ถึง 32 และพบว่า ลิแกนด์ Py-L-Trp ให้ค่าพลังงานการจับมากที่สุดคือเท่ากับ -11.28 kcal/mol ส่วนลิแกนด์ Py-L-Phe ให้ค่า number of conformation มากที่สุดคือเท่ากับ 32 ส่วนค่าพลังงานการจับระหว่างอนุพันธ์ไพรินที่มีประจุมีค่าอยู่ในช่วง -11.57 ถึง -10.01 kcal/mol โดยมีจำนวนโครงสร้างที่เข้าจับ มีค่าระหว่าง 5 ถึง 38 และพบว่าลิแกนด์ Py-L-Trp ให้ค่าพลังงานการจับมากที่สุดคือเท่ากับ -11.57 kcal/mol ส่วนลิแกนด์ Py-L-Phe ให้ค่า number of conformation มากที่สุดคือเท่ากับ 38 จึงสรุปได้ว่าเมื่อทำการเพิ่มความยาวของโมเลกุลโดยเติมตัว glycine ลงไปพบว่า มีผลต่อค่าพลังงานการจับระหว่างอนุพันธ์ไพรินกับ Lysozyme แต่มีผลทำให้ให้ค่า number of conformation ลดลงเนื่องจากการเพิ่มความยาวของโมเลกุลมีผลต่อบริเวณการจับ (Binding site) โดยจะทำให้เกิดแรงกีดขวางเนื่องจากขนาด (steric hindrance interaction) ทำให้โครงสร้างเกิดความไม่เสถียรเกิดขึ้น และเมื่อพิจารณาอนุพันธ์ไพรินที่มีประจุและไม่มีประจุพบว่าอนุพันธ์ไพรินที่มีประจุทำให้พลังงานการจับเพิ่มขึ้นและจำนวนโครงสร้างที่เข้าจับเพิ่มขึ้นมากกว่าอนุพันธ์ไพรินที่มีประจุซึ่งอนุพันธ์ไพรินมีความสามารถในการจับกับ Lysozyme ได้ ส่วนลิแกนด์ Py-L-Phe และ Py-L-Trp มีความสามารถในการจับกับ Lysozyme ได้ดีและมีความเสถียรสูง ส่วน ลิแกนด์ Py-Gly-Phe และ Py-Gly-Trp สามารถจับโปรตีนได้ดีเพราะมีค่าพลังงานการจับที่สูงแต่มีความเสถียรน้อยกว่าของ Py-L-Phe และ Py-L-Trp เมื่อพิจารณาจากค่า Number of conformation และ Py-Gly-Gly-Phe กับ Py-Phe-Gly-Gly มีความสามารถในการจับกับ Lysozyme ได้ดีและมีความเสถียรน้อย

จากการศึกษาบริเวณการจับกันระหว่าง อนุพันธ์ของไพรินกับLysozyme พบว่าบริเวณที่เกิดการจับกันของอนุพันธ์ไพรินกับ lysozyme มีกรดอะมิโนโดยรอบในระยะ 4 Å คือ PHE34, GLU35, ALA48, THR47, ASP52, ASN59, TRP63, ASP101, ASP106, ALA107, TRP108, VAL109 และ ARG112 ล้อมรอบอยู่ซึ่งจากการศึกษาพบว่าเกิดการจับกันระหว่างส่วนของวงไพริน กับ วงแหวนเหลี่ยมของ TRP108 โดยจะเกิดแรงhydrophobic interaction ซึ่งในงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า อนุพันธ์ไพรินสามารถเข้าไปจับกับ lysozyme ได้ที่ตำแหน่ง TRP108 และ VAL109 (Kumar; et al. 1997: 2085-2087) ซึ่งการเพิ่ม

glycine มีผลทำให้ขนาดของโมเลกุลยาวขึ้นต่อการ binding ที่เกิดขึ้นโดยทำให้ระยะห่างระหว่าง อนุพันธ์ของไพรีน กับ กรดอะมิโนโดยรอบมีค่าเพิ่มขึ้นทำให้เกิดการจับกันได้น้อยลง

จากงานวิจัยนี้ทำให้ทราบถึงการเกิดอันตรกิริยาของอนุพันธ์ไพรีนที่มีประจุและไม่มีประจุกับ BSA และ Lysozyme ได้ดียิ่งขึ้นและเป็นการยืนยันผลของการทดลองที่ผ่านมาเพื่อใช้เป็นแนวทางในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการเกิดอันตรกิริยาของ ลิแกนด์กับโปรตีน ในอนาคตได้





บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- คัชรินทร์ ศิริวงศ์. (2550). วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 35: 28–36.
- ธีรเกียรติ์ เกิดเจริญ. (2539). “คอมพิวเตอร์ช่วยออกแบบโมเลกุล กับ การพัฒนานาโนเทคโนโลยี”. วารสารเทคโนโลยีวัสดุ. ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ. 39: 17-22.
- ยานี ตรองพานิชย์. (2554). *ชีวโมเลกุล: โครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีน*: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- รัตนา สัมพันธ์จิต. (2548). *ชีวเคมี: โครงสร้างและหน้าที่ของชีวโมเลกุล*. นนทบุรี: เอมพันธ์.
- สุนทร ปิยะโชคณากุล. (2552). *เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อภิญา ชัยวิสุทธางกูร. (2552). *เคมีเชิงฟิสิกส์และการประยุกต์ใช้ในงานวิจัย*. กรุงเทพฯ: แดเน็กซ์อินเตอร์คอร์ปอเรชั่น.
- Ao, J.; et al. (2015). Interaction mechanisms between organic UV filters and bovine serum albumin as determined by comprehensive spectroscopy exploration and molecular docking. *Chemosphere*. 119: 590-600.
- Buranaprapuk, A.; & Kumar, C. V. (2000). Protein Scissors: Role of Aromatic Residues on the Binding Affinity and Photocleavage of Efficiency of Pyrenyl Peptides. *Tetrahedron*. 56: 7019-7025.
- Buranaprapuk, A.; et al. (2008). Chiral Protein Scissors Activated by Light: Recognition and Protein Photocleavage by a New Pyrenyl Probe. *J. Phys. Chem. B*. 112: 9258-9265.
- Damodaran, S. (1996). *In Food Chemistry*. 3rd ed. New York. Marcel Dekker Company.
- Intechopen. (2014). Docking. Retrieved June 12, 2014, from <http://www.intechopen.com/books/an-integrated-view-of-the-molecular-recognition-and-toxinology-from-analytical-procedures-to-biomedical-applications>.
- Jayabharathi, J.; et al. (2012). Docking investigation and binding interaction of benzimidazole derivative with bovine serum albumin. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol*. 117: 27-32.

- Kumar, C. V.; & Tolosa, L. M. (1993). Interaction of hydrophobic probes with Serum Albumin- Influence of the side chain and exciplex formation at the binding site. *J. Phys. Chem.* 97: 13914-13919.
- Kumar, C. V.; & Buranaprapuk, A. (1997). Site-Specific Photocleavage of Proteins. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 36: 2085-2087.
- Kumar, C. V.; et al. (1998). Photochemical protease: Site-Specific Photocleavage of hen egg lysozyme and bovine serum albumin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 10361-10366.
- Kumar, C. V.; & Buranaprapuk, A. (1999). Tuning the Selectivity of Protein Photocleavage: Spectroscopic and Photochemical Studies. *J. Am. Chem. Soc.* 121: 4262-4270.
- Kumar, C. V.; et al. (2000). Artificial Metallopeptidases: Regioselective Cleavage of Lysozyme. *Chem. Comm.* 597-598.
- Kumar, C. V.; et al. (2002a). Chiral Protein Scissors: High Enantiomeric Selectivity for Binding and its Effect on Protein Photocleavage Efficiency and Specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 5810-5815.
- Kumar, C. V.; et al. (2002b). Protein scissors: Photocleavage of proteins at specific locations. *Proc. Indian Acad. Sci (Chem. Sci.)* 114: 579-592.
- Kumari, M.; et al. (2014). Spectroscopic and docking studies on the interaction between pyrrolidinium based ionic liquid and bovine serum albumin. *J. Mol. Biol.* 124: 349-356.
- Malaikaew, P.; et al. (2011). Photocleavage of avidin by a new pyrenyl probe. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 103:251-255.
- Neil, C. (1999). Structures and properties of biological molecules. 5th ed. New York. Benjamin Cummings Publishers.
- Paramaguru, G.; et al. (2010). Interaction of anthraquinone dyes with lysozyme: Evidences from spectroscopic and docking studies. *J. Hazard. Mater.* 175: 985-991.
- RCSB Protein Data Bank. (2014). *Protein Data Bank*. Retrieved June 10, 2014, from <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>.
- Sarkar, M. et al. (2013). Interaction of bovine serum albumin with a psychotropic drug Alprazolam: Physicochemical, Photophysical and molecular Docking studies. *J. Lumin.* 142: 220-230.

- Shanmugaraj, S.; et al. (2015). Probing the binding interaction of thionine with lysozyme: A spectroscopic and molecular docking investigation. *Dyes and Pigments*. 112: 210-219.
- Shi. J. H.; et al. (2014). Characterization of interaction between isoliquiritigenin and bovine serum albumin: Spectroscopic and molecular docking methods. *J. Lumin*. 145: 643–650.
- Skt, M.; et al. (2012). Interactions of different polyphenols with bovine serum albumin using fluorescence quenching and molecular docking. *Food Chemistry*. 135: 2418–2424.
- Thanyada, R.; et al. (2007). Active site dynamics and combined quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM modelling of a HIV-1 reverse transcriptase/DNA/dTTP complex. *J. Mol. Gr. Modell*. 26(1): 1-13.
- Zheng, M.; et al. (2013). Computational methods for drug design and discovery: focus on China. *Trends Pharmacol Sci*. 34: 549-559.





คำอธิบายศัพท์

ALA	Alanine
ARG	Arginine
ASN	Asparagine
ASP	Asparate
GLN	Glutamate
GLY	Glycine
ILE	Isoleucine
LEU	Leucine
LYS	Lysine
PHE	Phenylalanine
SER	Serine
THR	Threonine
TRP	Tryptophan
TYR	Tyrosine
VAL	Valine
Kcal/mol	Kilocalorie per mole



ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อสกุล	นายสุวิชา เพ็ชรนิล
วันเดือนปีเกิด	15 พฤศจิกายน พ.ศ. 2532
สถานที่เกิด	จังหวัดสิงห์บุรี
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 22/8 หมู่ 3 ตำบล สิงห์ อำเภอบางระจัน จังหวัดสิงห์บุรี 16130
ตำแหน่งหน้าที่การงานในปัจจุบัน	-
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2551	มัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนสิงห์บุรี อำเภอมะเมือง จังหวัดสิงห์บุรี
พ.ศ. 2555	วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเคมี จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ จังหวัดกรุงเทพมหานคร
พ.ศ. 2558	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเคมี จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ จังหวัดกรุงเทพมหานคร