โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การคำนวณการเข้าจับเชิงโมเลกุลระหว่างอนุพันธ์ของไอโซไนอะซิดกับเอนไซม์ของเชื้อวัณโรคดื้อยา

Molecular docking calculation between isoniazid derivatives and enzyme of drug-resistant tuberculosis

ชื่อนิสิต นางสาวศันสนีย์ แก้วมรกต

ภาควิชา เคมี

ปีการศึกษา 2560

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การคำนวณการเข้าจับเชิงโมเลกุลระหว่างอนุพันธ์ของไอโซไนอะซิดกับเอนไซม์ของเชื้อวัณโรคดื้อยา

Molecular docking calculation between isoniazid derivatives and enzyme of drug-resistant tuberculosis

โดย

นางสาวศันสนีย์ แก้วมรกต

รายงานนี้เป็นสวนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2560

โครงการ การคำนวณการเข้าจับเชิงโมเลกุลระหว่างอนุพันธ์ของไอโซไนอะซิดกับเอนไซม์ของเชื้อวัณโรคดื้อยา

โดย นางสาวศันสนีย์ แก้วมรกต

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

.... ประธานกรรมการ

(อาจารย์ ดร.ปาริฉัตร วนลาภพัฒนา)

.... อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมศักดิ์ เพียรวณิช)

.... กรรมการ

(อาจารย์ ดร.สกุลสุข อุ่นอรุโณทัย)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

.... หัวหน้าภาควิชาเคมี

(รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิชัย พาราสุข)

วันที่ .... เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2561

คุณภาพของการเขียนรายงานเล่มนี้อยู่ในระดับ ☑ ดีมาก ☐ ดี ☐ พอใช้

ชื่อโครงการ การคำนวณการเข้าจับเชิงโมเลกุลระหว่างอนุพันธ์ของไอโซไนอะซิดกับเอนไซม์ของเชื้อวัณโรคดื้อยา
ชื่อนิสิตในโครงการ นางสาวศันสนีย์ แก้วมรกต เลขประจำตัว 5733163123
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมศักดิ์ เพียรวณิช
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2560

บทคัดย่อ

ปัจจุบันเชื้อที่ก่อให้เกิดวัณโรค (เชื้อแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis*) เกิดการดื้อต่อยารักษา การดื้อยาของเชื้อโรคมักจะเกิดจากการที่เอนไซม์เป้าหมายของยารักษาโรคนั้นเกิดการกลายพันธุ์ ทำให้ยาไม่สามารถเข้าจับได้ จึงไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นั้นได้ งานวิจัยนี้ศึกษาเปรียบเทียบโครงสร้างการเข้าจับระหว่างอนุพันธ์ของไอโซไนอะซิดจำนวน 30 ชนิด กับโครงสร้างของเอนไซม์ 9 โครงสร้าง คือ เอนไซม์ของเชื้อวัณโรคชนิดดั้งเดิมและชนิดที่มีการกลายพันธุ์ ได้แก่ I21V, S94A, I47T, D148G, V203A, I215A, T266E และ T266D โดยใช้เทคนิคการคำนวณการเข้าจับเชิงโมเลกุล ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการค้นคว้าและพัฒนายารักษาโรคตัวใหม่ที่มีประสิทธิภาพ ผลการคำนวณพบว่า ความสัมพันธ์ระหว่างค่าพลังงานการเข้าจับกับค่าการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของตัวยับยั้งที่เข้าจับกับเอนไซม์ของเชื้อวัณโรคชนิดดั้งเดิมนั้นไม่มีความสอดคล้องกัน และในเอนไซม์ชนิดดั้งเดิม พบว่า วงหลักของอนุพันธ์ไอโซไนอะซิดนั้นเกิดอันตรกิริยากับกรดอะมิโนชนิด Gly96, Phe97 และ Ala198 รวมทั้งเกิดพันธะไฮโดรเจนกับโมเลกุล NADH ที่อยู่ในโครงสร้างของตัวรับเป็นหลัก นอกจากนี้ยังพบว่าอนุพันธ์ของไอโซไนอะซิดส่วนใหญ่สามารถเข้าจับได้ดีกับเอนไซม์ของเชื้อวัณโรคชนิดกลายพันธุ์ V203A, I215A, T266E และ T266D และสุดท้ายพบว่าตัวยับยั้งชนิด 1i, 6i และ LL-3858 น่าจะมีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์กับเอนไซม์ชนิดกลายพันธุ์ได้ดี เนื่องจากมีลักษณะการเข้าจับของตัวมันเองในเอนไซม์ชนิดดั้งเดิมคล้ายกับชนิดที่มีการกลายพันธุ์

คำสำคัญ: การคำนวณการเข้าจับเชิงโมเลกุล, การดื้อยา

Project Title Molecular docking calculation between isoniazid derivatives and enzyme of drug-resistant tuberculosis

Student Name Miss Sansanee Kaewmorakot Student ID 5733163123

Advisor Name Assistant Professor Somsak Pianwanit, Ph.D.

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic Year 2017

Abstract

Nowadays, *Mycobacterium tuberculosis*, which causes tuberculosis, has developed resistance to drug treatment. The resistance is usually caused by mutation in enzyme target, hence drug cannot suitably bind to the enzyme target and thus it cannot inhibit the enzyme function. In this research, molecular docking calculations between 30 isoniazid derivatives and 9 enzyme structures, wild type and 8 mutations, which are I21V, S94A, I47T, D148G, V203A, I215A, T266E and T266D, were carried out and compared. This research will be useful for research and development of new effective drugs. The results show that no relationship between binding energy and biological activity for wild type enzyme could be observed. In the wild type, the core structure of isoniazid derivatives interacts mainly with Gly96, Phe97, and Ala198 and it also form hydrogen bonding with NADH in the enzyme. In addition, most isoniazid derivatives bind well with V203A, I215A, T266E and T266D mutations. Finally, 1i, 6i and LL-3858 inhibitors are possible to inhibit the mutant enzymes as well because they can bind to the wild type and 8 mutants of enzyme with similar binding modes.

Keywords: molecular docking calculation, drug resistance

กิตติกรรมประกาศ

รายงานฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้วิจัยได้รับความช่วยเหลือและเอาใจใส่เป็นอย่างสูงจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมศักดิ์ เพียรวณิช อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน ที่ได้ให้คำปรึกษาและข้อมูลต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.ปาริฉัตร วนลาภพัฒนา และอาจารย์ ดร.สกุลสุข อุ่นอรุโณทัย ที่เสียสละเวลามาเป็นกรรมการในการสอบงานวิจัย รวมถึงให้คำแนะนำจนรายงานเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้มอบทุนสนับสนุนจากโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ในครั้งนี้ และได้รับความเอื้อเฟื้ออุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัยจากเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตลอดจนความช่วยเหลือจากบุคลากรฝ่ายต่าง ๆ จึงกราบขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

และขอขอบพระคุณเพื่อนภาคเคมี รุ่นพี่ รุ่นน้อง และครอบครัว ที่คอยให้กำลังใจจนดำเนินโครงการสำเร็จลุล่วงด้วยดี สุดท้ายนี้ผู้วิจัยคาดหวังว่า ผู้ที่สนใจจะได้รับความรู้จากงานวิจัยฉบับนี้ ตลอดจนสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในชีวิตประจำวันและพัฒนางานวิจัยให้เกิดประโยชน์ในลำดับต่อไป

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญรูป	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	2
1.2.1 เทคนิคการเข้าจับเชิงโมเลกุลหรือโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้ง (molecular docking)	2
1.2.2 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์	3
1.2.3 กลไกการออกฤทธิ์ของยาไอโซไนอะซิด (isoniazid)	4
1.2.4 โปรแกรม AutoDock Vina	4
1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
1.4 วัตถุประสงค์	7
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	7
บทที่ 2 การทดลอง	8
2.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่เกี่ยวข้อง	8
2.1.1 ระบบฐานข้อมูล	8
2.1.2 โปรแกรมที่เกี่ยวข้อง	8
2.1.3 PDB code ของตัวรับชนิดดั้งเดิมและชนิดกลายพันธุ์รวม 9 โครงสร้าง	8
2.1.4 Code ของตัวยับยั้งรวม 31 โครงสร้าง	9
2.2 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง	9
2.2.1 การเตรียมโครงสร้างของตัวรับ (receptor)	9
2.2.2 การเตรียมโครงสร้างของสารยับยั้ง (ligand)	10
2.3 การคำนวณการเข้าจับเชิงโมเลกุลระหว่างตัวรับและตัวยับยั้ง	10

เรื่อง **หน้า**

2.4 การวิเคราะห์ผลโครงสร้างการเข้าจับ 12

บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง 13

3.1 การทดสอบความน่าเชื่อถือของโปรแกรม AutoDock Vina 13

3.2 การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างค่า minimal inhibitory concentration (MIC) และค่าพลังงานการเข้าจับเชิงโมเลกุล (binding energy) ของอนุพันธ์ของไอโซไนอะซิดกับเอนไซม์ของเชื้อวัณโรคชนิดดั้งเดิม (wild type) 14

3.3 การวิเคราะห์หา amino acid residue ที่อยู่บริเวณใกล้กับอนุพันธ์ของไอโซไนอะซิดในการเข้าจับกับเอนไซม์ของเชื้อวัณโรคชนิดดั้งเดิม (wild type) 16

3.4 การวิเคราะห์ค่าพลังงานการเข้าจับเชิงโมเลกุล (binding energy) ของอนุพันธ์ของไอโซไนอะซิดในการเข้าจับกับเอนไซม์ของเชื้อวัณโรคชนิดดั้งเดิม (wild type) เปรียบเทียบกับเอนไซม์ของเชื้อวัณโรคชนิดที่มีการกลายพันธุ์ 19

3.5 การวิเคราะห์หาอนุพันธ์ของไอโซไนอะซิดที่มีลักษณะการเข้าจับของตัวมันเองคล้ายกันทั้งในเอนไซม์ของเชื้อวัณโรคชนิดดั้งเดิม (wild type) กับชนิดที่มีการกลายพันธุ์ 20

3.6 การวิเคราะห์หารูปแบบการเข้าจับของตัวยับยั้งที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงสุด เมื่อพิจารณาจากค่า MIC ในการเข้าจับกับเอนไซม์ของเชื้อวัณโรคชนิดดั้งเดิม (wild type) 22

บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง 25

เอกสารอ้างอิง 26

ภาคผนวก 29

ประวัติผู้วิจัย 48

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
ตารางที่ 1 PDB code ของโครงสร้างตัวรับ 9 โครงสร้าง	8
ตารางที่ 2 Code ของโครงสร้างตัวยับยั้ง 31 โครงสร้าง	9
ตารางที่ 3 ค่า minimal inhibitory concentration (MIC) และค่าพลังงานการเข้าจับเชิงโมเลกุล (binding energy) ของตัวยับยั้งทั้ง 31 ชนิดกับตัวรับชนิดดั้งเดิม (wild type)	14
ตารางที่ 4 amino acid residue ของตัวรับชนิดดั้งเดิม (wild type) ที่พบใกล้กับตัวยับยั้งทั้ง 31 ชนิด ในรัศมี 6 Å และการเกิดพันธะไฮโดรเจน	17
ตารางที่ 5 ค่าเฉลี่ยของค่าพลังงานการเข้าจับเชิงโมเลกุล (binding energy) และค่าพลังงานสัมพัทธ์ของการเข้าจับเชิงโมเลกุล (relative binding energy) ของตัวยับยั้งทั้ง 31 ชนิดกับตัวรับชนิดกลายพันธุ์เทียบกับชนิดดั้งเดิม (Wild type)	19
ตารางที่ 6 ค่าพลังงานการเข้าจับเชิงโมเลกุล (binding energy) ของตัวยับยั้งทั้ง 31 ชนิดกับตัวรับชนิดกลายพันธุ์	41
ตารางที่ 7 ค่าพลังงานสัมพัทธ์ของการเข้าจับเชิงโมเลกุล (relative binding energy) ของตัวยับยั้งทั้ง 31 ชนิดกับตัวรับชนิดกลายพันธุ์เทียบกับชนิดดั้งเดิม (wild type)	42

สารบัญรูป

รูป	หน้า
รูปที่ 1 การเข้าจับเชิงโมเลกุล	2
รูปที่ 2 สมมติฐานการเหนี่ยวนำ	3
รูปที่ 3 กลไกการกระตุ้นไอโซไนอะซิดให้ออกฤทธิ์ได้	4
รูปที่ 4 หน้าต่างการคำนวณโดยใช้ Vina docking	11
รูปที่ 5 ขนาดของกล่องขอบเขตค้นหาตามแกน x, y และ z	11
รูปที่ 6 ตัวอย่างการซ้อนทับของโครงสร้างตัวยับยั้งที่คำนวณด้วยตัวรับทั้ง 9 ชนิด	12
รูปที่ 7 ตัวอย่างลักษณะการเข้าจับของตัวยับยั้งใน x-ray structure (สีแดง) และจากโปรแกรม AutoDock Vina (สีน้ำเงิน) ในเอนไซม์ชนิดดั้งเดิม (wild type)	13
รูปที่ 8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) และค่าพลังงานการเข้าจับเชิงโมเลกุล (Binding energy) ของตัวยับยั้งทั้ง 31 ชนิดกับตัวรับชนิดดั้งเดิม (Wild type)	15
รูปที่ 9 ลักษณะการเข้าจับของตัวยั้บยั้งในเอนไซม์ชนิดกลายพันธุ์ I215A (สีชมพู) เปรียบเทียบกับในเอนไซม์ชนิดดั้งเดิม (wild type) (สีเขียว)	20
รูปที่ 10 ตัวอย่างโครงสร้างการเข้าจับระหว่างตัวยับยั้งและตัวรับชนิด Wild type (สีเหลือง) เทียบกับชนิดกลายพันธุ์ I21V (สีขาว), S94A (สีชมพู), I47T (สีฟ้า), D148G (สีน้ำเงิน), V203A (สีม่วง), I215A (สีเทา), T266E (สีเขียว) และ T266D (สีส้ม)	21
รูปที่ 11 โครงสร้างของอนุพันธ์ไอโซไนอะซิดชนิด 1i, 6i และLL-3858	21
รูปที่ 12 โครงสร้างการเข้าจับระหว่างตัวยับยั้ง LL-3858 กับตัวรับชนิด Wild type	22
รูปที่ 13 โครงสร้างการเข้าจับระหว่างตัวยับยั้ง LL-3858 กับตัวรับชนิดกลายพันธุ์สายพันธุ์ I21V	22
รูปที่ 14 โครงสร้างการเข้าจับระหว่างตัวยับยั้ง LL-3858 กับตัวรับชนิดกลายพันธุ์สายพันธุ์ S94A	22
รูปที่ 15 โครงสร้างการเข้าจับระหว่างตัวยับยั้ง LL-3858 กับตัวรับชนิดกลายพันธุ์สายพันธุ์ I47T	22
รูปที่ 16 โครงสร้างการเข้าจับระหว่างตัวยับยั้ง LL-3858 กับตัวรับชนิดกลายพันธุ์สายพันธุ์ D148G	23
รูปที่ 17 โครงสร้างการเข้าจับระหว่างตัวยับยั้ง LL-3858 กับตัวรับชนิดกลายพันธุ์สายพันธุ์ V203A	23
รูปที่ 18 โครงสร้างการเข้าจับระหว่างตัวยับยั้ง LL-3858 กับตัวรับชนิดกลายพันธุ์สายพันธุ์ I215A	23
รูปที่ 19 โครงสร้างการเข้าจับระหว่างตัวยับยั้ง LL-3858 กับตัวรับชนิดกลายพันธุ์สายพันธุ์ T266E	23
รูปที่ 20 โครงสร้างการเข้าจับระหว่างตัวยับยั้ง LL-3858 กับตัวรับชนิดกลายพันธุ์สายพันธุ์ T266D	23

รูป หน้า

รูปที่ 21 โครงสร้างตัวยับยั้ง LL-3858 24

รูปที่ 19 โครงสร้างของตัวยับยั้งไอโซไนอะซิดและอนุพันธ์ของไอโซไนอะซิด 30

รูปที่ 20 โครงสร้างการเข้าจับระหว่างตัวยับยั้งและตัวรับชนิด Wild type (สีเหลือง) เทียบกับชนิดกลายพันธุ์ I21V (สีขาว), S94A (สีชมพู), I47T (สีฟ้า), D148G (สีน้ำเงิน), V203A (สีม่วง), I215A (สีเทา), T266E (สีเขียว) และ T266D (สีส้ม) 43

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

วัณโรค (tuberculosis หรือ TB) เป็นโรคติดต่ออันตราย แต่สามารถป้องกันและรักษาให้หายขาดได้ หากได้รับการรักษาอย่างต่อเนื่อง อย่างไรก็ตามปัจจุบันเชื้อที่ก่อให้เกิดวัณโรค (เชื้อแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis*) เกิดการดื้อต่อยารักษา [1,2] ประกอบกับผู้ป่วยในประเทศด้อยพัฒนาไม่ได้รับการรักษาที่ดี จึงทำให้มีผู้ป่วยเสียชีวิตด้วยโรคนี้เป็นจำนวนมากในแต่ละปี [3]

ปัจจุบันองค์การอนามัยโลกได้จัดให้ประเทศไทยเป็น 1 ใน 14 ประเทศของโลกที่มีภาระวัณโรค วัณโรคที่สัมพันธ์กับการติดเชื้อเอชไอวี และวัณโรคดื้อยาหลายขนานสูง จากรายงานองค์การอนามัยโลกปี พ.ศ. 2559 คาดประมาณว่า ประเทศไทยมีผู้ป่วยวัณโรครายใหม่ประมาณ 120,000 ราย ผู้ป่วยวัณโรคที่สัมพันธ์กับการติดเชื้อเอชไอวี 15,000 ราย และผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาหลายขนานหรือผู้ป่วยที่มีเชื้อวัณโรคดื้อต่อยาหลักอย่างน้อย 2 ชนิดคือ ไอโซไนอะซิด และ ไรแฟมพิซิน (multi-drug resistant-TB: MDR-TB) 4,500 ราย จากผลการดำเนินงานวัณโรคของประเทศไทยปี พ.ศ. 2559 พบว่า มีผู้ป่วยขึ้นทะเบียนรักษาวัณโรค 73,756 ราย โดยสามารถรักษาผู้ป่วยวัณโรคได้สำเร็จคิดเป็นเพียงร้อยละ 77.6 เท่านั้น ดังนั้นกระทรวงสาธารณสุขจึงได้เห็นชอบให้จัดตั้งแผนยุทธศาสตร์วัณโรคระดับชาติ พ.ศ. 2560-2564 ซึ่งมีเป้าหมายเร่งรัดให้เกิดความสำเร็จในการรักษาให้ได้ร้อยละ 90 โดยต้องลดการตาย ลดการขาดยา และพัฒนาระบบส่งต่อและติดตามผลการรักษา จึงจะส่งผลให้อุบัติการณ์วัณโรคลดลงอย่างรวดเร็วเพื่อจะยุติวัณโรคได้ [4]

จากสถิติข้างต้น ปัญหาการดื้อยาจึงนับเป็นปัญหาที่สำคัญ ยารักษาโรคติดเชื้อส่วนใหญ่จะมีกลไกการออกฤทธิ์โดยเข้าจับกับเอนไซม์ที่สำคัญของเชื้อโรคแล้วไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว ทำให้เชื้อโรคไม่สามารถดำเนินชีวิตตามปกติได้ การดื้อยาของเชื้อโรคมักจะเกิดมาจากการที่เอนไซม์เป้าหมายของยารักษาโรคนั้นเกิดการกลายพันธุ์ ทำให้ยาไม่สามารถเข้าจับได้ จึงไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นั้นได้ ดังนั้นข้อมูลเกี่ยวกับโครงสร้างการเข้าจับระหว่างเอนไซม์กับยารักษาโรคจึงเป็นข้อมูลที่สำคัญต่อการค้นคว้าพัฒนายารักษาโรคตัวใหม่ ในโครงการนี้จึงสนใจจะศึกษาเปรียบเทียบโครงสร้างการเข้าจับระหว่างยารักษาวัณโรคกับเอนไซม์ของเชื้อโรคชนิดดั้งเดิม (wild type) กับชนิดที่มีการกลายพันธุ์โดยใช้เทคนิคการคำนวณการเข้าจับเชิงโมเลกุล เพราะเป็นเทคนิคที่สามารถทำนายโครงสร้างการเข้าจับได้เป็นอย่างดี ประหยัดทั้งเวลาและเงินทุน

ในปี ค.ศ. 2017 Hu, Y.Q. และคณะ ได้รวบรวมข้อมูลของอนุพันธ์ของไอโซไนอะซิด (isoniazid) ซึ่งเป็นยาหลักต้านเชื้อวัณโรคชนิดหนึ่งไว้ด้วยกันทั้งหมด 12 กลุ่ม [5] ซึ่งอนุพันธ์แต่ละชนิดจะมีฤทธิ์เป็นสารยับยั้งเข้าจับกับเอนไซม์ของเชื้อวัณโรคต่าง ๆ กัน

ในปี ค.ศ. 2015 Nayak, N. และคณะ ได้ทำการคำนวณหาโครงสร้างการเข้าจับระหว่างอนุพันธ์ของไอโซไนอะซิดในกลุ่ม pyrazole กับเอนไซม์ของเชื้อวัณโรค [6] ผลการศึกษาพบว่า อนุพันธ์ของไอโซไนอะซิด

ในกลุ่ม pyrazole สามารถใช้เป็นต้นแบบโครงสร้างของยาชนิดใหม่ได้ เนื่องจากอาจยับยั้งเอนไซม์ enoyl-acyl carrier protein reductase (InhA) ได้ ซึ่งงานวิจัยนี้เป็นหนึ่งในข้อมูลที่ Hu, Y.Q. และคณะ [5] ได้รวบรวมเอาไว้ด้วยเช่นกัน

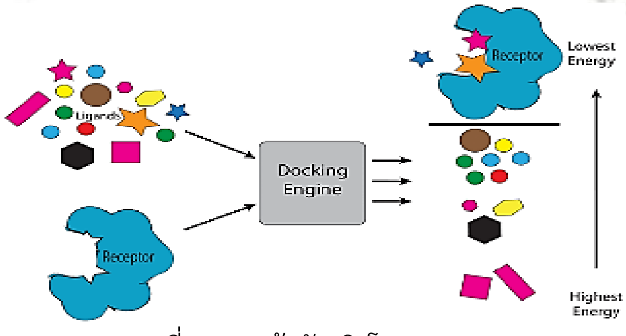
จากตัวอย่างงานวิจัยข้างต้นพบว่ายังมีผู้ศึกษาเกี่ยวกับการคำนวณหาการเข้าจับเชิงโมเลกุลระหว่างอนุพันธ์ของไอโซไนอะซิดกับเอนไซม์ของเชื้อวัณโรคดื้อยาชนิดอื่น ๆ โดยใช้โปรแกรมทางคอมพิวเตอร์ค่อนข้างน้อย ด้วยสาเหตุนี้จึงทำให้ผู้วิจัยเกิดความสนใจที่จะศึกษากลไกการดื้อยาของเชื้อวัณโรค จากการคำนวณหาการเข้าจับเชิงโมเลกุลระหว่างอนุพันธ์ของไอโซไนอะซิดกับเอนไซม์ของเชื้อวัณโรคดื้อยา โดยใช้โปรแกรมทางคอมพิวเตอร์ AutoDock Vina เข้ามาช่วย เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว และประหยัด

1.2 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

1.2.1 เทคนิคการเข้าจับเชิงโมเลกุลหรือโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้ง (molecular docking)

วัตถุประสงค์ของโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้ง คือ ทำนายลักษณะการวางตัวของสาร (ligand) เมื่อจับกับโมเลกุลหรือโปรตีนเป้าหมาย (target หรือ receptor) แล้วคำนวณหาค่าพลังงานการจับระหว่างสารกับโมเลกุลเป้าหมายนั้น โดยคำนวณจากทุกอันตรกิริยาที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ van der waals, hydrogen bonding, electrostatic และ hydrophobic จากนั้นนำค่าพลังงานการจับที่คำนวณได้มาเรียงลำดับ โดยที่ค่าพลังงานการจับต่ำสุดจะเป็นค่าการจับระหว่างสารกับโมเลกุลเป้าหมายที่เสถียรที่สุด [7] ดังแสดงในรูปที่ 1 ซึ่งจะเห็นได้ว่า โมเลกุลตัวรับ (สีฟ้า) มีโพรงการจับเป็นแฉกรูปดาวอยู่ 2 ตำแหน่ง ขณะที่สารที่ต้องการคัดกรองแทนด้วยรูปทรงเรขาคณิตสีต่างๆ เมื่อทดสอบการจับกับของสารกับโมเลกุลตัวรับ ด้วยเทคนิคโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้ง จะเห็นว่ารูปทรงเรขาคณิตอื่นๆ ซึ่งไม่สามารถเข้ากันได้กับบริเวณโพรงการจับของโมเลกุลตัวรับ เมื่อคำนวณค่าพลังงานการจับ จะได้ค่าที่สูง (ติดลบน้อย) ขณะที่โครงสร้างสารรูปดาว ซึ่งสามารถจับกับโมเลกุลตัวรับได้อย่างพอดี จะได้ค่าพลังงานการจับที่ต่ำ (ติดลบมาก)

ปัจจุบันเทคนิคโมเลคิวลาร์ด็อกกิ้ง มีโปรแกรมจำนวนมาก โดยโปรแกรมที่มีความนิยมหรือมีความถูกต้องในการทำนายสูง ได้แก่ AutoDock, AutoDock Vina และ GOLD เป็นต้น [8,9] ในงานวิจัยนี้เลือกใช้โปรแกรม AutoDock Vina เนื่องจากเป็นโปรแกรมฟรีเช่นเดียวกับ AutoDock แต่ถูกพัฒนาให้มีความถูกต้องและรวดเร็วมากขึ้น อีกทั้งยังแตกต่างจาก GOLD ที่ต้องมีการเสียค่าบริการ



รูปที่ 1 การเข้าจับเชิงโมเลกุล [7]

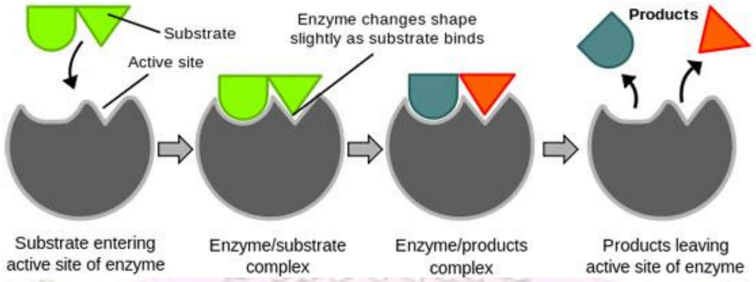
1.2.2 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

เอนไซม์ (enzyme) คือ กลุ่มของโปรตีนที่มีหน้าที่พิเศษแตกต่างจากโปรตีนทั่วไป คือ มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง เพื่อใช้ในการสังเคราะห์องค์ประกอบภายในเซลล์ ระบบการย่อยอาหาร ฯลฯ

เอนไซม์หรือในงานวิจัยนี้กำหนดให้เป็น “ตัวรับ” (receptor) มีความจำเพาะต่อสารที่ทำปฏิกิริยาที่เรียกว่า ซับสเตรท (substrate) โดยถ้ามีสารอื่นที่เข้ามาจับกับเอนไซม์แทนซับสเตรทแล้ว มีผลยับยั้งไม่ให้เอนไซม์สามารถทำงานได้ตามปกติ จะเรียกสารนั้นว่าเป็น “ตัวยับยั้ง” (inhibitor) หรือในงานวิจัยนี้กำหนดให้เป็น “ลิแกนด์” (ligand)

ในการทำงานของเอนไซม์ หลักการเข้าทำปฏิกิริยาหรือการเข้าจับกันระหว่างเอนไซม์กับซับสเตรท จนกลายเป็นเอนไซม์-ซับสเตรทคอมเพล็กซ์ (enzyme-substrate complex) มีสมมติฐานที่อธิบายกลไกไว้ดังนี้

1. สมมติฐานแม่กุญแจกับลูกกุญแจ ที่เอนไซม์จะเปรียบเสมือนเป็นแม่กุญแจ ส่วนซับสเตรทคือลูกกุญแจ การที่จะไขแม่กุญแจได้ ต้องใช้ลูกกุญแจที่จำเพาะเจาะจงกับแม่กุญแจนี้เท่านั้น เช่นเดียวกันซับสเตรทต้องมีรูปร่างจำเพาะเจาะจงถึงจะรวมกับเอนไซม์และเกิดปฏิกิริยาจนกลายเป็นผลิตภัณฑ์ได้
2. สมมติฐานการเหนี่ยวนำ บริเวณเร่ง (active site) จะสามารถยืดหยุ่นและเปลี่ยนสภาพได้เมื่อซับสเตรทเข้าใกล้บริเวณเร่งของเอนไซม์ ซับสเตรทจะเหนี่ยวนำให้เอนไซม์เปลี่ยนโครงรูปบริเวณเร่งให้มีรูปร่างและขนาดพอเหมาะที่จะรวมกับซับสเตรทได้ ดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 สมมติฐานการเหนี่ยวนำ [20]

ในการยับยั้งเอนไซม์ ปฏิกิริยาเคมีอาจหยุดชะงักได้ด้วยสารประเภทหนึ่งที่เราเรียกว่า “ตัวยับยั้งเอนไซม์” (inhibitor) ซึ่งจะมีอยู่ 3 แบบ คือ

1. ตัวยับยั้งแบบถาวร เป็นสารที่จับกับเอนไซม์อย่างถาวรด้วยพันธะโควาเลนต์ จนกลายเป็นสารประกอบที่เสถียรทำให้เอนไซม์ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้อีก
2. ตัวยับยั้งแบบชั่วคราว เป็นตัวยับยั้งที่เกาะอยู่บนโมเลกุลของเอนไซม์อย่างชั่วคราวด้วยอันตรกิริยาอื่น ๆ (ที่ไม่ใช่พันธะโควาเลนต์) จึงมีโอกาสหลุดออกจากเอนไซม์กลับสู่สภาพเดิมได้
3. ตัวยับยั้งแบบย้อนกลับ เป็นตัวยับยั้งที่เกิดจากปฏิกิริยาที่มีปริมาณมากจนเกินพอ ที่สามารถยับยั้งการทำงาน

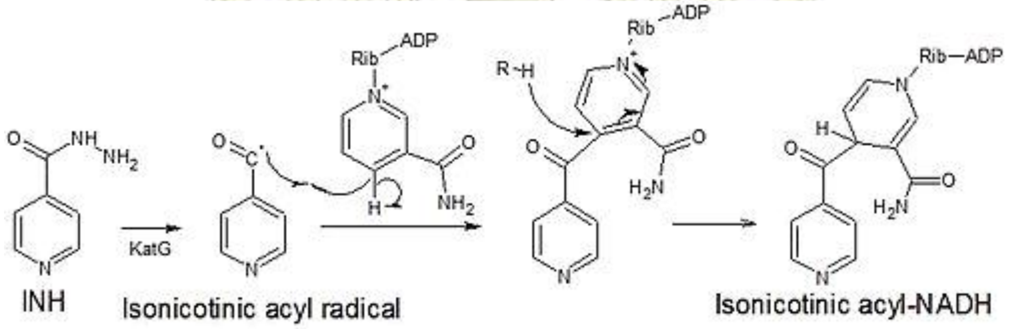
ของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาขั้นแรกในวิถีเมแทบอลีซึม (metabolism) ได้ ซึ่งการยับยั้งรูปแบบนี้จะพบได้ในกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน คอเลสเตอรอล กรดอะมิโนนิวคลีโอไทด์ และในเมแทบอลิซึมคาร์โบไฮเดรต [10]

1.2.3 กลไกการออกฤทธิ์ของยาไอโซไนอะซิด (isoniazid)

ไอโซไนอะซิด (isoniazid, INH) เป็น prodrug หรือยาที่ไม่สามารถออกฤทธิ์ได้เอง ต้องถูกกระตุ้นก่อนจึงจะสามารถออกฤทธิ์ได้ โดยจะถูกกระตุ้นด้วยเอนไซม์ catalase-peroxidase ในเชื้อวัณโรค (*Mycobacterium tuberculosis*) ที่เรียกว่า KatG [11]

KatG จะกระตุ้นไอโซไนอะซิดให้เกิดเป็น acyl isonicotinic radical เพื่อใช้ในการจับกับ NADH กลายเป็น nicotinoyl-NAD แสดงดังรูปที่ 3 โดยคอมเพล็กซ์นี้จะไปยึดติดกับ enoyl-acyl carrier protein reductase (InhA) ซึ่งจะเป็นการยับยั้งการเข้าจับของซับสเตรดตามธรรมชาติคือ enoyl-acpM และยับยั้งการสังเคราะห์กรดไขมัน อีกทั้งกระบวนการนี้จะยับยั้งการสังเคราะห์กรด mycolic ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่จำเป็นในผนังเซลล์ของเชื้อ mycobacterial ทำให้เชื้อวัณโรคไม่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ [12]

ในงานวิจัยนี้สนใจที่จะศึกษาตัวยาไอโซไนอะซิดเพราะเป็นหนึ่งในตัวยาหลักที่ใช้ในการรักษาวัณโรค



รูปที่ 3 กลไกการกระตุ้นไอโซไนอะซิดให้ออกฤทธิ์ได้

1.2.4 โปรแกรม AutoDock Vina

AutoDock Vina เป็นโปรแกรมสำหรับคำนวณการเข้าจับเชิงโมเลกุล (molecular docking) และการคัดกรองเสมือนจริง (virtual screening) โปรแกรมจะทำนายการเข้าจับกันระหว่างโครงสร้างของตัวรับและตัวยับยั้ง โดยใช้ genetic algorithm [13] ทำการสุ่มบริเวณช่องว่างภายในตัวรับ รวมถึงบริเวณที่ตัวยับยั้งเข้าจับกับตัวรับอยู่ตลอดเวลา เพื่อหาตำแหน่งและทิศทางที่เหมาะสมของตัวยับยั้งในการเข้าจับกับตัวรับ ซึ่งการเข้าจับนี้มีความจำเพาะสูง แต่บางครั้งการสุ่มนี้อาจจะไม่ใช่ตำแหน่งที่ตัวยับยั้งเข้าจับกับบริเวณเร่งจริงของตัวรับตามผลทางโครงสร้างเอกซเรย์ โดยโปรแกรมจะทำการหาโครงสร้างที่เสถียร (optimization) และคำนวณ

พลังงานเพื่อให้ได้โครงสร้างที่มีค่าพลังงานต่ำที่สุด โดยใช้วิธีทางกลศาสตร์ควอนตัม ซึ่งเป็นวิธีที่มีความถูกต้องและแม่นยำสูง แต่อาจใช้เวลาในการคำนวณมาก ดังนั้นจึงเหมาะกับการคำนวณระบบขนาดเล็ก

โปรแกรมนี้ใช้ scoring functions [14] ที่มีหน้าที่และพารามิเตอร์ที่หลากหลาย ซึ่งจะดูจากความเหมาะสมในการเข้าจับกันระหว่างตัวรับและตัวยับยั้งที่ใช้ สามารถคำนวณค่าพลังงานการเข้าจับ (binding energy) ได้จากระยะทางที่ขึ้นกับแรงกระทำระหว่างคู่อะตอมได้ ดังสมการต่อไปนี้

$$E = \Sigma e_{pair}(d)$$

โดยที่ d คือ ระยะทางระหว่างพื้นผิวของสองอะตอม

$$d = r - R_i - R_j$$

โดยที่ r คือ ระยะทางระหว่างสองอะตอม R_i และ R_j คือ รัศมีของอะตอมทั้งสอง

$$e_{pair}(d) = [w_1 \times Gauss_1(d)] + [w_2 \times Gauss_2(d)] + [w_3 \times Repulsion(d)] + [w_4 \times Hydrophobic(d)] + [w_5 \times H\text{-}Bond(d)]$$

โดยทั่วไป ทุก ๆ แรงกระทำของคู่อะตอม จะมี 3 พจน์แรกเป็นองค์ประกอบ แต่บางชนิดอะตอม อาจมีผลของแรง hydrophobic และผลของพันธะไฮโดรเจนด้วย เห็นได้ว่าโปรแกรมนี้มีความรวดเร็ว แม่นยำในการคำนวณ และเป็นที่นิยม อีกทั้งยังใช้งานง่ายจึงเหมาะกับงานวิจัยในครั้งนี้

1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปี ค.ศ. 2006 Oliveira, J.S. และคณะ [15] ได้ศึกษาความแตกต่างของโครงสร้างผลึก InhA ชนิดดั้งเดิมและชนิดกลายพันธุ์ ได้แก่ I21V, S94A และ I47T ที่มีผลต่อการต้านทานยาไอโซไนอะซิด งานวิจัยนี้บ่งชี้ว่าโครงสร้างของ InhA ที่มีการกลายพันธุ์ส่งผลให้ยาไอโซไนอะซิดมีประสิทธิภาพในการเข้าจับน้อยลง

ในปีเดียวกัน Molle, V. และคณะ [16] ได้ศึกษาการเกิด phosphorylation ของ InhA 2 สายพันธุ์ ได้แก่ T266E และ T266D โดย Thr-266 เป็น kinase phosphoacceptor พบว่าเมื่อเกิดการกลายพันธุ์ดังกล่าวจะลดความสามารถในการเข้าจับของ NADH ใน InhA ทำให้ต้านการสังเคราะห์ mycolic acid และการเจริญเติบโตใน *Mycobacterium* สายพันธุ์ smegmatis งานวิจัยนี้บ่งชี้ว่าการเกิด phosphorylation ของ InhA อาจเป็นกลไกที่ผิดปกติในทำนองเดียวกับการใช้ยาไอโซไนอะซิดในการรักษาเชื้อวัณโรค ดังนั้นจึงถูกนำมาเสนอเป็นแนวทางใหม่ในการพัฒนายาต้านวัณโรคในอนาคต

ในปี ค.ศ. 2007 Dias, M.V. และคณะ [17] ได้ศึกษากลไกการทำงานของโมเลกุลยาและการต้านทานต่อยาไอโซไนอะซิด ซึ่งเป็นยาที่นิยมใช้ในการรักษาวัณโรคจากผลโครงสร้างเอกซเรย์ งานวิจัยนี้บ่งชี้ว่ายา

ไอโซไนอะซิดเป็น pro-drug ที่ต้องเข้ายึดจับกับ NADH เกิดเป็น isonicotinyl-NAD ก่อน ยาจึงจะสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ NADH-dependent enoyl-acyl carrier protein reductase (InhA) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ใน mycobacterial ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ mycolic acid ชนิดสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) ได้ อีกทั้งยังศึกษาโครงสร้างของ InhA ชนิดกลายพันธุ์ (I21V และ S94A) ที่ต้านทานต่อยาไอโซไนอะซิดเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนายาที่มีประสิทธิภาพในอนาคต

ในปี ค.ศ. 2012 Hartkoorn, R.C. และคณะ [18] ได้ศึกษาประสิทธิภาพในการเป็นตัวยับยั้งของ pyridomycin ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติมีฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ mycolic acid ของ InhA ชนิดกลายพันธุ์คือ D148G ที่มีประสิทธิภาพเหมือนยาไอโซไนอะซิด ซึ่งใช้เป็นโครงสร้างต้นแบบในการพัฒนายาได้

ในปี ค.ศ. 2015 Lai, C.T. และคณะ [19] ได้ศึกษาผลของการกลายพันธุ์ของ InhA ชนิด V203A และ I215A ที่เกิดจากการเปลี่ยน valine และ isoleucine เป็น alanine ตามลำดับ โดยมีตัวยับยั้งเป็น 5-hexyl-2-(2-methylphenoxy)phenol ซึ่งใช้เป็นโครงสร้างต้นแบบในการพัฒนายาได้

ในปี ค.ศ. 2017 Hu, Y.Q. และคณะ [5] เห็นถึงความสำคัญในการคิดค้นและพัฒนาตัวยาเพื่อนำมาใช้รักษาวัณโรคที่กำลังเป็นโรคระบาดไปทั่วโลก ซึ่งเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) ปัจจุบันเชื้อวัณโรคเกิดกลายพันธุ์จนเป็นเชื้อโรคดื้อยา ทำให้ยาที่ใช้อยู่ส่วนใหญ่ขาดประสิทธิภาพ Hu, Y.Q. และคณะ จึงได้รวบรวมข้อมูลของอนุพันธ์ของไอโซไนอะซิด (isoniazid) ซึ่งเป็นยาหลักต้านเชื้อวัณโรคชนิดหนึ่งไว้ด้วยกันทั้งหมด 12 กลุ่ม ได้แก่ azole, pyrazoline, pyrrole, triazine, 2-azetidinone, thiazolidinone/thiazolidinedione, isatin, quino(xa)line, furoxan, trans-cinnamic acid, miscellaneous INH และ hydrazide-hydrazone derivatives เพื่อใช้เป็นฐานข้อมูลในการพัฒนาตัวยาต่อไปในอนาคต งานวิจัยนี้บ่งชี้ว่าอนุพันธ์ของไอโซไนอะซิดแต่ละชนิดมีฤทธิ์เป็นสารยับยั้งที่เข้าจับกับเอนไซม์ของเชื้อวัณโรคต่าง ๆ กัน และ LL-3858 เป็นอนุพันธ์ที่คาดว่ามีประสิทธิภาพมากเพียงพอที่จะถูกนำมาใช้ยาเป็นรักษาวัณโรคได้จริงในอนาคต

จากงานวิจัยที่ผ่านมา เห็นได้ว่า มีการศึกษาโครงสร้างเอนไซม์ของเชื้อวัณโรคชนิดกลายพันธุ์และการคิดค้นพัฒนายารักษาวัณโรคชนิดใหม่ ๆ อย่างต่อเนื่อง เพื่อนำมารักษาเชื้อวัณโรคดื้อยา ซึ่งการนำวิธีการคำนวณทางคอมพิวเตอร์เข้ามาช่วยในการทำนายหาโครงสร้างของยาที่มีความจำเพาะต่อเอนไซม์ของเชื้อวัณโรคจะช่วยลดระยะเวลาในขั้นตอนการคัดกรองหาสารยับยั้งก่อนนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในห้องปฏิบัติการ ดังนั้นงานวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาโครงสร้างการเข้าจับระหว่างอนุพันธ์ของไอโซไนอะซิด 30 โครงสร้าง กับเอนไซม์ของเชื้อวัณโรคชนิดดั้งเดิมเปรียบเทียบกับเอนไซม์ชนิดที่มีการกลายพันธุ์ 8 ชนิด ได้แก่ I21V, S94A, I47T, D148G, V203A, I215A, T266E และ T266D โดยใช้โปรแกรม AutoDock Vina เป็นโปรแกรมในการคำนวณการเข้าจับระหว่างตัวรับกับตัวยับยั้ง

1.4 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาเปรียบเทียบโครงสร้างการเข้าจับระหว่างอนุพันธ์ของไอโซไนอะซิดกับเอนไซม์ของเชื้อวัณโรคชนิดดั้งเดิมกับชนิดที่มีการกลายพันธุ์โดยใช้เทคนิคการคำนวณการเข้าจับเชิงโมเลกุล

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

โครงสร้างการเข้าจับระหว่างอนุพันธ์ของไอโซไนอะซิดกับเอนไซม์ของเชื้อวัณโรคทั้งชนิดดั้งเดิมและกลายพันธุ์ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการค้นคว้าและพัฒนายารักษาโรคตัวใหม่ที่มีประสิทธิภาพ

บทที่ 2
การทดลอง

2.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่เกี่ยวข้อง

2.1.1 ระบบฐานข้อมูล

โครงสร้างตัวรับ 9 โครงสร้าง นำมาจากฐานข้อมูล ชื่อ Protein Data Bank (PDB)

2.1.2 โปรแกรมที่เกี่ยวข้อง

2.1.2.1 VEGA ZZ เป็นโปรแกรมทาง molecular modeling ที่ใช้ในการเตรียมไฟล์รูปแบบต่าง ๆ เช่น เตรียมโครงสร้างของตัวรับ (receptor)

2.1.2.2 AutoDockTools-1.5.6 (ADT) เป็นส่วนหนึ่งของชุดโปรแกรม MGL Tools ซึ่งเป็นโปรแกรมนี้ใช้สำหรับเตรียมโครงสร้างตัวรับและตัวยับยั้ง

2.1.2.3 HyperChem Professional เป็นโปรแกรมสำหรับใช้สร้างโครงสร้างตัวยับยั้ง

2.1.2.4 AutoDock Vina เป็นโปรแกรมสำหรับใช้คำนวณการเข้าจับเชิงโมเลกุล

2.1.3 PDB code ของตัวรับชนิดดั้งเดิมและชนิดกลายพันธุ์รวม 9 โครงสร้าง

ตารางที่ 1 PDB code ของโครงสร้างตัวรับ 9 โครงสร้าง

Type	**PDB code**
Wild type	2IDZ
I21V	2IE0
I47T	2AQI
S94A	2IEB
D148G	4DQU
V203A	5COQ
I215A	5CPB
T266E	3OEY
T266D	3OF2

2.1.4 Code ของตัวยับยั้งรวม 31 โครงสร้าง

ตารางที่ 2 Code ของโครงสร้างตัวยับยั้ง 31 โครงสร้าง

Derivative	**Code**	Derivative	**Code**	Drug	**Code**
Azole	1a	Thiazolidinone/Thiazolidinedione	13e	Isoniazid	INH
	1i		13g		
	2h		14a		
Pyrazoline	5i	Isatin	16a		
	5t		16k		
	6i		16m		
Pyrrole	7a	Quino(xa)line	17a		
	7b		18e		
	LL-3858		18f		
Triazine	8a	Furoxan	19g		
	9g		19h		
	10a		19i		
2-Azetidinone	11a	Trans-cinnamic acid	20a		
	11e		20c		
	12g		20e		

2.2 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

2.2.1 การเตรียมโครงสร้างของตัวรับ (receptor)

- เปิดโปรแกรม ADT จากนั้นกดเมนู File ---> Read Molecule แล้วเลือกไฟล์โครงสร้างของตัวรับที่โหลดมาจากฐานข้อมูล Protein Data Bank (PDB) และได้ตัดโมเลกุลอื่น ๆ ออกแล้ว (นามสกุลไฟล์ .pdb) โดยโครงสร้างตัวรับแต่ละชนิดได้ทำการ superimpose กับ 2IDZ (wild type) โดยใช้ Swiss PDB Viewer 4.10, Iterative Magic Fit และ CA only)
- เลือกเมนู Edit ---> Hydrogens ---> Add แล้วเลือกช่อง Polar Only จากนั้นกดปุ่ม OK
- เลือกเมนู Edit ---> Atoms ---> Assign AD4 type เพื่อกำหนดชนิดของอะตอมให้ตรงตามที่โปรแกรม AutoDock Vina รู้จัก
- เลือกเมนู Grid ---> Macromolecule --> Choose แล้วเลือกชื่อที่เป็นไฟล์ตัวรับ กด Select

Molecule

- โปรแกรมจะทำการคำนวณประจุอะตอมแบบ Gasteiger ให้ และมีหน้าต่างแสดงข้อความผลลัพธ์ให้ กดปุ่ม OK แล้วเลือกโฟลเดอร์ที่ต้องการบันทึกไฟล์
- บันทึกไฟล์ตัวรับในนามสกุล .pdbqt

2.2.2 การเตรียมโครงสร้างของสารยับยั้ง (ligand)

- ใช้ HyperChem เพื่อวาดรูปโครงสร้างของสาร ทำการคำนวณปรับโครงสร้าง (geometry optimization) ด้วยวิธี Molecular Mechanics ชนิด MM+ จากนั้นบันทึกไฟล์ให้เป็นรูปแบบ MDL MOL (นามสกุล .mol)
- ใช้โปรแกรมแปลงไฟล์ให้เป็นรูปแบบ PDB
- เปิดโปรแกรม ADT แล้วเลือกเมนู Ligand ---> Input ---> Open
- เลือกประเภทของไฟล์เป็น pdb จากนั้นเลือกไฟล์โครงสร้างของสารยับยั้ง กด Open
- โปรแกรมจะทำการเปิดไฟล์ ผสานอะตอมไฮโดรเจนชนิดนอนโพลาร์ (อะตอมไฮโดรเจนที่ไม่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนได้) เข้ากับอะตอมที่มันต่ออยู่ พร้อมทั้งจัดเตรียมข้อมูลเกี่ยวกับพันธะที่หมุนได้ในโมเลกุลเพื่อทำ flexible docking ให้กดปุ่ม OK
- เลือกเมนู Ligand ---> Torsion Tree ---> Detect Root เพื่อให้โปรแกรมทำการตรวจหาตำแหน่งที่จะเป็นศูนย์กลางในการหมุนส่วนต่าง ๆ ของโมเลกุล (flexible docking)
- เลือกเมนู Ligand ---> Torsion Tree ---> Choose Torsions เพื่อให้โปรแกรมแสดงพันธะที่กำหนดให้หมุนในระหว่างการคำนวณ ถ้าโปรแกรมแสดงได้ถูกต้อง ให้กดปุ่ม Done ในหน้าต่าง Torsion Count
- บันทึกไฟล์ในรูปแบบ pdbqt โดยให้กดเมนู Ligand ---> Output ---> Save as PDBQT

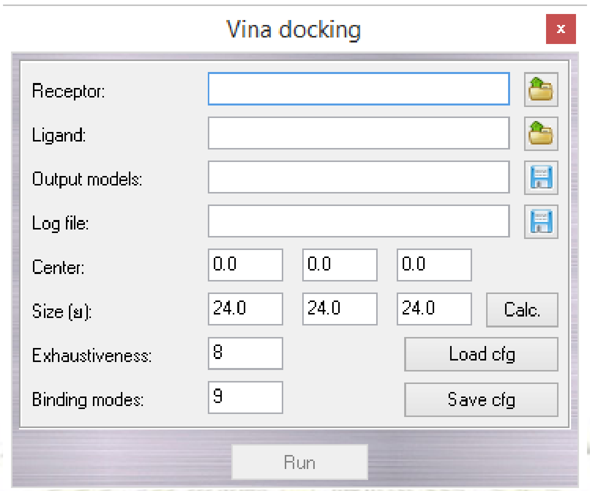
2.3 การคำนวณการเข้าจับเชิงโมเลกุลระหว่างตัวรับและตัวยับยั้ง

โปรแกรมที่ใช้ในการคำนวณการเข้าจับเชิงโมเลกุลระหว่างตัวรับและตัวยับยั้ง คือ โปรแกรม AutoDock Vina ซึ่งเป็นโปรแกรมที่รวดเร็วและมีความแม่นยำสูง

ขั้นตอนการคำนวณการเข้าจับเชิงโมเลกุล

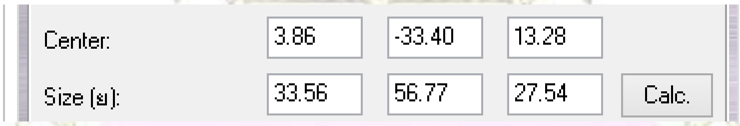
- เปิดไฟล์สารยับยั้งที่มาจากฐานข้อมูล Protein Data Bank (ไฟล์ที่มีเฉพาะโครงสร้างของสารยับยั้ง นามสกุลไฟล์ .pdb) ด้วยโปรแกรม VEGA ZZ

- เลือกเมนู Calculate --> Docking --> Vina docking
- ในหน้าต่าง Vina docking ให้กดปุ่ม Calc. โปรแกรมจะคำนวณจุดศูนย์กลางของโมเลกุล (center) ตามแกน x, y และ z ให้ รวมทั้งคำนวณขนาดของโมเลกุล (size) ตามแกน x, y และ z ให้ด้วย



รูปที่ 4 หน้าต่างการคำนวณโดยใช้ Vina docking

- กำหนดขนาดของกล่องขอบเขตค้นหาให้ครอบคลุมบริเวณที่จะเข้าจับ (binding site) เพื่อบอกให้โปรแกรม Vina ทำการค้นหาเฉพาะภายในบริเวณกล่องนี้เท่านั้น โดยให้ทำการบวกค่าขนาดของโมเลกุล (size) ในแต่ละแกนที่ได้จากข้อที่แล้วด้วย 15 และถ้าค่าในแกนใดมีค่าน้อยกว่า 22.5 ให้ปรับค่าเป็น 22.5 ซึ่งเป็นค่าที่เหมาะสมที่ให้ผลการวิเคราะห์อย่างมีประสิทธิภาพ [21] ค่าเหล่านี้คือขนาดของกล่องขอบเขตค้นหาตามแกน x, y และ z ตามลำดับ โดยให้ปรับค่าเป็นตัวเลขตามรูปสำหรับตัวรับ ดังแสดงในรูปที่ 5

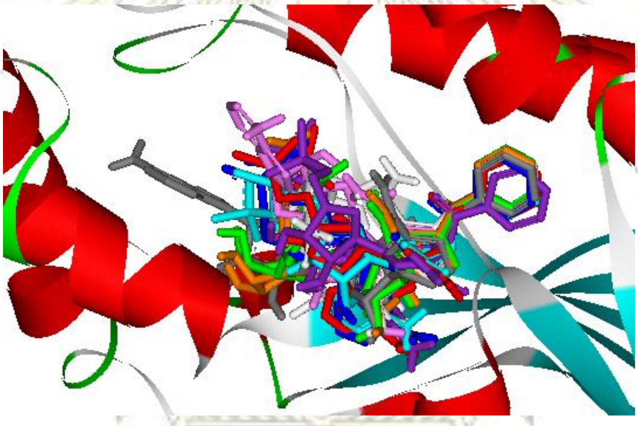


รูปที่ 5 ขนาดของกล่องขอบเขตค้นหาตามแกน x, y และ z

- กำหนดค่าพารามิเตอร์สำหรับการคำนวณ
  - กดปุ่ม Open เพื่อเลือกไฟล์ Receptor (ไฟล์ pdbqt ที่เตรียมจากข้อ 2.2.1)
  - กดปุ่ม Open เพื่อเลือกไฟล์ Ligand (ไฟล์ pdbqt ที่เตรียมจากข้อ 2.2.2)
  - ชื่อไฟล์ Output models: และ Log file: จะขึ้นให้โดยอัตโนมัติ
  - กดปุ่ม Run
- โปรแกรม VEGA ZZ จะไปเรียกโปรแกรม AutoDock Vina ขึ้นมาคำนวณ (จะมีหน้าต่างแสดงการคำนวณเปิดขึ้นมา) ให้รอจนกระทั่งการคำนวณเสร็จสิ้น

2.4 การวิเคราะห์ผลโครงสร้างการเข้าจับ

- เปิดไฟล์ผลการคำนวณ (ไฟล์ pdbqt ที่ได้จากข้อ 2.3 โดยดูชื่อไฟล์ได้จากช่อง Output models:) ด้วยโปรแกรม VEGA ZZ โปรแกรมจะแสดงโครงสร้างของสารยับยั้งที่ได้จากการคำนวณการเข้าจับ โดยเราสามารถเลือกดูโครงสร้างการเข้าจับแต่ละโหมดได้ (โปรแกรม AutoDock Vina จะบันทึกโหมดการเข้าจับไว้ 9 โหมด เรียงตามลำดับพลังงาน โดยโหมดการเข้าจับลำดับแรกจะมีพลังงานต่ำที่สุด) ให้บันทึกโครงสร้างโหมดการเข้าจับแรกสุด โดยให้กดเมนู File ---> Save As แล้วบันทึกไฟล์ในรูปแบบ Mol2
- ทำการเปิดโครงสร้างตัวรับที่มาจากข้อ 2.2.1 จากนั้นเปิดโครงสร้างของตัวยับยั้งที่ได้จากการคำนวณการเข้าจับกับทั้ง 9 ตัวรับ ได้แก่ Wild type, I21V, S94A, I47T, D148G, V203A, I215A, T266E และ T266D เพื่อเปรียบเทียบการเข้าจับเชิงโมเลกุลระหว่างอนุพันธ์ของไอโซไนอะซิดกับเอนไซม์ของเชื้อวัณโรคชนิดดั้งเดิมกับชนิดที่มีการกลายพันธุ์ ดังรูป



รูปที่ 6 ตัวอย่างการซ้อนทับของโครงสร้างตัวยับยั้งที่คำนวณด้วยตัวรับทั้ง 9 ชนิด

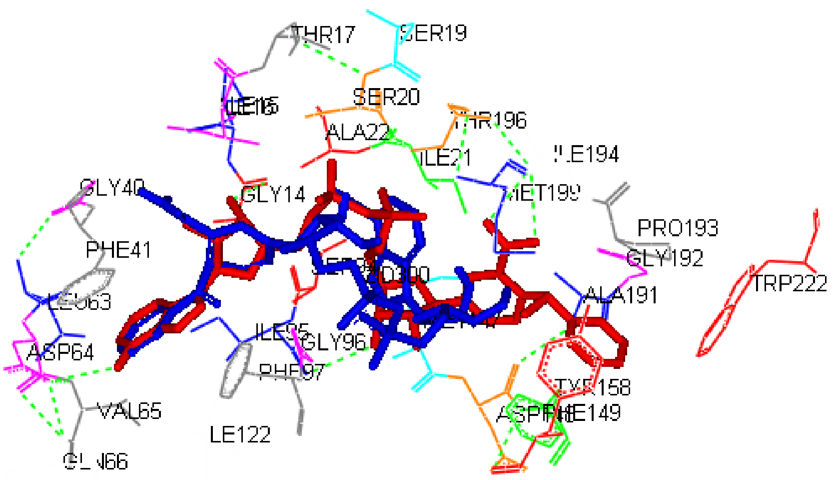
บทที่ 3

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

จากการศึกษาการเข้าจับเชิงโมเลกุลระหว่างโครงสร้างของยาไอโซไนอะซิดและอนุพันธ์ที่แตกต่างกัน 10 กลุ่ม ๆ ละ 3 ชนิด รวมเป็นจำนวน 31 ชนิด กับเอนไซม์ของเชื้อวัณโรคชนิดดั้งเดิม (wild type) และชนิดที่มีการกลายพันธุ์ ได้แก่ I21V, S94A, I47T, D148G, V203A, I215A, T266E และ T266D ย่อมมีพารามิเตอร์ที่แตกต่างกัน ทำให้ส่งผลต่อความถูกต้องแม่นยำและพลังงานในการทำนายโครงสร้าง หลังจากคำนวณการเข้าจับโดยใช้โปรแกรม AutoDock Vina ผู้วิจัยจึงเลือกโครงสร้างที่มีค่าพลังงานต่ำที่สุดมาเปรียบเทียบระหว่างโครงสร้างตัวยับยั้งที่อยู่ในเอนไซม์ของเชื้อวัณโรคชนิดดั้งเดิมกับชนิดที่มีการกลายพันธุ์ และมีการวิเคราะห์ผลการทดลองดังต่อไปนี้

3.1 การทดสอบความน่าเชื่อถือของโปรแกรม AutoDock Vina

จะทำการดึงโครงสร้างของตัวยับยั้งในเอนไซม์จากโครงสร้างทางเอกซเรย์ (x-ray structure) ออกแล้วทำการใส่กลับเข้าไปใหม่โดยใช้โปรแกรม AutoDock Vina จากผลการทดลอง พบว่า โครงสร้างของตัวยับยั้งอยู่ในตำแหน่งใกล้เคียงกับตำแหน่งเดิมในโครงสร้างทางเอกซเรย์ (x-ray structure) แต่มี conformation แตกต่างไปบ้าง ดังแสดงในรูปที่ 7 ซึ่งแสดงว่าโปรแกรม AutoDock Vina มีประสิทธิภาพในการนำมาใช้งานได้



รูปที่ 7 ตัวอย่างลักษณะการเข้าจับของตัวยับยั้งใน x-ray structure (สีแดง) และจากโปรแกรม AutoDock Vina (สีน้ำเงิน) ในเอนไซม์ชนิดดั้งเดิม (wild type)

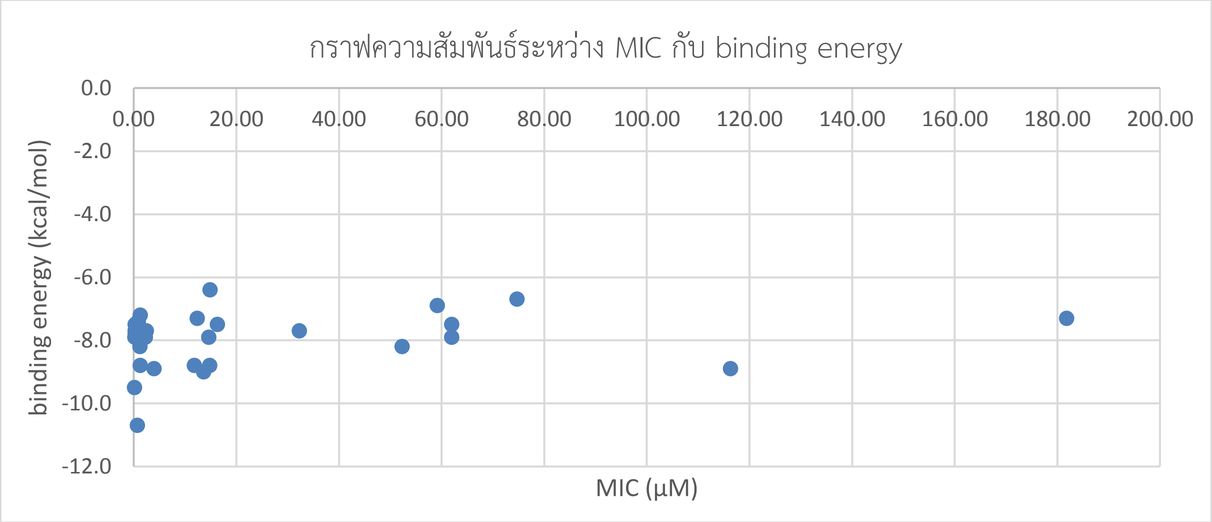
3.2 การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างค่า minimal inhibitory concentration (MIC) และค่าพลังงานการเข้าจับเชิงโมเลกุล (binding energy) ของอนุพันธ์ของไอโซไนอะซิดกับเอนไซม์ของเชื้อวัณโรคชนิดดั้งเดิม (wild type)

ผลการคำนวณพลังงานการเข้าจับเชิงโมเลกุล (binding energy) ของโครงสร้างตัวยับยั้งที่อยู่ในเอนไซม์ของเชื้อวัณโรคชนิดดั้งเดิม โดยใช้โปรแกรม AutoDock Vina ซึ่งเลือกโครงสร้างที่มีค่าพลังงานต่ำที่สุดมาเปรียบเทียบกับค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ที่ได้จากการทดลองในห้องปฏิบัติการที่มีผู้รายงานไว้ตามเอกสารอ้างอิง [21-30]

ตารางที่ 3 แสดงค่า minimal inhibitory concentration (MIC) และค่าพลังงานการเข้าจับเชิงโมเลกุล (binding energy) ของตัวยับยั้งทั้ง 31 ชนิดกับตัวรับชนิดดั้งเดิม (wild type)

ligand	**MIC (μM)**	**binding energy (kcal/mol)**
INH	0.73	-10.7
1a	0.78	-7.6
1i	0.29	-7.7
2h	2.50	-7.7
5i	116.30	-8.9
5t	52.30	-8.2
6i	0.26	-7.9
7a	14.90	-6.4
7b	74.70	-6.7
LL-3858	0.14	-9.5
8a	4.00	-8.9
9g	13.62	-9.0
10a	59.21	-6.9
11a	16.33	-7.5
11e	32.28	-7.7
12g	0.89	-7.5
13e	14.64	-7.9
13g	0.90	-7.4
14a	181.85	-7.3
16a	12.37	-7.3

Ligand	MIC (µM)	Binding energy (kcal/mol)
16k	0.31	-7.8
16m	14.83	-8.8
17a	62.00	-7.9
18e	1.22	-8.2
18f	0.58	-7.9
19g	62.00	-7.5
19h	11.82	-8.8
19i	1.30	-8.8
20a	0.30	-7.5
20c	1.30	-7.2
20e	2.30	-7.9



รูปที่ 8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า minimal inhibitory concentration (MIC) และค่าพลังงานการเข้าจับเชิงโมเลกุล (binding energy) ของตัวยับยั้งทั้ง 31 ชนิดกับตัวรับชนิดดั้งเดิม (wild type)

ผู้วิจัยตั้งสมมติฐานว่า การคำนวณการเข้าจับเชิงโมเลกุลระหว่างอนุพันธ์ของไอโซไนอะซิดกับเอนไซม์ของเชื้อวัณโรคชนิดดั้งเดิม จะให้ค่าพลังงานการเข้าจับ (binding energy) ที่มีความสัมพันธ์กับค่าการออกฤทธิ์ทางชีวภาพหรือค่า activity เนื่องจากงานวิจัยก่อนหน้า [7] ที่รายงานว่า ค่าพลังงานการจับต่ำสุดจะเป็นค่าการจับระหว่างสารกับโมเลกุลเป้าหมายที่เสถียรที่สุด ดังนั้น อนุพันธ์ของไอโซไนอะซิดที่มีค่า MIC ต่ำสุด น่าจะมีค่าพลังงานการเข้าจับต่ำสุดด้วยเช่นกัน แต่จากผลการคำนวณตามตารางที่ 3 และรูปที่ 8 พบว่า ไม่สามารถหาความสัมพันธ์ที่แน่นอนระหว่างค่าพลังงานการเข้าจับกับค่า activity ในการคำนวณครั้งนี้ได้ ทั้งนี้ ผู้วิจัยคิด

ว่าค่าพลังงานการเข้าจับนั้นไม่ใช่ปัจจัยหลักเพียงอย่างเดียวที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของตัวยับยั้ง อาจจะมีข้อกำหนดอื่น ๆ ทางการทดลองในห้องปฏิบัติการที่ส่งผลต่อค่า activity ของตัวยับยั้งร่วมด้วย เนื่องจากค่า activity ที่แสดงในตารางที่ 3 รวบรวมมาจากหลายงานวิจัย [22-30] ซึ่งแต่ละงานวิจัยอาจจะใช้ข้อกำหนด (condition) ในการทดลองที่แตกต่างกัน จึงทำให้ผลการทดลองไม่เป็นไปตามสมมติฐานที่ตั้งไว้ และผู้วิจัยคิดว่าโปรแกรมที่ใช้ในการคำนวณนั้นเป็นเพียงการสุ่มหาโครงสร้างและตำแหน่งที่ให้พลังงานการเข้าจับต่ำสุดตามที่ประสิทธภาพของโปรแกรมจะสามารถทำได้ ทำให้โครงสร้างและตำแหน่งการเข้าจับนั้นอาจเกิดความคลาดเคลื่อนไปจากตำแหน่งจริงได้

3.3 การวิเคราะห์หา amino acid residue ที่อยู่บริเวณใกล้กับอนุพันธ์ของไอโซไนอะซิดในการเข้าจับกับเอนไซม์ของเชื้อวัณโรคชนิดดั้งเดิม (wild type)

ผลชนิดของ amino acid residue ของเอนไซม์ของเชื้อวัณโรคชนิดดั้งเดิม (wild type) ที่อยู่บริเวณใกล้กับอนุพันธ์ของไอโซไนอะซิดในรัศมี 6 Å และการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง amino acid residue กับอนุพันธ์ของไอโซไนอะซิด

ตารางที่ 4 แสดง Amino acid residue ของตัวรับชนิดดั้งเดิม (Wild type) ที่พบใกล้กับตัวยับยั้งทั้ง 31 ชนิดในรัศมี 6 Å และการเกิดพันธะไฮโดรเจน (ช่องสีเทา)

Amino acid residue		INH	1a	1i	2h	5i	5t	6i	7a	7b	LL-3858	8a	9g	10a	11a	11e	12g	13e	13g	14a	16a	16k	16m	17a	18e	18f	19g	19h	19i	20a	20c	20e
GLY	14	✓																														
	40	✓																														
	96	✓	✓	✓	✓	**✓**	✓	✓	✓	✓	✓	**✓**	**✓**	**✓**	✓	✓	**✓**	✓	✓	✓	**✓**	✓	✓	**✓**	✓	**✓**	✓	✓	✓	**✓**	✓	✓
ALA	22	✓																														
	198	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	201			✓		✓																										
	206					✓							✓																			
SER	20	✓																														
	94	**✓**																														
THR	17						✓																				✓					
	196	✓				✓						✓		✓														✓	✓			
VAL	65	✓																														
LEU	63	✓																														
	197			✓		✓	✓										✓										✓					
	207					✓																										
ILE	15	✓																														
	16	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓			✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓		✓	✓	✓	✓
	21	✓																														
	95	✓																														
	122	✓																														

Amino acid residue		INH	1a	1i	2h	5i	5t	6i	7a	7b	LL-3858	8a	9g	10a	11a	11e	12g	13e	13g	14a	16a	16k	16m	17a	18e	18f	19g	19h	19i	20a	20c	20e
ILE	194	✓																														
	202			✓		✓							✓			✓							✓									
MET	98	✓	✓	✓			✓	✓	✓			✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓							✓				✓	
	103				✓	✓			✓				✓			✓						✓	✓									
	147	✓																														
	161	✓	✓		✓			✓	✓	✓	✓	✓	✓			✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	199	✓	✓	✓	✓	✓			✓	✓	✓	✓		✓		✓	✓	✓			✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
PRO	99												✓				✓						✓									✓
	193	✓											✓				✓						✓									✓
PHE	41		✓	✓	✓		✓	✓			✓	✓								✓	✓		✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓
	97	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	149	✓									✓			✓				✓		✓			✓			✓						
TYR	158				✓				✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓			✓	✓	✓			✓		✓	✓	✓	✓	✓
ASP	42							✓			✓											✓						✓	✓	✓	✓	
	64	✓																														
GLN	66	✓																														
	100			✓		✓						✓	✓			✓						✓	✓		✓							
LYS	118		✓								✓				✓				✓	✓					✓			✓				✓
	165																						✓									
ARG	43		✓					✓			✓																✓	✓	✓	✓		
ZID	300	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

จากตารางที่ 4 พบว่า amino acid residue ของเอนไซม์ของเชื้อวัณโรคชนิดดั้งเดิม (wild type) ที่อยู่บริเวณใกล้กับอนุพันธ์ของไอโซไนอะซิดในรัศมี 6 Å นั้น มีอยู่ 3 residues ที่สามารถพบได้กับตัวยับยั้งทุกชนิด ได้แก่ Gly96, Phe97 และ Ala198 และยังพบโมเลกุลของ ZID300 ซึ่งเป็นโมเลกุลของ NADH ที่ตัวยับยั้งส่วนใหญ่เกิดพันธะไฮโดรเจนได้ จากผลข้างต้น ผู้วิจัยคิดว่า amino acid residue ทั้ง 3 ชนิดนี้และ NADH เป็นโมเลกุลที่มีความสำคัญต่อการเข้าจับในบริเวณเร่งของเอนไซม์ของเชื้อวัณโรคชนิดดั้งเดิม ซึ่งมีความจำเพาะกับวงไอโซไนอะซิดที่เป็นวงหลักของอนุพันธ์ตัวยับยั้งทุกชนิด โดยโมเลกุลของ NADH นั้นสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้า [12,17] ที่รายงานว่า ไอโซไนอะซิดต้องเข้าจับกับ NADH ก่อนจึงจะสามารถออกฤทธิ์ในการยับยั้งได้ จึงพบ NADH ในบริเวณใกล้กับอนุพันธ์ตัวยับยั้งทุกชนิดได้

3.4 การวิเคราะห์ค่าพลังงานการเข้าจับเชิงโมเลกุล (binding energy) ของอนุพันธ์ของไอโซไนอะซิดในการเข้าจับกับเอนไซม์ของเชื้อวัณโรคชนิดดั้งเดิม (wild type) เปรียบเทียบกับเอนไซม์ของเชื้อวัณโรคชนิดที่มีการกลายพันธุ์

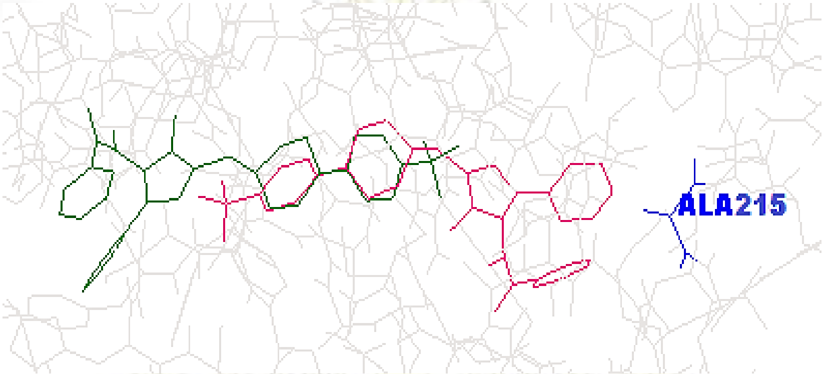
ผลความแตกต่างของค่า binding energy ของโครงสร้างการเข้าจับระหว่างตัวยับยั้งทั้ง 31 ชนิดกับตัวรับชนิดกลายพันธุ์ 8 ชนิด ได้แก่ I21V, S94A, I47T, D148G, V203A, I215A, T266E และ T266D เมื่อเทียบกับการเข้าจับกับตัวรับชนิดดั้งเดิม

ตารางที่ 5 แสดงค่าเฉลี่ยของค่าพลังงานการเข้าจับเชิงโมเลกุล (binding energy) และค่าพลังงานสัมพัทธ์ของการเข้าจับเชิงโมเลกุล (relative binding energy) ของตัวยับยั้งทั้ง 31 ชนิดกับตัวรับชนิดกลายพันธุ์เทียบกับชนิดดั้งเดิม (Wild type)

average (kcal/mol)	wild type	I21V	S94A	I47T	D148G	V203A	I215A	T266E	T266D
binding energy	-8.0	-7.8	-8.0	-7.4	-7.9	-8.4	-9.1	-8.2	-8.2
relative binding energy	0.0	0.2	0.0	0.6	0.1	-0.4	-1.1	-0.2	-0.2

จากผลดังตารางที่ 5 ข้างต้น พบว่าตัวยับยั้งทั้ง 31 ชนิดสามารถเข้าจับกับเอนไซม์ชนิดกลายพันธุ์ 4 ชนิด ได้แก่ V203A, I215A, T266E และ T266D ได้ดีกว่าการเข้าจับในเอนไซม์ชนิดดั้งเดิม เนื่องจากมีค่า relative binding energy ต่ำกว่า เมื่อพิจารณาลักษณะการเข้าจับของตัวยับยั้งที่สามารถเข้าจับกับเอนไซม์ชนิดกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิดได้ดีกว่าการเข้าจับในเอนไซม์ชนิดดั้งเดิม พบว่า ลักษณะการเข้าจับของตัวยั้บยั้งใน

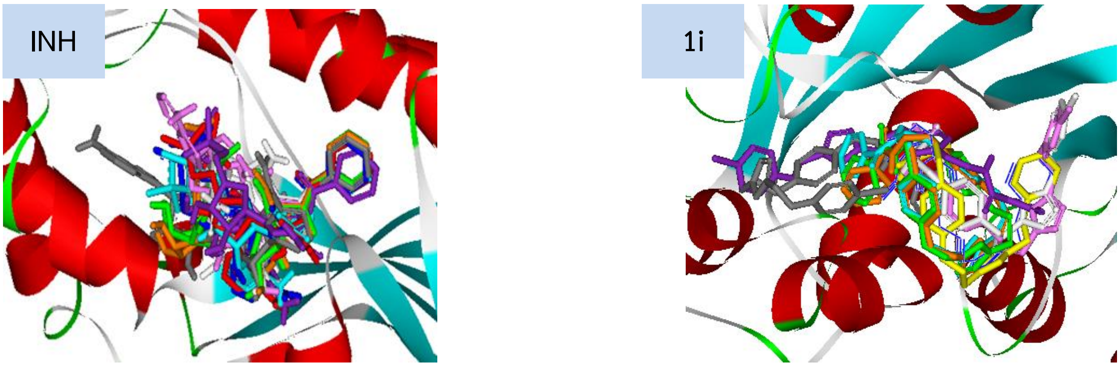
เอนไซม์ชนิดกลายพันธุ์ I215A ซึ่งเกิดกลายพันธุ์ของกรดอะมิโน isoleucine มาเป็น alanine ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่า ผู้วิจัยจึงตั้งสมมติฐานว่า อาจส่งผลให้พื้นที่ในการเข้าจับเพิ่มขึ้น ตัวยับยั้งจึงสามารถเข้าจับได้ดีกว่าในเอนไซม์ชนิดดั้งเดิม ดังแสดงในรูปที่ 9 แต่เมื่อพิจารณาลักษณะการเข้าจับของตัวยั้บยั้งในเอนไซม์ชนิดกลายพันธุ์ V203A, T266E และ T266D พบว่า ไม่เห็นความแตกต่างของการเข้าจับกับเอนไซม์ชนิดดั้งเดิมที่ชัดเจน ผู้วิจัยจึงยังไม่ทราบเหตุผลที่แน่ชัดที่ทำให้การเข้าจับของตัวยั้บยั้งกับเอนไซม์ชนิดกลายพันธุ์ทั้ง 3 ชนิดนี้ดีกว่าการเข้าจับในเอนไซม์ชนิดดั้งเดิม ซึ่งอาจจะต้องรอผลในการทดลองทางห้องปฏิบัติการต่อไป



รูปที่ 9 ลักษณะการเข้าจับของตัวยั้บยั้งในเอนไซม์ชนิดกลายพันธุ์ I215A (สีชมพู) เปรียบเทียบกับในเอนไซม์ชนิดดั้งเดิม (wild type) (สีเขียว)

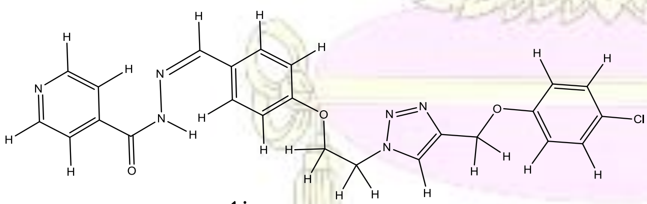
3.5 การวิเคราะห์หาอนุพันธ์ของไอโซไนอะซิดที่มีลักษณะการเข้าจับของตัวมันเองคล้ายกันทั้งในเอนไซม์ของเชื้อวัณโรคชนิดดั้งเดิม (wild type) กับชนิดที่มีการกลายพันธุ์

นำโครงสร้างของตัวยับยั้งที่ได้จากการคำนวณการเข้าจับเชิงโมเลกุลกับทั้ง 9 ตัวรับ ได้แก่ wild type, I21V, S94A, I47T, D148G, V203A, I215A, T266E และ T266D มาเปรียบเทียบกัน (ภาคผนวก, รูปที่ 23) เมื่อพิจารณาผลโครงสร้างการเข้าจับเชิงโมเลกุลระหว่างอนุพันธ์ของไอโซไนอะซิดกับเอนไซม์ของเชื้อวัณโรคชนิดดั้งเดิมกับชนิดที่มีการกลายพันธุ์ พบว่า มีตัวยับยั้ง 7 ชนิดที่มีลักษณะการเข้าจับของตัวมันเองคล้ายกันทั้งในเอนไซม์ชนิดดั้งเดิม (wild type) กับชนิดที่มีการกลายพันธุ์ ได้แก่ อนุพันธุ์ชนิด 1i, 6i, LL-3858, 11a, 11e, 19h และ 19i ซึ่งมีรูปแบบเดียวกับการเข้าจับของโครงสร้างยาไอโซไนอะซิด (INH) ที่มีลักษณะการเข้าจับของตัวมันเองคล้ายกันทั้งในเอนไซม์ชนิดดั้งเดิม (wild type) กับชนิดที่มีการกลายพันธุ์ ดังแสดงในรูปที่ 10

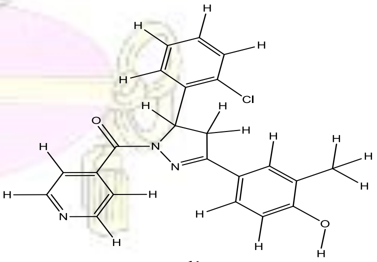


รูปที่ 10 ตัวอย่างโครงสร้างการเข้าจับระหว่างตัวยับยั้งและตัวรับชนิด Wild type (สีเหลือง) เทียบกับชนิดกลายพันธุ์ I21V (สีขาว), S94A (สีชมพู), I47T (สีฟ้า), D148G (สีน้ำเงิน), V203A (สีม่วง), I215A (สีเทา), T266E (สีเขียว) และ T266D (สีส้ม)

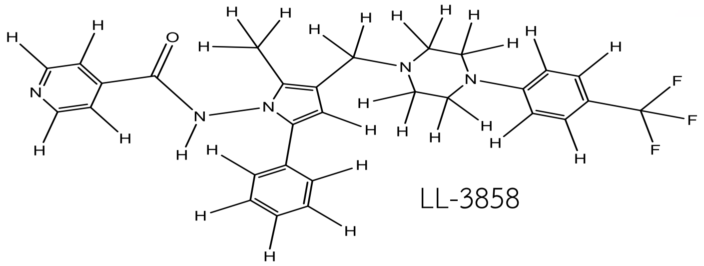
ผู้วิจัยจึงตั้งสมมติฐานว่า ตัวยับยั้งทั้ง 7 ชนิดนี้อาจมีความจำเพาะต่อโมเลกุลบางตัวที่มีเหมือนกันทั้งในตัวรับชนิดดั้งเดิมและชนิดกลายพันธุ์ และเนื่องจากการที่มีลักษณะการเข้าจับของตัวมันเองคล้ายกันทั้งในเอนไซม์ชนิดดั้งเดิม (wild type) กับชนิดที่มีการกลายพันธุ์ ดังนั้นตัวยับยั้งที่มีค่า activity สูงในการออกฤทธิ์กับเอนไซม์ชนิดดั้งเดิม (wild type) น่าจะมีความเป็นไปได้ที่จะสามารถออกฤทธิ์ได้ดีกับเอนไซม์ชนิดกลายพันธุ์เช่นกัน เมื่อพิจารณาค่า MIC จากตารางที่ 3 พบว่าในอนุพันธ์ทั้ง 7 ชนิดข้างต้น มีอนุพันธ์ที่มีค่า MIC ต่ำกว่ายาไอโซไนอะซิด ได้แก่ 1i, 6i และLL-3858 ซึ่งน่าจะเป็นอนุพันธ์ที่ประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์กับเอนไซม์ชนิดกลายพันธุ์ได้ และเมื่อพิจารณาจากโครงสร้างของอนุพันธุ์ทั้ง 3 ชนิด ดังแสดงในรูปที่ 11 พบว่า โครงสร้างของอนุพันธ์ทั้ง 3 ชนิดมีอะตอมของธาตุในหมู่ฮาโลเจนที่มีความสามารถในการเข้าจับได้ดีกับโมเลกุลที่ชอบให้อิเล็กตรอน ซึ่งผู้วิจัยคิดว่าน่าจะเป็น NADH เนื่องจากเป็นโมเลกุลที่ชอบให้อิเล็กตรอน (reducing agent) อีกทั้งยังพบในอยู่ในโครงสร้างของเอนไซม์ชนิดดั้งเดิมและชนิดกลายพันธุ์ทุกชนิดด้วย



1i



6i



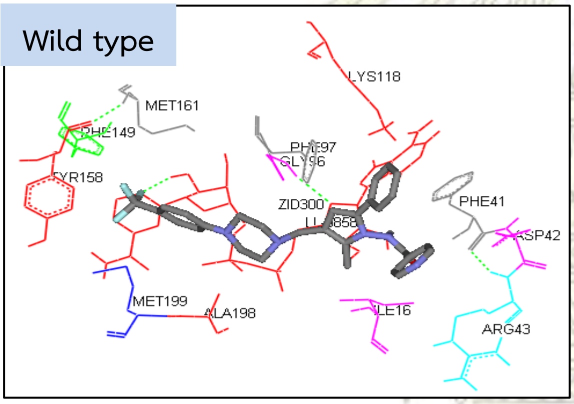
LL-3858

รูปที่ 11 โครงสร้างของอนุพันธ์ไอโซไนอะซิดชนิด 1i, 6i และLL-3858

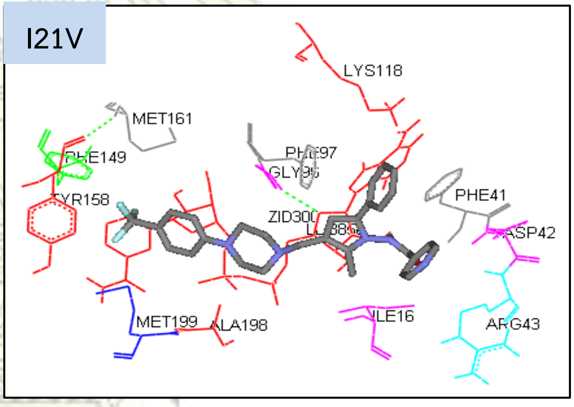
ส่วนลักษณะการเข้าจับของตัวยับยั้งต่างชนิดในตัวรับชนิดเดียวกัน ก่อนหน้านี้ผู้วิจัยได้สันนิษฐานไว้ว่า วงหลักของไอโซไนอะซิด (ภาคผนวก, รูปที่ 22) ของตัวยับยั้งทุกสารน่าจะมีตำแหน่งในการเข้าจับในตัวรับชนิดเดียวกันที่เหมือนกัน แต่ที่ผลไม่เป็นเช่นนั้น อาจเป็นเพราะในโครงสร้างของตัวยับยั้ง ส่วนที่เป็นอนุพันธ์ส่งผลให้วงหลักของไอโซไนอะซิดไม่สามารถเข้าจับที่ตำแหน่งเดียวกันได้

3.6 การวิเคราะห์หารูปแบบการเข้าจับของตัวยับยั้งที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงสุด เมื่อพิจารณาจากค่า MIC ในการเข้าจับกับเอนไซม์ของเชื้อวัณโรคชนิดดั้งเดิม (wild type)

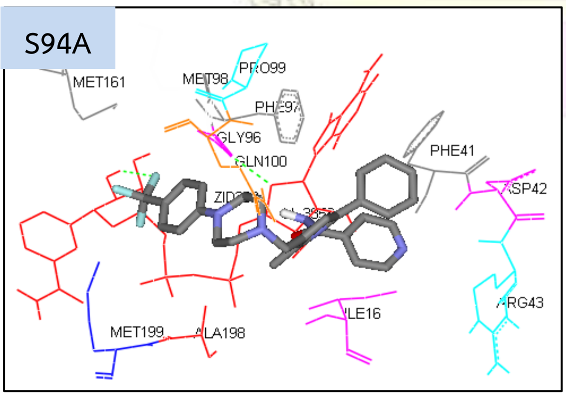
จากตารางที่ 3 พบว่า LL-3858 เป็นตัวยับยั้งที่มีค่า MIC ต่ำที่สุด แสดงว่าเป็นตัวยับยั้งที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงสุดเมื่อเข้าจับกับเอนไซม์ชนิดดั้งเดิม อีกทั้งในงานวิจัยของ Hu, Y.Q. และคณะ [5] ได้รายงานไว้ว่า LL-3858 เป็นอนุพันธ์ที่คาดว่ามีประสิทธิภาพมากเพียงพอที่จะถูกนำมาใช้ยาเป็นรักษาวัณโรคได้จริงในอนาคต ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษารูปแบบการเข้าจับเชิงโมเลกุลระหว่างตัวยับยั้งดังกล่าวกับตัวรับชนิดดั้งเดิม (wild type) และชนิดกลายพันธุ์ทั้ง 8 ชนิด ซึ่งได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 12-20



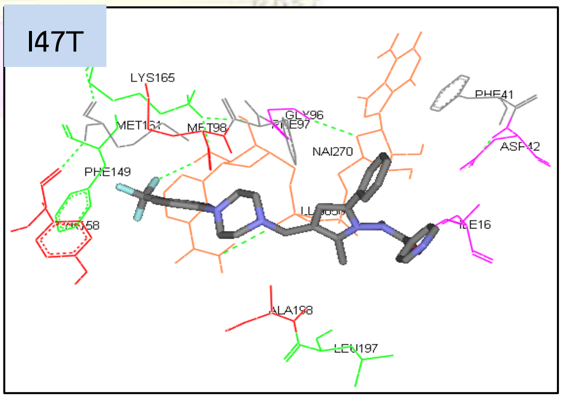
รูปที่ 12 โครงสร้างการเข้าจับระหว่างตัวยับยั้ง LL-3858 กับตัวรับชนิด Wild type



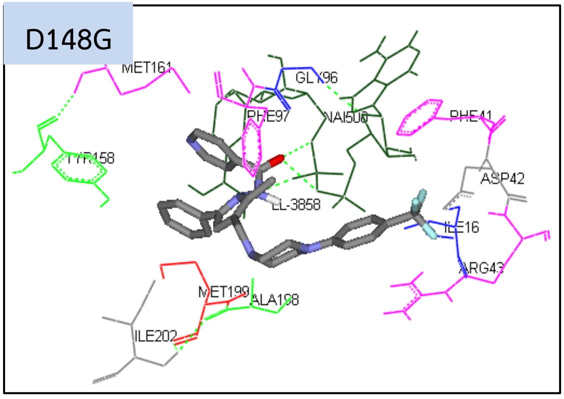
รูปที่ 13 โครงสร้างการเข้าจับระหว่างตัวยับยั้ง LL-3858 กับตัวรับชนิดกลายพันธุ์ I21V



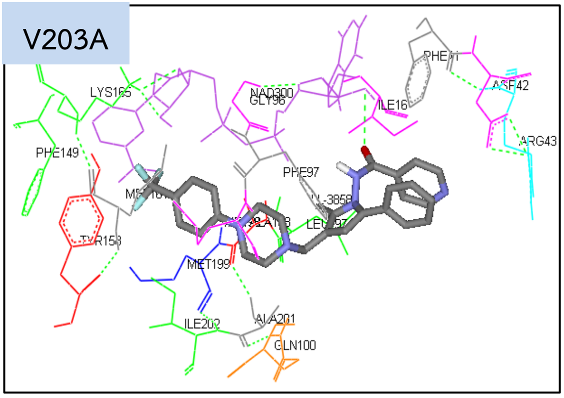
รูปที่ 14 โครงสร้างการเข้าจับระหว่างตัวยับยั้ง LL-3858 กับตัวรับชนิดกลายพันธุ์ S94A



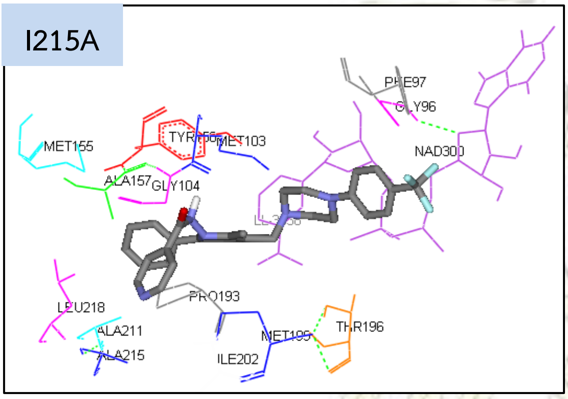
รูปที่ 15 โครงสร้างการเข้าจับระหว่างตัวยับยั้ง LL-3858 กับตัวรับชนิดกลายพันธุ์ I47T



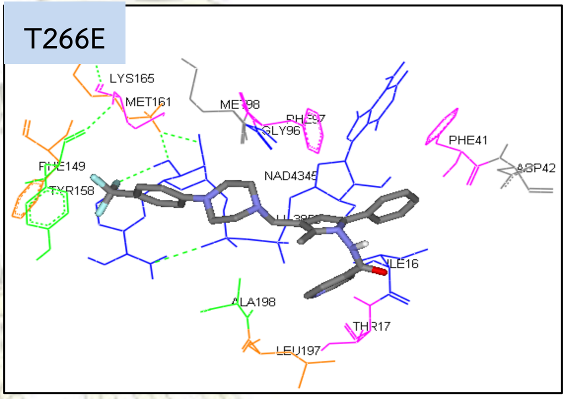
รูปที่ 16 โครงสร้างการเข้าจับระหว่างตัวยับยั้ง LL-3858 กับตัวรับชนิดกลายพันธุ์ D148G



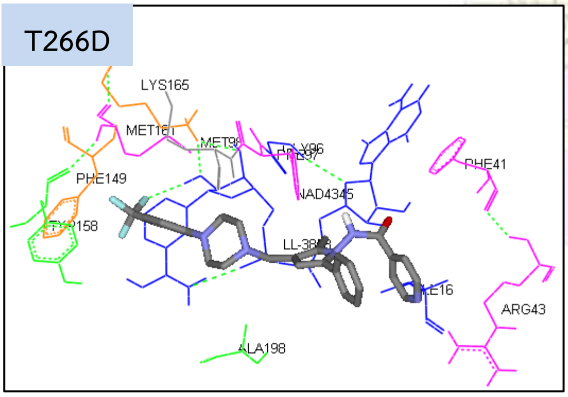
รูปที่ 17 โครงสร้างการเข้าจับระหว่างตัวยับยั้ง LL-3858 กับตัวรับชนิดกลายพันธุ์ V203A



รูปที่ 18 โครงสร้างการเข้าจับระหว่างตัวยับยั้ง LL-3858 กับตัวรับชนิดกลายพันธุ์ I215A

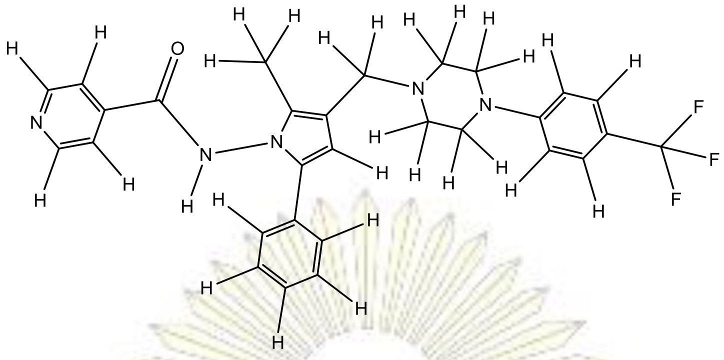


รูปที่ 19 โครงสร้างการเข้าจับระหว่างตัวยับยั้ง LL-3858 กับตัวรับชนิดกลายพันธุ์ T266E



รูปที่ 20 โครงสร้างการเข้าจับระหว่างตัวยับยั้ง LL-3858 กับตัวรับชนิดกลายพันธุ์ T266D

จากรูปข้างต้น พบว่า โครงสร้างการเข้าจับเชิงโมเลกุลของตัวยับยั้ง LL-3858 กับเอนไซม์ชนิดดั้งเดิมและชนิดกลายพันธุ์ ส่วนใหญ่จะอยู่ในตำแหน่งและลักษณะที่คล้ายกัน และเกิดพันธะไฮโดรเจนกับ NADH ได้สองแบบ คือ 1) ตำแหน่งอะตอม O 2) ตำแหน่งอะตอม F



รูปที่ 21 โครงสร้างตัวยับยั้ง LL-3858

โดยโครงสร้างที่หันด้านอะตอม F เข้าจับกับ NADH จะให้ค่าพลังงานการเข้าจับที่ต่ำกว่าโครงสร้างที่หันด้านอะตอม O เข้าจับกับ NADH ดังแสดงในตารางที่ 3 และ 6 ซึ่งยังตรงกับสมมติฐานของผู้วิจัยในข้อ 3.5 อีกด้วย ดังนั้นผู้วิจัยจึงหวังว่าข้อมูลเหล่านี้อาจจะมีประโยชน์ไม่มากก็น้อยสำหรับการพัฒนายาในอนาคตต่อไป

บทที่ 4
สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาเปรียบเทียบโครงสร้างการเข้าจับระหว่างอนุพันธ์ของไอโซไนอะซิดกับเอนไซม์ของเชื้อวัณโรคชนิดดั้งเดิมกับชนิดที่มีการกลายพันธุ์โดยใช้เทคนิคการคำนวณการเข้าจับเชิงโมเลกุล ซึ่งมีโครงสร้างของตัวรับชนิดดั้งเดิมและชนิดกลายพันธุ์รวมทั้งหมด 9 โครงสร้างที่นำมาจากฐานข้อมูล Protein Data Bank และโครงสร้างของตัวยับยั้งที่เป็นยาไอโซไนอะซิดและอนุพันธุ์ของไอโซไนอะซิด 30 โครงสร้างที่มาจากงานวิจัยของ Hu, Y.Q. และคณะ [5] สามารถสรุปได้ว่า อนุพันธ์ของตัวยับยั้งชนิด 1i, 6i และ LL-3858 ซึ่งเป็นอนุพันธ์ที่มีลักษณะการเข้าจับของตัวมันเองที่คล้ายกันทั้งในเอนไซม์ชนิดดั้งเดิม (wild type) กับชนิดที่มีการกลายพันธุ์ อีกทั้งยังมีค่าการออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ชนิดดั้งเดิมสูง เมื่อเทียบกับยาไอโซไนอะซิด จึงน่าจะเป็นอนุพันธ์ที่ประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์กับเอนไซม์ชนิดกลายพันธุ์ได้ดีเช่นกัน สุดท้ายผู้วิจัยหวังว่าข้อมูลเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ต่อการค้นคว้าและพัฒนายารักษาโรคตัวใหม่ที่มีประสิทธิภาพในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. Gamngoen, R.; Putim, C.; Burt-Indr, B. Extensively-drug resistant tuberculosis: A new strain and future challenge, *Bulletin of Chiang Mai Associated Medical Sciences* **2015**, 48, 18-28.
2. Kaufmann, S.H.; Winau, F. From bacteriology to immunology: the dualism of specificity, *NATURE IMMUNOLOGY* **2005**, 11, 1063-1066.
3. World Health Organization, Global tuberculosis report 2016. http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/ (accessed March 20, 2017).
4. กลุ่มยุทธศาสตร์และประเมินผล, แผนงานควบคุมวัณโรค ปี 2560-2564. https://www.tbthailand.org/download/Manua/หนังสือแผนยุทธศาสตร์วัณโรคระดับชาติ%20FINAL_new%20des.pdf (accessed March 29, 2018).
5. Hu, Y.Q.; Zhang, S.; Zhao, F.; Gao, C.; Feng, L.S.; Lv, Z.S.; Xu, Z.; Wu, X. Isoniazid derivatives and their anti-tubercular activity, *European Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, 133, 255-267.
6. Nayak, N.; Ramprasad, J.; Dalimba, U. New INH–pyrazole analogs: Design, synthesis and evaluation of antitubercular and antibacterial activity, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2015**, 25, 5540-5545.
7. Jacob, R.B.; Andersen, T.; McDougal, O. M. Accessible high-throughput virtual screening molecular docking software for students and educators, *PLOS Computational Biology* **2012,** 8, e1002499.
8. Meng, X.Y.; Zhang, H. X.; Mezei, M.; Cui, M. Molecular docking: A powerful approach for structure-based drug discovery, *Current Computer Aided Drug Design* **2011**, 7, 146-157.
9. ยงพิศาลภพ, จิราภรณ์. คอมพิวเตอร์ช่วยการค้นพบ การออกแบบ และการพัฒนาตัวยา: เครื่องมือสำคัญสำหรับงานวิจัยทางเภสัชกรรม, *EAU Heritage Journal* **2012**, 6, 47-57.
10. MedThai, เอนไซม์ (Enzyme) คืออะไร? ประโยชน์ของเอนไซม์ 11 ข้อ. https://medthai.com/เอนไซม์/ (accessed March 29, 2018).
11. Suarez, J.; Ranguelova, K.; Jarzecki, A.A.; Manzerova, J.; Krymov, V.; Zhao, X.; Yu, S.; Metlitsky, L.; Gerfen, G.J.; Magliozzo, R.S. An oxyferrous heme/protein-based radical intermediate is catalytically competent in the catalase reaction of *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG), *The Journal of Biological Chemistry* **2009,** 284, 7017–7029.

12. Timmins, G.S.; Master, S; Rusnak, F.; Deretic, V. Nitric oxide generated from isoniazid activation by KatG: source of nitric oxide and activity against Mycobacterium tuberculosis, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2004**, 48, 3006–3009.
13. Jones, G.; Willett, P.; Robert, C.; Leach, R. A.; Taylor, R. Further Development of a Genetic Algorithm for Ligand Docking and Its Application to Screening Combinatorial Libraries, *Journal of the American Chemical Society* **1999**, 719, 271-291.
14. Quiroga, R.; Villarreal, A. M. Vinardo: A Scoring Function Based on Autodock Vina Improves Scoring, Docking, and Virtual Screening, *PLoS ONE* **2016**, 10, 1371-1389.
15. Oliveira, J.S.; Pereira, J.H.; Canduri, F.; Rodrigues, N.C.; de Souza, O.N.; de Azevedo Jr., W.F.; Basso, L.A.; Santos, D.S. Crystallographic and Pre-steady-state Kinetics Studies on Binding of NADH to Wild-type and Isoniazid-resistant Enoyl-ACP(CoA) Reductase Enzymes from Mycobacterium tuberculosis, *Journal of Molecular Biology* **2006**, 359, 646-666.
16. Molle, V.; Gulten, G.; Vilcheze, C.; Veyron-Churlet, R.; Zanella-Cleon, I.; Sacchettini, J.C.; Jacobs Jr, W.R.; Kremer, L. Phosphorylation of InhA inhibits mycolic acid biosynthesis and growth of Mycobacterium tuberculosis, *Molecular Microbiology* **2010**, 78, 1591-1605.
17. Dias, M.V.; Vasconcelos, I.B.; Prado, A.M.; Fadel, V.; Basso, L.A.; de Azevedo, W.F.; Santos, D.S. Crystallographic studies on the binding of isonicotinyl-NAD adduct to wild-type and isoniazid resistant 2-trans-enoyl-ACP (CoA) reductase from Mycobacterium tuberculosis, *Journal of Structural Biology* **2007**, 159, 369-380.
18. Hartkoorn, R.C.; Sala, C.; Neres, J.; Pojer, F.; Magnet, S.; Mukherjee, R.; Uplekar, S.; Boy-Rottger, S.; Altmann, K.H.; Cole, S.T. Towards a new tuberculosis drug: pyridomycin - nature's isoniazid, *EMBO Molecular Medicine* **2012**, 4, 1032-1042.
19. Lai, C.T.; Li, H.J.; Yu, W.; Shah, S.; Bommineni, G.R.; Perrone, V.; Garcia-Diaz, M.; Tonge, P.J.; Simmerling, C. Rational Modulation of the Induced-Fit Conformational Change for Slow-Onset Inhibition in Mycobacterium tuberculosis InhA, *Biochemistry* **2015**, 54, 4683-4691.
20 MedThai, เอนไซม์ (Enzyme) คืออะไร? ประโยชน์ของเอนไซม์ 11 ข้อ !. https://medthai.com/เอนไซม์/ (accessed March 29, 2018).
21 Feinstein, W.P.; Brylinsk, M. Calculating an optimal box size for ligand docking and virtual screening against experimental and predicted binding pockets, *Journal of Cheminformatics* **2015**, 7, 1-10.

22 Martins, F.; Santos, S.; Ventura, C.; Elvas-Leitão, R.; Santos, L.; Vitorino, S.; Reis, M.; Miranda, V.; Correia, H.F.; Aires-de-Sousa, J.; Kovalishyn, V.; Latino, D.A.; Ramos, J.; Viveiros, M. Design, synthesis and biological evaluation of novel isoniazid derivatives with potent antitubercular activity, *European Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, 81, 119-138.

23 Shaharyar, M.; Siddiqui, A.A.; Ali, M.A.; Sriramb, D.; Yogeeswar, P. Synthesis and in vitro antimycobacterial activity of N-nicotinoyl-3-(40-hydroxy-30-methyl phenyl)-5-[(sub) phenyl]-2-pyrazolines, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2006**, 16, 3947–3949.

24 Raval, J.P.; Patel, N.H.; Patel, H.V.; Patel, P.S. In vitro antimycobacterial activity of novel N-(4-(substituted phenyl amino)-6-(pyridin-2-ylamino)-1,3,5-triazin-2-yl) isonico tinohydrazide, *MEDICINAL CHEMISTRY RESEARCH* **2011**, 20, 274–279.

25 Jaju, S.; Palkar, M.; Maddi, V.; Ronad, P.; Mamledesai, S.; Satyanarayana, D.; Ghatole, M. Synthesis and Antimycobacterial Activity of a Novel Series of Isonicotinylhydra zide Derivatives, *ARCH PHARM Chemistry in Life Sciences* **2009**, 342, 723–731.

26 Pattan, S.; Kedar, M.; Pattan, J.; Dengale, S.; Sanap, M.; Gharate, U.; Shinde, P.; Kadam, S. Synthesis and evaluation of some novel 2,4-thiazolidinedione derivatives for antibacterial, antitubercular and antidiabetic activities, *Indian Journal of Chemistry - Section B Organic and Medicinal Chemistry* **2012**, 51, 1421-1425.

27 Sriram, D.; Yogeeswari, P.; Madhu, K. Synthesis and in vitro and in vivo antimycobacterial activity of isonicotinoyl hydrazones, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2005**, 15, 4502-4505.

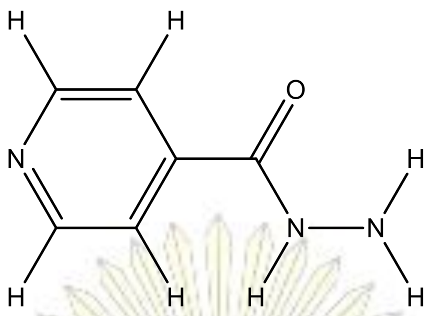
28 Torres, E.; Moreno, E.; Ancizu, S.; Barea, C.; Galiano, S.; Aldana, I.; Monge, A.; Pérez-Silanes, S. New 1,4-di-N-oxide-quinoxaline-2-ylmethylene isonicotinic acid hydrazide derivatives as anti-Mycobacterium tuberculosis agents, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2011**, 21, 3699-3703.

29 Fernandes, G. F. dos S.; Souza, P.C. de.; Marino, L.B.; Chegaev, K.; Guglielmo, S.; Lazzarato, L.; Fruttero, R.; Chung, M.C.; Pavan, F.R.; Santos, J.L. dos. Synthesis and biological activity of furoxan derivatives against Mycobacterium tuberculosis, *European Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, 123, 523-531.

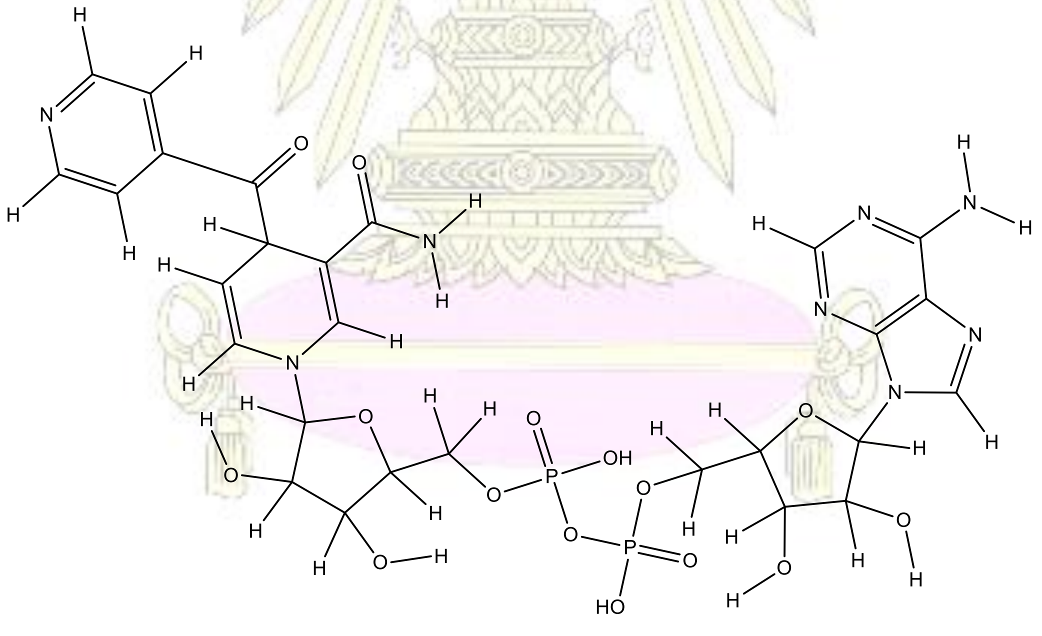
30 De, P.; Yoya, G.K.; Constant, P.; Bedos-Belval, F.; Duran, H.; Saffon, N.; Daffe, M.; Baltas, M. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of New Cinnamic Derivatives as Antituberculosis Agents, *Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, 54, 1449–1461.

ภาคผนวก

Isoniazid



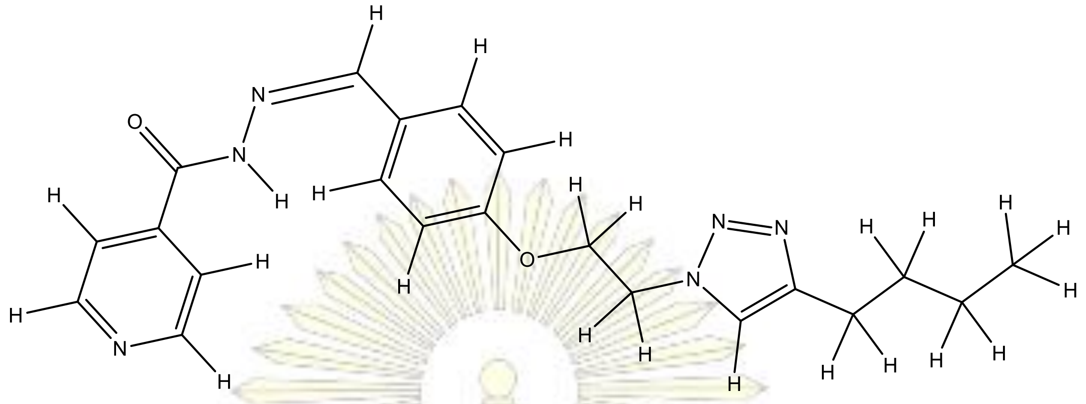
Isonicotinic acyl-NADH



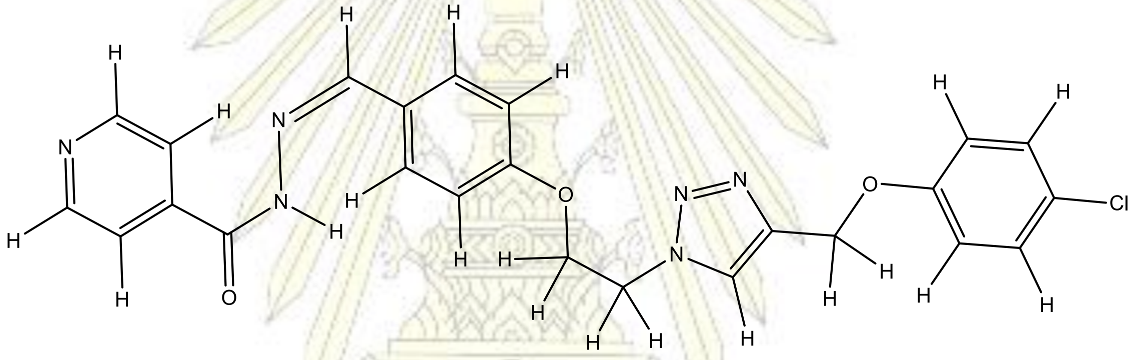
Isoniazid Derivatives

1) INH-azole hybrids

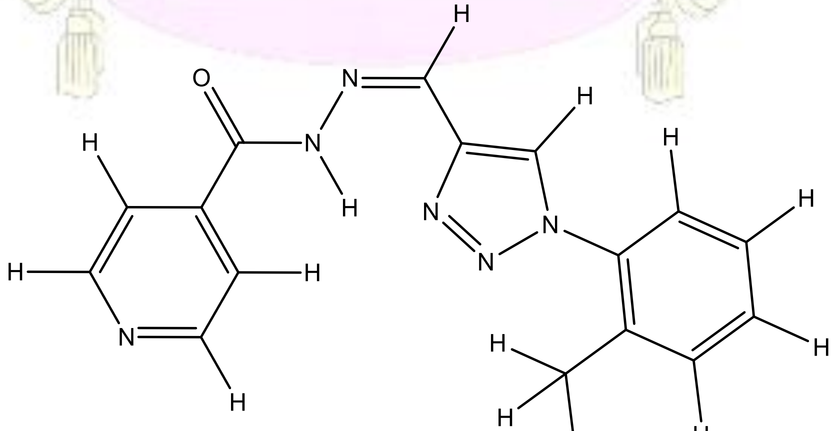
1a



1i

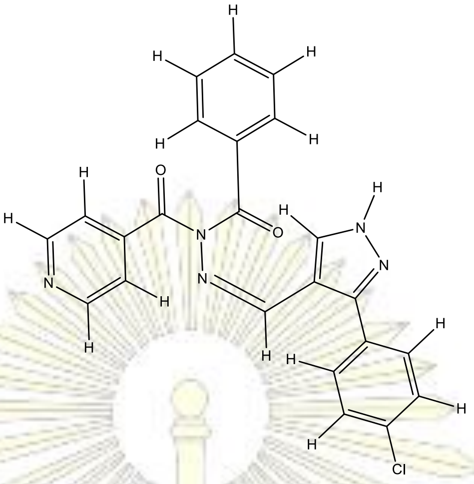


2h

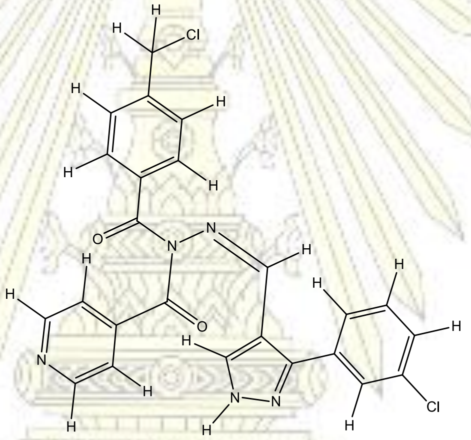


2) INH-pyrazoline hybrids

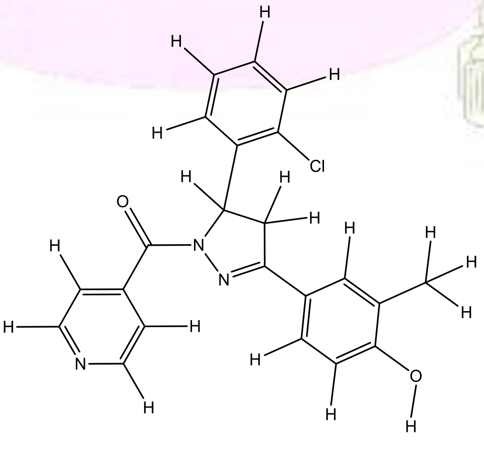
5i



5t

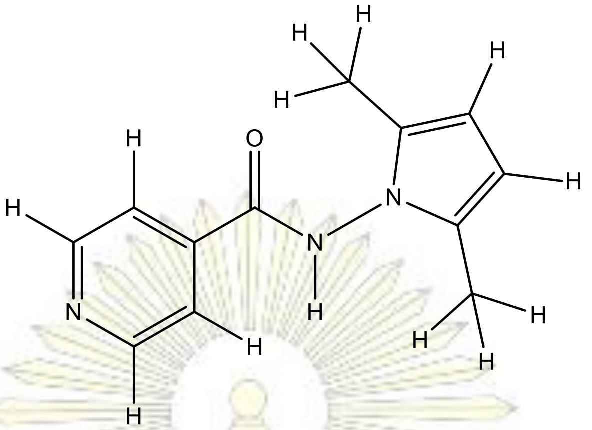


6i

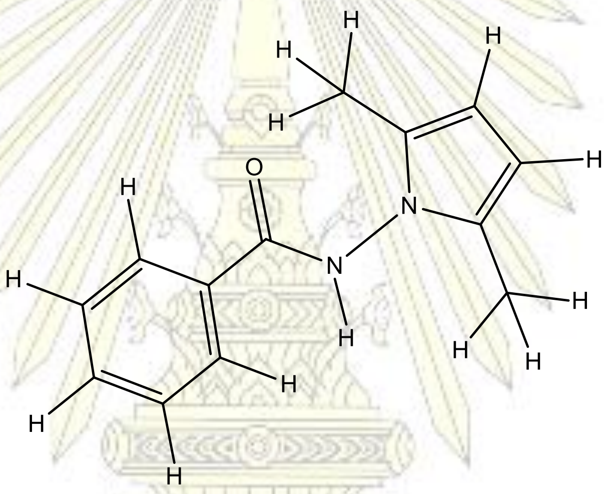


3) INH-pyrrole hybrids

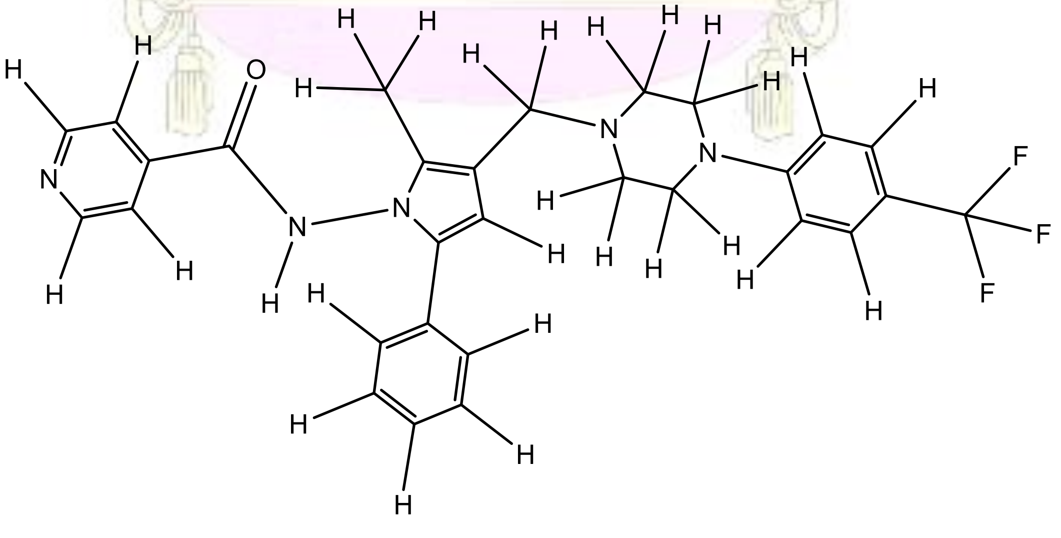
7a



7b

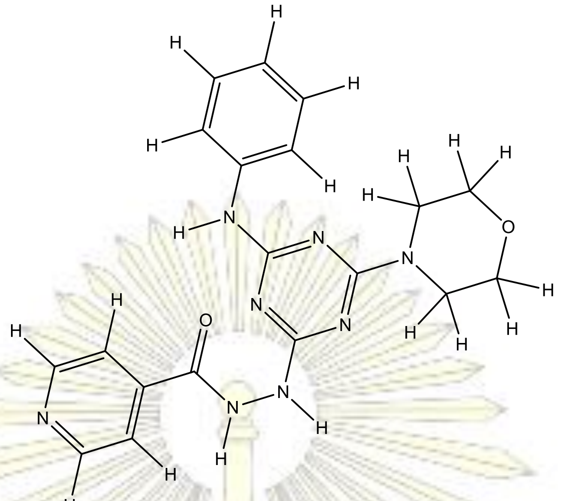


LL-3858

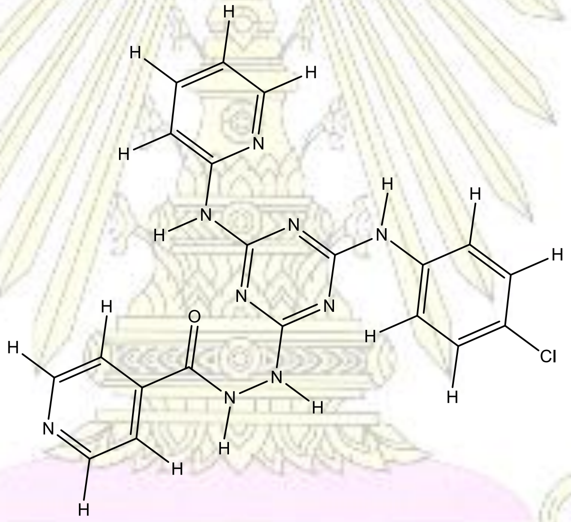


4) INH-triazine hybrids

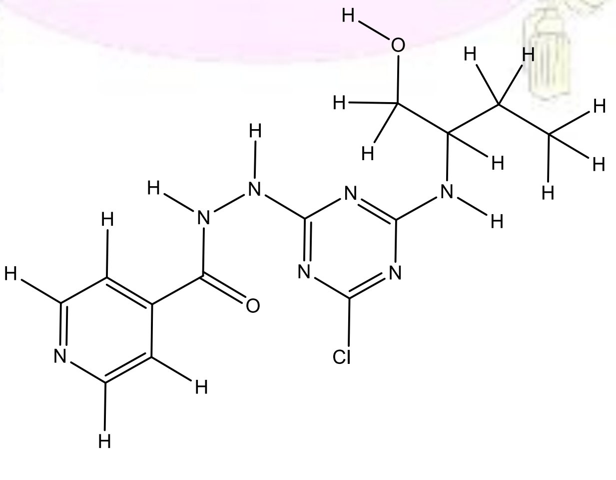
8a



9g

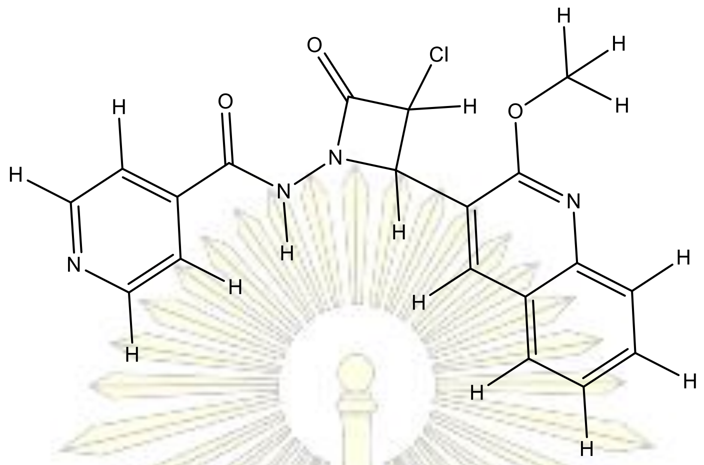


10a

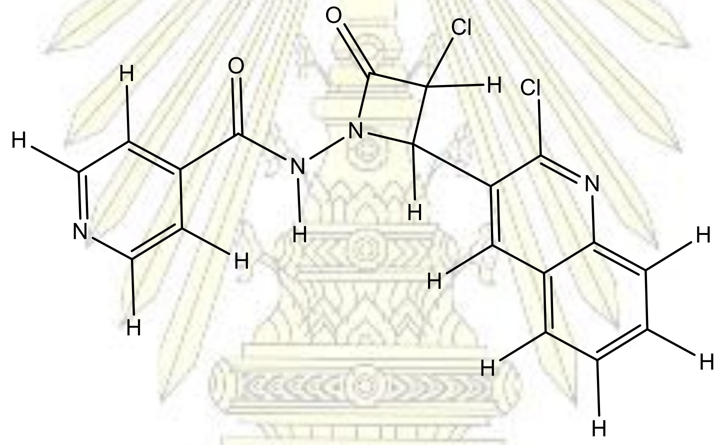


5) INH-2-azetidinone hybrids

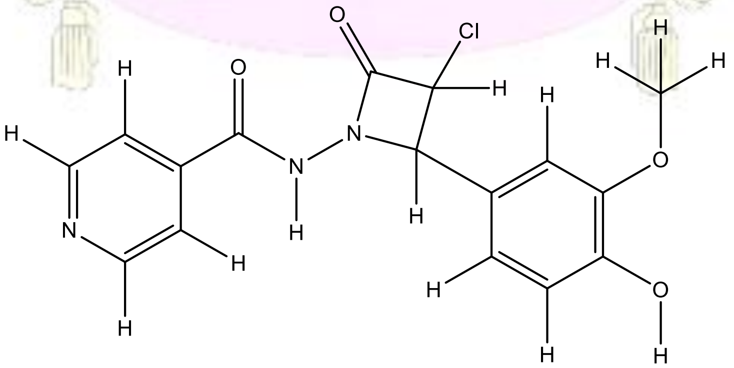
11a



11e

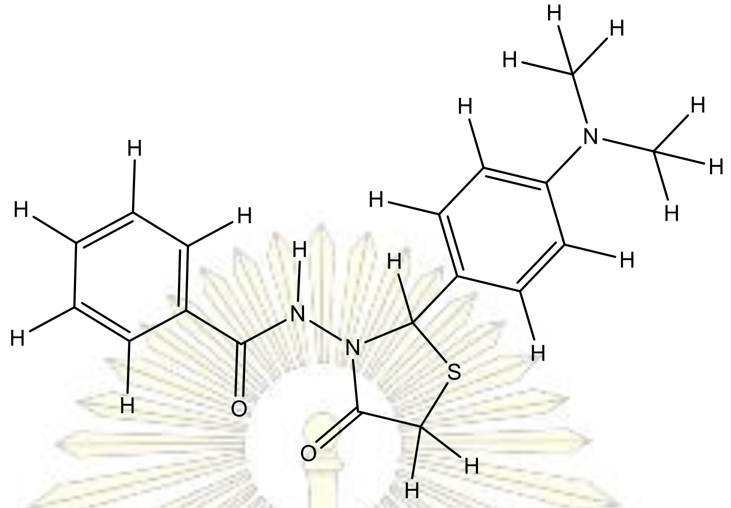


12g

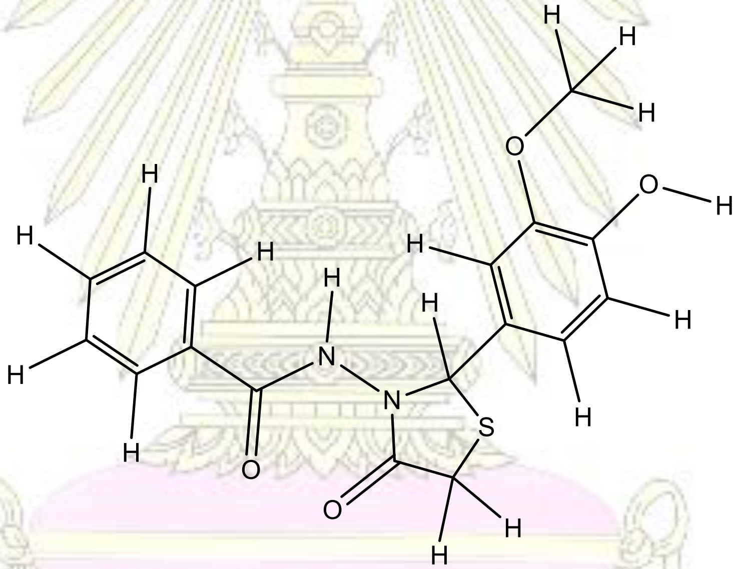


6) INH-thiazolidinone/thiazolidinedione hybrids

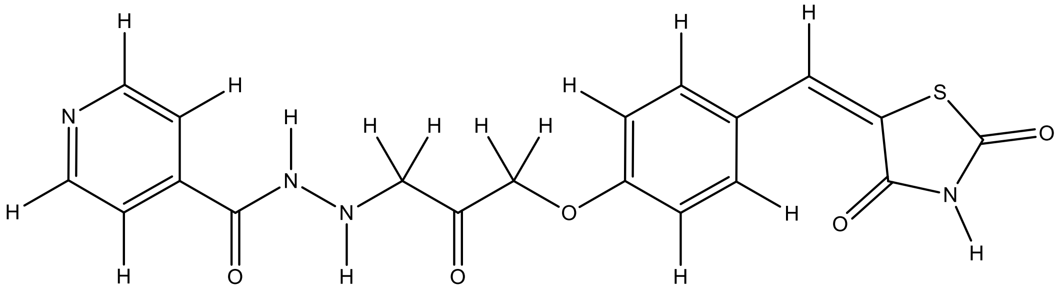
13e



13g

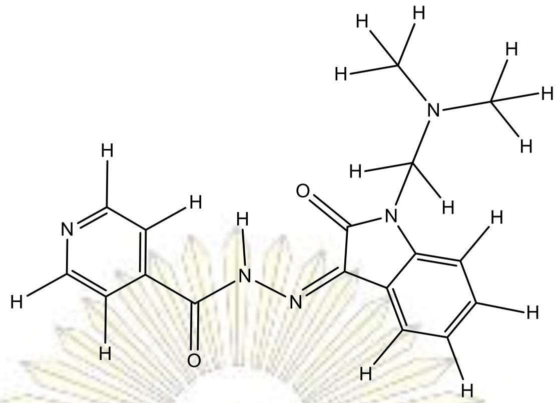


14a

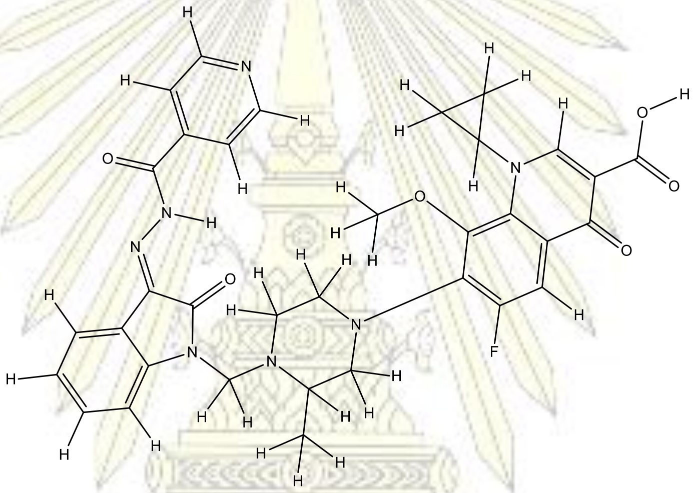


7) INH-isatin hybrids

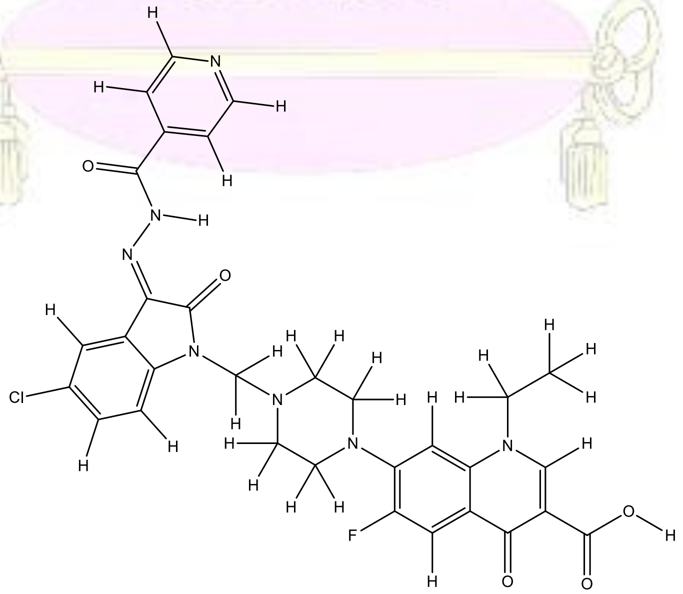
16a



16k

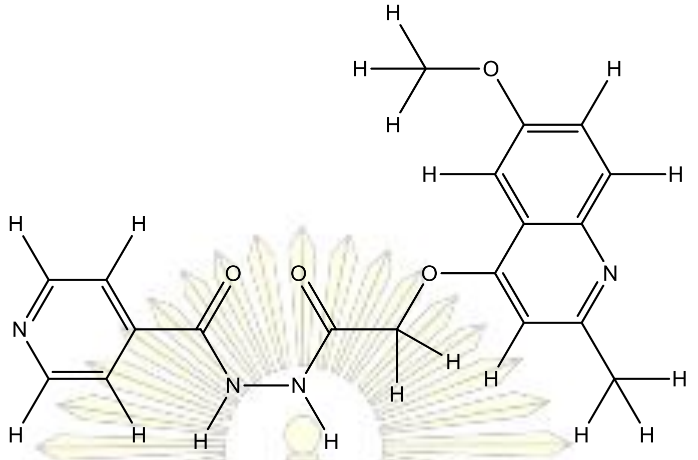


16m

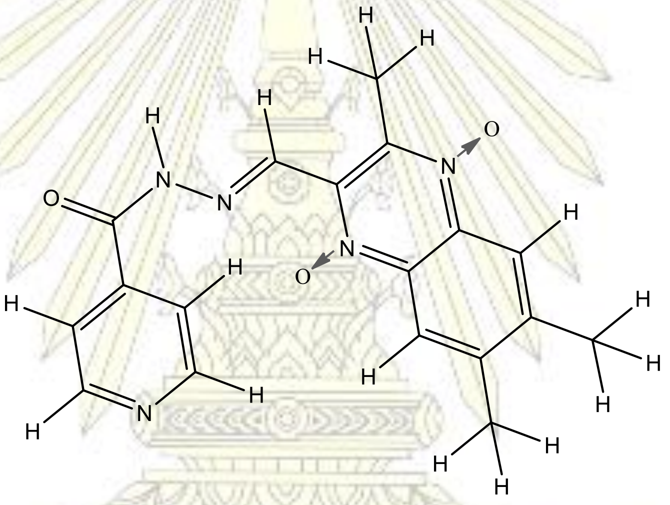


8) INH-quino(xa)line hybrids

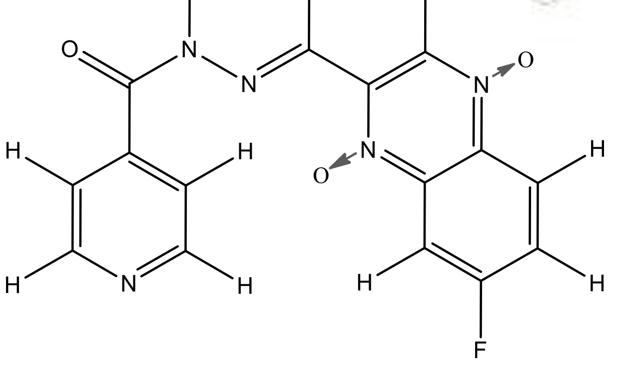
17a



18e

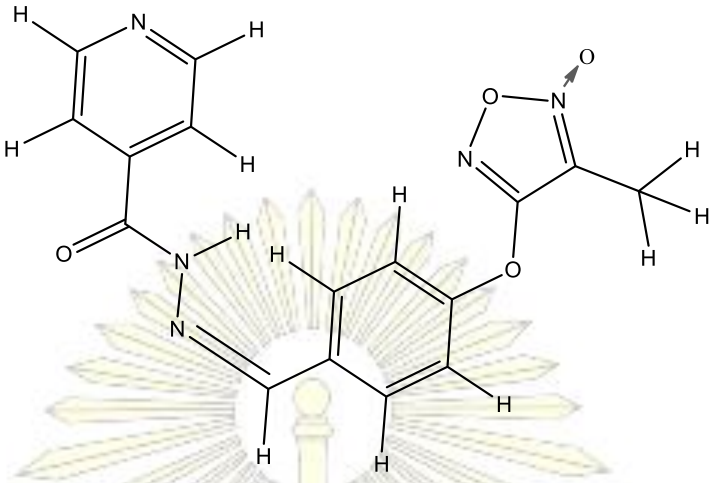


18f

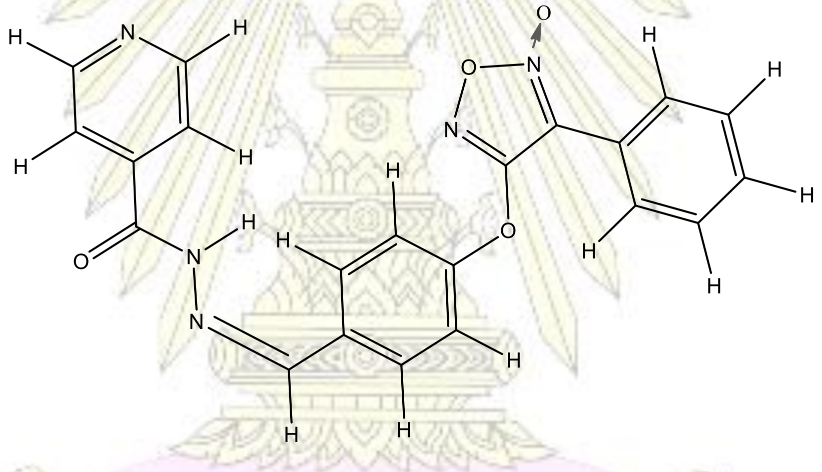


9) INH-furoxan hybrids

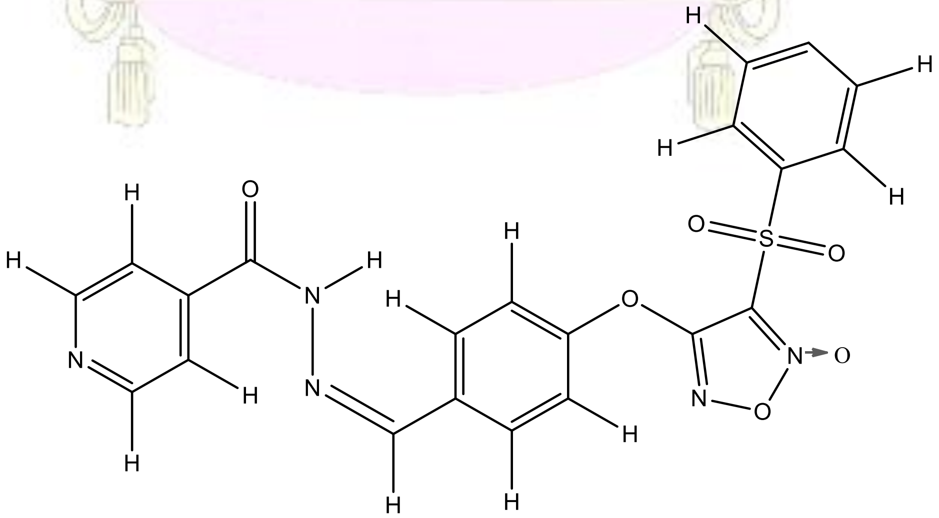
19g



19h

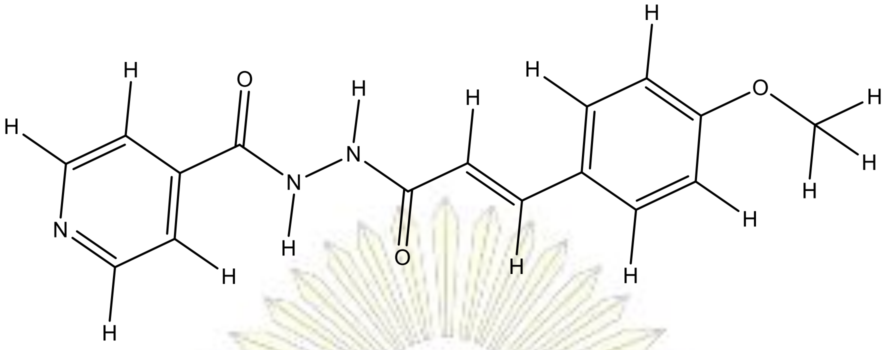


19i

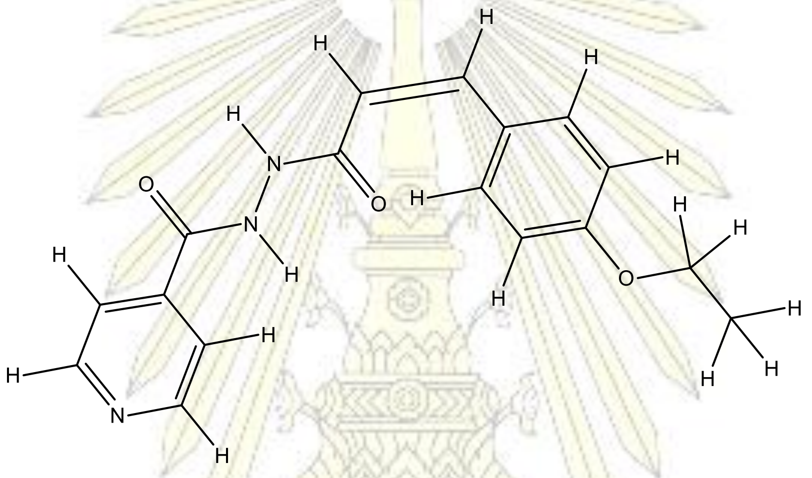


10) INH-trans-cinnamic acid hybrids

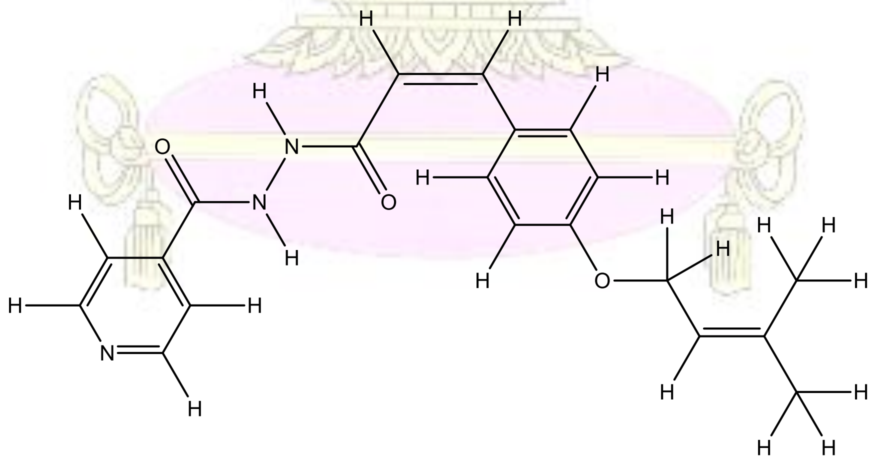
20a



20c



20e



รูปที่ 22 โครงสร้างของตัวยับยั้งไอโซไนอะซิดและอนุพันธ์ของไอโซไนอะซิด

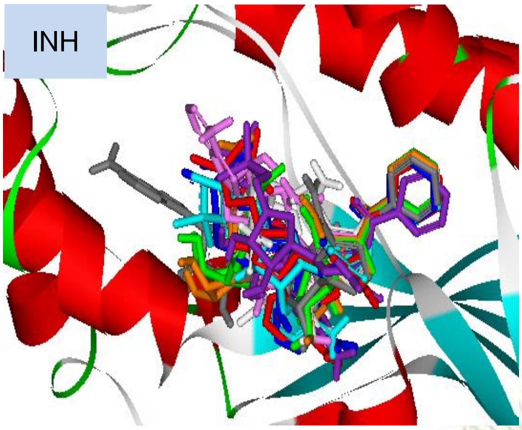
ตารางที่ 6 แสดงค่าพลังงานการเข้าจับเชิงโมเลกุล (binding energy) ของตัวยับยั้งทั้ง 31 ชนิดกับตัวรับชนิดกลายพันธุ์

Binding energy (kcal/mol)								
Ligand	**I21V**	**S94A**	**I47T**	**D148G**	**V203A**	**I215A**	**T266E**	**T266D**
INH	-10.4	-10.6	-10.2	-10.0	-10.8	-10.7	-10.4	-10.7
1a	-7.3	-7.7	-6.6	-7.6	-9.8	-8.9	-7.2	-7.8
1i	-7.8	-8.1	-7.7	-7.8	-10.9	-9.2	-7.7	-7.7
2h	-7.3	-7.6	-7.3	-7.7	-8.7	-8.9	-7.9	-7.7
5i	-8.4	-8.9	-8.0	-8.3	-7.9	-9.7	-9.3	-9.4
5t	-8.6	-8.0	-7.6	-8.5	-7.9	-9.4	-8.3	-8.3
6i	-7.9	-8.0	-8.0	-8.2	-8.2	-9.4	-7.7	-8.0
7a	-5.6	-6.2	-5.3	-6.5	-5.5	-7.0	-6.4	-6.5
7b	-6.6	-6.9	-6.0	-6.6	-6.5	-7.8	-6.9	-7.0
LL-3858	-8.7	-9.4	-8.1	-8.8	-8.9	-10.9	-9.7	-9.3
8a	-8.7	-9.0	-8.7	-8.9	-8.7	-9.7	-9.1	-9.2
9g	-9.1	-8.9	-8.9	-9.1	-9.1	-9.8	-9.2	-9.2
10a	-6.8	-7.2	-6.6	-6.9	-7.3	-7.3	-7.4	-7.1
11a	-7.1	-7.4	-7.5	-7.5	-8.1	-8.8	-7.5	-7.5
11e	-7.3	-8.7	-7.7	-7.6	-8.3	-9.3	-8.0	-8.2
12g	-7.6	-7.0	-6.7	-7.4	-7.0	-8.4	-7.3	-7.1
13e	-7.8	-7.8	-6.1	-6.9	-7.9	-7.8	-8.3	-8.3
13g	-7.4	-7.4	-7.4	-7.4	-7.1	-9.0	-7.7	-7.2
14a	-7.2	-7.1	-7.3	-8.0	-10.0	-8.9	-7.8	-7.6
16a	-7.1	-7.0	-7.3	-7.3	-7.2	-8.5	-7.4	-7.7
16k	-7.6	-9.3	-8.1	-8.3	-7.7	-10.5	-8.5	-8.5
16m	-8.1	-10.2	-7.3	-9.1	-7.7	-10.6	-9.5	-9.5
17a	-8.1	-8.0	-7.3	-7.7	-7.7	-8.7	-8.0	-8.0
18e	-7.9	-7.9	-7.0	-7.9	-8.1	-10.0	-8.7	-8.4
18f	-7.7	-7.5	-7.7	-7.9	-7.8	-9.3	-8.3	-8.4
19g	-8.0	-7.4	-7.4	-7.6	-9.3	-9.3	-8.1	-8.2
19h	-8.6	-8.7	-7.7	-9.2	-9.3	-9.8	-9.1	-9.1
19i	-9.0	-8.9	-7.0	-8.1	-10.8	-10.3	-8.3	-9.1
20a	-7.6	-7.0	-6.6	-7.4	-9.3	-8.3	-7.8	-7.8
20c	-7.2	-6.8	-7.2	-7.2	-9.0	-8.1	-8.0	-7.5
20e	-7.3	-7.0	-7.2	-7.9	-7.3	-9.0	-7.4	-7.5

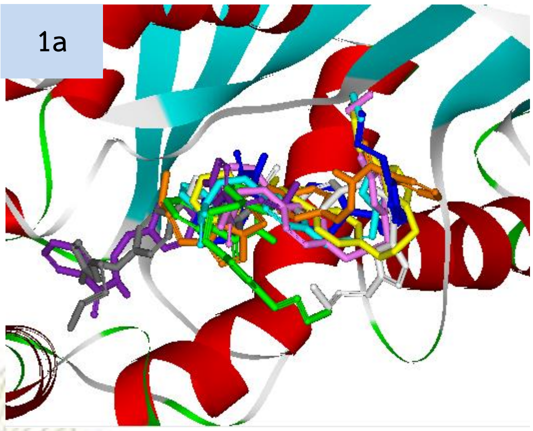
ตารางที่ 7 แสดงค่าพลังงานสัมพัทธ์ของการเข้าจับเชิงโมเลกุล (relative binding energy) ของตัวยับยั้งทั้ง 31 ชนิดกับตัวรับชนิดกลายพันธุ์เทียบกับชนิดดั้งเดิม (wild type)

relative binding energy (kcal/mol)								
ligand	**I21V**	**S94A**	**I47T**	**D148G**	**V203A**	**I215A**	**T266E**	**T266D**
INH	0.3	0.1	0.5	0.7	-0.1	0.0	0.3	0.0
1a	0.3	-0.1	1.0	0.0	-2.2	-1.3	0.4	-0.2
1i	-0.1	-0.4	0.0	-0.1	-3.2	-1.5	0.0	0.0
2h	0.4	0.1	0.4	0.0	-1.0	-1.2	-0.2	0.0
5i	0.5	0.0	0.9	0.6	1.0	-0.8	-0.4	-0.5
5t	-0.4	0.2	0.6	-0.3	0.3	-1.2	-0.1	-0.1
6i	0.0	-0.1	-0.1	-0.3	-0.3	-1.5	0.2	-0.1
7a	0.8	0.2	1.1	-0.1	0.9	-0.6	0.0	-0.1
7b	0.1	-0.2	0.7	0.1	0.2	-1.1	-0.2	-0.3
LL-3858	0.8	0.1	1.4	0.7	0.6	-1.4	-0.2	0.2
8a	0.2	-0.1	0.2	0.0	0.2	-0.8	-0.2	-0.3
9g	-0.1	0.1	0.1	-0.1	-0.1	-0.8	-0.2	-0.2
10a	0.1	-0.3	0.3	0.0	-0.4	-0.4	-0.5	-0.2
11a	0.4	0.1	0.0	0.0	-0.6	-1.3	0.0	0.0
11e	0.4	-1.0	0.0	0.1	-0.6	-1.6	-0.3	-0.5
12g	-0.1	0.5	0.8	0.1	0.5	-0.9	0.2	0.4
13e	0.1	0.1	1.8	1.0	0.0	0.1	-0.4	-0.4
13g	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	-1.6	-0.3	0.2
14a	0.1	0.2	0.0	-0.7	-2.7	-1.6	-0.5	-0.3
16a	0.2	0.3	0.0	0.0	0.1	-1.2	-0.1	-0.4
16k	0.2	-1.5	-0.3	-0.5	0.1	-2.7	-0.7	-0.7
16m	0.7	-1.4	1.5	-0.3	1.1	-1.8	-0.7	-0.7
17a	-0.2	-0.1	0.6	0.2	0.2	-0.8	-0.1	-0.1
18e	0.3	0.3	1.2	0.3	0.1	-1.8	-0.5	-0.2
18f	0.2	0.4	0.2	0.0	0.1	-1.4	-0.4	-0.5
19g	-0.5	0.1	0.1	-0.1	-1.8	-1.8	-0.6	-0.7
19h	0.2	0.1	1.1	-0.4	-0.5	-1.0	-0.3	-0.3
19i	-0.2	-0.1	1.8	0.7	-2.0	-1.5	0.5	-0.3
20a	-0.1	0.5	0.9	0.1	-1.8	-0.8	-0.3	-0.3
20c	0.0	0.4	0.0	0.0	-1.8	-0.9	-0.8	-0.3
20e	0.6	0.9	0.7	0.0	0.6	-1.1	0.5	0.4

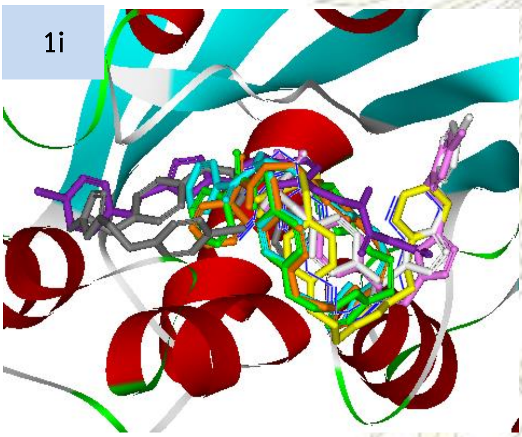
INH



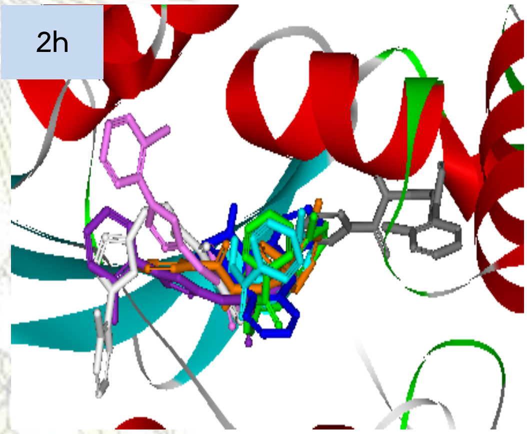
1a



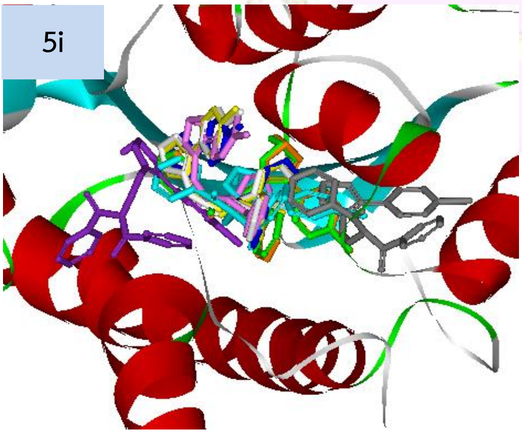
1i



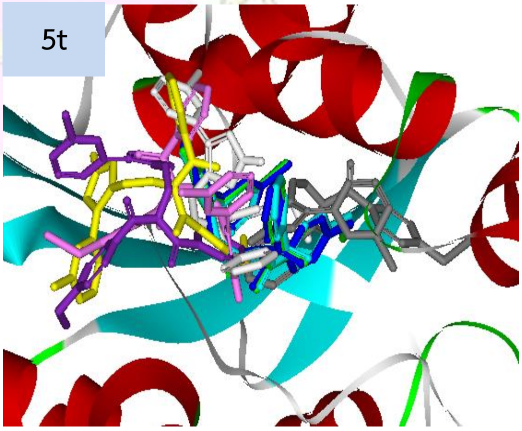
2h



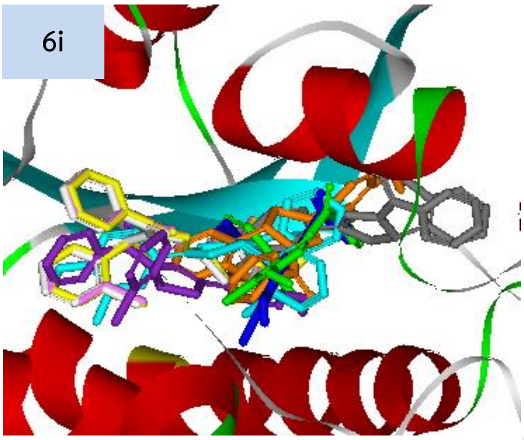
5i



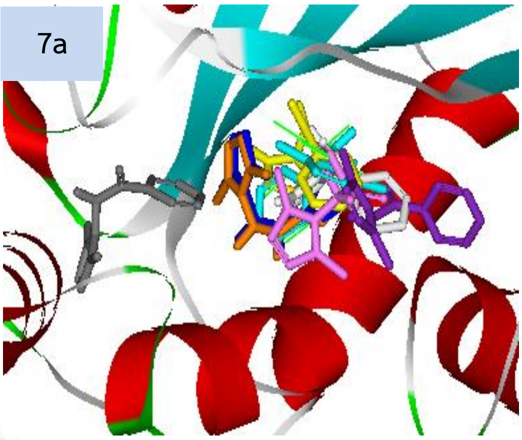
5t



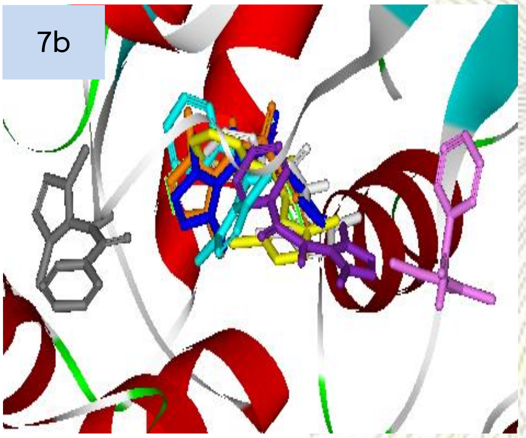
6i



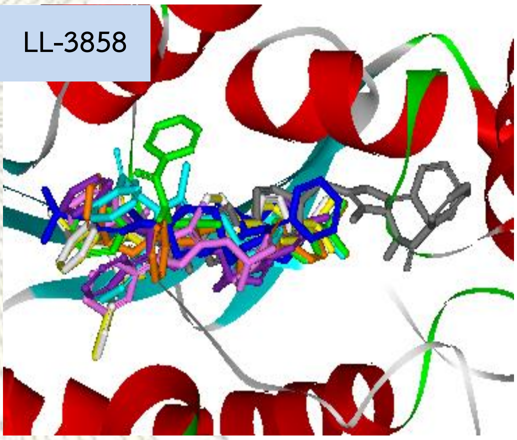
7a



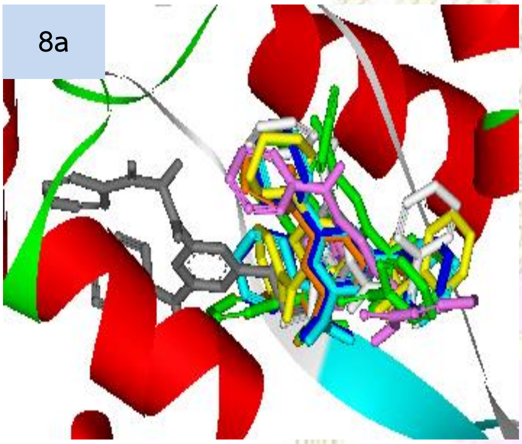
7b



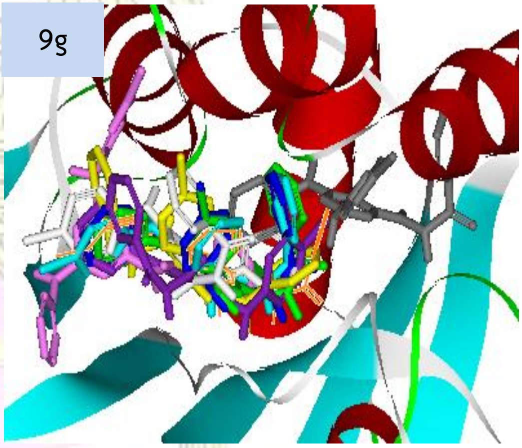
LL-3858



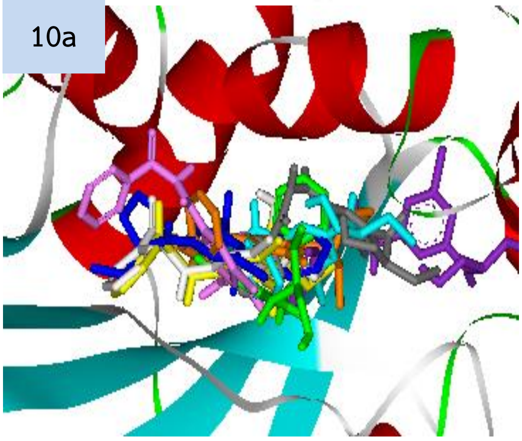
8a



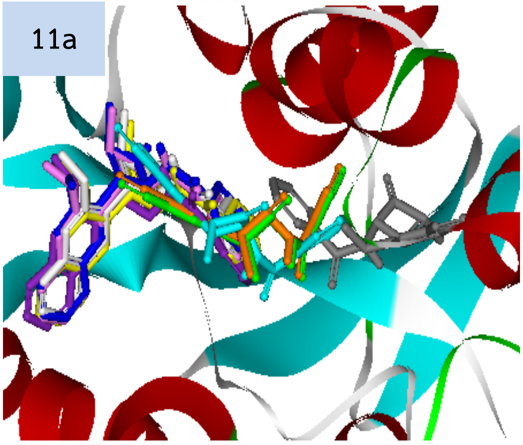
9g

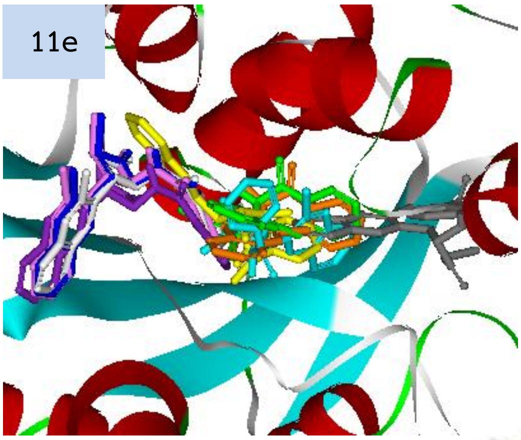


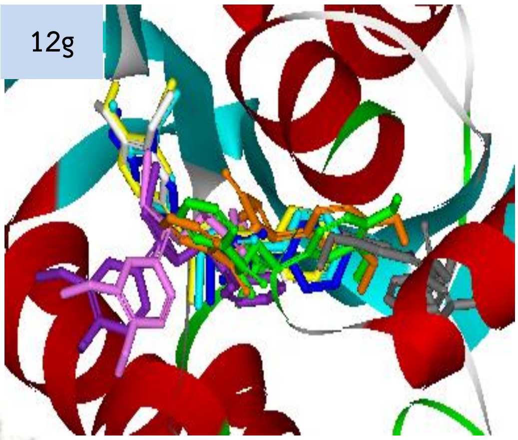
10a

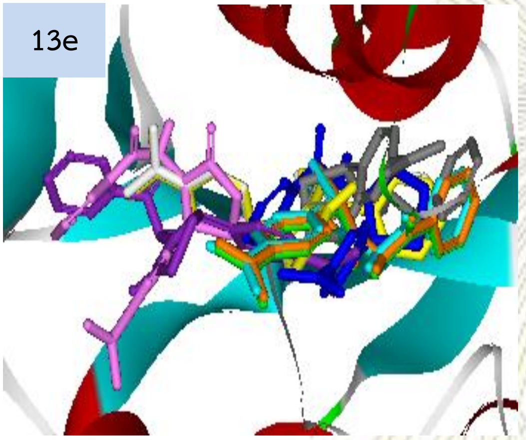


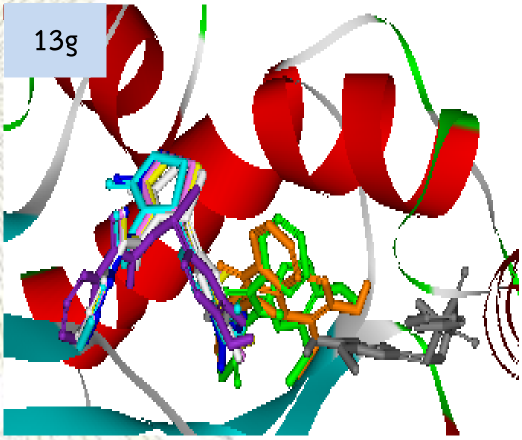
11a

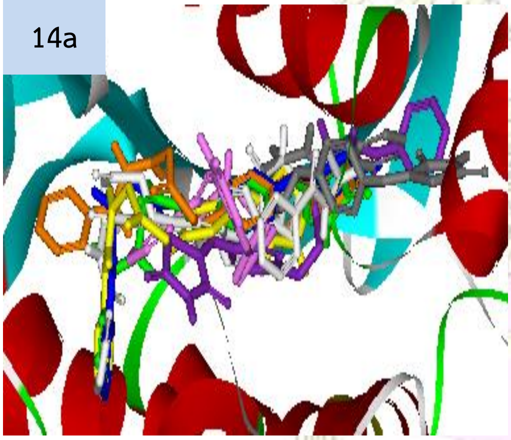


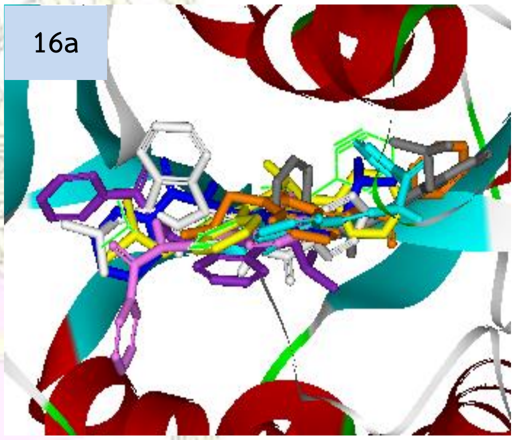

11e

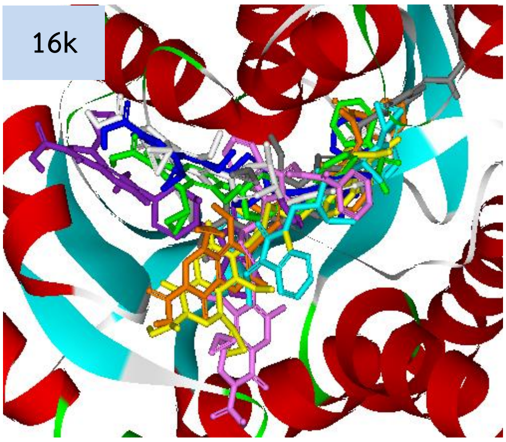

12g

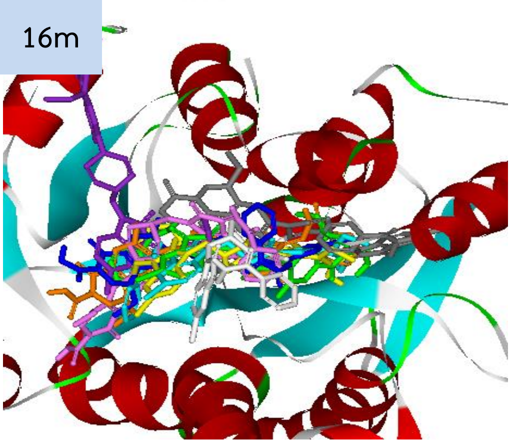

13e


13g

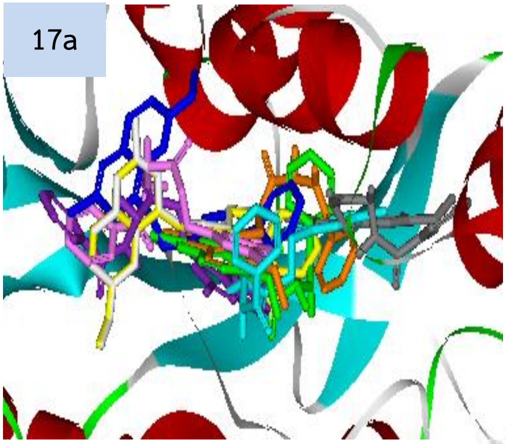

14a


16a

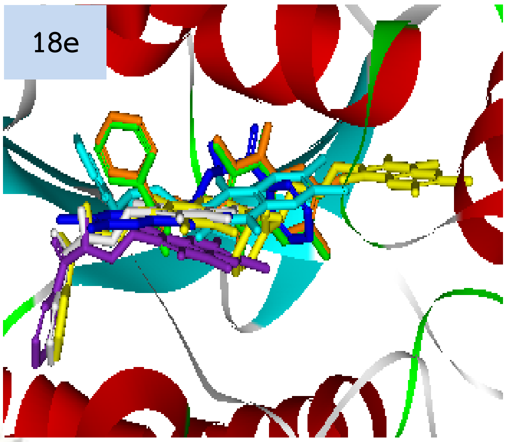

16k


16m

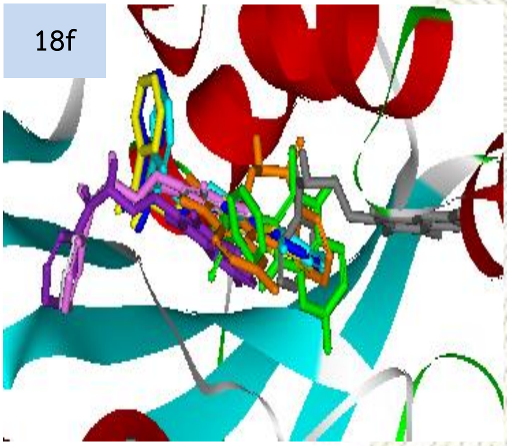
17a



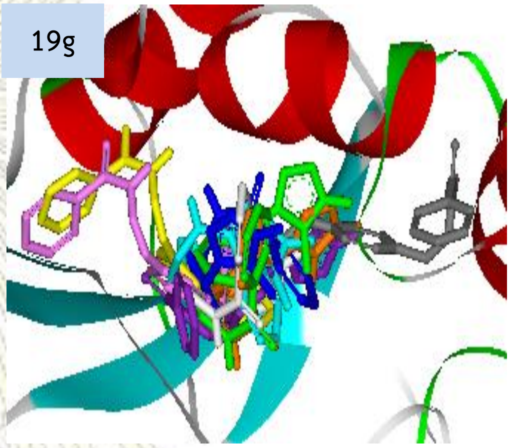
18e



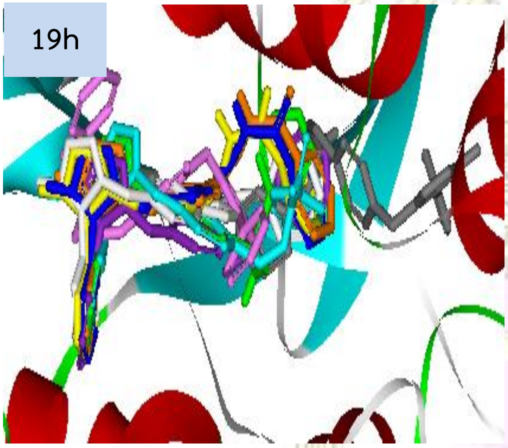
18f



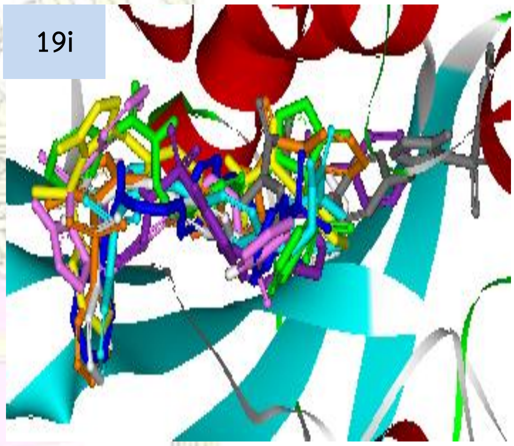
19g



19h

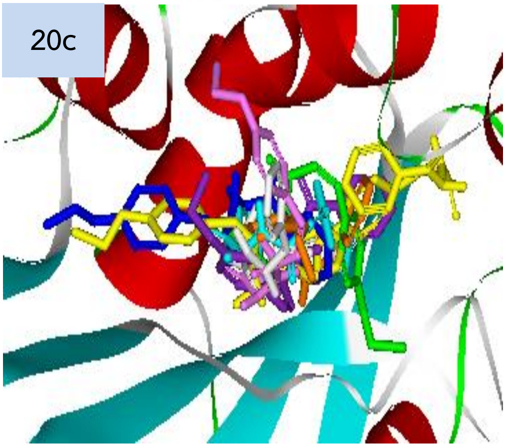


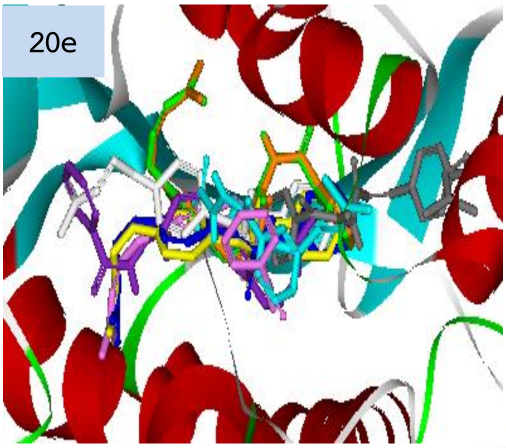
19i



20a

20c





รูปที่ 23 โครงสร้างการเข้าจับระหว่างตัวยับยั้งและตัวรับชนิด Wild type (สีเหลือง) เทียบกับชนิดกลายพันธุ์ I21V (สีขาว), S94A (สีชมพู), I47T (สีฟ้า), D148G (สีน้ำเงิน), V203A (สีม่วง), I215A (สีเทา), T266E (สีเขียว) และ T266D (สีส้ม)

ประวัติผู้วิจัย

นางสาวศันสนีย์ แก้วมรกต เกิดเมื่อวันที่ 16 มีนาคม พ.ศ. 2539 ที่จังหวัดเพชรบุรี สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนเบญจมเทพอุทิศจังหวัดเพชรบุรี เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2557 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 143 หมู่ 3 ตำบลบ้านหม้อ อำเภอเมืองเพชรบุรี จังหวัดเพชรบุรี รหัสไปรษณีย์ 76000 อีเมล sansanee_cp@hotmail.com