



โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การประกอบตัวเองของตัวนำพานาโนกรดไฮยาลูรอนิกสำหรับการประยุกต์
ด้านชีววิทยาทางการแพทย์
Self-assembly of hyaluronic acid nanocarriers for biomedical
applications

ชื่อนิสิต นางสาวปฐมาวดี สุนทรสุวรรณ เลขประจำตัว 6033056323
ภาควิชา เคมี
ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การประกอบตัวเองของตัวนำพานาโนกรดไฮยาลูรอนิกสำหรับการประยุกต์
ด้านชีววิทยาทางการแพทย์
Self-assembly of hyaluronic acid nanocarriers for
biomedical applications

โดย
นางสาวปฐมาวดี สุนทรสุวรรณ

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2563

โครงการ การประกอบตัวเองของตัวนำพานาโนกรตไฮยาโลรอนิกสำหรับการประยุกต์ด้านชีววิทยา
ทางการแพทย์

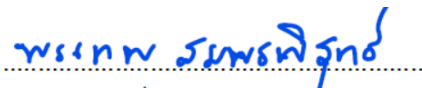
โดย นางสาวปฐมาวดี สุนทรสุวรรณ

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

- | | |
|--|------------------|
| 1. รองศาสตราจารย์ ดร. สมศักดิ์ เพ็ญรวณิช | ประธานกรรมการ |
| 2. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภาณุวัฒน์ ผดุงรส | กรรมการ |
| 3. ศาสตราจารย์ ดร. พรเทพ สมพรพิสุทธิ์ | อาจารย์ที่ปรึกษา |

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี



(ศาสตราจารย์ ดร. พรเทพ สมพรพิสุทธิ์)
อาจารย์ที่ปรึกษา



(รองศาสตราจารย์ ดร. วรวิทย์ โฮვნ)
หัวหน้าภาควิชาเคมี

วันที่ 28 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2564

Project Title Self-assembly of hyaluronic acid nanocarriers for biomedical applications

Student Name Miss Pathamawadee Sunthornsuwan Student ID 6033056323

Advisor Name Professor Dr.Pornthep Sompornpisut

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic Year 2020

Abstract

Hyaluronic acid (HA) is a naturally occurring polysaccharide found in many living organisms. The HA products have been widely used in medical, pharmaceutical, nutritional, and cosmetic applications. It has been previously reported that depending on the degree of the substitution the HA derivatized with the acetyl group increases the hydrophobicity, allowing to form micelles in aqueous solutions. However, the molecular self-assembly of the acetylated HA has not been yet understood. In this study, molecular dynamics (MD) simulations of HA 5 units with different acetylation sites were conducted to investigate the aggregation of the structural complex. From the results, the HA with the acetyl modification showed a decrease in the diffusion rate with respect to the unmodified HA. In addition, the HA with the single acetyl-substitution had a higher diffusion rate than that with the double acetyl-substitution. This finding suggested that hydrophobic interactions compel monomer-monomer attraction while unmodified interactions in HA leads to faster diffusion. The results of this study showed similar in shape and hydration structure of the modified and unmodified HA since HA with 5 units may be too small to exhibit polymer folding and to show an impact of the hydrophobic substitution on the three-dimensional shape.

Keyword: acetylated hyaluronic acid, molecular dynamics simulation, self-assembly

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลือจากศาสตราจารย์ ดร. พรเทพ สมพรพิสุทธิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่ได้กรุณาชี้แนะ ให้คำแนะนำ และคำปรึกษา ตลอดจนแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นระหว่างการดำเนินโครงการ ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สมศักดิ์ เพ็ญรวณิช และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภาณุวัฒน์ ผดุงรส กรรมการสอบโครงการ ที่ได้ให้คำแนะนำและแก้ไขรายงานฉบับนี้ให้ดียิ่งขึ้น และขอขอบคุณพี่ ๆ ในหน่วยปฏิบัติการวิจัยเคมีคอมพิวเตอร์ทุกคน ที่ได้ให้คำแนะนำ และให้ความช่วยเหลือตลอดการทำวิจัย

สุดท้ายนี้ ขอขอบพระคุณคณะวิทยาศาสตร์ที่ได้ให้ทุนสนับสนุนโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ประจำปีการศึกษา 2563

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ	1
1.2 วัตถุประสงค์และขอบเขตงานวิจัย	2
1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
1.4 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	6
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	8
บทที่ 2 การทดลอง	9
2.1 อุปกรณ์	9
2.2 โปรแกรมที่ใช้ในการดำเนินงานวิจัย	9
2.3 วิธีการทดลอง	9
บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	13
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง	20
เอกสารอ้างอิง	22
ภาคผนวก	23
ประวัติผู้วิจัย	24

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 ระบบจำลองของ HA, periodic boundary sizes และจำนวนอะตอมทั้งหมดที่ทำการจำลอง	11
ตารางที่ 3.1 ตารางแสดงแบบจำลองโครงสร้างภาพนิ่ง (snapshot structure) ของ acetylated HA ที่เวลาเริ่มต้น ($t = 0$ ns) และเวลาที่ $t = 110$ ns	13
ตารางที่ 3.2 ตารางแสดงค่าสัมประสิทธิ์เฉลี่ยของการแพร่ (D)	16
ตารางที่ 3.3 ตารางแสดงค่าเฉลี่ยรัศมีไจเรชัน (R_g)	17
ตารางที่ 3.4 ตารางแสดงค่าเฉลี่ยของจำนวนน้ำที่ล้อมรอบโมเลกุลของ HA และ acetylated HA ภายใน first solvation shell	19

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1.1 สูตรโครงสร้างอย่างง่ายของหน่วยย่อยกรดไฮยาลูรอนิก	1
รูปที่ 1.2 ตัวอย่างโครงสร้างของอนุพันธ์ของกรดไฮยาลูรอนิกที่ถูกแทนที่ด้วยหมู่อะซิติก (acetylated HA)	2
รูปที่ 1.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ในเซลล์ Vero ซึ่งไม่มีตัวรับ CD44 ของ AC-HALM3 ที่บรรจุ DOX กับ free DOX	3
รูปที่ 1.4 ผลการทดสอบการแข่งขันกันของ AC-HALM และ HALM ในเซลล์มะเร็งจากกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์	3
รูปที่ 1.5 โครงสร้างของกรดไฮยาลูรอนิกที่แทนที่ด้วยโซ่แอลคิลที่มีความยาวแตกต่างกัน และโครงสร้างของกรดไฮยาลูรอนิกที่ไม่มีการดัดแปลง	4
รูปที่ 1.6 การจำลองอนุพันธ์กรดไฮยาลูรอนิกที่แทนที่ด้วยโซ่แอลคิลที่เวลาต่าง ๆ	5
รูปที่ 2.1 แบบจำลองโครงสร้างสามมิติของ HA (A) 5 units (HA5) และ (B) 10 units (HA10)	9
รูปที่ 2.2 รูปแสดงโครงสร้างของ acetylated HA และ HA	10
รูปที่ 2.3 ตัวอย่างระบบจำลอง MD ของ acetylated HA ในสารละลาย	12
รูปที่ 3.1 กราฟแสดงอัตราการแพร่ของโมเลกุลของ acetylated HA ขนาด 5 units ที่ดัดแปลงด้วยอะซิติกที่ตำแหน่งแตกต่างกันและ HA ขนาด 5 units และ 10 units	15
รูปที่ 3.2 กราฟแสดงอัตราการแพร่ของโมเลกุลแบบสเกล log ของ acetylated HA ขนาด 5 units ที่ดัดแปลงด้วยอะซิติกที่ตำแหน่งแตกต่างกันและ HA ขนาด 5 units และ 10 units ในช่วงเวลา 100 - 110 ns	15
รูปที่ 3.3 กราฟแสดงค่า R_g (Å) ของ acetylated HA ขนาด 5 units ที่ดัดแปลงด้วยอะซิติกที่ตำแหน่งแตกต่างกันและ HA ขนาด 5 units และ 10 units	17
รูปที่ 3.4 กราฟแสดงค่าฟังก์ชันการกระจายเชิงรัศมี (RDF) ของน้ำใน acetylated HA ขนาด 5 units ที่ดัดแปลงด้วยอะซิติกที่ตำแหน่งแตกต่างกันและ HA ขนาด 5 units และ 10 units	18
รูปที่ 3.5 กราฟแสดงจำนวนน้ำที่ล้อมรอบโมเลกุลของ HA และ acetylated HA ภายใน first solvation shell	19

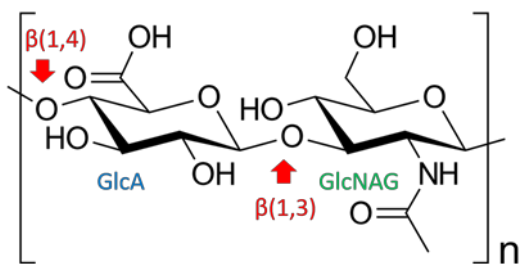
บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันมีการพยายามพัฒนาวิธีการรักษาโรคมะเร็งที่จะสามารถตรวจจับเซลล์มะเร็งเป้าหมายได้อย่างแม่นยำ เพื่อแก้ปัญหารักษาด้วยเคมีบำบัดที่ไม่สามารถตรวจจับเซลล์เนื้องอกได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้ส่งผลกระทบต่อเซลล์อื่น ๆ และก่อให้เกิดผลข้างเคียง¹ มีการพัฒนาระบบการนำส่งยาโดยใช้อนุภาคนาโนที่จะสามารถกำหนดเป้าหมายและลดผลข้างเคียงซึ่งได้ผลดีกว่ายารักษามะเร็งแบบทั่วไป²

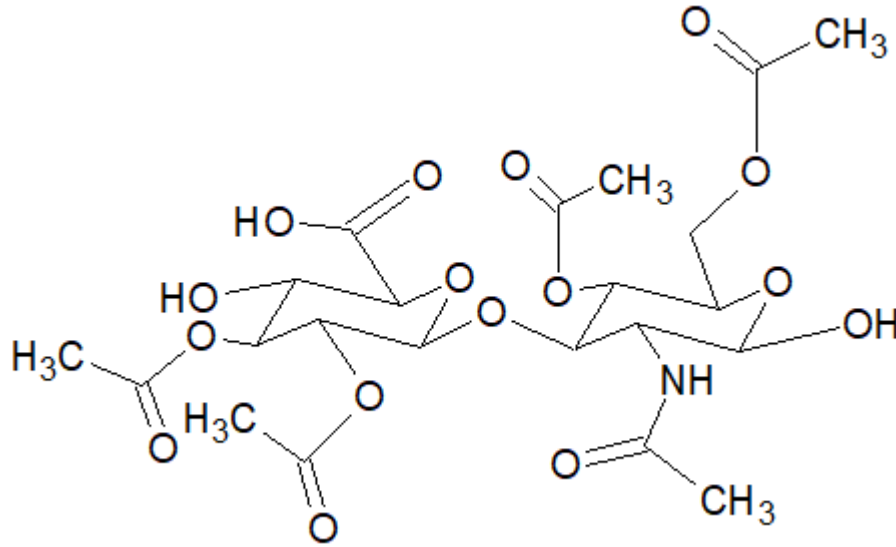
กรดไฮยาลูรอนิกหรือ HA เป็นพอลิเมอร์ที่มีประจุลบโดยประกอบด้วยหน่วยย่อยไฮดรอกซีคาร์บอเนตของ D-glucuronic acid (GlcA) และ N-acetyl D-glucosamine (GlcNAG) ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกเบต้า(1,3) และเบต้า(1,4)^{3, 4} (รูปที่ 1.1) กรดไฮยาลูรอนิกถูกนำมาใช้ทางการแพทย์อย่างกว้างขวางเนื่องจากพบได้ง่ายในธรรมชาติ มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับร่างกาย ไม่เป็นพิษ ไม่ทำลายเซลล์หรือก่อเซลล์ผิดปกติ ไม่ก่อให้เกิดการแพ้ภูมิคุ้มกัน และสามารถย่อยสลายได้ง่ายโดยเอนไซม์ในร่างกาย⁵



รูปที่ 1.1 สูตรโครงสร้างอย่างง่ายของหน่วยย่อยกรดไฮยาลูรอนิก

มีรายงานว่าเซลล์มะเร็งมีการแสดงออกของตัวรับการดูดซึมของเซลล์สำหรับกรดไฮยาลูรอนิกแตกต่างจากเซลล์ปกติ โดยมีการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้น (overexpression) เช่น ตัวรับ CD44 ซึ่งมีปฏิสัมพันธ์กับกรดไฮยาลูรอนิก⁶ จึงมีการนำกรดไฮยาลูรอนิกมาใช้ในระบบการขนส่งยา โดยมีการประยุกต์ใช้กรดไฮยาลูรอนิกเพื่อการรักษาในหลากหลายรูปแบบ เช่น กรดไฮยาลูรอนิกแบบไมเซลล์ นาโนเจล และอนุภาคนาโนอินทรีย์⁷ อนุพันธ์ของกรดไฮยาลูรอนิกที่ถูกแทนที่ด้วยหมู่อะซิติก หรือ acetylated HA (รูปที่ 1.2) เป็นรูปแบบหนึ่งของกรดไฮยาลูรอนิกแบบนาโนเจล โดยการทำให้อะซิติกเลชันเพื่อเพิ่มความไม่ชอบน้ำให้กับกรดไฮยาลูรอนิก ซึ่งจากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า acetylated HA สามารถนำมาใช้เป็นตัวนำพาอนุภาคนาโนได้ และพบว่าสัดส่วนของการแทนที่ของกลุ่มอะซิติกมีผลต่อขนาดของอนุภาค และปริมาณยาที่ถูกปลดปล่อย⁸ นอกจากนี้ยังพบว่า acetylated HA มีความสามารถในการดูดซึมสูงกว่ากรดไฮยาลูรอนิกมาก และไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์⁹ ในงานวิจัยนี้จะศึกษาการประกอบตัวเอง (self-assembly) ของตัวนำพานาโนกรดไฮยาลูรอนิกที่เป็น acetylated HA โดยจะศึกษาสมบัติเชิงโครงสร้างและพลวัตของตัวนำพานาโนกรดไฮยาลูรอนิกในระดับ

อนุภาคนาโนโดยเทคนิคการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล และเปรียบเทียบ acetylated HA ที่มีการดัดแปลงด้วยอะซิติกที่ตำแหน่งแตกต่างกัน



รูปที่ 1.2 ตัวอย่างโครงสร้างของอนุพันธ์ของกรดไฮยาลูรอนิกที่ถูกแทนที่ด้วยหมู่อะซิติก (acetylated HA)

1.2 วัตถุประสงค์และขอบเขตของการวิจัย

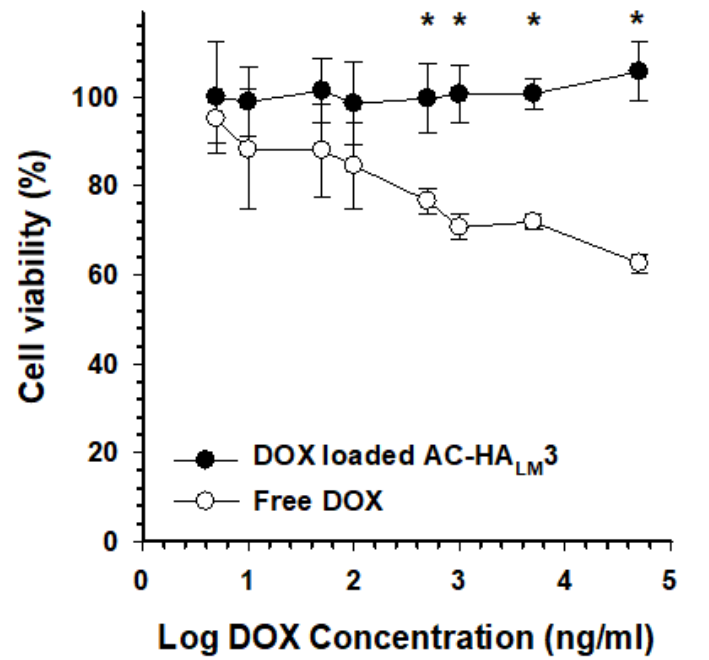
1. เพื่อศึกษาการประกอบตัวเองของตัวนำพานาโนกรดไฮยาลูรอนิกในระดับอนุภาคนาโน
2. เพื่อศึกษาอิทธิพลของตำแหน่งที่มีการดัดแปลงด้วยอะซิติกต่อการประกอบตัวเองของตัวนำพานาโนกรดไฮยาลูรอนิกในระดับอนุภาคนาโน

1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การพัฒนากระบวนการขนส่งยาไปสู่เซลล์เป้าหมายในปัจจุบัน กรดไฮยาลูรอนิกเป็นสารชนิดหนึ่งที่ถูกเลือกมาใช้ในกระบวนการขนส่งยา เนื่องจากการมีปฏิสัมพันธ์กับตัวรับ CD44 มีการศึกษาดัดแปลงกรดไฮยาลูรอนิกเพื่อพัฒนาวิธีการขนส่งยาเข้าสู่เซลล์มะเร็ง Acetylated HA นาโนเจลเป็นอีกตัวเลือกหนึ่งที่ถูกนำมาใช้เป็นตัวนำพานาโนการรักษามะเร็ง

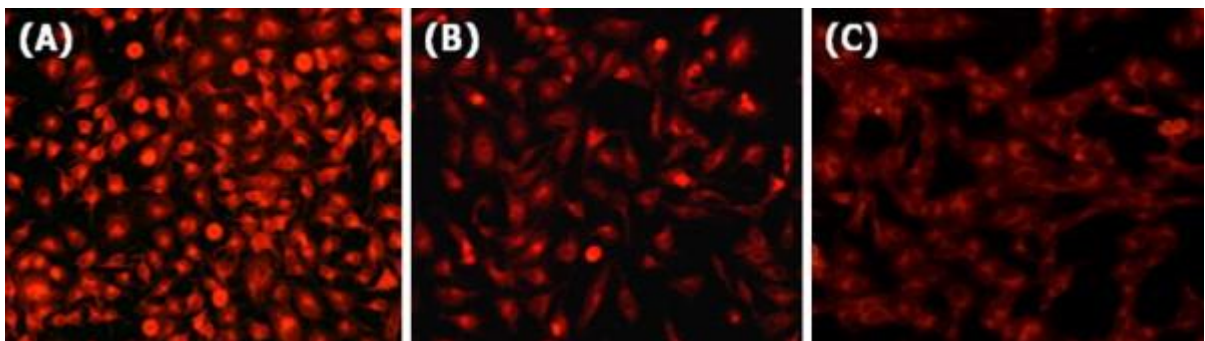
Wooram Park และคณะ (2010) ได้เตรียม Acetylated HA ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ 3 ตัวอย่าง คือ AC-HA_{LM} 1,2, และ 3 โดยมีระดับของอะซิติกเลชันที่แตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 0.8, 2.1, และ 2.6 ตามลำดับ พบว่าอนุภาคนาโนเจลมีขนาดลดลงเมื่อระดับอะซิติกเลชันเพิ่มขึ้น และมีความไม่ชอบน้ำเพิ่มมากขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากลุ่มอะซิติกสามารถนำมาใช้เป็นแทนที่ไม่ชอบน้ำของนาโนเจลได้ จากการบรรจุรักษามะเร็ง Doxorubicin (DOX) พบว่าประสิทธิภาพของการบรรจุ DOX เพิ่มสูงขึ้นเมื่อระดับอะซิติกเลชันสูงขึ้น และพบว่าขนาดของนาโนเจลที่บรรจุ DOX มีขนาดเล็กลงเมื่อเทียบกับนาโนเจลที่ไม่ได้บรรจุ DOX เนื่องจากเกิดแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic interaction) ระหว่าง DOX และกลุ่มอะซิติกขึ้น มีการทดสอบการปลดปล่อยยาของนาโนเจลในหลอดทดลอง พบว่าอัตราการปลดปล่อยยาลดลงเมื่อระดับของอะซิติกเลชันสูงขึ้น และเมื่อผ่านไป 1 วัน พฤติกรรมการปลดปล่อยยาจะมีลักษณะเหมือนปฏิกิริยาอันดับศูนย์เป็นระยะเวลา 7 วัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากลุ่มอะซิติกสามารถใช้บรรจุยาได้เป็นระยะเวลานาน มีการทดสอบ

นาโนเจลที่บรรจุยา กับเซลล์มะเร็ง HeLa ที่มีตัวรับ CD44 โดยวิธี MTT พบว่า AC-HA_{LM3} ที่บรรจุ DOX กับ free DOX เปรียบเทียบการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งมีค่าใกล้เคียงกัน และเมื่อทดสอบกับเซลล์มะเร็ง Vero ที่ไม่มีตัวรับ CD44 พบว่าเปรียบเทียบการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งของ AC-HA_{LM3} ที่บรรจุ DOX มีค่าสูงเกือบ 100% ดังรูปที่ 1.3 ซึ่งต่างจาก free DOX ซึ่งผลลัพธ์นี้แสดงให้เห็นว่าปฏิสัมพันธ์ระหว่างตัวรับกับตัวพานาโนเจลมีผลต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็ง



รูปที่ 1.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ในเซลล์ Vero ซึ่งไม่มีตัวรับ CD44 ของ AC-HA_{LM3} ที่บรรจุ DOX กับ free DOX

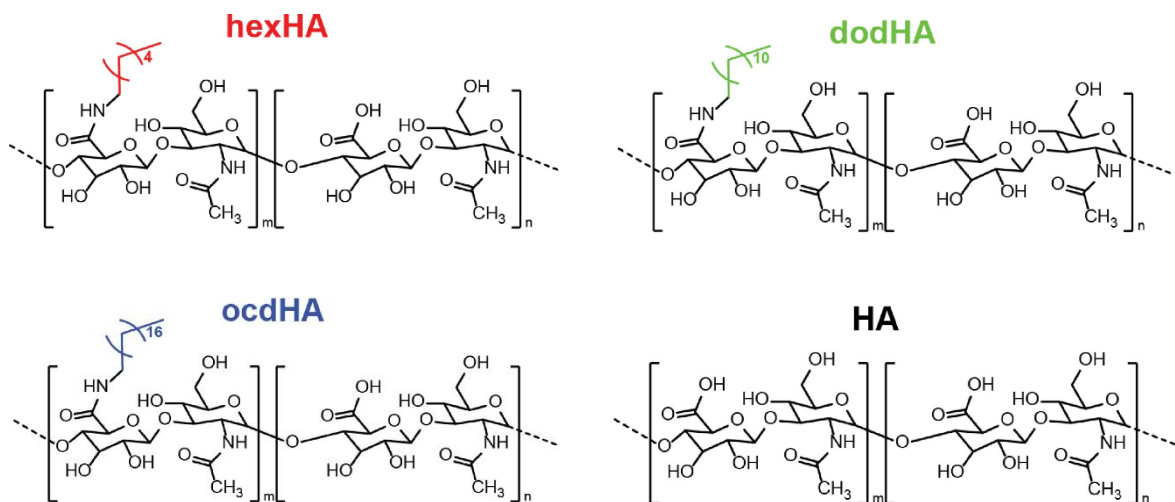
เพื่อพิสูจน์ปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์มะเร็งกับ AC-HA_{LM} จึงได้มีการตรวจสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (รูปที่ 1.4) ซึ่งพบว่า AC-HA_{LM} กับ HA_{LM} เกิดการแข่งขันกันเข้าสู่เซลล์มะเร็ง แสดงว่า AC-HA_{LM} นั้นสามารถเข้าสู่เซลล์มะเร็งได้ด้วยวิธี endocytosis เช่นเดียวกับกับ HA



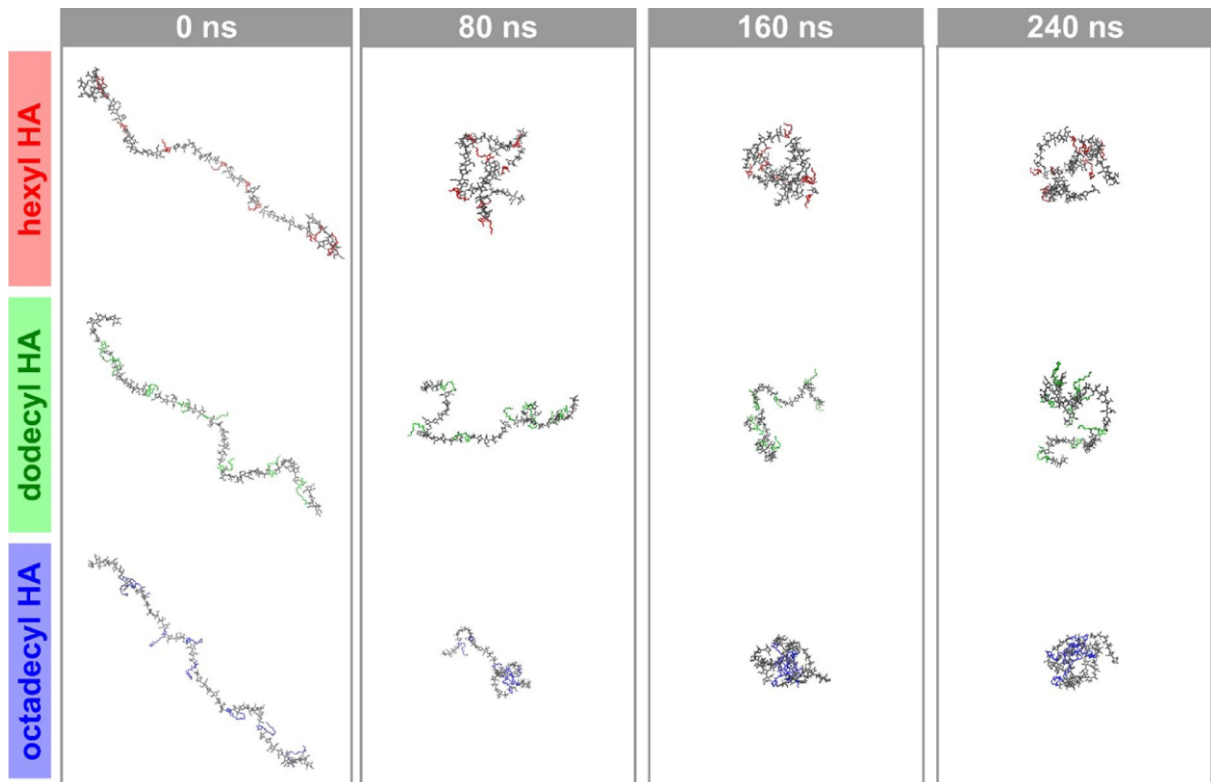
รูปที่ 1.4 ผลการทดสอบการแข่งขันกันของ AC-HA_{LM} และ HA_{LM} ในเซลล์มะเร็งจากกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (A) AC-HA_{LM} ที่บรรจุ DOX ในเซลล์ HeLa ซึ่งมีตัวรับ CD44 (B) AC-HA_{LM} ที่บรรจุ DOX และ free HA_{LM} ในเซลล์ HeLa (C) AC-HA_{LM} ที่บรรจุ DOX ในเซลล์ Vero ซึ่งไม่มีตัวรับ CD44

Carmela Saturnino และคณะ (2014) ได้ศึกษา Acetylated HA เปรียบเทียบกับ free HA จากการศึกษาการต้านอนุมูลอิสระและการต้านการอักเสบ โดยใช้วิธีทดสอบกับ ABTS และ NO ในหลอดทดลอง พบว่า Acetylated HA มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ABTS และ NO เพิ่มสูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการดูดซึมจากการทดลองในหลอดทดลอง พบว่า Acetylated HA มีความสามารถในการดูดซึมมากกว่า 6 เท่า และมีความเสถียรเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ได้ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์กับเซลล์ 3 ชนิด โดยเปรียบเทียบกับ 6-MP ซึ่งเป็นยาที่ใช้รักษาโรคมะเร็ง พบว่า Acetylated HA และ free HA มีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำมากเมื่อเทียบกับ 6-MP และทดสอบว่า Acetylated HA และ free HA สามารถดัดแปลง NO หรือมีผลต่อการผลิต NO หรือไม่ โดยการเพิ่มปริมาณ NO ในเซลล์สูงขึ้น พบว่าไม่มีผลต่อการดัดแปลง NO และช่วยลดปริมาณ NO ในเซลล์ได้

William M. Payne และคณะ (2018) ได้ศึกษาการประกอบตัวเองของกรดไฮยาลูรอนิกที่แทนที่ด้วยโซ่แอลคิลที่มีความยาวแตกต่างกัน 3 แบบ คือ hexylamine จะเรียกว่า hexHA, dodecylamine เรียกว่า dodHA และ octadecyl เรียกว่า ocdHA (รูปที่ 1.5) แล้วเปรียบเทียบผลที่ได้ระหว่างการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลและการทดลองใน bulk solution โดยจำลอง hexHA, dodHA, และ ocdHA ที่เป็นสายเดี่ยวที่มีความดัน 1 atm อุณหภูมิ 303 K เป็นเวลา 260 ns เมื่อเปรียบเทียบกับรัศมีไจเรชัน (Rg) พบว่าโครงสร้างของกรดไฮยาลูรอนิกที่แทนที่ด้วยโซ่แอลคิลมีขนาดเล็กกว่า HA ที่ไม่ได้ทำการดัดแปลง เนื่องจากปฏิสัมพันธ์ไฮโดรโฟบิกระหว่างโมเลกุล (hydrophobically-driven intramolecular interactions) ความยาวของโซ่แอลคิลที่มากขึ้นจะทำให้โครงสร้างมีขนาดเล็กลงเนื่องจากอิทธิพลของการรวมตัวของกลุ่มไฮโดรโฟบิก แต่ dodHA พบว่ามีพฤติกรรมใกล้เคียงกับกรดไฮยาลูรอนิกซึ่งอาจมาจากความเครียดภายในโมเลกุล และเมื่อเปรียบเทียบระยะจากปลายถึงปลายของพอลิเมอร์พบว่ามีความสอดคล้องกันกับ Rg



รูปที่ 1.5 โครงสร้างของกรดไฮยาลูรอนิกที่แทนที่ด้วยโซ่แอลคิลที่มีความยาวแตกต่างกัน และโครงสร้างของกรดไฮยาลูรอนิกที่ไม่มีการดัดแปลง โดยที่ $n = 19$ และ $m = 7$



รูปที่ 1.6 การจำลองอนุพันธ์กรดไฮยาลูรอนิกที่แทนที่ด้วยโซ่แอลคิลที่เวลาต่าง ๆ

จากรูปที่ 1.6 จะเห็นการประกอบตัวเองของอนุพันธ์ HA ที่แทนที่ด้วยโซ่แอลคิลได้อย่างชัดเจน จากการตรวจสอบพื้นที่ผิวสัมผัสตัวทำละลาย (solvent-accessible surface area, SAS) พบว่าพื้นที่ผิวสัมผัสตัวทำละลายทั้งหมดของ hexHA และ ocdHA มีการลดลง ส่วน dodHA มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย ซึ่งสอดคล้องกับผลของ Rg และจากการตรวจสอบสัดส่วนของพื้นที่ผิวสัมผัสตัวทำละลายไฮโดรโฟบิกและพื้นที่ผิวสัมผัสตัวทำละลายไฮโดรฟิลิก ทำให้เห็นความแตกต่างของ hexHA และ ocdHA โดย ocdHA สามารถเห็นการลดลงของพื้นที่ผิวสัมผัสตัวทำละลายไฮโดรโฟบิกที่ชัดเจน นอกจากนี้ยังมีการตรวจสอบผลของระดับแอลคิลเลชัน โดยทำการจำลอง hexHA, dodHA, และ ocdHA ที่มีการแทนที่ด้วยโซ่แอลคิล 50% พบว่า Rg และระยะทางจากปลายถึงปลายมีค่าใกล้เคียงกับผลการทดลองก่อนหน้านี้ ความแตกต่างคือระดับของแอลคิลเลชันที่สูงขึ้นทำให้โมเลกุลเข้าสู่สมดุลได้เร็วขึ้น และยังมีการตรวจสอบอิทธิพลระดับของการแตกตัว (degree of dissociation) เนื่องจากหมู่คาร์บอกซิลิกของกรดไฮยาลูรอนิกโดยเปรียบเทียบผลระหว่างกรดไฮยาลูรอนิกสายเดี่ยว 26 unit 10 kDa ที่มีการแตกตัว 20% และ 100% พบว่า Rg และจำนวนพันธะไฮโดรเจนระหว่างพอลิเมอร์กับโมเลกุลของน้ำโดยรอบไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าระดับของการแตกตัวไม่มีผลต่อการจำลองแอมฟิฟิลิกกรดไฮยาลูรอนิก จากนั้นทำการทดลองใน bulk solution โดยสังเคราะห์ hexHA, dodHA, และ ocdHA 10 kDa และ 100 kDa เพื่อเปรียบเทียบอิทธิพลของความยาวของโซ่พอลิเมอร์ พบว่าพอลิเมอร์ที่มีขนาดยาวกว่าจะมีการประกอบตัวเองช้ากว่า จากการวัดขนาดของพอลิเมอร์พบว่า hexHA, dodHA, และ ocdHA ใน bulk solution มีแนวโน้มเช่นเดียวกับการจำลอง และจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Dynamic light scattering (DLS) พบว่าค่า intensity ของ ocdHA มีค่ามากกว่า hexHA และ dodHA ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ocdHA มีขนาดอนุภาคที่เล็กกว่า

1.5 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

1.5.1 การประกอบตัวเอง (self-assembly)

Self-assembly คือ การบวนการที่โมเลกุลมารวมกลุ่มกันและจัดเรียงตัวเองให้เป็นระเบียบ จนเกิดเป็นโครงสร้างที่มีขนาดใหญ่และความเสถียรโดยไม่ต้องมีการสร้างพันธะโควาเลนต์ระหว่างกัน

1.5.2 การจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล (Molecular dynamics simulation)

การจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล หรือ MD simulation เป็นเทคนิคการจำลองด้วยคอมพิวเตอร์เพื่อวิเคราะห์การเคลื่อนที่ทางกายภาพของอะตอมหรือโมเลกุล และศึกษาสมบัติทางไดนามิกโดยอาศัยกฎข้อที่ 2 ของนิวตัน

$$\vec{F} = m \vec{a} = m \frac{d\vec{v}}{dt} = m \frac{d^2\vec{r}}{dt^2} \quad (1)$$

โดยที่ \vec{F} คือ แรงที่กระทำต่อเวลา (N)

m คือ มวลของอะตอม

\vec{v} คือ ความเร็วของอะตอม

\vec{a} คือ ความเร่งของอะตอม

\vec{r} คือ ระยะทางที่อะตอมเคลื่อนที่

t คือ เวลา

1.5.3 สนามของแรง (force field)

Force field สำหรับการจำลองโมเลกุลหมายถึงรูปแบบและพารามิเตอร์ของฟังก์ชันทางคณิตศาสตร์ที่ใช้อธิบายพลังงานศักย์ของระบบอนุภาค โดยรูปแบบของฟังก์ชันพื้นฐานจะประกอบไปด้วย bonded terms ซึ่งอธิบายเกี่ยวกับอะตอมที่เชื่อมโยงกันด้วยพันธะโควาเลนต์ และ nonbonded terms ซึ่งอธิบายถึงแรงไฟฟ้าสถิตในระยะยาวและแรงแวนเดอร์วาลส์ โดยสามารถเขียนเป็นสมการได้ดังนี้

$$E_{\text{total}} = E_{\text{bonded}} + E_{\text{nonbonded}} \quad (2)$$

โดยที่ bonded terms และ nonbonded terms สามารถจำแนกได้ดังนี้

$$E_{\text{bonded}} = E_{\text{bond}} + E_{\text{angle}} + E_{\text{dihedral}} \quad (3)$$

$$E_{\text{nonbonded}} = E_{\text{electrostatic}} + E_{\text{vanderWaals}} \quad (4)$$

หรืออีกเขียนได้อีกรูปแบบดังนี้

$$U = \sum_{\text{bonds}} k_b (b - b_0)^2 + \sum_{\text{angles}} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{torsions}} \sum_n k_{\phi,n} [1 + \cos(n\phi + \phi_n)] + \sum_{i < j}^{\text{atoms}} 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \sum_{i < j}^{\text{atoms}} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \quad (5)$$

โดยที่

$$\sum_{\text{bonds}} k_b (b-b_0)^2 \quad (6)$$

คือพจน์ของ E_{bond} ซึ่ง k_b คือ ค่าคงที่ของแรงสำหรับการยืดหดพันธะ (bond stretching), b และ b_0 คือ ความยาวพันธะและความยาวพันธะสมดุล ตามลำดับ

$$\sum_{\text{angles}} k_\theta (\theta-\theta_0)^2 \quad (7)$$

คือพจน์ของ E_{angle} โดยที่ k_θ คือ ค่าคงที่ของแรงมุมพันธะ, θ และ θ_0 คือ มุมพันธะและมุมพันธะสมดุล ตามลำดับ

$$\sum_{\text{torsions}} \sum_n k_{\phi,n} [1 + \cos(n\phi + \phi_n)] \quad (8)$$

คือพจน์ของ E_{dihedral} โดยที่ n คือจำนวนคลื่นของฟังก์ชันของโคไซน์, ϕ คือ เฟสของฟังก์ชันโคไซน์ และ $k_{\phi,n}$ คือค่าคงที่ของมุมไดฮีดรัล

$$\sum_{i < j}^{\text{atoms}} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \quad (9)$$

คือพจน์ของ $E_{\text{electrostatic}}$ ซึ่งอาศัยการคำนวณจากกฎของคูลอมบ์ โดยที่ q_i และ q_j คือประจุบนอะตอม i และ j ตามลำดับ, ϵ_0 คือ ค่าเพอร์มิตติวิตีของสุญญากาศ (vacuum permittivity) และ r_{ij} คือรัศมีระหว่างอะตอม i และ j

$$\sum_{i < j}^{\text{atoms}} 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (10)$$

คือพจน์ของ $E_{\text{vanderWaals}}$ ซึ่งอยู่ในรูปของฟังก์ชันพลังงานศักย์เลนาร์ด-โจนส์ (Lennard-Jones) โดยที่ ϵ_{ij} คือค่า potential well depth ระหว่างอะตอม i และ j , σ_{ij} คือระยะห่างระหว่างอะตอม i และ j ที่มีค่าพลังงานศักย์เท่ากับศูนย์ และ r_{ij} คือรัศมีระหว่างอะตอม i และ j

1.5.4 ค่าการกระจัดเฉลี่ยกำลังสอง (Mean Squared Displacement, MSD)

เป็นค่าที่ใช้บอกตำแหน่งของโมเลกุลเปลี่ยนแปลงไปอย่างไรเมื่อเวลาผ่านไปโดยเทียบกับตำแหน่งอ้างอิง สามารถบอกได้ว่าโมเลกุลมีการกระจายตัวอย่างอิสระ หรือถูกจำกัดการเคลื่อนที่

$$\text{MSD}(t) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |r_i(t) - r_i(0)|^2 \quad (11)$$

โดยที่ $r_i(t)$ คือ ตำแหน่งของอะตอม i ที่เวลา t

$r_i(0)$ คือ ตำแหน่งของอะตอม i ที่จุดอ้างอิง

t คือ เวลา

นอกจากนี้ MSD ยังสามารถบอกได้เกี่ยวกับการแพร่กระจายของอะตอม โดยในระบบที่ไม่เป็นของแข็ง ค่า MSD เมื่อนำมาพล็อตกราฟเทียบกับเวลาจะเป็นเส้นตรง โดยเราสามารถดูพฤติกรรมของระบบได้จากความชันของ MSD ซึ่งเรียกว่าสัมประสิทธิ์การแพร่ (diffusion coefficient, D)

$$\text{MSD} = 2nDt \quad (12)$$

โดยที่ n คือ จำนวนมิติของการเคลื่อนที่แบบบราวเนียน

1.5.5 รัศมีจายเรชัน (Radius of gyration, R_g)

เป็นการวัดรากที่สองของค่าเฉลี่ยของผลต่างกำลังสองของระยะทางของโมเลกุลภายในระบบจากศูนย์กลางมวล (center of mass) สามารถบอกถึงรูปร่างหรือการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโมเลกุล การหดตัวหรือการคลายตัวของโมเลกุลในระหว่างการจำลองพลวัต

$$R_g = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (r_i - r_{\text{mean}})^2}{N}} \quad (13)$$

โดยที่ r_{mean} คือ ตำแหน่งเฉลี่ยของมอนอเมอร์

1.5.6 ค่าฟังก์ชันการกระจายเชิงรัศมี (Radial Distribution Function, RDF)

เป็นค่าที่ทำให้เราทราบถึงความน่าจะเป็นของการพบเจอคู่อะตอมที่ระยะทางต่าง ๆ ซึ่งใช้ในการอธิบายถึงสมบัติเชิงโครงสร้าง

$$g(r) = g^{(n)}(r_1, \dots, r_n) = \frac{N! \int \dots \int e^{\frac{-U_N}{kT}} dr_{n+1} \dots dr_N}{\rho^{n(N-n)! \int \dots \int e^{\frac{-U_N}{kT}} dr_1 \dots dr_N}} \quad (14)$$

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ประยุกต์ความรู้และผลการศึกษาไปพัฒนาระบบขนส่งยาระดับอนุภาคนาโนของกรดไฮยาลูรอนิกเพื่อใช้ในการทางการแพทย์ให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

บทที่ 2

การทดลอง

2.1 อุปกรณ์

1. คอมพิวเตอร์ส่วนบุคคล
2. คอมพิวเตอร์แม่ข่าย

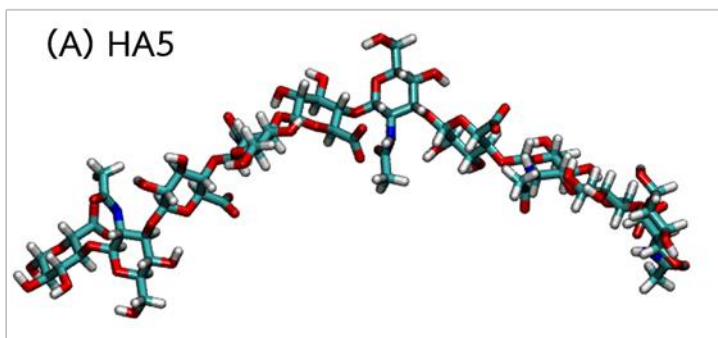
2.2 โปรแกรมที่ใช้ดำเนินงานวิจัย

1. CHARMM-GUI
2. GFortran
3. MobaXterm
4. NAMD
5. OriginPro
6. Packmol
7. VMD 1.9.3

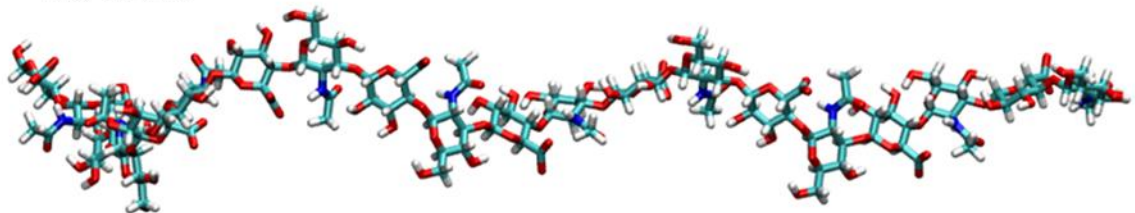
2.3 วิธีการทดลอง

2.3.1 การเตรียมระบบสำหรับจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล

1. ใช้แบบจำลองโครงสร้างสามมิติของ HA ขนาด 5 units (HA5) และ 10 units (HA10) จากงานวิจัยของ Taweechat P. et. al.¹⁰ เป็นโครงสร้างเริ่มต้น (รูปที่ 2.1)

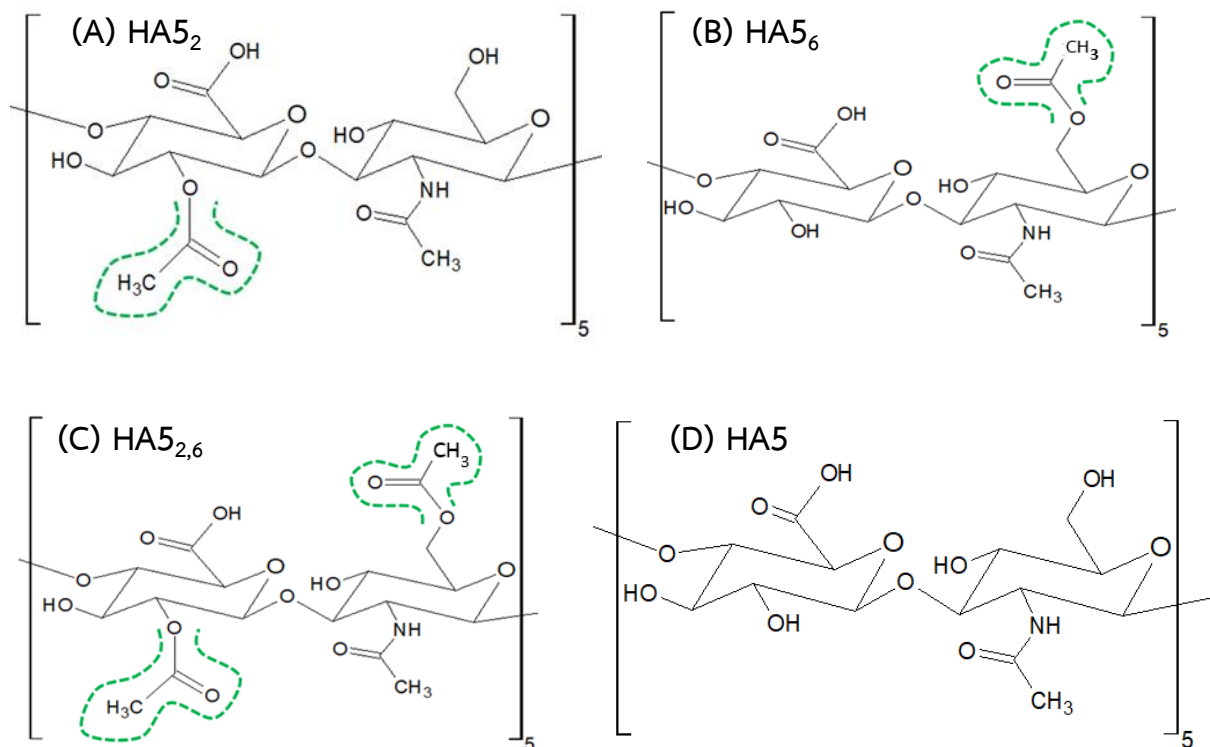


(B) HA10



รูปที่ 2.1 แบบจำลองโครงสร้างสามมิติของ HA (A) 5 units (HA5) และ (B) 10 units (HA10)

2. สร้างแบบจำลองโครงสร้างของ acetylated HA ขนาด 5 units ใน CHARMM-GUI และนำไฟล์โครงสร้างไปใช้ในการเตรียมระบบ โดยศึกษา Acetylated HA 5 ระบบ ที่มีตำแหน่งการดัดแปลงของอะซิติลแตกต่างกัน โดยเลือกดัดแปลงตำแหน่งที่ 2 ของ D-glucuronic acid และตำแหน่งที่ 6 ของ N-acetyl D-glucosamine เนื่องจากไม่สามารถสร้างโครงสร้างที่มีการดัดแปลงที่ตำแหน่งอื่นได้ซึ่งเกิดจากข้อผิดพลาดของ CHARMM-GUI โดย Acetylated HA 5 ระบบ ประกอบด้วย HA₅₂, HA₅₆, HA₅₆^{*}, HA₅_{2,6}, และ HA₅_{2,6}^{*} (รูปที่ 2.2) โดย HA₅₂ ดัดแปลงด้วยอะซิติลที่ตำแหน่งที่ 2 ของ D-glucuronic acid ในกรดไฮยาลูรอนิกทุกตำแหน่ง, HA₅₆ ดัดแปลงที่ตำแหน่งที่ 6 ของ N-acetyl D-glucosamine ทุกตำแหน่ง, HA₅₆^{*} ดัดแปลงที่ตำแหน่งที่ 6 ของ N-acetyl D-glucosamine แบบสุ่ม, HA₅_{2,6} ดัดแปลงที่ตำแหน่งที่ 2 ของ D-glucuronic acid และตำแหน่งที่ 6 ของ N-acetyl D-glucosamine ทุกตำแหน่ง, และ HA₅_{2,6}^{*} ดัดแปลงที่ตำแหน่งที่ 2 ของ D-glucuronic acid และตำแหน่งที่ 6 ของ N-acetyl D-glucosamine แบบสุ่ม



รูปที่ 2.2 รูปแสดงโครงสร้างของ acetylated HA และ HA โดยที่ (A) ดัดแปลงด้วยอะซิติลตำแหน่งที่ 2 ของ D-glucuronic acid, (B) ดัดแปลงที่ตำแหน่งที่ 6 ของ N-acetyl D-glucosamine, (C) ดัดแปลงที่ตำแหน่งที่ 2 ของ D-glucuronic acid และตำแหน่งที่ 6 ของ N-acetyl D-glucosamine, และ (D) HA ที่ไม่มีการดัดแปลง

3. สร้างแบบจำลองของ HA ในสารละลาย โดยใช้โครงสร้างที่เตรียมไว้ในข้อ 1 และ 2 ซึ่งรวมทั้งหมด 7 ระบบ ดังนี้ 1) HA₅, 2) HA₅₂, 3) HA₅₆, 4) HA₅₆^{*}, 5) HA₅_{2,6}, 6) HA₅_{2,6}^{*}, และ 7) HA₁₀ ในแต่ละระบบจะมีโครงสร้างสำเนาของโมเลกุลของ HA ทั้งหมด 10 โมเลกุล สำหรับ force field ใช้ CHARMM36 carbohydrate force field parameters จากนั้นจะทำการใส่โมเลกุลของน้ำชนิด TIP3P force field 10,000 โมเลกุล ซึ่งเป็นตัวทำละลายให้กับระบบ เนื่องจากหมู่คาร์บอกซิลของ HA อยู่ในสภาวะไอออน ดังนั้น

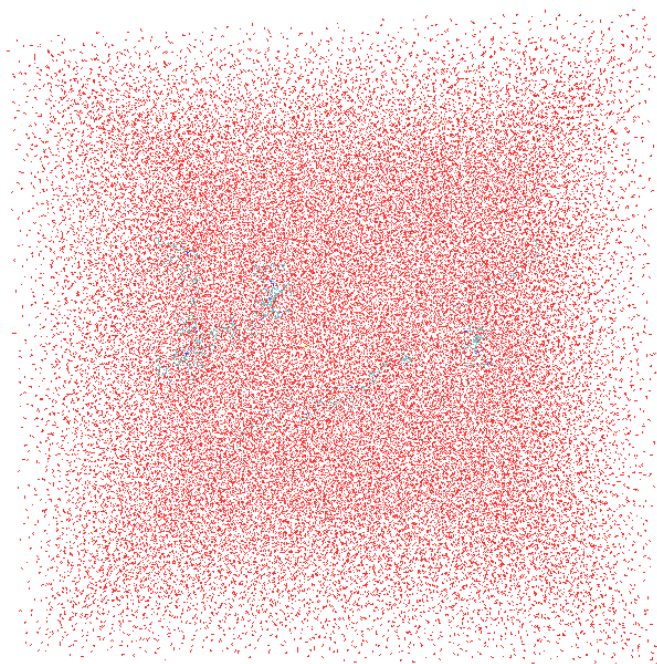
จึงเติมแคทไอออน Na^+ และแอนไอออน Cl^- และทำให้ระบบเป็นกลางทางประจุไฟฟ้า โดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ปรับให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 M ซึ่ง force field ของไอออนใช้ CHARMM36 parameters เช่นเดียวกัน ภายหลังจากทำการเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์แล้ว จะได้ระบบที่มีรูปทรงลูกบาศก์ขนาดเท่ากับ $148 \times 148 \times 148 \text{ \AA}^3$ (รูปที่ 2.3) ดังแสดงในตารางที่ 2.1 สำหรับขั้นตอนในข้อ 3 นี้ ดำเนินโดยการเขียนสคริปต์หรือชุดคำสั่งด้วยโปรแกรมภาษา tcl และประมวลชุดคำสั่งนี้ด้วยโปรแกรม VMD 1.9.3 สำหรับคำสั่งที่ใช้ในการรันไฟล์ .tcl คือ `vmd -dispdev text -e` ตามด้วยชื่อไฟล์นามสกุล tcl

ตารางที่ 2.1 ระบบจำลองของ HA, periodic boundary sizes และจำนวนอะตอมทั้งหมดที่ทำการจำลอง

ระบบ	Box size (\AA^3)	Total number of atoms
HA5	$148 \times 148 \times 148$	309,407
HA5 ₂	$148 \times 148 \times 148$	314,552
HA5 ₆	$148 \times 148 \times 148$	314,531
HA5 ₆ *	$148 \times 148 \times 148$	314,506
HA5 _{2,6}	$148 \times 148 \times 148$	314,547
HA5 _{2,6} *	$148 \times 148 \times 148$	314,530
HA10	$148 \times 148 \times 148$	311,707

2.3.2 การจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลของ acetylated HA

เตรียมไฟล์ .conf และกำหนดพารามิเตอร์สำหรับการจำลอง โดยทำการจำลองโดยใช้ periodic boundary condition ความเร็วในการเคลื่อนที่ของอนุภาคจะสอดคล้องกับที่อุณหภูมิ 300 K ความดัน 1 atm กำหนดเวลาในการเคลื่อนที่ต่อครั้ง (timestep) เท่ากับ 2 เฟมโตวินาที (fs) หรือ 2×10^{-15} วินาที และ non-bonded cutoff สำหรับ electrostatic และ van der Waals interactions เท่ากับ 12.0 \AA ก่อนเริ่มการจำลอง MD ทำการผ่อนคลายสภาพแข็งเกร็งทางโครงสร้างของระบบด้วยวิธี energy minimization จำนวน 1,000 steps หลังจากนั้นนำระบบทำการจำลอง MD ต่อ โดยให้จำนวนครั้งในการเคลื่อนที่ทั้งหมด 55,000,000 steps ดังนั้นในการศึกษานี้ เวลาที่ใช้ในการจำลอง MD ของระบบ เท่ากับ 110 นาโนวินาที (ns) ในขั้นตอนการจำลองนี้ใช้โปรแกรม NAMD



รูปที่ 2.3 ตัวอย่างระบบจำลอง MD ของ acetylated HA ในสารละลาย

2.3.3 การวิเคราะห์ผล

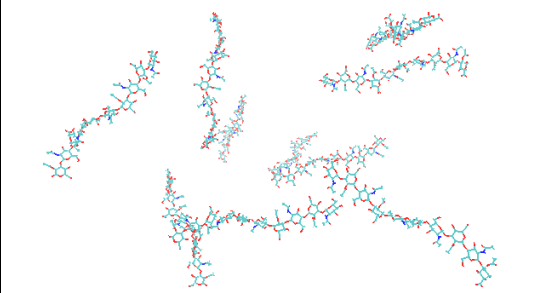
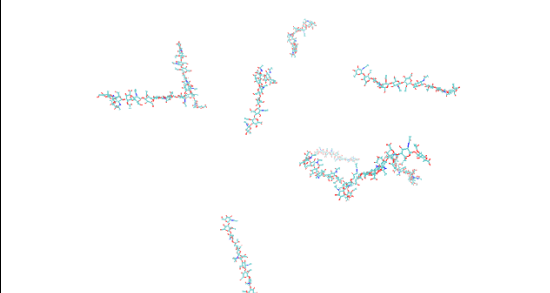
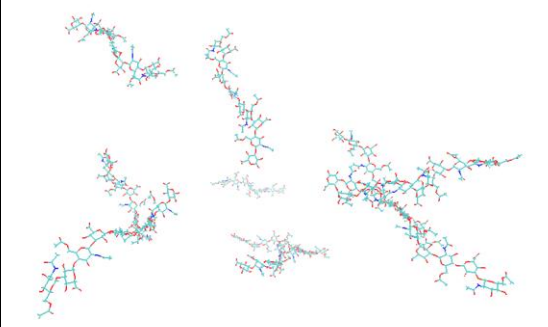
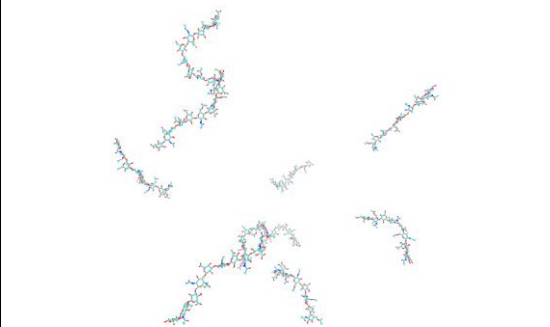
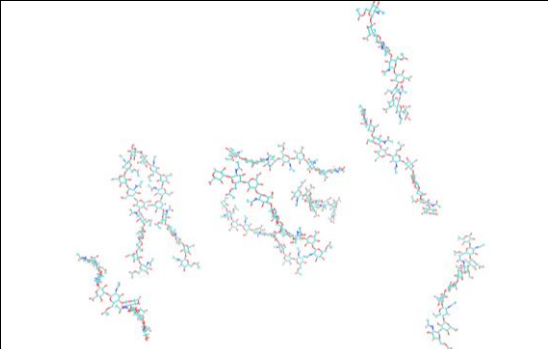
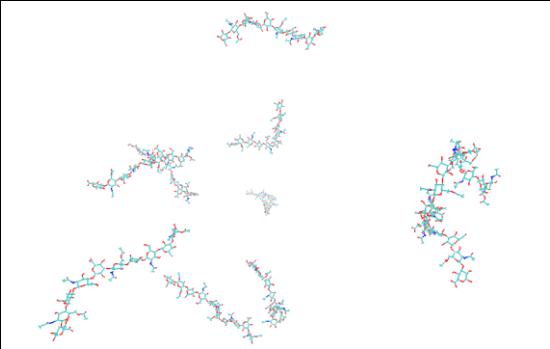
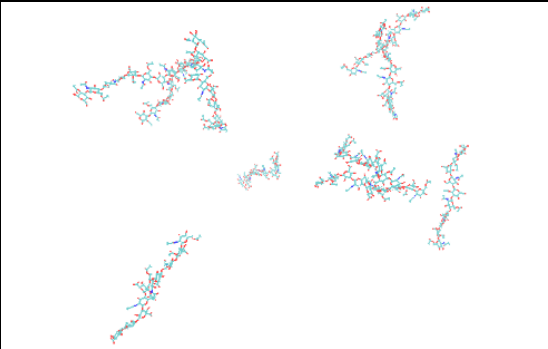
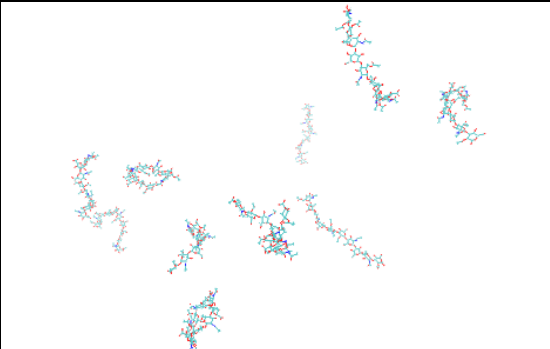
การวิเคราะห์ผลจะนำไฟล์ trajectory ที่ได้จากการรัน MD ไปวิเคราะห์ผ่านโปรแกรม VMD 1.9.3 โดยจะวิเคราะห์ค่า MSD, Rg, และ RDF แล้วนำข้อมูลที่ได้ไปพล็อตกราฟเพื่อทำการวิเคราะห์ผล

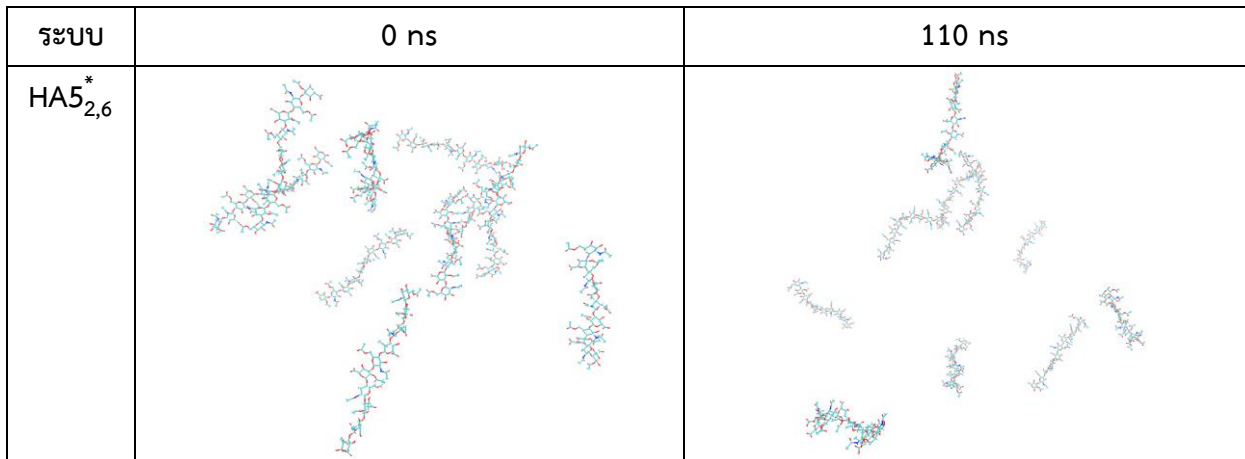
บทที่ 3

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

การประกอบตัวเองของ acetylated HA

ตารางที่ 3.1 ตารางแสดงแบบจำลองโครงสร้างภาพนิ่ง (snapshot structure) ของ acetylated HA ที่เวลาเริ่มต้น ($t = 0$ ns) และเวลาที่ $t = 110$ ns

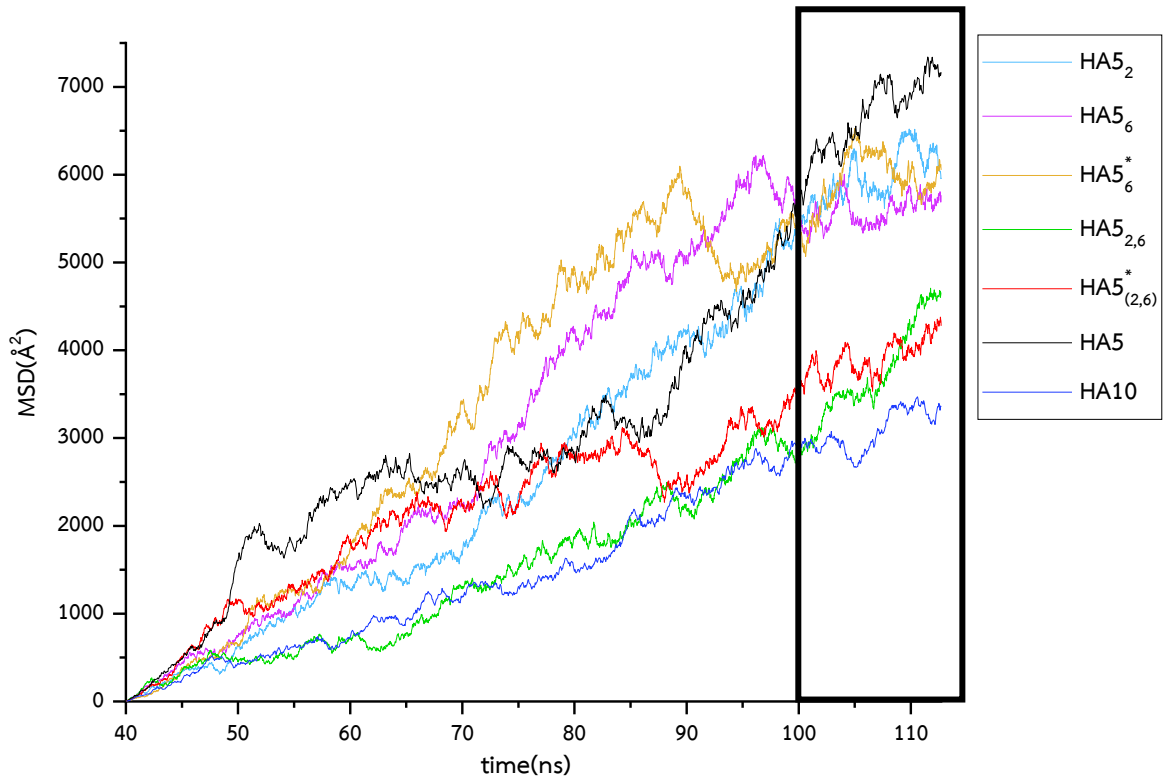
ระบบ	0 ns	110 ns
HA ₅ ₂		
HA ₅ ₆		
HA ₅ ₆ [*]		
HA ₅ _{2,6}		



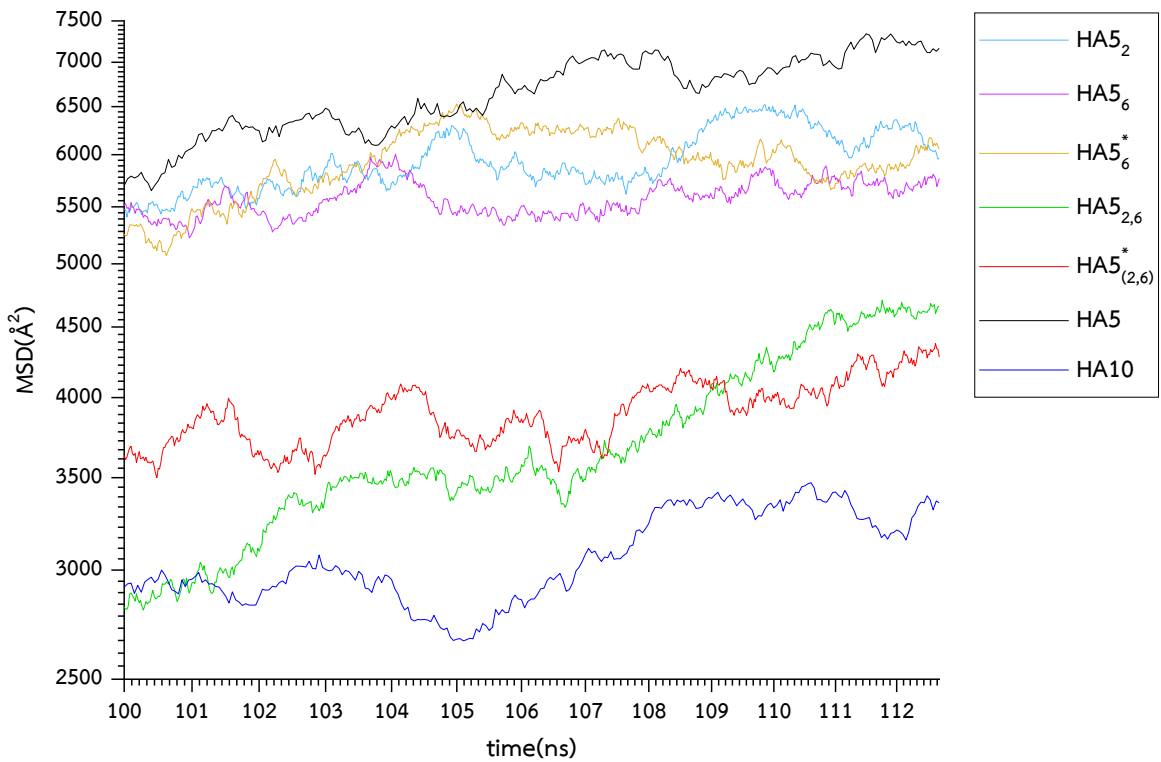
จากรูปในตารางที่ 3.1 พบว่า ยังไม่สามารถสังเกตเห็นการประกอบตัวเองของ acetylated HA ได้อย่างชัดเจน ซึ่งอาจเป็นเพราะระยะเวลาในการจำลองน้อยเกินไป ดังนั้นในการอภิปรายผลการทดลองนี้จะพิจารณาอัตราการแพร่ ขนาดของโมเลกุล และโครงสร้างไฮเดรชัน โดยวัดจาก MSD, Rg และ RDF ตามลำดับ และจะใช้วิธีการวิเคราะห์เชิงสัมพัทธ์เพื่อเปรียบเทียบสมบัติที่สามารถวัดได้จากการจำลอง และวิเคราะห์แนวโน้มที่น่าจะเกิดขึ้นในแต่ละระบบ

3.1 อัตราการแพร่โดยการวิเคราะห์ค่าการกระจัดเฉลี่ยกำลังสอง (Mean Squared Displacement, MSD)

การวิเคราะห์ค่า MSD เป็นการหาผลต่างของจุดศูนย์กลางมวลเมื่อเวลาเปลี่ยนไปโดยเทียบกับโมเลกุลอ้างอิง โดยโมเลกุลที่ใช้อ้างอิงในการวิเคราะห์นี้คือโมเลกุลที่ดำเนินการจำลองเป็นเวลา 40 นาโนวินาที และจะเริ่มสังเกตการเปลี่ยนแปลงการเคลื่อนที่ของโมเลกุลเมื่อดำเนินการจำลองตั้งแต่เวลา 40 ns เป็นต้นไป จากรูปที่ 3.1 พบว่าช่วงระยะเวลา 70 – 100 ns กราฟค่อนข้างมีความผันผวน โดยเมื่อเปรียบเทียบระหว่าง acetylated HA ขนาด 5 units ในช่วงเวลา 100 - 110 ns พบว่า HA5₂, HA5₆, และ HA5₆* ที่ดัดแปลงด้วยอะซิติก 1 ตำแหน่ง มีแนวโน้มของอัตราการแพร่ในทำนองเดียวกัน HA5_{2,6} และ HA5_{2,6}* ที่มีการดัดแปลงด้วยอะซิติก 2 ตำแหน่ง มีค่า MSD น้อยกว่า แสดงว่าตำแหน่งของการดัดแปลงด้วยอะซิติกมีผลต่อการเคลื่อนที่ของโมเลกุล นอกจากนี้ มีการเปรียบเทียบกับ HA ที่ไม่ได้ทำการดัดแปลงขนาด 5 units (HA5) และ 10 units (HA10) พบว่า HA5 มีแนวโน้มที่จะมีการกระจายตัวของโมเลกุลมากที่สุดหากมีการจำลองเป็นระยะเวลานานยิ่งขึ้น และ HA10 มีค่า MSD น้อยที่สุดเมื่อเทียบกับทั้งหมด เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง acetylated HA และ HA5 พบว่า HA5 มีค่า MSD มากกว่า นอกจากนี้ พบว่า HA5_{2,6} และ HA5_{2,6}* ที่มีการดัดแปลงด้วยอะซิติก 2 ตำแหน่งมีอัตราการแพร่ลดลงและใกล้เคียงกับ HA10 ซึ่งมีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่า 2 เท่า แสดงว่าการเติมอะซิติกซึ่งเป็นการเพิ่มไฮโดรโฟบิกมีผลทำให้อัตราการแพร่ของโมเลกุลลดลง ซึ่งอาจเกิดจาก hydrophobic interaction โมเลกุลอาจมีการรวมตัวกัน และ HA ซึ่งมีความเป็นไฮโดรฟิลิกสูง โมเลกุลอาจเกิด interaction กับน้ำได้ดีจึงมีอัตราการแพร่สูง



รูปที่ 3.1 กราฟแสดงอัตราการแพร่ของโมเลกุลของ acetylated HA ขนาด 5 units ที่ตัดแปลงด้วยอะซิติกที่ตำแหน่งแตกต่างกันและ HA ขนาด 5 units และ 10 units



รูปที่ 3.2 กราฟแสดงอัตราการแพร่ของโมเลกุลแบบสเกล log ของ acetylated HA ขนาด 5 units ที่ตัดแปลงด้วยอะซิติกที่ตำแหน่งแตกต่างกันและ HA ขนาด 5 units และ 10 units ในช่วงเวลา 100 - 110 ns

และเมื่อนำข้อมูลในช่วงเวลา 100 - 110 ns พล็อตเป็นสเกล log ดังรูปที่ 3.2 พบว่ากราฟมีลักษณะค่อนข้างเป็นเส้นตรง และเห็นความแตกต่างของค่า MSD แต่ละระบบได้อย่างชัดเจน และเมื่อนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยของสัมประสิทธิ์การแพร่ (D) ตามสมการที่ 12 โดยกำหนดให้ความเข้มข้นมีค่าเท่ากับ 1 จะได้ค่าเฉลี่ยของสัมประสิทธิ์การแพร่ของ HA5₂, HA5₆, HA5₆^{*}, HA5_{2,6}, HA5_{2,6}^{*}, HA5, และ HA10 ดังนี้ 14.85, 14.19, 14.85, 9.16, 9.81, 16.67, และ 7.62 Å²/ns ตามลำดับ (ตารางที่ 3.2) ดังนั้น เมื่อเปรียบเทียบอัตราการแพร่ของโมเลกุลกรดไฮยาลูรอนิคที่ศึกษานี้ ตามค่าสัมประสิทธิ์การแพร่จากมากไปหาน้อยจะได้ลำดับเป็นดังต่อไปนี้

$$HA5 > HA5_2 \approx HA5_6 \approx HA5_6^* > HA5_{2,6} \approx HA5_{2,6}^* > HA10$$

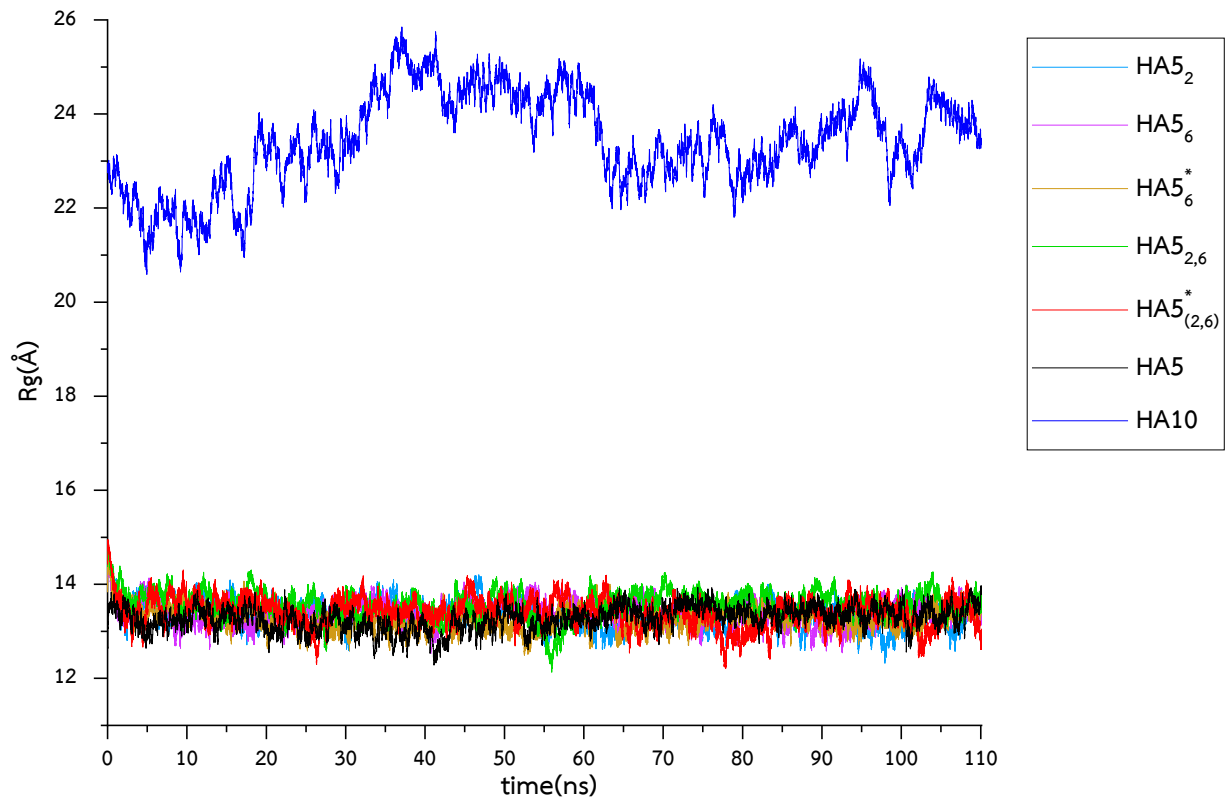
ตารางที่ 3.2 ตารางแสดงค่าสัมประสิทธิ์เฉลี่ยของการแพร่ (D)

ระบบ	D (Å ² /ns)
HA5 ₂	14.85
HA5 ₆	14.19
HA5 ₆ [*]	14.85
HA5 _{2,6}	9.16
HA5 _{2,6} [*]	9.81
HA5	16.67
HA10	7.62

3.2 ขนาดของโมเลกุลโดยการวิเคราะห์รัศมีไจเรชัน (Radius of gyration, R_g)

การวิเคราะห์รัศมีไจเรชันหรือ R_g สามารถบอกได้ว่าขนาดหรือรูปร่างสามมิติของโมเลกุลมีการเปลี่ยนแปลงหรือไม่ จากรูปที่ 3.3 พบว่า HA10 มีค่า R_g แตกต่างจากระบบอื่นอย่างชัดเจนเนื่องจากมีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่า เมื่อพิจารณา HA5 และ acetylated HA พบว่า R_g มีค่าใกล้เคียงกันมาก โดยมีค่าเฉลี่ย R_g ของ HA5₂, HA5₆, HA5₆^{*}, HA5_{2,6}, HA5_{2,6}^{*}, และ HA5 เท่ากับ 13.36, 13.40, 13.29, 13.57, 13.41 และ 13.27 Å ตามลำดับ ดังตารางที่ 3.3 และเมื่อเวลาผ่านไปพบว่า R_g ยังคงมีค่าใกล้เคียงกับที่จุดเริ่มต้นแสดงว่าขนาดหรือรูปร่างของโมเลกุลมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก ดังนั้นในช่วงระยะเวลาของการจำลอง MD นี้ การตัดแปลงด้วยหมู่อะซิติลจำนวน 1 หรือ 2 ตำแหน่งให้กับโมเลกุลกรดไฮยาลูรอนิคขนาด 5 unit ไม่ส่งผลต่อขนาดหรือรูปร่างสามมิติอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ค่า R_g ของ HA10 มีค่ามากกว่า HA ขนาด 5 unit และมีความผันผวนมากกว่าอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งจากข้อมูลก่อนหน้าพบว่า HA ที่มีความยาวของโซ่พอลิเมอร์มาก ความแปรปรวนของโครงสร้างมากส่งผลให้รัศมีไจเรชันมีความผันผวนมาก¹⁰ และเมื่อเปรียบเทียบขนาดของโมเลกุลกรดไฮยาลูรอนิคที่ศึกษานี้ ตามรัศมีไจเรชันจากมากไปหาน้อยจะได้ลำดับเป็นดังต่อไปนี้

$$HA10 > HA5 \approx HA5_2 \approx HA5_6 \approx HA5_6^* \approx HA5_{2,6} \approx HA5_{2,6}^*$$



รูปที่ 3.3 กราฟแสดงค่า R_g (Å) ของ acetylated HA ขนาด 5 units ที่ดัดแปลงด้วยอะซิติกที่ตำแหน่งแตกต่างกันและ HA ขนาด 5 units และ 10 units

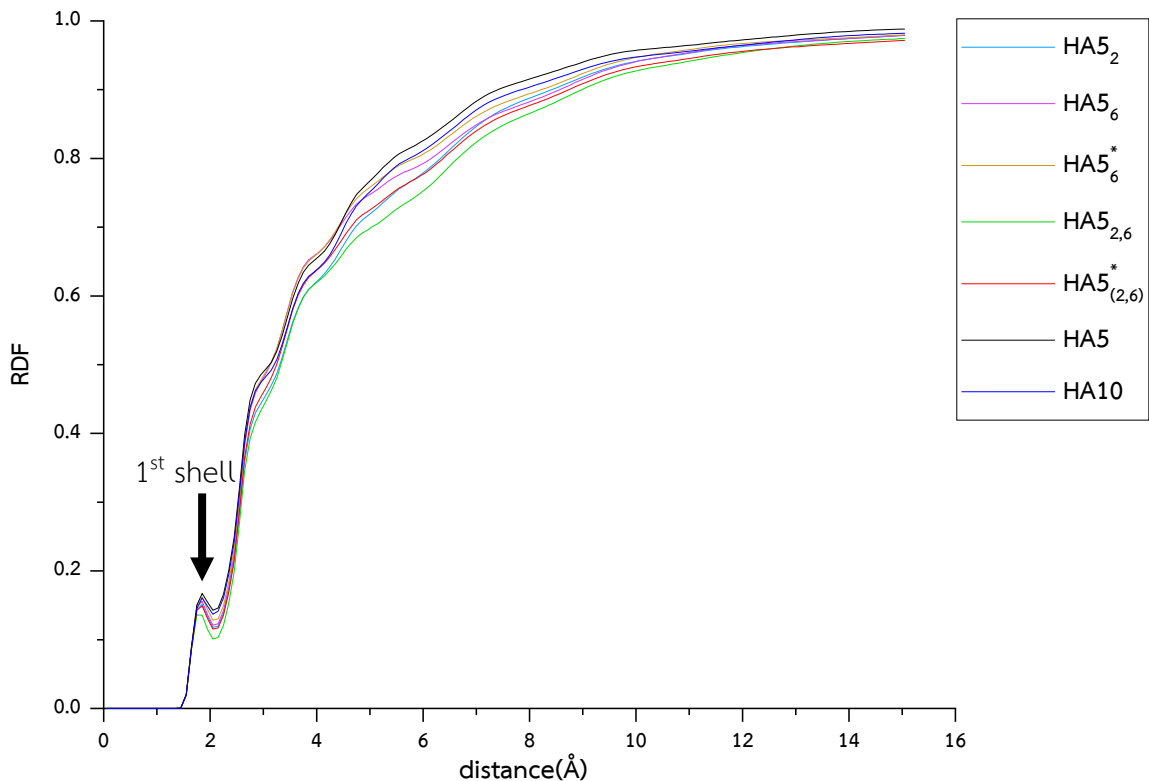
ตารางที่ 3.3 ตารางแสดงค่าเฉลี่ยรัศมีไจเรชัน (R_g)

ระบบ	R_g (Å)
HA5 ₂	13.36 ± 0.28
HA5 ₆	13.40 ± 0.25
HA5 ₆ [*]	13.29 ± 0.24
HA5 _{2,6}	13.57 ± 0.28
HA5 _{2,6} [*]	13.41 ± 0.31
HA5	13.27 ± 0.26
HA10	23.43 ± 1.00

3.3 โครงสร้างไฮเดรชันโดยการวิเคราะห์ค่าฟังก์ชันการกระจายเชิงรัศมี (Radial Distribution Function, RDF)

การวิเคราะห์ RDF เป็นการหาความน่าจะเป็นของการพบเจอคู่อะตอมที่ระยะทางต่าง ๆ จากรูปที่ 3.4 เป็นการหาความน่าจะเป็นของการพบเจอโมเลกุลน้ำที่ล้อมรอบโมเลกุล HA และ acetylated HA เทียบกับระยะทาง ซึ่งพบว่า กราฟ RDF ของการพบเจอโมเลกุลน้ำที่ล้อมรอบโมเลกุล HA และ acetylated HA

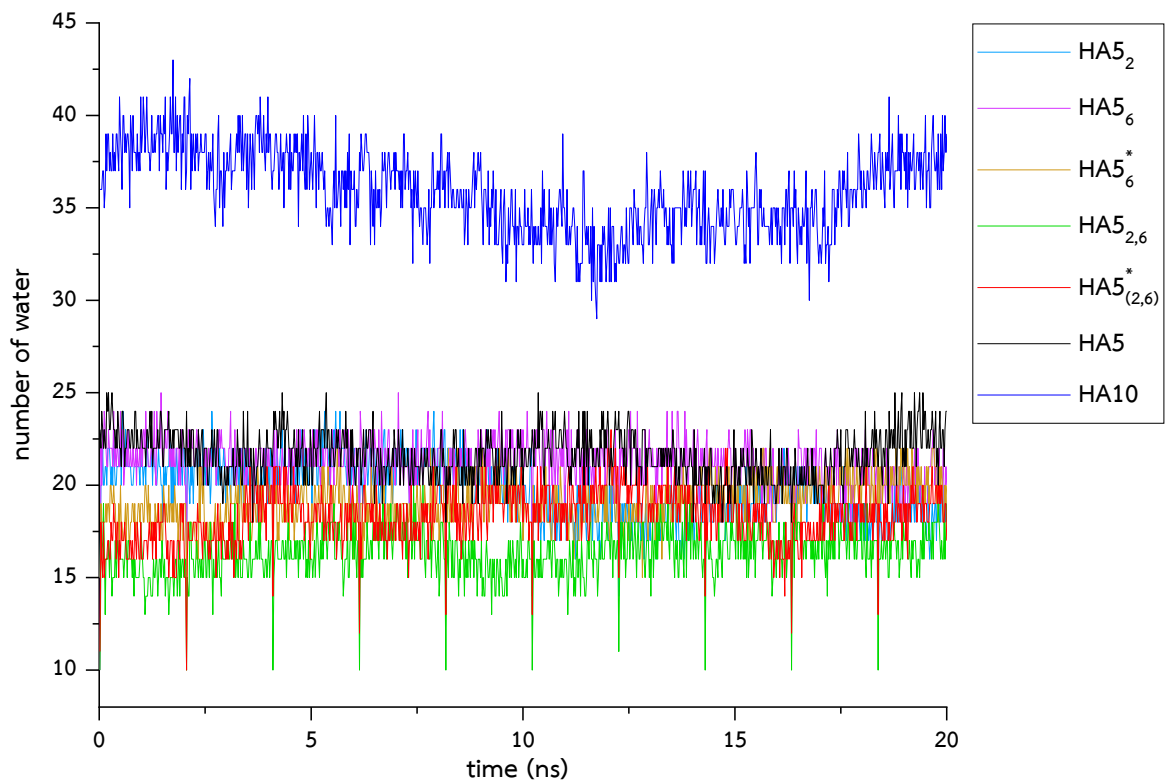
มีลักษณะใกล้เคียงกัน โดยจากกราฟจะพบพีคที่ชัดเจนพีคแรกของ RDF ซึ่งเป็นน้ำในชั้นแรกที่ล้อมรอบโมเลกุล HA (first solvation shell) อยู่ภายในช่วง $r = 1.45 - 2.15 \text{ \AA}$ โดยที่จุดสูงสุดของพีคอยู่ที่ตำแหน่ง 1.85 \AA จากการวิเคราะห์ตำแหน่งและทิศทางการจัดวางโมเลกุลของน้ำแสดงความเป็นไปได้ของพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลของ HA และน้ำ ซึ่งสอดคล้องกับบทความวิจัยที่เคยมีรายงานไว้ก่อนหน้านี้¹⁰ ดังนั้นแสดงว่าโครงสร้างไฮเดรชันของโมเลกุล HA และ acetylated HA ที่ศึกษามีลักษณะคล้ายคลึงกัน อย่างไรก็ตาม ที่ปลายพีคแรกของ RDF ไม่ได้แตะหรือสัมผัสกับแกน x ($y=0$) แสดงว่าน้ำที่อยู่ใน first solvation shell สามารถแลกเปลี่ยนกันกับน้ำใน bulk solution



รูปที่ 3.4 กราฟแสดงค่าฟังก์ชันการกระจายเชิงรัศมี (RDF) ของน้ำใน acetylated HA ขนาด 5 units ที่ดัดแปลงด้วยอะซิติกที่ตำแหน่งแตกต่างกันและ HA ขนาด 5 units และ 10 units

จากการคำนวณหาจำนวนของน้ำ (coordinate number, CN) ที่ล้อมรอบโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกและ acetylated HA ภายใน first solvation shell โดยกำหนดระยะตั้งแต่ $0 - 2.2 \text{ \AA}$ จากรูปที่ 3.5 จะสังเกตได้ว่า HA10 มีจำนวนของน้ำที่ล้อมรอบโมเลกุลมากที่สุดเนื่องจากมีขนาดใหญ่กว่า ค่าเฉลี่ยของจำนวนน้ำที่ล้อมรอบโมเลกุลภายใน first solvation shell ของ HA5₂, HA5₆, HA5₆^{*}, HA5_{2,6}, HA5_{2,6}^{*}, HA5, และ HA10 มีค่าเท่ากับ 19.74, 21.19, 19.06, 16.33, 18.32, 21.63, และ 35.88 ตามลำดับ ดังตารางที่ 3.4 จะเห็นได้ว่า HA5 มีค่าเฉลี่ยจำนวนน้ำมากกว่า acetylated HA ยกเว้น HA5₆ ทั้งนี้อาจต้องใช้เวลาในการจำลองมากกว่านี้ และ HA5_{2,6} ที่มีตำแหน่งของการดัดแปลงด้วยอะซิติกมากที่สุดมีค่าเฉลี่ยของจำนวนน้ำน้อยที่สุด เมื่อเปรียบเทียบจำนวนน้ำใน first solvation shell รอบโมเลกุลกรดไฮยาลูรอนิกที่ศึกษานี้ ตามค่าเฉลี่ยที่คำนวณได้จากมากไปหาน้อยจะได้ลำดับเป็นดังต่อไปนี้

$$HA10 > HA5 \approx HA5_6 > HA5_2 \approx HA5_6^* \approx HA5_{2,6}^* > HA5_{2,6}$$



รูปที่ 3.5 กราฟแสดงจำนวนน้ำที่ล้อมรอบโมเลกุลของ HA และ acetylated HA ภายใน first solvation shell

ตารางที่ 3.4 ตารางแสดงค่าเฉลี่ยของจำนวนน้ำที่ล้อมรอบโมเลกุลของ HA และ acetylated HA ภายใน first solvation shell

ระบบ	ค่าเฉลี่ยของจำนวนน้ำที่ล้อมรอบโมเลกุล
HA5 ₂	19.74 ± 1.66
HA5 ₆	21.19 ± 1.34
HA5 ₆ [*]	19.06 ± 1.32
HA5 _{2,6}	16.33 ± 1.33
HA5 _{2,6} [*]	18.32 ± 1.47
HA5	21.63 ± 1.28
HA10	35.88 ± 2.23

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

การศึกษานี้ใช้เทคนิคการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลเพื่อจำลองการประกอบตัวเองของโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิก ขนาด 5 หน่วยในสารละลายที่มีน้ำเป็นตัวทำละลาย โดยมีการดัดแปลงโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกด้วยการเติมหมู่อะซิติกแทนที่หมู่ไฮดรอกซิลในตำแหน่งที่ 2 และ 6 เพื่อลดความเป็นขั้วของโมเลกุล และทำการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล เป็นเวลา 110 ns ที่อุณหภูมิ 300 K ความดัน 1 atm เมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างภาพนิ่งก่อนและหลังการจำลองพบว่า ยังไม่มีการประกอบตัวอย่างชัดเจนในระยะเวลาของการจำลอง จากการศึกษาอัตราการแพร่โดยการวิเคราะห์ค่าการกระจายเฉลี่ยกำลังสอง พบว่าการดัดแปลงด้วยหมู่อะซิติกมีผลต่ออัตราการแพร่ของโมเลกุล โดยกรดไฮยาลูรอนิกที่ไม่มีการดัดแปลงมีอัตราการแพร่สูงกว่ากรดไฮยาลูรอนิกที่ดัดแปลงด้วยหมู่อะซิติก กรดไฮยาลูรอนิกที่ดัดแปลงด้วยหมู่อะซิติกสองตำแหน่งมีอัตราการแพร่ต่ำกว่ากรดไฮยาลูรอนิกที่มีการดัดแปลงด้วยหมู่อะซิติกเพียงตำแหน่งเดียว ทั้งนี้การที่อัตราการแพร่ลดลงอาจเป็นเพราะอิทธิพลทางไฮโดรโฟบิกของหมู่อะซิติกทำให้เกิดอันตรกิริยาดึงดูดระหว่างโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิก ในขณะที่อันตรกิริยาของกรดไฮยาลูรอนิกที่ไม่มีการดัดแปลงนั้นจะเป็นแบบการกระจายตัว (dispersion)

เป็นที่น่าสังเกตว่ากรดไฮยาลูรอนิกที่ดัดแปลงด้วยหมู่อะซิติกสองตำแหน่ง มีแนวโน้มที่ให้อัตราการแพร่ลดลงใกล้เคียงกับอัตราการแพร่ของกรดไฮยาลูรอนิกที่ไม่ได้ดัดแปลงและมีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่าสองเท่า แสดงว่าการเพิ่มความเข้มข้นไฮโดรโฟบิกให้กับกรดไฮยาลูรอนิกมีผลต่ออัตราการแพร่อย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตาม ยังไม่พบการขดตัวหรือมีวนพับของโครงสร้างภายในโมเลกุลกรดไฮยาลูรอนิกอย่างชัดเจน ทั้งนี้เนื่องจากค่ารัศมีไจเรชันของกรดไฮยาลูรอนิกค่อนข้างคงที่โดยมีค่าผันแปรอยู่ในช่วงแคบ ๆ ตลอดช่วงระยะเวลาในการจำลองพลวัต นอกจากนี้รัศมีไจเรชันของกรดไฮยาลูรอนิกที่ไม่มีการดัดแปลงกับที่มีการดัดแปลงนั้นมีค่าใกล้เคียงกัน แสดงว่ากรดไฮยาลูรอนิกทั้งสองชนิดมีรูปทรงที่คล้ายกัน และจากการศึกษาโครงสร้างไฮเดรชันโดยวิเคราะห์จากกราฟฟังก์ชันการกระจายเชิงรัศมี พบว่า โครงสร้างไฮเดรชันของกรดไฮยาลูรอนิกที่ไม่มีการดัดแปลงกับที่มีการดัดแปลงนั้นแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย โมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกมีโมเลกุลน้ำล้อมรอบอยู่เป็นโครงสร้างชั้นแรก (first shell structure) โดยเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลของกรดไฮยาลูรอนิกกับน้ำ ค่าเฉลี่ยจำนวนน้ำที่ล้อมรอบกรดไฮยาลูรอนิกที่ไม่มีการดัดแปลงมากกว่าที่มีการดัดแปลงด้วยหมู่อะซิติก ยกเว้นมีการดัดแปลงที่ตำแหน่งที่ 6 (HA5₆) ทั้งนี้อาจเกี่ยวข้องกับเวลาของการจำลองที่ไม่มากพอ

ข้อเสนอแนะ

สำหรับการทดลองในลำดับถัดไปควรมีการศึกษาในระยะเวลาในการจำลองที่ยาวนานขึ้นเพื่อที่จะสามารถสังเกตพฤติกรรมของการประกอบตัวเองของกรดไฮยาลูรอนิกที่มีการดัดแปลงด้วยหมู่อะซิติกได้ชัดเจนมากขึ้น ขนาดของกรดไฮยาลูรอนิก 5 หน่วยอาจเล็กเกินไปที่จะสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงรูปทรงสามมิติอัน

เนื่องมาจากการม้วนพับทางโครงสร้างของพอลิเมอร์ ดังนั้นการเพิ่มระบบการจำลองที่มีการดัดแปลงด้วยหมู่ อะซิติกที่ตำแหน่งแตกต่างกันในกรดไฮยาลูรอนิคขนาดใหญ่มากขึ้น น่าจะให้ผลการทดลองที่สังเกตเห็นการ ประกอบตัวเองได้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น อย่างไรก็ตาม ข้อจำกัดหรืออุปสรรคสำคัญในการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล ของระบบที่มีขนาดใหญ่มากขึ้น คือ สมรรถนะและประสิทธิภาพของเครื่องคอมพิวเตอร์

เอกสารอ้างอิง

1. Bazak, R.; Hour, M.; El Achy, S.; Kamel, S.; Refaat, T., Cancer active targeting by nanoparticles: a comprehensive review of literature. *J Cancer Res Clin Oncol* **2015**, *141* (5), 769-784.
2. Wang, X.; Wang, Y.; Chen, Z. G.; Shin, D. M., Advances of cancer therapy by nanotechnology. *Cancer Res Treat* **2009**, *41* (1), 1-11.
3. Weissmann, B.; Meyer, K., The Structure of Hyalobiuronic Acid and of Hyaluronic Acid from Umbilical Cord^{1,2}. *J Am Chem Soc* **1954**, *76* (7), 1753-1757.
4. Fraser, J. R.; Laurent, T. C.; Laurent, U. B., Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med* **1997**, *242* (1), 27-33.
5. Oh, E. J.; Park, K.; Kim, K. S.; Kim, J.; Yang, J. A.; Kong, J. H.; Lee, M. Y.; Hoffman, A. S.; Hahn, S. K., Target specific and long-acting delivery of protein, peptide, and nucleotide therapeutics using hyaluronic acid derivatives. *J Control Release* **2010**, *141* (1), 2-12.
6. Wickens, J. M.; Alsaab, H. O.; Kesharwani, P.; Bhise, K.; Amin, M.; Tekade, R. K.; Gupta, U.; Iyer, A. K., Recent advances in hyaluronic acid-decorated nanocarriers for targeted cancer therapy. *Drug Discov Today* **2017**, *22* (4), 665-680.
7. Kim, K.; Choi, H.; Choi, E. S.; Park, M. H.; Ryu, J. H., Hyaluronic Acid-Coated Nanomedicine for Targeted Cancer Therapy. *Pharmaceutics* **2019**, *11* (7).
8. Park, W.; Kim, K. S.; Bae, B. C.; Kim, Y. H.; Na, K., Cancer cell specific targeting of nanogels from acetylated hyaluronic acid with low molecular weight. *Eur J Pharm Sci* **2010**, *40* (4), 367-75.
9. Saturnino, C.; Sinicropi, M. S.; Parisi, O. I.; Iacopetta, D.; Popolo, A.; Marzocco, S.; Autore, G.; Caruso, A.; Cappello, A. R.; Longo, P.; Puoci, F., Acetylated hyaluronic acid: enhanced bioavailability and biological studies. *Biomed Res Int* **2014**, *2014*, 921549.
10. Taweechat, P.; Pandey, R. B.; Sompornpisut, P., Conformation, flexibility and hydration of hyaluronic acid by molecular dynamics simulations. *Carbohydr Res* **2020**, *493*, 108026.

ภาคผนวก

ตัวอย่างแสดงการคำนวณค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ (D) ของ HA5₂

จากสมการที่ 12

$$\text{MSD} = 2nDt$$

$$\log \text{MSD} = \log 2nDt = \log t + \log 2nD$$

จากรูปที่ 3.2 เมื่อเขียนกราฟเป็นเส้นตรง โดยกำหนดให้ค่าความชันเท่ากับ 1 จะได้ว่า

$$\log \text{MSD} = \log t + 1.95$$

กำหนดให้ n คือ 3

$$1.95 = \log 2nD = \log 6D$$

∴ ค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ (D) = 14.85 Å²/ns

ประวัติผู้วิจัย

นางสาวปฐมาวดี สุนทรสุวรรณ เกิดเมื่อวันที่ 5 เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2541 ที่จังหวัดกาญจนบุรี สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนท่ามะกาวิทยาคม จังหวัดกาญจนบุรี เมื่อปีการศึกษา 2559 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2560 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 41/5 หมู่ 5 ตำบลตะคร้ำเอน อำเภอท่ามะกา จังหวัดกาญจนบุรี รหัสไปรษณีย์ 71130 อีเมล breenniiz@gmail.com