

การศึกษาอันตรกิริยาระหว่างเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส
กับสารสำคัญจากต้นสองฟ้า ด้วยวิธีโมเลกุลาร์ดีคกิง

To Study the Molecular Interaction between Acetylcholinesterase Enzymes
and the Isolated Compounds from *Clausena Harmandiana*
by Molecular Docking Technique¹

กิ่งแก้ว สีทน¹ ปัญญาดา ปัญญาทิพย์² และเพลินทิพย์ ภูทองกิ่ง^{3,4}

Kingkaeo Sithon¹, Panyada Panyatip² and Ploenthip Puthongking^{3,4}

¹สาขาวิชาเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

¹Master of Sciences Program in Pharmaceutical Chemistry and Natural Products,
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University

²กลุ่มวิจัยเมลาโทนิน คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

²Melatonin Research Group, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University

³ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

³Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University

⁴ศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพจากสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

⁴Center for Research and Development of Herbal Health Products (CRD-HHP),
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University

Received: July 17, 2020

Revised: September 11, 2020

Accepted: September 18, 2020

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาการจำลองอันตรกิริยาระหว่างเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสชนิด *Homo sapiens* (*hAChE*) และ *Torpedo californica* (*TcAChE*) กับสารสำคัญจากต้นสองฟ้า (*Clausena harmandiana*) ได้แก่สารกลุ่มคูมาริน ซึ่งประกอบด้วย Xanthoxyletin, Nordentatin, Dentatin และ Clausarin สารกลุ่มคาร์บาโซลแอลคาลอยด์ ได้แก่ 7-Methoxymukonal, 7-Methoxyheptaphylline และ Heptaphylline ด้วยวิธีโมเลกุลาร์ดีคกิง ในการทดลองได้นำสารมาตรฐานที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส ได้แก่ Donepezil, Rivastigmine, Galantamine และ Tacrine เป็นกลุ่มควบคุมในการรีดีคกิง จากการทดลองสามารถสร้างพารามิเตอร์ที่สอดคล้องกับรายงานที่ผ่านมา โดยสารมาตรฐานทุกตัวมีค่าพลังงานยึดจับ กับ *hAChE* อยู่ในช่วง -11.53 ถึง -7.31 kcal/mol และ *TcAChE* อยู่ในช่วง -11.30 ถึง -7.04 kcal/mol ดังนั้นพารามิเตอร์ดังกล่าวจึงถูกนำมาใช้ศึกษากับสารทดสอบ ผลการศึกษาพบว่าการเกิดอันตรกิริยาระหว่างเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสทั้งชนิด *hAChE* และ *TcAChE* กับสารทดสอบทั้งหมดให้ผลสอดคล้องและเป็นไปในทิศทางเดียวกัน และมีการยึดจับผ่านอันตรกิริยา 3 แบบ ได้แก่ H-bonding, π - π interaction

และ hydrophobic interaction ที่บริเวณ Peripheral Anionic Site--PAS ได้เช่นเดียวกันทั้งหมด และพบว่าสารกลุ่มคูมารินสามารถยึดจับกับเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสทั้ง 2 ชนิด ได้ดีกว่าสารกลุ่มคาร์บาโซลแอลคาลอยด์ โดยสาร Clausarin สามารถยึดจับกับเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสทั้ง 2 ชนิดได้ดีที่สุด และมีค่าพลังงานยึดจับใกล้เคียงกับ Donepezil จึงอาจกล่าวได้ว่า สารจากต้นส่องฟ้าโดยเฉพาะสารกลุ่มคูมารินมีศักยภาพในการพัฒนาต่อยอดเป็นสารออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส

คำสำคัญ: โมเลกุลาร์ด็อกกิง ส่องฟ้า อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส คูมาริน คาร์บาโซลแอลคาลอยด์

Abstract

This research aims to study the molecular interaction between acetylcholinesterases (AChEs), *Homo sapiens* (*hAChE*) and *Torpedo californica* (*TcAChE*) and the isolated Coumarins (Xanthoxyletin, Nordentatin, Dentatin and Clausarin) and Carbazole alkaloids (7-Methoxymukonal, 7-Methoxyheptaphylline and Heptaphylline) from *Clausena harmandiana* using *in-silico* molecular docking technique. Four standard acetylcholinesterase inhibitors are Donepezil, Rivastigmine, Galantamine, and Tacrine were used for re-docking process. The complex of *hAChE* or *TcAChE* with four standard acetylcholinesterase inhibitors displayed the binding energies value in the range -11.53 to -7.31 kcal/mol and -11.30 to -7.04 kcal/mol, which accorded to the previously study. Therefore, the optimized crystal structures of AChEs were further used in this study. The docking result showed the same pattern of molecular interaction via H-bonding, π - π interaction and hydrophobic interaction at Peripheral Anionic Site--PAS, and stability binding trend between AChEs and all tested compounds were observed. Coumarins displayed the stable complex with AChEs than Carbazole alkaloids, especially Clausarin exhibited the most stability complex. To summarize, the isolated compounds from *C. harmandiana*, particularly coumarins have the high potential to be acetylcholinesterase inhibitor agent.

Keywords: molecular docking, *hAChE*, *TcAChE*, coumarins, Carbazole alkaloids



บทนำ

จากการสำรวจ 10 สาเหตุหลักของการเสียชีวิตของประชากรทั่วโลกในปี ค.ศ. 2010 ถึง ค.ศ. 2016 ขององค์การอนามัยโลก พบผู้ป่วยเสียชีวิตจากโรคอัลไซเมอร์เพิ่มขึ้นเป็นอันดับที่ 5 ในปี ค.ศ. 2016 ซึ่งเดิมในปี ค.ศ. 2010 อยู่ในอันดับที่ 8 จะเห็นได้ว่าอัตราการเสียชีวิตจากโรคอัลไซเมอร์ในระยะเวลา 6 ปี มีอัตราเพิ่มสูงขึ้นถึง 41.67% ซึ่งสูงกว่าอัตราการเพิ่มขึ้นของโรคหัวใจ (11.57%)

ซึ่งเป็นสาเหตุการเสียชีวิตเป็นอันดับแรก (WHO, 2018) สืบเนื่องจากอัตราการเพิ่มขึ้นของสถิติการเกิดโรคอัลไซเมอร์ เป็นผลให้มีความวิจัยเกี่ยวกับโรคทางระบบประสาทเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ โดยเฉพาะโรคอัลไซเมอร์ มีการตั้งสมมุติฐานการเกิดโรคอัลไซเมอร์ไว้หลายสมมุติฐาน โดยสมมุติฐานโคลิเนอร์จิก (Cholinergic hypothesis) เป็นสมมุติฐานที่ได้รับการยอมรับอย่างแพร่หลายในทางวิทยาศาสตร์ว่าเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดโรค จึงมีการนำสมมุติฐานดังกล่าวมาใช้

สำหรับการออกแบบโครงสร้างยารักษาโรคอัลไซเมอร์ในปัจจุบัน กล่าวคือโรคอัลไซเมอร์เกิดจากการลดลงของสารสื่อประสาทอะซิติลโคลีน (Acetylcholine--ACh) ที่บริเวณปลายประสาท เนื่องจากถูกไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (Acetylcholinesterase--AChE) ทำให้อะซิติลโคลีนที่ส่งไปยังตัวรับนิโคตินิก (Nicotinic receptor) และมัสคารินิก (Muscarinic receptor) เกิดความไม่สมดุล และเหนี่ยวนำให้เกิดการสะสมของเบต้าอะไมลอยด์ (β -amyloids) รวมไปถึงการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเทาโปรตีน (Tau proteins) ส่งผลให้เกิดเป็นโรคอัลไซเมอร์ (Giacobini, 2003) หนึ่งในแนวทางการรักษาโรคอัลไซเมอร์คือการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถไฮโดรไลซ์สารสื่อประสาทอะซิติลโคลีนได้ ส่งผลให้ปริมาณสารสื่อประสาทอะซิติลโคลีนเพิ่มขึ้น และเกิดการยับยั้งการสะสมของสารเบต้าอะไมลอยด์ รวมถึงป้องกันการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเทาโปรตีน ยารักษาโรคอัลไซเมอร์ในปัจจุบันที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE ได้แก่ Tacrine, Donepezil, Galantamine และ Rivastigmine (ภาพ 1) แต่ในปัจจุบันได้ยกเลิกการใช้ Tacrine ในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ ทั้งนี้เนื่องจากพบรายงานการเกิดพิษต่อตับ (Froestl, Muhs & Pfeifer, 2014) แต่อย่างไรก็ตามยังคงมีการใช้ Tacrine เพื่อเป็นสารมาตรฐานในห้องปฏิบัติการสำหรับการทดสอบในหลอดทดลอง

การพัฒนาการรักษาโรคอัลไซเมอร์ในปัจจุบันมีความก้าวหน้าอย่างมาก เนื่องจากมีการนำการศึกษาทางเคมีคอมพิวเตอร์เข้ามาประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกโครงสร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ AChE โดยการศึกษาโมเลกุลาร์ด็อกกิง (Molecular docking) จากการคำนวณพลังงานการยึดจับและการเกิดอันตรกิริยากับกรดอะมิโน โดยใช้ซอฟต์แวร์ทางคอมพิวเตอร์มาประยุกต์ใช้ในการคำนวณ และใช้วิธีของ Monte Carlo ในการหาตำแหน่งที่เหมาะสมของสารในการจับกับกับเอนไซม์ (Metropolis, Rosenbluth, Rosenbluth, Teller & Teller, 1953) โดยโปรแกรมดังกล่าวได้พัฒนามาจากโครงสร้างเอกซเรย์ของเอนไซม์ AChE ที่เคยมีรายงานได้แก่เอนไซม์ *Homo sapiens* (รหัส 1B41 1F8U 4EY6 4EY7), *Mus musculus* (รหัส 1N5M 1N5R 1J06 1J07), *Torpedo californica* (รหัส 1EVE

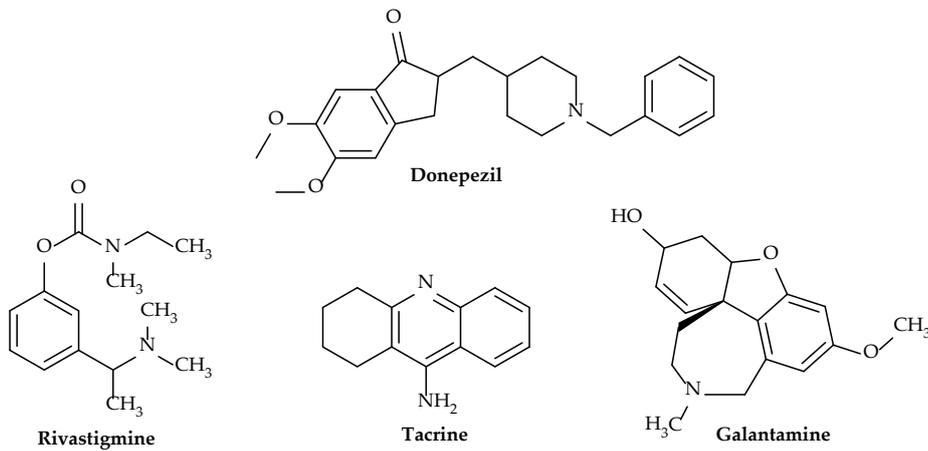
1GQR 1DX6 1W6R 1QTI 1EA5 1ACJ), *Electrophorus electricus* (รหัส 1C2O) และ *Drosophila melanogaster* (รหัส 1QO9) แต่ที่นิยมนำมาศึกษาโมเลกุลาร์ด็อกกิง ได้แก่ *H. sapiens* (hAChE), *E. electricus* (eelAChE) และ *T. californica* (TcAChE) แต่เนื่องจาก เอนไซม์ TcAChE และ eelAChE มีความคล้ายคลึงกันมาก จึงได้มีนักวิทยาศาสตร์ทำการเปรียบเทียบผลของการด็อกกิงจากทั้ง 2 เอนไซม์ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกัน แต่ข้อมูลการเกิดอันตรกิริยาของกรดอะมิโนจากเอนไซม์ TcAChE มีความชัดเจนมากกว่า eelAChE (Razavi et al., 2013) จึงทำให้มีงานวิจัยหลายฉบับนิยมใช้โครงสร้างของเอนไซม์ TcAChE มากกว่า eelAChE

เนื่องจากประเทศไทยมีความอุดมสมบูรณ์ของทรัพยากรธรรมชาติเป็นอย่างมาก สมุนไพรหรือสารจากธรรมชาติจึงเป็นแหล่งที่มาสำคัญของการค้นหายารักษาโรคต้นสอ่งฟ้า (*Clausena harmandiana*) ซึ่งเป็นต้นไม้ที่พบมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ในอดีตใช้เป็นยาพื้นบ้านในการลดไข้ จากข้อมูลด้านพฤกษเคมีมีรายงานว่าพบสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบหลัก 2 กลุ่ม คือ สารกลุ่มคาร์บาโซลแอลคาลอยด์ (Carbazole alkaloids) และสารกลุ่มคูมาริน (Coumarins) (Songsiang, Thongthoom, Boonyarat & Yenjai, 2011; Jantakoon, Tadtong & Puthongking, 2012; Wangboonskul, Tunsirikongkon & Sasithomwetchakun, 2015; Jantamart, Weerapreeyakul & Puthongking, 2019) และจากงานวิจัยเบื้องต้นของกลุ่มของผู้วิจัยที่ผ่านมา พบสารสกัดหยาบจากต้นสอ่งฟ้ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท และพบสารองค์ประกอบ คือ สาร Nordentatin ซึ่งเป็นสารในกลุ่มคูมาริน มีฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์ประสาทสูงกว่าสารอื่นๆ ในกลุ่มคูมาริน (Jantakoon et al., 2012) และกลุ่มของผู้วิจัยยังได้แยกสารองค์ประกอบจากต้นสอ่งฟ้าได้แก่ สารกลุ่มคูมาริน 4 ชนิด ได้แก่ Xanthoxyletin, Dentatin, Nordentatin และ Clausarin และสารกลุ่มคาร์บาโซลแอลคาลอยด์ จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ 7-Methoxyheptaphylline, Heptaphylline และ 7-Methoxymukonal (ภาพ 2) พบว่า สารทุกตัวมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Jantamart et al., 2019) นอกจากนี้กลุ่มวิจัยยังสนใจศึกษาศักยภาพของสารทั้ง 7 ชนิดในการออกฤทธิ์ป้องกันหรือรักษาโรคอัลไซเมอร์ ผ่าน

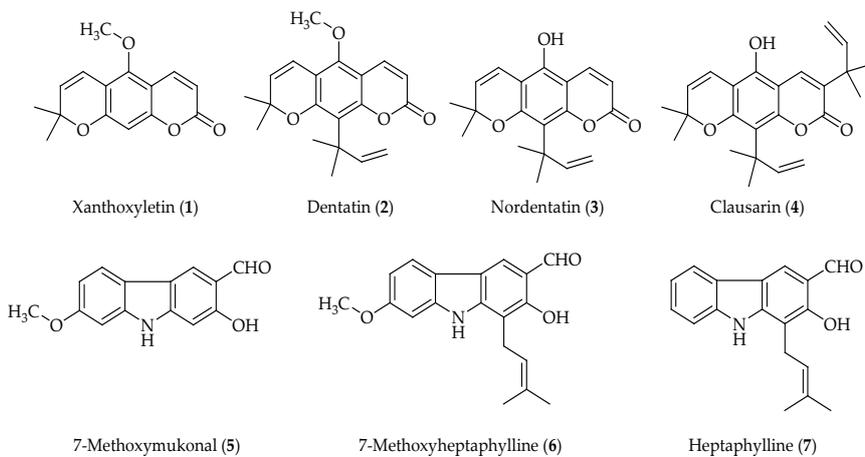
กลไกการยับยั้งเอนไซม์ AChE จากการทบทวนวรรณกรรมที่ผ่านมาไม่พบรายงานแสดงการเกิดอันตรกิริยาของสารกลุ่มคูมารินและคาร์บาโซลแอลคาลอยด์ จากต้นสอ่งฟ้ากับเอนไซม์ AChE จึงทำให้เกิดงานวิจัยครั้งนี้ และเนื่องจากสารที่แยกได้จากต้นสอ่งฟ้ามีปริมาณน้อยมาก ดังนั้นเพื่อลดปริมาณการใช้สารจากธรรมชาติในเบื้องต้น และเพื่อให้ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการทดสอบ เพื่อให้ได้มาซึ่งข้อมูลเบื้องต้น ผู้วิจัยจึงได้นำโปรแกรมคอมพิวเตอร์มาใช้ในการทำนายความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ AChE รวมถึงการศึกษาการเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารจากต้นสอ่งฟ้ากับเอนไซม์ AChE ด้วยวิธีโมเลกุลาร์ต็อกกิง ในการทดลองครั้งนี้เลือกใช้โครงสร้างเอกซเรย์ของเอนไซม์ *hAChE* และ *TcAChE*

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อทำนายฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ AChE ของสารสำคัญจากเปลือกรากสอ่งฟ้า 7 ชนิด ได้แก่ Xanthoxyletin, Nordentatin, Dentatin, Clausarin, 7-Methoxymukonal, 7-Methoxy-heptaphylline และ Heptaphylline ด้วยวิธีโมเลกุลาร์ต็อกกิง และศึกษาอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างสารทั้ง 7 ชนิด กับเอนไซม์ *AChEs* (*hAChE* และ *TcAChE*) เพื่อเป็นข้อมูลอ้างอิง และแนวทางในการดัดแปลงโครงสร้างสารกลุ่มคูมารินและคาร์บาโซลแอลคาลอยด์ให้มีฤทธิ์สูงขึ้น



ภาพ 1 โครงสร้างของสารมาตรฐานที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส



ภาพ 2 โครงสร้างของสาร 7 ชนิด ที่แยกได้จากต้นสอ่งฟ้า

วิธีดำเนินการวิจัย

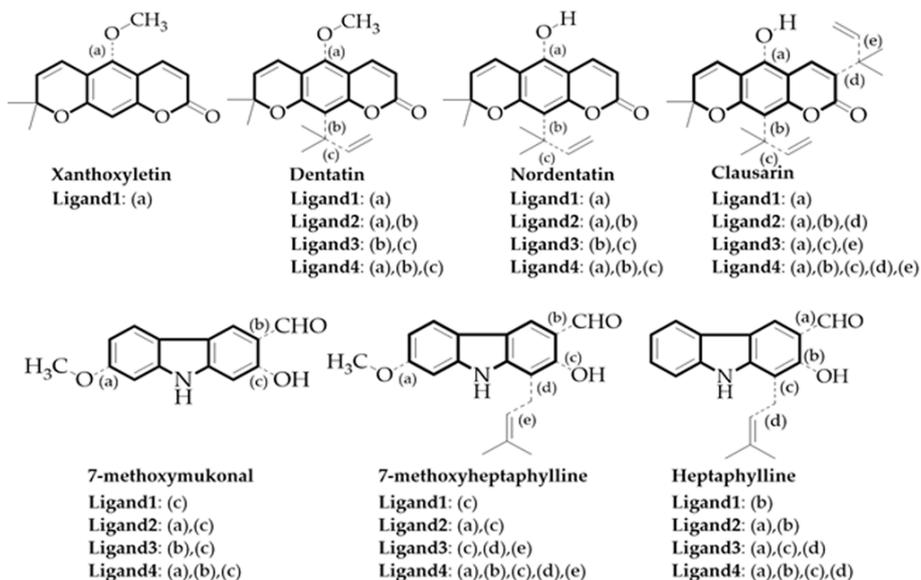
1. การเตรียมโครงสร้างเอนไซม์ด้วยขบวนการรีด็อกกิ่ง

การรีด็อกกิ่งเป็นการหาพารามิเตอร์ที่เหมาะสมในการสร้างโครงสร้างจำลองของเอนไซม์เพื่อใช้ในการทดลอง โดยเริ่มจากการดาวน์โหลดโครงสร้างเอกซเรย์ของเอนไซม์ AChE ทั้ง 2 ชนิดจากธนาคารโปรตีน (<https://www.rcsb.org/>) โดยใช้รหัสในการดาวน์โหลดของชนิด *hAChE* และ *TcAChE* เป็น 4EY7 (Cheung et al., 2012) และ 1EVE (Kryger, Silman & Sussman, 1999) ตามลำดับ จากนั้นใช้โปรแกรม Discovery Studio 5.0 (Accelrys, San Diego, USA) เพื่อทำการตัดโมเลกุลน้ำ และตัดแยกโมเลกุล Donepezil ออกจากโครงสร้างเอกซเรย์ นำโครงสร้างของ Donepezil ที่แยกออกมาไปเติมอะตอมไฮโดรเจน และคำนวณตำแหน่งของอะตอมไฮโดรเจนที่เหมาะสมด้วยโปรแกรม Hyper Chem 7.0 (Hypcube, Gainesville, FL, USA) ส่วนโครงสร้างของโปรตีนนำไปเติมอะตอมของไฮโดรเจน โดยใช้โปรแกรม AutoDockTools (Morris et al., 2009) ซึ่งจะศึกษาพารามิเตอร์ 2 ชนิด คือ (1) พันธะการหมุนของกรดอะมิโนในบริเวณเร่งของเอนไซม์ (2) พันธะการหมุนของลิแกนด์ โดยสร้างแผนที่กริดขนาด 60 Å x 60 Å x 60 Å ระยะห่าง 0.375 Å แล้วนำโครงสร้างของ Donepezil ที่เติมไฮโดรเจนแล้วมาเตรียมเป็นไฟล์ PDBQT เพื่อกำหนดการหมุนของพันธะ จากนั้นจึงนำโครงสร้างของ Donepezil มาทำการด็อกกิ่งเข้าไปในบริเวณเร่งของเอนไซม์ ด้วยโปรแกรม AutoDock4.2 (Sanner, 1999) โดยใช้ Lamarckian

Genetic Algorithm--LGA (Mashhadi, Shanechi & Lucas, 2003) ในการคำนวณค่าพลังงานต่ำสุด โดยกำหนดค่า Population size เท่ากับ 300, Energy evaluations เท่ากับ 250,000 และ GA runs เท่ากับ 200 ซึ่งการรีด็อกกิ่งของโครงสร้าง 4EY7 และ 1EVE จะเลือกพารามิเตอร์ที่ให้ตำแหน่งด็อกกิ่งใกล้เคียงกับโครงสร้างเอกซเรย์ โดยพิจารณาจากค่า Root-Mean-Square Deviation--RMSD ไม่เกิน 2.0 Å ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้ (Taha et al., 2011) แล้วนำพารามิเตอร์ที่ได้ไปศึกษาโมเลกุลาร์ด็อกกิ่งกับสารจากสองฟ้า 7 ชนิด

1. การศึกษาโมเลกุลาร์ด็อกกิ่ง

นำโครงสร้างของลิแกนด์ที่ต้องการศึกษาไปวาดเป็นโครงสร้างสามมิติโดยใช้โปรแกรม HyperChem 7.0 จากนั้นหาค่าพลังงานต่ำสุดของโครงสร้างโดยใช้ระเบียบวิธี Semi-empirical แบบ AM1, Polak-Ribiere conjugate gradient method (RMSD < 0.1 kcal/mol) โดยบันทึกเป็นไฟล์ PDB ด้วยโปรแกรม Open babel (O'Boyle et al., 2011) และเตรียมไฟล์ PDBQT ซึ่งกำหนดการหมุนของลิแกนด์ดังภาพ 3 และใช้ค่าพารามิเตอร์ที่ได้จากการรีด็อกกิ่งโดยใช้แผนที่กริดขนาด 60Å x 60Å x 60Å ในการด็อกกิ่งสารที่ต้องการศึกษาโดยดูค่าพลังงานยึดจับของสารกับโปรตีน จากนั้นนำโครงสร้างด็อกกิ่งที่ได้มาพล็อตกราฟเพื่อดูการเกิดอันตรกิริยาด้วยโปรแกรม PyMOL (Schrödinger LLC, New York, NY)

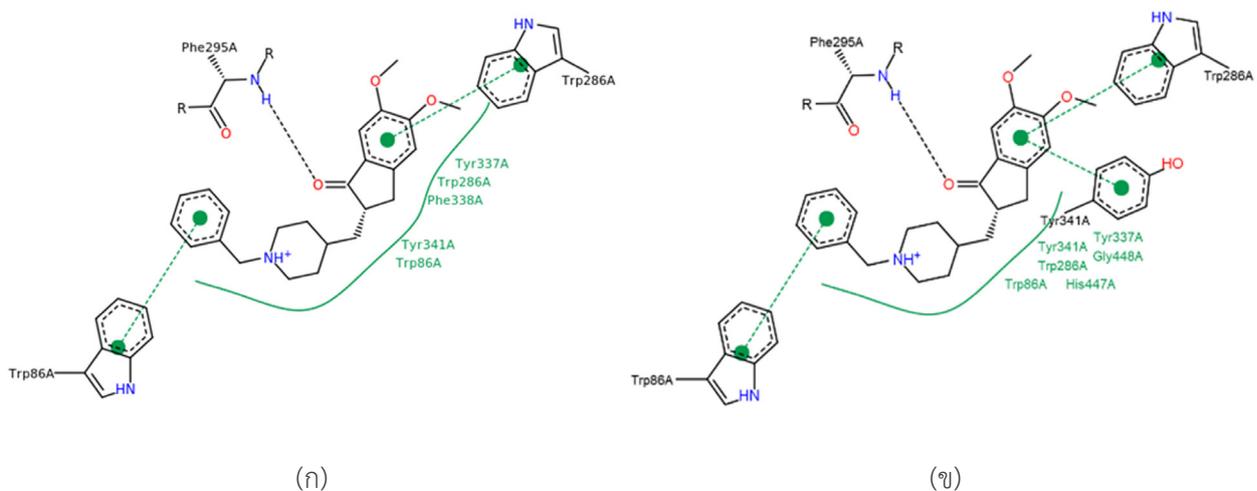


ภาพ 3 แสดงการกำหนดการหมุนพันธะที่หมุนได้ของลิแกนด์ของสารจากต้นสองฟ้า

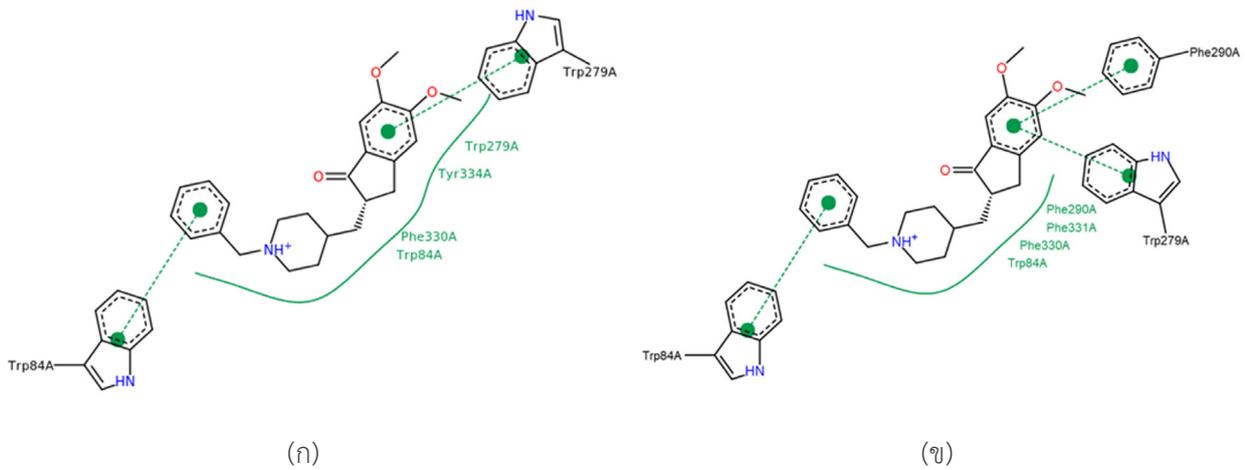
ผลการวิจัย

การศึกษาโมเลกุลาร์ดีอกกิงของสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กในการจับกับเอนไซม์ *AChEs* (*hAChE* และ *TcAChE*) จำเป็นต้องมีการตรวจสอบความถูกต้องของเอนไซม์ที่นำมาศึกษา วิธีการนี้เรียกว่าการรีด็อกกิง ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ได้ทำรีด็อกกิงเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสทั้ง 2 ชนิด กับสารมาตรฐาน คือ Donepezil โดยอ้างอิงบริเวณตัวเร่งที่สำคัญของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส จากการทดลองของ Wiesner, Křiz, Kuca, Jun and Koca (2007) พบว่า บริเวณ Peripheral Anionic Site--PAS ของ *hAChE* ประกอบด้วยกรดอะมิโน Asp74 Tyr124 Trp286 Tyr337 Tyr341 บริเวณ Acyl-binding Pocket--ABP ประกอบด้วยกรดอะมิโน Trp236 Phe295 Phe297 และ Phe338 บริเวณ Catalytic Anionic Site--CAS ประกอบด้วยกรดอะมิโน Trp86 Tyr133 Glu202 Gly448 และ Ile451 และบริเวณ Catalytic Triad--CT ประกอบด้วยกรดอะมิโน Ser203 His447 Glu334 สำหรับบริเวณ PAS ของ *TcAChE* ประกอบด้วยกรดอะมิโน Asp72 Tyr121 Trp279 Phe330 และ Tyr334 บริเวณ ABP ประกอบด้วย Trp233 Phe288 Phe290 และ Phe331 บริเวณ CAS ประกอบด้วย Trp84 Tyr130 Glu199 Gly441 และ Ile444 และบริเวณ CT ประกอบด้วย Ser200 His440 Glu327

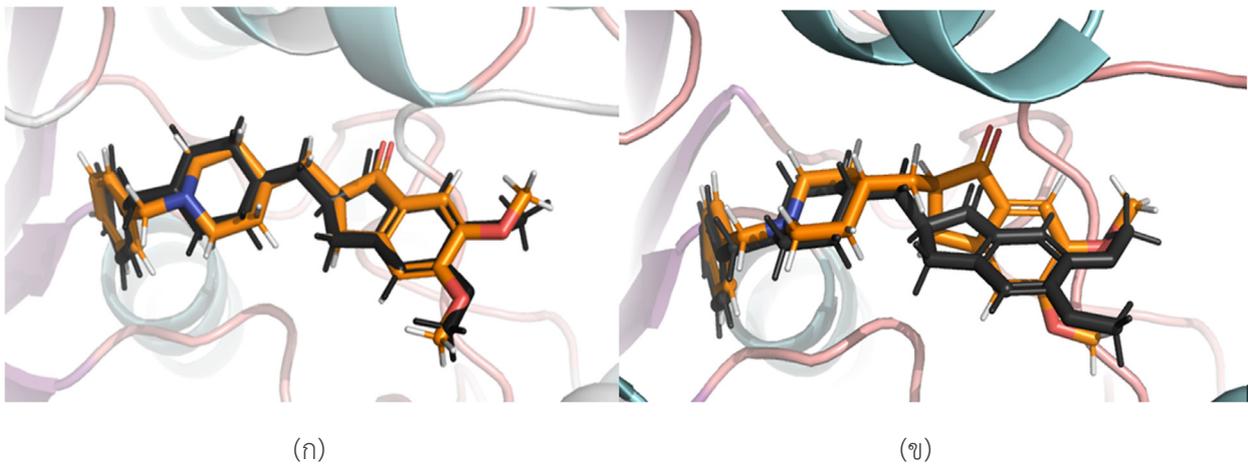
จากการทดลองได้ค่า RMSD เท่ากับ 0.599 สำหรับเอนไซม์ *hAChE* และ 1.551 Å สำหรับเอนไซม์ *TcAChE* ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ที่ยอมรับได้ของการรีด็อกกิง โดยค่าที่ยอมรับได้กำหนดค่าต้องน้อยกว่า 2 Å (Araújo, Lima, Pinto, De Alencastro & Albuquerque, 2011) เมื่อนำโครงสร้างของเอนไซม์ *hAChE* ที่เตรียมได้จากการรีด็อกกิงมาทำการดีอกกิงกับ Donepezil (ภาพ 4ข) พบการเกิดอันตรกิริยากับ Trp86 และ Trp286 ด้วย π - π interaction และเกิดแรงกระทำผ่าน H-bonding กับ Phe295 เช่นเดียวกับอันตรกิริยาที่พบในโครงสร้างเอกซเรย์ของ *hAChE* กับ Donepezil (ภาพ 4ก) และซ้อนทับกันสนิท ดังแสดงตามภาพ 6ก เช่นเดียวกับโครงสร้างรีด็อกกิงของเอนไซม์ *TcAChE* กับ Donepezil (ภาพ 5ข) พบการเกิดอันตรกิริยาผ่าน π - π interaction กับ Trp84 และ Trp279 ได้เหมือนกับโครงสร้างเอกซเรย์ของ *TcAChE* กับ Donepezil (ภาพ 5ก) และซ้อนทับกันสนิทดังแสดงตามภาพ 6ข จากผลการทดลองดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่าโครงสร้างของเอนไซม์ *hAChE* และ *TcAChE* ที่เตรียมได้จากการรีด็อกกิงมีความน่าเชื่อถือ และสามารถนำไปใช้ในการทดลองต่อไป



ภาพ 4 การเกิดอันตรกิริยาของ (ก) โครงสร้างเอกซเรย์ของ *hAChE* - Donepezil (ข) โครงสร้างรีด็อกกิงของ *hAChE* - Donepezil



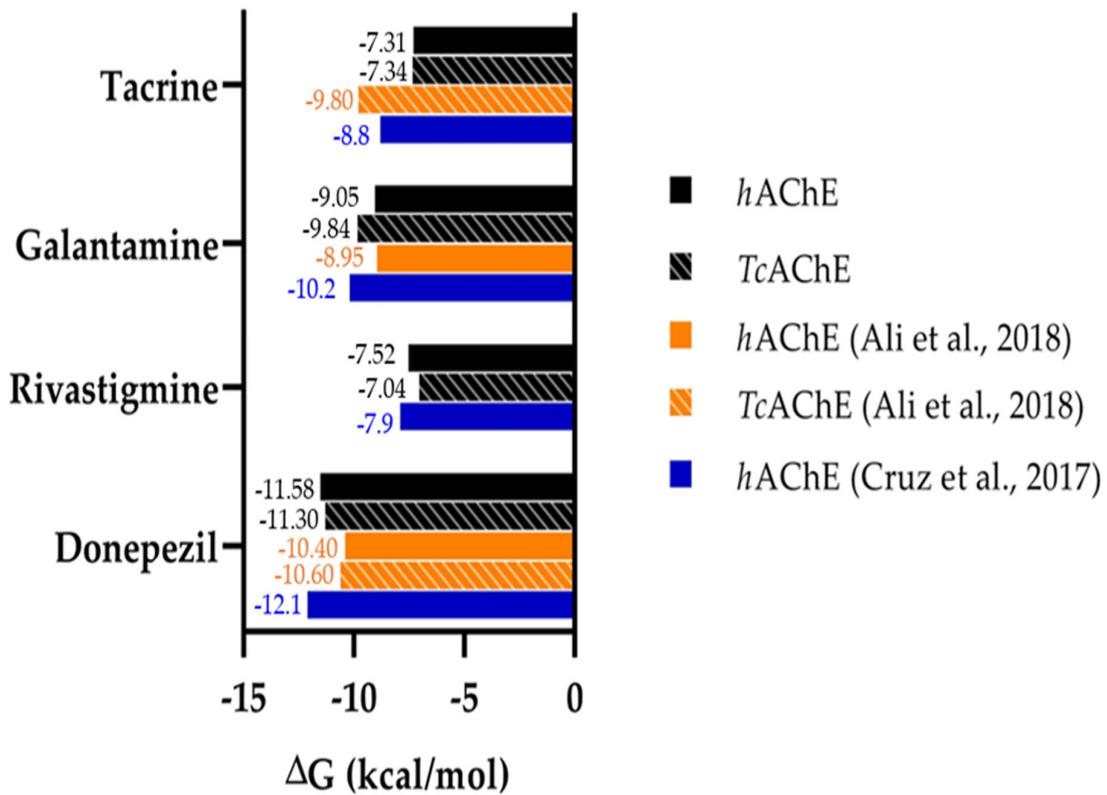
ภาพ 5 การเกิดอันตรกิริยาของ (ก) โครงสร้างเอกซเรย์ของ *TcAChE* - Donepezil (ข) โครงสร้างรีด็อกกิ่งของ *TcAChE* - Donepezil



ภาพ 6 เปรียบเทียบตำแหน่งของโครงสร้างรีด็อกกิ่ง (ส้ม) กับโครงสร้างเอกซเรย์ (ดำ) (ก) *hAChE* (ข) *TcAChE*

เพื่อเป็นการยืนยันความถูกต้องและแม่นยำของโครงสร้างของเอนไซม์ *hAChE* และ *TcAChE* ที่ได้จากการรีด็อกกิ่ง ผู้วิจัยจึงได้นำสารมาตรฐานที่เคยมีการศึกษามาก่อน ได้แก่ Donepezil Rivastigmine, Galantamine และ Tacrine (ภาพ 7) มาทำการศึกษาค่าพลังงานการยึดจับมีค่าสอดคล้องกับรายงานการศึกษาที่ผ่านมา (Rehman, Khan, Khan & Roohullah, 2013; Cruz et al., 2017;

Ali, Seong, Jung, Jannat & Choi, 2018) จากภาพ 7 สาร Donepezil สามารถเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดได้ดีที่สุด ส่งผลให้ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ *AChE* สูง ดังนั้นการทดลองในขั้นตอนต่อไปจึงเลือกใช้สาร Donepezil เป็นสารมาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบการเกิดอันตรกิริยากับสารจากต้นสอฟ้าต่อไป



ภาพ 7 แสดงค่าพลังงานยึดจับของยารักษาโรคอัลไซเมอร์กับเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรสเปรียบเทียบกับโครงสร้างที่มีการศึกษาโมเลกุลาร์ด็อกกิ่ง

ผลการศึกษาการเกิดอันตรกิริยาของสารทั้ง 7 ชนิด จากต้นส่่องฟ้าสรุปได้ดังตาราง 1 และภาพ 8 แสดงตัวอย่าง การเกิดอันตรกิริยาของสารกลุ่มคูมาริน คือ Clausarin และ คาร์บาโซลแอลคาลอยด์ คือ 7-Methoxyheptaphylline กับเอนไซม์ hAChE และ TcAChE สรุปผลการทดลองดังนี้ คือ สารประกอบเชิงซ้อนของสารกลุ่มคูมารินกับเอนไซม์ AChEs มีความเสถียรกว่าสารประกอบเชิงซ้อนของสาร กลุ่มคาร์บาโซลแอลคาลอยด์ โดยดูจากค่าพลังงานยึดจับ ที่มีค่าต่ำ (สารที่มีค่าพลังงานยึดจับต่ำ-ค่าติดลบมาก- บ่งชี้ว่าสารประกอบเชิงซ้อนมีความเสถียรสูงกว่ากว่าสารที่มี ค่าพลังงานยึดจับสูง-ค่าติดลบน้อย) โดย Clausarin มีค่า พลังงานยึดจับต่ำกว่าสารอื่นที่แยกจากต้นส่่องฟ้า และมีค่า ใกล้เคียงกับ Donepezil ที่มีพลังงานยึดจับเท่ากับ -11.53 kcal/mol กับเอนไซม์ hAChE และ -11.30 kcal/mol

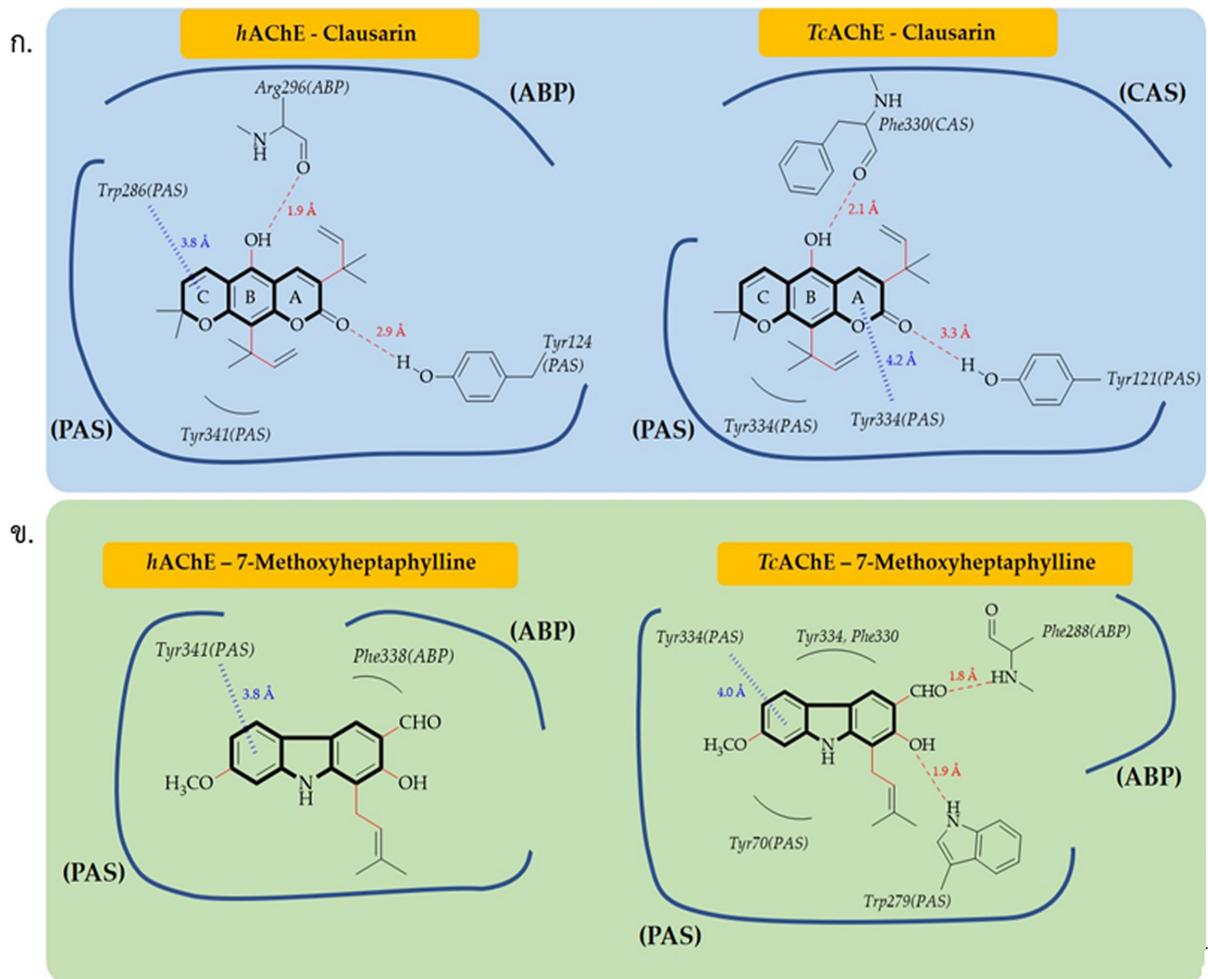
กับเอนไซม์ TcAChE เมื่อพิจารณาอันตรกิริยาในการเกิด เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของสารทดสอบกับเอนไซม์พบว่า Donepezil จะเกิดพันธะไฮโดรเจนกับเอนไซม์ hAChE บริเวณ ABP แต่ไม่พบอันตรกิริยาดังกล่าวในเอนไซม์ TcAChE และพบอันตรกิริยาแบบ $\pi-\pi$ interaction และ แบบ hydrophobic interaction ได้ทั้งในเอนไซม์ hAChE และ TcAChE ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมา (Cruz et al., 2017) เช่นเดียวกับอันตรกิริยาของสารกลุ่มคูมาริน และคาร์บาโซลแอลคาลอยด์ ที่สามารถเกิดอันตรกิริยา ได้ทั้ง 3 แบบ คือ H-bonding, $\pi-\pi$ interaction และ hydrophobic interaction และพบอันตรกิริยาได้ที่บริเวณ CAS, PAS และ ABP แต่ไม่พบอันตรกิริยาที่บริเวณ CT

ตาราง 1

การเกิดอันตรกิริยาของสารกลุ่มคูมารินกับเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสชนิด hAChE และ TcAChE

ชื่อสาร	$\Delta G_{\text{binding}}$ (kcal/mol)		ชนิดอันตรกิริยาและกรดอะมิโน							
			H-bonding		π - π interaction		hydrophobic interaction			
			hAChE	TcAChE	hAChE	TcAChE	hAChE	TcAChE	hAChE	TcAChE
Donepezil	-11.53	-11.30	Phe295	-	Trp86, Trp84, Trp86, Gly448, Trp84, Trp286, Trp279, Trp286, Phe330, Tyr341, Phe290, Tyr341, Tyr337, His447, Phe331					
1	-8.83	-8.47	Ser293, Arg296	Trp279, Arg289	-	-	Trp286, Phe338		Trp279, Phe331	
2	-9.48	-9.56	Tyr133	Asp72	Trp86	-	Trp86, Gly121, Ser125, Trp84, Ser122			
3	-9.38	-9.20	Arg296	Gly117	-	-	Trp286, Tyr341, Trp84, Ser122			
4	-11.04	-10.43	Tyr124, Arg296	Tyr121, Phe330	Trp286	Tyr334	Trp286, Tyr341, Tyr334			
5	-7.48	-7.83	Phe295, Arg296	Trp279, Ser286	Phe338, Tyr341	Phe331	Phe338, Tyr337, Tyr341, Tyr334, Phe331			
6	-8.54	-8.84	-	Phe288, Trp279	Tyr341, Tyr334	Tyr334	Phe338, Tyr341, Tyr70, Tyr334, Phe330			
7	-8.23	-8.14	-	Trp279, Phe288	Tyr341, Tyr334	Tyr334	Tyr341, Tyr334			

หมายเหตุ: กำหนดให้แต่ละสีแทนกรดอะมิโนที่ตำแหน่งของบริเวณเร่ง ดังนี้ CAS PAS ABP CT



ภาพ 8 การเกิดอันตรกิริยาของ (ก) Clausarin และ (ข) 7-Methoxyheptaphylline กับเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส ชนิด *hAChE* และ *TcAChE*

อภิปรายผล

ผลการศึกษาโมเลกุลาร์ด็อกกิ่งของเอนไซม์ *hAChE* และ *TcAChE* กับสารกลุ่มคูมารินและคาร์บาโซลแอลคาลอยด์ จากต้นสอ่งฟ้าให้ผลการทดลองสอดคล้องและไปในทิศทางเดียวกัน และพบอันตรกิริยาได้ทั้ง 3 แบบ คือ H-bonding π - π interaction และ hydrophobic interaction ที่บริเวณ CAS, PAS และ ABP เช่นเดียวกัน แต่ชนิดและลำดับของกรดอะมิโนที่เกิดอันตรกิริยาของเอนไซม์ AChE แต่ละชนิดมีความแตกต่างกันดังแสดงในตาราง 1 สำหรับโครงสร้างของสารกลุ่มคูมารินจากต้นสอ่งฟ้าทั้ง 4 ชนิด พบว่า หมู่ฟังก์ชันที่จำเป็นต่อการเกิดอันตรกิริยาแบบ H-bonding กับเอนไซม์ *hAChE* หรือ *TcAChE* คือ หมู่ -OH ที่เกาะบนวงแหวน B และ O-atom ของหมู่คาร์บอกซาลดีไฮด์ของวง A และเกิดอันตรกิริยาแบบ π - π interaction กับ

วง A และ C หมู่ฟังก์ชัน 1,1-dimethyl allyl บนวงแหวน B จำเป็นสำหรับการเกิดอันตรกิริยาแบบ Hydrophobic interaction ส่วนโครงสร้างของคาร์บาโซลแอลคาลอยด์ หมู่ -OH และ -CHO สามารถเกิดอันตรกิริยาแบบ H-bonding ส่วนวงแหวนอะโรมาติก ทั้ง 2 วงสามารถจับกับเอนไซม์ผ่านเกิดอันตรกิริยาแบบ π - π interaction จากข้อมูลของงานวิจัยในครั้งนี้อาจสรุปหมู่ฟังก์ชันที่จำเป็นของโครงสร้างสารกลุ่มคูมาริน และคาร์บาโซลแอลคาลอยด์ ในการเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับเอนไซม์ *hAChE* และ *TcAChE* ซึ่งจะทำให้งานวิจัยต่อไปสามารถออกแบบโครงสร้างสารอนุพันธ์ของคูมารินและคาร์บาโซลแอลคาลอยด์ เพื่อให้ได้สารใหม่ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ AChE ดีกว่าสารตั้งต้น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องนี้ได้รับการสนับสนุนเงินทุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ (สกว) รหัส MRG5180175 ทุนวิจัยร่วมโครงการไทย-จีน (DBG60800063) และศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์

สุขภาพจากสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และคณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.ชำนาญภัทรพานิช สำหรับคำแนะนำแนวทางในการดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้



References

- Ali, M. Y., Seong, S. H., Jung, H. A., Jannat, S., & Choi, J. S. (2018). Kinetics and molecular docking of dihydroxanthyletin-type coumarins from *Angelica decursiva* that inhibit cholinesterase and BACE1. *Archives of Pharmacal Research*, 41(7), 753–764. <https://doi.org/10.1007/s12272-018-1056-9>
- Araújo, J. Q., Lima, J. A., Pinto, A. D. C., De Alencastro, R. B., & Albuquerque, M. G. (2011). Docking of the alkaloid geissospermine into acetylcholinesterase: A natural scaffold targeting the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Molecular Modeling*, 17(6), 1401–1412. <https://doi.org/10.1007/s00894-010-0841-2>
- Cheung, J., Rudolph, M. J., Burshteyn, F., Cassidy, M. S., Gary, E. N., Love, J., ..., & Height, J. J. (2012). Structures of human acetylcholinesterase in complex with pharmacologically important ligands. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55, 10282 - 10286. <https://doi.org/10.1021/jm300871x>
- Cruz, I., Puthongking, P., Cravo, S., Palmeira, A., Cidade, H., Pinto, M., & Sousa, E. (2017). Xanthone and Flavone Derivatives as Dual Agents with Acetylcholinesterase Inhibition and Antioxidant Activity as Potential Anti-Alzheimer Agents. *Journal of Chemistry*, 2017, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2017/8587260>
- Froestl, W., Muhs, A., & Pfeifer, A. (2014). Cognitive Enhancers (Nootropics). Part 2: Drugs Interacting with Enzymes. Update 2014. *Journal of Alzheimer's Disease*, 42(1), 1–68. <https://doi.org/10.3233/JAD-140402>
- Giacobini, E. (2003). Cholinergic function and Alzheimer's disease. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 18, S1–S5. <https://doi.org/10.1002/gps.935>
- Jantakoon, P., Tadtong, S., & Puthongking, P. (2012). Neuritogenic and antioxidant activities of nordentatin from *Clausena harmandiana*. *Journal of Asian Association of Schools of Pharmacy*, 1(3), 180–186. https://www.aaspjournal.org/uploads/155/5952_pdf.pdf
- Jantamart, P., Weerapreeyakul, N., & Puthongking, P. (2019). Cytotoxicity and apoptosis induction of coumarins and carbazole alkaloids from *Clausena harmandiana*. *Molecules*, 24(18), 1–14. <https://doi.org/10.3390/molecules24183385>

- Kryger, G., Silman, I., & Sussman, J. L. (1999). Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricept p): Implications for the design of new anti-Alzheimer drugs. *Structure*, 7(3), 297–307. [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(99\)80040-9](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(99)80040-9)
- Mashhadi, H. R., Shanechi, H. M., & Lucas, C. (2003). A new genetic algorithm with Lamarckian individual learning for generation scheduling. *IEEE Transactions on Power Systems*, 18(3), 1181–1186. doi: 10.1109/TPWRS.2003.814888.
- Metropolis, N., Rosenbluth, A.W., Rosenbluth, M.N., Teller, A.H., & Teller, E. (1953). Equation of state calculations by fast computing machines. *The Journal of Chemical Physics*, 21(6), 1087–1092. <https://doi.org/10.1063/1.1699114>
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A.J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16), 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
- O’Boyle, N. M., Banck, M., James, C. A., Morley, C., Vandermeersch, T., & Hutchison, G. R. (2011). Open babel: An open chemical toolbox. *Journal of Cheminformatics*, 3(33), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-3-33>
- Razavi, S. F., Khoobi, M., Nadri, H., Sakhteman, A., Moradi, A., Emami, S., ..., & Shafiee, A. (2013). Synthesis and evaluation of 4-substituted coumarins as novel acetylcholinesterase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 64, 252–259. doi: 10.1016/j.ejmech.2013.03.021.
- Rehman, F.U., Khan, M. F., Khan, I., & Roohullah, -. (2013). Molecular interactions of an alkaloid euchrestifoline as a new acetylcholinesterase inhibitor. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 8(4), 361–364. <https://doi.org/10.3329/bjpv.v8i4.16417>
- Sanner, M. F. (1999). Python: A programming language for software integration and development. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 17(1), 57–61. <http://mgl.scripps.edu/people/sanner/html/papers/NewsAndViewsSept99.pdf>
- Songsiang, U., Thongthoom, T., Boonyarat, C., & Yenjai, C. (2011). Claurailas A-D, cytotoxic carbazole alkaloids from the roots of *Clausena harmandiana*. *Journal of Natural Products*, 74(2), 208–212. <https://doi.org/10.1021/np100654m>
- Taha, M. O., Habash, M., Al-Hadidi, Z., Al-Bakri, A., Younis, K., & Sisan, S. (2011). Docking-based comparative intermolecular contacts analysis as new 3-D QSAR concept for validating docking studies and in silico screening: NMT and GP inhibitors as case studies. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 51(3), 647–669. <https://doi.org/10.1021/ci100368t>
- Wangboonskul, J., Tunsirikongkon, A., & Sasithornwetchakun, W. (2015). Simultaneous determination of nine analytes in *Clausena harmandiana* Pierre. by new developed high-performance liquid chromatography method and the influence of locations in Thailand on level of nordentatin and dentatin. *Pharmacognosy Magazine*, 11(41), 1–14. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.149666>

Wiesner, J., Křiz, Z., Kuca, K., Jun, D., & Koca, J. (2007). Acetylcholinesterases-The structural similarities and differences. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 22(4), 417–424.
doi: 10.1080/14756360701421294

World Health Organization (WHO). (2018). *Top 10 causes of death*. Retrieved from https://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/causes_death/top_10/en/

