



การทำโมเลกุลลาร์ต็อกกิ้งของอนุพันธ์ชนิดใหม่ของสารไฮโฟเดอมีน เอ ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไกลโคเจน ฟอสโฟริเลส

Molecular Docking of New Hyphodermin A Derivatives for Glycogen Phosphorylase Inhibitory Activity

ชนิธา จุ้ยประเสริฐ พรทิพย์ บุญศรี ณัฐพล อภิรติกุล และ พนารัตน์ อรุณรัตติยากร*

Chanitha Juiprasert Pornthip Boonsri Nuttapon Apiratikul and Panarat Arunrattiyakorn*

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย

Department of chemistry, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Bangkok, Thailand

*Corresponding author, E-mail: panarata@g.swu.ac.th

บทคัดย่อ

เอนไซม์ไกลโคเจน ฟอสโฟริเลส (Glycogen Phosphorylase; GP) ทำหน้าที่เร่งการสลายไกลโคเจนให้เป็นน้ำตาลกลูโคส-1-ฟอสเฟต ซึ่งเป็นขั้นกำหนดปฏิกิริยาในกระบวนการสลายไกลโคเจน (Glycogenolysis) ดังนั้น ตัวยับยั้งสำหรับเอนไซม์นี้จึงเป็นเป้าหมายหนึ่งที่ใช้เป็นยาในการรักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 2 หรือ Non-insulin dependent diabetes งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะหาสารชนิดใหม่ในการจับกับเอนไซม์ GP เพื่อทำนายแนวโน้มการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ GP โดยขั้นตอนการวิจัย เป็นการทำโมเลกุลลาร์ต็อกกิ้ง เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสังเคราะห์อนุพันธ์ไฮโฟเดอมีน เอ (Hyphodermin A derivatives) ได้แก่ สารอนุพันธ์ 14-18 ในการจับกับบริเวณควบคุมในโมเลกุลของเอนไซม์ GP บริเวณเหล่านี้ ได้แก่ Purine site, AMP site และ Indole site และทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการจับกับตัวลิแกนด์ดั้งเดิม จากผลการศึกษาพบว่า อนุพันธ์เหล่านี้มีค่าพลังงานในการจับกับเอนไซม์ (Binding Energy; B.E.) ที่บริเวณ Indole site ดีที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งอนุพันธ์ 16-18 โดยมีค่า B.E. ต่อบริเวณดังกล่าวอยู่ในช่วง -10.91 ถึง -11.72 kcal/mol และมีค่า B.E. ดีกว่าลิแกนด์เดิม CP 403,700 (12) ซึ่งมีค่าเท่ากับ -10.57 kcal/mol อีกด้วย นอกจากนั้นเมื่อพิจารณาค่า B.E. ของแต่ละสารต่อทุกบริเวณควบคุมที่ศึกษาแล้ว พบว่า อนุพันธ์ 18 ให้ค่า B.E. ดีที่สุดต่อทั้งสามบริเวณควบคุม ดังนั้น จึงสรุปได้ว่า สารอนุพันธ์ไฮโฟเดอมีน เอ ทุกตัวที่ศึกษามีประสิทธิภาพในการจับกับเอนไซม์ GP ที่ดี และมีแนวโน้มในการนำไปพัฒนาเป็นยาที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ GP เพื่อรักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ได้ต่อไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งสำหรับอนุพันธ์ 18

คำสำคัญ: อนุพันธ์ไฮโฟเดอมีน ไกลโคเจน ฟอสโฟริเลส โมเลกุลลาร์ต็อกกิ้ง โรคเบาหวานชนิดที่ 2



Abstract

Glycogen phosphorylase (GP) plays a crucial role in catalyzing the breakdown of glycogen to form glucose-1-phosphate, which is the rate-limiting step in glycogenolysis in animals. Therefore, Glycogen phosphorylase inhibitor is one of the therapeutic targets for antidiabetic drug in type 2 diabetes (non-insulin dependent diabetes). As we are looking for new GP inhibitors; therefore, in this work, we applied molecular docking method to the investigation of the binding energy of compounds and GP enzyme in comparison to those reported GP inhibitor. In this study, five new hyphodermin A derivatives (**14–18**) were docked on each allosteric sites of GP which are AMP site, purine site and indole sites. The results showed that all derivatives have the highest binding affinity at indole site. Three of which (**16–18**) had the binding energy values of -10.91 to -11.72 kcal/mol lower than that of CP 403,700 (**12**), previously reported as GP inhibitor, at the values of -10.57 kcal/mol. The results showed that compounds **16–18** had the potential as GP inhibitors, especially compound **18** which could be used as the lead compound due to that fact that the lowest B.E. was observed at indole site. For the further study, we have planned to test these compounds in the GP inhibitory activity for treatment of type 2 diabetes to confirm the result from the molecular docking.

Keywords: Hyphodermin derivatives, Glycogen phosphorylase, Molecular docking, Diabetes Type2

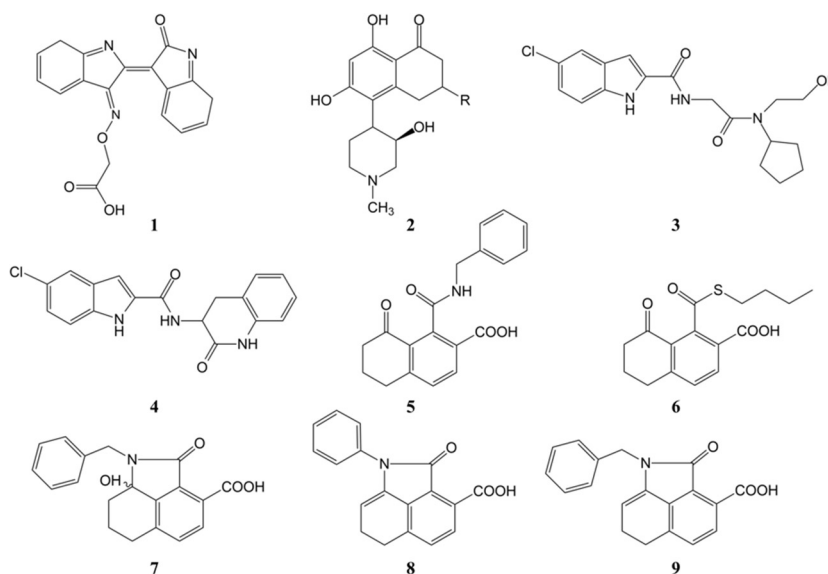
1. บทนำ

ไกลโคเจน ฟอสโฟริเลส (Glycogen Phosphorylase ; GP) เป็นเอนไซม์ที่สำคัญต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต โดยทำหน้าที่ในการสลายไกลโคเจน (Glycogen) เป็นน้ำตาลกลูโคส-1-ฟอสเฟต (Glucose-1-Phosphate) ซึ่งเป็นเอนไซม์ในขั้นกำหนดปฏิกิริยาในกระบวนการสลายไกลโคเจน (Glycogenolysis) สำหรับในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม พบเอนไซม์ส่วนใหญ่ของเอนไซม์ GP ทั้งในกล้ามเนื้อ ตับและสมอง ดังนั้น เอนไซม์ GP จึงเป็นหนึ่งในโมเลกุลเป้าหมายที่ใช้ในการรักษาภาวะระดับน้ำตาลในเลือดสูง (Hyperglycaemia) ของผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 หรือ Non-insulin dependent diabetes เนื่องจากเมื่อเอนไซม์นี้ทำงานได้ดีลงจะสามารถทำให้การสลายไกลโคเจนเป็นน้ำตาลลดลงเช่นกัน (Schweiker, Loughlin, Lohning, Petersson, & Jenkins, 2014) ซึ่งปัจจุบัน พบว่าโรคเบาหวานชนิดนี้เป็นปัญหาที่พบได้ทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ อีกทั้งยังมีรายงานจากองค์การอนามัยโลก (World Health Organization ; WHO) ว่าเป็นหนึ่งในสาเหตุที่เสี่ยงต่อการเสียชีวิตก่อนวัยอันควรสูงเป็นอันดับที่ 3 รองจากความดันโลหิตสูงและการสูบบุหรี่ (World Health Organization, 2017) โดยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 เกิดจากการที่ตับอ่อนสามารถผลิตอินซูลินได้ตามปกติ แต่ไม่สามารถนำน้ำตาลกลูโคสในกระแสเลือดเข้าสู่เซลล์ได้ ส่งผลให้ระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดสูง ซึ่งอาจทำให้เกิดความเสียหายต่อไต ระบบประสาท และอาจทำให้ตาบอดและเกิดโรคหัวใจตามมาได้ (Harvard Medical School, 2018)



วิธีการหนึ่งที่ใช้ในการรักษาอาจทำได้โดยการให้ยาเพื่อรักษาระดับน้ำตาลในเลือดให้อยู่ในระดับปกติ โดยปัจจุบัน ยาที่ใช้สำหรับการรักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 2 มีทั้งหมด 14 กลุ่ม แต่มีผู้ป่วยเพียง 36% เท่านั้นที่สามารถใช้ยาเหล่านี้ เพื่อรักษาระดับน้ำตาลในเลือดให้อยู่ในระดับปกติได้ (Miller, Nguyen, Hu, Lin, & Nguyen, 2014) ดังนั้น ยาที่ใช้ในการรักษาโรคนี้จึงจำเป็นต้องการพัฒนาให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้นไป ซึ่งยาอีกกลุ่มหนึ่งที่มีการวิจัยอย่างต่อเนื่องได้แก่ ยาในกลุ่มที่มีกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ GP โดยการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้จัดเป็นอัลโลสเตอริกเอนไซม์ (Allosteric enzyme) ซึ่งมีหลายบริเวณในโมเลกุลที่ตัวควบคุม (ตัวเร่งปฏิกิริยาหรือตัวยับยั้งปฏิกิริยา) สามารถเข้าจับได้ และเนื่องจากเอนไซม์นี้มีหลายบริเวณควบคุม ดังนั้น โครงสร้างของตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ จึงมีโครงสร้างได้หลากหลาย ตามลักษณะของแต่ละบริเวณควบคุม (Schweiker et al, 2014) และจากการศึกษาผลงานวิจัยพบว่า สารในกลุ่ม Heterocyclic เป็นสารกลุ่มหนึ่งที่สามารถยับยั้งการทำงานของ GP สารเหล่านี้ ได้แก่ อนุพันธ์ของ Indirubin (1), อนุพันธ์ของ Flavopiridol (2), สาร 5-Chloroindoloyl glycine amide (3) และสาร 3,4-Dihydroquinolin-2(1H)-one (4) นอกจากนี้ยังพบว่าอนุพันธ์บางชนิดของสาร Hyphodermins (5-9) ซึ่งถูกรายงานว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของ GP อยู่ในช่วงความเข้มข้นที่ 0.222-22 mM ในขณะที่ Hyphodermin A, B และ D ไม่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการทำงานของ GP (Hampson et al, 2006; Loughlin, Pierens, Petersson, Henderson, & Healy, 2008; Magda, Demetres, Evangelia, Gerhard, & Nikos, 2005; Rosauer et al, 2003; Wright et al, 2005)

จากการศึกษาโครงสร้างของสารดังกล่าวข้างต้นที่มีรายงานว่าสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ GP ได้ เมื่อทำการศึกษเกี่ยวกับโครงสร้างสารกับการออกฤทธิ์พบว่า โครงสร้างสารมีความหลากหลาย โดยทุกโมเลกุลมีโครงสร้างของวงอะโรมาติก (Aromatic) และไนโตรเจนอะตอม (Nitrogen) เป็นองค์ประกอบภายในโมเลกุล



รูปที่ 1 โครงสร้างสารที่รายงานว่ามียฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ GP



ต่อมาได้มีการศึกษาและพบว่า อนุพันธ์บางชนิดของสาร Hyphodermins (5–9) สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ GP ได้ โดยที่สาร Hyphodermins หรือ naphtho[1,2-*c*]furan-3,9-dione derivatives เป็นสารเมแทบอไลต์ที่แยกได้จากเห็ด *Hyphoderma radula* และมีรายงานว่าสาร Hyphodermins มีแนวโน้มในการใช้เป็นยารักษาและป้องกันโรคต่างๆ ได้แก่ โรคหอบหืด โรคหลอดเลือดอักเสบเรื้อรัง โรคหัวใจและโรคที่เกิดจากความผิดปกติของระบบประสาทส่วนกลาง (Henkel Thomas, Mueller Hartwig, Schmidt Delf, & Wollweber Hartmund, 1997) ดังนั้น กลุ่มผู้วิจัยจึงสนใจทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ชนิดใหม่ของสาร Hyphodermins นำไปสู่การศึกษาความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ GP โดยการศึกษาครั้งนี้ได้นำระเบียบวิธี Molecular docking เพื่อศึกษาพลังงานการยึดจับ (Binding energy ; B.E.) และอันตรกิริยา (Interaction) ระหว่างสารสังเคราะห์อนุพันธ์ Hyphodermin A (14–18) กับเอนไซม์ GP ในการทำนายแนวโน้มการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ GP เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการออกแบบและพัฒนาใช้ในการรักษาภาวะระดับน้ำตาลในเลือดสูงของผู้โรคเบาหวานชนิดที่ 2 ให้มีประสิทธิภาพต่อไป

2. วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาค่า B.E. ระหว่างสารสังเคราะห์อนุพันธ์ Hyphodermin A (14–18) กับเอนไซม์ GP ที่บริเวณ Purine site, AMP site และ Indole site โดยใช้วิธี Molecular docking
2. เพื่อศึกษาอันตรกิริยาระหว่างสารสังเคราะห์อนุพันธ์ Hyphodermin A (14–18) กับกรดอะมิโนที่บริเวณ Purine site, AMP site และ Indole site ของเอนไซม์ GP
3. เพื่อทำนายแนวโน้มการออกฤทธิ์ของสารสังเคราะห์อนุพันธ์ Hyphodermin A (14–18) ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ GP

3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเตรียมโครงสร้างของโปรตีน

เตรียมโครงสร้างของโปรตีนโดยใช้เอนไซม์ Human Liver Glycogen Phosphorylase (HLGP) จาก Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>) รหัสโปรตีน 1L5R (Ekstrom et al, 2002), 3DDS (Thomson et al, 2009) และ 1L5Q (Ekstrom et al, 2002) โดยมีโครงสร้างของสาร Riboflavin (10), GSK261 (11), และ CP-403,700 (12) จับอย่างจำเพาะที่บริเวณ Purine site, AMP site และ Indole site ตามลำดับ

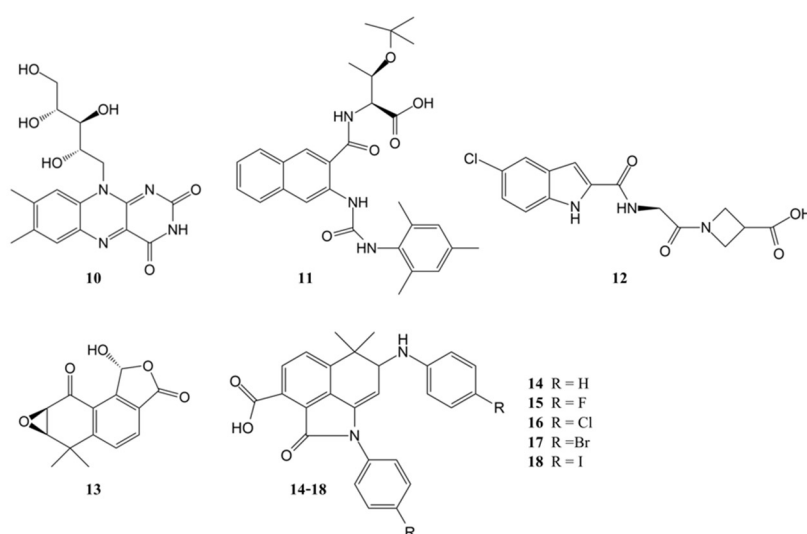
3.2 การเตรียมไฟล์โครงสร้างของลิแกนด์

เตรียมโครงสร้างของลิแกนด์ทั้งหมด 3 กลุ่ม ดังรูปที่ 2 ดังนี้

- 3.2.1 โครงสร้างลิแกนด์เดิม ได้แก่ Riboflavin (10), GSK261 (11), CP-403,700 (12)
- 3.2.2 โครงสร้างของสารตั้งต้น Hyphodermin A (13)
- 3.2.3 โครงสร้างของสารสังเคราะห์อนุพันธ์ Hyphodermin A (14–18)



โดยโครงสร้างลิแกนด์เดิม 10–12 เติร์มได้จากการดึงลิแกนด์ออกจากโปรตีน HLGP รหัส 1L5R, 3DDS และ 1L5Q ตามลำดับ ซึ่งได้จากขั้นตอนของการเติร์มโครงสร้างของโปรตีน จากนั้นเติมอะตอมไฮโดรเจนที่ขาดหายไปให้กับโครงสร้างของลิแกนด์ ส่วนโครงสร้างของสารตั้งต้น Hyphodermin A และสารสังเคราะห์อนุพันธ์ Hyphodermin A ได้จากการจำลองโครงสร้างสามมิติด้วยโปรแกรม Gaussian view (Duke & O'Leary, 1992) และทำการ optimize โครงสร้างด้วยโปรแกรม Gaussian 09 (Frisch et al, 2016) ด้วยระเบียบวิธี B3LYP/6-31G(d,p) เพื่อให้ได้โครงสร้างที่มีความเสถียร



รูปที่ 2 โครงสร้างของลิแกนด์ทั้งหมด ได้แก่ สารที่ 10–18

3.3 การหาพารามิเตอร์ที่เหมาะสมสำหรับการ docking

ทำการหาพารามิเตอร์ที่เหมาะสมในการทำ Molecular docking โดยใช้โปรแกรม AutoDock 4.2 (Morris et al, 2009) โดยทำการดึงลิแกนด์เดิมออกจากโปรตีน HLGP ที่ได้จาก X-ray จากนั้นทำการ Redocking ลิแกนด์เดิมกลับเข้าไปที่บริเวณจับเดิม เพื่อให้ได้พารามิเตอร์ที่ทำให้โครงสร้างของลิแกนด์เดิมเข้าจับกับบริเวณนั้นได้เหมือนเดิม โดยพิจารณาความเหมาะสมของพารามิเตอร์ที่ใช้ได้จากค่า RMSD (Root Mean Square Deviation) โดยในงานวิจัยนี้เลือกใช้ลิแกนด์ 10, 11 และ 12 ที่บริเวณ Purine site, AMP site และ Indole site ตามลำดับ ซึ่งเป็นลิแกนด์ที่ถูกระบุไว้ว่าเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ GP ที่มีประสิทธิภาพและจำเพาะต่อบริเวณดังกล่าว จากผลการทำ Redocking พบว่าลิแกนด์เดิมเหล่านี้มีค่า RMSD น้อยกว่า 2.0 Å ดังนั้น พารามิเตอร์ที่ใช้สำหรับการทำ Redocking เป็นพารามิเตอร์ที่เหมาะสมต่อการทำ Docking โดยพารามิเตอร์ดังกล่าว ได้แก่ กล่องกริดขนาด 60x60x60 Å³ ช่องว่างระหว่างกริด เท่ากับ 0.375 Å และกำหนดจำนวนรอบในการรัน จำนวน 150 รอบ



3.4 การทำ Molecular docking

นำพารามิเตอร์ที่เหมาะสมที่ได้จากการ Redocking มาใช้ในการทำ Cross docking กับลิแกนด์เดิมที่บริเวณจับอื่น ได้แก่ ลิแกนด์ 10 กับบริเวณ AMP site และ Indole site, ลิแกนด์ 11 กับบริเวณ Purine site และ Indole site และลิแกนด์ 12 กับบริเวณ Purine site และ AMP site เพื่อศึกษาความจำเพาะต่อบริเวณจับโดยการเปรียบเทียบค่า B.E. ที่บริเวณจับเดิมกับบริเวณจับอื่นๆภายในเอนไซม์

จากนั้นใช้พารามิเตอร์ดังกล่าวทำการ Dock กับลิแกนด์ที่เตรียมไว้ ได้แก่ สารตั้งต้น Hyphodermin A และสารสังเคราะห์อนุพันธ์ Hyphodermin A กับบริเวณจับทั้ง 3 บริเวณดังกล่าว ด้วยโปรแกรม AutoDock 4.2 จากนั้นศึกษาประสิทธิภาพในการจับของอนุพันธ์ Hyphodermin A ที่มีต่อเอนไซม์ GP โดยพิจารณาจากค่า B.E. และอันตรกิริยาของสารในแต่ละบริเวณจับและนำไปสู่การหาความจำเพาะของสารสังเคราะห์อนุพันธ์ Hyphodermin A ต่อบริเวณจับทั้ง 3 บริเวณของเอนไซม์ GP ด้วยโปรแกรม Discovery Studio 4.0 (www.accelrys.com)

4. ผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ศึกษาประสิทธิภาพในการจับกับเอนไซม์ GP ด้วยสารสังเคราะห์อนุพันธ์ Hyphodermin A (14–18) โดยการทำให้ Molecular docking ที่บริเวณ Purine site, AMP site และ Indole site โดยขั้นแรกเป็นการศึกษาลิแกนด์เดิม 10, 11 และ 12 ที่รายงานว่าเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ GP ที่มีประสิทธิภาพและจำเพาะต่อบริเวณ Purine site, AMP site และ Indole site โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 17 μ M (Ekstrom et al, 2002), 7 nM (Thomson et al, 2009) และ 45 nM (Rath et al, 2000) ตามลำดับ จากผลการทำ Cross docking ของสารเหล่านี้ เมื่อเปรียบเทียบกับค่า B.E. ที่บริเวณจับเดิมกับบริเวณจับอื่นๆภายในเอนไซม์ พบว่า สาร 10, 11 และ 12 ให้ค่า B.E. ที่บริเวณจับเดิมดีกว่าบริเวณจับอื่นๆ โดยมีค่า B.E. ที่บริเวณ Purine site, AMP site และ Indole site เท่ากับ -10.34, -14.32 และ -10.57 kcal/mol ตามลำดับ ดังตารางที่ 1 ดังนั้น จึงแสดงให้เห็นว่า สาร 10–12 มีความจำเพาะต่อบริเวณจับเดิมดังกล่าว ซึ่งให้ค่าที่สอดคล้องกับค่าที่ได้จากการทดลองจริง จึงบ่งชี้ว่าการศึกษาดังวิธี Molecular docking สามารถนำมาใช้ในการพิจารณาความจำเพาะของสารต่อบริเวณจับของเอนไซม์ได้

จากนั้นจึงทำ Molecular docking กับเอนไซม์ GP ด้วยสารสังเคราะห์อนุพันธ์ Hyphodermin A (14–18) พบว่ามีค่า B.E. กับเอนไซม์ GP อยู่ในช่วง -9.32 ถึง -9.52 kcal/mol ที่โพรงการจับ Purine site, ช่วง -8.85 ถึง -10.97 kcal/mol ที่โพรงการจับ AMP site และช่วง -9.33 ถึง -11.37 kcal/mol ที่โพรงการจับ Indole site ในขณะที่สารตั้งต้น Hyphodermin A ให้ค่า B.E. น้อยกว่าสารสังเคราะห์อนุพันธ์ Hyphodermin A โดยมีค่า B.E. ที่โพรงการจับ Purine site, AMP site และ Indole site เท่ากับ -7.54, -6.67 และ -7.08 kcal/mol ตามลำดับ ดังตารางที่ 1

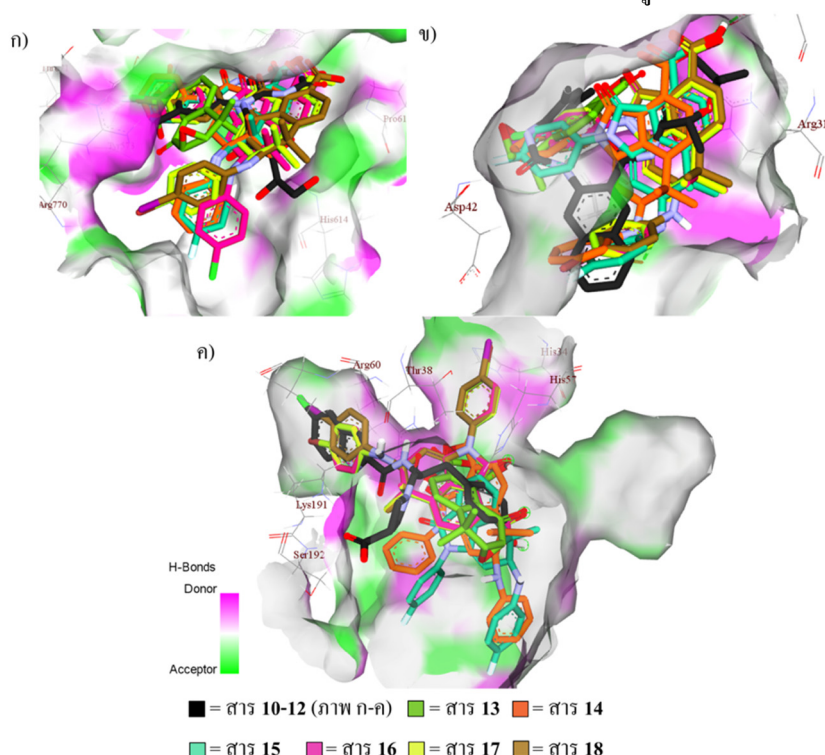


ตารางที่ 1 แสดงค่าพลังงานการยึดจับ (B.E.) ของเอนไซม์ GP กับลิแกนด์ต่างๆ ในหน่วย kcal/mol

โมเลกุล	Purine site (RMSD 1.992)	AMP site (RMSD 0.961)	Indole site (RMSD 0.961)
13	-7.54	-6.67	-7.08
14	-9.43	-9.11	-9.53
15	-9.32	-8.85	-9.33
16	-9.50	-10.02	-10.91
17	-9.50	-10.48	-11.37
18	-9.52	-10.97	-11.72
Riboflavin (10)	-10.34*	-8.66	-6.19
GSK261 (11)	-6.81	-14.32*	-7.15
CP 403,700 (12)	-8.27	-9.43	-10.57*

*ลิแกนด์เดิมที่จับอย่างจำเพาะต่อบริเวณควบคุม

จากผลการทำ Molecular docking พบว่า อนุพันธ์ Hyphodermin A เหล่านี้ สามารถเข้าจับกับเอนไซม์ GP ได้ทั้ง 3 บริเวณ โดยมีการวางตัวของโครงสร้างที่แตกต่างกันในแต่ละบริเวณจับ ขึ้นอยู่กับลักษณะของโพรงการจับในแต่ละบริเวณ ในขณะที่โครงสร้างของอนุพันธ์เหล่านี้มีการวางตัวที่คล้ายกันเมื่ออยู่ในโพรงการจับ Purine site และ AMP site ในขณะที่โพรงการจับ Indole site มีการวางตัวของโครงสร้างที่แตกต่างกัน ดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 แสดงการซ้อนทับกันของโครงสร้างลิแกนด์ (10–18) ภายในโพรงการจับ (ก) Purine site (ข) AMP site (ค) Indole site



5. การอภิปรายผล

จากการทำ Molecular docking กับเอนไซม์ Human Liver Glycogen Phosphorylase (HLGP) ด้วยสารสังเคราะห์อนุพันธ์ Hyphodermin A (14–18) พบว่า อนุพันธ์เหล่านี้สามารถเข้าจับกับเอนไซม์ ได้ทั้ง 3 บริเวณ โดยพิจารณาจากการวางตัวและค่า B.E เมื่อเทียบกับลิแกนด์เดิม (10–12) ในแต่ละบริเวณจับ โดยพบว่าอนุพันธ์ส่วนใหญ่มีการจับอย่างจำเพาะต่อโพรงการจับของ Indole site และมีประสิทธิภาพในการจับที่ดีกว่าลิแกนด์เดิม (12) และพบว่าอนุพันธ์เหล่านี้มีประสิทธิภาพในการจับกับเอนไซม์ GP ได้ดีกว่าสารตั้งต้น Hyphodermin A ทั้งนี้เนื่องจากโครงสร้างของ Hyphodermin A มีขนาดของโมเลกุลที่เล็กไม่เหมาะสมต่อขนาดของโพรงการจับ ส่งผลให้ ค่า B.E. ของสารตั้งต้น Hyphodermin A ต่ำกว่าค่า B.E. ของสารสังเคราะห์อนุพันธ์ Hyphodermin A ในทุกบริเวณจับ ซึ่งให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกับงานวิจัยของ Wendy A. ที่รายงานว่า Hyphodermin A ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของ GP ในช่วงความเข้มข้น 0.222-22 mM (Loughlin et al, 2008) จึงสรุปได้ว่าการทำ Molecular docking พบว่าสารสังเคราะห์อนุพันธ์ Hyphodermin A มีประสิทธิภาพในการจับกับเอนไซม์ GP ได้ดีกว่าสารตั้งต้น Hyphodermin A

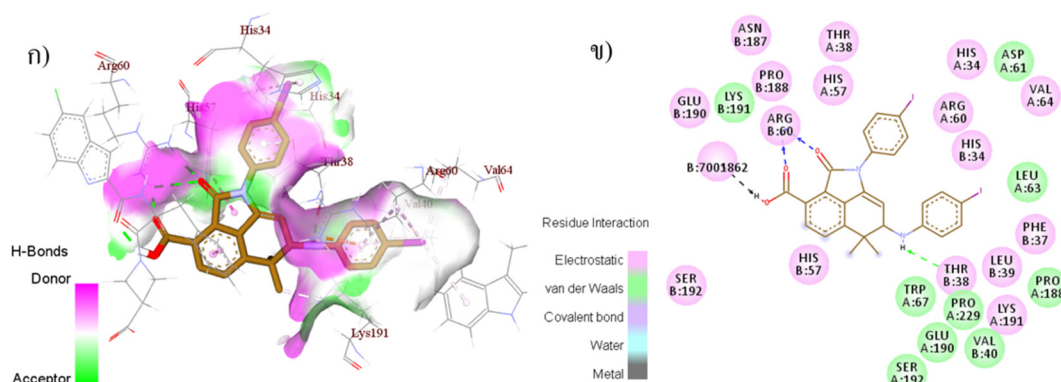
จากการทำ Molecular docking ที่บริเวณ Purine site พบว่าสารสังเคราะห์อนุพันธ์ของ Hyphodermin A ทั้ง 5 อนุพันธ์ เกิด Interaction ที่สำคัญ ได้แก่ การสร้างพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน Asn282 รวมถึงเกิดแรงแบบ Hydrophobic และ Electronic stacking กับกรดอะมิโน Phe285 และ Tyr613 อีกทั้งยังพบว่าอนุพันธ์ 14–17 เกิดการสร้างแรงแบบ Pi-anion กับกรดอะมิโน Glu572 ในขณะที่การวางตัวของ อนุพันธ์ 18 ไม่สามารถสร้างแรงดังกล่าวได้ แต่การวางตัวของอนุพันธ์ 18 ทำให้เกิดการสร้างแรงแบบ Pi-sigma กับกรดอะมิโน Glu382 โดยมีความยาวของแรงเท่ากับ 2.59 Å และสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน Gly612 และ Asn282 ได้และแข็งแรงกว่าอนุพันธ์ตัวอื่น จึงทำให้อนุพันธ์ 18 เป็นอนุพันธ์ที่มีประสิทธิภาพในการจับกับเอนไซม์ GP ได้ดีที่สุดที่บริเวณนี้ และเมื่อพิจารณา ค่า B.E. ของอนุพันธ์ 16 และ 17 พบว่ามีค่าเท่ากัน เนื่องจากการจัดวางตัวของโครงสร้างที่ใกล้เคียงกัน ดังรูปที่ 3ก

ภายในโพรงการจับของ AMP site พบว่าความมีขั้ว สำคัญต่อการเกิด Interaction ที่บริเวณนี้ โดยพบว่า การวางตัวของลิแกนด์เดิม (11) สามารถเกิดแรงดึงดูดทางไฟฟ้ากับกรดอะมิโน Arg81 และ Arg310 ได้ ทำให้ลิแกนด์นี้มีค่า B.E. ที่ดี แสดงให้เห็นว่าลิแกนด์นี้มีความจำเพาะต่อการจับกับเอนไซม์ GP ที่บริเวณ AMP site และบ่งชี้ถึงความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้มีประสิทธิภาพ โดยพบว่าอนุพันธ์ Hyphodermin A (14–18) มีการวางตัวที่ใกล้เคียงกับลิแกนด์เดิม (11) แต่มีความ Rigid ของโครงสร้างมากกว่า ดังรูปที่ 3ข และด้วยความยืดหยุ่นของโครงสร้างทำให้ลิแกนด์เดิมสามารถวางตัวได้อย่างจำเพาะต่อโพรงการจับของบริเวณนี้ และส่งผลต่อการสร้างพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโนที่โพรงการจับนี้ได้ถึง 8 พันธะ โดยพบว่า Interaction ที่สำคัญของสารสังเคราะห์อนุพันธ์ Hyphodermin A ต่อการจับบริเวณนี้ ได้แก่ การสร้างพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน Arg242 แต่การวางตัวของอนุพันธ์ 14 และ 15 มีโครงสร้างบิดออกไปจากตำแหน่งการวางตัวของอนุพันธ์ 16–18 ทำให้ค่า B.E. ของอนุพันธ์ 14 และ 15 มีค่าการจับที่ไม่ดี แต่เนื่องจากอนุพันธ์ 14 ไม่มีหมู่แทนที่ของอะตอมฟลูออรีน ส่งผลให้เกิดวางตัวใกล้เคียงกับอนุพันธ์ 16–18 มากกว่าอนุพันธ์ 15 อีกทั้งเกิดการสร้างแรงแบบ Pi-cation กับ Arg193 ทำให้ค่า B.E. ของอนุพันธ์ 14 ดีกว่าค่าของอนุพันธ์ 15 จากสารสังเคราะห์ Hyphodermin A ทั้ง 5 อนุพันธ์ พบว่าอนุพันธ์ 18 ให้ค่าประสิทธิภาพ



การจับที่ดีที่สุด แต่เมื่อพิจารณาการวางตัวภายในโพรงการจับของบริเวณนี้พบว่า การวางตัวของอนุพันธ์ 16, 17 และ 18 มีการวางตัวที่คล้ายกัน ดังรูปที่ 3 ข จึงทำให้ค่า B.E. ของทั้ง 3 อนุพันธ์นี้ใกล้เคียงกัน อีกทั้งเมื่อพิจารณา Interaction กับกรดอะมิโนภายในโพรงการจับ พบว่าเกิด Interaction คล้ายกัน โดยอนุพันธ์ 16 และ 17 มีการสร้างแรงแบบ Pi-sigma กับกรดอะมิโน Gln71 แต่พบว่าระยะห่างของแรงในอนุพันธ์ 17 มีระยะที่สั้นกว่าอนุพันธ์ 16 เล็กน้อย รวมถึงอนุพันธ์ 17 เกิดการสร้างแรงแบบ Pi-lone pair กับกรดอะมิโน Gln 71 ทำให้ค่า B.E. ดีกว่าอนุพันธ์ 16 และถึงแม้อนุพันธ์ 17 จะเกิด Interaction ได้เหมือนกับอนุพันธ์ 18 แต่เมื่อพิจารณาระยะห่างของ Interaction พบว่าอนุพันธ์ 18 มีระยะห่างของ Interaction ที่สั้นกว่าทำให้ Interaction แข็งแรงกว่าส่งผลให้อนุพันธ์ 18 มีประสิทธิภาพในการจับกับบริเวณนี้ได้ดีกว่าอนุพันธ์ตัวอื่น

สำหรับบริเวณ Indole site พบว่าภายในโพรงการจับมีทั้งลักษณะของ Hydrophobic และ Hydrophilic ทำให้สารสังเคราะห์อนุพันธ์ Hyphodermin A ซึ่งมีลักษณะโครงสร้างเป็นแบบวงอะโรมาติก มีความจำเพาะต่อโพรงการจับภายในบริเวณนี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งอนุพันธ์ 16-18 พบว่าให้ค่า B.E. ดีกว่าลิแกนด์เดิม (12) เนื่องจากมีการวางตัวภายในโพรงการจับที่คล้ายกับลิแกนด์เดิม โดยวงอะโรมาติกของ 3 อนุพันธ์นี้วางตัวในตำแหน่งเดียวกับวง Indole ซึ่งเป็นโครงสร้างส่วนหนึ่งของลิแกนด์เดิม มีเพียงส่วนของวงอะโรมาติกของอนุพันธ์ 18 ซึ่งถูกแทนที่ด้วยอะตอมของไอโอดีน มีโครงสร้างบิดตัวต่างจากอนุพันธ์ที่ 16 และ 17 จึงทำให้เกิด Interaction แบบ Hydrophobic กับกรดอะมิโน Val64 เกิดการสร้างพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน Arg60 ที่แข็งแรงกว่า ส่งผลให้อนุพันธ์ 18 มีค่า B.E. ที่ดีกว่าอนุพันธ์ 16 และ 17 เล็กน้อย และเนื่องจากกรดอะมิโน Arg60 และ Val64 มีความสำคัญต่อโพรงการจับภายในบริเวณ Indole site อีกทั้งยังมี Interaction ที่สำคัญ ที่ทำให้อนุพันธ์ 16-18 จับกับเอนไซม์ GP ได้ดีกว่าอนุพันธ์ 14 และ 15 ได้แก่ การสร้างพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน Thr38 รวมถึงการวางตัวของอนุพันธ์ 14 และ 15 มีวางตัวในตำแหน่งที่ใกล้เคียงกัน แต่วางตัวแตกต่างจากลิแกนด์เดิม (12) และอนุพันธ์ 16-18 จึงส่งผลให้มีประสิทธิภาพในการจับกับเอนไซม์ได้ไม่ด้อยเท่ากับอนุพันธ์ 16-18



รูปที่ 4 (ก) การจัดวางตัวและ (ข) การเกิดอันตรกิริยา ของอนุพันธ์ 18 ในโพรงการจับ Indole site



จากการทำ Molecular docking กับเอนไซม์ GP ทั้ง 3 บริเวณ ด้วยสารสังเคราะห์ห่อนุพันธ์ Hyphodermin A จำนวน 5 อนุพันธ์ ได้แก่ อนุพันธ์ 14-18 พบว่ามีความจำเพาะต่อบริเวณ Indole site มากที่สุดบ่งชี้ว่ามีความเหมาะสมต่อการนำไปพัฒนาเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ GP ที่บริเวณ Indole site โดยเฉพาะอย่างยิ่งอนุพันธ์ 18 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการจับกับเอนไซม์ GP ได้ดีที่สุด เนื่องจากการสร้างพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน Arg60 อีกทั้งยังสามารถสร้างพันธะแบบ Hydrophobic กับ Val 64 และ Lys191 ได้ ซึ่งส่งผลต่อการเคลื่อนที่ของเอนไซม์ ทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ GP ได้ เนื่องจากเอนไซม์ GP มีลักษณะเป็น dimer ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย ซึ่งการเติมเต็มของตัวทำละลายภายในช่องว่างระหว่าง 2 หน่วยย่อยนี้ จะส่งผลให้เกิดการหมุนของแต่ละหน่วยย่อยได้ 7 องศาในขณะที่เอนไซม์ทำงาน แต่เมื่อมีกรดอะมิโน Arg60 และ Val 64 สร้างพันธะไฮโดรเจนกับตัวยับยั้งของเอนไซม์ จะเกิดการขัดขวางการเคลื่อนที่ของเอนไซม์ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ (Rath et al, 2000) โดยพบว่าการวางตัวของอนุพันธ์ 18 ภายในโพรงการจับแตกต่างจากอนุพันธ์ตัวอื่น เนื่องจากอนุพันธ์นี้มีการแทนที่ของวงอะโรมาติกด้วยอะตอมของไอโอดีนซึ่งมีขนาดใหญ่ ส่งผลให้การวางตัวของอนุพันธ์ 18 มีการบิดของวงอะโรมาติกมากกว่าตัวอื่นๆจึงเกิดการสร้าง Interaction กับกรดอะมิโนภายในโพรงการจับของบริเวณ Indole site ได้แข็งแรงกว่าอนุพันธ์ตัวอื่นๆ

จากการทำ Molecular docking เพื่อพิจารณาค่า B.E. และอันตรกิริยาของสารสังเคราะห์ห่อนุพันธ์ Hyphodermin A (14-18) ที่มีต่อเอนไซม์ GP พบว่าอนุพันธ์เหล่านี้สามารถจับกับเอนไซม์ GP ได้ทุกบริเวณจับ โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณ Indole site ซึ่งมีค่า B.E. ที่ดีกว่าหรือใกล้เคียงกับลิแกนด์เดิม จึงสามารถทำนายได้ว่า สารสังเคราะห์ห่อนุพันธ์ Hyphodermin A สามารถนำไปใช้ในการพัฒนาเป็นตัวยาที่มีกลไกการออกฤทธิ์แบบยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ GP เพื่อใช้ในการรักษาภาวะระดับน้ำตาลในเลือดสูงของผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ได้

6. บทสรุป

จากผลการศึกษาค่า B.E. ของสารสังเคราะห์ห่อนุพันธ์ Hyphodermin A (14-18) ต่อเอนไซม์ GP โดยใช้ระเบียบวิธี Molecular docking พบว่าอนุพันธ์เหล่านี้มีค่า B.E. ที่ใกล้เคียงกับลิแกนด์เดิมของแต่ละบริเวณจับ โดยสารเหล่านี้มีความจำเพาะต่อบริเวณ Indole site เนื่องจากโครงสร้างของอนุพันธ์มีความเป็นอะโรมาติกสูง ซึ่งสามารถเกิด interaction กับกรดอะมิโนที่มีความเป็น Hydrophobic ที่อยู่ในโพรงการจับ Indole site ได้ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งอนุพันธ์ 18 ซึ่งมีค่า B.E. ดีที่สุดในทุกบริเวณจับ และมีค่าที่ดีกว่าลิแกนด์เดิม CP 403,700 (12) ที่บริเวณ Indole site อีกด้วย ทำให้อนุพันธ์ 18 มีประสิทธิภาพในการจับกับเอนไซม์ GP ที่บริเวณ Indole site ได้ดีที่สุด ดังนั้น จากผลการศึกษาที่ได้จึงเป็นข้อมูลสำคัญต่อกลุ่มผู้วิจัยในการนำสารเหล่านี้ไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ GP ในห้องปฏิบัติการต่อไป เพื่อพัฒนาเป็นโมเลกุลต้นแบบในการพัฒนาเป็นตัวยาที่ใช้ในการรักษาภาวะระดับน้ำตาลในเลือดสูงของผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ต่อไป



7. กิตติกรรมประกาศ

กลุ่มผู้วิจัยขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ชนก ทองนำ ที่ให้การสนับสนุนสารเคมี สถาบัน Tottori Mycological Institute ประเทศญี่ปุ่น สำหรับความอนุเคราะห์เชื้อเห็ด *Hyphoderma radula* รวมถึงสถาบัน Institute for Molecular Science (IMS) ประเทศญี่ปุ่นและคณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒที่เอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์ตลอดจนสารเคมีที่ใช้ในการทำวิจัย และทุน สกว. สำหรับการศึกษาในระดับปริญญาโทของนางสาว ชนิศา จัยประเสริฐ

8. เอกสารอ้างอิง

- Duke, B. J., & O'Leary, B. (1992). The Gaussian programs as a teaching tool: A case study on molecular hydrogen calculations. *Journal of Chemical Education*, 69(7), 529. doi:10.1021/ed069p529
- Ekstrom, J., Pauly, T., Carty, M., Soeller, W., Culp, J., Danley, D., . . . Rath, V. (2002). Structure-Activity Analysis of the Purine Binding Site of Human Liver Glycogen Phosphorylase. *Chemistry & biology*, 9, 915-924. doi:10.1016/S1074-5521(02)00186-2
- Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Fox, D. J. (2016). Gaussian 16 Rev. C.01. Wallingford, CT.
- Hampson, L. J., Arden, C., Agius, L., Ganotidis, M., Kosmopoulou, M. N., Tiraidis, C., Oikonomakos, N. G. (2006). Bioactivity of glycogen phosphorylase inhibitors that bind to the purine nucleoside site. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14(23), 7835-7845. doi:10.1016/j.bmc.2006.07.060
- Harvard Medical School. (2018). Type 2 Diabetes Mellitus. Retrieved from https://www.health.harvard.edu/a_to_z/type-2-diabetes-mellitus-a-to-z.
- Henkel Thomas, D. R., Mueller Hartwig, D. R., Schmidt Delf, D. R., & Wollweber Hartmund, D. R. (1997). DE Patent No. DE 19611366 A1.
- Loughlin, W. A., Pierens, G. K., Petersson, M. J., Henderson, L. C., & Healy, P. C. (2008). Evaluation of novel Hyphodermin derivatives as Glycogen Phosphorylase a inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16(11), 6172-6178. doi:10.1016/j.bmc.2008.04.047
- Magda, N. K., Demetres, D. L., Evangelia, D. C., Gerhard, E., & Nikos, G. O. (2005). Indirubin-3-Aminooxy-Acetate Inhibits Glycogen Phosphorylase by Binding at the Inhibitor and the Allosteric Site. Broad Specificities of the Two Sites. *Letters in Drug Design & Discovery*, 2(5), 377-390. doi:10.2174/1570180054405839
- Miller, B., Nguyen, H., Hu, C., Lin, C., & Nguyen, Q. (2014). New and Emerging Drugs and Targets for Type 2 Diabetes: Reviewing the Evidence. *American health & drug benefits*, 7, 452-463.



- 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. *Computational Chemistry*, 16, 2785-2791.
- Rath, V. L., Ammirati, M., Danley, D. E., Ekstrom, J. L., Gibbs, E. M., Hynes, T. R., . . . Hoover, D. J. (2000). Human liver glycogen phosphorylase inhibitors bind at a new allosteric site. *Chemistry & Biology*, 7(9), 677-682. doi:10.1016/S1074-5521(00)00004-1
- Rosauer, K. G., Ogawa, A. K., Willoughby, C. A., Ellsworth, K. P., Geissler, W. M., Myers, R. W., . . . Moller, D. E. (2003). Novel 3,4-Dihydroquinolin-2(1H)-one inhibitors of human glycogen phosphorylase a. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 13(24), 4385-4388. doi:10.1016/j.bmcl.2003.09.022
- Schweiker, S., Loughlin, W., Lohning, A., Petersson, M., & Jenkins, I. (2014). Synthesis, screening and docking of small heterocycles as Glycogen Phosphorylase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 84, 584-594. doi:10.1016/j.ejmech.2014.07.063
- Thomson, S., Banker, P., Bickett, D., Boucheron, J., Carter, H., Clancy, D., . . . Weiel, J. (2009). Anthranilimide based glycogen phosphorylase inhibitors for the treatment of type 2 diabetes. Part 3: X-ray crystallographic characterization, core and urea optimization and in vivo efficacy. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 19, 1177-1182. doi:10.1016/j.bmcl.2008.12.085
- World Health Organization. (2017). Cardiovascular Diseases. Retrieved from [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
- Wright, S. W., Rath, V. L., Genereux, P. E., Hageman, D. L., Levy, C. B., McClure, L. D., Treadway, J. L. (2005). 5-Chloroindoloyl glycine amide inhibitors of glycogen phosphorylase: synthesis, in vitro, in vivo, and X-ray crystallographic characterization. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 15(2), 459-465. doi:10.1016/j.bmcl.2004.10.048