



การทำนายศักยภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขตตายต่อการยับยั้งโปรตีน
เป้าหมายของโรคอัลไซเมอร์บนคอมพิวเตอร์

โดย

นายณัฐพล ปาลวัฒน์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ปีการศึกษา 2566

IN SILICO PREDICTION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM
GLYCOSMIS PENTAPHYLLA(RETZ.) AGAINST PROTEIN TARGETS IN
ALZHEIMER'S DISEASE

BY

Nattapol Palawat

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY
FACULTY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
THAMMASAT UNIVERSITY
ACADEMIC YEAR 2023

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

วิทยานิพนธ์

ของ

ณัฐพล ปาลวัฒน์

เรื่อง

การถ่ายยัคยภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตายต่อการยับยั้งโปรตีนเป้าหมายของ
โรคอัลไซเมอร์บนคอมพิวเตอร์

ได้รับการตรวจสอบและอนุมัติ ให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

เมื่อ วันที่ 20 มิถุนายน พ.ศ. 2567

ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุปัญญา จิตตพันธ์)

กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชนิตโชติ ปิยพิทยานันต์)

กรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(รองศาสตราจารย์ ดร. เทพปัญญา เจริญรัตน์)

กรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จันทนา ไพโรจน์)

คณบดี

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเพชร จิระจกุล)

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การทำนายศักยภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใน เขยตายต่อการยับยั้งโปรตีนเป้าหมายที่ของ โรคอัลไซเมอร์บนคอมพิวเตอร์
ชื่อผู้เขียน	นายณัฐพล ปาลวัฒน์
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
สาขาวิชา/คณะ/มหาวิทยาลัย	เทคโนโลยีชีวภาพ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชนิตโชติ ปิยพิทยานันต์
ปีการศึกษา	2566

บทคัดย่อ

เขยตายเป็นพืชสมุนไพรในตำรับยาไทยหลายตำรับ มีฤทธิ์ด้านการอักเสบ ลดระดับคลอเลสเทอรอลในเลือด ด้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติยับยั้งโคลีนเอสเตอเรส ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคอัลไซเมอร์ ในปัจจุบันยารักษาโรคอัลไซเมอร์มีผลข้างเคียงค่อนข้างมาก งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเข้าจับระดับโมเลกุลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตายกับโปรตีนเป้าหมายที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคอัลไซเมอร์ และเพื่อประเมินศักยภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตายสำหรับการรักษาโรคอัลไซเมอร์ โดยมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตาย 40 ชนิด กับโปรตีนเป้าหมายที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคอัลไซเมอร์ 46 ชนิด และมียาควบคุมเชิงบวกที่เกี่ยวข้องกับการรักษาโรคอัลไซเมอร์ 23 ชนิด ศึกษาแบบการเข้าจับกันระดับโมเลกุล วิเคราะห์อันตรกิริยา และทำนายคุณสมบัติทางเภสัชวิทยา ผลการวิจัยพบว่า 1-Methoxy-3-methyl-9H-carbazole มีค่าพลังงานการยึดเกาะต่อโปรตีน Acetylcholinesterase เท่ากับ -8.5 กิโลแคลอรีต่อโมล ดีกว่ายา Donepezil Galantamine Rivastigmine และ Tacrine ซึ่งมีค่าเท่ากับ -7.8 -7.0 -6.2 และ -7.6 กิโลแคลอรีต่อโมล และ 3-Methoxy-1,2-dimethyl-9H-carbazol-4-one มีค่าพลังงานการยึดเกาะต่อโปรตีน Cholinesterase เท่ากับ -9.2 กิโลแคลอรีต่อโมล ดีกว่ายา Galantamine Rivastigmine มีค่าเท่ากับ -8.7 และ -7.7 กิโลแคลอรีต่อโมล จากการวิเคราะห์อันตรกิริยา พบว่าการยึดเกาะของสาร 1-Methoxy-3-methyl-9H-carbazole และยา Donepezil Galantamine Rivastigmine และ Tacrine ต่อโปรตีน Acetylcholinesterase มีตำแหน่งแตกต่างกัน สามารถเข้ายับยั้งการทำงานของ

Acetylcholinesterase แบบไม่แข่งขันกัน อาจพิจารณาใช้เป็นตัวยับยั้งเสริมกันได้ ส่วนการยิดเกาะของ 3-Methoxy-1,2-dimethyl-9H-carbazol-4-one ต่อ Cholinesterase มีการเกิดแรงไฮโดรโฟบิกและการเรียงซ้อนพายตำแหน่งเดียวกับ Galantamine 1 ตำแหน่งคือ TRP-82 ซึ่งอาจพิจารณาได้ว่าสามารถเข้ายับยั้งการทำงานของ Cholinesterase เป็นแบบแข่งขันกัน จึงไม่ควรใช้ร่วมกัน แต่มีตำแหน่งเข้าจับแตกต่างกันกับ Rivastigmine จึงคาดว่าจะเข้ายับยั้งการทำงานของ Cholinesterase แบบไม่แข่งขันกัน และสามารถพิจารณาใช้เป็นตัวยับยั้งเสริมกันได้ สุดท้ายการทำนายคุณสมบัติทางเภสัชวิทยา พบว่า 1-Methoxy-3-methyl-9H-carbazole และ 3-Methoxy-1,2-dimethyl-9H-carbazol-4-one ผ่านเกณฑ์ตามคุณสมบัติความเป็นยาตามกฎหมายของลิปินส์กี้ แสดงถึงความสามารถในการดูดซึมและการกระจายตัวที่ดี เมื่อพิจารณาถึงคุณสมบัติเมแทบอลิซึมและความเป็นพิษ สารทั้ง 2 ชนิดเป็นตัวยับยั้ง CYP2C19 อาจส่งผลให้สารออกฤทธิ์ได้นาน และมีความเป็นพิษปานกลาง การศึกษานี้สามารถนำไปสู่ทางเลือกกระบวนการรักษาหรือบรรเทาอาการโรคอัลไซเมอร์ในอนาคต

คำสำคัญ: โรคอัลไซเมอร์, เหยตตาย, สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ, การจำลองการเข้าจับกันของโมเลกุล, อันตรกิริยา, การทำนายคุณสมบัติทางเภสัชวิทยา

Thesis Title	<i>In silico</i> prediction of bioactive compounds from a <i>Glycosmis pentaphylla</i> (Retz.) against protein targets in Alzheimer's disease
Author	Mr. Nattapol Palawat
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Major Field/Faculty/University	Biotechnology Science and technology Thammasat University
Thesis Advisor	Assistant Professor Chanitchote Piyapittayanun
Academic Year	2023

ABSTRACT

Glycosmis pentaphylla (Retz.) is a traditional Thai herb used in many Thai medicine recipes. It was reported to have anti-inflammatory effects, reduce cholesterol levels, and possess antioxidant properties. In addition, it also has cholinesterase inhibitory properties which is related to Alzheimer's disease (AD). Since, current Alzheimer's medications have many side effects, putative bioactive compounds should be assessed as alternatives to treat the disease. This study aimed to investigate binding patterns between bioactive compounds from a medicinal plant *Glycosmis pentaphylla* (Retz.) and target proteins associated with AD by using molecular docking techniques, molecular interactions and ADMET prediction in order to evaluate their potential for treating Alzheimer's disease. The 40 bioactive compounds in *Glycosmis pentaphylla* (Retz.) and the 23 AD drugs were examined for the best binding energy among 46 target proteins. From the analysis of molecular docking, the results showed that the binding affinity between 1-Methoxy-3-methyl-9H-carbazole and Acetylcholinesterase was -8.5 kcal/mol, better than Donepezil, Galantamine, Rivastigmine and Tacrine which were -7.8, -7.0, -6.2 and -7.6 kcal/mol respectively. The binding affinity between 3-Methoxy-1,2-dimethyl-9H-carbazol-4-one and Cholinesterase was -9.2 kcal/mol, better than Galantamine and Rivastigmine which were -8.7 and -7.7 kcal/mol respectively. From the analysis of molecular interaction, it was evident that the binding mode of 1-

Methoxy-3-methyl-9H-carbazole to Acetylcholinesterase differs from that of the drugs Donepezil, Galantamine, Rivastigmine, and Tacrine. Therefore, these compounds and drugs may inhibit the function of Acetylcholinesterase through noncompetitive mechanisms. Hence, they could be considered as complementary inhibitors for combined therapeutic approaches while the interaction between 3-Methoxy-1,2-dimethyl-9H-carbazol-4-one and Cholinesterase resembled that of Galantamine due to comparable overlapping binding sites of hydrophobic forces and pi stacking; TRP-82, implying a potential competitive inhibition mechanism. In contrast, it differed in binding position from Rivastigmine hence this indicated their potential as complementary inhibitors. In addition, the ADMET predictions indicate that both 1-Methoxy-3-methyl-9H-carbazole and 3-Methoxy-1,2-dimethyl-9H-carbazol-4-one met the criteria for drug-likeness according to Lipinski's Rule of Five, suggesting good absorption and distribution properties. Considering their metabolic and toxicity profiles, both compounds inhibited CYP2C19, potentially prolonging their pharmacological effects and exhibiting moderate toxicity. This study could pave the way for future therapeutic options or symptom alleviation in Alzheimer's disease.

Keywords: Alzheimer's disease, *Glycosmis pentaphylla* (Retz.), Bioactive compounds, Molecular docking, Molecular interaction, ADMET prediction

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปได้โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชนิตโชติ ปิยพิทยานันต์ ขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงที่คอยให้ความรู้ ประสพการณ์ แนะนำแนวทาง ให้คำปรึกษา ตักเตือน กระตุ้นเสริมสร้างกำลังใจ และช่วยแก้ไขปัญหาในการทำวิทยานิพนธ์นี้อย่างดี ตลอดมา ด้วยจิตวิญญาณความเป็นครูอย่างเต็มเปี่ยม

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ภูมิภัทร ใจแก้ว ที่คอยแนะนำแนวทางการทำวิจัยตั้งแต่ เริ่มต้นจนถึงสิ้นสุดการทำวิทยานิพนธ์นี้อย่างดีและเต็มที่เสมอมา รวมถึงคอยให้กำลังใจทุกครั้ง ที่ข้าพเจ้าเข้าไปรับคำปรึกษา จนทำให้วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร.วรุณธร เชื้อบุญมี ที่ได้เมตตาให้ความอนุเคราะห์ข้อมูล ในการทำงานวิจัย และจุดประเด็นให้เกิดหัวข้อวิทยานิพนธ์นี้ขึ้น ทั้งยังคอยให้คำปรึกษาในการทำงาน วิจัยให้สำเร็จ

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คุณเปรมณัช ขุนปักษี เจ้าหน้าที่ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ เจ้าหน้าที่คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ที่คอย ให้การสนับสนุน และอำนวยความสะดวกในหลาย ๆ ด้าน และขอบคุณ ครอบครัว เพื่อน พี่ และน้อง สำหรับกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์นี้ให้สำเร็จ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สุปัญญา จิตตพันธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. เทพปัญญา เจริญรัตน์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จันทนา ไพบูรณ์ ที่ให้เกียรติเป็นกรรมการสอบ วิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ คุณธนพร เตชประภาสรัตน์ คุณนภกษมณชน ทหารไทย คุณอภิษฐา ขำปลอด และคุณณัฐนิช เชื้อพลพิชัย ที่อนุเคราะห์ข้อมูลในการทำงานวิจัย

นายณัฐพล ปาลวัฒน์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	(1)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	(3)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบัญตาราง	(11)
สารบัญภาพ	(12)
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์งานวิจัย	2
1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.4 สถานที่ทำวิจัย	2
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 เหยตตาย	3
2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	3
2.1.2 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา	4
2.2 โรคอัลไซเมอร์	4
2.2.1 สมมติฐานการเกิดโรคอัลไซเมอร์	5
2.2.1.1 Cholinergic hypothesis	5
2.2.1.2 Amyloid-Beta hypothesis	5

2.2.1.3 Inflammatory hypothesis	6
2.2.1.4 Calcium homeostasis and NMDA hypotheses	6
2.2.1.5 Tau propagation hypothesis	7
2.2.1.6 Mitochondrial cascade hypothesis and related hypotheses	8
2.2.1.7 Neurovascular hypothesis	9
2.2.2 การรักษาโรคอัลไซเมอร์	9
2.2.3 การรักษาโดยไม่ใช้ยา	9
2.2.4 การรักษาโดยใช้ยา	10
2.2.4.1 ยาในกลุ่ม Cholinesterase inhibitors: ChEIs :	10
(1) Donepezil	10
(2) Rivastigmine	10
(3) Galantamine	11
(4) Tacrine	11
2.2.4.2 ยาในกลุ่ม N-methyl-D-aspartate(NMDA) Receptor Antagonist :	11
(1) Memantine	11
2.2.4.3 ยาในกลุ่ม Anti-amyloid therapy :	12
(1) Aducanumab	12
(2) Lecanemab	12
2.2.5 การรักษาโดยใช้สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ	12
2.3 การจำลองการเข้าจับกันของโมเลกุล (Molecular docking)	14
2.3.1 Molecular mechanics force field based	14
2.3.2 Empirical methods-based	14
2.3.3 Knowledge-based methods-based	15
2.3.4 Consensus Fundamentally	15
2.4 ADMET	15
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	16

บทที่ 3 วิธีการวิจัย	18
3.1 อุปกรณ์และโปรแกรมทางชีวสารสนเทศ	18
3.2 ฐานข้อมูลสาธารณะ	18
3.3 การคัดเลือกโครงสร้างของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเซตาย โปรตีน เป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์และโครงสร้างของยาเป็นโครงสร้าง สามมิติ	19
3.3.1 การคัดเลือกโครงสร้างสามมิติของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใน เซตายจากฐานข้อมูล PubChem	19
3.3.2 การคัดเลือกโครงสร้างสามมิติของโปรตีนเป้าหมายจาก ฐานข้อมูล UniProt	19
3.3.3 การคัดเลือกข้อมูลยาที่เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์จากฐานข้อมูล DrugBank	19
3.4 การเตรียมข้อมูล	19
3.4.1 การเตรียมไฟล์ข้อมูลสำหรับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเซตายและ ยาที่เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์	19
3.4.2 การเตรียมข้อมูลสำหรับโปรตีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์	20
3.5 การทำนายบริเวณเข้าจับกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเซตายและยา ใน โปรตีนเป้าหมายและตำแหน่งเร่งปฏิกิริยาบนโครงสร้างสามมิติของโปรตีน	21
3.6 การเตรียมไฟล์สำหรับการจำลองการเข้าจับกันของโมเลกุล (Molecular docking)	21
3.6.1 การเตรียมไฟล์ข้อมูลสำหรับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเซตายและ ยาที่เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์	21
3.6.2 การเตรียมไฟล์ข้อมูลสำหรับโปรตีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับโรค อัลไซเมอร์	21
3.7 ขั้นตอนในการทำ Multiple Molecular Docking	22
3.8 การแสดงผลของการทดสอบการเข้าจับระหว่างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใน เซตายและยากับโปรตีนเป้าหมายของการเกิดโรคอัลไซเมอร์ และการ วิเคราะห์อันตรกิริยา	23
3.9 การทำนายคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใน เซตายและยา	24

บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	25
4.1 การคัดเลือกโครงสร้างสามมิติ	25
4.2 การทำนายบริเวณเข้าจับในโปรตีนเป้าหมาย	25
4.3 การทดสอบการเข้าจับกันระหว่างโมเลกุล (Molecular docking)	27
4.3.1 ผลการเข้าจับของสาร 1-Methoxy-3-methyl-9H-carbazole และ ยา Donepezil, Galantamine, Rivastigmine, และ Tacrine ต่อโปรตีน Acetylcholinesterase	34
4.3.2 ผลการเข้าจับของสาร 3-Methoxy-1,2-dimethyl-9H-carbazol- 4-one และยา Donepezil, Galantamine, Rivastigmine, และ Tacrine ต่อโปรตีน Cholinesterase	35
4.4 การวิเคราะห์อันตรกิริยา	35
4.4.1 การวิเคราะห์อันตรกิริยาของ 1-Methoxy-3-methyl-9H- carbazole เทียบกับยา Donepezil, Galantamine, Rivastigmine, และ tacrine ต่อโปรตีน Acetylcholinesterase	37
4.4.2 การวิเคราะห์อันตรกิริยาของ 3-Methoxy-1,2-dimethyl-9H- carbazol-4-one เทียบกับยา Galantamine และ Rivastigmine ต่อโปรตีน Cholinesterase	41
4.5 การทำนายคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใน เขยตายและยา	43
4.6 อภิปรายผลการทดลอง	46
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย	48
5.1 สรุปผลการทดลอง	48
รายการอ้างอิง	50

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 การคัดเลือกโครงสร้างสามมิติ	25
4.2 บริเวณเข้าจับที่ 1 ของโปรตีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์	25
4.3 พลังงานการยึดเกาะของยาควบคุมเชิงบวกต่อโปรตีน Acetylcholinesterase และ Cholinesterase	29
4.4 พลังงานการยึดเกาะของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตายต่อโปรตีน Acetylcholinesterase เมื่อเทียบกับคะแนนการยึดเกาะของยา Rivastigmine (พลังงานการยึดเกาะ -6.2 กิโลแคลอรีต่อโมล)	29
4.5 พลังงานการยึดเกาะของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตายต่อโปรตีน Cholinesterase เมื่อเทียบกับคะแนนการยึดเกาะของยา Rivastigmine (พลังงานการยึดเกาะ -7.7 กิโลแคลอรีต่อโมล)	31
4.6 แสดงค่าพลังงานการยึดเกาะของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตายที่ดีที่สุด และยาควบคุมเชิงบวกเมื่อจับกับโปรตีนเป้าหมาย Acetylcholinesterase และ Cholinesterase	33
4.7 ผลการวิเคราะห์อันตักิริยา	36
4.8 แสดงค่าการตรวจสอบคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตาย	44
4.9 แสดงค่าการตรวจสอบคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาของยาควบคุมเชิงบวก	45

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 วิธี acetylcholine	5
2.2 วิธี วิธี amyloid-beta precursor protein	6
2.3 Calcium homeostasis and NMDA hypotheses	7
2.4 การเติมหมู่ฟอสเฟตของโปรตีนเทา	8
2.5 Mitochondrial cascade hypothesis and related hypotheses	8
2.6 ภาพแสดงโครงสร้างของมิติของ Donepezil	10
2.7 ภาพแสดงโครงสร้างของมิติของ Rivastigmine	10
2.8 ภาพแสดงโครงสร้างของมิติของ Galantamine	11
2.9 ภาพแสดงโครงสร้างของมิติของ Tacrine	11
2.10 ภาพแสดงโครงสร้างของมิติของ Memantine	12
3.1 แสดงตัวอย่างการกำหนดค่าในไฟล์ config_j.txt	22
4.1 scatterplot 3D ของพลังงานการยึดเกาะระหว่างลิแกนด์และโปรตีนเป้าหมาย	28
4.2 โครงสร้างโมเลกุลการเข้าจับของสารออกฤทธิ์ 1-Methoxy-3-methyl-9H-carbazole (สีแดง) และยา Donepezil (สีน้ำเงิน) Galantamine (สีเหลือง) Rivastigmine (สีม่วง) Tacrine (สีส้ม) ต่อโปรตีนเป้าหมาย Acetylcholinesterase (สีเขียว)	34
4.3 โครงสร้างโมเลกุลการเข้าจับของสารออกฤทธิ์ 3-Methoxy-1,2-dimethyl-9H-carbazol-4-one (สีน้ำตาล) และยา Galantamine (สีเหลือง) Rivastigmine (สีม่วง) ต่อโปรตีนเป้าหมาย Cholinesterase (สีเขียว)	35
4.4 โครงสร้างเชิงซ้อนระหว่างโมเลกุลสาร 1-Methoxy-3-methyl-9H-carbazole และ ยา Donepezil	37
4.5 โครงสร้างเชิงซ้อนระหว่างโมเลกุลสาร 1-Methoxy-3-methyl-9H-carbazole และยา Galantamine	38
4.6 โครงสร้างเชิงซ้อนระหว่างโมเลกุลสาร 1-Methoxy-3-methyl-9H-carbazole และยา Rivastigmine	39
4.7 โครงสร้างเชิงซ้อนระหว่างโมเลกุลสาร 1-Methoxy-3-methyl-9H-carbazole และยา Tacrine	40

4.8 โครงสร้างเชิงซ้อนระหว่างโมเลกุลสาร 3-Methoxy-1,2-dimethyl-9H-carbazol-4-one และยา Galantamine	41
4.9 โครงสร้างเชิงซ้อนระหว่างโมเลกุลสาร 3-Methoxy-1,2-dimethyl-9H-carbazol-4-one และยา Rivastigmine	42



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ความรู้ที่ได้จากการค้นพบและการใช้สืบทอดกันมายาวนานของบรรพบุรุษ ส่งผลให้ปัจจุบันสมุนไพรไทยได้รับความสนใจและมีการวิจัยด้านการสกัดและการประเมินประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ มากขึ้น ทั้งนี้เพื่อเป็นข้อมูลในการนำสมุนไพรมาใช้ประโยชน์อย่างเหมาะสมและปลอดภัย รวมถึงนำไปสู่การพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ยา เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง และในอาหารเสริม เป็นต้น เนื่องจากยารักษาโรคในปัจจุบันมีราคาสูง และมีผลข้างเคียงมาก

เขยตาย (*Glycosmis pentaphylla*) จัดอยู่ในวงศ์ Rutaceae เป็นพืชสมุนไพรในตำรับยาไทยหลายตำรับ (Siriluk *et al.*, 2022) มีลักษณะเป็นไม้พุ่มกึ่งไม้ยืนต้นขนาดเล็ก มีชื่อท้องถิ่นอื่น ๆ ว่า ส้มขึ้น, ประยงค์ใหญ่, กระรอกน้ำ, เขยตายแม่ยายชักปรก, หล้ายาง และชมขึ้น เป็นต้น มีนําสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของเขยตายมาใช้ประโยชน์หลากหลาย ส่วนมากเป็นสารในกลุ่มอัลคาลอยด์และเอนิเมต มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ ลดระดับคลอเลสเตอรอลในเลือด ต้านการอักเสบ (Hongwei Chen *et al.*, 2022) ต้านเนื้องอก ต้านอนุมูลอิสระ ต้านไวรัส ต้านเชื้อราและแบคทีเรีย เป็นต้น (Sreejith *et al.*, 2012) นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติยับยั้งโคลินเอสเตอเรส (Rahman *et al.*, 2017) ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคอัลไซเมอร์ อย่างไรก็ตามการศึกษาสมบัติทางเภสัชวิทยาของเขยตายยังมีจำนวนน้อยมาก

อัลไซเมอร์ หรือโรคความจำเสื่อม เป็นโรคทางสมองเกี่ยวข้องกับความเสี่ยงของเซลล์ประสาทในสมองที่ค่อยๆ ทำลายความจำและทักษะการคิด สูญเสียการทำงานของรับรู้ การใช้เหตุผล และความสามารถทางพฤติกรรมจนถึงระดับที่รบกวนชีวิตประจำวันและกิจกรรมต่าง ๆ สาเหตุของโรคอัลไซเมอร์ยังไม่แน่ชัด (Blennow *et al.*, 2016) แต่มีรายงานสมมติฐานหลัก ๆ ประการแรกคือ เมื่อเบตา-อะมิลลอยด์สลายจะให้อนุมูลอิสระออกมาทำให้เกิดสภาวะที่เอื้อต่อความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน และกระตุ้นให้เซลล์ประสาทเกิดการอักเสบ รวมทั้งภาวะสมดุลของแคลเซียม หากขาดภาวะสมดุลแคลเซียมส่งผลเสียต่อระบบประสาทและสมอง ประการที่สองคือ อัตราการสังเคราะห์สารสื่อประสาทชนิดอะเซติลโคลีนในสมองลดลงส่งผลต่อการทำงานของเซลล์ประสาท ทำให้การทำงานของสมองสูญเสียอย่างต่อเนื่อง (Hardy *et al.*, 2002 และ Agarwal *et al.*, 2020) ในปัจจุบันมียารักษาโรคอัลไซเมอร์ที่ได้รับการขึ้นทะเบียนจากองค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกาจำนวนน้อย ราคาแพง และมีผลข้างเคียงค่อนข้างมาก อย่างไรก็ตามเคยมีรายงานว่า

เขยตายมีคุณสมบัติในการยับยั้งอะเซติลโคลีนเอสเทอเรส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยอะเซติลโคลีนและ มีฤทธิ์ด้านการเกิดออกซิเดชัน (Rahman *et al.*, 2017) จึงเป็นที่มาของงานวิจัยนี้ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการจำลองการจับของโมเลกุล (molecular- docking) ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตายกับโปรตีนเป้าหมายที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคอัลไซเมอร์เพื่อพิจารณาว่าสารสกัดจากเขยตายมีประสิทธิภาพในการยับยั้งโปรตีนเป้าหมายที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคอัลไซเมอร์ได้หรือไม่ และเพื่อประเมินศักยภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตายต่อโรคอัลไซเมอร์ ซึ่งคาดว่าจะทำให้ได้ข้อมูลที่สำคัญสำหรับทางเลือกในการรักษาหรือป้องกันโรคอัลไซเมอร์ ทั้งยังมีส่วนสนับสนุนข้อมูลของตำรายาไทยให้มีความน่าเชื่อถือมากขึ้น ซึ่งเป็นการส่งเสริมภูมิปัญญาไทยในอีกทางหนึ่งด้วย

1.2 วัตถุประสงค์งานวิจัย

1.2.1) เพื่อศึกษาการเข้าจับระดับโมเลกุลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตายกับโปรตีนเป้าหมายที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคอัลไซเมอร์

1.2.2) เพื่อประเมินศักยภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตายสำหรับการรักษาโรคอัลไซเมอร์

1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1) ทราบถึงรูปแบบการเข้าจับโปรตีนของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตายกับโปรตีนเป้าหมายที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคอัลไซเมอร์

1.3.2) ทราบถึงศักยภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตายต่อโปรตีนเป้าหมายที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคอัลไซเมอร์

1.4 สถานที่ทำวิจัย

ห้องปฏิบัติการ B-508 อาคารเรียนบรรยายรวม 5 สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี

บทที่ 2

วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เชยตาย

เชยตายหรือ *Glycosmis pentaphylla* (Retz.) DC. จัดอยู่ในวงศ์ส้ม (Rutaceae) เป็นพืชเขตร้อนของทวีปเอเชีย และออสเตรเลีย พบได้ในอินเดีย พม่า จีนตอนใต้ ประเทศในแถบคาบสมุทรอินโดจีน สุมาตราและชวา ส่วนในประเทศไทยพบขึ้นตามป่าโปร่ง ป่าเบญจพรรณ และตามชายป่า (Labony Khandokar, *et al.*, 2021, disthai, สืบค้นเมื่อ 2023) มักพบในพื้นที่ความชื้นสูง แสงแดดจัด เป็นพันธุ์ไม้หอมที่แข็งแรง เจริญเติบโตเร็ว อดทนต่อสภาพแวดล้อม สามารถขยายพันธุ์ได้ด้วยวิธีการเพาะเมล็ด การปักชำ และการตอนกิ่ง มีชื่อท้องถิ่นอื่น ๆ ว่า กระรอกน้ำข้าว (ชลบุรี), ส้มขึ้น (ภาคเหนือ, ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ), ตาระแป (มลายู-ยะลา), หล้ายาง (ภาคใต้), ประยงค์ใหญ่ (กรุงเทพมหานคร), พุทธรักษา (สุโขทัย), มันหมู (ประจวบคีรีขันธ์) เป็นต้น (Medthai, 2019)

2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ลำต้น จัดเป็นพรรณไม้พุ่มกึ่งไม้ยืนต้นขนาดเล็ก มีความสูงได้ประมาณ 2-4 เมตร แตกกิ่งก้านต่ำตั้งแต่โคนต้นเป็นพุ่มเตี้ย ลำต้นเป็นเหลี่ยม เปลือกลำต้นเรียบเป็นสีน้ำตาลอมเทา ผิวลำต้นตกรูเป็นวงสีขาว (Medthai, 2019)

ใบ มีลักษณะเป็นใบประกอบแบบขนนก ออกเรียงสลับตรงข้ามหรือกึ่งตรงข้าม มีใบย่อยประมาณ 3-5 ใบ ลักษณะของใบย่อยเป็นรูปรีหรือรูปไข่กลับ ปลายใบแหลมถึงกลม โคนใบสอบเรียว ส่วนขอบใบเรียบหรือมีรอยจักตื้น ใบมีขนาดกว้างประมาณ 3-5 เซนติเมตร และยาวประมาณ 8-14 เซนติเมตร แผ่นใบเรียบ ผิวใบทั้งสองด้านมีจุดต่อม หลังใบเรียบสีสีเขียวเข้มเป็นมัน ส่วนท้องใบเรียบเป็นสีอ่อนกว่า (Medthai, 2019)

ดอก เป็นช่อกระจุกประมาณ 12-15 ดอก ยาวประมาณ 10-30 เซนติเมตร ดอกมีขนาดเล็กเป็นสีขาว มีกลิ่นหอม โดยจะออกตามซอกใบและที่ปลายกิ่ง กลีบดอกเป็นสีขาว มี 5 กลีบ ขนาด 4-5 x 2-2.5 มิลลิเมตร เรียงซ้อนกันเป็นวง ผิวมีต่อมจุด รูปไข่กลับ ส่วนกลีบเลี้ยงที่โคนเชื่อมติดกัน ปลายแยกออกเป็น 5 แฉก ยาวประมาณ 1-1.5 มิลลิเมตร รูปแหลมถึงรูปไข่ มีขนอ่อนที่ส่วนปลาย มีใบประดับหุ้ม โดยชั้นบนจะมี 5 กลีบใหญ่ และมีส่วนย่อยเล็ก ๆ หลายอัน มีต่อมซึ่งเป็นร่องส่วนก้านชูดอกสั้นมาก เกสรเพศเมียออกเรียงเป็นวง ตรงกลางแกนดอกมีเกสรเพศผู้เป็นแท่ง ส่วนรัง

ไข่ม้วนมีขนาดกว้างประมาณ 2-2.5 มิลลิเมตร เป็นรูปไข่ ดอกมีเกสรเพศผู้ 8-10 อัน ก้านชูอับเรณูยาวประมาณ 2-3 มิลลิเมตร (Medthai, 2019)

ผล เป็นรูปทรงกลมขนาดเล็ก มีขนาดกว้างประมาณ 1-1.2 เซนติเมตร และยาวประมาณ 1.18 เซนติเมตร ปลายผลแหลม ผิวผลเรียบ ผลอ่อนเป็นสีเขียว เมื่อสุกแล้วจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูใส ฉ่ำน้ำ มีรสหวาน ภายในผลมีเมล็ดสีดำ 1 เมล็ด เมล็ดมีลักษณะกลม เป็นลาย (Medthai, 2019)

2.1.2 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

มีฤทธิ์ในรักษาอาการไอ หลอดลมอักเสบ (Babu *et al.*, 2020) ด้านแบคทีเรีย (Murugan, *et al.*, 2016) โรคโลหิตจาง โรคดีซ่าน โรคไขข้อ (Vinitha S Babu *et al.*, 2020) เป็นไข้ ความผิดปกติของตับ ตืดเชื้อทางเดินปัสสาวะ โรคหนองใน ลดระดับน้ำตาลในเลือด มะเร็ง ท้องร่วง โรคบิด การระบาดของพยาธิ ขับน้ำนม แก้อาการปวดหัวฟันผุ ภาวะหัวใจล้มเหลว แก้อาการปวดกล้ามเนื้อและภายนอก ลดระดับคลอเลสเตอรอล ต้านเนื้องอก ต้านอนุมูลอิสระ ต้านไวรัส ต้านเชื้อรา และต้านการอักเสบ นอกจากนี้รายงานวิจัยยังพบว่ามีคุณสมบัติในการยับยั้ง Cholinesterase ให้มีการสังเคราะห์ acetylcholine มากขึ้น ส่งผลดีต่อระบบประสาทและสมอง (Rahman *et al.*, 2017, Labony Khandokar *et al.*, 2021) สารพฤกษเคมีหลักเช่น ฟลาโวนอยด์ (Yi Wu *et al.*, 2012) เอไมด์ คูมาริน อาร์โบรีน (Sreejith PS *et al.*, 2012) อัลคาลอยด์ และเทอร์ปีนอยด์ (Ahmed *et al.*, 2012) เป็นต้น

2.2 โรคอัลไซเมอร์

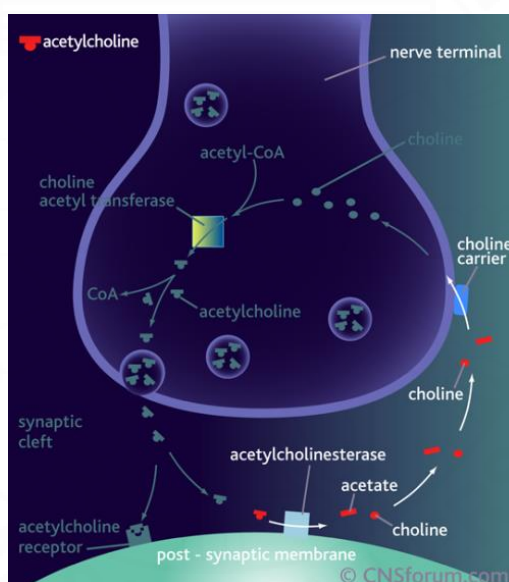
โรคอัลไซเมอร์เป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับสมองส่วนที่ควบคุมความคิด ความจำ และภาษา เกิดจากความเสื่อมของระบบประสาทซึ่งมักจะเริ่มอย่างช้า ๆ และแย่งแย่ง ๆ เกิดจากการเปลี่ยนแปลงในสมอง นำไปสู่การสะสมของโปรตีนบางชนิด ซึ่งทำให้สมองหดตัวและเซลล์สมองตายในที่สุด โดยอาการเริ่มแรกอาจมีความจำถดถอยจนตัวเองรู้สึกได้ พูดซ้ำ ๆ เรื่องเดิม สับสนทิศทาง เริ่มเครียด อารมณ์เสียง่ายและซึมเศร้า จากนั้นจะเริ่มมีการสูญเสียความทรงจำเล็กน้อย สุดท้ายอาจสูญเสียความจำทั้งหมดและนำไปสู่การสูญเสียความสามารถในการสนทนาและการตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อม อาจส่งผลกระทบต่อความสามารถของบุคคลในการดำเนินกิจกรรมประจำวัน และเป็นสาเหตุของภาวะสมองเสื่อม 60–70% พบมากในผู้สูงอายุที่มีอายุมากกว่า 60 ปี (Dinda B, *et al.*, 2019, mayoclinic, 2015, Boris Decourt, *et al.*, 2022)

2.2.1 สมมติฐานการเกิดโรคอัลไซเมอร์

ปัจจุบันสาเหตุของการเกิดโรคอัลไซเมอร์ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด อย่างไรก็ตามมีการตั้งสมมติฐานของการเกิดโรค ดังนี้

2.2.1.1 Cholinergic hypothesis

เป็นสมมติฐานที่เก่าแก่ที่สุดเป็นพื้นฐานของยาที่มีอยู่ในปัจจุบัน ซึ่งเสนอว่าโรคอัลไซเมอร์จากกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ choline acetyltransferase ลดลง ในสมองส่วน amygdala, hippocampus และ cortex โดยที่อัตราการสังเคราะห์และการขนส่งสารสื่อประสาทชนิด acetylcholine ในสมองลดลงที่บริเวณ synapses (Robert Briggs, *et al.*, 2016, Liu PP, *et al.*, 2019, Agarwal M, *et al.*, 2020, Boris Decourt, *et al.*, 2022)

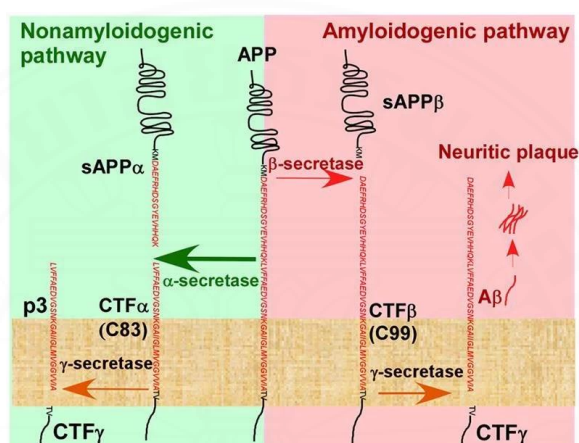


ภาพที่ 2.1 วิธี acetylcholine ที่มา: (CNSforum.com)

2.2.1.2 Amyloid-Beta hypothesis

สมมติฐานนี้ได้รับการยอมรับมากที่สุดในกลุ่มนักวิจัย เนื่องจากคำอธิบายเกี่ยวกับการก่อตัวของ amyloid plaque และการสะสมของ Amyloid-beta ($A\beta$) ซึ่งเป็นจุดเด่นที่สำคัญของโรคอัลไซเมอร์ เกิดจากการกลายพันธุ์ในตำแหน่งของยีน amyloid-beta precursor protein (APP) บนโครโมโซมคู่ที่ 21 โดยปกติ APP จะถูกไฮโดรไลซ์โดยเอนไซม์ alpha-secretase จะได้ sAPP-alpha ละลายน้ำได้ และ C83 fraction มีหน้าที่ส่งเสริมเกี่ยวกับความจำ การเรียนรู้ของสมอง และรักษาสมรรถนะความเครียดของเส้นประสาท แต่ในคนที่โรคอัลไซเมอร์ APP จะถูกไฮโดรไลซ์โดยเอนไซม์ beta-secretase จะได้ sAPP-beta ไม่สามารถละลายน้ำได้ และ C99 fraction

จากนั้น เอนไซม์ gamma-secretase ทำการไฮโดรไลซ์ C99 fraction ได้ $A\beta$ 2 หน่วยย่อย ($A\beta$ 40 ไม่สามารถละลายน้ำได้ หรือ $A\beta$ 42 ละลายน้ำได้) ซึ่งทำให้เกิด amyloid plaque ทำให้เกิดการขัดขวางการทำงานของ sAPP ซึ่งนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงทางเมแทบอลิซึม ส่งผลให้เกิดภาวะที่เอื้อต่อความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน และภาวะสมดุลของแคลเซียม ส่งผลให้เกิดโรคอัลไซเมอร์ได้ (Robert Briggs, *et al.*, 2016, Liu PP, *et al.*, 2019, Agarwal M, *et al.*, 2020, Boris Decourt, *et al.*, 2022)



ภาพที่ 2.2 วิธี amyloid-beta precursor protein ที่มา: (acrobiosystems.com)

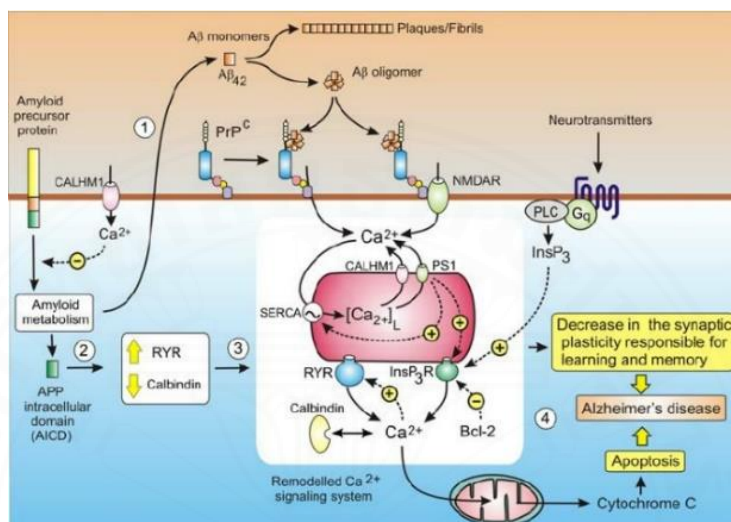
2.2.1.3 Inflammatory hypothesis

การอักเสบของระบบประสาทถือว่าเป็นผลต่อเนื่องในสมมติฐานของอะไมลอยด์ โดยที่การตอบสนองการอักเสบของ microglia และ astrocytes ในระบบประสาทส่วนกลางมีบทบาทสำคัญทำให้เกิดโรคอัลไซเมอร์ การศึกษาในหลอดทดลองได้เชื่อมโยงพยาธิวิทยาของ $A\beta$ ในโรคอัลไซเมอร์ กับการอักเสบของระบบประสาท แสดงให้เห็นว่า $A\beta$ มีผลในการกระตุ้นการทำงานของ microglia ที่เกิดจากไซโตไคน์ ในผู้ป่วยอัลไซเมอร์ $A\beta$ สามารถจับกับเซลล์ microglia ผ่านทาง D36-TLR4-TLR6 receptor complex และ the NLRP3 inflammatory complex จะปล่อยปัจจัยที่กระตุ้นการอักเสบ เช่น TNF- α และทำให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน ทำให้เซลล์ประสาทเสียหาย นอกเหนือจากระดับที่เพิ่มขึ้นของ TNF- α แล้ว ระดับที่เพิ่มขึ้นของไซโตไคน์ที่มีการอักเสบ IL-1 β , TGF- β , IL-12 และ IL-18 ในระบบประสาทส่วนกลางยังเพิ่มความเสียหายในสมอง และมีความสัมพันธ์กับการลุกลามของโรคอัลไซเมอร์ (Pei-Pei Liu *et al.*, 2019)

2.2.1.4 Calcium homeostasis and NMDA hypotheses

แคลเซียมในเซลล์มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการทำงานของเซลล์ประสาท เช่น neural growth and differentiation, action potential, and synaptic plasticity.

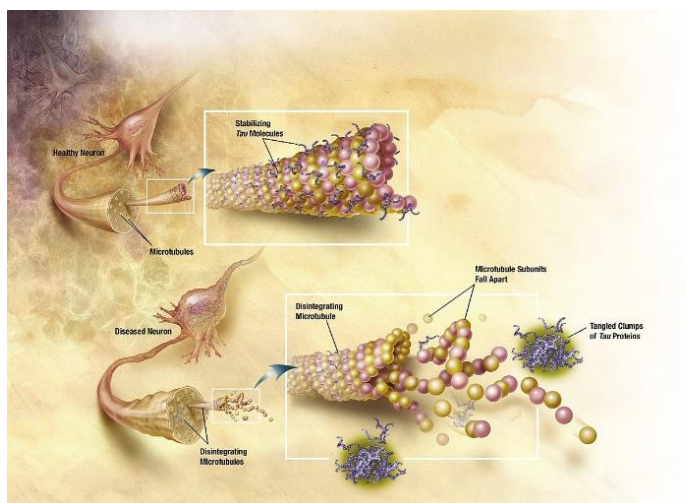
สภาวะสมดุลแคลเซียมมีความสัมพันธ์กับความจำและการเรียนรู้ เป็นผลต่อเนื่องในสมมติฐานของอะไมลอยด์ ในปี 1992 Mattson และคณะ ได้เสนอสมมติฐานว่า $A\beta$ ส่งผลต่อสภาวะสมดุลแคลเซียม ทำให้แคลเซียมไหลเข้าสู่เซลล์ประสาทอย่างต่อเนื่อง เมื่อระดับแคลเซียมภายในเซลล์เพิ่มขึ้น อาจทำให้เซลล์ประสาทเสี่ยงต่อสิ่งเร้าจากสิ่งแวดล้อมมากขึ้น (Michael, 2010, Cascella, *et al.*, 2021)



ภาพที่ 2.3 Calcium homeostasis and NMDA hypotheses ที่มา: (Michael, 2010)

2.2.1.5 Tau propagation hypothesis

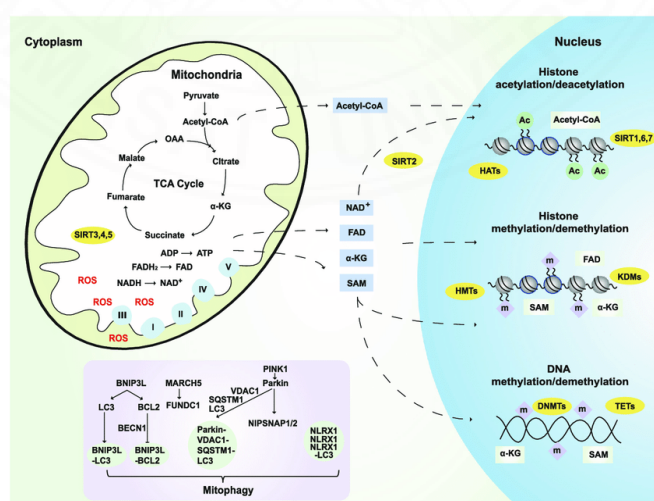
ลักษณะการก่อโรคที่โดดเด่นอีกประการหนึ่งของผู้ป่วยอัลไซเมอร์คือ neurofibrillary tangles (NFTs) เกิดจากโปรตีนเทามีการเติมหมู่ฟอสเฟตมากเกินไป (hyperphosphorylated tau) ซึ่งโปรตีนเทาเกาะอยู่กับไมโครทูบูล ทำหน้าที่ทำให้ไมโครทูบูลมีความเสถียรภาพ ส่งผลให้เกิดการแยกโพลีเมอร์ของไมโครทูบูลและความผิดปกติของแอกซอน ซึ่งนำไปสู่การเสื่อมของเซลล์ประสาทและการตายของเซลล์ประสาท ส่งผลให้เกิดโรคอัลไซเมอร์ การเติมหมู่ฟอสเฟตที่ผิดปกติของโปรตีนเทาเกิดจากการแสดงออกในระดับสูงของไคเนสฟอสโฟรีเลสชันต่าง ๆ เช่น glycogen synthase kinase 3 β (GSK- 3 β), cyclin-dependent kinase 5 (CDK5), และ tyrosine kinase ซึ่งถือเป็นเป้าหมายยาที่เป็นไปได้สำหรับการรักษาโรคอัลไซเมอร์ (Robert Briggs, *et al.*, 2016, Kametani F, *et al.*, 2018, Liu PP, *et al.*, 2019, Agarwal M, *et al.*, 2020)



ภาพที่ 2.4 การเติมหมู่ฟอสเฟตของโปรตีนเทา ที่มา: (NIA/NIH.)

2.2.1.6 Mitochondrial cascade hypothesis and related hypotheses

ในปี 2004 Swerdlow และ Khan ได้เสนอสมมติฐานนี้ว่า ไมโทคอนเดรียอาจส่งผลต่อการแสดงออกและการประมวลผลของยีน APP และการสะสมของ $A\beta$ ในสมมติฐานนี้จะประกอบด้วย 3 ประการ ประการแรก การทำงานของไมโทคอนเดรียจะถูกกำหนดโดยการถ่ายทอดทางพันธุกรรม ประการที่สอง อัตราการเปลี่ยนแปลงที่เกี่ยวข้องกับอายุ ซึ่งพิจารณาจากปัจจัยทางพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อม และหากประสิทธิภาพของไมโทคอนเดรียลดลงจะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงฟิโนไทป์ของผู้สูงอายุ ประการที่สาม อัตราการเปลี่ยนแปลงการทำงานของไมโทคอนเดรียในแต่ละคนจะส่งผลต่อการเกิดโรคอัลไซเมอร์ (Pei-Pei Liu *et al.*, 2019)



ภาพที่ 2.5 Mitochondrial cascade hypothesis and related hypotheses

ที่มา: (Pei-Pei Liu *et al.*, 2019)

2.2.1.7 Neurovascular hypothesis

การศึกษาผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์พบว่ามีความผิดปกติของระบบประสาทและหลอดเลือดก่อนที่จะเริ่มมีอาการของสมองเสื่อม สภาวะสมดุลของสิ่งแวดล้อมภายในเซลล์ขนาดเล็กและเมแทบอลิซึมในสมองขึ้นอยู่กับ การส่งสารตั้งต้นและการระบายของเสียผ่านทางเลือด, เซลล์ประสาท, astrocytes เพื่อสร้างการทำงานที่สนับสนุนความสมบูรณ์ของโครงสร้างและหน้าที่ของสมอง ซึ่งความผิดปกติของหลอดเลือดจะนำไปสู่ความผิดปกติของสมองและโรคทางระบบประสาท รวมถึงโรคอัลไซเมอร์ (Pei-Pei Liu *et al.*, 2019)

จากรายงานงานวิจัยแสดงให้เห็นว่าระดับคอเลสเตอรอลสูง ภาวะไขมันในเลือดสูง เป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อระบบประสาทมีความเสี่ยงในการเป็นโรคอัลไซเมอร์ และผู้ป่วยที่มีภาวะน้ำตาลในเลือดสูง หรือผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 มีความเสี่ยงในการเป็นโรคสมองเสื่อมเพิ่มขึ้น (Hassing *et al.*, 2009)

2.2.2 การรักษาโรคอัลไซเมอร์

ปัจจุบันยังไม่มีวิธีการรักษาที่ทำให้โรคอัลไซเมอร์หายขาด แต่สามารถดูแลรักษาแบบประคับประคองตามอาการและปัญหาที่เกิดขึ้น ชะลอภาวะสมองให้เสื่อมช้าที่สุดเพื่อเพิ่มคุณภาพชีวิตของทั้งผู้ป่วยและผู้ดูแล และป้องกันอันตรายที่อาจเกิดขึ้นจากภาวะแทรกซ้อนต่าง ๆ ได้ ด้วยวิธีการรักษาที่หลากหลาย เนื่องจากการศึกษาสาเหตุการเกิดโรคอัลไซเมอร์ยังไม่แน่ชัด สำหรับแนวทางการรักษาโรคอัลไซเมอร์แบ่งออกเป็น 3 รูปแบบ คือ การรักษาโดยไม่ใช้ยา การรักษาโดยใช้ยา และการรักษาโดยใช้สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เป็นทางเลือกในการรักษา

2.2.3 การรักษาโดยไม่ใช้ยา

ทำความเข้าใจการวินิจฉัย ธรรมชาติของโรค และอาการที่อาจเกิดขึ้นในอนาคต เพื่อวางแผนการดูแลระยะยาว แก้ไขข้อจำกัดและปัจจัยเสี่ยงที่ทำได้ เช่น ปัญหาการได้ยิน สายตา โรคประจำตัว ให้ผู้ป่วยอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่คุ้นเคย ปลอดภัย จัดตารางกิจกรรมแต่ละวันให้เหมือนเดิมทุกวัน จัดกิจกรรมกระตุ้นสมองที่ผู้ป่วยคุ้นเคย ชื่นชอบ และไม่ก่อให้เกิดความเครียด ปรับพฤติกรรมโดยเน้นวิธีที่ถูกใจผู้ป่วย ไม่จำเป็นต้องถูกต้องหากไม่เป็นอันตราย ฝึกหรือให้ความช่วยเหลือผู้ป่วยให้ทำกิจวัตรประจำวัน que ผู้ป่วยยังพอทำได้ ดูแลสุขภาพกาย สมดุลชีวิตของผู้ดูแลให้สามารถดูแลผู้ป่วยอย่างมีคุณภาพ ดูแลให้ผู้ป่วยได้นอนหลับอย่างมีคุณภาพตามสุขลักษณะการนอน เช่น ไม่ดื่มสารคาเฟอีนในช่วงเย็นหรือก่อนนอน ไม่ออกกำลังกายใกล้กับเวลานอน เข้านอนและตื่นนอนตรงเวลา ปรับความสว่างในห้องนอนให้มีดพอดิ เพราะหากวงจรการนอนไม่ดีจะส่งผลต่อภูมิคุ้มกันของร่างกาย ความดันโลหิต น้ำหนัก และรวมถึงความจำด้วย ดื่มน้ำให้พอเพียง เพื่อป้องกันภาวะเลือดหนืดหรือ

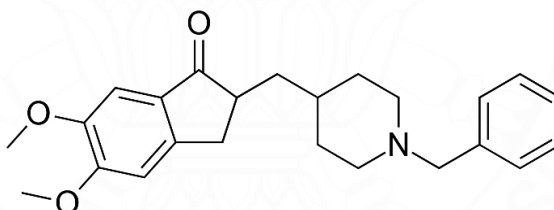
เลือดชั้นซึ่งทำให้เลือดไหลเวียนไม่สะดวก สมองไม่สดชื่น หากไม่มีข้อห้าม เช่น มีโรคหัวใจหรือโรคไต ควรดื่มน้ำวันละ 2 ลิตรเป็นอย่างน้อย (สุขเจริญ, 2023)

2.2.4 การรักษาโดยใช้ยา

ปัจจุบันยาหลักที่ใช้ในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ ได้แก่ ยายับยั้งการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรส (Cholinesterase inhibitors: ChEIs) และยายับยั้งการทำงานของสารสื่อประสาทชนิดกลูตาเมต (NMDA Receptor Antagonist) สำหรับผู้ป่วยในระดับอาการรุนแรงปานกลางถึงมาก (moderate to severe) และยาอื่นๆ มีรายละเอียด ดังต่อไปนี้ (อำไพ พิมพิไกร และคณะ, 2021, alzheimersresearchuk, 2024)

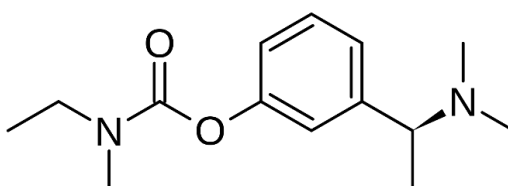
2.2.4.1 ยาในกลุ่ม Cholinesterase inhibitors: ChEIs :

(1) Donepezil ได้รับการขึ้นทะเบียนจาก FDA สำหรับรักษาโรคอัลไซเมอร์ในระยะ โดยออกฤทธิ์ยับยั้ง acetylcholinesterase (AChE) ซึ่งมีหน้าที่ทำลาย acetylcholine ด้วยปฏิกิริยา hydrolysis จึงทำให้ปริมาณ acetylcholine ในเซลล์ประสาทสมองเพิ่มขึ้น ส่งผลต่อความจำ รวมทั้งความผิดปกติทางด้านอารมณ์และความนึกคิด แต่ด้วยฤทธิ์ของยาทำให้ไปเพิ่ม Cholinergic Activity ที่ทางเดินอาหาร ทำให้เกิดผลข้างเคียง เช่น คลื่นไส้ อาเจียน นอนไม่หลับ หัวใจเต้นช้า และเหนื่อยล้า เป็นต้น



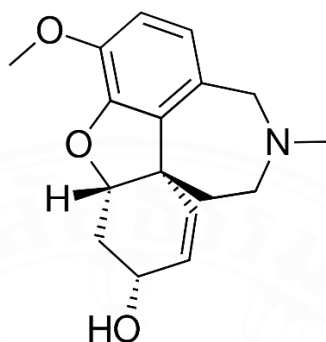
ภาพที่ 2.6 ภาพแสดงโครงสร้างของมิตของ Donepezil ที่มา: wikipedia

(2) Rivastigmine ได้รับการขึ้นทะเบียนจาก FDA สำหรับรักษาโรคอัลไซเมอร์ในระยะต้นถึงระยะกลาง ออกฤทธิ์ยับยั้งได้ทั้ง acetylcholinesterase (AChE) และ Butyrylcholinesterase (BuChE) ส่งผลทำให้การเรียนรู้ ความจำ อาการทางจิตของผู้ป่วยและการแสดงออกทางด้านพฤติกรรมดีขึ้น อาการข้างเคียงมักเกิดขึ้นเมื่อใช้ในขนาดมากกว่า 6 mg เช่น คลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง และไม่อยากอาหาร



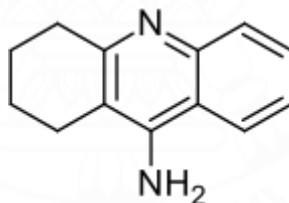
ภาพที่ 2.7 ภาพแสดงโครงสร้างของมิตของ Rivastigmine ที่มา: Wikipedia

(3) **Galantamine** ได้รับการขึ้นทะเบียนจาก FDA สำหรับรักษาโรคอัลไซเมอร์ในระยะต้นถึงระยะกลาง เป็น tertiary alkaloid ออกฤทธิ์ยับยั้งอย่างจำเพาะต่อ AChE นอกจากนี้ยังยับยั้ง presynaptic nicotinic modulator ด้วย ซึ่งยังไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับกลไกนี้ว่ามีความสำคัญทางคลินิกอย่างไร อาการข้างเคียงที่เกิดขึ้นเป็นอาการเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหาร



ภาพที่ 2.8 ภาพแสดงโครงสร้างของโมเลกุลของ Galantamine ที่มา: Wikipedia

(4) **Tacrine** เป็นตัวยับยั้ง cholinesterase ตัวแรกที่ได้รับการอนุมัติจาก FDA สำหรับการรักษาโรคอัลไซเมอร์ในระยะต้นถึงระยะกลาง เป็นสารยับยั้งโคลีนเอสเตอเรสแบบพลิกกลับได้ซึ่งจับกับซีรีนที่เร่งปฏิกิริยาในบริเวณที่ทำงานของโปรตีน ผลข้างเคียงที่พบบ่อยได้แก่ อาการทางเดินอาหาร (คลื่นไส้ อาเจียน ท้องร่วง ปวดท้อง) และไม่ค่อยมีอาการปวดกล้ามเนื้อและเวียนศีรษะ (Nicholas *et al.*, 2001)

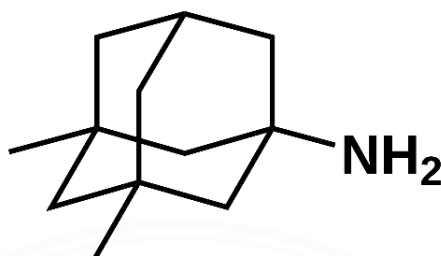


ภาพที่ 2.9 ภาพแสดงโครงสร้างของโมเลกุลของ Tacrine ที่มา: Wikipedia

2.2.4.2 ยาในกลุ่ม N-methyl-D-aspartate(NMDA)Receptor Antagonist :

(1) **Memantine** ได้รับการขึ้นทะเบียนจาก FDA สำหรับรักษาโรคอัลไซเมอร์ระยะกลางถึงหนัก ช่วยปกป้องเซลล์ประสาทในสมองจาก glutamate ที่มีมากเกินไป โดยการช่วยการทำงานของ signal-to-noise ratio ของ glutamatergic transmission ที่ NMDA receptor ซึ่งสารสื่อประสาทนี้เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์ ส่งผลให้การเรียนรู้ และความจำของผู้ป่วยอัลไซเมอร์ดีขึ้น อีกทั้งการใช้ Memantine ร่วมกับยาในกลุ่ม Cholinesterase Inhibitors ทำให้ประสิทธิภาพในการรักษาดีกว่าการใช้ยาตัวใดตัวหนึ่ง อาการข้างเคียงที่เกิดขึ้น ได้แก่ คลื่นไส้ เวียนศีรษะ

(Dizziness) กระสับกระส่าย (Restlessness) ความคิดสับสน (Confusion) และประสาทหลอน (Hallucination)



ภาพ 2.10 ภาพแสดงโครงสร้างของมิติของ Memantine ที่มา: Wikipedia

2.2.4.3 ยาในกลุ่ม Anti-amyloid therapy :

(1) **Aducanumab** ได้รับการขึ้นทะเบียนแบบเร่งด่วนจาก FDA ในปี 2021 ซึ่งเป็น human monoclonal antibody ใช้ในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ระยะ mild cognitive impairment (MCI) หรือ mild AD ผลการศึกษาทางคลินิกพบว่า aducanumab สามารถลด amyloid plaques ในสมองของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ได้ (Dhillon, 2021)

(2) **Lecanemab** ยาล่าสุดที่ได้รับการขึ้นทะเบียนแบบเร่งด่วนจาก FDA ในปี 2023 สำหรับรักษาโรคอัลไซเมอร์ระยะต้น เป็น anti-amyloid beta ($A\beta$) protofibril antibody ช่วยลดการสะสมของโปรตีน Amyloid Beta ที่จับตัวกันเป็น Amyloid Plaques ซึ่งเมื่อไปจับกับเซลล์สมองจะส่งผลให้เซลล์สมองเสื่อมและฝ่อลง โดยจะเข้าจับกับโปรตีน beta amyloid ที่ก่อตัวขึ้นในสมองของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ (BBC 2022, The Coverage 2023)

2.2.5 การรักษาโดยใช้สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

เนื่องจากการรักษาโรคอัลไซเมอร์โดยใช้อยู่ในปัจจุบันมีค่าใช้จ่ายสูง ดังนั้นการรักษาโดยใช้สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีสรรพคุณช่วยบำรุงสมอง ช่วยเพิ่มจำนวนเซลล์ประสาท สร้างสารสื่อประสาทในสมอง เพิ่มความจำ ลดการทำลายเซลล์ประสาท เพิ่มการไหลเวียนของเลือดที่ไปเลี้ยงสมอง ลดการอักเสบของสมอง จึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการรักษาที่น่าสนใจ พืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ป้องกันและรักษาโรคอัลไซเมอร์ ได้แก่

บัวบก มีสรรพคุณที่ออกฤทธิ์ต่อระบบต่าง ๆ ในร่างกาย ที่โดดเด่นต่อการบำรุงสมองของใบบัวบกได้แก่ มีฤทธิ์เพิ่มระดับสารสื่อประสาทในสมอง มีสารต้านอนุมูลอิสระสูง และช่วยเพิ่มการไหลเวียนของเลือดที่ไปเลี้ยงสมอง ไม่ให้สมองอยู่ในภาวะของการขาดเลือด (HDmall สืบค้นเมื่อ 2024)

พรมมิ หรือ ผักมิ มีความนิยมในตำรายาอายุรเวทของอินเดีย ซึ่งจากงานวิจัยพบว่า พรมมิมีสรรพคุณที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของความจำ การตัดสินใจ ช่วยปกป้องเซลล์สมอง มีฤทธิ์ต้านความจำเสื่อม และช่วยในเรื่องการนอนหลับ โดยการกระตุ้นสารสื่อประสาทและเพิ่มการไหลเวียนของเลือดที่ไปเลี้ยงสมอง นอกจากนี้พรมมิเองยังช่วยลดความตึงเครียดและคลายความเครียดได้ดีรวมไปถึงช่วยลดการอักเสบของสมองและช่วยปกป้องเซลล์สมอง (กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก, 2023)

กลีบบัวแดง จัดเป็นสมุนไพรที่มีรสหอมเย็น ที่มีสรรพคุณบำรุงหัวใจ แก้ไข้ แก้ร้อนใน กระหายน้ำ จากการศึกษาวิจัย พบว่ากลีบบัวแดงมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่มีผลต่อสารสื่อประสาท มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และมีฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มกันของโปรตีน Amyloid-beta ($A\beta$) ซึ่งรวมทั้งพบว่ามีฤทธิ์ป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทได้ ซึ่งมีผลช่วยป้องกันภาวะสมองเสื่อมทั้งชนิดความจำระยะสั้นและความจำระยะยาวได้ (Maneenet J, *et al.*, 2019)

ขมิ้นชัน มีสรรพคุณที่หลากหลาย ช่วยรักษาหรือบรรเทาอาการต่าง ๆ ของร่างกายได้หลายระบบ สำหรับในสมองนั้นขมิ้นชันจะช่วยป้องกันการเกาะกลุ่มของโปรตีน Amyloid-beta ($A\beta$) เมื่อสารตัวนี้ไม่เกาะกลุ่มกันไปขัดขวางการทำงานของเซลล์สมองก็จะทำให้เซลล์สมองสามารถทำงานได้อย่างเป็นปกติ และมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โคลินเอสเตอเรสไม่ให้ถูกทำลายลงได้ง่ายอีกด้วย อีกทั้งยังช่วยลดความเครียดที่เป็นสาเหตุหนึ่งโรคอัลไซเมอร์ (Healthykare, 2021)

ดอกอัญชัน มีสรรพคุณที่โดดเด่น คือ การเพิ่มการไหลเวียนของเลือดและช่วยขยายหลอดเลือดขนาดเล็กให้ทำงานได้อย่างเต็มที่จึงช่วยเพิ่มปริมาณของเลือดที่ไปเลี้ยงสมอง (Healthy Kare สืบค้นเมื่อ 2024)

แปะก๊วย มีสาร EGb 761 มีฤทธิ์ยับยั้งการทำลายเซลล์ประสาทที่เกิดจาก hydroxyl radical, staurosporine และ Amyloid-beta ($A\beta$) และจากหลายงานวิจัยที่บ่งชี้ว่าแปะก๊วยสามารถเพิ่มการไหลเวียนของเลือดในสมอง ทำให้เซลล์สมองได้รับเลือดมาเลี้ยงมากขึ้น (Healthykare, 2021)

ผักโขม มีปริมาณของกรดโฟลิกสูง และมีเอนไซม์ที่มีประโยชน์ต่อระบบประสาท นอกจากนี้ยังมีสรรพคุณในการช่วยลดอาการของความจำเสื่อม (Healthykare, 2021)

ผลไม้ตระกูลเบอร์รี่ เป็นแหล่งรวมสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้รับการยอมรับ นอกจากนี้ในเบอร์รี่แต่ละชนิดก็ยังอุดมไปด้วยสารอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายหลายชนิด แต่สรรพคุณที่มีต่อสมองคือช่วยเพิ่มการไหลเวียนเลือดและช่วยเพิ่มจำนวนเซลล์ประสาท (Healthy Kare สืบค้นเมื่อ 2024)

2.3 การจำลองการเข้าจับกันของโมเลกุล (Molecular docking)

เป็นเทคนิคทางคอมพิวเตอร์สำหรับจำลองการเข้าจับระหว่างลิแกนด์ (ligand) กับ โมเลกุลเป้าหมาย (Receptor) ที่สนใจ แล้วรายงานผลออกมาเป็นค่าพลังงานการเข้าจับ (Binding affinity) การจำลองการเข้าจับกันของโมเลกุลเป็นเครื่องมือสำคัญที่ช่วยในการเข้าใจสารประกอบทางเคมีที่มีปฏิสัมพันธ์กับโมเลกุลเป้าหมาย ใช้ทำนายผลทางเภสัชวิทยาอย่างมีประสิทธิภาพ ในการทดลองทางคอมพิวเตอร์ (In Silico) โดย Fisher ได้เสนอทฤษฎี Lock-and-Key ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1894 อธิบายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโมเลกุลเป้าหมาย (receptor) กับลิแกนด์ (ligand) ซึ่งสามารถจดจำซึ่งกันและกันผ่าน geometric matching และ energy matching โดยลิแกนด์เชื่อมต่อกับโมเลกุลเป้าหมายมีลักษณะคล้ายลูกกุญแจกับแม่กุญแจ โดยทั้งโมเลกุลเป้าหมายและลิแกนด์ถือเป็นโครงสร้างที่แข็ง ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงในระหว่างการเชื่อมต่อโมเลกุลระหว่างลิแกนด์และโมเลกุลเป้าหมายได้ (Fischer, 1894)ต่อมา Koshland ได้เสนอทฤษฎี Induced Fit ในปี 1958 โครงสร้างของโปรตีนและลิแกนด์สามารถเปลี่ยนแปลงหลังจากโปรตีนเชื่อมต่อกับลิแกนด์แล้ว ซึ่งบ่งชี้ว่าโครงสร้างลิแกนด์และโปรตีนมีความยืดหยุ่นระหว่างการเชื่อมต่อโมเลกุล (Koshland, 1958) เมื่อนำทฤษฎี Induced Fit มาปรับใช้กับปฏิสัมพันธ์ระหว่างโมเลกุลยากับโมเลกุลเป้าหมาย ปรากฏว่าผลลัพธ์การเชื่อมต่อลิแกนด์และโมเลกุลเป้าหมายมีความแม่นยำมาก ซึ่งสำคัญสำหรับการค้นคว้าและพัฒนา ยา การประเมินการเข้าจับกันของโครงสร้างลิแกนด์กับโมเลกุลเป้าหมาย แบ่งได้ 4 แบบ (Meng, X, *et al.*, 2011, Chen, G., *et al.*, 2020) ได้แก่

2.3.1 Molecular mechanics force field based

การประเมินพลังงานยึดเหนี่ยวแรงแวนเดอร์วาล และไฟฟ้าสถิตแบบโคลัมบิก เช่นเดียวกับพันธะมุมคล้ายพันธะ และการเบี่ยงเบนแรงบิด เพื่อกำหนดความสัมพันธ์ในการเข้าจับ ฟังก์ชันการให้คะแนนนี้เป็นการพิจารณาพันธะไฮโดรเจน การละลาย และการมีส่วนร่วมของเอนโทรปี โปรแกรมซอฟต์แวร์ที่นิยมใช้ เช่น AutoDock, DOCK และ GoldScore

2.3.2 Empirical methods-based

การคำนวณพลังงานยึดเหนี่ยวที่สลายตัวเป็นองค์ประกอบของพลังงานหลายอย่าง เหมาะสำหรับปฏิสัมพันธ์โครงสร้างผลึกเชิงซ้อนบางประเภท เช่น พันธะไฮโดรเจน ปฏิสัมพันธ์ของไอออนิก ผลของ hydrophobic และเอนโทรปี โดยค่าคะแนนที่ได้มาจากการคำนวณแต่ละองค์ประกอบคูณด้วยค่าสัมประสิทธิ์ ซึ่งค่าสัมประสิทธิ์ได้จากการวิเคราะห์การถดถอยของ ligand-protein complex ที่ทราบค่า binding affinities โปรแกรมซอฟต์แวร์ที่นิยมใช้ เช่น LUDI, PLP และ ChemScore

2.3.3 Knowledge-based methods-based

การประเมินกลุ่มของโครงสร้างผลึกเชิงซ้อนในทางสถิติของลิแกนด์-โปรตีน ช่วยให้องค์ประกอบ อะตอม และการจัดกลุ่มฟังก์ชันมีความเป็นไปได้ที่จะแยกออกเป็นคู่ เพื่อให้ได้ความถี่ของการสัมผัสระหว่างอะตอมหรือระยะระหว่างลิแกนด์และโปรตีน ยิ่งถ้ามีปฏิสัมพันธ์ที่ดีความถี่ของเหตุการณ์ก็จะยิ่งมากขึ้น เหมาะสำหรับปฏิสัมพันธ์แบบ sulphur-aromatic หรือ cation- π แต่ไม่เหมาะสำหรับปฏิสัมพันธ์ metals หรือ halogens โปรแกรมซอฟต์แวร์ที่นิยมใช้ เช่น PMF และ DrugScore

2.3.4 Consensus Fundamentally

เป็นวิธีล่าสุดที่รวมคะแนนที่แตกต่างกันหลายรายการเพื่อประเมินโครงสร้างการเชื่อมต่อตำแหน่งของลิแกนด์ที่อาจเกิดขึ้น Consensus scoring มักจะมีการปรับค่า virtual screening, and improves the prediction of bound conformations และ poses อย่างไรก็ตามการทำนายพลังงานอาจจะมีคลาดเคลื่อนนอกจากนี้หากคะแนนที่แตกต่างกันมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ การให้คะแนนด้วยวิธีนี้อาจไม่เหมาะสม โปรแกรมซอฟต์แวร์ที่นิยมใช้ เช่น CScore ร่วมกับ DOCK, ChemScore, PMF, GOLD และ FlexX

2.4 ADMET

ADMET เป็นทางเลือกใหม่ในการพัฒนายา สามารถคัดกรองยาบนคอมพิวเตอร์ได้ ซึ่ง ADMET คือ คุณสมบัติการดูดซึม การกระจาย เมแทบอลิซึม การขับถ่าย และความเป็นพิษของโมเลกุลขนาดเล็ก คุณสมบัติ ADMET ที่คาดการณ์ไว้สามารถนำมาใช้ในการคัดแยกสารประกอบที่มีคุณสมบัติที่ไม่เอื้ออำนวยในช่วงต้นของกระบวนการพัฒนายา ซอฟต์แวร์ที่นิยมใช้ ได้แก่ AutoDock Vina, GOLD, Glide และ Schrödinger Suite ช่วยให้เราสามารถประเมินคุณสมบัติของยาในแง่ของการดูดซึม การกระจายตัวภายในร่างกาย เมแทบอลิซึม การขับถ่าย และความเป็นพิษที่อาจเกิดขึ้นได้ก่อนที่จะทำการทดลองในระดับต่อไป โดยฐานข้อมูลเกี่ยวกับ ADMET มีมากมาย ต่างกันที่ข้อจำกัดของแต่ละฐานข้อมูล ตัวอย่างฐานข้อมูล ADMET เช่น admetSAR (Agarwal, *et al.*, 2023) SwissADME (Daina *et al.*, 2017)

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Rahman *et al.* (2017) รายงานว่า cholinergic activity ที่ลดลงและความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันเป็นปัจจัยสำคัญในการเกิดโรคอัลไซเมอร์ ดังนั้นการยับยั้งโคลีนเอสเตอเรสและออกซิเดชันจึงเป็นสองวิธีที่มีแนวโน้มในการพัฒนายาสำหรับอัลไซเมอร์ การศึกษานี้ประเมินคุณสมบัติต่าง ๆ ของสารสกัดจากใบ *G. pentaphylla* ผลการทดลองปรากฏว่ามีศักยภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation และยับยั้งโคลีนเอสเตอเรส ซึ่งทำให้ *G. pentaphylla* มีประสิทธิภาพในการรักษาอัลไซเมอร์ นอกจากนี้สารสกัดยังให้ผลดีต่อการต้านแบคทีเรีย

Hongwei Chen *et al.* (2022) สกัดสารจากลำต้นและใบของ *Glycosmis ovoidea* Pierre (ประยงค์ไข่มุก) จากการวิเคราะห์ด้วยสเปกโทรสโกปี 1D และ 2D NMR และ HRESIMS พบว่ามีสารประกอบ 5 ชนิดมีผลยับยั้งปานกลางต่อการผลิตไนตริกออกไซด์ที่ถูกกระตุ้นโดยไลโปโพลีแซ็กคาไรด์ในเซลล์ไมโครเกลีย BV-2 โดยมีค่า IC₅₀ ในช่วง 18.30–30.84 μM และสารประกอบ 3 ชนิดแสดงการยับยั้งที่มีศักยภาพใน 5-lipoxygenase (5-LOX) ที่มีค่า IC₅₀ ในช่วง 2.08–10.26 μM ซึ่งสรุปได้ว่าสารสกัดจาก *Glycosmis ovoidea* Pierre มีฤทธิ์การต้านการอักเสบในสมอง จากนั้นวิเคราะห์ตำแหน่งการจับที่เป็นไปได้ของสารประกอบออกฤทธิ์ที่มี 5-LOX ด้วยวิธี molecular docking

Fatima Javed Mirza *et al.* (2022) การศึกษานี้ได้ทำการตรวจสอบศักยภาพในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ของสารพฤกษเคมีที่มีทั้งสามชนิดของ *Rosmarinus officinalis* ได้แก่ กรดเออร์โซลิค (UA), กรดโรสมารินิก (RA) และกรดคาร์โนซิก (CA) โดยใช้วิธีการต่าง ๆ เช่น AutoDock Vina และการจำลองไดนามิกของโมเลกุล (MD) เพื่อพิจารณาความสัมพันธ์ที่ผูกพันกับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า UA และ RA เป็นตัวยับยั้งที่เป็นไปได้ของ AChE และ BACE1 และมีพลังงานการจับยึดที่เทียบเคียงได้กับพลังงานของโดเนเพซิลที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก

V. K. Loganathbabuthasma *et al.* (2023) โปรตีนเทามีบทบาทสำคัญในโรคอัลไซเมอร์ และยาต่าง ๆ ที่มีในตลาดในปัจจุบันไม่เพียงว่ามีราคาแพงมาก แต่ยังมีผลข้างเคียงที่ร่างกายการใช้ยาที่มีอยู่แล้วเป็นวิธีที่ดีวิธีการวิจัยเริ่มจากเลือกโมเลกุลสารประกอบจาก Selleckchem natural product library และความสามารถของยาในการผ่าน Blood Brain Barrier (BBB) และตรวจสอบคุณสมบัติ ADMET (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, and Toxicity) โดยใช้ SwissADME. โครงสร้างของโปรตีนทาว ถูกดึงมาจาก PDB และทำ molecular docking กับ

สารประกอบโดยใช้ PyRx-Virtual Screening Tool ผลการวิจัยพบว่ามีสารประกอบทั้งหมด 92 ชนิด ที่ผ่านเกณฑ์คัดกรอง ADMET และพบว่า Ligustroflavone มีค่า binding affinity ดีที่สุดนี้

Ahsas Goyal และ Neetu Agrawal (2023) การศึกษามีวัตถุประสงค์เพื่อระบุฟลาโวนอยด์ที่สามารถจับกับตัวรับ $\alpha 7$ nAChR ได้อย่างมีประสิทธิภาพซึ่งมีบทบาทสำคัญในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ (AD) วิเคราะห์การเชื่อมต่อโมเลกุลและการจำลองไดนามิกของโมเลกุลเพื่อประเมินความสัมพันธ์ในการจับและความเสถียรในการก่อตัวของฟลาโวนอยด์ 50 ตัว โดยที่อะเมนโดฟลาโวนและกาลโลคาเทซินมีค่าการจับกับ $\alpha 7$ nAChR สูงที่สุด

Mahfuza Afroz Soma (2019) ศึกษาสารประกอบยาแก้ปวดและต้านการอักเสบที่มีอยู่ในใบ *Glycosmis pentaphylla* ผ่านการวิเคราะห์ไฟโตเคมีและการศึกษา in silico docking มีการแยกสารประกอบ 9 ชนิด รวมถึง arborinine และ phytol ซึ่งพบว่าจับกับไซต์แอคทีฟของ cyclooxygenase-2 (COX-2) ซึ่งบ่งชี้ถึงศักยภาพในการแก้ปวดและต้านการอักเสบได้

B. G. Rao และ N. J. Raju (2009) ศึกษาการต้านอักเสบของสารสกัดเมทานอลและเอทิลเอซีเทตจากรากของ *Glycosmis pentaphylla* ในหนูเมอร์แอลบีโนวิสตา ผลการต้านอักเสบของสารสกัดเมทานอลและเอทิลเอซีเทตจาก *Glycosmis pentaphylla* ที่ปริมาณ 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่ามีค่า $P < 0.001$ แสดงว่าสามารถลดการอักเสบของหนูได้ และใช้ Ibuprofen (50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) เป็นสารต้านการอักเสบเปรียบเทียบ

นภกษณพนธ์ และคณะ (2020) สกัด จำแนก และทดสอบประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญจากสมุนไพรเขยตาย จากใบ ลำต้น และราก ด้วยวิธีการหมักร่วมกับการใช้คลื่นความถี่สูง และ เทคนิค Thin Layer Chromatography จากนั้นศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียด้วย Disc Agar diffusion พบสารในกลุ่มอัลคาลอยด์ และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus*

ธนพร (2022) ตรวจสอบรูปแบบการจับและอันตรกิริยาระหว่างยารักษาภาวะสมดุลของแคลเซียมและยาต้านการอักเสบโปรตีนเป้าหมายของการเกิดโรคอัลไซเมอร์ โดยมียาอัลไซเมอร์ 24 ชนิด ยารักษาภาวะสมดุลของแคลเซียม 74 ชนิด และยาต้านการอักเสบ 133 ชนิด ได้รับการตรวจสอบเพื่อหารูปแบบการเข้าจับกันที่ดีที่สุดกับโปรตีนเป้าหมาย 55 ชนิดที่สัมพันธ์กับโรคอัลไซเมอร์ โดยเทคนิคการเข้าจับกันระดับโมเลกุล อันตรกิริยาของพันธะเชิงซ้อนระหว่างยาและโปรตีนถูกระบุผ่านโปรแกรม PLIP ผลการวิจัยพบว่าการเปรียบเทียบแสดงให้เห็นว่า Plicamycin และ Talniflumate เป็นยารักษาโรคที่ดีกว่าสำหรับการรักษาโรคอัลไซเมอร์มากกว่า Nirogacestat และ BMS-986115

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และโปรแกรมทางชีวสารสนเทศ

- 3.1.1 เครื่องคอมพิวเตอร์ Lenovo รุ่น V50a-22IMB ระบบปฏิบัติการ Windows
- 3.1.2 โปรแกรม Avogadro
- 3.1.3 โปรแกรม Maestro
- 3.1.4 โปรแกรม Discovery Studio
- 3.1.5 PrankWeb
- 3.1.6 โปรแกรม AutoDock Tools
- 3.1.7 โปรแกรม Git Bash
- 3.1.8 โปรแกรม PLIP
- 3.1.9 โปรแกรม PyMol
- 3.1.10 โปรแกรม Microsoft Excel
- 3.1.11 โปรแกรม Open Babel GUI
- 3.1.12 โปรแกรม Spyder
- 3.1.13 SwissADME
- 3.1.14 ProTox3

3.2 ฐานข้อมูลสาธารณะ

- 3.2.1 ฐานข้อมูล PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)
- 3.2.2 ฐานข้อมูล UniProt (<https://www.uniprot.org>)
- 3.2.3 ฐานข้อมูล DrugBank (<https://go.drugbank.com>)
- 3.2.4 ฐานข้อมูล RCSB Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org>)

3.3 การคัดเลือกโครงสร้างของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตาย โปรตีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์ และโครงสร้างของยา เป็นโครงสร้างสามมิติ

3.3.1 การคัดเลือกโครงสร้างสามมิติของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตายจากฐานข้อมูล PubChem

เข้าสู่หน้าเว็บของ Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) นำรายชื่อสารสกัดที่ได้รับความนิยมวิเคราะห์ข้อมูลสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตายจากงานวิจัยของ นกภกษณพญ์ ทหารไทย, อภิขญา ขำปลอด และณัฐนิช เชื้อพลพิชัย มาทำการค้นหาโครงสร้างสามมิติ จากนั้นทำการดาวน์โหลดโครงสร้างสามมิติในรูปแบบไฟล์ *.pdb

3.3.2 การคัดเลือกโครงสร้างสามมิติของโปรตีนเป้าหมายจากฐานข้อมูล UniProt

ได้รับความอนุเคราะห์ข้อมูลชนิดของโปรตีนเป้าหมาย จากธนพร เตชประภาสรัตน์ แล้วนำรหัส Uniprot ID ของโปรตีนเป้าหมายเพื่อใช้ในการค้นหาโครงสร้างสามมิติของโปรตีน จากนั้นเข้าสู่เว็บของ RCSB PDB (<https://www.rcsb.org/>) เพื่อทำการค้นหาโครงสร้างโปรตีนสามมิติที่เกี่ยวข้องกับยาที่ใช้ในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ และทำการดาวน์โหลดไฟล์นามสกุล *.pdb

3.3.3 การคัดเลือกข้อมูลยาที่เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์จากฐานข้อมูล DrugBank

ได้รับความอนุเคราะห์ข้อมูลชนิดยาที่เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์จาก ธนพร เตชประภาสรัตน์ ได้แก่ยาที่ใช้ในการรักษาเกี่ยวกับโรคอัลไซเมอร์ ยาที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ และยาที่เกี่ยวข้องกับการรักษาสมดุลของแคลเซียมในร่างกาย จากนั้นทำการเข้าสู่เว็บไซต์ของ DrugBank (<https://go.drugbank.com/>) ดาวน์โหลดโครงสร้างสามมิติของยาในรูปแบบไฟล์ *.pdb แต่ถ้ายาชนิดไหนที่มีข้อผิดพลาดทางโครงสร้างจะทำการดาวน์โหลดโครงสร้างยาผ่าน ChemSpider เป็นรูปแบบไฟล์ *.mol หรือ *.mol2

3.4 การเตรียมไฟล์ข้อมูล

3.4.1 การเตรียมไฟล์ข้อมูลสำหรับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตายและยาที่เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์

ใช้ไฟล์โครงสร้างสามมิติที่ได้ทำการดาวน์โหลดมาจากในขั้นตอนก่อนหน้านี้ เริ่มจากการปรับโครงสร้างของไฟล์ให้เหมาะสมโดยใช้โปรแกรม Avogadro โดยวิธีการดังนี้ ทำการเปิดโปรแกรมและเปิดไฟล์โครงสร้าง 3D ผ่าน File > Open > เลือกไฟล์ที่ต้องการ จากนั้นเลือกคำสั่ง Extensions > Optimized Geometry และบันทึกไฟล์เป็น ligandname_optimized.pdb จากนั้น

ใช้โปรแกรม Discovery Studio ในการเพิ่มไฮโดรเจน และการคำนวณประจุและบันทึกไฟล์นามสกุล *.pdb โดยทำการเปิดโปรแกรมและเปิดไฟล์โครงสร้าง 3D ผ่าน File > Open > เลือกไฟล์ที่ต้องการ ขึ้นต่อมาเลือกคำสั่ง Chemistry > add H, Polar, Chiral ต่อมาเลือกเมนูคำสั่ง Charge > Calculate สุดท้ายเลือกเมนู Structure > Clean Geometry และบันทึกไฟล์เป็น ligandname_optimized_clean.pdb

3.4.2 การเตรียมข้อมูลสำหรับโปรตีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์

ใช้ไฟล์โครงสร้างสามมิติของโปรตีนเป้าหมายที่ได้ทำการดาวน์โหลดมาจากระดับก่อนหน้า เริ่มจากการปรับโครงสร้างไฟล์ให้เหมาะสมโดยใช้โปรแกรม Maestro เพื่อทำการตรวจสอบโครงสร้างและเตรียมโครงสร้างไฟล์ให้ถูกต้องเหมาะสมโดยทำการเปิดโปรแกรม Maestro เลือก File > Change Working Directory เลือก directory ที่ต้องการทำงานและกดปุ่ม Select Folder สุดท้ายบันทึกโปรเจกต์ที่ใช้ทำงานด้วย File > Save Project As > เปลี่ยนชื่อไฟล์ projectname.pjr > กดปุ่ม Save เปิดไฟล์โครงสร้างโปรตีนผ่าน File > Import Structure > เลือกโครงสร้างโปรตีนที่ต้องการปรับโครงสร้างให้เหมาะสม > open > import > เลือกเครื่องมือ protein preparation workflow จากแถบเมนู เลือกเมนู Protein Preparation > กดปุ่ม Interactive (On) เลือก Specify Protein > Workspace (included entry) > Global Setting > Simulation as pH 7.4 จากนั้น check box ด้านหน้า Small molecules กำหนดตามค่า defaults ของโปรแกรม สุดท้ายกดปุ่ม Reviews Structure > เลือกเมนู Preprocess > check box Cap terminal และ fill in missing side chains จากนั้นเลือก more options > checked box ตามค่า defaults และกดปุ่ม Preprocess > เลือกเมนู Diagnose and Analyze > กดปุ่ม Check Structure ถัดมาเลือก Substructure tab พิจารณา Ligand, Water, และ Chain ที่ไม่ต้องการเลือกและกดปุ่ม Delete from Entry จากนั้นเลื่อนไปยัง Diagnostics tab พิจารณา Valences, Missing, และ Reports สุดท้ายกลับไปยัง workflows > เลือกเมนู Optimized and H-bond assignment > กดปุ่ม Settings กำหนดค่าตาม defaults ตามที่โปรแกรมตั้งไว้ สุดท้ายกดปุ่ม optimize และบันทึกโครงสร้างโปรตีนผ่าน File > Export Structure > บันทึกเป็น proteinname_optimized.pdb จากนั้นใช้โปรแกรม Discovery Studio ในการเพิ่มไฮโดรเจน และการคำนวณประจุและบันทึกไฟล์นามสกุล *.pdb ตามขั้นตอนที่ 3.4.1

3.5 การทำนายบริเวณเข้าจับกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเซตตายและยา ในโปรตีนเป้าหมายและตำแหน่งเร่งปฏิกิริยาบนโครงสร้างสามมิติของโปรตีน

นำโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนก่อนหน้านี้ในรูปแบบของไฟล์ *.pdb มาทำการทำนายตำแหน่งการเข้าจับกับสารตั้งต้นผ่าน PrankWeb (<https://prankweb.cz>) โดยการเลือก custom structure > choos file เลือกไฟล์ที่ต้องการทำนายบริเวณเข้าจับ จากนั้นกด Submit สุดท้ายดาวน์โหลดไฟล์ ซึ่งประกอบด้วยไฟล์หลัก 2 ไฟล์ ได้แก่ ไฟล์ structure.pdb_prediction.csv (เปิดผ่านโปรแกรม Microsoft Excel แสดงผลของจำนวนตำแหน่งที่เข้าจับสารตั้งต้นของโปรตีนและพิกัด (center x, center y และ center z) ของตำแหน่งที่สารตั้งต้นเข้าจับกับโปรตีน และไฟล์ structure.pdb_residues.csv (เปิดผ่านโปรแกรม Microsoft Excel) แสดงผลของตำแหน่ง และชนิดของกรดอะมิโนที่ปรากฏในแต่ละตำแหน่งของบริเวณที่เข้าจับกับโปรตีน

3.6 การเตรียมไฟล์สำหรับการจำลองการเข้าจับกันของโมเลกุล (Molecular docking)

3.6.1 การเตรียมไฟล์ข้อมูลสำหรับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเซตตายและยาที่เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์

ใช้โปรแกรม Autodock tools ในการเตรียมไฟล์ออกมาเป็นไฟล์นามสกุล *.pdbqt เพื่อเตรียมสำหรับการทดสอบการเข้าจับกับโปรตีน ดังนี้

Ligand > input > Open > OK

Ligand > Torsion Tree > Choose Torsion > Done

Ligand > Torsion Tree > Detect Root

Ligand > Output > Save as PDBQT > บันทึกเป็น X.pdbqt

(X คือ ลำดับของลิแกนด์)

3.6.2 การเตรียมไฟล์ข้อมูลสำหรับโปรตีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์

ใช้โปรแกรม Autodock tools ในการเตรียมไฟล์ออกมาเป็นไฟล์นามสกุล *.pdbqt เพื่อเตรียมสำหรับการทดสอบการเข้าจับกับโปรตีน ดังนี้

File > Read Molecule > เลือกไฟล์โปรตีน > Open

คลิก Cl ในช่องของ Dashboard > By atom type > Close

Select > Select from string > ช่อง residues พิมพ์ HOH*, ช่อง atom

พิมพ์ * > Add > Dismiss (ถ้ามีโมเลกุลน้ำที่เป็นจุดสีเหลืองให้ทำ Edit > Delete > Delete selected atoms > Continue)
 เลือก Edit > Hydrogens > Add > Polar only > OK
 Grid > Macromolecule > Choose > เลือกโปรตีน > Select Molecule
 > OK > บันทึกไฟล์ modelX.pdbqt (X คือ เลขของโปรตีน)
 กำหนดค่า center x, y, z ตาม prankweb และ Dimension x, y, z คือ
 40, 40, 40

3.7 ขั้นตอนในการทำ Multiple Molecular Docking

เป็นขั้นตอนที่ใช้ในการทำ Binding Affinity Energy ด้วย Autodock Vina โดยจะทำงานผ่านโปรแกรม Git Bash โดยในขั้นตอนนี้จะประกอบไปด้วยไฟล์ ดังนี้

- (1) ไฟล์โปรตีนเป้าหมาย (ไฟล์นามสกุล *.pdbqt)
- (2) ไฟล์โครงสร้างสามมิติของยา (ไฟล์นามสกุล *.pdbqt)
- (3) ไฟล์โครงสร้างสามมิติของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเซลล์ตาย (ไฟล์นามสกุล *.pdbqt)
- (4) ไฟล์กำหนดค่า (configuration file) หรือ config_j.txt (j คือ ไฟล์ของโปรตีนเป้าหมาย)
- (5) ไฟล์ vina.exe
- (6) ไฟล์ vina_license.rtf
- (7) ไฟล์ vina_split.exe

```
center_x = ****    # ตำแหน่งศูนย์กลางของบริเวณเข้าจับ
center_y = ****    # ตำแหน่งศูนย์กลางของบริเวณเข้าจับ
center_z = ****    # ตำแหน่งศูนย์กลางของบริเวณเข้าจับ
size_x  = 40       # ขนาดของมิติที่ใช้กำหนดพื้นที่ในการให้ลิแกนด์เข้าจับกับโปรตีน
size_y  = 40       # ขนาดของมิติที่ใช้กำหนดพื้นที่ในการให้ลิแกนด์เข้าจับกับโปรตีน
size_z  = 40       # ขนาดของมิติที่ใช้กำหนดพื้นที่ในการให้ลิแกนด์เข้าจับกับโปรตีน
```

ภาพที่ 3.1 แสดงตัวอย่างการกำหนดค่าในไฟล์ config_j.txt

ขั้นตอนแรกของการทำงานจะต้องเปลี่ยนไดเรกทอรีไปที่โฟลเดอร์ที่เก็บข้อมูล และ พิมพ์คำสั่งเรียก Autodock vina จากนั้นกำหนดค่าให้ j=1 สุดท้ายพิมพ์คำสั่งเพื่อให้ Autodock vina ทำงานโดยใช้ไฟล์ที่กำหนดค่าตัวเลข ดังนี้

```
$ cd                                คำสั่งเปลี่ยนไดเรกทอรี
$ ./vina --help                     คำสั่งเรียก Autodock vina
$ j=1                               คำสั่งกำหนดค่า j=1
$ for j in {1..3} ; do for i in {101..105} ; do ./vina --receptor
$j.pdbqt --ligand $i.pdbqt --config config_$j.txt --out $j}_$i.pdbqt --log $j}_$i.log ;
done ; done
```

(j คือ ไฟล์ของโปรตีนเป้าหมาย และ i คือ ไฟล์ของยา) คำสั่งให้ Autodock vina ทำงาน

เมื่อสิ้นสุดการประมวลผลจะได้ไฟล์ 2 ไฟล์ คือ ไฟล์นามสกุล *.log เป็นไฟล์ที่เก็บตารางข้อมูลค่าพลังงานของการเข้าจับกันของโปรตีนและลิแกนด์ และไฟล์นามสกุล *.pdbqt เป็นไฟล์โครงสร้างของลิแกนด์ที่มีการเข้าจับกับตำแหน่งของโปรตีน

ซึ่งในการทดสอบการเข้าจับกันระหว่างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตายและยากับโปรตีนเป้าหมายของการเกิดโรคอัลไซเมอร์จะถูกทำซ้ำคู่ละ 3 ซ้ำ โดยจะเลือก pocket ที่ดีที่สุดของทุกโปรตีน แล้วทำการเลือกค่าพลังงานการยึดเกาะที่ดีที่สุดสำหรับการรายงานผลและนำไปวิเคราะห์อันตรกิริยาในขั้นตอนต่อไป

3.8 การแสดงผลของการทดสอบการเข้าจับระหว่างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตายและยากับโปรตีนเป้าหมายของการเกิดโรคอัลไซเมอร์ และการวิเคราะห์อันตรกิริยา

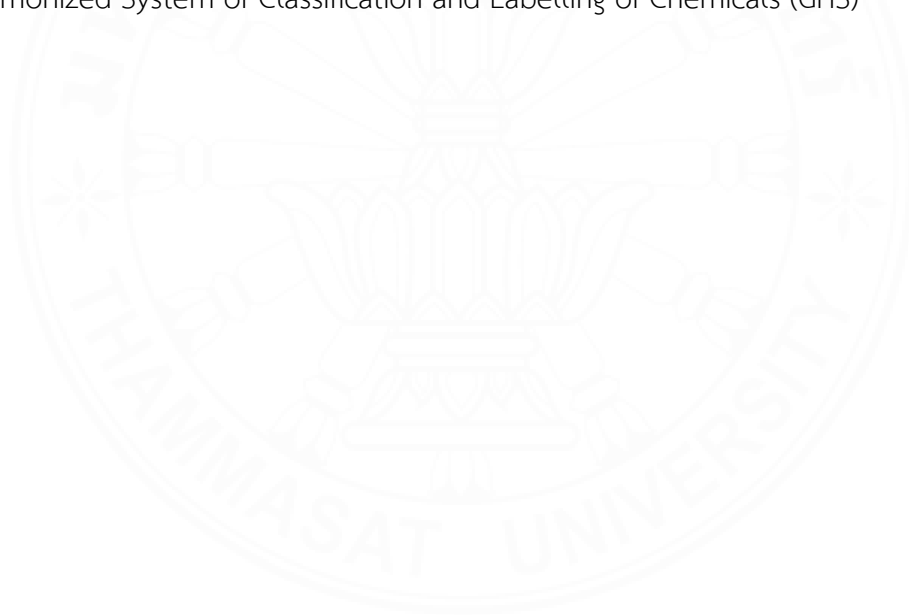
นำไฟล์โครงสร้างลิแกนด์ที่เข้าจับกับโปรตีนเป้าหมายนามสกุล *.pdbqt ที่ได้จากการทำ Multiple Molecular Docking มาเปิดในโปรแกรม Discovery Studio จากนั้นบันทึกไฟล์ของลิแกนด์ที่ให้ค่าพลังงานการเข้าจับที่ดีที่สุดเป็นนามสกุล *.pdb ต่อมานำไฟล์ที่ได้และไฟล์ของโปรตีนนามสกุล *.pdbqt ที่ได้จากขั้นตอนที่ 3.3.2 มาเปิดในโปรแกรม PyMol เพื่อแสดงผลเป็นภาพของลิแกนด์ที่เข้าจับกับโปรตีนในตำแหน่งที่มีค่าพลังงานการเข้าจับที่ดีที่สุด แล้วบันทึกไฟล์นามสกุล *.pdb จากนั้นบันทึกภาพโดยเลือกรูปแบบ ray trace with transparent background เป็นไฟล์ *.png

ต่อมาทำการแปลงไฟล์ *.pdb ที่ได้จากโปรแกรม PyMol ผ่านโปรแกรม Open Babel GUI โดยจะมีการเพิ่ม HETATM, CONECT, ENDML, MODEL และ REMARK เพื่อเป็นการจัดระเบียบของไฟล์

สุดท้ายนำไฟล์นามสกุล *.pdb ที่ได้จากโปรแกรม Open Babel GUI ไปวิเคราะห์อันตรกิริยาผ่าน PLIP (<https://plip-tool.biotec.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>) จากนั้นดาวน์โหลดไฟล์แสดงผลการวิเคราะห์อันตรกิริยาที่อยู่ในรูปแบบของไฟล์นามสกุล *.png, *.pse และ *.RST

3.9 การทำนายคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตายและยา

นำโครงสร้างของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตายและยาไปทำนายคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาผ่าน SwissADME (<http://www.swissadme.ch>) เพื่อใช้ในการพิจารณาค่าคุณสมบัติการดูดซึม, การกระจายตัว, เมแทบอลิซึม และการขับออกของสาร โดยพิจารณาค่าความเหมือนยา (Drug likeness) ตามกฎเกณฑ์ของลิปินสกี (Lipinski' rule) จากนั้นทำนายความเป็นพิษด้วย Protox3 (<https://tox.charite.de/protox3>) โดยจำแนกความเป็นพิษออกเป็น 6 ประเภทตาม Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)



บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การคัดเลือกโครงสร้างสามมิติ

ผลการคัดเลือกโครงสร้างสามมิติของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขตตาย 40 ชนิด โปรตีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์ 46 ชนิด และยาควบคุมเชิงบวกที่ใช้ในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ 23 ชนิด

ตารางที่ 4.1 การคัดเลือกโครงสร้างสามมิติ

ข้อมูลโครงสร้างสามมิติ	ฐานข้อมูล	จำนวนข้อมูล
โปรตีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์	Protein Data Bank	46
สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเขตตาย	PubChem	40
ยาที่ใช้ในการรักษาโรคอัลไซเมอร์	DrugBank	23

4.2 การทำนายบริเวณเข้าจับในโปรตีนเป้าหมาย

การทำนายบริเวณเข้าจับของสารตั้งต้นในโปรตีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์ และตำแหน่งเร่งปฏิกิริยาบนโครงสร้างสามมิติของโปรตีน ดำเนินการผ่านโปรแกรม PrankWeb โดยเลือกเฉพาะบริเวณเข้าจับที่ 1 (pocket1) ซึ่งมีความน่าจะเป็นสูงสุดที่สารตั้งต้นสามารถเข้าจับได้ดี

ตารางที่ 4.2 บริเวณเข้าจับที่ 1 ของโปรตีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์

Uniport ID	ชื่อโปรตีน	คะแนน	ความน่าจะเป็น	CenterX	Center Y	Center Z
P28222	5-hydroxytryptamine 1	26.66	0.896	-10.6932	-18.523	20.8911
P28221	5-hydroxytryptamine 1D	13.48	0.706	95.4102	121.2583	119.8157
P28566	5-hydroxytryptamine 1E	26.43	0.894	92.0758	121.4461	118.1679
P47898	5-hydroxytryptamine 2A	37.85	0.951	-28.4837	-11.6837	144.2661
P41595	5-hydroxytryptamine 2B	28.65	0.909	21.8315	17.706	9.7313
P28335	5-hydroxytryptamine 2C	31.01	0.922	38.5373	31.658	58.1946
P46098	5-hydroxytryptamine 3A	8.18	0.48	-19.2036	3.7808	5.1224

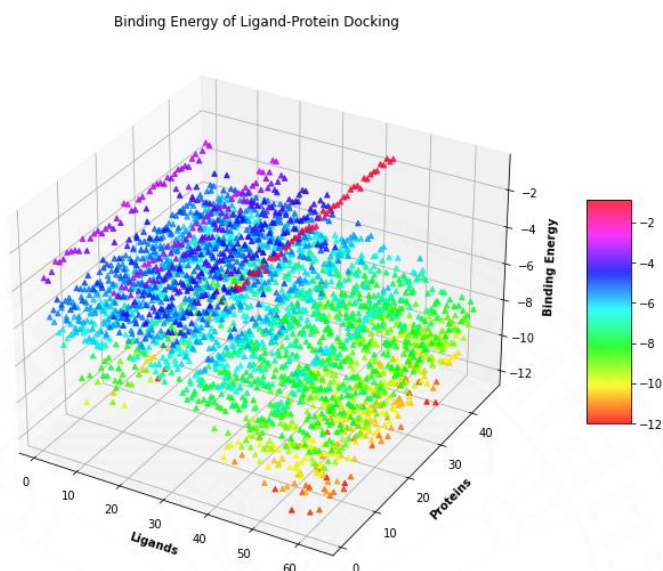
P47898	5-hydroxytryptamine 5A	19.01	0.825	-18.3057	11.6365	7.7531
P50406	5-hydroxytryptamine 6	22.42	0.863	119.5188	80.1896	125.1869
P34969	5-hydroxytryptamine 7	29.27	0.913	90.2812	108.6963	79.7726
P08909	5-hydroxytryptamine_1C	32.72	0.931	4.4003	5.8248	-8.899
P22303	Acetylcholinesterase	19.9	0.837	120.8025	109.2585	-134.119
P35348	Alpha-1A adrenergic	15.67	0.763	-9.787	-5.1005	3.5178
P35368	Alpha-1B adrenergic	11.72	0.65	-2.7271	-0.5105	12.9156
P25100	Alpha-1D adrenergic	15.13	0.751	-1.6248	9.0258	-14.0938
P08913	Alpha-2A adrenergic	23.05	0.869	-3.2643	-6.908	-20.3163
P18089	Alpha-2B adrenergic	38.06	0.952	119.2908	114.0578	84.1071
P18825	Alpha-2C adrenergic	23.44	0.872	-9.8319	4.7879	56.9687
P08588	Beta adrenergic	29.9	0.916	21.4457	-22.2271	79.4869
P07550	Beta2 adrenergic	17.54	0.802	-4.1435	-11.7452	-50.6396
P06276	Cholinesterase	31.43	0.924	-18.5369	-27.2199	42.5243
P41143	Delta-type opioid	11.4	0.637	-5.5717	-69.1266	72.2846
P21728	Dopamine D1	24.44	0.88	96.653	111.0993	130.4318
P35462	Dopamine D3	24.09	0.877	5.9937	14.5852	-10.0987
P21917	Dopamine D4	21.15	0.85	-17.5211	16.4957	-18.1661
P21918	Dopamine D5	20.68	0.846	7.8182	3.9878	-8.8417
Q96BI3	Gamma-secretase subunit APH-1A	23.67	0.874	201.6462	161.1457	155.7879
Q9NZ42	Gamma-secretase subunit PEN-2	22.69	0.866	202.2062	160.2734	154.1679
P23415	Glycine	23.48	0.873	-31.0097	-15.3402	11.8389
P35367	Histamine H1	21.73	0.856	17.5427	35.5253	18.0914
P25021	Histamine H2	14.41	0.732	159.2549	163.0322	199.3963
Q9Y5N1	Histamine H3	12.97	0.691	-20.1906	51.0283	-0.0825
Q9H3N8	Histamine H4	8.77	0.516	-8.9551	-6.3757	12.9668
P01584	Interleukin-1 beta	1.81	0.033	40.799	22.9965	64.4443
P41145	Kappa-type opioid	22.24	0.861	106.7776	105.9213	70.0645

Q01959	Sodium dependent serotonin_transporter	24.65	0.881	-36.6181	-19.4132	2.9665
P08172	Muscarinic acetylcholine receptor M2	29.49	0.914	181.9727	27.941	522.3483
P20309	Muscarinic acetylcholine receptor M3	17.5	0.801	125.7122	117.8551	159.3143
P08173	Muscarinic acetylcholine receptor M4	34.83	0.94	55.564	-1.703	77.7332
P08912	Muscarinic acetylcholine receptor M5	30.34	0.918	34.7702	24.6932	-37.4004
P35372	Mu-type opioid	50.23	0.976	168.838	161.0317	171.9736
Q9Y6K9	NF-kappa-B essential modulator	6.96	0.394	38.513	-50.0448	0.0581
P29475	Nitric oxide synthase brain	110.72	0.998	117.3488	246.879	356.6446
P19838	Nuclear_factor_NF- kappa-B	2.11	0.048	11.1113	-55.1307	6.4156
Q12809	Potassium voltagegated channel subfamilyH member_2	5.3	0.262	106.8759	59.0542	64.7073
P31645	Sodium-dependent dopamine_transporter	13.58	0.709	2.4813	2.7463	-2.0095

4.3 การทดสอบการเข้าจับกันระหว่างโมเลกุล (Molecular docking)

จากการทดสอบการเข้าจับกันระหว่างโมเลกุลด้วยโปรแกรม Autodock Vina โดย ลิแกนด์ คือ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตาย 40 ชนิด และยาควบคุมเชิงบวกที่ใช้ในการรักษา โรคอัลไซเมอร์ 23 ชนิดกับโปรตีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคอัลไซเมอร์ 46 ชนิด แสดงผล การจำลองการเข้าจับกันเชิงโมเลกุล โดยกำหนดให้ค่าพลังงานการยึดเกาะ (Binding Affinity) ที่ดี

ที่สุดมีค่าเข้าใกล้สีแดง (-12.00 กิโลแคลอรีต่อโมล) ในขณะที่กำหนดให้ค่าพลังงานการยึดเกาะที่แย่ที่สุดมีค่าเข้าใกล้สีชมพูเข้ม (-2.00 กิโลแคลอรีต่อโมล) ดังภาพที่ 4.1

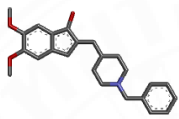
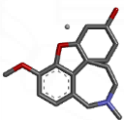
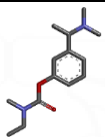
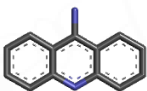


ภาพที่ 4.1 scatterplot 3D ของพลังงานการยึดเกาะระหว่างลิแกนด์และโปรตีนเป้าหมาย โดยแกน X, Y และ Z คือ ลิแกนด์ โปรตีน และค่าพลังงานการยึดเกาะ ตามลำดับ ลิแกนด์ 1-40 คือ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตาย และลิแกนด์ 41-63 คือ ยาควบคุมเชิงบวก

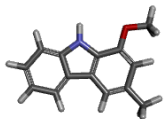
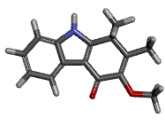
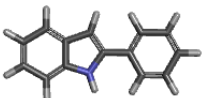
ยาควบคุมเชิงบวก 4 ชนิด ที่ได้รับการขึ้นทะเบียนจาก FDA ให้ใช้รักษาโรคอัลไซเมอร์ ในปัจจุบัน ได้แก่ Donepezil, Galantamine, Rivastigmine และ Tacrine ซึ่งมีโปรตีนเป้าหมาย 2 ชนิดที่สำคัญต่อการเกิดโรคอัลไซเมอร์ตามทฤษฎี Cholinergic ได้แก่ Acetylcholinesterase และ Cholinesterase ผลการทดลองการเข้าจับของยาต่อโปรตีนเป้าหมายข้างต้น ตามตารางที่ 4.3 และคัดเลือกผลการทดลองการเข้าจับของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตายต่อโปรตีน Acetylcholinesterase ดังตารางที่ 4.4 โดยกำหนดเกณฑ์การคัดเลือก คือ มีพลังงานยึดเกาะดีกว่าหรือเท่ากับพลังงานการยึดเกาะต่อโปรตีน Acetylcholinesterase ของยา Rivastigmine ซึ่งมีพลังงานการยึดเกาะเท่ากับ -6.2 กิโลแคลอรีต่อโมล เป็นพลังงานที่แย่ที่สุดในการยึดเกาะกับโปรตีน Acetylcholinesterase เมื่อเทียบกับยาควบคุมเชิงบวก 4 ชนิดข้างต้น และคัดเลือกผลการทดลองการเข้าจับของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตายต่อโปรตีน Cholinesterase ดังตารางที่ 4.5 โดยกำหนดเกณฑ์การคัดเลือก คือ มีพลังงานดีกว่าหรือเท่ากับพลังงานการยึดเกาะต่อโปรตีน Cholinesterase ของยา Rivastigmine ซึ่งมีพลังงานการยึดเกาะเท่ากับ -7.7 กิโลแคลอรีต่อโมล เป็น

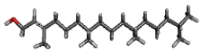
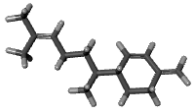
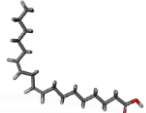
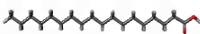
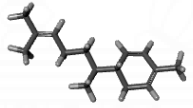
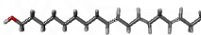
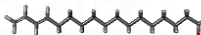
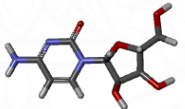
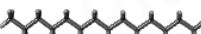
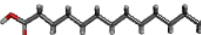
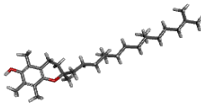
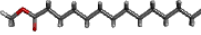
คะแนนที่แย่ที่สุดในการยึดเกาะกับโปรตีน Cholinesterase เมื่อเทียบกับยาควบคุมเชิงบวก 4 ชนิดข้างต้น

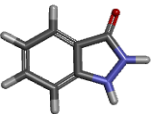
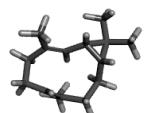
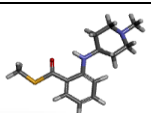
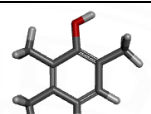
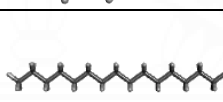
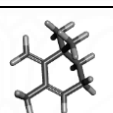
ตารางที่ 4.3 พลังงานการยึดเกาะของยาควบคุมเชิงบวกต่อโปรตีน Acetylcholinesterase และ Cholinesterase

ยาควบคุมเชิงบวก	โครงสร้างโมเลกุล	พลังงานการยึดเกาะต่อโปรตีน Acetylcholinesterase (กิโลแคลอรีต่อโมล)	พลังงานการยึดเกาะต่อโปรตีนCholinesterase (กิโลแคลอรีต่อโมล)
Donepezil		-7.8	-9.6
Galantamine		-7.0	-8.7
Rivastigmine		-6.2	-7.7
Tacrine		-7.6	-10.5

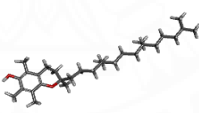
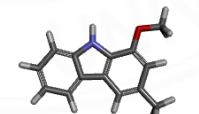
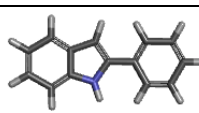
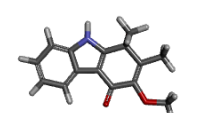
ตารางที่ 4.4 พลังงานการยึดเกาะของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตายต่อโปรตีน Acetylcholinesterase เมื่อเทียบกับคะแนนการยึดเกาะของยา Rivastigmine (พลังงานการยึดเกาะ -6.2 กิโลแคลอรีต่อโมล)

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตาย	โครงสร้างโมเลกุล	พลังงานการยึดเกาะ (≥ -6.2) (กิโลแคลอรีต่อโมล)
1-Methoxy-3-methyl-9H-carbazole		-8.5
3-Methoxy-1,2-dimethyl-9H-carbazol-4-one		-8.3
Alpha-phenylindole		-8.2

Phytol		-7.4
beta-Sesquiphellandrene		-7.4
Linoleic acid		-7.4
Octadecanoic acid		-7.3
Zingiberene		-7.2
Gamma-Murolene		-7.0
9,12,15-Octadecatrien		-7.0
9,17-Octadecadienal		-7.0
Cytidine		-6.9
Methyl palmitate		-6.8
n-Hexadecanoic acid		-6.7
Vitamin e		-6.7
Hexadecanoic acid, methyl ester		-6.6

3-Indazolone		-6.6
Bicyclogermacrene		-6.6
Thioanthranilic acid		-6.5
2,3,6-Trimethylphenol		-6.4
1-Heptadecane		-6.2
Gamma-Pyrene		-6.2

ตารางที่ 4.5 พลังงานการยึดเกาะของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตายต่อโปรตีน Cholinesterase เมื่อเทียบกับคะแนนการยึดเกาะของยา Rivastigmine (พลังงานการยึดเกาะ -7.7 กิโลแคลอรีต่อโมล)

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตาย	โครงสร้างโมเลกุล	พลังงานการยึดเกาะ (≥ -7.7) (กิโลแคลอรีต่อโมล)
Vitamin E		-9.3
3-Methoxy-1,2-dimethyl-9H-carbazol-4-one		-9.2
Alpha-phenylindole		-8.3
1-Methoxy-3-methyl-9H-carbazole		-8.0

จากผลการทดลองการเข้าจับของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตายต่อโปรตีน เป้าหมายAcetylcholinesterase ดังตารางที่ 4.4 เปรียบเทียบกับยาควบคุมเชิงบวก 4 ชนิด ได้แก่ Donepezil Galantamine Rivastigmine และ Tacrine ดังตารางที่ 4.3 พบว่ามีสารในเขยตาย 3

ชนิดที่มีพลังงานการยิดเกาะดีกว่ายา Donepezil คือ 1-Methoxy-3-methyl-9H-carbazole, 3-Methoxy-1,2-dimethyl-9H-carbazol-4-one และ Alpha-phenylindole ค่าพลังงานการยิดเกาะเท่ากับ -8.5 -8.3 และ -8.2 กิโลแคลอรีต่อโมล ตามลำดับ สารในเขยตาย 11 ชนิดที่มีพลังงานการยิดเกาะดีกว่ายา Galantamine คือ 1-Methoxy-3-methyl-9H-carbazole, 3-Methoxy-1,2-dimethyl-9H-carbazol-4-one, Alpha-phenylindole, beta-Sesquiphellandrene, Phytol, Linoleic acid, Octadecanoic acid, Zingiberene, Gamma-Murolene, 9,12,15-Octadecatrien และ 9,17-Octadecadienal ค่าพลังงานการยิดเกาะเท่ากับ -8.5 -8.3 -8.2 -7.4 -7.4 -7.4 -7.3 -7.2 -7.0 -7.0 และ -7.0 กิโลแคลอรีต่อโมล ตามลำดับ สารในเขยตาย 22 ชนิดที่มีพลังงานการยิดเกาะดีกว่ายา Rivastigmine คือ 1-Methoxy-3-methyl-9H-carbazole, 3-Methoxy-1,2-dimethyl-9H-carbazol-4-one, Alpha-phenylindole, Phytol, beta-Sesquiphellandrene, Linoleic acid, Octadecanoic acid, Zingiberene, 9,17-Octadecadienal, 9,12,15-Octadecatrien, Gamma-Murolene, Cytidine, Methyl palmitate, n-Hexadecanoic acid, Vitamin E, Hexadecanoic acid-methyl ester, 3-Indazolone, Bicyclogermacrene, Thioanthranilic acid, 2,3,6-Trimethylphenol, 1-Heptadecane และ Gamma-Pyronene ค่าพลังงานการยิดเกาะเท่ากับ -8.5, -8.3, -8.2, -7.4, -7.4, -7.4, -7.3, -7.2, -7.0, -7.0, -7.0 -6.9 -6.8 -6.7 -6.6 -6.6 -6.5 -6.4 -6.2 และ -6.2 กิโลแคลอรีต่อโมล ตามลำดับ และพบว่าสารในเขยตาย 3 ชนิดที่มีพลังงานการยิดเกาะดีกว่ายา Tacrine คือ 1-Methoxy-3-methyl-9H-carbazole, 3-Methoxy-1,2-dimethyl-9H-carbazol-4-one และ Alpha-phenylindole ค่าพลังงานการยิดเกาะเท่ากับ -8.5, -8.3, และ -8.2 กิโลแคลอรีต่อโมล ตามลำดับ

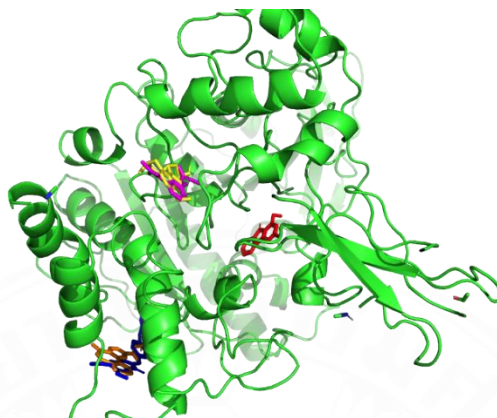
จากผลการทดลองการเข้าจับของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตายต่อโปรตีนเป้าหมาย Cholinesterase ดังตารางที่ 4.4 เปรียบเทียบกับยาควบคุมเชิงบวก 4 ชนิด ได้แก่ Donepezil Galantamine Rivastigmine และ Tacrine ดังตารางที่ 4.3 พบว่าสารในเขยตาย 2 ชนิดที่มีพลังงานการยิดเกาะดีกว่ายา Galantamine คือ Vitamine E และ 3-Methoxy-1,2-dimethyl-9H-carbazol-4-one ค่าพลังงานการยิดเกาะเท่ากับ -9.3 และ -9.2 กิโลแคลอรีต่อโมล ตามลำดับ สารในเขยตาย 4 ชนิดที่มีพลังงานการยิดเกาะดีกว่ายา Rivastigmine คือ Vitamine E, 3-Methoxy-1,2-dimethyl-9H-carbazol-4-one, Alpha-phenylindole และ 1-Methoxy-3-methyl-9H-carbazole ค่าพลังงานการยิดเกาะเท่ากับ -9.3 -9.2 -8.3 และ -8 กิโลแคลอรีต่อโมล ตามลำดับ และพบว่าไม่มีสารในเขยตายที่มีพลังงานการยิดเกาะดีกว่ายา Donepezil และ Tacrine โดยการเข้าจับของสารในเขยตายต่อโปรตีน Cholinesterase ดีที่สุดคือ 3-Methoxy-1,2-dimethyl-9H-carbazol-

4-one ค่าพลังงานการยึดเกาะเท่ากับ -9.2 กิโลแคลอรีต่อโมล ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการเข้าจับของ Donepezil และ Tacrine ต่อโปรตีน Cholinesterase ค่าพลังงานการยึดเกาะเท่ากับ -9.6 และ -10.5 กิโลแคลอรีต่อโมล ตามลำดับ

ตารางที่ 4.6 แสดงค่าพลังงานการยึดเกาะของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตายที่ดีที่สุด และยาควบคุมเชิงบวกเมื่อจับกับโปรตีนเป้าหมาย Acetylcholinesterase และ Cholinesterase

ชื่อโปรตีนเป้าหมาย	ประเภทของลิแกนด์	ชื่อของลิแกนด์	ค่าพลังงานการยึดเกาะ (กิโลแคลอรีต่อโมล)
Acetylcholinesterase	สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตาย	1-Methoxy-3-methyl-9H-carbazole	-8.5
	ยาควบคุมเชิงบวก	Donepezil	-7.8
		Galantamine	-7
		Rivastigmine	-6.2
		Tacrine	-7.6
Cholinesterase	สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตาย	3-Methoxy-1,2-dimethyl-9H-carbazol-4-one	-9.2
	ยาควบคุมเชิงบวก	Donepezil	-9.6
		Galantamine	-8.7
		Rivastigmine	-7.7
		Tacrine	-10.5

4.3.1 ผลการเข้าจับของสาร 1-Methoxy-3-methyl-9H-carbazole และยา Donepezil, Galantamine, Rivastigmine, Tacrine ต่อโปรตีน Acetylcholinesterase

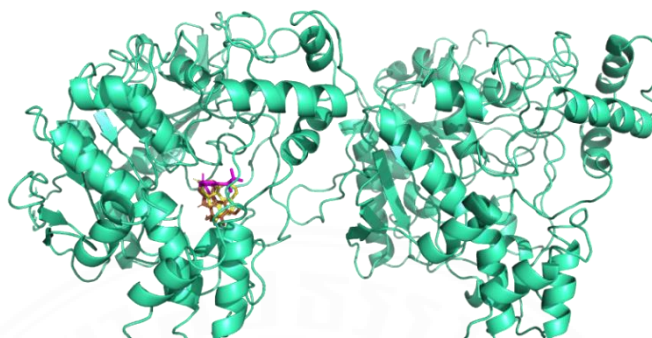


ภาพที่ 4.2 โครงสร้างโมเลกุลการเข้าจับของสารออกฤทธิ์ 1-Methoxy-3-methyl-9H-carbazole (สีแดง) และยา Donepezil(สีน้ำเงิน) Galantamine(สีเหลือง) Rivastigmine(สีม่วง) Tacrine(สีส้ม) ต่อโปรตีนเป้าหมาย Acetylcholinesterase (สีเขียว)

จากภาพที่ 4.2 จะเห็นได้ว่าสารออกฤทธิ์ในเขยตาย 1-Methoxy-3-methyl-9H-carbazole เข้าจับในบริเวณที่แตกต่างจากยาควบคุมเชิงบวก โดยที่สารออกฤทธิ์ 1-Methoxy-3-methyl-9H-carbazole มีค่าพลังงานการยึดเกาะกับโปรตีน Acetylcholinesterase ดีที่สุดหากเทียบกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตายทั้งหมด และดีกว่ายาควบคุมเชิงบวกทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ Donepezil, Galantamine, Rivastigmine, และ Tacrine แสดงให้เห็นว่า 1-Methoxy-3-methyl-9H-carbazole สามารถเข้าจับกับโปรตีน Acetylcholinesterase ได้ดีกว่ายาควบคุมเชิงบวกทั้ง 4 ชนิด

จากการศึกษาพบว่า ยา Donepezil, Galantamine, Rivastigmine, และ Tacrine เป็นยายับยั้งโปรตีน Acetylcholinesterase ในสมองที่เฉพาะเจาะจง ซึ่ง Acetylcholinesterase เป็นที่สามารถสลายสารสื่อประสาท Acetylcholine ได้เป็น acetate ions และ choline ส่งผลต่อระบบประสาทและสมอง เป็นสาเหตุของการเกิดโรคอัลไซเมอร์หรือความจำเสื่อมได้ เกี่ยวข้องกับการทำงานของ Cholinergic และยังเป็นเป้าหมายสำคัญของยาส่วนใหญ่ที่ใช้รักษาโรคอัลไซเมอร์ อีกทั้งการศึกษาทางชีวเคมีระบุว่า Acetylcholinesterase กระตุ้นให้เกิดการก่อตัวของอะไมลอยด์ และก่อให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อน AChE-Ap ที่เป็นพิษต่อระบบประสาทมากกว่า Ap peptide เพียงอย่างเดียว แสดงให้เห็นว่าสารยับยั้ง Acetylcholinesterase ที่จำเพาะอาจให้ผลดีต่อการรักษาโรคอัลไซเมอร์ (Gabriella Marucci, *et al.*, 2021, Nibaldo, *et al.*, 2005, Mridula Saxena *et al.*, 2019)

4.3.2 ผลการเข้าจับของสาร 3-Methoxy-1,2-dimethyl-9H-carbazol-4-one และยา Donepezil Galantamine Rivastigmine Tacrine ต่อโปรตีน Cholinesterase



ภาพที่ 4.3 โครงสร้างโมเลกุลการเข้าจับของสารออกฤทธิ์ 3-Methoxy-1,2-dimethyl-9H-carbazol-4-one (สีน้ำตาล) และยา Galantamine (สีเหลือง) Rivastigmine (สีม่วง) ต่อโปรตีนเป้าหมาย Cholinesterase (สีเขียว)

จากภาพที่ 4.3 จะเห็นได้ว่าสารออกฤทธิ์ในเขยตาย 3-Methoxy-1,2-dimethyl-9H-carbazol-4-one เข้าจับในตำแหน่งที่ใกล้เคียงกับยาควบคุมเชิงบวก โดยที่สารออกฤทธิ์ 3-Methoxy-1,2-dimethyl-9H-carbazol-4-one มีค่าพลังงานการยึดเกาะกับโปรตีน Cholinesterase ดีที่สุดหากเทียบกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตายทั้งหมด และดีกว่ายาควบคุมเชิงบวก 2 ชนิด ได้แก่ Galantamine และ Rivastigmine แสดงให้เห็นว่า 3-Methoxy-1,2-dimethyl-9H-carbazol-4-one สามารถเข้าจับกับโปรตีน Cholinesterase ได้ดีกว่ายาควบคุมเชิงบวก 2 ชนิด

จากการศึกษาพบว่า Cholinesterase เป็นเป้าหมายการรักษาที่สำคัญสำหรับโรคอัลไซเมอร์ เกี่ยวข้องการเสื่อมสภาพของเซลล์ประสาท โดย Cholinesterase สามารถสลาย Choline ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญสำหรับการสร้างสารสื่อประสาทในระบบ cholinergic ในสมอง และการสูญเสียสารสื่อประสาทเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้สูญเสียการรับรู้ นำไปสู่การเป็นโรคอัลไซเมอร์ได้

4.4 การวิเคราะห์อันตรกิริยา

จากการทดลองการเข้าจับกันของโมเลกุลระหว่างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อโปรตีนเป้าหมายที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคอัลไซเมอร์ เทียบกับยาควบคุมเชิงบวกที่ได้รับการขึ้นทะเบียนจาก FDA ในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าในเขยตายมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิดที่มีค่าพลังงานการยึดเกาะดีกว่ายาควบคุมเชิงบวก แต่สารที่ให้พลังงานดีที่สุดในกลุ่มนี้ คือ

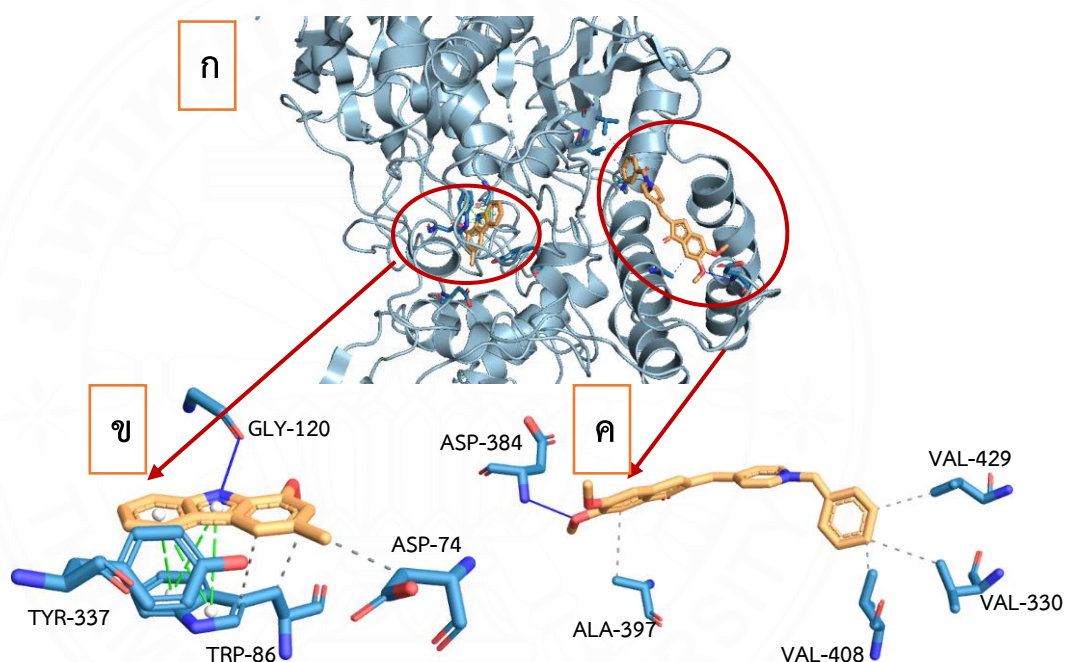
1-Methoxy-3-methyl-9H-carbazole และ 3-Methoxy-1,2-dimethyl-9H-carbazol-4-one
จากนั้นนำสาร 2 ชนิดนี้มาวิเคราะห์อันตรกิริยาผ่านโปรแกรม PLIP ผลการวิเคราะห์ ดังนี้

ตารางที่ 4.7 ผลการวิเคราะห์อันตรกิริยา

Target	Ligand	Interactions
Acetylcholinesterase	1-Methoxy-3-methyl-9H-carbazole	<u>Hydrogen bond</u> : GLY-120 <u>Hydrophobic bond</u> : ASP-74, TYR-337, TRP-86 <u>Pi-Stacking</u> : TRP-86
	Donepezil	<u>Hydrogen bond</u> : ASP-384 <u>Hydrophobic bond</u> : VAL-330, ALA-397, VAL-480, VAL-429
	Galantamine	<u>Hydrogen bond</u> : THR-238, ARG-247, ARG-296 <u>Hydrophobic bond</u> : VAL-239, PRO-290
	Rivastigmine	<u>Hydrogen bond</u> : ARG-296 <u>Hydrophobic bond</u> : PRO-290, ARG-296, PHE-297, VAL-300, PRO-368, GLN-369
	Tacrine	<u>Hydrogen bond</u> : ARG-525 <u>Hydrophobic bond</u> : LYS-332, ASP-384, ARG-393, ALA-397
Cholinesterase	3-Methoxy-1,2-dimethyl-9H-carbazol-4-one	<u>Hydrogen bond</u> : HIS-438 <u>Hydrophobic bond</u> : TRP-82, ALA-382, TYR-332, TRP-430, TYR-440 <u>Pi-Stacking</u> : TRP-86
	Galantamine	<u>Hydrogen bond</u> : GLU-197 <u>Hydrophobic bond</u> : TRP-82 <u>Pi-Stacking</u> : TRP-82
	Rivastigmine	<u>Hydrogen bond</u> : GLY-116, GLY-117 <u>Hydrophobic bond</u> : LEU-286, PHE-329, PHE-398 <u>Pi-Stacking</u> : TRP-82, PHE-239

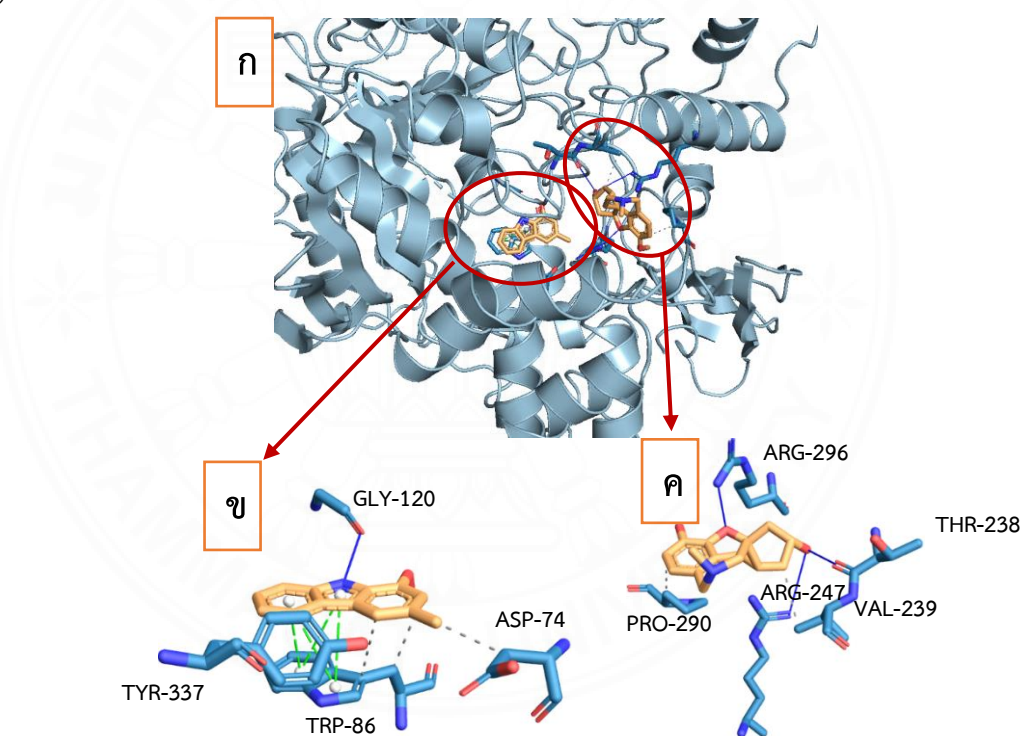
4.4.1 การวิเคราะห์อันตรกิริยาของ 1-Methoxy-3-methyl-9H-carbazole เทียบกับยา Donepezil, Galantamine, Rivastigmine, และ tacrine ต่อโปรตีน Acetylcholinesterase

จากการทดลองการเข้าจับกันของโมเลกุลระหว่าง 1-Methoxy-3-methyl-9H-carbazole กับโปรตีน Acetylcholinesterase พบว่ามีค่าพลังงานการยึดเกาะดีกว่ายาควบคุมเชิงบวกที่ได้รับการขึ้นทะเบียนจาก FDA 4 ชนิด ได้แก่ Donepezil, Galantamine, Rivastigmine, และ Tacrine จึงนำสาร 1-Methoxy-3-methyl-9H-carbazole มาวิเคราะห์อันตรกิริยาเปรียบเทียบกับยาทั้ง 4 ชนิด ดังภาพที่ 4.4 4.5 4.6 และ 4.7



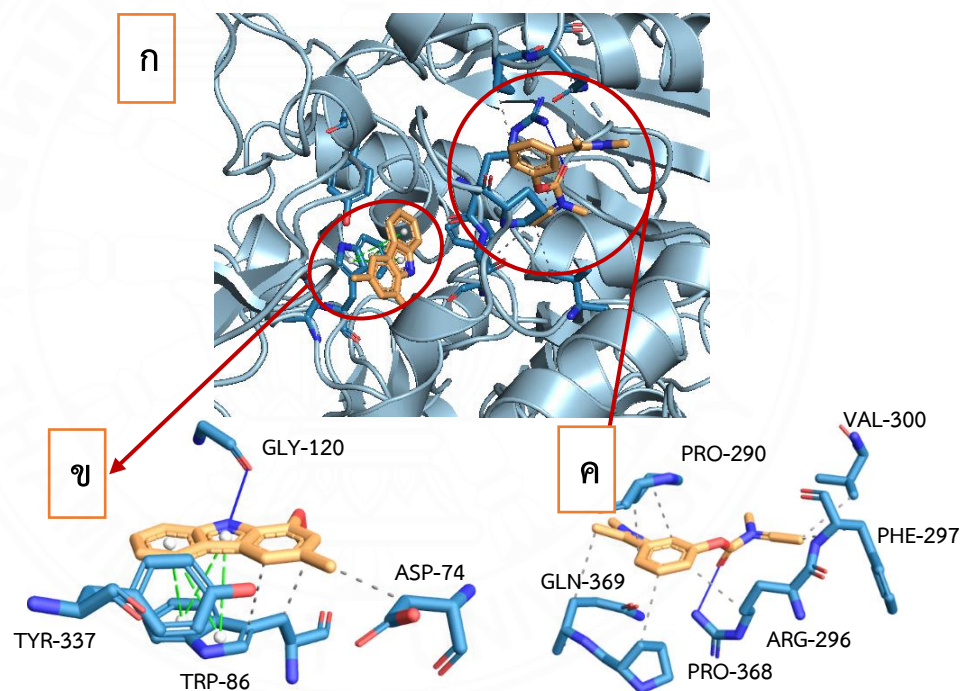
ภาพที่ 4.4 ก) โครงสร้างเชิงซ้อนระหว่างโมเลกุลสาร 1-Methoxy-3-methyl-9H-carbazole และยา Donepezil เกิดพันธะในการเข้าจับกับโปรตีน Acetylcholinesterase ข) การเกิดพันธะของโปรตีน Acetylcholinesterase (โครงสร้างสีฟ้า) กับ สาร 1-Methoxy-methyl-9H-carbazole (โครงสร้างส้ม) พันธะไฮโดรเจน (เส้นทึบสีน้ำเงิน) แรงไฮโดรโฟบิก (เส้นประสีเทา) และการเรียงซ้อนพาย (เส้นประสีเขียว) ค) การเกิดพันธะของโปรตีน Acetylcholinesterase (โครงสร้างสีฟ้า) กับยา Donepezil (โครงสร้างส้ม) พันธะไฮโดรเจน (เส้นทึบสีน้ำเงิน) และแรงไฮโดรโฟบิก (เส้นประสีเทา)

จากภาพที่ 4.4 ก) เปรียบเทียบตำแหน่งการยึดเกาะของ 1-Methoxy-3-methyl-9H-carbazole และยา Donepezil ต่อโปรตีน Acetylcholinesterase พบว่ามีบริเวณยึดเกาะแตกต่าง ภาพที่ 4.4 ข) พบว่าในการยึดเกาะของ 1-Methoxy-3-methyl-9H-carbazole ต่อ Acetylcholinesterase เกิดพันธะไฮโดรเจน 1 ตำแหน่ง คือ GLY-120 เกิดแรงไฮโดรโฟบิก 3 ตำแหน่ง คือ ASP-74 TYR-337 และ TRP-86 อีกทั้งเกิดการเรียงซ้อนพาย (π -Stacking) ที่ตำแหน่ง TRP-86 ส่วนภาพที่ 4.4 ค) เป็นการยึดเกาะของ Donepezil ต่อ Acetylcholinesterase เกิดพันธะไฮโดรเจน 1 ตำแหน่ง คือ ASP-384 เกิดแรงไฮโดรโฟบิก 4 ตำแหน่ง คือ VAL-330 ALA-397 VAL-480 และ VAL-429 สังเกตเห็นการยึดเกาะของ 1-Methoxy-3-methyl-9H-carbazole กับ Donepezil มีตำแหน่งแตกต่างกัน ซึ่งอาจพิจารณาได้ว่าสามารถเข้ายับยั้งการทำงานของ Acetylcholinesterase แบบไม่แข่งขันกัน



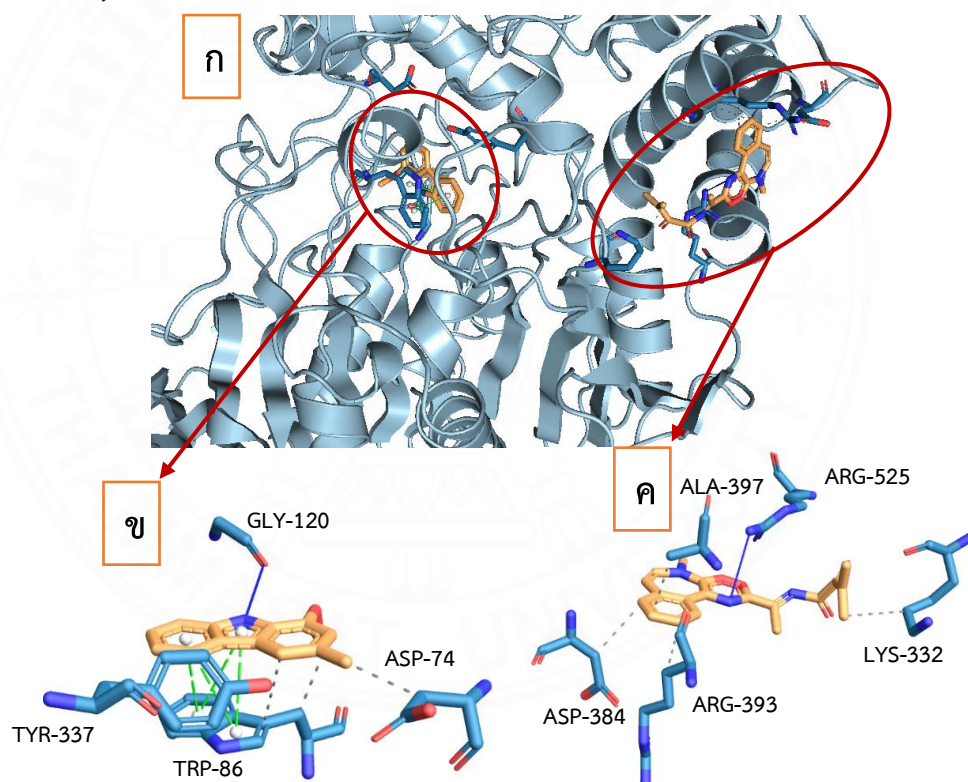
ภาพที่ 4.5 ก) โครงสร้างเชิงซ้อนระหว่างโมเลกุลสาร 1-Methoxy-3-methyl-9H-carbazole และยา Galantamine เกิดพันธะในการเข้าจับกับโปรตีน Acetylcholinesterase ข) การเกิดพันธะ ของโปรตีน Acetylcholinesterase (โครงสร้างสีฟ้า) กับ สาร 1-Methoxy-methyl-9H-carbazole (โครงสร้างส้ม) พันธะไฮโดรเจน (เส้นทึบสีน้ำเงิน) แรงไฮโดรโฟบิก (เส้นประสีเทา) และการเรียงซ้อนพาย (เส้นประสีเขียว) ค) การเกิดพันธะของโปรตีน Acetylcholinesterase (โครงสร้างสีฟ้า) กับยา Galantamine (โครงสร้างส้ม) พันธะไฮโดรเจน (เส้นทึบสีน้ำเงิน) และแรงไฮโดรโฟบิก (เส้นประสีเทา)

จากภาพที่ 4.5 ก) เปรียบเทียบตำแหน่งการยึดเกาะของ 1-Methoxy-3-methyl-9H-carbazole และยา Galantamine ต่อโปรตีน Acetylcholinesterase พบว่ามีบริเวณยึดเกาะแตกต่างกัน ภาพที่ 4.5 ข) พบว่าในการยึดเกาะของ 1-Methoxy-3-methyl-9H-carbazole ต่อ Acetylcholinesterase เกิดพันธะไฮโดรเจน 1 ตำแหน่ง คือ GLY-120 เกิดแรงไฮโดรโฟบิก 3 ตำแหน่ง คือ ASP-74 TYR-337 และ TRP-86 อีกทั้งเกิดการเรียงซ้อนพาย (π -Stacking) ที่ตำแหน่ง TRP-86 และภาพที่ 4.5 ค) เป็นการยึดเกาะของ Galantamine ต่อ Acetylcholinesterase เกิดพันธะไฮโดรเจน 3 ตำแหน่ง คือ THR-238 ARG-247 และ ARG-296 เกิดแรงไฮโดรโฟบิก 2 ตำแหน่ง คือ VAL-239 และ PRO-290 สังเกตเห็นการยึดเกาะของ 1-Methoxy-3-methyl-9H-carbazole กับ Galantamine มีตำแหน่งแตกต่างกัน ซึ่งอาจพิจารณาได้ว่าสามารถเข้ายับยั้งการทำงานของ Acetylcholinesterase แบบไม่แข่งขันกัน



ภาพที่ 4.6 ก) โครงสร้างเชิงซ้อนระหว่างโมเลกุลสาร 1-Methoxy-3-methyl-9H-carbazole และยา Rivastigmine เกิดพันธะในการเข้าจับกับโปรตีน Acetylcholinesterase ข) การเกิดพันธะ ของโปรตีน Acetylcholinesterase (โครงสร้างสีฟ้า) กับ สาร 1-Methoxy-methyl-9H-carbazole (โครงสร้างส้ม) พันธะไฮโดรเจน (เส้นทึบสีน้ำเงิน) แรงไฮโดรโฟบิก (เส้นประสีเทา) และ การเรียงซ้อนพาย (เส้นประสีเขียว) ค) การเกิดพันธะของโปรตีน Acetylcholinesterase (โครงสร้างสีฟ้า) กับยา Rivastigmine (โครงสร้างส้ม) พันธะไฮโดรเจน (เส้นทึบสีน้ำเงิน) และแรงไฮโดรโฟบิก (เส้นประสีเทา)

จากภาพที่ 4.6 ก) เปรียบเทียบตำแหน่งการยึดเกาะของ 1-Methoxy-3-methyl-9H-carbazole และยา Rivastigmine ต่อโปรตีน Acetylcholinesterase พบว่ามีบริเวณยึดเกาะแตกต่างกัน ภาพที่ 4.6 ข) พบว่าในการยึดเกาะของ 1-Methoxy-3-methyl-9H-carbazole ต่อ Acetylcholinesterase เกิดพันธะไฮโดรเจน 1 ตำแหน่ง คือ GLY-120 เกิดแรงไฮโดรโฟบิก 3 ตำแหน่ง คือ ASP-74 TYR-337 และ TRP-86 อีกทั้งเกิดการเรียงซ้อนพาย (π -Stacking) ที่ตำแหน่ง TRP-86 และภาพที่ 4.6 ค) เป็นการยึดเกาะของ Rivastigmine ต่อ Acetylcholinesterase เกิดพันธะไฮโดรเจน 1 ตำแหน่ง คือ ARG-296 เกิดแรงไฮโดรโฟบิก 6 ตำแหน่ง คือ PRO-290 ARG-296 PHE-297 VAL-300 PRO-368 และ GLN-369 สังเกตเห็นการยึดเกาะของ 1-Methoxy-3-methyl-9H-carbazole กับ Rivastigmine มีตำแหน่งแตกต่างกัน ซึ่งอาจพิจารณาได้ว่าสามารถเข้ายับยั้งการทำงานของ Acetylcholinesterase แบบไม่แข่งขันกัน

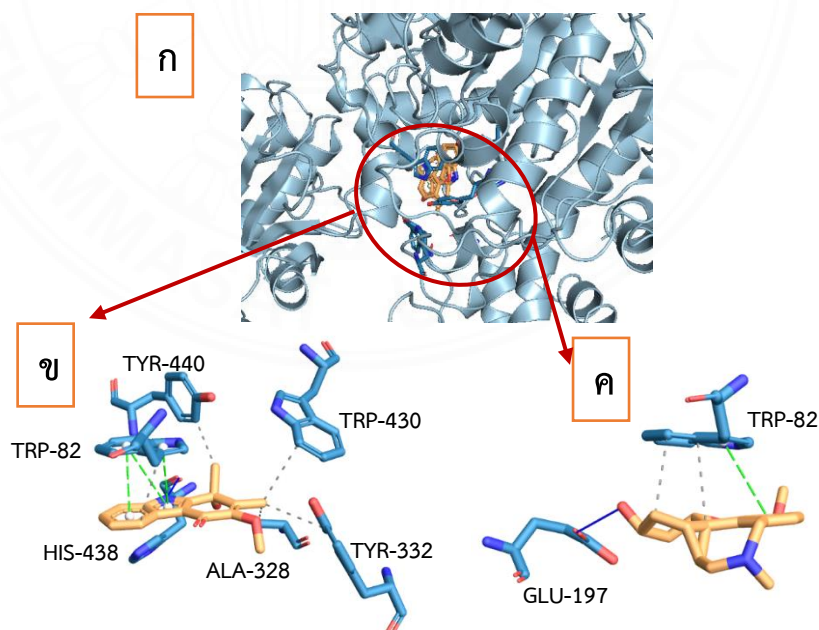


ภาพที่ 4.7 ก) โครงสร้างเชิงซ้อนระหว่างโมเลกุลสาร 1-Methoxy-3-methyl-9H-carbazole และยา Tacrine เกิดพันธะในการเข้าจับกับโปรตีน Acetylcholinesterase ข) การเกิดพันธะ ของโปรตีน Acetylcholinesterase (โครงสร้างสีฟ้า) กับ สาร 1-Methoxy-methyl-9H-carbazole (โครงสร้างส้ม) พันธะไฮโดรเจน (เส้นทึบสีน้ำเงิน) แรงไฮโดรโฟบิก (เส้นประสีเทา) และการเรียงซ้อนพาย (เส้นประสีเขียว) ค) การเกิดพันธะของโปรตีน Acetylcholinesterase (โครงสร้างสีฟ้า) กับยา Tacrine (โครงสร้างส้ม) พันธะไฮโดรเจน (เส้นทึบสีน้ำเงิน) และแรงไฮโดรโฟบิก (เส้นประสีเทา)

จากภาพที่ 4.7 ก) เปรียบเทียบตำแหน่งการยึดเกาะของ 1-Methoxy-3-methyl-9H-carbazole และยา Tacrine ต่อโปรตีน Acetylcholinesterase พบว่ามีบริเวณยึดเกาะแตกต่างกัน ภาพที่ 4.7 ข) พบว่าในการยึดเกาะของ 1-Methoxy-3-methyl-9H-carbazole ต่อ Tacrine เกิดพันธะไฮโดรเจน 1 ตำแหน่ง คือ GLY-120 เกิดแรงไฮโดรโฟบิก 3 ตำแหน่ง คือ ASP-74 TYR-337 และ TRP-86 อีกทั้งเกิดการเรียงซ้อนพาย (π -Stacking) ที่ตำแหน่ง TRP-86 และภาพที่ 4.7 ค) เป็นการยึดเกาะของ Tacrine ต่อ Acetylcholinesterase เกิดพันธะไฮโดรเจน 1 ตำแหน่ง คือ ARG-525 เกิดแรงไฮโดรโฟบิก 4 ตำแหน่ง คือ LYS-332 ASP-384 ARG-393 และ ALA-397 สังเกตเห็นการยึดเกาะของ 1-Methoxy-3-methyl-9H-carbazole กับ Tacrine มีตำแหน่งแตกต่างกัน ซึ่งอาจพิจารณาได้ว่าสามารถเข้ายับยั้งการทำงานของ Acetylcholinesterase แบบไม่แข่งขันกัน

4.4.2 การวิเคราะห์อันตรกิริยาของ 3-Methoxy-1,2-dimethyl-9H-carbazol-4-one เทียบกับยา Galantamine และ Rivastigmine ต่อโปรตีน Cholinesterase

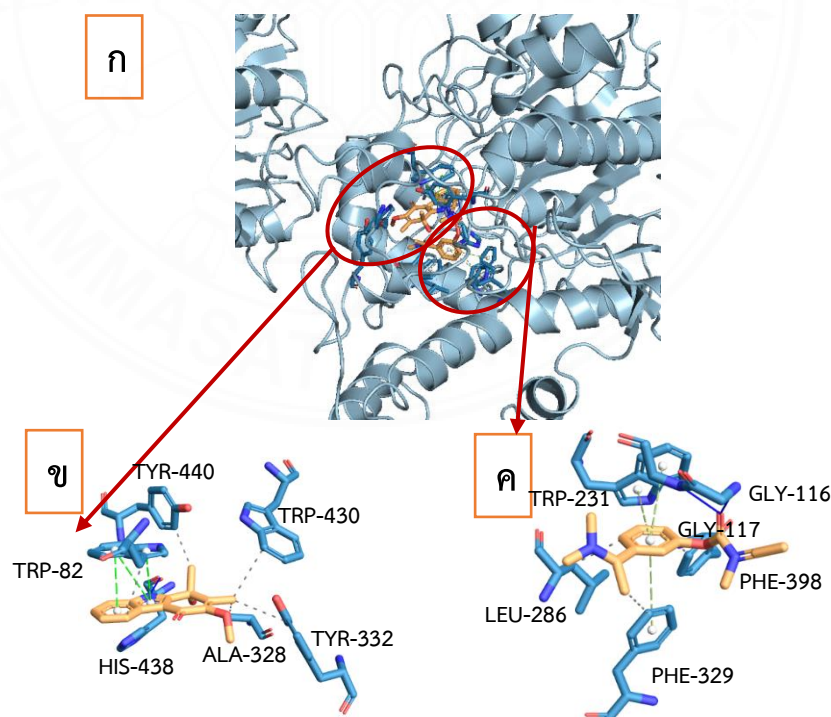
จากการทดลองการเข้าจับกันของโมเลกุลระหว่าง 3-Methoxy-1,2-dimethyl-9H-carbazol-4-one กับโปรตีน Cholinesterase พบว่ามีค่าพลังงานการยึดเกาะดีกว่ายาควบคุมเชิงบวกที่ได้รับการขึ้นทะเบียนจาก FDA 2 ชนิด ได้แก่ Galantamine และ Rivastigmine จึงนำสาร 3-Methoxy-1,2-dimethyl-9H-carbazol-4-one มาวิเคราะห์อันตรกิริยาเปรียบเทียบกับยาทั้ง 2 ชนิด ดังภาพที่ 4.8 และ 4.9



ภาพที่ 4.8 ก) โครงสร้างเชิงซ้อนระหว่างโมเลกุลสาร 3-Methoxy-1,2-dimethyl-9H-carbazol-4-one และยา Galantamine เกิดพันธะในการเข้าจับกับโปรตีน Cholinesterase ภาพที่ 4.8 ข) การเกิดพันธะของโปรตีน Cholinesterase (โครงสร้างสีฟ้า) กับสาร

3-Methoxy-1,2-dimethyl-9H-carbazol-4-one (โครงสร้างส้ม) พันธะไฮโดรเจน (เส้นทึบสีน้ำเงิน) แรงไฮโดรโฟบิก (เส้นประสีเทา) และการเรียงซ้อนพาย (เส้นประสีเขียว) ภาพที่ 4.8 ค) การเกิดพันธะของโปรตีน Cholinesteras (โครงสร้างสีฟ้า) กับยา Galantamine (โครงสร้างส้ม) พันธะไฮโดรเจน (เส้นทึบสีน้ำเงิน) แรงไฮโดรโฟบิก (เส้นประสีเทา) และการเรียงซ้อนพาย (เส้นประสีเขียว)

จากภาพที่ 4.8 ก) เปรียบเทียบตำแหน่งการยึดเกาะของ 3-Methoxy-1,2-dimethyl-9H-carbazol-4-one และยา Galantamine ต่อโปรตีน Cholinesterase พบว่ามีบริเวณยึดเกาะตำแหน่งใกล้เคียงกัน ภาพที่ 4.8 ข) พบว่าในการยึดเกาะของ 3-Methoxy-1,2-dimethyl-9H-carbazol-4-one ต่อ Cholinesterase เกิดพันธะไฮโดรเจน 1 ตำแหน่ง คือ HIS-438 เกิดแรงไฮโดรโฟบิก 5 ตำแหน่ง คือ TRP-82 ALA-382 TYR-332 TRP-430 และ TYR-440 อีกทั้งเกิดการเรียงซ้อนพาย (π -Stacking) ที่ตำแหน่ง TRP-82 และภาพที่ 4.8 ค) เป็นการยึดเกาะของ Galantamine ต่อ Cholinesterase เกิดพันธะไฮโดรเจน 1 ตำแหน่ง คือ GLU-197 เกิดแรงไฮโดรโฟบิก 1 ตำแหน่ง คือ TRP-82 อีกทั้งเกิดการเรียงซ้อนพายที่ตำแหน่ง TRP-82 สังเกตเห็นการยึดเกาะของ 3-Methoxy-1,2-dimethyl-9H-carbazol-4-one เกิดแรงไฮโดรโฟบิกตำแหน่งเดียวกับ Galantamine 1 ตำแหน่งคือ TRP-82 และมีการเรียงซ้อนพายที่ตำแหน่งเดียวกัน คือ TRP-82 ซึ่งอาจพิจารณาได้ว่าสามารถเข้ายับยั้งการทำงานของ Cholinesterase แบบแข่งขันกัน



ภาพที่ 4.9 ก) โครงสร้างเชิงซ้อนระหว่างโมเลกุลสาร 3-Methoxy-1,2-dimethyl-9H-carbazol-4-one และยา Rivastigmine เกิดพันธะในการเข้าจับกับโปรตีน Cholinesterase ข) การเกิดพันธะของโปรตีน Cholinesterase (โครงสร้างสีฟ้า) กับ สาร 3-Methoxy-1,2-dimethyl-9H-

carbazol-4-one (โครงสร้างส้ม) พันธะไฮโดรเจน (เส้นทึบสีน้ำเงิน) แรงไฮโดรโฟบิก (เส้นประสีเทา) และการเรียงซ้อนพาย (เส้นประสีเขียว) ค) การเกิดพันธะของโปรตีน Cholinesterase (โครงสร้างสีฟ้า) กับยา Rivastigmine (โครงสร้างส้ม) พันธะไฮโดรเจน (เส้นทึบสีน้ำเงิน) และแรงไฮโดรโฟบิก (เส้นประสีเทา)

จากภาพที่ 4.9 ก) เปรียบเทียบตำแหน่งการยึดเกาะของ 3-Methoxy-1,2-dimethyl-9H-carbazol-4-one และยา Rivastigmine ต่อโปรตีน Cholinesterase พบว่ามีบริเวณยึดเกาะตำแหน่งใกล้เคียงกันภาพที่ 4.9 ข) พบว่าในการยึดเกาะของ 3-Methoxy-1,2-dimethyl-9H-carbazol-4-one ต่อ Cholinesterase เกิดพันธะไฮโดรเจน 1 ตำแหน่ง คือ HIS-438 เกิดแรงไฮโดรโฟบิก 5 ตำแหน่ง คือ TRP-82 ALA-382 TYR-332 TRP-430 และ TYR-440 อีกทั้งเกิดการเรียงซ้อนพาย (π -Stacking) ที่ตำแหน่ง TRP-82 และภาพที่ 4.9 ค) เป็นการยึดเกาะของ Rivastigmine ต่อ Cholinesterase เกิดพันธะไฮโดรเจน 2 ตำแหน่ง คือ GLY-116 และ GLY-117 เกิดแรงไฮโดรโฟบิก 3 ตำแหน่ง คือ LEU-286 PHE-329 และ PHE-398 อีกทั้งเกิดการเรียงซ้อนพาย (π -Stacking) ที่ตำแหน่ง TRP-231 และ PHE-239 สังเกตเห็นการยึดเกาะของ 3-Methoxy-1,2-dimethyl-9H-carbazol-4-one กับ Rivastigmine มีตำแหน่งแตกต่างกัน ซึ่งอาจพิจารณาได้ว่าสามารถเข้ายับยั้งการทำงานของ Cholinesterase แบบไม่แข่งขันกัน

4.5 การทำนายคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตายและยา

ทำนายคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งหมดที่มีค่าพลังงานการยึดเกาะดีกว่ายาควบคุมเชิงบวกแต่ละชนิดที่ได้รับการขึ้นทะเบียนจาก FDA ต่อโปรตีน Acetylcholinesterase และโปรตีน Cholinesterase ด้วย SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) ซึ่งพิจารณาตามคุณสมบัติความเป็นยาตามกฎของลิปินสกี (Lipinski' rule of five) คือน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่าหรือเท่ากับ 500, จำนวนการละลายในชั้นน้ำและไขมัน $\log P_{ow}$ (WLOGP) น้อยกว่าหรือเท่ากับ 4.15 จำนวนตัวรับพันธะไฮโดรเจนน้อยกว่าหรือเท่ากับ 5 และพันธะที่หมุนได้น้อยกว่าหรือเท่ากับ 10 ต่อมาพิจารณาคุณสมบัติเมแทบอลิซึม คือ การเป็นตัวยับยั้ง CYP2C19 (CYP2C19 inhibitor) ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการเร่งการเผาผลาญของยาหลายชนิด ส่งผลให้ยาไม่ตกค้างในร่างกายเป็นเวลานาน ลดความเป็นพิษของยาที่มีต่อร่างกาย จากนั้นทำนายคุณสมบัติการเป็นพิษด้วย ProTox3 (<https://tox.charite.de/protox3/>) โดยการศึกษาที่ Toxicity Class โดยระดับความเป็นพิษสูงสุดคือ Class 1 และความเป็นพิษน้อยที่สุดคือ Class 6 สุดท้ายพิจารณาค่า LD50 (50% lethal dose) หมายถึงระดับความเป็นพิษต่อร่างกายของ

มนุษย์ โดยคำนวณจากปริมาณสารที่ทำให้สัตว์ทดลองครึ่งหนึ่งตายจากการได้รับเพียงครั้งเดียว ผลการทำนายของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตายดังตารางที่ 4.8 และผลการทำนายของยาควบคุมเชิงบวก 4 ชนิดที่นำมาพิจารณา ดังตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.8 แสดงค่าการตรวจสอบคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตาย

Compound name	Drug likeness – Lipinski’ rule	Pharmacokinetics - CYP2C19 inhibitor	Toxicity Class	Predicted LD50 (mg/kg)
Cytidine	Yes; 0 violation	No	4	826
Hexadecanoic acid, methyl ester	Yes; 1 violation: MLOGP>4.15	No	5	5000
n-Hexadecanoic acid	Yes; 1 violation: MLOGP>4.15	No	4	900
1-Heptadecane	Yes; 1 violation: MLOGP>4.15	No	5	3000
9,17-Octadecadienal	Yes; 1 violation: MLOGP>4.15	No	5	5000
Octadecanoic acid	Yes; 1 violation: MLOGP>4.15	No	4	900
1-Methoxy-3-methyl-9H-carbazole	Yes; 0 violation	Yes	3	1200
Vitamin e	Yes; 0 violation	No	5	5000
Phytol	Yes; 1 violation: MLOGP>4.15	No	5	5000
9,12,15-Octadecatrien	Yes; 1 violation: MLOGP>4.15	No	6	11730
Thioanthranilic acid	Yes; 0 violation	Yes	4	875
3-Indazolone	Yes; 0 violation	No	4	1000
Methyl palmitate	Yes; 1 violation: MLOGP>4.15	No	5	5000

Zingiberene	Yes; 1 violation: MLOGP>4.15	Yes	4	1680
Gamma-Murolene	Yes; 1 violation: MLOGP>4.15	Yes	4	1680
Bicyclogermacrene	Yes; 1 violation: MLOGP>4.15	Yes	5	5300
3-Methoxy-1,2-dimethyl-9H-carbazol-4-one	Yes; 0 violation	Yes	3	95
Gamma-Pyronene	Yes; 0 violation	No	5	3450
beta-Sesquiphellandrene	Yes; 1 violation: MLOGP>4.15	Yes	5	5000
Alpha-phenylindole	Yes; 0 violation	No	3	100
Linoleic acid	Yes; 1 violation: MLOGP>4.15	No	6	10000
2,3,6 - Trimethylphenol	Yes; 0 violation	No	5	3200

ตารางที่ 4.9 แสดงค่าการตรวจสอบคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาของยาควบคุมเชิงบวก

Drug name	Drug likeness – Lipinski' rule	Pharmacokinetics - CYP2C19 inhibitor	Toxicity Class	Predicted LD50 (mg/kg)
Donepezil	Yes; 0 violation	No	4	505
Galantamine	Yes; 0 violation	No	3	85
Rivastigmine	Yes; 0 violation	No	4	1000
Tacrine	Yes; 0 violation	No	2	40

จากตารางที่ 4.8 พบว่าเมื่อพิจารณาตามกฎของลิปินสกี สารทั้งหมดที่นำมาทดสอบผ่านเกณฑ์การทดสอบ หากพิจารณาถึงการเป็นตัวยับยั้ง CYP2C19 มีสาร 7 ชนิด ที่มีผลการทำนายว่า เป็นตัวยับยั้ง CYP2C19 ได้แก่ 1-Methoxy-3-methyl-9H-carbazole, Thioanthranilic acid, Zingiberene, Gamma-Murolene, Bicyclogermacrene, 3-Methoxy-1,2-dimethyl-9H-

carbazol-4-one และ beta-Sesquiphellandrene ผลการทำนายความเป็นพิษไม่มีสารชนิดไหนที่มีความเป็นพิษรุนแรง

ผลการทำนายทางเภสัชวิทยาของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ 1-Methoxy-3-methyl-9H-carbazole และ 3-Methoxy-1,2-dimethyl-9H-carbazol-4-one ผ่านเกณฑ์ตามคุณสมบัติความเป็นยาตามกฎของลิปินส์ แสดงถึงความสามารถในการดูดซึมและการกระจายตัวที่ดี เมื่อพิจารณาถึงคุณสมบัติเมแทบอลิซึมและความเป็นพิษ สารทั้ง 2 เป็นตัวยับยั้ง CYP2C19 อาจส่งผลให้สารออกฤทธิ์ได้นาน และมีความเป็นพิษปานกลาง

4.6 อภิปรายผลการทดลอง

จากการทดลองมีข้อบกพร่องบางประการเกี่ยวกับข้อมูลของโปรตีนเป้าหมาย และโปรแกรมที่ใช้ในการทดลอง ส่งผลให้อาจมีโปรตีนที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคอัลไซเมอร์บางชนิด ไม่ถูกนำมาวิเคราะห์ร่วมด้วย อย่างไรก็ตามจากข้อมูลโปรตีนเป้าหมายที่นำมาวิเคราะห์ในการทดลองนี้ สามารถบรรลุเป้าหมายตามวัตถุประสงค์ของงานวิจัย ได้แก่ เพื่อศึกษาการเข้าจับระดับโมเลกุลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตายกับโปรตีนเป้าหมายที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคอัลไซเมอร์ และเพื่อประเมินศักยภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตายสำหรับการรักษาโรคอัลไซเมอร์

งานวิจัยนี้ใช้ค่าพลังงานการยึดเกาะของยาควบคุมเชิงบวกที่องค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกาอนุมัติให้ใช้สำหรับการรักษาโรคอัลไซเมอร์ที่มีค่าพลังงานแย่ที่สุดต่อโปรตีน Acetylcholinesterase และ Cholinesterase มาใช้เป็นเกณฑ์การคัดเลือกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เนื่องจากต้องการค้นหาสารในเขยตายที่อาจมีศักยภาพเทียบเท่าหรือมากกว่ายาที่มีอยู่ในปัจจุบันให้ได้จำนวนมากที่สุด เพื่อเป็นทางเลือกสำหรับการนำไปทดลองหรือประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ ตามวัตถุประสงค์ รวมทั้งสารบางชนิดอาจมีข้อจำกัดแตกต่างกัน และเนื่องจากผลการทำนายความเป็นพิษของสารในเขยตายที่ผ่านเกณฑ์การคัดเลือก 22 ชนิด อยู่ในเกณฑ์ความเป็นพิษปานกลาง (Toxicity call 3 และ 4) การประยุกต์ใช้ในรูปแบบการสกัดแยกเฉพาะสารที่มีประสิทธิภาพเหมาะสมสำหรับการรักษาโรคอัลไซเมอร์อาจส่งผลดีมากกว่าการประยุกต์ใช้ในรูปแบบสารสกัดหยาบในระยะยาว

งานวิจัยนี้ใช้วิธีทางชีวสารสนเทศในการทำนายผลการทดลองทั้งหมด เพราะฉะนั้นจึงมีความน่าเชื่อถือในระดับหนึ่งเท่านั้น ผลจากงานวิจัยนี้สามารถเป็นแนวทางต่อยอดองค์ความรู้เพื่อศึกษาทดลองในห้องปฏิบัติการ สัตว์ทดลอง และการวิจัยในคน

การศึกษานี้ได้เพิ่มความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับการยืดเกาะระดับโมเลกุลและอันตรกิริยาของโครงสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตายกับโครงสร้างโปรตีนเป้าหมายที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคอัลไซเมอร์ เท่าที่ค้นคว้ามาพบว่างานวิจัยชิ้นนี้เป็นการศึกษาการยืดเกาะระดับโมเลกุลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตายต่อโปรตีนที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคอัลไซเมอร์ด้วยเทคนิคทางชีวสารสนเทศเป็นครั้งแรก นอกจากนี้ยังเป็นการพัฒนาพืชสมุนไพรหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพให้เป็นที่น่าสนใจ น่าเชื่อถือ และเพื่อเป็นข้อมูลให้มีการนำสมุนไพรมาใช้ประโยชน์อย่างมีประสิทธิภาพ เสริมสร้างคุณภาพชีวิต และเศรษฐกิจต่อไป



บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองในส่วนการคัดเลือกโครงสร้างสามมิติ ได้โครงสร้างในรูปแบบไฟล์นามสกุล *.pdb ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตาย จากฐานข้อมูล PubChem จำนวน 40 ชนิด โครงสร้างของโปรตีนเป้าหมายที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคอัลไซเมอร์ จากฐานข้อมูล RCSB PDB จำนวน 46 ชนิด และโครงสร้างของยาควบคุมเชิงบวกที่เกี่ยวข้องกับการรักษาโรคอัลไซเมอร์ จาก DrugBank จำนวน 23 ชนิด

จากผลการทดลองส่วนของการทำนายบริเวณเข้าจับผ่าน PrankWeb พบว่าโปรตีน Acetylcholinesterase และ Cholinesterase บริเวณเข้าจับที่มีความน่าจะเป็นสูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 83.7 % และ 92.4 % ตามลำดับ ซึ่งเป็นบริเวณที่สารตั้งต้นสามารถเข้าจับได้ดีที่สุด โดยคาดคะเนจากบริเวณที่มีการเข้าจับบ่อยครั้ง

จากการทดสอบการเข้าจับกันระหว่างโมเลกุลด้วยโปรแกรม Autodock Vina โดยลิแกนด์ คือ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตาย 40 ชนิด และยาควบคุมเชิงบวกที่เกี่ยวข้องกับการรักษาโรคอัลไซเมอร์ 23 ชนิด ต่อโปรตีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคอัลไซเมอร์ 46 ชนิด โดยพิจารณานำผลการทดลองของยาควบคุมเชิงบวก 4 ชนิดที่ได้รับการอนุมัติจาก FDA ให้ใช้รักษาโรคอัลไซเมอร์ในปัจจุบันมาเปรียบเทียบกับผลการทดลองของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตาย พบว่าเมื่อเข้าจับกับโปรตีน Acetylcholinesterase มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตาย 22 ชนิด ที่มีค่าพลังงานการยึดเกาะดีกว่ายาควบคุมเชิงบวกอย่าง Rivastigmine และเมื่อเข้าจับกับโปรตีน Cholinesterase มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตาย 4 ชนิด ที่มีค่าพลังงานการยึดเกาะดีกว่ายาควบคุมเชิงบวกอย่าง Rivastigmine สารที่มีค่าพลังงานการยึดเกาะต่อโปรตีน Acetylcholinesterase ที่ดีที่สุดคือ 1-Methoxy-3-methyl-9H-carbazole มีค่าเท่ากับ -8.5 กิโลแคลอรีต่อโมล และสารที่มีค่าพลังงานการยึดเกาะต่อโปรตีน Cholinesterase ที่ดีที่สุดคือ 3-Methoxy-1,2-dimethyl-9H-carbazol-4-one มีค่าเท่ากับ -9.2 กิโลแคลอรีต่อโมล ในขณะที่ค่าพลังงานการยึดเกาะของ Donepezil Galantamine Rivastigmine และ Tacrine ต่อโปรตีน Acetylcholinesterase มีค่าเท่ากับ -7.8 -7.0 -6.2 และ -7.6 กิโลแคลอรีต่อโมล ตามลำดับ และต่อโปรตีน Cholinesterase มีค่าเท่ากับ -9.6 -8.7 -7.7 และ -10.5 กิโลแคลอรีต่อโมล แสดงให้เห็นว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตาย 2 ชนิด ได้แก่ 1-Methoxy-3-methyl-9H-carbazole มีศักยภาพในการเข้าจับกับโปรตีน Acetylcholinesterase ได้ดีกว่ายาควบคุมเชิงบวกทั้ง 4 ชนิด

ได้แก่ Donepezil Galantamine Rivastigmine และ Tacrine และ 3-Methoxy-1,2-dimethyl-9H-carbazol-4-one มีศักยภาพในการเข้าจับกับโปรตีน Cholinesterase ได้ดีกว่ายาควบคุมเชิงบวก 2 ชนิด ได้แก่ Galantamine Rivastigmine

ต่อมาเป็นการวิเคราะห์อันตรกิริยาผ่านโปรแกรม PLIP พบว่าการยึดเกาะของสาร 1-Methoxy-3-methyl-9H-carbazole ต่อโปรตีน Acetylcholinesterase เกิดพันธะไฮโดรเจน 1 ตำแหน่ง คือ GLY-120 เกิดแรงไฮโดรโฟบิก 3 ตำแหน่ง คือ ASP-74 TYR-337 และ TRP-86 อีกทั้งเกิดการเรียงซ้อนพาย (π -Stacking) ที่ตำแหน่ง TRP-86 โดยการยึดเกาะของสาร 1-Methoxy-3-methyl-9H-carbazole กับยา Donepezil Galantamine Rivastigmine และ Tacrine ต่อโปรตีน Acetylcholinesterase มีตำแหน่งแตกต่างกัน สามารถเข้ายับยั้งการทำงานของ Acetylcholinesterase แบบไม่แข่งขันกัน อาจพิจารณาใช้เป็นตัวยับยั้ง Acetylcholinesterase เสริมกันได้ ส่วนการยึดเกาะของ 3-Methoxy-1,2-dimethyl-9H-carbazol-4-one ต่อ Cholinesterase เกิดพันธะไฮโดรเจน 1 ตำแหน่ง คือ HIS-438 เกิดแรงไฮโดรโฟบิก 5 ตำแหน่ง คือ TRP-82 ALA-382 TYR-332 TRP-430 และ TYR-440 อีกทั้งเกิดการเรียงซ้อนพาย (π -Stacking) ที่ตำแหน่ง TRP-82 มีการเกิดแรงไฮโดรโฟบิกตำแหน่งเดียวกับ Galantamine 1 ตำแหน่งคือ TRP-82 และมีการเรียงซ้อนพายที่ตำแหน่งเดียวกัน คือ TRP-82 ซึ่งอาจพิจารณาได้ว่าสามารถเข้ายับยั้งการทำงานของ Cholinesterase แบบแข่งขันกัน อาจไม่สามารถใช้ร่วมกันได้ แต่มีตำแหน่งแตกต่างกันกับ Rivastigmine สามารถเข้ายับยั้งการทำงานของ Cholinesterase แบบไม่แข่งขันกัน อาจพิจารณาใช้เป็นตัวยับยั้ง Acetylcholinesterase เสริมกันได้

สุดท้ายผลการทำนายคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งหมดที่มีค่าพลังงานการยึดเกาะดีกว่ายาควบคุมเชิงบวกแต่ละชนิดต่อโปรตีน Acetylcholinesterase และโปรตีน Cholinesterase โดยพิจารณาตามคุณสมบัติความเป็นยาตามกฎของลิปินสกี เมแทบอลิซึม และคุณสมบัติการเป็นพิษ พบว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ 1-Methoxy-3-methyl-9H-carbazole และ 3-Methoxy-1,2-dimethyl-9H-carbazol-4-one ผ่านเกณฑ์ตามคุณสมบัติความเป็นยาตามกฎของลิปินสกี แสดงถึงความสามารถในการดูดซึมและการกระจายตัวที่ดี เมื่อพิจารณาถึงคุณสมบัติเมแทบอลิซึมและความเป็นพิษ สารทั้ง 2 ชนิดเป็นตัวยับยั้ง CYP2C19 อาจส่งผลให้สารออกฤทธิ์ได้นาน และมีความเป็นพิษปานกลาง

รายการอ้างอิง

1. จิตระยุทธ์ จิตอ่อนน้อม, (2024). การประยุกต์ใช้เทคนิคการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลทางด้านวิทยาศาสตร์โปรตีน. Naresuan phayao journal, (1), 4-16.
2. ธนพร เตชประภาสรัตน์, (2022). การทำนายศักยภาพของยาเก่าที่นำกลับมาใช้ใหม่ต่อโปรตีนเป้าหมายของโรคอัลไซเมอร์ บนคอมพิวเตอร์. โครงการปัญหาพิเศษปริญญาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
3. นภกษมนพณ์ ทหารไทย, อภิษฎา ขำปลอด, ณัฐนิช เชื้อพลพิชัย, (2024). การสกัดและการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสมุนไพรเขยตาย (*Glycosmis pentaphylla*). โครงการสนับสนุนการจัดตั้งห้องเรียนวิทยาศาสตร์ในโรงเรียน (วมว.)มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์-โรงเรียนสวนกุหลาบวิทยาลัย รังสิต. สุขเจริญ ตั้งวงษ์ไชย. (2023). ไปต่ออย่างไร..เมื่อวินิจฉัยเป็นอัลไซเมอร์. โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย, ภาควิชาจิตเวชศาสตร์.
<https://chulalongkornhospital.go.th/kcmh/line/alzheimers/>
4. อำไพ พิมพ์ไกร, พรณพิศา นันตาวัง, รัชภูมิ เมืองแก้ว, อติศร ตรีทิพย์รักษ์, นิภาพรณ ทิพย์จักร. (2021). ต้นทุนทางตรงและต้นทุนทางอ้อมในการรักษาโรคสมองเสื่อมในเขตจังหวัดเชียงใหม่. โรงพยาบาลประสาทเชียงใหม่ องค์การสวนพฤกษศาสตร์. สืบค้นเมื่อ 2023. เขยตาย.
<https://www.navanurak.in.th/rayongbotanic>
5. Agarwal, M., Alam, M.R., Haider, M.K., Malik, M.Z., and Kim, D.K., (2020). Alzheimer's disease: an overview of major hypotheses and therapeutic options in nanotechnology. Nanomaterials (Basel, Switzerland), 11(1), 59.
6. Agu, P.C., Afiukwa, C.A., Orji, O.U. Ezeh, E.M., Ofoke, I.H., Ogbu, C.O., Ugwuja, E.I., and Aja, P.M., (2023). Molecular docking as a tool for the discovery of molecular targets of nutraceuticals in diseases management. Scientific Reports 13, 13398.
7. Ahmed, I., Islam, R., Sikder, M. A. A., Haque, M. R., Al Mansur, M. A., and Rashid, M. A, (2015). Alkaloid, sterol and triterpenoids from *Glycosmis pentaphylla* (Retz.) DC. Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences, 13(2), 115–118.
8. Alzheimer's association. (2020). Alzheimer's disease facts and figures [Internet].
<https://www.alz.org/media/Documents/alzheimers-facts-and-figures.pdf>
9. Alzheimersresearchuk. (2022). What is Alzheimer's disease? [Internet].

https://www.alzheimersresearchuk.org/wpcontent/plugins/mof_bl_0.2.9/downloads/WAD-0522-0524_WEB.pdf

10. Alzheimersresearchuk. (2024). Treatments for dementia [Internet].

https://www.alzheimersresearchuk.org/wp-content/plugins/mof_bl_0.2.9/downloads/TRE-0422-0424_WEB.pdf

11. Berridge, M.J., (2010). Calcium hypothesis of Alzheimer's disease. Pflugers Arch - European Journal of Physiology, 459, 441–449.

12. B. G. Rao. and N. J. Raju., (2009). Investigation of anti-inflammatory activity of *Glycosmis pentaphylla* (Rutaceae). International Journal of Chemical Sciences, 7(4), 2891-2899.

13. Blennow, K., de Leon, M. J. and Zetterberg, H., (2006). Alzheimer's disease. Lancet, 368, 387–403.

14. Boris Decourt, Gary X D'Souza, Jiong Shi, Aaron Ritter, Jasmin Suazo and Marwan N Sabbagh, (2022). The cause of Alzheimer's disease: The Theory of Multipathology Convergence to Chronic Neuronal Stress, 13(1), 37–60.

15. Cascella, R., and Cecchi, C., (2021). Calcium dyshomeostasis in Alzheimer's disease pathogenesis. International Journal of Molecular Sciences, 22(9), 4914.

16. Chen, G., Seukep, A. J., and Guo, M., (2020). Recent advances in molecular docking for the research and discovery of potential marine drugs. Marine Drugs, 18(11), 545.

17. Daina, A., Michielin, O. and Zoete, V., (2017). SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. Scientific Reports, 7, 42717.

18. Decourt, B., D'Souza, G. X., Shi, J., Ritter, A., Suazo, J., and Sabbagh, M. N., (2022). The cause of Alzheimer's disease: The theory of multipathology convergence to chronic neuronal stress. Aging and Disease, 13(1), 37–60.

19. Dhillon, S., (2021). Aducanumab: first approval. Drugs 81, 1437–1443.

20. Dinda, B., Dinda, M., Kulsi, G., Chakraborty, A., and Dinda, S., (2019). Therapeutic potentials of plant iridoids in Alzheimer's and Parkinson's diseases: A review. European Journal of Medicinal Chemistry, 169, 185–199.

21. Disthai. สืบค้นเมื่อ 2023. เมษายน. <https://www.disthai.com>

22. Hampel, H., Mesulam, M.M., Cuello, A.C., Farlow, M.R., Giacobini, E., Grossberg, G.T., Khachaturian, A.S., Vergallo, A., Cavedo, E., Snyder, P.J., and Khachaturian, Z.S., (2018). The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain. A Journal of Neurology*, 141(7), 1917–1933.
23. Hassing LB, Dahl AK, Thorvaldsson V, Berg S, Gatz M, Pedersen NL and Johansson B., (2009). Overweight in midlife and risk of dementia: a 40-year follow-up study. *International Journal of Obesity* 33, 893–898.
24. Hardy, J., and Selkoe, D. J., (2002). The Amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297, 353–356.
25. HDmall. สืบค้นเมื่อ 2023. ใบบัวบก ข้อมูล ลักษณะ สรรพคุณ โทษ วิธีใช้เพื่อสุขภาพ. <https://hdmall.co.th/c/asiatic-pennywort-drink-helps-bruising>
26. Healthykare. 2021. 10 สมุนไพรป้องกันสมองเสื่อมและสมุนไพรป้องกันอัลไซเมอร์.
27. Hongwei Chen, Jun Lin, Sisi Zhu, Kewu Zeng, Pengfei Tu and Yong Jiang, (2022). Anti-inflammatory constituents from the stems and leaves of *Glycosmis ovoidea* Pierre. *Phytochemistry*, 203, 113369.
28. Kametani F. and Hasegawa M, (2018). Reconsideration of amyloid hypothesis and tau hypothesis in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neuroscience*, 12:25.
29. Koshland D. E., (1958). Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America*, 44(2), 98–104.
30. Labony Khandokar, Md. Sazzadul Bari, Veronique Seidel and Md. Areeful Haque, (2021). Ethnomedicinal uses, phytochemistry, pharmacological activities and toxicological profile of *Glycosmis pentaphylla* (Retz.) DC.: A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 278, 114313
31. Liu, PP., Xie, Y., Meng, XY. And Kang, J.S., (2019). History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 4, 29.
32. Maneenet, J., Daodee, S., Monthakantirat, O., Boonyarat, C., Khamphukdee, C., Kwankhao, P., Pitiporn, S., Awale, S., Chulikhit, Y. and Kijjoa, A. (2019). Kleeb Bua Daeng, A thai traditional herbal formula, ameliorated unpredictable chronic mild stress-Induced cognitive impairment in ICR Mice. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(24), 4587.

33. Marucci, G., Buccioni, M., Ben, D.D., Lambertucci, C., Volpini, R. and Amenta, F. (2021). Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*, 190, 108352.
34. MayoClinic. 2015. Alzheimer's disease. <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/alzheimers-disease/symptoms-causes/syc-20350447>.
35. Meng, X.Y., Zhang, H.X., Mezei, M. and Cui, M., (2011). Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Current Computer-Aided Drug Design*, 7(2), 146–157.
36. Medthai. แผนจัดการเพื่อคุ้มครองสมุนไพรในพื้นที่เขตนุรักษ์. 2019. สืบค้นเมื่อ 16 ธันวาคม 2566 จาก: <https://medthai.com/%E0%B9%80%E0%B8%B8%B2%E0%B8%A2/>.
37. Mirza, Fatima Javed, Saadia Zahid, Sanila Amber, Sumera, Hira Jabeen, Noreen Asim and Syed Adnan Ali Shah, (2022). Multitargeted molecular docking and dynamic simulation studies of bioactive compounds from *rosmarinus officinalis* against Alzheimer's disease. *Molecules*, 27, no. 21: 7241.
38. Mridula Saxena and Ragini Dubey, (2019). Target enzyme in Alzheimer's disease: acetylcholinesterase inhibitors. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 19(4), 264 – 275.
39. Murugan, N. and Natarajan, D., (2016). Phytochemical, antioxidant and antibacterial activities of *Glycosmis pentaphylla* (Rutaceae) leaf extracts against selected multidrug resistant bacteria's. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 8, 737–744.
40. Nibaldo C. nestrosa, Juan Paulo Sagal and Marcela Colombres, (2005). Acetylcholinesterase interaction with alzheimer amyloid β . *Subcellular Biochemistry*, 38, 299–317
41. Nicholas D. Tsopelas and Deborah B. Marin, (2016). Cholinergic Treatments of Alzheimer's Disease. *Functional Neurobiology of Aging*, 475-486
42. Rahman, Rezanur Islam, Tania Faruquee, Hossain Akhter and Sharmin Haque, Md., (2017). Evaluation of antioxidant, cholinesterase inhibitory properties, and antibacterial potentials of *Glycomis pentaphylla* leaf extract relevant to the treatment of Alzheimer's isease. *Journal of Applied Pharmacy*, 9. 17.
43. Robert Briggs, Sean P Kennelly and Desmond O'Neill, (2016). Drug treatments in Alzheimer's disease. *Clinical Medicine Journal*, 16 (3) 247-253.

44. Singh, S., Goyal, A. and Agrawal, N.,(2023). Molecular docking and dynamic simulation to identify $\alpha 7$ nAChR binding affinity of flavonoids for the treatment of Alzheimer's disease. *Chemistry & Biodiversity*, 20, e202300306.
45. Soma, M.A., Khan, M.F., Tahia, F., Al-Mansur, M.A., Rahman, M.S., and Rashid, M.A., (2019). Cyclooxygenase-2 inhibitory compounds from the leaves of *Glycosmis pentaphylla* (Retz.) A. DC.: Chemical and in silico studies. *Asian Journal of Chemistry*, 31(6), 1260–1264.
46. Sreejith, P.S., Praseeja, R.J. and Asha, V.V., (2012). A review on the pharmacology and phytochemistry of traditional medicinal plant, *Glycosmis pentaphylla* (Retz.) Correa. *Journal of Pharmacy Research*, 5, 2723–2728.
47. The Coverage. 2023. อัลไซเมอร์ ยังพอมีความหวัง เมื่อโลกค้นพบ ยา ที่ช่วยรักษา ไม่ใช่แค่ ประคองอาการ เหมือนในอดีต. <https://www.thecoverage.info/news/content/5431>
- The straits time. 2023. In a first, US FDA gives full approval for an Alzheimer's drug. <https://www.straitstimes.com/world/united-states/us-makes-new-alzheimers-drug-more-widely-accessible>
48. Vasanth Kanth, T. L. B., Raha, A., Vijay Murali, R. M., Yuvatha, N., Kumaran, K., Kirubakaran, R., and AruUothi, K. N., (2023). Repurposing of clinically proven bioactive natural compounds for targeted treatment of Alzheimer's disease using molecular docking approach. *Research square. In Silico Pharmacology*, 11(1), 33.
49. Vinitha, S., Babu, P.M. and Radhamany, (2020). Phytochemical composition and evaluation of anti-inflammatory activity in *Glycosmis pentaphylla* (Retz.)DC.-An ethnobotanically important medicinal Plant. *Advances in Zoology and Botany*, 8(3), 109-115.
50. Walker, D., and Lue, L.F. (2007). Anti-inflammatory and immune therapy for Alzheimer's disease: current status and future directions. *Currentneuropharmacology*, 5(4), 232–243.
51. Yi Wu , Xin Hu , Guang-Zhong Yang , Zhi-Nan Mei and Yu Chen, (2012). Two new flavanols from *Glycosmis pentaphylla*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 14:8, 738-742.
52. Zhao H and Caflisch A, (2015). Molecular dynamics in drug design. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 91:4-14.