

การยับยั้งการทำงานของนิวรามินิเดสของไข้หวัดใหญ่ H1N1
สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยยาโอเซลทามิเวียร์
สารแอนโดรกราโฟไลด์และอนุพันธ์

Inhibition of Wide Type and Mutant of Influenza a Neuraminidase
H1N1 with Oseltamivir, Andrographolide and Derivatives

พนิดา กังซุ่น^{1*} และวันสิริ อินทร์นอก²
Panita Kongsun^{1*} and Wansiri Innok²

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาประสิทธิภาพการยึดจับระหว่างโปรตีนนิวรามินิเดส (NA) ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ 2009 H1N1 สายพันธุ์ดั้งเดิม (WT) สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง H274Y และ R292K กับยาโอเซลทามิเวียร์ (OTV) สารแอนโดรกราโฟไลด์และอนุพันธ์ (AGD) ในฟ้าทะลายโจร ด้วยวิธีโมเลกุลาร์ดอกกิ้ง ผลการคำนวณของ OTV พบว่าประสิทธิภาพในการยึดจับ OTV-WT ~ OTV-H274Y > OTV-R292K ซึ่งสอดคล้องกับค่า IC₅₀ จากการทดลอง สำหรับผลการคำนวณของสาร AGD พบว่าสาร AGD 1 และ 5 มีโอกาสพัฒนาไปเป็นยารักษาโรคไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ WT และ H274Y ในขณะที่สาร AGD 2 มีโอกาสพัฒนาไปเป็นยารักษาสายพันธุ์ R292K ซึ่งมีอัตราการดื้อยาสูงเมื่อเทียบกับ WT และ H274Y เนื่องจากถึงแม้มีการกลายพันธุ์ไปแล้วก็ยังยึดจับกับ N1 ได้ดี มีพลังงานยึดจับกับสายพันธุ์ WT, H274Y และ R292K เท่ากับ -7.95 -8.09 และ -7.74 kcal/mol ตามลำดับ

คำสำคัญ: นิวรามินิเดส สารแอนโดรกราโฟไลด์และอนุพันธ์ R292K H274Y โมเลกุลาร์ดอกกิ้ง

Abstract

In this study, molecular docking was performed on the 2009 H1N1 complexed with the well-known drug, oseltamivir (OTV), andrographolide and derivatives (AGD) from *Andrographis paniculata*, to investigate the binding affinity of the inhibitors toward wide type and mutant types at the position of H274Y and R292K of neuraminidase (NA). The results of OTV revealed that the efficiency of binding is OTV-WT ~ OTV-H274Y > OTV-R292K in which agree well with IC₅₀ values from experimental data. The calculation revealed that AGD1

¹ อ.ดร., สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ พัทลุง 93210

² นิสิตปริญญาโท สาขาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ พัทลุง 93210

¹ Lecturer, Dr., Department of Chemistry, Faculty of Science, Thaksin University, Phatthalung, 93210

² Master student, Department of Chemistry, Faculty of Science, Thaksin University, Phatthalung, 93210

* Corresponding author: E-mail address: panita487@hotmail.com. Tel.: 076-609-600 ext 2362

and AGD5 are good opportunity for developing as NA inhibitor for WT and H274Y. While AGD2 is a good opportunity for developing as NA inhibitor especially for R292K mutant that has more resistant fold when compare to wide type and H274Y. This is due to the AGD2 binds to NA active site in which the binding energies were -7.95, -8.09 and -7.74 kcal/mol for WT, H274Y and R292K, respectively.

Keywords: Neuraminidase, Andrographolide and Derivatives, R292K, H274Y, Molecular Docking

บทนำ

ไข้หวัดใหญ่ (Influenza) เป็นโรคที่เกิดการติดเชื้อไวรัสที่ระบบทางเดินหายใจในสัตว์ปีกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และในช่วงแพร่ระบาดตามฤดูกาล โรคไข้หวัดใหญ่สามารถแพร่กระจายได้ง่ายจากมนุษย์สู่มนุษย์ [1] การแพร่ระบาดของไข้หวัดใหญ่ในมนุษย์พบว่ามีการแพร่ระบาดครั้งแรกในช่วงปี ค.ศ. 1918 – 1919 ที่เรียกว่า ไข้หวัดสเปน (Spanish Flu) ซึ่งเป็นเหตุให้มีจำนวนผู้เสียชีวิตมากกว่า 50 ล้านคนทั่วโลก [2] จัดเป็นปัญหาสุขภาพที่สร้างความตื่นตระหนก และวิตกกังวลอย่างมาก โรคไข้หวัดใหญ่ที่ทำให้เกิดการก่อโรคแบบรุนแรงเกิดจากเชื้อไวรัสอินฟลูเอนซาชนิด (Type) เอ ซึ่งบนผิวของไวรัสมีไกลโคโปรตีนปรากฏอยู่สองชนิด คือ ฮีแมกกลูตินิน (Hemagglutinin; HA) มี 18 ชนิด (H1-H18) และนิวรามิเนด (Neuraminidase; NA) มี 11 ชนิด (N1-N11) [3] จึงทำให้เกิดระบบการเรียกชื่อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ สายพันธุ์ต่างๆ โดยระบุประเภทของ HA และ NA เช่น H1N1 และ H5N1 เป็นต้น [4]

NA เป็นไกลโคโปรตีนที่ทำหน้าที่สลายพันธะไกลโคไซด์ที่เชื่อมระหว่างกรดไขมันของไขมันและไขมัน และช่วยปล่อยไวรัสออกจากเซลล์เจ้าบ้านที่ติดเชื้อ โดยการทำลายรีเซพเตอร์บนเซลล์เจ้าบ้านและไวรัส ทำให้เชื้อไวรัสหลุดออกนอกเซลล์และช่วยให้ไวรัสแพร่กระจายไปติดเชื้อเซลล์ใกล้เคียงต่อไป จากการศึกษาโครงสร้างสามมิติของ NA พบว่าที่บริเวณเร่งของ NA สายพันธุ์ N1 ประกอบด้วย Catalytic Residues (R118, D151, D152, R224, E276, R292, R371 และ Y406) และ Framework Residues (E119, R156, W178, S179, D198, I222, E227, H274, E277, N294 และ E425) [5]

ยาต้านไข้หวัดใหญ่ที่ใช้อยู่ในปัจจุบันคือ โอเซลทามิเวียร์ (OTV) เนื่องจากมีความสะดวกในการใช้งาน มีลักษณะโครงสร้างคล้ายคลึงกับกรดไขมัน ทำให้สามารถยับยั้งการทำงานของ NA โดยการเข้าแทนที่กรดไขมัน และส่งผลให้ไวรัสไม่สามารถเคลื่อนที่ออกจากเซลล์เจ้าบ้านได้ [6] ปัจจุบันมีการพัฒนาสารยับยั้งการทำงานของ NA ได้แก่ Favipiravir, Laninamivir และ Peramivir [7] อย่างไรก็ตามพบว่าสมุนไพรฟ้าทะลายโจรซึ่งเป็นสมุนไพรไทยมีฤทธิ์ต้านไวรัสไข้หวัดใหญ่ได้ [8] ซึ่งสารสำคัญที่พบในฟ้าทะลายโจร คือแอนโดรกราโฟไลด์ ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม ไดเทอปีนอยด์แลกโตน และยังพบอนุพันธ์อื่นๆ ของแอนโดรกราโฟไลด์ (AGD) เช่น Neoandrographolide และ 14 - deoxy andrographolide

ปัญหาสำคัญที่พบในการใช้ยาโอเซลทามิเวียร์คือการดื้อยาโดยเฉพาะเมื่อเมื่อ N1 เกิดการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 274 จาก His เป็น Tyr (H274Y) และ ตำแหน่ง 292 จาก Arg เป็น Lys (R292K) ทำให้ขนาดของบริเวณเร่งของ NA เปลี่ยนไป [9] ส่งผลต่อประสิทธิภาพของยาโอเซลทามิเวียร์เป็นอย่างมาก โดยค่า IC_{50} ของสายพันธุ์ดั้งเดิม (WT) และสายพันธุ์ที่กลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง H274Y และ ตำแหน่ง R292K เท่ากับ 0.4 ± 0.1 nM, 110 ± 12 nM และ 3200 ± 220 nM ตามลำดับ [10]

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาเปรียบเทียบการยับยั้งการทำงานของโปรตีนนิวรามิเนดของไข้หวัดใหญ่

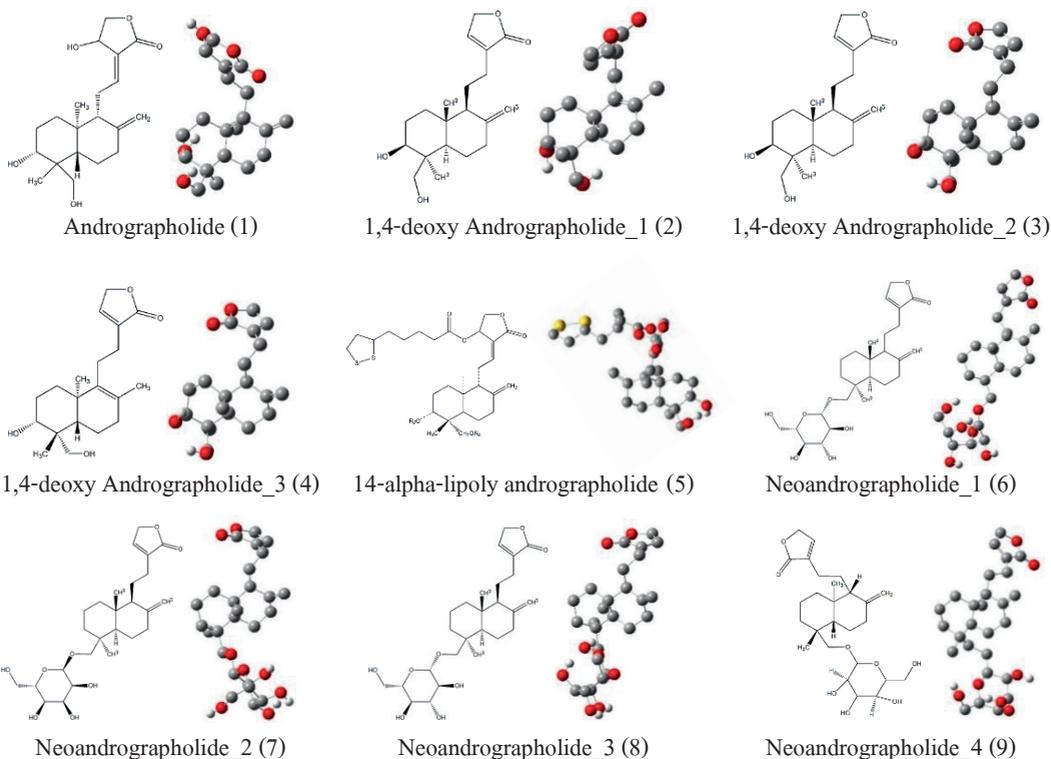
2009 H1N1 สายพันธุ์ WT และสายพันธุ์กลายพันธุ์ H274Y และ R292K กับยา OTV และสาร AGD ในฟ้าทะลายโจร ด้วยเทคนิคโมเลกุลาร์ด็อกกิง (Molecular Docking) เพื่อให้เกิดความรู้ความเข้าใจในการยับยั้งการทำงานของโปรตีนนิวรามิเนส อันจะเป็นโอกาสในการค้นพบหรือพัฒนาายที่สามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีนนิวรามิเนสอย่างมีประสิทธิภาพแม้จะเป็นสายพันธุ์ที่กลายพันธุ์

วิธีการวิจัย

1. เตรียมไฟล์โครงสร้างสามมิติของโปรตีนนิวรามิเนส

โครงสร้างสามมิติของ NA ที่เกิดสารประกอบเชิงซ้อนอยู่กับ OTV สามารถดาวน์โหลดได้จากเว็บไซต์ RCSB Protein Data Bank โดยใช้ PDB ID คือ 2HU4 (WT) และโครงสร้างสามมิติของ NA ที่มีกรกลายพันธุ์ทำการเตรียมโดยเปลี่ยนตำแหน่งกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง H274 เป็น Y274 (H274Y) และตำแหน่ง R292 เป็น K292 (R292K)

2. เตรียมไฟล์โครงสร้างสามมิติของลิแกนด์แอนโดรกราโฟไลด์และอนุพันธ์ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 โครงสร้างสองมิติและสามมิติของลิแกนด์แอนโดรกราโฟไลด์และอนุพันธ์ (AGD)

3. โมเลกุลาร์ด็อกกิงระหว่างโปรตีนนิวรามิเนสกับสารแอนโดรกราโฟไลด์และอนุพันธ์

กำหนดตำแหน่งกึ่งกลางของ Binding Site ของแกน x, y และ z โดยใช้ตำแหน่งกึ่งกลางของโมเลกุลตัวรับ OTV เป็น -0.0030 81.8690 และ 108.9590 ตามลำดับ จากนั้นทำการเติมประจุและ Solvation Term ให้กับโปรตีนด้วยโปรแกรม AutoDockTool กำหนดขอบเขตของ Grid box เท่ากับ 50x50x50 เพื่อกำหนดขอบเขตในการคำนวณค่า Binding

Energy โดยที่สารยับยั้งที่สนใจจะไม่สามารถเคลื่อนออกนอกกล่องนี้ได้ เมื่อสารยับยั้งถูกเคลื่อนไปแต่ละตำแหน่ง ก็จะมีการคำนวณค่าพลังงานระหว่างสารยับยั้งกับโปรตีนทุกครั้ง ทำการคำนวณ docking เพื่อหาตำแหน่งที่เหมาะสมในการจับตัวกันของโมเลกุลทั้งสองและรูปร่างโมเลกุลที่เหมาะสมที่สุดในการจับตัวกันของโมเลกุลทั้งสอง ในการทดลองครั้งนี้จะสั่ง `ga_run` ทั้งหมด 100 วัน โดยโปรแกรม AutoDock และโปรแกรมจะทำการจัดโครงสร้างของลิแกนด์ ที่อยู่ในลักษณะเดียวกันให้อยู่ในกลุ่ม (Cluster) เดียวกันโดยใช้ค่าทางสถิติ (RMSD) เป็นเกณฑ์ในการจัดกลุ่ม

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

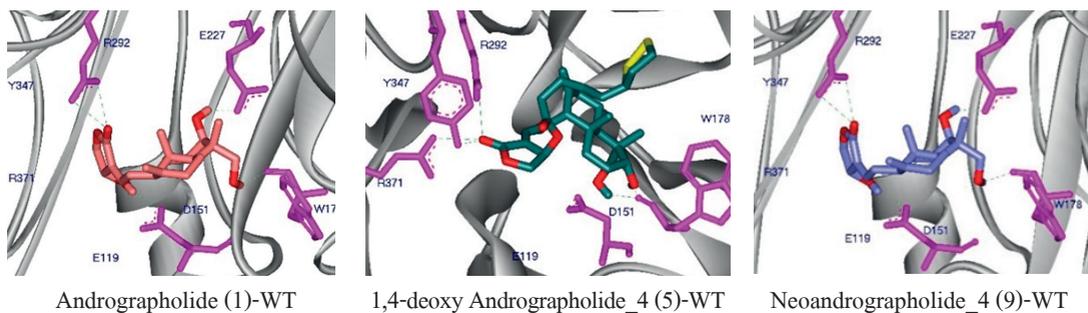
1. อันตรกิริยากับสายพันธุ์ดั้งเดิม (WT)

การทำโมเลกุลาร์ดีค็อกกิ้งเป็นการศึกษาการออกแบบโมเลกุลยาโดยคำนึงถึงรูปแบบการยึดจับระหว่างโปรตีนกับลิแกนด์ โดยพิจารณาจากค่าพลังงานในการยึดจับ (Binding Energy) ถ้าพลังงานในการยึดจับมีค่าเป็นลบแสดงว่าการยึดจับระหว่าง 2 โมเลกุลสามารถจับกันได้ดี และจะต้องพิจารณาควบคู่ไปกับความแข็งแรงของการเกิดพันธะไฮโดรเจน โดยพิจารณาได้จากความยาวพันธะและมุมพันธะระหว่างตัวให้กับตัวรับโปรตอน [11] ผลจากการศึกษาโมเลกุลาร์ดีค็อกกิ้ง พบว่าพลังงานการยึดจับระหว่างยา OTV กับ NA สายพันธุ์ดั้งเดิมมีค่าเท่ากับ -6.99 kcal/mol (ตารางที่ 1) โดยเกิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโนของ N1 ดังต่อไปนี้ E119, D151, R292, Y347, R371 และ R371 (ตารางที่ 3) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Wang S-Q *et al.* [12] ซึ่งมีพลังงานการยึดจับระหว่างยา OTV กับ NA สายพันธุ์ดั้งเดิมเท่ากับ -6.92 kcal/mol และ Rungrotmongkol T *et al.* [13] รายงานว่ากรดอะมิโนดังกล่าวนี้เป็น Key Residues ในตำแหน่งยึดจับ

ตารางที่ 1 พลังงานในการยึดจับและ % conformational cluster ของ OTV และ AGD กับ N1 ทั้ง 3 สายพันธุ์

ligand	WT		H274Y		R292K	
	Binding Energy (kcal/mol)	Num in Clus	Binding Energy (kcal/mol)	Num in Clus	Binding Energy (kcal/mol)	Num in Clus
OTV	-6.96	100	-6.99	100	-6.57	100
1	-7.38	33	-7.36	32	-8.63	38
2	-7.95	37	-8.09	38	-7.74	40
3	-6.88	28	-7.70	35	-7.63	31
4	-7.14	27	-7.85	24	-7.26	25
5	-8.40	13	-8.37	10	-8.85	12
6	-5.89	45	-7.33	37	-7.11	48
7	-7.57	19	-7.21	29	-7.44	25
8	-7.43	27	-7.29	36	-7.32	35
9	-7.23	15	-8.98	14	-8.68	16

จากที่กล่าวมาแล้วข้างต้นว่าถ้าพลังงานในการยึดจับมีค่าเป็นลบแสดงว่าการยึดจับระหว่าง 2 โมเลกุลสามารถจับกันได้ดีซึ่งเมื่อเปรียบเทียบพลังงานยึดจับระหว่าง OTV-N1 กับ AGD-N1 พบว่าสาร AGD สารที่ 1 2 4 5 7 8 และ 9 มีพลังงานยึดจับต่ำกว่า OTV โดยสารตัวที่ 5 มีพลังงานในการยึดจับต่ำที่สุดเท่ากับ -8.40 kcal/mol รองลงมาเป็น 2 7 8 1 9 และ 4 มีพลังงานในการยึดจับเท่ากับ -7.95 -7.57 -7.43-7.38 -7.23 และ -7.14 kcal/mol ตามลำดับ (ตารางที่ 1) แสดงว่าสารดังกล่าวยึดจับกับ N1 ได้ดีกว่ายา OTV อย่างไรก็ตามในการพิจารณาสารยับยั้งการทำงานของ NA ได้ดีหรือไม่นั้นจะพิจารณาจากพลังงานเพียงอย่างเดียวไม่ได้ต้องพิจารณาว่าเกิดอันตรกิริยากับกรดอะมิโนที่สำคัญในตำแหน่งยึดจับด้วยหรือไม่ (E119 D151 R292 R292 Y347 R371 และ R371) ซึ่งจากข้อมูลของการเกิดพันธะไฮโดรเจนของสายพันธุ้ดั้งเดิมพบว่า สาร AGD สารที่ 1 5 และ 9 เกิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโนที่สำคัญใกล้เคียงกับยา OTV ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 การเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างสาร AGD สารที่ 1 5 และ 9 กับ N1 สายพันธุ้ WT

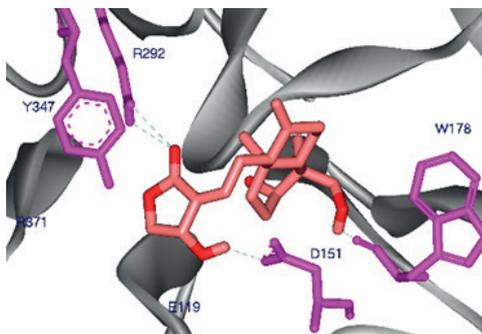
ตารางที่ 2 การเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างยา OTV กับ N1 ทั้ง 3 สายพันธุ้

พันธะไฮโดรเจน OTV- H274Y			พันธะไฮโดรเจน OTV- H274Y			พันธะไฮโดรเจน OTV- H274Y		
กรดอะมิโน	ความยาวพันธะ (Å)	มุมพันธะ (องศา)	กรดอะมิโน	ความยาวพันธะ (Å)	มุมพันธะ (องศา)	กรดอะมิโน	ความยาวพันธะ (Å)	มุมพันธะ (องศา)
E119	2.80	101.7	E119	2.88	103.7	E119	2.77	110.6
D151	2.73	100.9	D151	2.74	103.8	D151	2.63	111.0
R292	2.95	123.2	R292	2.77	129.8	R152	3.18	167.1
R292	2.64	150.2	Y347	2.87	118.5	K292	2.70	153.8
Y347	3.12	98.7	R371	2.89	101.4	Y347	2.87	100.8
R371	2.98	116.2	R371	2.75	148.6	R371	2.69	100.2
R371	2.76	113.8				R371	2.93	135.6
						R371	2.99	90.4

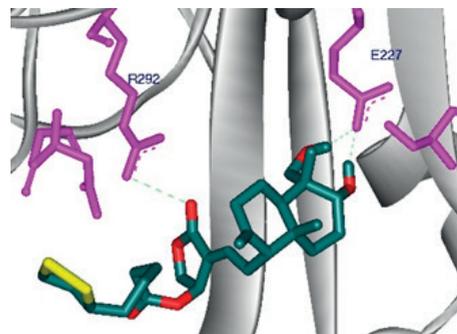
2. อันตรกิริยาของสายพันธุ์กลายพันธุ์ H274Y และ R292K

มีรายงานว่าประสิทธิภาพยา OTV ลดลงเมื่อ N1 เกิดการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 274 จาก His เป็น Tyr (H274Y) และ ตำแหน่ง 292 จาก Arg เป็น Lys (R292K) โดยค่า IC₅₀ ของ OTV-WT, OTV-H274Y และ OTV-R292K เท่ากับ 0.4 ± 0.1 nM, 110 ± 12 nM และ 3200 ± 220 nM ตามลำดับ [10] ซึ่งผลจากการทำโมเลกุล docking ของ OTV สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายพันธุ์ พบว่ามีพลังงานในการยึดจับ เท่ากับ -6.96 -6.99 และ -6.57 kcal/mol สำหรับระบบ OTV-WT, OTV-H274Y และ OTV-R292K ตามลำดับ (ตารางที่ 1) จะเห็นว่าพลังงานในการยึดจับของระบบ H274Y ไม่ต่างจากระบบ WT มากนัก ในขณะที่ระบบ R292K มีพลังงานต่างจากระบบ WT ค่อนข้างมาก ซึ่งพลังงานการยึดจับของระบบ OTV-R292K ที่สูงกว่าอีกสองระบบเนื่องจากเมื่อกรดอะมิโน Arg ตำแหน่ง 292 กลายพันธุ์เป็น Lys ทำให้พันธะไฮโดรเจนที่เกิดกับ Arg292 จำนวน 2 พันธะที่พบในระบบ OTV-WT และ OTV-H274Y หายไป แต่เกิดพันธะไฮโดรเจนเพียง 1 พันธะ กับ Lys (ตารางที่ 2) ที่ได้กลายพันธุ์ไปถึงแม้กรดอะมิโน Arg กับ Lys เป็นกรดอะมิโนที่มีประจุบวกเหมือนกันแต่ Lys มีจำนวนคาร์บอนในหมู่ R น้อยกว่า Arg ทำให้สายโซ่สั้นกว่า พันธะไฮโดรเจนที่เกิดจึงไม่แข็งแรงเท่ากับของ Arg แสดงให้เห็นว่าการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง R292K มีผลต่อการคือยา OTV มากกว่าการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง H274Y ซึ่งสอดคล้องกับค่า IC₅₀จากการทดลอง [10]

สำหรับระบบ AGD-H274Y สาร AGD สารที่ 9 มีพลังงานในการยึดจับต่ำที่สุดเท่ากับ -8.98 kcal/mol รองลงมาเป็น 5 2 4 3 1 6 8 และ 7 มีพลังงานในการยึดจับเท่ากับ -8.37 -8.09 -7.85 -7.70 -7.36 -7.33 -7.29 และ -7.21 kcal/mol ตามลำดับ (ตารางที่ 1) แต่เมื่อพิจารณาจากการเกิดพันธะไฮโดรเจนพบว่า สาร AGD สารที่ 1 และ 5 เกิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโนของ N1 ใกล้เคียงกับยา OTV โดยเกิดพันธะกับตำแหน่ง R292 ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่สำคัญที่มีผลต่อการคือยา OTV และกรดอะมิโนอื่นๆ ที่สำคัญ ดังภาพที่ 3



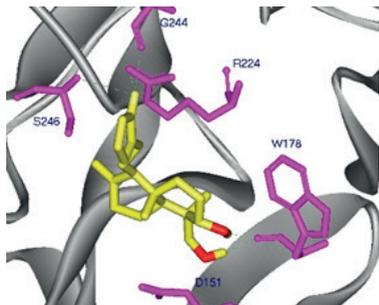
Andrographolide (1)-H274Y



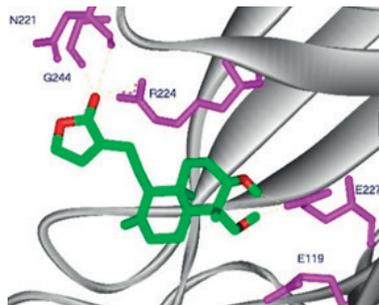
1,4 – deoxy Andrographolide_4 (5)-H274Y

ภาพที่ 3 การเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างสาร AGD สารที่ 1 และ 5 กับ N1 สายพันธุ์ H274Y

สำหรับระบบ AGD- R292K สาร AGD สารที่ 5 มีพลังงานในการยึดจับต่ำที่สุดเท่ากับ -8.85 kcal/mol รองลงมาเป็น 9 1 3 2 7 8 4 และ 6 มีพลังงานในการยึดจับเท่ากับ -8.68 -8.63 -7.63 -7.74 -7.44 -7.32 -7.26 และ -7.11 kcal/mol ตามลำดับ (ตารางที่ 1) แต่เมื่อพิจารณาจากการเกิดพันธะไฮโดรเจนพบว่าสาร AGD สารที่ 2 และ 3 มีการเกิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโนที่สำคัญของ N1 หลายพันธะ และมีพลังงานในการยึดจับค่อนข้างต่ำ (ภาพที่ 4)



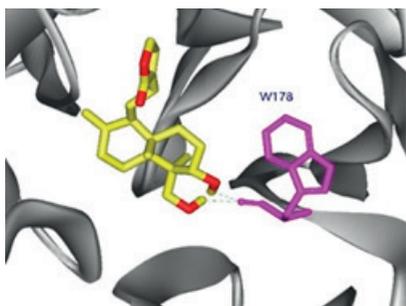
1,4 – deoxy Andrographolide_1 (2)-R292K



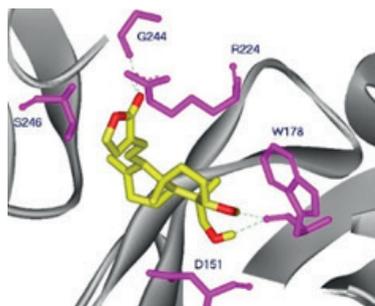
1,4 – deoxy Andrographolide_2 (3)-R292K

ภาพที่ 4 การเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างสาร AGD สารที่ 2 และ 3 กับ N1 สายพันธุ์ R292K

จากผลการทำโมเลกุลาร์ด็อกกิ้งพบว่าสำหรับระบบดั้งเดิม สาร AGD สารที่ 1, 5 และ 9 เกิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโนที่สำคัญใกล้เคียงกับยา OTV และระบบ H274Y สาร AGD สารที่ 1 และ 5 เกิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโนที่สำคัญใกล้เคียงกับยา OTV แสดงว่าสาร AGD 1 และ 5 มีโอกาสพัฒนาไปเป็นยารักษาโรคไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายพันธุ์ H274Y ได้อย่างไรก็ตามสาร AGD สารที่ 1 และ 5 ไม่เกิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโนที่สำคัญกับสายพันธุ์กลายพันธุ์ R292K ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีผลต่อการดื้อยาของ OTV ในขณะที่สาร AGD สารที่ 2 ซึ่งคือสาร 1,4-deoxy Andrographolide_1 เป็นสารที่มีโอกาสพัฒนาไปเป็นยารักษาโรคไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายพันธุ์ H274Y และ R292K เนื่องจากถึงแม้จะมีการกลายพันธุ์ไปแล้วก็ยังยึดจับ กับ N1 ได้ดีอยู่คือ มีพลังงานยึดจับกับสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายพันธุ์ H274Y และ R292K เท่ากับ -7.95 -8.09 และ -7.74 kcal/mol ตามลำดับ และเกิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโนที่สำคัญของ N1 อีก 2 สายพันธุ์ได้ดังแสดงในภาพที่ 5



1,4 – deoxy Andrographolide_1 (2)-WT



1,4 – deoxy Andrographolide_2 (3)-H273Y

ภาพที่ 5 การเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างสาร AGD สารที่ 2 กับ N1 สายพันธุ์ WT และ R292K

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาโมเลกุลาร์ดีอกกิ่งระหว่างโปรตีนนิวรามิเนด (NA) ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ 2009 H1N1 สายพันธุ์ WT และสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง H274Y และตำแหน่ง R292K กับยา OTV และสาร AGD ในฟ้าทะลายโจรจำนวน 9 โครงรูปผลการคำนวณของ OTV พบว่าพลังงานในการยึดจับของระบบ H274Y ไม่ต่างจากระบบ WT มากนัก ในขณะที่ระบบ R292K มีพลังงานต่างจากระบบ WT ค่อนข้างมากเนื่องจากพันธะไฮโดรเจนที่เกิดกับ Arg292 จำนวน 2 พันธะที่พบในระบบ OTV-WT และ OTV-H274Y หายไป แต่เกิดพันธะไฮโดรเจนเพียง 1 กับ Lys ที่ได้กลายพันธุ์ไปโดยมีพลังงานในการยึดจับเท่ากับ -6.96 -6.99 และ -6.57 kcal/mol สำหรับระบบ OTV-WT, OTV-H274Y และ OTV-R292K ตามลำดับ แสดงว่าความสามารถในการยึดจับ OTV-WT ~ OTV-H274Y > OTV-R292K ซึ่งสอดคล้องกับค่า IC50จากการทดลอง สำหรับผลการคำนวณของสาร AGD พบว่า สาร AGD 1 และ 5 มีโอกาสพัฒนาไปเป็นยารักษาโรคไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายพันธุ์ H274Y ในขณะที่สาร AGD สารที่ 2 ซึ่งก็คือสาร 1,4 - deoxy Andrographolide_1 เป็นสารที่มีโอกาสพัฒนาไปเป็นยารักษาโรคไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายพันธุ์ H274Y และ R292K เนื่องจากถึงแม้มีการกลายพันธุ์ไปแล้วก็ยังยึดจับกับ N1 ได้คืออยู่ที่ มีพลังงานยึดจับกับสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายพันธุ์ H274Y และ R292K เท่ากับ -7.95 -8.09 และ -7.74 kcal/mol ตามลำดับ และสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโนที่สำคัญของ N1 อีก 2 สายพันธุ์ได้

คำขอขอบคุณ

การวิจัยในครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย กองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยทักษิณ ประเภททุนวิจัยตามยุทธศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 ในหัวข้อวิจัยอันตรกิริยาระหว่าง โปรตีนนิวรามิเนดของไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ H1N1 กับสารออกฤทธิ์ในกลุ่ม ฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ด้วยเทคนิคโมเลกุลาร์ดีอกกิ่ง ขอขอบคุณ

เอกสารอ้างอิง

- [1] Albiñana, C.B., Machara, A., Řezáčová, P., Pachel, P., Konvalinka, J. and Kožíšek, M. (2016). “Kinetic, Thermodynamic and Structural Analysis of Tamiphosphor Binding to Neuraminidase of H1N1 (2009) Pandemic Influenza”, **European Journal of Medicinal Chemistry**. 121, 100-109.
- [2] Taubenberger, J.K. and Morens, D.M. (2006). “1918 Influenza: The Mother of all Pandemics”, **Emerging Infectious Diseases**. 12, 15-22.
- [3] Centers for Disease Control and Prevention. (2017). **Influenza Type A Viruses**. Retrieved 3 August 2016, from <https://www.cdc.gov/flu/avianflu/influenza-a-virus-subtypes.htm>.
- [4] Chamni, S. (2014). “Influenza Virus and Current Anti-influenza Drugs”, **Journal of Science and Technology**. 22, 258-271.
- [5] Rungrotmongkol, T., Yotmanee, P., Nunthaboot, N. and Hannongbua, S. (2011). “Computational Studies of Influenza A Virus at Three Important Targets: Hemagglutinin, Neuraminidase and M2 Protein”, **Current Pharmaceutical Design**. 17, 1720-1739.

- [6] Weinstock, D.M. and Zuccotti, G. (2009). “The Evolution of Influenza Resistance and Treatment”, **The Journal of the American Medical Association**. 301, 1066-1069.
- [7] Takashita, E., Ejima, M., Ogawa, R., Fujisaki, S., Neumann, G., Furuta, Y., Kawaoka, Y., Tashiro, M. and Odagiri, T. (2016). “Antiviral Susceptibility of Influenza Viruses Isolated from Patients Pre- and Post-Administration of Favipiravir”, **Antiviral Research**. 132, 170-177.
- [8] Chen JX, X.H., Ye WC, Fang BH, Liu YH, Yuan SH, Yu P, Wang YQ (2009). “Activity of Andrographolide and Its Derivatives Against Influenza Virus in Vivo and in Vitro”, **Biol Pharm Bull**. 32, 1385-1391.
- [9] Rungrotmongkol, T., Malaisree, M., Nunthaboot, N., Sompornpisut, P. and Hannongbua, S. (2010). “Molecular Prediction of Oseltamivir Efficiency Against Probable Influenza A (H1N1-2009) Mutants: Molecular Modeling Approach”, **Amino Acids**. 39, 393–398.
- [10] Vries, E.v.d., Anber, J., Linden, A.v.d., Wu, Y., Maaskant, J., Stadhouders, R., Beek, R.v., Rimmelzwaan, G., Osterhaus, A., Boucher, C., *et al.* (2013). “Molecular Assays for Quantitative and Qualitative Detection of Influenza Virus and Oseltamivir Resistance Mutations”, **The Journal of Molecular Diagnostics**. 15, 348-354.
- [11] Kongsune, P., Malee, S. and Doloh, P. (2015). “Inhibition of Influenza A Hemagglutinin H1N1 with Andrographolide and Derivatives”, **Thaksin University Journal**. 18, 41-48.
- [12] Wang, S.-Q., Cheng, X.-C., Dong, W.-L., Wang, R.-L., and Chou, K.-C. (2010). “Three New Powerful Oseltamivir Derivatives for Inhibiting the Neuraminidase of Influenza Virus”, **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 401, 188-191.
- [13] Rungrotmongkol, T., Frecer, V., De-Eknamkul, W., Hannongbua, S. and Miertus, S. (2009). “Design of Oseltamivir Analogs Inhibiting Neuraminidase of Avian Influenza Virus H5N1”, **Antiviral Research**. 82, 51-58.