

การทำนายศักยภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตายต่อโปรตีนเป้าหมาย ที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคอัลไซเมอร์บนคอมพิวเตอร์

In silico Prediction of the Potential of Bioactive Compounds from *Glycosmis pentaphylla* (Retz.) Against Protein Targets in Alzheimer's Disease

ณัฐพล ปาลวัฒน์¹ ชนิตโชติ ปิยพิทยานันต์¹ วรณธร เชื้อบุญมี¹ และภุภิกัทร ใจแก้ว^{1*}
Nattapol Palawat¹, Chanitchote Piyapittayanun¹, Varundhorn Chuaboonmee¹
and Phuphiphat Jaikaew^{1*}

บทคัดย่อ

เขยตายเป็นพืชสมุนไพรในตำรายาไทยหลายตำรับ มีฤทธิ์ด้านการอักเสบ ลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด ต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติยับยั้งโคลีนเอสเตอเรส (cholinesterase) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคอัลไซเมอร์ ในปัจจุบันยารักษาโรคอัลไซเมอร์มีผลข้างเคียงค่อนข้างมาก งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเข้าจับระดับโมเลกุลและอันตรกิริยาของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตาย 40 ชนิดกับโปรตีนเป้าหมายที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคอัลไซเมอร์ 46 ชนิด โดยมียาควบคุมเชิงบวกที่เกี่ยวข้องกับการรักษาโรคอัลไซเมอร์ 23 ชนิด ศึกษารูปแบบการเข้าจับกับระดับโมเลกุลและวิเคราะห์อันตรกิริยาผ่านโปรแกรมปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนและลิแกนด์ (PLIP) ผลการวิจัยพบว่าค่าพลังงานการยึดเกาะระหว่างแอลฟา-ฟีนิลลันโดล (α -phenylindole) กับโปรตีนเบต้า2-อะดรีเนอร์จิก (β 2-adrenergic) เท่ากับ -9.4 กิโลแคลอรีต่อโมล และจากการวิเคราะห์อันตรกิริยาพบว่าการเกิดพันธะไฮโดรเจน 1 ตำแหน่ง และเกิดแรงไฮโดรโฟบิก 7 ตำแหน่ง เทียบกับยาควบคุมเชิงบวกไรวาสติกมิน ซึ่งมีค่าพลังงานการยึดเกาะเท่ากับ -7.8 กิโลแคลอรีต่อโมล จึงบ่งชี้ได้ว่าแอลฟา-ฟีนิลลันโดลในเขยตายมีศักยภาพในการเข้าจับกับโปรตีนเบต้า2-อะดรีเนอร์จิกได้ดีกว่ายาไรวาสติกมิน (rivastigmine) นอกจากนั้นยังพบว่าแอลฟา-ฟีนิลลันโดลมีการเกิดแรงไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) ที่ซ้อนทับกับยาไรวาสติกมินอยู่ 4 ตำแหน่ง ได้แก่ VAL1114A PHE1193A PHE1289A และ TYR1308A การศึกษานี้สามารถนำไปสู่ทางเลือกการรักษาหรือบรรเทาอาการโรคอัลไซเมอร์ในอนาคต

คำสำคัญ: โรคอัลไซเมอร์ เขยตาย สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ การจำลองการเข้าจับกันของโมเลกุลอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุล

¹ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

* Corresponding author e-mail: pupipat@tu.ac.th

DOI: <https://doi.org/10.65217/wichchajinstru.2025.v44i1.263261>

Received: 4 May 2024, Revised: 22 June 2024, Accepted: 3 July 2024

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 are related to Alzheimer's disease (AD). Bioactive compounds might be considered as an alternative to current Alzheimer's medications, which exhibited many side effects. This study aims to investigate binding patterns between bioactive compounds from a medicinal plant *G. pentaphylla* (Retz.) against target proteins of AD using molecular docking techniques and molecular interactions that were identified through the PLIP program. The 40 bioactive compounds in *G. pentaphylla* (Retz.) and the 23 Food and Drug Administration (FDA)-approved drugs of AD were examined for the best binding energy among the 46 target proteins of AD. The result shows that the binding energy between α -phenylindole and β 2-adrenergic was -9.4 kilocalorie per mole (kcal/mol). The molecular interaction analysis found one hydrogen bond and seven hydrophobic forces. While the binding energy between Rivastigmine and β 2-adrenergic drug was -7.8 kcal/mol indicating that α -phenylindole had a better binding affinity to β 2-adrenergic. In addition, there were four overlapping binding sites of hydrophobic forces: VAL1114A, PHE1193A, PHE1289A, and TYR1308A on α -phenylindole and Rivastigmine. These results propose a potential alternative for treating or alleviating AD symptoms in the future.

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

บทนำ

องค์ความรู้ที่ได้จากการค้นพบและการใช้สืบทอดกันมายาวนานของบรรพบุรุษ ส่งผลให้ปัจจุบันสมุนไพรไทยได้รับความสนใจและมีการวิจัยด้านการสกัดและการประเมินประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ มากขึ้น ทั้งนี้เพื่อเป็นข้อมูลในการนำสมุนไพรมาใช้ประโยชน์อย่างเหมาะสมและปลอดภัย รวมถึงนำไปสู่การพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ยา เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง และในอาหารเสริม เป็นต้น เนื่องจากยารักษาโรคในปัจจุบันมีราคาสูงและมีผลข้างเคียงมาก

เขยตาย มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Glycosmis pentaphylla* จัดอยู่ในวงศ์ Rutaceae เป็นพืชสมุนไพรในตำรับยาไทยหลายตำรับ (Sintupachee and Ruang-On, 2022) มีลักษณะเป็นไม้พุ่มกึ่งไม้ยืนต้นขนาดเล็ก มีชื่อท้องถิ่นอื่น ๆ ว่า ส้มขึ้น ประยงค์ใหญ่ กระรอกน้ำ เขยตายแม่ยายชักปรก หญ้ายาง และชมขึ้น เป็นต้น มีการนำสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของเขยตายมาใช้ประโยชน์หลากหลายส่วนมากเป็นสารในกลุ่มอัลคาลอยด์และเอไมด์ มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ ลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด ต้านการอักเสบ (Chen *et al.*, 2022) ต้านเนื้องอก ต้านอนุมูลอิสระ ต้านไวรัส ต้านเชื้อรา

และแบคทีเรีย เป็นต้น (Sreejith *et al.*, 2012) นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติยับยั้งโคลีนเอสเตอเรส (cholinesterase) (Rahman *et al.*, 2017) ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคอัลไซเมอร์ อย่างไรก็ตาม การศึกษาสมบัติทางเภสัชวิทยาของเขยตายยังมีจำนวนน้อยมาก

อัลไซเมอร์ หรือโรคความจำเสื่อม เป็นโรคทางสมองเกี่ยวข้องกับความเสี่ยงของเซลล์ประสาทในสมองที่ค่อย ๆ ทำลายความจำและทักษะการคิด สูญเสียการทำงานของรับรู้ การใช้เหตุผล และความสามารถทางพฤติกรรมจนถึงระดับที่รบกวนชีวิตประจำวันและกิจกรรมต่าง ๆ สาเหตุของโรคอัลไซเมอร์ยังไม่แน่ชัด แต่มีรายงานสมมติฐานหลัก ๆ ประการแรก คือ เมื่อเบตา-อะมิลอยด์ (β -amyloid) สลายจะให้อนุมูลอิสระออกมาทำให้เกิดสภาวะที่เอื้อต่อความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน และกระตุ้นให้เซลล์ประสาทเกิดการอักเสบ รวมทั้งภาวะสมดุลของแคลเซียม หากขาดภาวะสมดุลแคลเซียมส่งผลเสียต่อระบบประสาทและสมอง ประการที่สอง คือ อัตราการสังเคราะห์สารสื่อประสาทชนิดอะเซทิลโคลีน (acetylcholine) ในสมองลดลงส่งผลต่อการทำงานของเซลล์ประสาท ทำให้การทำงานของสมองสูญเสียอย่างต่อเนื่อง (Agarwal *et al.*, 2020) ในปัจจุบันมียารักษาโรคอัลไซเมอร์ที่ได้รับการขึ้นทะเบียนจากองค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกาจำนวนน้อย ราคาแพง และมีผลข้างเคียงค่อนข้างมาก เช่น อาการข้างเคียงที่เกิดจากยาไรวาสติกมิน (rivastigmine) ได้แก่ อาเจียน เบื่ออาหาร เวียนศีรษะ ปวดท้อง ท้องร่วง อ่อนเพลียเพื่อยแรง เหงื่อออก น้ำหนักลด ง่วงซึม และเป็นลมหมดสติ (Mimica and Presecki, 2009) อย่างไรก็ตามเคยมีรายงานว่าเขยตายมีฤทธิ์ในการยับยั้งอะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส (acetylcholinesterase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ยับยั้งอะเซทิลโคลีนและมีฤทธิ์ด้านการเกิดออกซิเดชัน (Rahman *et al.*, 2017) จึงเป็นที่มาของงานวิจัยนี้ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการจำลองการจับของโมเลกุล (molecular docking) ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตายกับโปรตีนเป้าหมายที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคอัลไซเมอร์ เพื่อพิจารณาว่าสารสกัดจากเขยตายมีประสิทธิภาพในการยับยั้งโปรตีนเป้าหมายที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคอัลไซเมอร์ได้หรือไม่ และเพื่อประเมินศักยภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตายต่อโรคอัลไซเมอร์ ซึ่งคาดว่าจะทำให้ได้ข้อมูลที่สำคัญสำหรับทางเลือกในการรักษาหรือป้องกันโรคอัลไซเมอร์ ทั้งยังมีส่วนสนับสนุนข้อมูลของตำรายาไทยให้มีความน่าเชื่อถือมากขึ้น ซึ่งเป็นการส่งเสริมภูมิปัญญาไทยในอีกทางหนึ่งด้วย

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การคัดเลือกโครงสร้างสามมิติของสารประกอบ โปรตีน และยา

1.1 การคัดเลือกโครงสร้างสามมิติของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตายจากส่วนของลำต้น ราก และใบ ที่ผ่านการจำแนกด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรเมทรี (gas chromatography mass spectrometry: GC-MS) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากงานวิจัยของ นภกษมนชนัน และคณะ (2563) ทำการค้นหาโครงสร้างสามมิติ 40 ชนิด จาก 44 ชนิด โดย 2 ชนิด 'ไม่พบโครงสร้างข้อมูล' ได้แก่ 1-Allyl-3,6-dimethylindole-4,7-dione และ 6-methoxy-7-3-methylbut-2-enyl-,1,3dioxole(4,5-h)quinoline-8-one อีก 2 ชนิดโครงสร้างไม่สมบูรณ์ ได้แก่ beta-Pinene และ beta-Acoradiene จากฐานข้อมูล Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) ทำการดาวน์โหลดโครงสร้างสามมิติในรูปแบบไฟล์นามสกุล *.sdf (ตารางที่ 1-3)

ตารางที่ 1 การวิเคราะห์สารสกัดหยาบจากส่วนลำต้นของเขยตายโดยวิธี GC-MS

ชื่อของสารประกอบ	รีเทนชันไทม์ (นาทีก)	ค่าสัญญาณ
1. acetic acid	4.2	1,270,940
2. 2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one	12.08	158,039
3. tetradecane	14.73	144,461
4. 2,3,6-Trimethylphenol	16.19	115,768
5. cytidine	17.82	485,156
6. dodecane	19.37	258,136
7. hexadecanoic acid, methyl ester	20.70	342,806
8. n-Hexadecanoic acid	21.44	683,953
9. heptadecane	22.28	129,298
10. methyl stearte	22.58	115,669
11. A, 17-Octadecadienal	23.05	799,429
12. octadecanoic acid	23.22	298,526
13. 1-Methoxy-3-methyl-9H-carbazole	24.09	686,676
14. 6-Methoxy-7-3-methylbot-2-enyl-1,3-dioxolo [4,5] quinoline-8-one	25.67	5,084,207
15. vitamin E	27.48	178,729

ที่มา: นภกษมนฑน์ และคณะ (2563)

ตารางที่ 2 การวิเคราะห์สารสกัดหยาบจากส่วนใบของเขยตายโดยวิธี GC-MS

ชื่อของสารประกอบ	รีเทนชันไทม์ (นาทีก)	ค่าสัญญาณ
1. 1-Vinyl-aziridine	3.90	2,133,754
2. acetic acid	4.58	1,493,681
3. N-(2-Methylbutylidene) isobutylami	7.04	819,579
4. 2-Propenamide	8.65	545,232
5. 1-(2-Methyl-propenyl)-aziridine	18.17	2,763,887
6. hexadecanoic acid	21.54	4,206,767
7. phytol	22.53	3,861,226
8. 9,12,15-Octadecatrien	23.14	3,383,507
9. octadecanoic acid	23.28	2,143,245
10. thioanthranilic acid	24.64	1,564,362
11. 3-Indazolone	25.28	9,847,250

ที่มา: นภกษมนฑน์ และคณะ (2563)

ตารางที่ 3 การวิเคราะห์สารสกัดหยาบจากส่วนรากของเขยตายโดยวิธี GC-MS

ชื่อของสารประกอบ	รีเทนชันไทม์ (นาที)	ค่าสัญญาณ
1. acetic acid	5.32	4,327,974
2. furfural	6.23	321,653
3. 2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one	12.05	1,357,509
4. 2-Furancarboxaldehyde,5-(hydroxymethyl)	13.78	469,840
5. (-)-beta-Pinene	14.75	778,826
6. zingiberene	14.94	1,329,183
7. gamma-Mourolene	15.04	816,677
8. (-)-beta-Acoradiene	15.64	1,687,154
9. gamma-Pyronene	16.04	4,020,751
10. 1,3,6-Octatriene,3,7-dimethyl	16.23	9,334,633
11. methyl palmitate	20.70	685,387
12. alpha-prenylindole	18.85	1,001,895
13. hexadecanoic acid	21.50	3,689,426
14. 1-Allyl-3,6-dimethylindole-4,7-dione	22.69	392,728
15. linoleic acid	23.18	5,647,256
16. 1-methoxy-3-methyl-9H-carbazole	24.18	8,190,660
17. 6-methoxy-7-(3-methylbut-2-enyl)-1,3 dioxole (4,5-h)quinoline-8-one	25.97	10,585,483
18. 3-Methoxy-1,2-dimethyl-9H-carbazol-4-one	26.72	8,110,113
19. squalene	28.77	526,126

ที่มา: นภกษมนธ์ และคณะ (2563)

1.2 การคัดเลือกโครงสร้างสามมิติของโปรตีนเป้าหมาย 46 ชนิดที่แตกต่างกัน และทั้งหมดเป็นโปรตีนที่พบในมนุษย์ จากฐานข้อมูลโปรตีน โดยได้รับความอนุเคราะห์ข้อมูลชนิดของโปรตีนเป้าหมายจากงานวิจัยของธนพร (2565) ลำดับถัดมานำรหัส Uniprot ID ของโปรตีนเป้าหมายมาใช้ในการค้นหาโครงสร้างสามมิติ ในฐานข้อมูล RCSB PDB (<https://www.rcsb.org/>) และทำการดาวน์โหลดไฟล์นามสกุล *.pdb

1.3 การคัดเลือกข้อมูลยาควบคุมเชิงบวกที่เกี่ยวข้องกับการรักษาโรคอัลไซเมอร์ ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์ข้อมูลจากงานวิจัยของธนพร (2565) ได้แก่ ยาที่ใช้ในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ 23 ชนิด จากนั้นเข้าสู่เว็บไซต์ของ DrugBank (<https://go.drugbank.com/>) ดาวน์โหลดโครงสร้างสามมิติของยาในรูปแบบไฟล์นามสกุล *.pdb

2. การเตรียมไฟล์ข้อมูล

2.1 การเตรียมไฟล์ข้อมูลสำหรับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขตยาควบคุมเชิงบวกที่เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์ ใช้ไฟล์โครงสร้างสามมิติที่ได้ทำการดาวน์โหลดมาจากในขั้นตอนก่อนหน้านี้ เริ่มจากการปรับโครงสร้างของไฟล์ให้เหมาะสมโดยใช้โปรแกรม Avogadro และบันทึกไฟล์นามสกุล *.pdb จากนั้นใช้โปรแกรม Discovery studio ในการเพิ่มไฮโดรเจน และทำการคำนวณประจุทั้งก่อนและหลังการเพิ่มไฮโดรเจน สุดท้ายทำการบันทึกไฟล์นามสกุล *.pdb

2.2 การเตรียมข้อมูลสำหรับโปรตีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์ โดยใช้ไฟล์โครงสร้างสามมิติของโปรตีนเป้าหมายที่ได้ทำการดาวน์โหลดมาจากขั้นตอนก่อนหน้านี้ เริ่มจากการตรวจสอบโครงสร้าง และเตรียมโครงสร้างไฟล์ให้ถูกต้องเหมาะสม โดยใช้เครื่องมือการเตรียมโปรตีน (protein preparation workflow) จากแถบเมนูของโปรแกรม Maestro บันทึกโครงสร้างโปรตีนนามสกุล *.pdb จากนั้นใช้โปรแกรม Discovery studio ในการเพิ่มไฮโดรเจน และทำการคำนวณประจุทั้งก่อนและหลังการเพิ่มไฮโดรเจน สุดท้ายทำการบันทึกไฟล์นามสกุล *.pdb

3. การทำนายบริเวณเข้าจับของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขตยาควบคุมเชิงบวกในโปรตีนเป้าหมายและตำแหน่งเร่งปฏิกิริยาบนโครงสร้างสามมิติของโปรตีน

นำโปรตีนที่ได้เตรียมไฟล์ไว้เหมาะสมแล้วจากขั้นตอนก่อนหน้านี้ในรูปแบบของไฟล์นามสกุล *.pdb มาทำนายตำแหน่งการเข้าจับกับสารตั้งต้นผ่าน PrankWeb (<https://prankweb.cz>) จากนั้นดาวน์โหลดไฟล์ ซึ่งประกอบด้วยไฟล์หลัก 2 ไฟล์ ได้แก่ ไฟล์ structure.pdb_prediction.csv แสดงผลของจำนวนตำแหน่งที่เข้าจับกับสารตั้งต้นของโปรตีนและพิกัด (center x y และ z) ของตำแหน่งที่สารตั้งต้นเข้าจับกับโปรตีน และไฟล์ structure.pdb_residues.csv แสดงผลของตำแหน่งและชนิดของกรดอะมิโนที่ปรากฏในแต่ละตำแหน่งของบริเวณที่เข้าจับกับโปรตีน

4. การเตรียมไฟล์ข้อมูลของยาควบคุมเชิงบวกที่เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์ และโปรตีนเป้าหมายสำหรับการจำลองการเข้าจับกันของโมเลกุล

4.1 การเตรียมไฟล์ข้อมูลสำหรับการทดสอบการเข้าจับกับโปรตีนเป้าหมายของยาควบคุมเชิงบวกที่เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์ และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขตยา โดยใช้โปรแกรม Autodock tools เพื่อส่งข้อมูลออกมาเป็นไฟล์นามสกุล *.pdbqt

4.2 การเตรียมไฟล์ข้อมูลสำหรับโปรตีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์ โดยใช้โปรแกรม Autodock tools เพื่อตรวจสอบความสมบูรณ์ของไฟล์จากขั้นตอนก่อนหน้านี้ จะดำเนินการลบโมเลกุลของน้ำที่ยังคงหลงเหลืออยู่ ออก ทำการเติมไฮโดรเจน และคำนวณประจุโดยรวมอีกครั้ง เพื่อให้มั่นใจว่าโครงสร้างอะตอมทั้งหมดสมบูรณ์ ก่อนทำการส่งข้อมูลออกมาเป็นไฟล์นามสกุล *.pdbqt จากนั้นทำการกำหนดค่าตำแหน่งศูนย์กลาง x y z ตามผลการทำนายของโปรแกรม Prankweb และกำหนดขนาดของกล่องพลังงาน x y z เป็น 40 40 40 อังสตรอม ตามลำดับ เพื่อให้ครอบคลุมบริเวณเข้าจับ (binding site) ของโปรตีนเป้าหมายที่กำหนดจากผลการทำนายของโปรแกรม Prankweb

5. ทดสอบการเข้าจับกันระหว่างโมเลกุล

โดยทำการทดสอบหาค่าพลังงานการเข้าจับระหว่างโมเลกุล (multiple molecular docking) ด้วย Autodock vina ซึ่งจะทำงานผ่านโปรแกรม Git bash ในขั้นตอนนี้ประกอบด้วย ไฟล์โครงสร้างสามมิติโปรตีนเป้าหมาย (*.pdbqt) ไฟล์โครงสร้างสามมิติของยา (*.pdbqt) ไฟล์โครงสร้างสามมิติของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตาย (*.pdbqt) ไฟล์พารามิเตอร์สำหรับกำหนดค่าข้อมูลที่เป็นของโปรแกรม (*.txt) ดังภาพที่ 1 ไฟล์ vina.exe ไฟล์ vina_license.rtf และ 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 1 ตัวอย่างการกำหนดค่าในไฟล์พารามิเตอร์ config.txt

ดำเนินการประมวลผลการทำงานของโปรแกรมโดยใช้การสั่งงานภายใต้ command line ของ Autodock vina โดยใช้ไฟล์ข้อมูลทั้งหมดที่เตรียมไว้ก่อนหน้านี้ เมื่อสิ้นสุดการประมวลผล จะได้ผลลัพธ์ 2 ไฟล์ คือ ไฟล์นามสกุล *.log เป็นไฟล์ที่เก็บตารางข้อมูลค่าพลังงานของการเข้าจับกันของโปรตีนและลิแกนด์ และไฟล์นามสกุล *.pdbqt เป็นไฟล์โครงสร้างของลิแกนด์ที่มีการเข้าจับกับตำแหน่งของโปรตีนเป้าหมาย ก่อนทำการทดสอบการเข้าจับกันของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตายกับโปรตีนเป้าหมายของโรคอัลไซเมอร์ โปรตีนเป้าหมายจะถูกทดสอบความถูกต้องในการเข้าจับกับสารหรือยาเดิมก่อนด้วยเทคนิครี-ด็อกกิ้ง (re-docking) ตัวอย่างผลการทดสอบ เพื่อดูการเข้าจับระหว่างตัวรับโปรตีนเบต้า2-อะดรีเนอร์จิก ($\beta 2$ adrenergic receptor) กับยาอาริพิราโซล (aripiprazole) พบว่ามีการเข้าจับในตำแหน่งการจับ (pocket binding site) เดียวกันและให้ค่าพลังงานการยึดเกาะคงที่เท่ากับ -10 กิโลแคลอรีต่อโมล ทั้ง 3 ซ้ำ และในขณะเดียวกันได้ทำการทดสอบนำยาที่เกี่ยวข้องกับการรักษาอัลไซเมอร์ทั้งหมดไปทำการเข้าจับกับโปรตีนเป้าหมายอื่น ๆ ด้วยเทคนิคครอส-ด็อกกิ้ง (cross-docking)

ในการทดสอบการเข้าจับกันระหว่างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตายและยาควบคุมเชิงบวกที่เกี่ยวข้องกับการรักษาโรคอัลไซเมอร์กับโปรตีนเป้าหมายของการเกิดโรคอัลไซเมอร์จะถูกทำซ้ำคู่ละ 3 ซ้ำ ในแต่ละซ้ำจะกำหนดตำแหน่งเข้าจับสำหรับการหาตำแหน่งในการเข้าจับกันที่เป็นไปได้ทั้งหมด 10 ตำแหน่ง โดยจะเลือกบริเวณเข้าจับในโปรตีนเป้าหมายที่ดีที่สุดของทุกโปรตีนแล้วทำการเลือกค่าพลังงานการยึดเกาะที่ดีที่สุดสำหรับการรายงานผล และนำไปวิเคราะห์อันตรกิริยาในขั้นตอนต่อไป

6. การแสดงผลของการทดสอบการเข้าจับระหว่างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตาย กับโปรตีนเป้าหมายของการเกิดโรคอัลไซเมอร์และยาควบคุมเชิงบวก และการวิเคราะห์อันตรกิริยา

นำไฟล์โครงสร้างลิแกนด์ที่เข้าจับกับโปรตีนเป้าหมายที่ให้ค่าพลังงานการเข้าจับดีที่สุด จากการทดสอบการเข้าจับกันระหว่างโมเลกุลมาเปิดในโปรแกรม Autodock tools จากนั้นบันทึกไฟล์ของลิแกนด์ที่ให้ค่าคะแนนการเข้าจับที่ดีที่สุดเป็นนามสกุล *.pdb ต่อมานำไฟล์ลิแกนด์ในการเข้าจับที่ดีที่สุดและไฟล์ของโปรตีนเป้าหมายที่ใช้ มาเปิดในโปรแกรม PyMol เพื่อแสดงผลเป็นภาพของลิแกนด์ที่เข้าจับกับโปรตีนในตำแหน่งที่มีค่าคะแนนการเข้าจับที่ดีที่สุด แล้วบันทึกไฟล์นามสกุล *.pdb และ *.png ขั้นตอนต่อมาทำการจัดเรียงอะตอมและพันธะใหม่ให้ถูกต้องด้วยการแปลงไฟล์นามสกุล *.pdb ผ่านโปรแกรม Open Babel GUI สุดท้ายนำไฟล์นามสกุล *.pdb ที่ได้ ไปวิเคราะห์อันตรกิริยาผ่านโปรแกรมปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนและลิแกนด์ (PLIP) (<https://plip-tool.biotec.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>) และทำการดาวน์โหลดไฟล์ผลการวิเคราะห์อันตรกิริยาที่อยู่ในรูปนามสกุล *.png *.pse และ *.RST

ผลการวิจัย

1. ผลการคัดเลือกโครงสร้างสามมิติของสารประกอบ โปรตีน และยา

ผลการคัดเลือกโครงสร้างสามมิติของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตาย 40 ชนิด โปรตีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์ 46 ชนิด และยาควบคุมเชิงบวกที่ใช้ในการรักษาและเกี่ยวข้องกับอาการของโรคอัลไซเมอร์ 23 ชนิด ดังตารางที่ 4 จากผลการคัดเลือกโปรตีนเป้าหมายที่ใช้เป็นแม่แบบในการทำการจำลองการเข้าจับกันของโมเลกุลนั้น ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบความเหมือนกันของลำดับโปรตีนเป้าหมายที่รวบรวมมาจาก UniProt กับลำดับของโปรตีนแม่แบบจากฐานข้อมูล PDB โดยใช้โปรแกรม SIM ในฐานข้อมูล ExPasy (<https://web.expasy.org/sim/>) ผลการทดลองแสดงตัวอย่างของโปรตีนเบต้า2-อะดรีเนอร์จิก (β 2-adrenergic) รหัส UniProt ID (P07550) และ PDB ID (6N48) มีค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกัน (identity) ที่ 90 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4 การคัดเลือกโครงสร้างสามมิติ

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

2. ผลการทำนายบริเวณเข้าจับของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตายและยาควบคุมเชิงบวกในโปรตีนเป้าหมาย

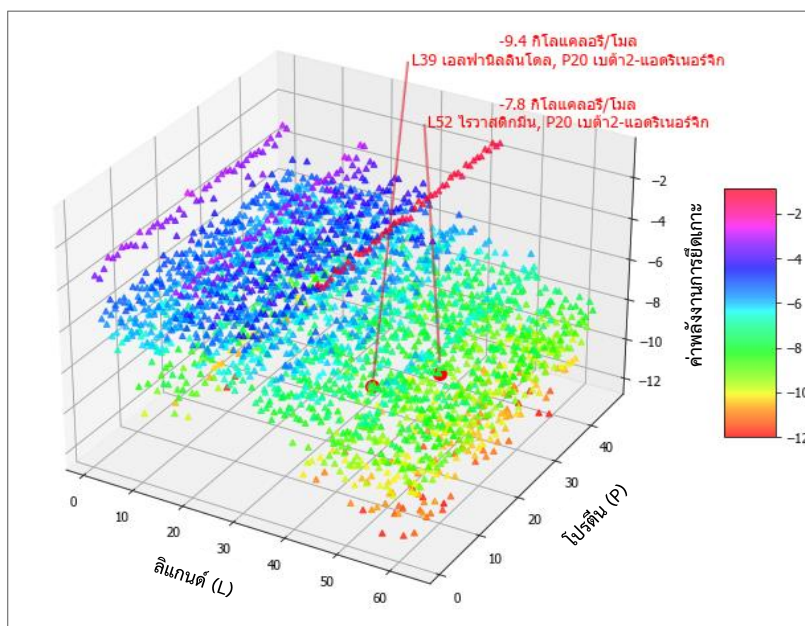
การทำนายบริเวณเข้าจับของสารตั้งต้นในโปรตีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์ และตำแหน่งเร่งปฏิกิริยาบนโครงสร้างสามมิติของโปรตีน ดำเนินการผ่านโปรแกรม PrankWeb ผลการทำนายบริเวณเข้าจับของโครงสร้างโปรตีนเบต้า2-อะดรีเนอร์จิก ดังตารางที่ 5 แสดงจำนวนบริเวณเข้าจับที่ทำนายได้สูงสุด 5 ลำดับแรกจากทั้งหมด 15 บริเวณ โดยบริเวณเข้าจับที่บริเวณที่ 1 มีความน่าจะเป็นสูงสุดเท่ากับ 0.802 หรือ 80.2 เปอร์เซ็นต์ ที่สารตั้งต้นสามารถเข้าจับได้ดีที่สุด

ตารางที่ 5 บริเวณเข้าจับของโครงสร้างโปรตีนเบต้า2-อะดรีเนอร์จิก 5 ตำแหน่งแรกที่มีความน่าจะเป็นดีที่สุด

บริเวณเข้าจับ	คะแนน	ความน่าจะเป็น	แกน X	แกน Y	แกน Z
บริเวณที่ 1	17.54	0.802	-4.1435	-11.7452	-50.6396
บริเวณที่ 2	6.82	0.381	1.8138	-14.9628	-58.4809
บริเวณที่ 3	4.35	0.194	-4.0970	-0.3344	-34.2454
บริเวณที่ 4	3.50	0.132	0.8100	-13.0921	-7.9508
บริเวณที่ 5	2.56	0.074	-14.3616	-20.0693	-49.4921

3. ผลการทดสอบการเข้าจับกันระหว่างโมเลกุล

ผลการทดสอบการเข้าจับกันระหว่างโมเลกุลด้วยโปรแกรม Autodock vina โดย ลิแกนด์ คือ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตาย 40 ชนิด และยาควบคุมเชิงบวกที่ใช้ในการรักษา โรคอัลไซเมอร์ 23 ชนิดกับโปรตีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคอัลไซเมอร์ 46 ชนิด แสดงผลการจำลองการเข้าจับกันเชิงโมเลกุล จากการทดสอบทั้งหมด 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำดำเนินการหาความน่าจะเป็นในการเข้าจับทั้งหมด 10 ตำแหน่ง และทำการรายงานผลเฉพาะตำแหน่งที่ให้ค่าพลังงานการยึดจับกันที่ดีที่สุดเพียงตำแหน่งเดียวจากทั้งหมดทุกซ้ำ โดยกำหนดให้ค่าพลังงานการยึดเกาะที่ดีที่สุดมีค่าเข้าใกล้สีแดง (-12.00 กิโลแคลอรีต่อโมล) ในขณะที่กำหนดให้ค่าพลังงานการยึดเกาะที่แย่ที่สุดมีค่าเข้าใกล้สีชมพูเข้ม (-2.00 กิโลแคลอรีต่อโมล) ดังภาพที่ 2



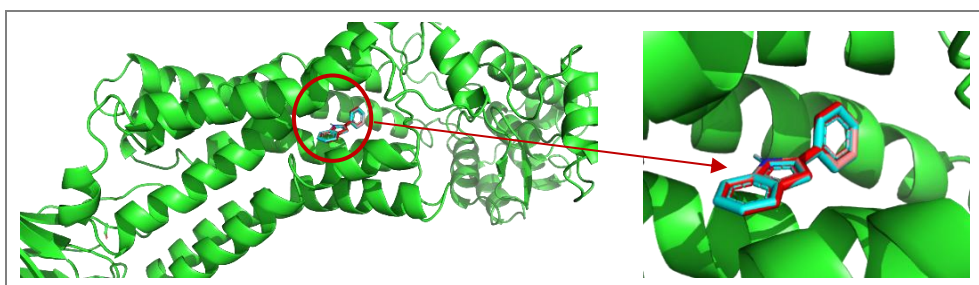
ภาพที่ 2 แผนภูมิการกระจายแบบจุดของพลังงานการยึดเกาะระหว่างลิแกนด์และโปรตีนเป้าหมาย โดยแกน X Y และ Z คือ ลิแกนด์ โปรตีน และค่าพลังงานการยึดเกาะระหว่างลิแกนด์และโปรตีนเป้าหมาย ตามลำดับ

จากโปรตีนเป้าหมายทั้งหมด 46 ชนิด และสารออกฤทธิ์ในเขยตายทั้งหมด 40 ชนิด ผลการทดลองพบว่าการเข้าจับระหว่างโปรตีนเบต้า2-อะดรีเนอร์จิกกับแอลฟาฟีนิลลินโดลในเขยตายมีความน่าสนใจ เนื่องจากมีค่าพลังงานการยึดเกาะเท่ากับ -9.4 กิโลแคลอรีต่อโมล ซึ่งมีค่าดีกว่าเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกับยาควบคุมเชิงบวกระหว่างไรวาสติกมีนกับโปรตีนเบต้า2-อะดรีเนอร์จิก ซึ่งมีค่าพลังงานการยึดเกาะเท่ากับ -7.8 กิโลแคลอรีต่อโมล แสดงให้เห็นว่าแอลฟา-ฟีนิลลินโดล (α -phenylindole) จากเขยตายมีศักยภาพในการเข้าจับกับโปรตีนเบต้า2-อะดรีเนอร์จิกได้ดีกว่ายาไรวาสติกมีน ดังตารางที่ 6 แสดงผลการเข้าจับกันของแอลฟา-ฟีนิลลินโดลและไรวาสติกมีนต่อโปรตีนเบต้า2-อะดรีเนอร์จิก ดังภาพที่ 3 และ 4 ตามลำดับ

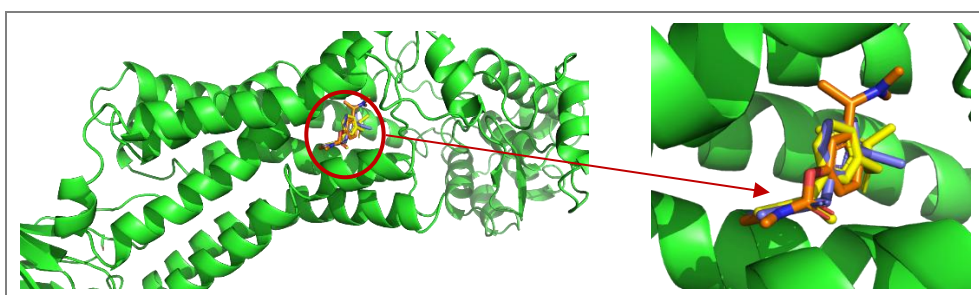
มีการรายงานว่าความผิดปกติของเบต้า2-อะดรีเนอร์จิกส่งผลต่อการเพิ่มการสะสมเบตา-อะมีลอยด์ โดยลดการทำงานของแอลฟา-ซีเครเตส และลดจำนวนแขนงของเดนไดรต์ ส่งผลต่อประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำ เป็นสาเหตุในการเกิดโรคอัลไซเมอร์ได้ (Wu *et al.*, 2017)

ตารางที่ 6 ค่าพลังงานการยึดเกาะระหว่างลิแกนด์แอลฟา-ฟีนิลลินโดลและยาไรวาสติกมีนกับโปรตีนเป้าหมายเบต้า2-อะดรีเนอร์จิก

โปรตีนเป้าหมาย	ลิแกนด์	ค่าพลังงานการยึดเกาะ (กิโลแคลอรีต่อโมล)
เบต้า2-อะดรีเนอร์จิก	แอลฟา-ฟีนิลลินโดล	-9.4
เบต้า2-อะดรีเนอร์จิก	ไรวาสติกมีน	-7.8



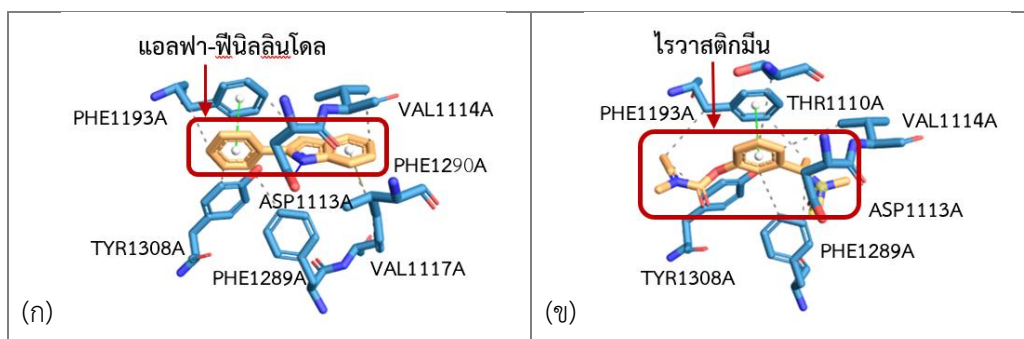
ภาพที่ 3 โครงสร้างโมเลกุลการเข้าจับกันระหว่างแอลฟา-ฟีนิลลินโดล (เข้าครั้งที่ 1: สีชมพู เข้าครั้งที่ 2: สีฟ้า และเข้าครั้งที่ 3 สีแดง) กับเบต้า2-อะดรีเนอร์จิก PDB ID: 6N48 (สีเขียว)



ภาพที่ 4 โครงสร้างโมเลกุลการเข้าจับกันระหว่างไรวาสติกมีน (เข้าครั้งที่ 1: สีน้ำเงิน เข้าครั้งที่ 2: สีส้ม และเข้าครั้งที่ 3 สีเหลือง) กับเบต้า2-อะดรีเนอร์จิก PDB ID: 6N48 (สีเขียว)

4. การวิเคราะห์อันตรกิริยา

จากการวิเคราะห์อันตรกิริยาของโครงสร้างแอลฟา-ฟีนิลลินโดลเปรียบเทียบกับไรวาสติกมินในการเข้าจับกับโปรตีนเบต้า2-อะดรีเนอร์จิก ผ่านโปรแกรม PLIP พบว่าในการยึดเกาะของแอลฟา-ฟีนิลลินโดลกับเบต้า2-อะดรีเนอร์จิก เกิดพันธะไฮโดรเจน 1 ตำแหน่งที่บริเวณโซ่ข้าง (side chain) คือ ASP1113A เกิดแรงไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) 7 ตำแหน่ง อีกทั้งเกิดการเรียงซ้อนพาย (π -Stacking) ที่ตำแหน่ง PHE1193A และ PHE1290A ส่วนการยึดเกาะของไรวาสติกมินกับเบต้า2-อะดรีเนอร์จิก ไม่มีการเกิดพันธะไฮโดรเจน เกิดแรงไฮโดรโฟบิก 7 ตำแหน่ง อีกทั้งเกิดการเรียงซ้อนพายที่ตำแหน่ง PHE1193A และเกิดสะพานเกลือ (salt bridges) ที่ตำแหน่ง ASP1113A นอกจากนี้พบว่าแอลฟา-ฟีนิลลินโดลและไรวาสติกมิน มีการเกิดแรงไฮโดรโฟบิกที่ตำแหน่งเดียวกัน 4 ตำแหน่ง ได้แก่ VAL1114A PHE1193A PHE1289A และ TYR1308A ซึ่งอาจพิจารณาได้ว่าแอลฟา-ฟีนิลลินโดลและไรวาสติกมินเข้ายับยั้งการทำงานของโปรตีนเบต้า2-อะดรีเนอร์จิกแบบแข่งขันในการยึดเกาะบริเวณเดียวกัน ดังภาพที่ 5



ภาพที่ 5 การเกิดแรงไฮโดรโฟบิก (เส้นประสีเทา) การเรียงซ้อนพาย (เส้นประสีเขียว) และสะพานเกลือ (เส้นประสีเหลือง) ของแอลฟา-ฟีนิลลินโดล (ก) และไรวาสติกมิน (โครงสร้างสีส้ม) (ข) กับโปรตีนเบต้า2-อะดรีเนอร์จิก (โครงสร้างสีฟ้า)

การอภิปรายผลการวิจัย

ในผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ มีการรายงานว่าโปรตีนเบตา-อะมีลอยด์สามารถเข้าจับกับเซลล์ไมโครเกลีย เกิดการส่งสัญญาณของเซลล์ไปกระตุ้นกระบวนการที่ทำให้เกิดการอักเสบ และมีความสัมพันธ์กับโรคอัลไซเมอร์ (Liu *et al.*, 2019) นอกจากนี้มีรายงานว่าปฏิกิริยาออกซิเดชันเป็นปัจจัยสำคัญในการเกิดโรคอัลไซเมอร์ มีการประเมินคุณสมบัติต่าง ๆ ของสารสกัดจากใบเขยตาย ผลการทดลองปรากฏว่ามีศักยภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) (Rahman *et al.*, 2017) ด้านอักเสบ (Soma *et al.*, 2019) รวมทั้งมีการศึกษาพบว่าความผิดปกติของเบต้า2-อะดรีเนอร์จิกส่งผลต่อการเพิ่มการสะสมเบตา-อะมีลอยด์ (Wu *et al.*, 2017) จากผลการทดลองสนับสนุนที่กล่าวมาข้างต้นมีความสอดคล้องกับผลการทดลองในงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าเขยตายอาจมีศักยภาพในการยับยั้งหรือป้องกันการเกิดโรคอัลไซเมอร์ อันมีสาเหตุมาจากการอักเสบของระบบประสาท การเกิดออกซิเดชัน และการสะสมเบตา-อะมีลอยด์ การศึกษานี้

ได้เพิ่มความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับการยึดเกาะระดับโมเลกุลและอันตรกิริยาของโครงสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตายกับโครงสร้างโปรตีนเป้าหมายที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคอัลไซเมอร์ งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการยึดเกาะระดับโมเลกุลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตายต่อโปรตีนที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคอัลไซเมอร์ด้วยเทคนิคทางชีวสารสนเทศเป็นครั้งแรก ผลจากงานวิจัยสามารถเป็นแนวทางต่อยอดองค์ความรู้เพื่อศึกษาทดลองในห้องปฏิบัติการ สัตว์ทดลอง และการวิจัยในคน เพื่อยืนยันความน่าเชื่อถือของงานวิจัยนำไปสู่การประยุกต์ใช้ได้จริง หรือการใช้เทคนิคทางชีวสารสนเทศเพื่อการศึกษาต่อเนื่องในด้านการจำลองพลวัตทางโมเลกุล การทำนายหาคุณสมบัติทางเภสัชวิทยา หรือการศึกษาเกี่ยวกับสาเหตุอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคอัลไซเมอร์ นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มข้อมูลเชิงลึกเกี่ยวกับสมุนไพรรักษาเพื่อเป็นแนวทางต่อยอดองค์ความรู้ พัฒนาสมุนไพรรักษาให้เกิดประโยชน์อย่างมีประสิทธิภาพ เสริมสร้างคุณภาพชีวิต และเศรษฐกิจต่อไป

สรุปผลการวิจัย

ผลการทดลองในส่วนการคัดเลือกโครงสร้างสามมิติ ได้โครงสร้างของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตายจากฐานข้อมูล PubChem จำนวน 40 ชนิด โครงสร้างของโปรตีนเป้าหมายที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคอัลไซเมอร์จากฐานข้อมูลฐานข้อมูล PDB จำนวน 46 ชนิด และโครงสร้างของยาควบคุมเชิงบวกที่เกี่ยวข้องกับการรักษาโรคอัลไซเมอร์จาก DrugBank จำนวน 23 ชนิด ผลการทดลองส่วนของการทำนายบริเวณเข้าจับผ่าน PrankWeb พบว่าโปรตีนเบต้า2-อะดรีเนอร์จิกมีบริเวณเข้าจับ 15 ตำแหน่ง โดยบริเวณเข้าจับที่มีความน่าจะเป็นสูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 80.2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นบริเวณที่สารตั้งต้นสามารถเข้าจับได้ดีที่สุด โดยคาดคะเนมาจากบริเวณที่มีการเข้าจับบ่อยครั้ง ในการทดสอบการเข้าจับกันระหว่างโมเลกุลด้วยโปรแกรม Autodock vina โดยลิแกนด คือ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเขยตาย 40 ชนิด และยาควบคุมเชิงบวกที่เกี่ยวข้องกับการรักษาโรคอัลไซเมอร์ 23 ชนิด ต่อโปรตีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคอัลไซเมอร์ 46 ชนิด พบว่าพลังงานการยึดเกาะระหว่างแอลฟา-ฟีนิลลีนโดลกับโปรตีนเบต้า2-อะดรีเนอร์จิกมีค่าเท่ากับ -9.4 กิโลแคลอรีต่อโมล ในขณะที่พลังงานการยึดเกาะของไรวาสติกมีนกับโปรตีนเบต้า2-อะดรีเนอร์จิกมีค่าเท่ากับ -7.8 กิโลแคลอรีต่อโมล จึงบ่งชี้ได้ว่าแอลฟา-ฟีนิลลีนโดลในเขยตายมีศักยภาพในการเข้าจับกับโปรตีนเบต้า2-อะดรีเนอร์จิกได้ดีกว่ายาไรวาสติกมีน สุดท้ายผลการวิเคราะห์อันตรกิริยาผ่านโปรแกรม PLIP พบว่าการยึดเกาะของแอลฟา-ฟีนิลลีนโดลกับโปรตีนเบต้า2-อะดรีเนอร์จิกมีการเกิดพันธะไฮโดรเจน 1 ตำแหน่งที่บริเวณโซ่ข้าง คือ ASP1113A เกิดแรงไฮโดรโฟบิก 7 ตำแหน่ง อีกทั้งเกิดการเรียงซ้อนพายที่ตำแหน่ง PHE1193A และ PHE1290A โดยมีการเกิดแรงไฮโดรโฟบิกที่ตำแหน่งเดียวกันกับไรวาสติกมีน 4 ตำแหน่ง ได้แก่ VAL1114A PHE1193A PHE1289A และ TYR1308A มีความเป็นไปได้ว่าแอลฟา-ฟีนิลลีนโดลและไรวาสติกมีนเข้ายับยั้งการทำงานของโปรตีนเบต้า2-อะดรีเนอร์จิกแบบแข่งขันกัน

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนอุปกรณ์และสารเคมีจากสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

เอกสารอ้างอิง

- ธนพร เทชประภาสรัตน์. (2565). การทำนายศักยภาพของยาเก่าที่นำกลับมาใช้ใหม่ต่อโปรตีนเป้าหมายของโรคอัลไซเมอร์บนคอมพิวเตอร์. *โครงการปัญหาพิเศษปริญญาบัณฑิต*. มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.
- นภกษมนนท์ ทหารไทย อภิษฎา ขำปลอด และณัฐนิช เชื้อพลพิชัย. (2563). การสกัดและการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสมุนไพรเขยตาย (*Glycosmis pentaphylla*). *โครงการสนับสนุนการจัดตั้งห้องเรียนวิทยาศาสตร์ในโรงเรียน (วมว.)*. มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์-โรงเรียนสวนกุหลาบวิทยาลัย รังสิต.
- 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), doi: <https://doi.org/10.3390/nano11010059>.
- Chen, H., Lin, J., Zhu, S., Zeng, K., Tu, P. and Jiang, Y. (2022). Anti-inflammatory constituents from the stems and leaves of *Glycosmis ovoidea* Pierre. *Phytochemistry*, 203, doi: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2022.113369>.
- Liu, P.P., Xie, Y., Meng, X.Y. and Kang, J.S. (2019). History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 4, doi: <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0063-8>.
- Mimica, N. and Presecki, P. (2009). Side effects of approved antidementives. *Psychiatria Danubina*, 21(1), 108-113.
- Rahman, R.I., Tania, F., Hossain, A., Sharmin, H. and Anwarul H. (2017). Evaluation of antioxidant, cholinesterase inhibitory properties, and antibacterial potentials of *Glycomis pentaphylla* leaf extract relevant to the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Applied Pharmacy*, 9, 17-30, doi: <https://doi.org/10.14233/ajchem.2019.21913>.
- Sintupachee, S. and Ruang-On, S. (2022). A database system for the diversity of medicinal herbs used as traditional medicinal formulas of the Cha-Uat Thai traditional medicine club, Cha-Uat district, Nakhon Si Thammarat province. *Wichcha Journal Nakhon Si Thammarat Rajabhat University*, 41(1), 49-64.
- 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, doi: <https://doi.org/10.14233/ajchem.2019.21913>.
- 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.

Wu, Q., Sun, J.X., Song, X.H., Wang, J., Xiong, C.Q., Teng, F.X. and Gao, C.X. (2017). Blocking beta 2-adrenergic receptor inhibits dendrite ramification in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neural Regeneration Research*, 12(9), 1499-1506, doi: <https://doi.org/10.4103/1673-5374.215261>.