ผลของสารสกัดจากรากต้นโลดทะนงต่อพิษงูเห่าไทย Interaction between thai cobra venom (Naja kaouthia) and the principle components from Lodthanong extract (Trigonostmon reidioides (Kurz) Creib)

ชื่อโครงงาน ผลของสารสกัดจากรากต้นโลดทะนงต่อพิษงูเห่าไทย Interaction between thai cobra venom (Naja kaouthia) and the principle components from Lodthanong extract (Trigonostmon reidioides (Kurz) Creib)

ชื่อผู้ปฏิบัติ นายคเณศ เต็มไตรรัตน์

ชั้น มัธยมศึกษาปีที่ 5

สถาบัน โรงเรียนมหิดลวิทยานุสรณ์

นักวิทยาศาสตร์พี่เลี้ยง รองศาสตราจารย์ดร.โอภา วัชระคุปต์

สถาบัน ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์

นักวิทยาศาสตร์พี่เลี้ยง มหาวิทยาลัยมหิดล

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันปัญหางูกัดเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขที่สำคัญปัญหาหนึ่งของประเทศไทย ถึงแม้ว่าในสมัยนี้จะมีเซรุ่มแก้พิษงูแล้วก็ตาม แต่เซรุ่มเหล่านี้มักจะมีอยู่ตามโรงพยาบาลใหญ่ ๆ หรือในเมืองเท่านั้น ทำให้เวลาชาวบ้านที่อยู่ตามชนบทห่างไกลถูกงูพากัดมักจะถูกส่งโรงพยาบาลไม่ทัน ผลก็คืออาการเข้าขั้นรุนแรง และอาจเสียชีวิตได้ ดังนั้นการใช้สมุนไพรไทยเป็นแนวทางหนึ่งในการช่วยบรรเทาอาการจากการถูกงูพิษกัดหรือช่วยในการยืดอายุเวลาในการออกฤทธิ์หรือช่วยไปยับยั้งประสิทธิภาพในการทำงานของพิษงู จึงเป็นอีกทางเลือกที่น่าสนใจ โลดทะนงเป็นสมุนไพรชนิดหนึ่งที่ถูกบันทึกไว้ในตำรายาสมุนไพรว่ามีสรรพคุณแกพิษงูได้ โครงงานนี้จึงได้นำสาระสำคัญจากรากต้นโลดทะนงที่ได้เคยมีรายงานการค้นพบโครงสร้างสารมา docking กับพิษงูเห่าในส่วนที่เป็น neurotoxin 3 ซึ่งออกฤทธิ์ต่อระบบประสาท โดยสารเคมีที่ได้นำมา docking คือ RediocideA , RediocideB,RediocideC,RediocideD, RidiocideE, Lotthanongine และ Afzelechib - (4α8) - afzelechin ซึ่งผลที่ได้ออกมาพบว่าพลังงานในกานจับกันของสารเคมีกับ neurontoxin3 อยู่ที่ -8.17 ถึง -10.5 ตำแหน่งกรดอะมิโนของ neurotoxin3 ที่ไปจับกับสาระสำคัญจากรากต้นโลด คือ TYR21 , THR24 , LYS23 , TRP25 , และ LYS35 โดยมีระยะห่างของการจับระหว่าง 1.6 - 4.0 A และตำแหน่งของกรดอะมิโนใน neurontoxin3 ที่จับกับ acetylcholine receptor ก็มีบางบริเวณที่เป็นบริเวณเดียวกันกับที่สาระสำคัญจากรากสมุนไพรโลดทะนงไปจับด้วย ซึ่งผลที่ได้จากการ docking ทำให้สามารถอธิบายกลไลการแก้พิษงูของสมุนไพรโลดทะนงในระดับโมเลกุลได้ว่า สารเคมีในรากต้นโลดทะนงไปจับกับ neurotoxin3 ในบริเวณ bindind site จับกับ actyleholine receptor ทำให้ neurotoxin3 ที่เข้าสู่ร่างกายมนุษย์ไม่สามารถไปจับกับ acetylcholine receptor ได้ ผลก็คือสารเคมีจากรากต้นโลดทะนงสามารถไปยับยั้งประสิทธิภาพการทำงานของพิษงูเห่าได้ นอกจากนี้โครงงานนี้ยังได้ทำการสกัดสารจากรากต้นโลดทะนงและนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการทำงานของพิษงูเห่าในหลอดทดลอง (in vitro) โดยใช้เทคนิค SDS - PAGE เพื่อสนับสนุนการทดลองที่ได้จากการ docking อีกด้วย

ความสำคัญและที่มาของโครงงาน

ประเทศไทยเราเป็นประเทศที่ตั้งอยู่ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ซึ่งตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้น ด้วยลักษณะที่ตั้งนี้เองส่งผลให้ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความอุดมสมบูรณ์และมีความหลากหลายทางชีวภาพมาก ประเทศไทยมีทั้งพันธุ์ไม้และพันธุ์สัตว์มากมายหลายสปีชีส์ ในบรรดาพันธุ์ไม้มากมายหลายสปีชีส์นี้เองแต่ละพันธุ์ก็จะมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและสารออกฤทธิ์แตกต่างกัน พันธุ์ไม้หลายชนิดถูกบันทึกสรรพคุณมาเป็นเวลานาน ซึ่งพันธุ์ไม้ที่ถูกบันทึกสรรพคุณนั้นส่วนใหญ่เราจะรู้จักกันโดยทั่วไปในชื่อสมุนไพรชนิดต่างๆ ตามตำราสมุนไพรไทยโบราณทั่วไป

เนื่องจากประเทศไทยมีพันธุ์สัตว์มากมาย จากรายงายของกระทรวงสาธารณสุขปัญหางูกัดยังเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย งูเป็นสัตว์เลื้อยคลาน (Reptile) ชนิดหนึ่งซึ่งมีหลายชนิดและพบจำนวนมากมาย งูมีทั้งประเภทงูที่มีพิษและงูไม่มีพิษ งูเห่า (Naja kaouthia) เป็นงูพิษชนิดหนึ่งที่มีพิษร้ายแรง ซึ่งพบชุกชุมมากในภาคกลาง บริเวณกรุงเทพ ลาดกระบัง สมุทรปราการ อยุธยา อ่างทอง ลพบุรี มักอยู่ตามป่าและท้องนา ลักษณะที่สำคัญของมันคือ เมื่อโกรธมันจะแผ่แม่เบี้ย ชูคอสูงและฉกกัดอย่างรวดเร็ว ซึ่งปัญหางูเห่าก็เป็นปัญหาสำคัญสำหรับคนไทย โดยเฉพาะชาวนาซึ่งมักจะถูกงูเห่ากัดเป็นประจำ

ตามตำรายาสมุนไพรไทยโดยทั่วไปมีการบันทึกถึงสรรพคุณของสมุนไพรที่สามารถแก้พิษงูได้ อาทิ รากต้นหางกระรอก นาคราช รากโปร่งฟ้า รากโลดทะนง ว่านพชรหึง รากกำจัดเถา รากโคกกระออม ต้นเสมา รากลิ้นงูเห่า ยางต้นโมก เปลือกผลน้อยหน่า เป็นต้น โลดทะนง (Trigonostemon reidioides (Kurz) Craib) หรือชื่ออื่น อาทิ นางแช่ง ข้าวเย็นเนิน ก็เป็นสมุนไพรชนิดหนึ่งซึ่งถูกบันทึกไว้ว่ามีสรรพคุณแก้พิษงูได้ ต้นโลดทะนงมีสารเคมีมากมายหลายชนิด จากรายงานวิจัยของการแพทย์แผนไทยและทิศทางการวิจัยในอนาคต พบว่าน้ำยาสมุนไพรโลดทะนงสามารถยืดอายุการตายของหนูที่ได้พิษงูเห่า และจากรายงานการวิจัยหลายฉบับ[2-4] ได้มี การค้นพบโครงสร้างของสารเคมีชนิดต่างๆ ที่พบในต้นโลดทะนงมากมายอาทิ Lothanongine[2] , Afzilichin - ($4\alpha 8$) - afzilichin[2] , Rediocide A[4] ดังนั้นหากสามารถทำการศึกษาหากลุ่มสารเคมีในต้นโลดทะนงที่ไปมีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของพิษงูเห่า รวมทั้งทำการสกัดสารเคมีนั้นออกมาได้ก็จะสามารถช่วยชีวิตผู้ที่ถูกงูเห่ากัดได้ อันได้เป็นประโยชน์ต่อวงการแพทย์และเภสัชกรรมในประเทศไทย

วัตถุประสงค์ของโครงงาน

1. เพื่อทำการศึกษาหากลุ่มสารเคมีในรากต้นโลดทะนงที่ไปมีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของพางูเห่าไทย
2. เพื่อทำการสกัดสารเคมีและทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีที่สกัดได้จากต้นโลดทะนงในการไปยับยั้งประสิทธิภาพการทำงานของพิษงูเห่า
3. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากรากต้นโลดทะนงในการออกฤทธิ์ต้านพิษงูเห่าไทย

วิธีการดำเนินการ

การศึกษาในโครงงานวิทยาศาสตร์นี้แบ่งเป็นขั้นตอนในการทำการศึกษาทดลองดังนี้

การทดลองที่ 1 การศึกษาในหลอดทดลอง (in vitro)

ตอนที่ 1 การสกัดสารเคมีจากรากต้นโลดทะนง

1. นำรากของต้นโลดทะนงมาทำให้แห้ง
2. นำรากของต้นโลดทะนงที่ทำให้แห้งแล้วมาบดเป็นผง
3. นำผงรากต้นโลดทะนง 331.4 g มาแช่ใน MeOH 720 mL
4. นำผลรากต้นโลดทะนงที่แช่ใน MeOH มากรองด้วยกระดาษกรอง
5. นำ MeOH ที่กรองแล้วจากข้อ 4 ไประเหย MeOH ออก
6. นำสารที่ได้จากข้อที่ 6 ไปสกัดโดยใช้กรวยแยกโดยใช้ H_2O 120 mL , CH_2Cl_2 4 * 50mL และ BuOH4 * 20 mL ตามลำดับ
7. ทำการสกัดสารจากผลรากต้นโลดทะนงในข้อที่ 2 200g โดยใช้ CH_2Cl_2 ใน Soxhlet extraction apparatus

เมื่อทำการสกัดสารจากรากต้นโลดทะนงในการทดลองที่ 1 จะได้ Crude extract ออกมา

ตอนที่ 2 การศึกษาสารสกัดจากรากต้นโลดทะนงในหลอดทดลอง (in vitro) เบื้องต้นในการออกฤทธิ์ต้านพิษงูเห่าไทยโดยใช้วิธี electrophoresis (SDS - PAGE)

1. การเตรียมสารตัวอย่าง นำพิษงูเห่า (lyophilized venom) 0.6 mg มาละลายกับน้ำ 10 mL ในหลอดทดลอง เพื่อใช้เป็นชุดการทดลองควบคุม ไว้สำหรับใช้เปรียบเทียบกับพิษงูเห่าที่ผสมกับสารสกัดจากรากต้นโลดทะนง

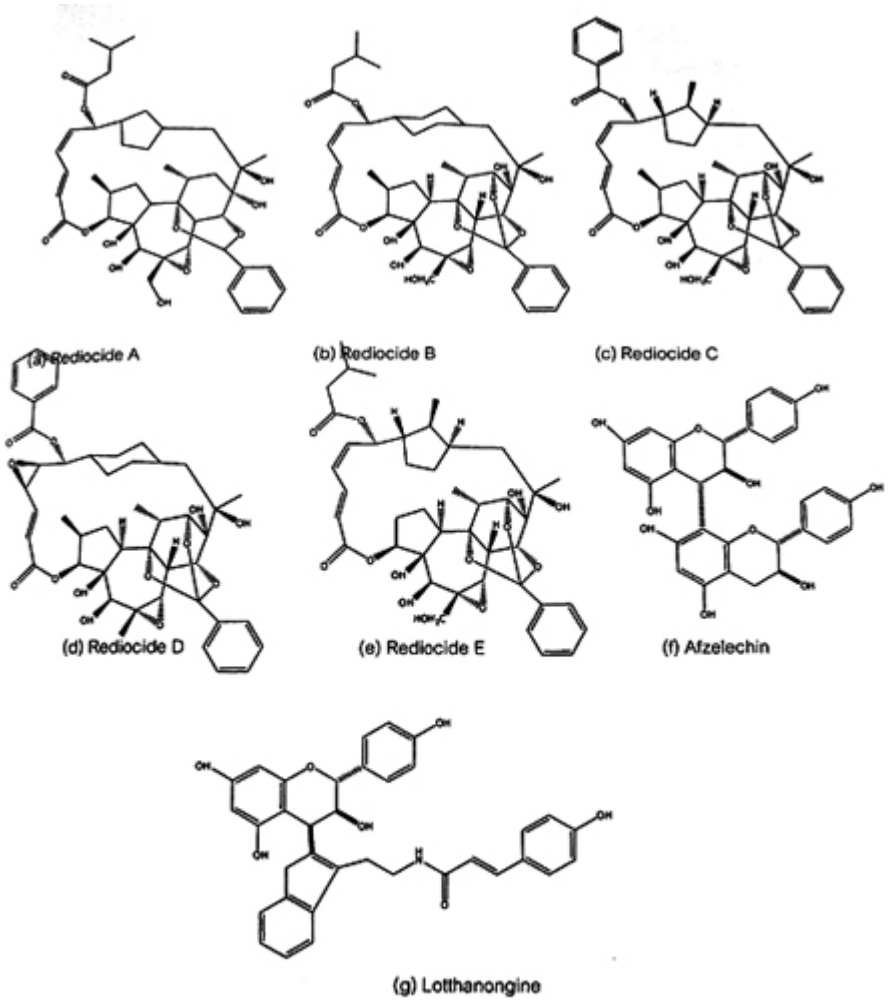
2. การเตรียมสารทดสอบ นำสารละลายพิษงูเห่า (lyophilized venom) ที่เตรียมในข้อ 1 มา 1 mL ผสมกับสารสกัดจากรากต้นโลดทะนงจากตอนที่ 1 ปริมาณ 1 mL ในหลอดทดลอง

3. การทำ electrophoresis โดยใช้เทคนิค Sodiumdodecylsulfate polyacrylamide gel electrohoresis (SDS-PAGE) นำสารละลายในข้อ 1 และ 2 เฉพาะส่วนที่ใส มาทดสอบหาการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารสกัดกับพิษงูเห่าโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE[7]

4. บันทึกผลการทดลองโดยการสังเกตแถบโปรตีนที่ได้จากพิษงูเห่าจาก สารละลายข้อ 1 เปรียบเทียบกับแถบโปรตีนที่ได้จากสารละลายในข้อ 2 ซึ่งเป็นพิษงูเห่าที่ผสมกับสารจากต้นโลดทะนง (Crude extract) โดยสังเกตว่าแถบโปรตีนของพิษงูเห่าจากสารละลายในข้อ 2 ว่า ลดลงหรือหายไปหรือไม่

การทดลองที่ 2 การศึกษาโดยใช้คอมพิวเตอร์ (in sillico)

ทำการทดลองโดยการค้นคว้าหารูปร่างโครงสร้างสารเคมีต่าง ๆ ที่พบในต้นโลดทะนงมาทำการ docking กับโครงสร้าง neurotoxin3 ซึ่งเป็นโปรตีนในพิษงูโดยใช้โปรแกรม Autodock และวิเคราะห์ผลจากโปรแกรมในบริเวณที่สาระสำคัญไปจับกับพิษงู neurotoxin3 (binding site) เพื่อหากลไกในระดับโมเลกุลในการยับยั้งพิษจากงูเห่าไทยของสมุนไพร



รูปที่ 1 โครงสร้างสารสำคัญในรากสมุนไพรโลดทะนง

ผลการทดลอง

ผลการทดลองที่ 2

จากการทดลองนำเอาสาระสำคัญในรากสมุนไพรโลดทะนงที่เคยมีรายการค้นพบมาก่อน ดังนั้นแสดงในรูปที่ 1 ใน dock กับ พิษงูเห่า neirotoxin3 โดยทำการ **docking** 100 ครั้ง หลังจาก docking 100 ครั้ง นำ conformer ที่ได้มาจัดเป็นกลุ่ม cluster โดยในแต่ละ cluster ประกอบไปด้วย conformer ที่มีโครงสร้าง 3 มิติใกล้เคียงกัน (RMSD< 2A) ผลที่ได้แสดงใน ตารางที่ 1 และรูปที่ 2 จากนั้นนำสารสำคัญในรากสมุนไพรโลดทะนงไปวัดระยะกับกรดอะมิโนใน neurotoxin3 เพื่อหาตำแหน่งของกรดอะมิโน neurotoxin3 ที่จับกับสาระสำคัญในรากสมุนไพรโลดทะนง ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 ผลการ docking ระหว่างสาระสำคัญในรากต้นโลดทะนงกับพิษงูเห่า neurotoxin3*

Ligand	Cluster number	Member in cluster	Lowest energy (Kcal/mol)	Highest energy (Kcal/mol)
RediocideA	3	31	-8.79	-7.8
RediocideB	5	31	-9.03	-8.68
RediocideC	1 2	47 36	-8.68 -8.65	-8.07 -8.24
RediocideD	1 3	23 31	-9.33 -8.74	-6.9 -8.34
RediocideE	1	35	-9.59	-8.49
Afzelechin	4	25	-8.17	-6.66
Lotthanongine	1	18	-10.5	-9.54
	12	27	-8.28	-8.09

* ทำการ docking 100 ครั้ง ระหว่าง ligand กับพิษงูเห่า neurotoxin3 หรือ $\alpha - cobratoxin(POBcode1LXG)$ นำ conformer ที่ได้จากการ docking 100 ครั้ง มาจัดเป็นกลุ่ม cluster โดยในแต่ละ cluster ประกอบด้วย conformer ที่มีโครงสร้าง 3 มิติใกล้เคียงกัน (ROMSD < 2A) ในตารางแสดงเฉพาะ cluster ที่มีจำนวน conformers สูง

ตารางที่ 2 ตำแหน่งกรดอะมิโนใน neurotoxin3 ที่จับกับสาระสำคัญในรากสมุนไพรโลดทะนง

RediocideA($\mathring{A}$)	RediocideB($\mathring{A}$)	RediocideC($\mathring{A}$)	RediocideC[1] ($\mathring{A}$)	RediocideD($\mathring{A}$)	Rediocide D[1]	RediocideE($\mathring{A}$)
CO-HO TYR21(2.97)		HO-HC LYS23 (2.150)	OH-OC ASP8(3.477)		CO-HC PRO7(3.827)	HO-HC PRO7(2.691)
CO-HC TYR21(3.26)	CO-HC THR24 (2.479)	OH-OC LYS23(2.823)			CO-HC PRO15(3.765)	HO-HC PRO7 (2.706)
CO-HC THR24(3.458)	CO-HO THR24(3.867)	HO-HC LYS23(3.429)		CO-HC THR24(3.060)	HO-HO TYR21 (3.776)	OH-OC ASP8 (2.649)
O-HC TRP25(2.113)		HO-HN LYS23(3.906)			HO-HC LYS23 (2.779)	OH-OC ASP8(3.697)
OH-OC TRP25(3.104)		HO-HC THR24(3.794)	HO-HC TRP25(2.131)		OH-OC LYS23(3.921)	O-HO TYR21 (3.797)
O-HN TRP25(3.278)		O-HN TRP25(2.240)	O-HN TRP25(2.649)		O-HN TRP25(3.452)	O-HC TRP25(2.404)

OH-OC CYS26(3.532)	CO-HC CYS26(2.540)	O-HC TRP25(2.679)		CO-HC CYS26(2.456)		O-HN TRP25 (3.848)
OH-OC-CYS26(3.321)	CO-HN CYS26(3.503)	O-HN TRP25 (3.794)		CO-HN CYS26(3.735)		
O-HC CYS26 (3.969)		O-HC CYS26(3.847)		CO-HC CYS26(3.991)		
HO-HC ASP27(2.254)		O-HC ASP27(3.237)				
HO-HC CYS30(2.524)						
HO-HO SER31(2.118)		O-HO SER31(3.579)	O-HO SER31(3.657)		O-HO SER31(3.126)	
HO-HN SER31(2.378)	O-HN ARG36 (1.782)					
HO-HC SER31(3.362)	O-HC ARG36 (1.825)					
CO-HC LYS35(2.724)	O-HN ARG36(2.616)	O-HN LYS35 (2.963)	O-HN LYS35(2.670)	OH-HC LYS35(1.964)	O-HC LYS35(2.325)	O-HN LYS35(1.745)
O-HN LYS35(3.700)	O-HN VAL37(2.487)	O-HC LYS35(3.228)		HO-HN ARG36(3.984)	O-HN LYS35(2.988)	O-HC LYS35(3.722)
CO-HC ASP38(2.924)	O-HC VAL37(3.896)	O-HC ASP38(3.401)		HO-HN VAL37(3.494)		O-HC ALA42(2.069)
CO-HC ALA42 (3.788)	HO-HN LYS69(2.659)	OH-OC ASP38(3.460)				O-HC ALA42(3.397)
		HO-HC VAL52(3.988)				

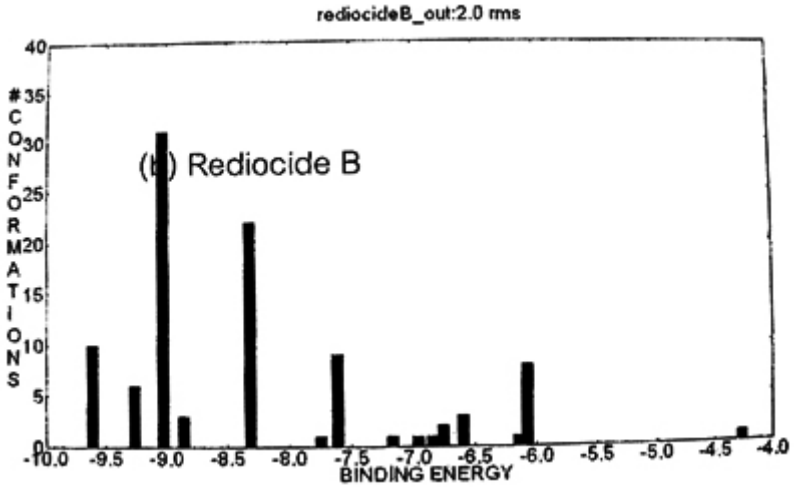
<u>หมายเหตุ</u> Rediocide C' คือ Rediocide C ที่ได้มาจากโครงสร้างใน cluster ที่ 2

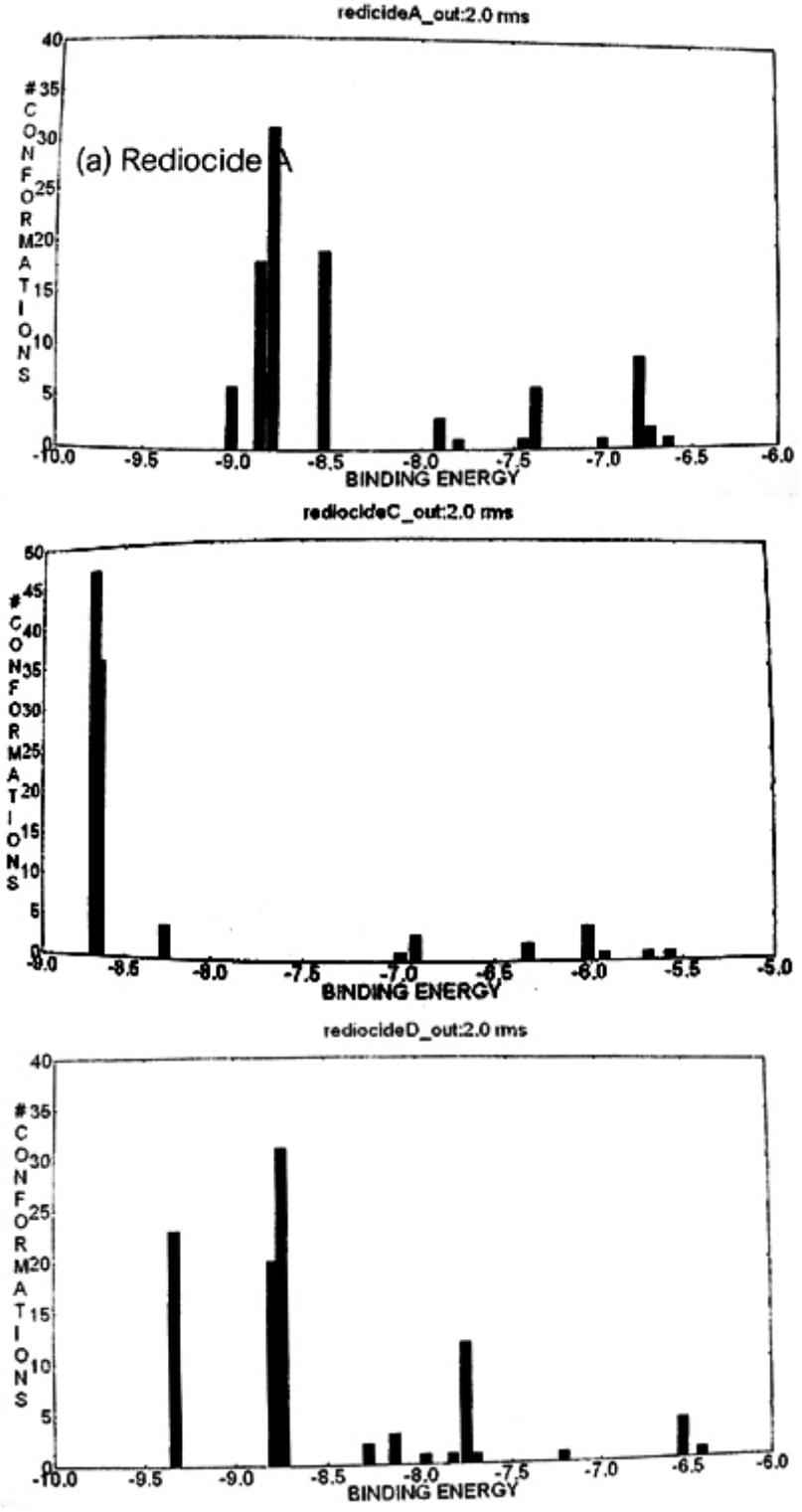
Rediocide D' คือ Rediocide D ที่ได้มาจากโครงสร้างใน cluster ที่ 1

ตารางที่ 2(ต่อ) **ตำแหน่งกรดอะมิโนใน neurotoxin3 ที่จับกับสาระสำคัญในรากสมุนไพรดลดทะนง**

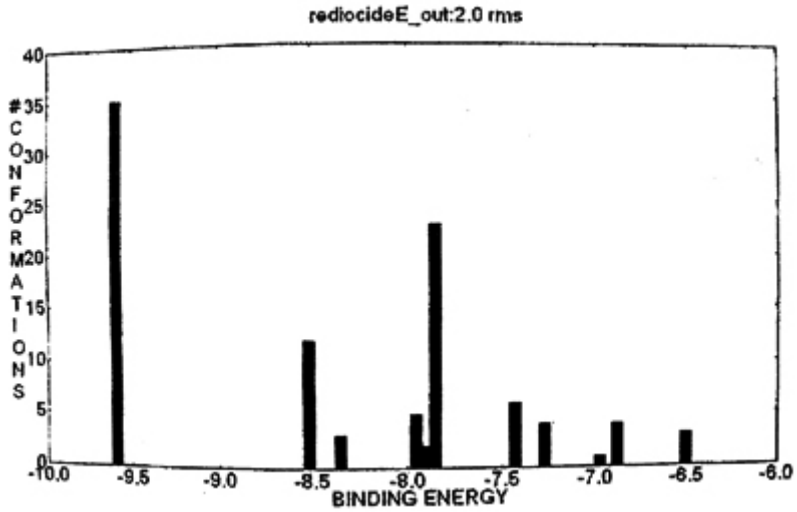
Afzelechin (A)	Lotthanongine (A)	Lotthanongine[1](A)
HO-HC PRO7(3.426)		HO-HC PRO7 (3.285)
HO-HC CYS14(2.274)		OH-OC ASP8(2.960)
HO-HC CYS14(3.585)		
HO-HC PRO15(2.897)		
O-HO TYR21 (2.510)		OH-OH TYR21 (1.823)
O-HC TYR21(3.925)		HO-HC TYR21 (3.666)
OH-OC LYS23(2.198)		HO-HC LYS23 (1.550)
HO-HC LYS23(2.449)		HO-HN LYS23 (3.268)
HO-HN LYS23 (2.958)	O-HC THR24 (3.363)	CO-HC THR24 (3.088)
HO-HC LYS23 (3.325)	O-HC CYS26 (3.040)	HO-HC TRP25(1.662)
HO-HC THR24 (3.374)	OH-HO SER31 (3.035)	HO-HN TRP25 (2.754)
HO-HC TRP25 (2.532)	HO-OH SER31 (3.212)	CO-HC CYS26(2.812)
HO-HC TRP25 (3.225)	OH-OC LYS35 (1.796)	HO-HC ASP27(2.556)
OH-HO SER31 (2.209)	HO-HC ARG36 (1.685)	OH-OC ASP27(2.766)
HO-HC SER (3.988)	HO-HN ARG36(2.934)	HO-HN ALA28(3.396)
HO-HN LYS35 (2.536)	HO-HN VAL37(2.649)	HO-HN LYS35 (1.745)
HO-HN LYS35 (3.465)	HO-HC VAL37 (3.142)	HO-HN ARG36(3.310)
OH-OC ASP38(1.774)	OH-OC ARG68(2.021)	HO-HC VAL37 (2.630)
OH-OC ASP38(2.856)	HO-HC LYS69 (2.547)	

หมายเหตุ Lotthanongine[1] คือ Lotthanongine ที่ได้มาจากโครงสร้างใน cluster ที่ 1



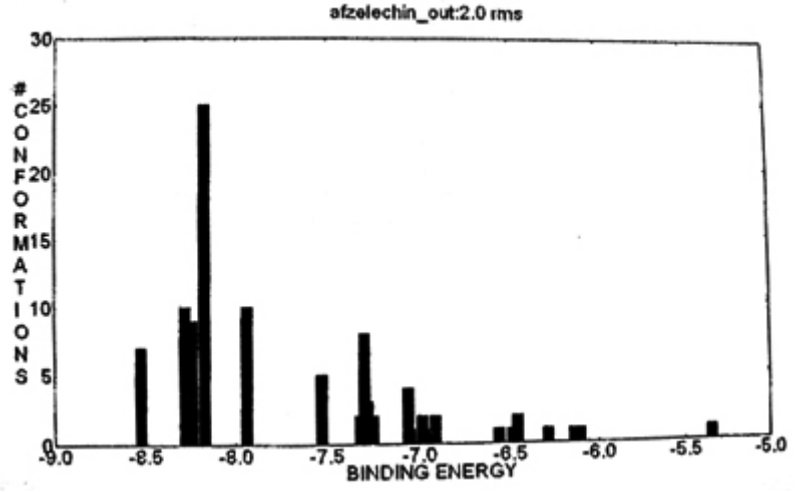


(c) Rediocide C

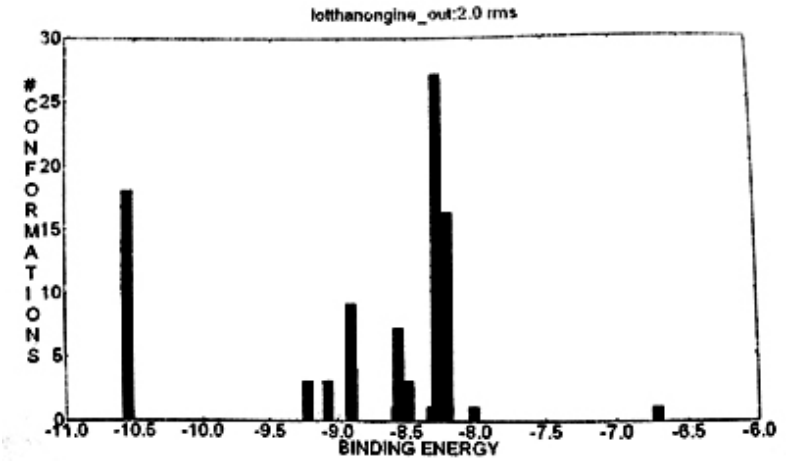


(d) Rediocide D

$\alpha - cobratoxin$จากการทำ docking 100 ครั้ง กราฟแต่ละแท่งประกอบด้วย comformers ของสาระสำคัญในรากสมุนไพรโลดทะนง ขณะจับกับพิษงูเห่าที่มีโครงสร้าง 3 มิติใกล้เคียงกัน (RMSD<2A)



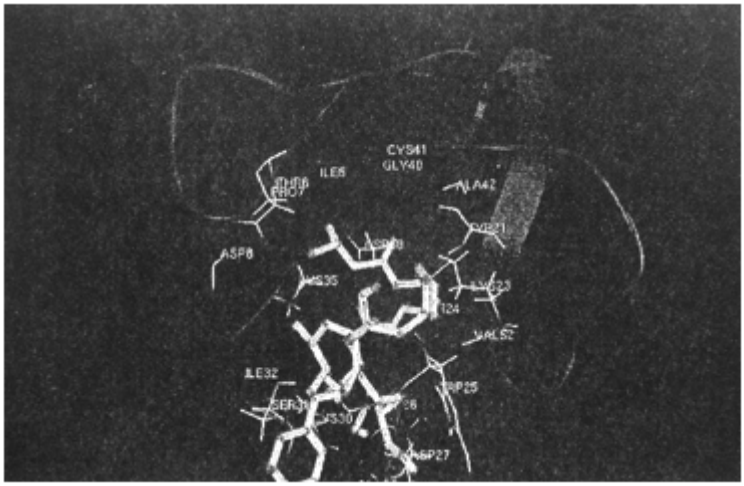
(e) Rediocide E



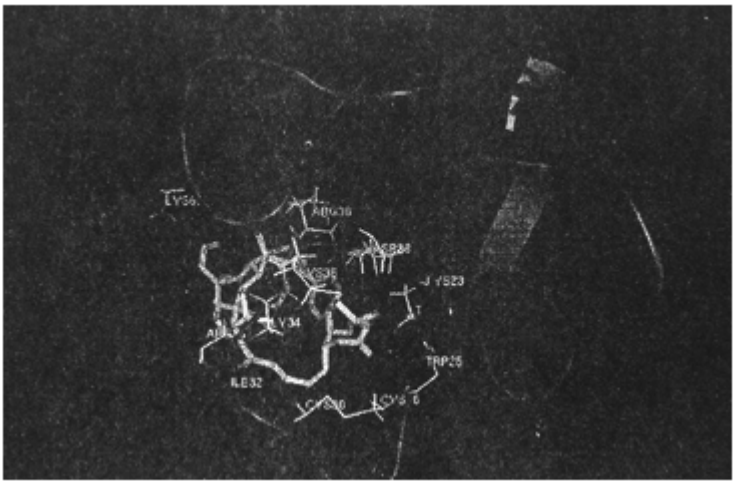
(f) Afzelechin

รูปที่ 2 (ต่อ) กลุ่ม cluster ของ conformers ของสาระสำคัญในรากสมุนไพรโลดทะนงที่ จับกับ พิษงูเห่า neurotoxin3 หรือ $\alpha - cobratoxin$จากการทำ docking 100 ครั้ง กราฟแต่ละแท่งแประกอบด้วย comformers ของสาระสำคัญในรากสมุนไพรโลดทะนง ขณะจักกับพิษงูเห่าที่มีโครงสร้าง 3 มิติใกล้เคียงกัน (RMSA < 2A)

รูปที่ 15 rediocide A ที่กำลังจับกับ neurotoxin3

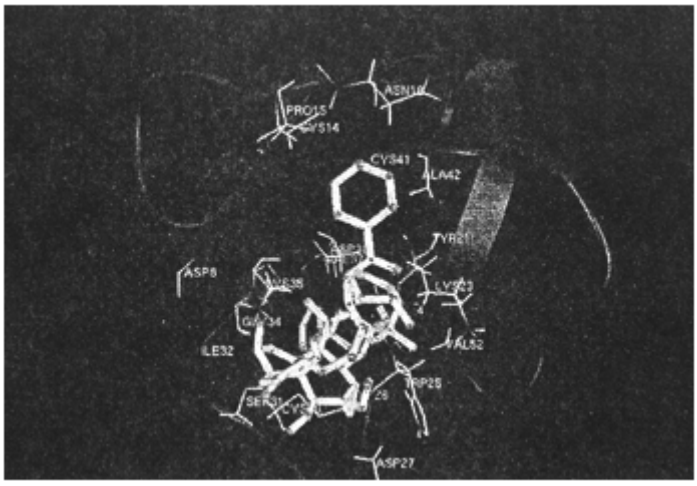


(a) Rediocide A

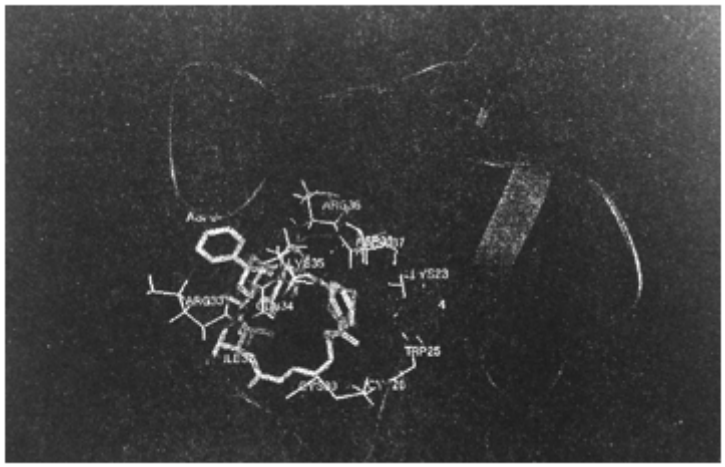


(b) Rediocide B

รูปที่ 3 สาระสำคัญในรากสมุนไพรโลดทะนงขณะจับพิษงูเห่า neurotoxin3

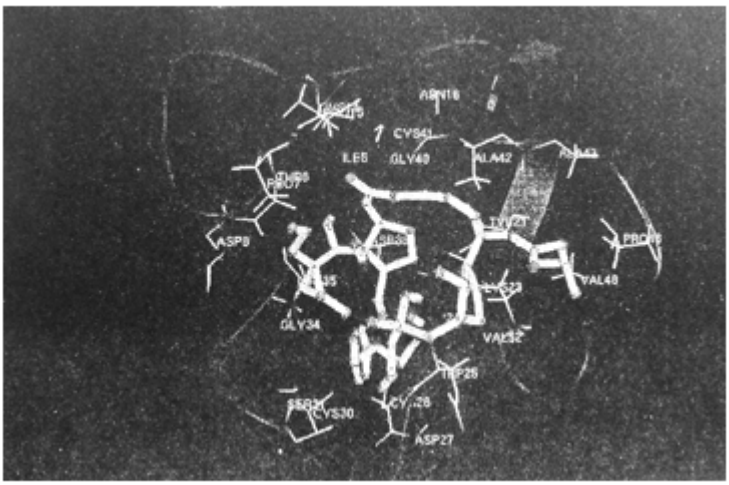


(c) Rediocide c

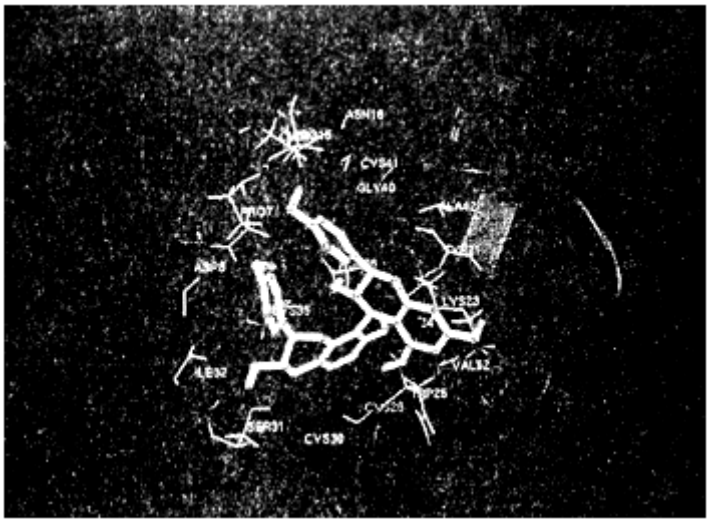


(d) Rediocide D

รูปที่ 3 (ต่อ) สาระสำคัญในรากสมุนไพรโลดทะนงขณะจับกับพิษงูเห่า neurotoxin3

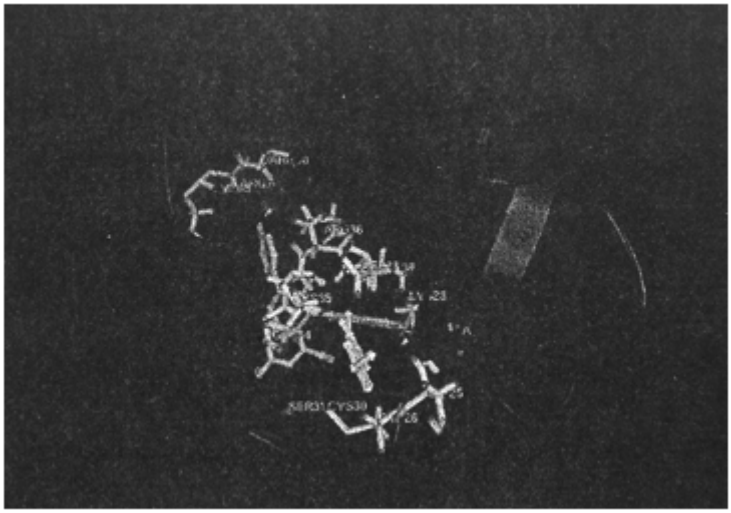


(e) Rediocide E



(f) Afzelechin

รูปที่ 3 (ต่อ) สาระสำคัญในรากสมุนไพรโลดทะนงขณะจับกับพิษงูเห่า neurotoxin3



(g) Lothanongine

รูปที่ 3 (ต่อ) สาระสำคัญในรากสมุนไพรโลดทะนงขณะจับกับพิษงูเห่า neurotoxin3

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทดลองนำ neurotoxin3 ซึ่งเป็นโมเลกุลโปรตีนของพิษงูเห่าไทยที่มีผลตอระบบประสาท ที่ได้มาจาก X-ray crystallography โดยนำมา dock กับสารสำคัญจากรากต้นโลดทะนงที่ได้มีรายงานถึงการค้นพบโครงสร้างสารมาก่อนหน้านี้ โดยในการ dock ออกมาเป็นกลุ่ม cluster ที่มีโครงสร้าง 3 มิติใกล้เคียงกัน (RMSD < 2A) ดังแสดงเป็นกราฟแท่งระหว่างกลุ่ม comformers (cluster) ที่แสดงจำนวน conformers ของสารสำคัญกับ docking energy พบว่า Rediocide A มี cluster ที่น่าสนใจคือ cluster ที่ 3 ซึ่งมี Rediocide A อยู่ 31 conformers ใน cluster นี้มีพลังงานในการจับกันต่ำสุด -8.79 Kcal/mol Rediocide A จับกับพิษงู neurotoxin3 ที่ตำแหน่งของกรดอะมิโนที่สำคัญดังนี้คือ TRY42 , THR24 , LYS35 , SER31 , CYS26 , CYS30 , ASP38 , และ ASP27 โดยมีระยะห่างในการจับกันระหว่าง 1.6-4.0 A Rediocide B มี cluster ที่น่าสนใจคือ clusterที่ 5 ซึ่งมี Rediocide B อยู่ 31 conformers มีพลังงานในการจับกันต่ำสุด-9.03 Kcal/mol ตำแหน่งของกรดอะมิดนที่สารนี้ไปจับด้วยที่น่าสนใจมีดังนี้คือ ARG36 , VAL37 , LYS69 , THR24 และ CYS26 โดยมีระยะห่างในการจับกันระหว่าง 1.6-4.0 A Rediocide C มี cluster ที่น่าสนใจคือ cluster ที่ 1 ซึ่งมี Rediocide C อยู่ 47 conformers ใน cluster นี้มีพลังงานในการจับกันต่ำสุด -8.68 Kcal/mol Rediocide C จับกับพิษงู neurotoxin3 ที่ตำแหน่งของกรดอะมิโนที่สำคัญดังนี้คือ ASP38 , LYS23 , THR24 , VAL52 , TRP25 , ASP27 , LYS35 , CYS26 , และ SER31 โดยมีระยะห่างในการจับกันระหว่าง 1.6-4.0A นอกจากนี้ Rediocide C ยังมี cluster ที่น่าสนใจคือ cluster ที่ 2 ซึ่งมี Rediocide C อยู่ 36 conformers ใน cluster นี้มีพลังงานในการจับกันต่ำสุด -8.65 Kcal/mol Rediocide C จับกับพิษงู neurotoxin3 ที่ตำแหน่งของกรดอะมิโนที่สำคัญคือ LYS35, SER31 , TRP25 และ ASP8 โดยมีระยะห่างในการจับกันระหว่าง 1.6-4.0A Rediocide D มี cluster ที่น่าสนใจคือ cluster ที่ 1 ซึ่งมี Rediocide D อยู่ 23 conformers ใน cluster นี้มีพลังงานในการจับกันต่ำสุด -9.33 Kcal/mol Rediocide D จับกับพิษงู neurotoxin3 ที่ตำแหน่งของกรดอะมิโนที่สำคัญดังนี้คือ PRO7 , PRO15 , TRP25 , TYR21 , LYS23 , SER31 , และ LYS35 โดยมีระยะห่างในการจับกันระหว่าง 1.6-4.0 A นอกจากนี้ Rediocide D ยังมี cluster ที่น่าสนใจคือ cluster ที่ 3 ซึ่งมี Rediocide D อยู่ 31 coformers ใน cluster นี้มีพลังงานในการจับกันต่ำสุด -8.74 Kcal/mol Rediocide D จับกับพิษงู neurotoxin3 ที่ตำแหน่งของกรดอะมิโนที่สำคัญดังนี้คือ CYS26 , THR24, LYS35 , ARG36 และ VAL37 โดยมีระยะห่างในการจับกันระหว่าง 1.6-4.0A Rediocide E มี cluster ที่น่าสนใจคือ cluster ที่ 1 ซึ่งมี Rediocide E อยู่ 35 conformers ใน cluster นี้มีพลังงานในการจับกันต่ำสุด -9.59 Kcal/mol Rediocide E จับกับพิษงู neurotoxin3 ที่ตำแหน่งของกรดอะมิโนที่สำคัญดังนี้คือ TYR21, ALA42 , LYS35 , ASP8 , PRO7 และ TRP25 โดยมีระยะห่างในการจับกันระหว่าง 1.6-4.0 A Afzelechin (4 α 8)-afzelechin มี cluster ที่น่าสนใจคือ cluster ที่ 4 ซึ่งมี $Afzelechin-(4\alpha \rightarrow 8)-afzelechin$ อยู่ 25 conformers ใน cluster นี้มีพลังงานในการจับกันต่ำสุด -8.17 Kcal/mol Afzelechin - (4 α 8) - afzelechin จับกับพิษงู neurotoxin3 ที่ตำแหน่งของกรดอะมิโนที่สำคัญมีดังนี้คือ TYR21 , LYS23 , TRP25 , THR24, LYS23, ASP38, PRO7 , LYS35 , CYS14 , PRO15 และ SER31 โดยมีระยะห่างในการจับกันระหว่าง 1.6-4.0 Lotthanongine มี cluster ที่น่าสนใจคือ cluster ที่ 1 ซึ่งมี Lotthanongine อยู่ 18 conformers ใน cluster นี้มีพลังงานในการจับกันต่ำสุด -10.5 Kcal/mol Lotthanongine จับกับพิษงู neurotoxin3 ที่ตำแหน่งของกรดอะมิโนที่สำคัญดังนี้คือ TYR21 , LYS23 , ASP8 , PRO7 , THR24, TRP25, LYS35 , CYS26, VAL37 , ASP27, ALA28 และ ARG36 โดยมีระยะห่างในการจับกันระหว่าง 1.6-4.0 A นอกจากนี้ Lotthanongine ยังมี cluster ที่น่าสนใจ

คือ cluster ที่ 12 ซึ่งมี Lotthanongine อยู่ 27 conformers ใน cluster นี้มีพลังงานในการจับกันต่ำสุด -8.28 Kcal/mol Lotthanongine จับกับพิษงู neurotoxin3 ที่ตำแหน่งของกรดอะมิโนที่สำคัญคือ ARG68 , LYS69 , ARG36 , LYS35 , VAL37 , SER31 , CYS26 และ THR24 โดยมีระยะห่างในการจับกันระหว่าง 1.6-4.0A

โดยภาพรวมแล้วจะพบว่าตำแหน่งของกรดอะมิโนที่สารเคมีรากต้นโลดทะนงส่วนใหญ่จับด้วยคือ TYR21 , THR24 , LYS23 , TRP25 และ LYS35 ส่วนตำแหน่งของกรดอะมิโนบางตัวที่ปรากฏว่าจับกับสารเคมีตัวหนึ่งแต่ไม่ไปจับกับสารเคมีอีกตัว หรือตำแหน่งของกรดอะมิดนบางตัวที่ปรากฏว่าจับกับสารเคมีบางตัวเท่านั้นอาจเป็นเพราะว่าสารเคมีนั้นมีรูปร่างต่างกันหรือถ้าเป็นสารชนิดเดียวกันก็มี conformation ที่แตกต่างกันทำให้เวลาไปจับกับกรดอะมิโนแล้วบางตัวจะได้ตำแหน่งของกรดอะมิโนที่แปลงกออกมา ตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ปรากฏในตาราง แสดงเฉพาะมีระยะห่างกันน้อยกว่า 4.0A ซึ่งเป็นระยะที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนได้ดี ดังนั้นโดยภาพรวมจึงสรุปได้ว่า สารแต่ละตัวที่มีรายงานการค้นพบโครงสร้างสารจากรากต้นโลดทะนงไปจับกับ neurotoxin3 ในบริเวณใกล้เคียงกันเกิดพันธะไฮโดรเจนกับ neurotoxin3 และมีพลังงานในการจับกันค่อนข้างต่ำ ซึ่งทำให้เวลาสารจับกันแล้วค่อนข้างเสถียรและอยู่ตัว neurotoxin3 เป็นสารพิษที่มีผลต่อระบบประสาทโดยเมื่อเข้าสู่ร่างกายของมนุษย์จะจับกับ acetylcholine receptor[5] ซึ่งเป็นการไปยังยั้งการจับของสารสื่อประสาททำให้ร่างกายของมนุษย์ที่ได้รับพิษเข้าไปไม่สามารถส่งกระแสประสาทไปตามเส้นประสาทที่ถูก block ได้ ผลที่ตามมาคืออาการอัมพาตของอวัยวะต่างๆ โดยตำแหน่งของกรดอะมิโนใน neurotoxin3 ที่จับกับ acetylcholine receptor ได้แก่ ASP27 , PHE29 , CYS30 , ILE32 , ARG33 , GLY34 , ARG36 , LYS35 และ VAL37 ซึ่งเป็นบริเวณเดียวที่สารสกัดจากรากต้นโลดทะนงเข้าไปจับ ทำให้ binding site ของ neurotoxin3 ไม่ว่างทำให้ไม่สามารถไปจับกับ acetylcholine receptor ได้ จึงไม่เกิดพิษ ผลการทดลองที่ได้จากการใช้เทคนิคคอมพิวเตอร์ (in silico) ทำให้เข้าใจถึงกลไกในการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุลของสารสกัดจากรากต้นโลดทะนงที่สามารถไปยับยั้งประสิทธิภาพการทำงานของพิษงูเห่าไทยและสามารถออกฤทธิ์ต้านพิษงูเห่าไทยได้

เอกสารอ้างอิง

1. TempeamA, Thasana N, Thavornkitcharat A, et al. ln vitro cytotoxicity of some thai medicinal plants and daphnane diterpenoid from Trigonostemon redioides. Mahidol University Journal of Pharmaceutical Science 2002;29(3-4) : 25-31.
2. Kanchanapoom T, Kasai R, Chumsri P, et al. Lotthanongine ,an unprecedented flavonoidal indole alkaloid from the root of thae medicinal plant , Trigonostemon redioides. Tet Lett 2002 ; 43: 2941-2943
3. Jarasuriya H,Zink DL, Borris RP, Nanakorn W, et al. Rediocides B-E ,Potent lnsecticides from Trigonostemon redioides. J Nat Prod 2004;67:228 - 231.
4. Jarasuriya H,Zink DL, Singh SB, et al. Structure and strerochemistry of rediocide A, a highly modifiled daphnane from Trigonostemon redioides exhibiting potent insecticidal activity. J Am Chem Soc 2000;122:4998-4999.

5. Zeng H, Hawrot E. NMR - based binding screen and structural analysis of the complex formed between α1 -cobratoxin and an 18-Mer cognate peptide derived from the α1subunit of the nicotinic acetylcholine receptor from Torpedo californica. J Bio Chem 2002;277:37439-37445.
6. Chanhome L, Wongtongkam N, Know O, et al. Genus specific neutralization of Bungarus snake venoms by thai red cross banded krait antivenom. J Nat Toxins 1999;8:135-140
7. Laemmli UK.Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.Nature 1970;227:680-685
8. Smitinand T.Thai plant name.Revised edition 2001.Prachachon Co.Ltd.Bangkok.
9. ประวิทย์ ชุมเกษียร และ คณะ.ระบาดวิทยาของผู้ถูกงูพิษกัดในประเทศไทย พ.ศ. 2525-2529: ใน : ชาญ โพชนุกุล , บรรณาธิการ. พิษจากพืช สัตว์ และจุลชีพ. กรุงเทพมหานคร : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ; 2533. หน้า 71-86
10. สมบัติ ประภาวิชา. ผลของความเข้มข้นและช่วงเวลาได้รับน้ำยาสมุนไพรโลดทะนง แดงต่อการยืดอายุการตายของหนูที่ได้รับพิษงูเห่า. รวมบทคัดย่องานวิจัยการแพทย์แผนไทยและทิศทางการวิจัยในอนาคต สถาบันการแพทย์แผนไทย 2543
11. สถานเสาวภา สภากาชาดไทย รายงานประจำปี 2545; 15-22.
12. เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ . ตำรายาทั้งมวลของพ่อจารย์เคน ลาวงศ์ . กรุงเทพมหานคร : ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย;2537. หน้า 41
13. วุฒิ วุฒิธรรมเวช. เภสัชกรรมไทย รวมสมุนไพร. กรุงเทพมหานคร : โอ เอส พริ้นติ้งเฮาส์ ; 2540.
14. สายสนม กิตติขจร .ตำราสรรพคุณ สมุนไพรยาไทยแผนโบราณ. พิมพ์ครั้งที่ 1.2526 . หน้า 226.