อันตรกิริยาระหว่างเคอร์คิวมินกับทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟา

นิสิตผู้วิจัย 1. นสภ.นัทธพงศ์ จองจิตพิศุทธิ์

2. นสภ.ณฐพร สุวรรณ

3. นสภ.อารยะ จันทรสิงหาญ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

โครงการปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

เภสัชศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาค้นพบและพัฒนายา

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2557

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

Interaction of Curcumin with Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF-α)

Mr. Nattapong Jongjitphisut

Miss. Nataporn Suwan

Mr. Araya Chuntharasinghan

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Senior Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement

for the Bachelor of Science Program in Pharmacy

Chulalongkorn University

2014

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

โครงการลำดับที่ 2.8

ปีการศึกษา 2557

บทคัดย่อ

ชื่อโครงการ : อันตรกิริยาระหว่างเคอร์คิวมินกับทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟา

หัวหน้าโครงการ : นายนัทธพงศ์ จองจิตพิศุทธิ์ 5336544833

ผู้ร่วมโครงการ : นางสาวณฐพร สุวรรณ 5336521333

: นายอารยะ จันทรสิงหาญ 5336588433

อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ. ภก. ดร.พรชัย โรจน์สิทธิศักดิ์, รศ. ภญ.นวลศรี นิวัติศัยวงศ์, อ. ภก.พัฒนชัย ลิมปิกิรติ

สาขา/ภาควิชา : สาขาค้นพบและพัฒนายา/ ภาควิชาอาหารและเภสัชเคมี

ทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาเป็นไซโตไคน์ที่ถูกหลั่งออกมาจากแมโครฟาจ ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบและการเกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ในปัจจุบันการวิจัยเพื่อหาตัวยับยั้งการทำงานของทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาเป็นที่สนใจอย่างมากและแอนติบอดี้ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟา เช่น อินฟลิซิแมบ, เอทาเนอร์เซปท์ และอดาลิมูแมบ ได้ถูกใช้เป็นยาต้านการอักเสบเพื่อรักษาโรคภูมิต้านทานต่อตนเอง (autoimmune diseases) เคอร์คิวมินเป็นสารโมเลกุลเล็กจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย ที่ผ่านมาได้มีการศึกษาการเกิดอันตรกิริยาระหว่างเคอร์คิวมินและ ทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟา โดยอาศัยโปรแกรมจำลองทางคอมพิวเตอร์ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการพัฒนา เคอร์คิวมินเป็นสารยับยั้งทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟา อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีหลักฐานจากการทดลองที่แสดงการจับกันระหว่างเคอร์คิวมินและทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟา ในงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจที่จะศึกษาการเกิดอันตรกิริยาระหว่าง เคอร์คิวมินและทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาด้วยเทคนิคสเปคโตรฟลูออโรเมทตรี โดยกำหนด excitation wavelength ที่ 280 นาโนเมตร และวัด emission spectra ความยาวคลื่นตั้งแต่ 300 ถึง 400 นาโนเมตร ของทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาที่ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ในสภาวะที่มีเคอร์คิวมินความเข้มข้นตั้งแต่ 0.4-8.0 ไมโครโมลาร์ ผลการทดลองพบว่าเคอร์คิวมิน ลดการปลดปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์ของทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาที่ 315 นาโนเมตร ด้วย static process ค่าคงที่ในการเกิดอันตรกิริยาระหว่างเคอร์คิวมินและ ทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟา เมื่อคำนวณด้วยสมการ modified Stern-Volmer เท่ากับ 1.02, 1.13 และ 1.38 x 10^5 M^{-1} ส่วนจำนวนของ binding sites ที่คำนวณได้จากสมการ Stern-Volmer เท่ากับ 0.80, 0.89 และ 0.84 ที่อุณหภูมิ 293, 299 และ 305 เคลวิน ตามลำดับ สำหรับค่าพารามิเตอร์ทางอุณหพลศาสตร์ได้แก่ enthalpy (ΔH), entropy (ΔS) และ Gibbs free energy (ΔG) ซึ่งคำนวณจากสมการของ van't Hoff พบว่า ΔH และ ΔS มีค่ามากกว่า 0 แสดงให้เห็นว่าเคอร์คิวมินจับกับทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาด้วยแรงไฮโดรโฟบิค ส่วน ΔG ที่มีค่าน้อยกว่า 0 แสดงให้เห็นว่าการจับกันเป็นแบบ spontaneous interaction ผลการศึกษานี้ ชี้ให้เห็นว่าเคอร์คิวมินสามารถจับกับทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟา และมีศักยภาพในการพัฒนาต่อไปเพื่อใช้เป็นยาต้านการอักเสบหรือใช้ในงานวิจัยทางชีวการแพทย์

คณะเภสัชศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต .....

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

Project No. 2.8
Academic year 2014

Abstract

Senior project title : Interaction of Curcumin with Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF-**α**)
Student's name : Mr. Nattapong Jongjitphisut 5336544833
: Miss Nataporn Suwan 5336521333
: Mr. Araya Chantharasinghan 5336588433
Advisor/ Co-advisor : Assoc. Prof. Pornchai Rojsitthisak, Ph.D., Assoc. Prof. Nuansri Niwattisaiwong, Patanachai Limpikirati
Field/Department : Drug Discovery and Development/ Food and Pharmaceutical Chemistry

Tumor necrosis factor alpha (TNF-**α**) is a cytokine secreted by macrophage that can cause inflammation and mediate inflammation-related diseases. Currently, investigation of TNF-**α** inhibitors has been received considerable attention and a number of anti-TNF-**α** monoclonal antibodies e.g. infliximab, etanercept and adalimumab has been used as anti-inflammatory drugs for the treatment of autoimmune diseases. Recently, curcumin, a polyphenolic compound, has been shown to interact with TNF-**α** using molecular docking, which could be further developed as a TNF-**α** inhibitor. However, there is no experimental evidence on the interaction between curcumin and TNF-**α**. In this work, we therefore investigated the interaction between curcumin and TNF-**α** using spectrofluorometry. The excitation wavelength was set at 280 nm and the emission spectra of TNF-**α** were collected from 300 to 400 nm in the presence of various concentrations from 0.4-8.0 μM of curcumin. The results showed that curcumin decreased the fluorescence intensity at 315 nm of TNF-**α** through the static process. The binding constants, calculated by modified Stern-Volmer equation, were found to be 1.02, 1.13 and 1.38 x 10^5 M^{-1} and the number of binding sites, calculated by Stern-Volmer equation, was 0.80, 0.89 and 0.84 at the temperatures of 293, 299 and 305 K, respectively. The thermodynamic parameters, which are enthalpy (ΔH), entropy (ΔS) and Gibbs free energy (ΔG), were calculated from van't Hoff equation. The values of ΔH and ΔS were greater than 0, suggesting that curcumin bound to TNF-**α** via hydrophobic force and the value of ΔG was less than 0, indicating that the interaction occurs spontaneously. These findings suggest that curcumin has a potential to be developed as anti-TNF-**α** for therapeutic and biomedical research applications.

Faculty of Pharmaceutical Sciences Student's signature .....
Chulalongkorn University Advisor's signature .....

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

คำนำ

โครงการปริญญานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรเภสัชศาสตรบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้ทำการศึกษาเพื่อหาอันตรกิริยาระหว่างไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบที่มีชื่อว่า ทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟา และเคอร์คิวมินซึ่งเป็นสารที่พบได้ในสมุนไพรไทย ด้วยเทคนิคสเปคโตรฟลูออโรเมทตรี ซึ่งการศึกษาอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลทั้ง 2 โมเลกุลนั้นจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการศึกษากลไกในการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบของเคอร์คิวมิน ซึ่งเป็นแนวทางหนึ่งในการค้นคว้าและพัฒนาสารในกลุ่มนี้ เพื่อให้ได้สารที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบที่ดีขึ้นในอนาคต

ผู้ศึกษาหวังเป็นอย่างยิ่งว่าโครงการปริญญานิพนธ์นี้จะมีประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาอื่นๆต่อไป

คณะผู้จัดทำ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาโครงการปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้ศึกษาขอกราบขอบพระคุณ รศ. ภก. ดร.พรชัย โรจน์สิทธิศักดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ และ รศ. ภญ.นวลศรี นิวัติศัยวงศ์ และ อ. ภก.พัฒนชัย ลิมปิกิรติ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของโครงการนี้ ตลอดจนให้ความรู้และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อโครงการนี้

ขอขอบคุณ ภก. ปวีณวัชร์ รัตนดิลก ณ ภูเก็ต ที่ช่วยให้คำแนะนำ รวมถึงให้ความช่วยเหลือในเรื่องการเตรียมสารเคมีและการใช้เครื่องมือในการทำปริญญานิพนธ์นี้

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ภาควิชาอาหารและเภสัชเคมีและเจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือและวิจัยคณะเภสัชศาตร์ ที่ให้ความสะดวกในการจัดหาสารเคมีและเครื่องมือเพื่อใช้ในโครงการนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		จ
คำนำ		ฉ
กิตติกรรมประกาศ		ช
สารบัญ		ซ
สารบัญรูปภาพ		ญ
สารบัญตาราง		ฏ
บทที่		
1	บทนำ	1
	1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการศึกษา	1
	1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	5
	1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
2	ปริทัศน์วรรณกรรม	6
	2.1 หลักการของฟลูออเรสเซนท์	6
	2.2 หลักการเกิด quenching ของฟลูออเรสเซนท์	7
	2.3 Modified Stern-Volmer	10
	2.4 Stoichiometric ratio	11
	2.5 พารามิเตอร์ทางอุณหพลศาสตร์	12
3	เครื่องมือที่ใช้และวิธีดำเนินการวิจัย	
	3.1 สารเคมี	13
	3.2 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือ	13
	3.3 การเตรียมสารเคมีและตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์	13
	3.4 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย	15

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
4	ผลและอภิปรายผลการวิจัย	18
	4.1 Emission spectrum ของทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์	**18**
	4.2 Emission spectra ของเคอร์คิวมินความเข้มข้น 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 2.4, 2.8, 3.2, 3.6, 4.0, 4.4, 4.8, 5.2, 5.6, 6.0, 6.4, 6.8, 7.2, 7.6 และ 8.0 ไมโครโมลาร์	**19**
	4.3 Emission spectrum ของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาและเคอร์คิวมิน	21
	4.4 การศึกษากลไกในการเกิดอันตรกิริยาระหว่างทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาและเคอร์คิวมิน	22
	4.5 การหาค่าคงที่ของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน (K_a)	25
	4.6 อัตราส่วนการเกิดอันตรกิริยาหรือจำนวนของตำแหน่งในการเกิดอันตรกิริยา (binding site, n)	24
	4.7 การศึกษาอุณหพลศาสตร์ของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาและเคอร์คิวมิน	27
5	สรุปผลการทดลอง	29
บรรณานุกรม		30

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 โครงสร้างของทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟา; ภาพจากมุมล่างของโมเลกุล (ซ้ายมือ) และ ภาพจากด้านข้างของโมเลกุล (ขวามือ) 1

รูปที่ 2 บทบาทหน้าที่ของทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟา ในสภาวะที่ร่างกายปกติ (สีเขียว) และโรคต่างๆ ที่ทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟามีบทบาทเกี่ยวข้องในการทำให้เกิดพยาธิภาพของโรค (สีฟ้า) 2

รูปที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของเคอร์คิวมิน 3

รูปที่ 4 โมเลกุลเป้าหมายในการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบของเคอร์คิวมิน 3

รูปที่ 5 ตำแหน่งในการเกิดปฏิกิริยาและกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิกิริยาระหว่างทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟากับเคอร์คิวมิน 4

รูปที่ 6 Jablonski diagram 6

รูปที่ 7 Emission spectrum ของ tryptophan (TRP), tyrosine (TYR) และ phenylalanine (PHE) 7

รูปที่ 8 การเปรียบเทียบระหว่าง Collision หรือ Dynamic quenching กับ Static quenching 8

รูปที่ 9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าค่า K_{SV} เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น 9

รูปที่ 10 Emission spectra ของทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ที่อุณหภูมิ (A) 293 เคลวิน (B) 299 เคลวิน และ (C) 305 เคลวิน 18

รูปที่ 11 Emission stectra ของเคอร์คิวมินที่อุณหภูมิ (A) 293 เคลวิน (B) 299 เคลวิน และ (C) 305 เคลวิน 19

รูปที่ 12 Emission spectrum ของทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟา (สีน้ำเงิน) และ เคอร์คิวมิน (สีเขียว) 20

รูปที่ 13 Emission spectra ของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง TNF-α และเคอร์คิวมินที่อุณหภูมิ (A) 293 เคลวิน (B) 299 เคลวิน และ (C) 305 เคลวิน 21

รูปที่ 14 Stern–Volmer plots จากการเกิด quenching ของทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาโดยเคอร์คิวมินที่อุณหภูมิ 293, 299 และ 305 เคลวิน (น้ำเงิน, แดง, เขียว)ตามลำดับ 23

รูปที่ 15 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง 1/[Q] กับ F0/ΔF 24

รูปที่ 16 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\log[Q]$ กับ $\log\left[\frac{(F_0-F)}{F}\right]$ 26

รูปที่ 17 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{1}{T}$ กับ $\ln K_a$ 27

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ค่า parameters ที่เกี่ยวข้องกับกรดอะมิโน ในสารละลาย pH 7 7

ตารางที่ 2 Parameter ต่างๆ ที่ใช้ในการวัด Fluorescence intensity ด้วยเครื่อง FP-8200 spectrofluorometer 15

ตารางที่ 3 ค่า K_{SV} ของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาและเคอร์คิวมินที่อุณหภูมิ 293, 299 และ 305 เคลวิน 23

ตารางที่ 4 ค่าคงที่ของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาและเคอร์คิวมิน ที่อุณหภูมิ 293, 299 และ 305 เคลวิน 25

ตารางที่ 5 จำนวนตำแหน่งในการเกิดอันตรกิริยาของทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาที่อุณหภูมิ 293, 299 และ 305 เคลวิน 26

ตารางที่ 6 ค่า Enthalpy Entropy และ Gibbs free energy ที่คำนวณได้จากสมการที่ 5 28

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

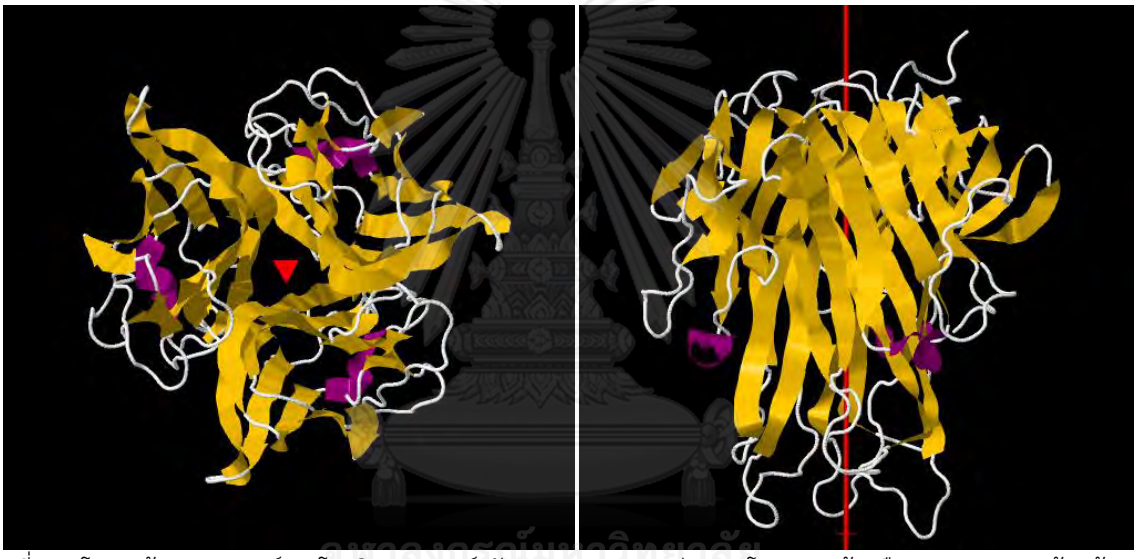
บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการศึกษา

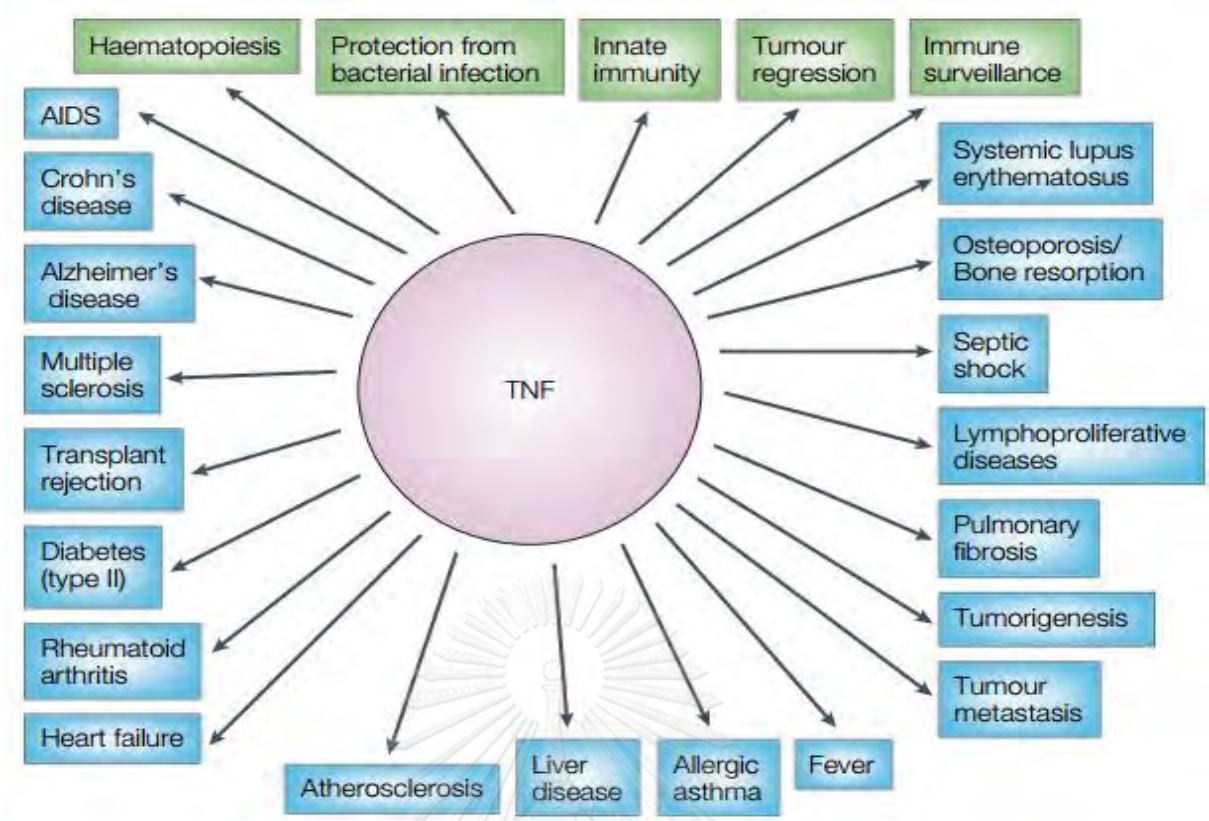
ทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟา (tumor necrosis factor alpha, TNF-α) เป็นโปรตีนไซโตไคน์ (cytokine) ซึ่งโครงสร้างที่มีฤทธิ์ (biologically active) นั้นเป็น homotrimer ที่ประกอบจาก monomer ที่เหมือนกันขนาด 17 kDa จำนวน 3 หน่วยย่อยมารวมกัน ซึ่งแต่ละหน่วยย่อยนั้น มีการจัดเรียงตัวแบบ anti-parallel β-sandwich และยึดเกาะกันด้วยพันธะ covalent (disulfide bonding จาก cysteine residue) ทำให้เกิด homotrimer ที่มีรูปทรงคล้ายระฆัง (bell shaped) ที่สมมาตรทั้ง 3 ด้าน (รูปที่ 1) (1) โดยที่ส่วนบนและส่วนล่างจะประกอบด้วย amino acid residues ที่มีขั้วและมีประจุ แต่ในส่วนตรงกลางจะเป็นส่วนที่มีความเป็น hydrophobic หรือเป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (2)



รูปที่ 1 โครงสร้างของทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟา; ภาพจากมุมล่างของโมเลกุล (ซ้ายมือ) และภาพจากด้านข้างของโมเลกุล (ขวามือ) (1)

ทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาเป็นไซโตไคน์ที่ทำหน้าที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบและการตอบสนองของภูมิคุ้มกัน โดยทั่วไปจะถูกหลั่งออกมาจาก monocyte หรือ macrophage เป็นหลัก ในสภาวะที่ร่างกายเป็นปกติทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาจะช่วยในการรักษาสมดุลของร่างกายและมีส่วนช่วยในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายในการป้องกันร่างกายจากการติดเชื้อ แต่ในทางกลับกันทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาเป็นตัวการหลักที่ก่อให้เกิดการอักเสบในหลายโรค (รูปที่ 2) เช่น โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ โรคเบาหวาน โรคหลอดเลือดหัวใจ รวมไปถึงโรคมะเร็ง (3) โดยเกิดจากการที่ในบริเวณที่อักเสบนั้นมีความเข้มข้นของทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้มีการดึงดูดสารจำพวก adhesion molecules และ angiogenic factors ไปยังบริเวณนั้น ก่อให้เกิดการอักเสบขึ้น (4, 5) ดังนั้นหากสามารถยับยั้งการทำงานของทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาได้ ก็สามารถช่วยหยุดหรือชะลอการดำเนินของโรคดังกล่าวได้

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

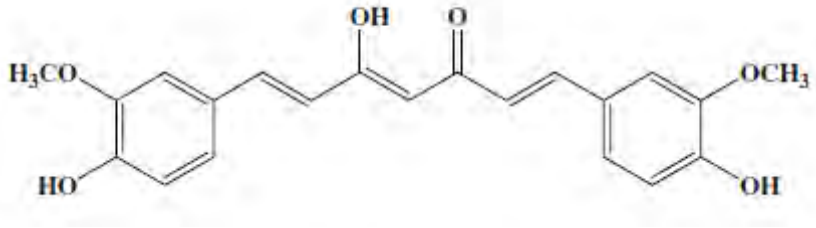


รูปที่ 2 บทบาทหน้าที่ของทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟา ในสภาวะที่ร่างกายปกติ (สีเขียว) และโรคต่างๆ ที่ทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟามีบทบาทเกี่ยวข้องในการทำให้เกิดพยาธิภาพของโรค (สีฟ้า) (3)

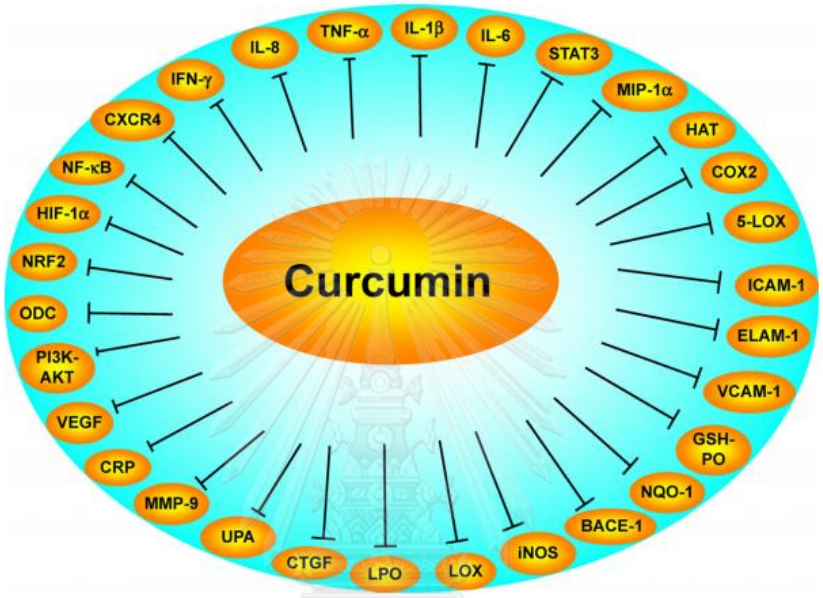
ในปัจจุบันยาที่ยับยั้งทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟา ซึ่งออกฤทธิ์โดยการจับกับทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาโดยตรงนั้นมีอยู่ในรูปแบบที่เป็น monoclonal antibody ชื่อว่า infliximab ได้รับการอนุมัติให้ใช้ในการรักษาโรค psoriasis, Crohn's disease, ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis, rheumatoid arthritis และ ulcerative colitis (6) แต่ทั้งนี้ยังไม่มียาที่เป็นสารเคมีโมเลกุลเล็กที่ถูกพัฒนาเพื่อใช้ในการยับยั้งการทำงานของทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟา

เคอร์คิวมิน หรือ 1, 7-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiens-3,5-dione (รูปที่ 3) เป็นสารสำคัญที่สกัดได้จากเหง้าของขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.) ซึ่งเป็นสมุนไพรไทยที่มีการใช้มาเป็นระยะเวลานาน จากการศึกษาที่ผ่านมาระบุว่าเคอร์คิวมินเป็นสารที่ออกฤทธิ์กว้าง มีประสิทธิภาพทั้งในการต้านการอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการเกิดเนื้องอกและต้านเชื้อไวรัสและแบคทีเรีย (7) ทั้งนี้จากการที่เคอร์คิวมินมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ จึงทำให้มีการศึกษาแนวโน้มในการพัฒนา เคอร์คิวมินเพื่อนำไปใช้ในบรรเทาอาการจากโรคที่เกิดจากการอักเสบเรื้อรัง (chronic inflammatory disease) เช่น โรคความเสื่อมของระบบประสาท โรคหัวใจ หอบหืด ข้ออักเสบและสะเก็ดเงิน เป็นต้น (8) จากการศึกษาพบว่าเคอร์คิวมินสามารถออกฤทธิ์ต้านการอักเสบผ่านการกระตุ้นหรือยับยั้งไซโตไคน์, สารตัวกลางที่ก่อให้เกิดการอักเสบ และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบหลายชนิด ดังแสดงในรูปที่ 4

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



รูปที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของเคอร์คิวมิน (7)

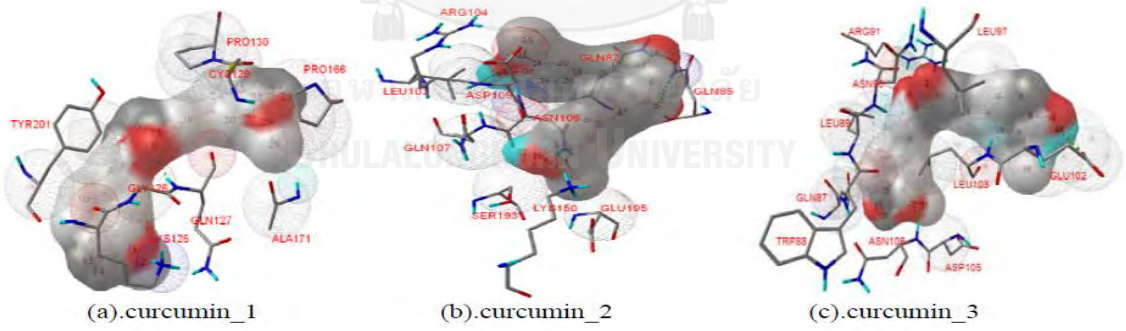


รูปที่ 4 โมเลกุลเป้าหมายในการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบของเคอร์คิวมิน (8)

จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าเคอร์คิวมินสามารถออกฤทธิ์ต้านการอักเสบผ่านการยับยั้งวิถีของทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟา ทั้งทางการทดลองในร่างกายและการทดลองในหลอดทดลองได้ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงผลทางอ้อมของเคอร์คิวมินที่มีต่อทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟา แต่ก็ยังไม่สามารถที่จะทราบถึงกลไกการออกฤทธิ์ที่เกิดขึ้นจริงของเคอร์คิวมิน (9) ทั้งนี้การศึกษาอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างโมเลกุลยาและสารโมเลกุลใหญ่ ทั้งที่เป็นตัวรับ (receptor), ไซโตไคน์, สารตัวกลาง (mediator) และเอนไซม์ต่างๆ นั้น อาจเป็นแนวทางหนึ่งที่ทำให้สามารถเข้าใจกลไกการออกฤทธิ์ของยาได้มากขึ้น โดยการทราบถึงลักษณะของอันตรกิริยาที่เกิดขึ้น ตำแหน่งที่โมเลกุลยาไปเกิดอันตรกิริยากับโมเลกุลนั้น (binding site) รวมไปถึงความชอบ (affinity) ในการเกิดอันตรกิริยาจะเป็นแนวทางในการพัฒนาโมเลกุลยาต่อไปได้ โดยทั่วไปอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างโมเลกุลยากับกรดอะมิโนของสารโมเลกุลใหญ่ ที่บริเวณตำแหน่งที่เกิดอันตรกิริยานั้นจะเป็น non-covalent เช่น H-bond, Hydrophobic bond และ ionic bond เป็นต้น

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

ในส่วนการศึกษาการเกิดอันตรกิริยาของทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟากับเคอร์คิวมินนั้นในปี 2010 Wua และคณะ (10) ได้ทำการศึกษาโดยใช้เทคนิค molecular docking แสดงให้เห็นถึงตำแหน่งในการเกิดอันตรกิริยา และกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลทั้งสอง (รูปที่ 5) ซึ่งถือเป็นการศึกษาที่สำคัญที่แสดงให้เห็นถึงแนวโน้มในการพัฒนาโมเลกุลยาต่อไปได้และสามารถช่วยสร้างความเข้าใจในแง่ของกลไกการออกฤทธิ์ของเคอร์คิวมินได้เพิ่มเติมมากยิ่งขึ้น แต่ทั้งนี้การศึกษานี้เป็นเพียงการทำนายผลผ่านการใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ ไม่ได้มีการทำการทดลองจริงและยังไม่มีการศึกษาใดที่ทำการทดลองการเกิดอันตรกิริยาโดยตรงระหว่างเคอร์คิวมินและทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟา ดังนั้นการศึกษานี้จึงเป็นการทดลองการเกิดอันตรกิริยาโดยตรงระหว่างเคอร์คิวมินและทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาที่ความเข้มข้นในช่วงใกล้เคียงกับในสภาวะร่างกาย โดยใช้ทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาความเข้มข้นคงที่และเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเคอร์คิวมิน และใช้เทคนิค Fluorescence quenching spectroscopy เพื่อติดตามการเกิดอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลทั้ง 2 นี้ ซึ่งเป็นวิธีการที่ไม่ยุ่งยาก มีความน่าเชื่อถือและสามารถทำซ้ำได้ นอกจากนี้ยังสามารถคำนวณหาค่าคงที่ของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเคอร์คิวมินกับทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟา ได้จากค่า association constant (K_a) และหาจำนวนโมเลกุลของเคอร์คิวมินที่ทำอันตรกิริยาพอดีกับทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟา 1 โมเลกุล (n) นั่นคือจำนวนตำแหน่งในทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาที่เกิดอันตรกิริยาเคอร์คิวมิน โดยใช้สมการ Stern–Volmer และ modified Stern–Volmer คำนวณพารามิเตอร์ทางอุณหพลศาสตร์เพื่ออธิบายการเกิดอันตรกิริยาระหว่างเคอร์คิวมินและทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟา



รูปที่ 5 ตำแหน่งในการเกิดอันตรกิริยาและกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอันตรกิริยาระหว่างทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟากับเคอร์คิวมิน (10)

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาอันตรกิริยาระหว่างเคอร์คิวมินกับทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาโดยอาศัยเทคนิค Fluorescence quenching spectroscopy

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เมื่อสิ้นสุดโครงการปริญญานิพนธ์นี้ สามารถทราบอันตรกิริยาระหว่างอนุพันธ์ของเคอร์คิวมินกับทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาว่าสามารถเกิดอันตรกิริยากันได้โดยตรงหรือไม่ ซึ่งจะส่งผลให้เข้าใจถึงกลไกในการมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ และฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นที่เกี่ยวข้องกับทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาของเคอร์คิวมินมากยิ่งขึ้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

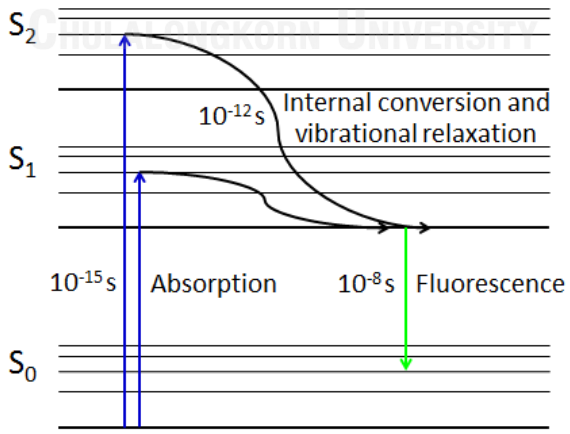
บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

บทที่ 2
ปริทัศน์วรรณกรรม

2.1 หลักการของฟลูออเรสเซนท์

Fluorescence คือ ปรากฏการณ์อย่างหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับโมเลกุลที่มีลักษณะโครงสร้างที่สามารถให้แสง fluorescence ได้ เรียกโครงสร้างนี้ว่า fluorophore ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นโครงสร้างที่มีการคอนจุเกตของพันธะไพเป็นจำนวนมาก เช่น aromatic ring (11) โมเลกุลที่มี fluorophore สามารถดูดกลืนพลังงานแสงจากภายนอกที่ความยาวคลื่นหนึ่งๆ ซึ่งมีพลังงานมากพอที่ทำให้ electron ภายในโมเลกุลเกิดการเปลี่ยนระดับพลังงาน (transition) จากชั้น ground state (S_0) สู่ชั้น excited state (S_1, S_2,...S_n) โดยในแต่ละชั้นของระดับพลังงานประกอบด้วยชั้นพลังงานย่อย คือ vibrational sublevel และ rotational sublevel อีกหลายชั้น กระบวนการดูดกลืนแสงนี้ใช้เวลาประมาณ 10^{-15} วินาที (13) จากนั้นอิเล็กตรอนที่ excited state จะคายพลังงานออกมาในรูปของความร้อนกลับสู่ vibrational state ชั้นที่ต่ำที่สุดของชั้น excited state ระดับแรก (S_1) ด้วยกระบวนการที่เรียกว่า internal conversion และ vibrational relaxation (11, 12) ซึ่งใช้เวลาประมาณ 10^{-12} วินาที และคายพลังงานกลับสู่ชั้น ground state ด้วยกระบวนการที่เรียกว่า fluorescence ซึ่งใช้เวลาประมาณ 10^{-8} วินาที เนื่องพลังงานที่คายออกมาในรูป fluorescence มีค่าน้อยกว่าพลังงานที่ถูกดูดกลืน ทำให้แสงที่ fluorescence มีความยาวคลื่นมากกว่าแสงที่ถูกดูดกลืน (12) กระบวนการต่างๆนี้สามารถอธิบายได้จาก Jablonski diagram ตามรูปที่ 6

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



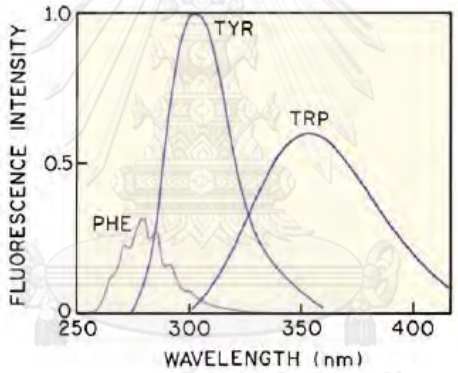
รูปที่ 6 Jablonski diagram

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

โปรตีนเป็นสารชนิดหนึ่งที่มีคุณสมบัติในการปล่อยแสง fluorescence ออกมาได้ เนื่องจากมีกรดอะมิโนบางโมเลกุลที่มีโครงสร้าง aromatic ได้แก่ tryptophan, tyrosine และ phenylalanine โดย tryptophan และ tyrosine นั้นจะมีค่า quantum yield ที่สูงใกล้เคียงกัน จึงให้ fluorescence intensity สูง แต่ phenylalanine จะมี quantum yield ที่ต่ำกว่า (รูปที่ 7) ทำให้ phenylalanine มีความสำคัญน้อยกว่า tryptophan และ tyrosine (ตารางที่ 1) ซึ่งในกรณีของ tryptophan นั้น emission ของโมเลกุลมีความไวต่อสภาวะแวดล้อมรอบๆตัวมันค่อนข้างมาก จึงถูกนำมาใช้ในการติดตามเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน หรือใช้ในการติดตามเพื่อศึกษาการเกิดอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนและสารเคมีชนิดอื่นๆ (14)

ตารางที่ 1 ค่า parameters ที่เกี่ยวข้องกับกรดอะมิโน ในสารละลาย pH 7 (12)

Species[a]	λ_{ex} (nm)	λ_{ex} (nm)	Bandwidth (nm)	Quantum yield	Lifetime (ns)
Phenylalanine	260	282	–	0.02	6.8
Tyrosine	275	304	34	0.14	3.6
Tryptophan	295	353	60	0.13	3.1 (mean)



รูปที่ 7 Emission spectrum ของ tryptophan (TRP), tyrosine (TYR) และ phenylalanine (PHE) (12)

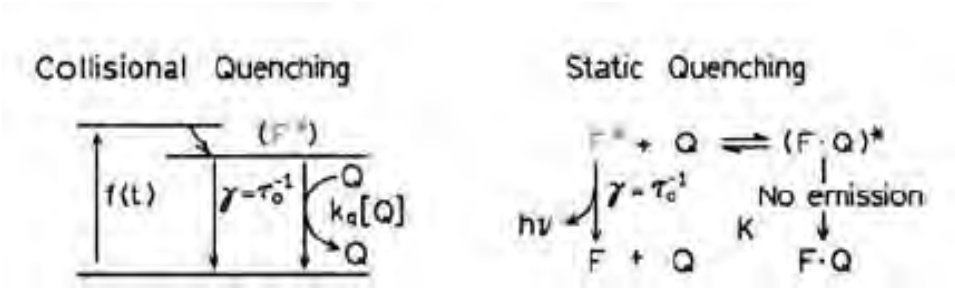
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.2 หลักการเกิด quenching ของฟลูออเรสเซนท์ (11)

Fluorescence quenching หมายถึง กระบวนการใดก็ตามที่เกิดขึ้นแล้วมีผลทำให้ค่า fluorescence intensity ของสารลดลง กลไกในการเกิด quenching สามารถแบ่งได้ออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ collision quenching หรือ dynamic quenching และ static quenching โดย dynamic quenching นั้นเกิดจากการที่โมเลกุลเกิดการแพร่หรือชนกับโมเลกุลที่มี fluorophore และอยู่ในช่วง excited state เกิดการถ่ายเทพลังงานกลับสู่ ground state ออกมาในรูปความร้อน ไม่ได้ emission photon ออกมา (รูปที่ 8) ซึ่งไม่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ fluorophore ต่างจาก

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

static quenching ที่โมเลกุลที่มี fluorophore เกิดอันตรกิริยากับ quencher ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนขึ้น โดยที่สารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นนั้นไม่สามารถให้ emission หรือ flurescence intensity ออกมาได้ (รูปที่ 8) การแยกว่า quenching ที่เกิดขึ้นเป็นรูปแบบใดสามารถทำได้โดยใช้สมการที่ชื่อว่า Stern-Volmer



รูปที่ 8 การเปรียบเทียบระหว่าง Collision หรือ Dynamic quenching กับ Static quenching (11)

สมการ Stern-Volmer จะพิจารณาจากค่า fluorescence intensity ที่เปลี่ยนแปลงไประหว่างที่มี และไม่มี quencher โดยที่ fluorescence intensity ที่ได้จาก fluorophore จะเป็นค่าความเข้มข้นของ fluorophore ที่ excited state, $[F*]$ ภายใต้การให้แสงกระตุ้นอย่างต่อเนื่องจะเป็นผลทำให้ fluorophore ที่ถูกกระตุ้นมีปริมาณคงที่ ดังนั้น $d[F*]/dt = 0$ โดยสามารถอธิบายได้ทั้งในกรณีที่มีและไม่มี quencher ตามสมการต่อไปนี้

$$\frac{d[F*]}{dt} = f(t) - \gamma[F*]_0 = 0 \qquad \text{สมการที่ 1}$$

$$\frac{d[F*]}{dt} = f(t) - \left(\gamma + K_q[Q]\right)[F*] = 0 \qquad \text{สมการที่ 2}$$

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

$[F*]$ - fluorescence intensity ของ fluorophore ที่อยู่ใน excited state

$f(t)$ - constant excitation function

γ - decay rate ของ fluorophore เมื่อไม่มี quencher

$\gamma + K_q[Q]$ - decay rate ของ fluorophore เมื่อมี quencher

เมื่อนำสมการ 1 มาหารกับ สมการ 2 จะได้

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\gamma + k_q[Q]}{\gamma} = 1 + k_q\tau_0[Q] \qquad \text{สมการที่ 3}$$

หรือ

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q\tau_0[Q] = 1 + K_{SV}[Q] \qquad \text{(สมการที่ 3)}$$

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

F_0 - fluorescence intensity เมื่อไม่มี quencher

F - fluorescence intensity เมื่อมี quencher

k_q - bimolecular quenching constant

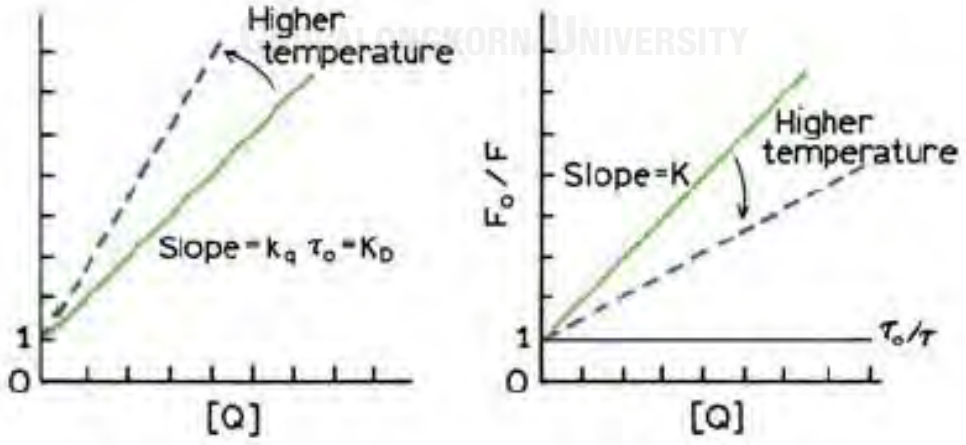
K_{SV} - Stern-Volmer quenching constant

τ_0 - lifetime ของ fluorophore เมื่อไม่มี quencher

$[Q]$ - ความเข้มข้นของ quencher

โดยนำค่า fluorescence intensity ที่ได้จากการทำการทดลองมาเขียนเป็นความสัมพันธ์ โดยกำหนดให้แกน X คือ $[Q]$ และ แกน Y คือ $\frac{F_0}{F}$ จะได้ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงตามสมการที่ 3 โดยจะสามารถหาค่า K_{SV} ได้จากความชัน ซึ่งพบว่าถ้าหาก quenching ที่เกิดขึ้นเป็นแบบ dynamic quenching ค่า K_{SV} จะมีค่าสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองมีค่าสูงขึ้น เนื่องจากค่าการแพร่ของโมเลกุลไปชนกันเพิ่มสูงขึ้น แต่ถ้าquenching ที่เกิดขึ้นเป็นแบบ static quenching ค่า K_{SV} จะมีค่าลดลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิขึ้น เนื่องจากอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นจะไปทำลายพันธะที่เกิดขึ้นระหว่างสารทั้ง 2 โมเลกุลทำให้สารประกอบเชิงซ้อนแยกออกจากกันได้มากขึ้น (รูปที่ 9)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



รูปที่ 9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า K_{sv} เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น (11)

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

2.3 Modified Stern-Volmer (11)

เนื่องจากโปรตีนส่วนใหญ่ประกอบด้วยกรดอะมิโน tryptophan มากกว่า 1 โมเลกุล ซึ่งอาจจะมีเพียงบางโมเลกุลที่จะสามารถเกิด quenching กับ quencher ได้ โดยจะเรียกว่าส่วนที่เข้าถึงได้ (accessible, a) และอาจจะมีบางโมเลกุลที่ quencher ไม่สามารถเข้าไปเกิด quenching ได้ โดยจะเรียกว่าส่วนที่เข้าถึงไม่ได้ (inaccessible, b) ดังนั้นปริมาณแสง fluorescence ที่ปล่อยออกมาในขณะที่ยังไม่มี quencher (F_0) จะประกอบไปด้วย fluorescence จากส่วนที่เข้าถึงได้รวมกับ fluorescence จากส่วนที่เข้าถึงไม่ได้

$$F_0 = F_{0a} + F_{0b} \qquad \text{สมการที่ 4}$$

เมื่อมี quencher เข้าไปเกิด quenching กับโปรตีน จะทำให้ intensity ในส่วนที่เข้าถึงได้มีปริมาณลดลงตามหลักของ Stern-Volmer equation แต่ในส่วนที่เข้าถึงไม่ได้จะไม่เกิด quenching ดังนั้นจะเขียนสมการ 4 ใหม่ได้ดังนี้

$$F = \frac{F_{0a}}{1+K_a[Q]} + F_{0b} \qquad \text{สมการที่ 5}$$

เมื่อ K_a คือ Stern-Volmer quenching constant ของส่วนที่เข้าถึงได้ และ $[Q]$ คือความเข้มข้นของ quencher จากนั้นนำสมการที่ 4 ลบด้วยสมการที่ 5 จะได้

$$\Delta F = F_0 - F = F_{0a}\left(\frac{K_a[Q]}{1+K_a[Q]}\right) \qquad \text{สมการที่ 6}$$

นำส่วนกลับของสมการที่ 6 หารด้วยสมการที่ 4 จะได้

$$\frac{F_0}{\Delta F} = \frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{1}{f_a K_a[Q]} + \frac{1}{f_a} \qquad \text{สมการที่ 7}$$

กำหนดให้ $f_a = \frac{F_{0a}}{F_{0b}+F_{0a}}$

สมการที่ 7 คือ สมการ modified Stern-Volmer หากนำสมการที่ได้นี้ไปหาความสัมพันธ์ โดยกำหนดให้แกน X คือ $\frac{1}{[Q]}$ และแกน Y คือ $\frac{F_0}{\Delta F}$ จะพบว่าความสัมพันธ์ที่ได้เป็นเส้นตรงและสามารถหาค่าคงที่ของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน (K_a) ได้จากความชันและจุดตัดแกน Y คือ $\frac{1}{f_a}$

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

2.4 Stoichiometric ratio (14)

เนื่องจากการเกิดอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุล 2 ชนิดสามารถเขียนสมการเคมีได้ ดังนี้

$$F + nQ \rightleftharpoons FQ_n$$

F - สารที่มี fluorophore

Q - quencher

FQ_n - สารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง fluorophore กับ quencher

n - จำนวนโมเลกุลของ quencher ที่ทำอันตรกิริยาพอดีกับสารที่มี fluorophore 1 โมเลกุล (stoichiometric ratio)

สามารถคำนวณหาค่าคงที่ของการเกิดอันตรกิริยาได้ดังนี้

$$K_a = \frac{[FQ_n]}{[F_f][Q_f]^n}$$ สมการที่ 8

$[F_f]$ - ความเข้มข้นของ free fluorophore

$[Q_f]$ - ความเข้มข้นของ free quencher

เนื่องจากความเข้มข้นของ fluorophore ทั้งหมดก่อนที่จะมี quencher จะเท่ากับผลรวมของความเข้มข้น fluorophore อิสระ $[F_f]$ กับความเข้มข้น fluorophore $[F_b]$ ที่เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน

$$[F_t] = [F_f] + [F_b]$$

ดังนั้นสมการที่ 8 เขียนใหม่ได้เป็น

$$K_a = \frac{[F_t]-[F_f]}{[F_f][Q_f]^n}$$ สมการที่ 9

และสารที่จะให้แสง fluorescence ได้คือสารที่มี fluorophore เท่านั้น ดังนั้นจะกำหนดให้

$$[F_t] = F_0 \text{ และ } [F_f] = F$$

เมื่อนำไปแทนค่าลงในสมการที่ 9 จะได้

$$K_a = \frac{F_0-F}{F[Q_f]^n}$$ สมการที่ 10

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

จากนั้นเปลี่ยนสมการทั้งหมดให้อยู่ในรูป log จะได้

$$\log \frac{(F_0-F)}{F} = log\ K_a + nlog[Q] \qquad \text{สมการที่ 11}$$

นำค่า fluorescence intensity ที่ได้จากการทดลองมาหาความสัมพันธ์ โดยกำหนดให้แกน X คือ ความเข้มข้น $[Q]$ และแกน Y คือ $\log\frac{(F_0-F)}{F}$ ซึ่งจะได้ความสัมพันธ์ระหว่าง 2 ตัวแปรออกมาเป็นเส้นตรงตามสมการที่ 11 ซึ่งความชันที่ได้จากกราฟเส้นตรงจะเท่ากับค่า stoichiometric ratio

2.5 พารามิเตอร์ทางอุณหพลศาสตร์ (16)

เราสามารถใช้ Enthalpy (ΔH), Entropy (ΔS) และ Gibbs free energy (ΔG) ในการแปลผลเกี่ยวกับกลไกในการเกิดอันตรกิริยาระหว่างโปรตีน (fluorophore) กับ quencher ที่เราสนใจได้ ซึ่งสามารถหาค่า parameters ต่างๆได้จาก van't Hoff equation

$$ln\ K_a = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \qquad \text{สมการที่ 12}$$

โดยจะนำค่าคงที่ของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน (K_a) ที่คำนวณได้จากสมการ modified Stern-Volmer equation และได้จากการทดลองที่อุณหภูมิต่างกันอย่างน้อย 3 อุณหภูมิ มาหาความสัมพันธ์โดยกำหนดให้แกน X คือ $\frac{1}{T}$ และแกน Y คือ $ln\ K_a$ จะได้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงตามสมการ van't Hoff equation โดยสามารถหาค่า Enthalpy (ΔH) ได้จากความชันของเส้นตรง และ Entropy (ΔS) ได้จากจุดตัดแกน Y จากนั้นนำค่าทั้ง 2 ที่ได้แทนลงในสมการที่ 13 เพื่อหาค่า Gibbs free energy (ΔG) ดังนี้

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \qquad \text{สมการที่ 13}$$

จากงานวิจัยของ Ross PD และคณะ ในปี 1981 (15) ได้ทำการรวบรวมข้อมูลและสรุปสมมติฐานที่เกี่ยวข้องกับการใช้ตัวแปรทางอุณหพลศาสตร์เพื่อทำนายกลไกในการเกิดอันตรกิริยาระหว่างสาร 2 โมเลกุล นั้นว่าสามารถเกิดอันตรกิริยาระหว่างกันด้วยแรงพันธะชนิดใดดังนี้ (16)

(1) $\Delta H > 0$ และ $\Delta S > 0$ อันตรกิริยาที่เกิดขึ้นจะเป็นแบบ hydrophobic interaction

(2) $\Delta H < 0$ และ $\Delta S < 0$ อันตรกิริยาที่เกิดขึ้นจะเกิดจากแรง hydrogen bond และแรง van de Waals เป็นหลัก

(3) $\Delta H \cong 0$ และ $\Delta S < 0$ อันตรกิริยาเกิดขึ้นได้จากแรง Electrostatic interaction เป็นหลัก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

บทที่ 3
เครื่องมือที่ใช้และวิธีดำเนินการวิจัย

2.1 สารเคมี

1) Sodium chloride (NaCl; MW 58.44 g/mole) (Carlo Erba)
2) Potassium chloride (KCl; MW 74.5513 g/mole) (M&B LTD)
3) Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4; MW 141.9588 g/mole) (Unilab)
4) Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4; MW 136.0855 g/mole) (Merck)
5) Conc. Hydrochloric acid
6) Conc. Sodium hydroxide
7) Dimethyl sulfoxide (C_2H_6OS; MW 76.13 g/mole) (Merck)
8) TNF-α (R&D Systems)
9) Curcumin (MW 398.38)
10) Ethanol (C_2H_6O; MW 46.07 g/mole) (Macron chemical)
11) DI water
12) Ultrapure water

2.2 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือ

1) FP-8200 spectrofluorometer (JASCO)
2) Micro fluorometer Cell with Teflon stopper, 0.35 มิลลิลิตร
3) Magnetic stirrer
4) pH meter รุ่น SevenCompact (Mettler Toledo)
5) Auto Pipette (Lamda Plus)
6) เครื่อง centrifuge

2.3 การเตรียมสารเคมีและตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์

1) การเตรียม 10X PBS buffer pH 7.2

   ชั่ง Sodium chloride, Potassium chloride, Disodium hydrogen phosphate และ Potassium dihydrogen phosphate หนัก 40, 1, 7.2 และ 1.2 กรัม ตามลำดับ เทสารที่ชั่งทั้งหมดใส่ beaker ขนาด 500 มิลลิลิตร เติม ultrapure water ลงไป 400 มิลลิลิตร นำไปวางบนเครื่อง Magnetic stirrer จนเกลือละลายหมด นำไปปรับ pH ให้ได้ 7.2 ด้วย Conc. Hydrochloric acid หรือ Conc. Sodium hydroxide จากนั้นเทสารละลายลงใน volumetric

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

flask ขนาด 500 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนครบด้วย ultrapure water เทสารละลายใส่ขวดแก้ว เก็บในตู้เย็น

2) การเตรียมสารละลาย 1X PBS buffer pH 7.2
ปิเปตสารละลาย 10X PBS buffer 10 มิลลิลิตร ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนครบด้วย ultrapure water

3) การเตรียมสารละลายเข้มข้นของทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟา ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์
นำขวดแก้วที่บรรจุทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาน้ำหนัก 100 ไมโครกรัม ออกจากตู้แช่แข็ง วางทิ้งไว้จนมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง Reconstitute ด้วย ultrapure water ปริมาตร 57 ไมโครลิตร กลิ้งขวดแก้วบนฝ่ามือจนละลายหมด ปิเปตสารละลายทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาปริมาตร 10 ไมโครลิตร ด้วย auto pipette ใส่ลงใน appendorf จำนวน 5 อัน นำไปแช่ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส

4) การเตรียมสารละลายเจือจางของทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟา ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์
นำ appendorf 1 อัน ออกมาจากตู้เย็น วางทิ้งไว้จนมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง ปิเปตสารละลายออกมา 2.6 ไมโครลิตร ใส่ลงใน appendorf อีกอันหนึ่ง จากนั้นปิเปตสารละลาย PBS buffer ปริมาตร 257 ไมโครลิตร เติมลงไป กลิ้ง appendorf บนฝ่ามือเพื่อให้สารละลายผสมเข้ากันดี นำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 15 วินาที

5) การเตรียมเคอร์คิวมิน ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ใน ethanol
ชั่ง เคอร์คิวมิน หนัก 36.84 มิลลิกรัม เทใส่ใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร ปิเปต DMSO 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงไปเพื่อช่วยการละลาย swirl จนเคอร์คิวมินละลายหมด ปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตร ด้วย ethanol

6) การเตรียมสารละลาย 50:50 ethanol/น้ำ
ตวงสารละลาย ethanol และน้ำ อย่างละ 50 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดแก้ว swirl สารละลายให้เข้ากัน

7) การเตรียมเคอร์คิวมิน ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ใน 50:50 ethanol/น้ำ
ไปเปต 10 มิลลิโมลาร์ เคอร์คิวมิน stock solution 0.1 มิลลิลิตร ใส่ใน appendorf เติม 50:50 ethanol/น้ำ 0.9 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ จากนั้นเจือจางต่ออีกครั้งโดยไปเปตเคอร์คิวมิน ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ใน appendorf แล้วเติม 50:50 ethanol/น้ำ ลงไป 0.9 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

2.4 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

1) การวัด emission spectrum ของทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์

วัดหา emission spectrum ของทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟา ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ในสารละลาย PBS buffer pH 7.2 โดยบรรจุสารละลายดังกล่าวปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ใน cuvette ขนาด 0.35 มิลลิลิตร และใช้ blank เป็น PBS buffer pH 7.2 บันทึกค่า intensity ที่ความยาวคลื่น 315 นาโนเมตร (F_0) และ spectrum ที่วัดได้ โดยใช้ parameter ต่างๆ ในการวัดตามตารางที่ 2 ด้านล่าง

ตารางที่ 2 Parameter ต่างๆ ที่ใช้ในการวัด Fluorescence intensity ด้วยเครื่อง FP-8200 spectrofluorometer

Mode	Emission
Excitation bandwidth	5 nm
Emission bandwidth	5nm
Response	0.2 sec
Sensititvity	Low
Data interval	0.5 nm
Excitation wavelength	280 nm
Measurement range	300-400 nm
Scan speed	200 nm/min

การทำ blank

ปิเปต PBS buffer ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ใส่ลงใน cuvette นำ cuvette ใส่ลงใน sample compartment ของเครื่อง แล้วกดวัด blank

2) การวัด Emission spectrum ของเคอร์คิวมินความเข้มข้น 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 2.4, 2.8, 3.2, 3.6, 4.0, 4.4, 4.8, 5.2, 5.6, 6.0, 6.4, 6.8, 7.2, 7.6 และ 8.0 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ เพื่อดู emission spectrum ที่เกิดขึ้นจากเคอร์คิวมินเมื่อใช้ความยาวคลื่นสำหรับการ excitation เท่ากันกับทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาโดยวัดหา emission spectrum ของเคอร์คิวมินซึ่งค่อยๆ ถูกไทเทรตครั้งละ 1 ไมโครลิตร ลงในสารละลาย PBS buffer pH 7.2 ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ใน cuvette ขนาด 0.35 มิลลิลิตร (จะทำให้ความเข้มข้นของเคอร์คิวมินใน cuvette เพิ่มขึ้นตามลำดับข้างต้น) โดยใช้ blank เป็น PBS buffer pH 7.2 และ

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

ใช้ parameter ต่างๆ ในการวัดเช่นเดียวกันกับการวัด spectrum ของ TNF-α บันทึกค่า intensity ที่ความยาวคลื่น 315 นาโนเมตร และ emission spectrum ที่วัดได้

การทำ blank

ปิเปต PBS buffer ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ใส่ลงใน cuvette นำ cuvette ใส่ลงใน sample compartment ของเครื่อง แล้วกดวัด blank

การไทเทรตสารละลายเคอร์คิวมิน

บรรจุ PBS buffer ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ใส่ลงใน cuvette ขนาด 0.35 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายเคอร์คิวมินจาก stock ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ใส่ลงใน cuvette ปิดฝาจุกแล้วพลิกกลับไปมาเพื่อให้สารละลายผสมเข้ากันดี เช็ด cuvette ด้วยกระดาษเช็ดเลนส์ก่อนใส่ลงใน sample compartment ของเครื่อง แล้วกดวัด

3) การวัด emission spectrum ของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาและเคอร์คิวมิน

โดยใช้เทคนิคการไทเทรตสารละลายเคอร์คิวมิน (เช่นเดียวกันกับการทดลองหา emission spectrum ของเคอร์คิวมิน) ลงใน cuvette ที่บรรจุทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาความเข้มข้นคงที่ที่ 1 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร และทดสอบการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่ 3 อุณหภูมิ ได้แก่ 20, 26 และ 32 องศาเซลเซียส (293, 299 และ 305 เคลวิน) ตามลำดับ บันทึกค่า fluorescence intensity ที่ความยาวคลื่น 315 นาโนเมตร (F) และ emission spectrum ที่เกิดขึ้น

การทำ blank

ปิเปต PBS buffer ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ใส่ลงใน cuvette นำ cuvette ใส่ลงใน sample compartment ของเครื่อง แล้วกดวัด blank

การวัด Fluorescence intensity และspectrum ของ TNF-α

ปิเปตสารละลายทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาจากสารละลายความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ใส่ลงใน cuvette แล้วนำ cuvette ใส่ลงใน sample compartment ของเครื่อง FP-8200 spectrofluorometer กดวัด sample

ปิเปต เคอร์คิวมิน ครั้งละ 1 ไมโครลิตร ใส่ลงใน cuvette ปิดฝาจุก พลิกกลับไปมาให้สารละลายผสมเข้ากัน จากนั้นใส่ cuvette ลงใน sample compartment ของเครื่อง FP-8200 spectrofluorometer กดวัด sample บันทึก spectrum และค่า Fluorescence intensity

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

4) การศึกษากลไกการเกิดอันตรกิริยา (Quenching mechanism) การหาค่าคงที่ของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน (K_a) และจำนวนตำแหน่งในการเกิดอันตรกิริยา (n)

5) การศึกษาทางอุณหพลศาสตร์ (Thermodynamic) ของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างเคอร์คิวมินและทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟานำข้อมูลและค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ได้จากการศึกษา fluorescence มาคำนวณค่าทางอุณหพลศาสตร์โดยใช้สมการ van't Hoff equation

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

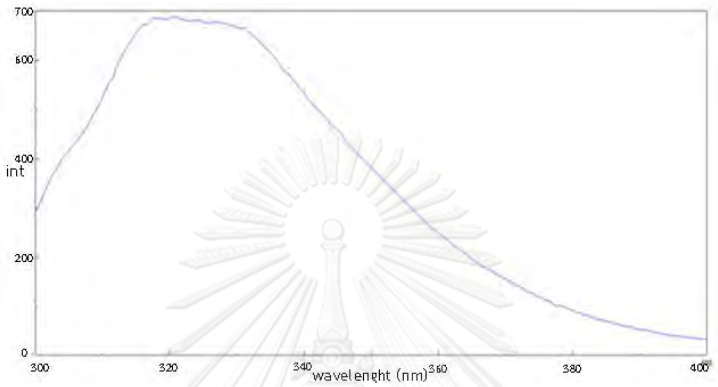
บทที่ 4

ผลและอภิปรายผลการวิจัย

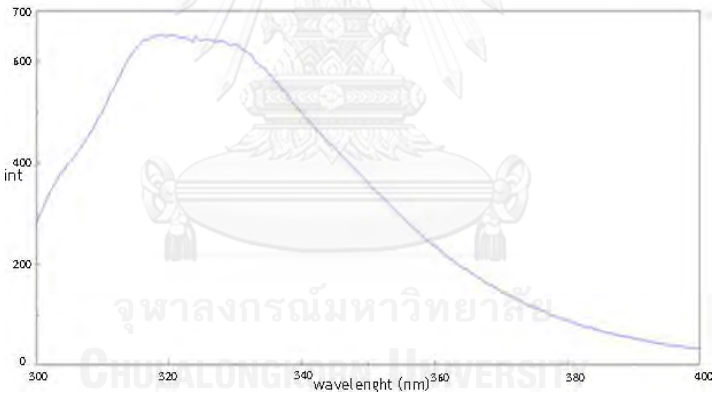
4.1 Emission spectrum ของทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์

ลักษณะ emission spectrum ที่ได้จากทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาเมื่อวัดที่อุณหภูมิแตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 10

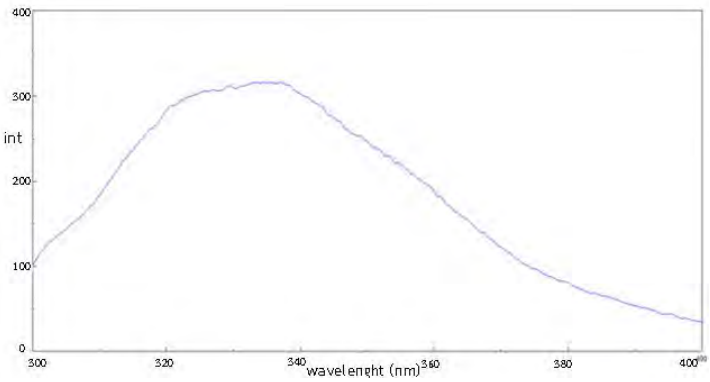
A.



B.



C.



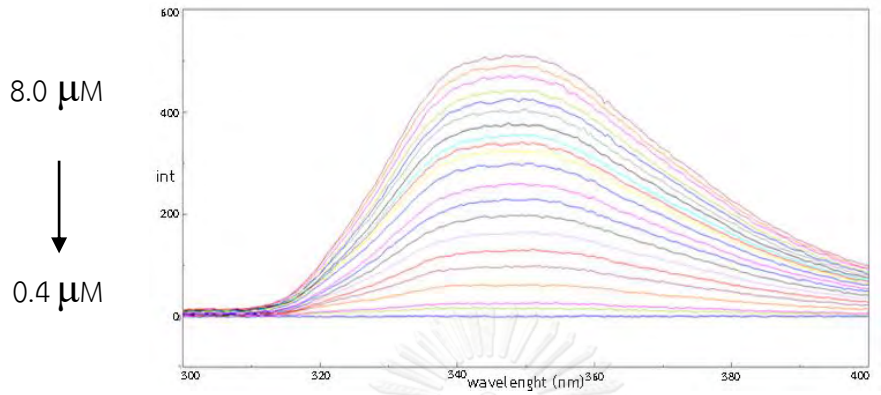
รูปที่ 10 Emission spectra ของทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ที่อุณหภูมิ(A) 293 เคลวิน (B) 299 เคลวิน และ (C) 305 เคลวิน

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

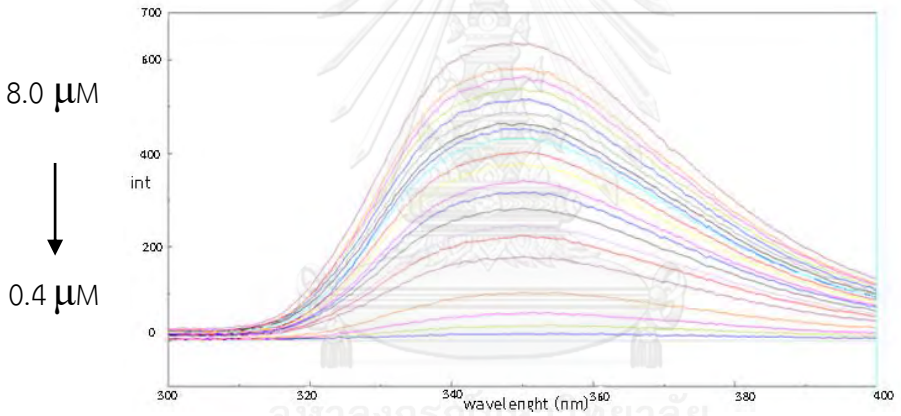
4.2 Emission spectra ของเคอร์คิวมินความเข้มข้น 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 2.4, 2.8, 3.2, 3.6, 4.0, 4.4, 4.8, 5.2, 5.6, 6.0, 6.4, 6.8, 7.2, 7.6 และ 8.0 ไมโครโมลาร์

ลักษณะ emission spectra ของ เคอร์คิวมิน ดังแสดงในรูปที่ 11

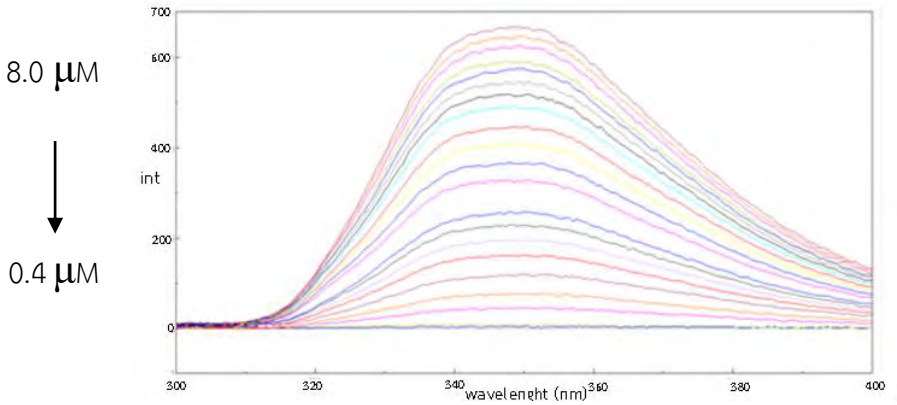
A.



B.



C.

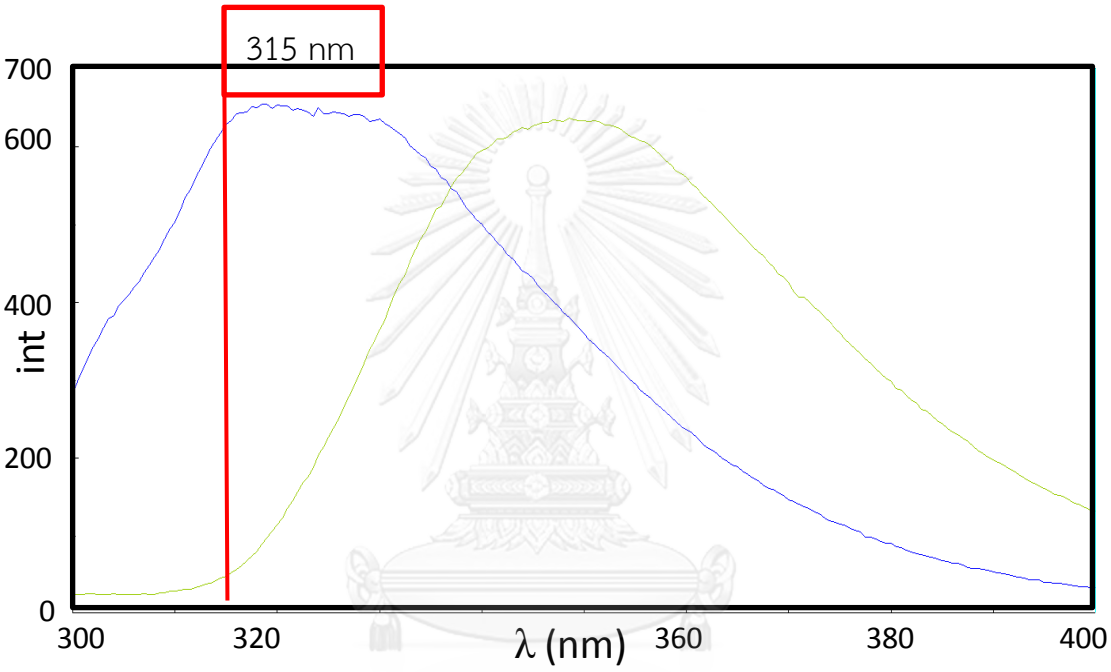


รูปที่ 11 Emission spectra ของเคอร์คิวมินที่อุณหภูมิ (A) 293 เคลวิน (B) 299 เคลวิน และ (C) 305 เคลวิน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

จะเห็นได้ว่าเคอร์คิวมินเมื่อใช้ความยาวคลื่นในการ excitation เท่ากันกับทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาคือที่ 280 นาโนเมตร จะให้ emission spectra ออกมารบกวน spectrum ของทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาในช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 320 นาโนเมตร เป็นต้นไป ดังนั้นเพื่อเป็นการตัดผลรบกวนจาก emission spectrum ของเคอร์คิวมิน จึงควรเลือกความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการบันทึกค่า fluorescence intensity โดยการนำ emission spectrum ของสารทั้งสองชนิดมาซ้อนทับกัน โดยใช้ทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ และเคอร์คิวมินที่ความเข้มข้น 8 ไมโครโมลาร์ เนื่องจากเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดลอง ซึ่งมีโอกาสส่งผลรบกวนมากที่สุดดังแสดงในรูปที่ 12



รูปที่ 12 Emission spectrum ของทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟา (สีน้ำเงิน) และ เคอร์คิวมิน (สีเขียว)

ดังนั้นในการบันทึกผล fluorescence intensity ของสารประกอบเชิงซ้อนจึงควรเลือกใช้ความยาวคลื่นที่ต่ำกว่า 320 นาโนเมตร ซึ่งในการทดลองนี้เลือกใช้ที่ 315 นาโนเมตร เนื่องจากมีผลรบกวนจากเคอร์คิวมินน้อยที่สุดและยังคงเป็นช่วง peak ของ emission spectrum ของทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟา

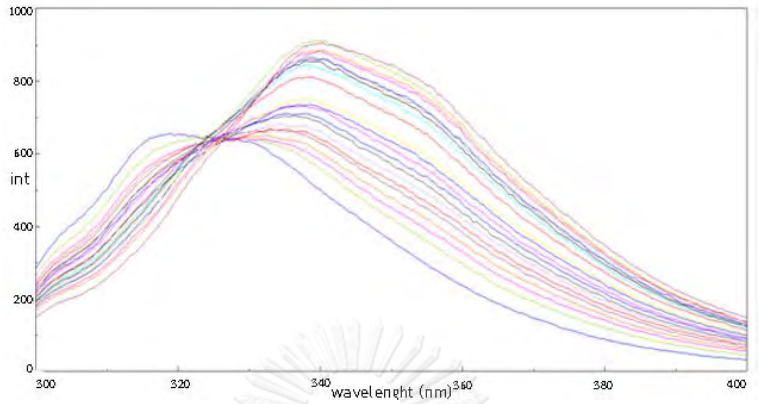
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

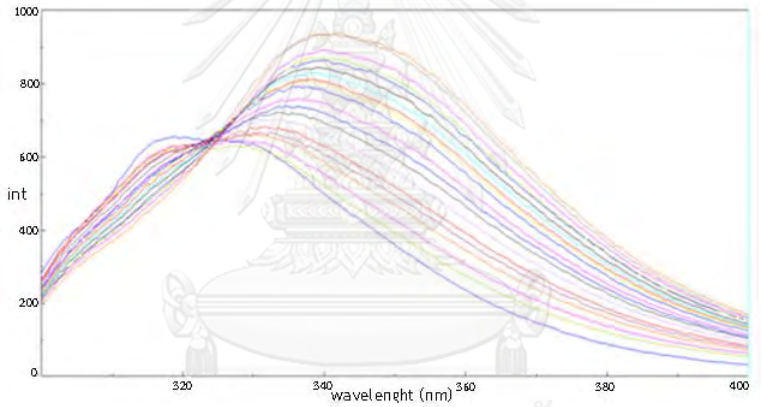
4.3 Emission spectrum ของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาและเคอร์คิวมิน

ลักษณะของ emission spectrum ของสารประกอบเชิงซ้อนดังแสดงในรูปที่ 13

A.

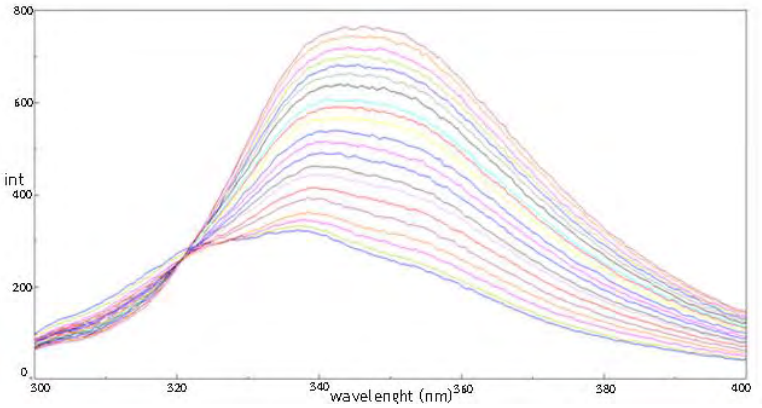


B.



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

C.



รูปที่ 13 Emission spectra ของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง TNF-α และเคอร์คิวมินที่อุณหภูมิ (A) 293 เคลวิน (B) 299 เคลวิน และ (C) 305 เคลวิน

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

จาก emission spectrum ของสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้น จะเห็นได้ว่า emission spectrum ของทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาถูกรบกวนโดย emission spectrum ของเคอร์คิวมิน (ที่เหลือจากการทำอันตรกิริยา) ในช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 320 นาโนเมตร (จุดตัดของ spectrum) เป็นต้นไป ทำให้ spectrum ในช่วงตั้งแต่ความยาวคลื่นดังกล่าวมี intensity สูงขึ้นเรื่อยๆ ตามความเข้มข้นของเคอร์คิวมินที่ไทเทรตลงไป ในทางกลับกันช่วงความยาวคลื่นต่ำกว่า 320 นาโนเมตร ลงไป intensity ของ spectrum นั้น มีแนวโน้มที่ลดลงเรื่อยๆ แสดงให้เห็นถึงผลของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน เนื่องจาก quenching effect เกิดขึ้นเมื่อเคอร์คิวมินเข้าไปเกิดอันตรกิริยากับทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาจึงทำให้ปริมาณ amino acid residue ที่สามารถปล่อยแสง fluorescence ได้ลดลง จึงทำให้ fluorescence intensity โดยรวมของทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟา ลดลง

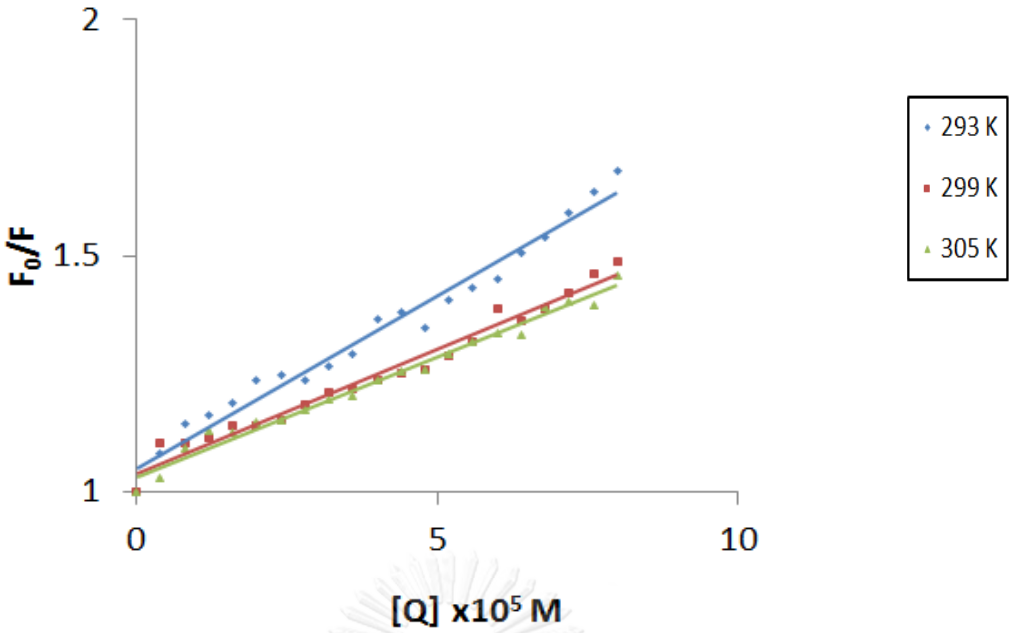
4.4 การศึกษากลไกในการเกิดอันตรกิริยาระหว่างทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาและเคอร์คิวมิน

การเกิด fluorescence quenching หรือการที่ fluorescence intensity ของทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาลดลงอันเนื่องมาจากการเกิดอันตรกิริยากับ quencher ซึ่งในที่นี้คือเคอร์คิวมินนั้น เป็นไปได้สองอย่างคือ dynamic quenching และ static quenching ซึ่งการพิสูจน์ว่าทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาและเคอร์คิวมินเกิดปฏิริยากันในรูปแบบใดนั้น สามารถทำได้โดยการสังเกตความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่ใช้ในการทำอันตรกิริยากับค่า K_{sv} ที่ได้จากสมการ Stern-Volmer (สมการที่ 3) ที่แสดงด้านล่าง (9)

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q\tau_0[Q] = 1 + K_{SV}[Q] \qquad \text{(สมการที่ 3)}$$

จากสมการ Stern–Volmer ซึ่งพล็อตระหว่าง [Q] และ (F_0/F) จะได้ค่า K_{sv} (ค่าความชัน) ที่อุณหภูมิต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 14 โดยทั่วไปตามทฤษฎีในการเกิด fluorescence quenching นั้น หากเพิ่มอุณหภูมิขึ้นแล้วทำให้ค่า K_{sv} เพิ่มขึ้นนั้นแสดงว่ากลไกการเกิดอันตรกิริยาเป็นแบบ dynamic quenching ในทางกลับกันหากค่าคงที่ K_{sv} มีค่าลดลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิขึ้นแสดงว่ากลไกการเกิดอันตรกิริยาเป็นแบบ static quenching ซึ่งในการยืนยันกลไกการเกิดอันตรกิริยาว่าเป็นแบบใดนั้นมีความสำคัญ เนื่องจากหากกลไกการเกิดอันตรกิริยาเป็นแบบ dynamic quenching การเกิดอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลจะเป็นเพียงการเข้ามาชนกันเท่านั้น จึงแสดงออกโดยการที่มีค่า K_{sv} เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิขึ้น เนื่องจากแต่ละโมเลกุลมีพลังงานสูงขึ้นเป็นผลให้โมเลกุลมีการชนกันมากขึ้น แต่หากกลไกการเกิดอันตรกิริยาเป็นแบบ static quenching จะเป็นการแสดงให้เห็นถึงการเกิดขึ้นของสารประกอบเชิงซ้อนเนื่องจากเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น สารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นจะไม่เสถียร ส่งผลให้ค่า K_{sv} มีค่าลดลง (9) ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าค่า K_{sv} มีค่าลดลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิขึ้น (ตารางที่ 3) แสดงว่ากลไกในการเกิดอันตรกิริยาเป็นแบบ static quenching และสามารถยืนยันได้ว่าเกิดอันตรกิริยาระหว่างทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟากับเคอร์คิวมินได้สารประกอบเชิงซ้อนเกิดขึ้นจริง

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



รูปที่ 14 Stern–Volmer plots จากการเกิด quenching ของทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาโดยเคอร์คิวมินที่อุณหภูมิ 293, 299 และ 305 เคลวิน (น้ำเงิน, แดง, เขียว) ตามลำดับ

ตารางที่ 3 ค่า K_{sv} ของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาและเคอร์คิวมินที่อุณหภูมิ 293, 299 และ 305 เคลวิน

อุณหภูมิ (เคลวิน)	K_{sv} (x10^4 Lmol^{-1})	R^2
293	7.29	0.973
299	5.28	0.973
305	5.06	0.982

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

4.5 การหาค่าคงที่ของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน (K_a)

เมื่อยืนยันผลการเกิดอันตรกิริยาระหว่างทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาและเคอร์คิวมินได้ว่าเป็นแบบ static quenching ดังนั้นจึงใช้สมการ modified Stern–Volmer ในการหาค่าคงที่ของของอันตรกิริยาในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน

$$\frac{F_0}{\Delta F} = \frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{1}{f_a K_a [Q]} + \frac{1}{f_a} \qquad \text{(สมการที่ 7)}$$

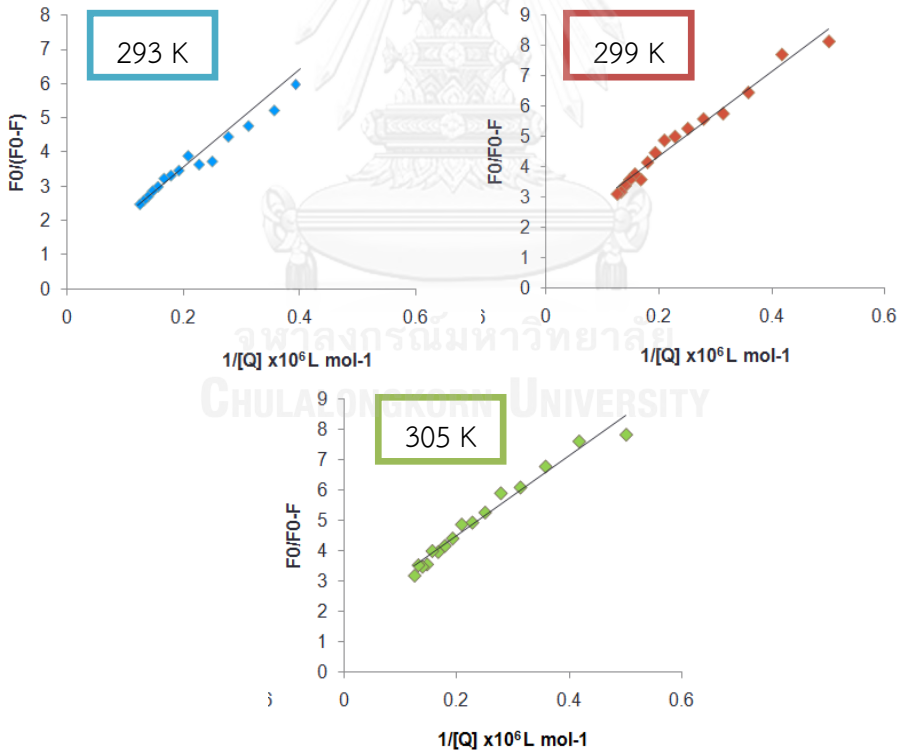
F_0 และ F - Fluorescence intensity เมื่อไม่มี quencher และเมื่อมี quencher ตามลำดับ

[Q] - ความเข้มข้นของ quencher

K_a - effective quenching constant หรือค่าคงที่ของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน

f_a - fraction of accessible fluorescence

กราฟที่พล็อตระหว่าง 1/[Q] และ $F_0/\Delta F$ จะเป็นกราฟเส้นตรงที่มีความชันคือ $1/(f_a K_a)$ และจุดตัดแกน Y คือ $1/f_a$ ดังรูปที่ 15 ซึ่งค่าคงที่ของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่คำนวณได้จากความชันของกราฟแสดงในตารางที่ 4



รูปที่ 15 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง 1/[Q] กับ $F_0/\Delta F$

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

ตารางที่ 4 ค่าคงที่ของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาและเคอร์คิวมิน ที่อุณหภูมิ 293, 299 และ 305 เคลวิน

อุณหภูมิ (เคลวิน)	K_a (x10^5 L mol^{-1})	R^2
293	1.01742	0.9663
299	1.13409	0.9761
305	1.38188	0.9706

สำหรับค่า K_a ที่คำนวณได้ในที่นี้ ถือเป็นค่าที่จำเพาะของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารคู่หนึ่งๆ และจะเห็นได้ว่าค่า K_a ระหว่างทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาและเคอร์คิวมินมีค่าอยู่ในช่วง 10^5 ซึ่งเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับ monoclonal antibody ที่เป็นตัวยับยั้งทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟา (TNF-α inhibitor) ที่มีกลไกในการออกฤทธิ์โดยการจับกับทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาโดยตรง พบว่าตัวยับยั้ง ทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟา มีค่า K_a อยู่ในช่วง 10^{10} ซึ่งแสดงให้เห็นถึงแรงยึดเหนี่ยวที่มีต่อ ทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟานั้นมีสูงกว่าเคอร์คิวมินค่อนข้างมาก ทั้งนี้อาจเนื่องจาก monoclonal antibody นั้นถูกออกแบบมาให้มีความจำเพาะต่อทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาโดยเฉพาะ รวมไปถึงเทคนิคที่ใช้ในการหาค่า K_a นั้นอาจแตกต่างกัน จึงทำให้ค่า K_a แตกต่างกันค่อนข้างมาก

4.6 อัตราส่วนการเกิดอันตรกิริยาหรือจำนวนของตำแหน่งในการเกิดอันตรกิริยา (binding site, n)

สามารถคำนวณหาจำนวนตำแหน่งในการเกิดอันตรกิริยา (n) ที่มีอยู่บนโปรตีน ได้จากสมการที่ 11

$$log\left[\frac{(F_0-F)}{F}\right] = log\, K_a + n\, log[Q] \qquad \text{(สมการที่ 11)}$$

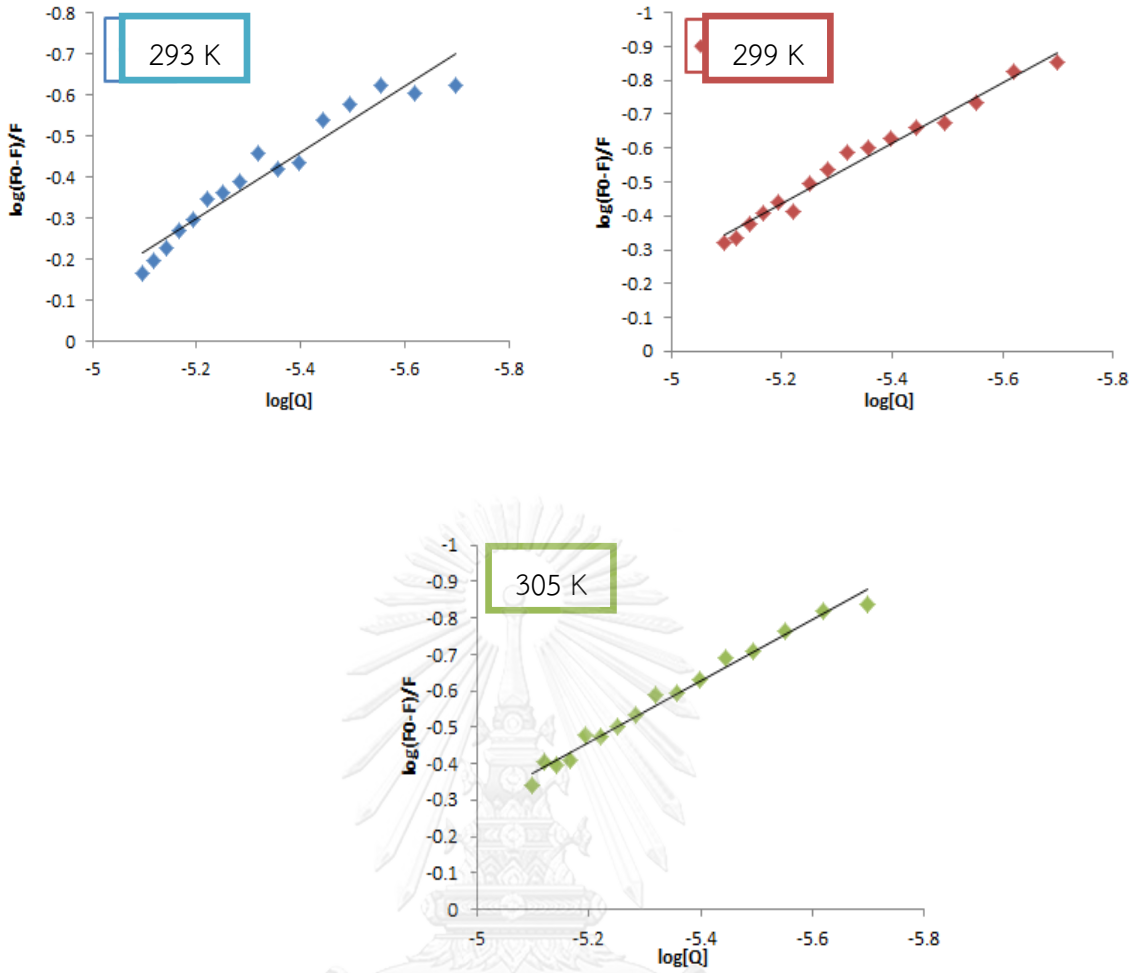
n - จำนวน substantive binding site หรือตำแหน่งในการเกิดอันตรกิริยาที่เป็นอิสระต่อกันบนโปรตีน

[Q] - ความเข้มข้นของ quencher

สามารถคำนวณได้จากการพล็อตกราฟระหว่าง $log[Q]$ กับ $log\left[\frac{(F_0-F)}{F}\right]$ จะได้เป็นกราฟเส้นตรงดังรูปที่ 16 และความชันเป็นค่า n หรือ จำนวนตำแหน่งในการเกิดอันตรกิริยาโดยจำนวนตำแหน่งในการเกิดอันตรกิริยาที่คำนวณได้จากการทดลองที่อุณหภูมิต่างๆ แสดงในตารางที่ 5

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



รูปที่ 16 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $log[Q]$ กับ $log\left[\frac{(F_0-F)}{F}\right]$

ตารางที่ 5 จำนวนตำแหน่งในการเกิดอันตรกิริยาของทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาที่อุณหภูมิ 293, 299 และ 305 เคลวิน

อุณหภูมิ (เคลวิน)	n	R^2
293	0.8037	0.9341
299	0.8974	0.9781
305	0.8419	0.983

จากค่าที่ได้จากความชัน จะเห็นได้ว่าค่า n มีค่าใกล้เคียง 1 ดังนั้นในการเกิดอันตรกิริยาระหว่างทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟา 1 โมเลกุลจะเข้าทำอันตรกิริยากับเคอร์คิวมิน 1 โมเลกุล

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

4.7 การศึกษาอุณหพลศาสตร์ของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาและเคอร์คิวมิน

ในการทำนายแรงยึดเหนี่ยวที่เกิดขึ้นในอันตรกิริยากันระหว่างทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟากับเคอร์คิวมินนั้นสามารถทำได้โดยใช้สมการ van't Hoff ดังสมการที่ 4

$$ln\, K_a = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \qquad \text{(สมการที่ 12)}$$

K_a - effective quenching constant ซึ่งเป็นค่าที่ได้จากการคำนวณในการศึกษา Fluorescence quenching

R - gas constant ซึ่งมีค่าเท่ากับ 8.314 $JK^{-1}mol^{-1}$

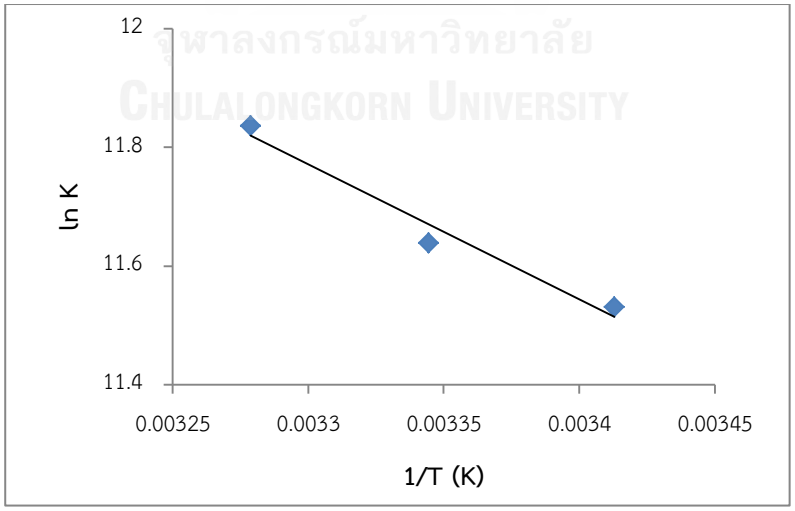
ΔH - enthalpy

ΔS - entropy

T - อุณหภูมิ (เคลวิน)

สามารถคำนวณหาค่า enthalpy และ entropy ได้โดยพล็อตกราฟระหว่าง 1/T กับ $\ln K_a$ จะได้กราฟเส้นตรง ซึ่งความชันมีค่าเท่ากับ $\Delta H/R$ และ จุดตัดแกน Y คือ $\Delta S/R$ ดังรูปที่ 17 แล้วนำค่า ΔH และ ΔS แทนลงในสมการที่ 5 เพื่อหาค่า ΔG และค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่คำนวณได้แสดงในตารางที่ 6

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \qquad \text{(สมการที่ 13)}$$



รูปที่ 17 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{1}{T}$ กับ $\ln K_a$

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

ตารางที่ 6 ค่า Enthalpy Entropy และ Gibbs free energy ที่คำนวณได้จากสมการที่ 5

อุณหภูมิ (เคลวิน)	ΔH (kJ mol^{-1})	ΔS (J $mol^{-1}K^{-1}$)	ΔG (kJ mol^{-1})
293			-28.1
299	18.9	160.3	-29.0
305			-29.9

จากค่า ΔH และ ΔS ที่คำนวณได้มีค่ามากกว่า 0 ซึ่งสามารถช่วยทำนายแรงยึดเหนี่ยวในการเกิดอันตรกิริยาได้ว่าเป็นแบบ hydrophobic force เนื่องจากในการเกิดอันตรกิริยาดังกล่าวจะเป็นการที่โมเลกุลของเคอร์คิวมินเข้าไปแทรกอยู่ในบริเวณที่ไม่ชอบน้ำของทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาซึ่งก่อนที่เกิดการเข้าไปแทรกได้นั้น จะต้องมีการดูดพลังงานเข้าสู่ระบบเพื่อสลายพันธะไฮโดรเจนของน้ำที่ล้อมอยู่รอบๆ โมเลกุลของ เคอร์คิวมินและบริเวณที่ไม่ชอบน้ำนั้นของทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟา ซึ่งทำให้ได้ค่า ΔH เป็นบวก นอกจากนี้การที่โมเลกุลของเคอร์คิวมินเข้าไปแทรกในบริเวณที่ไม่ชอบน้ำของทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟานั้นทำให้โมเลกุลของน้ำที่มีการจัดเรียงตัวอยู่อย่างเป็นระเบียบในตอนแรก มีความไม่เป็นระเบียบเพิ่มมากขึ้น จึงทำให้ค่า ΔS เพิ่มขึ้นและมีค่าเป็นบวก จากนั้นเมื่อนำค่า ΔH และ ΔS ไปแทนลงในสมการที่ 5 ซึ่งทำให้ได้ค่า ΔG เป็นค่าลบ ซึ่งแสดงให้เห็นอันตรกิริยานั้นเป็นแบบ spontaneous reaction คือ อันตรกิริยาระหว่างทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟาและเคอร์คิวมินนั้นสามารถเกิดขึ้นได้เอง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

ปริญญานิพนธ์นี้เป็นการทดลองเพื่อศึกษาอันตรกิริยาระหว่างเคอร์คิวมินกับทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟา โดยอาศัยเทคนิค Fluorescence quenching spectroscopy ในอุณหภูมิที่ต่างกัน สามารถยืนยันได้ว่าอันตรกิริยาระหว่างทั้ง 2 โมเลกุลเกิดขึ้นจริง โดยโมเลกุลทั้งสองสามารถเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างกัน โดยพิจารณาจากผลการทดลองตามสมการ Stern-Volmer ที่ให้ค่า K_{sv} แปรผกผันกับอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น มีอัตราการเกิดอันตรกิริยาเท่ากับ 1:1 จากการคำนวณอัตราส่วนของการเกิดอันตรกิริยา ซึ่งมีแรงระหว่างโมเลกุล คือ แรงไฮโดรโฟบิค ซึ่งได้จากการพิจารณาโดยใช้เกณฑ์ในการจำแนกจากค่า enthalpy และ entropy ที่คำนวณได้จากสมการ van't Hoff นอกจากนี้ยังพบว่าอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นนี้สามารถเกิดขึ้นได้เอง (spontaneous) โดยการพิจารณาจากค่า Gibbs free energy ที่น้อยกว่า 0 ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาโดยใช้ molecular docking

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

รายการอ้างอิง

1. He MM, Smith AS, Oslob JD, Flanagan WM, Braisted AC, Whitty A. Small-molecule inhibition of TNF-alpha. Science, 2005; 310(5750):1022-1025
2. Ostade XV, Tavernier J, Fiers W. Structure—activity studies of human tumour necrosis factors. Protein Engineering, 1994; 7(1): 5-22
3. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. Nature Reviews Immunology, 2003; 3:745-756
4. Jaka MC, Podlipnik C, Simona J, Kuzman D, Vesnaver G, Lah J. Recognition of human tumor necrosis by a therapeutic antibody a factor TNF-α fragment: energetics and structural features. J. Biol. Chem. 2012; 287:8613-8620.
5. Fionula MB, Andrew J, David C, Ravinder M, Marc F. Inhibitory effect of tnf-α; antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. The lancet. 1989; 29:244-247
6. US Food and Drug Administration [database on the Internet]. [cited 2015 May 25]. Available from: http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/01/briefing/3779b2_01_3-CBER.tables.pdf
7. Mandeville JS, Froehlich E, Tajmir-Riahi HA. Study of curcumin and genistein interactions with human serum albumin. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2009; 49:468-474
8. Aggarwal BB, Harikumar KB. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2009; 41:40-59
9. Gupta SC, Tyagi AK, Priya DT, Hinojosa M, Prasad S, Aggarwal BB, Downregulation of tumor necrosis factor and other proinflammatory biomarkers by polyphenols, Archives of Biochemistry and Biophysics, 2014; 559:91–99

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

10. Wuaa ST, Suna JC, Leeb KJ, Sun YM. Docking prediction for Tumor Necrosis Factor-α and five herbal inhibitors. 2010; 2(9): 4263-4277

11. Lakowicz JR. Principles of fluorescence spectroscopy third edition. Springer Science Business Media, LLC. 2006

12. Sauer M, Hofkens J, Enderlein J. Handbook of fluorescence spectroscopy and imaging. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. 2011; ISBN: 978-3-527-31669-4

13. The Edinburgh Super-Resolution Imaging Consortium [homepage on the Internet]. Principles of fluorescence. [cited 2015 May 10]. Available from: http://www.esric.org/education/fluorescence.html

14. Bi S, Ding L, Tian Y, Song D, Zhou X, Liu X, et al. Investigation of the interaction between flavonoids and human serum albumin. j.molstruc. 2004; 703:37-45

15. Ross PD, Subramanian S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. biochemistry. 1981; 20:3096-3102

16. GE YS, Jin C, Song Z, Zhang JQ, Jiang FL, Liu Y. Multi-spectroscopic analysis and molecular modeling on the interaction of curcumin and its derivatives with human serum albumin: A comparative study. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2014; 124:265-276

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.