

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบการจับกันระหว่างสารต้านการอักเสบจากเหง้าไพลกับ เอนไซม์ไซโคลออกซิจีเนส 2 โดยใช้โปรแกรม ArgusLab

Determination of optimal conformations for the binding between anti-inflammatory compounds from Plai rhizome and cyclooxygenase 2 using ArgusLab program

โกมารภักจ์ ปิ่นทอง และ ประสาน ตั้งยีนยงวัฒนา

สาขาวิชาการแพทย์แผนตะวันออก วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต

Email: komaraphat.p61@rsu.ac.th

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เพื่อศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสมโดยวิธีการจำลองการจับกัน (Molecular Docking) ระหว่างสารต้านการอักเสบจากไพลกับเอนไซม์ไซโคลออกซิจีเนส 2 โดยใช้โปรแกรม ArgusLab 4.0.1 ใช้เอนไซม์ไซโคลออกซิจีเนส 2 ไอโซฟอร์ม 3 ชนิดกับสารสำคัญที่พบจากสารสกัดจากเหง้าไพล 5 ชนิด (Ligand) โดยจะแสดงด้วยค่าพลังงานการจับกัน (Binding energy) และพิจารณาการจับกันของสารและเอนไซม์เพื่อทำความเข้าใจในการเปรียบเทียบหาสภาวะที่เหมาะสมด้วยวิธี ArgusDock และ GA Dock วิธีการศึกษาเริ่มจากการสร้างโครงสร้าง 2 มิติของสารสกัดเหง้าไพลจากโปรแกรม ChemSketch และเปลี่ยนเป็นโครงสร้างสามมิติพร้อมปรับระดับพลังงานของโมเลกุลให้อยู่ในสถานะต่ำสุด (Geometry Optimization) โดยใช้โปรแกรม Avogrado สำหรับโครงสร้างของเอนไซม์ไซโคลออกซิจีเนส 2 (1CX2, 5JVZ, 5W58) ได้รับจาก Protein Data Bank จากนั้นทำการจำลองการจับกันบนโปรแกรม ArgusLab 4.0.1 โดยเลือกวิธี Argus Dock และ GA Dock ตามลำดับ นำค่าการจับกันของพลังงานที่ได้มาหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าพลังงานการจับกัน กับค่าความเข้มข้นของการยับยั้งเอนไซม์ (IC₅₀) ของสารสกัดจากเหง้าไพล 5 ชนิดและพิจารณาจากกรดอะมิโนในเอนไซม์ไซโคลออกซิจีเนส 2 ที่เกิดปฏิสัมพันธ์กับ Ligand เพื่อดูการซ้อนทับที่ดีเพื่อเลือกสภาวะที่เหมาะสม ผลการศึกษาพบว่า เอนไซม์ 1CX2 กับลิแกนด์ 5 ชนิด โดยวิธี ArgusDock และ GA Dock มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.3929 และ 0.325 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าผลการทดลองของทั้งสองสภาวะไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ รวมทั้งปฏิกิริยาของกรดอะมิโนที่จับกันระหว่างเอนไซม์และลิแกนด์พบว่าการซ้อนทับและสอดคล้องกันดี เอนไซม์ 5JVZ กับลิแกนด์ 5 ชนิด โดยวิธี ArgusDock และ GADock มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.5029 และ 0.6607 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าผลการทดลองในสภาวะ GADock เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการจับกันของสารและเอนไซม์มากกว่า ArgusDock ปฏิกิริยาของกรดอะมิโนที่จับกันระหว่างเอนไซม์และลิแกนด์พบว่าการซ้อนทับและสอดคล้องกันดี และเอนไซม์ 5W58 กับลิแกนด์ 5 ชนิด มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.0451 และ 0.5169 โดยวิธี ArgusDock และ GADock ตามลำดับ แสดงผลการทดลองในสภาวะ GADock เป็นสภาวะที่เหมาะสม พบว่าการซ้อนทับและสอดคล้องกันดี ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการหาสภาวะการจำลองในแต่ละสภาวะพบว่า เอนไซม์ 5JVZ เหมาะสมที่สุดในการนำมาจำลองการจับกัน สภาวะที่เหมาะสมนี้มีประโยชน์ต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาการออกฤทธิ์และหาสภาวะที่เหมาะสมของสารต่างๆในสมุนไพรชนิดอื่นๆ

คำสำคัญ: การจำลองการจับกัน, ค่าพลังงานการจับกัน, ลิแกนด์, เอนไซม์ไซโคลออกซิจีเนส 2, ArgusLab

Abstract

The objective of this study was to find the optimal conformations for the binding (Molecular Docking) between anti-inflammatory substances from Plai (*Zingiber cassumuna* Roxb.) rhizome and the enzyme cyclooxygenase 2 using ArgusLab 4.0.1 program. The docking of cyclooxygenase2 isoforms 3 types and the 5 compounds from Plai rhizome (Ligand) showed binding energy and conformations for the binding with enzymes. This research aimed to study the comparison of the best conditions using the ArgusDock and GA Dock modes. The process started with drawing 2D structure of the 5 compound by ChemSketch program and then converted to 3D structure with Geometry Optimization by Avogrado program. The structures of the cyclooxygenase 2 enzyme (1CX2, 5JVZ, 5W58) were obtained from the Protein Data Bank. The compound and enzyme were subjected to ArgusLab 4.0.1 with ArgusDock and GADock modes, respectively. The binding energy of the study were used to find the correlation between binding energy and enzyme inhibitory concentration (IC₅₀) values of 5 compounds. The amino acids in the enzyme cyclooxygenase 2 pockets showed the interactions with ligand to find the overlap for the best conditions.

The results indicated that the 1CX2 enzyme and 5 ligands using the ArgusDock and GADock mode had correlation coefficients (r) equal to 0.3929 and 0.325, respectively. These results indicated that the experimental results of the two conditions were not much different. The 5JVZ enzyme and ligands by the ArgusDock and GADock modes had a correlation coefficient (r) equal to 0.5029 and 0.6607, respectively. These indicated that the result of GA Dock was more suitable conditions for the docking than ArgusDock. It was found that there was good overlap and agreement, and the 5W58 enzyme and ligands had correlation coefficients (r) of 0.0451 and 0.5169 by the ArgusDock and GADock modes, respectively. The results indicated that GA Dock was the ideal condition. It showed good overlap and consistency. Therefore, it was found that the 5JVZ enzyme was the most suitable for docking to obtain the optimal conformation. It can be concluded that this method is useful for applied to studying the effects and finding the optimal conditions of various substances in other herbs.

Keywords: Molecular Docking, Binding Energy, Ligand, Cyclooxygenase2, ArgusLab

1. บทนำ

ในปัจจุบันความเจ็บป่วยต่างๆมีมากมาย ในกลุ่มคนวัยทำงานมักพบ พฤติกรรมของการนั่งทำงานในระยะเป็นเวลานานส่งผลทำให้เกิดอาการต่างๆตามมา เช่น โรคออฟฟิศซินโดรม (Office Syndrome) จัดอยู่ในกลุ่มอาการปวดกล้ามเนื้อและเยื่อพังผืด (Myofascial Pain Syndrome) ซึ่งมักเกิดจากการที่ต้องใช้กล้ามเนื้อมัดเดิมซ้ำไปมา เป็นระยะเวลานานและต่อเนื่อง โดยผลจะทำให้เกิดการอักเสบกล้ามเนื้อตามมา โดยการรักษามีหลายวิธีเช่น การนวด การรับประทานยาคลายกล้ามเนื้อ เป็นต้น โดยเฉพาะการทานกลุ่มยาคลายกล้ามเนื้อบรรเทาอาการปวดซึ่งเป็นที่ยอมรับวิธีนี้ออกฤทธิ์ค่อนข้างเร็วแต่ก็มีผลข้างเคียงที่พบบ่อยเช่น การระคายเคืองต่อกระเพาะอาหาร ภาวะการแข็งตัวของเลือดบกพร่อง โดยกลุ่มยาที่พบ มักจะเป็นยาในกลุ่มยาแก้อักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (NSAIDs) เช่น ไอบูโพรเฟน ไพร็อกซิแคม ไทโคลฟีแนค เซเลค็อกสิบ เป็นต้น [1,19]

ไซโคลออกซีจีเนส (Cyclooxygenase หรือ COX) โดยเอนไซม์ประกอบไปด้วย COX 1 และ COX 2 เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทมากที่สุดที่ทำให้เกิดกระบวนการอักเสบ คือเอนไซม์ชนิดค็อกซ์ 2 (COX2) โดยทำหน้าที่สร้างพรอสตาแกลนดิน (prostaglandins) ที่ทำให้เกิดอาการปวด อาการอักเสบและไข้ [1,8] ในขณะที่เอนไซม์ชนิดค็อกซ์ 1 (COX1) ทำหน้าที่สร้างพรอสตาแกลนดินที่ช่วยปกป้องผนังกระเพาะอาหารและทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด[13] ในกลุ่มสมุนไพรที่ช่วยในการลดการอักเสบ พบว่า สารสกัดเหง้าไพล (*Zingiber cassumunar* Roxb.) มีสารที่ช่วยต้านการอักเสบได้ดี มีสารสำคัญหลายชนิดช่วยต้านการอักเสบ[7,10,14,17]เช่น สารกลุ่ม Phenylbutanoids, Curcuminoids และ Sesquiterpenoids เป็นต้น [2,4,15,18]

เคมีเชิงคำนวณ (Computational chemistry) ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการหาสถานะที่เหมาะสมในการจับกันระหว่างสารต้านการอักเสบกับเอนไซม์ ไซโคลออกซีจีเนส 2 นั้น ทดแทนการทดลองจริงซึ่งถ้าหากมีการทำในห้องทดลองสังเคราะห์สาร หรือทำในสัตว์ทดลอง จะทำให้สูญเสียทรัพยากร สารเคมี รวมถึงชีวิตของสัตว์ทดลอง สิ้นเปลืองเวลา และมีค่าใช้จ่ายที่สูง การทำนายสถานะที่เหมาะสมในการจับกันระหว่างสารต้านการอักเสบกับเอนไซม์ไซโคลออกซีจีเนสด้วยการใช้วิธีการทางคอมพิวเตอร์ก่อนการทดสอบจริงในห้องปฏิบัติการ สามารถช่วยลดค่าใช้จ่ายต่างๆและระยะเวลาได้ ในปัจจุบันคอมพิวเตอร์มีบทบาทและความสำคัญอย่างมากในวงการวิทยาศาสตร์ ที่สามารถค้นคว้าและวิจัยทางเคมี โดยนำคอมพิวเตอร์มาคำนวณในการออกแบบโมเลกุล สถานะ เอนไซม์ต่างๆ ก่อนทำการทดลองจริง แล้วนำผลลัพธ์ที่ได้ มาเป็นแนวทางการเปรียบเทียบนำไปสู่การปฏิบัติและทดลองจริง [5,12]

ArgusLab เป็นโปรแกรม จำลองโมเลกุล ที่ถูกเขียนและพัฒนาขึ้นโดย Mark Tompson ในปี ค.ศ.2004 โดยเป็นโปรแกรมที่ติดตั้งและใช้งานได้ฟรีโดยไม่มีค่าใช้จ่ายโดยมีวิธีการทำงาน ได้ 2 แบบ คือ แบบ GA dock จะทำงานโดยใช้ วิธีอัลกอริธึมทางพันธุกรรม (genetic algorithm, GA) และ ArgusDock จะทำงานโดยใช้ Shape-base search algorithm [3,5,9] วิธีอัลกอริธึมทางพันธุกรรมถูกนำไปใช้กับการจำลองโมเลกุลระหว่างเอนไซม์กับสารหรือตัวยาเพื่อเชื่อมโยงกับโครงสร้างที่รู้จักในตัวของเอนไซม์พลังงานอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลจะลดลงโดยใช้วิธีอัลกอริธึมทางพันธุกรรมสำหรับกระบวนการจับกัน อัลกอริทึมเริ่มต้นด้วยการสร้างประชากรโครงสร้างสารเริ่มต้นแบบสุ่ม อัลกอริธึมจะหาและสร้างลำดับของประชากรใหม่ที่ดีขึ้น ในแต่ละขั้นตอนรุ่นที่ดีจะได้รับการต่อไปให้ดีขึ้น รุ่นที่ดีจะตัดออกไป อัลกอริทึมจะใช้โครงสร้างในรุ่นปัจจุบันเพื่อสร้างโครงสร้างถัดไป [6,11] สำหรับ Shape-base search algorithm จะพิจารณาการประเมินความคล้ายคลึงกันของโมเลกุลโดยพิจารณาจากโครงสร้างและคุณสมบัติที่เทียบเท่ากัน วิธีการเหล่านี้ขึ้นอยู่กับระยะห่างระหว่างอะตอม การแสดงตามการซ้อนทับแบบเกาส์เซียนที่มีอะตอมเป็นศูนย์กลาง ตัวอธิบายเซอร์นิเก และพื้นผิวฮาร์โมนิกทรงกลม [16]

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการหาสถานะที่เหมาะสมในการทดสอบการจับกันระหว่างสารต้านการอักเสบจากไพลกับเอนไซม์ไซโคลออกซีจีเนส 2 โดยใช้โปรแกรม ArgusLab และเปรียบเทียบค่าการจับกันกับฤทธิ์ต้านการอักเสบ (IC₅₀) จากเหง้าไพลที่มีการรายงาน [4]

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1.) ทดสอบการจับกันของเอนไซม์ Cyclooxygenase 3 ไอโซฟอร์ม (Isoforms) ได้แก่ 1CX2, 5JVZ และ 5W58 กับสารสำคัญที่พบในเหง้าไพล 5 ชนิด
- 2.) เปรียบเทียบค่าการจับกัน (Binding energy) กับฤทธิ์การต้านการอักเสบ (IC₅₀) จากสารสำคัญจากเหง้าไพล
- 3.) เปรียบเทียบสถานะที่เหมาะสมการจับกันด้วยวิธี ArgusDock และ GA Dock

3. สมมติฐานการวิจัย

การหาสถานะที่เหมาะสมในการทดสอบการจับกันระหว่างสารต้านการอักเสบจากไพลกับเอนไซม์ไซโคลออกซีจีเนส 2 เพื่อหาโครงสร้างของเอนไซม์ที่เหมาะสมที่สุดต่อการออกฤทธิ์ที่ดี สามารถจำลองการจับกันโดยใช้โปรแกรม ArgusLab 4.0.1 และเปรียบเทียบสถานะ Docking ระหว่าง ArgusDock และ GADock ได้

4. วิธีดำเนินการวิจัย

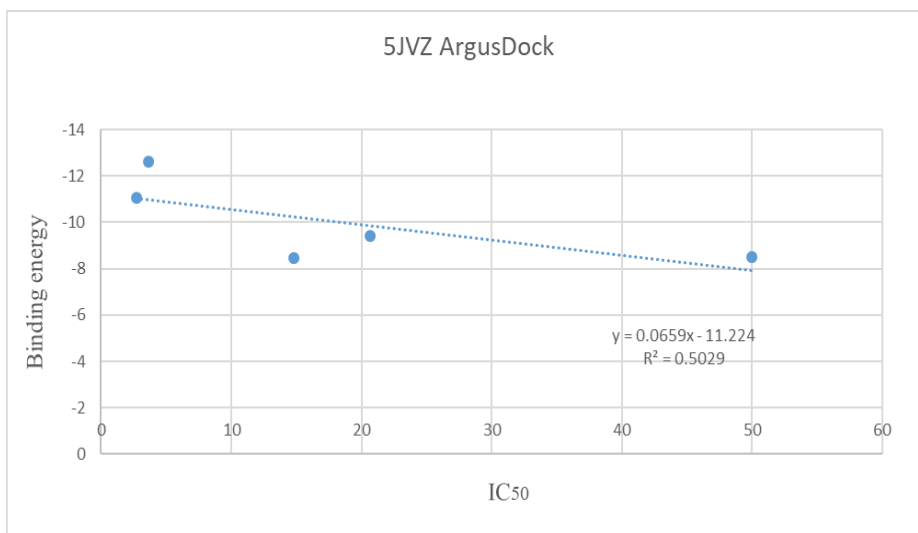
วิธีการศึกษาเริ่มจากการสร้างโครงสร้าง 2 มิติของสารสกัดเหง้าไพลจากโปรแกรม ChemSketch เปลี่ยนเป็นโครงสร้างสามมิติ พร้อมปรับระดับพลังงานของโมเลกุลให้อยู่ในสถานะต่ำสุด (Geometry Optimization) โดยใช้โปรแกรม Avogrado สำหรับโครงสร้างของเอนไซม์ไซโคลออกซีจีเนส 2 (1CX2, 5JVZ, 5W58) ได้รับจาก Protein Data Bank จากนั้นทำการจำลองการจับกันบนโปรแกรม ArgusLab 4.0.1 โดยเลือกวิธี ArgusDock และ GADock ตามลำดับ นำค่าการจับกันของพลังงานที่ได้มาหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าพลังงานการจับกัน กับค่าความเข้มข้นของการยับยั้งเอนไซม์ (IC₅₀) ของสารสกัดจากเหง้าไพล 5 ชนิดและพิจารณาจากกรดอะมิโนในเอนไซม์ไซโคลออกซีจีเนส 2 ที่เกิดปฏิสัมพันธ์กับ Ligand เพื่อดูการซ้อนทับที่ดีและเพื่อเลือกสถานะที่เหมาะสม

5. ผลการทดลอง

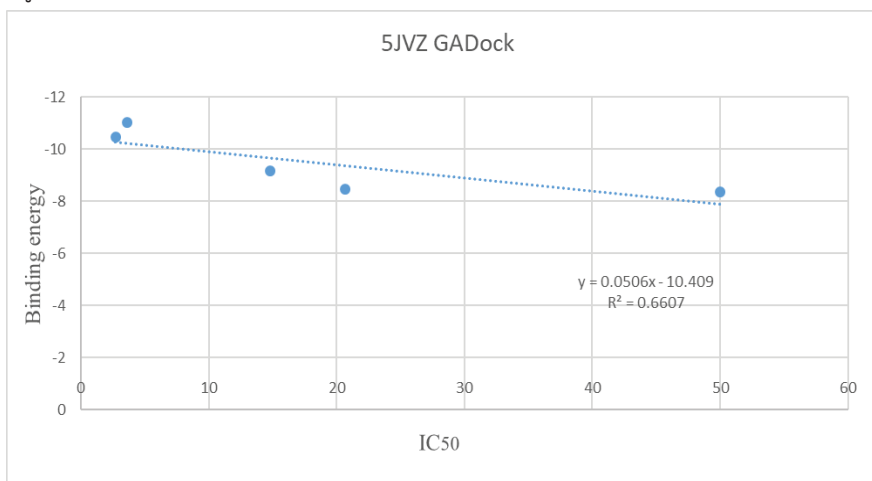
เอนไซม์ 1CX2 กับลิแกนด์ 5 ชนิด โดยวิธี ArgusDock และ GA Dock มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.3929 และ 0.325 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าผลการทดลองของทั้งสองสถานะไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ รวมทั้งปฏิกิริยาของกรดอะมิโนที่จับกันระหว่างเอนไซม์และลิแกนด์พบว่าการซ้อนทับและสอดคล้องกันดี เอนไซม์ 5JVZ กับลิแกนด์ 5 ชนิด โดยวิธี ArgusDock และ GA Dock มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.5029 และ 0.6607 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าผลการทดลองในสถานะ GADock เป็นสถานะที่เหมาะสมในการจับกันของสารและเอนไซม์มากกว่า ArgusDock ปฏิกิริยาของกรดอะมิโนที่จับกันระหว่างเอนไซม์และลิแกนด์พบว่าการซ้อนทับและสอดคล้องกันดี และเอนไซม์ 5W58 กับลิแกนด์ 5 ชนิด มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.0451 และ 0.5169 โดยวิธี ArgusDock และ GADock ตามลำดับ

ตารางที่ 1 แสดงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r)

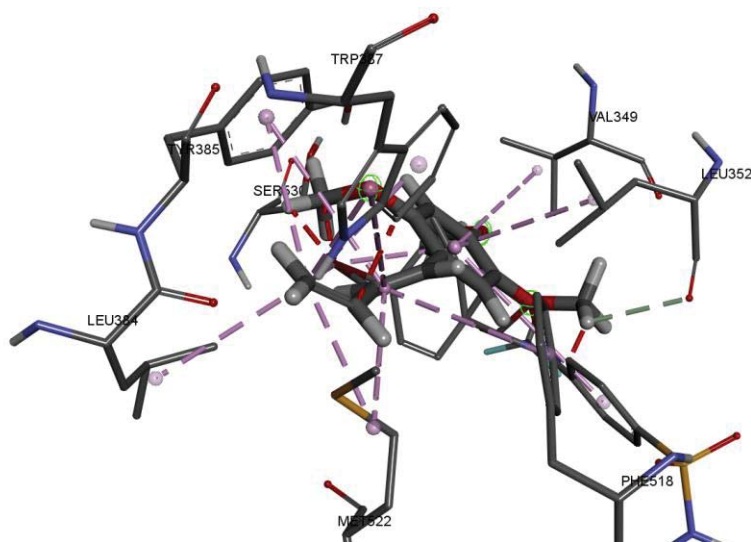
รูปแบบของเอนไซม์COX2	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ด้วยวิธี ArgusDock	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ด้วยวิธี GADock
1CX2	0.3929	0.3250
5JVZ	0.5029	0.6607
5W58	0.0451	0.5169



รูปที่ 1 กราฟแสดง ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ด้วยวิธี ArgusDock ของเอนไซม์ 5JVZ

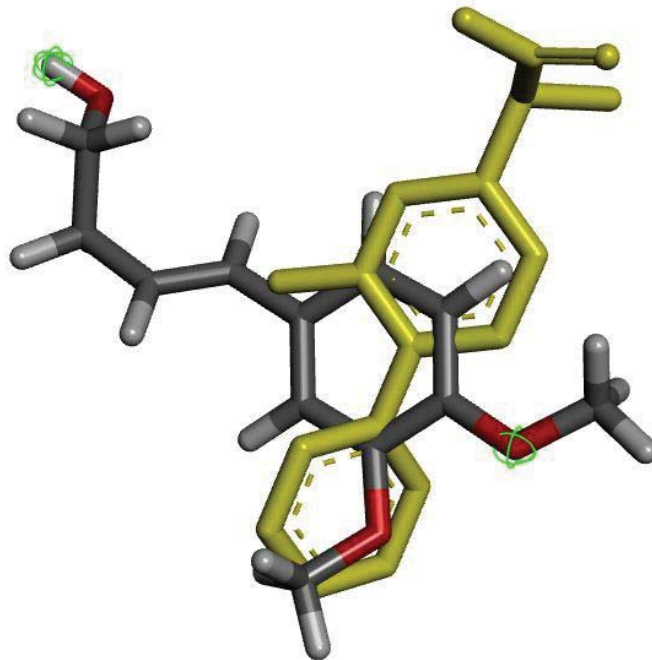


รูปที่ 2 กราฟแสดง ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ด้วยวิธี GADock ของเอนไซม์ 5JVZ



รูปที่ 3 แสดงการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่าง Compound D กับกลุ่มกรดอะมิโน (Phe518 Leu352 Tyr385 และ Met522)

เมื่อดูจาก Compound D ที่มีเกิดปฏิสัมพันธ์กับกรดอะมิโน (รูปที่3) พบว่า Compound D วางตัวอยู่ใกล้กับ Phe518 Leu352 Tyr385 และ Met522 ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่จับกับเอนไซม์ COX2 และเมื่อดูการจับกันของ Compound D (รูปที่4) พบว่า สารได้จับบริเวณ Active site ของเอนไซม์ COX2 5JVZ ซึ่งเป็นการแสดงให้เห็นว่า จำลองโมเลกุลด้วยวิธี GADock เหมาะสมในการนำมาจำลองการจับกัน



รูปที่ 4 แสดงการซ้อนทับกันของ Compound D กับสารลิแกนด์ใน Active Site ของเอนไซม์ 5JVZ ด้วยวิธี GADock

6. สรุปผล

จากผลการวิเคราะห์การจับกันในแต่ละสภาวะ การจับกันระหว่างลิแกนด์และเอนไซม์ COX2 ในทั้งหมด 3 ไอโซฟอร์ม พบว่า เอนไซม์ 5JVZ มีความเหมาะสมในการนำจำลองการจับกัน เนื่องจากมีการจับกันของโครงสร้างที่มีการซ้อนทับกับตำแหน่งบริเวณ Active site และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.6607 ซึ่งแสดงผลที่มากกว่า การจับกันของทุกสภาวะที่ทดสอบ ดังนั้น เอนไซม์ 5JVZ ด้วยวิธี GADock จึงเป็นสภาวะที่ดีที่สุดและเหมาะสมกับการเป็นแนวทางนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาการออกฤทธิ์ และหาสภาวะที่เหมาะสมของสมุนไพรอื่น ๆ ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- [1] Blanca-Lopez, N., Soriano, V., Garcia-Martin, E., Canto, G., & Blanca, M. (2019). NSAID-induced reactions: classification, prevalence, impact, and management strategies. *Journal of asthma and allergy*, 12, 217–233.
- [2] Devkota, H.P.; Paudel, K.R.; Hassan, M.M.; Dirar, A.I.; Das, N.; Adhikari-Devkota, A.; Echeverría, J.; Logesh, R.; Jha, N.K.; Singh, S.K.; et al. Bioactive Compounds from *Zingiber montanum* and Their Pharmacological Activities with Focus on Zerumbone. *Appl. Sci.* 2021, 11, 10205.
- [3] Ferreira, L. G., dos Santos, R.N., Oliva, G., & Andricopulo, A. D. (2015). Molecular docking and structure-based drug design strategies. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 20(7), 13384-13421.
- [4] Han, A. R., Kim, M. S., Jeong, Y. H., Lee, S. K., & Seo, E. K. (2005). Cyclooxygenase-2 inhibitory phenylbutenoids from the rhizomes of *Zingiber cassumunar*. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 53(11), 1466–1468.
- [5] Jacob, T., John Wahr, J., Pfeffer, T., & Swenson, S. (2011). Recent contribution of glaciers and ice caps to sea level rise. *Nature*, 482, p.514-58.
- [6] Jones G, Willett P, Glen RC, Leach AR, Taylor R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J Mol Biol.* 1997 Apr 4;267(3):727-48.
- [7] Kiatyinggungsulee N, Wangmad M, Swasdimongkol D, Mokkahasmit M. Some pharmacological studies of active constituent in Plai (*Zingiber cassumunar* Roxb.) *Bull Dep Med Sci Thailand* 1979; 21: 13-24.
- [8] Salamat, M. S, Robbins and Cotran: Pathologic Basis of Disease, 8th Edition, *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, Volume 69, Issue 2, February 2010, Page 214,
- [9] M.A Thompson, Molecular docking using ArgusLab, an efficient shape-base search algorithm and AScore scoring function, in *Proceeding of the ACS Meeting, Philadelphia, Pa , USA, March-April 2004*, 172, CINF 42.
- [10] Mokkahasmit M, Sawasdimongkol K, Sartravaha P, Toxicity study of some thai medicinal plant. *Bull Dep Med Sci Thailand* 1971; 12: 36-65.
- [11] Morris, G.M., Goodsell, D.S., Halliday, R.S., Huey, R., Hart, W.E., Belaw, R.K., Olsen, A.J. (1998). Automated docking using Lamarckian genetic algorithm and empirical binding energy function. *Journal of Computational Chemistry*, 19, 1639-1662.
- [12] Morris, G.m., Lim-Wilby, M. (2008) Molecular docking. *Method in Molecular Biology*, 433, 365-382.
- [13] Murphy HS, Ward PA. Inflammation. In: Rubin E, et al, eds. *Rubin’s Pathology: Clinicopathologic Foundation of Medicine*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005: 40-83.
- [14] Panyathanya R, Ngamwathana W, Chawalidthumrong P, Permpipat U, Leekakulthanit O, Chantachaya C. Study of acute and chronic toxicity of Plai (*Zingiber cassumunar* Roxb.) in rats *Siriraj Hosp Gaz* 1986; 38: 413-6.
- [15] Pongsakorn S, Koysooko R, Pinthong T, Morasakul B. Pharmacokinetic studies of Compound D isolated from Plai (*Zingiber cassumunar* Roxb.) in rats *Vajira Med J* 1988; 32: 101.
- [16] Ramírez-Velásquez, Iliana & Bedoya Calle, Alvaro & Velez, Ederley & Caro-Lopera, Francisco. (2022). Shape Theory Applied to Molecular Docking and Automatic Localization of Ligand Binding Pockets in Large Proteins. *ACS Omega*. 7. 10.1021/acsomega.2c02227.

- [17] Sittichai Koontongkaew, Orapan Poachanukoon, Seewaboon Sireeratawong, Thaweephol Dechatiwongse Na Ayudhya, Parirat Khonsung, Kanjana Jaijoy, Ruedee Soawakontha, Monraudee Chanchai, "Safety Evaluation of Zingiber cassumunar Roxb. Rhizome Extract: Acute and Chronic Toxicity Studies in Rats", International Scholarly Research Notices, vol. 2014, Article ID 632608, 14 pages, 2014.
- [18] William L. Smith, Michael G. Malkowski, Interactions of fatty acids, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and coxibs with the catalytic and allosteric subunits of cyclooxygenases-1 and -2, Journal of Biological Chemistry, Volume 294, Issue 5, 2019, Pages 1697-1705, ISSN 0021-9258,
- [19] Wongrakpanich, S., Wongrakpanich, A., Melhado, K., & Rangaswami, J. (2018). A Comprehensive Review of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug Use in The Elderly. Aging and disease, 9(1), 143–150.