



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชต่อเอนไซม์ Cytochrome P450 2A6 ที่ย่อยสลายนิโคติน
และผลกระทบต่อเอนไซม์ cytochrome P450 ในตับ

Study of compounds from Thai medicinal plants in inhibition against
the human cytochrome P450 2A6, nicotine-metabolizing enzyme, and their
effects toward human hepatic cytochrome P450 monooxygenases

โดย

ผศ.ดร.ทรงกลด สารภูษิต

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

รศ.ดร. พรพิมล รงคินพรัตน์

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ผศ. ดร. เอกรัฐ ศรีสุข

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ดร. ปณิดา ดวงแก้ว

คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี

วันวิสาข เนตรเรืองแสง

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 6 ชลบุรี

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๙

มหาวิทยาลัยบูรพา

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชต่อเอนไซม์ Cytochrome P450 2A6 ที่ย่อยสลายนิโคติน
และผลกระทบต่อเอนไซม์ cytochrome P450 ในตับ

Study of compounds from Thai medicinal plants in inhibition against
the human cytochrome P450 2A6, nicotine-metabolizing enzyme, and their
effects toward human hepatic cytochrome P450 monooxygenases

โดย

ผศ.ดร.ทรงกลด สารภูษิต

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

รศ.ดร. พรพิมล รงคันพรัตน์

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ผศ. ดร. เอกรัช ศรีสุข

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

อ. ดร. ปณิดา ดวงแก้ว

คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี

วันวิสาข เนตรเรืองแสง

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 6 ชลบุรี

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่อง “การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชต่อเอนไซม์ Cytochrome P450 2A6 ที่ย่อยสลายนิโคตินและผลกระทบต่อเอนไซม์ cytochrome P450 ในตับ” สามารถมีผลการทดลองที่ก้าวหน้ามาจนได้เสร็จสมบูรณ์เป็นรายงานฉบับนี้ ต้องขอขอบคุณการสนับสนุนทุนวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๙ มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 86/2559 ซึ่งผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้ นอกจากนี้แล้วผู้วิจัยขอขอบคุณนิสิต-นักศึกษาทุกคนที่ช่วยทำการทดลอง รวมถึงคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดลที่ให้ความสนับสนุนด้านสถานที่และเครื่องมือต่างๆในการทำการทดลอง

คณะผู้วิจัย

บทคัดย่อ

ชื่อโครงการ การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชต่อเอนไซม์ Cytochrome P450 2A6 ที่ย่อยสลายนิโคตินและผลกระทบต่อเอนไซม์ cytochrome P450 ในตับ

ชื่อผู้วิจัย ทรงกลด สารภูษิต ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
พรพิมล รงค์นพรัตน์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
เอกรัฐ ศรีสุข ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ปณิดา ดวงแก้ว คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร
วิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี
วันวิสาข์ เนตรเรืองแสง ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 6 ชลบุรี

ปัญหาโรคระบบทางเดินหายใจอันเนื่องมาจากการสูบบุหรี่ โดยเฉพาะโรคมะเร็งปอด ถือเป็นหนึ่งในปัญหาที่สำคัญของประเทศไทย โดยเอนไซม์ CYP2A6 ในตับที่ย่อยสลายนิโคตินก่อให้เกิดการเสพติดการสูบบุหรี่ในขณะที่เอนไซม์ CYP2A13 ที่ปอดกระตุ้นสารก่อมะเร็ง 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) ส่งผลให้เกิดโรคมะเร็งปอดขึ้น ดังนั้นการลดการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 จึงเป็นเป้าหมายในการรักษาอาการเสพติดบุหรี่และลดโอกาสเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งปอด โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความจำเพาะและกลไกในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ของสารสกัดจากสมุนไพรขมิ้นชันและหญ้าดอกขาว ที่เคยมีรายงานว่าออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดีในหลอดทดลอง ผลการศึกษาพบว่าสารสำคัญในกลุ่มฟลาโวนอยด์จากพืชทั้งสองชนิดได้แก่ apigenin luteolin chrysoeriol และ quercetin ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ได้ดีกว่าสารสำคัญในกลุ่ม thiophene ทั้งสามชนิดที่ทำบริสุทธิ์ได้จากขมิ้นชัน และสารบริสุทธิ์ในกลุ่ม hirsutinolide-type sesquiterpene lactones จากสมุนไพรหญ้าดอกขาวออกฤทธิ์ยับยั้งได้น้อยที่สุด อย่างไรก็ตามสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ 4 ชนิดออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 แบบผันกลับได้ ในขณะที่สารในกลุ่ม thiophene และ hirsutinolide-type sesquiterpene lactones ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 แบบผันกลับไม่ได้ที่ขึ้นอยู่กับสารให้อิเล็กตรอน NADPH เวลาที่ใช้ในการบ่มสารยับยั้งและความเข้มข้นของสารยับยั้ง (Mechanism based inhibition)

Abstract

Project Title Study of compounds from Thai medicinal plants in inhibition against the human cytochrome P450 2A6, nicotine-metabolizing enzyme, and their effects toward human hepatic cytochrome P450 monooxygenases

Investigators

Songklod Sarapusit, Ph.D, Department of Biochemistry, Faculty of Science, Burapha University
Pornpimol Rongnoparut, Ph.D, Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University
Ekaruth Srisook, Ph.D, Department of Chemistry, Faculty of Science, Burapha University
Panida Duangkaew, Ph.D, Silpakorn University Phetchaburi IT campus
Wanvisa Neadruengsang, M.Sc, Regional Medical Center, Chon BUri

Cigarette smoking is one of the major causes of various tobacco-associated respiratory diseases including lung cancer. The human cytochrome P450 CYP2A6 and CYP2A13 are responsible for nicotine metabolisms and metabolic activation of tobacco-specific nitrosamines 4-(methyl-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK), associated with smoking addiction and lung cancers, respectively. Therefore, inhibition of these two enzymes is an important therapeutic target in smoking cessation and lung cancer prevention. This study aims to characterize inhibiting mechanism of the active constituents *Phuchea indica* and *Vernonia cinerea* that have been reported to potently inhibit CYP2A6 enzyme *in vitro*. The results showed that the active flavonoids from both plants (apigenin, luteolin, chrysoeriol, and quercetin) could potently inhibit both CYP2A6 and CYP2A13 compared to three isolated thiophenes from *P. indica* and hirsutinolide-type sesquiterpene lactones from *V. cinerea*, respectively. However, detailed mechanism characterization indicated that flavonoids inhibit both CYP2A6 and CYP2A13 in reversible mode, while inhibition by thiophenes and hirsutinolides were mechanism-based (NADPH-, concentration-, and time- dependence) and irreversible against CYP2A6 and CYP2A13 enzyme.

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันประชากรทั่วโลก รวมถึงประเทศไทย มีแนวโน้มที่จะป่วยและเสียชีวิตจากโรคเรื้อรังเช่น โรคเบาหวาน โรคมะเร็ง โรคความดันโลหิตสูง โรคหัวใจและหลอดเลือด และโรคต่างๆอันเนื่องมาจากการสูบบุหรี่มากขึ้น รวมถึงการที่ผู้สูบบุหรี่เป็นโรคเรื้อรังดังกล่าวเพิ่มขึ้น ซึ่งการเจ็บป่วยด้วยโรคอันเนื่องมาจากการสูบบุหรี่และโรคเรื้อรังดังกล่าวนี้ เป็นปัญหาเร่งด่วนที่ควรได้รับการแก้ไขและหาแนวทางป้องกันเพราะเป็นโรคอันตรายที่ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการรักษาด้วยยาต่างๆสูง ทำให้ในปัจจุบันจึงมีผู้นิยมบริโภคอาหารเสริมสุขภาพชนิดต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาหารเสริมที่ทำมาจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่เป็นพืชสมุนไพรต่างๆมากขึ้น โดยมีความเชื่อว่าสามารถป้องกัน ช่วยลดหรือชะลออาการเจ็บป่วยและช่วยในการลดการสูบบุหรี่ได้ โดยเห็นได้จากจำนวนของผลิตภัณฑ์อาหารเสริมต่างๆที่เพิ่มขึ้นมากมายในปัจจุบัน เมื่อรับประทานยาหรือโรคเรื้อรังต่างๆ ยาจะถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายและถูกย่อยสลายหรือกระตุ้นด้วยเอนไซม์ในกลุ่ม Cytochrome P450 (P450s) ที่ดับเป็นกลไกหลัก โดยเฉพาะเอนไซม์ CYP3A4 CYP2C9 CYP2D6 และ CYP1A2 ที่เป็นเอนไซม์ P450s ที่พบมาก (รวมประมาณ 82%) ของปริมาณเอนไซม์ P450s ทั้งหมดในตับที่ทำหน้าที่หลักในการย่อยสลายยารักษาโรคต่างๆ ในทางเดียวกัน ในผู้ที่สูบบุหรี่สารนิโคตินจากบุหรี่จะเข้าสู่กระแสเลือดและถูกย่อยสลายเพื่อกำจัดออกจากร่างกายโดยเอนไซม์ cytochrome P4502A6 (CYP2A6) ในตับที่ทำหน้าที่หลักในการย่อยสลายนิโคตินในบุหรี่ และเกี่ยวข้องกับพฤติกรรมกรรมการติดการสูบบุหรี่ของผู้สูบบุหรี่

เนื่องจากสารสำคัญในพืชสมุนไพรหลายชนิด เมื่อรับประทานร่วมกับยารักษาโรคที่ถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ในกลุ่ม P450s ในตับที่ทำหน้าที่หลักในการย่อยสลายยา มักก่อให้เกิดอาการข้างเคียงจากยา (adverse drug effects) ทำให้อาการโรคเรื้อรังนั้นๆรุนแรงมากขึ้น เพราะเกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Cytochrome P450 ต่างๆที่ทำปฏิกิริยากับยาที่รับประทานเข้าไปเพื่อรักษาโรค ทำให้ยาที่รับประทานเข้าไปถูกย่อยสลาย (กำจัดทิ้งออกจากร่างกาย) ช้าลง หรือประสิทธิภาพการรักษายาลดลงเพราะสารสำคัญในสมุนไพรไปเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนที่ถอดรหัสเป็นเอนไซม์ P450s (gene induction) ทำให้มีการแสดงออกของเอนไซม์เพิ่มขึ้นและย่อยสลายยาเร็วขึ้น ทำให้การรักษาโรคเรื้อรังมีประสิทธิภาพลดลง ในทางตรงกันข้ามการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ที่ย่อยสลายนิโคติน ส่งผลให้การทำงานในการย่อยสลายนิโคตินลดลง คงระดับนิโคตินในเลือดให้อยู่ยาวนานขึ้น จึงช่วยยืดระยะเวลาที่จะสูบบุหรี่มวนถัดไปให้นานขึ้นและเลิกบุหรี่ได้ง่ายขึ้น ในขณะที่การเหนี่ยวนำการแสดงออกของเอนไซม์ CYP2A6 จะทำให้การย่อยสลายนิโคตินเร็วขึ้นและสูบบุหรี่มวนต่อไปเร็วขึ้น ดังนั้นการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งและการเหนี่ยวนำการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 CYP3A4 CYP2C9 CYP2D6 และ CYP1A2 ของพืชสมุนไพรไทยต่างๆที่นิยมรับประทานในปัจจุบัน จึงเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญเพื่อนำไปใช้เพื่อลดอัตราการเกิดผลกระทบบางๆ ที่อาจเกิดขึ้นในขณะรับประทานยาและสามารถนำไปใช้ในการช่วยลดการสูบบุหรี่ได้อย่างปลอดภัย ป้องกันผลข้างเคียงต่างๆ อันอาจเกิดขึ้นจากการใช้สมุนไพรไทยในการลดการสูบบุหรี่ ที่ไปส่งผลต่อเอนไซม์ P450s อื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายยาได้อย่างปลอดภัย และยังสามารถนำไปเป็นข้อมูลที่สำคัญในผู้ป่วยที่เป็นโรคเรื้อรังบางโรคเช่นโรคเบาหวานที่ภาวะการเป็นโรคเรื้อรังส่งผลกระทบต่อการทำงานและการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ cytochrome P450 ที่ย่อยสลายยาในผู้ป่วยเองและทำให้เกิดผลข้างเคียงต่างๆตามมาได้ด้วยเช่นกัน

ในการศึกษารุ่นนี้ในขั้นต้นผู้วิจัยจะศึกษาสารออกฤทธิ์จากพืชสมุนไพรไทยที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ในหลอดทดลอง (*in vitro* reconstitution system) ทำบริสุทธิ์และหาโครงสร้างของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง รวมถึงกลไกในการยับยั้ง หลังจากนั้นผู้วิจัยมุ่งหวังที่จะศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งและการเหนี่ยวนำการทำงานของเอนไซม์ P450s ต่างๆที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายยาและย่อยสลายนิโคตินในตับของมนุษย์ของสารสกัดจากพืชสมุนไพรเหล่านี้ โดยวางแผนใช้เซลล์ตับของมนุษย์ที่ถูกดัดแปลง (immortalized human hepatocyte) เป็นต้นแบบ (model) ใน

การศึกษา เพราะเซลล์ต้นที่นำมาใช้ศึกษาได้มีรายงานว่ามีความสัมพันธ์ทางชีวเคมีที่ดีเหมาะสมกับการนำมาศึกษาครั้งนี้ เพราะมีการแสดงออกของเอนไซม์ cytochrome P450 และเอนไซม์อื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายยา รวมถึงสามารถทำการเลี้ยงได้อย่างต่อเนื่อง ต่างจากการศึกษาใน primary human hepatocyte ทำให้เหมาะสมกับการศึกษาการออกฤทธิ์ของสารสกัดแม้จะได้ปริมาณสารสกัดบริสุทธิ์เพียงเล็กน้อยก็สามารถนำมาศึกษาได้ เพื่อเป็นข้อมูลถึงความปลอดภัยในการนำสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 มาใช้ช่วยลดการสูบบุหรี่โดยไม่มีผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ cytochrome P450 ในการย่อยสลายยารักษาโรคนิตต่าง ๆ ได้อย่างยั่งยืน นอกจากนี้กระบวนการและเทคนิคต่างๆที่ได้จากผลการศึกษาจะถูกลำเอียงใช้ในการศึกษาผลของสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์อื่น ๆ ต่อการย่อยสลายยาที่ใช้ในการรักษาโรคเรื้อรังต่างๆ และจะเป็นข้อมูลที่สำคัญในการเฝ้าระวังผลกระทบต่อสุขภาพจากยารักษาโรค (Herb-drug interaction; HDI) ต่อไปได้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย (ในปีแรก)

1. ศึกษาค้นคว้าหาสารสกัดจากพืชสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ที่มีบทบาทในการย่อยสลายนิโคตินและสารก่อมะเร็ง ทำให้สามารถลดการสูบบุหรี่และอัตราเสี่ยงจากโรคมะเร็งระบบทางเดินหายใจ
2. ศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารสกัดจากพืชสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6
3. ศึกษาความจำเพาะและกลไกในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ของสารสกัดจากพืชสมุนไพรไทย

1.3 สมมติฐานของการทดลอง

สารสำคัญจากสมุนไพรไทยสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ได้อย่างจำเพาะ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการทดลอง

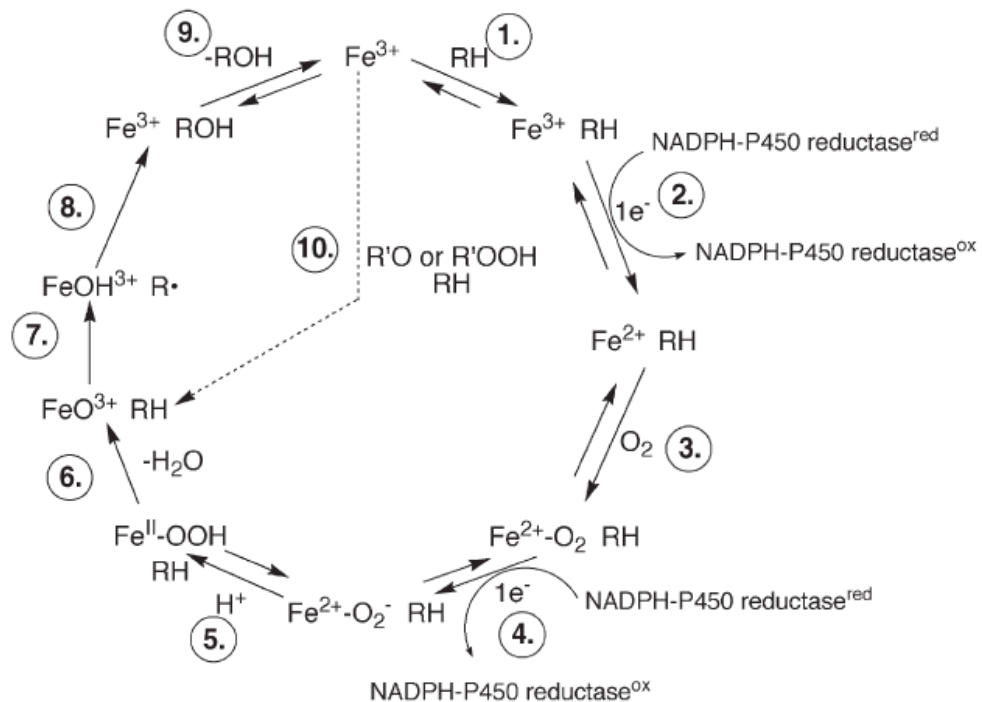
1. ได้ทราบกลไกในการยับยั้งของสารสำคัญจากสมุนไพรขลุ่ยและหญ้าดอกขาว

บทที่ 2

บททวนวรรณกรรม

2.1 ทฤษฎีพื้นฐานที่เกี่ยวข้อง

เอนไซม์ Cytochrome P450 (CYPs หรือ P450s) เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึมของสารเคมีทั้งสารที่มีอยู่ในร่างกายเช่น ฮอร์โมนและกรดไขมันต่างๆ และสารที่ร่างกายได้รับจากภายนอกเช่น ยาและสิ่งปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมต่างๆ เนื่องจากเอนไซม์ P450s พบเป็นจำนวนมากในร่างกายและในสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิด ดังนั้นเอนไซม์ P450 จึงถูกแยกย่อยและแบ่งออกเป็นกลุ่มๆตามลำดับความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนของยีนนั้นๆ โดยยีนที่อยู่ในตระกูล (Family) เดียวกันต้องมีความคล้ายคลึงของกรดอะมิโนมากกว่าร้อยละ 40 และยีนในตระกูลย่อย (Subfamily) เดียวกันต้องมีความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนมากกว่าร้อยละ 55 ทั้งนี้เนื่องจาก P450s ไม่ได้ถูกจัดจำแนกตามกลุ่มของสารตั้งต้นที่ทำปฏิกิริยาหรือชนิดของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น ดังนั้นเอนไซม์ P450s ในตระกูลและตระกูลย่อยเดียวกันอาจเร่งปฏิกิริยาที่มีความแตกต่างหรือมีความเหมือนกันก็ได้และเอนไซม์ P450s หนึ่งเอนไซม์ยังสามารถทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นได้มากกว่า 1 ตัวอีกด้วย (Bernhardt R, 2006; Mansuy D, 1998; Nelson et al, 1996; Ortiz, 2005)

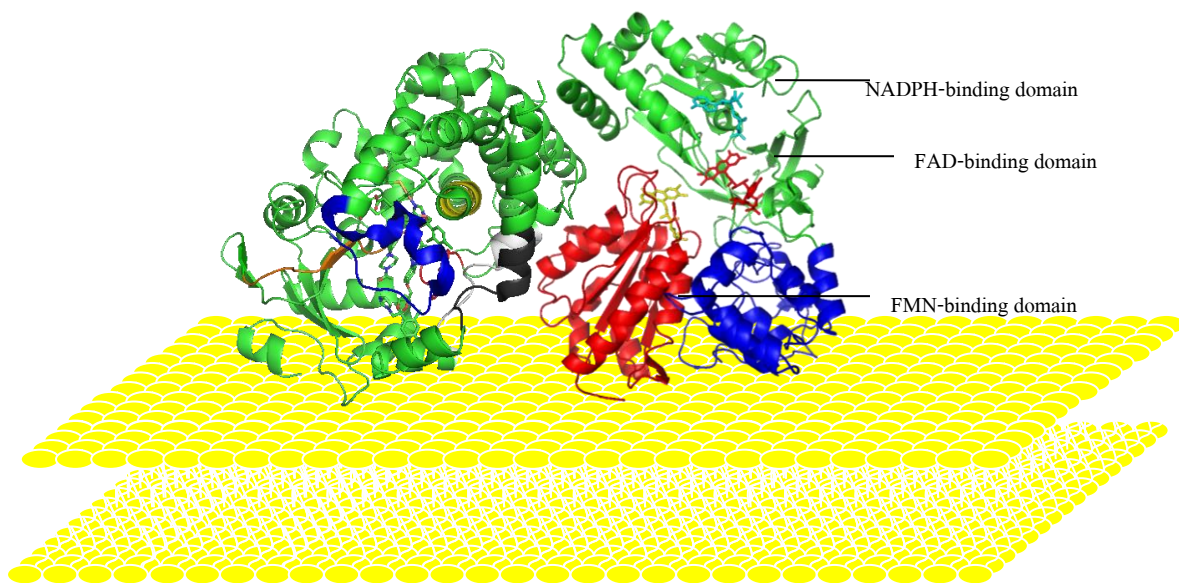


ภาพที่ 2-1 ปฏิกิริยาของเอนไซม์ P450s โดยแบ่งออกเป็นขั้นตอนการกระตุ้นโมเลกุลของออกซิเจน (ขั้นตอนที่ 1-6) การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (ขั้นตอนที่ 7 และ 8) และการปล่อยผลิตภัณฑ์ (ขั้นตอนที่ 9) ที่มา Guengerich FG, 2001

ในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ P450s นั้น (ภาพที่ 2-1) เอนไซม์ P450s จะต้องได้รับอิเล็กตรอนที่ส่งผ่านมาจาก เอนไซม์ NADPH-cytochrome P450 reductase (CPR) โดยที่อิเล็กตรอนตัวแรกจะรีดิวซ์เหล็ก

(Fe^{3+} เป็น Fe^{2+}) ที่เป็นส่วนประกอบหนึ่งของเอนไซม์ P450s เพื่อให้เอนไซม์ P450s สามารถจับกับออกซิเจนได้ ส่วนตัวอิเล็กตรอนตัวที่สองจะกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในโมเลกุลของออกซิเจนให้เกิดเป็นสารประกอบไฮดรอกซิล (iron-hydroxy complex) และเร่งการเกิดปฏิกิริยาต่อไปโดยเอนไซม์ทั้งสองจะทำงานร่วมกันใน Endoplasmic reticulum ของเซลล์ในการเร่งปฏิกิริยาต่างๆ เช่น Squalene monooxygenase, Heme oxygenase และโดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์ในกลุ่ม Cytochrome P450 ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมที่สำคัญต่างๆ (Bernhardt R, 2006; Emre M et al, 2007; Guengerich FG, 2001; Ortiz, 2005) รวมถึงตัวรับอิเล็กตรอนอื่นๆ เช่น cytochrome c และ ferricyanide ด้วยเช่นกัน

เอนไซม์ CPR เป็นเอนไซม์ที่มีส่วนจับกับเยื่อหุ้มเมมเบรนและประกอบด้วยโมเลกุลของ FAD และ FMN ทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ช่วยในการขนส่งอิเล็กตรอน โดยอิเล็กตรอนจะถูกขนส่งจาก NADPH ผ่านโมเลกุลของ FAD และ FMN ไปยังตัวรับอิเล็กตรอนดังที่กล่าวในเบื้องต้น เนื่องจากเอนไซม์ CPR เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สำคัญในการทำงานของเอนไซม์ P450s ที่มีความสำคัญอย่างมากต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิต ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาเอนไซม์ CPR ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดเช่น CPR ของคน, หนูและแมลงวัน อย่างกว้างขวาง (Shen et al., 1989; Dohr et al., 2001; Murataliev et al, 1999) โดยจากการศึกษาโครงสร้างสามมิติของ CPR ในหนูพบว่า CPR ประกอบด้วย 4 โดเมน คือ NH_2 -terminal, FMN-binding domain, FAD-binding domain, และ NADPH-binding domain (Wang et al., 1997) โดยส่วน FMN domain จะแยกออกมาให้เห็นเด่นชัด ในขณะที่ส่วน FAD-binding domain และ NADPH-binding domain จะอยู่รวมกัน (ภาพที่ 2-2)



ภาพที่ 2-2 แบบจำลองของ Cytochrome P450s (ซ้าย) และ P450s Oxidoreductase (ขวา) ซึ่งเรียงตัวกันอยู่ใน Endoplasmic reticulum

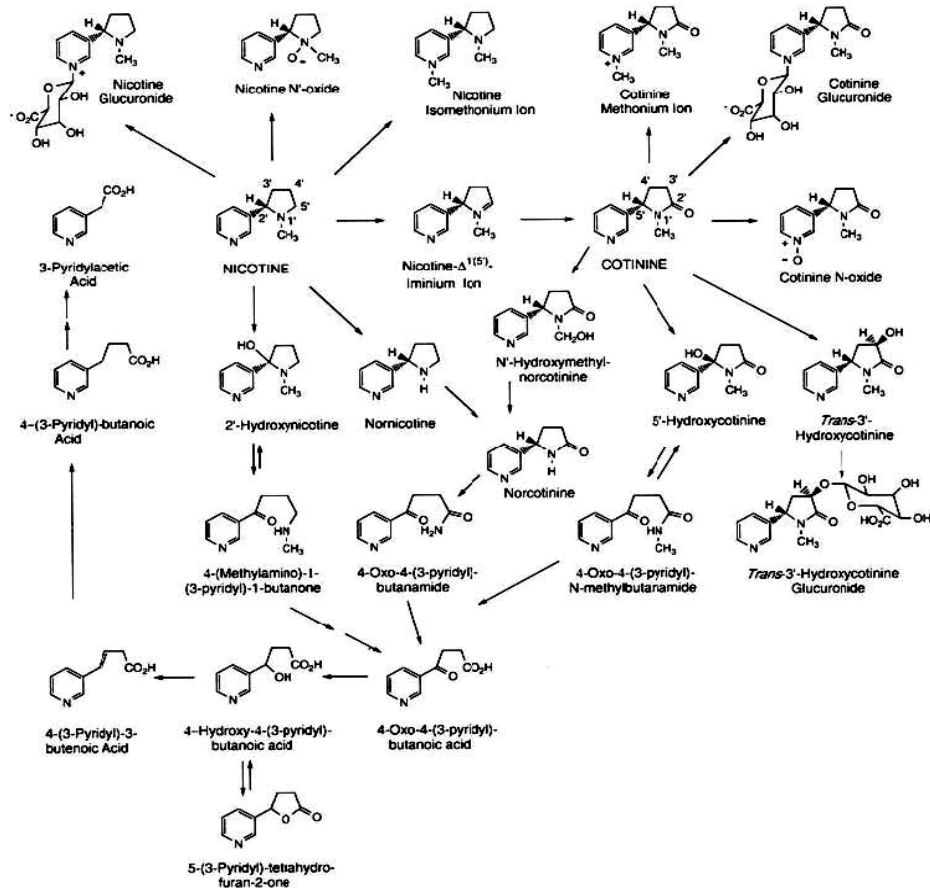
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคในระบบทางเดินหายใจจากการสูบบุหรี่ โดยเฉพาะโรคมะเร็งปอดและโรคถุงลมโป่งพองจัดเป็นปัญหาสำคัญในหลายประเทศทั่วโลก รวมถึงประเทศไทย จากการคาดการณ์ขององค์การอนามัยโลก (WHO) คาดว่าในปี พ.ศ. 2573 จะมีผู้เสียชีวิตด้วยโรครดังกล่าวถึง 8 ล้านคน (WHO, 2008) สำหรับประเทศไทย

ในปี 2549 มีการประมาณการว่าโรคระบบทางเดินหายใจจากการติดบุหรี่ทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจถึง 9.86 ล้านบาท (Bundhamcharoen,2012) ล่าสุดจากผลการสำรวจในปี พ.ศ. 2554 พบว่ามีคนไทยสูบบุหรี่มากกว่า 11 ล้านคนหรือมากกว่า 21 % ของประชากรทั้งประเทศ โดยผู้เสพบุหรี่ส่วนใหญ่อยู่ในวัยทำงาน โดยที่อัตราการสูบบุหรี่เพิ่มขึ้นในกลุ่มเยาวชน กลุ่มผู้ไม่เคยเรียนหนังสือและผู้อาศัยอยู่นอกเขตเทศบาล รวมถึงผู้มีฐานะในระดับปานกลางทั่วไป โดยที่อัตราดังกล่าวยังคงเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องโดยมีเพียง 1.77 ล้านคนเท่านั้นที่เคยและพยายามเลิกบุหรี่แต่ไม่สำเร็จโดยมีค่าเฉลี่ยของการเลิกบุหรี่ได้ก่อนกลับมาสูบบุหรี่ซ้ำคือ 11.44 เดือน ทั้งนี้สาเหตุเกิดจากการหงุดหงิด/ฉุนเฉียว/โกรธง่าย ถึงร้อยละ 38.61 และเพราะความเครียดร้อยละ 27.42 และพบว่าถึงแม้เลิกบุหรี่ไปแล้วถึง 20 ปีก็สามารถกลับมาสูบบุหรี่ได้อีก แสดงให้เห็นว่าการเสพติดบุหรี่เพียงหนึ่งครั้งส่งผลให้ต้องเสพติดบุหรี่และสามารถเลิกการเสพติดได้ยาก (ศิริวรรณ และคณะ 2555)

จากการศึกษาพบว่าบุหรี่ประกอบไปด้วยสารประกอบต่างๆมากมาย โดยที่มากกว่า 40 ชนิดเป็นสารพิษและสารก่อมะเร็ง ดังนั้นโรคทางเดินหายใจเช่น โรคหอบและโรคถุงลมโป่งพอง จึงเป็นโรคที่พบมากในกลุ่มผู้สูบบุหรี่และผู้ใกล้ชิด นอกจากนี้กลุ่มผู้สูบบุหรี่ยังเป็นกลุ่มเสี่ยงที่จะมีอาการของโรคหัวใจขาดเลือด โรคหัวใจวาย และโรคที่เกี่ยวข้องต่างๆ (WHO, 2008) อุบัติการณ์การเกิดโรคต่างๆเหล่านี้เกิดขึ้นเนื่องจากนิโคตินที่เป็นสารประกอบหลักในบุหรี่ ที่มีผลทำให้หัวใจเต้นเร็วขึ้นและเพิ่มความดันโลหิตขึ้น (Benowitz, 2008) นอกจากนี้นิโคตินยังเป็นสารประกอบสำคัญที่มีผลให้เสพติดการสูบบุหรี่โดยไปออกฤทธิ์กระตุ้นระบบการตอบสนองต่อความยินดี ผ่านการจับกับตัวรับนิโคตินที่บริเวณปลายประสาทของสมองส่วน VTA ทำให้เกิดการหลั่งสารสื่อประสาทโดปามีนออกมามากขึ้น มีผลทำให้ผู้สูบบุหรี่มีความรู้สึกสุขสบายใจและลดความเครียดต่างๆ ผู้สูบบุหรี่จึงสูบบุหรี่เพื่อคงระดับนิโคตินในกระแสเลือดและในสมองให้เกิดความรู้สึกมีความสุขต่อไป ส่งผลให้ผู้สูบบุหรี่และบุคคลใกล้เคียงได้รับสารพิษต่างๆ ในบุหรี่ไปด้วย (Hukkanen et al, 2005) โดยประมาณ 80-90% ของนิโคตินที่เข้าสู่ร่างกายผ่านทาง การดูดซึมที่เนื้อเยื่อคัดหลังที่ปาก ระบบทางเดินหายใจและระบบทางเดินอาหาร จะถูกย่อยสลายโดยกลไกหลักด้วยเอนไซม์ CYP2A6 ในตับเกิดเป็นสารประกอบ nicotine $\Delta^{1(5)}$ -iminium ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็นโคทินิกินโดยเอนไซม์ aldehyde oxidase (Hukkanen et al, 2005) หลังจากนั้นโคทินิกินที่เกิดขึ้นจะเกิดปฏิกิริยา hydroxylation ได้เป็นสารประกอบต่างๆ เช่น *trans*-3'-hydroxycotinine, 5'-hydroxycotinine และ nornicotine (ภาพที่ 2-3) ซึ่งสุดท้ายทั้งโคทินิกินและสารประกอบที่ได้จากโคทินิกินต่างๆ จะถูกเติมหมู่น้ำตาล (glucoronation) และขับออกทางปัสสาวะ (Benowitz, 2008; Flammang et al, 1992)

ในคนพบว่ามีเอนไซม์ P450 ถึง 18 กลุ่มและ 43 กลุ่ม โดยเอนไซม์ CYP2A6 ในตับที่สามารถย่อยสลายนิโคตินได้ดีด้วยค่าความสามารถในการจับกับสารตั้งต้น (K_m) ต่อนิโคตินที่ต่ำและอัตราการเร่งปฏิกิริยา (V_{max}) ที่สูง (Patten et al, 1996) CYP2A13 ที่พบในระบบทางเดินหายใจ CYP2B6 ที่พบในสมอง ลำไส้เล็กและไต

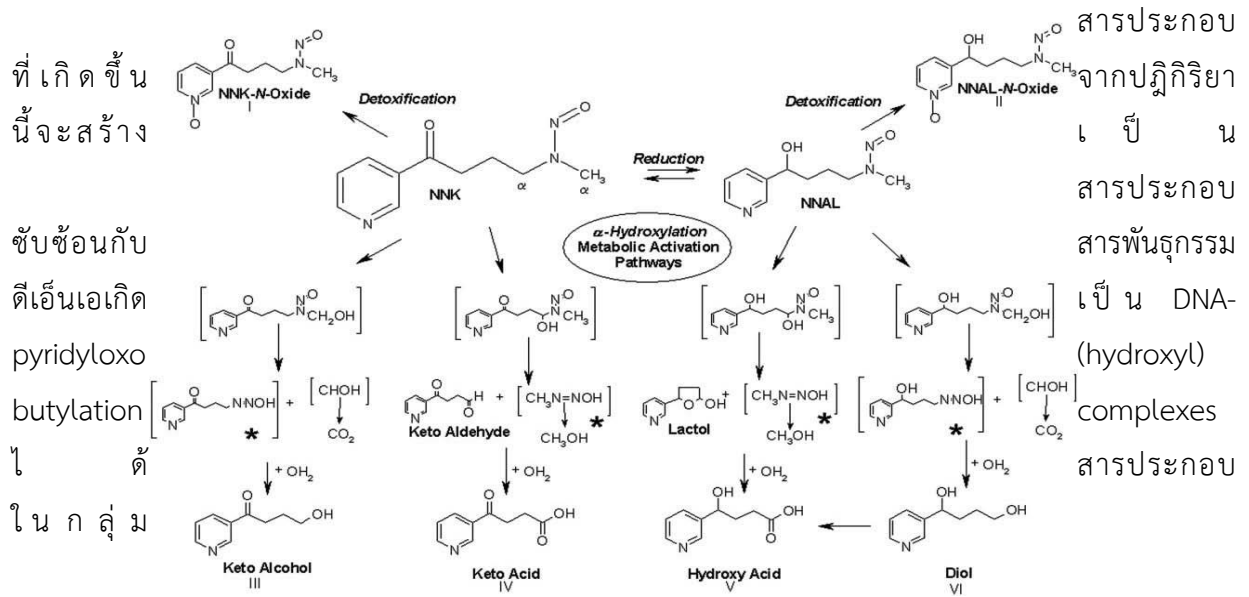


CYP2D6 ที่พบในสมองและ CYP2E1 ที่พบในปอดและสมอง ถูกรายงานว่าสามารถย่อยสลายนิโคตินในคน (Hukkanen et al, 2002; Miksys et al, 2002; Su et al, 2000) อย่างไรก็ตามบทบาทของเอนไซม์ CYP2A13 ในระบบทางเดินหายใจต่อการย่อยสลายนิโคตินยังไม่ชัดเจน เพราะในผู้สูบบุหรี่ที่การทำงานของ CYP2A13 น้อย ยังคงมีโอกาสเกิดมะเร็งในระบบทางเดินหายใจสูง (Jiang et al, 2004) สำหรับเอนไซม์ CYP2B6 และ CYP2D6 ไม่ได้เป็นเอนไซม์หลักในการย่อยสลายนิโคติน เพราะคนที่มีการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองน้อย (poor metabolizer, PM) และตีมาก (extensive metabolizer, EM) มีอัตราการสลายนิโคตินและโคตินินไม่ต่างกัน (Benowitz et al, 1996) ในขณะที่เอนไซม์ CYP2E1 เกี่ยวข้องกับการได้รับแอลกอฮอล์มากกว่านิโคติน แสดงให้เห็นว่า การย่อยสลายของนิโคตินที่ตับโดยเอนไซม์ CYP2A6 เป็นกระบวนการหลักของร่างกายในการกำจัดนิโคตินและการกระตุ้นการสูบบุหรี่ ซึ่งส่งผลเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็งต่างๆในระบบทางเดินหายใจในผู้สูบบุหรี่

ภาพที่ 2-3 กลไกในการกำจัดนิโคติน (Hukkanen et al, 2005)

ในขณะที่เมื่อ NNK เข้าสู่ร่างกายจะถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ CYP2A13 ที่แสดงออกในปริมาณมากที่เนื้อเยื่อปอดและเซลล์เยื่อบุทางเดินหายใจได้เป็นสารประกอบ NNK-N-oxide และ NNAL ซึ่งจะถูกรอกออกซิไดส์อีกครั้งด้วย CYP2A13 เกิดเป็นสารประกอบ NNAL-N-Oxide (ภาพที่ 2-5) หรือถูกเติมหมู่น้ำตาลกลายเป็น NNAL-glucuronide จากนั้นสารประกอบทั้งหมดจะถูกกำจัดออกจากร่างกายทางปัสสาวะ อย่างไรก็ตามเอนไซม์ CYP2A13 สามารถเร่งปฏิกิริยา hydroxylation ที่หมู่ α -methyl carbon หรือ α -methylene

carbon ของ NNK หรือ NNAL ได้เป็นสารประกอบ NNK-keto alcohol, NNK-Keto acid, NNAL-diol และ NNAL-Hydroxy acid (รูปที่ 2-4) ที่มีฤทธิ์เป็นสารก่อมะเร็งที่รุนแรงขึ้น (NNK-metabolic activation) จากนั้น



methylguanine DNA adduct ที่ตำแหน่งออกซิเจนที่ 6 และไนโตรเจนที่ 7 (O⁶-MeG และ N⁷-MeG) ซึ่ง
สันนิษฐานว่าเป็นกลไกที่สำคัญของสารประกอบ NNK ในบุหรี่ ในการทำให้เกิดมะเร็ง (carcinogenesis)
โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคมะเร็งต่างๆในระบบทางเดินหายใจ เช่นโรคมะเร็งปอด ชนิด adenocarcinoma และ
squamous cell carcinoma ที่เป็นมะเร็งปอดที่มีความสามารถในการแพร่กระจายสูง (malignant
pulmonary tumor) ไปสู่บริเวณต่างๆของปอด หรือแม้แต่อวัยวะอื่นๆได้ง่าย (Brown, 2007; Hecht et al,
1998; 1999a; 1999b; Hoffmann et al, 1996; Fukami et al, 2010) และมะเร็งกล่องเสียง (Chiang et al.,
2011; Hecht, 1998; Hecht, 1999a, 1999b)

ภาพที่ 2-4 กลไกในการกระตุ้นสารก่อมะเร็งของเอนไซม์ CYP2A13 (Brown PJ, 2007)

นอกเหนือไปจากความสามารถในการย่อยสลายนิโคตินแล้ว เอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ยังถูกพบว่าสามารถย่อยสลายสารประกอบอื่นๆได้ เช่นสาร coumarin ไปเป็นผลิตภัณฑ์ 7-hydroxycoumarin (ปฏิกิริยา coumarin-7-hydroxylase) ที่นิยมนำมาใช้เป็นตัวตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ในหลอดทดลอง (Miles et al, 1990)

จากการศึกษาในประชากรพบว่ายีน CYP2A6 มีความหลากหลายทางพันธุกรรม (polymorphism) ถึง 38 อัลลีลที่แตกต่างกัน (Koudsi et al, 2009) ซึ่งมีทั้งอัลลีลที่ทำงานผิดปกติหรือไม่สามารถย่อยนิโคตินได้และที่สามารถย่อยนิโคตินได้ดีเกินไป (Kamataki et al, 2005) โดยที่ความหลากหลายในการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ส่งผลต่อการย่อยสลายนิโคตินและมีบทบาทที่สำคัญในการกำหนดพฤติกรรมการสูบบุหรี่ เช่นผู้สูบบุหรี่ที่ย่อยสลายนิโคตินน้อยจะสูบบุหรี่ต่อวันน้อยกว่าคนที่ย่อยสลายนิโคตินได้ดีและมีความเสี่ยงในการเสพติดนิโคตินน้อย ในทางตรงกันข้ามผู้สูบบุหรี่ที่มีการเพิ่มจำนวนยีน CYP2A6 หรือมีการย่อยสลายนิโคตินได้ดีมากจะมีการสูบบุหรี่มากกว่าคนปกติและมีโอกาสที่เป็นมะเร็งเนื่องจากการสูบบุหรี่มากกว่าปกติ (Schoedel et al, 2004; Sellers et al 2000; Tyndale & Sellers 2002) ที่น่าสนใจเป็นอย่างมากคือในผู้สูบบุหรี่ที่มีการขาดหายไปของยีน CYP2A6 จะมีอัตราเสี่ยงในการเป็นมะเร็งปอดน้อยมาก อย่างไรก็ตามไม่มีความสัมพันธ์ในกรณีผู้ไม่สูบบุหรี่ (Kamatiki et al, 2005; Miyamoto et al, 1999) สำหรับประเทศไทยพบว่าประชากรส่วนใหญ่เป็นบุคคลที่มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ดีกว่าปกติ โดยแบ่งเป็นอัลลีล CYP2A6*1A ซึ่งเป็นพันธุกรรมตามธรรมชาติ (wild-type) และ CYP2A6*1B ซึ่งเป็นอัลลีลที่ย่อยสลายนิโคตินได้ดีมากเกินไป (EM) มากถึง 32-52% และ 27-40% ตามลำดับ ในขณะที่อัลลีล CYP2A6*4C ซึ่งเป็นการขาดหายไปของยีนถูกพบเพียงแค่ 8-9 % เท่านั้น (Mahavorasirikul et al, 2009; Peamkrasatam et al, 2006; Ujijin et al, 2002) ใกล้เคียงกับที่พบในประชากรของประเทศเกาหลีและญี่ปุ่น (Kamataki et al, 2005; Yoshida et al, 2002; Kwon et al, 2001) อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ไม่ได้ศึกษาในรายละเอียดความสัมพันธ์ในการกระจายของความหลากหลายทางพันธุกรรมของ CYP2A6 อัลลีลต่างๆกับความสามารถในการย่อยสลายนิโคตินในผู้สูบบุหรี่และไม่สูบบุหรี่

ในขณะที่เอนไซม์ CYP2A13 มีความหลากหลายทางพันธุกรรม (polymorphism) อยู่ถึง 10 อัลลีลที่แตกต่างกัน โดยอัลลีล CYP2A13*4 ที่มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจากอาร์จินีนเป็นกลูตามีนที่ตำแหน่ง 101 จะไม่เกิดปฏิกิริยาต่อสารตั้งต้น NNK เลย (Wang et al, 2006) เช่นเดียวกับอัลลีล CYP2A13*2 ที่มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจากอาร์จินีนเป็นซิสเทอีนที่ตำแหน่ง 257 จะมีปฏิกิริยาต่อสารตั้งต้น NNK และ coumarin ลดลง (Zhang et al, 2002) นอกจากนี้ยังพบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของเอนไซม์ CYP2A13*2 เกี่ยวพันกับการลดลงของการเกิดโรคมะเร็งปอดชนิด adenocarcinoma ในคนจีนที่สูบบุหรี่ (Wang et al, 2003) แต่ไม่พบความเกี่ยวพันระหว่าง CYP2A13*2 กับการเกิดโรคมะเร็งกล่องเสียงในคนจีนที่สูบบุหรี่ (Jiang et al, 2004) สอดคล้องกับผลการศึกษาที่พบว่าการเพิ่มการทำงานของ CYP2A13 ในการทำปฏิกิริยากับ NNK จะเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งปอดให้มากขึ้น (Chiang et al., 2011; Hecht, 1998; Zhang et al, 2002) แสดงให้เห็นว่าการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 มีบทบาทสำคัญในการเกิดโรคมะเร็งปอดที่พบมากในผู้สูบบุหรี่และบุคคลใกล้ชิด

เนื่องด้วยการเสพติดบุหรี่จากนิโคตินเป็นสิ่งที่จำเป็นต้องได้รับการรักษาและโรคมะเร็งปอดที่เกิดจากสูบบุหรี่เป็นโรคอันตรายร้ายแรง ในปัจจุบันจึงมียาที่เป็นนิโคตินทดแทน (NRT) ต่างๆ ทั้งในรูปของนิโคตินหมากฝรั่งชนิดเคี้ยวหรือชนิดแผ่นติดผิวหนังมาใช้ร่วมกับการบำบัดพฤติกรรมของผู้สูบบุหรี่ เพื่อช่วยในการบำบัดและช่วยให้ผู้สูบบุหรี่เลิกจากการสูบบุหรี่ อย่างไรก็ตามการบำบัดด้วยวิธีนี้ยังไม่ได้รับความนิยมเนื่องจากความไม่

สะดวกในการใช้ ไม่มีประสิทธิภาพที่รวดเร็วและมีผลข้างเคียงต่างๆ (Sellers et al, 2003) อีกหนึ่งวิธีที่ใช้ในการบำบัดคือการใช้อยาที่ไปลดการทำงานของตัวรับนิโคตินในสมองซึ่งจะส่งผลให้ลดอาการเสพติดนิโคตินลง เช่น ยาในกลุ่ม bupropion HCl และ varenicline ซึ่งเป็นยาในกลุ่มที่ใช้ก่อน (first-line drug) และยา nortriptyline และ clonidine ซึ่งเป็นยาในกลุ่มถัดไป (second-line drug) แต่ยาต่างๆเหล่านี้ให้ผลข้างเคียงกับผู้ใช้ยา โดย bupropion HCl ทำให้เกิดอาการนอนไม่หลับ ปากแห้ง มือสั่นและปวดศีรษะ (Carrozzi et al, 2008) ในขณะที่ varenicline ทำให้เกิดอาการอาเจียนและปวดหัว (Gonzalez et al, 2006; Jorenhy et al, 2006) ส่วนยา second-line drug จะทำให้เกิดอาการง่วงนอน อ่อนเพลีย มึนงง ความดันโลหิตสูง ตาพร่า หน้ามืด มือสั่น (Carrozzi et al, 2008) และเนื่องจากเอนไซม์ CYP2A6 มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายนิโคตินในคนและอัตราการเกิดโรคมะเร็งที่สืบเนื่องจากการสูบบุหรี่ ดังที่พบความสัมพันธ์ในผู้ที่มีการขาดหายของยีน CYP2A6 ดังนั้นการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 จึงเป็นอีกหนึ่งวิธีทางเลือกในการช่วยบำบัดอาการเสพติดบุหรี่และลดอัตราการเกิดโรคมะเร็งทางเดินหายใจและโรคมะเร็งต่างๆได้ (Sellers et al, 2003)

แม้จะยังไม่มีการศึกษาสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A13 มากนัก แต่ในปัจจุบันมีสารหลายตัวที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ได้เช่นสาร methoxsalen (8-methoxypsoralen) ที่สามารถยับยั้งการย่อยสลายนิโคตินและยับยั้งการกระตุ้นการเกิดมะเร็งในหนู (Damaj et al, 2007; Miyazaki et al, 2005) เมื่อใช้ coumarin เป็นตัวตรวจสอบพบว่า 8-MOP ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ด้วยกลไกทั้งแบบแข่งขันที่ผันกลับได้ (competitive inhibition) และการยับยั้งกลไกการย่อยสลายแบบ mechanism-based inhibition (MBI-สารยับยั้งถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์แต่ผลิตภัณฑ์หรือตัวกลางที่เกิดขึ้นจับแน่นกับเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์หมดสภาพในการทำงาน) (Siu and Tyndale, 2007; von Weymarn et al, 2005) และเนื่องจากกลไกการยับยั้งแบบ MBI มีการสร้างพันธะโควาเลนต์ขึ้นระหว่างสารยับยั้งกับกรดอะมิโนบริเวณแอคทีฟของเอนไซม์ (active site) ทำให้ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อย่างถาวรและต้องมีการสร้างเอนไซม์ใหม่ขึ้นมาแทนที่เอนไซม์ที่สูญเสียการทำงานไป ดังนั้นยา tranlycypromine และยา tryptamine ซึ่งมีกลไกการยับยั้งการทำงานแบบ competitive inhibition จึงมีประสิทธิภาพการทำงานที่ด้อยกว่า 8-MOP เนื่องจากประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ของยา tranlycypromine และยา tryptamine จะลดลงเมื่อได้รับสารตั้งต้นทั้ง coumarin และนิโคตินเพิ่ม นอกจากนี้การศึกษาเบื้องต้นในคนพบว่า 8-MOP สามารถลดการย่อยสลายนิโคตินและพบว่าสามารถลดการกำจัดนิโคตินออกจากร่างกายได้ (Sellers et al, 2000, 2003) โดยผู้สูบบุหรี่ที่ได้รับ 8-MOP หรือ tranlycypromine ร่วมกับการได้รับนิโคตินจะมีระดับของนิโคตินในกระแสเลือดเพิ่มขึ้นและลดการสูบบุหรี่ลง โดยเพิ่มระยะเวลาก่อนที่จะสูบบุหรี่วนต่อไปให้ยาวนานขึ้น (sellers et al, 2000) แม้ในที่สุดจะพบว่าทั้ง 8-MOP หรือ tranlycypromine ส่งผลกระทบต่อผู้ใช้ทำให้ต้องระงับการใช้สารทั้งสอง แต่ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ในการย่อยสลายนิโคตินสามารถทำให้สูบบุหรี่น้อยลงได้ (Sellers et al, 2003; Siu and Tyndale, 2007) จึงได้มีการสร้างสารสังเคราะห์ต่างๆขึ้น (synthetic compounds) เพื่อนำมาใช้ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 เช่นสารที่มีโครงสร้าง 3-heteroaromatic และ 3-aliphatic pyridine เป็นโครงสร้างหลักที่พบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้อย่างจำเพาะเจาะจง (Yano et al, 2006) หรือสาร selegiline ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นเพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ monoamine oxidase ที่พบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้ด้วย (Siu and Tyndale, 2008) และสารสังเคราะห์ N1-(4-fluorophenyl) cyclopropane-1-carboxamide ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ด้วยเช่นกัน (Rahnasto et al, 2008)

เนื่องด้วยแนวโน้มในการรักษาโรคที่นิยมใช้สารจากธรรมชาติ จึงได้มีการศึกษาโดยใช้ menthol ซึ่งเป็นสารแต่งกลิ่นในอาหาร ผสมลงในบุหรี่และพบว่าสามารถเพิ่มครึ่งชีวิตของสารโคตินินในกระแสเลือดในผู้สูบบุหรี่ผู้หญิงได้ (Ahijevych et al, 2002) เพราะ menthol มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6

ได้ (MacDougall et al, 2003) นอกจากนี้ น้ำ grapefruit ก็สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ในการย่อยสลายสาร coumarin ได้เช่นเดียวกันแต่ไม่ตีเท่ากับการยับยั้งเอนไซม์ CYP3A4 ในขณะที่สารสกัด nootkatone บริสุทธิ์ที่สกัดจากส้มโอสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดีแต่ไม่มีรายงานถึงความจำเพาะในการยับยั้ง (Merket et al, 1994; Runkel et al, 1997; Tassaneeyakul et al, 2000) รวมถึงสารสกัดจาก Kava และสารในกลุ่ม kavalactone สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP3A4 และ CYP2C9 ที่เกี่ยวกับการย่อยสลายสารแปลกปลอมภายนอกอื่น ๆ ได้ดีกว่าเอนไซม์ CYP2A6 (Mathews et al, 2002) สารประกอบ isothiocyanate ในกลุ่มผักกะหล่ำก็มีประสิทธิภาพที่ต่ำในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 และต้องถูกตัดแปลงในหลอดทดลองก่อนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งให้เพิ่มขึ้น (von Weymarn et al, 2007) เมื่อเปรียบเทียบกับ สาร decursinol angelate ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม pyranocoumarin ที่สกัดได้จากรากของ *Angelica gigas* ที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้แบบ MBI (Yoo et al, 2007) แสดงให้เห็นว่าสารจากธรรมชาติมีสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ที่ดี ด้วยเหตุนี้สารสกัดจากธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานและจำเพาะต่อเอนไซม์ CYP2A6 โดยไม่มีผลข้างเคียงและไม่เป็นพิษต่อร่างกาย จึงเป็นหนึ่งในแนวทางเลือกที่สำคัญในการป้องกันการเสพติดบุหรี่ รวมถึงลดระดับการเป็นมะเร็งปอดทั้งในผู้สูบบุหรี่และผู้ใกล้ชิดต่อไป

จากผลการศึกษาผู้วิจัยพบว่า สมุนไพรและผลไม้ที่นิยมรับประทานเพื่อรักษาสุขภาพหลายชนิดในประเทศไทยสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ในหลอดทดลองได้ โดยนอกเหนือจากน้ำมะเฟืองซึ่งเป็นน้ำผลไม้ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ที่ดีที่สุดด้วยกลไก MBI (Pouyfung et al., 2012; 2013) ผลการศึกษายังพบอีกว่าพืชสมุนไพรและน้ำผลไม้ในวงศ์ Asteraceae และ Acanthaceae หลายชนิดเช่นหญ้าดอกขาว เก๊กฮวยและทองพันชั่ง สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดีมากเช่นกัน (ทรงกลด สารภูษิตและพรพิมล รงค์นพรัตน์, 2554; Prasopthum et al., 2013) โดยพบว่าพืชทุกชนิดที่นำมาศึกษาสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดีโดยสารสกัดส่วนเอทานอลของพืช ชลูดอกคำฝอย ทองพันชั่งและหญ้าดอกขาว ออกฤทธิ์ยับยั้งได้ดีใกล้เคียงกัน เมื่อทำการศึกษาต่อเนื่องผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการได้สารสำคัญจากพืชสมุนไพร 2 ชนิดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ได้ดี คือสมุนไพรทองพันชั่งและสมุนไพรหญ้าดอกขาว โดยได้สารสำคัญจำนวน 3 ชนิดจากสมุนไพรทองพันชั่ง ได้แก่ Rhinacanthin-A, -B, และ -C ที่มีรายงานการออกฤทธิ์ช่วยฆ่าเชื้อไวรัส ลดการอักเสบและนำมาใช้ประโยชน์ต่าง ๆ มากมายสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งทั้งเอนไซม์ CYP2A6 และเอนไซม์ CYP2A13 ได้ดี เช่นเดียวกับสารสำคัญอื่น ๆ เช่น 8-MOP หรือ Seligeline ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งทั้งสองเอนไซม์ได้ (Hukkunen, 2005; Xi et al., 2009) แต่ไม่สามารถทดสอบฤทธิ์ของสาร Rhinacanthin -I และ -H ได้เพราะไม่สามารถแยกสารทั้งสองที่เป็นไอโซเมอร์กันออกจากกันได้ โดยกลไกการยับยั้งของสารสำคัญ ทั้งสามเป็นแบบผันกลับไม่ได้แบบ mechanism base inhibition และสาร Rhinacanthin-B ออกฤทธิ์ยับยั้งดีที่สุด และผู้วิจัยได้สารสำคัญทั้งหมด 8 ชนิด จากหญ้าดอกขาวโดยสารสำคัญในกลุ่ม Hirsutinolides 8a-(2-methylacryloyloxy)-hirsutinolide-13-O-acetate, 8a-(4-hydroxymethylacryloyloxy)-hirsutinolide-13-O-acetate, 8a-tigloyloxyhirsutinolide-13-O-acetate และ 8a-(4-hydroxytigloyloxy)-hirsutinolide-13-O-acetate ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 แบบผันกลับไม่ได้แบบ mechanism base inhibition ซึ่งเป็นการยับยั้งที่มีประสิทธิภาพมากกว่าการยับยั้งแบบผันกลับได้ของสารในกลุ่ม Flavonoid ได้แก่ Apigenin, Chrysoeriol, Luteolin และ Quercetin ซึ่งแม้จะยังไม่มีรายงานการยับยั้งการทำงานของสารสำคัญทั้ง 8 ชนิดจากหญ้าดอกขาวต่อเอนไซม์ CYP2A13 แต่ผู้วิจัยพบว่าสารสำคัญ 7 ชนิด ยกเว้นเพียง 8a-(4-hydroxymethylacryloyloxy)-hirsutinolide-13-O-acetate ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Monoamine oxidase ทั้งรูปแบบ A และ B (MAO-A & MAO-B) ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายสารสื่อประสาทโดปามีนในสมองได้ และเกี่ยวกับกับการเสพติดนิโคตินในสมองได้ เช่นเดียวกับยา Seligeline ที่ยับยั้งทั้ง CYP2A6 และ MAO ที่นำมาใช้เพื่อลดการสูบบุหรี่ในปัจจุบัน (Fowler et al., 2008; Grime et al., 2009;

Xi et al., 2009; Zhou et al., 2005) การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาสารสำคัญและกลไกการยับยั้งของสารสำคัญในกลุ่มที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 และศึกษากลไกการยับยั้งของสารสำคัญในหลอดขาวต่อเอนไซม์ CYP2A13 เพื่อประโยชน์ในการบำบัดอาการการติดบุหรี่ของผู้เสพติดเพื่อช่วยลดอัตราการเกิดโรคระบบทางเดินหายใจและโรคมะเร็งอันเนื่องมาจากการสูบบุหรี่ได้

บทที่ 3

สารเคมีและวิธีการทดลอง

3.1 สารเคมี

1. Acetic acid glacial (CH_3COOH) MW 60.053 บริษัท Carlo erba ประเทศสหรัฐอเมริกา
2. Acrylamide ($\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}$) MW 71.80 บริษัท ACROS ORGANIC ประเทศสหรัฐอเมริกา
3. Albumin บริษัท ACROS ORGANIC ประเทศสหรัฐอเมริกา
4. Alcohol MW 32.042 บริษัท Carlo erba analytical ประเทศสหรัฐอเมริกา
5. 5-Aminolevulinic acid hydrochloride (δ -ALA) MW 167.59 บริษัท SIGMA-ALDRIC ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
6. Ammonium persulfate (APS) ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$) MW 228.20 บริษัท Bio Basic INC ประเทศแคนาดา
7. Ampicilin ($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{NaO}_4\text{S}$) MW.371.39 บริษัท Bio Basic INC ประเทศแคนาดา
8. Bisacrylamide MW 154.20 บริษัท Promega Corporation ประเทศสหรัฐอเมริกา
9. Bardford ยี่ห้อ Bio-rad บริษัท Bio-rad Laboratories, Inc ประเทศสหรัฐอเมริกา

10. Coumarin (C₉H₆O₂) MW 146.15 บริษัท Fluka Analytical ประเทศฝรั่งเศส
11. Dipotassium hydrogen phosphate (K₂HPO₄) MW 174.16 บริษัท Carlo erba analytical ประเทศสหรัฐอเมริกา
12. Disodium hydrogen phosphate (Na₂HPO₄) MW 141.96 บริษัท Fisher scientific analytical grade ประเทศอังกฤษ
13. Ethyl alcohol absolute (C₂H₅OH) MW 46.070 บริษัท Carlo erba ประเทศสหรัฐอเมริกา
14. Glycerol (CH₂OHCHOHCH₂OH) MW 92.095 ยี่ห้อ Carlo erba บริษัท Bio Basic INC. ประเทศแคนาดา
15. Glycine MW 75.10 ยี่ห้อ UPS Grade บริษัท RESEARCH ORGANICS ประเทศสหรัฐอเมริกา
16. Imidazole MW 68.08 บริษัท Bio Basic INC ประเทศแคนาดา
17. Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) MW 238.31 บริษัท Promega ประเทศสหรัฐอเมริกา
18. LB agar, Difco™, บริษัท Dickinson company ประเทศสหรัฐอเมริกา
19. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate ในรูปรีดิวซ์ (NADPH) บริษัท Fluka HPLC grade ประเทศสหรัฐอเมริกา
20. Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (C₆H₅CH₂SO₂F) บริษัท Bio Basic INC ประเทศแคนาดา
21. Potassium dihydrogen phosphate (KH₂PO₄) MW 136.09 บริษัท Carlo erba ประเทศสหรัฐอเมริกา
22. Sodium chloride (NaCl) MW 58.443 บริษัท Carlo erba ประเทศสหรัฐอเมริกา
23. Sodium dodecyl sulfate (SDS) (C₁₂H₂₅OSO₃Na) MW 288.83 บริษัท BIO BASIC INC. ประเทศแคนาดา
24. Trytone Power ยี่ห้อ Biotech บริษัท Bio Basic INC ประเทศแคนาดา
25. Tris-Hydrochloride ยี่ห้อ Promega บริษัท Promega Corporation ประเทศสหรัฐอเมริกา
26. Tris(Hydroxymethyl)aminomethane (NH₂C(CH₂OH)₃) MW 121.14 บริษัท USB Corporation ประเทศสหรัฐอเมริกา
27. Yeast extract บริษัท Bio Basic INC. ประเทศแคนาดา
28. 1,2-dilauryl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DLPC) MW 621.83 บริษัท Bio Basic INC ประเทศแคนาดา

3.2 พลาสมิดที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1 พลาสมิดที่บรรจุยีน CYP2A6 และ CYP2A13 ของคนที่ขาดส่วนจับกับเมมเบรน (Δ 23human CYP2A6 และ Δ 23human CYP2A13) (ได้รับมาจาก Assoc. Prof. Dr. Emily E. Scott, Dept. of Medicinal Chemistry, Kansas University, USA)

3.2.2 พลาสมิด pN111ompA3 ที่บรรจุยีน CPR ของหนูที่มีส่วนจับเมมเบรน (ratCPR) (ได้รับมาจาก Prof. Dr. Jung-Ja Kim, Dept. of Biochemistry, Medical College of Wisconsin, USA)

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเหนี่ยวนำการแสดงออก การทำบริสุทธิ์และกิจกรรมของเอนไซม์ Cytochrome P450 reductase จากหนู (rat CPR)

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ C41 (DE3) ที่ได้รับการส่งผ่านพลาสมิด DNA ที่มียีน rat CPR (pINIII-flrat CPR) จากนั้นเหนี่ยวนำการแสดงออกโปรตีนและทำบริสุทธิ์โปรตีนด้วยนิกเกิลคอลัมน์ ทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE จากนั้นวัดการทำงานของเอนไซม์ rat CPR ในการส่งผ่านอิเล็กตรอนไปยังตัวรับอิเล็กตรอน Cytochrome c ในหลอดทดลอง (Pouyfung et al., 2013; Thongjam et al., 2013; Wongsri et al., 2014)

3.3.2 การเหนี่ยวนำการแสดงออก การทำบริสุทธิ์ของเอนไซม์และการตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13

ทำการเลี้ยงเชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ XL-1 blue ที่ได้รับการส่งผ่าน cDNA ที่มียีน *cyp2a6* และ *cyp2a13* (pKKK- Δ -23-2A6 และ pKKK- Δ -23-2A13) จากนั้นเหนี่ยวนำการแสดงออกโปรตีนด้วย IPTG และ 5-aminolevulinic acid hydrochloride (δ -ALA) ทำบริสุทธิ์โปรตีนโดยผ่านนิกเกิลคอลัมน์ และตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE และทำการศึกษากิจกรรมเร่งปฏิกิริยาการออกซิเดชันของเอนไซม์ CYP2A6 หรือ CYP2A13 ต่อสารประกอบเรืองแสง Coumarin ในหลอดทดลอง (*in vitro*) โดยวัดการเพิ่มขึ้นของสารผลิตภัณฑ์ (7-hydroxycoumarin) โดยใช้เครื่อง Fluorescence Spectroscopy (Insee et al., 2014; Pouyfung et al., 2013; Thongjam et al., 2013)

3.4.5 การเตรียมสารสกัดจากพืช

ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยใช้หญ้าดอกขาว ดอกคำฝอย ทองพันชั่ง ขลุ่ รางจืด เก๊กฮวยและฟ้าทะลายโจร โดยในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ผู้วิจัยจะทำบริสุทธิ์สารสำคัญที่ออกฤทธิ์โดยใช้กิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 เป็นตัวนำ (Bio-assay guide isolation) อย่างคร่าวๆดังนี้ นำพืชมาล้างทำความสะอาดและปั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ จึงนำแช่ในสารละลายเอทานอล จากนั้นทำการกรอง จากนั้นทำการแยก fraction โดยใช้สารละลายเฮกเซนและเอทิล อะซิเตทตามลำดับ ทำบริสุทธิ์สารสำคัญด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี และตรวจสอบความบริสุทธิ์และโครงสร้างของสารสำคัญด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Nuclear Magnetic Resonance (NMR) และ Liquid Chromatography-Mass spectrometry (LC-MS) ในส่วนสกัดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ทั้งสองได้ดี

3.4.6 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์

3.4.6.1 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ cytochrome P450 reductase จากหนู (rat CPR)

เตรียมปฏิกิริยาโดยทำการบ่มเอนไซม์ rat CPR ที่บริสุทธิ์ร่วมกับสารละลาย 50 μ M cytochrome c และสารสกัดแต่ละลำดับส่วน ในสารละลาย 50 mM Tris- HCl buffer pH 7.5 ผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร แล้วจึงเติมสารละลาย 50 μ M NADPH เพื่อเริ่มปฏิกิริยา เป็นเวลา 5 นาที คำนวณหาค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่เหลืออยู่ เพื่อดูผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เมื่อเปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ rat CPR ปกติ (100% remaining activity) โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำ ที่เป็นอิสระต่อกัน

3.4.6.2 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) และ cytochrome P450 2A13 (CYP2A13) โดยปฏิกิริยา co-incubation

เตรียมปฏิกิริยาโดยทำการบ่มเอนไซม์ CYP2A6 หรือ CYP2A13 ที่บริสุทธิ์ร่วมกับเอนไซม์ rat CPR และ DLPC จากนั้นเติมสารละลาย 100 mM Kpi buffer pH 7.4 เติมสารตั้งต้น coumarin และสารสกัดแต่ละลำดับส่วนของสมุนไพรที่ทำการศึกษา หลังจากนั้นเริ่มปฏิกิริยาโดยเติม 50 μ M NADPH วัดค่าการเพิ่มขึ้น

ของผลิตภัณฑ์ (7-hydroxycoumarin) โดยใช้เครื่อง fluorescence spectroscopy เป็นเวลา 10 นาที คำนวณหาค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่เหลืออยู่ เพื่อดูผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เมื่อเปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ CYP2A6 หรือ CYP2A13 ปกติ (100% remaining activity)

3.4.6.3 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) และ cytochrome P450 2A13 (CYP2A13) โดยปฏิกิริยา pre-incubation

เตรียมปฏิกิริยาโดยทำการบ่มเอนไซม์ CYP2A6 หรือ CYP2A13 ที่บริสุทธิ์ร่วมกับเอนไซม์ rat CPR และ DLPC จากนั้นเติมสารสกัดแต่ละลำดับส่วนของสมุนไพรมานำการศึกษา ในสารละลาย 100 mM Kpi buffer pH 7.4 และเติม 50 μ M NADPH เพื่อเริ่มปฏิกิริยา บ่มปฏิกิริยาเป็นเวลาต่างๆ จากนั้นเติมสารตั้งต้น coumarin และเริ่มปฏิกิริยาอีกครั้งโดยเติม 50 μ M NADPH วัดค่าการเพิ่มขึ้นของผลิตภัณฑ์ (7-hydroxycoumarin) โดยใช้เครื่อง fluorescence spectroscopy คำนวณหาค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่เหลืออยู่ เพื่อดูผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เมื่อเปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ CYP2A6 หรือ CYP2A13 ปกติ(100% remaining activity)

3.4.6.4 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) และ cytochrome P450 2A13 (CYP2A13) แบบ dialysis

เตรียมปฏิกิริยาโดยทำการบ่มเอนไซม์ CYP2A6 หรือ CYP2A13 ที่บริสุทธิ์ร่วมกับเอนไซม์ rat CPR และ DLPC จากนั้นเติมสารสกัดแต่ละลำดับส่วนของสมุนไพรมานำการศึกษา ในสารละลาย 100 mM Kpi buffer pH 7.4 จากนั้นบ่มข้ามคืนในถุง dialysis ที่แช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ เมื่อครบเวลานำเอนไซม์มาเติมสารตั้งต้น coumarin และเริ่มปฏิกิริยาอีกครั้งโดยเติม 50 μ M NADPH วัดค่าการเพิ่มขึ้นของผลิตภัณฑ์ (7-hydroxycoumarin) โดยใช้เครื่อง fluorescence spectroscopy คำนวณหาค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่เหลืออยู่ เพื่อดูผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เมื่อเปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ CYP2A6 หรือ CYP2A13 ปกติ(100% remaining activity)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การแสดงออกและการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ CYP2A6 CYP2A13 และ Cytochrome P450 reductase

นำโคโลนีที่ผ่านการทรานฟอร์มพลาสมิดดีเอ็นเอที่มี cDNA ของเอนไซม์ CYP2A6 CYP2A13 และ rat CPR ในเซลล์สายพันธุ์ XL-1 blue (สำหรับ CYP2A6 และ CYP2A13) กับ C41 (DE3)) (สำหรับ rat CPR) มาทำการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Luria-Bertani media และเหนี่ยวนำการแสดงออกของเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ที่ความเข้มข้นของสารเหนี่ยวนำ IPTG 0.6 mM ณ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มี δ -ALA ที่ความเข้มข้น 5 μ g/ml ในขณะที่เอนไซม์ rat CPR เหนี่ยวนำการแสดงออกของเอนไซม์ที่ความเข้มข้นของสารเหนี่ยวนำ IPTG 0.2 mM ณ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นทำให้เซลล์แตกและทำบริสุทธิ์เอนไซม์ทั้งสามด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบจำเพาะโดยใช้ Ni^{2+} -NTA เป็นส่วนคงที่ (Ni^{2+} -Affinity chromatography)

4.2 การตรวจสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ rat CPR CYP2A6 และ CYP2A13

4.2.1 การตรวจสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ rat CPR กับสารสกัดจากพืชสมุนไพร

นำเอนไซม์ rat CPR ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์มาศึกษากิจกรรมในการเร่งการส่งอิเล็กตรอนให้กับสารตั้งต้น cytochrome c ด้วย spectrophotometer ที่ค่าการดูดกลืนแสง 550 นาโนเมตร พบว่าเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้มีค่าความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา Cytochrome C reduction เท่ากับ 47.13 ± 4.8015 $\mu\text{mol}/\text{Cyt c reduction}/\text{min}/\text{mg protein}$ จากนั้นศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของสารสกัดต่อเอนไซม์ CPR โดยบ่มเอนไซม์ร่วมกับ Cytochrome C และสารสกัดจากพืชสมุนไพร (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) พบว่าสารสกัดสมุนไพร ไม่ส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ CPR

4.2.2 การตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6

ทำการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ มาทำปฏิกิริยาร่วมกับเอนไซม์ rat CPR ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว เพื่อตรวจสอบปฏิกิริยา coumarin 7-hydroxylation ที่ค่าความยาวคลื่นปลดปล่อย 460 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง 96 well plate fluorescence spectroscopy พบว่าในปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์ CYP2A6 และ rat CPR เมื่อมีตัวให้อิเล็กตรอน NADPH จะเกิดปฏิกิริยา ในขณะที่ปฏิกิริยาที่ไม่มี NADPH หรือ เอนไซม์ CYP2A6 หรือ เอนไซม์ CPR อย่างใดอย่างหนึ่งจะไม่เกิดปฏิกิริยา โดยเอนไซม์ CYP2A6 ที่ทำการศึกษามีค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ (activity) เท่ากับ 3.5421 ± 0.0041 $\mu\text{mol 7-hydroxycoumarin}/\text{min}/\text{mg protein}$ เมื่อเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย 7-hydroxycoumarin

4.2.3 การตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13

ทำการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ มาทำปฏิกิริยาร่วมกับเอนไซม์ rat CPR ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว เพื่อตรวจสอบปฏิกิริยา coumarin 7-hydroxylation ที่ค่าความยาวคลื่นปลดปล่อย 460 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง 96 well plate fluorescence spectroscopy พบว่าในปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์ CYP2A6 และ rat CPR เมื่อมีตัวให้อิเล็กตรอน NADPH จะเกิดปฏิกิริยา ในขณะที่ปฏิกิริยาที่ไม่มี NADPH หรือ เอนไซม์ CYP2A6 หรือ เอนไซม์ CPR อย่างใดอย่างหนึ่งจะไม่เกิดปฏิกิริยา โดยเอนไซม์ CYP2A6 ที่ทำการศึกษามีค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ (activity) เท่ากับ 0.10 ± 0.001 $\mu\text{mol 7-hydroxycoumarin}/\text{min}/\text{mg protein}$ เมื่อเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย 7-hydroxycoumarin

4.3 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A13 ของสารสกัดหญ้าดอกขาว

4.3.1 การเตรียมสารสกัดจากหญ้าดอกขาวและการแยกสารสกัดแบบลำดับส่วน

ทำการสกัดพืชสมุนไพรหญ้าดอกขาวที่เก็บจากบริเวณรอบมหาวิทยาลัยบูรพา มาทำความสะอาด สับให้ละเอียด อบให้แห้งและสกัดในสารละลายเอทานอล ได้ปริมาณสุทธิ 60 กรัม จากนั้นแยกสารสกัดแบบลำดับส่วน ได้ส่วนสกัดเฮกเซน (Hexane) เอทิลอะซิเตต (Ethyl acetate) และน้ำ (Water) ปริมาณสุทธิ 9.79 กรัม, 19.09 กรัม และ 25.11 กรัม ตามลำดับ (Wongsri et al., 2014) พบว่ายกเว้นส่วนสกัดน้ำ ทุกส่วนสกัดสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ทั้งสองได้ดีด้วยค่า IC_{50} ที่ใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 4-1) จากนั้นนำทั้งส่วนสกัดเฮกเซนและเอทิล

อะซิเทตไปผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟี และพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารด้วยเทคนิค NMR และ LC-MS พบว่าได้สารบริสุทธิ์จากส่วนสกัดทั้งสองรวม 8 ชนิด ดังภาพที่ 4-1

ตารางที่ 4-1 ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ของสารสำคัญจากหญ้าดอกขาว (*V. cinerea*) และขลุ้ (*P. indica*) (Boonruang et al., In press)

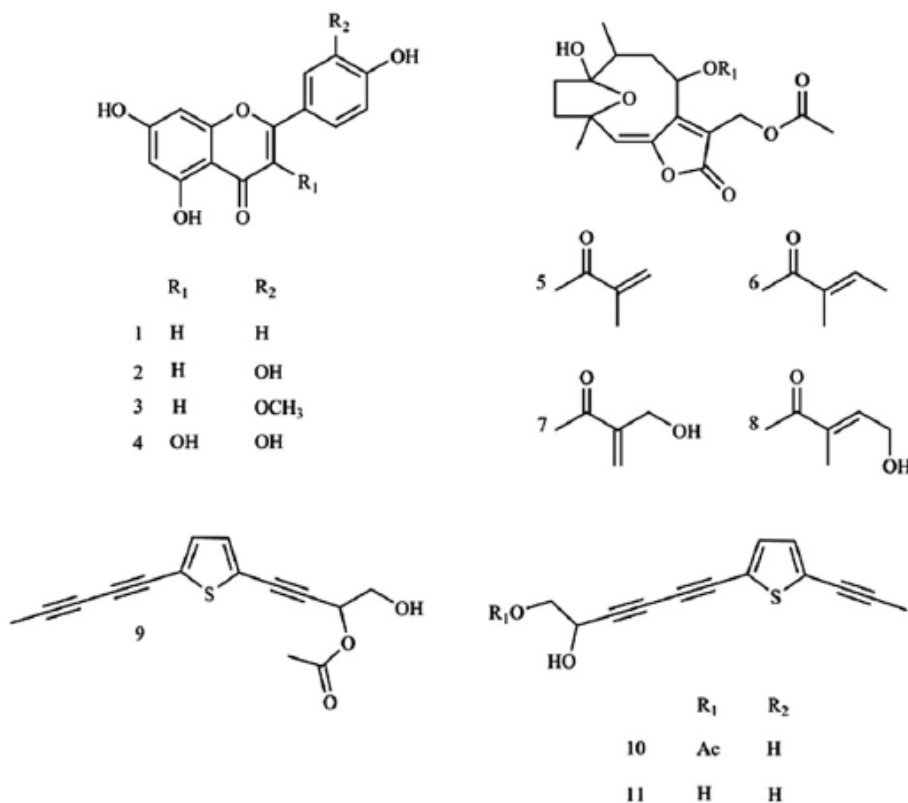
Samples	CYP2A6 ^a		CYP2A13 ^a	
	Coincubation	Pre-incubation	Coincubation	Pre-incubation
<i>V. cinerea</i>				
Ethanol (µg/ml)	4.00 ± 0.14 ^{b,c}	2.32 ± 0.01 ^{b,c}	3.57 ± 0.008 ^b	2.54 ± 0.06 ^b
Hexane (µg/ml)	3.31 ± 0.24 ^{b,c}	1.65 ± 0.05 ^{b,c}	3.25 ± 0.22 ^b	2.03 ± 0.05 ^b
Ethyl acetate (µg/ml)	2.90 ± 0.16 ^{b,c}	1.57 ± 0.03 ^{b,c}	2.28 ± 0.09	2.07 ± 0.08
Aqueous fraction (µg/ml)	>100	ND	>100	ND
Apigenin 1 (µM)	0.90 ± 0.07 ^c	0.77 ± 0.16 ^c	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01
Luteolin 2 (µM)	1.38 ± 0.18 ^c	1.26 ± 0.07 ^c	0.18 ± 0.02	0.17 ± 0.01
Chrysoeriol 3 (µM)	1.14 ± 0.10 ^c	0.99 ± 0.12 ^c	0.82 ± 0.05	0.79 ± 0.01
Quercetin 4 (µM)	2.66 ± 0.24 ^c	2.15 ± 0.38 ^c	0.80 ± 0.01	0.74 ± 0.02
Hirsutinolide 5 (µM)	22.3 ± 2.5 ^{b,c}	8.64 ± 0.37 ^{b,c}	16.44 ± 3.10 ^b	4.50 ± 0.18 ^b
Hirsutinolide 6 (µM)	37.8 ± 3.5 ^{b,c}	20.80 ± 1.10 ^{b,c}	20.86 ± 1.46 ^b	7.66 ± 0.98 ^b
Hirsutinolide 7 (µM)	32.7 ± 2.2 ^{b,c}	6.80 ± 0.77 ^{b,c}	23.26 ± 1.35 ^b	10.52 ± 0.49 ^b
Hirsutinolide 8 (µM)	64.5 ± 5.8 ^{b,c}	13.10 ± 2.40 ^{b,c}	36.11 ± 1.39 ^b	15.94 ± 0.67 ^b
<i>P. indica</i>				
Ethanol (µg/ml)	8.32 ± 0.07 ^b	4.73 ± 0.70 ^b	8.37 ± 0.79 ^b	5.44 ± 0.20 ^b
Hexane (µg/ml)	8.38 ± 1.10 ^b	3.34 ± 0.17 ^b	5.31 ± 0.62 ^b	3.39 ± 0.35 ^b
Ethyl acetate (µg/ml)	3.52 ± 0.85	2.91 ± 0.09	5.15 ± 0.36	4.96 ± 0.10
Aqueous fraction (µg/ml)	>100	ND	90.0 ± 0.08	85.15 ± 0.11
Thiophene 9 (µM)	6.43 ± 1.29 ^b	2.12 ± 0.19 ^b	6.18 ± 0.28 ^b	2.29 ± 0.34 ^b
Thiophene 10 (µM)	4.44 ± 0.14 ^b	2.97 ± 0.01 ^b	2.94 ± 0.01 ^b	1.15 ± 0.88 ^b
Thiophene 11 (µM)	3.90 ± 0.20 ^b	0.18 ± 0.01 ^b	2.40 ± 0.33 ^b	1.47 ± 0.12 ^b

^aEach value represents mean ± SD of triplicate experiments.

^bSignificant difference ($p < .05$) between IC₅₀ values of coincubation versus pre-incubation.

^cData obtained from Prasophthum et al., 2015.

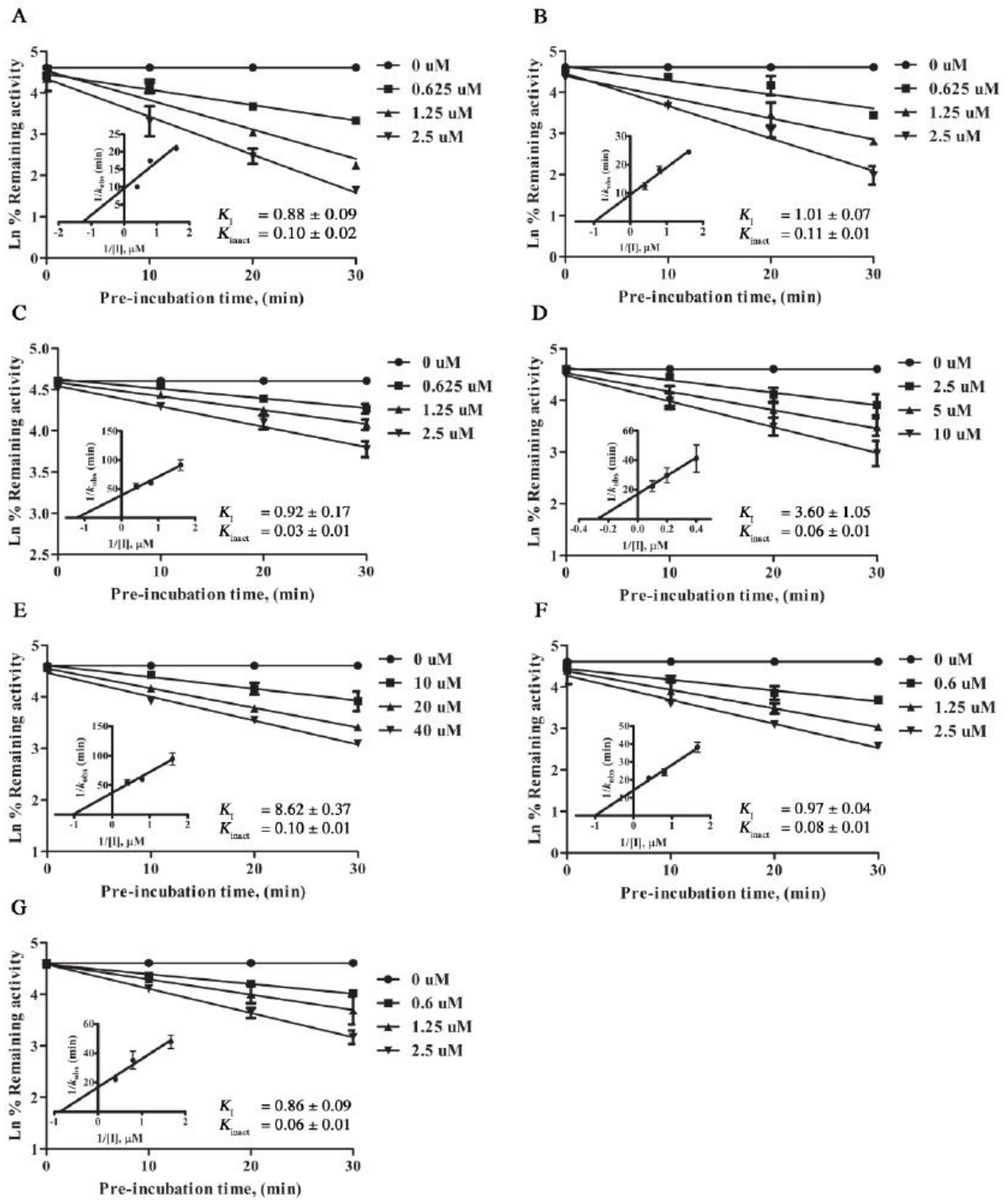
ND: not determined.



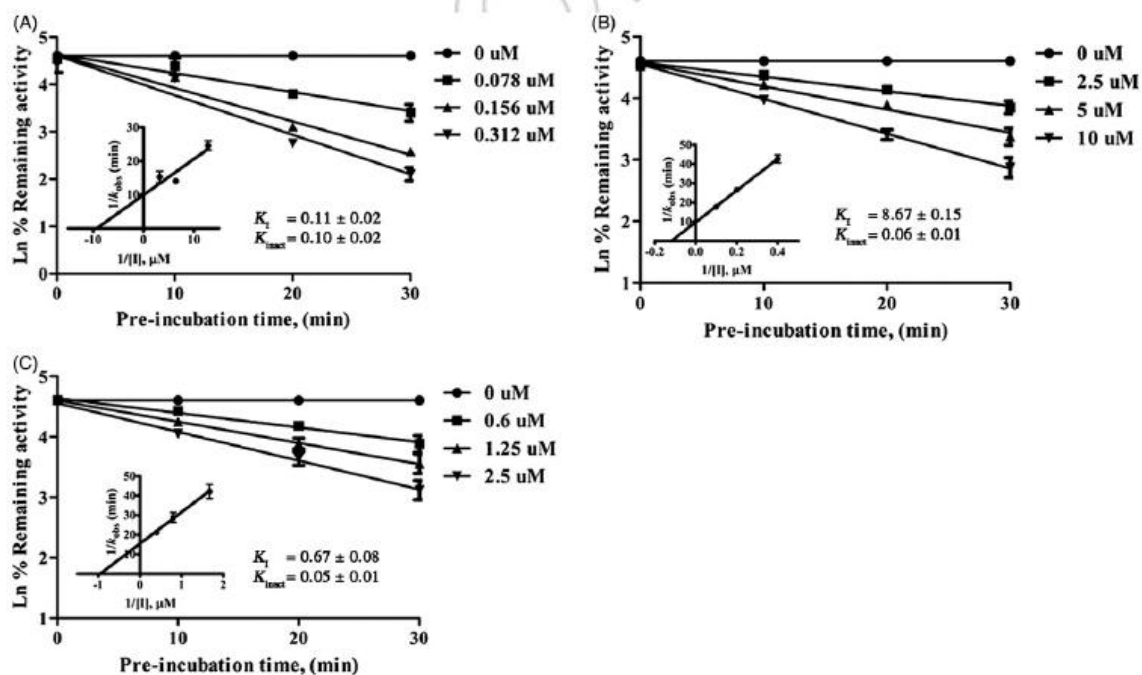
ภาพที่ 4-1 โครงสร้างสารสำคัญจากหลอดดอกขาวและขลุ่ยที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ได้แก่ apigenin (1), luteolin (2), chrysoeriol (3), quercetin (4), 8 α -(2-methylacryloyloxy)-hirsutinolide-13-O-acetate (5), 8 α -tigloyloxyhirsutinolide-13-O-acetate (6), 8 α -(4-hydroxymethacryloyloxy)-hirsutinolide-13-O-acetate (7), 8 α -(4-hydroxytigloyloxy)-hirsutinolide-13-O-acetate (8), 2-(penta-1,3-dien-1-yl)-5-(4-acetoxy-3-hydroxybuta-1-yn-1-yl) thiophene (9), 2-(prop-1-ynyl)-5-(6-acetoxy-5-hydroxyhexa-1, 3-diinyl) thiophene (10), 2-(prop-1-ynyl)-5-(5, 6-dihydroxyhexa-1,3-diinyl) thiophene (11). (Boonruang et al., Inpress)

4.3.2 กลไกการยับยั้งการทำงานของสารสำคัญจากหลอดดอกขาวต่อเอนไซม์ CYP2A13

เพื่อศึกษากลไกการทำงานของสารสำคัญ ผู้วิจัยทำการทดลองเหมือนที่ทดสอบกับเอนไซม์ CYP2A6 (Prasopthum et al., 2016) โดยทดสอบฤทธิ์ยับยั้งในสองสภาวะคือสภาวะปกติที่บ่มสารยับยั้งพร้อมสารตั้งต้นของเอนไซม์ทั้งสองที่ทำการตรวจสอบ (Co-incubation) และสภาวะที่บ่มสารยับยั้งก่อนเป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงตามด้วยสารตั้งต้น (Pre-incubation หรือ NADPH-dependence inhibition) พบว่าค่า IC₅₀ ของการยับยั้งของสารทุกตัวในกลุ่ม Hirsutinolides มีค่าลดลง หรือมีค่าประสิทธิภาพในการยับยั้งที่เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4-1) แสดงถึงแนวโน้มของการยับยั้งแบบผันกลับไม่ได้แบบ Mechanism-base (MBI) จึงทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยทำการศึกษาที่หลายค่าความเข้มข้นของสารยับยั้ง (Concentration dependence inhibition) และเวลาที่บ่มสารยับยั้ง (Time dependence inhibition) ผลการศึกษาที่ได้พบว่า สาร Hirsutinolide 5 ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A13 ได้ดีที่สุดด้วยค่า Ki 5.61 μ M ในขณะที่ Hirsutinolide 6 ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A13 ด้วยค่า Ki 7.97 μ M ตามมาด้วย Hirsutinolide 7 ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A13 ด้วยค่า Ki 12.56 μ M และ Hirsutinolide 8 ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A13 ด้วยค่า Ki 15.76 μ M ตามลำดับ โดยการยับยั้งเป็นแบบผันกลับไม่ได้ (ตารางที่ 4-1 และภาพที่ 4-2 และ 4-3) และฤทธิ์การยับยั้งนี้ไม่สามารถแก้ไขได้ด้วย GSH หรือ catalase หรือเมื่อทำการทดสอบการจับของสารยับยั้งด้วยวิธี Dialysis (ตารางที่ 4-3) ในทางตรงกันข้ามสารสำคัญในกลุ่ม Flavonoids ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ด้วยกลไกแบบผันกลับได้ (ตารางที่ 4-2)



ภาพที่ 4-2 กราฟที่แสดงแบบ Time- and concentration-dependent inactivation ของสารสำคัญ ต่อเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13. กราฟที่แสดงเอนไซม์ CYP2A6 ของสาร thiophene 9 (A) thiophene 10 (B) และกราฟที่แสดงเอนไซม์ CYP2A13 ของสาร Hirsutinolide 5 (C), Hirsutinolide 6 (D), Hirsutinolide 8 (E), thiophene 9 (F), thiophene 10 (G)



ภาพที่ 4-3 กราฟที่ยับยั้งแบบ Time- and concentration-dependent inactivation ของสาร thiophene 11 ต่อเอนไซม์ CYP2A6 (A) และสาร Hirsutinolide 7 (B) กับสาร thiophene 11 (C) ต่อเอนไซม์ CYP2A13

ตารางที่ 4-2 ค่าคงที่การยับยั้งการทำงานของสารสำคัญจากหญ้าดอกขาว (*V. cinerea*) และขลุ้ (*P. indica*) (Boonruang et al., In press)

Compounds	CYP2A6 ^a				CYP2A13 ^a			
	K_i (μM)	K_i (μM)	K_{inact}	Mode	K_i (μM)	K_i (μM)	K_{inact}	Mode
<i>V. cinerea</i> (μM)								
Apigenin 1	0.43 ± 0.17^b	NA ^b	NA ^b	Mixed type ^b	0.014 ± 0.002	NA	NA	Mixed type
Luteolin 2	0.80 ± 0.06^b	NA ^b	NA ^b	Competitive ^b	0.07 ± 0.01	NA	NA	Competitive
Chrysoeriol 3	0.63 ± 0.12^b	NA ^b	NA ^b	Competitive ^b	0.28 ± 0.01	NA	NA	Competitive
Quercetin 4	1.19 ± 0.27^b	NA ^b	NA ^b	Competitive ^b	0.11 ± 0.01	NA	NA	Competitive
Hirsutinolide 5	15.1 ± 2.1^b	7.45 ± 0.62^b	0.05 ± 0.01^b	Mixed type ^b	5.61 ± 0.99	0.92 ± 0.17	0.03 ± 0.01	Mixed type
Hirsutinolide 6	30.6 ± 1.5^b	15.4 ± 1.80^b	0.03 ± 0.01^b	Mixed type ^b	7.97 ± 0.78	3.60 ± 1.05	0.06 ± 0.01	Mixed type
Hirsutinolide 7	20.4 ± 5.4^b	5.32 ± 0.29^b	0.03 ± 0.01^b	Mixed type ^b	12.56 ± 1.26	8.67 ± 0.15	0.06 ± 0.01	Mixed type
Hirsutinolide 8	42.3 ± 8.4^b	7.64 ± 1.24^b	0.09 ± 0.01^b	Mixed type ^b	15.76 ± 2.5	8.62 ± 0.37	0.10 ± 0.01	Mixed type
<i>P. indica</i> (μM)								
Thiophene 9	3.23 ± 0.43	0.88 ± 0.09	0.10 ± 0.02	Mixed type	2.96 ± 0.10	0.97 ± 0.04	0.08 ± 0.01	Mixed type
Thiophene 10	2.07 ± 0.23	1.01 ± 0.07	0.11 ± 0.01	Mixed type	1.12 ± 0.09	0.86 ± 0.09	0.06 ± 0.01	Mixed type
Thiophene 11	1.80 ± 0.18	0.11 ± 0.02	0.10 ± 0.02	Mixed type	1.08 ± 0.05	0.67 ± 0.08	0.05 ± 0.01	Mixed type

^aEach value represents mean \pm SD of triplicate experiments.
^bData obtained from Prasopthum et al., 2015.
 NA: not applicable.

ตารางที่ 4-4 การทดสอบการจับของสารยับยั้งด้วยวิธี Dialysis (Boonruang et al., In press)

	Per cent remaining activity ^a						
	Pre-incubation	Dialysis (-) NADPH	Dialysis (+) NADPH	5 mM semicarbazide	2mM GSH	2000 U catalase	70 μ M $K_3Fe(CN)_6$
CYP2A6							
<i>P. indica</i>							
5 μ M Thiophene 9	30.14 \pm 3.70	89.33 \pm 7.00	20.09 \pm 5.21	26.75 \pm 2.39	21.63 \pm 1.97	26.89 \pm 3.07	22.71 \pm 1.58
5 μ M Thiophene 10	35.22 \pm 3.22	87.48 \pm 9.25	23.69 \pm 2.06	21.12 \pm 3.31	28.52 \pm 1.72	24.09 \pm 4.49	19.18 \pm 1.83
5 μ M Thiophene 11	12.54 \pm 1.93	82.39 \pm 2.49	10.08 \pm 1.84	12.92 \pm 3.47	8.42 \pm 0.90	14.42 \pm 1.41	11.23 \pm 2.96
CYP2A13							
<i>V. cinerea</i>							
10 μ M Hirsutinolide 5	29.28 \pm 2.53	86.03 \pm 6.65	18.63 \pm 0.94	24.35 \pm 2.54	28.20 \pm 6.54	20.27 \pm 6.24	24.07 \pm 0.62
10 μ M Hirsutinolide 6	28.35 \pm 2.92	85.34 \pm 4.98	22.77 \pm 1.13	25.04 \pm 3.81	33.60 \pm 4.80	26.61 \pm 3.86	25.91 \pm 1.87
10 μ M Hirsutinolide 7	22.16 \pm 1.88	93.27 \pm 2.10	21.35 \pm 4.45	26.60 \pm 1.25	18.29 \pm 1.54	20.90 \pm 5.18	21.39 \pm 2.75
20 μ M Hirsutinolide 8	23.89 \pm 3.17	92.39 \pm 4.03	18.37 \pm 1.10	20.70 \pm 2.92	25.79 \pm 4.20	19.44 \pm 1.39	21.82 \pm 1.85
<i>P. indica</i>							
5 μ M Thiophene 9	28.97 \pm 4.57	85.34 \pm 4.98	20.92 \pm 0.24	23.17 \pm 3.38	23.17 \pm 3.38	22.14 \pm 2.39	24.86 \pm 3.95
5 μ M Thiophene 10	28.95 \pm 1.25	93.02 \pm 6.58	21.43 \pm 3.95	26.98 \pm 8.11	26.98 \pm 8.11	22.18 \pm 2.38	26.89 \pm 1.75
5 μ M Thiophene 11	20.17 \pm 2.76	96.84 \pm 0.73	19.63 \pm 4.21	19.58 \pm 2.73	23.48 \pm 1.72	19.54 \pm 2.95	18.87 \pm 0.18

^aData represent means \pm SD of triplicate experiments.

4.4ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A13 ของสารสกัดขลุ้

4.4.1 การเตรียมสารสกัดจากขลุ้และการแยกสารสกัดแบบลำดับส่วน

ทำการสกัดพืชสมุนไพรขลุ้ที่ได้รับจากวิสาหกิจชุมชน ตำบลบ่อ อำเภอลำดวน จังหวัดจันทบุรี มาทำความสะอาด สับให้ละเอียด อบให้แห้งและสกัดในสารละลายเอทานอล จากนั้นแยกสารสกัดแบบลำดับส่วน ได้ส่วนสกัดเฮกเซน (Hexane) เอทิลอะซิเตต (Ethyl acetate) และน้ำ (Water) ตามลำดับ พบว่าขลุ้ส่วนสกัดน้ำทุกส่วนสกัดสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ทั้งสองได้ดีด้วยค่า IC₅₀ ที่ใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 4-1) จากนั้นนำทั้งส่วนสกัดเฮกเซนและเอทิล อะซิเตตไปผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟี และพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารด้วยเทคนิค NMR และ LC-MS พบว่าได้สารบริสุทธิ์จากส่วนสกัดทั้งสองรวม 4 ชนิด (quercetin 4 และ thiophene 9-11) ดังภาพที่ 4-1

4.4.2 กลไกการยับยั้งการทำงานของสารสำคัญจากขลุ้ต่อเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13

เพื่อศึกษากลไกการทำงานของสารสำคัญ ผู้วิจัยทำการทดลองเหมือนที่ทดสอบสารจากหญ้าดอกขาวกับเอนไซม์ CYP2A6 (Prasopthum et al., 2016) โดยทดสอบฤทธิ์ยับยั้งในสองสถานะคือสถานะปกติที่บ่มสารยับยั้งพร้อมสารตั้งต้นของเอนไซม์ทั้งสองที่ทำการตรวจสอบ (Co-incubation) และสถานะที่บ่มสารยับยั้งก่อนเป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงตามด้วยสารตั้งต้น (Pre-incubation หรือ NADPH-dependence inhibition) พบว่าค่า IC₅₀ ของการยับยั้งของสารทุกตัวในกลุ่ม thiophene มีค่าลดลง หรือมีค่าประสิทธิภาพในการยับยั้งที่เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4-1) แสดงถึงแนวโน้มของการยับยั้งแบบผันกลับไม่ได้แบบ MBI จึงทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยทำการศึกษาที่หลายค่าความเข้มข้นของสารยับยั้ง (Concentration dependence inhibition) และเวลาที่บ่มสารยับยั้ง (Time dependence inhibition) ผลการศึกษาที่ได้พบว่า สาร thiophene 11 ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ได้ดีที่สุดด้วยค่า Ki 1.08 และ 1.08 μ M ในขณะที่ thiophene 10 ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ได้ด้วยค่า Ki 2.07 และ 1.12 μ M ตามมาด้วย thiophene 9 ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ได้ด้วยค่า Ki 3.23 และ 2.96 μ M โดยการยับยั้งเป็นแบบผันกลับไม่ได้ (ตารางที่ 4-1 และภาพที่ 4-2 และ 4-3) และฤทธิ์การยับยั้งนี้ไม่สามารถแก้ไขได้ด้วย GSH หรือ catalase หรือเมื่อทำการทดสอบการจับของสารยับยั้งด้วยวิธี Dialysis (ตารางที่ 4-3) ในทางตรงกันข้าม quercetin ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ด้วยกลไกแบบผันกลับได้ (ตารางที่ 4-2)

บทที่ 5

อภิปราย สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

Cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม cytochrome P450 ที่พบมากในตับ และมีบทบาทที่สำคัญในการย่อยสลายยาและสารแปลกปลอมภายนอกเช่น สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายยารักษาโรคในกลุ่มยารักษาอาการชัก (Valproic acid หรือ Losigamone) ยารักษาโรคเอดส์ (Efavirenz) ยารักษาโรคมะเร็ง (Cyclophosphamine) แต่บทบาทที่สำคัญของเอนไซม์ CYP2A6 คือเป็นกลไกหลักในการกำจัดนิโคตินที่ออกฤทธิ์ให้เกิดการเสพติดการสูบบุหรี่ออกจากร่างกาย (ย่อยสลายร้อยละ 80-90 ของนิโคตินทั้งหมดที่เข้าสู่ร่างกาย) (Di *et al.*, 2009; Hukkanen *et al.*, 2002; Ortiz de Montellano, 2005; Patten *et al.*, 1996) อย่างไรก็ตามการกำจัดนิโคตินออกจากร่างกายนี้ ส่งผลให้นิโคตินไปกระตุ้นระบบตอบสนองต่อความยินดีในสมองลดลง ดังนั้นผู้สูบบุหรี่จึงต้องสูบบุหรี่มากขึ้นเพื่อรักษาระดับนิโคตินในเลือด ให้ไปกระตุ้นระบบตอบสนองต่อความยินดีให้คงความรู้สึกที่ดีมีความสุขไว้ ทำให้สูบบุหรี่อย่างต่อเนื่อง (Di *et al.*, 2009; Hukkanen *et al.*, 2002; Patten *et al.*, 1996) และผู้สูบบุหรี่ที่เกิดการกลายพันธุ์ของยีน *cyp2a6* ที่ทำให้เอนไซม์ CYP2A6 ย่อยสลายสารตรวจสอบ Coumarin และนิโคตินลดลงนั้น จะสูบบุหรี่น้อยและเลิกสูบบุหรี่ได้ง่ายกว่าผู้สูบบุหรี่ที่มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ปกติ ด้วยเหตุนี้การลดการย่อยสลายนิโคตินของเอนไซม์ CYP2A6 เพื่อคงระดับของนิโคตินในเลือด จึงเป็นอีกหนึ่งในแนวทางที่สามารถนำมาใช้เพื่อช่วยในการรักษาการเสพติดบุหรี่ในผู้สูบบุหรี่ร่วมกับการได้รับยานิโคตินทดแทนต่างๆ เพื่อให้เกิดการลด ละ เลิกการสูบบุหรี่อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด

Cytochrome P450 2A13 (CYP2A13) เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม P450 ที่พบมากที่เนื้อเยื่อปอดและเยื่อทางเดินหายใจ ยังไม่ทราบบทบาทที่แน่ชัดในการย่อยสลายยาและสารแปลกปลอมภายนอก รวมถึงสารในร่างกายต่างๆ ว่าจะสามารถทำหน้าที่ได้เช่นเดียวกับเอนไซม์ CYP2A6 ที่มีความคล้ายคลึงกันในลำดับกรดอะมิโนมากกว่าร้อยละ 90 หรือไม่ แต่บทบาทที่สำคัญของเอนไซม์ CYP2A13 คือการย่อยสลายสารนิโคตินในบุหรี่บางส่วน แต่ไม่ได้เป็นกลไกหลักในการกำจัดนิโคติน และไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *cyp2a13* กับพฤติกรรมการสูบบุหรี่เช่นเดียวกับยีน *cyp2a6* (Di *et al.*, 2009; Hukkanen *et al.*, 2002; Ortiz de Montellano, 2005; Patten *et al.*, 1996) อย่างไรก็ตามพบว่าเอนไซม์ CYP2A13 เกี่ยวพันกับการย่อยสลายสารก่อมะเร็ง 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL) และ 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) ซึ่งเป็นสารพิษที่พบได้ในบุหรี่และเป็นสารเกี่ยวข้องกับกับการเกิดโรคมะเร็ง เช่น โรคมะเร็งกล่องเสียง โรคมะเร็งปอด เป็นต้น (Patten *et al.*, 1996) เพราะสารก่อมะเร็ง NNK สามารถถูกกระตุ้นโดยเอนไซม์ CYP2A13 ได้เป็นสารที่ก่อมะเร็งมากขึ้นและไปมีผลต่อสารพันธุกรรมของเนื้อเยื่อระบบทางเดินหายใจจนก่อให้เกิดโรคมะเร็งปอดในที่สุด จึงได้มีการศึกษาการหาสารที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 เพื่อลดอัตราเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งปอดได้อย่างปลอดภัย โดยพบว่าสาร 8-MOP ที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้สามารถยับยั้งเอนไซม์ CYP2A13 ได้ อย่างไรก็ตามสารนี้ก่อให้เกิดผลข้างเคียงกับผู้ใช้ในขณะที่ต้องการลดการสูบบุหรี่ (Di *et al.*, 2009; Xi *et al.*, 2009)

จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า สารสำคัญพืชหลายชนิดเช่นขลุ่ ดอกคำฝอย หน้้าดอกขาวและทองพันชั่ง สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดี (ทรงกลด สารภูษิตและพรพิมล รงค์นพรัตน์, 2554) โดยนอกเหนือจากน้้ามะเฟืองซึ่งเป็นน้้าผลไม้ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ที่ดีที่สุดด้วยกลไก MBI (Pouyfung et al., 2012; 2013) โดยฤทธิ์ยับยั้งแบบ mechanism based inhibition เป็นการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แบบผันกลับไม่ได้ โดยสารยับยั้งถูกเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ จากนั้นผลิตภัณฑ์จับแน่นกับเอนไซม์ จนเกิดสารประกอบเชิงซ้อนเอนไซม์ที่เสถียรภาพ (dead-end complex) ซึ่งมีเกณฑ์เบื้องต้นสำหรับบ่งชี้สามประการคือ 1) NADPH-dependent เป็นการศึกษาคผลของการยับยั้ง เมื่อเติม NADPH เพื่อทำปฏิกิริยาก่อนเติมสารตั้งต้น ถ้าตัวยับยั้งเป็นแบบ Mechanism-base inhibitor จะส่งผลให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์เพิ่มมากขึ้นเพราะสารยับยั้งถูกเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ cytochrome P450 แล้วเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่บริเวณเร่ง ส่งผลให้เอนไซม์เสถียรภาพถาวร (เกิด dead-end complex) 2) Concentration-dependent เป็นการศึกษาคผลของการยับยั้ง เมื่อเติม NADPH เพื่อทำปฏิกิริยาก่อนเติมสารตั้งต้น โดยเพิ่มความเข้มข้นของตัวยับยั้ง ถ้าตัวยับยั้งเป็นแบบ mechanism-base inhibitor จะพบว่าเมื่อความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้น ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์จะมีประสิทธิภาพมากขึ้น 3) Time-dependent ศึกษาผลของการยับยั้ง เมื่อเติม NADPH เพื่อทำปฏิกิริยาก่อนเติมสารตั้งต้นเมื่อเวลาผ่านไป เอนไซม์จะจับกับตัวยับยั้งได้ดียิ่งขึ้น ถ้าตัวยับยั้งเป็นแบบ mechanism-base inhibitor ส่งผลให้การยับยั้งเอนไซม์มีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้น (Hukkanen, Jacob and Benowitz, 2005, Di et al., 2009)

จากผลการศึกษาผู้วิจัยพบว่าพืชสมุนไพรไทยหลายชนิดเช่นหน้้าดอกขาว เก๊กฮวยและทองพันชั่ง สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดี (ทรงกลด สารภูษิตและพรพิมล รงค์นพรัตน์, 2554; Prasopthum et al., 2013) โดยผู้วิจัยสามารถได้สารสำคัญจากพืชสมุนไพรทองพันชั่งได้แก่ Rhinacanthin-A, -B, และ -C ที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งทั้งเอนไซม์ CYP2A6 และเอนไซม์ CYP2A13 ได้ดี ด้วยกลไกการยับยั้งของสารสำคัญทั้งสามเป็นแบบผันกลับไม่ได้แบบ MBI (Pouyfung et al., 2014) เช่นเดียวกับสารสำคัญอื่นๆเช่น 8-MOP หรือ Seligeline ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งทั้งเอนไซม์ได้ (Hukkunen, 2005; Xi et al., 2009) และสามารถได้สารสำคัญจากพืชได้สารสำคัญจากพืชสมุนไพรหน้้าดอกขาวทั้งหมด 8 ชนิด ได้แก่สารสำคัญในกลุ่ม Hirsutinolides 4 ชนิด ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 แบบผันกลับไม่ได้แบบ MBI และสารในกลุ่ม Flavonoid 4 ชนิด (Prasipthum et al., 2016) การศึกษาคครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาสารสำคัญและกลไกการยับยั้งของสารสำคัญในขลุ่ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 และศึกษากลไกการยับยั้งของสารสำคัญในหน้้าดอกขาวต่อเอนไซม์ CYP2A13 เพื่อประโยชน์ในการบำบัดอาการการติดบุหรี่ของผู้เสพบุหรี่เพื่อช่วยลดอัตราการเกิดโรคระบบทางเดินหายใจและโรคมะเร็งอันเนื่องมาจากการสูบบุหรี่ได้

การศึกษาคครั้งนี้ประสบความสำเร็จในการศึกษาคฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของสารสำคัญทั้ง 8 ชนิดจากสมุนไพรหน้้าดอกขาวต่อเอนไซม์ CYP2A13 โดยพบว่าสารสำคัญทั้ง 8 ชนิด สามารถยับยั้งการทำงานของทั้งเอนไซม์ด้วยประสิทธิภาพและกลไกการยับยั้งที่ใกล้เคียงกัน โดยสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์จะออกฤทธิ์ยับยั้งได้ดีกว่า (จากค่า IC_{50} และค่า K_i) แต่กลไกในการยับยั้งเป็นแบบผันกลับได้ ซึ่งต่างจากสารในกลุ่ม Hirsutinolide อีก 4 ชนิด ที่กลไกการยับยั้งเป็นแบบผันกลับไม่ได้ที่ฤทธิ์ยับยั้งจะนานกว่า ทั้งนี้สารสำคัญทั้ง 8 ชนิดจะยับยั้งเอนไซม์ CYP2A13 ได้ดีกว่าเอนไซม์ CYP2A6 เล็กน้อย นอกจากนี้ยังสามารถศึกษาคฤทธิ์การทำงานของสารสำคัญในกลุ่ม thiophene จากพืชสมุนไพรขลุ่ที่จากการศึกษา ซึ่งผลที่ได้พบว่าสารสำคัญในกลุ่มนี้มีกลไกการยับยั้งเป็นแบบผันกลับไม่ได้ที่ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A13 ได้ดีกว่าเอนไซม์ CYP2A6 เช่นเดียวกัน และฤทธิ์การยับยั้งของสาร hirsutinolide ทั้ง 4 ชนิดและ thiophene 3 ชนิด นี้ไม่สามารถแก้ไขได้ด้วย GSH หรือ catalase หรือเมื่อทำการทดสอบการจับของสารยับยั้งด้วยวิธี Dialysis จากผลการศึกษาทั้งหมดจนถึงปัจจุบันนี้ แสดงให้เห็นว่าสารสำคัญจากพืชทั้งในกลุ่ม Rhinacanthin จากการศึกษาค่อนหน้านี้ 3 ชนิด รวมถึงกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่ทำการศึกษาค 4 ชนิด กลุ่ม hirsutinolide ที่ทำการศึกษาค 4 ชนิดและกลุ่ม thiophene ที่ทำการศึกษาค 3

ชนิด สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งได้ทั้งเอนไซม์ CYP2A6 และเอนไซม์ CYP2A13 ซึ่งจะเป็นผลดีในการนำไปใช้เพราะสามารถลดการย่อยสลายนิโคตินเพื่อลดการสูบบุหรี่และป้องกันการกระตุ้นสารก่อมะเร็งในปอดไปได้พร้อมกัน

5.2 ข้อเสนอแนะ

ควรศึกษาเพิ่มเติมถึงความจำเพาะในการออกฤทธิ์ยับยั้งของสารสำคัญดังกล่าว เพื่อความปลอดภัยในการนำไปใช้ต่อไป

บรรณานุกรม

ทรงกลด สารภูษิต (2554) การยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ที่ย่อยสลายนิโคตินในคน: ทางเลือกใหม่ในการลดการสูบบุหรี่. บทความวิชาการ วารสารวิทยาศาสตร์ ม.บูรพา ปีที่ 16 ฉบับที่ 2

ทรงกลด สารภูษิตและพรพิมล รงค์นพรัตน์ (2554) การศึกษาการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ที่ย่อยสลายนิโคตินในคนของน้ำสมุนไพรและน้ำผลไม้ไทย รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ ศูนย์วิจัยและจัดการความรู้เพื่อการควบคุมยาสูบ

ศิริวรรณ พิทยรังสฤษฏ์ และประภาพรรณ เอี่ยมอนันต์ (2555). สรุปสถานการณ์การควบคุมการบริโภคยาสูบของประชากรไทย พ.ศ. 2555. กรุงเทพฯ ศูนย์วิจัยและจัดการความรู้เพื่อการควบคุมยาสูบ

Ahijevych KL, Tyndale RF, Dhath RK, Weed HG, and Browning KK (2002) Factors influencing cotinine half-life during smoking abstinence in African American and Caucasian women. *Nicotine Tob Res* 4:423–431.

Benowitz,NL (2008) Clinical pharmacology of nicotine: implications for understanding, preventing and treating tobacco addiction. *Clin Pharmacol Ther* 83:531-541.

Bernhardt R. (2006). Cytochrome P450 as versatile biocatalysts. *Biotechnology*. 124: 28-145.

Boonruang, S., Prakobsri, K., Pouyfung, P., Srisook, E., Prasopthum, A., Rongnoparut, P., Sarapusit, S. (2017). Inhibition of human cytochromes P450 2A6 and 2A13 by flavonoids, acetylenic thiophenes and sesquiterpene lactones from *Pluchea indica* and *Vernonia cinerea*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. (In press)

Brown, P.J., Bedard, LL., Reid, KR., Petsikas, D., Massey TE. (2007) Analysis of CYP2A contributions to metabolism of 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in human peripheral lung microsomes. *Drug Metabolism Disposition*, 35, 2086-2094.

Bundhamcharoen K (2012). Economic Burden from Smoking Related Diseases in Thailand in 2009. National burden of disease program, International Health Policy Program.

Carrozzi L, Pistelli F, Viegi G. (2008). Pharmacotherapy for smoking cessation. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease*, 2 : 301-317.

Chiang, H., Wang, C., Lee, H., Tsou, T. (2011) Metabolic effects of CYP2A6 and CYP2A13 on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)-induced gene mutation--a mammalian cell-based mutagenesis approach. *Toxicological and Apply Pharmacology*. 253, 145-152.

Damaj MI, Siu ECK, Sellers EM, Tyndale RF and Martin BR (2007) Inhibition of nicotine metabolism by methoxysalen: pharmacokinetic and pharmacological studies in mice. *J. Pharmacol Exp Ther* 320: 250-257.

Di YM, Chow VDW, Yang LP, Zhou SF. (2009). Structure, function, regulation and polymorphism of Human Cytochrome P450 2A6. *Current Drug Metabolism*, 10, 754-780.

Döhr O, Paine MJ, Friedberg T, Robert GCK, Wolf R. (2001) Engineering of a functional human NADH-dependent cytochrome P450 system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98: 81-86.

Emre M, Isin F, Guengerich P. (2007). Complex reactions catalyzed by cytochrome P450 enzyme. *Biochemical et Biophysica Acta*. 1770: 314-329.

Flammang AM, Gelboin HV, Aoyama T, Gonzalez FJ & McCoy GD (1992) Nicotine metabolism by cDNA-expressed human cytochrome P-450s. *Biochem Arch* 8: 1-8.

Fowler S and Zhang H. (2008) *In Vitro* Evaluation of Reversible and Irreversible Cytochrome P450 Inhibition: Current Status on Methodologies and their Utility for Predicting Drug-Drug Interactions. *The AAPS Journal*. 10 (2): 410-424

Fukami, T., Nakajima, M., Matsumoto, I., Zen, Y, Oda, M., Yokoi, T. (2010) Immunohistochemical analysis of CYP2A13 in various types of human lung cancers. *Cancer Sciences*, 101, 1024-1028.

Gonzales D, Rennard SI, Nides M, Oncken C, Azoulay S, Billing CB (2006) Varenicline, an alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor partial agonist, vs sustained-release bupropion and placebo for smoking cessation: a randomized controlled trial. *JAMA* 296: 47-55.

Grime KH, Bird J, Ferguson D, and Riley RJ. (2009) Mechanism-based inhibition of cytochrome P450 enzymes: An evaluation of early decision making in vitro approaches and drug-drug interaction prediction methods. *European journal of pharmaceutical sciences*. 36: 175-191

Guengerich FP. (2001). Common and Uncommon Cytochrome P450 Reactions Related to Metabolism and Chemical Toxicity. *Chemical Research in Toxicology*. 14(6): 611-650.

He, XY., Shen, J., Ding, X., Lu, AY., Hong, JY. (2004) Identification of critical amino acid residues of human CYP2A13 for the metabolic activation of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, a tobacco-specific carcinogen. *Drug Metabolism Disposition*, 32, 1516-1521.

Hecht SS (1998) Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobaccospecific N-nitrosamines. *Chem Res Toxicol* 11: 559-603.

Hecht SS (1999a) DNA adduct formation from tobacco-specific N-nitrosamines. *Mutat. Res*. 424: 127-142.

Hecht SS (1999b) Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 91: 1194-1210.

Hoffmann D, Riverson A, and Hecht SS (1996) The biological significance of tobacco-specific N-nitrosamine: smoking and adenocarcinoma of the lung. *Critical Review in Toxicology*, 26, 199-211.

Hukkanen JP, and Benowitz NL (2005) Metabolism and disposition kinetics of Nicotine. *Pharmacol Rev* 57:79–115.

Hukkanen J, Pelkonen O, Hakkola J, and Raunio H (2002) Expression and regulation of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 (CYP) enzymes in human lung. *Crit Rev Toxicol* 32:391–411.

Insee, A., Rongnoparut, P., Duangkaew, P., & Sarapusit, S. (2014). Inhibition of the tobacco-specific nitrosamine metabolizing cytochrome P450 2A13 by some plants from Eastern Thailand. *Proceedings of the 5th International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO5)* (pp. 338-342). Phuket: Natural Product Research Center of Excellence, Prince of Songkla University.

Jiang, JH., Jia, WH., Chen, HK., Feng, BJ., Qin, HD., Pan, ZG., Shen, GP., Huang, LX., Feng, QS., Chen, LZ., Lin, DX., Zeng, YX. (2004) Genetic polymorphisms of CYP2A13 and its relationship to nasopharyngeal carcinoma in the Cantonese population *Journal of Translational Medicine*, 2, 24-32.

Jorenby DE, Hays JT, Rigotti NA, Azoulay S, Watsky EJ, Williams K (2006) Efficacy of varenicline, an alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor partial agonist, vs placebo or sustained-release bupropion for smoking cessation: a randomized controlled trial. *JAMA* 296: 56–63.

Kamataki T, Fujieda M, Kiyotani K, Iwano S and Kunitoh H (2005) Genetic polymorphism of CYP2A6 as one of the potential determinants of tobacco-related cancer risk. *Biochem Biophys Res Comm* 338: 306-310.

Koudsi NA, Jasjit SA, Lin S-K, Sellers EM and Tyndale RF (2009) A novel CYP2A6 allele (CYP2A6*35) resulting in an amino-acid substitution (Asn438Tyr) is associated with lower CYP2A6 activity in vivo. *Pharmacogenomics J.* 1: 1-9

Kwon J, Nakajima M, Chai S et al (2001) Nicotine metabolism and CYP2A6 allele frequencies in Koreans. *Pharmacogenetics* 11:317–323

Kramlinger VM, von Weymarn LB, Murphy SE (2012) Inhibition and inactivation of cytochrome P450 2A6 and cytochrome P450 2A13 by menthofuran, -nicotyrine and menthol. *Chemical Biological Interactions*, **197**, 87-92

MacDougall JM, Fandrick K, Zhang X, Serafin SV, and Cashman JR (2003) Inhibition of human liver microsomal (S)-nicotine oxidation by menthol and analogues. *Chem Res Toxicol* 16:988–993.

Mahavorasirikul W, Tassaneeyakul W, Satarug S, Reungweerayut R, Na-Bangchang C, and Na-Bangchang K. (2009) CYP2A6 genotypes and coumarin-oxidation phenotypes in a Thai population and their relationship to tobacco smoking. *Eur J Clin Pharmacol* 65:377–384

Mansuy D. (1998). The great diversity of reactions catalyzed by cytochrome P450. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. 121: 5-14.

Mathews JM, Etheridge AS, and Black SR (2002) Inhibition of human cytochrome P450 activities by kava extract and kavalactones. *Drug Metab Dispos* 30: 1153-1157.

Merkel U, Sigusch H, and Hoffmann A (1994) Grapefruit juice inhibits 7-hydroxylation of coumarin in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 46:175–177.

Miles JS, McLaren AW, Forrester LM, Glancey MJ, Lang MA and Wolf CR (1990) Identification of the human liver cytochrome P-450 responsible for coumarin 7-hydroxylase activity. *Biochem J* 267:365–371.

Miyamoto M, Umetsu Y, Dosaka-Akita H, Sawamura Y, Yokota J, Kunitoh H, Nemoto N, Sato K, Ariyoshi N, Kamataki T (1999) CYP2A6 gene deletion reduces susceptibility to lung cancer, *Biochem Biophys Res Commun* 261 658–660.

Miyazaki M, Yamazaki H, Takeuchi H, Saoo K, Yokohira M, Masumura K-I, Nohmi T, Funae Y, Imaida K and Kamataki T. (2005) Mechanisms of chemopreventive effects of 8-methoxypsoralen against 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced mouse lung carcinomas. *Carcinogenesis* 26: 1947-1955.

Murataliev MB, Feyereisen R, Walker FA. (2004) Electron transfer by di-flavin reductase. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29: 233-242. *Biochim. Biophys. Acta* 8; 1698(1):1-26

Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW. (1996). P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, and nomenclature. *Pharmacogenetics*. 6: 1-42.

Ortiz de Montellano, PR. (Ed.), (2005). *Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry*, third edition. New York : Kluwer Academic/Plenum Publishers.

Patten CJ, Smith TJ, Murphy SE, Wang MH, Lee J, Tynes RE, Koch P, and Yang CS (1996) Kinetic analysis of the activation of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone by heterologously expressed human P450 enzymes and the effect of P450-specific chemical inhibitors on this activation in human liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 333: 127–138.

Peterson, LA., Carmella, SG., Hecht, SS. (1990) Investigations of metabolic precursors to hemoglobin and DNA adducts of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Carcinogenesis*, 11, 1329–33.

Peamkrasatam S, Sriwatanakul K, Kiyotani K, Fujieda M, Yamazaki H, Kamataki T, Yoovathaworn K (2006) In vivo evaluation of coumarin and nicotine as probe drugs to predict

he metabolic capacity of CYP2A6 due to genetic polymorphism in Thais. *Drug Met Pharmacokinet* 21:475–484.

Prasopthum, A., Sarapusit, S., Rongnoparut, P (2013) *Carthamus tinctorius* as a source of potent inhibitors of Human Cytochrome P450 2A13. In *Proceeding of the 6th Thailand-Japan International Academic Conference 2013*. Ozaka, Japan.

Pouyfung, P., Sarapusit, S., Rongnoparut P. (2013) Time- and NADPH-dependent inactivation of human CYP2A6 by *Averrhoa carambola* fruit. In *Proceeding of the 6th Thailand-Japan International Academic Conference 2013*. Ozaka, Japan.

Pouyfung, P., Prasopthum, A., Sarapusit, S., Srisook, E., & Rongnoparut, P. (2014). Mechanism-based- Inactivation of Cytochrome P450 2A6 and 2A13 by *Rhinacanthus nasutus* Constituents. *Drug Metabolisms and Pharmacokinetics*, 29(1), 75-82.

Runkel M, Bourian M, Tegtmeier M, and Legrum W (1997) The character of inhibition of the metabolism of 1,2-benzopyrone (coumarin) by grapefruit juice in human. *Eur J Clin Pharmacol* 53:265–269.

Schoedel KA, Hoffmann EB, Rao Y, Sellers EM, Tyndale RF. 2004. Ethnic variation in CYP2A6 and association of genetically slow nicotine metabolism and smoking in adult Caucasians. *Pharmacogenetics* 14:615–626.

Schlicht KE, Zinggeler-Berg J, and Murphy SE (2009) Effect of CYP2A13 Active Site Mutation Asn297Ala on Metabolism of Coumarin and Tobacco-specific Nitrosamines. *Drug Metab Dispos.* 37:665-671. Sellers EM, Kaplan HL, and Tyndale RF (2000) Inhibition of cytochrome P450 2A6 increases nicotine's oral bioavailability and decreases smoking. *Clin Pharmacol Ther* 68:35–43.

Sellers EM, Kaplan HL, and Tyndale RF (2000) Inhibition of cytochrome P450 2A6 increases nicotine's oral bioavailability and decreases smoking. *Clin Pharmacol Ther* 68:35–43.

Sellers EM, Ramamoorthy Y, Zeman MV, Djordjevic MV, and Tyndale RF (2003a) The effect of methoxsalen on nicotine and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) metabolism in vivo. *Nicotine Tob Res* 5:891–899.

Sellers EM, Tyndale RF and Fernandes LC (2003b) Decreasing smoking behaviour and risk through CYP2A6 inhibition *Drug Discov Today* 8:487-493.

Shen AL, Porter TD, Wilson TE, Kasper CB. (1989). Structural analysis of the FMN binding domain of NADPHcytochrome P450 oxidoreductase by site – direct mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry.* 254: 7584–7589.

Siu ECK and Tyndale RF (2007) Non-nicotinic therapies for smoking cessation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 47:541–64

Siu ECK and Tyndale RF (2008) Selegiline is a mechanism-based inactivator of CYP2A6 inhibiting nicotine metabolism in humans and mice. *J Pharmacol Exp Ther* 324: 992-999.

Smith TJ, Guo ZY, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Stoner GD and Yang CS (1992). Metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in human lung and livermicrosomes and cytochromesP-450 expressed in hepatoma cells. *Cancer Research*. 52: 1757-1763.

Smith GBJ, Castonguay A, Donnelly PJ, Reied KR, Petsikas D and Massey TE. (1999). Biotransformation of the tobacco-specific carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in freshly isolated human lung cell. *Carcinogenesis*. 20: 1809-1818.

Smith GBJ, Bend JR, Bedard LL, Reid KR, Petsikas D and Massey TE. (2003). Biotransformation of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in peripheral human lung microsomes. *Drug Metabolism and Disposition*. 31: 1134-1141.

Smith BD, Sander JL, Porubsky PR., Lushington GH, Stout CD and Scott EE. (2007). Structure of the human lung cytochrome P450 2A13. *The Journal of Biological Chemistry*. 23: 17306-17313.

Su T, Bao Z, Zhang Q-Y, Smith T J, Hong J-Y, and Ding X (2000) Human cytochrome P450 CYP2A13: predominant expression in the respiratory tract and its high efficiency metabolic activation of a tobacco-specific carcinogen, 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Cancer Res* 60: 5074-5079

Tassaneeyakul W, Guo LO, Fukuda K, Ohta T, Yamazoe Y. (2000) Inhibition selectivity of grapefruit juice components on human cytochromes P450. *Arch Biochem Biophys*. 378:356-63.

Thongjam, S., Rongnoparut, P., & Sarapusit, S. (2013). Inhibition of The Human Cytochrome P450 2A6, The Nicotine Metabolising Enzyme by *Pluchea indica* Extract. In Proceedings of the 5th Science Research Conference. (pp.BIO214-217) Payao: University of Payao (Poster presentation) March 4th-5th, 2013 at, Payao, Thailand.

Tyndale RF, Sellers EM (2002) Genetic variation in CYP2A6-mediated nicotine metabolism alters smoking behavior. *Ther Drug Monit* 24:163-171

Ujjin P, Satarug S, Vanavanitkun Y et al (2002) Variation in coumarin 7-hydroxylase activity associated with genetic polymorphism of cytochrome P450 2A6 and the body status of iron stores in adult Thai males and females. *Pharmacogenetics* 12:241-249

von Weyarn LB, Chun JA, Knudsen GA, and Hollenberg PF (2007) Effects of eleven isothiocyanates on P450 2A6- and 2A13-catalyzed coumarin 7-hydroxylation. *Carcinogenesis* 27: 782-790

von Weyarn LB, Zhang QY, Ding X, Hollenberg PF. (2005) Effects of 8-methoxypsoralen on cytochrome P450 2A13. *Carcinogenesis* 26: 621-629.

Wang M, Roberts DL, Paschke R, Shea TM, Masters BSS, Kim JJ. (1997). Three-

dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: Prototype for FMN- and FAD-containing enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94: 8411-8416.

Wang, H., Tan, W., Hao, B., Miao, X., Zhou, G., He, F., Lin, D. (2003) Substantial reduction in risk of lung adenocarcinoma associated with genetic polymorphism in *cyp2a13*, the most active cytochrome p450 for the metabolic activation of tobacco-specific carcinogen NNK. *Cancer Research*, 63, 8057–8061.

Wang, SL., He, XY., Shen, J., Wang, JS., Hong, JY. (2006) The Missense Genetic Polymorphisms of Human CYP2A13: Functional Significance in Carcinogen Activation and Identification of A Null Allelic Variant. *Toxicological sciences*, 94, 38–45.

WHO Report on the Global Tobacco Epidemic, 2008: The MPOWER package. Geneva, World Health Organization.

Wongsri, T., Thongjam, S., Rongnoparut, P., Duangkaew, P., & Sarapusit, S. (2014). Inhibition studies of Cytochrome P450 2A6 by *Vernonia cinerea* Less. and *Carthamus tinctorius* L. extracts. *Proceedings of the 5th International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO5)* (pp. 343-347). Phuket: Natural Product Research Center of Excellence, Prince of Songkla University.

Xi Z, Spiller K, Gardner EL. (2009) Mechanism-based medication development for the treatment of nicotine dependence. *Acta Pharmacologica Sinica*, 30: 723–739.

Yano JK, Denton TT, Cemy MA, Zhang X, Johnson EF, and Cashman JR (2006). Synthetic inhibitors of cytochrome P450 2A6: Inhibitory activity, difference spectra, mechanism of inhibition, and protein cocrystallization. *J Med Chem* 49: 6987-7001.

Yoshida R, Nakajima M, Watanabe Y, Kwon JT, Yokoi T (2002) Genetic polymorphisms in human CYP2A6 gene causing impaired nicotine metabolism. *Br J Clin Pharmacol* 54:511–517

Yoo HH, Lee MW, Kim YC, Yun C-H, and Kim D-H (2007) Mechanism-based inactivation of cytochrome p450 2a6 by decursinol angelate isolated from *Angelica gigas*. *Drug Metab Dispos* 35:1759–1765

Zhang, X., Su, T., Zhang, QY., Gu, J., Caggana, M., Li, H., Ding, X. (2002) Genetic polymorphisms of the human CYP2A13 gene: Identification of single-nucleotide polymorphisms and functional characterization of an Arg257Cys variant. *Journal of Pharmacological Experiment Therapy*, 302, 416-423.

Zhou S, Chan SY, Goh BC, Chan E, Duan W, Huang M, and McLeod HL (2005) Mechanism-Based Inhibition of Cytochrome P450 3A4 by Therapeutic Drugs. *Clin Pharmacokinet*. 44 (3): 279-304

ประวัติคณะผู้วิจัย

1. หัวหน้าโครงการ	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทรงกลด สารภูษิต Songklod Sarapusit, Ph.D
หน่วยงาน	ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ที่อยู่	169 ถ. ลาดยาวบางแสน ต.แสนสุข อ.เมืองฯ จ.ชลบุรี 20131
โทรศัพท์	038-103-058 ต่อ 15
โทรสาร	038-393-495
อีเมลล์	songklod@buu.ac.th
สาขาวิชาการที่ชำนาญ	การศึกษาสมบัติของโปรตีน และชีวเคมีของเอนไซม์ cytochrome P450 ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายยาในคน

ผลงานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว (5 ปีย้อนหลัง)

1. Prasopthum, A., Pouyfung, P., Sarapusit, S., Srisook, E., & Rongnoparut, P. (2015). Inhibition effects of *Vernonia cinerea* active compounds against cytochrome P4502A6 and human monoamine oxidases, possible targets for reduction of tobacco dependence. *Drug Metabolisms and Pharmacokinetics*, 30, 174-181
2. Kotewong, R., Duangkaew, P., Srisook, E., Sarapusit, S., Rongnoparut, P. (2014) Structure-function relationships of inhibition of mosquito cytochrome P450 enzymes by flavonoids of *Andrographis paniculata*. *Parasitology Research*. 113(9), 3381-3392
3. Pouyfung, P., Prasopthum, A., Sarapusit, S., Srisook, E., Rongnoparut, P. (2014). Mechanism-based-inactivation of Cytochrome P450 2A6 and 2A13 by *Rhinacanthus nasutus* Constituents. *Drug Metab Pharmacokinet*. 29(1): 75-82
4. Wongsri, T., Rongnoparut, P., Sarapusit, S. (2014) Inhibition of cytochrome P450 3A4 by Thai herbal teas and fruit juices. *Burapha Science Journal*. 19(3): 6-12. (T-JIF = 0.069/2554)
5. Anantakul, J., Thongjam, S., Rongnoparut, P., Sarapusit, S. (2014) Effect of medicinal folk plants from Ban-Ang-Ed official Community Forest Project (The Chaipattana Foundation) on the cytochrome P450 2A6 enzyme. *Burapha Science Journal*. 19(3): 185-190.
6. Insee, A., Rongnoparut, P., Duangkaew, P., Sarapusit, S. (2014) Inhibition of the tobacco-specific nitrosamine metabolizing cytochrome P450 2A13 by some plants from Eastern Thailand. In Proceeding of the 5th International Conference on Natural Products for Health and Beauty 2014, (pp. 338-342) Phuket, Thailand
7. Anantakul, J., Wongsri, T., Thongjam, S., Rongnoparut, P., Sarapusit, S. (2014) Inhibitory effects of medicinal folk plants from Ban-Ang-Ed Official Community Forest Project (The Chaipattana Foundation) on drug-metabolizing cytochrome P450 3A4 and 2C9 enzymes. In Proceeding of the 5th International Conference on Natural Products for Health and Beauty 2014, (pp. 348-352) Phuket, Thailand
8. Wongsri, T., Thongjam, S., Rongnoparut, P., Duangkaew, P., Sarapusit, S. (2014) *Inhibition studies of Cytochrome P450 2A by Vernonia cinerea Less and Carthamus tinctorius L. extracts. In Proceeding of the 5th International Conference on Natural Products for Health and Beauty 2014, (pp. 343-347) Phuket, Thailand*
9. Insee, A., Thongjam, S., Rongnoparut, P., Sarapusit, S. *Effect of medicinal folk plants from Ban-Ang-Ed official Community Forest Project (The Chaipattana Foundation) on the*

cytochrome P450 2A13 enzyme. In *Proceeding of the 6th Science Research Conference 2014* (pp. B1328-333) Chon Buri, Burapha University

10. Sarapusit S, Lertkeitmongkol P, Duangkeaw P, and Rongnparut P (2013) Modeling of *Anopheles minimus* mosquito NADPH-Cytochrome P450 Oxidoreductase (CYPOR) and mutagenesis analysis: Insight into unique enzymatic properties. *Int. J. Mol. Sci.* 14(1), 1788-1801
11. Prasopthum, A., Sarapusit, S., Rongnparut, P (2013) *Carthamus tinctorius* as a source of potent inhibitors of Human Cytochrome P450 2A13. In *Proceeding of the 6th Thailand-Japan International Academic Conference 2013* (pp. 70-74) Ozaka, Japan.
12. Pouyfung, P., **Sarapusit, S.**, Rongnparut P. (2013) Time- and NADPH-dependent inactivation of human CYP2A6 by *Averrhoa carambola* fruit. In *Proceeding of the 6th Thailand-Japan International Academic Conference 2013* (pp. 151-155) Ozaka, Japan.
13. Thongjam, S., Rongnparut, P., Sarapusit, S. (2013). Inhibition of The Human Cytochrome P450 2A6, The Nicotine Metabolising Enzyme by *Pluchea indica* Extract. In *Proceedings of the 5th Science Research Conference* (pp.BIO214-217) Payao: University of Payao, Thailand
14. Kornathorn, C., Photon, P., Printawrangkul, C., Sootanun, P., Sarapusit, S (2013). Genetic Relatedness of Lamp Shell (*Lingula unguis*) in Thailand. In *Proceedings of the 5th Science Research Conference* (pp.BIO54-58) Payao: University of Payao, Thailand

1.2 ผู้ร่วมงานวิจัย

	รองศาสตราจารย์ ดร. พรพิมล รงศ์นพรัตน์
	Pornpimol Rongnoparut, Ph.D.
สถานที่ติดต่อ	ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล 272 ถ. พระรามที่ 6 เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400
โทรศัพท์	02-201-5453
โทรสาร	02-354-7174
อีเมลล์	scprn@mahidol.ac.th
สาขาวิชาการที่ชำนาญ	อณูชีววิทยาและชีวเคมีของเอนไซม์ cytochrome P450
ผลงานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว (5 ปีย้อนหลัง)	

1. Prasopthum, A., Pouyfung, P., Sarapusit, S., Srisook, E., & Rongnoparut, P. (2015). Inhibition effects of *Vernonia cinerea* active compounds against cytochrome P450 2A6 and human monoamine oxidases, possible targets for reduction of tobacco dependence. *Drug Metabolisms and Pharmacokinetics*, 30, 174-181
2. Kotewong, R., Duangkaew, P., Srisook, E., Sarapusit, S., Rongnoparut, P. (2014) Structure-function relationships of inhibition of mosquito cytochrome P450 enzymes by flavonoids of *Andrographis paniculata*. *Parasitology Research*. 113(9), 3381-3392
3. Pouyfung, P., Prasopthum, A., Sarapusit, S., Srisook, E., Rongnoparut, P. (2014). Mechanism-based-Inactivation of Cytochrome P450 2A6 and 2A13 by *Rhinacanthus nasutus* Constituents. *Drug Metab Pharmacokinet*. 29(1): 75-82
4. Wongsri, T., Rongnoparut, P., Sarapusit, S. (2014) Inhibition of cytochrome P450 3A4 by Thai herbal teas and fruit juices. *Burapha Science Journal*. 19(3): 6-12. (T-JIF = 0.069/2554)
5. Anantakul, J., Thongjam, S., Rongnoparut, P., Sarapusit, S. (2014) Effect of medicinal folk plants from Ban-Ang-Ed official Community Forest Project (The Chaipattana Foundation) on the cytochrome P450 2A6 enzyme. *Burapha Science Journal*. 19(3): 185-190.
6. Insee, A., Rongnoparut, P., Duangkaew, P., Sarapusit, S. (2014) Inhibition of the tobacco-specific nitrosamine metabolizing cytochrome P450 2A13 by some plants from Eastern Thailand. In Proceeding of the 5th International Conference on Natural Products for Health and Beauty 2014, (pp. 338-342) Phuket, Thailand
7. Anantakul, J., Wongsri, T., Thongjam, S., Rongnoparut, P., Sarapusit, S. (2014) Inhibitory effects of medicinal folk plants from Ban-Ang-Ed Official Community Forest Project (The Chaipattana Foundation) on drug-metabolizing cytochrome P450 3A4 and 2C9 enzymes. In Proceeding of the 5th International Conference on Natural Products for Health and Beauty 2014, (pp. 348-352) Phuket, Thailand
8. Wongsri, T., Thongjam, S., Rongnoparut, P., Duangkaew, P., Sarapusit, S. (2014) *Inhibition studies of Cytochrome P450 2A by Vernonia cinerea Less and Carthamus tinctorius L. extracts. In Proceeding of the 5th International Conference on Natural Products for Health and Beauty 2014, (pp. 343-347) Phuket, Thailand*
9. Insee, A., Thongjam, S., Rongnoparut, P., Sarapusit, S. *Effect of medicinal folk plants from Ban-Ang-Ed official Community Forest Project (The Chaipattana Foundation) on the cytochrome P450 2A13 enzyme. In Proceeding of the 6th Science Research Conference 2014 (pp. B1328-333) Chon Buri, Burapha University*

10. Sarapusit S, Lertkeitmongkol P, Duangkeaw P, and Rongnoparut P (2013) Modeling of *Anopheles minimus* mosquito NADPH-Cytochrome P450 Oxidoreductase (CYPOR) and mutagenesis analysis: Insight into unique enzymatic properties. *Int. J. Mol. Sci.* 14(1), 1788-1801
11. Prasopthum, A., Sarapusit, S., Rongnoparut, P (2013) *Carthamus tinctorius* as a source of potent inhibitors of Human Cytochrome P450 2A13. *In Proceeding of the 6th Thailand-Japan International Academic Conference 2013* (pp. 70-74) Ozaka, Japan.
12. Pouyfung, P., **Sarapusit, S.**, Rongnoparut P. (2013) Time- and NADPH-dependent inactivation of human CYP2A6 by *Averrhoa carambola* fruit. *In Proceeding of the 6th Thailand-Japan International Academic Conference 2013* (pp. 151-155) Ozaka, Japan.
13. Thongjam, S., Rongnoparut, P., Sarapusit, S. (2013). Inhibition of The Human Cytochrome P450 2A6, The Nicotine Metabolising Enzyme by *Pluchea indica* Extract. *In Proceedings of the 5th Science Research Conference* (pp.BIO214-217) Payao: University of Payao, Thailand.
14. Kornathorn, C., Photon, P., Printawrangkul, C., Sootanun, P., Sarapusit, S (2013). Genetic Relatedness of Lamp Shell (*Lingula unguis*) in Thailand. *In Proceedings of the 5th Science Research Conference* (pp.BIO54-58) Payao: University of Payao, Thailand

1.3 ผู้ร่วมงานวิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกรัฐ ศรีสุข
Ekaruth Srisook

หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาเคมี, คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา อ. เมือง ชลบุรี 20131
โทรศัพท์ 038-745900 ต่อ 3053
E: mail ekaruth@buu.ac.th

สาขาที่ชำนาญพิเศษ Organic synthesis, Medicinal chemistry, Natural product

ผลงานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว (5 ปีย้อนหลัง)

1. Prasopthum, A., Pouyfung, P., Sarapusit, S., Srisook, E., & Rongnoparut, P. (2015). Inhibition effects of *Vernonia cinerea* active compounds against cytochrome P450A6 and human monoamine oxidases, possible targets for reduction of tobacco dependence. *Drug Metabolisms and Pharmacokinetics*, 30, 174-181
2. Kotewong, R., Duangkaew, P., Srisook, E., Sarapusit, S., Rongnoparut, P. (2014) Structure-function relationships of inhibition of mosquito cytochrome P450 enzymes by flavonoids of *Andrographispaniculata*. *Parasitology Research*. 113(9), 3381-3392
3. Pouyfung, P., Prasopthum, A., Sarapusit, S., Srisook, E., Rongnoparut, P. (2014). Mechanism-based-Inactivation of Cytochrome P450 2A6 and 2A13 by *Rhinacanthus nasutus* Constituents. *Drug Metab Pharmacokinet*. 29(1): 75-82
4. Buranakit, P., Srisook, K., Srisook E., Hrimpeng, K. Bioassay-guided isolation, characterized and antibacterial activity of isolated compound from *Zingiber mekongense* rhizome. Proceeding of the 1st Joint ACS AGFD – ACS ICSC Symposium on Agricultural and Food Chemistry, Bangkok, Thailand, 2014, pp. 185-190.
5. กล่าวขวัญ ศรีสุข, สาวินีย์ สีมาพันธ์, ปริญญา เกตุกุล, พรสุดา กันแก้ว, เอกรัฐ ศรีสุข, กาญจนา ทริมเพ็ง, เบลุจวรรณ ชิวปรีชา, และคำรณ เลียดประถม. (2557).ฤทธิ์ต้านการอักเสบของพืชสมุนไพรบางชนิดในโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด จังหวัดจันทบุรี.วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. 19 (ฉบับพิเศษ): 304-311.
6. Buapool, D., Mongkol, N, Chantimal, J., Roytrakul, S., Srisook, E., Srisook, K. (2013). Molecular mechanism of anti-inflammatory activity of *Pluchea indica* leaves in macrophages RAW 264.7 and its action in animal models of inflammation. *Journal of Ethnopharmacology*. 4: 495-504.
7. กล่าวขวัญ ศรีสุข, สุดารัตน์ อินทสุวรรณ, กิ่งกาญจน์ วัชรนาวิและเอกรัฐ ศรีสุข. ฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารประกอบที่แยกได้จากใบสามเงา. Proceeding of the 5th Science Research Conference, University of Phayao, Thailand, 2013, pp. 11-15.

1.4 ผู้ร่วมโครงการวิจัย

อ. ดร. ปณิดา ดวงแก้ว

Panida Duangkaew, Ph.D.

สถานที่ติดต่อ

คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร

วิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี อำเภอชะอำ จังหวัดเพชรบุรี

อีเมลล์

panida.d@su.ac.th

สาขาวิชาการที่ชำนาญ

อณูชีววิทยาและชีวเคมีของเอนไซม์ cytochrome P450

ผลงานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว (5 ปีย้อนหลัง)

1. Kotewong, R., Duangkaew, P., Srisook, E., Sarapusit, S., Rongnoparut, P. (2014) Structure-function relationships of inhibition of mosquito cytochrome P450 enzymes by flavonoids of *Andrographispaniculata*. *Parasitology Research*. 113(9), 3381-3392
2. Insee, A., Rongnoparut, P., Duangkaew, P., Sarapusit, S. (2014) Inhibition of the tobacco-specific nitrosamine metabolizing cytochrome P450 2A13 by some plants from Eastern Thailand. In Proceeding of the 5th International Conference on Natural Products for Health and Beauty 2014, (pp. 338-342) Phuket, Thailand
3. Wongsri, T., Thongjam, S., Rongnoparut, P., Duangkaew, P., Sarapusit, S. (2014) *Inhibition studies of Cytochrome P450 2A by Vernonia cinerea Less and Carthamas tinctorius L. extracts. In Proceeding of the 5th International Conference on Natural Products for Health and Beauty 2014, (pp. 343-347) Phuket, Thailand*
4. Sarapusit S, Lertkeitmongkol P, Duangkaew P, and Rongnoparut P (2013) Modeling of *Anopheles minimus* mosquito NADPH-Cytochrome P450 Oxidoreductase (CYPOR) and mutagenesis analysis: Insight into unique enzymatic properties. *Int. J. Mol. Sci.* 14(1), 1788-1801
5. Pet-huan S, Duangkaew P, Sarapusit S, Srisook E, Rongnoparut P (2012) Inhibition against Mosquito Cytochrome P450 enzymes by Rhinacanthin-A, -B, and -C elicits synergism on Cypermethrin cytotoxicity in *Spodoptera frugiperda* Cells. *Journal of Medical Entomology*. 49 (5): 993-1000.

1.5 ผู้ร่วมโครงการวิจัย

วันวิสาข์ เนตรเรืองแสง

Wanvisa Neadruengsang, M.Sc.

สถานที่ติดต่อ

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 6 ชลบุรี จ. ชลบุรี

อีเมลล์

wanvisa.n@dmsc.mail.go.th

สาขาวิชาการที่ชำนาญ

ชีววิทยาโมเลกุลรับผิดชอบการตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับโรคทางระบาดวิทยาด้วยเทคนิค RT-PCR, real-time PCR, Microarray, LC-MS, และ RNA interference

ประวัติการศึกษา

2553

วท.ม. (อณูชีววิทยา) มหาวิทยาลัยมหิดล, ประเทศไทย

2549

วท.บ. (เทคนิคการแพทย์) มหาวิทยาลัยมหิดล, ประเทศไทย

ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย

1. หัวหน้าโครงการวิจัย

-

2. ผู้ร่วมโครงการวิจัย

-

3. ผลงานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

Chutipongvivate S, Prompunjai Y, Wangsiricharoen S, **Neadruengsang W**. The External Quality Assessment in Primary Health Care Unit. Journal of the Medical Technologist Association of Thailand. 2014: 42(1):4844-4851.

Prompunjai Y, **Neadruengsang W**, Chutipongvivate S. Prevalence of severe Thalassemia and Hemoglobinopathies in risk Couples in Eastern Thailand, Journal of the Medical Technologist Association of Thailand 2013: 41 (3): 4646-4653.

Chutipongvivate S, Prompunjai Y and **Neadruengsang W**. 2014. External quality assessment scheme for HIV serology testing of hospital in central part of Thailand. Burapha Science journal 2014: 19 (Special volume 2014): 312-317.

Wanvisa Neadruengsang, Nitsara Karoonuthaisiri and Witoon Tirasophon. 2010. An alternative effective procedure for gene knockdown in *Drosophila melanogaster* S2 cell. The 16th National Graduate Research Conference, Maejo University, Chiangmai