



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาระบบตรวจสอบสารยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีน ออกซิเดสในพืชสมุนไพรไทยเพื่อใช้
ป้องกันโรคทางสมองและบำบัดอาการติดยาสูบ

Development of inhibition assays for screening Thai medicinal plants against
monoamine oxidases, pharmacotherapeutic target enzymes of
neurological disorders and tobacco dependence

โดย

ผศ.ดร.ทรงกลด สารภูษิต

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

รศ.ดร. พรพิมล รงศ์นพรัตน์

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ผศ. ดร. เอกรัฐ ศรีสุข

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ดร. ปณิดา ดวงแก้ว

คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๙

มหาวิทยาลัยบูรพา

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาระบบตรวจสอบสารยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีน ออกซิเดสในพืชสมุนไพรไทยเพื่อใช้
ป้องกันโรคทางสมองและบำบัดอาการติดยา

Development of inhibition assays for screening Thai medicinal plants against
monoamine oxidases, pharmacotherapeutic target enzymes of
neurological disorders and tobacco dependence

โดย

ผศ.ดร.ทรงกลด สารภูษิต

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

รศ.ดร. พรพิมล รงคันพรัตน์

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ผศ. ดร. เอกฤทธิ์ ศรีสุข

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

อ. ดร. ปณิตา ดวงแก้ว

คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่อง “การพัฒนาระบบตรวจสอบสารยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีน ออกซิเดสในพืชสมุนไพรไทย เพื่อใช้ป้องกันโรคทางสมองและบำบัดอาการติดยา” สามารถมีผลการทดลองที่ก้าวหน้ามาจนได้เสร็จสมบูรณ์ เป็นรายงานฉบับนี้ ต้องขอขอบคุณการสนับสนุนทุนวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๙ มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 85/2559 ซึ่งผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้ นอกจากนี้แล้วผู้วิจัยขอขอบคุณนิสิต-นักศึกษาทุกคนที่ช่วยทำการทดลอง รวมถึงคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาและคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดลที่ให้ความสนับสนุนด้านสถานที่และเครื่องมือต่างๆในการทำการทดลอง

คณะผู้วิจัย

บทคัดย่อ

ชื่อโครงการ การพัฒนาระบบตรวจสอบสารยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีน ออกซิเดสในพืชสมุนไพรไทยเพื่อใช้ป้องกันโรคทางสมองและบำบัดอาการติดยา

ชื่อผู้วิจัย ทรงกลด สารภูษิต ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
พรพิมล รงค์พันธ์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
เอกรัฐ ศรีสุข ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ปณิดา ดวงแก้ว คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร
วิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี

โรคทางระบบประสาทเช่น โรคซึมเศร้า โรคสมาธิสั้นและโรควิตกกังวลรวมไปถึงโรคพาร์กินสัน เป็นโรคที่พบมากขึ้นในปัจจุบัน โดยหนึ่งในสาเหตุหนึ่งที่สำคัญของอุบัติการณ์โรคเหล่านี้เกิดจากการทำงานของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส (monoamine oxidase : MAO) ซึ่งประกอบไปด้วย 2 isoform คือ MAO-A และ MAO-B ที่แตกต่างกันตรงบริเวณ active site ในสมองทำหน้าที่ย่อยสลายสารสื่อประสาท เช่น serotonin และ dopamine มากเกินไป นอกจากนี้ปฏิกิริยาการย่อยสลายโดปามีนยังส่งผลให้เกิดสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ที่สามารถเร่งให้เกิดกระบวนการลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน ที่ร่วมส่งผลให้เกิดอาการโรคทางสมองดังกล่าวข้างต้นขึ้น วัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อพัฒนาระบบตรวจสอบการยับยั้งเอนไซม์ MAO โดยพัฒนาระบบตรวจสอบการยับยั้งเอนไซม์ MAO ของสารสกัดจากสมุนไพรไทยโดยใช้เอนไซม์ MAO จากสมองหมู (*Sus domestica*) ที่ผู้วิจัยเตรียมขึ้น และตรวจสอบการยับยั้งเอนไซม์ MAO ด้วยวิธี ABTS assay ผลการศึกษาพบว่าส่วนสกัดจากเซลล์สมองหมูสามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารประกอบ p-Tyramine ซึ่งใช้เป็นตัวตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ MAO ได้และสารสกัดหยาบจากสมุนไพรโกฐน้ำเต้าสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งทั้ง MAO-A และ MAO-B ได้ดีที่สุดที่ค่า IC_{50} 18.58 $\mu g/ml$ และยังสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MAO-B ได้ดีที่สุดที่ค่า IC_{50} 18.26 $\mu g/ml$ ส่วนสารสกัดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MAO-A ได้ดีที่สุด คือหญ้าหมอน้อยที่ค่า IC_{50} 3.526 $\mu g/ml$

Abstract

Project Title Development of inhibition assays for screening Thai medicinal plants against monoamine oxidases, pharmacotherapeutic target enzymes of neurological disorders and tobacco dependence

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

Nowadays, the number of patients from many neurological disease, such as Depression, Attention Deficit disorder, and Anxiety including Parkinson's disease Disorders have been increasing. Monoamine Oxidase (MAO) has been report as an important mechanism of these neurological diseases development. MAO have 2 isoform; MAO-A and MAO-B; which are difference in their active site environment. In addition, lipid-peroxidation by the metabolic by product of Dopamine metabolism, the hydrogen peroxide (H_2O_2), has been proposed as another factor that could facilitated the progression of brain degenerative tissue in patients. This study aims to develop an assay method to screen for Thailand herbal extracts that could inhibit the MAO using pig (*Sus domesticus*) brain homolysate and ABTS assay. The results showed that the Pig brain homogenate could functionally metabolite tyramine probe substrate and *Rheum palmatum* L. extract could potently inhibited Pig brain MAO-A and MAO-B with an IC_{50} value at 18.58 $\mu\text{g/ml}$. Interestingly, *R palmatum* also potently inhibited Pig brain MAO-B with an IC_{50} value 18.26 $\mu\text{g/ml}$, while *Vernonia cenerea* could potently Pig brain MAO-A with an IC_{50} value at 3.526 $\mu\text{g/ml}$

บทที่ 1

บทนำ

1.1ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันประชากรไทยมีแนวโน้มที่จะป่วยและเสียชีวิตจากโรคเรื้อรังทางสมอง เช่น โรคอัลไซเมอร์ โรคพาร์กินสันและมีอุบัติการณ์ของผู้ป่วยเป็นโรคทางระบบประสาทเช่น โรคซึมเศร้า โรคสมาธิสั้น โรควิตกกังวลและโรคเครียดจากเหตุการณ์ร้ายแรงมากขึ้น จากการศึกษาในโครงการลงทะเบียนผู้ป่วยโรคพาร์กินสันในประเทศไทยพบว่า มีผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยเป็นพาร์กินสันกว่า 40,000 คน โดยพบว่าในเขตเมืองมีความชุกของโรคพาร์กินสันประมาณ 126.83 คน ต่อประชากร 100,000 คน และในเขตชนบทมีความชุกของโรคพาร์กินสันประมาณ 90.82 คน ต่อประชากร 100,000 คน ประกอบกับจำนวนผู้สูงอายุที่เพิ่มขึ้นและจะเพิ่มเป็นเท่าตัวในอีก 15 ปีข้างหน้า จึงทำให้จำนวนผู้ป่วยโรคพาร์กินสันมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น และกระทรวงสาธารณสุขระบุว่า ในปี พ.ศ. 2551 มีผู้ป่วยเสียชีวิตจากกลุ่มอาการเหล่านี้จำนวน 5,093 คน (ต่อประชากร 100,000 คน) หรือร้อยละ 8.1 ของกลุ่มโรคทั้งหมด และในปี พ.ศ. 2555 พบว่าอัตราดังกล่าวเพิ่มขึ้นเป็นจำนวน 6,207 คน (ต่อประชากร 100,000 คน) หรืออัตราผู้เสียชีวิตร้อยละ 9.7 ของกลุ่มโรคทั้งหมด โดยอุบัติการณ์ร่วมกันของการเกิดโรคส่วนหนึ่งถูกรายงานว่า เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ชื่อ โมโนเอมีน ออกซิเดส (Monoamine Oxidase: MAO) ในสมองทำหน้าที่ย่อยสลายสารสื่อประสาทที่มีหมู่เอมีนหนึ่งหมู่ (Monoamine Neuro-transmitters: MNTs) ได้แก่ สารสื่อประสาทเซโรโทนิน (Serotonin หรือ 5-Hydroxytryptamine; 5-HT) สารสื่อประสาทโดปามีน (Dopamine: DA) และสารสื่อประสาทนอร์เอพิเนฟริน (Norepinephrin: NE) ในสมองมากเกินไป ในปัจจุบันจึงมีการใช้ยาในการลดการทำงานของเอนไซม์ MAO ในสมองเพื่อนำมาใช้ในการรักษาโรคทางสมองดังกล่าว เช่น Tranylcypromine Selegiline และ Moclobemide แต่ยาข้างต้นส่งผลกระทบต่อผู้ใช้ (Riederer et al., 2004) ทำให้ยังคงมีการศึกษาค้นคว้าอย่างต่อเนื่องเพื่อค้นหาและประยุกต์ใช้สารเคมีทั้งจากการสังเคราะห์และจากสมุนไพรธรรมชาติในการลดการทำงานของเอนไซม์ MAO ในสมองที่ปลอดภัยและมีประสิทธิภาพในการรักษาโรคโดยปราศจากผลข้างเคียง นอกจากนี้การนำสมุนไพรที่ออกฤทธิ์ดีในการยับยั้งเอนไซม์ MAO มาใช้ทั้งเพื่อป้องกันหรือรักษาโรคทางสมองต่างๆ จำเป็นต้องมีการตรวจสอบความปลอดภัยในที่อาจเกิดขึ้นเมื่อรับประทานก่อนหรือหลังรับประทานยาโรคต่างๆ (Herb-drug interaction; HDI) ได้อย่างไรก็ตามการศึกษาค้นคว้าดังกล่าวต้องใช้เอนไซม์ MAO จากสมองมนุษย์ซึ่งได้มาโดยยากและเป็นข้อจำกัดในการศึกษาค้นคว้า รวมถึงเอนไซม์ MAO บริสุทธิ์ของมนุษย์ที่สามารถสั่งซื้อจากบริษัทสารเคมีต่างๆมีค่าใช้จ่ายสูง ไม่เหมาะสมกับการนำมาเป็นตัวตรวจสอบเบื้องต้นในการศึกษาเพื่อค้นหาพืชสมุนไพรจากธรรมชาติที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MAO ในหลอดทดลอง

เนื่องด้วยข้อจำกัดในการศึกษาเอนไซม์ MAO จากสมองมนุษย์และเพื่อลดค่าใช้จ่ายจากการใช้เอนไซม์ MAO บริสุทธิ์ที่มีราคาแพง การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จึงมุ่งไปสู่การพัฒนาระบบตรวจสอบการยับยั้งเอนไซม์ MAO ของสารสกัดจากสมุนไพรไทยโดยใช้เอนไซม์ MAO จากสมองหมู (*Sus domesticus*) ที่มีรายงานว่ามีการทำงาน การกระจายตัวและสัดส่วนของเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B ใกล้เคียงกับมนุษย์คือร้อยละ 25 ต่อร้อยละ 75 ตามลำดับ (Abell et al., 2001; Bai et al., 2005; Saura Marti et al., 1990; Tipton et al., 1968a) ที่ผู้วิจัยเตรียมขึ้นเปรียบเทียบกับระบบการตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ MAO ชุดตรวจสอบมาตรฐาน

(ชุด kit) เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการนำสมุนไพรมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO ไปใช้เพื่อลดอัตราการเกิดผลกระทบบาง ๆ ที่อาจเกิดขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. พัฒนาระบบตรวจสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO จากสมอหุม
2. เปรียบเทียบผลการยับยั้งของสารสกัดพืชสมุนไพรที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ MAO จากสมอหุม

1.3 สมมติฐานของการทดลอง

สามารถใช้เอนไซม์ MAO จากสมอหุมมาพัฒนาให้ใช้ตรวจสอบฤทธิ์ของสารสำคัญในสมุนไพรมีฤทธิ์ต่อการทำงานของเอนไซม์ MAO

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการทดลอง

1. ได้ระบบตรวจสอบการทำงานของ MAO ที่ง่ายและมีประสิทธิภาพ
2. สามารถนำสารสกัดจากสมุนไพรมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO มาใช้ในการรักษาโรคทางระบบประสาทและสมองที่เกิดจากการลดลงของสารสื่อประสาท เนื่องจากการกิจกรรมของเอนไซม์ MAO เช่น โรคพาร์กินสัน โรควิลสัน โรควิตกกังวล และโรคเครียดจากเหตุการณ์ร้ายแรง

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

2.1 ทฤษฎีพื้นฐานที่เกี่ยวข้อง

2.1.1 เอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส

เอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส (monoamine oxidase: MAO) เป็นเอนไซม์ที่พบบริเวณเยื่อหุ้มชั้นนอกของไมโทคอนเดรีย มี flavin adenine dinucleotide (FAD) เป็นองค์ประกอบ ค้นพบครั้งแรกโดย Hare et al., ในปี 1928 เรียกว่า tyramine oxidase ซึ่งต่อมามีผู้ค้นพบเอนไซม์อีกหลายตัวที่เกี่ยวข้องกับการ oxidation ของ amine ได้แก่ adrenaline oxidase และ aliphatic amine oxidase ภายหลังได้ตั้งชื่อรวมกันว่า MAO เนื่องจากเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้มีคุณสมบัติเหมือนกันหลายประการ เอนไซม์ MAO ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา oxidative deamination ของ neurotransmitters และ biogenic amine เช่น tryptamine, dopamine, epinephrine, serotonin เป็นต้น (Davison, 1958) ดังสมการ

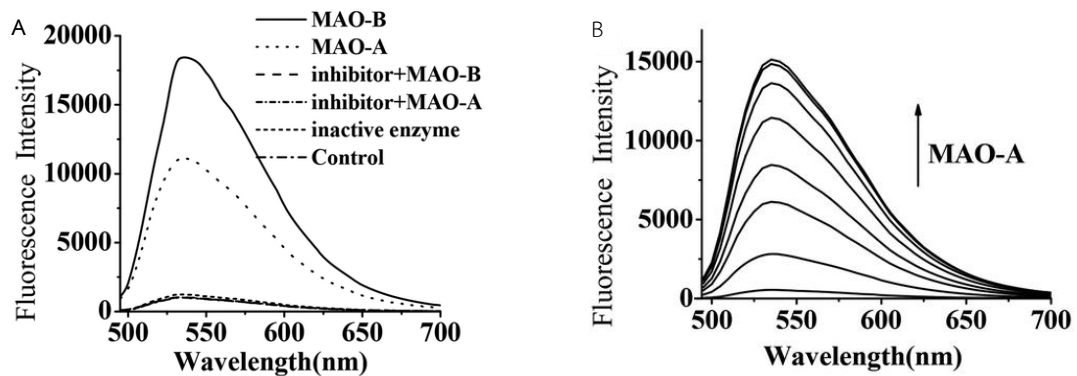


Monoamine oxidase มี 2 รูปแบบ (isoform A และ B: MAO-A และ MAO-B) ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารสื่อประสาทที่มีหมู่อะมีนหนึ่งหมู่ ซึ่ง MAO ทั้งสองรูปแบบนี้มีความแตกต่างกันที่ความจำเพาะเจาะจงของสารตั้งต้นและความไวของตัวยับยั้ง โดย MAO-A จะเด่นในการออกซิไดซ์ serotonin ซึ่งเป็น neurotransmitters และสามารถออกซิไดซ์ substrate บางชนิดได้เช่นเดียวกับ MAO-B ได้แก่ tyramine, adrenaline และ dopamine ส่วน MAO-B จะเด่นในการออกซิไดซ์สารพวก arylalkylamines เช่น benzylamine (Binda et al., 2004; Houslay and Tipton, 1976) สำหรับความไวต่อตัวยับยั้ง MAO-A จะมีความไวในการยับยั้งด้วย clorgyline ส่วน MAO-B จะมีความไวต่อตัวยับยั้ง pargyline (Urbanc et al., 1991)

2.1.2 วิธีการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส โดยตรวจสอบการเกิดขึ้นของสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

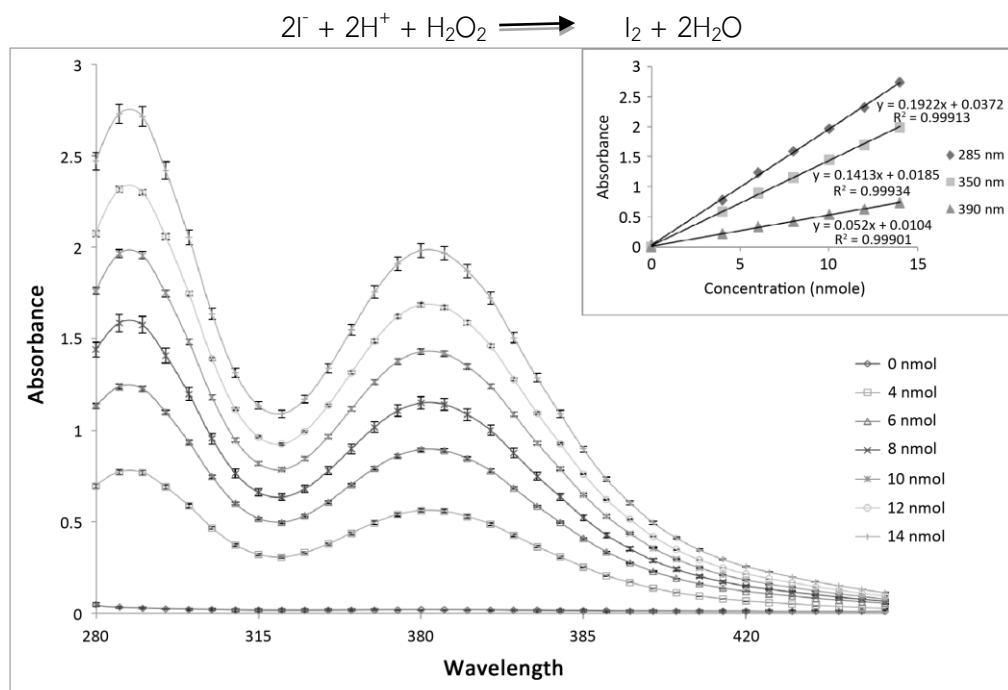
จากคุณสมบัติของเอนไซม์ MAO ในการเกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายสารสื่อประสาท พบว่าได้สารที่เป็นพิษต่อระบบประสาทได้แก่ สารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) และแอมโมเนีย (NH_3) โดยเฉพาะสาร (H_2O_2) ซึ่งสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระอื่นๆ ส่งผลให้เกิดความผิดปกติในการทำงานของไมโทคอนเดรีย (mitochondria) และทำให้เกิดกระบวนการตายของเซลล์ประสาทได้ (Neuronal apoptosis) โดยเฉพาะในกรณีผู้ป่วยโรคพาร์กินสันที่เอนไซม์ MAO-B มีการเพิ่มการทำงานขึ้นส่งผลให้เกิดผลกระทบมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้กลุ่มผู้ได้รับยาเสพติด MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) ซึ่งเป็นสารเสพติดที่สังเคราะห์จากฝิ่น (ออกฤทธิ์เหมือนกับเฮโรอีน) ที่สามารถถูกย่อยสลายโดย MAO-B และเหนี่ยวนำให้เกิดโรคพาร์กินสันได้อีกทางหนึ่งด้วย (Chung et al., 2015) อย่างไรก็ตามในปัจจุบันการตรวจสอบการทำงานของ MAO จะมุ่งตรวจสอบความเข้มข้นของ H_2O_2

2.1.2.1 ตรวจสอบกิจกรรมของ MAO ด้วยชุดตรวจสอบมาตรฐาน (ชุด kit) โดยจะตรวจสอบการมีอยู่ของ H_2O_2 ที่เกิดจากการย่อยสลายสารตั้งต้น *p*-tyramine เมื่อสีย้อมหรือ dye ทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 และถูกเร่งด้วยเอนไซม์ horseradish peroxidase (HRP) จึงเกิดการเรืองแสงขึ้น สามารถตรวจวัดด้วย fluorescence spectroscopy โดยใช้ค่า excitation 530 นาโนเมตร และ emission 585 นาโนเมตร (Biochem, 1968)



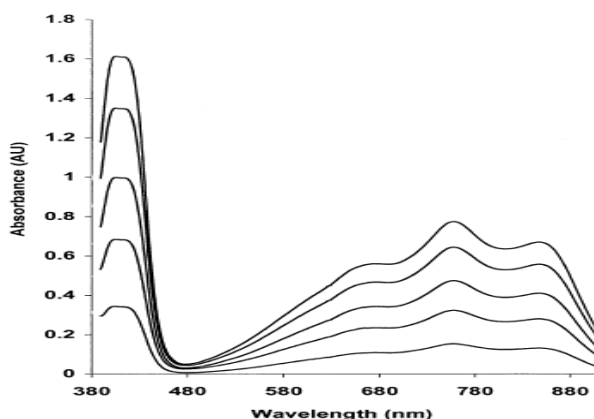
ภาพที่ 2-1 spectrum ความเข้มแสง fluorescent ของเอนไซม์ MAO (Li et al., 2014)

2.1.2.2 ตรวจสอบกิจกรรมของ MAO ด้วยสารโปแทสเซียมไอโอไดร์ (KI) โดยจะตรวจสอบการมีอยู่ของ H_2O_2 เมื่อ KI ทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 จะเกิดผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ H_2O และ I_2 ดังสมการ ซึ่ง I_2 สามารถทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 288 นาโนเมตร และ 353 นาโนเมตร (Sanders et al., 2014)



ภาพที่ 2-2 spectrum การดูดกลืนแสงของ KI ที่มาจากการปฏิกิริยาการตรวจสอบการมีอยู่ของ H_2O_2 ภาพเล็กแสดงถึงตัวอย่างของกราฟมาตรฐานเมื่อวัดการเกิด I_2 ที่ความยาวคลื่น 285 nm, 350 nm และ 490 nm ตามลำดับ (Sanders et al., 2014)

2.1.2.3 ตรวจสอบกิจกรรมของMAO ด้วยABTS assay (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) โดยตรวจสอบการมีอยู่ของ H₂O₂ เมื่อสาร ABTS ทำปฏิกิริยากับ H₂O₂ และเร่งการเกิดปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ horseradish peroxidase (HRP) ได้ผลิตภัณฑ์คือ ABTS radical cation (ABTS⁺) และ H₂O ดังสมการ เมื่อเกิดปฏิกิริยาจาก ABTS เป็น ABTS⁺ จะมีสีเขียวและสามารถทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร (Roberta et al., 1999)



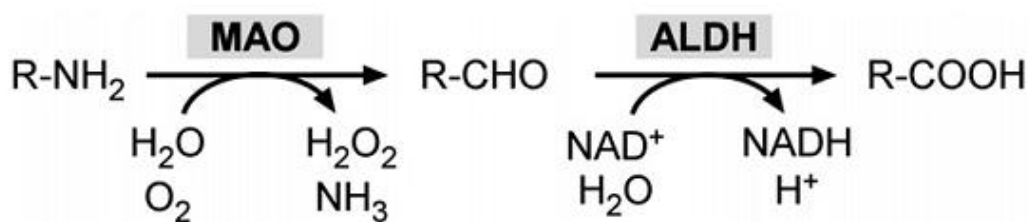
ภาพที่ 2-3 spectrum การดูดกลืนแสงของ ABTS radical cation ที่ความเข้มข้นของ H₂O₂ ต่าง ๆ (Roberta et al., 1999)

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันประชากรไทยมีแนวโน้มที่จะป่วยและเสียชีวิตจากโรคเรื้อรังทางสมองเช่น โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease: AD) โรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease: PD) และมีอุบัติการณ์ของผู้ป่วยเป็นโรคทางระบบประสาทเช่น โรคซึมเศร้า (Depression) โรคสมาธิสั้น (Attention Deficit Hyperactivity Disorder: ADHD) โรควิตกกังวล (Anxiety disorder) และโรคเครียดจากเหตุการณ์ร้ายแรง (PTSD) มากขึ้น โดยข้อมูลจากกลุ่มภารกิจด้านข้อมูลข่าวสารสุขภาพ สำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ กระทรวงสาธารณสุขระบุว่า ในปี พ.ศ. 2551 มีผู้ป่วยเสียชีวิตจากกลุ่มอาการเหล่านี้จำนวน 5,093 คน (ต่อประชากร 100,000 คน) หรือร้อยละ 8.1 ของกลุ่มโรคทั้งหมด และในปี พ.ศ. 2555 พบว่าอัตราดังกล่าวเพิ่มขึ้นเป็นจำนวน 6,207 คน (ต่อประชากร 100,000 คน) หรืออัตราผู้เสียชีวิตร้อยละ 9.7 ของกลุ่มโรคทั้งหมด (สถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข, 2555) ซึ่งสาเหตุหลักร่วมกันของโรคทางสมองเหล่านี้เกิดขึ้นเนื่องจากการลดลงของสารสื่อประสาทที่มีหมู่เอมีนหนึ่งหมู่ (MNTs) เช่น สารสื่อประสาทเซโรโทนิน (5-HT) จาก Serotonergic neuron สารสื่อประสาทโดปามีน (DA) จาก Dopaminergic neuron และสารสื่อประสาทนอร์เอพิเนฟริน (NE) จาก Noradrenergic neuron ที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ชื่อ โมโนเอมีน ออกซิเดส (MAO) ในสมองที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารสื่อประสาท 5-HT DA และ NE ดังกล่าวข้างต้น (Bortolato et al., 2008; Finberg, 2014; review in Hamon et al., 2013; Patil et al., 2013; Song et al., 2013; Yamada et al., 2004)

เอนไซม์โมโนเอมีน ออกซิเดส (MAO; EC 1.4.3.4.) หรือเอนไซม์ tyramine oxidase (Hare, 1928) เป็นเอนไซม์ที่พบที่บริเวณเยื่อหุ้มชั้นนอกของไมโทคอนเดรีย มีหมู่ฟลาวิน (Flavin) เป็นองค์ประกอบ พบได้ในเซลล์ในเนื้อเยื่อหลายชนิดโดยเฉพาะที่สมองและตับในมนุษย์ มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบเอมีนหนึ่งหมู่ทั้งแบบไพรมารี เซคันดารี และเทอร์นารีเอมีนแต่ประสิทธิภาพการทำงานจะลดลงกับสารที่มีหมู่เอมีนสองหมู่ (diamines) เช่น histamine (Edmondson et al., 2009; Hamon et al., 2013; review in Patil

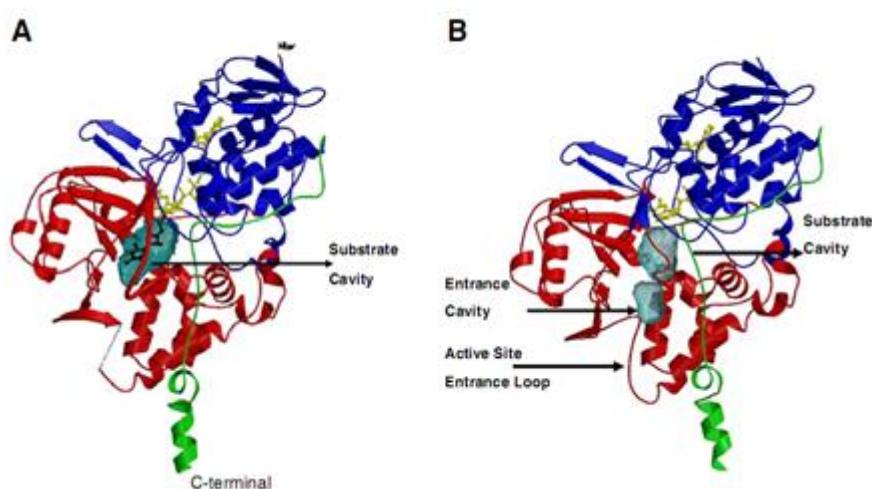
et al., 2013) จากการศึกษาพบว่า MAO มีสองรูปแบบ (isoform) ในมนุษย์ ได้แก่ รูปแบบ A และ B (MAO-A และ MAO-B) ที่ถูกสร้างขึ้นจากยีนสองยีนที่แยกจากกันที่อยู่บนโครโมโซม X (Xp11.23) โดยเรียงตัวในทิศทางตรงข้ามกัน (Lan et al., 1989) มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาแบบเดียวกัน (ภาพที่ 2-4)



ภาพที่ 2-4 กลไกการย่อยสลายสารประกอบเอมีนหนึ่งของเอนไซม์ MAO (Bortolato et al., 2008)

ปฏิกิริยาของเอนไซม์ MAO (รูปที่ 1) จะให้สารผลิตภัณฑ์คืออัลดีไฮด์และ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซึ่งเป็นพิษกับเซลล์ ในกรณีของพรามารีเอมีนจะได้สารแอมโมเนียแต่ในกรณีการย่อยสลายเซคันดารีหรือเทอร์นารีจะได้สารประกอบไนโตรเจนอื่นๆ อัลดีไฮด์ที่ได้จะถูกเร่งปฏิกิริยาอีกครั้งโดยเอนไซม์ Aldehyde dehydrogenase (ALDH) ในขณะที่ H_2O_2 จะถูกเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) หรือ catalase หรือเกิดปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ glutathione อย่างไรก็ตามจากการศึกษาพบว่าในสภาวะที่เกิดพยาธิสภาพความผิดปกติเกิดขึ้น เช่นในผู้ป่วยโรคพาร์กินสันจะมีความผิดปกติในการทำงานของเอนไซม์ในการลดอนุมูลอิสระเหล่านี้ แต่จะมีการทำงานของ MAO ปกติหรือเพิ่มขึ้น (ซึ่งมักจะเพิ่มขึ้นเมื่ออายุมากขึ้น) ทำให้เกิดการย่อยสลาย MNTs มากขึ้น เกิด H_2O_2 มากขึ้น ซึ่งอาจก่อให้เกิดผลกระทบต่อเซลล์โดยเหนี่ยวนำให้เกิดสภาวะ oxidative stress และสภาวะเซลล์ประสาทตายได้ (neuronal apoptosis) (Vaya et al., 2012)

จากการศึกษาเพิ่มเติมในสมบัติของทั้ง MAO-A และ MAO-B พบว่าเอนไซม์ทั้งสองแม้จะพบที่บริเวณเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียชั้นนอกเหมือนกัน เร่งปฏิกิริยาแบบเดียวกันรวมถึงมีโครงสร้างของเอนไซม์ใกล้เคียงกัน แต่ความแตกต่างที่บริเวณเร่ง (active site) ทั้งที่บริเวณทางเข้าและบริเวณจับสารตั้งต้น (ภาพที่ 2-5) ส่งผลให้เอนไซม์ทั้งสองมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นและตัวยับยั้งที่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 2-1



ภาพที่ 2-5 โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ MAO-A (A) และเอนไซม์ MAO-B (B) ที่มีความแตกต่างกันที่บริเวณ substrate cavity (Finberg, 2014)

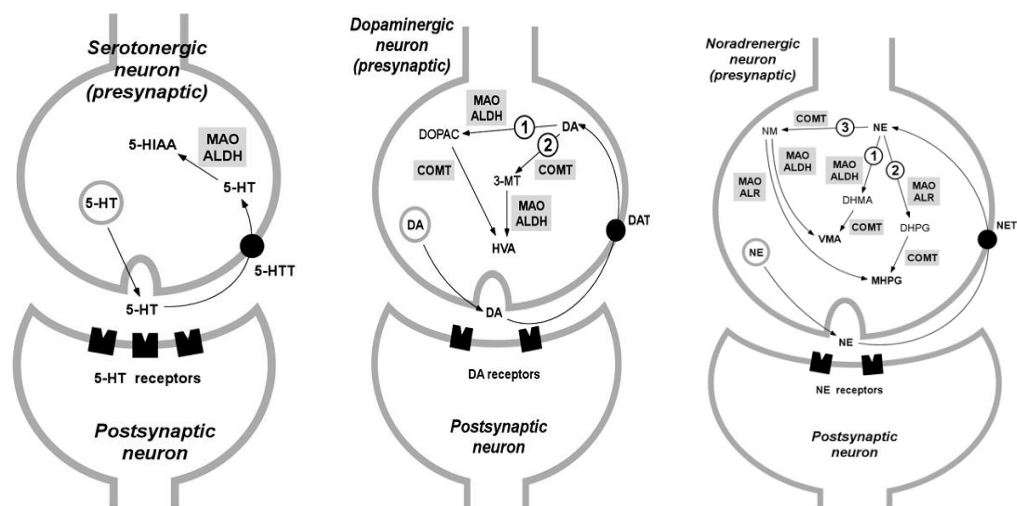
ตารางที่ 2-1 สรุปสารตั้งต้นและตัวยับยั้งของเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B

ชนิด/ประเภท	จำเพาะกับเอนไซม์ MAO-A	จำเพาะกับเอนไซม์ MAO-B	ไม่จำเพาะกับ MAO-A หรือ MAO-B
สารตั้งต้น	Serotonin Noradrenaline	Benzylamine 2-phenylethylamine	Dopamine Tyramine Tryptamine Kynuramine
สารยับยั้ง	<u>แบบผันกลับไม่ได้</u> - Clorgyline <u>แบบผันกลับได้</u> - Methamphetamine - Moclobemide - Cimorex - Amiflamine - Isatin	<u>แบบผันกลับไม่ได้</u> - Selegiline - Rasagiline <u>แบบผันกลับได้</u> - Safinamide	<u>แบบผันกลับไม่ได้</u> Phenelzine Isocarboxazide Tranylcypromine Pargyline <u>แบบผันกลับได้</u> Ladostigil

*ข้อมูลจาก Bortolato et al., 2008; Finberg, 2014

และความแตกต่างกันความสามารถในการย่อยสลายสารตั้งต้นที่แตกต่างกันส่งผลให้เอนไซม์ MAO-A และ MAO-B มีบทบาทหน้าที่แตกต่างกันในร่างกาย โดยเฉพาะที่สมองซึ่ง MAO ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารสื่อประสาท 5-HT ที่ Serotonergic neuron DA ที่ Dopaminergic และ NE ที่ Noradrenergic neuron (ภาพที่ 2-6) ซึ่งเป็นกลไกที่สำคัญในการควบคุมการทำงานของสารสื่อประสาทของเซลล์สมอง ซึ่งโดยปกติสารสื่อประสาทเหล่านี้ทำหน้าที่สำคัญร่วมกันเกี่ยวกับอารมณ์และความรู้สึก (mood and emotion) และควบคุมการทำงานของคำสั่งการ (motor function) การรับรู้และกระบวนการความคิดของสมอง (perception and cognitive) โดยการทำงานมากเกินไปของเอนไซม์ MAO ส่งผลให้ระดับสารสื่อประสาทเหล่านี้ในสมองลดลง ทำให้เกิดอาการโรคทางสมองดังกล่าวข้างต้น

โดยโรคพาร์กินสันหรือโรคสันนิบาตมักพบในผู้สูงอายุในคนทุกเชื้อชาติ โดยในคนที่มีอายุตั้งแต่ 60 ปีขึ้นไปพบเป็นโรคนี้ถึง 1% ผู้ชายมีโอกาสเป็นโรคมามากกว่าผู้หญิงประมาณ 1.5 เท่า ผู้ป่วยจะมีอาการสั่นขณะช่วงการพัก (Resting tremor) เคลื่อนไหวร่างกายช้าลง (Bradykinesia) ร่างกายมีสภาพแข็งเกร็ง (Rigidity) และการทรงตัวขาดความสมดุล (Postural instability) ในขณะที่โรคอัลไซเมอร์หรืออาการสมองเสื่อมนั้นยิ่งอายุมากขึ้นก็จะพบอัตราการเป็นโรคมามากขึ้น โดยในช่วงอายุ 65-69 ปีพบอุบัติการณ์การเกิดผู้ป่วยรายใหม่ประมาณ 3 คนต่อพันคนต่อปี โดยจะพบกลุ่มแผ่น (Plaque) ที่เกิดจากการรวมตัวของโปรตีนที่ชื่อ Beta-amyloid protein (β -AP) ที่ผิดปกติและถูกล้อมรอบด้วยเซลล์ประสาทที่เสื่อม (Dystrophic neuritis) เรียกกลุ่มแผ่นนี้ว่า Amyloid plaques หรือ Neuritic plaques ส่งผลให้เกิดอาการความจำเสื่อม หลงลืม มีพฤติกรรมและนิสัยเปลี่ยนไป ซึ่งอาการจะดำเนินไปอย่างช้าๆ แต่ค่อยๆรุนแรงขึ้นเรื่อยๆ จนในที่สุดจะช่วยเหลือตัวเองไม่ได้ และเสียชีวิตในที่สุด โดยอุบัติการณ์ของการเกิดโรคทั้งสองถูกรายงานว่ามีจุดร่วมเดียวกันคือมีการตายหรือการเสื่อมสภาพของเซลล์ประสาท และมีปริมาณสารสื่อประสาท DA ในสมองที่ลดลง (Chen et al., 2007; Riederer et al., 2004; Finberg, 2014)



ภาพที่ 2-6 กลไกการย่อยสลายสารสื่อประสาท (1) 5-HT ที่ Serotonergic neuron โดย MAO และ ALDH ได้เป็น 5-hydroxyindole-3-acetic acid (5-HIAA) (2) DA ที่ Dopaminergic neuron ซึ่งมีสองกลไกสำคัญ โดยกลไกแรก DA จะถูกย่อยสลายโดย MAO และ ALDH ได้ 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) ที่จะถูกเร่งปฏิกิริยาต่อโดย catechol-O-methyltransferase (COMT) ไปเป็น homovanillic acid (HVA) และกลไกที่สองที่ COMT จะเปลี่ยน DA ไปเป็น 3-methoxytyramine (3-MT) ที่จะเร่งปฏิกิริยาต่อด้วย MAO และ ALDH ได้ HVA (3) NE ที่ Noradrenergic neuron ซึ่งมีสามกลไกสำคัญ โดยกลไกแรก NE จะถูกย่อยสลายโดย MAO และ ALDH ได้ 3,4-dihydroxymandelic acid (DHMA) ที่จะถูกเร่งปฏิกิริยาโดย COMT เป็น vanillyl-mandelic acid (VMA) หรือกลไกที่สอง NE จะถูกย่อยสลายโดย MAO และ ALR (aldehyde reductase) เป็น 3,4-dihydroxyphenylglycol (DHPG) และ 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol (MHPG) โดย COMT หรือกลไกที่สาม NE จะถูกย่อยสลายโดย COMT ได้ normetanephrine (NM) ซึ่งจะเปลี่ยนเป็น MHPG (โดย MAO/ALR) หรือ VMA (โดย MAO/ALDH) (Bortolato et al., 2008)

แม้ว่าจะมีหลายปัจจัยทั้งพันธุกรรมหรือสิ่งแวดล้อมที่อาจส่งผลต่อการเกิดพยาธิสภาพของเซลล์สมองหนึ่งในข้อสมมุติฐานที่สำคัญคือ สารอนุมูลอิสระ ROS (Reactive Oxygen Species) ซึ่งในกรณีนี้คือ H_2O_2 ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลาย 5-HT DA และ NE โดยเฉพาะที่เกิดจากการทำงานของ MAO-B ที่เซลล์ astrocyte ในบริเวณที่มีการตายหรือการเสื่อมสภาพของเซลล์ประสาทที่มีระดับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นในผู้ป่วย จะส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องที่นำไปสู่กระบวนการ oxidative stress และเหนี่ยวนำให้เกิดการตายหรือการเสื่อมสภาพของเซลล์ประสาท (Jossan et al., 1991; Saura et al., 1994) ทั้งนี้เซลล์ประสาทไวต่อปฏิกิริยาของสารอนุมูลอิสระเนื่องจาก 1) มีปริมาณสารต่อต้านอนุมูลอิสระต่ำ 2) ที่เยื่อหุ้มเซลล์มีปริมาณของกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายตำแหน่ง (Polyunsaturated fatty acid) ในปริมาณสูงซึ่งเอื้อต่อกระบวนการ lipid peroxidation และเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ได้ง่าย (Chen et al., 2007; Cooper, 2003; Hazel and Williams, 1990; Riederer et al., 2004) โดยการยับยั้งเอนไซม์ MAO สามารถลดการสร้างสาร H_2O_2 ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลาย tyramine ได้ (Hauptmann et al., 1996) ในขณะที่โรคสมาธิสั้น (ADHD) ที่พบได้บ่อยในเด็กที่ไม่สามารถควบคุมสมาธิและการเคลื่อนไหวของตนเองได้ จึงก่อให้เกิดปัญหาต่างๆ เช่น ผลการเรียนตกต่ำและมีปัญหาด้านความสัมพันธ์กับผู้อื่นแม้จะมีระดับสติปัญญาปกติ นั้นพบว่าหนึ่งในพยาธิสภาพที่พบคือมีระดับของสารสื่อประสาท DA ในสมองน้อยกว่าปกติ ในขณะที่โรคซึมเศร้า (Depression) โรควิตกกังวล (Anxiety)

disorder) และโรคเครียดจากเหตุการณ์ร้ายแรง (PTSD) จะพบว่าผู้ป่วยเมื่อมีตัวกระตุ้นให้เกิดอาการดังกล่าวจะมีระดับของสารสื่อประสาท 5-HT และ NE ต่ำกว่าค่าปกติ (Bortolato et al., 2008; Finberg, 2014; Yamada et al., 2004)

จากสาเหตุข้างต้นทำให้เกิดการศึกษาค้นคว้าผลผลิตยาต่างๆ ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO (MAO inhibitor; MAOI) ในสมองเพื่อคงระดับของสารสื่อประสาทและลดอาการพยาธิสภาพของโรคทางสมองดังกล่าวมากมาย (ตารางที่ 1) นอกจากนี้ยังได้มีการนำมาใช้ยับยั้งเอนไซม์ MAO เพื่อให้คงระดับสารสื่อประสาทโดปามีนในสมองเพื่อลดการสูบบุหรี่อีกด้วย (Tranlylcypromine และ Selegiline) จากการศึกษาพบว่ายาที่ยับยั้งเอนไซม์ MAO-A จะใช้รักษาอาการโรคซึมเศร้า โรควิตกกังวล และโรคเครียดจากเหตุการณ์ร้ายแรง ในขณะที่ยาที่ยับยั้งเอนไซม์ MAO-B จะใช้รักษาอาการโรคพาร์กินสัน โรคอัลไซเมอร์และโรคสมาธิสั้น (Bortolato et al., 2008; Finberg, 2014; Yamada et al., 2004) โดยยาแต่ละชนิดจะมีความความสามารถและกลไกในการยับยั้งเอนไซม์ MAO ที่แตกต่างกัน โดยสามารถแบ่งยาตามความจำเพาะในการยับยั้งได้เป็น 1) ยาที่จำเพาะในการยับยั้ง MAO-A 2) ยาที่จำเพาะในการยับยั้ง MAO-B และ 3) ยาที่ยับยั้งได้ทั้ง MAO-A และ MAO-B และแบ่งกลไกในการยับยั้ง MAO ได้เป็น 1) การยับยั้งแบบผันกลับไม่ได้ (Irreversible inhibition) ที่ยานั้นออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MAO อย่างถาวรโดยเข้าไปทำปฏิกิริยากับโครงสร้างของฟลาวินที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้อีก การยับยั้งโดยกลไกนี้ปริมาณยาที่ได้รับต้องส่งผลให้เอนไซม์ส่วนหนึ่งลดการทำงานลงอย่างถาวร และปริมาณที่ได้รับต่อมา จะลดการทำงานเพิ่มขึ้นจนกระทั่งเข้าสู่จุดที่เอนไซม์ถูกยับยั้งมากกว่า 80% และจะให้ปริมาณยาต่อเนื่องเพื่อให้ MAO ถูกยับยั้งคงที่ แต่ถ้าไม่ได้รับยาอย่างต่อเนื่องเอนไซม์ MAO ที่ถูกสร้างขึ้นใหม่จะสามารถเร่งปฏิกิริยาขึ้นได้ (Green et al., 1975) และ 2) การยับยั้งแบบผันกลับได้ (Reversible inhibition) ที่การยับยั้งเอนไซม์เกิดขึ้นไม่ถาวรและประสิทธิภาพในการยับยั้งขึ้นอยู่กับกลไกในการยับยั้ง โดยตัวยับยั้งต้องมีความสามารถที่ดีในการแย่งจับกับ MAO (high affinity) เมื่อเปรียบเทียบกับสารตั้งต้นของ MAO ในร่างกาย (Bortolato et al., 2008; Finberg, 2014)

โดยการพัฒนา MAOI เกิดขึ้นเนื่องจากการพบว่ายา Iproniazid ที่ใช้รักษาโรควัณโรคสามารถยับยั้งเอนไซม์ MAO และใช้รักษาอาการซึมเศร้าได้ (Fox et al., 1953; Zeller et al., 1952) ทำให้เกิดการสังเคราะห์ยาอื่นๆ (ตารางที่ 2-1) เช่น Phenelzine หรือ Tranlylcypromine ที่ใช้สำหรับรักษาโรคซึมเศร้าหรือโรควิตกกังวลและสามารถยับยั้ง CYP2A6 ในการย่อยสลายนิโคตินได้ โดยยาทั้งสองออกฤทธิ์ยับยั้งแบบผันกลับไม่ได้ต่อทั้ง MAO-A และ MAO-B หรือ Clorgyline ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งอย่างจำเพาะต่อ MAO-A แบบผันกลับไม่ได้ ที่สามารถเพิ่มระดับของ 5-HT ที่บริเวณของสมองที่มี serotonergic neuron ปริมาณมาก (kitanaka et al., 2010) ผลการศึกษายังพบว่า Clorgyline (1 mg/kg) สามารถยับยั้งฤทธิ์ของสาร Methylendioxy-metamphetamine (MDMA) ที่จะกระตุ้นให้มีการหลั่งสารสื่อประสาท 5-HT และ DA ได้ (Alves et al., 2007) และ Clorgyline ยังสามารถลดความเป็นพิษของ metamphetamine ที่มีต่อสมองและลดอัตราการเกิด oxidative stress ได้อีกด้วย (Aluf et al., 2013; Thomas et al., 2009) ในขณะที่ยา Selegiline และ Rasagiline ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งอย่างจำเพาะต่อ MAO-B แบบผันกลับไม่ได้ถูกนำมาใช้สำหรับรักษาโรคพาร์กินสันและโรคอัลไซเมอร์ (Cesura et al., 1992; Esteban et al., 2014; Finberg et al., 2002; Knoll, 2000; Song et al., 2013; Thomas et al., 2000) โดยในช่วงแรกพบว่า Selegiline ยังสามารถยับยั้งการย่อยสลายสารเสพติด MPTP ของ MAO-B ที่จะได้สารผลิตภัณฑ์ที่จะเป็นพิษรุนแรงกับสมองและเหนี่ยวนำให้เกิดโรคพาร์กินสันได้ (Heikkila et al., 1984; Langston et al., 1984; Tatton et al., 1996) จากนั้นพบว่า การได้รับ Selegiline ปริมาณ 10 mg และ Rasagiline ปริมาณ 1 mg ต่อวันจะส่งผลช่วยยับยั้งการทำงานของ MAO-B โดยไม่ต้องควบคุมอาหาร และการเพิ่มปริมาณของ Selegiline เป็น 30 mg ต่อวันจะช่วยลดอาการโรคซึมเศร้าได้ (Mann et al., 1989) นอกจากนี้ยังมีรายงานการค้นพบว่า Selegiline สามารถยับยั้งฤทธิ์ของสาร MDMA ที่จะกระตุ้นให้มีการหลั่งสารสื่อประสาท 5-HT และ DA ได้ โดยลดการเกิด oxidative stress ได้ดีกว่า

Clorgyline (Alves et al., 2007) ในทางตรงข้ามกับการยับยั้งแบบผันกลับไม่ได้ดังกล่าวข้างต้น ยาที่ออกฤทธิ์ยับยั้งแบบผันกลับได้ถูกรายงานว่าสามารถนำมาใช้รักษาโรคได้เช่นกัน แต่มีประสิทธิภาพที่น้อยกว่า เช่นยา Moclobemide และ Cimoxotone ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งอย่างจำเพาะต่อ MAO-A แบบผันกลับได้ ที่สามารถรักษาอาการโรคซึมเศร้าได้ดีเมื่อใช้ร่วมกับยาที่ยับยั้งการดูดซึมสารสื่อประสาทเซโรโทนิน (Selective Serotonin Reuptake inhibitor: SSRI) (Bech et al., 2012; Caille et al., 1996; Gillman, 2006) ในขณะที่ยา Safinamide ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งอย่างจำเพาะต่อ MAO B แบบผันกลับได้ ที่ยับยั้ง MAO-B ได้ดีกว่า MAO A ถึง 700 เท่า (Binda et al., 2007) ยังอยู่ในระหว่างพัฒนาขั้นที่ 3 โดยที่ Safinamide ที่ปริมาณ 100 mg ต่อวันสามารถเพิ่มการทำงานของระบบสั่งการได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งการย่อยสลาย MPTP ได้ดีเหมือน Selegiline และ Rasagiline (Schapira et al., 2010; 2013)

แม้ว่าจะมีการนำยาที่เป็น MAOI มาใช้กันอย่างแพร่หลาย แต่ยาข้างต้นส่งผลกระทบต่อข้างเคียงในผู้ใช้ โดยในช่วงแรกของการพัฒนายาพบว่า Phenelzine และ Tranylcypromine ที่ยับยั้งได้ทั้ง MAO-A และ MAO-B จะส่งผลให้เกิดโรค “Cheese effect” คือเกิดอาการความดันโลหิตสูงและเลือดออกในสมอง เมื่อผู้ป่วยรับประทานชีส ไวน์หรืออาหารหมักดอง ที่มีสารในกลุ่ม tyramine และ sympathomimetic amines (Brown et al., 1989; Finberg et al., 2011) นอกจากนี้ Phenelzine ยังส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อระบบประสาทและตับ (Gillman et al., 2011) หรือการได้รับ Tranylcypromine ร่วมกับยา Fluoxetine ที่ไปยับยั้งตัวรับเซโรโทนิน (Serotonin Transporter blocker: SERT) จะส่งผลให้เกิดการเพิ่มขึ้นอย่างของของ 5-HT และ DA ส่งผลให้เกิดอาการ Serotonin syndrome (Shioda et al., 2004) ที่จะมีอาการสับสน ตื่นเต้น กระวนกระวาย อยู่ไม่สุข (Gillman et al., 1999; 2004) ในขณะที่ยา Clorgyline Selegiline และ Rasagiline ส่งผลให้เกิดอาการความดันโลหิตสูง โดยเฉพาะเมื่อผู้ป่วยได้รับ L-dopa (lavodopa) ซึ่งช่วยต้านอาการของโรคควบคู่กันและส่งผลให้เกิดอาการความดันสูงวิกฤตได้ (Finberg et al., 2006; Riederer et al., 2011) ทำให้ปัจจุบันยังคงมีการศึกษาค้นคว้าอย่างต่อเนื่องเพื่อค้นหาและประยุกต์ใช้สารเคมีสังเคราะห์จากโครงสร้างพื้นฐานเช่น โครงสร้างพื้นฐานแบบ Hydrazine หรือ Amphetamine หรือ Benzofuran หรือ β -Tetralone ที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง MAO ได้ดี เพื่อพัฒนาตัวยาที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง MAO สำหรับนำไปใช้รักษาโรค (Esteban et al., 2014; He et al., 2014; Legoabe et al., 2014; Prins et al., 2014; Song et al., 2013) อย่างไรก็ตามการประยุกต์ใช้สารกลุ่มดังกล่าวที่ผ่านการศึกษาว่าออกฤทธิ์ยับยั้ง MAO ที่ดีนั้น อาจเกิดปัญหาเรื่องความปลอดภัยในการใช้เช่นเดียวกับสารสังเคราะห์ที่ได้รับการพัฒนาเป็นตัวยาแล้วดังกล่าวข้างต้นได้

เนื่องด้วยแนวโน้มในการรักษาโรคที่ย้อนกลับไปใช้สารจากธรรมชาติ (natural products) เพื่อลดความเป็นพิษและผลข้างเคียง จึงมีการศึกษาโดยค้นหาสารจากพืชสมุนไพรที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MAO ได้ เช่น สารสกัดจากสมุนไพร *Hypericum perforatum* (Butterweck et al., 2002) หรือ *Zanthoxylum schinifolium* (Jo et al., 2002) หรือ *Kaempferia galangal* (Huong et al., 2002) หรือ *Acorus gramineus* (Tao et al., 2005) หรือ β -Carboline จาก *Peganum harmala* (Herraiz et al., 2010) หรือพืชสมุนไพรจากประเทศเดนมาร์ก *Trigonella foenum-graecum*, *Apium graveolens*, *Calluna vulgaris* (Jager et al., 2013) ที่มีรายงานว่าสามารถยับยั้ง MAO-A ได้ดี ในขณะที่จากพืชสมุนไพรจีนที่ทำการศึกษา 27 ชนิดสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO ได้ นั้น สารสกัดจากต้น *Arisaema amurense*, *Lilium brownii* var. *colchesteri*, *Lycium chinense* และ *Uncaria rhynchophylla* ยับยั้งการทำงานของ MAO-B ได้ดีกว่า MAO-A ในหลอดทดลอง (Hou et al., 2005; Lin et al., 2003) เช่นเดียวกับ *Gentiana lutea* (Haraguchi et al., 2004) *Ruta graveolens*, *Schotia brachypetala*, *Mentha aquatica* และ *Gasteria croucheri* ซึ่งเป็นพืชประจำถิ่นในทวีปแอฟริกา (Stafford et al., 2007) หรือ *Phellodendron amurense*, *Cyamopsis psoralioides*, *Glycyrrhiza glabra/uralensis*, *Psoralea corylifolia* ที่นิยมใช้ในประเทศอินเดียยับยั้งการทำงานของ MAO-B ได้ดีกว่า MAO-A ในหลอดทดลอง (Mazzio et al., 2013)

แม้ว่าการศึกษาดังกล่าวข้างต้น มุ่งเน้นไปที่การค้นหาพืชสมุนไพรที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งได้ โดยทั้งหมดออกฤทธิ์ยับยั้งแบบผันกลับไม่ได้และมีเพียงสารสำคัญจากพืช (ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว) ในกลุ่ม alkaloids, phenols และ anthraquinones ที่มีรายงานถึงฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ MAO A และ MAO B แบบผันกลับได้ (Kong et al., 2004) และยังไม่มียางานที่ชี้ชัดถึงการนำมาใช้ทางการแพทย์เพื่อช่วยลดอาการของโรคทางสมองดังกล่าว แต่ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารสำคัญจากพืชออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ MAO ในสมองของมนุษย์และสัตว์ได้ และน่าจะเป็นแหล่งในการนำมาใช้ทำการศึกษาเพื่อบรรเทาหรือป้องกันอุบัติการณ์การเกิดโรคทางสมองต่อไปได้เช่นเดียวกับสารสังเคราะห์ทางเคมีต่างๆ

ด้วยเหตุที่การค้นหาสารสำคัญจากสมุนไพรที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B ที่ปลอดภัยและมีประสิทธิภาพในการรักษาโรคโดยปราศจากผลข้างเคียงนั้น จำเป็นต้องใช้เอนไซม์ MAO จากสมองมนุษย์ในปริมาณมากซึ่งเอนไซม์ MAO บริสุทธิ์ของมนุษย์ที่สามารถสั่งซื้อจากบริษัทสารเคมีต่างๆมีค่าใช้จ่ายสูง ไม่เหมาะสมกับการนำมาเป็นตัวตรวจสอบเบื้องต้นในการศึกษาเพื่อค้นหาสารสำคัญจากพืชสมุนไพรจากธรรมชาติที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MAO ในหลอดทดลอง ดังนั้นเพื่อเป็นการประหยัดค่าใช้จ่ายและพัฒนาระบบตรวจสอบที่ง่ายและรวดเร็วเหมาะสมในการตรวจสอบฤทธิ์การยับยั้งเบื้องต้น ผู้วิจัยได้ทำการใช้สมองหมู (*Sus domesticus*) ที่มีรายงานว่ามีการทำงาน การกระจายตัวและสัดส่วนของเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B ใกล้เคียงกับมนุษย์คือร้อยละ 25 ต่อร้อยละ 75 ตามลำดับ (Abell et al., 2001; Bai et al., 2005; Saura Marti et al., 1990; Tipton et al., 1968a) เช่นเดียวกับสมองของหนู rat (*Rattus norvegicus*) ที่ได้มีการนำมาใช้ตรวจสอบการยับยั้งการทำงานของสมุนไพรอย่างแพร่หลาย (Jager et al., 2013; Kong et al., 2004; Lin et al., 2003; Stafford et al., 2007) โดยเตรียมสารละลายโปรตีนจากไมโทคอนเดรียจากสมองหมู (ดัดแปลงจาก Tipton, 1968b) โดยพัฒนาวิธีตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ MAO ใดๆก็ตามตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ MAO ในปัจจุบันจะใช้กลไกการตรวจสอบ H_2O_2 ที่เกิดขึ้นโดยสารเรืองแสงหรือ dye เร่งการเกิดปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ horseradish peroxidase (HRP) และตรวจวัดด้วย fluorescence spectroscopy ซึ่งใช้ชุด kit ในการตรวจวัด ชุด kit มีราคาที่สูง ผู้วิจัยจึงพยายามพัฒนาระบบการตรวจสอบที่ว่องไวและมีประสิทธิภาพที่สามารถใช้ตรวจสอบ MAO activity ได้โดยใช้สาร KI และสาร ABTS ที่สามารถตรวจสอบการมีอยู่ของ H_2O_2 ได้คล้ายกันกับชุด kit และนำมาใช้ค้นหาสารสกัดจากสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO จากสมองหมู

บทที่ 3

สารเคมีและวิธีการทดลอง

3.1 สารเคมี

1. 0.25M Sucrose buffer pH 7.5
2. Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) ($C_6H_5CH_2SO_2F$) บริษัท Bio Basic INC. ประเทศแคนาดา
3. potassium iodide (KI) บริษัท Carlo erba ประเทศสหรัฐอเมริกา
4. hydrogen peroxide (H_2O_2)
5. Tris-Hydrochloride ยี่ห้อ Promega บริษัท Promega Corporation ประเทศสหรัฐอเมริกา
6. Ethyl alcohol absolute (C_2H_5OH) MW 46.070 บริษัท Carlo erba ประเทศสหรัฐอเมริกา
7. Tyramine ,97% บริษัท Acros ประเทศสหรัฐอเมริกา
8. Hydrochloric acid (HCl) MW 36.46 บริษัท Carlo erba ประเทศสหรัฐอเมริกา
9. Glycerol ($CH_2OHCHOHCH_2OH$) MW 92.095 บริษัท Bio Basic INC. ประเทศแคนาดา
10. Ethyl Acetate (EA) บริษัท Carlo erba ประเทศสหรัฐอเมริกา
11. Hexane บริษัท Carlo erba ประเทศสหรัฐอเมริกา
12. 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) หรือ ABTS บริษัท Sigma-Alorich ประเทศสหรัฐอเมริกา
13. Horseradish peroxidase หรือ HRP บริษัท Sigma-Alorich ประเทศสหรัฐอเมริกา
14. Monoamine oxidase A (MAO-A), Monoamine oxidase B (MAO-B) บริษัท Sigma-Alorich ประเทศสหรัฐอเมริกา
15. (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) หรือ HEPES buffer บริษัท อิตาลีมาร์ (ประเทศไทย) จำกัด
16. Monoamine Oxidase Assay Kit บริษัท Sigma-Alorich ประเทศสหรัฐอเมริกา
17. Bardford ยี่ห้อ Bio-rad บริษัท Bio-rad Laboratories, Inc ประเทศสหรัฐอเมริกา
18. น้ำกลั่น ภาควิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยบูรพา
19. Sodium chloride (NaCl) MW 58.443 บริษัท Carlo erba ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2 สมุนไพรในการศึกษาครั้งนี้

- เก๊กฮวย (*Dendranthema indicum* L. หรือ *Chrysanthemum indicum* L.)
- รางจืด (*Thunbergia laurifolia* Lindl.)
- กระจับปี่ (*Hibiscus sabdariffa* L.)
- มะตูม (*Aegle marmelos* (L.) Carrea)
- ดอกคำฝอย (*Carthamus tinctorius* L.)
- โโกศเขมา (*Atractylodes lancea* (Thunb.) DC.)
- โกงน้ำเต้า (*Rheum officinale* Baill.)
- โกงเชียง (*Angelica sinensis* (Oliv.) Diels)
- ทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz)
- โกงหัวบัว (*Ligusticum sinense* Oliv. cv. Chuanxiong Hort)
- โกงกระดูก (*Saussurea lappa* Clarke)
- หญ้าหมอน้อย (*Vernonia cinerea*)
- ปอกะปิต (*Helicteres isora* L.)
- หญ้าหนวดแมว (*Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq.)

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเตรียมสมุนไพร

สมุนไพรทั้งหมดซื้อจากร้านสมุนไพรสี่ทองตั้งอยู่ในจังหวัดชลบุรี พืชสมุนไพรที่เตรียมทำสารสกัดเองคือ เก๊กฮวยและรางจืด แล้ว จากนั้นนำพืชสมุนไพรมาบดให้ละเอียดแบ่งพืชสมุนไพรใส่ถุงผ้าดิบ ถุงละ 50 กรัม นำไปแช่ใน 95% เอทานอลในสัดส่วน 1 กรัม : 10 มิลลิลิตร แล้วทำการเขย่าโหลแก้ว 3 ครั้งต่อวัน เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นทำการกรองสารสกัดด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 (ทำการสกัด 3 ครั้ง) นำส่วนสกัดเอทานอลที่ได้ไปทำการระเหยตัวทำละลายเอทานอลด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน จากนั้นเก็บสารละลายไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะทำการทดลอง ในส่วนของพืชสมุนไพรกระจับปี่, มะตูม, ดอกคำฝอย, โกงเขมา, โกงน้ำเต้า, โกงเชียง, ทองพันชั่ง, โกงหัวบัว, โกงกระดูก, หญ้าหมอน้อย, ปอกะปิต, หญ้าหนวดแมว ได้รับจากคุณธัญญาภรณ์ วงศ์ศรี

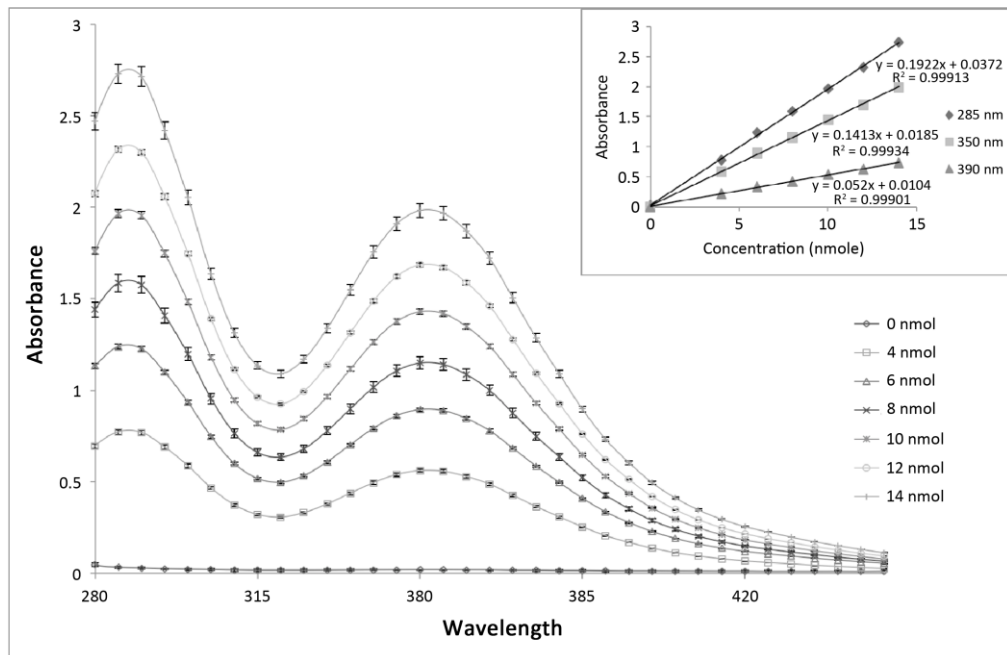
3.3.2 การเตรียมและการทำบริสุทธิ์สารละลายโปรตีนจากไมโทคอนเดรียจากสมองหมู

ทำการซื้อสมองของหมูที่เพิ่งเสียชีวิตจากโรงฆ่าสัตว์และถูกรักษาไว้ด้วยความเย็นจากร้านค้าในตลาดสดจังหวัดชลบุรี จากนั้นทำการแช่สมองหมูที่ได้ลงในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.25 M Sucrose pH 7.6 ปริมาตร 9-10 เท่าของน้ำหนักสมองที่ได้ (w/v) ปั่นสมองหมูที่ได้ในเครื่องปั่นเป็นเวลา 1-2 นาที (ใส่ 5 mM PMSF) จากนั้นปั่นเหวี่ยงสารละลายสีชมพูเข้มที่ได้ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่เก็บได้ไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ 5,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนใสที่เก็บได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา

30 นาที เก็บตะกอนที่ได้และเก็บสารละลายที่เป็นส่วนใสโปรตีนไว้ที่ -80 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้ (ดัดแปลงจาก Jager et al., 2013; Kong et al., 2004; Lin et al., 2003; Stafford et al., 2007; Tipton, 1968b)

3.3.3 ตรวจสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ MAO จากสมองหมูด้วยสารละลายโพแทสเซียมไอโอไดร์

3.3.3.1 ใส่สารละลายของ 1M KI ปริมาตร 500 μ l , 0.88mM H₂O₂ และ 1M buffer Tris-HCl ในคิวเวตซึ่งมีปริมาตรรวมเท่ากับ 1000 μ l ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrometer ที่ความยาวคลื่น 288 และ 353 นาโนเมตร โดยใช้สารละลาย H₂O₂ ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน 100 μ M, 55 μ M, 27.5 μ M, 13.75 μ M, 6.875 μ M และ 3.4 μ M



ภาพที่ 3-1 spectrum การดูดกลืนแสงของ KI ที่มาจากปฏิกิริยาการตรวจสอบการมีอยู่ของ H₂O₂ ภาพเล็กแสดงถึงตัวอย่างของกราฟมาตรฐานเมื่อวัดการเกิด I₂ ที่ความยาวคลื่น 285 nm, 350 nm และ 490 nm ตามลำดับ (Sanders et al., 2014)

3.3.3.2 นำสารละลายส่วนใสของสมองหมู (11.71 μ g Protein) บ่มกับสารตั้งต้นTyramine ที่ความเข้มข้น 0.5 mM และบัฟเฟอร์ Tris-HCl ในหลอดเอฟเฟนดอร์ป เติมไฮโดรคลอริก 50 ไมโครลิตร เพื่อทำการหยุดปฏิกิริยาในช่วงเวลาต่างๆ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสไว้และใส่โพแทสเซียมไอโอไดร์ 500 ไมโครลิตร จากนั้นทำการวัดด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 288 และ 353 นาโนเมตร และคำนวณหาอัตราเร็วของปฏิกิริยา

3.3.4 ตรวจสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ MAO ด้วย ABTS

เป็นการตรวจสอบโดยใช้โหมด kinetic ในการตรวจวัดกิจกรรมการทำงานของ MAO และพิจารณาจากอัตราการเกิดของปฏิกิริยา และใช้หลายความเข้มข้นของ p-tyramine (5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 500 μ M) โดยบ่ม 50 mM HEPES บัฟเฟอร์ 650 μ l กับสารตั้งต้นTyramine และสารละลาย

15.4µM ABTS กับเอนไซม์ 0.077 Unit HRP จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ MAO (0.084µg Protein) และวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 405 nm

3.3.5 ตรวจสอบการยับยั้งเอนไซม์มอนอามีนออกซิเดสของพืชสารสกัดสมุนไพรไทย

เป็นการตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งเอนไซม์มอนอามีนออกซิเดส เตรียมสารสกัดทุกชนิดที่ทำการทดสอบที่ความเข้มข้น 0.5 mg/ml เพื่อทดสอบความเข้มข้นที่ 10 µg/ml , 50 µg/ml และ 100 µg/ml โดยใช้ บัฟเฟอร์ HEPES จากนั้นใส่สารสกัด และใส่ 8 µM *p*-tyramine, 15.4µM ABTS, 0.077 Unit HRP ผสมให้เข้ากัน จากนั้นวัดความสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ 20 นาที เพื่อดูว่ามีการเกิดปฏิกิริยาอื่น ๆ เกิดขึ้นหรือไม่ก่อนทำการเติมเอนไซม์ MAO เพื่อเริ่มปฏิกิริยา และทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร

3.3.5.1 การยับยั้งด้วยสารยับยั้งมาตรฐาน Pargyline 0.5 mM และ Clorgyline 0.05 mM

ใส่ 50mM HEPES บัฟเฟอร์ 650 µl บ่มกับ Pargyline ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.5µM, 1µM, 1.5µM, 2µM, 4µM, 6µM, 8µM, 10µM) และเติม 8 µM *p*-tyramine กับสารละลาย 15.4µM ABTS และเอนไซม์ 0.077 Unit HRP วัดความสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ 20 นาที ก่อนทำการเติมเอนไซม์ MAO (0.084µg Protein) เพื่อเริ่มปฏิกิริยาและทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร

ใส่ 50mM HEPES บัฟเฟอร์ 650 µl บ่มกับ Clorgyline ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.02µM, 0.03µM, 0.04µM, 0.05µM, 0.1µM, 0.2µM) และเติม 8 µM *p*-tyramine กับสารละลาย 15.4µM ABTS และเอนไซม์ 0.077 Unit HRP วัดความสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ 20 นาที ก่อนทำการเติมเอนไซม์ MAO (0.084µg Protein) เพื่อเริ่มปฏิกิริยาและทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร

3.3.5.3 การยับยั้งด้วยสารสกัดต่อทั้ง MAO-A และ MAO-B

การยับยั้งด้วยสารสกัดต่อทั้ง MAO-A และ MAO-B นั้นจะยังไม่ใส่ด้วยยับยั้งมาตรฐานทั้ง Pargyline 0.5 mM และ Clorgyline 0.05 mM โดยใน 50mM HEPES บัฟเฟอร์ จากนั้นใส่สารสกัดที่ความเข้มข้น 10 µg/ml , 50 µg/ml และ 100 µg/ml บ่มด้วย 8 µM *p*-tyramine กับสารละลาย 15.4 µM ABTS และเอนไซม์ 0.077 U HRP ผสมกัน และนำคิวเวตใส่เครื่อง double beam spectrometer เพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 20 นาที จากนั้นเติมเอนไซม์ MAO (0.084µg Protein) และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ในขณะที่ Control ส่วนที่ไม่ได้ใส่สารสกัดของพืช จะใส่เอทานอล

3.3.5.4. การยับยั้งด้วยสารสกัดต่อ MAO-A

หลักการคือทำการยับยั้งเอนไซม์ MAO-B ด้วย Pargyline ก่อนจะศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MAO-A ด้วยสารสกัดพืชทั้ง 14 ชนิด โดยบ่ม 1 µM Pargyline กับเอนไซม์ MAO (0.084µg Protein) ที่ไว้ 5 นาที เพื่อยับยั้งกิจกรรม MAO-B ในขณะที่รอบ่ม ใส่ 50mM HEPES บัฟเฟอร์ 650 µl ลงในคิวเวต จากนั้นใส่สารสกัดที่ความเข้มข้น 10 µg/ml , 50 µg/ml และ 100 µg/ml และบ่ม 8 µM *p*-tyramine กับสารละลาย 15.4µM ABTS และเอนไซม์ 0.077 U HRP ผสมกัน และนำคิวเวตใส่เครื่อง double beam spectrometer เพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 20 นาที จากนั้นเติมเอนไซม์ MAO (0.084µg Protein) ที่บ่มร่วมกับ Pargyline 1 µM ที่ไว้ในข้างต้นและทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร

3.3.5.5 การยับยั้งด้วยสารสกัดต่อ MAO-B

หลักการคือทำการยับยั้งเอนไซม์ MAO-A ด้วย Clorgyline ก่อนจะศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MAO-B ด้วยสารสกัดพืชทั้ง 14 ชนิด โดยบ่ม 0.5 µM Clorgyline กับเอนไซม์ MAO (0.084µg Protein) ที่ไว้ 5 นาที

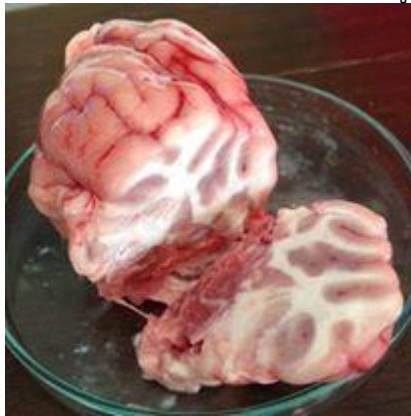
เพื่อยับยั้งกิจกรรม MAO-A ในขณะที่รอป่ม ใส่ 50mM HEPES บัฟเฟอร์ 650 μ l ลงในคิวเวตจากนั้นใส่สารสกัด ที่ความเข้มข้น 10 μ g/ml , 50 μ g/ml และ 100 μ g/ml บ่มด้วย 8 μ M *p*-tyramine กับสารละลาย 15.4 μ M ABTS และเอนไซม์ 0.077 U HRP ผสมกัน และนำคิวเวตใส่เครื่อง double beam spectrometer เพื่อวัดค่า การดูดกลืนแสงประมาณ 20 นาที จากนั้นเติมเอนไซม์ MAO (0.084 μ g Protein) ที่บ่มร่วมกับ clogyline 0.5 μ M ทิ้งไว้ในข้างต้นและทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การเตรียมเอนไซม์ MAO จากสมองหมู

นำสมองหมูที่ได้จากหมูที่เสียชีวิตแล้ว (ภาพที่ 4-1) มาทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง(หัวข้อ 3.4.2) จะได้ส่วนตะกอนกับส่วนใสที่มีไมโทคอนเดรียที่มีเอนไซม์ MAO อยู่

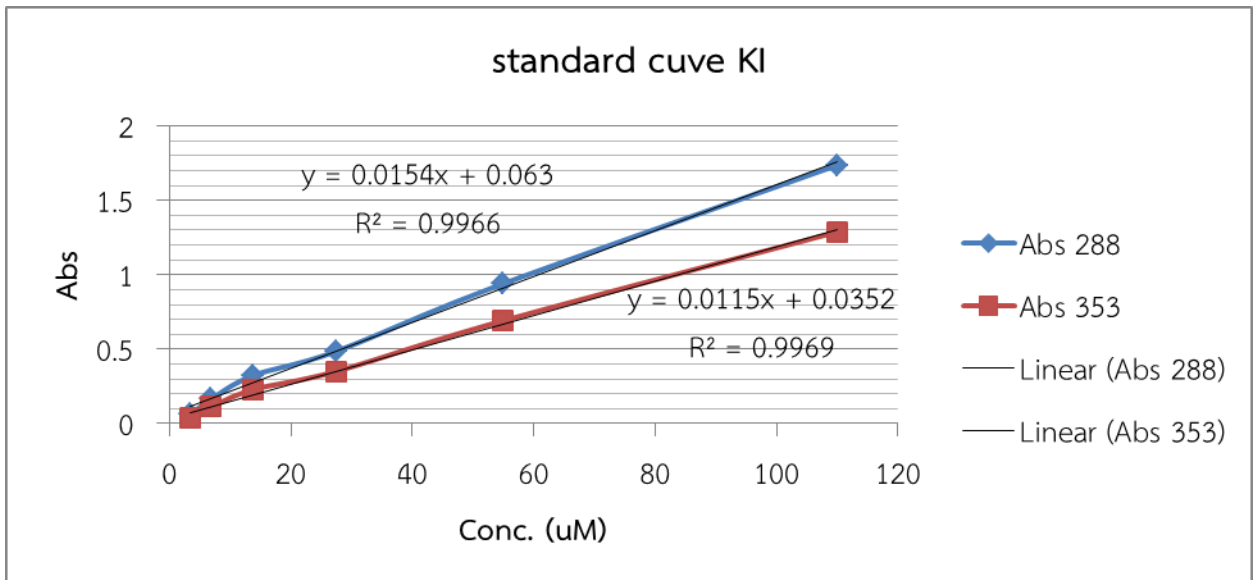


ภาพที่ 4-1 สมองหมูที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์

4.2 การตรวจสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ MAO ด้วยสารละลาย KI

4.2.1 การทำปฏิกิริยาของสารละลายโพแทสเซียมไอโอไดร์ (KI) กับสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) มาตรฐาน

ตรวจสอบการทำปฏิกิริยาระหว่างสารตรวจสอบ KI และผลิตภัณฑ์ H_2O_2 โดยใช้สารละลาย 1M KI, 0.88 mM H_2O_2 ในสารละลาย 1M buffer Tris-HCl จากนั้น ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrometer ที่ความยาวคลื่น 200 – 500 นาโนเมตร พบว่าสารละลาย KI ทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 มาตรฐาน ได้ผลิตภัณฑ์ I_2 ที่ตรวจสอบได้ที่ความยาวคลื่น 288 และ 353 นาโนเมตรจากนั้นสร้างกราฟมาตรฐาน โดยใช้สารละลาย H_2O_2 ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่าสาร KI ที่เกิดขึ้นมีความสามารถในการดูดกลืนแสงโดยมีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงที่ 288 nm และ 535 nm ดังภาพที่ 4-2

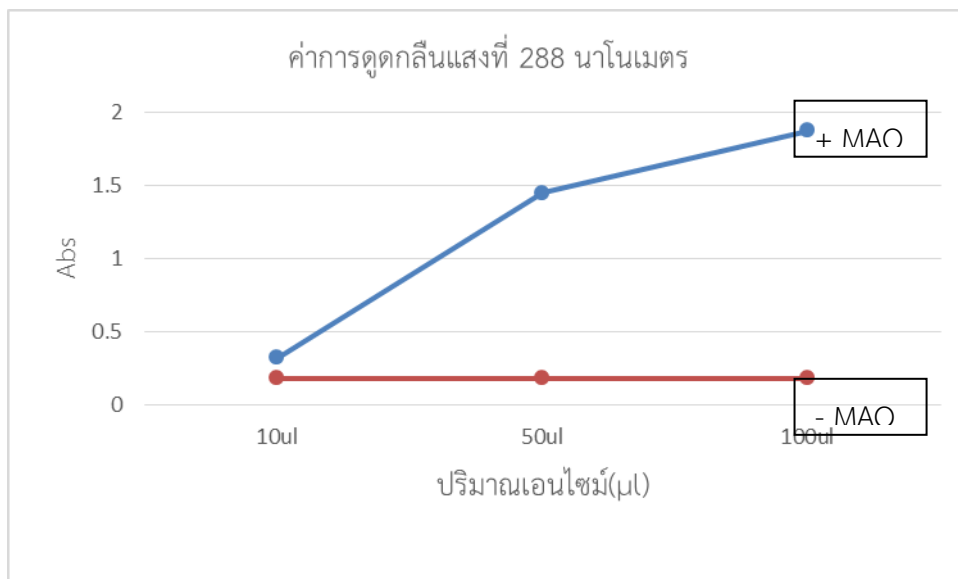


ภาพที่ 4-2 กราฟมาตรฐานการดูดกลืนแสงที่ 280 nm และ 535 nm ของผลิตภัณฑ์ I_2 ที่ความเข้มข้นของสารละลาย H_2O_2 ต่าง ๆ

4.2.2 การตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ MAO จากส่วนไส้ของสมองหมู

ตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ MAO ในการทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น tyramine ในสารละลาย 1M Tris-HCl pH 7.5 จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย 2N HCl ที่เวลาต่าง ๆ ผลการทดลองพบว่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ MAO เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 4-3 และ 4-4)

อย่างไรก็ตามการตรวจสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ MAO ด้วยสารละลาย KI พบว่าไม่เหมาะสมสำหรับตรวจสอบกิจกรรมของ MAO เนื่องจากสามารถเกิดปฏิกิริยาต่อเนื้อได้ แม้จะหยุดปฏิกิริยาด้วย HCl เกิดเป็นสีเหลืองของ I_2 ปรากฏขึ้นเมื่อเวลาผ่านไปทำให้การใช้สารละลาย KI อาจไม่เหมาะสมในการตรวจสอบยืนยันถึงกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ MAO



ภาพที่ 4-3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 288 นาโนเมตรของการทดสอบตรวจติดตามการเกิดผลิตภัณฑ์ H_2O_2 ด้วยสารละลาย KI ซึ่งจะทำให้การหยุดปฏิกิริยาด้วย 2N HCl ที่เวลา 30 นาที

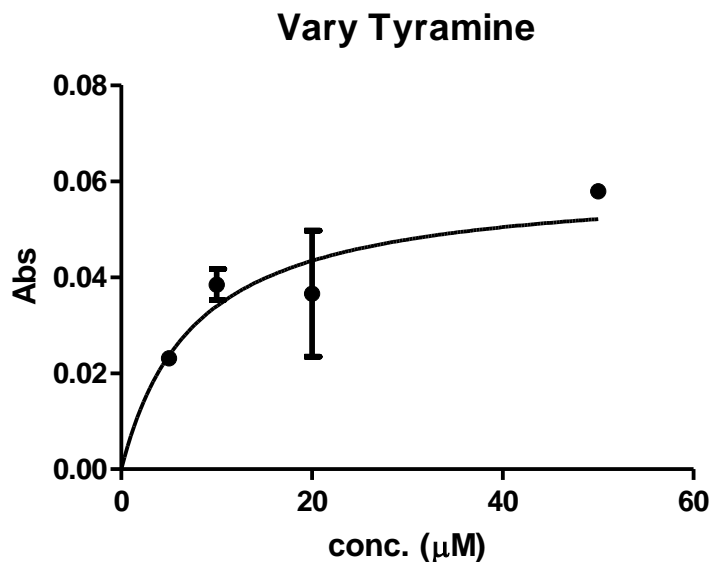


ภาพที่ 4-4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 353 นาโนเมตรของการทดสอบตรวจติดตามการเกิดผลิตภัณฑ์ H_2O_2 ด้วยสารละลาย KI ซึ่งจะทำให้การหยุดปฏิกิริยาด้วย 2N HCl ที่เวลา 30 นาที

4.3 การตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO ด้วย ABTS assay

4.3.1 การวัดการทำงานของ MAO ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ MAO จากสารตั้งต้น tyramine ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และนำมาวิเคราะห์ผล พิจารณาจากค่า K_m ที่ได้ (GraphPad Prism 5) พบว่าค่า K_m ของเอนไซม์ MAO ต่อสารตั้งต้น tyramine คือ $8 \mu M$ ภาพที่ 4-5



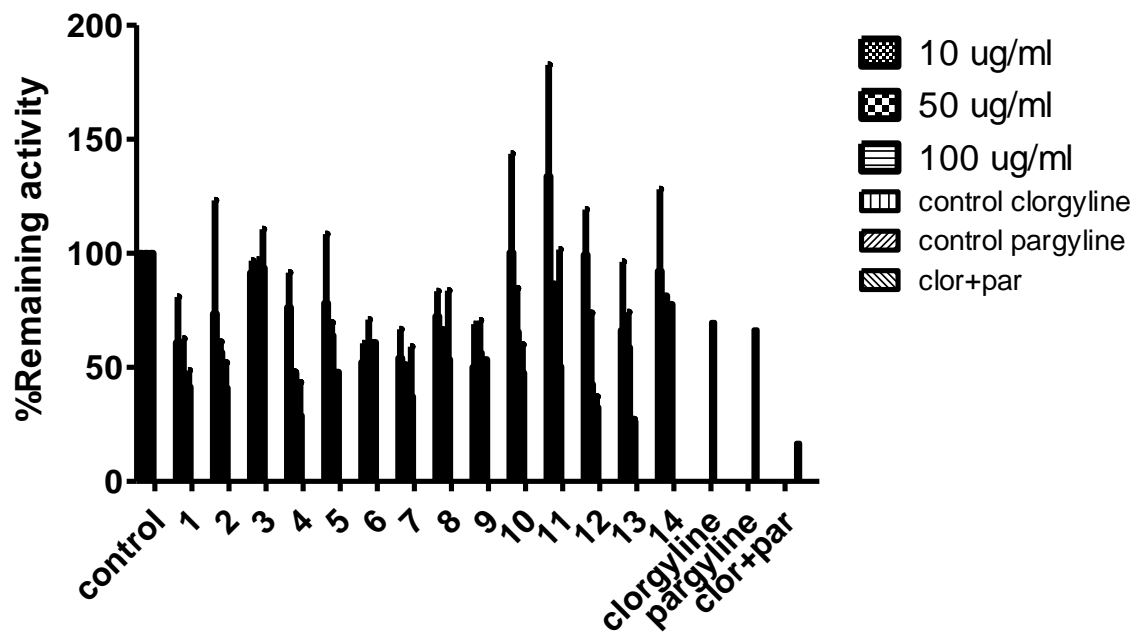
ภาพที่ 4-5 ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารตั้งต้น tyramine ที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ MAO การทดลองทำสามซ้ำและวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม GraphPad Prism5

4.3.2 การยับยั้ง MAO-A และ MAO-B

เป็นการตรวจสอบโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ในการตรวจวัดกิจกรรมการทำงานของ MAO และฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดสมุนไพร ที่ความเข้มข้นของ *p*-tyramine $8 \mu M$ ความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ คือ

10 µg/ml, 50 µg/ml และ 100 µg/ml และได้ทำการใส่ตัวยับยั้งเอนไซม์ MAO-A (clorgyline) และ MAO-B (pargyline) เป็นปฏิกิริยาควบคุมในการตรวจสอบกิจกรรมการทำงานของ MAO จากสมองหนู ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดจากโกฐน้ำเต้าออกฤทธิ์ยับยั้งทั้ง MAO-A และ MAO-B ได้ดีที่สุดที่ค่า IC₅₀ 18.58 µg/ml สารสกัดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งได้ตรงลงมา คือโกฐเขมา, เก๊กฮวย, ทองพันชั่ง, มะตูม, ปอกะบิด, หนุ้าหมอน้อย, รางจืด, ดอกคำฝอย, โกฐเจียง, โกฐหัวบัว, โกฐกระดูก, หนุ้าขนาดแมว และกระเจี๊ยบ ที่ค่า IC₅₀ 32.82, 37.89, 38.84, 39.27, 42.97, 50.5, 52.47, 79.37, 85.19, 98.69, 159.6, 300.2 และ 781.9 µg/ml ตามลำดับ

MAO inhibition



หมายเลข 1 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดเก๊กฮวย,
 หมายเลข 3 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดกระเจี๊ยบ,
 หมายเลข 5 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดดอกคำฝอย,
 หมายเลข 7 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดโกฐน้ำเต้า,
 หมายเลข 9 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดทองพันชั่ง,
 หมายเลข 11 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดโกฐกระดูก,
 หมายเลข 13 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดปอกะบิด,

หมายเลข 2 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดรางจืด
 หมายเลข 4 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดมะตูม
 หมายเลข 6 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดโกฐเขมา
 หมายเลข 8 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดโกฐเจียง
 หมายเลข 10 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดโกฐหัวบัว
 หมายเลข 12 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดหนุ้าหมอน้อย
 หมายเลข 14 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดหนุ้าขนาดแมว

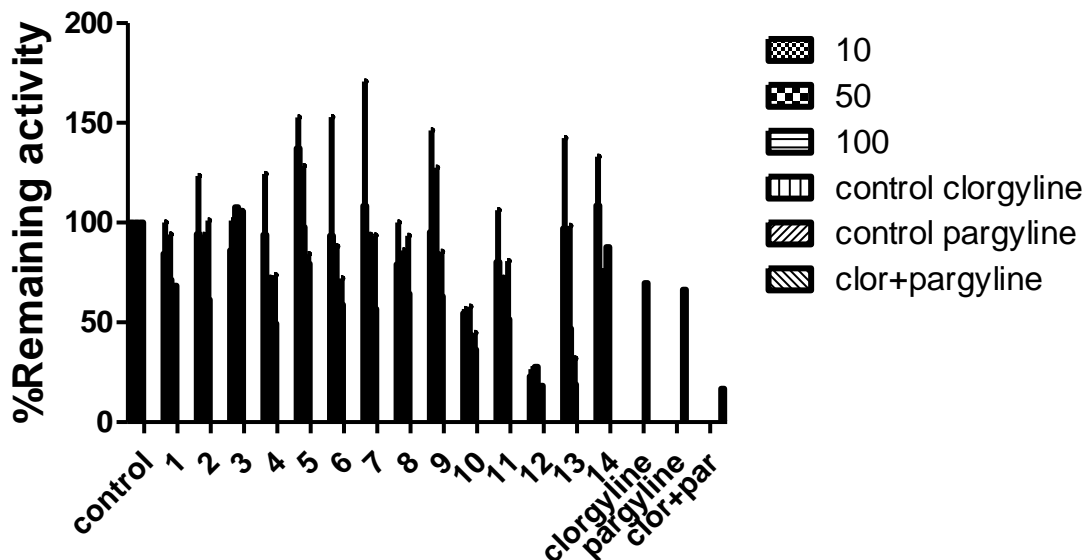
ภาพที่ 4-6 กราฟแสดงการเปรียบเทียบการยับยั้งของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 10, 50 และ 100 µg/ml ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO การทดลองทำสามซ้ำและวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม GraphPad Prism5

4.3.3 ยับยั้ง MAO-A

ทำการบ่มตัวยับยั้งเอนไซม์ MAO-B หรือ pargyline กับเอนไซม์ MAO ก่อนเพื่อยับยั้งเอนไซม์ MAO-B ในสมองหนูก่อนตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ MAO-A ในสมองหนู จากนั้นนำสารสกัดจากพืชสมุนไพรมาใช้ยับยั้งโดยใช้ความเข้มข้น 10 µg/ml, 50 µg/ml และ 100 µg/ml สารสกัดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MAO-A ได้ดีที่สุด คือโกฐกระดูกที่ค่า IC₅₀ 3.526 µg/ml สารสกัดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งได้ตรงลงมา คือโกฐหัวบัว, ปอกะบิด

, โกลูกระดุก, มะตูม, โกลูเซมา, โกลูเจียง, โกลูน้ำเต้า, เก๊กฮวย, รางจืด, ทองพันชั่ง, หนุ่ำนวดแมว และดอกคำฝอย ที่ค่า IC₅₀ 35.82, 43.71, 82.67, 88.64, 113.4, 119.2, 123.7, 133.6, 144, 198.3, 494.3 และ 720.5 µg/ml ตามลำดับ และสารสกัดที่ไม่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MAO-A ได้ คือกระเจี๊ยบ

MAO-A inhibition



หมายเลข 1 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดเก๊กฮวย,
 หมายเลข 3 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดกระเจี๊ยบ,
 หมายเลข 5 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดดอกคำฝอย,
 หมายเลข 7 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดโกลูน้ำเต้า,
 หมายเลข 9 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดทองพันชั่ง,
 หมายเลข 11 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดโกลูกระดุก,
 หมายเลข 13 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดปอกะบิด,

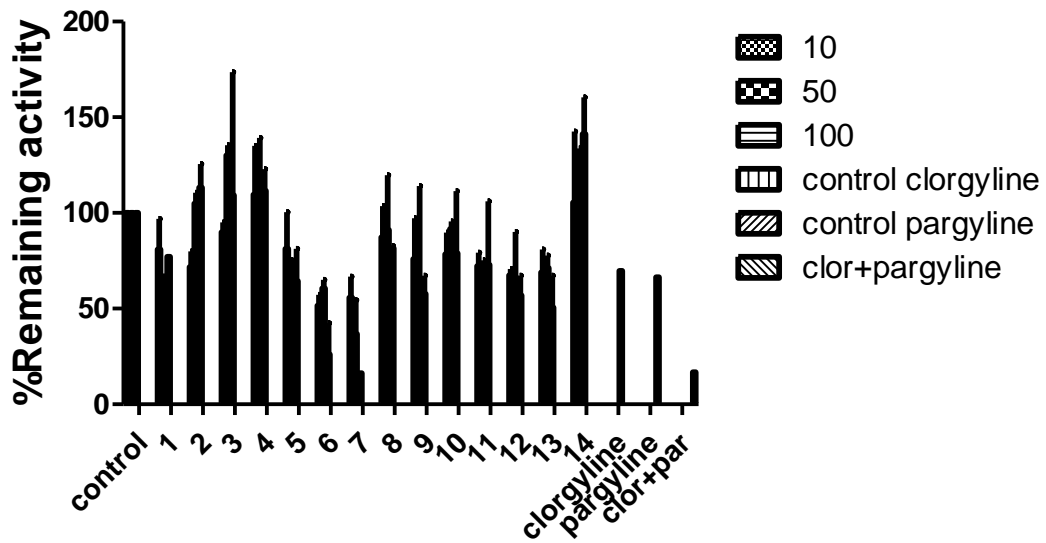
หมายเลข 2 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดรางจืด
 หมายเลข 4 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดมะตูม
 หมายเลข 6 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดโกลูเซมา
 หมายเลข 8 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดโกลูเจียง
 หมายเลข 10 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดโกลูหัวบัว
 หมายเลข 12 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดหนุ่ำนวน้อย
 หมายเลข 14 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดหนุ่ำนวดแมว

ภาพที่ 4-7 กราฟแสดงการเปรียบเทียบการยับยั้งของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 10, 50 และ 100 µg/ml ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A เมื่อยับยั้ง MAO-B ด้วย pargyline ก่อนทำการทดลอง การทดลองทำสามซ้ำและวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม GraphPad Prism5

4.3.4 ยับยั้ง MAO-B

ทำการบ่มตัวยับยั้งเอนไซม์ MAO-A หรือ clorgyline กับเอนไซม์ MAO ก่อนเพื่อยับยั้งเอนไซม์ MAO-A ในสมองหมู่มาก่อนตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ MAO-B ในสมองหมู่มาก่อน นำสารสกัดจากพืชสมุนไพรมาใช้ยับยั้งโดยใช้ความเข้มข้น 10 µg/ml, 50 µg/ml และ 100 µg/ml สารสกัดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MAO-B ได้ดีที่สุดคือโกลูน้ำเต้าที่ค่า IC₅₀ 18.26 µg/ml สารสกัดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งได้ตรงลงมา คือโกลูเซมา, หนุ่ำนวน้อย, ปอกะบิด, ทองพันชั่ง, ดอกคำฝอย, โกลูกระดุก, เก๊กฮวย, โกลูหัวบัว และโกลูเจียง ที่ค่า IC₅₀ 42.96, 87.6, 94.13, 98.97, 133, 151.6, 156.3, 360.9, 425.7 µg/ml ตามลำดับ และสารสกัดที่ไม่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MAO-B ได้ คือรางจืด, กระเจี๊ยบ, มะตูม และหนุ่ำนวดแมว

MAO-B inhibition



หมายเลข 1 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดเก๊กฮวย,
 หมายเลข 3 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดกระเจียบ,
 หมายเลข 5 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดดอกคำฝอย,
 หมายเลข 7 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดโกฐน้ำเต้า,
 หมายเลข 9 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดทองพันชั่ง,
 หมายเลข 11 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดโกฐกระดูก,
 หมายเลข 13 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดปอกระบิด,

หมายเลข 2 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดรางจืด
 หมายเลข 4 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดมะตูม
 หมายเลข 6 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดโกฐเขมา
 หมายเลข 8 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดโกฐเจียง
 หมายเลข 10 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดโกฐหัวบัว
 หมายเลข 12 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดหญ้าหมอน้อย
 หมายเลข 14 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดหญ้าหนวดแมว

ภาพที่ 4-8 กราฟแสดงการเปรียบเทียบการยับยั้งของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 10, 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-B เมื่อยับยั้ง MAO-A ด้วย clorgyline ก่อนทำการทดลอง การทดลองทำสามซ้ำและวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม GraphPad Prism5

บทที่ 5

อภิปราย สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผลการทดลอง

เอนไซม์ Monoamine Oxidase (MAO) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา oxidative deamination ของ neurotransmitters และ biogenic (Davison, 1958) จากคุณสมบัติของเอนไซม์ MAO ในการเกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายสารสื่อประสาท พบว่าได้สารที่เป็นพิษต่อระบบประสาทคือ สารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) และแอมโมเนีย (NH_3) โดยเฉพาะสาร (H_2O_2) ซึ่งสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระอื่นๆ ส่งผลให้เกิดความผิดปกติในการทำงานของไมโทคอนเดรีย (mitochondria) และทำให้เกิดกระบวนการตายของเซลล์ประสาทได้ (Neuronal apoptosis) (Chung et al., 2015) จากสาเหตุข้างต้นทำให้เกิดการศึกษาค้นคว้าผลผลิตยาต่างๆที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO (MAO inhibitor; MAOI) ที่ถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลาย แต่ยาข้างต้นส่งผลกระทบต่อข้างเคียงในผู้ใช้ ส่งผลให้เกิดโรค “Cheese effect” คือ เกิดอาการความดันโลหิตสูงและเลือดออกในสมอง เมื่อผู้ป่วยรับประทานชีส ไวน์หรืออาหารหมักดอง (Brown et al., 1989; Finberg et al., 2011) จึงมีความพยายามหาสารสกัดจากธรรมชาติที่ปลอดภัยและสามารถออกฤทธิ์ยับยั้ง MAO ได้ อย่างไรก็ตามการศึกษาค้นคว้าดังกล่าวต้องใช้เอนไซม์ MAO จากสมองมนุษย์ซึ่งได้มาโดยยากและเป็นข้อจำกัดในการศึกษาค้นคว้า รวมถึงเอนไซม์ MAO บริสุทธิ์ของมนุษย์ที่สามารถสั่งซื้อจากบริษัทสารเคมีต่างๆมีค่าใช้จ่ายสูง ไม่เหมาะสมกับการนำมาเป็นตัวตรวจสอบเบื้องต้นในการศึกษาเพื่อค้นหาพืชสมุนไพรจากธรรมชาติที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MAO ในหลอดทดลอง

จากการพัฒนาระบบในการตรวจสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ MAO ด้วยสมองหมูซึ่งมีรายงานว่าพบเอนไซม์ MAO อยู่ที่บริเวณเยื่อหุ้มชั้นนอกของไมโทคอนเดรีย และมีมีกลไกการทำงาน การกระจายตัวและสัดส่วนของเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B ใกล้เคียงกับมนุษย์คือร้อยละ 25 ต่อร้อยละ 75 ตามลำดับ (Abell et al., 2001; Bai et al., 2005; Saura Marti et al., 1990; Tipton et al., 1968a) ด้วยวิธีการต่าง ๆ ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยทำการเตรียมเอนไซม์ MAO (ดัดแปลงจาก Jager et al., 2013; Kong et al., 2004; Lin et al., 2003; Stafford et al., 2007; Tipton, 1968b) โดยเตรียมสารละลายจากส่วนไมโทคอนเดรียเป็นสารละลายส่วน cytoplasm จากนั้นทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ MAO ด้วยสารละลาย KI ที่มีสมมติฐานที่ว่าเมื่อเอนไซม์ MAO เร่งปฏิกิริยา oxidative deamination ของสารตั้งต้นแล้วได้ H_2O_2 เป็นผลิตภัณฑ์และสามารถตรวจสอบได้โดยสารละลาย KI ที่มีไอโอดีนเป็นส่วนผสม โดย H_2O_2 จะเข้าทำปฏิกิริยาและเกิดเป็นไอโอดีนที่มีสีซึ่ง I_2 สามารถทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 288 นาโนเมตร และ 353 นาโนเมตร (Sanders et al., 2014) ผลการศึกษาพบว่าเกิดสารละลายสีเหลืองของ I_2 ในหลอดทดลองที่ใส่สารละลายเอนไซม์ MAO ในช่วงเวลาที่ทดสอบคือ 20 นาทีเท่านั้น (ไม่พบสีเหลืองของ I_2 ในหลอดควบคุม) อย่างไรก็ตามเมื่อตั้งปฏิกิริยาทิ้งไว้นานกว่า 30 นาทีปรากฏว่าสารละลายมีความเข้มของสีเหลืองเพิ่มขึ้นสอดคล้องกับค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเกิดจากการเกิด auto reaction จากสารละลาย HCl เข้าทำปฏิกิริยาต่อกับ I_2 ดังสมการ



ผู้วิจัยจึงได้ยกเลิกการทดสอบด้วยสารละลาย KI และพยายามพัฒนาระบบการตรวจสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ MAO โดยวิธี ABTS assay ที่ตรวจสอบการมีอยู่ของ H_2O_2 โดยใช้สาร ABTS ทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 ด้วยเอนไซม์ horseradish peroxidase (HRP) ได้ผลิตภัณฑ์คือ ABTS radical cation ($ABTS^+$) เมื่อเกิดปฏิกิริยาจาก ABTS เป็น $ABTS^+$ จะมีสีเขียวและสามารถทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร (Roberta et al., 1999) และได้ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย 2N HCl ที่เวลาต่าง ๆ พบว่า peak จากการดำเนินงานจากกิจกรรมของ MAO ไม่ปรากฏให้เห็นในการทดลอง หรือไม่มี H_2O_2 เกิดขึ้น ซึ่งเกิดจาก HCl มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ HRP (Asud et al., 2011) จึงได้เปลี่ยนวิธีการหยุดปฏิกิริยาโดยการ freeze – thaw ซึ่งวิธีการนี้ตรวจสอบไม่พบกิจกรรมของ MAO เช่นกัน (ไม่แสดงผลการทดลอง)

ทำการศึกษาโดยใช้ชุดตรวจสอบมาตรฐาน (ชุด kit) ที่ตรวจสอบ H_2O_2 ที่เกิดจากการย่อยสลายสารตั้งต้น *p*-tyramine เมื่อสีย้อมหรือ dye ทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 ด้วยแรงของเอนไซม์ horseradish peroxidase (HRP) จะเกิดการเรืองแสงเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารละลายเอนไซม์ MAO จากสมองหมูที่เตรียมขึ้นเพื่อเปรียบเทียบสารตั้งต้น และบัฟเฟอร์ จากการตรวจสอบพบว่าชนิดของ Buffer และ *p*-tyramine ที่เตรียมขึ้นนั้นมีผลต่อกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ MAO (ภาพที่ 4-6) โดยบัฟเฟอร์ที่ใช้คือ Tris-Cl pH 7.4 แต่ผู้วิจัยพบว่าชุดตรวจสอบมาตรฐานใช้ HEPES buffer จึงทำการแก้ไขโดยการเปลี่ยนเป็น HEPES buffer pH 7.5 (Kun Hu et al., 2010; Mazzio et al., 2013) นอกจากนี้ยังพบว่า *p*-tyramine ที่เตรียมขึ้นเองนั้นตกตะกอนได้ง่ายและมีผลต่อกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ MAO ผู้วิจัยจึงทำการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ *p*-tyramine จากชุด kit เพื่อจะเตรียมความเข้มข้นให้ใกล้เคียงกัน จากผลการทดสอบที่ได้ นั้น ความเข้มข้นของ *p*-tyramine ของชุด kit อยู่ที่ประมาณ 0.028 M *p*-tyramine ซึ่งน้อยกว่าความเข้มข้นที่ 0.25 M ที่ผู้วิจัยเตรียมขึ้นประมาณเกือบ 10 เท่า หลังจากนั้นจึงได้ตรวจสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ MAO จากสมองหมูในสถานะใหม่ ในการหาค่า K_m ของเอนไซม์ MAO จากสมองหมูที่มีต่อสารตั้งต้น *p*-tyramine ด้วยวิธีตรวจสอบที่ใช้ ABTS เป็นสารตรวจสอบพบว่าได้ค่า K_m ประมาณ 8 μM ซึ่งใกล้เคียงกับที่เคยมีการศึกษามาก่อนหน้านี้ (Jager et al., 2013; Kong et al., 2004; Lin et al., 2003; Stafford et al., 2007; Tipton, 1968b)

จากนั้นทำการศึกษาค่า K_m ของเอนไซม์ MAO และเพื่อความสะดวกรวดเร็วจึงได้พัฒนาระบบการตรวจคัดกรองด้วย microplate reader ซึ่งเป็นวิธีการที่สะดวกรวดเร็วใช้ปริมาณสารที่น้อย แต่ไม่สามารถตรวจวัดการเกิดปฏิกิริยาในการขึ้นเริ่มต้นได้ (ภาพที่ 4-8) ซึ่งอาจเกิดจากปริมาตรที่น้อยและความแม่นยำในการวัดของเครื่องมือ ผู้วิจัยจึงตรวจฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO จากสมองหมูด้วยเครื่อง double beam spectrometer ที่จะเริ่มปฏิกิริยาโดยใส่เอนไซม์ MAO ทั้งนี้เพราะลำดับการใส่สารในปฏิกิริยามีผลต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยา โดยการใส่ MAO เพื่อเริ่มปฏิกิริยาจะส่งผลให้ค่า initial rate สูงสุด เมื่อเทียบกับการใส่ tyramine เป็นตัวเริ่มปฏิกิริยา (ไม่แสดงผลการทดลอง) ทั้งนี้อาจเนื่องจาก MAO อาจจับกับ ABTS ทำให้เร่งปฏิกิริยาได้ช้า โดยในการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งผู้วิจัยใช้สาร clorgyline, และ pargyline ที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง MAO-A และ MAO-B เป็นปฏิกิริยาควบคุม โดยสารละลายทั้งสองนี้ที่มีกลไกในการยับยั้ง MAO-A และ B แบบไม่ผันกลับ (Zdenek et al., 2010) และค่า k_i ของ clorgyline อยู่ในช่วง 0.02 - 0.05 μM และ k_i ของ pargyline อยู่ในช่วง 0.05 - 1.8 μM (Jiang et al., 2015) โดยในการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้ 2 เท่าของค่า k_i เพื่อเป็นการยืนยันว่าสารละลายทั้ง 2 ชนิดนั้นสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยไม่พบการเกิดปฏิกิริยาในหลอดที่เป็น positive control แต่เมื่อทำการใส่ตัวยับยั้งแค่ตัวใดตัวหนึ่งลงไปพบ activity นั้นหมายถึงตัวยับยั้งสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งอีก isoform หนึ่งเพื่อให้อีกหนึ่ง isoform ที่ไม่ถูกยับยั้งแสดงหน้าที่ในการทำปฏิกิริยา

เมื่อทำการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ MAO ทั้งสอง isoforms จากสารสกัดจากสมองหมูทั้ง 14 ชนิด โดยปฏิกิริยา co-incubation ซึ่งจะใส่สารละลายที่เตรียมทำปฏิกิริยาทั้งหมดลงในคิวเวตและเริ่มปฏิกิริยาโดยใส่เอนไซม์ MAO จากสมองหมู โดยทำการทดสอบกับสารสกัดทั้งหมด 3 ความเข้มข้น 10

µg/ml, 50 µg/ml และ 100 µg/ml แต่ถ้าจะศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดที่มีต่อ MAO-A หรือ MAO-B จะบ่มเอนไซม์ MAO จากสมองหมู่มากับสารมาตรฐานที่ยับยั้งอีก isoform ของ MAO ก่อน (pre-incubation with inhibitor) จากผลการศึกษาสารสกัดที่นำมายับยั้งเอนไซม์ MAO พบว่าสารสกัดจากโกฐน้ำเต้าออกฤทธิ์ยับยั้งทั้ง MAO-A และ MAO-B ได้ดีที่สุดที่ค่า IC₅₀ 18.58 µg/ml สารสกัดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งได้รองลงมา คือโกฐเขมา, เก๊กฮวย, ทองพันชั่ง, มะตูม, ปอกะบิด, หญ้าหมอน้อย, รางจืด, ดอกคำฝอย, โกฐเจียง, โกฐหัวบัว, โกฐกระดุก, หญ้านวดแมว และกระเจี๊ยบตามลำดับ และเมื่อทำการทดลองในการนำสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มายับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A เมื่อยับยั้ง MAO-B ด้วย 1µM pargyline สารสกัดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MAO-A ได้ดีที่สุด คือหญ้าหมอน้อยที่ค่า IC₅₀ 3.526 µg/ml สารสกัดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งได้รองลงมา คือโกฐหัวบัว, ปอกะบิด, โกฐกระดุก, มะตูม, โกฐเขมา, โกฐเจียง, โกฐน้ำเต้า, เก๊กฮวย, รางจืด, ทองพันชั่ง, หญ้านวดแมว และดอกคำฝอยตามลำดับ โดยสารสกัดที่ไม่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MAO-A ได้คือสารสกัดจากกระเจี๊ยบ ในขณะที่เมื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-B เมื่อยับยั้ง MAO-A ด้วย 0.05 µM clorgyline ก่อนทำการทดลอง พบว่าสารสกัดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MAO-B ได้ดีที่สุด คือโกฐน้ำเต้าที่ค่า IC₅₀ 18.26 µg/ml สารสกัดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งได้รองลงมา คือโกฐเขมา, หญ้าหมอน้อย, ปอกะบิด, ทองพันชั่ง, ดอกคำฝอย, โกฐกระดุก, เก๊กฮวย, โกฐหัวบัว และโกฐเจียงตามลำดับ โดยสารสกัดที่ไม่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MAO-B ได้ คือรางจืด, กระเจี๊ยบ, มะตูม และหญ้านวดแมว

โดยสรุปสารสกัดที่ยับยั้ง MAO-A และ MAO-B ได้แตกต่างกันโดยที่สารสกัดที่ยับยั้ง MAO-A ได้ดีที่สุดคือหญ้าหมอน้อยที่ค่า IC₅₀ 3.526 µg/ml และสารสกัดที่ยับยั้ง MAO-B ได้ดีที่สุด คือโกฐน้ำเต้าที่ค่า IC₅₀ 18.26 µg/ml ซึ่งส่วนสารสกัดจากโกฐน้ำเต้านั้นยังออกฤทธิ์ยับยั้งทั้ง MAO-A และ MAO-B ได้ดีที่สุดที่ค่า IC₅₀ 18.58 µg/ml ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พืชสมุนไพรหลายชนิดสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MAO ได้เช่นสารสกัดจากสมุนไพร *Hypericum perforatum* (Butterweck et al., 2002) หรือ *Zanthoxylum schinifolium* (Jo et al., 2002) หรือ *Kaempferia galangal* (Huong et al., 2002) หรือ *Acorus gramineus* (Tao et al., 2005) หรือ β-Carboline จาก *Peganum harmala* (Herraiz et al., 2010) หรือพืชสมุนไพรจากประเทศเดนมาร์ก *Trigonella foenum-graecum*, *Apium graveolens*, *Calluna vulgaris* (Jager et al., 2013) ที่มีรายงานว่าสามารถยับยั้ง MAO-A ได้ดี ในขณะที่จากพืชสมุนไพรจีนที่ทำการศึกษา 27 ชนิดสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO ได้ นั้น สารสกัดจากต้น *Arisaema amurense*, *Lilium brownii* var. *colchesteri*, *Lycium chinense* และ *Uncaria rhynchophylla* ยับยั้งการทำงานของ MAO-B ได้ดีกว่า MAO-A ในหลอดทดลอง (Hou et al., 2005; Lin et al., 2003) เช่นเดียวกับ *Gentiana lutea* (Haraguchi et al., 2004) *Ruta graveolens*, *Schotia brachypetala*, *Mentha aquatica* และ *Gasteria croucheri* ซึ่งเป็นพืชประจำถิ่นในทวีปแอฟริกา (Stafford et al., 2007) หรือ *Phellodendron amurense*, *Cyamopsis psoralioides*, *Glycyrrhiza glabra/uralensis*, *Psoralea corylifolia* ที่นิยมใช้ในประเทศอินเดียยับยั้งการทำงานของ MAO-B ได้ดีกว่า MAO-A ในหลอดทดลอง (Mazzio et al., 2013) และแสดงให้เห็นศักยภาพของพืชสมุนไพรที่สามารถนำมาใช้พัฒนาต่อไปได้

ตาราง 5-1 ค่า IC₅₀ ของสารสกัดแต่ละชนิดในการยับยั้งเอนไซม์ MAO, MAO-A และ MAO-B

สารสกัด	MAO inhibition	MAO-A inhibition	MAO-B inhibition	คุณสมบัติในการออกฤทธิ์ยับยั้ง
	IC ₅₀ (µg/ml)	IC ₅₀ (µg/ml)	IC ₅₀ (µg/ml)	
เก็กฮวย	37.89	133.6	156.3	ยับยั้ง A > B เล็กน้อย
รางจืด	52.47	144	-	ยับยั้ง A ไม่ยับยั้ง B
กระเจียบ	781.9	-	-	ไม่ยับยั้งทั้ง A และ B
มะตูม	39.27	88.64	-	ยับยั้ง A ไม่ยับยั้ง B
ดอกคำฝอย	79.37	720.5	133	ยับยั้ง B > A เล็กน้อย
โกฐเขมา	32.82	113.4	42.96	ยับยั้ง B > A มาก
โกฐน้ำเต้า	18.58	123.7	18.26	ยับยั้ง B > A มาก
โกฐเจียง	85.19	119.2	425.7	ยับยั้ง A > B
ทองพันชั่ง	38.84	198.3	98.97	ยับยั้ง B > A เล็กน้อย
โกฐหัวบัว	98.69	35.82	360.9	ยับยั้ง A > B มาก
โกฐกระดุก	159.6	82.67	151.6	ยับยั้ง A > B เล็กน้อย
หญ้าหมอน้อย	50.5	3.526	87.6	ยับยั้ง A > B มาก
ปอกะบิด	42.97	43.71	94.13	ยับยั้ง A > B เล็กน้อย
หญ้านวดแมว	300.2	494.3	-	ยับยั้ง A แต่ไม่ยับยั้ง B

5.2 สรุปผลการทดลอง

จากคุณสมบัติของเอนไซม์ MAO ในการเกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายสารสื่อประสาท ได้สารที่เป็นพิษต่อระบบประสาทได้แก่ สารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H₂O₂) จึงได้พัฒนาระบบในการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ MAO จากสมมองหมูและตรวจสอบการมีอยู่ของ H₂O₂ ในปฏิกิริยาด้วยวิธีการ ABTS assay และตรวจวัดการเกิดปฏิกิริยาด้วยวิธีการ coupling assay พบว่าสารสกัดที่นำมาทดสอบในการยับยั้งเอนไซม์ MAO สารสกัดที่ยับยั้ง MAO-A และ MAO-B ได้แตกต่างกันโดยที่สารสกัดที่ยับยั้ง MAO-A ได้ดีที่สุด คือหญ้าหมอน้อย ที่ค่า IC₅₀ 3.526 µg/ml และสารสกัดที่ยับยั้ง MAO-B ได้ดีที่สุด คือโกฐน้ำเต้าที่ค่า IC₅₀ 18.26 µg/ml ซึ่งส่วนสารสกัดจากโกฐน้ำเต้านั้นยังออกฤทธิ์ยับยั้งทั้ง MAO-A และ MAO-B ได้ดีที่สุดที่ค่า IC₅₀ 18.58 µg/ml

5.3 ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากสารสกัดจากสมุนไพรไทยบางชนิดยังไม่มีผลสนับสนุนการยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ MAO ที่เด่นชัด จึงควรมีการศึกษาผลด้วยชุดมาตรฐาน (ชุด kit) และ MAO บริสุทธิ์ของมนุษย์ เพื่อเป็นการยืนยันผลสนับสนุนสารสกัดจากสมุนไพรไทยที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MAO ในหลอดทดลองได้

บรรณานุกรม

- Abell CW, Kwan SW. (2001). Molecular characterization of mono amine oxidase A and B. *Prog nucleic Acid Res Mol Biol.* 6, 129-56
- Alves, E., Summavielle, T., Alves, C. J., Gomes-da-Silva, J., Barata, J. C., Fernandes, E., et al. (2007). Monoamine oxidase-B mediates ecstasy-induced neurotoxic effects to adolescent rat brain mitochondria. *Jneurosci.* 27(38), 10203–10210.
- Alves, E., Summavielle, T., Alves, C. J., Custodio, J. B., Fernandes, E., de Lourdes, Bastos M., et al. (2009). Ecstasy-induced oxidative stress to adolescent rat brain mitochondria in vivo: influence of monoamine oxidase type A. *Addict Biol* 14(2), 185–193.
- Aluf, Y., Vaya, J., Khatib, S., Loboda, Y., & Finberg, J. P. (2013). Selective inhibition of mono-amine oxidase A or B reduces striatal oxidative stress in rats with partial depletion of the nigro-striatal dopaminergic pathway. *Neuropharmacology* 65, 48–57.
- Amacher DE. (2010) The effects of cytochrome P450 induction by xenobiotics on endobiotic metabolism in pre-clinical safety studies. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 20(4), 159–166
- 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. (Special issue on 6th Science research conference)*: 185-190.
- Bai C, Meng H, Zhao W, pan Y. (2005) Molecular cloning and characterization of monoamine oxidase A and B genes in Pig. *DNA seq.* 16(3), 161-165
- Bech P, Stage KB, Larsen JK, Vestergaard P, & Gram LF. (2012). The predictive validity of atypical neurovegetative depressive symptoms identified by the first principal component in the DUAG trial of moclobemide versus clomipramine. *J Affect Disord* 140(3), 253–259.
- Benowitz,NL (2008) Clinical pharmacology of nicotine: implications for understanding, preventing and treating tobacco addiction. *Clin Pharmacol Ther* 83:531-541
- Binda C, Wang J, Pisani L, Caccia C, Carotti A, Salvati P, et al. (2007). Structures of human monoamine oxidase B complexes with selective noncovalent inhibitors: safinamide and coumarin analogs. *J Med Chem* 50(23), 5848–5852.
- Bortolato M, Chen K, Shih JC. (2008) Monoamine oxidase inactivation: from pathophysiology to therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev.* 60(13-14):1527-33.
- Butterweck V, Nahrstedt A, Evans J, Hufeisen S, Rauser L, Savage J, Popadak B, Ernsberger P, Roth BL. (2002). In vitro receptor screening of pure constituents of St. John'sWort reveals novel interactions with a number of GPCRs. *Psychopharmacology Bulletin* 162, 193–202.
- Brown CS, Kent TA, Bryant SG, Gevedon RM, Campbell JL, Felthous AR, Barratt ES, Rose RM. (1989) Blood platelet uptake of serotonin in episodic aggression. *Psychiatry Res.* 27, 5–12.
- Caille D, Bergis OE, Fankhauser C, Gardes A, Adam R, Charieras T, et al. (1996). Befloxatone, a new reversible and selective monoamine oxidase-A inhibitor. II. Pharmacological profile. *J Pharmacol Exp Ther* 277(1), 265–277.
- Cesura AM, Pletscher A. (1992) The new generation of monoamine oxidase inhibitors, *Prog. Drug Res.* 38, 171–297.

Chen Y, Ferguson SS, Negishi M, Goldstein JA. (2004) Induction of Human *CYP2C9* by Rifampicin, Hyperforin, and Phenobarbital Is Mediated by the Pregnane X Receptor. *J Pharm Exper Therap.* 308: 495-501

Chen JJ, Swope DM, Dashtipour K. (2007). Comprehensive Review of Rasagiline, a second-generation monoamine oxidase inhibitor, for treatment of Parkinson's disease. *Clinical Therapeutics.* 29(9), 1825-1849.

Cooper A. Glutathione in the brain: disorders of glutathione metabolism. In: Rosenberg R, Prusiner S, DiMauro S, Barchi R, Klunk L (Eds.), *The molecular and genetic basis of neurological disease*. Boston: Butterworth-Heinemann.

DeVore NM, Smith BD, Urban MJ and Scott EE (2008) Key residues controlling phenacetin metabolism by human cytochrome P450 2A enzymes. *Drug Metab Disp* 36:2582-2590.

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.

Edmondson D E, Binda C, Wang J, Upadhyay AK., & Mattevi A. (2009). Molecular and mechanistic properties of the membrane-bound mitochondrial monoamine oxidases. *Biochemistry* 48(20), 4220-4230.

Esteban G, Allan J, Samadi A, Mattevi A, Unzeta M, Contelles J-M, Binda C, Ramsay RR. (2014). Kinetic and structural analysis of the irreversible inhibition of human monoamine oxidases by ASS234, a multi-target compound designed for use in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1844, 1104-1110.

Finberg, J. P., & Youdim, M. B. (2002). Pharmacological properties of the anti-Parkinson drug rasagiline; modification of endogenous brain amines, reserpine reversal, serotonergic and dopaminergic behaviours. *Neuropharmacology* 43(7), 1110-1118.

Finberg, J. P., Gross, A., Bar-Am, O., Friedman, R., Loboda, Y., & Youdim, M. B. (2006). Cardiovascular responses to combined treatment with selective monoamine oxidase type B inhibitors and -DOPA in the rat. *Br J Pharmacol* 149(6), 647-656

Finberg, J. P., & Gillman, P. K. (2011). Selective inhibitors of monoamine oxidase Type B and the "cheese effect". In M. B. Youdim, & P. Riederer (Eds.), *International Review of Neurobiology* Vol. 100.(pp.169-190). Burlington: Academic Press.

Finberg JPM. (2014) Update on the pharmacology of selective inhibitors of MAO-A and MAO-B: Focus on modulation of CNS monoamine neurotransmitter release. *Pharmacology & Therapeutics.* 143, 133-152.

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.

Fox HH, Gibas JT. (1953) Synthetic tuberculostats. V. Alkylidene derivatives of iso-nicotinylhydrazine. *J. Org. Chem.* 18, 983-989.

Genser D. (2008) Food and drug interaction: consequences for the nutrition/health status. *Ann Nutr Metab.* 52 Suppl 1:29-32. *Journal of Ethnopharmacology.* 91, 351-355.

Gillman, P. K. (1999). The serotonin syndrome and its treatment. *J Psychopharmacol* 13(1), 100-109.

Gillman, P. K. (2006). A review of serotonin toxicity data: implications for the mechanisms of antidepressant drug action. *Biol Psychiatry* 59(11), 1046-1051.

Gillman, P. K. (2011). Advances pertaining to the pharmacology and interactions of irreversible nonselective monoamine oxidase inhibitors. *J Clin Psychopharmacol.* 31(1), 66–74.

Gillman, P. K., & Whyte, I. M. (2004). Serotonin syndrome. In P. Hadad, S. Dursun, & B. Deakin (Eds.), *Adverse syndromes and psychiatric drugs* (pp. 37–49). Oxford: Oxford University Press.

Green AR, & Youdim MB. (1975). Effects of monoamine oxidase inhibition by clorgyline, deprenil or tranylcypromine on 5-hydroxytryptamine concentrations in rat brain and hyperactivity following subsequent tryptophan administration. *Br J Pharmacol.* 55(3), 415–422.

Hamon M, Blier P. (2013) Monoamine neurocircuitry in depression and strategies for new treatments. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry.* 45, 54–63

Haraguchi H, Tanaka Y, Kabbash A, Fujioka T, Ishizu T, Yagi A. (2004) Monoamine oxidase inhibitors from *Gentiana lutea*. *Phytochemistry.* 65, 2255-2260.

Hare MLC.(1928). Tyramine oxidase: a new enzyme system in liver. *Biochem J* 22 (4), 968–979.

Hauptmann N, Grimsby J, Shih JC, Cadenas E. (1990) The metabolism of tyramine by monoamine oxidase A/B causes oxidative damage to mitochondrial DNA. *Arch. Biochem. Biophys.* 335, 295–304

Hazel JR, Williams EE. (1990) The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. *Prog Lipid Res.*29: 167–227.

He X, Chen Y-Y, Shi J-B, Tang W-J, Pan Z-X, Dong Z-Q, Song B-A, Li J, Liu X-H. (2014). New coumarin derivatives: Design, synthesis and use as inhibitors of hMAO. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 22, 3732-3738.

Heikkila RE, Manziolo L, Cabbat FS, & Duvoisin RC. (1984). Protection against the dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine by monoamine oxidase inhibitors. *Nature* 311(5985), 467–469.

Herraz T, González D, Ancín-Azpilicueta C, Arán VJ, Guillén H. (2010). β -Carboline alkaloids in *Peganum harmala* and inhibition of human monoamine oxidase (MAO). *Food and Chemical Toxicology.* 48, 839-845.

Hollenberg PF, Kent UM, Bumpus NN. (2008) Mechanism-Based Inactivation of Human Cytochromes P450s: Experimental Characterization, Reactive Intermediates, and Clinical Implications *Chem. Res. Toxicol.* 21, 189–205

Hou W-C, Lin R-D, Chen C-T, Lee M-H. (2005). Monoamine oxidase B (MAO-B) inhibition by active principles from *Uncaria rhynchophylla*. *Journal of Ethnopharmacology* 100, 216–220.

Hu Z, Yang X, Ho PCL, Chan SY, Heng PWS, Chan E, Duan W, Koh HL and Zhou S. (2005) Herb-Drug Interactions: A Literature Review. *Drugs.* 65 (9): 1239-1282

Hubbard PA, Shen AL, Paschke R, Kasper CB, and Kim JJ P. (2001) NADPH-Cytochrome P450 Oxidoreductase. *J Biol Chem* 276: 29163-29170.

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

Huong DTL, Dat NT, Minh CV, Kang J-S, Kim YH. (2002) Monoamine oxidase inhibitors from *Aquilaria agallocha*. *Natural Product Sciences* 8, 30–33.

Inui H, Maeda A, Ohkawa H. (2007) Molecular Characterization of Specifically Active Recombinant Fused Enzymes Consisting of CYP3A4, NADPH-Cytochrome P450 Oxidoreductase, and Cytochrome b5. *Biochemistry.* 46, 10213-10221.

Itoh M, Nakajima M, Higashi E, Yoshida R, Nagata K, Yamazoe Y, and Yokoi T. (2006). Induction of human CYP2A6 is mediated by Pregnane-X receptor with Peroxisome proliferators-activated receptor-coactivation **1**. *J Pharm Exper Therap.* 319: 693-702

Jager AK, Gauguin B, Andersen J, Adsersen A, Gudiksen L. (2013) Screening of plants used in Danish folk medicine to treat depression and anxiety for affinity to the serotonin transporter and inhibition of MAO-A. *Journal of Ethnopharmacology*. 145, 822–825

Jo YS, Houg DTL, Bae K, Lee MK, Kim YH. (2002). Monoamine oxidase inhibitory coumarin from *Zanthoxylum schinifolium*. *Planta Medica* 68, 84–85.

Jossan SS, Gillberg PG, Gottfries CG, Karlsson I, Orelund L. (1991) Monoamine oxidase B in brains from patients with Alzheimer's disease: a biochemical and autoradiographical study. *Neuroscience*. 45:1–12.

Kirchheiner J Seeringer A. (2007) Clinical implications of pharmacogenetics of cytochrome P450 drug metabolizing enzymes. *Biochimica et biophysica acta*. 1770(3), 489-94.

Kitanaka, N., Kitanaka, J., & Takemura, M. (2005). Inhibition of methamphetamine-induced hyperlocomotion in mice by clorgyline, a monoamine oxidase-a inhibitor, through alteration of the 5-hydroxytryptamine turnover in the striatum. *Neuroscience* 130(2), 295–308.

Knoll J. (2000) (-)Deprenyl (selegiline): past, present and future, *Neurobiology (Bp.)* 8, 179–199.

Kong LD, Cheng CHK, Tan RX. (2004) Inhibition of MAO A and B by some plant-derived alkaloids, phenols and anthraquinones.

Lan NC, Heinzmann C, Gal A, Klisak I, Orth U, Lai E, Grimsby J, Sparkes RS, Mohandas T, Shih JC, (1989) Human monoamine oxidase A and B genes map to Xp 11.23 and are deleted in a patient with Norrie disease, *Genomics* 4 (1989) 552–559.

Langston JW, Irwin I, Langston EB, & Forno LS. (1984). Pargyline prevents MPT induced parkinsonism in primates. *Science* 225(4669), 1480–1482.

Lee SJ, Bell DA, Coulter SJ, Ghanayem B, and Goldstein JA. (2005). Recombinant CYP3A4*17 is defective in metabolizing the hypertensive drug Nifedipine, and the CYP3A4*17 allele may occur on the same chromosome as CYP3A5*3, representing a new putative defective CYP3A haplotype. *J Pharmacol Exp Ther*. 313 (1): 302–309

Legoabe LJ, Petzer A, Petzer J. (2014) α -Tetralone derivatives as inhibitors of monoamine oxidase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 24, 2758-2763.

Lin RD, Hou WC, Yen KY, Lee MH. (2003) Inhibition of monoamine oxidase B (MAO-B) by Chinese herbal medicines. *Phytomedicine*. 10, 650-656.

Lynch T, Price A. (2007) The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects. *Am Fam Physician*. 76(3), 391-6.

Mann, J. J., Aarons, S. F., Wilner, P. J., Keilp, J. G., Sweeney, J. A., Pearlstein, T., et al. (1989). A controlled study of the antidepressant efficacy and side effects of (-)-deprenyl. A selective monoamine oxidase inhibitor. *Arch Gen Psychiatry* 46(1), 45–50.

Mazzio E, Deiab S, Park K, Soilman KFA. (2013) High throughput screening to identify Natural Human monoamine oxidase B inhibitors. *Phytother Res*. 27(6), 818-828.

Naczek M and Shahidi F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *J Pharm Biomed Anal*. 41: 1523–1542

Ogu CC, and Maxa JL. (2000) Drug interactions due to cytochrome P450. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*. 13(4), 421–423.

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

Patil PO, Bari SB, Firke SD, Deshmukh PK, Donda ST, Patil PA. (2013) A comprehensive review on synthesis and designing aspects of coumarin derivatives as monoamine oxidase inhibitors for depression and Alzheimer's disease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 21 , 2434–2450

Pawlowska AG, Oleszek W, Braca A. (2008) Quali-quantitative analysis of flavonoids of *Morus nigra* L. and *Morus alba* L (Moraceae) fruits. *J Agric Food Biochem* 56 (9): 3377-3380

Pelkonen O, Turpeinen M, Hakkola J, Honkakoski P, Hukkanen J, Raunio H (2008) Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Arch Toxicol* 82, 667–715

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

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.

Prins LHA, Petzer JP, Malan SF. (2010) Inhibition of monoamine oxides by indole and benzofuran derivatives. *European journal of Medicinal Chemistry*.45, 4458-4466.

Riederer P, Danielczyk W, Grünblatt E. (2004) Monoamine Oxidase-B Inhibition in Alzheimer's Disease. *NeuroToxicology* 25 (2004) 271–277

Riederer, P., & Laux, G. (2011). MAO—inhibitors in Parkinson's disease. *Exp Neurobiol* 20(1), 1–17.

Saura J, Luque JM, Cesura AM, Da Prada M, Chan-Palay V, Huber G et al. (1994) Increased monoamine oxidase B activity in plaque-associated astrocytes of Alzheimer brains revealed by quantitative enzyme radioautography. *Neuroscience*. 62: 15–30

Schapira AH. (2010). Sildenafil in the treatment of Parkinson's disease. *Expert Opin Pharmacother* 11(13), 2261–2268.

Schapira AH, Stocchi F, Borgohain R, Onofrij M, Bhatt M, Lorenzana P, et al. (2013). Long-term efficacy and safety of sildenafil as add-on therapy in early Parkinson's disease. *Eur J Neurol* 20(2), 271–280.

Scott EE, Spatzenegger M and Halpert JR (2001) A truncation of 2B subfamily cytochromes P450 yields increased expression levels, increased solubility, and decreased aggregation while retaining function. *Arch Biochem Biophys* 395:57-68.

Shioda, K., Nisijima, K., Yoshino, T., & Kato, S. (2004). Extracellular serotonin, dopamine and glutamate levels are elevated in the hypothalamus in a serotonin syndrome animal model induced by tranylcypromine and fluoxetine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28(4), 633–640.

Smith BD, Sanders JL, Porubsky PR, Lushington GH, Stout CD, Scott EE (2007) Structure of the human lung cytochrome P450 2A13. *J Biol chem*. 282:17306-17313

Song MS, Matveychuk D, MacKenzie EM, Duchcherer. (2013) An update on monoamine oxidase inhibitors: Multifaceted drugs. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 44, 118-124.

Stafford GI, Pedersen PD, Jager AK, Staden J. (2007). Monoamine oxidase inhibition by southern African traditional medicinal plants. *South African Journal of Botany*. 73, 384-390.

Tatton W G, & Chalmers-Redman RME. (1996). Modulation of gene expression rather than monoamine oxidase inhibition: (-)-Deprenyl-related compounds in controlling neurodegeneration. *Neurology* 47(Supplement 3), S171–S183.

Tao G, Irie Y, Li D-J, Keung WM. (2005). Eugenol and its structural analogs inhibit monoamine oxidase A and exhibit antidepressant-like activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 13, 4777–4788.

Thomas T. (2000). Monoamine oxidase-B inhibitors in the treatment of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 21, 343–8.

Thomas, D.M., Francescutti-Verbeem, D.M., & Kuhn, D.M. (2009). Increases in cytoplasmic dopamine compromise the normal resistance of the nucleus accumbens to methamphetamine neurotoxicity. *J Neurochem.* 109(6), 1745–1755.

Tipton KF. (1968a) The reaction pathway of Pig brain mitochondrial monoamine oxidase. *European J. Biochem.* 5, 316-320.

Tipton KF. (1968b) The purification of Pig brain mitochondrial monoamine oxidase. *European J. Biochem.* 4, 103-107.

Vaya J, Aluf Y, & Finberg JPM. (2012). Oxidative stress in Parkinson's disease. In N. Gadoth, & H. H. Gobel (Eds.), *Oxidative stress and free radical damage in neurology* (pp. 191–224). New York: Springer-Verlag.

Wongsri T, Rongnoparut P, Sarapusit S. (2014) Inhibition of cytochrome P450 3A4 by Thai herbal teas and fruit juices. *Burapha Science Journal. (Special issue on 6th Science research conference):* 6-12.

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

Yamada M, Yasuhara H. (2004) Clinical pharmacology of MAO inhibitors: safety and future. *Neurotoxicology.* 25, 215-221.

Yamazaki H, Nakamura m, Komatsu T, Ohyama K, Hatanaka N, Asahi S, Shimada N, Guengerich FP, Shimada T, Nakajima M, and Yokoi T. (2002). Roles of NADPH-P450 Reductase and Apo- and Holo-Cytochrome b5 on Xenobiotic Oxidations Catalyzed by 12 Recombinant Human Cytochrome P450s Expressed in Membranes of *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 24, 329–337

Zeller EA, Barsky J. (1952) *In vivo* inhibition of liver and brain monoamine oxidase by 1-isonicotinyl-2-isopropyl hydrazine, *Proc. Soc. Exp. Biol.* 81, 459–461.

รัตนา อินทรานุปกรณ์ (2550) การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร พิมพ์ครั้งที่ 2 คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ 215 หน้า

สถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข (2555) สถิติสาธารณสุข พ.ศ. 2555 ISBN: 08570-3093

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 Rongneparut 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., Rongneparut, 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.**, Rongneparut 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., Rongneparut, 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, เบญจวรรณ 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.