



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 รงคินพรัตน์

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ผศ. ดร. เอกรัฐ ศรีสุข

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ดร. ปณิดา ดวงแก้ว

คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๐

มหาวิทยาลัยบูรพา

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 รงค์นพรัตน์

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ผศ. ดร. เอกรัฐ ศรีสุข

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

อ. ดร. ปณิดา ดวงแก้ว

คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่อง “การพัฒนาระบบตรวจสอบสารยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีน ออกซิเดสในพืชสมุนไพรไทย เพื่อใช้ป้องกันโรคทางสมองและบำบัดอาการติดยา” สามารถมีผลการทดลองที่ก้าวหน้ามาจนได้เสร็จสมบูรณ์ เป็นรายงานฉบับนี้ ต้องขอขอบคุณการสนับสนุนทุนวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๐ มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา ๑๒/๒๕๖๐ ซึ่งผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้ นอกจากนี้แล้วผู้วิจัยขอขอบคุณนิสิต-นักศึกษาทุกคนที่ช่วยทำการทดลอง รวมถึงคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาและคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดลที่ให้ความสนับสนุนด้านสถานที่และเครื่องมือต่างๆในการทำการทดลอง

คณะผู้วิจัย

บทคัดย่อ

ชื่อโครงการ การพัฒนาระบบตรวจสอบสารยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีน ออกซิเดสในพืชสมุนไพรไทยเพื่อใช้ป้องกันโรคทางสมองและบำบัดอาการติดยา

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

โรคทางระบบประสาทเช่น โรคซึมเศร้า โรคสมาธิสั้นและโรควิตกกังวลรวมไปถึงโรคพาร์กินสัน เป็นโรคที่พบมากขึ้นในปัจจุบัน โดยหนึ่งในสาเหตุหนึ่งที่สำคัญของอุบัติการณ์โรคเหล่านี้เกิดจากการทำงานของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส (monoamine oxidase : MAO) ทั้ง 2 isoform คือ MAO-A และ MAO-B การศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยเปรียบเทียบผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO จากสมอทอง (Sus domesticus) กับเอนไซม์ MAO จากมนุษย์ ทำการค้นหายาสำคัญในพืชสมุนไพรที่ออกฤทธิ์เอนไซม์ MAO และศึกษากลไกในการยับยั้งเอนไซม์ MAO รวมถึงเอนไซม์ CYP2A6 ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายนิโคตินและการเสพติดบุหรี่ ผลการศึกษาพบว่าเอนไซม์ MAO จากสมอทองสามารถนำมาใช้ในการทดสอบเบื้องต้นถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO ได้ โดยมีค่าประสิทธิภาพในการยับยั้งแตกต่างจากค่า MAO ของมนุษย์ อย่างไรก็ตามวิธีการในการตรวจสอบส่งผลต่อประสิทธิภาพในการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MAO ด้วยเช่นกัน โดยควรใช้สารตั้งต้นเรืองแสง kynuramine แทนที่วิธีการมาตรฐานที่ใช้การปฏิกิริยา coupling assay ของสารตรวจสอบ ABTS และเอนไซม์ HRP เมื่อทำการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งโดยวิธี Bio-assay guide isolation ผู้วิจัยได้สารสำคัญ 1 ชนิด (Rheum1) จากสมุนไพรโกฐน้ำเต้าที่ยังไม่สามารถระบุโครงสร้างได้ และสารสำคัญ 3 ชนิด (Rhinacanthin-A, -B, และ -C) จากสมุนไพรทองพันชั่ง โดยสารสำคัญ Rheum1 ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MAO-B ได้ดีที่สุดด้วยค่า IC_{50} 3.48 μ M และสาร Rhinacanthin-B ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MAO-A ได้ดีที่สุดด้วยค่า IC_{50} 17.21 μ M โดยสารทั้งสองออกฤทธิ์ยับยั้งแบบผันกลับได้ เมื่อนำมาศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 พบว่าสารสำคัญ Rheum1 ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ด้วยค่า IC_{50} 19.12 μ M ซึ่งมากกว่า Rhinacanthin-A ที่เคยมีรายงานว่ายับยั้งการทำงานของ CYP2A6 ด้วยค่า IC_{50} 1.88 μ M (Pouyfung et al., 2014) ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าสารสำคัญที่ได้ สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ถึง 3 เอนไซม์ และเป็นข้อมูลสำคัญในการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ลดหรือป้องกันโรคทางสมองหรือลดการสูบบุหรี่จากสมุนไพรไทยต่อไป

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) in both forms; MAO-A and MAO-B, have been report as an important mechanism of these neurological diseases development. This study aims to develop an assay method by comparing the inhibitory activity of medicinal plants against pig (*Sus domesticus*) brain MAOs enzymes and human MAOs enzymes. The plant constituents that could potently inhibit MAOs enzymes were selected, purified and characterized. The inhibitory activity against MAOs enzymes and CYP2A6 enzyme, the nicotine metabolizing enzyme, were investigated. Although species different did affect the inhibitory potency, pig brain MAO can be used as a preliminary step for MAO inhibitor screening. The difference in inhibitory constant values suggested that the kynuramine fluorescence substrate was more reliable and suitable for MAO inhibition assay compared to an indirect standard coupling assay using ABTS and HRP enzymes. Rheum1 and Rhinacanthin-A,-B, and-C were successfully isolated and purified by bio-assay guide isolation from *Rheum officinale* and *Rhinacanthus nasutus*, respectively. With reversible mode of inhibition, Rheum1 was the potent MAO-B inhibitor with an IC_{50} value of 3.48 μ M while Rhinacanthin-B was the potent MAO-A inhibitor (IC_{50} of 17.21 μ M). In addition, Rheum1 could reversibly inhibit CYP2A6 activity with an IC_{50} value of 19.12 μ M. However, Rhinacanthin has been reported its potency as an irreversible CYP2A6 inhibitor by Pouyfung et al., 2014. Rhinacanthin-A was the best CYP2A6 inhibitor with IC_{50} 1.88 μ M. These results suggested that all isolated constituents could efficiently inhibited MAO-A, MAO-B, and CYP2A6 enzymes and could be apply for either food supplement for prevention of neurological diseases or smoking cessation.

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

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 การศึกษาในช่วงต้นผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการใช้เอนไซม์ MAO จากสมองหมู (*Sus domesticus*) ที่มีรายงานว่ามีการทำงาน การกระจายตัวและสัดส่วนของเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B ใกล้เคียงกับมนุษย์ (Abell et al., 2001; Bai et al., 2005; Saura Marti et al., 1990; Tipton et al., 1968a) มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MAO ของสารสำคัญจากสมุนไพร จากนั้นทำการศึกษาเปรียบเทียบกับเอนไซม์ MAO ของมนุษย์ เพื่อทดสอบว่าจะสามารถนำเอนไซม์ MAO ในสมองหมูมาใช้ทดแทนการสังเคราะห์เอนไซม์ MAO มนุษย์ที่มีราคาแพงได้หรือไม่ รวมถึงค้นหาสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MAO ของมนุษย์

และทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ที่ย่อยสลายนิโคติน และเกี่ยวข้องกับการลดการสูบบุหรี่ เพื่อนำไปใช้ลดหรือป้องกันโรคทางสมองและช่วยลดการสูบบุหรี่ได้ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เปรียบเทียบผลการยับยั้งของสารสกัดพืชสมุนไพรที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ MAO จากสมองหมับเอนไซม์ MAO จากมนุษย์
2. ศึกษาสารสำคัญและกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งของสารสำคัญที่ได้

1.3 สมมติฐานของการทดลอง

สามารถใช้เอนไซม์ MAO จากสมองหมูมาพัฒนาให้ใช้ตรวจสอบฤทธิ์ของสารสำคัญในสมุนไพรที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ MAO ของมนุษย์ได้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการทดลอง

1. ได้ระบบตรวจสอบการทำงานของ MAO ที่ง่ายและมีประสิทธิภาพ
2. สามารถนำสารสกัดจากสมุนไพรที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO มาใช้ในการรักษาโรคทางระบบประสาทและสมองที่เกิดจากการลดลงของสารสื่อประสาท เนื่องจากการกิจกรรมของเอนไซม์ MAO เช่น โรคพาร์กินสัน โรคซึมเศร้า โรคสมาธิสั้น 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

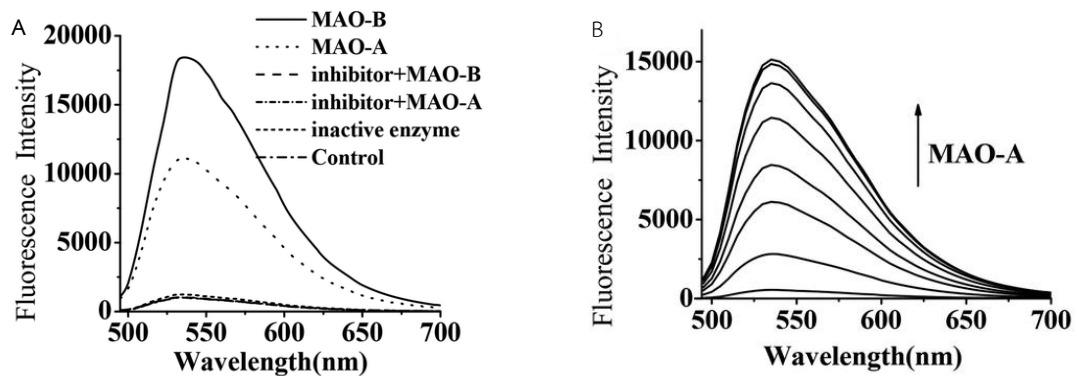


Monoamine oxidase มี 2 รูปแบบ (isoform A และ B: MAO-A และ MAO-B) ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารสื่อประสาทที่มีหมู่เอมีนหนึ่งหมู่ ซึ่ง MAO ทั้งสองรูปแบบนี้มีความแตกต่างกันที่ความจำเพาะเจาะจงของสารตั้งต้นและความไวของตัวยับยั้ง โดย MAO-A จะเด่นในการออกซิไดซ์ serotonin ซึ่งเป็น neurotransmitters 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

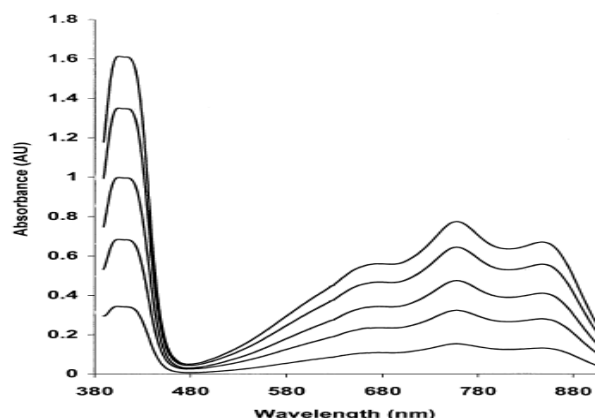
จากคุณสมบัติของเอนไซม์ MAO ในการเกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายสารสื่อประสาท พบว่าได้สารที่เป็นพิษต่อระบบประสาทได้แก่ สารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) และแอมโมเนีย (NH_3) โดยเฉพาะสาร (H_2O_2) ซึ่งสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระอื่นๆ ส่งผลให้เกิดความผิดปกติในการทำงานของไมโทคอนเดรีย (mitochondria) และทำให้เกิดกระบวนการตายของเซลล์ประสาทได้ (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 ด้วย ABTS assay (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) โดยตรวจสอบการมีอยู่ของ H_2O_2 เมื่อสาร ABTS ทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 และเร่งการเกิดปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ horseradish peroxidase (HRP) ได้ผลิตภัณฑ์คือ ABTS radical cation ($ABTS^+$) และ H_2O ดังสมการ เมื่อเกิดปฏิกิริยาจาก ABTS เป็น $ABTS^+$ จะมีสีเขียวและสามารถทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร (Roberta et al., 1999)



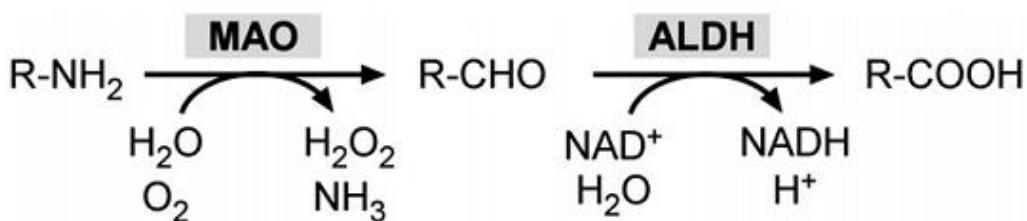
ภาพที่ 2-2 spectrum การดูดกลืนแสงของ ABTS radical cation ที่ความเข้มข้นของ H_2O_2 ต่าง ๆ (Roberta et al., 1999)

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันประชากรไทยมีแนวโน้มที่จะป่วยและเสียชีวิตจากโรคเรื้อรังทางสมองเช่น โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease: AD) โรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease: PD) และมีอุบัติการณ์ของผู้ป่วยเป็นโรค

ทางระบบประสาทเช่น โรคซึมเศร้า (Depression) โรควิตกกังวล (Anxiety disorder) และโรคเครียดจากเหตุการณ์ร้ายแรง (PTSD) มากขึ้น โดยข้อมูลจากกลุ่มภารกิจด้านข้อมูลข่าวสารสุขภาพ สำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ กระทรวงสาธารณสุข ระบุว่า ในปี พ.ศ. 2551 มีผู้ป่วยเสียชีวิตจากกลุ่มอาการเหล่านี้จำนวน 5,093 คน (ต่อประชากร 100,000 คน) หรือร้อยละ 8.1 ของกลุ่มโรคทั้งหมด และในปี พ.ศ. 2555 พบว่าอัตราการดังกล่าวเพิ่มขึ้นเป็นจำนวน 6,207 คน (ต่อประชากร 100,000 คน) หรืออัตราผู้เสียชีวิตร้อยละ 9.7 ของกลุ่มโรคทั้งหมด (สถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข, 2555) ซึ่งสาเหตุหลักร่วมกันของโรคทางสมองเหล่านี้เกิดขึ้นเนื่องจากการลดลงของสารสื่อประสาทที่มีหมู่อะมีนหนึ่งหมู่ (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)

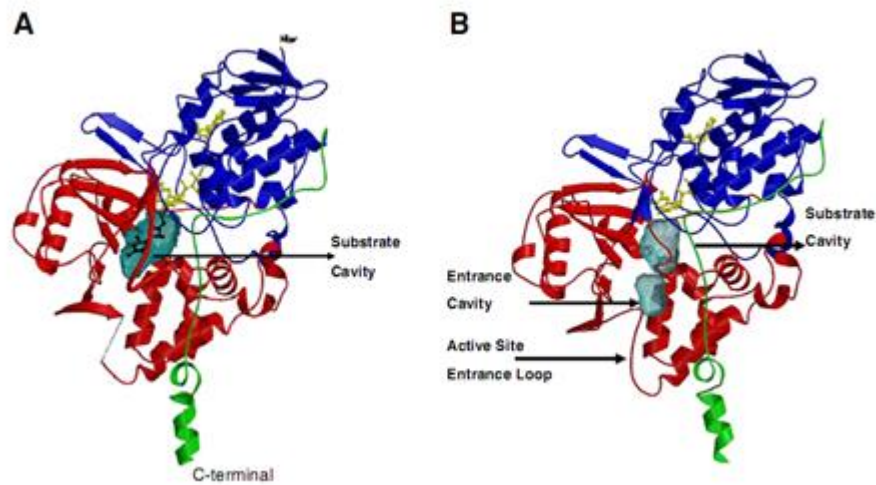
เอนไซม์โมโนเอมีน ออกซิเดส (MAO; EC 1.4.3.4.) หรือเอนไซม์ tyramine oxidase (Hare, 1928) เป็นเอนไซม์ที่พบที่บริเวณเยื่อหุ้มชั้นนอกของไมโทคอนเดรีย มีหมู่อะมีน (Flavin) เป็นองค์ประกอบ พบได้ในเซลล์เนื้อเยื่อหลายชนิดโดยเฉพาะที่สมองและตับในมนุษย์ มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบอะมีนหนึ่งหมู่ทั้งแบบไพรมารี เซคันดารี และเทอร์นารีเอมีนแต่ประสิทธิภาพการทำงานจะลดลงกับสารที่มีหมู่อะมีนสองหมู่ (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 2-3 กลไกการย่อยสลายสารประกอบอะมีนหนึ่งหมู่ของเอนไซม์ MAO (Bortolato et al., 2008)

ปฏิกิริยาของเอนไซม์ MAO (รูปที่ 1) จะให้สารผลิตภัณฑ์คืออัลดีไฮด์และ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซึ่งเป็นพิษกับเซลล์ ในกรณีของไพรมารีเอมีนจะได้สารแอมโมเนียแต่ในกรณีการย่อยสลายเซคันดารีหรือเทอร์นารีจะได้สารประกอบไนโตรเจนอื่นๆ 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 เเร่งปฏิกิริยาแบบเดียวกันรวมถึงมีโครงสร้างของเอนไซม์ใกล้เคียงกัน แต่ความแตกต่างที่บริเวณเร่ง (active site) ทั้งที่บริเวณทางเข้าและบริเวณจับสารตั้งต้น (ภาพที่ 2-5) ส่งผลให้เอนไซม์ทั้งสองมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นและตัวยับยั้งที่แตกต่างกัน

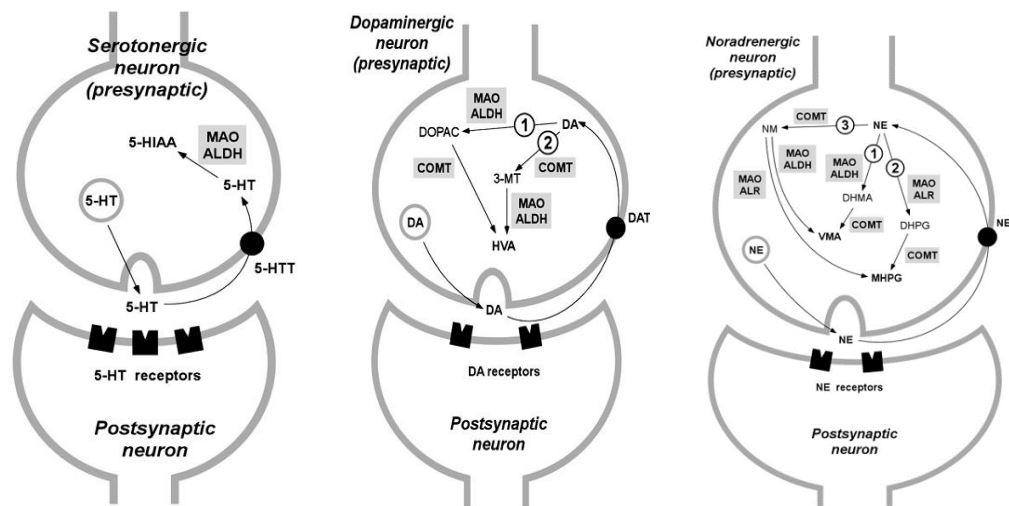


งตาราง

ภาพที่ 2-4 โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ MAO-A (A) และเอนไซม์ MAO-B (B) ที่มีความแตกต่างกันที่บริเวณ substrate cavity (Finberg, 2014)

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

โดยโรคพาร์กินสันหรือโรคสั่นบิดามักพบในผู้สูงอายุในคนทุกเชื้อชาติ โดยในคนที่มียาตั้งแต่ 60 ปีขึ้นไปพบเป็นโรคนี้ถึง 1% ผู้ชายมีโอกาสเป็นโรคมากกว่าผู้หญิงประมาณ 1.5 เท่า ผู้ป่วยจะมีอาการสั่นขณะพัก (Resting tremor) เคลื่อนไหวร่างกายช้าลง (Bradykinesia) ร่างกายมีสภาพแข็งเกร็ง (Rigidity) และการทรงตัวขาดความสมดุล (Postural instability) ในขณะที่โรคอัลไซเมอร์หรืออาการสมองเสื่อมนั้นยิ่งอายุมากขึ้นก็จะพบอัตราการเป็นโรคมากขึ้น 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 2-5 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) จะพบว่าผู้ป่วยเมื่อมีตัวกระตุ้นให้เกิดอาการดังกล่าวจะ

มีระดับของสารสื่อประสาท 5-HT และ NE ต่ำกว่าค่าปกติ (Bortolato et al., 2008; Finberg, 2014; Yamada et al., 2004)

จากสาเหตุข้างต้นทำให้เกิดการศึกษาค้นคว้าผลผลิตยาต่างๆที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO (MAO inhibitor; MAOI) ในสมองเพื่อคงระดับของสารสื่อประสาทและลดอาการพยาธิสภาพของโรคทางสมองดังกล่าวมากมาย นอกจากนี้ยังได้มีการนำมาใช้ยับยั้งเอนไซม์ MAO เพื่อให้คงระดับสารสื่อประสาทโดปามีนในสมองเพื่อลดการสับสนหรืออีกด้วย (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 ยา MAOI เกิดขึ้นเนื่องจากการพบว่ายา Iproniazid ที่ใช้รักษาโรควัณโรคสามารถยับยั้งเอนไซม์ MAO และใช้รักษาอาการซึมเศร้าได้ (Fox et al., 1953; Zeller et al., 1952) ทำให้เกิดการสังเคราะห์ยาอื่นๆ เช่น Clorgyline ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งอย่างจำเพาะต่อ MAO-A แบบผันกลับไม่ได้ ที่สามารถเพิ่มระดับของ 5-HT ที่บริเวณของสมองที่มี serotonergic neuron ปริมาณมาก (kitanaka et al., 2010) ผลการศึกษาพบว่า 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 ที่สามารถรักษาอาการโรคซึมเศร้าได้ดี

เมื่อใช้ร่วมกับยายับยั้งการดูดซึมสารสื่อประสาทเซโรโทนิน (Selective Serotonin Reuptake inhibitor: SSRI) (Bech et al., 2012; Caille et al., 1996; Gillman, 2006) ในขณะที่ยา Saffinamide ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งอย่างจำเพาะต่อ MAO B แบบผันกลับได้ ที่ยับยั้ง MAO-B ได้ดีกว่า MAO A ถึง 700 เท่า (Binda et al., 2007) ยังอยู่ในระหว่างพัฒนาขั้นที่ 3 โดยที่ Saffinamide 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 (levodopa) ซึ่งช่วยต้านอาการของโรคควบคุมกันและส่งผลให้เกิดอาการความดันสูงวิกฤตได้ (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) หรือ พืชสมุนไพรจากประเทศเดนมาร์ก *Trigonella foenum-graecum*, *Apium graveolens*, *Calluna vulgaris* (Jager et al., 2013) ที่มีรายงานว่าสามารถยับยั้ง MAO-A ได้ดี ในขณะที่จากพืชสมุนไพรจีนที่ทำการศึกษาศึกษา 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 แบบผันกลับ

ได้ (Kong et al., 2004) และยังไม่มียางานชี้ชัดถึงการนำมาใช้ทางการแพทย์เพื่อช่วยลดอาการของโรคทางสมองดังกล่าว 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 ผู้วิจัยจึงมีจุดมุ่งหมายพัฒนาระบบการตรวจสอบที่ว่องไวและมีประสิทธิภาพที่สามารถใช้ตรวจสอบ MAO activity ได้ 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.)
- โกงศอ (*Atractylodes lancea* (Thunb.) DC.)
- โกงศอน้ำเต้า (*Rheum officinale* Baill.)
- โกงศอเขียว (*Angelica sinensis* (Oliv.) Diels)
- ทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz)
- โกงศอหัวบัว (*Ligusticum sinense* Oliv. cv. Chuanxiong Hort)
- โกงศอกระดูก (*Saussurea lappa* Clarke)
- หญ้าหมอนน้อย (*Vernonia cinerea*)
- ปอกะปิต (*Helicteres isora* L.)
- หญ้าหนวดแมว (*Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq.)

3.3 พลาสมิดที่ใช้ในการทดลอง

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

3.3.2 พลาสมิด pIN11ompA3 ที่บรรจุยีน CPR ของหนูที่มีส่วนจับเมมเบรน (ratCPR) (ได้รับมาจาก Prof. Dr. Jung-Ja Kim, Dept. of Biochemistry, Medical College of Wisconsin)

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การเตรียมสมุนไพร

สมุนไพรทั้งหมดซื้อจากร้านสมุนไพรสีทองตั้งอยู่ในจังหวัดชลบุรี พืชสมุนไพรที่เตรียมทำสารสกัดเองคือ เก๊กฮวยและรางจืด แล้ว จากนั้นนำพืชสมุนไพรมาบดให้ละเอียดแบ่งพืชสมุนไพรใส่ถุงผ้าดิบ ถูกละ 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, โกงศอ, โกงศอน้ำเต้า, โกงศอเขียว, ทองพันชั่ง, โกงศอหัวบัว, โกงศอกระดูก, หญ้าหมอนน้อย, ปอกะปิต, หญ้าหนวดแมว ได้รับจากคุณธัญญาภรณ์ วงศ์ศรี

3.4.2 การเตรียมและการทำบริสุทธิ์สารละลายโปรตีนจากไมโทคอนเดรียจากสมองหมู

ทำการซื้อสมองของหมูที่เพิ่งเสียชีวิตจากโรงฆ่าสัตว์และถูกรักษาไว้ด้วยความเย็นจากร้านค้าในตลาดสดจังหวัดชลบุรี จากนั้นทำการแช่สมองหมูที่ได้ลงในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.25 M Sucrose pH 7.6 บั่นสมองหมูที่ได้ในเครื่องปั่นเป็นเวลา 1-2 นาที (ใส่ 5 mM PMSF) จากนั้นปั่นเหวี่ยงสารละลายสี่ชมพู่เข็มที่ได้ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสที่เก็บได้ไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ 5,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำส่วนใสที่เก็บได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บตะกอนที่ได้และเก็บสารละลายที่เป็นส่วนใสโปรตีนไว้ที่ -80 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้ (ดัดแปลงจาก Jager et al., 2013; Kong et al., 2004; Lin et al., 2003; Stafford et al., 2007; Tipton, 1968b)

3.4.3 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 50mM HEPES บัฟเฟอร์ 650 μ l กับสารตั้งต้น Tyramine และสารละลาย 15.4 μ M ABTS กับเอนไซม์ 0.077 Unit HRP จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ MAO (0.084 μ g Protein) และวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 405 nm

3.4.4 ตรวจสอบการยับยั้งเอนไซม์มอนอามีนออกซิเดสของพืชสารสกัดสมุนไพรไทย

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

3.4.4.1 การยับยั้งด้วยสารยับยั้งมาตรฐาน Pargyline 0.5 mM และ Clorgyline 0.05 mM

ใส่ 50mM HEPES บัฟเฟอร์ บ่มกับ Pargyline ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.5 μ M, 1 μ M, 1.5 μ M, 2 μ M, 4 μ M, 6 μ M, 8 μ M, 10 μ M) และเติม 8 μ M *p*-tyramine กับสารละลาย ABTS และเอนไซม์ HRP วัดความสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ 20 นาที ก่อนทำการเติมเอนไซม์ MAO (0.084 μ g Protein) เพื่อเริ่มปฏิกิริยาและทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร

ใส่ 50mM HEPES บัฟเฟอร์ บ่มกับ Clorgyline ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.02 μ M, 0.03 μ M, 0.04 μ M, 0.05 μ M, 0.1 μ M, 0.2 μ M) และเติม 8 μ M *p*-tyramine กับสารละลาย ABTS และเอนไซม์ HRP วัดความสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ 20 นาที ก่อนทำการเติมเอนไซม์ MAO (0.084 μ g Protein) เพื่อเริ่มปฏิกิริยาและทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร

3.4.4.2 การยับยั้งด้วยสารสกัดต่อทั้ง MAO-A และ MAO-B

การยับยั้งด้วยสารสกัดต่อทั้ง MAO-A และ MAO-B นั้นจะยังไม่ใส่ตัวยับยั้งมาตรฐานทั้ง Pargyline 0.5 mM และ Clorgyline 0.05 mM โดยใน 50mM HEPES บัฟเฟอร์ จากนั้นใส่สารสกัดที่ความเข้มข้น 10 μ g/ml

, 50 µg/ml และ 100 µg/ml บ่มด้วย 8 µM *p*-tyramine กับสารละลาย ABTS และเอนไซม์ HRP ผสมกัน เพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 20 นาที จากนั้นเติมเอนไซม์ MAO (0.084 µg Protein) และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ในขณะที่ Control ส่วนที่ไม่ได้ใส่สารสกัดของพืช จะใส่เอทานอล

3.4.4.3. การยับยั้งด้วยสารสกัดต่อ MAO-A

หลักการคือทำการยับยั้งเอนไซม์ MAO-B ด้วย Pargyline ก่อนจะศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MAO-A ด้วยสารสกัดพืชทั้ง 14 ชนิด โดยบ่ม 1 µM Pargyline กับเอนไซม์ MAO (0.084 µg Protein) ที่ไว้ 5 นาที เพื่อยับยั้งกิจกรรม MAO-B ในขณะที่บ่ม ใส่ 50 mM HEPES บัฟเฟอร์ ลงในคิวเวตจากนั้นใส่สารสกัดที่ความเข้มข้น 10 µg/ml , 50 µg/ml และ 100 µg/ml และบ่ม 8 µM *p*-tyramine กับสารละลาย ABTS และเอนไซม์ HRP ผสมกัน เพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 20 นาที จากนั้นเติมเอนไซม์ MAO (0.084 µg Protein) ที่บ่มร่วมกับ Pargyline 1 µM ที่ไว้ในข้างต้นและทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร

3.4.4.4 การยับยั้งด้วยสารสกัดต่อ MAO-B

หลักการคือทำการยับยั้งเอนไซม์ MAO-A ด้วย Clorgyline ก่อนจะศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MAO-B ด้วยสารสกัดพืชทั้ง 14 ชนิด โดยบ่ม 0.5 µM clorgyline กับเอนไซม์ MAO (0.084 µg Protein) ที่ไว้ 5 นาที เพื่อยับยั้งกิจกรรม MAO-A ในขณะที่บ่ม ใส่ 50 mM HEPES บัฟเฟอร์ ลงในคิวเวตจากนั้นใส่สารสกัดที่ความเข้มข้น 10 µg/ml , 50 µg/ml และ 100 µg/ml บ่มด้วย 8 µM *p*-tyramine กับสารละลาย ABTS และเอนไซม์ HRP ผสมกัน เพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 20 นาที จากนั้นเติมเอนไซม์ MAO (0.084 µg Protein) ที่บ่มร่วมกับ clorgyline 0.5 µM ที่ไว้ในข้างต้นและทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร

3.4.5 ตรวจสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ MAO ด้วยสารตั้งต้น kynuramine

ใช้สารละลาย MAO-A และ MAO-B บริสุทธิ์จากบริษัท SIGMA และใช้ kynuramine เป็นสารตั้งต้น จากนั้นทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ MAO โดยการวัดผลิตภัณฑ์ 4-hydroxyquinoline ที่ค่า λ_{ex} 310 nm และ λ_{em} 400 nm โดยใช้สาร clorgyline และ pargyline ที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง MAO-A และ MAO-B แบบไม่ผันกลับเป็นปฏิกิริยาควบคุมเชิงบวก

3.4.6 การเตรียมสารสกัดจากพืช

ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยมุ่งทำบริสุทธิ์สารสำคัญจากโสมน้ำเต้า (*Rheum officinale*) และทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus*) ที่ผลการศึกษาเบื้องต้นพบว่าออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B ได้ดี โดยในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยจะทำบริสุทธิ์สารสำคัญที่ออกฤทธิ์โดยใช้กิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ MAOs ทั้งสองเป็นตัวนำ (Bio-assay guide isolation) ดังนี้ นำพืชมาล้างทำความสะอาดและป่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ จึงนำแช่ในสารละลายเอทานอล จากนั้นทำการกรอง จากนั้นทำการแยก fraction โดยใช้สารละลายเฮกเซนและเอทิล อะซิเตตตามลำดับ ทำบริสุทธิ์สารสำคัญด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี และตรวจสอบความบริสุทธิ์และโครงสร้างของสารสำคัญด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Nuclear Magnetic Resonance (NMR) และ Liquid Chromatography-Mass spectrometry (LC-MS) ในส่วนสกัดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ทั้งสองได้ดี

3.4.7 การเหนี่ยวนำการแสดงออก การทำบริสุทธิ์และกิจกรรมของเอนไซม์ Cytochrome P450 reductase จากหนู (rat CPR)

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

3.4.8 การเหนี่ยวนำการแสดงออก การทำบริสุทธิ์ของเอนไซม์และการตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ CYP2A6

ทำการเลี้ยงเชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ XL-1 blue ที่ได้รับการส่งผ่าน cDNA ที่มียีน *cyp2a6* จากนั้นเหนี่ยวนำการแสดงออกโปรตีนด้วย IPTG และ 5-aminolevulinic acid hydrochloride (δ -ALA) ทำบริสุทธิ์โปรตีนโดยผ่านนิกเกิลคอลลัมน์และตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE และทำการศึกษากิจกรรมการออกซิเดชันของเอนไซม์ CYP2A6 ต่อสารประกอบเรืองแสง Coumarin ในหลอดทดลอง (*in vitro*) โดยวัดการเพิ่มขึ้นของสารผลิตภัณฑ์ (7-hydroxycoumarin) โดยใช้เครื่อง Fluorescence Spectroscopy (Insee et al., 2014; Pouyfung et al., 2013; Thongjam et al., 2013)

3.4.6 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์

3.4.9.1 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ cytochrome P450 reductase จากหนู (rat CPR)

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

3.4.9.2 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ cytochrome P450 2A6 (CYP2A6)

เตรียมปฏิกิริยาโดยทำการบ่มเอนไซม์ CYP2A6 ที่บริสุทธิ์ร่วมกับเอนไซม์ rat CPR และ DLPC จากนั้นเติมสารละลาย 100 mM Kpi buffer pH 7.4 เติมสารตั้งต้น coumarin และสารสกัดแต่ละลำดับส่วนของสมุนไพรที่ทำการศึกษา หลังจากนั้นเริ่มปฏิกิริยาโดยเติม NADPH วัดค่าการเพิ่มขึ้นของผลิตภัณฑ์ (7-hydroxycoumarin) โดยใช้เครื่อง fluorescence spectroscopy เป็นเวลา 10 นาที คำนวณหาค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่เหลืออยู่ เพื่อดูผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เมื่อเปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ CYP2A6 ปกติ (100% remaining activity)

บทที่ 4

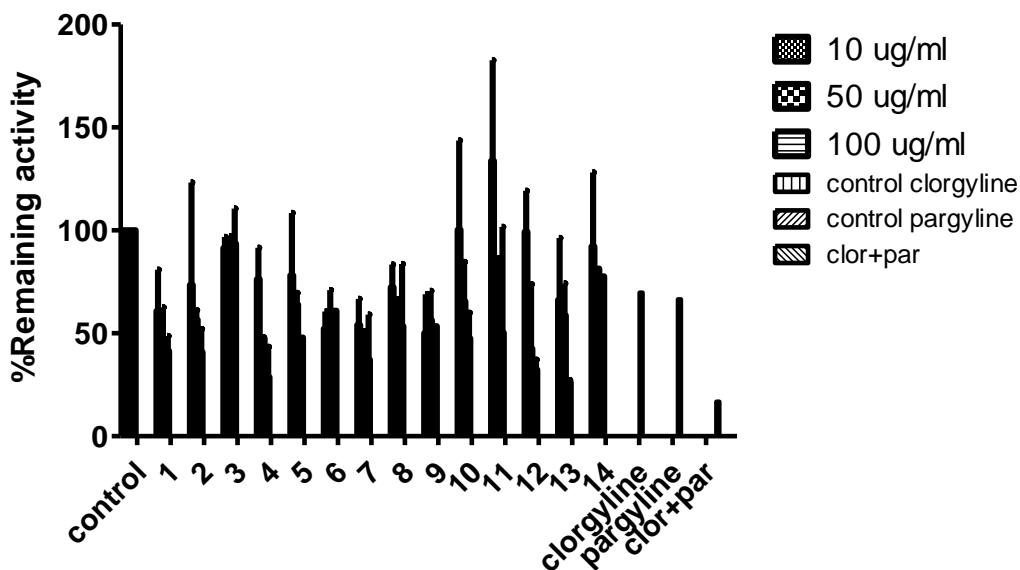
ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

4.1 การตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO ในสมองหนูด้วย ABTS assay

4.1.1 การยับยั้ง MAO-A และ MAO-B

เป็นการตรวจสอบโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ในการตรวจวัดกิจกรรมการทำงานของ MAO และฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดสมุนไพร ที่ความเข้มข้นของ *p*-tyramine 8 μ M ความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ คือ 10 μ g/ml, 50 μ g/ml และ 100 μ g/ml และได้ทำการใส่ตัวยับยั้งเอนไซม์ MAO-A (clorgyline) และ MAO-B (pargyline) เป็นปฏิกิริยาควบคุมในการตรวจสอบกิจกรรมการทำงานของ MAO จากสมองหนู ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดจากโถงน้ำเต้าออกฤทธิ์ยับยั้งทั้ง MAO-A และ MAO-B ได้ดีที่สุดในค่า IC_{50} 18.58 μ g/ml สารสกัดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งได้ตรงลงมา คือโถงเขมา, เก๊กฮวย, ทองพันชั่ง, มะตูม, ปอกระบิด, หน้้าหมอนน้อย, รางจืด, ดอกคำฝอย, โถงเจียง, โถงหัวบัว, โถงกระดูก, หน้้าหนวดแมว และกระเจียบ ที่ค่า IC_{50} 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 μ g/ml ตามลำดับ (ทรงกลด สารภูษิตและคณะ 2559)

MAO inhibition



หมายเลข 1 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดเก๊กฮวย,

หมายเลข 2 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดรางจืด

หมายเลข 3 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดกระเจียบ,

หมายเลข 4 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดมะตูม

หมายเลข 5 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดดอกคำฝอย,

หมายเลข 6 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดโถงน้ำเต้า,

หมายเลข 7 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดโถงเจียง

หมายเลข 8 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดโถงหัวบัว

หมายเลข 9 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดทองพันชั่ง,

หมายเลข 10 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดโถงกระดูก,

หมายเลข 11 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดหน้้าหมอนน้อย

หมายเลข 12 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดปอกระบิด,

หมายเลข 13 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดหน้้าหนวดแมว

หมายเลข 14 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดโถงเขมา

หมายเลข 2 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดรางจืด

หมายเลข 3 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดกระเจียบ,

หมายเลข 4 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดมะตูม

หมายเลข 5 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดดอกคำฝอย,

หมายเลข 6 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดโถงน้ำเต้า,

หมายเลข 7 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดโถงเจียง

หมายเลข 8 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดโถงหัวบัว

หมายเลข 9 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดทองพันชั่ง,

หมายเลข 10 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดโถงกระดูก,

หมายเลข 11 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดหน้้าหมอนน้อย

หมายเลข 12 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดปอกระบิด,

หมายเลข 13 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดหน้้าหนวดแมว

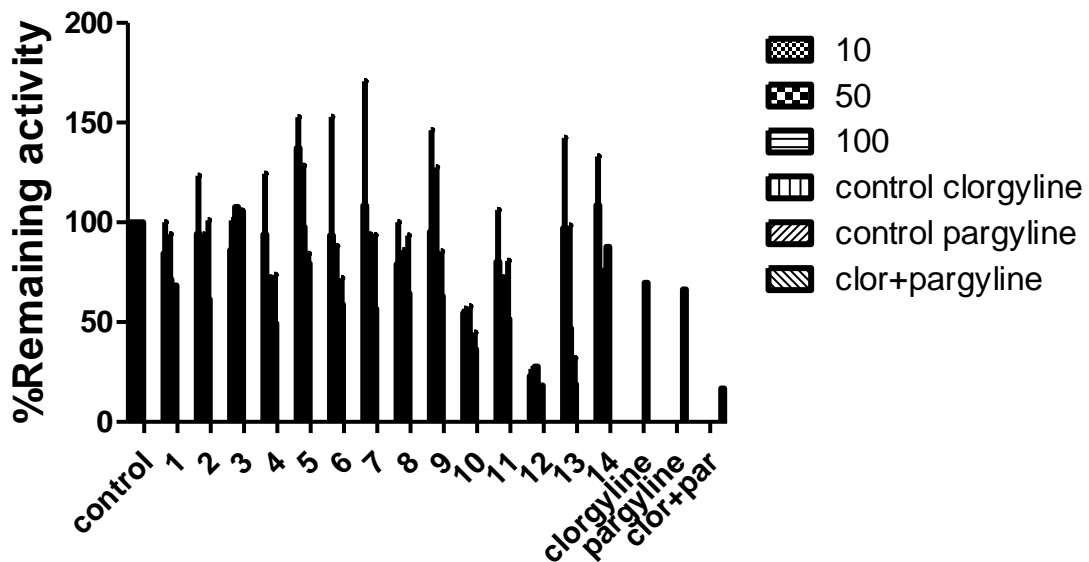
หมายเลข 14 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดโถงเขมา

ภาพที่ 4-1 กราฟแสดงการเปรียบเทียบการยับยั้งของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 10, 50 และ 100 μ g/ml ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO การทดลองทำสามซ้ำและวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม GraphPad Prism5

4.1.2 ยับยั้ง MAO-A

ทำการบ่มตัวยับยั้งเอนไซม์ MAO-B หรือ pargyline กับเอนไซม์ MAO ก่อนเพื่อยับยั้งเอนไซม์ MAO-B ในสมองหมูก่อนตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ MAO-A ในสมองหมู จากนั้นนำสารสกัดจากพืชสมุนไพรมาใช้ยับยั้งโดยใช้ความเข้มข้น 10 µg/ml, 50 µg/ml และ 100 µg/ml สารสกัดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MAO-A ได้ดีที่สุด คือโกฐกระดูกที่ค่า IC₅₀ 3.526 µg/ml สารสกัดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งได้ตรงลงมา คือโกฐหัวบัว, ปอกะบิด, โกฐกระดูก, มะตูม, โกฐเขมา, โกฐเจียง, โกฐน้ำเต้า, เก๊กฮวย, รางจืด, ทองพันชั่ง, หญ้าหนวดแมว 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 (ทรงกลด สารภูษิตและคณะ 2559)

MAO-A inhibition



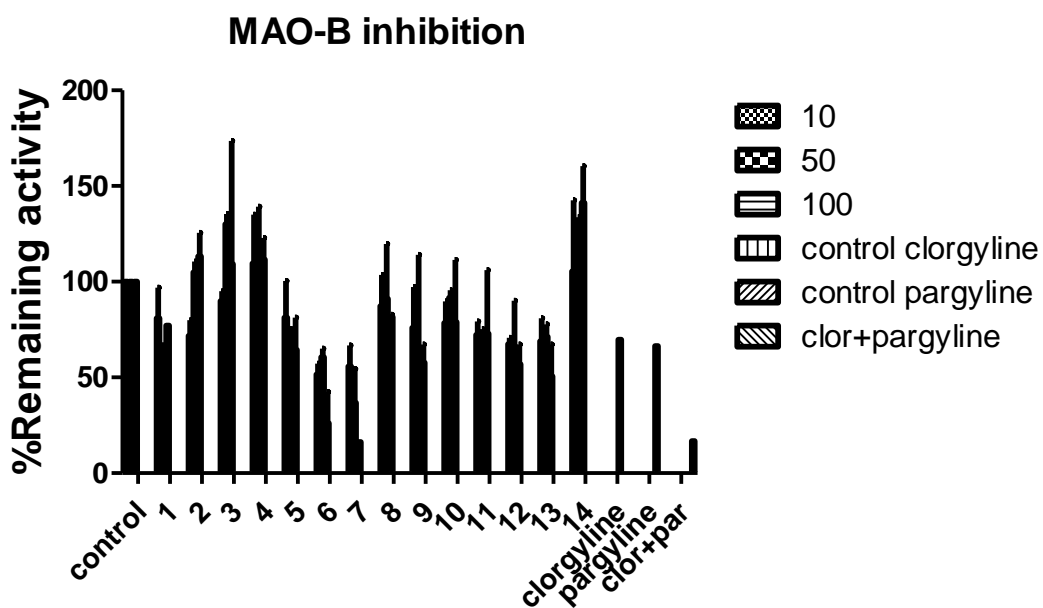
หมายเลข 1 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดเก๊กฮวย,
 หมายเลข 2 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดกระเจี๊ยบ,
 หมายเลข 3 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดดอกคำฝอย,
 หมายเลข 4 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดโกฐน้ำเต้า,
 หมายเลข 5 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดทองพันชั่ง,
 หมายเลข 6 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดโกฐกระดูก,
 หมายเลข 7 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดโกฐเขมา,
 หมายเลข 8 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดโกฐเจียง,
 หมายเลข 9 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดโกฐหัวบัว,
 หมายเลข 10 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดหญ้าหนวดแมว,
 หมายเลข 11 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดปอกะบิด,
 หมายเลข 12 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดมะตูม,
 หมายเลข 13 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดรางจืด,
 หมายเลข 14 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดหัวหนวด

หมายเลข 1 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดเก๊กฮวย,
 หมายเลข 2 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดรางจืด
 หมายเลข 4 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดมะตูม
 หมายเลข 6 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดโกฐเขมา
 หมายเลข 8 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดโกฐเจียง
 หมายเลข 10 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดโกฐหัวบัว
 หมายเลข 12 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดหญ้าหนวดน้อย
 หมายเลข 14 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดหญ้าหนวดแมว

ภาพที่ 4-2 กราฟแสดงการเปรียบเทียบการยับยั้งของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 10, 50 และ 100 µg/ml ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A เมื่อยับยั้ง MAO-B ด้วย pargyline ก่อนทำการทดลอง การทดลองทำสามซ้ำและวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม GraphPad Prism5

4.1.3 ยับยั้ง MAO-B

ทำการบ่มตัวยับยั้งเอนไซม์ MAO-A หรือ clorgyline กับเอนไซม์ MAO ก่อนเพื่อยับยั้งเอนไซม์ MAO-A ในสมองหมู่มาก่อนตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ MAO-B ในสมองหมู จากนั้นนำสารสกัดจากพืชสมุนไพรมา ใช้ยับยั้งโดยใช้ความเข้มข้น 10 µg/ml, 50 µg/ml และ 100 µg/ml สารสกัดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MAO-B ได้ดีที่สุด คือโกฐน้ำเต้าที่ค่า IC₅₀ 18.26 µg/ml สารสกัดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งได้ตรงลงมา คือโกฐเขมา, หนุ้าหมอน้อย, ปอกะบิด, ทองพันชั่ง, ดอกคำฝอย, โกฎกระดุก, เก๊กฮวย, โกฎหัวบัว และโกฐเจียง 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, กระจี้บ, มะตูม และหนุ้าหนวดแมว (ทรงกลด สารภูษิตและคณะ 2559)



หมายเลข 1 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดเก๊กฮวย,
 หมายเลข 2 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดรางจืด,
 หมายเลข 3 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดกระจี้บ,
 หมายเลข 4 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดมะตูม,
 หมายเลข 5 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดดอกคำฝอย,
 หมายเลข 6 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดโกฐเขมา,
 หมายเลข 7 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดโกฐน้ำเต้า,
 หมายเลข 8 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดโกฐเจียง,
 หมายเลข 9 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดทองพันชั่ง,
 หมายเลข 10 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดโกฐหัวบัว,
 หมายเลข 11 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดโกฎกระดุก,
 หมายเลข 12 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดหนุ้าหมอน้อย,
 หมายเลข 13 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดปอกะบิด,

หมายเลข 14 คือฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดหนุ้าหนวดแมว

ภาพที่ 4-3 กราฟแสดงการเปรียบเทียบการยับยั้งของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 10, 50 และ 100 µg/ml ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-B เมื่อยับยั้ง MAO-A ด้วย clorgyline ก่อนทำการทดลอง การทดลองทำสามซ้ำและวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม GraphPad Prism5

4.2 การตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO –ของมนุษย์

4.2.1 วิธี ABTS assay

ทำการศึกษาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของสารสมุนไพรต่อเอนไซม์ MAO จากมนุษย์โดยใช้สารละลาย MAO-A และ MAO-B บริสุทธิ์ และใช้ *p*-tyramine เป็นสารตั้งต้น จากนั้นทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ MAO โดยวิธี ABTS assay ด้วยเอนไซม์ horseradish peroxidase (HRP) ได้ผลิตภัณฑ์คือ ABTS radical cation (ABTS⁺) โดยใช้สาร clorgyline และ pargyline ที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง MAO-A และ MAO-B แบบไม่ผันกลับเป็นปฏิกิริยาควบคุมเชิงบวก โดยคัดเลือกพืชที่ออกฤทธิ์ยับยั้งได้ดีมา 4 ชนิดได้แก่ โกงฐน้ำเต้า โกงฐเขมา ทองพันชั่ง และหญ้าหมอน้อย (ดังผลจาก 4.1.2 และ 4.1.3) ผลการศึกษาพบว่า ค่า IC₅₀ มีความแตกต่างกัน จากที่ทำการศึกษาโดยใช้เอนไซม์ MAO จากสมองหมู โดยพบว่า โกงฐเขมา ยับยั้ง MAO-A และ MAO-B ได้ดีที่สุด รองลงมาคือทองพันชั่ง (ตารางที่ 4-1) และจากผลการทดลองที่ได้ยังแสดงให้เห็นว่าแม้จะสามารถใช้เอนไซม์ MAO จากสมองหมูทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสมุนไพรได้ แต่ความแตกต่างของสปีชีส์อาจส่งผลต่อการศึกษาขั้นสูงต่อไป จึงไม่สมควรใช้เอนไซม์ MAO จากสมองหมูในวิธีการนี้ทดแทนเอนไซม์ MAO จากมนุษย์ในการทดสอบต่อไป และมุ่งศึกษาสารสำคัญในโกงฐน้ำเต้าและทองพันชั่งต่อไป

ตารางที่ 4-1 ผลการศึกษาเปรียบเทียบการศึกษาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO ของพืช 4 ชนิด ด้วยวิธีการตรวจสอบแบบ ABTS assay เปรียบเทียบระหว่างเอนไซม์ MAO จากสมองหมู และ MAO จากมนุษย์

IC ₅₀ values (µg/ml)	ฤทธิ์ยับยั้ง pig brain MAO (ABTS assay)			ฤทธิ์ยับยั้ง human MAO (ABTS assay)		
	MAO-A	MAO-B	ความจำเพาะของ MAO-A/MAO-B	MAO-A	MAO-B	ความจำเพาะของ MAO-B/MAO-A
โกงฐเขมา <i>Atractylodes lancea</i> (Thunb.) DC.	113.4	42.96	0.38	5.828	20.99	3.60
ทองพันชั่ง <i>Rhinacanthus nasutus</i> (L.) Kurz	198.3	98.97	0.50	27.11	46.92	1.73
หญ้าหมอน้อย <i>Vernonia cinerea</i>	3.53	87.6	24.81	22.70	60.50	2.66
โกงฐน้ำเต้า <i>Rheum officinale</i> Baill	123.7	18.26	0.15	63.27	86.59	1.37

4.2.2 วิธี Kynuramine Fluorescence substrate

สืบเนื่องจากงานวิจัยที่รายงานว่า การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ MAO ผ่านการใช้เอนไซม์ HRP ที่วัดการเพิ่มขึ้นของ H₂O₂ สามารถเกิดความผิดพลาดได้เนื่องจากสารสำคัญในพืชสามารถยับยั้งเอนไซม์ HRP ได้ด้วยนั้น จึงได้ทำการศึกษาศึกษาสำคัญทั้งสี่ชนิดต่อเอนไซม์ HRP พบว่าไม่ยับยั้งการทำงานของ HRP ในหลอดทดลอง ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของสารสมุนไพรต่อเอนไซม์ MAO จากมนุษย์โดยใช้ kynuramine เป็นสารตั้งต้น โดยผลการศึกษาพบว่า แม้พืชที่ทำการศึกษาทั้ง 4 ชนิดจะสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO ได้ดี แต่เมื่อทดสอบโดยใช้ ABTS assay สารสำคัญมีแนวโน้มยับยั้ง MAO-A ได้ดีกว่า MAO-B แต่เมื่อทดสอบโดยใช้ Fluorescence substrate พบว่า สารสำคัญมีแนวโน้มยับยั้ง MAO-B ได้ดีกว่า

MAO-A ทั้งนี้อาจเกิดจากความแตกต่างเชิงโครงสร้างระหว่าง *p*-tyramine และ kynuramine ที่ส่งผลต่อการจับและการเร่งปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันคือ การวิเคราะห์ด้วยสารตั้งต้นkynuramine จะให้ค่าการยับยั้งที่ดีกว่า (ตารางที่ 4-2 และภาพที่ 4-4) อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์จากค่าความจำเพาะในการยับยั้ง MAO-B ต่อ MAO-A ยังพบว่าโกฐน้ำเต้าและทองพันชั่งสามารถยับยั้งได้ดี จึงยังคงมุ่งศึกษาสารสำคัญในพืชทั้งสองชนิดนี้

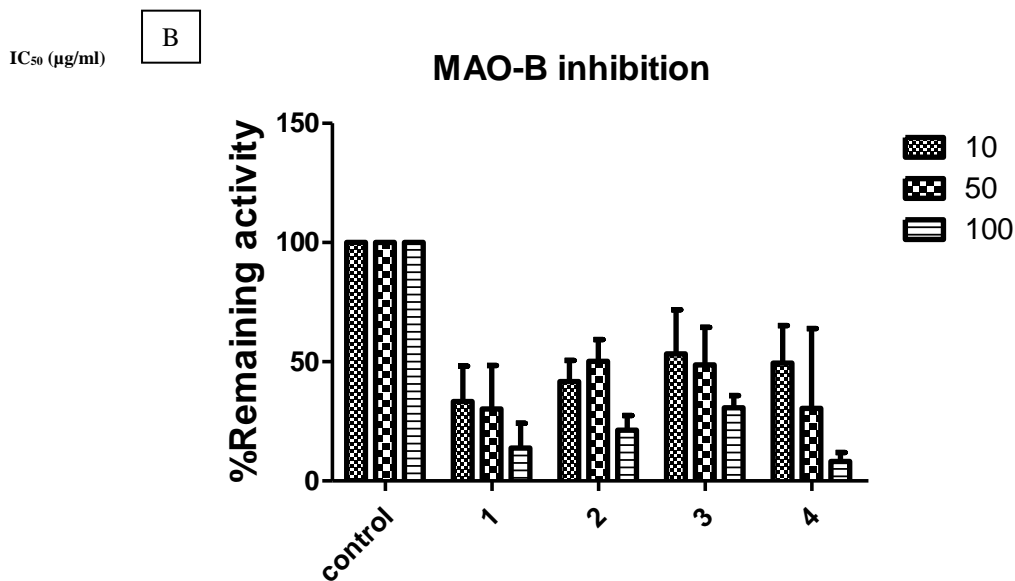
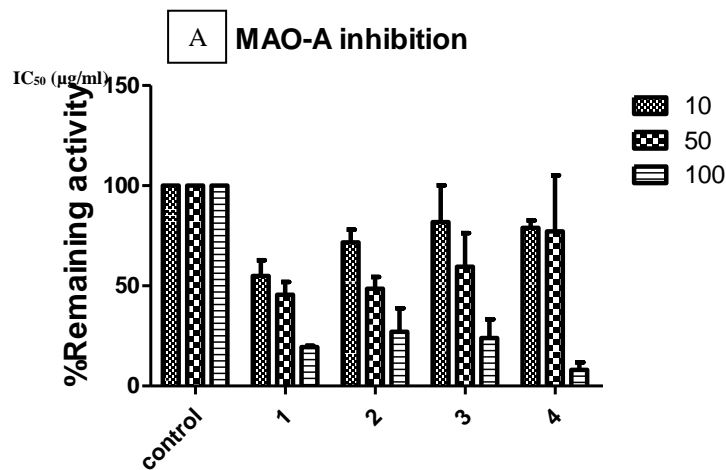
ตารางที่ 4-2 ผลการศึกษาเปรียบเทียบการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO ของพืช 4 ชนิด ด้วยวิธีการตรวจสอบแบบ ABTS assay และการใช้สารตรวจจับการทำงาน Fluorescence

IC ₅₀ values (µg/ml)	ฤทธิ์ยับยั้ง human MAO (ABTS assay)			ฤทธิ์ยับยั้ง human MAO (kynuramine probe substrate)		
	MAO-A	MAO-A	MAO-A	MAO-A	MAO-B	ความจำเพาะของ MAO-B/MAO-A
โกฐเขมา <i>Atractylodes lancea</i> (Thunb.) DC.	5.828	20.99	3.60	23.46	9.81	0.42
ทองพันชั่ง <i>Rhinacanthus nasutus</i> (L.) Kurz	27.11	46.92	1.73	38.18	15.25	0.40
หญ้าหมอน้อย <i>Vernonia cinerea</i>	22.70	60.50	2.66	53.65	38.65	0.72
โกฐน้ำเต้า <i>Rheum officinale</i> Baill	63.27	86.59	1.37	62.37	10.03	0.16

4.3 ศึกษาองค์ประกอบและการยับยั้ง MAO ของสารสกัดพืชสมุนไพรที่อยู่ในระหว่างทำบริสุทธิ์ (bio-assay guide) และการหาโครงสร้างสาร

4.3.1 การสกัดสารจากโกฐน้ำเต้าและฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B

ทำการสกัดพืชสมุนไพรโกฐน้ำเต้าด้วยสารละลายเอทานอล จากนั้นแยกสารสกัดแบบลำดับส่วน ได้ส่วนสกัดเฮกเซน (Hexane) เอทิลอะซิเตต (Ethyl acetate) และน้ำ (Water) จากนั้นศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์พบว่าส่วนสกัด hexane ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO ทั้งสองได้ดีที่สุด จึงทำการแยกด้วยเทคนิค chromatography โดยใช้ silica chromatography ได้ส่วนสกัดย่อยแล้วนำไปแยกอีกครั้งด้วย HPLC ได้สารสำคัญ 1 ชนิด ที่ยังไม่สามารถระบุโครงสร้างได้ ให้ชื่อว่า Rheum1 ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MAO-B ได้ดีกว่า MAO-A เมื่อทำการศึกษาเพิ่มขึ้นพบว่าค่าคงที่ของการยับยั้ง (IC₅₀) ไม่แตกต่างกัน แสดงว่า สาร Rheum1 ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B แบบผันกลับได้ (ตารางที่ 4-3)

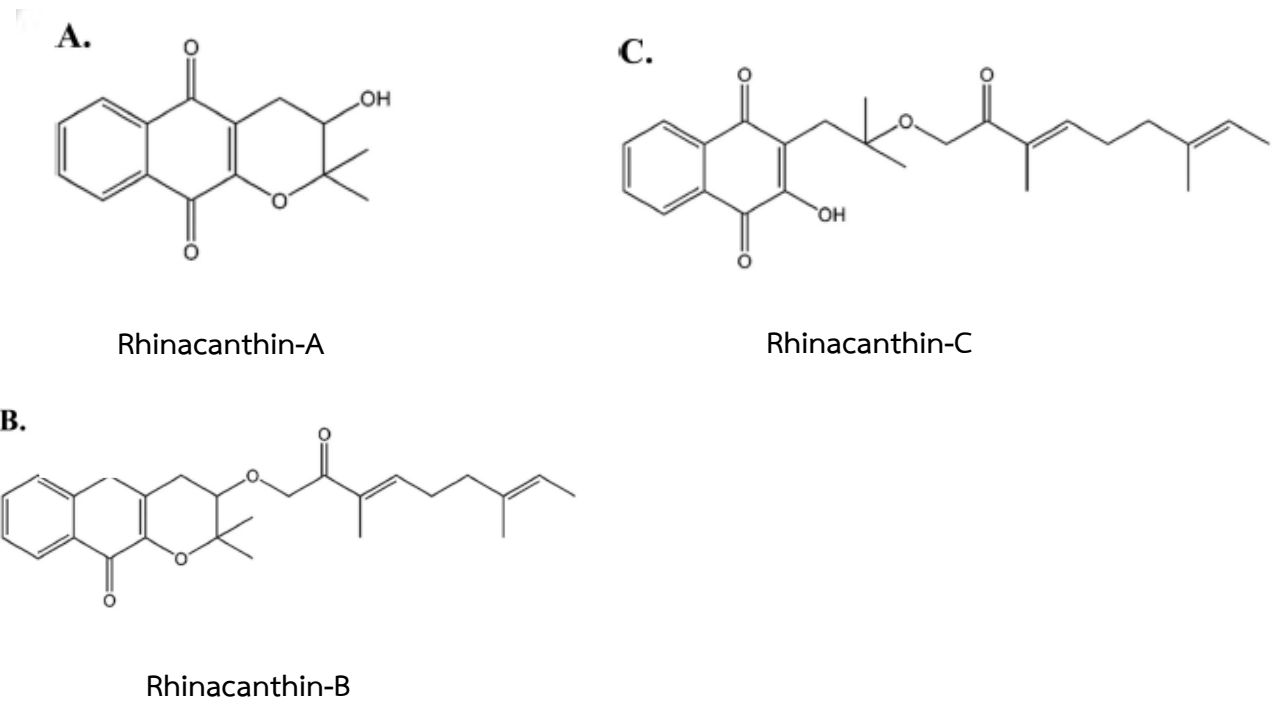


ภาพที่ 4-4 กราฟแสดงการเปรียบเทียบการยับยั้งของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 10, 50 และ 100 µg/ml ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B ด้วยเมื่อตรวจสอบโดยใช้สารตั้งต้น kynuramine เมื่อ 1 คือโกฐเขมา 2 คือทองพันชั่ง 3 คือหญ้าหมอน้อย และ 4 คือ โกงฐน้ำเต้า การทดลองทำสามซ้ำและวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม GraphPad Prism5

4.3.2 การสกัดสารจากทองพันชั่งและฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B

ทำการสกัดพืชสมุนไพรทองพันชั่งด้วยสารละลายเอทานอล จากนั้นแยกสารสกัดแบบลำดับส่วน ได้ส่วนสกัดเฮกเซน (Hexane) เอทิลอะซิเตต (Ethyl acetate) และน้ำ (Water) จากนั้นศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 พบว่าส่วนสกัด hexane ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO ทั้งสองได้ดีที่สุด จึงทำการแยกด้วยเทคนิค chromatography โดยใช้ silica chromatography ได้ส่วนสกัดย่อยแล้วนำไปแยกอีกครั้งด้วย HPLC ได้สารสำคัญ 5 ชนิด โดยมี 3 ชนิดที่สามารถระบุโครงสร้างของสารได้ คือ สาร Rhinacanthin-A, B และ -C (ภาพที่ 4-5) ในขณะที่สารสำคัญอีก 2 ชนิด มีปริมาณน้อยลงยังไม่สามารถระบุโครงสร้างได้ เมื่อทำการศึกษาฤทธิ์ยับยั้ง (ตารางที่ 4-3) พบว่าสารทั้งสามชนิดสามารถยับยั้งเอนไซม์ MAOs ได้ โดยสามารถยับยั้งเอนไซม์ MAO-B ได้ดีกว่า MAO-A โดย Rhinacanthin A สามารถยับยั้ง MAO-B ได้ดีที่สุด ซึ่งอาจเกิดจากการไม่มีแขน hydrocarbon สายยาว ทำให้สามารถเข้าจับกับบริเวณเร่งของเอนไซม์ MAO-B ที่มีขนาดเล็กได้ดีที่สุด ในขณะที่ Rhinacanthin B สามารถยับยั้งเอนไซม์ MAO-A ได้ดีที่สุด เมื่อทำการศึกษา

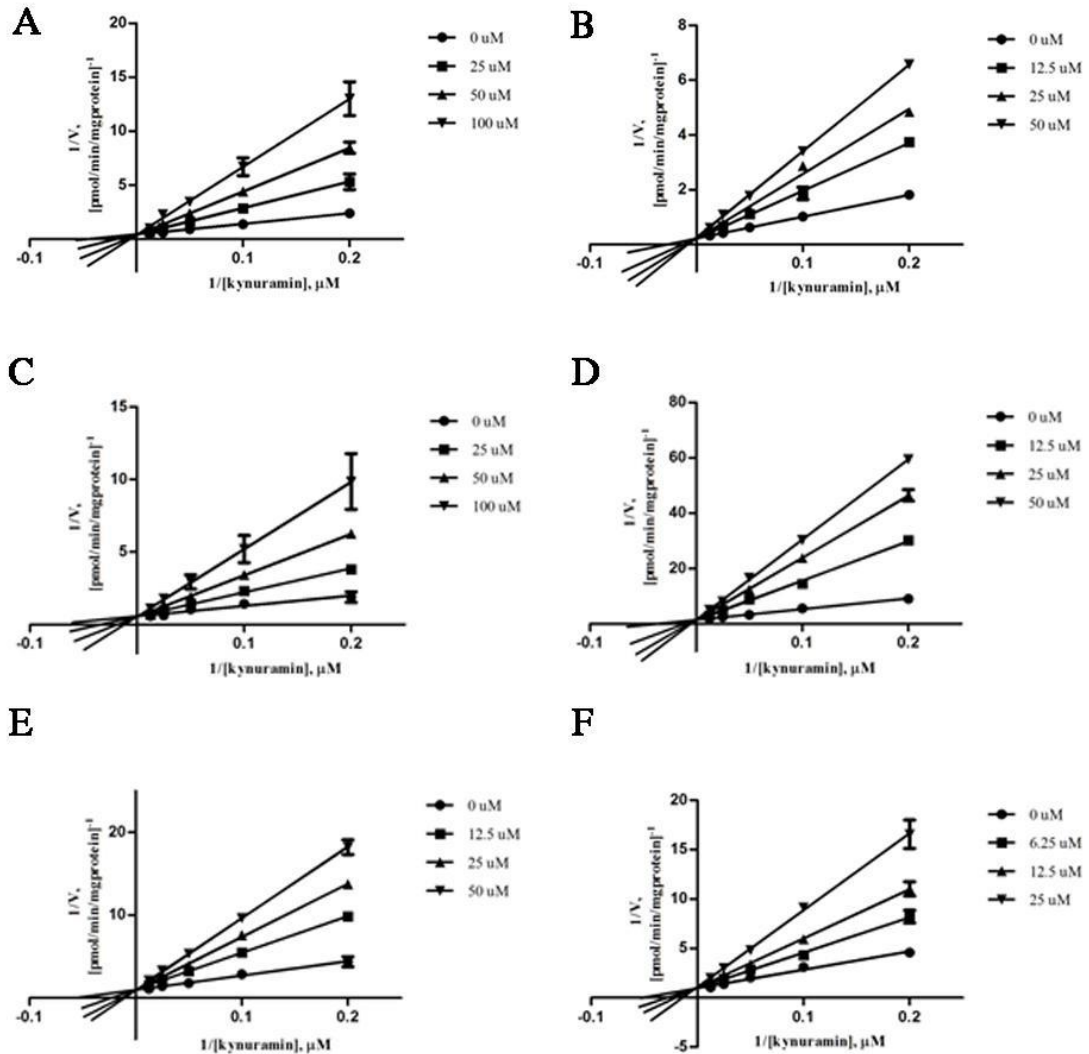
เพิ่มขึ้นพบว่าค่าคงที่ของการยับยั้ง (IC_{50}) ไม่แตกต่างกัน แสดงว่า สาร Rhinacanthin-A,-B และ -C ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B แบบผันกลับได้ โดยยับยั้งการทำงานแบบแข่งขัน (Competitive inhibition) (ภาพที่ 4-6)



ภาพที่ 4-5 โครงสร้างสาร Rhinacanthin-A,-B และ -C จากสมุนไพรทองพันชั่ง

ตารางที่ 4-3 ค่า IC_{50} ของสารสำคัญจากโกฐน้ำเต้า (*R officinale*) และทองพันชั่ง (*R nasutus*)

Samples	MAO-A		MAO-B		SI
	Co-incubation	Pre-incubation	Co-incubation	Pre-incubation	
<i>R.officinale</i>					
Ethanol ($\mu\text{g/ml}$)	60.89 \pm 2.43	59.75 \pm 3.95	31.01 \pm 2.35	33.235 \pm 1.16	
Hexane ($\mu\text{g/ml}$)	22.12 \pm 0.88	22.78 \pm 1.93	19.30 \pm 0.59	17.86 \pm 0.87	
Ethyl acetate ($\mu\text{g/ml}$)	13.19 \pm 3.25	10.69 \pm 2.44	13.55 \pm 1.39	13.58 \pm 0.72	
Aqueous ($\mu\text{g/ml}$)	>100	ND	>100	ND	
Rheum 1 (μM)	89.37 \pm 2.28	73.28 \pm 3.64	3.48 \pm 0.73	3.55 \pm 0.18	0.04
<i>R.nasutus</i>					
Ethanol ($\mu\text{g/ml}$)	65.99 \pm 2.48	57.55 \pm 0.17	25.24 \pm 1.47	24.04 \pm 0.57	
Hexane ($\mu\text{g/ml}$)	25.71 \pm 3.76	21.02 \pm 3.53	11.26 \pm 1.12	11.23 \pm 1.91	
Ethyl acetate ($\mu\text{g/ml}$)	43.44 \pm 1.68	44.43 \pm 1.56	26.01 \pm 3.09	25.62 \pm 1.54	
Aqueous ($\mu\text{g/ml}$)	>100	ND	>100	ND	
Rhinacanthin A (μM)	45.80 \pm 1.00	42.11 \pm 0.75	11.28 \pm 0.44	11.50 \pm 0.10	0.25
Rhinacanthin B (μM)	27.21 \pm 3.89	20.72 \pm 3.58	18.48 \pm 0.77	17.41 \pm 0.05	0.68
Rhinacanthin C (μM)	36.52 \pm 2.11	30.86 \pm 0.95	17.14 \pm 0.04	15.60 \pm 1.28	0.47



ภาพที่ 4-6 กลไกการยับยั้งของสาร rhinacanthin A (A), rhinacanthin B (B), rhinacanthin C (C) ต่อเอนไซม์ MAO-A และ rhinacanthin A (D), rhinacanthin B (E), rhinacanthin C (F) ต่อเอนไซม์ MAO-B.

4.4 การแสดงออกและการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ CYP2A6 และ CPR

ผู้วิจัยได้ทำการแสดงออกและทำบริสุทธิ์เอนไซม์ CYP2A6 และ CPR เอนไซม์ทั้งสองด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบจำเพาะโดยใช้ Ni^{2+} -NTA เป็นส่วนคงที่ (Ni^{2+} -Affinity chromatography) เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าเอนไซม์ CYP2A6 บริสุทธิ์ที่ได้มีขนาดมวลโมเลกุลประมาณ 55 kDa และเอนไซม์ CPR บริสุทธิ์ที่ได้มีขนาดมวลโมเลกุลประมาณ 78 kDa ทำการเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ที่ -80 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้

4.5 การยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ของสารสำคัญจากโสมน้ำเต้าและทองพันชั่ง

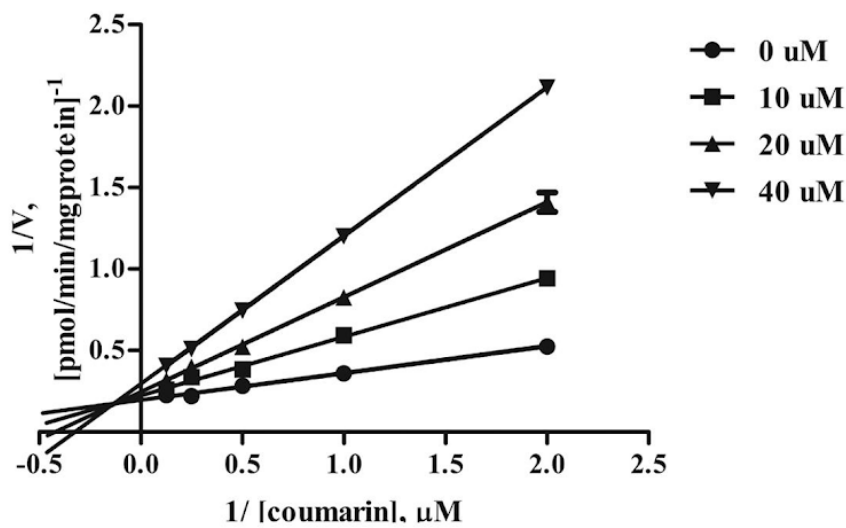
ทำการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ของสารสำคัญ Rheum1 จากโสมน้ำเต้า พบว่า สารสำคัญ Rheum1 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้ด้วยค่า IC_{50} ที่น้อยกว่า สารสำคัญ Rhinacanthin-A, -B และ -C ที่เคยรายงานใน Pouyfung at al., 2014 ประมาณ 4 – 20 เท่า (ตารางที่ 4-4) และเมื่อทำการศึกษาในสภาวะ pre-incubation ที่บ่มสารสำคัญร่วมกับเอนไซม์เพื่อเริ่มปฏิกิริยาก่อน แล้วจึงใส่

สารตั้งต้น โดยที่ถ้าค่า IC₅₀ ลดลง แสดงว่าสารสำคัญยับยั้งแบบผันกลับไม่ได้แบบ mexhanism based incubation เช่นเดียวกับสาร Rhinacanthin-A,-B และ -C จากผลการศึกษาคพบว่า Rheum 1 มีการยับยั้งแบบ mixed type inhibition (ภาพที่ 4-7)

ตารางที่ 4-4 ค่า IC₅₀ ของสารสำคัญจากโกฐน้ำเต้า (*R officinale*) และทองพันชั่ง (*R nasutus*)

Samples	CYP2A6	
	Co-incubation	Pre-incubation
<i>R.officinale</i>		
Rheum 1 (μM)	19.12 ± 0.28	21.01 ± 2.91
<i>R.nasutus</i>		
Rhinacantin A (μM)*	1.88 ± 0.13	0.63 ± 0.12
Rhinacantin B (μM)*	2.00 ± 0.03	1.19 ± 0.17
Rhinacantin C (μM)*	5.60 ± 0.94	1.18 ± 0.05

* ข้อมูลจาก Pouyfung et al., 2014



ภาพที่ 4-7 กลไกการยับยั้งของสาร rheum 1 ต่อเอนไซม์ CYP2A6

4.6 สรุปผลการทดลอง

ผลจากการศึกษาพบว่า สามารถใช้เอนไซม์ MAO จากสมองทดแทนเอนไซม์ MAO จากมนุษย์ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของสมุนไพรในเบื้องต้นได้ แต่ต้องตรวจสอบซ้ำอีกครั้งด้วยเอนไซม์ MAO จากมนุษย์ เพื่อยืนยันประสิทธิภาพในการยับยั้ง ผลการศึกษาพบว่า มีพืช 4 ชนิดที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ MAOs ทั้งสองเอนไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากนั้นเลือกพืชมาสองชนิดได้แก่ โกงฐน้ำเต้า และทองพันชั่ง มาศึกษาหาสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าว พบว่าสารสำคัญที่ได้จากโกงฐน้ำเต้า (Rheum1) สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MAO ทั้งสอง isoform ได้ดี โดยออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MAO-B ดีกว่าเอนไซม์ MAO-A ด้วยกลไกการยับยั้งแบบผันกลับได้ นอกจากนี้สารสำคัญ Rheum1 ยังสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดี ด้วยกลไกแบบ mixed-type inhibition นอกจากนี้ผู้วิจัยยังพบว่าสารสำคัญ 3 ชนิดจากทองพันชั่งได้แก่ Rhinacanthin-A, -B, และ -C สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MAO ทั้งสองได้ดีกว่า Rheum1 ด้วยกลไกการยับยั้งแบบแข่งขัน โดยสารทั้งสามชนิดเคยถูกรายงานว่าสามารถยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดีด้วยกลไกการยับยั้งแบบผันกลับไม่ได้ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MAOs สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ได้ด้วยเช่นกัน แสดงให้เห็นว่าสารสำคัญที่ได้สามารถนำไปใช้ในการช่วยลดอาการทางสมองและช่วยลดการสูบบุหรี่ได้ด้วยในเวลาเดียวกัน

4.7 ข้อเสนอแนะ

1. วิธีวิเคราะห์โดยใช้สาร ABTS และเอนไซม์ HRP กับวิธีวิเคราะห์ด้วยสารตั้งต้นเรืองแสง kynuramine สามารถใช้ในการตรวจสอบได้เช่นเดียวกัน แต่มีการให้ค่าของการยับยั้งที่แตกต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจากการวัดโดยใช้สาร ABTS และเอนไซม์ HRP เป็นวิธี coupling assay ดังนั้นต่อไปควรใช้สารตั้งต้น kynuramine ซึ่งเป็นการวัดปฏิกิริยาโดยตรง
2. ควรหาโครงสร้างของสาร Rheum1 เพื่อจะสามารถทำการศึกษาลักษณะอื่นๆได้ต่อไป

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, Adersen 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, Oreland 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.
- Naczki 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, Rongnparut 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., & Rongnparut, 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 oxidases 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). Safinamide 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 safinamide 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 tranlylcypromine 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 อินทรานุกกรณ์ (2550) การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร พิมพ์ครั้งที่ 2 คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ 215 หน้า

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