

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากมะเฟืองและขิงในการยับยั้งเอนไซม์ CYP2A13 และ
CYP2A6 ที่ย่อยสลายสารก่อมะเร็ง 4-(methylnitroso-amino)-1-(3-pyridyl)-1-
butanone (NNK) ในคน

Inhibition by *Averrhoa carambola* and *Zingiber officinale* Roscoe juices of
the human cytochrome P450, CYP2A13 and CYP2A6, the 4-(methylnitroso-
amino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) metabolizing enzyme

โดย

อ.ดร.ทรงกลด สารภูษิต

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

รศ.ดร. พรพิมล รงค์นพรัตน์

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ผศ. ดร. เอกรัฐ ศรีสุข

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

๗๔ ๐๑๗๖๕๕

- 7 ก.ค. 2558

354930

สนับสนุนโดย

เงินอุดหนุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล)

งบประมาณ ปี ๒๕๕๖

เริ่มบริการ

- 6 ก.ค. 2558

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่อง “การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากมะเฟืองและชิงในการยับยั้งเอนไซม์ CYP2A13 และ CYP2A6 ที่ย่อยสลายสารก่อมะเร็ง 4-(methylnitroso-amino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) ในคน” สามารถมีผลการทดลองที่ก้าวหน้าจนได้เสร็จสมบูรณ์เป็นรายงานฉบับนี้ ต้องขอขอบคุณการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยบูรพา ซึ่งผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้ นอกจากนี้ผู้วิจัยต้องขอขอบคุณ Prof. Dr. Jung-Ja P.Kim จาก Medical College of Wisconsin และ Assoc. Prof. Dr. Emily E. Scott จาก University of Kansas ประเทศสหรัฐอเมริกา ที่ให้ความกรุณามอบยีน rat CYP2A6 และ CYP2A13 ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ นอกจากนี้แล้วผู้วิจัยขอขอบคุณนิสิต-นักศึกษาทุกคนที่ช่วยทำการทดลอง รวมถึงคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาและคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดลที่ให้ความสนับสนุนด้านสถานที่และเครื่องมือต่างๆในการทำการทดลอง

คณะผู้วิจัย

บทคัดย่อ

ชื่อโครงการ การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากมะเฟืองและขิงในการยับยั้งเอนไซม์ CYP2A13 และ CYP2A6 ที่
ย่อยสลายสารก่อมะเร็ง 4-(methylnitroso-amino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) ในคน

ชื่อผู้วิจัย ทรงกลด สารภูษิต ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
พรพิมล รงค์นพรัตน์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
เอกรัฐ ศรีสุข ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ในปัจจุบันพบว่ามีอัตราการสูบบุหรี่เพิ่มสูงขึ้นและก่อให้เกิดผลร้ายต่างๆกับสุขภาพผู้ที่สูบบุหรี่และผู้ที่อยู่ใกล้ชิด อีกทั้งเป็นสาเหตุสำคัญในการเกิดโรคมะเร็งทางเดินหายใจซึ่งนับเป็นปัญหาที่ส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจของประเทศ โดยในบุหรี่มีสารนิโคตินที่ออกฤทธิ์ให้เกิดการเสพติด สามารถถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ CYP2A6 ที่ตับ ทำให้ระดับนิโคตินในเลือดต่ำและเกิดความอยากสูบบุหรี่ และ 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งในบุหรี่จะถูกกระตุ้นโดยเอนไซม์ CYP2A13 ที่ปอด ทำให้เกิดเป็นโรคมะเร็งปอดชนิด Adenocarcinoma ที่มีความสามารถในการแพร่กระจายสูง ดังนั้นการรักษาอาการเสพติดบุหรี่โดยการลดการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 จะช่วยลดโอกาสเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งปอดได้ ผลการศึกษาเบื้องต้นพบว่าน้ำขิงและน้ำมะเฟืองสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดี ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาฤทธิ์และกลไกของสารสกัดจากน้ำขิงและน้ำมะเฟืองในการยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ในหลอดทดลอง จากผลการศึกษาพบว่าส่วนสกัด Ethyl acetate ของน้ำขิงและน้ำมะเฟืองออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับส่วนสกัด Butanol และส่วนสกัดน้ำ ด้วยกลไกการยับยั้งแบบ mechanism based ที่ขึ้นอยู่กับ NADPH เวลาและความเข้มข้นของสารยับยั้ง อย่างไรก็ตามส่วนสกัด Ethyl acetate นี้ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ NADPH-Cytochrome P450 reductase ที่ทำหน้าที่ส่งอิเล็กตรอนให้กับเอนไซม์ในกลุ่ม cytochrome P450 ด้วยกลไกการยับยั้งแบบไม่แข่งขัน ด้วยเหตุนี้การนำส่วนสกัด Ethyl acetate ไปใช้จำเป็นต้องระมัดระวังถึงความปลอดภัยในการใช้เนื่องจากอาจส่งผลต่อการย่อยสลายยารักษาโรคของเอนไซม์ cytochrome P450 อื่นๆได้

Abstract

Project Title Inhibition by *Averrhoa carambola* and *Zingiber officinale* Roscoe juices of the human cytochrome P450, CYP2A13 and CYP2A6, the 4-(methylnitroso-amino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) metabolizing enzyme

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

Nowadays, the rate of cigarette smoking has been increased and is the cause of enormous deleterious effects on healthcare in both smoker and passive smokers. Various tobacco-related respiratory diseases are important economic problems in Thailand. Nicotine, an addictive components in cigarettes has been shown to metabolize by the liver specific cytochrome P450A6 enzyme, causing the decreasing in blood-nicotine level and smoking craving and continue smoking. The 4-(methyl-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK), a tobacco-specific carcinogen, has been shown to mainly metabolized by the lung-specific CYP2A13 enzyme and associate with adenocarcinoma lung cancer risk in smokers. Thus, inhibition of these two enzymes by specific inhibitor could an aid in smoking cession and lung cancer prevention. Our preliminary studied indicated that the ginger and starfruits juices could potentially highest inhibit the CYP2A6 enzyme. This study aims to further investigate the inhibitory activity and inhibition mechanism of the ginger extracts and starfruits extracts against CYP2A6 and CYP2A13 enzymes *in vitro*. The results, here in, indicated that the Ethyl acetate fraction showed the highest inhibitory activity against both enzymes compared to Butanol and water fraction. In addition the Ethyl acetate fraction of ginger and starfruit could irreversibly inhibited both CYP2A6 and CYP2A13 enzymes in mechanism based inhibition (MBI) mode (NADPH-, time-, and concentration-dependent). However, both extracts could potentially reversibly inhibited the P450 redox partner, NADPH-cytochrome P450 reductase (CPR) in non-competitive mode. This enzyme functions to transfer electron, one by one, from NADPH to various cytochrome P450 enzyme. Therefore, application the the Ethyl acetate fraction from both plants for smoking cessation therapy should be in caution from Food-drug interaction with various drug-metabolizing cytochrome P450 enzyme.

บทที่ 1

บทนำ

1.1ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคระบบทางเดินหายใจ อันเนื่องจากการสูบบุหรี่ทั้งในผู้เสพบุหรี่และบุคคลใกล้ชิดผู้เสพบุหรี่ (passive smoker) เช่น โรคมะเร็งปอด และโรคถุงลมโป่งพอง จัดเป็นภัยเงียบที่เป็นหนึ่งในปัญหาสำคัญของประเทศไทย จากการประมาณการพบว่าคนไทยทั้งผู้เสพบุหรี่และบุคคลใกล้ชิดผู้เสพบุหรี่เสียชีวิตจากโรคที่เกี่ยวข้องกับการสูบบุหรี่ปีละประมาณ 42,000 คน หรือวันละ 115 คน โดยในปี พ.ศ. 2549 มีผู้ป่วยที่สูบบุหรี่ได้รับวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งปอดประมาณ 5,299 ราย โรคหัวใจ 52,605 รายและโรคถุงลมโป่งพอง 624,309 ราย ทำให้มีการสูญเสียค่าใช้จ่ายในการรักษาอย่างน้อยเป็นเงิน 9,857 ล้านบาท หรือคิดเป็น 0.48% ของ GDP ในปี พ.ศ. 2549 จากผลการสำรวจในปี พ.ศ. 2552 พบว่ามีคนไทยสูบบุหรี่ถึง 10.90 ล้านคนหรือ 20.87 % ของประชากรทั้งประเทศ โดยผู้สูบบุหรี่ส่วนใหญ่อยู่ในวัยทำงาน (อายุ 25-59 ปี) นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราการสูบบุหรี่เพิ่มขึ้นในกลุ่มเยาวชน กลุ่มผู้ไม่เคยเรียนหนังสือ และผู้อาศัยอยู่นอกเขตเทศบาล รวมถึงผู้มีฐานะในระดับปานกลางทั่วไป ที่สำคัญที่สุดผู้สูบบุหรี่เหล่านี้นั้นราว 6.4 ล้านคน ยังสูบบุหรี่ขณะอยู่ในที่ทำงาน หรือบ้านที่มีบุคคลในครอบครัวอาศัยอยู่เป็นประจำ (passive smoker) ทำให้ประชากรในวัยทำงานประมาณ 3.3 ล้านคนได้รับควันบุหรี่ในที่ทำงานและประมาณ 20.5 ล้านคนได้รับควันบุหรี่ในบ้าน นอกจากนี้ยังพบว่าสตรีมีครรภ์ราว 17,059 คนสูบบุหรี่ในระหว่างตั้งครรภ์และในจำนวนนี้ร้อยละ 84.78 สูบบุหรี่ระหว่างให้นมบุตร ซึ่งทั้งหมดนี้ส่งผลต่อสุขภาพของประชากรตั้งแต่อยู่ในครรภ์มารดา รวมทั้งเป็นการปลูกฝังพฤติกรรมการสูบบุหรี่ให้แก่เด็กและเยาวชนอีกด้วย นอกจากนี้ในกลุ่มผู้เสพบุหรี่นี้มีเพียง 1.77 ล้านคนเท่านั้นที่เคยและพยายามเลิกบุหรี่แต่ไม่ประสบความสำเร็จ (ศิริวรรณ และคณะ 2555) เนื่องด้วยการสูบบุหรี่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของประชากร การพัฒนาทรัพยากรมนุษย์ และด้านเศรษฐกิจของประเทศ ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อช่วยในการลด ละ เลิกการสูบบุหรี่ เพื่อไม่ให้ผู้เสพบุหรี่และบุคคลใกล้ชิดได้รับสารพิษและสารก่อมะเร็งจากบุหรี่ ซึ่งจำเป็นต่อการลดภาวะการเกิดโรค และเพิ่มคุณภาพชีวิตของประชาชนทั้งในระยะสั้นและระยะยาว

เมื่อสูบบุหรี่หรือได้รับควันบุหรี่ ร่างกายจะได้รับสารพิษต่างๆมากกว่าหนึ่งพันชนิดจากควันบุหรือนั้นๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารประกอบในกลุ่มไนโตรซามีน 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) ที่จะถูกกระตุ้นให้เกิดเป็นสารก่อมะเร็งที่รุนแรง และสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดโรคมะเร็งปอดได้ในสัตว์ทดลอง เพราะนอกจากสาร NNK ที่เข้าสู่ร่างกายจะถูกย่อยสลายด้วยกลไกหลักผ่านเอนไซม์ CYP2A13 ที่พบมากในปอดและในเยื่อบุทางเดินหายใจได้เป็นสารประกอบ NNK-N-Oxide ที่จะถูกกำจัดออกไปแล้ว เอนไซม์ CYP2A13 สามารถเกิดปฏิกิริยาข้างเคียงได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบ NNK อื่นๆที่มีฤทธิ์ในการก่อสารมะเร็งที่รุนแรงขึ้น ส่งผลให้เกิดโรคมะเร็งต่างๆในทางเดินหายใจได้ (Patten et al., 1996) จากการศึกษาพบว่าผู้สูบบุหรี่ที่มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 ลดลงจะมีการย่อยสลาย NNK น้อยลงและมีอัตราการเกิดโรคมะเร็งปอดลดลง ในขณะที่การย่อยสลาย NNK ด้วยเอนไซม์ CYP2A6 ที่ตับซึ่งเป็นกลไกรองของร่างกายในการกำจัดสารพิษ NNK ก็สามารถเกิดปฏิกิริยาข้างเคียงให้เกิดสารก่อมะเร็งรุนแรงได้เช่นกัน แต่ยังไม่มียารายงานถึงความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งปอดและมะเร็งตับในผู้สูบบุหรี่ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเอนไซม์ทั้งสองยังเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายนิโคตินซึ่งเกี่ยวข้องกับการพฤติกรรมการณ์การสูบบุหรี่ โดยการลดการทำงานของเอนไซม์ทั้ง

สองทำให้ร่างกายคงระดับนิโคตินในเลือดให้นานขึ้น ผู้สูบบุหรี่จึงลดปริมาณการสูบบุหรี่ต่อวันลงซึ่งเป็นการลดการสูบบุหรี่ทางเลือกอีกทางหนึ่งด้วย

ดังนั้นการลดการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 และ CYP2A6 ด้วยตัวยับยั้งจำเพาะ จะส่งผลให้การกระตุ้นสารก่อมะเร็งจาก NNK และลดการย่อยสลายนิโคตินในร่างกาย ซึ่งเป็นการลดโอกาสที่ร่างกายจะสร้างสารก่อมะเร็งที่รุนแรงและลดการสูบบุหรี่ไปด้วยพร้อมกัน จึงลดผลร้ายต่างๆที่เกิดขึ้นกับร่างกาย ทั้งในตัวผู้สูบบุหรี่และผู้ใกล้ชิดได้ ทั้งนี้สืบเนื่องจากผลการทดลองเบื้องต้นพบว่า น้ำมะเฟืองและน้ำขิงออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 และ CYP2A6 ได้ดี (Pouyfung et al., 2013; Prasomthai et al., 2013) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 และ CYP2A6 จากนั้นทำการสกัดสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A13 และ CYP2A6 เพื่อนำมาใช้ช่วยลดการสูบบุหรี่และลดโอกาสในการเกิดโรคมะเร็งปอดในอนาคต

จุดประสงค์ในการศึกษานี้เพื่อศึกษาฤทธิ์และกลไกของน้ำมะเฟือง (*Averrhoa carambola*) และน้ำขิง (*Zingiber officinale* Roscoe) และสารสำคัญจากมะเฟืองและขิง ที่เป็นผลไม้และสมุนไพรพื้นบ้านที่มีสรรพคุณในการใช้รักษาโรคต่างๆและนิยมรับประทานทั่วไปทั้งในรูปแบบผลไม้สดหรือแบบที่แปรรูปเป็นน้ำผลไม้ ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 และเอนไซม์ CYP2A6 โดยใช้วิธีการตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ cytochrome P450 ในหลอดทดลอง (cytochrome P450 reconstitution system) ที่มีสารเรืองแสง (Fluorescent) เป็นตัวตรวจสอบ โดยวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายต่อการทดสอบ รวดเร็ว และจำเพาะต่อเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 (Donato et al., 2004) ซึ่งผลการทดลองที่ได้จะมีประโยชน์ในการนำพืชสมุนไพรที่มีอยู่ทั่วไปและหาได้ง่ายมาถ่ายทอดความรู้ให้กับชุมชนและประชาชนทั่วไปได้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

ศึกษาฤทธิ์และกลไกของน้ำมะเฟือง (*Averrhoa carambola*) และน้ำขิง (*Zingiber officinale* Roscoe) ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13

1.3 สมมุติฐานทางการศึกษา

สารสกัดจากน้ำมะเฟืองและน้ำขิง สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ได้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

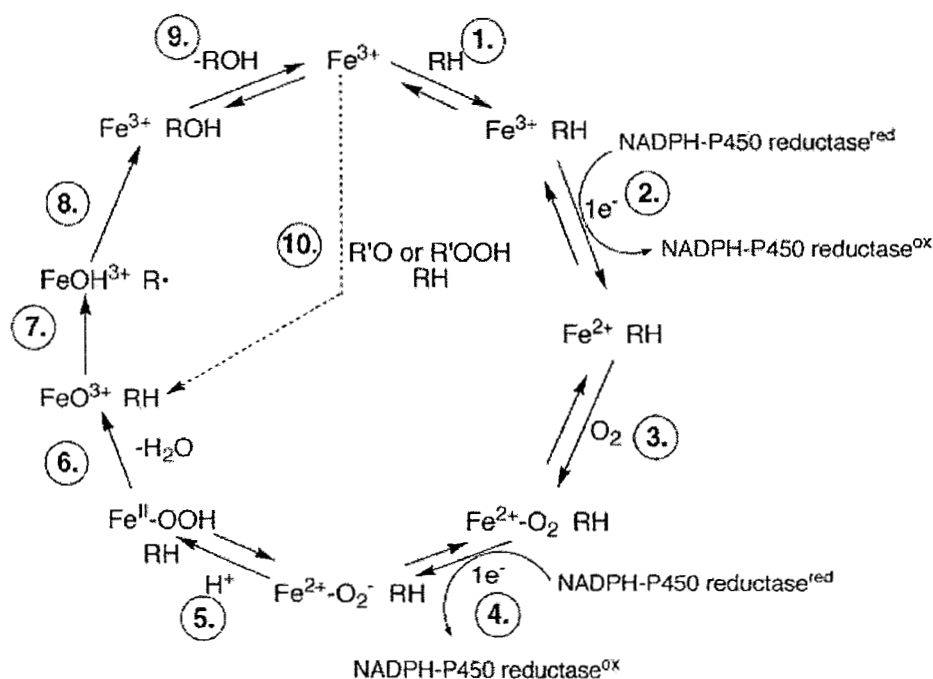
ทำให้ทราบฤทธิ์และกลไกการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ของน้ำมะเฟืองและน้ำขิงที่น่าจะสามารถนำมาใช้เพื่อช่วยลดกอัตราการสูบบุหรี่ได้

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

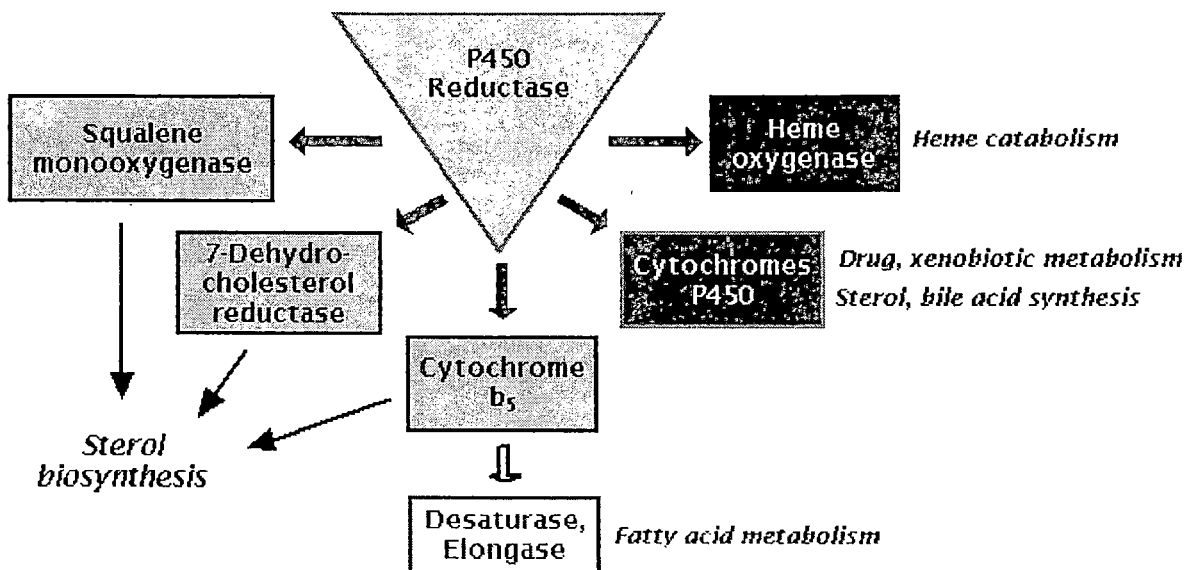
2.1 ทฤษฎีพื้นฐานที่เกี่ยวข้อง

เอนไซม์ Cytochrome P450 (CYPs หรือ P450s) เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการการเมแทบอลิซึมของสารเคมี รวมทั้งสารที่มีอยู่ในร่างกายเช่น ฮอโมนและกรดไขมันต่างๆ และสารที่ร่างกายได้รับจากภายนอกเช่น ยาและสิ่งปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมต่างๆ เอนไซม์ P450 จึงมีความสำคัญต่อการดำรงชีวิต และเนื่องจากเอนไซม์ P450s มีพบเป็นจำนวนมากในร่างกายและในสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิด ดังนั้นเอนไซม์ P450 จึงถูกแยกย่อยและแบ่งออกเป็นกลุ่มๆตามลำดับความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนของยีนนั้นๆ โดยยีนที่อยู่ในตระกูล (Family) เดียวกันต้องมีความคล้ายคลึงของกรดอะมิโนมากกว่าร้อยละ 40 และยีนในตระกูลย่อย (Subfamily) เดียวกันต้องมีความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนมากกว่าร้อยละ 55 ทั้งนี้เนื่องจาก P450s ไม่ได้ถูกจัดจำแนกตามกลุ่มของสารตั้งต้นที่ทำปฏิกิริยาหรือชนิดของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น เพราะฉะนั้นเอนไซม์ P450s ในตระกูลและตระกูลย่อยเดียวกันอาจเร่งปฏิกิริยาที่มีความแตกต่างหรือมีความเหมือนกันก็ได้ และเอนไซม์ P450s หนึ่งเอนไซม์ยังสามารถทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นได้มากกว่า 1 ตัวอีกด้วย (Bernhardt R, 2006; Mansuy D, 1998; Nelson et al, 1996; Ortiz, 2005)



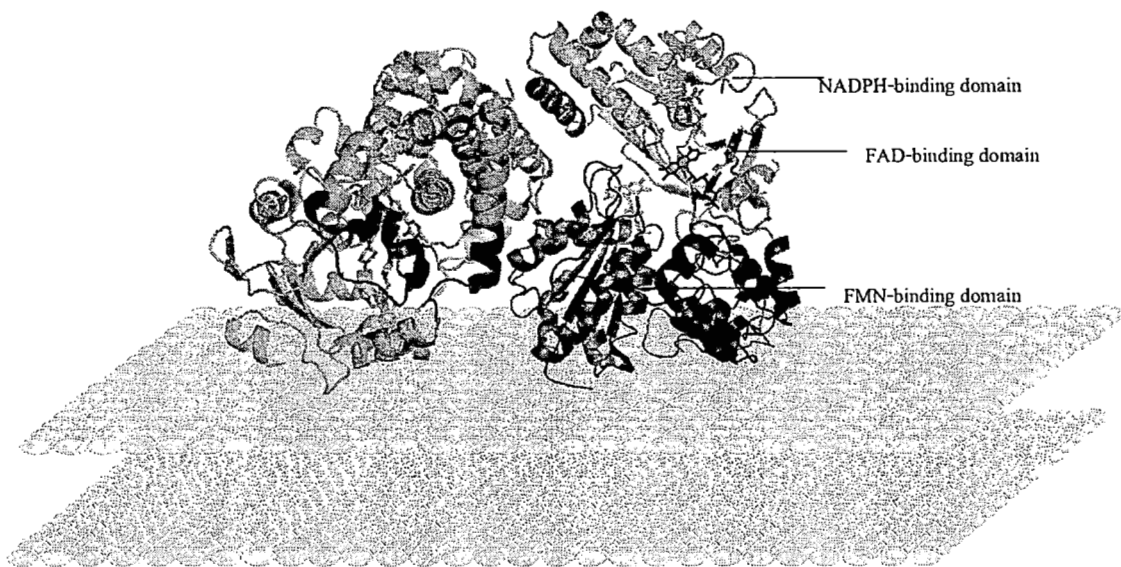
รูปที่ 2-1 ปฏิกิริยาของเอนไซม์ P450s โดยแบ่งออกเป็นขั้นตอนการกระตุ้นโมเลกุลของออกซิเจน (ขั้นตอนที่ 1-6) การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (ขั้นตอนที่ 7 และ 8) และการปล่อยผลิตภัณฑ์ (ขั้นตอนที่ 9) ที่มา Guengerich FG, 2001

ในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ P450s นั้น (รูปที่ 2-1) เอนไซม์ P450s จะต้องได้รับอิเล็กตรอนที่ส่งผ่านมาจาก เอนไซม์ NADPH-cytochrome P450 reductase (CPR) โดยที่อิเล็กตรอนตัวแรกจะรีดิวซ์เหล็ก (Fe^{3+} เป็น Fe^{2+}) ที่เป็นส่วนประกอบหนึ่งของเอนไซม์ P450s เพื่อให้เอนไซม์ P450s สามารถจับกับออกซิเจนได้ ส่วนตัวอิเล็กตรอนตัวที่สอง จะเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในโมเลกุลของออกซิเจนให้เกิดเป็นสารประกอบไฮดรอกซิล (iron-hydroxy complex) และเร่งการเกิดปฏิกิริยาต่อไปโดยเอนไซม์ทั้งสองจะทำงานร่วมกันใน Endoplasmic reticulum ของเซลล์ ในการเร่งปฏิกิริยาต่าง เช่น Squalene monooxygenase, Heme oxygenase และโดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์ในกลุ่ม Cytochrome P450 ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมที่สำคัญต่างๆ (Bernhardt R, 2006; Emre M et al, 2007; Guengerich FG, 2001; Ortiz, 2005) รวมถึงตัวรับอิเล็กตรอนอื่นๆเช่น cytochrome c และ ferricyanide ได้ด้วยเช่นกัน (ภาพที่ 2-2)



ภาพที่ 2-2 ตัวรับอิเล็กตรอนของเอนไซม์ NADPH-cytochrome P450 reductase ที่มีหน้าที่การทำงานต่างๆ ที่มา www.uky.edu/Pharmacy/ps/porter/CPR.htm

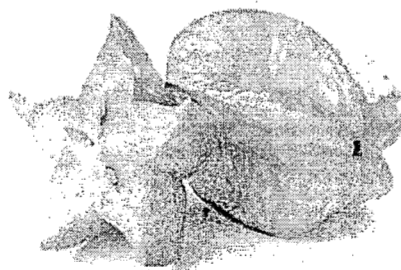
เอนไซม์ CPR เป็นเอนไซม์ที่มีส่วนจับกับเยื่อหุ้มเมมเบรนและประกอบด้วยโมเลกุลของ FAD และ FMN ทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ช่วยในการขนส่งอิเล็กตรอน โดยอิเล็กตรอนจะถูกขนส่งจาก NADPH ผ่านโมเลกุลของ FAD และ FMN ไปยังตัวรับอิเล็กตรอนซึ่งก็คือเอนไซม์ต่างๆ ที่กล่าวในเบื้องต้น เนื่องจาก เอนไซม์ CPR เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สำคัญในการทำงานของเอนไซม์ P450s ที่มีความสำคัญอย่างมากต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิต ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาเอนไซม์ CPR ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดเช่น CPR ของคน, หนูและแมลงวัน อย่างกว้างขวาง (Shen et al., 1989; Dohr et al., 2001; Murataliev et al, 1999) โดยจากการศึกษาโครงสร้างสามมิติของ CPR ในหนูพบว่า CPR ประกอบด้วย 4 โดเมน คือ NH_2 -terminal, FMN-binding domain, FAD-binding domain, และ NADPH-binding domain (Wang et al., 1997) โดยส่วน FMN domain จะแยกออกมาให้เห็นเด่นชัด ในขณะที่ส่วน FAD-binding domain และ NADPH-binding domain จะอยู่รวมกัน (ภาพที่ 2-3)



ภาพที่ 2-3 แบบจำลองของ Cytochrome P450s (ซ้าย) และ P450s Oxidoreductase (ขวา) ซึ่งเรียงตัวกันอยู่ใน Endoplasmic reticulum

2.2 สมุนไพรที่ใช้ในการศึกษา

2.2.1 มะเฟือง



ภาพที่ 2-4 มะเฟือง
(ที่มา : <http://frynn.com>)

ชื่อสามัญ carambola
ชื่อพื้นเมือง มะเฟืองเปรี้ยว มะเฟืองส้ม เฟือง สะบือ (เขมร)
ชื่อวิทยาศาสตร์ *Averrhoacarambola* Linn.
ชื่อวงศ์ AVERRHACEAE

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

- ต้น ไม้ยืนต้นขนาดเล็กจนถึงขนาดกลางมีลำต้นเป็นสีน้ำตาลอ่อน เปลือกของลำต้นค่อนข้างขรุขระมีตุ่มเล็กๆ ทั่วใบ
- ใบ ใบประกอบแบบขนนกออกเรียงกันเป็นคู่ๆ ไปตามแผง แผงหนึ่งมี 7-15 คู่ ลักษณะของใบย่อย เป็นรูปมนรี ขอบขนานแกมใบหอก ปลายใบแหลม ริมขอบใบเรียบเกลี้ยง ใบย่อยตรงปลายมักมีขนาดใหญ่กว่าใบตรงโคนแผง
- ดอก ดอกออกเป็นช่อสั้นๆ อยู่ตามบริเวณกิ่งและลำต้น ดอกมีสีม่วงอ่อนเป็นดอกขนาดเล็ก

- ผล ลักษณะของผลเป็นรูปเฟืองมีกลีบอยู่ 5 กลีบ เมื่อยังอ่อนผลเป็นสีเขียว แต่พอผลสุกหรือแก่เต็มที่ ผลก็เปลี่ยนเป็นสีเหลืองส้ม ผลสดอวบน้ำมีสันโดยรอบผ่าตามขวางเป็นรูปดาว เมล็ดมีสีดำยาวเรียวยาวประมาณ 5 มิลลิเมตร

ข้อควรระวัง มีประจำเดือนห้ามกิน ตกขาว ถ้าตั้งครรภ์กินเข้าไปทำให้แท้ง

(ที่มา : [http://scratchpad.wikia.com/wiki/สืบก้นเมื่อ 31 ตุลาคม 2556](http://scratchpad.wikia.com/wiki/สืบก้นเมื่อ_31_ตุลาคม_2556))

2.2.2 ขิง



ภาพที่ 2-5 ขิง

(ที่มา : <http://frynn.com/%E0%B8%82%E0%B8%B4%E0%B8%87/>)

ชื่อสามัญ

Ginger

ชื่อพื้นเมือง

ขิงแกลง ขิงแดง (จันทบุรี) ขิงเผือก (เชียงใหม่) สะเอ (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน)

ชื่อวิทยาศาสตร์

Zingiberofficinale Roscoe

ชื่อวงศ์

Zingiberaceae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

- ไม้ล้มลุก มีเหง้าใต้ดินสีน้ำตาลแกมเหลือง เนื้อในสีนวล มีกลิ่นเฉพาะ จะแทงหน่อหรือลำต้นเทียมขึ้นมาเหนือพื้นดิน

- ใบ เป็นใบเดี่ยว ออกเรียงสลับ รูปขอบขนาน ดอก ออกเป็นช่อ แทงออกจากเหง้าใต้ดิน ใบสลับเรียงเวียนสีเขียวอ่อน

- ดอกสีเหลืองแกมเขียว ผล เป็นผลแห้งทรงกลม ขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร เมล็ดเป็น 3 พู เมล็ด หลายเมล็ด
สรรพคุณ :

ต้น - ขับผายลม แก้อาเจียนแน่นท้อง แก้นิ่ว บำรุงไฟธาตุ แก้อาการเบื่อ ช่วยย่อยอาหาร ฆ่าพยาธิ แก้อาการปวด บิด แก้อาการปวด แก้อาการร้องอย่างแรง แก้อาเจียน

ใบ - แก้อาการกำเริบ ขับผายลม แก้นิ่วแก้อาการปวด แก้อาการเบื่อ บำรุงไฟธาตุ ช่วยย่อยอาหาร ฆ่าพยาธิ แก้อาการปวด บิด ขับลมในลำไส้

ดอก - ทำให้ชุ่มชื้น แก้อาการปวด ฆ่าพยาธิ ช่วยย่อยอาหาร แก้อาการเบื่อ บำรุงไฟธาตุแก้นิ่ว แก้อาการปวด บิด

ผล - แก้ไข้

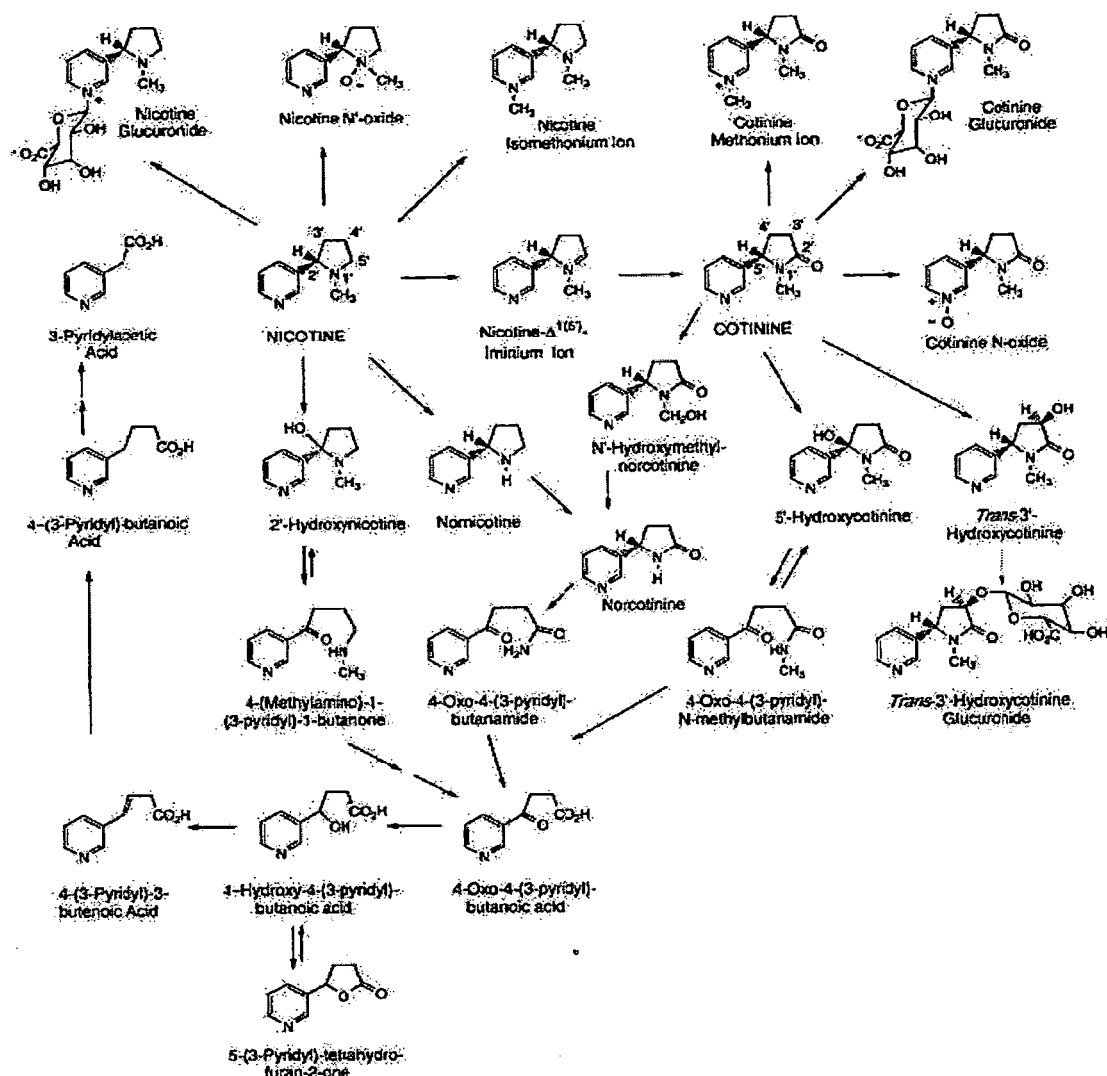
ส่วนที่ใช้ [] เหง้าแก่สด ต้น ใบ ดอก ผล

(ที่มา : http://www.rspg.or.th/plants_data/herbs/herbs_11_1.htm สืบก้นเมื่อ 31 ตุลาคม 2556)

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคระบบทางเดินหายใจ อันเนื่องจากการสูบบุหรี่ทั้งในผู้สูบบุหรี่และบุคคลใกล้ชิดผู้สูบบุหรี่ (passive smoker) เช่น โรคมะเร็งปอด และโรคถุงลมปอดโป่งพอง จัดเป็นภัยเงียบที่เป็นหนึ่งในปัญหาสำคัญของประเทศไทย จากการคาดการณ์ขององค์การอนามัยโลก (WHO) คาดว่าในปี พ.ศ. 2573 จะมีผู้เสียชีวิตด้วยโรคดังกล่าวถึง 8 ล้านคน (WHO, 2008) สำหรับประเทศไทยในปี 2552 พบว่า มีคนเสียชีวิตจากโรคที่เกิดจากการสูบบุหรี่ในกลุ่มคนอายุ 30 ปีขึ้นไป 48,338 คนหรือประมาณ 12% ของการเสียชีวิตทั้งหมด โดยโรคมะเร็งปอดและเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตถึง ร้อยละ 23.4 (11,303 คน) และพบในผู้ป่วยที่สูบบุหรี่ถึงร้อยละ 75 ทำให้มีการสูญเสียค่าใช้จ่ายในการรักษาอย่างน้อยเป็นเงิน 43.6 พันล้านบาท คิดเป็น 0.5% ของ GDP (Bundhamcharoen, 2012) ล่าสุดจากผลการสำรวจในปี พ.ศ. 2554 พบว่ามีคนไทยสูบบุหรี่ถึง 11.5 ล้านคนหรือเกือบ 20 % ของประชากรทั้งประเทศ โดยผู้สูบบุหรี่ส่วนใหญ่อยู่ในวัยรุ่นและวัยทำงาน (อายุ 19-40 ปี) ถึงร้อยละ 46.4 โดยที่อัตราการสูบบุหรี่เพิ่มขึ้นในกลุ่มเยาวชน กลุ่มผู้มีการศึกษาน้อย และผู้อาศัยอยู่นอกเขตเทศบาล รวมถึงผู้มีฐานะในระดับปานกลางทั่วไป ที่สำคัญที่สุดผู้สูบบุหรี่เหล่านี้ราว 6.4 ล้านคน ยังสูบบุหรี่ขณะอยู่ในที่ทำงาน หรือบ้านที่มีบุคคลในครอบครัวอาศัยอยู่เป็นประจำ (passive smoker) ทำให้ประชากรในวัยทำงานประมาณ 3.3 ล้านคนได้รับควันบุหรี่ในที่ทำงานและประมาณ 20.5 ล้านคนได้รับควันบุหรี่ในบ้าน นอกจากนี้ยังพบว่าสตรีมีครรภ์ราว 17,059 คนสูบบุหรี่ในระหว่างตั้งครรภ์และในจำนวนนี้ร้อยละ 84.78 สูบบุหรี่ระหว่างให้นมบุตร ซึ่งทั้งหมดนี้ส่งผลต่อสุขภาพของประชากรตั้งแต่อยู่ในครรภ์มารดา รวมทั้งเป็นการปลูกฝังพฤติกรรมการสูบบุหรี่ให้แก่เด็กและเยาวชน โดยในกลุ่มผู้สูบบุหรี่นี้มีเพียง 1.77 ล้านคนเท่านั้นที่เคยและพยายามเลิกบุหรี่แต่ไม่ประสบความสำเร็จ โดยมีค่าเฉลี่ยของการเลิกบุหรี่ได้ก่อนกลับมาสูบซ้ำคือ 11.44 เดือน และพบว่าถึงแม้เลิกบุหรี่ไปแล้วถึง 20 ปีก็สามารถกลับมาสูบบุหรี่ได้อีก แสดงให้เห็นว่าการเสพติดบุหรี่เพียงหนึ่งครั้งส่งผลให้ต้องเสพติดบุหรี่และสามารถเลิกการเสพติดได้ยาก (ศิริวรรณ และคณะ 2555)

จากการศึกษาพบว่า บุหรี่ประกอบไปด้วยสารประกอบต่างๆมากกว่า 4,000 ชนิด รวมถึงสารปรุงแต่งมากกว่า 40 ชนิดที่เป็นสารพิษและสารก่อมะเร็งที่ได้รับการดูดเข้าไปในปอด ดังนั้นโรคมะเร็งปอดจึงเป็นโรคมะเร็งที่พบมากที่สุดในกลุ่มผู้สูบบุหรี่และผู้ใกล้ชิด เช่นเดียวกับการเกิดโรคทางเดินหายใจอื่นๆเช่น โรคถุงลมปอดโป่งพอง (WHO, 2008) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าในกลุ่มผู้สูบบุหรี่ยังเป็นกลุ่มเสี่ยงที่จะมีอาการของโรคหัวใจขาดเลือด โรคหัวใจวาย และโรคที่เกี่ยวข้องต่างๆอีกด้วย (WHO, 2008) อุบัติการณ์การเกิดโรคต่างๆเหล่านี้เกิดขึ้นเนื่องจากสารนิโคตินในบุหรี่ไปออกฤทธิ์โดยตรงที่ระบบประสาทส่วนกลาง ในการกระตุ้นระบบการตอบสนองต่อความยินดี ทำให้มีการหลั่งสารโดปามีนออกมามากขึ้น ผู้สูบบุหรี่จึงมีความรู้สึกสุขสบายใจ ปราศจากความเครียดต่างๆ ดังนั้นผู้สูบบุหรี่จึงต้องสูบบุหรี่ตลอดเวลาเพื่อคงระดับของนิโคตินในกระแสเลือดและในสมองให้เกิดความรู้สึกดังกล่าวต่อไป ส่งผลให้ผู้สูบบุหรี่และบุคคลใกล้ชิดได้รับสารพิษต่างๆในบุหรี่ไปด้วย (Hukkanen et al, 2005) นอกจากนี้นิโคตินยังมีผลเพิ่มความดันโลหิตและทำให้หัวใจเต้นเร็วขึ้นอีกด้วย (Benowitz, 2008)



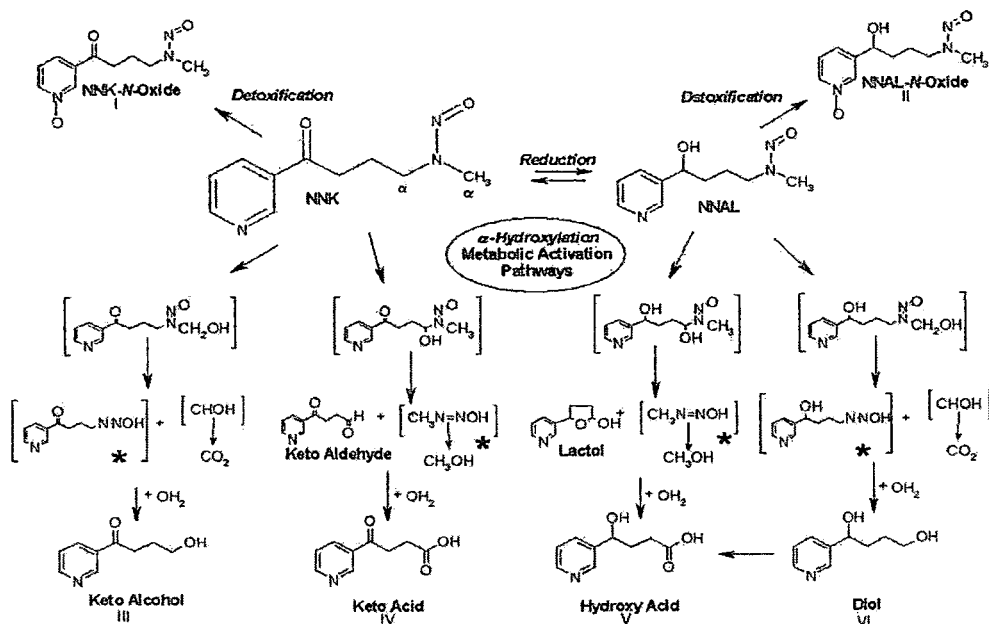
ภาพที่ 2-4 กลไกในการกำจัดนิโคติน (Hukkanen et al, 2005)

เมื่อสูบบุหรี่นิโคตินจะเข้าสู่ร่างกายผ่านทางเยื่อเยื่อคัตหลังที่ปาก (Oral mucosa) เข้าสู่ระบบทางเดินหายใจและระบบทางเดินอาหาร โดยที่ประมาณ 80-90% ของนิโคตินที่เข้าสู่ร่างกายจะถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ CYP2A6 ในตับเกิดเป็นสารประกอบ nicotine $\Delta^{1(5)}$ -iminium และเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันไปเป็นสารประกอบโคตินิน หลังจากนั้นโคตินินที่เกิดขึ้นจะเกิดปฏิกิริยา hydroxylation ได้เป็นสารประกอบต่างๆ เช่น *trans*-3'-hydroxycotinine, 5'-hydroxycotinine และ normicotine (รูป 2-4) ซึ่งสุดท้ายแล้วทั้งโคตินินและสารประกอบที่ได้จากโคตินินต่างๆ จะถูกเติมหมู่น้ำตาล (glucuronation) และขับออกทางปัสสาวะ (Benowitz, 2008; Flammang et al, 1992; Hukkanen et al, 2005) และนิโคตินอีกส่วนหนึ่งจะถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ CYP2A13 ในระบบทางเดินหายใจ ที่ไม่ได้เป็นระบบหลักที่ร่างกายใช้ในการกำจัดนิโคตินออกจากร่างกาย (Hukkanen et al, 2002; Su et al, 2000)

สำหรับ NNK นั้นเมื่อเข้าสู่ร่างกาย ส่วนใหญ่จะทำถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ CYP2A13 ที่แสดงออกในปริมาณมากที่ปอดและที่เซลล์เยื่อทางเดินหายใจได้เป็นสารประกอบ NNK-N-oxide และ NNAL ซึ่งจะถูกรอก

ซีไดส์อีกครั้งด้วย CYP2A13 เกิดเป็นสารประกอบ NNAL-N-Oxide (ภาพที่ 2-5) หรือถูกเติมหมู่น้ำตาลกลายเป็น NNAL-glucoronide จากนั้นสารประกอบทั้งหมดจะถูกกำจัดออกจากร่างกายทางปัสสาวะ ซึ่งเป็นบทบาทที่สำคัญของ CYP2A13 ในการกำจัดสารพิษ (NNK-detoxification) ออกจากร่างกาย อย่างไรก็ตามเอนไซม์ CYP2A13 สามารถเร่งปฏิกิริยา hydroxylation ที่หมู่ α -methyl carbon หรือ α -methylene carbon ของ NNK หรือ NNAL ได้เป็นสารประกอบ NNK-keto alcohol, NNK-Keto acid, NNAL-diol และ NNAL-Hydroxy acid (รูปที่ 2-5) ที่มีฤทธิ์เป็นสารก่อมะเร็งที่รุนแรงขึ้นได้ (NNK-metabolic activation) และสารประกอบที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยานี้จะสร้างเป็นสารประกอบซับซ้อนกับสารพันธุกรรมดีเอ็นเอเกิดเป็น DNA-pyridyloxo (hydroxyl) butylation complexes ได้สารประกอบในกลุ่ม methylguanine DNA adduct ที่ตำแหน่งออกซิเจนที่ 6 และไนโตรเจนที่ 7 (O^6 -MeG และ N^7 -MeG) ซึ่งสันนิษฐานว่าเป็นกลไกที่สำคัญของสารประกอบ NNK ในบุหรี ในการทำให้เกิดมะเร็ง (carcinogenesis) โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคมะเร็งต่างๆในระบบทางเดินหายใจ เช่นโรคมะเร็งปอด ชนิด adenocarcinoma และ squamous cell carcinoma ที่เป็นมะเร็งปอดที่มีความสามารถในการแพร่กระจายสูง (malignant pulmonary tumor) ไปสู่บริเวณต่างๆของปอดหรือแม้แต่วัยวะอื่นๆได้ง่าย (Brown, 2007; Hecht et al, 1998; 1999a; 1999b; Hoffmann et al, 1996; Fukami et al, 2010) และมะเร็งกล่องเสียง (Chiang et al., 2011; Hecht, 1998; Hecht, 1999a, 1999b)

เอนไซม์ในกลุ่ม cytochrome P450 (CYP,P450) คือกลุ่มของเอนไซม์ที่มีหมู่ heme เป็นองค์ประกอบและมีความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาย่อยสลายสารต่างๆทั้งภายในและภายนอกร่างกาย เช่นฮอร์โมน หรือสารแปลกปลอมที่ปนเปื้อนในอาหารและสิ่งแวดล้อม ในคนมีเอนไซม์ P450 ถึง 18 กลุ่มและ 43 กลุ่มย่อย (<http://dmelton.utmen.edu/CytochromeP450.html>) โดยเอนไซม์ P450 ที่พบว่าเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาย่อยสลาย NNK ในร่างกายคือเอนไซม์ CYP2A6 ที่พบในตับและปอด เอนไซม์ CYP2A13 ที่พบในปอดและระบบทางเดินหายใจ เอนไซม์ CYP2E1 และเอนไซม์ CYP3A4 ในตับ (Di et al., 2009; Hecht et al, 1998; Hukkunen, 2005; Smith et al, 1992; 1999; 2003; Su et al, 2000) จากการศึกษาพบว่าทุกเอนไซม์ที่กล่าวมาสามารถเร่งปฏิกิริยาย่อยสลาย NNK (NNK-detoxification) ได้ในหลอดทดลอง แต่มีเพียงเอนไซม์ CYP2A13 เท่านั้นที่สามารถเกิดปฏิกิริยา NNK- α -carbon hydroxylation ซึ่งเป็นปฏิกิริยากระตุ้นการเกิดสารก่อมะเร็งได้ ด้วยค่าความสามารถในการจับกับสารตั้งต้น (K_m) ต่ำ NNK ที่ต่ำและอัตราการเร่งปฏิกิริยา (V_{max}) ที่สูง และยังเหนี่ยวนำให้เกิดโครงสร้างซับซ้อนของ O^6 -MeG และ N^7 -MeG ได้ ด้วยเหตุนี้ปฏิกิริยา NNK-hydroxylation ของ CYP2A13 จึงถูกสันนิษฐานว่าเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็งต่างๆในระบบทางเดินหายใจในผู้สูบบุหรี (Chiang et al., 2011; He et al, 2004; Peterson et al, 1990; Su et al, 2000) นอกเหนือไปจากความสามารถในการย่อยสลาย NNK แล้ว เอนไซม์ CYP2A13 ยังถูกพบว่าสามารถย่อยสลายสารประกอบอื่นๆได้ เช่น สารนิโคตินในบุหรีเช่นเดียวกับเอนไซม์ CYP2A6 (Hukkanen et al, 2005) หรือสาร coumarin ไปเป็นผลิตภัณฑ์ 7-hydroxycoumarin (ปฏิกิริยา coumarin-7-hydroxylase) ที่นิยมนำมาใช้เป็นตัวตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ในหลอดทดลอง (Miles et al, 1990)



ภาพที่ 2-5 กลไกในการกระตุ้นสารก่อมะเร็งของเอนไซม์ CYP2A13 (Brown PJ, 2007)

จากการศึกษาพบว่าเอนไซม์ CYP2A13 มีความหลากหลายทางพันธุกรรม (polymorphism) อยู่ถึง 10 อัลลีลที่แตกต่างกัน (<http://www.cypalleles.ki.se/>) โดยพบว่าอัลลีล CYP2A13*4 ที่มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจากอาร์จินีนเป็นกลูตามีนที่ตำแหน่ง 101 จะไม่เกิดปฏิกิริยาต่อสารตั้งต้น NNK เลย (Wang et al, 2006) เช่นเดียวกับอัลลีล CYP2A13*2 ที่มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจากอาร์จินีนเป็นซิสเทอีนที่ตำแหน่ง 257 จะมีปฏิกิริยาต่อสารตั้งต้น NNK และ coumarin ลดลง (Zhang et al, 2002) นอกจากนี้ยังพบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของเอนไซม์ CYP2A13*2 เกี่ยวพันกับการลดลงของการเกิดโรคมะเร็งปอดชนิด adenocarcinoma ในคนจีนที่สูบบุหรี่ (Wang et al, 2003) แต่ไม่พบความเกี่ยวพันระหว่าง CYP2A13*2 กับการเกิดโรคมะเร็งกล่องเสียงในคนจีนที่สูบบุหรี่ (Jiang et al, 2004) สอดคล้องกับผลการศึกษาที่พบว่าการเพิ่มการทำงานของ CYP2A13 ในการทำปฏิกิริยากับ NNK จะเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งปอดให้มากขึ้น (Chiang et al., 2011; Hecht, 1998; Zhang et al, 2002) แสดงให้เห็นว่าการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 มีบทบาทสำคัญในการเกิดโรคมะเร็งปอดที่พบมากในผู้สูบบุหรี่และบุคคลใกล้ชิด แต่เป็นที่น่าเสียดายที่ยังไม่มีการศึกษาถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของ CYP2A13 ในประเทศไทย ที่จะช่วยให้เข้าใจในการกระจายของความหลากหลายทางพันธุกรรมของ CYP2A13 อัลลีลต่างๆ กับอัตราการเกิดโรคมะเร็งปอดในผู้สูบบุหรี่และบุคคลใกล้ชิด ซึ่งอาจจะสามารถนำมาใช้พยากรณ์อัตราเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งปอดจากบุหรี่ของคนไทยได้

เนื่องด้วยการเสพติดบุหรี่จากนิโคตินเป็นสิ่งที่จำเป็นต้องได้รับการรักษา และโรคมะเร็งปอดที่เกิดจากสูบบุหรี่เป็นโรคอันตรายร้ายแรงที่พบทั้งในผู้สูบบุหรี่และผู้ใกล้ชิด ในปัจจุบันจึงมียาที่เป็นนิโคตินทดแทน (NRT) ต่างๆ ทั้งในรูปของนิโคตินหมากฝรั่งชนิดเคี้ยว นิโคตินชนิดแผ่นติดผิวหนัง ที่พบว่ามีประสิทธิภาพสูงมาใช้ร่วมกับการบำบัดพฤติกรรมของผู้สูบบุหรี่ เพื่อช่วยในการบำบัดและช่วยให้ผู้สูบบุหรี่เลิกจากการสูบบุหรี่ อย่างไรก็ตามการบำบัดด้วยวิธีนี้ยังไม่ได้รับความนิยมเนื่องจากความไม่สะดวกในการใช้ ไม่มีประสิทธิภาพที่รวดเร็ว

และมีผลข้างเคียงต่างๆ (Sellers et al, 2003a; 2003b) อีกหนึ่งวิธีที่ใช้ในการบำบัดคือการให้ยาที่ไปลดการทำงานของตัวรับนิโคตินในสมองซึ่งจะส่งผลให้ลดอาการเสพติดนิโคตินลง เช่น ยาในกลุ่ม bupropion HCl และ varenicline ซึ่งเป็นยาในกลุ่มที่ใช้ก่อน (first-line drug) และยา nortriptyline และ clonidine ซึ่งเป็นยาในกลุ่มถัดไป (second-line drug) แต่ยาต่างๆ เหล่านี้ให้ผลข้างเคียงกับผู้ให้ยา โดย bupropion HCl ทำให้เกิดอาการนอนไม่หลับ ปากแห้ง มือสั่นและปวดศีรษะ (Carrozzi et al, 2008) ในขณะที่ varenicline ทำให้เกิดอาการอาเจียนและปวดหัว (Gonzalez et al, 2006; Jorenhy et al, 2006) ส่วนยา second-line drug จะทำให้เกิดอาการง่วงนอน อ่อนเพลีย มึนงง ความดันโลหิตสูง ตาพร่า หน้ามืด มือสั่น (Carrozzi et al, 2008) และเนื่องจากเอนไซม์ CYP2A6 มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายนิโคตินในคน ดังที่พบความสัมพันธ์ในผู้ที่มีการขาดหายของยีน CYP2A6 ดังนั้นการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 จึงเป็นอีกหนึ่งวิธีทางเลือกในการช่วยบำบัดอาการเสพติดบุหรี่ได้ (Sellers et al, 2003)

ในปัจจุบันมีสารหลายตัวที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้เช่นสาร methoxsalen (8-methoxypsoralen) ที่เป็นสารในกลุ่ม pyranocoumarin ที่สามารถยับยั้งการย่อยสลายนิโคตินและยับยั้งการกระตุ้นการเกิดมะเร็งในหนูได้ (Damaj et al, 2007; Miyazaki et al, 2005) เมื่อใช้ coumarin เป็นตัวตรวจสอบพบว่า 8-MOP มีกลไกการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ทั้งแบบแข่งขันที่ผันกลับได้ (competitive inhibition) และการยับยั้งกลไกการย่อยสลายแบบ mechanism-based inhibition (สารยับยั้งถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์แต่ผลิตภัณฑ์หรือตัวกลางที่เกิดขึ้นจับแน่นกับเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์หมดสภาพในการทำงาน) (Siu and Tyndale, 2007; von Weyarn et al, 2005) และเนื่องจากกลไกการยับยั้งแบบ mechanism-based นี้มีการสร้างพันธะโควาเลนต์ขึ้นระหว่างสารยับยั้งกับกรดอะมิโนบริเวณแอคทีฟของเอนไซม์ (active site) ทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อย่างถาวร (enzyme inactive) และทำให้ต้องมีการสร้างเอนไซม์ใหม่ขึ้นมาแทนที่เอนไซม์ที่สูญเสียการทำงานไป ดังนั้นยา tranylcypromine และยา tryptamine ซึ่งมีกลไกการยับยั้งการทำงานแบบ competitive inhibition จึงมีประสิทธิภาพการทำงานที่ด้อยกว่า 8-MOP เนื่องจากประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ของยา tranylcypromine และยา tryptamine จะลดลงเมื่อได้รับสารตั้งต้นทั้ง coumarin และนิโคตินเพิ่ม นอกจากนี้การศึกษาเบื้องต้นในคนพบว่า 8-MOP สามารถลดการย่อยสลายนิโคตินและพบว่าสามารถลดการกำจัดนิโคตินออกจากร่างกายได้ (Sellers et al, 2000, 2003a) โดยผู้สูบบุหรี่ที่ได้รับ 8-MOP หรือ tranylcypromine ร่วมกับการได้รับนิโคตินจะมีการเพิ่มระดับของนิโคตินในกระแสเลือดและลดการสูบบุหรี่ลง โดยเพิ่มระยะเวลาก่อนที่จะสูบบุหรี่วนต่อไปให้ยาวนานขึ้น (Sellers et al, 2000) แม้ในที่สุดจะพบว่าทั้ง 8-MOP หรือ tranylcypromine ส่งผลกระทบต่อผู้ใช้ทำให้ต้องระงับการใช้สารทั้งสองตัวนี้ แต่ผลการศึกษาทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ในการย่อยสลายนิโคตินสามารถลดทำให้ผู้สูบบุหรี่สูบบุหรี่น้อยลงได้ (Sellers et al, 2003; Siu and Tyndale, 2007) จึงได้มีการศึกษาโดยใช้สร้างสารสังเคราะห์ต่างๆ ขึ้น (synthetic compounds) เพื่อนำมาใช้ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 เช่นสารที่มีโครงสร้าง 3-heteroaromatic และ 3-aliphatic pyridine เป็นโครงสร้างหลักที่พบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้อย่างจำเพาะเจาะจง (Yano et al, 2006) หรือสาร selegiline ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นเพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ monoamine oxidase ที่พบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้ด้วย (Siu and Tyndale,

2008) และสารสังเคราะห์ N1-(4-fluorophenyl) cyclopropane-1-carboxamide ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ด้วยเช่นกัน (Rahnasto et al, 2008)

เนื่องด้วยแนวโน้มในการรักษาโรคที่ย้อนกลับไปใช้สารจากธรรมชาติ (natural products) เพื่อลดความเป็นพิษและผลข้างเคียง จึงมีการศึกษาโดยใช้ menthol ซึ่งเป็นสารแต่งกลิ่นในอาหาร ผสมลงในบุหรี่ และพบว่าสามารถเพิ่มครึ่งชีวิตของสารโคทินิกในกระแสเลือดในผู้สูบบุหรี่ผู้หญิงได้ (Ahijevych et al, 2002) เพราะ menthol มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้ในระดับหนึ่ง (MacDougall et al, 2003) อย่างไรก็ตามผลจากการใช้ menthol เพียงอย่างเดียวในการลดการสูบบุหรี่ยังไม่มีการศึกษาเพิ่มเติม นอกจากนี้ น้ำส้มโอ (grapefruit juice) ก็สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ในการย่อยสลายสาร coumarin ได้เช่นเดียวกันแต่ไม่ตีเท่ากับการยับยั้งเอนไซม์ CYP3A4 ในขณะที่สารสกัด nootkatone บริสุทธิ์ ที่สกัดจากส้มโอสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดีแต่ไม่มีรายงานถึงความจำเพาะในการยับยั้ง (Merket et al, 1994; Runkel et al, 1997; Tassaneeyakul et al, 2000) ในขณะที่สารสกัดจาก Kava และ สารในกลุ่ม kavalactone สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP3A4 และ CYP2C9 ที่เกี่ยวกับการย่อยสลายสารแปลกปลอมภายนอกอื่นๆ ได้ดีกว่าเอนไซม์ CYP2A6 (Mathews et al, 2002) สารประกอบ isothiocyanate ในกลุ่มผักกะหล่ำก็มีประสิทธิภาพที่ต่ำในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 และต้องถูกดัดแปลงในหลอดทดลองก่อนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งให้เพิ่มขึ้น (von Weymarn et al, 2007) เมื่อเปรียบเทียบกับสาร decursinol angelate ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม pyranocoumarin ที่สกัดได้จากรากของ *Angelica gigas* (มีโครงสร้างคล้ายกับ coumarin ที่เป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13) สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้แบบ mechanism-based inhibition (Yoo et al, 2007) แสดงให้เห็นว่าสารที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกับสารตั้งต้น coumarin สามารถมีสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดี และเนื่องจากสมบัติและโครงสร้างสามมิติที่ใกล้เคียงกันของเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 (DeVore et al, 2009; DeVore et al, 2008) ดังนั้นสารที่สามารถยับยั้ง CYP2A6 เพื่อช่วยในการลดการสูบบุหรี่ที่ดีจึงน่าที่จะยับยั้ง CYP2A13 ได้ดีด้วย เพราะผู้สูบบุหรี่และผู้ใกล้ชิดที่ได้รับสารพิษต่างๆ ในบุหรี่ตลอดระยะเวลาที่สูบบุหรี่หรือกำลังอยู่ในช่วงของการลด ละ เลิกการสูบบุหรี่ โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 จึงเป็นอีกหนึ่งกลไกทางเลือกที่จะช่วยในการป้องกันการเกิดโรคมะเร็งปอดที่เกิดขึ้นจากการสูบบุหรี่ทั้งในผู้สูบบุหรี่และผู้ใกล้ชิดได้ไปพร้อมกัน ด้วยเหตุนี้สารสกัดจากธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานและจำเพาะต่อเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 โดยไม่มีผลข้างเคียงและไม่เป็นพิษต่างร่างกาย จึงเป็นหนึ่งในแนวทางเลือกที่สำคัญในการป้องกันการเสพติดบุหรี่ย รวมถึงลดระดับการเป็นมะเร็งปอดทั้งในผู้สูบบุหรี่และผู้ใกล้ชิดต่อไป

ก่อนหน้านี้ได้มีการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 โดยใช้น้ำสมุนไพรวัวและน้ำผลไม้ 25 ชนิด พบว่า น้ำขิงและน้ำมะเฟืองสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้ถึง 90% มีความเป็นไปได้ที่จะเป็นสารในกลุ่ม furanocoumarin และ flavonoid (เช่น gallic acid, catechin, (-)-epicatechin, proanthocyanin และอื่นๆ) ที่มีรายงานว่าพบในมะเฟืองในปริมาณสูงเพราะสารในกลุ่ม furanocoumarin และ flavonoid นี้ (เช่น 8-MOP) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ P450 ในคนได้ดี (Guo *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2006; Merkel *et al.*, 1994; Tassaneeyakul *et al.*, 2000) และน้ำมะเฟืองเข้มข้น 40 % สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้ถึง 95 % แต่ในน้ำขิงนั้นไม่พบรายงานว่ามีส่วนประกอบในกลุ่ม furanocoumarin และ flavonoid ในปริมาณมากเช่นเดียวกับมะเฟือง แต่จะพบสารประกอบในกลุ่ม อัลคาลอยด์ ที่เป็นสารตั้งต้นกับสารนิโคตินของบุหรี่ในยาสูบปริมาณมาก (Pouyfung *et al.*, 2013; Prasomthai *et al.*, 2013) สารสกัดที่ได้จากพืชสมุนไพรและผลไม้ เป็นสารที่ไม่เป็นอันตรายต่อร่างกาย ดังนั้น ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะนำน้ำขิงและน้ำมะเฟืองมาศึกษาเพิ่มเติม เกี่ยวกับกลไกในการยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 และเอนไซม์ CYP2A13 เพื่อเป็นอีกแนวทางในการรักษาหรือบำบัดในผู้ติดบุหรี่ และช่วยลดอัตราเสี่ยงในการเกิดโรคที่เกิดจากการสูบบุหรี่ได้

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

1. กระบอกตวง (Graduated cylinder) ขนาด 10, 50, 100, 1000 และ 2000 มิลลิลิตร ยี่ห้อ Diffico ประเทศเยอรมนี
2. กระบอกฉีดสาร (Syringe Perfection) ขนาด 25 ไมโครลิตร บริษัท SGE ประเทศออสเตรเลีย
3. ขวดดูแรน (Duran) ขนาด 50, 100, 500 และ 1000 มิลลิลิตร ยี่ห้อ SCHOTT ประเทศเยอรมนี
4. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร ยี่ห้อ SCHOTT ประเทศเยอรมนี
5. นาฬิกาจับเวลา
6. หลอดหยด (Dropper)
7. ข้อนตักสาร
8. เครื่องกำเนิดแสงยูวี (UV)
9. เครื่องกลั่นระเหยแห้งในภาวะสุญญากาศ (Rotary Vacuum Evaporator) รุ่น N-N series บริษัท Eyela ประเทศญี่ปุ่น
10. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (Sonicator) รุ่น VCX 500 บริษัท Sonic and materials ประเทศสหรัฐอเมริกา
11. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น PG 2002-S บริษัท Mettler Toledo ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
12. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น AB 204-S บริษัท Mettler Toledo ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
13. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น AMA 240s บริษัท Astell Scientific ประเทศอังกฤษ
14. เครื่องปรับอุณหภูมิ (Heat box) รุ่น HBI บริษัท Bio-active
15. เครื่องปั่นแยกสารแบบควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ Sigma 3K18 ประเทศเยอรมนี
16. เครื่องปั่นแยกสารแบบควบคุมอุณหภูมิ รุ่น SORVALL RC 26 PLUS ประเทศสหรัฐอเมริกา
17. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) J.P.selecta บริษัท Bio Active ประเทศสเปน
18. เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary Evaporator)
19. เครื่องวัดกรดเบส (pH meter) รุ่น 713 pH meter บริษัท Metrohm ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
20. เครื่องสเปกโตรฟลูออโรโฟโตมิเตอร์ (Spectrofluorometer) ยี่ห้อ Jasco รุ่น FP-6200 บริษัท Jasco ประเทศญี่ปุ่น
21. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ยี่ห้อ Jasco รุ่น V-530 UV-VIS บริษัท Jasco ประเทศญี่ปุ่น

22. เครื่อง Fluorescence detector maintenance manual ยี่ห้อ Jasco รุ่น EP-1520 บริษัท Jasco ประเทศไทย
23. ชุดThin layer chromatography (Thin-layer Chromatography; TLC) silica gel 60 F254 บริษัท Merck KGaA ประเทศสหรัฐอเมริกา
24. ชุดโครมาโทกราฟีแบบจำเพาะที่มีนิเกิลเป็นลิแกนด์ (Ni^{2+} Affinity Chromatography) บริษัท Qiagen ประเทศสหรัฐอเมริกา
25. ชุดอิเล็กโตรโฟรีซิส (SDS-PAGE) บริษัท Bio-rad ประเทศสหรัฐอเมริกา
26. ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (Shaking incubator) รุ่น Innova 4320 บริษัท NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC EDISON, NJ ประเทศสหรัฐอเมริกา
27. ทิป (Tip) ขนาด 20, 200, 1000 ไมโครลิตร บริษัท Quality scientific plastic ประเทศสหรัฐอเมริกา
28. บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 50, 100, 250, 600 และ 1000 มิลลิลิตร ยี่ห้อ SCHOTT ประเทศเยอรมนี
29. ผ้าดิบ
30. พาราฟิล์ม (parafilm) บริษัท PECHINEY
31. ไมโครทิวป์ (Microtube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
32. ไมโครปิเปต (Micropipette) 1-10, 2-20, 20-200 และ 100-1000 ไมโครลิตร บริษัท Lio lab ประเทศสหรัฐอเมริกา
33. หลอดคิวเวต (Cuvette) บริษัท Plastibrand ประเทศเยอรมนี
34. หลอดทดลอง (Test tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
35. หลอดสำหรับหมุนเหวี่ยงแยก Cell ขนาด 50 มิลลิลิตร บริษัท SPL SPLLIFE SCINCE
36. โหลแก้ว
37. อะลูมิเนียมฟอยล์ (Aluminium foil) ยี่ห้อ TOPS บริษัท MMP คอร์ปอเรชั่น จำกัด ประเทศไทย
38. ที่วางหลอดทดลอง (Test tube rack)

3.2 สารเคมี

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

10. Coomassie Brilliant Blue G-250
11. Coumarin ($C_9H_6O_2$) MW 146.15 บริษัท Fluka Analytical ประเทศฝรั่งเศส
12. Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4) MW 174.16 บริษัท Carlo erba analytical ประเทศสหรัฐอเมริกา
13. Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) MW 141.96 บริษัท Fisher scientific analytical grade ประเทศอังกฤษ
14. Ethyl alcohol absolute (C_2H_5OH) MW 46.070 บริษัท Carlo erba ประเทศสหรัฐอเมริกา
15. Glycerol ($CH_2OHCHOHCH_2OH$) MW 92.095 ยี่ห้อ Carlo erba บริษัท Bio Basic INC. ประเทศแคนาดา
16. Glycine MW 75.10 ยี่ห้อ UPS Grade บริษัท RESEARCH ORGANICS ประเทศสหรัฐอเมริกา
17. Hydrochloric acid (HCl) MW 36.46 บริษัท Carlo erba ประเทศสหรัฐอเมริกา
18. Imidazole MW 68.08 บริษัท Bio Basic INC ประเทศแคนาดา
19. Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) MW 238.31 บริษัท Promega ประเทศสหรัฐอเมริกา
20. LB agar, Difco[™], บริษัท Dickinson company ประเทศสหรัฐอเมริกา
21. Methyl alcohol (CH_3OH) MW 32.042 บริษัท Carlo erba ประเทศสหรัฐอเมริกา
22. N,N,N',N'-Tetramethyl ethylenediamine (TEMED) MW 116.20 บริษัท RESEARCH ORGANICS ประเทศสหรัฐอเมริกา
23. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate ในรูปรีดิวซ์ (NADPH) บริษัท Fluka HPLC grade ประเทศสหรัฐอเมริกา
24. Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) ($C_6H_5CH_2SO_2F$) บริษัท Bio Basic INC ประเทศแคนาดา
25. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) MW 136.09 บริษัท Carlo erba ประเทศสหรัฐอเมริกา
26. Sodium chloride (NaCl) MW 58.443 บริษัท Carlo erba ประเทศสหรัฐอเมริกา
27. Sodium dodecyl sulfate (SDS) ($C_{12}H_{25}OSO_3Na$) MW 288.83 บริษัท BIO BASIC INC. ประเทศแคนาดา
28. Sodium hydroxide (NaOH) MW 39.997 บริษัท Carlo erba ประเทศสหรัฐอเมริกา
29. Tryptone Power ยี่ห้อ Biotech บริษัท Bio Basic INC ประเทศแคนาดา
30. Tris-Hydrochloride ยี่ห้อ Promega บริษัท Promega Corporation ประเทศสหรัฐอเมริกา
31. Tris(Hydroxymethyl)aminomethane ($NH_2C(CH_2OH)_3$) MW 121.14 บริษัท USB Corporation ประเทศสหรัฐอเมริกา
32. Yeast extract บริษัท Bio Basic INC. ประเทศแคนาดา
33. 1,2-dilauryl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DLPC) MW 621.83 บริษัท Bio Basic INC ประเทศแคนาดา
34. น้ำกลั่น

3.3 พลาสมิดที่ใช้ในการทดลอง

3.3.1 พลาสมิด pKK232-8 ที่บรรจุยีน CYP2A6 ของคนที่ขาดส่วนจับกับเอนไซม์ (Δ23human CYP2A6) (ได้รับมาจาก Assoc. Prof. Dr. Emily E. Scott, Dept. of Medicinal Chemistry, Kansas University, http://www.medchem.ku.edu/faculty_scott.shtml)

3.3.2 พลาสมิด pKK232-8 ที่บรรจุยีน CYP2A13 ของคนที่ขาดส่วนจับกับเอนไซม์ (Δ23human CYP2A13) (ได้รับมาจาก Assoc. Prof. Dr. Emily E. Scott, Dept. of Medicinal Chemistry, Kansas University, http://www.medchem.ku.edu/faculty_scott.shtml)

3.3.3 พลาสมิด pIN111ompA3 ที่บรรจุยีน CPR ของหนูที่มีส่วนจับเอนไซม์ (ratCPR) (ได้รับมาจาก Prof. Dr. Jung-Ja Kim, Dept. of Biochemistry, Medical College of Wisconsin, http://www.mcw.edu/biochemistry/Jung_Ja_Kim.htm)

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การเหนี่ยวนำการแสดงออกและการทำบริสุทธิ์ของเอนไซม์ Cytochrome P450 reductase จากหนู (rat CPR)

ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ C41 (DE3) ที่ได้รับการส่งผ่านพลาสมิด DNA ที่มียีน rat CPR (pIN111-flrat CPR) ในหลอดทดลองฟลาเกลียวพลาสติกที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ LB media (Liquid Broth media) และยาปฏิชีวนะ Ampicilin ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร (μg/ml) ทำการเลี้ยงในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งเขย่าด้วยความเร็วประมาณ 250 รอบ/นาที (rpm) เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อที่เลี้ยงไว้ข้างต้น มาเลี้ยงต่ออีกครั้ง (1%) ในขวดรูปชมพู่ขนาด 1,000 มิลลิลิตรที่มีอาหาร Modified LB (MLB) และยาปฏิชีวนะ Ampicilin ที่ความเข้มข้น 100 μg/ml ปริมาตร 400 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเลี้ยงในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งเขย่าด้วยความเร็วประมาณ 250 rpm นำมาวัดค่า OD₆₀₀ ให้อยู่ในช่วง 0.4-0.6 แล้วทำการเหนี่ยวนำการแสดงออกโปรตีนด้วย 0.2 mM IPTG ทำการเลี้ยงในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งเขย่าด้วยความเร็ว 160 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาจึงทำการเก็บตะกอนเซลล์โดยทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

นำตะกอนเซลล์ rat CPR มาเติมสารละลายบัฟเฟอร์ A (50 mM Tris- HCl buffer pH 7.5, 0.1% Triton X-100, 1% Lysozyme และ 0.2 mM PMSF) จากนั้นทำให้เซลล์แตกโดยวิธี sonication (Pulse on:off 9:9 วินาที เป็นเวลา 2 นาที 30 วินาที ที่ Amplitude 36%) ได้เป็นสารละลายเซลล์หยาบ (Crude extract) ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสที่ได้ และทำการปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 17,000 rpm เป็นเวลา 25 นาที ได้สารละลายส่วนใส (Cell lysate) ทำบริสุทธิ์โปรตีน (rat CPR) โดยผ่านนิกเกิลคอลัมน์ (Ni-column) ที่ปรับสภาพคอลัมน์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ B (50 mM Tris-HCl buffer pH 7.5, 50 mM NaCl, 5 mM Imidazole) ทำการล้างโปรตีนและชะเอนไซม์ rat CPR ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ B ที่ความเข้มข้นของ Imidazole ดังนี้ 5 mM Imidazole, 10 mM Imidazole, 50 mM Imidazole, 100 mM Imidazole และ 200 mM Imidazole และทำการเก็บส่วนที่ผ่านนิกเกิลคอลัมน์เป็น

wash 1, wash 2, wash 3, Elute 1 และ Elute 2 ตามลำดับ วัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford และตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE จากนั้นทำการเก็บโปรตีนที่บริสุทธิ์ไว้ที่ 20% Glycerol ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาทำการทดลอง

3.4.2 การเหนี่ยวนำการแสดงออกและการทำบริสุทธิ์ของเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13

ทำการเลี้ยงเชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ XL-1 blue ที่ได้รับการส่งผ่าน cDNA ที่มียีน cyp2a6 และ cyp2a13 (pKKK- Δ -23-2A6 และ pKKK- Δ -23-2A13) ลงในหลอดทดลองฝาเกลียวพลาสติกที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ LB media และยาปฏิชีวนะ Ampicilin ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ($\mu\text{g/ml}$) ทำการเลี้ยงในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งเขย่าด้วยความเร็วประมาณ 250 rpm เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อที่เลี้ยงไว้ข้างต้นปริมาตร 4 มิลลิลิตร มาเลี้ยงต่ออีกครั้งในขวดรูปชมพู่ ขนาด 1,000 มิลลิลิตรที่มีอาหาร Modified LB (MLB) และยาปฏิชีวนะ Ampicilin ที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 400 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเลี้ยงในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งเขย่าด้วยความเร็วประมาณ 250 rpm นำมาวัดค่า OD₆₀₀ ให้อยู่ในช่วง 0.4-0.6 แล้วทำการเหนี่ยวนำการแสดงออกโปรตีนด้วย 0.2 mM IPTG พร้อมกับ 0.005 mM 5-aminolevulinic acid hydrochloride (δ -ALA) ทำการเลี้ยงในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งเขย่าด้วยความเร็ว 160 rpm เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาจึงทำการเก็บตะกอนเซลล์โดยทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

นำตะกอนเซลล์ที่ได้ของแต่ละเอนไซม์ มาเติมสารละลายบัฟเฟอร์ A (100 mM Kpi buffer (Potassium Phosphate buffer) pH 7.4, 200 mM NaCl, 0.1% triton X-100, 10% glycerol, 0.2 mM PMSF) จากนั้นทำให้เซลล์แตกโดยวิธี sonication (Pulse on:off 9:9 วินาที เป็นเวลา 2 นาที 30 วินาที ที่ Amplitude 36%) ได้เป็นสารละลายเซลล์หยาบ (Crude extract) จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำการเก็บส่วนใสที่ได้ และทำการปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 17,000 rpm เป็นเวลา 25 นาที ได้สารละลายส่วนใส (Cell lysate) ทำบริสุทธิ์โปรตีนโดยผ่านนิกเกิลคอลัมน์ที่ปรับสภาพคอลัมน์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ B (สารละลายบัฟเฟอร์ A, 10 mM Imidazole) จากนั้นทำการล้างโปรตีนและเอนไซม์ CYP2A13 ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ B ที่ความเข้มข้นของ Imidazole ดังนี้ 10 mM Imidazole, 20 mM Imidazole, 50 mM Imidazole และ 100 mM Imidazole และทำการเก็บส่วนที่ผ่านนิกเกิลคอลัมน์เป็น wash 1, wash 2, wash 3, Elute 1 และ Elute 2 ตามลำดับ วัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford และตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE จากนั้นทำการเก็บโปรตีนที่บริสุทธิ์ไว้ที่ 20% Glycerol ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาทำการทดลอง

3.4.3 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ rat CPR

วัดการทำงานของเอนไซม์ rat CPR ในการส่งผ่านอิเล็กตรอนไปยังตัวรับอิเล็กตรอน (Cytochrome c) ในหลอดทดลอง โดยเตรียมสารละลาย Cytochrome c ในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร เพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลาย Cytochrome c ในสถานะ

ออกซิไดซ์ (ค่า $\epsilon = 7.2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) และทำการเตรียมสารละลาย NADPH ในสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl buffer pH 7.5 แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณความเข้มข้นของ NADPH (ค่า $\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) จากนั้นทำการตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ rat CPR ที่บริสุทธิ์โดยบ่มเอนไซม์ร่วมกับสารละลาย 50 μM Cytochrome c แล้วจึงเติมสารละลาย 50 μM NADPH ลงไปเพื่อเริ่มปฏิกิริยา จากนั้นติดตามผลการทำงานของเอนไซม์ rat CPR ในการขนส่งอิเล็กตรอนกับ Cytochrome c ให้เปลี่ยนเป็นรูปรีดิวซ์นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร (ค่า $\epsilon = 21.4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) นำค่าอัตราการเกิดปฏิกิริยามาคำนวณหาค่ากิจกรรมของปริมาณโปรตีนในปฏิกิริยา (Specific activity) ของเอนไซม์ โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำ ที่เป็นอิสระต่อกัน

3.4.4 การตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13

ทำการศึกษาการเร่งปฏิกิริยาการออกซิเดชันของเอนไซม์ CYP2A6 หรือ CYP2A13 ต่อสารประกอบเรืองแสง Coumarin ในหลอดทดลอง (*in vitro*) โดยเตรียมสารละลาย Coumarin ใน ethanol (คำนวณความเข้มข้นของ Coumarin ที่ค่าการดูดกลืนแสง 325 นาโนเมตร ($\epsilon = 23,500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) ทำการบ่มเอนไซม์ CYP2A6 หรือ CYP2A13 ที่บริสุทธิ์ (ประมาณ 100 ไมโครกรัมโปรตีน) ร่วมกับเอนไซม์ rat CPR (10 unit) ในสารละลาย 50 mM Tris-HCl pH 7.5 ที่มี Dilaurolphatidylcholine (DLPC) ตั้งทิ้งไว้ 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาที่กำหนดเติมสารตั้งต้น 20 μM Coumarin และตัวให้อิเล็กตรอน 50 μM NADPH เพื่อเริ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยสำหรับเอนไซม์ CYP2A6 จะวัดการเพิ่มขึ้นของสารผลิตภัณฑ์ (7-hydroxycoumarin) โดยใช้เครื่อง Fluorescence Spectroscopy ที่ค่าความยาวคลื่นปลดปล่อย (Emission wavelength) 460 นาโนเมตร ความยาวคลื่นกระตุ้น (Excitation wavelength) 355 นาโนเมตร เป็นเวลา 10 นาที และเอนไซม์ CYP2A13 จะวัดค่าการลดลงของสารตั้งต้น (Coumarin) โดยใช้เครื่อง Fluorescence Spectroscopy ที่ค่าความยาวคลื่นกระตุ้น 340 นาโนเมตร และความยาวคลื่นปลดปล่อย 456 นาโนเมตร เป็นเวลา 10 นาที สำหรับการทดลองควบคุมจะศึกษาการเกิดปฏิกิริยาการสร้างผลิตภัณฑ์เมื่อปราศจากตัวให้อิเล็กตรอน NADPH หรือ เอนไซม์ rat CPR โดยทั้งหมดการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง

3.4.5 การเตรียมสารสกัดจากขิงและมะเฟือง และการแยกสารสกัดแบบลำดับส่วน

ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยใช้ขิงและมะเฟืองที่ซื้อจากตลาดหนองมน อ.เมือง จ.ชลบุรี โดยเลือกใช้ขิงที่ไม่อ่อนหรือแก่เกินไป มะเฟืองที่สุกกำลังดี โดยนำขิงมาล้างทำความสะอาดและหั่นเป็นชิ้นบางๆ ทูบพอแหลก จึงนำไปต้มในน้ำกลั่นเป็นเวลา 30 นาที ทิ้งให้เย็น จากนั้นทำการกรองน้ำขิงด้วยผ้าขาวบางจำนวน 2 รอบ และนำไปกรองอีกครั้งด้วยกระดาษกรอง whatman (เบอร์ 1) เก็บน้ำขิงที่ได้ลงขวดทึบแสงไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ ส่วนมะเฟืองก็นำมาล้างให้สะอาดเช่นกัน หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นนำเข้าเครื่องปั่น เติมน้ำกลั่นพอประมาณ ปั่นจนละเอียดดี จึงนำมารองด้วยผ้าขาวบาง และทำการปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที (rpm) เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำไปกรองด้วยกระดาษกรอง whatman (เบอร์ 1) เก็บน้ำมะเฟืองที่ได้ใส่ขวดทึบแสงไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

จากนั้นทำการแยก fraction โดยละลายน้ำขิงและน้ำมะเฟืองที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นำน้ำขิงหรือน้ำมะเฟืองมาใส่กรวยแยกผสมกับ butanol ในอัตราส่วน 1:1 ตั้งทิ้งไว้ให้สารแยกชั้นกัน ไขชั้นน้ำมาสกัดซ้ำอีกรอบ ส่วนชั้น butanol เก็บใส่ขวดทึบแสง ชั้นน้ำที่สกัดได้จะนำมาสกัดกับ ethyl acetate ต่อในอัตราส่วน 1:1 ทำเช่นเดียวกับการสกัด butanol เก็บชั้น ethyl acetate และชั้นน้ำใส่ขวดทึบแสง จากนั้นนำชั้น butanol ชั้น ethyl acetate และชั้นน้ำ ไปทำการระเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator) แล้วชั่งน้ำหนักส่วนสกัดที่ได้ เก็บใส่หลอดทดลองพลาสติกฝาเกลียวให้พ้นแสงที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.4.6 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์

3.4.6.1 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ cytochrome P450 reductase จากหนู (rat CPR) ของสารสกัดขิงและมะเฟือง

เตรียมปฏิกิริยาโดยทำการบ่มเอนไซม์ rat CPR ที่บริสุทธิ์ร่วมกับสารละลาย 50 μ M cytochrome c และสารสกัดแต่ละลำดับส่วนของขิงหรือมะเฟือง (ชั้น butanol หรือชั้น ethyl acetate หรือชั้นน้ำ ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 μ g/ml) ในสารละลาย 50 mM Tris- HCl buffer pH 7.5 ผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ค่าความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร แล้วจึงเติมสารละลาย 50 μ M NADPH เพื่อเริ่มปฏิกิริยา เป็นเวลา 5 นาที คำนวณหาค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่เหลืออยู่ เพื่อดูผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เมื่อเปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ rat CPR ปกติ (100% remaining activity) โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำ ที่เป็นอิสระต่อกัน

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

เตรียมปฏิกิริยาโดยทำการบ่มเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ที่บริสุทธิ์ร่วมกับเอนไซม์ rat CPR และ DLPC ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมสารละลาย 100 mM Kpi buffer pH 7.4 ปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 1000 μ l เติมสารตั้งต้น 20 μ M coumarin เติมสารสกัดแต่ละลำดับส่วนของขิงหรือมะเฟือง ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10, 50 และ 100 μ g/ml หลังจากนั้นเริ่มปฏิกิริยาโดยเติม 50 μ M NADPH วัดค่าการเพิ่มขึ้นของผลิตภัณฑ์ (7-hydroxycoumarin) โดยใช้เครื่อง fluorescence spectroscopy เป็นเวลา 10 นาที คำนวณหาค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่เหลืออยู่ เพื่อดูผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เมื่อเปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ CYP2A6 ปกติ (100% remaining activity) โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำ ที่เป็นอิสระต่อกัน

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

เตรียมปฏิกิริยาโดยทำการบ่มเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ที่บริสุทธิ์ร่วมกับเอนไซม์ rat CPR และ DLPC ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมสารสกัดแต่ละลำดับส่วนของขิงหรือมะเฟือง ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10, 50 และ 100 μ g/ml และเติม 50 μ M NADPH เพื่อเริ่มปฏิกิริยา บ่มเป็นเวลา 10, 30 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 100 mM Kpi buffer pH 7.4 ปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 1000 μ l เติมสารตั้งต้น 20 μ M

coumarin และเริ่มปฏิกิริยาอีกครั้งโดยเติม 50 μ M NADPH วัดค่าการเพิ่มขึ้นของผลิตภัณฑ์ (7-hydroxycoumarin) โดยใช้เครื่อง fluorescence spectroscopy คำนวณหาค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่เหลืออยู่ เพื่อดูผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เมื่อเปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ CYP2A6 ปกติ (100% remaining activity) โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำ ที่เป็นอิสระต่อกัน

3.4.7 การทดสอบกลไกในการยับยั้งเอนไซม์ cytochrome P450 reductase

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

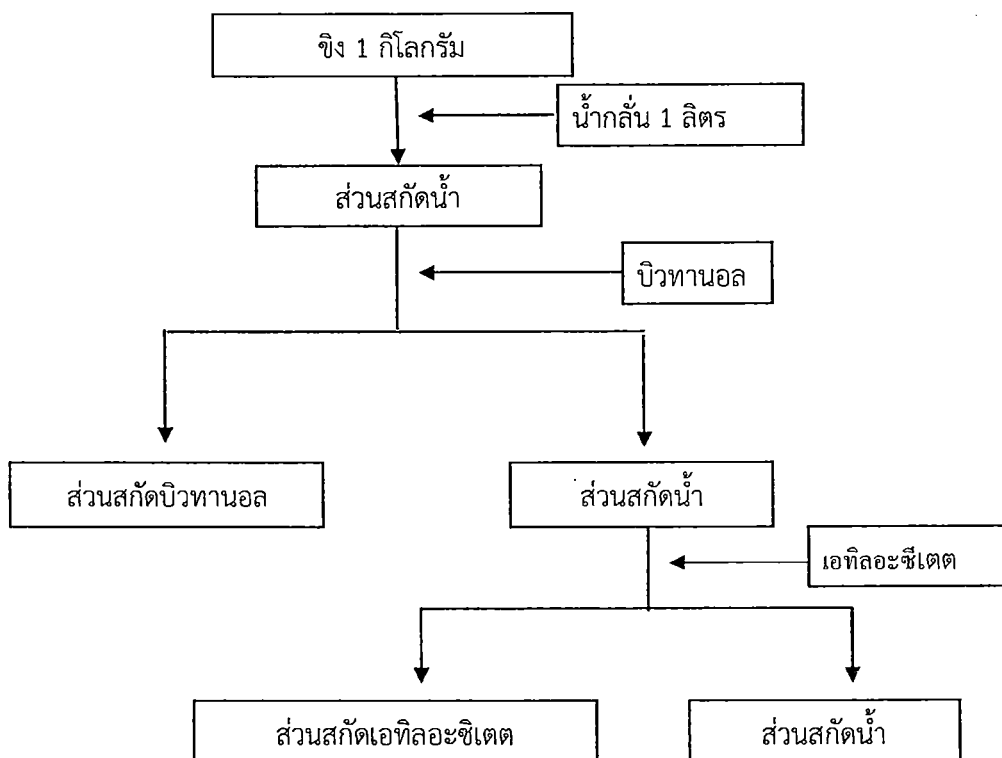
บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การสกัดสารสำคัญจากขิงและมะเฟือง

4.1.1 การสกัดสารสำคัญจากขิง

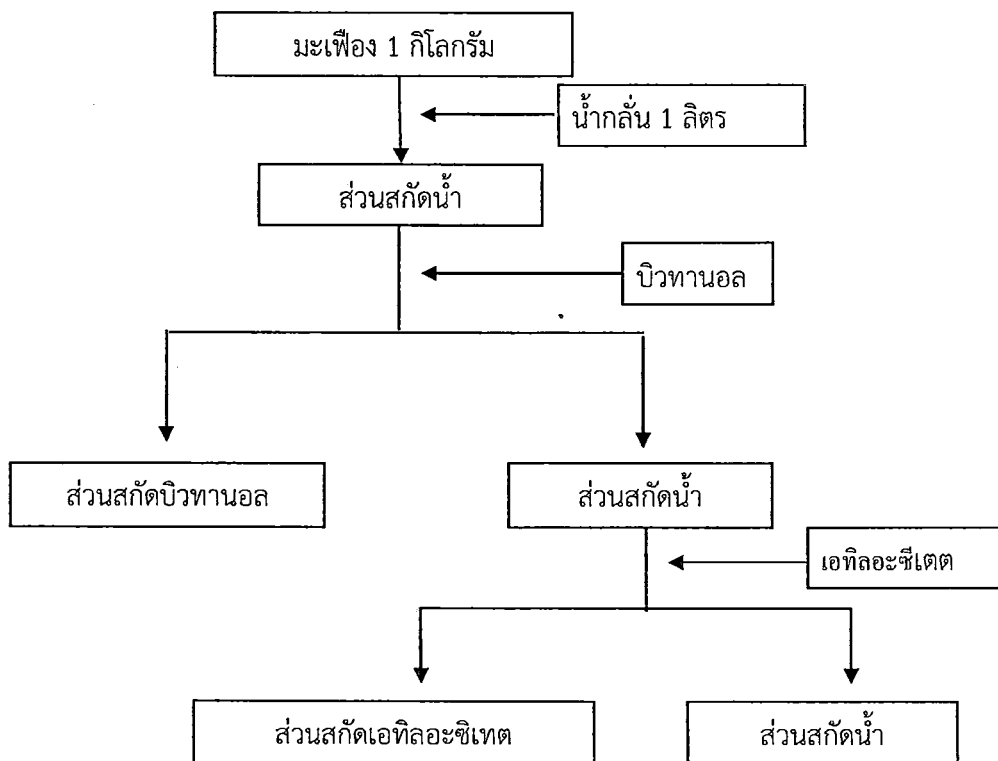
ทำการสกัดขิงโดยนำขิงมาล้าง จากนั้นหุบให้พอแหลก นำมาต้มในน้ำกลั่น โดยมีอัตราส่วนขิงต่อน้ำกลั่น 1:100 ให้เดือดแล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็น นำมากรองผ่านผ้าขาวบาง 2 ครั้ง และนำสารสกัดที่ได้กรองผ่านกระดาษกรองอีกครั้งหนึ่ง เมื่อนำมาแยกสารสกัดแบบลำดับส่วน ทำการกลั่นระเหย ได้ส่วนสกัด บิวทานอล (butanol) เอทิลอะซิเตต (ethyl acetate) และน้ำ (Water) (ภาพที่ 4-1) จากนั้นนำแต่ละส่วนสกัดมาทำละลายด้วยสารละลาย DMSO



ภาพที่ 4-1 ขั้นตอนสารสกัดจากพืชตัวอย่าง

4.1.2 การสกัดสารสำคัญจากมะเฟือง

ทำการสกัดสารจากมะเฟือง โดยนำมะเฟืองมาล้างให้สะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นนำมาปั่นให้ละเอียด ขณะปั่นเติมน้ำในอัตราส่วนปริมาตร มะเฟืองต่อน้ำกลั่น 1:100 นำน้ำมะเฟืองที่ได้มากรองผ่านผ้าขาวบาง 2 ครั้ง ปั่นตกตะกอนที่ 3000 rpm 5 นาที จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มากรองด้วยกระดาษกรองอีกครั้งหนึ่ง เมื่อนำมาแยกสารสกัดแบบลำดับส่วนทำการกลั่นระเหยได้ส่วนสกัดบิวทานอล (butanol) เอทิล อะซิเตต (ethyl acetate) และน้ำ (water) (ภาพที่ 4-2) จากนั้นนำแต่ละส่วนสกัดมาทำละลายด้วยสารละลาย DMSO



ภาพที่ 4-2 ขั้นตอนสารสกัดจากพืชตัวอย่าง

4.2 การแสดงออกและการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ Cytochrome 2A6 และ 2A13 กับ Cytochrome P450 reductase

นำโคโลนีที่ผ่านการทรานฟอร์มพลาสมิดดีเอ็นเอที่มี cDNA ของเอนไซม์ CYP2A6 CYP2A13 และ rat CPR ในเซลล์สายพันธุ์ XL-1 blue (สำหรับ CYP2A6 และ CYP2A13) และ C41 (DE3)) (สำหรับ rat CPR) มาทำการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Luria-Bertani media ที่ได้ทำการศึกษามาก่อนหน้านี้ว่าส่งผลต่อการแสดงออกของเอนไซม์ทั้งสามดีที่สุด และเหนี่ยวนำการแสดงออกของเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ที่ความเข้มข้นของสารเหนี่ยวนำ IPTG 0.6 mM ณ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และเพื่อให้เอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ที่แสดงออกมีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาได้ดียิ่งขึ้น ต้องมีสารตั้งต้นของการสังเคราะห์หมู่ Heme ที่เป็นกลุ่มโมเลกุลที่สำคัญของเอนไซม์ Cytochrome P450 คือ δ -ALA ที่ความเข้มข้น 20 ug/ml ในขณะที่เอนไซม์ rat CPR เหนี่ยวนำการแสดงออกของเอนไซม์ ที่ความเข้มข้นของสารเหนี่ยวนำ IPTG 0.2 mM ณ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นทำให้เซลล์แตก และทำบริสุทธิ์เอนไซม์ทั้งสามด้วยเทคนิคโคร

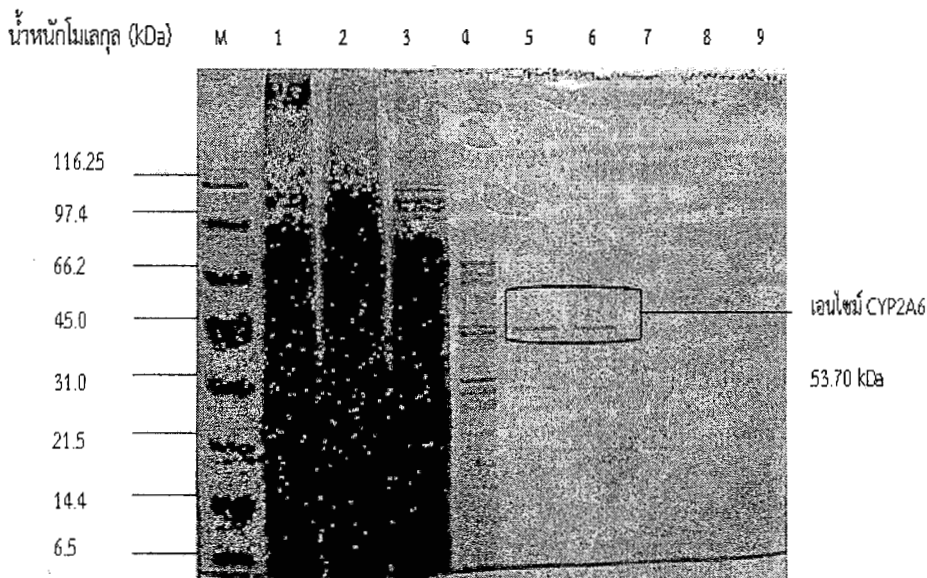
บร. 32378

กพ. 4 ก

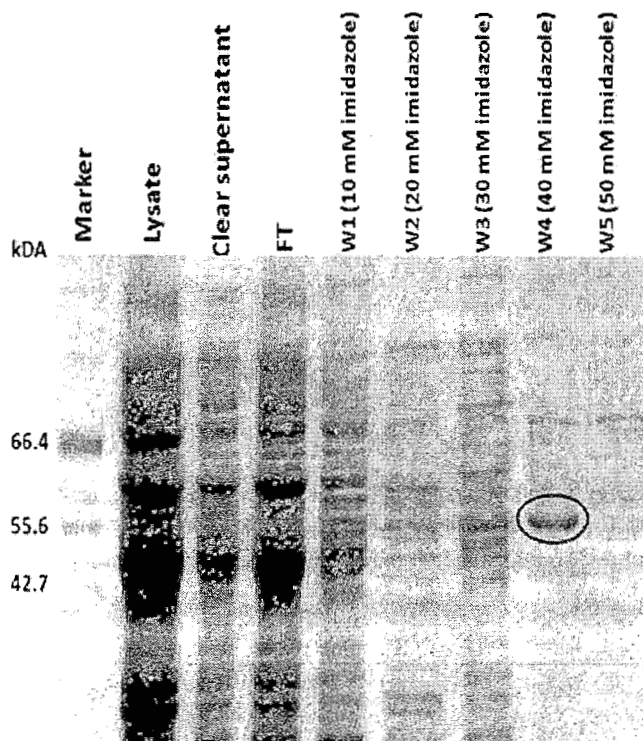
ณ. 4

354930

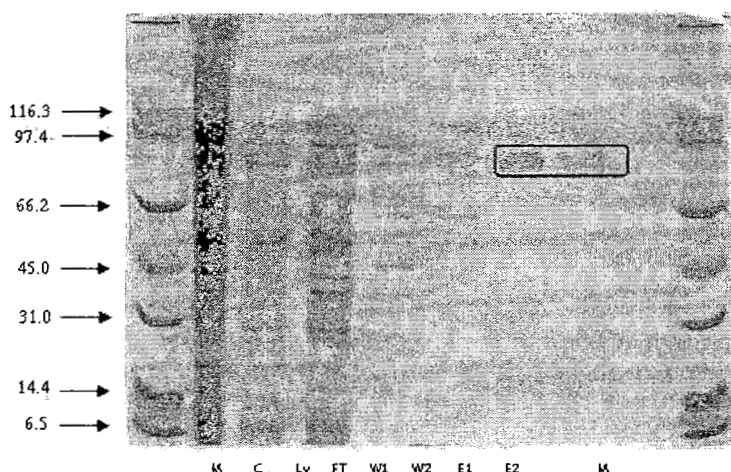
มาโตกราฟฟีแบบจำเพาะโดยใช้ Ni^{2+} -NTA เป็นส่วนคงที่ (Ni^{2+} -Affinity chromatography) เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 บริสุทธิ์ที่ได้มีขนาดมวลโมเลกุลประมาณ 55 kDa (ภาพที่ ๓-๑ และ ๓-๒) และเอนไซม์ CPR บริสุทธิ์ที่ได้มีขนาดมวลโมเลกุลประมาณ 78 kDa (ภาพที่ ๓-๓) ทำการเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ที่ -80 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้



ภาพที่ 4-3 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ CYP 2A6 โดย SDS-PAGE โดยที่ Lane M: Marker, Lane1: crude extract, Lane2: cell lysate, Lane3: flow through, Lane4: wash1, Lane5: wash2, Lane6: wash3, Lane7: elute1, Lane8: elute2, Lane9: elute3



ภาพที่ 4-4 การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ CYP2A13 โดย Ni^{2+} -Affinity chromatography



ภาพที่ 4-5 การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ rat CPR โดย Ni^{2+} -Affinity chromatography อักษรย่อ C แทนสารสกัดหยาบ (crude) และ Ly แทนส่วนใส (lysate) ของสารละลายโปรตีนจากเซลล์ FT แทนส่วนที่ไหลผ่านคอลัมน์ (Flow-through) ในขณะที่ W1 และ W2 แทนการล้างคอลัมน์เพื่อนำโปรตีนอื่นๆออกจากคอลัมน์ (Wash) และ E คือโปรตีน rat CPR ที่ถูกชะออกมาจากคอลัมน์ เมื่อ M คือ protein marker

4.2 การตรวจสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ rat CPR CYP2A13 และ CYP2A6

4.2.1 การตรวจสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ rat CPR กับสารสกัดจากมะเฟือง

นำเอนไซม์ rat CPR ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์มาศึกษากิจกรรมในการเร่งการส่งอิเล็กตรอนให้กับสารตั้งต้น cytochrome c พบว่าเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้มีค่าความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา Cytochrome C reduction เท่ากับ $47.13 \pm 4.80 \text{ umol/Cyt c reduction/min/mg protein}$ มาศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของน้ำมะเฟืองหรือน้ำขิงต่อเอนไซม์ CPR ที่ทำหน้าที่ส่งอิเล็กตรอนให้กับเอนไซม์ในกลุ่ม P450 โดยบ่มเอนไซม์ร่วมกับ Cytochrome C และน้ำมะเฟืองหรือน้ำขิง (10 %v/v) จากนั้นนำมาวัดกิจกรรมของเอนไซม์ด้วย spectrophotometer ที่ค่าการดูดกลืนแสง 550 นาโนเมตร นาน 5 นาที หลังจากเติม NADPH ซึ่งเป็นตัวเริ่มปฏิกิริยา พบว่าน้ำมะเฟืองและน้ำขิงไม่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CPR

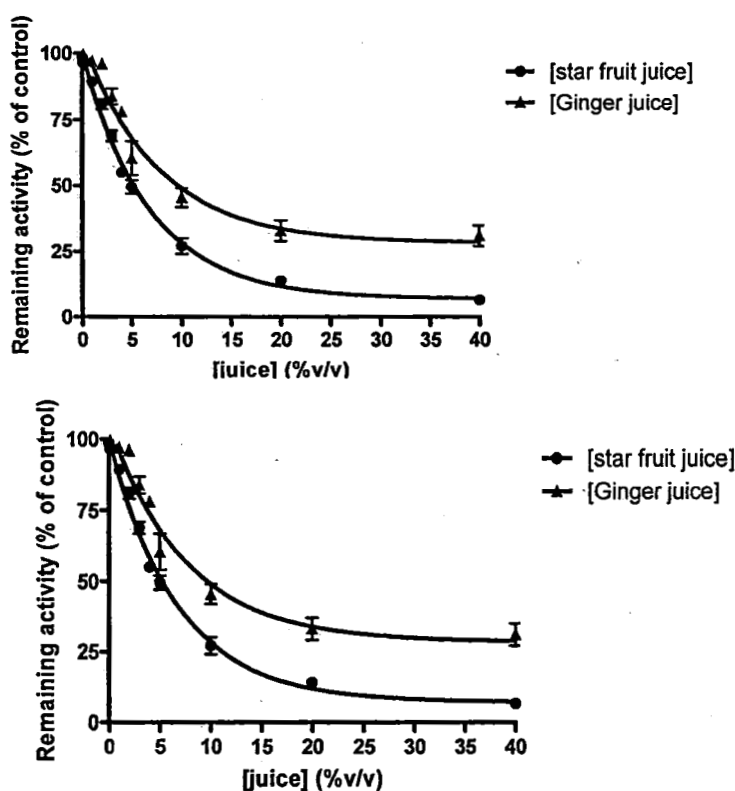
4.2.2 การตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 และ CYP2A6

ทำการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 และ CYP2A6 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ มาทำปฏิกิริยาร่วมกับเอนไซม์ rat CPR ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว เพื่อตรวจสอบปฏิกิริยา coumarin oxidation และ coumarin 7-hydroxylation ตามลำดับ โดยผลการศึกษาเบื้องต้นพบว่าในปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์ CYP2A13 หรือ CYP2A6 และ rat CPR เมื่อมีตัวให้อิเล็กตรอน NADPH จะเกิดปฏิกิริยา ในขณะที่ปฏิกิริยาที่ไม่มี NADPH หรือ เอนไซม์ CYP2A13 หรือ เอนไซม์ CPR อย่างใดอย่างหนึ่งจะไม่เกิดปฏิกิริยา เอนไซม์ CYP2A13 สามารถเร่งปฏิกิริยา coumarin oxidation เท่ากับ $0.10 \pm 0.001 \text{ umol coumarin-oxidized/min/mg protein}$ และ เอนไซม์ CYP 2A6 ที่ทำการศึกษามีค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ (activity) เท่ากับ 0.32 ± 0.0007

umol 7-hydroxycoumarin /min/mg protein โดยทำการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย 7-hydroxycoumarin

4.2.3 การตรวจสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP 2A13 และ CYP2A6 ด้วยน้ำมะเฟืองและน้ำขิง

ทำการวัดการกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 และ CYP2A6 ที่ความเข้มข้นของน้ำมะเฟือง (10 %v/v) โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับในหัวข้อ ๒.๓.๔.๓ นำค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้เปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมเอนไซม์ในสถานะที่ปราศจากพืชสมุนไพร เพื่อค้นหาประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 และ CYP2A6 จากน้ำมะเฟืองและน้ำขิง พบว่าน้ำมะเฟืองมีค่าการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 และ CYP2A6 ดีที่สุดที่ 10% v/v ที่ค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บริสุทธิ์ได้ครึ่งหนึ่งหรือร้อยละ 50 (IC_{50}) เท่ากับ 6.71 ± 0.06 และ 3.19 ± 0.09 ตามลำดับ ในขณะที่น้ำขิงมีค่าการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 และ CYP2A6 ดีที่สุดที่ 10% v/v ที่ค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บริสุทธิ์ได้ครึ่งหนึ่งหรือร้อยละ 50 (IC_{50}) เท่ากับ 15.23 ± 0.12 และ 8.14 ± 0.82 ตามลำดับ

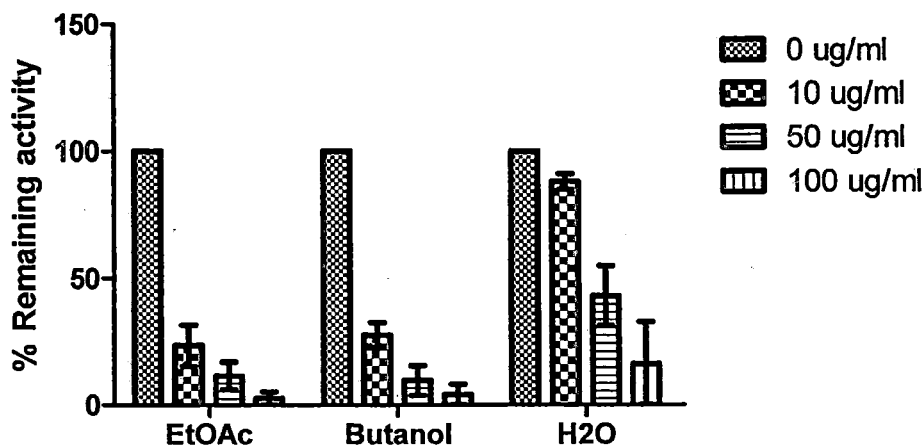


ภาพที่ 4-6 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 และ CYP2A6 บริสุทธิ์ต่อสารตั้งต้น Coumarin ของน้ำมะเฟืองและน้ำขิงเมื่อทำการศึกษาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ร้อยละของกิจกรรมเอนไซม์ที่เหลืออยู่คำนวณโดยทำไปเปรียบเทียบกับการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 เมื่อไม่เติมน้ำสมุนไพรหรือน้ำผลไม้ (น้ำเปล่า) การทดลองทำซ้ำทั้งหมดสองครั้ง และวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5

4.3 ทดสอบการยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ของสารสกัดขิง

4.3.1 ปฏิกริยา co-incubation

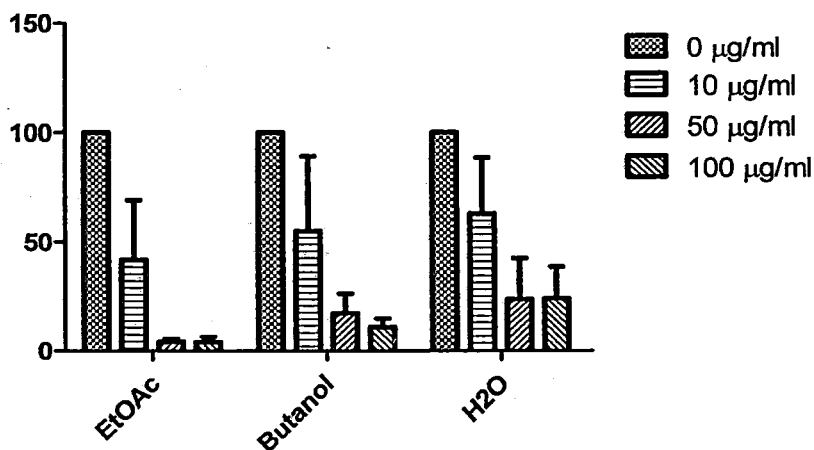
ทำการตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ในการเร่งปฏิกริยาสร้างสารผลิตภัณฑ์ 7-hydroxycoumarin พบว่าส่วนสกัด ethyl acetate, butanol และน้ำมีค่า IC_{50} = 3.39, 4.01 และ 36.20 ตามลำดับ (ภาพที่ 4-7)



ภาพที่ 4-7 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ในการเร่งปฏิกริยา coumarin 7-hydroxylase โดยส่วนสกัดขิง เปรียบเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์ CYP2A6 ในปฏิกริยาที่ปราศจากสารสกัดขิงโดยมีสารละลาย DMSO ที่เป็นตัวละลายสารสกัดเป็นตัวควบคุม (มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 100%)

4.3.2 ปฏิกริยา pre-incubation

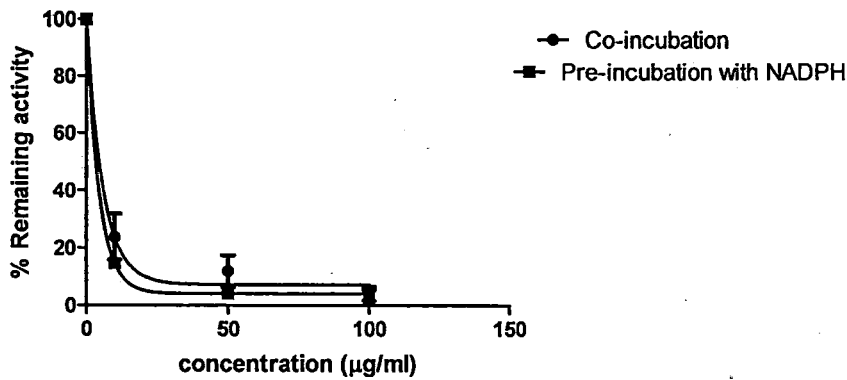
ทำการศึกษาปฏิกริยา pre-incubation เพื่อตรวจสอบกลไกการยับยั้งแบบ mechanism based inhibition ของสารสกัดขิง พบว่าการทำงานของเอนไซม์ลดลงอย่างชัดเจนเมื่อทำปฏิกริยา pre-incubation ของส่วนสกัด ethyl acetate, butanol และ ส่วนสกัดน้ำกับเอนไซม์ CYP2A6 เป็นเวลา 10 นาที (ภาพที่ 4-8) โดยส่วนสกัด ethyl acetate สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดีที่สุด โดยส่วนสกัด ethyl acetate, butanol และน้ำมีค่า IC_{50} = 1.80, 3.91 และ 29.01 ตามลำดับ



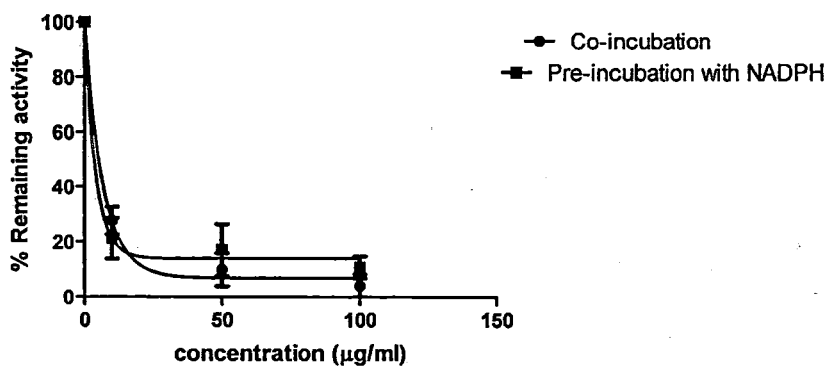
ภาพที่ 4-8 ปฏิกริยา pre-incubation ที่เวลา 10 นาทีโดยส่วนสกัด ethyl acetate, butanol และส่วนสกัดน้ำจากขิง โดยเปรียบเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์ CYP2A6 ในปฏิกริยาที่ปราศจากสารสกัดขิง (0 ug/ml) เป็นตัวควบคุม

เมื่อเปรียบเทียบผลการยับยั้งการทำงานของส่วนสกัดระหว่างปฏิกิริยา co-incubation และ pre-incubation จะเห็นได้ว่าปฏิกิริยา pre-incubation สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดีกว่าปฏิกิริยา co-incubation (ภาพที่ 4-9: NADPH dependent) ซึ่งเป็นคุณสมบัติเบื้องต้นที่จะบอกได้ว่าสารยับยั้งในสารสกัดขิงมีกลไกการยับยั้งเอนไซม์แบบ mechanism-based inhibition

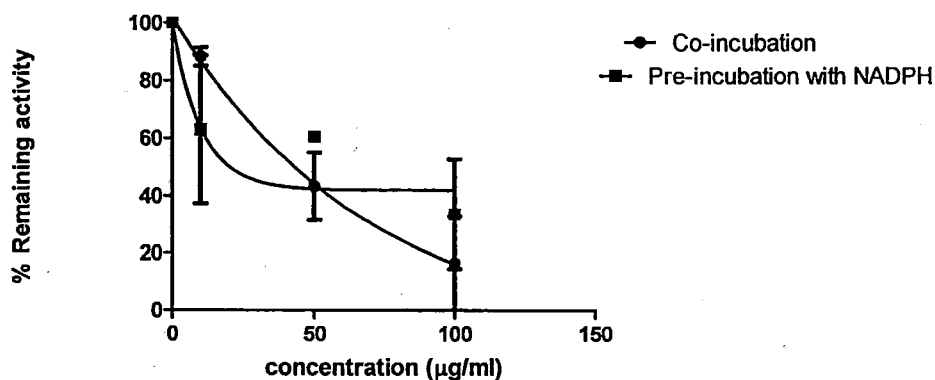
EtOAc compared 10 min



Butanol compared 10 min



H2O compared 10 min

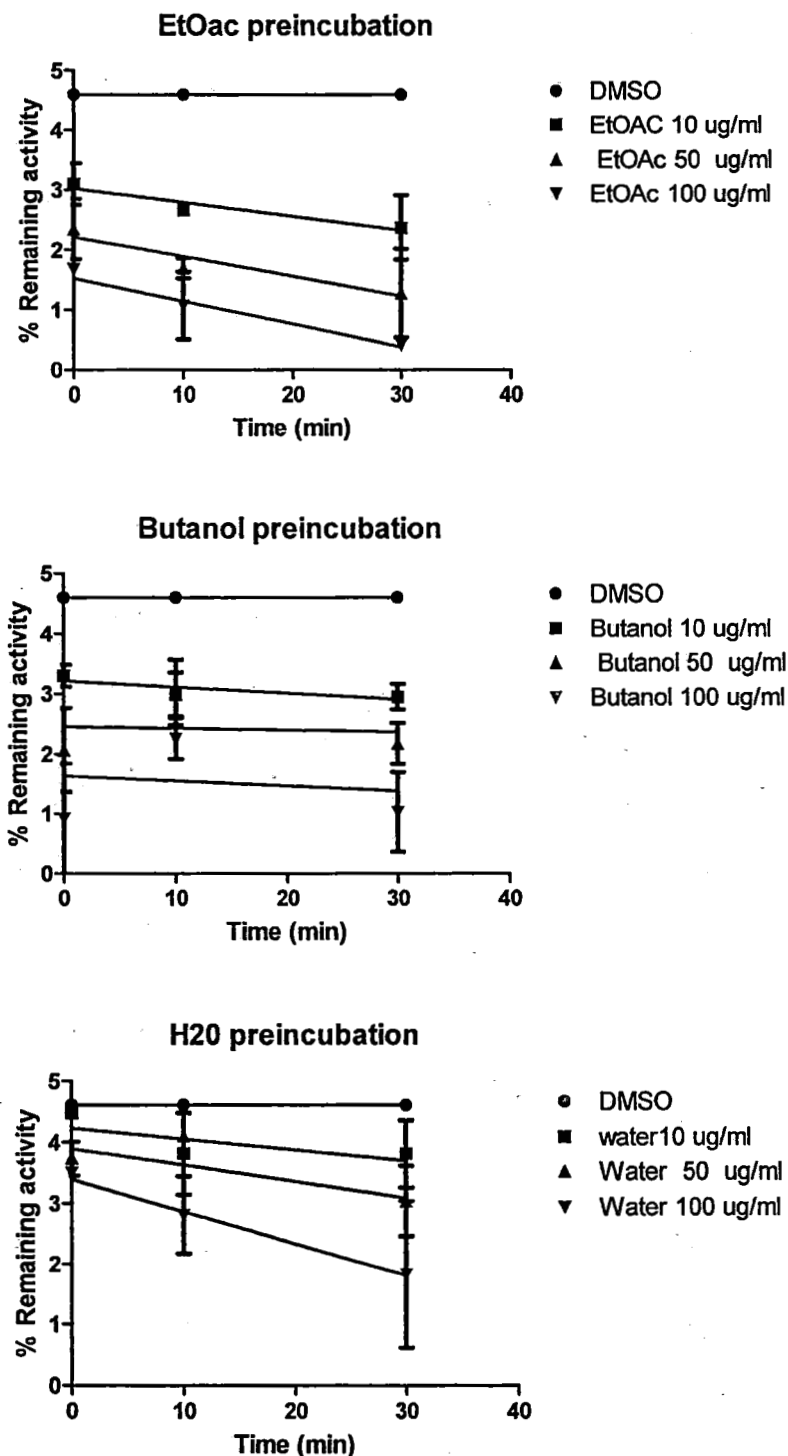


(C)

ภาพที่ 4-9 เปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ของส่วนสกัด ethyl acetate, butanol และน้ำของขิงระหว่างปฏิกิริยา co-incubation กับ pre-incubation ที่เวลา 10 นาที

จากนั้นวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 เมื่อทำปฏิกิริยา pre-incubation เป็นเวลา 30 นาที (ภาพที่ 4-10) พบว่าฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ของส่วนสกัด ethyl

acetate และส่วนสกัดน้ำ ขึ้นอยู่กับเวลาของการบ่มส่วนสกัดกับเอนไซม์ (pre-incubation time dependent) และขึ้นกับความเข้มข้นของส่วนสกัด (concentration dependent) จึงสรุปเบื้องต้นได้ว่าสารสกัดขิงส่วน ethyl acetate และส่วนสกัดน้ำออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 โดยกลไกการยับยั้งแบบ mechanism-based (การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แบบผันกลับไม่ได้) สำหรับส่วนสกัด butanol นั้น ขึ้นกับความเข้มข้นของส่วนสกัด แต่ไม่ขึ้นอยู่กับเวลาของการบ่มส่วนสกัดกับเอนไซม์ เป็นการยับยั้งแบบผันกลับได้

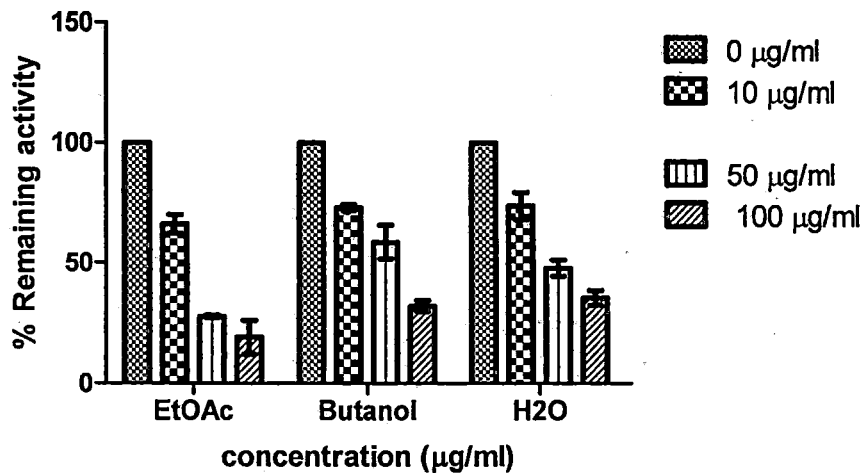


ภาพที่ 4-10 การทดสอบการยับยั้งแบบ concentration dependent และ time dependent ของเอนไซม์ CYP2A6 ในปฏิกิริยา pre-incubation ที่เวลา 10 และ 30 นาทีและความเข้มข้นต่างๆ

4.4 ทดสอบการยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ของสารสกัดมะเฟือง

4.4.1 ปฏิกริยา co-incubation

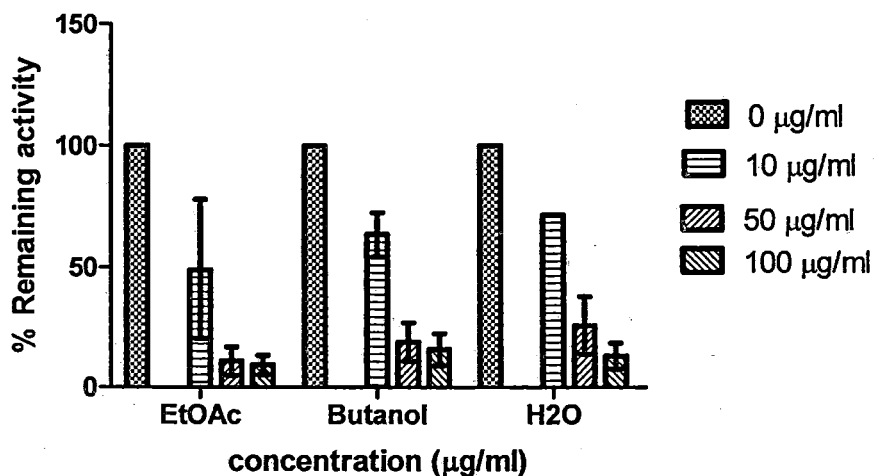
ทำการตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ในการเร่งปฏิกริยาสร้างสารผลิตภัณฑ์ 7-hydroxycoumarin พบว่าส่วนสกัด ethyl acetate สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ดีกว่าส่วนสกัดน้ำและ butanol โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 17.05, 42.81 และ 51.70 ตามลำดับ (ภาพที่ 4-11)



ภาพที่ 4-11 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ในการเร่งปฏิกริยา coumarin 7-hydroxylase โดยส่วนสกัดมะเฟือง เปรียบเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์ CYP2A6 ในปฏิกริยาที่ปราศจากสารสกัดมะเฟืองโดยมีสารละลาย DMSO ที่เป็นตัวละลายสารสกัดเป็นตัวควบคุม (มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 100%)

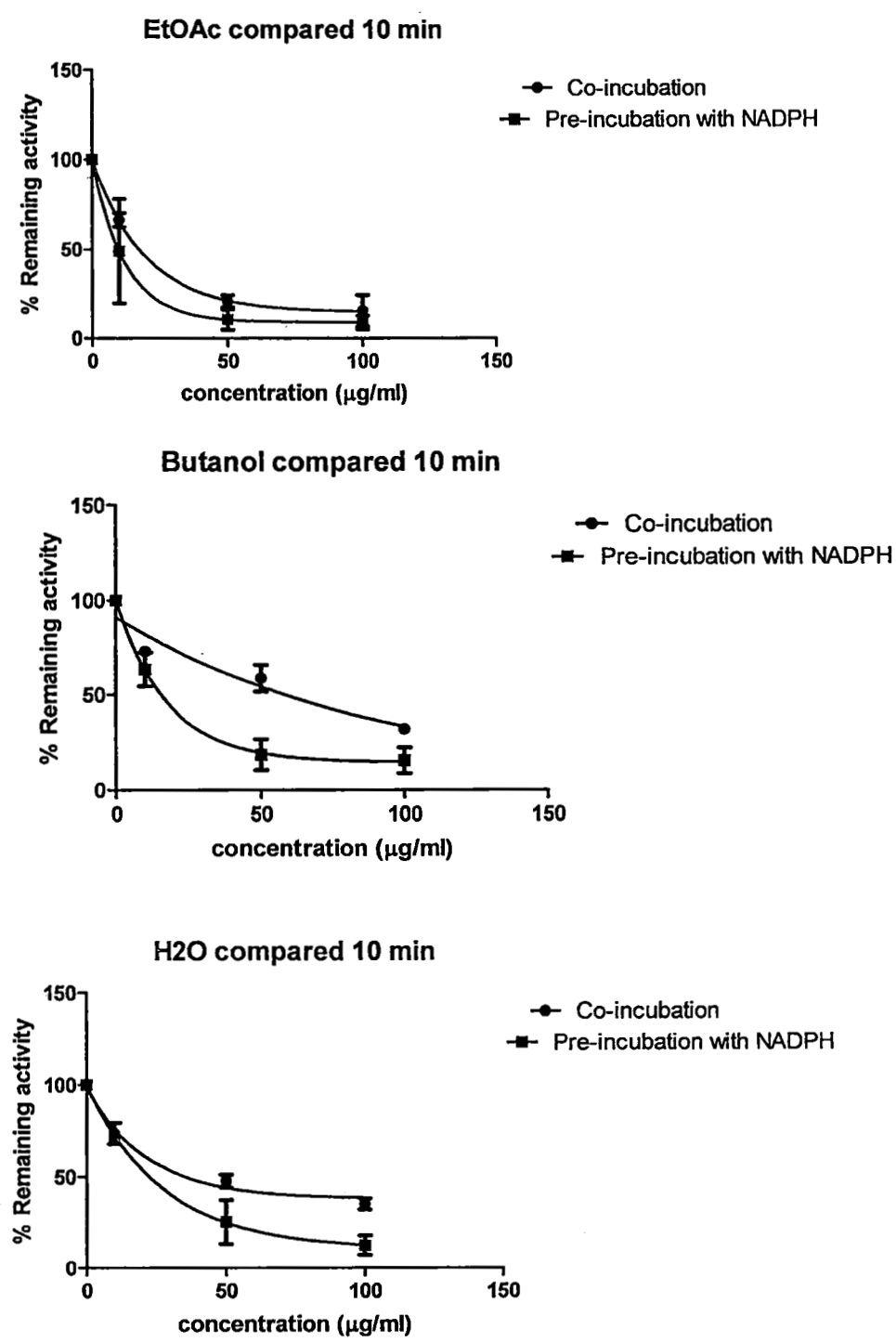
4.4.2 ปฏิกริยา pre-incubation

ทำการศึกษาปฏิกริยา pre-incubation เพื่อตรวจสอบกลไกการยับยั้งแบบ mechanism based inhibition ของสารสกัดมะเฟือง พบว่าการทำงานของเอนไซม์ลดลงอย่างชัดเจนเมื่อทำปฏิกริยา pre-incubation ของส่วนสกัด ethyl acetate, butanol และ ส่วนสกัดน้ำกับเอนไซม์ CYP2A6 เป็นเวลา 10 นาที (ภาพที่ 4-12) โดยส่วนสกัด ethyl acetate สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดีที่สุด โดยส่วนสกัด ethyl acetate, butanol และน้ำมีค่า IC_{50} = 8.82, 15.37 และ 18.06 ตามลำดับ



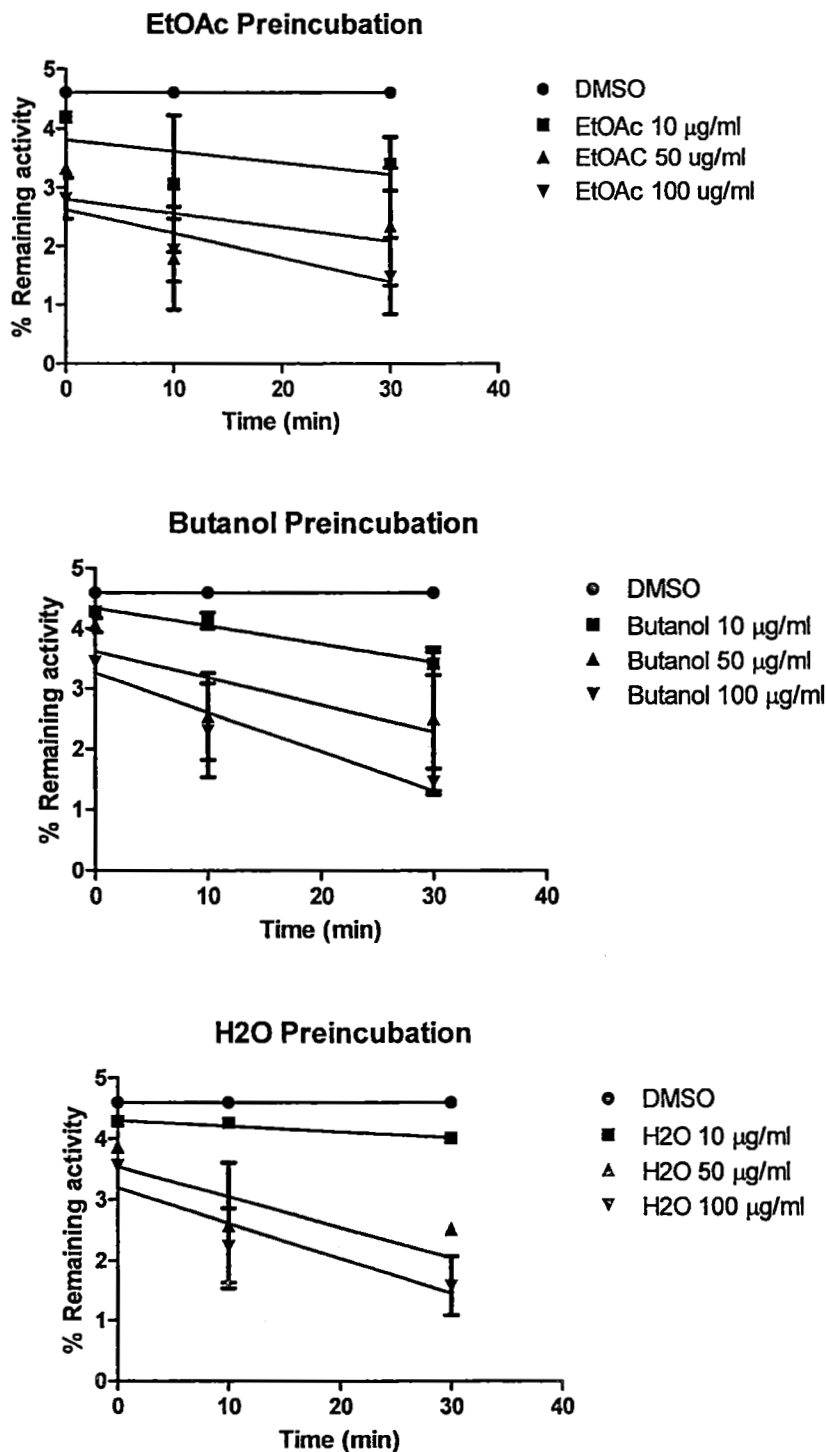
ภาพที่ 4-12 ปฏิกริยา pre-incubation ที่เวลา 10 นาทีโดยส่วนสกัด ethyl acetate, butanol และส่วนสกัดน้ำจากมะเฟือง โดยเปรียบเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์ CYP2A6 ในปฏิกริยาที่ปราศจากสารสกัดมะเฟือง (0 µg/ml) เป็นตัวควบคุม

เมื่อทำการเปรียบเทียบผลการยับยั้งการทำงานของส่วนสกัดระหว่างปฏิกิริยา co-incubation และ pre-incubation จะเห็นได้ว่าปฏิกิริยา pre-incubation สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดีกว่าปฏิกิริยา co-incubation (ภาพที่ 4-13: NADPH dependent) ซึ่งเป็นคุณสมบัติเบื้องต้นที่จะบอกได้ว่าสารยับยั้งในสารสกัดมะเฟืองมีกลไกการยับยั้งเอนไซม์แบบ mechanism-based



ภาพที่ 4-13 เปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ของส่วนสกัด ethyl acetate, butanol และน้ำของมะเฟืองระหว่างปฏิกิริยา co-incubation กับ pre-incubation ที่เวลา 10 นาที

จากนั้นวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 เมื่อทำปฏิกิริยา pre-incubation เป็นเวลา 30 นาที (ภาพที่ 4-14) พบว่าฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ของส่วนสกัด ethyl acetate butanol และส่วนสกัดน้ำ ขึ้นอยู่กับเวลาของการบ่มส่วนสกัดกับเอนไซม์ (pre-incubation time dependent) และขึ้นกับความเข้มข้นของส่วนสกัด (concentration dependent) จึงสรุปเบื้องต้นได้ว่าสารสกัดทั้งส่วน ethyl acetate butanol และส่วนสกัดน้ำออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 โดยกลไกการยับยั้งแบบ mechanism-based (การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แบบผันกลับไม่ได้)

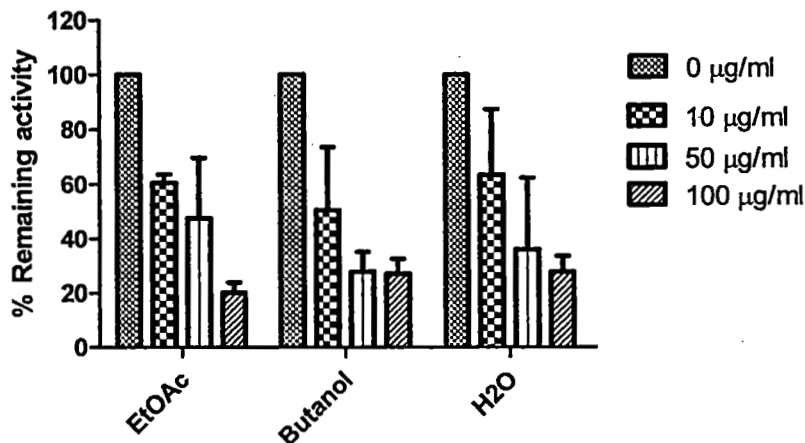


ภาพที่ 4-14 การทดสอบการยับยั้งแบบ concentration dependent และ time dependent ของเอนไซม์ CYP2A6 ในปฏิกิริยา pre-incubation ที่เวลา 10 และ 30 นาทีและความเข้มข้นต่างๆ

4.5 ทดสอบการยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 ของสารสกัดขิง

4.5.1 ปฏิบัติการ co-incubation

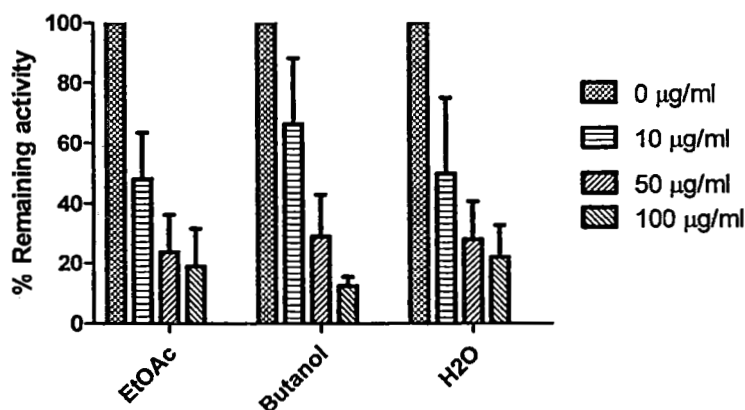
ทำการตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ในการเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายสารตั้งต้น coumarin พบว่าส่วนสกัด butanol สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ดีกว่าส่วนสกัดน้ำและ ethyl acetate โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 14.27, 19.58 และ 27.57 ตามลำดับ (ภาพที่ 4-15)



ภาพที่ 4-15 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 โดยส่วนสกัดขิง เปรียบเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์ CYP2A13 ในปฏิกิริยาที่ปราศจากสารสกัดขิงโดยมีสารละลาย DMSO ที่เป็นตัวละลายสารสกัดเป็นตัวควบคุม (มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 100%)

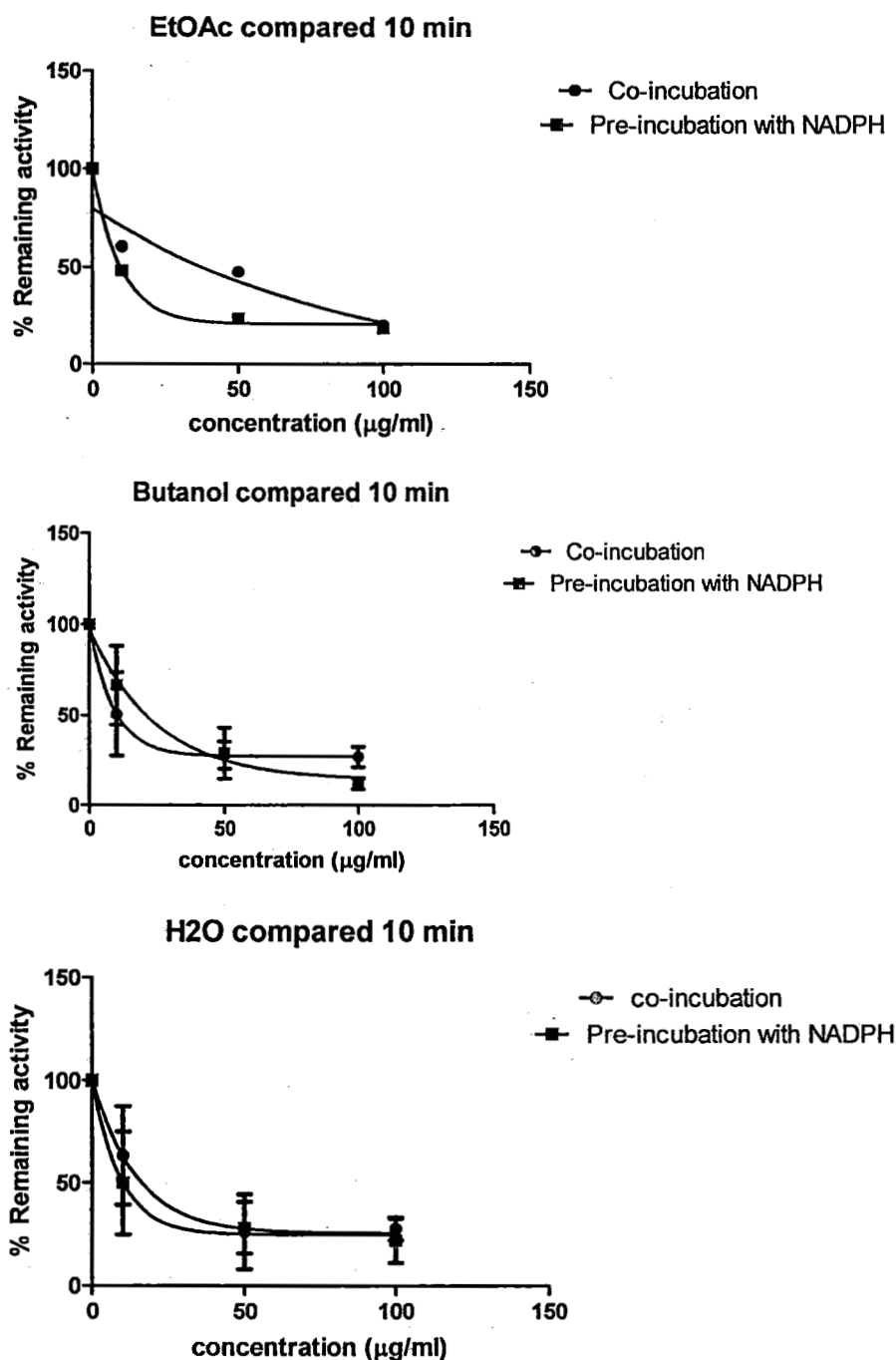
4.5.2 ปฏิบัติการ pre-incubation

ทำการศึกษาปฏิกิริยา pre-incubation เพื่อตรวจสอบกลไกการยับยั้งแบบ mechanism based inhibition ของสารสกัดขิง พบว่าการทำงานของเอนไซม์ลดลงอย่างชัดเจนเมื่อทำปฏิกิริยา pre-incubation ของส่วนสกัด ethyl acetate, butanol และ ส่วนสกัดน้ำกับเอนไซม์ CYP2A13 เป็นเวลา 10 นาที (ภาพที่ 4-16) โดยส่วนสกัด ethyl acetate สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดีที่สุด โดยส่วนสกัด ethyl acetate, butanol และน้ำมีค่า IC_{50} = 11.81, 19.29 และ 14.08 ตามลำดับ



ภาพที่ 4-16 ปฏิบัติการ pre-incubation ที่เวลา 10 นาทีโดยส่วนสกัด ethyl acetate, butanol และส่วนสกัดน้ำจากขิง โดยเปรียบเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์ CYP2A13 ในปฏิกิริยาที่ปราศจากสารสกัดขิง (0 µg/ml) เป็นตัวควบคุม

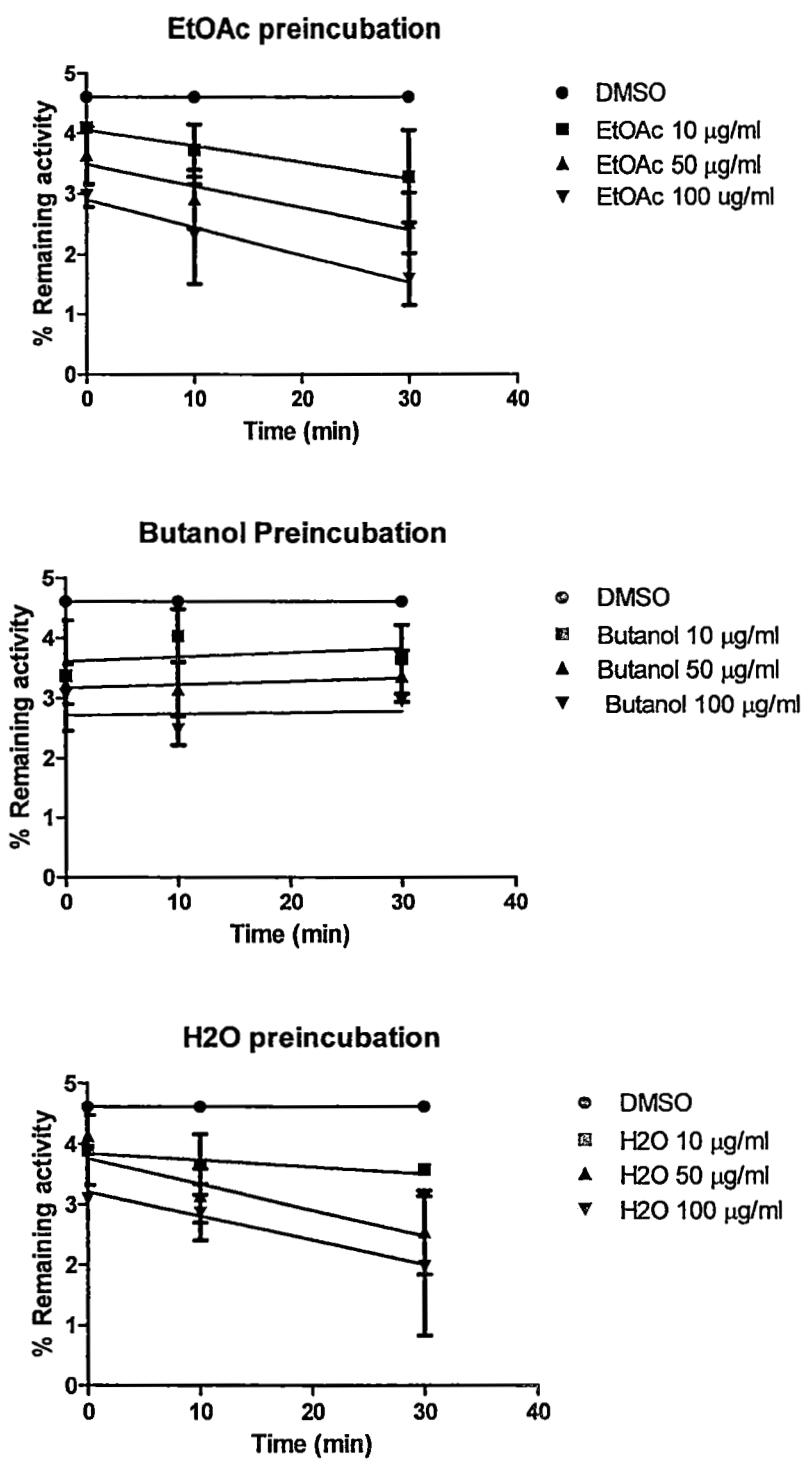
เมื่อทำการเปรียบเทียบผลการยับยั้งการทำงานของส่วนสกัดระหว่างปฏิกิริยา co-incubation และ pre-incubation จะเห็นได้ว่าปฏิกิริยา pre-incubation ของส่วนสกัด ethyl acetate และน้ำสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 ได้ดีกว่าปฏิกิริยา co-incubation (ภาพที่ 4-17: NADPH dependent) ซึ่งเป็นคุณสมบัติเบื้องต้นที่จะบอกได้ว่าสารยับยั้งในสารสกัดมะเฟืองมีกลไกการยับยั้งเอนไซม์แบบ mechanism-based แต่ในส่วนสกัด butanol อาจไม่ใช้การยับยั้งแบบ mechanism-based



ภาพที่ 4-17 เปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 ของส่วนสกัด ethyl acetate, butanol และน้ำของซึ่งระหว่างปฏิกิริยา co-incubation กับ pre-incubation ที่เวลา 10 นาที

จากนั้นวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 เมื่อทำปฏิกิริยา pre-incubation เป็นเวลา 30 นาที (ภาพที่ 4-18) พบว่าฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 ของส่วนสกัด ethyl acetate และส่วนสกัดน้ำ ขึ้นอยู่กับเวลาของการบ่มส่วนสกัดกับเอนไซม์ (pre-incubation time dependent)

และขึ้นกับความเข้มข้นของส่วนสกัด (concentration dependent) จึงสรุปเบื้องต้นได้ว่าสารสกัดชิงส่วน ethyl acetate และส่วนสกัดน้ำออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 โดยกลไกการยับยั้งแบบ mechanism-based (การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แบบผันกลับไม่ได้) สำหรับส่วนสกัด butanol นั้น ขึ้นกับความเข้มข้นของส่วนสกัด แต่ไม่ขึ้นอยู่กับเวลาของการบ่มส่วนสกัดกับเอนไซม์ เป็นการยับยั้งแบบผันกลับได้

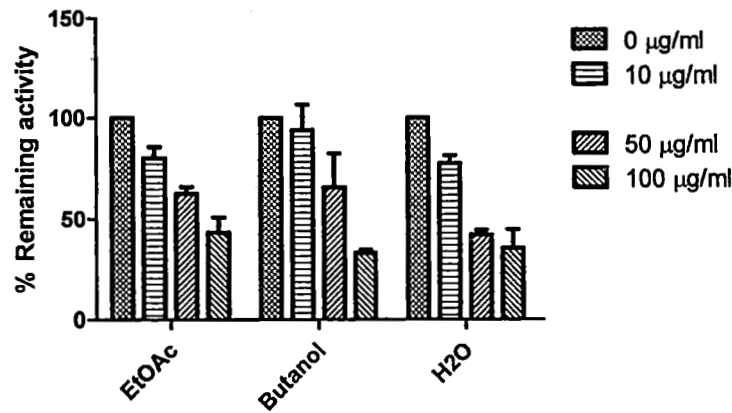


ภาพที่ 4-18 การทดสอบการยับยั้งแบบ concentration dependent และ time dependent ของเอนไซม์ CYP2A13 ในปฏิกิริยา pre-incubation ที่เวลา 10 และ 30 นาทีและความเข้มข้นต่างๆ

4.6 ทดสอบการยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 ของสารสกัดมะเฟือง

4.6.1 ปฏิกริยา co-incubation

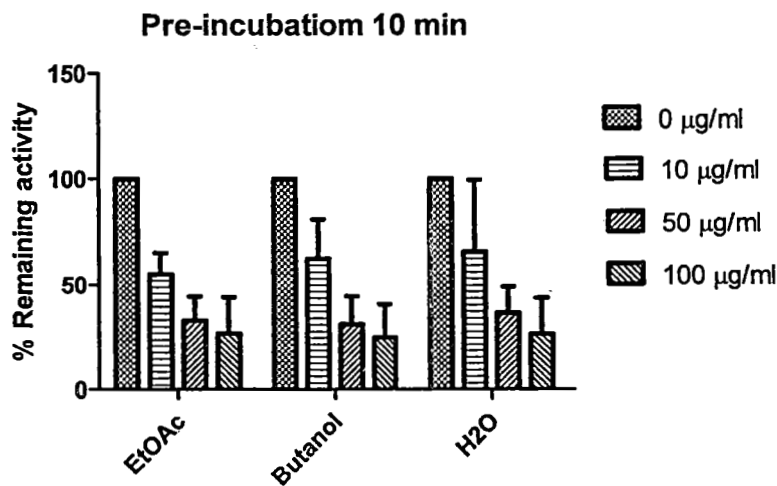
ทำการตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ในการเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายสารตั้งต้น coumarin พบว่าส่วนสกัด ethyl acetate สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ดีกว่าส่วนสกัด butanol และน้ำ โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 20.44, 21.68 และ 26.84 ตามลำดับ (ภาพที่ 4-19)



ภาพที่ 4-19 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 โดยส่วนสกัดมะเฟือง เปรียบเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์ CYP2A13 ในปฏิกิริยาที่ปราศจากสารสกัดมะเฟืองโดยมีสารละลาย DMSO ที่เป็นตัวละลายสารสกัดเป็นตัวควบคุม (มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 100%)

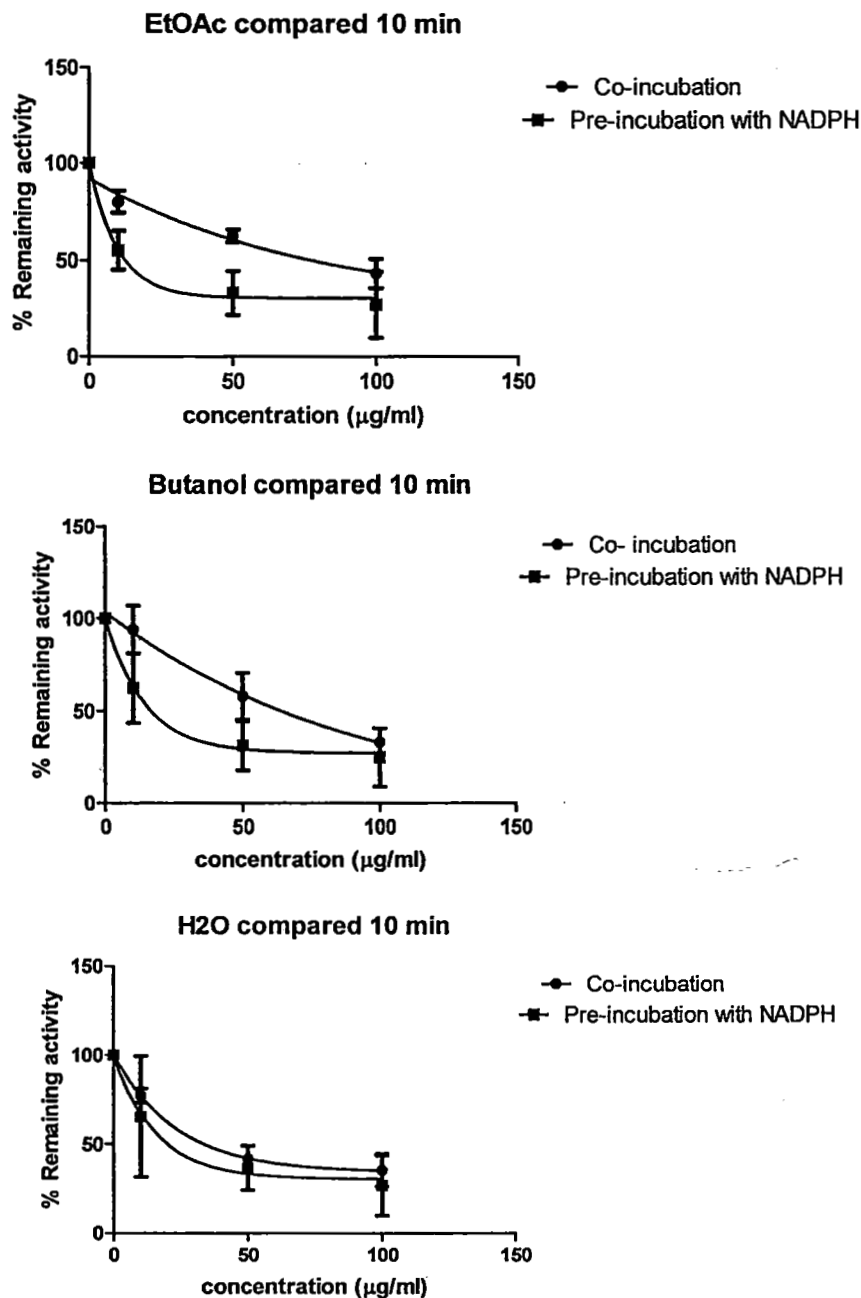
4.6.2 ปฏิกริยา pre-incubation

ทำการศึกษาปฏิกิริยา pre-incubation เพื่อตรวจสอบกลไกการยับยั้งแบบ mechanism based inhibition ของสารสกัดขิง พบว่าการทำงานของเอนไซม์ลดลงอย่างชัดเจนเมื่อทำปฏิกิริยา pre-incubation ของส่วนสกัด ethyl acetate, butanol และ ส่วนสกัดน้ำกับเอนไซม์ CYP2A13 เป็นเวลา 10 นาที (ภาพที่ 4-20) โดยส่วนสกัด ethyl acetate สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดีที่สุด โดยส่วนสกัด ethyl acetate, butanol และน้ำมีค่า IC₅₀ = 20.44, 21.68 และ 26.84 ตามลำดับ



ภาพที่ 4-20 ปฏิกริยา pre-incubation ที่เวลา 10 นาทีโดยส่วนสกัด ethyl acetate, butanol และส่วนสกัดน้ำจากมะเฟือง โดยเปรียบเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์ CYP2A13 ในปฏิกิริยาที่ปราศจากสารสกัดขิง (0 µg/ml) เป็นตัวควบคุม

เมื่อทำการเปรียบเทียบผลการยับยั้งการทำงานของส่วนสกัดระหว่างปฏิกิริยา co-incubation และ pre-incubation จะเห็นได้ว่าปฏิกิริยา pre-incubation ของส่วนสกัด ethyl acetate butanol และน้ำ สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 ได้ดีกว่าปฏิกิริยา co-incubation (ภาพที่ 4-21: NADPH dependent) ซึ่งเป็นคุณสมบัติเบื้องต้นที่จะบอกได้ว่าสารยับยั้งในสารสกัดมะเฟืองมีกลไกการยับยั้งเอนไซม์แบบ mechanism-based

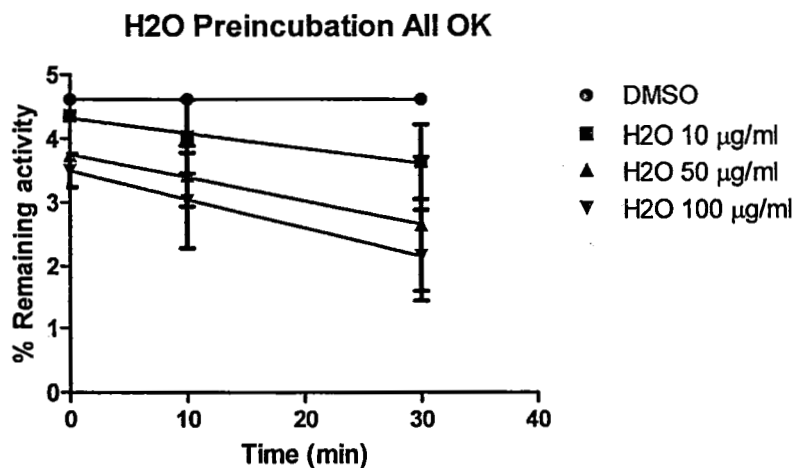
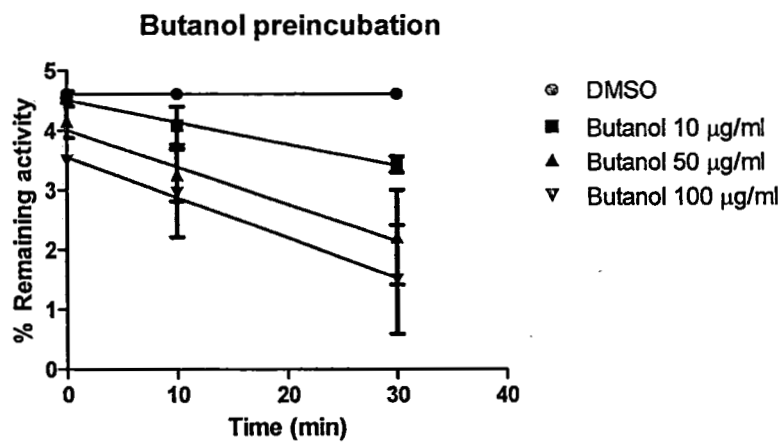
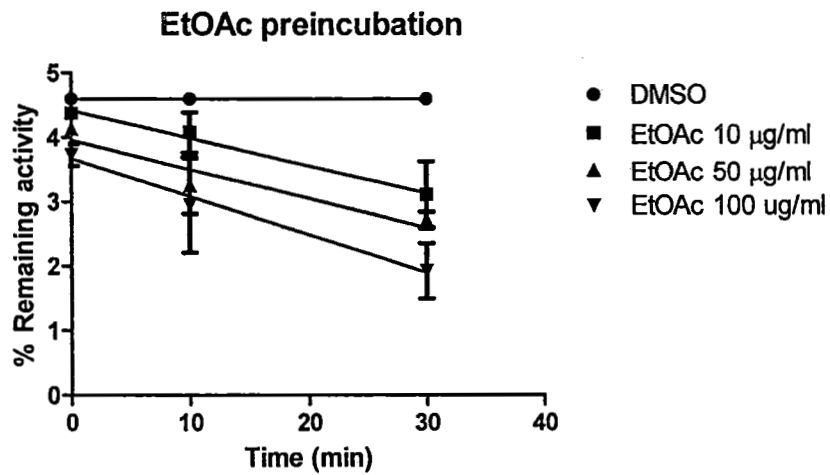


(C)

ภาพที่ 4-21 เปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 ของส่วนสกัด ethyl acetate, butanol และน้ำของชิงมะเฟืองระหว่างปฏิกิริยา co-incubation กับ pre-incubation ที่เวลา 10 นาที

จากนั้นวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 เมื่อทำปฏิกิริยา pre-incubation เป็นเวลา 30 นาที (ภาพที่ 4-22) พบว่าฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 ของส่วนสกัด ethyl

acetate และส่วนสกัดน้ำ ขึ้นอยู่กับเวลาของการบ่มส่วนสกัดกับเอนไซม์ (pre-incubation time dependent) และขึ้นกับความเข้มข้นของส่วนสกัด (concentration dependent) จึงสรุปเบื้องต้นได้ว่าสารสกัดซึ่งส่วน ethyl acetate และส่วนสกัดน้ำออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 โดยกลไกการยับยั้งแบบ mechanism-based (การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แบบผันกลับไม่ได้)

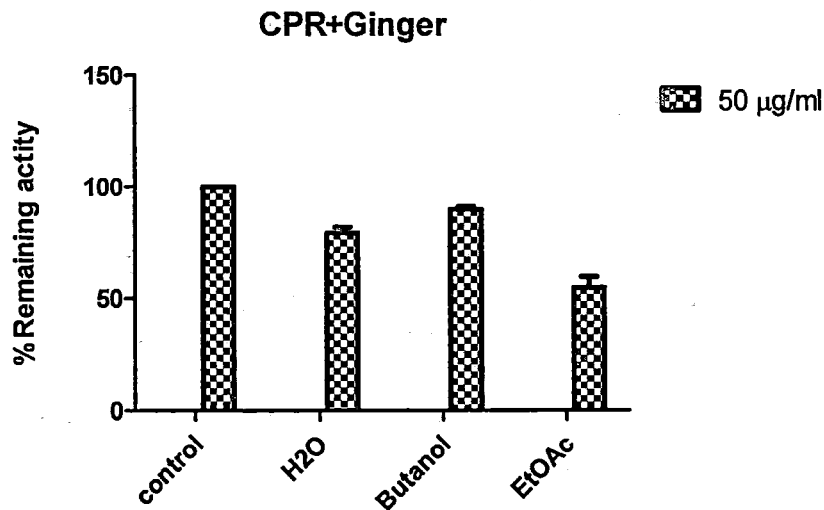


ภาพที่ 4-22 การทดสอบการยับยั้งแบบ concentration dependent และ time dependent ของเอนไซม์ CYP2A13 ในปฏิกิริยา pre-incubation ที่เวลา 10 และ 30 นาทีและความเข้มข้นต่างๆ

4.7 การยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ rat CPR ของสารสกัดจากขิงและมะเฟือง

4.7.1 สารสกัดจากขิง

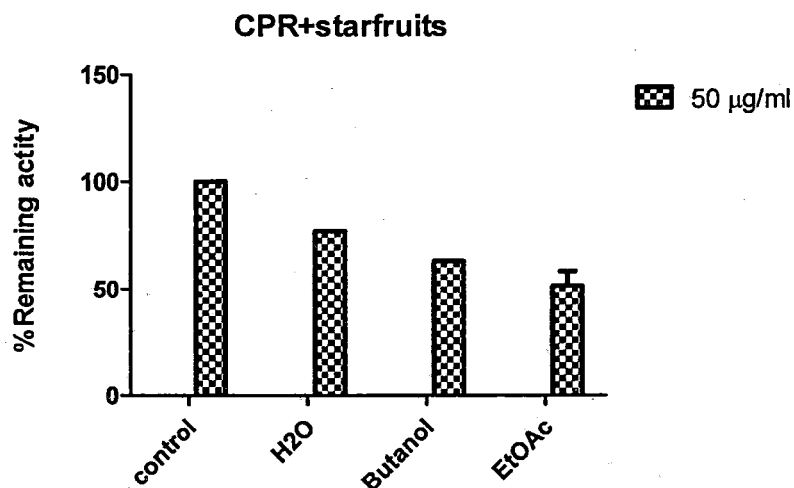
นำเอนไซม์ rat CPR ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์มาศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากขิงและมะเฟืองที่แยกแบบลำดับส่วนในแต่ละส่วนสกัด ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$ โดยมีสารละลาย DMSO ที่เป็นตัวละลายสารสกัดเป็นตัวควบคุม (มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 100%) ผลการศึกษาพบว่า ส่วนสกัด ethyl acetate ยับยั้งเอนไซม์ rat CPR ได้ถึง 45.25% ส่วนสกัดน้ำและบิวทานอล ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ rat CPR ได้ 20.63% และ 10.44% ตามลำดับ (ภาพที่ 4-23)



ภาพที่ 4-23 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ rat CPR ของสารสกัดจากขิง เปรียบเทียบกับปฏิกิริยาที่ปราศจากสารสกัดจากขิง (Control)

4.7.2 สารสกัดจากมะเฟือง

ในขณะที่สารสกัดลำดับส่วนจากมะเฟืองในส่วนสกัด ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$ พบว่า ส่วนสกัด ethyl acetate ยับยั้งเอนไซม์ rat CPR ได้ถึง 48.57% ส่วนสกัดบิวทานอลและน้ำ ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ rat CPR ได้ 36.82% และ 22.81% ตามลำดับ (ภาพที่ 4-24)



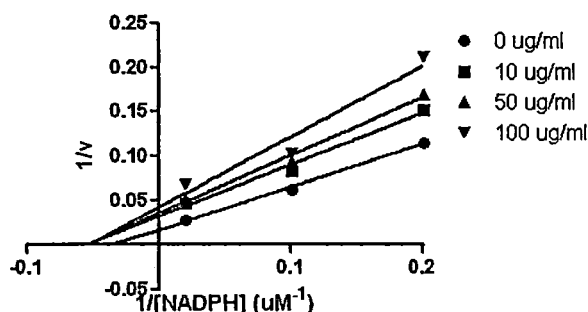
ภาพที่ 4-24 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ rat CPR ของสารสกัดจากมะเฟือง เปรียบเทียบกับปฏิกิริยาที่ปราศจากสารสกัดจากขิง (Control)

4.8 กลไกการยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ rat CPR ของส่วนสกัด ethyl acetate ของสารสกัดจากขิงและมะเฟือง

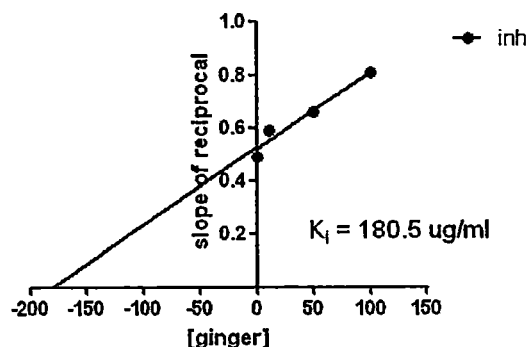
4.8.1 ส่วนสกัด ethyl acetate จากขิง

นำเอนไซม์ rat CPR ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์มาศึกษากลไกการยับยั้งของส่วนสกัด ethyl acetate พบว่าส่วนสกัด ส่วนสกัด ethyl acetate ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ rat CPR ในการรับอิเล็กตรอนจาก NADPH แบบ non-competitive inhibition ด้วยค่า K_i เท่ากับ 180.50 $\mu\text{g/ml}$ (ภาพที่ 4-25) และออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ rat CPR ในการส่งอิเล็กตรอนให้ cytochrome c แบบ non-competitive inhibition ด้วยค่า K_i เท่ากับ 166.30 $\mu\text{g/ml}$ (ภาพที่ 4-26)

Lineweaver-Burk of fixed cytc_ginger

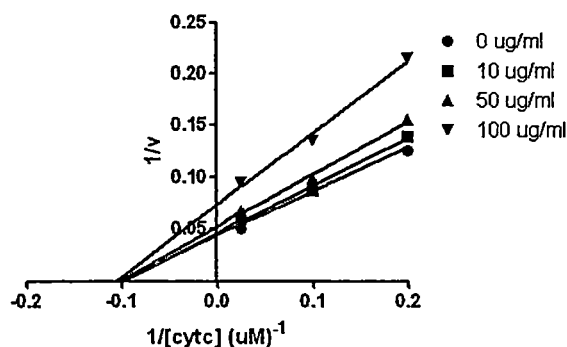


slope of fixed cytc

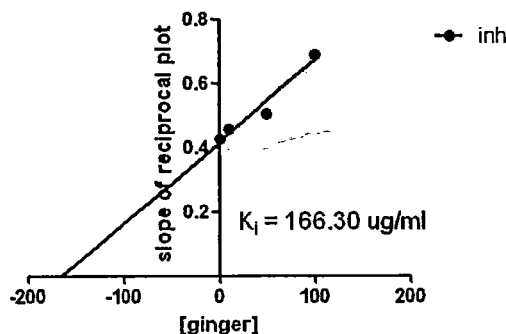


ภาพที่ 4-25 Line-Weaver Burk แสดงกลไกการยับยั้งเอนไซม์ rat CPR ของส่วนสกัด ethyl acetate จากขิง

Lineweaver-Burk of fixed NADPH ginger



slope of fixed NADPH

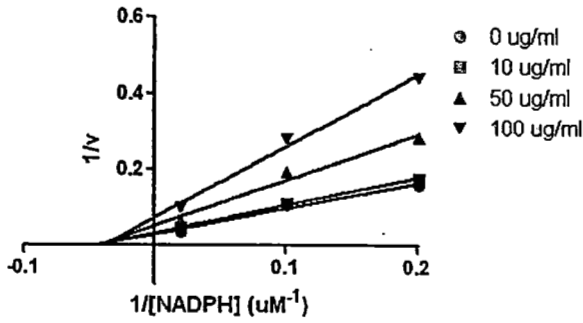


ภาพที่ 4-26 Line-Weaver Burk แสดงกลไกการยับยั้งเอนไซม์ rat CPR ของส่วนสกัด ethyl acetate จากขิง

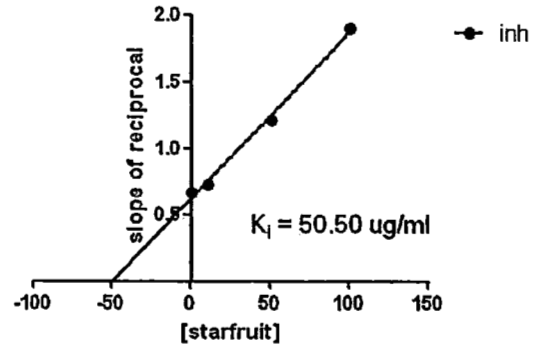
4.8.1 ส่วนสกัด ethyl acetate จากมะเฟือง

นำเอนไซม์ rat CPR ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์มาศึกษากลไกการยับยั้งของส่วนสกัด ethyl acetate พบว่าส่วนสกัด ส่วนสกัด ethyl acetate ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ rat CPR ในการรับอิเล็กตรอนจาก NADPH แบบ non-competitive inhibition ด้วยค่า K_i เท่ากับ 50.50 $\mu\text{g/ml}$ (ภาพที่ 4-27) และออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ rat CPR ในการส่งอิเล็กตรอนให้ cytochrome c แบบ non-competitive inhibition ด้วยค่า K_i เท่ากับ 77.36 $\mu\text{g/ml}$ (ภาพที่ 4-28)

Lineweaver-Burk of fixed cytc_starfruit

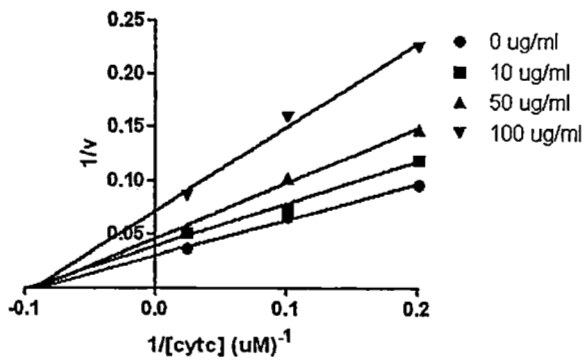


slope of fixed cytc

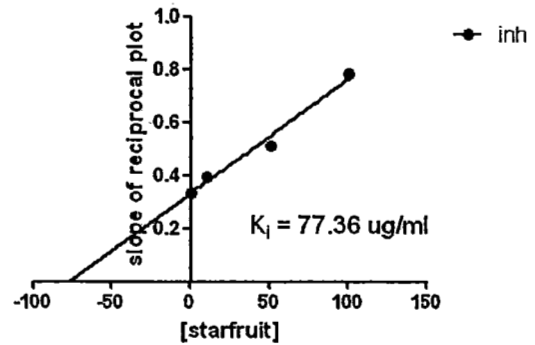


ภาพที่ 4-27 Line-Weaver Burk แสดงกลไกการยับยั้งเอนไซม์ rat CPR ของส่วนสกัด ethyl acetate จากมะเฟือง

Lineweaver-Burk of fixed NADPH starfruit



slope of fixed NADPH



ภาพที่ 4-28 Line-Weaver Burk แสดงกลไกการยับยั้งเอนไซม์ rat CPR ของส่วนสกัด ethyl acetate จากมะเฟือง

บทที่ 5

สรุปและวิเคราะห์ผลการทดลอง

5.1 อภิปรายผลการทดลอง

Cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม cytochrome P450 ที่พบมากในตับ และมีบทบาทที่สำคัญในการย่อยสลายยาและสารแปลกปลอมภายนอก เช่น สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายยารักษาโรค เช่น ยารักษาอาการชัก (Valproic acid หรือ Losigamone) ยารักษาโรคเอดส์ (Efavirenz) ยารักษาโรคมะเร็ง (Cyclophosphamine) แต่บทบาทที่สำคัญของเอนไซม์ CYP2A6 คือการเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายสารนิโคตินในบุหรี่ ที่ออกฤทธิ์ให้เกิดการเสพติดการสูบบุหรี่ (ร้อยละ 80-90 ของนิโคตินทั้งหมดที่เข้าสู่ร่างกาย) จากการศึกษาพบว่า การย่อยสลายนิโคตินโดยเอนไซม์ CYP2A6 ที่ตับที่ทำให้ระดับนิโคตินในเลือดลดลงนั้น เป็นกลไกหลักในการกำจัดนิโคตินออกจากร่างกายมากกว่าการย่อยสลายที่อวัยวะอื่นๆ (Di *et al*, 2009; Hukkanen *et al.*, 2002; Ortiz de Montellano, 2005; Patten *et al.*, 1996) และการกำจัดนิโคตินออกจากร่างกายนี้ ส่งผลให้นิโคตินไปกระตุ้นระบบตอบสนองต่อความยินดีในสมองลดลง ดังนั้นผู้สูบบุหรี่จึงต้องสูบบุหรี่มากขึ้นเพื่อรักษาระดับนิโคตินในเลือด ให้ไปกระตุ้นระบบตอบสนองต่อความยินดีให้คงความรู้สึกที่ดีมีความสุขไว้ ทำให้สูบบุหรี่อย่างต่อเนื่อง (Di *et al.*, 2009; Hukkanen *et al.*, 2002; Patten *et al.*, 1996) และยังพบว่าผู้สูบบุหรี่ที่เกิดการกลายพันธุ์ของยีน CYP2A6 ที่ทำให้เอนไซม์ CYP2A6 ย่อยสลายสารตรวจสอบ Coumarin และนิโคตินลดลงนั้น จะสูบบุหรี่น้อยและเลิกสูบบุหรี่ง่ายกว่าผู้สูบบุหรี่ที่มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ปกติ ด้วยเหตุนี้การลดการย่อยสลายนิโคตินของเอนไซม์ CYP2A6 เพื่อคงระดับของนิโคตินในเลือด จึงเป็นอีกหนึ่งในแนวทางที่สามารถนำมาใช้เพื่อช่วยในการรักษาการเสพติดบุหรี่ในผู้สูบบุหรี่ร่วมกับการได้รับยานิโคตินทดแทนต่างๆ เพื่อให้เกิดการลด ละ เลิกการสูบบุหรี่อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด

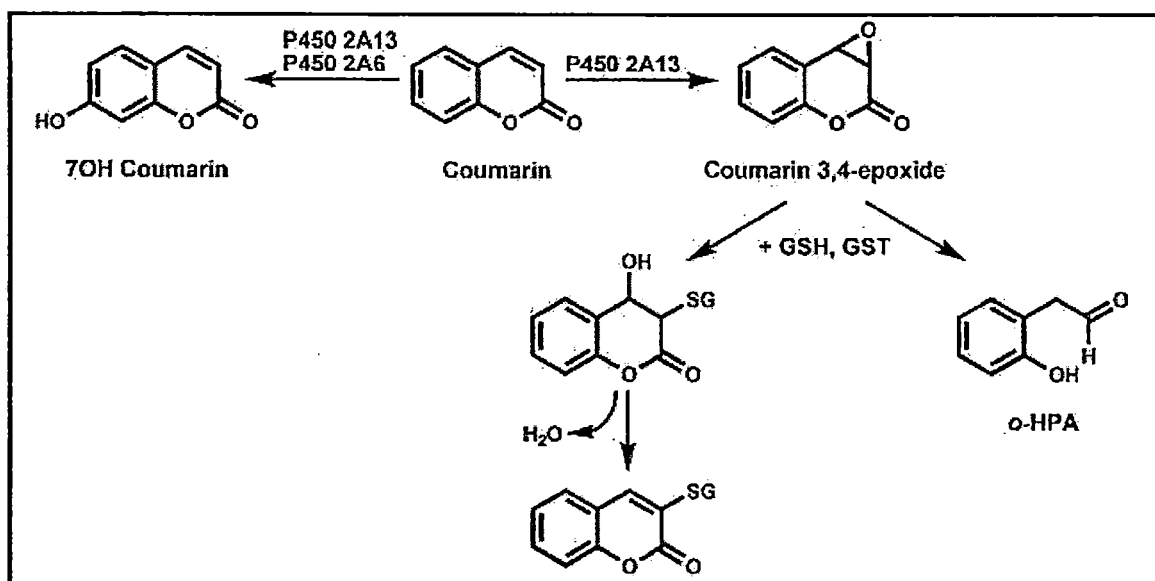
Cytochrome P450 2A13 (CYP2A13) เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม cytochrome P450 ที่พบมากในปอดและเนื้อเยื่อทางเดินหายใจ ยังไม่ทราบบทบาทที่แน่ชัดในการย่อยสลายยาและสารแปลกปลอมภายนอก รวมถึงสารในร่างกายต่างๆ ว่าจะสามารถทำหน้าที่ได้เช่นเดียวกับเอนไซม์ CYP2A6 ที่พบมากในตับและมีความคล้ายคลึงกัน ในลำดับกรดอะมิโนมากกว่าร้อยละ 90 แต่บทบาทที่สำคัญของเอนไซม์ CYP2A13 พบว่าเกี่ยวข้อง ในการเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายสารนิโคตินในบุหรี่ ที่ออกฤทธิ์ให้เกิดการเสพติดการสูบบุหรี่ เช่นเดียวกับเอนไซม์ CYP2A6 แต่ไม่พบว่าเป็นกลไกหลักในการกำจัดนิโคติน และไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของเอนไซม์ CYP2A13 กับพฤติกรรมมการสูบบุหรี่เช่นเดียวกับเอนไซม์ CYP2A6 (Di *et al*, 2009; Hukkanen *et al.*, 2002; Ortiz de Montellano, 2005; Patten *et al.*, 1996) อย่างไรก็ตาม การศึกษาค้นคว้าวิจัยพบว่าเอนไซม์ CYP2A13 เกี่ยวพันกับการย่อยสลายสารก่อมะเร็ง 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL) และ 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) ซึ่งเป็นสารพิษที่พบได้ในบุหรี่และเป็นสารเกี่ยวข้องกับกับการเกิดโรคมะเร็ง เช่น โรคมะเร็งกล่องเสียง โรคมะเร็งปอด เป็นต้น (Patten *et al.*, 1996) เพราะสารก่อมะเร็ง NNK จะถูกย่อยสลายและกระตุ้นโดยเอนไซม์ CYP2A13 ได้เป็นสารที่ก่อ

มะเร็งมากขึ้น และไปมีผลต่อสารพันธุกรรมของเนื้อเยื่อระบบทางเดินหายใจจนก่อให้เกิดโรคมะเร็งปอดในที่สุด จึงได้มีการศึกษาการหาสารที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 เพื่อลดอัตราเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งปอดได้อย่างปลอดภัย โดยพบว่าสาร 8-MOP ที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้สามารถยับยั้งเอนไซม์ CYP2A13 ได้ อย่างไรก็ตามสารนี้ก่อให้เกิดผลข้างเคียงกับผู้ใช้ในขณะที่ต้องการลดการสูบบุหรี่ (Di et al., 2009; Xi et al., 2009) เนื่องด้วยจากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า น้ำขิงและน้ำมะเฟืองสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้ถึง 90% เช่น 8-MOP และน้ำมะเฟืองเข้มข้น 40 % สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้ถึง 95 % (Pouyfung et al., 2013; Prasomthai et al., 2013) ดังนั้น ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะนำน้ำขิงและน้ำมะเฟืองมาศึกษาเพิ่มเติม เกี่ยวกับกลไกในการยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 และเอนไซม์ CYP2A13 เพื่อเป็นอีกแนวทางในการรักษาหรือบำบัดในผู้ติดบุหรี่ และช่วยลดอัตราเสี่ยงในการเกิดโรคที่เกิดจากการสูบบุหรี่ได้ โดยมุ่งเน้นศึกษาหาสาระสำคัญในพืชที่ออกฤทธิ์ยับยั้งแบบ mechanism based inhibition (การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แบบผันกลับไม่ได้ โดยสารยับยั้งถูกเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ จากนั้นผลิตภัณฑ์จับแน่นกับเอนไซม์ จนเกิดสารประกอบเชิงซ้อนเอนไซม์ที่เสถียรภาพ (dead-end complex)) ซึ่งมีเกณฑ์เบื้องต้นสำหรับบ่งชี้สามประการคือ 1) NADPH-dependent เป็นการศึกษาผลของการยับยั้ง เมื่อเติม NADPH เพื่อทำปฏิกิริยาก่อนเติมสารตั้งต้น ถ้าตัวยับยั้งเป็นแบบ Mechanism-base inhibitor จะส่งผลให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์เพิ่มมากขึ้นเพราะสารยับยั้งถูกเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ cytochrome P450 แล้วเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่บริเวณเร่ง ส่งผลให้เอนไซม์เสถียรภาพถาวร (เกิด dead-end complex) 2) Concentration-dependent เป็นการศึกษาผลของการยับยั้ง เมื่อเติม NADPH เพื่อทำปฏิกิริยาก่อนเติมสารตั้งต้น โดยเพิ่มความเข้มข้นของตัวยับยั้ง ถ้าตัวยับยั้งเป็นแบบ mechanism-base inhibitor จะพบว่าเมื่อความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้น ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์จะมีประสิทธิภาพมากขึ้น 3) Time-dependent ศึกษาผลของการยับยั้ง เมื่อเติม NADPH เพื่อทำปฏิกิริยาก่อนเติมสารตั้งต้นเมื่อเวลาผ่านไป เอนไซม์จะจับกับตัวยับยั้งได้ดียิ่งขึ้น ถ้าตัวยับยั้งเป็นแบบ mechanism-base inhibitor ส่งผลให้การยับยั้งเอนไซม์มีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้น (Hukkanen, Jacob and Benowitz, 2005, Di et al., 2009)

เนื่องจากการศึกษาการปฏิกิริยาของเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ในหลอดทดลองจำเป็นต้องมีเอนไซม์ CPR ที่จะทำหน้าที่ส่งอิเล็กตรอนเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาและสามารถทำการการศึกษาได้ ผู้วิจัยจึงแสดงออกเอนไซม์ rat CPR ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ C41 (DE3) และทำบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบจำเพาะที่มีนิเกิลเป็นลิแกนด์ (Ni^{2+}) โดยเอนไซม์ CPR จากหนู (rat CPR) เป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับเอนไซม์ CPR จากมนุษย์ (Iyanagi et al., 2012; Murataliev 2004) โดยเมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าเอนไซม์ rat CPR ที่ทำบริสุทธิ์ได้มีขนาดโมเลกุลประมาณ 79.63 kDa ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับขนาดโมเลกุลของ CPR ที่ได้จากการศึกษาโดย Shen ในปี ค.ศ.1989 ที่ประมาณ 78 kDa จากนั้นเมื่อทำการศึกษากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ rat CPR บริสุทธิ์ในการส่งผ่านอิเล็กตรอนไปให้กับ cytochrome c ในหลอดทดลองพบว่าค่า specific activity ของเอนไซม์ rat CPR ที่ได้คือ $47.13 \pm 4.80 \text{ umol/cytochrome c/min/mg protein}$ มีค่าใกล้เคียงกับการศึกษาเอนไซม์ rat CPR โดย Shen และคณะในปี 1989 ($51.50 \text{ U/mg protein}$) ที่ใช้ *E. coli* สายพันธุ์ C-1A

จากนั้นทำการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ของมนุษย์ โดเมนกระตุ้นการแสดงออกของยีน CYP2A6 จากพลาสมิด DNA ที่มียีน CYP2A6 ของมนุษย์ (pKK- Δ -23-2A6) ใน *E. coli* สายพันธุ์ XL-1blue ทำ

บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบจำเพาะโดยโปรตีนถูกชะออกมาที่ความเข้มข้นของ Imidazole เท่ากับ 20 mM และ 40 mM เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์โปรตีนจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่ามีขนาดโมเลกุลประมาณ 55 kDa ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับขนาดโมเลกุลของ CYP2A6 ที่รายงานในปี 2008 คือ 54.80 kDa (DeVore et al., 2008) และจากการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ในการเร่งปฏิกิริยา Coumarin 7-hydroxylase ในหลอดทดลองพบว่า Specific activity ของเอนไซม์ CYP2A6 มีค่าเท่ากับ 0.32 ± 0.0007 $\mu\text{mol}/7\text{-hydroxycoumarin} / \text{min}/\mu\text{g}$ protein ในขณะที่เอนไซม์ Cytochrome P450 2A13 (CYP2A13) เหนี่ยวนาการแสดงออก ในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ XL-1 blue และทำบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบจำเพาะที่มีนิเกิลเป็นลิแกนด์ ที่นิเกิลบนเม็ดเจลจะจำเพาะกับ 4xHis-tag ที่บริเวณตำแหน่งปลาย C-terminal ของโปรตีน (Smith et al., 2007) พบว่ามีขนาดมวลโมเลกุลประมาณ 55 kDa ซึ่งขนาดมวลโมเลกุลใกล้เคียงกับค่ามวลโมเลกุล 56.23 kDa (Smith et al., 2007) และไม่สามารถตรวจวัดการเพิ่มขึ้นของผลิตภัณฑ์ 7-hydroxycoumarin ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์หลักของการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ CYP2A13 ได้ จึงทำการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ CYP2A13 ในการเร่งปฏิกิริยาการลดลงของสารตั้งต้น coumarin เพราะทั้งนี้อาจเกิดจากอัตราเร็วในการเร่งปฏิกิริยา coumarin 7-hydroxylation ของ CYP2A13 มีค่าต่ำกว่าเอนไซม์ CYP2A6 ที่มีลำดับกรดอะมิโนใกล้เคียงกันถึง 92% และเอนไซม์ CYP2A13 สามารถเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายของตั้งต้น coumarin ได้มากกว่าหนึ่งผลิตภัณฑ์ (ภาพที่ 5-1) โดย coumarin 3,4 epoxide ที่เกิดขึ้นไม่เสถียรและเปลี่ยนรูปได้ง่าย จึงทำให้ตรวจสอบได้ยาก (Schlicht et al., 2009) ผู้วิจัยจึงทำการตรวจสอบการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารตั้งต้น coumarin เนื่องด้วยอัตราเร็วของปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์สามารถหาได้จากการเปลี่ยนแปลงของสารตั้งต้นที่ลดลงต่อหน่วยเวลา โดยเอนไซม์ CYP2A13 สามารถเร่งปฏิกิริยา coumarin oxidation เท่ากับ 0.10 ± 0.001 μmol coumarin-oxidized/min/mg protein



ภาพที่ 5-1 การเปลี่ยนแปลง coumarin โดยเอนไซม์ CYP2A13

(แหล่งที่มา: Schlicht et al, 2009)

จากการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ของสารสกัดจากขิง พบว่าสารสกัดขิงในส่วนสกัดชั้น ethyl acetate สามารถยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดีที่สุด และเป็นการยับยั้งแบบ mechanism-based เพราะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งที่ดีขึ้น (ตารางที่ 5-1; ค่า IC_{50} มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญ) และออกฤทธิ์ยับยั้งแบบ concentration dependent และ time dependent มากกว่าส่วนสกัดน้ำ แต่ส่วนสกัด butanol ไม่มีการลดลงของค่า IC_{50} และ ไม่ออกฤทธิ์ยับยั้งแบบ แสดงให้เห็นว่าส่วนสกัด butanol ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 โดยเป็นแบบผันกลับได้ (ภาพที่ 4-10) และการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ของสารสกัดจากมะเฟือง พบว่าสารสกัดมะเฟืองในส่วนสกัดชั้น ethyl acetate สามารถยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดีที่สุด และเป็นการยับยั้งแบบ mechanism-based เพราะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งที่ดีขึ้น (ตารางที่ 5.2) และออกฤทธิ์ยับยั้งแบบ concentration dependent และ time dependent มากกว่าส่วนสกัด butanol และน้ำ (ภาพที่ 4-14)

ตารางที่ 5-1 การเปรียบเทียบค่า IC_{50} ระหว่างปฏิกิริยา co-incubation และ pre-incubation ของเอนไซม์ CYP2A6 ในแต่ละส่วนสกัดของขิง

Sample	Co-incubation IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	Pre-incubation IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
EtOAc fraction	3.39 ± 0.11	1.80 ± 0.07
Butanol fraction	4.01 ± 0.08	3.91 ± 0.19
Water fraction	36.20 ± 0.14	29.01 ± 0.28

ตารางที่ 5-2 การเปรียบเทียบค่า IC_{50} ระหว่างปฏิกิริยา co-incubation และ pre-incubation ของเอนไซม์ CYP2A6 ในแต่ละส่วนสกัดของมะเฟือง

Sample	Co-incubation IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	Pre-incubation IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
EtOAc fraction	17.05 ± 0.07	8.82 ± 0.23
Butanol fraction	51.70 ± 0.07	15.37 ± 0.10
Water fraction	42.81 ± 0.06	18.06 ± 0.13

สำหรับการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ CYP2A13 ของสารสกัดจากขิง พบว่าสารสกัดขิงในส่วนสกัดชั้น ethyl acetate สามารถยับยั้งเอนไซม์ CYP2A13 ได้ดีที่สุด และเป็นการยับยั้งแบบ mechanism-based เพราะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งที่ดีขึ้น (ตารางที่ 5-3) และออกฤทธิ์ยับยั้งแบบ concentration dependent และ time dependent มากกว่าส่วนสกัดน้ำ แต่ส่วนสกัด butanol ไม่มีการลดลงของค่า IC_{50} และ ไม่ออกฤทธิ์ยับยั้งแบบ แสดงให้เห็นว่าส่วนสกัด butanol ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 โดยเป็นแบบผันกลับได้ (ภาพที่ 4-18) เช่นเดียวกับเอนไซม์ CYP2A6 และการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ CYP2A13 ของสารสกัดจากมะเฟือง พบว่าสารสกัดมะเฟืองในส่วนสกัดชั้น ethyl acetate สามารถยับยั้งเอนไซม์ CYP2A13 ได้ดีที่สุด และเป็นการยับยั้งแบบ mechanism-based เพราะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งที่ดีขึ้น (ตารางที่ 5.4)

และออกฤทธิ์ยับยั้งแบบ concentration dependent และ time dependent มากกว่าส่วนสกัด butanol และน้ำ (ภาพที่ 4-22)

ตารางที่ 5-3 การเปรียบเทียบค่า IC₅₀ ระหว่างปฏิกิริยา co-incubation และ pre-incubation ของเอนไซม์ CYP2A13 ในแต่ละส่วนสกัดของขิง

Sample	Co-incubation IC ₅₀ (µg/ml)	Pre-incubation IC ₅₀ (µg/ml)
EtOAc fraction	27.57± 0.16	11.81± 0.18
Butanol fraction	14.27± 0.20	19.29± 0.19
Water fraction	19.58± 0.22	14.08± 0.22

ตารางที่ 5-4 การเปรียบเทียบค่า IC₅₀ ระหว่างปฏิกิริยา co-incubation และ pre-incubation ของเอนไซม์ CYP2A13 ในแต่ละส่วนสกัดของมะเฟือง

Sample	Co-incubation IC ₅₀ (µg/ml)	Pre-incubation IC ₅₀ (µg/ml)
EtOAc fraction	73.95± 0.07	20.44± 0.16
Butanol fraction	66.00± 0.13	21.68± 0.17
Water fraction	41.83± 0.07	26.84± 0.21

จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากน้ำขิงและน้ำมะเฟืองในส่วนสกัด Ethyl acetate ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ที่เป็นสารตั้งต้นมาตรฐานในหลอดทดลองได้ ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะเป็นสารในกลุ่ม furanocoumarin และ flavonoid (เช่น gallic acid, catechin, (-)-epicatechin, proanthocyanin และอื่นๆ) ที่มีรายงานว่าพบในมะเฟืองในปริมาณสูงเพราะสารในกลุ่ม furanocoumarin และ flavonoid นี้ (เช่น 8-MOP) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ P450 ในคนได้ดี (Guo *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2006; Merkel, Sigusch and Hoffmann, 1994; Tassaneeyakul *et al.*, 2000) แต่ในน้ำขิงนั้นไม่พบรายงานว่ามีการประกอบในกลุ่ม furanocoumarin และ flavonoid ในปริมาณมากเช่นเดียวกับมะเฟือง แต่จะพบสารประกอบในกลุ่ม อัลคาลอยด์ ที่เป็นสารตั้งต้นกับสารนิโคตินของ บุหรี่ในยาสูบปริมาณมาก (ทรงกลด สารภูษิต และ พรพิมล รงคันพรัตน์, 2554) อย่างไรก็ตามยังจำเป็นต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงความจำเพาะในการยับยั้งโดยทำการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนของ เอนไซม์ CPR ของสารสกัดจากน้ำขิงและน้ำมะเฟือง ทั้งนี้เพราะเอนไซม์ CPR ทำหน้าที่ส่งผ่านอิเล็กตรอนจาก NADPH ไปยังกลุ่มเอนไซม์ไซโตโครมพี 450 (P450s) ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายสารประกอบต่างๆที่สำคัญในสิ่งมีชีวิตทั้งที่เกิดขึ้นในร่างกายหรือได้รับจากภายนอก เช่น กรดไขมัน พรอสตาแกลนดิน ยารักษาโรค สารเคมี และสารพิษต่างๆ รวมไปถึงสามารถเร่งปฏิกิริยารีดักชัน (Reduction) ของสารเคมีต่างๆ เช่น ยาต้านมะเร็งต่างๆ ยาปฏิชีวนะ และสารประกอบวงแหวนไนโตร เช่น เบสเพียวรีน ไพริมิดีน เป็นต้น (Iyanagi *et al.*, 2012; Murataliev 2004) เมื่อเอนไซม์ CPR ถูกกระตุ้นหรือถูกยับยั้งการทำงานอาจก่อให้เกิดปัญหาต่างๆ ทางด้านสุขภาพอันเนื่องมาจากการทำงานที่ผิดปกติของเอนไซม์กลุ่มไซโตโครมพี 450 อื่นๆได้ (Kim *et al.*,

2006; Liu et al, 2002) โดยที่ความเข้มข้น 10 %v/v ของน้ำขิงและน้ำมะเฟืองไม่ส่งผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ rat CPR แต่เมื่อทำการศึกษาต่อเนื่องโดย Bio-assay guide isolation สารสำคัญในน้ำขิงและน้ำมะเฟืองกลับพบว่า สารสำคัญในส่วนสกัด Ethyl acetate ของทั้งขิงและมะเฟืองออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ rat CPR ในการรับอิเล็กตรอนจาก NADPH แบบ non-competitive inhibition ด้วยค่า K_i เท่ากับ 180.50 $\mu\text{g/ml}$ และออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ rat CPR ในการส่งอิเล็กตรอนให้ cytochrome c แบบ non-competitive inhibition เช่นเดียวกัน (ภาพที่ 4-25 ถึง 4-28) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการนำเอาส่วนสกัด Ethyl acetate ของขิงและมะเฟืองที่ความเข้มข้นที่มากไปใช้ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 อาจส่งผลกระทบต่อเอนไซม์ CYPs อื่นๆ ผ่านทางการทำงานของเอนไซม์ CPR ได้ ซึ่งต้องระมัดระวังในการนำไปใช้ต่อไป

5.2 สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการแสดงออก(expression), การทำบริสุทธิ์ (purification) และศึกษาสารสกัดจากน้ำขิงและน้ำมะเฟืองเมื่อแยกสารสกัดแบบลำดับส่วน เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ที่ย่อยสลายสารนิโคตินในร่างกายมนุษย์ และเอนไซม์ CYP2A13 ที่กระตุ้นสารก่อมะเร็ง NNK ในบุหรี่ย่ร่วมกับเอนไซม์ rat CPR พบว่าส่วนสารสกัด ethyl acetate และส่วนสกัดน้ำ สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 และเอนไซม์ CYP2A13 ได้โดยกลไกการยับยั้งแบบ mechanism-based (การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แบบผันกลับไม่ได้) เช่นเดียวกันกับในส่วนสกัด butanol ของสารสกัดขิง ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 แต่เป็นการยับยั้งแบบผันกลับได้ สำหรับในสารสกัดมะเฟืองพบว่าออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 และเอนไซม์ CYP2A13 โดยเมื่อแยกสารสกัดแบบลำดับส่วนพบว่าส่วนสกัดทั้ง 3 ส่วน ได้แก่ ส่วนสกัด ethyl acetate, butanol และส่วนสกัดน้ำ ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 และเอนไซม์ CYP2A13 แบบ mechanism-based (การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แบบผันกลับไม่ได้) อย่างไรก็ตามต้องระวังการนำไปใช้ในส่วนสกัด ethyl acetate เนื่องจากได้มีการตรวจสอบพบว่า หากใช้ในปริมาณมาก จะส่งผลยับยั้งเอนไซม์ CPR ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในการส่งอิเล็กตรอนให้กับเอนไซม์ในกลุ่ม cytochrome P450 ซึ่งจะส่งผลให้ส่งผลกระทบต่อเอนไซม์ cytochrome P450 ในกลุ่มอื่นๆและอาจส่งผลกระทบต่อร่างกายได้ อย่างไรก็ตามยังต้องศึกษาเพิ่มเติมถึงสารสำคัญในพืชกลุ่มนี้ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ความจำเพาะและกลไกในการยับยั้ง (Foeler et al, 2008; Grime 2009; Xi et al., 2009; Zhou et al., 2005) เพื่อความปลอดภัยในการนำมาใช้ประโยชน์ได้จริงต่อไป

บทที่ 6

เอกสารอ้างอิง

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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.

DeVore NM, Smith BD, Wang JL, Lushington GH and Scott EE (2008) Key residues controlling binding of diverse ligands to human cytochrome P450 2A enzymes. *Drug Metab Disp* 36:2582-2590

Donato MT, Jiménez N, Castell JV, Gómez-Lechón J. (2004) Fluorescence-based assay for screening nine cytochrome P450 (P450) activities in intact cells expressing individual human P450 enzymes. *Drug Metab Disp* 32: 699-706

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

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

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

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

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

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

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

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

Guo LQ, Fukuda K, Ohta T, Yamazoe Y. (2000) Role of furanocoumarin derivatives on grapefruit juice-mediated inhibition of human CYP3A activity. *Drug Metab Dispos*, 28(7):766-771.

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

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

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

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

1194–1210.

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

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

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

Iyanagi T, Xia C, Kim JJ. (2012) NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase: prototypic member of the diflavin reductase family. *Archive in Biochemistry and Biophysic*. 258(1): 72-89

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

Jorenby DE, Hays JT, Rigotti NA, Azoulay S, Watsky EJ, Williams K (2006) Efficacy of varenicline, an $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor partial agonist, vs placebo or sustained-release bupropion for smoking cessation: a randomized controlled trial. *JAMA* 296: 56–63.

Kim H, Yoon YJ, Shon JH, Cha IJ, Shin JG, Liu KH. (2006) Inhibitory effects of fruit juices on cyp3a activity. *Drug Metab Dispos*. 34(4):521-523.

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

Liu M, Li XQ, Weber C, Lee CY, Brown J, Liu RH (2002) Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. *J Agric Food Chem* 50:2926-2930.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Prasopthum, A., Saraputit, 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*. Ozaka, Japan.

Pouyfung, P., Saraputit, 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*. Ozaka, Japan.

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

Schlicht KE, Zinggeler-Berg J, and Murphy SE (2009) Effect of CYP2A13 Active Site Mutation Asn297Ala on Metabolism of Coumarin and Tobacco-specific Nitrosamines. *Drug Metab Dispos.* 37:665-671. Sellers EM, Kaplan HL, and Tyndale RF (2000) Inhibition of

cytochrome P450 2A6 increases nicotine's oral bioavailability and decreases smoking. *Clin Pharmacol Ther* 68:35–43.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Wang M, Roberts DL, Paschke R, Shea TM, Masters BSS, Kim JJ. (1997). Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: Prototype for FMN- and FAD-containing enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94: 8411-8416.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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