



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชในวงศ์ Asteraceae และ Acanthaceae ในการยับยั้ง  
เอนไซม์ CYP2A6 ที่ย่อยสลายนิโคตินในคน  
Inhibition of the human cytochrome P450, CYP2A6, the nicotine metabolizing  
enzyme by Asteraceae and Acanthaceae plant extracts

โดย

ผศ.ดร.ทรงกลด สารภูษิต

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

รศ.ดร. พรพิมล รงคินพรัตน์

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ผศ. ดร. เอกรัฐ ศรีสุข

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

อ. ดร. ปณิดา ดวงแก้ว

คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๗

มหาวิทยาลัยบูรพา

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่อง “การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชในวงศ์ Asteraceae และ Acanthaceae ในการยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ที่ย่อยสลายนิโคตินในคน” สามารถมีผลการทดลองที่ก้าวหน้ามาจนได้เสร็จสมบูรณ์เป็นรายงานฉบับนี้ 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 CPR และ CYP2A6 ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ นอกจากนี้แล้วผู้วิจัยขอขอบคุณนิสิต-นักศึกษาทุกคนที่ช่วยทำการทดลอง รวมถึงคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาและคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดลที่ให้ความสนับสนุนด้านสถานที่และเครื่องมือต่างๆในการทำการทดลอง

คณะผู้วิจัย

## บทคัดย่อ

**ชื่อโครงการ** การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชในวงศ์ Asteraceae และ Acanthaceae ในการยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ที่ย่อยสลายนิโคตินในคน

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

ในปัจจุบันโรคระบบทางเดินหายใจอันเนื่องมาจากการสูบบุหรี่ นับเป็นปัญหาที่ส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจของประเทศ โดยในบุหรี่ยังมีสารนิโคตินที่ออกฤทธิ์ให้เกิดการเสพติดและสารก่อมะเร็ง 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) ซึ่งสารทั้งสองถูกเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ CYP2A6 ที่ตับและเอนไซม์ CYP2A13 ที่ปอดและก่อให้เกิดการเสพติดการสูบบุหรี่และโรคมะเร็งปอดขึ้น ดังนั้น การลดการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 น่าจะช่วยรักษาอาการเสพติดบุหรี่และช่วยลดโอกาสเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งปอดได้ โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำบริสุทธิ์และศึกษาฤทธิ์ของสารสำคัญพืชในวงศ์ Asteraceae ได้แก่กลุ่มดอกคำฝอยและหญ้าดอกขาว และในวงศ์ Acanthaceae ได้แก่ทองพันชั่งที่เคยมีรายงานว่าออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดีในหลอดทดลอง ผลการศึกษาในเบื้องต้นของพืชในวงศ์ Asteraceae พบว่าส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทของขลุ่ยและหญ้าดอกขาวออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดีที่สุด สำหรับส่วนสกัดดอกคำฝอยเฮกเซนและเอทิลอะซิเตทออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดี โดยส่วนสกัดย่อยเฮกเซนที่ 4 5 และ 7 ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดีมาก และยังต้องทำบริสุทธิ์ส่วนสกัดสมุนไพรเหล่านี้เพิ่มเติมเพื่อค้นหาสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ต่อไป ในขณะที่ผลการศึกษาในสมุนไพรทองพันชั่งในวงศ์ Acanthaceae พบว่าทั้งส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ได้ดี โดยสารสำคัญจากทองพันชั่งที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ได้แก่ Rhinacanthin-A, -B, และ -C ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ได้ดี ด้วยกลไกการยับยั้งแบบผันกลับไม่ได้ที่ขึ้นอยู่กับสารให้อิเล็กตรอน NADPH เวลาที่ใช้ในการบ่มสารยับยั้งและความเข้มข้นของสารยับยั้ง (Mechanism based inhibition) โดย Rhinacanthin-B ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A13 และ CYP2A6 ได้ดีที่สุด ด้วยค่า KI 0.16  $\mu$ M และ 0.44  $\mu$ M ตามลำดับ

## Abstract

**Project Title** Inhibition of the human cytochrome P450, CYP2A6, the nicotine metabolizing enzyme by Asteraceae and Acanthaceae plant extracts

### Investigators

Songklod Sarapusit, Ph.D, Department of Biochemistry, Faculty of Science, Burapha University

Pornpimol Rongnoparut, Ph.D, Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University

Ekaruth Srisook, Ph.D, Department of Chemistry, Faculty of Science, Burapha University

Panida Duangkaew, Ph.D, Silpakorn University Phetchaburi IT campus

Nowadays, various tobacco-related respiratory diseases are important economic problems in Thailand. Nicotine, an addictive component in cigarettes as well as the tobacco-specific carcinogen 4-(methyl-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) have been shown to metabolize by the liver specific cytochrome P450A6 enzyme and lung-specific CYP2A13 enzyme and associate with smoking craving and adenocarcinoma lung cancer risk in smokers, respectively. Thus, inhibition of these two enzymes by specific inhibitor could be an aid in smoking cessation and lung cancer prevention. This study aims to characterize the active constituents and their inhibitory activities in medicinal plants from family Asteraceae (*Phuchea indica*, *Carthamus tinctorius*, *Vernonia cinerea*) and Acanthaceae (*Rhinacanthus nasutus*) that previously reported to inhibit CYP2A6 and CYP2A13 enzymes *in vitro*. The results, in family Asteraceae, indicated that the Ethyl acetate fraction of *P.indica* and *V. cinerea* could potentially inhibit CYP2A6 enzyme. The Hexane and Ethyl acetate fraction of *C. tinctorius* could equally inhibit CYP2A6 enzyme in which the Hexane sub-fraction 4, 5, and 7 of *C. tinctorius* were potentially inhibited CYP2A6 enzyme. Further investigation on active constituents from these plants are under investigation. Interestingly, both Hexane and Ethyl acetate fraction of *R. nasutus* could potentially inhibit CYP2A6 and CYP2A13 enzymes. The purified active compounds, Rhinacanthin-A, -B, and -C were successfully isolated and characterized as an NADPH-, time-, and concentration dependent inhibition as an indicator of a suicide inhibition or mechanism based inhibition (MBI) mode in which the Rhinacanthin-B was the best inhibitor against CYP2A13 and CYP2A6 enzymes with  $K_I$  values of 0.16  $\mu\text{M}$  and 0.44  $\mu\text{M}$ , respectively.

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคระบบทางเดินหายใจอันเนื่องจากการสูบบุหรี่เช่น โรคมะเร็งปอดและโรคถุงลมปอดโป่งพอง จัดเป็นภัยเงียบที่เป็นหนึ่งในปัญหาสำคัญของประเทศไทย จากการประมาณการพบว่าคนไทยทั้งผู้สูบบุหรี่และคนใกล้ชิดผู้สูบบุหรี่เสียชีวิตจากโรคที่เกี่ยวข้องกับการสูบบุหรี่ปีละประมาณ 42,000 คนหรือวันละ 115 คน โดยในปี พ.ศ. 2549 มีผู้ป่วยที่สูบบุหรี่ได้รับวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งปอดประมาณ 5,299 ราย โรคหัวใจ 52,605 ราย และโรคถุงลมโป่งพอง 624,309 ราย (Bundhamcharoen,2012) จากผลการสำรวจในปี พ.ศ. 2554 พบว่ามีคนไทยสูบบุหรี่มากกว่า 10.90 ล้านคนหรือมากกว่า 21 % ของประชากรทั้งประเทศเป็นผู้สูบบุหรี่ โดยผู้สูบบุหรี่ส่วนใหญ่อยู่ในวัยทำงานและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ที่สำคัญที่สุดผู้สูบบุหรี่เหล่านี้มากกว่า 6.4 ล้านคน ที่สูบบุหรี่ขณะอยู่ในที่ทำงาน หรือบ้านที่มีบุคคลในครอบครัวอาศัยอยู่เป็นประจำ (passive smoker) ทำให้ประชากรในวัยทำงานมากกว่า 3.3 ล้านคนได้รับควันบุหรี่ในที่ทำงานและมากกว่า 21 ล้านคนได้รับควันบุหรี่ในบ้าน (ศิริวรรณ และคณะ 2555) เนื่องด้วยการสูบบุหรี่ส่งผลกระทบต่อทั้งสุขภาพของประชากร การพัฒนาทรัพยากรมนุษย์และด้านเศรษฐกิจของประเทศ ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อช่วยในการลด ละ เลิกการสูบบุหรี่ เพื่อไม่ให้ผู้สูบบุหรี่และบุคคลใกล้ชิดได้รับสารพิษและสารก่อมะเร็งจากบุหรี่ เพื่อเพิ่มคุณภาพชีวิตของประชาชนทั้งในระยะสั้นและระยะยาว

นิโคติน (Nicotine) เป็นสารที่เป็นส่วนประกอบหลักของบุหรี่ ออกฤทธิ์ที่ระบบประสาทส่วนกลางมีผลทำให้ผู้สูบบุหรี่มีพฤติกรรมติดการสูบบุหรี่ (เสพติดบุหรี่) ร่างกายจึงได้รับสารพิษต่างๆมากกว่าพันชนิดจากบุหรี่ ส่งผลให้เกิดโรคเกี่ยวกับทางเดินหายใจต่างๆ โดยเมื่อเข้าสู่ร่างกายนิโคตินส่วนใหญ่จะถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ CYP2A6 ในตับได้เป็นสารประกอบโคทีนิน (Cotinine) ที่จะถูกย่อยสลายต่อไปก่อนถูกกำจัดออกจากร่างกายทางปัสสาวะ อย่างไรก็ตามการย่อยสลายนิโคตินโดยเอนไซม์ CYP2A6 สามารถเกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียงได้เป็นสารก่อมะเร็ง nitrosamine ขึ้นมาส่งผลให้เกิดโรคมะเร็งได้เช่นสารประกอบ 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) ในบุหรี่ที่สามารถกระตุ้นสารก่อมะเร็งปอดได้ จากการศึกษาพบว่าในคนที่มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ลดลง จะย่อยสลายนิโคตินน้อยลง ลดปริมาณการสูบบุหรี่และสามารถหยุดสูบบุหรี่ได้ง่ายขึ้น ดังนั้นการลดการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ด้วยตัวยับยั้งจำเพาะน่าจะส่งผลให้มีการย่อยสลายนิโคตินน้อยลง รักษาระดับนิโคตินในกระแสเลือดไว้ให้คงอยู่ในกระแสเลือดนานขึ้นและส่งผลให้สูบบุหรี่ลดลง ซึ่งเป็นการลดโอกาสที่ร่างกายจะได้สัมผัสกับสารประกอบเป็นพิษต่างๆในบุหรี่และลดผลร้ายต่างๆที่จะเกิดขึ้นกับร่างกายในตัวผู้สูบบุหรี่และบุคคลใกล้ชิดได้ นอกจากนี้เมื่อสูบบุหรี่หรือได้รับควันบุหรี่ ร่างกายจะได้รับสารพิษต่างๆโดยเฉพาะอย่างยิ่งสารประกอบในกลุ่มไนโตรซามีน 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) ดังนั้นการลดการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ด้วยตัวยับยั้งจำเพาะ จะส่งผลให้ลดการกระตุ้นสารก่อ

มะเร็งจาก NNK และลดการย่อยสลายนิโคตินในร่างกาย ซึ่งเป็นการลดโอกาสที่ร่างกายจะสร้างสารก่อมะเร็งที่รุนแรงและลดการสูบบุหรี่ไปด้วยพร้อมกัน จึงลดผลร้ายต่างๆที่จะเกิดขึ้นกับร่างกาย ทั้งในตัวผู้สูบบุหรี่และผู้ใกล้ชิดได้

เนื่องด้วยผลการทดลองเบื้องต้นของกลุ่มผู้วิจัยพบว่าน้ำชาสมุนไพรและน้ำผลไม้หลายชนิด สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ในหลอดทดลองได้ โดยเฉพาะน้ำชาสมุนไพรและน้ำผลไม้หลายชนิด ในวงศ์ Asteraceae และ Acanthaceae ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งได้อย่างมีประสิทธิภาพที่ดี เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำชาสมุนไพรและน้ำผลไม้อื่นๆที่ความเข้มข้นเดียวกัน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของพืชสมุนไพรในวงศ์ Asteraceae และ Acanthaceae ต่อเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 จากนั้นทำการสกัดสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 จากนั้นศึกษากลไกในการยับยั้งการทำงานของสารสกัดเพื่อช่วยลดการสูบบุหรี่และลดโอกาสในการเกิดโรคมะเร็งปอดในอนาคต (ทรงกลด สารภูษิตและพรพิมล รงค์นพรัตน์, 2554)

### 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

ศึกษาฤทธิ์และกลไกของสารสกัดจากพืชในวงศ์ Asteraceae และ Acanthaceae ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ในหลอดทดลอง

### 1.3 สมมุติฐานทางการศึกษา

สารสกัดจากพืชในวงศ์ Asteraceae และ Acanthaceae สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ได้

### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

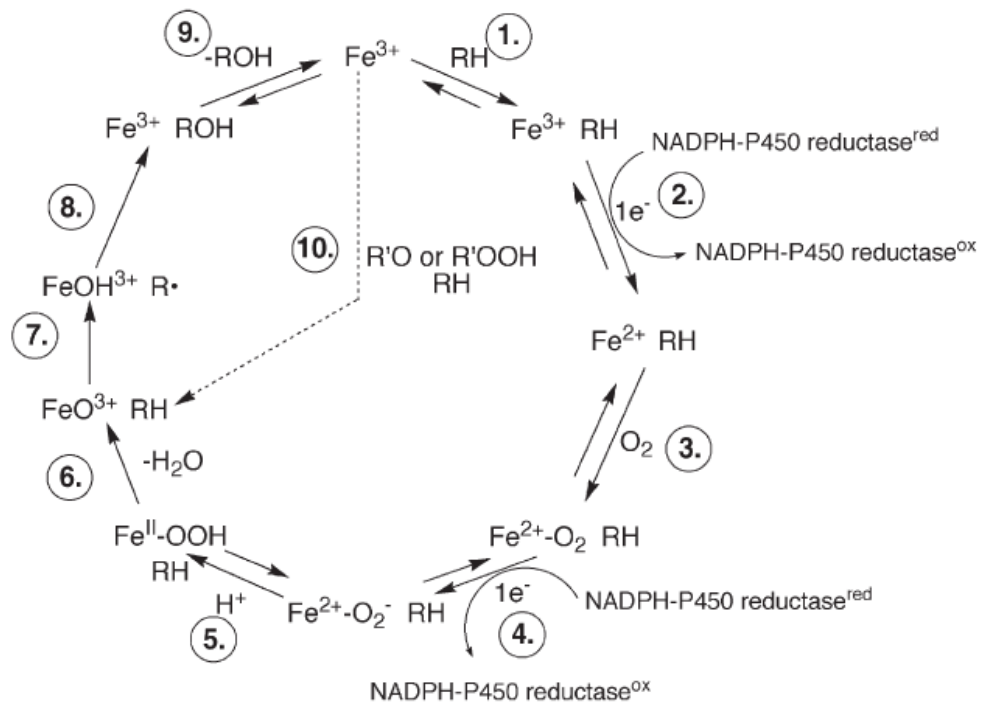
ทำให้ทราบฤทธิ์และกลไกในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ของสารสกัดจากพืชในวงศ์ Asteraceae และ Acanthaceae ที่น่าจะสามารถนำมาใช้เพื่อช่วยลดอัตราการสูบบุหรี่ได้

## บทที่ 2

### ทบทวนวรรณกรรม

#### 2.1 ทฤษฎีพื้นฐานที่เกี่ยวข้อง

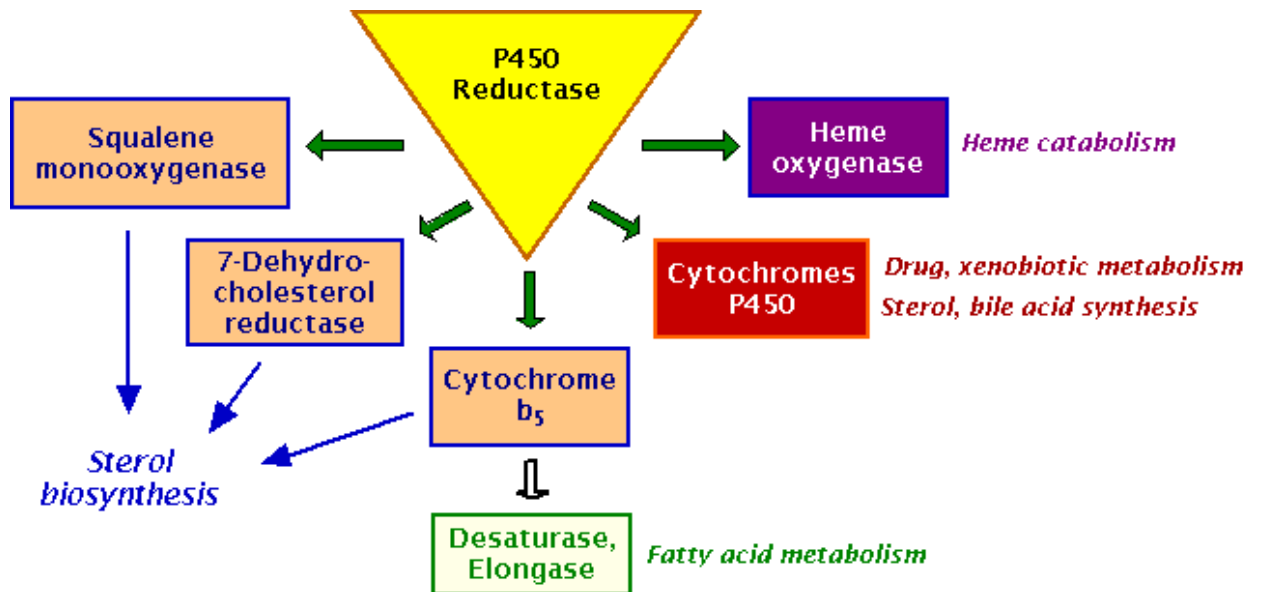
เอนไซม์ Cytochrome P450 (CYPs หรือ P450s) เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึมของสารเคมีทั้งสารที่มีอยู่ในร่างกายเช่น ฮอร์โมนและกรดไขมันต่างๆ และสารที่ร่างกายได้รับจากภายนอกเช่น ยาและสิ่งปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมต่างๆ เนื่องจากเอนไซม์ P450s พบเป็นจำนวนมากในร่างกายและในสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิด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



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

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

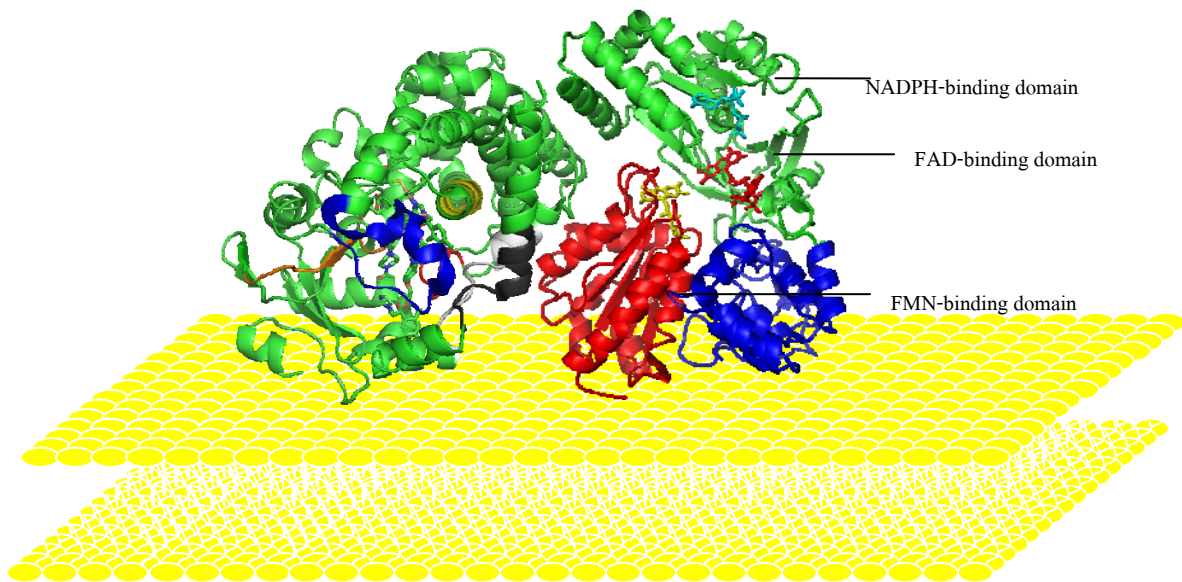
(Fe<sup>3+</sup> เป็น Fe<sup>2+</sup>) ที่เป็นส่วนประกอบหนึ่งของเอนไซม์ P450s เพื่อให้เอนไซม์ P450s สามารถจับกับออกซิเจนได้ ส่วนตัวอิเล็กตรอนตัวที่สองจะกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในโมเลกุลของออกซิเจนให้เกิดเป็นสารประกอบไฮดรอกซิล (iron-hydroxy complex) และเร่งการเกิดปฏิกิริยาต่อไปโดยเอนไซม์ทั้งสองจะทำงานร่วมกันใน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



ภาพที่ 2-2 ตัวรับอิเล็กตรอนของเอนไซม์ NADPH-cytochrome P450 reductase ที่มีหน้าที่การทำงานต่างๆ ที่มา [www.uky.edu/Pharmacy/ps/porter/CPR.htm](http://www.uky.edu/Pharmacy/ps/porter/CPR.htm)

เอนไซม์ CPR เป็นเอนไซม์ที่มีส่วนจับกับเยื่อหุ้มเมมเบรนและประกอบด้วยโมเลกุลของ FAD และ FMN ทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ช่วยในการขนส่งอิเล็กตรอน โดยอิเล็กตรอนจะถูกขนส่งจาก NADPH ผ่านโมเลกุลของ FAD และ FMN ไปยังตัวรับอิเล็กตรอนดังที่กล่าวในเบื้องต้น 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<sub>2</sub>-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

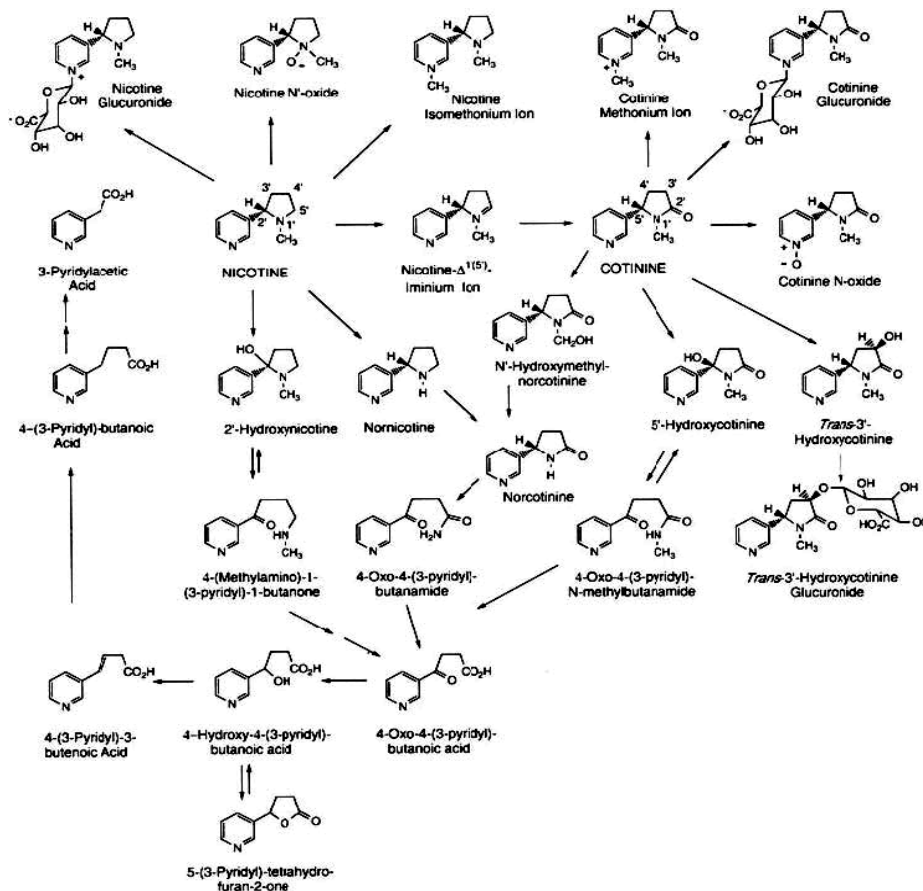
## 2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคในระบบทางเดินหายใจจากการสูบบุหรี่ โดยเฉพาะโรคมะเร็งปอดและโรคถุงลมปอดโป่งพอง จัดเป็นปัญหาสำคัญในหลายประเทศทั่วโลก รวมถึงประเทศไทย จากการคาดการณ์ขององค์การอนามัยโลก (WHO) คาดว่าในปี พ.ศ. 2573 จะมีผู้เสียชีวิตด้วยโรครดังกล่าวถึง 8 ล้านคน (WHO, 2008) สำหรับประเทศไทย ในปี 2549 มีการประมาณการว่าโรกระบบทางเดินหายใจจากการติดบุหรี่ทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจถึง 9.86 ล้านบาท (Bundhamcharoen, 2012) ล่าสุดจากผลการสำรวจในปี พ.ศ. 2554 พบว่ามีคนไทยสูบบุหรี่มากกว่า 11 ล้านคนหรือมากกว่า 21 % ของประชากรทั้งประเทศ โดยผู้สูบบุหรี่ส่วนใหญ่อยู่ในวัยทำงาน โดยที่อัตราการสูบบุหรี่เพิ่มขึ้นในกลุ่มเยาวชน กลุ่มผู้ไม่เคยเรียนหนังสือและผู้อาศัยอยู่นอกเขตเทศบาล รวมถึงผู้มีฐานะในระดับปานกลางทั่วไป โดยที่อัตราดังกล่าวยังคงเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องอันเนื่องมาจากการรुकศึบของธุรกิจยาสูบผ่านทางสื่อโฆษณา การปรับปรุงรูปลักษณ์ภายนอกของหีบห่อบรรจุและการปรับราคาให้ถูกลง รวมถึงการสูบบุหรี่ในรูปแบบอื่นๆ เช่น ยาเส้นที่มีราคาถูกในกลุ่มผู้มีรายได้น้อย และบาราгуในหมู่วัยรุ่นและวัยทำงาน โดยเฉพาะในวัยรุ่นผู้หญิง จากการศึกษาพบว่า มีเพียง 1.77 ล้านคนเท่านั้นที่เคยและพยายามเลิกบุหรี่แต่ไม่สำเร็จโดยมีค่าเฉลี่ยของการเลิกบุหรี่ได้ก่อนกลับมาสูบซ้ำคือ 11.44 เดือน โดยสาเหตุเกิดจากการหงุดหงิด/ ฉุนเฉียว/ โกรธง่าย ถึงร้อยละ 38.61 และเพราะความเครียดร้อยละ 27.42 และพบว่าถึงแม้เลิกบุหรี่ไปแล้วถึง 20 ปีก็สามารถกลับมาสูบบุหรี่ได้อีก แสดงให้เห็นว่าการเสพติดบุหรี่เพียงหนึ่งครั้งส่งผลให้ต้องเสพติดบุหรี่และสามารถเลิกการเสพติดได้ยาก (ศิริวรรณ และคณะ 2555)

จากการศึกษาพบว่าบุหรี่ปะกอบไปด้วยสารประกอบต่างๆมากกว่า 4,000 ชนิด โดยที่มากกว่า 40 ชนิดเป็นสารพิษและสารก่อมะเร็งเมื่อเกิดการเผาไหม้ขึ้นและได้รับการสูดเข้าไปในปอด ดังนั้นโรคทางเดินหายใจเช่น โรคมะเร็งปอดและโรคถุงลมปอดโป่งพอง จึงเป็นโรคที่พบมากในกลุ่มผู้สูบบุหรี่และผู้ใกล้ชิด นอกจากนี้กลุ่มผู้สูบบุหรี่ยังเป็นกลุ่มเสี่ยงที่จะมีอาการของโรคหัวใจขาดเลือด โรคหัวใจวาย และโรคที่เกี่ยวข้องต่างๆ (WHO, 2008) อุบัติการณ์การเกิดโรคต่างๆเหล่านี้เกิดขึ้นเนื่องจากนิโคตินที่เป็นสารประกอบหลักในบุหรี่ ที่มีผลทำให้หัวใจเต้นเร็วขึ้นและเพิ่มความดันโลหิตขึ้น (Benowitz, 2008) นอกจากนี้นิโคตินยังเป็นสารประกอบสำคัญที่มีผลให้เสพติดการสูบบุหรี่โดยไปออกฤทธิ์กระตุ้นระบบการตอบสนองต่อความยินดี ผ่านการจับกับ

ตัวรับนิโคตินที่บริเวณปลายประสาทของสมองส่วน VTA ทำให้เกิดการหลั่งสารสื่อประสาทโดปามีนออกมามากขึ้น มีผลทำให้ผู้สูบบุหรี่มีความรู้สึกสุขสบายใจและลดความเครียดต่างๆ ผู้สูบบุหรี่จึงสูบบุหรี่เพื่อคงระดับนิโคตินในกระแสเลือดและในสมองให้เกิดความรู้สึกมีความสุขต่อไป ส่งผลให้ผู้สูบบุหรี่และบุคคลใกล้เคียงได้รับสารพิษต่างๆ ในบุหรี่ไปด้วย (Hukkanen et al, 2005)

โดยประมาณ 80-90% ของนิโคตินที่เข้าสู่ร่างกายผ่านทาง การดูดซึมที่เนื้อเยื่อคัตหลังที่ปาก ระบบทางเดินหายใจและระบบทางเดินอาหาร จะถูกย่อยสลายโดยกลไกหลักด้วยเอนไซม์ CYP2A6 ในตับเกิดเป็นสารประกอบ nicotine  $\Delta^{1(5)}$ -iminium ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็นโคทินินโดยเอนไซม์ aldehyde oxidase (Hukkanen et al, 2005) หลังจากนั้นโคทินินที่เกิดขึ้นจะเกิดปฏิกิริยา hydroxylation ได้เป็นสารประกอบต่างๆ เช่น *trans*-3'-hydroxycotinine, 5'-hydroxycotinine และ nornicotine (ภาพที่ 2-4) ซึ่งสุดท้ายทั้งโคทินินและสารประกอบที่ได้จากโคทินินต่างๆ จะถูกเติมหมู่ น้ำตาล (glucuronation) และขับออกทางปัสสาวะ (Benowitz, 2008; Flammang et al, 1992)

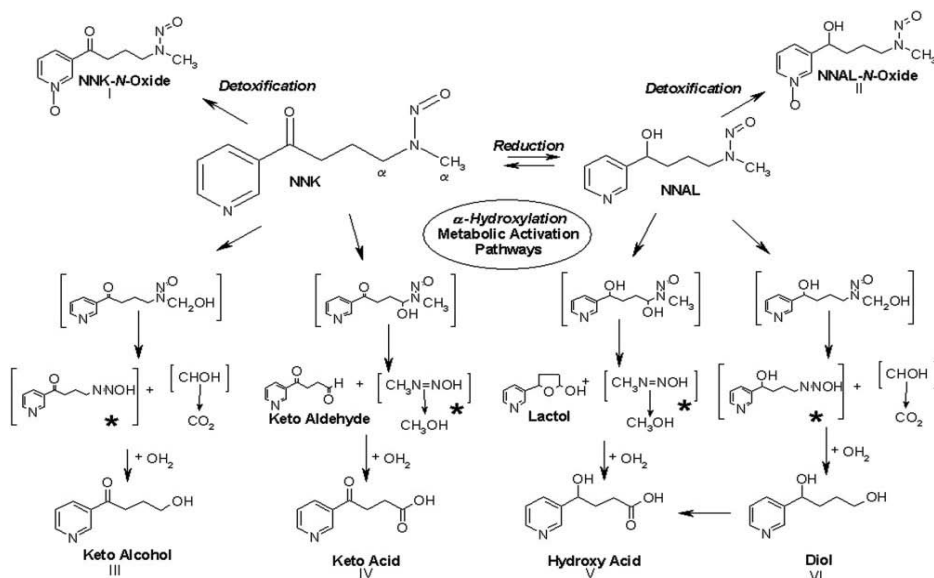


ภาพที่ 2-4 กลไกในการกำจัดนิโคติน (Hukkanen et al, 2005)

ในคนพบว่ามีเอนไซม์ P450 ถึง 18 กลุ่มและ 43 กลุ่มย่อย (<http://dmelsson.utmen.edu/CytochromeP450.html>) โดยเอนไซม์ CYP2A6 ในตับที่สามารถย่อยสลายนิโคตินได้ดีด้วยค่าความสามารถในการจับกับสารตั้งต้น ( $K_m$ ) ต่อนิโคตินที่ต่ำและอัตราการเร่งปฏิกิริยา ( $V_{max}$ ) ที่สูง (Patten et al, 1996) CYP2A13 ที่พบในระบบทางเดินหายใจ CYP2B6 ที่พบในสมอง ลำไส้เล็กและไต CYP2D6 ที่พบในสมองและ CYP2E1 ที่พบในปอดและสมอง ถูกรายงานว่าสามารถย่อยสลายนิโคตินในคน (Hukkanen et al, 2002; Miksys et al, 2002; Su et al, 2000) อย่างไรก็ตามบทบาทของเอนไซม์ CYP2A13 ในระบบทางเดินหายใจต่อการย่อยสลายนิโคตินยังไม่ชัดเจน เพราะในผู้เสพยาหรี่ที่มีการทำงานของ CYP2A13 น้อย ยังคงมีโอกาสเกิด

มะเร็งในระบบทางเดินหายใจสูง (Jiang et al, 2004) สำหรับเอนไซม์ CYP2B6 และ CYP2D6 ไม่ได้เป็นเอนไซม์หลักในการย่อยสลายนิโคติน เพราะคนที่มีการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองน้อย (poor metabolizer, PM) และตีมาก (extensive metabolizer, EM) มีอัตราการสลายนิโคตินและโคตินีนไม่ต่างกัน (Benowitz et al, 1996) ในขณะที่เอนไซม์ CYP2E1 เกี่ยวข้องกับการได้รับแอลกอฮอล์มากกว่านิโคติน แสดงให้เห็นว่า การย่อยสลายของนิโคตินที่ตีโดยเอนไซม์ CYP2A6 เป็นกระบวนการหลักของร่างกายในการกำจัดนิโคตินและการกระตุ้นการสูบบุหรี่ ซึ่งส่งผลเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็งต่างๆในระบบทางเดินหายใจในผู้สูบบุหรี่

ในขณะที่เมื่อ NNK เข้าสู่ร่างกายจะถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ CYP2A13 ที่แสดงออกในปริมาณมากที่สุด และที่เซลล์เยื่อบุทางเดินหายใจได้เป็นสารประกอบ NNK-N-oxide และ NNAL ซึ่งจะถูกรีดออกซิไดส์อีกครั้งด้วย CYP2A13 เกิดเป็นสารประกอบ NNAL-N-Oxide (ภาพที่ 2-5) หรือถูกเติมหมู่น้ำตาลกลายเป็น NNAL-glucuronide จากนั้นสารประกอบทั้งหมดจะถูกกำจัดออกจากร่างกายทางปัสสาวะ อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ CYP2A13 สามารถเร่งปฏิกิริยา hydroxylation ที่หมู่  $\alpha$ -methyl carbon หรือ  $\alpha$ -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<sup>6</sup>-MeG และ N<sup>7</sup>-MeG) ซึ่งสันนิษฐานว่าเป็นกลไกที่สำคัญของสารประกอบ NNK ในบุหรี่ ในการทำให้เกิดมะเร็ง (carcinogenesis) โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคมะเร็งต่างๆในระบบทางเดินหายใจ เช่นโรคมะเร็งปอด ชนิด adenocarcinoma และ squamous cell carcinoma ที่เป็นมะเร็งปอดที่มีความสามารถในการแพร่กระจายสูง (malignant pulmonary tumor) ไปสู่อวัยวะต่างๆของปอดหรือแม้แต่วัยวะอื่นๆได้ง่าย (Brown, 2007; Hecht et al, 1998; 1999a; 1999b; Hoffmann et al, 1996; Fukami et al, 2010) และมะเร็งกล่องเสียง (Chiang et al., 2011; Hecht, 1998; Hecht, 1999a, 1999b)



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

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

จากการศึกษาในประชากรพบว่ายีน CYP2A6 มีความหลากหลายทางพันธุกรรม (polymorphism) ถึง 38 อัลลีลที่แตกต่างกัน (<http://www.imm.ki.se/cypalleles> และ Koudsi et al, 2009) ซึ่งมีทั้งอัลลีลที่ทำงานผิดปกติหรือไม่สามารถย่อยนิโคตินได้และที่สามารถย่อยนิโคตินได้ดีเกินไป (Kamatiki et al, 2005) โดยที่ความหลากหลายในการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ส่งผลต่อการย่อยสลายนิโคตินและมีบทบาทที่สำคัญในการกำหนดพฤติกรรมการสูบบุหรี่ เช่นผู้สูบบุหรี่ที่ย่อยสลายนิโคตินน้อยจะสูบบุหรี่ต่อวันน้อยกว่าคนที่ย่อยสลายนิโคตินได้ดีและมีความเสี่ยงในการเสพติดนิโคตินน้อย ในทางตรงกันข้ามผู้สูบบุหรี่ที่มีการเพิ่มจำนวนยีน CYP2A6 หรือมีการย่อยสลายนิโคตินได้ดีมากจะมีการสูบบุหรี่มากกว่าคนปกติและมีโอกาสที่เป็นมะเร็งเนื่องจากการสูบบุหรี่มากกว่าปกติ (Schoedel et al, 2004; Sellers et al 2000; Tyndale & Sellers 2002) ที่น่าสนใจเป็นอย่างมากคือในผู้สูบบุหรี่ที่มีการขาดหายไปของยีน CYP2A6 จะมีอัตราเสี่ยงในการเป็นมะเร็งปอดน้อยมาก อย่างไรก็ตามไม่มีความสัมพันธ์ในกรณีผู้ไม่สูบบุหรี่ (Kamatiki et al, 2005; Miyamoto et al, 1999) สำหรับประเทศไทยพบว่าประชากรในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นบุคคลที่มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ดีกว่าปกติ โดยแบ่งเป็นอัลลีล CYP2A6\*1A ซึ่งเป็นพันธุกรรมตามธรรมชาติ (wild-type) และ CYP2A6\*1B ซึ่งเป็นอัลลีลที่ย่อยสลายนิโคตินได้ดีมากเกินไป (EM) มากถึง 32-52% และ 27-40% ตามลำดับ ในขณะที่อัลลีล CYP2A6\*4C ซึ่งเป็นการขาดหายไปของยีนถูกพบเพียงแค่ 8-9 % เท่านั้น (Mahavorasirikul et al, 2009; Peamkrasatam et al, 2006; Ujjin et al, 2002) ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่พบในประชากรของประเทศเกาหลีและญี่ปุ่น (Kamatiki et al, 2005; Yoshida et al, 2002; Kwon et al, 2001) อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ไม่ได้ศึกษาในรายละเอียดความสัมพันธ์ในการกระจายของความหลากหลายทางพันธุกรรมของ CYP2A6 อัลลีลต่างๆกับความสามารถในการย่อยสลายนิโคตินในผู้สูบบุหรี่และไม่สูบบุหรี่

ในขณะที่เอนไซม์ 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 ที่มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจากอาร์จินีนเป็นซิสเตอีนที่ตำแหน่ง 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 ที่จะทำให้เข้าใจในการกระจายของความหลากหลายทางพันธุกรรมของ CYP2A13 อัลลีลต่างๆ กับอัตราการเกิดโรคมะเร็งปอดในผู้

สูบบุหรี่และบุคคลใกล้ชิด ซึ่งอาจจะสามารถนำมาใช้พยากรณ์อัตราเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งปอดจากบุหรี่ของ  
คนไทยได้

เนื่องด้วยการเสพติดบุหรี่จากนิโคตินเป็นสิ่งที่จำเป็นต้องได้รับการรักษาและโรคมะเร็งปอดที่เกิดจากสูบ  
บุหรี่เป็นโรคอันตรายร้ายแรง ในปัจจุบันจึงมียาที่เป็นนิโคตินทดแทน (NRT) ต่างๆ ทั้งในรูปของนิโคตินหมาก  
ฝรั่งชนิดเคี้ยวหรือชนิดแผ่นติดผิวหนัง ที่พบว่ามีประสิทธิภาพสูงมาใช้ร่วมกับการบำบัดพฤติกรรมของผู้สูบบุหรี่  
เพื่อช่วยในการบำบัดและช่วยให้ผู้สูบบุหรี่เลิกจากการสูบบุหรี่ อย่างไรก็ตามการบำบัดด้วยวิธีนี้ยังไม่ได้รับความ  
นิยมเนื่องจากความไม่สะดวกในการใช้ ไม่มีประสิทธิภาพที่รวดเร็วและมีผลข้างเคียงต่างๆ (Sellers et al,  
2003) อีกหนึ่งวิธีที่ใช้ในการบำบัดคือการใช้ยาที่ไปลดการทำงานของตัวรับนิโคตินในสมองซึ่งจะส่งผลให้ลด  
อาการเสพติดนิโคตินลง เช่น ยาในกลุ่ม bupropion HCl และ varenicline ซึ่งเป็นยาในกลุ่มที่ใช้ก่อน (first-  
line drug) และยา nortriptyline และ clonidine ซึ่งเป็นยาในกลุ่มถัดไป (second-line drug) แต่ยาต่างๆ  
เหล่านี้ให้ผลข้างเคียงกับผู้ที่ใช้ยา โดย bupropion HCl ทำให้เกิดอาการนอนไม่หลับ ปากแห้ง มือสั่นและปวด  
ศีรษะ (Carrozzi et al, 2008) ในขณะที่ varenicline ทำให้เกิดอาการอาเจียนและปวดหัว (Gonzalez et al,  
2006; Jorenhy et al, 2006) ส่วนยา second-line drug จะทำให้เกิดอาการง่วงนอน อ่อนเพลีย มึนงง ความ  
ดันโลหิตสูง ตาพร่า หน้ามืด มือสั่น (Carrozzi et al, 2008) และเนื่องจากเอนไซม์ CYP2A6 มีบทบาทสำคัญใน  
การย่อยสลายนิโคตินในคนและอัตราการเกิดโรคมะเร็งที่สืบเนื่องกับการสูบบุหรี่ ดังที่พบความสัมพันธ์ในผู้ที่มี  
การขาดหายของยีน CYP2A6 ดังนั้นการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 จึงเป็นอีกหนึ่งวิธีทางเลือกใน  
การช่วยบำบัดอาการเสพติดบุหรี่และลดอัตราการเกิดโรคมะเร็งระบบทางเดินหายใจและโรคมะเร็งต่างๆได้ (Sellers et  
al, 2003)

แม้จะยังไม่มีการศึกษาสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A13 มากนัก แต่ในปัจจุบันมีสารหลายตัวที่  
สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ได้เช่นสาร methoxsalen (8-  
methoxypsoralen-สารในกลุ่ม pyranocoumarin) ที่สามารถยับยั้งการย่อยสลายนิโคตินและยับยั้งการกระตุ้น  
การเกิดมะเร็งในหนู (Damaj et al, 2007; Miyazaki et al, 2005) เมื่อใช้ coumarin เป็นตัวตรวจสอบพบว่า 8-  
MOP ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ด้วยกลไกทั้งแบบแข่งขันที่ผันกลับได้ (competitive inhibition)  
และการยับยั้งกลไกการย่อยสลายแบบ mechanism-based inhibition (MBI-สารยับยั้งถูกย่อยสลายโดย  
เอนไซม์แต่ผลิตภัณฑ์หรือตัวกลางที่เกิดขึ้นจับแน่นกับเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์หมดสภาพในการทำงาน) (Siu  
and Tyndale, 2007; von Weymarn et al, 2005) และเนื่องจากกลไกการยับยั้งแบบ MBI มีการสร้างพันธะ  
โควาเลนต์ขึ้นระหว่างสารยับยั้งกับกรดอะมิโนบริเวณแอคทีฟของเอนไซม์ (active site) ทำให้ยับยั้งการทำงาน  
ของเอนไซม์อย่างถาวรและต้องมีการสร้างเอนไซม์ใหม่ขึ้นมาแทนที่เอนไซม์ที่สูญเสียการทำงานไป ดังนั้นยา  
tranylcypromine และยา tryptamine ซึ่งมีกลไกการยับยั้งการทำงานแบบ competitive inhibition จึงมี  
ประสิทธิภาพการทำงานที่ดีกว่า 8-MOP เนื่องจากประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ของยา  
tranylcypromine และยา tryptamine จะลดลงเมื่อได้รับสารตั้งต้นทั้ง coumarin และนิโคตินเพิ่ม  
นอกจากนี้การศึกษาเบื้องต้นในคนพบว่า 8-MOP สามารถลดการย่อยสลายนิโคตินและพบว่าสามารถลดการ  
กำจัดนิโคตินออกจากร่างกายได้ (Sellers et al, 2000, 2003) โดยผู้สูบบุหรี่ที่ได้รับ 8-MOP หรือ  
tranylcypromine ร่วมกับการได้รับนิโคตินจะมีระดับของนิโคตินในกระแสเลือดเพิ่มขึ้นและลดการสูบบุหรี่ลง  
โดยเพิ่มระยะเวลาก่อนที่จะสูบบุหรี่มวนต่อไปให้ยาวนานขึ้น (sellers et al, 2000) แม้ในที่สุดจะพบว่าทั้ง 8-  
MOP หรือ tranylcypromine ส่งผลกระทบต่อผู้ใช้ทำให้ต้องระงับการใช้สารทั้งสอง แต่ผลการศึกษา  
แสดงให้เห็นว่าสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ในการย่อยสลายนิโคตินสามารถทำให้สูบบุหรี่น้อยลงได้  
(Sellers et al, 2003; Siu and Tyndale, 2007) จึงได้มีการสร้างสารสังเคราะห์ต่างๆขึ้น (synthetic  
compounds) เพื่อนำมาใช้ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 เช่นสารที่มีโครงสร้าง 3-

heteroaromatic และ 3-aliphatic pyridine เป็นโครงสร้างหลักที่พบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้อย่างจำเพาะเจาะจง (Yano et al, 2006) หรือสาร selegiline ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นเพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ monoamine oxidase ที่พบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้ด้วย (Siu and Tyndale, 2008) และสารสังเคราะห์ N1-(4-fluorophenyl) cyclopropane-1-carboxamide ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ด้วยเช่นกัน (Rahnasto et al, 2008)

เนื่องด้วยแนวโน้มในการรักษาโรคที่ย้อนกลับไปใช้สารจากธรรมชาติ จึงได้มีการศึกษาโดยใช้ menthol ซึ่งเป็นสารแต่งกลิ่นในอาหาร ผสมลงในบุหรี่ยาสูบและพบว่าสามารถเพิ่มครึ่งชีวิตของสารโคทีนีนในกระแสเลือดในผู้เสพยาสูบผู้หญิงได้ (Ahijevych et al, 2002) เพราะ menthol มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้ (MacDougall et al, 2003) อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาเพิ่มเติมถึงผลจากการใช้ menthol เพียงอย่างเดียวในการลดการสูบบุหรี่ นอกจากนี้ น้ำ grapefruit ก็สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ในการย่อยสลายสาร coumarin ได้เช่นเดียวกันแต่ไม่ดีเท่ากับการยับยั้งเอนไซม์ CYP3A4 ในขณะที่สารสกัด nootkatone บริสุทธิ์ที่สกัดจากส้มโอสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดีแต่ไม่มีรายงานถึงความจำเพาะในการยับยั้ง (Merket et al, 1994; Runkel et al, 1997; Tassaneeyakul et al, 2000) รวมถึงสารสกัดจาก Kava และสารในกลุ่ม kavalactone สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP3A4 และ CYP2C9 ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารแปลกปลอมภายนอกอื่น ๆ ได้ดีกว่าเอนไซม์ CYP2A6 (Mathews et al, 2002) สารประกอบ isothiocyanate ในกลุ่มผักกะหล่ำก็มีประสิทธิภาพที่ต่ำในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 และต้องถูกดัดแปลงในหลอดทดลองก่อนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งให้เพิ่มขึ้น (von Weymarn et al, 2007) เมื่อเปรียบเทียบกับสาร decursinol angelate ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม pyranocoumarin ที่สกัดได้จากรากของ *Angelica gigas* ที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้แบบ MBI (Yoo et al, 2007) แสดงให้เห็นว่าสารจากธรรมชาติมีสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ที่ดี ด้วยเหตุนี้สารสกัดจากธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานและจำเพาะต่อเอนไซม์ CYP2A6 โดยไม่มีผลข้างเคียงและไม่เป็นพิษต่อร่างกาย จึงเป็นหนึ่งในแนวทางเลือกที่สำคัญในการป้องกันการเสพติดบุหรี่ยาสูบ รวมถึงลดระดับการเป็นมะเร็งปอดทั้งในผู้สูบบุหรี่และผู้ใกล้ชิดต่อไป

จากผลการศึกษาเบื้องต้นของกลุ่มผู้วิจัยพบว่า สมุนไพรและผลไม้ที่นิยมรับประทานเพื่อรักษาสุขภาพหลายชนิดในประเทศไทยสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ในหลอดทดลองได้ โดยนอกเหนือจากน้ำมะเฟืองซึ่งเป็นน้ำผลไม้ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ที่ดีที่สุดด้วยกลไก MBI (Pouyfung et al., 2012; 2013) ผลการศึกษายังพบอีกว่าพืชสมุนไพรและน้ำผลไม้ในวงศ์ Asteraceae และ Acanthaceae หลายชนิดเช่น หนุ่ยดอกขาว เก๊กฮวยและทองพันชั่ง สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดีมากเช่นกัน (ทรงกลด สารภูษิตและพรพิมล รงค์นพรัตน์, 2554; Prasopthum et al., 2013) เนื่องด้วยพืชในวงศ์ทั้งสองส่วนใหญ่นิยมนำมารับประทานและออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดีนั้นมียาสมุนไพรทางการแพทย์มากมายในการนำมาทำเป็นชาสมุนไพรรักษาสุขภาพอย่างกว้างขวาง และโดยเฉพาะพืชทั้งสองกลุ่มนี้มีรายงานว่า เป็นพืชในวงศ์ที่มีสารประกอบในกลุ่ม pyranocoumarin (กลุ่มหนึ่งของ phenolic และ flavonoids) ที่มีความสามารถในการเป็นทั้งสารตั้งต้น (coumarin) และตัวยับยั้ง (8-MOP และ decursinol angelate ที่สกัดได้จากรากของ *A.gigas*) ที่ดีของเอนไซม์ CYP2A6 ดังนั้นสมุนไพรจากวงศ์ของพืชทั้งสอง จึงน่าจะมีความสามารถที่จะนำมาใช้ศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 เพื่อใช้ในการบำบัดอาการการติดบุหรี่ยาสูบของผู้เสพยาสูบเพื่อช่วยลดอัตราการเกิดโรคมะเร็งทางเดินหายใจและโรคมะเร็งอื่นเนื่องมาจากการสูบบุหรี่ได้

## บทที่ 3

### สารเคมีและวิธีการทดลอง

#### 3.1 สารเคมี

1. Acetic acid glacial ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) 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 ( $\delta$ -ALA) MW 167.59 บริษัท SIGMA-ALDRIC ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
6. Ammonium persulfate (APS) ( $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) MW 228.20 บริษัท Bio Basic INC ประเทศแคนาดา
7. Ampicilin ( $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{NaO}_4\text{S}$ ) MW.371.39 บริษัท Bio Basic INC ประเทศแคนาดา
8. Bisacrylamide MW 154.20 บริษัท Promega Corporation ประเทศสหรัฐอเมริกา
9. Bardford ยี่ห้อ Bio-rad บริษัท Bio-rad Laboratories, Inc ประเทศสหรัฐอเมริกา
10. Coumarin ( $\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_2$ ) MW 146.15 บริษัท Fluka Analytical ประเทศฝรั่งเศส
11. Dipotassium hydrogen phosphate ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) MW 174.16 บริษัท Carlo erba analytical ประเทศสหรัฐอเมริกา
12. Disodium hydrogen phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) MW 141.96 บริษัท Fisher scientific analytical grade ประเทศอังกฤษ
13. Ethyl alcohol absolute ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) MW 46.070 บริษัท Carlo erba ประเทศสหรัฐอเมริกา
14. Glycerol ( $\text{CH}_2\text{OHCHOHCH}_2\text{OH}$ ) MW 92.095 ยี่ห้อ Carlo erba บริษัท Bio Basic INC. ประเทศแคนาดา
15. Glycine MW 75.10 ยี่ห้อ UPS Grade บริษัท RESEARCH ORGANICS ประเทศสหรัฐอเมริกา
16. Imidazole MW 68.08 บริษัท Bio Basic INC ประเทศแคนาดา
17. Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) MW 238.31 บริษัท Promega ประเทศสหรัฐอเมริกา
18. LB agar, Difco<sup>tm</sup>, บริษัท Dickinson company ประเทศสหรัฐอเมริกา
19. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate ในรูปรีดิวซ์ (NADPH) บริษัท Fluka HPLC grade ประเทศสหรัฐอเมริกา
20. Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{SO}_2\text{F}$ ) บริษัท Bio Basic INC ประเทศแคนาดา
21. Potassium dihydrogen phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) MW 136.09 บริษัท Carlo erba ประเทศสหรัฐอเมริกา
22. Sodium chloride ( $\text{NaCl}$ ) MW 58.443 บริษัท Carlo erba ประเทศสหรัฐอเมริกา



23. Sodium dodecyl sulfate (SDS) ( $C_{12}H_{25}OSO_3Na$ ) MW 288.83 บริษัท BIO BASIC INC.ประเทศแคนาดา
24. Tritone Power ยี่ห้อ Biotech บริษัท Bio Basic INC ประเทศแคนาดา
25. Tris-Hydrochloride ยี่ห้อ Promega บริษัท Promega Corporation ประเทศสหรัฐอเมริกา
26. Tris(Hydroxymethyl)aminomethane ( $NH_2C(CH_2OH)_3$ ) MW 121.14 บริษัท USB Corporation ประเทศสหรัฐอเมริกา
27. Yeast extract บริษัท Bio Basic INC. ประเทศแคนาดา
28. 1,2-dilauryl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DLPC) MW 621.83 บริษัท Bio Basic INC ประเทศแคนาดา

### 3.2 พลาสมิดที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1 พลาสมิดที่บรรจุยีน CYP2A6 ของคนที่ขาดส่วนจับกับเมมเบรน ( $\Delta 23$ human CYP2A6) (ได้รับมาจาก Assoc. Prof. Dr. Emily E. Scott, Dept. of Medicinal Chemistry, Kansas University, [http://www.medchem.ku.edu/faculty\\_scott.shtml](http://www.medchem.ku.edu/faculty_scott.shtml))

3.2.2 พลาสมิดที่บรรจุยีน CYP2A6 ของคนที่ขาดส่วนจับกับเมมเบรน ( $\Delta 23$ human CYP2A13) (ได้รับมาจาก Assoc. Prof. Dr. Emily E. Scott, Dept. of Medicinal Chemistry, Kansas University, [http://www.medchem.ku.edu/faculty\\_scott.shtml](http://www.medchem.ku.edu/faculty_scott.shtml))

3.2.3 พลาสมิด pNIIIompA3 ที่บรรจุยีน CPR ของหนูที่มีส่วนจับเมมเบรน (ratCPR) (ได้รับมาจาก Prof. Dr. Jung-Ja Kim, Dept. of Biochemistry, Medical College of Wisconsin, [http://www.mcw.edu/biochemistry/Jung\\_Ja\\_Kim.htm](http://www.mcw.edu/biochemistry/Jung_Ja_Kim.htm))

### 3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเหนี่ยวนำการแสดงออก การทำบริสุทธิ์และกิจกรรมของเอนไซม์ Cytochrome P450 reductase จากหนู (rat CPR)

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

3.3.2 การเหนี่ยวนำการแสดงออก การทำบริสุทธิ์ของเอนไซม์และการตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13

ทำการเลี้ยงเชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ XL-1 blue ที่ได้รับการส่งผ่าน cDNA ที่มียีน *cyp2a6* และ *cyp2a13* (pKKK- $\Delta$ -23-2A6 และ pKKK- $\Delta$ -23-2A13) จากนั้นเหนี่ยวนำการแสดงออกโปรตีน



ด้วย IPTG และ 5-aminolevulinic acid hydrochloride ( $\delta$ -ALA) ทำปฏิกิริยาโปรตีนโดยผ่านนิกเกิลคอลัมน์ และตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE และทำการศึกษาการเร่งปฏิกิริยาการออกซิเดชันของเอนไซม์ CYP2A6 หรือ CYP2A13 ต่อสารประกอบเรืองแสง Coumarin ในหลอดทดลอง (*in vitro*) โดยวัดการเพิ่มขึ้นของสารผลิตภัณฑ์ (7-hydroxycoumarin) โดยใช้เครื่อง Fluorescence Spectroscopy (Insee et al., 2014; Pouyfung et al., 2013; Thongjam et al., 2013)

### 3.4.5 การเตรียมสารสกัดจากพืช

ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยใช้หญ้าหมอน้อย (*Vernonia cinerea*) และดอกคำฝอย (*Carthamus tinctorius*) จากวงศ์ Asteraceae และทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus*) จากวงศ์ Acanthaceae ที่ผลการศึกษาเบื้องต้นพบว่าออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ได้ดี โดยในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยจะทำปฏิกิริยาสารสำคัญที่ออกฤทธิ์โดยใช้กิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 เป็นตัวนำ (Bioassay guide isolation) อย่างคร่าวๆดังนี้ นำพืชมาล้างทำความสะอาดและปั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ จึงนำแช่ในสารละลายเอทานอล จากนั้นทำการกรอง จากนั้นทำการแยก fraction โดยใช้สารละลายเฮกเซนและเอทิล อะซิเตทตามลำดับ ทำปฏิกิริยาสารสำคัญด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี และตรวจสอบความบริสุทธิ์และโครงสร้างของสารสำคัญด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Nuclear Magnetic Resonance (NMR) และ Liquid Chromatography-Mass spectrometry (LC-MS) ในส่วนสกัดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ทั้งสองได้ดี

### 3.4.6 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์

3.4.6.1 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ cytochrome P450 reductase จากหนู (rat CPR)

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

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

เตรียมปฏิกิริยาโดยทำการบ่มเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ที่บริสุทธิ์ร่วมกับเอนไซม์ rat CPR และ DLPC จากนั้นเติมสารละลาย 100 mM Kpi buffer pH 7.4 เติมสารตั้งต้น coumarin และสารสกัดแต่ละลำดับส่วนของสมุนไพรที่ทำการศึกษา หลังจากนั้นเริ่มปฏิกิริยาโดยเติม 50  $\mu$ M NADPH วัดค่าการเพิ่มขึ้นของผลิตภัณฑ์ (7-hydroxycoumarin) โดยใช้เครื่อง fluorescence spectroscopy เป็นเวลา 10 นาที คำนวณหาค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่เหลืออยู่ เพื่อดูผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เมื่อเปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ CYP2A6 หรือ CYP2A13 ปกติ (100% remaining activity)

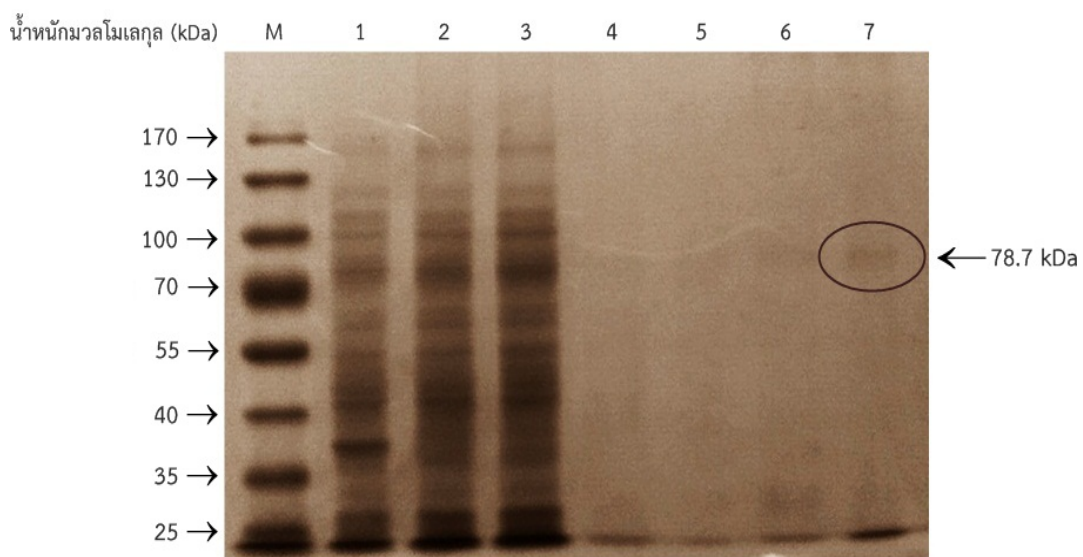
3.4.6.3 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) และ cytochrome P450 2A13 (CYP2A13) โดยปฏิกิริยา pre-incubation

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

## บทที่ 4 ผลการทดลอง

### 4.1 การเหนี่ยวนำการแสดงออกและการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ Cytochrome P450 reductase จากหนู (rat CPR)

ทำการเหนี่ยวนำการแสดงออกของเอนไซม์ CPR จากนั้นทำบริสุทธิ์เอนไซม์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบจำเพาะโดยใช้  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA ( $\text{Ni}^{2+}$ -Affinity chromatography) และตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยใช้ SDS-PAGE โดยเอนไซม์ rat CPR บริสุทธิ์ (ภาพที่ 4-1) มีขนาดมวลโมเลกุลประมาณ 78 kDa และเอนไซม์ที่ได้มีค่า specific activity ในการเร่งปฏิกิริยาสังเคราะห์อิเล็กตรอนให้ Cytochrome c มีค่าเท่ากับ  $47.13 \pm 4.80 \mu\text{mol cytochrome c reduced}/\text{min}/\text{mg protein}$

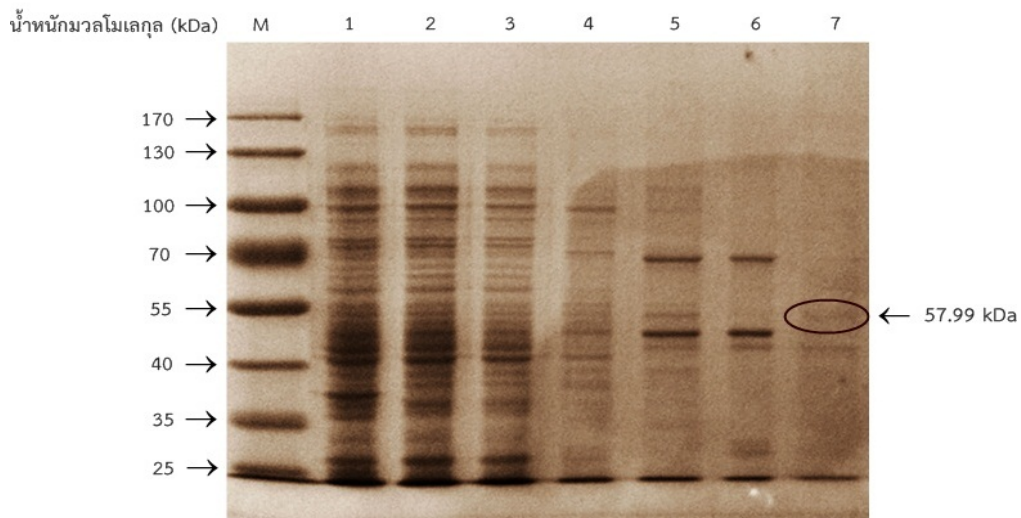


ภาพที่ 4-1 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ rat CPR โดยที่ M = แถบโปรตีนมาตรฐาน, แถบที่ 1 = Cell lysate, แถบที่ 2 = Crude extract, แถบที่ 3 = Flow through, แถบที่ 4 = Wash1 (5 mM Imidazole), แถบที่ 5 = Wash2 (20 mM Imidazole), แถบที่ 6 = Wash3 (50 mM Imidazole), แถบที่ 7 = Elute1 (100 mM Imidazole)

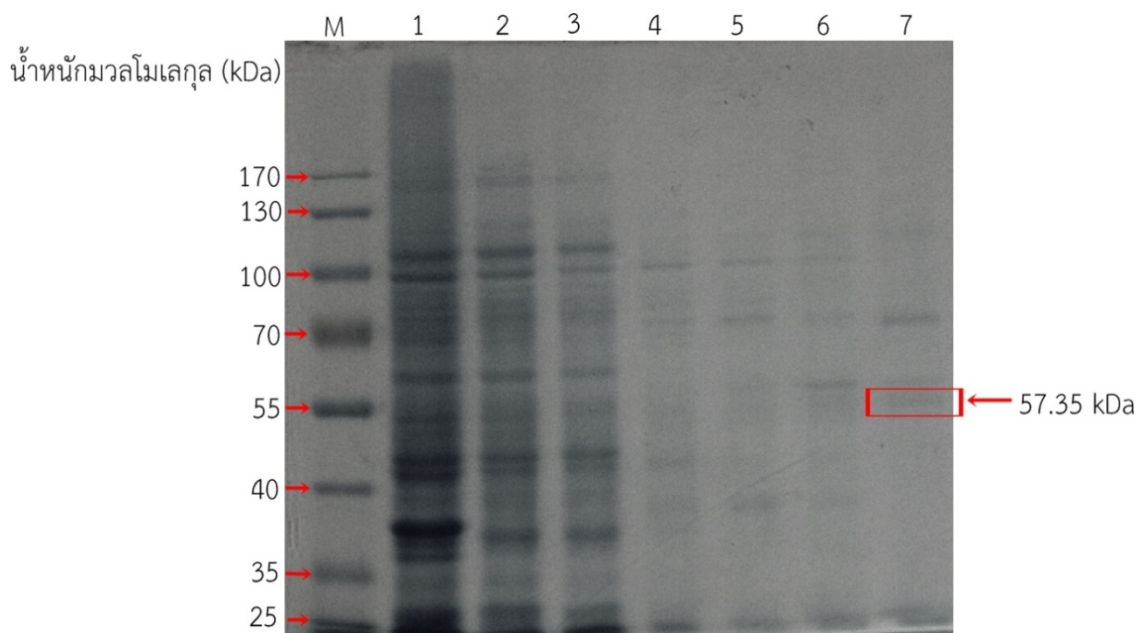
### 4.2 การเหนี่ยวนำการแสดงออกและการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ Cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) และ Cytochrome P450 2A13 (CYP2A13)

ทำการเหนี่ยวนำการแสดงออกและทำบริสุทธิ์เอนไซม์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบจำเพาะโดยใช้  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA และตรวจสอบด้วย SDS-PAGE (ภาพที่ 4-2) พบว่าเอนไซม์ที่คาดว่าเป็นเอนไซม์ CYP2A6 บริสุทธิ์ มีมวลโมเลกุลของเอนไซม์ประมาณ 58 kDa ซึ่งใกล้เคียงกับค่าขนาดมวลโมเลกุลที่ได้จากการทำด้วยวิธีชีวสารสนเทศ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 54.80 kDa และมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยา Hydroxylation ของสารตั้งต้น Coumarin ไปเป็น 7-hydroxycoumarin เท่ากับ  $0.32 \pm 0.0007 \mu\text{mol 7-hydroxycoumarin}/\text{min}/\text{mg protein}$  ในขณะที่เอนไซม์ที่คาดว่าเป็นเอนไซม์ CYP2A13 บริสุทธิ์ มีมวลโมเลกุลของเอนไซม์ประมาณ 57 kDa (ภาพที่ 4-3) ซึ่งใกล้เคียงกับค่าขนาดมวลโมเลกุลที่ได้จากการทำด้วยวิธีชีวสารสนเทศ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 54.80

kDa และมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยา Hydroxylation ของสารตั้งต้น Coumarin ไปเป็น 7-hydroxycoumarin เท่ากับ  $0.10 \pm 0.001 \mu\text{mol 7-hydroxycoumarin/min/mg protein}$



**ภาพที่ 4-2** การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ CYP2A6 โดยที่ M = แถบโปรตีนมาตรฐาน, แถบที่ 1 = Cell lysate, แถบที่ 2 = Crude extract, แถบที่ 3 = Flow through, แถบที่ 4 = Wash1 (5 mM Imidazole), แถบที่ 5 = Wash2 (20 mM Imidazole), แถบที่ 6 = Wash3 (50 mM Imidazole), แถบที่ 7 = Elute1 (100 mM Imidazole)

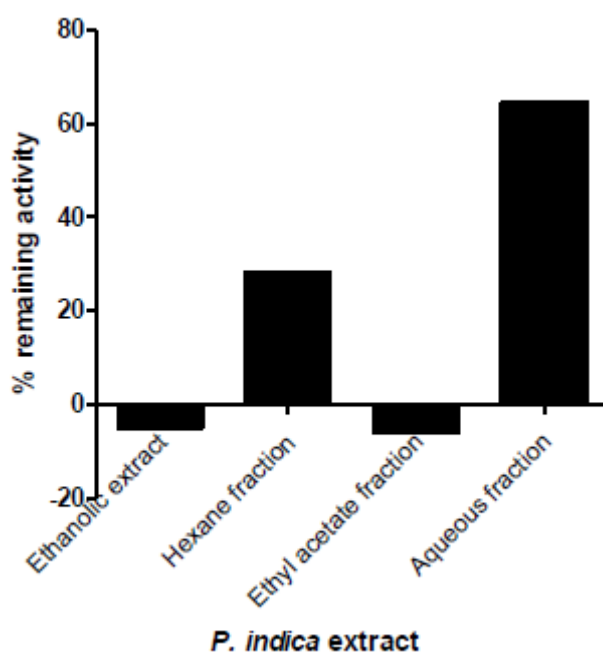


**ภาพที่ 4-3** การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ CYP2A13 โดยที่ M คือ Marker, lane ที่ 1 คือ lysate (สารละลายโปรตีนทั้งหมด), lane ที่ 2 คือ extract (สารละลายส่วนใส), lane ที่ 3 คือ Flow through (สารละลายส่วนใสที่ผ่านคอลัมน์), lane ที่ 4 คือ wash1 (10 mM Imidazole), lane ที่ 5 คือ wash2 (20 mM Imidazole), lane ที่ 6 คือ wash3 (40 mM Imidazole), lane ที่ 7 คือ elute1 (60 mM Imidazole), lane ที่ 8 คือ elute2 (80 mM Imidazole)

### 4.3 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ของสารสกัดสมุนไพรขลุ้

จากผลการศึกษาเบื้องต้นที่พบว่าสารสกัดจากพืชสมุนไพรหลายชนิดในวงศ์ Asterceae และ Acanthaceae สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ในหลอดทดลองได้ดี (ทรงกลด สารภูษิตและพรพิมล รงค์นพรัตน์, 2554) โดยในการศึกษาครั้งนี้พืชที่ผู้วิจัยเลือกได้แก่ ขลุ้ (*Phuchia indica*) ดอกคำฝอย (*Carthamus tinctorius*) และหญ้าหมอน้อย (*Vernonia cenerea*) จากวงศ์ Asterceae และทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus*) จากวงศ์ Acanthaceae

นำเอาขลุ้ที่ตากแห้งแล้วไปละลายในสารละลาย Ethanol แล้วจึงนำเอาสารละลายที่ได้ไประเหยด้วยเครื่องสุญญากาศ ได้สารสกัดในส่วนของ Ethanol 60 กรัม จากนั้น จึงนำเอาส่วนที่ได้จากการทำระเหยแล้วนั้นไปทำการแยกสารสกัดแบบลำดับส่วนด้วย Hexane, Ethyl Acetate และน้ำ นำหนัก 43 กรัม, 2 กรัม และ 50 กรัมตามลำดับ นำเอาสารสกัดแต่ละส่วนที่ได้ มาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ที่ความเข้มข้น 50  $\mu\text{g/ml}$  โดยเปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ที่ปราศจากสารสกัดจากขลุ้เป็นตัวควบคุม (มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ร้อยละ 100) พบว่าส่วนสกัดเอทิล อะซิเตตจากขลุ้สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้สูงสุด (ภาพที่ 4-4)



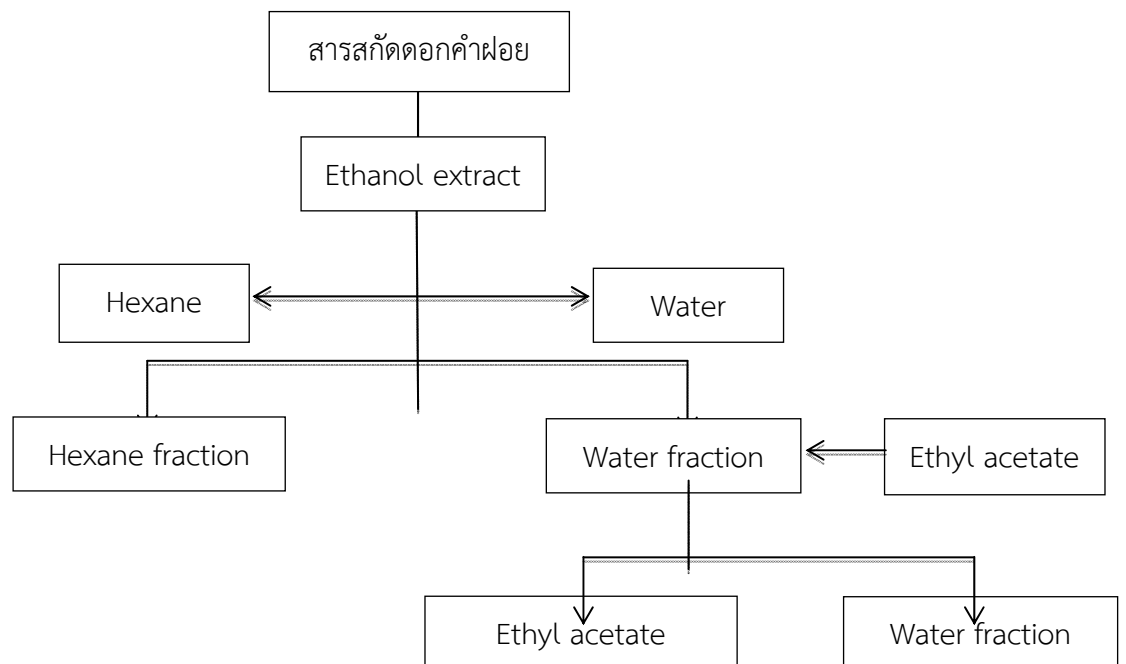
ภาพที่ 4-4 การยับยั้ง เอนไซม์ CYP2A6 ด้วยสารสกัดขลุ้ และส่วนสกัดที่แยกขึ้น (Thongjam et al., 2012)

### 4.4 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ของสารสกัดดอกคำฝอย

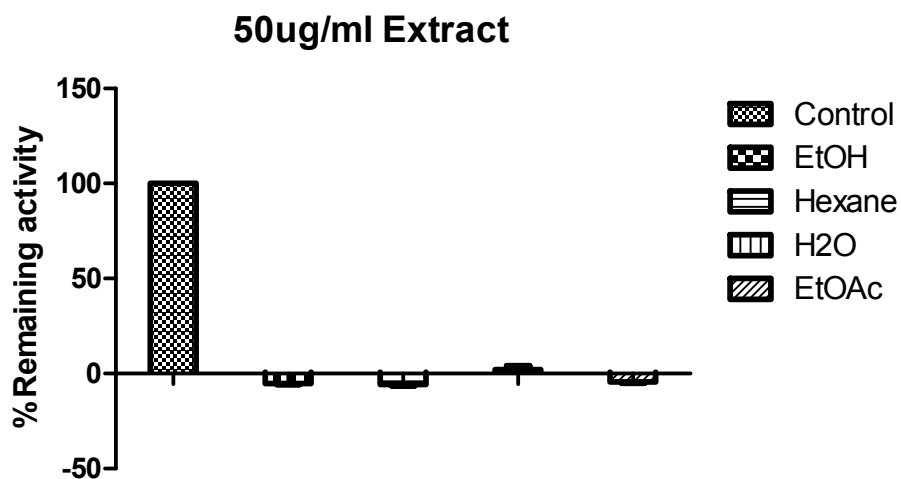
#### 4.4.1 สารสกัดจากดอกคำฝอยและการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยสารสกัดจากดอกคำฝอย

นำเอาดอกคำฝอยที่ตากแห้งแล้วไปละลายในสารละลาย Ethanol แล้วจึงนำเอาสารละลายที่ได้ไประเหยด้วยเครื่องสุญญากาศ ได้สารสกัดในส่วนของ Ethanol 56.15g จากนั้น จึงนำเอาส่วนที่ได้จากการทำระเหยแล้วนั้นไปทำการแยกสารสกัดแบบลำดับส่วนด้วย Hexane, Ethyl Acetate และน้ำ ซึ่งได้ปริมาณสารสกัดเป็น 7.63 g, 6.0 g และ 32.94 g ตามลำดับ (ภาพที่ 4-5) นำเอาสารสกัดจากดอกคำฝอยที่แยกตามลำดับส่วนในแต่ละส่วนที่ความเข้มข้น 50  $\mu\text{g/ml}$  มาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 โดยเปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ที่ปราศจากสารสกัดจากดอกคำฝอยเป็นตัวควบคุม (มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ร้อยละ 100) พบว่า ที่ความเข้มข้น 50  $\mu\text{g/ml}$  ของสารสกัด ทุกส่วนสกัดจากดอกคำฝอย

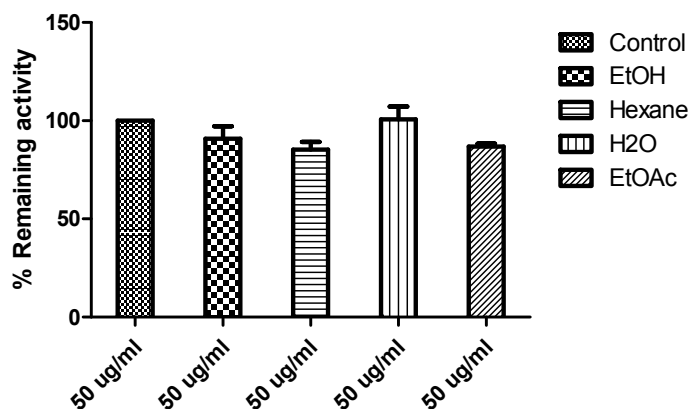
นั้นสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ทั้งหมด โดยส่วนสกัดน้ำยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้น้อยที่สุด (ภาพที่ 4-6) และสารสกัดจากดอกคำฝอยไม่ส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ rat CPR (ภาพที่ 4-7) แสดงว่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ลดลงเกิดจากการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6



ภาพที่ 4-5 ขั้นตอนการสกัดดอกคำฝอย



ภาพที่ 4-6 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ของสารสกัดจากดอกคำฝอยที่ความเข้มข้น 50  $\mu\text{g/ml}$  เมื่อทำการทดสอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ร้อยละของกิจกรรมที่เหลืออยู่คำนวณโดยเปรียบเทียบกับการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ที่ไม่มีการเติมสารสกัดจากดอกคำฝอย วิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5



ภาพที่ 4-7 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ rat CPR ด้วยสารสกัดจากดอกคำฝอย ที่ความเข้มข้น 50  $\mu\text{g/ml}$  เมื่อทำการทดสอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับตัวควบคุมที่ไม่มีการเติมสารสกัด วิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5

#### 4.4.2 ส่วนประกอบสารสกัดดอกคำฝอยชั้นเฮกเซนและการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6

นำเอาส่วนของสารสกัดจากดอกคำฝอยในส่วนของ Hexane มาลงคอลัมน์ซิลิกา ทำการชะคอลัมน์ด้วยอัตราส่วนของ Hexane และ Ethyl acetate ดังนี้ 90:10, 80:20, 70:30, 50:50, 30:70 และ 0:100 ตามลำดับ จากนั้นทำการรวมสารตามแถบที่ปรากฏขึ้นบนแผ่น TLC ที่ใกล้เคียงกันและสีที่ชะลงออกมาจากคอลัมน์ได้สารประกอบมาทั้งหมด 8 ส่วน (FH1-FH8) จากนั้นนำสารสกัดที่ได้จากการแยกในส่วนของ Hexane ที่แยกได้สารประกอบทั้งหมดมาทดสอบเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 เพื่อหาสารประกอบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ที่ดีที่สุด โดยทดสอบที่ความเข้มข้น 50  $\mu\text{g/ml}$  และเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ CYP2A6 ที่ได้กับกิจกรรมของเอนไซม์ CYP2A6 ในปฏิกิริยาที่ปราศจากสารสกัดจากดอกคำฝอย (มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ร้อยละ 100) โดยมีสารละลาย DMSO ซึ่งเป็นตัวละลายสารสกัดเป็นตัวควบคุม ซึ่งผลการศึกษาพบว่าสารประกอบที่แยกได้ในส่วนที่ 3, 4, 5 และ 7 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับ Methoxsalen (8-methoxypsolen; 8-MOP) ซึ่งเป็นสารที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 มาตรฐาน

#### 4.5 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ของสารสกัดหญ้าดอกขาว

##### 4.5.1 การเตรียมสารสกัดจากหญ้าดอกขาวและการแยกสารสกัดแบบลำดับส่วน

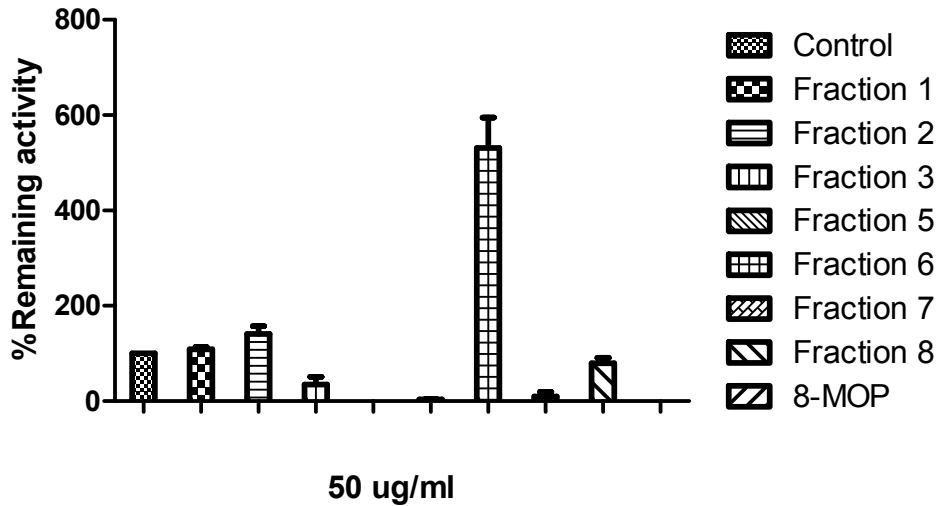
ทำการสกัดพืชสมุนไพรหญ้าดอกขาวที่เก็บจากบริเวณรอบมหาวิทยาลัยบูรพา มาทำความสะอาด สับให้ละเอียด อบให้แห้งและสกัดในสารละลายเอทานอล ได้ปริมาณสุทธิ 60 กรัม จากนั้นแยกสารสกัดแบบลำดับส่วน ได้ส่วนสกัดเฮกเซน (Hexane) เอทิลอะซิเตต (Ethyl acetate) และน้ำ (Water) ปริมาณสุทธิ 9.79 กรัม, 19.09 กรัม และ 25.11 กรัม ตามลำดับ (ภาพที่ 4-9)

##### 4.5.2 ทดสอบการยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ของสมุนไพรหญ้าดอกขาว

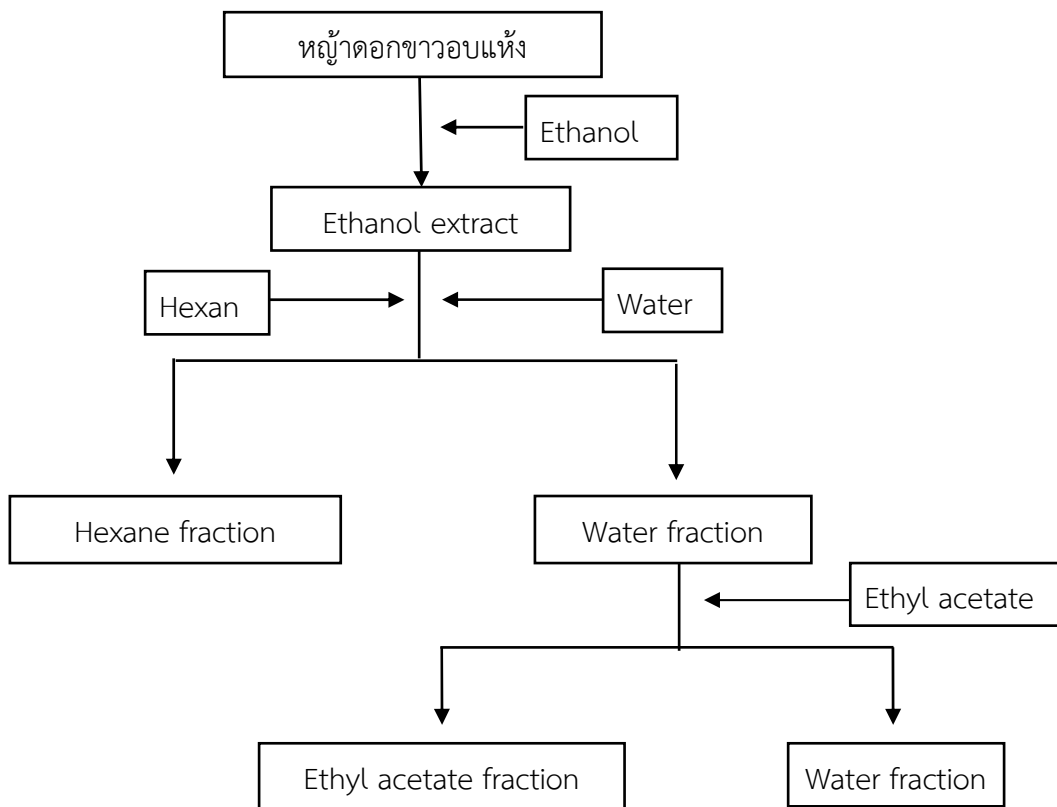
นำสารสกัดหญ้าดอกขาวที่ มาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ rat CPR โดยผลการศึกษาพบว่า ส่วนสกัดพืชสมุนไพรหญ้าดอกขาวในส่วนสกัดเอทานอล, เฮกเซน, น้ำ และเอทิลอะซิเตตไม่ส่งผลต่อการยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ rat CPR (ภาพที่ 4-10; ค่า P-value = 0.88 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%) จากนั้นนำสารสกัดพืชสมุนไพรในแต่ละส่วนสกัด มาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ rat CPR

ของเอนไซม์ CYP2A6 ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml, 50 µg/ml และ 100 µg/ml โดยเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ CYP2A6 ที่ได้ กับกิจกรรมของเอนไซม์ CYP2A6 ในปฏิกิริยาที่มีสารละลาย DMSO ที่เป็นตัวละลายสารสกัดเป็นตัวควบคุม (มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 100%)

### 50 ug/ml Fraction



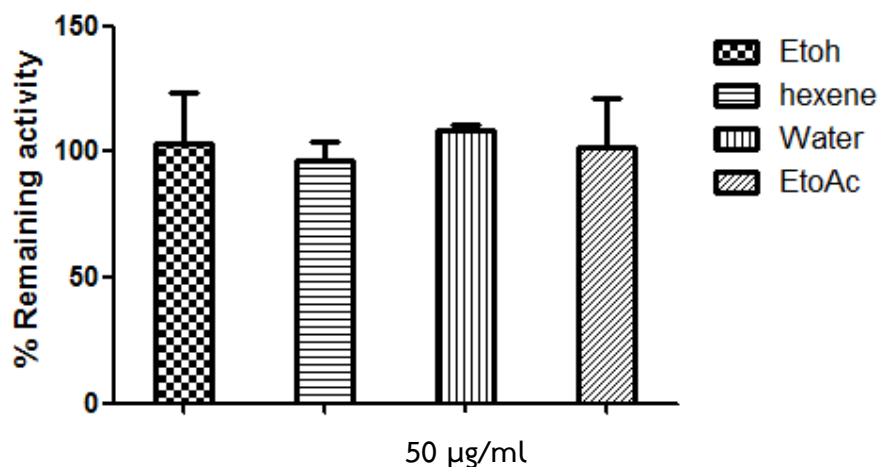
ภาพที่ 4-8 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 บริสุทธิ์ ด้วยสารสกัดจากดอกคำฝอยส่วนของเฮกเซน (Hexane) ทั้ง 8 ส่วน ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml เมื่อทำการศึกษาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับสารละลาย DMSO การทดลองทำซ้ำทั้งหมดสองครั้งและวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5 (Wongsri et al., 2014)



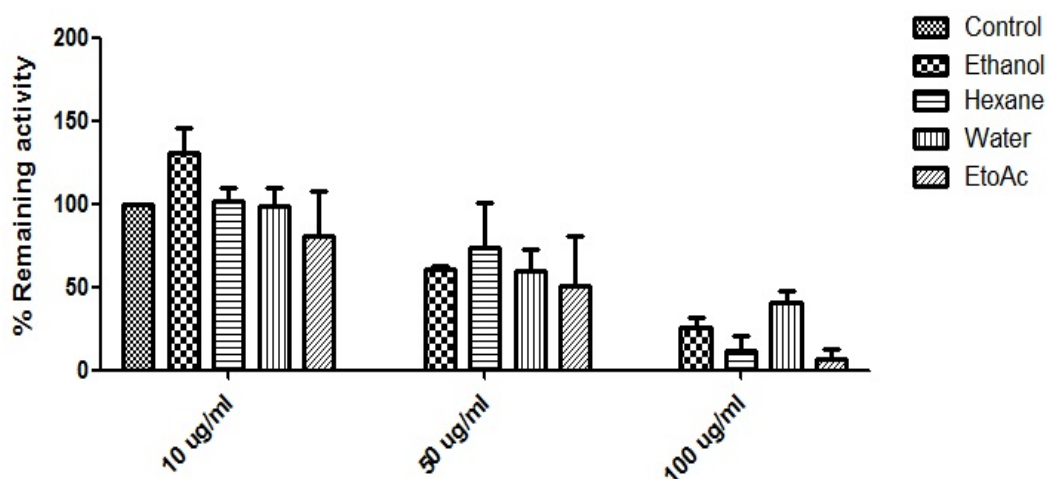
ภาพที่ 4-9 ลำดับขั้นตอนการสกัดหลวง้ดอกขาว



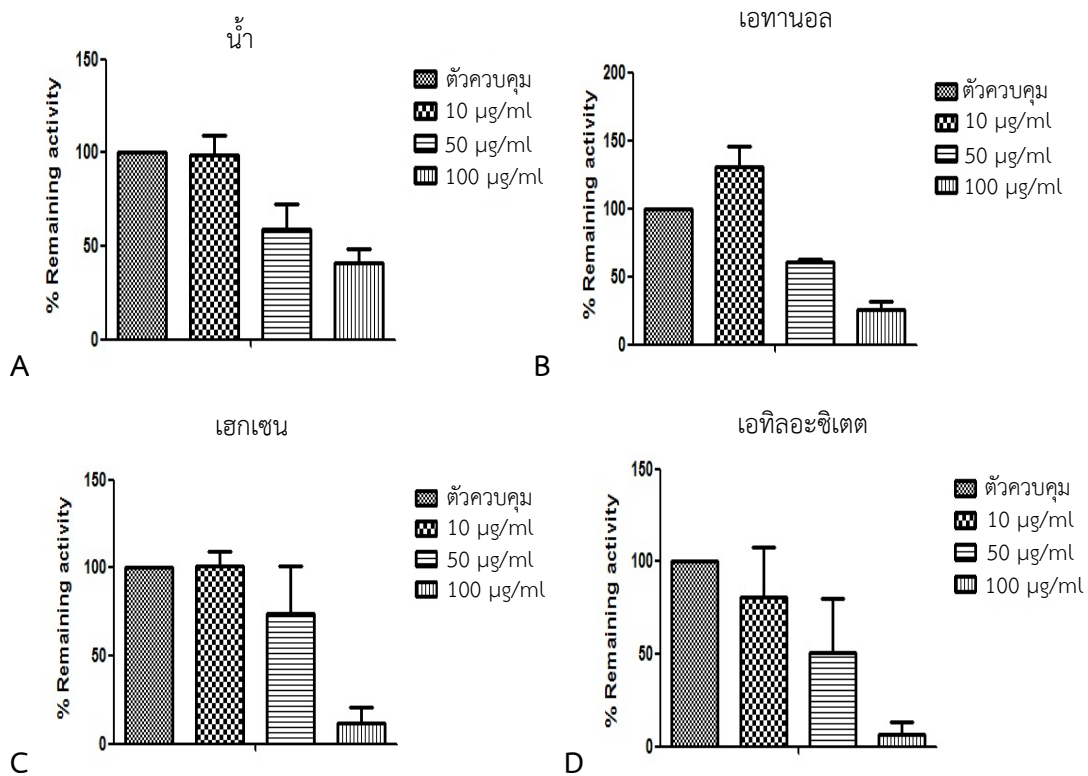
ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดหญ้าดอกขาวในส่วนสกัดเอทิลอะซิเตตมีความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดีที่สุด รองลงมาคือส่วนสกัดเฮกเซน (ภาพที่ 4-11) เพื่อทำการศึกษาลึก ผู้วิจัยนำสารสกัดพืชสมุนไพรหญ้าดอกขาวมาทำการศึกษาเพิ่มเติม พบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งกิจกรรมการทำงานของส่วนสกัดพืชสมุนไพรหญ้าดอกขาวขึ้นอยู่กับความเข้มข้น พบว่าความสามารถในยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ร้อยละ 50 ( $IC_{50}$ ) ของส่วนสกัดน้ำ เอทานอล เฮกเซน และเอทิลอะซิเตต สามารถยับยั้งได้ที่ค่า  $IC_{50}$  77.60, 76.55, 62.22 และ 33.09  $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ (ภาพที่ 4-12) โดยทางผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาในส่วนสกัดเฮกเซนก่อน



ภาพที่ 4-10 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ rat CPR บริสุทธิ์ ด้วยสารสกัดพืชสมุนไพรหญ้าดอกขาว ที่ความเข้มข้น 50  $\mu\text{g/ml}$  เปรียบเทียบกับ DMSO การทดลองทำซ้ำทั้งหมดสองครั้งและวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5



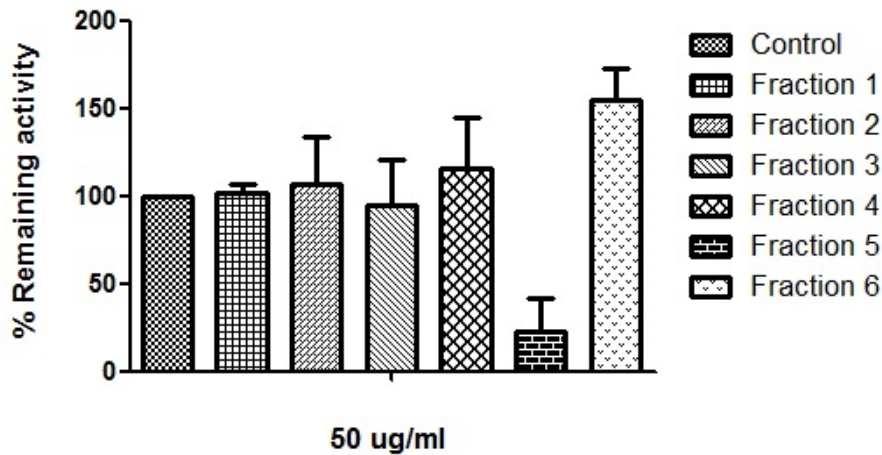
ภาพที่ 4-11 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 บริสุทธิ์ ในการเร่งปฏิกิริยา Coumarin 7-hydroxylase โดยส่วนสกัดพืชสมุนไพรหญ้าดอกขาว ที่ความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับสารละลาย DMSO ที่เป็นตัวละลายสารสกัด ร้อยละของกิจกรรมที่เหลืออยู่คำนวณเปรียบเทียบกับการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 เมื่อไม่เติมสารสกัดพืชสมุนไพรหญ้าดอกขาว วิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5



ภาพที่ 4-12 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 บริสุทธิ์ที่ร้อยละ 50 ในการเร่งปฏิกิริยา Coumarin 7-hydroxylase ของสารสกัดพืชสมุนไพรหญ้าดอกขาว ที่ทำการแยกแบบลำดับส่วน เมื่อทำการศึกษาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน (ภาพ A น้ำ, ภาพ B เอทานอล, ภาพ C เฮกเซน และภาพ D เอทิลอะซิเตต) เปรียบเทียบกับสารละลาย DMSO การทดลองทำซ้ำทั้งหมดสองครั้ง และวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5 (Wongsri et al., 2014)

#### 4.5.3 การแยกสารประกอบจากสารสกัดพืชสมุนไพรหญ้าดอกขาวและฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ของสมุนไพรหญ้าดอกขาวส่วนเฮกเซน

นำสารสกัดหญ้าดอกขาวในส่วนสกัดเฮกเซนมาแยกสารสำคัญด้วยวิธีโครมาโทกราฟี ด้วยอัตราส่วนของเฮกเซนต่อเอทิลอะซิเตต 80:20, 70:30, 50:50, 30:70 และ 0:100 ตามลำดับ ได้สารประกอบทั้งหมด 6 ส่วนสกัดย่อย (FH1-FH6) และนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ผลการศึกษาพบว่าสารประกอบที่แยกได้ในส่วนสกัดย่อยที่ 5 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 มากที่สุด (ภาพที่ 4-13) เทียบเป็นร้อยละได้เท่ากับ 77.71 (ค่า P-value = 0.01 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%)



ภาพที่ 4-13 ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 บริสุทธิ์ ด้วยสารสกัดพืชสมุนไพรหน้าดอกขาวส่วนสกัดเฮกเซน 6 ส่วนสกัดย่อย ที่ความเข้มข้น 50  $\mu\text{g/ml}$  เมื่อทำการศึกษาที่อุณหภูมิห้อง 37 องศาเซลเซียสเปรียบเทียบกับสารละลาย DMSO การทดลองทำซ้ำทั้งหมดสองครั้งและวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5 (Wongsri et al., 2014)

#### 4.6 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ของสารสกัดทองพันชั่ง

##### 4.6.1 การสกัดสารจากทองพันชั่งและฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13

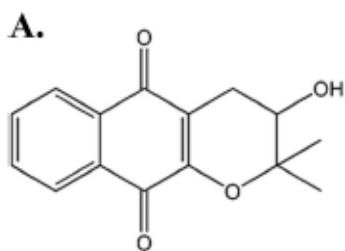
ทำการสกัดพืชสมุนไพรทองพันชั่งด้วยสารละลายเอทานอล ได้ปริมาณสุทธิ 5.2 กรัมจากนั้นแยกสารสกัดแบบลำดับส่วน ได้ส่วนสกัดเฮกเซน (Hexane) เอทิลอะซิเตต (Ethyl acetate) และน้ำ (Water) ปริมาณสุทธิ 1.1 กรัม, 0.7 กรัม และ 3.1 กรัม ตามลำดับ จากนั้นศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 พบว่ายกเว้นส่วนสกัดน้ำ ทุกส่วนสกัดสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ทั้งสองได้ดีด้วยค่า  $IC_{50}$  ที่ใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 4-1)

ตารางที่ 4-1 ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ของสารสำคัญจากทองพันชั่ง (Pouyfung et al., 2014)

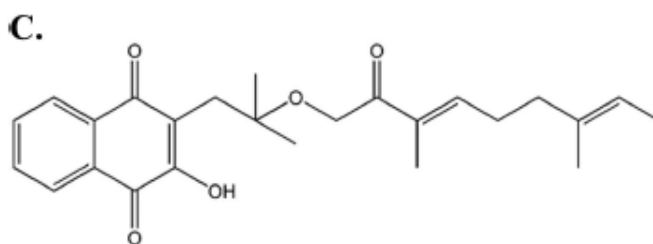
Test samples	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	CYP2A6 <sup>a</sup>		CYP2A13 <sup>a</sup>	
	Co-incubation ( $\mu\text{g/ml}$ )	Pre-incubation ( $\mu\text{g/ml}$ )	Co-incubation ( $\mu\text{g/ml}$ )	Pre-incubation ( $\mu\text{g/ml}$ )
Crude ethanol	$5.02 \pm 0.62$	$1.36 \pm 0.53^b$	$3.93 \pm 0.22$	$1.87 \pm 0.23^b$
Hexane fraction	$3.68 \pm 0.02$	$1.02 \pm 0.17^b$	$4.06 \pm 0.24$	$1.72 \pm 0.14^b$
Ethyl acetate fraction	$4.89 \pm 0.44$	$1.46 \pm 0.03^b$	$2.47 \pm 0.48$	$0.67 \pm 0.11^b$
Aqueous fraction	>500	— <sup>c</sup>	>250	— <sup>c</sup>
8-methoxysoralen ( $\mu\text{M}$ )	$1.53 \pm 0.01$	$0.39 \pm 0.11^b$	$0.79 \pm 0.01$	$0.27 \pm 0.01^b$
Rhinacanthin-A ( $\mu\text{M}$ )	$1.88 \pm 0.13$	$0.63 \pm 0.12^b$	$1.42 \pm 0.05$	$0.41 \pm 0.07^b$
Rhinacanthin-B ( $\mu\text{M}$ )	$2.00 \pm 0.03$	$0.54 \pm 0.02^b$	$1.58 \pm 0.17$	$0.29 \pm 0.08^b$
Rhinacanthin-C ( $\mu\text{M}$ )	$5.60 \pm 0.94$	$1.19 \pm 0.17^b$	$7.10 \pm 0.81$	$4.28 \pm 0.40^b$
Rhinacanthin-H/I ( $\mu\text{M}$ )	$5.33 \pm 0.76$	$1.18 \pm 0.05^b$	$6.50 \pm 1.40$	$2.22 \pm 0.18^b$

#### 4.6.2 การทำบริสุทธิ์สารสำคัญจากทองพันชั่งโดยวิธี Bio-assay guide isolation

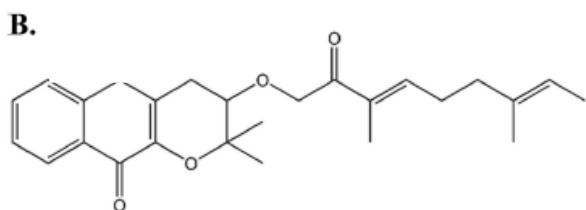
จากนั้นนำทั้งส่วนสกัดเฮกเซนและเอทิล อะซิเตตไปผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีทดสอบฤทธิ์ยับยั้งและนำส่วนสกัดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ไปทำการแยกสารสำคัญด้วย TLC หรือ HPLC และพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารด้วยเทคนิค NMR และ LC-MS พบว่าได้สารบริสุทธิ์จากส่วนสกัดทั้งสอง 3 ชนิดคือ Rhinacanthin-A, Rhinacanthin-B, และ Rhinacanthin-C และสารผสม Rhinacanthin-I/H (ภาพที่ 4-14)



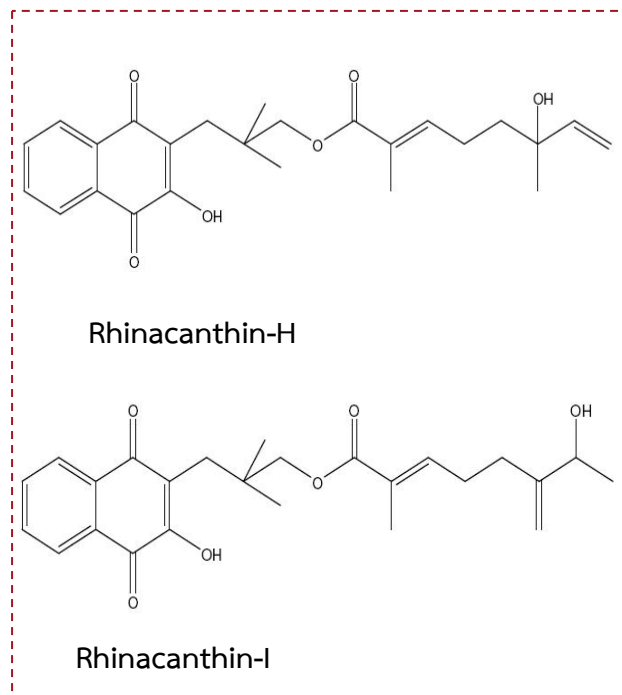
Rhinacanthin-A



Rhinacanthin-C



Rhinacanthin-B



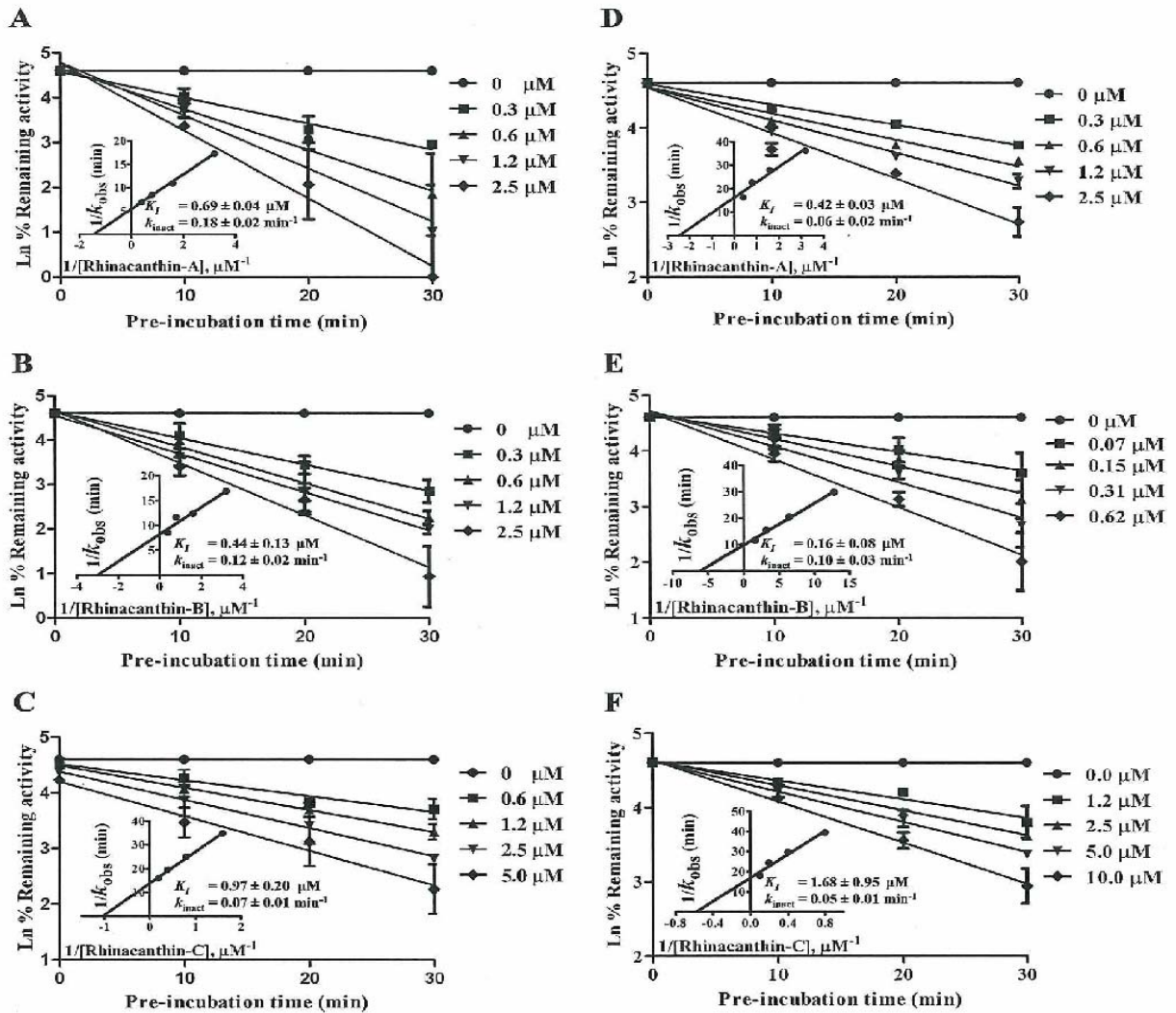
Rhinacanthin-H

Rhinacanthin-I

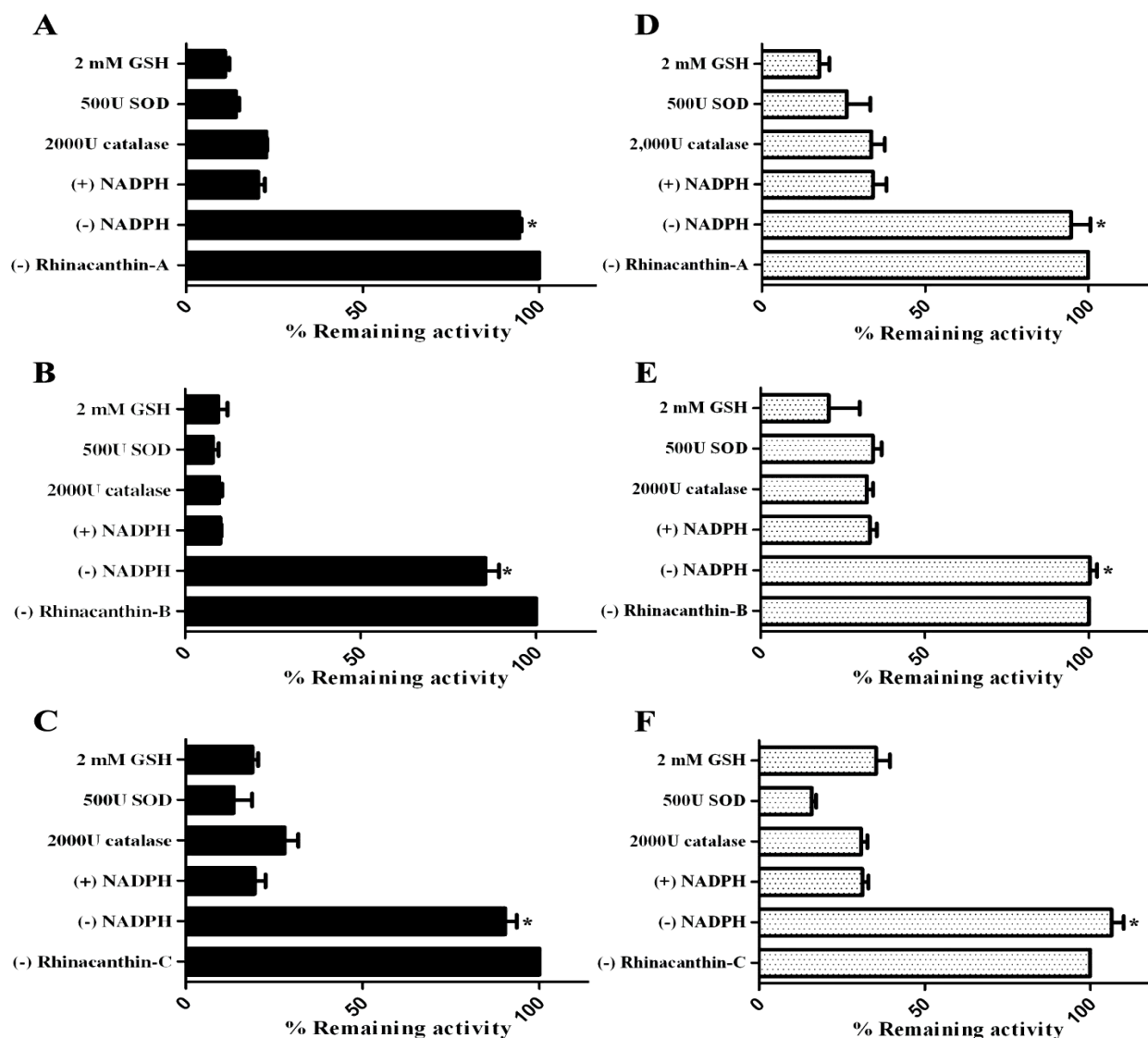
ภาพที่ 4-14 โครงสร้างสาระสำคัญจากทองพันชั่ง  
ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13  
(Pouyfung et al., 2014)

#### 4.6.3 กลไกการยับยั้งการทำงานของสารสำคัญจากทองพันชั่งต่อเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13

เพื่อศึกษากลไกการทำงานของสารสำคัญ ในเบื้องต้นผู้วิจัยได้ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งในสองสถานะคือสถานะปกติที่บ่มสารยับยั้งพร้อมสารตั้งต้นของเอนไซม์ทั้งสองที่ทำการตรวจสอบ (Co-incubation) และสถานะที่บ่มสารยับยั้งก่อนเป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงตามด้วยสารตั้งต้น (Pre-incubation หรือ NADPH-dependence inhibition) พบว่าค่า  $IC_{50}$  ของการยับยั้งของสารทุกตัวมีค่าลดลง หรือมีค่าประสิทธิภาพในการยับยั้งที่เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4-1) แสดงถึงแนวโน้มของการยับยั้งแบบผันกลับไม่ได้แบบ Mechanism-base (MBI) จึงทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยทำการศึกษาที่หลายค่าความเข้มข้นของสารยับยั้ง (Concentration dependence inhibition) และเวลาที่บ่มสารยับยั้ง (Time dependence inhibition) ผลการศึกษาที่ได้พบว่า สาร Rhinacanthin-B ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A13 ได้ดีที่สุดในด้วยค่า  $K_I$  0.16  $\mu\text{M}$  และ CYP2A6 ได้ดีที่สุดในด้วยค่า  $K_I$  0.44  $\mu\text{M}$  ในขณะที่ Rhinacanthin-A ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A13 และ CYP2A6 ด้วยค่า  $K_I$  0.42  $\mu\text{M}$  และ 0.69  $\mu\text{M}$  ตามลำดับ และ Rhinacanthin-C ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A13 และ CYP2A6 ด้วยค่า  $K_I$  1.68  $\mu\text{M}$  และ 0.97  $\mu\text{M}$  ตามลำดับ (ภาพที่ 4-15) และฤทธิ์การยับยั้งนี้ไม่สามารถแก้ไขได้ด้วย GSH หรือ SOD หรือ catalase (ภาพที่ 4-16) หรือเมื่อทำการทดสอบการจับของสารยับยั้งด้วยวิธี Dialysis (ตารางที่ 4-2)



ภาพที่ 4-15 การยับยั้งการทำงานของสาร Rhinacanthin-A, -B, และ -C จากทองพันชั่งต่อเอนไซม์ CYP2A6 (A,B และ C) และเอนไซม์ CYP2A13 (D,E และ F) ตามลำดับ (Pouyfung et al., 2014)



ภาพที่ 4-16 การทดสอบการยับยั้งการทำงานของสาร Rhinacanthin-A, -B, และ -C จากทองพันชั่ง ต่อเอนไซม์ CYP2A6 (A, B และ C) และเอนไซม์ CYP2A13 (D, E และ F) ในสถานะที่มีสาร GSH หรือ SOD หรือ catalase ตามลำดับ (Pouyfung et al., 2014)

ตารางที่ 4-2 การทดสอบการจับของสารยับยั้งด้วยวิธี Dialysis (Pouyfung et al., 2014)

Conditions	Percent remaining activity <sup>a</sup>	
	CYP2A6	CYP2A13
Before dialysis		
(-) Rhinacanthin	100	100
After dialysis		
(-) Rhinacanthins	91.4 ± 4.7	95.6 ± 0.8
(+) Rhinacanthins		
2.5 μM Rhinacanthin-A, - NADPH	85.6 ± 8.0	96.6 ± 8.5
2.5 μM Rhinacanthin-A, + NADPH	10.6 ± 5.3 <sup>b</sup>	10.0 ± 0.8 <sup>b</sup>
2.5 μM Rhinacanthin-B, - NADPH	83.5 ± 5.6	91.0 ± 0.9
2.5 μM Rhinacanthin-B, + NADPH	14.3 ± 2.5 <sup>b</sup>	7.3 ± 4.2 <sup>b</sup>
5.0 μM Rhinacanthin-C, - NADPH	86.2 ± 4.3	91.5 ± 4.5
5.0 μM Rhinacanthin-C, + NADPH	21.1 ± 1.6 <sup>b</sup>	29.3 ± 5.4 <sup>b</sup>
(+) 8-MOP		
2.5 μM 8-MOP, - NADPH	90.7 ± 0.1	89.0 ± 5.8
2.5 μM 8-MOP, + NADPH	12.0 ± 1.7 <sup>b</sup>	22.0 ± 1.5 <sup>b</sup>



## บทที่ 5

### อภิปราย สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

Cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม cytochrome P450 ที่พบมากในตับ และมีบทบาทที่สำคัญในการย่อยสลายยาและสารแปลกปลอมภายนอก เช่น สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายยา รักษาโรค เช่น ยารักษาอาการชัก (Valproic acid หรือ Losigamone) ยารักษาโรคเอดส์ (Efavirenz) ยารักษาโรคมะเร็ง (Cyclophosphamine) แต่บทบาทที่สำคัญของเอนไซม์ CYP2A6 คือการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารนิโคตินในบุหรี่ 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 จะสูบบุหรี่น้อยและเลิกสูบบุหรี่ได้ง่ายกว่าผู้สูบบุหรี่ที่มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ปกติ ด้วยเหตุนี้การลดการย่อยสลายนิโคตินของเอนไซม์ CYP2A6 เพื่อคงระดับของนิโคตินในเลือด จึงเป็นอีกหนึ่งในแนวทางที่สามารถนำมาใช้เพื่อช่วยในการรักษาการเสพติดบุหรี่ยุคใหม่ที่ร่วมกับการได้รับยา นิโคตินทดแทนต่างๆ เพื่อให้เกิดการลด ละ เลิกการสูบบุหรี่อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด

Cytochrome P450 2A13 (CYP2A13) เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม cytochrome P450 ที่พบมากในปอด และเนื้อเยื่อทางเดินหายใจ ยังไม่ทราบบทบาทที่แน่ชัดในการย่อยสลายยาและสารแปลกปลอมภายนอก รวมถึงสารในร่างกายต่างๆ ว่าจะสามารถทำหน้าที่ได้เช่นเดียวกับเอนไซม์ CYP2A6 ที่พบมากในตับและมีความคล้ายคลึงกันในลำดับกรดอะมิโนมากกว่าร้อยละ 90 แต่บทบาทที่สำคัญของเอนไซม์ CYP2A13 พบว่าเกี่ยวข้องพันในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารนิโคตินในบุหรี่ ที่ออกฤทธิ์ให้เกิดการเสพติดการสูบบุหรี่ เช่นเดียวกับเอนไซม์ CYP2A6 แต่ไม่พบว่าเป็นกลไกหลักในการกำจัดนิโคติน และไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของเอนไซม์ CYP2A13 กับพฤติกรรมการสูบบุหรี่เช่นเดียวกับเอนไซม์ CYP2A6 (Di *et al.*, 2009; Hukkanen *et al.*, 2002; Ortiz de Montellano, 2005; Patten *et al.*, 1996) อย่างไรก็ตามพบว่าเอนไซม์ CYP2A13 เกี่ยวพันกับการย่อยสลายสารก่อมะเร็ง 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL) และ 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) ซึ่งเป็นสารพิษที่พบได้ในบุหรี่และเป็นสารเกี่ยวข้องกับกับการเกิดโรคมะเร็ง เช่น โรคมะเร็งกล่องเสียง โรคมะเร็งปอด เป็นต้น (Patten *et al.*, 1996) เพราะสารก่อมะเร็ง NNK จะถูกย่อยสลายและกระตุ้นโดยเอนไซม์ CYP2A13 ได้เป็นสารที่ก่อมะเร็งมากขึ้น และไปมีผลต่อสารพันธุกรรมของเนื้อเยื่อระบบทางเดินหายใจจนก่อให้เกิดโรคมะเร็งปอดในที่สุด จึงได้มีการศึกษาหาสารที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 เพื่อลดอัตราเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งปอดได้อย่างปลอดภัย โดยพบว่าสาร 8-MOP ที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้สามารถยับยั้งเอนไซม์ CYP2A13 ได้ อย่างไรก็ตามสารนี้ก่อให้เกิดผลข้างเคียงกับผู้ใช้ในขณะที่ต้องการลดการสูบบุหรี่ (Di *et al.*, 2009; Xi *et al.*, 2009) เนื่องด้วยจากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า สารสำคัญพืชในวงศ์ Asteraceae ได้แก่ กลุ่ม ดอกคำฝอยและหญ้าดอกขาว และในวงศ์ Acanthaceae ได้แก่ ทองพันชั่ง สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดี (ทรงกลด สารภูษิตและพรพิมล รังคนพรัตน์, 2554) ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษา

เพิ่มเติม เกี่ยวกับสารสำคัญและกลไกในการยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 และเอนไซม์ CYP2A13 เพื่อเป็นอีกแนวทางในการรักษาหรือบำบัดในผู้ติดยา และช่วยลดอัตราเสี่ยงในการเกิดโรคที่เกิดจากการสูบบุหรี่ได้ โดยมุ่งเน้นศึกษาหาสารสำคัญในพืชที่ออกฤทธิ์ยับยั้งแบบ mechanism based inhibition (การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แบบผันกลับไม่ได้ โดยสารยับยั้งถูกเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ จากนั้นผลิตภัณฑ์จับแน่นกับเอนไซม์ จนเกิดสารประกอบเชิงซ้อนเอนไซม์ที่เสถียร (dead-end complex)) ซึ่งมีเกณฑ์เบื้องต้นสำหรับบ่งชี้สามประการคือ 1) NADPH-dependent เป็นการศึกษาค้นพบของการยับยั้ง เมื่อเติม NADPH เพื่อทำปฏิกิริยาก่อนเติมสารตั้งต้น ถ้าตัวยับยั้งเป็นแบบ Mechanism-base inhibitor จะส่งผลให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์เพิ่มมากขึ้นเพราะสารยับยั้งถูกเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ cytochrome P450 แล้วเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่บริเวณเร่ง ส่งผลให้เอนไซม์เสถียร (เกิด dead-end complex) 2) Concentration-dependent เป็นการศึกษาค้นพบของการยับยั้ง 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)

ผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าพืชทุกชนิดที่นำมาศึกษาสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดี โดยสารสกัดส่วนเอทานอลของพืชในวงศ์ Asteraceae ทั้งสามชนิดคือ ชลูดอกคำฝอยและหญ้าดอกขาว ออกฤทธิ์ยับยั้งได้ดีใกล้เคียงกัน โดยส่วนสกัดย่อยเฮกเซนของดอกคำฝอยที่ 4 และ 5 ซึ่งอยู่ในช่วงอัตราส่วนเฮกเซนต่อเอทิลอะซิเตต (Hexane : Ethyl acetate) 70:30 มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ได้ 100% และ 96.01% ตามลำดับซึ่งยับยั้งได้เทียบเท่ากับ 8-MOP ที่เป็นสารยับยั้งมาตรฐานเช่นเดียวกับ Fraction ที่ 7 และ 3 ซึ่งอยู่ในช่วงอัตราส่วน Hexane : Ethyl acetate ที่ 30:70 และ 90:10 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้ รองลงมาคือ 90.09% และ 65.06% ตามลำดับ ในขณะที่ส่วนสกัดเอทิล อะซิเตตของพืชสมุนไพรรชูดอกคำฝอยและหญ้าดอกขาวสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งได้ดีเช่นเดียวกัน แม้ว่าจะยังคงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงชนิดและโครงสร้างของสารสำคัญในพืชสมุนไพรรชูดอกคำฝอยทั้งสามชนิด แต่เนื่องด้วยสมุนไพรรชูดอกคำฝอยทั้งสามชนิดอยู่ในวงศ์ Asteraceae ที่มีรายงานของการพบสารยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดี และในปัจจุบันในประเทศไทยนิยมใช้สมุนไพรรชูดอกคำฝอยอย่างแพร่หลาย โดยชาชลูดอกคำฝอยมีรายงานถึงการนำมาใช้เป็นชาชงเพื่อสุขภาพ ในขณะที่ชาหญ้าดอกขาวมีการนำมาใช้ลดการสูบบุหรี่อย่างหลาย แสดงให้เห็นว่าพืชทั้งสามชนิดมีแนวโน้มที่จะเป็นพืชสมุนไพรรชูดอกคำฝอยเพื่อลดการสูบบุหรี่ที่ปลอดภัยได้

ในขณะที่สารสำคัญจากสมุนไพรรชูดอกคำฝอยทั้งสามชนิดจากวงศ์ Acanthaceae ได้แก่ Rhinacanthin-A, -B, และ -C ที่มีรายงานการออกฤทธิ์ช่วยฆ่าเชื้อไวรัส ลดการอักเสบและนำมาใช้ประโยชน์ต่าง ๆ มากมายสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งทั้งเอนไซม์ CYP2A6 และเอนไซม์ CYP2A13 ได้ดี เช่นเดียวกับสารสำคัญอื่น ๆ เช่น 8-MOP หรือ Seligeline ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งทั้งสองเอนไซม์ได้ (Hukkanen, 2005; Xi *et al.*, 2009) แต่ไม่สามารถทดสอบฤทธิ์ของสาร Rhinacanthin -I และ -H ได้เพราะไม่สามารถแยกสารทั้งสองที่เป็นไอโซเมอร์กันออกจากกันได้ และจากผลการศึกษาพบว่ากลไกการยับยั้งของสารสำคัญทั้งสามเป็นแบบผันกลับไม่ได้แบบ mechanism base inhibition เช่นที่เคยรายงาน (Fowler *et al.*, 2008; Grime *et al.*, 2009; Xi *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2005) ซึ่งเป็นการยับยั้งที่มีประสิทธิภาพมากกว่าการยับยั้งแบบผันกลับได้ โดยสาร Rhinacanthin-B ออกฤทธิ์ยับยั้งดีที่สุด และอาจเป็นข้อมูลที่สำคัญในการนำไปใช้ต่อไป

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

ควรศึกษาเพิ่มเติมเพื่อค้นหาสารสำคัญในพืชสมุนไพรรชูดอกคำฝอยและหญ้าดอกขาวต่อไป



## บทที่ 6

### เอกสารอ้างอิง

Ahijevych KL, Tyndale RF, Dhatt 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.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Insee, A., Rongnoparut, P., Duangkaew, P., & Sarapusit, S. (2014). Inhibition of the tobacco-specific nitrosamine metabolizing cytochrome P450 2A13 by some plants from Eastern Thailand. *Proceedings of the 5<sup>th</sup> International Conference on Natural Products for*

*Health and Beauty (NATPRO5)* (pp. 338-342). Phuket: Natural Product Research Center of Excellence, Prince of Songkla University.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Peamkrasatam S, Sriwatanakul K, Kiyotani K, Fujieda M, Yamazaki H, Kamataki T, Yoovathaworn K (2006) In vivo evaluation of coumarin and nicotine as probe drugs to predict the metabolic capacity of CYP2A6 due to genetic polymorphism in Thais. *Drug Met Pharmacokinet* 21:475–484.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Smith TJ, Guo ZY, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Stoner GD and Yang CS (1992). Metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in human lung and 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.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ทรงกลด สารภูษิตและพรพิมล รงค์นพรัตน์ (2554) การศึกษาการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ที่ย่อยสลายนิโคตินในคนของน้ำสมุนไพรและน้ำผลไม้ไทย รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ ศูนย์วิจัยและจัดการความรู้เพื่อการควบคุมยาสูบ

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